

采用SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready串联质谱系统对注射用丹参多酚酸中活性成分的鉴定策略

An integrated strategy for chemical characterization of Salvianolate lyophilized Injection by SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready System

满卓¹, 司丹丹¹, 龙志敏¹, 郭立海¹, 郭亚清², 韩立峰²

Zhuo Man¹, Dandan Si¹, Zhimin Long¹, Lihai Guo¹, Yaqing Guo², Lifeng Han²

¹ SCIEX 应用支持中心, 中国

² 天津中医药大学

Keywords: 7500; QTRAP; Salvianolate Lyophilized Injection (SLI); pMRM-IDA-EPI

前言

注射用丹参多酚酸 (SLI) 是一种从丹参水提取物中提取的冻干粉针剂, 由丹参水溶性提取物制成。它具有活血通络、抗炎、抗氧化、神经营养和神经保护等功能。在临床上, 它经常用于治疗中风恢复期经络中的血瘀和侧支阻塞综合征 (轻度至中度脑梗死)。由于SLI是一种成分复杂的中药注射剂, 其临床应用的安全性一直是以往研究中不可避免的话题。迄今为止, 如何全面表征SLI的活性成份, 特别是具有潜在生物活性的微量成分, 仍然具有很大的挑战。

本实验使用超高效液相色谱-三重四极杆-线性离子阱质谱 (UHPLC-QTRAP-MS/MS) 相结合, 提出了一种新颖、灵敏且简单的策略, 用于系统和快速分析SLI的化学成分。该策略具有以下特点:

1. 通过QTRAP® System独特的多种采集模式复合联用的方式, 一针进样, 同时得到一级和二级碎片信息。采用四种扫描模式 (EMS-IDA-EPI, Pre-IDA-EPI, NL-IDA-EPI, pMRM-IDA-EPI) 具有互补性的新策略。
2. 结合LightSight软件自动预测相似结构未知物的功能, 从而快速、灵敏地分析SLI中的活性成分。
3. 从SLI中鉴定出总共171种化合物。其中, 27个痕量成分以前没有报道过。这种策略可以显著提高对于SLI中大量痕量活性成份

的鉴定及异构体的区分, 从而全面的鉴定到SLI中不同含量水平的活性成份。

4. 另外, 对定性结果选出的13个代表性成份在15批次SLI中的进行准确定量。其中, 丹酚酸A (Sal A)、Sal B、Sal D、紫精酸 (LA) 和迷迭香酸 (RA) 被证明是主要成分。这15批样品均一性良好, 均未出现异常批次。
5. 这种新策略可以显著提高对于未发现的化学成分的鉴定, 并为鉴定其它中药的有效成分提供了很好的思路。

仪器设备

SCIEX ExionLC™ AD超高效液相色谱系统联用SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready四极杆-线性离子阱复合质谱系统



图1. ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 7500-QTRAP® Ready系统

样品信息:

样品: 制备样品SLI时, 用1 mL超纯水稀释。在6000转的转速下旋转并离心10分钟, 过滤, 上机分析。

定性分析批号为20180903

定量分析的15个批号分别为20200101、20200102、20200104、20200105、20200201、20200202、20200203、20200204、20200206、20200207、20200401、20200402、20200404、20200405和20200406。

标准品信息:

标准品: 丹参素、咖啡酸、阿魏酸、异芥酸、丹酚酸C、原儿茶酸、紫草酸、香草醛酸、丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸D、原儿茶酸醛、迷迭香酸。

13种参考标准溶液的储备标准溶液在浓度为2.0 mg/mL的甲醇溶液。然后, 按比例混合储备溶液, 并用10%ACN稀释, 以制备最终混合标准溶液。通过将标准溶液与10%ACN的混合物连续稀释, 制备了一系列工作标准溶液。

色谱方法:

色谱柱: ACQUITY HSS T3 column (2.1 × 100 mm, 1.8 μm)

流动相: A: 水+0.03%甲酸

B: 乙腈; 甲醇 (1:1) +0.03%甲酸

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40°C;

定性梯度洗脱30min;

定量梯度洗脱10min;

质谱方法:

离子源: ESI电喷雾电离源

扫描方式: NEG负模式

气帘气CUR: 45psi

喷雾电压IS: -4500v

源温度 Temp: 350°C

雾化气Gas1: 35psi

辅助气GAS2: 70psi

碰撞气CAD: 9psi

定性分析采集方式设置: 多种扫描方式结合采集

定量分析采集方式设置: MRM多反应监测模式

用于定量的标准品离子对信息请见表1。

表1. 13种SLI的活性成分的质谱离子对参数

Compounds	Q1	Q3	CE
Danshensu 1	197	135	-40
Danshensu 2	197	123	-40
Lithospermic acid 1	537.1	185	-10
Lithospermic acid 2	537.1	295.1	-60
Caffeic acid 1	179	134	-40
Caffeic acid 2	179	135	-40
Vanillic acid 1	167	108	-40
Vanillic acid 2	167	152	-20
Ferulic acid 1	193.1	133	-40
Ferulic acid 2	193.1	134	-40
Isoferulic acid 1	193.1	133	-40
Isoferulic acid 2	193.1	134	-40
Salvianolic acid A 1	493.1	185	-60
Salvianolic acid A 2	493.1	109	-10
Salvianolic acid B 1	717.1	321	-10
Salvianolic acid B 2	717.1	339.1	-10
Salvianolic acid C 1	491	293	-40
Salvianolic acid C 2	491	311	-40
Salvianolic acid D 1	417.1	175	-60
Salvianolic acid D 2	417.1	135	-10
Protocatechuic aldehyde 1	137	108	-40
Protocatechuic aldehyde 2	137	92	-40
Protocatechuic acid 1	153	109	-40
Protocatechuic acid 2	153	91	-40
Rosmarinic acid 1	359.1	161	-70
Rosmarinic acid 2	359.1	133	-70

实验流程:

实验设计流程如图2所示:

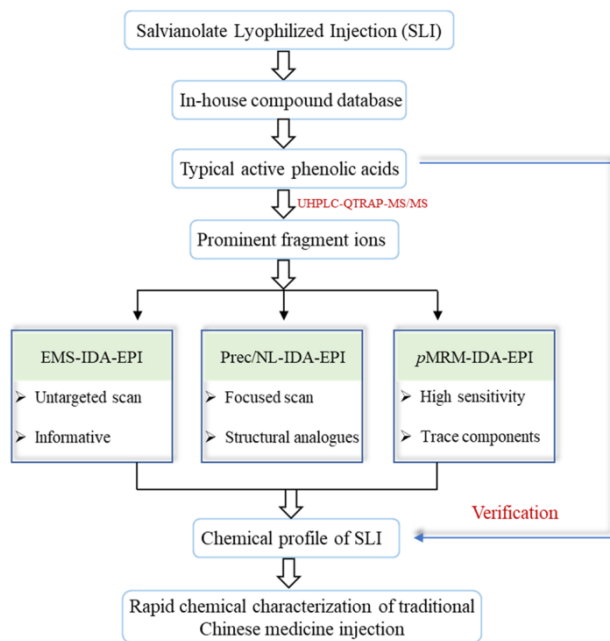


图2. 实验设计流程

1. 建立丹参水溶性提取物成分的自建库。
2. 使用非靶向增强扫描模式 (EMS) -信息依赖型采集 (IDA) -增强子离子扫描模式 (EPI) 获得 SLI 中代表性组分的碎裂行为, 适合于含量较高的成份。
3. 利用获得的特定碎片进行前体母离子扫描 (Prec) 和中性丢失扫描 (NL) -IDA-EPI 扫描, 从SLI获得更多的同系列相似结构的活性成份。特征子离子设置: 192, 109等, 中性丢失分子设置: 198, 162等。
4. 基于典型的碎片离子和合理的预测, 以及对酚酸可能发生的化学反应的合理预测, 并结合LightSight软件自动预测和建立多种扫描模式, 开发了一种具有454个预测MRM离子对的高灵敏多反应监测 (pMRM) -IDA-EPI 扫描方法, 以提高SLI中低浓度未知活性成份的鉴定。

实验结果

1. 定性结果

1.1 EMS、Prec、NL和pMRM-IDA-EPI扫描模式的特征离子筛选

SLI来源于丹参的水提取物, 主要由各种酚酸组成, 主要包括丹参素和咖啡酸, 另外原儿茶酸和原儿茶醛也被认为是重要的单体化合物。其次, 酚酸容易发生氧化、还原、糖基化和其他反

应。基于这些衍生化代谢反应, 可以推测它们在裂解途径中可能存在的碎片离子。图3显示了丹参素等主要活性成分的碎片信息。这些化合物的二级质谱图显示了特征碎片 m/z 197、179、135、109 等。此外, 还考虑了一些已知标准品 (如紫草次酸、迷迭香酸和丹酚酸B) 的典型特征碎片离子, 如 m/z 519、353、321、295、185和159。另外, 化合物可通过198 Da (丹参素, $-C_9H_{10}O_5$)、180 Da (咖啡酸, $-C_9H_8O_4$)、162 Da (葡萄糖, $-C_6H_{10}O_5$) 的中性丢失(NL)生成产物离子, 或同时失去两个或更多中性分子。

因此, 将子离子 m/z 197、179、161和109用于Prec-IDA-EPI前体母离子增强扫描设置; NL198、180和162被选择用于SLI的NL-IDA-EPI中性丢失扫描。另外, 非靶向EMS-IDA-EPI扫描, 以获得SLI中所有可检测的化合物。

pMRM的预测离子对信息通过LightSight软件实现, 根据典型的酚酸母核结构, 可以快速高效的预测相关裂解途径的衍生化合物, 共得到SLI潜在组分的454个pMRM离子对, 并直接导出为采集方法, 方便、快捷、高效。

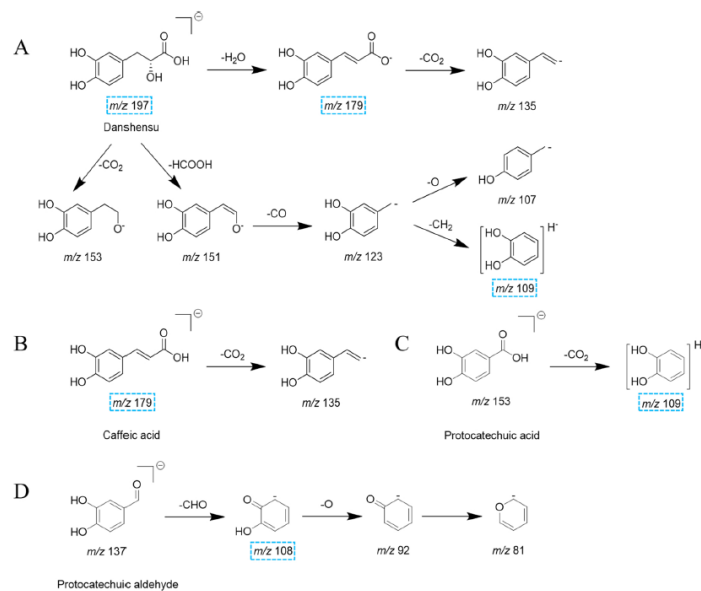


图3. 负离子作用下 SLI 中四个主要活性组分的二级质谱图。(A) 丹参素、(B) 咖啡酸、(C) 原儿茶酸和(D) 原儿茶醛。

1.2 SLI的四种扫描模式汇总结果

如图4所示, 将pMRM、EMS、Prec和NL四种采集方式进行了韦恩图汇总, 表明四种采集方式均有各自的优势。在这四种扫描模式的帮助下, 共鉴定到171种成分, 其中12种与标准品对照确

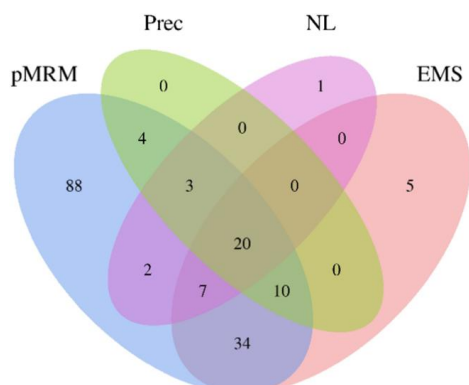


图4. 四种扫描方式的鉴定结果汇总的韦恩图

认，保证鉴定准确度。此外，27种痕量成分以前从未报告过。其中一些是黄酮类化合物，如黄芩苷和尤帕林（化合物114和170）。大多数仍然属于酚酸。此外，在pMRM、EMS、Prec和NL

中分别检测到168、76、37和33种化合物。这些化合物可分为以下类型：单体、二聚体、三聚体、四聚体酚酸及其异构体和衍生物（即糖基化、烷基化、水解、脱氧、脱羧、脱氢、氧化等）。

根据各自扫描模式的优势互补，首先使用基于QTRAP系统的EMS-IDA-EPI扫描来获取非靶向化学信息。然后利用代表性组分的典型碎片离子进行半靶向的Prec和NL-IDA-EPI扫描，得到更多结构相关且含量相对较高的化合物。随后，总结了碎片离子的特征和典型性，以及可能的衍生代谢途径。基于以上信息，可以开发出灵敏度和选择性更高的pMRM扫描方法，以获得全面的化合物，尤其是痕量化合物。因此，EMS、Prec和NL-IDA-EPI可以被视为与靶向的pMRM-IDA-EPI的补充策略，以获取更多对结构解析有用的片段信息。

EMS作为一种非靶向扫描模式，可以全面挖掘分析物的MS碎片信息。Prec和NL，也称为半靶向策略，可以选择性地检测与母核结构相似的化合物。如图5所示，化合物48和50（图5A和5B）通过EMS检测到，而47和38（图5C和5D）通过Prec（ m/z 109）和NL

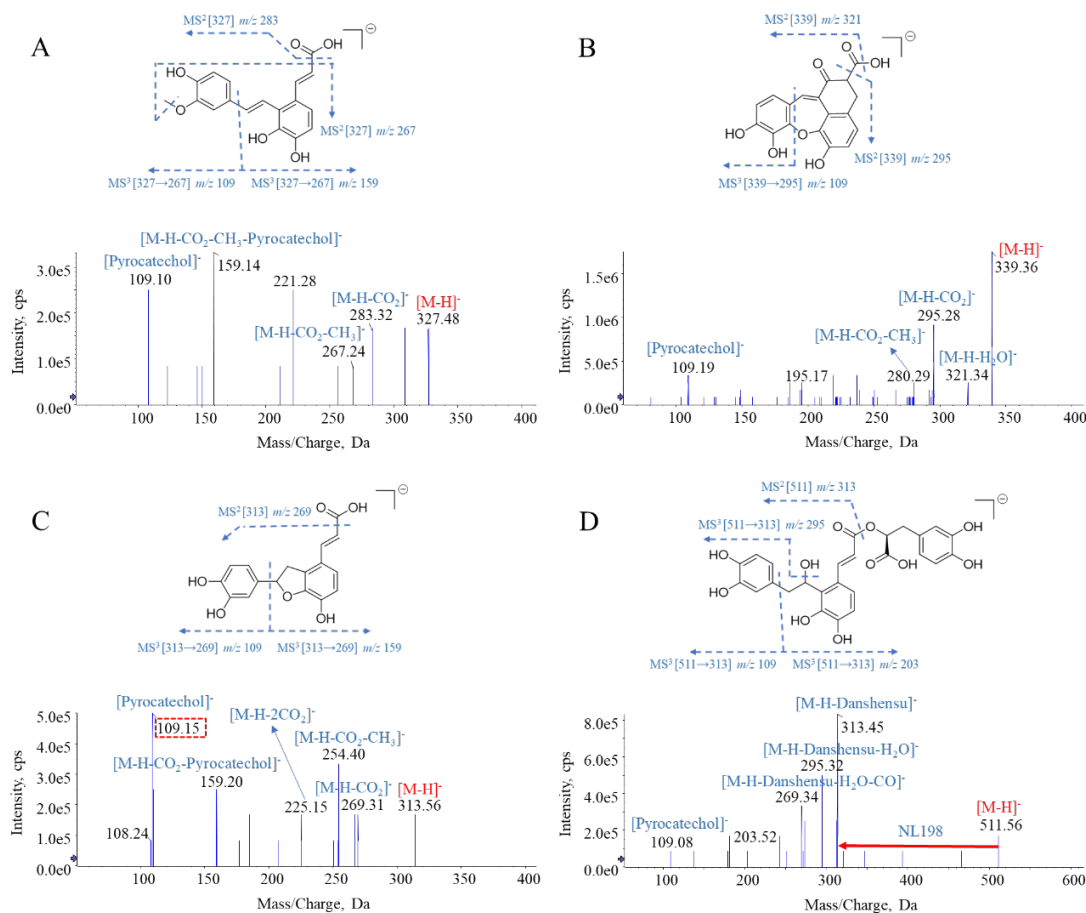


图5. EMS、Prec 和NL 扫描模式检测到的4种SLI化合物的MS/MS谱图和推荐的碎裂行为。(A)化合物48、3'-或4'-丹酚酸甲酯F，通过EMS；(B)化合物50，丹酚酸G，通过EMS；(C)化合物47，(E)-3-(2-(3,4-二羟基苯基)-7-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-4-基)丙烯酸，通过Prec (m/z 109)；(D)化合物38，7'-氢-8'-羟基-丹酚酸A，NL(198 Da)。

(198Da) 分别检测到。化合物48(RT,7.30min)在m/z327处产生[M-H]⁻并进一步脱羧产生m/z283处的碎片离子。其产物离子m/z267表明甲基化发生在C-3'或C-4'。随后, m/z267离子在m/z159和109处产生碎片离子, 这与丹酚酸F的碎裂一致。因此, 化合物48被鉴定为3'或4'-甲基丹酚酸F。

SLI中的酚酸具有结构相似但含量差异较大的特点。一些痕量成分, 例如一系列酚酸衍生物, 可能具有潜在的生物活性, 但难以检测。pMRM-IDA-EPI扫描模式作为一种靶向策略, 灵敏度高, 干扰少, 一次进样即可同时检测不同含量水平的组分, 并且得到丰富的增强二级扫描质谱图。如图6所示, 以图6A的化合物75为例, 它们仅通过pMRM 扫描模式可以检测到。由于75和79(图

6B) 之间的保留时间更近且结构相似, EMS 的非选择性以及 Prec 和 NL 扫描模式提供的信息较少, 使得这三种方法难以检测到它们。然而, 根据酚酸可能的反应, 预测的 MRM 离子对 m/z 745.1 > 321.0 和 745.1 > 519.0, 以及 m/z 715.1 > 321.0 和 715.1 > 295.1, 可以通过pMRM 扫描模式轻松检测和区分化合物75 和79。此外, 该方法的高灵敏度还体现在异构体的鉴定上, 以化合物79 为例, 本研究共鉴定出6种异构体, 即化合物37、99、109、112和143。pMRM均能检测到, EMS只能检测到37, 而Prec和NL均未检测到。在本研究中, 我们还举了一些其他例子来说明 pMRM 的优势。它们的详细碎片概况如图6所示。

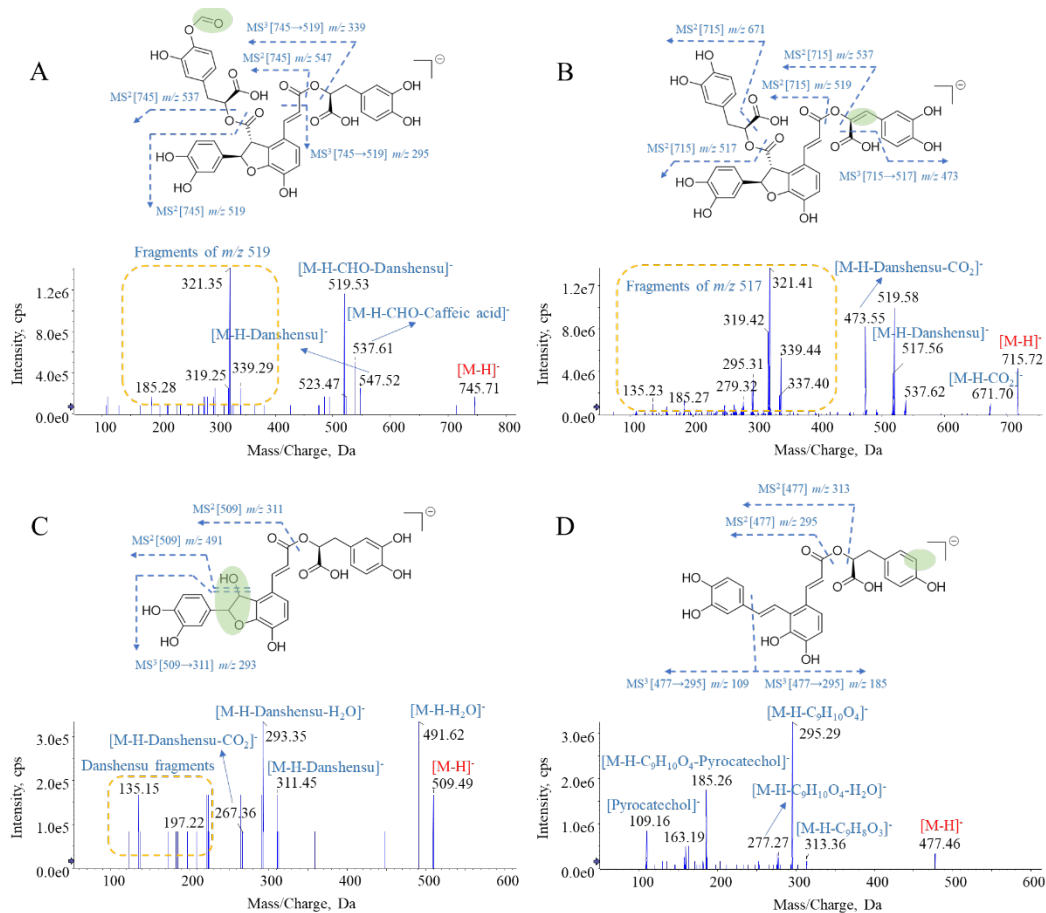


图6. pMRM 扫描模式下SLI中4种组分的MS/MS谱图注释。(A) 化合物75、3'''或4''''-甲酰基丹酚酸B, Sal B的甲酰化产物; (B) 化合物79, 7''', 8''-二去氢-水杨酸B, Sal B的脱氢产物; (C) 化合物91, (E)-3-(3,4-二羟基苯基)-2-((3-(2-(3,4-二羟基苯基)-3,7-二羟基-2,3-二氢苯并呋喃-4-基)丙烯酰基)氧基)丙酸, Sal A的氧化产物; (D) 化合物120, 2-(((E)-3-(2-((E)-3,4-二羟基苯乙烯基)-3,4-二羟基苯基)丙烯酰基)氧基)-3-(4-羟基苯基)丙酸, Sal A的脱氢产物。绿色阴影代表生化反应位点, 丹酚酸缩写为Sal。

2. 定量结果

2.1 13种标准品XIC提取离子流色谱图请见图7。

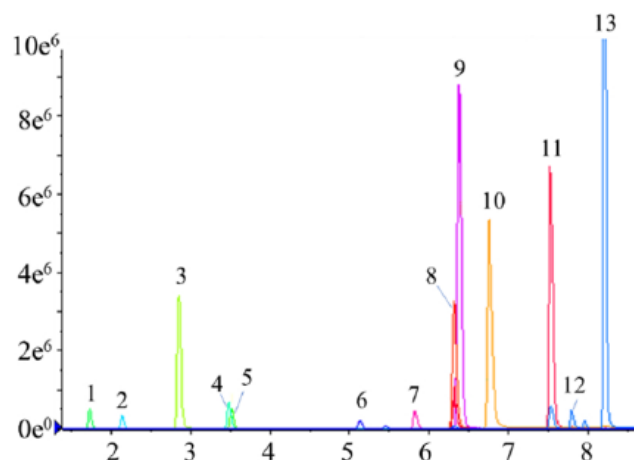


图7. 13种活性成分标准品溶液的XIC提取离子流色谱图

2.2 线性、精密度和准确度

13个定量分析成分的回归方程、相关系数和线性范围如表2所示。结果表明，所有13种分析物均显示出良好的线性关系，线性相关系数 r 值大于0.997。

表2. 标准曲线汇总

Compounds	Regression equations	Linearity ranges (ng·mL ⁻¹)	Correlation coefficients (r)
Danshensu	$y = 3.68 \times 10^3 x + 4.10 \times 10^3$	1.00-1000	0.9978
Lithospermic acid	$y = 2.42 \times 10^4 x + 2.11 \times 10^4$	2.50-1000	0.9997
Caffeic acid	$y = 4.49 \times 10^4 x + 1.88 \times 10^3$	0.10-100	0.9997
Vanillic acid	$y = 3.29 \times 10^3 x + 1.08 \times 10^3$	1.00-1000	0.9998
Ferulic acid	$y = 1.45 \times 10^4 x + 1.56 \times 10^3$	0.50-100	0.9997
Isoferulic acid	$y = 5.24 \times 10^3 x + 4.22 \times 10^2$	1.00-100	0.9995
Salvianolic acid A	$y = 6.93 \times 10^3 x + 3.20 \times 10^3$	2.50-1000	0.9975
Salvianolic acid B	$y = 2.49 \times 10^4 x + 1.46 \times 10^5$	2.50-500	0.9997
Salvianolic acid C	$y = 1.14 \times 10^4 x + 4.10 \times 10^3$	1.25-500	0.9992
Salvianolic acid D	$y = 8.32 \times 10^3 x + 1.26 \times 10^3$	0.50-100	0.9997
Protocatechuic aldehyde	$y = 5.75 \times 10^4 x + 2.85 \times 10^4$	1.25-100	0.9983
Protocatechuic acid	$y = 1.96 \times 10^4 x + 2.24 \times 10^3$	0.25-100	0.9995
Rosmarinic acid	$y = 6.62 \times 10^4 x + 1.31 \times 10^4$	1.00-1000	0.9987

通过向样品中添加80%、100%和120%已知浓度的标准品溶液，对应三个不同的浓度水平（低、中、高），进行加标回收实验，从而考察本方法的回收率和精密度。对每种浓度水平进行一式三份分析，并使用以下公式计算结果：回收率（%）=（检测量-原始量）/加标量 × 100。如表3所示，目标化合物的回收率在77.05%到99.30%之间，RSD值在0.45%到5.80%之间。

2.4 不同批次丹参注射液的含量结果

通过SLI的三个平行实验确定定量结果，如表4所示。从图8可以看出，13种成分的含量差别很大。丹酚酸A（Sal A）、Sal B、Sal D、紫草次酸（LA）和迷迭香酸（RA）是主要成分。其中，Sal B的含量最高（195.08-350.46 μg/mg），然后是LA、Sal A和RA，具有几乎相同的特征。如前所述，基于化学成分鉴定、来源分析、靶细胞提取物和药代动力学研究，Sal B、RA、LA和Sal D被筛选并确定为SLI的有效标记物。此外，香草醛、阿魏酸、Sal C、原儿茶醛和原儿茶酸的含量较低，这些都是SLI的重要活性成分。

总结

本实验在UHPLC-QTRAP LC-MS/MS系统上，采用一种新颖、灵敏且简单的方法策略，根据EMS、Prec、NL和pMRM-IDA-EPI各自扫描方式的优势，系统和快速地表征了SLI中的化学成分。共鉴定到171种成份，27种微量成分首次在SLI中发现。根据定性结果选

表4. 不同批次丹参注射液的含量结果汇总

Components	Batches														
	20200101	20200102	20200104	20200105	20200201	20200202	20200203	20200204	20200206	20200207	20200401	20200402	20200404	20200405	20200406
Danshensu	0.7563	0.7986	0.8263	0.7884	0.8513	0.8066	0.9092	0.8474	0.7108	0.7639	0.6946	0.8346	0.7444	0.8007	0.8215
Lithospermic acid	22.686	25.362	24.232	23.602	22.325	26.285	23.877	25.451	23.263	24.214	22.018	21.632	23.723	22.262	22.183
Caffeic acid	0.3754	0.4462	0.4938	0.4754	0.4692	0.5754	0.4523	0.5385	0.3846	0.4431	0.4431	0.4338	0.3831	0.1985	0.3554
Vanillic acid	0.0054	0.0054	0.0054	0.0053	0.0054	0.0054	0.0053	0.0053	0.0054	0.0054	0.0053	0.0054	0.0053	0.0054	0.0054
Ferulic acid	0.0132	0.0140	0.0143	0.0146	0.0171	0.0163	0.0154	0.0164	0.0136	0.0150	0.0104	0.0117	0.0098	0.0038	0.0104
Isoferulic acid	0.0530	0.0474	0.0463	0.0485	0.0560	0.0544	0.0498	0.0593	0.0478	0.0539	0.0361	0.0406	0.0357	0.0302	0.0270
Salvianolic acid A	22.622	25.231	24.500	23.497	19.468	24.646	22.885	27.725	22.466	24.138	21.197	22.766	22.706	22.352	22.226
Salvianolic acid B	303.30	299.85	310.46	253.38	294.77	350.46	259.08	344.62	284.31	280.92	195.08	166.15	266.62	220.92	230.46
Salvianolic acid C	0.0698	0.0606	0.0564	0.0471	0.0502	0.0445	0.0386	0.0390	0.0364	0.0475	0.0187	0.0442	0.0455	0.0174	0.0154
Salvianolic acid D	2.0523	1.4692	1.4785	1.1092	0.9815	1.5308	1.2600	1.4815	1.0785	1.4138	1.9646	1.2277	1.3169	0.9477	1.0015
Protocatechuic aldehyde	0.0432	0.0721	0.0439	0.0530	0.0638	0.0651	0.0421	0.0741	0.0695	0.0474	0.0380	0.0706	0.0552	0.0318	0.0627
Protocatechuic acid	0.0054	0.0071	0.0065	0.0068	0.0079	0.0072	0.0065	0.0074	0.0058	0.0063	0.0060	0.0061	0.0066	0.0058	0.0070
Rosmarinic acid	25.195	27.458	25.711	27.765	27.274	26.429	24.708	27.054	25.075	26.734	21.803	27.842	26.163	27.282	23.912

表3. 精密度和准确度

Compounds	Precision RSD (%)	Recovery	
		Mean (%)	RSD (%)
Danshensu	2.88	93.90	3.95
Lithospermic acid	3.78	82.20	0.45
Caffeic acid	3.93	98.80	0.80
Vanillic acid	1.74	98.75	5.80
Ferulic acid	5.69	92.60	2.45
Isoferulic acid	5.84	88.10	1.85
Salvianolic acid A	2.85	77.05	1.70
Salvianolic acid B	4.30	85.00	1.35
Salvianolic acid C	3.73	89.05	1.60
Salvianolic acid D	2.72	78.00	2.30
Protocatechuic aldehyde	2.30	98.95	1.20
Protocatechuic acid	4.02	99.30	5.45
Rosmarinic acid	4.04	82.75	1.45

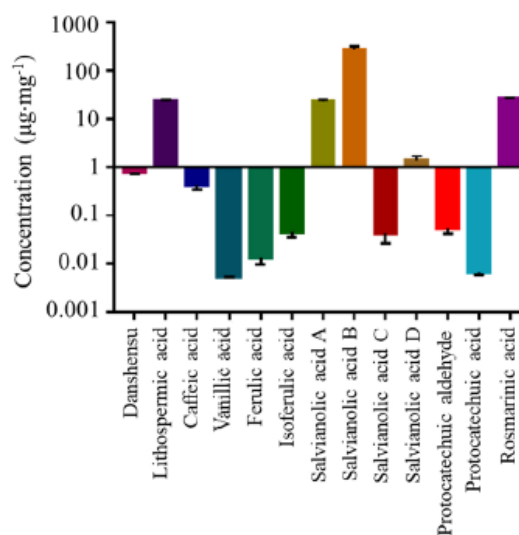


图8. 不同15 批次 SLI 中 13 种成分的含量分布

择的13种代表性成分在15 批SLI中进行准确定量。这15批样品均表现出良好的均匀性，重现性好。

总体而言，这种新策略可以加速提高对于未发现的中药成分的鉴定能力，尤其是对于痕量成分；可以作为一种推荐方法用于其它中药成份的深入分析鉴定，从而灵敏、快速的实现对于中药复杂组分的深度表征。

参考文献：

1. Yaqing Guo, Rui Mao, Yuanyuan Zhang, Rongrong Li, Patrick Kwabena Oduro, Dandan Si, Lifeng Han, Yuhong Huang, Guixiang Pan. An integrated strategy for the systematic chemical characterization of Salvianolate lyophilized injection using four scan modes based on the ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 215 (2022) 114769 doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114769;

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在和美国/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14815-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)