

在线酶切液相色谱仪 (Perfinity iDP)– 三重四极杆液质联用仪 LCMS-8040 超快速定性检测阿胶药材

LCMSMS-215

摘要: Perfinity iDP 液相色谱仪是岛津推出的蛋白质在线酶切系统, 可将蛋白质分子在几分钟内酶切成小分子的肽段。本文使用岛津在线酶切液相色谱 (Perfinity iDP)– 三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用系统建立了一种超快速定性检测阿胶药材的方法。本方法参照《中国药典 (2015 版)》中阿胶项下, 使用 NH_4HCO_3 溶液提取、过滤后, 使用串联系统在线完成快速酶解、分离及检测。本方法选择阿胶的特征肽作为定性依据; 按照药典要求建立了 $m/z 539.8 > 612.4$ 和 $m/z 539.8 > 923.8$ 检测离子对, 结果显示对照品溶液及市售药材样品中阿胶特征肽的信噪比均远远大于 3:1, 表明该方法完全满足药典的要求, 且将酶切过程由手工的十几小时缩短为几分钟, 可实现阿胶药材的快速、准确、灵敏的定性检测。

关键词: 在线酶切液相色谱仪 (Perfinity iDP) 三重四极杆质谱 阿胶 特征肽段

胶类药材是具有典型民族特色的传统中药, 为动物的皮熬制而成的明胶类物质, 以补血、升血功能而著称。在 2010 版中国药典中通过茚三酮显色法进行定性鉴别, 此方法缺少特异性, 不易对不同来源的胶类药材进行区分。2015 版药典对鉴定方法进行修正, 把原来的茚三酮显色法改为液质联用的方法检测特征性肽段, 方法更科学可靠。该方法使用胰蛋白酶对不同来源的明胶类物质进行酶切处理, 通过液质联用技术发现不同样品胶的酶解产物存在特征肽段的差异。从而通过检测样品胶中的特征肽段对样品胶的种类进行鉴定。但酶解胶类药材往往需要 12 小时以上, 难以满足执法部门、企业等要求快速、准确得到样品检测结果的需求。

Perfinity iDP (Integrated Digestion Platform) 是自动

化在线蛋白质酶切液相色谱, 采用高效率的胰蛋白酶固定化色谱柱, 对样品中的蛋白质进行在线酶切。通过使用已最优化的专用胰蛋白酶酶解缓冲液, 提高了酶解效率, 实现了最快几分钟完成的在线酶切, 与传统手工酶切 (需要 12-24 小时) 相比, 大大缩短了样品前处理时间; 同时在重现性方面, 由于 Perfinity iDP 系统将酶切、浓缩、分离、检测的一系列过程在线自动化, 降低了人为误差, 提高了分析精度。

本文利用岛津在线酶切液相色谱 (Perfinity iDP)– 三重四极杆液质联用 LCMS-8040 对阿胶中的特征肽段进行了分析, 建立了阿胶药材快速定性的方法, 可为大量胶类药材样品的快速定性分析提供参考。

实验部分

1.1 仪器

在线酶解液相色谱 Perfinity iDP– 三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用系统, 具体配置为 LC-20ADXR×2 输液泵, DGU-20A₅ 脱气机, SIL-20ACHT 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, FCV-36AH×2, CBM-20A 系统控制器, LC-20AD+LPGE, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, Perfinity iDP V 1.0.0.30 (工作站), LabSolutions Ver. 5.80 CHS 色谱工作站。

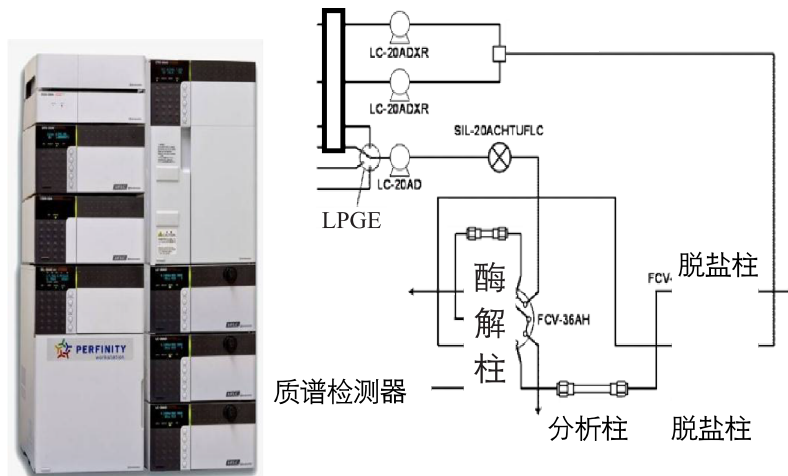


图1 Perfinity iDP系统及流路图

Perfinity iDP 工作原理：Perfinity iDP 工作时分为三个程序，依次是酶解、脱盐和反相分离。酶解时，样品经过高效率的胰蛋白酶固定化色谱柱被酶解成多肽片段，经酶解柱流出后，进入脱盐柱被富集；脱盐时，阀位进行切换，高比例的水相冲洗脱盐柱，将盐成分冲洗出去，而多肽仍然被富集在脱盐柱上；反向分离时，采用梯度洗脱，逐渐提高有机相的比例冲洗脱盐柱，将多肽从脱盐柱上洗脱下来，进入 C18 反向色谱柱柱进行分离，之后进入质谱进行检测。

1.2 分析条件

酶解条件：

用于酶解的流动相试剂包 (Perfinity 公司，228-56951-60) 包括酶解试剂 A、B 和 C 三种试剂：

酶解试剂 A：将预处理 Kit 中 “Wash Solution Concentrate” 加到烧杯中，加 1 L 水充分混合、溶解。将配好溶液转移至流动相瓶中。脱气。

酶解试剂 B：将预处理 Kit 中 “Digest Buffer Concentrate” 加到烧杯中，加 500 mL 水和 20 mL 异丙醇充分混合、溶解。加水至 900 mL，调整 pH 值至 8.4(可接受范围：7.9~8.4)。转移到容量瓶中，加水定容至 1 L。将配好溶液转移至流动相瓶中。脱气。

酶解试剂 C：将预处理 Kit 中 “Re-equilibration Concentrate” 加到烧杯中，加 600 mL 水和 250 mL 异丙醇充分混合、溶解。转移到容量瓶中，加水定容至 1 L。将配好溶液转移至流动相瓶中。脱气。

酶解时间：6 分钟

分离条件：

色谱柱：Shim-pack GISS, 2.1 mm I.D. × 100 cm,

1.9 μm

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液。

流动相 B：乙腈

流速：0.3 mL/min

时间程序：初始浓度 5%B，9 分钟内线性变化为 60%B

柱温：40℃

进样体积：5 μL

质谱检测条件：

离子化模式：ESI, 正离子模式

离子喷雾电压：+4.5 kV

雾化气流速：氮气 3.0 L/min

干燥气流速：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

DL 温度：300℃

加热模块温度：450℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 3

表1 MRM优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
驴皮特征肽段	539.8	612.40	-38	-24	-22
		923.80	-38	-24	-40

1.3 对照品和样品配制及前处理方法

取一定量的对照药材或待测样品粉末，加 1% NH_4HCO_3 溶液 50 mL，超声处理 30 min，使用微孔滤膜滤过。滤液直接进样分析。

结果与讨论

2.1 在线酶切系统分析阿胶对照药材的 MRM 色谱图

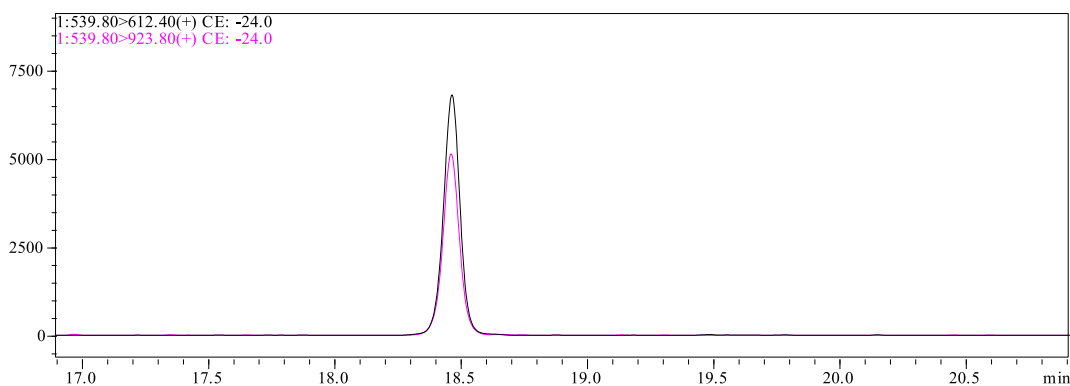


图2 阿胶对照药材特征多肽的MRM色谱图

LCMSMS 分析获得阿胶对照药材特征多肽的 MRM 色谱图，保留时间为：18.43min。图 1 中两对特征离子对 m/z 539.8>612.4 以及 m/z 539.8>923.8 的信噪比分别为 2145 和 1877，充分满足药典中要求的色谱峰信噪比大于 3:1 的要求。

2.2 实际样品测试

对市售的二种阿胶药材样品进行分析，结果如图 3~4 和表 3 所示。

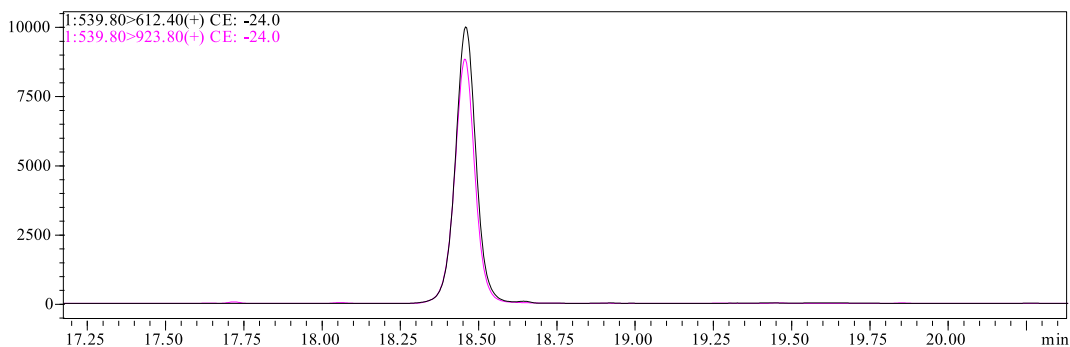


图3 市售阿胶样品1的色谱图

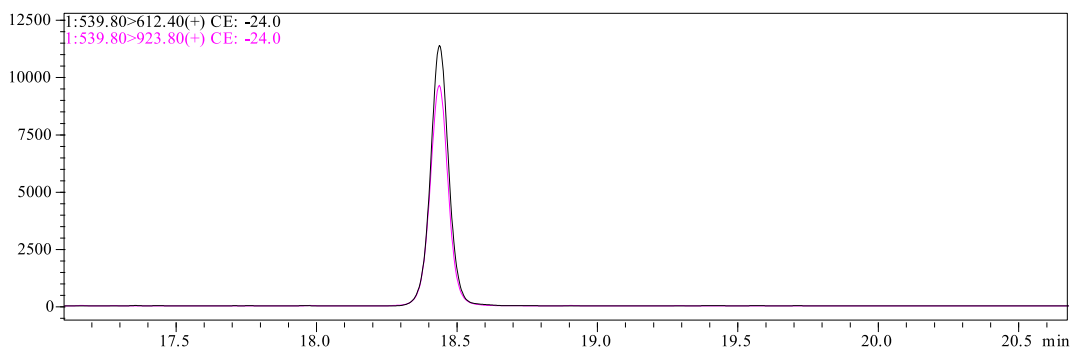


图4 市售阿胶样品2的色谱图

表2 实际样品中驴皮源特征肽段分析结果

样品编号	离子对信息	保留时间 (min)	峰高	峰面积	信噪比
样品 1	539.8>612.4	18.42	10154	45968	1624
	539.8>923.8		8654	39242	1697
样品 2	539.8>612.4	18.42	11286	50699	2210
	539.8>923.8		9555	43311	2128

结论

本文建立了一种使用岛津在线酶切液相色谱 (Perfinity iDP)- 三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用系统鉴定阿胶中特征肽段的方法，此方法不需要十几小时的手工酶切过程，可以超快速地实现阿胶定性检测。该方法所检测阿胶特征肽段 MRM 色谱图中离子对 m/z 539.8>612.4, m/z 539.8>923.8 的响应明显，完全满足 2015 版药典要求色谱峰信噪比大于 3:1 的要求。市售两种阿胶药材样品分析结果表明均含有驴皮特征肽段 MRM 离子对，表明所测样品中含有阿胶成分。因此，本方法可为应对药典要求实现阿胶药材的快速、准确、灵敏的定性鉴别提供参考。