

· 中药工业 ·

基于LC-MS/MS技术同时定量分析片仔癯中特征胰酶水解肽[△]

李文正¹, 刘文静¹, 曹妍¹, 李玮¹, 赵晨², 刘丛盛^{2*}, 宋青青^{1*}, 宋月林¹

1. 北京中医药大学 中药学院 中药现代研究中心, 北京 100248;

2. 漳州片仔癯药业股份有限公司, 福建 漳州 363000

[摘要] 目的: 阐明片仔癯中的蛋白组, 定量分析其中的特征胰酶水解肽, 以提高片仔癯的质量控制水平。方法: 优化总蛋白提取条件, 采用二辛可宁酸(BCA)法测定总蛋白含量, 利用鸟枪法蛋白组学表征片仔癯的蛋白组, 并进一步选择含量较高、稳定性好、长度适宜的特征多肽作为目标分析物, 采用在线能量分辨质谱法(online ER-MS)优化特征肽的离子对及最佳碰撞能, 建立反相液相色谱-选择反应监测(RPLC-SRM)定量分析方法, 测定11批片仔癯中目标多肽的含量。结果: 利用UniProt数据库从片仔癯中共鉴定了来源于200个蛋白的343个肽段, 以酶和骨架蛋白为主; 筛选得到ALSSALHER、TLLEGEESR和VAPLGEEFR 3个特征肽, 以其作为目标分析物进行定量分析, online ER-MS优化3个特征肽的定量参数离子对分别为 m/z 492.3→799.4、517.3→819.4和509.3→637.3, 碰撞能分别为25.0、24.4、28.6 eV。方法学验证符合定量要求, 3个多肽类成分在 batches 片仔癯样品中均被检出(ALSSALHER: 0.06~0.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; TLLEGEESR: 0.08~0.26 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; VAPLGEEFR: 0.27~1.09 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 含量差异较小, 其中特征肽VAPLGEEFR的含量较高。结论: 建立的方法可靠, 可为富含蛋白类成分的中药制剂的质量评价提供思路与方法。

[关键词] 片仔癯; 酶切特征肽; 定量分析; 选择反应监测; 在线能量分辨质谱

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)04-0880-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20221024006

Simultaneous Quantitative Analysis of Characteristic Tryptic Peptides in Pien Tze Huang Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

LI Wen-zheng¹, LIU Wen-jing¹, CAO Yan¹, LI Wei¹, ZHAO Chen², LIU Cong-sheng^{2*},
SONG Qing-qing^{1*}, SONG Yue-lin¹1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100248, China;

2. Zhangzhou Pien-Tze-Huang Pharmaceutical Co., Ltd., Zhangzhou 363000, China

[Abstract] **Objective:** To carry out proteomic profiling for Pien Tze Huang (PTH) and quantitate its characteristic tryptic peptides to improve the quality control level of PTH. **Methods:** The conditions for extracting total proteins was optimized and bicinchoninic acid (BCA) assay was adopted to determine the content of total proteins. The proteome of PTH was characterized by shotgun method. Moreover, some characteristic tryptic peptides with relatively high abundance, high stability and appropriate lengths were selected as the targets for analysis, while the ion pairs and collision energies were optimized using online energy-resolved mass spectrometry (online ER-MS). Therefore, the quantitative analysis method based on Reversed-phase Liquid Chromatography-Selective Reaction Monitoring (RPLC-SRM) was established to determine the contents of target peptides in 11 batches of PTH. **Results:** A total of 343 peptides from 200 proteins were

[△] **[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82003911, 81773875, 81973444); 漳州片仔癯药业股份有限公司开放课题(2020072220058)

^{*} **[通信作者]** 刘丛盛, 高级经济师, 研究方向: 中药化学成分分析; E-mail: zhics@zzpzh.com
宋青青, 讲师, 研究方向: 中药药效物质基础与质量评价; Tel: 010-64286100, E-mail: song_qingq@163.com

identified from PTH using UniProt database, which were mainly enzymes and cytoskeletal proteins. Three characteristic tryptic peptides, namely ALSSALHER, TLLEGEESR and VAPLGEEFR, were chosen as the targets for quantitative analysis. The quantitative parameters for the three characteristic peptides were optimized using online ER-MS as follows: m/z of ion pairs 492.3→799.4, 517.3→819.4 and 509.3→637.3, collision energy 25.0, 24.4, 28.6 eV, respectively. The methodological validation met with the requirement for quantitative analysis. The three peptides could be detected in all batches without significant difference in their contents (ALSSALHER: 0.06-0.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; TLLEGEESR: 0.08-0.26 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; VAPLGEEFR: 0.27-1.09 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), among which the content of VAPLGEEFR was relatively higher. **Conclusion:** The method in this study is reliable, which may provide ideas and methods for quality evaluation of traditional Chinese medical preparations with abundant protein compositions.

[Keywords] Pien Tze Huang; characteristic tryptic peptides; quantitative analysis; selective reaction monitoring; online energy-resolved mass spectrometry

片仔癀是国家一级中药保护品种,具有清热解毒、凉血化瘀、消肿止痛的功效^[1]。现代药理学研究表明,片仔癀具有抗炎、抗肿瘤、保肝等多种作用^[2-5],临床应用广泛。目前已公开的药味包括植物药三七,以及天然麝香、蛇胆和牛黄3味名贵动物药^[4],其中三七皂苷、麝香酮、胆汁酸等小分子化合物已被深入研究,并作为片仔癀质量标志物用于其质量评价^[6-10]。蛋白、多肽等大分子化合物虽也表现出广泛的药理活性,如麝香多肽具有抗炎、抗癌的作用^[11-12],三七中含有抗真菌蛋白^[13],但未对其进行深入分析和研究。

鸟枪法蛋白组学通过酶解样品中的蛋白,采用液相色谱-质谱法(LC-MS)对肽段进行分离鉴定,从而实现蛋白的全谱分析。该策略能够实现复杂样品中蛋白高通量的定性、定量分析^[14],尤其适用于富含大量蛋白的动物类中药的分析。但基于该平台的多肽定量分析灵敏度较差、动态线性范围窄,难以满足样品中种类多且含量差异大的蛋白的全面精准定量分析。三重四极杆(QqQ)-MS的选择反应监测(SRM)被视为绝对定量的金标准^[15],前后2个四极杆(Q_1 、 Q_3)作为质量过滤器,中间四级杆(Q_2)作为碰撞池发生碰撞诱导解离产生碎片离子,设定前体离子和碎片离子分别通过 Q_1 和 Q_3 可以增强选择性,提高灵敏度,定量线性范围更是增加到5个数量级^[15]。然而,SRM建立的关键在于获得被测物的最佳质谱参数。Skyline软件能够预测SRM参数^[16],但受不同分析仪器的限制,其推荐的SRM参数并不能使所有QqQ-MS发挥定量优势。本课题组前期建立了在线能量分辨(online ER)-MS,可以在各种QqQ-MS平台实现不依赖于对照品的质谱参数优化^[17-18],提高了方法的灵敏度,拓宽了线性范围。

本研究基于鸟枪法蛋白组学策略,利用nano LC-Q Exactive HF Orbitrap-MS结合UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)分析并鉴定片仔癀中蛋白类成分,筛选特征肽,采用online ER-MS优化质谱参数,建立反相液相色谱(RPLC)-SRM定量分析方法,测定了11批片仔癀中的3个胰酶水解特征肽含量,可为片仔癀的质量标准提升提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ME204型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司);5424R型离心机(德国艾本德公司);MQD-S2P型恒温双层摇床(上海旻泉仪器有限公司);UltiMate 3000型纳升级超高效液相色谱系统、Q Exactive HF型质谱仪(美国赛默飞公司);LC-20ADXR型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Qtrap 5500型质谱仪(美国Sciex公司);10 kDa超滤管(美国赛多利斯公司)。

1.2 试剂

二辛可宁酸(BCA)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);三氯乙基磷酸酯(TCEP,北京博奥拓达科技有限公司);碘代乙酰胺(美国Sigma公司);比伐卢定(上海源叶生物科技有限公司);胰蛋白酶(美国普洛麦格公司);碳酸氢铵和尿素(北京化工厂);质谱级甲酸和乙腈(美国赛默飞公司);超纯水由实验室Milli-Q型纯水系统制备;多肽ALSSALHER、TLLEGEESR、VAPLGEEFR由上海源叶生物科技有限公司合成(纯度 $\geq 98\%$)。

各批片仔癀由漳州片仔癀药业股份有限公司提供(表1),样品存放于北京中医药大学中药学院中药现代研究中心。

表1 11批片仔癀样品信息及其总蛋白质量分数

编号	批号	总蛋白质量分数/%
PTH1	211189	7.00
PTH2	211190	7.42
PTH3	211191	6.58
PTH4	211192	6.79
PTH5	211193	7.21
PTH6	211194	6.79
PTH7	211195	7.21
PTH8	211196	8.68
PTH9	211197	5.74
PTH10	211198	7.21
PTH11	211184	7.42

1.3 混合对照品溶液制备

分别取多肽对照品 ALSSALHER、TLLEGEESR、VAPLGEEFR 适量,精密称定,用纯水溶解,配制质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。精密吸取各对照品储备液,用纯水制备成终质量浓度均为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,用纯水逐级稀释,得到系列质量浓度的对照品溶液,待用。

取比伐卢定适量,精密称定,用纯水配成质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标 (IS) 储备液,稀释至质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,待用。

精密吸取各对照品溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$,分别加入等体积的内标溶液,得到系列质量浓度的含内标的混合对照品溶液。

1.4 供试品溶液制备

精密称定各批片仔癀 50 mg ,分别加入甲醇 1 mL ,超声提取 30 min ,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $7607\times g$ 离心 10 min ,去上清液;加入 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液 1 mL ,超声提取 30 min , $7607\times g$ 离心,取上清液,重复操作,合并上清液至 4 mL 离心管,冷冻干燥 16 h ,加入纯水 $200\text{ }\mu\text{L}$ 复溶,得到片仔癀总蛋白溶液,BCA法测定总蛋白浓度。随后,采用过滤辅助提取法制备片仔癀多肽样品。取一定体积的片仔癀总蛋白溶液(蛋白质量为 2.5 mg),在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min ,放至室温,加入 TCEP,尿素补足至 $300\text{ }\mu\text{L}$ 使 TCEP 终浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,在 $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min ,然后放至室温。将样品转移至 10 kDa 超滤管, $15\text{ }871\times g$ 离心 30 min 后加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$,避光反应 30 min ,加入 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素 $100\text{ }\mu\text{L}$, $15\text{ }871\times g$ 离心 30 min ;加入 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液 $200\text{ }\mu\text{L}$,

$15\text{ }871\times g$ 离心 30 min ,重复2次,弃去超滤液;在超滤管中加入胰蛋白酶(胰酶:蛋白为 $1:50$),于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中酶解 16 h ,更换离心管,离心收集超滤液,加入水 $100\text{ }\mu\text{L}$,再次离心,收集超滤液,合并2次超滤液,冷冻干燥,加入纯水 $100\text{ }\mu\text{L}$ 复溶,得到片仔癀酶解多肽样品。吸取上述酶解样品 $50\text{ }\mu\text{L}$,加入等体积内标溶液,即得供试品溶液。

1.5 Nano LC-Q Exactive HF Orbitrap-MS分析

采用 nano LC-Q Exactive HF Orbitrap MS 系统,分析片仔癀酶解多肽样品。EASY-Spray™ 色谱柱($100\text{ mm}\times 0.75\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$,美国赛默飞公司);进样量为 $2\text{ }\mu\text{L}$;流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 0.1% 甲酸乙腈 (B),梯度洗脱 ($0\sim 5.0\text{ min}$, $5\%\sim 8\%\text{ B}$; $5.0\sim 68.0\text{ min}$, $8\%\sim 35\%\text{ B}$; $68.0\sim 75.0\text{ min}$, $35\%\sim 50\%\text{ B}$; $75.0\sim 80.0\text{ min}$, $50\%\sim 100\%\text{ B}$; $80.0\sim 85.0\text{ min}$, $100\%\text{ B}$; $85.0\sim 85.1\text{ min}$, $100\%\sim 5\%\text{ B}$; $85.1\sim 90.0\text{ min}$, $5\%\text{ B}$);柱温为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$;流速为 $0.5\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱条件:电喷雾离子源 (ESI),正离子模式,标准化碰撞能 (CE) 为 35% ,活化时间为 10 ms , MS^1 全扫描范围 m/z $350\sim 1500$,分辨率为 $60\text{ }000$; MS^2 谱图以 FTMS 模式采集,扫描范围 m/z $120\sim 1970$,分辨率为 7500 。

将质谱数据导入 MaxQuant 1.6.10,使用 Andromeda 肽段搜索引擎及 UniProt 数据库检索,参数设置如下:蛋白和多肽假阳性率 (FDR) $\leq 1\%$;酶解方式为胰蛋白酶酶切 (Trypsin) /P;酶切遗漏数为2;固定修饰为半胱氨酸烷基化;可变修饰为甲硫氨酸的氧化和蛋白N端乙酰化。

1.6 基于RPLC-SRM的片仔癀特征肽定量分析

采用 LC-Qtrap MS/MS 系统对片仔癀酶解多肽样品中3个特征肽进行定量分析。色谱柱为 HSS T3 ($100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$,美国 Waters 公司);柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;流速为 $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$;流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 0.1% 甲酸乙腈 (B),梯度洗脱 ($0\sim 2.00\text{ min}$, $12\%\sim 15\%\text{ B}$; $2.00\sim 3.00\text{ min}$, $15\%\sim 30\%\text{ B}$; $3.00\sim 6.00\text{ min}$, $30\%\sim 35\%\text{ B}$; $6.00\sim 7.00\text{ min}$, $35\%\sim 55\%\text{ B}$; $7.01\sim 12.00\text{ min}$, $12\%\text{ B}$)。质谱检测采用 ESI 正离子模式,离子源参数:气帘气 (CUR) 为 35 psi ($1\text{ psi}\approx 6.895\text{ kPa}$),碰撞气 (CAD) 为 High,喷雾电压为 5500 V ,温度 (TEM) 为 $450\text{ }^{\circ}\text{C}$,离子源气体1 (GS1) 为 55 psi ,GS2 为 55 psi 。

采用 online ER-MS 对 3 个特征肽离子对的质谱参数进行优化, 首先将高分辨质谱采集得到的前体离子与 MS^2 中响应高的子离子配对, 进而派生出一系列拟离子对 (PITs), 给予 PITs 阶梯式 CE, 通过拟合裂解曲线获得最佳碰撞能 (OCE)。以 VAPLGEEFR 为例, 其前体离子 $[M+2H]^{2+} m/z$ 为 509.29, MS^2 中主要碎片离子 m/z 为 847.43 (y_7^+)、750.38 (y_6^+)、637.30 (y_5^+)、424.22 (y_7^{2+}), 构建 4 对候选离子对 m/z 509.3→847.4、509.3→750.4、509.3→637.3、509.3→424.2, 进而衍生出 4 组 PITs, 如 m/z 509.3→847.4 可以衍生出 1 组 PITs 509.290→847.401、509.290→847.402、509.290→847.403 等, 以 2 eV 为步长, 每个 PIT 扫描时间为 5 ms, 采集 CE 为 6~50 eV 的峰面积。峰面积经归一化处理后, 导入 GraphPad Prism 8.0 软件进行高斯曲线拟合, 获得各离子对裂解曲线, 曲线顶点对应的 CE 即为 OCE。VAPLGEEFR 的其余离子对 m/z 509.3→750.4、509.3→637.3、509.3→424.2, 特征肽 ALSSALHER、TLLEGEESR 的离子对及相应 CE 均按上述方法优化。

1.7 方法学验证

1.7.1 线性和灵敏度 分析 1.3 项下各质量浓度混合对照品溶液, 以被测成分峰面积/内标峰面积作为纵坐标 (Y), 以质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得到标准曲线与线性范围。以信噪比 (S/N) 约为 3 的被测成分质量浓度作为检测下限 (LLOD), 以 S/N 约为 10 的被测成分质量浓度作为定量下限 (LLOQ)。

1.7.2 精密度考察 在被测成分的线性范围内, 取高 ($500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中 ($125 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、低 ($31 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 质量浓度进行日内精密度考察, 每个质量浓度连续进样 6 次, 记录峰面积。

1.7.3 重复性考察 按 1.4 项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 进样分析, 记录峰面积。

1.7.4 稳定性考察 取同一份供试品溶液, 在 4°C 保存, 分别在 0、2、4、8、12 h 分别进样测定, 记录峰面积。

1.8 特征肽的含量测定

按 1.4 项下方法制备 11 批片仔癀供试品溶液, 按 1.6 项下方法建立的定量方法进样分析, 将峰面积比值 (分析物峰面积/内标峰面积) 代入标准曲

线, 求得待测物质量浓度, 计算各批片仔癀中目标多肽含量。

2 结果与讨论

2.1 总蛋白样品制备条件的优化

为提高片仔癀样品总蛋白的提取率, 本研究分别考察了不同提取溶液 (RIPA 裂解液、水、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液、甲醇和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液)、料液比 (1:10、1:20、1:50)、提取时间 (0.5、1.0、2.0 h) 对提取效率的影响, 通过 BCA 法测定总蛋白含量。结果表明, 采用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液提取蛋白效率显著高于 RIPA 裂解液和水, 同时, 采用甲醇提取片仔癀样品, 弃去上清液后用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液提取, 与单独使用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液的蛋白提取效率近乎一致, 且进一步减少了基质中脂溶性杂质的干扰; 料液比 1:20 与 1:50 提取得到的总蛋白含量差异无统计学意义, 但均高于料液比 1:10 时提取总蛋白含量; 不同提取时间得到的总蛋白量差异无统计学意义。最终, 片仔癀样品提取条件为采用料液比 1:20, 先甲醇提取 0.5 h 并去除上清液, 沉淀用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵水溶液再次提取 0.5 h。BCA 法测得各批片仔癀总蛋白质量分数见表 1。

2.2 片仔癀中蛋白多肽的定性分析

高分辨 nano LC-Q Exactive HF Orbitrap-MS 采集的片仔癀酶解多肽样品的总离子流图见图 1。使用 MaxQuant 1.6.10 软件对采集到的质谱数据进行处理, 利用 Andromeda 与 UniProt 数据库鉴别多肽序列, 并归属蛋白来源。最终, 从片仔癀胰酶水解多肽样品中鉴定了 343 个肽段, 来源于 200 个蛋白, 以酶和骨架蛋白为主。各蛋白的氨基酸数目为 18~4563, 匹配肽段数为 1~13, 序列覆盖率为 0.33%~100.00%, 鉴定得分前 20 的蛋白见表 2, 其中 16 个蛋白来源于牛, 1 个蛋白来源于人参。

在此基础上, 选择无修饰、无漏切位点、响应高、稳定性好且长度适宜的特征肽 ALSSALHER、TLLEGEESR 和 VAPLGEEFR 进行定量分析。ALSSALHER 来源于酶 (α -amylase A type-1/2, P0C1B3)、TLLEGEESR 来源于骨架蛋白 (keratin, type II cytoskeletal 1, P04264)、VAPLGEEFR 来源于载脂蛋白 (apolipoprotein A-I, P15497)。

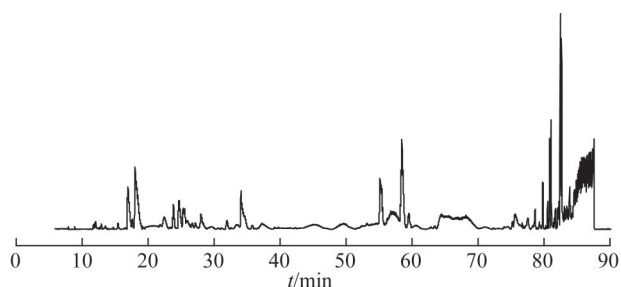


图1 片仔癀酶解多肽样品的 nano LC-Q Exactive HF Orbitrap-MS总离子流图

2.3 RPLC-SRM定量方法的建立

2.3.1 RPLC-SRM方法的优化 为了实现RPLC-SRM对3个特征肽定量测定,除了在色谱上对待测物的有效分离,避免其流出而造成的离子化竞争,更需要设置适宜的待测物质谱参数,提高其质谱响应。虽然多肽质谱参数可以通过Skyline软件预测得到,或是通过注射对照品手动优化获得,但不可避免会有检测灵敏度低、多肽对照品消耗量大、优化过程费时等缺点。Online ER-MS策略无需对照品便能实现质谱参数的精确优化,获得优于Skyline预测的质谱参数。

以VAPLGEEFR为例阐明CE优化过程。首先,通过高分辨质谱采集到多肽VAPLGEEFR的MS¹前体离子信息[M+2H]²⁺ *m/z* 为509.29, MS²主要碎片离子为酰胺键断裂生成的 *m/z* 918.47 (y_8^+)、847.43

(y_7^+)、750.38 (y_6^+)、637.30 (y_5^+)、580.28 (y_4^+)、451.23 (y_3^+)、424.22 (y_2^{2+})、322.19 (y_2^+)、268.17 (b_3^+)、175.12 (y_1^+) (表3,图2),选择其中响应较高的碎片离子 *m/z* 为847.43、750.38、637.30、424.22,构建4对候选离子对 *m/z* 509.3→847.4、509.3→750.4、509.3→637.3、509.3→424.2,进而衍生出4组PITs (*m/z* 509.290→847.431、509.290→847.432、509.290→847.433等, *m/z* 509.290→750.381、509.290→750.382、509.290→750.383等, *m/z* 509.290→637.301、509.290→637.302、509.290→637.303等, *m/z* 509.290→424.221、509.290→424.222、509.290→424.223等)。以2 eV为步长,在CE为6~50 eV时,赋予每个PIT 1个CE,每个PIT扫描时间5 ms。由于Qtrap的Q₁和Q₃分辨率低,无法识别PITs之间50 mDa以下的差异,因此能够采集得到同一化合物不同CE下对应的峰面积,也能通过Analyst软件SRM模式进行自检。将多肽VAPLGEEFR 4组PITs在不同能量下的峰面积进行归一化后导入GraphPad Prism 8.0软件,分别采用高斯曲线拟合裂解曲线, *m/z* 509.3→847.4的高斯曲线方程为 $Y=13.2 \times \exp\{-0.5[(X-23.3)/7.8]^2\}$, OCE为23.3 eV; *m/z* 509.3→750.4的高斯曲线方程为 $Y=14.2 \times \exp\{-0.5[(X-28.9)/7.6]^2\}$, OCE为28.9 eV; *m/z* 509.3→637.3的高斯曲线方程为 $Y=30.5 \times \exp\{-0.5[(X-28.6)/7.4]^2\}$, OCE

表2 片仔癀中鉴别得分前20的蛋白

序号	UniProt ID	蛋白	覆盖率/%	序列长度/bp	相对分子质量/kDa
1	P07756	carbamoyl-phosphate synthase [ammonia]	14.07	1500	164.48
2	P10719	ATP synthase subunit beta	28.17	529	56.32
3	P04264	keratin, type II cytoskeletal 1	21.89	644	66.00
4	P00761	trypsin	29.44	231	24.39
5	P18687	60 kDa heat shock protein	24.08	573	60.95
6	P13645	keratin, type I cytoskeletal 10	17.47	584	58.79
7	P04785	protein disulfide-isomerase	12.38	509	56.92
8	P35908	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	10.17	639	65.39
9	A2Q0Z0	elongation factor 1-alpha 1	17.97	462	50.09
10	P83618	ribonuclease-like storage protein	16.39	238	27.32
11	O09171	betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	17.69	407	44.95
12	P0C1B3	alpha-amylase A type-1/2	7.62	499	54.78
13	P15497	apolipoprotein A- I	20.00	265	30.26
14	P00502	glutathione S-transferase alpha-1	38.74	222	25.59
15	Q9DBE0	cysteine sulfinic acid decarboxylase	10.95	493	55.11
16	P05183	cytochrome P450 3A2	4.56	504	57.69
17	Q91Y97	fructose-bisphosphate aldolase B	23.08	364	39.48
18	P10760	adenosylhomocysteinase	14.35	432	47.51
19	P13060	elongation factor 2	4.98	844	94.40
20	P01946	hemoglobin subunit alpha-1/2	36.62	142	15.32

为28.6 eV; m/z 509.3→424.2的高斯曲线方程为 $Y=100.9 \times \exp\{-0.5[(X-20.6)/5.0]^2\}$, OCE为20.6 eV (图3)。与Skyline软件推荐的结果相比,多肽VAPLGEEFR 4个候选离子对相同,且各离子对的CE预测值均为24.8 eV,不能达到各离子对的最佳响应,如离子对 m/z 509.3→424.2在24.8 eV时的响应仅为在OCE (20.6 eV) 时的70%,故online ER-MS能够获得最佳质谱参数用于建立多肽定量方法。虽然多肽VAPLGEEFR 4个候选离子对中 m/z 509.3→424.2响应最高,但该离子对专属性差,同时能检测到另一色谱峰且与VAPLGEEFR分离度差,因此为了保障分析方法的专属性、灵敏度,最终选择 m/z 509.3→637.3 (28.6 eV) 作为定量离子对。

另2个特征肽ALSSALHER与TLLEGEESR同样采用online ER-MS策略进行分析,最终多肽ALSSALHER的定量离子对为 m/z 492.3→799.4,高斯曲线 $Y=100.0 \times \exp\{-0.5[(X-25.0)/6.6]^2\}$, OCE为25.0 eV,多肽TLLEGEESR的定量离子对为 m/z 517.3→819.4,高斯曲线 $Y=104.2 \times \exp\{-0.5[(X-24.4)/7.6]^2\}$, OCE为24.4 eV (表3)。

将已优化好的3个多肽质谱参数输入SRM列表,初步建立SRM方法,进一步通过优化流动相和洗脱程序来完善分析方法。与其他甲醇-水等流动相体系相比,选用乙腈-甲酸水体系时,各多肽离子对的响应提高,且色谱峰形良好。通过优化色谱洗脱条件,最终各分析物及内标的出峰时间为1.89~8.03 min,能够实现快速分离和分析(图4)。

2.3.2 方法学验证 方法学验证结果见表4。3个特征肽LLOD与LLOQ分别为3.9、7.8 ng·mL⁻¹,线性范围为7.8~10 000.0 ng·mL⁻¹,日内精密度RSD≤13.45%,重复性RSD 8.46%~27.51%,稳定性RSD≤35.41%,方法灵敏度高,线性关系、精密度与重复性良好,符合多肽的定量要求。

2.4 各批片仔癀定量结果

11批片仔癀目标多肽含量的测定见表5。结果显示,3个特征肽在11批片仔癀样品中均被检出,ALSSALHER质量分数为0.06~0.44 μg·g⁻¹,TLLEGEESR质量分数为0.08~0.26 μg·g⁻¹,VAPLGEEFR质量分数较高,为0.27~1.09 μg·g⁻¹。除PTH9之外,3个特征肽在其余10批片仔癀中的质量

表3 片仔癀3个特征肽多级质谱及其定量离子对、CE信息

分析物序号	多肽序列	UniProt ID	MS ¹	MS ²	t_R /min	离子对 m/z	OCE/eV
1	ALSSALHER	P0C1B3	492.17[M+2H] ²⁺	912.49(y_8^+), 799.40(y_7^+), 712.38(y_6^+), 625.35(y_5^+), 554.31(y_4^+), 441.22(y_3^+), 304.16(y_2^+), 185.13(b_2^+)	1.89	492.3→799.4	25.0
2	TLLEGEESR	P04264	517.23[M+2H] ²⁺	819.37(y_7^+), 706.30(y_6^+), 577.26(y_5^+), 262.15(y_2^+), 215.14(b_2^+)	3.76	517.3→819.4	24.4
3	VAPLGEEFR	P15497	509.29[M+2H] ²⁺	918.47(y_8^+), 847.43(y_7^+), 750.38(y_6^+), 637.30(y_5^+), 580.28(y_4^+), 451.23(y_3^+), 424.22(y_2^+), 322.19(y_1^+), 268.17(b_3^+), 175.12(y_1^+)	7.04	509.3→637.3	28.6
IS	bivalirudin				8.03	1 091.4→356.4	71.3

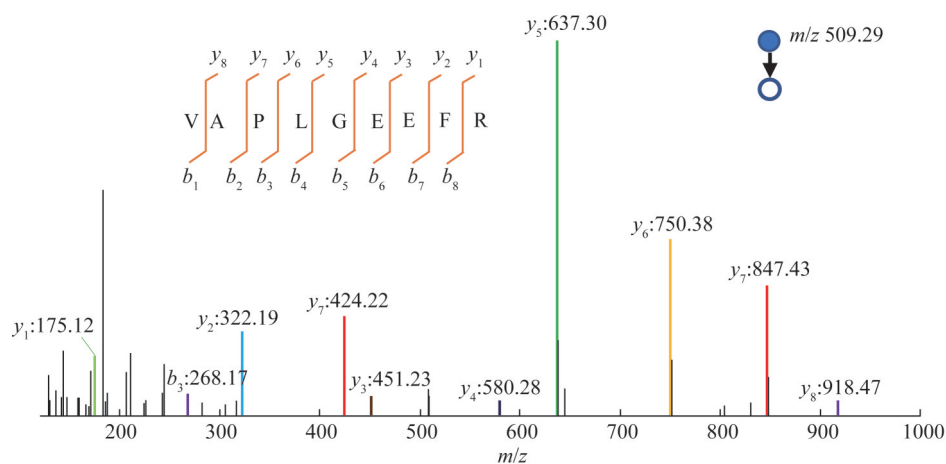


图2 片仔癀胰酶酶解样品中特征肽VAPLGEEFR的MS²谱图及结构注释

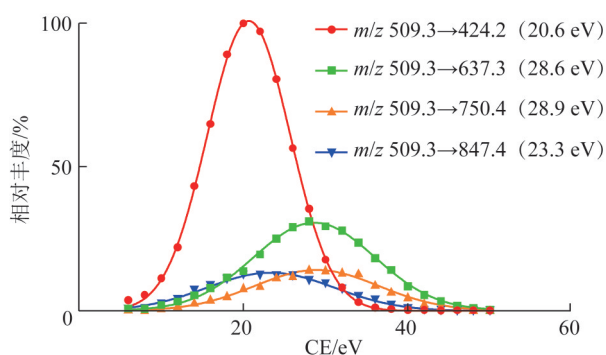
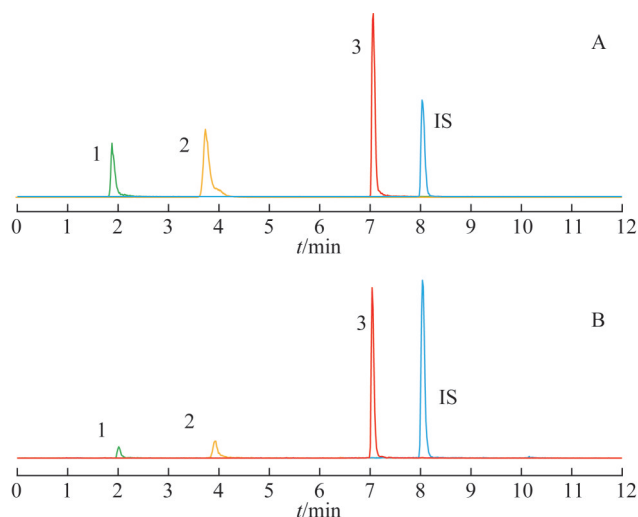


图3 多肽VAPLGEEFR候选离子对的裂解曲线

分数均为VAPLGEEFR>ALSSALHER>TLLEGEESR,不同批间均一性较好。

3 结论

本研究采用LC-MS实现了片仔癯中蛋白的鉴定及特征肽的定量分析。基于鸟枪法蛋白组学策略,采用 nano LC-Q Exactive HF Orbitrap-MS,结合 UniProt数据库,共从片仔癯中鉴别了来源于200个蛋白的343个肽段,从中筛选3个特征肽(ALSSALHER、TLLEGEESR、VAPLGEEFR)作为其质量标志物进行分析。基于不依赖于对照品的online ER-MS策略,获得了3个目标多肽的定量离子对及OCE,其优化结果显著优于Skyline软件预测



注: A. 混合对照品; B. 片仔癯酶解多肽样品; 1. ALSSALHER; 2. TLLEGEESR; 3. VAPLGEEFR。

图4 片仔癯3个特征肽及内标的提取离子流图

的质谱参数,且与利用对照品手动优化相比,节省了多肽对照品及分析时间。建立的RPLC-SRM分析方法方法学验证结果良好,11批片仔癯中3个特征肽的含量稳定,各批间样品均一性较好,其中多肽VAPLGEEFR含量最高。本研究可为片仔癯的质量标准提升及含有动物药药味的中成药质量分析提供参考。

表4 片仔癯3个特征肽的RPLC-SRM定量方法学验证结果

多肽序列	标准曲线	<i>r</i>	日内精密度RSD/%			重复性RSD/%	稳定性RSD/%
			低	中	高		
ALSSALHER	$Y=0.001\ 48X-0.002\ 74$	0.995\ 3	6.55	13.45	11.25	25.54	33.62
TLLEGEESR	$Y=0.003\ 10X+0.013\ 20$	0.991\ 4	2.91	7.10	4.88	27.51	24.82
VAPLGEEFR	$Y=0.004\ 20X-0.045\ 60$	0.997\ 6	2.96	6.62	3.65	8.46	35.41

注:线性范围均为7.8~10 000.0 ng·mL⁻¹。

表5 RPLC-SRM定量分析11批片仔癯中目标多肽的质量分数

编号	μg·g ⁻¹		
	ALSSALHER	TLLEGEESR	VAPLGEEFR
PTH1	0.35	0.16	0.85
PTH2	0.44	0.10	0.65
PTH3	0.17	0.09	0.44
PTH4	0.15	0.08	0.32
PTH5	0.30	0.14	0.49
PTH6	0.10	0.08	0.48
PTH7	0.24	0.16	0.80
PTH8	0.17	0.15	0.86
PTH9	0.06	0.07	0.27
PTH10	0.26	0.10	0.92
PTH11	0.34	0.26	1.09

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:703.
- [2] ZHU J H, ZHANG D, WANG T, et al. Target identification of hepatic fibrosis using Pien Tze Huang based on mRNA and lncRNA[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 16980.
- [3] DENG Y Q, LUO H, SHU J, et al. Pien Tze Huang alleviate the joint inflammation in collagen-induced arthritis mice[J]. Chin Med, 2020, 15:30.
- [4] HUANG L L, ZHANG Y P, ZHANG X Q, et al. Therapeutic potential of Pian-Tze-Huang: A review on its chemical composition, pharmacology, and clinical

- application[J]. *Molecules*, 2019, 24(18):3274.
- [5] ZHANG L H, LAM W P, LYU L H, et al. Protective effects and potential mechanisms of Pien Tze Huang on cerebral chronic ischemia and hypertensive stroke [J]. *Chin Med*, 2010, 5:35.
- [6] HUANG M Q, XU W, ZHANG Y P, et al. Identification and quantification of the anti-inflammatory constituents in Pian-Tze-Huang by liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1027:27-39.
- [7] XU W, ZHANG Y P, ZHOU C J, et al. Simultaneous quantification six active compounds in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study of Pien-Tze-Huang[J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1061/1062:314-321.
- [8] 陈啟兰. 近红外光谱法测定片仔癀中皂苷类成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(8):1596-1600.
- [9] 贾金茹, 李茜, 屠鹏飞, 等. 利用直接注射-多级质谱全扫描法快速分析片仔癀化学成分组[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(13):3501-3510.
- [10] 李玮, 蒋珍珍, 李茜, 等. 利用在线加压溶剂提取-超高效液相色谱-离子阱-飞行时间-质谱法定性分析片仔癀化学成分组[J]. *色谱*, 2021, 39(5):478-487.
- [11] 肖庆忠, 李浩威, 温冠媚, 等. 麝香多肽体外诱导成年大鼠和人骨髓间充质干细胞定向分化为神经元的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(10):1179-1182.
- [12] 王文杰, 钟森, 郭颖, 等. 麝香糖蛋白成分对中性白细胞趋化反应的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(1):59-62.
- [13] LAM S K, NG T B. Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (Sanchi ginseng) roots [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(3):287-292.
- [14] ZHANG Y Y, FONSLow B R, SHAN B, et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics [J]. *Chem Rev*, 2013, 113(4):2343-2394.
- [15] LANGE V, PICOTTI P, DOMON B, et al. elected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial[J]. *Mol Syst Biol*, 2008, 4:222.
- [16] CHEN Z A, RAPPILBER J. Quantitative cross-linking/mass spectrometry to elucidate structural changes in proteins and their complexes [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(1):171-201.
- [17] YAN Y, SONG Q Q, CHEN X J, et al. Simultaneous determination of components with wide polarity and content ranges in *Cistanche tubulosa* using serially coupled reverse phase-hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1501:39-50.
- [18] LIU W J, YU J, LI W, et al. Simultaneous determination of eight tryptic peptides in musk using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2021, 1171:122624.

(收稿日期: 2022-10-24 编辑: 王笑辉)