

液相色谱飞行时间质谱联用定性定量血清样品

朱辉, 黄保

(广州禾信仪器股份有限公司, 广东 广州 510530)

摘要: 利用液相飞行时间质谱联用仪对吴宝剑课题组提供的血清样品加标(对硝基苯酚、氟二氧嘧啶、染料木黄酮、乌头碱和内部 SNX2112) 进行定性定量分析。

关键词: 血清; 飞行时间质谱

1 测试条件

1.1 实验样品

对硝基苯酚、氟二氧嘧啶、染料木黄酮、内标 SNX2112 和乌头碱的特征离子峰信息如下表所示:

表一 样品特征离子峰信息

序号	样品	分子式	检测的特征离子(\pm)	特征峰的质荷比(m/z)
1	对硝基苯酚	$C_6H_5NO_3$	$[M-H]^-$; $[M+HCOOH-H]^-$	138.01910; 184.02457
2	乌头碱	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	$[M+H]^+$	646.32268
3	染料木黄酮	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$; $[M+HCOOH-H]^-$	269.04498; 315.05045
4	内标 SNX2112	$C_{23}H_{27}F_3N_4O_3$	$[M-H]^-$; $[M+HCOOH-H]^-$	463.19566; 509.20113
5	氟二氧嘧啶	$C_4H_3FN_2O_2$	$[M-H]^-$	129.01001

暨大药学院吴宝剑课题组提供的样品信息:

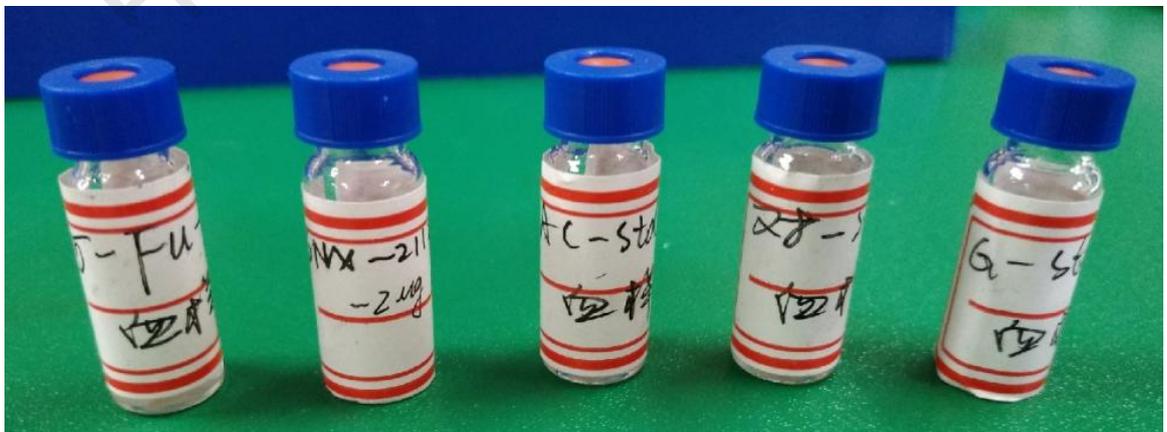


图1 血样加标样品信息

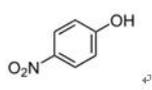
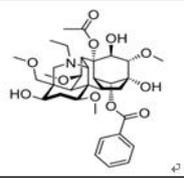
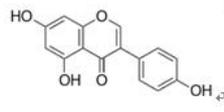
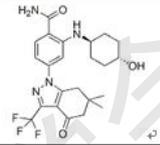
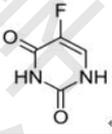
化合物 [Ⓔ]	分子式 [Ⓔ]	分子量 [Ⓔ]	结构式 [Ⓔ]
4-Nitrophenol(硝基酚) [Ⓔ]	C ₆ H ₅ NO ₃ [Ⓔ]	139.11 [Ⓔ]	
Aconitine (乌头碱) [Ⓔ]	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁ [Ⓔ]	645.73708 [Ⓔ]	
Genistein (染料木素) [Ⓔ]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ [Ⓔ]	270.24 [Ⓔ]	
SNX2112 [Ⓔ]	C ₂₃ H ₂₇ F ₃ N ₄ O ₃ [Ⓔ]	464.48 [Ⓔ]	
Fluorouracil (氟二氧嘧啶) [Ⓔ]	C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂ [Ⓔ]	130.077 [Ⓔ]	

图2 标准物质信息表

1.2 实验仪器

OPSI-TOF-9(L); EX-1700s-HPLC;

1.3 实验条件

1) 色谱条件

- 色谱柱: Bioppearl-HC C18 (5 μ m, 2.1*150 mm);
- 手动进样阀: Rheodyne; 7725i;
- 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μ L;

2) 质谱条件

- 雾化气压: 0.35MPa, 辅助气气压: 0.05MPa;
- 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C; 辅助气温度: 380 $^{\circ}$ C;

3 测试方法

3.1 对硝基苯酚使用溶液配制

- 2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL 和 50ng/mL 对硝基苯酚标准溶液: 分别从浓度为 1 μ g/mL 对硝基苯酚溶液中移取 20 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L 和 500 μ L 到各自装有一定体积甲醇的 10mL 容量瓶中, 然后用甲醇定容到刻度;
- 加标对硝基苯酚血样稀释液 (浓度: 20ng/mL): 从浓度为 2 μ g/mL 加标对硝基苯酚血样

溶液中移取 20 μ L 和 980 μ L 甲醇混匀即可。

3.2 乌头碱使用溶液配制

- 1) 1 ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL 和 20ng/mL 乌头碱标准溶液：分别从浓度为 100ng/mL 染料木黄酮溶液中移取 10 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L 和 200 μ L 到各自装有一定体积乙腈的 1mL 容量瓶中，然后用乙腈定容到刻度；
- 2) 加标乌头碱血样稀释液（浓度：5ng/mL）：从浓度为 200ng/mL 加标乌头碱血样溶液中移取 250 μ L 到装有一定体积乙腈的 10mL 容量瓶中，然后用乙腈定容到刻度。

3.3 染料木黄酮使用溶液配制

- 1) 5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL 和 100ng/mL 染料木黄酮标准溶液：分别从浓度为 1 μ g/mL 染料木黄酮溶液中移取 50 μ L、100 μ L、200 μ L、500 μ L 和 1000 μ L 到各自装有一定体积甲醇的 10mL 容量瓶中，然后用甲醇定容到刻度；
- 2) 加标染料木黄酮血样稀释液（浓度：20ng/mL）：从浓度为 2 μ g/mL 加标对硝基苯酚血样溶液中移取 20 μ L 和 1980 μ L 体积甲醇混匀即可。

3.4 SNX2112 使用溶液配制

- 1) 5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL 和 100ng/mL SNX2112 标准溶液：分别从浓度为 1 μ g/mL SNX2112 溶液中移取 50 μ L、100 μ L、200 μ L、500 μ L 和 1000 μ L 到各自装有一定体积甲醇的 10mL 容量瓶中，然后用甲醇定容到刻度；
- 2) 加标 SNX2112 血样稀释液（浓度：20ng/mL）：从浓度为 2 μ g/mL 加标对硝基苯酚血样溶液中移取 20 μ L 和 1980 μ L 体积甲醇混匀即可。

3.5 氟二氧嘧啶使用溶液配制

- 1) 10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL 和 200ng/mL 氟二氧嘧啶标准溶液：分别从浓度为 1 μ g/mL 氟二氧嘧啶溶液中移取 10 μ L、20 μ L、50 μ L、100 μ L 和 200 μ L 到各自装有一定体积甲醇的 1mL 容量瓶中，然后用甲醇定容到刻度；
- 2) 加标氟二氧嘧啶血样稀释液（浓度：50ng/mL）：从浓度为 2 μ g/mL 加标对硝基苯酚血样溶液中移取 25 μ L 和 975 μ L 甲醇混匀即可。

3.6 具体操作方法

在样品进行测试前，先用 100 μ g/L 利血平甲醇溶液和 1mg/L1-己烷磺酸钠溶液分别对仪器正负离子模式下的质量轴进行校正，然后取 10 μ L 测试样液上 LC-TOF 进行测试，记录实验数据和结果。

4 测试结果

4.1 对硝基苯酚实验数据分析

1) 色谱条件：A：0.1%甲酸水，B：0.1%甲酸乙腈；流量：0.3mL/min；梯度洗脱如下图

min	A%	B%	mL/min
0.000	90	10	0.300
3.500	5	95	0.300
5.000	5	95	0.300
5.500	90	10	0.300

图3 对硝基苯酚流动相梯度洗脱条件

2) 质谱条件：ESI:-3600V；Nozzle: -190V；out-plate: -50V；sk1: -18V；RFQ_{p-p}: 250V；MIR_{p-p}: 80V。

3) 对硝基苯酚进流动相后出来的质谱图

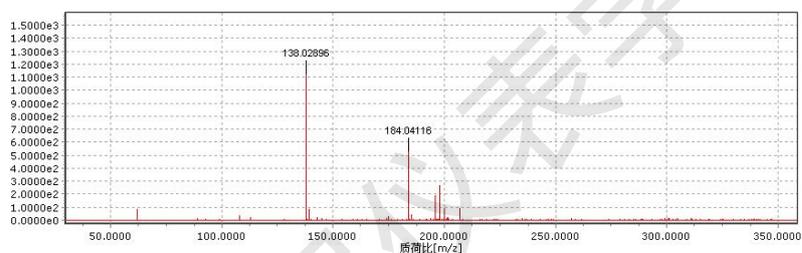
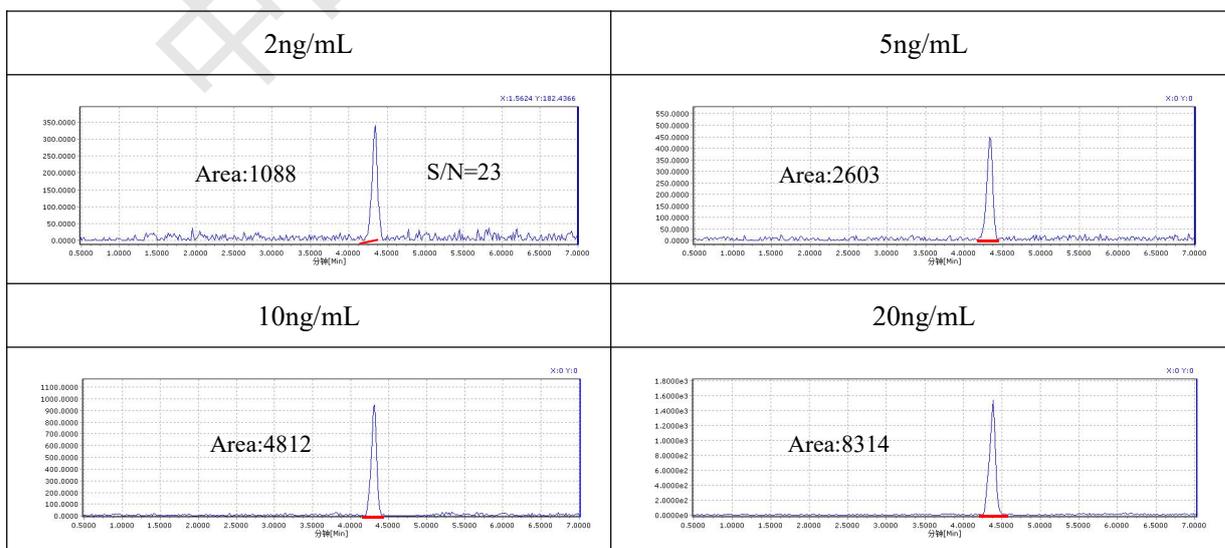


图4 对硝基苯酚进流动相后质谱图

数据分析：对硝基苯酚经过流动相后，经质谱检测可得到【M-H】⁻：138 和【M-H+HCOOH】⁻：184 两个目标峰。

4) 对硝基苯酚的校准曲线和加标回收

表二 对硝基苯酚校准曲线点和加标回收点的 MIC 图 (m/z138)



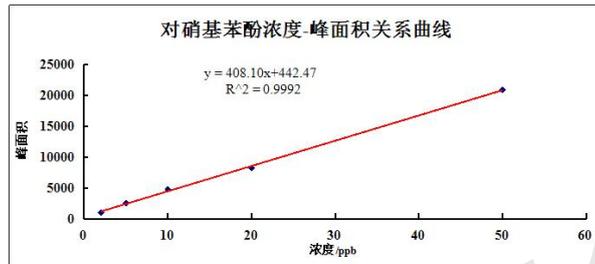
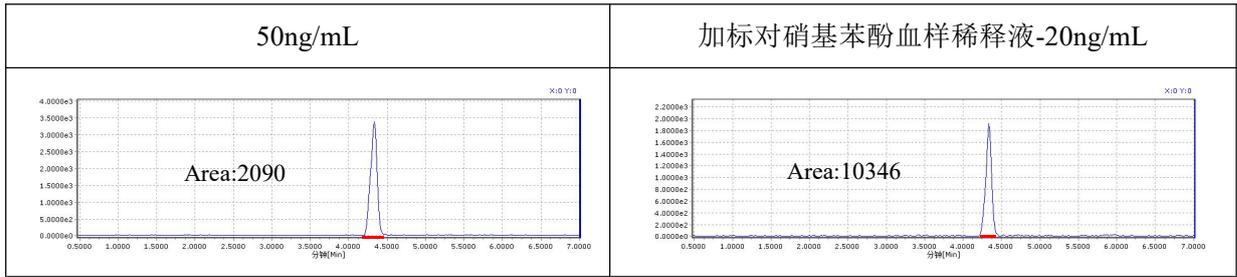


图5 对硝基苯酚校准曲线

数据分析：对硝基苯酚定量曲线最低点（2ng/mL）m/z138 的 MIC 峰信噪比约为 $350/15=23$ ；其曲线线性 R^2 为 0.9992，大于 0.99；根据 $y=408.10x+442.47$ ，带入样品信号的峰面积：10346 计算得到血清样品中对硝基苯酚的浓度为 24.27ng/mL，其回收率 $=24.27/25*100\%=120\%$ 。

4.2 乌头碱实验数据分析

1) 色谱条件：A：0.1%甲酸水，B：0.1%甲酸乙腈；流量：0.3mL/min；梯度洗脱如下图

min	A%	B%	mL/min
0.000	90	10	0.300
3.500	5	95	0.300
5.000	5	95	0.300
5.500	90	10	0.300

图6 乌头碱流动相梯度洗脱条件

2) 质谱条件：ESI:3600V；Nozzle: 110V；out-plate: 93V；sk1: 30V；RFQp-p: 1000V；MIRp-p: 250V。

3) 乌头碱进流动相后出来的质谱图

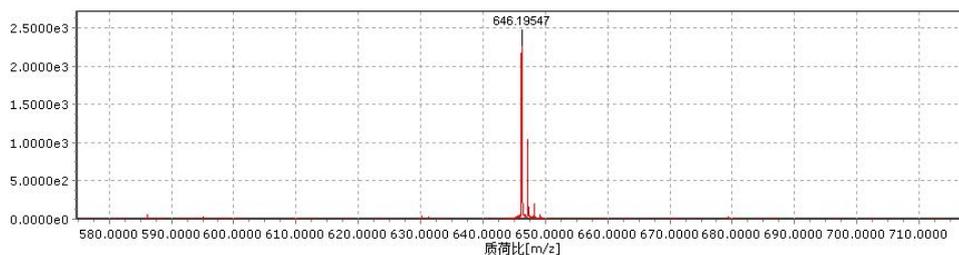


图7 乌头碱进流动相后质谱图

数据分析：乌头碱标准溶液经过流动相后，经质谱检测可得到【M+H】⁺：646 目标峰。

4) 乌头碱的校准曲线和加标回收

表三 乌头碱校准曲线点和加标回收点的 MIC 图 (m/z646)

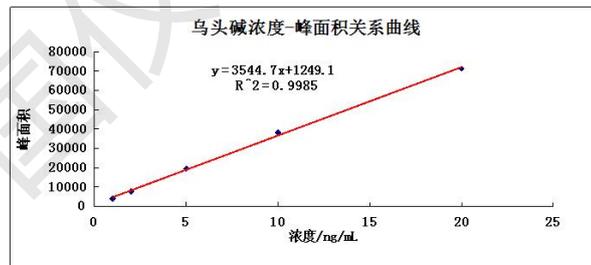
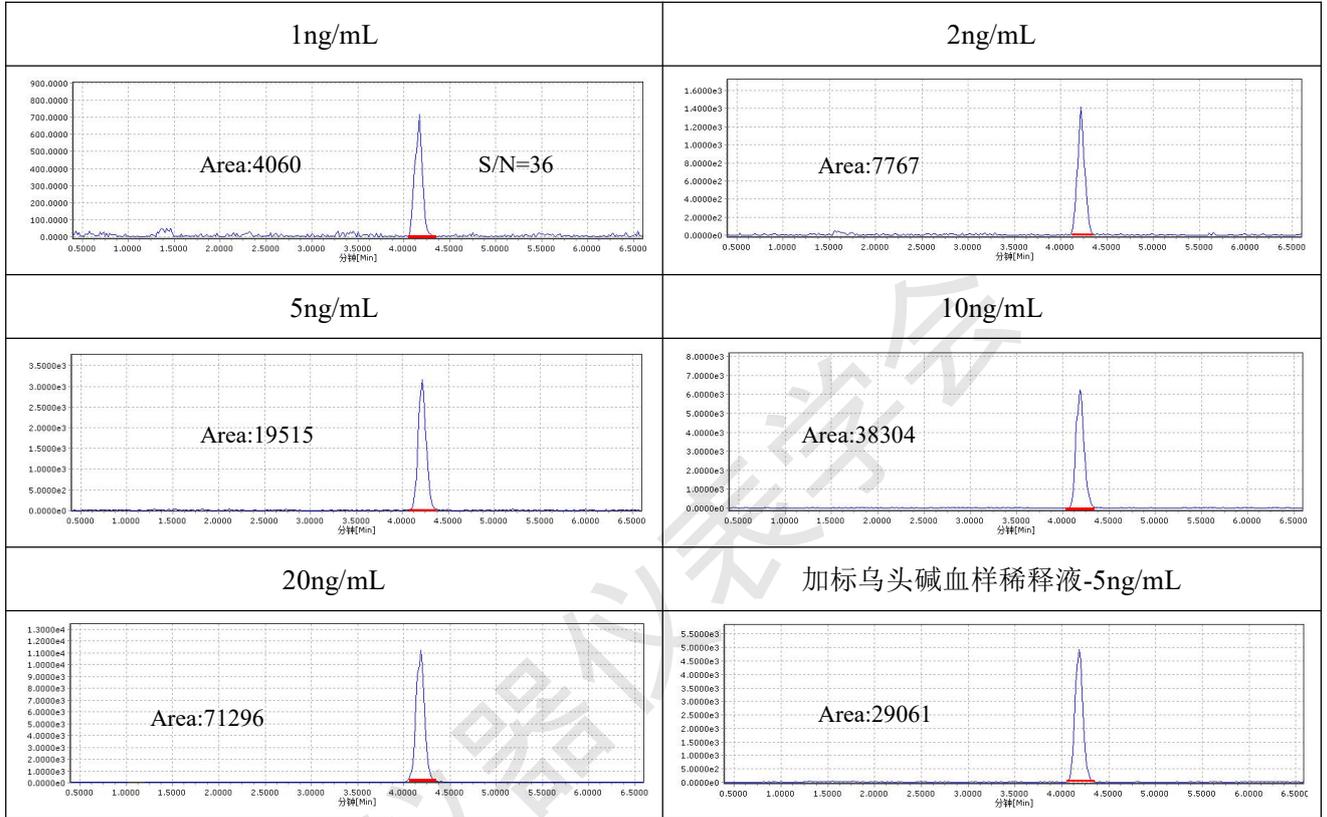


图 8 乌头碱校准曲线

数据分析：乌头碱定量曲线最低点 (1ng/mL) m/z646 的 MIC 峰信噪比约为 718/20=36，其曲线的线性 R² 为 0.9985，大于 0.99。根据 $y=3544.7x+1249.1$ ，带入样品信号的峰面积：29061 计算得到血清样品中乌头碱的含量为 7.8ng/mL，其回收率=7.8/5*100%=156%。

4.3 染料木黄酮实验数据分析

1) 色谱条件：A：0.1%甲酸水，B：0.1%甲酸乙腈；流量：0.3mL/min；梯度洗脱如下图

min	A%	B%	mL/min
0.000	90	10	0.300
3.500	5	95	0.300
6.000	5	95	0.300
6.500	90	10	0.300

图9 染料木黄酮流动相梯度洗脱条件

- 2) 质谱条件: ESI:-3600V; Nozzle: -190V; out-plate: -50V; sk1: -18V; RFQp-p: 700V; MIRp-p: 100V。
- 3) 染料木黄酮进流动相后出来的质谱图

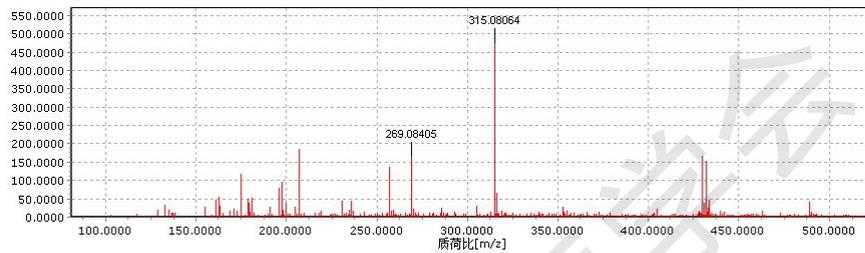


图10 染料木黄酮进流动相后质谱图

数据分析: 染料木黄酮标准溶液经过流动相后, 经质谱检测得到[M-H]:269 和 [M-H+HCOOH]:315 的目标峰。

- 4) 染料木黄酮的校准曲线和加标回收

表四 染料木黄酮校准曲线点和加标回收点的 MIC 图 (m/z315)

5ng/mL	10ng/mL
20ng/mL	50ng/mL
100ng/mL	加标染料木黄酮血样稀释液-200ng/mL

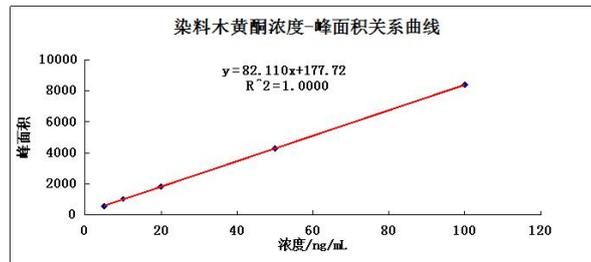
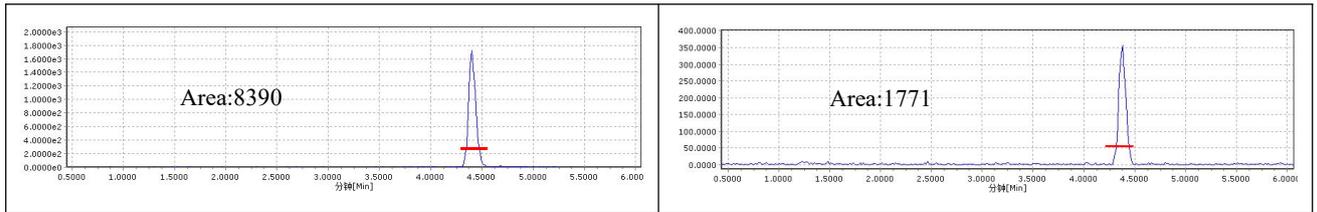


图 11 染料木黄酮校准曲线

数据分析：染料木黄酮最低浓度点（5ng/mL）m/z315 的 MIC 峰信噪比约为 96/6=16，其曲线线性 R^2 为 1，小于 0.99。根据 $y=82.110x+177.72$ ，带入样品信号的峰面积：1771 计算得到血清样品中染料木黄酮的含量为 19.4ng/mL，其回收率= $19.4/200*100\%=9.7\%$ 。

4.4 SNX2112 实验数据分析

1) 色谱条件：A：水，B：甲醇；流量：0.3mL/min；梯度洗脱如下图

min	A%	B%	mL/min
0.000	90	10	0.300
3.500	5	95	0.300
6.000	5	95	0.300
6.500	90	10	0.300

图 12 SNX2112 流动相梯度洗脱条件

2) 质谱条件：ESI:-3600V；Nozzle: -190V；out-plate: -80V；sk1: -18V；RFQp-p: 800V；MIRp-p: 200V。

3) SNX2112 进流动相后出来的质谱图

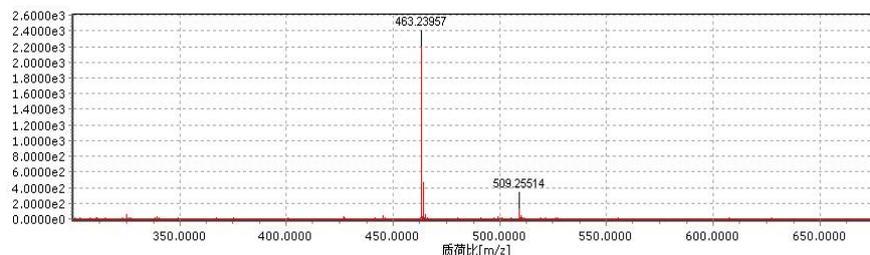


图 13 SNX2112 进流动相后质谱图

数据分析：SNX2112 标准溶液经过流动相后，经质谱检测可得到[M-H]:463 和

[M-H+HCOOH]:509 的目标峰，因液相系统未清洗干净，含有少量甲酸，故也检出有 [M-H+HCOOH]:509。

4) SNX2112 的校准曲线

表五 SNX2112 校准曲线点的 MIC 图 (m/z463)

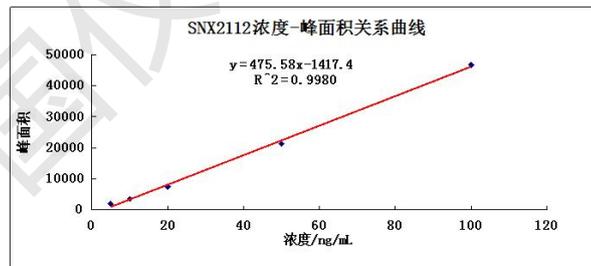
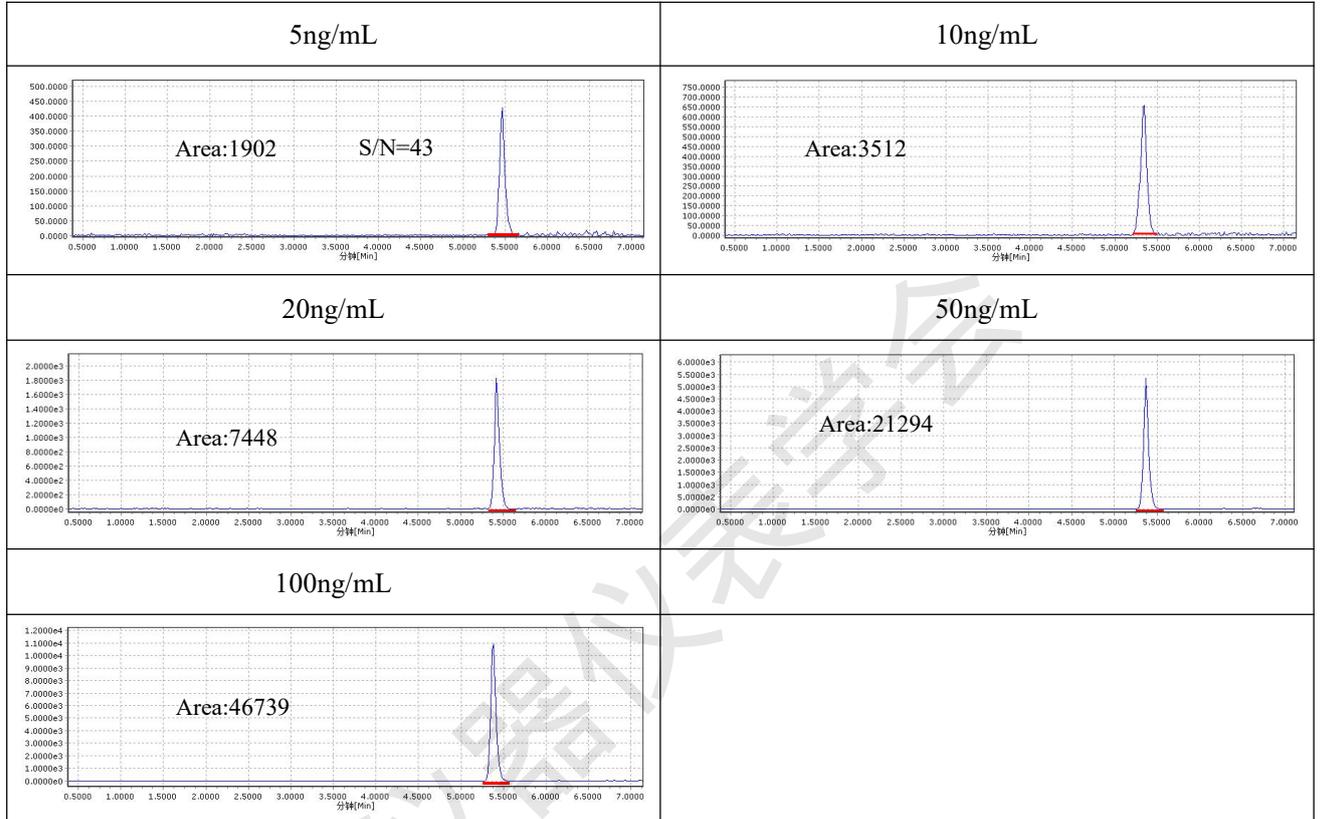


图 14 SNX2112 校准曲线

5) 加标 SNX2112 血样稀释液 (20ng/mL)

加标 SNX2112 血样稀释液 (20ng/mL) 中并未检出有 [M-H]:463 的目标离子峰，但有明显的染料木黄酮 [M-H]:269 的目标峰，见图 15。经过染料木黄酮标准溶液 (20ng/mL) 单点定量：根据 $y=1271.5x$ ，带入样品信号的峰面积计算得到血清样品中染料木黄酮的含量为 22.2ng/mL，若按加标浓度为 20 ng/mL，其回收率有 111%。

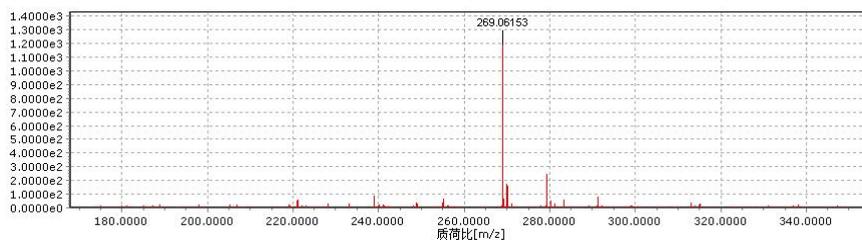
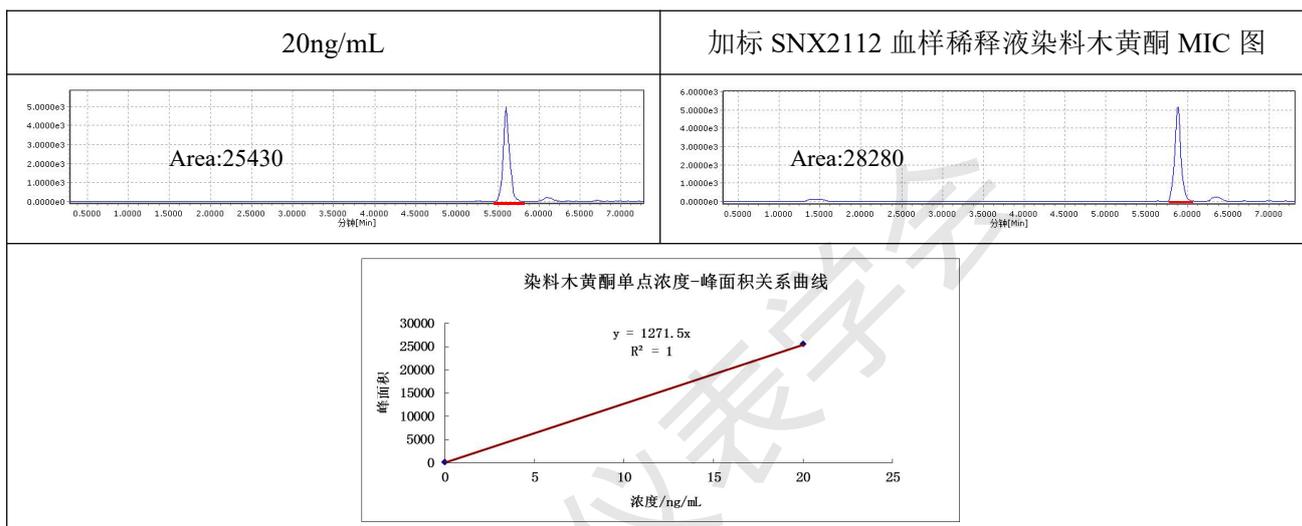


图 15 加标 SNX2112 血样稀释液 MIC 图

表六 染料木黄酮单点定量 MIC 图 (m/z269) 和校准曲线



4.5 氟二氧嘧啶实验数据分析

1) 色谱条件: A: 水, B: 甲醇; 流量: 0.3mL/min; 梯度洗脱如下图

min	A%	B%	mL/min
0.000	5	95	0.300
1.500	5	95	0.300
3.500	90	10	0.300
5.000	90	10	0.300
5.500	5	95	0.300

图 16 氟二氧嘧啶流动相梯度洗脱条件

2) 质谱条件: ESI:-3600V; Nozzle: -190V; out-plate: -50V; sk1: -18V; RFQp-p: 600V;

MIRp-p: 80V。

3) 氟二氧嘧啶进流动相后出来的质谱图

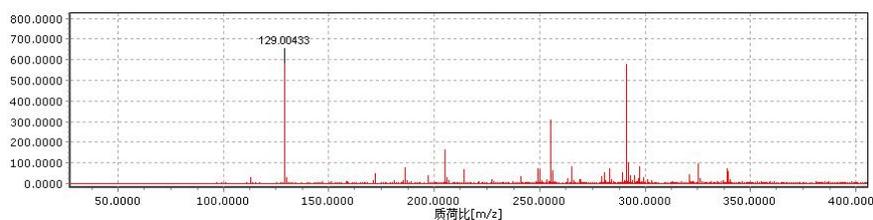


图 17 氟二氧嘧啶进流动相后质谱图

数据分析：氟二氧嘧啶标准溶液经过流动相后，经质谱检测可得到[M-H]⁻:129 目标峰。

4) 氟二氧嘧啶的校准曲线

表七 氟二氧嘧啶校准曲线点和加标回收点的 MIC 图 (m/z129)

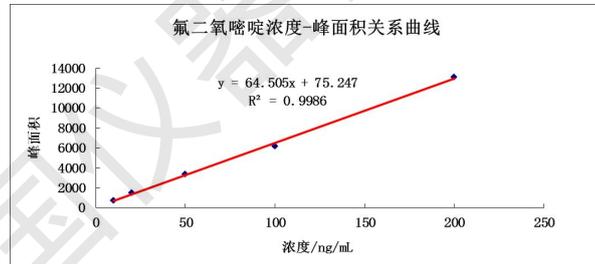
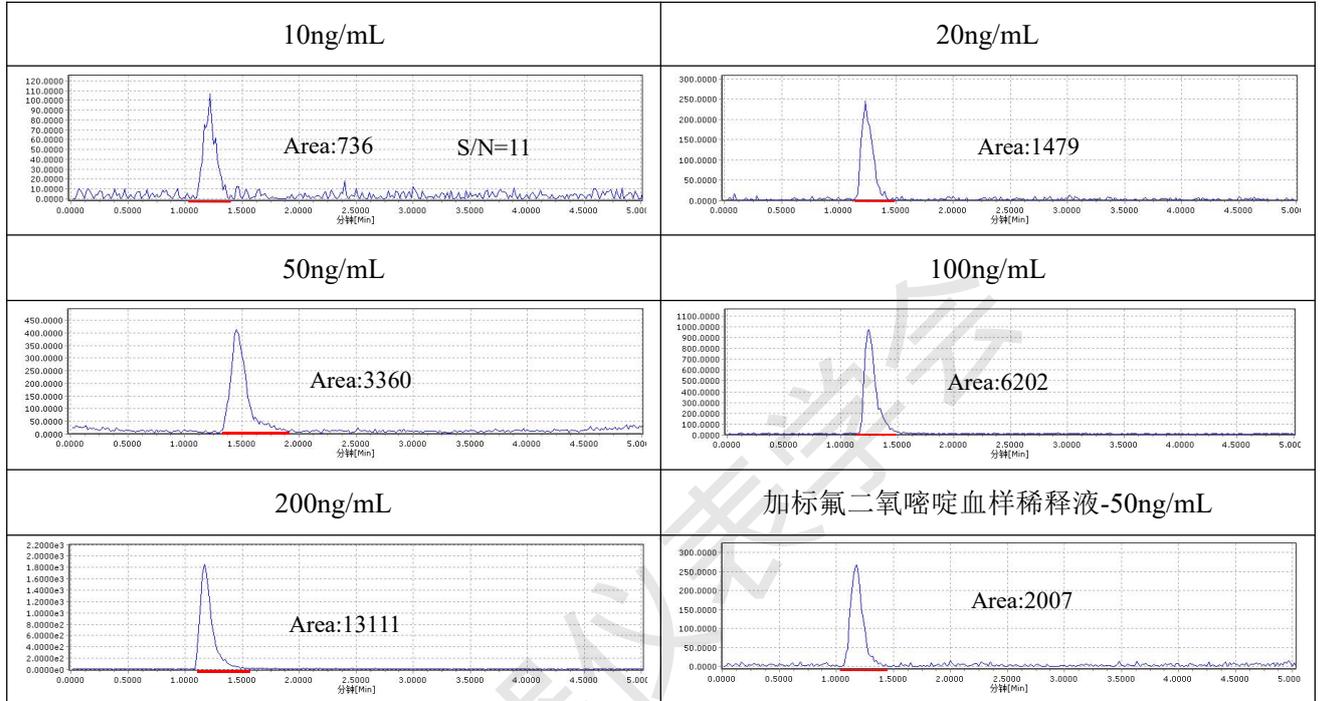


图 18 氟二氧嘧啶校准曲线

数据分析：氟二氧嘧啶最低浓度点（10ng/mL）m/z129 的 MIC 峰 S/N=110/10=11，其曲线线性 R^2 为 0.9986，大于 0.99。根据 $y=64.505x+75.247$ ，带入样品信号的峰面积:2007 计算得到血清样品中氟二氧嘧啶的浓度为 30ng/mL，其回收率=30/50*100%=60%。

5 测试结论

5.1 对硝基苯酚（4-Nitrophenol）

- 1) 在流动相中含有甲酸条件下，对硝基苯酚在负离子模式下除了产生主峰离子【M-H】⁻: 138 外，还会络合甲酸分子形成【M-H+HCOOH】⁻: 184。
- 2) 定量曲线最低点（2ng/mL）m/z138 的 MIC 峰信噪比约为 23，满足定量限大于 10 要求。

3) 由 2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL 和 50ng/mL 建立的曲线其线性 R^2 为 0.9992, 大于 0.99, 根据 $y=408.10x+442.47$, 对加标对硝基苯酚血清样品稀释液 (理论值为 20ng/mL) 进行定值为 24.27ng/mL, 其回收率为 120%。

5.2 乌头碱 (Aconitine)

- 1) 在正离子模式下, 乌头碱产生主要特征峰离子为 $【M+H】^+$: 646。
- 2) 定量曲线最低点 (1ng/mL) $m/z646$ 的 MIC 峰信噪比约为 $718/20=36$, 满足定量限大于 10 要求。
- 3) 由 1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、10ng/mL 和 20ng/mL 建立的曲线其线性 R^2 为 0.9985, 大于 0.99, 根据 $y=3544.7x+1249.1$, 对加标乌头碱血清样品稀释液 (理论值为 5ng/mL) 进行定值为 7.8ng/mL, 其回收率为 156%, 回收率偏高。

5.3 染料木黄酮 (Genistein)

- 1) 在流动相中含有甲酸条件下, 染料木黄酮在负离子模式下产生主峰离子为 $【M-H+HCOOH】^-$: 315, 另外还含有 $【M-H】^-$: 269。
- 2) 定量曲线最低点 (5ng/mL) $m/z315$ 的 MIC 峰信噪比约为 16, 满足定量限大于 10 要求。
- 3) 由 5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL 和 100ng/mL 建立的曲线其线性 R^2 为 1, 大于 0.99, 根据 $y=82.110x+177.72$, 对加标染料木黄酮血清样品稀释液 (理论值为 200ng/mL) 进行定值为 19.4ng/mL, 其回收率为 9.7%, 回收率偏低原因待下一步沟通分析。

5.4 SNX2112

- 1) 在流动相中含有甲酸条件下, SNX2112 在负离子模式下较易与甲酸分子络合形成 $【M-H+HCOOH】^-$:509 和 $【M-H+2HCOOH】^-$:551, 因而将流动相改为 A 为水, B 为甲醇, 在该流动相下 SNX2112 特征离子峰为 $【M-H】^-$: 463。
- 2) 定量曲线最低点 (5ng/mL) $m/z463$ 的 MIC 峰信噪比约为 43, 满足定量限大于 10 要求。
- 3) 由 5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL 和 100ng/mL 建立的曲线其线性 R^2 为 0.9980, 大于 0.99。对加标 SNX2112 血样稀释液 (理论值为 20ng/mL) 测试未检出有 $m/z463$, 但有很强的染料木黄酮 $m/z269$ 的信号峰。通过同浓度 (20ng/mL) 染料木黄酮标准溶液的单点定值, 其中染料木黄酮的含量为 22.2ng/mL, 若按其理论值为 20ng/mL 来计算, 回收率约为 111%。

5.5 氟二氧嘧啶 (Fluorouracil)

- 1) 在流动相 A 为水, B 为甲醇条件下, 氟二氧嘧啶在负离子模式下产生主峰离子为 $【M-H】^-$: 129。

- 2) 定量曲线最低点 (10ng/mL) m/z129 的 MIC 峰信噪比约为 11, 满足定量限大于 10 要求。
- 3) 由 10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL 和 200ng/mL 建立的曲线其线性 R^2 为 0.9986, 大于 0.99, 根据 $y=64.505x+75.247$, 对加标氟二氧嘧啶血清样品稀释液 (理论值为 50ng/mL) 进行定值为 30ng/mL, 其回收率为 60%, 回收率偏低原因待下一步沟通分析。

目标物	曲线最低点 S/N	校准曲线相关系数 R^2	血样加标回收率
对硝基苯酚	23	0.9992	120%
乌头碱	36	0.9985	156%
染料木黄酮	16	1	9.7%
内标 SNX2112	43	0.9980	未检出, 但染料木黄酮回收率为 111% (理论值按 20ng/mL 算)
氟二氧嘧啶	11	0.9986	60%
备注		1. 定量限信噪比要求: >10 ; 2. R^2 要求: >0.99 3. 回收率要求: 70%~130%。	