

# Nexera MX 系统用于人血浆中右美沙芬及其代谢物的分析

## LCMSMS-360

**摘要：** 本文建立了一种使用 Nexera MX 超高效平行液相色谱和三重四极杆质谱联用系统用于超快速检测人血浆中右美沙芬及其代谢产物的分析方法。同传统 LCMS 分析方法相比较，平行液相色谱质谱联用的方法提高质谱使用效率，相同时间内分析通量可提高近一倍。在本例中，右美沙芬及其代谢物 O-去甲右美沙芬在血浆浓度 0.25~500 ng/mL 范围内线性、重复性和回收率结果良好，数据表明在 Nexera MX 系统上开发的该方法可以用于人血浆中右美沙芬及其代谢物的分析方法建立提供参考。

**关键词：** 平行液相 三重四极杆质谱 右美沙芬 人血浆

常规液质联用分析中，由于受到 HPLC 或 UHPLC 分析方法的限制，质谱的利用率不能发挥至最大，致使分析通量受限。岛津利用其 Nexera X2 优良的 UHPLC 平台，搭载 MXDST 技术开发出充分提高 LCMS 使用效率的超高效平行液相色谱质谱联用系统，可为使用超快

速分析的用户提供极富性价比的仪器选择。

本文使用该系统建立了中枢性镇咳药右美沙芬及其代谢物 O-去甲右美沙芬的分析方法，可供学习了解 Nexera MX 系统工作方式和相关分析检测方法建立参考使用。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津平行液相 - 质谱分析系统。具体配置为 LC-30AD×4（输液泵），DGU-20A<sub>5</sub>×2（在线脱气机），SIL-30ACMP（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱，含 FCV-32AH 流路切换阀），CBM-20A（系统控制器），LCMS-8060（三重四极杆质谱仪），LabSolutions Ver. 5.92（色谱工作站软件）。

### 1.2 化合物信息

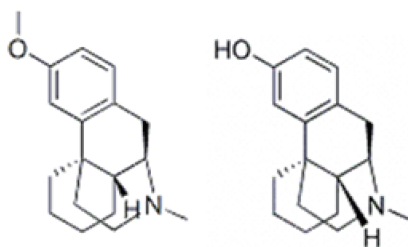


图1 右美沙芬（左）和O-去甲右美沙芬

表1 化合物信息

化合物	CAS#	分子式	MRM 通道	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
右美沙芬	125-71-3	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO	272.10>215.00*	-12	-25	-10
			272.10>171.00	-12	-40	-30
O-去甲右美沙芬	125-73-5	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO	258.10>156.95*	-16	-39	-30
			258.10>198.95	-16	-28	-20

\*定量离子通道

### 1.3 分析条件

液相色谱条件:

色谱柱: InertSustain C8 2.1 mm I.D.  
×50 mm L., 5 μm

柱温: 40°C

进样量: 1 μL

流动相: A相 -0.1% 甲酸水溶液; B相 - 乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 15%,

流速: 0.5 mL/min

洗脱程序见表 2

表2 流路1梯度洗脱程序

#	Time	Flow	A. Conc.	B. Conc.
1	Initial	0.5	85.0	15.0
2	0.20	0.5	85.0	15.0
3	1.10	0.5	10.0	90.0
4	1.25	0.5	10.0	90.0

表 3 流路 2 的冲洗平衡程序

#	Time	Flow	A. Conc.	B. Conc.
1	Initial	0.5	10.0	90.0
2	0.15	0.5	10.0	90.0
3	0.16	0.5	85.0	15.0
4	1.25	0.5	85.0	15.0

质谱条件:

离子源: ESI

干燥气流速: 3.0 L/min

工作模式: MRM (+)

接口温度: 300°C

雾化气流速: 3.0 L/min

脱溶剂管温度: 250°C

加热气流速: 10.0 L/min

加热模块温度: 400°C

### 1.4 样品制备

工作溶液配制:

取右美沙芬和 O- 去甲右美沙芬储备液, 以甲醇 - 水溶液 (1:1,V/V) 稀释为浓度分别为 10000、5000、2000、1000、500、200、100、50、20、10 和 5 ng/mL 系列标准溶液。

内标溶液配制:

取 D3- 右美沙芬和 D3-O- 去甲右美沙芬储备液, 以甲醇 - 水溶液 (1:1,V/V) 稀释为 500 ng/mL 的内标溶液备用。

血浆样品制备:

取人空白血浆 95 μL, 加入系列浓度的工作溶液 5 μL, 制成含有右美沙芬和 O- 去甲右美沙芬浓度为 500、250、100、50、25、10、5、2.5、1、0.5 和 0.25 ng/mL 的血浆样品, 涡旋混匀后备用。

血浆样品处理:

取血浆样品 100 μL, 加入内标溶液 5 μL, 振荡后加入沉淀剂 (甲醇 - 乙腈, 1/1, V/V) 300 μL, 涡旋振荡 1 min, 再经 10000 g 低温离心后取上清液 300 μL, 加入超纯水 300 μL, 混合均匀, 上机分析。

## 结果与讨论

### 2.1 NexeraMX 平行液相系统

在传统 LCMS 分析中，LC 梯度洗脱方式最为常用，梯度洗脱过程中冲洗和再平衡阶段质谱不再采集有用数据，属于质谱“空闲时间”。在 UHPLC 作为质谱前端液相的方法中，空闲时间所占总方法中 LC 运行时间的比例更大，约占 30~50%。大批量样品的连续分析中，质谱的空闲时间显著影响了分析通量的提高。

Nexera MX 系统通过对原有 Nexera X2 UHPLC 的升级，在原系统上增加一套独立流路，使两流路通过共用自动进样器的方式实现交替进样。MX 系统独有的 MXDST 技术，实现了流路 1 在分析的同时流路 2 在冲洗和平衡，在液相梯度完成并且目标峰出峰结束后便可交替流路开始下一针的分析。整个批量分析过程通过两条流路的不断交替进样和分析来完成，有效利用质谱空闲时间使得整体分析时间利用率提高将近 100%，以相对微小的成本增加来翻倍提升分析通量是极高性价比的选择。

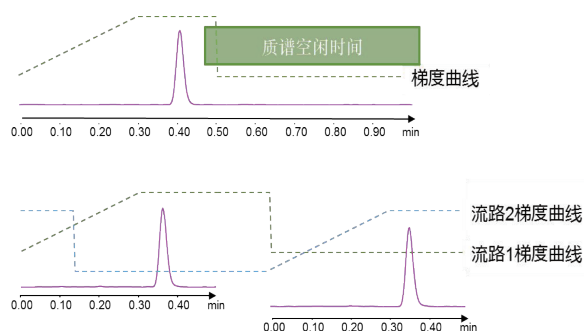


图2 常规液相分析与平行液相分析



图3 Nexera MX系统及其工作方式

### 2.2 专属性和灵敏度考察

以空白基质样品和空白基质样品配制浓度为 0.05 ng/mL 的基质加标样品考察分析方法的专属性和灵敏度，按分析条件进样结果如图 4~5 所示。

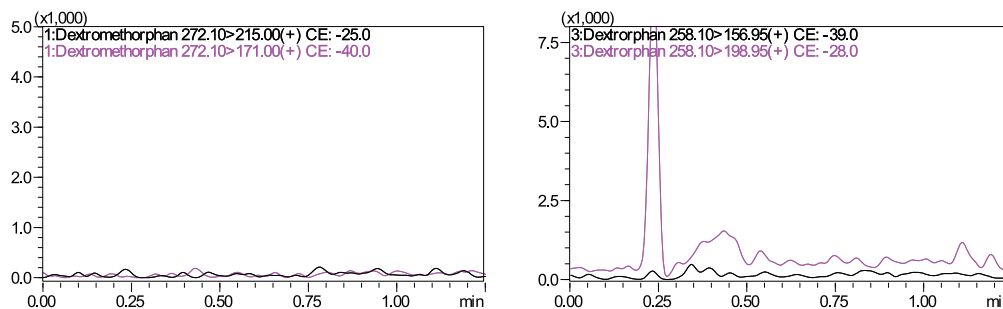


图4 空白血浆样品MRM色谱图

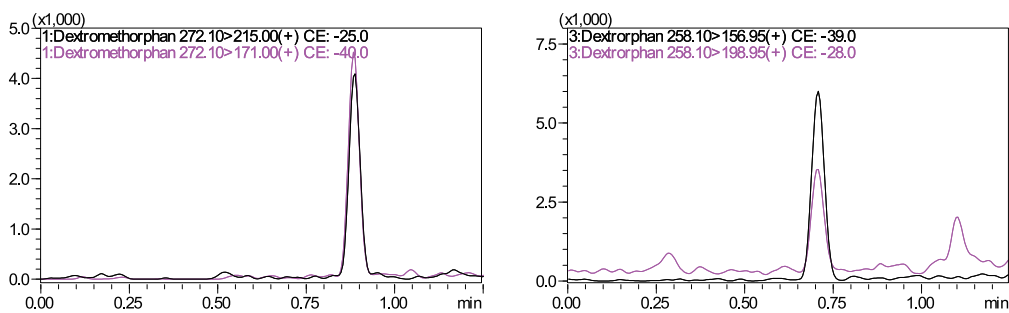


图5 浓度为0.05 ng/mL的右美沙芬（左）和O-去甲右美沙芬（右）基质样品MRM色谱图

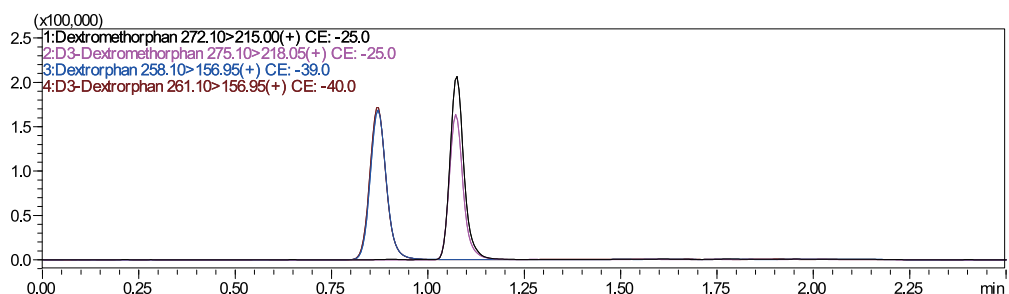


图6 常规LCMS方法下右美沙芬（黑）和O-去甲右美沙芬（红）MRM色谱图（2.5 ng/mL）

### 2.3 基质效应

按照“样品制备”项下取右美沙芬和 O- 去甲右美沙芬工作溶液，加入内标溶液，分别以沉淀剂和经过蛋白沉淀后的空白血浆稀释，使成浓度为 0.05、1 和 50 ng/mL 的溶液标样和空白基质加标样，分别进样分析，以空白基质加标样峰面积与内标峰面积比值对溶液标样峰面积与内标峰面积比值做比来考察基质效应，所得内标归一化基质效应因子在高、中、低三个浓度上的结果如表 4 所示。结果表明，该方法下，右美沙芬和 O- 去甲右美沙芬无显著基质效应影响。

表4 基质效应考察结果

化合物	内标归一化基质效应因子		
	0.05 ng/mL	1.00 ng/mL	50.0 ng/mL
右美沙芬	104.25	102.13	102.03
O-去甲右美沙芬	98.87	99.98	101.59

### 2.4 标准曲线

处理好的血浆加标样品进样分析，内标法以峰面积比对浓度比做曲线，权重为  $1/C^2$ ，曲线及参数见下图所示。

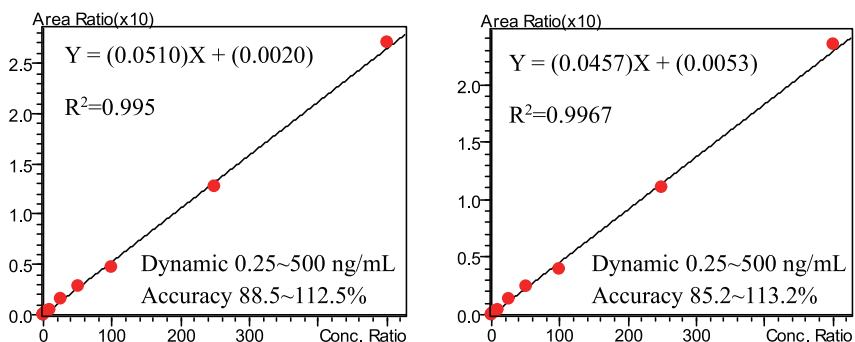


图7 右美沙芬和O-去甲右美沙芬的标准曲线

## 2.5 重复性

平行液相色谱系统中有两套独立的液相流路，两流路之间的差异会影响系统的重复性和结果的可靠性。为了验证 NexeraMX 系统的重复性，以人空白血浆按照“血浆样品制备”项下所述制备浓度为 0.50 和 25.0 ng/mL 的 QC 样品，经前处理后进行分析，两条流路交替运行的连续 6 针分析结果如表 5 所示，结果表明右美沙芬及其代谢产物 O-去甲右美沙芬的保留时间和面积重复性在流路 1 和流路 2 之间平行分析时表现良好。

表5 右美沙芬及O-去甲右美沙芬重复性结果 (RSD%, n=6)

#	右美沙芬						O-去甲右美沙芬					
	保留时间			峰面积			保留时间			峰面积		
	S1	S2	合计	S1	S2	合计	S1	S2	合计	S1	S2	合计
QC-1	0.11	0.06	1.01	0.71	0.48	5.06	0.13	0.06	0.63	0.60	1.87	1.62
QC-2	0.06	0.07	0.97	1.07	0.48	3.67	0.07	0.07	0.66	0.42	0.63	0.53

S1 流路1; S2 流路2

## 2.6 回收率

取空白血浆按照“血浆样品制备”方法加入右美沙芬配制成浓度分别为 0.5 和 25.0 ng/mL 的 QC 样品，经处理后分析，计算回收率如表 6 所示。

表6 右美沙芬和O-去甲右美沙芬的回收率分析结果 (n=6)

	右美沙芬		O-去甲右美沙芬	
	Rec-1	Rec-2	Rec-1	Rec-2
目标浓度 (ng/mL)	0.5	25.0	0.5	25.0
测得浓度 (ng/mL)	0.517	25.343	0.514	24.737
回收率(%)	103.3	101.4	102.8	98.9
标准偏差(%)	4.02	0.47	4.92	0.60

## 2.7 Nexera MX 的效率及性价比

本例中，使用 Nexera MX 系统完成一个样品进样分析约用时 1.3 min，而常规的 LCMS 分析方法为 2.5 min，以一个分析批 80 针分析为例计算，使用 MX 系统可在 1.73 h 完成工作，而常规 LCMS 进样相同数量的样品耗时为 3.33 h，MX 系统对工作效率的提升显著。另外，MX 系统可以通过常规的 LCMS 系统升级获得，硬件方面通过增加两台 LC-30AD 输液泵和流路切换阀及相关管路来实现，相比较购买两套液质联用仪来提升工作效率的方法节省了大量开支，是相关需要超快速液质联用分析实验室极高性价比的选择。

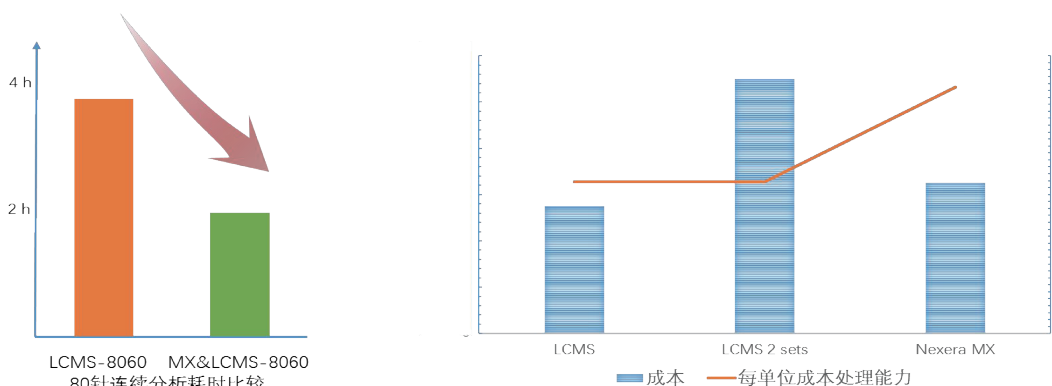


图8 分析耗时与性价比比较

## ■ 结论

本文使用 Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统建立人血浆中右美沙芬及其代谢物 O- 去甲右美沙芬的 LCMSMS 分析方法，同传统液质联用分析方法相比，平行液相色谱系统提高了后端质谱利用率，两根色谱柱交替分析和平衡的方式节省总分析时间将近 50%，另外分析结果表明新方法具有稳定可靠、快速高效的特点，可以供相关生物分析实验参考。Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统可供具有大批量样品分析需求并且使用超快速液质联用分析方法的领域使用。