

岛津Q-TOF系统应用文集 (医药篇)



前言

自 J. J. Thomson 开创性地将质谱仪引入科学界以来，质谱技术历经了波澜壮阔的发展历程，多位科学家的卓越贡献更是为其赢得了诺贝尔奖的殊荣。特别是近年来，随着田中耕一与 Fenn 等先驱在软电离技术上的突破，质谱技术迎来了前所未有的飞跃，新型质谱仪器如雨后春笋般涌现，极大地拓宽了其在科学研究中的应用边界。

在药品安全日益成为全球关注焦点的背景下，药品检测与药物研发领域对分析手段的需求日益严苛。面对样品量大、成分复杂、含量微量的挑战，质谱技术凭借其快速性、准确性及高灵敏度，在药物分析、药物代谢等关键领域展现出不可替代的优势，成为科研人员手中不可或缺的分析利器。

质谱技术的革新步伐从未停歇，高端质谱仪器的不断涌现，不仅提升了分析性能，也推动了科研方法的革新。其中，Q-TOF 质谱仪作为医药研究领域的璀璨明珠，其能够精确测定母离子与子离子的质量数，为未知化合物的结构鉴定提供了强有力的支持，尤其是在药物质量控制及代谢产物识别方面展现出卓越的性能。同时，TOF 技术的持续优化，如岛津引入的 UF-grating 离子提取技术与 UF-FlightTube 精准温控飞行管等创新，进一步提升了仪器的质量准确度与分辨率，为科学研究注入了新的活力。

在此背景下，LCMS-9030/9050 作为岛津倾力打造的研究级四极杆-飞行时间质谱仪，不仅继承了岛津品牌一贯的高性能与耐用性，还融入了先进的设计理念与人性化的操作界面，旨在为用户提供更加高效、精准的分析解决方案。为了充分展示这款质谱仪在医药领域的广泛应用潜力，岛津中国分析中心已基于该仪器平台开展了一系列应用数据开发，并编纂成《岛津 Q-TOF 系统应用文集（医药篇）》，该文集详尽阐述了 Q-TOF 质谱在化学药物杂质分析、中药材及配方颗粒鉴定、生物大分子药物研究、化妆品及保健品安全评估、药用辅料与医疗包材分析以及临床研究等多个细分领域的具体应用案例，旨在为相关领域的研究人员提供宝贵的参考与启示。

本文集旨在促进学术交流与知识共享，其内容仅供学习与研究之用，不涉及任何商业目的。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第 1 章 质谱技术革新：Q-TOF 引领医药分析新优势	1
1.1 质谱技术“飞跃式”发展.....	1
1.2 走进 Q-TOF 的世界	1
1.3 HPLC-Q-TOF 联用技术在各医药领域的解决方案	2
第 2 章 Q-TOF 在药物中有关物质杂质鉴定的应用	7
2.1 SEC-RPLC-QTOF MS 法鉴定注射剂中聚合物杂质	8
2.2 缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质分析.....	17
2.3 定性分析宫缩抑制剂阿托西班中的多聚体杂质.....	23
2.4 定性分析左卡尼汀中未知杂质.....	30
2.5 布美他尼中 N-亚硝基布美他尼的测定	35
第 3 章 Q-TOF 在中药材及中药配方颗粒的应用	40
3.1 石椒草配方颗粒成分定性鉴定.....	41
3.2 SFE-LCMS-QTOF 联用测定补骨脂主要成分	46
3.3 全谱二维液相色谱与 Q-TOF 联用分析不同产地当归活性成分	53
3.4 全谱二维液相色谱与 Q-TOF 联用于防风饮片的指纹图谱研究.....	60
第 4 章 Q-TOF 在化妆品及保健品中非法添加化合物快速筛查的应用	68
4.1 LCMS-9050 快速筛查保健品中非法添加物.....	69
4.2 LCMS-9030 快速筛查化妆品中 214 种风险物质	75
第 5 章 Q-TOF 在生物大分子药物的应用	88
5.1 曲妥珠单抗药物肽图分析.....	89
5.2 曲妥珠单抗游离 N 糖的分离与鉴定.....	95
5.3 寡核苷酸分子量测定和序列确认.....	100
5.4 多肽类药物生长抑素中的聚集体定性分析.....	104
5.5 mRNA 药物加帽的分析.....	111
第 6 章 Q-TOF 在药用辅料及医疗包材的应用	118
6.1 医疗器械一次性双工冲洗盒管材中可沥滤物定性鉴定流程	119
6.2 定量检测医用胶塞中 13 种亚硝胺基因毒性杂质含量	128
第 7 章 Q-TOF 在临床研究中的应用	133
7.1 前列腺癌生物标志物筛选.....	134
7.2 4in1 组学技术对小鼠动脉粥样硬化的代谢组和脂质组学研究.....	140
7.3 人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠初步代谢机理研究.....	148
7.4 基于在线变相聚焦-SFE-SFC-MS 技术大鼠血浆脂质组学研究.....	155

第 1 章 质谱技术革新：Q-TOF 引领医药分析新优势

1.1 质谱技术“飞跃式”发展

自 20 世纪 60 年代气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 诞生以来, 质谱分析领域迎来了重大突破。然而, 面对自然界中广泛存在的强极性、低挥发性及低稳定性化合物, GC-MS 的应用受到了一定限制。为克服这一难题, 科学家们将目光投向了液相色谱与质谱的联用, 即高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS), 这一技术专为分析上述难题化合物而设计。

随着时间的推移, 特别是进入 20 世纪 60 年代末期, 一项关键技术——大气压电离 (API) 技术中的电喷雾电离 (ESI) 得到了广泛应用。ESI 技术的出现, 极大地改善了液相色谱样品向质谱转移的效率与稳定性, 使得 HPLC-MS 技术能够更高效地分析复杂样品中的微量成分。

到了 20 世纪 90 年代, 质谱技术再次迎来革新, 飞行时间质谱 (TOF-MS) 因其出色的性能开始受到广泛关注。TOF-MS 以其高分辨率、高质量精度和快速扫描速度等优势, 迅速成为质谱分析领域的新宠。更重要的是, TOF-MS 与包括液相色谱在内的多种分析技术联用, 不仅拓宽了质谱分析的应用范围, 还极大地提高了分析效率和准确性, 成为现代科学研究中不可或缺的工具之一。

LC-MS 技术, 特别是 HPLC 与 TOF-MS 的联用, 经过数十年的发展, 已经取得了显著进步, 为分析化学领域带来了革命性的变化。这一技术不仅解决了传统质谱分析难以应对的难题, 还推动了生命科学、药物研发、环境监测等多个领域的快速发展。



图 1. Q-TOF 仪器 (左: LCMS-9030; 右: LCMS-9050)

1.2 走进 Q-TOF 的世界

利用离子从离子源到达检测器的时间不同达到区分不同质荷比的效果, 这就是飞行时间分质谱的原理。离子受到加速电压的作用离开离子源后在一个无场区域内飞行直至抵达检测器, 各种质荷比的离子接受相同动能, 由于它们的质量不同, 因而速度有差异。

Q-TOF 质谱仪主要是由离子源、质量分析器 (四极杆、碰撞池、飞行管)、检测器等组成。

在液质联用仪中, 我们常用到的离子源有电喷雾离子源 (ESI)、大气压化学电离源 (APCI)、双离子源 (DUIS) 等。近几年, 还开发了诸如微流量离子源 (Micro-ESI), 为 Q-TOF 提供了微流分析的功能; 原位探针电喷雾离子源 (PESI), 用探针采集微量样品后直接离子化, 无需对样品进行复杂预处理和液相分离条件设置, 使得药物样品的分析更加方便和快捷。



图 2. Q-TOF 常见离子源

在质谱仪的精密构造中，质量分析器占据着无可替代的核心地位。在众多质量分析器类型中，四极杆、飞行时间（TOF）和离子阱各具特色，而它们之间的巧妙组合更是孕育出了功能多样的质谱仪器家族。在这个庞大的家族中，岛津 TOF 质谱以其独特的 UF-accumulation™ 离子累积技术（图 3a）脱颖而出。想象一下，在 TOF 质谱内部，UF-accumulation™ 技术如同一位精明的调度员，在碰撞池中精心组织离子的累积。这个过程就像是在为一场盛大舞会准备嘉宾，每个离子都被细心地引导到最佳位置，等待着它们的“出场”时刻。当碰撞室中的离子释放与正交加速器的离子发射达到精准同步时，这场“舞会”便正式拉开序幕。这种同步释放与发射的机制，不仅提升了离子的利用率，还确保了质谱分析的准确性和稳定性。就像一场精心编排的交响乐，每一个音符（离子）都在正确的时刻响起，共同谱写出物质微观世界的壮丽乐章。

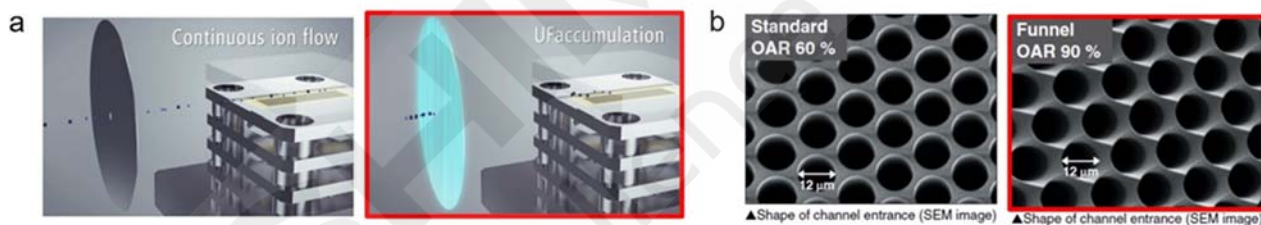


图 3. TOF 创新技术 (a. UF-accumulation™ 离子累积; b. Funnel MCP 检测器)

在质谱仪的末端，检测器如同一位敏锐的哨兵，负责捕捉并记录离子的存在与强度。岛津 Q-TOF 配备了 Funnel MCP 微通道板检测器（图 3b），这一设计巧妙地借鉴了漏斗原理，通过增大开口面积，使得更多离子能够顺利进入检测区域。与传统的电子倍增器相比，Funnel MCP 不仅提高了离子的通过率，还将离子利用率从 60% 提升至 90%，从而实现了灵敏度的飞跃式提升。

综上，Q-TOF 质谱仪凭借对离子源、质量分析器及检测器等核心硬件的持续创新，实现了对复杂样品的高效且精准分析，并深入应用于科研临床探索、药物成分分析等多个关键领域，展现了其强大的分析能力和广泛的价值。

1.3 HPLC-Q-TOF 联用技术在各医药领域的解决方案

在医药领域，Q-TOF 质谱技术灵活应对天然产物、药代动力、杂质鉴定及代谢组学等需求。针对复杂基质多目标物，岛津 4in1 在线分析系统，即全谱二维液相色谱联合 Q-TOF (LCMS-9050)，通过特色串联 HILIC 与 RPLC 技术，一次进样可实现从低极性到高级性目标物的分离，并且可节省 3/4 的样品量和总分析时间；

生物惰性液相系统解决生物药吸附残留问题；二维杂质鉴定系统助力杂质分离；超临界流体色谱操作便捷、自动化程度高、前处理配置丰富；探针电喷雾实现在线原位分析；成像质谱显微镜则提供组分空间分布的可视化，这些技术共同推动了医药分析的高效与精准（图 4）。

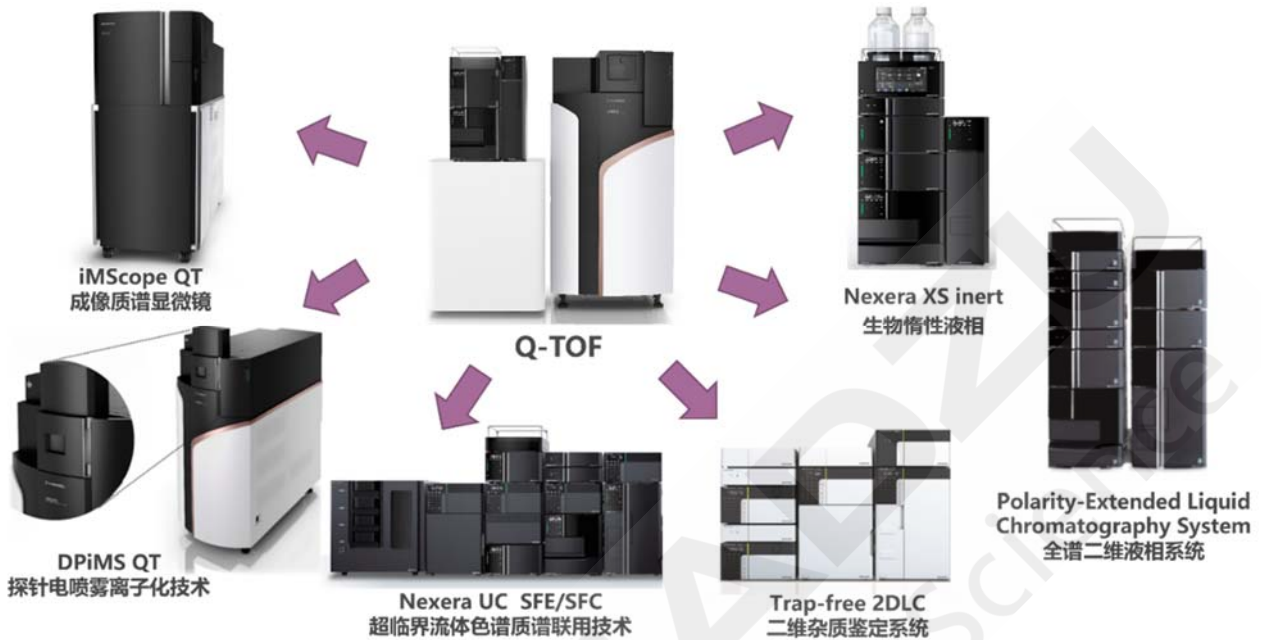


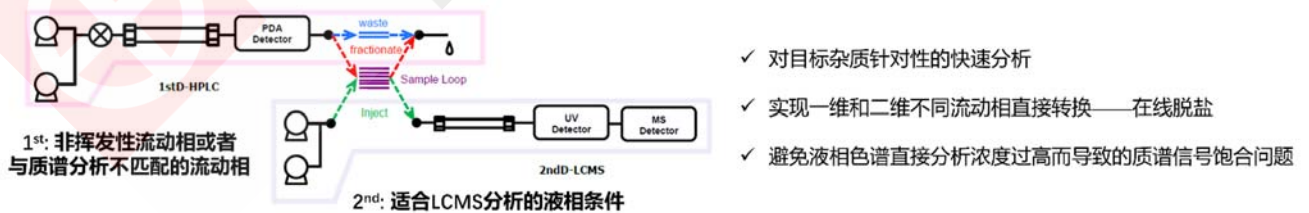
图 4. Q-TOF 灵活扩展单元

1.3.1 药物杂质分析

在制药行业中，确保原料药的纯净度是保障药品安全性和有效性的重要前提。随着法规标准的提升，传统的杂质检测方法已难以满足需求。2D-LCMS-QTOF 技术为制药行业提供一种高效、精确的杂质检测解决方案。

通过结合两种不同性质的色谱柱，实现了复杂混合物的高效分离。第一维色谱柱负责初步分离，将主要成分和其他杂质分开；第二维色谱柱则对通过切换阀引入过来的，一维色谱中的目标色谱峰进行进一步的详细分离。这种组合方式显著提高了分离效率，尤其是在处理复杂基质的样品时表现出色。

此外，四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF) 具有高分辨率和高灵敏度的特点，能够准确检测和鉴定微量杂质。QTOF 通过测定精确质量数，获得丰富的结构信息，进一步帮助研究人员确定杂质的化学组成和结构。



- ✓ 对目标杂质针对性的快速分析
- ✓ 实现一维和二维不同流动相直接转换——在线脱盐
- ✓ 避免液相色谱直接分析浓度过高而导致的质谱信号饱和问题

图 5. Trap free 2D-LCMS 流路及优势

1.3.2 中药成分分析

中药是一个非常复杂的体系，含有的化学成分往往种类繁多、结构复杂、含量较低，可能部分稳定性还差。采用常规方法鉴定中药活性成分，需进行大量提取、分离、纯化后，再进行四大光谱测定，整个过程耗时较长、繁琐、目的性差。

采用色谱质谱联用技术，先经过液相分离，再进行 Q-TOF 质谱检测，具有高效快速、灵敏度高、样品预处理简单等优点。利用 Q-TOF 技术还可以获得更多的化学信息，包括各种组分及其二级碎片离子的准确分子质量、元素组成以及对应的化学结构等，尤其适用于含量少、不宜分离或在分离过程中容易发生变化或损失的成分分析，使传统中药检测方法中容易被忽略的微量或痕量成分很容易被检测到，并通过大量的化学结构信息对其进行定性。

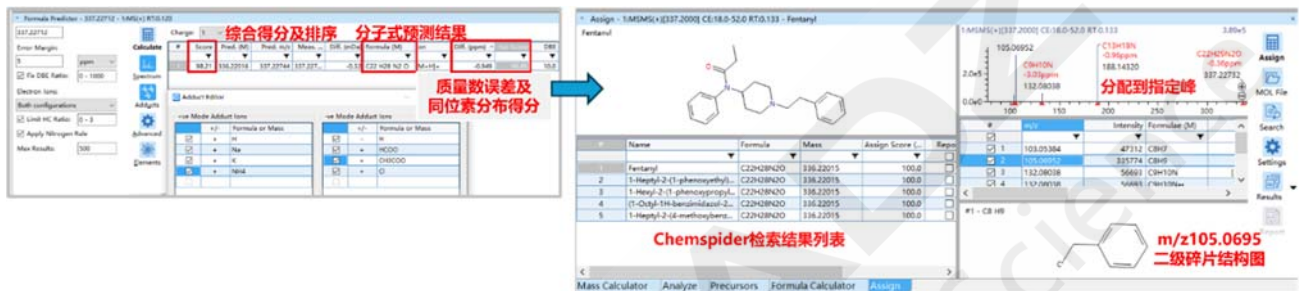


图 6. LabSolutions Insight Explore 软件分子式预测以及二级碎片分配功能

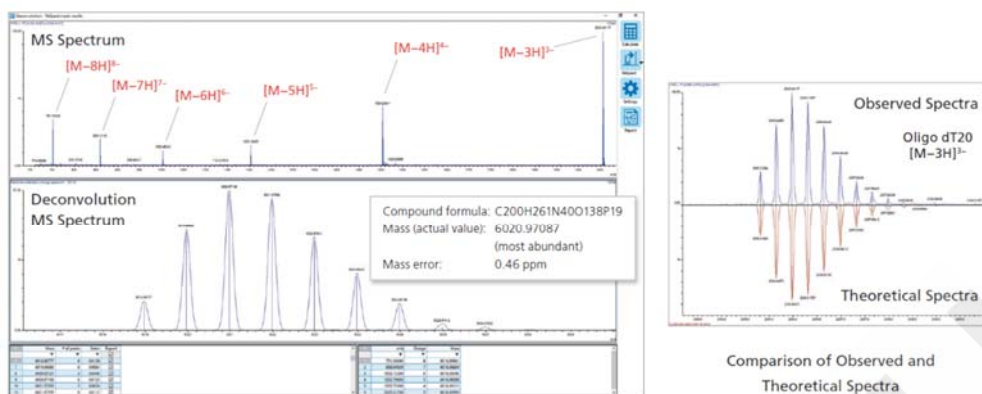
1.3.3 大分子生物药

近年来，为了实现对生物技术药物进行全面快速的定性表征，生物技术药物领域的领军企业以及高端仪器制造商携手并进，不断探索并开发出多种质谱技术，尤其是高分辨质谱技术，这些技术已成为该类药物快速定性分析的重要工具。在这一背景下，LabSolutions Insight Explore CSD 多电荷分析功能凭借其强大的解卷积处理能力脱颖而出，为准确测定药物分子量提供了坚实的技术支撑。

以单克隆抗体这一生物技术药物的典型代表为例。通过 Q-TOF 研究人员可以开展一系列详尽的定性分析，包括但不限于精确分子量测定，这涵盖了整体蛋白的分子量分析以及亚基层面的精细解析，为理解药物的基本结构特征提供了关键数据。此外，肽图分析作为探索蛋白质翻译后修饰 (PTMs) 的重要手段，在 Q-TOF 辅助下得以深入实施，揭示了抗体分子中复杂的修饰状态，对于理解药物活性、稳定性及安全性至关重要。

硫键分析作为抗体结构研究中的关键环节，也通过 Q-TOF 技术得到了精准的执行。二硫键作为稳定蛋白质三级结构的重要桥梁，其位置与状态直接关联到抗体的生物活性与功能表现。因此，这一分析不仅加深了对抗体结构复杂性的认识，也为后续的药物设计、优化及质量控制提供了宝贵的指导。

综上所述，Q-TOF 质谱技术与 LabSolutions Insight Explore CSD 多电荷分析功能的结合应用，为生物技术药物的全方位、快速定性表征开辟了新的路径，极大地推动了该领域研究的发展与进步。



Deconvolution Example (Oligo dT20)

图 7. LabSolutions Insight Explore CSD 多电荷分析功能

1.3.4 快速定性筛查

对目标物的定性快筛也是 Q-TOF 技术的一大优势。其中，LabSolutions Insight Explore 软件成为实现这一目标的关键工具，该软件使分析者能够迅速且精确地筛查目标化合物。在操作过程中，无论是采用数据依赖采集（DDA）还是数据独立采集（DIA）模式，都能高效处理大量样品数据。结合岛津开发的多种 QTOF 高分辨质谱库，涵盖法医毒物、兽药残留、农药种类及抗生素杂质等广泛领域，LabSolutions Insight Explore 软件的批量搜库功能得以充分发挥，实现对样品中目标物组分的快速而全面的筛查。

进一步地，该软件支持个性化设置匹配定性指标，通过 Flag 功能的智能应用，为不同的筛查结果赋予鲜明颜色标记。这一创新设计不仅提升了筛查结果的直观性，还极大地增强了筛查过程的灵活性和准确性。在食品安全、保健品质量控制、化妆品安全评估以及医疗接触材料监管等领域，这一技术革新有效助力防止违禁物质的渗入，从而保护公众免受潜在健康风险的威胁，为行业标准的提升和消费者安全的保障提供了坚实的技术支撑。

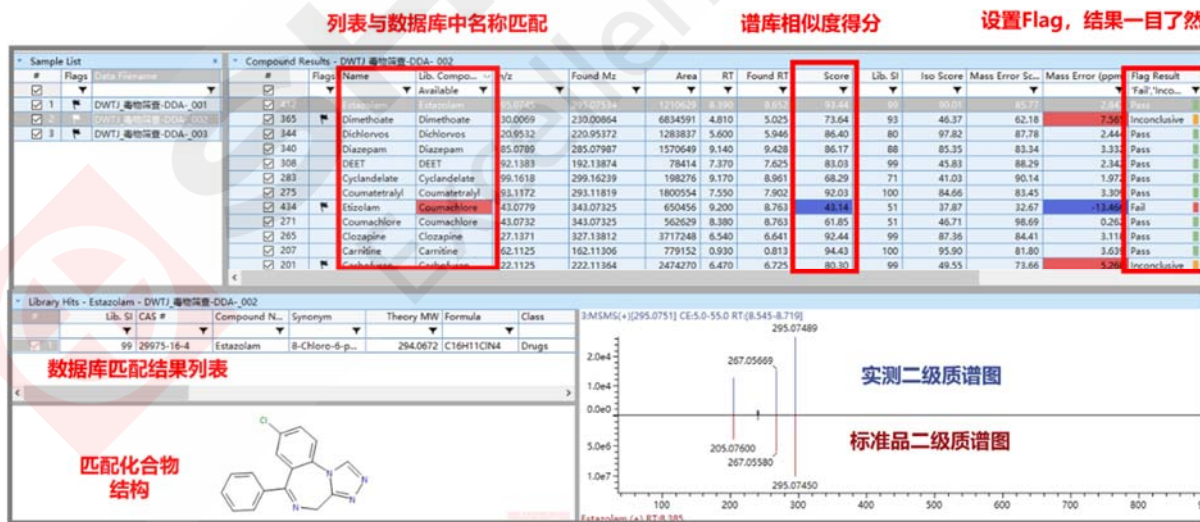


图 8. LabSolutions Insight Explore 数据库快筛界面

1.3.5 代谢组学

针对复杂基质多目标物分析，比如非靶代谢组学和脂质组学、天然产物等方向，样品会同时含有低极性和高极性目标物，普通液相一针难以同时得到正离子、负离子、高极性 & 低极性的数据，且处理数据费时费

力，岛津基于此研发了 4in1 组学技术，即全谱二维液相色谱联合 Q-TOF (LCMS-9050)，通过特色串联 HILIC 与 RPLC 技术，一次进样可实现从低极性到极高极性目标物的分离。并且可节省 3/4 的样品量和总分析时间。内含一套标配 UHPLC，无需任何管路改动，即可自由切换常规 UHPLC 和全谱二维液质系统。

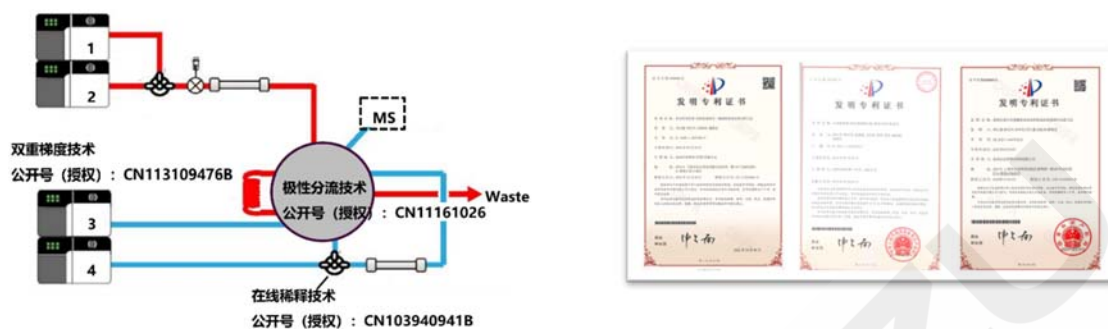


图 9. 全谱二维液质联用系统及其专利技术

第 2 章 Q-TOF 在药物中有关物质杂质鉴定的应用

在药物研发与生产领域，物质杂质，特指原料药及制剂中的有机成分，其来源广泛，涵盖了制备工艺中的副反应产物、原料本身携带的杂质、纯化与精制步骤引入的杂质，以及成品储存条件变化所致的新生成物。在药物杂质鉴定的领域中，一个系统而严谨的方法论对于解析未知化合物至关重要。这一过程通常遵循以下逻辑清晰、连贯的步骤：

首先，我们利用一级质谱数据作为起点，通过精确分析这些数据，预测出可能的分子式，为后续结构推断奠定坚实基础。接着，借助二级质谱数据进一步推测出潜在结构式，这一步骤是揭示化合物骨架与官能团的关键。

随后，为了验证并细化这些结构假设，我们对二级质谱中的碎片离子进行详细的结构归属分析，这一过程如同拼图游戏，通过碎片间的连接与匹配，逐步勾勒出候选化合物的全貌。此阶段不仅考验分析者的专业知识，也依赖于先进的数据处理工具。

在此基础上，为了最终确认候选化合物的正确性，我们采用标准品比对该一决定性步骤。通过比对未知物与标准品在质谱中的保留时间、离子丰度比等关键参数，我们能够确凿无疑地验证所推测结构的准确性。这一环节不仅是对前期分析工作的有力验证，也是确保鉴定结果可靠性的必要手段。

在整个鉴定流程中，岛津数据解析软件 LabSolutions Insight Explore 高级功能，如 Analyze 峰提取、分子式预测以及二级离子碎片分配等模块，极大地提升了数据处理的效率与精度，帮助实验者更深入地探索未知杂质的质谱裂解规律，推动了药物杂质鉴定领域的技术进步与发展。



图 1. 未知物鉴定基本思路

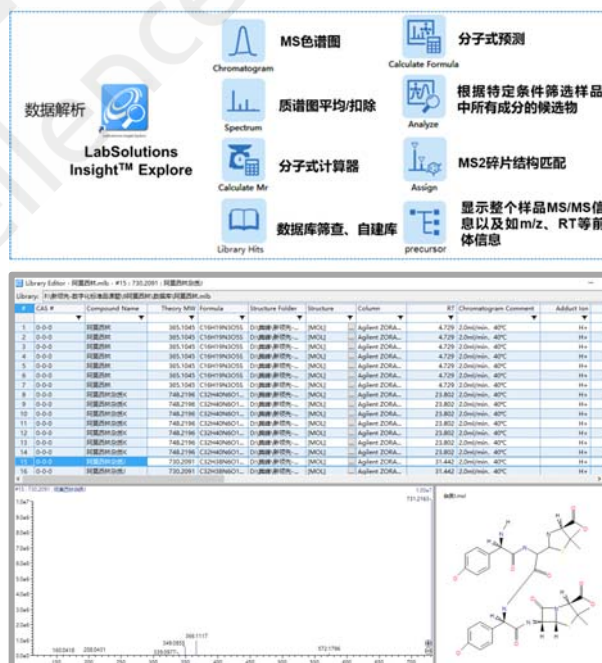


图 2. Insight Explore 软件高级功能

2.1 SEC-RPLC-QTOF MS 法鉴定注射剂中聚合物杂质

摘要: 本文建立在线体积排阻-反相液相色谱-飞行时间质谱法(SEC-RPLC-QTOFMS)用于注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中的聚合物杂质的鉴定。一维采用 Shimpack Diol-150 (7.9 mm I. D. × 250 mm L., 5 μm)色谱柱;进样量为 20 μL 并以 254 nm 为检测波长,建立了头孢哌酮和聚合物杂质的 SEC 分离条件;并将 SEC 分离所得聚合物杂质通过中心切割技术收集到二维 RPLC 中脱盐和进一步分离,采用 Q-TOF 为检测器,采集分离所得杂质一级和二级质谱信息后对其进行结构鉴定。在一维条件下头孢哌酮与聚合物峰分离良好;通过二维 RPLC-QTOFMS 推测出 9 个杂质的结构,其中有 4 个为闭环二聚物。在线 SEC-RPLC-QTOFMS 技术可以将聚合物指针性定位与在线脱盐高分辨质谱鉴定有机结合起来,为表征聚合物杂质的研究开拓了新的思路。

关键词: 头孢哌酮; 聚合物杂质; 在线体积排阻-反相液相色谱-飞行时间质谱

β-内酰胺类抗生素包括了头孢菌素、青霉素和碳青霉烯类,是临床最常用的注射剂型抗生素。注射用头孢哌酮钠(Cefoperazone Sodium)舒巴坦钠(Sulbactam Sodium)是一种复合制剂,是由第三代头孢菌素类抗生素头孢哌酮和由辉瑞公司研制开发的首个β-内酰胺酶抑制剂舒巴坦钠组合而成。β-内酰胺类抗生素引发的速发型过敏反应与药物中存在的高分子聚合物杂质有关。其中内源性聚合物是β-内酰胺类抗生素杂质控制的重点。

聚合物杂质检测的难点是:含量低、类型多、且结构不稳定无商用对照品色谱不易定位。《中国药典》2015年版采用Sephadex G10葡聚糖凝胶柱对β-内

酰胺类抗生素中高分子聚合物进行测定,该色谱柱效低,聚合物杂质分离效率低,辅料干扰严重,除分子排阻作用外,还会产生吸附、疏水等作用。

本文首次使用Shimpack Diol-150色谱柱建立了注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠中的高分子聚合物的尺寸排阻色谱法,使用二维液相阀切技术并辅之与质谱联用,对头孢哌酮及高分子杂质分别进行了一级、二级质谱解析。对谱图进行分析归纳,推测出注射液头孢哌酮钠舒巴坦钠中9个未知杂质,其中4个为闭环聚合物杂质。该法进样量小,分离效能高,分析时间短,专属性强,灵敏度高,为注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠的质量控制提供了重要的依据。

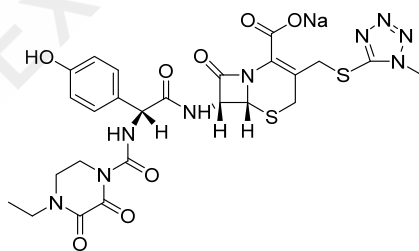


图1. 头孢哌酮钠结构式

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津二维SEC-RPLC-QTOFMS系统,如图2所示。具体配置为LC-20AD×4(输液泵),SIL-20AC(自动进样器),CTO-20AC(柱温箱),CBM-20A(系统控制器),DGU-20A₅(在线脱气机),SPD-20A(紫外检测器,一维

检测器), SPD-M30A(二极管阵列检测器, 二维检测器), FCV-32AH×2 (流路选择阀), 定量环体积500 μL。LCMS 9030 (LCMS-QTOF, 四极杆-飞行时间质谱仪) 和LabSolution Ver.5.96 (色谱工作站)。

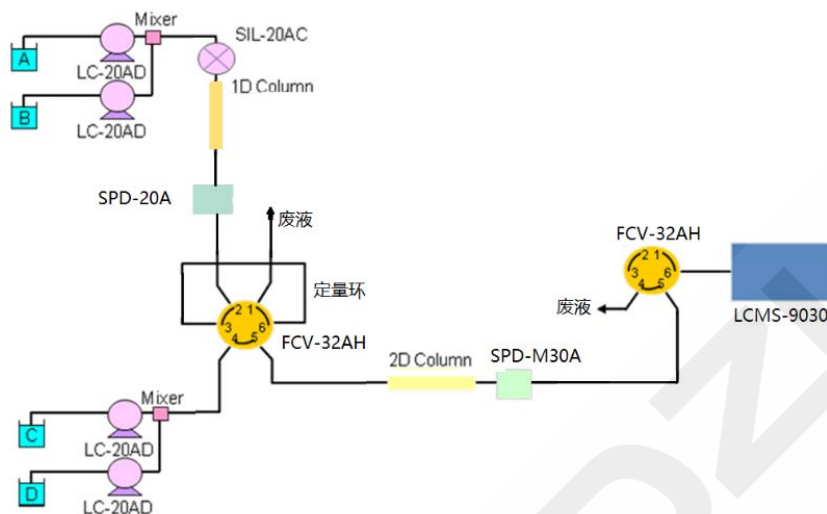


图2. 二维SEC-RPLC-QTOFMS杂质鉴定系统流程图

1.2 分析条件

1stD 液相色谱条件: Shimpack Diol-150 (7.9 mm I.D.×250 L. mm, 5 μm, P/N: 228-14775-91); 流动相: 磷酸缓冲溶液[5 mmol/L 磷酸氢二钠-5 mmol/L 磷酸二氢钠-61:39 (体积比)]-乙腈(95:5)。等度洗脱, 0.8 mL/min。采集时间: 60 min。检测波长: 254 nm; 柱温: 30°C; 进样量: 20 μL。

2ndD 液相色谱条件: Shimpack VP ODS 色谱柱 (4.6 mm I.D.×250 L.mm, 5 μm, P/N: 228-34937-92), 检测波长: 254 nm, 柱温: 30°C, 流速: 1.0 mL/min, 定量环体积: 500 μL, 流动相 A: 0.1%甲酸水; 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈。梯度洗脱: 0-10 min (5% B)→10-20 min (5%-20% B)→20-30 min(20%-50% B)→40-50 min(100% B)→51-60 min(5% B)。柱后分流比, 废液端: 质谱端=8:2。进质谱流速约为 0.2 mL/min。右阀切入质谱端时间为 12 min。

质谱条件: 离子源: ESI (+), 接口电压: 4.5 kV, 扫描范围: 一级质谱: m/z 100~3000; 自动二级: m/z 100~3000; 雾化气: 氮气 3.0 L/min, 干燥气: 氮气 10 L/min, 加热气: 空气 10 L/min, 碰撞气: 氩气, 脱溶剂管温度: 100°C, 加热模块温度: 100°C, 接口温度: 100°C, 检测器电压: 2.5 kV, 校准方法: 自动调谐优化电压, 外标法校准质量数。检测器工作时间 12-50 min。

1.3 溶液的配制

精密称取注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠原料药样品 0.2 g 置 5 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 作为供试品溶液(临用新制)。

2. 结果与讨论

2.1 一维色谱图

按照 1.3 制备供试品溶液, 按“1.2”项下的<LC 1stD>色谱条件进行分析, <LC 1stD>色谱图如图 3 所示, 峰 1 (R.T.=8.66 min) 为高分子聚合物杂质; 峰 2 (R.T.=10.60 min) 为头孢哌酮主峰。本实验研究对象为聚合物杂质, 在 SEC 色谱柱上, 其出峰时间在主峰之前。在峰 1 前有一小峰, 经鉴定不是目标物, 本文不

做讨论。

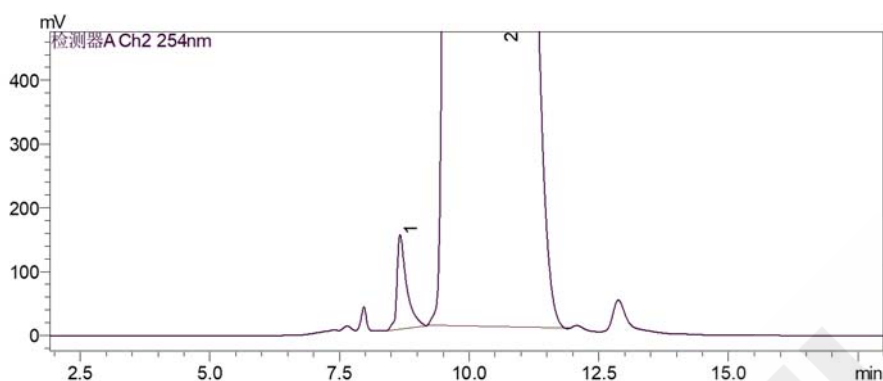


图 3. 头孢哌酮<LC 1stD>色谱图 (1: 聚合物 (polymer); 2: 头孢哌酮 (Cefoperazone))

2.2 头孢哌酮主峰结构鉴定

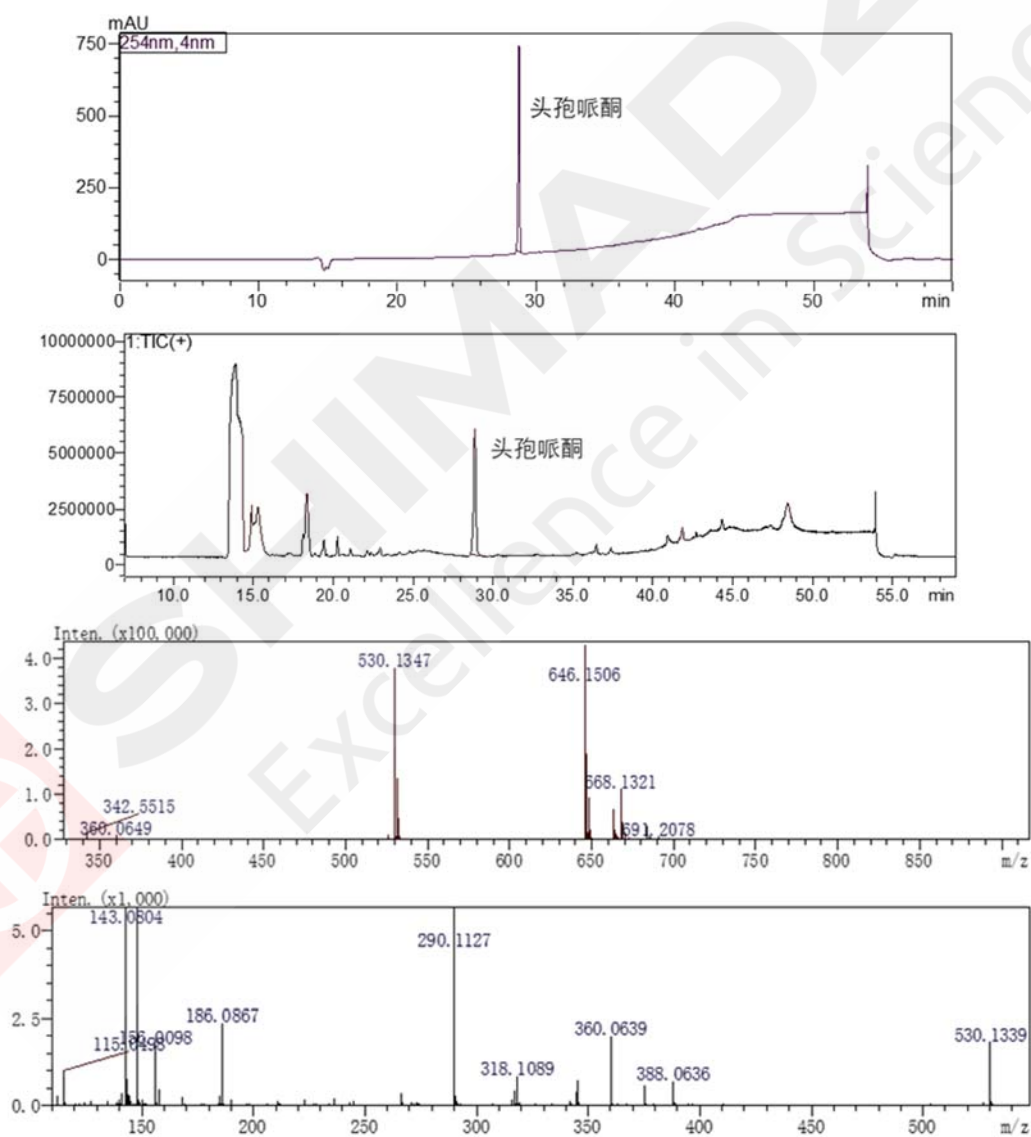


图 4. 头孢哌酮主峰<LC 2ndD>液相色谱图、TIC 图及 MS¹ 和 MS² 质谱图

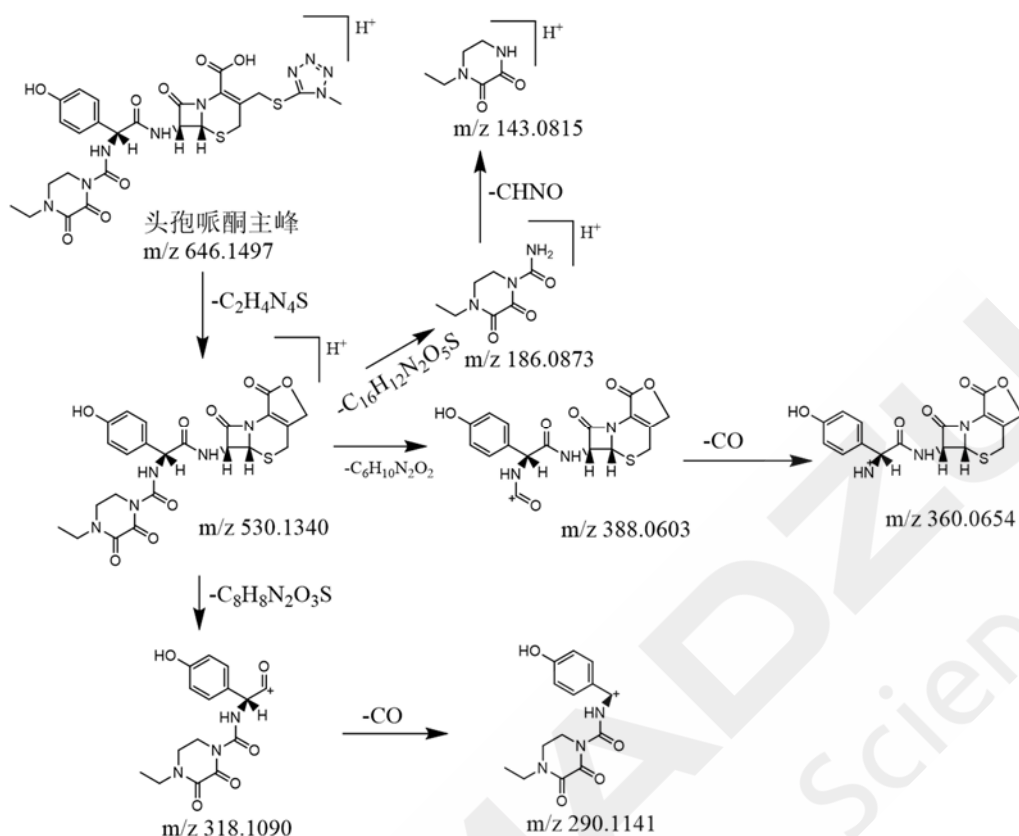


图 5. 头孢哌酮主峰可能的裂解规律

使用 SEC-RPLC-QTOFMS 系统鉴定主峰的原因是为了得到主峰在二维柱上的出峰时间，便于结合二维保留时间鉴定聚合物杂质。在 SEC-RPLC-QTOFMS 系统中，将头孢哌酮主峰切换到定量环转至二维脱盐分析，左阀切阀时间为 10.5-11.1 min。馏分经过 $<2^{nd}D LC>$ 分析，得到头孢哌酮主峰的二维液相色谱图，TIC 总离子流色谱图和多级质谱图如图 4 所示。头孢哌酮主峰在二维的出峰时间为 28.76 min，TIC 图上亦可见明显响应。对头孢哌酮主峰进行二级质谱分析结果如下：头孢哌酮分子式 $C_{25}H_{26}N_9NaO_8S_2$ ，精确质量数为 645.1424，一级质谱图中 m/z 646.1506 为 $[M+H]^+$ ， m/z 668.1321 为 $[M+Na]^+$ ， m/z 530.1347 为头孢哌酮在离子源分解产生的碎片，以上离子与软件计算理论质核比误差均在 2 ppm 内。头孢哌酮二级质谱碎片主要有 m/z 530.1339、388.0636、360.0639、318.1089、290.1127、186.0867 和 143.0804。推测其可能的裂解规律见图 5。

2.3 聚合物杂质结构鉴定

在 SEC-RPLC-QTOFMS 系统中，将头孢哌酮聚合物峰切换到定量环转至二维脱盐分析，左阀切阀时间为 8.5-9.1 min。馏分经过 $<2^{nd}D LC>$ 分析，得到聚合物峰的二维液相色谱图如图 6 所示。与空白溶剂相比，聚合物峰在二维紫外色谱图中分离出多种组分，说明聚合物峰是混合物。质谱检测器上有 9 个物质峰检出。前 4 个杂质二维出峰时间在主峰之前，后 5 个杂质的二维出峰时间在主峰之后。

聚合物峰-1 的 MS^1 为 m/z 234.0434， MS^2 主要碎片为 m/z 217.1043、146.0537、124.0744 等，经鉴定其为原料药中的舒巴坦。聚合物峰-2 的 MS^1 为 m/z 377.1457， MS^2 主要碎片为 m/z 164.0705、143.0805、115.0486 等，推测其结构可能是头孢哌酮 β -内酰胺键断裂生成的副产物。聚合物峰-3 的 MS^1 为 m/z 548.1453， MS^2 主要碎片为 m/z 406.0703、319.0749、143.0802 等。其结构可能是头孢哌酮内酯的水解产物。聚合物峰-4 物质的 MS^1 为 m/z 761.2280， MS^2 主要碎片为 m/z 575.1555、532.1819、390.1110、186.0867 和 143.0802 等。 m/z

186.0867和143.0802二氮六元杂环的特征碎片， m/z 532.1819和390.1110为头孢哌酮内酯及特征碎片的加氢还原峰。推断聚合物峰-4为头孢哌酮的有关物质，碎片信息有限未推导出其可能的结构。聚合物峰-5的 MS^1 为 m/z 664.1614， MS^2 主要碎片为 m/z 548.1452、406.0703、143.0804等，其结构可能是头孢哌酮 β -内酰胺键水解产物。以上五个杂质均非聚合物杂质。

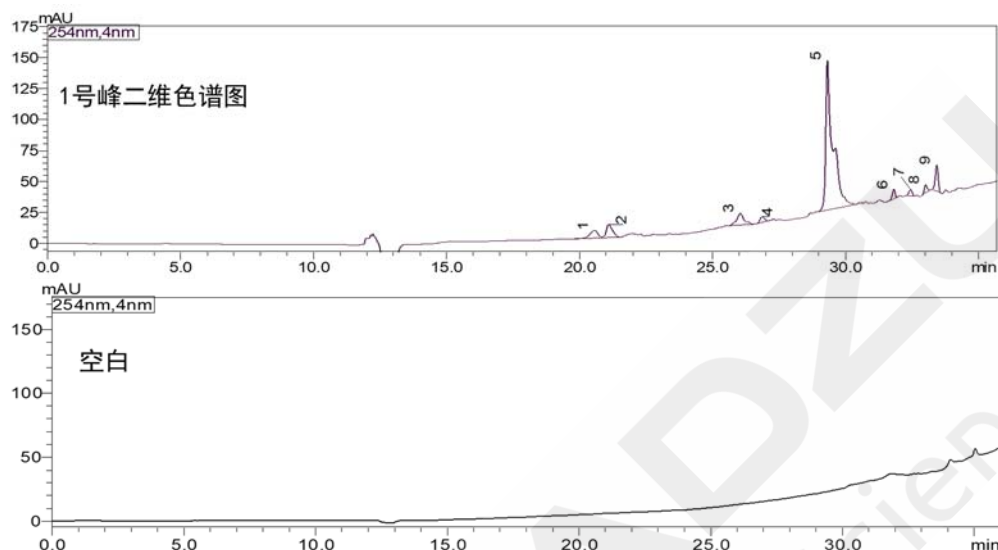


图6. 头孢哌酮聚合物峰<LC 2ndD>液相色谱图及空白溶剂二维色谱图

聚合物峰-6与聚合物峰-7的质谱图见图7。两者的 MS^1 均为 m/z 1175.2797， MS^2 主要碎片为 m/z 1059.2567、345.0546、530.1317等。推测其结构是头孢哌酮和头孢哌酮内酯闭环二聚而成，分子式为 $C_{48}H_{50}N_{14}O_{16}S_3$ ，与理论质核比相对误差为1.02 ppm。闭环二聚的反应过程，可能是头孢哌酮7位侧链活性氨基进攻内酯的 β -内酰胺键(8a)，也可能是内酯的7位侧链活性氨基进攻头孢哌酮的 β -内酰胺键(8b)，对应的结构式见图8。8a与8b的二级碎片完全一致，由于没有对照品，不能进一步鉴定。以8a为例推导其可能的裂解规律见图9。聚合峰-6与聚合物峰-7二维出峰时间在主峰之后，满足聚合物杂质保留更强的出峰规律。

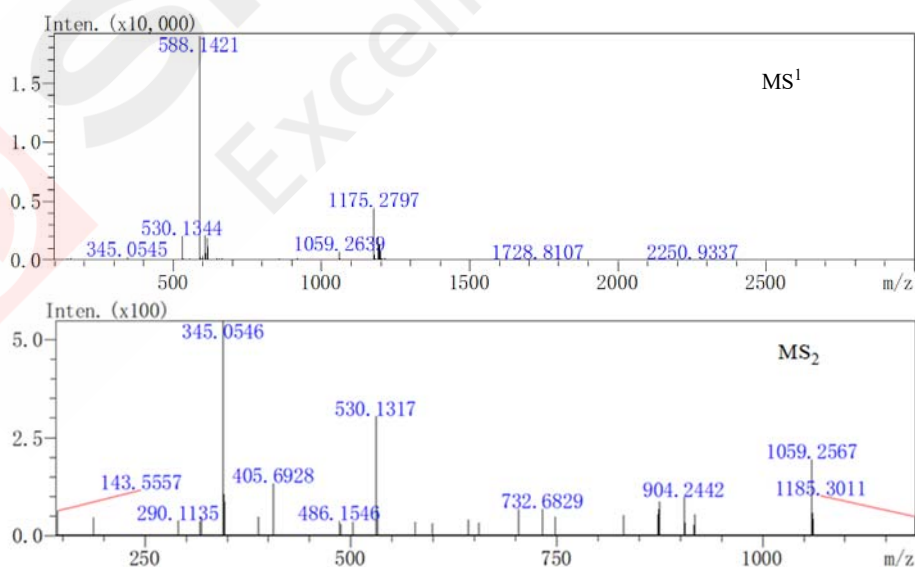


图7. 聚合物峰-6、7 MS^1 和 MS^2 质谱图(母离子 m/z 1175.2797)

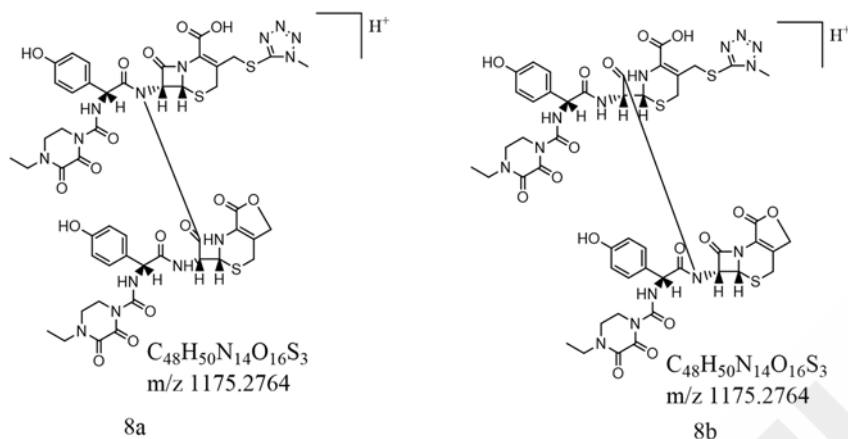


图 8. 聚合物峰-6、7 可能的结构式

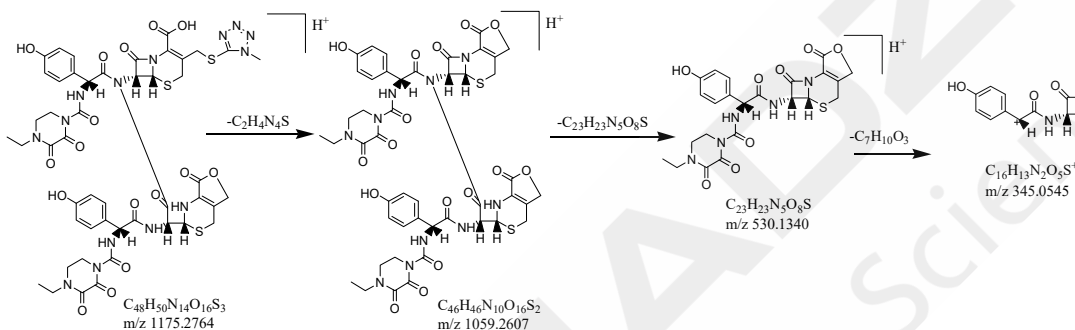


图 9. 聚合物峰-6、7 可能的裂解规律

聚合物峰-8与聚合物峰-9的质谱图见图10，两者的 MS^1 均为m/z 1291.2926。推测其结构是头孢哌酮闭环二聚产物，分子式为 $C_{50}H_{54}N_{18}O_{16}S_4$ ， $[M+H]^+$ 与理论质核比误差为0.38 ppm。聚合物峰-8强度弱无二级碎片，聚合物峰-9的二级主要碎片为m/z 1175.2793、1059.2636、1015.2711、829.2091等，上述二级质谱碎片佐证了聚合物内部共价键结构的存在，为推测聚合物杂质的结构和聚合方式提供了依据。由于头孢哌酮7位侧链有两个活性氨基位点，发生L型聚合反应有两种产物，可能的结构式见图11。由于没有对照品，不能进一步鉴定。结合聚合物峰-9的二级碎片，以11a为例推导其可能的裂解规律见图12。聚合物峰-8与聚合物峰-9的二维出峰时间在主峰之后，满足聚合物杂质保留更强的出峰规律。

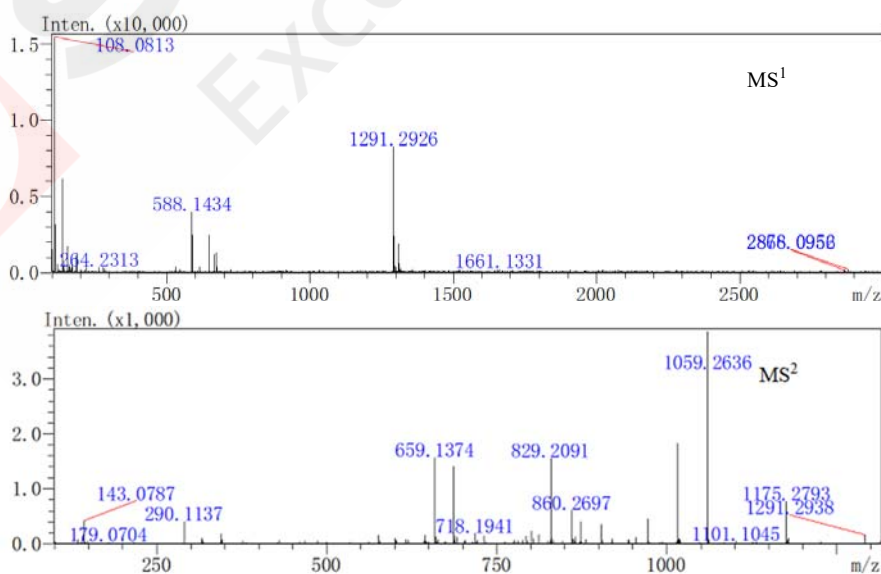


图10. 聚合物峰-8、9 MS^1 和 MS^2 质谱图(母离子m/z 1291.2961)

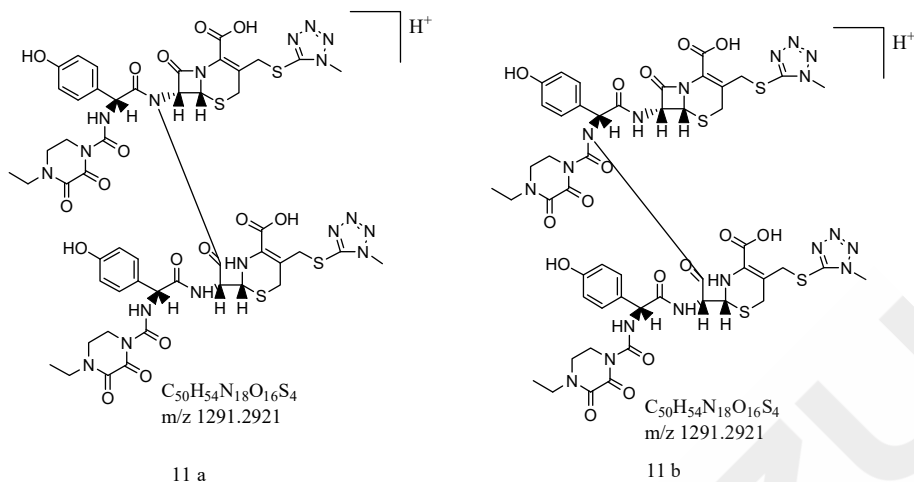


图 11. 聚合物峰-8、9 可能的结构式

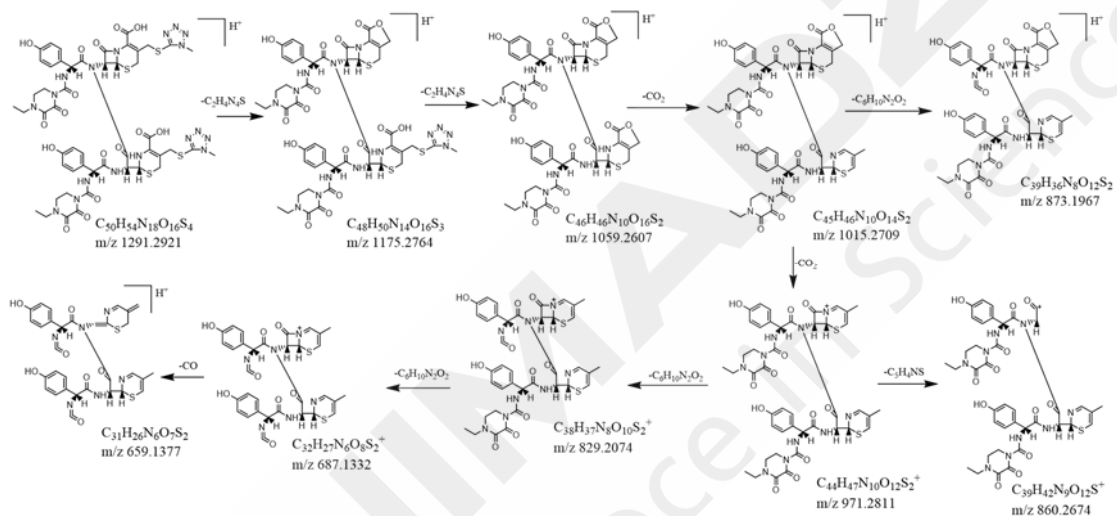


图 12. 聚合物峰-8、9 可能的裂解规律

3. 讨论

3.1 在线脱盐液质联用技术

本实验采用二维SEC-RPLC-QTOFMS法对注射用头孢哌酮聚合物进行鉴定，该方法基于馏分收集环 (Fraction loop) 将目标馏分从一维转移至二维液相质谱联用系统，对目标峰指针性的快速分析的同时完成流动相转换即脱盐的过程，即在不改变原流动相条件的基础上，实现了液质联用鉴定目标聚合物杂质。鉴定出4种聚合物，并对其结构及裂解规律进行推测。二级质谱碎片佐证了聚合物内部共价键结构的存在，并非范德华力结合的二聚体。4种聚合物杂质二维出峰时间均在主峰二维的出峰时间之后，符合聚合物杂质保留更强的特性。

3.2 色谱柱的选择

现行标准采用的葡聚糖G10的色谱柱，色谱条件下由于高分子助悬剂的影响，聚合物峰检出数量少，聚合物峰型差，无法与主峰完全分离。本文选择的Shimpack Diol-150色谱柱采用二醇基键合的多孔高纯硅胶，独有的化学修饰技术确保分离度的同时峰型更加尖锐。实验结果表明聚合物峰与主峰之间分离度有了很大改善。尽管供试品采用过量进样，一维色谱图中主峰为平头峰，聚合物峰切至二维经高分辨质谱确证聚合物峰中未检测到头孢哌酮主峰。表明本法一维聚合物峰与主峰分离度良好。

3.3 与《中国药典》方法对比

本法结合QTOFMS对头孢哌酮聚合物杂质进行精准检测，克服了药典方法定性能力不足的技术缺陷。按《中国药典》2015版收载的注射用头孢哌酮聚合物检查方法进行对比实验，本法的进样量更少，选择性更高，灵敏度更高，分离度更好。聚合物峰在二维为混合物，经高分辨质谱确证其紫外谱图中响应最大的峰是头孢哌酮水解产物，并非聚合物杂质。聚合物杂质在样品中的含量微乎其微，本法采用500 μL 定量环将一维中聚合峰全切入二维才得以检测。同时由于一维流动相中无有机相，并未引起二维溶剂效应。全切的另一个优点是：如有需要，二维可以对聚合物杂质进行定量检测。

3.4 方法的优化

β -内酰胺类抗生素的聚合物结构不稳定易水解，需临用新配。质谱检测时需将离子源温度设置为较低值，避免聚合物在离子源上分解。 β -内酰胺类抗生素的闭环二聚体的响应为 $[2M+H]^+$ 。当样品浓度高时由于范德华力聚合在离子源上也能出现 $[2M+H]^+$ 的响应，需要结合保留时间和二级质谱图进行区分。

4. 结论

本文建立了在线SEC-RPLC-QTOFMS系统，将聚合物指针性定位与在线脱盐高分辨质谱鉴定有机结合起来。经高分辨质谱LCMS-9030鉴定二维色谱图中强度最高峰并非聚合物杂质，高分辨质谱的使用克服了药典方法定性不足的问题。LCMS-9030灵敏度高，适用于低含量杂质的结构鉴定，为 β -内酰胺类抗生素中聚合物的分离、分析及产品质量提高提供了依据。

5. 附加补充

抗生素中的聚合物杂质作为引发临床不良反应的主要过敏原，其含量的严格监控至关重要。传统上，采用排阻色谱法检测此类杂质虽可行，但面临检测周期长、分离度与专属性不足、定量不精确及结构鉴定困难等挑战。

为克服这些技术瓶颈，岛津创新性地构建了 SEC-RPLC-QTOF（尺寸排阻色谱-反相液相色谱-四极杆飞行时间质谱）联用分析平台，该平台集成了中心切割技术，实现了在线除盐并高效分离目标杂质。结合 LCMS-QTOF 系统与岛津自主研发的质谱库，实现了对杂质结构的精确鉴定。此平台的推出，不仅显著降低了企业的研发成本，还为工艺优化、剂型创新及产品质量提升提供了强有力的技术支持。

岛津基于其二维液相高分辨质谱平台，建立了《抗生素杂质数字化标准品数据库》(P/N: 232-07103-41)，这一数据库成为企业降本增效的关键工具。该数据库广泛收录了《欧洲药典》中 β -内酰胺类抗生素相关杂质的标准品信息，利用 LCMS-9030 液相色谱-高分辨质谱仪，在 ESI 正负双模式下，采集了 7 个不同碰撞能量下的二级质谱图，并详细记录了化合物信息、推测结构式、色谱分析条件及《中国药典》规定的流动相条件下的保留时间。此外，为方便科研人员在不同质谱平台间的转换，数据库还提供了 18 种抗生素杂质的 MRM（多反应监测）方法文件，适用于液相色谱-三重四极杆质谱仪的检测，极大地促进了药物研发效率与成本效益的双重提升。

表 1. 抗生素杂质数字化标准品数据库内容信息

编号	项目	杂质对照品数量	MS/MS谱图数量	聚合物种类
1	头孢甲肟	6	80	3
2	拉氧头孢	5	29	3
3	氟氧头孢	4	37	7
4	头孢呋辛钠	12	111	3
5	头孢曲松	10	91	3
6	头孢他啶	7	59	3
7	头孢唑林钠	16	105	2
8	头孢吡肟	17	112	3
9	阿莫西林	14	180	6
10	头孢呋辛酯	7	98	2
11	头孢哌酮钠舒巴坦钠	16	161	2
12	头孢克肟	8	126	3
13	头孢泊肟酯	17	140	9
14	头孢地尼	14	154	1
15	氟氯西林钠	6	111	4
16	阿奇霉素	16	112	-
17	阿维巴坦钠	3	21	-
18	头孢美唑钠	4	45	-
小计	18 个品种	182 种对照品	1772 张谱图	54 种聚合物分子式

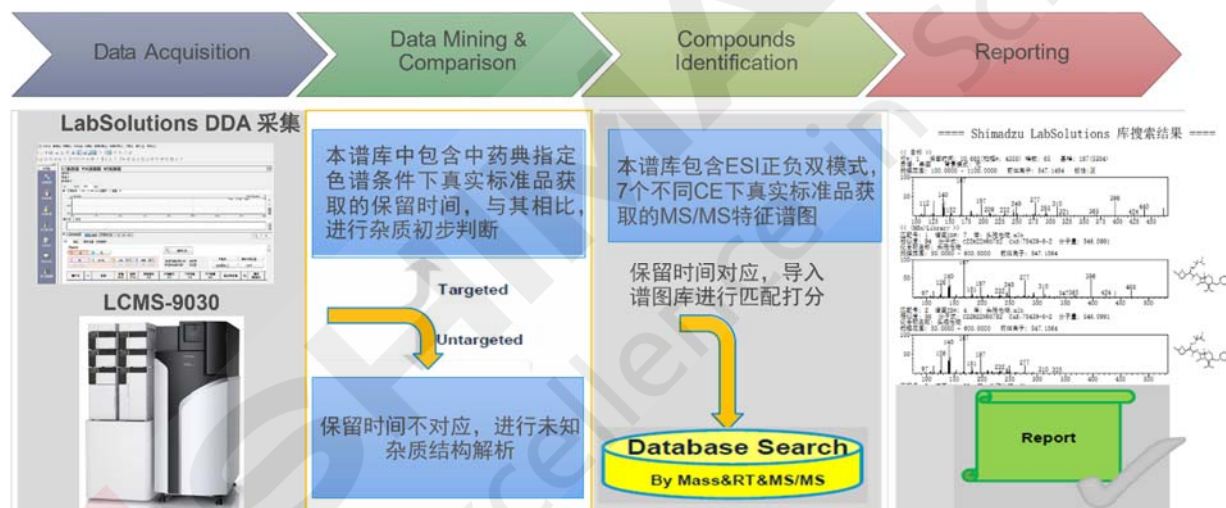


图 13. 《抗生素杂质数字化标准品数据库》使用流程

2.2 缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质分析

摘要： 本文利用岛津 LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质 NDMA、NMBA、NDEA、NDIPA、NEIPA 和 NDBA 的分析方法。该方法采用外标法定量，六种亚硝胺类杂质线性相关系数均大于 0.999；六种亚硝胺类化合物定量限（LOQ）在 0.004~0.045 ppm 之间；低中高浓度混合标准工作溶液重复性保留时间 RSD% 为 0.05~0.57%，峰面积 RSD% 为 0.70~8.48%；方法回收率在 82.6~107.5% 之间。方法准确可靠，可用于实际样品的检测。实验结果表明，该方法能快速准确地测定缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质。

关键词： LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统 缬沙坦 亚硝胺类化合物

遗传毒性杂质是指化合物本身直接或间接损伤细胞DNA，产生基因突变或体内诱变，具有致癌可能。亚硝胺类化合物NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA及NDBA是常见的遗传毒性杂质。缬沙坦是一款血管紧张素II受体拮抗剂抗高血压类药物，用于治疗高血压症、充血性心力衰竭、后心肌梗塞的药物。2018年以来，沙坦类药物中陆续被发现检出亚硝胺类化合物，引起社会的广泛关注，其将产生致癌风险，并给相关企业造成巨大损失，故需要进行严格

的检测和管控。

U.S. FDA (Food & Drug Administration) 已公布沙坦类药物中亚硝胺类杂质的LC-HRMS分析方法及相关的限度要求：《高分辨质谱法测定ARB（血管紧张素受体阻滞剂）原料药中六种亚硝胺类杂质》。本实验使用岛津LCMS-9030四极杆飞行时间液质联用系统，建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA和NDBA的分析方法，供制药药检相关从业人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统。具体配置为：

系统控制器	: CBM-20A	在线脱气机	: DGU-20A5
输液泵	: LC-30AD×2	自动进样器	: SIL-30AC
柱温箱	: CTO-20AC	检测器	: SPD-M20A
质谱仪	: LCMS-9030	色谱	: LabSolutions Ver 5.109
		工作站	: LabSolutions Insight Ver 3.8

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱	: ACE-C18-AR (4.6 mm I.D. × 150 mm L., 3 μm)
流动相	: A相-0.1%甲酸水；B相-0.1%甲酸甲醇
流速	: 0.8 mL/min
柱温	: 40°C
进样体积	: 10 μL
洗脱方式	: 梯度洗脱，B相初始浓度为30%，时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
1.50	泵	B.Conc	30
8.50	泵	B.Conc	70
13.00	泵	B.Conc	75
14.00	泵	B.Conc	98
16.00	泵	B.Conc	98
16.10	泵	B.Conc	30
20.00	控制器	Stop	

质谱条件:

离子源	: APCI (+, -)	检测器电压	: 2.1 kV (+, -)
雾化气流速	: 3 L/min	扫描模式	: MS Scan
干燥气流速	: 5.0 L/min	事件时间	: 0.1 s
D L 温度	: 180°C	阈值	: Low
接口温度	: 300°C	电晕针电压	: (±)3.5 kV
加热模块温度	: 200°C	EIC 提取误差	: 15 ppm
M S 参数	: 见表 2		

表 2. MS 参数

No.	化合物名称	CAS 号	质谱采集时间 (min)	MS Scan (+/-)	MS Scan 范围 (m/z)	EIC 提取 (m/z)
1	NDMA	62-75-9	2.0-4.0	+	65-85	75.0552
2	NMBA	61445-55-4	2.5-4.5	-	140-160	145.0623
3	NDEA	55-18-5	4.5-7.5	+	90-110	103.0859
4	NEIPA	16339-04-1	6.5-8.5	+	105-130	117.1017
5	NDIPA	601-77-4	8.0-10.0	+	120-140	131.1175
6	NDBA	924-16-3	12.0-14.0	+	150-170	159.1490

2. 样品前处理

对照品溶液的制备：取六种亚硝胺类化合物混合标准贮备液（10 mg/L），用甲醇作为溶剂逐级稀释为 1、2、5、10、20、50、75、100 ng/mL 的标准系列工作溶液。

供试品溶液的制备：精密称取 100 mg 缬沙坦原料药至 15 mL 的离心管中，加入 5.0 mL 甲醇超声涡旋至原料药完全溶解，即得。

3. 结果与讨论**3.1 标准工作溶液 EIC 色谱图与供试品溶液 UV 色谱图**

为避免高浓度的缬沙坦原料药进入仪器，污染质谱，待六种亚硝胺化合物全部出峰后将液相流路切至废液。由于不同色谱系统的延迟体积的差异，六种亚硝胺杂质和缬沙坦的保留时间会发生变化，建议配置紫外或二极管阵列检测器进行色谱图的监控。

取 2 中配制得到的 50 ng/mL 标准工作溶液上机分析，所得色谱图如图 1（上）所示。取 2 中制备得到的供试品溶液上机分析，通过二极管阵列检测器（检测波长 254nm）采集到的色谱图如图 1（下）所示，从图中可以看出六种亚硝胺杂质与缬沙坦分离度良好。自 13.5 min 开始，设置分流阀流路切换至排液侧（接废液），为避免切阀造成下一针进样的基线波动，18.0 min 将分流阀流路切换至进样侧（接入质谱）。

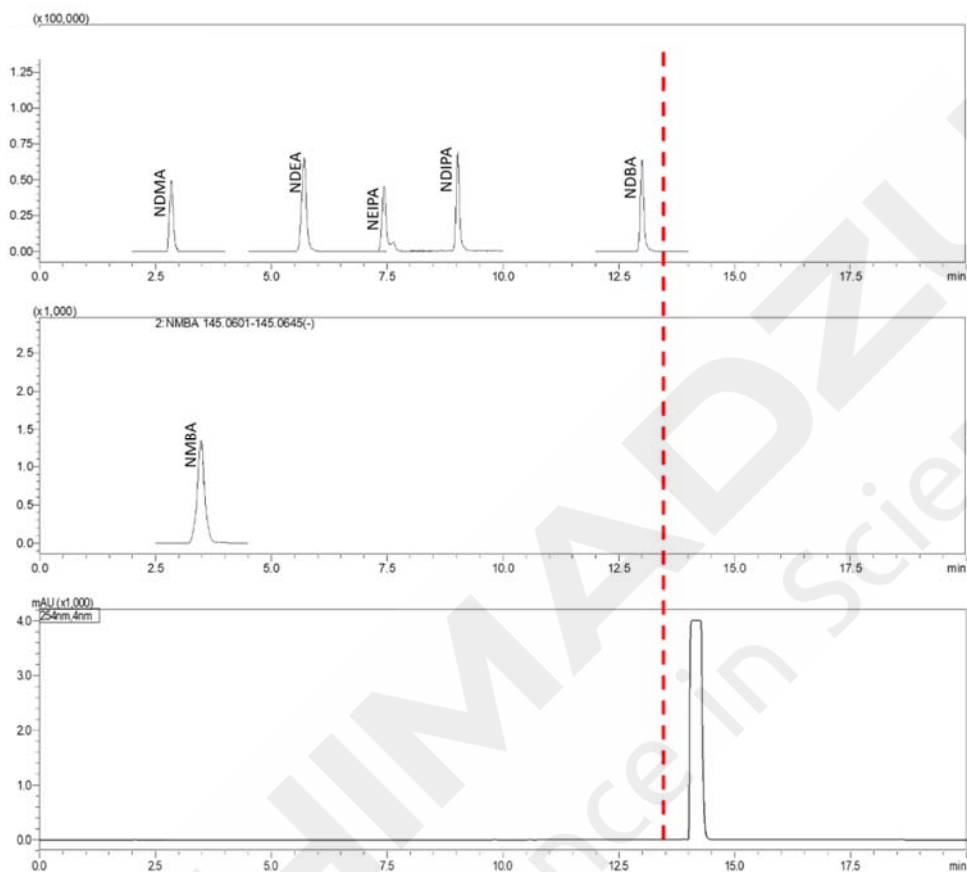


图 1. 标准工作溶液 (50 ng/mL) EIC 色谱图 (上, 中) 与供试品溶液 UV 色谱图 (下)

3.2 线性范围

分别取 2 中配制得到的系列标准工作溶液，按照 1.2 的分析条件进样分析。以各目标物浓度为横坐标，目标物峰面积为纵坐标，以外标法绘制标准曲线，结果见表 3。

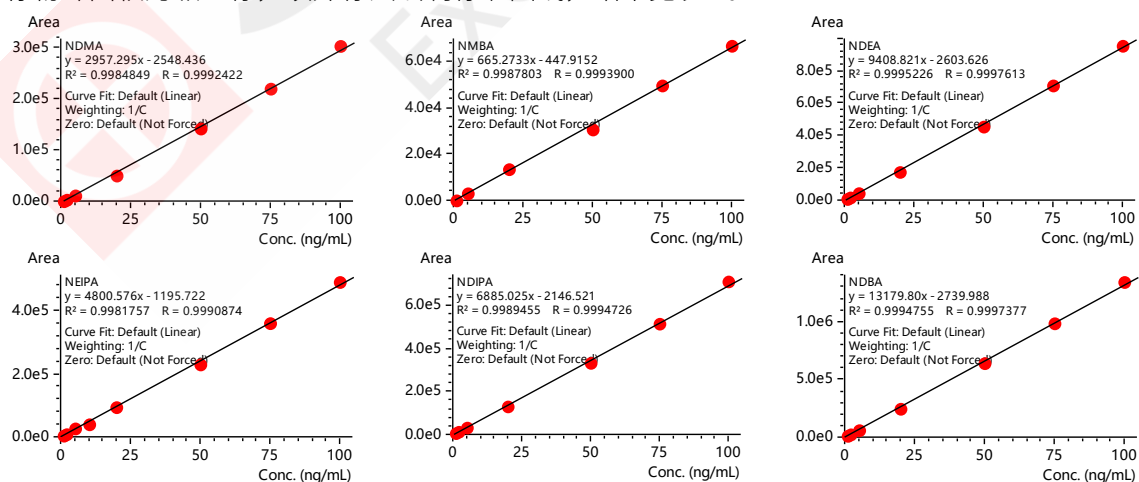


图 2. 亚硝胺类化合物标准曲线

表 3. 标准曲线结果

No.	化合物	线性范围(ng/mL)	标准曲线	相关系数 (r)	准确度(%)
1	NDMA		$Y = 2957.304X + (-2548.44)$	0.9992	84.0-113.5
2	NMBA		$Y = 665.273X + (-447.915)$	0.9994	88.7-111.8
3	NDEA	1.0-100.0	$Y = 9408.82X + (-2603.63)$	0.9998	96.7-105.2
4	NEIPA		$Y = 4800.58X + (-1195.72)$	0.9991	84.1-110.0
5	NDIPA		$Y = 6885.02X + (-2146.52)$	0.9995	94.7-109.2
6	NDBA		$Y = 13179.8X + (-2739.99)$	0.9997	95.1-106.8

3.3 灵敏度实验

按照 1.2 分析条件测定, 取混合标准工作溶液中最低点 1.0 ng/mL (0.05 ppm) 计算仪器灵敏度, 色谱图见图 3。通过 LabSolutions 软件计算仪器检测限及定量限, 结果见表 4。

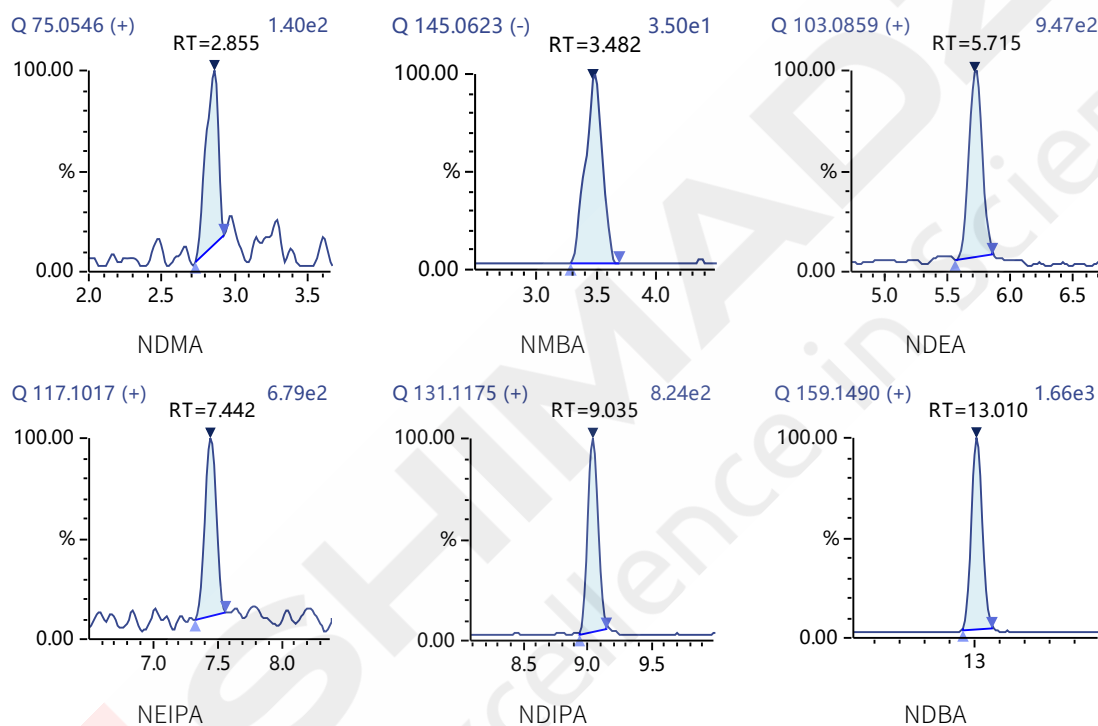


图 3. 六种亚硝胺化合物 EIC 色谱图 (1.0 ng/mL)

表 4. 六种亚硝胺化合物灵敏度测定结果

No.	化合物名称	检测限 LOD		定量限 LOQ	
		ng/mL	ppm	ng/mL	ppm
1	NDMA	0.025	0.001	0.082	0.004
2	NMBA	0.201	0.010	0.662	0.033
3	NDEA	0.033	0.002	0.109	0.005
4	NEIPA	0.170	0.009	0.568	0.028
5	NDIPA	0.059	0.003	0.196	0.010
6	NDBA	0.039	0.002	0.129	0.006

3.4 精密度

取标准工作溶液三组（浓度分别为 2.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL）按照 1.2 分析条件连续进样 6 次，考察仪器精密度，结果如表 5，六种亚硝胺化合物保留时间 RSD%为 0.05~0.57%，峰面积 RSD%为 0.70~8.48%，仪器精密度良好。

参照 U.S. FDA (Food & Drug Administration) 《高分辨质谱法测定 ARB (血管紧张素受体阻滞剂) 原料药中六种亚硝胺类杂质》中系统适用性的规定：重复进样 6 次的对照品溶液亚硝胺类杂质目标峰峰面积 RSD%应不大于 10%。

表 5. 精密度试验结果 (n=6)

No.	化合物名称	2.0 ng/mL		10.0 ng/mL		50.0 ng/mL	
		保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	NDMA	0.24	6.16	0.17	4.90	0.07	1.18
2	NMBA	0.57	8.48	0.48	3.25	0.15	2.01
3	NDEA	0.07	1.26	0.10	3.41	0.09	0.88
4	NEIPA	0.10	5.08	0.09	2.46	0.08	0.70
5	NDIPA	0.07	1.18	0.09	2.37	0.07	1.11
6	NDBA	0.05	0.74	0.08	1.02	0.05	0.98

3.5 加标回收率

取缬沙坦原料药样品，按 2 中供试品溶液的制备进行样品前处理，制备低（80%）、中（100%）、高（120%）3 种浓度的溶液，每个浓度平行制备三份，上机分析，回收率测定结果见表 6。三个不同浓度加标回收率在 82.6~107.5%之间。

表 6. 加标回收实验结果 (n=3)

No.	化合物名称	低浓度 (80%)	中浓度 (100%)	高浓度 (120%)
1	NDMA	92.8	101.9	86.6
2	NMBA	95.4	90.1	93.7
3	NDEA	93.8	95.8	95.8
4	NEIPA	90.3	92.6	106.2
5	NDIPA	82.6	92.3	103.6
6	NDBA	107.5	96.0	95.8

3.6 样品测定

取 2 中配制得到的供试品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，EIC 色谱图如图 4 所示，六种亚硝胺类杂质测定结果见表 7。

参照 U.S. FDA (Food & Drug Administration) 《高分辨质谱法测定 ARB (血管紧张素受体阻滞剂) 原料药中六种亚硝胺类杂质》中报告的规定：供试品中测得亚硝胺类杂质浓度 (ppm) \geq LOD 时，报“检出”；供试品中测得亚硝胺类杂质浓度 (ppm) $<$ LOD 时，报“未检出”。

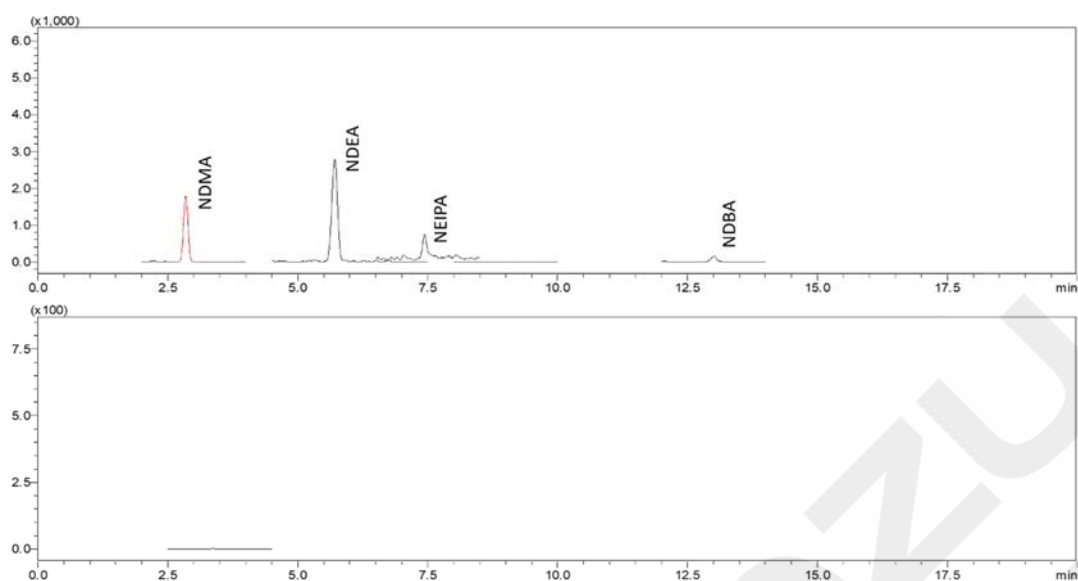


图 4. 供试品溶液 EIC 色谱图

表 7. 供试品溶液测试结果

No.	化合物名称	含量 (ppm)
1	NDMA	0.289
2	NMBA	N.D.
3	NDEA	0.147
4	NEIPA	0.042
5	NDIPA	N.D.
6	NDBA	0.005

N.D. = Not Detected

4. 结论

本文使用岛津 LCMS-9030 四极杆飞行时间液质联用系统建立了缬沙坦原料药中六种亚硝胺类遗传毒性杂质 NDMA、NMBA、NDEA、NDIPA、NEIPA 和 NDBA 的分析方法。实验结果表明，线性、灵敏度、精密性、回收率结果均符合 U.S. FDA (Food & Drug Administration) 《高分辨质谱法测定 ARB (血管紧张素受体阻滞剂) 原料药中六种亚硝胺类杂质》的规定。该方法能快速准确地测定缬沙坦原料药中六种亚硝胺类杂质，为制药药检相关行业的从业人员提供了参考。

2.3 定性分析宫缩抑制剂阿托西班中的多聚体杂质

摘要： 本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 对多肽药物阿托西班中的单体和多聚体杂质进行定性分析。测试结果使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对杂质的分子式进行预测，结果显示阿托西班单体、二聚体和三聚体的 MS¹ 的离子质荷比同理论值均小于 1 mDa。使用 LabSolutions Insight Explore 软件中解卷积功能预测目标物的分子量，预测分子量和理论分子量的误差小于 3 ppm。

关键词： Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 阿托西班 多聚体杂质

技术特点：

- ❖ 利用 Trap-Free 2DLC Q-TOF 联用系统分析阿托西班中的多聚体杂质，可实现一维和二维不同流动相直接转换，也能避免液相色谱直接分析浓度过高而导致的质谱信号饱和的问题。
- ❖ LCMS-9030 在分析中拥有高分辨率和准确质量数，为目标化合物的鉴定提供可靠信息。

阿托西班是一种合成的多肽类物质，其作用机制是与催产素竞争子宫肌层、蜕膜、胎膜上的催产素受体，拮抗催产素作用，从而达到抑制子宫收缩的作用可在受体水平对人催产素产生竞争性抑制作用。在临床中，常用于治疗孕期早产。

杂质研究是药物质量研究的一项重要内容，是药物质量保证的关键因素之一。为了提高临床用药安全，需对合成过程中产生的工艺杂质和储存过程中产生的降解杂质进行了详细的研究。由于托西班化学结构特性，其在生产和储存过程中可能产生杂

质，而这些杂质可能引起过敏反应、毒性及其他不良反应。

针对多肽药物中的由两个或多个多肽组成的稳定的多聚体杂质，可利用体积排阻色谱法 (SEC) 分离相关杂质。本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-free 2DLC+LCMS-9030，既能避免 SEC 的色谱条件于质谱离子源不匹配，也能有效解决液相色谱分析浓度过高而导致的质谱信号饱和的问题。本文成功对阿托西班多肽药物中的多聚杂质进行定性确证，为相关检测人员提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 Trap-free 2DLC+LCMS-9030 四极杆飞行质谱联用仪系统。具体配置为

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-20AD XR × 4	自动进样器：	SIL-20ACXR
柱温箱：	CTO-20AC	质谱仪：	LCMS-9030
检测器 A：	SPD-M20A	检测器 B：	SPD-20A
切换阀	FCV-32AH ₂ × 2	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

一维液相色谱条件:

色 谱 柱 : SHIMSEN Ankylo SEC-150 (300 mm×7.8 mm I.D., 3.0 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-01215-04)

流 动 相 : 水: 异丙醇: 乙酸 (150/150/200, V/V/V)

流 速 : 0.3 mL/min

柱 温 : 30°C

进 样 量 : 10 μL

洗脱方式 : 等度洗脱

二维液相色谱条件:

色 谱 柱 : Shim-Pack GISS C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30048-02)

流 动 相 : A 相-0.5%乙酸水 B 相-乙腈

流 速 : 0.3 mL/min

柱 温 : 30°C

洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
31.60	柱温箱	CTO.RVR	0*
31.70	柱温箱	CTO.RVR	1*
34.50	泵	B.Conc3	10
50.00	泵	B.Conc3	90
52.00	泵	B.Conc3	90
52.10	泵	B.Conc3	10
60.00	控制器	Stop	

注: * “0” 表示流路切换至捕集定量环, 流路切换的时间根据一维液相色谱的保留时间变化;

“1” 表示一维流路直接进废液,

LCMS-9030 质谱条件:

离 子 源 : ESI (+)

接 口 电 压 : 4.5 kV

加热模块温度 : 400°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

D L 温 度 : 300°C

干燥气流速 : 10.0 L/min

接 口 温 度 : 300°C

加热气流速 : 10.0 L/min

碰 撞 气 : 氦气

扫 描 模 式 : MS

1.3 样品前处理方法

准确称取多肽样品约5 mg, 加入一维流动相1.6 mL振摇溶解后, 上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 Trap-Free 2DLC 系统介绍

Trap-Free 2DLC 系统是一套支持在线流动相转换的二维液相与色谱-质谱联用仪的组合系统。本系统的第一维液相色谱系统，可使用非挥发性流动相或者与质谱分析不匹配的流动相体系，通过系统中切换阀、程序命令的组合，对第一维液相色谱系统分离的组分进行分馏。本系统的第二维液相色谱系统，可以采用适合 LCMS 分析的液相色谱条件，针对分馏的组分，进行针对性的质量分析。

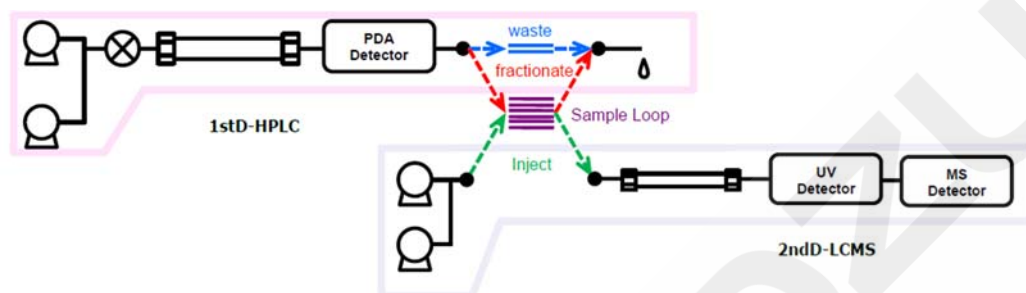


图 1. Trap-free 2DLC Q-TOF 系统的原理图

样品分析过程：

- 1) 第一维 HPLC，使用 PDA 检测器检测杂质，已杂质峰的保留时间为指标，将目标组分分馏至样品环。
- 2) 样品环，在样品环 1-5 内保留分馏后的组分。样品环 6 用于第一维与第二维的流动相置换。
- 3) 第二维 LCMS，利用第二维的色谱柱分离样品环内的组分后，使用 UV 检测器和 MS 检测器进行检测。

2.2 多肽样品一维 SEC 色谱图

首先样品通过一维液相色谱分析，确认各目标物的出峰时间。根据分子排阻色谱的原理，目标化合物依据分子的体积大小而分离，样品按照分子量由大到小的顺序出峰。在阿托西班样品的一维液相色谱图中可以看到单体及多聚体的色谱峰，其中单体（峰 3）的出峰时间最晚，出峰时间更早的峰 1、2 为不同分子量的杂质。

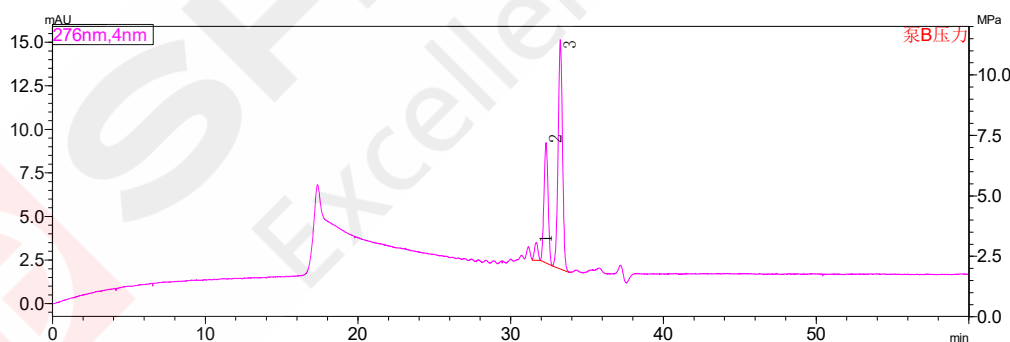


图 2. 阿托西班样品一维液相色谱图

2.3 通过 MS¹ 质谱图定性多聚体杂质

由于一维 SEC 分析的流动相中含有 40%乙酸，不能直接应用于质谱分析中。使用 Trap-free 2DLC 系统，可以针对性分馏目标组分，然后用于质谱匹配的流动相条件进行分离分析，并于质谱联用进行质量分析。针对不同分馏组分，需要根据分析目标峰的一维 SEC 分离的保留时间修改对应的时间程序。

2.3.1 阿托西班二聚体杂质

根据阿托西班二聚体在一维液相色谱中的保留时间，更新时间程序中的阀切换使时间。二维液相 UV 色谱图和 MS¹ 总离子流色谱图如图 3 所示，二聚体杂质的出峰时间约为 42.5 min。因为一维色谱的流动相中

异丙醇和乙酸的比例较高，二维液相色谱峰出现了明显的前沿峰。阿托西班二聚体平均质谱图见图 4，可以分别观察到带双电荷和三电荷的分子离子峰。

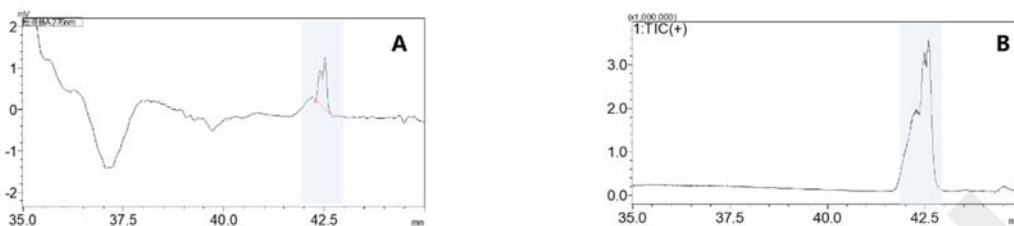


图 3. 阿托西班二聚体二维液相 UV 色谱图 (A) 和 MS¹ 总离子流色谱图 (B)



图 4. 阿托西班二聚体的平均质谱图

使用LabSolutions Insight Explore软件中分子式预测功能对分子离子峰基于准确分子量和同位素丰度比进行预测，预测结果显示，阿托西班二聚体的[M+2H]²⁺的质荷比误差为0.09 mDa，[M+3H]³⁺的质荷比误差为-0.19 mDa，相对偏差均小于1 ppm。

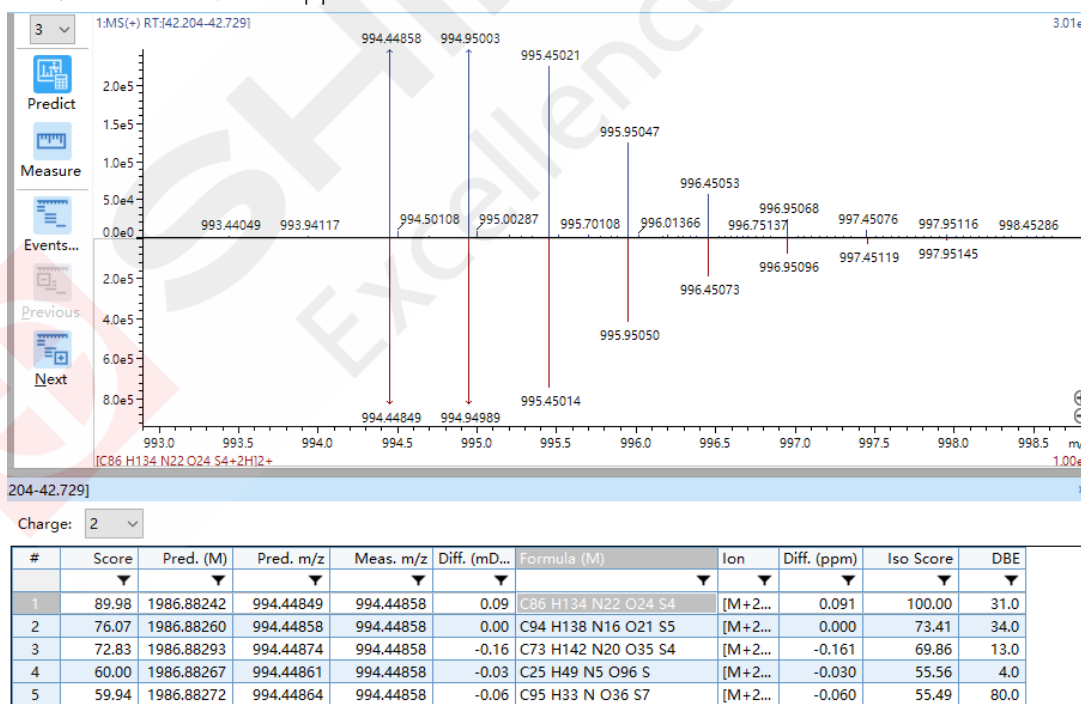


图 5. 阿托西班二聚体的[M+2H]²⁺ 峰分子式预测结果

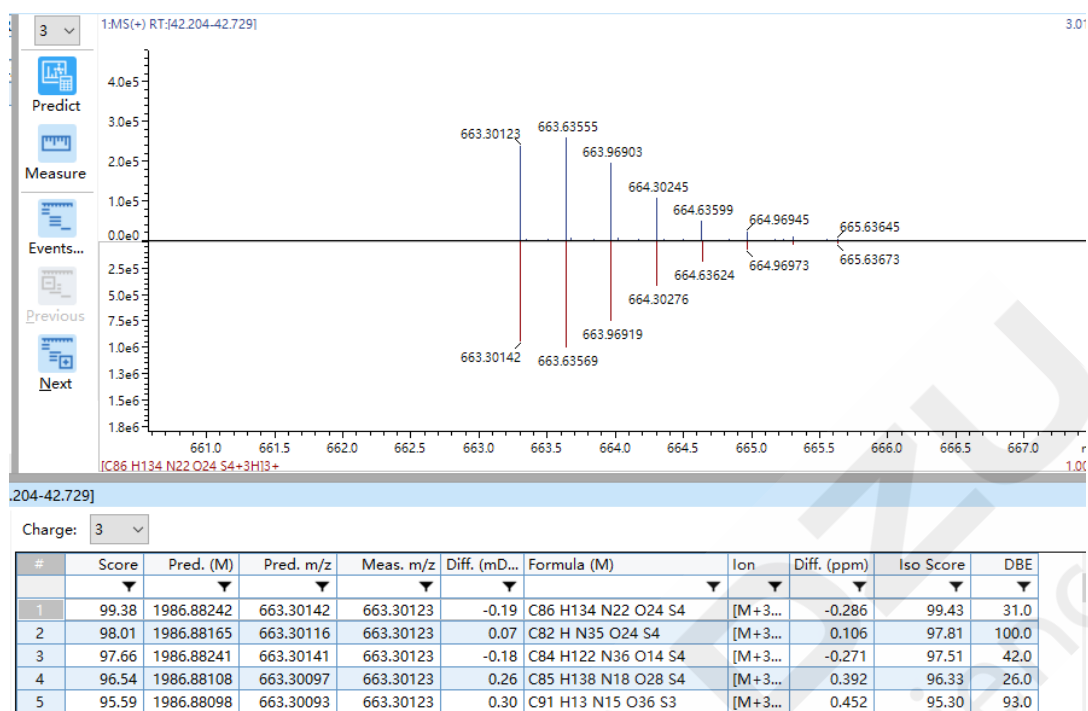


图 6. 阿托西班二聚体的[M+3H]³⁺ 峰分子式预测结果

使用 LabSolutions Insight Explore 软件中解卷积功能预测阿托西班二聚体的分子量，如图 7 所示，预测结果显示，阿托西班二聚体的预测分子量为 1987.88611，误差为-3.58 mDa，相对偏差为-1.80 ppm。

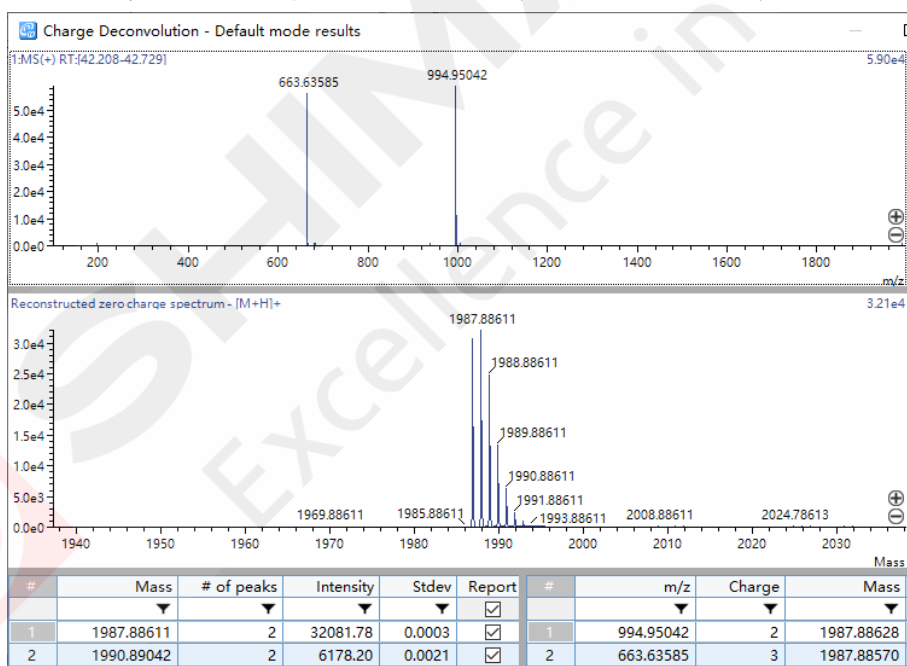


图 7. 阿托西班二聚体解卷积分析结果

2.3.2 阿托西班三聚体

根据阿托西班二聚体在一维液相色谱中的保留时间，更新时间程序中的阀切换使时间。二维液相色谱和 MS¹ 总离子流色谱图如图 8 所示，三聚体杂质的保留时间约为 42.7 min。因为一维色谱的流动相中异丙醇和乙酸的比例较高，二维液相色谱峰出现了前沿峰。阿托西班三聚体杂质的平均质谱图见图 9，可以分别观察到带双电荷、三电荷的分子离子峰。

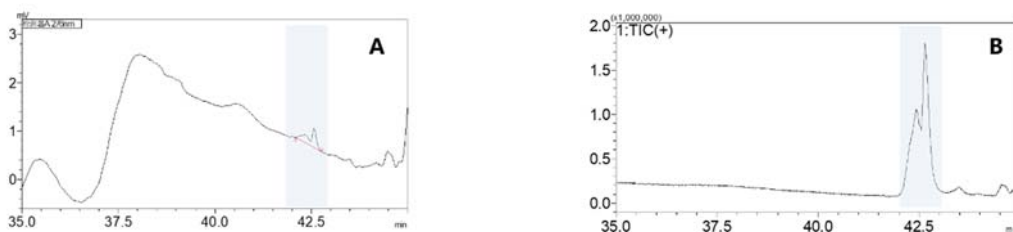


图 8. 阿托西班三聚体二维液相色谱图 (A) 和 MS¹ 总离子流色谱图 (B)

1:MS(+) RT:[42.581-42.758]

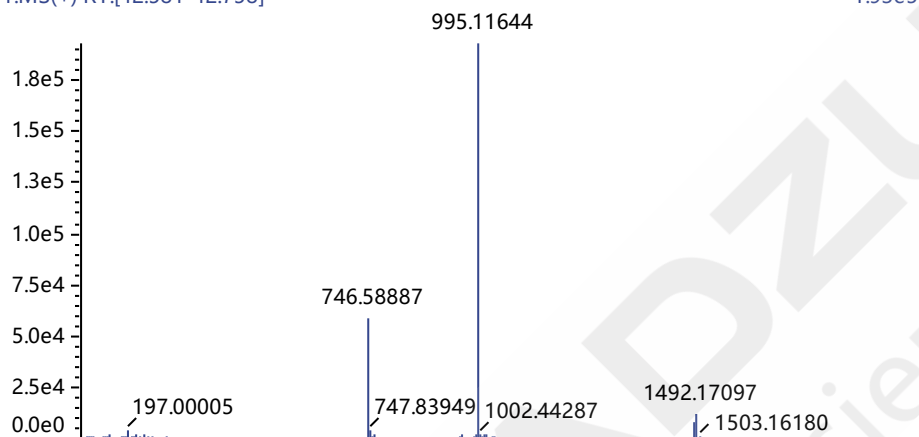


图 9. 阿托西班三聚体的 MS¹ 质谱图

使用Insight Explore软件中分子式预测功能对分子离子峰基于准确分子量和同位素丰度比进行预测, 预测结果显示, 阿托西班三聚体的[M+2H]²⁺的质荷比误差为-0.087mDa, [M+3H]³⁺的质荷比误差为-0.151mDa, 相对偏差均小于1ppm。

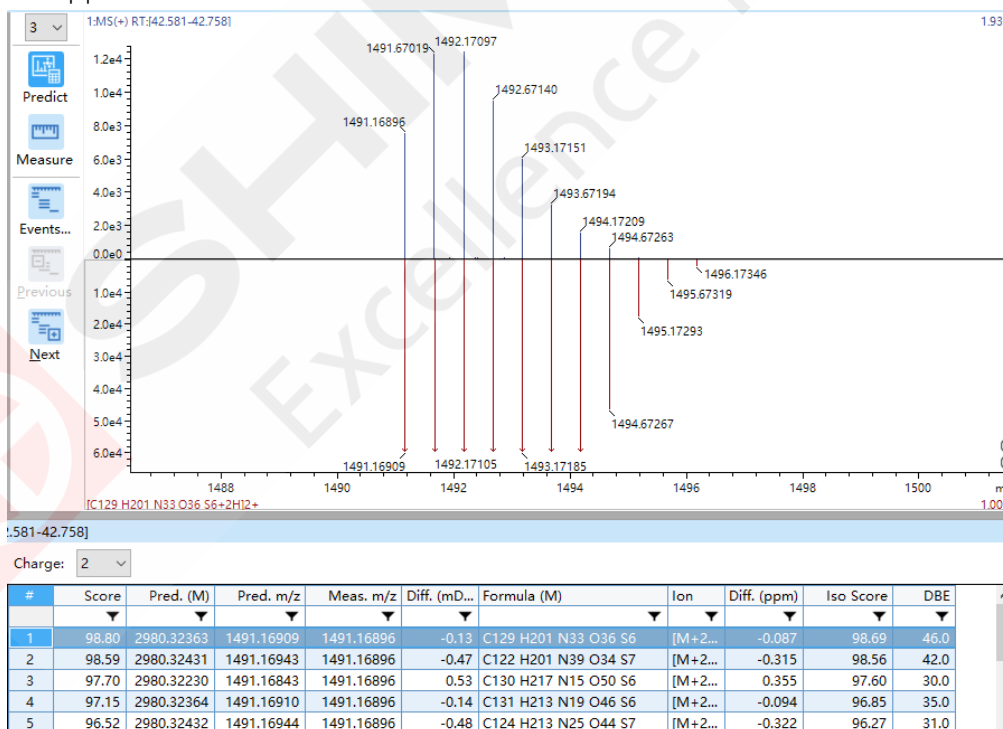


图 10. 阿托西班三聚体的[M+2H]²⁺ 峰分子式预测结果

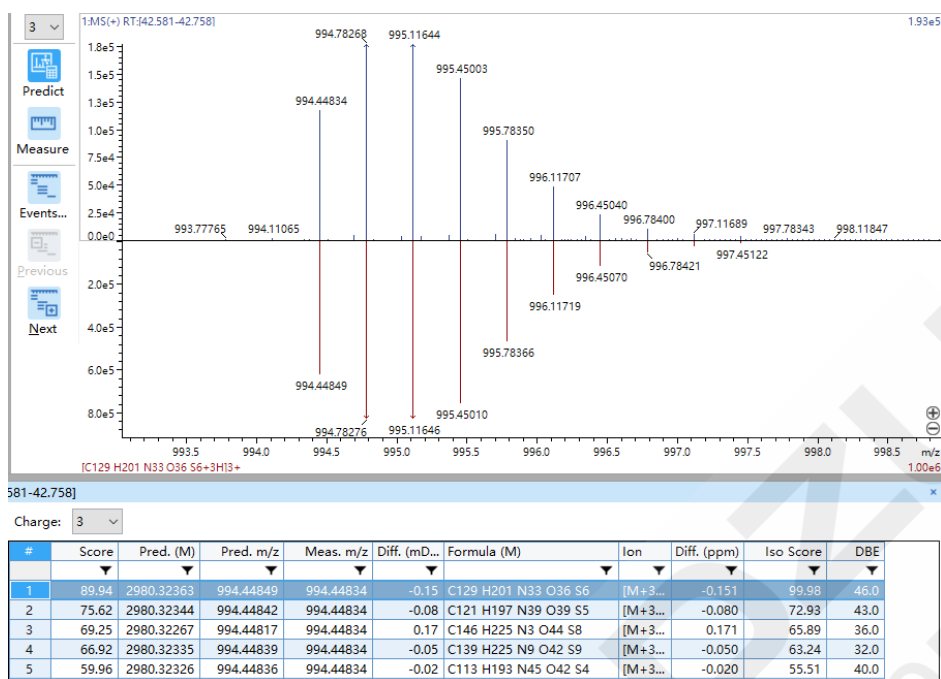


图 11. 阿托西班三聚体的[M+3H]³⁺ 峰分子式预测结果

使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测阿托西班三聚体的分子量，如图 17 所示，阿托西班三聚体的预测分子量为 2980.32690，误差为 3.27 mDa，相对偏差为 1.10 ppm。

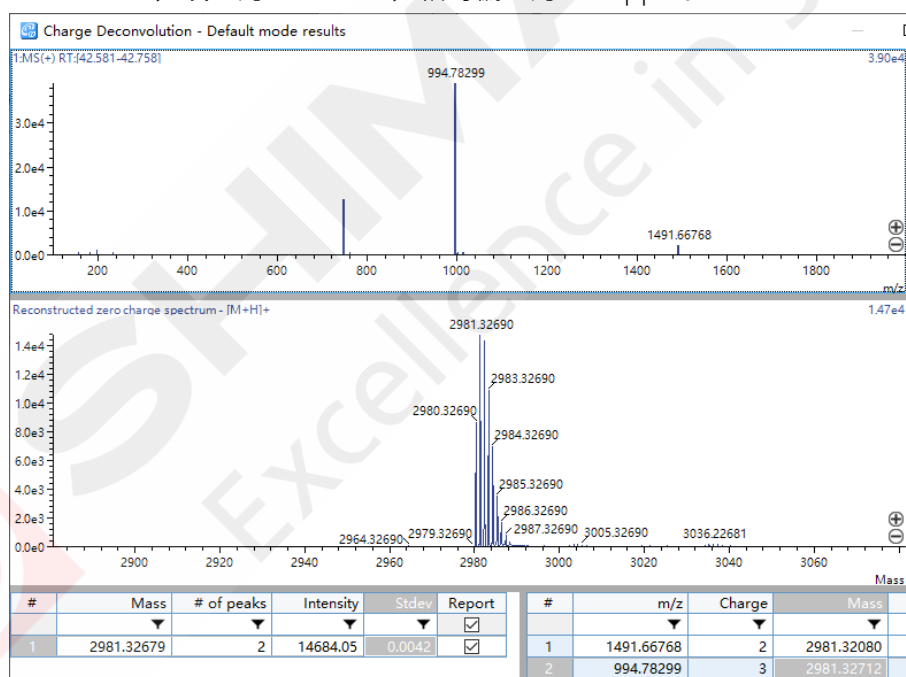


图 12. 阿托西班三聚体解卷积分析结果

3. 结论

本实验采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 对多肽药物阿托西班中的多聚体杂质进行定性分析。测试结果使用岛津 Insight Explore 对杂质分子式进行预测，结果显示阿托西班二聚体和三聚体 MS¹ 离子质荷比同理论值均小于 1 mDa。使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测目标物的分子量，预测分子量和理论分子量误差小于 3 ppm。

2.4 定性分析左卡尼汀中未知杂质

摘要： 本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9050 对左卡尼汀中未知物杂质进行定性分析。测试结果使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对杂质的分子式进行预测，结果显示未知物杂质的 MS¹ 的离子质荷比同理论值均小于 1 mDa，使用 Insight Explore 软件进行二级碎片匹配，匹配度良好，且碎片均小于 1 mDa。

关键词： Trap-Free 2DLC+LCMS-9050 左卡尼汀 杂质鉴定

技术特点：

- ❖ 利用 Trap-Free 2DLC+LCMS-9050 系统通过中心切割技术，实现 LCMS 可用非挥发性缓冲盐做流动相。
- ❖ LCMS-9050 兼顾高灵敏度和高质量准确度，为未知物定性分析提供可靠信息。

左卡尼汀是类维生素营养液，又称左旋肉毒碱，是哺乳动物能量代谢中必需的体内天然物质。卡尼汀的主要作用机理为：1) 促进脂酰辅酶A的 β 氧化，通过抑制乙酰基与游离脂酰辅酶A的结合促进脂肪代谢；2) 影响三羧酸循环，促进葡萄糖代谢。临床上某些疾病状态下，自身合成的左卡尼汀不足，会导致细胞代谢过程失调，临床可能出现肌张力减低、肌痉挛和心律失常等症状，需进行必要的左卡尼汀补充治疗，从而纠正心肌细胞的脂肪代谢障碍、改善心肌能力代谢失衡。

药物杂质影响到药物用药的质量安全，在药品

生产和研发过程中，需对合成过程中产生的工艺杂质和储存过程中产生的降解杂质进行了详细的研究。左卡尼汀生产及储存过程中，某些未知杂质可能引起毒副作用和其他不良反应。

本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-free 2DLC+LCMS-9050，可有效解决常规一维分析中使用非挥发缓冲盐无法进质谱的问题，同时一维分析方法不用调整，可保证保留时间分离不受影响。本文对左卡尼汀未知杂质进行了准确定性，为相关检测人员提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 Trap-free 2DLC+LCMS-9050 四极杆飞行质谱联用仪系统。具体配置为

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-20AD XR × 4	自动进样器：	SIL-20ACXR
柱温箱：	CTO-20AC	质谱仪：	LCMS-9050
检测器 A：	SPD-M20A	检测器 B：	SPD-20A
切换阀	FCV-12AH × 2	色谱工作站：	LabSolutions Ver.5.118
	FCV-14AH × 2		

1.2 分析条件

一维液相色谱条件:

色 谱 柱 : Ultimate NH2 (250 mm×4.6 mm I.D., 5μm)

流 动 相 : 磷酸二氢钾缓冲液(磷酸二氢钾 6.81g, 加水溶解至 1000 mL, 磷酸调节 pH 值至 4.0) -乙腈 (35:65, v:v)

流 速 : 1.0 mL/min

柱 温 : 30°C

进 样 量 : 10 μL

洗脱方式 : 等度洗脱

二维液相色谱条件:

色 谱 柱 : Hilic-Z (150 mm×2.1 mm I.D., 2.7μm)

流 动 相 : 0.1%甲酸水-乙腈 (30:70, v:v)

流 速 : 0.3 mL/min

柱 温 : 30°C

洗脱方式 : 等度洗脱

LCMS-9050 质谱条件:

离 子 源 : APCI(+)

接 口 电 压 : 4.5 kV

加热模块温度 : 200°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

D L 温 度 : 200°C

干燥气流速 : 5.0 L/min

接 口 温 度 : 350°C

扫 描 模 式 : MS, MS/MS

1.3 样品前处理方法

准确称取左卡尼汀注射液 (1 g/10 mL) 样品, 过0.22 μm滤膜过滤后, 上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 一维 UV 色谱图

从图中可以看出在左卡尼汀主峰前有 2 个未知杂质峰, 通过设置不同切阀时间, 可将目标 2 个杂质峰切入第二维液相, 通过出峰处压力变化, 可知 2 个成分均成功切入第二维液相。

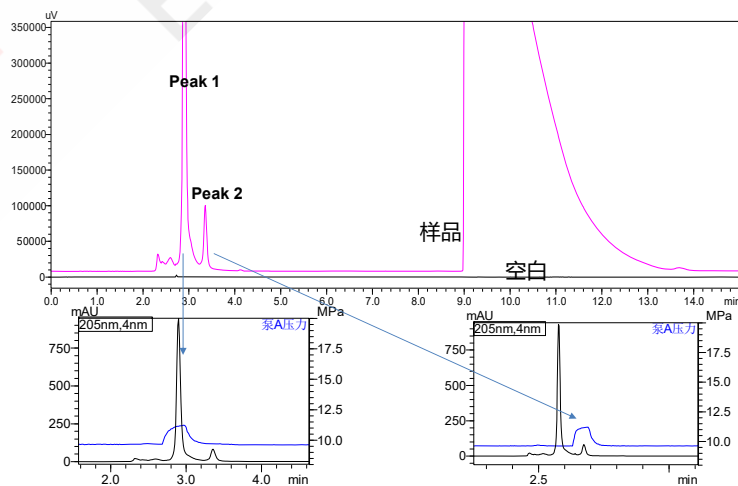


图1. 左卡尼汀一维UV光谱图及切阀压力变化图

2.2 杂质 1 结构解析

根据杂质 1 一维的保留时间, 进行切阀程序的设置, 可将杂质 1 切入对应的 loop 中, 通过对质谱信息解析, 使用 Insight Explore 软件中分子式预测功能对未知峰基于准确分子量和同位素丰度比进行预测, 预测结果显示 m/z 为 85.02807 的分子式为 $C_4H_4O_2$, $[M+H]^+$ 同理论质荷比误差为 -0.34 mDa, 结果如图 2 所示。

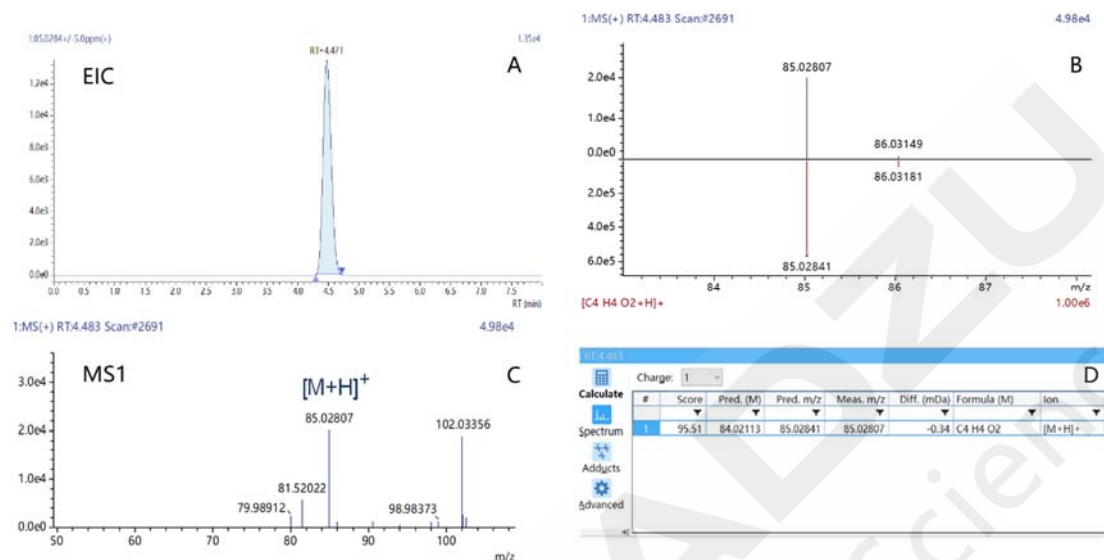


图 2. 杂质 1 一级质谱图及分子式预测结果

(A: EIC 提取离子流, B: 同位素峰匹配图, C: 对应 MS1 质谱图, D: 分子式预测结果)

将 Labsolutions Insight Explore 软件预测出的可能分子式及搜库得到的可能结构式, 进行 MS² 的进一步的匹配, 利用 Labsolutions Insight Explore 软件分析中的 Assign 功能对质谱图中碎片离子进行匹配分析, 进而对预测出的结构式做进一步确定。

结合二级碎片信息, $C_4H_4O_2$ 的搜库比对结构可能为呋喃酮, 匹配结果如下图 3 所示: 碎片离子的匹配度良好, 碎片离子 m/z 39.02195、44.99666、57.03330 同理论值误差均小于 1 mDa。

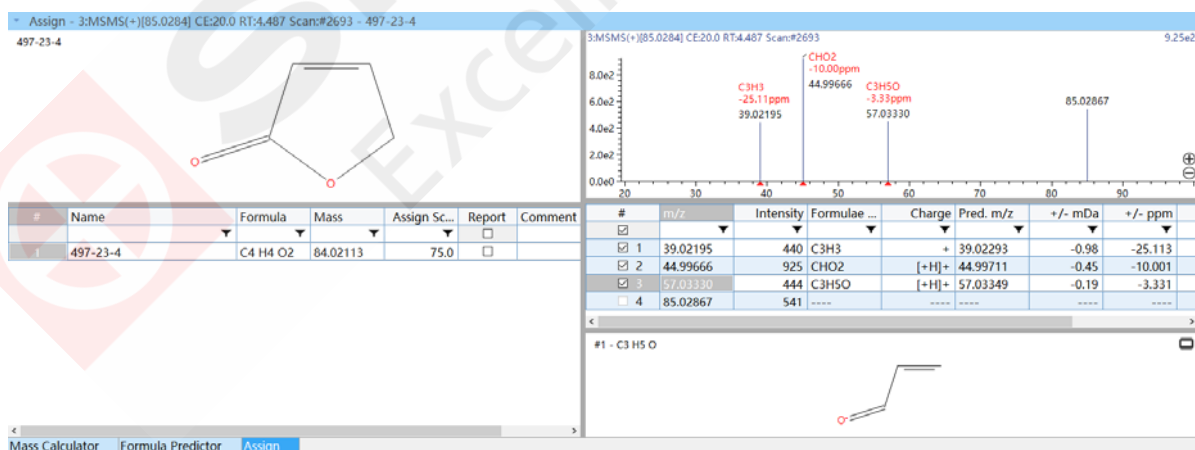


图 3. 杂质 1 $C_4H_4O_2$ 二级结构匹配结果

根据碎片结果，推测杂质 1 呋喃酮可能的裂解方式如下图 4 所示：

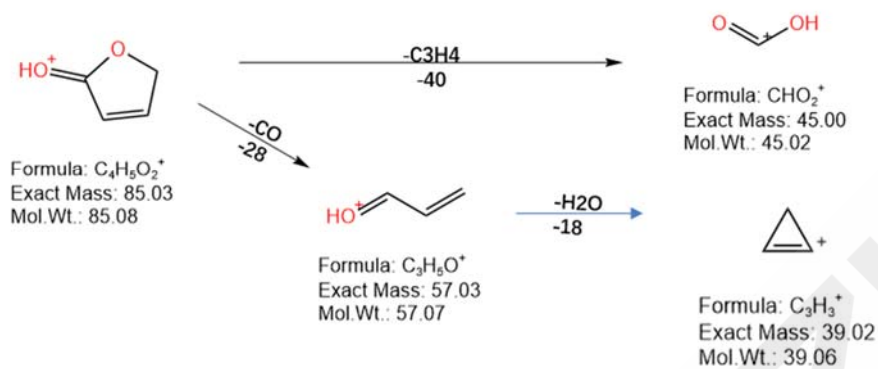


图 4. 呋喃酮可能裂解方式

2.3 杂质 2 结构解析

根据杂质 2 在一维液相色谱中的保留时间，更新时间程序的阀切换时间。杂质在二维的 MS1 级质谱图如下图 5 所示，在负离子模式下，使用 LabSolutions Insight Explore 软件中分子式预测功能对未知峰基于准确分子量和同位素丰度比进行预测，预测结果显示 m/z 为 119.03421 的分子式为 $C_4H_8O_4$ ， $[M-H]$ 同理论质荷比误差为 -0.78 mDa。

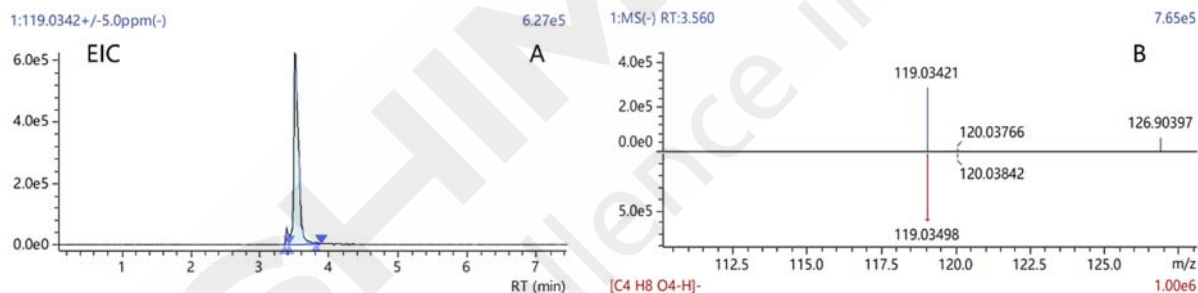


图 5. 杂质 2 一级质谱图及分子式预测结果

(A: EIC 提取离子流, B: 同位素峰匹配图, C: 对应 MS1 质谱图, D: 分子式预测结果)

将 Labsolutions Insight Explore 软件预测出的可能分子式及搜库得到的可能结构式，进行 MS² 的进一步的匹配，利用 Labsolutions Insight Explore 软件分析中的 Assign 功能对质谱图中碎片离子进行匹配分析。结合二级碎片信息， $C_4H_8O_2$ 的搜库比对，匹配的结果为 3,4-二羟基丁酸：碎片离子的匹配度良好，碎片离子 m/z 59.01289、73.02855、101.02345、119.03412 同理论值误差均小于 1 mDa。

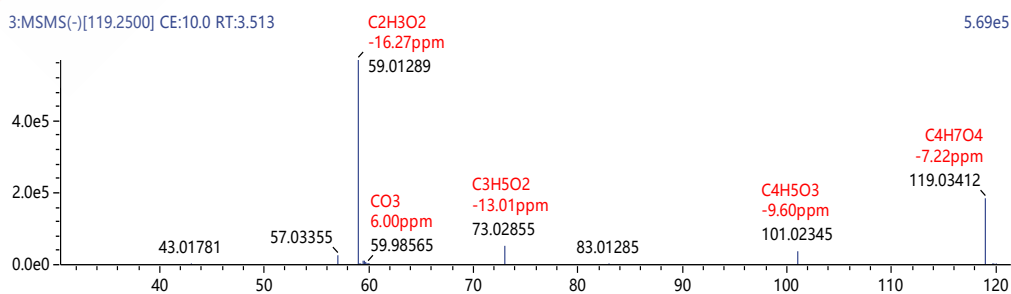


图 6. 杂质 2 二级质谱图结果

3,4-二羟基丁酸推测可能的裂解方式如下图 7 所示。

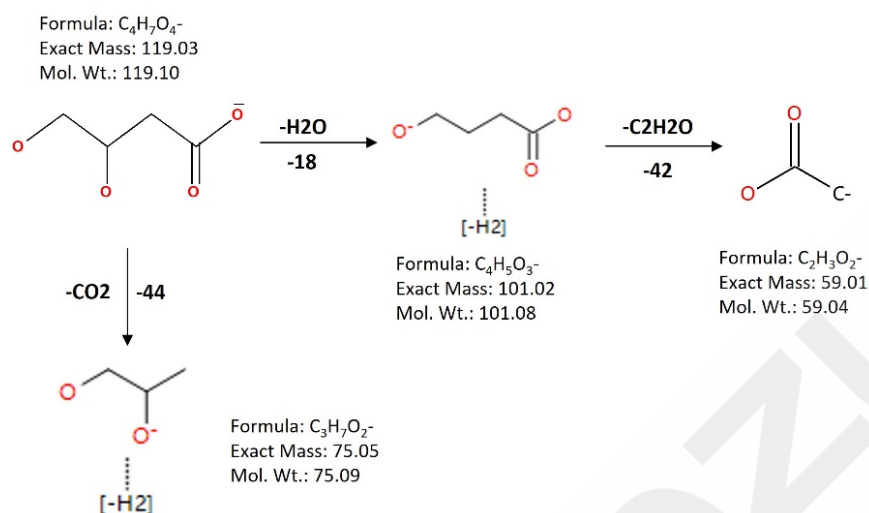


图 7. 3,4-二羟基丁酸可能裂解方式

3. 结论

本实验采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9050 对左卡尼汀的两个未知杂质峰进行定性分析。测试结果使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对杂质的分子式进行预测分析，结果显示杂质 1 可能为呋喃酮，杂质 2 可能为 3,4-二羟基丁酸，且 MS1 和 MS2 的实测分子量同理论分子量误差均小于 1 mDa。

2.5 布美他尼中 N-亚硝基布美他尼的测定

摘要: 本文利用岛津超高效液相色谱-飞行时间质谱仪,建立了布美他尼中杂质N-亚硝基布美他尼的检测方法。亚硝基布美他尼在1.0~20 ng/mL浓度范围内,其相关系数大于0.999,精确度在94.2%~105.2%;回收率为91.59~104.71%;对不同浓度的标准溶液平行分析6次,其保留时间RSD为0.08~0.16%,面积RSD为0.89~2.94%,仪器精密度良好。该方法满足检测要求,同时采用了切阀的方式减少质谱的污染,可有效应对FDA发布的对于布美他尼药物产品中的亚硝胺类杂质N-亚硝基布美他尼的检测。

关键词: LCMS-Q-TOF N-亚硝基布美他尼 定量检测

技术特点:

- ❖ 使用离子累积技术,可提高目标物灵敏度约 20 倍。
- ❖ 采用自动进样器的 Co-injection 功能(共进样模式)消除溶剂效应对峰形的影响。

布美他尼(bumetanide)是一强效利尿剂。化学名为3-丁氨基-4-苯氧基-5-磺酰基苯甲酸。分子式:C₁₇H₂₀N₂O₆S,分子量364.42。临床上布美他尼主要用于治疗水肿疾病,包括充血性心力衰竭、肝硬化、肾脏疾病,高血压尤其伴有肾功能不全或高血压危象等。

在一些布美他尼药物产品中发现可能存在或形成N-亚硝基布美他尼。为帮助确保布美他尼药物产品和药物物质的安全和质量,本文建立了使用岛津四极杆飞行时间质谱联用仪检测布美他尼中N-亚硝基布美他尼的方法,用于确定是否存在布美他尼亚硝胺药物相关杂质(NDSRI)。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪,具体配置为:

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-403
输液泵	: LC-40D XS × 2	柱温箱	: CTO-40C
自动进样器	: SIL-40C XS	质谱仪	: LCMS-9050
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118, Insight Ver. 4.0 SP2		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack Velox C18 (100 mm×2.1 mm I.D, 2.7 μm) 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-32009-03		
流动相	: A: 0.1%甲酸水溶液; B: 乙腈		
进样体积	: 10 μL	柱温	: 40°C
流速	: 0.4 mL/min	进样模式	: 同时注入 (15 μL 水)
洗脱方式	: 梯度洗脱,初始浓度为 B 相 20%,时间程序见表 1。		

表 1. 液相梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.00	Pumps	Pump B Conc.	40
7.50	Pumps	Pump B Conc.	90
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.10	Pumps	Pump B Conc.	20
11.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式	: ESI+	雾化气流速	: 3.0 L/min
接口电压	: +4.5 kV	干燥气流速	: 10.0 L/min
接口温度	: 300°C	加热气流速	: 10.0 L/min
D L 温度	: 250°C	加热块温度	: 400°C
扫描模式	: SIM (15 ppm), m/z: 394.1067		
M S 程序	: 分析开始时分流阀选择进样侧, 具体切阀程序见表2。		

表 2. MS 程序

No.	时间	命令
1	7.800	分流阀: 流路切换 排液侧
2	10.500	分流阀: 流路切换 排液侧

1.3 校准品及样品制备

校准曲线制备: 以甲醇为稀释剂, 配置浓度约为 100 ng/mL 的 N-亚硝基布美他尼对照品储备液, 随后用稀释剂将标准品储备液溶液分别配制为 1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 ng/mL 的标准品溶液。

2. 结果与讨论

2.1 共进样 (Co-injection 功能)

分别使用标准进样模式以及同时注入模式采集 (图 1), 使用标准模式时由于溶剂效应的存在导致峰形差, 同时注入模式可以消除溶剂效应对色谱峰的影响。



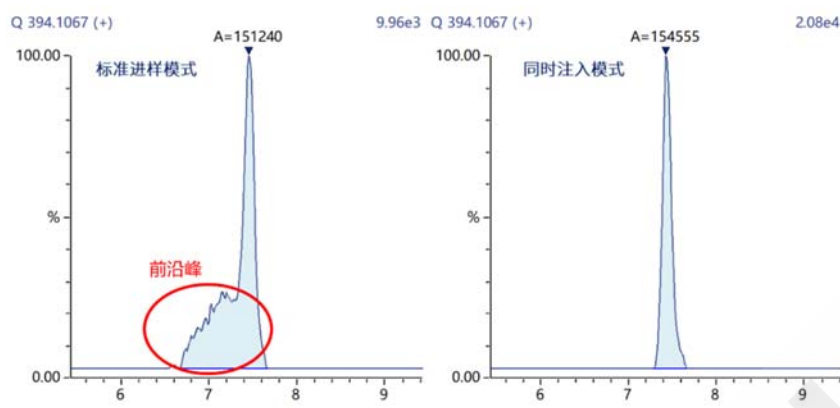


图 1. 不同进样模式的设置方式（上）以及标准溶液色谱图（下）

2.2 离子累积技术 (UF-Accumulation)

不使用离子累积功能时，将进行连续离子流测定。使用此功能时，可以通过在 Q2 碰撞池内积累离子，使离子释放与正交加速单元的离子射出同步，从而提高离子的使用效率。如图 2 所示，使用离子累积技术时（即 ID 选项框不勾选），可以大幅度提高目标物的响应（提升约 20 倍），有利于定量分析。

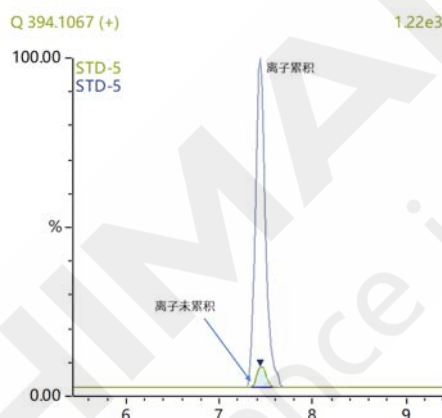


图 2. 离子累积模式的设置方式（上）以及两种模式对比图（下）

2.3 色谱图

N-亚硝基布美他尼 MS 色谱图及布美他尼 PDA 色谱图如下所示，在 7.8~10.5 min 内将布美他尼切入废液中，防止过高的浓度污染质谱。

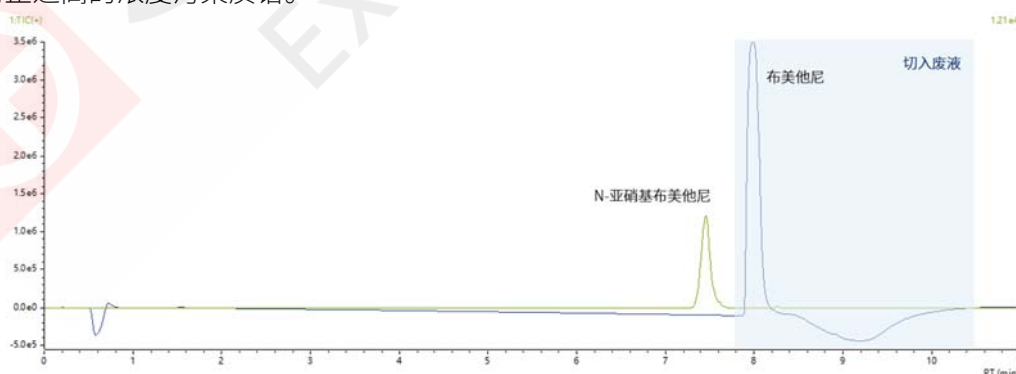


图 3. N-亚硝基布美他尼及原料药布美他尼色谱图

2.4 校准曲线

按照 1.3 项下配制方法，配制校准曲线浓度点对应的溶液。以化合物浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标进行分析。N-亚硝基布美他尼在 1.0~20.0 ng/mL 浓度范围内相关系数大于 0.999，精确度在 94.2%~

105.2%，曲线结果如图 4 所示。

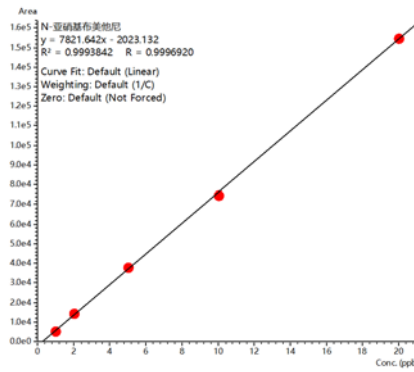


图 4. 校准曲线结果

2.5 精密度测定结果

分别取低浓度和高浓度点样品，连续进样 6 针考察精密度，结果如表 3 所示。

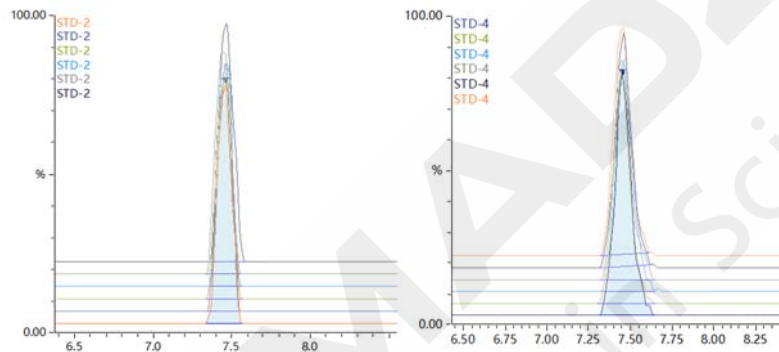


图 5. 不同浓度水平下连续 6 针叠加图 (左: 2 ng/mL; 右: 10 ng/mL)

表 3. 精密度测定结果 (n=6)

浓度	2 ng/mL		10 ng/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	7.46	14488	7.45	75717
2	7.46	14340	7.45	73903
3	7.47	13868	7.46	75132
4	7.44	14875	7.45	73842
5	7.46	15083	7.46	74955
6	7.46	14427	7.46	74481
平均值	7.46	14514	7.45	74672
RSD(%)	0.16	2.94	0.08	0.98

2.6 加标回收率及实际样品测试

按照 1.3 项下配制方法，分别配制供试品溶液以及加标溶液，其中每个浓度水平加标溶液平行配置 3 份，按 1.2 中的分析条件对供试品及加标样进行分析，测试供试品中 N-亚硝基布美他含量为 1.84 ng/mL，色谱图如图 6 所示；加标回收率在 91.59~104.71%间；如表 4 所示。

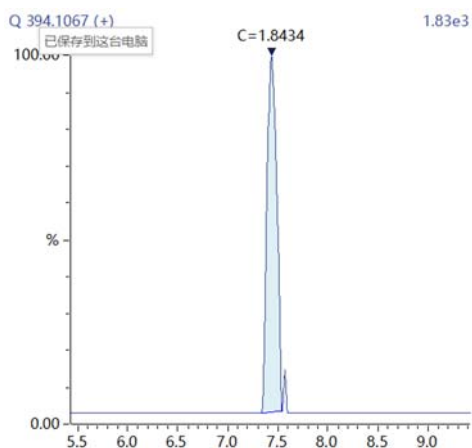


图 6. 供试品溶液色谱图

表 4. 加标样品分析结果

	供试品浓度 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	测定浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
LQC	1.84	2	3.88	101.63
			3.86	101.07
			3.94	104.71
HQC	1.84	10	11.00	91.59
			11.40	95.60
			11.47	96.29

3. 结论

本文利用岛津公司的LCMS-9050四极杆飞行时间液质联用仪，建立了对布美他尼中N-亚硝基布美他尼的测定方法。使用SIM模式采集，外标法定量分析。N-亚硝基布美他尼在1.0~20.0 ng/mL浓度范围内相关系数大于0.999，精确度在94.2%~105.2%；加标回收实验中，考察了2个不同浓度水平，回收率为91.59~104.71%；重复性实验中，对不同浓度的标准溶液重复进样6次，其保留时间RSD为0.08~0.16%，面积RSD为0.89~2.94%，，仪器精密度良好。该方法能满足FDA发布的对于布美他尼药物产品中的亚硝胺类杂质N-亚硝基布美他尼的检测。

第 3 章 Q-TOF 在中药材及中药配方颗粒的应用

UPLC-Q-TOF 技术在中药材指纹图谱的构建与质量评价中扮演着核心角色，其显著贡献在于对指纹图谱中共有峰的精准指认与鉴定，不仅覆盖了已知化学成分，还深入探索了未知成分。传统上，HPLC 或 UPLC 已被广泛应用于中药材指纹图谱的建立，而相似度评价与主成分分析 (PCA) 技术则进一步加速了主成分峰与差异峰的辨识过程。在此基础上，UPLC-Q-TOF 技术的引入，通过超高效液相色谱与四极杆飞行时间质谱的串联，实现了对总离子流色谱图的精细采集。

该技术流程首先聚焦于色谱图中各色谱峰的精确质量数识别，结合保留时间信息，全面表征中药材中的复杂化学成分。随后，利用对照品比对、文献参照及高分辨质谱数据的深度解析，依据精确质量数及同位素分布规律，推导出分子式，并通过二级质谱特征及文献资料的综合分析，准确鉴定中药材中的化学成分。这一系列步骤不仅深化了对中药材化学组成的理解，更为中药材的质量控制提供了科学依据。

对于中药复方制剂的质量评价，其原理虽与中药材化学成分分析相似，但关键在于完成化学成分的鉴别后，还需进一步追溯这些成分至具体药材，以揭示不同药材对复方整体化学成分的贡献度。近年来，UPLC-Q-TOF 技术与天然产物化合物-高分辨质谱数据库的结合，以及大数据对比分析策略的运用，极大地加速了中药复方制剂化学成分的识别及其药材归属的判定，从而成为中药制剂质量评价领域的一项重要革新。

本章内容将围绕以下几个方面展开详细论述：一是中药材指纹图谱的构建与化学成分析；二是利用该技术对不同来源、不同产地中药材的质量进行全面评价；三是探讨 UPLC-Q-TOF 在中药复方制剂研究及质量评价中的应用案例，以期为中药材及中药复方制剂的质量控制提供实践指导与理论支持。

3.1 石椒草配方颗粒成分定性鉴定

摘要：本文使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪对石椒草配方颗粒成分进行了高分辨质谱鉴定。利用 MSDIAL 软件、Labsolutions Insight Explore 软件和 Chemspider 数据库，对正负两种离子模式下的色谱峰进行了分子式预测和结构式解析。结果显示样品中共鉴定出 22 种可能的化合物，主要为香豆素类化合物，此外还有少量黄酮类、脂肪酸等天然活性物质。

关键词：四极杆飞行时间质谱 石椒草配方颗粒 鉴定

技术特点：

- ❖使用高分辨质谱对石椒草配方颗粒进行成分分析。
- ❖结合 MSDIAL 与 Insight Explore 软件对数据进行分析。

石椒草为芸香科植物石椒草属的一种多年生草本植物，在我国主要分布于气候温和、湿润，海拔 1000-2800 米的西南地区，如云南东北部、四川西南部等，在印度东北部和日本等地也有一定分布；石椒草的干燥全草药用价值较大，为民间常用植物药，具有疏风解表、清热解毒、行气活血等功效，可用于治疗支气管炎、肺炎、胃痛腹胀、泌尿系统感染等。此外，石椒草在我国彝族传统医药中占有重要的地位。

中药配方颗粒以中药饮片为原料，经现代工艺提取、浓缩、干燥、制粒而制成颗粒制剂，可供中医临床调配使用。它保留了传统中医药辨证论治、复

方配伍、随证加减的优势和特色，同时弥补了传统中药汤剂煎煮费时、储存携带不便等不足，更能体现中药用药的现代化、规范化和标准化，是对传统中药的重要创新。但配方颗粒的原料品种与真伪不易确定，导致其质量难以把控，确保其质量稳定、可靠成为亟待解决的问题。

本文以石椒草配方颗粒为例，使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪，结合相关软件和数据库，对提取液中的成分进行了鉴定，为广开药源，改革剂型，提高疗效提供必要的依据，同时也为其质量标准的建立提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱联用仪系统。具体配置为：

系统控制器	： SCL-40	在线脱气机	： DGU-405
输液泵	： LC-40D X3	质谱仪	： LCMS-9050
自动进样器	： SIL-40C X3	柱温箱	： CTO-40C
色谱工作站	： LabSolutions Ver.5.118 LabSolutions Insight Explore Ver.4.0		

1.2 分析条件

液相条件

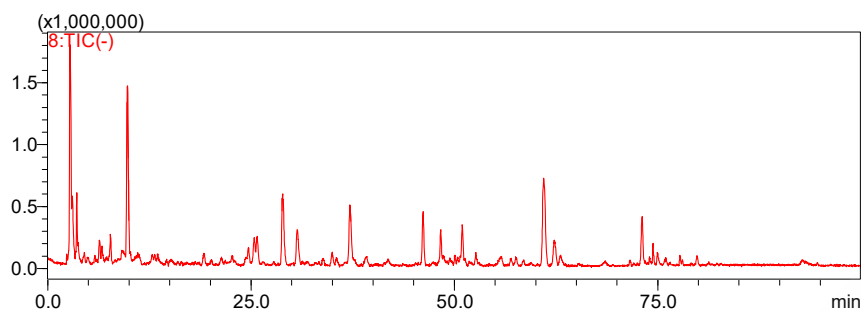


图 1. 石椒草配方颗粒提取液 TIC 色谱图 (上图为正模式, 下图为负模式)

2.2 公共数据库初步筛查

使用 MSDIAL 软件, 通过 MSMS-Public-Pos-VS15、MSMS-Pos-Vaniya-Fiehn_Natural_Products 数据库和 MSMS-Public-Neg-VS15、MSMS-Neg-Vaniya-Fiehn_Natural_Products 数据库分别对正模式数据和负模式数据进行初步筛查。根据二级质谱图匹配情况, 对分析物进行初步筛选。以负模式, 保留时间 37.16 min, m/z 623.1624 为例, 图 2 为该化合物二级质谱图匹配情况。

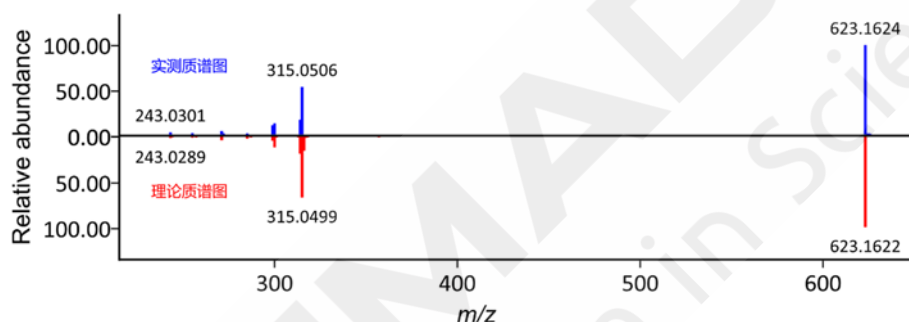


图 2. 公共数据库 (MSMS-Public-Neg-VS15) 中 m/z 623.1624 二级质谱匹配图

2.3 一级质谱图推断分子式

经过公共数据库初步筛查, 得到二级质谱匹配度较高的 m/z 信息, 进一步使用 LabSolutions Insight Explore 软件, 分别对正、负离子模式的 MS^1 图进行解析。以提取液负模式, 保留时间 37.16 min 为例。通过对该未知峰提取及峰形比对, 可知该处对应的化合物为 m/z 623.16246, 图 3 为该保留时间下 MS^1 质谱图, 图 4 为其提取离子流色谱图。

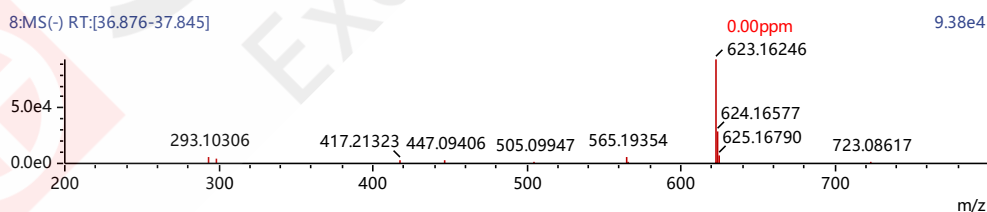


图 3. RT 37.16 min 处的 MS^1 质谱图

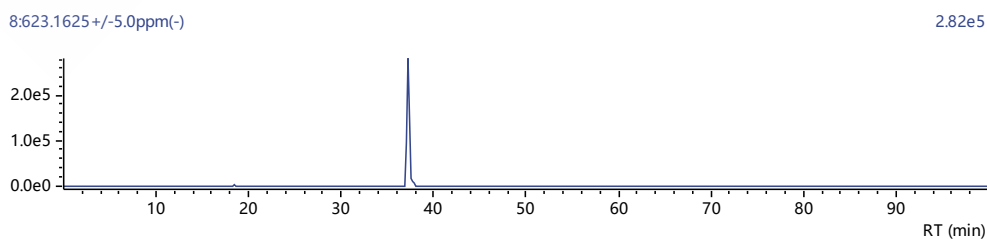


图 4. m/z 623.16246 提取离子流色谱图

基于准确分子量和同位素丰度比，利用Labsolutions Insight Explore件中的Calculate Formula功能预测其可能的分子式。预测结果显示m/z 623.16246的分子式为C₂₈H₃₂O₁₆，[M-H]⁺质荷比同理论质荷比误差为1.123 ppm，同位素分布匹配得分为95.27，结果见图5。

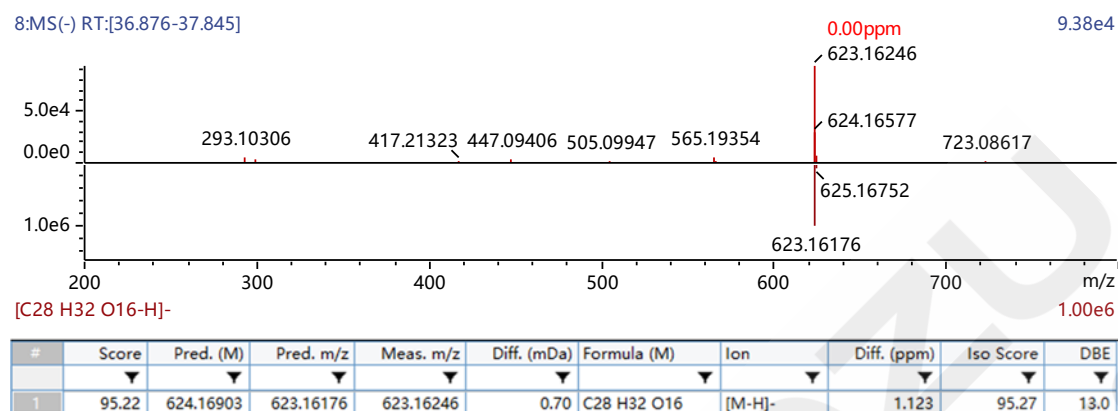


图5. m/z 623.16246分子式预测结果

2.4 MS²结构式及化合物推测

为确认该化合物的结构式和化合物名称，利用 Labsolutions Insight Explore 软件数据库检索和 Assign 功能进一步分析。首先，通过预测的分子式在线搜索 Chemspider 数据库，列出与分子式相符的化合物。然后，使用 Assign 功能，对 MS² 质谱图中碎片离子与可能的结构式进行自动匹配分析，为化合物的进一步确定提供依据。

C₁₂H₁₂O₅ 的预测结果见图 6，该化合物可能是 Narcisin（水仙苷），图片左侧显示该化合物的结构式，右侧显示其碎片解析结果。

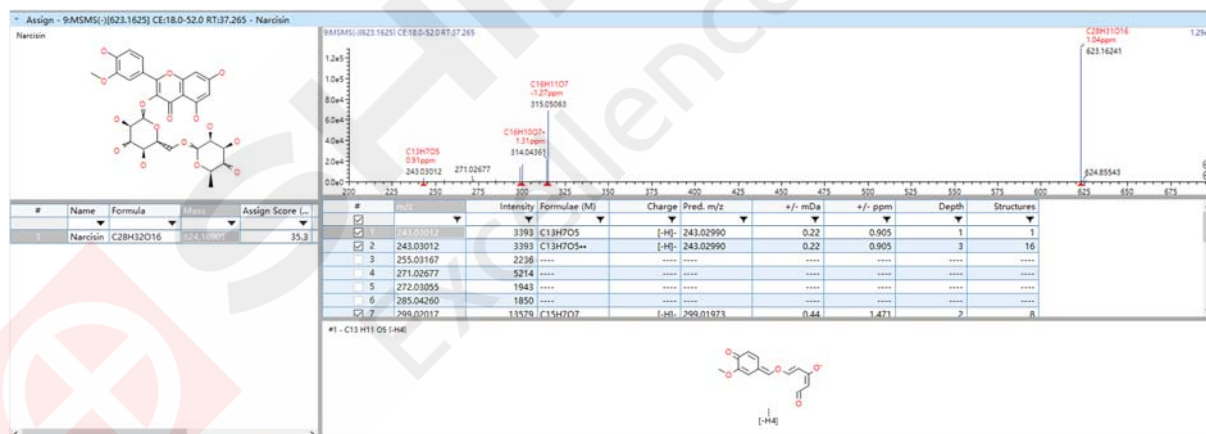


图 6. C₁₂H₁₂O₅ 的预测结果

2.5 提取液成分鉴定结果

采用上述流程，在石椒草配方颗粒提取液中共识别出 22 种可能的化合物，包括香豆素类、黄酮类、脂肪酸等天然活性物质。表 2 为鉴定结果列表。

表 2. 石椒草配方颗粒提取液成分鉴定结果列表

No.	R.T. (min)	m/z	Type	Predicted Name	Predicted Formula	Predicted m/z	Diff. (ppm)
1	3.03	268.1039	[M+H] ⁺	Adenosine/腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.1040	-0.26
2	19.24	357.1195	[M-H] ⁻	Sweroside/獐牙菜苷	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	357.1191	1.12
3	22.95	161.0243	[M-H] ⁻	3 hydroxycoumarin/3-羟基香豆素	C ₉ H ₆ O ₃	161.0244	-0.19
4	28.86	303.0502	[M+H] ⁺	Quercetin/槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0499	1.09
5	28.88	465.1033	[M+H] ⁺	Hyperoside/金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1027	1.25
6	28.88	611.1618	[M+H] ⁺	Rutin/芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1607	1.87
7	34.96	505.0994	[M-H] ⁻	6"-O-Acetylisouercitrin/ 6"-O-乙酰基异槲皮苷	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505.0988	1.35
8	35.52	593.1519	[M-H] ⁻	Nicotiflorin/山奈酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1512	1.26
9	37.17	623.1624	[M-H] ⁻	Narcisin/水仙苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.1618	1.12
10	38.99	277.1072	[M+H] ⁺	Dihydromethysticin/二氢麻醉椒素	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	276.0997	0.69
11	37.15	317.0659	[M+H] ⁺	Isorhamnetin/异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317.0655	1.14
12	50.97	353.0662	[M+H] ⁺	Dephnoetin/西瑞香素	C ₁₉ H ₁₂ O ₇	353.0655	1.81
13	50.97	659.1611	[M+H] ⁺	Rutarenin/繸状芸香甙酯	C ₃₁ H ₃₀ O ₁₆	659.1606	0.79
14	52.87	237.0760	[M+H] ⁺	5,6,7-Trimethoxy-2H-chromen-2- one/5,6,7-三甲氧基香豆素	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	237.0757	1.43
15	56.02	217.0495	[M+H] ⁺	Bergapten/香柑内酯	C ₁₂ H ₈ O ₄	217.0495	-0.05
16	60.20	207.0654	[M+H] ⁺	Scoparone/滨蒿内酯	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	207.0651	1.26
17	62.32	329.2335	[M-H] ⁻	9,10,13-Trihydroxy-11-octadecenoic acid/9,10,13-三羟基-11-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2333	0.46
18	63.37	247.0604	[M+H] ⁺	Pimpinellin/茴芹内酯	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	247.0601	1.34
19	72.23	317.1021	[M+H] ⁺	4',6-Dihydroxy-5,7- dimethoxyflavone/ 4',6-二羟基-5,7-二甲氧基黄酮	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	317.1019	0.57
20	72.90	259.0967	[M+H] ⁺	Luvangetin/鲁望桔内酯	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	259.0964	0.81
21	74.42	229.0861	[M+H] ⁺	trans-resveratrol/反式白藜芦醇	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	229.0859	0.79
22	79.15	255.1018	[M+H] ⁺	3-(alpha,alpha dimethylallyl)psoralen/ 状芸香素	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	255.1015	0.90

3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪对石椒草配方颗粒提取液成分进行了鉴定，利用公共数据库及岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对相关成分进行分子式预测和结构式解析。结果显示在该样品提取液中共鉴定出 22 种可能的化合物，包括香豆素类、黄酮类、脂肪酸等天然活性物质，可为相关研究人员提供参考。

3.2 SFE-LCMS-QTOF 联用测定补骨脂主要成分

摘要: 本文利用岛津超临界流体萃取技术 (SFE) 提取了中药补骨脂中的主要成分, 并利用其中 9 种物质的标准品, 在岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪 (LCMS-QTOF) 上建立了定量标准曲线和高分辨二级质谱库。标准曲线下限 0.2~1 $\mu\text{g/L}$, 上限 50~500 $\mu\text{g/L}$, $R^2 > 0.990$ 。在标准质谱库的基础上, 推断了主要二级碎片离子的裂解路径。根据标准曲线, 测定补骨脂样品中相关物质的含量为 0.27~38.52 mg/g。样品中相关物质的二级质谱与标准谱库匹配良好, 库搜索匹配度 > 90%。

关键词: 四极杆飞行时间质谱 离线超临界萃取 (Offline-SFE) 补骨脂 高分辨质谱库

补骨脂是豆科植物补骨脂的干燥成熟果实, 性味辛、苦、温, 归肾、脾经。补骨脂具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻等功效, 外用可消风祛斑, 主要用于治疗肾阳不足所致阳痿遗精、腰膝冷痛、肾虚作喘、外用也可治疗白瘫风、斑秃。主要化学成分为香豆素类、单萜酚类、黄酮类, 具有雌激素样作用以及抗炎、抗菌、抗真菌、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节的活性, 用于预防和治疗骨质疏松、细菌感染、哮喘和骨关节炎等。然而长期或大量服用补骨脂具有引发肝损伤的潜在危险, 并有光毒性、肾毒性和生殖毒性, 限制了其在临床中的应用。因此,

充分了解补骨脂的化学成分谱, 对全面掌握补骨脂致毒机制至关重要。

传统分析方法需利用甲醇等有机溶剂对补骨脂样品进行萃取, 费时费力且污染较大。本文采用岛津公司超临界流体萃取 (SFE) 技术, 利用超临界态二氧化碳对补骨脂的主要成分进行了快速提取。在 LCMS-9030 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪上建立了 9 种主要成分的标准曲线及高分辨标准二级质谱库, 解析了二级质谱裂解规律。在此基础上, 通过精确质量数及二级质谱对 SFE 提取样品中相应物质进行了确证, 并定量分析了相应浓度。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 Nexera-UC Offline-SFE 超临界萃取系统, 具体配置: SFE-30A 超临界流体萃取单元, LC-30AD_{SF} 二氧化碳输液泵, LC-20AD_{XR} 输液泵 (含 LPGE 低压梯度比例阀), SFC-30A \times 2 背压调节单元, CBM-20A 系统控制器, LabSolutions V 5.91 工作站软件。

岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪, 具体配置: LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A_{SR} 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪, LabSolutions V 5.97 工作站软件, 质谱解析软件 LabSolutions Insight Explore LCMS。

1.2 分析条件

SFE 萃取条件

萃取剂: A: 超临界态二氧化碳; B: 乙醇
萃取流速: 5 mL/min
萃取剂比例: 10% B
静态萃取: 3 min

动态萃取: 8 min
萃取温度: 45 $^{\circ}\text{C}$
萃取背压: 20 MPa
萃取次数: 3 次循环萃取

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack GISS, 2.1 mm I.D. × 100 mm L.,
1.9 μm
流动相: A: 水; B: 甲醇
流速: 0.3 mL/min
进样体积: 1 μL
柱温: 40°C
洗脱方式: 梯度洗脱 (表 1)

表 1. 液相梯度时间程序

Time(min)	%B
0.00	50
1.00	50
5.00	95
8.00	95
8.10	50
10.00	STOP

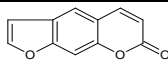
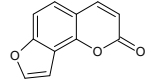
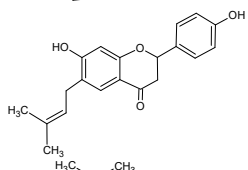
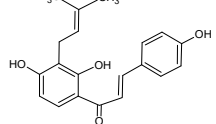
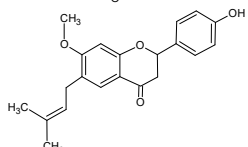
质谱条件

离子源: ESI (+)、ESI (-) 加热模块温度: 400°C
离子源接口电压: 4.0 kV (+)、-3.0 kV (-) 接口温度: 300°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min 采集模式: MS¹ (m/z 50 -400)
干燥气: 氮气 10 L/min MS/MS (m/z 50 - 350)
加热气: 空气 10 L/min 碰撞能量 (CE): (35±17) V
碰撞气: 氩气 ID: ON
脱溶剂管温度: 250°C

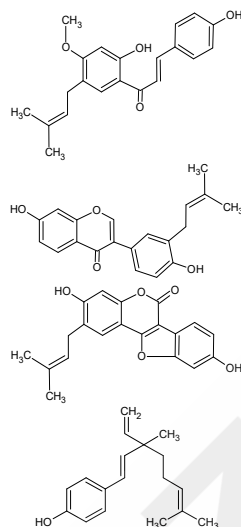
1.3 目标物信息

本次实验 9 种目标物质基本信息如表 2 所示。

表 2. 目标物质基本信息

编号	物质	化学式	分子量	结构式	分析模式
1	补骨脂素	C ₁₁ H ₆ O ₃	186.17		+
2	异补骨脂素	C ₁₁ H ₆ O ₃	186.17		+
3	补骨脂甲素	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	324.37		-
4	补骨脂乙素	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	324.37		-
5	补骨脂二氢黄酮甲醚	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338.40		-

6	4'-O-甲基补骨脂 查尔酮 B	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338.40	
7	新补骨脂异黄酮	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	322.35	
8	补骨脂定	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336.34	
9	补骨脂酚	C ₁₈ H ₂₄ O	256.37	



2. 样品前处理

用 24 目中草药粉碎机将盐炙补骨脂磨成粉末，准确称取 2 g 左右补骨脂粉末样品，放置于 5 mL SFE 萃取罐中，由超临界流体萃取，萃取条件见 1.2 SFE 萃取条件，萃取出液用乙醇吸收，并最终定容至 20 mL。

3. 结果与讨论

3.1 标准曲线绘制

将 9 种目标物标准品配制成混标溶液上机分析，根据 MS¹ 精确 m/z 提取色谱图定量分析（图 1、2），绘制标准曲线（图 3），线性范围及相关系数见表 3。

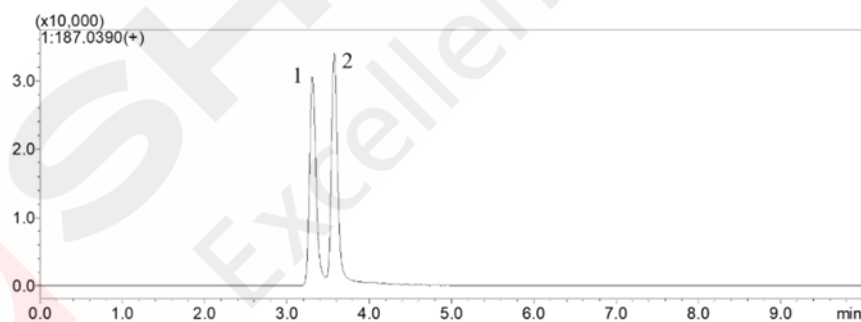


图 1. ESI (+) 模式 100 µg/L 混标提取离子流图 (编号对应物质参见表 2)

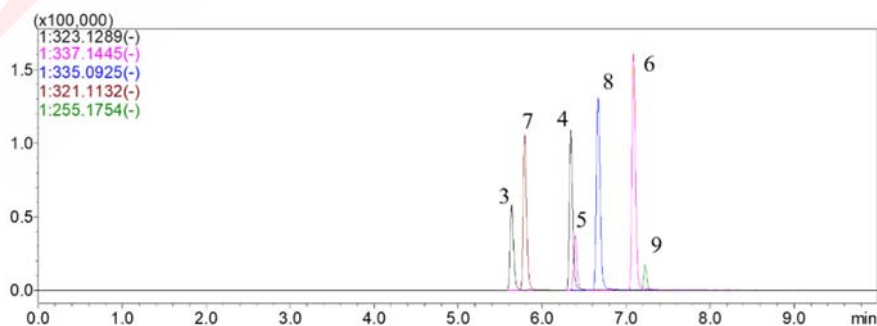


图 2. ESI (-) 模式 100 µg/L 混标提取离子流图 (编号对应物质参见表 2)

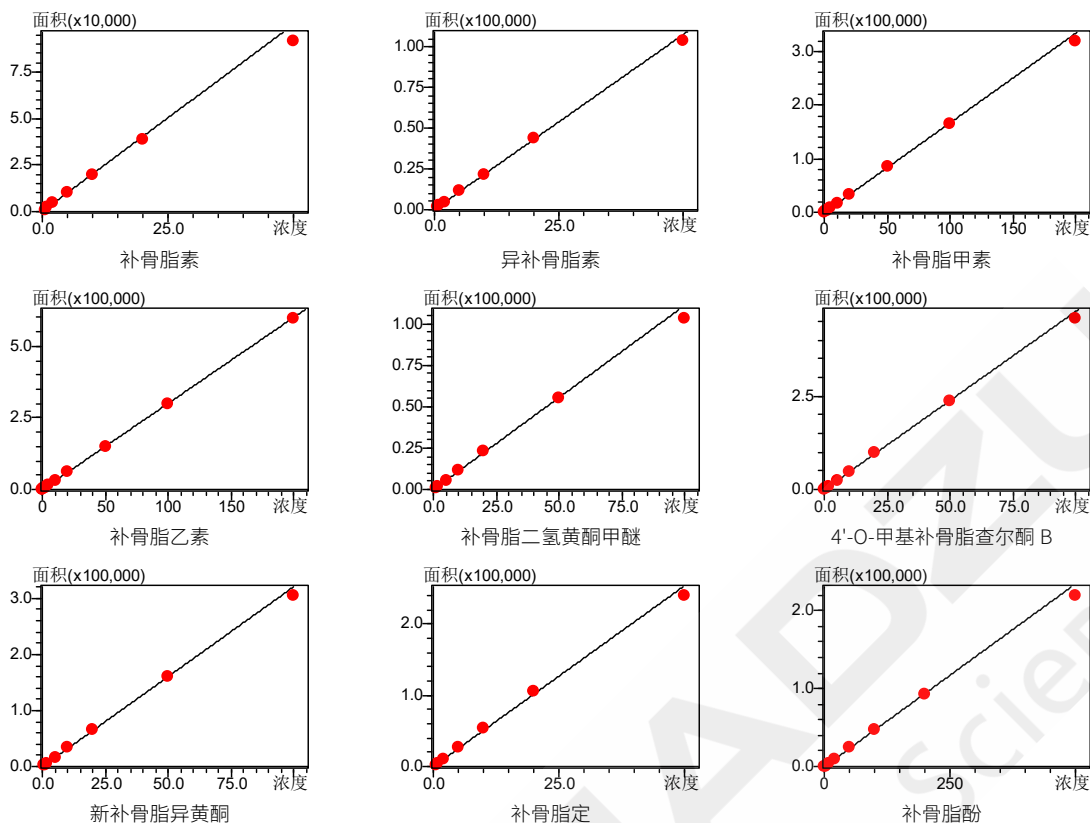


图 3. 目标物质标准曲线

表 3. 标准曲线方程及线性范围

编号	物质	保留时间 (min)	校准曲线	相关系数	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)
1	补骨脂素	3.337	$Y=2007.36X+164.720$	$r^2=0.990$	0.5-50
2	异补骨脂素	3.543	$Y=2143.19X+287.446$	$r^2=0.999$	0.5-50
3	补骨脂甲素	5.663	$Y=1699.27X-236.984$	$r^2=0.999$	0.5-200
4	补骨脂乙素	6.359	$Y=3003.99X-335.959$	$r^2=0.998$	0.2-200
5	补骨脂二氢黄酮甲醚	6.412	$Y=1113.00X-77.1179$	$r^2=0.998$	1-100
6	4'-O-甲基补骨脂查尔酮 B	7.108	$Y=4773.52X-95.5994$	$r^2=0.999$	0.2-100
7	新补骨脂异黄酮	5.799	$Y=3208.57X-174.052$	$r^2=0.997$	0.5-100
8	补骨脂定	6.688	$Y=5080.87X+80.8283$	$r^2=0.998$	0.5-50
9	补骨脂酚	7.249	$Y=469.491X-194.737$	$r^2=0.999$	1-500

3.2 标准质谱库建立及二级质谱解析

连接两通直接进样 1 pg 标准品单标（补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚 10 pg）获取目标物的标准一级和二级质谱图，建立标准质谱库，并推断主要碎片离子的裂解路径。图 4 至图 6 及表 4 展示了补骨脂素的相应结果，9 种物质的完整结果见附件。

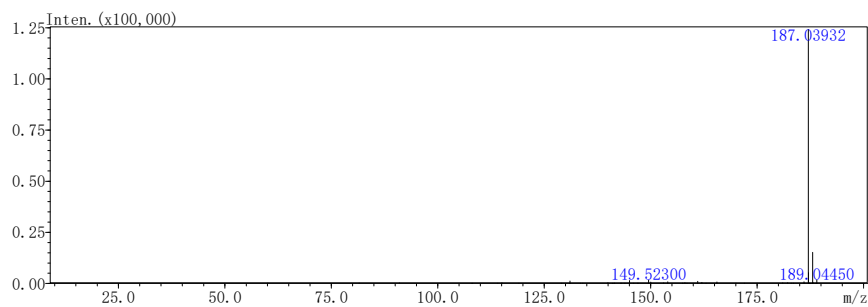


图 4. 补骨脂素一级质谱图

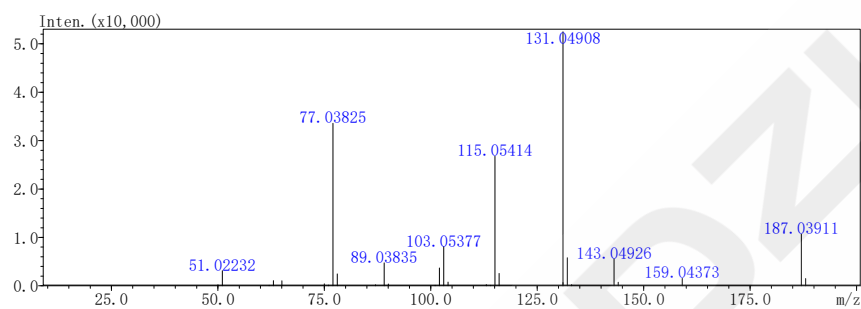


图 5. 补骨脂素二级质谱图

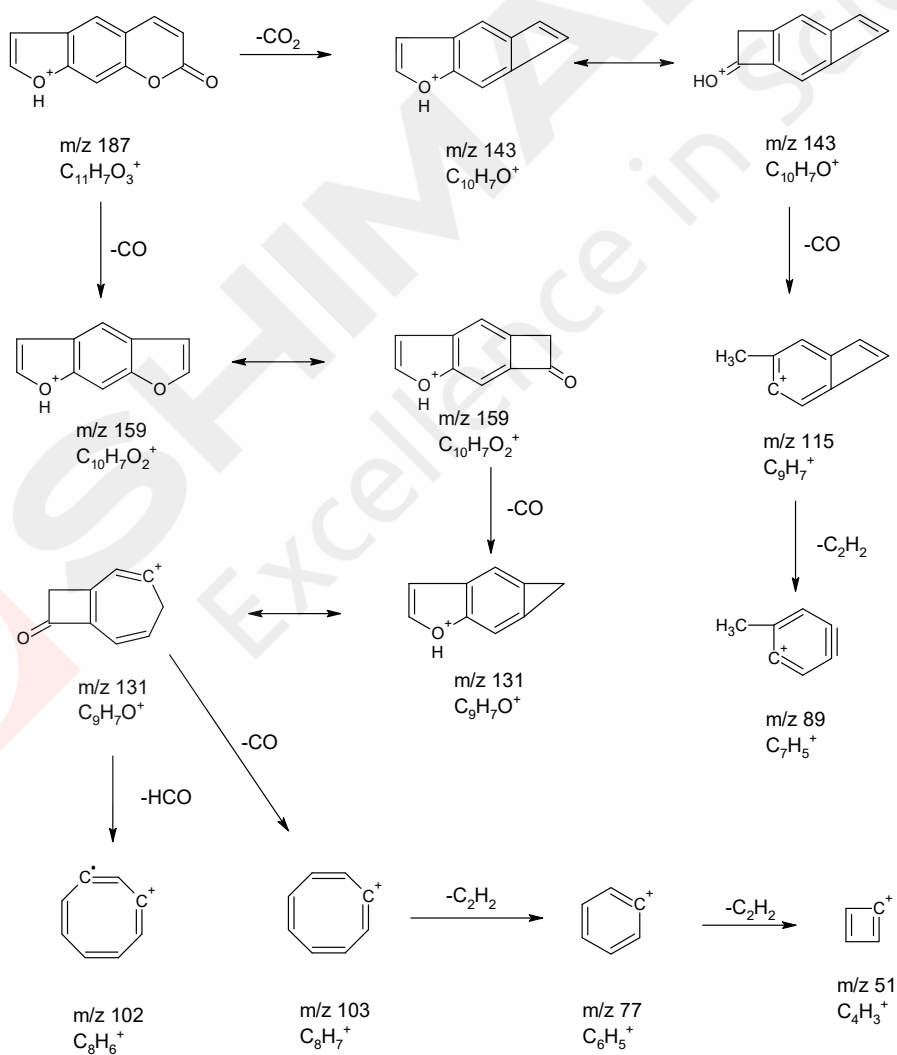


图 6. 补骨脂素可能的二级质谱裂解规律

表 4. 补骨脂素 MS¹ 及主要 MS² 离子信息

离子类型	理论 m/z	实测 m/z	分子式预测 (M)	偏差 (ppm)	同位素得分
[M+H] ⁺	187.03897	187.03932	C ₁₁ H ₆ O ₃	1.85	99.5
[M+H] ⁺	159.04406	159.04373	C ₁₀ H ₆ O ₂	-2.07	0.0
[M+H] ⁺	143.04914	143.04926	C ₁₀ H ₆ O	0.82	98.5
[M+H] ⁺	131.04914	131.04908	C ₉ H ₆ O	-0.45	99.9
[M+H] ⁺	115.05423	115.05414	C ₉ H ₆	-0.72	100.0
[M+H] ⁺	103.05423	103.05377	C ₈ H ₆	-4.46	97.4
[M] ⁺	102.04640	102.04612	C ₈ H ₆	-2.76	52.0
[M+H] ⁺	89.03858	89.03835	C ₇ H ₄	-0.22 mDa	96.5
[M+H] ⁺	77.03858	77.03825	C ₆ H ₄	-0.32 mDa	99.3
[M+H] ⁺	51.02293	51.02232	C ₄ H ₂	-0.61 mDa	0.0

3.3 实际样品分析

将补骨脂粉末萃取液稀释一定倍数后上机分析，色谱图如图 7、8 所示。根据 3.1 建立的标准曲线计算上机样品中目标物浓度，再结合稀释倍数、萃取液体积和所萃取的补骨脂粉末重量计算出粉末中的浓度（表 5）。将实际样品中目标物的二级质谱图在 3.2 中建立的标准谱库中进行搜索，匹配度均>90%（表 5），且能够很好地区分补骨脂素和异补骨脂素这一对同分异构体（图 9）。

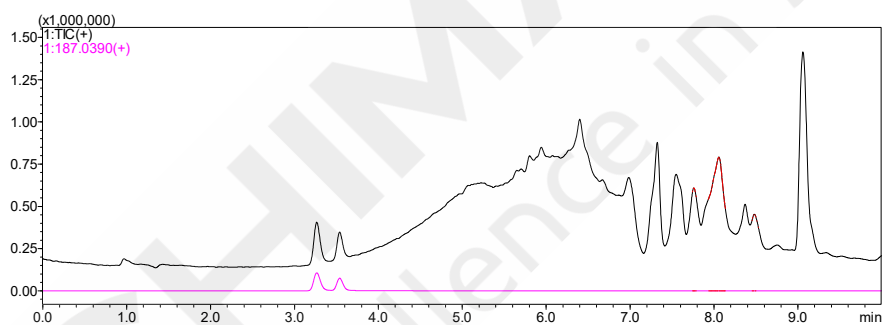


图 7. 1000 倍稀释后正模式下实际样品 TIC 图和提取离子流图

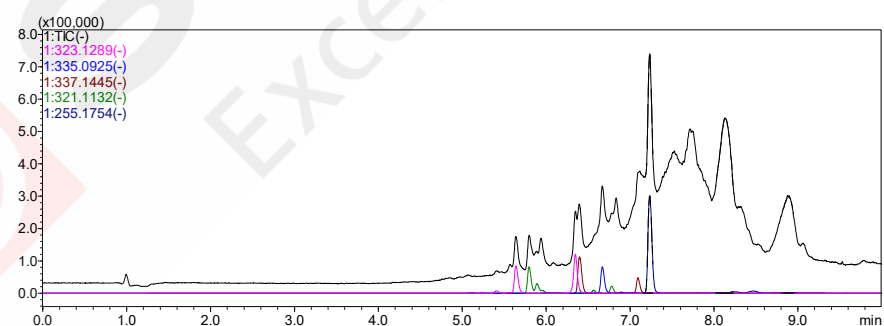


图 8. 1000 倍稀释后负模式下实际样品 TIC 图和提取离子流图

表 5. 补骨脂粉末样品目标物浓度

编号	物质	溶液浓度(μg/L)	稀释倍数	粉末浓度(mg/g)	库搜索得分
1	补骨脂素	37.992	10000	3.74	100
2	异补骨脂素	26.726	10000	2.63	100
3	补骨脂甲素	158.143	1000	1.56	99
4	补骨脂乙素	125.340	1000	1.23	99
5	补骨脂二氢黄酮甲醚	47.791	10000	4.70	100
6	4'-O-甲基补骨脂查尔酮 B	27.913	1000	0.27	100
7	新补骨脂异黄酮	77.004	1000	0.76	94
8	补骨脂定	49.573	1000	0.49	98
9	补骨脂酚	391.573	10000	38.52	97

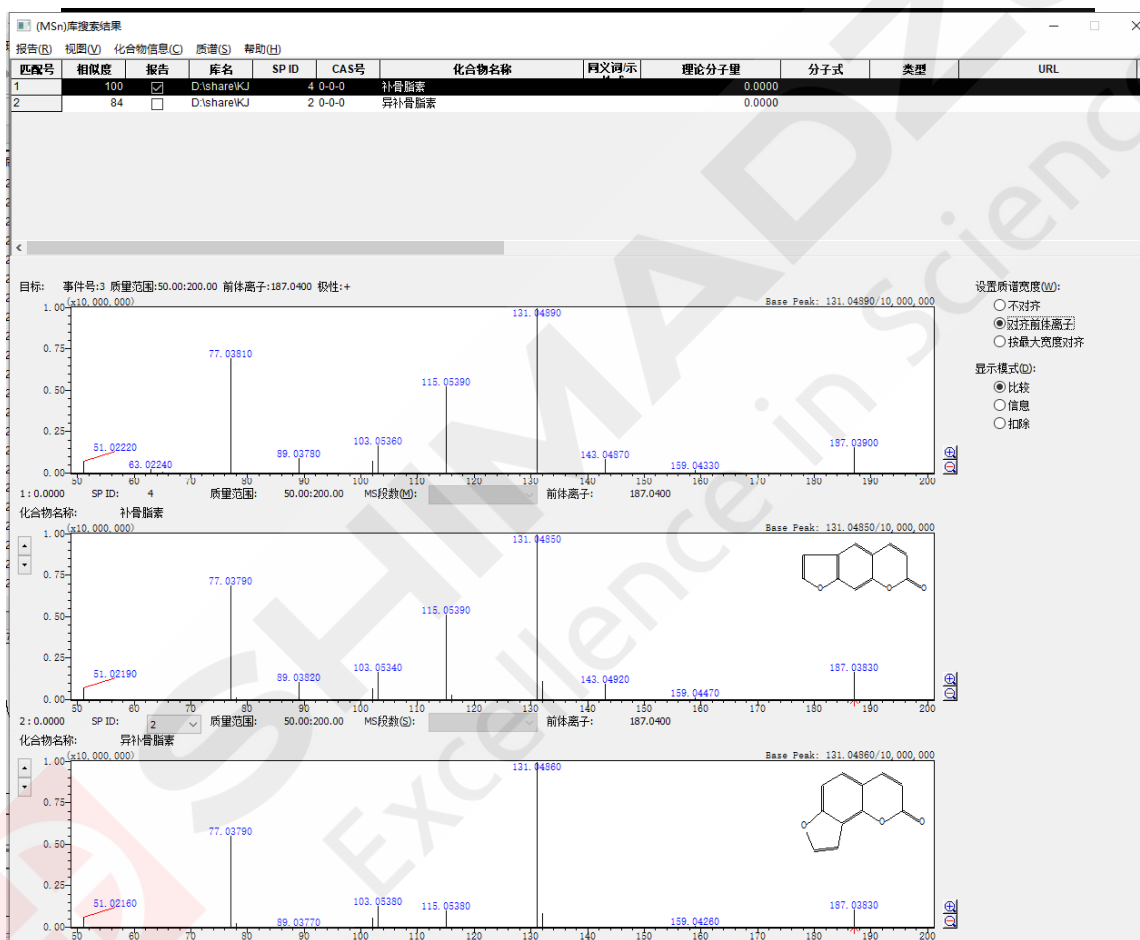


图 9. 实际样品中补骨脂素二级库搜索结果

4. 结论

本文利用 LCMS-9030 建立了补骨脂中 9 种物质的标准曲线，标准曲线下限 0.2~1 μg/L，上限 50~500 μg/L，线性范围 100-1000 倍， $R^2 > 0.990$ ； MS^1 误差 < 2 ppm，同位素得分 > 97， MS^2 误差 < 5 ppm。实际样品二级质谱与标准谱库匹配得分 > 90%，相应物质浓度 0.27~38.52 mg/g。

3.3 全谱二维液相色谱与 Q-TOF 联用分析不同产地当归活性成分

摘要: 为探究不同产地当归活性成分的差异, 采用全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用非靶向代谢组学测定方法, 对甘肃、云南当归中的活性成分进行比较。采集后数据经 MS-DIAL 软件进行峰提取和对齐后, 采用 Metaboanalyst 进行统计学分析, 经数据库比对、Labsolutions Insight Explore 鉴定差异活性成分。结果表明, 全谱二维液相色谱 (Polarity-Extended Liquid Chromatography- PELC) 方法相对于一维液相色谱 (One-Dimensional Liquid Chromatography-1D-LC) 方法可提高当归成分的分析覆盖率; 通过主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 发现不同产地的当归存在显著差异; 经数据库比对、Labsolutions Insight Explore 软件预测共鉴定出 43 种差异性化合物, 包括苯酞类、有机酸类等天然活性物质。

关键词: 全谱二维液相色谱 甘肃当归 云南当归 非靶向代谢组学分析

技术特点:

- ❖ PELC 方法相对于 1D-LC 方法可提高当归成分的分析覆盖率。
- ❖ MSDIAL、MetaboAnalyst、Insight Explore 多软件联合使用, 快速确定差异性标志物。

当归 *Angelicae sinensis* (Oliv.) Diels 为“妇科圣药”, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便之功效, 主要含有苯酞类、单萜和倍半萜类、芳香类化合物、脂肪烃及其衍生物、多糖、有机酸及其他类化学成分, 化合物从低极性到高级性均有涉及。当归应用范围广泛, 在中药配方中有“十方九归”之说, 历来以医家珍品著称。目前我国公认的当归道地产区为甘肃岷县等地, 此外, 我国云南、贵州、四川、湖北、陕西等地的当归产量也在逐年加大, 并被称为“云

归”“川归”“窑归”等。前期研究表明当归是典型的生境主导型药材, 其品质受产区生态环境影响显著。因此, 研究不同产地当归品质差异对于当归规范化种植、保障药材质量以及临床疗效均具有重要意义。

本文采用全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用的非靶向代谢组学测定方法, 对甘肃、云南当归中的活性成分进行比较分析, 从而阐明不同产地当归药材的质量特征, 为当归的产地溯源识别及质量控制提供了科学依据。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津全谱二维液相色谱与 LCMS-9050 联用仪, 具体配置为:

输液泵	: LC-30AD×4	系统控制器	: CBM-20A
自动进样器	: SIL-30AC	在线脱气机	: DGU-20A5
柱温箱	: CTO-20AC (内置 FCV-32AH×2)	飞行时间质谱仪	: LCMS-9050
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118; LabSolutions Insight Ver. 4.0		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：第一维：SeQuart ZIC-HILIC (2.1 × 150 mm, 3 μm)
第二维：Phenomenex Kinetex C8 (2.1 × 150 mm, 2.6 μm)

流动相：第一维：A相-5mM的乙酸铵；B相-乙腈
第二维：A相- 0.05%甲酸+2mmol/L的乙酸铵溶液； B相-乙腈

分析流速：第一维：0.3 mL/min； 第二维：0.3 mL/min；

柱温：35°C 进样体积：3 μL

洗脱方式：梯度洗脱，时间程序见表 1-表 3

表 1. 一维液相色谱的时间程序 (初始流动相 B 为 95%)

时间(min)	单元	处理命令	值
3.00	泵	B.Conc	95
15.00	泵	B.Conc	70
18.00	泵	B.Conc	50
21.00	泵	B.Conc	50
21.10	泵	B.Conc	95
39.50	控制器	Stop	

表 2. 二维液相的时间程序 (初始流动相 B 为 20%)

时间(min)	单元	处理命令	值
19.00	泵	B.Conc3	22
31.00	泵	B.Conc3	100
36.00	泵	B.Conc3	100
36.10	泵	B.Conc3	20
39.50	控制器	Stop	

表 3. 阀切换程序 (初始 CTO.RVL=1, CTO.RVR=1)

时间(min)	单元	处理命令	值
2.45	柱温箱	CTO.RVL	0
2.45	柱温箱	CTO.RVR	0
22.50	柱温箱	CTO.RVL	1
22.50	柱温箱	CTO.RVR	1
39.50	控制器	Stop	

质谱条件

离子源：ESI 加热模块温度：400°C

雾化气流速：3.0 L/min DL 温度：250°C

加热气流速：10.0 L/min 接口温度：300°C

干燥气流速：10.0 L/min

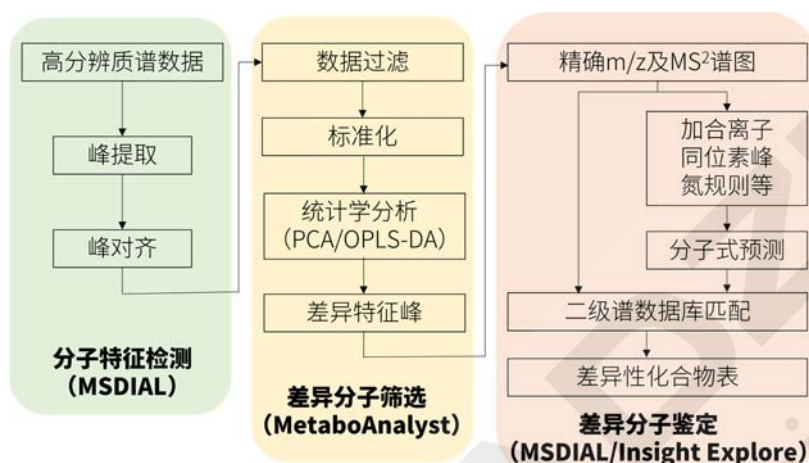
扫描模式：MS Scan(m/z 50 -1200) (事件时间: 0.1s)

DDA MS/MS (m/z 50 -1200) (5 个依从事件, 事件时间 0.1s)

1.3 样品处理及采集

取本品粉末约 100 mg，精密称定，置于 15 mL 离心管中，加入 70% 甲醇 5 mL，放置过夜，超声 30 分钟，12000 r/min 高速离心 3 min，过 0.22 μm 滤膜，供测定。

1.4 数据处理



2. 结果与讨论

2.1 两种方法的覆盖率对比

单一的 HILIC 方法和 RPLC 方法在死时间附近均有严重的共洗脱现象，样品中的化合物无法实现良好的分离，QC 样品的 TIC 色谱图见图 1，图 2。而 PELC 结合了 HILIC 和 RPLC 这两种分离色谱，通过 HILIC 保留极性成分，HILIC 不能保留的低极性成分则转移至第二维 RPLC 进行分离，从而避免了死时间附近的共洗脱严重的问题，QC 样品的 TIC 色谱图见图 3。去除死时间附近流出的化合物，采用 1D-LC 方法与 PELC 方法检测到的特征峰数见表 4，结果表明，相较于 1D-LC 方法，所建立的 PELC 方法可提高当归成分的分析覆盖率。

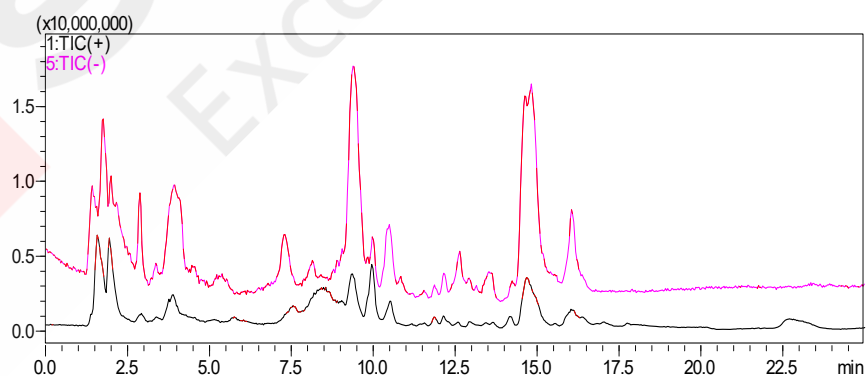


图 1. HILIC 方法分析 QC 样品色谱图

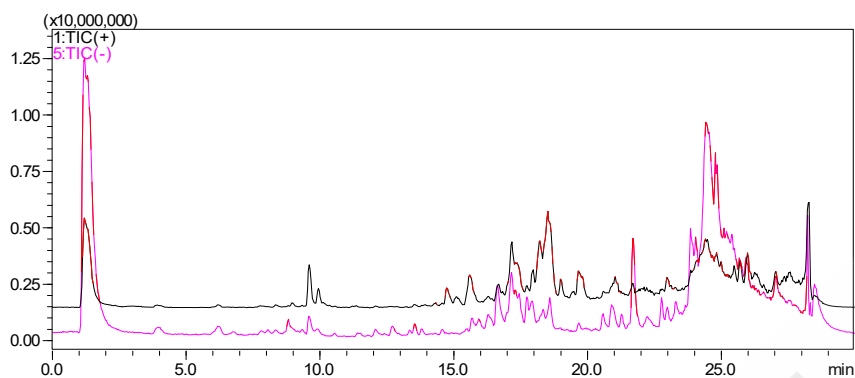


图 2. RPLC 方法分析 QC 样品色谱图

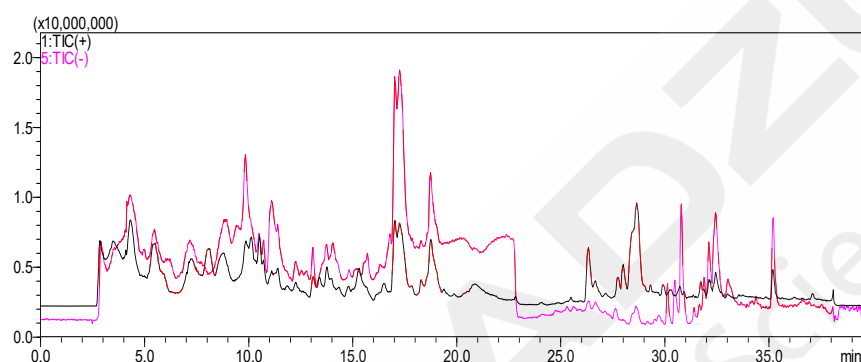


图 3. PELC 方法分析 QC 样品色谱图

表 4. 采用 1D-LC 方法与 PELC 方法检测到的特征峰数

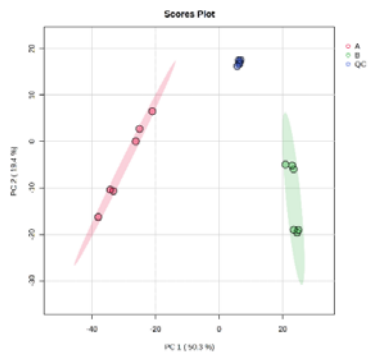
前端分离模式	质谱采集模式	特征峰数
1D-LC (HILIC)		1619
1D-LC (RPLC)	ESI(+)	1529
PELC		2164
<hr/>		
1D-LC (HILIC)		3965
1D-LC (RPLC)	ESI(-)	2222
PELC		4275

2.2 差异性化合物筛选

分析后数据经 MSDIAL 软件进行峰提取和对齐后，将峰对齐表导入 MetaboAnalyst 平台，设定缺失值处理、数据过滤及标准化等参数，进行统计学分析。

2.2.1 主成分分析 (PCA)

不同产地当归及质控样品QC的PCA 得分图见图4，每个散点表示一个样本，样本全部处于95% 置信区间；在正离子模式下，PC1 的贡献率为50.30%，PC2 的贡献率为19.40%；在负离子模式下，PC1 的贡献率为38.30%，PC2 的贡献率为32.70%；各组样本之间表现出明显的分离趋势，表明甘肃当归与云南化合物差异显著；质控组中的平行样本聚集在一起，表明测定过程中未出现明显偏差，说明各产地当归代谢组数据的稳定性较好。



a) 正模式

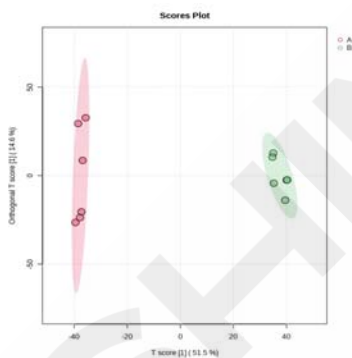


b) 负模式

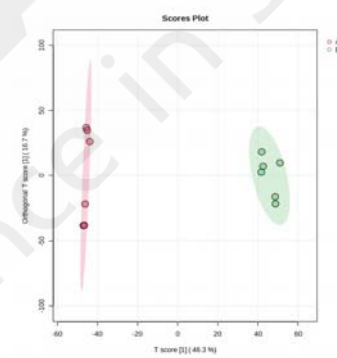
图 4. PCA 得分图 (A: 甘肃当归, B: 云南当归, QC: 质控)

2.2.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

不同产地当归的 OPLS-DA 分析结果如图 5 所示, 模型中各组样品均位于 95% 置信区间内, 2 组样本点间完全分离, 无重叠区域, 区分效果较好, 表明甘肃当归与云南当归具有明显的差异性。此外, 模型验证结果见图 6, R2Y 和 Q2 分别代表所建模型的解释率和预测能力, 它们的值越接近于 1 表明模型的拟合度越好, 可信度越高, 正离子模式下 R2Y=0.982, Q2=0.956, 负模式下 R2Y=0.981, Q2=-0.955, 表明模型稳健可靠。对模型进行置换检验, 通过观察打乱前的原始模型在 100 次随机打乱样本的随机置换检验, 绘制置换检验图 (图 7)。结果表明, 正模式和负模式下 P 值均小于 0.01, 模型没有过拟合。

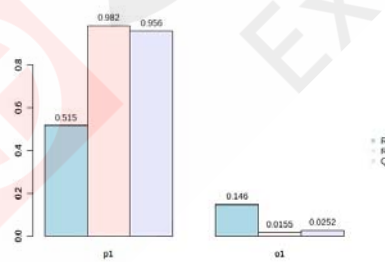


a) 正模式

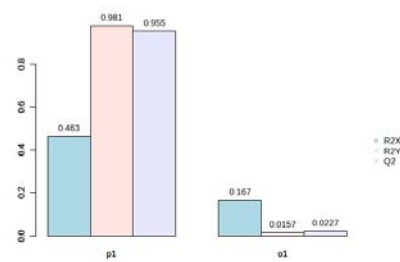


b) 负模式

图 5. OPLS-DA 得分图 (A: 甘肃当归, B: 云南当归)



a) 正模式



b) 负模式

图 6. 模型验证图

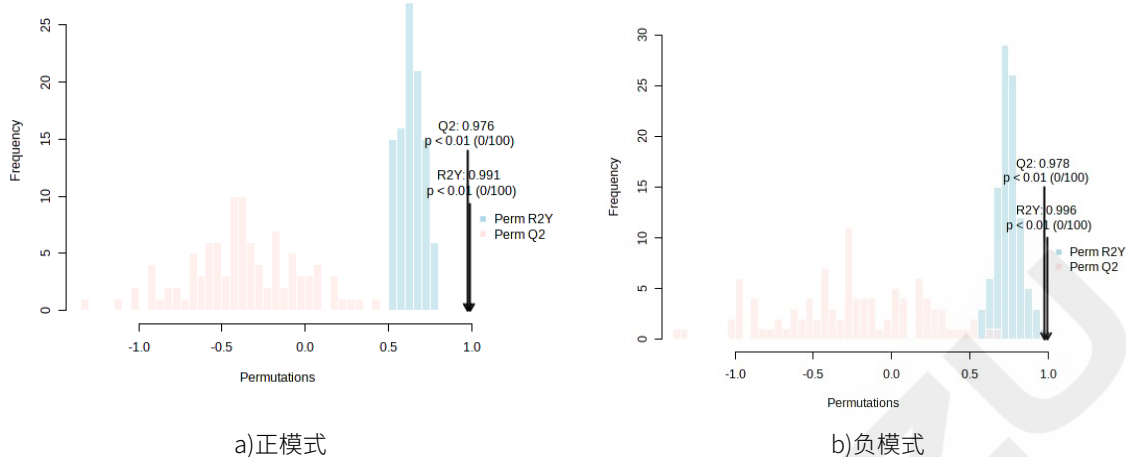


图 7. OPLS-DA 100 次置换检验结果

2.2.3 差异化合物火山图

利用t检验和变异系数法比较两组之间的活性成分差异，设立筛选条件，对正、负离子模式下检测到的所有活性成分进行差异分析，采用火山图进行可视化展示 (图8)，甘肃当归和云南当归在正离子和负离子模式下共筛选出差异表达活性成分分别为1458和1843 个，其中正离子活性成分上调 (同一化合物:甘肃当归含量大于云南当归) 823个、下调 (同一化合物:甘肃当归含量小于云南当归) 635个，负离子活性成分上调 1001 个、下调842 个。

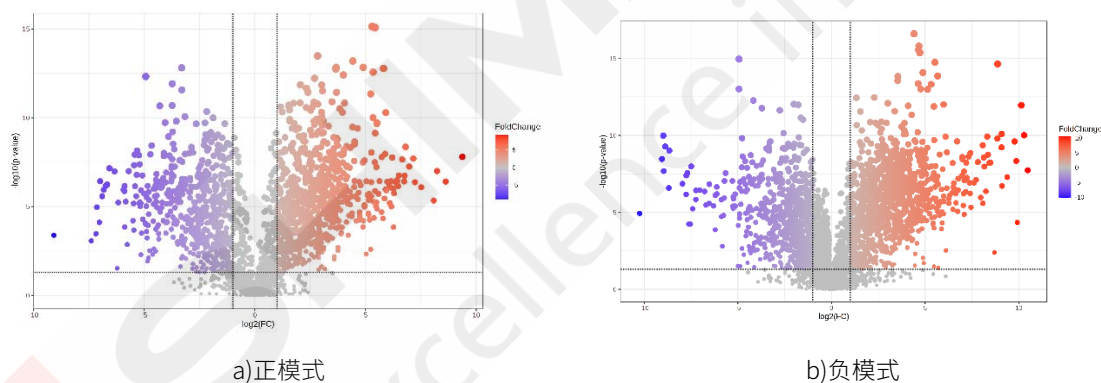


图 8. 火山图结果

2.2.4 差异活性成分中显著成分的筛选结果

通过将单变量统计和多元统计分析相结合的方法，对活性成分进行挖掘。根据多元统计分析 OPLS-DA 结果的 VIP 值 (表示对应活性成分的组间差异在各组样本分类判别中的影响强度)，可以初步筛选出甘肃产当归和云南产当归的差异活性物质，进一步筛选则通过结合单变量统计火山图结果 (P-value 与 Fold change) 进行。本试验筛选标准为：活性成分在不同样本间的差异为 2 倍以上或 0.5 以下且 P-value 小于 0.05，即 $\text{Fold change} \leq 0.5$ 和 $\text{Fold change} \geq 2$; P-value 小于 0.05; $\text{VIP} \geq 1$ 。最终正模式下筛选得到 1351 个差异物质，负模式下筛选得到 1716 个差异物质。

2.3 差异性化合物鉴定

通过 MSDIAL 软件，对化合物进行鉴定。所得结果进一步使用 Insight Explore 软件的分子式预测、在线数据库检索 (ChemSpider/PubChem) 和 Assign 功能 (图 9) 确认。共鉴定出 43 种差异性化合物，包

括藁本内酯类、有机酸类等天然活性物质，表 5 为部分差异性化合物鉴定结果表。

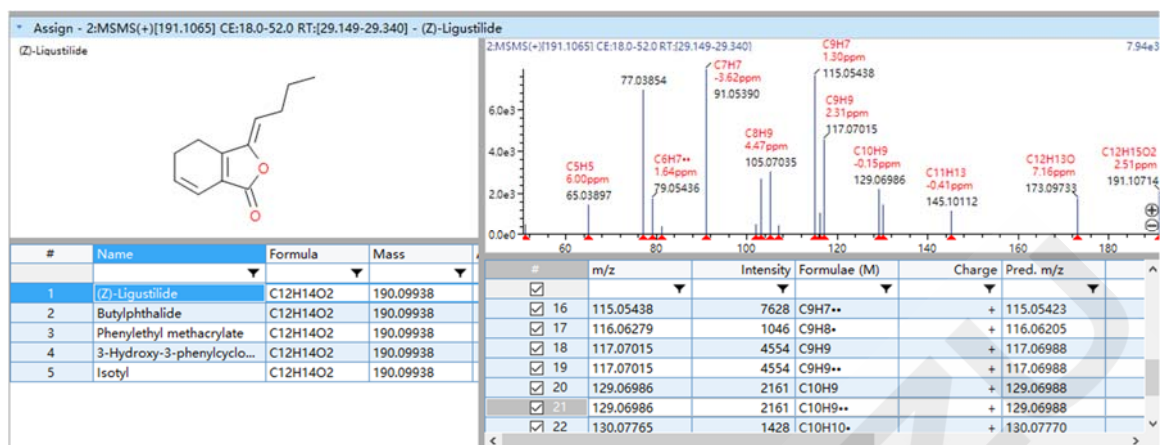


图 9. 利用 MS-DIAL 鉴定差异活性物质

表 5. 部分差异性化合物鉴定结果表

序号	Rt (min)	化合物名称	分子式	加合离子	实测m/z	理论m/z	误差(ppm)
1	12.15	二咖啡酰奎尼酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.1181	515.1195	-2.72
2	13.21	3-O-阿魏酰奎尼酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	367.1030	367.1035	-1.36
3	22.87	胆碱	C ₅ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	104.1070	104.1070	0.00
4	25.64	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.0493	193.0498	-2.59
5	25.84	洋川芎内酯A	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	[M+H] ⁺	193.1224	193.1223	0.52
6	27.98	E-丁烯基苯酞	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	[M+H] ⁺	189.0910	189.0910	0.00
7	29.15	Z-藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.1065	191.1067	-1.05

3. 结论

采用全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用的非靶向测定方法，对甘肃、云南当归中的活性成分进行比较。经 MSDIAL 软件进行峰提取和对齐后，通过 MetaboAnalyst 平台进行数据预处理、统计学分析得到差异活性成分，在与 MSDIAL 数据库比对、Labsolutions Insight Explore 软件预测共鉴定出 43 种差异性化合物，包括苯酞类、有机酸类等天然活性物质。

3.4 全谱二维液相色谱与Q-TOF联用用于防风饮片的指纹图谱研究

摘要: 本文首次采用全谱二维液相色谱系统建立了防风饮片的指纹图谱分析方法。将亲水作用色谱 (HILIC) 和反相液相色谱 (C8) 相结合, 一针进样实现对防风饮片内不同极性成分的同时保留和分离。通过二维柱后切换阀的引入, 大大降低了 HILIC 模式和反相分离模式切换引起的信号波动, 消除了一维阀切换时间附近色谱峰的影响。在该系统下, 样品连续测定 6 次, 指纹图谱中 20 种组分数谱峰保留时间 RSD% 不大于 0.35%, 峰面积 RSD% 不大于 3.90%, 仪器精密度良好。将全谱二维液相系统与四极杆飞行时间质谱 LCMS-9050 联用, 进行防风指纹图谱分析的同时对指纹图谱中主要特征峰鉴定, 采用正负极同时切换的模式采集数据, 共鉴定出 12 种成分。

关键词: 全谱二维液相 飞行时间质谱 防风饮片 指纹图谱

技术特点:

- ❖ 首次采用全谱二维液相色谱技术建立中药指纹图谱分析方法, 一针进样实现防风饮片中不同极性成分的保留和分离, 色谱峰信息更丰富。
- ❖ 通过二维柱后切换阀的引入, 大大降低了HILIC模式和反相分离模式切换引起的信号波动, 消除了一维阀切换时间附近色谱峰的影响。
- ❖ 高分辨质谱正负离子模式同时分析, 提高峰鉴定效率。

防风是为伞形科植物防风 (*saposhnikovia divaricate* (turcz.) schischk) 的干燥根。防风始载于《神农本草经》, 现代药理研究表明防风具有解热、抗炎、镇静、镇痛以及抗肿瘤等药理活性作用, 是我国最常用的传统中药之一。防风化学成分复杂, 主要包含色原酮类、香豆素类、多糖类、挥发油类、聚乙炔类、甘油酯类等。

指纹图谱是控制中药或天然药材质量的有效手段, 关于防风药材指纹图谱的研究报道很多, 从相关文献中我们可以看到防风药材中的成分极性跨度较大, 单一的分离模式很难将极性跨度较大的这些

成分同时进行较好地保留并展现在指纹图谱上。岛津全谱二维液相色谱系统, 可以实现一针进样同时分析高、中、低极性物质, 不仅可以将相同分离模式进行组合, 还可以将不同分离模式如亲水作用色谱模式 (HILIC) 和反相液相色谱模式 (C8或者C18) 组合, 是非常有应用前景的分离分析技术。另外, 岛津LCMS-9050四极杆飞行时间质谱仪具备正负极同时切换功能, 将全谱二维液相色谱与LCMS-9050联用, 可以实现一针进样, 正负离子模式同时进行数据采集, 提高指纹图谱中特征峰的定性效率。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津全谱二维液相色谱四极杆飞行时间质谱联用系统, 具体配置为:

输 液 泵	: LC-30AD×4	系 统 控 制 器	: CBM 20A
在 线 脱 气 机	: DGU-405	自 动 进 样 器	: SIL-40C X3

柱温箱 : CTO-20AC
 飞行时间质谱仪 : LCMS-9050
 色谱工作站 : LabSolutions Ver. 5.118; LabSolutions Insight Ver. 4.0
 检测器 : SPD-M20A
 切换阀 : FCV-12AH×3

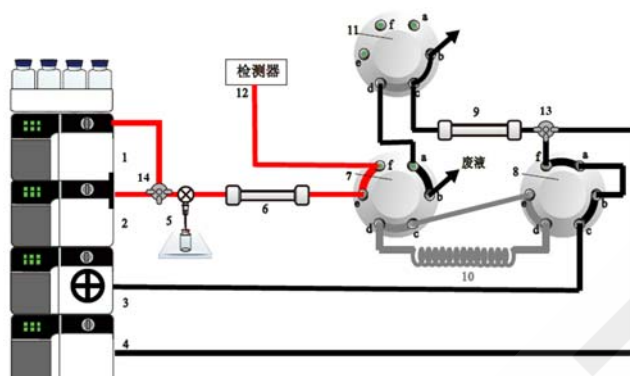


图1. 全谱二维液相色谱四极杆飞行时间质谱联用系统示意图

(1: 一维液相输液泵 A; 2: 一维液相输液泵 B; 3: 二维液相输液泵 A; 4: 二维液相输液泵 B; 5: 自动进样器; 6: 一维色谱柱; 7: 二位六通阀左; 8: 二位六通阀右; 9: 二维色谱柱; 10: 500 μ L 样品环; 11: 二位六通阀 3; 12: 检测器 (PDA+MS); 13, 14: 混合器)

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : 第一维: SeQuart ZIC-HILIC (2.1×150 mm, 3μ m)
 第二维: Kinetex[®] C₈ (2.1×150 mm, 2.6μ m)

流动相 : 第一维: A相-2 mM 乙酸铵溶液; B相-乙腈
 第二维: A相-0.1%甲酸水溶液; B相-0.1% 甲酸乙腈

分析流速 : 第一维: 0.4 mL/min; 第二维: 0.6 mL/min;

柱温 : 30°C
 进样体积: 2 μ L

洗脱方式 : 梯度洗脱, 时间程序见表 1-表 3

表 1. 一维液相色谱的时间程序 (初始流动相 B 为 96%)

时间(min)	单元	处理命令	值
6.00	泵	B.Conc	92
10.00	泵	B.Conc	82
18.00	泵	B.Conc	75
20.00	泵	B.Conc	50
30.00	泵	B.Conc	50
30.10	泵	B.Conc	96

表 2. 二维液相色谱的时间程序 (初始流动相 B 为 10%)

时间(min)	单元	处理命令	值
19.00	泵	B.Conc3	10
20.00	泵	B.Conc3	25
25.00	泵	B.Conc3	50
32.00	泵	B.Conc3	75
35.00	泵	B.Conc3	95

39.00	泵	B.Conc3	95
39.01	泵	B.Conc3	10

表 3. 其他时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
0.01	柱温箱	CTO.RVL	1
0.01	柱温箱	CTO.RVR	1
1.70	柱温箱	CTO.RVL	0
1.70	柱温箱	CTO.RVR	0
15.00	控制器	Event	0
20.10	柱温箱	CTO.RVL	1
20.10	柱温箱	CTO.RVR	1
38.00	柱温箱	CTO.RVL	0
38.00	柱温箱	CTO.RVR	0
40.00	控制器	Stop	

注：柱温箱阀命令“0”为一维色谱柱连检测器，“1”为一维色谱柱连定量环；控制器 Event “1”为二维柱后流动相进 CTO.RVL 的 a 号位（默认为切废液）

质谱条件

离子源	: ESI+/ESI-	接口电压	: 4.5 kV/-3.5 kV
接口温度	: 300°C	加热模块温度	: 400°C
雾化气流速	: 3.0 L/min	D L 温度	: 250°C
加热气流速	: 10.0 L/min	碰撞气	: 氦气
干燥气流速	: 10.0 L/min	扫描模式	: MS & MS/MS (DDA)

2. 样品前处理

取防风饮片约1.0 g，精密称定，加甲醇10 mL超声45 min，10000转离心10 min，0.22 μm滤膜过滤，取上清液即得。

3. 结果与讨论

3.1 样品提取溶剂的选择

在《中国药典》2020版防风药材含量测定项及中国食品药品检定研究院公布的国家药品抽检探索性研究第六期防风饮片液相指纹图谱检验方法中，防风均采用100%甲醇作为提取溶剂。本实验对比了100%甲醇、70%甲醇及水3种溶剂的提取效果。3种提取溶剂在一维液相HILIC模式下的指纹图谱数据，如图2所示。可以看出100%甲醇和70%甲醇提取出的色谱峰数量大体相当，但100%甲醇条件下10 min之前的色谱峰信号更高，峰形更好；水作为提取溶剂时，10 min之后的色谱峰数量相比其它两种溶剂更多，10 min之前的色谱峰数量明显偏少，即弱极性化合物提取效率低。对比3种提取溶剂，可以发现防风饮片中10 min之前的色谱峰为其主要成分，故综合考虑选择100%甲醇作为提取溶剂。

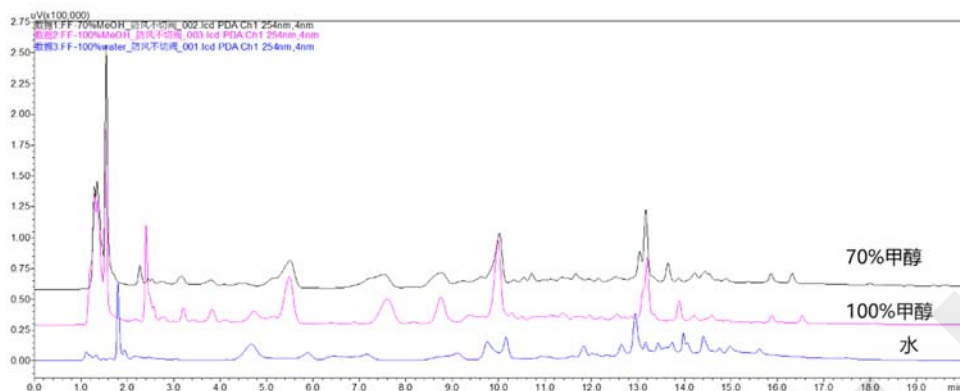


图2. 不同提取溶剂下的色谱图

3.2 一维液相分析条件的优化和切阀时间的确认

在全谱二维液相的分析中，对一维液相分析条件优化很重要，尤其需要对流动相初始比例及梯度斜率的优化和确认，它不仅会影响一维 HILIC 模式下各组分的分离，对切入二维液相的化合物数量也会产生影响。较理想的分析条件为 HILIC 模式下不保留组分能尽可能完全地切入至定量环中，其它可保留组分在一维条件下尽可能得到完全分离。通过优化一维液相色谱条件，防风饮片一维液相色谱图如图 3 所示，一维样品导入定量环的切阀时间设为 1.7 min。由于一维 20 min 后无明显色谱峰，将二维分析的切换时间设定为 20 min，即一维液相 20 min 后继续高比例水相冲洗和平衡色谱柱，二维液相在 20 min 后开始洗脱，缩短整体分析时长。

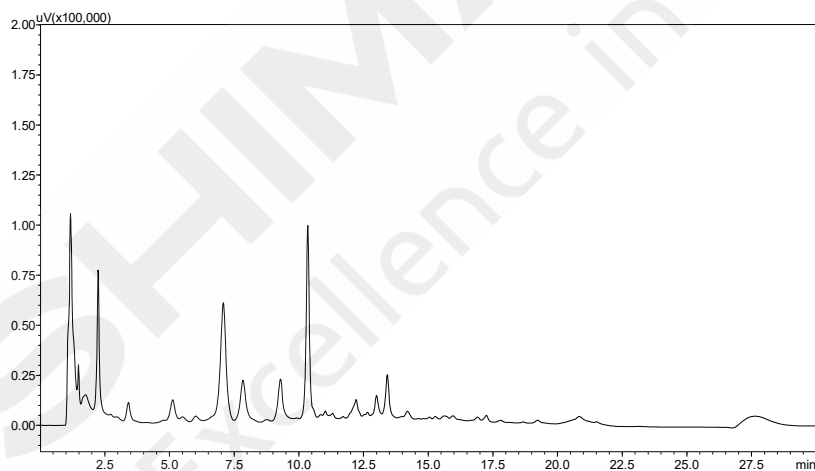


图3. 防风饮片一维液相色谱图

3.3 一维切阀对附近色谱峰影响的解决方法

一维液相分析条件和切阀时间确定后，就要将 HILIC 模式下不保留的组分导入至定量环收集以进行二维分析使用。待定量环内样品收集完成，在切阀时间之后的 HILIC 模式下能保留的组分开始在一维进行分析，同时，定量环内样品在二维色谱柱柱头进行聚焦。待一维分析结束，柱头聚焦组分开始被二维流动相洗脱，最后二维色谱柱平衡至分析结束。由于在进行这种常规全谱二维分析时，上一针样品分析结束时检测器内充满的是二维流动相体系，通常为高比例水相，而下一针样品开始分析时检测器内流入的是高比例有机相，此时两种极端比例的流动相在检测器内发生混合，易造成信号波动，对切阀时间附近的色谱峰信号产生影响，如图 4 红色椭圆标记区域的色谱峰。为消除此影响，我们在二维色谱柱与检测器之间加入一个二位六通阀，使每一针样品二维分析结束前（二维色谱柱平衡时）将一维的流动相导入检测器，二维的高比例流

动相切入至废液，保证所有样品一维分析开始前检测器里都是一维的初始流动相体系，有效避免了两相混合产生的信号波动对切阀附近色谱峰的影响，实际效果如下图蓝色色谱图所示。

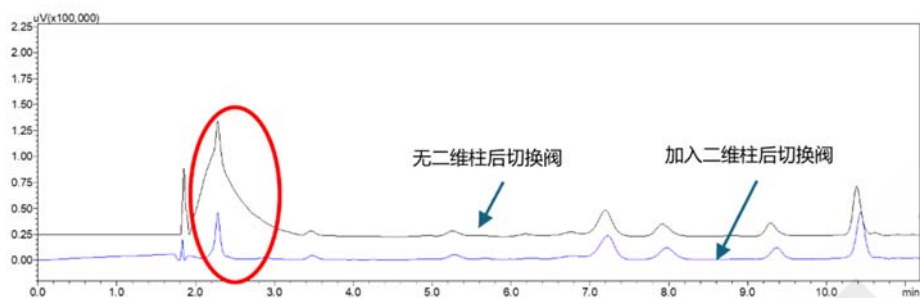


图4. 一维切阀对附近色谱峰的影响及解决方法

3.3 二维液相分析条件的优化

二维液相分析条件不仅影响二维的分离效果，也影响着定量环内样品导入二维液相后在色谱柱柱头的聚焦效果。参考 AP_News_303 应用研究结果，500 μL 定量环在 10% 有机相初始比例的条件下，聚焦体积（二维液相中利用有机相将目标物从定量环中携带出来的体积）在 $\geq 800 \mu\text{L}$ 的情况下所测化合物峰面积才能趋于稳定。在保证聚焦体积的同时，也需要考虑二维液相上高有机相初始比例可能会造成色谱峰丢失的风险。本实验二维液相分析条件优化后的防风药材及空白溶剂色谱图如下图所示。

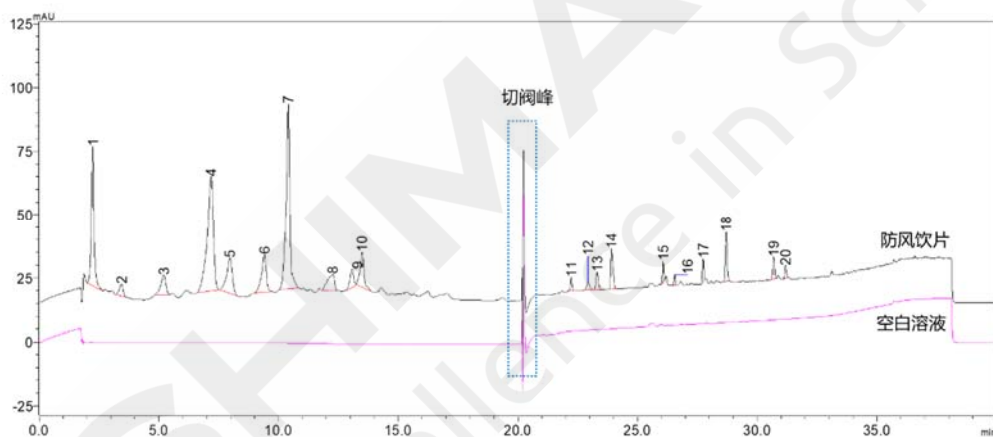


图5. 防风饮片和空白溶液全谱二维液相指纹图谱

3.4 精密度

取样品溶液连续测定6次，考察仪器精密度，结果显示，20种组分数谱峰的保留时间RSD不大于0.35%，峰面积RSD值不大于3.90%，仪器精密度良好。

表 4. 精密度结果

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
保留时间RSD(%)	0.18	0.16	0.18	0.35	0.30	0.30	0.16	0.10	0.06	0.06
峰面积RSD(%)	3.20	2.81	2.23	1.90	2.68	3.50	1.23	2.10	3.90	1.71
峰号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
保留时间RSD(%)	0.03	0.04	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03
峰面积RSD(%)	1.52	2.87	2.38	2.32	2.73	2.51	1.74	0.92	1.84	2.27

3.5 特征峰鉴定

将全谱二维液相与LCMS-9050四极杆飞行时间质谱仪联用，对防风饮片指纹图谱中主要特征峰进行定

性分析，采用正负离子模式同时扫描的数据采集方式，所得TIC图如下所示。

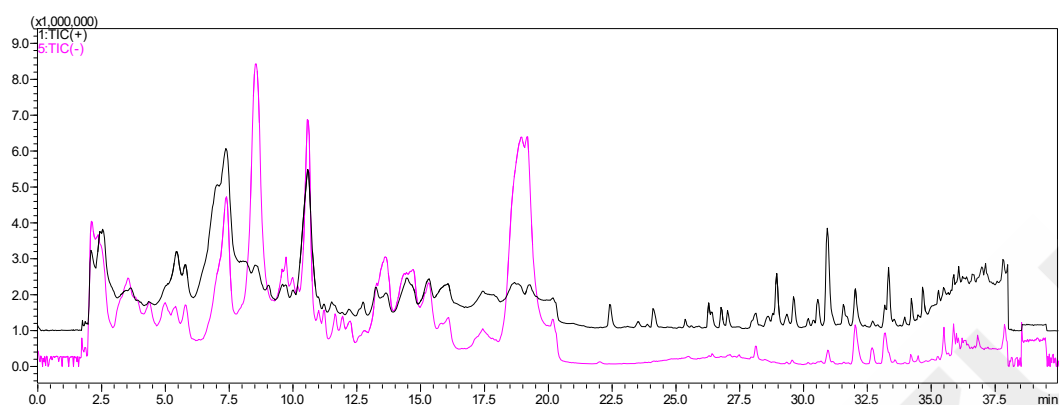
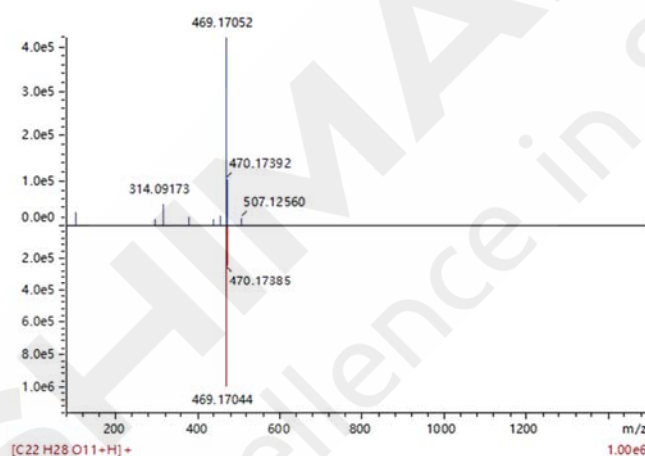


图6. 防风饮片正负离子模式质谱扫描图谱

用岛津Labsolutions Insight Explore数据处理软件结合文献信息对化合物进行鉴定。以防风中7号特征峰鉴定为例，展示鉴定过程。提取7号特征峰保留时间处的质谱信息，基于精确分子量和同位素丰度比，利用Labsolutions Insight Explore件中的Calculate Formula功能预测其可能的分子式。预测结果显示m/z 469.17052的分子式为C₂₂H₂₈O₁₁，[M+H]⁺同理论质荷比误差为0.171 ppm，同位素分布匹配得分为100.00，结果如图7所示。



#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	99.95	468.16316	469.17044	469.17052	0.08	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	0.171	100.00	9.0

图7. 峰7的分子式预测结果

为确认该化合物的结构式和化合物名称，利用 Labsolutions Insight Explore 软件数据库检索和 Assign 功能及文献信息进行进一步分析。将 MS¹ 质荷比对应的二级质谱图发送至软件的 Assign 界面，通过预测的分子式在线搜索 PubChem/Chemspider 数据库，得到可能的化合物结构信息，同时采用 Assign 功能对二级质谱图进行匹配并对碎片离子进行归属，所匹配得到的化合物按得分大小依次进行排序显示。经匹配，Assign 结果显示 (2S)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-7-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-5-one (中文名：升麻素苷) 等得分较高，如图 8，查阅相关文献，升麻素苷为防风中主要化学成分，且 MS² 的 Assign 得分为 100，二级碎片归属后偏差不大于-4.15 ppm，故推测峰 7 为升麻素苷。防风指纹图谱中其它已推测的特征峰结果如表 5 所示。

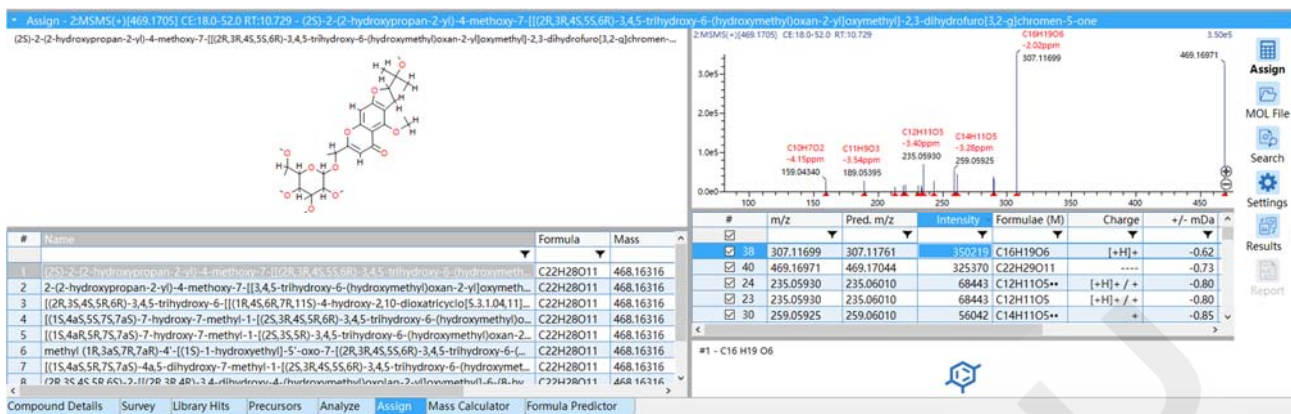


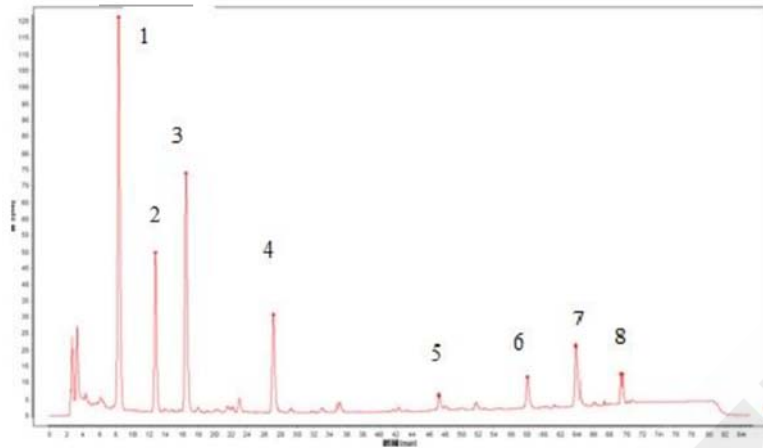
图8. 峰7的MS²质谱图及Assign匹配结果

表5. 防风饮片指纹图谱部分特征峰推测结果列表

ID	R.T. (min)	Predicted Name	Type	Meas. m/z	Predicted Formula	Predicted Mass	MS ² Diff. (ppm)
1	2.23	升麻素	[M+H] ⁺	307.1175	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	307.1176	-0.22
3	5.21	亥毛酚苷	[M+H] ⁺	439.1598	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	439.1598	-0.06
4	7.22	5-O-甲基维斯阿米醇苷	[M+H] ⁺	453.1752	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	453.1755	-0.68
5	8.00	腺苷	[M-H] ⁻	266.0894	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	266.0894	0.00
7	10.42	升麻素苷	[M+H] ⁺	469.1705	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	469.1704	0.17
11	22.24	5-O-甲基维斯阿米醇	[M+H] ⁺	291.1225	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	291.1227	-0.55
12	22.94	补骨脂素	[M+H] ⁺	187.0388	C ₁₁ H ₆ O ₃	187.0389	-0.53
13	23.32	花椒毒素	[M+H] ⁺	217.0494	C ₁₂ H ₈ O ₄	217.0495	-0.64
14	23.92	香柑内酯	[M+H] ⁺	217.0494	C ₁₂ H ₈ O ₄	217.0495	-0.32
15	26.08	3-O-乙酰基亥茅酚	[M+H] ⁺	319.1176	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	319.1176	0.18
16	26.54	珊瑚菜内酯	[M+H] ⁺	301.1069	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	301.1070	-0.498
18	28.72	3'-O-当归酰基亥茅酚	[M+H] ⁺	359.1487	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	359.1489	-0.473

3.6 与常规一维反相液相色谱分析的比较

目前,对于中药指纹图谱分析主要采用普通反相分离的模式,如C18或C8。单一模式下部分品种难免会出现有些化合物不能很好地保留和分离的情况。本实验中,将HILIC与C8模式结合,分离得到20个色谱峰。与国家药品抽检探索性研究第六期防风饮片液相指纹图谱相比,色谱峰数量更多,信息更丰富。所以全谱二维技术可以作为发现中药中更多化学成分的一种手段,帮助建立更完善的质量控制指标。



对照指纹图谱

峰1: 升麻素苷 峰2: 升麻素 峰3: 5-o-甲基维斯阿米醇苷
 峰4: 亥毛酚苷 峰5: 欧前胡素 峰6、7、8未知

图9. 国家药品抽检探索性研究第六期防风饮片液相指纹图谱

(来源: <https://www.nifdc.org.cn/directory/web/nifdc/bshff/gjchj/yjxglj/jyffsix/20200408221030207.html>)

4. 结论

本文首次采用全谱二维液相色谱系统建立了防风饮片的指纹图谱分析方法。将亲水作用色谱 (HILIC) 和反相液相色谱 (C8) 相结合, 采用一针进样的方式, 在 40 min 内实现对防风饮片内 20 种不同极性成分的同时保留和分离, 利用 LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱仪对主要特征成分进行快速鉴定。该系统稳定性好, 能获取更多中药化学成分信息, 可以作为中药指纹图谱的一种分析手段, 为建立更完善的中药质量控制指标提供参考。

第 4 章 Q-TOF 在化妆品及保健品中非法添加化合物

快速筛查的应用

目前，关于化妆品及保健食品中非法添加药物的检测方法主要有光谱法、离子迁移谱法、薄层色谱法、高效液相色谱法和液质联用法等。其中，液质联用法具有灵敏度高、准确度高、高通量的特点，是目前采用最多的分析技术。液质法根据仪器不同原理，主要有三重四极杆的定性定量方法。该方法定量准确，但定性略有不足；而飞行时间质谱属于高分辨质谱，可精确测定分子质量数和二级质谱，具有高特异性、高通量、高扫描速度等优势，能快速进行定性筛查，可实现无标样的定性分析。

以 DDA 或 DIA 模式批量采集样品数据，结合岛津《化妆品风险物质高分辨质谱数据库》、《农药高分辨质谱数据库》及《兽药高分辨质谱数据库》，使用 LabSolutions Insight Explore 软件的批量搜库功能，对样品中非法添加组分进行快速筛查。不仅提高了筛查效率和准确率，还大大缩短了整个分析时间，为保健品和化妆品安全提供重要技术支撑。

数据库快速筛查流程如下：



图 1. Insight Explore 二级质谱库筛查流程

其中，标准中对于阳性样品的判断依据为：样品中目标物的色谱峰保留时间与标准物质工作溶液一致（相对误差在±2.5%之内），且样品中目标物前体离子的质荷比与理论质荷比一致（质荷比大于等于200时，质量精度小于等于5 ppm；质荷比小于200时，质量精度小于1 mDa），同时至少1个二级质谱特征离子与标准物质工作溶液一致（质荷比大于等于200时，质量精度小于等于5 ppm；质荷比小于200时，质量精度小于1 mDa）。



图 2. 化妆品风险物质 QTOF 质谱库

4.1 LCMS-9050 快速筛查保健品中非法添加物

摘要: 本文利用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱仪, 结合《保健品非法添加 QTOF 质谱库》建立了一种对保健品中非法添加物质的快速筛查方法。对 7 个样本中的非法添加物质进行定性分析, 其结果显示: 在 7 个样本中共筛查出 13 种添加化合物, 二级碎片与数据库匹配度高。使用该方法, 可通过一针进样, 快速完成目标物的定性筛查, 结果准确可靠。

关键词: 四极杆飞行时间串联质谱仪 保健品 非法添加

随着社会的发展, 越来越多的人关注保健, 在生活中也常服用保健品。为了追求利益, 部分不法生产者会在一些保健食品中非法添加各种药物以达到宣传的效果, 吸引消费者长期购买。然而长期使用这种食品, 可能会给消费者造成严重的身体健康问题。

对于保健品中非法添加物的检测一直是相关部门重点关注的领域。但是, 由于保健品的种类繁多, 需要针对每一类的保健品收集所需的标准品后才能

建立对应的检测方法, 工作量大且效率低。因此, 非常需要一种灵敏、高效的检测方法能够快速对多种类的样品以及非法添加物进行检测。

本文使用岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱仪, 建立了一种对保健品中非法添加物快速定性的分析方法。对 7 个样品进行了分析, 可快速筛查出样品中的非法添加成分, 该方法准确可靠, 可为保健品的检测提供帮助。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪, 具体配置为:

输液泵	: LC-40B X3×2	系统控制器	: CBM-40
自动进样器	: SIL-40C	飞行时间质谱仪	: LCMS-9050
柱温箱	: CTO-40S	在线脱气机	: DGU-405
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118; LabSolutions Insight Ver. 4.0SP2		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: GIST-HP_C18-AQ (150 mm×2.1 mm., 1.9 μm (岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30807-03)		
流动相	: A 相-5 mM 乙酸铵 (0.1%甲酸); B 相-乙腈		
流速	: 0.3 mL/min		
进样体积	: 1 μL	柱温	: 40°C
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 30%, 洗脱程序见表 1。		

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	泵	B.Conc	15
9.50	泵	B.Conc	75
20.00	泵	B.Conc	95
30.00	泵	B.Conc	95
30.10	泵	B.Conc	15
30.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子源	: ESI(+/-)	加热模块温度	: 400°C
雾化气流速	: 3.0 L/min	DL 温度	: 250°C
加热气流速	: 10.0 L/min	接口温度	: 300°C
干燥气流速	: 10.0 L/min	扫描模式	: MS Scan(m/z 100 -1000) DDA MS/MS (m/z 100 -1000)

1.4 样品前处理

1.4.1 提取溶液配制

分别配置以下 3 种提取溶液各 500 mL。

提取溶液 1: 乙腈: 甲醇: 10 mM 乙酸铵=10: 55: 35

提取溶液 2: 乙腈: 甲醇: 10 mM 乙酸铵 (含 0.1%甲酸) =10: 55: 35

提取溶液 3: 乙腈: 甲醇: 0.2%三乙胺水溶液=40: 30: 30

1.4.2 样品溶液配制

取样品研细, 称取 0.3 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 分别加入上述提取液适量, 超声 10 min 使其溶解, 放置冷却至室温, 加提取液稀释至刻度, 摇匀。放置过夜, 取上清液适量, 高速离心 (10000 r/min), 精密吸取上清液 1 mL, 至于进样小瓶中; 每种样品分别用上述三种提取液提取。

2. 结果与讨论

分别使用 DDA(+/-)模式对每个样品经过三种不同提取后的溶液进行采集, 结合《保健品非法添加二级质谱库》, 使用 Insight Explore 软件的批量搜库功能, 对每个样品中的非法添加进行快速筛查。数据处理步骤如下:



2.1 导入化合物信息

将 DDA 数据导入 Insight Explore 软件，在“Edit Method”项下的“Compounds”列表中添加需要筛查的非法添加物的名称以及 m/z 信息。

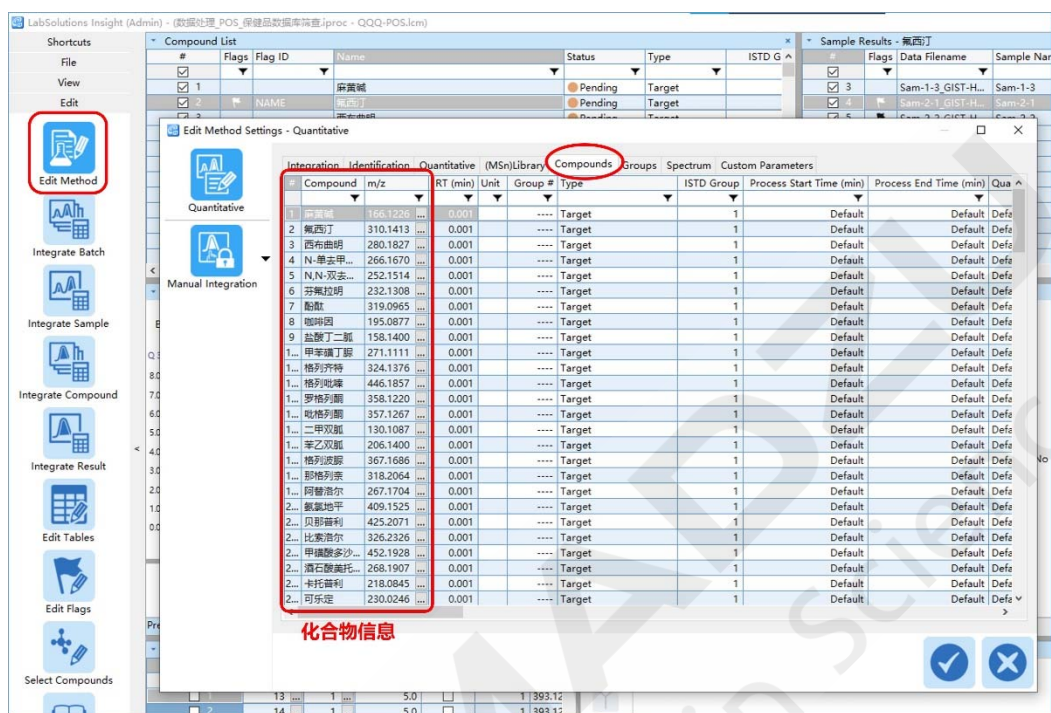


图 1. Insight Explore 软件截图

2.2 导入保健品二级质谱库

在“Edit Method”项下的“(MSn)Library”中添加《保健品非法添加二级质谱库》。如图 2 所示，添加了保健品中非法添加物的二级数据库，同时设置了搜索相同的前体离子等条件。

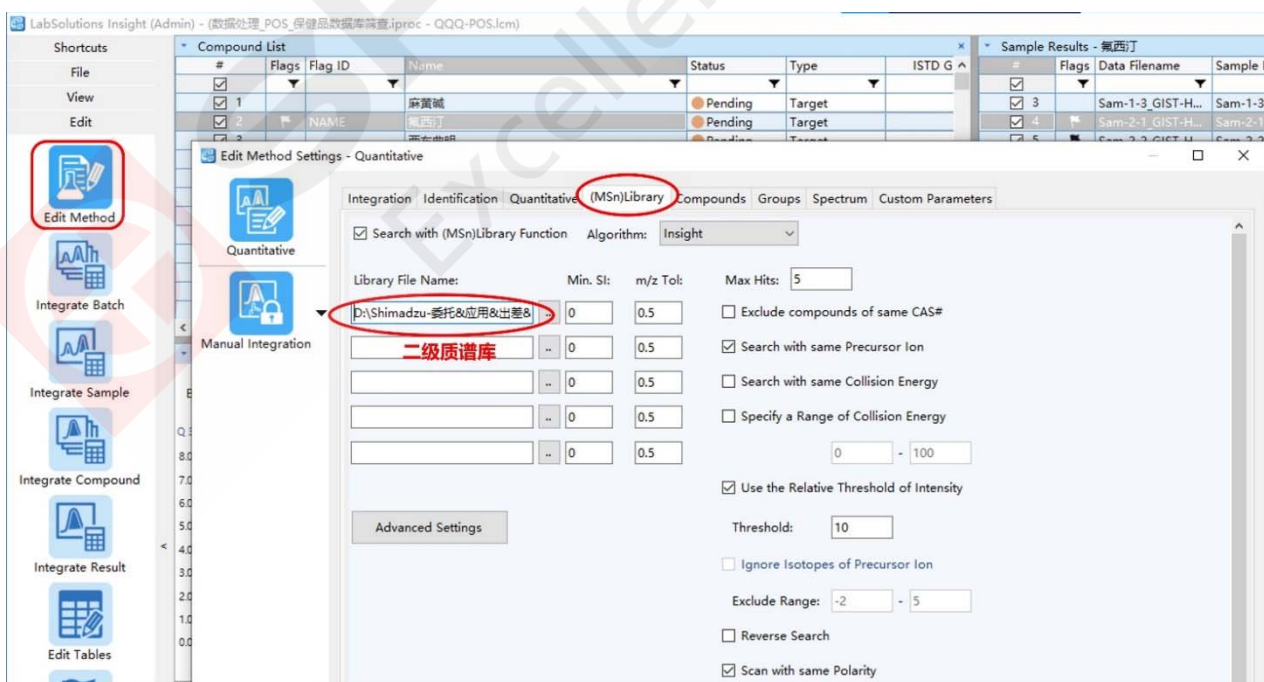


图 2. Insight Explore 软件截图

2.3 编辑“Flags”

在“Edit Flags”项下编辑结果判定的依据。如图3所示，本文中添加了两个判定依据，分别是“Lib Compound Name”和“Min. Library Similarity Index”，对于不满足其中任一条件的结果，会有“小旗”图标显示。

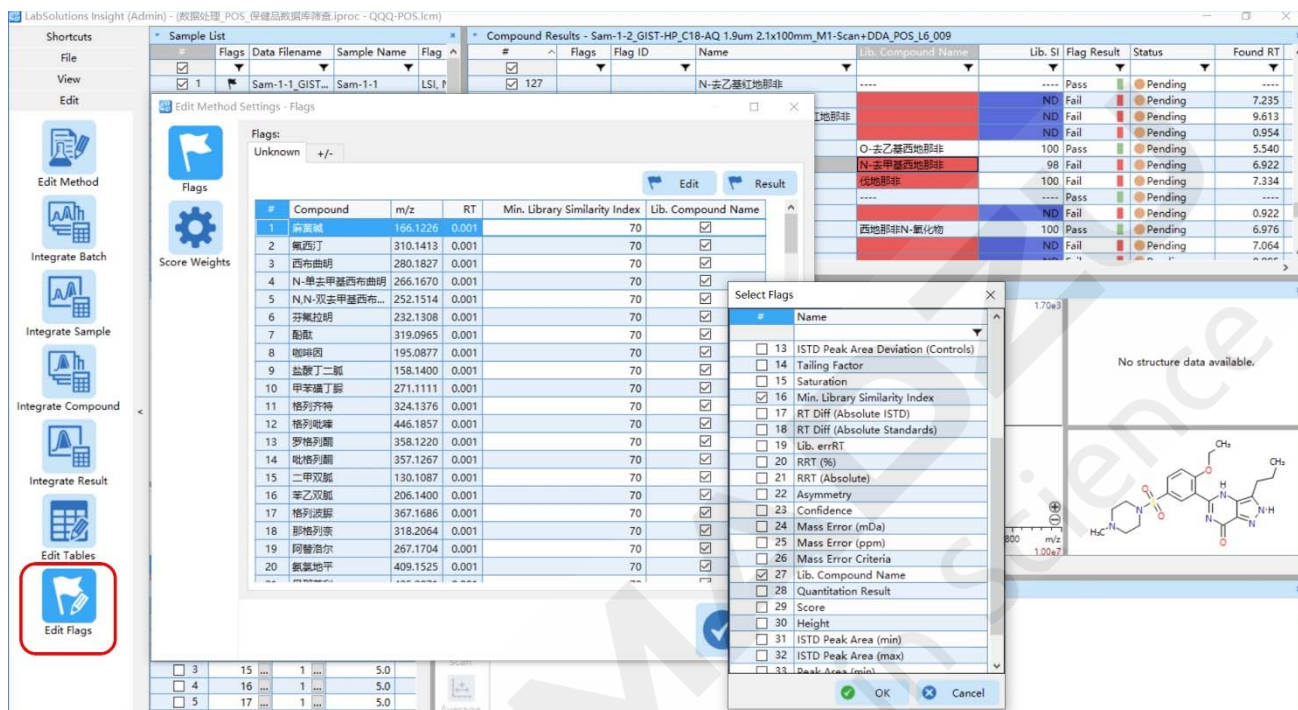


图 3. Insight Explore 软件截图

2.4 批量搜库及结果说明

对导入的数据使用“Search Library”。如图4所示，批量对导入的三个数据进行搜索。

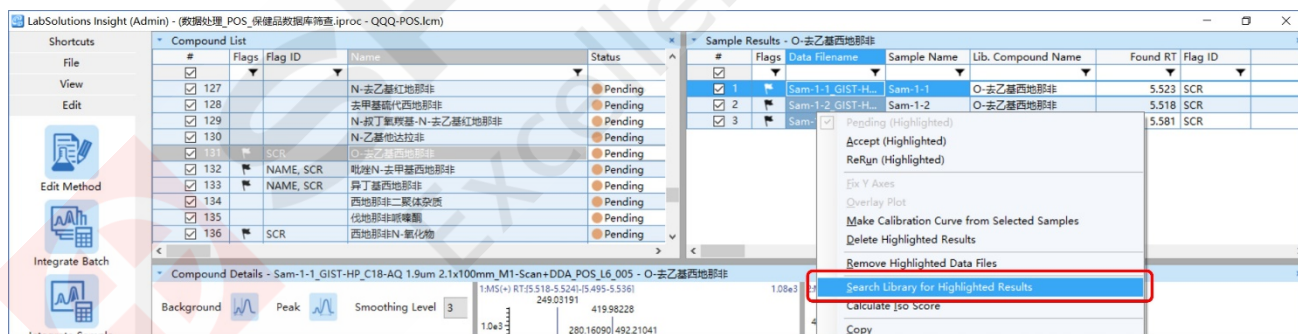


图 4. Insight Explore 软件截图

搜索结果如下图5所示，化合物列表中的名称“吡唑N-去甲基西地那非”二级碎片与数据库中质谱图匹配良好，匹配度大于70，故“Lib. SI”没有蓝色填充，但是名称与通过二级碎片比对得到的化合物名称不对，故在名称那一栏显示了红色，“Flag ID”显示了Name；“西地那非N-氧化物”二级碎片与数据库中质谱图匹配良好，匹配度大于70，且与数据库中名称一致，故没有Flag显示。

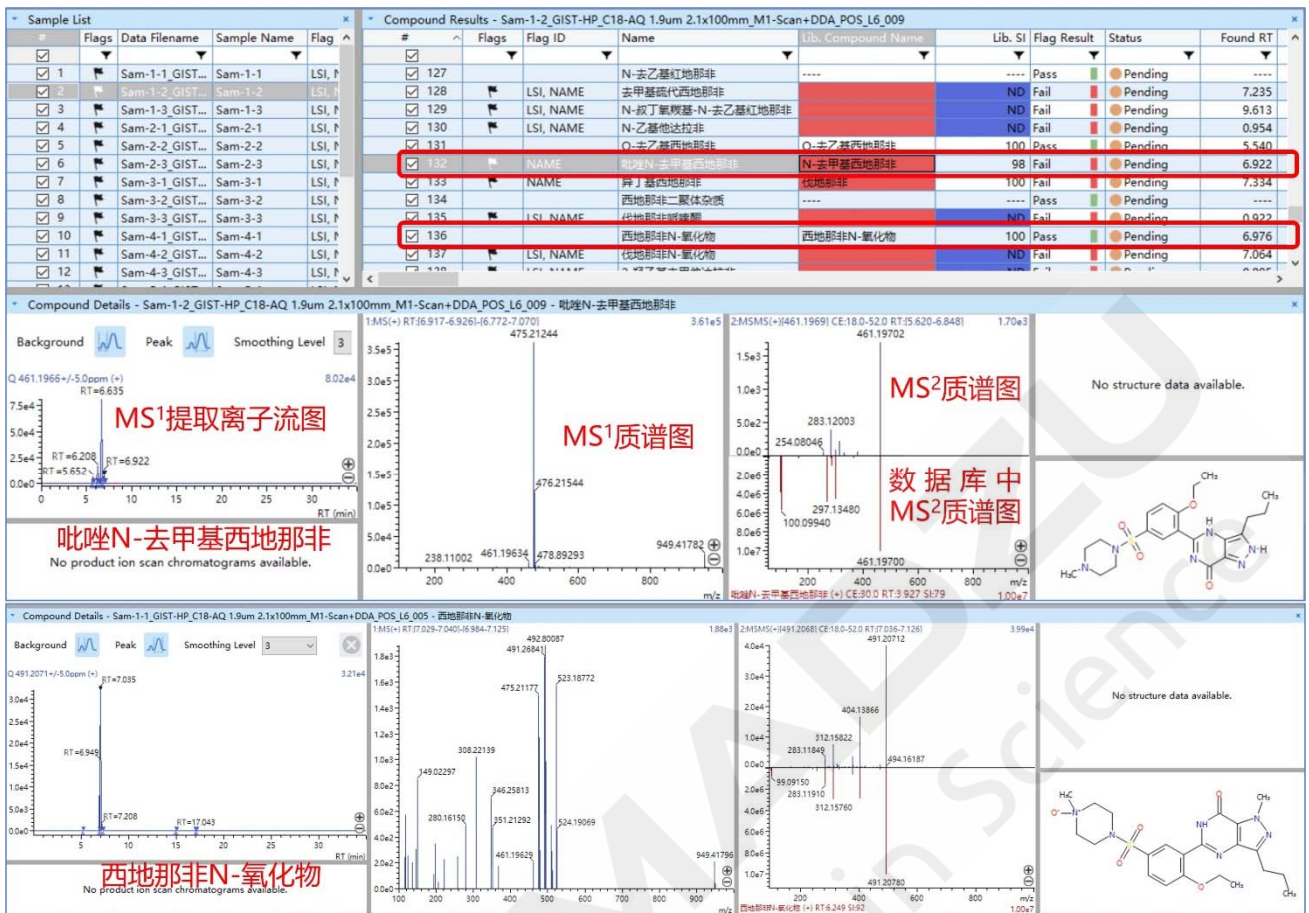


图 5. Insight Explore 软件截图

2.5 样品结果

利用上述方式进行批量搜库，7个样本的结果汇总如下表所示。



表 2. 13 种化合物在 7 个样品中的检出结果 (面积值)

序号	化合物名称	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7
1	西地那非	2769373	2714488	2717451	3384771	8664063	8483894	19569747
2	他达拉非	1921641	1767011	2562125	1450922	N.D.	N.D.	1392645
3	脱硫伐地那非	13431	12999	31523	ND	789323	765683	15615
4	N-去乙酰伐地那非	189833	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	N-去甲基西地那非	515718	438505	364713	355004	N.D.	N.D.	417011
6	吡唑 N-去甲基西地那非	63472	58470	54230	98954	1417040	1342914	76381
7	异丁基西地那非	84509	77690	152554	116668	2711682	2596266	96092
8	西地那非 N-氧化物	3089885	2948318	2977523	2316950	54638	77938	2534576
9	双去碳西地那非	25523	23882	25478	95905	219525	227367	26553
10	对乙酰氨基酚	N.D.	N.D.	N.D.	73844	N.D.	N.D.	N.D.
11	羟基豪莫西地那非	N.D.	N.D.	N.D.	19930	N.D.	N.D.	N.D.
12	去甲基哌嗪基西地那非磷酸	N.D.	N.D.	N.D.	14699	50303	49254	N.D.
13	氨基西地那非	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15201	15492	N.D.

注：“N.D.”表示未检出。

3. 结论

本文利用岛津公司 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪, 结合《保健品非法添加二级质谱库》快速对 7 个保健品样品中非法添加物进行筛查。结果显示: 7 个保健品样本中定性出 13 种非法添加物, 所有定性出的化合物的二级碎片与质谱库匹配良好。通过 7 个保健品样本的测试验证, 该方案可以实现一针进样, 快速完成目标物的定性筛查, 判定保健品中可能的非法添加物, 具有一定的实际应用价值, 供相关人员参考。

4.2 LCMS-9030 快速筛查化妆品中 214 种风险物质

摘要: 本文利用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱仪,建立了化妆品中 214 种风险物质的鉴别和确认方法。使用 LabSolutions insight 建立了 200 余种风险物质的高分辨二级质谱库,根据保留时间及精确质量数进行鉴别,并使用二级质谱库及典型二级碎片离子丰度比进行确认。10 ng/mL 浓度的两种基质加标样品(柔肤水、护肤霜),以溶剂标液进行定量计算,超过 70%的化合物回收率在 50-120%之间。该方法可用于化妆品中风险物质的快速筛查。

关键词: LCMS-Q-TOF 化妆品 风险物质

作为一种直接作用于人体的化学工业产品,化妆品给我们带来美丽的同时,健康安全必须得到保障,然而,我国化妆品行业一些不健康的现象,例如:不法厂家给化妆品中添加可能危害健康的禁用物质等行为给爱美人士的健康带来隐患。

备受关注的《化妆品监督管理条例》正式出台,于 2021 年 1 月 1 日起施行。《条例》共 6 章 80 条,

从四个方面对化妆品生产经营活动及其监督管理予以规范。

本文参考相关标准,建立了基于岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱的化妆品中风险物质的筛查方法,MS1 一级高质量准确度数据快速筛查,MS2 二级特征碎片离子匹配精准定性。为化妆品中风险物质物筛查方法建立提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪,具体配置为

输液泵	:LC-30AD×2	系统控制器	:CBM-20Alite
自动进样器	:SIL-30AC	飞行时间质谱仪	:LCMS-9030
柱温箱	:CTO-20AC	色谱工作站	:LabSolutions Ver. 5.98
在线脱气机	:DGU-20A5R		LabSolutions Insight Ver. 3.7

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack GIST-HP C18 100 mm I.D.× 2.1 mm I.D., 1.9 μm, P/N: 227-30807-02		
流动相	: A 相-0.1%甲酸水+2 mM 甲酸铵; B 相-乙腈		
洗针模式	: 进样前后洗针, External only (进样针外壁清洗), Rinse Port		
流速	: 0.25 mL/min	柱温	: 40°C
进样体积	: 5 μL	洗针液	: 甲醇/水=1:1 (v:v)
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为5%, 时间程序见表1。		

质谱条件

离子源	: ESI+/-	加热模块温度	: 400°C
雾化气流速	: 3.0 L/min	DL 温度	: 250°C
加热气流速	: 10.0 L/min	接口温度	: 300°C

干燥气流速：10.0 L/min 扫描模式：MS Scan (m/z 50 -1000)
MS² DDA (m/z 50 -1000)

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	泵	B.Conc	5
5.00	泵	B.Conc	30
13.00	泵	B.Conc	60
16.00	泵	B.Conc	98
18.00	泵	B.Conc	98
18.50	泵	B.Conc	5
22.00	控制器	Stop	

1.3 试剂

乙腈：色谱级，室温保存。

实验用水：由 Milli-Q Plus 水净化系统经去离子与二次净化制得。

甲酸：色谱级，纯度 98%，室温保存。

甲酸铵：色谱级，纯度 99%，室温保存。

1.4 样品前处理

精密称量 0.5 g 柔肤水、护肤霜样品置于 15 mL 离心管中，加入 2 mL 乙腈，充分涡旋 2 min，使其充分与样品混合均匀，再加入 7 mL 乙腈，超声提取 10 min，静置至室温，乙腈定容 10 mL，充分摇匀，4000 r/min 离心 5 min，取 1 mL 上清液过 0.22 μm 滤膜后上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 准确质量数提取结果

214 种风险物质提取离子流色谱图 EIC 图 (10 ng/mL) 如图 1 所示。

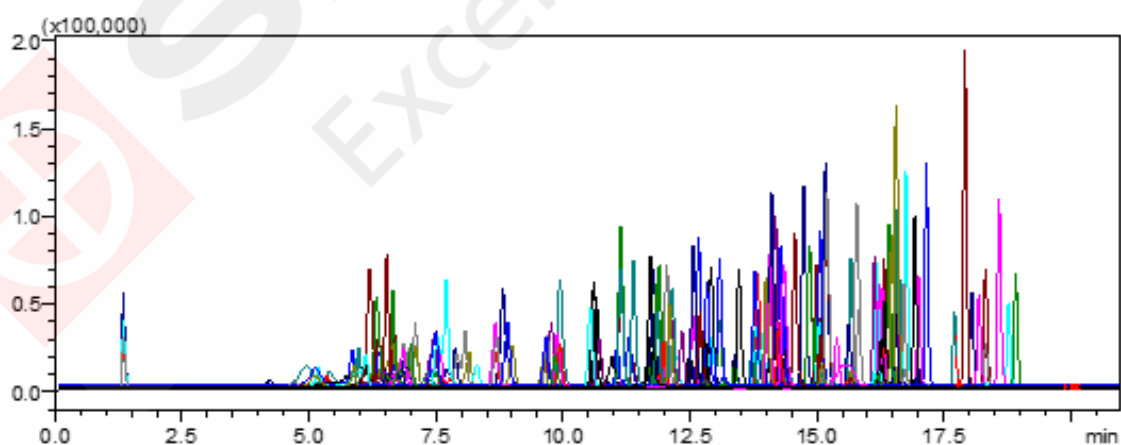


图 1. 214 种风险物质提取离子流色谱图 EIC 图 (10 ng/mL)

2.2 方法检出限

配制浓度 10 ng/mL 的 214 种风险物质混合标准样品，上机进行测定，214 种风险物质品种信息、中英文名、CAS、一级离子、保留时间、定量限 (ASTM, S/N=10) 等结果见表 2。

表 2. 214 种风险物质化合物信息

类型	序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	离子类型	一级离子	保留时间 (min)
抗菌药	1	磺胺醋酰	Sulfacetamide	144-80-9	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	[M+H] ⁺	215.04849	5.8
	2	磺胺多辛	Sulfadoxine	2447-57-6	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	[M+H] ⁺	311.08085	8.7
	3	磺胺二甲基异噻啉	Sulfisomidine	515-64-0	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	279.09102	5.3
	4	磺胺嘧啶	Sulfadiazine	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	251.05972	6.3
	5	磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	57-68-1	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	279.09102	7.5
	6	琥珀酰磺胺噻唑	Succinylsulfathiazole	116-43-8	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₅ S ₂	[M+H] ⁺	356.03694	6.9
	7	磺胺二甲异恶唑	Sulfisoxazole	127-69-5	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	268.07504	9.0
	8	磺胺二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxine	122-11-2	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	[M+H] ⁺	311.08085	9.9
	9	磺胺喹恶啉	Sulfaquinoxaline	59-40-5	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	[M+H] ⁺	301.07537	9.9
	10	磺胺硝苯	Sulfantran	122-16-7	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₅ S	[M-H] ⁻	334.05032	11.5
	11	盐酸二氟沙星	Difluoxacin hydrochloride	91296-86-5	C ₂₁ H ₂₀ ClF ₂ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	400.14673	7.7
	12	吲哚美辛	Indometacin	53-86-1	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	[M-HCl+H] ⁺	358.08406	15.6
	13	保泰松	Phenylbutazone	50-33-9	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	309.15975	16.2
	14	盐酸洛美沙星	Lomefloxacin hydrochloride	98079-52-8	C ₁₇ H ₂₀ ClF ₂ N ₃ O ₃	[M-HCl+H] ⁺	352.14673	6.7
	15	氟甲喹	Flumequine	42835-25-6	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	[M+H] ⁺	262.08740	11.3
	16	硝酸咪康唑	Miconazole nitrate	22832-87-7	C ₁₈ H ₁₅ Cl ₄ N ₃ O ₄	[M-HNO ₃ +H] ⁺	414.99330	15.0
	17	盐酸萘替芬	Naftifine hydrochloride	65473-14-5	C ₂₁ H ₂₂ ClN	[M-HCl+H] ⁺	288.17468	11.8
	18	替硝唑	Tinidazole	19387-91-8	C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	[M+H] ⁺	248.06995	7.0
	19	硝酸益康唑	Econazole nitrate	24169-02-6	C ₁₈ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₄	[M-HNO ₃ +H] ⁺	381.03227	13.9
	20	地红霉素	Dirithromycin	62013-04-1	C ₄₂ H ₇₈ N ₂ O ₁₄	[M+H] ⁺	835.55258	8.5
	21	红霉素	Erythromycin	114-07-8	C ₃₇ H ₆₇ N ₃ O ₁₃	[M+H] ⁺	734.46852	9.9
	22	琥乙红霉素	Erythromycin ethylsuccinate	1264-62-6	C ₄₃ H ₇₅ N ₃ O ₁₆	[M+H] ⁺	862.51586	12.5
	23	西咪替丁	Cimetidine	51481-61-9	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ S	[M+H] ⁺	253.12299	5.2
	24	溴莫尼定	Brimonidine	59803-98-4	C ₁₁ H ₁₀ BrN ₅	[M+H] ⁺	292.01923	5.4
	25	莫匹罗星	Mupirocin	12650-69-0	C ₂₆ H ₄₄ O ₉	[M+H] ⁺	501.30581	11.7

26	他扎罗汀	Tazarotene	118292-40-3	C21H21NO2S	[M+H] ⁺	352.13658	18.6
27	克罗米通	Crotamiton	483-63-6	C13H17NO	[M+H] ⁺	204.13829	13.7
28	三甲氧苄氨嘧啶)	Trimethoprim	738-70-5	C14H18N4O3	[M+H] ⁺	291.14517	6.6
29	二甲氧甲基苄氨嘧啶	Ormethoprim	6981-18-6	C14H18N4O2	[M+H] ⁺	275.15025	6.9
30	巴喹普林	Baquiloprim	102280-35-3	C17H20N6	[M+H] ⁺	309.18222	1.3
31	舒巴坦钠	Sulbactam sodium	69388-84-7	C8H10NNaO5S	[M+H] ⁺	256.02502	15.6
32	丙磺舒	Probenecid	57-66-9	C13H19NO4S	[M-H] ⁻	284.09620	13.8
33	阿地普林	Aditoprim	56066-63-8	C15H21N5O2	[M+H] ⁺	304.17680	1.4
34	盐酸布替萘酚	Butenafine hydrochloride	101827-46-7	C23H28ClN	[M-HCl+H] ⁺	318.22163	14.1
35	卢立康唑	Luliconazole	187164-19-8	C14H9Cl2N3S2	[M+H] ⁺	353.96877	15.0
36	伏立康唑	Voriconazole	137234-62-9	16H14F3N5O	[M+H] ⁺	350.12232	11.9
37	那氟沙星	Nadifloxacin	124858-35-1	C19H21FN2O4	[M+H] ⁺	361.15581	10.6
38	利拉萘酯	Liranaftate	88678-31-3	C18H20N2O2S	[M+H] ⁺	329.13183	18.2
39	磺胺二甲唑	Sulfamoxol	729-99-7	C11H13N3O3S	[M+H] ⁺	268.07504	7.1
40	甲硝唑	Metronidazole	443-48-1	C6H9N3O3	[M+H] ⁺	172.07167	5.4
41	氧氟沙星	Ofloxacin	82419-36-1	C18H20FN3O4	[M+H] ⁺	362.15106	6.4
42	左氧氟沙星	Levofloxacin hydrochloride	100986-85-4	C18H20FN3O4	[M+H] ⁺	362.15106	6.4
43	环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	C17H18FN3O3	[M+H] ⁺	332.14050	6.5
44	克林霉素	Clindamycin	18323-44-9	C18H33ClN2O5S	[M+H] ⁺	425.18715	8.1
45	林可霉素	Lincomycin	154-21-2	C18H34N2O6S	[M+H] ⁺	407.22104	5.3
46	多西环素	Doxycycline	564-25-0	C22H24N2O8	[M+H] ⁺	445.16055	8.4
47	米诺环素	Minocycline	10118-90-8	C23H27N3O7	[M+H] ⁺	458.19218	6.6
48	阿奇霉素	Azithromycin	83905-01-5	C38H72N2O12	[M+H] ⁺	749.51581	7.8
49	克拉霉素	Clarithromycin	81103-11-9	C38H69NO13	[M+H] ⁺	748.48417	11.6
50	罗红霉素	Roxithromycin	80214-83-1	C41H76N2O15	[M+H] ⁺	837.53185	11.9
51	克霉唑	Clotrimazole	23593-75-1	C22H17ClN2	[M-C3N2H3] ⁺	277.07785	12.8

52	酮康唑	Ketoconazole	65277-42-1	C26H28Cl2N4O4	[M+H] ⁺	531.15604	11.1
53	氟康唑	Fluconazole	86386-73-4	C13H12F2N6O	[M+H] ⁺	307.11135	7.5
54	联苯苄唑	Bifonazole	60628-96-8	C22H18N2	[M+H] ⁺	311.15428	12.7
55	磺胺吡啶	Sulfapyridine	144-83-2	C11H11N3O2S	[M+H] ⁺	250.06447	6.7
56	磺胺甲噁唑	Sulfamerazine	127-79-7	C11H12N4O2S	[M+H] ⁺	265.07537	7.0
57	磺胺甲二唑	Sulfamethizole	144-82-1	C9H10N4O2S2	[M+H] ⁺	271.03179	7.4
58	磺胺甲氧嗪	Sulfamethoxy pyridazine	80-35-3	C11H12N4O3S	[M+H] ⁺	281.07029	7.5
59	磺胺氯吡嗪	Sulfachloropyridazine	80-32-0	C10H9ClN4O2S	[M+H] ⁺	285.02075	8.3
60	磺胺甲异噁唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	C10H11N3O3S	[M+H] ⁺	254.05939	8.7
61	依诺沙星	Enoxacin	74011-58-8	C15H17FN4O3	[M+H] ⁺	321.13575	6.2
62	沙拉沙星	Sarafloxacin	98105-99-8	C20H17F2N3O3	[M+H] ⁺	386.13108	7.6
63	培氟沙星	Pefloxacin	70458-92-3	C17H20FN3O3	[M+H] ⁺	334.15615	6.7
64	氟罗沙星	Fleroxacin	79660-72-3	C17H18F3N3O3	[M+H] ⁺	370.13731	6.4
65	双氟沙星	Difloxacin	98106-17-3	C21H19F2N3O3	[M+H] ⁺	400.14673	7.7
66	莫西沙星	Moxifloxacin	151096-09-2	C21H24FN3O4	[M+H] ⁺	402.18237	7.9
67	诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	C16H18FN3O3	[M+H] ⁺	320.14050	6.3
68	恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	C19H22FN3O3	[M+H] ⁺	360.17180	7.1
69	呋喃它酮	Furaltadone	139-91-3	C13H16N4O6	[M+H] ⁺	325.11426	6.0
70	四环素	Tetracycline	60-54-8	C22H24N2O8	[M+H] ⁺	445.16055	7.1
71	土霉素	Oxytetracyclin	79-57-2	C22H24N2O9	[M+H] ⁺	461.15546	6.7
72	螺内酯	Spirolactone	52-01-7	C24H32O4S	[M+H] ⁺	417.20941	11.9
73	灰黄霉素	Griseofulvin	126-07-8	C17H17ClO6	[M+H] ⁺	353.07865	12.9
74	氯霉素	Chloramphenicol	56-75-7	C11H12Cl2N2O5	[M-H] ⁻	321.00505	9.1
75	氯霉素二醇物	1-p-nitropheny-2-amino1.3-propanediol	CB13962449	C9H12N2O4	[M+H] ⁺	213.08698	1.5

激素	76	诺龙	Nandrolone	434-22-0	C18H26O2	[M+H] ⁺	275.20056	12.6
	77	坎利酮	Canrenone	976-71-6	C22H28O3	[M+H] ⁺	341.21112	14.8
	78	屈螺酮	Drospirenone	67392-87-4	C24H30O3	[M+H] ⁺	367.22677	14.7
	79	炔雌醚	Quinestrol	152-43-2	C25H32O2	[M+H] ⁺	365.24751	19.0
	80	炔诺酮	Norethindrone	68-22-4	C20H26O2	[M+H] ⁺	299.20056	13.6
	81	表睾酮	Epitestosterone	481-30-1	C19H28O2	[M+H] ⁺	289.21621	14.4
	82	康力龙	Stanozolol	10418-03-8	C21H32N2O	[M+H] ⁺	329.25874	14.0
	83	孕二烯酮	Gestodene	60282-87-3	C21H26O2	[M+H] ⁺	311.20056	14.3
	84	马烯雌酮	Equilin	474-86-2	C18H20O2	[M+H] ⁺	269.15361	15.0
	85	四烯雌酮	Altrenogest	850-52-2	C21H26O2	[M+H] ⁺	311.20056	15.0
	86	丙酸睾酮	Testosterone propionate	57-85-2	C22H32O3	[M+H] ⁺	345.24242	18.0
	87	醋酸环丙孕酮	Cyproterone acetate	427-51-0	C24H29ClO4	[M+H] ⁺	417.18271	16.4
	88	醋酸优力司特	Ulipristal Acetate	126784-99-4	C30H37NO4	[M+H] ⁺	476.27954	15.7
	89	17 α -羟基黄体酮	Hydroxyprogesterone	68-96-2	C21H30O3	[M+H] ⁺	331.22677	14.5
	90	宝丹酮	Boldenone	846-48-0	C19H26O2	[M+H] ⁺	287.20056	12.3
	91	苯丙酸诺龙	Nandrolone phenylpropionate	62-90-8	C27H34O3	[M+H] ⁺	407.25807	18.7
	92	苯甲酸雌二醇	Estradiol benzoate	50-50-0	C25H28O3	[M+H] ⁺	377.21112	18.3
	93	去氧皮质酮	Desoxycorticosterone	64-85-7	C21H30O3	[M+H] ⁺	331.22677	13.7
	94	醋酸去氧皮质酮	Deoxycorticosterone acetate	56-47-3	C23H32O4	[M+H] ⁺	373.23734	16.2
	95	雌酮硫酸酯哌嗪	Estropipate	7280-37-7	C22H32N2O5S	[M-C4H10N2-H] ⁻	349.11152	9.8
	96	左炔诺孕酮	Levonorgestrel	797-63-7	C21H28O2	[M+H] ⁺	313.21676	15.1
97	美雄酮	Metandienone	72-63-9	C20H28O2	[M+H] ⁺	301.21621	13.0	
98	丙酸诺龙	Nandrolone 17-propionate	7207-92-3	C21H30O3	[M+H] ⁺	331.22677	17.7	
99	泼尼松龙	Prednisolone	50-24-8	C21H28O5	[M+H] ⁺	361.20095	9.6	
100	泼尼松	Prednisone	53-03-2	C21H26O5	[M+H] ⁺	359.18530	9.7	
101	异氟泼尼松	9-fluoroprednisolone	338-95-4	C21H27FO5	[M+H] ⁺	379.19153	9.6	

102	氢化可的松	Hydrocortisone	50-23-7	C21H30O5	[M+H] ⁺	363.21660	9.7
103	可的松	Cortisone	53-06-5	C21H28O5	[M+H] ⁺	361.20095	9.6
104	甲基泼尼松龙	Methylprednisolone	83-43-2	C22H30O5	[M+H] ⁺	375.21660	10.6
105	倍他米松	Betamethasone	378-44-9	C22H29FO5	[M+H] ⁺	393.20718	10.9
106	地塞米松	Dexamethasone	50-02-2	C22H29FO5	[M+H] ⁺	393.20718	10.9
107	氟米松	Flumethasone	2135-17-3	C22H28F2O5	[M+H] ⁺	411.19776	11.0
108	倍氯米松	Beclomethasone	4419-39-0	C22H29ClO5	[M+H] ⁺	409.17763	11.3
109	曲安奈德	Triamcinolone acetonide	76-25-5	C24H31FO6	[M+H] ⁺	435.21775	11.8
110	地索奈德	Desonide	638-94-8	C24H32O6	[M+H] ⁺	417.22717	11.7
111	氟尼缩松	Flunisolide	77326-96-6	C24H31FO6	[M+H] ⁺	435.21775	11.8
112	氟轻松	Fluocinolone acetonide	67-73-2	C24H30F2O6	[M+H] ⁺	453.20833	12.0
113	曲安西龙双醋酸酯	Triamcinolone diacetate	67-78-7	C25H31FO8	[M+H] ⁺	479.20758	12.1
114	氟氢缩松	Fludroxycortide	1524-88-5	C24H33FO6	[M+H] ⁺	437.23340	12.1
115	泼尼松龙醋酸酯	Prednisolone 21-acetate	52-21-1	C23H30O6	[M+H] ⁺	403.21152	12.3
116	氟米龙	Fluorometholone	426-13-1	C22H29FO4	[M+H] ⁺	377.21227	12.4
117	氢化可的松醋酸酯	Hydrocortisone 21-acetate	50-03-3	C23H32O6	[M+H] ⁺	405.22717	12.4
118	氟氢可的松醋酸酯	Fludrocortisone 21-acetate	514-36-3	C23H31FO6	[M+H] ⁺	423.21775	12.5
119	地夫可特	Deflazacort	14484-47-0	C25H31NO6	[M+H] ⁺	442.22242	12.6
120	泼尼松醋酸酯	Prednisone 21-acetate	125-10-0	C23H28O6	[M+H] ⁺	401.19587	12.6
121	可的松醋酸酯	Cortisone 21-acetate	50-04-4	C23H30O6	[M+H] ⁺	403.21152	13.0
122	卤美他松	Halometasone	50629-82-8	C22H27ClF2O5	[M+H] ⁺	445.15879	12.8
123	甲基泼尼松龙醋酸酯	Methylprednisolone 21-acetate	53-36-1	C24H32O6	[M+H] ⁺	417.22717	13.4
124	倍他米松醋酸酯	Betamethasone 21-acetate	987-24-6	C24H31FO6	[M+H] ⁺	435.21775	11.8
125	睾酮	Testosterone	58-22-0	C19H28O2	[M+H] ⁺	289.21621	13.4
126	地塞米松醋酸酯	Dexamethasone 21-acetate	1177-87-3	C24H31FO6	[M+H] ⁺	435.21775	11.8
127	布地奈德	Budesonide	51333-22-3	C25H34O6	[M+H] ⁺	431.24282	13.7

128	氢化可的松丁酸酯	Hydrocortisone 17-butyrate	13609-67-1	C25H36O6	[M+H] ⁺	433.25847	13.8
129	孕三烯酮	Gestrinone	16320-04-0	C21H24O2	[M+H] ⁺	309.18491	14.1
130	氟米龙醋酸酯	Fluormetholone 17-acetate	3801-06-7	C24H31FO5	[M+H] ⁺	419.22283	14.1
131	甲睾酮	Methyltestosterone	58-18-4	C20H30O2	[M+H] ⁺	303.23186	14.2
132	氢化可的松戊酸酯	Hydrocortisone 17-valerate	57524-89-7	C26H38O6	[M+H] ⁺	447.27412	14.9
133	曲安奈德醋酸酯	Triamcinolone acetonide acetate	3870-07-3	C26H33FO7	[M+H] ⁺	477.22831	14.9
134	二氟拉松双醋酸酯	Diflorasone diacetate	33564-31-7	C26H32F2O7	[M+H] ⁺	495.21889	15.1
135	氟轻松醋酸酯	Fluocinonide	356-12-7	C26H32F2O7	[M+H] ⁺	495.21889	15.1
136	炔诺孕酮	Norgestrel	6533-00-2	C21H28O2	[M+H] ⁺	313.21621	15.1
137	倍他米松戊酸酯	Betamethasone 17-valerate	2152-44-5	C27H37FO6	[M+H] ⁺	477.26470	15.6
138	哈西奈德	Halcinonide	3093-35-4	C24H32ClFO5	[M+H] ⁺	455.19951	16.1
139	泼尼卡酯	Prednicarbate	73771-04-7	C27H36O8	[M+H] ⁺	489.24830	16.1
140	氯替泼诺	Loteprednol etabonate	82034-46-6	C24H31ClO7	[M+H] ⁺	467.18311	16.2
141	阿氯米松双丙酸酯	Alclometasone dipropionate	66734-13-2	C28H37ClO7	[M+H] ⁺	521.23006	16.9
142	安西奈德	Amcinonide	51022-69-6	C28H35FO7	[M+H] ⁺	503.24396	16.2
143	卤倍他索丙酸酯	Halobetasol Propionate	66852-54-8	C25H31ClF2O5	[M+H] ⁺	485.19009	16.2
144	氯倍他索丙酸酯	Clobetasol 17-propionate	25122-46-7	C25H32ClFO5	[M+H] ⁺	467.19951	16.3
145	氟替卡松丙酸酯	Fluticasone propionate	80474-14-2	C25H31F3O5S	[M+H] ⁺	501.19171	16.4
146	莫米他松糠酸酯	Mometasone furoate	83919-23-7	C27H30Cl2O6	[M+H] ⁺	521.14922	16.5
147	醋酸甲地孕酮	Megestrol acetate	595-33-5	C24H32O4	[M+H] ⁺	385.23734	16.5
148	醋酸氯地孕酮	Chlormadinone acetate	302-22-7	C23H29ClO4	[M+H] ⁺	405.18272	16.7
149	倍他米松双丙酸酯	Betamethasone dipropionate	5593-20-4	C28H37FO7	[M+H] ⁺	505.25961	16.6
150	黄体酮	Progesterone	57-83-0	C21H30O2	[M+H] ⁺	315.23186	16.5
151	醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone 17-acetate	71-58-9	C24H34O4	[M+H] ⁺	387.25299	16.7
152	甲羟孕酮	Medroxyprogesterone	520-85-4	C22H32O3	[M+H] ⁺	345.24242	15.6
153	倍氯米松双丙酸酯	Beclmetasone dipropionate	5534-09-8	C28H37ClO7	[M+H] ⁺	521.23006	16.9

抗组胺	154	双氟可龙戊酸酯	Diflucortolone valerate	59198-70-8	C27H36F2O5	[M+H] ⁺	479.26036	17.0
	155	氯倍他松丁酸酯	Clobetasone 17-butyrate	25122-57-0	C26H32ClFO5	[M+H] ⁺	479.19951	17.2
	156	己酸羟孕酮	Hydroxyprogesterone caproate	630-56-8	C27H40O4	[M+H] ⁺	429.29994	18.3
	157	环索奈德	Ciclesonide	126544-47-6	C32H44O7	[M+H] ⁺	541.31598	18.9
	158	阿司咪唑	Astemizole	68844-77-9	C28H31FN4O	[M+H] ⁺	459.25547	8.8
	159	地氯雷他定	Desloratadine	100643-71-8	C19H19ClN2	[M+H] ⁺	311.13096	8.1
	160	吩噻嗪	Phenothiazine	92-84-2	C12H9NS	[M+H] ⁺	200.05285	16.5
	161	奋乃静	Desloratadine	58-39-9	C21H26ClN3OS	[M+H] ⁺	404.15579	11.7
	162	氯雷他定	Loratadine	79794-75-5	C22H23ClN2O2	[M+H] ⁺	383.15209	14.3
	163	马来酸溴苯那敏	Brompheniramine	980-71-2	C16H19BrN2·C4H4O4	[M-C4H4O4+H] ⁺	319.08044	8.9
	164	特非那定	Terfenadine	50679-08-8	C32H41NO2	[M+H] ⁺	472.32101	14.5
	165	盐酸苯海拉明	Diphenhydramine	147-24-0	C17H21NO·HCl	[M-HCl+H] ⁺	256.16959	9.8
	166	盐酸氟奋乃静	Fluphenazine	146-56-5	C22H26F3N3OS·2HCl	[M-2HCl+H] ⁺	438.18214	12.5
	167	盐酸氯丙嗪	Chlorpromazine	69-09-0	C17H19ClN2S·HCl	[M-HCl+H] ⁺	319.10302	12.0
	168	盐酸曲吡那敏	Tripelennamine	154-69-8	C16H21N3·HCl	[M-HCl+H] ⁺	256.18082	8.7
	169	盐酸赛庚啉	Cyproheptadine	41354-29-4	C21H21N·HCl·H2O	[M-HCl-H2O+H] ⁺	288.17468	11.1
	170	盐酸西替利嗪	Cetirizine	83881-52-1	C21H25ClN2O3·2HCl	[M-2HCl+H] ⁺	389.16265	11.1
	171	盐酸异丙嗪	Promethazine	58-33-3	C17H20N2S·HCl	[M-HCl+H] ⁺	285.14200	10.5
	172	赛克利嗪	Cyclizine Hydrochloride	303-25-3	C18H23ClN2	[M-HCl+H] ⁺	267.18558	9.9
	173	二苯拉林	Diphenylpyraline	147-20-6	C19H23NO	[M+H] ⁺	282.18524	10.6
174	多西拉敏	Doxylamine	469-21-6	C17H22N2O	[M+H] ⁺	271.18049	6.9	
麻醉剂	175	盐酸丁卡因	Tetracaine hydrochloride	136-47-0	C15H25ClN2O2	[M-HCl+H] ⁺	265.19106	9.6
	176	苯佐卡因	Benzocaine	94-09-7	C9H11NO2	[M+H] ⁺	166.08626	10.5
	177	利多卡因	Lidocaine	137-58-6	C14H22N2O	[M+H] ⁺	235.18049	7.0
	178	盐酸普鲁卡因	Chloroprocaine hydrochloride	3858-89-7	C13H20Cl2N2O2	[M-HCl+H] ⁺	271.12078	6.6
	179	盐酸普鲁卡因	Procaine hydrochloride	51-05-8	C13H21ClN2O2	[M-HCl+H] ⁺	237.15975	5.9

农残	180	普鲁卡因胺	procainamide	51-06-9	C13H21N3O	[M+H] ⁺	236.17574	4.7
	181	辛可卡因	Cinchocaine	85-79-0	C20H29N3O2	[M+H] ⁺	344.23325	11.3
	182	甲萘威	Carbaryl	63-25-2	C12H11NO2	[M+H] ⁺	202.08626	12.3
	183	多菌灵	Carbendazim	10605-21-7	C9H9N3O2	[M+H] ⁺	192.07676	6.2
	184	丁变敌	Di-allate	2303-16-4	C10H17Cl2NOS	[M+H] ⁺	270.04807	17.8
	185	敌草隆	Diuron	330-54-1	C9H10Cl2N2O	[M+H] ⁺	233.02430	12.7
	186	氟环唑	Epoxiconazole	106325-08-0	C17H13ClFN3O	[M+H] ⁺	330.08040	15.3
	187	丁苯吗啉	Fenpropimorph	67306-03-0	C20H33NO	[M+H] ⁺	304.26349	13.0
	188	精吡氟禾草灵	Fluazifop-p-butyl	79241-46-6	C19H20F3NO4	[M+H] ⁺	384.14172	17.9
	189	丙炔氟草胺	Flumioxazin	103361-09-7	C19H15FN2O4	[M+H] ⁺	355.10887	14.7
	190	异菌脲	Iprodione	36734-19-7	C13H13Cl2N3O3	[M+H] ⁺	330.04068	16.0
	191	异恶唑草酮	Isoxaflutole	141112-29-0	C15H12F3NO4S	[M+H] ⁺	360.05119	15.1
	192	亚胺菌	Kresoxim-methyl	143390-89-0	C18H19NO4	[M+H] ⁺	314.13869	16.7
	193	禾草敌	Molinate	2212-67-1	C9H17NOS	[M+H] ⁺	188.11037	15.3
	194	久效磷	Monocrotophos	2157-98-4	C7H14NO5P	[M+H] ⁺	224.06824	6.2
	195	炔螨特	Propargite	2312-35-8	C19H26O4S	[M+NH4] ⁺	368.18901	18.3
	196	扑灭津	Propazine	139-40-2	C9H16ClN5	[M+H] ⁺	230.11670	14.2
	197	西玛津	Simazine	122-34-9	C7H12ClN5	[M+H] ⁺	202.08540	10.7
	198	十三吗啉	Tridemorph	24602-86-6	C19H39NO	[M+H] ⁺	298.31044	15.5
	199	二苯胺	Diphenylamine	122-39-4	C12H11N	[M+H] ⁺	170.09643	16.2
200	炔苯酰草胺	Propyzamide	23950-58-5	C12H11Cl2NO	[M+H] ⁺	256.02905	15.6	
201	甲草胺	Alachlor	15972-60-8	C14H20ClNO2	[M+H] ⁺	270.12553	16.2	
202	倍硫磷	Fenthion	55-38-9	C10H15O3PS2	[M+H] ⁺	279.02730	16.9	
203	腈菌唑	Myclobutanil	88671-89-0	C15H17ClN4	[M+H] ⁺	289.12145	15.0	
204	氟硅唑	Flusilazole	85509-19-9	C16H15F2N3Si	[M+H] ⁺	316.10761	15.8	
205	氯苯嘧啶醇	Fenarimol	60168-88-9	C17H12Cl2N2O	[M+H] ⁺	331.03995	15.0	

	206	特乐酚	Dinoterb	1420-07-1	C10H12N2O5	[M-H]-	239.06734	16.8
	207	碘苯腈	Ioxynil	1689-83-4	C7H3I2NO	[M-H]-	369.82313	13.8
青霉素	208	氨苄西林三水合物	Ampicillin Trihydrate	7177-48-2	C16H19N3O4S·3H2O	[M-3H2O+H]+	350.11690	11.9
	209	青霉素 G 钾盐	Penicillin G potassium salt	113-98-4	C16H17N2O4SK	[M-K+2H]+	335.10600	10.0
	210	青霉素 V 钾盐	Penicillin V potassium salt	132-98-9	C16H17N2O5SK	[M-K+2H]+	351.10092	10.8
	211	苯唑西林钠	Oxacillin sodium monohydrate	7240-38-2	C19H18N3NaO5S·H2O	[M-Na-H2O+2H]+	402.11182	11.5
	212	氯唑西林钠	Cloxacillin sodium hydrate	7081-44-9	C19H19ClN3NaO6S·H2O	[M-Na-2H2O+2H]+	436.07285	12.3
	213	萘夫西林钠	Nafcillin sodium hydrate	7177-50-6	C21H23N2NaO6S·H2O	[M-Na-2H2O+2H]+	415.13222	12.7
	214	双氯西林钠	Dicloxacillin sodium hydrate	13412-64-1	C19H16Cl2N3NaO5S·H2O	[M-Na-H2O+2H]+	470.03387	13.4



SHIMADZU
Excellence in Science

2.3 二级高分辨质谱库建立

配制 100 ng/mL 的 214 种风险物质混合标准样品溶液，按照前述条件进行前处理，上机分析。进行一级 MS 扫描，以及 MS/MS(DDA)扫描，获得不同碰撞能 (10V、20V、30V、40V、50V、60V) 下的二级质谱图，使用 LabSolutions insight 软件进行二级质谱库的建立。200 余种风险物质高分辨二级质谱库收录了 1000 余张二级质谱图，以及化合物的中文名、分子式、保留时间、色谱条件，高分辨质荷比等信息。

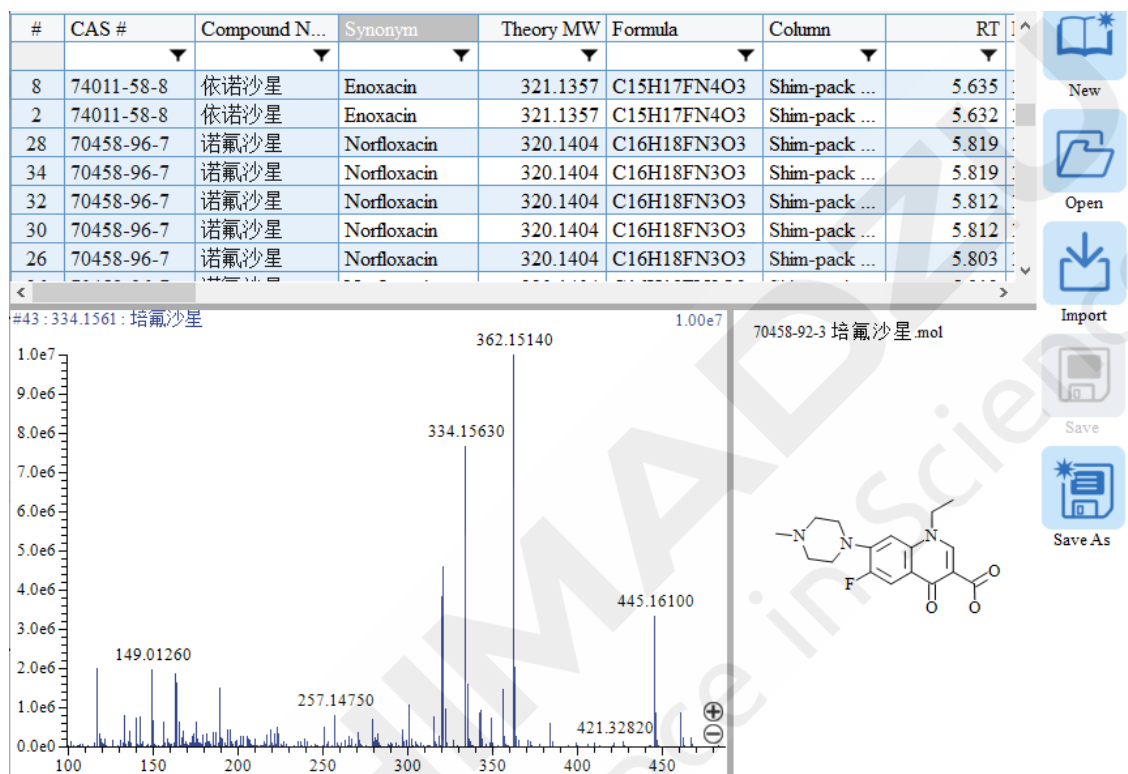


图 2. 风险物质二级质谱库预览

2.4 化妆品样品加标鉴别与确认

按照前述分析条件，制备 100 ng/mL 加标样品，根据保留时间及精确质量数进行鉴别，二级质谱库或典型二级碎片离子丰度比进行确认。以磺胺氯吡嗪为例演示加标样品的定性过程，混合标液中磺胺氯吡嗪 m/z 285.0208 色谱出峰时间 RT=8.321min。利用岛津 LabSolutions Insight Explore 的谱库检索功能，对加标样品中 m/z 285.0208 的化合物进行二级质谱图谱库匹配，相似度得分 96 分，如图 4 所示。典型碎片离子与标准谱库中质量偏差小于 5ppm，如表 3 所示。

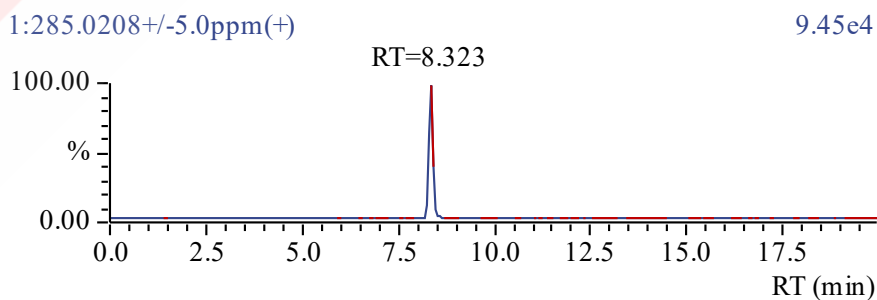


图 3. m/z 285.0208 提取离子流图

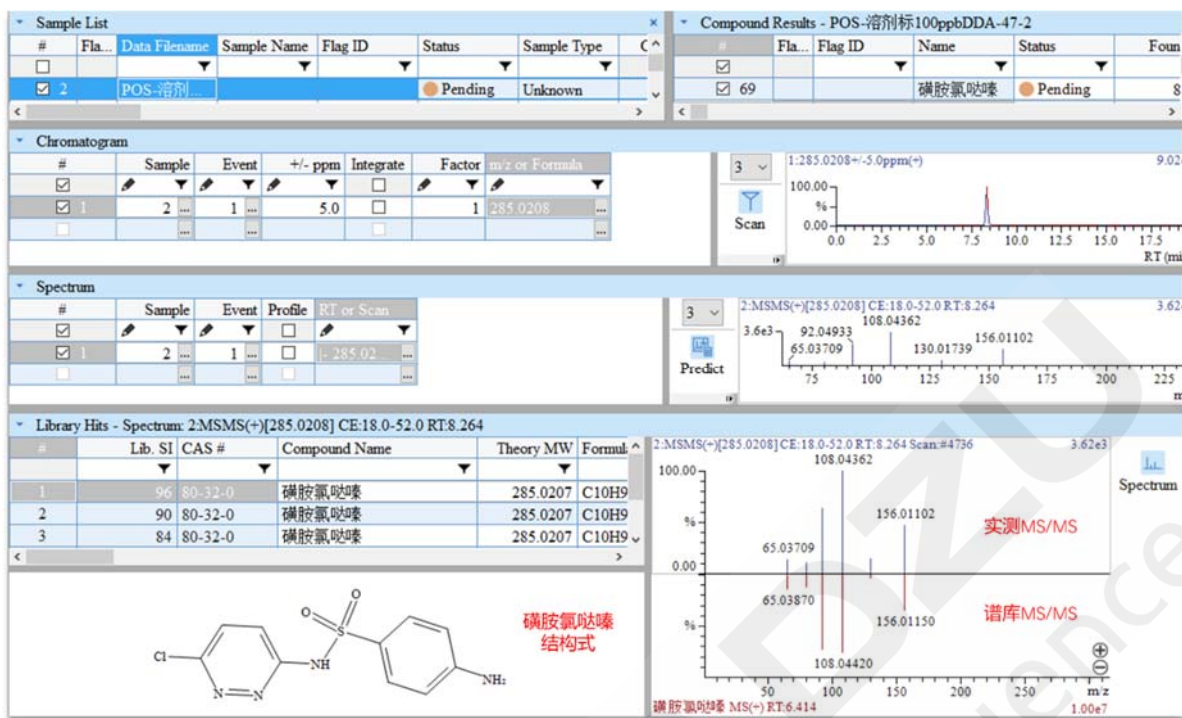


图 4. m/z 285.0208 二级质谱图谱库检索结果

表 3. m/z 285.0208 二级质谱图典型碎片离子质量偏差

化合物	典型二级碎片离子 1	典型二级碎片离子 2
标准谱库	92.04920	156.0115
加标样品	92.04933	156.0110
质量偏差	1.41229	3.076696

2.5 加标回收率

10 ng/mL 柔肤水、护肤霜两种加标样品进行计算加标回收率，回收率结果如图 5、6 所示，柔肤水、护肤霜两种化妆品的回收率在 50-120%之间的化合物数量分别为 156 和 179 个。

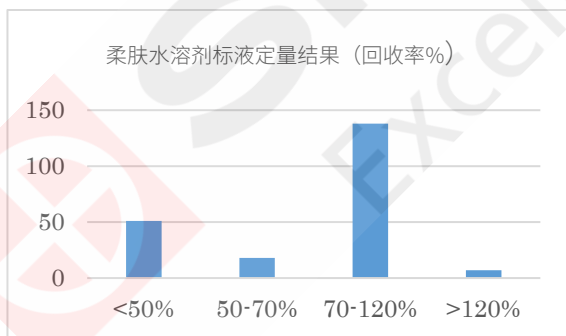


图 5. 柔肤水基质加标 (10 ng/mL) 回收率结果

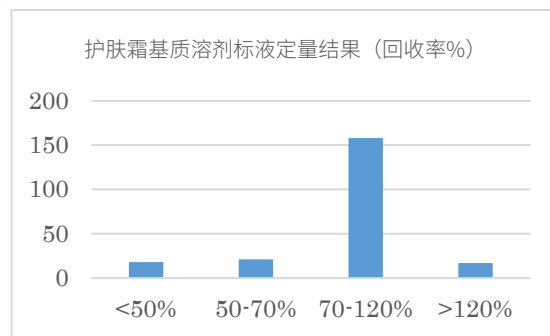


图 6. 护肤霜基质加标 (10 ng/mL) 回收率结果

3. 结论

本文采用岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪，建立了化妆品中 214 种风险物质鉴别与确认的方法，同时创建了二级质谱库。经添加回收样品分析，质谱库匹配度良好。该方法简便、灵敏、定性筛查准确性好，可用于化妆品中风险物质的快速定性筛查。

第 5 章 Q-TOF 在生物大分子药物的应用

随着生物技术药物的迅猛进步，对这类药物进行全面且高效的定性表征成为了研发与生产过程中的关键环节。为此，生物技术药物企业及精密仪器制造商竞相研发出多种质谱技术，尤其是高分辨质谱技术，以加速并深化对生物技术药物的解析能力。

以单克隆抗体（单抗）为例，高分辨质谱，特别是 Q-TOF 质谱，已被广泛应用于其分子量测定（涵盖整体蛋白及亚基分析）、肽图分析（聚焦于翻译后修饰）以及二硫键分析等定性表征领域。

寡核苷酸疗法近年来发展迅速，核酸药物被认为是继小分子药物、抗体药物之后第三代创新药物。为了确保其安全性和有效性，需要对寡核苷酸治疗药物中的杂质进行全面检测和鉴定。寡核苷酸是由一系列重复的类似核碱基、糖和主干连接物组成。即使寡核苷酸具有相同的分子，它们也可能组成不同的序列。

通常，使用数据分析软件来鉴定寡核苷酸成分非常耗时。LabSolutions Insight Biologics 是 LabSolutions 系列的一体化软件，数据可自动实现从采集到分析的所有过程。该软件可以轻松配置序列信息进行数据分析，程序可以综合识别链长差异、核苷酸差异、修饰、离子加合物等各类杂质信息。采用数据依赖采集(DDA)模式进行数据采集，用 MS¹ 谱图计算杂质的分子量，结合 MS¹ 谱图与 MS² 谱图从杂质的片段谱中识别序列。此外，可通过可视化检查片段覆盖率来确认序列的有效性。

本章聚焦于岛津 Q-TOF 质谱在生物大分子研究领域，特别是蛋白类药物定性表征方面的应用实例。除了上述单抗药物肽图分析及翻译后修饰研究外，该质谱还应用于寡核苷酸分子量测定与序列验证、mRNA 药物加帽状态分析等领域。

此外，岛津针对生物药的解决方案不仅包含 Q-TOF 仪器，还有比如 LCMSMS（三重四极杆质谱）、ICPMS（电感耦合等离子体质谱）、MALDI（基质辅助激光解吸电离）、PPSQ（蛋白质测序仪）、LC（液相色谱）等多元化机种，为生物技术药物研发与生产提供了强有力的技术支持。



图 1. 岛津蛋白类药物整体仪器方案

5.1 曲妥珠单抗药物肽图分析

摘要：本文采用岛津 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 液质联用仪对曲妥珠单抗进行肽图分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics 软件对肽图分析的结果进行解析。结果显示，在只应用胰蛋白酶的情况下，轻链和重链的序列覆盖率分别为 97.20%和 88.44%。利用 Protein metrics 软件对肽段上的修饰基团进行解析，结果显示，该单抗的修饰类型主要有糖基化 (NGlycan)、氧化 (Oxidation)、脱酰胺 (Deamidated) 等。该方法快速、准确，分析精确度高，成功应用于曲妥珠单抗药物的检测，为单抗药物的肽图分析提供参考。

关键词：Q-TOF 单抗 肽图分析

曲妥珠单抗 (Trastuzumab)，是抗ErbB2/HER2 (原癌基因人类表皮生长因子2) 的单克隆抗体，为重组DNA衍生的人源化抗P185糖蛋白单克隆抗体，属IgG1抗体，含人的框架区以及能与HER2结合的鼠抗-p185 HER2抗体的互补决定区，人源化部分占95%，鼠抗部分占5%。曲妥珠单抗被广泛应用于各期HER-2阳性乳腺癌的治疗，于1998年被美国FDA批准，是第一个抗HER-2的人源化单克隆抗体，对HER-2高表达的转移性乳腺癌，具有独特功效，其在局部晚期乳腺癌、低危早期乳腺癌治疗中的应用疗效及安全性已经更新并在进行跟深入的研究，这对HER-2阳性乳腺癌治疗的优化和患者长期生存率的提高

都将产生深远影响。

在单克隆抗体的生产过程中,不同的理化因素易产生各种翻译后修饰 (post-translational modification, PTM)变异体,如糖基化、氧化、脱酰胺、异构化等, 这些PTM可能引起抗体理化性质变化, 这些变化会对抗体效力、免疫原性和稳定性产生负面影响。因此抗体的PTM与产品的安全性、有效性和稳定性息息相关。本文采用岛津LCMS-9030 Q-TOF四极杆-飞行时间液质联用仪对曲妥珠单抗酶解后肽段进行分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics软件对检测结果进行解析。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用高效液相色谱仪 LC-30AD 与四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9030 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20Alite	脱气机：	DGU-20A ₅
输液泵：	LC-30AD × 2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.96

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (150 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)，PN:227-30048-03，岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A相-0.1%甲酸水溶液；B相-0.1%甲酸乙腈溶液

流速：0.4 mL/min

柱 温 : 50°C

进样体积 : 1 μ L

洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为3%, 时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pump	B.Conc	3
50.00	Pump	B.Conc	50
51.00	Pump	B.Conc	90
56.00	Pump	B.Conc	90
56.10	Pump	B.Conc	3
60.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI+

加热模块温度 : 400°C

雾化气流速 : 3.0 L/min

干燥气流速 : 10.0 L/min

加热气流速 : 10.0 L/min

扫描模式 : MS 和 MS/MS (DDA)

接口温度 : 300°C

接口电压 : 4.5 KV

D L 温度 : 250°C

事件时间 : 0.1 s

2. 样品前处理

利用超纯水将曲妥珠单抗粉末制剂配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 然后吸取 10 μ L 该溶液样品, 加入 80 μ L 还原溶液 (50 mM Tris-HCl, 含 8 M 尿素和 5 mM DTT), 在 37°C 下震荡 60 min, 结束后加入 4 μ L IAA 溶液 (500 mM), 在室温条件下避光震荡 30 min, 然后加入 600 μ L 酶解缓冲液 (50 mM Tris-HCl) 和 5 μ L 胰蛋白酶溶液 (含 1 μ g 胰蛋白酶), 在 37°C 下反应 6 小时, 酶解结束后加入 10 μ L 50% 甲酸水溶液终止酶解反应, 然后转入低吸附 PP 材质的样品瓶, 进行 LC/MS 分析。

3. 结果与讨论

3.1 曲妥珠单抗肽段色谱图

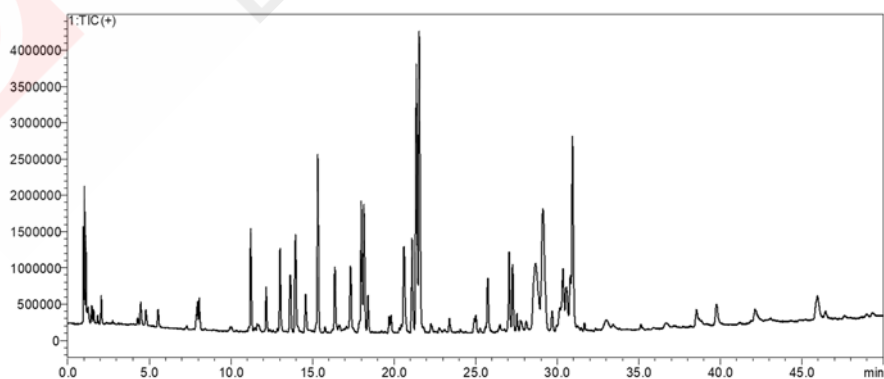


图 1. 曲妥珠单抗酶解后的总离子流色谱图

3.2 数据处理

将LabSolutions采集好的数据直接导入到Protein Metrics软件的PMi-PTM模块，并导入曲妥珠单抗的氨基酸序列，进行蛋白序列覆盖率的计算和蛋白修饰基团分析。在仅使用胰蛋白酶的条件下，由图2可知曲妥珠单抗重链的序列覆盖率为88.44%，轻链覆盖率为97.20%（表2和图2）。通过该软件PMi-PTM模块不仅能查看每个肽段的一级质谱图，还可以根据二级质谱图校对肽段的碎片，尤其是带修饰的碎片基团，以肽段EVQLVESGGGLVQPGGSLR为例，可以根据二级质谱图清晰判断每个碎片的断裂位置（图3）。

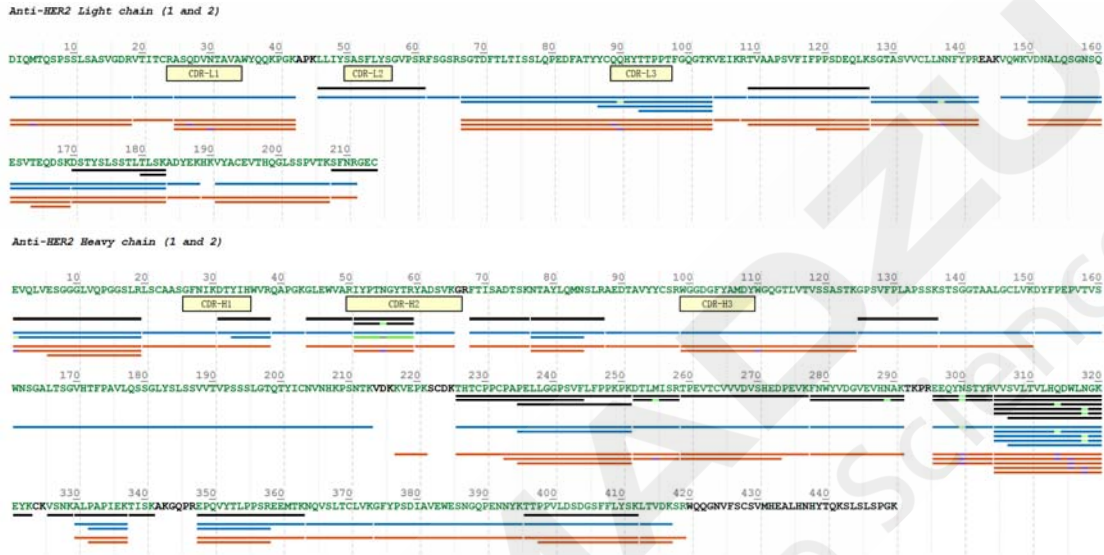
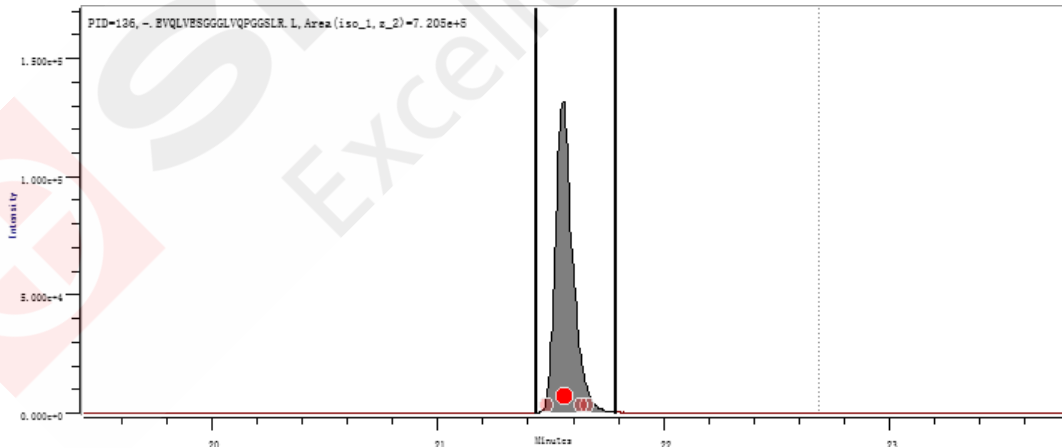


图 2. 曲妥珠单抗酶解后序列覆盖图

表 2. 酶解肽段序列覆盖结果

蛋白名称	覆盖的氨基酸个数/总氨基酸个数	序列覆盖率%
曲妥珠单抗轻链	208 / 214	97.20
曲妥珠单抗重链	398 / 450	88.44



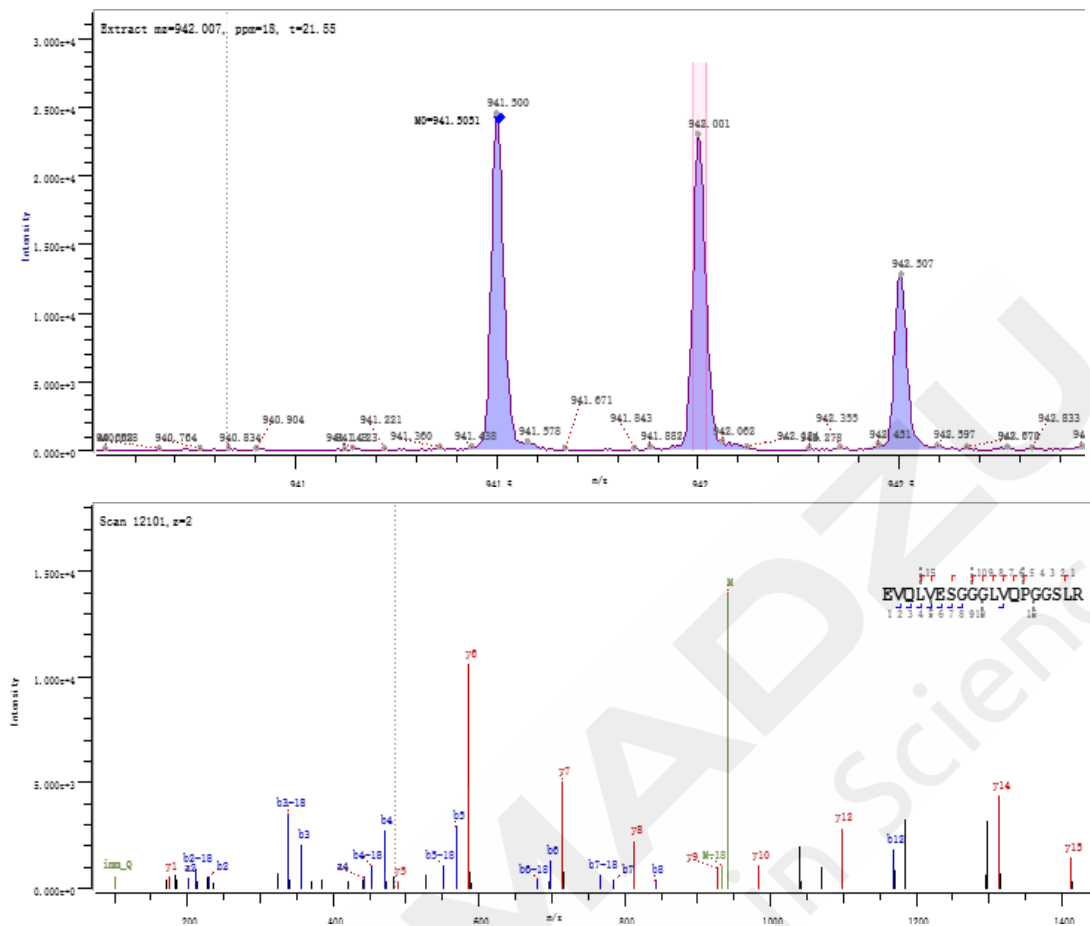


图 3. 肽段 EVQLVESGGGLVQPGGSLR 的色谱图和质谱图

经软件分析发现该曲妥珠单抗上存在的修饰有脱酰胺 (deamidated)、糖基化 (NGlycan)、氧化 (Oxidation) 等, 其中, Heavy chain N300上全部发生了糖基化, W316上的52.1%发生了双氧化, N55上的60.9%发生了脱酰胺, 其余修饰类型所占比例均在20%以下 (表3)。以焦谷氨酸环化 (pyro-Glu) 修饰为例, 肽段EVQLVESGGGLVQPGGSLR发生修饰后, 修饰后的肽段疏水性更强, 保留时间也比未修饰的肽段要靠后, 并且从质谱图上也可看出明显差异, 未修饰肽段m/z 932.497 (带2个电荷), 修饰后肽段m/z 941.505 (带2个电荷) (图4)。

表 3. 曲妥珠单抗酶解后各肽段上检测到的修饰以及修饰肽段占比

肽段名称	修饰类型	轻链/重链	修饰氨基酸	修饰位点	修饰比例
ASQDVNTAVAWYQQKPGK	Deamidated/0.9840	轻链	N	30	11
			Q	27	10.9
DIQMTQSPSSLSASVGDR	Dethiomethyl/-48.0034	轻链	M	4	6.95
DTLMISR	Dethiomethyl/-48.0034	重链	M	255	13.1
EEQYNSTYR	NGlycan/1241.4545	重链	N	300	49.4
	NGlycan/1444.5339		N	300	20.2
	NGlycan/1606.5867		N	300	30.3
EVQLVESGGGLVQPGGSLR	Glu->pyro-Glu/-18.0106	重链	E	1	1.79
IYPTNGYTR	Deamidated/0.9840	重链	N	55	60.9
SGTASVCLLNFFYPR	Deamidated/0.9840	轻链	N	137	3.89
		轻链	Q	89	3.92

SGTDFTLTISLQPEDFATY CQQHYTTPPTFGQGTK				90	2.3
	Deamidated/0.9840	重链	N	318	8.78
			Q	314	6.86
	Deamidated/0.9840; Dioxidation/31.9898	重链	Q,W	314,316	14.3
	Dioxidation/31.9898	重链	W	316	52.1
Dioxidation/31.9898; Deamidated/0.9840	重链	W,N	316,318	18	
WGGDGFYAMDYWGQGLTV VSSASTK	Oxidation/15.9949	重链	W	110	11

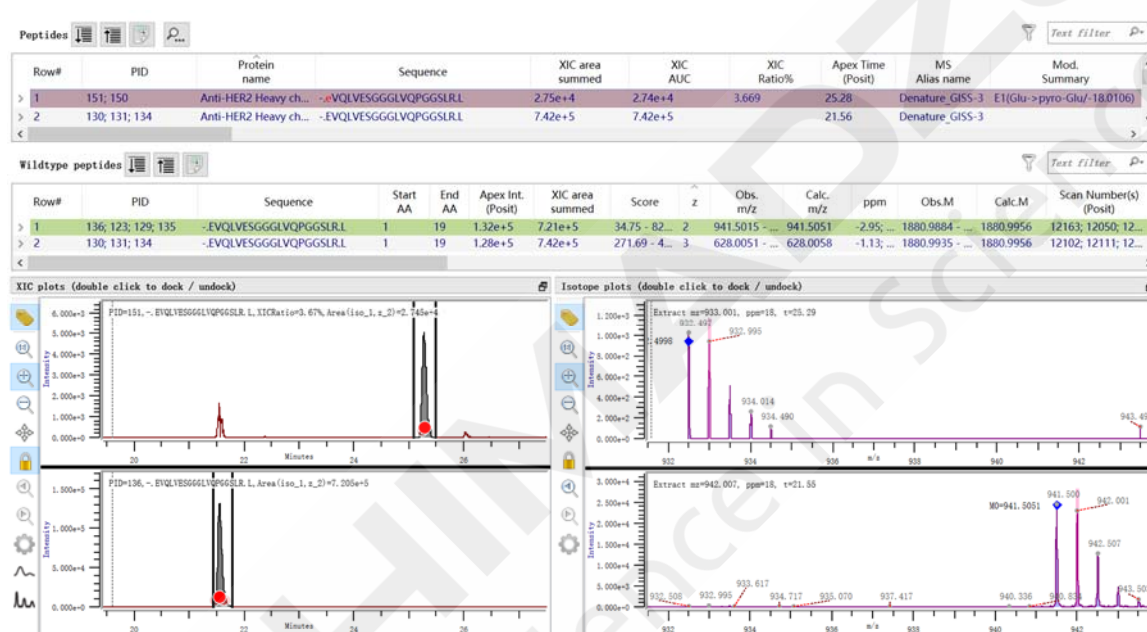


图 4. 肽段 EVQLVESGGGLVQPGGSLR 修饰及未修饰肽段的色谱图和质谱图

4. 结论

PTM构成了抗体产品质量属性系列，应在成药性开发性评估期间予以考虑，尤其是当它们对抗体药物的治疗 and 安全性产生影响时。鉴于PTM对抗体药物的影响，应利用并优化现有的技术手段进行检测，以实现对抗体药物的质量控制。随着人们对PTM影响的不断深入了解，通过优化抗体的PTM，进而获得优良生物活性、安全性高以及稳定性好的均一性抗体生物制品，所以，对单抗药物进行肽图分析在药物研发生产过程中显得至关重要。本文采用岛津LCMS-9030 Q-TOF液质联用仪对曲妥珠单抗样品进行肽图分析，并结合LabSolutions和Protein Metrics软件对肽图分析结果进行解析。结果显示，在仅使用胰蛋白酶的情况下，轻链和重链的序列覆盖率分别为97.20%和88.44%。经Protein metrics软件对肽段上的修饰基团进行解析，结果显示，该单抗样品上的修饰类型有糖基化 (NGlycan)、脱酰胺 (deamidated)、氧化 (Oxidation) 等，其中，Heavy chain N₃₀₀上全部发生了糖基化，W316上的52.1%发生了双氧化，N55上的60.9%发生了脱酰胺，其余修饰类型所占比例均在20%以下。

5.2 曲妥珠单抗游离 N 糖的分离与鉴定

摘要： 本文利用岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40XR 连接荧光检测器 RF-20A XS 及四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 联用系统建立了单抗游离 N 糖的分离与鉴定方法，对曲妥珠单抗的 N 糖进行了定性与定量分析。该方法使用 PNGaseF 酶将 N 糖从单抗中释放出来，并利用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 进行标记，之后使用荧光检测器 RF-20A XS 与四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 进行检测，荧光检测器的峰面积用于 N 糖的相对定量，高分辨质谱得到的精确质量数可对各峰进行定位。连续进样 6 针，色谱中所有峰的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 3%，质谱中各糖型的质量数偏差均小于 2 ppm，最后通过峰面积计算出了各个糖型的丰度比。该方法稳定可靠，峰面积和保留时间的重复性及质量准确度均符合要求。

关键词： RF-20A XS LCMS-9030 Nexera LC-40XR 单克隆抗体 游离 N 糖

在众多的蛋白质翻译后修饰中，糖基化修饰是最重要和最复杂的修饰之一，也是评价抗体的关键质量属性之一。根据糖基化的修饰位点可将糖基化分为 N 位糖基化和 O 位糖基化。动物细胞分泌的免疫球蛋白中 N 位的糖基化是最普遍的糖基化修饰，同时也是研究最多的一种糖基化修饰。以 IgG1 为例，其重要的糖基化修饰位点位于 Fc 端，且根据其末端精细结构(长度、分支及单糖排列)的不同又可分为复合型、杂合型和高甘露糖型。

单抗药物功能的实现与其糖基化修饰密切相关，糖基化修饰会影响蛋白的性能，如构象、稳定性、

溶解度、药物代谢动力学、活性及免疫原性等。2020 版《中国药典》第三部新增了《3130-单抗 N 糖谱测定法》，作为指导原则，进一步完善了生物制品全过程质量控制的要求。

本文利用岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40XR 连接荧光检测器 RF-20A XS 以及四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 建立了单抗游离 N 糖的分离与鉴定方法，对曲妥珠单抗的 N 糖进行了定性与定量分析，方法稳定可靠，峰面积和保留时间重复性及质量数准确度均符合要求，分析检测方法供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪连接荧光检测器和四极杆飞行时间质谱。具体配置为：

系统控制器	: CBM-40lite	脱气机	: DGU-403
输液泵	: LC-40AB XR	自动进样器	: SIL-40C XR
柱温箱	: CTO-40C	质谱仪	: LCMS-9030
荧光检测器	: RF-20A XS	色谱工作站	: LabSolutions LCMS Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱 : 酰胺基键合硅胶填充色谱柱, 150 mm x 2.1 mm I.D., 1.7 μ m
流动相 : A 相-50mM 甲酸铵水溶液 B 相-乙腈

流 速 : 0.5 mL/min 柱 温 : 60°C

进 样 量 : 5 μ L

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 78%, 时间程序见表 1

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
38.5	Pump	B.Conc	55.9
39.5	Pump	B.Conc	20.0
44.5	Pump	B.Conc	20.0
46.5	Pump	B.Conc	78.0
60.0	Controller	Stop	

荧光检测器条件:

激 发 波 长 : 330nm

数 据 速 率 : 1 pts/s

发 射 波 长 : 420nm

增 益 : 1

LCMS-9030 质谱条件:

离 子 源 : ESI+

接 口 电 压 : 4.0 kV

雾 化 气 流 速 : 3 L/min

加 热 模 块 温 度 : 350°C

D L 温 度 : 250°C

加 热 气 流 速 : 10.0 L/min

接 口 温 度 : 400°C

干 燥 气 流 速 : 10.0 L/min

扫 描 模 式 : MS 扫描

扫 描 范 围 : 500-2500 m/z

1.3 前处理方法

1) N糖的酶切

准备30 kD的超滤离心管, 加入150 μ L的超纯水, 13500 g离心5分钟(舍弃残留有大体积液体的超滤管, 并处理新的超滤管)。加入200 μ L 10 mg/mL 的样品溶液至超滤管中, 13500 g 离心10分钟, 丢弃下层液体。向上层截留溶液中加入400 μ L 10 mmol/L的磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH7.4), 13500 g离心10分钟, 重复两次, 吸取全部上层截留溶液转移至离心管中。吸取150 μ L 10 mmol/L的PBS润洗上层超滤管, 并转移至对应的离心管中(浓度约为10 mg/mL)。取25 μ L置换PBS后的溶液, 加入5 μ L N糖苷酶F (PNGase F) 和 70 μ L 10 mmol/L的PBS, 总体积为100 μ L, 混匀并短暂离心, 37°C水浴下孵育20小时。

2) 蛋白去除和N糖的标记

2-氨基苯甲酰胺 (2-AB标记溶液) 的制备: 取350 μ L二甲亚砜(DMSO) 和150 μ L乙酸, 混匀。精密称取25 mg 2-AB加入上述溶液中, 充分溶解。精密称取30 mg氨基硼氢化钠加入上述溶液中, 充分溶解(可适当加热)。

向酶切完的溶液中加入三倍体积预冷的乙醇, 涡旋混匀, -20°C放置1小时, 沉淀蛋白。13500 g离心10分钟。吸取适量(如360 μ L) 上清液至离心管中离心干燥。待完全干燥后, 加入10 μ L 2-AB标记溶液, 涡旋混匀并短暂离心, 65°C下孵育2~4小时。

3) 标记的N糖纯化

标记的N糖纯化采用固相萃取，按照说明书进行操作，对标记的N糖进行纯化，以去除游离的2-AB，离心干燥纯化的样品，用100 μ L 70% 乙腈溶液复溶。

2. 结果与讨论

2.1 Nexera LC-40 连接 RF-20A XS 连续进样重复性考察

按照前处理方法1.3对曲妥珠单抗上连接的N糖进行酶切，酶切下来的游离N糖进样分析，结果如图1所示。对仪器的连续进样差异性进行评估，结果如表2显示，连续进样6针，所有峰的峰面积和保留时间的RSD均小于3%，仪器及方法重复性良好，可用于对N糖的相对定量。

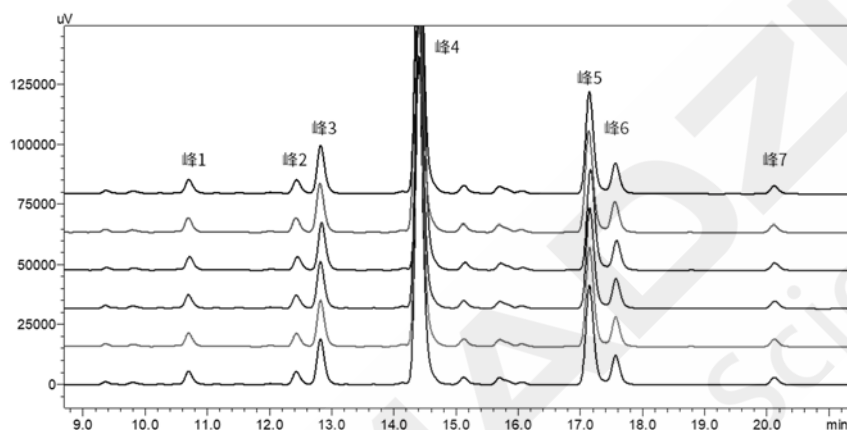


图 1. 曲妥珠单抗 N 糖连续进样色谱图

表 2. 曲妥珠单抗 N 糖峰面积及保留时间连续进样重复性 (n=6)

峰号	峰面积			保留时间		
	平均峰面积	标准偏差	RSD%	平均保留时间 (min)	标准偏差	RSD%
峰 1	52371	1086	2.075	10.699	0.004	0.036
峰 2	48913	1144	2.339	12.433	0.005	0.039
峰 3	169913	3854	2.268	12.821	0.005	0.042
峰 4	1278049	28948	2.265	14.405	0.006	0.043
峰 5	389980	3491	0.895	17.150	0.008	0.045
峰 6	121318	945	0.779	17.570	0.008	0.045
峰 7	30887	497	1.609	20.124	0.008	0.041

2.2 四极杆飞行时间质谱LCMS-9030确认曲妥珠单抗样品N糖结构信息

对主要的色谱峰使用高分辨质谱进行结构确认，鉴定出包括 G0-GN, G0F-GN, G0, G0F, G1Fa/b, G2F 等七种标记的 N 糖，如图 2 所示。图 3 展示了 2-AB 标记 N 糖的理论结构，表 3 列出了 LCMS-9030 所得到实际质量数与理论质量数的误差，结果显示，质量误差均在 2ppm 以内，质量数准确度符合要求。

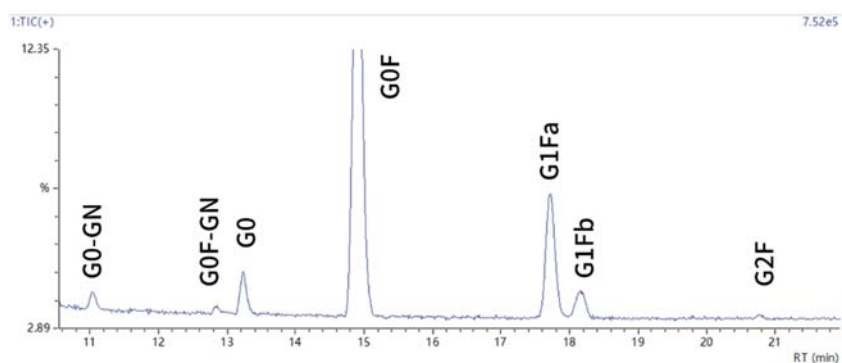


图 2. 曲妥珠单抗 2-AB 标记 N 糖的总离子流图

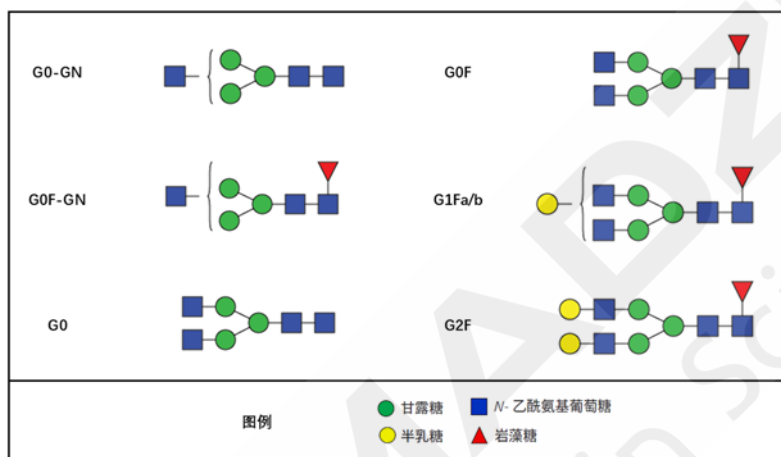


图 3. 曲妥珠单抗 2-AB 标记 N 糖的理论结构 (GN=GlcNA)

表 3. 曲妥珠单抗 N 糖分析质量准确度

2-AB N-glycan	实测质量 m/z	理论质量 m/z	质量误差 ppm
G0-GN	1234.4823	1234.4832	-0.729
G0F-GN	1380.5420	1380.5411	0.652
G0	1437.5629	1437.5625	0.278
G0F	1583.6214	1583.6205	0.568
G1Fa/b	1745.6740	1745.6733	0.401
G2F (z=2)	954.3679	954.3667	1.276

2.3 N糖的相对定量

使用高分辨质谱对糖型进行表征后，如图4所示，可对荧光检测器中的各峰进行归属，并通过峰面积确认各个糖型的丰度比，结果如图5所示，在所有糖型中，G0F是占比最高的糖型，比例约为61%。

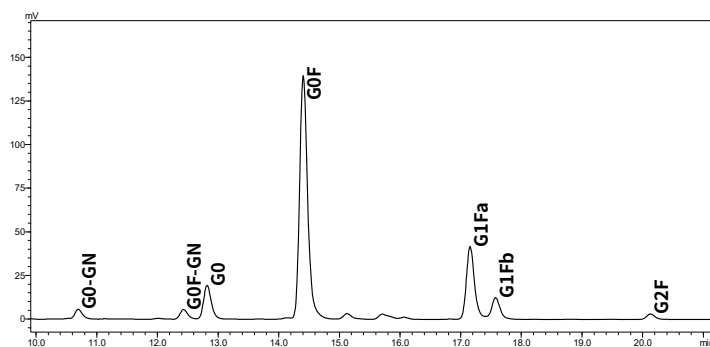


图 4. 曲妥珠单抗 2-AB 标记 N 糖荧光色谱图

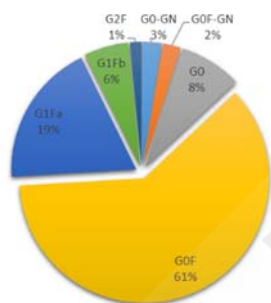


图 5. 曲妥珠单抗 2-AB 标记各 N 糖型的相对丰度

3. 结论

本文利用岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40XR 连接荧光检测器 RF-20A XA 和四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 建立了单抗游离 N 糖的分离与鉴定方法，对曲妥珠单抗的 N 糖进行了定性与定量分析，连续进样 6 针，色谱中所有峰的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 3%，质谱中各糖型的质量数偏差均小于 2 ppm，最后通过峰面积计算出了各个糖型的丰度比。方法稳定可靠，峰面积、保留时间及质量数准确度均符合要求，可供相关检测人员参考。

5.3 寡核苷酸分子量测定和序列确认

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱进行寡核苷酸分子量测定和序列确认的方法。目标寡核苷酸是长度为 21mer、进行了 2'-O-methyl 修饰的 RNA 类型的寡核苷酸。使用 LabSolutions Insight Explore CSD 软件中 Respect 算法进行多电荷解卷积处理，寡核苷酸各同位素峰分离良好，单同位素质量误差 0.16 ppm。使用 Protein metrics 中 Oligo 模块进行了寡核苷酸序列确认，结果显示目标寡核苷酸序列与设计序列匹配良好。可为寡核苷酸分子量测定和序列确认提供参考。

关键词：Q-TOF LCMS-9030 寡核苷酸 分子量测定 序列确认

寡核苷酸药物通常指由化学合成生产的长度 50 个以内核苷酸组成的一类药物，包含单链或双链 DNA 或 RNA。目前研究较多的是反义寡核苷酸药物 (ASO) 和小干扰 RNA 药物 (siRNA)。与小分子药物和单抗药物靶向蛋白质不同，寡核苷酸药物通常靶向 mRNA，从转录后水平进行治疗，具有特异性好、有效性高和长效性突出的优势。

寡核苷酸药物通过固相化学合成生产，其碱基序列通常是已知的，但在合成、纯化等工艺过程中，其结构有可能发生改变，故对寡核苷酸进行分子量

测定和碱基序列确认，是保证寡核苷酸碱基序列与设计序列一致的重要技术手段。寡核苷酸药物为酸性强极性化合物，通过离子对反相色谱质谱法进行分子量表征是经典的分析方法。

本文采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱，利用高精度一级质量数和二级碎裂离子信息，结合数据处理软件，对长度为 21mer 的 RNA 型的寡核苷酸进行了分子量测定和序列确认，供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱，具体配置为：

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-20A ₅
输液泵	: LC-40AD X3×2	自动进样器	: SIL-40C X3
柱温箱	: CTO-40C	飞行时间质谱仪	: LCMS-9030
色谱工作站	: LabSolutions Ver.5.114、LabSolutions Insight Explore CSD Protein metrics 软件 Oligo 模块		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: XBridge Oligonucleotide C18 50 mm x 2.1 mm I.D., 2.5 μm;		
流动相	: A-15 mM TEA+400 mM HFIP; B-甲醇和流动相 A 等体积混合	流速	: 0.2 mL/min
进样体积	: 1 μL	柱温	: 60°C
洗脱方式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 时间程序见表 1。		

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	40
11.00	Pumps	Pump B Conc.	40
12.00	Pumps	Pump B Conc.	100
13.00	Pumps	Pump B Conc.	100
13.10	Pumps	Pump B Conc.	20
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式	: ESI-	雾化气流速	: 3 L/min
加热模块温度	: 400°C	加热气流速	: 10 L/min
接口温度	: 350°C	干燥气流速	: 10 L/min
D L 温度	: 250°C	扫描模式	: MS、MS/MS
扫描范围 m/z	: MS1 500-2000 MS2 100-2000	碰撞能量	: 10~80 V

1.3 样品处理

将寡核苷酸样品用超纯水溶解并稀释成 100 pmol/μL 的样品溶液，直接进样分析。

21mer 寡核苷酸序列信息如下：

5'-rGmUrArAmCmCrArArGrArGmUrAmUmUmCmCrAmUTT-3'

注：“r”表示 RNA；“m”表示 2'-O-methyl 修饰。

单同位素质量：6761.07876

2. 结果与讨论

2.1 寡核苷酸精确分子量测定

使用 LCMS-9030 分析寡核苷酸样品，TIC 图和一级质谱图分别见图 1 和图 2。TIC 图中可观察到明显的寡核苷酸目标峰。一级质谱图中可观察到从 $[M-4H]^4$ 到 $[M-10H]^{10}$ 之间分布的寡核苷酸多电荷离子。使用 LabSolutions Insight Explore CSD 的“ReSpect”算法进行多电荷解卷积处理，得到去卷积后的谱图，如图 3 所示。由图可知，寡核苷酸各同位素峰基本实现基线分离，实测单同位素质量为 6761.07764，与理论同位素质量 6761.07876 相比，质量误差为 0.16 ppm，质量准确度好。

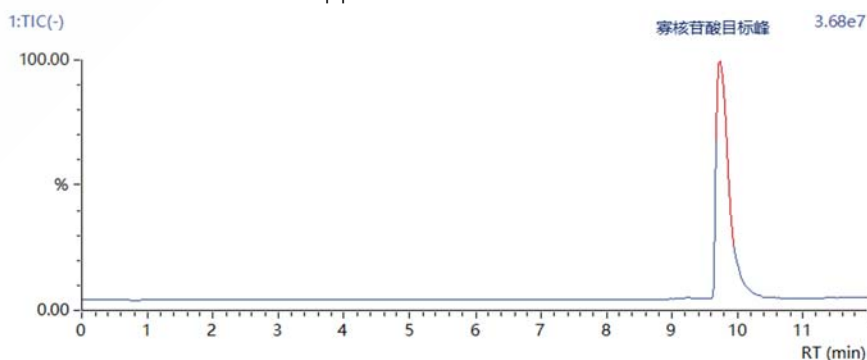


图 1. 寡核苷酸样品 TIC 图

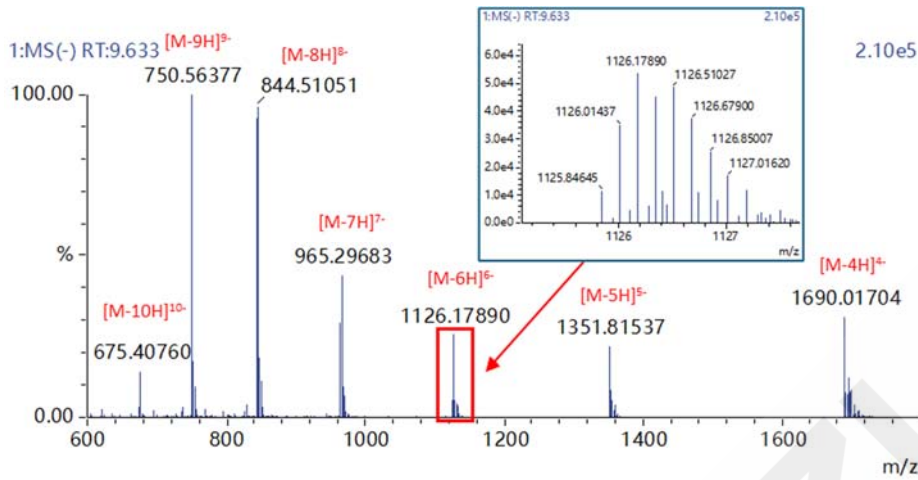


图 2. 寡核苷酸一级质谱图

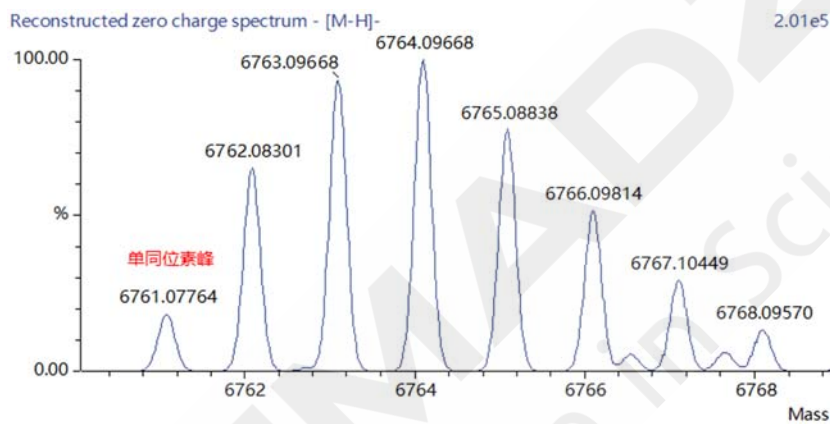


图 3. 寡核苷酸去卷积谱图

2.2 寡核苷酸序列确认

使用 Protein metrics 软件中的 Oligo 模块，将 LCMS-9030 采集的原始数据载入，输入寡核苷酸的设计序列，即可自动进行寡核苷酸序列确认，结果见图 4。该图是 ESI 二级质谱图，可以看到丰富的寡核苷酸碎片离子，图中已标记出匹配上的寡核苷酸碎片离子类型。图中右上角是寡核苷酸设计序列，折线符号表示该位置实测碎片离子和理论碎片离子一致。由此可知，该寡核苷酸序列与设计序列匹配度良好。

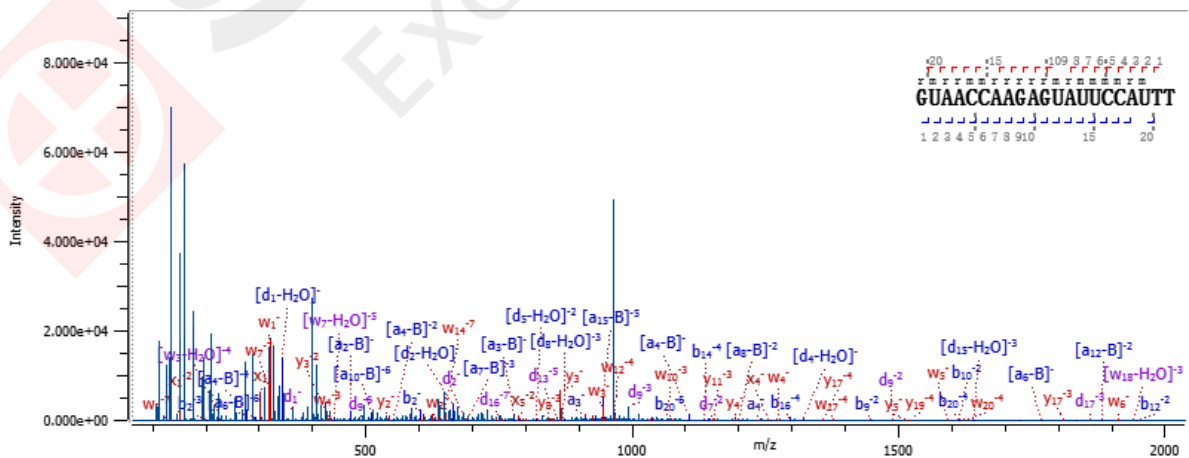


图 4. 寡核苷酸序列确认结果

3. 结论

使用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱结合 Insight Explore CSD 和 Protein metrics 数据处理软件，建立了寡核苷酸分子量测定和序列确认的方法。岛津 Q-TOF 具有高分辨、高质量数准确度和高灵敏度的特点，可以测得寡核苷酸及其碎片离子的精确质量。通过 LabSolutions Insight Explore CSD 中 Respect 算法可以进行高效的多电荷解卷积处理，去卷积后寡核苷酸同位素峰基本达到基线分离，轻松得到精确单同位素质量，与理论值质量误差为 0.16 ppm，质量准确度高。通过 Protein metrics 中 Oligo 模块可自动、批量、快速地进行寡核苷酸序列确认，结果直观准确。本方法操作简便、准确度高，适用于寡核苷酸药物分子量表征和序列确认。



SHIMADZU
Excellence in Science

5.4 多肽类药物生长抑素中的聚集体定性分析

摘要: 本文使用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统结合尺寸排阻色谱法, 开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法, 使用岛津 LabSolutions Insight Explore 软件对色谱峰进行解析, 并对多电荷结果进行解卷积分析。实验结果显示, 该方法可以分离多肽类药物生长抑素的主成分和聚集体, 分离出的 4 个色谱峰分别为生长抑素的四聚体, 三聚体, 非共价二聚体和共价二聚体。

关键词: Q-TOF 多肽类药物 生长抑素 聚集体

生长抑素全称为生长激素释放抑制激素, 由 Brazeau 等于 1973 年首次从绵羊的下丘脑中提取。天然生长抑素很难实现工业化大生产, 现在生长抑素已经实现了人工合成, 并且合成生长抑素与天然生长抑素的化学结构及药理作用方面完全相同。生长抑素由 14 个氨基酸残基组成, 其中第 3 位及第 14 位的氨基酸由二硫键连接呈环状结构。

作为一种多肽类药物, 生长抑素在纯化和放置的过程中, 受到加热、冷冻、搅拌等外力作用时可能发生结构改变, 产生聚集体。聚集体的存在可能

会降低药物活性, 改变半衰期及增加免疫原性, 影响药物的安全性和有效性。因此对药物中的聚集体进行监测和评价, 是对药物进行质量评价的一个重要方面。

本文使用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统结合尺寸排阻色谱法, 开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法, 使用岛津 LabSolutions Insight Explore 软件对色谱峰进行解析, 并对多电荷结果进行解卷积分析。



生长抑素结构

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪-四极杆飞行时间质谱仪, 配置信息如下:

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C X3
输液泵	: LC-40B XS	柱温箱	: CTO-40S
脱气机	: DGU-403	质谱	: LCMS-9030

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: 凝胶色谱柱 TSK-GEL G2000SWx1 (7.8x300 mm I.D., 5.0 μm)		
流动相	: 三氟乙酸: 乙腈: 水=0.2:30:70		
进样体积	: 20 μL	柱温	: 40°C
流速	: 0.5 mL/min	洗针液	: 甲醇/水=1:1 (v:v)
洗脱方式	: 等度洗脱		

质谱条件

离子化模式 : ESI(+)	加热模块温度 : 400 °C
雾化气流速 : 3.0 L/min	干燥气流速 : 10.0 L/min
接口温度 : 300 °C	扫描模式 : MS, m/z 1000-2500
D L 温度 : 250 °C	接口电压 : 3.5 kV
碰撞气 : 氦气	事件时间 : 0.1s

1.3 样品前处理

精密称取样品10 mg, 加1 mL水溶解制成10 mg/mL溶液, 加水稀释成0.5 mg/mL的溶液。

2. 结果与讨论

2.1 生长抑素色谱图解析

按照1.2分析条件分析0.5 mg/mL的样品溶液, 得到色谱图如图1所示。从图可知, 生长抑素的保留时间为18.649 min, 对该色谱峰进行解析, 检测到m/z 1637.72272、819.36403和546.57778的准分子离子峰。其中m/z 1637.72272为[M+H]⁺峰, m/z 819.36403为[M+2H]²⁺峰, m/z 546.57778为[M+3H]³⁺峰。

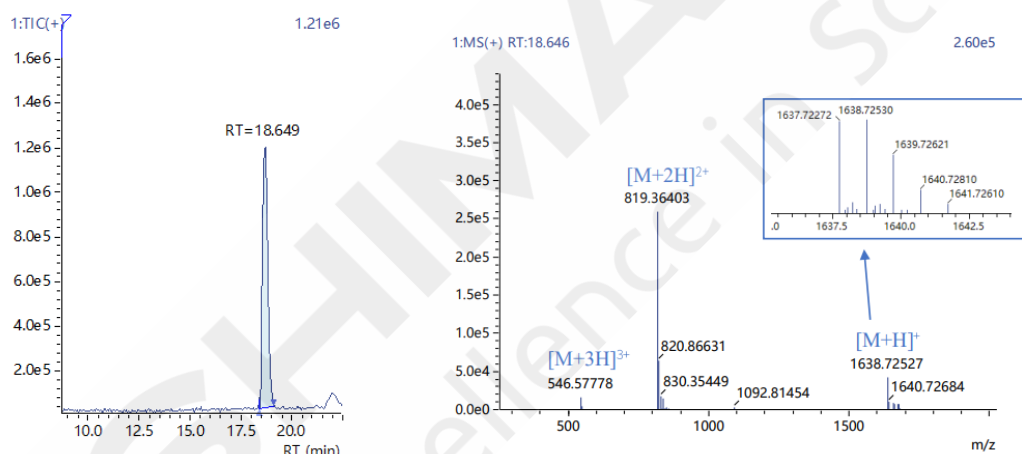


图 1. 生长抑素的色谱图和质谱图

2.2 生长抑素中聚集体色谱图解析

为了能检测到生长抑素中的微量聚集体杂质, 在进行杂质分析时提高样品浓度到10 mg/mL。在分析过程中为了避免高浓度样品进入质谱, 在软件中设置阀切换程序, 将18 min以后的高浓度组分切入废液。由图2可知, 共检测到4个色谱峰。通过LabSolutions Insight Explore软件对14.5~17.5 min 四个色谱峰进行分析, 可知为生长抑素的四个聚集体杂质峰。

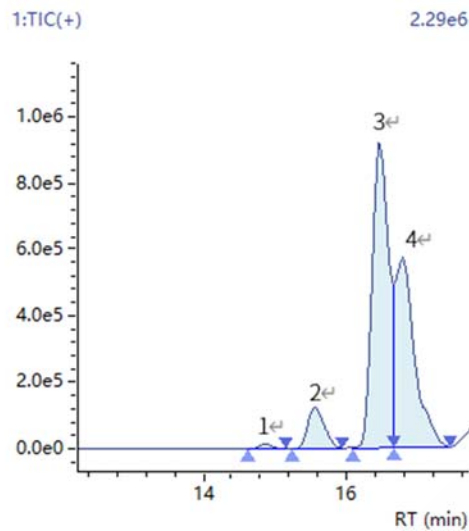


图 2. 生长抑素的聚集体分离色谱图

2.2.1 四聚体色谱峰解析

对图2中1#峰的质谱图进行解析，检测到 m/z 1638.98576的准分子离子峰，可以看到同位素峰间隔为0.25 Da，该聚集体带4个电荷，分子量约为6550.90，为生长抑素的四聚体。

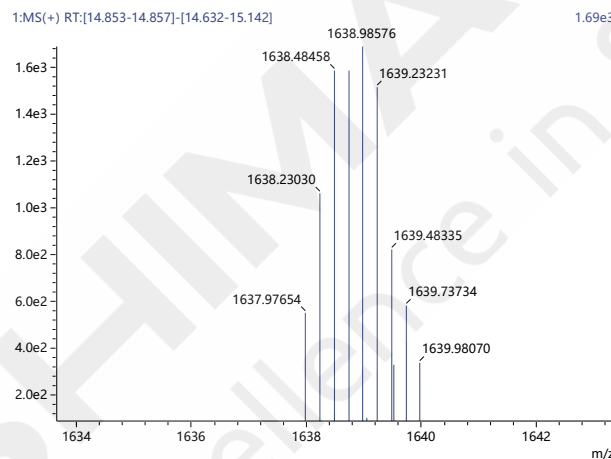
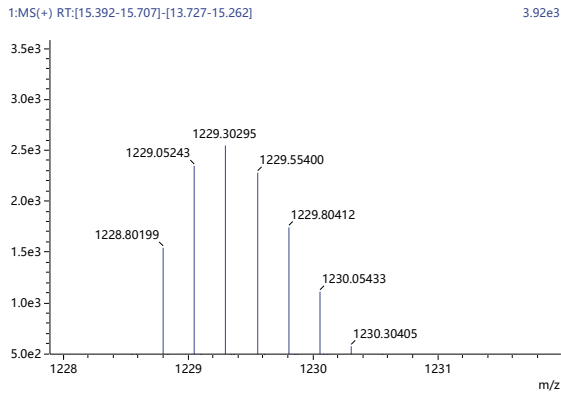


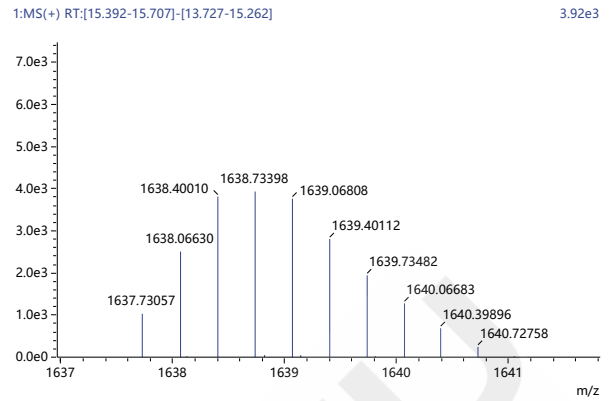
图 3. 四聚体色谱峰的质谱图

2.2.2 三聚体色谱峰解析

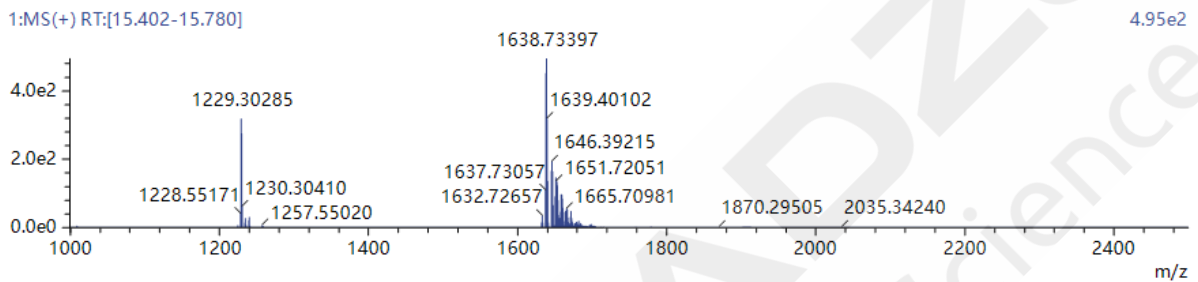
对图2中2#峰的质谱图进行解析，检测到 m/z 1229.30295与1638.73398的准分子离子峰，其中 m/z 1229.30295峰的同位素峰间隔为0.25 Da，该聚集体带4个电荷。 m/z 1638.73398峰的同位素峰间隔为0.33 Da，该聚集体带3个电荷。通过LabSolutions Insight Explore软件对两个不同电荷数（3个电荷和4个电荷）的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为4913.17，为生长抑素的三聚体。



a. 4 个电荷质谱图



b. 3 个电荷质谱图

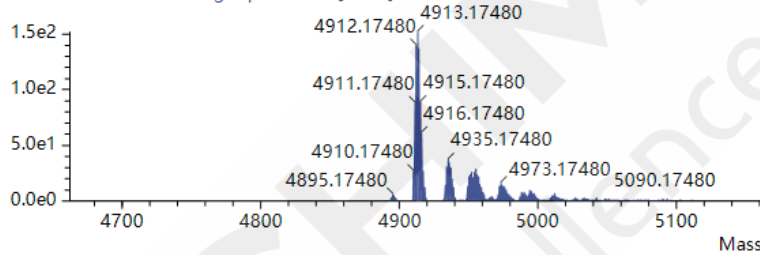


Charge Deconvoluted components

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	4913.17474	2	152.06	0.0073

Mass: 4913.17474

Reconstructed zero charge spectrum - [M+H]⁺



#	m/z	Charge	Mass	Weight
1	1638.73051	3	4913.16968	0.64
2	1229.30321	4	4913.18373	0.36

c. 解卷积结果图

图 4. 三聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

2.2.3 非共价二聚体色谱峰解析

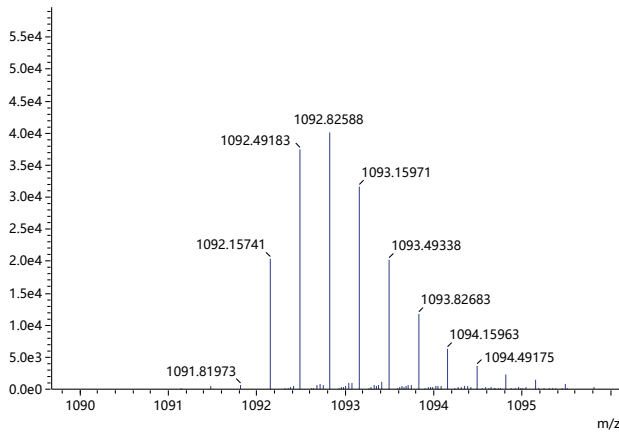
对图2中3#峰的质谱图进行解析，检测到m/z 1092.82588与1638.73517的准分子离子峰，其中m/z 1092.82588峰的同位素峰间隔为0.33 Da，该聚集体带3个电荷。m/z 1638.73517峰的同位素峰间隔为0.50 Da，该聚集体带2个电荷。通过LabSolutions Insight Explore软件对两个不同电荷数（2个电荷和3个电荷）的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为3275.45，为非共价二聚体。

1:MS(+) RT:[16.355-16.557]-[15.872-16.287]

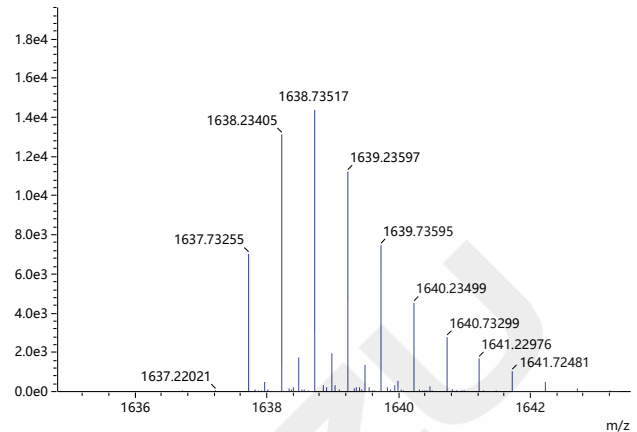
4.01e4

1:MS(+) RT:[16.287-16.572]

3.74e4



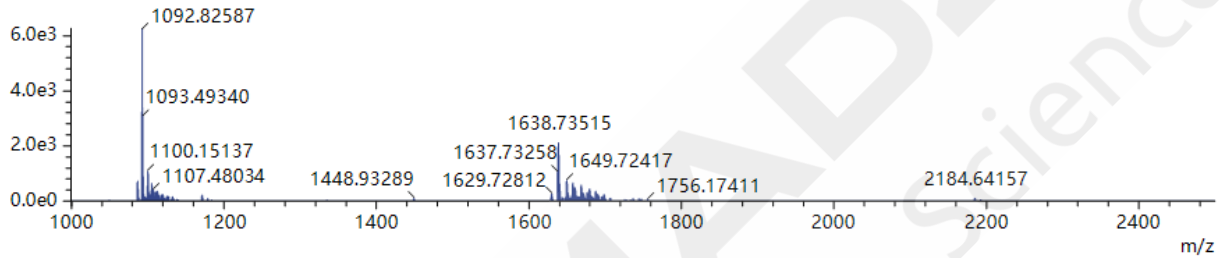
a. 3 个电荷质谱图



b. 2 个电荷质谱图

1:MS(+) RT:[16.347-16.575]

6.27e3

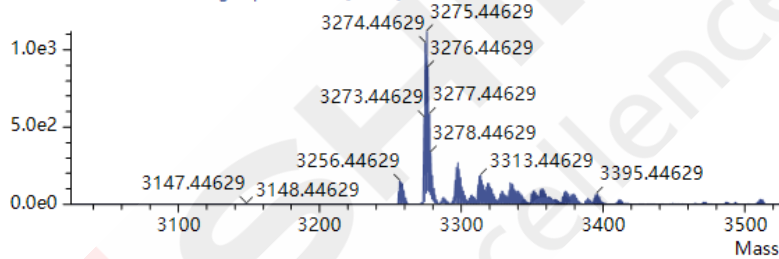


Charge Deconvoluted components

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	3275.44624	2	1118.69	0.0004

Mass: 3275.44624

Reconstructed zero charge spectrum - [M+H]⁺



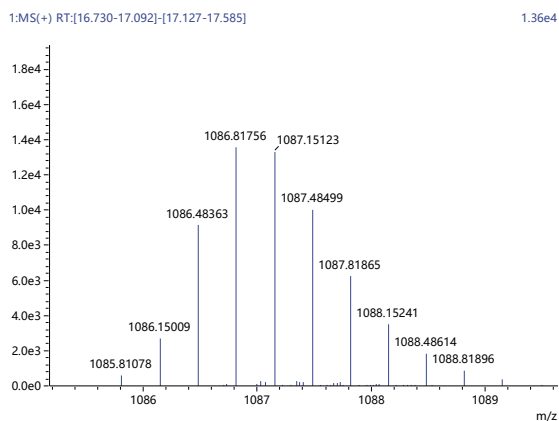
#	m/z	Charge	Mass	Weight
1	1638.73051	2	3275.44645	0.692
2	1092.82253	3	3275.44575	0.308

c. 解卷积结果图

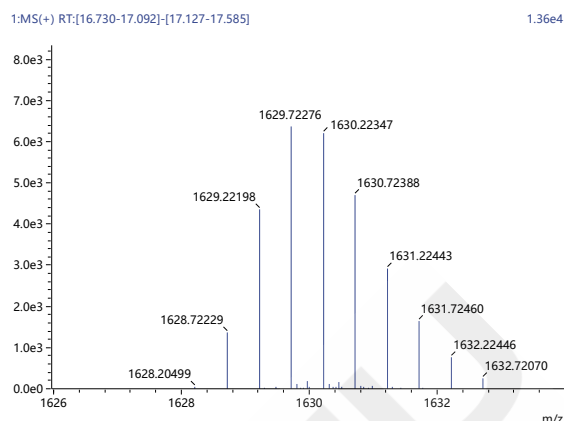
图 5. 非共价二聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

2.2.4 共价二聚体色谱峰解析

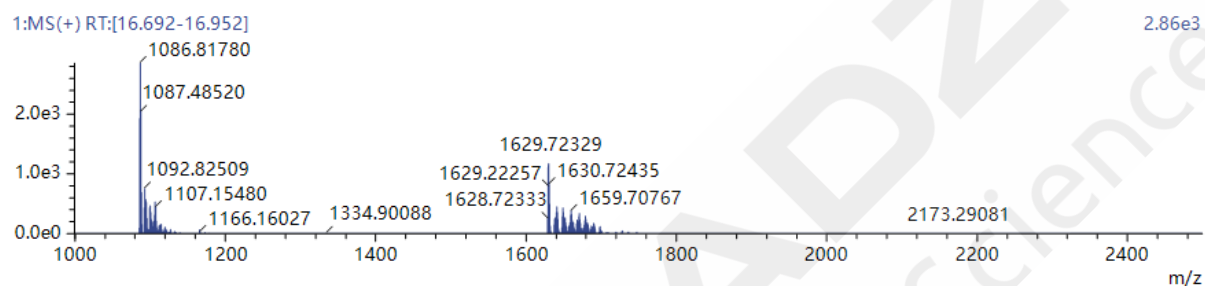
对图2中4#峰的质谱图进行解析，检测到m/z 1086.81756与1629.72276的准分子离子峰，其中m/z 1086.81756峰的同位素峰间隔为0.33 Da，该聚集体带3个电荷，m/z 1629.72276峰的同位素峰间隔为0.50 Da，该聚集体带2个电荷。通过LabSolutions Insight Explore软件对两个不同电荷数（2个电荷和3个电荷）的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为3257.43，为共价二聚体。



a. 3 个电荷质谱图



b. 2 个电荷质谱图

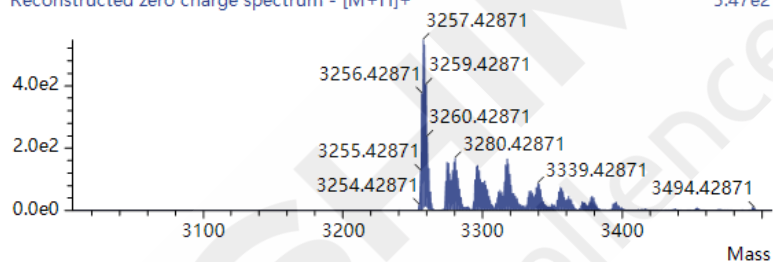


Charge Deconvoluted components

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stddev
1	3257.42876	2	546.66	0.0029

Mass: 3257.42876

Reconstructed zero charge spectrum - [M+H]⁺



#	m/z	Charge	Mass	Weight
1	1629.72082	2	3257.42708	0.692
2	1086.81812	3	3257.43252	0.308

c. 解卷积结果图

图 6. 共价二聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

2.2.5 四个聚集体色谱峰解析汇总

表 1. 四个聚集体色谱峰解析汇总

峰号	m/z	同位素峰间隔 (Da)	电荷数	分子量	聚集体
1#	1638.98576	0.25	4	6550.90	四聚体
2#	1229.30295	0.25	4	4913.17	三聚体
	1638.73398	0.33	3		
3#	1092.82588	0.33	3	3275.45	非共价二聚体
	1638.73517	0.50	2		
4#	1086.81756	0.33	3	3257.43	共价二聚体
	1629.72276	0.50	2		

3. 结论

本文使用岛津LCMS-Q-TOF液质联用系统结合尺寸排阻色谱法, 开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法。实验结果显示, 该方法可以分离多肽类药物生长抑素的主成分和聚集体, 通过LabSolutions Insight Explore软件对色谱峰进行解析, 并对多电荷结果进行解卷积分析可知, 分离出的4个色谱峰分别为生长抑素的四聚体, 三聚体, 非共价二聚体和共价二聚体。该方法可为多肽类药物的聚集体分析提供参考。

5.5 mRNA 药物加帽的分析

摘要: 本文使用岛津 LCMS-QTOF 联用系统, 建立了一种 mRNA 药物加帽分析的方法。在高温条件下, 使用聚合物基质反相色谱柱对 5'-加帽序列, 生物素标记探针等进行分离, 并通过 LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱对色谱峰进行鉴定。在 260nm 下计算各色谱峰的峰面积, 单点外标法定量。该方法可用于 mRNA 药物加帽率的研究。

关键词: mRNA 加帽 反相色谱 LCMS-9050

真核生物的mRNA转录后, 在5'端生成N7-甲基化的鸟苷三磷酸(m7GpppG)帽子结构, 增强了mRNA稳定性, 避免mRNA被核酸外切酶降解; 同时帽子结构是翻译起始因子eIF4E识别位点, 具有重要生理意义。mRNA药物一般以DNA为模板, 经体外转录(IVT)制备。加帽工艺一般有两种: 第一种称为“转录后加帽”工艺, 运用复合酶体系, 经四步反应, 在mRNA依次生成5'端鸟苷三磷酸(GpppG, G Cap), N7-甲基化的鸟苷三磷酸(m7GpppG, Cap0)和核糖2位羟基甲基化(m7GpppmG, Cap1); 第二种称为“共转录”加帽, 即在IVT时, RNA聚合酶将m7GpppG加入mRNA中, 替换原有的GTP。然而加帽过程可能产生加帽不完全, 或反向序列帽子等杂

质, 影响原料药的质量及稳定性。

传统的5'帽子结构研究采用外切酶水解, 经聚丙烯酰胺PAGE凝胶电泳或离子色谱法检测P³²标记的5'-帽子。本文采用LCMS-Q-TOF等技术对加帽效率进行研究, 无需放射性标记, 更适合治疗用的mRNA药物。

本文对比了“转录后加帽”、“共转录”两种加帽工艺, 并以合成对照品为对照, 进行单点外标定量。Cap和uncapped片段, 生物素标记探针以及mRNA片段经反相色谱分离, LCMS-9050采集质谱数据, 经LabSolutions Insight Explore软件解卷积分析, 实现了对5'加帽产物的识别与加帽率研究。该分析条件稳定, 可靠, 供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪-四极杆飞行时间质谱仪, 配置信息如下:

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C X3
输液泵	: LC-40B X3	柱温箱	: CTO-40S
PDA检测器	: SPD-M40	质谱	: LCMS-9050

1.2 分析条件

色谱条件

色谱柱	: SHIMSEN Ankylo C18-300S, 100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm (P/N:380-01202-73), 岛津(上海)实验器材有限公司
洗脱液	: A: 200 mM HFIP+8.3 mM TEA 水溶液 B: A相/MEOH=1:2

流速 : 0.25 mL/min 提取波长 : 260 nm
 进样体积 : 5 μ L 柱温 : 55°C
 洗针模式 : R0,R3 均为甲醇/乙腈/异丙醇/水 (1:1:1:1, 加 1%FA)
 洗脱方式 : 梯度洗脱, 起始为 20% B 相, 见表 1

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	70
17.00	Pumps	Pump B Conc.	95
20.00	Pumps	Pump B Conc.	95
21.00	Pumps	Pump B Conc.	20
25.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI- 加热模块温度 : 400°C
 雾化气流速 : 3.0 L/min 干燥气流速 : 10.0 L/min
 加热气流速 : 10.0 L/min 扫描模式 : MS scan, m/z 500-5000
 接口温度 : 300°C 接口电压 : 4.5 kV
 D L 温度 : 250°C 事件时间 : 0.6 s

1.3 供试品的制备

供试品溶液: 参考 Beverly 等 (2016) 的文献, 为了保证体外转录的 mRNA 的稳定性, mRNA 需要进行 5' 端加帽, 加帽工艺有两种: 1、经过多种复合酶作用, 依次生成 G cap, Cap0 和 Cap1 的帽子结构(如图 1), 409 样品为此方式获得; 2、采用“共转录”方式, 在 5' 端加入 m7GpppG 替代 GTP, 再获得 Cap0 结构, 391 样品为此方式构建。为了采用 MS 对加帽核苷酸进行分析, 通常采用酶切的方式获得 5' 端寡核苷酸序列, 具体操作流程参考图 2, 生物素标记的探针与 mRNA 共同退火, 获得引物标记的序列, 经免疫磁珠捕获, RNAse H 酶解, 获得含帽子寡核苷酸序列, 经纯化得到上机溶液。具体样品信息如下表 2 所示。

表 2. 样品信息

样品	浓度	平均分子量 (Da)	备注
AGG-38nt Cap	5 μ M	12515.8	uncapped U 对照
Cap probe	5 μ M	9762.5	
391-S1	/	391k	酶解未纯化
391-S2	/	391k	磁珠纯化
409-S1	/	409k	酶解未纯化
409-S2	/	409k	磁珠纯化
uncapped	/	12825.6	
Gcap	/	13089.8	
Cap0	/	13104.8	
Cap1	/	13119.2	

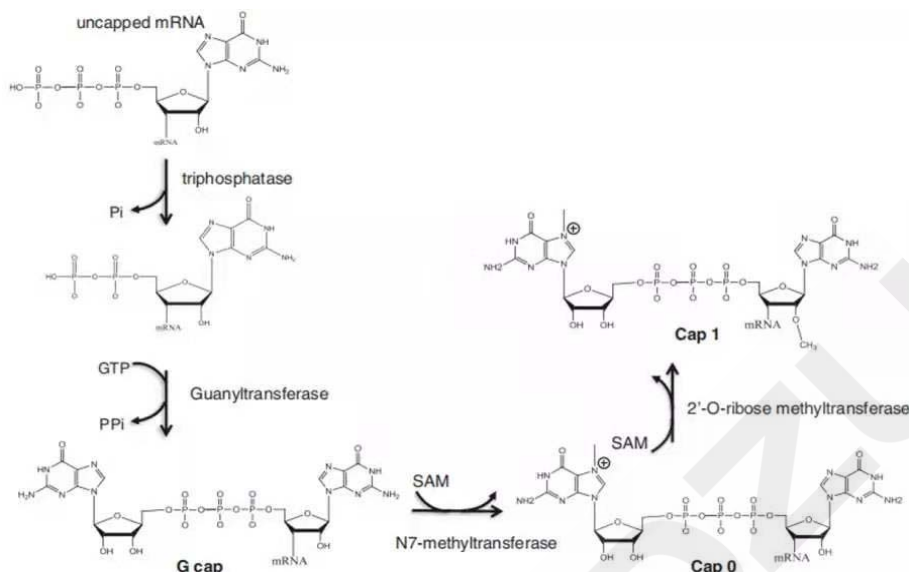


图 1. mRNA 体外转录后酶促加帽途径

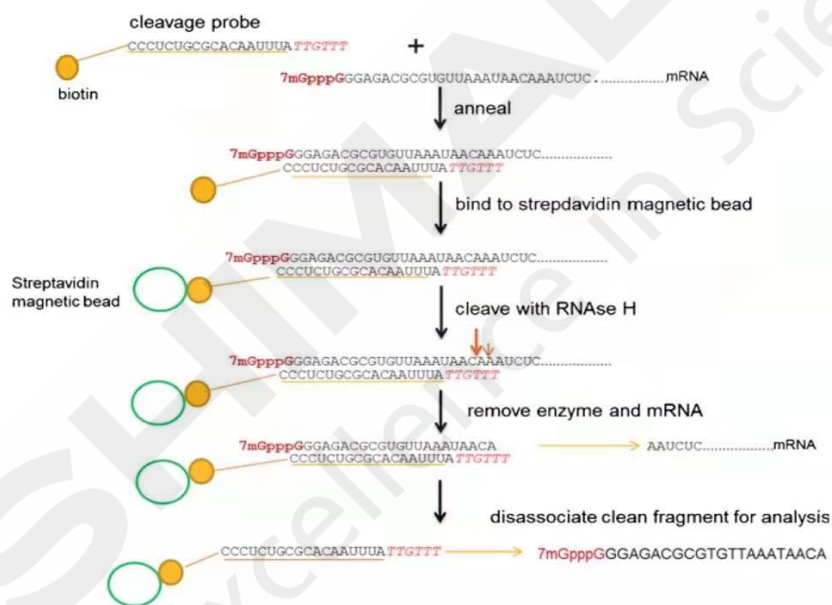


图 2. mRNA 5' 帽子酶切前处理 (序列仅参考)

2. 结果与讨论

2.1 AGG-38nt Cap 及 Cap probe 对照品分离及鉴定结果

AGG-38nt Cap 是化学合成的帽子结构，AGG-38nt Cap 保留时间为 3.8 min，如图 3 所示。MS 数据经 LabSolutions Insight 分析，可以观察到[M-4H]⁴⁺的 m/z 3128，[M-5H]⁵⁺的 m/z 2502...[M-14H]¹⁴⁺的 m/z 892 等，经 LabSolutions Insight Explore 解卷积算法计算，平均质荷比[M-H]为 12515，与理论值吻合。

Cap probe 是 3' 端带有生物素标记的探针序列，与 AGG-38nt Cap 序列互补，其 5' 端以 TTGTTT 起始，可特异性结合 RNase H。Cap probe 出峰时间 4.8 min，经 MS 确认，[M-3H]³⁺的 m/z 3253，[M-4H]⁴⁺的 m/z 2439...[M-12H]¹²⁺的 m/z 812 等，如图 4 所示，经过解卷积分析，平均质荷比[M-H]为 9762。

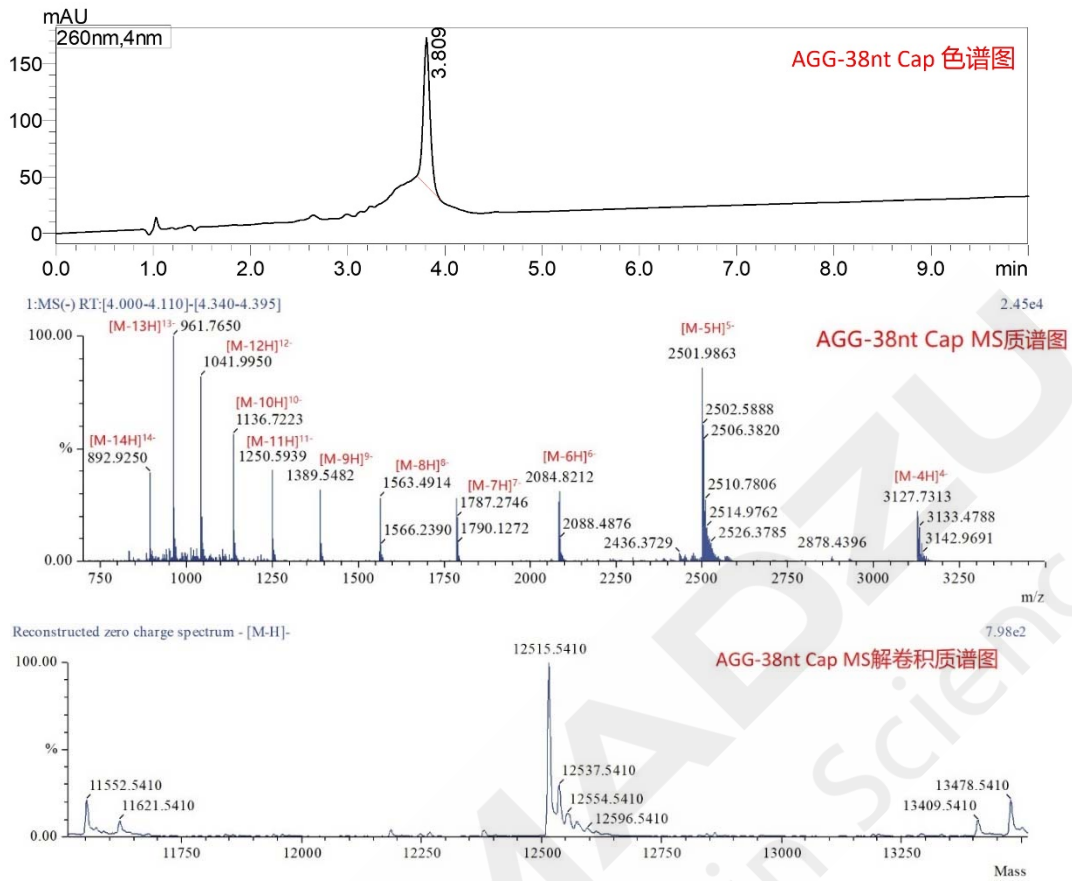


图 3. AGG-38nt Cap 色谱图及质谱解卷积结果

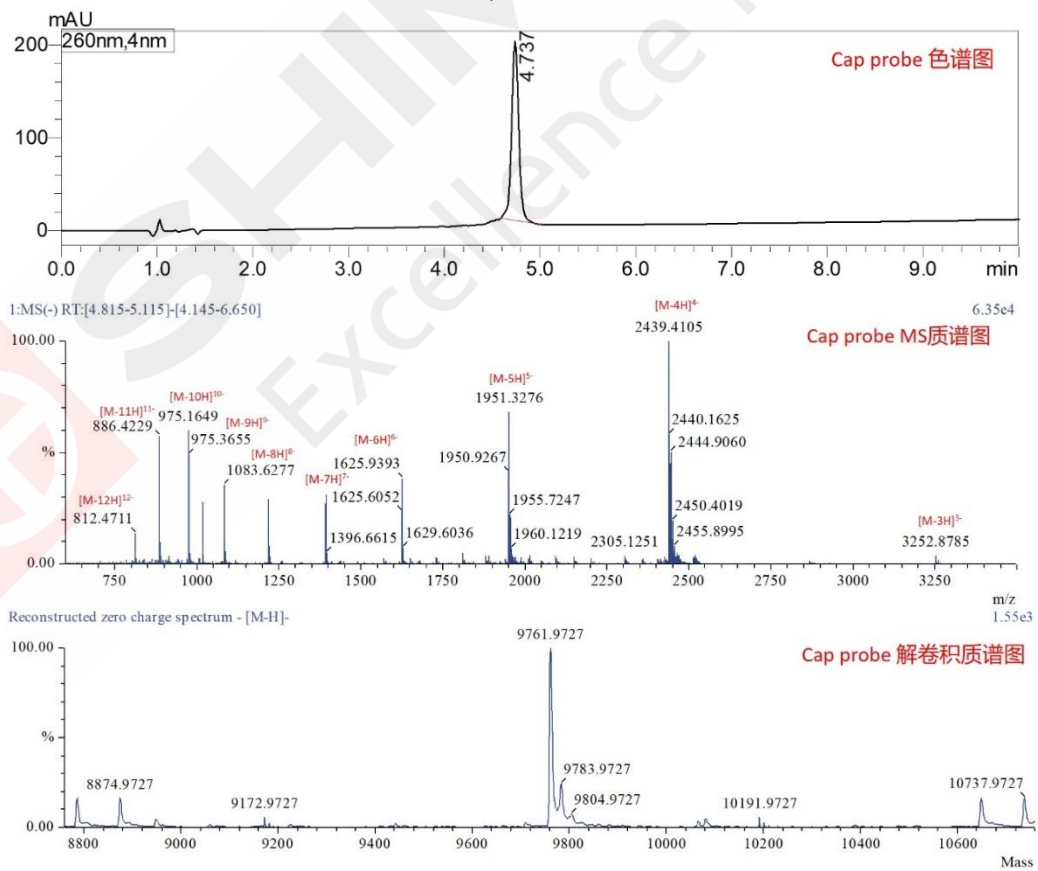


图 4. Cap probe 色谱图及质谱解卷积结果

2.2 391 样品结果解析

391-s1 未纯化，因此色谱图上能看到较大的 mRNA 残余峰，而 391-s2 经过链霉亲和素 (SAV) 磁珠纯化，除去了蛋白及 mRNA 长序列片段，色谱图及解卷积结果如图 5 所示。391-s2 RT=3.8 min 的色谱峰经 MS 分析，可以观察到[M-5H]⁵⁻的 m/z 2623，[M-6H]⁶⁻的 m/z 2185，...[M-12H]¹²⁻的 m/z 1092 等，如图 5 所示，经过解卷积分析，平均质荷比[M-H]为 13121，与理论值相当，RT=3.8 min 色谱峰均为 Cap1 结构。IVT 制备的 mRNA，其尿嘧啶 (U) 被甲基-假尿嘧啶取代，所以，Cap1 与对照品 AGG-38nt Cap 结构类似，色谱保留时间一致，但质荷比不同。RT=4.7 min 色谱峰经质谱确认，为 Cap probe。

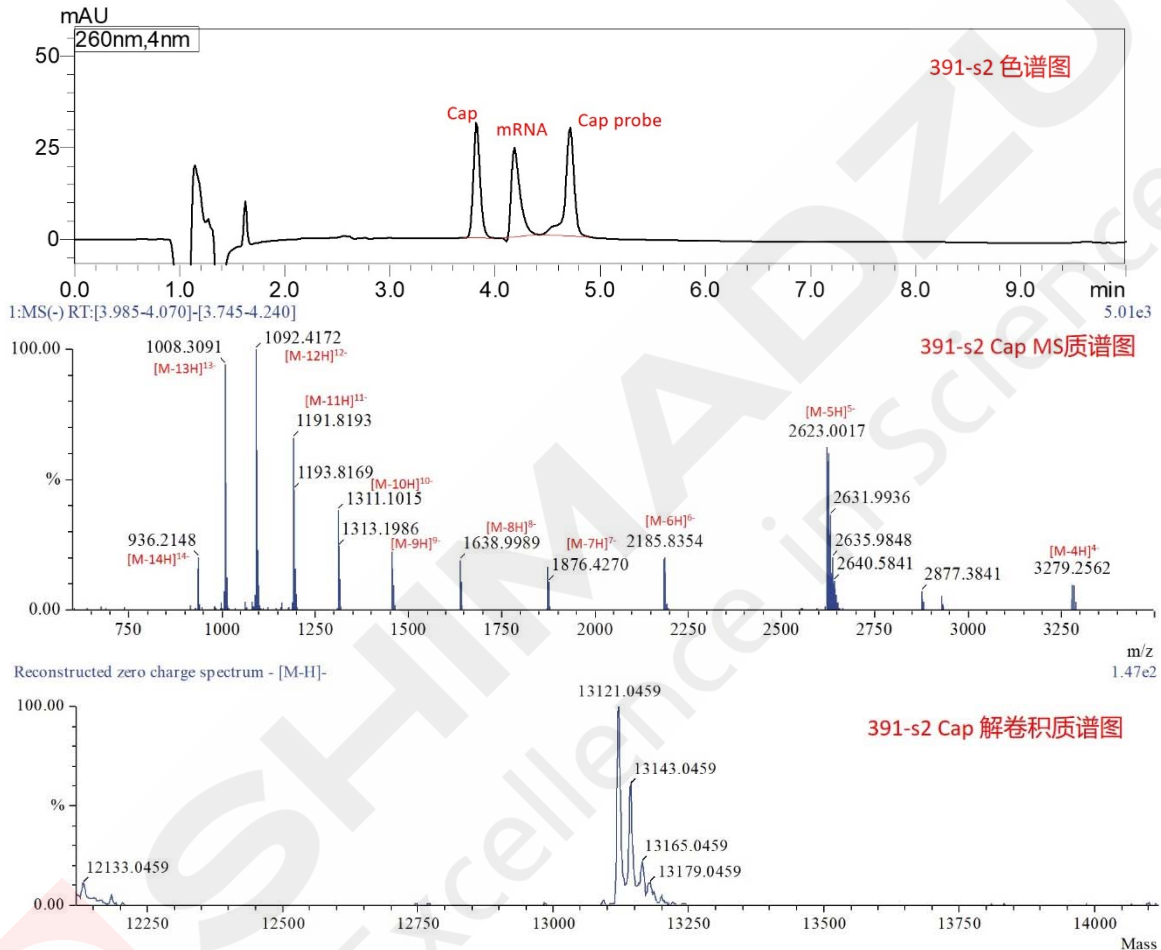


图 5. 391-s2 的色谱图及质谱解卷积结果

图 5 中 RT=4.18 min 色谱峰，经质谱分析，在 m/z 750-2000 范围内有微弱的一簇信号，如下图 6，推测为长序列 mRNA 片段，由于 ESI 模式的电荷分散效应，质谱信号极弱，无法解卷积。391-s2 经过 SAV 纯化，除去了 mRNA 大片段及酶，因此，391-s2 中 RT=4.18 min 峰面积为 140174，仅为 391-s1 中 RT=4.18 min 的峰面积的 2.8%。

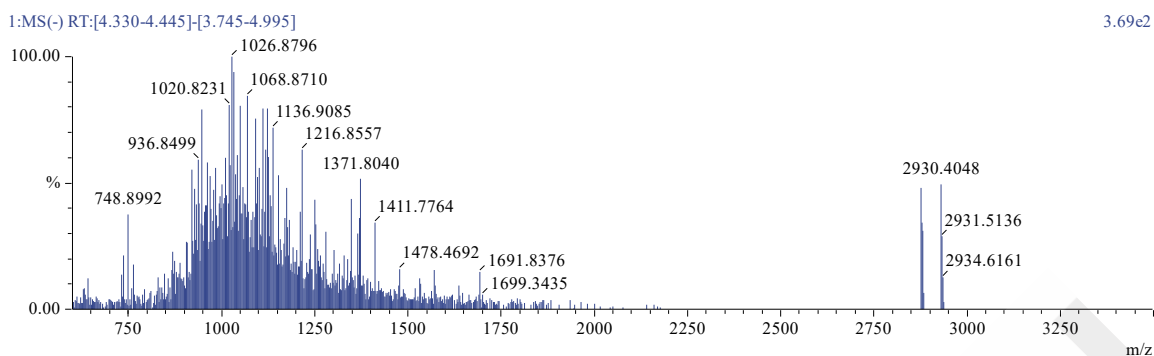


图 6. RT=4.18 min 的质谱图

2.3 409 样品结果解析

409-s1、409-s2 中 RT=3.8 min 的峰经 MS 分析,可以观察到 $[M-5H]^{-5}$ 的 m/z 2608, $[M-7H]^{-7}$ 的 m/z 1863, 经解卷积分析, 质荷比 $[M-H]^{-}$ 为 13049, 与理论值吻合, 为 Cap1 结构。4.7 min 色谱峰经质谱确认, 为 Cap probe; RT=4.2 min 色谱峰经质谱确认, 推测为 mRNA 长序列片段。

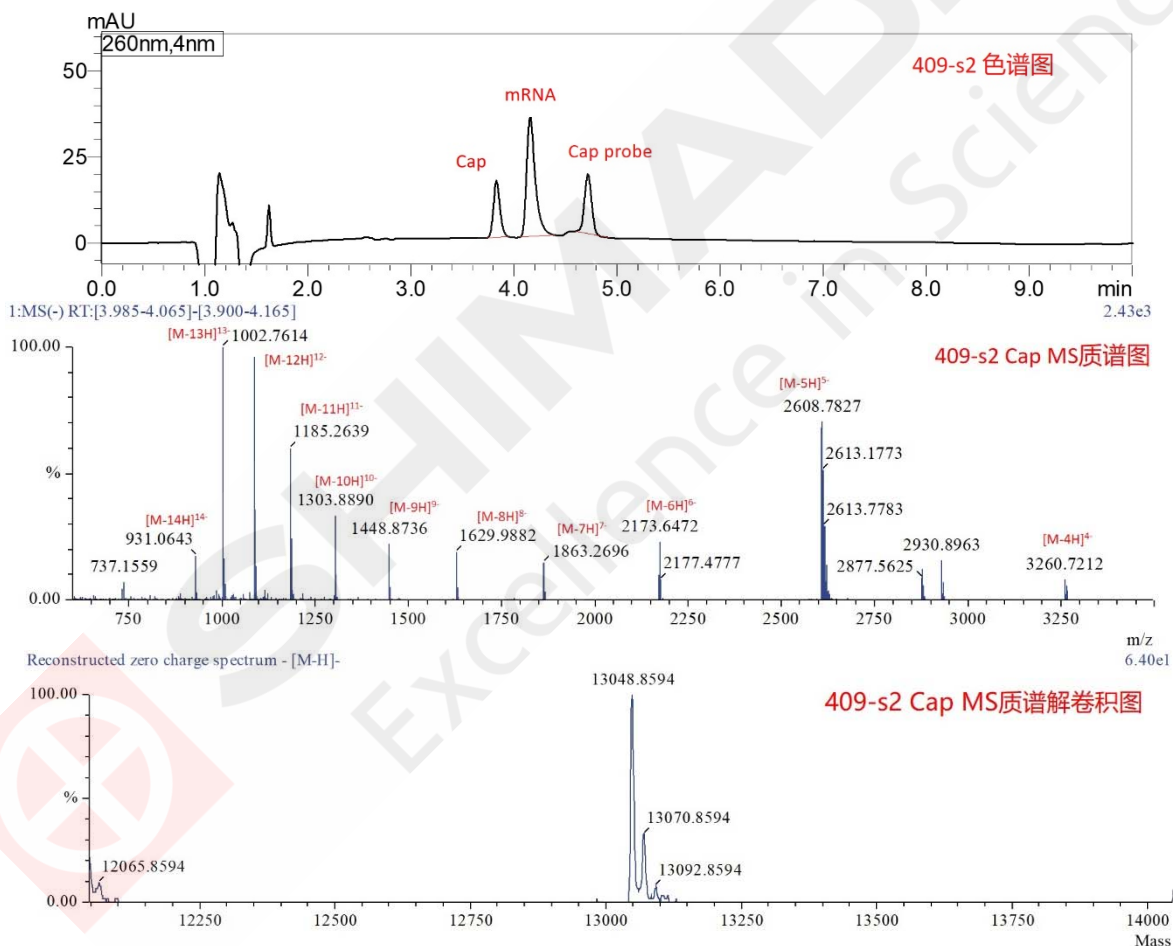


图 7. 409-s2 的的质谱图

2.4 Cap1 浓度分析

根据质谱定性结果, 391 和 409 样品中 RT=3.8 min 峰均为 Cap1 结构, 没有其他类似结构共流出。因此, 以 AGG-38nt Cap 为对照品, 根据紫外色谱峰面积, 单点法计算各样品中 Cap1 的浓度, 结果如下表 3 所示。s2 浓度均高于 s1, 这表明磁珠纯化可以获得较高浓度的 Cap1, 有利于色谱分离与检测; 此外, 391-

s2 和 409-s2 浓度分别为 1.53 μM 、1.72 μM ，表明两种工艺加帽效率相当。对照品及样品对比色谱图如图 8 所示。

表 3. 样品中 Cap1 浓度

峰名称	保留时间	峰面积	稀释倍数	浓度 μM
AGG-38nt Cap	2.91	717439	1	5
391-s1	2.85	39957	3.5	0.97
391-s2	2.93	62794	3.5	1.53
409-s1	2.97	11575	3.5	0.28
409-s2	2.95	70627	3.5	1.72

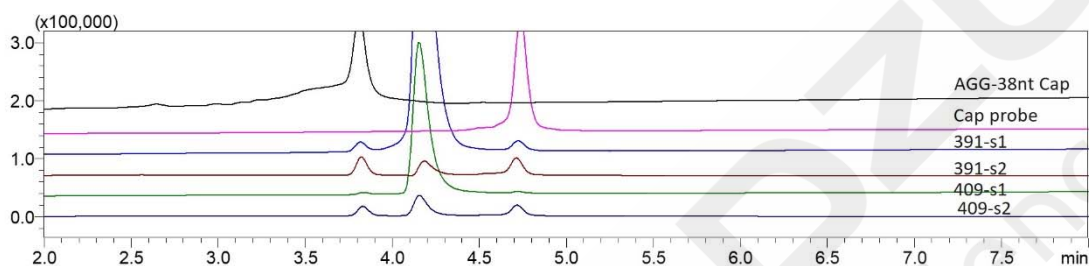


图 8. 对照品及样品色谱图 (260 nm)

3. 结论

基于岛津 LCMS-QTOF 联用系统，建立了一种 mRNA 加帽的质谱分析方法。核酸电负性强，本方法采用三乙胺离子对试剂，实现在反相模式分离，流动相中添加六氟异丙醇，促进了核酸在负模式下的电离，对酶解后的 mRNA 片段进行分离和检测，并分别采用紫外和质谱的数据进行了色谱定性和质谱多电荷解卷积分析，两种工艺的加帽样品均能准确定性 Cap1、Cap probe，以合成的 AGG-38nt-Cap 为标准，单点外标法计算 Cap1 含量，391-s2 和 409-s2 中 Cap1 浓度分别为 1.53 μM 、1.72 μM ，表明两种工艺加帽效率相当。该方法可用于 mRNA 加帽效率评估，也可供寡核苷酸质量控制提供参考。

第 6 章 Q-TOF 在药用辅料及医疗包材的应用

近年来，我国药品审评审批制度的深刻变革，特别是仿制药一致性评价体系的建立健全，以及原辅包与制剂关联评审机制的全面推进，为制药行业的蓬勃发展注入了强劲动力。在这一背景下，药用辅料与医疗包材的研发、生产及应用领域亦迎来了前所未有的发展机遇与重视。

药用辅料，作为药品生产及处方调配中的关键组成部分，有增溶、助溶、调节药物释放等功能。作为非活性成分，它们虽不直接贡献药理活性，却深刻影响着制剂的整体质量、安全性及有效性。因此，深入探究药用辅料与药品间的相互作用，确保其安全性，成为保障药品质量不可或缺的一环。

同时，医疗器械在使用过程中，尤其是与人体持续接触或作用于人体时，可能释放出称为“可沥滤物”的化学物质。这些物质涵盖灭菌残留、加工残留、降解产物、溶剂及各类添加剂（如稳定剂、抗氧化剂、增塑剂、着色剂等），它们可能直接或通过介质（如药液、血液）进入人体，构成潜在的安全风险。值得注意的是，并非所有添加剂及工艺残留均构成威胁，其风险程度往往取决于产品与人体的接触方式及程度。

为有效应对可沥滤物带来的挑战，岛津采用高效、准确的筛查与鉴定方案：该方案依托高分辨质谱 Q-TOF 技术，在 DDA 模式下采集数据，随后利用 LabSolutions Insight Explore 软件的强大功能，包括 Analyze 峰提取、Screen 目标物筛查、Formula Predictor 分子式预测、Assign 库检索及碎片峰归属等，结合既定的可沥滤物筛查列表，对样品中的组分峰进行精准靶向筛查。同时，对于筛查列表之外的未知化合物，亦能进行高效定性鉴定。此方案不仅简化了样品前处理流程，还实现了检测方法的通用性与流程化定性分析的高效性，显著提升了复杂组分定性鉴定的效率与准确性，有效减轻了分析人员的工作负担。

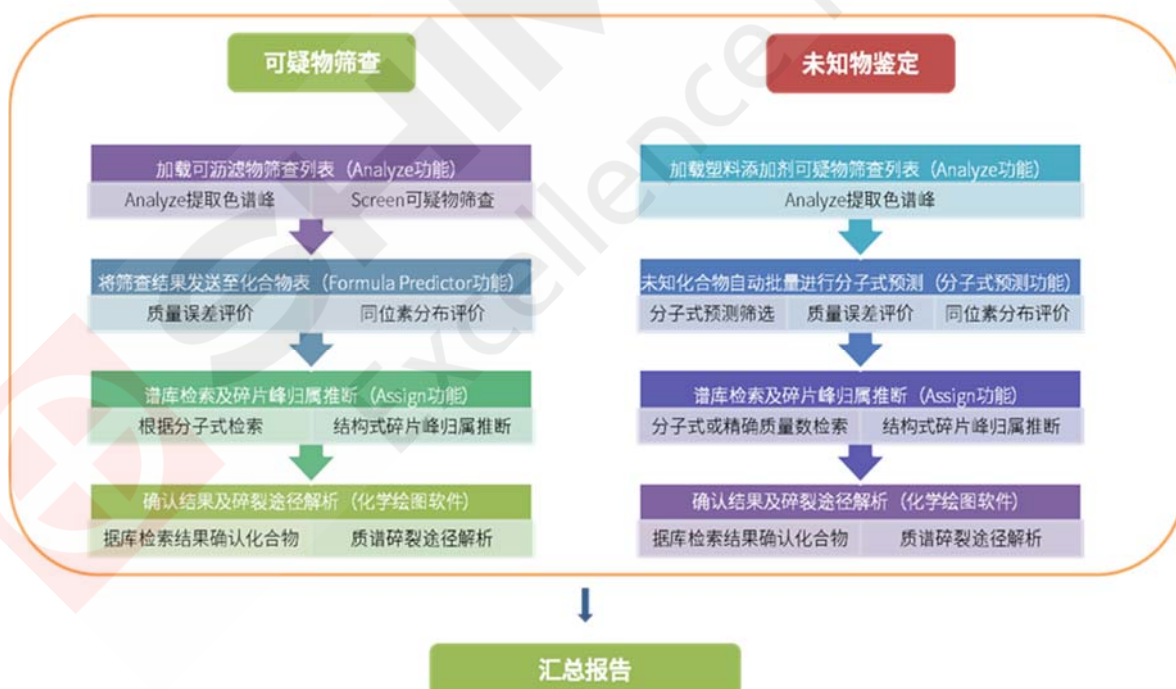


图 1. DDA 数据处理流程 (以可沥滤物为例)

6.1 医疗器械一次性双工冲洗盒管材中可沥滤物定性鉴定流程

摘要: 本文应用超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪,建立了医疗器械可沥滤物定性鉴定方法与流程,并成功应用于一次性双工冲洗盒管材中可沥滤物的定性检测。样品经模拟浸提或极限浸提法后即可进样分析。使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件中 Analyze 智能峰提取、Screen 目标物筛查、Formula Predictor 分子式预测、Assign 在线库检索与碎片峰归属以及二级质谱库检索等功能,对提取到的 218 个色谱峰进行了流程化鉴定。

关键词: 医疗器械 四极杆飞行时间质谱仪 可沥滤物

技术特点:

- ❖ Labsolutions Insight Explore 软件,功能强大丰富,化合物筛查鉴定利器。
- ❖ 定性鉴定流程化,结合可沥滤物筛查库,加速可疑物筛选鉴定。

可沥滤物是在医疗器械产品与人体不断接触并发挥作用的过程中,或与使用中的其他介质(如药液、血液等)相互作用时,从医疗器械中释放的化学物质。一般包括灭菌残留剂、加工工艺残留、降解产物、溶剂、材料中的单体及添加剂(包括稳定剂、抗氧化剂、增塑剂、着色剂等)等。

可沥滤物的产生既与医疗器械所用材料、终产品的加工方式有关,也与产品和人体的接触方式及接触时间有关。以高分子医疗器械为例,其在医疗器械发挥作用的过程中,原材料所用的各种包括增塑剂、抗氧化剂、稳定剂等在内的添加剂,以及生产加工过程中引入的工艺残留均可能直接或通过相关介质进入人体,形成可沥滤物的安全性风险。当

然,并非所有的添加剂及工艺残留均会带来风险,如果相关产品或组件不与人体直接或间接接触,则其风险相对可控。

在医疗器械发挥诊疗作用的同时,可沥滤物也在或短期或长期地对人体产生安全性方面的危害。因此,对其安全性研究既是企业在设计开发产品阶段需要重点关注内容,也是相关产品技术审评关注重点。

本文建立了基于液相色谱四极杆飞行时间高分辨质谱联用技术的可沥滤物筛查鉴定方法及流程,并应用于一次性双工冲洗盒管材中可沥滤物的快速筛查鉴定。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-9050,配置信息如下:

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D X3×2	柱温箱	: CTO-40C
自动进样器	: SIL-40C X3	质谱仪	: LCMS-9050
色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.118、LabSolutions Insight Explore Ver.1.0		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack GISS HP (100 mm×2.1 mm, 3 μm; 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30084-02)

流 动 相 : A 相-0.1%甲酸水, B 相-0.1%甲酸乙腈

进 样 体 积 : 2 μL

流 速 : 0.45 mL/min 柱 温 : 40°C

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 15%, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间(min)	单元	处理命令	值
3.00	泵	B Conc	30
20.00	泵	B Conc	60
30.00	泵	B Conc	100
35.00	泵	B Conc	100
35.01	泵	B Conc	15
38.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式 : ESI+ 雾化气流速 : 3.0 L/min

接口温度 : 300°C 干燥气流速 : 10.0 L/min

D L 温度 : 250°C 加热气流速 : 10.0 L/min

加热模块温度 : 400°C 碰撞气 : 氦气

扫描模式 : DDA 喷针位置 : +1.0 mm

D D A 参 数 : MS m/z 50 - 1200, MS/MS(DDA) m/z 50 - 1200

1.3 样品前处理

取一次性双工冲洗盒样品, 称取 100 g 输液器透明管路, 按约 5 cm 长度将其剪碎, 置 500 mL 具塞锥形瓶中, 加入 500 mL 乙醇/水 (3:7), 37°C 浸提 24 小时后, 取样检测。

2. 结果与讨论

2.1 色谱图

空白提取溶剂为乙醇水 (3:7), 经提取溶剂与浸提液 TIC 图对比, 提取溶剂无明显干扰峰, 样品提取液正离子检测模式下获得较多组分峰。

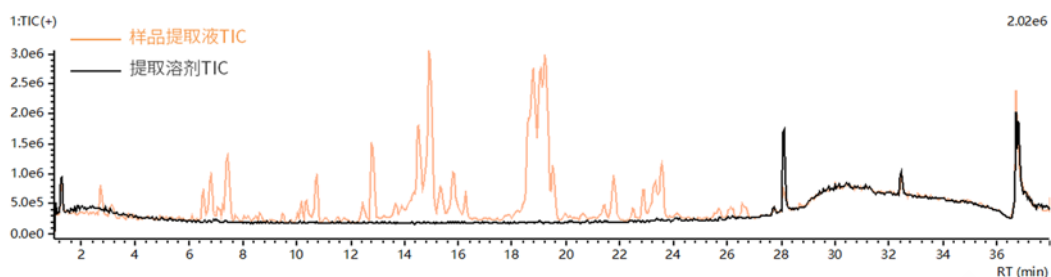


图 1. 样品提取液与空白提取溶剂 TIC 对比图

使用 Labsolutions Insight Explore 软件中 Analyze 功能模块，对样品进行自动峰提取。设置质谱响应阈值大于 1000，色谱响应 Medium 以上，S/N 大于 10，峰提取保留时间范围：0 - 30 min，提取结果如图 5 所示，正离子模式共计提取 218 个组分峰。

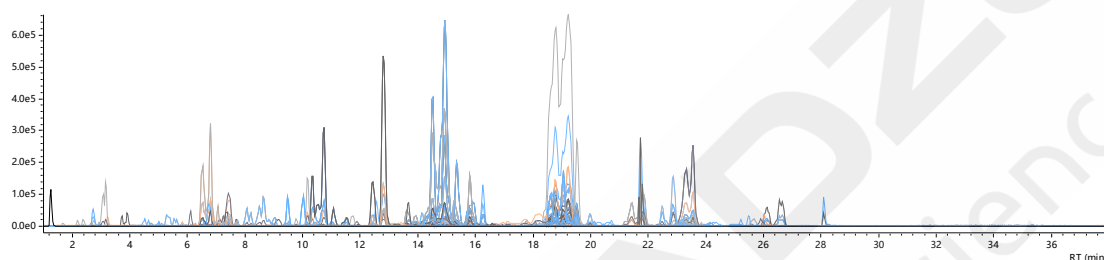


图 2. 样品提取液 EIC 图

2.2 可沥滤物定性鉴定

2.2.1 基于可沥滤物筛查列表的定性鉴定

综合使用 Labsolutions Insight Explore 软件中 Analyze 模块中 Analyze 峰提取、Screen 目标物筛查、Formula Predictor 分子式预测、Assign 库检索及碎片峰归属功能，结合自建的 2659 种可沥滤物筛查列表，对提取得到的组分峰进行靶向筛查，操作流程简述如下。

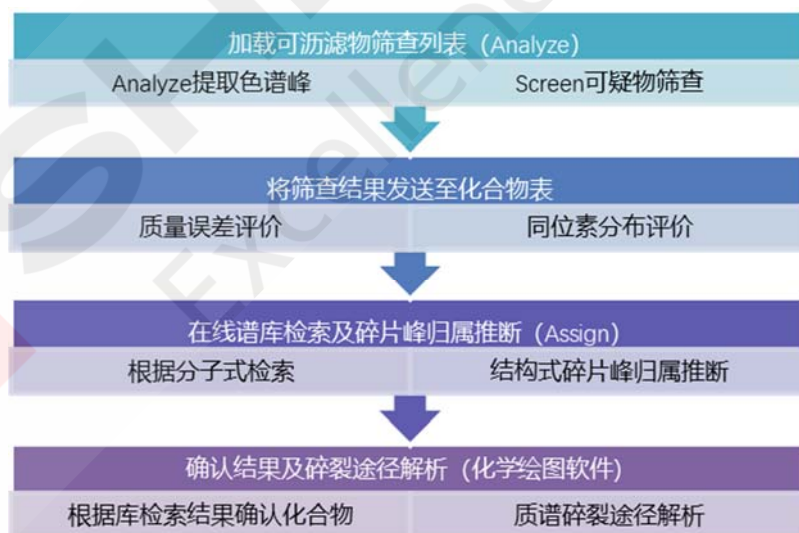


图 3. 基于可沥滤物筛查列表的定性鉴定流程

使用 Labsolutions Insight Explore 软件中 Analyze 模块中 Screen 功能，结合自建的 2659 种可沥滤物筛查列表，对提取得到的组分峰进行靶向筛查，共得到 37 种疑似目标成分，质量误差 ± 5 ppm 以内，同位素分布得分 ≥ 60 ，结果见表 2。

表 2. 37 种疑似目标成分

NO.	化合物	CAS	分子式	理论 m/z	实测 m/z	质量误差 ppm	同位素得分
1	1,6-己内酰胺	105-60-2	C6H11NO1	114.0913	114.0916	2.6	97.7
2	N-乙基-2-吡咯烷酮	2687-91-4	C6H11NO1	114.0913	114.0916	2.6	97.7
3	1,4,7-三氧环十三烷-8,13-二酮	6607-34-7	C10H16O5	217.1071	217.1076	2.4	97.6
4	N,N'-己烷-1,6-二基双(N'-苯脲)	39072-70-3	C22H30N4O2	383.2442	383.2437	-1.3	95.8
5	新癸酸环氧乙烷甲基酯	26761-45-5	C13H24O3	229.1798	229.1804	2.4	95.6
6	三甘醇双(辛酸酯)	106-10-5	C22H42O6	403.3054	403.3061	1.6	94.9
7	三乙二醇二异辛酸酯	94-28-0	C22H42O6	403.3054	403.3061	1.6	94.9
8	3,3-二甲基-1,5-二氧杂环十一烷-6,11-二酮	94113-47-0	C11H18O4	215.1278	215.1284	2.8	93.2
9	三甘醇二庚酸酯	7434-40-4	C20H38O6	375.2741	375.2748	1.7	93.0
10	硬脂酰胺	124-26-5	C18H37NO1	284.2948	284.2954	2.3	92.3
11	十六碳酰胺	629-54-9	C16H33NO1	256.2635	256.2640	2.0	91.4
12	月桂酸甘油酯	142-18-7	C15H30O4	275.2217	275.2225	2.8	90.5
13	十八烷基二乙醇胺	10213-78-2	C22H47N1O2	358.3680	358.3684	1.1	89.6
14	司盘 20	1338-39-2	C18H34O6	347.2428	347.2436	2.3	89.2
15	己二酸二丁氧基乙酯	141-18-4	C18H34O6	347.2428	347.2436	2.3	89.2
16	过氧化碳酸二(2-乙基己酯)	16111-62-9	C18H34O6	347.2428	347.2436	2.3	89.2
17	1,2,3-丙烷三庚酸酯	620-67-7	C24H44O6	429.3211	429.3220	2.2	86.9
18	司盘 80	1338-43-8	C24H44O6	429.3211	429.3220	2.2	86.9
19	2,4,6-三叔丁基苯酚	732-26-3	C18H30O1	263.2369	263.2375	2.0	86.4
20	三甘醇辛酸癸酸酯	7346-78-3	C24H46O6	431.3367	431.3373	1.4	85.3
21	司盘 60	1338-41-6	C24H46O6	431.3367	431.3373	1.4	85.3
22	2,5-二甲基-2,5-二(2-乙基己酰过氧化)己烷	13052-09-0	C24H46O6	431.3367	431.3373	1.4	85.3
23	乙酰柠檬酸三丁酯	77-90-7	C20H34O8	403.2326	403.2336	2.3	82.9
24	二十烷酰胺	51360-63-5	C20H41NO	312.3261	312.3266	1.5	80.5
25	叔丁基过氧化碳酸-2-乙基己酯	34443-12-4	C13H26O4	247.1904	247.1910	2.3	79.2
26	二氢茉莉酮酸甲酯	24851-98-7	C13H22O3	227.1642	227.1645	1.3	79.0
27	单硬脂酸甘油酯	123-94-4	C21H42O4	359.3156	359.3165	2.4	78.2
28	9,10-二羟基十八酸甲酯	1115-01-1	C19H38O4	331.2843	331.2850	2.2	74.4
29	乙酰蓖麻油酸甲酯	140-03-4	C21H38O4	355.2843	355.2849	1.8	71.8
30	1,1-二叔丁基过氧化-3,3,5-三甲基环己烷	6731-36-8	C17H34O4	303.2530	303.2539	2.9	69.2
31	3-羟基-2,2-二甲基丙基 3-羟基-2,2-二甲基丙酸盐二丙烯酸酯	30145-51-8	C16H24O6	313.1646	313.1630	-5.0	64.5
32	邻苯二甲酸丁苄酯	85-68-7	C19H20O4	313.1434	313.1429	-1.6	62.6
33	2,2'-(亚甲基双(亚苯基氧亚甲基))双环氧乙烷	39817-09-9	C19H20O4	313.1434	313.1429	-1.6	62.6
34	2,2-二甲基-1,3-丙二醇二苯甲酸酯	4196-89-8	C19H20O4	313.1434	313.1429	-1.6	62.6
35	顺式-9-十六烯酸	2091-29-4	C16H30O2	255.2319	255.2326	2.9	60.8
36	棕榈油酸	373-49-9	C16H30O2	255.2319	255.2326	2.9	60.8
37	甲基丙烯酸月桂酯	142-90-5	C16H30O2	255.2319	255.2326	2.9	60.8

将上述结果发送至化合物表，在化合物详细信息视图下，确认色谱图、一级质谱m/z及同位素分布匹

配情况、二级谱图信息，并进行在线库检索及二级质谱峰归属鉴定，如图7所示。

质量误差与同位素分布评价及二级质谱图



在线谱库检索及碎片峰自动归属结果

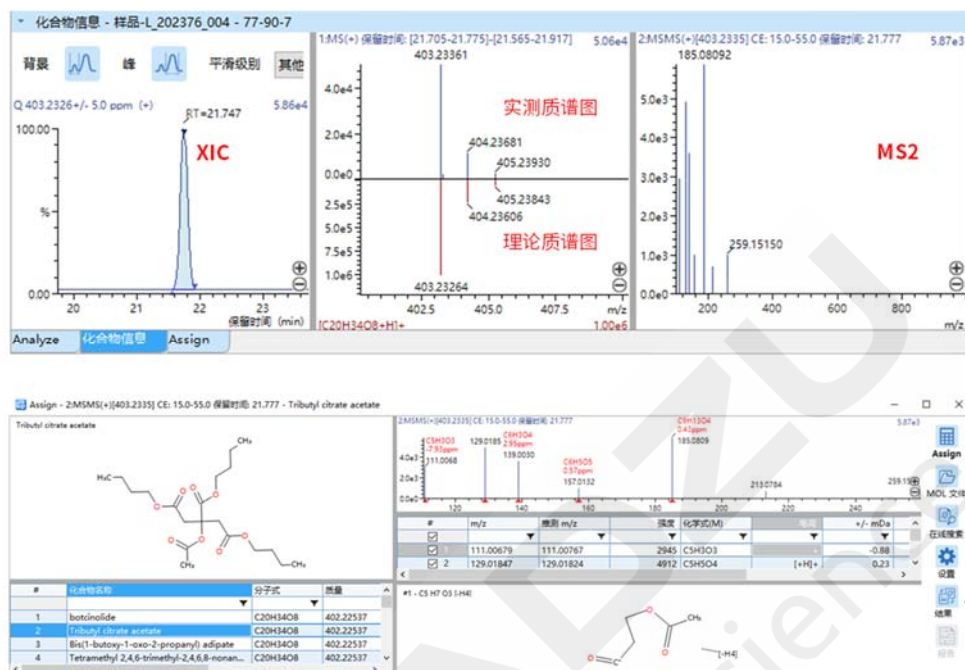


图 4. 目标物鉴定及二级质谱峰归属

根据二级质谱峰归属结果，对可能的化合物结构式进行碎裂途径解析，结果见图8。37个可疑目标物均可依此流程进行定性解析，部分结果见图9。

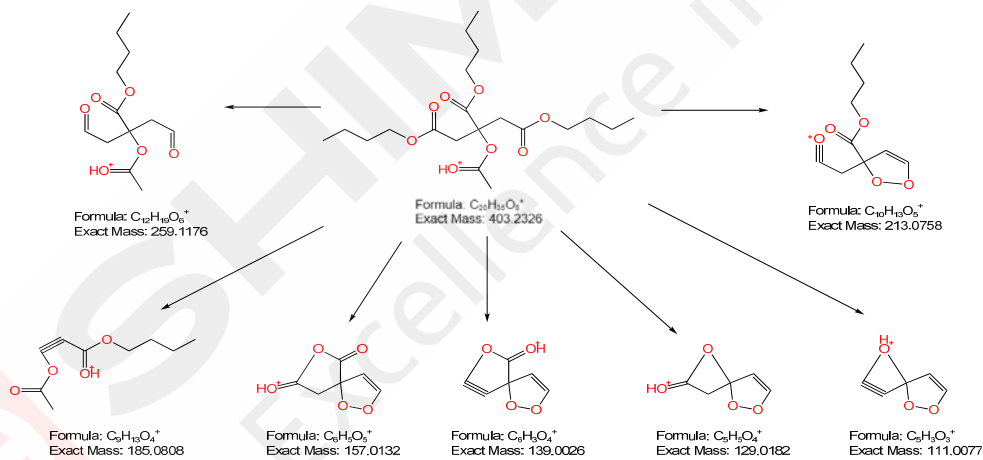
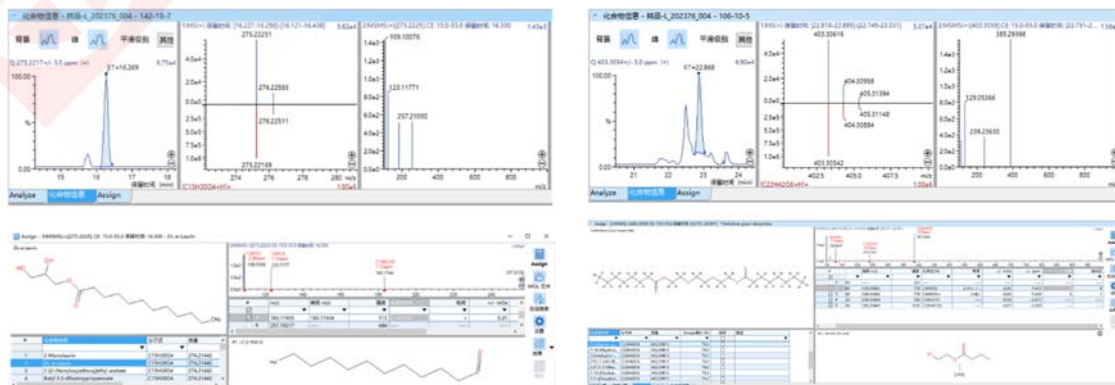
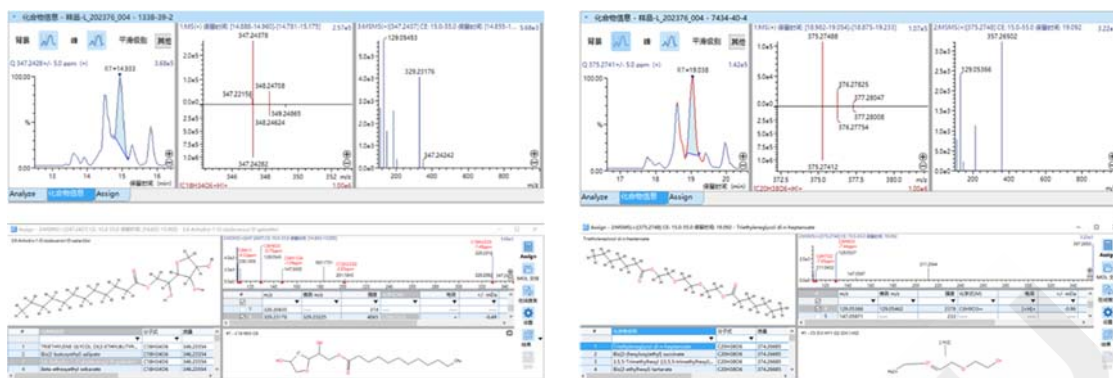


图 5. 二级质谱碎裂途径



a). 月桂酸甘油酯

b). 三甘醇双辛酸酯



c). 司盘20

d). 三甘醇二庚酸酯

图 6. 在线库检索及碎片峰归属鉴定结果

2.2.2 筛查列表之外的未知化合物定性鉴定

通过筛查列表筛选之后，还有大量未知化合物需进行鉴定。综合使用Labsolutions Insight Explore软件中Analyze模块中Analyze峰提取、Formula Predictor分子式预测、Assign在线库检索及碎片峰归属功能，操作流程简述如下。



图 7. 筛查列表之外未知化合物鉴定流程

首先使用 Labsolutions Insight Explore 软件 Analyze 模块中 Screen 功能，结合自建的 2659 种可沥滤物筛查列表，进行靶向筛查后，经筛选得到筛查列表之外的未知化合物峰。使用 Analyze 中 Formula Predictor，进行批量分子式预测并筛选确认结果，部分结果展示见图 11。

#	m/z	保留时间	响应	峰宽	保留时间组	分子式推测	分子式推测结果	差值 (ppm)	差值 (mDa)	同位素得分	得分
24	439.21008	7.447	610794	0.846	106	<input checked="" type="checkbox"/>	[C22 H36 O F2 P2+Na]+	-0.205	-0.09	99.89	99.83
50	425.23069	12.456	135956	0.212	124	<input checked="" type="checkbox"/>	[C22 H38 F2 P2+Na]+	-0.494	-0.21	99.76	99.58
43	357.16796	10.745	144912	0.384	118	<input checked="" type="checkbox"/>	[C16 H26 N2 F3 P+Na]+	0.476	0.17	99.72	99.56
3	240.09301	2.724	105965	0.247	92	<input checked="" type="checkbox"/>	[C6 H18 N3 O3 Si P+H]+	0.958	0.23	99.63	89.23
2	217.10757	2.724	173984	0.457	92	<input checked="" type="checkbox"/>	[C7 H19 N2 O2 P+Na]+	-0.322	-0.07	99.59	99.51
51	253.18044	12.560	289397	0.489	125	<input checked="" type="checkbox"/>	[C12 H27 N2 P+Na]+	0.118	0.03	99.58	99.59
1	219.03204	1.268	294391	0.353	91	<input checked="" type="checkbox"/>	[C10 H7 N2 O2 P+H]+	1.141	0.25	99.51	99.03
22	423.20957	7.411	282475	0.844	105	<input checked="" type="checkbox"/>	[C20 H30 O F6+Na]+	0.614	0.26	99.45	99.24
32	342.19753	10.745	246738	0.419	118	<input checked="" type="checkbox"/>	[C10 H25 N9 O3+Na]+	0.789	0.27	99.40	99.11
53	387.27508	12.804	143697	0.213	126	<input checked="" type="checkbox"/>	[C22 H34 N4 O2+H]+	-0.955	-0.37	99.26	98.90
55	409.25709	12.804	2414281	0.457	126	<input checked="" type="checkbox"/>	[C22 H31 N4 F3+H]+	-0.660	-0.27	99.22	99.01
10	351.21499	5.525	111738	0.622	98	<input checked="" type="checkbox"/>	[C15 H32 N2 F3 P+Na]+	0.712	0.25	99.20	98.97
31	427.26745	9.164	132886	0.543	111	<input checked="" type="checkbox"/>	[C17 H38 N6 F2 P2+H]+	0.117	0.05	98.79	98.88
29	350.20253	8.621	152300	0.719	109	<input checked="" type="checkbox"/>	[C15 H29 N F5 P+H]+	-1.485	-0.52	98.34	97.77
34	407.24096	10.154	492457	0.522	114	<input checked="" type="checkbox"/>	[C19 H40 O F2 P2+Na]+	-1.252	-0.51	98.18	97.76
4	267.15748	3.144	634345	0.659	93	<input checked="" type="checkbox"/>	[C14 H20 N4+Na]+	-2.021	-0.54	98.17	97.27
8	441.24677	5.003	100855	0.521	96	<input checked="" type="checkbox"/>	[C22 H31 N4 O2 F3+H]+	-0.952	-0.42	98.00	97.77
52	369.26443	12.804	184486	0.249	126	<input checked="" type="checkbox"/>	[C22 H32 N4 O+H]+	-1.246	-0.46	97.97	97.58
35	408.24476	10.154	108416	0.176	114	<input checked="" type="checkbox"/>	[C17 H34 N3 O3 F3+N...	0.759	0.31	97.56	97.47
14	273.17060	6.739	330584	0.355	101	<input checked="" type="checkbox"/>	[C11 H27 N2 O2 P+Na]+	1.318	0.36	97.51	97.13
33	273.17048	10.014	304440	0.346	113	<input checked="" type="checkbox"/>	[C15 H20 N4 O+H]+	-1.867	-0.51	97.42	96.70

图 8. 未知化合物筛选及分子式预测结果

然后，将上述结果全部选中，发送至化合物表，查看化合物详细信息，并将二级谱图发送至 Assign 进行在线谱库检索及碎片峰归属鉴定，见图 12。此外，如有可沥滤物本地二级谱库，可直接对批量样品进行本地谱库检索。

The screenshot displays the 'Formula Predictor' and 'Assign' software interfaces. The top window shows the 'Formula Predictor' results for m/z 329.23269, listing several predicted molecular formulas such as [C18 H32 O5] and [M+H]+ with their respective scores and errors. The bottom window shows the 'Assign' interface for the same compound, displaying the chemical structure of 2-月桂酸异山梨酯 (2-laurate isosorbide) and its fragmentation pattern. A table below the structure lists identified peaks and their corresponding molecular formulas, such as m/z 183.17410 identified as C18H32O5.

图 9. Assign 在线可检索及碎片峰归属

根据二级质谱归属结果，对可能的化合物结构式进行碎裂途径解析，结果见图13。其他未知化合物均依此进行定性解析，图14展示了部分定性结果。

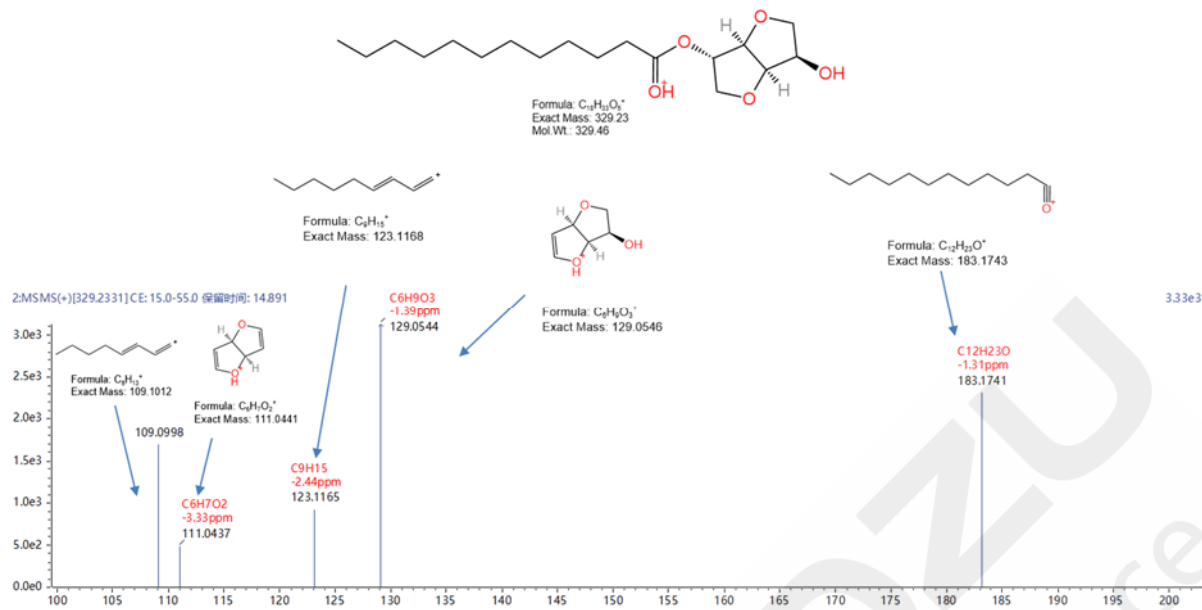
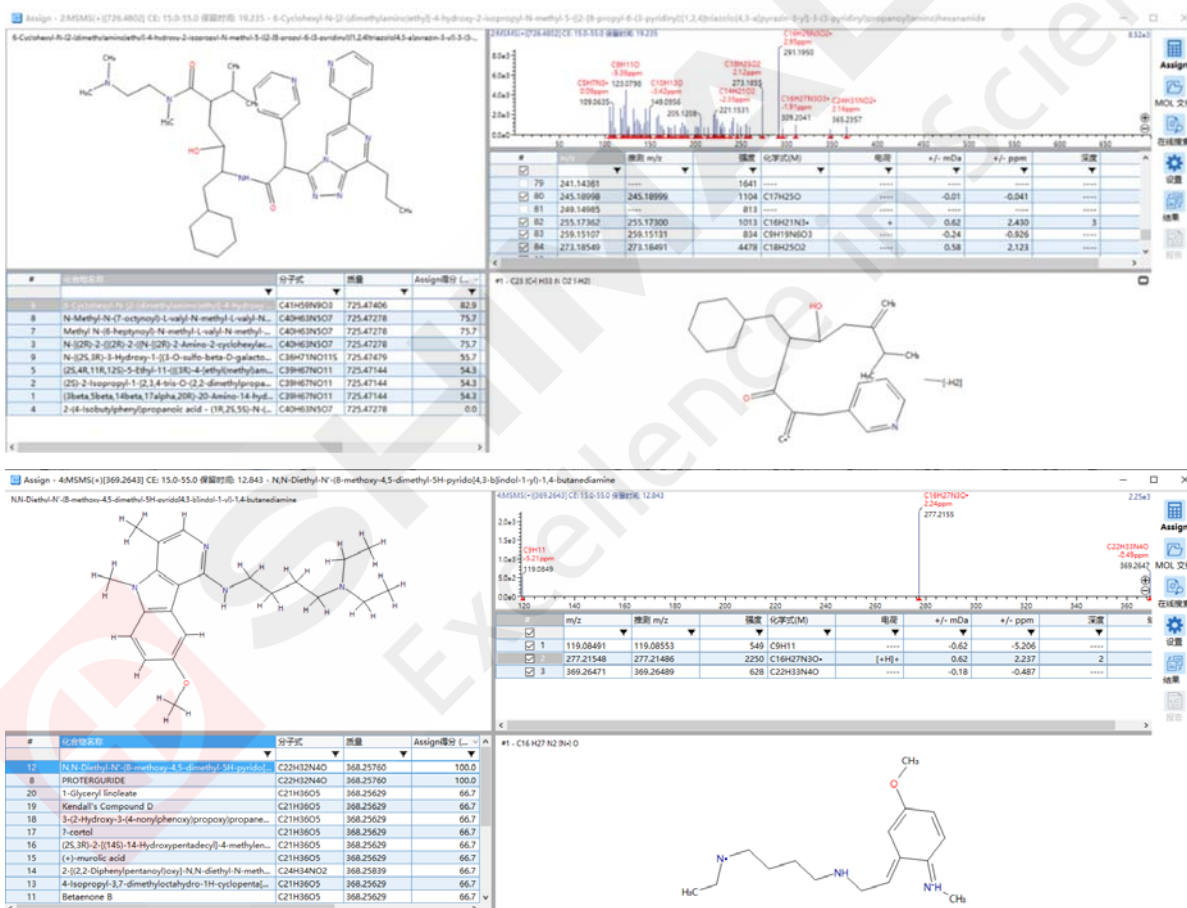


图 10. 二级质谱碎裂途径及峰归属



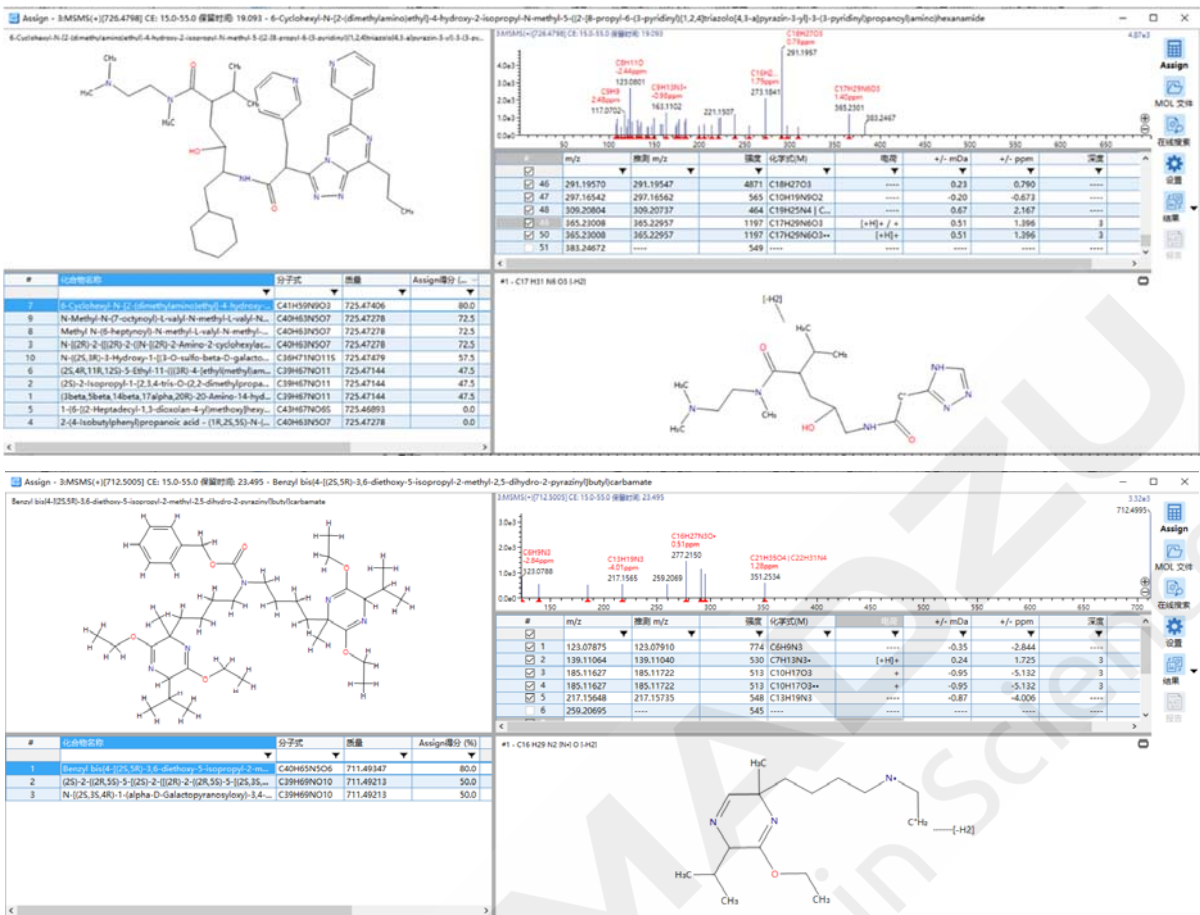


图 11. 部分未知物在线检索及碎片峰归属定性结果

3. 结论

本文建立的医疗器械可沥滤物定性鉴定方法与流程，成功应用到了一次性双工冲洗盒管材中可沥滤物的定性检测。该方案样品前处理方法简便、检测方法通用、流程化定性分析高效准确，可以极大的提高可沥滤物复杂组分定性鉴定效率及准确性，减轻分析人员工作负担。

6.2 定量检测医用胶塞中13种亚硝胺基因毒性杂质含量

摘要: 本文利用岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱仪,建立了医用胶塞中13种亚硝胺基因毒性杂质的检测方法。该方法满足法规关于弹性密封件中亚硝胺0.01 mg/kg的检出灵敏度要求,同时方法学结果表明,13种亚硝胺在1.0~50 ng/mL浓度范围内线性关系良好,多针重复性、稳定性良好,5 ng/mL和20 ng/mL平均加标回收率为96.20%-108.30%,RSD为0.48%-4.40%之间。该方法满足检测要求,能快速、有效的分析医用胶塞中13种基因毒性杂质的含量。

关键词: LCMS-Q-TOF 亚硝胺 基因毒性杂质 定量检测

技术特点:

- ❖ QTOF 分辨率高,定性准确度高,可同时定性和定量筛查亚硝胺杂质。
- ❖ 方法灵敏度高,可满足法规 0.1 mg/kg 检出要求。

N-亚硝胺(也称为亚硝胺)是一类物质,其中许多是强致突变剂,已被列为可能的人类致癌物。美国环境保护署(EPA)污染物风险信息集成系统(IRIS)将亚硝胺的风险指数定为b2,即具有潜在人体致癌性。2018年6月,全球监管机构收到一批缬沙坦活性物质中存在N-亚硝基二甲胺(NDMA)的报告。随着事件发展,对潜在存在的亚硝胺杂质的调查扩展到了其他生产商以及相关的包材辅助设备。2018年国家药品监督管理局发布《化学药品与弹性密封

件相容性研究技术指导原则(试行)》中特别指出:亚硝胺、亚硝基类物质在现有分析技术条件下应不得检出(欧盟指令为亚硝胺浸出不得过0.01 mg/kg弹性体,亚硝基类物质浸出不得过0.1 mg/kg弹性体)。

本文使用岛津LCMS-9050超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱仪,建立了医用胶塞中13种亚硝胺基因毒性杂质的分析方法。该方法准确可靠,可用于医药胶塞生产企业质控检测提供相关的方案参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪,具体配置为:

系统控制器	: CBM-40lite	脱气机	: DGU-403
输液泵	: LC-40D XS × 2	柱温箱	: CTO-40S
自动进样器	: SIL-40C XS	质谱仪	: LCMS-9050
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118, Insight Ver. 4.0		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: ACE-C18 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5μm)		
流动相	: A:水; B:0.1% 甲酸甲醇		
进样体积	: 20 μL	柱温	: 40°C

流 速 : 0.8 mL/min 洗 针 液 : 甲醇/水=1:1 (v:v)

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 5%, 时间程序见表 1。

表 1. 液相梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Pumps	Pump B Conc.	65
9.00	Pumps	Pump B Conc.	70
9.10	Pumps	Pump B Conc.	100
11.00	Pumps	Pump B Conc.	100
11.10	Pumps	Pump B Conc.	5
14.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : APCI+ 雾化气流速 : 3.0 L/min
接口电压 : +4.5 kV 干燥气流速 : 5.0 L/min
接口温度 : 300°C 加热气流速 : 10.0 L/min
D L 温度 : 200°C 加热模块温度 : 200°C
扫描模式 : SIM (10 ppm)

表 2. SIM 参数

No.	名称	缩写	[M+H] ⁺
1	N-亚硝基二甲胺	NDMA	75.05529
2	N-亚硝基二乙胺	NDEA	103.0866
3	N-亚硝基二丁胺	NDBA	159.1492
4	N-亚硝基二异丁胺	NDiBA	159.1492
5	N-亚硝基二丙胺	NDPA	131.1179
6	N-亚硝基二异丙胺	NDiPA	131.1179
7	N-亚硝基吗啉	NMOR	117.0658
8	N-亚硝基哌啶	NPIP	115.0866
9	N-亚硝基-N-甲基苯胺	NMPhA	137.0709
10	N-亚硝基-N-乙基苯胺	NEPhA	151.0866
11	N-亚硝基二苄胺	NDBzA	227.1179
12	N-亚硝基-二乙醇胺	NDELA	135.0764
13	N-亚硝基吡咯烷	NPYR	101.0709

1.3 样品前处理

称取胶塞样品碎片 (约 10 g), 放入 100 mL 玻璃杯中, 加入 50 mL 20%乙醇水溶液, 超声提取 1 h。取 2 mL 提取溶液于离心管中, 12000 r/min 离心 5 min 后, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 上机检测。

2. 结果与讨论

2.1 灵敏度

配置 2 ng/mL 混标采用 SIM 模式进行灵敏度测试, 13 种亚硝酸胺峰形及灵敏度良好, 信噪比均大于 10。

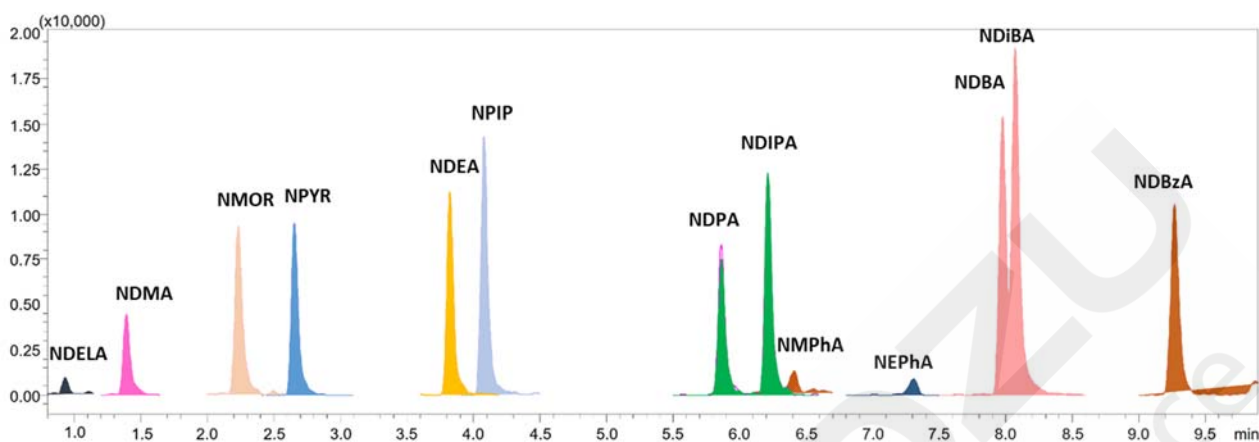


图 2. 13 种亚硝酸胺 MS 色谱图 (2 ng/mL)

2.2 校准曲线

分别配制 1、2、5、10、50、100 ng/mL 的 13 种混标溶液, 进样分析, 以化合物浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析, 13 种化合物在 1~50 ng/mL 浓度范围内线性良好, 相关系数大于 0.998。

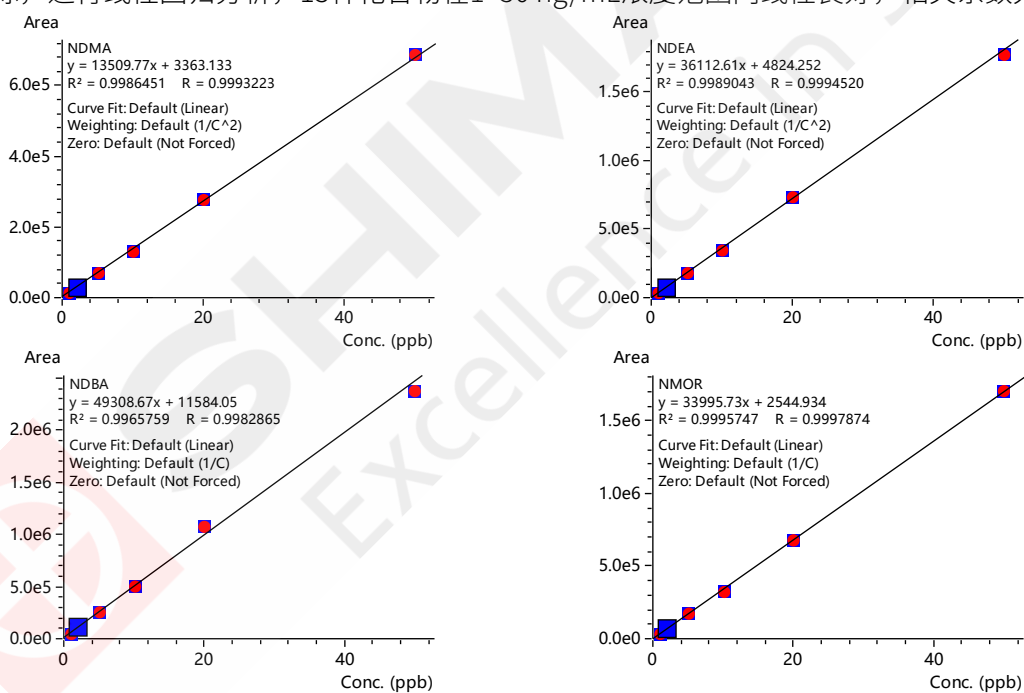


图 3. 部分亚硝酸胺校准曲线 (1-50 ng/mL)

2.3 重复性

取 2 ng/mL 标准溶液连续分析 6 次, 考察仪器的重复性, 测定结果见表 3。

表 3. 13 种亚硝胺重复性测试结果 (n=6)

No.	化合物	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
1	NDMA	0.047	1.64
2	NDEA	0.071	3.41
3	NDBA	0.045	2.21
4	NDiBA	0.048	0.56
5	NDPA	0.064	5.36
6	NDiPA	0.043	2.71
7	NMOR	0.011	2.06
8	NPIP	0.074	1.47
9	NMPhA	0.062	5.56
10	NEPhA	0.047	3.22
11	NDBzA	0.038	1.18
12	NDELA	0.104	2.51
13	NPYR	0.054	1.076

2.4 加标回收率

将空白基质样品进行5、20 ng/mL浓度加标后,按照上述前处理方法处理后上机,平行3份样品考察回收率和RSD,具体结果如下:平均加标回收率为96.20%-108.30%,RSD为0.48%-4.40%之间。

表 4. 13 种亚硝胺加标回收率和精密度结果 (n=3)

No.	化合物	添加浓度 (ng/mL)	平均实测浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
1	NDMA	5	5.073	101.46	2.23
		20	20.263	101.32	0.87
2	NDEA	5	5.122	102.44	1.19
		20	20.871	104.36	0.47
3	NDBA	5	5.189	103.79	1.44
		20	21.60	108.00	1.02
4	NDiBA	5	5.312	106.25	1.50
		20	21.662	108.30	0.69
5	NDPA	5	5.112	102.25	3.41
		20	20.151	100.76	1.37
6	NDiPA	5	5.178	103.65	1.65
		20	20.790	103.95	0.70
7	NMOR	5	5.096	101.94	1.13
		20	20.105	100.53	0.38
8	NPIP	5	5.213	104.25	0.48
		20	21.238	106.19	0.50

9	NMPHA	5	4.984	96.20	4.40
		20	20.140	100.70	3.98
10	NEPhA	5	4.807	96.14	4.31
		20	19.481	97.41	2.34
11	NDBzA	5	5.092	101.84	0.65
		20	20.358	101.79	0.24
12	NDELA	5	4.901	98.03	4.72
		20	20.767	103.84	4.44
13	NPYR	5	5.058	101.17	1.00
		20	20.367	101.84	0.96

2.5 未知样品检测

未知胶塞样品提取液，经上机分析后，样品中NDiBA有检出，其含量通过计算为0.034 ng/mL，低于法规检出要求 2 ng/mL。

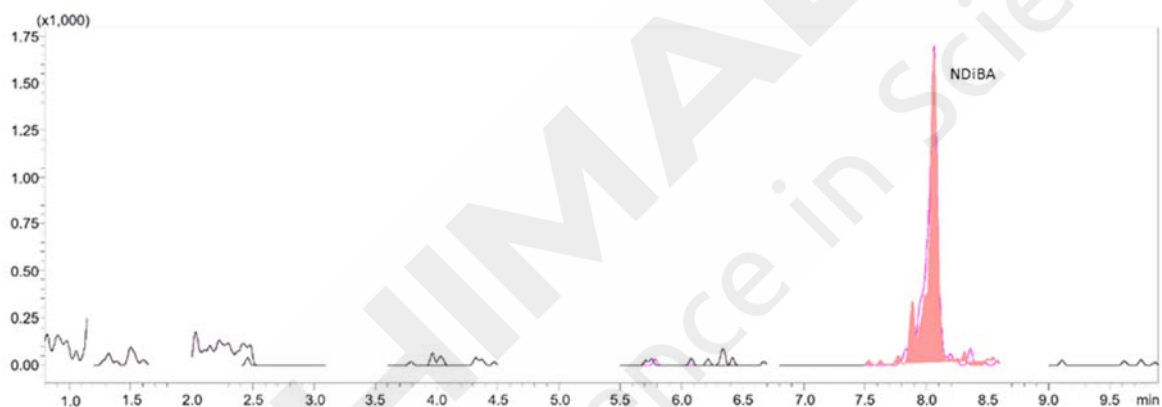


图4. 胶塞样品色谱图

3. 结论

本文利用岛津 LCMS-9050 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪，建立了医用胶塞中 13 种亚硝胺基因毒性杂质的检测方法。该方法满足《化学药品与弹性密封件相容性研究技术指导原则》法规中关于亚硝胺 0.01 mg/kg (2 ng/mL 溶液浓度) 的灵敏度要求，方法学考察中，线性、灵敏度、重复性和加标回收率良好，为胶塞中亚硝胺基因毒杂质含量检测研究提供参考。

第 7 章 Q-TOF 在临床研究中的应用

在临床研究领域，对疾病机制的深入理解、早期诊断方法的开发以及药物筛选效率的提升一直是科学家们不懈追求的目标。为了实现这些目标，代谢组学作为一门新兴的科学领域，逐渐崭露头角，为临床研究提供了全新的视角和强有力的工具。

代谢组学专注于研究生物体内源性小分子化合物，如氨基酸、糖类、有机酸、核苷酸及脂质等，旨在揭示这些分子在生物体受到外界刺激或遗传变异影响下的含量变化。这些变化的小分子不仅是生物体代谢状态的直接反映，更是疾病发生、发展和药物治疗效果的关键指标。因此，代谢组学的核心目标在于识别并解析这些变化的小分子，为疾病的早期诊断、病情监测以及药物筛选提供科学依据。

然而，代谢组学领域的研究并非一帆风顺。代谢物极性的广泛分布给全面分析带来了巨大挑战。传统的单一分析方法往往难以覆盖所有极性范围的代谢物，导致信息缺失和分析不准确。为了解决这一问题，业内开始探索双色谱分离策略，但这种方法不仅耗时较长，降低了分析效率，还容易产生数据冗余和交叉，为后续分析带来困扰。

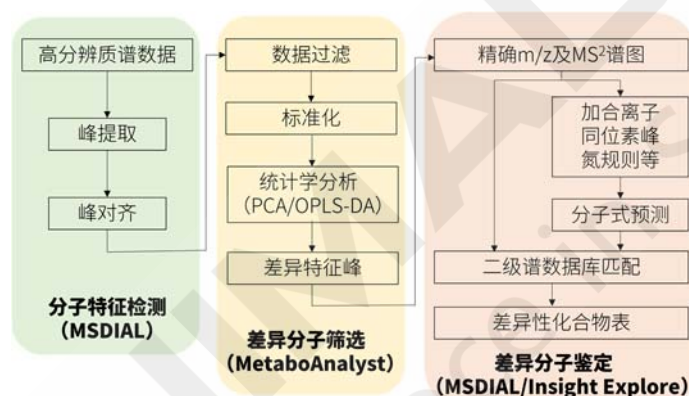


图 1. 非靶代谢组学数据处理流程

为解决这一难题，岛津推出了其创新的全谱二维液质系统，该系统凭借在线稀释专利技术、极性分流与双重梯度特色技术，成为代谢组学全组分分析的优选平台。该系统不仅能够作为宽极性多目标物数据库的通用分离工具，还实现了极性差异显著的两类关联物质的同时分析，极大提升了分析效率与灵活性。此外，系统内嵌的 UHPLC 子系统，更便于日常检测工作的顺利进行。

作为新一代多功能质谱前端平台，岛津全谱二维液质系统能够与三重四极杆和飞行时间质谱等高端分析仪器无缝对接，为复杂基质中宽极性痕量物质的定性、定量、筛查及深入分析提供了强大支持。本章将聚焦于岛津全谱二维液质系统（与 LCMS-9030 或 9050 联用）在非靶向代谢组学中的应用实践，旨在为相关领域的研究人员与从业者提供有价值的参考与启示。



图 2. 全谱二维液质联用系统

7.1 前列腺癌生物标志物筛选

摘要: 本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对前列腺癌患者和正常人的尿液外泌体样本进行了非靶向代谢组学分析。基于全谱二维液相系统,正和负模式下共得到 6840 个特征峰。偏最小二乘判断分析(PLS-DA)表明正常组与模型组有显著差异,共找到 451 种变量投影重要性(VIP)大于 1 的候选差异性代谢物,经数据库比对鉴定出 12 种差异性代谢物,主要影响的通路包括鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等。

关键词: 全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 外泌体

前列腺癌(prostatecancer, PCa)是一种较普遍的泌尿系统肿瘤,其发病率在世界范围内不断增加。PCa的早期筛查主要依赖直肠指诊和血清前列腺特异性抗原(PSA)检测,然而直肠指诊只能初步评估前列腺的基本情况,如大小、质地等,缺乏准确性。PSA也受良性前列腺增生及尿路感染等影响,对PCa诊断的特异性较差。因此,PCa的诊断和治疗急需准确、特异且无创的生物标志物。

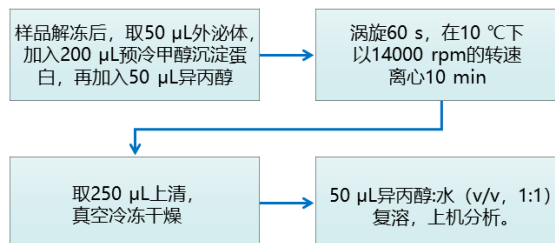
外泌体是细胞自发分泌的一种胞外囊泡,广泛存在于各类细胞,如尿液、血液、腹水及精液等,具有良好的稳定性及低毒性等特点,在肿瘤的发生、发展及血管生成和免疫调控中发挥着重要作用。因其具有独特囊泡结构及双层脂质膜,使其囊泡内核酸和肿瘤相关蛋白免遭外部酶的降解,故不少学者认为外泌体有可能成为PCa的非侵入性生物标志物。

代谢组学是研究特定生物体系中整体代谢物水平及其变化规律的独立学科,是疾病研究的重要手段之一。代谢组学研究中的一大困难是代谢物极性跨度大,难以用一种方法完成分析。本研究利用全谱二维液相系统,可以同时完成高极性和低极性的代谢物分析,大大节省了实验工作量和分析时间。该系统与岛津四极杆-飞行时间质谱LCMS-9030结合,可以进行宽极性目标物的非靶向代谢组学全组分研究。

本研究利用全谱二维液相-QTOF系统,以非靶向代谢组学的工作流程分析了前列腺癌患者与正常人的尿液外泌体样本,发现12种差异性代谢物,主要为脂质,此外还有有机酸、核苷酸等代谢产物,主要影响鞘脂代谢、泛酸和辅酶A的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成。

1. 实验部分

1.1 样品采集及处理



正常组与模型组各取 7 份样品进行分析,每份样品各取 5 μL ,制成质量控制(QC)样品。QC 样品在样品分析前连续进样 6 针,之后每分析 6 个样品插入 2 针 QC,通过 QC 样全程监测数据质量。

1.2 仪器

仪器由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用，其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱、一个定量环、一个高压十通阀构成，检测器为 LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪。具体配置为：

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40B XR × 2; LC-40B X3 × 2	自动进样器	: SIL-40C X3
定量环	: 500 μL	柱温箱	: CTO-40C
十通阀	: FCV-36AH	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.97

1.3 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: 第一维: Shim-pack GIST NH2, 100 mm×2.1mm I.D., 3 μm, P/N: 227-30291-05 第二维: Phenomenex Kinetex C8, 150 mm×2.1 mm I.D., 2.6 μm, P/N: 00F-4497-AN		
流动相	: 第一维: A相- 25mM 乙酸铵+25mM 氨水/水, B相-乙腈 第二维: A相-水, B相- 5mM 乙酸铵/乙腈: 异丙醇 (v/v, 6:4) +		
进样体积	: 2 μL	流速	: 0.4 mL/min
柱温	: 45 °C	洗脱方式	: 梯度洗脱 (表 1)

质谱条件

离子源	: ESI	接口温度	: 300 °C
接口电压	: +4.5 kV/ -3.5 kV	D L 温度	: 250 °C
雾化气	: 氮气 3.0 L/min	加热块温度	: 400 °C
干燥气	: 氮气 10.0 L/min	扫描模式	: MS1 SCAN (m/z 50-1000)
加热气	: 空气 10.0 L/min		MS2 DDA (m/z 50-1000)

表 1. 液相梯度时间程序

时间 (min)	单元	命令	值
0.00	泵	B.Conc	95
0.00	泵	B.Conc3	20
0.00	柱温箱	Oven Valve 2	0
1.90	柱温箱	Oven Valve 2	1
2.90	泵	B.Conc	95
15.90	泵	B.Conc	65
17.90	泵	B.Conc	40
19.90	泵	B.Conc	40
20.00	泵	B.Conc	95
20.00	泵	B.Conc3	20
20.30	柱温箱	Oven Valve 2	0
37.00	泵	B.Conc3	100
41.50	泵	B.Conc3	100
41.60	泵	B.Conc3	20
42.00	泵	B.Conc3	20
42.00	控制器	Stop	

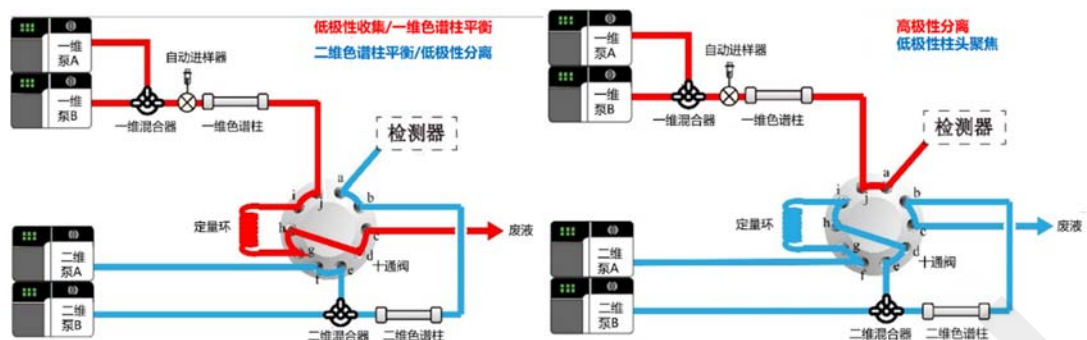


图 1. 全谱二维系统流程图 (左图: 初始状态; 右图: 切阀后)

1.4 数据处理

采用 Signpost MS 软件对谱图数据处理如离子提取、峰对齐等后, 将数据导入 MetaboAnalyst 和 SIMCA 软件进行统计分析, 找出差异性代谢物, 依据精确 m/z 及 MS^2 谱图在 MS DIAL 及 HMDB 等平台搜索确认代谢物种类, 然后在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。

2. 结果与讨论

2.1 色谱图与特征色谱峰

人尿液外泌体 QC 样品的基峰 (BPC) 色谱图如图 2 所示。与普通一维方法相比较, 全谱二维在 MS Dial 软件中检出亲水性小分子代谢物和亲脂性物质的数量有显著提升 (如图 3 所示), 也证实了全谱二维具有同时分离宽极性、多目标物的特点。

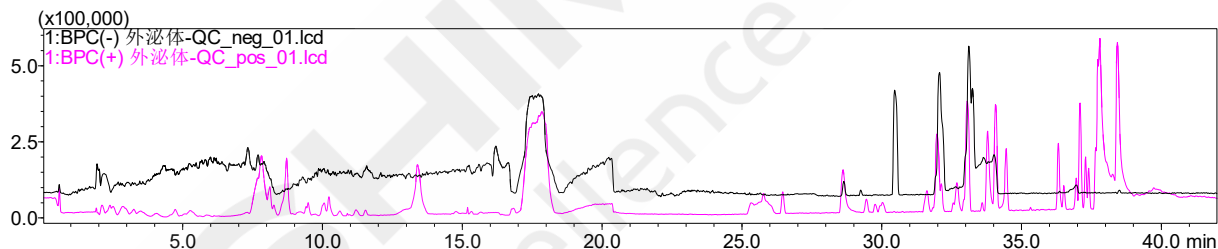


图 2. QC 样品 BPC 图 (红色: 正模式; 黑色: 负模式)

在正和负模式下, 将全谱二维采集的各数据导入 Signpost MS 软件, 提取峰表并对齐色谱峰后, 共得到 6840 个特征峰。随后对缺失值进行过滤, 利用“80%规则”(去除任何一组中出现频率都小于 80%的离子) 筛选特征峰, 且剔除在 QC 样品中峰面积 $RSD > 30\%$ 的特征峰, 最后, 将剩余特征峰导入 SIMCA 软件用于下一步统计分析 (如图 4 所示)。

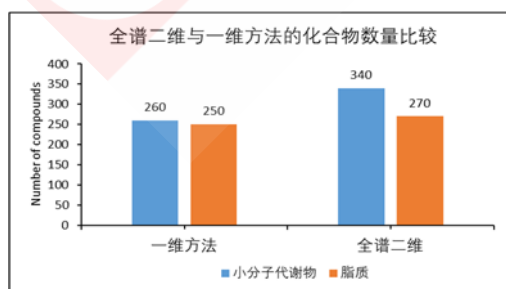


图 3. 全谱二维与一维方法化合物数量比较

将原始数据导入 Signpost MS 进行峰提取和峰对齐

经过“80%规则”筛选

剔除在 QC 样品中峰面积 $RSD > 30\%$ 的特征峰

将特征峰导入 SIMCA 软件用于统计分析

图 4. 数据预处理流程

2.2 差异性代谢物查找

将正常组、模型组与质控组数据导入 SIMCA 软件进行偏最小二乘判断分析 (PLS-DA), 结果显示, 质控组 (QC) 数据聚集性良好, 表明仪器状态稳定, 正常组与模型组可以明显地区分, 表明前列腺癌患者与正常人的尿液外泌体代谢产物有显著差异 (图 5)。

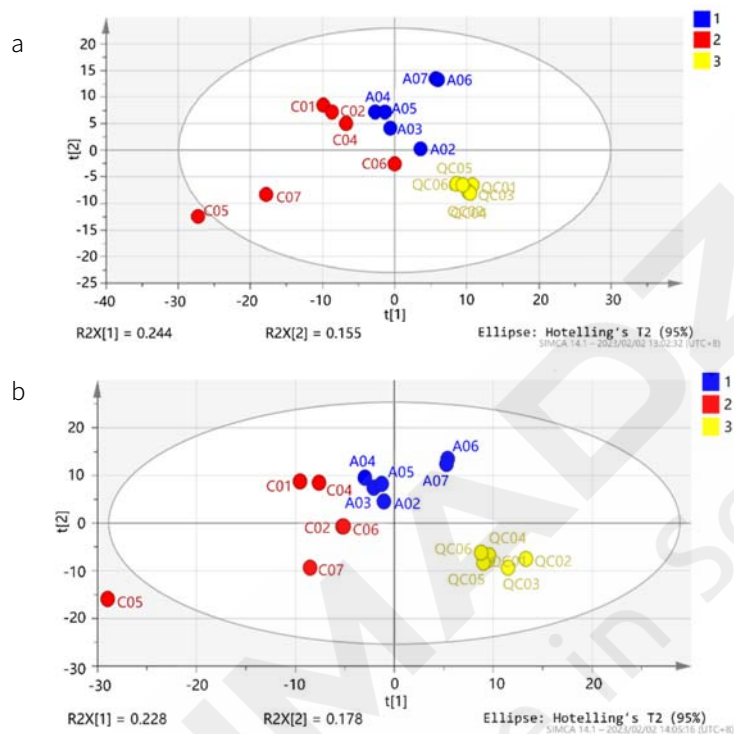


图 5. 偏最小二乘判断分析 (PLS-DA) 散点图

(图 a: 正模式; 图 b: 负模式; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 质控组)

以交叉验证的方式对上述 PLS-DA 模型进行验证, 结果表明: 正模式下载距 $R^2=0.816$, $Q^2=-0.366$, 负模式下载距 $R^2=0.369$, $Q^2=-0.264$, 模型可靠, 没有过拟合 (图 6)。

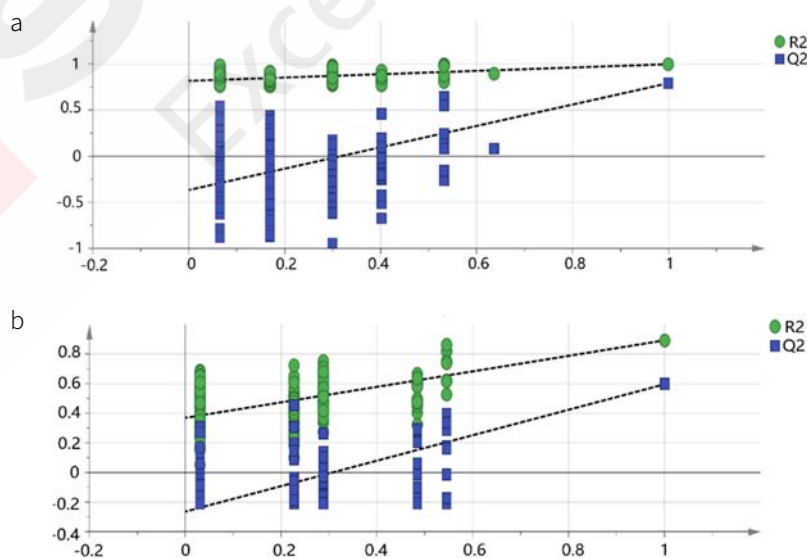


图 6. PLS-DA 200 次交叉验证结果 (图 a: 正模式; 图 b: 负模式)

通过变量投影重要性(variable importance of projection, VIP)筛选差异性代谢物。选取 VIP > 1 的特征峰, 认为对组间差异贡献较大, 是潜在的差异性代谢物。二维色谱正模式下候选差异性代谢物共 220 个, 负模式下候选差异性代谢物共 231 个 (图 7)。

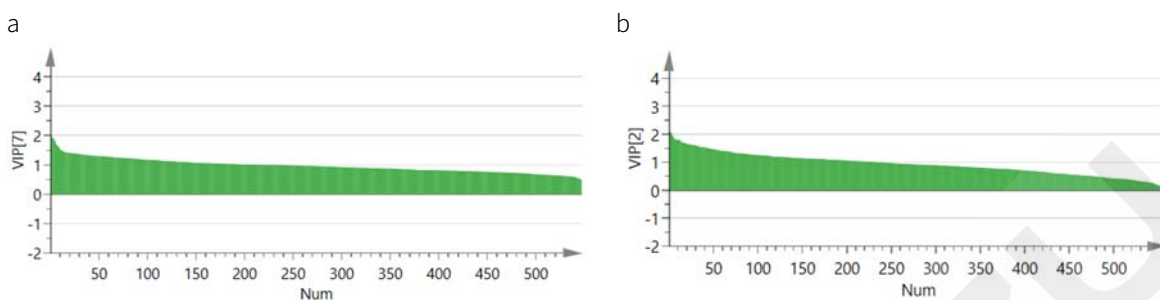


图 7. PLS-DA 各物质 VIP 值计算 (图 a: 正模式; 图 b: 负模式)

2.3 差异性代谢物鉴定

将所有 VIP > 1 的候选差异性代谢物进行 t 检验, 将 $p < 0.05$ 的物质谱图导入 MS-DIAL 软件, 通过精确 m/z 和 MS^2 谱图匹配进行鉴定 (图 8)。将所得结果与 HMDB 平台比对, 共鉴定出 12 种差异性代谢物; 所有物质质量测定误差 < 4 ppm; 11 种物质浓度水平上调, 另外 1 个浓度下调 (表 2)。

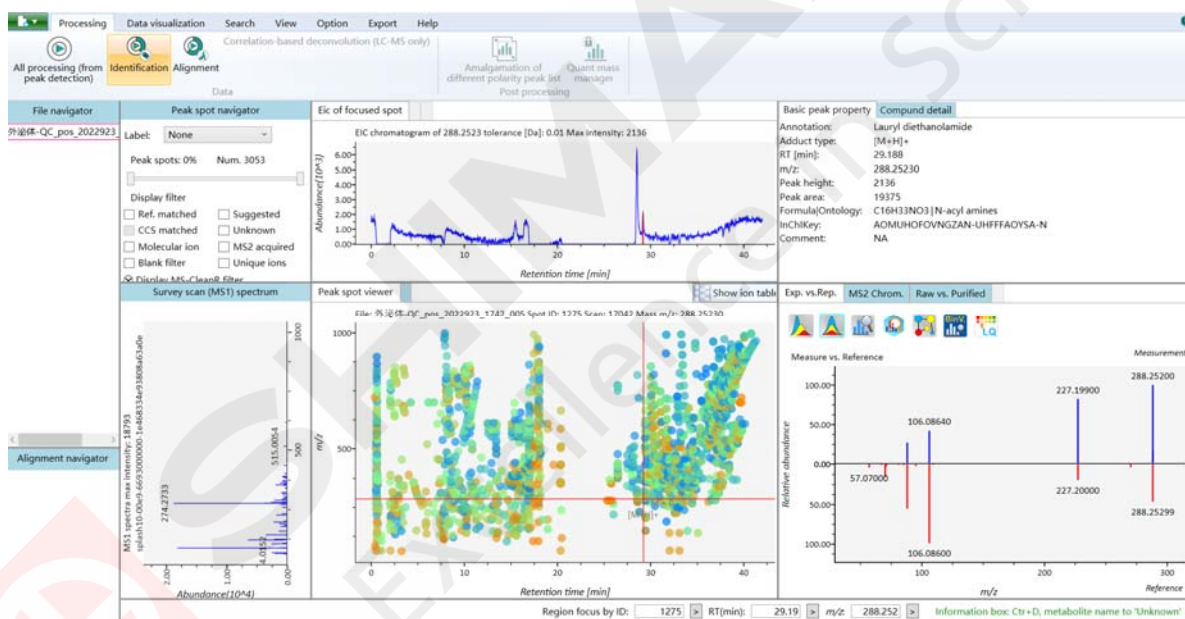


图 8. 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 2. 差异性代谢物鉴定结果表

编号	物质	模式	R.T. (min)	实测 m/z	理论 m/z	误差 (ppm)	上/下调
1	C17-sphinganine	+	5.08	288.2892	288.2900	2.77	↑
2	Pantothenic acid	+	16.41	220.1084	220.1080	1.82	↓
3	Lauryldiethanolamine	+	34.46	274.2740	274.2740	0.00	↑
4	D-ribo-Phytosphingosine	+	5.86	318.3026	318.3030	1.26	↑
5	Boldenone	+	32.52	453.3293	453.3310	3.75	↑
6	NAE 20:2	+	31.53	352.3204	352.3210	1.70	↑
7	NAE 20:1	+	32.24	354.3358	354.3367	2.54	↑

8	Octadecanoic acid	-	38.72	283.2632	283.2640	2.82	↑
9	Pseudouridine	-	8.54	243.0618	243.0620	0.82	↑
10	C10-LAS	-	27.39	297.1518	297.1520	0.67	↑
11	Lignoceric acid	-	35.60	367.3593	367.3590	0.82	↑
12	2-acetoxy-6-pentadecylbenzoic acid	-	37.69	389.2691	389.2680	2.83	↑

*: ↑ 上调, ↓ 下调

2.4 通路分析

将表 2 中鉴定出的 12 个物质导入 MetaboAnalyst 平台进行通路分析, 发现前列腺癌患者尿液外泌体主要受影响的代谢通路有鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等 (图 9)。

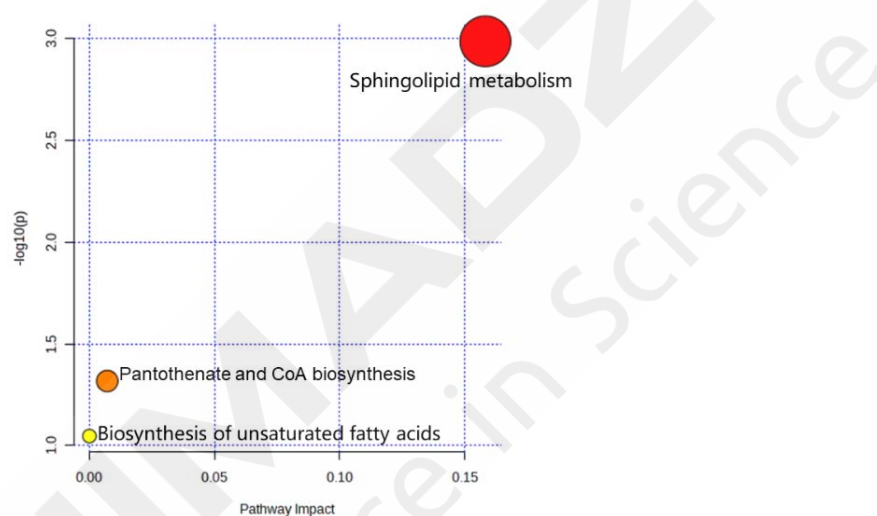


图 9. 前列腺癌患者尿液外泌体受影响的主要代谢通路

3. 结论

本文利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用, 对前列腺癌患者和正常人尿液外泌体样本进行了非靶向代谢组学研究。PLS-DA 分析表明, 正常组与模型组尿液外泌体成分有显著区别, 利用 VIP 值 > 1 筛查到 451 种差异性代谢物, 通过准确 m/z 及 MS² 库搜索鉴定出 12 种差异性代谢物。这些差异性代谢物主要影响鞘脂代谢、泛酸和辅酶 A 的生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成等。本研究增进了对前列腺癌生物标志物筛选的认识, 同时表明全谱二维液相系统作为一种有力的工具可帮助研究者一次性分析极性跨度更大的代谢物。

7.2 4in1 组学技术对小鼠动脉粥样硬化的代谢组和脂质组学研究

摘要: 本文使用岛津特色产品全谱二维液相+LCMS-9050, 采用宽极性、正负离子同时扫描模式对动脉粥样硬化模型小鼠血浆样本进行了非靶向代谢组学和脂质组学分析。通过对疾病组、对照组和 QC 质控组数据进行单因素 (Fold Change 和 T 检验) 和多元统计分析 (PCA 和 OPLS-DA) 筛查差异性代谢物, 以及比对 MS¹ 和 MS² 谱图共找到 110 个差异成分, 涉及氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 等内源物, 为小鼠动脉粥样硬化的代谢组学和脂质组学研究提供应用参考。

关键词: 4in1组学技术 小鼠动脉粥样硬化 代谢组学 脂质组学

技术特点:

- ❖ 体现 4 in 1 组学技术特色, 适合非靶向代谢组学和脂质组学分析。
- ❖ 结合 MetaboAnalyst、MS DIAL 等多种数据处理方式筛查与鉴定差异性代谢物。

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是一种常见的大动脉疾病, 是动脉管壁的一种长期的慢性炎症性疾病, 也是动脉硬化的主要原因, 是导致动脉壁增厚和失去弹性的疾病。随着世界人口中年龄因素以及越来越多的肥胖患者和糖尿病患者的出现, AS 及其并发症 (冠心病) 每年导致的人类死亡人数高居不下, 严重危害人类健康。因此探寻有效的干预药物对于防治动脉粥样硬化相关疾病具有重要意义。

本文采用岛津 4in1 代谢组学技术, 利用全谱二

维和四极杆飞行时间质谱 LCMS-9050 联用系统, 对动脉粥样硬化小鼠血浆样本进行宽极性目标物的非靶向代谢组学和脂质组学的全组分研究, 共发现 110 个差异性代谢物, 包括氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 等内源物。该技术实现了 1 针分析即可达到传统 4 针分析效果, 节省了 3/4 的实验工作量和分析时间, 且极大减少质谱负担。本文为 4in1 组学技术的应用提供相关案例参考。

1. 实验部分

1.1 动脉粥样硬化小鼠模型构建

以喂食普通饲料小鼠作为对照组, 以喂食高脂饲料小鼠作为疾病模型组, 喂养 12 周后, 进行模型的评价。包括血脂水平检测, ELASA 法检测炎症因子, 免疫荧光检测主动脉巨噬细胞的表达, 以及 HE 染色, masson 染色评价主动脉病变情况。

1.2 样品采集及处理

取 50 μ L 血浆放入 EP 管中, 加入 250 μ L 预冷的甲醇/异丙醇 (4:1, v/v), 涡旋混匀, 放置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱, 沉淀蛋白, 离心 10 min (13000 rpm, 4 $^{\circ}$ C), 取上清液, 干燥, 加入 100 μ L 的异丙醇/水 (1:1, v/v), 涡旋复溶, 离心取上清液, 用于进样分析。各待测物上清液均匀混合, 制为 QC 样本, 进样分析。

1.3 仪器



图 1. 岛津全谱二维液相色谱与四极杆飞行时间质谱联用系统

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用，其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱、一个定量环、一个十通阀构成，检测器为 LCMS-9050 四极杆飞行时间质谱仪。具体配置为：

系统控制器	: CBM-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XS × 4	自动进样器	: SIL-40C XS
定量环	: 500 μ L	柱温箱	: CTO-40C
十通阀	: FCV-36AH	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114

1.4 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: 第一维: Shim-pack Velox HILIC (150 mm x 2.1 mm I.D., 2.7 μ m, P/N: R227-32025-04, 岛津(上海)实验器材有限公司) 第二维: Shim-pack GIST C18-AQ HP (150 mm x 3 mm I.D., 3 μ m, P/N: 227-30766-05, 岛津(上海)实验器材有限公司)		
流动相	: 第一维: A相-5 mM 乙酸铵, B相-乙腈; 第二维: A相-0.1%甲酸水, B相-乙腈		
进样体积	: 2 μ L	柱温	: 40 $^{\circ}$ C
流速	: 第一维: 0.35 mL/min; 第二维: 0.3 mL/min		
洗脱方式	: 梯度洗脱 (表 1~3)		

表 1. 一维液相色谱的时间程序 (初始流动相 B 为 90%)

时间(min)	单元	处理命令	值
1.5	泵	B.Conc	90
4.0	泵	B.Conc	88
11.0	泵	B.Conc	85
14.0	泵	B.Conc	85
20.0	泵	B.Conc	80
22.0	泵	B.Conc	60
22.1	泵	B.Conc	90
45.0	控制器	Stop	

表 2. 二维液相的时间程序 (初始流动相 B 为 20%)

时间(min)	单元	处理命令	值
24.0	泵	B.Conc3	20
25.0	泵	B.Conc3	70
33.0	泵	B.Conc3	80
35.0	泵	B.Conc3	90
40.0	泵	B.Conc3	90
42.0	泵	B.Conc3	95
43.0	泵	B.Conc3	100
43.1	泵	B.Conc3	20
45.0	控制器	Stop	

表 3. 阀切换程序 (初始 Oven Valve 2=0)

时间(min)	单元	处理命令	值
1.70	柱温箱	Oven Valve 2	1
24.0	柱温箱	Oven Valve 2	0
45.0	控制器	Stop	

质谱条件

离子源	: ESI	接口温度	: 300 °C
接口电压	: +4.5 kV	DL 温度	: 250 °C
雾化气	: 氮气 3.0 L/min	加热块温度	: 400 °C
干燥气	: 氮气 10.0 L/min	扫描模式	: MS1 SCAN (m/z 50-1000)
加热气	: 空气 10.0 L/min		MS2 DDA (m/z 50-1000)

1.5 数据处理

① 采用 MS DIAL 软件对原始数据 (对照组、疾病组和 QC 组) 进行峰提取、对齐, 得到 Data Matrix; ② 将 Data Matrix 导入 MetaboAnalyst 平台进行数据过滤、归一化处理、单因素统计分析 (Fold Change 和 T 检验)、多元统计分析 (PCA 和 OPLS-DA), 找出差异性特征峰; ③ 依据精确 m/z 及 MS^2 谱图在 MS-DIAL 软件及 HMDB 平台搜索确认代谢物种类及生信分析。



图 2. 代谢组学数据处理基本思路

2. 结果与讨论

2.1 不同色谱方法比较

将 QC 样品分别使用 HILIC 方法、RPLC 方法和全谱二维方法分析。由 BPC 色谱图结果显示, RPLC 色谱峰在死时间有较多共流出组分, 且低极性组分分离度不佳; HILIC 色谱图上在死时间也同样出现较多共流

出组分峰，不利于后续代谢组学分析。全谱二维色谱方法结合了 HILIC 和 RPLC 这两者的优势，将低极性与高极性目标物分别转移至各自适合的色谱体系中进行分离，有效地提高了峰容量与分离度，MS 色谱图见图 5。

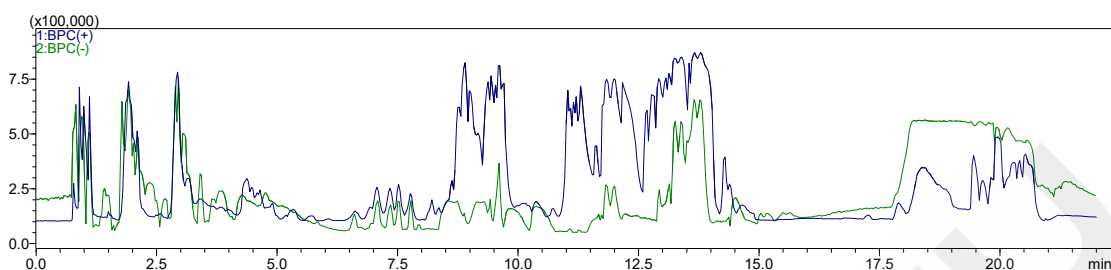


图 3. QC 样品 BPC 色谱图 (HILIC 方法)

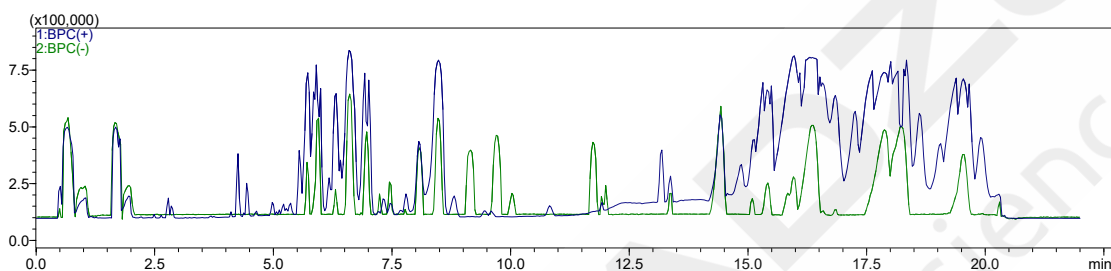


图 4. QC 样品 BPC 色谱图 (RPLC 方法)

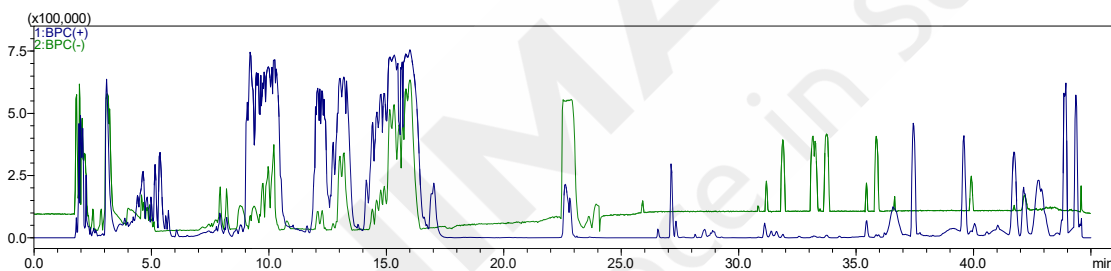


图 5. QC 样品 BPC 色谱图 (全谱二维液质联用方法)

2.2 差异性代谢物查找

2.2.1 主成分分析 (PCA)

将对照组、模型组与 QC 质控样品数据导入 MetaboAnalyst 进行主成分分析 (PCA)，结果显示，各组样本之间表现出明显的分离趋势，表明动脉粥样硬化小鼠与正常小鼠血浆代谢产物差异显著；质控组中的平行样本聚集度高，表明仪器状态稳定，测定过程中未出现明显偏差，说明各组血浆代谢产物数据的稳定性较好。

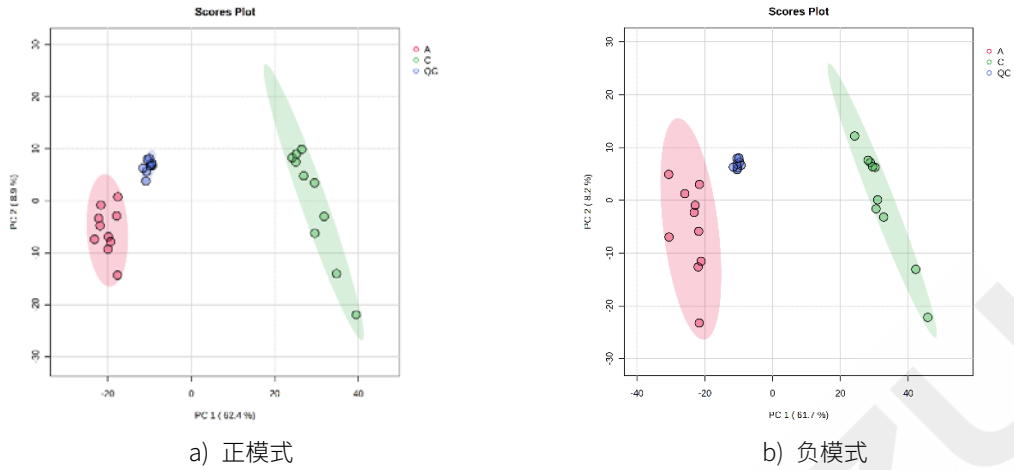


图 6. PCA 得分图 (A: 模型组, C: 对照组, QC: 质控)

2.2.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

对照组与模型组的 OPLS-DA 分析结果如图 7 所示, 模型中各组样品均位于 95%置信区间内, 2 组样本点完全分离, 无重叠区域, 区分效果较好, 表明动脉粥样硬化小鼠与正常小鼠血浆代谢产物具有显著差异。

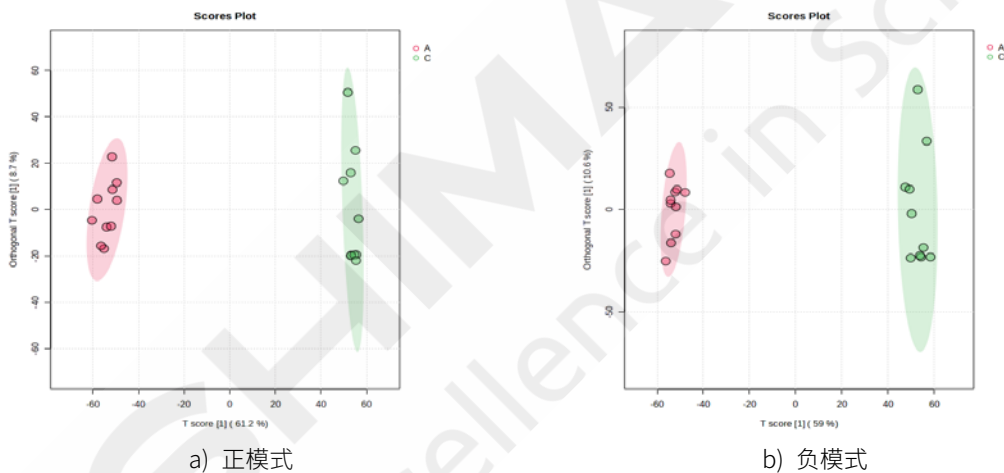


图 7. OPLS-DA 得分图 (A: 模型组, C: 对照组)

此外, 模型验证结果见图 8, R2Y 和 Q2 分别代表所建模型的拟合度和预测能力, 它们的值越接近于 1 表明模型的拟合度越好, 可信度越高, 正离子模式下 R2Y=0.989, Q2=0.987, 负离子模式下 R2Y=0.982, Q2=0.981, 表明模型稳健可靠。

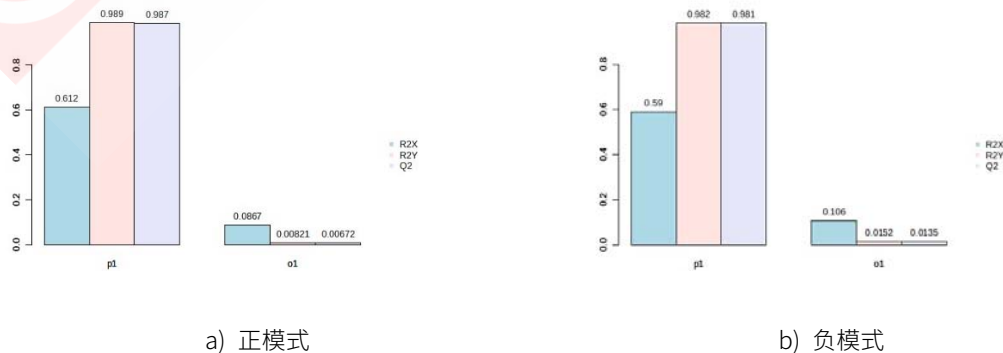


图 8. 模型验证图

对模型进行置换检验，通过观察模型在 100 次随机置换检验，绘制置换检验图（图 9）。结果表明，正模式和负模式下 P 值均小于 0.01，模型没有过拟合。

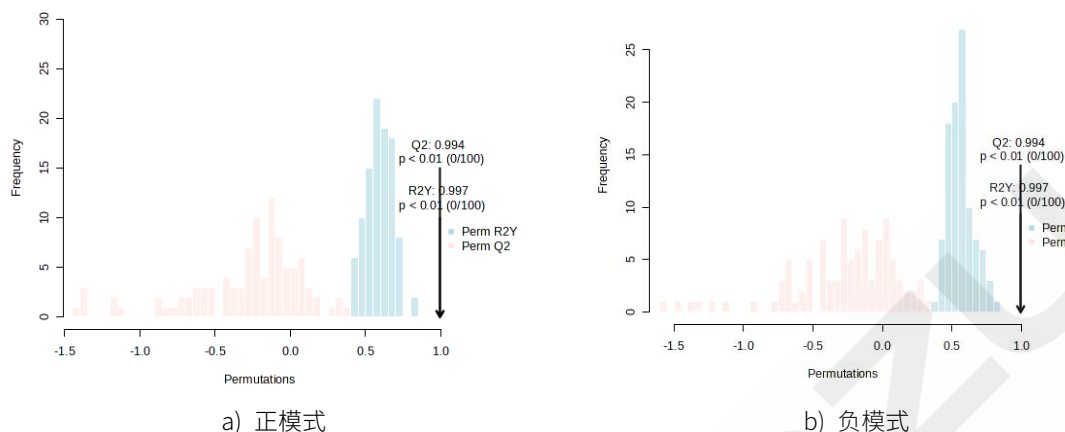


图 9. OPLS-DA 100 次置换检验结果

2.2.3 差异代谢物火山图

对正、负模式下检测到的所有离子峰进行差异分析，采用火山图进行可视化展示（图 10），动脉粥样硬化小鼠与正常小鼠在正离子和负离子模式下共筛选出差异表达离子峰分别为 3291 和 3068 个，其中正模式下浓度水平上调的离子峰有 2128 个、下调有 1163 个，负模式上调的有 2050 个、下调的有 1018 个。

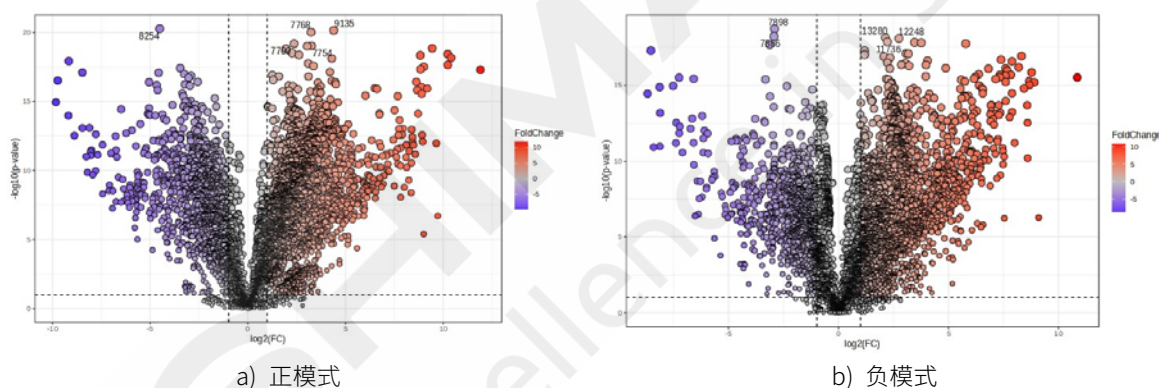


图 10. 对照组和模型组的火山图

2.2.4 结合单变量和多元统计分析结果筛选差异物

通过变量投影重要性(Variable Importance of Projection, VIP)筛选差异性代谢物。选取 VIP > 1 的特征峰，认为对组间差异贡献较大，是潜在的差异性代谢物。将所有 VIP > 1 的候选差异性代谢物进行单变量统计结果 (P-value 与 Fold change) 筛选，将 Fold change ≤ 0.5 / Fold change ≥ 2 且 P-value < 0.05 的物质取交集。最终正模式下筛选得到 2692 个差异物质，负模式下筛选得到 1716 个差异物质，即认为是本实验中模型组与对照组的差异性代谢物。

2.3 差异性代谢物鉴定

使用 MS-DIAL 软件，通过精确 m/z 和 MS² 谱图匹配对得到的差异离子峰进行鉴定（图 11）。剔除外源性物质等不可能存在于小鼠血浆中的物质，将所得结果与 HMDB 平台比对，共鉴定出 110 个差异性代谢物，包括氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺 (LPE)、溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 等内源代谢物，表 4 为部分差异性代谢物鉴定结果表。相对于对照组，模型组的 61 种物质浓度水平上调，另外 49 种物质浓度下调。所有化合物

质荷比测定误差 < 3 ppm。

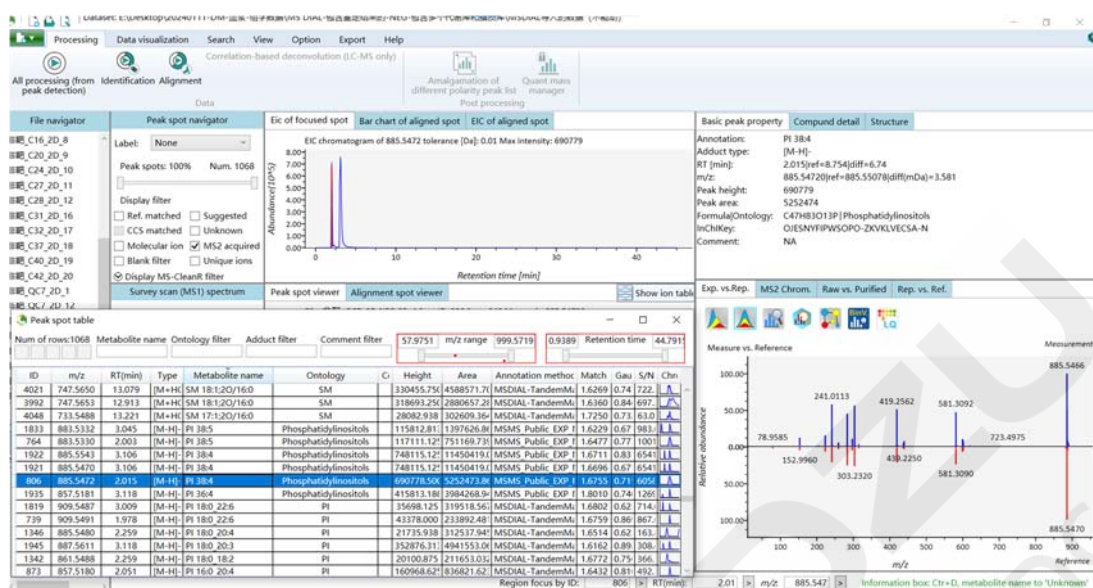


图 11. 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 4. 部分差异性代谢物鉴定结果表 (VIP>1, p<0.05, FC≤0.5 或 FC≥2)

编号	内源物	加合方式	实测 m/z	理论 m/z	误差 (ppm)	R.T. (min)	上/下调*
1	2-Hydroxybutyric acid	[M-H]-	103.0393	103.0392	0.97	2.80	↑
2	L-Carnitine	[M+H]+	162.1123	162.1125	-1.23	23.10	↑
3	L-Tyrosine	[M-H]-	180.0658	180.0660	-1.11	8.41	↑
4	O-ACETYLCARNITINE	[M+H]+	204.1230	204.1230	0.00	22.81	↑
5	Pantothenate	[M-H]-	218.1031	218.1034	-1.33	2.88	↑
6	D-erythro-Sphingosine	[M+H]+	300.2897	300.2897	0.00	2.94	↑
7	Arachidonic acid	[M-H]-	303.2318	303.2320	-0.63	1.96	↓
8	Docosahexanoic acid	[M-H]-	327.2318	327.2327	-2.75	30.78	↓
9	Stearoyl-L-Carnitine	[M+H]+	428.3728	428.3734	-1.40	12.47	↑
10	LPE O-16:1	[M+H]+	438.2971	438.2979	-1.83	7.59	↑
11	1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	[M+H]+	454.2927	454.2928	-0.22	8.19	↑
12	LPE O-18:1	[M-H]-	464.3142	464.3146	-0.86	7.26	↑
13	LPE 18:0	[M-H]-	480.3097	480.3096	0.27	7.08	↑
14	LPC 16:1-SN2	[M+H]+	494.3239	494.3241	-0.40	15.49	↑
15	LPE 20:4	[M-H]-	500.2779	500.2783	-0.72	7.77	↓
16	LPC O-18:1	[M+H]+	508.3758	508.3762	-0.79	14.06	↑
17	LPG 18:1	[M-H]-	509.2889	509.2884	0.98	3.82	↑
18	LPC 17:0-SN1	[M+H]+	510.3551	510.3554	-0.59	15.41	↓
19	1-heptadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	[M+H]+	510.3552	510.3554	-0.39	15.48	↓
20	LPC O-18:0	[M+H]+	510.3914	510.3918	-0.78	16.28	↑

*: ↑ 上调, ↓ 下调

2.4 通路分析

使用 KEGG 数据库，将鉴定得到的 110 个差异代谢物在 MetaboAnalyst 平台进行通路富集分析，综合统计学 P 值和路径影响结果，发现影响的通路主要有磷脂生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成等（图 12~13）。

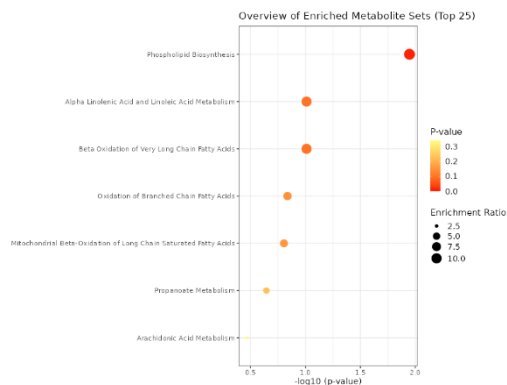


图 12. Metabolites 富集分析

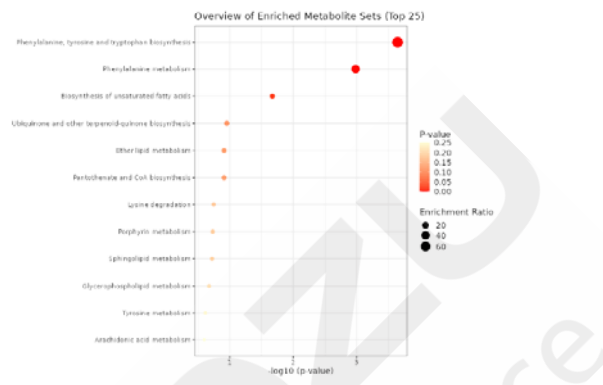


图 13. Lipids 富集分析

3. 结论

本文通过代谢组学研究方法，利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用仪，非靶向分析动脉粥样硬化小鼠血浆样品的内源代谢物变化。统计结果表明，质控组数据聚集性强；模型组与对照组血浆成分有显著区别。通过准确 m/z 及 MS^2 库搜索鉴定出 110 种内源物，包括氨基酸、溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）、溶血磷脂酰胆碱（LPC）等。这些差异性代谢物主要影响磷脂生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成等。本研究表明全谱二维液相系统是宽极性、多组分数据库“通用型”分离平台，扩大了代谢物分析的极性范围，加上高分辨质谱 LCMS-9050 具有正负模式同时扫描功能，可节省 3/4 的样品分析时间，能帮助代谢组学和脂质组学研究者一次分析极性跨度更大的代谢物。

7.3 人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠初步代谢机理研究

摘要: 本文利用全谱二维液相系统结合四极杆-飞行时间质谱对人参二醇皂苷组分不同剂量给药后的阿尔茨海默症小鼠血浆样本进行了非靶向代谢组学分析。基于全谱二维液相系统, 正模式下共得到 4679 个特征峰。偏最小二乘判断分析 (PLS-DA) 表明模型组与给药组有显著差异, 共找到 457 种变量投影重要性 (VIP) 大于 1 的候选差异性代谢物, 经数据库比对鉴定出 5 种差异性代谢物, 主要影响的通路包括精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成等。

关键词: 全谱二维液相 四极杆-飞行时间质谱 人参二醇皂苷 阿尔茨海默症

技术特点:

- ❖ 采用全谱二维液相结合 Q-TOF, 实现宽极性目标物的非靶向代谢组学分析。
- ❖ 结合 Signpost MS、SIMCA、MS-DIAL 等多种数据处理软件进行差异代谢物筛查与鉴定。

阿尔茨海默病 (AD), 是一种发展较为缓慢的神经系统退行性疾病, 临床上主要表现为记忆力逐步衰减、不同程度的认知障碍等症状。其病程较长且难以彻底治愈。目前尚缺乏治疗 AD 的有效药物, 西药的治疗效果一般, 且易产生耐药性。

传统中草药具有多成分、多靶点的优势, 特别是人参皂苷治疗 AD 成为了近年来的研究热点。人参皂苷有很好的神经保护作用, 对抗 AD 有明显作用。前期研究发现, 一种人参二醇皂苷组分 (包括 Rb1、Rb3 和 Rd) 对 3-硝基丙酸所致的神经退化动物模型的治疗效果明显优于人参总皂苷或单体皂苷, 而人参三醇皂苷提取物则对上述模型没有显示治疗作用。人参二醇皂苷包括 Rb1、Rb2 等 Rb 组分, 具有镇静作用; 相反, 三醇类皂苷包括 Re、Rf 等, 具有兴奋性作用。目前国际上大多数对人参皂苷研究仅限于人参总皂苷或某几种单体皂苷的中枢神经系统保护作

用。因此, 本文希望进一步探究不同剂量下的人参二醇皂苷组分对 AD 小鼠的初步代谢机理。

由于代谢物极性跨度大, 难以用一种方法完成分析。目前普遍采用两种色谱分离方法, 如亲水色谱柱和反相色谱柱。但此方式往往需要耗费双倍的前处理和分析时间, 且会产生双份数据, 定性分析难度高。本研究利用全谱二维液相系统, 可以进行宽极性目标物的非靶向代谢组学的全组分研究, 将分析时间缩短 1/2。

本研究利用全谱二维液相-QTOF 系统, 以非靶向代谢组学的研究方法分析了人参二醇皂苷组分不同剂量给药后的阿尔茨海默症小鼠血浆样本, 共发现 5 种差异性代谢物, 主要为氨基酸、核苷和脂肪酸类, 主要影响精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成。

1. 实验部分

1.1 样品采集及处理



模型组与 2 种给药组各取 3~4 份样品进行分析，每份样品各取 5 μL ，均匀混合，制成质量控制 (QC) 样品。QC 样品在样品分析前连续进样 6 针，之后每分析 6 个样品插入 2 针 QC，通过 QC 样全程监测数据质量。

1.2 仪器

岛津全谱二维液质系统拥有在线稀释专利技术和极性分流、双重梯度特色技术，是岛津独家产品，适合于代谢组学中全组分分析，可作为宽极性多目标物数据库的通用分离平台，并适用于极性相差较大的两类关联物质的同时分析，而且该系统内含一个 UHPLC 子系统，方便日常常规检测。该系统为新一代多功能质谱前端平台，可与三重四极杆和飞行时间质谱联用，助力复杂基质中宽极性痕量物质的定性、定量、筛查和分析。



图 1. 岛津全谱二维液质系统

本文使用全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用，具体配置为：

系统控制器	: SCL-40	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40B XR \times 2; LC-40B X3 \times 2	自动进样器	: SIL-40C X3
定量环	: 500 μL	柱温箱	: CTO-40C
十通阀	: FCV-36AH	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114

1.3 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: 第一维: Hillic 色谱柱, 150 mm \times 2.1mm I.D., 3 μm ; 第二维: C8 色谱柱, 150 mm \times 2.1 mm I.D., 2.6 μm		
流动相	: 第一维: A 相-0.1%甲酸+5mM 乙酸铵/水: 乙腈 (v/v, 95: 5) ; B 相-0.1%甲酸+5mM 乙酸铵/水: 乙腈 (v/v, 5: 95) 第二维: A 相-水; B 相- 5mM 乙酸铵/乙腈: 异丙醇 (v/v, 6:4)		
进样体积	: 2 μL	流速	: 0.4 mL/min

柱温 : 45 °C

洗脱方式 : 梯度洗脱 (表 1)

质谱条件

离子源 : ESI

接口温度 : 300 °C

接口电压 : +4.5 kV

D L 温度 : 250 °C

雾化气 : 氮气 3.0 L/min

加热块温度 : 400 °C

干燥气 : 氮气 10.0 L/min

扫描模式 : MS1 SCAN (m/z 50-1000)

加热气 : 空气 10.0 L/min

MS2 DDA (m/z 50-1000)

表 1. 液相梯度时间程序

时间 (min)	单元	命令	值
0.00	泵	B.Conc	90
0.00	泵	B.Conc3	20
0.00	柱温箱	Oven Valve 2	0
1.50	泵	B.Conc	90
2.00	柱温箱	Oven Valve 2	1
18.00	泵	B.Conc3	20
20.00	泵	B.Conc	60
22.00	泵	B.Conc	60
22.00	柱温箱	Oven Valve 2	0
22.10	泵	B.Conc	90
35.00	泵	B.Conc3	100
39.50	泵	B.Conc3	100
39.60	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc	90
40.00	控制器	Stop	

1.4 数据处理

首先采用 Signpost MS 软件和 MetaboAnalyst 平台对原始数据进行峰的提取、对齐、匹配、峰强度校正和归一化处理, 再将数据导入 SIMCA 软件进行统计分析, 找出差异性代谢物, 依据精确 m/z 及 MS² 谱图在 MS-DIAL 软件及 HMDB 平台搜索确认代谢物种类, 然后在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析 (如图 2 所示)。



图 2. 代谢组学数据处理流程图

2. 结果与讨论

2.1 色谱图与特征色谱峰

小鼠血清 QC 样品的基峰 (BPC) 色谱图如图 3 所示。将各组数据文件导入 Signpost MS 软件, 根据强度阈值提取峰表并对齐色谱峰后, 共得到 4679 个特征峰。随后对数据进行归一化处理, 利用“80%规则”(去除任何一组中出现频率都小于 80%的离子) 筛选特征峰, 且剔除在 QC 样品中峰面积 RSD>30%的特征峰, 共找到 1078 个特征峰, 将其导入 SIMCA 软件用于统计分析, 用于进一步统计分析。

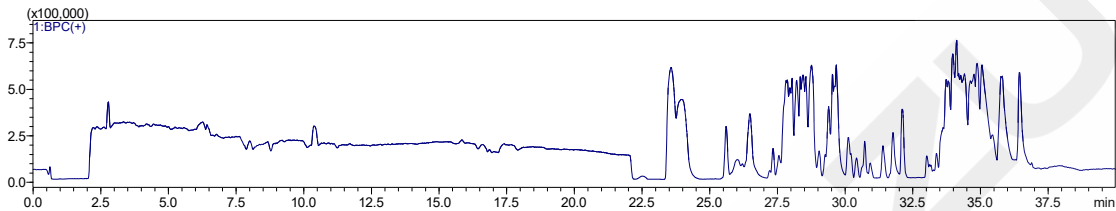


图 3. QC 样品 BPC 图 (正模式)

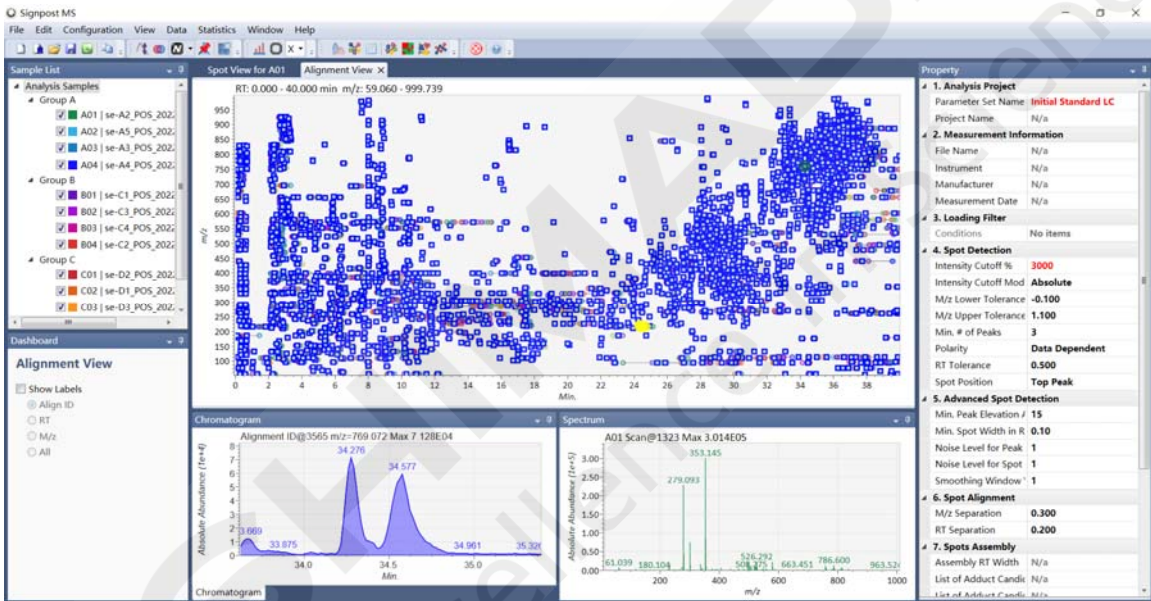


图 4. Signpost MS 峰提取与峰对齐

2.2 差异性代谢物查找

将模型组、给药组与质控组数据导入 SIMCA 软件进行偏最小二乘判断分析 (PLS-DA), 结果显示, 质控组 (QC) 数据聚集性良好, 表明仪器状态稳定。模型组与 2 种不同剂量给药组之间区分明显, 且给药组-高剂量与模型组的区分更为显著 (图 5)。

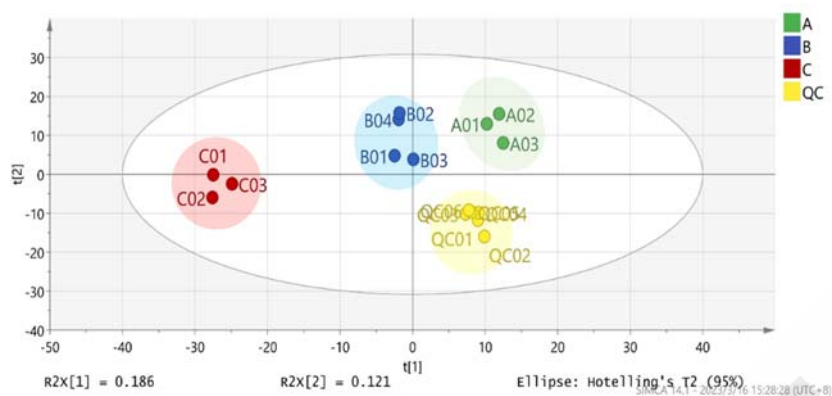


图 5. 偏最小二乘判断分析 (PLS-DA) 散点图

(A: 模型组; B: 给药组-低剂量; C: 给药组-高剂量; QC: 质控组)

以交叉验证的方式对上述 PLS-DA 模型进行验证, 结果表明: 截距 $R^2=0.414$, $Q^2=-0.217$, 模型可靠, 没有过拟合 (图 6)。

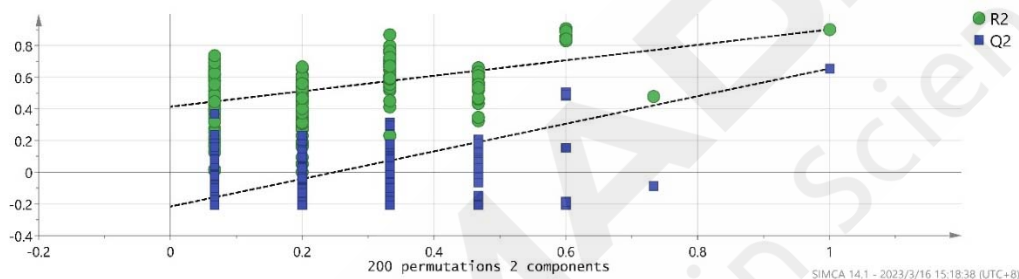


图 6. PLS-DA 200 次交叉验证结果

通过变量投影重要性(variable importance of projection, VIP)筛选差异性代谢物。选取 $VIP > 1$ 的特征峰, 认为对组间差异贡献较大, 是潜在的差异性代谢物。正模式下候选差异性代谢物共 457 个 (图 7)。将所有 $VIP > 1$ 的候选差异性代谢物进行 t 检验, 将 $p < 0.05$ 的物质取交集, 共得到 92 个特征峰, 即认为是本实验中模型组与给药组的差异性代谢物。

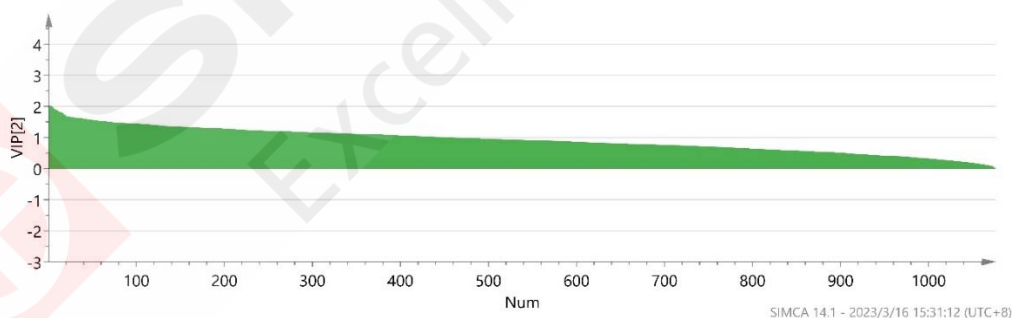


图 7. PLS-DA 各物质 VIP 值计算

2.3 差异性代谢物鉴定

使用 MS-DIAL 软件, 通过精确 m/z 和 MS^2 谱图匹配对得到的 92 个特征峰离子进行鉴定 (图 8)。剔除 HMDB 平台中无搜索结果物质, 以及植物源性物质等不可能存在于小鼠血浆中的物质, 得到表 2, 主要包括氨基酸、核苷和脂肪酸类物质。相对于模型组, 给药组的 4 种物质浓度水平上调, 另外 1 个浓度下调。将所得结果与 HMDB 平台比对, 共鉴定出 5 种差异性代谢物; 所有物质质量测定误差 < 2 ppm (表 2)。



图 8. 利用 MS-DIAL 鉴定差异性代谢物

表 2. 差异性代谢物鉴定结果表 (VIP>1, p<0.05)

No.	化合物名称	RT (min)	加合离子	理论 m/z	实测 m/z	质量数偏差 (ppm)	上/下调
1	L-Carnitine	6.46	[M+H] ⁺	162.1125	162.1123	1.2337	↑
2	Citrulline	11.23	[M+Na] ⁺	198.0849	198.0847	1.0097	↑
3	Inosine	3.92	[M+Na] ⁺	291.0700	291.0699	0.3436	↑
4	Gamma-Glutamylglutamine	14.21	[M+H] ⁺	276.1190	276.1187	1.0865	↑
5	Arachidonic acid	27.16	[M+Na] ⁺	327.2295	327.2300	1.5280	↓

*: ↑ 上调, ↓ 下调

2.4 通路分析

使用 KEGG 数据库, 将表 2 中鉴定得到的 5 个差异代谢物在 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析, 综合统计学 P 值和路径影响结果, 发现阿尔茨海默症小鼠受人参二醇皂苷组分影响的代谢通路主要有精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成等 (图 9)。

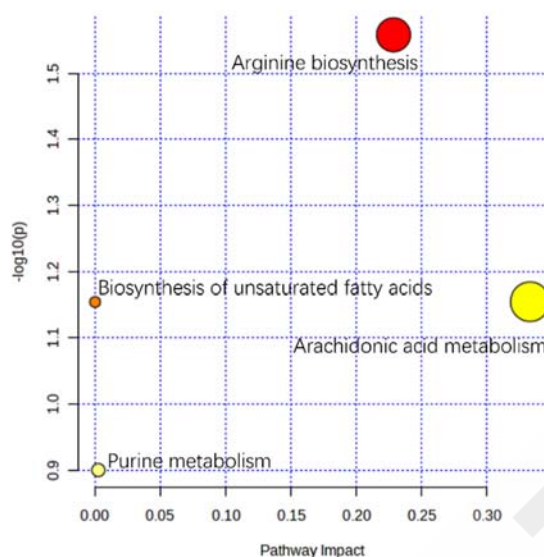


图 9. 人参二醇皂苷组分治疗阿尔茨海默症小鼠的通路分析

3. 结论

本文通过代谢组学研究方法，利用全谱二维液相系统与四极杆-飞行时间质谱联用仪，非靶向分析人参二醇皂苷组分给药后的阿尔兹海默症小鼠血清样品的内源代谢物变化。全谱二维液相扩大了代谢物分析的极性范围，加上 Q-TOF 的高分辨定性能力，共检测到正离子代谢特征峰 4679 个。统计结果表明，质控组数据聚集性强，表明仪器状态稳定；模型组与给药组血浆成分有显著区别。通过准确 m/z 及 MS^2 库搜索鉴定出 5 种内源代谢物，包括氨基酸、核苷和脂肪酸类等。这些差异性代谢物主要影响精氨酸生物合成、花生四烯酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成等。本研究表明全谱二维液相系统是宽极性、多组分数据库“通用型”分离平台，配合 LCMS-9030 可节省 1/2 的样品分析时间，可以帮助研究者一次分析极性跨度更大的代谢物。

7.4 基于在线变相聚焦-SFE-SFC-MS 技术大鼠血浆脂质组学研究

摘要：变相聚焦策略可有效地改善 SFE（超临界流体萃取）和 SFC（超临界流体色谱）在线联用过程中的超临界色谱峰形并提高灵敏度。本研究基于在线变相聚焦-SFE-SFC 系统与三重四级杆液质系统联用，建立了集提取、分离和检测于一体的脂质组学分析方法，实现了绿色高效的脂质组分析。最后，将在线变相聚焦-SFE-SFC 系统与 LCMS-9030 联用对 I 型糖尿病（type 1 diabetes, T1D）大鼠血浆进行脂质组学研究，经过多元统计分析和差异脂质筛选，鉴定了 77 种差异脂质。代谢通路分析表明，甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路与 T1D 的发生密切相关。这项研究为脂质组学分析提供了一种新方法，其实验结果也为 T1D 的诊断和治疗提供了有力依据。

关键词：在线SFE-SFC-MS 三重四极杆质谱 四极杆飞行时间质谱 I 型糖尿病 脂质组学

技术特点：

- ❖ 基于在线 SFE-SFC 系统，应用变相聚焦策略，实现了复杂样品的提取、分离及检测一体化分析。
- ❖ 综合使用多元统计分析（PCA、ROC、火山图等）展示 77 种差异脂质筛选流程。

开发绿色高效一体化的分析方法是当前分析领域的前沿课题。由于超临界二氧化碳(sc-CO₂)的独特性质，在线超临界流体萃取-超临界流体色谱(SFE-SFC)发展迅速，在许多领域得到了广泛应用。然而，它仍然面临着一些挑战，如峰展宽和基质效应。为了解决这一问题，我们基于岛津的Nexera UC系统和LCMS-8050质谱建立了在线变相聚焦-超临界流体萃取-超临界流体色谱-串联质谱(在线变相聚焦-SFE-SFC-MS/MS)方法。该方法以CO₂为溶剂，采用

变相聚焦策略将分析物堆积在色谱柱上，实现了全体积进样，提高了灵敏度。将建立的方法应用于 I 型糖尿病（type 1 diabetes, T1D）大鼠血浆脂质组学研究，经过多元统计分析和差异脂质筛选，鉴定了 77 种差异脂质。代谢通路分析表明，甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路与 T1D 的发生密切相关。这项研究为脂质组学分析提供了一种新方法，其实验结果也为 T1D 的诊断和治疗提供了有力依据。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 Nexera UC+LCMS-8050 (LCMS-9030) ，配置信息如下：

二氧化碳泵	: LC-30AD SF	改性剂泵	: LC-20AD XR
补充液泵	: LC-20AD XR	萃取单元	: SFE-30A
自动进样器	: SIL-30AC	柱温箱	: CTO-20AC
系统控制器	: CBM-20A	背压调节器	: SFC-30A×2
质谱仪	: LCMS-8050/LCMS-9030	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118

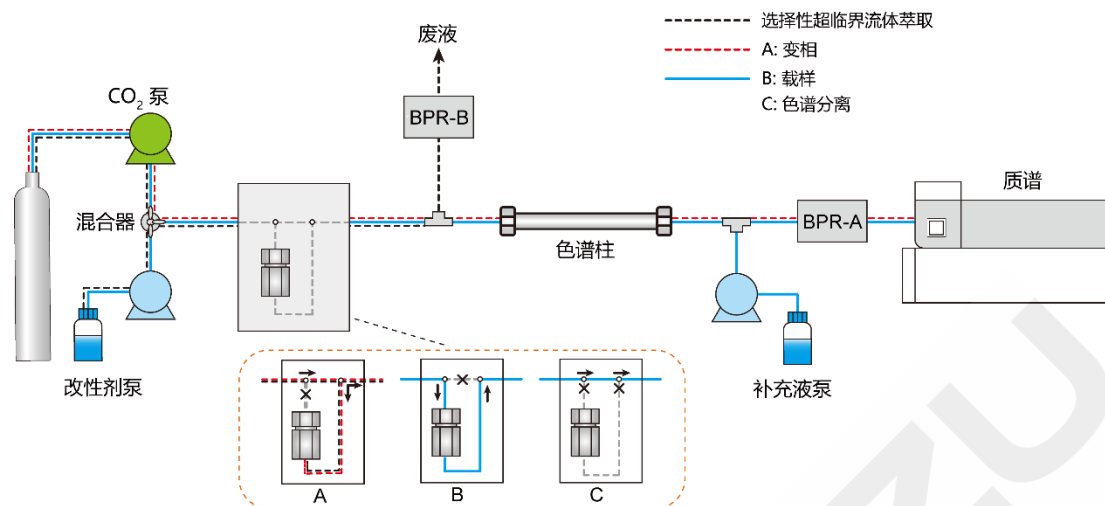


图 1. 在线变相聚焦-SFE-SFC-MS 系统流程图

如图 1 所示，在线变相聚焦-SFE-SFC-MS 包括四个步骤：

第一步是超临界流体萃取（黑色虚线）：萃取罐中加入血浆样品，当萃取溶剂充满容器时，多余的溶剂通过 BPR-B 排出。

第二步是相变（红色虚线）：改性泵停止输送改性剂，BPR-A 关闭。此时，CO₂ 从超临界状态转变为气态，并充满色谱柱。

第三步是载样和色谱分离（蓝色实线）：BPR-A 的压力恢复，萃取溶剂将所有提取物从萃取罐转移到色谱柱。由于系统压力需要 1.5 min 才能恢复到设定值，色谱柱中的气态 CO₂ 并没有立即过渡到超临界状态。因此，目标物可以堆积在色谱柱头。之后进行色谱分离（蓝色实线）。流动相没有流经萃取单元，而是直接进入色谱柱，对目标物进行梯度洗脱。

第四步是串联质谱对所有分析物进行检测。

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱：Shim-pack UC-XRP (150 mm x 4.6 mm I.D., 3.0 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30501-01)

流 动 相：A- sc-CO₂; B-甲醇 (含 1%水和 10 mM 甲酸铵)

萃 取 温 度：35°C

样 品 体 积：5 μL

柱 温：35°C

洗 脱 模 式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 10%，时间程序如图 2 所示。

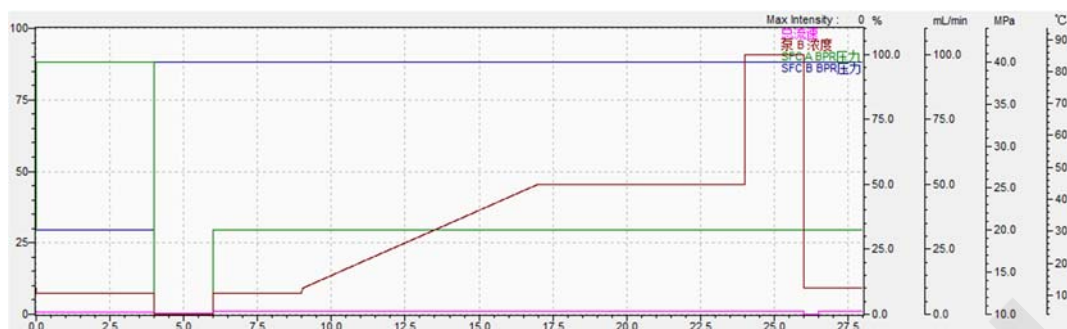


图 2. 在线变相聚焦-SFE-SFC 方法的时间程序

质谱条件

离子源 : ESI (+,-)	接口温度 : 300 °C
加热块温度 : 350 °C	D L 温度 : 250 °C
雾化气流速 : 3.0 L/min	加热块温度 : 400 °C
干燥气流速 : 10.0 L/min	加热气流速 : 10.0 L/min
扫描模式 : MRM (LCMS-8050) , SCAN+DDA (LCMS-9030)	

2. 样品处理

用移液枪将 5 μ L 血浆样品沿萃取罐罐壁加入，进行萃取。

3. 结果与讨论

3.1 标准溶液色谱图

在线变相聚焦-SFE-SFC 系统在 28 min 内完成对 16 种脂质标准品的良好分离，色谱图见图 3，具体化合物信息见附表。

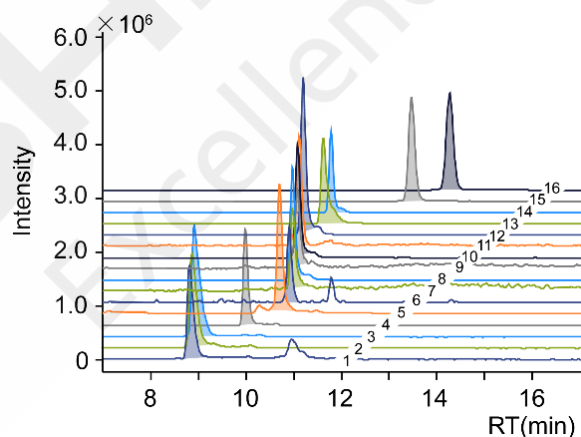


图 3. 在线变相聚焦-SFE-SFC 系统的标准溶液 MRM 色谱图

3.2 变相聚焦效果

如图 4 所示，在传统在线 SFE-SFC 中，出峰时间较早的 6 种脂质 (No. 1-6) 出现了明显的峰展宽现象，而在线变相聚焦-SFE-SFC 方法获得了更加尖锐对称的色谱峰形，表明变相聚焦策略可以解决传统在线 SFE-SFC 系统中弱保留分析物提前扩散的问题。此外，采用变相聚焦策略后，16 个脂质的相对峰高都有所增加 (图 4c)，其中包括 4 个脂肪酰类 (fatty acyls, FAs)、2 个甘油二酯 (diglycerides, DGs)、2 个甘油三酯 (triacylglycerols, TGs)、溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholines, LPCs) LPC 18:1 和磷脂酰胆碱

(phosphatidylcholines, PCs) PC 18:1/16:0 在内的 10 个脂质标准品的相对峰高增加了 50%以上, 而其他几个甘油磷脂类 (glycerophospholipids, GPs) 的相对峰高变化较小。因此, 在线变相聚焦-SFE-SFC 方法可显著改善色谱峰形和灵敏度, 尤其是对 FAs 和甘油酯类 (glycerolipids, GLs), 这有利于提高脂质组学分析的定量准确性。

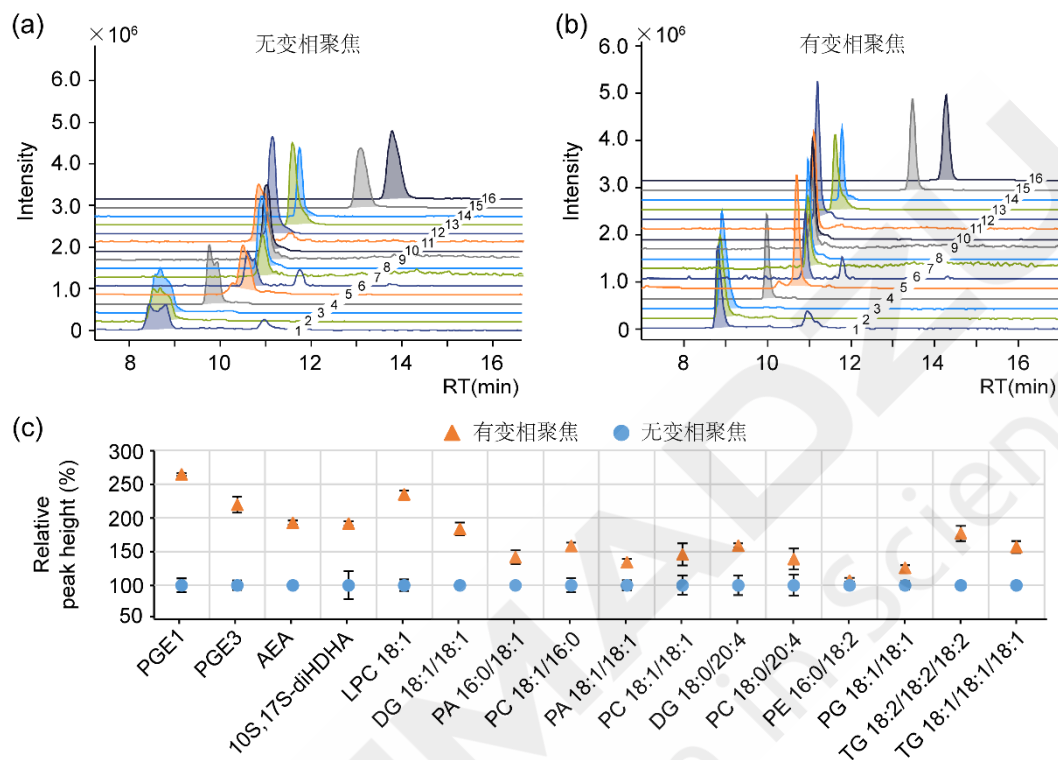


图 4. 色谱峰形和相对峰高的对比结果: (a) 有变相聚焦; (b) 无变相聚焦; (c) 相对峰高

3.3 方法稳定性

图 5 分别显示了质控 (quality control, QC) 样本在正离子和负离子模式下的基峰色谱图。图 6a-b 显示在正离子模式和负离子模式下, 9 个 QC 样本的第一主成分投影均在 ±2SD 范围内, 表明所建立的方法和所用仪器具有良好的稳定性。

此外, 对 QC 样本进行了重复检测, 将原始数据标准化后计算出脂质变量峰面积的 RSD, 在正离子和负离子模式下分别有 86%和 83%的脂质变量峰面积的 RSD 小于 30% (图 6c-d), 并且只有在 QC 样本中峰面积的 RSD 小于 30%的变量才能继续分析, 这些结果表明了该分析方法在脂质分析过程中重复性良好, 且结果可靠。

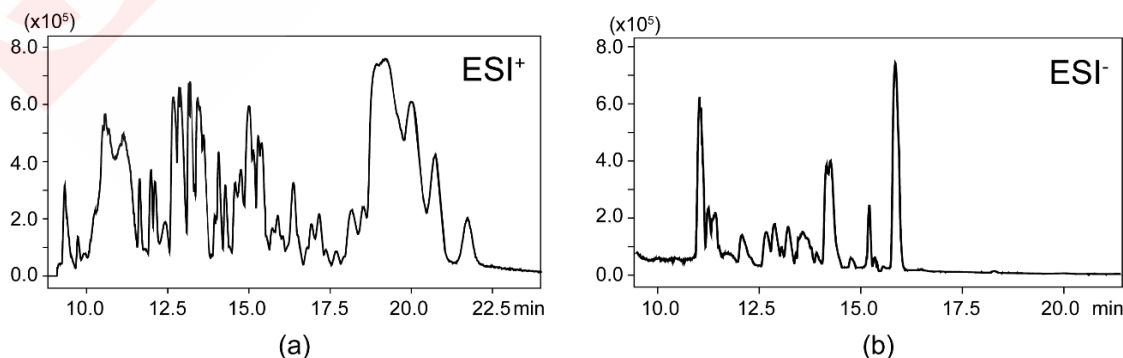


图 5. QC 样本的基峰色谱图: (a) 正离子模式; (b) 负离子模式

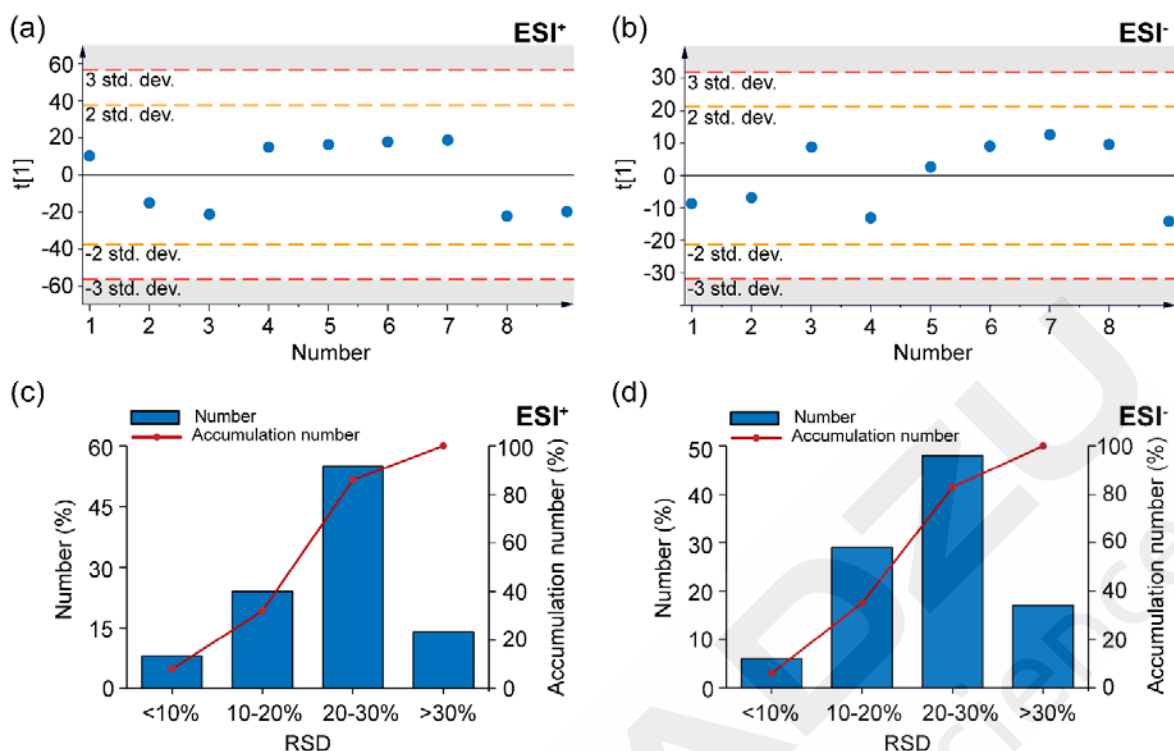
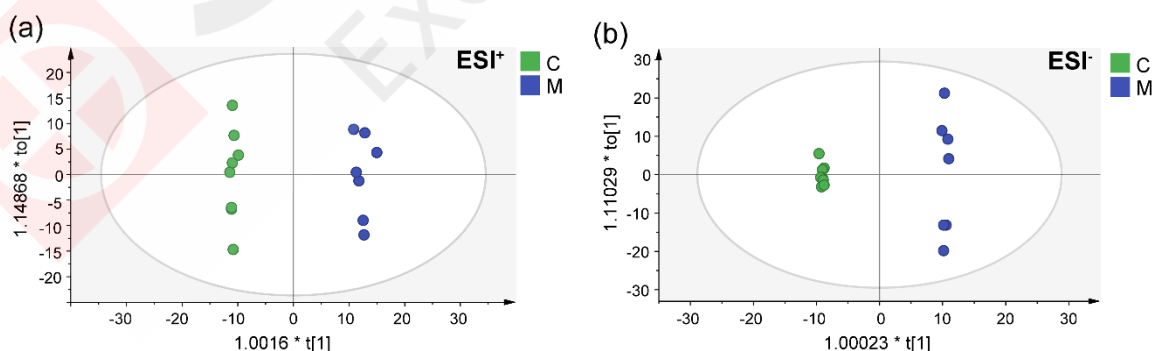


图 6. QC 样本的稳定性和重现性: (a) 正离子模式下 QC 样本的 PCA 得分图; (b) 负离子模式下 QC 样本的 PCA 得分图; (c) 正离子模式下 QC 样本的精密性; (d) 负离子模式下 QC 样本的精密性

3.4 多元统计分析

将 T1D 大鼠的血浆样品分为对照组 (n=8) 和模型组 (n=7), 通过多元统计分析研究两组间的脂质水平变化, 如图 7 所示, 在有监督的 OPLS-DA 模型中, 模型组和对照组完全分离, 表明两组间的脂质水平差异显著。正离子模式 (图 7a) 下模型的 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.994 和 0.83, 负离子模式 (图 7b) 下模型的 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.999 和 0.713, 表明该模型的拟合度和预测能力均良好。差异变量的筛选通过比较两组样本中变量的相对丰度实现, 其筛选依据以下三个规则: 1) OPLS-DA 模型分析时所得变量的 VIP 值大于 1; 2) 变量经 t 检验所得的 p 值小于 0.05; 3) 两组样本的 FC 大于 2 或小于 0.5。经过筛选, 正离子模式 (图 7c) 和负离子模式 (图 7d) 下分别获得了 282 个和 105 个差异变量。



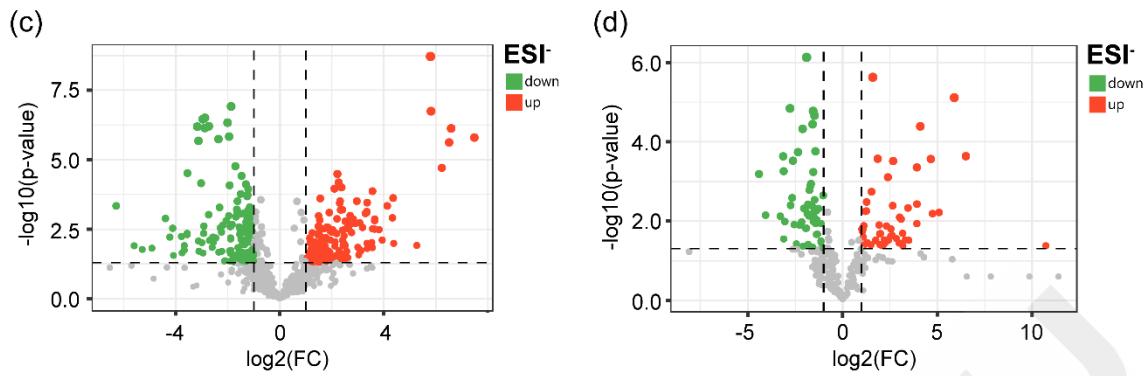


图 7. 对照组和模型组的 OPLS-DA 得分图和差异变量筛选火山图:

- (a) 正离子模式下的 OPLS-DA 得分图; (b) 负离子模式下的 OPLS-DA 得分图;
 (c) 离子模式下差异变量筛选火山图; (d) 负离子模式下差异变量筛选火山图

3.5 差异脂质鉴定

差异变量的鉴定是通过 MS-DIAL 软件将一级和二级质谱信息与数据库中的进行匹配, 并与 LIPID MAPS 网站和 HMDB 库中的相关信息进行核对, 最终鉴定出 77 个差异脂质。

从图 8a 可知, 两组样本间的差异脂质种类覆盖范围较广, 包括 4 个类别: 44.2% 的 GLs、33.8% 的 GPs、14.3% 的鞘脂类 (sphingolipids, SPs) 和 7.8% 的固醇脂类 (sterol lipids, STs)。此外, 本研究也比较了差异脂质在对照组和模型组中的相对丰度, 结果如图 8b 所示。与对照组相比, 模型组中磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamines, PEs) 和神经酰胺 (ceramides, Cers) 的含量较高, 而溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholines, LPCs)、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositols, PIs)、鞘磷脂 (sphingomyelins, SMs) 和胆固醇酯 (cholesteryl ester, CEs) 的含量较低。在其他脂类中, 模型组中 2 种磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholines, PCs)、20 种 TGs 和 1 种 ST 上调, 而 9 种 PCs、14 种 TGs 和 1 种 ST 下调。

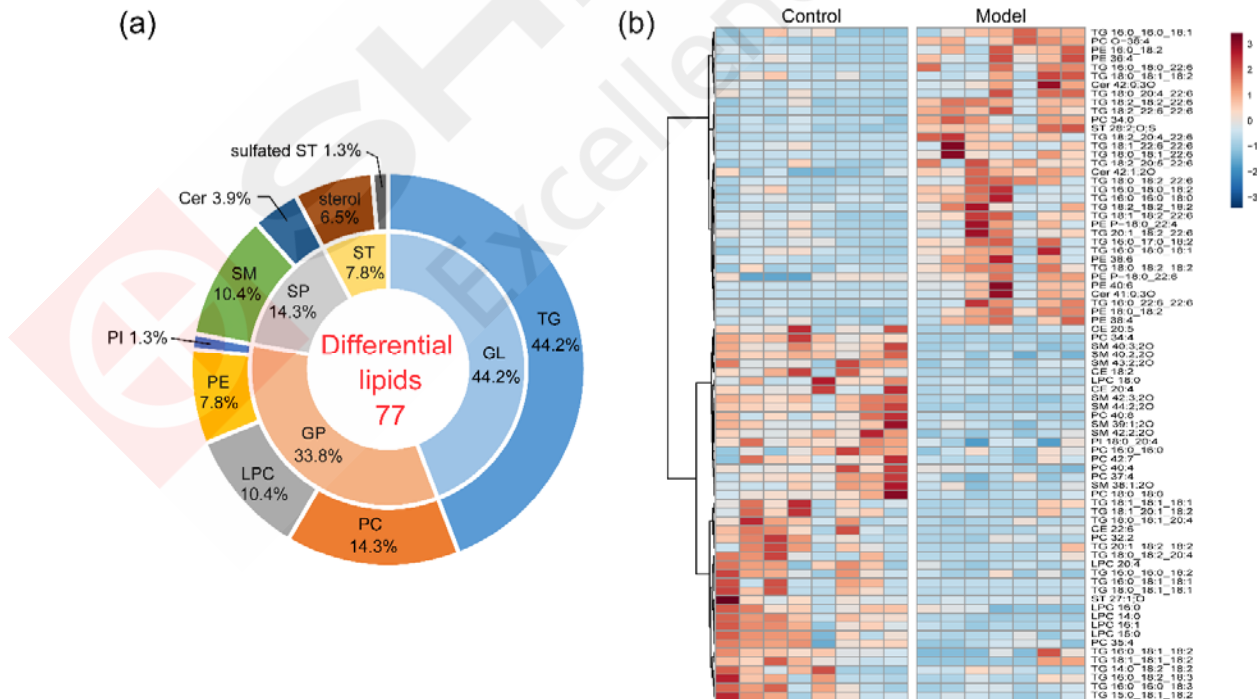


图 8. 对照组和模型组中 77 种差异脂质的分类 (a) 和相对水平 (b)

为了评估差异脂质对区分对照组和模型组的准确性，本研究进行了受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic, ROC）分析，图 9 显示 SM 40:2;20、TG 18:2_22:6_22:6、TG 18:2_20:4_22:6、PC 34:4、SM 40:3;20、Cer 41:0;30、TG 18:0_18:1_22:6 和 PC O-38:4 这 9 种差异血脂的曲线下面积（area under the curve, AUC）值均为 1，表明它们具有很强的诊断能力，有希望成为 T1D 的生物标志物。此外，它们的相对水平如图 10 所示，其中 SM 40:2;20、SM 40:3;20 和 PC 34:4 在模型组中显著降低，而其他五种脂质则显著升高。

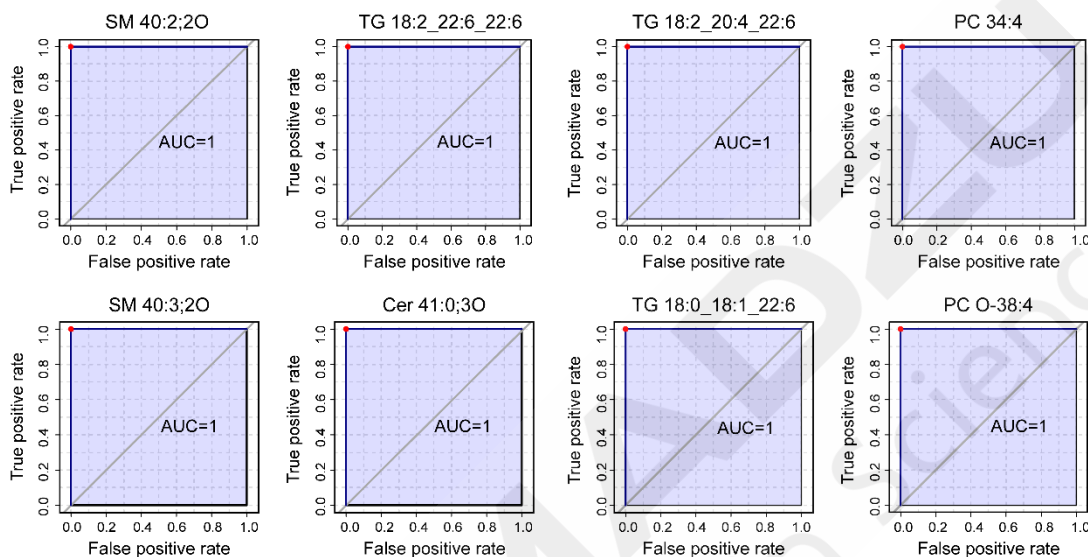


图 9. 显著差异脂质的 ROC 分析

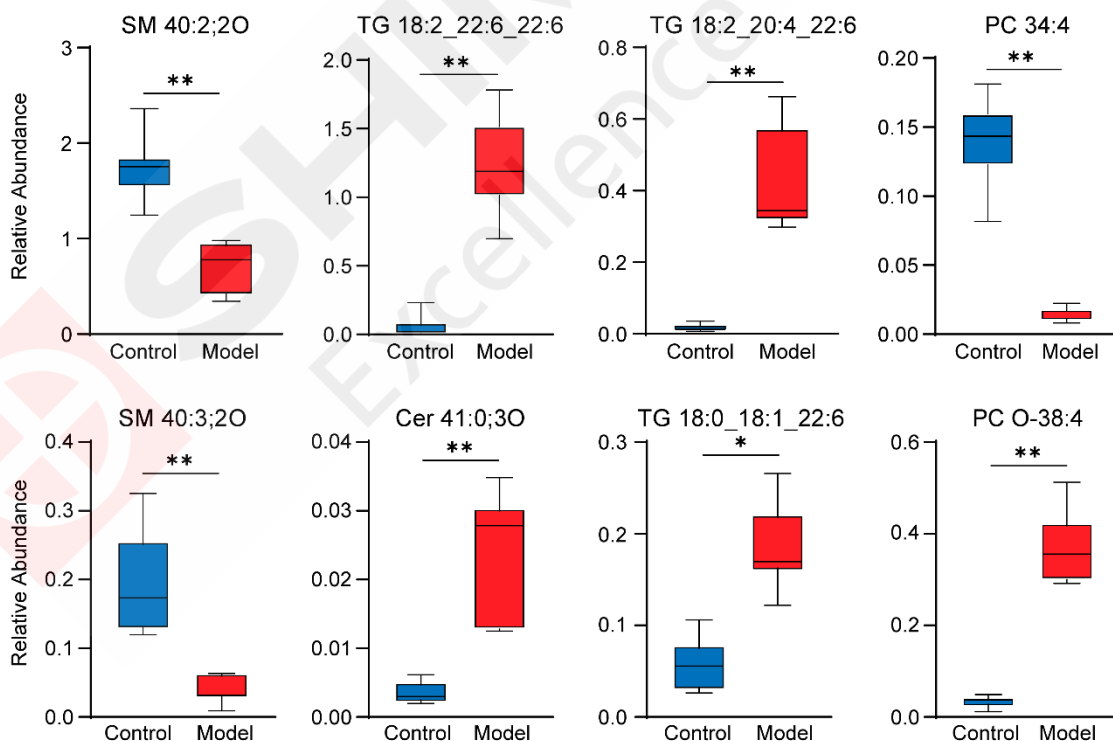


图 10. 8 种显著差异脂质的相对水平 (*, p<0.05; **, p<0.01)

3.6 代谢通路分析

为了进一步研究与 T1D 相关的生化干扰，我们根据所有差异脂质进行了通路分析。本研究共绘制了 8 条代谢通路（图 11），其中 pathway impact > 0.1 的甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路被认为是与 T1D 脂质紊乱相关的重要通路。

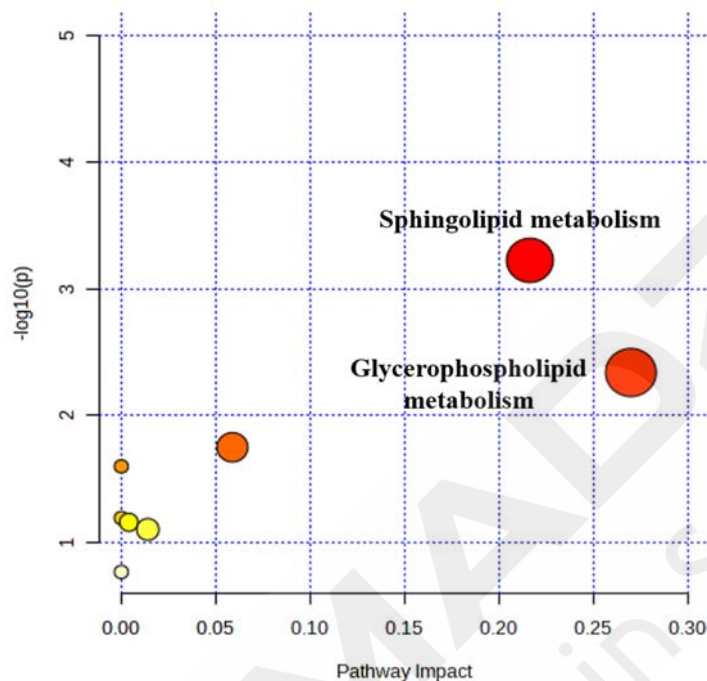


图 11. 差异脂质代谢通路气泡图

4. 结论

本研究应用在线变相聚焦-SFE-SFC-MS 系统进行糖尿病大鼠脂质组学研究。在线系统使用 $sc\text{-CO}_2$ 为主要萃取溶剂和流动相，实现了脂质组学的绿色分析。此外，应用变相聚焦技术获得了尖锐对称的峰形，提高灵敏度，便于定量分析。该绿色分析系统稳定性良好，经过多元统计分析和差异脂质筛选，确定了 77 种差异脂质，其中，模型组中 43 个脂质水平相对于对照组显著下调，其余 34 个脂质则显著上调。代谢通路分析表明，甘油磷脂代谢和鞘脂代谢通路与 T1D 的发生密切相关。这项研究为脂质组学分析提供了一种新方法，其得到的 8 个显著差异脂质具有很强的诊断能力，有望成为 T1D 诊断和治疗的标志物。

附表

16 种脂质标准品的基本信息与 MRM 参数

序号	化合物名称	分子式	离子类型	前体离子	产物离子	Q1 Pre	CE(V)	Q3 Pre
1	PGE1	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	[M-H] ⁻	353.25	273.35*	29.0	20.0	29.0
					235.25	16.0	16.0	16.0
2	PGE3	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M-H] ⁻	349.20	313.25*	30.0	11.0	30.0
					189.30	16.0	17.0	12.0
3	AEA	C ₂₂ H ₃₇ NO ₂	[M+H] ⁺	348.35	287.30*	-24.0	-14.0	-19.0
					91.10	-25.0	-48.0	-16.0
4	10S,17S-diHDHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	[M-H] ⁻	359.25	206.25*	30.0	16.0	23.0
					93.10	16.0	27.0	10.0
5	LPC 18:1	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	[M+H] ⁺	522.60	71.20*	-36.0	-41.0	-12.0
					43.20	-36.0	-49.0	-17.0
6	DG 18:1/18:1	C ₃₉ H ₇₂ O ₅	[M+Na] ⁺	643.55	602.30*	-34.0	-13.0	-22.0
					361.25	-22.0	-30.0	-27.0
7	PA 16:0/18:1	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	[M-H] ⁻	673.45	281.30*	32.0	40.0	13.0
					153.10	30.0	35.0	10.0
8	PC 18:1/16:0	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	782.40	86.00*	-40.0	-55.0	-30.0
					184.10	-22.0	-26.0	-12.0
9	PA 18:1/18:1	C ₃₉ H ₇₃ O ₈ P	[M-H] ⁻	699.45	153.15*	32.0	40.0	14.0
					417.35	32.0	25.0	30.0
10	PC 18:1/18:1	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	786.65	701.40*	-28.0	-22.0	-36.0
					85.95	-28.0	-55.0	-30.0
11	DG 18:0/20:4	C ₄₁ H ₇₂ O ₅	[M+Na] ⁺	667.55	23.10*	-26.0	-35.0	-30.0
					519.25	-34.0	-35.0	-40.0
12	PC 18:0/20:4	C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	810.65	386.00*	-24.0	-36.0	-11.0
					184.05	-28.0	-35.0	-20.0
13	PE 16:0/18:2	C ₃₉ H ₇₄ NO ₈ P	[M-H] ⁻	714.45	255.30*	32.0	35.0	12.0
					146.95	34.0	38.0	15.0
14	PG 18:1/18:1	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	[M-H] ⁻	773.50	153.00*	36.0	38.0	26.0
					417.30	36.0	30.0	20.0
15	TG 18:2/18:2/18:2	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	[M+Na] ⁺	901.80	599.55*	-20.0	-42.0	-32.0
					81.10	-20.0	-53.0	-14.0
16	TG 18:1/18:1/18:1	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆	[M+Na] ⁺	907.85	625.55*	-26.0	-38.0	-30.0
					265.35	-26.0	-47.0	-30.0

*表示定量离子

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本产品资料所宣传的内容,以本版本为准,资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考,如有变动恕不另行通知。

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
B座12层
邮政编码: 610063
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028,OCEAN CENTRE,HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI,KOWLOON,HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所
的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。