

# UHPLC 方法开发系统串联三重四极杆质谱 8050 在溴酚类同分异构体化合物分析中的应用

## LCMSMS-155

**摘要：**使用岛津 UHPLC 方法开发系统串联三重四极杆质谱 LCMS-8050，进行 11 种溴酚类同分异构体化合物分析方法建立过程中流动相和色谱柱的考察和分析。该实验考察了三款色谱柱和 6 种流动相在通用梯度条件下对样品中各化合物分离分析的影响，通过谱图对比综合考虑，NH<sub>4</sub>Ac-MeOH 和 Inertsil ODS-4 为适合该样品分析的流动相体系和色谱柱。

**关键词：**UHPLC 方法开发系统溴酚类同分异构体 LCMS-8050

溴酚是一类广泛分布于多种环境介质中的有机污染物，具有持久性和生物累积性，对生态环境和人体健康构成严重威胁。同时，由于溴酚类化合物具有非常低的味觉阈值，在水中或食品中即使以很低浓度存在时，也会产生令人非常反感的气味。目前适合该类化合物分析的液质联用技术鲜有报道，因此建立一种适用于这类化合物检测的液质联用分析方法显得尤为重要。岛津 UHPLC 方法开发系统是一套用于液相分析条件探索优化的自动化装置，它利用工作站控制自动进行色谱柱切

换和流动相选择而实现了原本需要人力干预才能完成的分析方法开发过程。专用 Method Scouting Solution 工作站将繁琐的条件变化设置过程大为简化，图形界面易于操作和理解。本实验通过岛津 UHPLC 方法开发系统串联三重四极杆质谱 LCMS-8050，对 11 种溴酚类异构体的 LC-MS/MS 分析方法进行优化，考察了不同流动相和色谱柱对化合物分离和质谱响应的影响，从而通过该系统确定适用的流动相和色谱柱。

## 实验部分

### 1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表 1 化合物信息

编号	名称	英文名	CAS No.
A1	对溴苯酚	P-Bromophenol	10641-2
A2	间溴苯酚	m-bromophenol	591-20-8
B1	2,3-二溴苯酚	2,3-Dibromophenol	2851445-6
B2	3,5-二溴苯酚	3,5-Dibromophenol	62641-5
C1	2,3,4-三溴苯酚	2,3,4-Tribromophenol	-
C2	2,4,5-三溴苯酚	2,4,5-Tribromophenol	1440161-7
C3	3,4,5-三溴苯酚	3,4,5-Tribromophenol	25376-38-9
D1	2,3,5,6-四溴苯酚	2,3,5,6-Tetrabromophenol	-
D2	2,3,4,6-四溴苯酚	2,3,4,6-Tetrabromophenol	-
D3	2,3,4,5-四溴苯酚	2,3,4,5-Tetrabromophenol	576-55-6
E1	2,3,4,5,6-五溴苯酚	Pentabromophenol	608-71-9

## 1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为具体配置为 LC-30AD×2 ( 输液泵, 配四元低压梯度比例阀 ), DGU-20A5R×2 ( 在线脱气机 ), SIL-30AC ( 自动进样器 ), CTO-20AC ( 柱温箱, 含 FCV-34AH 高压流路切换阀 ), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, Method Scouting Solution Ver. 1.00 ( 方法开发系统工作站, ) LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

## 1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Inertsil ODS-4 3.0 mm I.D.×150 mmL., 2.0 μm

Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×150 mmL., 2.2 μm

Shim-pack XR-Phenyl 2.0 mmI.D.×100 mmL., 2.2 μm

流动相:

A1: 水

A2: 水 ( 0.1 % 甲酸 )

A3: 水 ( 1 mM NH<sub>4</sub>Ac )

B1: 甲醇

B2: 乙腈

B3: 甲醇 / 乙腈 ( 1 : 1, V/V )

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

洗脱方式: 梯度洗脱

表 2 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	25
20.00	Pumps	Pump B Conc.	90
25.00	Pumps	Pump B Conc.	90
25.01	Pumps	Pump B Conc.	35
30.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI, 负离子模式分析

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 18.0 L/min

接口温度: 350°C

DL 温度: 300°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 8.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 15 ms

MRM 参数: 见表 3

表3 MRM 参数

化合物编号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
A1	171.10	78.90*	13.0	23.0	30.0
A2	170.90	79.00*	19.0	22.0	28.0
B1	250.80	79.00*	19.0	23.0	29.0
	250.80	81.00	19.0	22.0	30.0
B2	250.80	79.00*	18.0	25.0	30.0
	250.80	81.00	18.0	25.0	30.0
C1	328.80	78.90*	12.0	31.0	30.0
	328.80	81.00	12.0	30.0	29.0
C2	328.80	78.90*	12.0	31.0	30.0
	328.80	81.00	12.0	32.0	30.0
C3	328.80	78.90*	12.0	31.0	30.0
	328.80	81.00	12.0	29.0	30.0
D1	408.60	79.00*	15.0	35.0	28.0
	408.60	81.00	15.0	40.0	29.0
D2	408.60	79.00*	15.0	34.0	28.0
	408.60	81.00	15.0	32.0	29.0
D3	408.60	79.00*	15.0	41.0	30.0
	408.60	81.00	15.0	40.0	28.0
E1	488.50	79.00*	14.0	34.0	29.0
	488.50	81.00	25.0	36.0	29.0

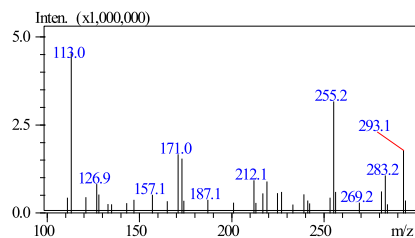
注：\*表示定量离子

#### 1.4 标准溶液的配制

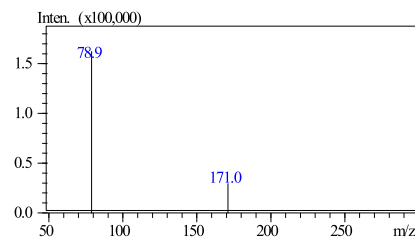
用甲醇 / 水 =50:50 的溶液依次稀释为 0.1、0.5、1、5、10、25 ng/mL 系列浓度的工作曲线。

## 结果讨论

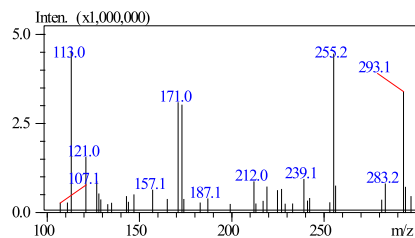
### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



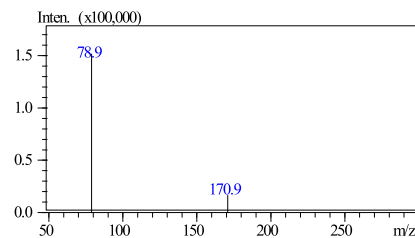
A1 一级质谱图



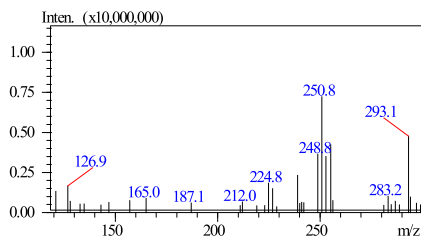
A1 产物离子扫描质谱图(CE 值 25 V)



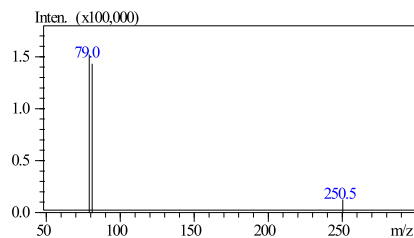
A2 一级质谱图



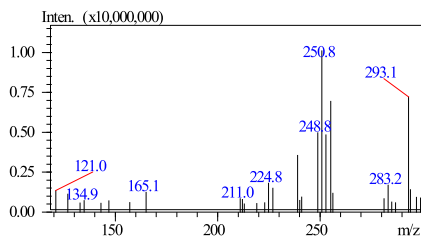
A2 产物离子扫描质谱图(CE 值 25 V)



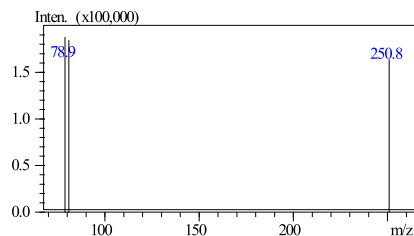
B1 一级质谱图



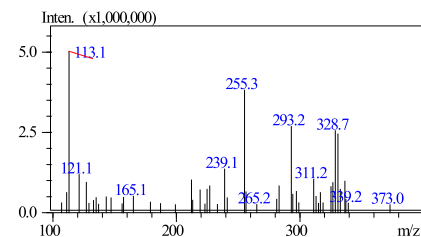
B1 产物离子扫描质谱图(CE 值 30 V)



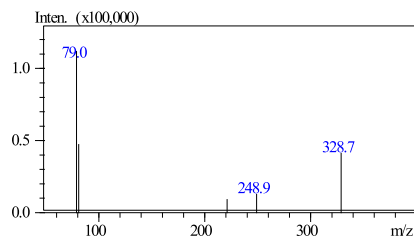
B2 一级质谱图



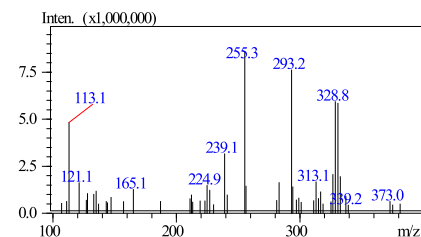
B2 产物离子扫描质谱图(CE 值 30 V)



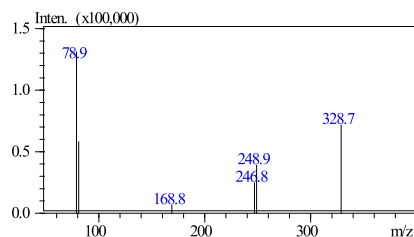
C1 一级质谱图



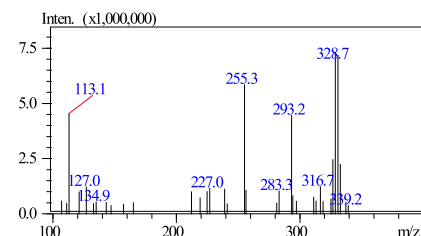
C1 产物离子扫描质谱图(CE 值 35 V)



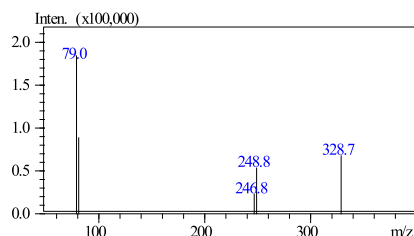
C2 一级质谱图



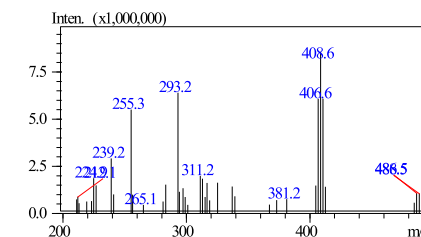
C2 产物离子扫描质谱图(CE 值 35 V)



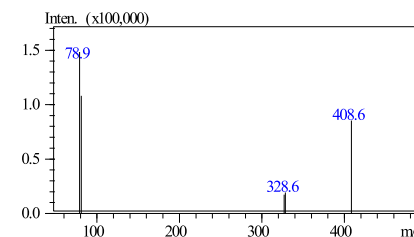
C3 一级质谱图



C3 产物离子扫描质谱图(CE 值 35 V)



D1 一级质谱图



D1 产物离子扫描质谱图(CE 值 37 V)

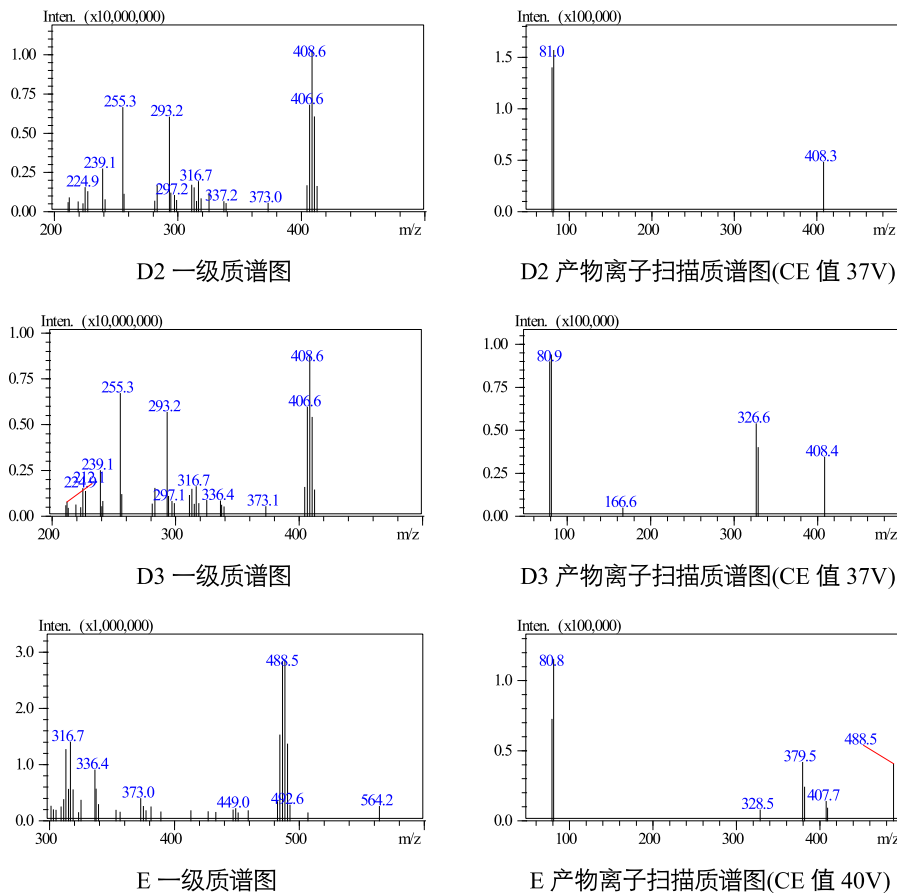


图 1 各样品扫描质谱图

## 2.2 方法选择

通过方法开发系统 Method Scouting Solution 软件自动生成批处理表 (如图 2) 在 3 种 A 相和 3 种 B 相间以及 3 款色谱柱间进行选择, 组合成 3×3×3 共 27 种方法选择方式。

Analysis	Vial	Tray	Inj. Vol	AutoPurge	Sample Name	Column Position	PumpA	PumpB
1	-1	1	1					
2	-1	1	1				C:1 mMNH4Ac	
3	-1	1	1				B:0.1fa-w	
4	-1	1	1					C:acn-met
5	-1	1	1					B:MeOH
6	-1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	A:Water	A:ACN
7	1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	A:Water	A:ACN
8	-1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	A:Water	B:MeOH
9	1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	A:Water	B:MeOH
10	-1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	A:Water	C:acn-met
11	1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	A:Water	C:acn-met
12	-1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	B:0.1fa-w	A:ACN
13	1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	B:0.1fa-w	A:ACN
14	-1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	B:0.1fa-w	B:MeOH
15	-1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	C:1 mMNH4Ac	C:acn-met
16	1	1	1		bromophenol	1:ODS-III,60C,80MPa	C:1 mMNH4Ac	C:acn-met
17	-1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	A:Water	A:ACN
18	1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	A:Water	A:ACN
19	-1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	A:Water	C:acn-met
20	1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	A:Water	C:acn-met
21	-1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	A:Water	C:acn-met
22	1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	B:0.1fa-w	C:acn-met
23	-1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	B:0.1fa-w	C:acn-met
24	1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	C:1 mMNH4Ac	C:acn-met
25	-1	1	1		bromophenol	2:ODS4,50C,60MPa	C:1 mMNH4Ac	C:acn-met
26	1	1	1		bromophenol	3:XR-Phenyl,60C,60MPa	A:Water	A:ACN
27	1	1	1		bromophenol	3:XR-Phenyl,60C,60MPa	A:Water	A:ACN

图 2 批处理表截图

批处理表中自动生成进样位为“-1”的流动相的快速置换和色谱柱的平衡的栏目。平衡的方式和时间根据所设定的系统策略及数据库中色谱柱长度和内径等信息自动生成，避免人工建立时费时费力，甚至考虑不周引发的方法错误等情况发生。部分化合物质谱响应离子流图（MRM）如图3所示。

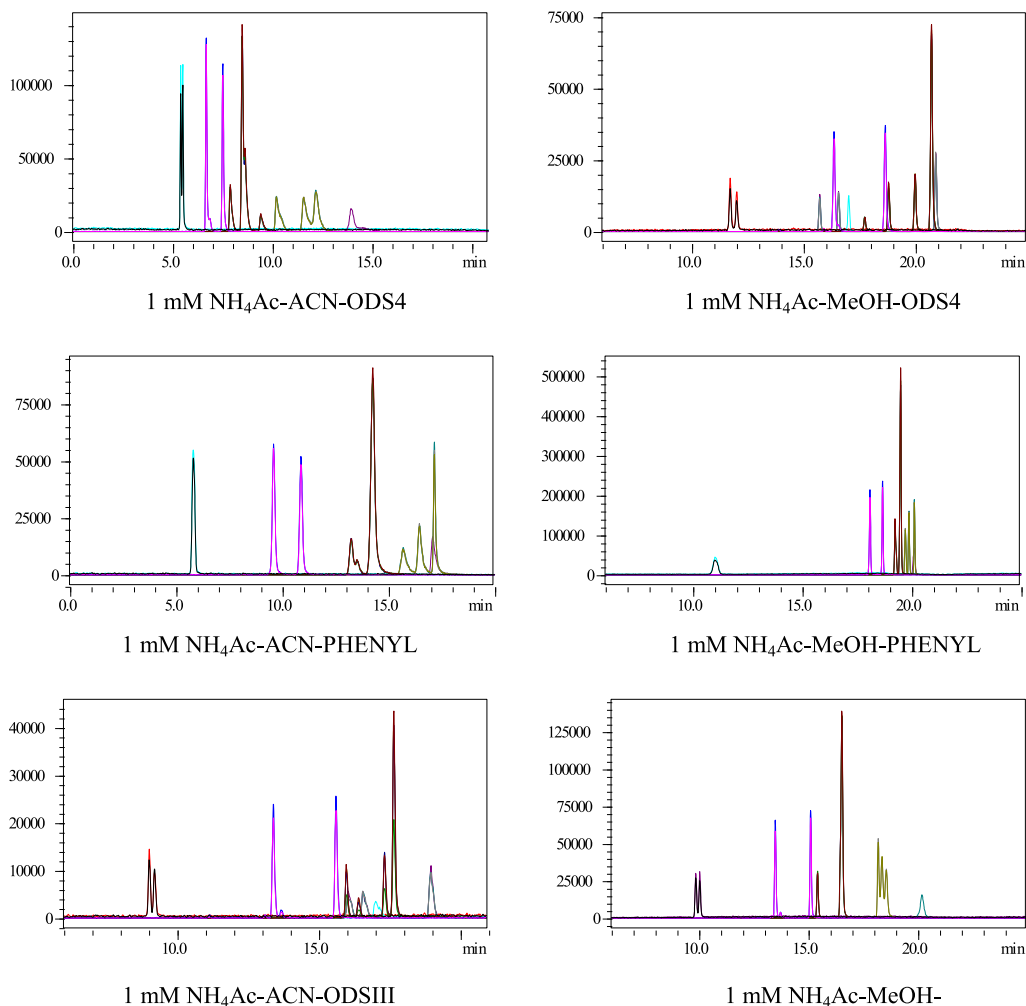


图3 各分析方法色谱图

利用方法开发系统进行流动相和色谱柱筛选采集到的化合物 MRM 色谱图，根据峰形，分离度，峰强度等因素判断最优条件为 1 mM NH<sub>4</sub>Ac-MeOH-ODS4。对以上梯度条件进行微调后得到以下用来分析的条件，初始比例为 0.1 mM NH<sub>4</sub>Ac 水/MeOH=65/35，进样体积为 10 μL。

表4 实际分析梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	45
15.00	Pumps	Pump B Conc.	70
25.00	Pumps	Pump B Conc.	90
25.01	Pumps	Pump B Conc.	35
30.00	Controller	Stop	

### 2.3 线性范围

将 1.4 中得到的标准溶液进样分析得到如下所示标准曲线，线性范围为 0.1~25 ng/mL，判定系数  $r^2$  范围为 0.9993~0.9999。

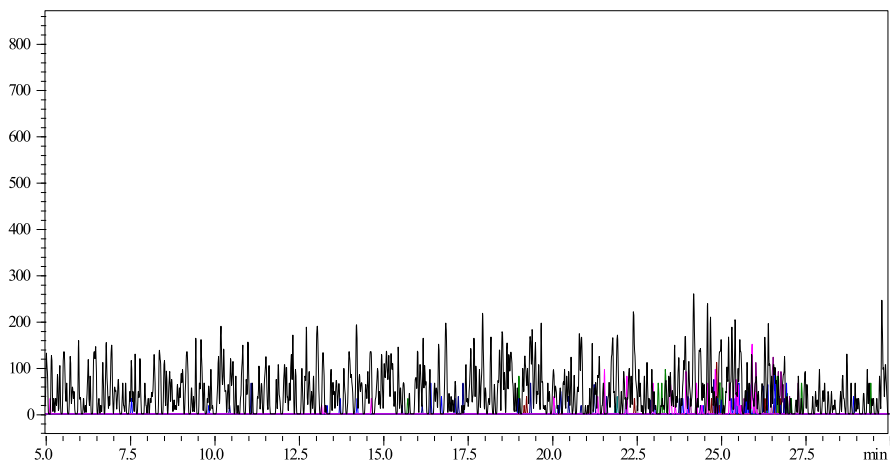


图 4 空白基质色谱图

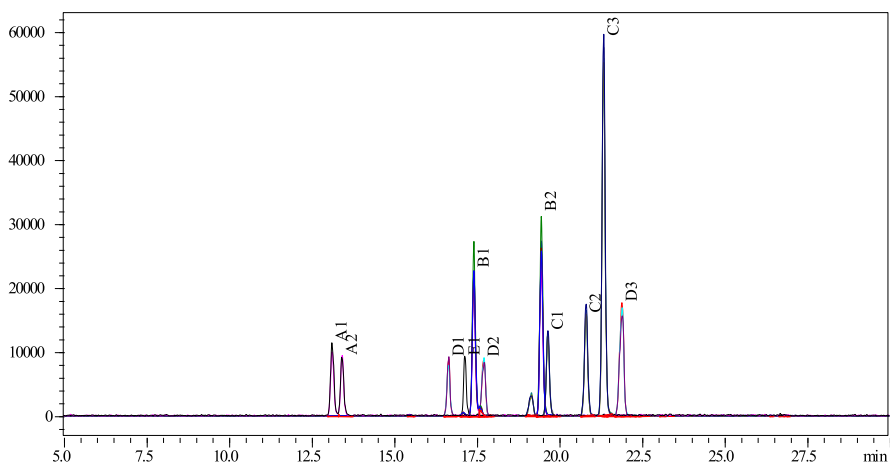
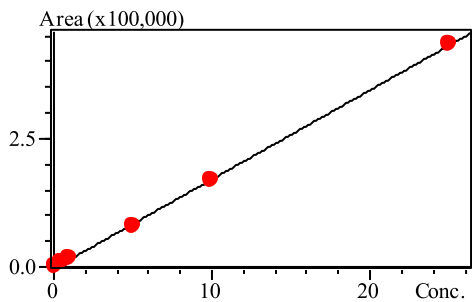
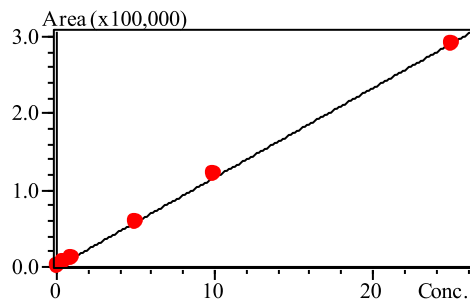


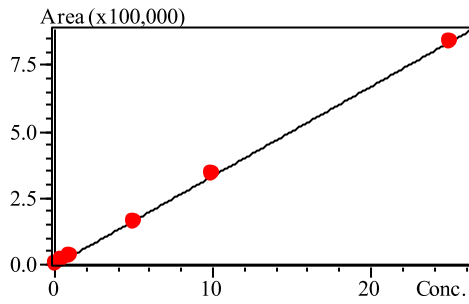
图 5 混标溶液色谱图(5 ng/mL)



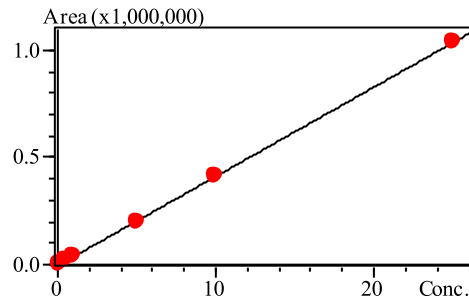
A1 标准曲线



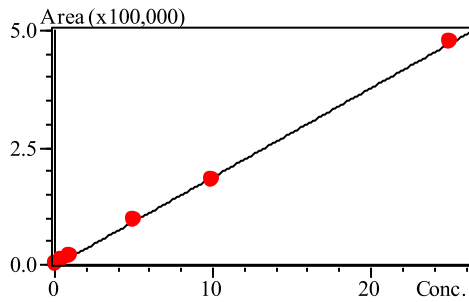
A2 标准曲线



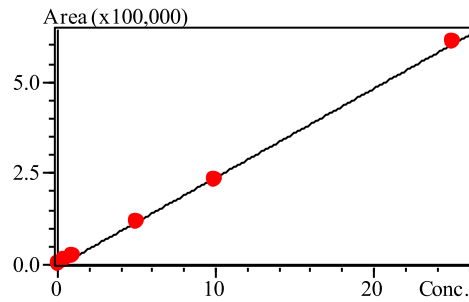
B1 标准曲线



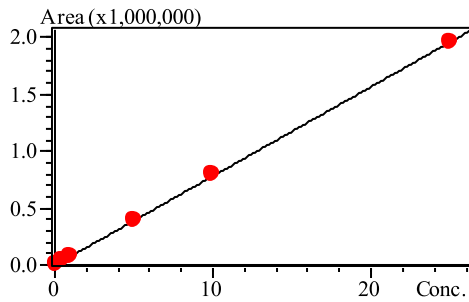
B2 标准曲线



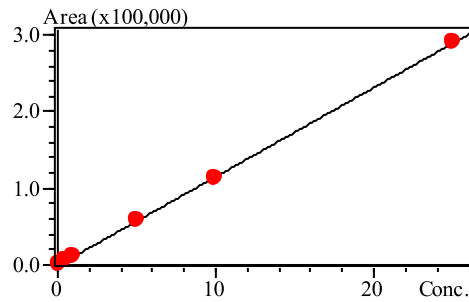
C1 标准曲线



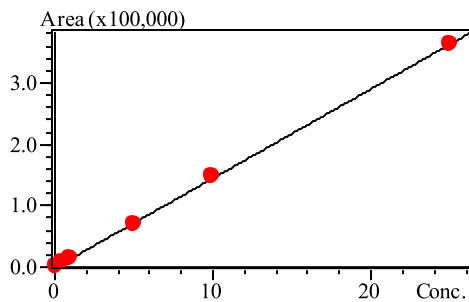
C2 标准曲线



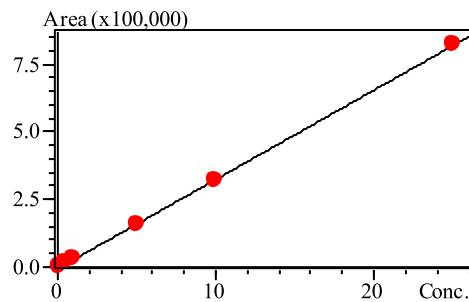
C3 标准曲线



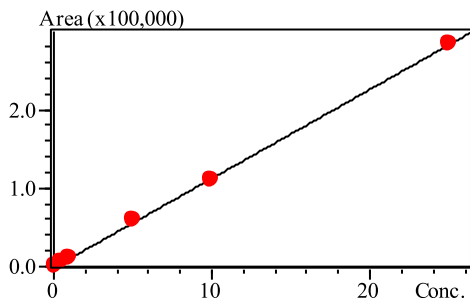
D1 标准曲线



D2 标准曲线



D3 标准曲线



E1 标准曲线

图 6 各样品标准曲线

表 5 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	r <sup>2</sup>
A1	对溴苯酚	$Y = (17382.0)X + (-3150.36)$	0.9994
A2	间溴苯酚	$Y = (11675.8)X + (4.10090)$	0.9996
B1	2,3-二溴苯酚	$Y = (33600.4)X + (-3060.03)$	0.9998
B2	3,5-二溴苯酚	$Y = (41653.4)X + (-4649.61)$	0.9999
C1	2,3,4-三溴苯酚	$Y = (19018.6)X + (-2762.21)$	0.9996
C2	2,4,5-三溴苯酚	$Y = (24366.8)X + (-4680.74)$	0.9993
C3	3,4,5-三溴苯酚	$Y = (78603.7)X + (-3443.51)$	0.9999
D1	2,3,5,6-四溴苯酚	$Y = (11627.7)X + (-948.602)$	0.9999
D2	2,3,4,6-四溴苯酚	$Y = (14569.2)X + (-997.748)$	0.9998
D3	2,3,4,5-四溴苯酚	$Y = (32953.2)X + (-5715.46)$	0.9998
E1	2,3,4,5,6-五溴苯酚	$Y = (11364.4)X + (-1211.69)$	0.9997

#### 2.4 重复性考察

用甲醇 / 水 = 50:50 的溶液配制浓度分别为 0.5、5、20 ng/mL 的溶液，每个浓度进样 7 次考察方法的重复性，结果如下。保留时间的 RSD % 在 0.01~0.18 % 之间，峰面积的 RSD % 在 0.72~5.49 % 之间。

表 6 保留时间和峰面积重复性结果 (n=7)

样品名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)		RSD% (20 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
对溴苯酚	0.11	4.17	0.07	3.31	0.05	2.10
间溴苯酚	0.18	4.19	0.04	3.32	0.06	2.73
2,3-二溴苯酚	0.05	5.32	0.02	5.29	0.02	1.71
3,5-二溴苯酚	0.04	4.56	0.02	1.86	0.02	1.70
2,3,4-三溴苯酚	0.07	5.33	0.03	1.33	0.03	2.07
2,4,5-三溴苯酚	0.08	5.32	0.03	1.96	0.02	0.72
3,4,5-三溴苯酚	0.04	3.12	0.01	1.20	0.01	1.05
2,3,5,6-四溴苯酚	0.08	4.60	0.05	3.10	0.03	1.96
2,3,4,6-四溴苯酚	0.09	4.27	0.04	3.28	0.05	1.89
2,3,4,5-四溴苯酚	0.07	4.75	0.03	1.54	0.02	1.54
2,3,4,5,6-五溴苯酚	0.07	5.49	0.04	3.43	0.03	2.64

## ■ 结论

同分异构体化合物因其分子量相同，所以利用 LC-MS/MS 定量时有时仅仅依赖于化合物的质荷比是难以完成的，此时化合物的分离至关重要。对于该类化合物的分离如果使用常规仪器和方法需要耗费较长的时间，本实验使用岛津 UHPLC 方法开发系统同 LCMS-8050 联用，对以上同分异构体化合物的 LC-MS/MS 方法建立进行了优化。通过对 3 种有机相和 3 种水相及 3 款色谱柱组成的 27 种组合方式快速筛查，综合考察质谱响应和分离效果，初步确定了适合该类化合物分析的流动相和色谱柱及梯度方法，对进一步细化方法提供了较大的帮助。此种组合方式拓展了方法开发系统的应用领域和效果，使得对复杂成分的 LC-MS/MS 分析条件优化时流动相和色谱柱的选择变得自动和高效化，为方法开发的前期工作节省了时间，促进整体工作效率的提高。