

液相色谱串联飞行时间质谱法检测血液和尿液样本中的63种三高类治疗药物

Determination 63 Antihypertensive and Hypoglycemic and Lipid-Lowering Drugs in Blood and Urine by HPLC-QTOF

郭琳琳, 孙小杰, 刘冰洁, 郭立海

Guo Linlin, Sun Xiaojie, Liu Bingjie, Guo Lihai

SCIEX 中国

Keywords: SWATH®; Antihypertensive and Hypoglycemic and Lipid-Lowering Drugs; Blood and Urine

1、前言

血液和尿液是公安系统在案发现场提取到的常见生物样本，而这些生物样本中的成分可以反映供体的相关信息。随着人们生活水平的提高，糖尿病、高血压、高血脂成为常见的威胁人类健康的高发慢性病^[1]，且治疗药物种类呈现多样化，快速准确鉴定体液中的药物成分，有助于协助办案人员快速了解检材供体特征，缩小侦查范围，具有较强的实践意义。

本文建立了液相色谱串联四极杆-飞行时间质谱法快速检测血液和尿液中的63种三高药物的方法，采用SWATH®采集技术，确定了方法的线性范围、回收率和精密密度。

本实验优势和特点

快速高通量：一针进样，15分钟完成血液和尿液中的63种三高类治疗药物的准确定性和定量；

SWATH®采集技术：对样品中所有可检测到的化合物进行全面检测和定量分析（MS/MS^{ALL}），并且使用二级质谱用于定量分析，降低干扰，定量结果准确；

前处理简便：采用蛋白沉淀法，处理血液和尿液样本，操作简单，耗时短；

回收率和重现性好：三个不同浓度下的多份添加质控样本，血液基质的分析方法的回收率为72-118%，相对标准偏差为1.3-4.6%；尿液样本的回收率为71-109%，相对标准偏差为3.3-4.9%。

2、实验部分

2.1 样品前处理

- 血液：取100 μl血液样本，加入200 μl蛋白沉淀剂（甲醇：乙腈=1:1），涡旋1min，冷冻离心10min，取上清液上机待测。
- 尿液：取100 μl尿液样本，加入200 μl蛋白沉淀剂（甲醇：乙腈=1:1），涡旋1 min，冷冻离心10 min，取上清液上机待测。

2.2 液相方法

色谱柱：Phenomenex Luna Omega, 1.7 μm, 3.0 mm × 100 mm

流动相：A：水（2mmol/L甲酸铵+0.1%甲酸）

B：甲醇（2mmol/L甲酸铵+0.1%甲酸）

流速：0.3mL/min

进样量：2 μL

梯度洗脱程序：如表1所示

表1. 液相梯度设置

Time/min	A/%	B/%
0.00	95	5
1.00	95	5
1.50	60	40
7.00	30	70
10.00	2	98
12.00	2	98
12.10	95	5
15.00	95	5

2.3 质谱条件

离子源：ESI源

离子源参数：

IS电压：5500 V 源温度 TEM: 550°C

气帘气 CUR: 30 psi 碰撞气 CAD: Medium

雾化气 GS1: 55 psi 辅助气 GS2: 60 psi

采集模式：SWATH®采集模式；

TOF MS质核比扫描范围：m/z 80-1000；

63种化合物的离子信息见附表1。

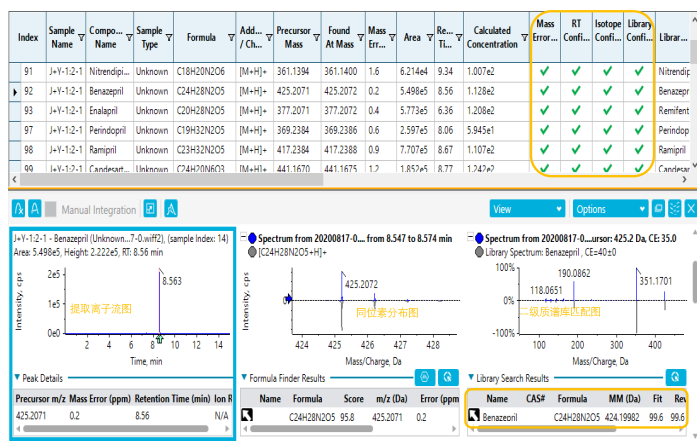


图2. 63种三高类治疗药物的定性数据处理结果

3. 结果与讨论

3.1 63种三高治疗药物的提取离子流图，如图1所示。

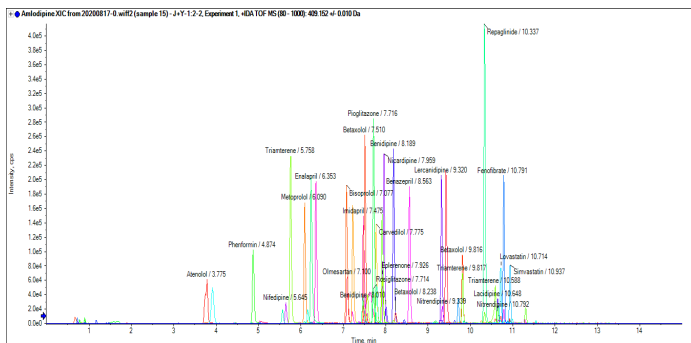


图1. 63种三高类治疗药物的提取离子流图

3.2 63种三高类药物的定性数据处理

建立数据处理方法，将标准品和实际样品的数据导入OS软件中处理，对63种三高类治疗药物进行定性数据处理，如图2所示，定性结果四个维度包括：一级质量偏差、保留时间偏差、同位素匹配和数据库匹配，对化合物进行定性结果进行确证，并且使用红绿灯显示规则，定性结果一目了然。

3.3 63种三高类药物的定量数据处理

高质量精度质谱通常采用一级质谱数据进行定量数据处理，而针对某些化合物在复杂基质中，使用一级质谱数据定量时，可能会出现基线噪音高，基质干扰大等问题，传统的扫描模式无法满足高分辨数据二级定量的要求。SWATH®数据采集模式为全色谱峰的一级和二级信息连续采集，采集得到的数据可进行一级和二级同时定量处理，使用高质量精度的二级定量可有效降低基质干扰，选择性高；对于响应差、灵敏度要求高的化合物，在高选择性的同时，提供更好的信噪比，从而获取高灵敏、准确的定量结果。如图3所示在尿液基质中的氨氯地平的数据处理中，当使用氨氯地平的一级质谱m/z=409.1525进行定量时，色谱峰基线高，且有明显的干扰峰，信噪比低，而使用氨氯地平的二级质谱离子m/z=238.0630时，得到色谱峰基线几乎无干扰，相应的信噪比比一级提高将近一个数量级。图4中，在尿液样品中，阿卡波糖的一级质谱离子的色谱峰干扰严重，完全提取不到，无法进行后续分析，而对二级质谱离子m/z=304.1398进行提取，提取得到明显的色谱峰，响应强度和信噪比均满足定性定量要求。因此，使用二级质谱定量，灵敏度和准确度更高。SCIEX OS 软件可在同一界面同时处理定性和定量数据，界面直观，省时省力。

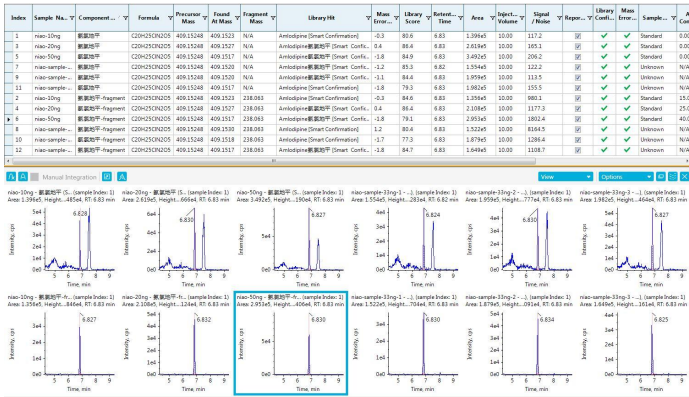


图3. 尿基质样品中的氯氮平的一级和二级质谱数据处理对比

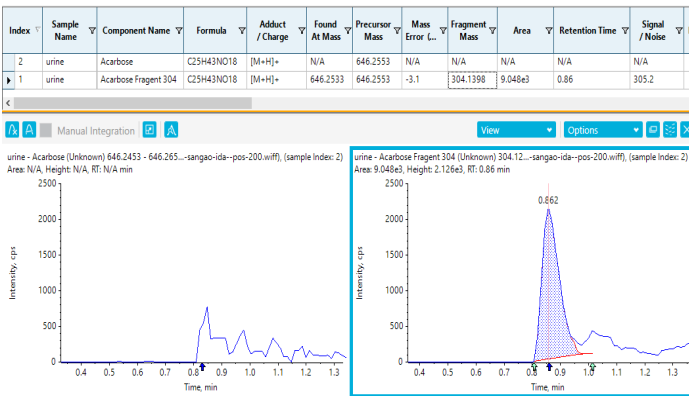


图4. 尿液样品中的阿卡波糖的一级和二级质谱数据处理对比

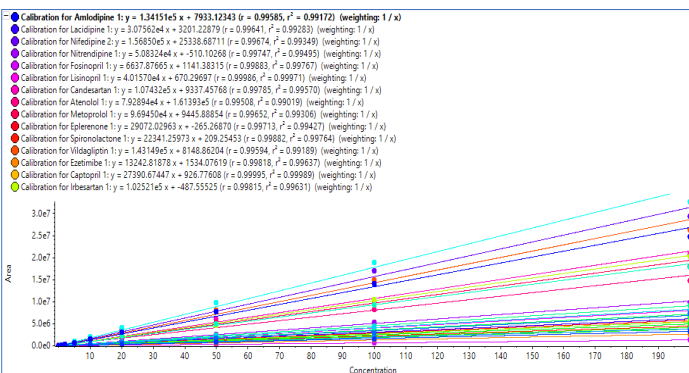


图5. 63种三高类治疗药物的线性结果

3.4 63种三高类药物的方法线性

该方法中，63种三高类药物在血液和尿液基质中的线性关系良好，相关系数R均大于0.995，保证了不同浓度样品的定量准确性。

3.5 63种三高类药物的回收率和重复性

取空白血液和尿液基质，分别添加三个浓度水平，每水平6个平行样。充分混匀后，按照前方法进行处理，按照仪器条件进行测定。结果表明，血液基质的分析方法的回收率为72-118%，相对标准偏差为1.3-4.6%；尿液样本的回收率为71-109%，相对标准偏差为3.3-4.9%。说明方法的回收率高，稳定性好，完全可以满足血液和尿液样本中63种三高类药物检测的需要。

4. 总结

本文使用SCIEX液相色谱串联飞行时间质谱系统，采用SWATH®采集技术，建立了测定血液和尿液中63种三高类药物的方法；一针进样，15分钟完成了63种三高类药物的准确度和定量的测定；采用二级质谱定量的方法，化合物的灵敏度和定量准确度更高。本实验验证了血液和尿液在三个浓度范围的添加回收率，结果表明，血液基质的分析方法的回收率为72-118%，相对标准偏差为1.3-4.6%；尿液样本的回收率为71-109%，相对标准偏差为3.3-4.9%。该方法快速、准确、全面的完成了血液和尿液中的三高类治疗药物的准确度和定量的测定。

参考文献:

[1]. 王超, 祝波, 等. RRLC-MS/MS法同时测定保健食品中31种降糖、降压、降血脂类非法添加化合物药物[J]. 中国药师, 2019, 22(10): 1946-1950.

附表1

63种三高类治疗药物的化合物信息

序号	中文名	英文名	分子式	加合离子形式	理论一级精确质量	实测一级精确质量	质量偏差 (ppm)	二级精确质量	峰面积	保留时间 (min)
1	阿卡波糖	Acarbose	C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈	[M+H] ⁺	646.2553	646.2559	1.0	304.1398	1.45E+05	0.82
2	氨氯地平	Amlodipine	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	[M+H] ⁺	409.1525	409.1528	0.9	238.0634	4.55E+05	6.83
3	阿替洛尔	Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	267.1703	267.1705	0.8	145.0655	2.49E+06	2.34
4	阿托伐他汀	Atorvastatin	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	[M+H] ⁺	559.2603	559.2603	0.1	440.2247	4.33E+06	8.04
5	贝那普利	Benazepril	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	425.2071	425.2074	0.8	351.1678	6.34E+06	6.48
6	贝尼地平	Benidipine	C ₂₈ H ₃₁ N ₃ O ₆	[M+H] ⁺	506.2286	506.2285	-0.2	175.1308	1.04E+07	6.54
7	倍他洛尔	Betaxolol	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	[M+H] ⁺	308.2220	308.2222	0.5	116.1068	1.11E+07	5.59
8	苯扎贝特	Bezafibrate	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	[M+H] ⁺	362.1154	362.1160	1.8	138.9943	2.69E+06	7.52
9	比索洛尔	Bisoprolol	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	[M+H] ⁺	326.2326	326.2329	0.9	116.1080	7.64E+06	5.03
10	坎地沙坦	Candesartan	C ₂₄ H ₂₀ N ₆ O ₃	[M+H] ⁺	441.1670	441.1674	1.0	263.1278	2.95E+06	7.30
11	卡托普利	Captopril	C ₉ H ₁₅ NO ₃ S	[M+H] ⁺	218.0845	218.0845	-0.3	116.0720	1.62E+06	3.82
12	卡维地洛	Carvedilol	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	407.1965	407.1969	0.8	206.1174	7.06E+06	6.10
13	环丙贝特	Ciprofibrate	C ₁₃ H ₁₄ Cl ₂ O ₃	[M+Na] ⁺	311.0212	311.0213	0.2	107.0802	1.06E+05	7.90
14	氯贝特	Clofibrate	C ₁₂ H ₁₅ ClO ₃	[M+H] ⁺	243.0782	243.0781	-0.5	141.0110	2.58E+05	8.35
15	依那普利	Enalapril	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	377.2071	377.2073	0.5	234.1477	1.49E+07	5.48
16	依普利酮	Eplerenone	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	[M+H] ⁺	415.2115	415.2118	0.8	163.0750	2.80E+06	6.06
17	依替米贝	Ezetimibe	C ₂₄ H ₂₁ F ₂ NO ₃	[M+H] ⁺	410.1562	410.1558	-1.1	238.0634	9.38E+04	6.83
18	非洛地平	Felodipine	C ₁₈ H ₁₉ Cl ₂ NO ₄	[M+H] ⁺	384.0764	384.0764	0.0	324.0163	6.00E+05	8.64
19	非诺贝特	Fenofibrate	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	[M+H] ⁺	361.1201	361.1205	0.9	233.0367	1.06E+07	9.48
20	氟伐他汀钠	Fluvastatin	C ₂₄ H ₂₆ FNO ₄	[M+Na] ⁺	434.1738	434.1738	-0.1	224.0869	1.98E+05	8.38
21	福辛普利	Fosinopril	C ₃₀ H ₄₆ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	586.2904	586.2905	0.1	458.2053	4.21E+06	9.84
22	吉非罗齐	Gemfibrozil	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	[M+Na] ⁺	273.1461	273.1462	0.2	129.0907	3.30E+05	9.01
23	格列本脲	Glibenclamide	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	[M+H] ⁺	494.1511	494.1509	-0.4	169.0041	2.09E+06	8.14
24	格列齐特	Gliclazide	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	324.1376	324.1378	0.5	127.1244	9.02E+06	7.01
25	格列美脲	Glimepiride	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	[M+H] ⁺	491.2323	491.2328	1.0	126.0915	1.49E+06	8.48
26	格列吡嗪	Glipizide	C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S	[M+H] ⁺	446.1857	446.1858	0.4	167.0159	1.77E+06	7.02
27	格列喹酮	Gliquidone	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₆ S	[M+H] ⁺	528.2163	528.2161	-0.3	167.0161	1.08E+06	8.95
28	咪达普利	Imidapril	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₆	[M+H] ⁺	406.1973	406.1976	0.8	234.1480	4.29E+06	5.48
29	吲达帕胺	Indapamide	C ₁₆ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	366.0674	366.0676	0.6	132.0812	4.10E+05	5.52
30	厄贝沙坦	Irbesartan	C ₂₅ H ₂₈ N ₆ O	[M+H] ⁺	429.2397	429.2401	0.9	195.1481	1.08E+07	7.44
31	拉西地平	Lacidipine	C ₂₆ H ₃₃ NO ₆	[M+H] ⁺	456.2381	456.2382	0.4	354.1332	7.77E+05	9.36
32	乐卡地平	Lercanidipine	C ₃₆ H ₄₁ N ₃ O ₆	[M+H] ⁺	612.3068	612.3072	0.7	298.2172	9.99E+06	7.83
33	赖诺普利	Lisinopril	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₅	[M+H] ⁺	406.2336	406.2337	0.0	84.0826	1.78E+05	3.21
34	氯沙坦	Losartan	C ₂₂ H ₂₁ ClN ₆ O ₂	[M+H] ⁺	437.1487	437.1488	0.2	235.0990	1.04E+06	7.28

63种三高类治疗药物的化合物信息 (续)

序号	中文名	英文名	分子式	加合离子形式	理论一级精确质量	实测一级精确质量	质量偏差 (ppm)	二级精确质量	峰面积	保留时间 (min)
35	洛伐他汀	Lovastatin	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	[M+H] ⁺	405.2636	405.2639	0.8	199.1478	3.50E+05	9.41
36	二甲双胍	Metformin	C ₄ H ₁₁ N ₅	[M+H] ⁺	130.1087	130.1094	5.6	71.0636	2.76E+06	0.82
37	美托洛尔	Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	268.1907	268.1909	0.8	116.1080	5.34E+06	4.05
38	那格列奈	Nateglinide	C ₁₉ H ₂₇ NO ₃	[M+H] ⁺	318.2064	318.2065	0.4	120.0810	3.98E+05	8.41
39	尼卡地平	Nicardipine	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₆	[M+H] ⁺	480.2129	480.2133	0.8	166.1222	9.98E+06	6.29
40	烟酸	Nicotinic Acid	C ₆ H ₅ NO ₂	[M+H] ⁺	124.0393	124.0396	2.0	78.0364	2.69E+05	1.10
41	硝苯地平	Nifedipine	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	347.1238	347.1242	1.3	254.0812	6.81E+04	7.83
42	尼群地平	Nitrendipine	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	361.1394	361.1397	0.8	315.0984	9.57E+05	7.84
43	奥美沙坦	Olmesartan	C ₂₄ H ₂₆ N ₆ O ₃	[M+H] ⁺	447.2139	447.2139	-0.1	207.0910	2.36E+06	5.20
44	培哚普利	Perindopril	C ₁₉ H ₃₂ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	369.2384	369.2389	1.5	172.1342	1.03E+07	6.00
45	苯乙双胍	Phenformin	C ₁₀ H ₁₅ N ₅	[M+H] ⁺	206.1400	206.1401	0.2	105.0704	4.65E+06	2.99
46	吡格列酮	Pioglitazone	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	[M+H] ⁺	357.1267	357.1271	0.9	134.0958	1.21E+07	5.30
47	普伐他汀	Pravastatin	C ₂₃ H ₃₆ O ₇	[M+Na] ⁺	447.2353	447.2356	0.7	167.0153	3.83E+05	7.05
48	普萘洛尔	Propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	[M+H] ⁺	260.1645	260.1648	1.2	183.0800	7.58E+06	5.36
49	雷米普利	Ramipril	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	417.2384	417.2386	0.5	234.1494	2.80E+07	6.72
50	瑞格列奈	Repaglinide	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	453.2748	453.2751	0.8	230.1903	3.13E+07	8.17
51	罗格列酮	Rosiglitazone	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	358.1220	358.1223	0.9	135.0916	8.42E+06	4.35
52	瑞舒伐他汀	Rosuvastatin	C ₂₂ H ₂₈ FN ₃ O ₆ S	[M+H] ⁺	482.1756	482.1757	0.4	369.0643	3.31E+06	6.99
53	沙格列汀	Saxagliptin	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	316.2020	316.2021	0.3	180.1380	5.73E+05	3.51
54	辛伐他汀	Simvastatin	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	[M+H] ⁺	419.2792	419.2796	0.9	199.1477	6.83E+05	9.69
55	西格列汀	Sitagliptin	C ₁₆ H ₁₅ F ₆ N ₅ O	[M+H] ⁺	408.1254	408.1257	0.8	235.0799	7.44E+05	4.02
56	螺内酯	Spironolactone	C ₂₄ H ₃₂ O ₄ S	[M+Na] ⁺	439.1914	439.1915	0.4	341.2105	1.15E+05	7.87
57	替米沙坦	Telmisartan	C ₃₃ H ₃₀ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	515.2442	515.2446	0.9	305.1757	6.71E+06	7.55
58	甲苯磺丁脲	Tolbutamide	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	[M+H] ⁺	271.1111	271.1113	0.7	155.0162	2.56E+06	6.39
59	氨苯蝶啶	Triamterene	C ₁₂ H ₁₁ N ₇	[M+H] ⁺	254.1149	254.1150	0.6	237.0877	6.96E+06	3.95
60	缬沙坦	Valsartan	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃	[M+H] ⁺	436.2343	436.2347	0.9	291.1498	1.55E+06	7.77
61	维拉帕米	Verapamil	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	455.2904	455.2912	1.8	165.0922	6.36E+06	6.18
62	维格列汀	Vildagliptin	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	304.2020	304.2022	0.9	154.0970	1.82E+06	2.37
63	伏格列波糖	Voglibose	C ₁₀ H ₂₁ NO ₇	[M+H] ⁺	268.1391	268.1394	1.3	92.0721	1.04E+06	0.79

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13122-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835