

Q Exactive Focus 不同高分辨定量方式在药物分析中的应用

周哲, 江峥

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词: 静电场轨道阱, 高分辨定量, Q Exactive Focus, 杂质, SIM, PRM

ÜZONGLAB

1. 引言

质谱技术因其出色的灵敏度和专属性已经被广泛的应用于药物分析, 传统质谱定量采用单位分辨选择离子检测 SIM 或选择反应监测 SRM 的定量方式, 高分辨质谱具有获得化合物离子精确质量数和分离相邻质量峰的能力, 被越来越多的应用于定量分析中。

基于 Orbitrap 静电场轨道阱技术的 Q Exactive Focus 将高性能四极杆与高分辨 Orbitrap 技术相结合, 具有高达 70,000 FWHM 的分辨率和长期稳定的高质量精度, 可获得高质量的一级和二级高分辨质谱数据, 保证了定性和定量结果的可靠性; 媲美高端三重四极杆的灵敏度和宽线性范围可轻松定量药物中的微量组分。Q Exactive Focus 提供不同的高分辨定量模式, 满足不同的定量需要:

a) 全扫描 (FullScan) 高分辨定量: 所有扫描范围内的化合物离子通过四极杆, 送入 Orbitrap 后得到检测, 再通过精确质量数从 Fullscan 数据中提取 XIC 图谱进行定量, 因为 Q Exactive Focus 具有良好的质量精度, 因此可以将提取窗口缩小至 5 ppm, 甚至更低, 充分保证了方法极高的选择性, 该种定量方式无需预知化合物信息, 可以记录所有已知和未知的化合物质谱信号, 方便数据的回溯分析。

b) 选择离子检测 (SIM) 高分辨定量: 通过四极杆对目标化合物进行选择通过, 然后将目标化合物送入 Orbitrap 进行高分辨扫描, 然后通过一级精确质量数提取 XIC 图谱进行定量。该种定量方式通过高性能四极杆的筛选和过滤, 可去除大量的干扰离子, 使目标化合物更多的进入检测器, 提升了检测的灵敏度。

c) 平行反应检测 (PRM) 高分辨定量: 通过四极杆对目标化合物进行选择通过, 离子在通过后进入碰撞池发生高能碰撞碎裂, 所产生的碎片将被同时送入 Orbitrap 进行高分辨扫

描, 然后选择高分辨的二级子离子进行定量。该定量方式通过四极杆过滤掉大量干扰离子提高了灵敏度的同时, 二级高分辨质谱进一步提高了定量的专属性。

本文通过对盐酸美金刚杂质 N-(二甲基金刚烷)甘氨酸进行定量, 分别比对了上述几种高分辨定量方式, 从原理角度对不同定量方式的特点进行阐述, 对定量效果的灵敏度、线性范围、专属性进行了比较。

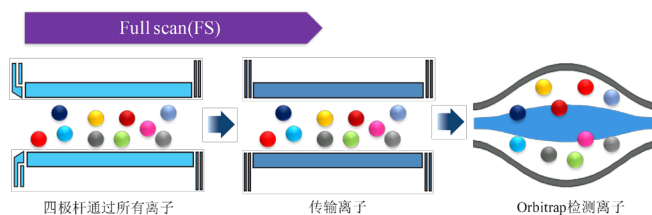


图 1. 全扫描 (FullScan) 高分辨定量示意图

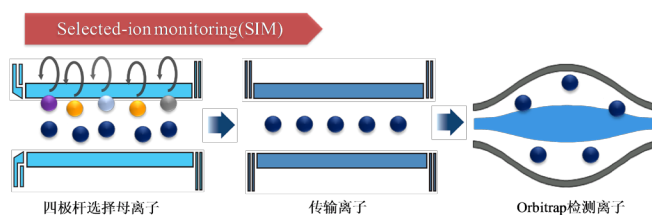


图 2. 选择离子检测 (SIM) 高分辨定量示意图

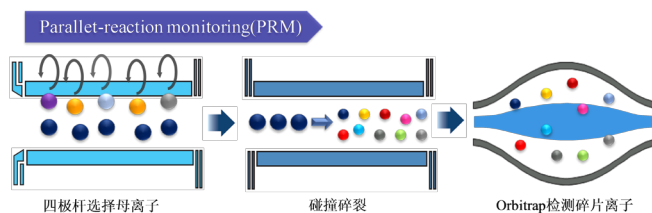


图 3. 平行反应检测 (PRM) 高分辨定量示意图

2. 实验条件

2.1 液相色谱条件:

仪器: Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱仪

色谱柱: Thermo Scientific Hypersil Gold aQ (100 × 2.1 mm, 1.9 μm)

流动相: A 为水相: 0.1% 甲酸水, B 为有机相: 乙腈

梯度条件:

时间 (min)	A	B
0	75	25
5	60	40

时间 (min)	A	B
5.1	75	25
7	75	25

流速 0.3 mL/min, 进样量: 1 μL, 柱温为 30°C

2.2 质谱条件

仪器: Thermo Q Exactive Focus 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨串联质谱

离子源参数: HESI Spray voltage: +3.5 KV; Sheath Gas

Pressure: 40 arb; Aux Gas Pressure: 10 arb; Capillary Temp:

300°C; Heater Temp: 350°C

扫描模式 Scan Mode	全扫描 FullScan	选择离子监测 SIM	平行反应监测 PRM
AGC 目标值 AGC Target	1e6	5e4	5e4
扫描范围 Scan range	100.00 to 700.00 m/z;	236.18 to 240.18 m/z	50.00 to 260.00 m/z
目标母离子 Target Ion	—	238.18016 m/z	238.18016 m/z
隔离窗口 Isolation Window	—	4.0 m/z	4.0 m/z
碰撞能量 CE	—	—	40、60、80

2.3 样品制备

取盐酸美金刚片杂质 N-(二甲基金刚烷)甘氨酸对照品储备液, 逐级稀释后制成含 N-(二甲基金刚烷)甘氨酸 0.12、0.6、1.2、6.0、12.0、60、120、600、1200、6000、12000 ng/ml (ppb) 的溶液, 分别按上述不同扫描模式进样分析。

3. 结果

3.1 全扫描 (FullScan)

全扫描 FullScan 定量记录的是所有进入检测器的离子信号, 然后通过精确分子量提取获得目标化合物谱响应进而实现定量。图 4 为 0.6、1.2、6.0 ng/ml 三个浓度全扫描下目标化合物的提取离子流信号, 即使在 0.6 ng/ml 浓度下, 上样量仅为 0.6 pg, 全扫描仍能检测到目标化合物离子明显的信号, 1.2 ng/ml 浓度下信号强度进一步提高, 且提取离子流窗口都使用了统一的 5 ppm (0.0012 amu), 表明 QE Focus 在极低浓度下可以保持出色的质量精度。

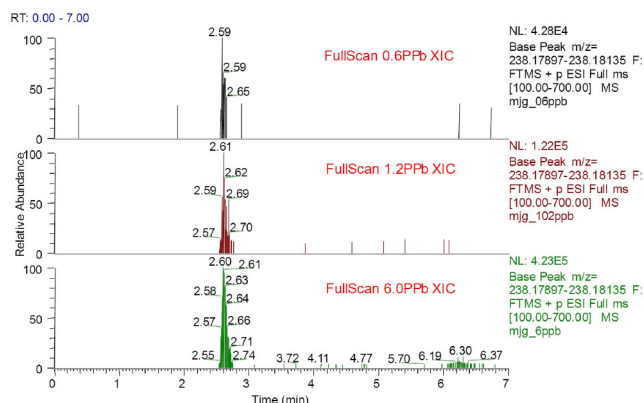


图 4. 全扫描 0.6 PPb、1.2 PPb、6.0 PPb 浓度下提取离子流色谱图

考察全扫描定量的线性范围和重现性。N-(二甲基金刚烷)甘氨酸的一级全扫描精确质量数 XIC 色谱图, 1.2 ng/ml~12 μg/ml 标准曲线见图 5, 1.2 ng/ml 和 1200 ng/ml 两个浓度下各 5 针精密密度见图 6。

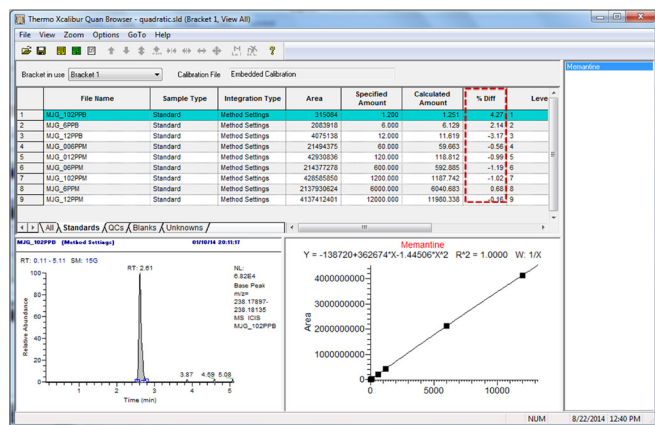


图 5. 全扫描定量线性范围 (1.2 ng/ml~12 μg/ml)

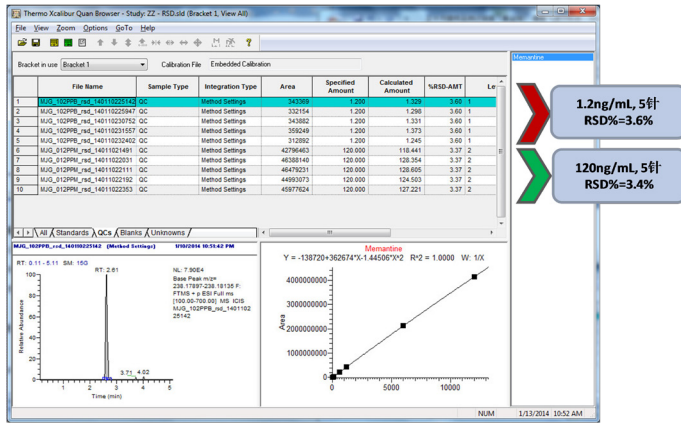


图 6. 全扫描定量精密度 (1.2、120 ng/ml)

结果表明, N-(二甲基金刚烷)甘氨酸在 1.2 ng/ml-12 μ g/ml 线性关系良好, $Y=-138720+362674X-1.44506X^2$, $R^2=1.0000$, 各浓度点的偏差都在 5% 以内。在 1.2 ng/ml 定量下限和 120 ng/ml 高浓度下重现性均良好, 5 针 RSD 均小于 4%

3.2 选择离子监测 (SIM)

选择离子监测 SIM 高分辨定量通过四极杆对目标化合物进行选择性通过, 然后将目标化合物送入 Orbitrap 进行高分辨扫描。通过四极杆的筛选和过滤, 可去除大量的干扰离子, 使目标化合物更多的进入检测器, 然后通过一级精确质量数的提取进行定量。比较 0.12 ng/ml SIM 模式下提取离子流信号, 结合 AGC 值和各浓度下离子注入时间, 可知在 0.12 ng/ml 浓度下进入 Orbitrap 检测器的目标化合物离子数目大幅增加。即使浓度比全扫描降低 10 倍, 仍可获得较好的峰型。

但在定量过程中, 常存在同质异素甚至同分异构体的干扰, 通过一级精确质量数无法获得与目标化合物的有效区分, 例如在 SIM 模式下各浓度 XIC, 可观察到 6.2 min 存在干扰峰 (图 7 蓝色虚线框部分)。

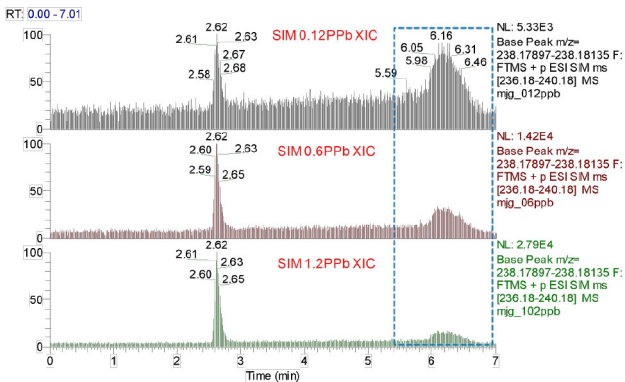


图 7. 选择离子监测 0.6 PPb、1.2 PPb、6.0 PPb 浓度下提取离子流色谱图

从图 8 一级质谱数据中可以看出, 6.2 min 的峰中存在 m/z 238.014 的干扰离子, 与目标杂质 N-(二甲基金刚烷)甘氨酸非常接近, 仅相差 0.5 ppm, 无法通过一级质谱对两者加以区分。

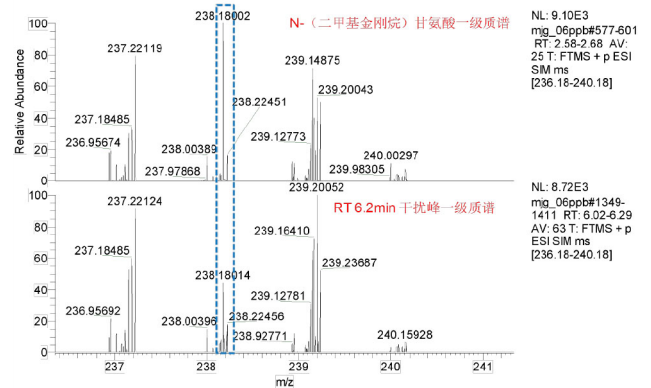


图 8. N-(二甲基金刚烷)甘氨酸和干扰峰一级质谱比对

3.3 平行反应监测 (PRM)

平行反应检测 (PRM) 高分辨定量通过四极杆对目标化合物进行选择性通过,

离子在通过后立即进入碰撞池并发生高能碰撞碎裂, 所产生的碎片将被同时送入 Orbitrap 进行高分辨扫描, 然后选择高分辨的二级离子进行定量。该定量方法的特点为, 在四极杆过滤掉大量干扰离子提高了灵敏度的同时, 二级高分辨质谱进一步提高了定量的专属性。

为更好的进行 PRM 定量, 需要选择出高质量的定量离子, 采用 Q Exactive Focus 对目标杂质 N-(二甲基金刚烷)甘氨酸进行二级碎裂, 在获得了高质量的二级质谱图后, 将其导入专业的小分子结构解析软件 Mass Frontier 7.0, 可快速准确的完成对不同碎片离子及其所对应的结构进行自动推测 (图 9)。

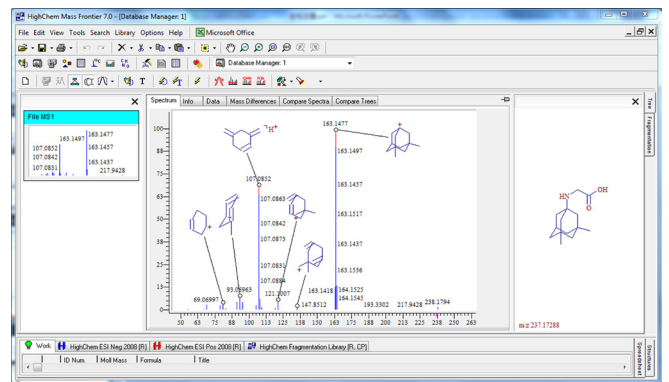


图 9. Mass Frontier 自动归属二级质谱碎片

该软件含有 Fragmentation Library 碎裂数据库，该数据库几乎涵盖了所有已发表的文献，在快速完成碎片结构归属的同时，可以获得完整的碎片裂解机理，并可方便的调用查看所引用的文献情况，保证了碎片解析的准确性（图 10）。

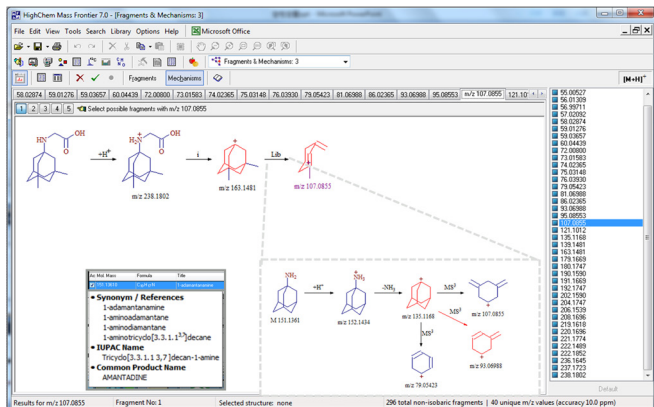


图 10. Fragmentation Library 提供碎片裂解机理

由以上分析可知， m/z 107.0855 和 163.1481 的碎片具有较高的质量，作为 PRM 定量的首选离子。

进一步，通过比对 N-（二甲基金刚烷）甘氨酸二级质谱和 6.2 min 干扰离子的二级质谱图（图 11）发现， m/z 107.0855 碎片离子同时存在于两者之中（蓝色虚线框部分），以此离子定量无法有效区分目标化合物和干扰离子，而 m/z 163.1481 碎片离子只存在于目标化合物二级质谱图中（红色虚线框部分），以此离子定量，具有更高的专属性。

4. 结论：

4.1 本方法采用 Q Exactive Focus 进行高分辨定量，获得了出色的定量结果。全扫描定量线性范围为 1.2 ng/ml~12 μg/ml， $R^2=1.000$ ，每个浓度点和线性的偏差小于 5%，且无论是高浓度还是低浓度都获得了小于 4% 的 RSD；选择离子监测 SIM 通过四极杆过滤背景干扰并筛选目标母离子进行累积，可使定量灵敏度提高至 0.12 ng/ml，比进口注册标准提高 200 倍，整个线性范围高达 5 个数量级；平行反应监测 PRM 通过四极杆过滤背景干扰并筛选目标母离子累积后进行高能裂解，进而获得高质量的二级子离子全扫描信息，在保证了灵敏度的同时，有效的排除同质异素甚至同分异构的干扰，获得更高的专属性。

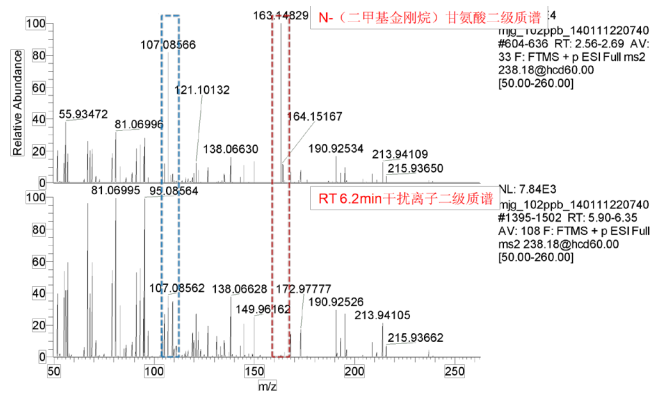


图 11. N-（二甲基金刚烷）甘氨酸和干扰峰二级质谱比对

通过比对 SIM 定量和 PRM 定量效果，通过采用子离子 m/z 163.1481 进行 PRM 定量，可更好的去除背景干扰，获得更高的专属性（图 12）。

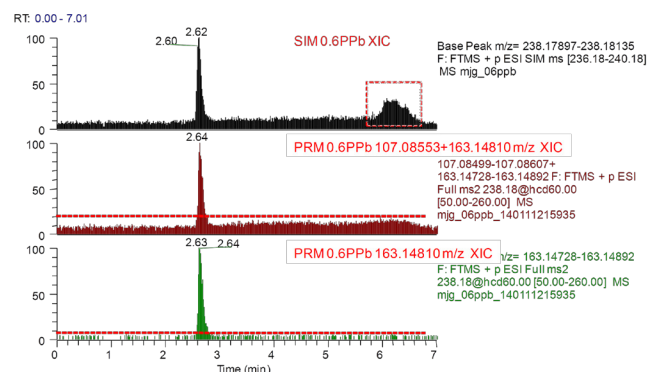


图 12. 不同定量方式和不同的子离子选择情况下提取离子流对比

4.2 Q Exactive Focus 将高性能四极杆与高分辨 Orbitrap 技术相结合，具有高达 70,000 FWHM 的分辨率和长期稳定的高质量精度，即使在杂质极低含量的情况下，仍可获得高质量的一级和二级高分辨质谱数据，保证了定性和定量结果的可靠性；媲美高端三重四极杆的灵敏度和宽线性范围可轻松定量药物中的痕量杂质。与三重四极杆质谱相比，Q Exactive Focus 采用一级质谱定量不需要优化母离子，子离子参数，仅利用目标化合物精密分子质量即可实现准确定量，更为方便快捷。采用二级高分辨质谱定量可以记录子离子全扫描信息，通过在数据后处理中灵活的挑选更具有专属性的子离子进行定量，有效的排除基质干扰，选择性更好，灵敏度更高。

禹重科技® UZONGLAB

成分分析仪器 | 表面测试仪器 | 样品前处理仪器

上海市闵行区春申路2525号芭洛商务大楼
电话：021-8039 4499 传真：021-5433 0867
上海|北京|沈阳|太原|长沙|广州|成都|青岛|香港
全国销售和售后服务电话：400-808-4598

邮编：201104, China
邮箱：shanghai@uzong.cn

更多信息请访问：www.uzong.cn



了解我们



微信公众号