

高效液相色谱/质谱联用仪

作者

Sharanya Reddy

PerkinElmer, Inc.

Shelton, CT USA

利用AxION 2 TOF MS的精确质量、灵敏度和宽的动态范围进行杂质鉴

简介

飞行时间 (TOF) 质谱仪可提供精确的质量信息和高灵敏度及较宽的质量范围, 因此可进行未知化合物如杂质的鉴定。利用PerkinElmer AxION® 2 TOF MS的TrapPulse™技术具有提的高准确质量的性能, 使得我们的工作流程能够发现杂质并进行鉴定。传统的扫描仪器, 如四级杆质谱仪, 当进行较宽质量范围扫描时, 会

丢失大量的灵敏度。这种灵敏度丢失的情况不会发生在AxION 2 TOF质谱仪上, 因为该设备具有快速的样品采集速率, 从而使得我们可以测定杂质, 否则该类杂质将被丢失。AxION 2 TOF MS的TrapPulse 创新的模式提高了分析灵敏度, 在此例中, 捕集脉冲模式是在脉冲进入飞行管之前, 收集密集的离子包来实现灵敏度的提高。这使得我们很容易测定低浓度水平的未知化合物, 这些化合物在传统设计的TOF仪器中或许不能被发现。

除了很宽的动态范围灵敏度外, AxION 2 TOF MS可提供准确质量, 能够进行实时质量锁定, 准确同位素测定, 质量分辨率, 所有这些都增加了杂质快速、准确鉴定的信心。增加的质量精确度和测定同位素比率的能力使得AxION 2 TOF MS明显的减少了潜在的候选化合物, 这些候选化合物需要利用分子式进行进一步的鉴定。典型鉴定未知化合物分子式的工作流程包括利用基于元素准确质量

和同位素模式进行的分子式计算。PerkinElmer AxION EC ID软件进一步减少了匹配化合物的可能性，该匹配是通过准确质量和同位素比与数据库中存在的分子式信息进行比较。然后对匹配分子式进行排名，以获得用户根据精确质量范围和同位素比确定最适合的分子式。此功能大大提高了选择正确分子式的能力，无需考虑含有的元素、能不能发生分子式断裂、或者运行另外的试验。

在这里，我们提出了一种简化的筛选、鉴定杂质的方法，以一种不受管制褪黑激素药片为例。褪黑激素已经被发现在某些食物中，在美国，它可以作为一种膳食补充剂在柜台被销售，并且其可能含有未知的杂质。

试验条件

LC条件：

LC系统：Flexar™ FX-10 HPLC

LC色谱柱：PerkinElmer Brownlee™ Supra C18色谱柱 (1.9 μm, 2.1 x 50 mm)

色谱柱温度：25 °C

流速：0.4mL/min

流动相A：含有0.1%的甲酸水溶液

流动相B：含有0.1%甲酸的乙腈溶液

进样体积：2 μL

梯度：5min内，B由20%增加到40%，然后在2min之内B的量增加到70%。

质谱条件：

质谱仪：PerkinElmer AxION 2 TOF，ESI 阳离子扫描模式

离子源：PerkinElmer Ultraspray™ 2 (双 ESI 源)

毛细管出口电压：+100V

脉冲模式：m/z 100-700

捕集脉冲模式：m/z 100-700

样品制备

将含有1mg褪黑激素的几片褪黑激素药片用砂浆和杵磨碎后溶解在10mL的水中，混合溶液进行涡旋，然后6000rpm离心10min，收集上层溶液，注射进入色谱柱。

结果与讨论

利用Flexar FX-10 HPLC与AxION 2 TOF MS的联用仪进行杂质分析

PerkinElmer Flexar FX-10 HPLC与AxION 2 TOF MS完全集成，且由AxION数据系统控制。该集成的软件使得仪器启动非常容易，包括AxION 2 TOF MS的自动调谐，在一个页面中对所有仪器的参数进行方法编辑，通过一个单独的界面进行样品分析。使用一个软件包来完成仪器通讯，确保最短的停机时间。

灵敏度增加的AxION 2 TOF MS使用脉冲捕集模式给杂质分析提供了更深入的鉴定信息。传统脉冲模式的分析检测出了褪黑激素药片中很少量的杂质（图1a）。然而当使用捕集脉冲模式分析时，杂质分析的灵敏度几乎增加了8倍，这些杂质以前未能被明显的检测（图1b）。由于该仪器较宽的动态范围，AxION 2 TOF MS可以在一次分析中鉴定多个杂质。这种单次运行就可测量整个质量范围的能力，使得方法的开发比通过仪器扫描来实现更简单、更快速。

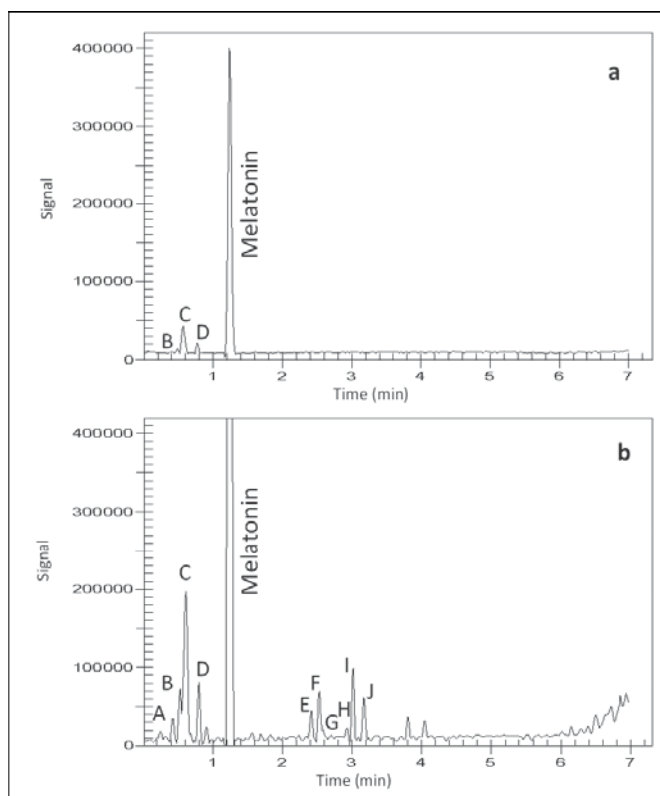


图1 (a) 基峰强度色谱 (BIC) m/z240-500，脉冲模式 (b) 基峰强度色谱 (BIC) m/z240-500，捕集脉冲模式，灵敏度增加了8倍，褪黑激素药片中监测到的杂质标记为A-J，利用ESI TOF阳离子扫描模式获得数据。

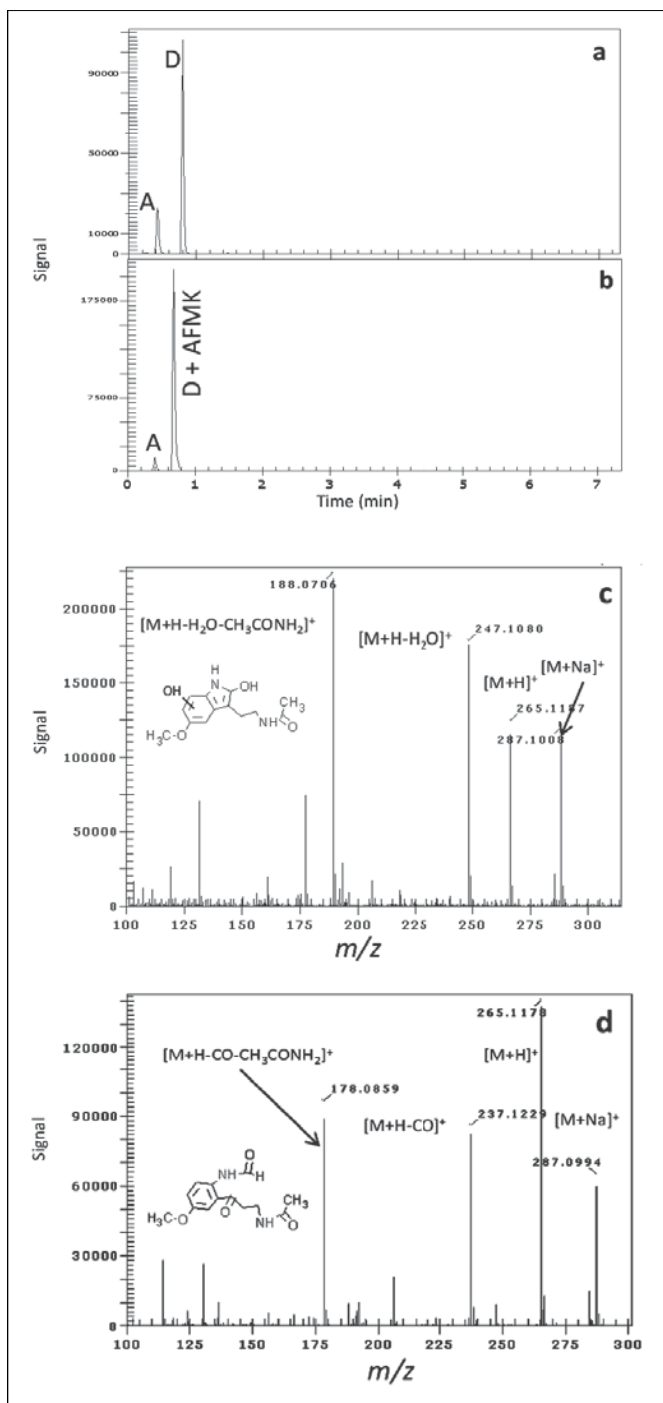


图2 (a) BIC ($m/z 265.132 \pm 0.050$), 褪黑激素药片中同分异构体A和D。(b) BIC ($m/z 265.132 \pm 0.050$), 在褪黑激素药片中加入AFMK标准物质与色谱峰D共流出。(c) 杂质A的质谱图, $[M+H]^+$ 离子的准确质量和峰A的碎片均小于理论值2.0ppm。(d) 色谱峰D的质谱图, $[M+H]^+$ 离子的准确质量和峰D碎片的阈值小于2.5ppm。

鉴定未知杂质

AxION 2 TOF MS提供的准确质量和精确同位素比及较宽的质量范围, 利用AxION EC ID软件更容易的鉴定未知杂质。杂质色谱峰A和D具有相同的准确质量, 但是具有不同的保留时间, 质谱图表明这两种物质可能是同分异构体(图2a,2b,和2d)。干净、可重复性的毛细管出口CID提供准确的质谱片段提供了进一步的确认, 这两个峰有相同的分子式, 但其具有不同的结构。通过AxION EC ID进一步进行分子式的确认(图3a和3b), AxION EC ID推出全自动的PubChem数据库检索(图3c)。AxION EC ID利用AxION 2 TOF MS提供的准确质量和同位素比进行检索, 仅获得唯一的匹配化合物反馈, 从而可以快速的鉴定未知色谱峰。N1-乙酰-N2-甲酰-5-甲氧基犬尿氨酸(AFMK)是PubChem数据库检索结果之一, 该化合物经体内研究表明是褪黑激素的代谢产物。色谱峰D与在样品中加入AFMK标准品的保留时间和质谱图匹配一致, 从而结果得到进一步确认(图2b和2d)。

Williamson等前期的研究利用了串联四级杆质谱仪测定结果推测色谱峰D的结构是一个取代的吡啶, Williamson提出吡啶元素的组成是($C_{14}H_{20}N_2O_3$), 准确质量是265.15467。AxION 2 TOF MS提供的更准确的分子质量表明, Williamson推测的分子结构比实际准确质量大约高出140ppm(色谱峰D由AxION 2 TOF MS获得), 由此可以知道Williamson推测是不正确的。

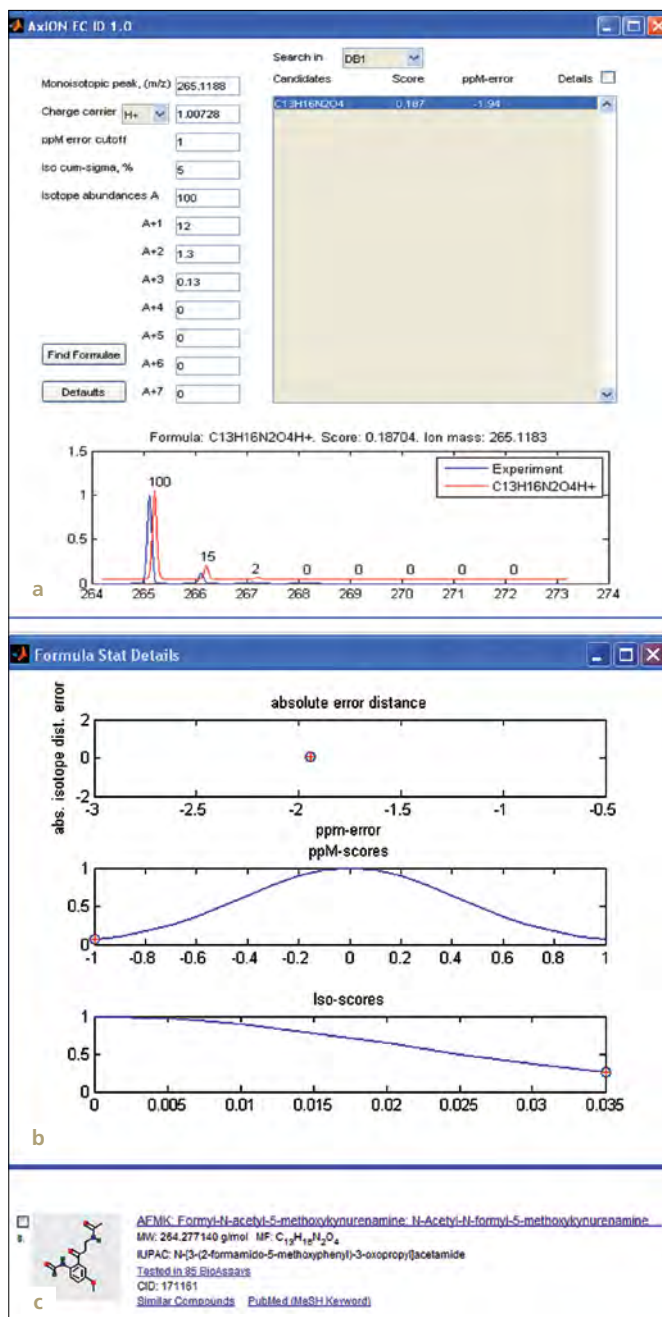


图3 (a) 用户使用AxION EC ID定义准确质量和同位素模式的确定性。(b) 附加与选择分子式匹配的实验数据统计拟合。(c) 从AxION ECID自动PubChem匹配选择分子式。

结论

利用PerkinElmer Flexar FX-10 HPLC与AxION 2 TOF MS联用仪，及创新的后处理软件组成的AxION平台，可提高和简化杂质分析。该分析快速、容易和准确。该平台将所有仪器的功能结合在一个单一接口的集成软件中，确保可靠启动和稳定的进行样品分析，此外，该平台能够快速和容易的给出未知杂质鉴定结果。

PerkinElmer, Inc.

珀金埃尔默仪器（上海）有限公司

地址：上海张江高科园区李冰路67弄4号

邮编：201203

电话：800 820 5046 或 021-38769510

传真：021-50791316

www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表，请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2012, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自所有者或所有者的财产。