

• 研究简报 •

一种新软件方法用于单位分辨质谱仪上药物相对分子质量的准确测定

刘 可¹, 马 彬¹, 王永东², 陈笑艳¹, 钟大放^{1*}

(1. 中国科学院 上海药物研究所, 上海 201203; 2. Cemo Bioscience, Danbury, CT 06810, USA)

关键词: 准确相对分子质量; 同位素; 单位分辨质谱仪

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)10 - 1112 - 03

A new software method for accurate mass measurements of drugs on unit mass resolution mass spectrometerLIU Ke¹, MA Bin¹, WANG Yong-dong², CHEN Xiao-yan¹, ZHONG Da-fang^{1*}

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

2. Cemo Bioscience, Danbury, CT 06810, USA)

Abstract: Accurate mass measurements of 20 drugs were conducted using MassWorks software on a TSQ Quantum Ultra mass spectrometer. All Q1 scan mass spectral data were collected in profile mode with full width at half maximum (FWHM) set at 0.7 Da. The mass errors of all 20 drugs (molecular weight between 135 and 810) were within the range from -22.4×10^{-6} to 36.1×10^{-6} , among them 90% of the drugs achieved a mass accuracy better than 10×10^{-6} . The new method can provide accurate mass measurements on unit mass resolution mass spectrometers.

Key words: accurate relative molecular mass; isotope; unit mass resolution mass spectrometer

多数药物为小分子有机化合物,测量准确相对分子质量可推测其分子式组成,进一步确定该化合物的不饱和度,因而准确相对分子质量测量是药物定性分析的重要技术。目前可以用于准确相对分子质量测量的仪器有扇形场(magnetic sector field)质谱仪、傅立叶变换-离子回旋共振(FT-ICR)质谱仪、飞行时间(TOF)质谱仪和Orbitrap质谱仪^[1,2],其中FT-ICR是目前分辨率最高的质谱仪,分辨率超过 1×10^6 ,测量结果的质量误差在 1×10^{-6} 内^[3]。但是这些高分辨质谱仪价格昂贵,使准确相对分子质量的测量和应用受到限制。自然界中很多元素(如药物中经常含有的C, H, O和N等)都具有同位素,每种同位素在自然界的丰度为一个固定值,质谱图

中同位素峰M+1、M+2等的相对丰度可用于准确相对分子质量校正计算。近来美国Cemo Bioscience公司利用同位素规律开发出一种软件(MassWorks)方法校正计算准确相对分子质量^[4-6],并将该方法应用于药物代谢产物鉴定工作中^[6]。该软件通过建立校正函数方程,并将同位素效应、仪器噪音过滤、峰形补偿纳入函数方程中^[7],经过计算校正profile模式质谱图并获得准确相对分子质量值。本文尝试利用该软件方法,在单位分辨质谱仪上测量多种药物的准确相对分子质量。

材料与方法

仪器 美国The mo Finnigan公司TSQ Quantum Ultra型液相色谱-串联质谱联用仪,配有电喷雾电离源(ESI)以及Xcalibur 1.4数据处理系统和直接进样用注射泵。美国Cemo Bioscience公司Mass WorksTM质谱分析软件, Version: 1, 1, 5, 0。

收稿日期: 2007-04-02.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 21 - 50800738,

E-mail: dfzhong@mail.shnc.ac.cn

药品与试剂 磷霉素、水杨酸、对乙酰氨基酚、苯海拉明和氯丙嗪(中国药品生物制品检定所);福多司坦(威海迪沙药业有限公司);硫辛酸(山东齐都药业有限公司);苦参碱、昂丹司琼和多烯紫杉醇(江苏恒瑞医药有限公司);唑吡坦(A analytical Clinical Concepts GmbH Germany);奥司他韦(上海医药集团);艾芬地尔(第四军医大学西京医院);非那雄胺(苏州东瑞制药有限公司);氯雷他定(西安新通药物研究有限公司);倍他米松(重庆华邦制药有限公司);辛伐他汀(北京万全阳光医药科技有限公司);缙沙坦(山东益健药业有限公司);阿立哌唑(上海亨泰实业有限公司);西地那非(上海药物研究所);氨溴索(江苏恒瑞医药股份有限公司)。实验时分别取样品适量,用甲醇溶解,配成质量浓度约为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的待测溶液,另配质量浓度约 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的昂丹司琼溶液。

质谱条件 电喷雾电离源(ESI),加热毛细管温度为 $320 \text{ }^\circ\text{C}$,鞘气(N_2)压力 35 Arb ,辅助气(N_2)压力为 5 Arb 。正离子检测模式下,源喷射电压为 3.8 kV ;负离子检测模式下,源喷射电压为 -4.2 kV 。注射泵直接进样,溶液流速 $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。仪器分辨率 FWHM(Full-Width Half-Maximum)值设定为 0.7 Da 。一级全扫描(Q1 scan);扫描 m/z 范围设定为 $100 \sim 900$,扫描周期时间为 1 s ;图谱采集为 profile 文件格式。磷霉素、水杨酸和硫辛酸为负离子方式检测,其余药物均为正离子方式检测。

结果

利用 MassWorks 软件对 20 种药物一级全扫描 profile 质谱图进行校正计算,获得准确相对分子质量结果见表 1。以药物氯丙嗪准确相对分子质量测定为例,经 MassWorks 校正计算前后的 profile 质谱

图见图 1。

Table 1 Accurate mass measurement results for 20 drugs

Drug	Measured ion formula	Theoretical mass	Measured mass	Mass error ($\times 10^{-6}$)
Fosfomycin	$\text{C}_3 \text{H}_6 \text{O}_4 \text{P}$	137.000 4	136.997 3	- 22.4
Salicylic acid	$\text{C}_7 \text{H}_5 \text{O}_3$	137.023 9	137.025 1	8.6
Ace tam inophen	$\text{C}_8 \text{H}_{10} \text{NO}_2$	152.071 2	152.070 9	- 2.1
Fudoste ine	$\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{NO}_3 \text{S}$	180.069 4	180.069 8	2.2
Thioctic acid	$\text{C}_8 \text{H}_{13} \text{O}_2 \text{S}_2$	205.035 7	205.043 1	36.1
Matrine	$\text{C}_{15} \text{H}_{25} \text{N}_2 \text{O}$	249.196 7	249.197 8	4.5
Diphenhydram ine	$\text{C}_{17} \text{H}_{22} \text{NO}$	256.170 1	256.168 8	- 5.2
Ondanse tron	$\text{C}_{18} \text{H}_{20} \text{N}_3 \text{O}$	294.160 6	294.159 3	- 4.4
Zolpidem	$\text{C}_{19} \text{H}_{22} \text{N}_3 \text{O}$	308.176 3	308.175 2	- 3.7
Osetam ivir	$\text{C}_{16} \text{H}_{29} \text{N}_2 \text{O}_4$	313.212 7	313.209 8	- 9.4
Chlopr omazine	$\text{C}_{17} \text{H}_{20} \text{ClN}_2 \text{S}$	319.103 6	319.102 5	- 3.3
Ifenprodil	$\text{C}_{21} \text{H}_{28} \text{NO}_2$	326.212 0	326.214 0	6.2
Finaste ride	$\text{C}_{23} \text{H}_{37} \text{N}_2 \text{O}_2$	373.285 5	373.286 1	1.6
Loratad ine	$\text{C}_{22} \text{H}_{24} \text{ClN}_2 \text{O}_2$	383.152 6	383.152 9	0.8
Betam ethasone	$\text{C}_{22} \text{H}_{30} \text{FO}_5$	393.207 7	393.211 5	9.6
Sim vastatin	$\text{C}_{25} \text{H}_{39} \text{O}_5$	419.279 7	419.282 8	7.4
Valsartan	$\text{C}_{24} \text{H}_{30} \text{N}_5 \text{O}_3$	436.234 9	436.234 3	- 1.3
Aripiprazole	$\text{C}_{23} \text{H}_{28} \text{Cl}_2 \text{N}_3 \text{O}_2$	448.155 9	448.157 6	3.7
Sildenafil	$\text{C}_{22} \text{H}_{31} \text{N}_6 \text{O}_4 \text{S}$	475.212 7	475.212 6	- 0.2
Docetaxel	$\text{C}_{43} \text{H}_{54} \text{NO}_{14}$	808.354 4	808.354 7	0.4

讨论

影响校正结果的因素包括主峰饱和度、干扰峰、峰响应和药物的化学结构。MassWorks 校正计算过程中将同位素效应纳入算法当中,为了确保计算结果的可靠性,要求化合物准分子离子峰不能为过饱和峰(平头峰),以保证计算时采用正确的同位素丰度值。例如不同浓度的昂丹司琼溶液的 profile 谱图。在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 昂丹司琼使准分子离子峰饱和,同位素峰(m/z 295)的相对丰度较高;相比低浓度溶液($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)得到的同位素峰的相对丰度

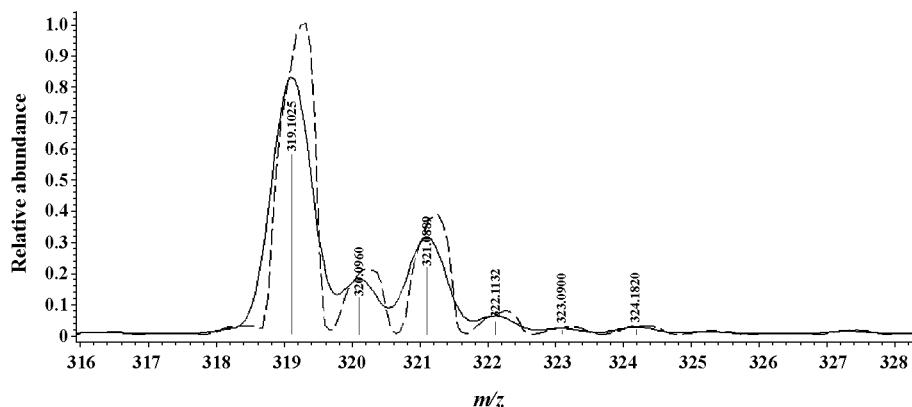


Figure 1 Full MS spectra of protonated molecules $[\text{M} + \text{H}]^+$ of chlorpromazine. - - -: Before calibration; —: After calibration

较低。采用前者校正计算的误差 (1×10^{-6}) 为后者的 5.5 倍。

一般对于不含 Cl 和 Br 的药物, 选取进行校正计算的区域为待测药物准分子离子峰前 1 Da 至后 3.5 Da, 而对于含 Cl 和 Br 的药物则选取准分子离子峰前 1 Da 至后 6 Da 为校正区域, 如果在选取的校正计算区域里面存在干扰峰则会导致计算结果产生很大误差。图 2 为氨溴索 ($C_{13}H_{18}BrN_2O$, 375.978 6) 进行校正计算时选取的校正区间, 准分子离子峰前 1 Da 处存在干扰峰, 校正后误差为 97.4×10^{-6} 。

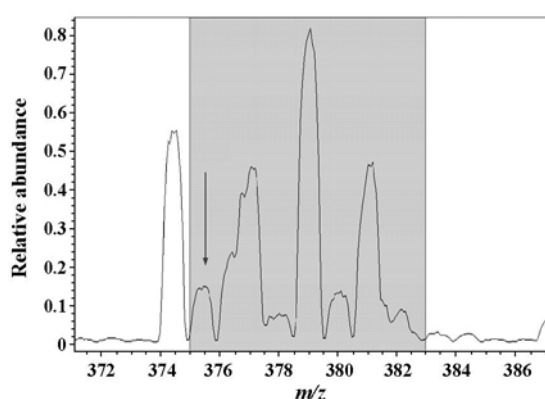


Figure 2 Selected mass range for ambrinolol accurate mass measurement

Blom^[8]证明了质量误差 (σ_{ppm}) 同峰响应 (S) 和分离度 (R) 满足如下关系式: $\sigma_{ppm} = \frac{10^6}{CRS^{1/2}}$, 其中 C 为常数。因此, 在保证准分子离子峰不过饱和的情况下, 应尽量提高样品的质谱响应来降低质量误差值。

本实验中酸性药物 (磷霉素、水杨酸、硫辛酸), 中性和两性药物 (对乙酰氨基酚、辛伐他汀、倍他米松、福多司坦、非那雄胺、多烯紫杉醇), 含碱性 N 原子药物 (苯海拉明、氯丙嗪、苦参碱、昂丹司琼、奥司他韦、艾芬地尔、氯雷他定、唑吡坦、缬沙坦、阿立哌唑、西地那非) 误差结果绝对值的平均值分别为 22.4, 3.9 和 4.3。药物分子的化学结构决定其离子化的难易程度, 通常碱性药物在正离子检测模式下响应高, 酸性药物在负离子检测模式下响应高, 两性 and 中性药物较难电离因而响应低。本实验中发现所测试的 3 种酸性药物溶液质谱响应偏低, 导致校正结果误差大; 而同浓度的碱性药物溶液质谱响应高, 校正结果误差小; 而在本文质谱条件下, 所测试的两性和中性药物响应较高, 因而校正结果误差小。

利用同位素峰高比推测化合物分子式组成为

1960 年代的早期技术 (Beynon 法), 近年来也有一些软件方法在此方面的应用。但所有的这些计算方法都需要假定某种峰形函数方程 (通常为高斯函数方程) 然后对质量误差进行校正, 这些未校正峰形的计算方法使得校正后结果的同位素分布同理论值之间存在较大误差。MassWorks 软件方法强调校正质量偏差的同时校正峰形^[7], 提高了校正后同位素分布的准确性, 进而提高了计算准确相对分子质量的准确度。

本文使用软件 MassWorks 校正计算方法在单位分辨率质谱仪上实现准确相对分子质量的测量, 对 20 种相对分子质量 135 ~ 810 之间的药物分子计算结果误差在理论值的 ($-22.4 \sim 36.1$) $\times 10^{-6}$ 之间, 其中 60% 的药物测量结果误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 以内, 90% 的药物测量结果误差在 $\pm 10 \times 10^{-6}$ 以内。说明这种新软件方法能适用于在单位分辨率质谱仪上测量药物的准确相对分子质量。

References

- [1] McLuckey SA, Wells JM. Mass analysis at the advent of the 21st century [J]. Chem Rev, 2001, 101: 571 - 606.
- [2] Ma SG, Chowdhury SK, Alton KB. Application of mass spectrometry for metabolite identification [J]. Curr Drug Metab, 2006, 7: 503 - 523.
- [3] Bristow AW, Webb KS. Intercomparison study on accurate mass measurement of small molecules in mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2003, 14: 1086 - 1098.
- [4] Zhao XG, Gu ZM, Gu M, et al. Combining profile mode mass spectral data processing and accurate mass filtering for metabolite identification [C]. Proc. 53rd ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, 2005, Poster No. 067.
- [5] Gu M, Wang YD, Zhao XG, et al. Accurate mass measurements on unit mass resolution mass spectrometers [C]. Proc. 53rd ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, 2005, Poster No. 050.
- [6] Gu M, Wang Y, Zhao XG, et al. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20: 764 - 770.
- [7] Wang YD. Methods for operating mass spectrometry (MS) instrument systems: US, 6983213 [P]. 2003-10-20.
- [8] Blom KF. Estimating the precision of exact mass measurements on an orthogonal time-of-flight mass spectrometer [J]. Anal Chem, 2001, 73: 715 - 719.