

用 MassLynx 4.1 软件提取液相色谱质谱联用部分重叠色谱峰的质谱图

梁乾德, 刘琳, 黄荣清, 高月

摘要 目的 两个化合物 A 和 X 采用液相色谱质谱联用法实现部分分离, 并形成部分重叠峰。尝试在不改变分离条件的情况下获得化合物 X 的“较纯的”质谱图。方法 运用 MassLynx 4.1 软件的“谱图合并(Combine Spectra process)”功能, 扣除化合物 A 的信号。结果 与预期相符, 所获得的质谱图明晰, 提示 X 可能是 A 的脱氢类似物, 后经验证, 与 A 脱氢类似物纯品的质谱图一致。结论 MassLynx 4.1 软件的“谱图合并”功能可以帮助分析者更容易地获得清晰的质谱信息, 并有可能节省传统方法中优化色谱条件所花费的时间, 是液相色谱质谱联用分析的有力工具。

关键词 液相色谱质谱联用; 重叠; 色谱峰; 质谱; MassLynx

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1008-9926(2011)05-0389-06

DOI 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.05.05

Extraction of the Mass Spectrum of Overlapped Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Peak with MassLynx 4.1 Software

LIANG Qian-de, LIU Lin, HUANG Rong-qing, GAO Yue

Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To obtain a “pure” mass spectrum of compound X without further optimization of the separation method. When two compounds A and X are partially separated with the current liquid chromatography/tandem mass spectrometry method and produce overlapped peaks. **Methods** The “Combine Spectra process” function of MassLynx 4.1 software with the subtraction of compound A’s signal was used. **Results** As expected, the extracted mass spectrum was unambiguous and indicated that compound X was possibly a dehydrogenated analog of compound A, which was supported by the similarity between the mass spectrum of X and the subsequently obtained mass spectrum of pure dehydrogenated analog of A. **Conclusion** The “Combine Spectra process” function of MassLynx 4.1 software can make it easier for the analyser to obtain clear mass spectrometric information, and may save the time taken to optimize the chromatographic condition by traditional methods. It is a powerful tool for high performance liquid chromatography analysis.

[Key words] high performance liquid chromatography; overlap; peak; mass spectrum; MassLynx

液相色谱质谱联用 (high performance liquid chromatography, LC-MS) 技术是对药物中未知成分进行定性分析的有力手段。但是, 当色谱分离效果差的时候会制约 LC-MS 的分析效果。因此通常情况下, 当两个化合物未充分分离而形成部分重叠峰的时候, 为了获得明确的质谱信息, 必须改变当前色谱条件以实现较充分的色谱分离。Waters MassLynx 4.1 软件是配合 Waters 系列质谱仪器的数据系统, 是集质谱信息采集、分析、管理和传送于一体的数据

平台, 其“谱图合并(Combine Spectra process)”功能能从部分重叠的 LC-MS 峰中提取出“较纯的”质谱图, 从而有可能省去优化色谱分离条件的过程, 提高工作效率。本文尝试运用该功能, 对两个部分分离化合物(化合物 A 和化合物 X) 中未知化合物 X 的质谱进行提取和分析。化合物 A (分子量为 370) 是本实验室研究的新药候选化合物。对化合物 X 进行鉴别有望发现化合物 A 的主要相关物质。

1 材料和方法

1.1 试剂 包含化合物 A 和化合物 X 的样品(粗品, 其中 A 的纯度 97.92%)、化合物 A 的纯品(纯度 99.73%), 化合物 A 脱氢类似物纯品(纯度

作者简介: 梁乾德, 博士, 副研究员。研究方向: 药物分析与中药现代化。Tel: (010) 66931225; E-mail: liangqiande@yahoo.com.cn

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所

通讯作者: 高月, Tel: (010) 66931312; E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn

98.68%, 均由本实验室黄荣清教授提供)。乙腈、甲酸均为 HPLC 级, 超纯水(Millipore 超纯水系统制备)。

1.2 仪器 Acquity UPLC 系统(包括溶剂管理器和样品管理器), BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm I. D., 1.7 μ m) 色谱柱, Synapt High Definition MS Q-TOF 质谱仪, 以及安装有 Masslynx v 4.1 软件的分析工作站(均为美国 Waters 公司)。

1.3 色谱 质谱条件 使用 BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm I. D., 1.7 μ m)。柱温: 35 $^{\circ}$ C。流动相: (A) 含 0.2% 甲酸的水和 (B) 含 0.2% 甲酸的甲醇-乙腈 (2:3) 溶液。梯度洗脱程序见表 1。流速: 0.5 ml/min。进样量: 1 μ l。质谱使用 ESI 离子源, 正离子模式。去溶剂气流速: 900 L/h, 温度: 450 $^{\circ}$ C, 锥孔气流速: 50 L/h, 源温: 100 $^{\circ}$ C, 毛细管电压和锥孔电压分别为 3000 V 和 40 V。扫描周期 0.17 s, 其中扫描时段 0.15 s, 扫描间延迟 0.02 s。捕获装置和传送装置的碰撞能量分别为 6.0 V 和 4.0 V。捕获装置气体流速 2.00 ml/min。锁校质量为 556.2771。

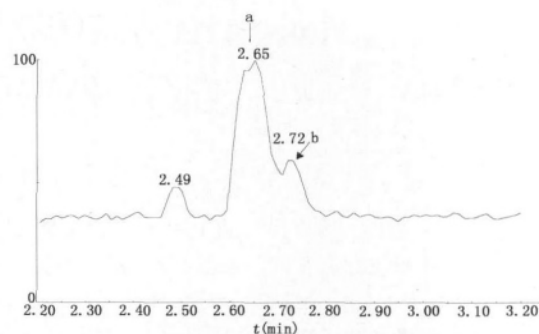
表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)
0.00	35	65
1.50	20	80
5.00	20	80
5.25	35	65
6.50	35	65

1.4 步骤和方法 首先考察含 A 和 X 粗品的总离子流色谱图(TIC), 确定 A 和 X 在 TIC 上的位置; 先用普通的谱图合并方法(只合并, 不扣除任何信号) 获得 A 的质谱图和 X 的质谱图(由于是部分分离, 其中含有 A 的信号); 再用合并后扣除特定信号的方法获得 X 的“较纯的”质谱图(扣除了 A 的信号), 并初步判断 X 可能是 A 的脱氢类似物; 然后在相同条件下分别考察 A 纯品和 A 脱氢类似物纯品的总离子流色谱图和质谱图, 另外还考察了优化色谱条件实现 A 和 X 基线分离后 X 的质谱图, 从而进一步佐证了 X 可能是 A 的脱氢类似物。

2 结果与讨论

2.1 含 A 和 X 粗品的 TIC 图 1 为含 A 和 X 粗品的 TIC。经定位, 峰 a 为 A 的色谱峰, 峰 b 为 X 的色谱峰。可以看出, 峰 a 和峰 b 只实现了部分分离。



a: 对应化合物 A; b: 对应未知化合物 X

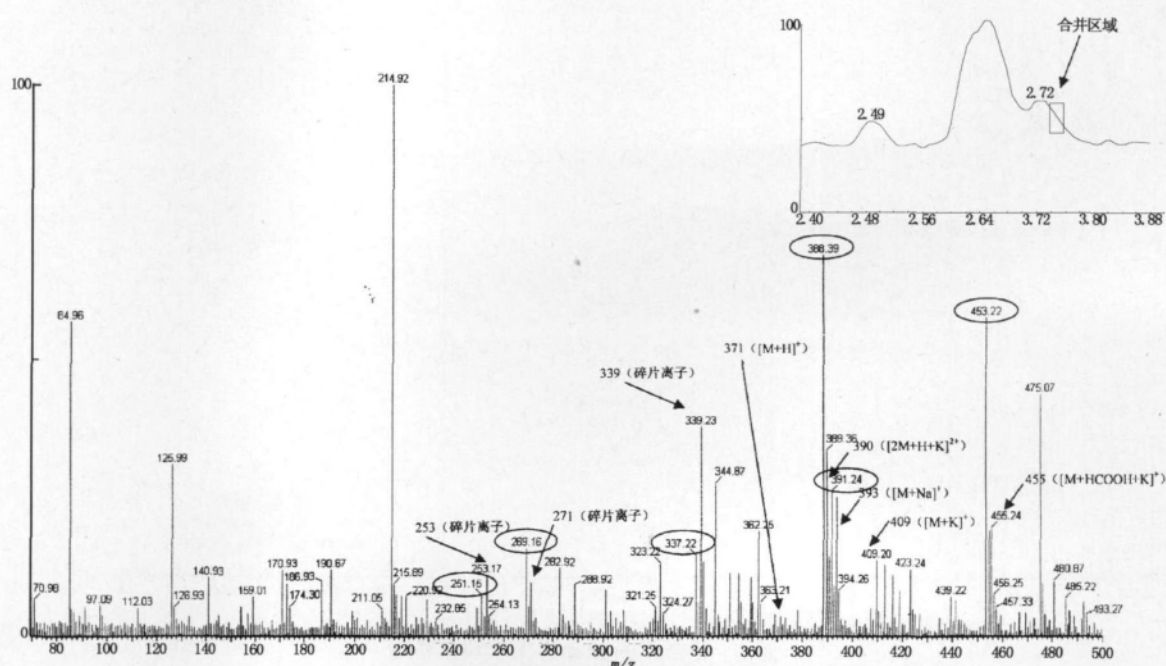
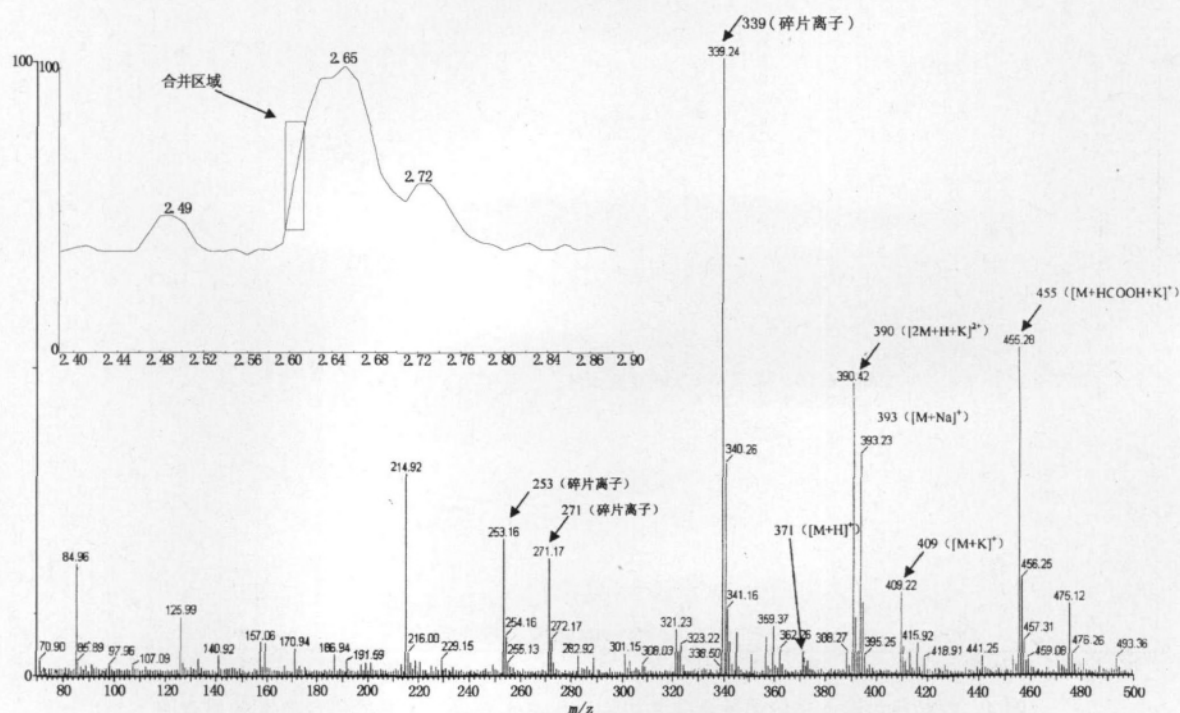
图 1 含 A 和 X 粗品的 TIC

2.2 对粗品中峰 a 进行谱图合并后获得的化合物 A 的质谱图 图 2 为对粗品中峰 a 进行谱图合并后获得的化合物 A 的质谱图。左上方的的小图显示被合并谱图区域的大致位置。质谱图中准分子离子峰 m/z 371 ($[M + H]^+$), 加合物离子峰 m/z 390 ($[2M + H + K]^{2+}$)、 m/z 393 ($[M + Na]^+$)、 m/z 409 ($[M + K]^+$) 和 m/z 455 ($[M + HCOOH + K]^+$) 明显显示该峰为化合物 A (分子量 370) 的色谱峰。 m/z 253, 271 和 339 是其主要碎片离子。

2.3 对粗品中峰 b 用普通谱图合并方法获得的化合物 X 的质谱图 图 3 为对粗品中峰 b 用普通谱图合并方法获得的化合物 X 的质谱图。右上方的的小图显示被合并谱图区域的大致位置。由于化合物 A 和 X 只实现了部分分离, 因此质谱图中既有 A 的信号也有 X 的信号。质谱图中除了有上面提到的化合物 A 的离子 (m/z 371, 390, 393, 409, 455, 253, 271, 339) 之外, 还可以看到一组符合“M-2”规律的离子, 即 m/z 369, 388, 391, 407, 453, 251, 269 和 337 (用椭圆标示, 其中 m/z 369 和 407 因为较弱而未标示)。提示峰 b 中可能存在化合物 A 的脱氢类似物。

2.4 对粗品中峰 b 进行谱图合并并扣除化合物 A 信号后获得的化合物 X 的质谱图 图 4 为对粗品中峰 b 进行谱图合并并扣除化合物 A 信号后获得的化合物 X 的质谱图。右上方小图显示被合并谱图区域和被扣除图谱区域的大致位置。与图 3 相比较, 所有 A 的信号 (m/z 371, 390, 393, 409, 455, 253, 271, 339) 都消失了, 而那一组“M-2”离子信号除了 391 之外仍存在并更加明晰(用椭圆标示), 表明这些信号很可能是 X 本身的信号。质谱图变得更加清楚且易于解释, 并再次提示化合物 X 可能是化合物 A 的脱氢类似物。

2.5 化合物 A 纯品的 TIC 和质谱图 图 5 为化合



物 A 纯品的 TIC 和质谱图(左上方小图)。小图中显示被合并谱图区域的大致位置。纯品的质谱图与粗品 a 峰的质谱图无明显差异。

2.6 化合物 A 脱氢类似物纯品的 TIC 和质谱图
图 6 为化合物 A 脱氢类似物纯品的 TIC 和质谱图 (左上方小图)。小图中显示被合并谱图区域的大

致位置。可以看出,类似物纯品的保留时间与粗品中 b 峰一致,见图 1。类似物纯品的质谱图与计算获得的“较纯的”质谱图相比,除 m/z 391 ($[M + Na]^+$) 之外, m/z 369 ($[M + H]^+$), 388 ($[2M + H + K]^{2+}$), 407 ($[M + K]^+$), 453 ($[M + HCOOH + K]^+$), 和主要碎片离子 251, 269 和 337 完全一致。

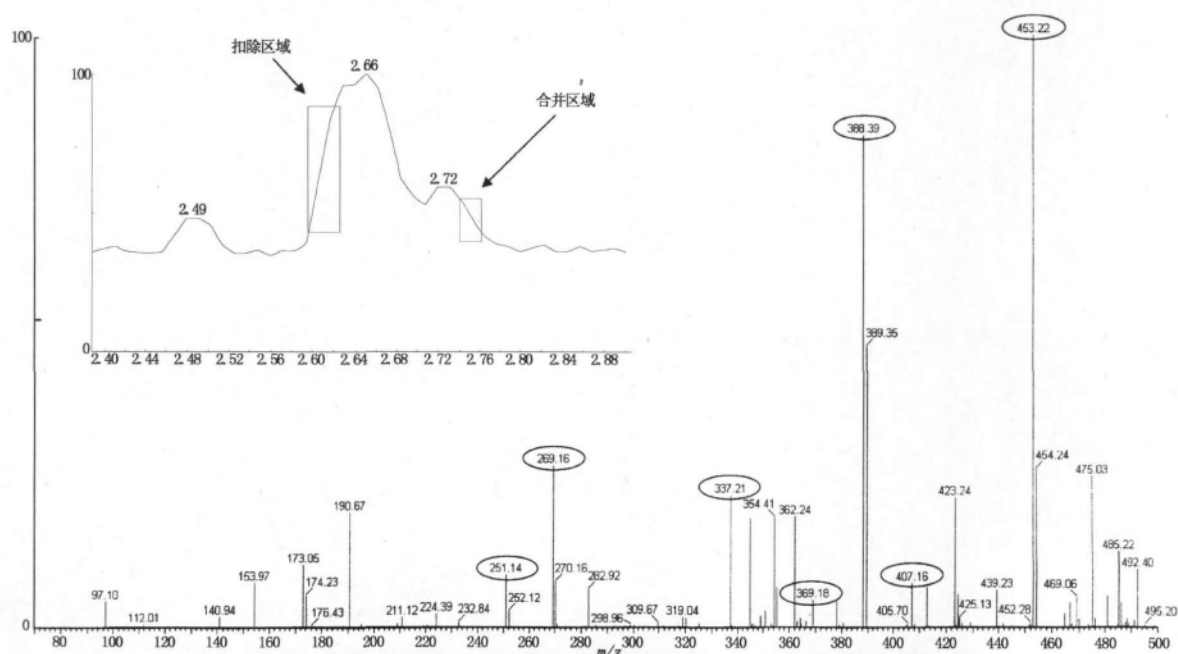


图 4 对粗品中峰 b 进行谱图合并并扣除化合物 A 信号后获得的化合物 X 的质谱图

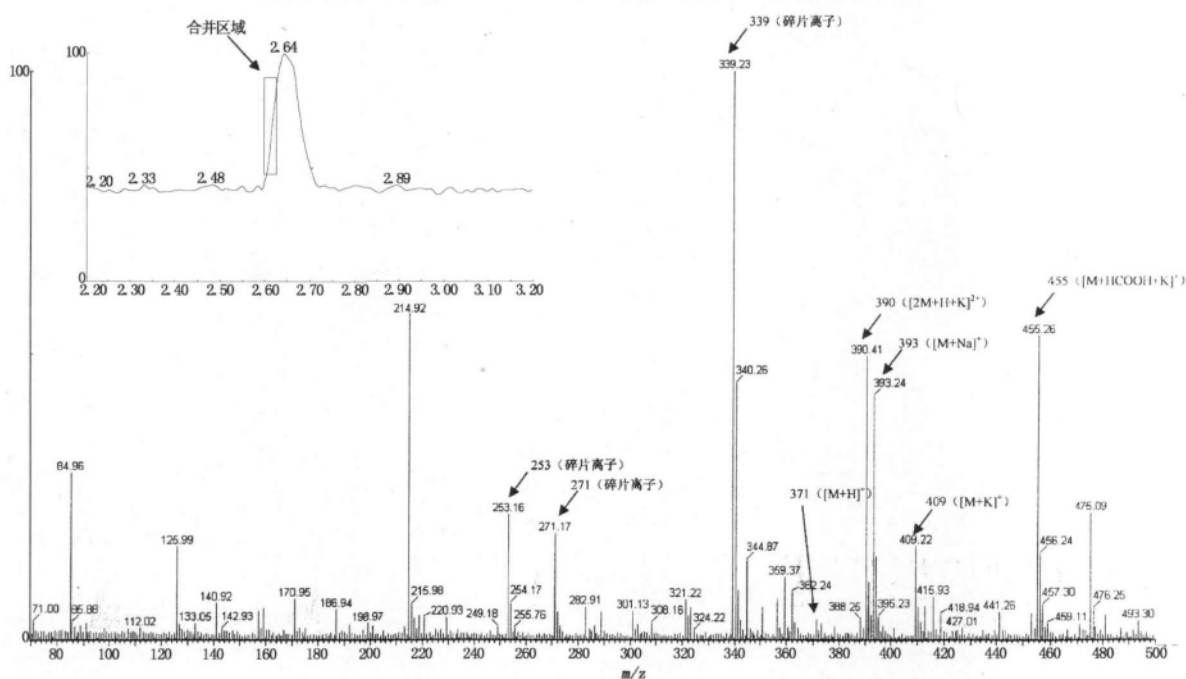


图 5 化合物 A 纯品的 TIC 和质谱图

(用椭圆标示),见图 4。 m/z 391 在计算得到的质谱图中消失是因为 A 本身也有明显的 m/z 391 ($[M+H+K]^{2+}$ 的同位素离子) 信号。这就佐证了化合物 X 可能是化合物 A 的脱氢类似物。

2.7 优化分离后对粗品中峰 b 进行谱图合并获得的化合物 X 的质谱图 图 7 为优化色谱分离条件实现 A 和 X 基线分离后,对粗品中峰 b 进行谱图合并获得的化合物 X 的质谱图。右上方小图显示被

合并谱图区域的大致位置。可以看出,该质谱图与化合物 A 脱氢类似物纯品的质谱图相似, m/z 391 ($[M+Na]^+$), m/z 369 ($[M+H]^+$), 388 ($[M+H+K]^{2+}$), 407 ($[M+K]^+$), 453 ($[M+HCOOH+K]^+$) 和主要碎片离子 251, 269 和 337 完全一致(用椭圆标示,其中 m/z 369 和 407 较弱未标示)。虽然其中有属于 A 的各信号 m/z 371、390、393、409、455、253、271 和 339,但都较弱,接近噪音水平。这再次

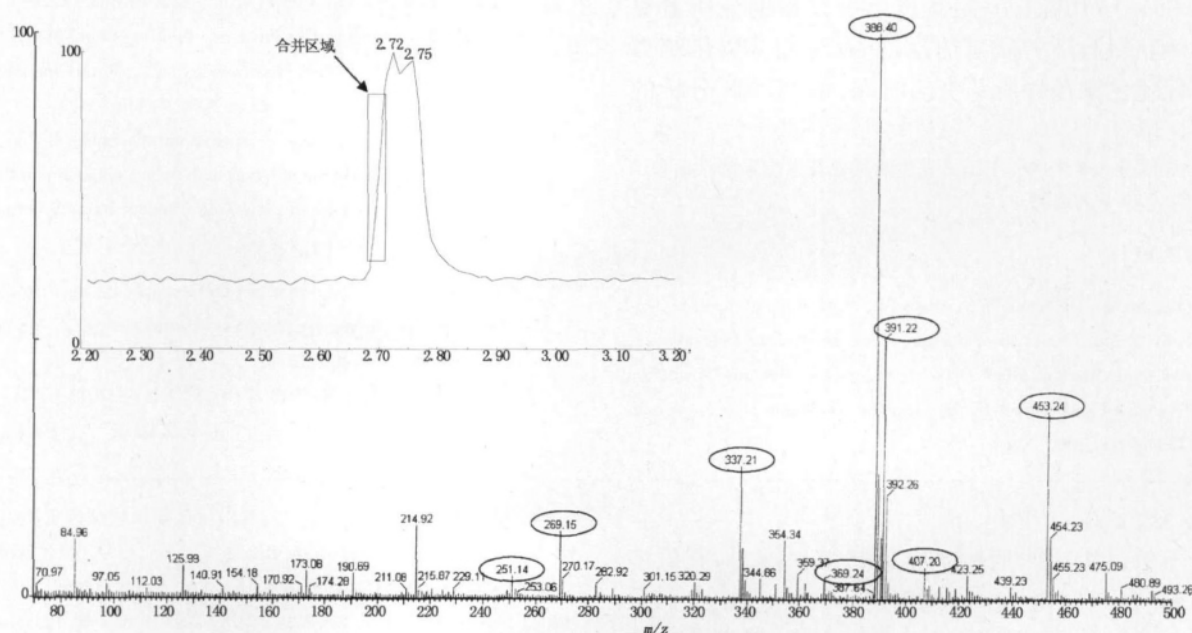


图 6 化合物 A 脱氢类似物纯品的 TIC 和质谱图

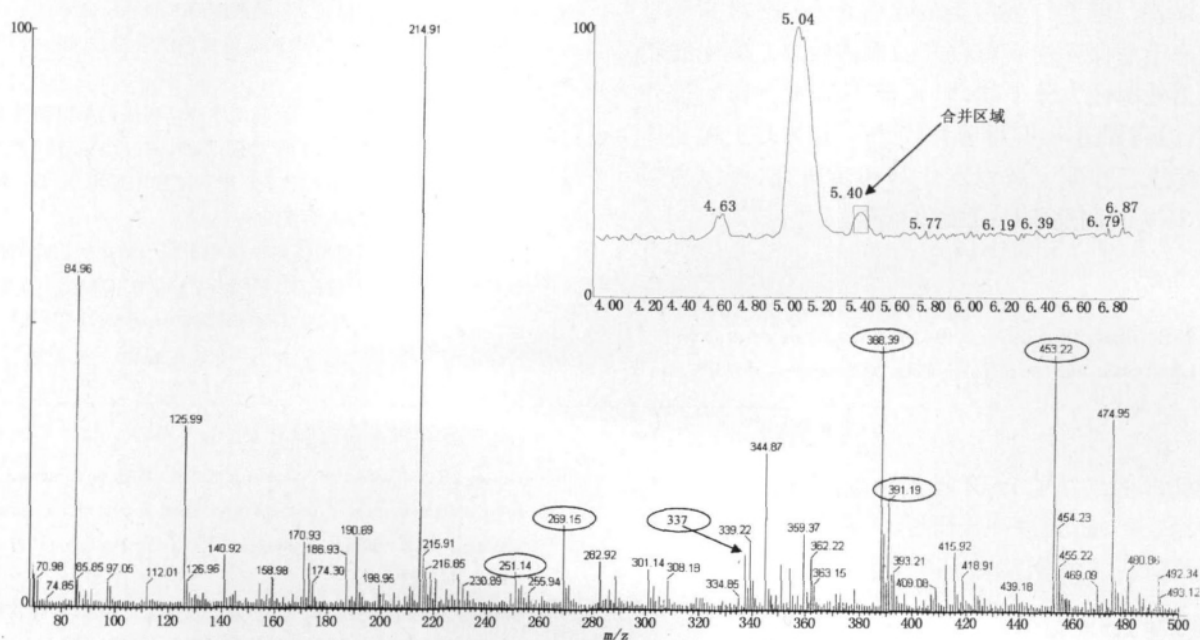


图 7 优化分离后对粗品中峰 b 进行谱图合并获得的化合物 X 的质谱图

佐证了化合物 X 可能是化合物 A 的脱氢类似物。

2.8 其他 本方法的原理与当前质谱系统领域的“背景扣除 (background subtraction)”技术的原理是一样的。目前“背景扣除”已经广泛运用于质谱数据处理中^[1-4]。所不同的是我们的方法是将化合物 A 的信号看作背景噪音, 将其减掉。需要指出, 为了较彻底且较单纯地将 A 的信号减掉, 所选择的被扣除区域中一定不能包含待测物 X 的信号(从峰形态上判断), 否则 X 的信号也会被扣除; 另外, 当部分

重叠峰两组分有可能产生大量相同离子时(表现在两峰质谱图差异不明显), 本方法就不适用了, 因为那样会丢失大量质谱信息。除 Waters Masslynx 4.1 软件之外, 目前许多其他厂商(如 AB Sciex)的液质联用工作站软件也具备此功能, 因此本方法有借鉴意义。

3 结论

Masslynx 4.1 软件的“谱图合并 (Combine Spec-

tra process) ”功能在一定程度上可以帮助分析者更容易地获得清晰的质谱信息,并有可能节省传统方法中优化色谱条件所花费的时间,是 LC-MS 分析的有力工具。

志谢 感谢 Waters 中国公司王勇先生及其他技术专家的帮助和国家自然科学基金的资助

参考文献

- [1] Malyarenko DI, Cooke WE, Adam BL, et al. Enhancement of Sensitivity and Resolution of Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometric Records for Serum Peptides Using Time-Series Analysis Techniques [J]. *Clinical Chemistry*, 2005, 51(1): 65-74

(上接 382 页)

因此不管是噬菌体的种子批还是工作液,均宜低容量分装,每个包装一次性使用。

单成分冻干可能造成噬菌体失活,糖类是噬菌体冻干的优良保护剂,但对冻干品的放置稳定性保护效果差。糖类与蛋白类的组合配方,则对冻干过程和冻干品保存均具有较好的保护效果。其中脱脂奶粉为外源性大分子物质,可能不适用于胃肠道外给药,尚需要进一步筛选替代物。本文关于噬菌体 D29 溶液态和冻干态稳定性的初步研究,可以为噬菌体 D29 的制剂学研究提供依据。

参考文献

- [1] World Health Organization. 2010/2011 Tuberculosis global facts [J]. http://www.who.int/tb/publications/2010/factsheet_tb_2010.pdf

(上接 388 页)

并依此成功建立了 PFIB 吸入性急性肺水肿模型,此模型稳定可靠,为进一步研究 PFIB 肺损伤机制及防治研究提供了依据。

参考文献

- [1] Wang HM, Ding RG, Ruan JX, et al. Perfluoroisobutylene induced acute lung injury and mortality are heralded by neutrophil sequestration and accumulation [J]. *J Occup Health*, 2001, 43(6): 331-338
- [2] 张宪成. 全氟异丁烯的理化性质及侦检防护 [J]. 国外医学军事医学分册, 1995, 12(3): 113-118
- [3] 张铤, 刘毓. 毒理学 [M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1997. 228-230; 238-241
- [4] 薛敬礼, 史崇敏, 宋国英, 等. 急性肺水肿动物模型复制 [J]. 四川动物, 2006, 25(3): 625-626
- [5] 刘瑞, 海春旭, 王鹏, 等. 光气急性中毒的剂量-反应关系与肺水肿动物模型的建立 [J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(5): 419-

- [2] Jennifer Listgarten and Andrew Emili. Statistical and Computational Methods for Comparative Proteomic Profiling Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. *Mass Spectrometry Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, 4: 419-434
- [3] François-Ludovic Sauvage, Franck Saint-marcoux, Bénédicte Duretz, et al. Screening of Drugs and Toxic Compounds with Liquid Chromatography-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry [J]. *Clinical Chemistry*, 2006, 52(9): 1735-1742
- [4] Vladimir A Likiš. Extraction of pure components from overlapped signals in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [J]. *Bio Data Mining*, 2009, 2: 6

(收稿日期: 2010-12-14; 修回日期: 2011-03-28)

(本文编辑 金杨红)

- [2] 何广学, 谢艳光, 任育麟, 等. 我国耐多药结核病高负担地区耐多药结核患者的性别和年龄分布特征 [J]. 中国健康教育, 2008, 24(6): 413-415; 418
- [3] Peng L, Chen BW, Luo YA, et al. Effect of mycobacteriophage to intracellular mycobacteria in vitro [J]. *Chin Med J*, 2006, 119(8): 692-695
- [4] 彭丽, 罗永艾, 陈保文, 等. 噬菌体 D29 对感染敏感株结核分枝杆菌豚鼠的疗效 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(8): 733-736
- [5] 彭丽, 罗永艾, 陈保文, 等. 噬菌体 D29 对耐药结核病豚鼠的治疗作用 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(17): 1576-1579
- [6] 彭丽. 噬菌体 D29 在结核病诊断和治疗中的应用 [D]. 博士学位论文. 重庆医科大学, 2006
- [7] 杨文慧. 分枝杆菌噬菌体 D29 应用于耐药结核病治疗的探索性研究 [D]. 博士学位论文. 军事医学科学院, 2009

(收稿日期: 2011-04-13; 修回日期: 2011-05-06)

(本文编辑 狄亚敏)

420

- [6] Gurley LR, Buchanan JS, London JE, et al. High performance capillary electrophoresis of proteins from fluid lining of the lungs of rats exposed to perfluoroisobutylene [J]. *J Chromatogr*, 1991, 559(1-2): 411-429
- [7] 薛敬礼, 史崇敏, 章金涛, 等. 不同方法诱发大鼠肺水肿动物模型的比较研究 [J]. 河南医学研究, 2006, 15(2): 109-111
- [8] 孔麒麟, 罗玉玉, 张文成. 肾上腺素诱导大鼠急性肺水肿模型的复制 [J]. 武警医学院学报, 2008, 17(6): 498-500
- [9] 梁志锋, 杨斌, 林军, 等. 甲醛吸入致大鼠急性肺水肿动物模型的建立 [J]. 环境与职业医学, 2007, 24(2): 204-206
- [10] 王和枚. 全氟异丁烯致急性肺损伤机理研究 [D]. 军事医学科学院博士学位论文, 2002. 78-82
- [11] Lehnert BE, Archuleta D, Behr MJ, et al. Lung injury after acute inhalation of perfluoroisobutylene: exposure concentration-response relationships [J]. *Inhal Toxicol*, 1993, 5: 1-32

(收稿日期: 2011-03-23; 修回日期: 2011-05-17)

(本文编辑 金杨红)