

使用Waters Xevo G3 QTof质谱仪改善亚硝酸杂质的传输

Lisa Reid, Lee A. Gethings, Jayne Kirk

Waters Corporation

摘要

实验证明，相较于采用默认的StepWave设置，在Waters Xevo™ G3 QTof质谱仪上采用软电离传输模式可以改善亚硝酸的传输。采用软电离StepWave设置时，本文概述的方法检测NDMA、NMPA、NMBA和NDBA这几种亚硝酸污染物的灵敏度得以提升。

优势

- 在Tof-MRM采集模式下可展现出出色灵敏度的QTof平台
- 工作流程具有出众的稳健性、重现性和灵活性
- 一款多功能系统，提供多种采集方法，支持靶向采集和筛查采集
- 仪器专属性高，可通过谱图可视化和准确质量数信息提高分析物鉴定的可信度
- waters_connect中的UNIFI应用程序是符合GXP要求的软件平台，提供从数据采集到报告生成的完整工作流程

简介

近年来，监管机构陆续发布相关指南，要求制药生产商对其产品中的亚硝胺污染物进行风险评估、定量，并设法减少这类污染物¹。最初，监管机构发现某些处方药中含有超出安全限值的亚硝胺，对接受这些药物治疗的患者有致癌风险。当时，药物批次被召回，监管机构建议制药生产商对之后的产品进行检测，确保在API每日最大给药浓度下，亚硝胺污染物含量低于26 ng/天（总量），或者各种单独的污染物含量不超出ng/天水平的相应限值。因此，在ng/mL或更低浓度水平监测这类有害化合物至关重要，需要使用高灵敏度、高选择性的分析方法。

Xevo G3 QTof不仅灵敏度和选择性出众，作为一款灵活的平台还具有额外的优势，即提供多种不同的采集模式，能够根据应用目标对目标分析物进行表征和定量。此外，Xevo G3 QTof采用了StepWave™ XS设计，用户可以优化离子进入质谱仪的传输过程，减少不稳定母离子分析物碎裂的可能性。

该分析采用了MS^E和ToF-MRM这两种采集方法：MS^E是一种筛查采集方法，它会记录指定质量范围内（例如50~1200 Da）的所有母离子和子离子，在开发方法和研究未知物质时很有用。ToF-MRM是一种靶向采集模式，该模式先在质谱仪的四极杆内选出预先确定的母离子质量数，再碎裂这些母离子。接下来，仪器对预先确定的碎片离子进行靶向信号增强，以达到比筛查采集模式更高的灵敏度。当分析人员需要鉴定未知物质时，通常会采用筛查采集模式（例如MS^E）；如果只需要分析已知分析物，可以采用靶向分析方法（例如ToF-MRM）。如需详细了解该仪器的不同采集模式，请参阅应用纪要：[720008021](#)²。这款QTof仪器无论在何种分析模式下都能采集可供查看的谱图，为用户提供准确质量数测量值和关于潜在干扰同分异构化合物的信息。

实验

样品前处理

NDMA、NMBA、NMPA和NDBA标准品购自Merck（英国普尔）。用甲醇制备各标准品的1 mg/mL储备液，用甲醇和这些储备液制备各标准品浓度为10 µg/mL的工作溶液。储备液用超纯水连续稀释至100 ng/mL。

超纯水稀释的储备液用于绘制标准曲线。

二甲双胍标准品购自Merck，用超纯水制成浓度为100 mg/mL的溶液。将二甲双胍、合适的标准品溶液和稀释用水混合，制得二甲双胍最终浓度为20 mg/mL的QC样品。

液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY Premier (FTN)

色谱柱:	Atlantis™ Premier BEH C ₁₈ AX (2.1 x 100, 1.7 um), P/N: 186009368
柱温:	40 °C
进样体积:	30 µL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	水, 0.1%甲酸, 5 mM甲酸铵
流动相B:	甲醇, 0.1%甲酸, 5 mM甲酸铵
梯度:	流动相A在98%下保持1.5 min, 在1.5~6 min从98%降至5%, 在6.5~7 min保持5%, 然后在7~9 min重新平衡至初始条件

质谱条件

质谱系统:	Xevo G3 QTof
离子源类型:	APCI+
电晕模式:	电流
电晕针电流(µA):	2.5
锥孔电压(V):	25
离子源温度(°C):	150
探头温度(°C):	325

锥孔气流速(L/h):	300
脱溶剂气流速(L/h):	450
StepWave模式:	软传输 ³
检测器自动增益:	关
分析器模式:	灵敏度
采集事件:	初始: 导流至废液, 1 min液流状态LC, 8 min导流至废液
Lockspray流速(μ L/min):	10
Lockspray设置:	双点, 亮氨酸脑啡肽 (持续时间2 s, 每60 s采样一次)
IDC:	关

MSE设置

采集范围:	50~600 Da
扫描速度:	2 Hz (扫描速度0.5 s)
低碰撞能量(eV):	2
高碰撞能量(eV):	10

Tof-MRM设置

采集范围:	独立通道 (图1)
质谱图:	窄 (为了减少背景信号, 只采集C12信息)
扫描速度:	2 Hz (扫描速度0.5 s)
低碰撞能量(eV):	2
高碰撞能量(eV):	根据化合物单独优化

MRM Experiment Experiment Type

Transitions Radar

Add Copy Paste Import Delete Delete All Spectrum: **Narrow** Scan time: s

Name	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision energy ramp start (V)	Collision energy ramp end (V)	Start time (min)	End time (min)	Run time (min)
1 NDMA	75.0550	75.0550	2	2	0.00	2.00	0.00 to 2.00
2 NMBA	147.0760	117.1000	5	5	2.00	3.80	2.00 to 3.80
3 NMPA	137.0710	66.1000	15	15	3.80	5.80	3.80 to 5.80
4 NDBA	159.1490	57.1000	10	10	5.80	8.50	5.80 to 8.50

图1.waters_connect的UNIFI应用程序中显示的ToF-MRM通道

数据处理

使用符合GXP要求的软件包 (waters_connect 2.2.0版中的UNIFI应用程序3.1.0.16版) 执行从数据采集到报告生成的完整工作流程。

结果与讨论

使用ACQUITY Premier系统对NDMA、NMBA、NMPA和NDBA进行色谱分离, 由配备APCI离子源的Xevo G3 QToF采集数据。使用waters_connect软件中的UNIFI应用程序采集、处理和查看数据。图2展示了亚硝胺污染物的典型提取离子流色谱图(XIC)和一个二甲双胍峰 (通常被导入废液以避免质谱检测器饱和)。

本研究以3 μg 柱上载样量进样标准品混合物，利用 MS^E 采集模式优化了离子源条件和离子传输设置。我们在优化过程中注意到，使用软传输StepWave设置³（详见应用纪要：[720007794ZH](#)）可以改善所有四种母离子的实测信号。图3展示了在 MS^E 缺省传输模式和软传输模式下分析四种化合物得到的结果。观察到软传输模式可以提高灵敏度之后，我们采用ToF-MRM采集模式分析了制备好的标准曲线样品和QC样品，以确定方法的检测限和稳健性。

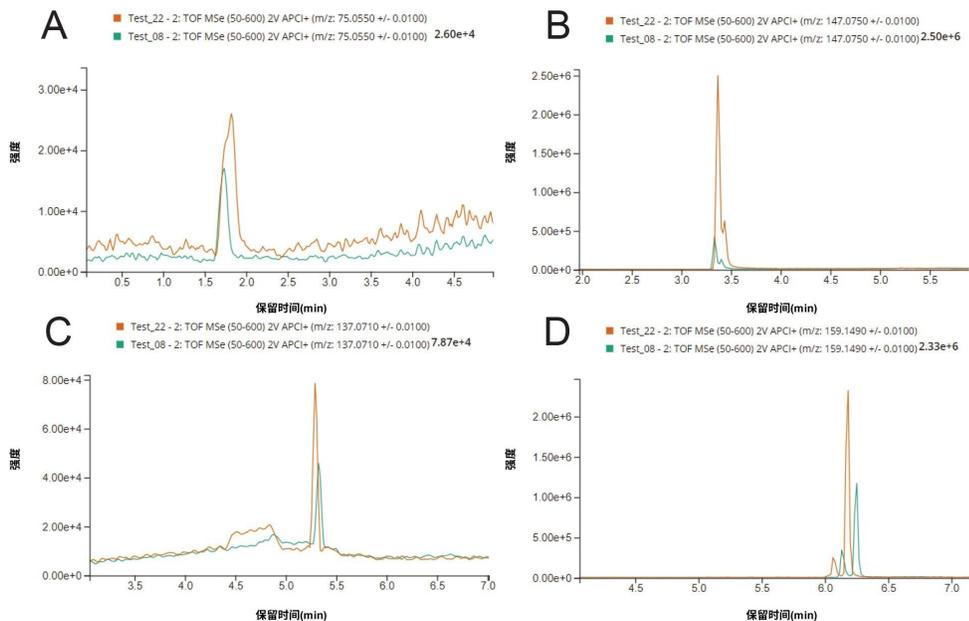


图3.NDMA (A)、NMBA (B)、NMPA (C)和NDBA (D)的提取离子流色谱图叠加图，由图可见软电离StepWave设置（橙色）的信号优于默认的StepWave设置（绿色）。

ToF-MRM的运行原理是按时间分段选出指定的母离子质量数，母离子在四极杆中分离，随后被送入碰撞室，在碰撞室中发生离子传输或碰撞诱导解离(CID)。接下来，ToF区域通过排斥极同步对用户指定的 m/z 值进行靶向信号增强⁴。本研究使用母离子-子离子通道分析NMBA、NMPA和NDBA这几种亚硝胺化合物，并对选定的子离子 m/z 应用靶向信号增强。采用伪MRM通道分析NDMA，因此对母离子 m/z 应用靶向信号增强。

使用0.001~10 ng/mL的稀释系列评估Xevo G3 QToF的灵敏度和线性表现，每个浓度点重复进样三次。该ToF-MRM采集方法得到的检测下限和定量下限(LLOD/Q)见表1。LLOD定义为标准曲线上 $S/N > 3$ 的最低浓度点，LLOQ定义为标准曲线上相比曲线的平均偏差(%)小于20%、%RSD < 10%且 $S/N > 10$ 的最低浓度点。LLOD在0.005 ng/mL (5 pg/mL)(NMBA)到0.01 ng/mL (100 pg/mL)（其余三种化合物）范围内。LLOQ在0.005 ng/mL (5 pg/mL)(NMBA)到0.05 ng/mL (50 pg/mL)（NDMA和NDPA）范围内，因此在20 mg/mL API溶液中的定量灵敏度

为0.25~2.5 ppb。图4展示了实验观察到的每个LLOQ处的信噪比。

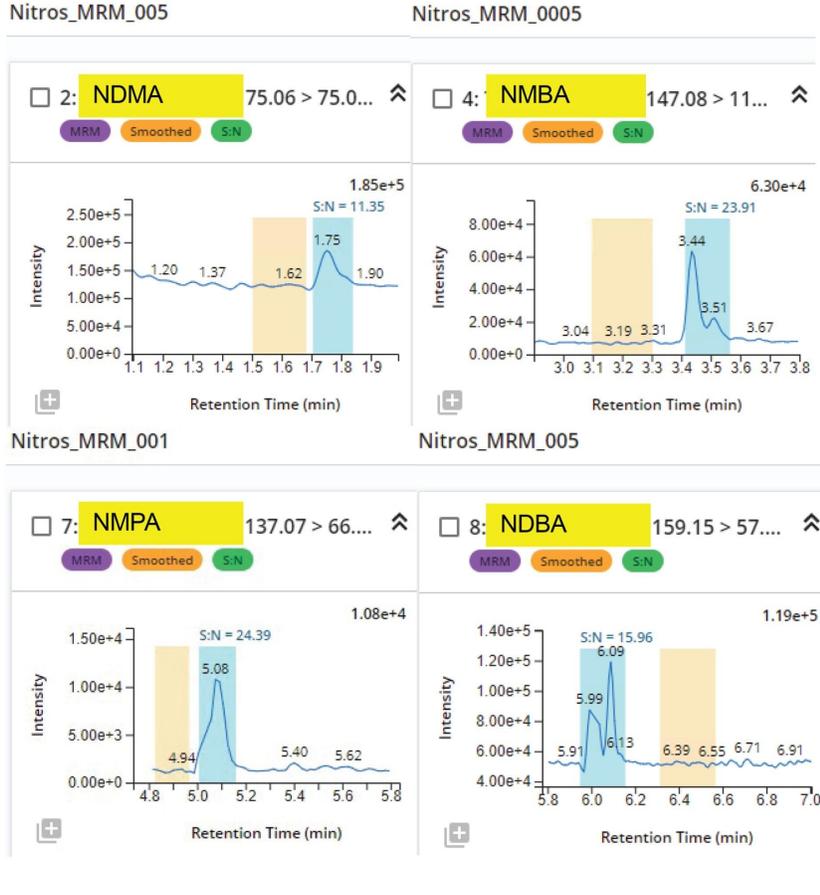


图4. NDMA、NMBA、NMPA和NDBA在LLOQ处的信噪比（峰到峰信噪比）计算结果。采用Stavitsky Golay算法执行平滑处理，宽度为±2个数据点，迭代2次。

各化合物的ToF-MRM线性表现见图5，图中显示了UNIFI生成的标准曲线（1/X加权），根据这些曲线评估线性并计算相比曲线的偏差用于确定LLOQ。四种化合物均表现出线性响应，两个处理软件平台得出的R²值都在0.998以上。本实验分析的最高浓度为10 ng/mL，相当于每种化合物300 pg的柱上载样量。对于本研究分析的任何化合物，该载样量均未超出系统的线性动态范围。

为了展示定量准确度，我们将亚硝胺标准品以两个QC浓度（0.5 ng/mL和5 ng/mL）加标到含有20 mg/mL二甲双胍的API样品中，计算每个浓度水平3次重复进样的浓度平均值，结果显示计算值在加标浓度的15%范围内。图6展示了经UNIFI处理后的QC视图示例。

所有化合物都表现出良好的进样重复性，具体评估方法为计算三次QC重复进样中每种化合物的标准差，然后取平均值。平均相对标准差(RSD)最高的是NMBA，其平均值为2.4%，平均RSD最低的是NDMA，其平均值为0.6%。如果使用整个分析过程中所有三次重复进样（包括LLOQ在内的所有标准曲线数据点以及QC数据点）的标准差来评估重复性，可知平均RSD最高的是NMBA，其平均值为2.1%；平均RSD最低的是NDMA，其平均值为1.1%。

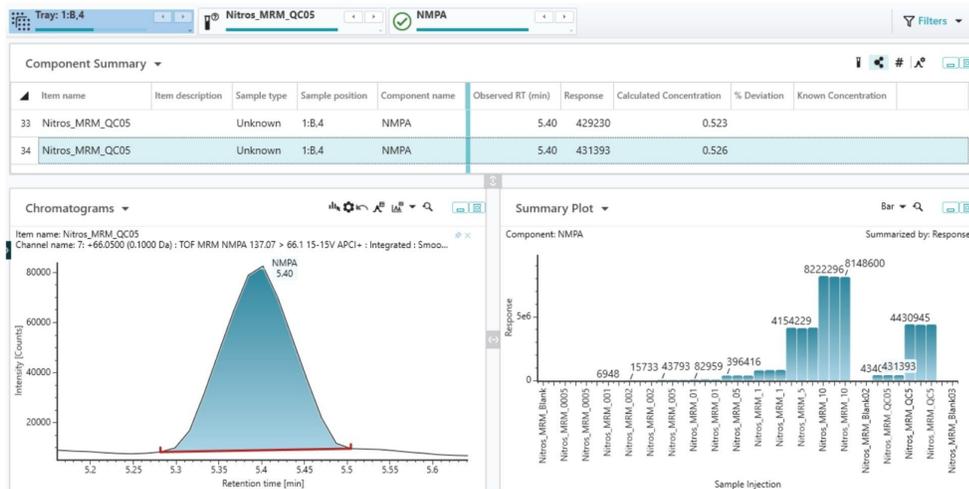


图6.代表性UNIFI处理视图，显示了所有进样的NMPA汇总图。被选中的进样是加标浓度为0.5 ng/mL的QC进样。

结论

Xevo G3 QToF平台既能在Tof-MRM模式下执行较为常规的定量工作流程，又能在MS^E模式下执行全面筛查分析来研究未知物质，得益于这样的优势，它为亚硝胺分析提供了一套灵活的解决方案。这款QToF仪器无论在何种分析模式下都能采集可供查看的谱图，为用户提供准确质量数测量值和关于潜在干扰同分异构化合物的信息。

这款软件平台非常灵活，可根据实验室环境、应用或用户要求提供定制化的使用体验。StepWave设计能够根据目

标化合物的易碎裂性优化传输，确保目标分析物的灵敏度得到提高。作为一款QToF质谱仪，该仪器还能为用户提供目标分析物的准确质量数信息，让用户更有把握地鉴定化合物和未知物质。

waters_connect中的UNIFI应用程序是完全合规的软件平台，可提供从数据采集到报告生成的完整工作流程。

本研究使用0.001~10 ng/mL的稀释系列评估了Xevo G3 QToF的灵敏度和线性表现（每个浓度点重复进样三次），结果显示，在20 mg/mL API溶液中的定量灵敏度可达0.25~2.5 ppb。对于本实验分析的所有四种化合物，系统在高至10 ng/mL（300 pg柱上进样当量）的浓度范围内呈线性， R^2 值>0.998，平均RSD<2.4%。

参考资料

1. FDA Guidance for industry: Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs, Revision 1, February 2021.
2. Natural Products Solution on the Xevo G3 QToF Mass Spectrometer. Waters Application Note. [720008021](#). August 2023.
3. 使用StepWave™ XS改善Xevo™ G3 QToF质谱仪上不稳定物质的传输. 沃特世应用简报. [720007794ZH](#). 2022年11月.
4. Targeted High-Resolution Quantification with ToF-MRM and HD-MRM. Waters Application Note. [720004728](#). June 2013.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo G3 QToF <<https://prod1-author.waters.com/nextgen/language-masters/en/products/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720008048ZH, 2023年12月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)