

采用安捷伦单四极杆 LC/MS 系统联用 二极管阵列检测器和蒸发光散射检测器 对药物发现化合物库中的化合物进行纯 度评定

应用简报

药物发现

作者

N.S. Kameswara Rao 博士和
Subhabrata Sen 博士
GVK Biosciences 公司,
海德拉巴, 印度

Syed Salman Lateef
Vinayak AK
安捷伦科技,
班加罗尔, 印度

摘要

在进行合成化合物的生物活性筛选之前, 支持化学制药的药物学家和分析科学家通常会评定它们的纯度。本文采用通用方法结合多检测器系统, 对 30 个库化合物进行了快速、自动化的纯度评定。Agilent 6130 系列单四极杆 LC/MS 系统与紫外 (UV) 和蒸发光散射检测器 (ELSD) 联用, 可以检测到单独采用一种检测模式可能丢失的杂质峰。安捷伦 Analytical Studio Reviewer 软件为化合物的确证和纯度的评定提供了更简洁的用户数据处理界面。



Agilent Technologies

前言

随着人们对提高高质量候选药物制备效率以及减少失败风险的日益重视，许多分析团队在药物发现和开发中愈加强调严格的化合物库纯度标准。这使得采用多种检测方法对药物纯度进行监测越来越重要，以确保药物化合物批次中不含杂质，从而保证药物的生物安全性和有效性。本文展示了一个采用多检测系统对化合物库进行纯度评定的安捷伦解决方案，该方案为药物化学家和工艺化学家简化了工作流程。

本实验采用以组合化学方法合成的 30 个库化合物。由于杂质可能缺少 UV 发色团而没有明显吸收，或者难于离子化，本实验中采用了 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (DAD) 联用 6130 系列单四极杆 LC/MS 系统和 Agilent 1260 Infinity 蒸发光散射检测器 (ELSD)。这就可以同时实现对有 UV 吸收和无 UV 吸收杂质的检测。质谱和 ELSD 可以互相补充。MS 不能检测的未电离化合物可以被 ELSD 检测到。¹ 本 LC 方法采用亚 2 μm 颗粒色谱柱，运行一个 7 min 的普通 LC 梯度洗脱程序。使用亚 2 μm 填料颗粒可以得到更高的理论塔板数，并因此获得比较大填充颗粒的同规格色谱柱更高的分辨率。这种完善的配置避免了为每种化合物开发单独的纯度检验方法。安捷伦 Analytical Studio Reviewer (ASR) 提供了一个直观的用户界面来显示 LC/MS 数据，用户可以在一

个窗口中同时浏览来自多个检测器的色谱图、纯度的峰面积百分比以及样品位置。ASR 也可对没有通过纯度检测的化合物进行快速评估。²

以前，我们展示过采用安捷伦质量触发式制备型 LC 系统和组分收集系统进行药物化合物纯化的解决方案。³ 本文中，我们将展示一个使用包括 UV、MS 和 ELSD 的多检测器系统和 Analytical Studio Reviewer 软件进行纯度评定的解决方案。

实验部分

库化合物的合成

按照如图 1 所示的母核结构，我们合成了库中 30 种不同的化合物。这些化合物通

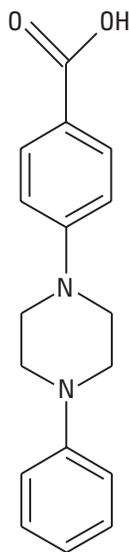


图 1. 用于合成库化合物的母核

过组合化学方法、使用金属催化剂合成。金属催化剂有助于形成一些杂质，给纯度评定带来挑战。

使用一个包括含 0.1% 甲酸的水和乙腈流动相系统的普通方法来评定这 30 种库化合物的纯度。UV 检测器设定了 210 nm、254 nm 和 280 nm 三个波长进行杂质检测。

通过测试一组预设的 10 个 ELSD 方法，可以轻松实现 ELSD 检测条件的最优化。这 10 个方法具有不同的蒸发温度、雾化温度和气体流量值。结果表明其中的一种方法 (表 1) 具有最佳的 ELSD 信号，因此我们所有的实验均选用该方法。

表 1. LC/MS 条件

LC/MS 条件		
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959964 902)	
TCC (柱温箱)	40 °C	
样品恒温箱	6 °C	
样品稀释剂	100 % 甲醇	
流动相	A: 0.1% 甲酸水溶液, B: 0.1% 甲酸乙腈溶液	
梯度程序	时间 (min)	% B
	0	10
	1.0	10
	4.0	75
	5.0	75
	5.5	95
	7.0	95
	7.01	10
	后运行时间: 1 分钟	
DAD	峰宽 > 0.1 min 210 nm、254 nm 和 280 nm	
UV 流通池	2 μL (容积), 3 mm (流路), 120 bar (最大耐压)	
流速	1.0 mL/min	
进样体积	10 μL, 采用 100% 流动相 B 洗针 10 s	
T 形接头	分流比 ELSD:MS 82:18。在 T 形接头后面连接一段不同长度的 0.12 mm PEEK 管来获得预期的分流比 ¹	
ELSD (G4260B) 参数	雾化器温度	80 °C
	蒸发器温度	80 °C
	蒸发器气体流量	每分钟 0.90 标准升 (SLM)
	平滑	3.0 s
	LED 强度	100 %
	PMT 增益	4
MS 数据采集	扫描范围	50–950 amu
	峰宽	0.05 min
	步长	0.1
	极性	正离子和负离子
	循环时间	0.84 s/循环
	碎裂电压	90 V
	干燥气温度	300 °C
	流量	10 L/min
	雾化器压力	15 psig
	鞘气温度	250 °C
	鞘气流量	7 L/min
	毛细管电压	3000 V
	负离子	2500 V
	喷嘴电压	正离子和负离子模式均为 1500 V
纯度评定	Analytical Studio Reviewer B.02.01 版 样品纯度选项 目标质量数检测 发现目标物的 BPI 百分数 8 确证目标物的 BPI 百分数 20	

结果与讨论

库化合物合成的确证

正离子模式的 MS 用于化合物分子量 (MW) 的确证。ASR 计算了用户预设的目标离子丰度 (面积) 与基峰离子丰度的比例, 并

且以基峰强度百分比 (BPI%) 的形式报告该比例 (图 2)。用户可以规定最小的 BPI% 值, 确证已检测到某化合物并将该样品标为绿色。标为红色的化合物表明它在设定的 BPI% 阈值以下。本实验中选择

BPI% 值为 20%。图 2 结果表明, 几乎所有化合物的质量与序列表中给定的质量数相符, 证明我们合成了期望的化合物。

Analytical Studio Reviewer (B.02.01)

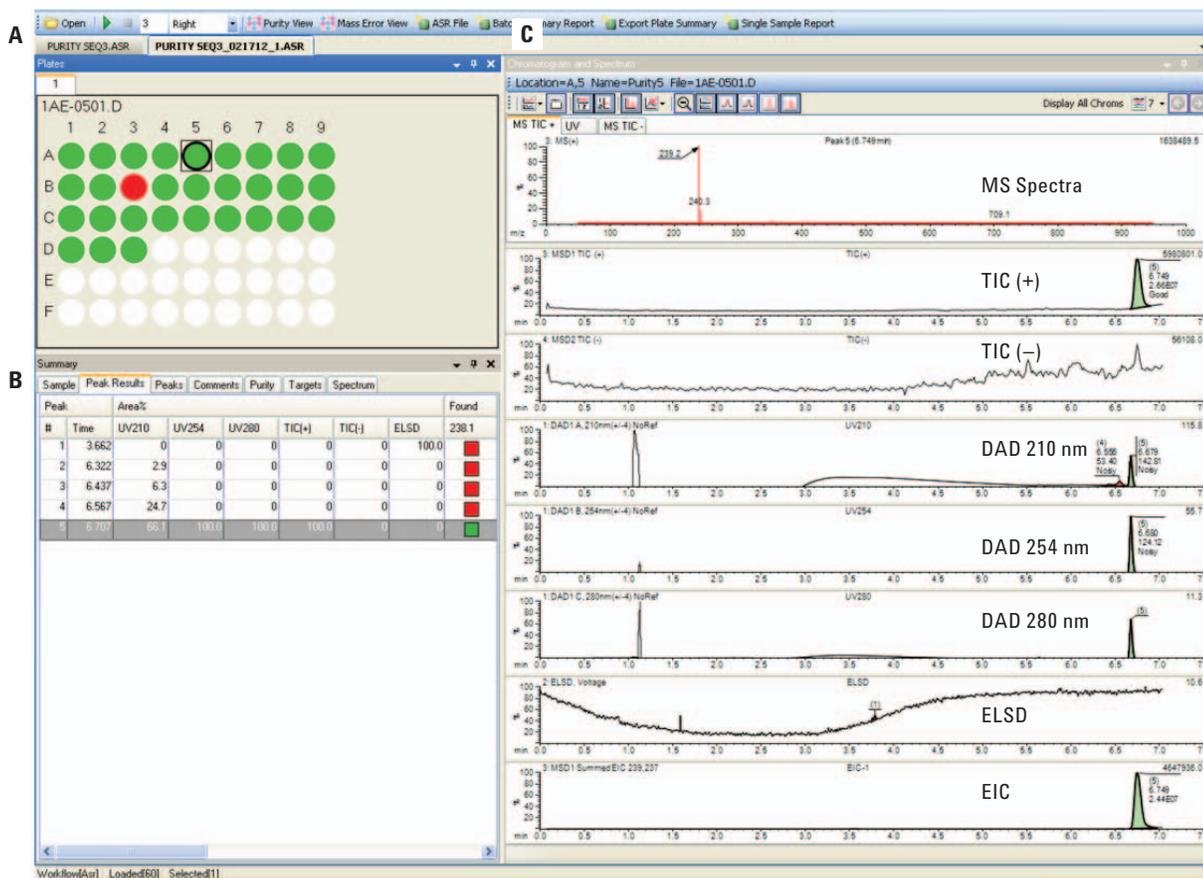


图 2. 绿色标识代表了被检测到质量数的化合物 (A)。从各个检测器得到的每个峰峰面积的百分比以表格形式列出 (B)。多色谱图视图选项展示了来自不同检测器的大量色谱图的堆积或叠加, 以方便同时查看各检测器互补的分析结果 (C)

化合物纯度的测定

基于任何一种检测器给出的峰面积百分比，ASR 可测定出这些化合物的纯度。彩色编码（图 3A）表明了纯度分级。粉色表示纯度 > 80% 峰面积百分比，而蓝色表示纯度在 20–80%，橙色表示纯度低于 20% 面

积百分比。采用 MS 作为纯度评定检测器的结果表明，三分之一库化合物的纯度高于 80%（图 3）。由于杂质或其加合物离子化效率的差异，可能会得出不同的纯度结果。ASR 允许用户查看不同检测器如 ELSD 的检测结果，以确证纯度评定结论。

当采用 ELSD 为主要检测器评定纯度时，结果显示 67% 的化合物纯度 > 80%。这表明 MSD 可以检测到更多的杂质，ELSD 或 UV 可用来进一步确证 MSD 的纯度评定结果。

Purity View in Analytical Studio Reviewer



图 3. ASR 的纯度视图显示了高纯度的化合物 (A)。每个色谱图中的峰面积百分比用于确定峰纯度 (B)

采用安捷伦喷射流离子源时检测灵敏度更高

采用配备 ESI 离子源或安捷伦喷射流离子源 (AJS) 的 6130B 系列单四极杆 LC/MS 系统分析库化合物。与采用 ESI 离子源的分析结果相比, 采用 AJS 离子源的分析结

果具有更高的信号强度, 从而可以检测和计算出更多的色谱峰 (图 4A)。采用 AJS 离子源时, 主峰信号的峰面积为 2.27×10^7 , 而采用 ESI 离子源时, 相同峰的峰面积为 1.07×10^7 , 前者信号强度为后者的两倍。ASR 的纯度视图 (图 4A 和 4B) 表明, 采用 AJS 离子源时有 9 种化合物

的纯度 > 80%, 而采用 ESI 离子源时却有 14 种化合物的纯度 > 80%。在图 4B 中, 一种化合物 (序号 16, 标记 B7) 采用 ESI 离子源时表明其纯度为 100%, 而该化合物在采用 AJS 离子源时, 纯度只有 70% (图 4A)。表明 AJS 离子源可以提供更准确的库化合物纯度评定。



图 4. 采用 AJS 离子源和 ESI 离子源分析相同库化合物得到的纯度结果比较 (B)

结论

联用带 AJS 离子源的 Agilent 6130 系列单四极杆 LC/MS 系统、Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器、Agilent 1260 ELSD Infinity 蒸发光散射检测器和安捷伦 Analytical Studio Reviewer 软件，为快速筛选库化合物提供了一个通用方法。采用一个耗时短的通用 LC 方法，使用亚 2 μm 颗粒色谱柱，避免了为每个化合物开发多种纯度检验方法。而且，多种检测器实现了互补检测，避免了使用单一检测器可能造成的杂质峰丢失。

AJS 离子源提供了更高的 MS 信号强度，实现了对化合物纯度更准确的评定。另外，Analytical Studio Reviewer 软件为化合物的数据审查和导航提供了快速而简单的解决方案，显著减少了数据分析时间。

参考文献

1. 使用二极管阵列检测器、单四极杆 MS 和蒸发光散射检测器进行 RRLC 杂质谱分析以检测无紫外吸收的化合物，安捷伦出版号 5990-4980CHCN
2. Agilent Analytical Studio Reviewer Maximizes Efficiency in Early Drug Discovery (安捷伦 Analytical Studio Reviewer 可最大程度提高早期药物发现的效率)，安捷伦出版号 5990-9034EN
3. Configuring a Mass-based Fraction Collection System for Highest Purity Mass Triggered Prep LC System (为最高纯度质量触发式制备型 LC 系统配置基于质量的组分收集系统)，应用简报，安捷伦出版号 5990-4845EN

致谢

衷心感谢安捷伦科技的 Yuqin Dai 博士和 Lester Taylor 博士对本文的技术讨论、审阅和意见。

www.agilent.com/chem/singlequad

本文信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
中国印刷，2013年3月26日
5991-2089CHCN



Agilent Technologies