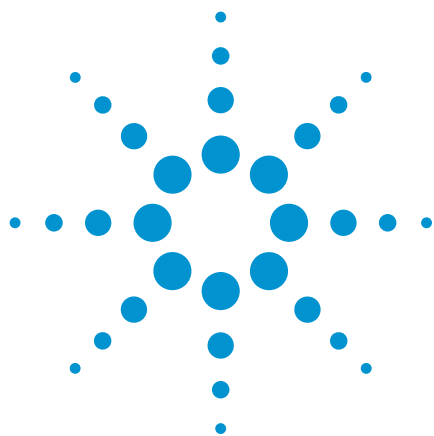




使用配备低能量 EI 离子源的高分辨率精确质量 GC/Q-TOF 分析可萃取和可浸出 (E&L) 化合物

应用简讯

作者

Kevin Rowland¹, Mark Jordi¹,
Kai Chen² 和 Jennifer Sanderson²

¹ Jordi Labs

马萨诸塞州曼斯菲尔德

² 安捷伦科技有限公司

美国加利福尼亚州圣克拉拉市

前言

准确的化合物鉴定对于研究可萃取和可浸出 (E&L) 化合物来说至关重要^[1]。E&L 萃取物极其复杂, 包含不同种类和浓度的化合物, 为化合物鉴定带来了极大的挑战^[2]。E&L 研究中适合采用气相色谱分析的部分通常采用单位质量数 GC/MS 在标准 EI 全扫描模式下进行, 通过 NIST GC/MS 谱库搜索进行化合物鉴定。如果这些化合物没有令人信服的谱库匹配得分, 则该技术仅提供有限的信息。

本文提出了一种新的工具来研究 E&L 化合物, 采用配置低能量 EI 离子源的高分辨率精确质量 GC/Q-TOF 进行分析, 该方法具有更高的灵活性和可靠性。



图 1. Agilent 7250 系列 GC/Q-TOF 系统



Agilent Technologies

实验部分

仪器分析

采用 Agilent 7250 系列 GC/Q-TOF 系统 (图 1), 在表 1 所列的运行条件下分析样品萃取物和对照物。进样正构烷烃用于校准采集方法的保留因子 (RI)。

表 1. Agilent 7250 GC/Q-TOF 操作条件

参数	值
色谱柱	Agilent DB-5 MS UI, 15 m × 0.25 mm, 0.25 μm
进样口	S/SL, 310 °C
载气	1.5 mL/min 氦气
柱温箱升温程序	50 °C 保持 5 min 以 10 °C/min 的速率升至 320 °C, 保持 10 min
传输线温度	280 °C
离子源模式	EI, 70 eV, 10–15 eV
离子源温度	200 °C
四极杆温度	150 °C
谱图范围	50–1000 m/z

数据分析

采用 Agilent MassHunter 未知物分析软件 B.08.00 的 SureMass 信号处理功能^[3] 得到谱图, 然后与 NIST 14 GC/MS 谱库进行匹配, 从而对化合物进行鉴定 (图 2)。通过将标准 EI 和低能量 EI 谱图进行比较, 研究所鉴定化合物的分子式。必要时, 使用 Agilent MassHunter 定性分析软件 B.08.00 对 MS 和 MS/MS 的质谱图进行审查。使用 Agilent MassHunter 分子结构关联软件 B.08.00 对未知物候选物基于 MS/MS 谱图进行结构鉴定。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) B.13 用于样品组之间的差异分析。

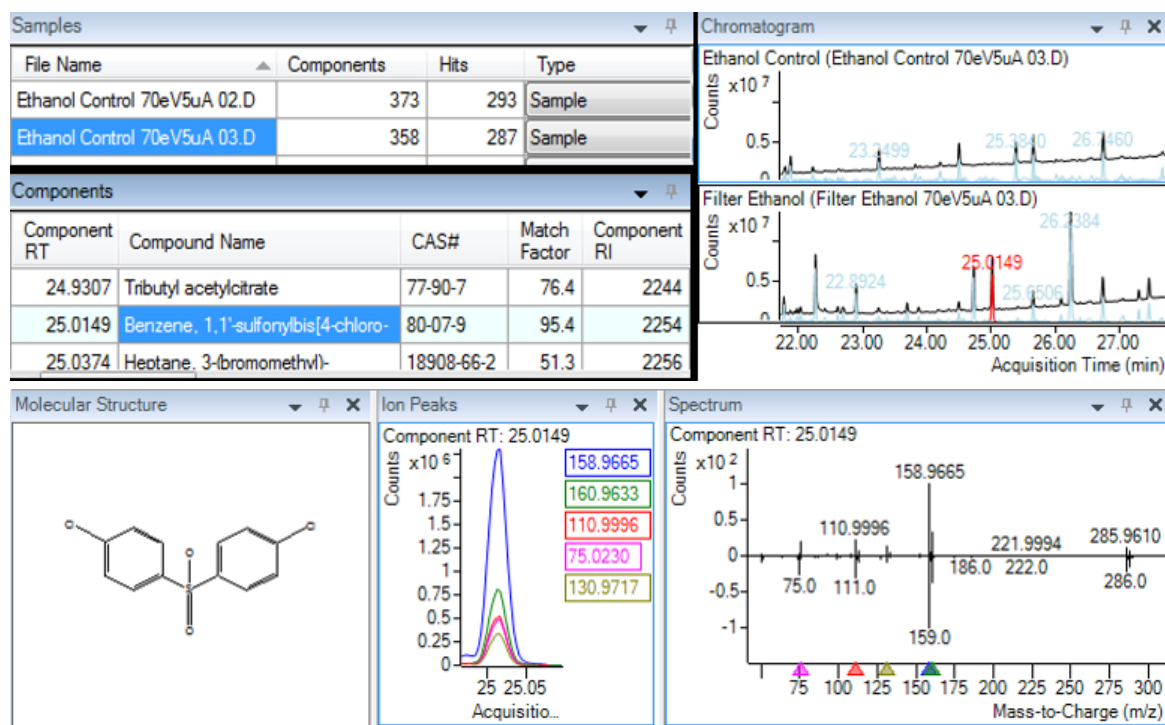


图 2. 用于 SureMass 峰检测和谱库匹配的 Agilent MassHunter 未知物分析工具软件

样品前处理

使用盐溶液在 37 °C 下对全套一次性生物处理系统进行 72 小时的流通式萃取。通过向每 200 mL 蒸馏水中加入 1 片磷酸盐缓冲片剂 (Sigma) 配制盐溶液, 得到 137 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl 和 10 mmol/L 磷酸盐的缓冲液 (25 °C 下 pH 为 7.4)。使用乙醇和水/乙醇 (1:1) 溶液萃取该装置的过滤器, 以展示萃取溶剂之间的差异。所有萃取实验均采用对照空白。每种萃取溶液 (除乙醇外) 都采用等量的二氯甲烷萃取, 然后浓缩为十分之一用于 GC/Q-TOF 分析。

结果与讨论

盐水萃取物与空白对照

我们使用 MPP 软件对样品和对照进行了差异分析, 以盐水萃取结果作为代表性数据组。结果表明, 全套装置的盐水萃取物中有 113 种化合物, 与空白对照相比, 其倍数变化 ≥ 3 且 P 值 ≥ 0.05 (图 3)。表 2 展示了丰度最高的组分。

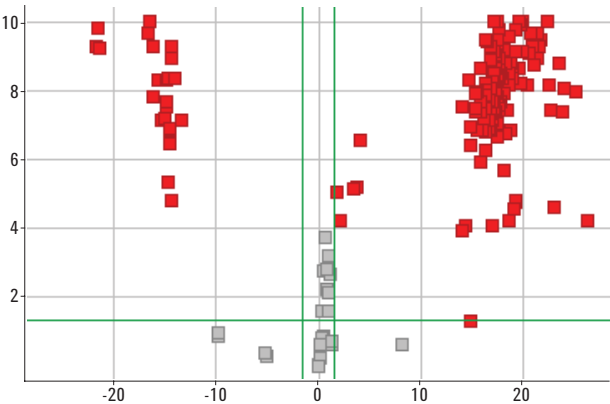


图 3. 火山图显示了以显著水平存在于盐水萃取物中的化合物 (右上)

表 2. 盐水萃取物的化合物鉴定列表 (前 28 种)

化合物	分子式*	RI	质量数误差 (mDa)
己内酰胺	C ₆ H ₁₁ NO	1268	0.2
苯酚	C ₆ H ₆ O	978	0.0
三(1,2-丙二醇), 单甲醚	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1315	0.0
三丙二醇基甲基乙基醚异构体 1	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1291	-0.2
三丙二醇基甲基乙基醚异构体 2	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1294	-0.2
三丙二醇基甲基乙基醚异构体 3	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1289	0.0
初步鉴定化合物	C ₉ H ₁₂ O ₄	1572	0.5
三丙二醇基甲基乙基醚异构体 4	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1286	-0.1
4-乙酰氧基-苯甲酸乙酯	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	1527	0.1
初步鉴定化合物	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃	1659	0.2
香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	1399	-0.1
己酰胺	C ₆ H ₁₃ NO	1144	-0.2
初步鉴定化合物	C ₈ H ₁₂ O ₃	1403	0.1
7,9-二叔丁基-1-氧杂螺(4,5)癸-6,9-二烯-2,8-二酮	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	1908	-0.2
初步鉴定化合物	C ₁₅ H ₂₂ O	1476	0.4
对羟基苯甲酸乙酯	C ₉ H ₁₀ O ₃	1522	0.2
1-甲基-2-吡咯烷酮	C ₅ H ₉ NO	1040	0.3
2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	1507	0.0
初步鉴定化合物	C ₆ H ₆ O	1069	-0.2
1,3-二甲基-2-咪唑啉酮	C ₅ H ₁₀ N ₂ O	1109	0.3
N-环己基-乙酰胺	C ₈ H ₁₅ NO	1292	0.2
二乙二醇丁醚	C ₈ H ₁₈ O ₃	1187	-0.2
2,5-二特丁基对苯二酚	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	1467	0.0
2-苯基-2-丙醇	C ₉ H ₁₂ O	1088	-0.3
初步鉴定化合物	C ₅ H ₁₂ O ₂	1014	0.1
苯并噻唑	C ₇ H ₅ NS	1232	0.2
邻苯二甲酸二甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1452	0.1
初步鉴定化合物	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	1349	0.5

* 通过比较标准 EI 模式和低能量 EI 模式下的谱图, 确定了所鉴定化合物的分子式 (或推测初步鉴定化合物的分子式)

萃取溶剂的影响

对过滤器萃取物进行了评估，以研究使用不同萃取溶剂对整体可萃取性的影响（图 4）。采用文氏图可轻松实现结果的可视化，并展示了每种萃取物中检测到的独有的可萃取物以及共同的可萃取物。

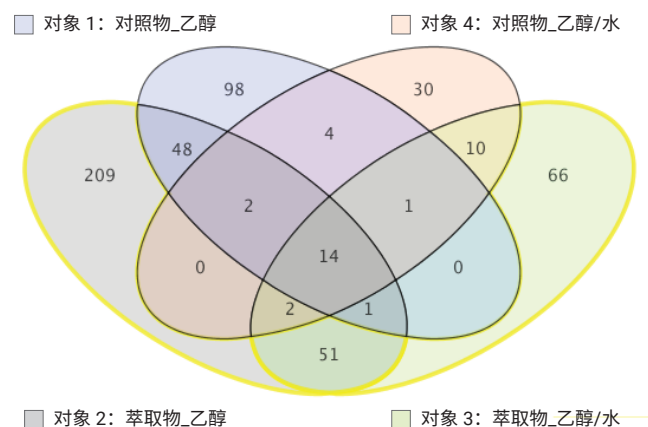


图 4. 从装置过滤器中由不同溶剂萃取的可萃取化合物的文氏图

低能量 EI 研究

低能量 EI 实验提高了保留或确证谱图中分子离子 (M^+) 的几率，如图 5 所示。在谱库搜索结果不理想时，这些实验可以为化合物的初步鉴定提供额外的信息。

图 6 显示了采用低能量 EI 和 Q-TOF MS/MS 研究未知化合物（两种溶剂萃取组之间共有的化合物）的工作流程。可能的候选物为苯甲醇衍生物。

图 7 显示了低能量 EI 谱图，也有助于可靠鉴定乙醇萃取物特有的许多烷烃化合物。

结论

- 低能量 EI 提高了保留或确证 (M^+) 的几率，并且精确质量 MS/MS 谱图为未知化合物的结构鉴定提供了有价值的信息
- 精确质量测定和 RI 校准可提高化合物鉴定结果的可靠性
- 差异分析有助于比较样品组中的 E&L 化合物

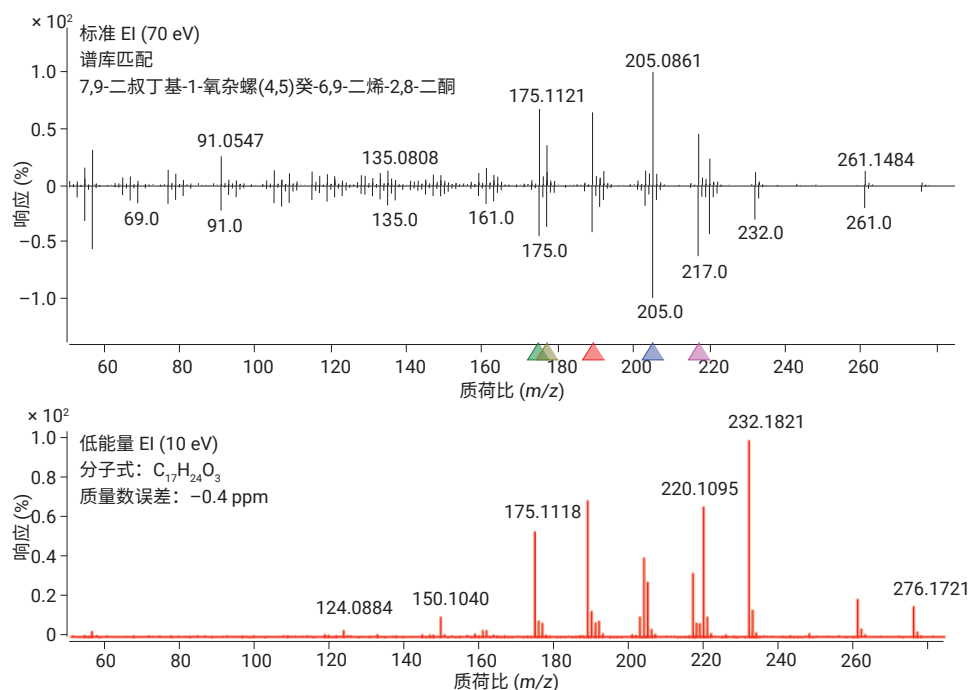


图 5. 低能量 EI 提高了 M^+ 在化合物谱图中的相对丰度，此化合物经可靠鉴定，其匹配得分为 92.6 (RI: 1908)

Chromatogram showing detector response (Y-axis, labeled 响应, scaled by $\times 10^7$) versus collection time (X-axis, labeled 采集时间 (min)). A peak is identified with a retention index (RI) of 1711 at approximately 19.6 minutes.

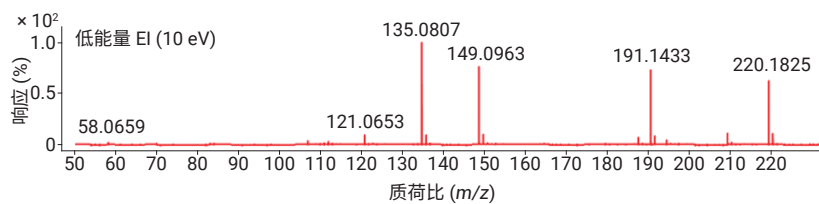


Figure 1 displays mass spectra of $C_{15}H_{24}O$. The left panel shows the low-energy EI (10 eV) mass spectrum, with peaks at m/z 220.1825 ($[C_{15}H_{24}O]^+$) and 221.1852 ($[C_{15}H_{24}O]^+$). The right panel shows the 5 eV CID mass spectrum, with peaks at m/z 121.0645 ($[C_8H_9O]^+$), 135.0803 ($[C_9H_{11}O]^+$), 149.0960 ($[C_{10}H_{13}O]^+$), 191.1429 ($[C_{13}H_{19}O]^+$), and 220.1818 ($[C_{15}H_{24}O]^+$). The bottom right panel shows the 10 eV CID mass spectrum, with peaks at m/z 77.0386, 107.0490, 121.0648, 135.0802, 191.1431, and 191.1434.

Figure 1 displays the chemical structures and ^1H NMR spectra of compounds 1-5. The structures are shown in a 3D perspective view. The ^1H NMR spectra are shown as a series of peaks with their corresponding chemical shifts. The chemical shifts are labeled in ppm. The chemical structures are labeled with their molecular formulas. The chemical shifts of the hydroxyl groups are labeled in ppm.

Compound	Molecular Formula	Chemical Shift (ppm)
1	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
2	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
3	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
4	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
5	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
6	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
7	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
8	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
9	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0
10	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	7.0

5

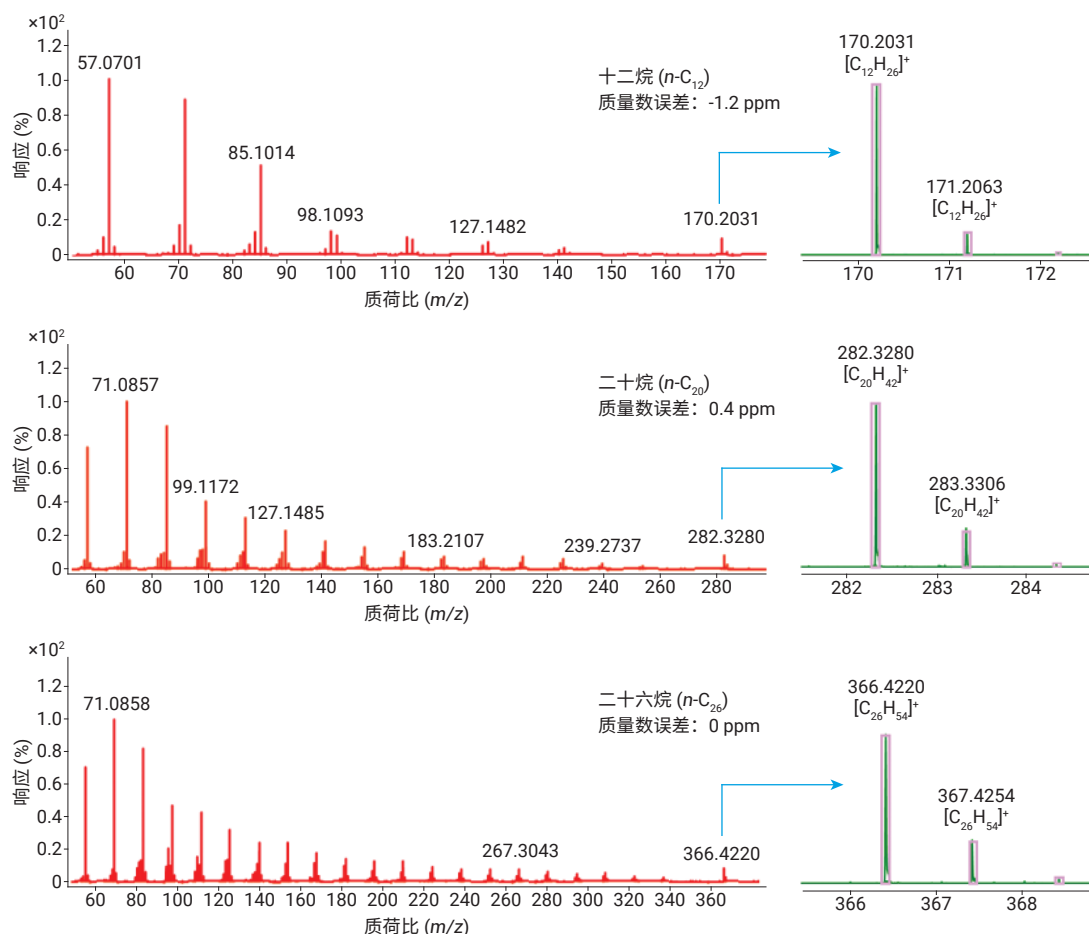


图 7. 正构烷烃的低能量 EI (12 eV) 谱图。M⁺ 离子簇显示了较好的质量准确性和同位素保真性

参考文献

1. D. Jenke. "Development and Justification of a Risk Evaluation Matrix to Guide Chemical Testing Necessary To Select and Qualify Plastic Components Used in Production Systems for Pharmaceutical Products" *PDA J. Pharma. Sci. Technol.* **69**, 677-712 (2015)
2. A. Mire-Sluis, et al. "Extractable and Leachables. Challenges and Strategies in Biopharmaceutical Development" *BioProcess Int.*, Feb (2011)
3. Agilent SureMass, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-8048CHCN (2017)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

RA.1096759259

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020 年 10 月 26 日，中国出版
5991-8198ZHCN



Agilent Technologies