

Использование Agilent OpenLab CDS для автоматизированной высокопроизводительной оценки чистоты проб с помощью масс-спектрометрии

Часть I. Определение чистоты пробы с помощью ВЭЖХ-МС

Авторы

Hua Dong (Хуа Донг)
Agilent Technologies, США

Leo Wang (Лео Ванг)
Agilent Technologies, США

Doug McIntyre (Дуг Мак-Интайр)
Wiefling Consulting, США

Аннотация

Эти рекомендации по применению описывают использование пакета ПО Agilent OpenLab CDS для автоматизации и упрощения идентификации соединений с оценкой чистоты проб. Данные, которые используются в этих рекомендациях по применению, были получены на высокопроизводительном жидкостном хроматографе Agilent InfinityLab с масс-селективным детектором ХТ (ВЭЖХ-МСД ХТ) с использованием пакета ПО Agilent OpenLab CDS. В этом имитирующем реальные условия эксперименте по оценке чистоты проб ряд фармацевтических субстанций хранился в холодильнике в течение четырех месяцев для того, чтобы вызвать их деградацию. После этого пробы анализировались методом ВЭЖХ-МС. Для оценки чистоты разложившихся проб полученные данные обрабатывались и проверялись в полностью автоматическом режиме, после чего так же автоматически создавался отчет. Сводные графики с цветовым кодированием для каждой партии и отчеты позволили визуально отобразить результаты оценки чистоты и быстро найти в каждой из партий деградировавшие пробы.

Введение

Оценка чистоты — это одна из важнейших задач для многих лабораторий. Химики-органики используют анализ чистоты, чтобы идентифицировать соединения, и для оценки выхода реакции синтеза. Химики-фармацевты, как правило, оценивают чистоту синтезированных фармацевтических субстанций перед тем, как перейти к их биологическим исследованиям. Химики-технологи используют оценку чистоты в ходе оптимизации рецептуры, а также для определения условий хранения. Лаборатории контроля и обеспечения качества фармакологических предприятий выполняют периодическую оценку чистоты, чтобы убедиться, что промежуточные и готовые продукты соответствуют предъявляемым к ним требованиям качества.

ВЭЖХ-МС применяется для оценки чистоты благодаря его чувствительности, возможности определять широкий спектр соединений и, самое главное, селективности, которая позволяет отделять вещества друг от друга по их уникальным физико-химическим параметрам — отношению массы к заряду (m/z). Благодаря этому ВЭЖХ-МС позволяет значительно повысить достоверность аналитических данных оценки чистоты.

Чтобы повысить скорость принятия решений, многие химики предпочитают выполнять оценку чистоты самостоятельно, а не полагаться на услуги, оказываемые центральными или подрядными лабораториями. Однако при этом они сталкиваются с тремя основными проблемами: 1) доступ

к оборудованию ВЭЖХ-МС, 2) время и трудозатраты, необходимые для того, чтобы научиться работать с системой ВЭЖХ-МС и правильно интерпретировать получаемые данные, 3) выделение значительного места в лаборатории для установки масс-спектрометра. Представленное решение позволяет устранить все эти проблемы за счет использования встроенных в ПО OpenLab CDS функций автоматизации, которые предназначены для быстрого получения данных о чистоте пробы, не занимаясь при этом интерпретацией МС-данных. Благодаря небольшой занимаемой площади масс-селективного детектора, его можно установить в стойку вместе с модулями ВЭЖХ, значительно сократив занимаемое системой пространство.

Эти рекомендации по применению описывают использование ПО Agilent OpenLab CDS с системой Agilent InfinityLab ВЭЖХ-МСД ХТ для автоматизации идентификации соединений и оценки чистоты проб в ходе эксперимента по имитации деградации нескольких фармацевтических субстанций при хранении. Описанная схема позволяет быстро определить чистоту проб.

Экспериментальная часть

Стандарты и реактивы

Стандарты бупирона гидрохлорида, амитриптилина гидрохлорида, нефазодона гидрохлорида, клопидогрела гидросульфата, паклитаксела, и фозиноприла натрия были приобретены в компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). Молекулярная масса этих соединений — от 277 до 853, что демонстрирует возможность применения ВЭЖХ-МС для анализа соединений в широком диапазоне молекулярных масс.

Из каждого стандарта был приготовлен базовый раствор в ацетонитриле с концентрацией 1000 мкг/мл. Затем базовые растворы хранились в холодильнике в течение четырех месяцев, после чего из них приготовили рабочие растворы с концентрацией 20 нг/мкл в 20% ацетонитрила в воде. Эти рабочие растворы анализировали для оценки чистоты проб после четырехмесячного хранения.

Оборудование ВЭЖХ-МС и условия проведения анализа

Для ВЭЖХ-МС анализа использовалась одноквадрупольная система ВЭЖХ-МС Agilent InfinityLab XT. Она включала в себя одноквадрупольный масс-спектрометр Agilent с электрораспылительным источником ионизации (ESI), с технологией Agilent Jet Stream (AJS), а также бинарный насос, пробоотборник и детектор на диодной матрице ВЭЖХ системы Agilent 1260 Infinity II.

ВЭЖХ-разделение выполнялось в течение 4 минут на колонке Poroshell 120 EC-C18 размером 2,1 × 50 мм с использованием в качестве подвижной фазы растворов 0,1% муравьиной кислоты в воде и ацетонитриле. ВЭЖХ-МС-система использовалась в режиме положительной ионизации с полным сканированием в диапазоне 100–900 m/z и частотой 2 сканирования в секунду.

Программное обеспечение

Для сбора и обработки данных, а также создания отчетов использовалось ПО Agilent OpenLab CDS версии 2.2.

Результаты и обсуждение

Идентификация соединений

ВЭЖХ-МС идеально подходит для идентификации соединений, так как при нормальных условиях в нем образуются ионы исследуемых соединений с характерной молекулярной массой с небольшим количеством фрагментных ионов. В режиме положительной ионизации соединение с молекулярной массой M , как правило, образует молекулярный аддукт (продукт присоединения) с протоном $[M + H]^+$. Например, паклитаксел, соединение с молекулярной массой 853,9, как правило, образует ион с m/z 854,3 (протонированный вариант его наиболее распространенного моноизотопного вида). В зависимости от используемой для ВЭЖХ-МС подвижной фазы могут также образовываться аддукты $[M + NH_4]^+$ или $[M + Na]^+$ с m/z 871,3 и 876,3 соответственно. В режиме отрицательной ионизации, как правило, ионы представлены продуктами отделения иона водорода с общей формулой $[M - H]^-$ и в некоторых случаях — аддуктами хлорид-иона Cl^- или ацетат-иона.

Если молекулярная масса ожидаемого вещества известна, то для того, чтобы подтвердить его наличие, можно воспользоваться хроматограммами экстрагированных ионов (EIC). Если единственный основной пик на хроматограмме EIC совпадает по времени с основным пиком на полной ионной хроматограмме (TIC), то можно с уверенностью предположить, что искомое соединение присутствует.

Оценка чистоты пробы

Чистоту пробы можно оценить, сравнивая сумму площадей пиков(-а) на хроматограммах(-е) EIC или площадь одного пика на хроматограмме TIC с суммой площадей всех остальных пиков на хроматограмме TIC. Например, если пик на хроматограмме EIC имеет площадь 950 000 единиц, а сумма площадей всех остальных пиков на хроматограмме TIC — 50 000 единиц, то расчетная чистота пробы может быть определена как 95%.

Так как эффективность ионизации (и вместе с ней коэффициент отклика МСД) может сильно отличаться от соединения к соединению, многие химики предпочитают использовать для оценки чистоты проб детекторы с более «универсальным откликом», например спектроскопический УФ- или диодно-матричный детектор. Несмотря на то, что чаще всего для этого применяются УФ-детекторы, для этой цели также

подходят испарительные детекторы светорассеяния (ELSD). При последовательном подключении детекторов одно и то же соединение после выхода из колонки будет иметь разные времена удерживания на УФ-, ELSD- и МСД-хроматограммах. Поэтому для расчета чистоты пробы к сигналу каждого из дополнительных детекторов надо применить задержку между ним и МСД.

Время удерживания вещества на EIC-хроматограмме МСД и задержка сигнала для соответствующего детектора будет применяться для поиска пика соединения на хроматограммах, полученных на этих дополнительных детекторах. Мерой чистоты пробы является относительная площадь пика основного соединения. На рис. 1 показан расчет чистоты для пробы паклитаксела после деградации при хранении. Сигнал УФ-детектора показывает, что паклитаксел все еще сохранил чистоту 97%.

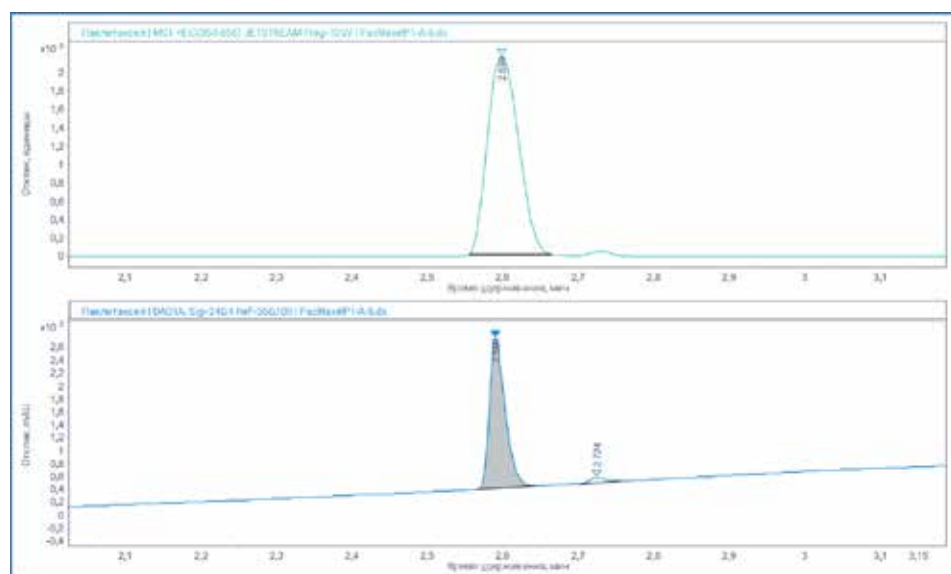


Рис. 1. Хроматограмма EIC для $[M + H]^+$ и УФ-хроматограмма паклитаксела с корректировкой времени удерживания для учета небольшой задержки МСД.

Автоматизированная обработка данных и составление отчетов

OpenLab CDS позволяет любому сотруднику, даже с минимальным опытом в обработке и интерпретации МС-данных, быстро подготовить отчет, подтверждающий идентичность соединения, с оценкой его чистоты. При постановке анализа одной или нескольких проб достаточно указать молекулярную массу (наиболее распространенного моноизотопного вида) или молекулярную формулу целевого соединения, чтобы программа автоматически обработала данные и выдала отчет (рис. 2).

Параметры OpenLab CDS для расчета чистоты пробы, такие как задержка сигнала, параметры интегрирования, возможные аддукты, предельное значение чистоты и сигнал, используемый для расчета чистоты, задаются в окне метода обработки данных (рис. 3). Несмотря на то что для оценки чистоты большинства проб пригоден один общий метод обработки данных, OpenLab CDS позволяет указать для оценки чистоты каждой пробы свой собственный метод. Обработку полученных данных можно повторить позже, задав, например, другую молекулярную массу или химическую формулу. Это полезно в том случае, если во время ввода исходных данных были допущены ошибки.

	State	Vial	Acq. method	Proc. method	Sample name	Target1	Volume
1	Completed	P1-A7	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Solvent		3
2	Completed	P1-A1	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Buspirone	305.2	2
3	Acquiring	P1-A2	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Anisotropic	277.2	2
4	Pending	P1-A3	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Clonidine	C16H16ON02S	2
5	Pending	P1-A4	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Nefazodone	C25H20N2O2	2
6	Pending	P1-A5	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Fosinopril	563.3	2
7	Pending	P1-A6	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Paditaxel	853.5	2

Рис. 2. Пример таблицы последовательности. В столбец Target1 можно ввести химическую формулу или молекулярную массу искомого соединения.

Рис. 3. Параметры метода обработки данных для оценки чистоты пробы. В этом примере чистота рассчитывается из данных хроматограммы TIC. Минимальное значение чистоты составляет 80% и учитывает как продукт присоединения иона водорода, так и продукт присоединения иона натрия.

После анализа и обработки данных результаты серии анализов можно открыть в сводной таблице (рис. 4) или проверить EIC, TIC и УФ-сигналы отдельно для каждой пробы (рис. 5). Цветовое кодирование позволяет легко заметить проблемные пробы. Как показано на рис. 4, бупирон, amitриптилин, nefазодон и клопидогрел соответствуют требованию чистоты не менее 80%, а паклитаксел и фозиноприл – нет. На рис. 5 показано, что при проверке данных для конкретной пробы можно увидеть точное рассчитанное значение чистоты, а также масс-спектры всех пиков, проинтегрированных на хроматограмме TIC. Масс-спектры могут дать полезную информацию о природе найденных примесей.

Sample Purity Results

Order	Sample name	Data file	Overall targets found	Overall purity
1	Solvent	SolventP1-A7.dx	N.A.	N.A.
2	Bupirone	BupironeP1-A1.dx	Yes	Pure
3	Amitriptylene	AmitriptyleneP1-A-2.dx	Yes	Pure
4	Clopidogrel	ClopidogrelP1-A-3.dx	Yes	Pure
5	Nefazodone	NefazodoneP1-A-4.dx	Yes	Pure
6	Fosinopril	FosinoprilP1-A-5.dx	Yes	Impure
7	Paclitaxel	PaclitaxelP1-A-6.dx	Yes	Impure

Рис. 4. Сводная таблица результатов оценки чистоты проб. Цветовая кодировка показывает, что паклитаксел и фозиноприл не соответствуют требованию минимальной чистоты 80%.

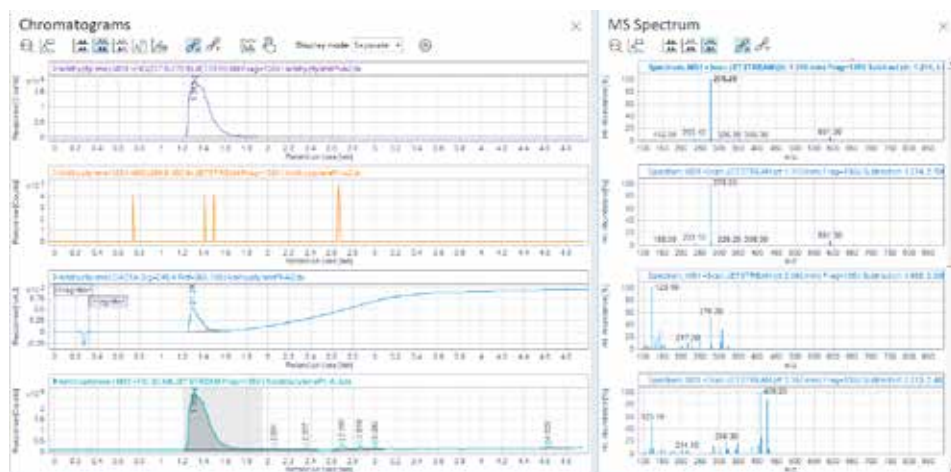


Рис. 5. Просмотр данных пробы amitриптилина отображает сигналы EIC, TIC и УФ, а также масс-спектры пиков, проинтегрированных на хроматограмме TIC.

После анализа всех проб система позволяет, с использованием предварительно созданного шаблона, автоматически составить отчет о чистоте проб, который показывает, найдено ли в каждой из проб искомое соединение, и рассчитанную чистоту (рис. 6). Цветовое кодирование, используемое в этом отчете, позволяет легко определить, есть ли в пробе искомое соединение и соответствует ли оно требуемому критерию чистоты.

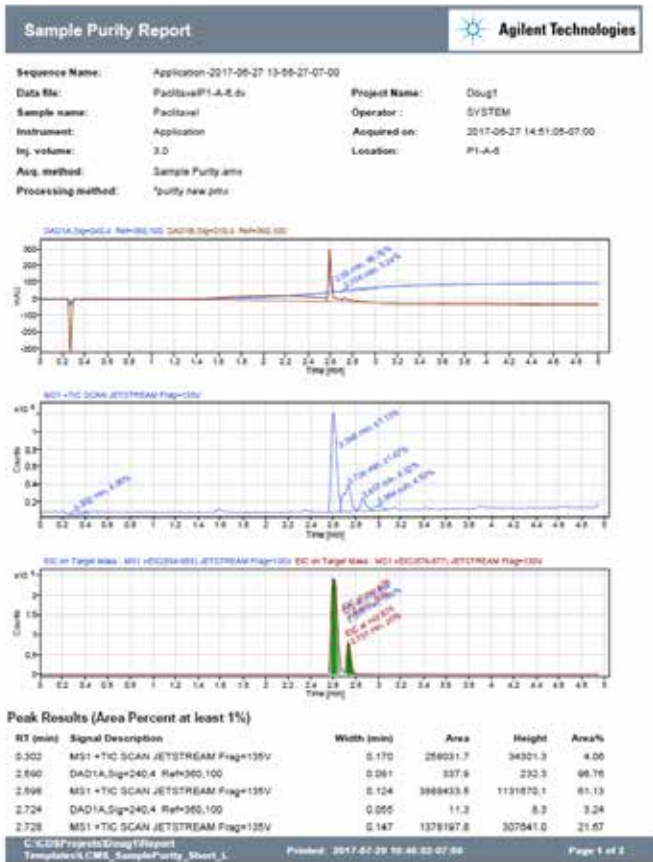


Рис. 6. Типовой отчет о чистоте пробы. В данном случае была задана минимальная чистота 80% по данным сигнала TIC. Паклитаксел был найден (зеленый цвет), однако его чистота была только 61%, что значительно ниже предельной (красный цвет).

Автоматизация работы

OpenLab CDS позволяет автоматизировать процесс оценки чистоты. Как показано на рис. 2, таблица последовательности позволяет легко менять информацию о пробе, молекулярные массы искомого соединения и методы обработки данных. Модуль для создания отчетов, встроенный в OpenLab CDS, позволяет редактировать шаблоны отчетов для различных целей. Необходимые шаблоны отчетов можно легко вставить в метод обработки данных для их автоматического составления и печати, как показано на рис. 7.

Выводы

Пакет ПО OpenLab CDS — это простое решение для автоматизированной оценки чистоты проб. С его помощью химики даже с небольшим опытом обработки и интерпретации МС-данных могут быстро получить результаты оценки чистоты проб, не полагаясь на услуги сторонних лабораторий, что позволяет повысить производительность вашей лаборатории.

Для больших партий проб сводная таблица чистоты с цветовой кодировкой позволяет легко обнаружить загрязненные пробы. Просмотр данных каждой пробы позволяет проверить отдельные хроматограммы EIC, TIC и УФ, чтобы получить больше информации о найденных примесях, точное рассчитанное значение чистоты, а также масс-спектры всех

пиков, проинтегрированных на хроматограмме TIC. Функциональные и гибкие шаблоны отчетов OpenLab CDS со встроенными расчетами и цветовой кодировкой позволяют обобщить результаты оценки чистоты (найденно ли искомое соединение и оценка его чистоты) в простом для восприятия виде. После анализа пробы отчет о ее чистоте может быть выдан автоматически.

Введенную информацию о пробе легко отредактировать, если, например, изначально была указана неверная формула вещества. Данные пробы можно быстро обработать заново, не прибегая к повторному анализу. ПО OpenLab CDS позволяет полностью автоматизировать процесс оценки чистоты, значительно увеличивая тем самым производительность загруженных лабораторий.

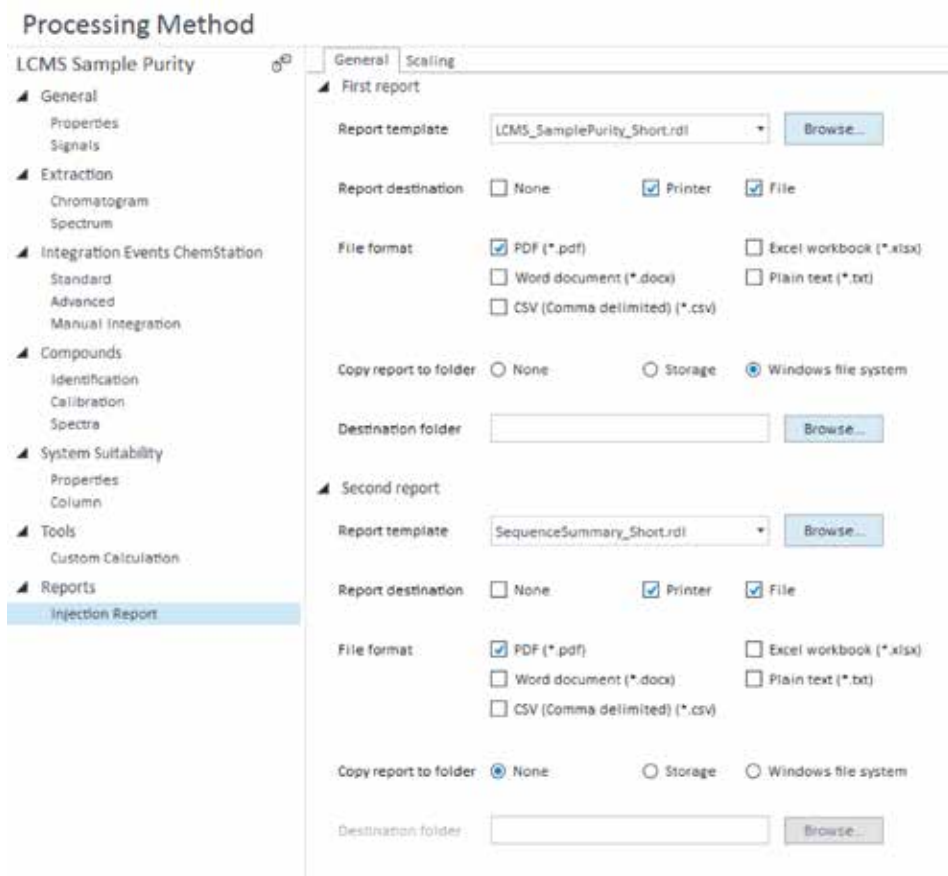


Рис. 7. Задание параметров отчета для автоматизации процесса.

www.agilent.com/chem/openlabcds

Информация в этом документе может быть изменена
без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2018.
Напечатано в США 17 мая 2018 г.
5991-9085RU

