

使用 Agilent OpenLab CDS 进行质谱的自动化高通量纯度评估

第 I 部分：使用 LC/MS 系统进行样品纯度测定

作者

Hua Dong
安捷伦科技公司，美国

Leo Wang
安捷伦科技公司，美国

Doug McIntyre
Wiefling Consulting, USA

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent OpenLab CDS 软件实现对化合物确认和样品纯度评估工作流程的简化与自动化。本应用简报所用的数据来自一台配备 Agilent OpenLab CDS 软件的高通量 Agilent InfinityLab 液相色谱/质量选择检测器 XT (LC/MSD XT)。在本次样品纯度模拟实验中，将各种药物化合物先冷藏 4 个月以促进降解，随后用 LC/MS 进行分析。为测定降解后样品的纯度，使用全自动化工作流程对数据进行处理、审查和报告。以颜色标记的批次汇总视图和报告可实现对纯度评估结果的可视化，并可快速显示批次中的降解样品。

前言

在许多实验室中，纯度评估是一项至关重要的任务。有机化学家用纯度分析确认化合物身份并预估合成过程的产率；药物化学家通常会在进行生物学研究之前评估所合成药物化合物的纯度；制剂科学家会将纯度评估用于制剂优化和指定储存建议；制药 QA/QC 实验室通常会进行纯度评估来确认药物中间体或终产品是否在质控限度内。

LC/MS 具有高灵敏度，对多种化合物有响应，最重要的是具有根据化合物质荷比 (m/z) 这一特有物理化学性质区分化合物的高选择性，故常用于纯度评估。也正因如此，使用 LC/MS 进行纯度评估可以显著提高分析测量的可靠性。

为了加快决策速度，比起依赖中心或合同实验室提供的支持性分析服务，化学家更愿意自行开展纯度测试。然而，若要自行开展样品测试，化学家还面临着三大挑战：1) 对 LC/MS 仪器的开放式访问，2) 学习操作 LC/MS 系统与解析 MS 数据需要耗费的精力，3) 放置一台质谱仪需要的实验室台面空间。本文介绍的解决方案采用内置自动化工作流程的 OpenLab CDS 应对上述三大挑战，使化学家无需解析 MS 数据即可快速获得纯度结果。质量选择检测器的体积非常小，可以和 LC 模块堆放在一起，以适应较小的实验室台面空间。

本应用简报介绍如何将 Agilent OpenLab CDS 软件与 Agilent InfinityLab 液相色谱/质量选择检测器 XT (LC/MSD XT) 配套使用，通过几种药物化合物的模拟储存降解实验实现对化合物确认与纯度评估工作流程的自动化。采用这一设置后，化学家可以快速测定样品纯度。

实验部分

标准品与化学品

盐酸丁螺环酮、盐酸阿米替林、盐酸奈法唑酮、硫酸氢氯吡格雷、紫杉醇和福辛普利钠标准品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。这些化合物的分子量范围为 277–853，展示了 LC/MS 在分析不同大小化合物上的广泛适用性。

将所有标准品用乙腈 (ACN) 配制浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的单标储备液。将所有储备液冷藏 4 个月，然后用 20% 的 ACN 水溶液配制成 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的工作溶液。随后对这些工作溶液进行分析，测定冷藏 4 个月后的样品纯度。

LC/MS 仪器和分析

用一台安捷伦单四极杆 InfinityLab LC/MSD XT 系统进行 LC/MS 分析。该系统包括一台安捷伦单四极杆质谱仪，配备使用安捷伦喷射流技术 (AJS) 的电喷雾 (ESI) 离子源、Agilent 1260 Infinity II 二元泵、进样器和二极管阵列检测器。

在 $2.1 \times 50 \text{ mm}$ Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上进行 4 分钟的高通量通用 LC 分离，以水和含有 0.1% 甲酸的 ACN 作为流动相。LC/MSD 系统在 ESI 正离子模式下运行，以每秒扫描 2 次的速度在 100–900 m/z 范围内进行全扫描采集。

软件

使用 Agilent OpenLab CDS 2.2 版进行数据采集、处理和报告。

结果与讨论

化合物确认

LC/MS 是进行化合物确认的理想选择，因为它在常规情况下可产生分子量指示性离子而几乎不产生碎片离子。当以正离子模式进行 LC/MS 分析时，分子量为 M 的化合物通常会生成增加了一个质子的 $[M+H]^+$ 离子。例如，紫杉醇是一种分子量为 853.9 的化合物，它通常会生成 854.3 m/z 的离子（其最高丰度单一同位素形态的质子化形式）。根据 LC/MS 分析使用的流动相，也可能出现 $[M+NH_4]^+$ 或 $[M+Na]^+$ ，分别在 871.3 和 876.3 m/z 处产生离子。在负离子 LC/MS 中，将脱氢生成 $[M-H]^-$ 离子，还可能产生 Cl^- 或乙酸盐加合物。

如果分子量已知，则可用提取离子色谱图 (EIC) 测定是否产生预期化合物。如果 EIC 中单个主峰的时间与总离子色谱 (TIC) 中的主峰重叠，则可以明确表明存在预期化合物。

样品纯度估计

通过比较 EIC 中峰的总面积或 TIC 中单个峰的面积与 TIC 中其他所有峰的总面积来估计样品纯度。例如，如果 EIC 中峰面积为 950000，而 TIC 中其他所有峰的面积响应为 50000，那么就可以估计样品纯度为 95%。

由于离子化效率（以及 MS 响应因子）在不同的化合物之间有较大差别，很多化学家更倾向于使用更加“普遍响应”的检测器（如 UV 或 DAD 等光谱检测器）来估计样品纯度。虽然 UVD 的使用较为

常见，但也可以使用蒸发光散射检测器 (ELSD)。串联配置时，色谱柱中洗脱的同一种化合物在 UVD、ELSD 和 MSD 色谱中有不同的保留时间。因此，需要在 MSD 和用于样品纯度计算的其他检测器之间使用信号延迟。

结合使用 MSD EIC 中化合物的保留时间与信号延迟，找到其他检测器中的化合物峰。该峰面积百分比为样品纯度的指标。图 1 展示了如何对储存中降解的紫杉醇样品进行纯度计算。根据 UV 信号的响应，紫杉醇仍有 97% 的纯度。

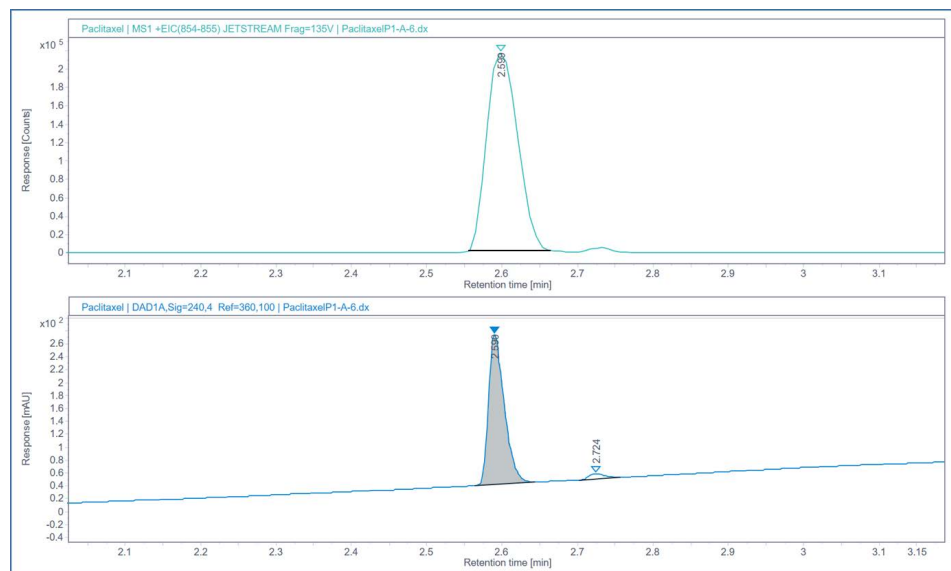


图 1. $[M+H]^+$ 的 EIC 和紫杉醇的 UV 色谱图，由于 MSD 分析中有轻微延迟因而对保留时间进行了调整

自动数据处理与报告

OpenLab CDS 可以使仅接受过少量数据系统培训或只有少量 MS 数据解析经验的化学家也可以快速获得化合物确认和纯度估计的报告。在提交一个或一组样品时，化学家需要为目标化合物指定分子量（丰度最高的单一同位素形态）或分子式，软件将利用这些信息自动处理数据并生成报告（图 2）。

处理方法窗口用于指定 OpenLab CDS 计算样品纯度时用到的参数，包括信号延迟、积分参数、潜在加合物、纯度截止限以及选择用于纯度计算的信号（图 3）。尽管大多数样品纯度评估都可以使用一种通用处理方法，但化学家可以在使用 OpenLab CDS 时选择定义一种不同的方法对自己的样品进行纯度评估。化学家也可以在输入更新的分子量或化学式之后重新处理数据。当初始数据输入出现错误时，此功能尤其实用。

	State	Vial	Acq. method	Proc. method	Sample name	Target1	Volume
1	Completed	PI-A7	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Solvent		3
2	Completed	PI-A1	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Buspirone	385.2	2
3	Acquiring	PI-A-2	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Amitriptylene	277.2	2
4	Pending	PI-A-3	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Clopidogrel	C16H16ClN02S	2
5	Pending	PI-A-4	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Nefazodone	C25H32ClN5O2	2
6	Pending	PI-A-5	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Fosinopril	563.3	2
7	Pending	PI-A-6	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Paclitaxel	853.3	2

图 2. 序列表的示例。化学家在“目标物 1”列中输入预期化合物的化学式或分子量

General Positive Ions Negative Ions

Calculate sample purity

Minimum purity limit %

Base signal

Calculation to use TIC % EIC/TIC %
(for MS base signal only)

Charge carriers

-electron

+H

+Na

+K

+NH4

Neutral losses

H2O

Charge states, if not known

Min

Max

Aggregates

Dimers

Trimers

图 3. 用于样品纯度测定的处理方法设置。此处，根据 TIC 计算样品纯度，考虑了质子化加合物和钠加合物，截止限为 80%

在完成样品分析和数据处理后，可以在汇总表（图 4）中审查一个批次的样品结果，或逐个样品检查单独的 EIC、TIC 和 UV 信号（图 5）。颜色标记可以快速指明存在问题的样品。如图 4 所示，丁螺环酮、阿米替林、奈法唑酮和氯吡格雷满足 80% 的纯度截止限，而紫杉醇和福辛普利不满足这一条件。如图 5 所示，审查特定样品可以得到精确的计算纯度以及整合到 TIC 中的所有峰的质谱图。质谱图可以提供样品中存在的任何杂质的性质等有用信息。

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

图 4. 样品纯度结果汇总表。颜色标记表明紫杉醇和福辛普利均不满足指定的 80% 纯度阈值

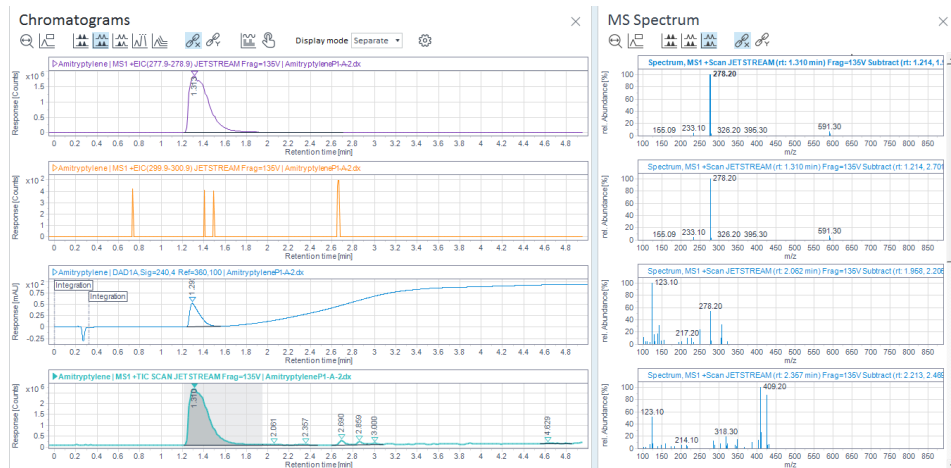


图 5. 阿米替林样品的特定数据审查展示了 EIC、TIC、UV 信号以及整合到 TIC 中的所有峰的质谱图

样品纯度报告可以表明是否发现化合物以及样品纯度估计值，报告可采用预先定义的模板在样品分析后自动生成（图 6）。报告中颜色的使用可以更加轻松地确定是否已发现化合物以及化合物是否符合所要求的纯度水平。

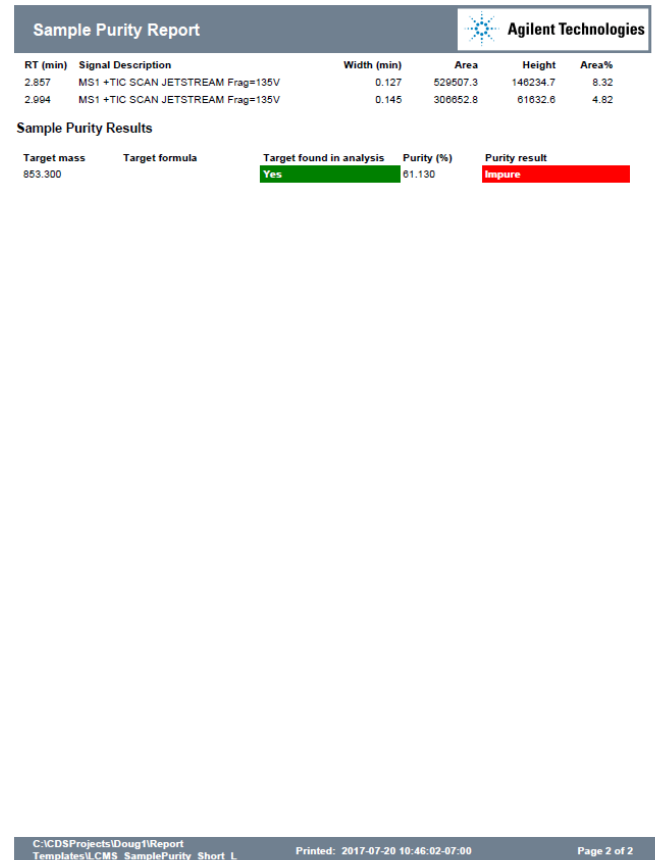
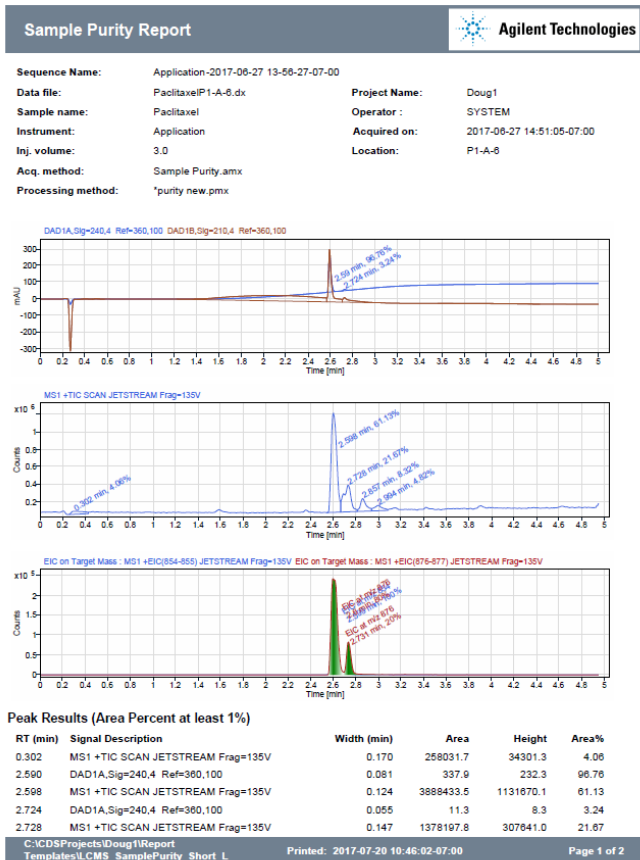


图 6. 典型的样品纯度报告。此例中，根据 TIC 信号指定了 80% 的纯度截止限。样品中发现了紫杉醇（以绿色标出），但纯度为 61%，低于纯度截止限（以红色标出）

工作流程自动化

通过使用 OpenLab CDS 实现样品纯度工作流程的自动化。如图 2 所示，可以通过序列列表轻松管理样品信息、目标质量数和处理方法。使用内置的 OpenLab CDS 报告模块，可以高度自定义报告以适应不同的使用目的。报告模板中的选项可以整合在处理方法中，以便自动生成和打印报告，如图 7 所示。

结论

OpenLab CDS 为样品纯度评估提供了一种简单的自动化解决方案。即使只有少量 MS 数据解析培训或经验的化学家，也可以在不借助外部分析服务的情况下快速获得样品纯度评估结果，大幅提高了实验室通量。

对于大批次样品而言，使用颜色标记的样品纯度结果汇总表可以轻松找出不纯样品。通过逐个样品审查，化学家可以检查单独的 EIC、TIC 和 UV 信号、精确计算的纯度以及 TIC 中整合的所有峰的质谱

图，从而了解有关存在杂质的更多信息。强大灵活的 OpenLab CDS 报告模板内置有计算以及结果颜色标记功能，能以简单直观的形式汇总样品纯度结果（无论是否发现化合物并估计了该化合物的纯度）。样品纯度报告可以在样品分析后自动生成。

化学家可以轻松地更改已输入的样品信息，如若输入的分子式有误，可进行更改。随后，样品快速得到重新处理，无需重复进样。整个样品纯度工作流程可以在 OpenLab CDS 内自动进行，极大地提升了高通量实验室的效率。

Processing Method

LCMS Sample Purity

General | Scaling

General

- Properties
- Signals

Extraction

- Chromatogram
- Spectrum

Integration Events ChemStation

- Standard
- Advanced
- Manual Integration

Compounds

- Identification
- Calibration
- Spectra

System Suitability

- Properties
- Column

Tools

- Custom Calculation

Reports

- Injection Report**

First report

Report template: LCMS_SamplePurity_Short.rdl [Browse...]

Report destination: None Printer File

File format: PDF (*.pdf) Excel workbook (*.xlsx)
 Word document (*.docx) Plain text (*.txt)
 CSV (Comma delimited) (*.csv)

Copy report to folder: None Storage Windows file system

Destination folder: [Browse...]

Second report

Report template: SequenceSummary_Short.rdl [Browse...]

Report destination: None Printer File

File format: PDF (*.pdf) Excel workbook (*.xlsx)
 Word document (*.docx) Plain text (*.txt)
 CSV (Comma delimited) (*.csv)

Copy report to folder: None Storage Windows file system

Destination folder: [Browse...]

图 7. 自动化工作流程的报告定义

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/openlabcds

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018年5月17日，中国出版
5991-9085ZHCN

