

使用安捷伦 LC/MSD iQ 质量选择检测器和 WalkUp 软件快速确证 API 纯度

作者

Kyle Covert 和 Robert Ley
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA, USA

摘要

本应用简报展示在基于 UV 的方法中增加质谱信息，如何能显著提高色谱效率。通过增加质谱信息，快速色谱方法能够轻松区分共洗脱物质，这些化合物对 UV 检测器响应较差或不包含发色团时更是如此。在某些情况下，与仅基于 UV 的工作流程相比，痕量化合物的检测限可提升 100 倍。在本应用简报中，联用 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 系统和 Agilent MassHunter WalkUp，在开放式环境中分析了 22 种不同活性药物成分 (API) 的纯度。InfinityLab LC/MSD iQ 是一种强大的自我感知型智能质谱检测器，可将质谱信息添加到标准 HPLC 工作流程中。MassHunter WalkUp 这款软件可使 LC/MS 系统在开放式访问环境中使用。

前言

在 API 的合成过程中，需要对许多反应步骤进行监测。为确保创建可靠且性价比高的合成途径，必须测试每个反应步骤的整体纯度和收率。快速获得结果，是为下一步做出恰当决策的关键基础。通过添加质谱信息，可采用更快的液相色谱分离方法，因为质谱检测可以鉴定共洗脱分析物。此外，可以减少或无需使用 UV 检测所需的运行标准品。此外，由于涉及质谱检测的实施方法十分复杂，一些实验室与外部分析团队合作测试 API 的纯度。InfinityLab LC/MSD iQ 单四极杆质谱仪以及 MassHunter WalkUp 软件通过提供包含质量确认的直观开放式系统，降低了上述复杂性。

InfinityLab LC/MSD iQ 单四极杆质量选择检测器 (MSD) 具有出色的可靠性，具有智能诊断功能，可在低流速到高流速下操作。它还可以自动优化 MS 参数，以在名为“自动采集” (Auto Acquire) 的智能自动采集模式下获取最佳结果。色谱工

作人员只需将其添加到现有 Agilent 1260 Infinity II 或 1290 Infinity II 液相色谱堆栈中，即可使用该系统，也可无缝集成到上一代安捷伦液相色谱仪堆栈中。

该仪器使用 MassHunter WalkUp 软件，可以用作开放式系统。WalkUp 用户有两种：

- 系统管理员
- 样品提交人员

方法由管理员控制，可在受控环境下提交样品。由于 WalkUp 在采集和数据分析软件上运行，因此提交者无需预先具备 Agilent OpenLab CDS 的知识即可操作该仪器。他们只需使用 WalkUp 的快速样品提交用户界面提交样品，该界面无需任何培训即可使用，如图 1 所示。

The screenshot displays the 'Rapid Sample Submission' interface. It features a header with 'Queue Runtime' at 0. The left sidebar includes 'Active Samples' and 'Clear Tray' buttons. The main form has the following fields: 'User Name' (chemist), 'Password' (masked with dots), 'Sample Name' (Amitriptyline), 'Sample Count' (1 with +/- buttons), 'WalkUp Method' (Sample Purity), and 'Mass Confirmation' (278). A 'Select Method' dropdown is set to 'Sample Purity' with a '3 min ACN gradient' note. 'Submit' and 'Cancel' buttons are at the bottom. A footer note says 'Please contact WalkUp Administrator in case of any errors/warnings. No Samples in Queue'.

图 1. Agilent MassHunter WalkUp 软件的快速样品提交用户界面。样品提交人员只需登录并选择具有目标质量/名称的分析方法即可。测量和数据分析自动在后台进行；提交者将通过电子邮件收到 PDF 结果报告

实验部分

标准品与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)。所有 API 均购自 Millipore-Sigma (Merck, Darmstadt, Germany)。超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。

仪器

分析系统包括以下模块：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (G6160A)

DAD, 配备安捷伦 60 mm 最大光强卡套式流通池 (G4212-60007), 用于最大限度提高 UV 检测器的灵敏度。

样品前处理

将 API 标准品称量至 15 mL Falcon 管中, 根据其溶解度, 用乙腈或甲醇稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。立即对样品进行分析, 并在室温下静置于溶液中三个月以上, 来模拟储存降解状况。用标称质量作为样品纯度分析的目标质量进行 API 分析。

表 1. API 化合物列表

API	标称质量 (Da)		
阿米替林	277	丁螺环酮	385
红霉素	733	氯氮平	326
卡托普利	217	西替利嗪	388
曲唑酮	371	紫杉醇	853
帕罗西汀	329	阿司匹林	180
氯吡格雷	321	氯雷他定	382
福辛普利	563	非索非那定	501
奈法唑酮	469	苯妥英	252
佐芬普利	429	咖啡因	194
快诺酮	298	布洛芬	206
卡铂	371	奥美拉唑	345

表 2. Agilent 1290 Infinity II 液相色谱方法参数

参数	HPLC 设定值	
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.9 μm , 40 $^{\circ}\text{C}$ (部件号 699675-902)	
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸乙腈溶液	
梯度	时间 (min)	%B
	0.00	5
	1.75	90
	2.90	90
	3.00	5
后运行	0.7 min	
流速	0.8 mL/min	
进样量	1 μL	
检测 UV	[254, 5/参比波长 360, 80] nm	

表 3. “自动采集” 自动创建的 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 参数

参数	LC/MSD iQ 设定值
离子源	ESI \pm
采集模式	自动采集模式
点/秒	2
扫描范围	m/z 100–1000

OpenLab CDS

使用 Agilent OpenLab CDS 软件进行数据采集、处理和报告。OpenLab CDS 提供法规认证功能，可根据美国 FDA 21 CFR Part 11、欧盟附录 11 及其他类似法规提供数据可靠性支持。1290 Infinity II LC 和 LC/MSD iQ 旨在确保 GxP 实验室常规应用中可靠且稳定的 LC/MS 分析。

MassHunter WalkUp 软件

MassHunter WalkUp 是一款开放式安捷伦软件，是 OpenLab CDS、ChemStation 和 MassHunter 采集平台的附加组件。WalkUp 是位于常规数据采集上方的控制软件，并提供简单的用户界面来提交样品。

结果与讨论

用于样品纯度评估的额外 MS 信息

在 HPLC 工作流程中，额外添加 MSD 检测使用户可以在其分析中添加其他维度信息。此外，MSD 可检测到在 UV 中吸收差或不含活性发色团的化合物。还提供了共洗脱分析物的明确信息，仅靠 UV 检测无法分辨。借助质谱信息可更轻松地鉴定杂质，既无需分析标准品，也节省了运行上述标准品来确定保留时间所需的时间。从而可以快速进行样品纯度评估，无需掌握预期保留时间。

已知 API 红霉素在 UV 光谱中吸收较差。在与 API 不同的波长处检测到杂质。在许多情况下，很难获得杂质标准品或有机反应中间体。此外，API 在 210 nm 处的吸收几乎无法与噪音区分，只能通过测量标准品后确定预期保留时间来确认。

图 2 显示了质谱检测的实用性，可从 MS 色谱图中看出，该色谱图中有一个大峰，根据其标称质量 (733 Da) 鉴定为红霉素。如果没有质谱信息，就不清楚哪个 UV 峰是杂质，哪个是 API。

Sample Purity Results

Target mass	Target found in analysis	Purity (%)	Purity result
733.0	Yes	85.44	Impure

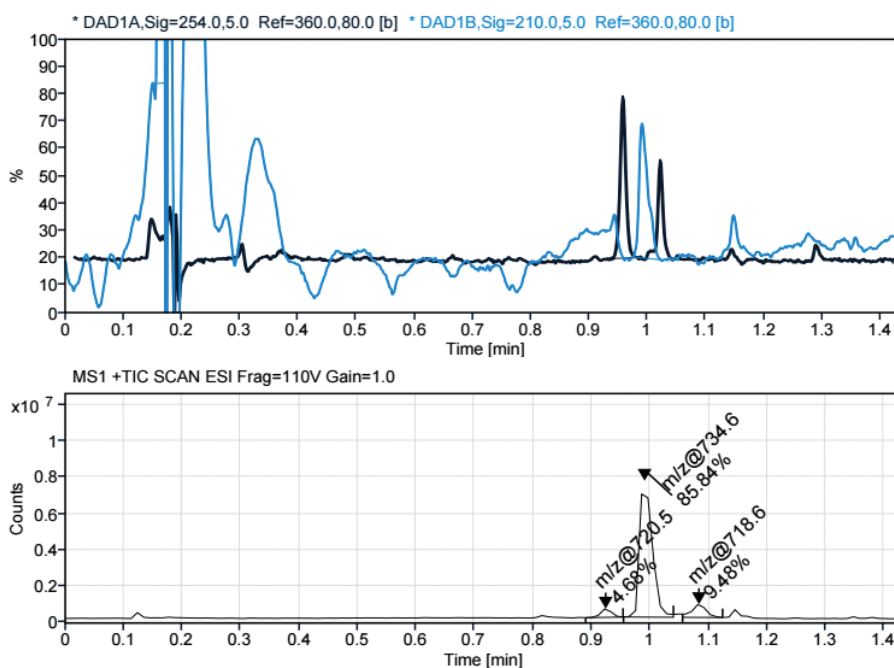


图 2. 红霉素样品的样品纯度结果。上图显示的是 254 和 210 nm 处的 UV 色谱图 (分别为黑色和蓝色迹线)，下图是标有基峰 m/z 和峰面积 % 的 MS 色谱图。从 MS 数据可以确认，210 nm 处的色谱峰为 API (约 1.0 min)，254 nm 处检出的两个峰为杂质

使用 OpenLab CDS 样品纯度工作流程简化反应监测

OpenLab CDS 提供了内置工作流程，可以自动处理数据并生成报告。使用已建立的方法，样品提交者无需执行数据分析，从而节省了宝贵的时间。样品纯度工作流程可让提交者最多输入五个目标质量，以在测量过程中进行监测。测量完成后，将使用从扫描信号中提取的目标质量的特定加合物，自动进行数据处理。然后，自动数据处理根据目标加合物的总 EIC 保留时间，在扫描信号中找到匹配的峰。如果找到目标，在报告中将显示为“已找到”，并根据 TIC% 或 EIC/TIC% 进行以下计算，来确定样品纯度。

本应用简报使用正离子 TIC% MS 样品纯度工作流程，并选择了 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 目标加合物，如图 3 所示。此外，选择 $[M-H]^-$ 和 $[M+HCOO]^-$ 加合物用于负离子扫描模式。

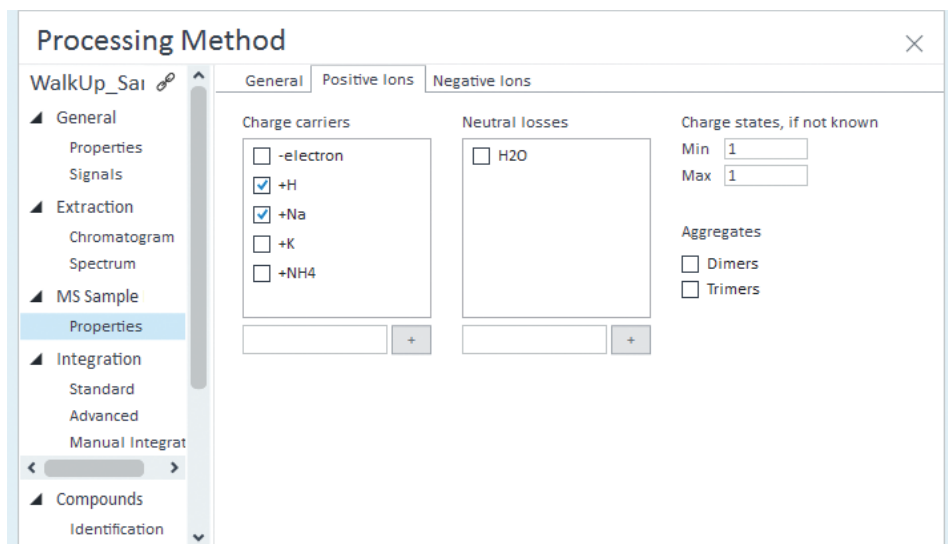


图 3. Agilent OpenLab CDS 数据分析处理方法选项卡中的 MS 样品纯度处理方法参数。MS 样品纯度通过 TIC% 计算确定。选择 H^+ 和 Na^+ 加合物用于正离子扫描模式。选择 $HCOO^-$ 加合物和去质子化分子用于负离子扫描模式。保存参数后，所有测量将自动进行数据处理和报告生成

图 4 显示了所有 22 种 API 的 OpenLab 数据分析和样品纯度结果。可轻松查看所有进样，未达到最低纯度限或未检测出的 API 标记为红色。样品提交者会收到每种 API 的样品纯度报告，类似于图 6 中的报告。

质谱信息对推断化学反应必不可少

监测整个合成途径中的反应是必要时做出正确决策和调整的关键。确定最佳应对方案需要快速可靠的结果。该模拟降解研究先稀释新制卡托普利，在 210 nm 处测量时，该色谱图在 UV 色谱图中显示一个峰。根据质谱信息将其确证为 API。MS 色谱图仅包含一个峰，目标质量的 EIC 对应于单峰；因此样品纯度为 100%。正离子 MS 质谱峰在质量数 m/z 218 和 457 处显示两个峰。前者是 API $[M+H]^+$ ，后者是钠加成二聚体 $[2M+Na]^+$ 。

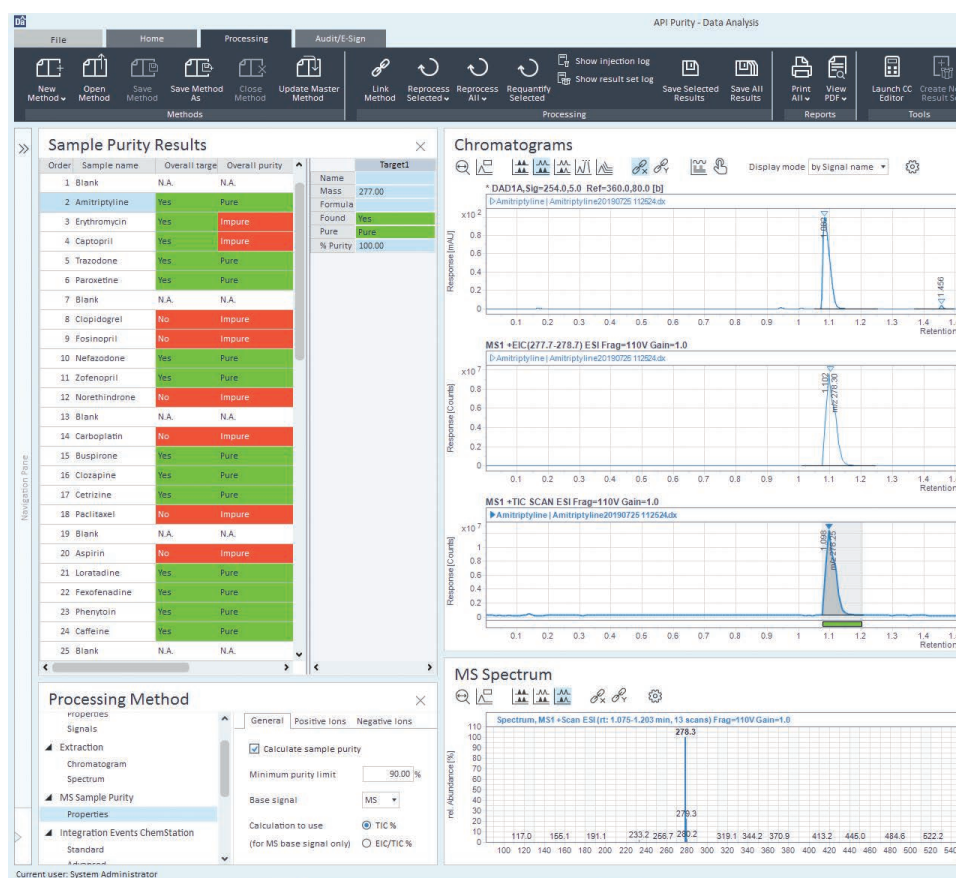


图 4. 用于样品纯度工作流程的 Agilent OpenLab CDS 2.4 数据分析 UI。“样品纯度结果”窗口显示了一系列进样的样品纯度结果。每行都包含样品名称，以及基于处理方法中设置的限值（纯样品 > 90%），样品属于纯样品还是不纯样品。UV 和 MS 色谱图显示在右侧，所选峰的 MS 谱图显示如下

在室温下静置三个月后，MS 色谱图有两个峰，正离子/负离子扫描模式的基峰分别在 m/z 218/216 和 433/431。 m/z 218 对应于 $[M+H]^+$ 加合物，而 m/z 433 对应于新物质。如图 6B 所示，254 nm 处的 UV 峰由 m/z 433 处的新物质组成，而非 m/z 218 的目标质量。卡托普利的标称质量为 217 Da， m/z 433 可能为 $[2M-2H+H]^+$ 。在观察卡托普利的结构时（图 5），推断随着时间的推移会形成二硫键。在这种情况下，质谱信息对于确定 API 的降解产物至关重要。通过检测 m/z 433 的二硫键二聚体，可以看出卡托普利的样品纯度仅为 58.49%。

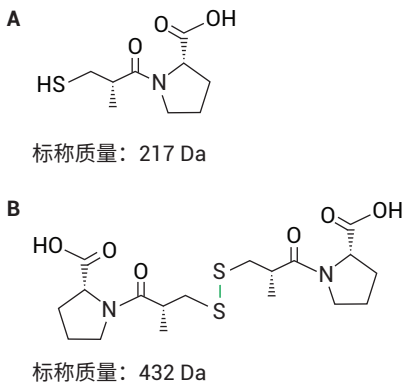


图 5. 卡托普利和二硫键二聚体的分子结构

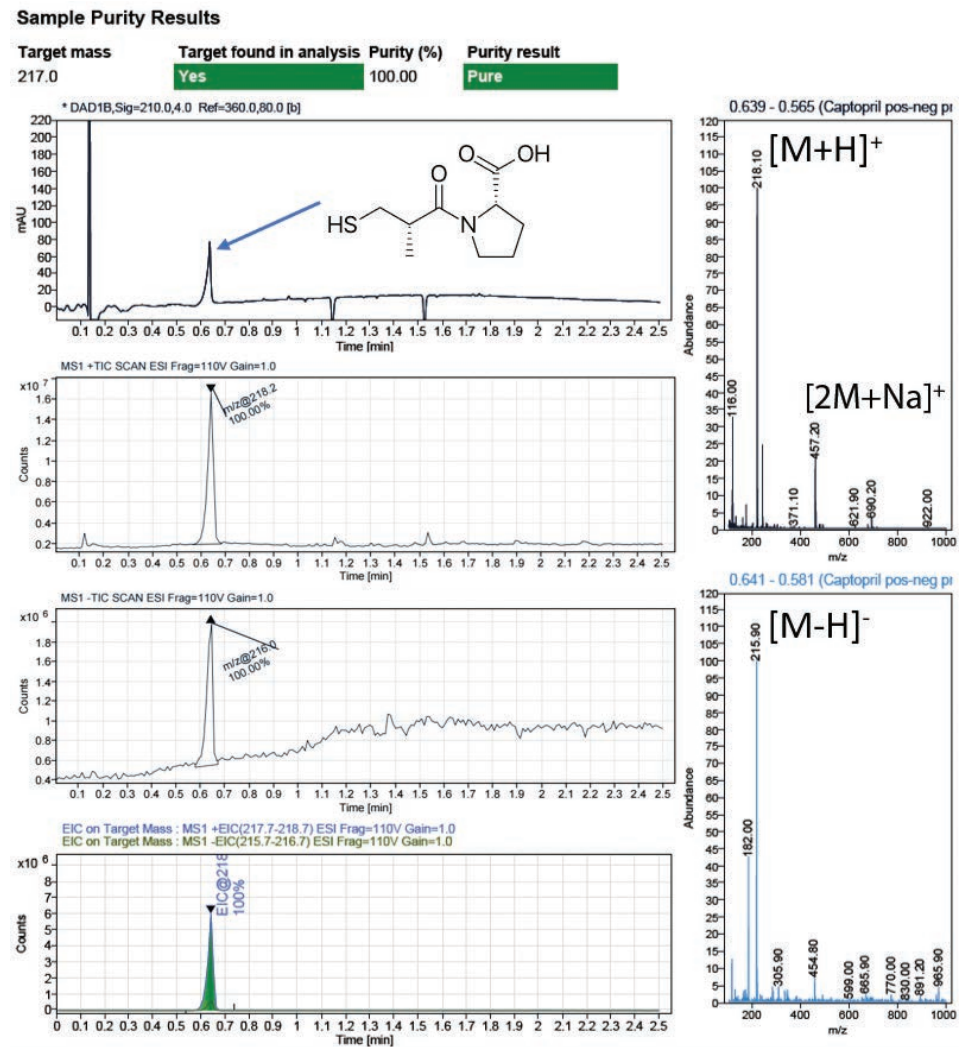


图 6A. 新鲜配制的卡托普利。该报告包括顶部的样品纯度结果以及标有 m/z 基峰的 UV 和 MS 谱图。目标化合物也有一个 EIC，以显示哪些峰由 API 组成。MS 谱图显示在右侧，并带有加注标签，以供手动注释

质谱信息对于鉴定 API 杂质很有价值。配置质量选择检测器有利于分辨共洗脱分析物。InfinityLab LC/MSD iQ 是与 UV 检测结合使用的理想系统，可向分析中添加质谱信息来进行样品纯度工作流程。当样品在 UV 中吸收差或很难获取标准品时非常重要。MassHunter WalkUp 可让多个用户使用直观用户界面提交样品，无需具备质谱知识。与 InfinityLab LC/MSD iQ 结合使用，可确保获得真正的开放式体验，从而快速获得结果，为必须快速做出决策的实验室节省了宝贵时间。

Sample Purity Results

Target mass	Target found in analysis	Purity (%)	Purity result
217.0	Yes	58.49	Impure

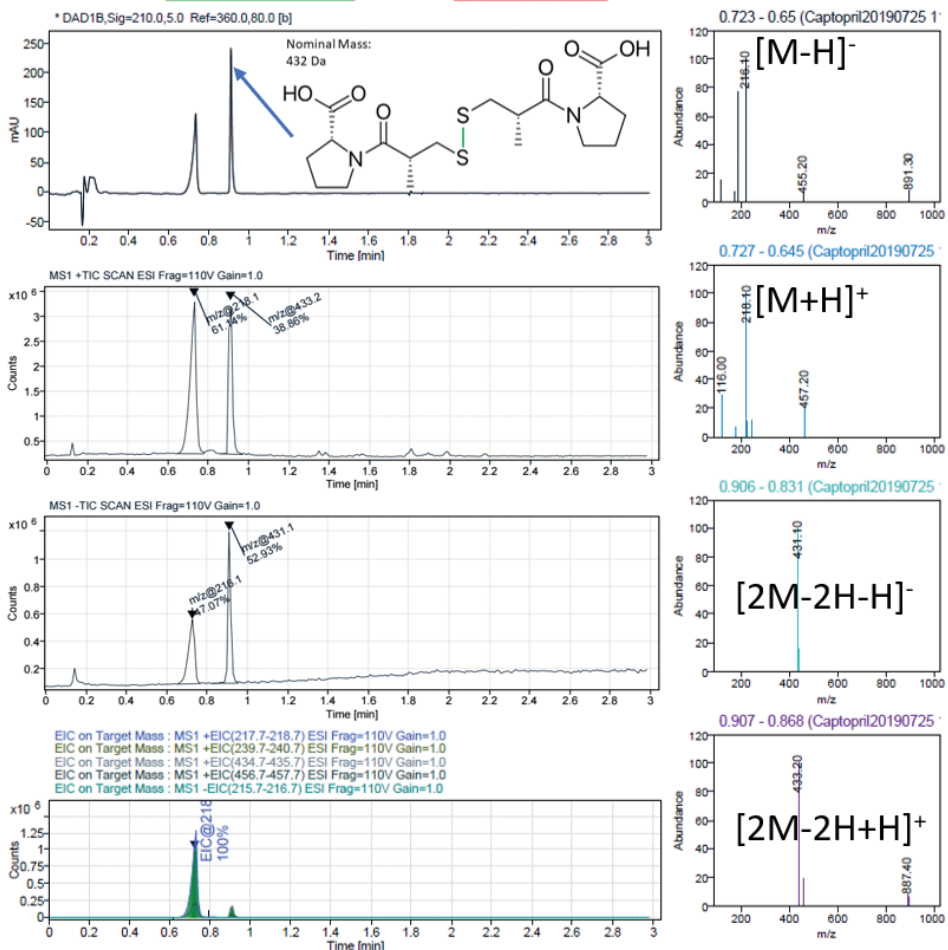


图 6B. 卡托普利样品在室温下静置三个月后。在 0.9 分钟处 m/z 433 有一种新物质，很可能表明 API 的两个分子之间已经形成了二硫键。利用质谱信息，可以轻松鉴定这种新物质。该报告使用 WalkUp 自动生成，将直接通过电子邮件发送给样品提交者。MS 谱图显示在右侧，并带有加注标签，以供手动注释

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

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, 2019
2019 年 11 月 08 日, 中国出版
5994-1503ZHCN
DE.8889814815

 **Agilent**
Trusted Answers