

[第47期]

液相色谱

■ 公司动态 ■ 制药领域解决方案
■ 应用报告 ■ 实验室数据管理系统 ■ 经验交流

质谱通讯



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

[理 论]

一项技术
突破并不仅
仅影响实验
室工作。

它还会影响
到您整个组织
的运作方式。

当技术不再是科学进步的绊脚石，
您的组织会有多大的发展空间？拥有了
革命性的 Waters® ACQUITY UltraPerformance
LC® 系统后，实验室科学家们便能以
更大的信心和更高的效率来开发各种
方法。ACQUITY UPLC® 为科学家们提供了
远远优于 HPLC 的数据和灵敏度。因此，
它对实验室、董事会以及任何需要科学
来提高生活品质的方方面面都深具
影响力。ACQUITY UPLC 系统是液相色谱
技术的未来。欲了解更多信息，请访问
网站 www.waters.com/al。

©2007 Waters Corporation. Waters, The Science of What's Possible,
ACQUITY UltraPerformance LC, UPLC and ACQUITY UPLC are
trademarks of Waters Corporation.



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

索 引

公司动态

新产品AquaAnalysis 系统发布会	01
2008年沃特世制药论坛	02
沃特世成功举办食品安全应用研讨会	03

制药领域解决方案

OPEN ACCESS应用	04
纯化和分离应用	06
生物定量分析应用	07
代谢产物鉴定应用	08
代谢组学应用	09

应用报告

药物研发中使用开放式软件Open Access进行自动化高通量LC-MS/MS方法开发和定量	10
新一代自动纯化系统	14
生物定量分析-使用UPLC/MS/MS获得终极速度和灵敏度	17
脂质组学：在不同脂肪酸底物作用下永生化肝细胞中总磷脂的研究	19
红豆杉属植物根须的UPLC-ESI-MS代谢轮廓分析	23

实验室数据管理系统专栏

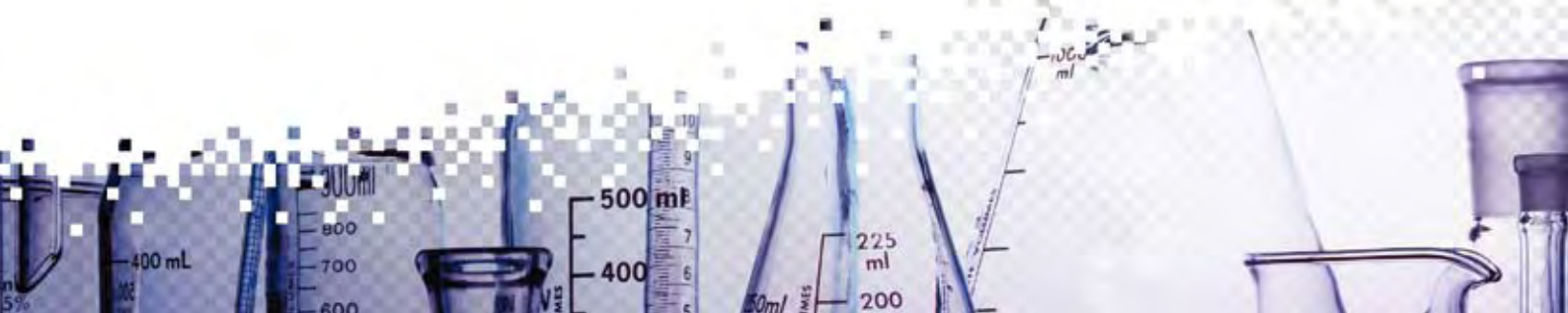
沃特世Empower 2软件——实现多供货商仪器控制，尽量减少培训和验证工作量	29
Empower 2方法验证管理器——精简药业产品开发中的方法验证工作	30
沃特世NuGenesis SDMS——信息化技术辅助客户满足21 CFR Part 11要求	32
沃特世NuGenesis SDMS——通过提交电子审查资料实现效率最优化	34

经验交流

超高效液相色谱仪（ACQUITY UPLC）光导流通池的维护	36
--------------------------------------	----

《液相色谱质谱通讯》在线专栏现已开通，提供过往期刊的电子文档，方便您在线阅读和下载。

欲知更多详情，请浏览www.waterschina.com。



新产品AquaAnalysis 系统发布会

沃特世科技（上海）有限公司于2008年4月10日在广东省深圳市博林诺富特酒店，举办了“2008年水质分析技术研讨会暨沃特世新产品AquaAnalysis 系统发布会”。

继2007年7月1日中国第一部强制性饮用水法规《生活饮用水卫生标准》颁布以来，各级监测单位在实施过程中，遇到了许多问题，总结了一些经验。举办此次会议是为了介绍先进的水质分析技术，给大家提供相互交流的平台。

本次会议特邀了中国水质分析专家，深圳市水务局水质监测中心领导和广东省水质分析领域的分析工作者们与沃特世技术人员一起探讨水质分析方法、交流分析经验、分享国际水质分析技术的现状和发展。

会上，介绍了液质联用技术在水质分析中的应用现状及其发展方向；沃特世各类质谱的特点；水质分析（液质系统）整体解决方案，包括固相萃取技术的应用；发布了沃特

世新产品——AquaAnalysis 系统。该系统是一款专为水质分析而设计的在线固相萃取——液质联用系统。它真正实现了水样全自动化提取、分离和分析。

与以往会议不同，这是一个从用户需求出发，与用户开展互动的研讨会。在水监测系统中享有盛名的卢益新主任在会上做了发言。用户张凌云介绍了其实际分析工作中积累的经验和遇到的问题，得到了与会者的共鸣。会上，大家讨论热烈，焦点主要集中在：水质分析整体解决方案。

会后，参会人员到深圳水务集团水质中心实验室参观，进一步交流了水质分析经验，更为直观了解液质联用技术在水质分析中的应用。

作为液相/液质分析技术的领先者，沃特世公司一直关注着分析工作者的需要，并致力于提供更为先进、完整的解决方案。



2008年沃特世制药论坛



2008年沃特世制药论坛合影

沃特世科技（上海）有限公司于2008年4月17日至18日在上海召开了2008年沃特世制药论坛，近50位来自中国主要的药物研发公司、CRO、以及高校药物研究领域的客户受邀参加了此次会议。此次论坛旨在介绍和推广沃特世制药领域创新和完善的解决方案，使客户能在竞争日趋激烈的药物研发领域获得强有力的工具。

来自沃特世公司美国总部，新加坡亚太总部以及中国的专家就沃特世针对药物领域的挑战所提供的解决方案进行了精彩的演说，内容涉及药物研发中高通量制备及分析，先导药物分析，临床鉴定，代谢物分析及鉴定，以及实验室数据安全管理和认证等等。

为了让客户更加直观地了解沃特世的解决方案，本次会议安排了四套系统的实验室演示环节，分别是：

- Metabolite Profiling and Identification System
代谢物鉴定系统
- UV/MS -Directed AutoPurification™ System
紫外/质谱外引导的自动纯化系统
- Quantitative Bioanalysis System
生物定量分析系统
- Open Access System (UPLC®-SQD)
开放式软件系统

现场气氛非常活跃，很多客户都对沃特世制药领域的解决方案表示出了强烈的兴趣。会议中，沃特世公司征求了客户对于产品和服务方面的意见和建议，以求进一步推动和提高客户认可度，更好地为客户服务。



沃特世成功举办食品安全应用研讨会

沃特世科技（上海）有限公司于2008年3月28日在山东省莱阳市龙大集团会议厅举办了“2008年沃特世食品安全全面解决方案应用技术研讨会”。

此次研讨会旨在与山东省食品企业交流与分享食品安全领域最新的热点应用，并为业内的液相/液质使用者提供沃特世全面的解决方案。参会的用户共56家单位，其中包括10家国家事业单位和46家食品企业。

与以往将会议地点选在酒店举办的模式不同，此次会议选择在沃特世用户--山东省食品行业翘楚的龙大食品集团内举行。除安排了应用报告“沃特世超高效食品安全系统（UPLC®/MS/MS）提供的全面解决方案”、“沃特世GC/MS/MS联用技术在食品安全中的应用”以及“沃特世完善的样品前处理和色谱柱分离的解决方案”外，特别在龙大实验室

安排了长达两个小时的现场实验演示。演示的内容包括了使用沃特世 UPLC®/Quattro Premier™ XE以及沃特世 Quattro Micro GC™分析痕量的甲胺磷，硝基呋喃，氯霉素，六六六等兽残农残的试验内容。通过沃特世技术人员和龙大实验人员详细的操作讲解和演示，与会的用户对这几项热点应用实验有了更直观深入的了解和体会。会后，用户们都对现场实验演示内容表示出了浓厚的兴趣，纷纷表示研讨会的内容对他们日常工作非常有帮助，希望沃特世公司可以经常举办这种形式的技术交流。

作为液相/液质行业的领跑者，沃特世公司将一直密切关注用户的需求，并致力于提供完善的解决方案与无忧的技术服务。



征稿启事

《液相色谱/质谱通讯》欢迎用户投稿

本刊自开办以来，一直得到用户的支持与厚爱。特此沃特世全体员工向您表达最诚挚的敬意，感谢您长久以来真诚的关心与帮助。“用户的成功=沃特世的成功”。我们希望成为您忠实的工作伙伴，期待着与您更多的交流与合作。

- 征稿范围：使用沃特世产品(包括UPLC®, HPLC或MS仪器、色谱柱、SPE或其它前处理产品等)的应用报告，使用技巧及成功经验或心得。稿件在3000字以内，以Word文件或A4纸打印稿投稿。
- 刊物一经采用，将酌致作者稿酬。未经录用的稿件，恕不退回，请作者自留底稿。
- 本刊为内部交流刊物，故不影响作者向公开正式出版物继续投稿。
- Word文件请电邮至 xie_ying_feng@waters.com

打印稿投稿请邮寄至上海办事处市场部收(见封底)

OPEN ACCESS应用

简介

对于实验室来说，由于面临着处理能力，多种系统和用户数据管理的挑战，很重要的一点就是要实现效率最大化。分析常规样品和将结果返回给化学家将消耗掉分析师整天的时间，以致他们很少有时间集中于那些要求分析师给予专业关注的工作。而易学易用的Open Access系统可供化学家们自行分析样品，让分析师能够腾出时间从事更具有时间挑战性的分析工作，而且不会导致最终分析结果质量下降。OpenLynx™ Open Access系统为那些非分析仪器专家的化学家们提供了强大的色谱和质谱分析能力。为了尽量减少仪器操作的培训时间，OpenLynx Open Access可引导化学家们完成样品提交、方法选择以及报告选项等操作步骤。这套系统由一位系统管理员进行维护，管理员预先定义了系统的配置、可供选用的实验方法、处理标准以及报告选项。通过让化学家们能够自行提交样品，常规分析工作的执行会变得更加高效，给仪器专家们留出更多时间，集中于执行高级分析工作。沃特世（Waters®）的Open Access系统是目前市场上最完整的系统产品线。通过灵活组合各类注射器、溶剂输送模块、色谱柱化学产品、MS技术和软件，沃特世能够针对实验室的具体要求提供完整的解决方案。

药物发现

化合物确认和整数及精确分子量

药物研发工作包括化学合成、先导药物阶段和优化以及化学库维护这几方面的内容。通过使用Open Access Systems，可为药物化学家提供访问液相色谱（LC）/质谱（MS）分析结果的能力。这套易学易用的Open Access系统可供化学家们自行分析样品，解放系统管理员的时间，让管理员可从事更具时间挑战性的分析工作，而且不会导致最终分析结果质量下降。

定量

化学家要求获得高准确度的可靠定量分析。而他们所执行的工作范围从杂质鉴定分析到ADME（吸收、分布、代谢和

排泄）研究，以及其它许多工作。如今，许多化学家正在非法规环境下使用着Open Access UPLC®和HPLC系统。这套系统提供了方便访问LC/MS/MS结果的能力。

Open Access能够帮助非专家用户轻松地运用各项先进软件和硬件功能来获得所需要的结果。而OpenLynx Open Access所具有的质量控制（QC）能力意味着即使经验不多的使用者也可以确信自己的所获结果是正确的。Open Access Quantitation让非专家用户可以向UPLC/MS/MS仪器提交样品以供进行定量分析，而Open Access QuanOptimize™会在分析之前自动精调MS。Open Access Exact Mass可供非专家用户用于提交样品和收到报告，报告将概要说明用户所提交化合物的最有可能的化学式。

Open Access得以采纳的最大推动因素是其样品处理能力，因为每套系统都会有许多用户，而这些用户全都想尽快获得自己的分析结果。而转移至UPLC后，处理能力可以增加1倍以上，而分析方法的耐用性不会有损失，MS系统也无需改造。

Open Access用户可通过多个通道来搜集数据，包括ESCI®、UV、PDA、ELSD和模拟源。在应用于UPLC时，色谱分辨率可以得到保持，而检测限可以更低。分辨率有助于实现精确检测和峰值积分，并可获得更高的灵敏度，可能对更低浓度的样品执行峰值检测。对于Open Access系统来说，这些特色都很重要，因为可以减少样品分析的失败率并节约时间。

通过让管理员可以创建和管理OALogin用户，Open Access Toolkit能够增加各套Open Access系统的灵活性和易用性。这套工具可以为OALogin用户创建新的项目目录，并在目录创建后移入分析获得的项目数据（例如原始数据文件）。此软件可以监测数量众多的仪器PC机，在一个集中地点提供了这些仪器的当前状态以及分批处理队列状态。这套系统还可以通过启用口令保护功能，确保只有经过培训的用户才能访问本系统，增加了用户对分析结果的信任度。

以沃特世为单一供应商的解决方案为客户提供了良好的支持体验，并提供了整个系统供货范围内通用的软件，用户可获得更长的有效运行时间、只需与单一供应商进行联络。而其它供货商所能提供的具备相近样品处理能力的系统都需要采用多供货商解决方案。

系统1：易用型样品分析UPLC/UV/MS

以整数分子量检测SQ检测仪为特色的ACQUITY® SQD、用于UV检测的ACQUITY UPLC® PDA检测仪、ACQUITY UPLC系统可以包括色谱柱管理器、样品组织器、OpenLynx Open Access软件。

快速极性切换（20毫秒）、ESCI标准、快速数据采集率（10000amu/秒）、确保长期离子源洁净度的ZSpray™源接口、紧凑的占地面积，扫描速度加快，可获得高质量和可信结果的ISD和ICD。IntelliStart™可供用户轻松方便地进行精调、校准以及执行系统检查以确保系统质量。

TQ检测仪是一款新推出的易于使用而且增强了处理能力的小型串联四极质谱检测仪。这款新仪器经过专门设计，是一款价格适中的快速MS/MS系统，并兼容ACQUITY UPLC系统。这款新MS/MS检测仪包括了一体化的流路装置，用于实现自动化配置操作，并采用了IntelliStart技术。TQD运用了T-Wave™技术以及专门设计用于高速数据采集的新型数字电子器件，实现了与ACQUITY的完全兼容性。TQD与UPLC配合使用时，整个系统都会因为速度和灵敏度得到增强而获得了提升。



搭配Open Access系统SQD或TQD的ACQUITY UPLC

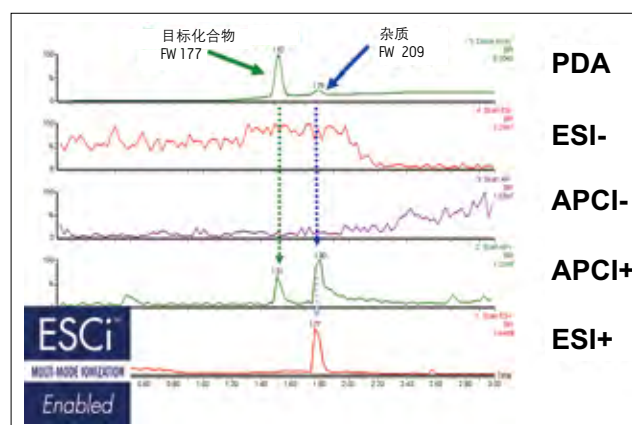
系统2：适用于Open Access Exact Mass的UPLC/MS

LCT Premier™ XE质谱仪、ACQUITY UPLC系统和OpenLynx Open Access软件

无与伦比的灵敏度、正负和负切换、ESCI、4个数量级线性范围、3ppm RMS精确分子量、12000 FWHM的分辨率、在较低质量下实现较高质谱分辨率、可确保长期源洁净度的ZSpray源接口、用于确保长期质谱分析精确度的LockSpray™技术。从设计上适用于快速数据采集工作，能够发挥出ACQUITY UPLC在分辨率、灵敏度和速度方面的优势。



ACQUITY UPLC搭配LCT Premier XE用于精确分子量测定Open Access



纯化和分离应用

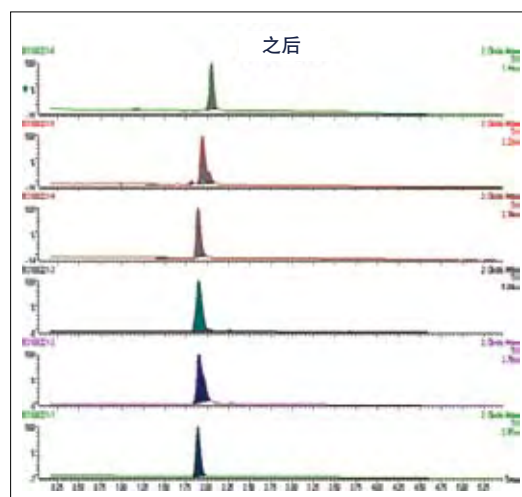
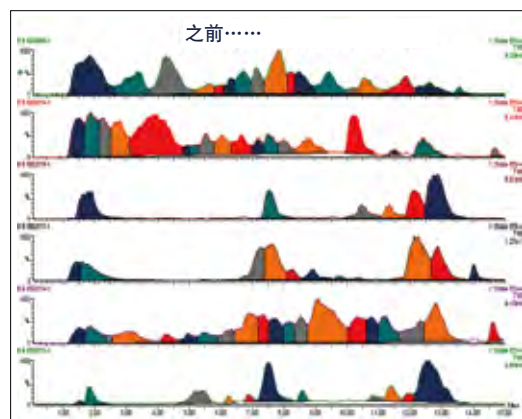
在整个药物研究和开发过程中始终贯穿着对相关化合物的纯化和分离。在药物研发领域工作的科学家们不断地在纯化各类合成化合物以方便建立相关数据库，而在研发领域工作的客户们有可能要不断地针对杂质、降解产物或未知代谢物进行分离工作。

为了将这些工作流程的自动化程度最大化，此种类型应用的理想配置方案应当能够：

- 正确处理各项分析和制备应用，具备范围宽广的各种流量和上样体积，并配备专用的流路系统
- 可以在分析模式与制备模式之间自动切换。这意味着采用软件控制切换阀使进样与收集一体化，从而消除了收集架与注射器之间的手工实体转换操作。

为了满足这些要求，通常推荐采用下列配置方案：

- 2545二元高压梯度泵，提供优异性能，流量范围从0.5ml/min到150ml/min
- 2767自动样品管理器，进样器与收集器于一体，并配备了独立的分析及制备流路，具备宽广的上样体积范围
- 色谱柱/流路管理器，可实现分析模式与制备模式之间的自动切换
- 3100型质谱仪
- 2489 TUV检测仪



2767自动样品管理器

2545二元高压梯度泵

色谱柱/流路管理器

3100型质谱仪

生物定量分析应用

简介

对生物样品中代谢物的定量分析是新药和现有药物开发研究的一个重要方面。这些药物通常具有较小的分子量，并要根据项目进展的阶段，在临床前研究（体外和动物试验）以及临床研究（人体试验）期间对这些药物进行试验。生物定量分析可应用于不同的生物基质，最为常见的是血液、血浆和尿液。定量分析方法的建立取决于几项因素，其中包括初始给药剂量、给药途径（口服、静脉注射等）以及所使用的药物品种。

目前应用于生物定量分析的主要技术是LC/MS/MS。这项技术所具有的灵敏度和选择性可以获得精确而可靠的数据，这些数据可以用于各种各样的不同用途，包括统计药理学（PK）分析。定量分析也是生物等效性研究一个不可分割的部分，这些研究用于确定现有药物的新制剂能否与原制剂在血液中具有相类似的释放速率和暴露水平。

高通量的数据处理也是一项重要的因素，因为通常需要在一天内生成数据并将数据返回至临床，并且要保证准确度和精密度。此外，较新型和更强效的药物都要求采用更低的检测限，从而推动分析师们去研究更为灵敏的方法。沃特世在这个应用中的许多领域均开展了工作，包括以提供更洁净样品和更低检测水平为目的的Oasis®样品制备解决方案，以提高灵敏度和处理能力为目标的ACQUITY UPLC®，用于提高灵敏度和选择性的质谱分析，以及符合法规要求的软件和系统资格。

高通量、高灵敏度生物定量分析用UPLC®/MS/MS系统

系统1:



适用于ACQUITY UPLC的Quattro Premier™ XE

它提高了样品高通量处理能力，增强了灵敏度（信噪比得到提升），具有更好的分辨率，降低了溶剂消耗量，而且整套系统占用空间很小。采用了T-Wave™碰撞室技术，达到了更快的扫描时间，信号不损失，信号通道之间无干扰，具备快速极性切换能力（20毫秒）。

系统2:



适用于ACQUITY UPLC的TQD系统

TQD检测仪是一款新推出的易于使用而且增强了处理能力的小型串联四极质谱检测仪。这款新仪器经过专门设计，是一款价格适中的快速MS/MS系统，并兼容ACQUITY UPLC系统。这款新型MS/MS检测仪的体积比Quattro micro™ API小25%，内含可用于实现自动化设置的一体化流路装置，并采用了沃特世新型的IntelliStart™技术。这款产品运用了T-Wave技术以及专门设计用于高速数据采集的新型数字电子器件，实现了与ACQUITY®的完全兼容性。TQD与UPLC联合使用，更能够体现速度和灵敏度增强带来的很多好处。

代谢产物鉴定应用

简介

在代谢产物研究中，最重要的是要理解某一具体药物是如何被机体所吸收、分布、代谢和清除的（ADME）。在药物寻找和开发过程中，代谢物鉴定是整个药物生产筛选过程中非常重要的部分，因为在清除过程中提早检测和鉴别出其主要的和毒性代谢途径后，有助于在转入开发阶段后对药物进行精细调整。而其中各种样品的分析非常复杂，既包括体内样品，又包括体外样品。对于体外样品来说，有可能是肝微粒体代谢和肝实质细胞代谢样品。典型的肝微粒体代谢包含了Phase I代谢物（除非添加了Phase II共因子）以及肝实质细胞（将包含Phase I和Phase II代谢物）。对于体内样品，可能是胆汁、粪便、血浆、尿和脑脊髓液。这些类型的样品均有可能包含很多不同类型的内源化合物，这些化合物有可能对推测的代谢物的监测产生干扰。而在大多数实例中，很少进行样品前处理工作，因为一定存在极性代谢物丢失的风险，所以采用了蛋白质沉淀方式。因此，在进行质谱分析前，要求最佳的LC分离，才

能让离子抑制和共流出的内源化合物不会干扰到可能的药物相关代谢物的检测。

UPLC®（ACQUITY UPLC®）是药物代谢样品鉴定工作中的最佳工作伙伴。这项关键技术能够提供优异的峰容量、分离度和无可匹敌的灵敏度及分析速度。质谱分析法是一种应用于药动学和代谢研究的发展完善且公认较好的技术。Q-TOF技术（SYNAPT™ MS或SYNAPT HDMS™）对药物代谢研究数据生成的质量做出了革命性的提升，这是因为这项技术具有精确的质谱分析能力，能够确保获得良好准确的数据和高灵敏度，这点对于代谢物鉴定具有非常重要的意义。精确质量数据的使用对于代谢物ID具有关键作用，因为化合物确认和消除虚假阳性反应对于理解一种具体新化学实体的代谢作用具有至关重要的作用。更多地，由于对药物发现过程中筛选大量化合物的要求提高，在数据处理方面呈现出瓶颈现象。因此，需要针对这个问题开发一种自动化数据处理方法，以便能够应对相应数量的待分析的候选药物。为了解决这个问题，MetaboLynx™和MassFragment™应用管理器能够深入挖掘复杂的数据集，找出预期和非预期的代谢产物。



适用于ACQUITY UPLC的SYNAPT MS系统



适用于ACQUITY UPLC的SYNAPT HDMS系统



ACQUITY UPLC Atlantis T3色谱柱

UPLC/MS/MS系统可实现高灵敏度和精确质量数的代谢物鉴定



代谢组学应用

简介

生物标记物是一种具有特定生物特性的分子标记物；具备一种可以用于测量疾病发展程度或治疗效果的生物化学特征或方面。这些生物标记物可用于支持化合物毒性评价和临床试验。因此，在后基因组学和蛋白质组学的时代，大家都一致认为代谢组学是研究领域一个至关重要的新方向，并可作为一种检测和识别生物标记物的方法。

生物体液的代谢特性中包括了数量巨大的内源小分子量代谢物，这些代谢物的组成取决于样品的衍生物，甚至取决于样品是在一天中的哪个时段采集的。而疾病和药物（以及其它生物活性分子）都会破坏随后立刻发生的代谢途径的浓度和通量。对此采取的反应措施包括了调节细胞内和细胞外环境以保持体内平衡。而这些紊乱和随后进行的调节都可以表达为对生物液体或组织正常构成的改变，这些改变可以用于描述疾病过程、毒性损害、药物反应或基因修改的本质或发生部位的特性。在非哺乳类生物体系也可以观察到类似的变化。

代谢组学采用了来自能够提供丰富信息 的各种分析技术的数据，特别是MS和/或NMR。这两项技术所提供的数据可以用统计学方法来进行评估，例如，主成份分析法（PCA），可以重点强调样品之间的细微和粗略的系统性差异。通过一段时间对这些所能观察到的变化的评估可以对过程紊乱或变动的机制提供关键性的信息。

系统1：具备精确质量分析能力的UPLC®/MS系统



ACQUITY UPLC搭配LCT Premier™ XE用于代谢组学应用

系统2：具备精确质量分析能力的GCT Premier™ (GC/TOF) 系统



系统3：具备精确质量分析能力的UPLC/MS/MS系统



适用于ACQUITY UPLC的SYNAPT MS系统

适用于ACQUITY UPLC的SYNAPT HDMS系统



药物研发中使用开放式软件Open Access进行自动化高通量LC-MS/MS方法开发和定量

Tobisam Khan, Gary Harland, Steve Preece和Paul Chilvers
沃特世公司, Wythenshawe, 曼彻斯特, 英国

概要: 本文研究旨在演示完整的全自动开放使用软件包, 从优化参数的初始设定到最终校正曲线和质量控制数据。

前言

在药物研发工作中, 人们需要不断的进行大量样品的方法优化和数据采集。由于增加了选择性和改进的灵敏度, LC-MS和LC-MS/MS仪器成为首选方法。更多的样品数量和更快的分析速度变得比以往更加重要。人们需要质谱不间断工作并能定义用户特权。本文演示三重四极杆质谱仪上的开放使用软件。

三重四极杆质谱仪分析药物的吸收, 分布, 代谢和排泄 (ADME) 要求多反应监测 (MRM) 模式, 即需要方法开发。本文中, 我们描述了开放使用中MS和MS/MS的操作, 其方法开发, 校正曲线采集和质量控制均自动完成。

方法

样品制备

四种磺胺类药剂的混合物被配成1 ng/μL溶液 (磺胺胍, 磺胺二甲氧嘧啶, 磺胺甲二唑, 磺胺甲唑)。开放使用软件为该类产品优化自动采集方法。

在1 pg/μL至1000 pg/μL之间做校正曲线。

质谱条件

仪器: Quattro Micro™ 三重四极杆质谱
模式: 电喷雾, 正离子模式
毛细管电压: 三千伏
离子源温度: 150°C
除溶剂温度: 350°C
碰撞气体: 氩气, 4.6 e(-3)mbar

液相

色谱柱: 沃特世 (Waters®) Symmetry® C₁₈ (2.1mm × 100mm, 3.5μm)
流速: 200 μL/min
流动相: 乙腈/水, 60/40, 体积比

开放使用软件设定步骤

1.1 QuanOptimize™ 定量优化参数

开放使用软件的定量优化和方法开发的第一步是建立分析功能中使用的设定方法。首先是定量优化的方法编辑 (图1)。自动MS 和 MS/MS分析所设定的参数为多反应监测分析建立过渡。之后, 软件自动定义采集参数, 使用QuanOptimize 定量优化的信息分析预先定义的校正系列。



图1 QuanOptimize 定量优化的方法编辑

在第一批校正进样分析时, 使用化合物的分子量采集质谱谱图, 椎孔电压在10到40V 之间渐变, 每次采集增加5V。自动测量的最佳椎孔电压信息依照加氢分子离子设定第一个四极杆。

校正溶液再一次进样, 开启碰撞气体, 碰撞能量从10到30V渐变。从色谱图中提取出子离子质谱图并比较得出峰度最高的子离子用于数据采集。

为完成以上步骤, 需要选择MS和MS/MS的通用调节文件, 以及为采集校正曲线的优化阶段和最终分析阶段定义的进样方法。

加合物由方法编辑定义，可追踪其他分子离子或其他加合物，如加钠或加锂离子。

水或二氧化碳的丢失可以从分子离子质谱图中被去除，因为它们是非特异性的。

1.2 为开放使用Open Access定量配置OpenLynx™

OpenLynx现在被加入定量优化QuanOptimize和定量Quantify功能，可以进行完全方法开发和分析。为将OpenLynx转成一种适合定量的格式，以下的对话框需要被定义。

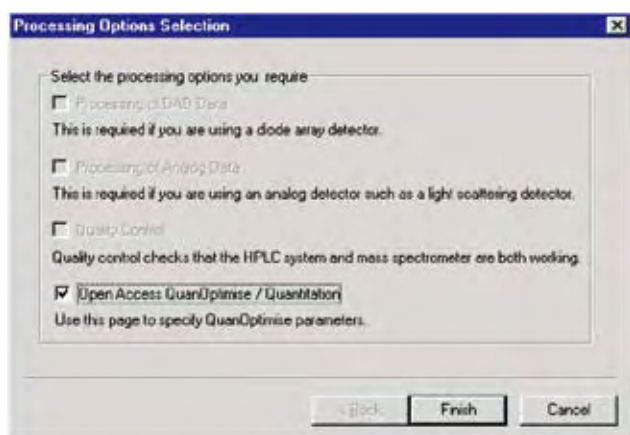


图2 处理选项

使用定量优化QuanOptimize的OpenLynx方法编辑，需进入以下界面：

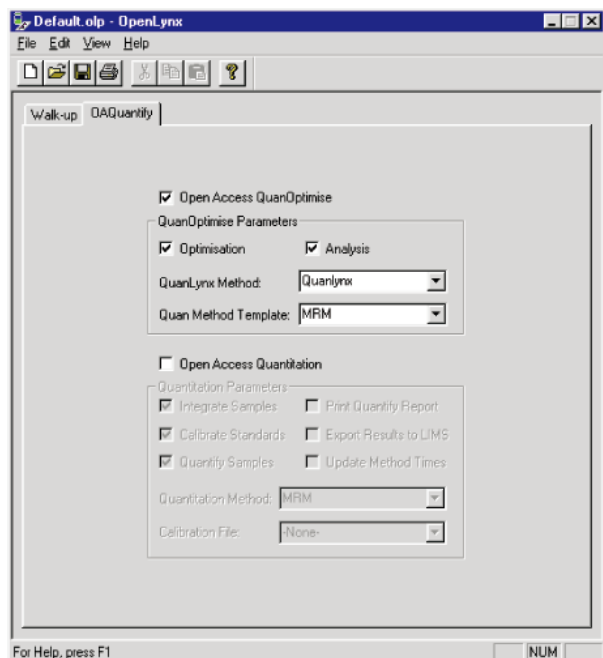


图3 OpenLynx的定量优化QuanOptimize界面

图中，实验的优化和结果分析由特殊定量Quantify方法和模版定义。该信息被定义后，选择步骤指引标记，添加描述和样品大小信息。（图4）

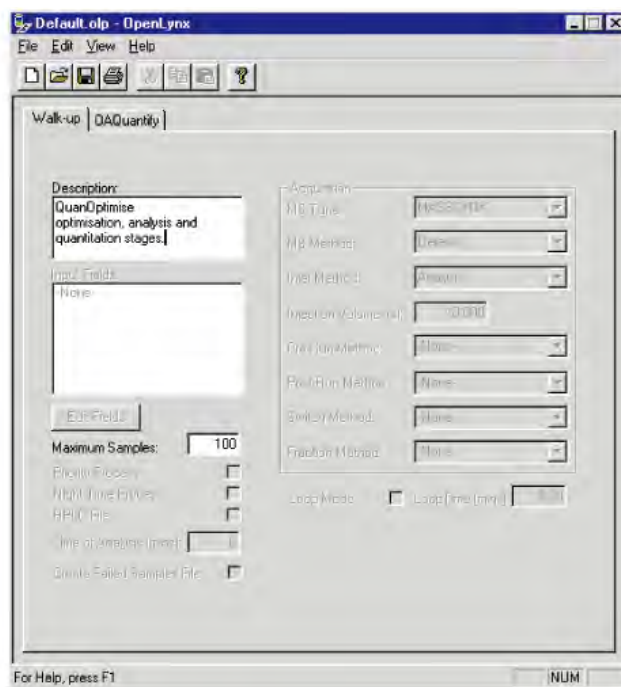


图4 OpenLynx的定量优化QuanOptimize界面

开放使用Open Access管理软件如图5所示，列出所有相关工作及其准备执行的排列顺序。（图5）。更重要的是，这种层次版面被突出并确认，和液相方法定义的内容是一致的。

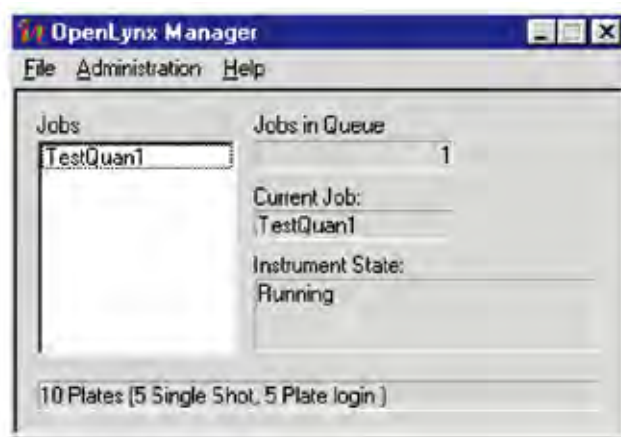


图5 OpenLynx管理软件

1.3 启动开放使用Open Access

当已经为开放使用Open Access设定了参数时，第一步是登录已经备好的样品信息。用户被依次引导回答一系列对话框。首先是Login界面（图6）

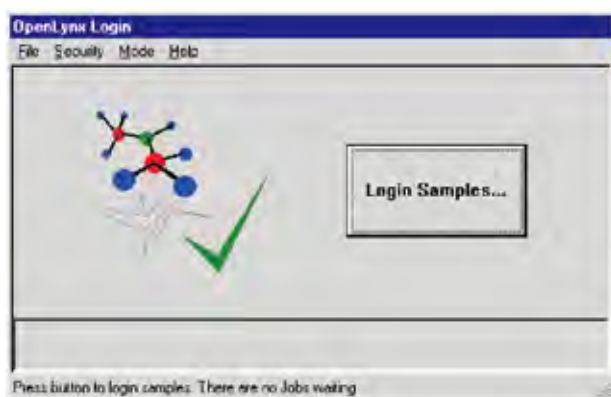


图6 OpenLynx管理软件登录

选择登录时，用户被给出几个选项，如样品如何分析，数据储存位置，甚至是数据是否须发送电子邮件给相关人员。（图7）

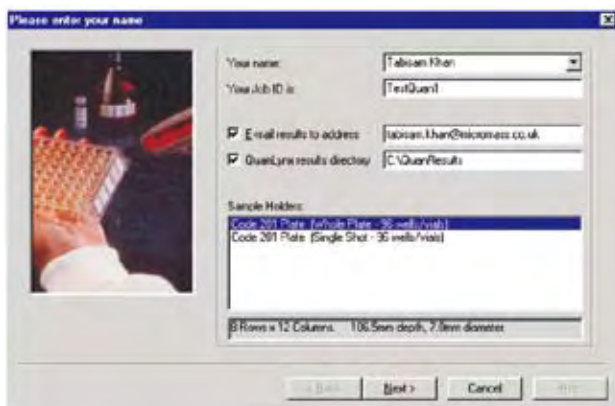


图7 用户定义和身份认证

只有得到允许进入样品信息的用户可以继续。这是向下移动菜单的管理，输入分析的确认号方可操作样品。电子邮件地址和储存目录也在此制定。如果选择开放使用Open Access的定量优化QuanOptimize的单一样品盘登录，用户将被限制该类型方法的继续使用。该方法现在被选出；

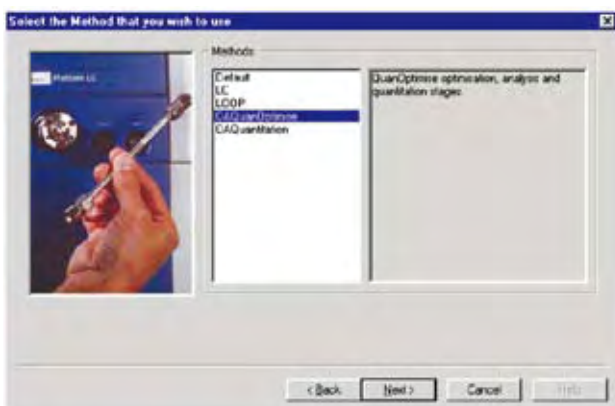


图8 方法选择

一旦选择了方法，化合物列表将被定义用于优化实验。这一步骤是必须的，因为先进行优化，之后多反应监测转换将被自动生成。转换文件将被直接写进采集方法，实验则开始进行。图9显示本实验中使用的四种磺胺类药物。在继续下一步样品分析前，该信息必须填入。

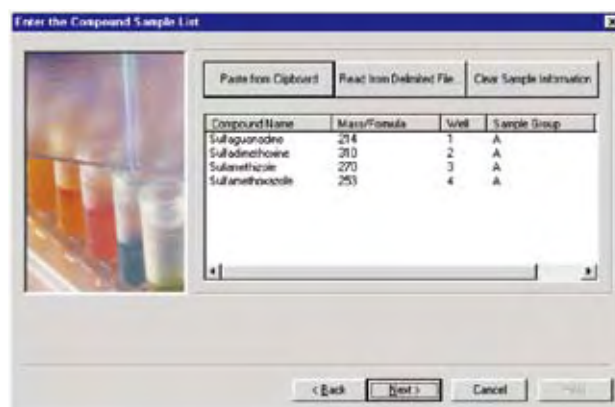


图9 化合物优化样品列表

下一步骤是进入分析样品列表。（图10）

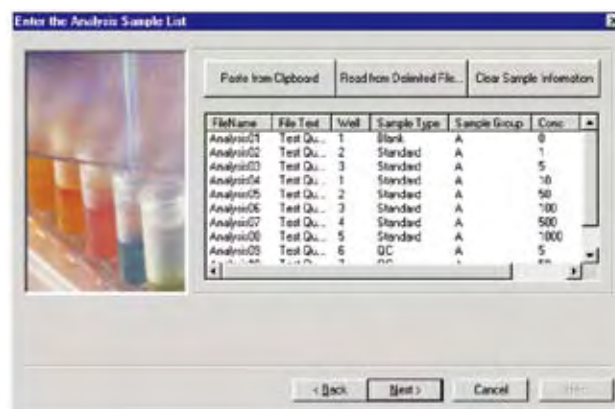


图10 分析样品列表

开放使用Open Access对话框，指导用户放置样品的位置。（图11）

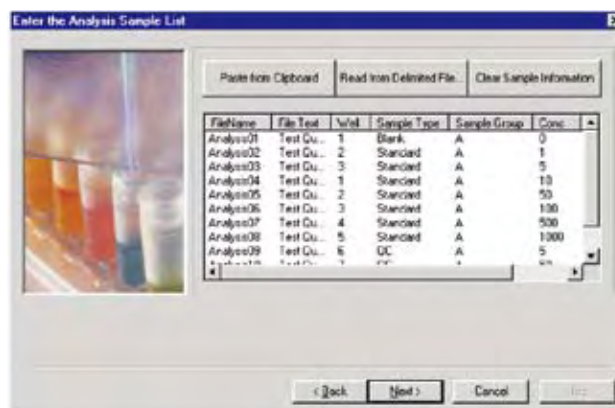


图11 样品位置

结果

以下列表显示软件为MS和MS/MS生成的优化参数。

磺胺胍 215.4>156, cv=30, ce=13

磺胺二甲氧嘧啶 311.5>156, cv=35, ce=22

磺胺甲二唑 271.4>156, cv=30, ce=13

磺胺甲唑 254.5>156, cv=35, ce=13

色谱图分别给出八张谱图，用于在不同锥孔电压的条件下自动生成分子离子（图12）。之后，软件为每一张色谱图生成质谱图，并基于最高峰，分配相应的锥孔电压。

MS/MS优化也遵循相似的步骤，质谱图中最大的峰被设定碰撞能量。（图14）

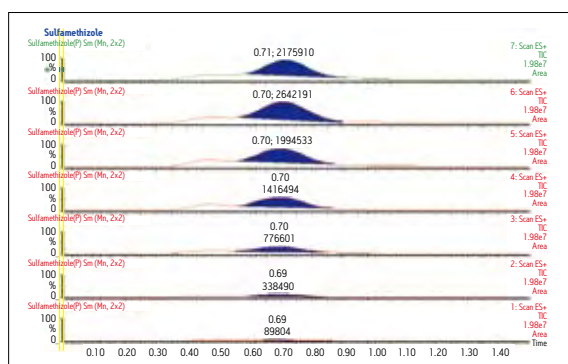


图12 色谱图表示磺胺甲二唑质谱优化

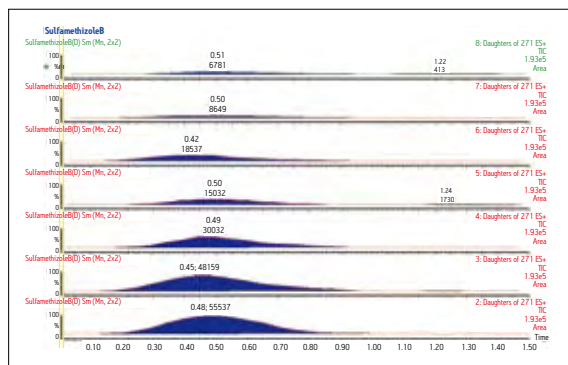


图13 色谱图表示磺胺甲二唑质谱/质谱MS/MS优化

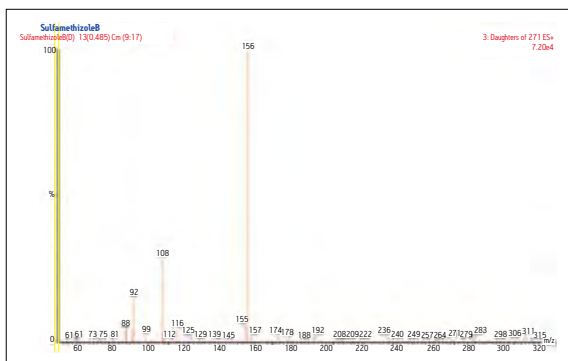


图14 磺胺甲二唑质谱/质谱MS/MS优化的提取质谱图

在开发使用Open Access的定量优化QuanOptimize中，使用预先设定的定量方法制作校正曲线。数据显示在浓度范围1pg/μl到1000pg/μl之间有良好的相关系数。所有四种化合物都重复了以上结果。

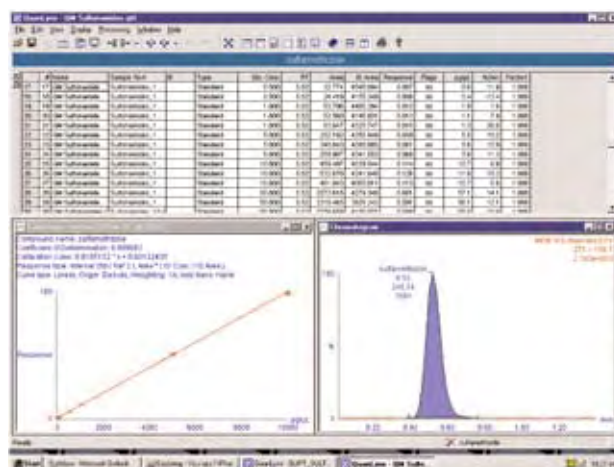


图15 磺胺甲二唑的校正曲线，线形关系超过三个数量级。

结论

开放使用Open Access定量优化QuanOptimize能够快速简便优化实验和方法开发。从初始的调节方案到最终校正曲线，数据保持了极高的灵敏度和数据一致性。

开放使用Open Access为化学家提供了步骤导引系统，灵活适用分析实验的开发。从样品导入至终端结果的操作是完整的一套体系。

新一代自动纯化系统

Ronan Cleary, Paul Lefebvre, Warren B Potts III
沃特世公司, 枫叶街34号, 米尔福德, 马萨诸塞州01757, 美国

概要: 传统上的制备样品分离过程使用紫外检测方法监测, 在所有色谱分离中收集许多组分, 然后再进行必要的人力分析和处理。质谱技术被证明有助于快速评价色谱峰身份和复杂色谱同一性。质谱触发的化合物分离利用质谱仪辨认目标峰信号并放置在组分收集管中, 减少处理步骤。化合物的纯化越来越成为合成化学家的责任。而获得一个成功的分离和收集所需要的知识与经验往往在这个合成专家组力所能及的范畴之外。

本文中, 我们探讨了在不牺牲化合物分辨率, 又可优化收集参数获得最佳性能的自动纯化过程, 该过程无需培训和指导。

前言

纯化过程最突出的困难是:

- 决定是否需要纯化
- 建立梯度集中分离同时流出的杂质
- 设定阈值优化收集已分离的化合物
- 设定软件功能确保非专家也可操作系统

一种管理方法是使用沃特世 (Waters®) 质谱操作软件 MassLynx™ 中的 FractionLynx™ 应用管理包。这套丰富的信息技术解决方案可以使从初始评价, 自动收集阈值设定到色谱纯化及收集组分分析全过程自动化。所有的功能都非常容易使用, 即使是最新的新手也可以通过使用开放式软件 Open Access 实现。

系统



沃特世质谱引导的自动纯化系统

组成部件

沃特世2545二元梯度模块, 2767样品管理器, 流路管理系统, 2998光电二极管阵列检测器, 3100质谱仪, 515泵和分流器。

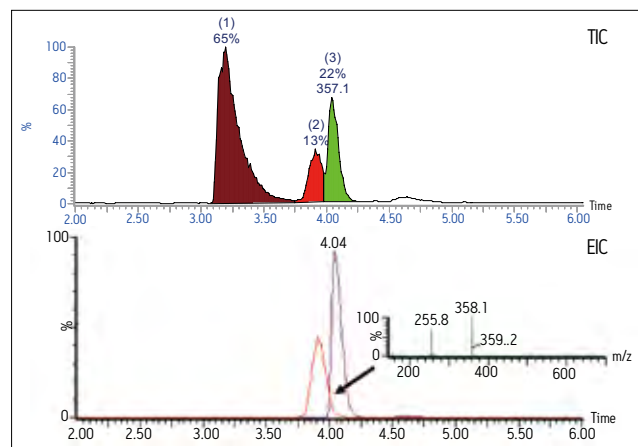
样品

100mg/mL测试药物混合物溶解于DMSO中。

自动纯化

自动纯化是FractionLynx应用管理软件包的组成部分, 提供从分析到后续的纯化和组分分析全系统水平的自动管理。

本研究中, 样品的分析筛选测定出样品不纯, 峰面积百分比仅占样品总量的百分之二十二。



感兴趣的化合物, 质量数为 357.1, 和另外一个化合物 255.1 同时洗脱出来, 如上总离子流图所示。两个提取离子流色谱图的重叠和质谱图的交叉, 更明确地说明是共流出

通常，化学家必须决定样品纯化是否需要，之后决定改善分离的必要梯度水平。基于样品纯度（百分之二十二）和分析保留时间，FractionLynx应用管理软件包可容易地做出上述两个决定。

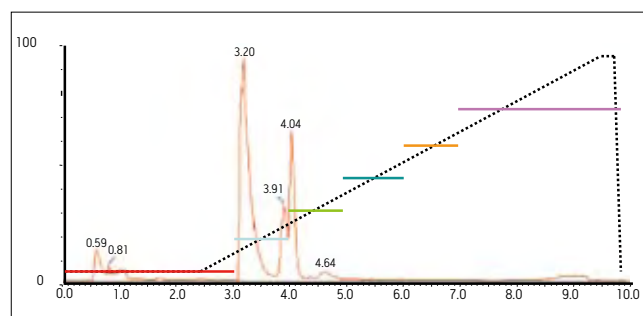
缓慢的梯度，或称窄梯度，可用于优化从相邻共流出杂质中的目标化合物分离，因而改善组分的纯度。

由于建立了分析过程保留时间和有机组成的相关关系，基于目标化合物的保留时间，将要使用的窄梯度可从现有梯度列表中被自动选出。

本试验中，在分析条件下4.04分钟洗脱出来的样品对应的洗脱剂中有机相浓度是25%。自动选出的窄梯度，从24%升至37%的有机相，即下图中绿色标出的部分。

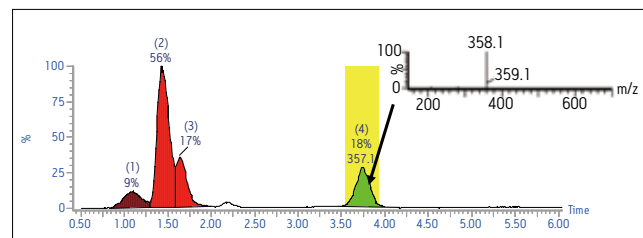
通过互动浏览窗口，软件决定的纯化方法可被自动执行，或人工调整之后执行。

含有其它五种窄梯度，在其它时间流出的样品可利用针对组分分析变化的梯度被纯化。



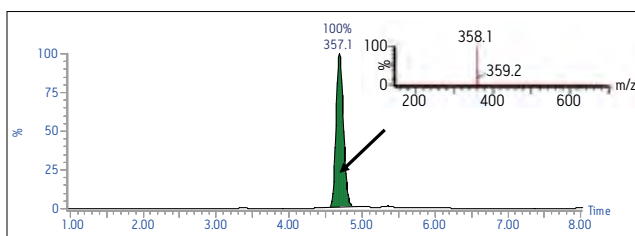
建立多种制备梯度，针对不同的分析洗脱组成

色谱图中表明成功的组分收集，黄色方块表示收集的组分。从提取离子流图上我们可以看到收集的组分不包含其它质量数。



自动选择窄梯度后收集的组分由目标化合物峰黄色部分表示。质谱报告其不含前面提到的分子量为255的组分

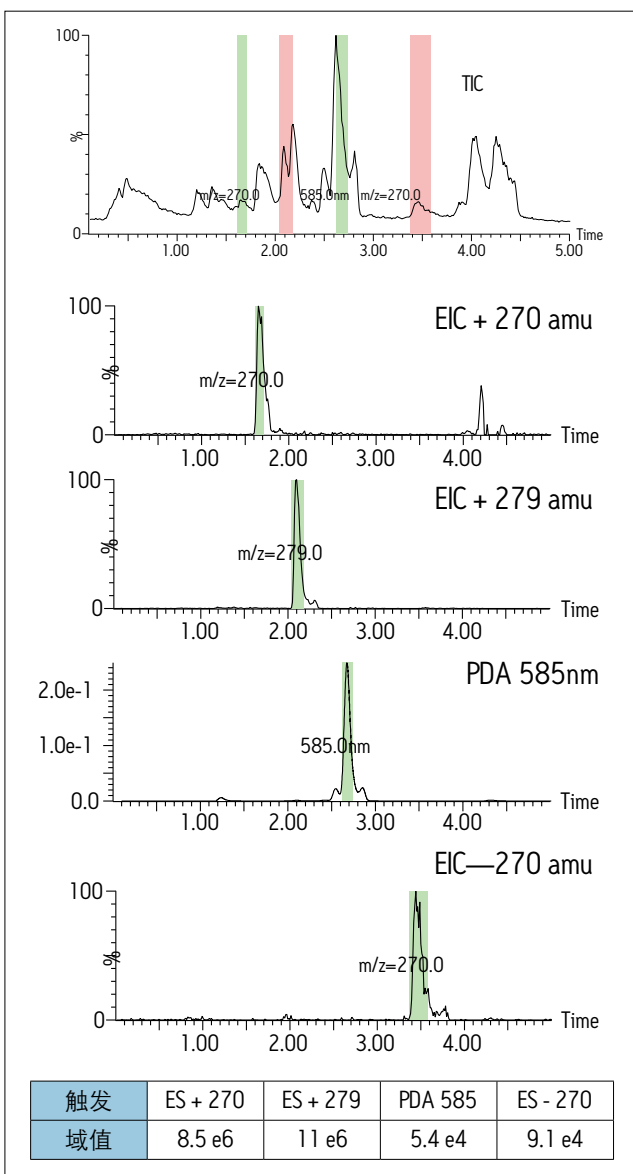
如有必要，对收集的组分可进行分析来确认纯化的成功，并在被转移到下一步骤之前，提供组分的基线分析。进样前，自动进样器在收集管内混合各组分，将去除所有可能在收集时发生浓度层差的影响。



收集组分的总离子流图，显示成功的纯化

自动收集域值测定

为了实际成功收集组分，设定正确的收集域值非常重要。域值必须足够高而不被基线的改变所影响，但还不能太



总离子流图显示一个复杂的样品，其收集的组分由彩色线条标出。每一张提取离子流图使用不同域值设定的触发收集，由新软件自动测出

高，否则可能会导致某些样品没有收集。在梯度过程中，检测器的背景强度可能变化，尤其是紫外模式，要求多模式域值设定。

在整个分析中设定模式域值，要求对色谱的预先了解，但这样的信息并不总是从事纯化工作的分析人员所能得到的。

制备级的域值可以从分析中估算出来，但是，必须分析样品来计算制备域值。

使用FractionLynx里面的AutoMIT功能，该软件可以从制备级空白进样生成的信息测定要求的域值。所有质量数，波长或其它检测器等可能触发收集的域值被测定。FractionLynx使用该信息设定域值触发收集。这意味着化学家可以拿来任何分析仪器上筛选的样品，仍然能够使用自动域值测定功能。

该软件能够进行自动测定和自动使用多个质量数，波长和模拟信号的域值。

开放使用Open Access纯化

其它应用管理软件包的功能都可以通过单一页面的开放使用Open Access格式来使用。

用户可以简单地从列表中选择分析方法，定义样品容器的形式，检测的反应化合物，质量数，紫外，蒸发光散射或模拟信号触发收集等。

开放使用Open Access工具包可远程管理用户，设定权限和系统监测。

结果

自动生成的报告显示组分的位置，色谱和质谱图。报告



单一屏幕开放使用Open Access登录，容易进入管理方法

中的信息可容易地以不同格式输出，如xml, csv 和tab，可兼容样品处理软件包，如液体处理或称重设备。

结论



FractionLynx浏览器显示相关样品和组分信息。如有必要，可互动编辑软件得出的结果

FractionLynx的自动纯化AutoPurify功能使得从开始的质量控制到收集组分的分析全过程自动化。

通过精选无需纯化的样品，不纯化的样品将不被分析，增加通量。

制备方法设定的软件控制无需个别建立分析方法，节省开发时间。

每个样品收集域值的自动测定，去除漂移或高背景信号的干扰，增加使用简便程度。

开放使用Open Access软件允许即使是完全新手也能够利用系统的全部潜在功能，无需培训。

生物定量分析-使用UPLC/MS/MS 获得终极速度和灵敏度

Kate Yu和Rob Plumb

沃特世公司，米尔福德，马萨诸塞州，美国

前言

超高效液相色谱 (UPLC®) 串联四极杆质谱是定量分析强有力的工具。正如以前报道，UPLC实际上保留高效液相色谱的原理，同时提高速度，灵敏度和分辨率，将分离科学带入新的领域。沃特世公司ACQUITY UPLC®系统被精心设计为极低系统体积和梯度驻留体积，充分发挥小于二微米的颗粒技术。因此，ACQUITY UPLC系统能够在生成小于一秒的色谱峰。

沃特世 (Waters®) Micromass® Quattro Premier™ 串联四极杆质谱仪具有先进的快速多反应监测数据分析功能，可以在极端窄的UPLC峰时间内收集足够多的数据点用于可靠定量。ACQUITY UPLC与Quattro Premier的结合在没有牺牲灵敏度和精度的同时，提高了定量速度。

为使用UPLC/MS/MS定量分析四种化合物的测试混合物，本应用文集描述了ACQUITY UPLC与Quattro Premier联用所获得的速度和灵敏度。

实验条件

液相条件

仪器： ACQUITY UPLC 超高效液相系统
 色谱柱： ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱； 2.1x50mm, 1.7μm
 流速： 0.6mL/min
 流动相： 10mM醋酸胺，pH值5， A： 10%乙腈，
 B： 80/20 乙腈/甲醇

进样体积： 5μL

梯度：	时间 (分钟)	%A	曲线
	0.0	95	—
	0.8	5	6
	1.0	5	6
	3.0	95	1

质谱条件

仪器： Quattro Premier三重四极杆质谱
 毛细管电压： 0.5千伏

离子源温度： 130°C

除溶剂温度： 400°C

除溶剂气体： 800L/Hr

电离模式： ESI

扫描模式： MRM

驻留时间： 10ms

转换时间： 10ms

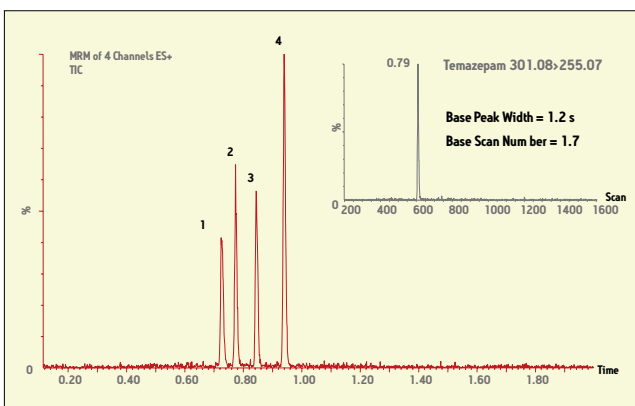


图1 测试混合物每个收集循环四通道的总离子流图：1 阿普唑仑 (309.0>281.0) 2 羟基安定 (301.0>255.0) 3 安定 (285.0>193.0) 4 普拉西坦 (325.1>271.1)

结果与讨论

图一显示了样品总离子流图，表明样品中所有分析物的基线分离度。所有四种化合物的数据收集是同时进行的，即每个数据收集循环式四个多反应监测通道。图二表明每个化合物的多反应监测色谱图。每个通道采用10ms的驻留时间和10ms的内部通道延迟时间，故每个收集的总循环时间是70ms。如图一所示（右上），是羟基安定的多反应监测色谱图，以扫描数量为X轴。液相的峰宽在基线是1.2秒，横跨峰时间内采集的数据点总数为17。

对于重复性好的峰定量，大家普遍接受的是色谱峰必须被定义为不少于15个数据点。图一表明即使在基线的峰宽只

有1.2秒，Quattro Premier还是能够采集足够的数据点用于复杂混合物的精确定量，因此，Quattro Premier是和ACQUITY UPLC超高效液相色谱系统理想匹配的质谱。

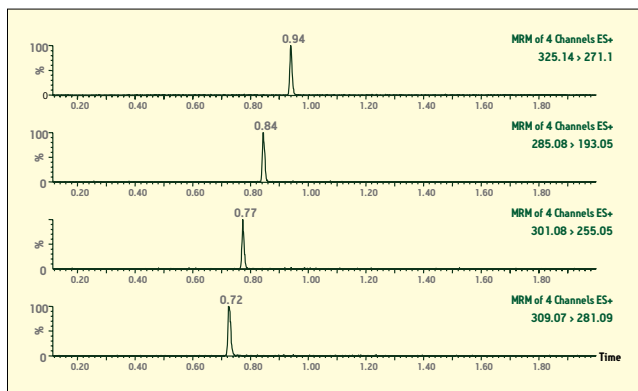


图2 每个测试化合物的多反应监测图

样品化合物的校正曲线如图三所示。对阿普唑仑的分析，线性范围从0.02ng/mL到1000ng/mL（4.5个数量级），对羟基安定、安定、普拉西泮的分析。线性范围从0.05ng/mL到1000ng/mL（4个数量级）每条曲线使用线性曲线调整的外标校正，以1/x计算。

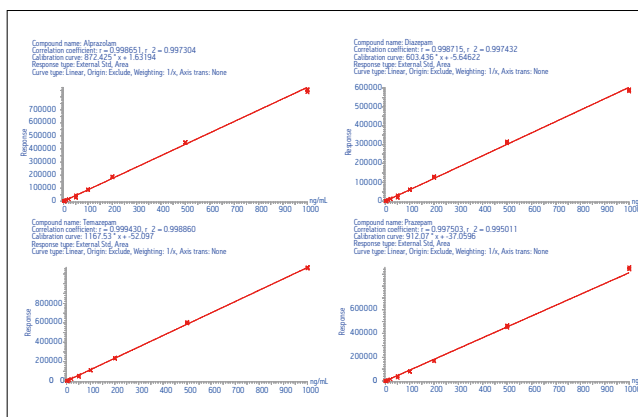


图3 测试化合物的校正曲线

每个测试化合物的定量分析结果如表一所示。此处报告的r平方值对阿普唑仑样品使用15点校正，对羟基安定、安定、普拉西泮的样品使用14点校正而获得。

表1 定量分析总结

Compound Name	MRM Transition	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)	Linear Range (ng/mL)	*R ²
Alprazolam	309.0>281.0	43	27	0.02-1000	0.997
Diazepam	285.1>193.0	36	32	0.05-1000	0.997
Prazepam	325.1>271.1	36	24	0.05-1000	0.995
Temazepam	301.1>255.0	26	20	0.05-1000	0.999

结论

对四种化合物的混合物进行UPLC/MS/MS超高效液相色谱/质谱/质谱定量分析是在沃特世公司ACQUITY UPLC系统和Quattro Premier质谱联机平台上，仅用1分钟同时完成四种多反应监测转换。本工作演示了UPLC/MS/MS超高效液相色谱/质谱/质谱在终极灵敏度下，可进行高通量，高质量分析工作。ACQUITY UPLC在基线生成平均液相色谱峰宽1.2秒，由于Quattro Premier具有高速多反应监测功能，每个峰获取17个数据点是可能的，因而保证准确的峰解析。因此，该系统是多组分复杂样品分析的理想选择。在测量的浓度范围内（0.02ng/mL – 1000ng/mL阿普唑仑，0.05ng/mL到1000ng/mL羟基安定、安定、普拉西泮）所有分析物表现出线性反应。

参考文献

1. Ultra Performance LC (UPLC): New Boundaries for the Chromatography Laboratory, White Paper, Waters Corporation, May 2004, 720000819EN.
2. N. Kirchner " Ion Processing: Control and Analysis " , US Patent No. 5,206,506, April 27th, 1993.
3. Application note, "Quattro Premier™: MRM Inter-Channel Crosstalk" , Waters Corporation, June 2004, 720000917EN.
4. K. Yu, et al. "HT Quantification Analysis for a 5 Drug Mixture in Rat Plasma –A Comparison of HPLC/MS/MS and UPLC/MS/MS" , Presented at the 52nd ASMS Conference, Nashville, TN, June 2004.

脂质组学：在不同脂肪酸底物作用下永生化肝细胞中总磷脂的研究

Michael Pagliassotti, Jessica Prenni, Phil Ryan, Paul Rainville, 和 Andrew Baker

食品科学与人类营养学系, 科罗拉多州立大学, 科林斯, 科罗拉多州, 美国; 大分子资源, 生物化学与分子生物学系, 科罗拉多州立大学, 科林斯, 科罗拉多州, 美国; 沃特世公司, 枫叶街34号, 米尔福德, 马萨诸塞州01757, 美国; 沃特世公司, 都柏林, 加利福尼亚州, 美国

摘要：脂肪酸在非脂肪组织的累积可导致细胞功能紊乱和细胞死亡。来自长链脂肪酸累积的脂毒性更易被饱和脂肪酸恶化。本文使用H4IIE鼠肝细胞瘤细胞作为脂肪肝疾病的模式系统，进行了细胞磷脂水平随饱和或不饱和脂肪酸作用的变化研究。

前言

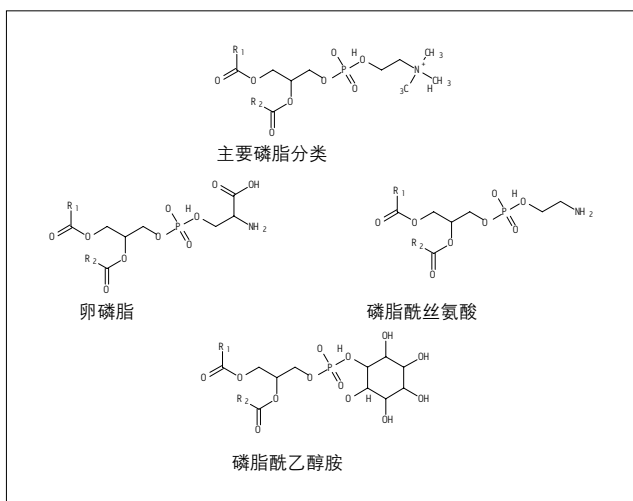
代谢综合症是一类疾病，包括高血脂，肥胖症和糖尿病。这些疾病共有一些相互关联的部分：胰岛素抵抗，脂肪酸代谢破坏和脂肪组成的改变。在肝脏中，这些代谢过程导致了被总称为非酒精性脂肪性肝疾病的产生。非酒精性脂肪性肝疾病是一中慢性疾病综合症，起初是由于脂肪酸在肝中的沉积（脂肪变性），在一些个体中，形成非酒精性脂肪肝和晚期肝病。

曾有研究指出非酒精性脂肪性肝病的发展进程包括一种急性刺激，或称为“第二次冲击”，加重脂肪肝。这种急性刺激，包括细胞中间产物和未建立的信号通路。我们最近演示了饱和脂肪酸的增加引起的脂肪肝的过程，表现为鼠体内增加的半胱氨酸蛋白酶蛋白-3活性，内质网压迫和肝损伤。此外，我们还演示了饱和脂肪酸，硬脂酸盐和棕榈酸盐，不依赖神经酰胺的沉积，潜在地引起H4IIE肝细胞的内质网压迫和细胞凋亡的过程。因此，增加的饱和脂肪酸的传输至或沉积在肝脏可能会造成对脂肪肝内在的第二次冲击。本研究试图分析，经棕榈酸盐或油酸盐培养后，H4IIE肝细胞的脂类环境。

一些技术已经被用于研究细胞和生物膜的脂类组分。特别是对非挥发性膜组分，如磷脂的分析依赖电喷雾质谱。格罗斯（Gross）和其他研究人员，基于脂类预分离和串联四极杆质谱，使用直接进样和纳升电喷雾分析策略。尽管可以获得很多信息，但这些方法仍不能发现新的分子水平物种。

由于磷脂前端集团的可变性，脂肪酰基链长度和不饱和度的分布，对这些脂类的分离比较复杂。大多数高效液相色谱HPLC对脂类的分离采用正相分离，导致重现性差，峰容量低。鉴于这个原因，我们开发了一种反相高效液相色谱

谱HPLC与电喷雾飞行时间质谱联用，采用水/乙腈流动相和填充小于二微米颗粒的C₈色谱柱方法。除了精确质量数能够用于阐明磷脂的种类，脂肪酰基链总碳数和每个组分的不饱和度外，创新的MSE技术还用于鉴定每一种脂肪酸。MSE在一次进样中传递平行的母离子和子离子精确质量分析数据。这在超高效液相色谱分离需要定性和定量数据时具有非常重要的作用。



方法

细胞培养和样品制备

H4IIE细胞在DMEM和10%的FBS中培养。当细胞铺满培养板底90%以上时，培养液换成500uM棕榈酸或油酸结合清蛋白六小时。另外分开的培养液作为对照。总细胞脂类用氯仿：甲醇提取，分析前稀释3:1。

液相色谱/质谱

沃特世 (Waters®) 超高效液相色谱ACQUITY UPLC®

流动相

50mM醋酸胺溶液, pH值5.0

乙腈

色谱柱 ACQUITY™ BEH_C 2.1x100毫米, 1.7微米粒径流速 550 μ l/min

温度 50°C

梯度:

平衡 35% B 0-1 分钟

渐变至65% B 1 分钟内

渐变至 95% B 13 分钟内

平衡 2 分钟

沃特世 Q-ToF Premier™

电喷雾 负离子模式

毛细管电压 3.5 千伏

锥孔电压 40 伏

内部质量校准标样: 脑啡肽

W模式分辨率 (fwhm) 15000 质荷比为554

MS^E实验

碰撞能量在高分量过程中从20 至40 V渐变。

结果

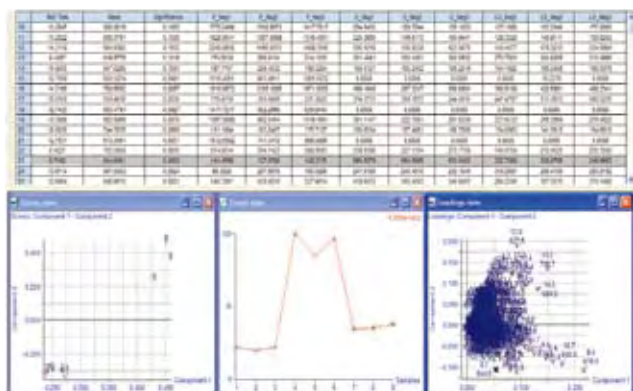


图1 代谢组学软件报告负离子液相/质谱分析从H411E细胞中分离出来的总磷脂。图上方: 组分和归一化峰面积列表。图左下方: 分值图显示种类分离。图西方中: 保留时间9.7分钟, 质荷比为844.6081的组分在各样品中的趋势图。图右下方: 以质荷比和保留时间数据对标记的数据图

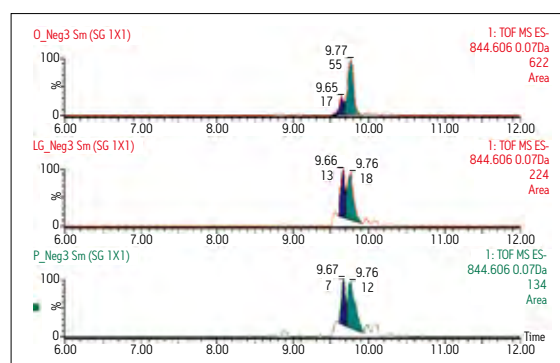


图2 保留时间9.71分钟, 质荷比为844.608的组分的提取离子流图。图上方: 油酸处理后, 图中间: 对照处理后, 图下方: 棕榈酸处理后

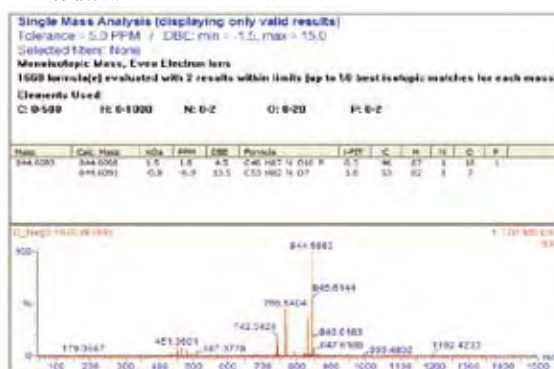


图3 保留时间9.71分钟, 质荷比为844.608的组分的元素组成分析报告

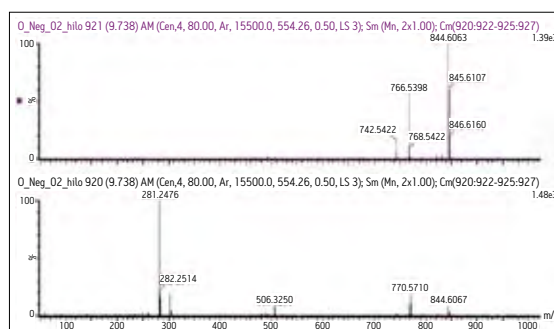


图4 图上方: 保留时间9.71分钟, 质荷比为844.608的组分的飞行时间质谱图, 图下方: 飞行时间MSE质谱图



图5 保留时间9.71分钟, 质荷比为844.608的组分经MSE产生的碎片离子元素组成分析报告。化合物是含有聚苯乙烯的脂肪酸盐和山嵛酸酰基链。

表1

磷脂	保留时间	质量数	平均峰面积			峰面积比率			分子式	误差 PPM
			棕榈酸	油酸	对照	棕榈/对照	油酸/对照	棕榈/油酸		
PI C36: ω 4	6.5671	858.523	103.62	6.41	10.80	959		1616	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P	2.8
PI C34: ω 0	7.3831	835.536	153.67	12.50	49.80	309		1229	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	3.2
PS C34: ω 0	7.4679	760.515	100.03	24.67	15.28	655		405	C ₄₀ H ₇₅ NO ₁₀ P	2.5
PE C36: ω 6	7.5368	736.5	52.30	6.75	21.18	247		775	C ₄₁ H ₇₁ NO ₈ P	4.1
PS C40: ω 4	7.582	838.564	110.01	12.87	36.45	302		855	C ₄₆ H ₈₁ NO ₁₀ P	5.7
PI C36: ω 2	7.7355	861.549	51.69	172.84	79.57				C ₄₅ H ₈₂ O ₁₃ P	2.7
PS C36: ω 2	7.7738	786.527	24.64	59.12	15.70		376	42	C ₄₂ H ₇₇ NO ₁₀ P	3.9
PI C38: ω 4	7.818	885.551	395.23	343.93	243.25	162			C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	3.3
PS C36: ω 0	8.0265	790.562	544.69	229.31	318.94	171	72	238	C ₄₂ H ₈₁ NO ₁₀ P	1.3
PS C35: ω 0	8.0278	776.547	114.18	51.75	59.30	193		221	C ₄₁ H ₇₉ NO ₁₀ P	1.3
PS C42: ω 3	8.1788	864.578	93.67	69.88	82.73				C ₄₈ H ₈₃ NO ₁₀ P	0.3
PS C36: ω 0	8.2756	790.562	274.09	17.83	76.21	360	23	1537	C ₄₂ H ₈₁ NO ₁₀ P	-0.1
PE C34: ω 2	8.3459	714.51	65.95	61.01	68.92				C ₃₉ H ₇₃ NO ₈ P	-1.5
PE C36: ω 4	8.3648	738.508	37.42	108.39	123.26				C ₄₁ H ₇₃ NO ₈ P	-1.9
PS C37: ω 1	8.4191	802.562	48.51	81.33	60.64		134	60	C ₄₃ H ₈₁ NO ₁₀ P	1.9
PS C38: ω 1	8.4287	816.578	213.18	348.99	297.37	72		61	C ₄₄ H ₈₃ NO ₁₀ P	-0.2
PS C40: ω 3	8.431	840.578	200.34	64.88	67.07	299		309	C ₄₆ H ₈₃ NO ₁₀ P	-0.1
PS C39: ω 3	8.4311	826.562	39.32	14.85	14.18	277		265	C ₄₅ H ₈₁ NO ₁₀ P	-1.9
PS C38: ω 1	8.6363	816.574	59.05	54.29	59.34				C ₄₄ H ₈₃ NO ₁₀ P	-2.4
PI C38: ω 3	8.6593	887.566	75.18	154.84	95.78		162	49	C ₄₇ H ₈₄ O ₁₃ P	3.3
PS C37: ω 0	8.7082	804.578	114.33	67.35	100.22			170	C ₄₃ H ₈₃ NO ₁₀ P	0.6
PS C36: ω 0	8.7613	790.549	9.01	40.66	18.45				C ₄₂ H ₈₁ NO ₁₀ P	1.4
PE C38: ω 3	8.7788	764.524	76.68	129.49	89.00		145	59	C ₄₃ H ₇₅ NO ₈ P	1.8
PS C40: ω 2	8.8204	842.59	99.29	63.02	57.75	172			C ₄₆ H ₈₅ NO ₁₀ P	4.4
PS C35: ω 1	8.9861	778.561	113.29	0.00	8.67	1307			C ₄₁ H ₈₁ NO ₁₀ P	1.8
PS C36: ω 1	8.9962	792.577	468.38	12.49	55.20	849	23	3750	C ₄₂ H ₈₃ NO ₁₀ P	3.8
PS C39: ω 1	9.0435	830.59	8.31	75.47	81.20	47		51	C ₄₅ H ₈₅ NO ₁₀ P	3.7
PE C34: ω 1	9.3262	716.522	106.95	82.80	87.12				C ₃₉ H ₇₅ NO ₈ P	0.1
PS C37: ω 0	9.3789	804.578	157.24	122.86	129.69	121		128	C ₄₃ H ₈₃ NO ₁₀ P	-3
PS C38: ω 0	9.3798	818.593	528.37	460.42	454.46	116		115	C ₄₄ H ₈₅ NO ₁₀ P	1.1
PE C40: ω 5	9.4424	790.54	38.49	71.17	45.77		155		C ₄₅ H ₇₇ NO ₈ P	2.1
PS C44: ω 5	9.4955	892.61	58.05	34.60	40.33	144	86	168	C ₅₀ H ₈₇ NO ₁₀ P	-0.3
PS C40: ω 1	9.5613	844.612	76.00	68.61	57.24				C ₄₆ H ₈₇ NO ₁₀ P	3.8
PE C36: ω 2	9.6235	742.54	72.54	248.79	100.82	72	247	29	C ₄₁ H ₇₇ NO ₈ P	2.3
PS C40: ω 1	9.7152	844.608	137.18	614.38	233.25	59	263	22	C ₄₆ H ₈₇ NO ₁₀ P	3.3
PS C39: ω 1	9.7188	830.592	47.03	218.82	62.61	75	349	21	C ₄₅ H ₈₅ NO ₁₀ P	5.1
PE C38: ω 4	9.7203	766.54	300.09	258.48	199.41	150			C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	4.3
PS C42: ω 3	9.7621	868.608	39.07	28.38	32.72				C ₄₈ H ₈₇ NO ₁₀ P	4.5
PE C40: ω 5	9.7667	792.555	71.14	24.01	42.74	166		296	C ₄₅ H ₇₉ NO ₈ P	5
PS C42: ω 2	10.164	870.629	57.23	23.94	34.82	164		239	C ₄₈ H ₈₉ NO ₁₀ P	4.7
PS C41: ω 1	10.271	858.625	19.24	33.80	33.41			57	C ₄₇ H ₈₉ NO ₁₀ P	3.7
PE C38: ω 3	10.555	768.556	61.39	64.50	42.47	145	152		C ₄₃ H ₇₉ NO ₈ P	2
PE C36: ω 1	10.604	744.554	163.39	166.97	150.29				C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	5.9
PS C40: ω 0	10.658	846.623	353.63	303.46	316.18	112		117	C ₄₆ H ₈₉ NO ₁₀ P	0
PS C39: ω 0	10.665	832.609	140.42	114.10	123.72			123	C ₄₅ H ₈₇ NO ₁₀ P	4.4
PS C42: ω 1	10.875	872.639	82.05	134.20	76.91		174	61	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₀ P	-0.8
标准偏差 PPM										2.3

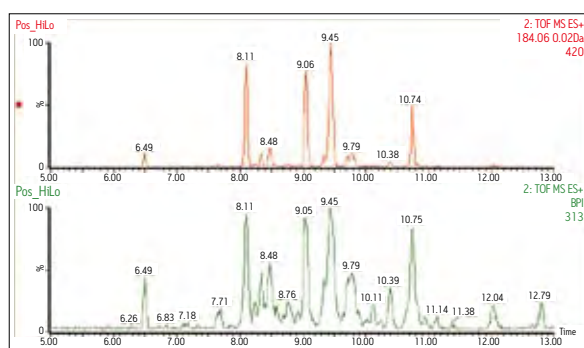
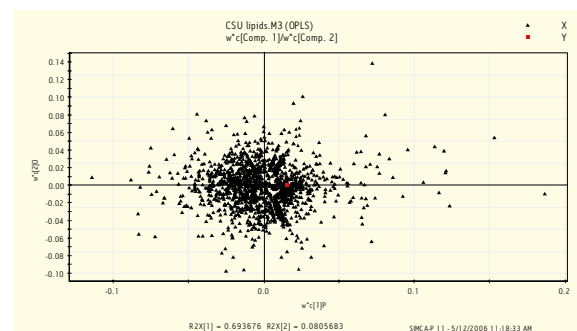
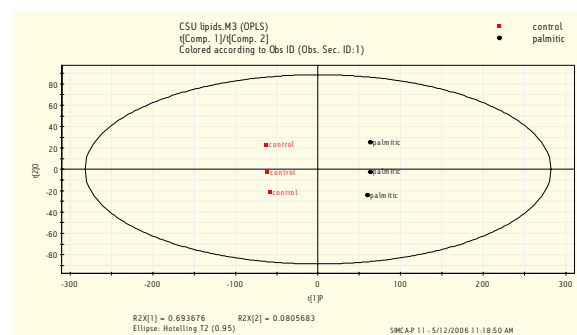


图6 图上方：来自脂质的液相/质谱MSE分析数据，质荷比为184的离子的提取离子流图。质荷比为184的离子是卵磷脂和鞘磷脂的特异离子。图下方：电喷雾正离子模式LC/MS BPI图。



图7 保留时间8.11分钟的质量谱元素组成分析报告，磷脂是PC32（质荷比732.5566）



使用SIMCA-P的数据可视化

图8 对照和棕榈酸处理后样品组的SIMCA-P正交偏最小二乘法制图。

上图：质谱保留时间数据图

下图：分值图。

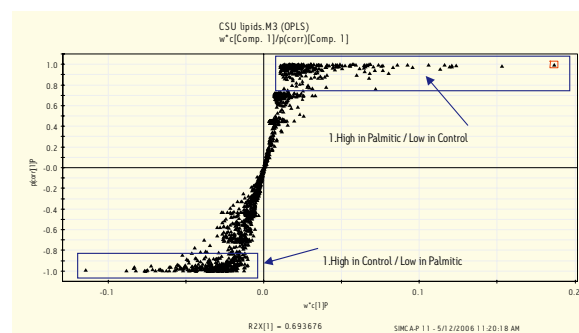


图9 对照和棕榈酸处理后样品组的SIMCA-P正交偏最小二乘法S图。该图突出了造成小组差异的组分。

结论

- 棕榈酸处理与对照和油酸处理后的样品组被清晰地分开
- 造成类别差异的磷脂被鉴定
- MSE数据测定磷脂酰基链的组成
- 正离子模式MSE鉴定和分析PC和SM磷脂

参考文献

- Angulo, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. N. Engl. J. Med. 346: 1221-1231, 2002.
- Day, C.P. and James O. Steatohepatitis: a Tale of Two Hits? Gastroenterology 114: 842-845, 1998.
- Wang, D., Wei, Y., and Pagliassotti, M.J. Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury In Rats With Hepatic Steatosis. Endocrinology 147: 943-951, 2006.
- Wei, Y., Wang, D., Peterson, F. and Pagliassotti, M.J. Saturated Fatty Acids Induce Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Independently of Ceramide in Liver Cells. Am. J. Physiol. (In Press).
- Han, X. and Gross, R.W. Electrospray Ionization Mass Spectroscopic Analysis of Human Erythrocyte Plasma Membrane Phospholipids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10635-10639, 1994.
- Brugger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F.T., and Lehman, W. D., Quantitative Analysis of Biological Membranes at the Low Picomole Level by Nano-electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2339-2344, 1997.
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H.-E., Rajashekar, C. B., Williams, T.D., and Wang, X. Profiling Membrane Lipids in Plant Stress Responses J. Biol. Chem. 277: 31994-32002, 2002.
- Ivanova P.I., Cerda, B.A., Horn, D.M., Cohen, J.S., McLafferty, F.W., and Brown, H.A., Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Changes in Phospholipids in RBL-2H3 Mastocytoma Cells During Degranulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 7152-7157, 2001.
- Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.-Z., Vissers, J.P.C, and Geromanos, S.J., Absolute Quantification of Proteins by LC/MSE : A Virtue of Parallel MS Acquisition. Molecular and Cellular Proteomics 5:144-156, 2005.

红豆杉属植物根须的UPLC-ESI-MS代谢轮廓分析

葛广波¹, 栾宏伟¹, 何芋歧², 王峥涛², 杨凌¹, 王秀丽³

1. 大连化学物理研究所药用资源开发组, 大连, 116023

2. 上海中医药大学中药标准化重点实验室, 上海, 201203

3. 沃特世科技(上海)有限公司, 上海, 201203

摘要: 针对红豆杉属植物复杂样品, 建立了快速、灵敏的超高效液相-电喷雾-质谱 (UPLC[®]-ESI-MS) 轮廓分析方法。通过条件优化选择了合适的源内裂解能用于获得丰富的分子及碎片离子峰, 这些离子信号有助于化合物的立体化学归属和亚结构分析。该方法被成功用于不同种属来源红豆杉根须样品的UPLC-ESI-MS代谢轮廓分析。从红豆杉根须提取物中共发现了四十个化合物, 包括1个有机酸, 1个多酚类物质, 1个类固醇, 3个木脂素及34个紫杉烷类化合物。值得注意的是, 三对紫杉烷C-7立体异构体可通过源内裂解产生的特征碎片峰加以区分。研究还发现不同种属红豆杉根须具有近乎一致的化学组成, 暗示不同种属红豆杉根须具有相似的次生代谢网络。

关键词: 超高效液相色谱; 电喷雾-质谱; 红豆杉; 源内裂解; 代谢轮廓分析; 紫杉烷。

红豆杉属植物是多种药用化合物 (如抗癌药物紫杉醇) 的重要来源, 在过去五十年中受到了极大的关注^[1,2]。目前紫杉醇及其类似物多烯紫杉醇被用于多种癌症的一线治疗。由于红豆杉属植物普遍生长缓慢, 且紫杉醇含量极其有限, 紫杉醇日益增长的市场需求引发了严重的来源危机^[3]。目前紫杉醇的主要来源是通过从可再生资源红豆杉枝叶中提取10-DAB等前体化合物 (图1) 进而半合成获得^[4-7]。紫杉醇及其前体化合物被称为紫杉烷类化合物, 它们是红豆杉属植物的特征次生代谢产物。目前已从该属植物中发现了400多个天然紫杉烷, 但其分布及含量随种属及组织部位不同而存在巨大差异^[8-11]。因此对不同种属红豆杉及其各组织部位次生代谢产物的分析是红豆杉GAP种植及紫杉烷药物GMP高效生产的前提。此

外, 通过对红豆杉植物中主要紫杉烷的监测, 了解紫杉烷的分布特征和代谢规律, 将有助于揭示紫杉烷类化合物在红豆杉属植物体内的生物合成、调控机制, 以及获取多种紫杉烷之间的关系和推导其代谢网络。

国内外已有工作主要集中在不同种属红豆杉枝叶成分的研究, 并发现不同种属红豆杉枝叶中, 其化学分布及含量差异显著^[8-11]。与之相对的是, 红豆杉其它组织部位的种间化学比较却很少有人关注, 尤其是对于红豆杉根须成分的系统研究还未见报道。值得注意的是, 红豆杉属植物根系发达, 根须生长较快^[12], 对根须资源的有效利用可以缓解紫杉烷的来源危机。因此对不同种属红豆杉根须的成分分析是非常必要的。在过去十多年中, 由于专属性强, 灵敏度高及具有较



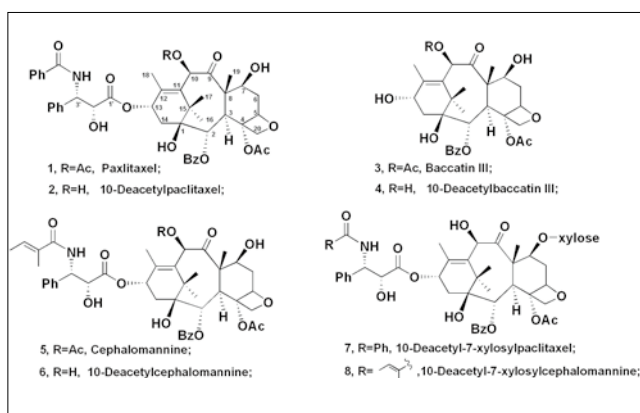


图1 紫杉醇及其半合成前体化合物的结构式

强结构解析能力等特点, LC-MS技术被认为是最适宜于复杂样品中紫杉烷类化合物分析的技术^[13-16]。然而, 由于红豆杉属植物化学成分复杂, 且含有多种微量成分及许多立体及位置异构体, 其代谢轮廓分析极具挑战性^[17,18]。近年来使用亚2 μ m填料的UPLC技术显示了良好的分离能力并大大节省了分析时间, 在药物及生物复杂样品分析中被广泛关注^[19,20]。同时UPLC及其联用技术还显示了出色的灵敏度及峰容量^[21,22]。这些优点使得快速分析红豆杉属植物复杂样品中的微量成分成为可能。本研究开发了一种用于红豆杉属植物复杂样品的快速、灵敏的化学分析方法, 并应用于不同种属来源红豆杉根须样品的成分比较。

表1 本研究所用样品信息

No.	Species	Voucher number	Origin source	Altitude	Collecting date	Age of yew trees
1	<i>T. yunnanensis</i>	CYW001R	Chayu, Tibet, China	3200 m	061203	>10 (wild)
2	<i>T. yunnanensis</i>	LJ001R	Lijiang, Yunnan, China	2500 m	071223	5
3	<i>T. × media</i>	MB001R	Mabian, Sichuan, China	1500 m	061021	7
4	<i>T. × media</i>	MB002R	Mabian, Sichuan, China	1500 m	061021	8
5	<i>T. chinensis</i>	SNJ001R	Fangxian, Hubei, China	1000 m	060420	6
6	<i>T. mairei</i>	LS001R	Lishui, Zhejiang, China	700 m	070103	4
7	<i>T. mairei</i>	LS002R	Lishui, Zhejiang, China	700 m	070103	5
8	<i>T. mairei</i>	LS003R	Lishui, Zhejiang, China	700 m	070103	6
9	<i>T. mairei</i>	LS004R	Lishui, Zhejiang, China	700 m	070103	7

*【通讯作者】杨凌, 研究员, 博士生导师。中国科学院“百人计划”入选者, 大连化学物理研究所药用资源开发研究组组长。
主要研究方向: 早期ADME性质及其导向下的新药发现研究; 天然产物及医药工业生物技术研究。E-mail: yling@dicp.ac.cn

实验部分

1.1 仪器与试剂

沃特世 (Waters®) UPLC TQD超高效液相色谱单重四极杆质谱联用仪, 配二元溶剂管理器、在线脱气机、样品管理器、TUV紫外检测器、SQD 检测器、MassLynx™ 4.1 质谱工作站软件。

乙腈为色谱纯 (Fisher 公司), 水为MilliQ超纯水, 其余试剂均为分析纯。标准品10-deacetylbaccatin III (10-DAB), baccatin III及paclitaxel购自Sigma公司; 其它紫杉烷标准品 (纯度> 95%, 上海金和生物技术有限公司) 包括7-*epi*-10-deacetylbaccatin III (*epi*-DAB), 9-dihydro-13-acetylbaccatin III (9-DHB), 10-deacetyl-7-xylosylpaclitaxel (10-DAXP), 10-deacetylcephalomannine (10-DAC), 10-deacetylpaclitaxel (10-DAP), 7-*epi*-10-deacetylcephalomannine (*epi*-DAC), 7-*epi*-10-deacetylpaclitaxel (*epi*-DAP) 及cephalomannine。

1.2 植物样本及样品制备

野生*T. yunnanensis*根须样品来自中国西藏察隅; 其它根须样本采自中国四大红豆杉种植区, 表一列出了本文研究所涉及的9个植物样本的具体信息。

所有植物样品经清洗、干燥后保存在大连化物所药用资源开发组。对于每个样本, 紫杉醇根须经干燥后粉碎, 并过40目筛; 准确称取一克粉末, 用5mL甲醇浸提4小时后辅助超声30分钟, 收集提取液, 残渣按上述操作再次提取, 合并两

次提取液并浓缩，将残渣溶于3mL甲醇/水 (2:1)，再用3mL正己烷洗去脂溶性干扰物，水相甲醇/水比例调至1:1.后用4mL二氯甲烷萃取两次，萃取液合并后旋蒸，旋蒸后的粗提物用甲醇复溶并定容至10mL容量瓶，过滤 (0.22 μ m滤膜) 后进行UPLC/MS分析。

1.3 检测条件

液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 柱; 2.1 \times 100mm;
粒径1.7 μ m
柱温: 35 $^{\circ}$ C
样品室温度: 室温
进样体积: 5 μ L
流速: 0.4 mL/min
检测波长: 227 nm
流动相: A: 水 B:乙腈
梯度洗脱详见表2。

表2 梯度洗脱参数

Time (min)	A(%)	B(%)	Curve
0.0	75	25	1
10.0	63	37	6
16.5	55	45	6
19.0	0	100	6
21.0	75	25	1

质谱条件

电离方式: ESI(+) ESI(-)
毛细管电压: 3.5 kv
离子源温度: 120 $^{\circ}$ C
一级锥孔电压: 40 V
锥孔反吹气: 50 L/h
去溶剂气温度: 350 $^{\circ}$ C
去溶剂气流量: 800 L/h
扫描范围: 100-1000 Da

结果与讨论

2.1 UPLC-ESI-MS分析

图2显示了四种红豆杉根须样品的UPLC色谱图，主要目标成分在16.5分钟内得到了较理想的分离，同时柱再生的时间与HPLC相比大大减少。UPLC还显示了良好的峰容量及重现性，所有色谱峰宽在4-12秒之间，色谱保留时间的偏差在0.04分钟以内。更为重要的是，UPLC-ESI-MS分析显示了良好的灵敏度:在优化后的分析条件下（见实验部分），六个紫

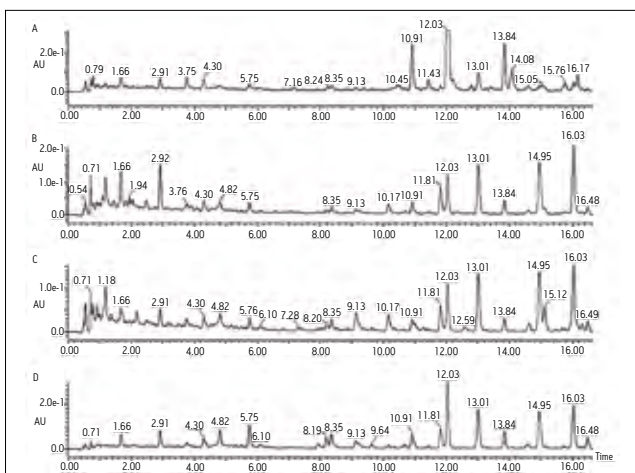


图2 四种红豆杉根须提取物UPLC谱图 (227 nm): A. 云南红豆杉根须 (CYW001R, 中国云南); B. 曼地亚红豆杉根须 (MB001R, 中国四川); C. 中华红豆杉根须 (SNJ001R, 中国湖北); D. 南方红豆杉根须 (LS002R, 中国浙江)

杉烷标准品 (10-DAB, baccatin, 10-DAXP, 10-DAP, *epi*-DAP及paclitaxel)的检测限在0.05到0.1 ng之间。

2.2 红豆杉根须代谢物的鉴定

借助UPLC-ESI-MS，从红豆杉根须提取物中获得了40个化合物的信息 (表3)，其中包括1个芳香羧酸 (No. 1)、1个类固醇 (No. 6)，1个多酚 (No. 8)，3个木脂素 (No. 2, 4, 7) 及34个紫杉烷类化合物。通过与标准品对照，参照保留时间及质谱信息确认了6种常见紫杉烷 (paclitaxel, cephalomannine, 10-DAP, 10-DAC, baccatine, 10-DAB) 及三个痕量7- α 羟基紫杉烷 (*epi*-DAP, *epi*-DAC及*epi*-DAB)。在所有根须样品中显著存在的三个物质峰 (保留时间分别为10.91, 12.03及13.84分钟)，被确定为10-deacetyl-7-xylosylcephalomannine (10-DAXC, 8), 10-deacetyl-7-xylosylpaclitaxel (10-DAXP, 7) 及10-deacetyl-7-xylosyltaxol C (10-DAXT, c, 9)。基于被分析物产生的分子及碎片离子峰，大量紫杉烷类似物的归属可通过与已知化合物的比对完成。此外还从部分根须样品中发现了2个新化合物 (NO. 35, 39)，通过与已知类似物的质谱信息对照，可推导其为deoxy-10-deacetyl-7-xylosylcephalomannine及deoxy-10-deacetyl-7-xylosylpaclitaxel。其它化学成分的归属通过与已报道质谱信息比对后获得^[17,18]。

2.3 紫杉烷的ESI-MS特征

大多数红豆杉根须成分在正离子模式下，[M+Na]⁺及[M+NH₄]⁺为主要的分子离子峰，同时[M+H]⁺也可以观测到。在负离子模式下，对于多数化合物来说，[M+HCOOH-H]⁻是最主要的分子离子峰，同时[M+2H₂O-H]⁻及[M-H]⁻也可以检测到。预实验显示在负离子模式下，随着cone电压的逐渐增强，许多紫杉烷类化合物可产生大量的分子离子及碎片离子，但是灵敏

表3 红豆杉根须成分鉴定及四种红豆杉根须的化学分布模式

No.	t_R	分子量	化合物	特征离子 (m/z)	化合物分布 ^b			
					YN	MD	CN	MA
1	1.23	122	benzoic acid	121	+++	+++	+++	+++
2	1.66	374	hydroxymatairesinol	747, 373, 355	+++	+++	++	++
3	2.91	544	10-deacetylbaccatin III	589, 543, 501, 121	++	+++	++	++
4	3.17	372	oxomatairesinol	371	+	+	+	+
5	3.76	464	ponasterone A	928, 463	++	+	+	+
6	3.90	604	9-dihydro-19-acetoxy-10-deacetylbaccatin III	649, 603, 543, 501	+	+	+	+
7	4.30	358	matairesinol	755, 660, 358, 329 ^c	++	++	++	++
8	4.34	546	afzelechin-(4 α \rightarrow 8)-afzelechin	545	++	++	++	++
9	4.53	544	7-epi-10-deacetylbaccatin III	543, 421, 391, 121	+	+	+	+
10	4.64	588	taxumairol K or 7,9-dideacetyltaxayuntin or taxayuntin B	633, 587, 545	+	+	+	+
11	4.82	588	taxumairol K or 7,9-dideacetyltaxayuntin or taxayuntin B	633, 587, 545, 121	+	++	++	++
12	5.50	594	5-deacetyltaxachitriene B	639, 593, 329	+	+	+	+
13	5.75	586	baccatin III	631, 585, 543	++	++	++	+++
14	6.10	588	taxumairol K or 7,9-dideacetyltaxayuntin or taxayuntin B	633, 587, 545	+	+	+	+
15	6.47	542	10-deacetyl-10-oxobaccatin V	577, 541, 371	+	+	+	+
16	7.00	730	10-hydroxyacetylbaccatin VI	753, 748, 731, 713 ^c	+	+	+	+
17	7.93	630	9-dihydro-13-acetylbaccatin III	675, 629, 587	+	+	+	+
18	8.20	630	taxayuntin F	675, 629, 121	+	+	++	+
19	8.35	630	taxayuntin E	675, 629, 121	+	+	++	+
20	9.13	592	5 α -cinnamoyloxy-9 α , 10 β , 13 α -triacetoxy-taxadiene	593, 533, 491, 473, 431 ^c	+	+	+	+
21	9.26	586	7-epi-baccatin III	631, 621, 585, 433 121				
22	9.39	909	10-deacetyl-7-xylosyltaxol D	954, 908, 2525, 121	+	+	+	+
23	9.64	536	taxezopidine F	581, 535, 475	+	+	+	+
24	10.13	777	10-deacetyltaxol D	822, 776, 501	+	+	+	+
25	10.16	686	taxinine M	731, 685, 643, 601	+	+	+	+
26	10.91	921	10-deacetyl-7-xylosylcephalomannine	966, 920, 525, 262	+++	+++	+++	+++
27	11.81	789	10-deacetylcephalomannine	856, 810, 746, 501	++	++	++	++
28	12.03	943	10-deacetyl-7-xylosylpaclitaxel	988, 942, 284	+++	+++	+++	+++
29	13.01	811	10-deacetylpaclitaxel	856, 810, 501	+++	+++	+++	+++
30	13.26	819	taxol D	864, 818, 525	+	+	+	+
31	13.84	937	10-deacetyl-7-xylosyltaxol C	982, 936, 278	+++	++	+++	++
32	14.60	789	7-epi-10-deacetylcephalomannine	834, 788, 636	+	+	+	+
33	14.95	831	cephalomannine	876, 830, 770, 525	++	+++	+++	+++
34	15.12	805	10-deacetyltaxuyunnanin A	850, 804, 762, 565	+	+	++	+
35	15.15	905	1-deoxy-10-deacetyl-7-xylosylcephalomannine	950, 525, 262,	+	ND	+	+
36	15.18	833	N-debenzoyl-N-(2-methylbutyryl)taxol	878, 832, 772, 525	+	+	+	+
37	15.76	811	7-epi-10-deacetylpaclitaxel	856, 810, 658	+	+	+	+
38	16.03	853	paclitaxel	898, 852, 792, 525	++	+++	+++	+++
39	16.17	927	1-deoxy-10-deacetyl-7-xylosylpaclitaxel	972, 926, 284	+	ND	+	+
40	16.48	714	baccatin VI	759, 731, 713, 671	+	++	++	++

^a t_R : 保留时间 (min); ^bYN、MD、CN、MA 分别代表云南、曼地亚、中华及南方红豆杉; ND表示未检测到, + 代表低含量, ++ 表示中等含量, +++ 表示高含量成分; ^c正离子模式。

度会随着cone电压的进一步增强而下降。因此本研究选择中等cone电压(40V)作为最适条件用于分析红豆杉植物提取物中的微量紫杉烷成分。在此条件下获得了许多化合物的母离子及碎片离子信号。这些碎片离子可用于化合物的亚结构分析,尤其对于紫杉烷母核上的侧链和酯基取代基团。值得注意的,一些特征碎片离子可以作为识别某些具有特定结构紫杉烷的标志信息。比如说, m/z 525会出现在紫杉醇及其它具有巴卡亭母核及C-13侧链的紫杉烷类似物中,它可以归属为C-10乙酰基中性消除及C-13侧链断裂后的碎片离子。此外,7-木糖紫杉烷在此测试条件下会显示强的C-13侧链碎片离子,暗示其易于中性脱除C-13侧链,结合C-13侧链信息及分子离子峰即可归属这些化合物(No. 22, 26, 28, 31, 35以及39)。

2.4 异构体鉴别

众所周知,对于质谱技术来说,异构体的鉴别极具挑战性。而红豆杉植物中存在许多立体及位置异构体。有趣的是,本研究发现C-7羟基立体异构体可通过其在特定条件下产生的特征碎片加以区分和鉴别(图3)。例如,10-DAP及其C-7羟基立体异构体 epi -DAP在负离子模式下具有相同的准分

子离子峰,但是 m/z 501是10-DAP最主要的碎片离子,但在 epi -DAP中 m/z 658是主要特征碎片。进一步研究发现: m/z 501出现在所有具有10-DAB母核及C-13侧链的紫杉烷类似物中,但在其C-7立体异构体中, m/z [M-152-H]⁻却是最主要的特征碎片离子。类似的,10-DAC及 epi -DAC也显示了相似的质谱信息。 m/z 501可被归属为断裂C-13侧链及C-4乙酰基后的碎片离子,而[M-152-H]⁻可认为是C-2苯甲氧基中性脱除及后续杂氧环中性消除甲醛后的结果^[23,24]。这种不一致的断裂方式使得此类异构体可以利用质谱技术加以区别。

在本研究中还遇到了多种位置异构体,基于LC-MS技术区分这些化合物非常困难。对于三个具有630分子量的化合物(表3),通过与标准品对比,第一个化合物被鉴定为9-DHB(7.93分钟)。对于另外两个化合物(保留时间分别为8.20及8.35分钟),借助已有文献报道中其在反相色谱上的保留规律,推测其分别为taxayuntin F和taxayuntin E^[10]。但对于另一组位置异构体(保留时间分别为4.39, 4.82及6.10分钟),它们具有相同的质谱信息(表3)。虽然之前的研究已有人从红豆杉根须中获取了三个具有588分子量的化合物^[18],但在没有标准品的情况下仅基于质谱信息并不能准确归属它们。

2.5 红豆杉根须代谢网络探讨

从UPLC色谱图及LC-MS分析结果可以看出,红豆杉根须中具有近乎一致的代谢轮廓和化学组成,暗示了该组织中存在相似的代谢网络。红豆杉根须最重要的化学特征是富含三个7-木糖基紫杉烷(Scheme 1. 7-9),这也意味着该组织存在合成7-木糖基紫杉烷的次生代谢路径。同时在根须也发现了许多含量较高且具有10-DAB母核的有用紫杉烷,包括10-DAB, baccatin, 10-DAP, 10-DAC, cephalomannine及paclitaxel,其中paclitaxel及cephalomannine的含量是相应枝叶中的2-8倍。从根须中共发现了22个(表3中3, 6, 9, 13, 17, 21, 24, 26-39)具有10-DAB母核的紫杉烷,这些化合物被认为是紫杉烷合成的中下游产物,即紫杉醇合成路径的中间体或其平行路径上的代谢产物,且它们都是经重要中间体10-DAB合成而来^[25]。重要的是,这些中间体占有总色谱峰面积的55%以上。这与红豆杉枝叶不同,枝叶中往往大量存在taxine B、taxinine M或其它分枝路径^[26],它们的形成耗费了大量紫杉烷的通用生物合成前体taxa-4, 11-diene,最终导致了有用紫杉烷在枝叶中的含量并不显著。红豆杉根须中存在的化合物及其在结构上的相关性可以帮助我们推导该组织中的次生代谢网络,尤其是有用紫杉烷(如paclitaxel, cephalomannine, 以及7-xylosyltaxanes)的生物合成路径及调控位点。此外,一致的化学组成和相似的代谢轮廓同样提示我们可以采用统一的工艺路径来开发不同种属来源的红豆杉根须资源,而红豆杉枝叶则需要根据种属的不同采用相应的开发策略。

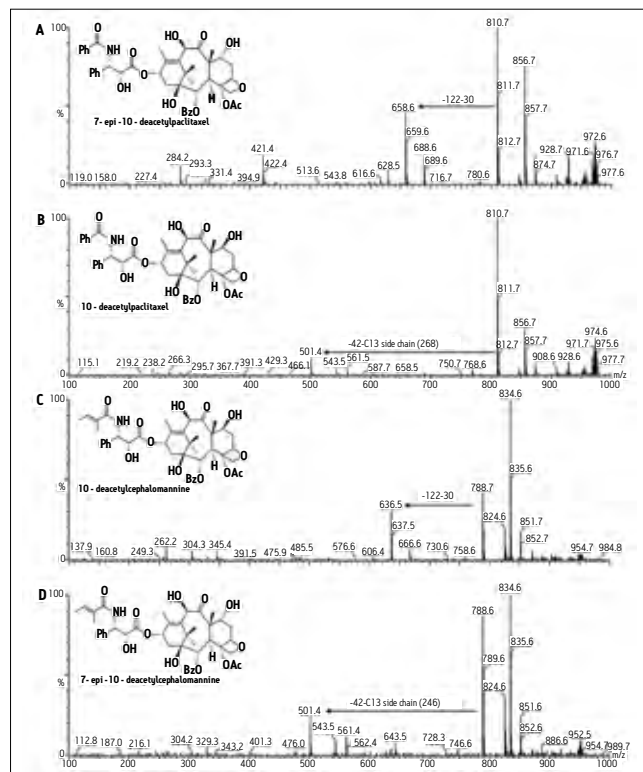


图3 两对10-去乙酰紫杉烷立体异构体的负离子模式ESI-MS谱图: A. 7- epi -10-deacetylpaclitaxel (epi -10-DAP); B. 10-deacetylpaclitaxel (10-DAP); C. 7- epi -10-deacetylcephalomannine; D. 10-deacetylcephalomannine

结论

本研究建立了用于红豆杉植物样品快速轮廓分析的UPLC-ESI-MS方法。该方法借助于UPLC的高效分离能力达到复杂样品的理想分离，并基于源内裂解质谱产生的丰富碎片完成了成分的立体化学及结构归属。利用该方法考察了四种不同种属来源的红豆杉根须样品的化学分布模式，共获得了40个化合物信息。研究发现这些根须样品具有相似的化学组成，暗示不同种属红豆杉根须存在相似的次生代谢网络。此外，还发现红豆杉根须中富集了大量具有10-DAB母核的有用紫杉烷，因而显示了良好的开发前景。

参考文献

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME et al. *J Am Chem Soc*, 1971; 93: 2325.
- [2] Appendino G. *Nat Prod Rep*, 1995; 121: 349.
- [3] Cragg GM, Schepartz SA, Suffness M, Grever MR. *J Nat Prod*, 1993; 56: 1657.
- [4] Jean-Noël D, Greene AE. *J Am Chem Soc*, 1988; 110: 5917.
- [5] Rao KV, Bhakuni RS, Johnson J, Oruganti RS. *J Med Chem*, 1995; 38: 3411.
- [6] Nikolakakis A, Caron G, Cherestes A et al. *Bioorg Med Chem*, 2000; 8: 1269.
- [7] Rao KV. *J. Heterocyclic Chem*, 1997; 34: 675.
- [8] Poupat C, Hook I, Guéritte F et al. *Planta Med*, 2000; 66: 580.
- [9] van Rozendaal ELM, Lelyveld GP, van Beek TA. *Phytochemistry* 2000; 53: 383.
- [10] Madhusudanan KP, Chattopadhyay SK, Tripathi VK et al. *Biomed Chromatogr*, 2002; 16: 343.
- [11] Ge GB, Zhang YY, Hao DC et al. *Chemotaxonomic study of medicinal Taxus species with fingerprint and multivariate analysis*. *Planta Med*, 2008, DOI: 10.1055/s-2008-1074531.
- [12] Harlow, William M, Harrar ES. *Textbook of dendrology*. 4th ed. McGraw-Hill, New York. 1958; 561.
- [13] Mortier KA, Zhang GF, Van Peteghem CH et al. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004; 15: 585.
- [14] Guo P, Ma JG, Li SL et al. *J Chromatogr B*, 2003; 798: 79.
- [15] Parise RA, Ramanathan RK, Zamboni WC et al. *J Chromatogr B*, 2003; 785: 231.
- [16] Sottani C, Minoia C, Colombo A et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997; 11: 1025.
- [17] Parmar VS, Jha A, Bisht KS et al. *Phytochemistry* 1999; 50: 1267.
- [18] Baloglu E, Kingston DGI. *J Nat Prod*, 1999; 62: 1448.
- [19] O' Connor D, Mortishire-Smith R, Morrison D et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006; 20: 851.
- [20] Li XQ, Xiong ZL, Ying XX et al. *Anal Chim Acta*, 2006; 580: 170.
- [21] Nováková L, Matysková L, Solich P. *Talanta*, 2006; 68: 908.
- [22] Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR et al. *J Chromatogr B*, 2005; 825: 134.
- [23] MacEachern-Keith GJ, Wagner Butterfield LJ, Incorvia Mattina M. *Anal Chem*, 1997; 69: 72.
- [24] McClure TD, Schram KH. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1992; 3: 672.
- [25] Croteau R, Ketchum REB, Kaspera R et al. *Phytochem Rev*, 2006; 5: 75.
- [26] Ketchum REB, Rithner CD, Qiu D et al. *Phytochemistry*, 2003; 62: 901

沃特世Empower 2软件

实现多供货商仪器控制，尽量减少培训和验证工作量

客户：一家世界级制药公司

背景介绍

一家世界级制药公司的分析研究和开发部门负责的工作是早期产品表征方法的开发和验证。这家实验室配备了大约20套色谱系统，这些系统由不同的仪器供货商供货，其中包括沃特世、Agilent（LC和GC）以及Shimadzu。

挑战

要管理为数不少的来自多家供货商的HPLC系统会对实验室生产率造成不利影响，并会增加运行成本。这个分析研究和开发部门必须能够应对一系列的挑战，实现自己初始仪器投资的效益最大化，这些挑战包括：

- 培训分析员使用多套软件包所要求花费的时间和精力。
- 需验证多套软件包效果相关的成本和风险。
- 从分析结果至原始仪器色谱条件的可追溯性。

解决方案

为了能够对范围宽广的色谱模块进行全面控制，并将这些模块连接到一个通用的色谱数据管理工具上，客户采用了沃特世（Waters®）Empower™2色谱数据软件执行数据采集、处理、报告和分发工作。Empower的Open Instrument Portal（OIP）技术让供货商能够在无需对Empower软件做出改变的前提下加入仪器控制功能。Empower的集成关系数据库让此软件可将色谱分析结果与原始方法参数关联起来。

第三方HPLC和GC供货商可以充分利用这项OIP技术来部署供Empower软件使用的仪器驱动程序，这些供货商包括了Shimadzu、Hitachi、Varian、Teledyne Tekmar和CTC Analytics。

业务效益

在依靠Empower 2实现对全部色谱系统的完全控制后，这家公司优化了仪器相关工作流程的成效。

对实验室和公司具有较高影响的效益包括：

- 通过在Empower基础上实现了控制现有HPLC和GC系统色谱仪软件的标准化，最大程度减少了化学家们高效操作色谱仪软件所需的培训。
- 彻底消除了多套色谱仪软件包，避免了所要求的额外培训和验证工作。
- 避免了色谱仪软件只支持单一供货商仪器时会发生的新技术实施和验证成本。
- 能够在所有仪器上运用Empower独有的法规达标准备工具，提供一套全面的审计追踪方法，这套方法具有可以找出初始仪器方法条件的可追溯性，并提供了先进的数据安全和处理能力。
- 通过运用Empower的集成化数据采集和分析能力，减少了分析员用于确认数据可追溯性所需要的时间和精力。
- 通过实现全部色谱系统的操作步骤、报告和维护的标准化，提升了实验室的生产率。



Empower 2方法验证管理器

精简药业产品开发中的方法验证工作

客户：一家世界级制药公司

背景介绍

这家全球性制药公司开发、生产和销售着数十种处方药和非处方药；这些疗法应用于治疗各类病症，包括各类敏感症、关节炎、癌症、糖尿病、过敏、抑郁症、心脏病以及HIV。

作为其药物开发和批准流程的一部分，这家公司应用了种类繁多的分析技术来执行化合物定量分析、提纯和表征工作，其中包括高性能液相色谱法（HPLC）。色谱方法验证是一个用于确认HPLC方法适用于鉴定药品物质和产品的认定、质量、规格含量、纯度和药效的流程，它也属于一项法规要求。

正确执行方法验证可以方便法规达标工作并为商业化铺平道路。不幸的是，当前用于验证色谱方法的流程耗时颇长且容易出错，不仅对生产率造成了不利影响，而且也最终延误了产品的推出。

挑战

公司下属的多家研究和开发机构采用了各种工具来执行方法验证工作，这些工具的能力各有不同，从而导致过程效率不高。为了努力在各个研发部门与生产厂之间协调方法验证工作，公司寻求实施一种自动化方法验证解决方案，这个方案能够包含由公司推动的基于模板的标准操作规程（SOP），用于管理各个验证工作流程以及一个用于存储结果的安全数据库并增强这些部分满足21 CFR Part 11要求的能力。

比能够引导方法验证文档编制过程的SOP模板还要重要的是，确保数据精确度和可追溯性的需要。公司想要让分析员们能够用与采集结果时所用相同的色谱数据软件（CDS）来执行全部方法验证计算工作。这样就能消除导出数据至电子表格执行计算的需要以及这个转换过程发生错误的可能性，从而简化了验证工作。公司还寻求在这套方案中包含数据审查和批准功能。

解决方案

这家公司选中了沃特世（Waters®）Empower 2软件方法验证管理器（MVM）作为统一全面的解决方案来满足自己的全部方法验证要求。Empower 2 MVM是市场领先CDS平台的企业级备选方案，用于解决色谱方法验证工作中的各种限制和瓶颈。



这家公司研发部的一位科学家表示，Empower 2 MVM节约了50%非样品制备工作时间

采用Empower 2 MVM后，公司的分析员们具备了如下的能力：

- 将已经确认的SOP参数结合到CDS软件中
- 显示正在进行的验证研究工作的状态，引导用户完成整个工作流程
- 优先关联注射数据以验证特性
- 自动检查数据，确认每个验证参数均符合SOP要求
- 在工作流程中的各个阶段对数据进行批准
- 在Empower 2内执行全部验证结果和统计计算工作
- 执行多成份分析以及对结果的分批处理
- 针对超出规格的结果警示用户
- 采用标准化模板生成报告

Empower 2 MVM还能够通过审计追踪、追踪每项验证试验的注射、提供控制用户行为的特权、确保Empower 2数据库内存入可追溯数据，来协助公司的法规达标工作。

业务效益

通过实施Empower 2 MVM，公司对方法验证流程实现了自动化并对此流程做出了显著的精简。

通过一系列因素的作用，整体生产率得到了提升，其中包括：

- 无需将数据转移至第三方软件包执行统计学计算和报告

- 减少了抄写错误以及用于检查这些错误的时间
- 为经验不足的分析员提供了SOP模板，不必继续参照那些复杂且冗长的规程
- 能够通过团队合作方式来管理验证研究工作，参与验证流程的每个人都可以在流程中的任何时刻确定哪些部分已经完成

这家公司全球研发部门的一位科学家表示，在方法验证研究中，非样品制备类的工作占去了约60%的用时。而采用Empower 2 MVM后，他估算这部分时间可以缩短至10%，意味着节约了50%的整体时间（参见表1）。这位科学家还说，同样重要的是，采用Empower 2 MVM后，他对自己方法验证数据的精确度和可追溯性更有信心了。

表1 采用Empower 2方法验证管理器所节约的方法验证工作时间

验证工作	总验证用时百分比	采用Empower 2 MVM 节约的时间
行政性工作	20	75
样品制备	40	0
处理数据	20	95
报告生成	20	80
总计	100	50

沃特世NuGenesis SDMS

信息技术辅助客户满足21 CFR Part 11要求

客户：一家生物制药公司

背景介绍

这是一家美国生物制药公司，从事应用于糖尿病、肥胖症和心血管病治疗用药物的发现、开发和商业化。

这家公司重点研究新肽类激素候选药物的潜在应用前景，并在代谢药物领域拥有广泛的研究和临床专业经验。公司已经编制了一套新型合成多肽物的特性库，用于鉴定和表征已知和未知肽类的活性。

公司拥有一系列的治疗方法，这些方法处于不同的临床开发阶段，并需要不断接受管制检查。

挑战

为了满足美国食品和药物管理（FDA）的要求，这家公司必须在关键实验室数据的备份和存档方面满足21 CFR Part 11 指南的要求。特别是，公司需要有一套能够针对Microsoft Excel电子表格执行文档锁定和版本控制的数据管理解决方案。

公司的工作流程中包含了从纸质报告将数据转抄至Excel电子表格的工序。这些电子表格要求进行100%的质量检验以确保数据的完整性。这个验证过程的劳动量非常大，而且容易发生转抄错误，而且这种错误必须予以识别和纠正。

解决方案

这家制药公司选定了沃特世（Waters®）NuGenesis™科学数据管理系统（SDMS），因为这套系统能够将由各个仪器、科学家和外部来源所生成的分散数据自动导入至一个中央信息仓库内。采用NuGenesis SDMS后，可以很方便地对数据进行搜索，在科学家之间交流和共享数据，从而有利于实验室生产率的提高、产品开发以及法规达标。

沃特世的企业解决方案团队与客户在NuGenesis SDMS应用部署的各个方面展开了密切合作。这项部署工作包括以下组成部分：



- 文件数据捕获 – 可以自动捕获、分类和保护任何类型的文件数据
- 打印数据捕获 – 在高可信度下捕获、索引和保护打印数据（仪表生成报告的实际内容）
- 统一模板 – 从已捕获的打印件中抽取有价格的数据以供分类和后续检索
- 自动抽取模板 – 自动化搜索和抽取主要数据，将主要数据导出至外部应用程序，以形成可使用Microsoft Office应用程序执行的附加计算用合规框架
- 应用程序控制处理器（ACM）- 提供了一个安全合乎标准的框架以便使用Microsoft Office应用程序Word、Excel和PowerPoint
- 软件开发套件（SDK）– 用于定制编程以运用NuGenesis SDMS的功能，例如与传统使用软件的特殊集成

系统的配置和数据模型均支持多种文件捕获和打印捕获应用程序类型。

沃特世负责编制安装和运行认证（IQ和OQ）工作手册以测试基本系统的安装和运行情况。沃特世还提供了定制化的性能认证（PQ）脚本，此脚本能够测试业务流程并验证标准操作规程（SOP）落实到位，而且系统满足预定用途的要求。

实施NuGenesis SDMS的一个驱动力就是与Microsoft Excel的集成。这个解决方案的功能为这家公司提供了以最高可信度控制和抽取数据并送至Excel电子表格的能力。

沃特世企业解决方案团队倾力合作，定义了自动抽取模板的要求，以支持Analyst和SoftMax Pro报告。这项增强方案为公司提供了将所要求的最大数量的数据点抽取送入Excel的能力。

沃特世在创建功能规格、产品开发、测试以及这项自动抽取增强方案的安装和验证测试的IQ/OQ/PQ方面发挥了协调职能。

业务效益

这家生物制药公司实验室内在关键性临床和预临床数据的备份、存档和检索方面均满足了21 CFR Part 11指南的要求。通过采用沃特世的NuGenesis SDMS解决方案，这些实验室显著提升了自己控制经验证电子表格的能力。科学家们可以将数据自动转送至受控Excel电子表格，而且不需要执行数据质量验证。

将自动抽取方案应用于Analyst和SoftMax Pro后，能够将每份报告手工输入所需的30分钟周转时间缩短至自动化方案的1分钟。平均来说，这样可以将数据输入所要求的时间每周缩短5个小时以上。如今，这家公司的质量管理部门已经可以只对数据执行抽样审计，而无需在手工数据输入后执行100%的验证工作。

这家公司计划在自己所有的实验室中部署NuGenesis SDMS。ACM将用于控制经验证的电子表格。另外，ACM将用于控制一份电子实验室日志簿。

沃特世NuGenesis SDMS

通过提交电子审查资料实现效率最优化

客户：一家基因制药公司

背景介绍

这是一家从事全球性研究、开发、生产和销售的大型基因制药公司，经营区域包括北美、南美、欧洲、亚洲和澳大利亚。

这家制药公司所坚持的目标是通过缩短新产品开发和商业化所需的时间，从研发投资上获得最大回报。

为了达到这个目标，这家公司已经实施了一系列战略性计划，包括实施沃特世（Waters®）实验室信息化解决方案。沃特世NuGenesis科学数据管理系统(SDMS)在实现科学数据输入自动化方面发挥了至关重要的作用，这些数据将输入公司用于提交审查资料的电子通用技术文档(eCTD)标准电子格式中。

eCTD是一种先进的方法，各制药公司都在运用这种方法来装配和提交审查资料以供全球各地的监管机构进行审查，包括美国FDA、加拿大卫生部、日本厚生省以及欧盟的欧洲药品管理局。

这种方法也对电子记录和数据管理工作提出了一系列独特的挑战。数据和记录必须存档在符合法规的安全数据库内，以保护各类电子记录的完整性，防止在相应保存期限内发生篡改和丢失现象。

挑战

这家公司要求配备一套电子化解决方案，这套方案要能够提供优于传统纸面文档编制和 workflows 存档的信息管理能力。这套解决方案必须能够满足一系列的关键业务驱动力的要求，包括：

- 通过优化审查资料提交流程确保新产品的独占性
- 响应监管机关和行业倡议，为实现电子资料提交和电子信息交换而采纳共同标准
- 实现研发投入回报最大化
- 减少产品开发和商业化时间
- 在降低成本的同时提升生产率和效率



SDMS目前已在这家制药公司用于提交审查资料的公司内部电子通用技术文档 (eCTD) 的科学数据输入处理中发挥着至关重要的作用

解决方案

这家公司选中了沃特世的NuGenesis SDMS，并作为建立全球性公司信息管理系统、交换和资料提交系统这个战略性计划的基石。

这项电子审查资料提交项目于2001年启动，采用了一个集成化软件解决方案，这个方案由以下多个核心应用程序来组合：

- 沃特世的NuGenesis SDMS：将仪器和外部来源生成的分散数据自动导入至一个中央数据仓库。信息可以进行搜索并在科学家之间进行交流和共享，从而便于提升实验室的效率、法规达标和产品开发。
- Broadvision一对一文档管理系统：为Microsoft Office格式和XML格式的业务文档提供了内容管理，并加入了电子签名工作流程以及集成PDF和Web发布功能。
- Lorenz docuBridge：采用一种eCTD文档将NuGenesis SDMS和Broadvision所采集的内容组合起来以供执行资料提交。

NuGenesis SDMS的实施工作于2002年初展开。部署的第一阶段集中在4个北美工作地点并在不到2年的时间内完成。

客户的主要兴趣在于运用NuGenesis SDMS的打印数据捕获技术，这项技术能够捕获、索引和保护仪器生成报告的真实内容。这家公司运用了文件数据捕获技术来执行对来自各类数据源的科学数据捕获、元数据抽取以及存档，这些数据源包括PerkinElmer的 TotalChrom色谱软件、Agilent的ChemStation和ChemStore色谱软件；LIMS和其它支持系统。

在软件集成阶段，沃特世的企业解决方案部门与这家公

司的公司法规执行部和IT部组成的跨部门团队展开了密切合作。沃特世团队提供了部署后业务和技术支持以及维护服务，结合客户提出的关键反馈意见，确保持续改进。

关键软件解决方案的成功验证是所有重大部署工作中的重要组成部分。而此套解决方案的验证包含了2个阶段：第1个阶段是核心应用程序，第2个阶段是与每个工作地点具体相关的部署。核心应用程序IQ/OQ的时间计划为7个月，工作地点具体相关数据配置的IQ/PQ为4至11个月。

业务效益

如今，沃特世的NuGenesis SDMS已在这家制药公司用于提交审查资料的电子通用技术文档(eCTD)的科学数据输入处理工作中发挥着至关重要的作用。这套系统的优势首先在于能够注册和获取新制药产品的批准，从而获得6个月的独占期，进而显著增强营业创收潜力。

转向采用全面电子化科学和业务信息管理战略后，可以简化从实验室科学家到最终审查资料提交之间的工作流程，从效率方面获得丰厚的回报。

通过NuGenesis SDMS实现的科学数据可用性提升了这家公司的生产率，再结合了可在任何地点实现的单点信息访问能力，实现了大幅消减运行成本。

最终，在各个国际法规监管组织增加严格检查的环境下，公司通过提升自身满足法规要求的能力，增加了公司的竞争力和战略地位。

总体来说，在这些效益的帮助下，客户得以缩短产品开发和商业化所需的时间。

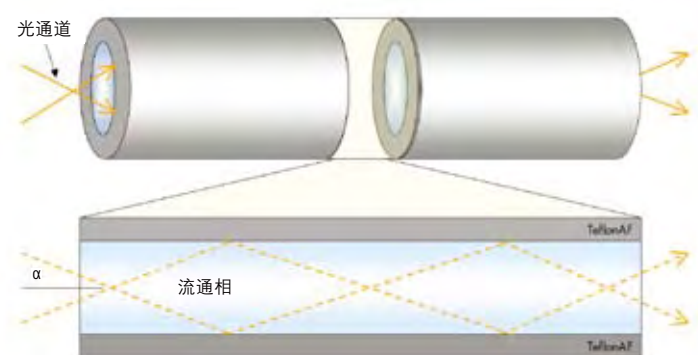


超高效液相色谱仪（ACQUITY UPLC）光导流通池的维护

光导流通池概况

沃特世（Waters®）光导流通池通过Teflon AF管传输光和样品。管路通过小体积流通池传输能量，使分析灵敏度得到提高。全反射（TIR）的原理是通过流体折射系数大于管路（Teflon AF）折射系数，将光限制在流体体内。

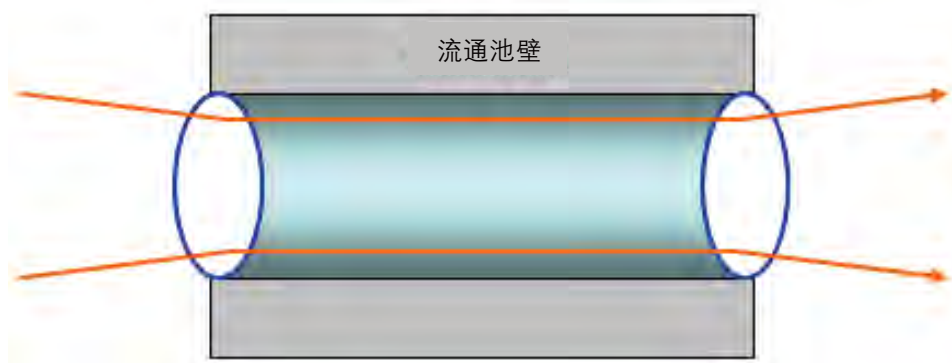
光线通过光导流通池的传输图



上图中，通过流通池的光通道被描绘成一对在池壁上交叉反弹的光线。每条光线携带的能量在每次反弹后保留。所有的光线都被反射，因此成为全反射。Teflon AF管在流通池的光通道中是一种活性成分。

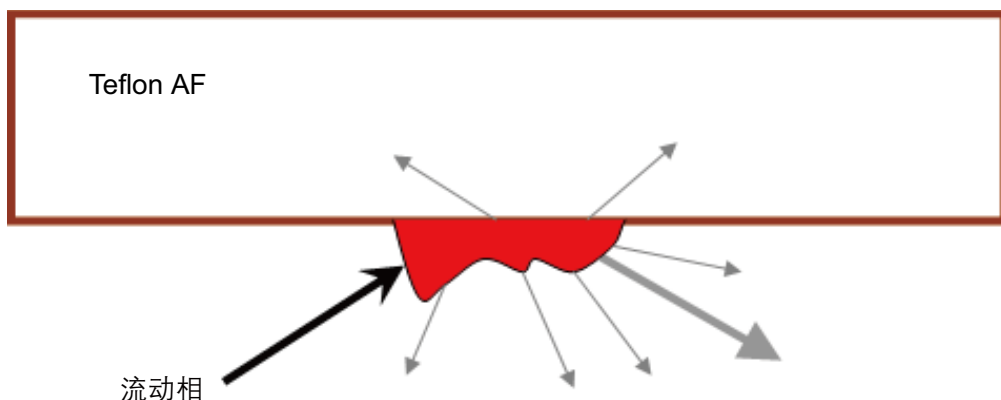
相对于光导流通池，常规流通池是在两端都具有透镜的全金属池。

光线通过常规流通池的传输图



光线通过常规流通池的通路被设计成避免与池壁接触的形式，主要是为了防止光线接触到池壁后产生可检测的信号。漫散光线的能量由于流动相组分、池壁光洁度（不可能达到100%反射）、或慢慢积聚污染物的不同具高度可变性。然而Teflon AF表面如镜般光洁，维护的好的流通池其相对细微的RI-依赖性可以忽略。表面污染物，下图红色不规则区域，会导致不需要的光束效应如散射（灰色细箭头）或吸收（灰色粗箭头），这些都会使基准能量降低。

光导流通池中不需要的光束效应



光导流通池方法的运行差异在于，光线通过与流通池壁的相互作用传输，而常规方法则避免这种相互作用，故光导流通池可在流通池中液体不变的情况下加强实际测定：

- 模拟与新流通池相似的情况下，定期确定流通池传输。（必须使用干净的流动相确定流通池的传输）
- 避免因检测器前系统组成改变而玷污流通池，如采用新柱子。

清洁流通池

当流通池被前次进样的残留物污染，关闭检测器，清洁流通池。脏的流通池会引起基线噪音，降低样品响应，校正曲线误差和其他问题。

- 当您试图解决问题时，先用流动相冲洗流通池。
- 如果没有改善，用100%纯有机溶剂冲洗流通池。
推荐：100%乙腈
- 如果问题仍然存在，用1%甲酸冲洗30分钟，再用水将甲酸冲走。
- 如果1%甲酸冲洗仍然失败，用系统酸液净化冲洗。（见进行系统酸的净化冲洗）
- 如果还是没有改善，请咨询沃特世技术服务部门。

注意：

- 为了防止流通池失败，不要连接任何会造成后压超过流通池最大耐受压力1000psi（69bar, 6895kPa）的管路或装置。
- 通过流通池的压力必须不超过1000psi（69bar, 6895kPa）。增加流速通常会增加压力。高粘度的流体一般会增加通过流通池的压力，从而需要较低的流速。允许的流速是在每个流通池耐受压力上限的基础上确定的。

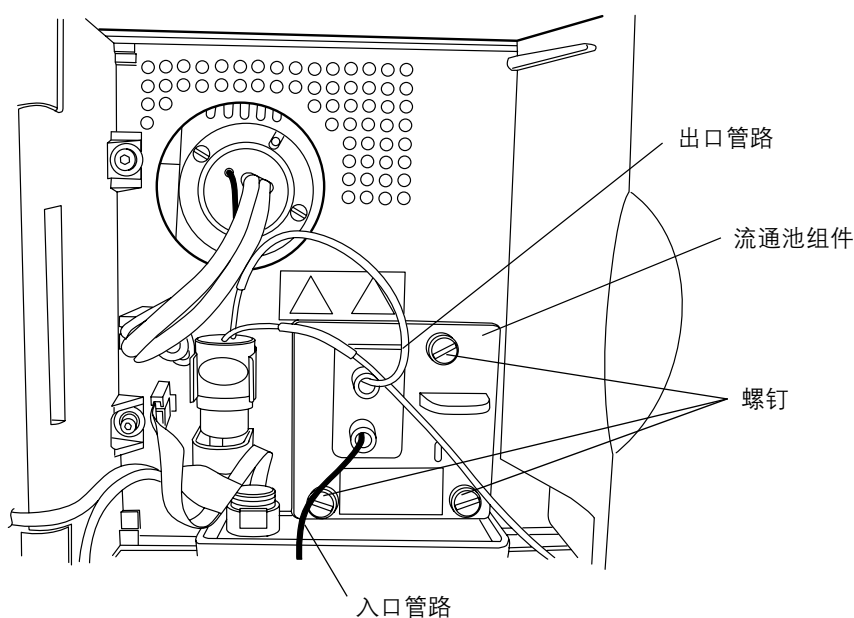
警告：为了避免溢出，每隔一定的时间清空废液容器。


规则：使用洁净的，经过脱气的洗脱液。

需要的材料：

- 1%甲酸
- 洁净的、化学耐受的、无粉尘手套
- 水（用于冲洗缓冲液配制）
- 可与流动相和水互溶的中间溶剂
- 不锈钢两通（为了在冲洗中替换柱子）
- 适合移去替换柱子的扳手

为了清洁流通池



1. 在检测器控制面板上，点 （熄灯）。
2. 停止溶剂流速，移去色谱柱。
3. 用接头或管道替换色谱柱。
4. 如果其他仪器在流通池出口后，冲洗时，断开流通池与其他仪器的连接，将流通池出口接到废液容器。
规则：在与质谱连接时，不要冲洗流通池。
5. 用HPLC级别的水冲洗检测器。如果流动相与水不互溶，先用中间溶剂冲洗。
6. 用1.0%甲酸水溶液或90%水/10%有机溶剂混合物，低速0.05-0.1ml/min冲洗流通池4小时。不要使压力超过1000psi（69bar，6895kPa）。
7. 用HPLC级别的水冲洗检测器。如果流动相与水不互溶，先用中间溶剂冲洗。
注意：从系统中移去其他正在使用的检测器。
8. 再次接上柱子。
9. 重新开启流动相流速。如果流动相与水不互溶，首先用中间溶剂冲洗。

进行系统酸性洁净冲洗

系统中的污染物会引起流通池污染。如果系统被污染，进行系统酸性洁净冲洗。这一步骤清洁二元泵溶剂管理系统，溶剂管理系统和流通池。

注意：如果您正在运行MS检测器，请不要进行系统酸性洁净冲洗。代之以咨询沃特世技术服务部门。

配制溶剂：

1. 配制50: 50(v/v) 甲醇：水混合液如下：
 - a. 用量筒量取500mL水。
 - b. 用另一个量筒量取500mL甲醇。
 - c. 将甲醇加入水中，混合5分钟。
2. 配制30: 70(v/v)磷酸：水混合溶液如下：
 - a. 用量筒量取700mL水。
 - b. 用另一个量筒量取300mL磷酸。
 - c. 将磷酸加入水中，混合5分钟。
3. 在1L的流动相瓶中充满100%水。
4. 在1L的流动相瓶中充满100%异丙醇。

注意：整个清洁步骤，从配制完溶剂到洗脱流通池中的污染物，耗时约6小时。

进行系统酸液洁净清洗

注意：不移去溶剂过滤头将污染流体通路。

1. 移去样品和溶剂管理系统的容器过滤器。
 2. 设置所有流路A1、A2、B1、B2柱塞杆清洗液，弱洗液和强洗液为50: 50甲醇: 水。
 3. 每个溶剂通路初始化运行5分钟。
 4. 柱塞杆清洗初始化。
 5. 初始化清洗注射器和进样注射器4次。
 6. 进样后连接流路中的压力节流器，使系统产生2000psi的后压。
 7. 在自动进样瓶中加入1mL流动相，设置样品瓶位置为1: A,1。
 8. 根据以下参数，创建一个仪器方法：
 - A. 流速 = 0.5mL/min
 - B. 梯度组成50%A1: 50%B1
 - C. 满定量环进样
 9. 运行30个满定量环进样，运行时间设置为0.5分钟。
 10. 用100%异丙醇作为溶剂重复步骤1-8。在进行这一清洗步骤时，不要让洗脱液通过光学检测器。节流器此时导入废液容器。
 11. 用100%水作为溶剂重复步骤1-8。
- 注意：**在运行磷酸清洗步骤前将柱塞杆清洗流路从流动相瓶中移除。
12. 用30: 70(v/v)磷酸: 水作为溶剂重复步骤1-8。
 13. 为了完全去除流通池中所有污染物，不断用磷酸混合溶液冲洗3小时以上。
 14. 用100%水作为溶剂重复步骤1-8。
 15. 用50: 50(v/v)甲醇：水作为溶剂重复步骤1-8。
 16. 再次安装上样品和溶剂管理系统的容器过滤器。

[创新]

专门为 UPLC 应用而设计
并通过认证和检验的色谱柱和保护柱



1.7 μm BEH UPLC 颗粒

1.8 μm HSS UPLC 颗粒

反相柱和 HILIC 色谱柱

八种不同的键合相

VanGuard 保护柱

ACQUITY UPLC® 色谱柱和保护柱是迄今为止技术领先的液相色谱柱。经过专门设计和检验，确保可用于高达 15000 psi(相当于 1000bar)的压力，具有卓越的高柱效和耐用性。有超过六十种不同规格和不同键合相的产品供选。您的实验室可以充分利用小颗粒填料的优势，在获得更高分离度的同时得到更快的分离。

欲了解更多有关 ACQUITY UPLC 色谱柱的信息，敬请访问
www.waters.com/acquitycolumns

Acquity
UltraPerformance LC®

©2008 沃特世公司。ACQUITY UPLC, UPLC, ACQUITY UltraPerformance LC, VanGuard, Waters, AccQ•Tag 和 The Science of What's Possible 是沃特世公司的商标。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

沃特世科技（上海）有限公司

地址：上海市浦东新区张东路1387号
41栋01室

邮编：201203

电话：021 - 6879 5888

传真：021 - 6879 4588

北京分公司

地址：北京市朝阳区八里庄西里98号
住邦2000商务中心3号楼22层

邮编：100025

电话：010 - 8586 8899

传真：010 - 8586 7099

广州分公司

地址：广东省广州市流花路
中国大酒店商业大厦406 - 407室

邮编：510015

电话：020 - 8626 6678

传真：020 - 8668 6217

沃特斯中国有限公司

地址：香港九龙柯士甸道102号901室

电话：852 - 2964 1800

传真：852 - 2549 6802

免费售后服务热线：

800 (400) 820 2676

www.waters.com

www.waterschina.com

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



©2008 沃特世公司。中国印刷
2008年6月 86GN00009CN
沃特世公司版权所有。