

使用质谱和UV光谱数据与Empower 3软件相结合的色谱系统简化峰追踪和共流出检测

Paula Hong and Patricia R McConville
沃特世公司

应用优势

- 结合质谱和UV光谱分析，可以在单次运行中同时实现峰追踪和共流出峰的鉴定
- 与ACQUITY UPLC H-Class四元系统结合的灵活软件可通过Auto•Blend Plus调节流动相pH值
- 此软件可在同一个工作流程中分析UV和质谱数据，从而简化数据分析过程

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class系统和Auto•Blend Plus™
ACQUITY UPLC PDA检测器
ACQUITY® QDa检测器
Empower® 3软件FR2

关键词

峰鉴定，共流出峰，四元溶剂管理器，
Auto•Blend Plus，镇痛药

简介

反相液相色谱（RPLC）分离方法的开发通常需要很多耗时步骤，包括大量的数据处理过程。许多筛选方案都依赖于UV检测，但单一的检测技术无法提供充分的丢失峰和共流出峰信息。

使用质谱检测器很难区分同量异位化合物。此外，由于背景干扰，微量化合物可能会丢失，一些重要的样品组分也可能无法离子化。不含发色团的化合物无法进行UV峰追踪，因此光谱无法可靠的进行辨别。发生共流出时，通常较难识别谱图中哪些光谱被“累加”。而当浓度存在非常较大的差异时，共流出物中微量化合物的谱线可能会完全消失。最后，尤其是当pH值发生变化时，UV光谱容易受溶剂化显色效应的影响而改变。这些都说明了使用单一检测技术进行方法开发的困难性。

为应对这些挑战，可以使用多种检测器来对单个样品进行分析，每种检测技术分别针对不同理化特性的分子。将检测器响应整合到一个软件界面中，就可以通过精简的平台简化数据分析。

实验

样品描述

镇痛药组合包含乙酰水杨酸、对乙酰氨基酚、2-乙酰氨基酚、乙酰苯胺、非那西汀和咖啡因，采用90:10的水/乙腈混合溶液配制，浓度为0.2 mg/mL。

UPLC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class系统, 配备ACQUITY等度溶剂管理器 (ISM)	波长:	245 nm
UV检测器:	ACQUITY UPLC PDA	采样速率:	20点/秒
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 µm, 2.1 × 50 mm	时间常数:	正常 (0.1 s)
柱温:	30 °C	ISM溶剂:	含0.1%甲酸的90:10 水/乙腈
样品温度:	20 °C	ISM分离:	10 (UPLC)
溶剂A:	125mM甲酸的水溶液	ISM流速:	0.5 mL/min
溶剂B:	125 mM氢氧化铵水溶液	进样体积:	1 µL
溶剂C:	乙腈		
溶剂D:	水		
组成:	使用Auto•Blend Plus制备		
清洗溶剂:	50:50水/乙腈 (含0.05%甲酸)		
洗脱溶剂:	90:10水/甲醇		
密封清洗液:	90:10水/甲醇		
流速:	0.6 mL/min		
梯度:	乙腈在0.5分钟内从2%增加 至10%，在0.3分钟内从10% 增加至50%		

MS条件质谱

检测器:	ACQUITY QDa
电离模式:	ESI+, ESI-
采集范围:	100-250 <i>m/z</i>
采样速率:	5点/秒
毛细管电压:	0.8 kV
锥孔电压:	10 V
探头温度:	600 °C

色谱数据管理

Empower 3 FR2

结果与讨论

在下面的研究中，我们利用配有ACQUITY QDa和ACQUITY UPLC PDA检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统对一份镇痛药混合物进行分析。使用Empower 3作为操作软件。初始筛选试验结果表明，在流动相pH为5时，六种标准品组分中有五种实现了分离（图1）。

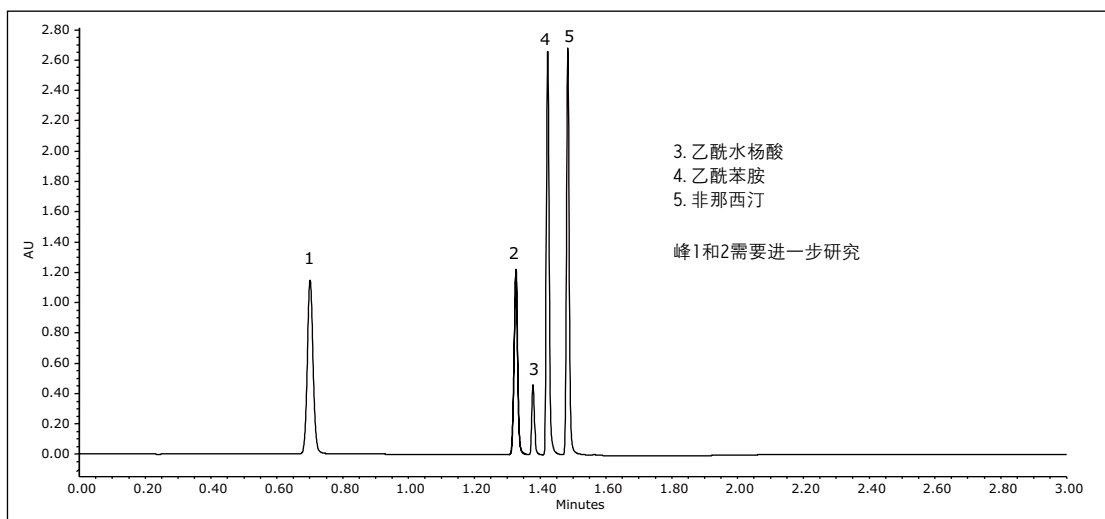


图 1. 镇痛药样品在pH=5，UV 245 nm波长下的UV谱图。

为了在分离中进行峰追踪以及确定是否存在共流出物，本实验分别对质谱和UV的光谱数据进行了分析。质谱数据用于识别混合物中具有独特质量数的组分。例如，峰4可以初步鉴定为乙酰苯胺 (m/z 136.0)，峰5为非那西汀 (m/z 180.0)。峰3存在于负离子模式下，也可根据其独特质量数鉴定为乙酰水杨酸 (m/z 137.0处的碎片离子)。如要区分峰1和峰2，还需对质谱和UV光谱数据进行进一步研究。

混合物中存在两种同量异位化合物（对乙酰氨基酚和2-乙酰氨基酚），其单一同位素质量数为152.1。在分离中（图1），峰1和2均含有对应的质量数。由于峰2还包含其他的主要分子离子，说明峰2可能存在共流出。因此，为了确证鉴别结果，除需要进行UV检测及追踪同量异位化合物的谱峰外，还需要将组分从峰2中完全分离出来。

为评估峰2的纯度，本文引用了Empower 3软件中的质量数分析窗口（图2）。1.3 min处峰的评估结果显示峰前沿处存在有 m/z 152和 m/z 110（图3）。相反，峰拖尾处显示有全部三个质量数，同时与峰顶点有不同的离子比率。三种离子的存在表明有多个分析物同时洗脱。具体来说，离子比率的不同和峰前沿 m/z 195的缺失表明仅有部分色谱分离。如果该比率在所有时间段保持不变，则碎片很可能来自离子源。鉴于混合物的已知组份，可确定拖尾峰的主要质量数来自咖啡因（ m/z 195.0）。峰前沿包含了同量异位化合物（2-乙酰氨基酚或对乙酰氨基酚）的两个母离子以及共有碎片离子 m/z 110.0¹。

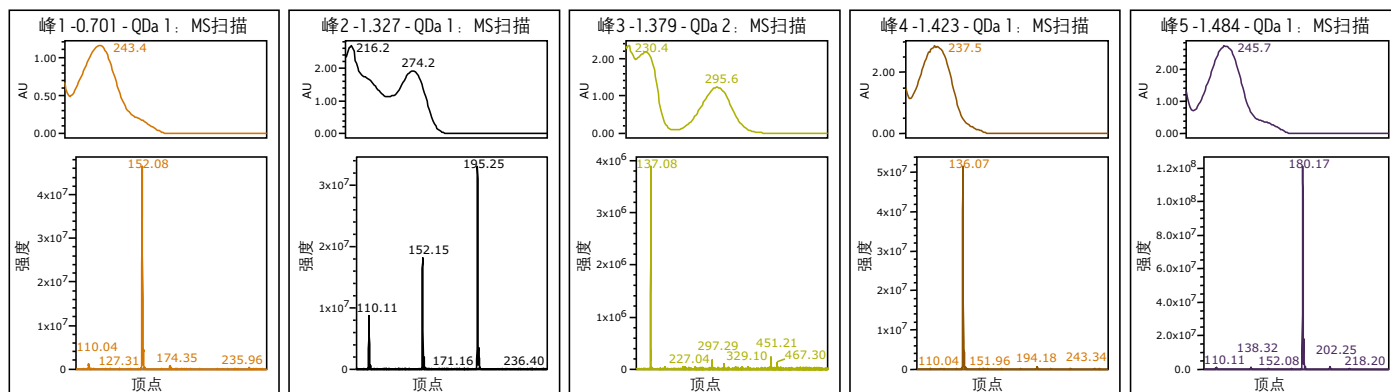


图2. Empower 3质量数分析窗口中镇痛药混合物的质谱和UV光谱组合视图。所有质量数顶点谱图都含有一个主要质量数（峰2除外），显示出三个主要离子。

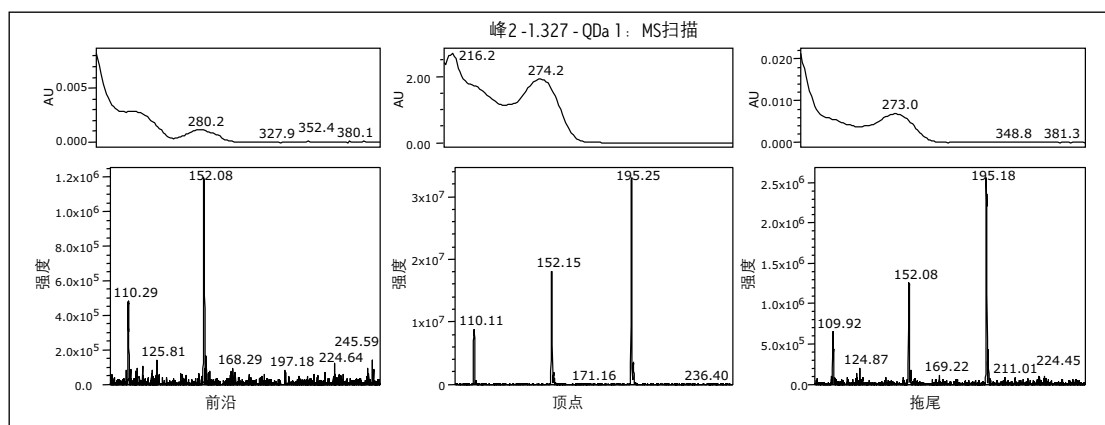


图3. Empower 3中的峰纯度视图，峰2的质量数和UV光谱数据显示在质量数分析窗口中。对峰的前沿、顶点和拖尾部分进行比较，结果显示离子比率不同，提示存在共流出物质。

为提高峰2中共流出物的分离度，实验对流动相pH值的影响进行了评估。使用设计灵活的软件，通过AutoBlend Plus以pH为单位直接输入反相梯度²。此过程可以在无需制备新缓冲液瓶的情况下实现对pH的控制。

流动相pH值的增加改变了两个共流出化合物的选择性（图4）。当pH为6时，咖啡因（峰B）被认为是两个未分离峰中较晚洗脱物的主要质量数（ m/z 195）来源。pH为7时，两种物质实现基线分离，其中咖啡因（峰B）较晚洗脱，峰A在1.2 min洗脱。

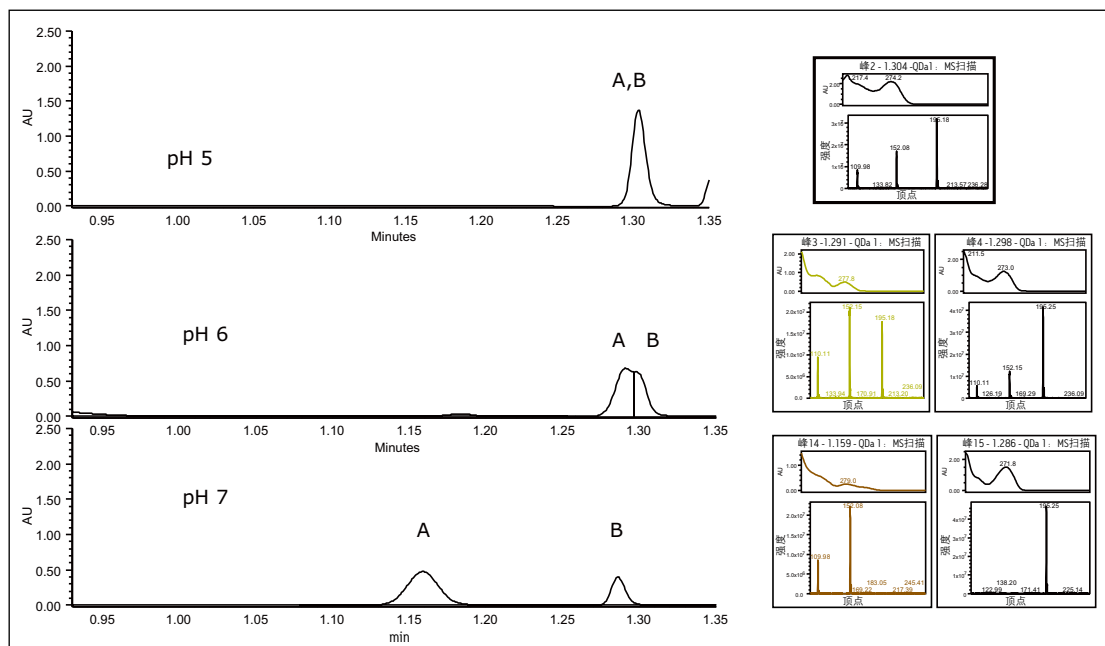


图4. 流动相pH值对峰2分离度的影响。流动相pH值越高，咖啡因与2-乙酰氨基酚之间的分离度越高。在pH为7时实现基线分离。

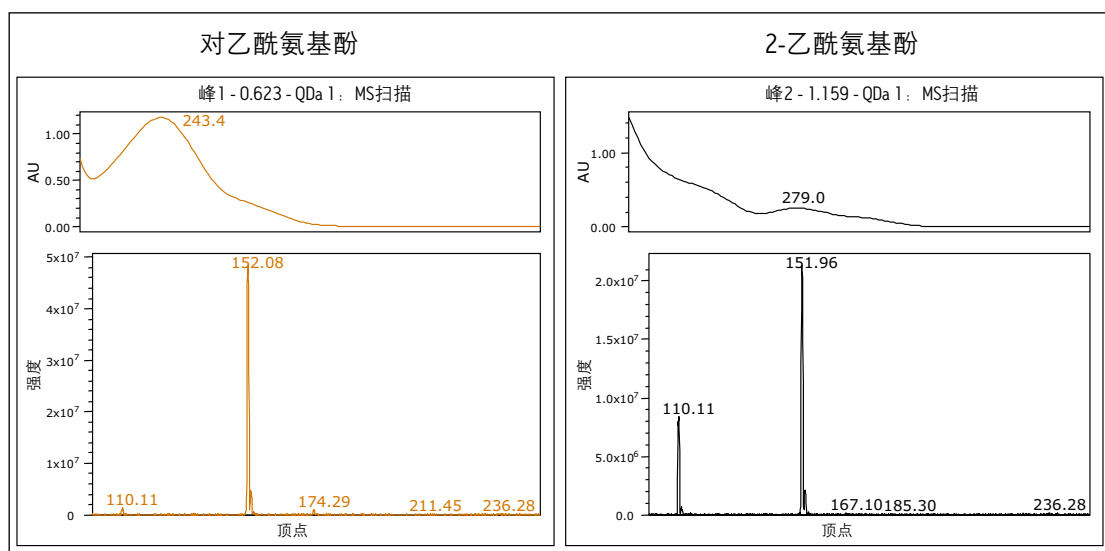


图5. Empower 3中的峰纯度视图。“质量数分析”窗口中显示了同量异位化合物的质量数和UV光谱数据。可根据UV谱图对同量异位化合物进行鉴别。

其中一种同量异位化合物（峰A）与咖啡因（峰B）在流动相pH为7时实现基线分离（图4），因此可以使用UV谱图对两种同量异位化合物进行峰追踪。虽然峰1（图1）和峰A（图4）的主要质量数相同，但峰A包含碎片离子 m/z 110（图5）。将同量异位化合物的质量数和UV谱图进行比较，可以得到峰鉴定所需的信息：峰1的UV谱图对应的是对乙酰氨基酚（最大波长为243 nm）。因此，后洗脱的峰A可确定为2-乙酰氨基酚。

结论

使用单一检测技术进行方法开发是一项比较困难的挑战，UV谱图数据有助于进行峰纯度评估和鉴定，但如果存在共流出物，峰追踪就难以实现。质谱数据可针对少数化合物实现色谱峰匹配，但如果存在同量异位化合物，就需要更多信息才能进行谱峰确证：无论是想要立即获取UV鉴定结果还是更可靠的分析定量，完整的分离都是最基本的要求。

通常情况下，需要进一步的分析才能对这些现象一一鉴别。为简化方法开发，可使用UV和质谱检测与精简的软件平台相结合的色谱系统，以实现峰纯度评估，有助于在单次运行中鉴定共流出物质。

参考文献

1. Manion JA et al. NIST Standard Reference Database 17. In NIST Chemical Kinetics Database, National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, Maryland, 20899-8320, 2008; Vol. Version 7.0 (Web Version).
2. Chavali A, Wheat TE, McConville PR. In Automating pH Manipulation in Reversed-phase Method Development, 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, the Netherlands, June 16-20, 2013; Waters Corporation, Poster: Amsterdam, the Netherlands, 2013.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY UPLC、ACQUITY、UPLC和Empower是沃特世公司的注册商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。



沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010-5209 3866
上海：021-6156 2666
广州：020-2829 6555
成都：028-6554 5999
香港：852-2964 1800

©2013 年沃特世公司。印制于中国
2013年11月 720004846ZH AG-PDF

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com