

面向多用户实验室的 Agilent 6120B 单四极杆 Walkup 系统

只需轻点几下鼠标即可实现可靠的 LC/MS 分析

应用简报

药物发现和研发

作者

Siji Joseph
安捷伦科技公司
印度

摘要

药物发现和开发期间，需要可靠且易用的仪器进行化合物鉴定和纯度检查。Agilent 6120B 单四极杆硬件和软件是在多用户环境中支持 Walkup LC/MS 方法分析小分子和生物分子的理想选择。简洁的软件界面与稳定耐用的硬件结合，让非专家用户也可以自信地执行高质量且可靠的 LC/MS 分析。Agilent MassHunter Walkup 软件提供自动电子邮件报告，用户坐在办公桌旁就可以接收到条理清晰的结果。本应用简报讨论了 6120B 单四极杆 Walkup 系统的主要硬件和软件功能，以及包括化学品库分析等应用中的实际使用。



Agilent Technologies

前言

在合成过程中的每个阶段，化学家都需要确认化合物合成是否成功，并估计目标化合物的纯度或产率。只有快速得出结果，才能为下一个合成步骤作出快速且恰当的决策。

使用 Agilent 6120B 单四极杆 Walkup 系统和管理员创建的方法，用户可以轻松执行复杂的分析任务。用户无需熟悉 Agilent ChemStation 或 Agilent MassHunter 软件，只需要学习几个简单的样品提交步骤，就可以操作系统。系统管理员可以创建详细的分析方法，供非专家用户使用。6120B 单四极杆 Walkup 系统的各种管理功能和稳定性评估在技术概述 5991-6534EN 中已经有所介绍。使用管理功能，可以根据用户要求对 6120B 单四极杆 Walkup 系统进行自定义设置。本应用简报介绍了使用 6120B 单四极杆 Walkup 系统进行 Walkup LC/MS 分析的用户相关功能。

实验细节

化学品与试剂

甲醇为 LC/MS 级，使用 LC/MS 洗脱液添加剂级甲酸铵和乙酸铵 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)。所有实验均使用 Milli-Q 水 (Merck, Darmstadt, Germany)。研究中使用的其他所有化学品均购自 Sigma-Aldrich 公司 (St Louis, USA)。

Walkup 仪器

Agilent 6120B 单四极杆 Walkup 系统由如下模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 脱气机 (G1322A)
- Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)
- 带外部样品盘 (部件号 G1313-60004) 和废液管 (部件号 G1313-27302) 的 Agilent 1260 Infinity 进样器 (G1329B)
- 带 2 位/6 通阀的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B)
- 带有组合离子源的 Agilent 6120B 单四极杆 LC/MS (G6120B) 可实现快速极性切换，以进行正离子化和负离子化模式采集 (默认 300 ms，但可通过高阻抗毛细管升级至 30 ms，间隔 10 ms)

Walkup 软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation, LC 和 LC/MS 系统版, 修订版 C.01.07
- 用于 LC/MS 和 LC 系统的 Agilent MassHunter Walkup 软件, 版本: C.02.01
- Agilent MassHunter Analytical Studio Reviewer (ASR), 版本: G3772AA, B.02.01

方法参数

LC 和 MS 仪器参数列于表 1 和表 2。多个不同任务的 Walkup 方法由管理员设定。用户需要根据分析需求，从列表中选择相应方法。表 1 和表 2 中列出了短时 (3 分钟) 方法和长时 (10 分钟) 方法。Agilent 1260 Infinity 泵的 A1 和 A2 通道有两种不同的流动相 (pH 3.2 和 pH 5.8)，以提供给用户多种方法选择。6120B 单四极杆可进行最高 2000 Da 的质量采集。但小分子库样品分析所选择的质量范围是 100-600 Da。

表 1. Agilent 1260 Infinity LC 方法参数

参数	短时方法	长时方法
色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm, 4 μm, 40 °C	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 100 mm, 2.7 μm, 40 °C
流动相 A	A1) 甲酸铵缓冲液, pH 3.2 A2) 乙酸铵缓冲液, pH 5.8	A1) 甲酸铵缓冲液, pH 3.2 A2) 乙酸铵缓冲液, pH 5.8
流动相 B	甲醇	甲醇
梯度	时间 %B 0 40 0.2 60 0.7 95 3 95	时间 %B 0 40 2 60 7 95 10 95
检测条件	a) 254 nm b) 双 (ESI/APCI) 正离子化模式 c) 双 (ESI/APCI) 负离子化模式	a) 254 nm b) 双 (ESI/APCI) 正离子化模式 c) 双 (ESI/APCI) 负离子化模式
进样量	3 μL	3 μL

本研究中使用的方法

- **短时：**采用乙酸铵和甲醇进行 3 分钟梯度洗脱（50 cm，4 μm 色谱柱），在正离子化和负离子化模式下进行快速筛查
- **短时：**采用甲酸铵和甲醇进行 3 分钟梯度洗脱（50 cm，4 μm 色谱柱），仅在正离子化模式下进行快速筛查
- **长时：**采用乙酸铵和甲醇进行 10 分钟梯度洗脱（100 cm，2.7 μm 色谱柱），在正离子化和负离子化模式下进行纯度检查
- **长时：**采用甲酸铵和甲醇进行 10 分钟梯度洗脱（100 cm，2.7 μm 色谱柱），仅在正离子化模式下进行纯度检查

Agilent MassHunter Walkup 工作流程

Agilent MassHunter Walkup 软件直观易用，无需预先具备 LC/MS 仪器或软件知识。只需简单点击几下鼠标，即可创建样品序列，最大限度减少手动操作错误。通过工作流程中显示的三个简单步骤（图 1），即可快速获得结果和可定制的报告。这些步骤包括简单的用户和应用程序登录，方便的方法选择和样品加载，帮助用户轻松创建样品序列。自动数据分析和电子邮件报告可实现快速流畅的分析。

表 2. Agilent 6120 单四极杆系统参数

参数	值
峰宽	0.02 分钟
阈值	150
步长	0.2
碎裂电压	70 V
电离模式	多模式
极性	正离子和负离子
干燥气流速	12 L/min
雾化器压力	35 psi
干燥气温度	250 °C
气化温度	200 °C
正/负离子化的毛细管电压	2000 V
正/负离子化的电晕电流	1 μA



图 1. Agilent 6120B 单四极杆 Walkup 系统的典型用户工作流程

用户使用用户名和密码登录到仪器后，需描述要提交的样品数目和类型，然后从管理员创建的可用方法列表中选择一个方法（图 2 和图 3）。软

件会显示将样品放到外部样品盘的具体位置（图 4）。然后样品被加载到系统中，排队等待分析和自动报告。

Walkup - User Login

User Login Time out after: **24:31**

Page 1 of 3

User Name: sijoseph

Password: *****

Department ID: Pharma Discovery

Job ID: Reaction mass

Workflow: mass Confirmation

Number Of Samples:

- Bio-samples
- CS - Compound Confirmation
- Library
- mass Confirmation
- Performance Evaluation
- Purity Evaluation

Next Finish Cancel

图 2. 第 1 步：显示有用户名、密码、所选工作流程和样品数目的用户名登录页面。在本示例中，选择的是质量确认工作流程

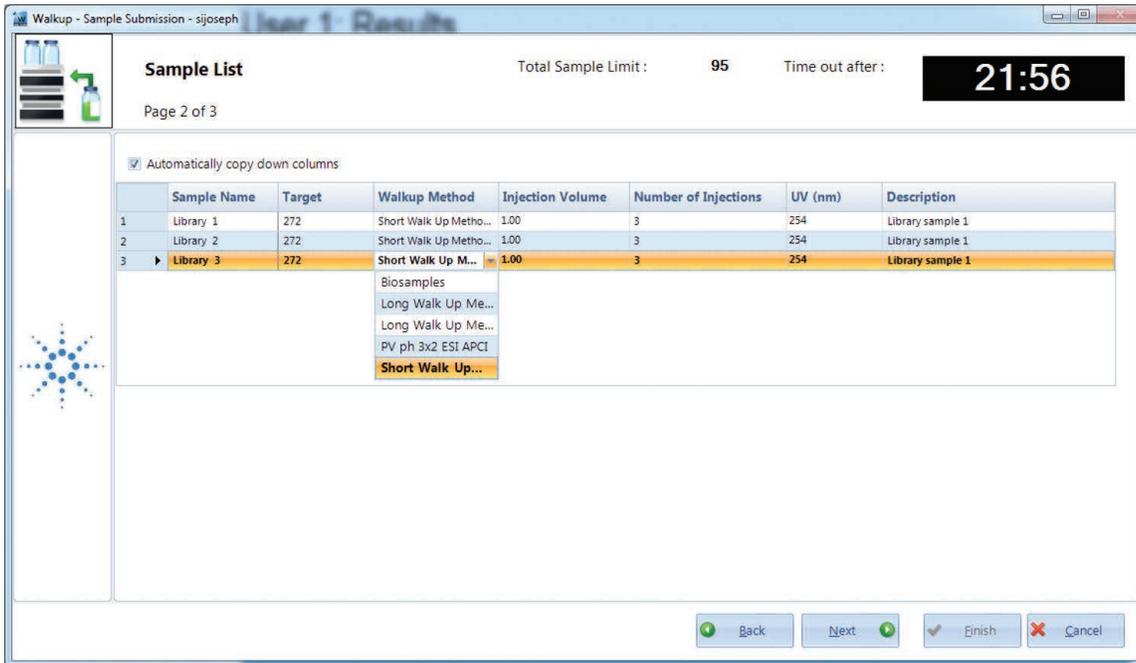


图 3. 第 2 步：从预填入的下拉列表中选择一种方法，输入相关样品详细信息。在本示例中，用户选择了短时方法进行快速梯度筛查。样品名称和预期 m/z 如下所示

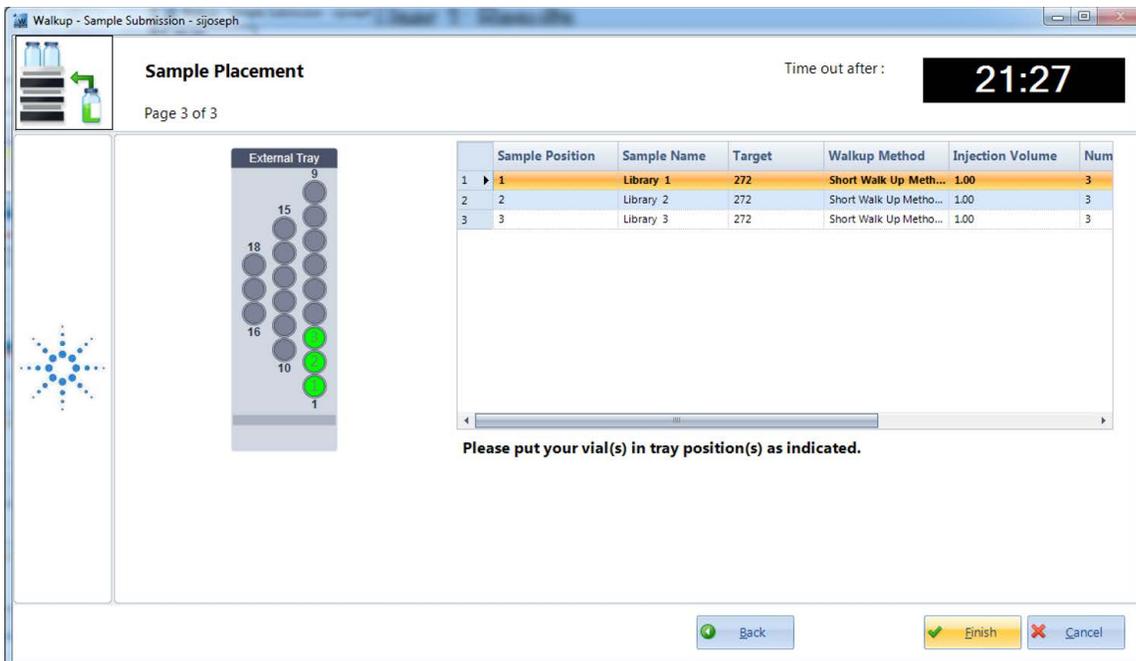


图 4. 第 3 步：样品加载。软件显示外部样品盘中的最终序列和样品瓶位置，以便样品加载

Agilent Infinity 自动进样器的机械臂会将提交的样品放入自动进样器中进样(图 5)。用户界面显示的各种颜色代码可以帮助用户跟踪分析过程。关于

任何问题和警报的自动通知都通过电子邮件或 SMS/短信直接发送给系统管理员。

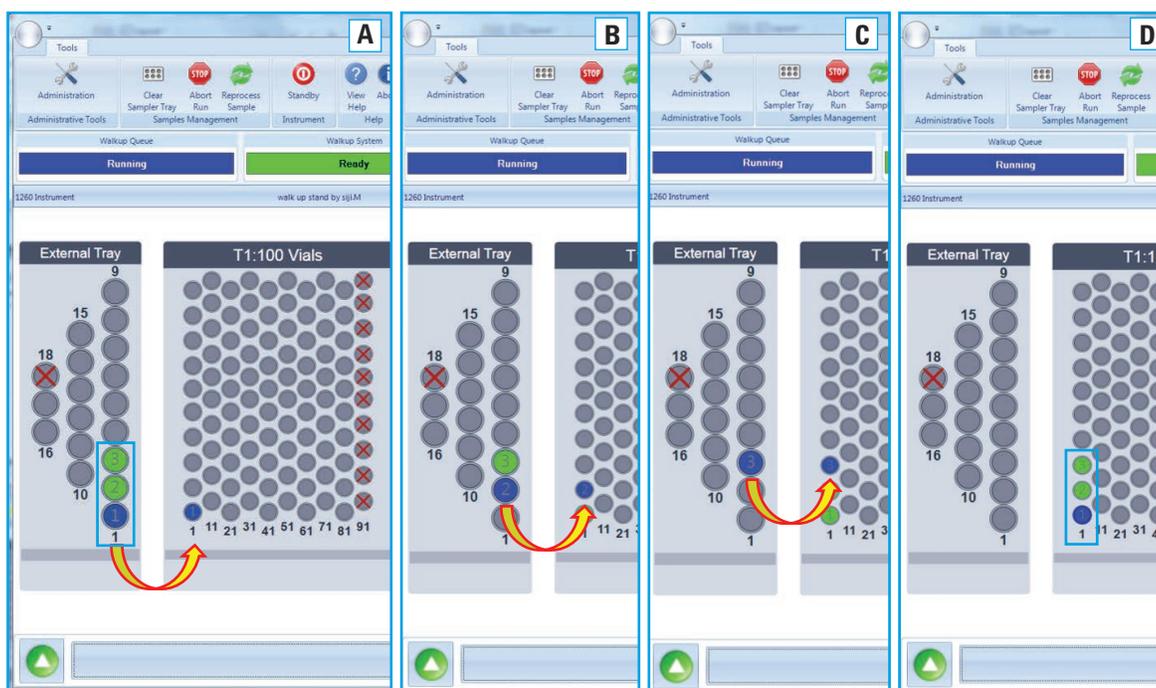


图 5. 用户成功地将三个样品放入外部样品盘中。图中显示了自动进样器的机械臂将三个样品瓶从外部样品盘按顺序转移到自动进样器 (A、B、C、D)

结果与讨论

Agilent MassHunter Walkup LC/MS 工作流程的应用

Agilent 1260 Infinity LC 与 6120B 单四极杆 Walkup 系统的组合适用于大多数分析物和应用。以下是其在药物研究和环境发展中的一些应用实例。

化合物库鉴定

使用一个包含 30 种化合物的库演示这种方法。使用 3 分钟梯度短时方法快速确认化合物。同时使用紫外和质谱检测进行全面检查。质谱检测采用带正负极性切换的组合离子源，以便检测各种化学物质。将库样品溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中，然后直接进样至 LC-UV/MS 系统。图 6 所示为孔板视图结果。基于用户定义的设置的一键式纯度视图总结了库分析结果。

采用互补检测的优势

仅采用单一检测方法有时可能使观察到的结果有偏差，而本次研究将质谱和紫外检测结合使用，能够对目标化合物进行更可靠的鉴定。即使目标化合物不含强紫外发色团，其也可能在正离子或负离子模式下发生电喷雾电离 (ESI) 或大气压化学电离 (APCI)，从而增加检出几率。

图 7 所示为库样品 13 的紫外和质谱谱图。在本示例中，在 1.5 分钟洗脱的紫外检测主峰，其 m/z 值并不对应目标化合物。质谱检测证实预期质量 (m/z 279) 作为次要峰存在，在 1.7 分

钟洗脱，如紫外检测谱图中所示。这清楚地表明了两种检测模式的优势

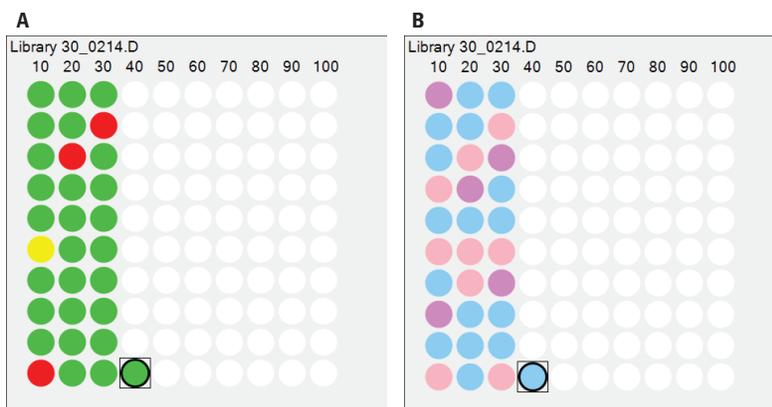


图 6. A) 基于目标 m/z 值的存在情况的孔板视图。绿色 = 检出一个或多个目标，黄色 = 检出一个或多个目标但相对强度较低，红色 = 未检出目标。在 30 个库样品中，有两个样品瓶（库 17 和 21）未显示预期目标 m/z 。其余 28 个样品瓶均含有预期的质量。第一个样品瓶是空白。B) 基于设定值的纯度视图：浅橙色 = 低纯度，蓝色 = 中纯度，深粉色 = 高纯度。总体而言，有 8 个库化合物纯度较低，17 个纯度中等，5 个纯度较高

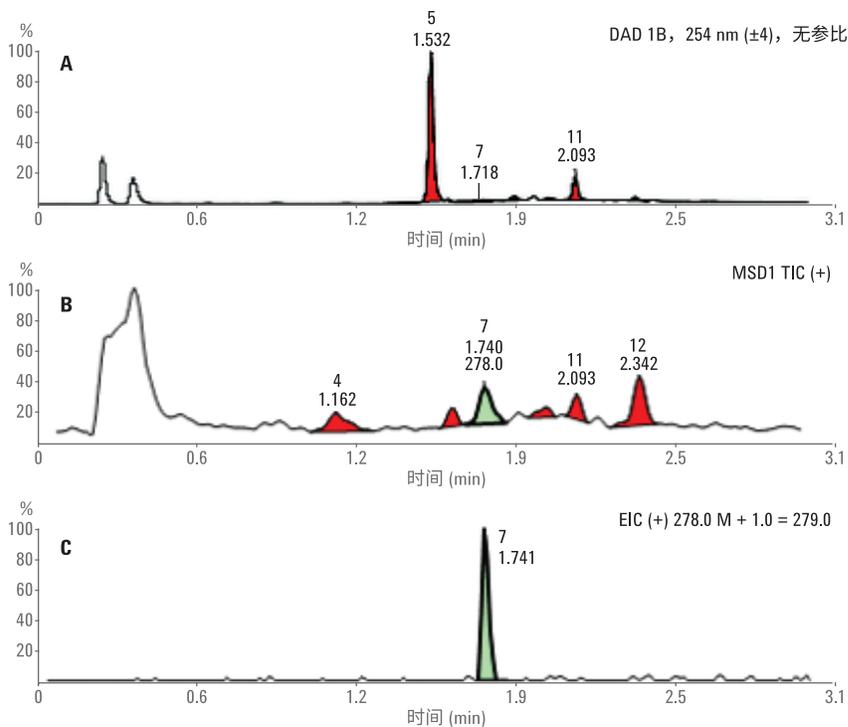


图 7. 库样品 13 的结果。紫外检测 (谱图 A) 的每个主峰不是预期目标 (m/z 279)。谱图 B 是正离子化模式下的总离子色谱图 (TIC)，其中 1.7 分钟检出目标质量。谱图 C 是目标的提取离子色谱图 (EIC)

化合物库纯度分析

在纯度分析中，使用 10 分钟梯度方法确保色谱的良好分离。此方法使用 10 cm 色谱柱进行开发。水相流动相为 pH 3.2 的甲酸铵（二元泵的 A1 通道）或 pH 5.8 的乙酸铵（二元泵的 A2 通道），具体取决于化合物的电离行为。有机流动相为甲醇。使用一个 2 位/6 通阀在短柱和长柱之间切换。

在 Walkup 设置中组合安排短时和长时方法是一个比较好的方案，通过确认分子量首先确定存在目标化合物，然后使用长时液相色谱方法进行纯度分析，确保色谱的充分分离。图 8 所示为同时使用短时和长时方法对库样品 10 进行紫外分析。ASR 报告显示，时间较长的 10 分钟方法可以提供更好的色谱分离度，有助于准确评估化合物的峰纯度。

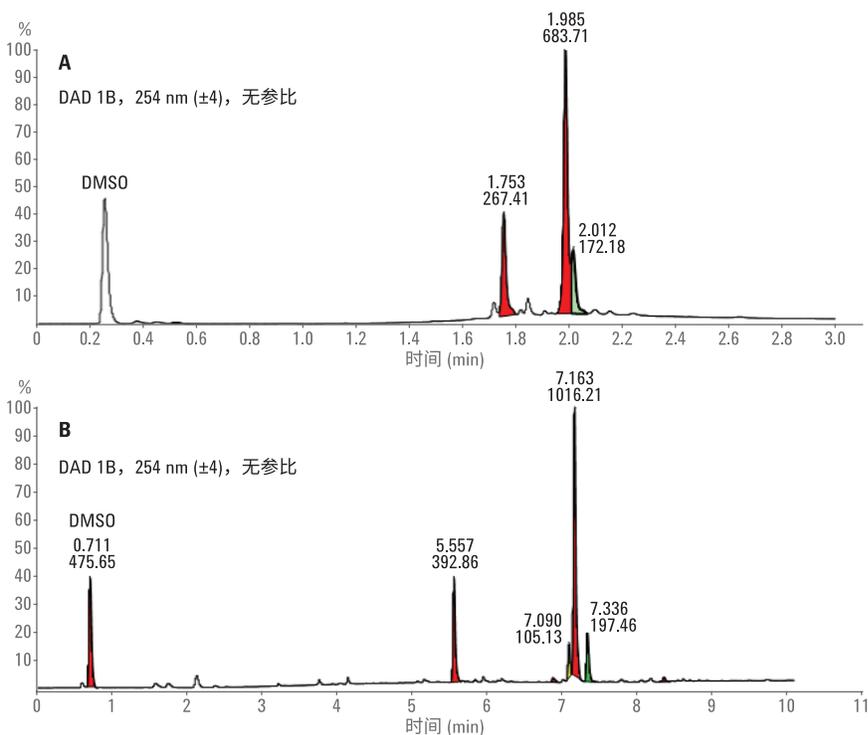


图 8. 使用 3 分钟短时方法 (A) 和 10 分钟长时方法 (B) 的库样品 10 的紫外检测谱图。3 分钟方法的目标峰与一种杂质共洗脱，使纯度评估较为困难。10 分钟方法的目标峰（保留时间：7.33）分离清晰，质谱检测确认了化合物分子量的目标质量值

目标化合物分析的反应监测

就五种不同的反应，使用短时 3 分钟的甲醇和乙酸铵 (pH 5.8) 液相色谱方法，监测预期分子量为 m/z 282 的化合物的形成。

图 9 所示为合成一化合物的五种不同反应试验的质谱正离子化模式 TIC 谱图。ASR 报告中灵活的彩色编码有助于显示结果和识别目标分析物。从中可以看出，只有第五次试验显示目标 m/z 282。

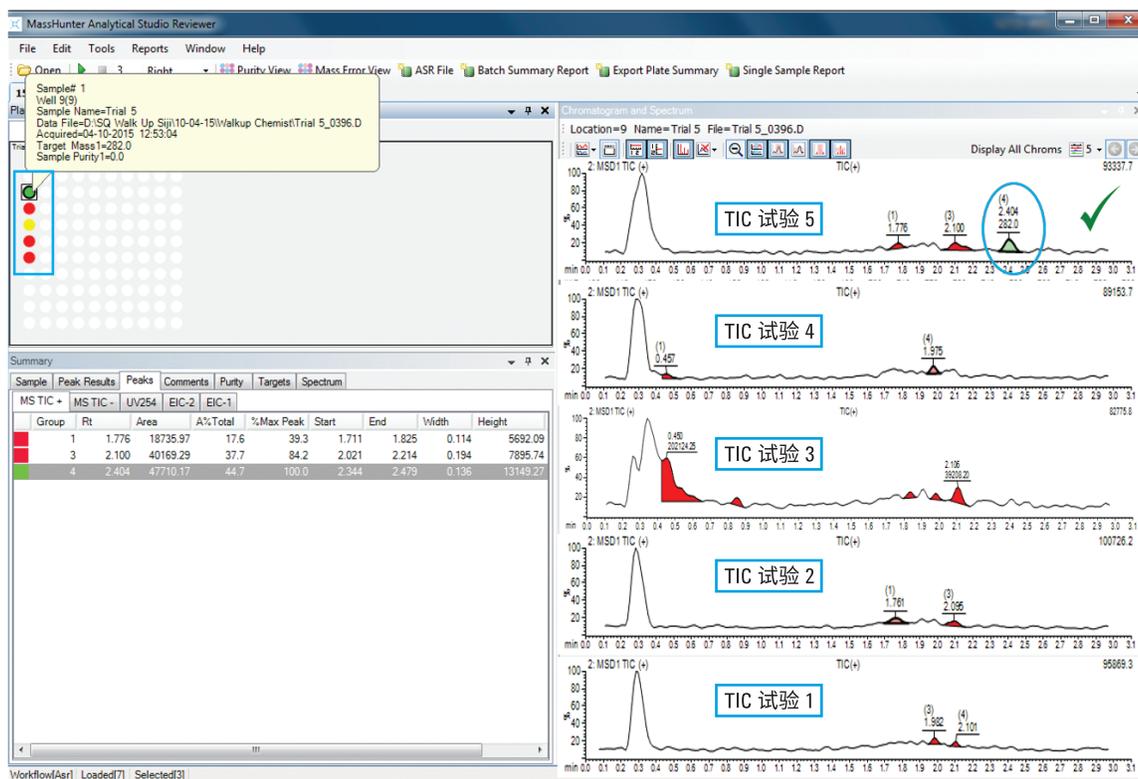


图 9. 五个反应监测样品的 ASR 报告。图片右侧显示了所有五个样品层叠的 TIC。样品瓶孔板视图确认了试验 5 含有目标 (绿色孔)

报告选项

分析完成后，会自动创建一份报告，由系统管理员在预置选项中以指定设置电邮给用户。图 10 为 PDF 格式的电子邮件报告示例。

LC/MS 的数据分析和结果可视化由 Agilent MassHunter Analytical Studio Reviewer (ASR) 协助完成。ASR 是一个直观的用户界面，可以快速浏览 LC/MS 数据审查和结果。ASR 报告可高度自定义，可报告特定数据。可以针对单个样品，也可针对一批多个样品生成报告。ASR 结果文件也可以直接通过电子邮件发送给用户。这些文件可以使用 ASR 软件远程打开，使用户能够以交互方式浏览数据并快速检查汇总

结果 (图 11)。ASR 软件中的**纯度视图**功能有助于根据紫外或质谱检测快速描绘出纯度结果。

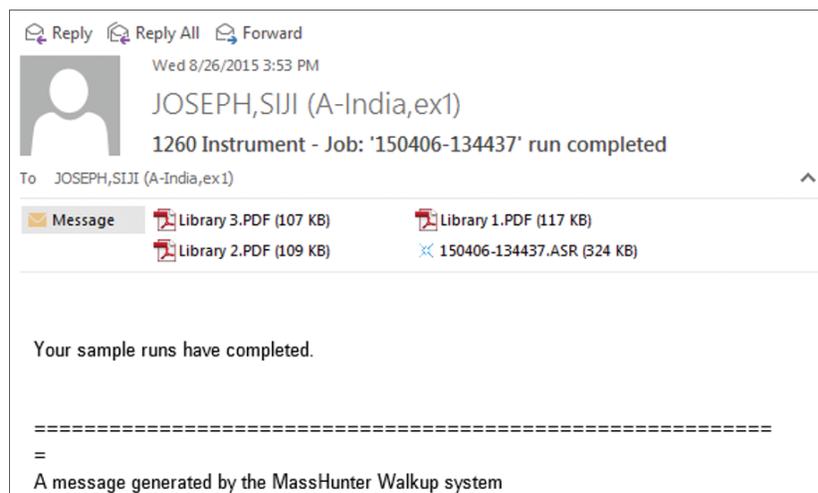


图 10. 给定序列分析结束后生成的一份典型电子邮件报告。附件包括该批次的各个 pdf 报告和 ASR 文件

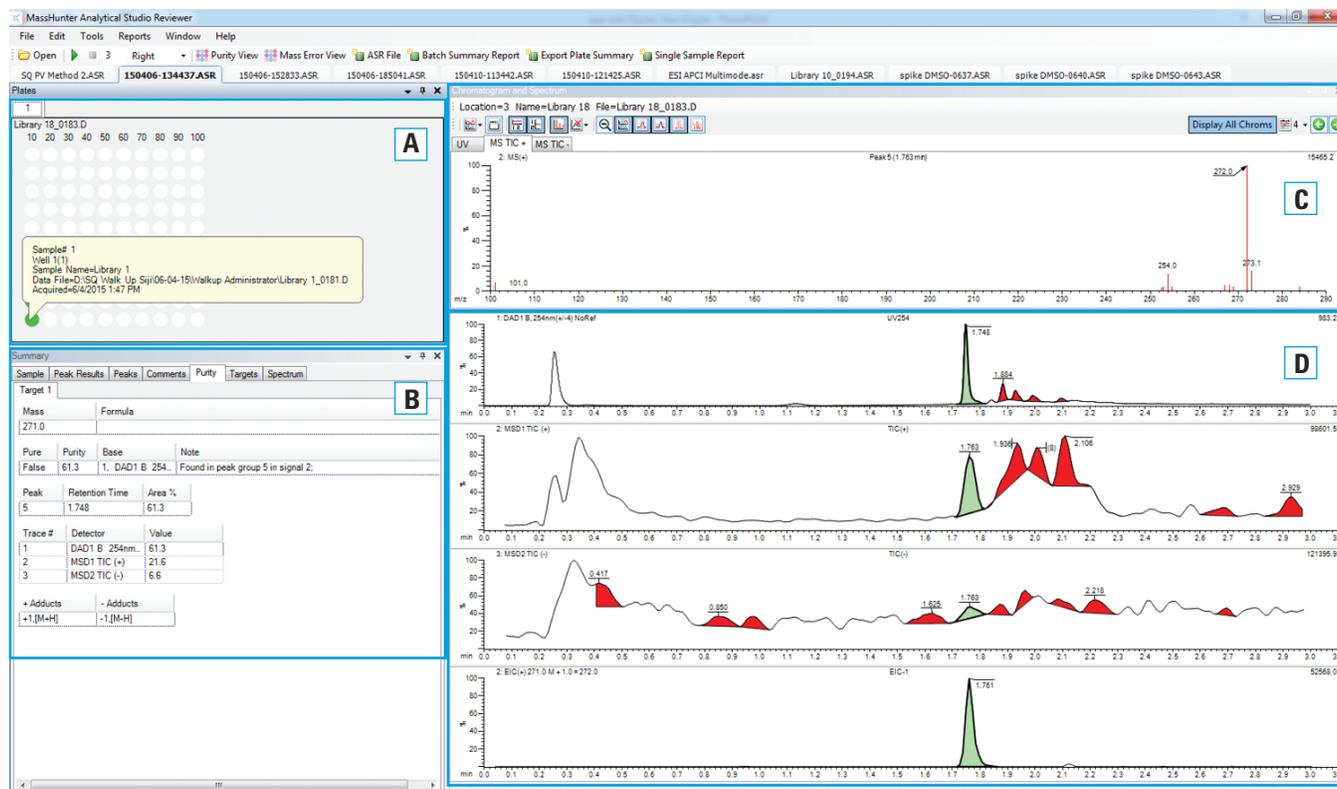


图 11. Agilent MassHunter Analytical Studio Reviewer 软件提供的结果视图。A) ASR 孔板视图，可根据每个样品中目标 m/z 值的存在情况查看结果。将光标悬停在每个孔上可以显示特定的样品详细信息。单击孔板中的每个孔时，右侧面板会显示对应的色谱图。B) 紫外和质谱检测结果的汇总窗格，可以快速查看纯度信息。C) 这部分会显示所选峰的质谱图。UV、MS (+) 和 MS (-) 谱图会以层叠方式显示在三个不同标签页中。D) 这部分会显示紫外色谱图、TIC 和 EIC

结论

Agilent MassHunter Walkup LC/MS 软件可以在多用户环境中实现合成化合物的常规分析。稳定的 Agilent 1260 Infinity LC 与 Agilent 6120B 单四极杆质谱系统组合使用，可以对各种物理化学性质迥异的合成化合物进行可靠的分析。紫外与质谱检测的互补使用也有助于鉴定多种目标分析物。使用 Walkup 软件可以轻松创建和分析样品序列，无需具备使用 LC/MS 硬件或软件的专业知识。

ASR 软件中提供了多种报告选项。使用 ASR 自动解析数据可以确保结果一致且可靠。用户会自动收到他们的定制结果，帮助他们快速作出与化学合成相关的决策。

参考文献

1. Joseph, S. Agilent 6120B single quadrupole Walkup System (Agilent 6120B 单四极杆 Walkup 系统)，*安捷伦科技公司技术概述*，出版号 5991-6534EN，**2016**

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，2016

2016年4月1日，中国出版

5991-6535CHCN



Agilent Technologies