

# Agilent LC/MSD TOFによる 組成式の自動確認

## アプリケーションノート

Doug McIntyre  
Agilent Technologies

### はじめに

創薬プロセスにおけるもっとも重要な目的は、リード化合物の合成です。それぞれのラボによって、ほんの数種から何千にいたる範囲で毎週新しい化合物を合成しています。この場合、目的の化合物が合成されたことを質量分析計で確認したうえで、スクリーニングによる適合性をチェックするのが一般的です。誤った化合物をスクリーニングしてもコストと時間の無駄になります。このような確認は、一般的には、ユニットマスレゾリューションが得られる四重極型質量分析計を使用して行われます。このアプローチが問題なのは、ネガティブな結果からは化合物が合成されなかった事実が判明するが、ポジティブな結果からは正しい化合物が合成された可能性が高いことが示されるだけという点です。

もし代わりに、精度が5 ppmを超える質量分析計の使用が可能ならば、ポジティブな結果から、合成した化合物が正しいことを高精度で確認できるようになります。

四重極型質量分析計はルーチンワークに使用するツールとして広く認識され、研究者の手を煩わせることなく、さまざまな条件のサンプルが分析できるよう改良を加えられています。歴史的には、飛行時間型(TOF)質量分析計のような高分解能MSについても状況は同じでした。Agilent LC/MSD TOF質量分析計は、多岐にわたる条件のサンプルを分析できる点で、四重極型質量分析計に近い機能と特性を備えています。このアプリケーションノートでは、Agilent LC/MSD TOFを用いたハイスループット環境における組成式の自動確認について説明します。



## 実験

実験にはAgilent 1100 シリーズHPLCシステムとAgilent LC/MSD TOFを用いました。LC/MSD TOFは、直行加速飛行時間型(oa-TOF、orthogonal-acceleration time-of-flight)質量分析計で、LC/MSD四重極型質量分析計およびLC/MSD Trapイオントラップ型質量分析計に用いる多くの直行型スプレーや大気圧イオンソースを使用することができます。これらのイオンソースは、広範囲の流量や条件でイオンを生成する能力が非常に高いことが証明されています。このアプリケーションの特性は、ほとんどの場合サンプルの濃度は不明であり、研究者がそれぞれに、さまざまな流量や分離法を利用するために重要です。組成式の確認は、最適な機器の操作についてほとんど知識を持たない、さまざまな人が利用するラボ環境で行われることが多くあります。

LC/MSD TOFのエレクトロスプレーイオンソースには2本のネブライザが使用されています。このリファレンス用ネブライザと、LC/MSD TOFのキャリブランドデリバリシステムが、リファレンスマススタンダードを連続的にイオンソースに流します。また、LC/MSD TOFの広いダイナミックレンジにより、低い濃度でもリファレンスマススタンダードの供給が可能です。

LC/MSD TOFは、サンプルの希釈や大がかりなデータ操作を必要とせず、広い範囲のサンプル濃度でルーチンで3 ppmを超える質量精度が得られるよう設計されています。このような設計は、次の4つの機能により可能となっています。

- 温度や湿度が安定しないラボでもデータの変動を最小限にし、高い質量精度をもたらすハードウェア
- オートチューニング、キャリブレーション、そしてトランスペアレント/自動内部リファレンスキャリブレーションのためのキャリブランドデリバリシステム(CDS)
- サンプル濃度の広い範囲で優れた質量精度をもたらすアナログ-デジタルコンバータ(ADC) デジタルシステム
- ピークの正確な質量をより精密に決定する、Agilentの設計によるピーク検出アルゴリズム

ここに挙げたいくつかの機能およびその効果の詳細は、以前発行したアプリケーションで説明されています。<sup>1</sup>

Agilent 1100シリーズ液体クロマトグラフは、バイナリポンプ、ウェルプレートサンプラー、サーモスタット付きカラムコンパートメント、およびダイオードアレイ検出器(DAD)で構成されます。カラムコンパートメントには、ハイスループットで実験を行うための自動カラム再生に便利な、10-port/2-positionバルブが搭載されています。<sup>2</sup> ほとんどの分析では2 mm x 50 mm、5 μm ZORBAX SB-C18カラム(製品番号860975-902)を0.4 mL/minで使用します。ハイスループットな実験では4.6 mm x 30 mm、1.8 μm ZORBAX SB-C18カラム2本を2 mL/minで使用しました。これらのハイスループット分析では、ネブライザにTee、0.005インチ内径のPEEKチューブ5センチを直接接続したシンプルなスプリッタを使用し、廃液チューブには0.010インチ内径のPEEKチューブ20センチを接続し、イオンソースに8対1のスプリットで供給しました。サンプルは0.1%ギ酸を加えたメタノールまたはアセトニトリルと水のグラジェントで分析しました。コンビナトリアルライブラリでの96-ウェルプレート3枚分のサンプルを分析しました。また、レセルピンまたは4種のサルファ剤の混合物(P/N 59987-20033)を含むサンプルを用いてシステムの性能をテストしました。

LC/MSD TOFのキャリブレーションにはAgilent tune mixを使用しました。リファレンス用のマススタンダードはキャリブランドデリバリシステムのボトルAからリファレンスネブライザ経由で継続的に供給されました。前半の実験ではm/z 118.086255および922.009798のマススタンダードを用いました。m/z 118.086255で得られたイオンはベタインであり、サンプルのフラグメントイオンを生成するためにフラグメント電圧を上げると、強度が激減しました。後半の実験ではベタインの代わりに、フラグメント電圧が高くともm/z 121.050873にて高い相対強度でイオンを生成したプリンを使用しました。コンビナトリアルライブラリについては、フラグメントを150ボルトに、スキャン範囲をm/z 50から1000に、そして1秒間に2回スキャンを行うようにトランジェントの数を設定した以外は、自動調整モードで機器を操作しました。

ハイスループット実験では、トランジェントは70,000まで短くなり、システムは再キャリブレーションが行われました。トランジェントが短いとスキャンが速くなるが、質量の上限が $m/z$  1500に限定される。1回で2000のトランジェントをスキャンする設定を使用し、1秒あたり5スキャンという採取間隔を実現しました。

コンビナトリアルライブラリに関し、サンプル名、プレート位置、および目的の式を含むExcelワークシートを4枚のウェルプレートのそれぞれについて作成しました。この情報をコピーし、複数のサンプルの分析に使用するソフトのコンポーネントワークリストに直接貼り付けました。M+1およびM+Naポジティブイオンの両方を考慮するためにメソッドを編集しました。サンプルの各バッチから得られた結果は、結果サマリー作成のためCSV形式ファイルに変換されました。

## 結果および考察

### 組成式の確認

データ処理により、式から自動的に分子量を計算しました。選択された広範囲の付加生成物をすべてカバーするために、抽出イオンクロマトグラム (EIC) が作成されました。平均質量スペクトルをEICの最大ピークに適用し、この理論的な質量を基準に各ターゲットの質量を比較しました。EIC、平均質量スペクトル、および付加物のイオンを示す拡張スペクトル、そして絶対質量誤差とppmを単位とする各付加物についての分析結果を含む1ページのレポートが、それぞれのターゲット物質について作成されました。このレポートの一例が図 1です。はじめの結果から、システムにはサンプル量が低いピコグラムからナノグラムの範囲にある場合に、3 ppm以内の高い質量精度をもたらす傾向があることが分かります。濃度が高くなると検出器はついに飽和し、質量を割り当てるのが困難なほどに質量ピークが歪み、同位体比率も低くなりました。EICピーク全体のスペクトルの飽和を評価するために、データ処理の方法に変更を加えました。オペレータはしきい値を設定することができ(本実験では50%を使用)、その後の計算に使用される平均スペクトルの作成では、指定したしきい値より小さい値だけが考慮されます。これにより、サンプル濃度の調整や再インジェクションなしに分析できるダイナミックレンジが大幅に向上します。

4枚の96ウェルプレートから得たデータをExcelで処理しました。シグナル量と分子量に対する質量誤差がプロットされました。各プレートでの平均誤差は3 ppm RMSで、誤差が2 ppm未満のプレートもありました。うち1枚では分子量250未満のサンプルの誤差が4から10 ppmの間となりました。しかし、計測した質量について候補となる式を計算すると、各サンプルから計算された質量誤差内で一つの式が得られました。

### ハイスループットの結果

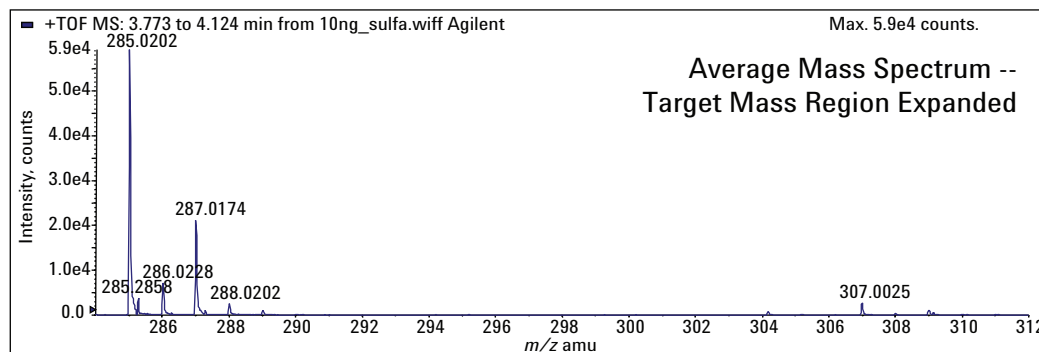
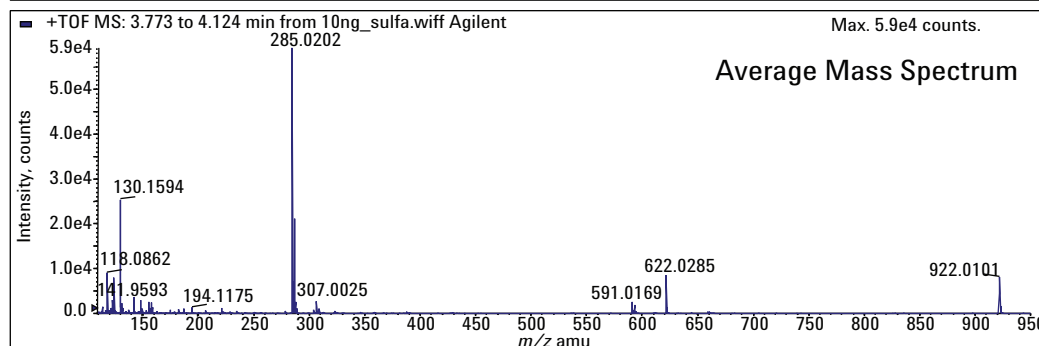
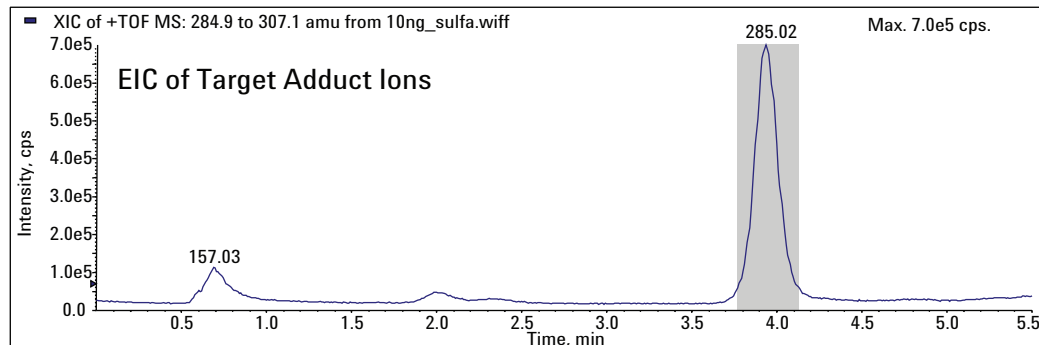
サンプルには、スルファメチゾール、スルファメタジン、スルファクロロピリダジン、およびスルファクロロメトキシシンが10 ng/ $\mu$ Lレベルで含まれていました。注入量は0.5  $\mu$ L。これにより、4つの分解ピークが観察されました。ピークはそれぞれ3秒の幅を持ち、0.8分未満で溶出していた(図 2参照)。システムは各ピークについて15のスキャンを行った。12回の分析から、質量精度は0.8 ppm RMSと求められました。自動カラム再生、ならびにウェルプレートオートサンプラーのオーバーラップインジェクションおよび自動ディレイボリュウムリダクションを用いたことにより、組成式確定レポートの処理および作成にかかった時間も含まれた1回の分析あたりのサイクルタイムは1分23秒でした。

### まとめ

Agilent LC/MSD TOFは、広範囲のサンプル濃度と分子量をもつ分子について、高い信頼性で自動組成式確認を行うことができます。平均質量精度は3 ppmを超えました。短く、粒子サイズの小さいカラムを高い流量で使用し、カラムを自動再生したところ、96ウェルプレートのライブラリの組成式を2時間あまりで確定できるスキャン速度が得られました。

Empirical Formula Confirmation Report

Empirical Formula: C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>CIN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S †Exact Mass: 284.01347 †Sample Name: 10 ng sulfa †Sample ID:  
 Data File Name: p:\Projects\sulfa 2\Data\10ng\_sulfa.wiff †Acq Time: May 08 2003, 12:05:38 PM



Species	Abundance (counts)	Target Mass (amu)	Measured Mass (amu)	Mass Error (m/z)	Mass Error (ppm)
[M+H] <sup>+</sup>	59329.42	285.02075	285.02019	-0.00056	-1.97
[M+Na] <sup>+</sup>	2799.10	307.00270	307.00248	-0.00021	-0.70

図 1. スルファクロロピリダジンに関する自動組成式確認レポート

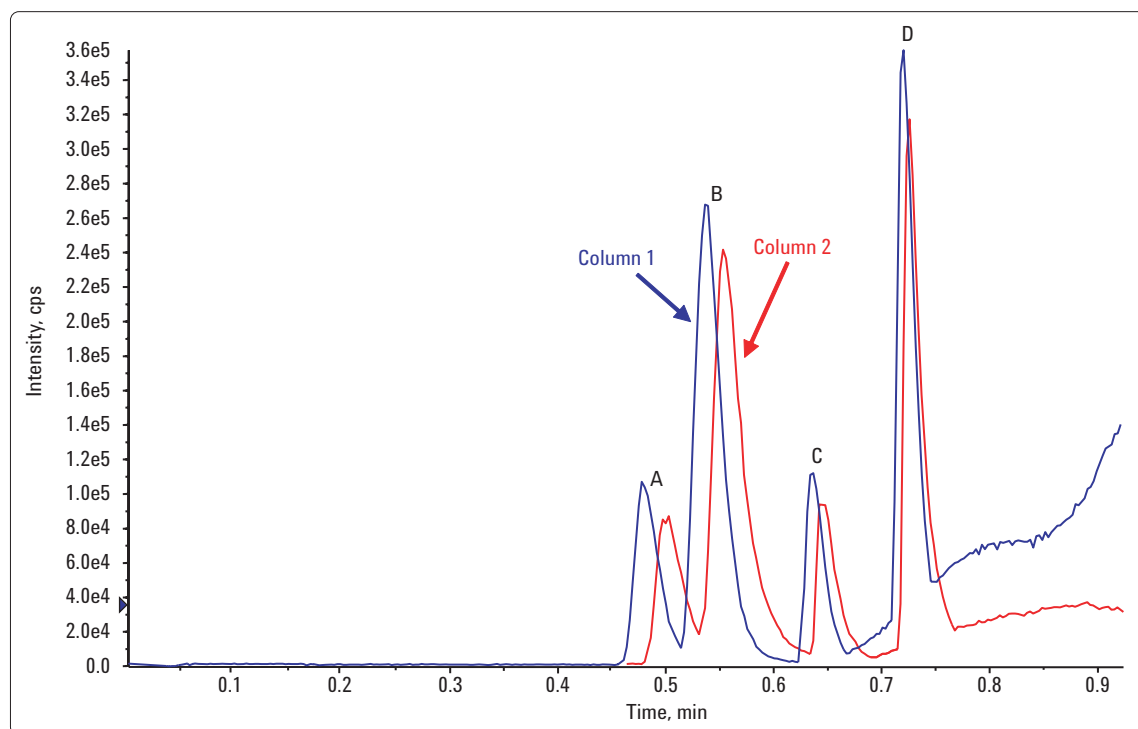


図2. それぞれのカラムでのサルファ剤の分離を示したクロマトグラム。ピークはそれぞれA) スルファメチゾール, B) スルファメタジン, C) スルファピリダジン, D) スルファメトキシシ

## 参考資料

1. "Time-of-Flight Mass spectrometry," Agilent Technologies Technical Overview, 2003, publication number 5989-0373EN
2. "High-Throughput HPLC-Alternating Column Regeneration with the Agilent 1100 Series Valve Solutions," Agilent Technologies Application Note, 2002, publication number 5988-7831EN

## 著者

Doug McIntyre は米国カリフォルニア州、サンタクララのAgilent Technologiesのアプリケーションケミストです。

お問い合わせ： 0120-477-111  
横河アナリティカルシステムズ株式会社  
〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

© Agilent Technologies, Inc. 2004

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

Agilentは、本文書に含まれる誤り、および本文書の内容または使用に関連して、付随的または間接的に引き起こされる損害について、一切の責任を負いません。

Printed in the U.S.A. February 27, 2004  
5989-0625JAJP

