

Agilent LC/MSD iQ 質量選択検出器と WalkUp ソフトウェアによる API の 迅速な純度確認

著者

Kyle Covert and Robert Ley
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

概要

このアプリケーションノートでは、UV ベースの分析に質量情報を追加することにより、クロマトグラフィーの効率が大幅に向上することを実証します。質量情報により、高速クロマトグラフィーメソッドで共溶出する化学種を容易に区別できます。これは特に、化合物応答が UV 検出器で十分でない場合や、発色団を含んでいない場合に有用です。場合によっては、UV 検出のみのワークフローよりも 100 倍優れた感度で、微量化合物を検出できます。このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab LC/MSD iQ システムと MassHunter WalkUp ソフトウェアを用いて、オープンアクセス環境で 22 種類の医薬品有効成分 (API) を分析して純度を求めました。InfinityLab LC/MSD iQ は、自動化された堅牢な質量検出器であり、標準 HPLC ワークフローに質量情報を追加します。MassHunter WalkUp は、LC/MS システムをオープンアクセス環境で使用できるようにするソフトウェアです。

はじめに

API の合成では、多数の反応ステップのモニタリングが必要になります。信頼性とコスト効率に優れた合成経路の確立には、各反応ステップにおいて全体の純度と収率を確認することが必要です。結果を迅速に得ることが、次の反応ステップでの適切な判断に重要です。質量情報を追加することにより、共溶出する成分の同定が可能となり、より高速な液体クロマトグラフィー分離メソッドを実行できます。さらに、質量情報の追加により、UV 検出を使用する際に必要な標準物質の分析を減らすことができる場合や、標準物質分析が不要になる場合があります。また、一部のラボでは、質量分析計を用いた分析の実行が複雑であるために、外部の分析グループと協力して API の純度をテストしています。InfinityLab LC/MSD iQ シングル四重極質量選択検出器と MassHunter WalkUp ソフトウェアを組み合わせると、直観的なオープンアクセスシステムで質量確認を実行できるため、こうした複雑さをなくすことができます。

InfinityLab LC/MSD iQ シングル四重極質量選択検出器は、信頼性が極めて高く、スマートな診断機能を備え、低流量から高流量にまで対応できます。また、自動測定モードと呼ばれるインテリジェントで自動化された取り込みモードでは、MS パラメータを自動的に最適化して最適な分析結果を提供します。既存の Agilent 1260 Infinity II または 1290 Infinity II LC スタックにこの検出器を追加するだけで、このシステムを構築できます。旧世代の Agilent LC ともシームレスに統合することが可能です。

MassHunter WalkUp ソフトウェアを使用すると、この機器をオープンアクセスシステムとして使用できます。WalkUp のユーザーには次の 2 タイプがあります。

- システム管理者
- 一般ユーザー

メソッドはシステム管理者によって管理され、管理された環境下でサンプルエントリーが可能になります。WalkUp は取り込みおよびデータ解析ソフトウェア上で動作するため、Agilent OpenLab CDS の知識がなくても機器を操作

することができます。図 1 に示す WalkUp の Rapid Sample Submission ユーザーインターフェースを使用するだけでサンプルをエントリーすることができ、使用のためのトレーニングはほぼ不要です。

The screenshot displays the 'Rapid Sample Submission' interface. At the top, it shows '0' for 'Queue Runtime'. The main form contains the following fields and controls:

- User Name:** chemist
- Password:** masked with dots
- Sample Name:** Amitriptyline
- Sample Count:** 1, with '+' and '-' buttons
- WalkUp Method:** Sample Purity
- Mass Confirmation:** 278

Below the form are 'Submit' and 'Cancel' buttons. To the right, under 'Select Method', 'Sample Purity' is selected, with a note '3 min ACU gradient'. At the bottom, a message reads: 'Please contact WalkUp Administrator in case of any errors/warnings. No Samples in Queue'.

図 1. Agilent MassHunter WalkUp ソフトウェアの Rapid サンプルエントリーユーザーインターフェース。一般ユーザーはログインして、ターゲット質量/名とともに分析メソッドを選択するだけです。測定およびデータ解析はバックグラウンドで自動的に実行され、分析者は分析結果の PDF レポートを電子メールで受け取ります。

実験方法

標準試薬および化学物質

すべての試薬と溶媒には、HPLC または LC/MS グレードのものを使用しました。アセトニトリルは Honeywell 社 (モリスタウン、ニュージャージー州、米国) から購入しました。すべての API 化合物は、Millipore-Sigma 社 (Merck、ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μmメンブレンフィルタカートリッジを備えた Milli-Q Integral システム (EMD Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を使用しました。

装置構成

以下のモジュールで構成されたシステムを用いました。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (G6160A)

DAD と Agilent 60 mm Max-Light カートリッジフローセル (G4212-60007) を使用して UV 検出器の感度を最大化しました。

サンプル前処理

API 標準物質を計量して 15 mL コニカルチューブに入れ、可溶性に応じて ACN または MeOH で濃度 10 μg/mL になるように希釈しました。サンプルは即時分析しました。また、室温で 3 か月にわたってサンプル溶液を放置し、保管による劣化をシミュレートしました。各 API のターゲットマスを整数質量で入力してサンプル純度分析を行いました。

表 1. API 化合物のリスト

API	整数質量 (Da)		
アミトリプチリン	277	ブスピロン	385
エリスロマイシン	733	クロザピン	326
カプトプリル	217	セチリジン	388
トラゾドン	371	パクリタキセル	853
パロキセチン	329	アスピリン	180
クロピドグレル	321	ロラタジン	382
フォシノプリル	563	フェキソフェナジン	501
ネファゾドン	469	フェニトイン	252
ゾフェノプリル	429	カフェイン	194
ノルエチンドロン	298	イブプロフェン	206
カルボプラチン	371	オメプラゾール	345

表 2. Agilent 1290 Infinity II LC 測定条件

パラメータ	HPLC の設定値	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、1.9 μm、40 °C (p/n 699675-902)	
移動相 A	0.1 % ギ酸 水溶液	
移動相 B	0.1 % ギ酸 ACN 溶液	
グラジエント	時間 (分)	%B
	0.00	5
	1.75	90
	2.90	90
	3.00	5
ポストラン	0.7 分	
流量	0.8 mL/min	
注入量	1 μL	
UV 検出	シグナル 254,5 nm/リファレンス 360, 80 nm	

表 3. 自動測定モードで設定された Agilent InfinityLab LC/MSD iQ のパラメータ

パラメータ	LC/MSD iQ の設定値
イオン源	ESI±
取り込みモード	自動測定モード
ポイント数/秒	2
スキャン範囲	m/z 100 ~ 1,000

OpenLab CDS

Agilent OpenLab CDS ソフトウェアを用いて、データ取り込み、データ処理、およびレポート作成を行いました。OpenLab CDS ソフトウェアはコンプライアンス機能を備えており、米国 FDA 21 CFR Part 11、EU Annex 11 など、各種規制のデータインテグリティに対応しています。1290 Infinity II LC と LC/MSD iQ は、GxP ラボのルーチンアプリケーションにおいて、信頼性と堅牢性に優れた LC/MS を実現できるように設計されています。

MassHunter WalkUp ソフトウェア

MassHunter WalkUp は、OpenLab CDS、ChemStation、MassHunter データ取り込みプラットフォームにアドオンできるオープンアクセスの Agilent ソフトウェアです。WalkUp は、標準データ取り込みソフトウェア上で動作する制御用ソフトウェアであり、サンプルをエントリーするためのシンプルなユーザーインターフェースを提供します。

結果と考察

サンプル純度の評価のための追加 MS 情報

HPLC ワークフローで UV 検出に MSD を加えると、分析に別の次元の情報を追加することができます。また MSD により、UV 吸収の乏しい化合物や活性発色団を含まない化合物を検出できます。UV 検出のみでは識別できない共溶出する成分について、明確な情報を得ることもできます。質量情報を活用することで、不純物の同定がより容易になり、標準溶液を分析してリテンションタイムを求める時間も不要となります。このため、各化合物の予測リテンションタイムを把握しなくても、サンプル純度を高速に評価できます。

API エリスロマイシンは十分な UV 吸収波長がないことが知られています。一方で不純物は API とは異なる波長で検出されます。多くの場合、不純物標準または有機反応中間生成物の入手は困難です。さらに、210 nm での API の吸光は、ノイズとの区別がほとんどつきません。これを確認するには、標準溶液を測定して予測リテンションタイムを求めるしかありません。

図 2 に、MS クロマトグラムで見ることができない質量検出のユーティリティを示します。整数質量 (733 Da) に基づいてエリスロマイシンとして同定された大きなピークがあることが分かります。質量情報がないと、どの UV ピークが不純物でどのピークが API なのかが不明確です。

Sample Purity Results

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

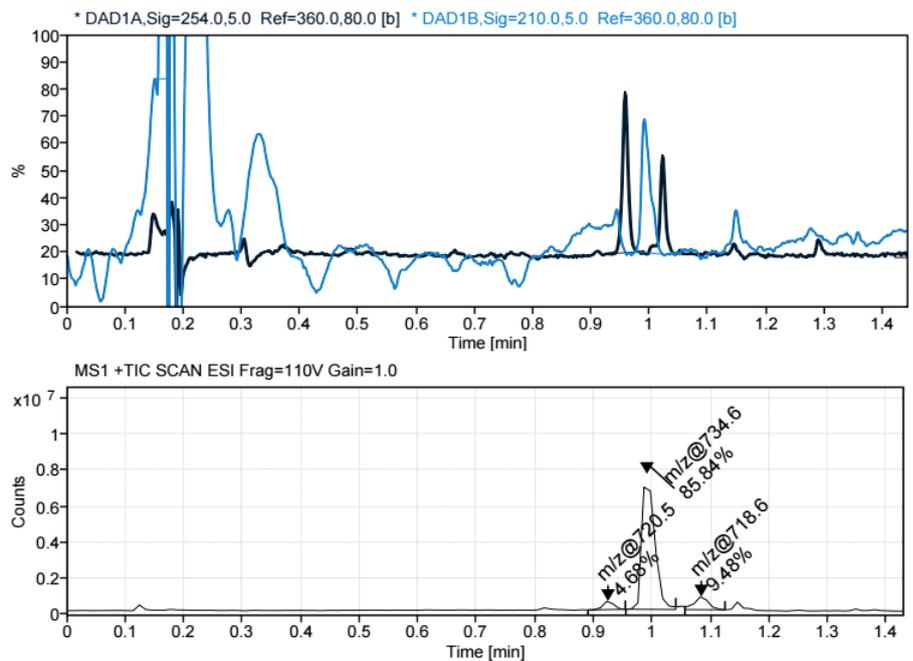


図 2. エリスロマイシンサンプルのサンプル純度の結果。上段に 254 nm (黒色) および 210 nm (青色) での UV クロマトグラム、下段にベースピーク m/z とピーク面積 % のラベルを付けた MS クロマトグラムを示します。MS データから、210 nm での分離ピークが API (~1.0 分) で UV 254 nm で検出された 2 個のピークが不純物であることを確認できます。

OpenLab CDS サンプル純度測定ワークフローによる効率的な反応モニタリング

OpenLab CDS は、データを自動的に処理してレポートを作成するワークフローを内蔵しています。確立されたメソッドを利用できるため、一般ユーザーはデータ解析を実行する必要がなく、貴重な時間を節約できます。サンプルの純度測定ワークフローでは、測定中にモニタリングするターゲットマスを最大 5 個入力できます。測定完了後に、スキャンシグナルから抽出されたターゲットマスの指定された付加体について、データ処理が自動的に実行されます。その後、ターゲット付加体の加算された EIC のリテンションタイムを基に、自動データ処理により、スキャンシグナル内のマッチングピークを検出します。ターゲットが見つかった場合、レポートに「found」と表示され、次の計算が実行されて TIC % または EIC/TIC % に基づいてサンプル純度を決定します。

このアプリケーションノートでは、図 3 のように、ポジティブ TIC % MS サンプル純度測定ワークフローに $[M+H]^+$ および $[M+Na]^+$ ターゲット付加体を選択して使用しました。さらに、ネガティブスキャンモード用に $[M-H]^-$ および $[M+HCOO]^-$ 付加体を選択しました。

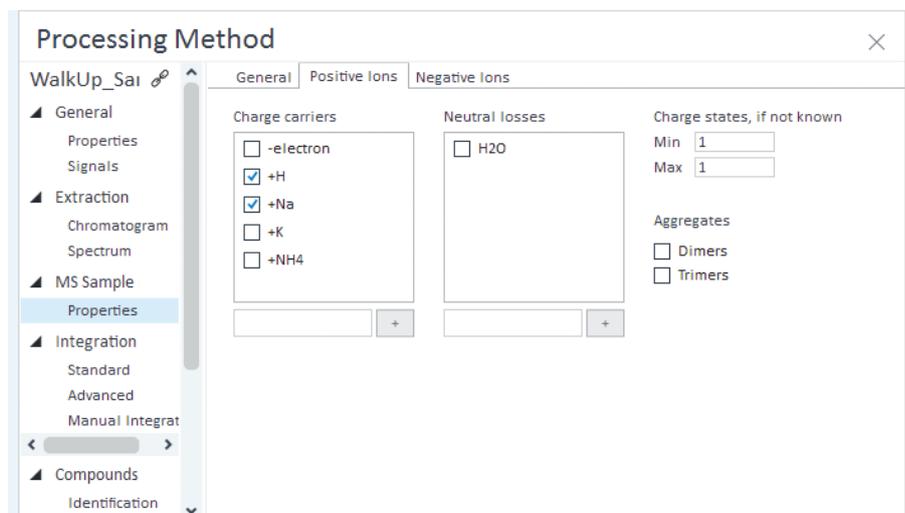


図 3. Agilent OpenLab CDS Data Analysis の解析メソッドタブ内の MS サンプル純度測定の方法パラメータ。MS サンプルの純度は TIC % 計算により求めました。ポジティブスキャンモード用に H^+ と Na^+ 付加体を選択しました。ネガティブスキャンモード用に $HCOO^-$ 付加体と脱プロトン化した分子を選択しました。パラメータが保存されると、すべての測定に対してデータ処理とレポート作成が自動的に実行されます。

図 4 に、OpenLab のデータ解析と、22 種類すべての API のサンプル純度の測定結果を示します。すべての注入結果を容易に一画面で表示でき、最小純度限度に適合しなかった API、または検出されなかった API は、赤色のフラグが付けられます。分析者は、図 6 に示すような API のサンプル純度レポートを受け取ります。

化学反応を推測するために重要な質量情報

合成経路全体の反応をモニタリングすることは、プロセスの適切な決定や必要に応じた調整のために重要です。最善策の決断には、高速で信頼できる測定結果が必要です。サンプル劣化のシミュレーション実験では、はじめにフレッシュなカプトプリルの希釈溶液の測定を行いました。210 nm での測定で、UV クロマトグラムに 1 つのピークが示されています。これは質量情報を基に API と確認されています。MS クロマトグラムに含まれるピークは 1 つのみで、ターゲット質量の EIC がこの単一ピークと一致しています。このためサンプル純度は 100 % です。ポジティブ MS ピークの質量スペクトルは、 m/z 218 と 457 の 2 つの質量を示しています。前者が API $[M+H]^+$ で後者がナトリウム付加のダイマー $[2M+Na]^+$ です。

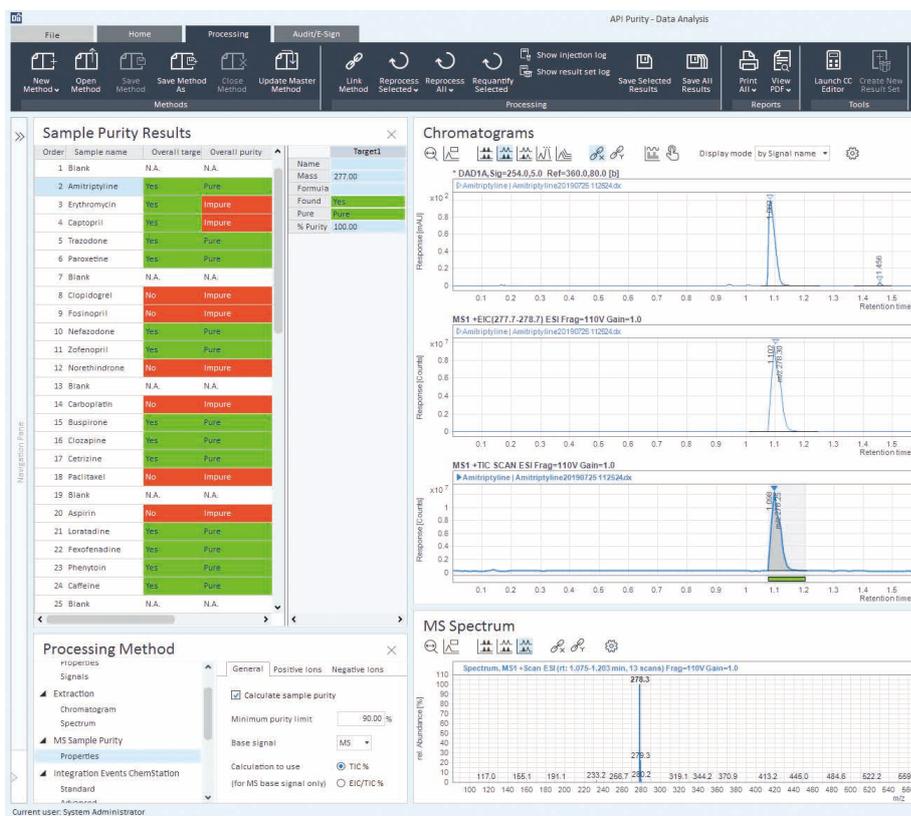


図 4. サンプル純度測定ワークフロー用の Agilent OpenLab CDS 2.4 データ解析の UI。サンプル純度結果ウィンドウに、一連の注入のサンプル純度測定結果が表示されます。各行にはサンプル名と、処理メソッドで設定したリミット値 (> 90 % が純粋) に基づいて、サンプルが純粋または純物でないのいずれかが表示されます。UV と MS クロマトグラムが右側に表示され、選択したピークの MS スペクトルが下に表示されます。

サンプル溶液を室温で3か月保管した後、MS クロマトグラムには2つのピークが検出され、ポジティブ/ネガティブスキャンモードのそれぞれのベースピークは m/z 218/216 と 433/431 でした。 m/z 218 は $[M+H]^+$ 付加体に相当しますが、 m/z 433 は新しい物質です。図 6B に示すように、254 nm での UV ピークは、 m/z 218 のターゲット質量ではなく、 m/z 433 の新しい物質で構成されます。カプトプリルの整数質量が 217 Da であるため、 m/z 433 は $[2M-2H+H]^+$ と考えられます。カプトプリルの構造 (図 5) を見ると、時間経過とともにジスルフィド結合が形成されたものと推定できます。このケースでは、API の分解生成物を決定するために質量情報が重要になります。 m/z 433 のジスルフィド結合されたダイマーの検出によって、カプトプリルのサンプル純度がわずか 58.49% であることがわかります。

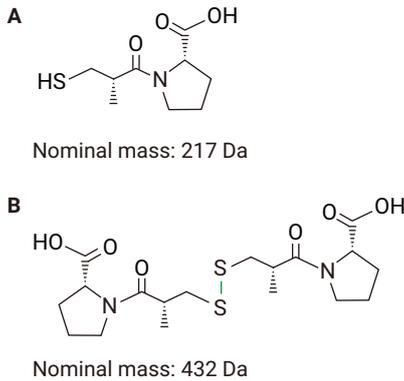


図 5. カプトプリルとジスルフィド結合されたダイマーの分子構造

Sample Purity Results

Target mass	Target found in analysis	Purity (%)	Purity result
217.0	Yes	100.00	Pure

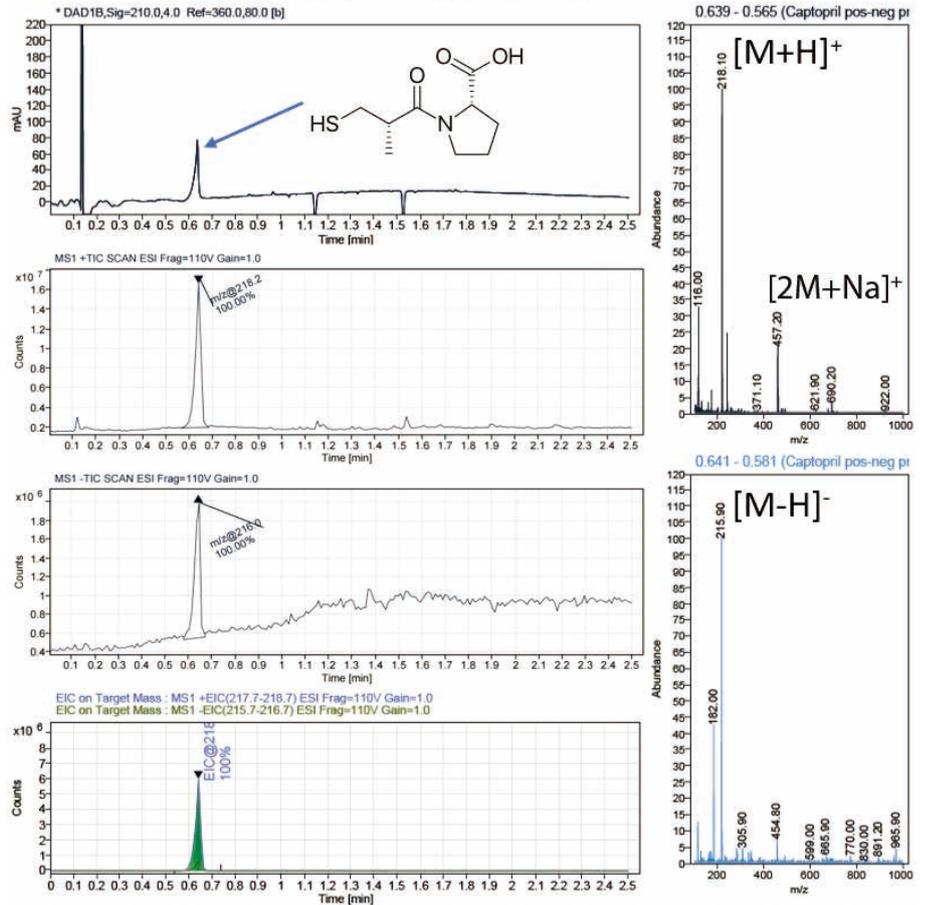


図 6A. 新しく調製したカプトプリルの測定結果。レポートには、サンプル純度の測定結果と、UV およびベースピーク m/z ラベル付きの MS のクロマトグラムが含まれます。どのピークが API を構成するかを示すターゲット化合物の EIC もレポートされます。右側には MS スペクトルが示され、注釈として手入力の付加体ラベルが付けられています。

質量情報は API の純度を確認する場合に有用です。質量選択検出器を使用すると、共溶出成分を区別できる機能によって生産性が向上します。分析に質量情報を加える InfinityLab LC/MSD iQ は、サンプル純度測定ワークフローにおいて UV 検出と組み合わせるシステムとして最適です。質量情報は、UV の吸光が弱いサンプルや標準物質を入手しにくい場合に重要です。MassHunter WalkUp は、質量分析の知識がなくても、複数のユーザーが直観的なユーザーインターフェースからサンプルをエントリすることができます。MassHunter WalkUp ソフトウェアと InfinityLab LC/MSD iQ と組み合わせることで、真のオープンアクセス体験を実現し、高速に結果が得られ、短時間で判断しなければならないラボでの貴重な時間を節約できます。

Sample Purity Results

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

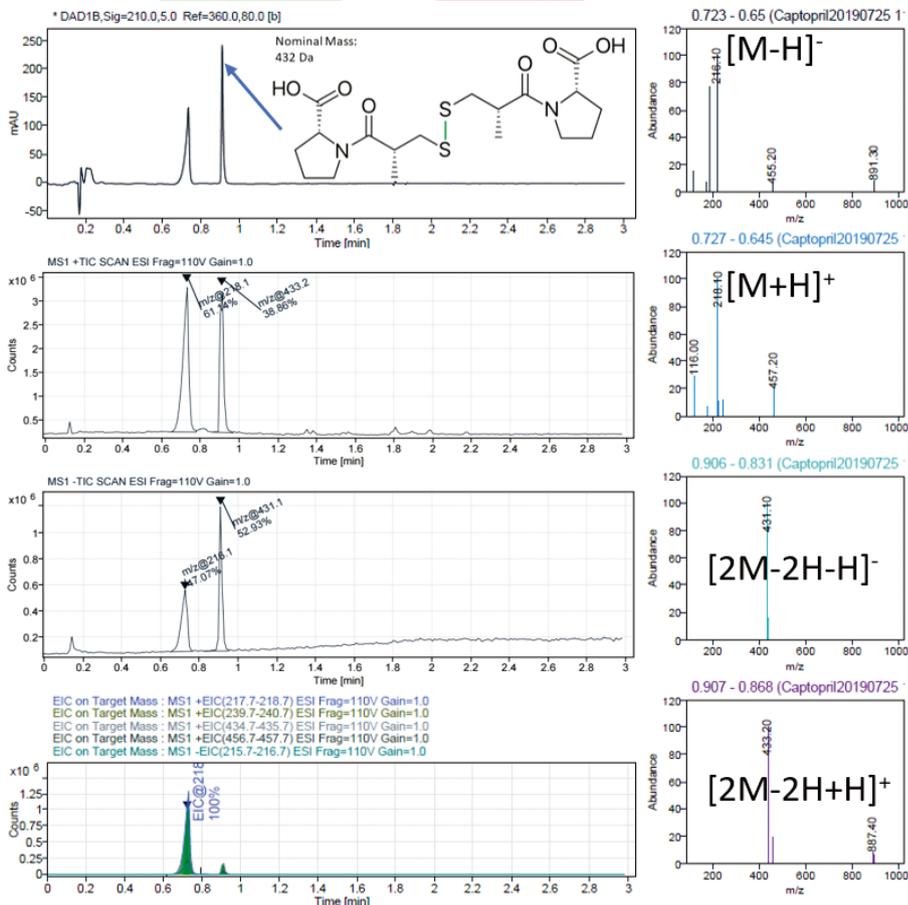


図 6B. 室温で3か月保管した後のカプトプリルサンプルの測定結果。0.9分時に m/z 433 の新しい物質があります。2つの API 分子間にスルフィド結合が形成された可能性が示されています。質量情報によって、新しい物質を容易に同定できます。レポートは WalkUp によって自動的に作成され、ユーザーに直接電子メールで送信されます。右側には MS スペクトルが示され、注釈としてマニュアル入力の付加体ラベルが付けられています。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
 © Agilent Technologies, Inc. 2019
 Printed in Japan, November 8, 2019
 5994-1503JAJP
 DE.8889814815