

Agilent OpenLab CDS と質量分析計による ハイスループット純度測定の自動化

パート I: LC/MS を用いたサンプル純度の測定

著者

Hua Dong
Agilent Technologies, USA

Leo Wang
Agilent Technologies, USA

Doug McIntyre
Wiefling Consulting, USA

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent OpenLab CDS ソフトウェアを用いた化合物確認およびサンプル純度測定ワークフローの簡素化と自動化について説明します。このアプリケーションノートで用いたデータは、ハイスループットの Agilent InfinityLab 液体クロマトグラフィー / 質量選択検出器 XT (LC/MSD XT) と、Agilent OpenLab CDS ソフトウェアで作成しました。このシミュレートしたサンプル純度実験では、分解されやすいようにさまざまな医薬品を 4 か月間冷蔵保管した後、LC/MS で分析しました。分解サンプルのサンプル純度を求めるために、得られたデータの処理、データレビュー、レポート作成を完全に自動化しました。色分けされたバッチサマリー表示とレポートにより、純度測定結果を視覚化でき、バッチ内の分解サンプルを素早く見つけることができます。

はじめに

純度測定は多くのラボにとって重要な作業です。有機化学の研究者は、同定した化合物の確認や合成プロセスにおける収率の推定に純度分析を用います。医薬品の研究者は通常、生物学的研究に進む前に合成した医薬品の純度を測定します。製剤の研究者は製剤の最適化や保管に関する注意を規定する際に、純度測定の結果を利用します。医薬品 QA/QC ラボでは、医薬品の中間体や最終製品が品質管理規定値内かを確認するために純度分析を日常的に実施します。

LC/MS が純度測定に用いられる理由は、感度や幅広い化合物に対するレスポンスが良好で、そしてなにより、質量電荷比 (m/z) という化合物特有の物理化学的特性に基づいて化合物を区別する選択性があるためです。よって、LC/MS を用いて純度を測定することで、測定結果の信頼性が大幅に向上します。

意思決定を迅速にするために、研究者はセントラルラボやコントラクトラボの分析サポートサービスに依頼するより、自分自身で純度測定を実施する方を好みます。しかし、主に次の3つの点が、研究者自身がサンプルを分析する障壁となっています。1) LC/MS 機器への自由なアクセスが必要、2) LC/MS システムの操作や MS データの解釈方法の習得にトレーニングが必要、3) 質量分析計の設置にラボのスペースが必要。ここで紹介するソリューションは、OpenLab CDS に組み込まれた自動化ワークフローによって、この3つの課題を解決します。OpenLab CDS により、研究者はMS データを解釈せずに、純度結果を迅速に得ることができます。占有スペースが大幅に削減されるため、小さなラボスペースに合わせて質量選択検出器と LC モジュールを積み重ねることが可能です。

このアプリケーションノートでは、Agilent OpenLab CDS ソフトウェアを Agilent InfinityLab 液体クロマトグラフィー / 質量選択検出器 XT (LC/MSD XT) とともに使用し、いくつかの医薬品をシミュレートした保管分解実験で化合物の確認およびサンプル純度分析を自動化する方法について示します。この構成により、研究者はサンプルの純度を迅速に決定することができます。

実験方法

標準試薬および化学物質

標準試薬の塩酸ブスピロン、塩酸アミトリプチリン、塩酸ネファゾドン、クロビドグレル硫酸塩、パクリタキセル、フォシノプリルナトリウムは、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から購入しました。これらの化合物の分子量は 277 から 853 であり、これらを用いることで化合物のサイズに関する LC/MS の幅広い適用性の実証ができます。

すべての標準試薬の各原液の濃度は 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、アセトニトリル (ACN) で調製しました。原液は 4 か月間冷蔵保管した後、20 % ACN 溶液で 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ の作業溶液を調製しました。次にこれらの作業溶液を分析して、4 か月保管後のサンプル純度を求めました。

LC/MS 機器および分析

Agilent シングル四重極 InfinityLab LC/MSD XT システムを用いて LC/MS 分析を実施しました。このシステムには、Agilent Jet Stream (AJS) 技術によるエレクトロスプレーイオン (ESI) ソース付のシングル四重極質量分析計、Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ、サンブラ、ダイオードアレイ検出器が含まれます。

4 分間の一般的なハイスループット LC 分離を 2.1 x 50 mm Poroshell 120 EC-C18 カラムにおいて、移動相に水と 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液を用いて実施しました。LC/MSD システムはポジティブ ESI モードで、1 秒あたり 2 スキャン、100 ~ 900 m/z のフルスキャンスペクトルで測定しました。

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.2 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しました。

結果と考察

化合物確認

LC/MS は化合物の確認に最適なツールです。これは、通常の条件下で、少量のフラグメントイオンとともに、分子量を示すイオンを生成するためです。LC/MS 分析をポジティブイオンモードで実施したとき、分子量 M の化合物は通常、プロトンが付加した $[M+H]^+$ イオンを生成します。例えば、分子量 853.9 のパクリタキセルは通常、 m/z 854.3 (プロトン化したモノアイソトピック質量) のイオンを生成します。LC/MS 分析に用いる移動相によっては、 $[M+NH_4]^+$ または $[M+Na]^+$ が生成される場合もあり、イオンの m/z はそれぞれ 871.3 または 876.3 になります。ネガティブイオンモードでは、水酸化物の引き抜きによりプロトンを失って $[M-H]^-$ イオンを生成し、場合によっては $[M+Cl]^-$ または、 $[M+CH_3COO]^-$ イオンを生成します。

分子量が既知の場合、抽出イオンクロマトグラム (EIC) を用いて、予想される化合物が存在するかどうかを確認することができます。EIC の大きなシングルピークが、トータルイオンクロマトグラム (TIC) の大きなピークと時間的に重なる場合、予想される化合物が確実に存在したと考えられます。

サンプル純度の推定

サンプル純度は EIC のピーク面積の合計または TIC のシングルピークの面積と TIC の他のすべてのピーク面積の合計を比較することにより推定します。例えば、EIC のピーク面積が 950,000 カウントで、TIC の他のピーク面積の合計が 50,000 カウントの場合、サンプルの純度は 95 % と推定できます。

イオン化効率 (ひいては MS レスポンスファクター) は、化合物間で大きく異なるため、多くの研究者は「汎用性の高いレスポンス」が得られる検出器 (UV や DAD などの分光検出器) を用いてサンプル純度を推定することを選びます。一般的には UVD を用いますが、蒸発光散乱検出器 (ELSD) を用いる場合もあります。検出器を直列に配置した場合、カラムから溶出される同じ化合物が、UVD や ELSD と MSD クロマトグラムでは異なったリテンションタイム

で示されます。このため、MSD とサンプル純度の計算に用いる検出器のクロマトグラムにはシグナルのディレイタイムを適用する必要があります。

シグナルのディレイタイムを考慮して MSD EIC での化合物のリテンションタイムを使用し、他の検出器における化合物のピークを見つけます。ピーク面積パーセントは、サンプル純度の測定値となります。図 1 に保管中に分解したパクリタキセルの純度の算出方法を示します。UV シグナルレスポンスに基づく、パクリタキセルは 97 % の純度を維持しています。

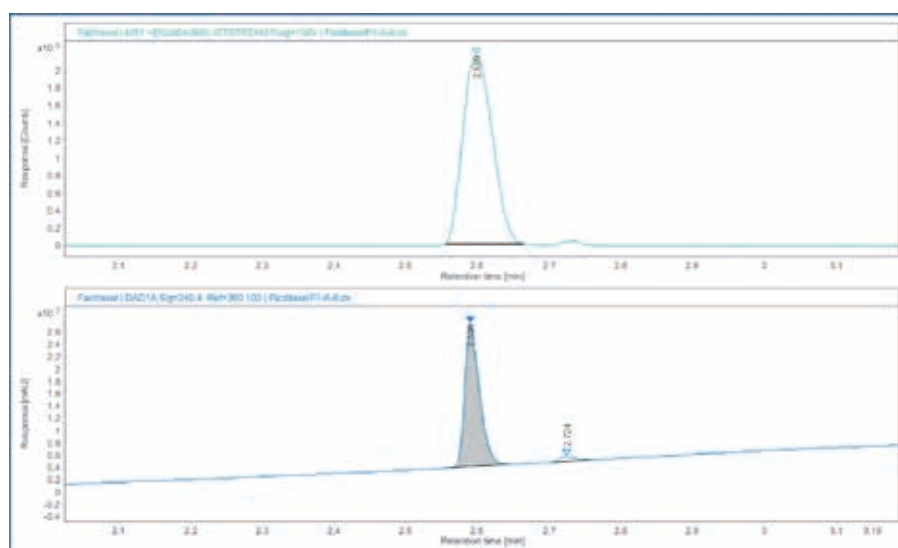


図 1. MSD 分析でのわずかなディレイタイムを調整したリテンションタイムでのパクリタキセルの $[M+H]^+$ の EIC と UV クロマトグラム

データ解析およびレポート作成の自動化

OpenLab CDS により、研究者はデータシステムのトレーニングや MS データの解釈の経験がほとんどなくても、推定純度で化合物同定を確認するレポートを迅速に作成することができます。サンプルまたはサンプルセットを提示する際に、研究者はこのソフトウェアで自動的にデータを解析し、レポートを作成するために使用するターゲット化合物の分子量 (モノアイソトピック質量) または分子式を指定します (図 2)。

解析メソッドウィンドウで OpenLab CDS のパラメータを指定し、シグナルのディレイタイム、積分パラメータ、可能性のある付加体、純度のカットオフ値、純度計算に使用するシグナルの選択などから、サンプル純度を計算します (図 3)。大半のサンプルの純度分析には 1 つの解析メソッドを使用しますが、OpenLab CDS ではサンプル純度を分析する別のメソッドを指定することもできます。研究者は変更した分子量または化学式を入力することによりデータを後で再解析することもできます。これは最初のデータ入力時に誤りがあった場合に非常に有用です。

	State	Vial	Acq. method	Proc. method	Sample name	Target 1	Volume
1	Completed	P1-A7	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Solvent		3
2	Completed	P1-A1	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Buspirone	385.2	2
3	Acquiring	P1-A2	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Anilindiphenol	277.2	2
4	Pending	P1-A3	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Clopidogrel	C16H18ClNO2S	2
5	Pending	P1-A4	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Nefarodone	C25H32ClNSO2	2
6	Pending	P1-A5	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Fosinopril	563.3	2
7	Pending	P1-A6	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Paditaxel	553.3	2

図 2. シーケンステーブルの例。「Target1」カラムには予想される化合物の化学式か分子量のいずれかを研究者自身が入力します。

図 3. 測定するサンプル純度の解析メソッドの設定。この設定では、サンプル純度はカットオフ値が 80 % で +H と +Na 付加を考慮し、TIC で計算します。

サンプル分析およびデータ解析後のサンプルバッチの結果は要約表 (図 4)、あるいは EIC、TIC、および UV シグナルでそれぞれのサンプルごとに確認できます (図 5)。色分けされているため、問題のあるサンプルを迅速に判断できます。図 4 に示したように、ブスピロン、アミトリプチリン、ネファゾドンおよびクロピドグレルは純度のカットオフ値 80 % に適合しましたが、パクリタキセルおよびフォシノプリルは適合しませんでした。図 5 に示したように、特定のサンプルを確認することにより、正確に計算した純度と TIC で積分したすべてのピークの質量スペクトルを得ることができます。質量スペクトルにより、不純物の性質について有用な情報が提供されます。

Sample Purity Results

Order	Sample name	Data file	Overall targets found	Overall purity
1	Solvent	SolventP1-A7.dx	N.A.	N.A.
2	Bupirone	BupironeP1-A1.dx	Yes	Pure
3	Amitriptylene	AmitriptyleneP1-A-2.dx	Yes	Pure
4	Clopidogrel	ClopidogrelP1-A-3.dx	Yes	Pure
5	Nefazodone	NefazodoneP1-A-4.dx	Yes	Pure
6	Fosinopril	FosinoprilP1-A-5.dx	Yes	Impure
7	Paclitaxel	PaclitaxelP1-A-6.dx	Yes	Impure

図 4. サンプル純度結果の要約表。色分けによりパクリタキセルおよびフォシノプリルナトリウムが指定した純度のカットオフ値 80 % に適合しないことを示しています。

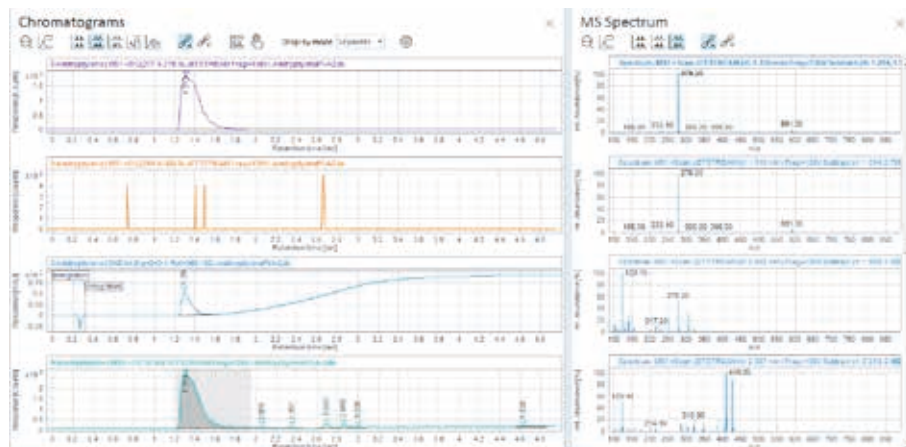


図 5. アミトリプチリンの特定のサンプルデータレビューで、EIC、TIC、UV シグナルおよび TIC で積分したピークの質量スペクトルを示しています。

標準搭載されたレポートテンプレートを用いれば、化合物が検出されたかどうかを示すサンプル純度のレポートとサンプルの推定純度が、サンプル分析後に自動的に作成されます(図 6)。レポートが色分けされていることで、化合物が検出されたか、また必要な純度かどうかを簡単に判断することができます。

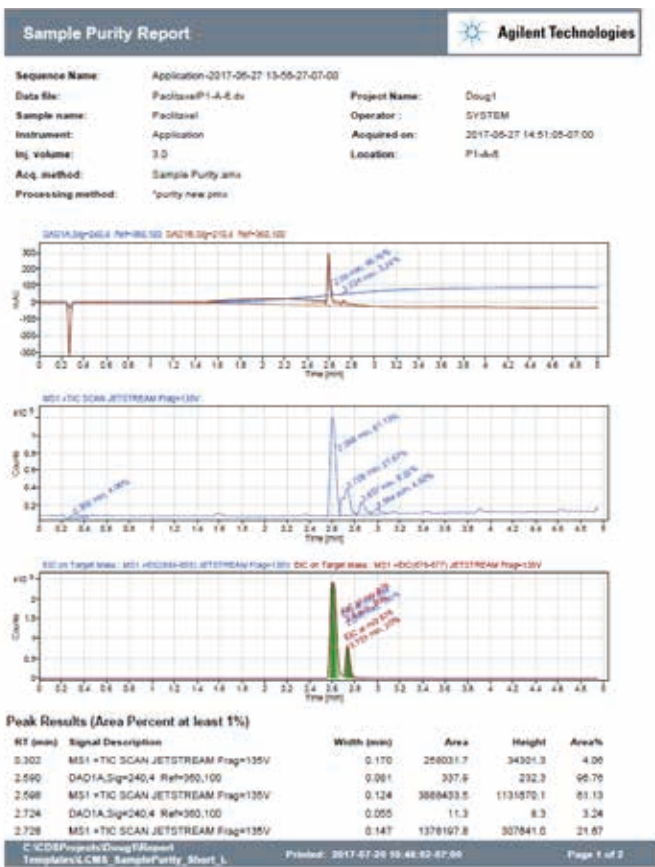


図 6. 典型的なサンプルの純度レポート。この場合、TIC シグナルに基づいて純度のカットオフ値 80 % を指定しています。パクリタキセルが検出 (緑表示) されましたが、サンプルでのパクリタキセルの純度は 61 % であり、カットオフ値を下回っています (赤表示)。

ワークフローの自動化

OpenLab CDS を用いればサンプル純度測定ワークフローを自動化できます。図 2 に示したように、サンプル情報、ターゲット質量、解析メソッドをシーケンステーブルで簡単に管理することができます。レポート設定では、OpenLab CDS レポートモジュールを用いてカスタマイズすることで、さまざまな目的に合わせる事が可能です。図 7 に示すように、選択したレポートテンプレートを解析メソッドに統合し、レポート作成と印刷を自動化することができます。

結論

OpenLab CDS はサンプル純度測定における簡単に自動化できるソリューションです。システムのトレーニングや MS データの解釈の経験がほとんどない研究者でも、外部の分析サービスに依頼せずに、サンプル純度の結果を迅速に得ることができ、ラボのスループットが向上します。

大量のサンプルでも、サンプル純度結果の色分けされた概要表により、純度の低いサンプルを簡単に見つけることができます。サンプルごとの確認では、不純物の情報をさらに得るために、EIC、TIC や UV シグナル、正確に計算した純度および TIC で積分したすべてのピークの質量スペクトルを研究者が精査することができます。パワフルで柔軟性のある OpenLab CDS のレポートテンプレートには、

標準搭載の計算機能と結果を色で分類する機能があり、サンプルの純度結果 (化合物の検出の可否および推定純度) を簡単に視覚化できます。サンプル純度のレポートはサンプル分析後に自動的に作成できます。

研究者は、例えば誤った化学式を入力した場合でも入力したサンプルの情報を簡単に変更できます。つまり、サンプルを再注入する必要がなく、迅速に再解析することができます。サンプル純度ワークフロー全体を OpenLab CDS で自動化できるため、ハイスループットラボの生産性が大幅に向上します。

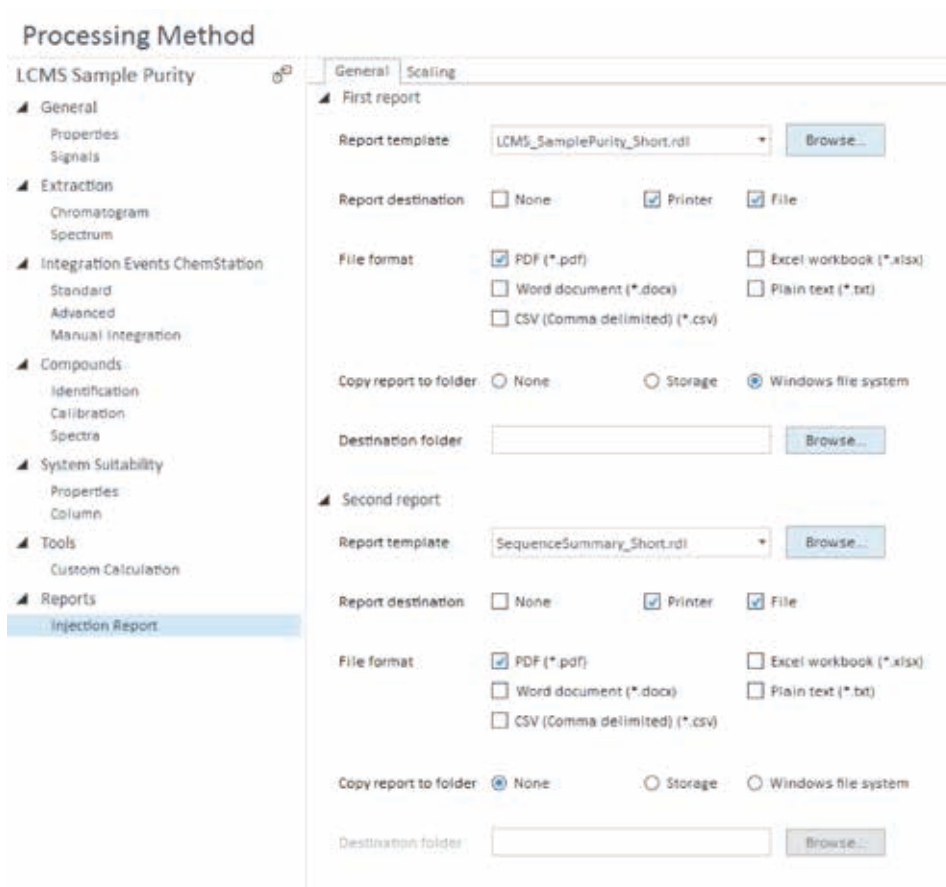


図 7. ワークフロー自動化のレポート設定

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. 2018
Printed in Japan, May 17, 2018
5991-9085JAJP

