유기합성 화학자를 위한 Agilent LC/MSD XT 단일 사중극자 오픈 액세스(open access) 시스템

몇 번의 클릭만으로 자동화되고 빠르며 확실한 LC/MS 분석 수행

응용 자료

의약품 및 바이오의약품

저자

Siji Joseph
Agilent Technologies, Inc.

Agilent 1260 Infinity II LC 시스템과 구성한 Agilent LC/MSD XT

개요

화합물 식별, 순도 분석 및 불순물 검출은 신약 개발 과정에서 이루어지는 중요한 분석 측정의 일부입니다. 제약 산업의 생산성 향상을 위해서는 보다 빠르고 정확한 측정을 제공는 비용 효율적인 첨단 기술이 이상적입니다. Agilent LC/MSD XT를 오픈 액세스 모드에서 사용하면 화합물 확인, 순도/불순물 분석 등의 업무를 자동화하고 최적화하는 데 뛰어난 사용자 유연성을 제공하게 됩니다. Agilent 1260 Infinity II LC 및 단일 사중극자 기술 기반 LC/MSD XT는 모두 매우 견고하여 오픈 액세스 실험실에 적합합니다. Agilent MassHunter Walkup 소프트웨어는 기존의 다중 사용자 환경에서 이루어지는 다양한 종류의 복합 LC/MS 분석에 사용하기 위해 시료 제출 과정을 단순화하도록 설계되었습니다. 애질런트 LC/MS 오픈 액세스 시스템과 MassHunter Walkup 소프트웨어를 함께 사용하면 화학 연구자들은 최소한의 교육만으로도 스스로 시료를 분석할 수 있게 되는데, 이는 소프트웨어가 자동으로 데이터 분석 및 보고서 작성 과정을 단순화시켜 실행하기 때문입니다.

Agilent Technologies

소개

LC/UV 분석은 의약품 제조 업체와 위탁 연구 기관에서 순도 분석에 광범위하게 적용하는 분석 기술입니다. 더불어 LC와 MSD의 결합으로 정량 및 정성 특성화를 위한 화합물 식별 및 순도 분석에서 더 높은 신뢰성을 확보할 수 있습니다. 동급 최고 성능을 자랑하는 LC/MSD 하드웨어 및 소프트웨어는 다중 사용자 환경에서 저분자와 생체분자에 대한 walk-up LC/MS 분석법을 지원하도록 설계되었습니다. 사용자는 시스템 운영을 위해 애질런트 ChemStation 이나 애질런트 MassHunter 소프트웨어에 익숙해질 필요 없이 오직 간단한 시료 제출 절차만 수행하면 됩니다.

관리자는 교육을 이수하지 않은 사용자도 화합물 확인, 순도 검사, 불순물 식별 등의 다양한 고급 과정을 즉시 수행할 수 있도록 LC/MSD 시스템을 설정할 수 있습니다. 이제 유기합성화학 실험실에서는 간소화되고 직관적인 소프트웨어 인터페이스와 견고한 하드웨어를 결합하여 우수한 품질과 신뢰성을 갖춘 LC/MS 분석을 수행할 수 있습니다.

오픈 액세스(Open Access) 기기 구성

애질런트 Walkup 하드웨어

애질런트 LC/MSD Walkup 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성됩니다.

- Agilent 1260 Infinity II binary pump(G7112B)
- 외부 트레이(p/n G1313-60004) 및 배출 튜브(p/n G1313-27302) 장착된 Agilent 1260 Infinity II 자동 료 주입기(G7129A)
- Agilent Max-Light 카트리지 셀 장착 Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 HS(G7117C)
- 양이온 수집 모드와 음이온 수집 모드 사이에서 30ms의 빠른 극성 전환이 가능한 Multimode 이온화원 사용 LC/MSD XT 시스템

이 Multimode 이온화원은 기분무 이온화(ESI) 및 대기압 화학 이온화 (APCI) 기능을 하나의 이온화원에 구현한 것으로 ESI 전용, APCI 전용 또는 ESI/APCI 혼합 모드로 사용할 수 있습니다. 빠른 극성 전환 기능을 지닌 Multimode 이온화원과 LC/MS Walkup 소프트웨어를 결합하면 간소화된 사용자 경험 안에서 광범위한 분자 특성에 대한 보편적인 검출이 가능하게 됩니다.

애질런트 Walkup 소프트웨어

애질런트 MassHunter Walkup은 애질런트 OpenLAB과 통합될 수 있으며 관리자가 여러 대의 시스템을 원격으로 관리할 수 있습니다. MSD Walkup 설정에 사용되는 소프트웨어 패키지는 다음과 같습니다.

- LC 및 LC/MS 시스템용 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, Rev. C.01.07
- LC/MS 및 LC 시스템용 Agilent MassHunter Walkup 소프트웨어, V: C.02.01.
- Analytical Studio Reviewer(ASR), V: G3772AA, B.02.01.

애질런트 MassHunter Walkup의 관리자 버전 소프트웨어는 사용자, 분석법, 기기 구성, 보고서 작성 등에 대한 관리를 지원합니다. MassHunter Walkup 관리자 버전 소프트웨어에 대한 자세한 내용은 애질런트 발행물 5991-6534EN을 참조하십시오.

MassHunter Walkup 소프트웨어는 쉽고 간편하게 사용할 수 있는 소프트웨어입니다. 시퀀스 생성, 분석법 선택, 시료 로딩 절차가 모두 직관적이고 LC/MS 하드웨어 또는 소프트웨어에 숙련되지 않은 사용자라 할지라도 이용이 가능합니다. 사용자 시료 로딩 절차에 대한 자세한 내용은 응용 자료 5991-6535EN을 참조하십시오.

Walkup 소프트웨어는 외부 트레이 상의 바이알 위치를 제안(최대 17개의 바이알)하며 사용자가 원하는 대로 시료의 우선순위를 정할 수 있습니다. 또한 Walkup 관리자 인터페이스를 사용해 주입된 바이알의 자동 폐기(지연 선택 가능) 기능을 설정할 수 있습니다.

애질런트 Walkup 소프트웨어는 자동 데이터 처리 및 보고서 이메일 발송 기능을 사용하도록 구성할 수 있습니다. Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition 또는 Agilent Analytical Studio Reviewer(ASR)는 개별 또는 일괄 보고서를 생성하는 기능과 함께 원하는 정보를 표시할 수 있도록 맞춤 설정 기능도 지원합니다.

실험 세부 정보

화학 물질 및 시약

메탄올은 LC/MS 등급으로 LC/MS 용리액 첨가제 등급의 포름산 암모늄 및 플루오르화 암모늄이 사용되었습니다 (Sigma-Aldrich, USA). 모든 실험에서는 Milli-Q 증류수가 사용되었습니다 (Merck, Darmstadt, Germany). 그 외 모든 화학 물질 및 표준물질은 Sigma-Aldrich(USA) 제품을 사용했습니다. 또한 Sigma-Aldrich (USA)사로부터 20종의 화합물 라이브러리를 구매하였으며 이를 Walkup 실험의 시연에 사용했습니다.

분석법 파라미터

본 작업에 사용된 18개의 화합물로 구성된 라이브러리는 넓은 극성 범위를 가진 분석물질을 포함합니다. 극성 범위에 따라 서로 다른 3개의 Walkup 분석법을 개발하여 사용자는 리스트에서 분석물질의 예상되는 극성에 맞는 분석법을 선택하게 하였습니다. 표 1은 극성, 비극성, 높은 비극성으로 구성된 3개의 그레디언트 프로그램을 나타냅니다. Agilent LC/MSD XT는 최대 3,000Da의 질량대 전하비 데이터를 수집할 수 있지만 여기서는 저분자 라이브러리 시료의 분석을 위해 질량 범위를 100 ~ 1,000Da으로 설정했습니다. 표1 및 2는 LC 및 MS 기기 파라미터를 나타냅니다.

결과 및 토의

신속한 화합물 확인을 위한 Agilent LC/MSD XT 오픈 액세스 시스템

Agilent LC/MSD XT 오픈 액세스 시스템은 Multimode 이온화원을 갖추고 있습니다. 이는 높은 범용성을 지닌 이온 소스로, ESI와 APCI를 동시에 지원합니다. 오픈 액세스 환경에서 화합물 확인을 빠르게 수행하는 Multimode 이온화원의 장점은 다양한 생리 화학적 특성을 지닌 18개의 저분자 시료의 라이브러리 스크리닝을 통해 확인할 수 있습니다. 또한 양이온 및 음이온 극성 전환 모드로 Multimode 이온화원을 사용하면 광범위한 화학종에 대한 이온화 가능성을 높여줍니다.

표 1. Agilent 1260 Infinity II LC 분석법 파라미터

파라미터	값			
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120, EC-C18, 2.1 × 50mm, 2.7µm, 온도: 45°C			
이동상 A	5mM 포름산 암모늄 및 1mM 플루오르화 암모늄 수용액			
이동상 B	5mM 포름산 암모늄 및 1mM 플루오르화 암모늄 메탄올 용액			
그레디언트	시간	%B		
		Gradient 1[a]	Gradient 2[b]	Gradient 3[c]
	0	15	50	70
	0.7	60	85	95
	2	60	85	95
Post run	2분			
유량	0.6mL/분			
주입량	1µL, 아세토니트릴로 니들 세척, flush port 7초간 작동			
UV 검출	254nm, Agilent 10mm Max-Light 카트리지 플로우 셀 사용			
수집 속도	40Hz			

[a] 극성 화합물용
[b] 비극성 화합물용
[c] 높은 비극성 화합물용

표 2. Agilent 6135B MSD Multimode 파라미터

파라미터	값
이온화원	Multimode
극성	양이온 및 음이온
건조 가스 온도	250°C
건조 가스 유량	6L/분
분무기 압력	30psig
Vaporizer 온도	250°C
캐필러리 전압(양극)	2,000V
노즐 전압(양극/음극)	2,000/2,000V
코로나 전류(양극/음극)	1/1µA
하전 전압(양극/음극)	2,000/2,000µA
피크 너비	0.02분
이온화 전환 지연 시간	50ms
극성 전환 지연 시간	30ms
MS 검출 신호	1. ESI 양이온 2. APCI 양이온 3. APCI 음이온 4. ESI 음이온
스캔 범위(*m/z*)	100 ~ 1,000m
Fragmentor 전압	양이온 모드: 160V 음이온 모드: 130V
Gain	1
임계값	50

한편 오픈 액세스 환경에서 화합물 확인을 위해 2분 정도 소요되는 짧은그레디언트 분석법을 사용하여 각각의 시료를 LC/UV/MSD 시스템에 주입하였습니다. LC 그레디언트는 각 분석물질의 극성에 알맞게 선택했습니다. UV 검출은 흡광도에 의한 일반적인 화합물 검출 방법입니다. 여기에 MSD를 추가로 적용하면 사용자는 분자 질량을 기반으로 표적 화합물을 확인할 수 있게 됩니다. 표 3은 본 연구에 사용된 화합물 목록을 나타냅니다.

결과표를 통해 음이온 및 양이온 극성 모드의 Multimode 이온화원을 사용한 MSD를 추가하는 경우의 장점을 확인할 수 있습니다. 예를 들어 sodium hexane sulfonate은 UV를 흡수하지 않았지만 음이온 모드의 MSD에서 검출되었습니다. 그 외 다른 여러 분석물질의 경우에도 ESI 양이온 모드보다 APCI 양이온 모드를 사용하는 편이 더 우수한 것으로 드러났습니다. 또 다른 예로 pravastatin은 양이온 모드를 사용하는 경우보다 음이온 모드를 사용할 때 감응이 더 높았습니다.

MSD 검출을 통한 화합물 확인의 신뢰도 증가

MSD로부터 얻은 분자 질량 정보는 UV 검출을 통한 순도 분석 결과의 신뢰도를 보완하는 역할을 합니다. Sulfamethizole(분자량 270)의 경우, 극성 화합물에 대한 그레디언트 1 조건을 사용하여 분리하였으며 UV 및 MSD 데이터를 수집했습니다. 용리 시간은 0.4분이었으며 화합물 순도는 UV 검출 결과 99% 이상인 것으로 나타났습니다. Multimode 이온화원을 통해 양이온 모드 및 음이온 모드에서 관측한 *m/z* 값은 각각 271*m/z* 및 269*m/z*이었습니다. 이렇게 MSD에서 얻어진 분자량 정보는 표적 화합물 확인에 도움이 되었습니다.

표 3. 사용된 화합물 목록

화합물	명칭	분자량
1	Pemirolast	228
2	Sulfamethizole	270
3	Sulfamethazine	278
4	Sodium hexanesulfonate	188
5	Amitriptyline	277
6	BMS-193885	590
7	BMS-493	255
8	Buspirone	385
9	Butorphan	311
10	Pravastatin	446
11	Sulfadimethoxine	310
12	Fosinopril	585
13	Nefazodone	470
14	Paclitaxel	876
15	Clopidogrel	321
16	Trazodone	371
17	Zofenopril	429
18	Ketoconazole	530

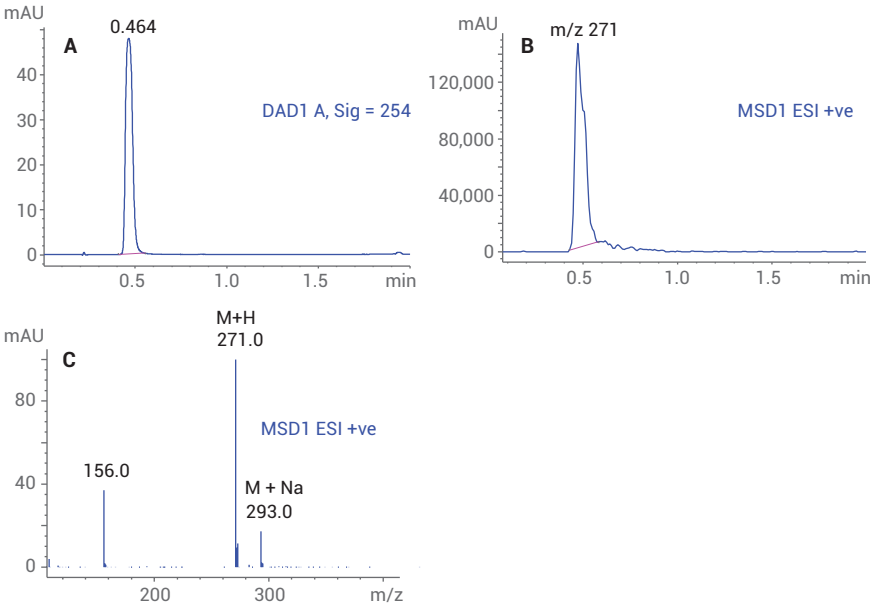

그림 1. Sulfamethizole(분자량 270)의 LC/MS 분석 결과. UV 신호(A)에서 화합물의 순도가 99% 이상으로 나타났으며, MSD 신호로부터 얻은 질량 정보를 통해 표적 분석물질을 정확히 식별할 수 있었음. B) ESI 양이온 트레이스. C) 양이온 이온화로부터 획득된 sulfamethizole MS 스펙트럼

MSD 오픈 액세스 시스템을 이용한 순도 평가 신뢰도 개선

여러 화합물이 존재하는 경우, UV 검출만으로 화합물 식별 및 순도 평가를 수행하기에는 무리가 있습니다. 이때 MSD로부터 분자 질량 정보를 획득하면 표적 피크를 찾고 화합물의 순도를 평가하는 데 도움이 될 수 있습니다. 그림 2는 fosinopril 분석을 예로 들어 이를 설명합니다. Fosinopril(분자량 585)은 높은 비극성 화합물에 사용하는 그레디언트 3 분석법 파라미터를 통해 분석하였으며, UV 결과를 추적하여 4개의 중요 피크를 확인했습니다(그림 2A). 올바른 표적 피크의 식별 없이는 확실한 순도 백분율을 평가하는 데 어려움이 있습니다. MSD 데이터에 따르면, 본 실험의 표적 피크는 1.4분 시점에서 용리되는 피크인 것으로 확인되었습니다. ESI 양이온/음이온 및 APCI 양이온/음이온 트레이스에서 관측되는 *m/z* 값의 정확도는 UV 순도 분석 결과에 높은 신뢰도를 제공하는 역할을 합니다.

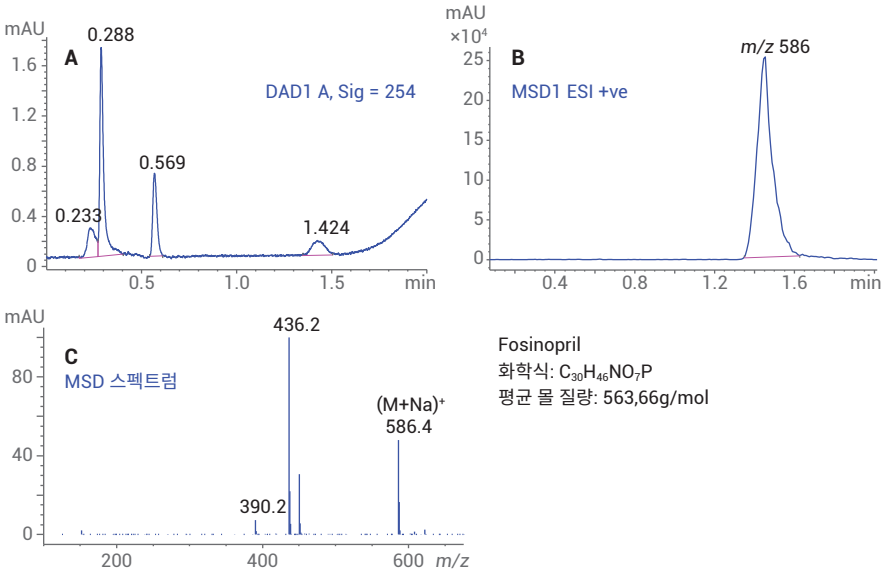

그림 2. 순도 분석으로부터 도출된 fosinopril(분자량 585)의 LC/MS 결과. A) 4개의 중요 크로마토그래피 피크를 지닌 fosinopril UV 검출 프로파일. MSD 신호를 바탕으로 획득한 질량 정보를 통해 1.4분에 용리되는 피크를 대상으로 식별(순도 약 15%). B) ESI 양이온 트레이스. C) 양이온화 모드로부터 도출된 fosinopril(*m/z* 586)의 MS 스펙트럼

극성 전환 기능을 보유한 Multimode 이온화원 MSD를 통해 다양한 종류의 화합물에 대한 이온화 향상

극성 전환을 통해 한 번의 크로마토그래피가 진행되는 동안 양이온화 및 음이온화 극성의 MS 데이터를 동시에 얻을 수 있습니다. 애질런트 LC/MSD는 빠른 극성 전환이 가능하여, 데이터의 품질을 저하시키지 않으면서도 하나의 특정한 크로마토그래피 피크로부터 더 많은 스캔 데이터를 수집할 수 있습니다. 이러한 기능은 한 번의 크로마토그래피 실행만으로 두 가지 극성의 MS 데이터를 수집할 수 있으며, 선호되는 극성과 상관없이 미지 분석물질을 식별할 수 있기 때문에 시간을 크게 절약할 수 있습니다. 이러한 극성 전환의 장점은 다음 두 예에서 자세하게 설명되어 있습니다.

- Nefazodone 분석에는 양이온 모드가 선호됩니다(그림 3).
- Sodium hexane sulfonate 분석에는 음이온화 극성 모드가 선호됩니다(그림 4).

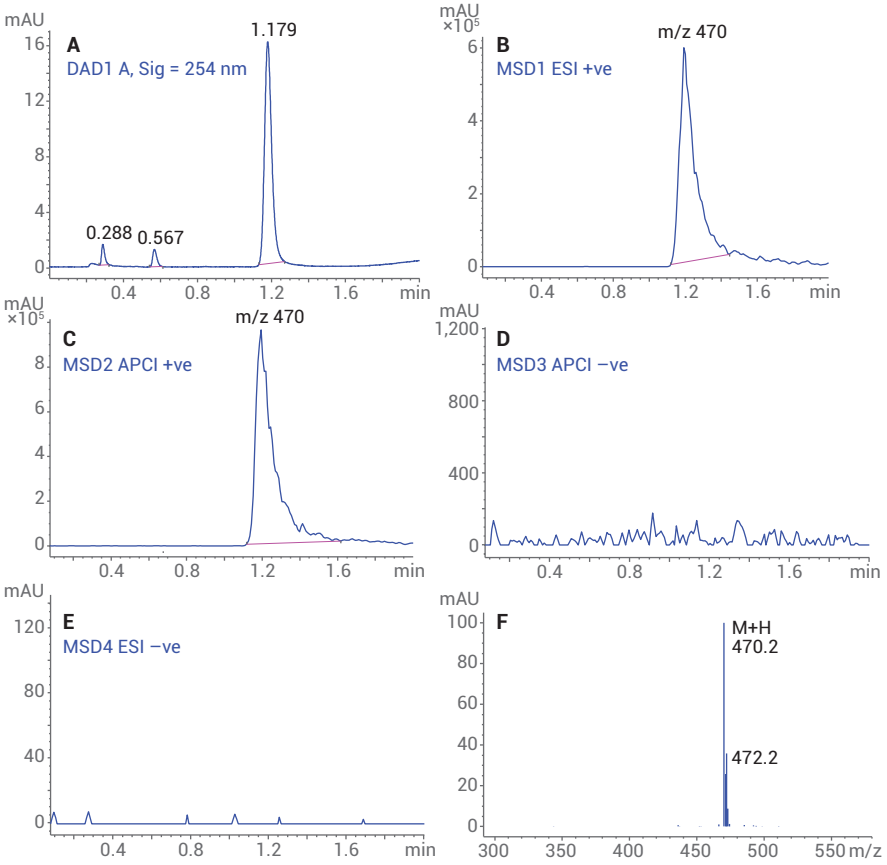

그림 3. Nefazodone(*m/z* 470)의 경우 양이온 극성 모드에서 양호한 이온화 특성을 보였으나, 음이온 극성 모드에서는 이온화가 전혀 관측되지 않음. A) Nefazodone의 UV 신호. B) ESI 양이온 트레이스. C) APCI 양이온 트레이스. D) APCI 음이온 트레이스 및 E) ESI 음이온 트레이스. F) Nefazodone의 MSD 스펙트럼

ASR로 자동화된 데이터 처리

직관적인 ASR 소프트웨어는 데이터 분석을 자동화하고 검토 시간을 단축합니다. ASR 보고서는 맞춤 설정이 있어 원하는 정보만 표시되도록 조절할 수 있으며 하나의 시료는 물론 여러 시료로 구성된 배치에 대해서도 보고서를 생성할 수 있습니다. ASR 결과는 시스템 관리자가 미리 설정한 옵션에 따라 지정된 사용자에게 이메일로 전송됩니다. 그림 5는 fosinopril 분석 결과를 담은 PDF 형식의 이메일 보고서를 나타냅니다. ASR을 사용하면 데이터 처리 및 시각화가 매우 간편해져 빠른 검토가 가능합니다.

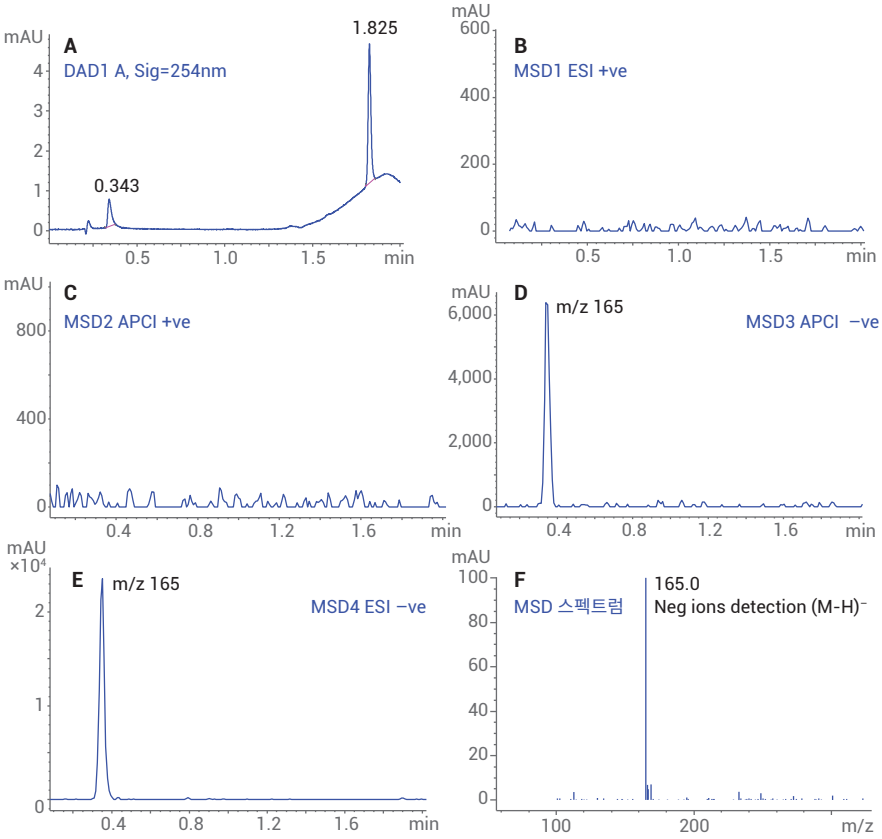

그림 4. Sodium hexane sulfonate(*m/z* 165)는 음이온 극성 모드에서는 이온화되었으나 양이온 극성 모드에서는 이온화가 전혀 관측되지 않았음. A) Sodium hexane sulfonate의 UV 신호. MSD 데이터를 통해 0.343분에 관측된 상대적으로 작은 피크가 표적 화합물임을 확인함. Sodium hexane sulfonate는 ESI 양이온 및 APCI 양이온 모드(B 및 C)에서는 검출되지 않았으나, ESI 음이온 및 APCI 음이온 모드(E)에서는 sodium hexane sulfonate(D 및 E)의 이온화가 원활하게 진행됨. F) Sodium hexane sulfonate의 MSD 스펙트럼

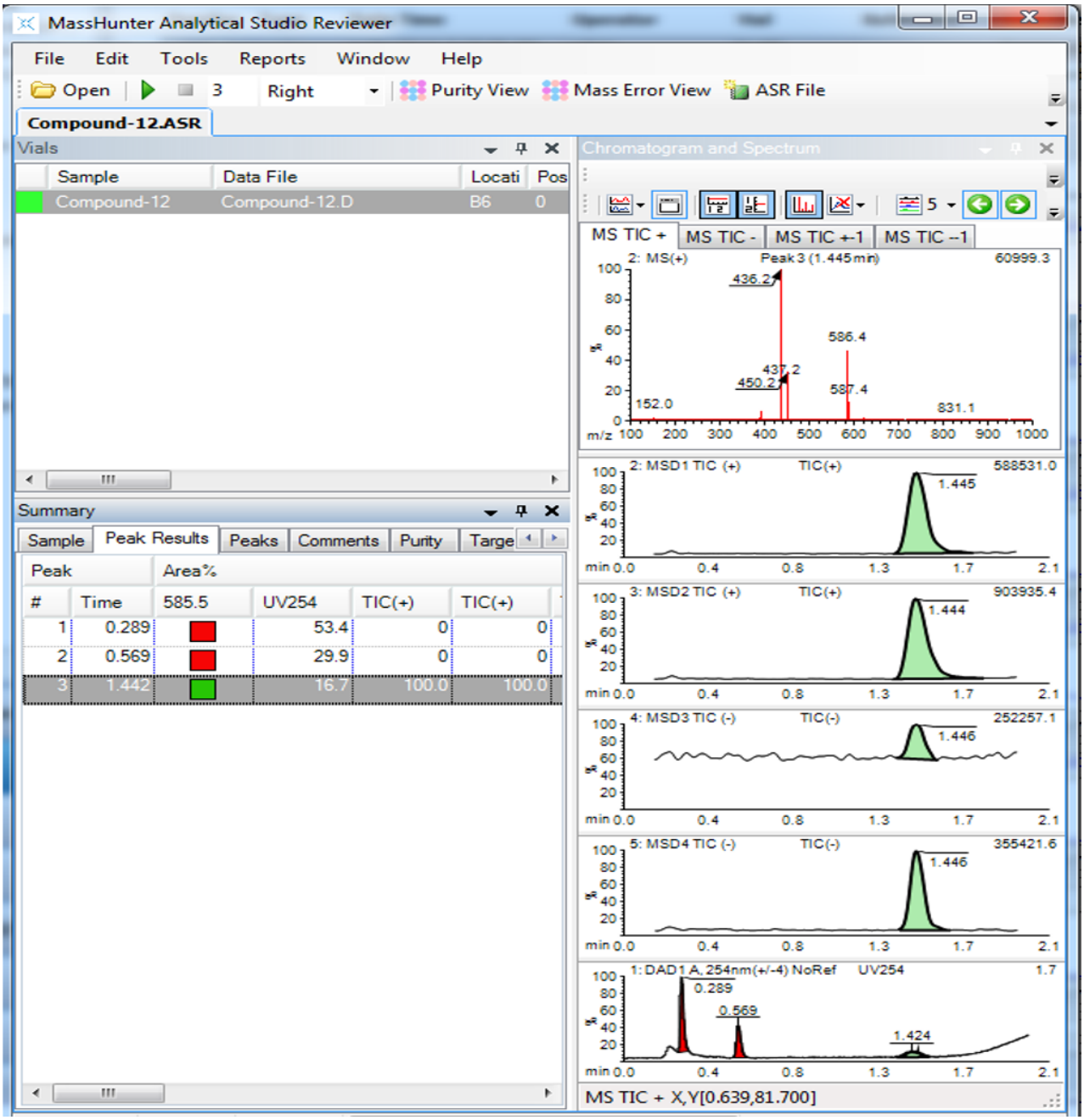

그림 5. Fosinopril의 ASR 보고서 스냅샷. ASR 보고서는 UV 신호 피크 면적에 따른 화합물 순도, 머무름 시간, MS 스펙트럼, 시각화를 위한 색상 코딩 등을 포함하고 있어 신속하게 해당 내용을 한 눈에 검토할 수 있음.

Walkup 결과 요약

표 4에는 UV 및 MSD로부터 도출된 화합물 확인 결과 및 감응 비교 결과가 요약되어 있습니다. UV 검출, ESI (양이온/음이온) 및 APCI(양이온/음이온)으로부터 검출한 표적 분석물질의 반응은 녹색 음영으로 표시되어 있으며 여기서 이온화 정도가 가장 강한 방식을 별표로 표시했습니다. 이 표에는 일상적인 순도 또는 화합물 식별 분석 시 UV 검출 방식에 MSD를 추가로 사용할 때의 장점이 요약되어 있습니다.

결론

견고한 Agilent 1260 Infinity II LC와 Agilent LC/MSD XT 및 Agilent MassHunter Walkup 소프트웨어의 조합은 다수의 연구원들이 일상의 LC/UV/MS 분석을 실시할 수 있는 쉽고 효율적인 시스템입니다. 오픈 액세스 모드에서 질량 분석법 및 UV 검출을 사용하면 비전문가인 MS 사용자도 손쉽게 화합물 식별 및 순도 분석을 수행할 수 있습니다. 직관적인 소프트웨어 구성을 통해 LC/MS에 대한 전문지식이 없는 사용자라도 시료 제출, 분석, 데이터 보고서 작성 등을 쉽게 처리할 수 있습니다. 또한, Multimode 이온화원 및 고속 극성 전환 기능을 통해 한 번의 주입만으로 넓은 범위의 화합물 유형을 분석할 수 있습니다. Agilent MassHunter Analytical Studio Reviewer(ASR) 소프트웨어의 자동화된 데이터 분석을 통해 유기합성 또는 의약화학 연구자가 데이터 검토와 보고서 작성을 간편하게 수행할 수 있도록 지원합니다.

표 4. 화합물 확인 결과 요약

	화합물	그레디언트	m/z	RT	UV	ESI+	APCI+	APCI–	ESI–
1	Pemirolast	1	229	0.83			★		
2	Sulfamethizole	1	271	0.48			★		★
3	Sulfamethazine	1	279	1.1			★		
4	Sodium hexanesulfonate	1	165	0.34					★
5	Amitriptyline	2	278	1.4			★		
6	BMS-193885	2	591	1.1			★		
7	BMS-493	2	256	0.5			★		
8	Buspirone	2	386	1.3			★		
9	Butorphan	2	312	0.45			★		
10	Pravastatin	2	447	0.6					★
11	Sulfadimethoxine	2	311	0.32			★		
12	Fosinopril	3	586	1.4		★			
13	Nefazodone	3	470	1.1			★		
14	Paclitaxel	3	877	0.4			★		
15	Clopidogrel	3	322	1.1			★		
16	Trazodone	3	372	0.5			★		
17	Zofenopril	3	430	0.4			★		
18	Ketoconazole	3	531	0.7			★		

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
2017년 6월 13일, 한국에서 발행
5991-8134KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies