

高分解能精密質量 GC/Q-TOF と Low - Energy EI イオン源による抽出物 および浸出物 (E&L) 化合物の分析

アプリケーションノート

著者

Kevin Rowland¹, Mark Jordi¹,
Kai Chen², and Jennifer Sanderson²

¹ Jordi Labs
Mansfield, Massachusetts

² Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, California

概要

抽出物および浸出物 (E&L) に関する研究では、正確な化合物の同定が重要になります [1]。広範囲にわたる種類と濃度の化学物質を含有する E&L 抽出は複雑であり、化合物の同定が課題となっています [2]。従来、E&L に関する研究の中で GC で検査可能な部分については、標準 EI フルスキャンモードでのユニットマス GC/MS と NIST GC/MS ライブラリ検索による化合物の同定が用いられています。ただし、ライブラリの一致スコアが不確かな状態で検出された化合物の場合、この手法から得られるのは限られた結果のみです。

この研究では、高分解能の精密質量 GC/Q-TOF と Low-Energy EI 対応のイオン源を用いることにより柔軟性と信頼性が向上した、E&L 化合物分析用の新しいツールについて説明します。



図 1. Agilent 7250 シリーズ GC/Q-TOF システム



Agilent Technologies

実験方法

機器による分析

サンプル抽出物とコントロールは、Agilent 7250 シリーズ GC/Q-TOF システム (図 1) と表 1 に示した条件により分析しました。取り込みメソッドのリテンションインデックス (RI) をキャリブレーションするために、n-アルカンを注入しました。

表 1. Agilent 7250 GC/Q-TOF 分析条件

パラメータ	設定
カラム	Agilent DB-5 MS UI, 15 m × 0.25 mm, 0.25 μm
注入口	S/SL, 310 °C
キャリアガス	1.5 mL/min ヘリウム
オープンプログラム	50 °C で 5 分、 10 °C/min で 320 °C まで上昇、10 分
トランスファーライン	280 °C
イオン源モード	EI, 70 eV, 10 ~ 15 eV
イオン源温度	200 °C
四重極温度	150 °C
スペクトル範囲	50 ~ 1,000 m/z

データ解析

化合物の同定では、Agilent MassHunter Unknowns Analysis B.08.00 の SureMass [3] および NIST 14 GC/MS ライブラリとの照合を用いました (図 2)。標準 EI スペクトルと Low-Energy EI スペクトルを比較することにより、同定した化合物の分子式を調査しました。必要に応じて、Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.08.00 を用いて MS および MS/MS 質量スペクトルを確認しました。未知化合物の候補物質を MS/MS スペクトルを基にして構造解析するために、Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator B.08.00 を用いました。サンプルグループの差分解析には、Agilent Mass Profiler Professional (MPP) B.13 を使用しました。

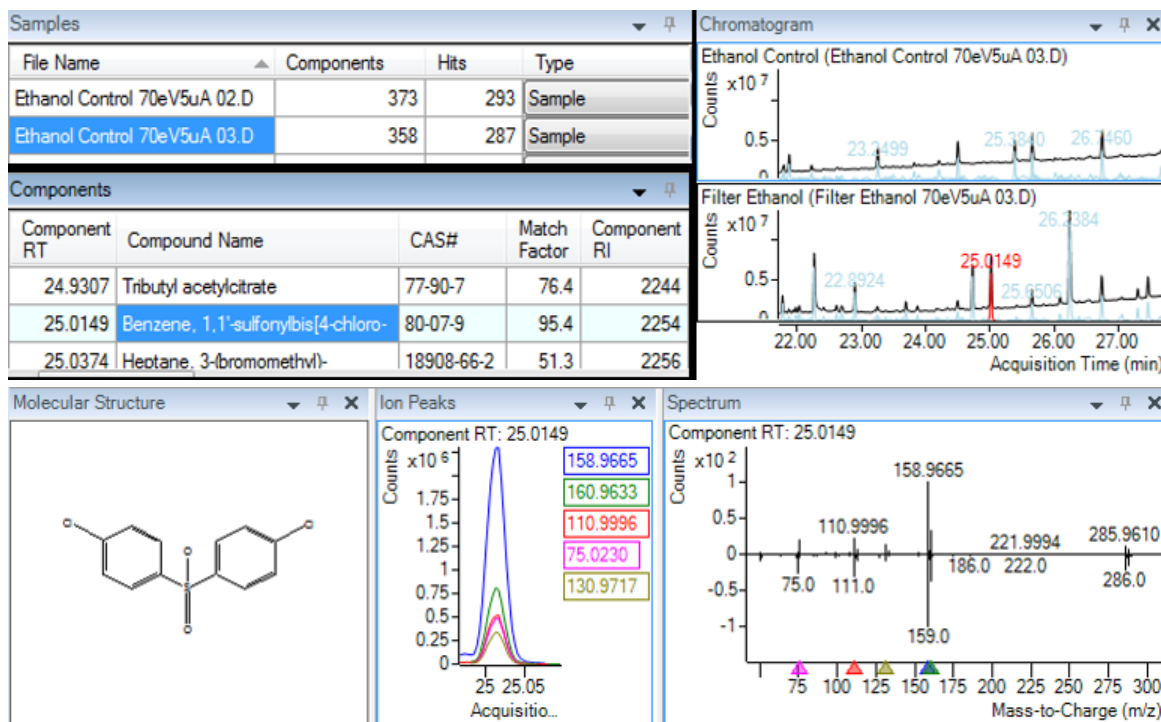


図 2. SureMass によるピーク検出とライブラリ照合に用いた Agilent MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェア

サンプル前処理

生理食塩水を 37 °C で 72 時間フロースルー抽出し、組み立てが完了した使い切りのバイオプロセスシステムを抽出しました。生理食塩水は、1 錠のリン酸緩衝生理食塩水錠剤 (Sigma) を 200 mL の各蒸留水に加えることで調製し、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM リン酸緩衝液を作製しました (25 °C で pH 7.4)。エタノールと水/エタノール (1:1) 溶液を用いてデバイスのフィルタを抽出し、抽出溶媒間の差を示しました。すべての抽出実験において、コントロールブランクを準備しました。各抽出溶液 (エタノール以外) は等量のジクロロメタンで抽出してから 10 倍に濃縮し、GC/Q-TOF により分析しました。

結果と考察

生理食塩水抽出物とコントロールブランクの関係

MPP ソフトウェアを用いてサンプルとコントロール間の差分析を実行し、生理食塩水抽出物の結果を代表的なデータセットとして示しました。その結果から、デバイス全体の生理食塩水抽出物中にはコントロールブランクと比較して、倍率変化 ≥ 3 および p -値 ≥ 0.05 を示す 113 の化合物が存在することがわかりました (図 3)。表 2 は、多く含まれる成分を示しています。

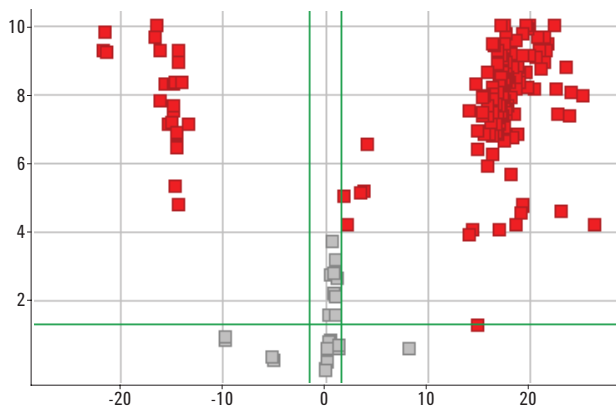


図 3. 生理食塩水抽出物中に有意に存在する化合物を示すボルケーノプロット (右上)

表 2. 生理食塩水抽出物の化合物の同定リスト (上位のリスト)

化合物	分子式*	RI	質量差 (mDa)
カプロラクタム	C ₆ H ₁₁ NO	1,268	0.2
フェノール	C ₆ H ₆ O	978	0.0
トリ(1,2-プロピレングリコール)、モノメチルエーテル	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1,315	0.0
Dowanol 62b 異性体 1	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1,291	-0.2
Dowanol 62b 異性体 2	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1,294	-0.2
Dowanol 62b 異性体 3	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1,289	0.0
暫定 ID 化合物	C ₉ H ₁₂ O ₄	1,572	0.5
Dowanol 62b 異性体 4	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	1,286	-0.1
安息香酸, 4-エトキシ, エチルエステル	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	1,527	0.1
暫定 ID 化合物	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃	1,659	0.2
バニリン	C ₈ H ₆ O ₃	1,399	-0.1
ヘキサナムド	C ₆ H ₁₃ NO	1,144	-0.2
暫定 ID 化合物	C ₈ H ₁₂ O ₃	1,403	0.1
7,9-ジ-tert-ブチル-1-オキサスピロ(4,5)デカ-6,9-ジエン-2,8-ジオン	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	1,908	-0.2
暫定 ID 化合物	C ₁₅ H ₂₂ O	1,476	0.4
エチルパラベン	C ₉ H ₁₀ O ₃	1,522	0.2
2-ピロリジノン, 1-メチル-	C ₆ H ₉ NO	1,040	0.3
2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	C ₁₄ H ₂₂ O	1,507	0.0
暫定 ID 化合物	C ₈ H ₈ O	1,069	-0.2
2-イミダゾリジノン, 1,3-ジメチル-	C ₆ H ₁₀ N ₂ O	1,109	0.3
アセトアミド, N-シクロヘキシル-	C ₈ H ₁₅ NO	1,292	0.2
ブトキシエトキシエタノール	C ₈ H ₁₆ O ₃	1,187	-0.2
ジ-tert-ブチルヒドロキノン	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	1,467	0.0
2-フェニルイソプロパノール	C ₉ H ₁₂ O	1,088	-0.3
暫定 ID 化合物	C ₈ H ₁₂ O ₂	1,014	0.1
ベンゾチアゾール	C ₇ H ₅ NS	1,232	0.2
フタル酸ジメチル	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1,452	0.1
暫定 ID 化合物	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	1,349	0.5

* 同定した化合物の分子式は、標準 EI モードと Low-Energy EI モードのスペクトルを比較することにより確認 (または、暫定 ID 化合物を提案) しました。

抽出溶媒の影響

フィルタ抽出物を評価して、異なる抽出溶媒を用いた際の抽出物プロフィール全体に対する影響を調べました (図 4)。ベン図によってこれらの結果を簡単に視覚化でき、各抽出で検出された一意の抽出物と共通の抽出物の両方がわかります。

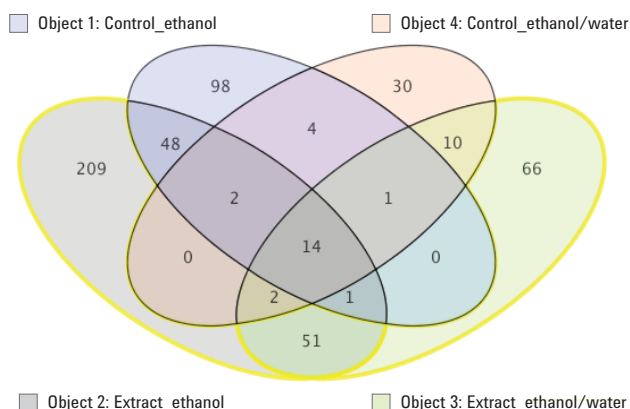


図 4. デバイスのフィルタにより異なる溶媒から抽出された抽出化合物を示すベン図

Low-Energy EI による評価

図 5 に示すように、Low-Energy EI を用いた実験により、スペクトル内の分子イオン (M^+) を維持または確認できる可能性が高くなります。これらの実験では、ライブラリ検索の結果に期待できない場合に、暫定化合物の同定に関するさらなる知見が得られます。

図 6 は、Low-Energy EI と Q-TOF MS/MS により、未知化合物 (2つの溶媒抽出グループ間で共通) を分析するためのワークフローを示しています。可能性のある候補物質は、ベンジルアルコール誘導体です。

図 7 は、Low-Energy EI スペクトルがエタノール抽出物に固有の多数のアルカン化合物を高い信頼度で同定するために有用であることを示しています。

結論

- Low-Energy EI により、 M^+ を維持または確認できる可能性が高まります。また、精密質量 MS/MS スペクトルからは、未知化合物の構造解析に関する有益な知見が得られます。
- 精密質量測定と RI キャリブレーションを実施することにより、化合物の同定における信頼性が向上します。
- 差分解析は、サンプルグループの E&L 化合物を比較するのに役に立ちます。

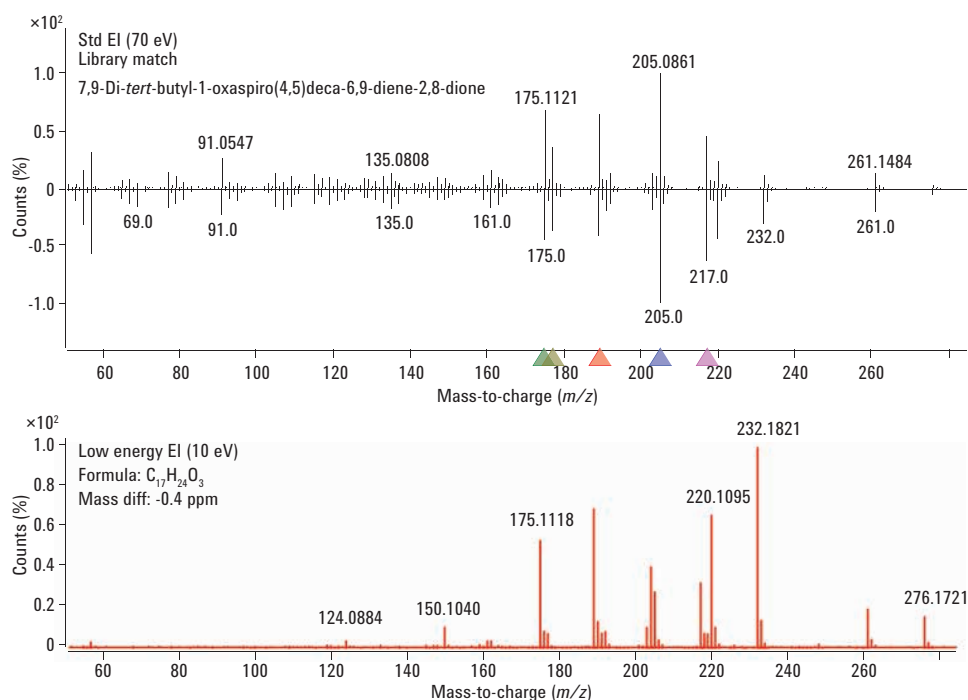
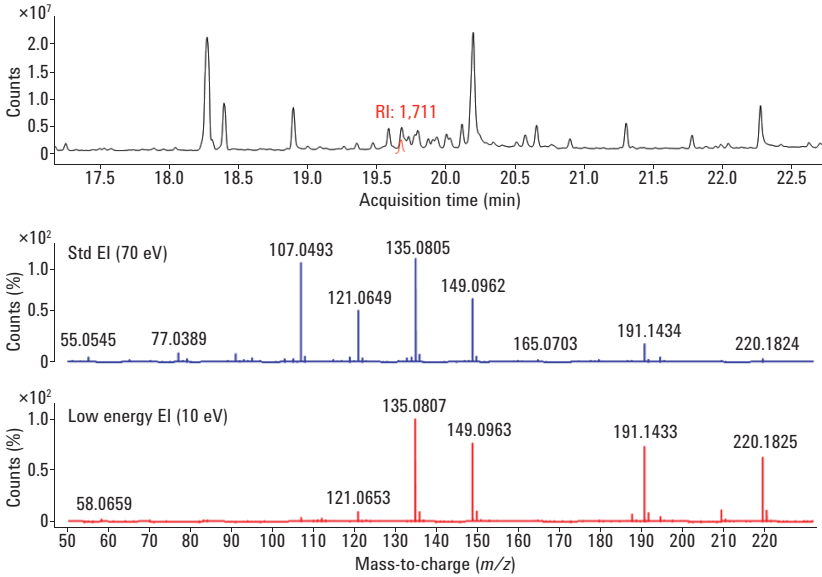
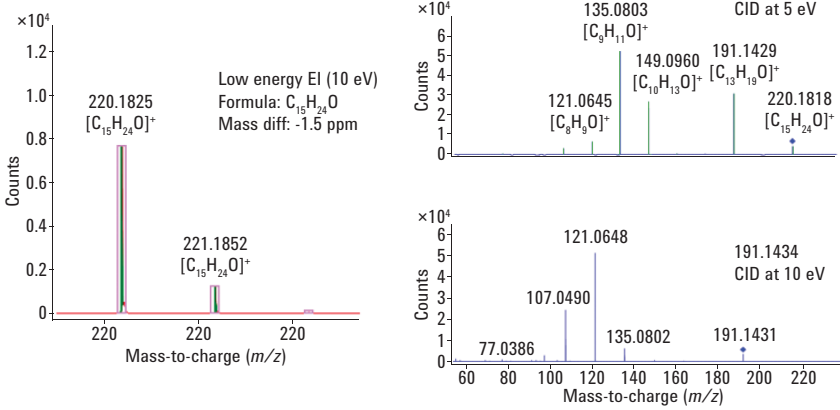


図 5. Low-Energy EI により、一致スコア 92.6 (RI : 1908) の高い信頼度で同定された化合物のスペクトル内の M^+ 相対アバンダンスが増加

Step 1: Measure unknowns with low energy EI source



Step 2: Confirm M⁺ and perform Q-TOF MS/MS



Step 3: Structure elucidation on possible candidate

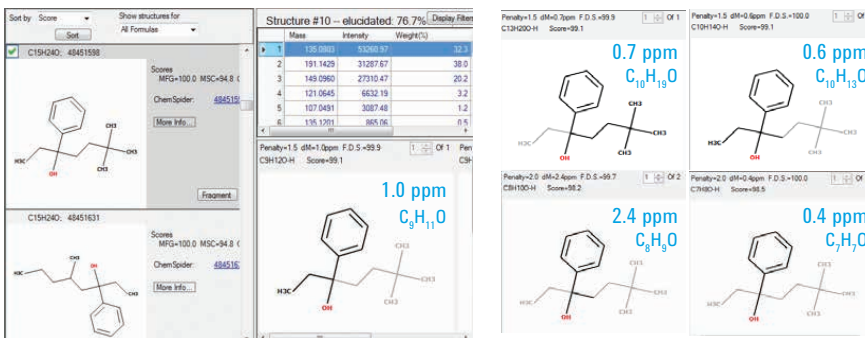


図 6. Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator による候補物質に関する Low-Energy EI および構造解析による未知化合物の分析ワークフロー

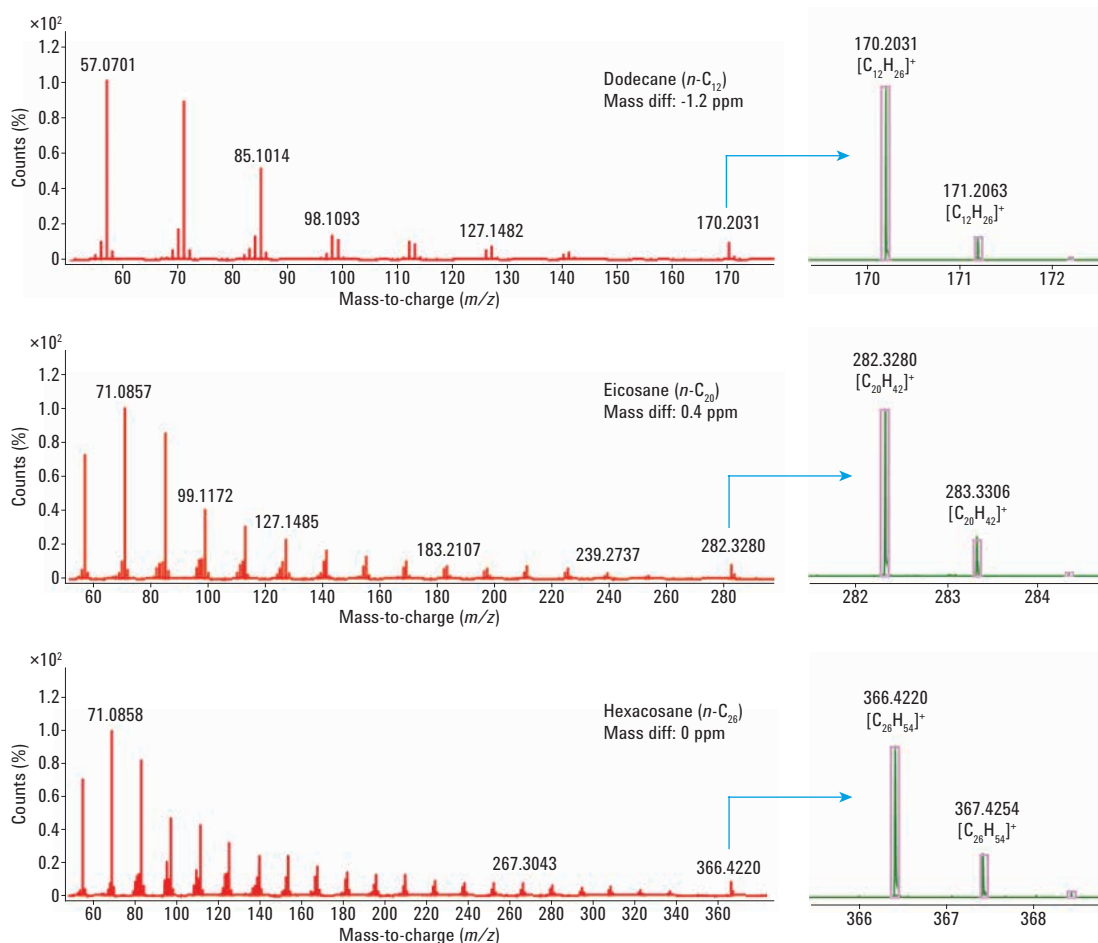


図 7. n-アルカンの Low-Energy EI (12 eV) スペクトル。M+ クラスタは良好な質量精度と同位体信頼度を示しています。

参考文献

1. D. Jenke. "Development and Justification of a Risk Evaluation Matrix to Guide Chemical Testing Necessary To Select and Qualify Plastic Components Used in Production Systems for Pharmaceutical Products" *PDA J. Pharma.Sci. Technol.* **69**, 677–712, (2015).
2. A. Mire-Sluis, *et al.* "Extractable and Leachables.Challenges and Strategies in Biopharmaceutical Development" *BioProcess Int.*, Feb (2011).
3. Agilent SureMass, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-8048EN (2017).

詳細

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

RA.1096759259

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, October 26, 2020

5991-8198JAJP



Agilent Technologies