

질량 분석기를 이용한 높은처리량의 자동화 순도 분석을 위한 애질런트 OpenLab CDS

파트 I: LC/MS를 이용한 시료 순도 분석

저자

Hua Dong
Agilent Technologies, USA

Leo Wang
Agilent Technologies, USA

Doug McIntyre
Wiefling Consulting, USA

개요

이 응용 자료는 애질런트 OpenLab CDS 소프트웨어를 이용한 화합물 확인 및 시료 순도 분석 워크플로의 자동화와 간소화에 대해 설명합니다. 이 응용 자료에 사용된 데이터는 높은 처리량의 애질런트 InfinityLab 액체 크로마토그래피/Mass Selective Detector XT(LC/MSD XT)와 애질런트 OpenLab CDS 소프트웨어를 이용해 생성되었습니다. 이 시뮬레이션한 시료 순도 실험에서는 4개월간 냉장고에 보관되어 분해된 다양한 제약 화합물을 사용해 LC/MS 분석을 수행하였습니다. 분해된 시료의 시료 순도 측정을 위한 데이터가 완벽하게 자동화된 워크플로를 통해 처리, 검토, 보고되었습니다. 여러 색상으로 표시된 요약 보기와 보고서는 순도 측정 결과를 시각화하여 배치당 관찰되는 시료 분해를 빠르게 보여줍니다.

소개

순도 측정은 많은 실험실에서 핵심적인 작업입니다. 유기화학자들은 순도 분석을 통해 화합물 식별 결과를 확정하고 합성 절차의 수율을 예측합니다. 의료 화학자들은 보통 합성 제약 화합물의 순도를 측정 후 생물학적 연구를 이어갑니다. 제제 연구 과학자들은 순도 분석을 제제 최적화에 이용해 보관에 대한 권장 사항을 알아냅니다. 제약계 QA/QC 실험실은 일반적으로 순도 분석을 통해 약품 중간산물 또는 최종 제품을 일정한 품질 한도로 유지합니다.

LC/MS는 감도, 다양한 종류의 화합물에 대한 반응, 그리고 가장 중요하게는 화합물의 독특한 물리적/화학적 속성, 즉 질량대 전하비(m/z)에 근거한 우수한 화합물 식별 선택성 때문에 순도 측정에 사용됩니다. 그러므로 LC/MS를 이용한 순도 측정은 측정의 분석적 신뢰성을 크게 향상시킬 수 있습니다.

화학자들은 의사결정을 빠르게 하기 위해 중앙 실험실이나 계약 실험실에서 제공하는 지원 분석 서비스에 의존하기보다 자체적으로 순도 테스트를 수행하는 것을 선호합니다. 그러나 자체적으로 시료를 분석하는 데에는 1) LC/MS 기기에 대한 개방적인 접근 2) 어떻게 LC/MS 시스템을 운영하고 MS 데이터를 해석하는지를 배우는 데 필요한 노력 3) 질량분석기를 들여놓기 위해 필요한 실험실 벤치 공간 등 3개의 주요 난점이 존재합니다. 여기에 설명된 해결책은 OpenLab CDS 내에 설계된 자동화 워크플로를 통해 화학자들이 MS 데이터 해석 없이 빠르게 순도 결과를 얻을 수 있는 과정을 보여줍니다. 자원 활용이 현저히 줄어들기 때문에 질량 선택적 검출기는 LC 모듈과 함께 작은 실험실 벤치 공간에 쌓아둘 수 있습니다.

이 응용 자료는 애질런트 OpenLab CDS 소프트웨어가 애질런트 InfinityLab 액체 크로마토그래피/Mass Selective Detector XT(LC/MSD XT)와 함께 어떻게 화합물 식별 확인 및 시료 순도 분석 워크플로를 자동화할 수 있는지를 여러 제약 화합물에 대한 시료 분해 시뮬레이션 실험을 통해 보여줍니다. 이 설정으로 화학자는 빠르게 시료의 순도를 측정할 수 있습니다.

실험

표준품 및 화학물질

Buspirone hydrochloride, Amitriptyline hydrochloride, Nefazodone hydrochloride, Clopidogrel hydrogensulfate, Paclitaxel, Fosinopril sodium 표준품을 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였습니다. 이들 화합물의 분자량은 277~853이며, LC/MS의 넓은 응용성을 증명합니다.

이 모든 표준품의 개별 원액은 아세토니트릴 (ACN)을 이용해 1000 μ g/mL의 농도로 준비되었습니다. 원액은 20% ACN 수용액에 20ng/ μ L의 농도로 작업용으로 준비되기 전 4개월간 냉장고에 보관하였습니다. 4개월간의 보관 뒤 시료 순도를 측정하기 위해 이러한 작업용 용액을 분석하였습니다.

LC/MS 기기 및 분석

LC/MS 분석에는 애질런트 single quadrupole InfinityLab LC/MSD XT 시스템이 사용되었습니다. 이 시스템에는 Agilent Jet Stream 기술(AJS)이 적용된 애질런트의 전자 분무(ESI) 이온화원, Agilent 1260 Infinity II Binary Pump, Sampler, 다이오드 어레이 검출기가 장착된 single quadrupole 질량분석기가 포함되어 있습니다.

4분간의 일반 높은 처리량 LC 분리가 2.1 x 50mm Poroshell 120 EC-C18 컬럼에서 물, ACN, 0.1% 포름산 이동상을 이용해 수행되었습니다. LC/MSD 시스템은 양이온 ESI 모드에서 1초당 2회 스캔의 속도로 100~900 m/z 의 Full-scan 수집으로 작동되었습니다.

소프트웨어

데이터 수집, 처리, 보고에는 애질런트 OpenLab CDS 2.2가 사용되었습니다.

결과 및 토의

화합물의 확인

LC/MS는 정상 조건에서 불과 몇 개의 fragmentation을 이용해 분자량을 나타내는 지시 이온을 생성하기 때문에 화합물 확인에 매우 이상적입니다. 양이온 모드에서 LC/MS 분석 수행 시, 화합물 분자량 M은 일반적으로 양성자가 더해짐으로써 $[M+H]^+$ 와 같이 이온을 생성합니다. 예를 들어 분자량 853.9의 화합물인 Paclitaxel은 $854.3m/z$ 의 이온을 생성합니다(단일 동위원소 중 중 가장 많은 양성자화 형태). LC/MS 분석에 사용된 이동상에 따라, $[M+NH_4]^+$ 또는 $[M+Na]^+$ 도 생성될 수 있으며, 이때 각각 871.3 또는 $876.3m/z$ 의 이온이 생성됩니다. 음이온 LC/MS 하이브리드 추출은 $[M-H]^-$ 이온을 생성하여, 잠재적으로 Cl⁻ 또는 아세테이트 부가물이 생성됩니다.

분자량이 알려져 있는 경우, 추출된 이온 크로마토그램(ECI)은 예상한 화합물이 실제 존재하는지를 확인하는 데 사용될 수 있습니다. EIC에서 하나의 주요 피크 시간이 MS 총 이온 크로마토그램(TIC)의 주요 피크 시간과 겹치면, 예상한 화합물이 존재함을 자신있게 추정할 수 있습니다.

시료 순도 추정

시료 순도는 EIC의 피크 면적 합 또는 TIC의 단일 피크 면적을 TIC의 모든 다른 피크 면적 총합과 비교함으로써 추정할 수 있습니다. 예를 들어 EIC 피크 면적은 950,000카운트이고 TIC의 모든 다른 피크 면적이 50,000카운트라면, 시료의 순도는 95%로 추정 가능합니다.

이온화 효율(그리고 MS 반응 계수)이 화합물별로 크게 다르기 때문에, 많은 화학자들은 시료 순도 평가 시 "일반적인 반응" 검출기, 예를 들면 UV 또는 DAD 분광기와 같은 기기를 더 많이 사용하고자 합니다. UVD가 일반적으로 많이 사용되나,

증기화 광산란 검출기(ELSD)와 같은 기기도 사용할 수 있습니다. 일련 설정 시, 컬럼에서 용출되는 동일 화합물이 UVD, ELSD, MSD 크로마토그램에서 각기 다른 머무름 시간을 나타냅니다. 따라서 MSD 및 추가 검출기가 시료 순도 계산에 사용될 때에는 신호 지연을 적용해야 합니다.

다른 검출기에서 화합물 피크를 찾을 때 MSD EIC의 화합물의 머무름 시간은 신호 지연과 함께 사용됩니다. 피크의 면적 비율이 시료 순도 측정 지표입니다. 그림 1은 Paclitaxel 시료이 보관 과정에서 분해를 거친 후 어떻게 순도 측정되는지를 보여줍니다. Paclitaxel의 순도는 UV 신호 반응을 기준으로 97%가 나왔습니다.

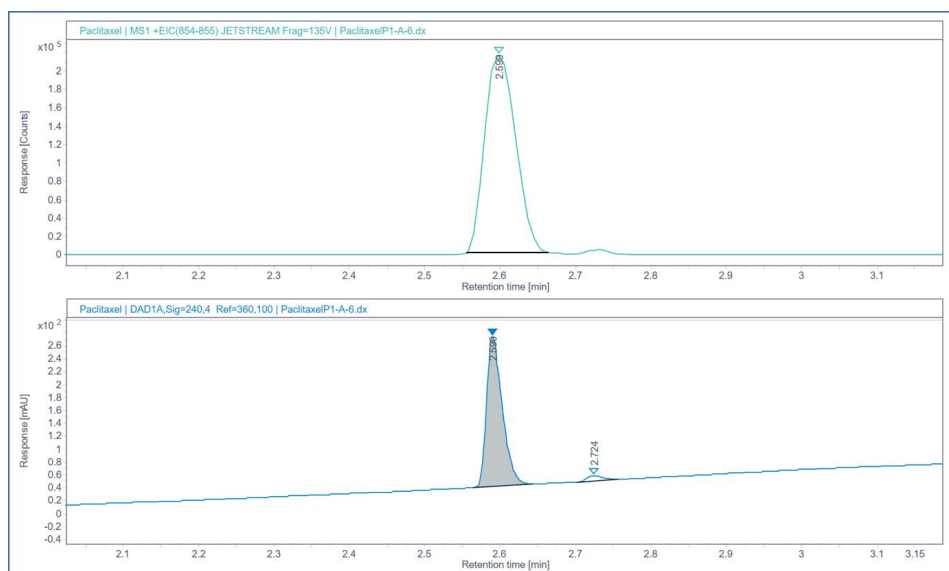


그림 1. Paclitaxel의 $[M+H]^+$ 및 UV 크로마토그램을 위한 EIC. MSD 분석에서 약간의 지연에 맞게 머무름 시간 조정됨

데이터 처리 및 보고 자동화

OpenLab CDS를 이용해 화학자들은 MS 데이터 해석에 대해 데이터 시스템 훈련 또는 경험이 적더라도 빠르게 화합물 식별을 확인하고 순도를 측정된 보고서를 생성할 수 있습니다. 시료 또는 시료 세트를 제출 시, 화학자는 분자량(동위원소 중에서 가장 흔한 형태) 또는 대상 화합물의 분자식을 지정하면 소프트웨어가 자동적으로 데이터 처리 및 보고서 생성을 완성할 수 있습니다(그림 2).

OpenLab CDS에서 시료 순도 계산 시, Processing Method 창이 파라미터 지정에 사용되며, 이 파라미터에는 신호 지연, 적분 파라미터, 잠재적인 부가물, 순도 한계값, 순도 계산에 사용될 신호 선택 사항 등이 있습니다(그림 3). 하나의 일반적인 처리법이 대부분의 시료 순도 측정에 사용될 수 있지만, 화학자는 OpenLab CDS로 시료 순도 분석 시 다른 처리법을 지정할 수 있는 옵션도 가지고 있습니다. 또한 화학자들은 수정된 분자량 또는 화학식을 입력하여 데이터를 나중에 재처리할 수도 있습니다. 이는 초기 데이터 입력 시 실수를 행했다면 매우 유용한 기능입니다.

	State	Vial	Acq. method	Proc. method	Sample name	Target1	Volume
1	Completed	PL-A7	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Solvent		3
2	Completed	PL-A1	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Buspirone	385.2	2
3	Acquiring	PL-A-2	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Amitriptylene	277.2	2
4	Pending	PL-A-3	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Clopidogrel	C16H16ClN02S	2
5	Pending	PL-A-4	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Nefazodone	C25H32ClN5O2	2
6	Pending	PL-A-5	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Fosinopril	563.3	2
7	Pending	PL-A-6	Sample Purity.amx	Sample Purity.pmx	Paclitaxel	853.3	2

그림 2. 시퀀스 표의 사례. 'Target1' 열은 화학자들이 예상되는 화합물의 화학식 또는 분자량을 입력하는 곳입니다

그림 3. 시료 순도 계산을 위한 처리법 설정. 여기에서는 시료 순도가 TIC 기반으로 계산되고, 양성자화 및 염화된 부가물 모두를 고려한 80%의 한계값이 적용됨

시료 분석과 데이터 처리 후, 시료 배치에 대한 결과는 요약 표에서 검토 가능하며 (그림 4), 또는 EIC, TIC, UV 신호 각각을 시료별로 살펴볼 수도 있습니다(그림 5). 시료는 색상으로 표시되어 문제가 있으면 빠르게 확인 가능합니다. 그림 4에 나타나 있듯이, Buspirone, Amitriptyline, Nefazodone, Clopidogrel은 80%의 순도 한계값을 충족시켰으나 Paclitaxel 과 Fosinopril은 그렇지 않았습니다. 그림 5에는, 특정 시료의 검토가 정확하게 계산된 순도, TIC에 적분된 모든 피크의 질량 스펙트럼을 제공한다는 것이 나타나 있습니다. 질량 스펙트럼은 존재하는 불순물의 성질에 대한 유용한 정보를 제공할 수 있습니다.

Sample Purity Results

Order	Sample name	Data file	Overall targets found	Overall purity
1	Solvent	SolventP1-A7.dx	N.A.	N.A.
2	Buspirone	BuspironeP1-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

그림 4. 시료 순도 결과 요약표. 색상 표시에는 Paclitaxel과 Fosinopril sodium이 80%의 순도 한계를 충족시키지 못하는 것으로 나타나 있음



그림 5. Amitriptyline에 대한 특정 시료 데이터 검토는 EIC, TIC, UV 신호, TIC에 적분된 피크에 대한 질량 스펙트럼을 나타냄

시료 순도 예측치와 함께 화합물이 발견되었는지를 나타내는 시료 순도 보고서는 시료 분석 후 미리 정의된 보고서 양식을 이용해 자동적으로 생성될 수 있습니다(그림 6). 보고서에서 색상의 사용은 화합물 검출 여부와 순도 수치 충족 여부를 한눈에 알아볼 수 있도록 해줍니다.

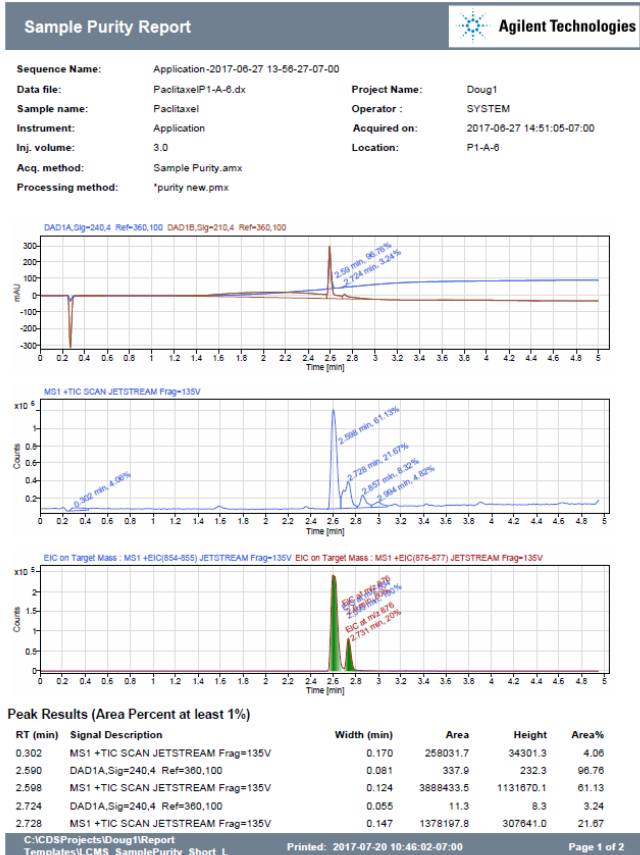


그림 6. 일반적인 시료 순도 보고서. 이 경우에는 TIC 신호에 기반을 둔 80%의 순도 한계값이 지정되었습니다. Paclitaxel이 검출되었으나(녹색으로 표시), 시료 내 Paclitaxel의 순도는 61%로 한계값 수치(빨간색으로 표시) 아래였습니다

워크플로 자동화

OpenLab CDS를 사용하여 시료 순도 워크플로를 자동화할 수 있습니다. 그림 2 시료 정보에 나타나 있듯이, 대상 질량, 처리법은 시퀀스 표에서 쉽게 관리 가능합니다. 보고서 정의는 OpenLab CDS의 내장 보고서 모듈을 이용해 다양한 목적에 따라 맞춤 설정할 수 있습니다. 그림 7에 나오는 바와 같이, 여러가지 보고서 양식이 자동화된 보고서 생성 및 인쇄를 위한 처리법에 통합되어 있습니다.

결론

OpenLab CDS는 시료 순도 분석을 위해 간단하며 자동화된 솔루션을 제공합니다. MS 데이터 해석에 대한 훈련 또는 경험이 부족한 화학자들도 외부 서비스에 의존하지 않고 쉽고 빠르게 시료 순도 결과를 얻을 수 있기 때문에 결과적으로 실험실 처리량이 향상됩니다.

대규모 시료 배치의 경우, 여러 색상으로 표시한 시료 순도 결과 요약표는 순수하지 않은 시료를 쉽게 발견할 수 있도록 해줍니다. 시료별 검토는 화학자들이 EIC, TIC, UV 신호, 정확하게 계산된 순도, TIC에 적분된 모든 피크의 질량 스펙트럼을 각각 자세히 검토해 존재하는 모든 불순물에 대한

파악을 할 수 있도록 합니다. 강력하면서도 유연하며 보기 쉬운 형식의 OpenLab CDS 보고서 양식에는 계산 기능 뿐 아니라, 시료 순도 결과(화합물이 발견되었는지, 순도가 어느 정도인지)를 눈에 띄게 요약해주는 다양한 색상 표시 기능도 내장되어 있습니다. 시료 분석 이후 시료 순도 보고서를 자동 생성할 수 있습니다.

화학자들은 시료에 입력된 정보, 예를 들어 잘못된 화학식 등을 쉽게 변경할 수 있습니다. 시료는 다시 주입 없이 신속하게 재처리될 수 있습니다. 전체 시료 순도 워크플로는 OpenLab CDS에 자동화되므로, 실험실의 생산성과 처리량은 현저하게 개선됩니다.

Processing Method

LCMS Sample Purity

General Scaling

General

- Properties
- Signals

Extraction

- Chromatogram
- Spectrum

Integration Events ChemStation

- Standard
- Advanced
- Manual Integration

Compounds

- Identification
- Calibration
- Spectra

System Suitability

- Properties
- Column

Tools

- Custom Calculation

Reports

- Injection Report

First report

Report template: LCMS_SamplePurity_Short.rdl [Browse...]

Report destination: None Printer File

File format: PDF (*.pdf) Excel workbook (*.xlsx)
 Word document (*.docx) Plain text (*.txt)
 CSV (Comma delimited) (*.csv)

Copy report to folder: None Storage Windows file system

Destination folder: [] [Browse...]

Second report

Report template: SequenceSummary_Short.rdl [Browse...]

Report destination: None Printer File

File format: PDF (*.pdf) Excel workbook (*.xlsx)
 Word document (*.docx) Plain text (*.txt)
 CSV (Comma delimited) (*.csv)

Copy report to folder: None Storage Windows file system

Destination folder: [] [Browse...]

그림 7. 워크플로 자동화를 위한 보고서 정의

www.agilent.com/chem/openlabcds

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 5월 17일, 한국에서 인쇄
5991-9085KO

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

