

Agilent OpenLab ChemStation Automated Purification Software による分析スケールから分取スケール への自動スケールアップ



Authors

林 慶子
内藤 厚子
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

分析スケール(～ 1mL/min)から分取スケール(4 mL/min ～)へのスケールアップの検討を行う場合、最適な分取メソッド構築のために、複数回の条件検討を行う必要があります。

Agilent OpenLab ChemStation Automated Purification Software は、分析スケールにおけるクロマトグラムからターゲット化合物が溶出する有機溶媒比率を算出し、ターゲット精製に適した分取メソッドを自動的に構築するソフトウェアです。

ターゲット化合物を純度・回収率・スループットともに良好なメソッドで分取するために、Automated Purification Software ではフォーカスグラジエントを作成します。これによりサンプル中に含まれる副生成物などの分離を改善し、一度の分取精製操作で確実にターゲット画分を得ることができます。

本アプリケーションノートでは、医薬品類をターゲットとし、フォーカスグラジエントの効果を確認しました。

Key words： 分取精製、スケールアップ、フォーカスグラジエント、自動化

システム

システム

1260 Agilent Infinity II HPLCシステム
1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7111B)
1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)
1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129A)
1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7115A)
1260 Infinity II フラクションコレクタ (G1364F)
1260 Infinity II フローモジュレーター (G7170B)
Agilent LC/MSD XT (G6135B)
OpenLab CDS ChemStation C01.08
With Automated Purification Software

分析条件

カラム
分析: ZORBAX SB C18, 3.0 x 150 mm, 5 µm
分取: ZORBAX SB C18, 9.6 x 150 mm, 5 µm

移動相
A : 0.1% ギ酸
B : 0.1% ギ酸含有アセトニトリル
メイクアップ: 0.1% ギ酸含有 (水/アセトニトリル=1/1)
ジェネリックグラジエント (分析) :
10%B (0 min) -> 95%B (7 min)

流速
分析: 0.5 mL/min
分取: 4.0 mL/min (メイクアップ: 0.5 mL/min)

検出
UV: 254/4 nm, reference off
MSD: positive/negative同時採取 (m/z=100-1000, fragmentor=100V)

ターゲット化合物

	compound	mass
1	サルファ剤4種 (スルファメチゾール)	270
2	アセトアミノフェン	151
3	レセルピン	608

Automated Purification Software

システムコンフィグレーション

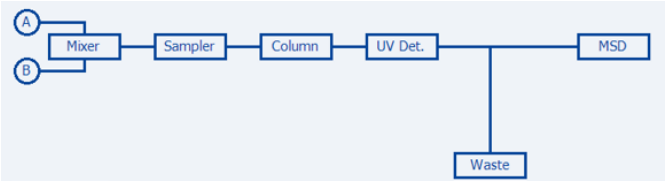


図1. 分析スケールのフロー図

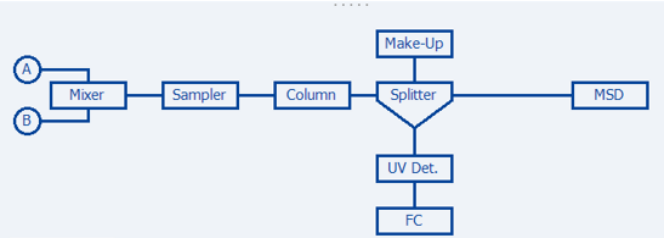


図2. 分取スケールのフロー図

分析設定

図3. 分析におけるイオン種の選択

図4. 分析のシーケンステーブル
(もしくは採取済みの結果セット)

分析設定を行いました。分析スケールではダイオードアレイ検出器から直列でMSDへ接続しました。分取スケールではフローモジュレーターの位置及び検出器までの配管ボリューム、ディレイタイムなどを正しく設定しました。
Automated Purification Softwareでは分析から分取までの一連の流れをタスクとして設定し実行します。
各種付加体を考慮したターゲットピークの同定を行うためのイオン種の設定を図3に示しました。
ギ酸及びギ酸含有アセトニトリルを用いた10%Bから95%Bのジェネリックグラジエントで各試料を分析するためのシーケンステーブルを作成しました(図4)。このとき採取済みの結果セットの読み込みも可能です。

分取設定

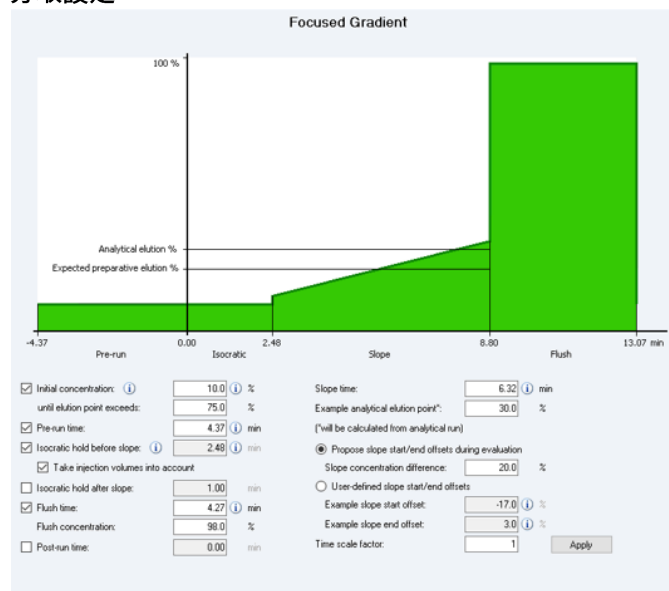


図5. フォカスグラジエントの設定画面

Preparative base method: C:\CHEM2\1\METHODS\DEM0806\PREP.M
Location Mapping: C:\CHEM2\1\PURIFY\TASKS\TASK001\PREP_SEQ_2018-06-05_12:25:11

Review analytical results before publication

Valid	Sample	Identifier	Sample type	Dilution (Analytical)	Location (Analytical)	Location (Preparative)	Inj location	Inj volume (μL)	Target formula	Target mass (g)	Additional masses (g)	Fraction start location
	Sample	P1-81	P1-81	1	10,000	270.0						Next Location
	Sample	P1-82	P1-82	1	10,000	151.0						Next Location
	Sample	P1-83	P1-83	1	10,000	581.0						Next Location
	Sample	P1-84	P1-84	1	10,000	608.0						Next Location
	Sample	P1-85	P1-85	1	10,000	454.0						Next Location
	Sample	P1-86	P1-86	1	10,000	550.0						Next Location
	Sample	P1-87	P1-87	1	10,000	270.0						Next Location
	Sample	P1-88	P1-88	1	10,000	266.0						Next Location
	Sample	P1-89	P1-89	1	10,000	296.0						Next Location

図6. 分取のテーブル

分取精製を行う際のフォカスグラジエントの設定画面を図5に示しました。今回の分析では初期値のまま分析を行いました。図6のように分取を行う際のテーブルを作成しました。個別に注入量などを設定可能です。設定が完了したらタスクを開始することにより、分析を行い、その結果から分取のメソッド設定、実行までを全自動で行いました。今回の検討で設定した部分を下に示しました。一般的なスケールアップのワークフローと比較するとかなり少ないステップで分取精製が実行可能です。

ワークフローの比較

【Automated Purification Softwareを使用した場合】

設定の確認（設定済みなら割愛可能）

- ・イオン種の設定
- ・フォカスグラジエントの設定

タスクの実行

- ・分析のシーケンス実行もしくは結果セットの読み込み
- ・分取のシーケンス実行

【一般的なスケールアップ検討の場合】

分析

- ・ジェネリックグラジエントによる溶出の確認
- ・グラジエント最適化の検討

スケールアップ

- ・線流速をあわせスケールアップ

分取

- ・トリガー条件の検討
- ・分取精製

結果

分析 結果

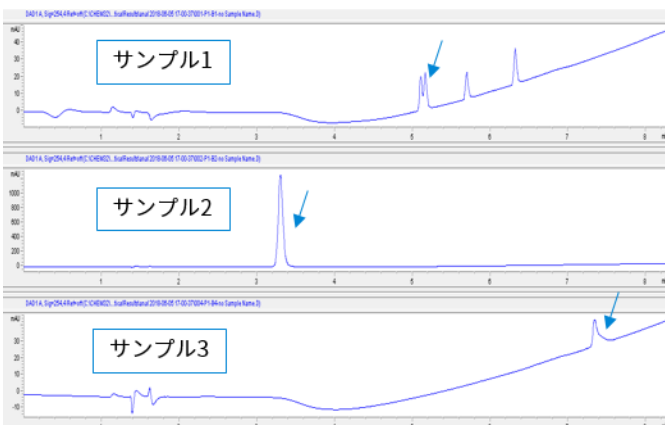


図7. 分析におけるサンプル1、2、3のクロマトグラム
(矢印：ターゲット)

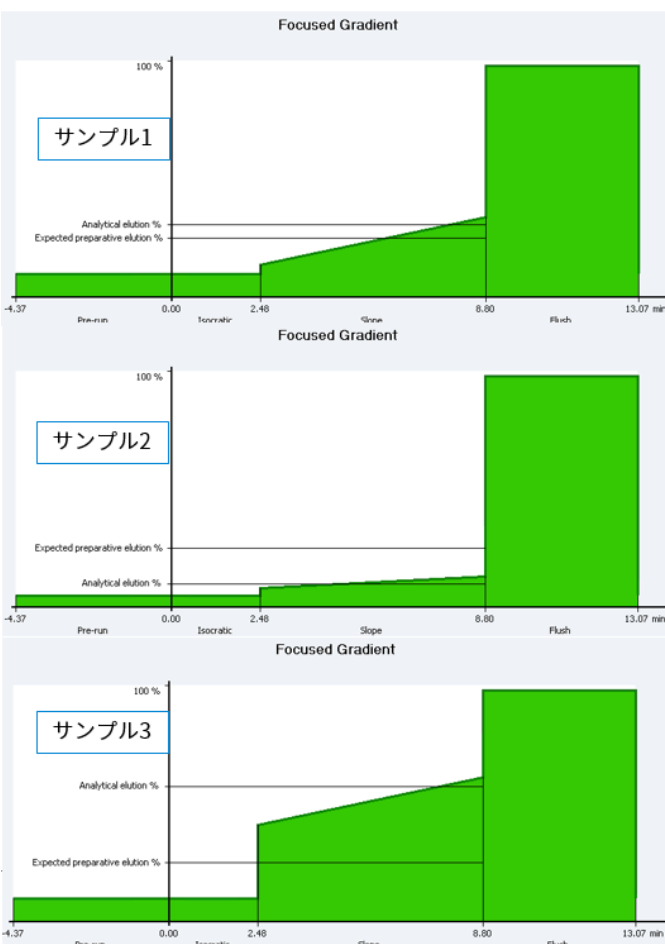


図8. 分析結果から作成されたフォカスグラジエント

ジェネリックグラジエントでは図7に矢印で示したターゲット化合物は、近傍の他の成分の影響を受けたり（サンプル1）比較的有機溶媒比率が低い画分で溶出したり（サンプル2）、保持が強い（サンプル3）などさまざまな保持時間に溶出します。分取を行う際にはターゲット化合物が共雑成分と良好に分離していることが非常に重要なため、ターゲットにフォーカスしたグラジエント設定を行うことにより負荷量を増やした際にも良好な純度の画分を得ることが可能になります（図8）。



図9. 分取分析のUVクロマトグラム（矢印：ターゲット）

図9にスケールアップ後のクロマトグラムを示しました。各化合物の疎水性にあわせたフォーカスグラジエントにより、不十分な分離が改善（サンプル1）、親水性の高い化合物をより保持（サンプル2）、疎水性の高いピークをより早く溶出（サンプル3）しました。サンプル中に存在する可能性がある共雑成分との分離にフォーカスグラジエントが有用であり、多様な化合物への適用が可能であることが示唆されました。

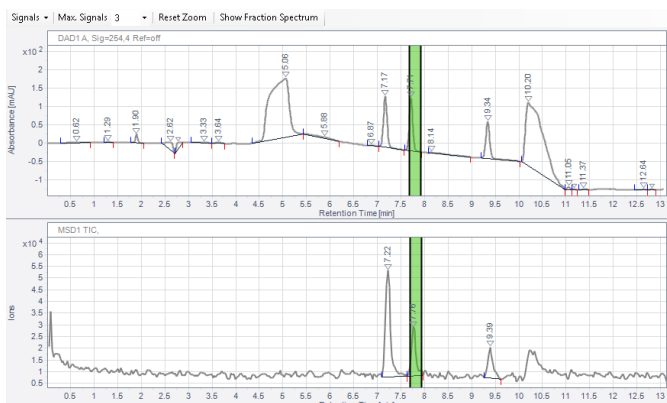


図10. 分取のUVクロマトグラム（上）及びTIC（下）

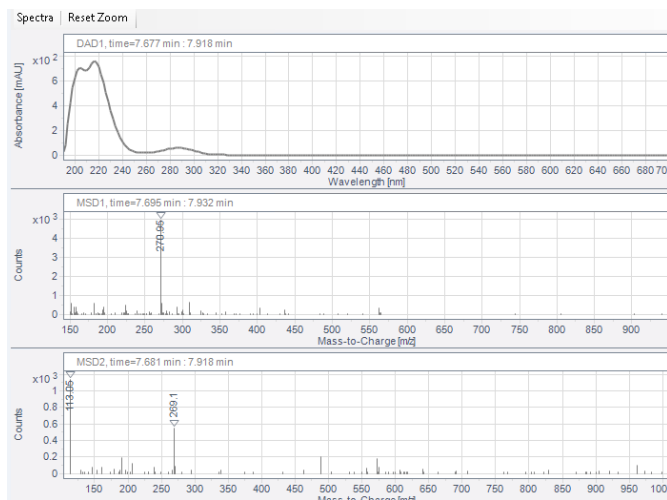


図11. フラクシオンのスペクトル、UV（上）Positive（中）Negative（下）

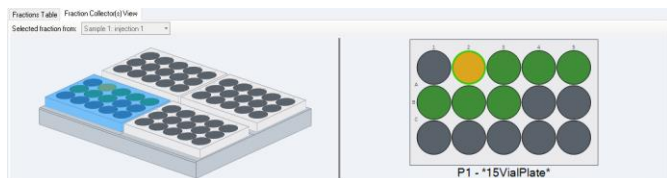


図12. 分取されたフラクションの確認画面

Automated Purification Systemの結果レビューアーでは分取を行ったときのクロマトグラム及びTICなどを比較的容易に閲覧することができます。図10にサンプル1のクロマトグラムを表示させた画面、図11もフラクションのUVスペクトル及びマスペクトルを表示させた画面を示しました。ワンクリックでクロマトグラムやUV及びマスペクトルの表示を行うことができ、採取された画分の定性情報を得ることが可能です。また、フラクションコレクタのどの部分にどのサンプルのフラクションが採取されているかを確認するFraction Collection View（図12）により採取された画分の回収やサンプルとの紐付けが容易です。図12中の着色されたウェルはフラクションが採取されたことを示し、現在表示中のクロマトグラムやスペクトルのフラクションは黄色で示されます。

まとめ

Automated Purification Softwareを用いることにより、分析スケールから分取スケールへのスケールアップを自動化することが可能となりました。広範な化合物に対応するジェネリックグラジエントでは分離が不十分であったり、保持が弱い、あるいは逆に保持が強い化合物に対し、フォーカスグラジエントを個別に作成して、分取メソッドを作成・実行することができます。本実験ではフォーカスグラジエントにより分離良好な分取画分が得られました。

手作業によるスケールアップ検討のステップでは、複数の項目をひとつひとつ設定する必要がありますが、Automated Purification Softwareではタスク実行前の設定を適切に行っておけば、自動で分析から分取までのワークフローを実行することが可能です。

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

LC-201807HK-001