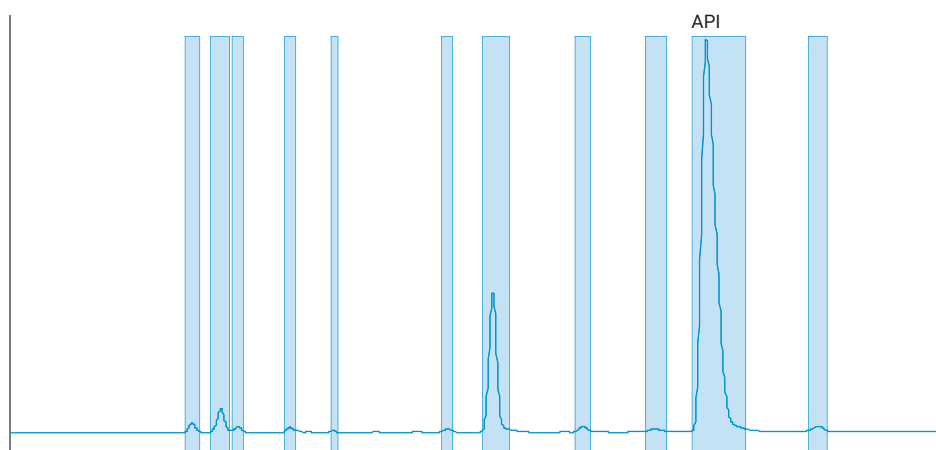


Agilent 1290 Infinity II オートスケール 分取精製 LC/MSD システムを用いた 医薬品不純物の分離と再分析



著者

Florian Rieck
Agilent Technologies, Inc.

概要

不純物を分離して特性評価を進めることは、製薬業界では日常的な作業です。この作業には、分取高速液体クロマトグラフィー（HPLC）がよく使用されます。本アプリケーションノートでは、分析スケールでのメソッド開発、分取条件へのスケールアップ、フラクションコレクション、フラクション再分析などの低分子精製ワークフローを紹介します。すべてのステップは、1 台のAgilent 1290 Infinity II オートスケール分取精製 LC/MSD システムで実行しました。このシステムと Agilent OpenLab CDS ChemStation の機能とを組み合わせることで、ワークフローの手動ステップを最小限に抑えて労力を削減し、エラーの原因を低減できます。

はじめに

有機不純物は、低分子医薬品の合成または長期保管中によく問題になります。登録医薬品の合成から生じる多数の一般的な分解生成物や中間体が、さまざまな薬局方に記載されています。新しい分子が開発されたり、未知の不純物が検出されたりするたびに、その化合物を分離・濃縮し、さらに特性評価することが必要となります。主成分からの不純物の分離には、HPLC がよく用いられます。未知の物質を大量に分離する方法としては、分取スケールの HPLC が選択されます。

分取精製ワークフローは通常、分析スケールでのメソッド開発から始まります。適切な固定相と移動相を見つけ分離グラジエントを最適化したら、分取スケールに条件をスケールアップし、フラクションを収集します。次に、フラクションコレクタで分離したすべての化合物を均質化して再分析する必要があります。このワークフローのステップの一部で手動操作が必要とされます（例えば、サンプルを分析システムから分取システムに移したり、分析システムに再注入するためのフラクションを準備したりする操作です）。

1290 Infinity II オートスケール分取 LC/MSD システムは、分析ハードウェアと分取ハードウェアを 1 つのシステムに組み合わせています。例えば、オートサンブラ/フラクションコレクタの組み合わせによって収集したフラクションは、フラクションベッドから移動することなく均質化して再注入できます。本アプリケーションノートでは、ハードウェアとソフトウェアをうまく組み合わせることで、典型的な精製ワークフローにおける時間の短縮と労力の低減を実現する方法を紹介します。手動の手順の排除は、プロセスからエラーの原因を取り除くことにもつながります。

実験方法

装置構成

この実験では、次のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity II オートスケール分取精製 LC/MSD システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity II 分取バイナリポンプ (G7161B) 50 mL ポンプヘッド付 (オプション #202)
- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7111B)
- Agilent 1290 Infinity II 分取精製 OpenBed サンプラ/コレクタ (G7158B)、5 mL 分取サンプルループ (オプション #241)
- Agilent 1260 Infinity II 可変波長検出器 (G7114A)、3 mm 分取石英製フローセル (#082) 付き
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、10 mm スタンダードセル (オプション #018) 付き
- Agilent 1290 Infinity II 分取カラムコンパートメント (G7163B)
- Agilent 1290 Infinity II MS フローモジュレータ (G7170B)
- Agilent 1260 Infinity II ディレイコイルオーガナイザ (G9324A)、網状ディレイコイル付、内径 21.2 mm カラム/流量 15 ~ 40 mL/min 用 (オプション #210)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 ポジション/14 ポート分取スケールバルブヘッド (G4738A) 付き
- Agilent InfinityLab LC/MSD XT (G6135B)

カラム

- **分析用カラム**：Agilent Prep-C18 Scalar、4.6 × 100 mm、5 µm (部品番号 449905-902)
- **分取用カラム**：Agilent Prep-C18、21.2 × 100 mm、5 µm (部品番号 449905-702)

ソフトウェア

LC および LC/MS システム用 Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition、バージョン C.01.10 [272]

溶媒およびサンプル

使用したすべての溶媒は LC グレードのものを VWR (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレン採水口カートリッジ (Millipak) を装着した Milli-Q Integral システムで調製しました。イブプロフェンナトリウム塩は Sigma (タウフキルヒェン、ドイツ) から購入し、意図的に劣化させました。50 mg/mL の溶液をアセトニトリル/水 (15/85、v/v) で調製し、分析注入用に 1:10 に希釈しました。

メソッドの設定

グラジエント条件は、最初に分析スケール用に開発し、次にジュネーブ大学が開発した HPLC 計算ソフトウェア¹ を使用して分取条件に移行しました。表 1 および 2 にそれぞれ詳細な HPLC と MSD メソッドの設定を示します。

表 1. 分析および分取分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	分析条件	分取条件
移動相	A) 0.1 % ギ酸水溶液 B) 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液	A) 0.1 % ギ酸水溶液 B) 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液
流量	1.5 mL/min	31.86 mL/min
グラジエント	0.00 min ~ 15 % B 8.00 min ~ 95 % B 8.20 min ~ 15 % B	0.00 min ~ 15 % B 0.75 min ~ 15 % B 8.75 min ~ 95 % B 9.00 min ~ 15 % B
ストップタイム	9.5 min	10 min
ポストタイム	1.3 min	1.3 min
注入量	10 µL (スカウティング) 50 µL (フラクション再分析)	3,000 µL
サンプラーのプリセット メソッド	プラグセッティング 2 180 µL ポストサンプルプラグ 25 % メタノール水溶液	プラグセッティング 2 180 µL ポストサンプルプラグ 25 % メタノール水溶液
温度	室温	室温
UV 検出器	254 nm 5 Hz データレート	254 nm 5 Hz データレート
MS 検出	シグナル 1Positive SIM, 56.0 % サイクルタイム <i>m/z</i> 165.1、177.1、179.1、193.1、 206.1、207.1、221.1、223.1 シグナル 2Negative SIM, 44 % サイクルタイム <i>m/z</i> 163.1、175.1、177.1、191.1、 205.1、221.1	シグナル 1Positive SIM, 56.0 % サイクルタイム <i>m/z</i> 165.1、177.1、206.1、207.1 シグナル 2Negative SIM, 44 % サイクルタイム <i>m/z</i> 163.1、175.1、205.1
MSD に対する スプリット比	フルフロー	1,500:1 (モード M1) 1.00 min ON 9.00 min OFF
フラクションコレクション	該当せず	ピークベース3.00 ~ 9.00 min 閾値 5 mAU Up-/down スロープ 5 mAU/s

表 2. MSD スプレーチャンバーの設定

パラメータ	設定値
メークアップ溶媒	0.1 % ギ酸 メタノール/水混合溶媒 (70/30)
メークアップガス流量	1.5 mL/min
イオン源	Agilent Jet Stream エレクトロ スプレー
ネブライザ圧力	35 psig (241.32 kPa)
ドライガス温度	300 °C
ドライガス流量	11.0 L/min
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11.0 L/min
キャピラリー電圧	±4,000 V
ノズル電圧	±600 V

結果と考察

劣化させたイブプロフェンサンプルは、分析スケールで直線グラジエントを用いた HPLC で分析しました。クロマトグラムは、サンプルが分解されていることを示しています (図 1)。不純物を調べるには、分取スケールの液体クロマトグラフィーを使用してすべての未知のピークを収集し、さらなる分析用に十分な量の試料を用意する必要があります。分析クロマトグラムのリテンションタイムと分離能を維持するために、HPLC グラジエント移行カルキュレータ¹ を使用して分析実施条件をスケールアップしました。スケールアップの確認を目的として、まず分取条件下での注入量をオンカラムの 15 mg サンプル用に調整しました。

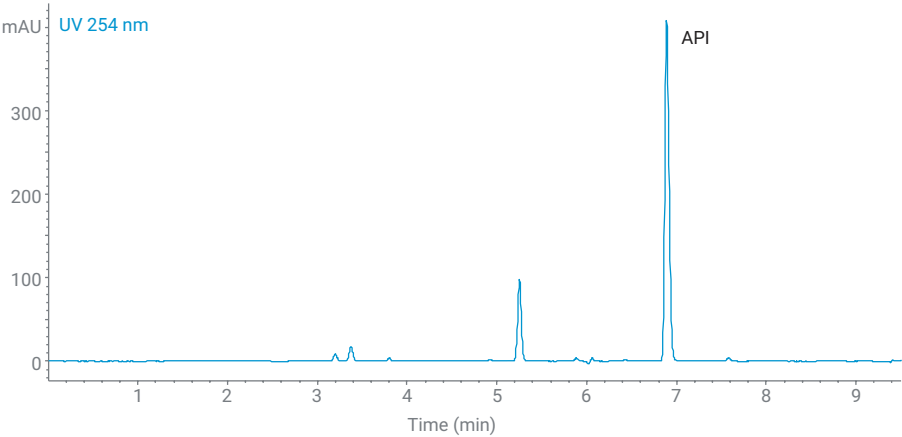


図 1. 分析スケールでのサンプルの分離。複数のピークは、医薬品有効成分 (API) が劣化していることを示しています。

図 2 に、分析分離と分取分離の結果を並べて比較しました。両方のクロマトグラムのピーク溶出パターンは、スケールアップが成功したことを示しています。フラクションコレクション用に注入量をさらに 10 倍に増やして、オンカラムサンプルを 150 mg にしました。コレクションでは、しきい値と勾配の組み合わせを使用して UV 信号でトリガーしました。10 個のピークが正常に収集されました (図 3 参照)。

収集後、質量選択的検出を行う分析条件でフラクションを再分析しました。ChemStation データ分析の [Purify (精製)] ビューには、再注入用のフラクションを収集して再注入シーケンスを自動で設定するツールが用意されています (図 4 を参照)。再分析するフラクションをワンクリックで選択し、シーケンスに追加できます。サンプル名と情報は、分取精製分析を参照して自動的に入力されます。再注入のデフォルトメソッドは、事前に選択できます。一旦、再注入シーケンスを生成して保存すると、オンラインの ChemStation でロードできます。すべてのシーケンスパラメータは送信するまで編集可能です。例えば、注入量を変更したり、シーケンスヘブランクやリファレンスランを追加したりできます。

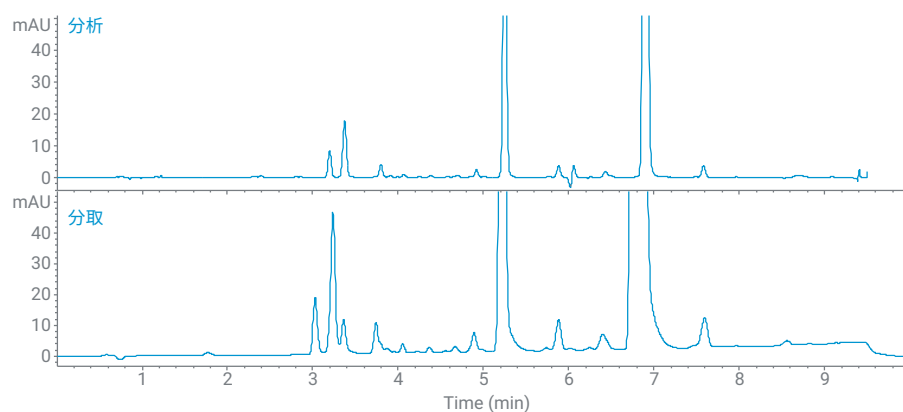


図 2. サンプルの分析スケールおよび分取スケール分離のクロマトグラム

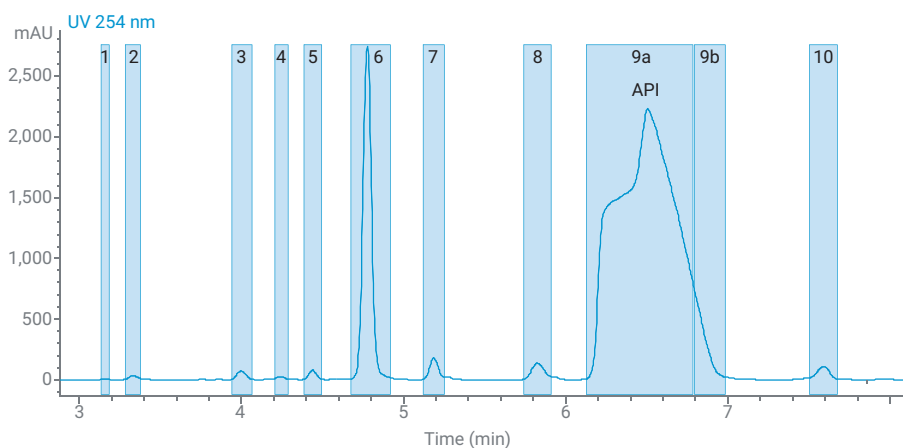


図 3. フラクションコレクションを使用した分取スケール分離のクロマトグラムの切り取り図。青いバーはフラクションコレクションイベントを表しています。オーバーロードが顕著であるにもかかわらず、API は問題なく分離・収集されています。

1290 Infinity II 分取 OpenBed サンプラ/コレクタを使用すると、フラクションを手動で処理することなく、再注入シーケンスのセットアップと実行が可能になります。再分析用に選択したメソッドには、注入前の均質化ステップが含まれていますが、これはオートサンプラが自動的に実行します。フラクションの均質化の重要性については、別の技術概要で詳細に説明されています。²

再分析された各フラクションの純度は、ブランク減算後の 254 nm におけるターゲットピーク面積と総ピーク面積の比によって決定しました。大半のフラクションの純度は非常に高いものでした (>99 % ターゲットピーク面積)。ただし、フラクション 2、3、および 8 の純度はわずかに 45 ~ 70 % でした (図 5 を参照)。これらの不純物は、分析スカウティング中には検出されませんでした。分取条件にスケールアップした後、このカラムの分離能または選択性では、これらの化合物を分離には十分ではありませんでした。不純物のマスペクトルを見ると、最も多いイオンは、検出された化合物がイブuproフェナルデヒド、およびイブuproフェンの 2 つの分解生成物または薬局方記載のイブuproフェン不純物である可能性があることを示しています。これらの不純物のさらなる解明は、認定された標準物質が必要となるため行いませんでした。重要なこととして、ソフトウェアを用いたフラクションの再分析により、すべてのフラクションが分取クロマトグラムで示されるほど純度が高いわけではないことが明らかになりました。これらの結果は、精製ワークフローのルーチンとしてフラクションの再分析を実施すべきであることを裏付けています。これらの実験で用いた 1290 Infinity II オートスケール分取精製 LC/MSD システムにより、収集されたフラクションに触れることなく、最小限の労力でこのステップを実施できます。

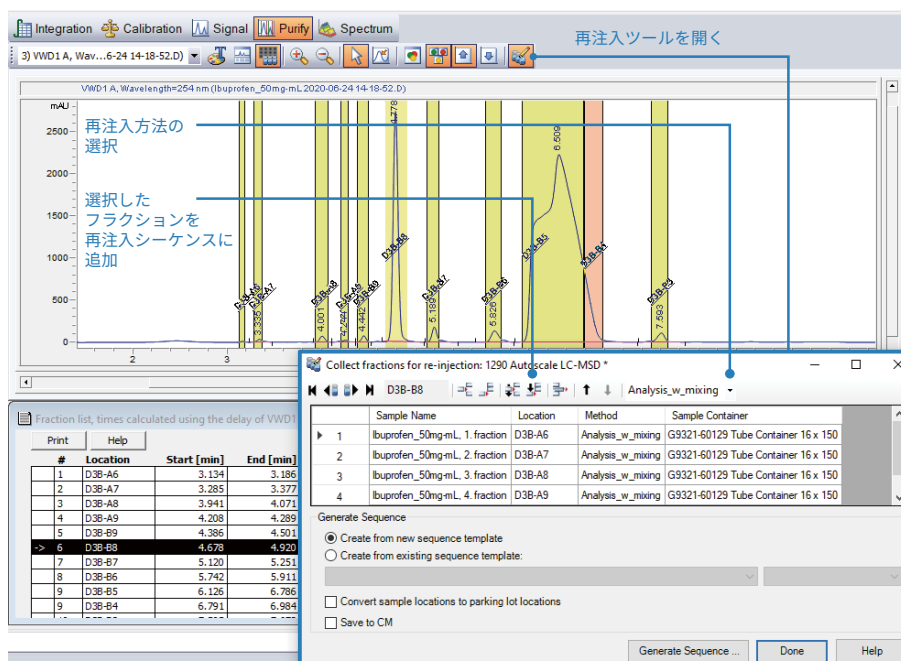


図 4. Agilent ChemStation データ解析の再注入ツール。フラクションを選択すると、再注入シーケンスに追加できます。シーケンスパラメータは事前に入力されていますが、編集可能になっています。

結論

1290 Infinity II オートスケール分取精製 LC/MSD システムを使用して、医薬品サンプルを分析スケールで分離しました。最適化されたメソッドを、すべてのピークの分離を維持しながら、分取条件にスケールアップしました。すべてのサンプル成分の分取精製は、システムの分取フローパスを用いて実行しました。すべてのフラクションを均質化し、再分析を行いました。分析流路に再度切り替えて、ソフトウェアを用いることにより、ユーザーの操作を最小限に抑えてこれらのステップを実行できます。フラクションを手動で処理する必要はありません。3つのフラクションが分取クロマトグラムで示唆されたほど純度が高くない結果となりました。精製を確実に行うには、フラクションの再分析が不可欠であることを示しています。ここに示すシステムを使用すると、ワークフロー全体をより短時間で実行し、ユーザーによる介入を低減できます。

参考文献

1. Guillarme, D. et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, 430-440.
2. Spuling, I.; Rieck, F. Spotting Fraction Impurities with More Confidence Using the Agilent 1290 Infinity II Preparative Open-Bed Sampler/Collector. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-1643EN, **2019**.

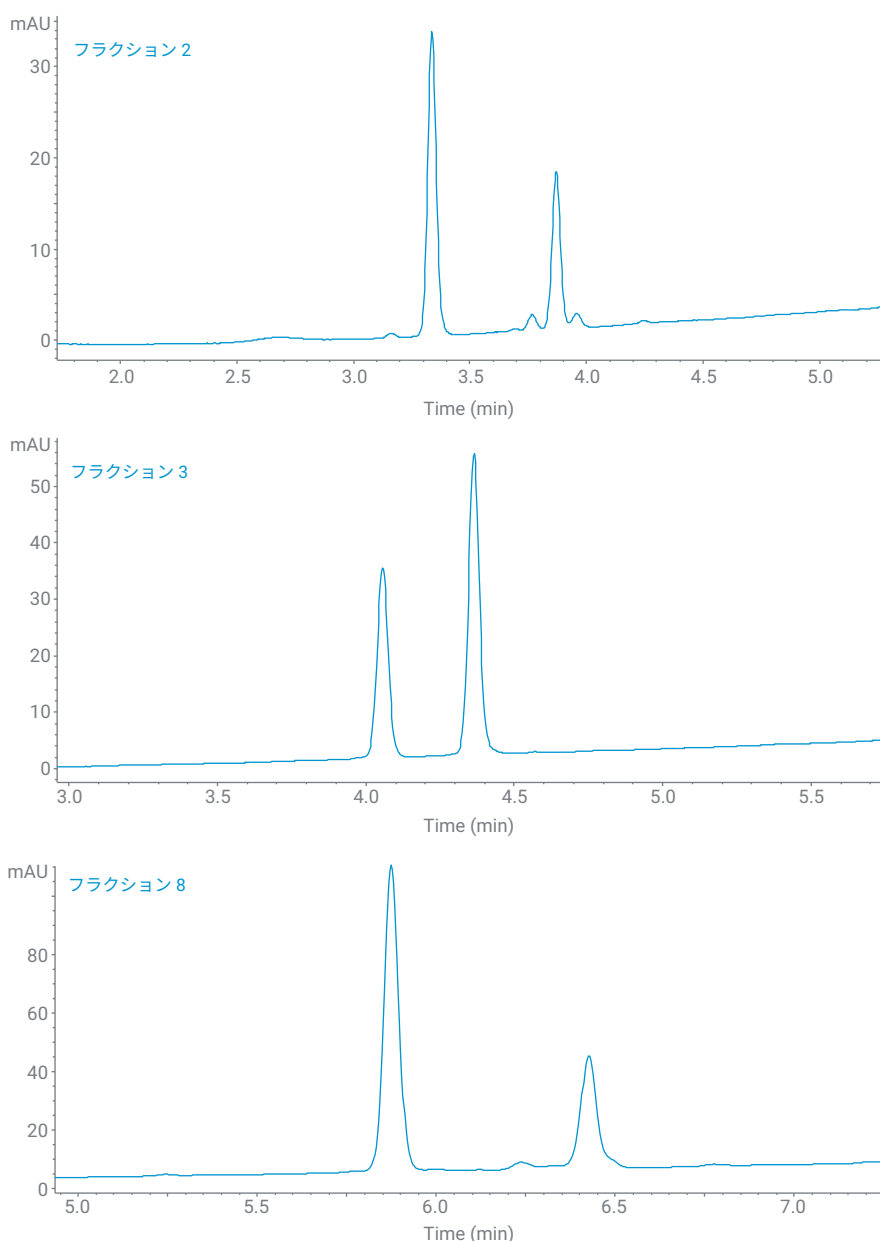


図 5. フラクション再分析のクロマトグラム。一部の不純物は、収集したフラクションを LC/MS で再分析した場合にのみ検出されました。

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. 2020
Printed in Japan, September 2, 2020
5994-2355JAJP
DE.000787037