

LC メソッド開発と頑健性試験の自動化

Agilent 機器コントロールフレームワークを用いた
ChromSwordAuto 5 および Agilent 1290 Infinity II LC

著者

Edgar Naegele and
Andreas Borowiak
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

Sergey Galushko
ChromSword
Muehlthal, Germany

はじめに

アジレントの機器コントロールフレームワーク (ICF) はソフトウェアコンポーネントです。ソフトウェアプラットフォームは ICF を使用して、クロマトグラフィーデータシステムやワークステーション内の Agilent LC 機器を簡単かつ迅速に制御できます。ChromSwordAuto は自動 HPLC メソッド開発に最適なソフトウェアです。このソフトウェアの以前のバージョンは、Agilent ChemStation や他のクロマトグラフィーデータシステム (CDS) によって Agilent LC 機器を制御するように設計されていました。この構成は、異なる医薬品サンプルに対応した自動メソッド開発に使用されていました¹⁻⁴。

ICF により、独立したメソッド開発 CDS^{5, 6} として Agilent LC および SFC 機器と連動する ChromSwordAuto 5 の機能が大幅に拡張されます。ChromSwordAuto 5 のみで、LC と SFC 機器の制御、分析シーケンスの実行、データ採取が可能です。ChromSwordAuto 5 は、Scout、Developer、AutoRobust、ReportViewer の 4 つのアプリケーションで構成されています。Scout はメソッドスクリーニングに使用され、スクリーニングに必要なパラメータを簡単にまとめて入力し、シーケンスを作成することができます。Developer は、設定された移動相の中から、各成分の分離の実現に最適なものを AI テクノロジーにより選択します。分析条件のシーケンスをオペレーターが設定することなく、ソフトウェアがアイソクラティックやグラジエント条件を考え、自動で 3 ~ 5 回 (迅速分析モードの場合) の最適化を行います。また、高分子分析モードや最大ピークの分離にフォーカスしたモードなどがあり、クロマトグラフィーに新しい潮流を与えるものです。AutoRobust はメソッドの頑健性を各種パラメータを変化させてシーケンスを作成し、実験計画法 (DoE) に基づく QbD (Quality by Design) アプローチを実現するもので、デザインスペースの構築が簡単に行えます。Report Viewer は、データブラウジング処理、プロジェクト管理を容易に行うことができます。ICF と ChromSwordAuto を組み合わせることで、両方のタイプの自動化に対応でき、ルーチンおよびインテリジェントメソッド開発ワークフローで研究者を支援できます。

この技術概要では次の点について解説します。

- Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムと ChromSwordAuto および ICF ソフトウェアのシームレスな連携を確実にするために満たす必要がある前提条件
- サポートされているモジュールと機器の機能
- ChromSwordAuto ソフトウェアの使用でサポートされているメソッド開発タスクおよびワークフロー
- ChromSwordAuto のデータ採取、処理、メソッド最適化ツールによって期待に応える 1290 Infinity II UHPLC システムの性能
- 複雑な多成分サンプルを分離できるメソッドの開発

実験方法

装置構成

自動メソッド開発では、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムを次のモジュールで使用しました。

- Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104A)
- Agilent 1290 Infinity パルプドライブ (G1170A) × 2、Agilent InfinityLab クイックチェンジ 12 ポジション/13 ポートバルブ (G4235A) 搭載
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT) (G7116B)、パルプドライブ (G7116B オプション #058) 装着、および Agilent InfinityLab キャピラリーキット (G4239C オプション #005) 装着した Agilent InfinityLab クイックチェンジ 8 ポジション/18 ポートバルブ (G4239C) 搭載
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (DAD) (G7117B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)

ソフトウェア

- ICF A.02.05 パッケージ、LC ドライバ A.02.18 付き
- ChromSwordAuto 5.1 クロマトグラフィーマソッド開発データシステム

ChromSwordAuto 5.1 パッケージには、ChromSwordAuto Scout、Developer、AutoRobust、ReportViewer アプリケーションが含まれています。これにより自動 HPLC メソッド開発のさまざまなタスクをサポートします。

- ChromSwordAuto Scout:** メソッドスクリーニング
- ChromSwordAuto Developer:** 低分子と高分子のメソッドの高速かつ詳細な最適化
- ChromSword AutoRobust:** 頑健性の調査とメソッドの改善
- ReportViewer:** データのブラウジング、処理、プロジェクト管理

ChromSwordAuto には、次のルーチン操作の自動化が組み込まれています。

- カラム平衡化
- カラムウォッシュアウトメソッド
- システムページ
- カラム および溶媒の切り替えシーケンス

ChromSwordAuto 5.1 と ICF の組み合わせの前提条件は次のとおりです。

- 先に ICF と Agilent LC ドライバパッケージを PC にインストール済みであること。
- すべての Agilent LC モジュールのファームウェアバージョンが、A.06.50、B.06.75、D.06.75 以上であること。
- 個々の Agilent モジュールが CAN によって接続されていること。最大データ量 (DAD > FLD > MWD > VWD) を生成する Agilent モジュール内の LAN カードを用いて、機器全体が LAN 経由で PC に接続されていること。

カラム

- Agilent ZORBAX Bonus-RP、100 mm × 2.1 mm、1.8 μm (p/n 858768-901)
- Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18、100 mm × 2.1 mm、1.8 μm (p/n 858700-902)
- Agilent ZORBAX StableBond C8、100 mm × 2.1 mm、1.8 μm (p/n 858700-906)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus、100 mm × 2.1 mm、1.8 μm (p/n 959758-902)

最終メソッド

パラメータ	設定値
溶媒	A) アセトニトリル B) 水 + 0.1 % リン酸、pH = 2.4
流量	0.3 mL/min
グラジエント	0 分: 22% A; 0.6 分: 26% A; 13 分: 30% A; 17.7 分: 55% A
ストップタイム	25 分
カラム	ZORBAX Bonus-RP、 100 mm × 2.1 mm、1.8 μm
カラム温度	30 °C
サンプル	2 μL
DAD	220 nm、データレート: 5 Hz

サンプル

16 種類の農薬化合物がアセトニトリル/アセトン (4:1) 溶液中にそれぞれ 1 mg/mL の濃度で含まれる Agilent 2D-LC チェックアウト標準。構成化合物の特性はサンプルに付属の資料に記載されています (p/n 5190-6895)。

サンプル前処理法: アセトニトリルで 1:10 に希釈し、希釈したものを実験で使用します。

溶媒

すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak 社) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。

結果と考察

メソッド開発の研究

このアプリケーションでは、次のメソッド開発結果が得られました。

- 異なる種類の逆相カラムと異なる有機溶媒による最初の最適化では、機器使用時間が約 48 時間、分析者による手動作業時間は約 1 時間でした。
- データブラウジングと最も有望なカラムの選択では、分析者の作業時間は 1 時間でした。
- 約 16 時間の機器使用時間と 30 分の手動作業時間で、最適なカラムと溶媒の組み合わせを用いた詳細な最終最適化を実行しました。

このソフトウェアの Rapid Optimization (高速最適化) モードでは、グラジエントプロフィールを最適化するために、カラム、溶媒、温度の考えられる組み合わせごとに、分析を 3 ~ 4 回実行します。

高速最適化の研究で得られた最良の結果は、ZORBAX Bonus-RP カラムで達成できました。

最初に適用したグラジエントは、非常に低い濃度の有機溶媒で開始し、40 分で有機溶媒はほぼ 100 % に増加しました。すべての化合物が分析時間の中央の 12 ~ 30 分の間に溶出し、いくつかの化合物では分離が不十分でした (図 1A)。分離を向上させるために最初の有機溶媒の濃度を最大 20 % にしたところ、溶出パターンが分析開始の方向に移動しました。分析時間全体にわたって必要な分離を得るために、最初の実験よりもなだらかなグラジエントを適用しました (図 1B)。しかし、分離は 2 つのケースで十分ではありませんでした。ソフトウェアが考察し、適用した 3 回目のグラジエントで分離を向上することができました。

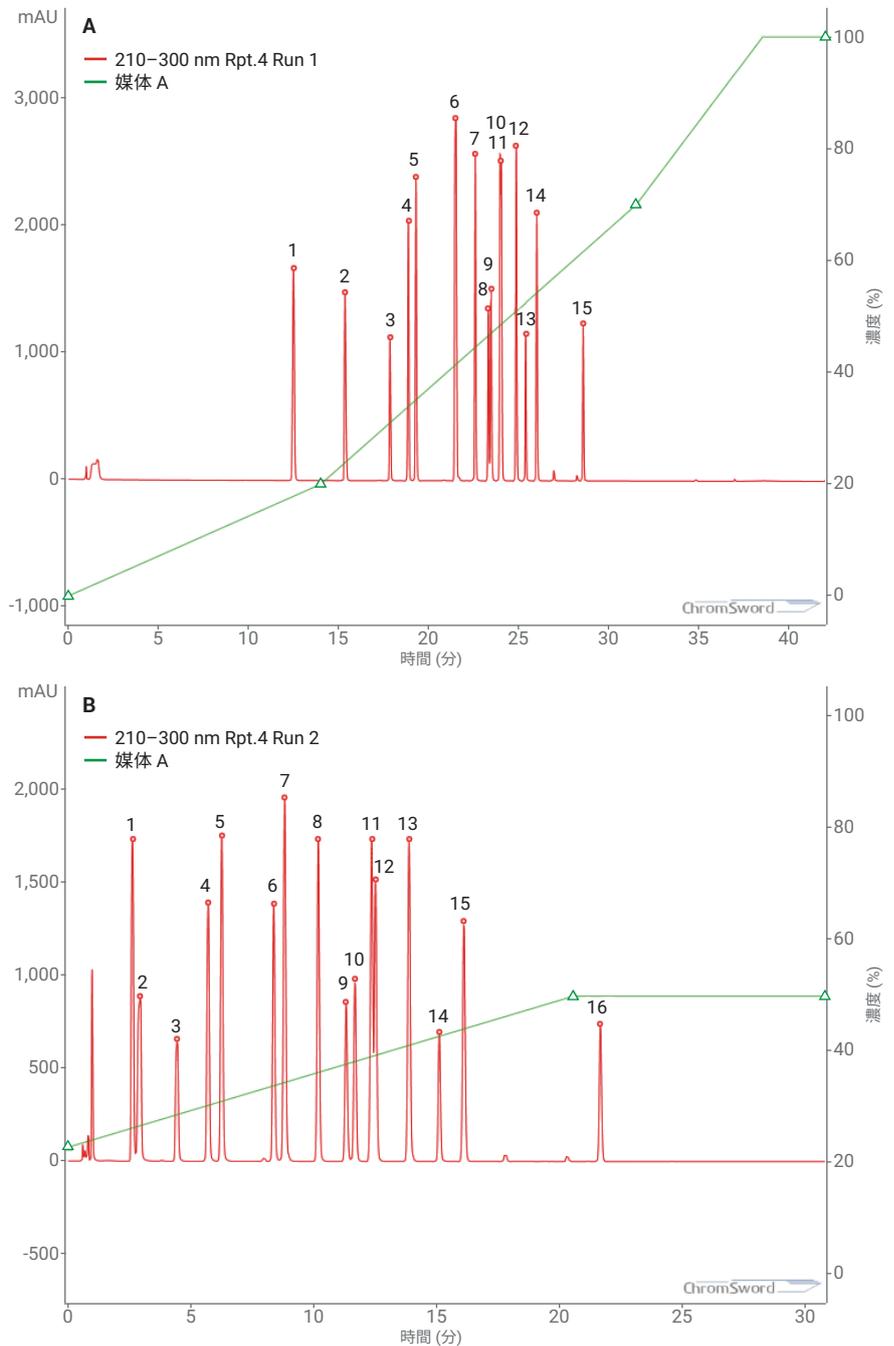


図 1. 16 種類の農薬の分離の高速最適化。A) 複雑なテストサンプルの分離の初期グラジエント。B) 開始条件での有機溶媒の濃度を高め、グラジエント勾配をなだらかにした、最初の最適化

このケースでは、9/10 と 11/12 のピークペアが十分な分離度で分離しました (図 2)。

この最適化の後には、すべての化合物が最大限の分離度で 22 分以内に分離しました。Fine Optimization (最終最適化) モードでは、詳細なサンプルプロファイリング、ピークトラッキング、最適化を実行できました。

頑健性の確認

頑健性試験は、機器使用時間が約 18 時間、レポート作成時間を含めた分析者の作業時間が約 30 分でした。

頑健性の確認のために、AutoRobust では次の異なる実験計画法 (DoE) がサポートされています。

- 一度に 1 つのパラメータ
- 要因分析法
- 最大 7 つのメソッド変数を同時に扱う統計学的 Plackett-Burman 計画

今回は要因分析法を適用し、流量、温度、溶媒 A の濃度 (%) の考えられる組み合わせをすべてテストしました。グラジエント条件を 1 % 間隔で変化させました。

AutoRobust では、選択した DoE が自動的に作成され、その計画法の各分析が実行されます。テストが終了すると、ReportViewer によって結果が解析されます。また、テストでを使用したメソッドのデザインスペースが 2 次元および 3 次元で構築され、重要な分析パラメータのレポートが作成されます。

溶媒 A の濃度と温度の影響について作成された 2 次元分離度マップは、カラム温度が 26 ~ 34 °C、グラジエントの初期の有機溶媒濃度が 25 ~ 27 % のスペースを示しています (図 3)。2 次元スペースにおける実際の実験ポイントは、丸で示されています。基本メソッドである中央のポイントは正方形で示されています。

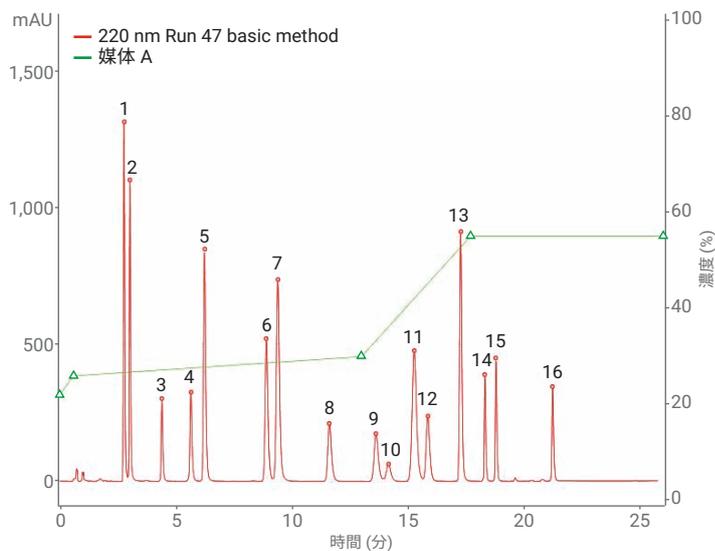


図 2. Rapid Optimization モードで達成した、最終的に最適化されたグラジエントと分離

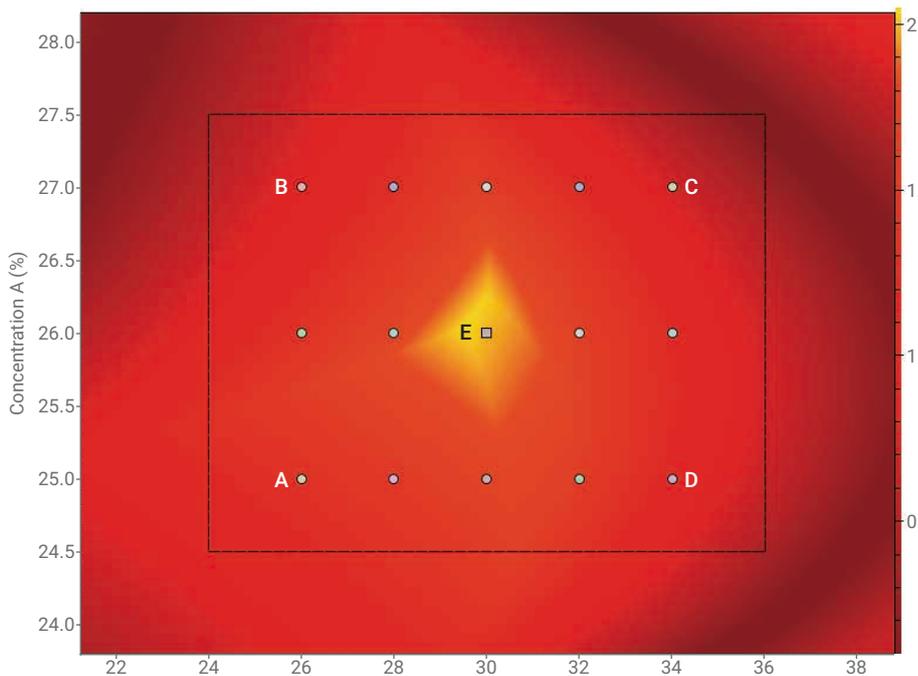


図 3. 溶媒 A の濃度とカラムの温度が化合物の分離能に及ぼす影響を示す 2 次元の分離度マップ。黄色は最適なスペースを示しています。測定ポイントには A ~ E の印が付けられ、図 4 に対応するクロマトグラムと各ポイントで計算された分離度が示されています。

流量 (3 次元) は、基本メソッドで 0.3 mL/min でした。同条件の濃度と温度を用い、流量を 0.2 および 0.4 mL/min として、追加の分析を実施しました。黄色の領域は最適な分離度

の範囲であり、ここでは測定された分離度がすべてのピークペアで 2.0 を超えていました。

図 4 に A ~ E のデータポイントを示します。ポイント A のクロマトグラムでは、ピーク 6 と 7 のクリティカルペアで $R_s = 0.78$ の最小分離度を示します。

ポイント B では同じグラジエント濃度で、ピーク 1 と 2 のクリティカルペアの最小分離度 ($R_s = 0.55$) が得られました。グラジエントに対して温度を変えると、ポイント C および D の結果が得られました (図 4)。この 2 次元ス

ペースの使用可能なクロマトグラムすべてが、実験で得られた結果から計算されます。3 次元目のパラメータとして流量を変えることによって、最適な条件が 0.28 mL/min であると特定することができました。さらに、温度

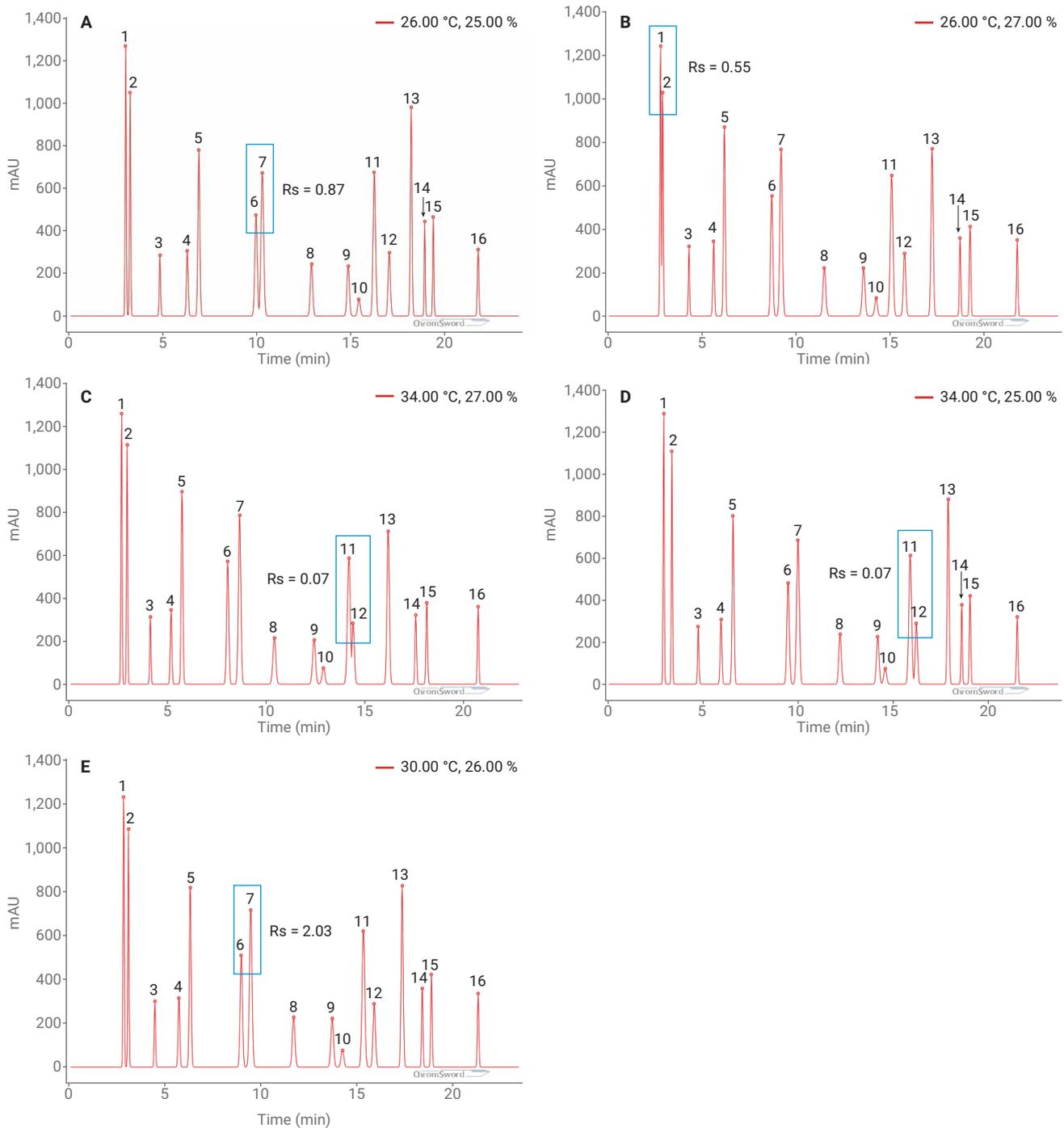


図 4. 図 3 の 2 次元分離度スペースで示された A ~ D の測定されたクロマトグラム。与えられた分離条件下での最小分離度のペアが青線で囲って示されています。クロマトグラム E は、クリティカルペアの分離度がすべて 2.03 を超える最適な条件下で得られたクロマトグラムです。

を 29.5 °C、有機溶媒の初期濃度を 25.9 % とすると、クリティカルピークペアの分離度が 2.03 以上となりました (図 4、クロマトグラム E)。流量が 0.23 mL/min 未満の場合と 3.3 mL/min を超える場合は、この最適な分離度のスペースが消滅します。

結論

1290 Infinity II LC と ChromSwordAuto ソフトウェアを用いた自動メソッド開発により、複雑な混合物を分離する最適な条件を短時間で効果的に特定できます。この技術概要に掲載されている結果は、*Chromatography Today*, Nov/Dec **2018** にも掲載されています。

参考文献

1. Galushko, S.; *et al.* ChromSword Software for Automated and Computer-Assisted Development of HPLC Methods. In *HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization*. Kromidas, S., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006; pp 557–570.
2. Hewitt, E. F.; Lukulay, P.; Galushko, S. Implementation of a Rapid and Automated High Performance Liquid Chromatography Method Development Strategy for Pharmaceutical Drug Candidates. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1107*(1–2), 79–87.
3. Xiao, K. P.; *et al.* Efficient Method Development Strategy for Challenging Separation of Pharmaceutical Molecules Using Advanced Chromatographic Technologies. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1163*(1–2), 145–156.
4. Vogel, F.; Galushko, S. Application of ChromSword Software for Automatic HPLC Method Development and Robustness Studies. Separation of Terbinafine and Impurities. *Chromatography Today* **2013**, 3–6.
5. Zhuang, J.; Kumar, S.; Rustom, A. Development and Validation of a Normal Phase Chiral HPLC Method for Analysis of Afoxolaner Using a Chiralpak AD-3 Column. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54*(10), 1813–1819. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw162>.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

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, 2019

Printed in Japan, March 20, 2019

5994-0373JAJP