

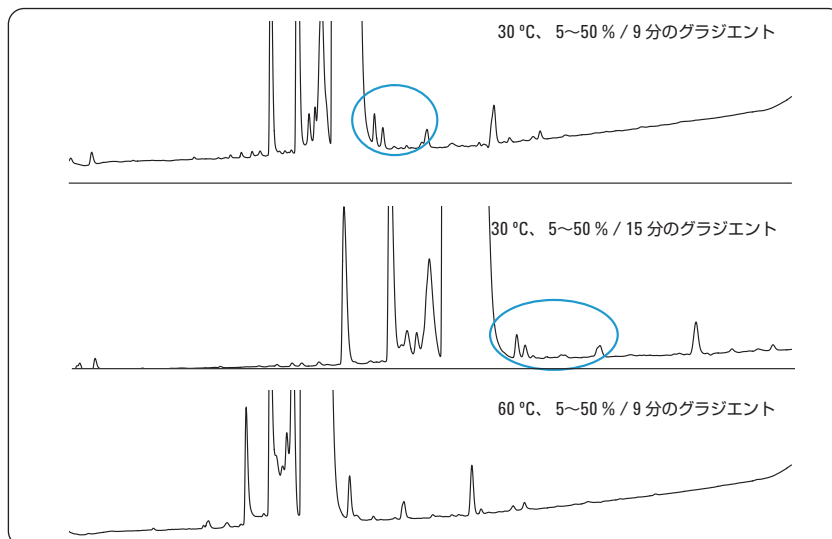
Agilent 1200 シリーズ LC メソッド 開発ソリューションによる メトプロロール錠の分解生成物の 分析メソッド開発

アプリケーション

創薬

著者

Angelika Gratzfeld-Hüsgen
Agilent Technologies
Waldbronn, Germany



概要

Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションは、LCメソッドの開発において最高の柔軟性と自動化を実現します。このシステムを用いて、医薬品の分解生成物分析に最適な分離条件を決定しました。一例として、メトプロロール錠を高温下で劣化させ得られた生成物を、以下を用いて分析しました。

- Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードによるメソッドとシーケンスの自動設定
- 選択性の異なる 6 種類の Agilent ZORBAX RRHT カラム
- 異なる移動相
- 異なる温度とグラジエント



Agilent Technologies

はじめに

新しい医薬品を開発する際には、予想外の分解物や有害な分解物の生成を防ぐために、有効成分および薬剤の有効期間や安定性を確認することが重要となります。薬剤をさまざまな条件下におき、生成する化合物をおもに HPLC により分析します。分解生成物が主成分と共溶出ししないようにするためには、使用する分析メソッドでサンプル中のすべての化合物を確実に分離する必要がありますので、適切な LC メソッド開発が求められます。一般に、分離状態の全体像をすばやくとらえ、最終的なメソッドの微調整に向けた適切な最初の条件を得るためには、各種の溶媒を用いて一連のカラムをテストすることから始まります。このメソッドスカウティングプロセスは、一連の化合物の分離に最適なカラムや移動相を見つけるのに役立ちます。メソッドスカウティングのための完全に自動化されたシステムがない場合は、メソッドスカウティングには多くの時間を消費することとなります。

Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションは、長さ 100 mm までのカラムを最大 8 本、長さ 300 mm までのカラムを最大 6 本使用できる柔軟性のきわめて高いシステムです。また、Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを使えば、メソッドとシーケンスの設定を自動化し、カラム、溶媒、グラジエント設定、温度の組み合わせをスクリーニングできます。さらに、メソッド開発とメソッド最適化を完全に自動化するために、アジレントのパートナーにより、以下のようなきわめて高度なメソッド開発ソフトウェアが提供されています。

- ChemStation 用 ChromSword Auto (ChromSword Baltic)
- ChemStation 用 ACD/AutoChrom (ACD/Labs)

このアプリケーションノートでは、以下のことを解説します。

- メトプロロール錠の分解生成物を例に、Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを用いてシーケンスを設定する方法
- 6 種類のカラムと 2 種類の移動相設定を用いた分解生成物の分析
- 2 種類の温度で 1 つのカラムと 2 つのグラジエントを用いたメソッドの微調整

実験

使用機器

Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションを Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC システムで構成しました。LC システムは、ファームウェアリビジョン A.06.01 以上の下記の本ジュールで構成されています。

- デガッサを搭載した Agilent 1200 バイナリポンプ SL
- Agilent 1200 高性能オートサンブラ SL Plus
- バルブドライブを内蔵した Agilent 1200 カラムコンパートメント SL Plus (G1316C) 2 台
- Agilent メソッド開発バルブキット (高圧用)
- Agilent メソッド開発用キャピラリキット (短いカラムに適した低拡散のキット)
- Agilent 1200 ダイオードアレイ検出器 (DAD) SL
- 複数の Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューションハイスループット (RRHT) カラム、粒子径 1.8 μm
- Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを搭載した Agilent ChemStation B04.01

サンプル前処理

メトプロロール各 50 mg を含む 2 つの錠剤を粉砕し、80 °C で 3 時間加熱しました。残留物を水 4 mL に溶解し、シリンジフィルタを用いて 2 段階のろ過を行って不溶物をすべて除去しました。シリンジフィルタは、最初に Minisart 0.8 μm フィルタ、次いで Agilent 0.45 μm フィルタを使用しました。得られた溶液 1 mL をサンプルとしました。

結果と考察

Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザード

Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードは、Agilent ChemStation ソフトウェアのアドオンです。これを使えば、複雑なマトリックスのサンプル分析用に選択した一連のカラム、溶媒、グラジエント設定、温度をスクリーニングするのに必要なメソッドとシーケンステーブルを、簡単かつ論理的に作成することが可能です。

メソッドスカウティングキャンペーンの設定は、複数のステップで構成されています。

- 新しいスクリーニングキャンペーンの作成 (図 1)

このステップでは、キャンペーンのルートフォルダと名前を設定を行い、キャンペーン内容が表示されます。新しい実験を設定する際には、必ずこのステップから始めます。

あらかじめ定義されたスクリーニングキャンペーンをロードし、修正することもできます。新しいサンプルを分析する際、標準化されたメソッドスカウティング手順を繰り返す場合には、この方法がきわめて効果的です。

- スクリーニングキャンペーンの定義 (図 2)

このステップでは、マスターメソッドとキャンペーン範囲を選択します。スカウティングキャンペーン中に変更されないすべての基本パラメータ (検出器設定など) は、マスターメソッドから読み込まれます。

- カラムスクリーニングの設定 (図 3)

この画面では、検討するカラムを選択します。ここに表示するカラムは、「more column thermostat cluster (カラムサーモスタットクラスターの詳細)」 > 「Instruments (機器)」にある「configure columns screen (カラム画面の設定)」であらかじめ定義しておく必要があります。定義されたカラムは、Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードにより自動的に認識されます。

- 溶媒選択の設定 (図 4)

Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードは、システム内に存在するポンプの種類 (バイナリまたはクォータナリ) を識別します。また、その他の外付け溶媒選択バルブ (G1160A) や内蔵溶媒選択バルブが存在するかどうかを認識します (バイナリポンプのみ)。溶媒はあらかじめ定義された名前とともにソフトウェア内で表示されます。

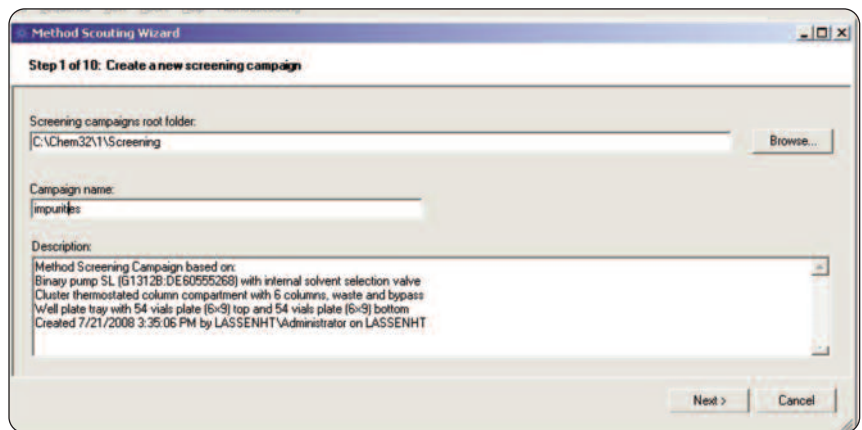


図 1
キャンペーンの開始

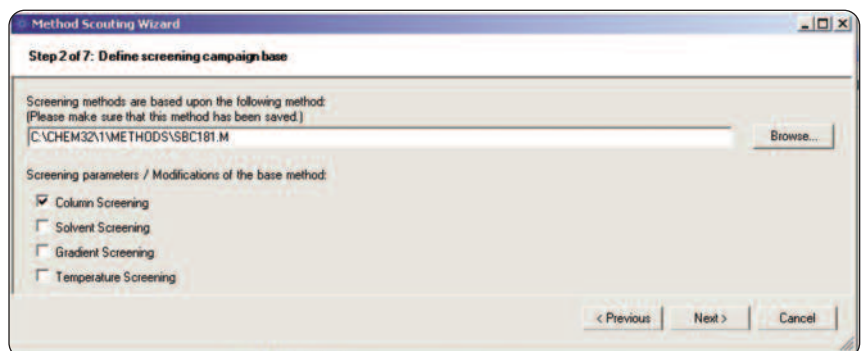


図 2
キャンペーン範囲の定義とマスターメソッドの選択

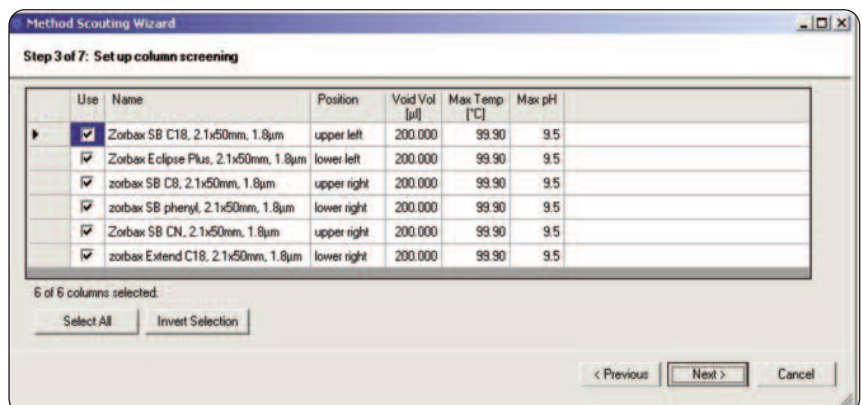


図 3
カラムの選択

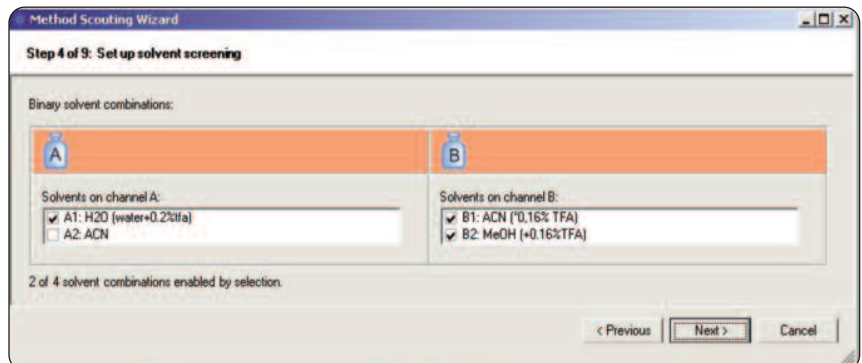


図 4
溶媒設定の選択

- グラジエント選択の設定 (図 5)

現在のスカウティングキャンペーンについて、あらかじめ定義された複数のグラジエントのバリエーションが選択された場合は、図 5 に示す画面が表示されます。この画面では、グラフを用いたり、グラジエントテーブルに適切な値を入力したりして、グラジエントを定義できます。同様に、あらかじめ定義された温度を選択し、スクリーニング列に加えることも可能です (図表なし)。

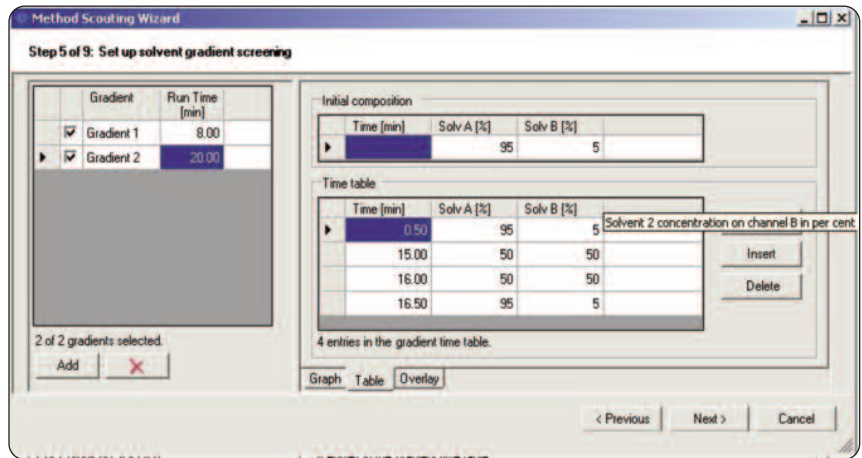


図 5
異なるグラジエントの設定

- メソッドの確認と選択 (図 6)

次の画面では、作成される必要なカラムとメソッドの組み合わせを確認できます。フルスクリーンの列が必要ない場合は、ユーザーにより不要な組み合わせを除外できます。また、選択したカラムに適さない温度と溶媒の組み合わせを自動的に除外できます。これはカラムの寿命を長くするのに役立ちます。

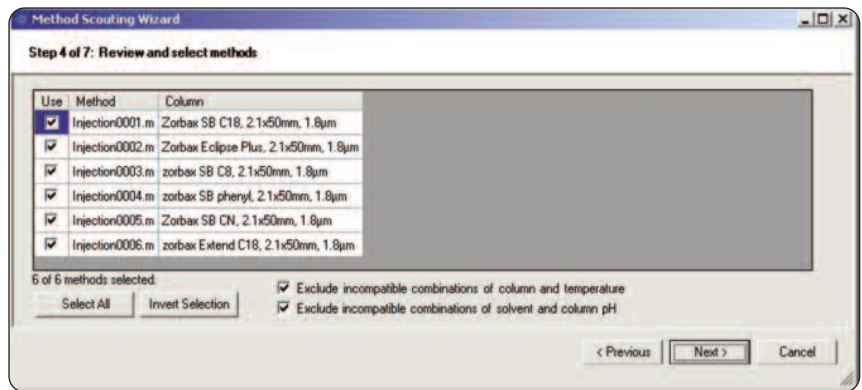


図 6
メソッドの確認と選択

- 平衡化時間とフラッシュの設定 (図 7 および 8)

ここでは、「フラッシュとカラムケア」に関するパラメータとカラム平衡化時間を定義します。フラッシュの設定には、廃液およびバイパスポジションを定義する必要があります。この設定には、溶媒変更時に混和する可能性のある混和性溶媒および非混和性溶媒、複数のデガッサのポジション、カラム使用後の各種処理手順に対応する多くのオプションがあります。

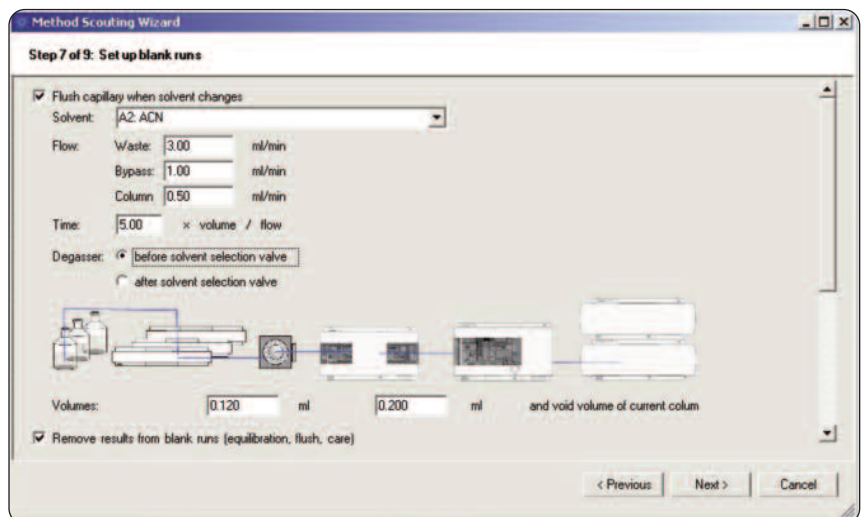


図 7
溶媒変更時のフラッシュ条件

• サンプルの設定 (図 9)

この画面では、サンプルを定義します。また、バイアルあたりの注入数、注入量、バイアルサイズも定義します。ユーザーが参考にできるように、シーケンスを完了するのに必要なサンプル量が計算されます。「Add (追加)」ボタンをクリックするだけで、サンプル行を追加することができます。

• サマリー (図 10)

最後に、キャンペーンの説明、シーケンスサマリー、溶媒使用量および廃液量の推定値などを含むスクリーニングキャンペーン全体に関する情報が、サマリー画面に表示されます。「Finish (完了)」ボタンをクリックすると、すべてのメソッドが生成され、プロジェクトフォルダに保存されます。シーケンスとスクリーニングキャンペーンの定義も保存されます。

キャンペーン設定が完了したら、シーケンスをロードし、開始することができます。

実施例

以下の実施例では、メトプロロール (主成分) とその分解生成物を含むサンプルを選択しました。

メソッドスカウティングは以下の手順で実施しました。

- C18 カラムで最初のテストクロマトグラムを採取
- 2 種類の移動相で 6 種類のカラムをテスト
- ピーク数のもっとも多いカラムおよび移動相のセットを選択
- 選択したカラムのグラジエントと温度のバリエーション
- 最終条件の選択

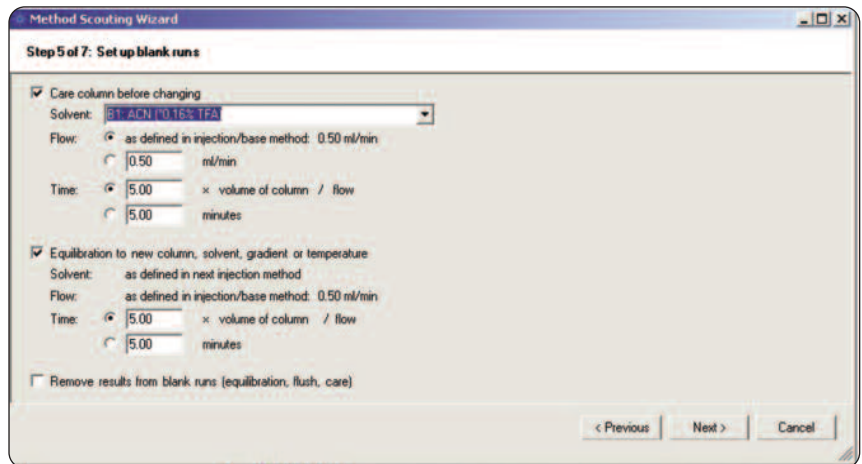


図 8
カラムケアおよび平衡化の設定

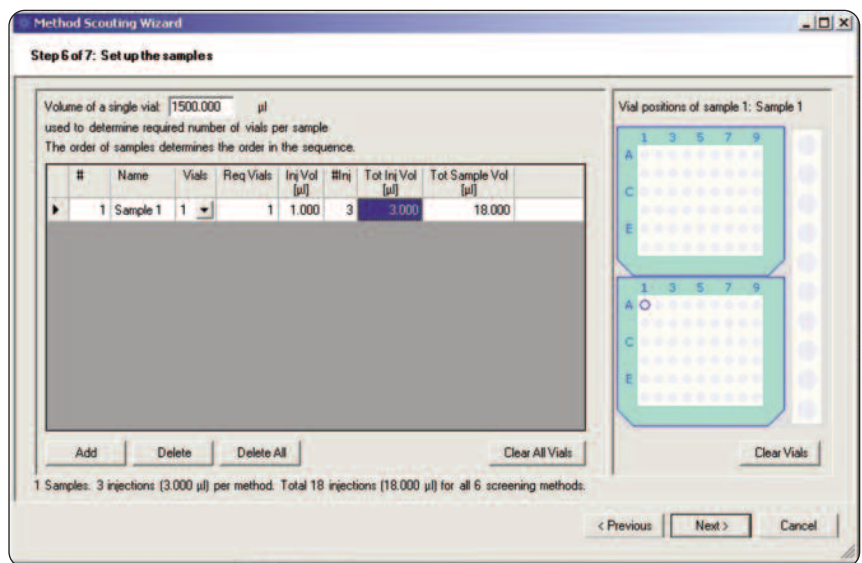


図 9
サンプルの設定

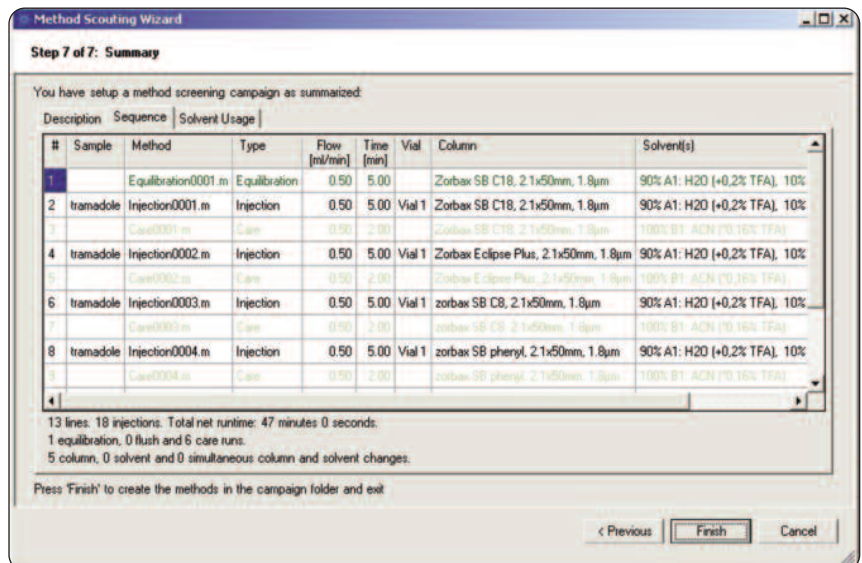


図 10
自動生成されたシーケンス

初期テストの条件

サンプル： メトプロロールと分解生成物
カラム： 2.1 x 50 mm カラム、
粒子径 1.8 μ m
移動相： 水 + 0.2 % TFA / ACN + 0.16 % TFA
流量： 0.5 mL/min
グラジエント： 5~50 % / 5 分
注入量： 1 μ L
カラム温度： 30 $^{\circ}$ C
DAD： 210、230、254、280/10 nm、
Ref 360/100 nm、
セルの光路長 3 mm、
サンプリングレート 20 Hz
配管： 0.12 mm キャピラリーおよび低拡散
熱交換器を用いた低ディレイボ
リュウム設定

最初の実験には Agilent ZORBAX SB-C18 カラムを用いました (クロマトグラムと条件は図 11 を参照)。移動相にはトリフルオロ酢酸 (TFA) を添加しました。最初の実験に用いたカラムのサイズは、2.1 x 50 mm です。このカラムの場合、有機溶媒 5% → 50% のグラジエントから始めるのが最適です。最初の実験の結果から、メトプロロール錠の加熱により、分解物が生成されたことがわかりました。

メソッドスカウティングの実験には、図 12 に示す 6 種類のカラムを選択しました。Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを用いて、シーケンスを設定しました。選択した溶媒の組み合わせは、アセトニトリル (ACN) と水、およびメタノール (MeOH) と水です。いずれも TFA を添加しました。マスターメソッドの設定後、Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを起動させ、ウィザードを用いて適切なシーケンスを設定しました。ACN/水を移動相に用いた場合のカラム 6 種類のクロマトグラムを図 12 に示しています。MeOH/水では、ACN/水よりもパフォーマンスが低くなりました。

スカウティングの実験条件

サンプル： メトプロロール分解生成物
カラム： 2.1 x 50 mm カラム、粒子径 1.8 μ m
移動相： 水 + 0.2 % TFA / ACN + 0.16 % TFA、または水 + 0.2 % TFA / MeOH + 0.16 % TFA
流量： 0.5 mL/min
グラジエント： 5~50 % / 5 分
注入量： 1 μ L
カラム温度： すべて 30 $^{\circ}$ C
DAD： 210、230、254、280/10 nm、
Ref 360/100 nm、
セルの光路長 3 mm、
サンプリングレート 20 Hz
配管： 0.12 mm キャピラリーおよび 1.6 μ l 低
拡散熱交換器を用いた低ディレイボ
リュウム設定

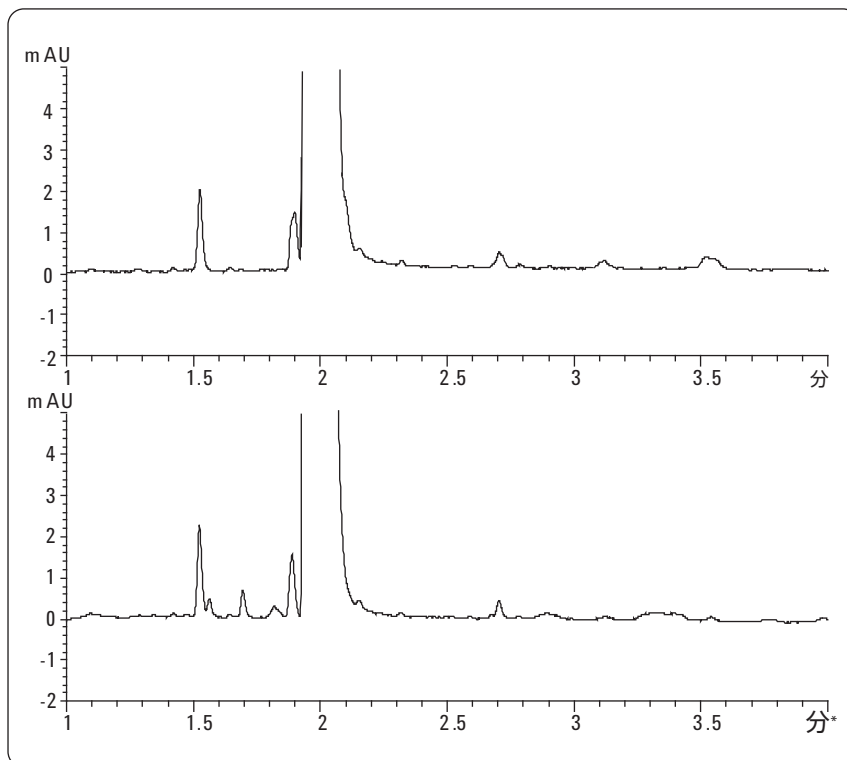


図 11
最初のテストで得られたクロマトグラム。上図：加熱前。下図：加熱後。

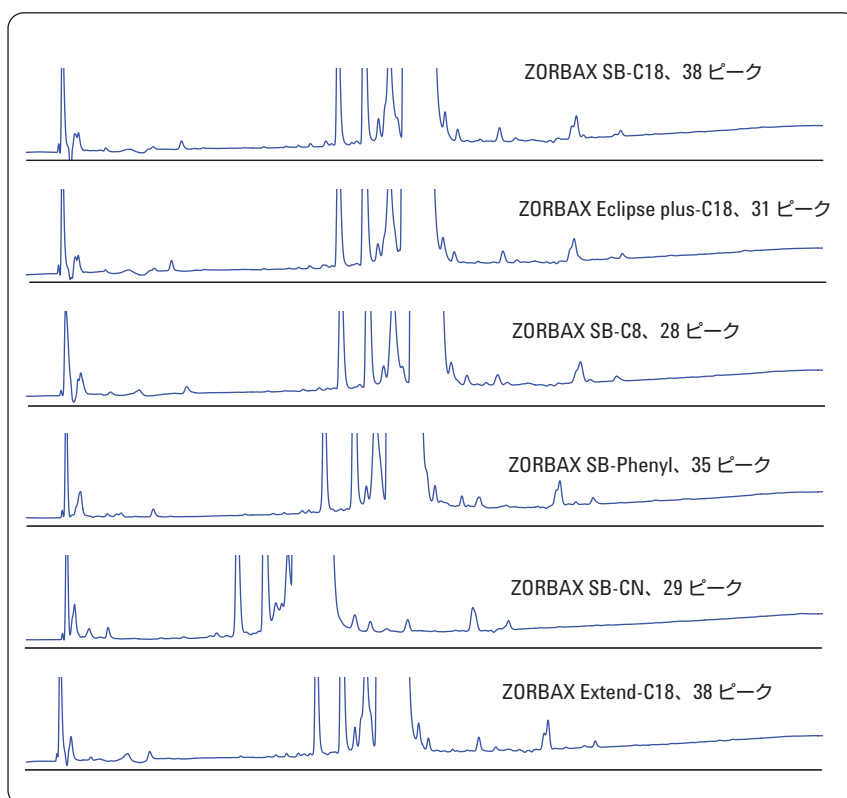


図 12
メソッドスカウティングの実験で得られた結果

最適な分離が得られるカラムとして、Agilent ZORBAX SB-C18 カラムを選択しました。この実験では、より多くのピークを得るためには、2つの波長が必要であることが示されました (図 13)。

上で述べた条件における 6 種類のカラムと 2 セットの溶媒を用いたカラムスクロマトグラフィ手順の所要時間は、全体で約 6 時間でした。手順はすべて、完全な無人操作で実施できました。

条件を最適化する実験では、選択したカラムを 2 種類のグラジエントパターン (ACN/水) および 2 種類の温度で使用しました (図 14 および 15 参照)。勾配の緩い 30 °C の条件で、最高の分離能が得られることがわかります。特に、メインピーク後に溶出するピークについては、この条件が適しています。

この微調整プロセスでは、約 2.5 時間で、選択したクロマトグラフィ条件における 2 つのグラジエントと 2 つの温度の評価が完了しました。

最終的なメソッドとして、以下の条件を選択しました (図 14 および図 15 の中央のクロマトグラムを参照)。

- ・カラム： Agilent ZORBAX SB-C18
RRHT, 2.1 x 50 mm、
粒子径 1.8 μm
- ・移動相： 水 + 0.2 % TFA / ACN +
0.16 % TFA
- ・流量： 0.5 mL/min
- ・グラジエント： 5~50 % / 15 分
- ・注入量： 1 μL
- ・カラム温度： 30 °C
- ・DAD： 210、280/10 nm、Ref
360/100 nm、
セルの光路長 3 mm、
サンプリングレート 20 Hz
- ・配管： 0.12 mm キャピラリーおよび
低拡散熱交換器を用いた低
ディレイボリューム設定

図 16 では、メトプロロールと分解生成物のスペクトルを比較しています。一部のスペクトルは、主化合物から得られたスペクトルときわめてよく似ています。Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムなどの適切な LC/MS システムでこのメソッドを利用すれば、構造をさらに検証することが可能です。

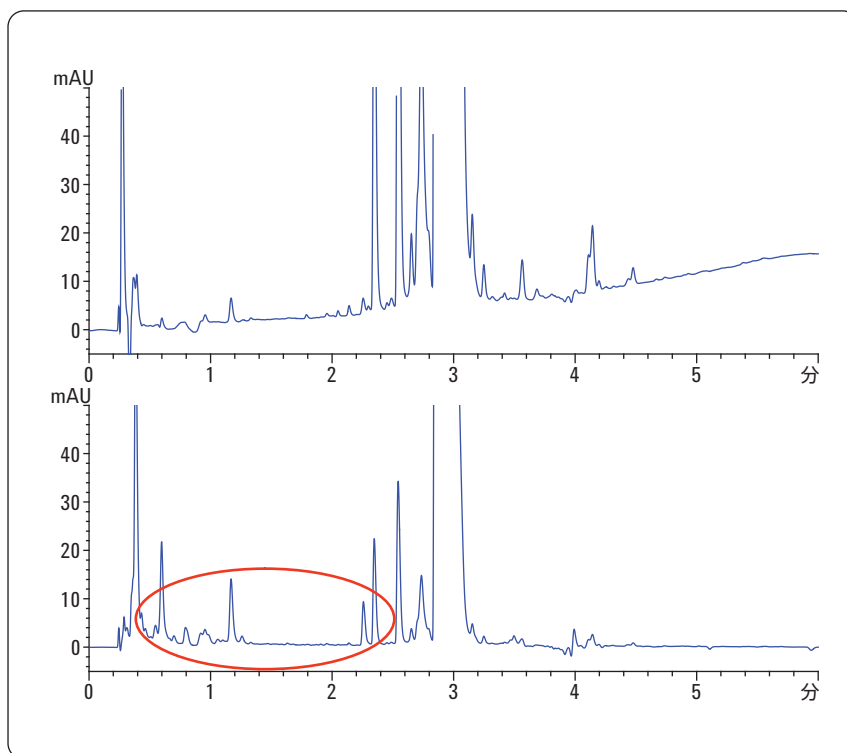


図 13
2 つの波長により、検出されるピークが多くなります。

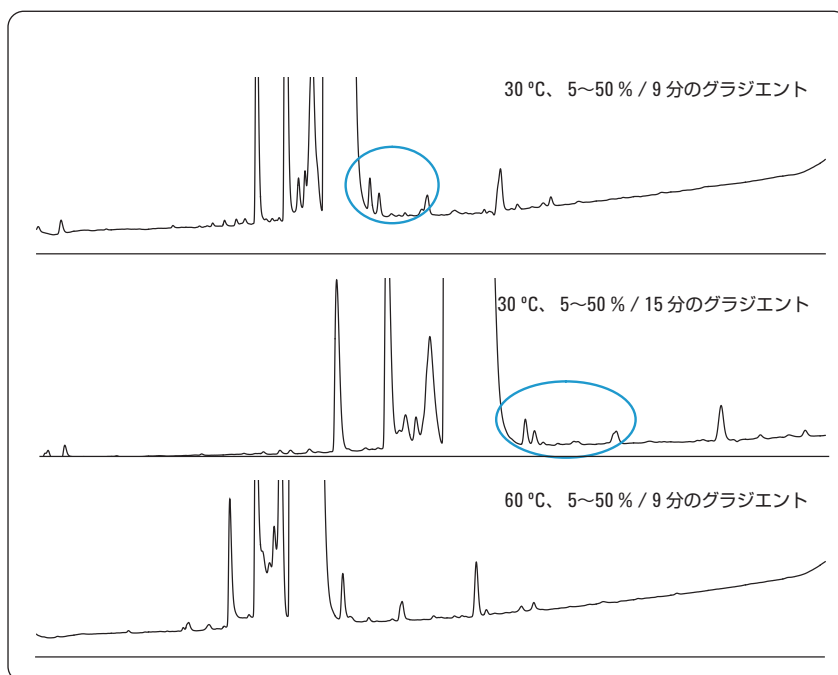


図 14
検出器波長 230 nm におけるメソッドの微調整

結論

Agilent 1200 シリーズメソッド開発ソリューションは、LCメソッドの開発において最高の柔軟性と最高の性能を実現します。Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを使えば、スカウティング実験をきわめて簡単かつ論理的な方法で設定することが可能です。複数のカラムや溶媒を用いた複雑なシーケンスでも自動的に設定でき、メソッドを手動で作成する必要はありません。また、カラムケア、フラッシュ、平衡化の条件も、クリック数回で自動的に設定できます。

Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを使って、メトプロロール錠の分解生成物を分離するメソッドを開発しました。6種類のカラムと2セットの溶媒の組み合わせをすべてスクリーニングし、その後、2種類のグラジエントと2種類の温度を用いて微調整を行いました。すべての手順を1日以内で終えることができました。ほとんどの時間、システムは無人で稼動するため、実験実施者は他の仕事を行うことができました。

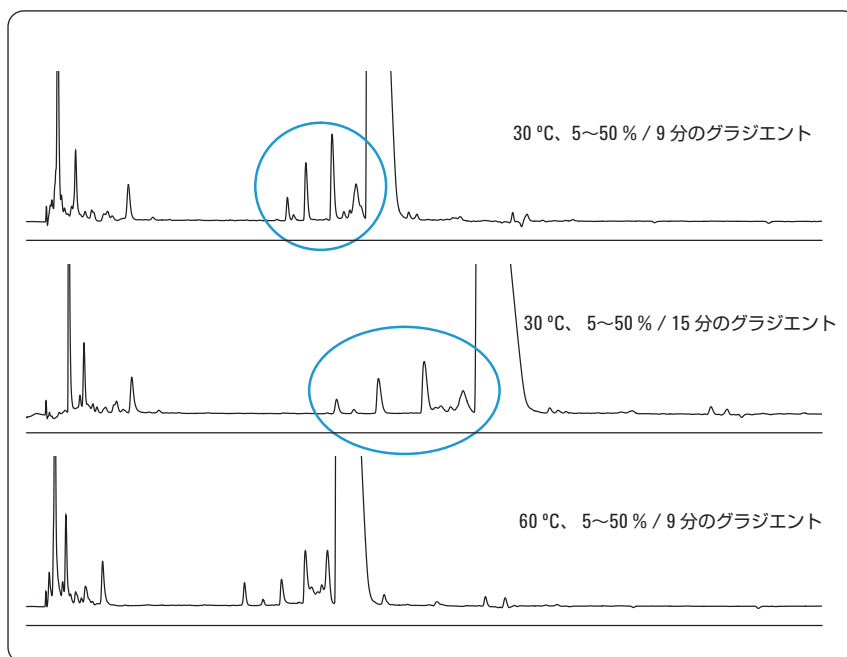


図 15
検出器波長 280 nm におけるメソッドの微調整

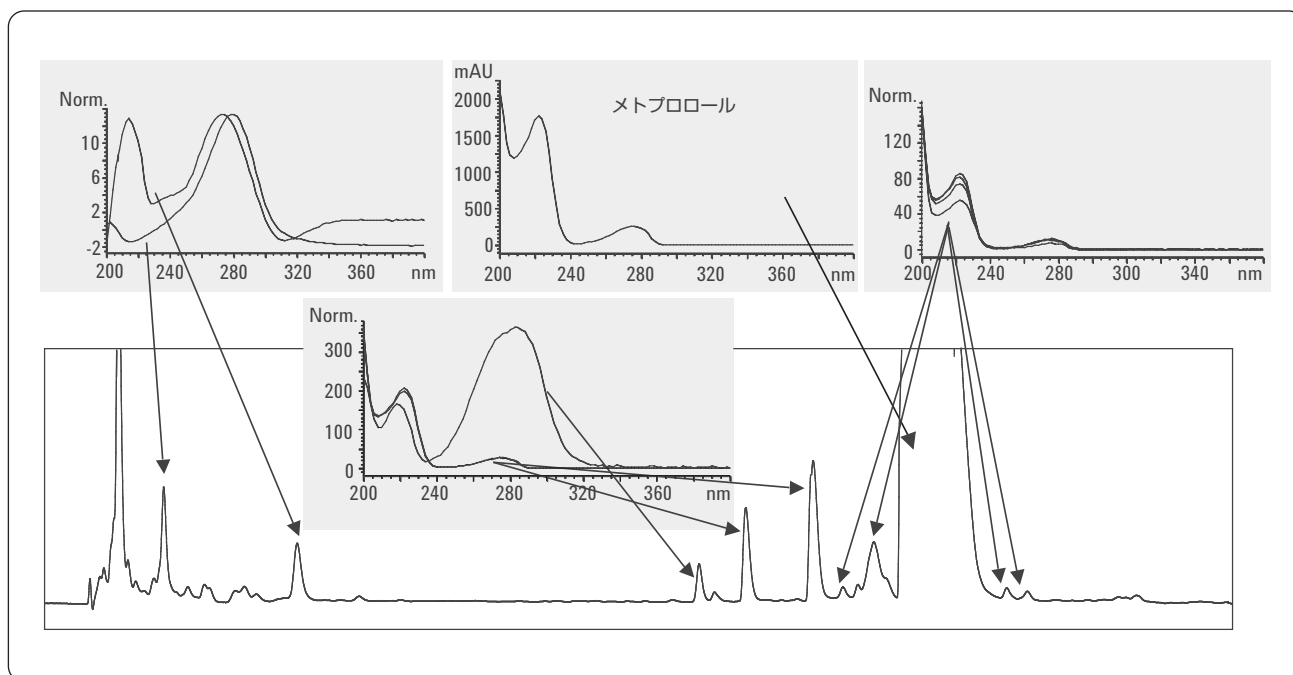


図 16
メトプロロールと分解生成物のスペクトル

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2008
Published October 1, 2008
Publication Number 5989-9339JAJP



Agilent Technologies