[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

医薬品ライブラリの分析および分取精製における効率的な手法の開発
～UPLC/MS分析からMSトリガー自動分取精製システムへ

No. 720002267J

Paul Lefebvre, Marian Twohig, Ronan Cleary
Waters Corporation, Milford, MA 01757

概要

精製を主な業務とされるラボも、分析系ラボと同様にスループットやパフォーマンスの向上が求められています。また精製ラボでは、純度が高く充分な量のフラクションをいち早く精製できるかが評価されます。

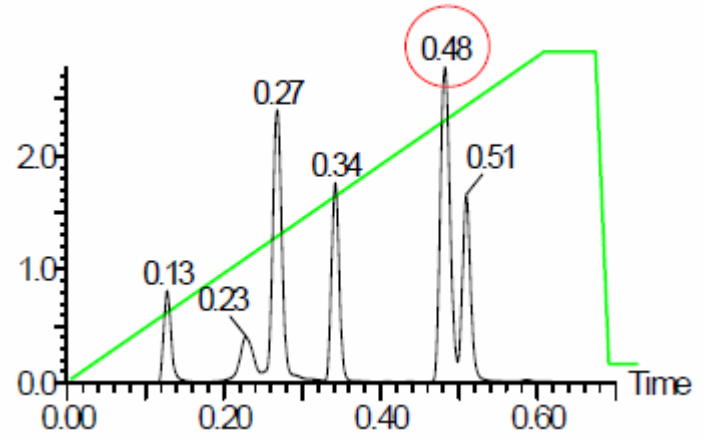
UltraPerformance LC® (UPLC®)は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を上回る 感度、分離能、スピードといった特徴から、クロマトグラフィーを行う研究者に広く受け入れられています。最近では、このUPLC®システムがサンプル精製前にサンプル評価のスクリーニングツールとして、使用されるようになりました。

また分析時の測定と同様の選択性と分離能を維持するには、分取時の測定サイクル時間をほぼ9倍にする必要があります[1]。多くのラボ研究者にとって、この長いサイクル時間は、非現実的です。

ここではUPLC®スクリーニングで得られた目的成分の保持時間に焦点をあて、精製サンプルの分取時のグラジエント条件を自動選択し適用する事で、選択性と分離能を維持しつつ効率的に分取を行う手法についてご提案致します。

UPLC® 分析から分取へのスケールアップ

図1 ACQUITY UPLC® の分離



ACQUITY UPLC® の分離

ACQUITY UPLC®によるサンプル分離では、目的化合物は0.48分に溶出し、0.51分のピークが隣接していることが分かります。

分析条件

装置 ：ACQUITY UPLC® MS / PDA / ELSDシステム
カラム ：Acquity BEH C18 1.7μm 2.1x 50 mm
流速 ：0.8 mL/min
注入量 ：2 μL
移動相A ：0.05%ギ酸 水溶液
移動相B ：0.05%ギ酸 アセトニトリル
グラジエント ：ジェネリック 5%～95%(移動相B) 0.7分

ACQUITY UPLC® MS / PDA / ELSD システム

分取条件

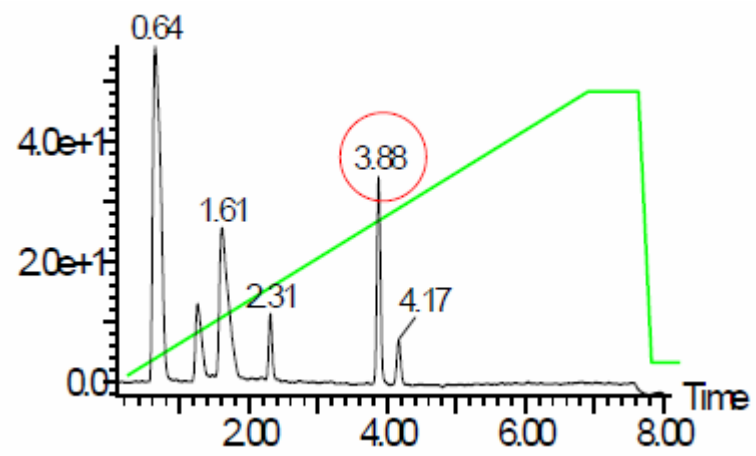
装置 ：Waters® MSトリガーAutoPurification™システム
カラム ：Waters XBridge™ Prep OBD™ C18
19 x 50 mm , 5 μm
流速 ：22 mL/min
注入量 ：200 μL
移動相A ：0.05%ギ酸 水溶液
移動相B ：0.05%ギ酸 アセトニトリル
グラジエント ：0.00 – 0.25分 2% –%B start
0.25 – 1.61分 %B start –%B end
1.61 – 1.86分 %B end – 95%B
1.86 – 2.71分 95%– 95%B
2.71 – 2.72分 95%– 2%B

MSシステム ：Waters 3100 MS検出器
イオン化モード ：ポジティブ
キャピラリ電圧 ：3 kV
脱溶媒温度 ：350℃
脱溶媒ガス ：500 L/Hr
ソース温度 ：300℃
測定範囲 ：150 – 700 amu
測定速度 ：5000 amu/秒

＊多数の精製システムが運用している条件下をシミュレートするため、医薬品化合物の混合試料を調製しました。

Waters® MSトリガーAutoPurification™システム

図2　一般的なスケールアップでの分取の選択性と分離能



一般的なスケールアップでの分取分離

分析時の分離条件をXBridge™ Prep OBD™ C18 カラム (19 mm X 50 mm)にスケールアップしました。XBridge™の技術はACQUITY UPLC® BEH Technology™と同じく、第2世代のBEH (Bridged Ethyl Hybrid) パーティクルをベースとしていますので、分析時と同様の選択性と分離能を保持しています。また選択性と分離能を維持しつつスケールアップするには、全体のサイクル時間を9倍ほど長くする必要があります。

表1　UPLC®分析時の溶出時間幅に対応するフォーカス分取グラジエントの組成

Method	溶出時間の幅 (Time)		%B start	%B end
A	0.170	0.295	2.0	17.5
B	0.295	0.420	17.5	33.0
C	0.420	0.545	33.0	48.5
D	0.545	0.670	48.5	64.0
E	0.670	0.795	64.0	79.5
F	0.795	0.920	79.5	95.0

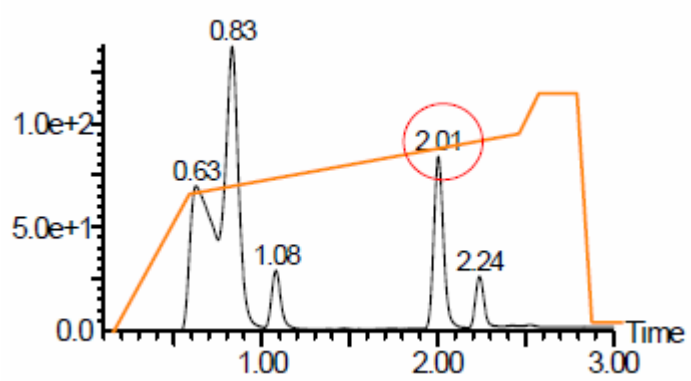
フォーカス分取グラジエントの適用

サンプル混合物から目的化合物を単離する精製ラボにおいて、分析時の分離能を維持するよりも目的化合物の単離と収率の方が重要です[2]。

移動相溶媒の組成比と保持時間の関係を元にして、フォーカスグラジエントの条件を作成しました。システムボリュームによっても、この条件は変わります[3]。

フォーカスグラジエントの背景となる考え方は、HPLCもUPLC® も同じですが、UPLC® 分析でのピークが溶出する範囲の幅は、かなり狭くなっています。 分析スケールでの測定結果より、目的成分の保持時間が、どのメソッドの幅に属するかを確認し、その条件の%Bの設定値を分取グラジエントの条件に当てはめ使用します。

図3　3分のフォーカスグラジエントを用いた目的化合物の分離

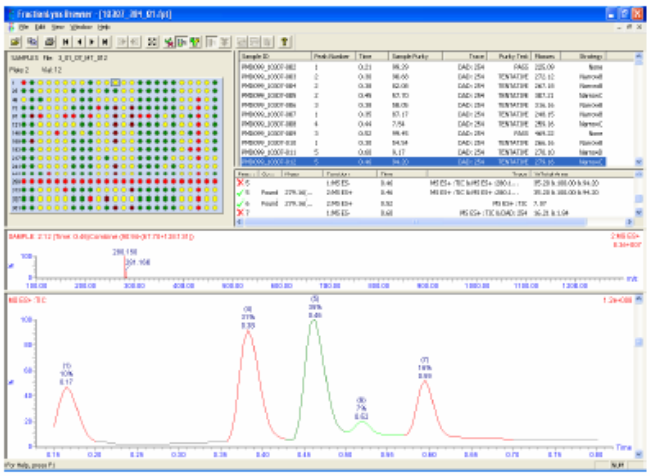


フォーカス分取での分離

UPLC®分析にて0.48分で溶出した化合物の分取精製の分離条件として、表1 に基づいて、メソッドC が選択されました。このフォーカスグラジエントを使用して、目的成分の分離および単離を3分で行うことができました。

ライブラリの精製

図4 AutoPurify™によるライブラリデータの自動解析結果画面



UPLC®でのライブラリ純度スクリーニング

同様の手法を膨大なサンプルライブラリの純度スクリーニングや精製にも応用できます。ACQUITY UPLC® システムの最大許容数（384 ウェルプレート22枚対応）と測定サイクル時間の早さが、ライブラリスクリーニングのスループットを上げる理想的なツールとなります。データは、FractionLynx ver4.1の標準機能であるAutoPurify™ を使用して自動解析処理されます[4]。

384 ウエルプレートの純度や目的成分の検出/不検出などが色分けされて表示されます。

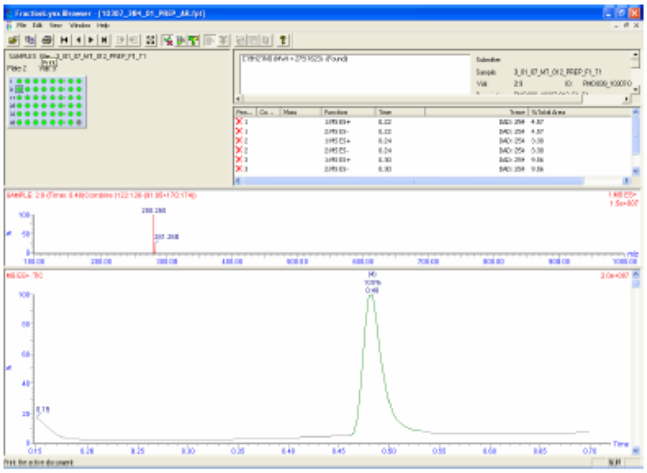
図5 AutoPurify™ によるライブラリ精製の解析結果画面

ライブラリ精製におけるフォーカスグラジエントの自動選択

AutoPurify™の機能には、予め設定された純度（全体のピーク面積に対する目的成分のピーク面積%）範囲に対して目的成分の精製行程の有無を判定したり、精製を必要とするサンプルの場合は、分析時の保持時間を元に、分取時の適切なLC条件を自動的に選択させる事が可能です。

表1のようなUPLC® の保持時間範囲に対するフォーカスグラジエントのLC条件を予め作成しておく事で、分離とスピードを重視したこの条件のうち、 AutoPurify™の自動解析により目的成分に対し、適切なLC条件を自動選択させる事が可能です。

図6 精製フラクションの純度確認分析データをAutoPurify™ で自動解析した結果画面



UPLC® による精製フラクションの純度確認分析

分取精製されたフラクションは、サンプルとして純度確認の分析が行われますが、分析時の測定フォーマット（サンプルリスト）もAutoPurify™の解析処理行程のステップで簡単に作成することができます。

まとめ

・フォーカスグラジエントの使用により、UPLC®から分取HPLCへの効率的なスケールアップが可能です。
・UPLC®の効率は、精製にも引き継がれ、スループットおよび生産性が飛躍的に向上します。
・FractionLynxのAutoPurify™機能は、UPLC QCから、精製、そしてそのフラクション分析までの自動化を可能にします。
・AutoPurify™ソフトウェアは、分析結果に基づいてフォーカスグラジエントを自動選択する機能があり、精製の質を高め、熟練者によるマニュアル操作の必要もなくなります。

参考文献

1. Seamless Method Transfer from UPLC® Technology to Preparative LC.
2. The Benefits of Focused Gradients for Purification, June 2007, Document submitted for print.
3. Optimized Chromatography for Mass Directed Purification of Peptides, Jablonski and Wheat, June 2004, document # 720000920EN
4. Purification Workflow Management, Cleary and Lefebvre May 2006, document # 720001466EN

720002267EN
©2007 Waters Corporation v1

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001
東京都品川区北品川 1-3-12第５小池ビル
TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011
大阪市淀川区西中島5-14-10カトキチ新大阪ビル11F
TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡