[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPLC テクノロジーから分取 HPLC への分析法移管

Diane M. Diehl, Fang Xia, Jie Y. Cavanaugh, Kenneth J. Fountain, Jo-Ann M. Jablonski, Thomas E. Wheat
WATERS CORPORATION, Milford, MA USA

はじめに

Ultra Performance LC® (UPLC® テクノロジー) はHPLCを上回る感度・分離能・スピードといった特徴により、広く受け入れられています。不純物分析や代謝物プロファイリングなどのアプリケーションにおいて、さらなる構造推定を行うため目的物を分離・精製するには、UPLCテクノロジーで開発した分析法を分取スケールへ移管する必要があります。

以上の理由から、UPLC分離の分取スケールへの移管に関する体系的なアプローチ法を開発しました。考慮すべき重要な点 (UPLC及びHPLC両システムにおいて) は、カラムケミストリー、粒子径、カラム内径、注入量、温度、移動相組成、流速、グラジエントの傾き、サイクルタイム、検出感度、注入方式、システムボリュームです。段階的に計算を行うことで、分析法移管の妥当性を確認できます。さらに、不純物分離と精製に向けた分取HPLC分離の最適化についても検討します。

実験方法

CLICK ON PART NUMBERS FOR MORE INFORMATION

UPLC条件

装置 :	Waters ACQUITY UPLC® PDAシステム
カラム :	ACQUITY UPLC BEH C_{18} 2.1×50 mm, 1,7µm 製品番号 : 186002350
移動相A :	10 mM NH_4HCO_3, pH10.0
移動相B :	アセトニトリル/100 mM NH_4HCO_3,pH 10.0 (90/10)
流速 :	1.0 mL/min
注入量 :	2 µL (パーシャルループ ; 5 µLサンプルループ)
サンプル :	合計濃度38 µg/mL (溶解溶媒 : DMSO) (化合物の構造は図1を参照)
カラム温度 :	室温
グラジエント :	移動相Bを2分間で5→95%に上げ、1分間ホールドし初期条件へ戻す サイクルタイム5分
強洗浄溶媒 :	90/10 (アセトニトリル/水)
弱洗浄溶媒 :	5/95 (アセトニトリル/水)
検出波長 :	245 nm
サンプリングレート :	20ポイント/秒

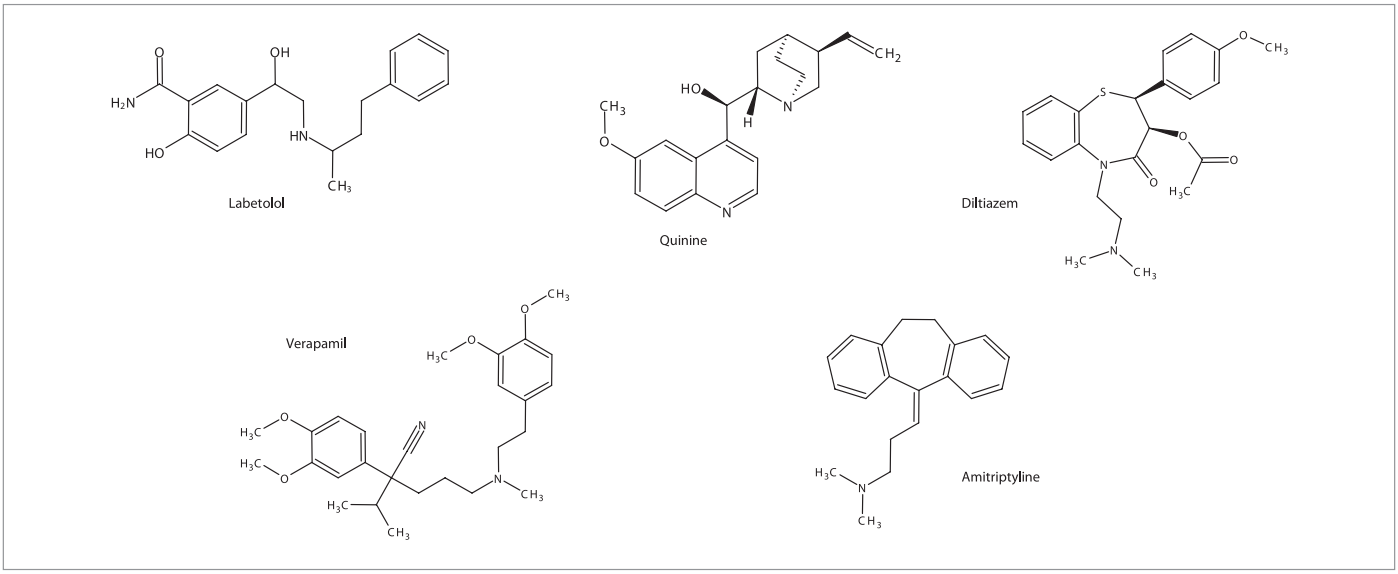

図 1　UPLC から分取 HPLC へ分析法移管を行った 5 種類の塩基性化合物の構造式

スケールアップ時の分離能の維持

分離能を維持するためには、カラム長さ（L）と粒子径（dp）の比を保つ必要があります。例えば、以下のカラムは同じ分離能をもちます。

50 mm（L）/1.7 µm（dp）= 29,412
100 mm（L）/3.5 µm（dp）= 28,571
150 mm（L）/5 µm（dp）= 30,000

この計算に基づくと、UPLC分離からスケールアップを行う場合XBridge™ Prep C_{18} OBD™ 19×150 mm, 5 µmカラムを選択します。XBridgeとACQUITY UPLC BEHカラムは同じ基材なので、同じ選択性が得られます。

注入量の計算

$$Vol_{PREP} = Vol_{UPLC} \bullet \frac{D^2_{PREP}}{D^2_{UPLC}} \bullet \frac{L_{PREP}}{L_{UPLC}},$$

Volは注入量（µL）、Dはカラム内径（mm）、Lはカラム長さ（mm）を示しています。2.1×50 mmのUPLCカラムで2 µL注入の場合、分取カラム19×150 mmでは491 µL注入になります。

流速の計算
カラムボリュームに比例したスケールアップ

カラムサイズに基づいて幾何学的に流速を求めるために以下の式を用います。

$$F_{PREP} = F_{UPLC} \bullet \frac{D^2_{PREP}}{D^2_{UPLC}},$$

Fは流速（mL/min）を示しています。2.1 mm内径カラムで流速1.0 mL/minの場合、19 mm内径のカラムでは流速81.9 mL/minになります。しかし、この流速は19×150 mmのカラムサイズに適切な値ではありません。一般的な流速は15 ～ 40 mL/minの範囲で用います。最適流速は粒子径（dp）に反比例するため、分取カラムに適切な流速を計算するために以下の式を用います。

$$F_{PREP,opt} = F_{UPLC,opt} \bullet \frac{D^2_{PREP}}{D^2_{UPLC}} \bullet \frac{d_{p_{UPLC}}}{d_{p_{PREP}}}$$

この式を用いると、内径2.1 mm,1.7 µmのカラムで流速1.0 mL/minという条件は分取用カラム内径19 mm,5 µmでは27.8 mL/minとなります。.

グラジエントオフセット時間の計算

ACQUITY UPLCと分取用HPLCシステムのデュエルボリューム（システムボリュームともいう）の違いは保持時間のずれに影響を及ぼします。デュエルボリュームとはポンプ出口からカラム入り口までの容量と定義されています。UPLCから分取スケールへ厳密にスケールアップするため、分取用HPLCのグラジエント開始前に初期ホールドを設定し、このデュエルボリュームの差を補正することが必要です（1）。

ACQUTY UPLCシステムのデュエルボリューム

測定したデュエルボリューム=0.105 mL（5 µLサンプルループ）
2.1×50 mmのUPLCカラムボリューム=0.173 mL
デュエルボリューム（mL）/カラムボリューム（mL）=カラム容積（c.v）
0.105 mL/0.173 mL=0.607 カラム容積（c.v）

実験を行うACQUITY UPLCシステムは0.607カラム容積分（c.v）のデュエルボリュームでした。

分取用HPLCシステムのデュエルボリューム

測定したデュエルボリューム=2.6 mL（1 mLサンプルループ）
19×150 mmのカラムボリューム=42.53 mL
2.6 mL/42.53 mL=0.061カラム容積（c.v）

分取用HPLCシステムは0.061カラム容積分のデュエルボリュームでした。

2つのシステム間のデュエルボリュームの差：

0.607カラム容積（c.v）-0.061カラム容積（c.v）=0.546カラム容積（c.v）

0.546カラム容積（c.v）×42.53 mL（分取カラムボリューム）=23.22 mL

この値が初期ホールド容量になります。

初期ホールド時間の計算：

ホールド時間=初期ホールド容量/流速

=23.22/27.8 mL/min

=0.83分

UPLCと分取用HPLCシステム間の容量の差を補正するために、初期ホールド時間を分取グラジエントの開始前に設定します。

グラジエントテーブルの計算

UPLCから分取HPLCへの移管を厳密に行うため、各グラジエントセグメントのカラム容積c.v値が等しくなるようにします。

UPLCグラジエントテーブル

	ステップ	時間（分）	流速（mL/分）	%A	%B	セグメント時間（分）	セグメント容量（カラム容積）
UPLCカラム 2.1 x 50 mm, 1.7 µm	初期ホールド	0	1.0	95	5	0	0
		2	1.0	5	95	2	11.56
		3	1.0	5	95	1	5.78
		3.1	1.0	95	5	0.1	0.58
		5.0	1.0	95	5	1.9	10.98

カラム体積に対して、グラジエントのセグメント時間の計算方法を以下に示します。

$$\text{セグメント容量} = \frac{\text{セグメント時間（分）} \times \text{流速}}{\text{カラムボリューム}}$$

$$\text{セグメント容量} = \frac{2\text{分} \times 1.0\ \text{mL/分}}{0.173\ \text{mL}} = 11.56\text{カラム容積}$$

同じ分離条件にするため、UPLCと分取HPLCのセグメント容量を等しくする必要があります。

分取HPLCグラジエントテーブル

グラジエントセグメント容量=時間（カラム容積（c.v）換算）×カラムボリューム

グラジエントセグメント容量=11.56 c.v×42.53 mL=491.65 mL

グラジエントセグメント時間=セグメント容量/流速

グラジエントセグメント時間=491.65 mL/27.8 mL/min=17.67 分

最初のグラジエントセグメント時間は17.67分、ホールド時間は0.83分なので、このセグメントの終了時間は、0.83分+17.67分=18.50分になります。

UPLCグラジエントの各セグメント条件と等しくするため、セグメント容量と時間について同様に計算を行い、分取HPLC分析のグラジエントテーブルを作成しました。UPLCと分取用HPLCと比較した結果を図2に示します。

	ステップ	時間（分）	流速（mL/分）	%A	%B	セグメント時間（分）	セグメント容量（カラム容積）
分取HPLCカラム 19 x 150 mm, 5 µm	初期ホールド	0.83	27.8	95	5	0	0
		18.50	27.8	5	95	17.67	11.56
		27.33	27.8	5	95	8.83	5.78
		28.21	27.8	95	5	0.88	0.58
		45.00	27.8	95	5	16.78	10.98

分取用HPLC条件

システム：AutoPurification™ システム、996 PDA検出器 AutoPurificationフローセル

カラム：XBridge Prep C_{18} OBD, 19×150 mm, 5 µm 製品番号：186002979

移動相A：10mM NH_4HCO_3, pH 10.0

移動相B：ACN/100 mM NH_4HCO_3, pH 10.0（90/10）

流速：27.8 mL/min

注入量：491 µL

サンプル：38 µg/mL（溶解溶媒DMSO）

カラム温度：室温

グラジエント：上記参照

検出：245 nm

サンプリングレート：1 ポイント/秒

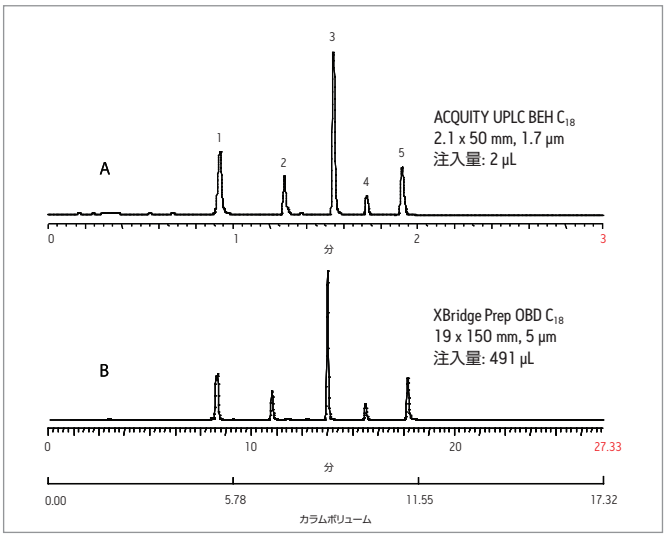

図 2　5 種類の塩基性化合物の分離（A）UPLC 分析（B）XBridge Prep C_{18} OBD カラム , 19 × 150 mm
化合物:(1) ラベタロール (2) キニーネ (3) ジルチアゼム (4) ベラパミル (5) アミトリプチリン

より短い分取カラムへのスケールアップ

図2に示したとおり、5種類の塩基性化合物のUPLC分離からのスケールアップに成功しました。UPLCカラムと分取用HPLCカラムにおけるピーク間の保持時間の比と分離能はほぼ同等でした。

分取分離のサイクルタイムはより短いカラムを用いることで最適化できます。短いカラムを用いると、移動相使用量、背圧、フラクション溶媒を削減できます。27.8から30 mL/minへとわずかに流速を上げ、150 mmカラムの代わりに50 mmカラムを用いることで分取用HPLC分離がより早いサイクルタイムで最適化できます。前述のとおり、初期ホールド時間とグラジエントセグメントの計算を行い、新しいグラジエントテーブルを作成しました。

	ステップ	時間（分）	流速（mL/分）	%A	%B	セグメント時間（分）	セグメント容量（カラム容積）
分取HPLCカラム 19 x 50 mm, 5 µm	初期ホールド	0.20	30	95	5	0	0
		5.66	30	5	95	5.46	11.56
		8.39	30	5	95	2.73	5.78
		8.66	30	95	5	0.27	0.58
		13.84	30	95	5	5.18	10.98

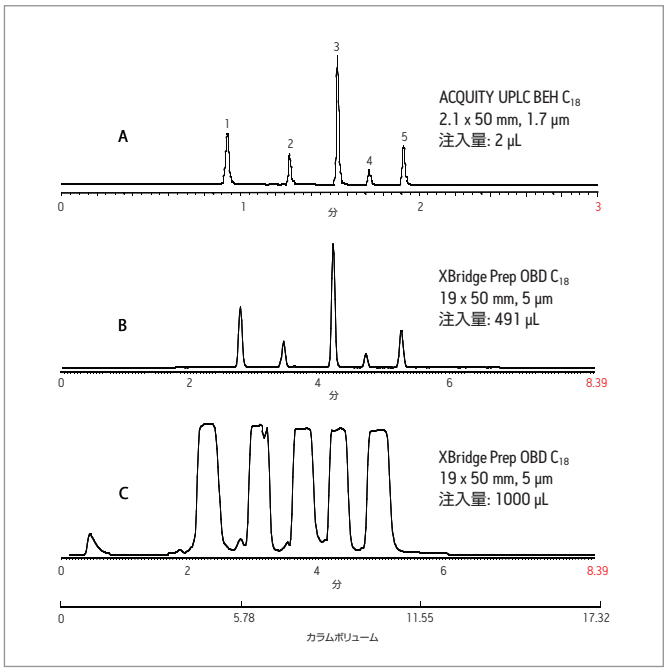

図 3　5 種類の塩基性化合物について最小限のサイクルタイムでロード量を最大にした結果
(A) UPLC 分析　(B) XBridge Prep C_{18} OBD カラムに 18.66 µg ロード
(C) XBridge Prep C_{18} OBD カラムに 190 mg ロード
化合物：(1) ラベタロール (2) キニーネ (3) ジルチアゼム (4) ベラパミル (5) アミトリプチリン

図3はUPLC（A）および19×50 mmの分取カラム（B）における標準品の分離を示しています。分離能と保持時間の比は図2に示した結果と同等です。50 mmカラムではサイクルタイムを45分（150 mmカラム）から14分まで短縮することが可能でした。図4Cには50 mmの分取カラムを用いてトータル190 mgの化合物を精製したオーバーロードのクロマトグラムを示しています。19×50 mmカラムへの限界ロード量は、分離とロード量の検討により決定しました。（データは記載しておりません）

APIの不純物及び分解物の分離

非常に複雑な混合物の分離及び分離後のスケールアップ精製は極めて困難です。アプリケーションを成功させるために重要なのは、(a) ロード量が多い条件で隣接ピーク間のベースライン分離を保つこと (b) UPLC分離と同等にするために効率よくスケールアップすること (c) 分離した化合物が高純度であることを実証するためフラクションを集めて再分析することです。

Zantac® の医薬原薬（API）であるラニチジンは濃度 2 mg/mL（溶解溶媒：メタノール/水=20/80）の標準溶液とし、85℃、48時間で加熱分解しました。UPLCの分析法ではAPIから不純物及び分解物の完全分離を検討しました（図4A）。2つの装置間の分離において、比例関係に基づくスケールアップを実証するために、19×150 mm, 5 µm XBridge Prep C_{18} OBDカラムへ移管を行いました。API分解物の高分離を分取スケールでも維持するため、全サイクルタイムは約90分でした。

サイクルタイムを最適化するため、19×150 mmカラムでフォーカスグラジエントを検討しました（1.2）。最適化を行い、API分解物が高分離された結果を図4Cに示しました。目的ピークを回収し再解析を行い、UVにより99%以上の純度を確認しました。

フォーカスグラジエントは分離を向上させるだけでなく、隣接ピークの分離も可能となり、さらにサイクルタイムも短縮できます。

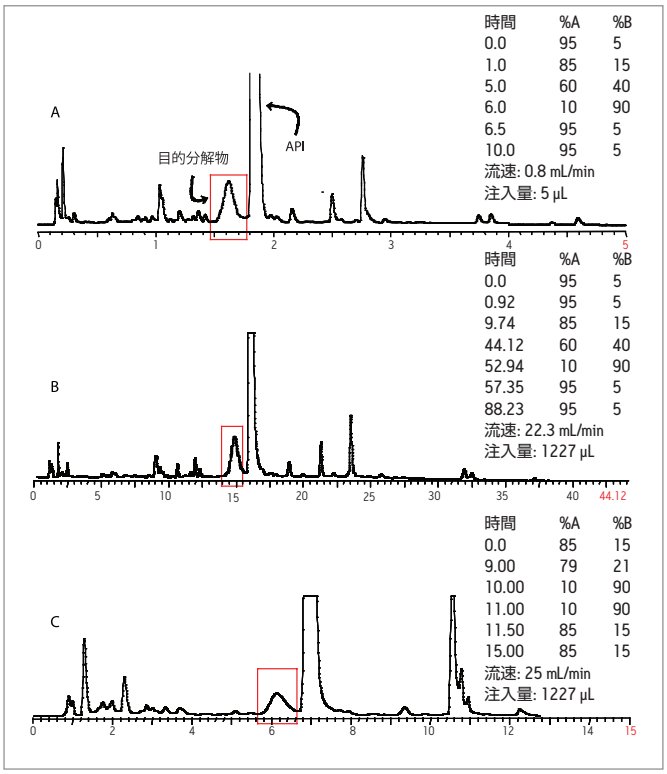

図 4　ラニチジン分解物の分離精製
(A) UPLC 分析 (B) XBridge Prep C_{18} OBD カラム，19×150 mm へスケールアップ分析 (C) XBridge Prep C_{18} OBD カラム，19×150 mm でのフォーカスグラジエントによる不純物分離

条件

カラム：	ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 2.1×50 mm, 1.7 µm 製品番号：186002350 XBridge Prep C18 OBD, 19×150 mm 製品番号：186002979
移動相A：	10 mM NH4HCO3, pH 10
移動相B：	アセトニトリル
サンプル：	2 mg/mLのラニチジン分解物（テキスト参照）
カラム温度：	室温
検出：	235 nm
サンプリングレート：	20ポイント/秒（UPLC）1ポイント/秒（分取HPLC）
デュエルボリューム：	5.4 mL（5 mLループの分取システム）

グラジエント条件、注入量、流速はクロマトグラムに記載

結論

UPLCテクノロジーで開発した分析法を分取用HPLCへ移管する操作手法を紹介しました。重要な点は、粒子径にあわせて流速を設定する、システムボリュームの違いを計算する、カラムボリュームにあわせてグラジエントを調整することです。さらに、フォーカスグラジエントを用いることでロード量を最大化し、分取用HPLCのサイクルタイムを最小限にすることが可能です。XBridge Prep OBDカラムはACQUITY UPLC BEHカラムと同じ基材を用いているため、UPLCを用いた分取分析の高速分析法開発に活用できます。そして、開発した分析法を容易にUPLCから分取LCシステムに移管することが可能です。

参考文献

1. Jablonski JM, Wheat TE, Diehl DM. Practical considerations in using, scaling, and evaluating preparative chromatography. Waters Application Note, in preparation, 2007.
2. Cleary R, Lefebvre P, Twohig M. Scaling a separation from UPLC to purification using focused gradients. Waters Application Note, in preparation, 2007.

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サムティ新大阪フロントビル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 札幌

Waters、UltraPerformance LC、UPLC およびACQUITY UPLC はWaters Corporationの登録商標です。
XBridge、OBD、AutoPurification およびThe Science of What's Possible はWaters Corporationの商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan. 2012年9月 720002375 JA PDF