[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

CSHカラムテクノロジーおよびフォーカスグラジエントを用いたUPLCスクリーニングメソッドから分取精製HPLCへの移管

Mia Summers and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, 34 Maple St., Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- UPLC® および粒子径2µm以下のカラムを用いた合成反応混合物の迅速スクリーニング
- CSH™ テクノロジーを用いたpHスイッチングでの良好なピーク形状と保持時間安定性による分析信頼性の向上
- UPLCスクリーニングから分取HPLCに直接移管できることで、時間のかかる分析法再開発の必要性を軽減
- フォーカスグラジエントによる精製スループットの向上とより高純度の分取精製

ウォーターズのソリューション

- ACQUITY UltraPerformance LC® システム
- ACQUITY UPLC® CSH C_{18}および XSelect™ CSH C_{18} カラム
- FractionLynx™ アプリケーションマネージャ搭載分取スケールクロマトグラフィー AutoPurification™ HPLC システム
- MassLynx™ CDS ソフトウェア

キーワード

分析法移管、精製、分取 HPLC、UPLC、スクリーニング、フォーカスグラジエント

はじめに

合成における反応のスクリーニングおよび分取精製は、低分子医薬品創薬ラボにおいて不可欠なステップです。後に続く合成によりきれいなサンプルを供することで反応の副生成物を低減し、医薬品のプロファイリングや毒性試験に用いる重要な医薬品原料の最終精製が容易に行えるようになります。創薬の施設の多くは、合成反応の進行を迅速にモニターするために分析スケールのスクリーニング専用装置を所有しています。これらの装置で長時間かかるスクリーニングメソッドを用いると、分析処理に過剰に時間がかかり、いつ反応を止めるかの判断が遅れてしまうこともあります。この判断の遅れによって過剰な副生成物を生成してしまい時間のかかる再合成が必要となったり、より複雑な生成ストラテジーが必要となったりします。次に、分析スクリーニングと分取スケールで異なるカラムケミストリーを使用すると、分取 HPLC スケールで分離条件を再検討しなければいけないということがよく起こります。2 種類のカラム固定相間で選択性が異なると、ターゲットピーク再同定が必要な場合もあり、より複雑な精製ストラテジーが必要となります。最後に、混合物中の全てのピークを分離するメソッドの開発は時間がかかって非効率的で、対象とするいくつかのピークのみを精製するために不必要であることが多くあります。

本アプリケーションノートでは、charged-surface hybrid (CSH) カラムで高 pH および低 pH 移動相を用いた UPLC スクリーニングプロトコールを行い、それに続きフォーカスグラジエントを用いて HPLC 分取精製に効率的にスケールアップした実例についてご紹介します。塩基性化合物のピーク形状向上、幅広い pH 範囲での使用、周期的な pH スイッチングにおける保持時間の安定性のために CSH カラムを選択しました。分取スケールでも同じカラム固定相を使用することで UPLC のスクリーニング分析における分離選択性を維持し、メソッド再検討の必要性を軽減できます。UPLC スクリーニング分析からフォーカスグラジエントを計算して、対象化合物の迅速な分取精製のための分取 HPLC スケールに直接移管できます。分取 HPLC でフォーカスグラジエントを使用することで、通常のグラジエントと比較して対象化合物を短時間でより純度高く分取することができ、最終的にサンプル精製のスループットを向上できます。

実験条件

ACQUITY UPLC 条件

移動相 A1: 0.1% ギ酸水溶液

移動相 A2: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

移動相 B1: 0.1% アンモニア水溶液

移動相 B2: 0.1% アンモニア
アセトニトリル溶液

カラム : ACQUITY UPLC CSH C_{18}
2.1 × 30mm、1.7µm
製品番号 186005295

グラジエント :

時間（分）	%A2（or B2）
0	2.0
0.2	2.0
2.0	98.0
2.5	98.0
2.6	2.0
3.0	2.0

分析時間 : 3 分

カラム温度 : 30℃

検出 : UV@210nm および 254nm

ニードル洗浄 : 95:5　アセトニトリル : 水

サンプルパージ : 90:10　水 : アセトニトリル

流速 : 0.9 mL/min

注入量 : 0.2 µL

MS 検出 : ToF-MS, ESI+ モード

スキャンレンジ : 100-1000 amu

結果および考察

分析法開発において、pH スイッチングはイオン性化合物を含む混合物の分離選択性に大きく影響します[1]。しかしながら、従来の C_{18} カラムで移動相 pH を周期的にスイッチングすると塩基性化合物のピーク形状悪化や保持時間のシフトが見られることがあります[2]。一方、CSH カラムは、周期的に高 pH と低 pH で移動相条件を変更して使用しても、低イオン強度移動相（ギ酸など）での塩基性化合物のピーク形状と保持時間が維持されるため、スクリーニング分析に最適なカラムです[3]。さらに、CSH カラムケミストリーは UPLC および HPLC カラムの粒子径をラインアップしているため、UPLC から分取 HPLC に移管する際に、異なるカラムケミストリーを分取 HPLC で使用して起こりうる分析法再検討の必要性を解消できます。

まず始めに、18 種それぞれの反応産物を迅速な 3 分の UPLC スクリーニングプロトコールにより ACQUITY UPLC CSH C_{18} 2.1×30mm、1.7µm カラムを用いて高 pH および低 pH 移動相条件下で分析しました。スクリーニングを行った 18 種の反応のうち 12 種は UPLC-MS スクリーニングによる同定の結果に基づいて良好であると判断されました（表 1）。これら 12 種の反応について、低 pH または高 pH でより良好な分離が得られた移動相条件を用いて対象化合物の分取精製を行いました。2 種類の反応についてスクリーニングを行ったクロマトグラムを図 1（A および B）に示しましたが、図 1A では低 pH 移動相条件、一方の図 1B では高 pH 移動相条件でより良好な分離が得られています。

反応	開始化合物	移動相	ターゲットピーク（分）	ターゲット質量（*m/z*）
1	Flurbiprofen	低 pH	1.38	366
2	Procatechuic acid	高 pH	1.07	284
3	Aminosalicylic acid	低 pH	0.82	196
4	5-Hydroxyindole acetic acid	高 pH	1.06	216
6	Epinepherine	低 pH	0.96	292
8	Ephedrine	高 pH	1.01	190
9	Labetalol	低 pH	1.32	395
10	Nadolol	低 pH	0.99	478
11	Anthranilic acid	高 pH	0.88	162
14	Loperamide	高 pH	1.24	519
15	Indomethacin	低 pH	1.42	358
18	Mycophenolic acid	低 pH	1.20	302

表1　良好な結果が得られた12種類の反応の UPLC スクリーニングについて、CSH C_{18} カラムでより良好な分離が得られた移動相条件での結果を記載しています。精製のターゲットとしたピークの保持時間および質量についても確認しました。

AutoPurification 条件

移動相 A: モディファイアー添加水溶液

移動相 B: モディファイアー添加アセトニトリル溶液

モディファイアー: 0.1%ギ酸（低 pH）
0.1% アンモニア（高 pH）

カラム: XSelect CSH C_{18} OBD™
19 × 100mm, 5µm
製品番号 186005421

フォーカスグラジエント:

時間（分）	%A2（or B2）
0	2.0
0.81	lower %B
10.0	upper %B
11.0	98.0
12.0	98.0
12.1	2.0
15.0	2.0

lower %B および upper %B の値はターゲット化合物の保持時間により決定

流速: 25 mL/min

検出: UV@210 nm および 254 nm

MS 検出: ESI+ モード

スキャンレンジ: 100-1000 amu
FractionLynx によるターゲット化合物の質量を用いた自動分取精製

データ処理: MassLynx CDS

サンプル調製

合成反応産物の各サンプルは 18 種の化合物 100mg をそれぞれ 2mL のジクロロメタン中でピリジン 2mL および無水酢酸 1mL を用い、アセチル化して調製しました。反応は 45℃で 1 時間攪拌して行い、完全にエバポレートして乾固させた後、アセトニトリル・メタノール・水の混液に溶解しました。

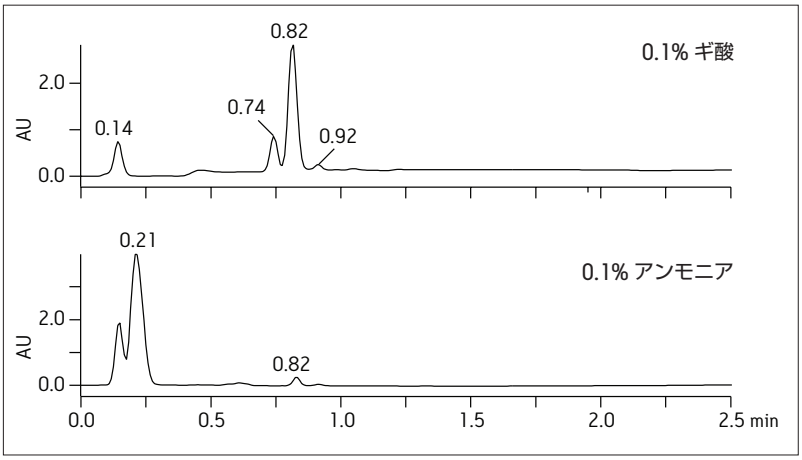

図1A　アミノサリチル酸反応産物のUPLCスクリーニング結果。0.1%ギ酸（低pH）条件で最良の分離。ターゲットピークは0.82分、m/z 196に確認（モノアセチル化体）。

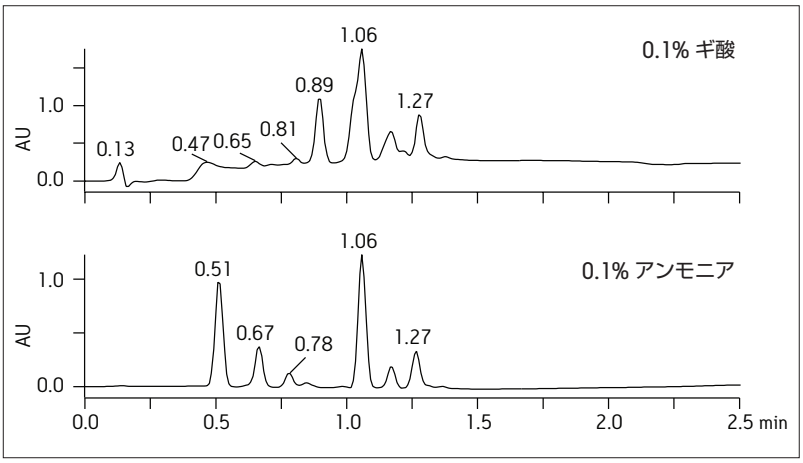

図1B　5-ヒドロキシインドール酢酸反応産物のスクリーニング結果。0.1%アンモニア（高pH）条件で最良の分離。ターゲットピークは1.06分、m/z 216に確認（モノアセチル化体）。

各反応において UPLC スクリーニングによりターゲット化合物を確認し、その情報を用いて分取精製 HPLC のためのフォーカスグラジエントを計算しました[4,5]。ターゲットピークの前後± 5% をフォーカスする範囲としました。“ジェネリックな”分取 HPLC フォーカスグラジエントは計算したフォーカスグラジエントセグメント時間を用いて作成し、全体の分析時間は再平衡化も含めて 15 分としました。対象ピークの溶出する前後では元のスクリーニンググラジエントよりも勾配を緩やかに変更することで、ターゲットピーク前後の不純物を選択的に分離してよりきれいな精製サンプルを得ることができます（図 2）。フォーカスグラジエントではまた、サンプル全体ではなく対象ピークの分離に大部分の時間がかけられるため、分取 HPLC の分析時間を最小限にしてサンプル精製のスループットを向上できます[6]。

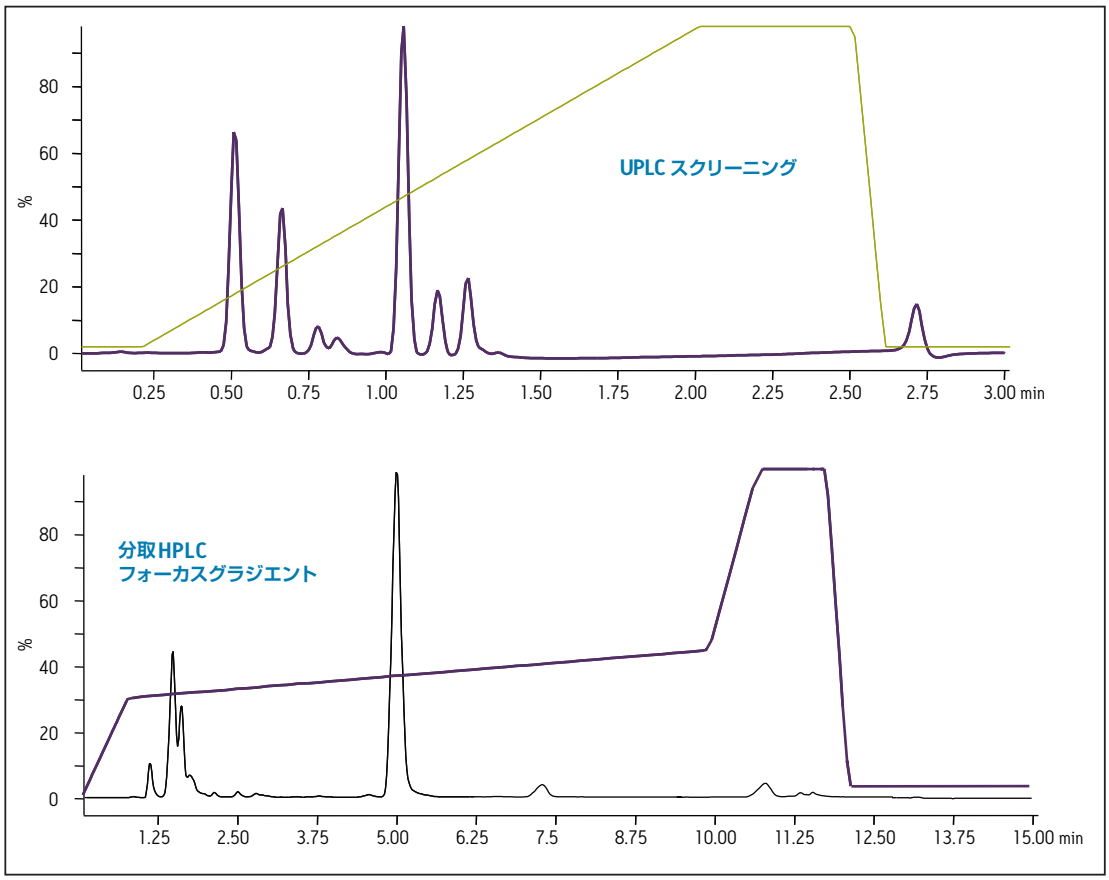

図2　5-ヒドロキシインドール酢酸反応産物の UPLC スクリーニンググラジエント（2 - 98%B）および分取 HPLC フォーカスグラジエント（30.5% - 40.5%）

12 種の各反応産物は、各ターゲット化合物の保持時間から計算した lower %B および upper %B（フォーカスするグラジエントセグメントの開始 %B および終了 %B）の値を入れた分取 HPLC フォーカスグラジエントを用いて精製しました。各化合物はターゲット化合物の質量をトリガーとして自動分取精製を実施しました。分取した化合物は UPLC スクリーニングメソッドにより再分析して保持時間、UV およびマススペクトルのプロファイルにより純度を確認しました。

UPLC スクリーニングから分取 HPLC フォーカスグラジエントへの分析法移管例を図 3（低 pH）および図 4（高 pH）に示しました。図 3 にはラベタロールアセチル化反応産物を示しています。低 pH での UPLC スクリーニングのクロマトグラムでは主要な 1 つのピークが見られましたが、このピークの MS スペクトルは 2 つの化合物が共溶出していることを示唆しています。グラジエントは 1.32 分に溶出するターゲットピークの前後でフォーカスし、化合物はフォーカスグラジエントを用いて分取精製しました。明らかに共溶出が認められますが、対象ピークの前後で勾配の緩やかなフォーカスグラジエントを用いることで対象化合物（*m/z* 395）の不純物との分離が向上し、質量数による自動精製により分取した化合物は UPLC スクリーニングメソッドを用いて再分析した結果、有効な純度であることが確認されました。

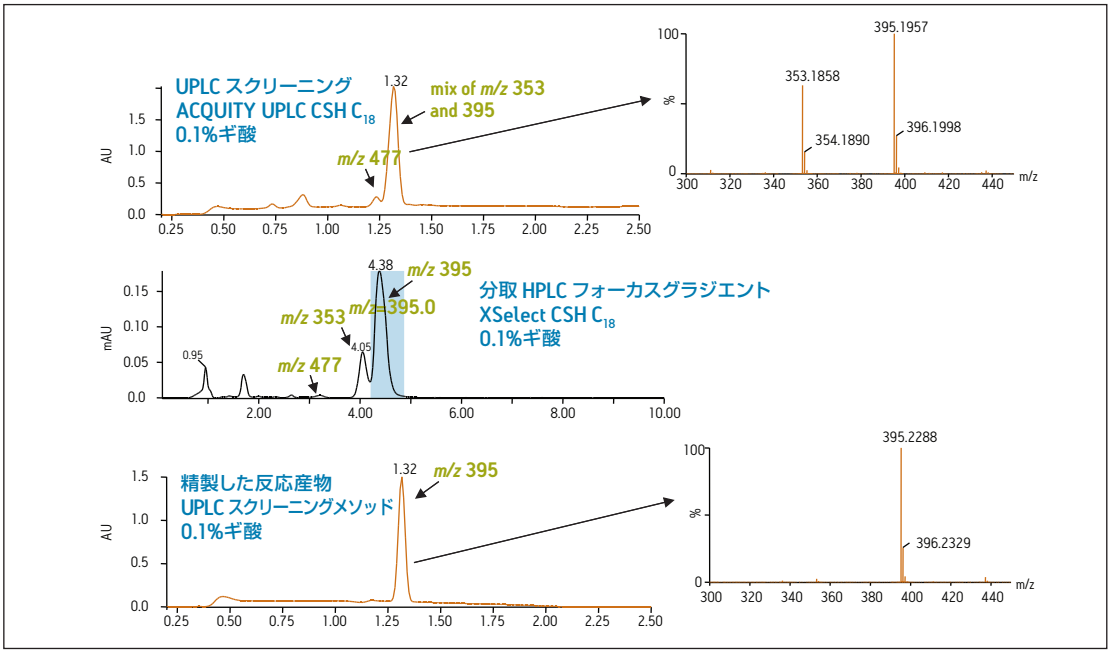

図3　ラベタロール反応産物：ターゲットピークの保持時間 1.32分（m/z 395、モノアセチル化体）のUPLCスクリーニング結果を、フォーカスグラジエントを用いた分取 HPLC に移管（負荷量50mg）。ターゲットとするm/z 395のピークを質量により精製し、UPLCスクリーニングメソッドを用いて再分析することで高純度の化合物が得られたことを確認。

もう 1 つの例（図 4）では、UPLC スクリーニング結果から 5- ヒドロキシインドール酢酸のアセチル化産物は高 pH 移動相条件で最良の分離が得られることが明らかになりました。ターゲットピークは 1.06 分に確認され、このピークの前後をフォーカスするグラジエントを用いた分取 HPLC に移管しました。分取 HPLC クロマトグラムでは、対象ピークから不純物が分離でき、より多くのサンプルをロードしてターゲット化合物を効率的に精製できることを示しています。

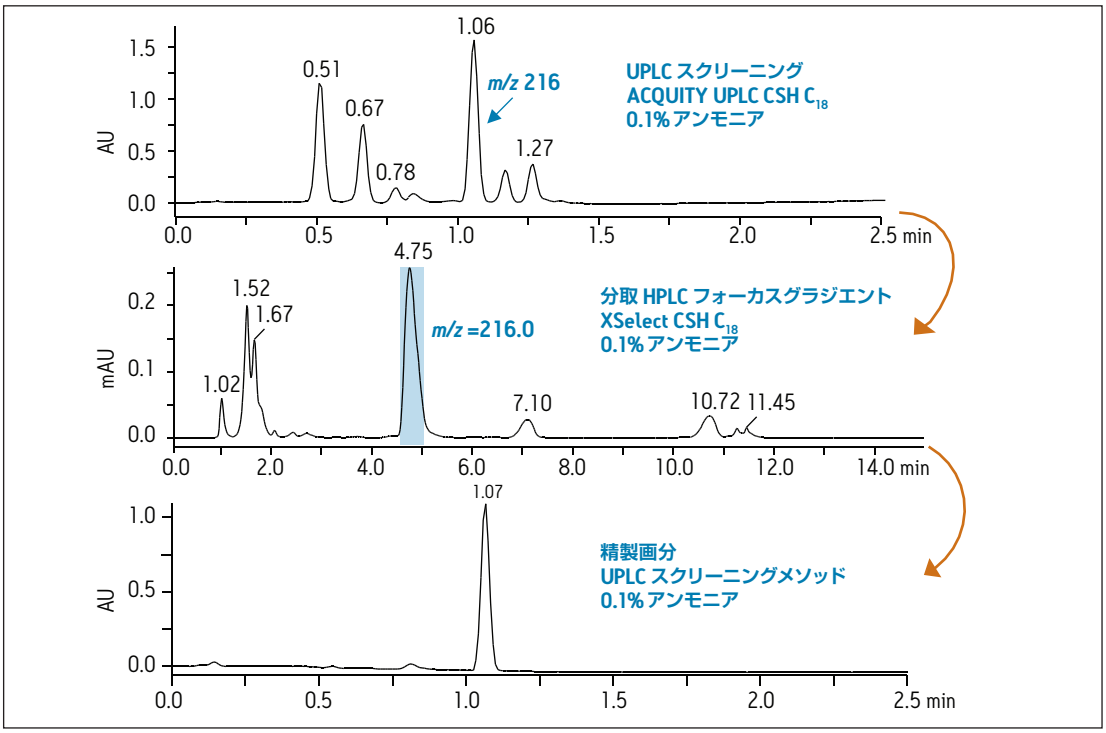

図4　5-ヒドロキシインドール酢酸反応産物：ターゲットピークの保持時間 1.06分（m/z 216、モノアセチル化体）の UPLC スクリーニング結果を、フォーカスグラジエントを用いた分取HPLCに移管（負荷量50mg）。ターゲットとするm/z 216のピークを分取し、UPLC スクリーニングメソッドを用いて再分析することで高純度の化合物が得られたことを確認。

結論

- 最適な分離条件を迅速に決定するために高＆低 pH 移動相条件を確実にスクリーニングする 3 分の UPLC-MS メソッドを ACQUITY UPLC CSH C_{18}、2.1×30mm、1.7μmカラムを用いて開発しました。
- UPLC から分取 HPLC に分離をスケールアップする際、UPLC と同じ CSH C_{18} カラム固定相を使用することで時間のかかるメソッド再検討の必要性を解消し、分析法移管を大幅に簡略化しました。
- フォーカスグラジエントの使用により反応混合物全体ではなく対象ピーク前後の分離に選択的にフォーカスすることで分取分析の時間を低減し、サンプルスループットを向上します。さらに対象ピーク前後の分離にフォーカスすることで近接して溶出する不純物の分離が向上し、結果としてより多くのサンプルをロードすることが可能となり、より効率的な分取精製を実現します。

References

1. U.D. Neue. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH: New York, 1997; p 316.
2. McCalley, D.V. *Anal. Chem*, **78**:2532 [2006].
3. Fountain K.J., Hewitson H.B., Iraneta P.C., Morrison D. *Practical Applications of Charged Surface Hybrid (CSH) Technology*, Waters Application Note [2010], Part Number 720003720EN.
4. Diehl D.M., Xia F., Cavanaugh J.Y., Fountain K.J., Jablonski J.M., Wheat T.E. *Method Migration from UPLC Technology to Preparative HPLC*, Waters Application Note [2007], Part Number 720002375EN.
5. Jablonski J.M., Wheat T.E., Diehl D.M. *Developing Focused Gradients for Isolation and Purification*, Waters Application Note [2009], Part Number 720002955EN.
6. Cleary R., Lefebvre P. *The Impact of Focused Gradients on the Purification Process*, Waters Application Note [2007], Part Number 720002284EN.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

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 および UPLC、ACQUITY UPLC、UltraPerformance LC は Waters Corporation の登録商標です。CSH、XSelect、AutoPurification、FractionLynx、MassLynx、ODB 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。

©22012 Waters Corporation. Printed in Japan.

2012年12月 720004228JA PDF