[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

分析法開発効率を向上させる体系的なスクリーニングプロトコール

Margaret Maziarz, Sean M. McCarthy, and Mark Wrona
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- UPLC® による頑健な分析法開発
- ACQUITY QDa® 検出器から得られる質量情報による迅速かつ正確な化合物同定
- ピーク同定のための分析を必要最小限に

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

ACQUITY UPLC カラム

ACQUITY QDa 検出器

ACQUITY UPLC PDA 検出器

Empower® 3 ソフトウェア

Waters® 品質管理標準 (QCRM)

キーワード

UPLC、分析法開発、ApexTrack™ 解析、Auto • Blend Plus™、メトクロプラミド塩酸塩、粒子径 2 µm 以下のカラム充填剤、質量分析計

はじめに

分析法開発では、成分が十分に分離し、頑健な分析が実施できるよう、様々なクロマトグラフィーパラメーターのスクリーニングが行われます。分析法開発には一時一事法、体系的で Quality by Design (QbD) を取り入れた手法など多くの方法が用いられますが、いずれの方法においても、求めるゴールとカラムの種類、有機溶媒、pH、グラジエント、流速、温度など分離を最適化するために検討するパラメーターは同じです。

これらのパラメーターを変更することによる効果は分析法開発の過程で体系的に評価されます。様々な最適化により得られた分析法を、適切な保持時間に得られるピーク数、分離度、テーリングファクター等に特別に設けた合格基準を使用して評価することとなります。適切な分析法が得られるまで、それぞれの段階で選択された最良の分析法をさらに調整します。この分析法開発過程を通して、各段階で最良の条件を選択できていることを確認し、その方法を選択した理由が明らかになっていることが重要です。

分析法を最適化する方法論にかかわらず、条件検討の全工程で重要な化合物を同定し、追跡していくことが必要となります。分析条件の変更により、ピークの溶出順が変わることや関連物質の UV スペクトルが十分に判別できないケースもありますので、可能であればそれぞれの条件で標準物質を分析して確認することで解析を単純化できます。この方法は大変効果のある方法ですが、長時間を要する作業であることも事実です。光学検出に加えて MS 検出を利用すると明確な同定が可能になります。さらに UV データと MS データを同時にモニターできるため、分析中即座にピーク同定ができるのみならず、同時溶出や溶出順の変化を確認することもできます。

本アプリケーションでは、UV (PDA) 検出に、操作が簡単な ACQUITY QDa 検出器による MS 検出を組み合わせて行ったメトクロプラミド塩酸塩および関連物質の UPLC 分析法開発についてご紹介します。スカウティング、スクリーニング、最適化の各段階において体系的なプロトコールを使用しました。各段階で得られた結果は、解析からカスタム計算 (自由に計算式を作成し解析、レポートに反映させることが可能な Empower 機能の一つ) を利用したランク付け、レポートまですべて Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア内で行い、分析者による判定の偏りを最小限にし、すべての目的に合致した分析法を作成しました。

実験条件

Waters 分析用スタンダード

LCMS　品質管理標準
（QCRM、製品番号 186006963）
（バイアルパッケージ）

分析法開発条件

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class システム、カラムマネージャ、溶媒選択バルブ（SSV）付属

カラム：ACQUITY UPLC CSH C_{18}、1.7 µm（製品番号 186005296）

ACQUITY UPLC CORTECS C_{18}+、1.6 µm（製品番号 186007114）

ACQUITY UPLC CSH Phenyl Hexyl、1.7 µm（製品番号 186005406）

ACQUITY UPLC HSS Pentafluorophenyl（PFP）、1.8 µm（製品番号 186005965）

サイズはいずれも 2.1 × 50 mm

カラム温度：40 ℃

注入量：1.0 µL

流速：0.6 mL/ 分

移動相 A：125 mM ギ酸水溶液

移動相 B：125 mM アンモニア水溶液

移動相 C：水

移動相 D1：アセトニトリル

移動相 D2：メタノール

分離条件：5 - 90% 有機溶媒 /5 分、リニアグラジエント

洗浄溶媒（パージ溶媒、ニードル洗浄溶媒）：水 / メタノール＝ 50：50

シール洗浄溶媒：水 / アセトニトリル＝ 90：10

PDA 検出器：ACQUITY UPLC PDA

PDA 条件：210 - 400 nm（270 nm 抽出）

MS 検出器：ACQUITY QDa 検出器（パフォーマンス）

スキャン範囲：*m/z* 100 - 400

イオン化モード：ESI ポジティブおよびネガティブ

プローブ温度：600 ℃

キャピラリー電圧：0.8 kV（ポジティブ、ネガティブ共）

コーン電圧：15 V

データ種類：セントロイド

システムコントロール、データ取り込みおよび解析

データ Empower 3 FR2 CDS ソフトウェア

本アプリケーションノートでは、分析法開発の過程で UV データと MS データを用いることで、どのようにすべての化合物を正確に追跡できるのか、また最終条件におけるピーク純度について示します。全体にわたり、体系的なプロトコール、MS 検出を利用することにより、頑健性、性能評価のいずれにおいても USP の基準[1] を満たす分析法をより速くより効果的に開発することができました。

試料調製

API および関連物質試料の調製

各試料を 1.0 mg/mL となるようメタノールで希釈しストック溶液としました。各ストック溶液を等量ずつバイアルに移し混合し、最終濃度が各々 0.06 mg/mL となるよう水で希釈し分析試料としました。本実験で使用した化合物を表 1 に示しました。

化合物	一般名	モノアイソトピック質量 (Da)
API	Metoclopramide	299.14
Imp. A	4-Acetamido-5-chloro-N-(2-(diethylamino) ethyl)-2-methoxybenzamide	341.15
Imp. B	Methyl 4-acetamido-5-chloro-2-methoxybenzamide	257.05
Imp. C	4-Amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid	201.02
Imp. D	Methyl 4-acetamido-2-methoxybenzoate	223.08
Imp. F	4-Amino-5-chloro-N-(2-(hydroxbenzamido)-2-hydroxbenzamide	
Imp. G	2-(4-Amino-5-chloro-2-hydroxbenzamido)-N,N-diethylethanamide oxide	315.14
Imp. H	4-Acetamido-2-hydroxbenzoic acid	195.05
Imp. 9	Methyl 4-amino-2-methoxybenzoate	181.07

表 1．UPLC 分析法開発に用いたメトクロプラミド塩酸塩の USP 特定関連物質リスト

結果および考察

分析法開発における体系的プロトコール

体系的なプロトコールを使用することにより、主要な分離選択性パラメーターについて一貫性のある評価が可能となり、頑健で再現性の高い分析法の開発が確かなものとなります。ここでは分析時間を短縮し高感度な分析を行うため UPLC を使用しました。

分離の選択性範囲を広げるため、異なる充填剤やリガンドをもつ化学的特性の違うカラムを使用しました。

図 1 に示したように一連の段階を中心にプロトコールを構築し、各段階で体系的に分離を追求していきます。プロトコールの最初の段階には、試料、合格基準、クロマトグラフィーシステムを決定し、システム性能を評価することも含まれます。

今回のゴールは、メトクロプラミドと USP に定められた関連物質それぞれのピークについて USP 分離度 2.0 以上、USP テーリング係数 1.5 以下、保持係数 (k*) 3.0 以上と設定しました。

グラジエント条件における保持係数は k/(k+1) と定義されています。

分析法開発をフレキシブルに行うため ACQUITY UPLC H-Class システムを選択し、さらに複数本のカラムを使用できるカラムマネージャ、最大９種類の溶媒を使用可能な溶媒選択バルブを装備しました。全成分を同定し、同時溶出の有無を確認するため、光学検出器である ACQUITY PDA 検出器と、MS 検出のための ACQUITY QDa 検出器の両方を用いました。システム性能の評価には LCMS 品質管理標準 (QCRM) を利用し、実験を開始する前にシステムを適正に運転できることを確認しました [3]。

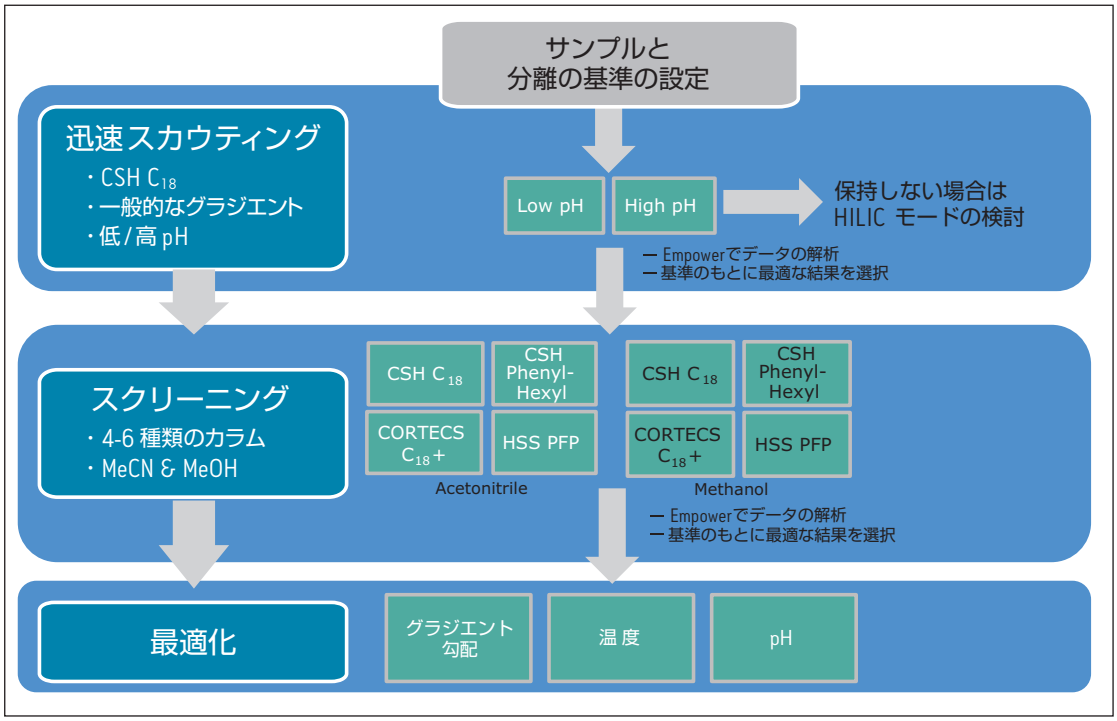


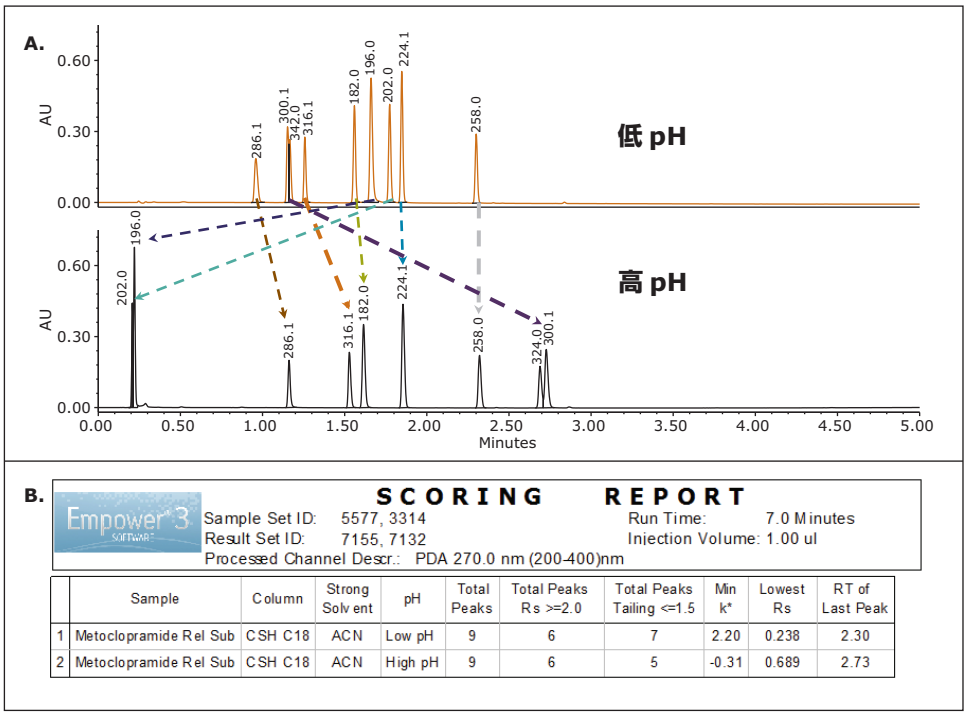
図 1. クロマトグラフィー分析法開発における体系的プロトコール

迅速スカウティング

試料、判定基準、システムを決定した後、短時間で分離条件のスクリーニングを行うため体系的プロトコールの迅速スカウティングの項目に着手しました。この段階でのゴールは、試料中の化合物の保持に適した移動相が、酸性であるのか塩基性であるのかを見極めることと、最適な分離モード (逆相または HILIC) を選択することです。

低 pH、高 pH での分析には、125 mM ギ酸水溶液と 125 mM アンモニア水溶液それぞれのストック溶液を使用し、逆相での分離については、5 分間でアセトニトリル濃度を 5 - 90% に変化させるグラジエント条件を用いました。対象が塩基性化合物であることから、予測通り、低 pH、高 pH の移動相条件で分離が劇的に変化しました（図 2）。MS データを利用することで、pH によりどの化合物が大きな影響を受けるのか追跡することも可能で、クロマトグラムは Empower で ApexTrack を使い自動的に解析しました。

次の段階に進むにあたり最適条件を決定するため、Empower でカスタム計算を組みレポートフォーマットもカスタマイズしました。設定したゴールに合致するピーク数を追跡することによりそれぞれのメソッドを採点し選択しました。このケースでは低 pH 条件ですべての化合物について良好な保持係数が得られ、この後に続く実験を低 pH で実施することとしました。



	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Min k*	Lowest Rs	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	ACN	Low pH	9	6	7	2.20	0.238	2.30
2	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	ACN	High pH	9	6	5	-0.31	0.689	2.73

図 2. 低 pH、高 pH 条件による迅速スカウティング
A. メトクロプラミドおよび関連物質の分離に及ぼされる pH の影響を示すクロマトグラム
大きく pH の影響を受ける化合物は MS データを利用して追跡
B. Empower 3 スコアリングレポート
合格基準は Empower のカスタム計算機能を利用して定義しレポートに反映
合計得点順に並べているため、最も良い分析条件が 1 番上に表示されます

スクリーニング

スカウティングの段階で保持の点から選択された条件（低 pH 条件）は、設定したすべての合格基準を満たしている訳ではなかったため、全成分の分離を目標にプロトコールの次の段階に進みました。ここではカラムマネージャを活用しました。カラムマネージャの採用により分析者の手をわずらわせることなく、様々なカラムを切り替えて分析することが可能になります。この段階でもスカウティングの段階と同じグラジエントを使用しましたが、有機溶媒についてはメタノールとアセトニトリルの両方を検討しました。

クロマトグラムの解析、最も良好に分離された条件の選択には、再び Empower スカウティングレポートを使用しました（図 3）。図 3 に示したように、ACQUITY UPLC CSH C_{18} カラム、メタノールを用いた条件で、分離度 2.0 以上、テーリング係数 1.5 以下を満たすピーク数が最大となりましたので、この条件を体系的プロトコールの最終段階である最適化の工程に適用しました。

SCORING REPORT

Sample Set ID: 4001 Run Time: 7.0 Minutes
Result Set ID: 7073 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Lowest Rs	Min k*	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	7	1.283	3.22	3.11
2	Metoclopramide Rel Sub	CORTECS C18+	ACN	Low pH	9	7	5	0.769	1.98	2.15
3	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	ACN	Low pH	9	5	7	2.308	2.15	2.30
4	Metoclopramide Rel Sub	CORTECS C18+	MeOH	Low pH	8	7	3	2.094	2.99	2.98
5	Metoclopramide Rel Sub	CSH Phenyl Hexyl	MeOH	Low pH	8	6	8	1.690	2.30	3.13
6	Metoclopramide Rel Sub	CSH Phenyl Hexyl	ACN	Low pH	8	5	5	0.654	0.98	2.21
7	Metoclopramide Rel Sub	HSS PFP	MeOH	Low pH	8	2	2	1.870	6.86	3.44
8	Metoclopramide Rel Sub	HSS PFP	ACN	Low pH	7	2	2	0.108	4.51	2.61

図 3. カラムの種類、有機溶媒を検討したスクリーニング段階の Empower 3 スコアリングレポート
ACQUITY UPLC CSH C_{18} カラム、メタノールを用いた条件で、分離度 2.0 以上、テーリング係数 1.5 以下を満たすピーク数が最大

最適化

いよいよ分析法開発のゴールに近づいてきましたが、スクリーニング段階の結果ではまだすべての合格基準を満たしていなかったため、分離の改善を図るため最適化の段階に進みました。この段階ではグラジエントの傾き、カラム温度、pH が分離に与える影響について検討し、各段階でスコアリングレポートを利用して分析条件を選択しました。

最初に検討したパラメーターはグラジエントの傾きで、グラジエント時間を固定し、グラジエント最終濃度の変更を行いました。レポートを使用して評価したところ、5 分間で 5 - 60% の有機溶媒勾配をかけた条件で最も良い分離が得られました（図 4）。全ピークの分離度についての合格基準を満たすため、同じ分析条件を用いてカラム温度を検討することとしました。この結果 45℃ですべてのピークの分離度が最大となり、開発過程の最初に設定したすべての基準を満たすことができました（図 5）。.

SCORING REPORT

Sample Set ID: 5181 Run Time: 7.0 Minutes
Result Set ID: 7285 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Lowest Rs	Min k*	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub, 60%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	9	1.727	3.56	4.01
2	Metoclopramide Rel Sub, 70%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	8	1.592	3.43	3.63
3	Metoclopramide Rel Sub, 80%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	7	1.463	3.31	3.34
4	Metoclopramide Rel Sub, 90%D	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	7	1.346	3.21	3.11

図 4. グラジエント勾配の最適化　5 分間で 5-90% の初期のグラジエント条件を、最終濃度 80%、70%、60% に変更
5 分間でメタノール 5-60% のグラジエント条件で最高点が得られ、分離度 2.0 以上、テーリングファクター 1.5 以下のピーク数が最大となり、最良の分離条件であることが示唆されました

SCORING REPORT

Sample Set ID: 5325, 5232 Run Time: 7.0 Minutes
Result Set ID: 7236, 7205 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Min k*	Lowest Rs	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub, 45C	CSH C18	MeOH	Low pH	9	8	9	3.27	2.280	3.87
2	Metoclopramide Rel Sub, 50C	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	9	3.04	1.816	3.79
3	Metoclopramide Rel Sub, 40C	CSH C18	MeOH	Low pH	9	7	9	3.54	1.757	3.99

図 5. カラム温度の最適化　40 ℃、45 ℃、50 ℃を検討し、45 ℃で分離度 2.0 以上のピーク数が最大となり最良の分離条件と示唆されました

この段階で、既に全ての基準に合致した分析法が得られていましたが、pH がクロマトグラムに与える影響についてさらに検討しました。しばしば pH のわずかな変化がイオン性の化合物の保持に大きな影響を及ぼすことがあるためです。これまでの実験で使用した移動相をそのまま利用して pH2.15、3.0、4.0 で分析しました（図 6）。pH3.0、4.0 の移動相調製には Auto • Blend Plus テクノロジーを使い、既にシステムにセットしてあったギ酸水溶液、アンモニア水溶液、メタノール、水を指定した一定の pH で混合させました。この結果、pH を高めると選択性に大きな変化が見られることがわかり、また、pH2.15 で最も良好な結果が得られることを確認しました（図 7）。

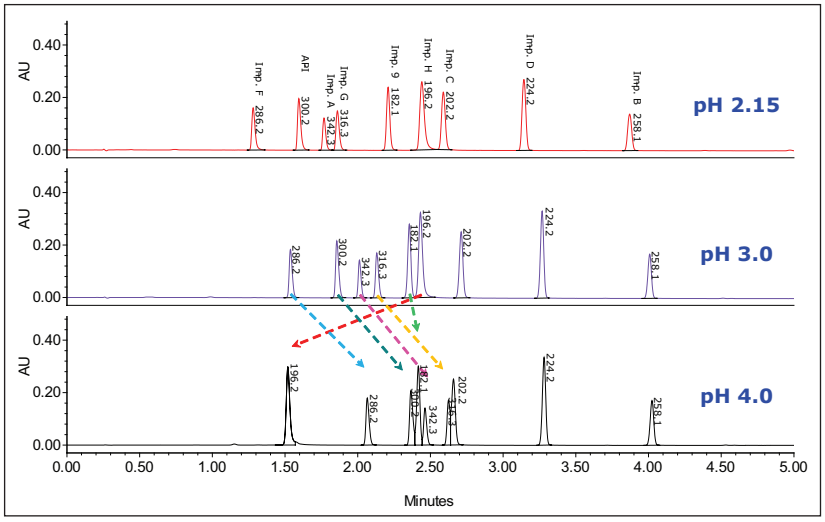


図 6. メトクロプラミドとその関連物質の分離における pH の影響を検討するための pH の最適化
ピークトラッキングは ACQUITY QDa 検出器による MS 検出により行いました。pH 2.15 の条件で最も優れた分離が得られる結果となりました

SCORING REPORT

Sample Set ID: 5325, 6461 Run Time: 7.5, 7.0 Minutes
Result Set ID: 7263, 7273 Injection Volume: 1.00 ul
Processed Channel Descr.: PDA 270.0 nm (200-400)nm

	Sample	Column	Strong Solvent	pH	Total Peaks	Total Peaks Rs >=2.0	Total Peaks Tailing <=1.5	Min k*	Lowest Rs	RT of Last Peak
1	Metoclopramide Rel Sub	CSH C18	MeOH	Low pH	9	8	9	3.27	2.280	3.87
2	Metoclopramide Rel Sub, pH 3.0	CSH C18	MeOH	pH = 3.0	9	7	9	4.12	1.687	4.01
3	Metoclopramide Rel Sub, pH 4.0	CSH C18	MeOH	pH = 4.0	9	5	4	4.06	0.632	4.02

図 7. pH の最適化　pH2.15 で最高点が得られ、最良の分析条件であることが示唆されました

UPLC 最終分析条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class システム、カラムマネージャ、溶媒選択バルブ（SSV）付属

カラム： ACQUITY UPLC CSH C_{18}、1.7 µm、2.1 x 50 mm（製品番号 186005296）

カラム温度： 45 ℃

注入量： 1.0 µL

流速： 0.6 mL / 分

移動相 A： 125 mM ギ酸水溶液

移動相 C： 水

移動相 D2： メタノール

分離条件：

ステップ	時間（分）	溶液 A（%）	溶液 C（%）	溶液 D（%）
1	初期条件	10	85.0	5.0
2	5.0	10	30.0	60.0
3	5.5	10	30.0	60.0
4	5.6	10	85.0	5.0
5	7.0	10	85.0	5.0

洗浄溶媒（パージ溶媒、ニードル洗浄溶媒）：水 / メタノール＝ 50：50

シール洗浄溶媒：水 / アセトニトリル＝ 90：10

PDA 検出器： ACQUITY UPLC PDA

PDA 条件： 210 - 400 nm（270 nm 抽出）

MS 検出器： ACQUITY QDa 検出器（パフォーマンス）

スキャン範囲： *m/z* 100 - 400

イオン化モード： ESI ポジティブおよびネガティブ

プローブ温度： 600 ℃

キャピラリー電圧：0.8 kV（ポジティブ、ネガティブ共）

コーン電圧： 15 V

データ種類：： セントロイド

システムコントロール、データ取り込みおよび解析

データ Empower 3 FR2 CDS ソフトウェア

最終UPLC分析法

開発された UPLC 条件の性能を検証するため、繰り返し注入再現性を確認しました。USP General Chapter、<621> クロマトグラフィー [2] に定義された規格に従い、5 回注入を行い本分析法の各々の成分についてのシステム適合性結果を評価した結果をテーブル 2 に示しました。

保持時間、面積値の再現性は USP の規格である 2.0% RSD 未満であり、全てのピークの USP 分離度は USP が一般的に求める 1.5 以上を十分上回る 2.5 以上で、本システム適合性結果が優れたものであることが示されました。分析法が決定した後には、本来バリデーション試験を実施することとなりますが、こちらについても Empower メソッドバリデーションマネージャ（MVM）ソフトウェアで自動的に実施することが可能です。

Empower 3 SOFTWARE

Report Method: System Suit_Sum Report
Sample Set ID: Sample Set Id 2622
Result Set ID: Result Set Id 2660
Channel Name: PDA 270

	Name	# of Inj.	%RSD RT	%RSD Peak Areas	Ave USP Resolution	Ave USP Tailing
1	Imp. F	5	0.07	0.19		1.2
2	API	5	0.06	0.22	6.7	1.3
3	Imp. A	5	0.06	0.21	3.4	1.2
4	Imp. G	5	0.07	0.23	2.5	1.2
5	Imp. 9	5	0.06	0.19	9.2	1.1
6	Imp. H	5	0.06	0.19	4.2	1.4
7	Imp. C	5	0.06	0.31	2.5	1.1
8	Imp. D	5	0.05	0.21	9.0	1.1
9	Imp. B	5	0.04	0.21	13.0	1.1

表 2. ACQUITY UPLC H-Class システムを使用した 5 回注入によるシステム適合性試験結果

結論

体系的プロトコールに従い、メトクロプラミドとその関連物質を分離するUPLC分析法の開発に成功しました。分離度2.0以上、テーリング係数1.5以下、保持係数（k*）3以上とした全9化合物の分離のゴールとなる合格基準は全て満たされました。

これまでUV検出で使用していたACQUITY UPLC H-Classシステムに ACQUITY QDa検出器を追加することにより、保持時間のみでピーク同定を行う場合に必要な複数回の分析（ピーク同定のために別途行う標準品の分析）を排除し、分析法開発の工程の効率化を実現しました。

9種の標準品を個別に分析することなく、分析法開発の実験を行いながら、1回の分析で即座に化合物の同定を行い、溶出順を決定することができました。

最後に、分析法開発の工程を通してEmpowerソフトウェアのApexTrackを使用することにより、クロマトグラムを公平に比較した一貫性のある評価が可能となります。さらにEmpowerのカスタム計算機能、レポート機能を利用してプロトコールの各段階において容易に最適条件を決定することができます。

分析法開発工程全体を通し、明確で体系的なプロトコールをUPLCシステム、検出器、UPLCカラムと共に運用することで、分析ラボの迅速かつ効果的なクロマトグラフィーメソッド構築が可能になります。またこのような方法で開発した分析法は一般的に再現性に優れ、続くバリデーションの成功率も高いものとなりラボの負担を軽減します。

.

参考文献

1. USP General Chapter, <1226>, Verification of Compedial Method, USP36-NF31, The United States Pharmacopeia Convention, official December 1, 2013.
2. USP General Chapter, <621>, Chromatography, USP36-NF31, The United States Pharmacopeia Convention, official December 1, 2013.
3. Berthelette KD, Summers M, Fountain KJ. Ensuring Data Quality by Benchmarking System Performance Using Waters Neutrals Quality Control Reference Material. Waters Corp. 2013; 720004622en.

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 富山

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY、ACQUITY UPLC、UPLC、QDa および Empower は Waters Corporation の登録商標です。ApexTrack、Auto • Blend Plus および CSH 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。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan.

2014年 8月 720005026JA PDF