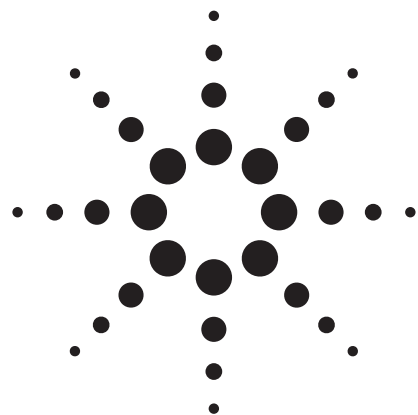
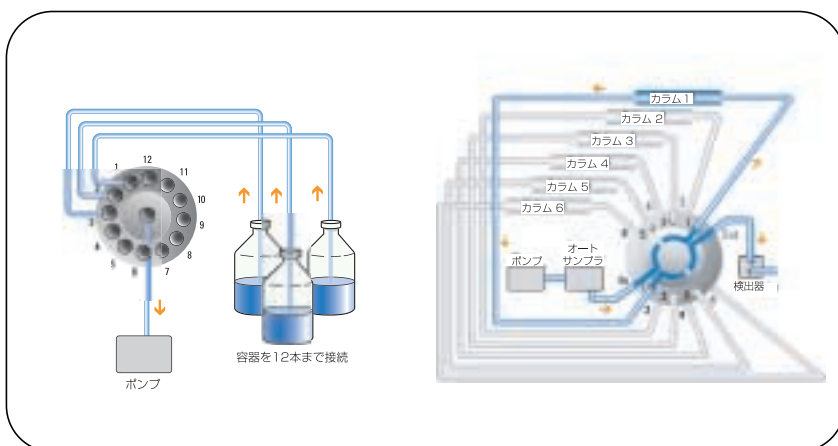




メソッド開発： Agilent 1100 シリーズの バルブソリューションによる 溶媒とカラムの選択

Udo Huber

アプリケーション



要旨

HPLC 分析メソッドが製薬分野での QA/QC ラボで、化合物の同定と定量に実際に使用できるようになるまでに、メソッドには 3 つのステージを通り抜ける必要があります。最初のステージはメソッド開発であり、続いてメソッドのバリデーション、さらに第 3 のステージとしてメソッドを標準操作手順書 (SOP) に文書化しなければなりません。これらのステージを経ることによって初めて QA/QC ラボでメソッドを使用できるようになります。メソッドのバリデーションについては多くの指針や規制が存在しますが、メソッドの開発についてはまだ実証実験的なプロセスであり、これは担当する分析化学者の経験に大きく依存します。メソッド開発のより高度なアプローチには、複数の溶媒とカラムを自動的に選択するシステムティックな実験があります。このアプリケーションノートではこの方法について説明します。



Agilent Technologies

はじめに

このアプリケーションノートでは Agilent 1100 シリーズバルブを使用した 3 通りのアプリケーションについて説明します。

1. Agilent 1100 シリーズの 12-ポジション/13-ポートバルブを使用した溶媒切換え。この方法により、10 ml/min 以下の分析流量に最高 12 種類までの溶媒を使用することができます。
2. Agilent 1100 シリーズ 6 ポジション選択バルブを利用した 6 種類までのカラム選択。
3. 溶媒選択とカラム選択の両方のバルブを組み合わせた柔軟性に富む自動メソッド開発。

装置

使用する Agilent 1100 シリーズは以下のモジュールから構成されています。

- Agilent 1100 シリーズクォーターナリポンプ (4 つまでのデガッサを装着)
- Agilent 1100 シリーズウェルプレートオートサンプラ
- Agilent 1100 シリーズ 12 ポジション/13 ポート選択バルブ
- Agilent 1100 シリーズ 6 ポジション選択バルブ
- Agilent 1100 シリーズカラムオーガナイザ
- Agilent 1100 シリーズダイオードアレイ検出器

システムのコントロールには Agilent ケミステーション (rev.A.09.03) を使用。

溶媒選択のための装置構成

溶媒の選択を可能にする方法として、図 1A および図 1B に示す 2 通りの装置構成が考えられます。

図 1A に示す構成ではデガッサが溶媒選択バルブの後に取付けられています。この構成の利点は 1 つのデガッサだけですべての溶媒を処理できることです。その一方で、新しい溶媒を選択するたびにデガッサ流路を洗浄する必要があるため、溶媒消費量が増えるという欠点があります。内部容積 12mL の標準デガッサ、および内部容積 1mL のマイクロデガッサを洗い流す容量としてそれぞれ 25mL および 5mL を推奨します。デガッサ流路の洗浄とそれに伴う溶媒の消費と廃棄に費やすコスト増加を避けるには、溶媒ボトルと溶媒選択バルブの中間にデガッサを取り付ける方法があります。

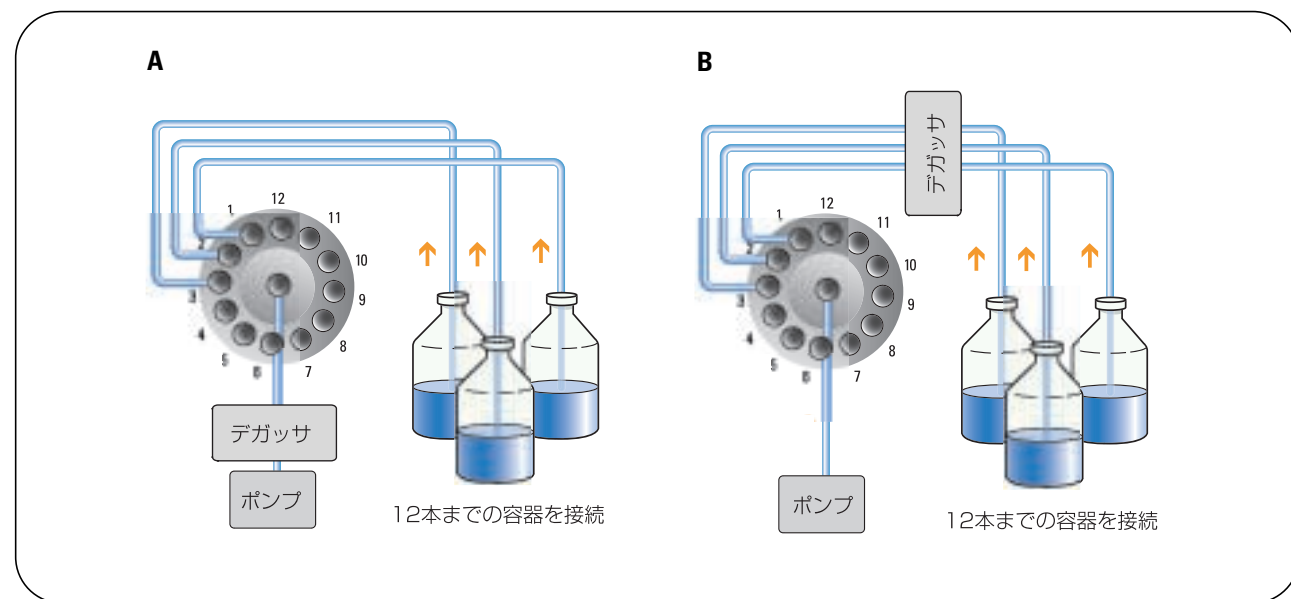


図 1

- A. 全ての溶媒を 1 つのデガッサチャンネルで脱気
B. それぞれの溶媒をそれぞれのデガッサで脱気

メソッドとシーケンスの設定が簡素化されて容易になることもこの構成の利点です。一方、この方法の欠点は4つまでのデガッサが必要になることですが、長期間にわたる溶媒の消費と廃棄コストの増分はデガッサ追加のコストをはるかに上回ることから、溶媒選択の溶媒チャンネルごとにデガッサを取り付けることをお勧めします。本アプリケーションノートではこちらの構成を使用するものとして説明します。

結果と考察

1. 溶媒の選択

Agilent 1100 シリーズの 12 ポジション/13 ポート選択バルブを使用することにより 12 種類までの溶媒を選択して使用することが可能になります。ここで示すアプリケーション例では、移動相 A として 5 種類の異なる水系緩衝液 (pH 3~11) を Zorbax Extend-C18 カラムに送液しています。各溶媒ごとに対応するメソッドを設定して、そのメソッドにより溶媒選択バルブが正しい位置に切替えられます。図 2 に溶媒 1 (pH=3 のリン酸緩衝液) で使用するメソッドのバルブ設定ウィンドウを示します。

5 種類の移動相を全て使用する自動溶媒選択実験では、図 3 のように各溶媒に対応するメソッドをシーケンステーブルの中にセットアップします。

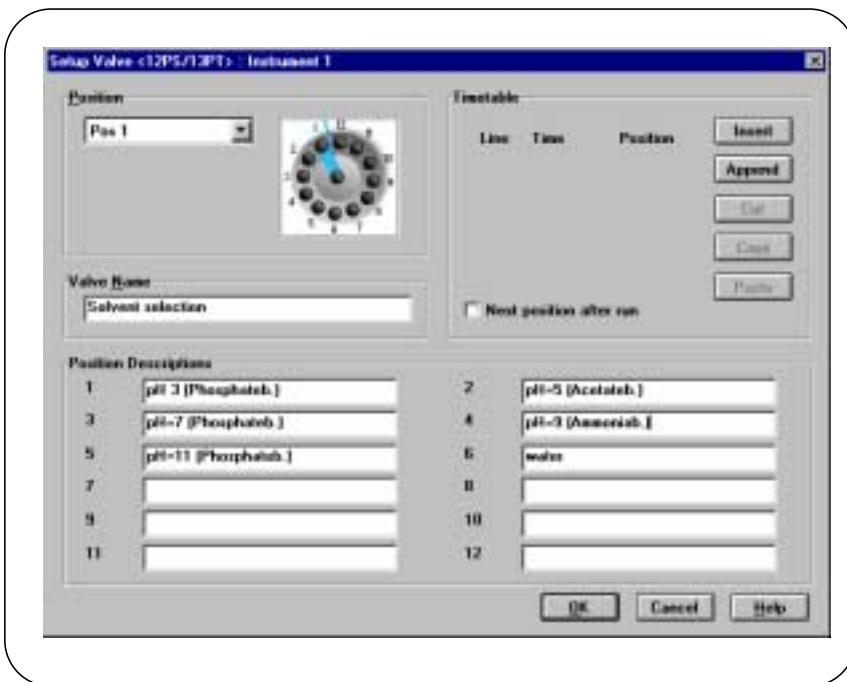


図 2
溶媒 1 を使用するバルブ設定パネル

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj/Location	Sample Type	Col Le
1	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH3_01	1	Sample	
2	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH5_01	1	Sample	
3	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH7_01	1	Sample	
4	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH9_01	1	Sample	
5	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH11_01	1	Sample	
6		Wash	WASH01	1	Sample	

図 3
自動溶媒選択に使用するシーケンステーブル

カラム: Zorbax Extend-C18
 4.6×75 mm, 3.5 μm
 移動相: A = 水系緩衝液
 B = アセトニトリル
 グラジエント: at 0 min 10 % B
 at 9 min 70 % B
 at 9.01 min 90 % B
 at 12 min 90 % B
 ストップタイム: 12 min
 ポストタイム: OFF
 流量: 1 mL/min
 注入量: 10 μL
 カラム温度: 室温
 UV 検出器: 254 nm/16
 (参照波長 360 nm/60)
 光路長 10 mm

溶媒選択実験の結果を図 4 に示します。Zorbax Extended-C18 カラムを使用した 3 種類の化合物の分離で最も分離が良かったのは pH 5 の溶媒を使用した場合でした。

カラムのプリケアとアフターケア次の溶媒へ切替えた後はカラムを新しい移動相でしばらく平衡化させなければなりません。このプロセスをカラムのプリケアと呼びます。カラムの平衡化にどれくらいの時間が必要となるかはカラムの長さ、内径、流量、および 2 つの移動相の混和性に依存します。それぞれの溶媒ごとにメソッドを作成したら、これらのメソッドをシーケンスの中に組み込みます。シーケンスパラメータパネルにある "待ち時間 (Wait Time)" 機能でこの平衡化に必要な時間を指定できます。図 5 に示す設定では、シーケンステーブルに指定したメソッドが読み込まれると直ちに溶媒選択バルブが新しいポジションに切替ります。メソッドが読み込まれた後指定した待ち時間（このアプリケーション例では 10 分）が経過するのを待ってから最初のインジェクションが実行されます。

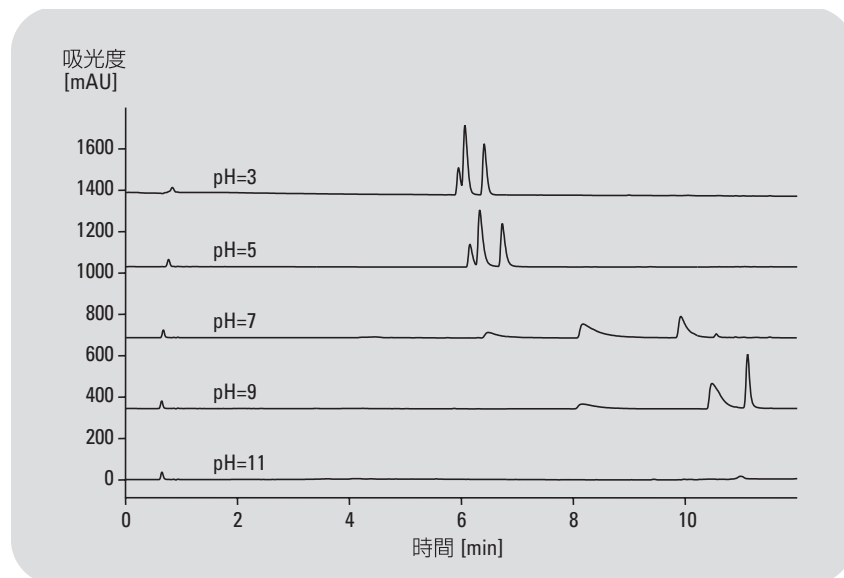


図 4
 溶媒選択実験の結果

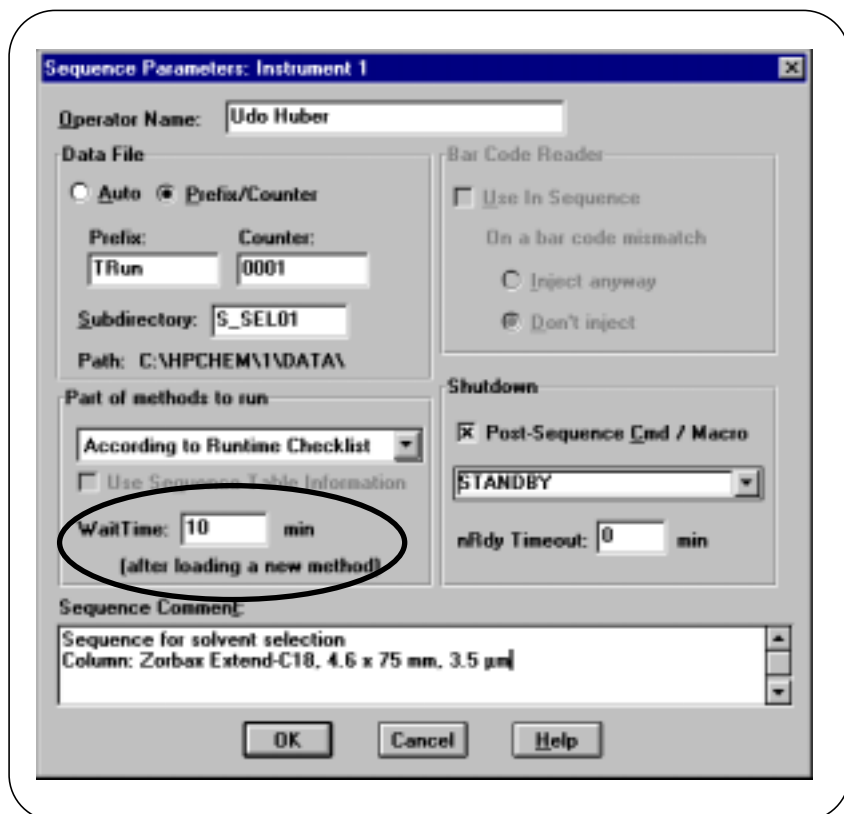


図 5
 シーケンスパラメータ設定パネル（待ち時間が 10 分に指定されています）

最後の実験を終えた後は、カラムを保管できるよう、緩衝液を含まない溶媒でカラムを平衡化させておかねばなりません。このプロセスをカラムのアフターケアと呼びます。これを実行するには、何もインジェクションしないブランクランをシーケンステーブルに組み込みます (図 3、第 6 行)。このブランクランの実行中にカラムに残っている緩衝液が水で洗い流され、最後にカラムを保管する溶媒 (アセトニトリルなど) で洗浄されます。保管に適した溶媒は通常、カラムに添付されたデータシートに記載されています。

2. カラムの選択

Agilent 1100 シリーズ 6 ポジション選択バルブを使用すると 6 本までのカラムを選択して使用できます。ここに示すアプリケーション例では、リン酸緩衝液 (pH=3) を移動相 A にして 4 種類の逆相カラムを選択しています。ポジション 5 はカラムではなくキャピラリーに接続されており、このバルブポジションはシステム洗浄などに使用できます。それぞれのカラムごとに別々なメソッドが設定され、そのメソッドに従ってカラム選択バルブが正しい位置に切替えられます。図 6 にカラム 1 (Zorbax Extend-C18) で使用するメソッドのバルブ設定ウィンドウを示します。

4 種類のカラムを全て使用する自動カラム選択実験では、図 7 のように各カラムに対応するメソッドをシーケンステーブルの中にセットアップします。

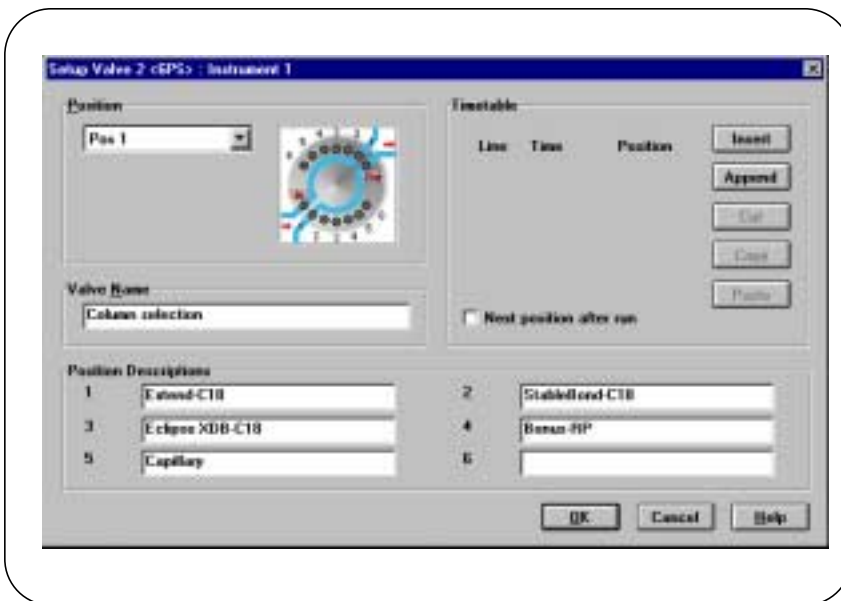


図 6
カラム 1 を使用するバルブ設定パネル

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj/Location	Sample Type	Cal L
1	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN1	1	Sample	
2	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN2	1	Sample	
3	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN3	1	Sample	
4	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN4	1	Sample	
5		Column wash	WASH_ALL	1	Sample	

図 7
自動カラム選択に使用するシーケンステーブル

カラム選択実験の結果を図 8 に示します。pH=3 の下記条件で最も分離が良かったのは Zorbax StableBond-C18 カラムを使用した場合でした。

カラム： Zorbax 逆相
4.6×75 mm, 3.5 μm
移動相： A = 50mM
リン酸緩衝液 (pH=3)
B = アセトニトリル
グラジエント： at 0 min 10 % B
at 9 min 70 % B
at 9.01 min 90 % B
at 12 min 90 % B
ストップタイム： 12 min
ポストタイム： OFF
流量： 1 mL/min
注入量： 10 μL
カラム温度： 室温
UV 検出器： 254 nm/16
(参照波長 360 nm/60)

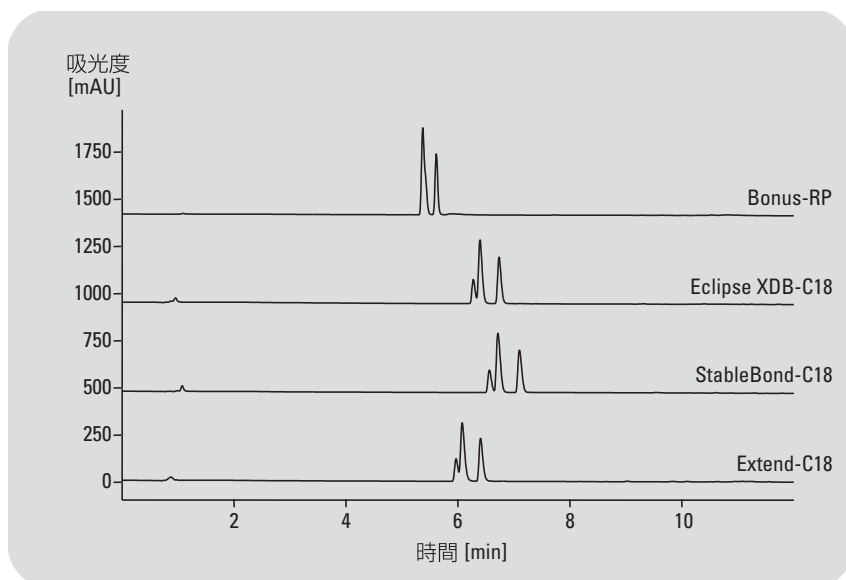


図 8
カラム選択実験の結果

カラムのプリケアとアフターケア

カラムのプリケアとアフターケアは溶媒選択の場合と同じ機能を使います。シーケンスパラメータパネルにある "待ち時間 (Wait Time)" 機能でカラムのプリケアを設定し、何もインジェクションしないブランクランを組み込んでアフターケアを設定します。図 7 に示すシーケンステーブル (第 5 行) では共通のメソッドを使って全てのカラムが洗浄されるよう指定しています。このメソッドはタイムテーブルに従って、洗浄溶媒を指定された時間流した後に、選択バルブを次のポジションに切替えます。カラムの材質や分析に使用した溶媒、シーケンス全体の時間的な長さによっては、毎分析の終了後直ちにカラムを洗浄しなければならないことがあります。このような場合には各カラムについて各分析の直後に洗浄メソッドを挿入したシーケンステーブルを作成します。

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj/Location	Sample Type	Cal L
1	Vial 31	Tricyclic Antid.	C1_S1	1	Sample	
2	Vial 31	Tricyclic Antid.	C1_S2	1	Sample	
3	Vial 31	Tricyclic Antid.	C1_S3	1	Sample	
4	Vial 31	Tricyclic Antid.	C2_S1	1	Sample	
5	Vial 31	Tricyclic Antid.	C2_S2	1	Sample	
6	Vial 31	Tricyclic Antid.	C2_S3	1	Sample	
7	Vial 31	Tricyclic Antid.	C3_S1	1	Sample	
8	Vial 31	Tricyclic Antid.	C3_S2	1	Sample	
9	Vial 31	Tricyclic Antid.	C3_S3	1	Sample	
10	Vial 31	Tricyclic Antid.	C4_S1	1	Sample	
11	Vial 31	Tricyclic Antid.	C4_S2	1	Sample	
12	Vial 31	Tricyclic Antid.	C4_S3	1	Sample	
13		Column wash	WASH_ALL	1	Sample	

図 9
溶媒とカラムの自動選択を実行するシーケンステーブル

溶媒とカラムを互に組み合わせて選択

12 ポジション/13 ポート選択バルブと 6 ポジション選択バルブの両方を同一システム上に取り付けることにより、溶媒とカラムを互に組み合わせて選択することも可能です。このアプリケーション例では 3 種類の水系溶媒 (pH 範囲 3~7) のそれぞれに 4 種類の逆相カラムを組み合わせたことができます。それぞれのサンプルごとにメソッドを作成し、このメソッドにより溶媒選択バルブとカラム選択バルブが正しい位置に切替えられます。溶媒選択とカラム選択に使用するメソッドのバルブ設定ウィンドウは図 2 と図 6 に示したものと同様です。

4 種類のカラム全てと 3 種類の溶媒全てを組み合わせて自動実験を実施するため、図 9 に示すシーケンステーブルの中に 12 種類のメソッドをセットアップしました。

溶媒選択とカラム選択を自動化した実験の結果を図 10 に示します。Zorbax StableBond-C18 でも化合物はベースラインで分離されていますが、最も優れた分離が得られたのは Zorbax Bonus-RP カラムを pH 7 で使用する組合せでした。

カラムのプリケアとアフターケア

カラムのプリケアとアフターケアの方法は前の説明と同様です。シーケンスパラメータパネルにある "待ち時間 (Wait Time)" 機能でカラムのプリケアを設定し、何もインジェクションしないブランクランを組み込んでアフターケアを設定します。図 9 に示すシーケンステーブル (第 13 行) では共通のメソッドを使って全てのカラムが洗浄されるよう指定しています。必要に応じて、各カラムの各分析ごとに洗浄メソッドをセットアップすることも可能です。

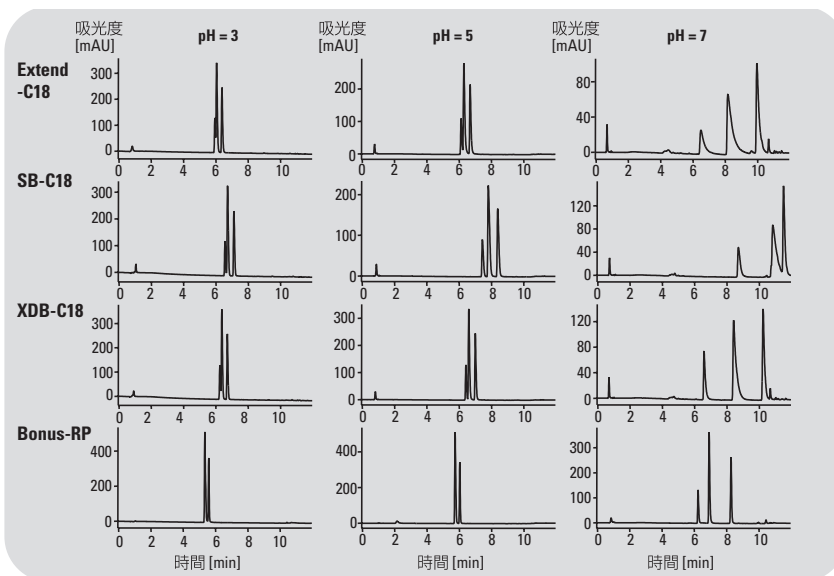


図 10
3 種類の溶媒と 4 種類のカラムを組合せた実験結果

結論

このアプリケーションノートでは 3 通りのアプリケーション (溶媒選択、カラム選択、両者を組合せた選択) について説明しました。Agilent 1100 シリーズの 12 ポジション/13 ポートバルブと 6 ポジション選択バルブを使用することにより、単一メーカーの製品による完全に自動化された統合システムの構築が可能であることを示しました。3 通りのアプリケーションについてバルブとシーケンスをセットアップしてプロセスを完全自動化する方法を全て説明しました。アプリケーション例として、異なる pH 値と異なる逆相カラムを組み合わせて 3 種類の化合物混合試料を分離しました。

溶媒とカラムを互に組合せて選択できることの利点を証明しました。最良の分離が得られる溶媒とカラムの組み合わせが容易に特定できることを図 10 の例で示しました。溶媒またはカラムの単独選択のみでは、同じ結果を得るまでにさらに数多くの実験が必要となります。

参考文献

1. "New dimensions for HPLC applications", Agilent Technologies Brochure, 2002, publication number 5988-6707EN.

Udo Huber は Agilent Technologies
(Waldbronn, Germany) のアプリケーションケミストです。

www.agilent.co.jp/chem/yan

Copyright © 2002 Agilent Technologies
All Rights Reserved.
著作権法で許された例外を除き、Agilent Technologies の書面による事前の同意なしにこの文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

発行：2002年 11月 1日
資料番号：5988-8347JAJP

横河アナリティカルシステムズ株式会社 本社/〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

- 1) システム、製品および部品に関するご相談窓口
- 2) 製品の操作、アプリケーションの問合せおよび故障時の連絡窓口