

Agilent 1290 Infinity II によるターゲット HPLC システム対応分析メソッドの開発

インテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) による
簡便迅速なターゲットシステムエミュレーション

アプリケーションノート

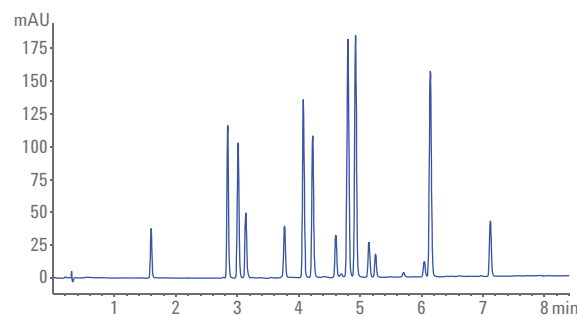
低分子医薬品

著者

Edgar Naegele and Andreas Borowiak
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードによる分析メソッドの開発と、ターゲット HPLC システムを直接エミュレート可能な Agilent インテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) によるメソッド移管を組み合わせたアプローチについて取り上げます。Agilent 1100 シリーズ LC と Waters Acquity UPLC H-Class などの大幅に異なるターゲットシステムに対して、提案するワークフローが、1つの親分析メソッド開発システムのみで汎用的にアプローチ可能であることが実証されました。



Agilent Technologies

はじめに

現代の分析メソッド開発施設は、さまざまな部門に導入された、メーカーや LC 世代の異なる多様なターゲットシステムに対応できる LC メソッドを開発するという難題に直面しています。多数のメソッド開発システムが必要となるという課題を克服するために、このアプリケーションノートでは、分析メソッドの開発と、Agilent インテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) による迅速かつ簡便なターゲットシステムエミュレーションを組み合わせたワークフローを紹介します。この目的には、Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションを親システムとして使用するのが最適です。これは、特定のターゲット LC にしか対応できない専用の分析メソッド開発システムとは異なり、多様なターゲットシステムの分析メソッドを開発できるうえ、手動でのシステム変更も不要だからです。

以前紹介したワークフローでは、移動相とカラムのスクリーニングをもとに開発した UHPLC メソッドを標準的な HPLC 条件に移管し、ISET によりターゲット LC システムをエミュレートしました¹。このアプリケーションノートで説明するワークフローでは、1290 Infinity II メソッド開発ソリューションと ISET によるターゲット LC システムのエミュレーションを用い、ターゲットシステムの分析メソッドを直接開発します。このワークフローの大まかな流れを図 1 に示します。まず、ISET でエミュレートした条件下でカラム、溶媒、および温度をスクリーニングし、良好な結果が得られるメソッドを作成します。この初期スクリーニングに続いて微調整のためのスクリーニングを実施し、分離能および分析時間に関して適切な分離結果が得られるようメソッドをさらに最適化します。最適な分離の分析メソッドを作成した後、メソッドをターゲットシステムに移管し、複数回の注入を行うメソッドの堅牢性をテストします。

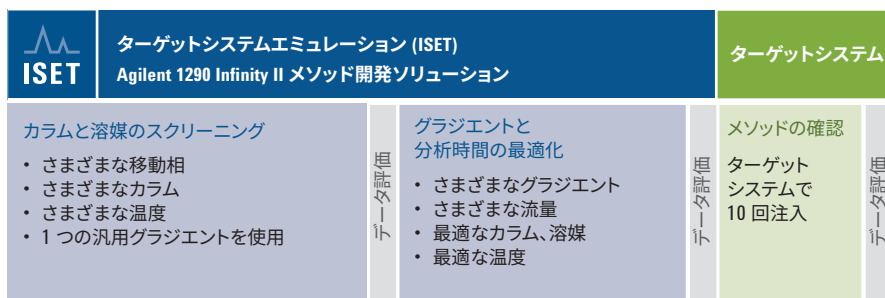


図 1. Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードと Agilent インテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) を組み合わせ、選択したターゲットシステム用のクロマトグラフィーメソッドを直接開発するための一般的なワークフロー

このアプリケーションノートでは、Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードと ISET を組み合わせ、特定のターゲットシステム用の分析メソッドを直接開発するワークフローを紹介します。このワークフローにより、Agilent 1100 シリーズ LC と Waters Acquity UPLC H-Class など大幅に異なるターゲットシステム用の分析メソッドを 1 つのハードウェアシステムで開発することができました。このワークフローの有効性をテストするため、15 種類の化合物からなる複雑なサンプルを使用し、Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションと特定のターゲットシステムで最終的なメソッドの同等性を比較・評価しました。

実験方法

機器

Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションでは、次のモジュールを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104A)、ISET 有効
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプルラ (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)
- Agilent 6140 シングル四重極 LC/MS (G6140B)

また、自動メソッド開発を行うために、1290 Infinity II メソッド開発ソリューションに次の部品が必要でした。

- Agilent InfinityLab クイックチェンジ 8 カラム選択バルブ (G4239C)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、InfinityLab クイックチェンジ 12 ポジション/13 ポートバルブ (G4235A) 搭載
- 低拡散キャピラリーキット、内径 0.12 mm (p/n 5067-4248)

機器の設定

1290 Infinity II フレキシブルポンプは、InfinityLab クイックチェンジ 12 ポジション/13 ポートバルブでクラスタ化し、Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition で溶媒を選択できるようにしました。溶媒の定義は、ChemStation のポンプ設定ダイアログで行いました。Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT) には InfinityLab クイックチェンジ 8 カラム選択バルブを装着し、ChemStation でクラスタ化しました。すべてのカラムでカラム ID タグ (p/n 5067-5917) を使用し、ChemStation でカラムを自動認識して ChemStation の MCT ダイアログで割り当てられるようにしました。カラムおよびグラジエントのスクリーニング、機器のフラッシュ、およびカラムの平衡化に必要なメソッドは、メソッドスカウティングウィザードで自動作成しました。ターゲットシステムのエミュレーションには、ISET を使用しました。

Agilent 1100 シリーズ LC の構成モジュールは次のとおりです。

- Agilent 1100 シリーズクォータナリポンプ (G1311A)
- Agilent 1100 シリーズデガッサ (G1379A)
- Agilent 1100 シリーズ標準オートサンブラ (G1329A)
- Agilent 1100 シリーズカラムコンパートメント (G1316A)
- Agilent 1100 シリーズダイオードアレイ検出器 (G1315B)

Waters Acquity UPLC H-Class の構成モジュールは次のとおりです。

- Acquity UPLC H-Class バイオクォータナリソルベントマネージャ
- Acquity UPLC バイオサンプルマネージャ FTN
- Acquity UPLC カラムマネージャ
- Acquity UPLC TUV 検出器

ソフトウェア

- LC および LC/MS システム用
Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition バージョン C.01.07 および
Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザード バージョン A02.06
- Agilent OpenLab CDS バージョン 2.1:
Waters Acquity H-Class のコントロール用

カラム

Agilent 1100 シリーズ LC (ターゲットシステム):

- Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18 USP L1、
4.6 × 150 mm、2.7 μm (p/n 683975-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell EC-C8 USP L7、
4.6 × 150 mm、2.7 μm (p/n 683975-906)
- Agilent InfinityLab Poroshell Bonus-RP USP L60、
4.6 × 150 mm、2.7 μm (p/n 693968-901)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、
4.6 × 150 mm、3.5 μm (p/n 959963-902)

Waters Acquity UPLC H-Class (ターゲットシステム):

- Agilent InfinityLab Poroshell EC C18、
2.1 × 100 mm、1.9 μm (p/n 695675-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell EC PFP、
2.1 × 100 mm、1.9 μm (p/n 695675-408)
- Agilent InfinityLab Poroshell EC Phenyl-Hexyl、
2.1 × 100 mm、1.9 μm (p/n 695675-912)
- Agilent InfinityLab Poroshell EC C8、
2.1 × 100 mm、1.9 μm (p/n 695675-906)

最終的なメソッド

システム	Agilent 1100 シリーズ LC	Waters Acquity UPLC H-Class
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 4.6 × 150 mm、3.5 μm	Agilent InfinityLab Poroshell EC PFP、 2.1 × 100 mm、1.9 μm、
温度	40 °C	40 °C
溶媒	A) 水、0.1 % (v.v) 酢酸 B) アセトニトリル、0.1 % (v.v) 酢酸	A) 水、0.1 % (v.v) 酢酸 B) アセトニトリル、0.1 % (v.v) 酢酸
流量	1.7 mL/min	0.85 mL/min
グラジエント	0 分: 10 %B 11.5 分: 49 %B 17 分: 55 %B	0 分: 10 %B 7.5 分: 47 %B 7.6 分: 10 %B
ストップタイム	17 分	9.5 分
ポストタイム	3 分	なし
UV 検出器	254/10 nm、参照 360/100 nm、データレート 20 Hz	

サンプル

テストサンプルとして、15種類の農薬および医薬品を含む複雑な混合溶液を使用しました。各化合物を個別にアセトニトリルに溶解し(1 mg/mL)、最後に同量の各溶液を混合しました。表1に、各化合物とその化学式および質量数を示します。

試薬

すべての溶媒は、HPLCグレードのものをMerck社(ドイツ)から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak) を装着した Milli-Q Integral システムで生成しました。すべての試薬は、Sigma-Aldrich 社(ドイツ)から購入しました。

結果と考察

ターゲットシステム:

Agilent 1100 シリーズ LC

Agilent 1100 シリーズ LC をターゲットシステムとし、このシステムで複雑なサンプルを分離するための初期メソッド開発を行いました。このスクリーニング処理では、メソッドスカウティングウィザードと ISET を用い、Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションで4種類の標準 HPLC カラム(「実験方法」を参照)、2種類の溶媒(メタノールおよびアセトニトリル)、および3種類の温度(30、40、および50°C)をスクリーニングしました。初期の汎用グラジエントでは、有機溶媒濃度を30分で5%から70%に増加させました。図2に、メソッドスカウティングウィザードでの初期スクリーニング処理後に得られたメソッドによる複雑なテストサンプルの最適な分離結果を示します。

表1. テストサンプルの組成 (各化合物のアセトニトリル溶液 1 mg/mL の混合液)

化合物名	化学式	m/z [M+H ⁺]
アトラジンデスエチル	C ₈ H ₁₀ ClN ₅	188.06
メトキシロン	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	229.07
ヘキサジノン	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	253.16
テルブチラジンデスエチル	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	202.08
メタベンズチアズロン	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	222.06
クロロトルロン	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	213.08
アトラジン	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	216.10
ジウロン	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233.02
メトブロムロン	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	259.00
メタザクロル	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	278.10
ニフェジピン	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	347.10
セブチラジン	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.11
テルブチラジン	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.11
リニューロン	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249.02
ニモジピン	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₇	419.18

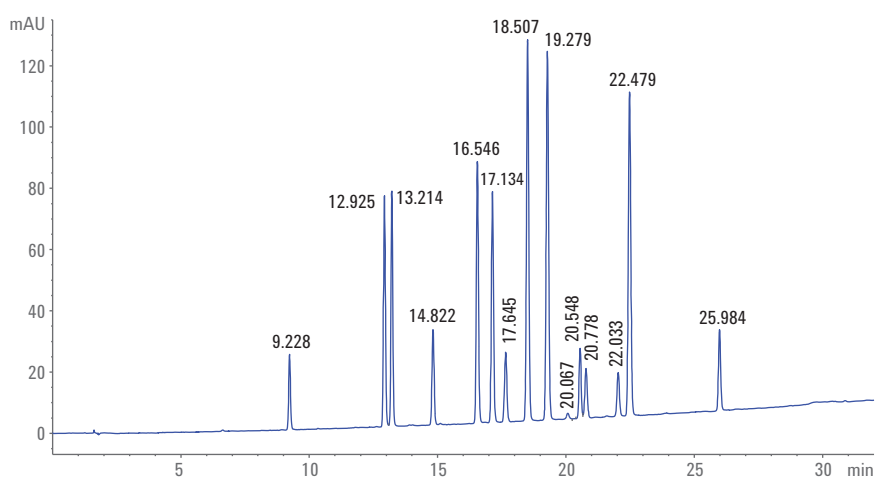


図2. Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードによる初期スクリーニング処理後に得られたメソッドによる複雑なテストサンプルの最適な分離結果。このスクリーニング処理は、ISETによりターゲット LC システムである Agilent 1100 シリーズ LC の動作をエミュレートした条件下で実施しました。

このメソッドを最適化するために、有機溶媒の初期濃度を 10% に設定しました。また、ストップタイムを最後の化合物の溶出から 30 秒後に設定し、この時点でグラジエント混合を終了するようにしました。第 2 のスクリーニング処理では、グラジエントの勾配および流量を 10% ずつ増加させ、メソッドの流量およびグラジエント時間を最適化しました。さらに、最終的なクロマトグラムで 12.037 分と 12.156 分に溶出した重要な化合物ペアの分解能を最適化するために、11.5 分から分析終了の 17 分までグラジエントの勾配を低減しました。最終的なメソッドでは、分析スピードと重要な化合物ペアの分解能との検討をしました (図 3)。

メソッドの開発および最適化プロセスでは、化合物を同定するために、シングル四重極質量分析計で測定しました。次に、最適化した最終メソッドをターゲットシステムである 1100 シリーズ LC に直接移管し、サンプルを 10 回繰り返し注入して分析しました (図 4)。

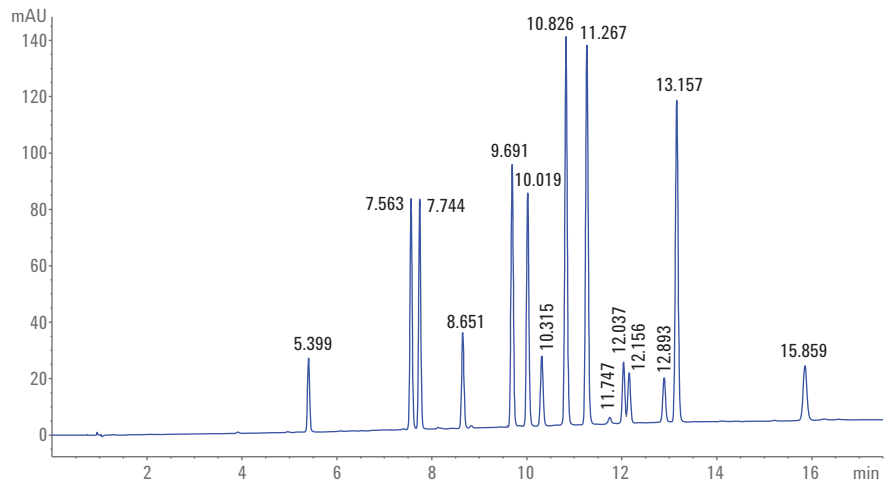


図 3. Agilent ChemStationメソッドスカウティングウィザードによる微調整のためのスクリーニング処理後に得られたメソッドによる複雑なテストサンプルの最適な分離結果。このスクリーニング処理は、ISETによりターゲット LC システムである Agilent 1100 シリーズ LC の動作をエミュレートした条件下で実施しました。

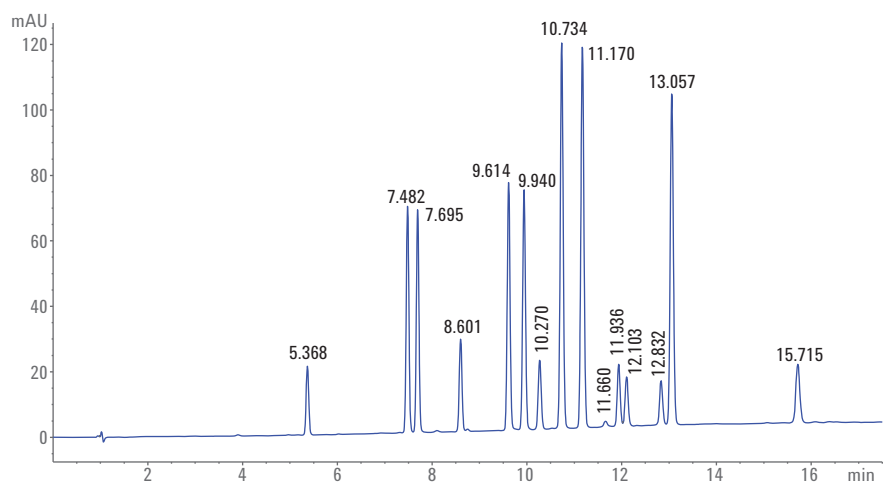


図 4. ターゲットシステムである Agilent 1100 シリーズ LC で得られた最終的な分離結果

ターゲットシステムでの繰り返し分析結果を評価したところ、リテンションタイムの標準偏差のほとんどが 0.003 分以下であることがわかりました。また、それに対応する RSD 値はほぼ 0.03 % 未満でした。メソッド開発システムとターゲットシステム間のリテンションタイムの差異は、概して 1 % 未満でした (表 2 および

図 5)。メソッド開発にかかった時間は、最初の大規模なスクリーニング処理に約 35 時間、最適化に約 8 時間、ターゲットシステムでの評価に約 5 時間、合計で約 48 時間でした。

表 2. Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションとターゲットシステムである Agilent 1100 シリーズ LC で得られたリテンションタイム、標準偏差、および RSD 値の比較 (tr = リテンションタイム、 \bar{c} = 平均、 σ = 標準偏差、RSD = 相対標準偏差)

No.	化合物	Agilent 1100 シリーズ LC \bar{x} (tr) (分)	Agilent 1100 シリーズ LC σ (tr) (分)	Agilent 1100 シリーズ LC RSD (%)	Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューション \bar{x} (tr) (分)	Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューション σ (tr) (分)	Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューション RSD (%)	Δ tr (%)
1	アトラジンデスエチル	5.365	0.002	0.035	5.401	0.002	0.037	0.7
2	メトキシロン	7.479	0.003	0.037	7.565	0.002	0.027	1.1
3	ヘキサジノン	7.692	0.003	0.037	7.745	0.001	0.016	0.7
4	テルブチラジンデスエチル	8.599	0.002	0.027	8.653	0.002	0.022	0.6
5	メタベンズチアズロン	9.613	0.002	0.023	9.692	0.002	0.020	0.8
6	クロロトルロン	9.939	0.002	0.023	10.021	0.002	0.019	0.8
7	アトラジン	10.269	0.002	0.020	10.316	0.002	0.016	0.5
8	ジウロン	10.734	0.002	0.017	10.827	0.002	0.023	0.9
9	メトプロムロン	11.170	0.002	0.020	11.269	0.003	0.024	0.9
10	メタザクロル	11.658	0.003	0.023	11.748	0.002	0.016	0.8
11	ニフェジピン	11.935	0.003	0.025	12.039	0.002	0.017	0.9
12	セブチラジン	12.103	0.002	0.019	12.158	0.002	0.016	0.5
13	テルブチラジン	12.833	0.002	0.019	12.895	0.002	0.016	0.5
14	リニユロン	13.058	0.003	0.020	13.159	0.003	0.020	0.8
15	ニモジピン	15.718	0.004	0.027	15.861	0.003	0.019	0.9

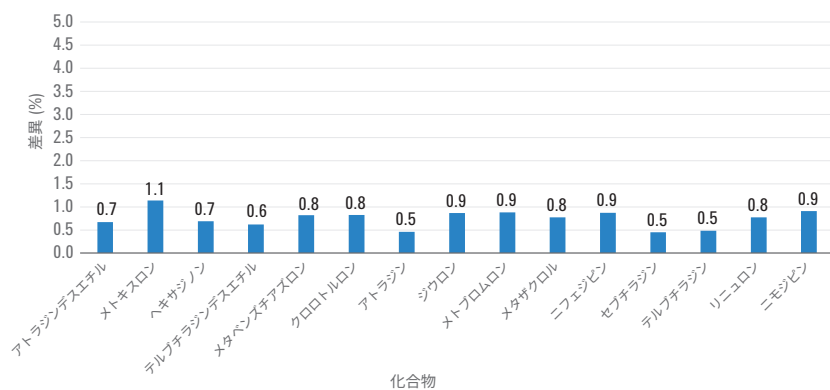


図 5. Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションとターゲットシステムである Agilent 1100 シリーズ LC で得られた各化合物のリテンションタイムの差異

ターゲットシステム:

Waters Acquity UPLC H-Class

Waters H-Class をターゲットシステムとした分離メソッドの開発には、より粒子径の小さい (1.9 μm) Agilent InfinityLab Poroshell カラムを使用しました。スタート地点として、C8、C18、フェニルヘキシル、およびペンタフルオロフェニル (PFP) 結合相のカラムを選び、UHPLC 機器で一般的に使用されているサイズ (2.1 \times 100 mm) のものを使用しました。初期スクリーニング処理では、有機溶媒としてメタノールとアセトニトリルを使用し、3種類の温度をテストしました。また、初期汎用グラジエントでは、有機溶媒濃度を20分で5%から70%に増加させました。予測どおり、C8 および C18 結合相のカラムは、従来の LC メソッドで得られた結果 (データの掲載なし) と同様の分離挙動を示しました。一方、PFP 結合相のカラムでは、C8 および C18 結合相とわずかに異なる選択性で溶出時間が格段に短縮されました (図 6)。

この時点ですべての化合物が分離され、最後のピークがリテンションタイム 12分で溶出していたため、この分離メソッドを次の最適化に使用しました。第2のスクリーニング処理では、PFP カラムで農業サンプルをより短い分析時間と最適な分解能で分離することを目標に、さまざまな流量とグラジエントをテストしました。最終的には、流量 0.85 mL/min でアセトニトリルを 10% から 47% に増加させるグラジエントを適用することで、わずか 7.4分で分離することができました (図 7)。

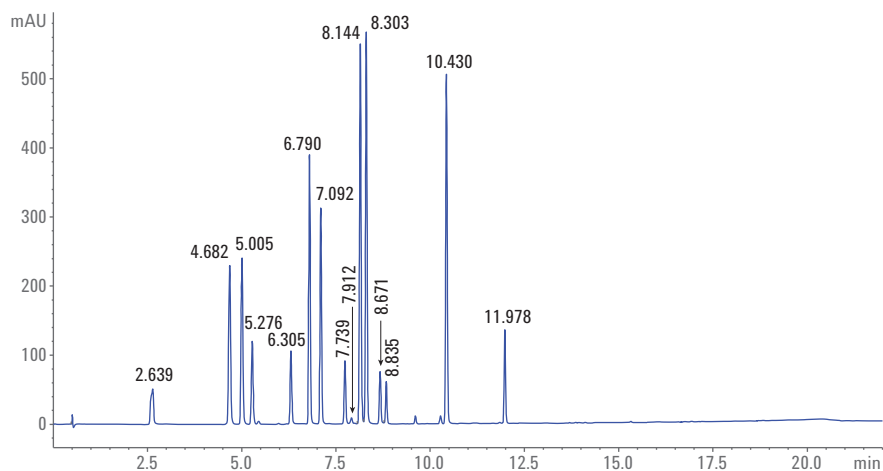


図 6. アセトニトリル濃度を 20 分で 5% から 70% に増加させるグラジエントをカラム温度 40 °C で適用し、PFP カラムで分析した農業サンプルの分離結果。このスクリーニング処理は、ISET によりターゲット LC システムである Waters H-Class の動作をエミュレートした条件下で実施しました。

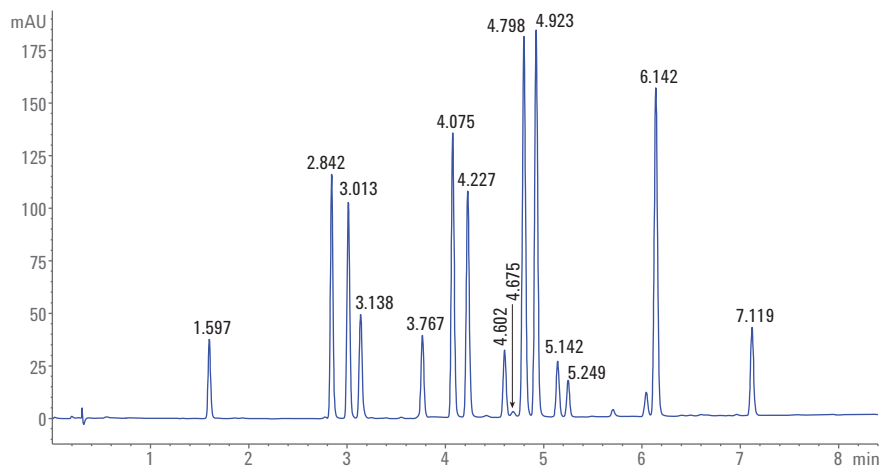


図 7. アセトニトリル濃度を 7.4 分で 10% から 47% に増加させるグラジエントをカラム温度 40 °C で適用し、PFP カラムで分析した農業サンプルの最終的な最適化分離結果。このスクリーニング処理は、ISET によりターゲット LC システムである Waters H-Class の動作をエミュレートした条件下で実施しました。

このメソッドをターゲットシステムである Waters H-Class システムに移管し、評価しました。1290 Infinity II メソッド開発システム (図 7) と Waters H-Class システム (図 8) で得られたクロマトグラムの比較から、両システムで同一のリテンションタイムが得られたことがわかります。

統計的評価のため、10 回の繰り返し分析を実施しました。この評価の結果、リテンションタイムの標準偏差は、ほぼ 0.01 分未満であることがわかりました。リテンションタイムの短い化合物については、対応する RSD 値は概して 0.2 % 未満でした。メソッド開発システムとターゲットシステム間のリテンションタイムの差異は、全体的に 2 % 未満でした (表 3 および図 9)。また、メソッド開発にかかった時間は、合計で約 37 時間でした。

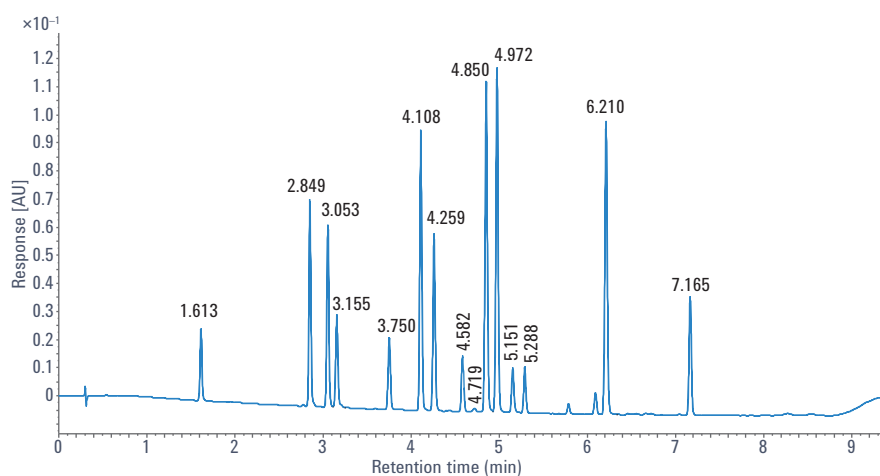


図 8. アセトニトリル濃度を 7.4 分で 10 % から 47 % に増加させるグラジエントを流量 0.85 mL/min、カラム温度 40 °C で適用し、PPF カラムを用いて Waters H-Class システムで分析した農薬サンプルの最終的な最適化分離結果

表 3. Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションとターゲットシステムである Waters H-Class LC で得られたリテンションタイム、標準偏差、および RSD 値の比較 (tr = リテンションタイム、 \bar{c} = 平均、 σ = 標準偏差、RSD = 相対標準偏差)

No.	化合物	Waters H-Class \bar{x} (tr) (分)	Waters H-Class σ (tr) (分)	Waters H-Class RSD (%)	Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューション \bar{x} (tr) (分)	Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューション σ (tr) (分)	Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューション RSD (%)	Δ tr (%)
1	アトラジンデスエチル	1.616	0.004	0.220	1.587	0.003	0.164	-1.8
2	ヘキサジノン	2.852	0.003	0.105	2.833	0.004	0.159	-0.6
3	メトキシロン	3.056	0.003	0.112	2.997	0.005	0.161	-1.9
4	テルブチラジンデスエチル	3.157	0.003	0.101	3.126	0.005	0.168	-1.0
5	アトラジン	3.753	0.003	0.070	3.764	0.005	0.132	0.3
6	メタベンズチアズロン	4.110	0.003	0.062	4.062	0.005	0.113	-1.2
7	クロロトルロン	4.261	0.002	0.055	4.213	0.005	0.114	-1.1
8	セブチラジン	4.585	0.002	0.046	4.601	0.005	0.104	0.3
9	メタザクロル	4.734	0.041	0.871	4.676	0.005	0.104	-1.2
10	メトプロムロン	4.864	0.038	0.788	4.781	0.006	0.122	-1.7
11	ジウロン	5.992	0.055	1.101	4.908	0.005	0.097	-1.7
12	テルブチラジン	5.166	0.043	0.824	5.137	0.005	0.100	-0.6
13	ニフェジピン	5.340	0.150	2.806	5.240	0.005	0.089	-1.9
14	リニユロン	6.212	0.001	0.024	6.121	0.006	0.105	-1.5
15	ニモジピン	7.167	0.001	0.016	7.108	0.005	0.066	-0.8

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションと Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードを使用し、選択したターゲットシステムの動作を ISET でエミュレートしながら分離分析メソッドを直接開発するアプローチについて取り上げました。Agilent 1100 Series LC と Waters Acquity UPLC H-Class をターゲットシステムとし、これらのシステムで複雑なサンプルを分離する分析メソッドを開発しました。どちらの機器についても、Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションで開発したメソッドとターゲットシステムでのメソッドの挙動に良好な相関性が認められました。リテンションタイムの偏差は、概して 2% 未満でした。また、1290 Infinity II メソッド開発ソリューションでのメソッド開発とターゲットシステムでのメソッドの評価は、ほぼ 2 日以下で完了しました。

参考文献

1. Huesgen, A. G. Fast screening of mobile and stationary phases with the Agilent 1290 Infinity LC and seamless method transfer to an Agilent 1200 Series LC using ISET, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0989EN, **2012**.

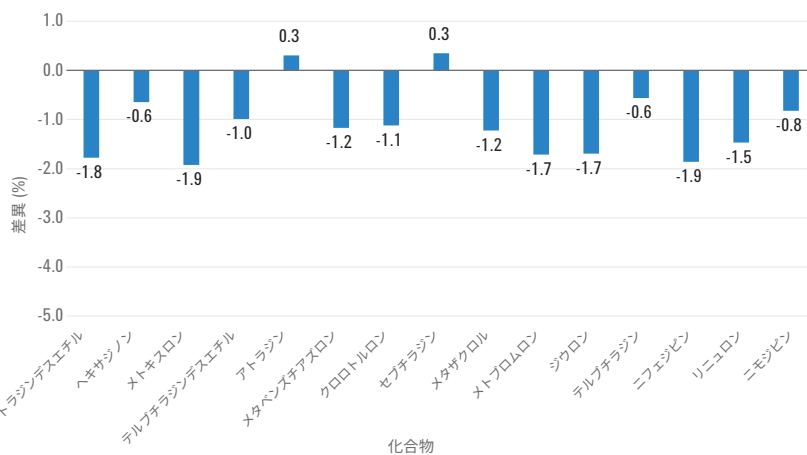


図 9. Agilent 1290 Infinity II メソッド開発ソリューションとターゲットシステムである Waters H-Class で得られた各化合物のリテンションタイムの差異

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, March 1, 2017

5991-7794JAJP



Agilent Technologies