

一連の分取精製ワークフローを効率化する 分析分取LC-MSシステム

藤崎 真一、増田 佑亮

ユーザーベネフィット

- ◆ 分析LCから分取LCへのスケールアップ及び純度/回収率確認を1システムで完結できます。
- ◆ 分取LCの分離条件検討を、LabSolutions MDの分析スケジュール自動生成機能により効率化できます。
- ◆ シングル四重極質量分析計 LCMS-2050により、分取対象化合物の質量情報が得られます。

■はじめに

分取LCは、混合物からの目的化合物の精製や天然物中の有効成分の探索、あるいは、不純物や未知化合物の構造解析等の用途で、医薬・食品・化学といった幅広い分野で使用されています。目的化合物を純度高く回収するには、他の成分や夾雑成分と分離した条件の確立が重要ですが、分取LC条件では、使用する試料量や移動相消費量が多いため、試料や移動相の消費を抑えられる分析スケールにて、分離条件を検討することが一般的です。条件検討においては、グラジエント条件等のLCパラメーターを複数パターン変動させることで最適な分離を探索しますが、各条件におけるメソッド作成や分析スケジュールの作成には手間がかかります。また、分析スケールでの条件検討後に、スケールアップ及び目的化合物の分取を実施しますが、その後の純度/回収率確認では分取した画分を、フラクションコレクターからオートサンプラーに移す作業が手間となります。本稿では、Nexera Prepシリーズの分析分取LC-MSシステムにより、分析スケールでの分離条件検討、スケールアップ及び分取、純度/回収率確認といった一連の分取精製ワークフロー（図1）を一つのシステムで実施した事例について紹介します。

分析スケールでの目的化合物の分離条件探索

探索された最適分離条件にて負荷量の検討

目的化合物の分取

純度/回収率の確認

図1 分取精製ワークフロー

■分析分取LC-MSシステムの概要

分析分取LC-MSシステムの流路図を図2に示しました。分析スケールでの分離条件検討、負荷量の検討、純度/回収率の確認では分析流路（図2上）が使用され、目的化合物の分取時には分取流路（図2下）が使用されます。分析用と分取用の2流路を併せ持ち、試験管等に分取した画分を直接分析流路へ注入できるリキッドハンドラー（LH-40）により、一連の分取精製ワークフローを本システムにて完結できます。また、LCMS-2050により、分離条件検討時には、目的化合物の質量情報が得られるだけでなく、分取時には、UV信号とMS信号を組み合わせてトリガーとして用いることが可能です。そのため、目的化合物をより純度高く回収できます。また、本システムはMSによる分取と検出を両立させるために分取流路をスプリットし、メイクアップポンプを用いて移動相の一部をMSに導入する構成となっています。

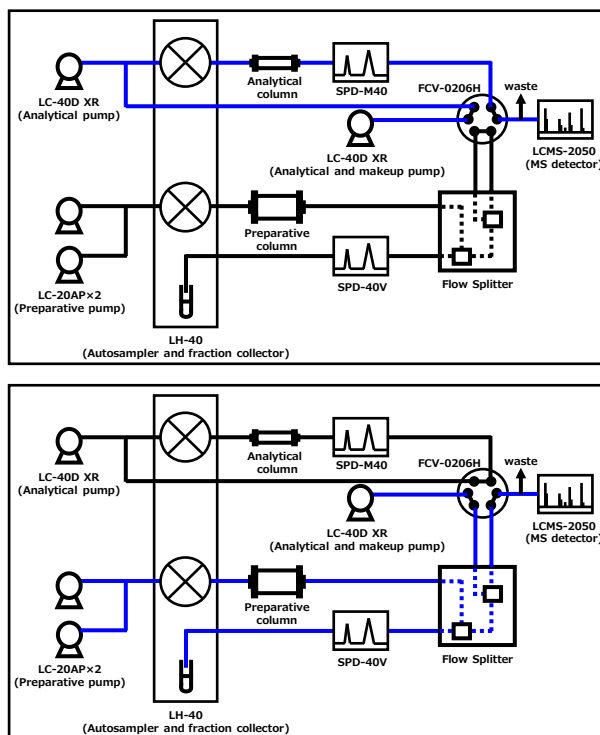


図2 分析流路（上）、分取流路（下）
*青色部分が使用する流路

以降では、本分析分取LC-MSシステムを用い、モデル化合物として、医薬品の7種混合標準品（分取対象化合物：Hydrocortisone）を用いて一連の分取精製ワークフローを効率化した事例について説明します。

■分析スケールでの分離条件探索

分析流路にて、分取対象化合物（Hydrocortisone）の分離条件の検討を行います。分離条件検討前のLCクロマトグラム（分析条件：表1）を図3に示します。Hydrocortisoneの近傍にはSalicylic acidが溶出しています。この条件を用いて負荷量を増加させると2化合物間の分離がさらに悪化し、回収時の純度が低下する恐れがあるため、分離の改善が必要です。ここでは、グラジエント条件を9パターン（初期濃度とグラジエントスロープを3パターンずつ）変動させることで、分離を検討しました。この際、各種LCパラメーターを網羅的に変動させた分析スケジュールを自動生成できるLabSolutions MDを用い、分離条件検討を効率化しました（図4）。得られたクロマトグラムを図5に示しており、初期濃度が15%、グラジエントスロープが20分（図5の③）の条件でHydrocortisoneとSalicylic acidの分離度が改善し最大となったため、次の負荷量の検討は、本条件をベースに実施しました。分離の検討時には、LCMS-2050により質量情報（Hydrocortisone：m/z 363.3）も同時に取得し、合成確認等の定性情報として活用しました。

表1 分析条件

Mobile Phase	: Pump A : 0.1% formic acid in water : Pump B : Acetonitrile
Column	: Shim-pack™ Scepter C18-120 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)*1
Sample	: (A) Hydrocortisone, (B) Salicylic acid, (C) Metoclopramide, (D) Lidocaine, (E) Furosemide, (F) Papaverine, (G) Quinidine
Sample Concentration	: 100 mg/L (Hydrocortisone), 10 mg/L (others)
Injection Volume	: 10 μL
LC Conditions	
Time Program	: B Conc. 25%(0 min)→45%(20 min) →25%(20.01-25 min)
Column Temp.	: Ambient
Flow rate	: 1 mL/min
Sample loop size	: 500 μL
Syringe size	: 500 μL
Detection (PDA)	: 245 nm (SPD-M40, conventional cell)
MS conditions	
Ionization	: ESI/APCI (DUIS™), positive and negative
Mode	: SCAN (<i>m/z</i> 100-500)
Nebulizing Gas Flow	: 2.0 L/min (N ₂)
Drying Gas Flow	: 5.0 L/min (N ₂)
Heating Gas Flow	: 7.0 L/min (N ₂)
DL Temp.	: 200 °C
Desolvation Temp.	: 450 °C
Interface Voltage	: 3.0/-2.0 kV (positive/negative)

*1 P/N: 227-31020-05

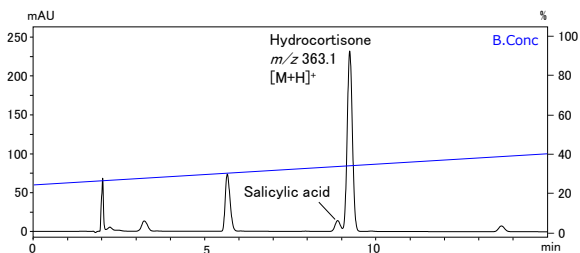
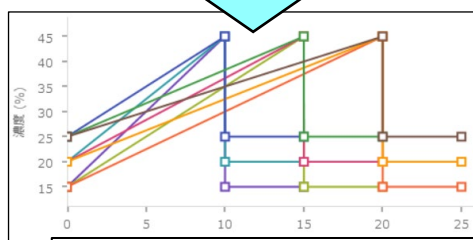
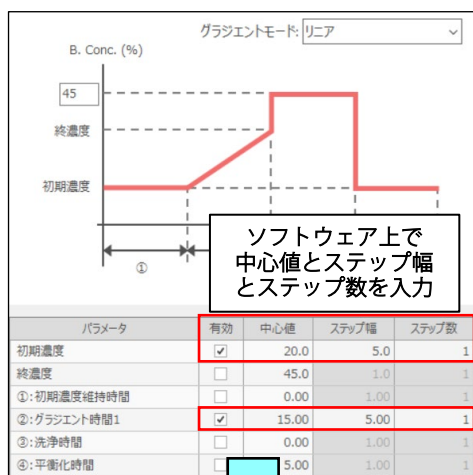


図3 分離条件検討前のLCクロマトグラム



カラム平衡化も反映した分析スケジュール
(初期濃度3パターン×グラジエントスロー
プ3パターン=9条件)を自動生成

図4 LabSolutions MDによる分析スケジュール生成の自動化

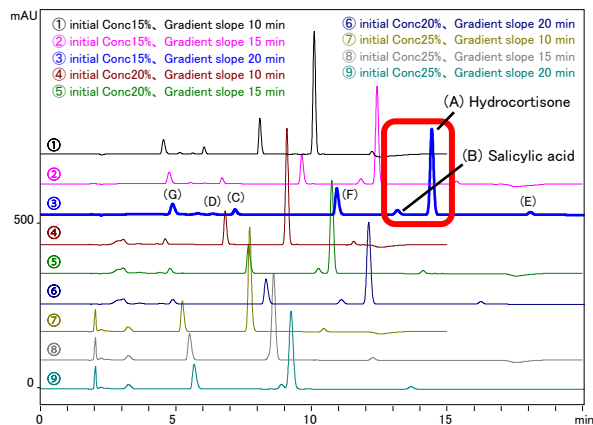


図5 LabSolutions MDによる分離条件検討結果
*HydrocortisoneとSalicylic acidの分離が
最も良いのは③(青色)のクロマトグラム

■ 負荷量の検討

分析スケールにて最適化された条件(図5の③)で、Hydrocortisone (10000 mg/L)を用いて、10, 20, 30, 40, 50, 100 μLの注入量で負荷量の検討を実施しました(図6)。注入量が100 μLでは、HydrocortisoneとSalicylic acidの分離が悪化(図中青丸内)しています。また、裾野には不純物と思われる微小ピーク(図中赤丸内)が重なりました。注入量が50 μLまでは、Hydrocortisoneが近傍のピークと一定の分離が得られています。そのため、注入量50 μLの条件にてスケールアップし、分取を実施することとしました。

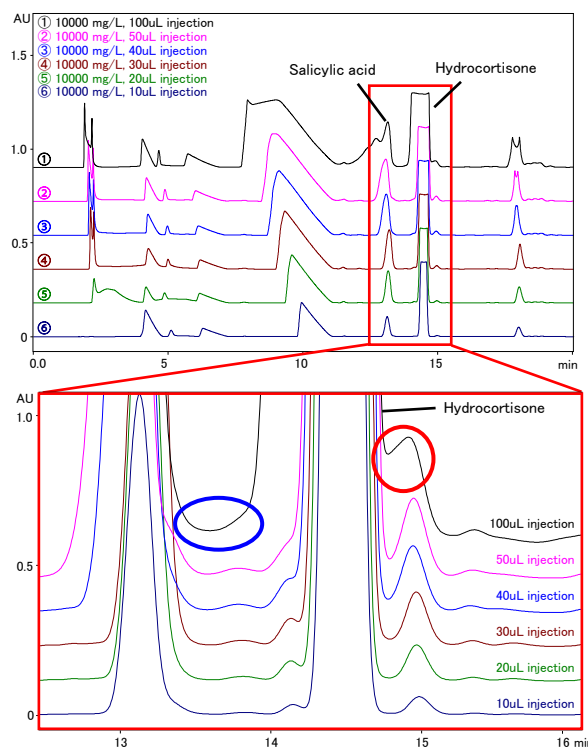


図6 負荷量の検討結果

■ 目的化合物の分取

UVトリガーにてHydrocortisoneの分取を実施しました。分取条件を表2(表1と異なるパラメータのみ記載)に、得られたLCクロマトグラムを図7(青い領域が分取領域)に示します。分取カラム(内径20 mm)と分析カラム(内径4.6 mm)の断面積比(約20倍)に基づき、流量を20 mL/min(線速度はスケールアップ前後で一定)に、注入量を1 mLにスケールアップしました。その結果、スケールアップの前後で同等の分離パターンが得られ、Salicylic acidとの分離を保ったままHydrocortisoneを分取することができました。

表2 分取条件

Column	: Shim-pack™ Scepter C18-120 (150 mm × 20 mm I.D., 5 μm)*1
Sample Concentration	: 10000 mg/L (Hydrocortisone), 1000 mg/L (others)
Injection Volume	: 1 mL
LC Conditions	
Flow rate (Prep)	: 20 mL/min
Flow rate (Makeup)	: 1.5 mL/min (Methanol)
Sample loop size	: 2 mL
Syringe size	: 5 mL
Detection (UV)	: 245 nm (SPD-40V, preparative cell)
MS conditions	
Desolvation Temp.	: 100 °C

*1 P/N: 227-31102-03

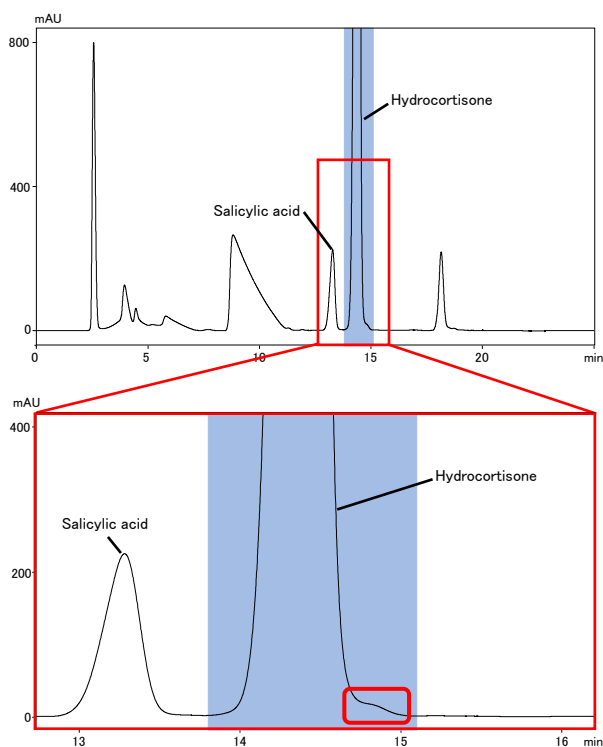


図7 UVトリガーによる分取クロマトグラム
*青い領域が分取領域

■ 純度/回収率の確認

分取したHydrocortisoneを分析流路に再注入した際に得られたクロマトグラム及び、分取したHydrocortisoneと同じ濃度になるように調製した混合標準品（回収率算出時のリファレンス用）のクロマトグラムを図8に示します。また、分取されたHydrocortisoneの純度及び回収率を表3に示します。純度は面積百分率で99%以上得ることができ、回収率も良好な結果となりました。

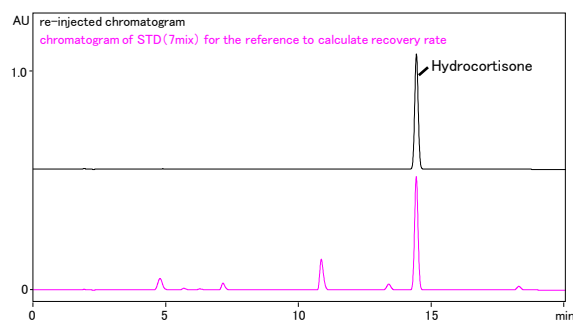


図8 純度/回収率確認時の再注入クロマトグラム (上)
混合標準品のクロマトグラム (下)

表3 分取したHydrocortisoneの純度及び回収率
(n=3, 平均値)

	純度(面積%)	回収率(%)
Hydrocortisone	99.7	101.2

図7の下側には、Hydrocortisoneを分取した領域の拡大図を示していますが、Hydrocortisoneの裾野に、不純物と思われるピークが極微量ですが観察されています(赤枠内)。分取結果としては、UVトリガーのみの使用でも、99.7%の純度(表3)が得られていますが、本分析分取LC-MSシステムにおいては、MSトリガー分取にも対応しているため、MSの高い定性能力によって、不純物を回避し、さらに高い純度で目的化合物を分取することも可能です。MSトリガー分取の詳細については[アプリケーションニュース「01-00651-JP」](#)を併せてご参照ください。

■ まとめ

分取精製ワークフローである、分析スケールでの分離条件検討、スケールアップ及び分取、純度/回収率確認を分析分取LC-MSシステムを用いて完結できることをご紹介しました。分析スケールでの分離条件検討時では、LabSolutions MDの各種LCパラメータを変動させた複数条件の分析スケジュールの自動生成機能により、分取対象化合物の分離検討を効率化できます。また、LCMS-2050により質量情報も同時に取得可能です。さらに、リキッドハンドラーLH-40により、試験管等に分取した画分を直接分析流路へ注入できるため、分取した画分を、フラクションコレクターからオートサンプラーに移す作業無く、シームレスな純度/回収率確認を実現します。本分析分取LC-MSシステムを用いたMSトリガー分取の詳細については「[01-00651-JP](#)」をご参照ください。

LabSolutions、LCMS、Nexera、Shim-packおよびDUIは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

＞ アンケート

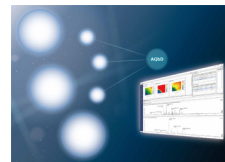
関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ Nexera Prep
分取精製液体クロマトグラフ



＞ LCMS-2050
シングル四重極質量分析計



＞ 分析法開発支援システム
分析法開発支援ソフトウェア

関連分野

＞ バイオ医薬品

＞ 低分子医薬品

＞ 工業材料・マテリアル

＞ 化学

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ