

タカラバイオ株式会社¹・エーエムール株式会社²
 ○渡辺 淳¹・比毛 浩²・安本 雅純¹・堀江 征司¹・板東 泰彦²

INTRODUCTION

製薬の分野において、高感度、ハイスループットは必須である。ハイスループットには、簡単なサンプルの前処理、たとえば、有機溶媒添加による除タンパクのみが好ましく、高感度を得るには注入量を増やすことが望ましい。ただ、有機溶媒リッチなサンプルをたくさん注入するとカラム保持時間が早くなる、ピーク形状が悪くなる、といった症状が現れ、また、有機溶媒濃度を低くするためにはサンプルの前処理にステップが加わり、スループットが落ち、また、サンプルの吸着が生じるかもしれない。今回、我々は、超高压LC-MS/MSシステムを用い、種々のカラムにおいて、サンプル注入量を増加させたときの保持力の変化を評価した。また、オンライン希釈によりサンプル注入量の増加に伴う保持力劣化、ピーク形状劣化の改善を試みた。



Figure 1. HTC-PAL AMR New Wash Station & Allegro-AMR UHPLC Pump & API 5000™ LC/MS/MS System

Device & Method

サンプルには、レセルピン、ベラパミル、プロプラノロールの混合液を用いた。サンプルの溶媒は、アセトリル100%とした。注入量を2, 5, 10, 20, 50μLまで注入量を変えて測定を行った。カラムは、固定相としてODSを用い、種々の粒子径(1.7~5.0μm)、長さ(50~100mm)のもので測定を行った。超高压HPLC-MS/MSシステムとして、質量分析装置はAPI 5000™ LC/MS/MS (Applied Biosystems MDS/Sciex)、オートサンブラーにAMR New Washタイプ HTC PAL、高耐圧ポンプにAllegro-AMR UHPLC Pumpを用いた。いずれもAnalyst 1.4.2ソフトウェアから制御して測定を行った。なお、ポジティブESIにて、MRM Modeで測定を行った。

Allegro-AMR UHPLC Pump

Delay volumeはわずか70μL。
 最大圧力100MPaまで使用可能。
 流速は0.1μL~1000μL/minに対応。
 Binary or Quaternaryに対応。
 API5000の制御ソフトAnalyst 1.4.2から操作可能



Figure 2. Allegro-AMR UHPLC Pump

EXPERIMENTAL

1. カラムの粒子径などの違いによる保持力の評価

まず、様々な粒子径の、同じ長さのカラムを用いて測定を行った。測定条件、使用したカラムは次のとおりである。

HPLC System: HTC PAL AMR New Wash Station
 Allegro-AMR UHPLC Pump

A液: 0.1% 甲酸 B液: 0.1% 甲酸含有アセトリル
 グラジエントプログラム:

Time (min)	0	1	2	2.01	3
A (%)	90	10	10	90	90
B (%)	10	90	90	10	10

流速: 400 μL/min
 カラム温度: 室温
 注入量: 2 μL ~ 50 μL

Mass Spectrometry: AB/MDS-Sciex API 5000™ LC/MS/MS

イオンソース: ターボイオンスプレー
 測定モード: MRM Positive
 Q1/Q3: 455/165 (Verapamil)
 609/195 (Reserpine)
 260/116 (Propranolol)

Table 1. Columns used for analyses

カラム	サイズ (mmID x mm)	粒子径 (μm)	測定時の最大圧力 (MPa)
カラムA	2.1 x 50	1.7	34
カラムB1	2.0 x 50	2	23
カラムB2	2.0 x 50	2	24
カラムC	2.0 x 50	2.2	22
カラムD1	2.0 x 50	3	13
カラムD2	2.0 x 50	3	10.5
カラムE	2.1 x 50	3	10
カラムF1	2.0 x 50	3	11
カラムF2	2.0 x 50	3	11
カラムF3	2.0 x 50	5	11

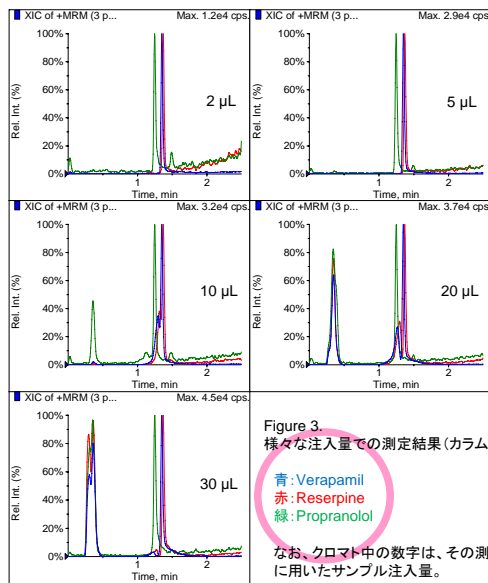


Figure 3. 様々な注入量での測定結果 (カラムA)

青: Verapamil
 赤: Reserpine
 緑: Propranolol
 なお、クロマト中の数字は、その測定に用いたサンプル注入量。

Figure 3に、カラムAにおける測定結果を示した。注入量が5μLまでは、各化合物とも良好に保持され、シャープなピーク形状をしていたが、10μLでは、各化合物のピーク形状が崩れ、特にプロプラノロールの一部が保持されずに溶出した。さらに注入量を増やしていくと、各化合物とも保持されずに溶出される割合が多くなった。したがって、良好なデータを得るためには、注入量は5μLが上限であると考えられる。

そのほかのカラムについても、様々な注入量で測定を行った。代表的なデータとして、Figure 4(a)に、各カラムの、注入量5μLと10μLの測定結果を示した。これらの結果から、一般的に、2 x 50 mmのカラムにおいては、粒子径の大きさによらず、注入量5μLまでは、良好な保持が得られ、シャープなピーク形状を保つことができるが、10μLでは良好な保持が得られないことが分かった。ただし、例外的に、カラムD1 (Cadenza CD-C18; インタクト株式会社)とD2 (Unison UK-C18; インタクト株式会社)については、10μLでも良好な保持が得られた。さらに、これらのカラムについては、注入量を50μLまで増加させても、良好な保持が得られた。(Figure 4(b))

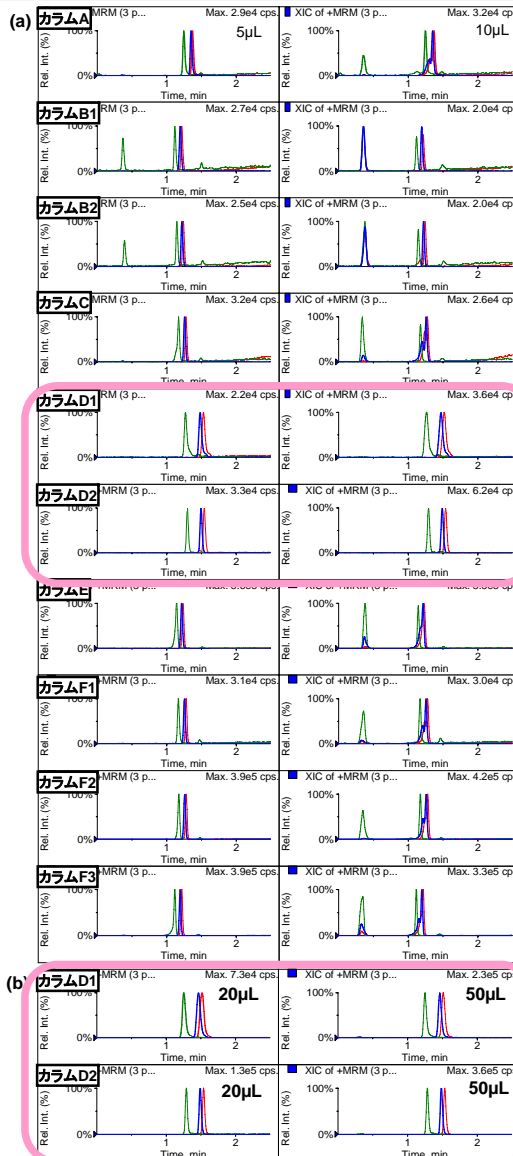


Figure 4. 様々な注入量での測定結果
 (a) 左列は注入量 5μL、右列は 10μL。
 上から、カラムA, B1, B2, C, D1, D2, E, F1, F2, F3の測定結果。
 (b) カラムD1, D2において、注入量をさらに増やしたときの測定結果。
 左列は注入量 20μL、右列は 50μL。

2. カラム長さの違いによる保持力の評価

次に、同じ種類で長さの異なるカラムを用いて測定を行ない、長さの違いにより保持性能の違いがあるか検討を行った。上記のカラムB1の、2 x 50 mm、2 x 75 mm、2 x 100 mmのものを用いた。測定結果をFigure 5に示した。2 x 50 mm、2 x 75 mmでは、10μL注入で著しいピーク形状の劣化が見られたが、2 x 100 mmではある程度劣化が抑えられていた。カラムの長さにより保持性能が改善することがわかった。なお、測定時の最大圧力は、2 x 75 mmのカラムで32MPa、2 x 100 mmのカラムで39MPaであった。

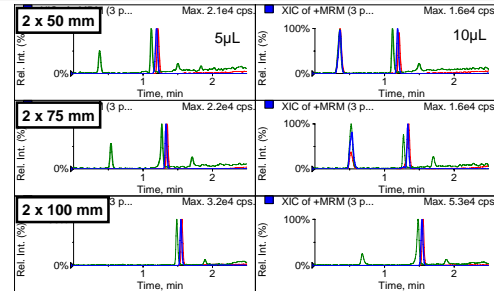


Figure 5. 長さの違うカラムでの様々な注入量での測定結果
 左列は注入量 5μL、右列は 10μL。
 上から、2 x 50mm, 2 x 75mm, 2 x 100mmカラムでの測定結果。

3. オンライン希釈による保持力改善の検討

次に、オートサンブラーのインジェクションバルブの前後にバイパスラインを作り、オンライン希釈を行うことができる系を構築した (Figure 6)。なお、希釈率は約5倍となるようにした。

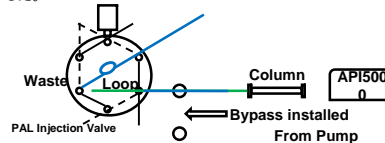


Figure 6. オンライン希釈回路図
 赤のラインを追加し、赤、青の流量の比率が4:1となるように設定した。

この系に同様に測定を行った結果、バイパスを使わない場合に5μLまでの注入が限界であった測定系において、10μLの注入においても良好なピーク形状を維持することができた。また、カラムの長さを2 x 100mmにして測定した際には、20μLの注入においても化合物のピーク形状の劣化が見られず、良好に測定を行うことができた (Figure 7)。

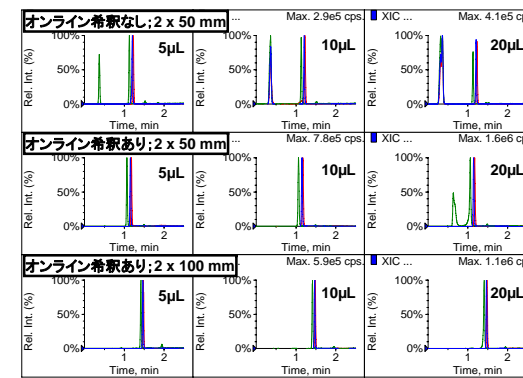


Figure 7. オンライン希釈を用いた、様々な注入量での測定結果
 左列は注入量 5μL、中列は 10μL、右列は 20μL。
 上から、オンライン希釈を用いないときの測定結果 (カラムB1: 2x50mm)、オンライン希釈を用いたときの測定結果 (カラムB1: 2x50mm)、オンライン希釈を用いたときの測定結果 (カラムB1: 2x100mm)

CONCLUSION

Allegro-AMR UHPLC Pump, HTC PAL AMR New Wash Station, API 5000™ を組み合わせた超高压LC-MS/MSシステムを用い、カラムの保持力 (有機溶媒耐性) について評価を行った結果、

1. カラムの保持力は粒子径に依存しなかった。ただし、保持力が非常に優れたカラムもあり、保持力はカラム充填技術 (固定相表面状態の均一性) などに依存する可能性があることが示唆された。
2. カラムの長さにより保持力は多少向上した。
3. オンライン希釈により保持力を改善することができた。