SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No.L559K

High Performance Liquid Chromatography

분취/정제/분석이 가능한 고효율 Prep LC 시스템

High Efficiency in Workflow from Preparative HPLC to Analytical HPLC by Nexera™ Prep System

분취 LC는 혼합물에서 표적 화합물을 분리하고 정제하는 기술로 널리 사용되고 있습니다. 타깃 성분 피크 및 분취성분의 정제 및 확인은 매우 많은 시간이 소요되며, 이러한 공정을 자동화하면 총 작업 시간의 단축을 기대할 수 있습니다. 본 application news는 Nexera Prep series의 한 부분으로 MS를 이용한 분취와 분석/분취용 LC-MS를 사용한 순도 확인에 대하여 소개합니다.

K. Nakajima

■ 분석/분취 LC-MS 시스템 소개

이 시스템에 사용되는 Liquid hander(LH-40)은 분취용과 분석 유로가 병렬로 되어 있어, 분취된 성분의 원활한 재분석이 가능합니다. Fig.1과 Fig.2는 분석용과 분취용의 LC-MS 흐름도를 보여줍니다. Fig.1은 시스템을 분취용 LC-MS로 사용할 때의 흐름도를 보여줍니다. 이 흐름 경로는 LH-40에서 주입된 표적 화합물은 분취용 컬럼을 통해 분리되며 그 일부분은 LCMS-2020으로 들어갑니다. LCMS-2020이 대상 화합물에서 발생하는 피크를 식별하면 LH-40 노즐의 끝에 장착된 solenoid valve가 열리고 대상 화합물이 각각 Fraction collector에 수집됩니다.

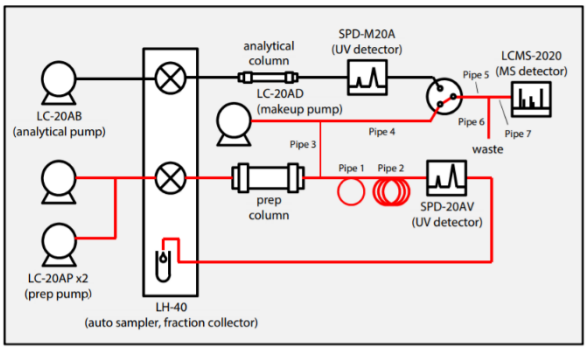

Fig. 1 Flow Diagram of Analytical/Preparative LC-MS During Fractionation

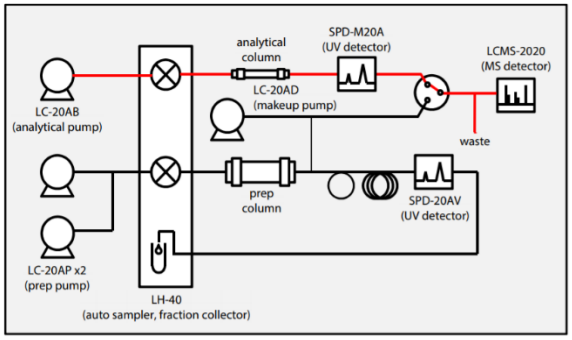

Fig. 2 Flow Diagram of Analytical/Preparative LC-MS During Analysis

Table 1 Configuration of Splitter Piping Used for LC-MS Trigger Fractionation

Pipe No.	Pipe 1	Pipe 2	Pipe 3	Pipe 4	Pipe 5	Pipe 6	Pipe 7
Material	PEEK	PTFE	PEEK	PEEK	PEEK	PEEK	PEEK
Diameter (mm)	0.25	1.0	0.025	0.25	0.13	0.13	0.13
Length (mm)	150	6000	40	1000	900	60	480

Fig.2는 시스템이 분석용 LC-MS로 사용 할 때의 흐름도 입니다. LH-40은 분취되어 수집된 물질을 분석 흐름 경로에 재주입하는 기능을 가지고 있습니다. 이 시스템에서는 Shimadzu LC-20AB를 이용하여 gradient 분석을 지원하였고, 분석 유로 중 고압유량전환 밸브를 도입하여 LCMS를 활용 할 수 있도록 하였습니다. 이 시스템에서 제공하는 분취 및 분석기능은 모두 Shimadzu workstation, LabSolutions™로 제어 할 수 있습니다. 배치 분석 중, 분취 LC-MS와 분석 LC-MS의 번환, 타겟 화합물의 분취, 순도 확인 등 모든 프로세스가 하나의 시스템에서 자동 수행되어 분할부터 재분석까지 전체 워크플로우에서 높은 효율을 실현하였습니다.

■ Prep LC-MS를 이용한 의약성분 분취

본 Prep LC-MS 시스템을 사용하여 케토프로펜(Ketoprofen)과 인도메타신(Indomethacin) 2가지 약물로 구성된 표준 혼합물을 모델 화합물로 사용하여 정제를 실시하였습니다. Table2.는 분취 조건을 보여줍니다. 분취용 컬럼으로 Shim-pack Scepter™ C18(particle diameter:5μm)을 사용하였습니다.

MS 검출은 high-speed positive/negative ionization switching scan mode(m/z range : 50~1,000)에서 수행되었습니다. MS를 이용한 분취는 타겟 화합물에서 발생하는 이온의 XIC(Extracted ion chromatogram)을 기반으로 실시됩니다. XIC는 타겟 화합물의 분자량을 설정하여 자동으로 그려집니다. Fig.3은 prep LC-MS로 얻은 크로마토그램입니다. A/B 2종류의 분취 성분은 UV검출기와 MS에 의해 검출되어 성공적으로 수집되었습니다.

Table 2 Fractionation Conditions (Preparative LC-MS Flow Line)

Prep conditions	
Column	: Shim-pack Scepter C18 (75 mm L. × 30 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A: water (containing 1%(wt/v) formic acid) B: acetonitrile (containing 1%(wt/v) formic acid)
Flow rate	: 40 mL/min
Makeup	: 1.5 mL/min (methanol)
Time program	: B conc. 10% (0 min) → 90% (6-8 min)
Column temp.	: Ambient
Injection vol.	: 1000 μL (containing 10 mg/mL for each compound)
Detection	: UV 250 nm (prep cell) MS (Posi. Nega. Scan *m/z* 50 - 1000)

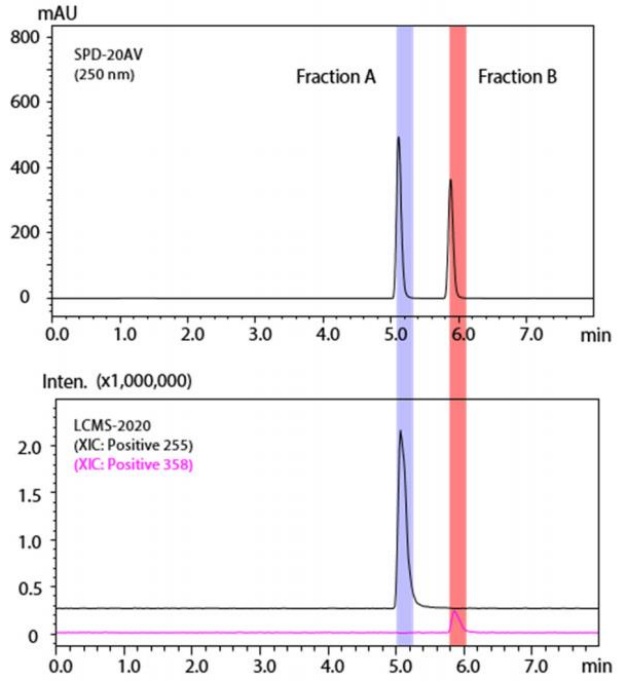

Fig. 3 Preparative Chromatograms of 2 Drugs
(Top: UV Detector Chromatogram, Bottom: LC-MS Chromatogram)

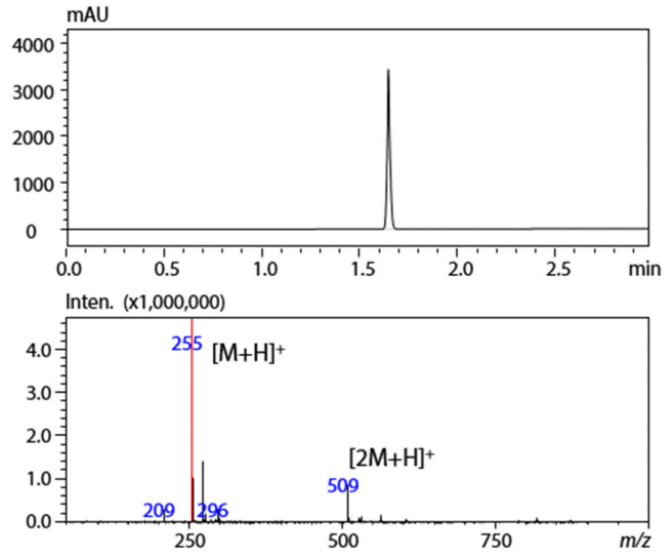

Fig. 4 Reanalysis Results of Fraction A (Ketoprofen)
(Top: UV Detector, Bottom: MS Spectrum of Detected Peak)

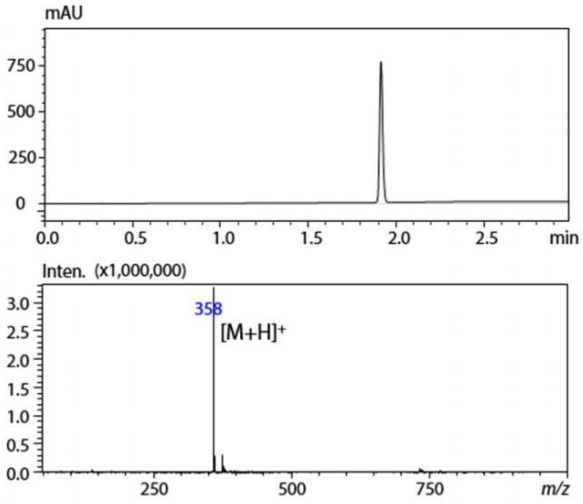

Fig. 5 Reanalysis Results of Fraction B (Indomethacin)
(Top: UV Detector, Bottom: MS Spectrum of Detected Peak)

■ 분석용 LC-MS를 이용한 분취 성분의 순도 확인

분취된 A와 B는 Fig.2와 같이 분석 흐름도 조건에서 분석되어 순도 확인이 되었습니다. Table3.은 분석 조건을 보여줍니다.

한번의 분취 과정 중에 많은 양의 분취물질이 얻어지며 그에 따라 순도확인에 대한 많은 샘플 분석 처리량이 요구됩니다. 이 실험에서는 높은 처리량과 높은 분리/좋은 피크 모양을 위하여 Shim-pack Scepter C18(particle size:3um)가 분석용 컬럼으로 사용되었습니다.

Fig.4와 Fig.5는 케토프로펜(Ketoprofen)과 인도메타신(Indomethacin)을 획득하기 위한 크로마토그램들을 보여줍니다. 피크 면적 정상화(UV Chromatogram)(Table4)에서 케토프로펜과 인도메타신 모두 99% 이상의 순도를 얻었으며, 두 화합물의 분석 시간은 모두 3분 이내였습니다.

Table 3 Analytical Conditions (Analytical LC-MS Flow Path)

Analytical conditions	
Column	: Shim-pack Scepter C18 (50 mm L. × 4.6 mm I.D., 3 µm)
Mobile phase	: A: water (containing 1%(wt/v) formic acid) B: acetonitrile (containing 1%(wt/v) formic acid)
Flow rate	: 2.5 mL/min
Time program	: B conc. 10% (0 min) → 90% (2-3 min)
Column temp.	: Ambient
Injection vol.	: 1 µL
Detection	: UV 250 nm (prep cell) MS (Posi. Nega. Scan *m/z* 50 - 1000)

Table 4 Purity of Target Compounds Contained in Fractions (Area Normalization, UV 250 nm)

	Area %
Ketoprofen*	99.8
Indomethacin	99.9

* Because the peak intensity was near the saturation point, the area normalization value is a reference value.

■ 결 론

본 자료는 LH-40 liquid handler 를 이용한 분취 및 분석 LC-MS 의 컨버터블 시스템 설정과 그 적용을 소개하였습니다. LH-40 의 재주입 기능을 사용하면 단일 batch 분석을 통하여, Prep LC-MS 에 의한 타켓 화합물의 분취와, 순도확인을 위한 재주입까지 한번에 수행 할 수 있습니다. 이는 분취를 통하여 획득한 샘플의 순도확인 및 MS 스펙트럼 확인까지 모든 공정을 수행하여 기존 분취 LC 의 워크플로우에서 효율성이 크게 향상 시켰습니다..

본 사 TEL.02)540-5541 FAX.02)541-2163 대전사무소 TEL.042)864-1161 FAX.042)864-1164 부산사무소 TEL.051)301-5400 FAX.051)301-5405 광주사무소 TEL.062)263-1293 FAX.062)263-1295
서울사무소 TEL.02)540-5061 FAX.02)3442-6737 대구사무소 TEL.053)746-5541 FAX.053)746-5560 울산사무소 TEL.052)249-5541 FAX.052)249-2163 전주사무소 TEL.063)273-5540 FAX.063)273-5547
기술연구소 TEL.02)540-5960 FAX.02)540-5980 천안사무소 TEL.041)910-5670 FAX.041)910-5672 여수사무소 TEL.061)921-5542 FAX.061)921-5543 스 펙 크 롬 TEL.02)540-0078 FAX.02)540-1278