

低分子医薬品化合物の分析条件検討の効率化

寺田 英敏

ユーザーベネフィット

- ◆ HPLCにおける分析条件の検討の大幅な省力化、効率化が図れます。
- ◆ 簡単な操作で煩雑な分析条件の変更を自動化することができます。
- ◆ マルチデータレポート機能を用いて、スカウティング結果を定量的に評価し、最適な条件の探索を容易にします。

はじめに

HPLCにおける分析メソッド開発をより効率的に実施するためには、はじめに保持や分離に影響の大きなパラメータであるカラム（固定相）や移動相の種類の絞り込みを行うメソッドスカウティングを実施することが非常に有効です。しかし、このメソッドスカウティングのプロセスでは、数多くの移動相（緩衝液pH、塩濃度、有機溶媒比率など）やカラム（ODS、C8、Phenylなど）の中から分析種に適したメソッドを見出すために実際に様々な条件で分析を行う必要があります。カラムの付け替えや移動相の調製・セットなど作業には多大な労力や時間、熟練度を必要とします。

ここでは、メソッドスカウティングのプロセスを自動化するために開発されたNexeraメソッドスカウティングシステムと専用ソフトウェア“Method Scouting Solution”について、低分子医薬品化合物に対する一斉分析条件の検討に適用した実施例を通して紹介します。

分析システムと専用ソフトウェアの概要

Nexeraメソッドスカウティングシステムの外観とMethod Scouting Solutionの画面を図1と2に示します。外観はスタンダードな高圧グラジエントシステムと変わりませんが、図2の画面内の流路図が示すように移動相やカラムを自動で切り替えて条件検討を行うことができます。

移動相の検討については、各ポンプにリザーバ切替バルブを設置することにより、最大16種類の移動相の組み合わせの条件検討を自動化することが可能です。また、移動相ブレンディング機能を用いることで、pHの異なる緩衝液をオンラインで自動調製することもできます。

カラムの検討については、カラムオープンの中にカラム切り換えバルブを入れることで、最大12本（図2の流路図では6本）のカラムを用いた連続的な条件検討を自動化できます。

スカウティング条件は、Method Scouting Solutionの画面で簡単に設定できます。



図1 Nexeraメソッドスカウティングシステム

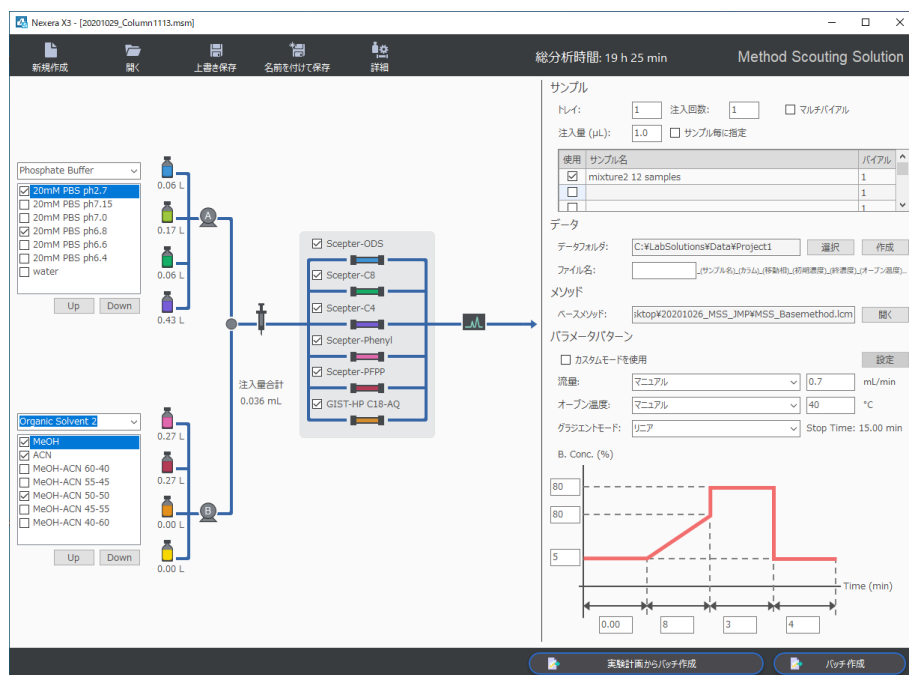


図2 Method Scouting Solution 画面

■対象医薬品成分

一斉分析条件の検討で対象とした医薬品成分と物性値を表1に示します。

表1 対象成分

No.	Compounds	Log P	pKa
1	Probenecid	3.21	3.4
2	(S)-(+)-Naproxen	3.18	4.15
3	Acetylsalicylic acid	1.19	3.49
4	Diclofenac sodium	4.51	4.15
5	Papaverine hydrochloride	3	6.4
6	Dibucaine hydrochloride	4.4	8.85
7	Amitriptyline hydrochloride	4.92	9.4
8	Indometacin	4.27	4.5
9	Antipyrine	0.38	1.4
10	Lidocain	2.44	8.01
11	Quinidine	3.44	8.56
12	Metoclopramide	2.62	9.27

■スカウティング条件とクロマトグラム

表2に移動相とカラムのスカウティング条件を示します。緩衝液のpHは酸性と中性となるようにオンラインブレンディング機能を用いて自動調製しました。また、有機溶媒の混合も、同様にオンラインブレンディング機能を用いました。ブレンディングやカラムの設定は、予めMethod Scouting Solutionのデータベースで登録したものを選擇するだけで、検討に用いることができます。手動で条件を変更して検討する場合は、移動相の調製・置換、カラムの交換や、分析メソッドや分析バッチの作成など多く作業を必要としますが、NexeraメソッドスカウティングシステムとMethod Scouting Solutionを用いることで全て簡単な操作で自動化が可能です。

本検討では、緩衝液2種類、有機溶媒3種類、カラム6種類の全36種類の分析条件のスカウティングを自動で実施しました。

カラムごとにまとめたクロマトグラムを図3~8に示します。キニジンとアセチルサリチル酸に不純物が含まれており、最大で14本のピークが溶出しています。カラム、移動相のpHや有機溶媒組成によって、保持や分離が大きく変わっていることが確認できます。

表2 移動相とカラムのスカウティング条件

Mobile phase:	
Pump A	Buffer*1
A1	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.7)
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)
Pump B	Organic solvent*2
B1	Acetonitrile
B2	Acetonitrile / Methanol = 1 : 1
B3	Methanol
Column:	
1	Shim-pack Scepter™ C18-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)*3
2	Shim-pack Scepter C8-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)*4
3	Shim-pack Scepter C4-300 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)*5
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)*6
5	Shim-pack Scepter PFPP-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)*7
6	Shim-pack™ GIST C18 AQ HQ (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.0 μm)*8

Analytical condition:	
Time program	: B.Conc. 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Inj.vol.	: 1.0 μL
Temperature	: 40 °C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

*1 緩衝液は以下の溶媒のオンラインブレンディングにより自動調整しました。

Solvent	A1 ratio	A2 ratio
A 50 mmol/L Phosphoric acid water	16%	0%
B 50 mmol/L Sodium dihydrogen phosphate water	24%	24%
C 50 mmol/L Disodium phosphate water	0%	16%
D Water	60%	60%

*2 有機溶媒は下の溶媒のオンラインブレンディングにより自動調整しました。

Solvent	B1 ratio	B2 ratio	B3 ratio
A Acetonitrile	100%	50%	0%
B Methanol	0%	50%	100%

*3 P/N 227-31013-03、*4 P/N 227-31034-03、*5 P/N 227-31176-03
*6 P/N 227-31064-03、*7 P/N 227-31054-03、*8 P/N 227-30808-02

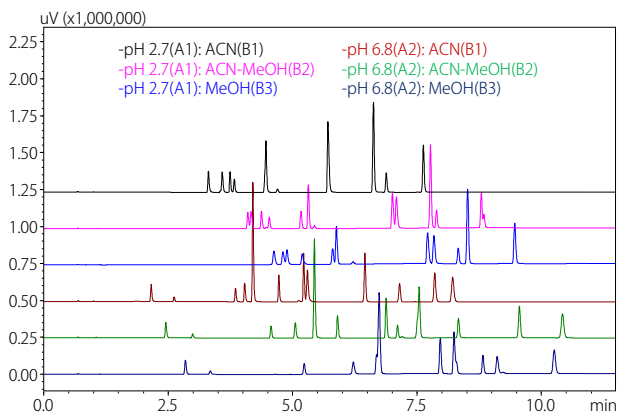


図3 Shim-pack Scepter C18-120 のクロマトグラム

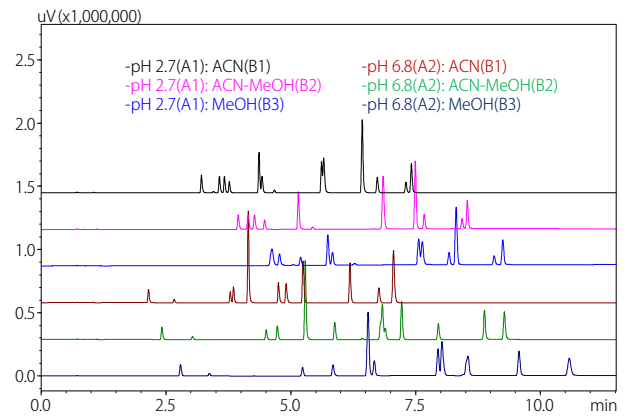


図4 Shim-pack Scepter C8-120 のクロマトグラム

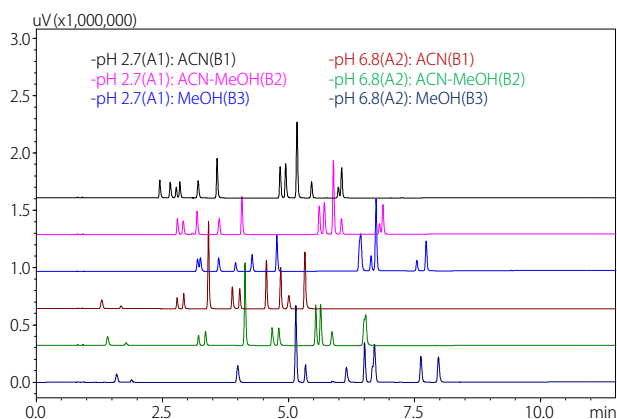


図5 Shim-pack Scepter C4-120 のクロマトグラム

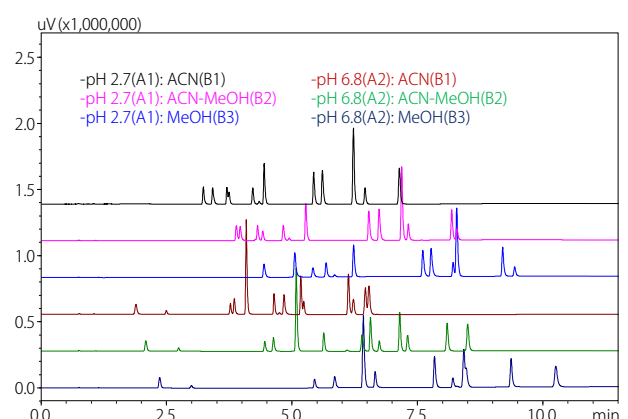


図6 Shim-pack Scepter Phenyl-120 のクロマトグラム

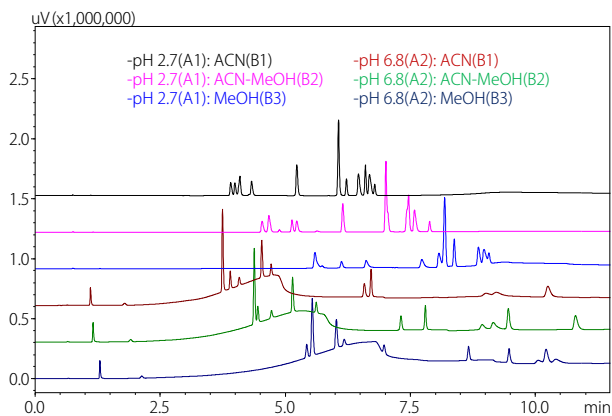


図7 Shim-pack Scepter PFPP-120のクロマトグラム

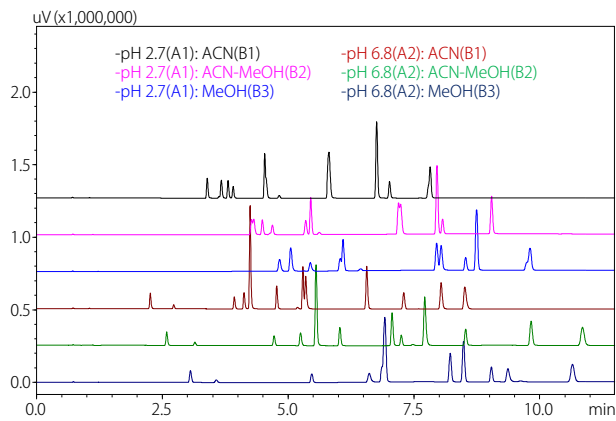


図8 Shim-pack GIST C18 AQのクロマトグラム

■ クロマトグラムの定量的評価

スカウティングでは検討した条件の数だけクロマトグラムが得られるため、どの条件で目的の分離が得られているかを評価する必要があります。クロマトグラムを全て人が確認して精査すると多くの手間が発生します。

本検討では、各分析条件での分離の状態を以下の式を用いて定量的に評価を行いました。評価値は、スカウティングで得られたデータファイルからLabSolutions™のマルチデータレポート機能を用いて算出しました。

$$E = P \times (Rs1 + Rs2 + \dots + RsP) \quad \dots \text{(式1)}$$

評価値 (E) はピーク検出数 (P) と分離度 (Rs ただし上限値に3.0) の和を用いて算出されます。

マルチデータレポート機能は、複数のデータからクロマトグラムの分離度などの評価に用いるパラメータを自動で抜き出し、表計算することができます。予め用意したレポートテンプレートで出力するだけで、自動的に計算結果が表示されます。

図9に各スカウティング条件で得られた評価値を棒グラフにした結果を示しています。このように、どの分析条件が最も分離が良い結果であるか視覚的に判断でき、かつ容易に確認することができるようになっています。

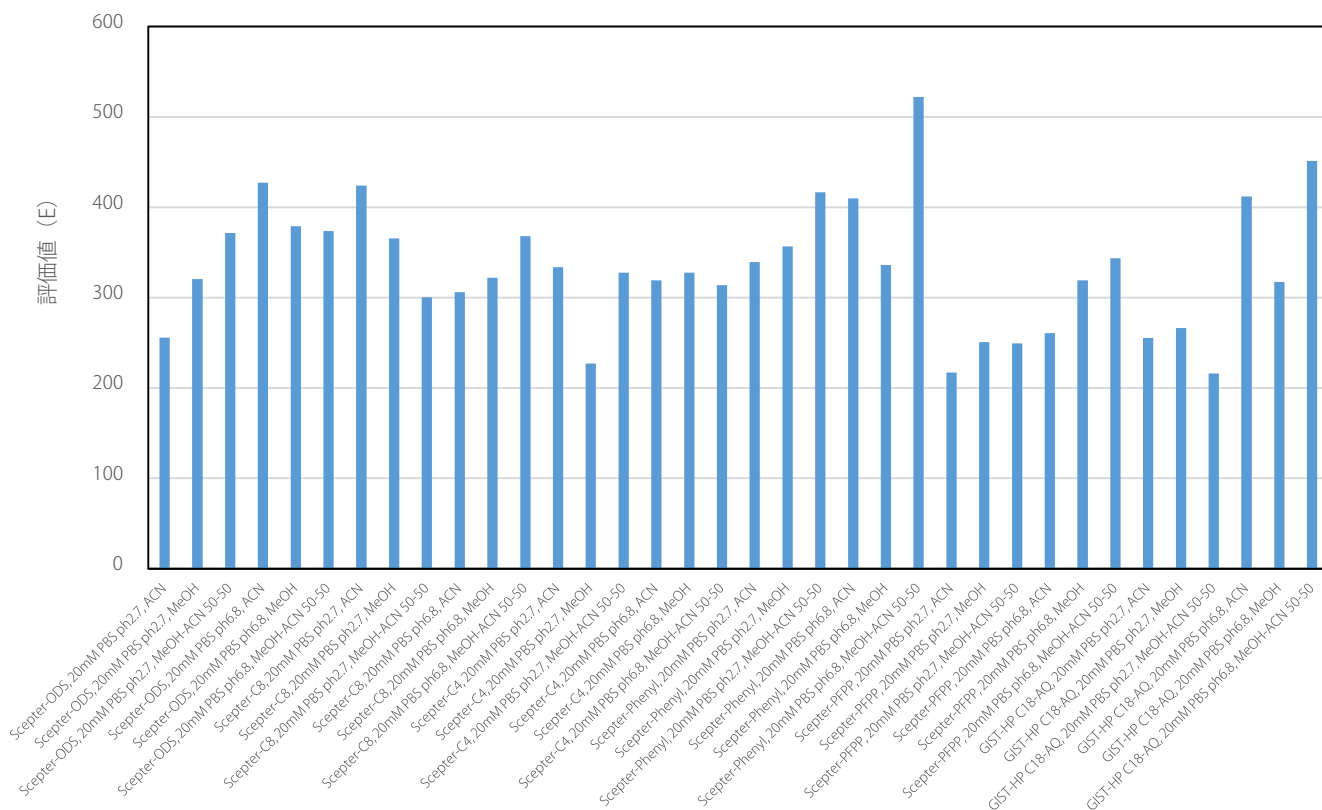


図9 分析条件と評価値

■スカウティング結果

マルチデータレポートによって得られた評価値が最も高い分析条件を表3に示します。また、得られたクロマトグラムを図10に、ピークパラメータを表4に示します。

全てのピークにおいて、分離度が2.3以上で分離が得られていることから、本条件で分析条件の検討を終了しました。スカウティングの結果で分離が不十分な場合でも、最も分離が良いカラムと移動相の組み合わせで、グラジエント条件やカラム温度などの最適化を実施することで、効率的な分析条件検討が実施できます。

条件を確定したのちに、同条件で各成分の標準試料の分析を行い、ピーク同定を行っています。

表3 評価値が最も高かった分析条件

Mobile phase:	
Pump A	Buffer
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)
Pump B	Organic solvent
B2	Acetonitrile / Methanol = 1 : 1
Column:	
4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)	
Analytical condition:	
Time program : B.Conc. 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min)	
Flow rate	: 0.7 mL/min
Inj.vol.	: 1.0 μL
Temperature	: 40 °C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

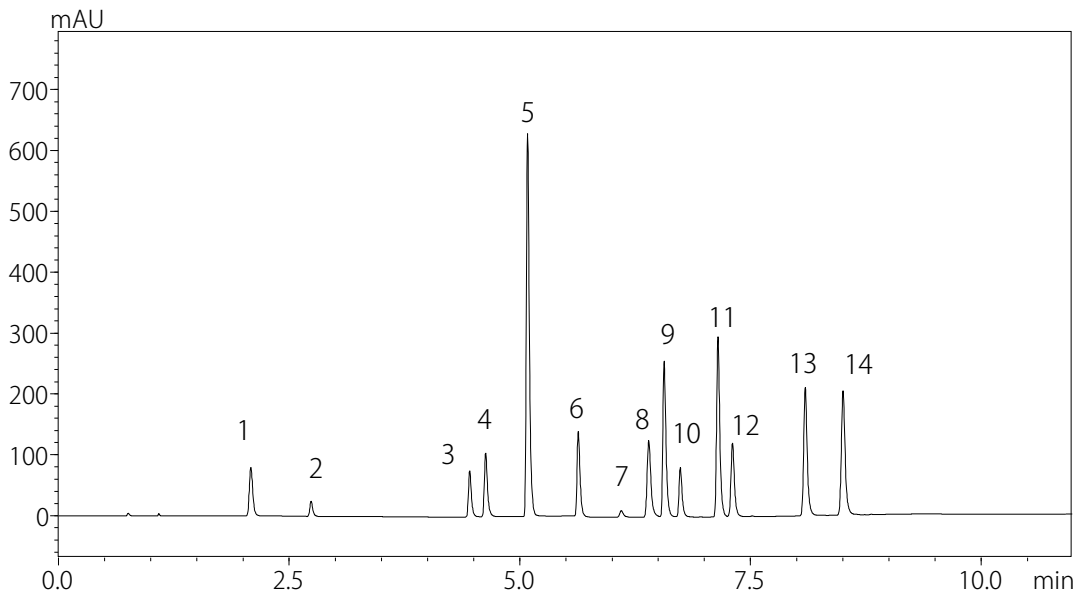


図10 最適条件のクロマトグラム

表4 最適分析条件におけるピークパラメータ

Peak No.	Compound	RT.(min)	Area	Height	Resolution (USP)	Symmetry factor
1	Acetylsalicylic acid	2.085	207910	79624	--	1.243
2	Impurity of acetylsalicylic acid	2.736	54637	24698	10.0	1.367
3	Antipyrine	4.456	169100	75912	28.7	1.378
4	Metoclopramide	4.629	251454	104804	2.8	1.424
5	(S)-(+)-Naproxen	5.083	1408900	628679	7.3	1.493
6	Probenecid	5.632	317401	139466	9.0	1.475
7	Impurity of quinidine	6.099	31171	10936	6.9	1.47
8	Quinidine	6.397	364149	125731	4.0	1.378
9	Diclofenac sodium	6.563	612211	256567	2.4	1.509
10	Indometacin	6.739	190695	81710	2.8	1.401
11	Papaverine hydrochloride	7.147	709025	295553	6.4	1.385
12	Lidocain	7.304	317027	120963	2.3	1.294
13	Dibucaine hydrochloride	8.093	570512	211125	11.2	1.296
14	Amitriptyline hydrochloride	8.501	593951	204085	5.5	1.326

■まとめ

今回は低分子医薬品化合物の一斉分析条件の検討に適用した実施例を通してメソッドスカウティングプロセスの自動化を紹介しました。その結果、logPやpKaなどの物性値が異なる成分は、移動相や固定相の影響により、分離パターンも大きく変化することを示しました。

分析条件の検討初期では、目的成分の分離・保持への影響が大きい因子であるカラムと移動相の組み合わせを網羅的に変更して分離確認を行うスカウティングが有効です。Nexeraメソッドスカウティングシステム と専用ソフトウェア“Method Scouting Solution”を用いることで、条件変更・データ採取を自動で実施することができ、HPLCにおける分析条件の検討の大幅な省力化、効率化が図れます。

各分析条件で得られたクロマトグラムの分離状態は、マルチデータレポート機能を用いて定量的な評価が可能であり、スカウティング結果をグラフとして可視化することもできるため、最適な分析条件の絞り込みに有効です。

Nexera、Shim-pack Scepter、Shim-pack、およびLabSolutionsは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00018-JP 初版発行：2021年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021