

固定相の異なるカラム間の分離選択性の違いの視覚化による最適カラム探索の効率化

藤崎 真一、周 毅婷

ユーザーベネフィット

- ◆ Shim-pack Arata™ C18はユニークな分離選択性を有するため、これまで分離が難しかった試料について分離改善が期待できます。
- ◆ LabSolutions MDはデザインスペースの描画により、複数種類のカラムの分離選択性の違いを視覚化できます。
- ◆ 複数種類のカラムの最小分離度のデザインスペースの比較により、最適カラムの探索を効率化できます。

■はじめに

分析法開発におけるカラムの選択は、分析種の保持挙動に大きな影響を与えます。そのため、最適な分離を得るには、保持挙動の異なる複数種類のカラムに渡って検討することが理想的です。分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions MDは、科学的な根拠とリスクを考慮し、Analytical Quality by Design (AQbD) に基づいた効率的な分析法開発を支援します。AQbDに基づいた分析法開発は、分析法の初期スクリーニング、最適化、頑健性評価というフェーズから成っています。本稿では、複数銘柄のC18カラムに対してデザインスペースを描画し、カラムスクリーニングを効率化した事例についてご紹介します。具体的には、6銘柄のカラムについて移動相やグラジエント条件といった各種パラメータを網羅的に変動させた際の分離選択性の違いを、変動領域全体においてデザインスペースにより視覚化しました。これにより、良好な分離が得られる領域が明確になり、より少ない分析回数で最適なカラム探索が可能となります。本探索により、Shim-pack Arata C18はその他のC18カラムと比べてユニークな分離選択性を有することが分かりました。

■分析条件

異なる6銘柄のC18カラム間の分離選択性の違いを、デザインスペースによる可視化を通して評価しました（分析条件：表1）。カラム間の分離選択性の違いを評価するために、塩基性化合物（Amitriptyline）と酸性化合物（Benzoic acid）と中性化合物（Phenol）を分析対象成分として用いました。水系移動相として0.1%酢酸水溶液、有機系移動相としてアセトニトリルとメタノールの混合溶液を用い、アイソクラティック溶離にて分析を実施しました。有機系移動相中のアセトニトリル比率を30%から70%まで20%刻み（3水準）で変動させ、さらに有機系移動相の初期濃度を40%から50%まで5%刻み（3水準）で変動させることで、計9（3×3）回の分析により、各カラムに対して分離度のデザインスペースを描画しました。

表1 分析条件

System : Nexera™ X3 (Method Scouting System)	
Compound :	
Amitriptyline	
Benzoic acid	
Phenol	
Mobile Phase:	
A) 0.1% formic acid in water	
B) Acetonitrile/Methanol = 30 : 70, 50 : 50, 70 : 30 (3 patterns)	
Column :	
1 : Shim-pack Arata C18	(100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)*1
2 : Column A (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.8 μm)
3 : Column B (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 2.5 μm)
4 : Column C (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)
5 : Column D (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)
6 : Column E (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)

Analytical Conditions (Isocratic):

B Conc. : 40, 45, 50% (3 patterns)
 Column Temp. : 40 °C
 Flow Rate : 0.5 mL/min
 Injection Vol. : 1 μL (80 mg/L)
 Detection : 254 nm (SPD-M40, UHPLC cell)

*1 P/N 227-32802-03

■デザインスペースによる分離度の視覚化

6銘柄のカラムに対して、縦軸に有機系移動相の初期濃度を、横軸に有機系移動相中のアセトニトリル比率をとり、Amitriptyline、Benzoic acid、Phenolの3種の化合物間の最小分離度のデザインスペースを描画しました（図1）。図中の赤色領域は分離度が大きく、青色領域は分離度が小さい領域を示します。

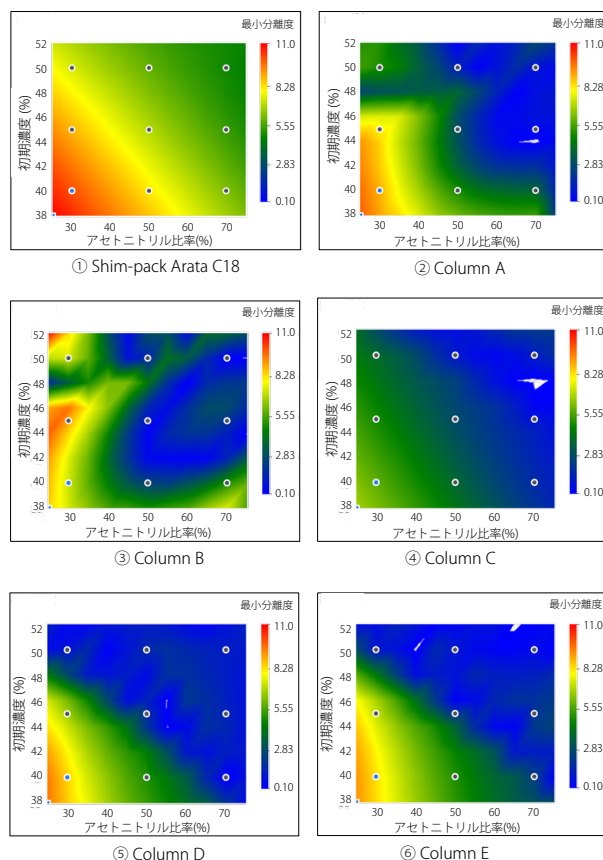


図1 各カラム（計6銘柄）における最小分離度のデザインスペース
 * 図中の黒丸（計9点）は分析を実施した点

* 図中（②、④、⑥）の白い領域は分離度が下限値（0.1）未満の領域

①のShim-pack Arata C18のデザインスペースは、他の銘柄のカラムに比べて分離度の大きい領域（赤色）がより広く、デザインスペース全域にわたって分離度の小さい領域（青色）が存在しないことが分かります。これは、有機系移動相の混合比率と初期濃度といった各種パラメーターの変動領域全体に渡ってShim-pack Arata C18がその他のカラムに比べて異なる分離選択性を有しており、良好な分離を与えることを示唆しています。このように、各カラムの分離選択性をデザインスペースにより視覚化することで、カラムごとの分離選択性の違いを容易に把握することができ、最適なカラム及び分析条件の探索を効率化できます。

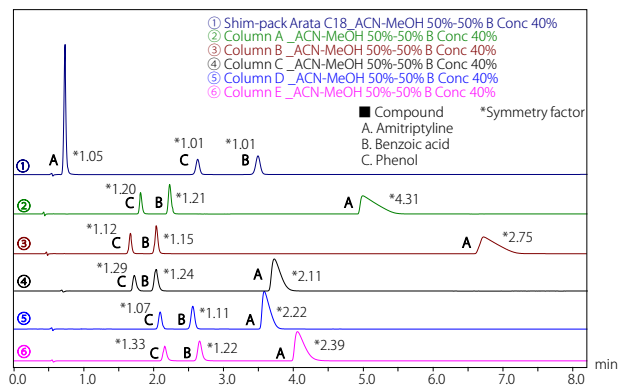


図2 各カラムで得られたクロマトグラム
有機系移動相 Acetonitrile/Methanol = 50 : 50、初期濃度 : 40%

図2に、有機系移動相中のアセトニトリル比率が50%、初期濃度が40%の条件で得られたクロマトグラムの一覧を示します。Shim-pack Arata C18はAmitriptyline（ピークA）に関して、優れたピーク形状（シンメトリー係数：1.05）を有する一方、その他のカラムはシリカゲル充填剤表面のシラノール基との相互作用によるピーク対称性の悪化（シンメトリー係数：2.11~4.31）が見られました。また、Benzoic acid（ピークB）及びPhenol（ピークC）に対して、Shim-pack Arata C18はその他のカラムと同等以上のピーク対称性を示しました。加えて、Shim-pack Arata C18は、塩基性化合物の溶出が早く、また酸性化合物の溶出が遅い特性があり、その他のカラムと比較して、異なる分離選択性を有することが分かりました。Shim-pack Arata C18は、このようなユニークな分離選択性を有するため、有機系移動相のアセトニトリル比率を増加させ、分析時間を短縮した場合でも、良好な分離を維持することが可能です（図3）。

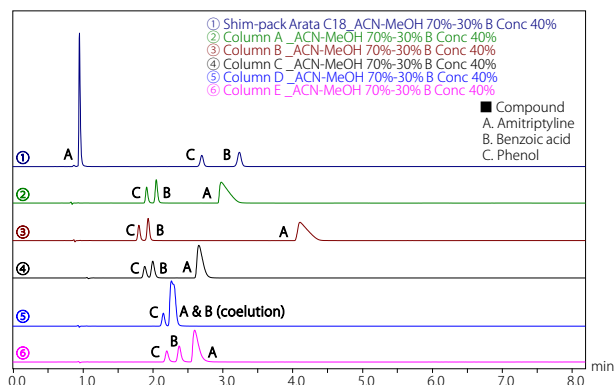


図3 各カラムで得られたクロマトグラム
有機系移動相 Acetonitrile/Methanol = 70 : 30、初期濃度 : 40%

図3に、有機系移動相中のアセトニトリル比率が70%、初期濃度が40%でのクロマトグラムを示します。図2と比較すると、アセトニトリル比率の増加により、②~⑥のカラムにおいて、Benzoic acid（ピークB）とPhenol（ピークC）の分離の悪化が見られる一方、Shim-pack Arata C18は良好な分離を維持しています。このように、Shim-pack Arata C18は、その他のC18カラムに比べて塩基性化合物の優れたピーク形状及び、ユニークな分離選択性を生かした分離改善が期待できます。

■最適な分析条件探索の効率化

LabSolutions MDIはデザインスペースの重ね書きにより最適な分析条件の探索を効率化します。一例として、各カラムに対して最小分離度が6以上かつ、Amitriptylineと最も近接するピークとの分離度が18以上をクライテリアとし、これを満たす条件領域を図4に示しました。①のShim-pack Arata C18において、図中の青線内の領域は最小分離度が6未満の領域、赤線内はAmitriptylineの分離度が18未満の領域を表しており、これら以外の領域（黒線ハッチング）がクライテリアを満たす条件領域となります。6銘柄のカラムの中でもユニークな分離選択性を有するShim-pack Arata C18が、上述のクライテリアを満たす領域が最も大きいことが分かりました。このように、デザインスペースの重ね書きにより、複数ピークに対して任意に設定した分離度のクライテリアを満たす条件領域を簡単かつ迅速に探索可能です。

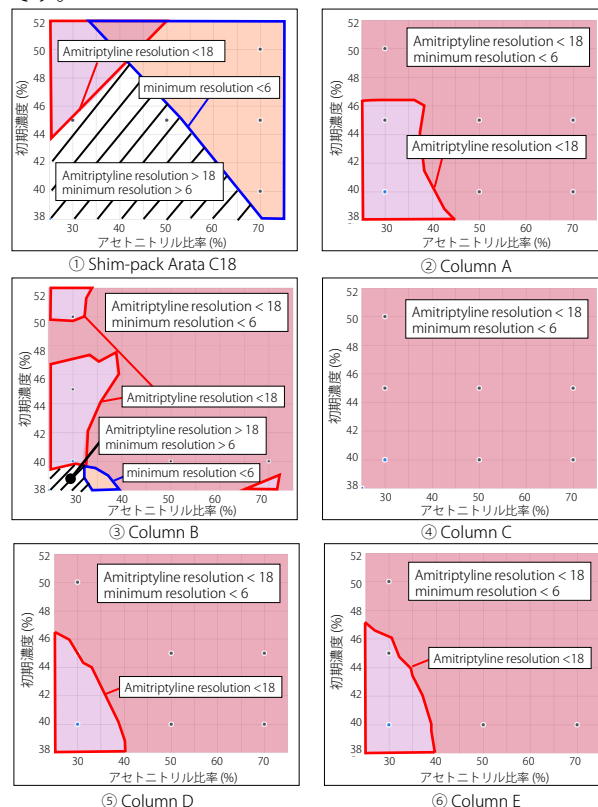


図4 最小分離度6未満及びAmitriptylineの分離度18未満の領域の
デザインスペースの重ね書き

■まとめ

LabSolutions MDIは、複数種類のカラムに対してデザインスペースを描画するにより、カラム間の分離選択性の違いを視覚化し比較することで、勘と経験に依存することなく、最適なカラム及び分析条件の探索を効率化できます。

*本稿は浅川直樹氏（元エーザイ株式会社）のご意見も参考に執筆しました。

Nexera、LabSolutionsおよびShim-pack Arata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

01-00370-JP 初版発行：2022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」、「®」を明記していない場合があります。

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。

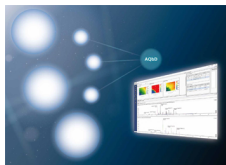
最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022

＞ 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。



＞ 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

＞ 低分子医薬品

＞ 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