

ユーザーベネフィット

- ◆ 異なる分析条件をスカウティングするための分析スケジュールを自動で作成可能
- ◆ 取得した分析結果を定量的に評価し、最適な条件を自動判別
- ◆ 自動で複数の移動相・カラムの切り換えを実行でき、夜間や休日など時間の有効活用が可能

■はじめに

HPLC分析において、移動相組成やカラムは目的成分の保持や分離に大きく影響を与えます。目的成分に適した分析条件を決定するのに、数多くの移動相（pH、塩濃度、有機溶媒比率など）やカラム（ODS、C8、Phenylなど）を探索する必要があり、労力、時間、経験を要します。

一体型HPLC i-Seriesに流路切換バルブを追加することで、最大6種類のカラムが使えるようになり、4種類の移動相溶媒と組み合わせた分析条件の探索（メソッドスカウティング）が可能です。

また、本システムは溶媒を任意の比率で自動混合する移動相ブレンディング機能を有しています。あらかじめ用意した数種の溶媒のみで、目的成分に適した条件を迅速に探出すことができます。

本稿では、i-Seriesメソッドスカウティングシステムを用いたタール色素12種の一斉分析条件スカウティングのワークフローをご紹介します。

■一斉分析条件のスкауティング

図1にi-Seriesメソッドスカウティングシステムの外観、図2に流路図を示します。カラムを切り換える流路切換バルブはカラムオープン内に内蔵されています。

表1に分析条件、表2に今回の分析対象にしたタール色素12種の化合物名を示します。カラムは異なる固定相6種類を使用しました。移動相は水系、有機系それぞれ2種類をセットし、移動相ブレンディング機能を用いてそれぞれの3種類目を調製しました。これらを組み合わせて計9種類を移動相として使用しました。上記の6種類のカラムと9種類の移動相を用いて6×9=合計54通りの分析条件のスкауティングを自動で行いました。

表1 分析条件

System	: LC-2060C 3D
Column	: (1)Shim-pack Scepter™ C18-120*1 (50 mm x 3.0 mmI.D., 1.9 μm) (2)Shim-pack Scepter C8-120*2 (50 mm x 3.0 mmI.D., 1.9 μm) (3)Shim-pack Scepter Phenyl-120*3 (50 mm x 3.0 mmI.D., 1.9 μm) (4)Shim-pack Scepter C4-300*4 (50 mm x 3.0 mmI.D., 1.9 μm) (5)Shim-pack Scepter PFPP-120*5 (50 mm x 3.0 mmI.D., 1.9 μm) (6)Shim-pack™ GIST C18-AQ HP*6 (50 mm x 3.0 mmI.D., 1.9 μm)
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ Vial for LC 1.5 mL, Glass*7
Mobile phase A	Aqueous mobile phase: A1: 10 mmol/L Acetic acid aqueous solution A2: 10 mmol/L Ammonium acetate aqueous solution A3: A1/A2=50:50 Ammonium acetate buffer solution prepared by blending function
Mobile phase B	Organic mobile phase: B1: Acetonitrile(ACN) B2: Methanol(MeOH) B3: B1/B2=50:50 ACN-MeOH prepared by blending function
Flow rate	: 0.7 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 2 μL
Detection	: PDA 254 nm
Time program	: B.Conc 5%(0 min)→90%(5 min)→90%(5.01-7 min) →5%(7.01-10 min)

- \*1. P/N: 227-31013-01, \*2. P/N: 227-31034-01
- \*3. P/N: 227-31064-01, \*4. P/N: 227-31176-01
- \*5. P/N: 227-31054-01, \*6. P/N: 227-30808-01
- \*7. P/N: 227-34001-01



図1 i-Seriesメソッドスカウティングシステムの外観

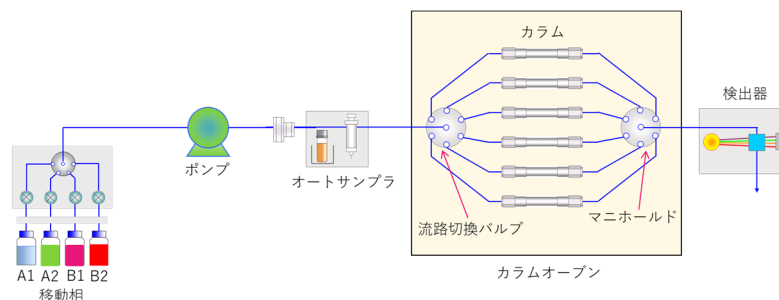


図2 i-Seriesメソッドスカウティングシステムの流路図

表 2 タール色素12種一覧

Compound name
Y4 (Tartrazine)
R2 (Amaranth)
B2 (Indigo Carmine)
R102 (New Coccine)
Y5 (Sunset Yellow FCF)
R40 (Allura Red AC)
G3 (Fast Green FCF)
B1 (Brilliant Blue FCF)
R3 (Erythrosine)
R106 (Acid Red)
R104 (Phloxine B)
R105 (Rose Bengal)

## ■ Method Scouting Solutionの設定

スカウティングするための分析スケジュール（バッチ）は専用のソフトウェアMethod Scouting Solutionを用いて作成しました。図3に設定画面を示します。バッチの作成手順は以下の通りです。

①事前にデータベース登録済みの移動相とカラムを選択します。②サンプルに関する情報を設定します。③グラジエントモードなどの分析条件を設定します。グラジエントはリニアグラジエント、ステップワイズなどがありますが、今回はリニアグラジエントを使用しました。④バッチ作成ボタンをクリックすると、バッチファイルが作成されます。このバッチファイルを用いて分析を行うことで、様々な分析条件のスカウティングを自動で行うことができます。

## ■ スカウティングのクロマトグラムと評価

図4~図9にスカウティングより得られたクロマトグラムを示します。R3(Erythrosine)に不純物が含まれており、最大13本のピークが検出されています。

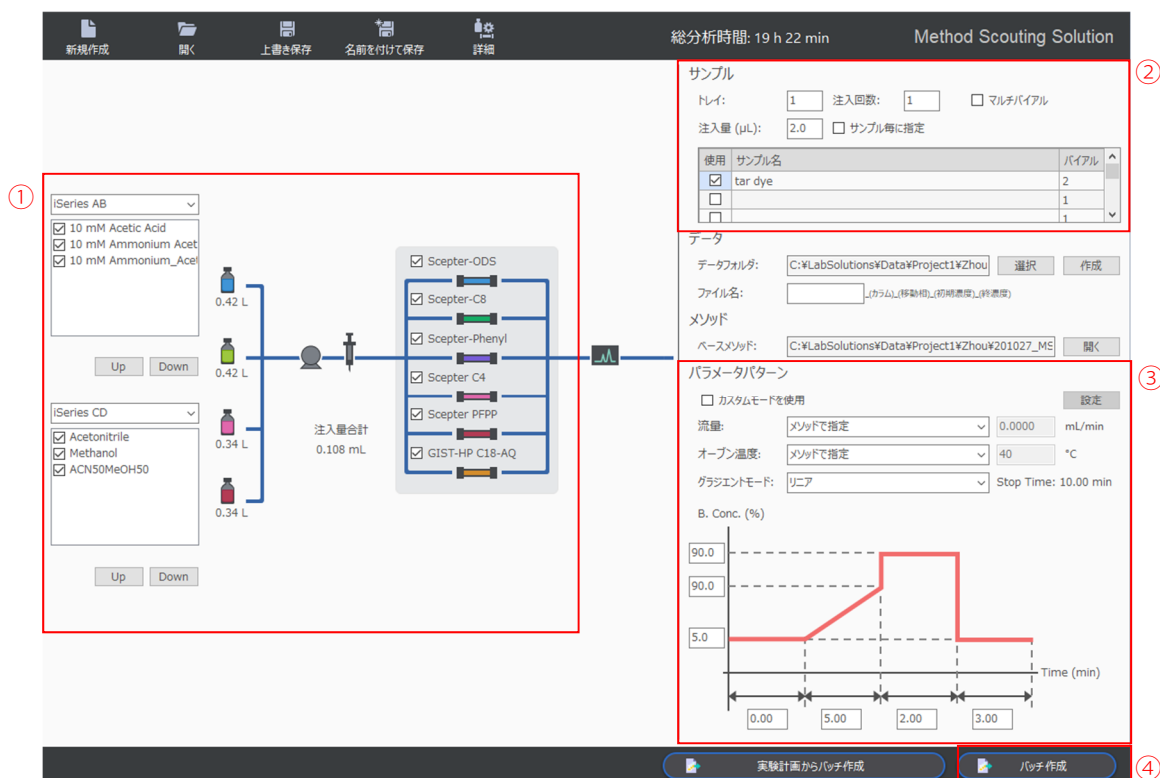


図 3 Method Scouting Solutionの設定画面

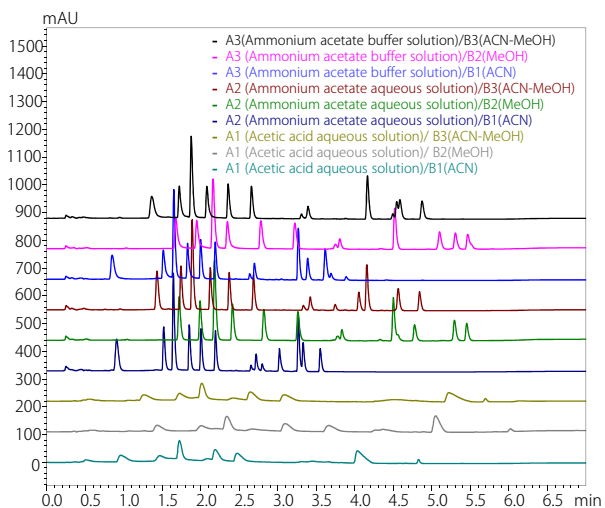


図 4 Shim-pack Scepter C18-120 (1) のクロマトグラム

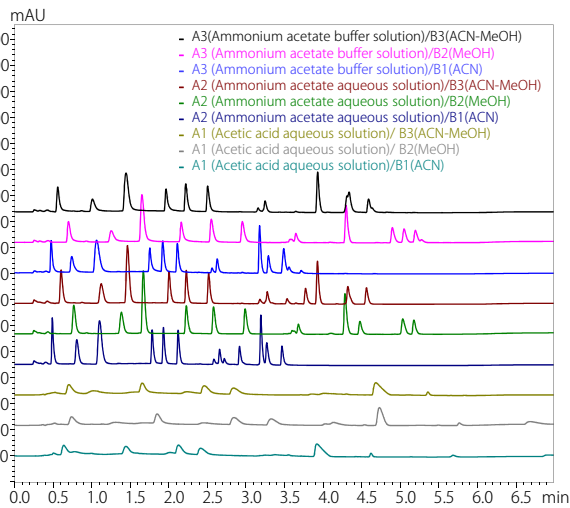


図 5 Shim-pack Scepter C8-120 (2) のクロマトグラム

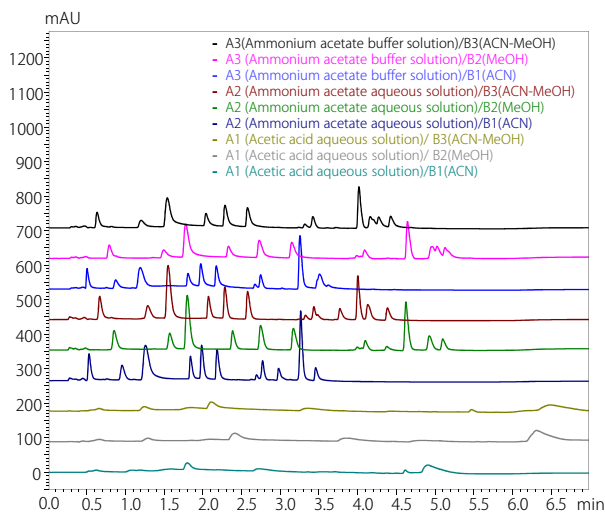


図6 Shim-pack Scepter Phenyl-120 (3) のクロマトグラム

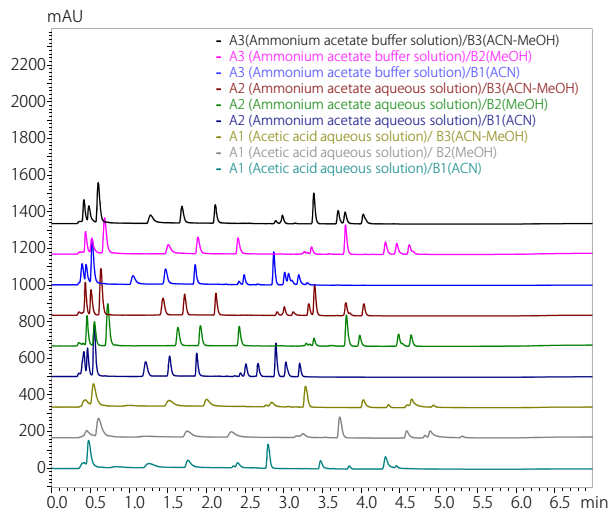


図7 Shim-pack Scepter C4-300 (4) のクロマトグラム

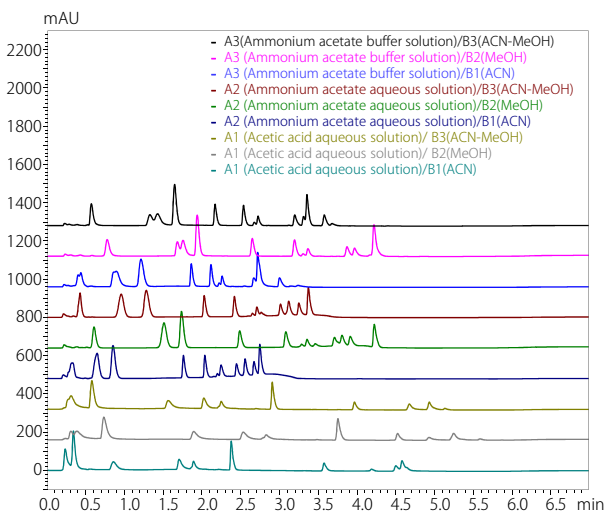


図8 Shim-pack Scepter PFP-120 (5) のクロマトグラム

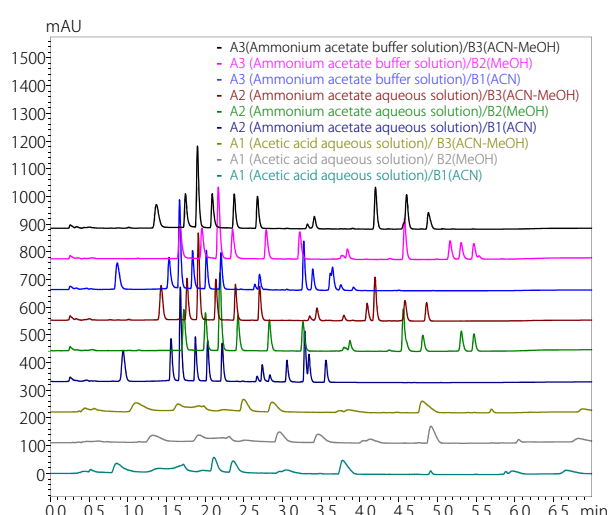


図9 Shim-pack GIST C18-AQ HP (6) のクロマトグラム

目視ではクロマトグラムの良否判定が難しいため、目的成分の分離状態をマルチデータレポート機能\*で定量的に評価しました。

評価値は下記の式を用い計算しました。

$$E = P \times (Rs1 + Rs2 + \dots + RsP)$$

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

\* LabSolutions™ DB/CS搭載の機能です。

図10に各条件の評価値を棒グラフにした結果を示します。評価値が大きいほど、棒グラフは高くなり、分離が良好であることを意味します。また、図11に今回スカウティングした54条件のうち、上位10条件の評価順位を示します。このように、最適な移動相・カラムの組み合わせは、定量的に評価することにより、簡単に見出すことができます。

分離評価レポート

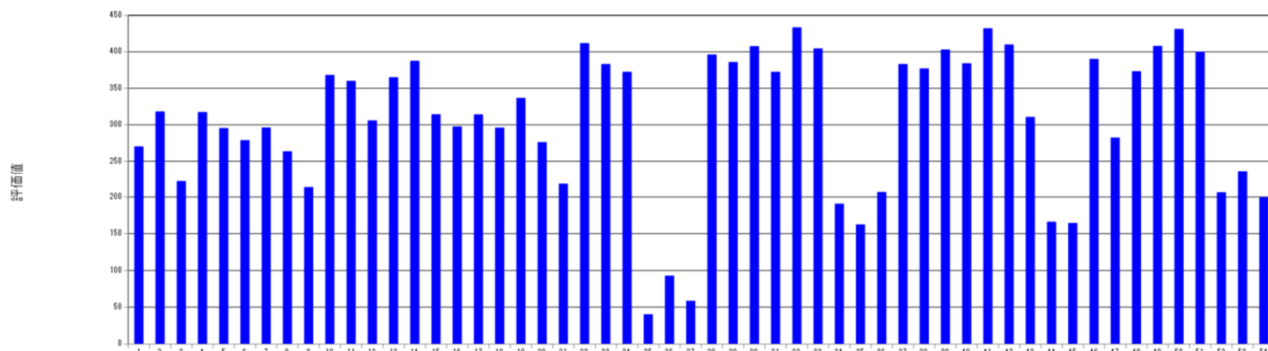


図10 マルチデータレポート機能で評価した各条件の評価値グラフ

## スカウティングレポートサマリー

順位	データファイル名	評価値	ピーク数	分離ピーク数
1	210121_Scepter-ODS_10 mM Ammonium Acetate_ACN50MeOH50_5,90_93.lcd	433.164	13	13
2	210121_Scepter-C8_10 mM Ammonium Acetate_ACN50MeOH50_5,90_96.lcd	431.869	13	12
3	210121_GST-HP C18-AQ_10 mM Ammonium Acetate_ACN50MeOH50_5,90_108.lcd	430.948	13	13
4	210121_Scepter-Phenyl_10 mM Ammonium Acetate_Methanol_5,90_81.lcd	411.636	13	8
5	210121_Scepter-C8_10 mM Ammonium Acetate_Acetonitrile_5,90_60.lcd	409.751	13	13
6	210121_GST-HP C18-AQ_10 mM Ammonium Acetate_Methanol_5,90_90.lcd	407.888	13	9
7	210121_Scepter-ODS_10 mM Ammonium Acetate Buffer_Acetonitrile_5,90_111.lcd	407.288	13	13
8	210121_Scepter-ODS_10 mM Ammonium Acetate_Acetonitrile_5,90_57.lcd	404.318	13	13
9	210121_Scepter-C8_10 mM Ammonium Acetate Buffer_Acetonitrile_5,90_114.lcd	402.741	13	13
10	210121_GST-HP C18-AQ_10 mM Ammonium Acetate_Acetonitrile_5,90_72.lcd	399.946	13	13

図11 マルチデータレポート機能で評価した評価順位（上位10条件）

### ■ タール色素12種一斉分析の最適条件

マルチデータレポートで一番高い評価値を得た分析条件を表3に、得られたクロマトグラムを図12に示します。各成分の保持時間、面積、高さ、分離度を表4に示します。分離度はいずれも1.5以上の結果となり、最適な分析条件を得ることができました。

表3 最適な分析条件

Column	: Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)
Mobile phase	: A: 10 mmol/L Ammonium acetate aqueous solution B: Acetonitrile/methanol=50:50
Flow rate	: 0.7 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 2 μL
Detection	: PDA 254 nm
Time program	: B: Conc 5%(0 min)→90%(5 min)→80% (5.01-7 min)→5%(7.01-10 min)

### ■ まとめ

一体型HPLC i-Seriesメソッドスカウティングシステムを用いて、タール色素12種の一斉分析条件を効率的に開発できました。

今回ご紹介したメソッドスカウティングのワークフローを用いる場合、移動相・カラムの切り換え、移動相調製、条件設定、分析実行、結果解析に費やす時間や労力を大幅に軽減でき、経験によらず誰でも簡単に分析条件を開発することが可能です。また、人の操作を必要としないため夜間などを有効に活用して、分析条件開発ができました。

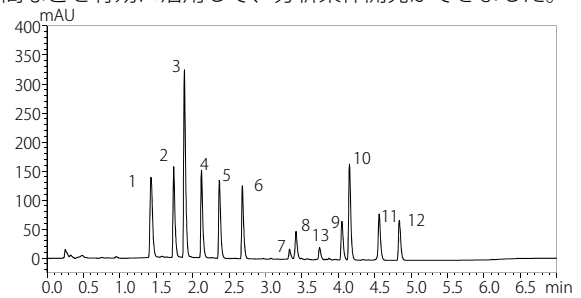


図12 最適な分析条件のクロマトグラム（各50 mg/L）  
ピーク番号は表4を参照、13：R3 (Erythrosine)の不純物

表4 最適な分析条件における分析結果

No.	Compound name	Retention time (min)	Area	Height (USP)	Resolution (USP)
1	Y4 (Tartrazine)	1.429	330507	137921	-
2	R2 (Amaranth)	1.741	289011	156399	5.33
3	B2 (Indigo Carmine)	1.888	596078	322442	2.83
4	R102 (New Coccine)	2.123	273436	150807	4.57
5	Y5 (Sunset Yellow FCF)	2.368	249399	134121	4.76
6	R40 (Allura Red AC)	2.683	235599	125620	5.96
7	G3 (Fast Green FCF)	3.331	30969	17154	12.27
8	B1 (Brilliant Blue FCF)	3.419	90527	47121	1.64
9	R3 (Erythrosine)	4.051	133815	66398	5.57
10	R106 (Acid Red)	4.155	330115	165064	1.85
11	R104 (Phloxine B)	4.560	172510	78862	6.99
12	R105 (Rose Bengal)	4.837	145987	68801	4.66

Shim-pack、Shim-pack Scepter、SHIMADZU LabTotal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

01-00137-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 に登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2020

▶ 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。



## 関連分野

▶ 低分子医薬品

▶ 石油・化学工業

▶ 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