

分析メソッドの開発

安定したルーチン分析のための、分析メソッド開発を紹介します。

化学分析の分野にもAIが波及してきました。クロマトグラフィーにおける分析メソッド開発もAIが使われ始めていますが、「人」による知識と経験則による判断は大切な要素です。ここでは逆相クロマトグラフィーにおけるHPLCでの分析メソッド開発を紹介します。

Keywords メソッドスカウティング 頑健性 ロバストネス メソッド移行

分析メソッドの開発

メソッドとは

メソッド(Method)とは、方法、手法、やり方などのことです。HPLCにおける分析メソッドは、以下を決める必要があります。

- ・ カラム(官能基・化学結合相、内径、長さ、粒子径)
- ・ 溶離液(有機溶媒、水/緩衝液、濃度、pH)
- ・ 温度
- ・ 検出器 など

重要なのは、誰が・いつ・どこで、分析しても同様の結果が得られることです。それを踏まえて分析メソッドを開発していきます。

ポイント

一般的な分析メソッド開発の流れです。分析種の物性情報や、参考となるクロマトグラムなどの情報があれば、省略することもできます。

メソッド スカウティング		最適化	検証	メソッド移行	→ 完成
溶離液		グラジエント 温度 注入量 など	頑健性 評価	機器を変えたとき メソッドの再調整が 必要な場合があります	
カ ラ ム		a	b	c	
	A	×	×	○	
	B	×	×	△	
	C	×	×	×	

自動分析による分析メソッド開発について

最新の分析メソッド開発は、複数のカラムと溶離液をセットして、メソッドスカウティングを実施します。自動分析を繰り返し、グラジエント溶離法を含む溶離液条件を最適化していきます。それらの結果を人が判断して、分析メソッドを開発します。

これら一連の工程には、自動分析や人の判断を支援するソフトウェアが使用されるようになりました。

これならわたしにも、できそうです。

確かに便利です。しかし、**自動分析やソフトウェアに丸投げでは、大量の溶媒や時間を浪費**してしまいます。様々な条件を試し過ぎてデータの山に埋もれてしまうことも、予想できます。また、分析条件の検討の経緯を理解しなければ、トラブル発生の際に、対処できなくなるでしょう。

用語の説明

メソッドスカウティング(Method scouting)

ある分析種に対し、様々なカラムや溶離液など条件を変えて得た分析結果から、最適な分析条件を探索すること。

頑健性(Robustness)

分析条件を小さい範囲で故意に変化させるときに、測定値が影響されにくい能力のこと。分析条件を適当な範囲で変化させ、測定値の安定性を検討する。(第十八改正日本薬局方 参考情報 G1.理化学試験関連抜粋)

ここでは、自動分析やソフトウェアに頼り過ぎない分析メソッド開発を紹介します。

それぞれの工程において、何がポイントか、理解することです。**的確な人の判断とソフトウェアやAIを適切に利用することで、スムーズな分析メソッド開発が可能になります。**

分析メソッド開発のコツ カラムの選択

逆相クロマトグラフィーでは、汎用性の高いC18カラム(ODSカラム)をファーストチョイスとします。

なぜC18カラム？それに、同じC18カラムでも、銘柄が沢山あります。何を選べばいいのかわかりません。

C18カラムは、分析種との疎水性相互作用により分離ができます。保持挙動が予想しやすく、参考文献も沢山あるので、溶離液のスカウティングが楽になります。

ただし、充填剤表面のエンドキャッピングが不十分だと、二次的相互作用(吸着など)によるピーク形状の不良や保持の遅延などが生じます。**高性能なC18カラムを選択しましょう。**

ポイント

一般に「低吸着」「高再現性」「高耐久性」であることが、高性能カラムです。中には独特の官能基を複雑に導入して、奇を衒った分離挙動が得られるカラムもありますが、分析メソッド開発のファーストチョイスには、シンプルな保持挙動、かつ幅広い溶離液組成で使用でき、どこでも安定して入手できるカラムを選択しましょう。

分析メソッド開発における各工程の迅速化には短いカラムが有効です。内径はルーチン分析に使うカラムと同じサイズを選びます。溶媒量を節約したい場合は、内径の小さいサイズで検討後カラム断面積に比例してスケールアップします。

UHPLCカラム(Sub 2 μ m)を用いた検討例がありますが、カラム圧が高いため、使用する機器が制限されます。様々な分析条件を試さなければいけない分析メソッド開発には適さない場合があります。

ここでは、pH 1からpH 12まで使用できる **L-column3 C18** 粒子径3 μ m, 長さ50 mmを選択して、分析メソッド開発をしていきます。

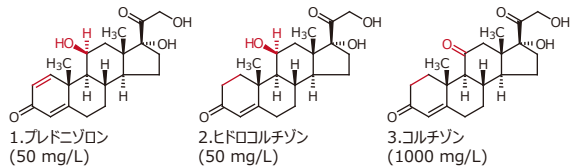
次のページからは、実際の分析メソッド開発を紹介します。



分析メソッドの開発 類縁物質の分離

糖質コルチコイド Glucocorticoid

糖質コルチコイドは副腎皮質の束状帯の細胞で産生されるステロイドホルモンであり、コルチゾール(ヒドロコルチゾン)、コルチゾン等があります。臨床ではプレドニゾン、デキサメタゾン、ベタメタゾンなどの合成ステロイド薬がよく用いられます。



「主成分(コルチゾン)に含有する微量な類縁物質(プレドニゾン、ヒドロコルチゾン)の分離」を目的とし、濃度を決定しました。これら3成分の分離を目指します。

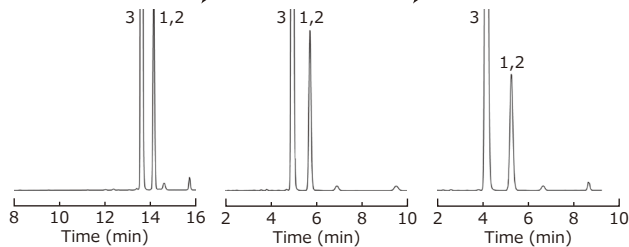
イソクラティックでは3成分がベースライン分離ができない既知情報があります。(Application Data No.L1065参照)そこでグラジエントを用いて分析メソッドを開発していきます。

(ソフトウェアによる自動分析)3成分が分離できる最適なグラジエント勾配に到達するまで、分析を繰り返します。

メソッドスカウティング 溶離液の選択

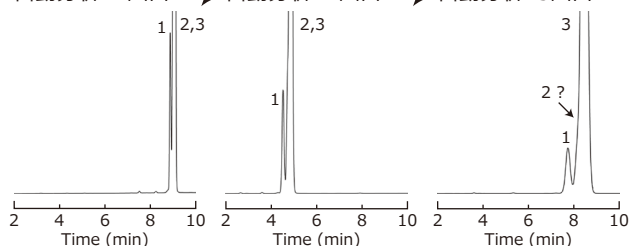
メタノール/水 グラジエント溶離 40℃

自動分析 1回目 → 自動分析 2回目 → 自動分析 3回目



アセトニトリル/水 グラジエント溶離 40℃

自動分析 1回目 → 自動分析 2回目 → 自動分析 3回目

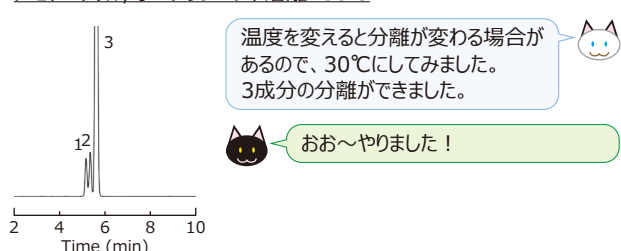


アセトニトリルで分離できそうです。自動分析を続けますか？

いいえ、経験上このまま続けても大きな変化はないでしょう。パラメーターを変えて分離挙動を確認しましょう。

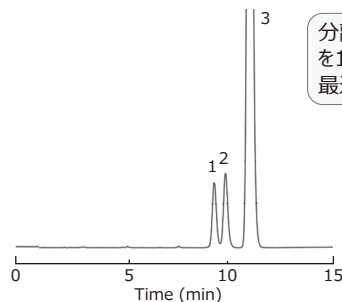
メソッドスカウティング 温度の選択

アセトニトリル/水 グラジエント溶離 30℃



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 3 μ m; Size: 4.6 mm I.D., 50 mm L.
Eluent: CH₃OH or CH₃CN/H₂O, Gradient elution
Flow rate: 1.5 mL/min
Temp.: 30°C or 40°C; Detection: UV 245 nm; Inj. vol.: 1 μ L

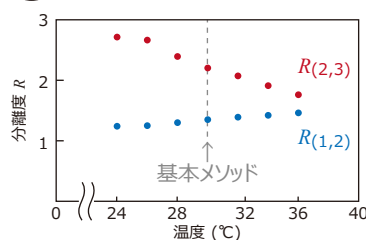
最適化



分離を改善したいので、カラム長さを150 mmにして溶離液組成を最適化しました。

[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 3 μ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃CN/H₂O (25/75)
Flow rate: 1 mL/min
Temp.: 30°C; Detection: UV 245 nm; Inj. vol.: 10 μ L

この基本メソッドで分離度と温度の関係をグラフにしました。

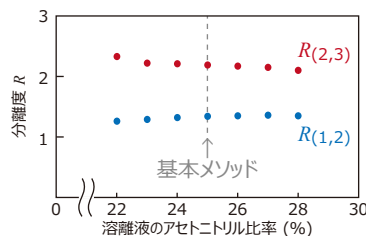


分離度1.5以上(完全分離)が望ましいですが、実際は1.2以上あれば、問題なく定量分析が可能です。

温度によって分離度が変化します。気を付けましょう。

頑健性評価

メソッド移行を考慮して、頑健性を評価しましょう。基本メソッドから各パラメーターを数%変化させます。



頑健性評価の一例です。溶離液の比率が数%ずれても分離度の変化が少ないことが分かりました。

他のLCへメソッド移行する

LCを変えるとクロマトグラムが異なることがあります。システム構造の異なるLCへのメソッド移行は調節が必要な場合があります。

クロマトグラムに影響する、主なシステム構造の違い	
送液システム	低圧グラジエント方式・高圧グラジエント方式
温度調節	ブロックヒーター型・空気循環型・プレヒーターの有無
その他	カラム外容積(配管・ミキサー・セル容量など)

分析条件はそのまま、異なるLCメーカー3社で分析結果を比較しました。

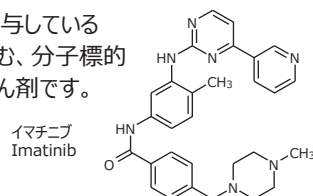
メーカー	保持時間(min)			理論段数			分離度	
	<i>t</i> _R (1)	<i>t</i> _R (2)	<i>t</i> _R (3)	<i>N</i> (1)	<i>N</i> (2)	<i>N</i> (3)	<i>R</i> (1,2)	<i>R</i> (2,3)
A社	10.1	10.7	11.6	10800	11100	11800	1.4	2.3
B社	9.2	9.7	10.6	11900	12000	12600	1.5	2.5
C社	9.2	9.8	10.7	9300	9600	10300	1.3	2.2

B社からC社へメソッド移行した場合、分離度が低下します。この場合、温度を低くすると、分離度*R*(1,2)が同等、若しくは向上することが、これまでの検討結果から予測されます。

分析メソッドの開発 不純物との分離

イマチニブ[®] Imatinib

イマチニブは、がんの増殖に関与しているタンパク質を選択的に抑え込む、分子標的治療薬として開発された抗がん剤です。



「医薬品の不純物プロフィール」を目的とし、主成分ピークと不純物ピークとの分離、不純物の多成分検出を目指します。

メソッドスカウティング 溶離液の選択

イマチニブはイオン性化合物です。物性情報から、アルカリ性溶離液が適していると予測されますが、pH 2～pH 11.5の水系溶媒を溶離液に用いて実際の分析結果を確認しました。

14種類の溶離液の組み合わせ結果です。
「多くの不純物ピークを検出」「イマチニブのピークが良好」なのは、アルカリ性溶離液とアセトニトリルの組み合わせでした。

		有機溶媒		アセトニトリル		メタノール	
				S	ピーク数	S	ピーク数
水系溶媒							
リン酸	pH 2.2	2.2	12	2.4	11		
ギ酸	pH 3	3.3	8	3.3	8		
酢酸	pH 3.5	2.1	12	2.5	11		
酢酸アンモニウム	pH 6	1.3	11	1.2	5		
リン酸塩	pH 7	1.2	10	1.3	10		
炭酸水素アンモニウム	pH 8	1.3	16	1.3	10		
リン酸塩	pH 11.5	1.2	16	1.2	17		

評価：高 > > 低

S: シンメトリー係数

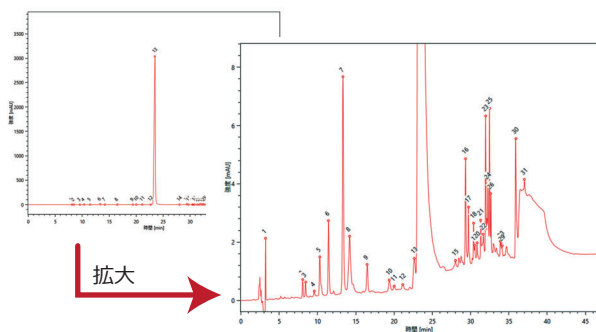
[Analytical conditions]
Column: *L-column3 C18*, 5 µm; Size: 4.6 mm I.D., 50 mm L.
Eluent: Gradient elution; Flow rate: 1.5 mL/min; Temp.: 40°C
Detection: UV 260 nm; Inj. vol.: 1 µL (2 g/L in CH₃OH)

今回は炭酸水素アンモニウムとアセトニトリルで最適化します。

最適化

不純物プロファイルの手順は不純物を検出後、それらを同定し解析します。不純物は量が少なく、構造が似ているものもあり、LC-U/VやLC-MSの分析では高分離能のカラムが要求されます。

ここからは粒子径3 μm 、カラム長さ250 mm
高耐圧仕様のカラム(最大使用圧力 50 MPa)を用いました。



[Analytical conditions]
Column: *L-column3 C18*, 3 μm ; Size: 4.6 mm I.D., 250 mm L. HP type
Eluent: A: CH_3CN , B: 20 mmol/L NH_4HCO_3 in H_2O
A/B, 25/75-30/70-58/42-61/39 (0-23.0-32.5-46.5 min)
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C
Detection: UV 260 nm; Inj. vol.: 5 μL (2 $\mu\text{g/L}$ in CH_3OH)

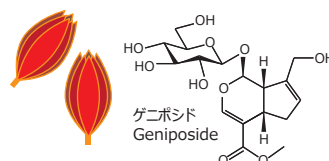
グラジエント溶離法は勾配が緩いとピークがブロードになります。
炭酸水素アンモニウムを用いたグラジエント条件で、
上記の不純物プロファイルメソッドができました。

サンシシ末 Powdered Gardenia Fruit

サンシシ(山梔子)末はアカネ科クチナシの果実を乾燥し、粉末にしたものです。

消炎排膿、皮膚疾患をはじめとした処方に配合されています。

サンシシには、イリドイド配糖体であるゲニポシドが含まれます。



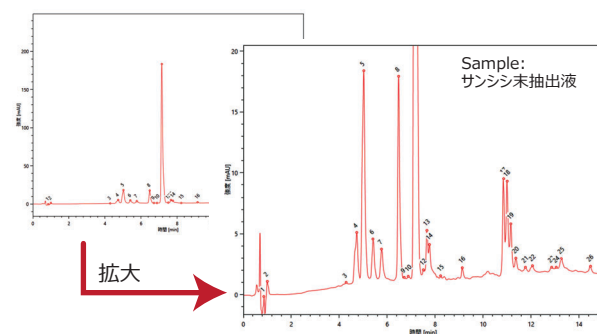
「分取カラムでのゲニポシドの分取・精製」を目的とし、ゲニポシドのピークと不純物ピークとの完全分離を目指します。

分析カラムでの最適化

第十八改正日本薬局方の定量法では、溶離液に水/アセトニトリル混液を用いています。
それを基に分析条件を最適化していきます。

L-column3 C18 は、サンシシ及びサンシシ末中のゲンポシド
定量法のシステム適合性及びシステム再現性に適合した
カラムです。(Application Data No.L3054参照)

「主成分ピークと不純物ピークとの分離」「多くの不純物ピークを検出」するため、最適なグラジエント勾配に到達するまで、自動分析を繰り返しました。



[Analytical conditions]
Column: *L-column3 C18*, 3 μm ; Size: 3.0 mm I.D., 50 mm L.
Eluent: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 2/98-32/68-32/68 (0-11.9-17.6 min)
Flow rate: 0.4 mL/min
Temp.: 25°C; Detection: UV 240 nm; Inj. vol.: 5 μL

この分析条件を採用して、分取カラムへスケールアップします。

 ポイント

LCにおける分離改善のポイントを押さえておきましょう。
分離改善するには、分離度 R を大きくします。

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k+1} \right)$$

関連する主なパラメーター

理論段数 N	カラム長さ, 粒子径, 充填剤への吸着抑制
分離係数 α	溶離液, 温度, 充填剤の種類
保持係数 k	水系溶離液比率の増加

分離係数が大きく変わるパラメータを確認し、ある程度条件を絞り込みます。理論段数を大きくする場合は、カラムサイズを変更します。最後に分析時間も含め最適化するために保持係数を調節するのが一般的な分析メソッド開発の流れです。

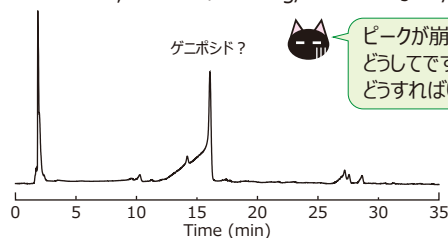
参考: LCテクニカルレポート Vol.17 分離改善のコツ
https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/technical_report/technical_report_17.pdf

分析メソッドの移行 分析から分取・精製

分取カラムでの最適化

	分析カラム	分取カラム
カラム内径	3 mm	20 mm
カラム長さ	50 mm	150 mm
グラジエント	2/98-32/68-32/68 (0-11.9-17.6 min)	2/98-32/68 (0-36.0 min)
流量	0.4 mL/min	20 mL/min
温度	25 °C	室温

注入量 5 mL, サンシシ末 10 mg/mL in CH₃OH/H₂O (1/1)

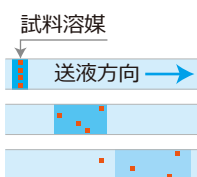


ピークが崩れてしまった…
どうしてですか？
どうすればいいの

(下図:左)試料溶媒が溶出力の強い溶離液として作用するため、試料溶媒の移動と一緒に分析種も移動します。このためピーク幅は広がってしまいます。

(下図:右)溶離液と同じ試料溶媒、若しくは有機溶媒比率が低い試料溶媒ならば、分析種は溶離液によって展開するのでピーク幅は狭くシャープになります。

有機溶媒比率
試料溶媒 > 溶離液



有機溶媒比率
試料溶媒 ≤ 溶離液



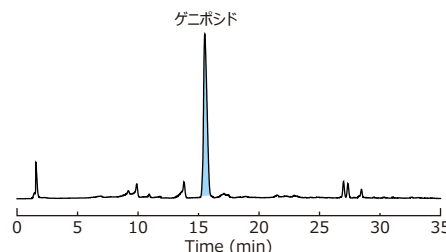
有機溶媒比率
高 低
■分析種

試料溶媒の組成を変更、若しくは注入量を少なくすることで、ピーク形状を改善することができます。

分取へのメソッド移行の最適化には、単なるスケールアップだけでなく、試料溶媒の種類や注入量の検討も重要です。

サンシシ末の量と抽出溶液を変えてみました。
有効成分の抽出効率を上げて、分取効率向上を試みました。

注入量 2 mL, サンシシ末 100 mg/mL in CH₃OH/H₂O (7/3)



ゲニボンドの溶出時間で分画位置を決定し、分取しました。
結果、一回の分取操作でゲニボンド8.5 mgが得られました。
(第十八改正日本薬局方の定量法に準じ含有量を算出)

まとめ

分析種と分析目的の数だけ、分析メソッド開発のポイントがあります。まずはアプリケーションデータなどの文献調査から、似たような分析種の分析メソッドがあれば、それを参考にするとところから始めてみましょう。

でも…「上手く分析できない」「分析メソッド開発を検討する知識も時間もLCもない」「カラムの選定が難しい」など…
悩みは沢山です。

そのようなときは、CERIクロマト技術部へご相談ください。

今回の登場人物(猫)

- 解説もこなします お任せください …クロマトグラフィーの経験に長けている先生
- 実務は任せろ …クロマトグラフィー中級者
- まだまだ勉強中です… …クロマトグラフィー初級者の新人(新猫)
- クールに仕事をこなします …LCに備わった自動分析ソフトウェア、AI搭載

「HPLC分析メソッド開発支援」承ります 「分取・精製」承ります

CERI クロマト技術部は、L-column シリーズの開発及び製造実績と、クロマトグラフィーに関する知識・経験則・分析技術に基づいた「HPLC分析メソッド開発支援」「分取・精製」を開始しました。

- ・ L-column シリーズ(主にL-column3)を使用し、分離モードは逆相クロマトグラフィー、装置はHPLCを用いたものに限りです。
- ・ 費用や納期は、試料や分析目的、申込内容で変わります。内容を確認後、納期を含めた見積書を提出します。
- ・ ご要望に応じて秘密保持契約を締結することもできます。

リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店までご連絡ください。

CERI

一般財団法人 化学物質評価研究機構
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

<https://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部

e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521

〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地