

Original

ミニチュアカラムを用いた逆相分配クロマトグラフィーにおける 迅速な移動相最適化

江幡美穂, 柳澤功, 坂本江美, 城田修

Rapid mobile phase optimization with a miniature column for reversed-phase chromatography

Miho Ebata, Isao Yanagisawa, Emi Sakamoto, Osamu Shirota

HPLC application laboratory, Professional pharmaceuticals and chemical division,

Shiseido Co. Ltd., 2-2-1 Hayabuchi, Tsuzuki, Yokohama, 224-8558 Japan

Received for review May 14, 2007. Accepted Jun 1, 2007.

Abstract

A rapid method to optimize a mobile phase for a given analyte in reversed-phase liquid chromatography was proposed, where ten preliminary 1.2-min gradient runs with altered starting organic contents (0 to 90%, with 10% increment) and the common final organic content (100%) were carried out with a miniature column (1.5 mm i.d. x 10 mm). It was found that an optimized mobile phase for a longer analytical column (150 mm) can be determined simply by using values obtained from calculations on a spread-sheet program with pieces of information given by the gradient runs. The method shortened the time required for mobile phase optimization to approximately 40 min, and also minimized the liquid consumption.

Keywords : mobile phase optimization ; miniature column ; reversed-phase chromatography

緒言

近年, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の分野でも高速分離, ハイスループット等のキーワードがよく見受けられるようになってきた。また, LC用検出器としての質量分析計 (MS) が普及し, LCカラムに求められる仕様, ジェオメトリーも多様化してきたといえる。しかし, 依然, 工業的に使用されるカラムおよび公定試験法で指定されるカラムの

大半は, 4.6 mm内径, 長さ15もしくは25 cmのものである。新規物質に対しては, これらのサイズのカラムを用い, アイソクラティック分析を前提とした時間と溶媒の消費を伴う移動相の最適化作業が行われている。

移動相の最適化を簡便に行う試みはこれまでもいくつか報告されている。Snyder等は試験的なグラジエント分析を行い, その結果から多くのパラメータを抽出し, 最適化された

Correspondence : HPLC application laboratory, Professional pharmaceuticals and chemical division, Shiseido Co. Ltd., 2-2-1 Hayabuchi, Tsuzuki, Yokohama, 224-8558 Japan

Tel : 045-590-6236 (社内携帯直通)

Fax : 045-590-6088

E-mail : osamu.shirota@to.shiseido.co.jp

移動相組成を予測する方法を紹介した [1, 2]. しかし, この方法は多くの数値, 数式の取り扱いを伴い, 簡便な方法とは言えない. また, パーソナルコンピュータ (PC) 上で化合物の性質をパラメータ化し移動相を予測する手法も存在し [3, 4], その目的のソフトウェアも市販されているが, これも広く普及しているとはいえない. その理由のひとつに, PC上で条件が予測されても実測を伴い検証する作業が依然必要であること等が挙げられる.

本報告では, これまでの手法と比較し, より簡便で迅速な条件検討手段を試みた結果を議論する. 実際に用いた条件検討用カラムは, 分析カラムの固定相と同一の化学構造を有する固定相を充填した小口径かつ極端に短いカラム (ミニチュアカラム) である. ミニチュアカラムにて短時間に一連の試験的なグラジエント測定を行い, その結果より得られた情報を用いると, 最適な移動相組成を短時間で決定することができるという結果を得たので報告する.

2. 実験

2.1 試薬

測定用試料には標準試薬 (ナカライ: 特級) を, 移動相には水 (ミリQ水), メタノール (ナカライ: HPLC用), 酢酸アンモニウム (和光: 特級), ギ酸 (和光: HPLC用), 酢酸 (和光: HPLC用), トリフルオロ酢酸 (和光: HPLC用) を用いた. 標準試料として, アミトリプチリン塩酸塩 (シグマ・アルドリッチ・ジャパン), ミコナゾール硝酸塩 (和光: 生化学用), アンピシリン (和光: 生化学用) を用いた.

2.2 装置・カラム

装置はNANOSPACE SI-2 (資生堂; 東京) のグラジエントシステムを用いた. 構成は3002オートサンプラー, 3004カラム恒温槽, 3010脱気装置, 3301デュアルポンプMS, 及び3002 UV-VIS検出器とした. データ処理にはEZChrom for Shiseido (資生堂) を用いた. 条件検討用カラムはCAPCELL PAK C₁₈ MGII S3 1.5 mm i.d. x 10 mm (資生堂) を, 分析用のカラムはCAPCELL PAK C₁₈ MGII S5 4.6 mm i.d. x 150 mm (資生堂) を使用した.

2.3 HPLC条件

HPLC条件はグラジエントA液には10 mmol/L酢酸アンモニウム, 0.1 vol%ギ酸, 0.1 vol%酢酸, もしくは0.1 vol%トリフルオロ酢酸を用いた. グラジエントB液には10 mmol/L酢酸アンモニウムを含有したメタノール, 0.1 vol%ギ酸を含有したメタノール, もしくは0.1 vol%酢酸を含有したメタノールを用いた. グラジエント条件はFigure 1に示した. 合計の流速は1 mL/minとした. いずれもプログラム開始後, 初期組成から0.8分間にて有機溶媒が100%となるように設定し, 安定時間を含め所要時間約1.2分間の10種のグラジエント測定を連続して行なった. この作業はPC上で計画を設定し, オートサンプラーによる自動注入にて行った. 検出は紫外吸収検出器を用い210 nmにて行った.

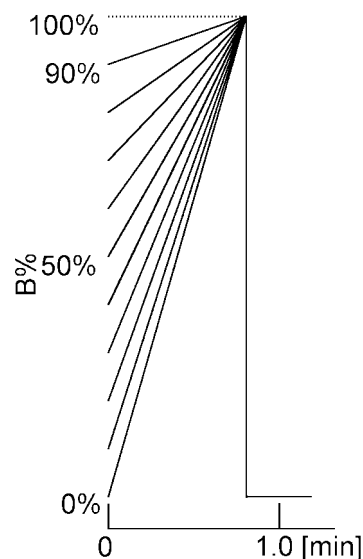


Figure 1. Ten gradient curves used for the optimization

2.4 データ解析

測定に用いたパーソナルコンピュータにエクセル2000 (マイクロソフト・ジャパン: 東京) をインストールし, 表作成, グラフ描画, 及び数値解析に使用した.

3. 結果と考察

一般にアイソクラティック条件にて新規物質の保持時間 (retention time, t_R) を調整する場合, その値は15 cm長のカラムの場合なら10分から20分 (k 値として約5–12に相当) の範囲に置かれている例が多いと思われる. 逆相クロマトグラフィーにおいて, 移動相中の有機溶媒含量を最適化する典型的な手順は以下のとおりである. 1) 有機溶媒量が十分に適正量より高いと思われる移動相にて, 比較的高濃度の標準溶液を用い, 目的物質のピークの存在を保持の無い状態, もしくは僅かに保持される状態で確認する. 2) 有機溶媒量を減少させて, 保持時間の増加を確認する. 3) この作業を目的の保持時間が得られるまで繰り返す.

この作業では, 二台のポンプを用い適宜流量組成を変更することで, 個々に移動相を調整するよりは格段に能率が向上する. しかし, ある組成から次の組成に移行する際に系の平衡化を確保するために10分程の時間をおく必要があり, その間に消費する溶媒量は少なくないと考えられる. こうした作業を合理化する目的で, 事前にグラジエント溶出を行う試みは既に報告されている [1, 2]. しかし, その中で扱われているパラメータ群の数, 数値の取り扱いの労力を総合的に考えると従来の方法を置き換える程の利益はないものと思われる.

本報で議論する移動相の最適化手法では迅速さ, 容易さを重視した. 一回あたり1.2分を要するグラジエント分析 (初期の有機溶媒組成を0, 10, 20, ... 90%とし, 終着点の有機溶媒組成は共通の値, 100%とする) を10回行うこととし

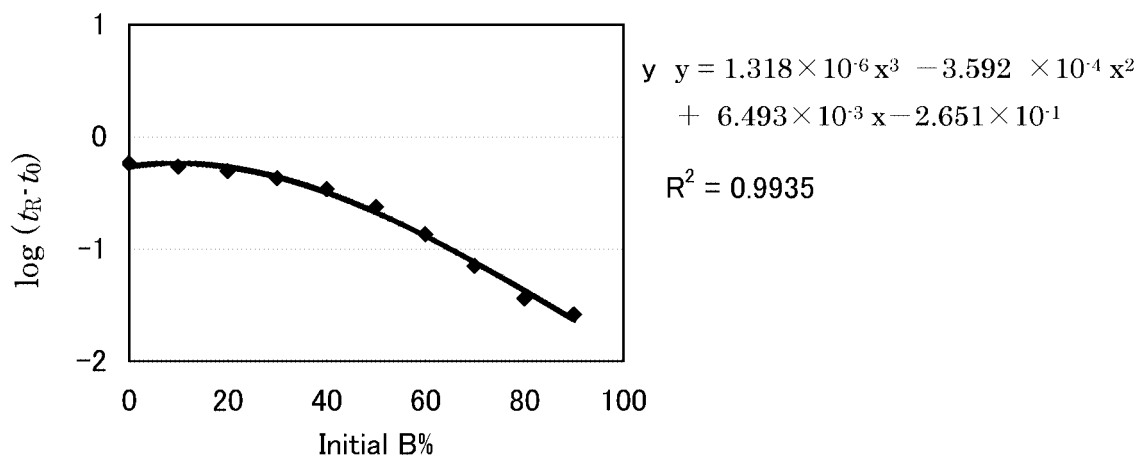
Amitriptyline 10 mmol/L CH₃COONH₄

Figure 2. Regression by the spread sheet program

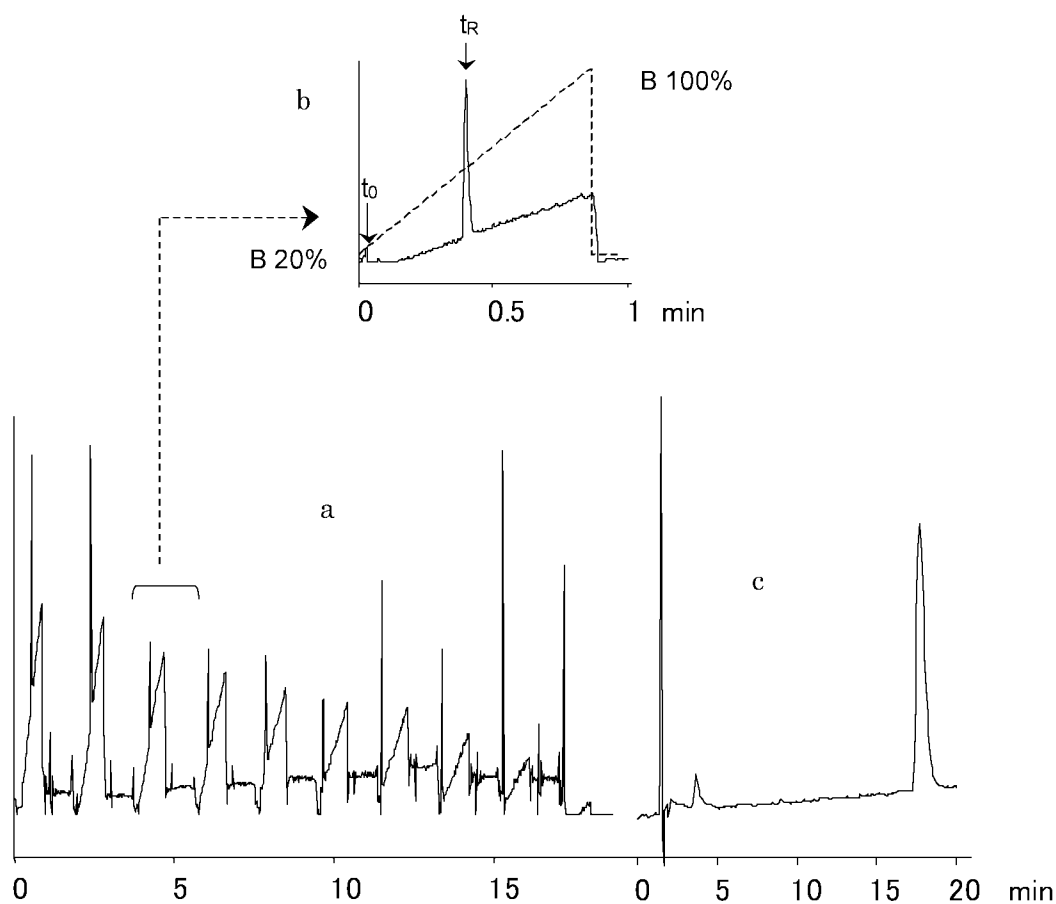


Figure 3. Flow of the optimization process (a : Preliminary gradient runs, b : Blow up of one gradient run, c : Test with a column of the objective size)

た。カラムには実際に分析を行う固定相と同一の化学構造をもつものを内径1.5 mm, 長さ10 mmのサイズのカラム (ミニチュアカラム, MC) に充填したものを用いた。この極端に内容積の小さいカラムにて, 1 mL/minの流速を用いると毎回の分析に要する安定化時間は非常に短く, 一測定当たり

1.2分で十分に連続分析が可能であった。

長さ150 mmの通常のカラムにて既に条件の最適化が終了している三環系抗うつ薬のひとつ, アミトリプチリンを例にとり, 最適化された移動相組成とMCでのグラジエント溶出時の保持時間の関係を調べてみた。各グラジエント溶出

Table 1. Values involved in the optimization process

Compound		Amitriptyline	Amitriptyline	Miconazole	Ampicillin
Aqueous phase		0.1 vol% TFA	0.1 vol% FA	0.1 vol% FA	AA
log ($t_R - t_0$)	0%	-0.2594	-0.3172	-0.2264	-0.5319
	10%	-0.2977	-0.3668	-0.2514	-0.6943
	20%	-0.3495	-0.4347	-0.2875	-0.9146
	30%	-0.4216	-0.5516	-0.3399	Value not obtained
	40%	-0.5469	-0.7348	-0.4177	
	50%	-0.7672	-1.0835	-0.5640	
	60%	-1.1521	-1.5882	-0.8652	
	70%	-1.6229	-1.9654	-1.4498	
	80%	-1.9788	-2.2343	-1.8945	
	90%	-2.4168			
Coefficients	A	5.40 E-07	3.48 E-06	-4.58 E-06	—
	B	-4.01 E-04	-7.32 E-04	1.34 E-04	-2.90 E-04
	C	7.80 E-03	1.23 E-02	-2.78 E-03	-1.33 E-02
	D	-2.99 E-01	-3.63 E-01	-2.34 E-01	-5.32 E-01
B% when log ($t_R - t_0$) = -1		55	46	62	22
5% Increment		55	45	60	20
tr of 150-mm col.		10.9	17.7	11.0	14.6

$$y = A x^3 + B x^2 + C x + D$$

TFA : trifluoroacetic acid FA : Formic acid AA : Ammonium acetate

における保持時間 (t_R) から、注入によるベースラインのみだれが最初に観測される時間 (t_0) の差の常用対数を縦軸にとり、そのときの有機溶媒の初期組成を横軸としグラフを描いた (Figure 2)。

ここで表計算ソフトの機能を用い、多項式の回帰曲線と回帰式を求めてみた。グラフは明らかに曲率をもっており、二次式より順に回帰を試み、決定係数が最初に0.99を超える時点まで行った。三次式の回帰にて十分に大きい決定係数 ($R^2 = 0.9957$) が得られ回帰の状態は良好と言えた。既に150 mmのカラムにおいて最適化された有機溶媒組成値, 55%をそのままこのグラフの横軸に与え、回帰式からこれに相当するlog ($t_R - t_0$) の値 (縦軸の値) を算出すると約-1という値が得られた。

いくつか異なる物質において同様の解析を行うとlog ($t_R - t_0$) の値はいずれも-1程度 (-0.9から-1.1の範囲) であることが判明した。そこで、報告者等はこの逆の手順にて目的である有機溶媒の最適組成予測が可能であると考えた。即ち、1) 10回のMCによるグラジエント分析を行う、2) log ($t_R - t_0$) と初期有機溶媒組成のプロットを行う、3) 表計算ソフトにて、多項式の回帰を二次式、三次式の順に行い、決定係数が大きい方の回帰式を採用する。{物質の親水性が強く有機溶媒濃度が高い領域ではlog ($t_R - t_0$) が0となり、グラフ上に十分な点が得られない場合は二次式へ回帰する}。

3) log ($t_R - t_0$) = -1となる有機溶媒組成値 (%) を求め、その値を実際の150 mmカラムの条件に適用する、という手順である。工程の概念図をFigure 3に示した。データ転送、表計算等の工程は同一のPCで作業を行う限り、その所要時間は設定如何では殆ど無視できるものとなる。全体で約40分程度の工程となる。

Table 1. にアミトリプチリン (水系移動相のタイプの異なるものを含む) に関する数値、及びその他の化合物を新規物質に見立てた有機溶媒最適組成の予測値を示した。この予測値は回帰式から得られた値を直近の5%毎の値に変更したものである。これは通常、移動相組成は操作の簡便さ、精密さのため、不必要に5%毎より細かな設定をしないという慣習に従うものである (一般に有機溶媒が40-60%程度の条件で適切な保持を示す物質においては、2-3%の有機溶媒組成の変更による保持時間の変化は2分以内と思われる)。これらの結果に従ったクロマトグラムをFigure 4に示した。条件の最適化の全工程を40分以内とする試みとして、これらの4.6 mm内径カラムによるクロマトグラムはいずれもグラジエント分析直後に測定したものを示した。ベースラインのドリフトが多少観測されるが、保持時間の確認は充分に行えた。

本報は値の取り扱いに関し演繹的な理論説明を与えておらず、ひとつの経験則の紹介に留まる。しかし、数値が非常に

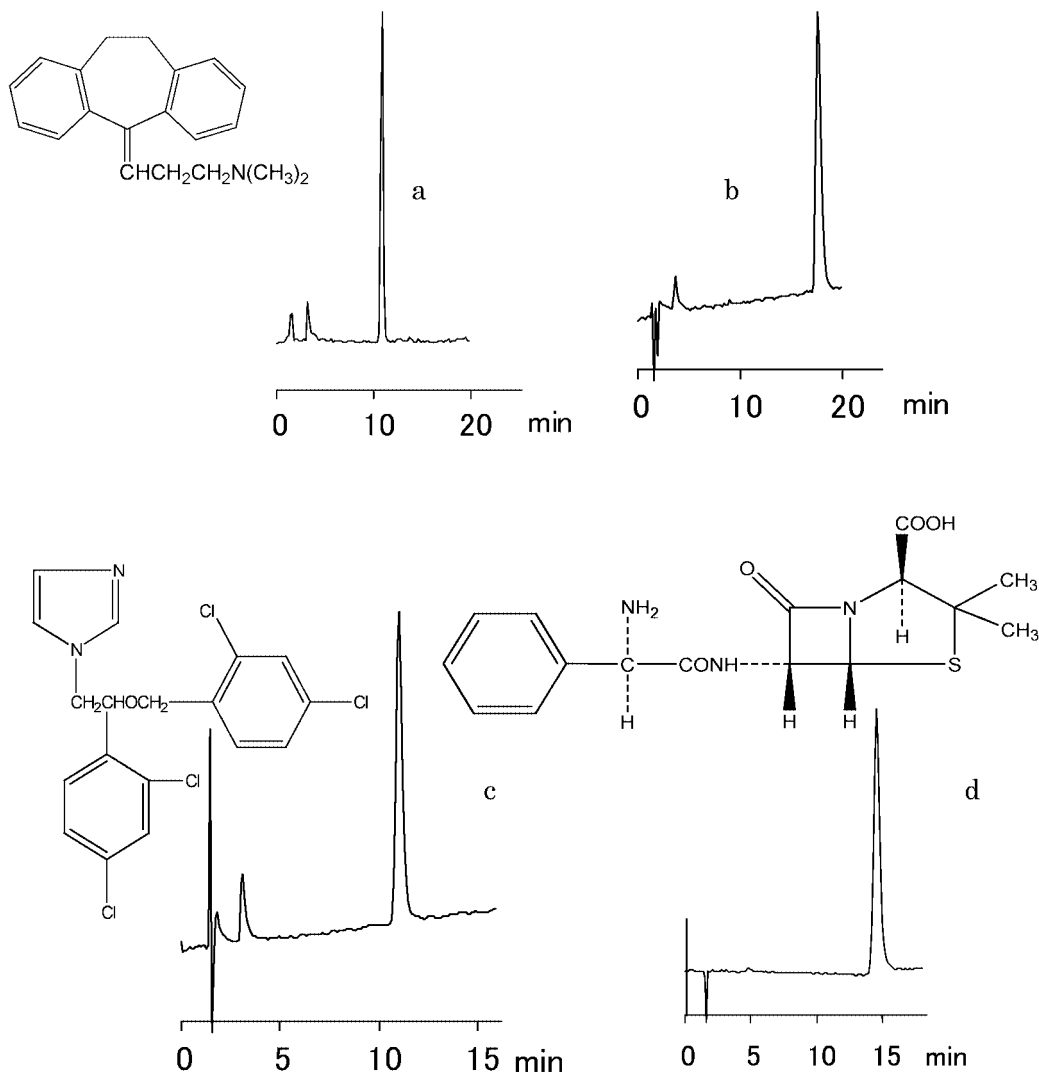


Figure 4. Test runs with the column of the objective size (performed immediately after the preliminary gradient runs)
(a : Amitriptyline with 0.1% TFA b : Amitriptyline with 0.1% formic acid c : Miconazole d : Ampicillin)

単純に取り扱えた理由として、検討に用いたMCのサイズが挙げられる。移動相流量に対し著しく固定相量の少ないカラムを用いることにより、通常取り扱いが容易ではないグラジエント溶出の遅れ（カラム先端と末端間に出来上がる有機溶媒のグラジエントの影響）等が無視できたのではないかと考える。

本法は、現在、報告者等の施設にて日常的に使用されている。緩衝液のタイプ、有機溶媒の選択を変更しても、多くの化合物に関して満足な結果が得られている。一方で、著しく親水性の高い物質や高次構造を持つペプチドに関しては良好な条件予測になり得ないことも判明している。しかし、こういった手法を全ての化合物に適応できる様、更なるパラメータや、複雑な数値の取り扱い方法を導入するのは本末転倒に

成り得ると考える。分析カラムのサイズを現在最も消費される150 mmと限定し、適度な疎水性を有する多数の化合物に応用できる、という価値に留めることで得られる簡便さを重視したい。

4. References

- [1] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 721 (1996) 3–14.
- [2] J.A. Lewis, L.R. Snyder, J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 721 (1996) 15–29.
- [3] R. Bonfichi, *J. Chromatogr. A*, 678, (1994) 213.
- [4] H.W. Bilke, I. Molmar, Ch. Gernet *J. Chromatogr. A*, 729 (1996) 189.