

適切なカラム選択による迅速分析法開発

Mia Summers and Kenneth J. Fountain Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- 複数のUPLC®カラムケミストリーを用いた短時間での分離向上
- 早い段階で最適な固定相を選択することで実 現するより迅速な分析法開発
- ACQUITY UPLC® H-Class カラムマネージャを用いた複数のカラムケミストリーによる自動サンプルスクリーニング

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC H-Class システム (カラムマネージャ付)

ACQUITY UPLC BEH, HSS, CSHTMカラム

ウォーターズカラム選択性チャート

Empower™ 3 CDSソフトウェア

キーワード

分析法開発、HPLC、UPLC、固定相、 選択性、反応生成物、スクリーニング、 劣化、天然物

はじめに

クロマトグラフィー分析のためのカラム選択は、分離の効率に大きく影響する分析法開発における重要なステップの1つです。不適切なカラムを選択してしまうと、分析法を開発し最適化するために不必要に時間がかかり、多大な労力がかかることもあります。多くのラボではカラムの選択肢が限られていて、従来からのエンドキャップされた C₁₈ カラムなど1つのコアとなるカラムケミストリーを分析法の基準として使用しています。しかしながら、カラムテクノロジーの進歩に伴い、異なる選択性のスクリーニングを行って分離向上を実現するために様々なパーティクル基材や官能基ケミストリーを入手しやすくなっています。

本アプリケーションノートでは、合成混合物、強制劣化反応物、天然物抽出液などの様々な種類のサンプルについて異なるカラム間での選択性の違いを示すことによって、最適なカラム固定相選択の重要性についてご紹介します。複数のカラムケミストリーを用いたサンプルスクリーニングは、カラムマネージャを備えたACQUITY UPLC H-Classシステムを用いて自動化し、化合物の溶出順序の変化はUV および MS 検出によりモニターしました。効果的な分析法を迅速に開発し、さらなる広範囲におよぶ分析法開発や最適化の必要性を最小限にするために、適切なカラムの選択は必要不可欠です。

実験方法

ACQUITY UPLC H-Class 分離条件

移動相: A:0.1%ギ酸水溶液

B:0.1%アセトニトリル溶液

グラジエント: 5分間で2-98%B

1分間ホールド、2%Bで再平衡化

検出: UV@254nm

SOD: ESI+、MSレンジ 100-600amu

ニードル洗浄: アセトニトリル:水=90:10

パージ溶媒: 水:アセトニトリル=10:90

シール洗浄溶媒: メタノール: 水=50:50

流速: 0.8mL/min

カラム温度: 30℃

注入量: 2山

カラム: ACQUITY UPLC, 2.1x50mm,

1.7 - 1.8µm

固定相: BEH C₁₈,

製品番号 186002350

BEH Shield RP18,

製品番号 186002853

CSH C₁₈,

製品番号 186005296

CSH Fluoro-Phenyl,

製品番号 186005351

CSH Phenyl-Hexyl,

製品番号 186005406

HSS Cyano,

製品番号 186005986

HSS PFP,

製品番号 186005965

HSS T3,

製品番号 186003538

データ管理

Empower 3 CDS

サンプル調製

Nadolol および 3,4-dihydroxy phenylacetic acid: 合成反応製品を代表するサンプルは、各化合物 10mg をアセチル化して調製しました。化合物はピリジンとジクロロメタンに溶解し、無水酢酸を加えて、40°に加熱して1時間攪拌して反応を行いました。サンプルはロータリーエバポレーターにより濃縮し、アセトニトリルに再溶解しました。

Ziprasidone 塩基分解: Ziprasidone はメタノールに溶解して 1mg/mL に調製します。 0.1Nの NaOH を添加して、80℃に加熱して 2 時間反応を行いました。反応は 0.1N HCl により中和しました。

Ashwagandha root: 1200mg の Ashwagandha root (Withania somnifera) はメタノール 2mL を用いて室温で一晩攪拌して抽出しました。 抽出液は 12,000 rpm で 10 分間 遠心分離して微粒子を除去しました。

結果および考察

分析法開発プロセスの早い段階で適切なカラムを選択することは、最適な分離を実現するために必要不可欠です。分離を汎用カラムケミストリー(おそらくラボで手持ちのカラム)で開発すると分離が最適ではなく、結果として更なる分析法の開発のために不必要に時間がかかる可能性があります。代わりに、最適な分離を得られるカラムを迅速に見つけるために何種類かのカラム固定相でスクリーニングを行うことで、その後の更なる分析法開発を最小限に抑える、または行う必要をなくすることができます。分離選択性の違いを最大限にするため、ウォーターズカラム選択性チャート(www.waters.com/selectivitychart)を用いると固定相の特徴が大きく異なるカラムを選択できます。様々なカラムを用いたスクリーニングは、カラムマネージャーと Empower 3 ソフトウェアを備えた ACQUITY UPLC H-Class システムにより自動化して効率化できます。

カラム間の選択性の違いを評価するために、様々なサンプルを調製しました。 分析法開発においてpHはピーク形状や選択性に大きく影響しますが、カラム 固定相のみを変更した影響をきちんとモニターするために、ここでは低pH分析 条件でのみ比較を行いました。サンプルが非常に複雑であるため、各サンプル の全てのピークについて化合物の同定は行いませんでしたが、代わりに主要な ピークの基準ピーク質量を用いて選択性の変更をモニターしました。

強制分解サンプル

パーティクル基材および結合相ケミストリーの分離への影響を評価するために、多くの異なるカラムケミストリーで Ziprasidone の塩基分解サンプルを分析しました(図 1)。カラムケミストリーの違いによって本サンプルの溶出順序および保持に顕著な違いが見られました。 ACQUITY UPLC BEH (エチレン架橋型ハイブリッド) C_{18} カラムは UPLC でよく用いられる非常に頑健なカラムです。 このケースでも、BEH C_{18} カラムで十分な分離は得られていますが、ピーク 1 と 2 についてはベースライン分離できていません。 CSH C_{18} カラムは同じ官能基ですが、クロマトグラムは全く異なる溶出順序を示し、全てのピーク間における分離度が向上しています。 この違いは CSH パーティクルの表面にチャージを結合させているということにのみよるものです。

HSS (ハイストレングスシリカ) Cyano カラムは BEH C₁₈ カラムと比べて保持は同等ですが分離度が向上しています。一方 HSS PFP での分離では全ての化合物、特に微量成分であるピーク 2 と 3 の保持が向上しました。HSS T3 カラムは HSS パーティクルに C₁₈ 官能基を結合していますが、官能基密度が低いことで BEH C₁₈ と比較した保持の向上は小さく溶出順序も大きく変わらず、ピーク 1 と 2 が共溶出しています。最後の BEH Shield RP18 カラムを用いたクロマトグラフィーでは BEH C₁₈ と比較して溶出順序が変わり、ピーク 2 と 3 がピーク 1 からベースライン分離しています。また、パーティクル基材のシラノール基がシールドされ相互作用が少なくなるため全ての化合物の保持が低減しました。全体として、Ziprasidone 塩基分解サンプルは様々なパーティクル基材および官能基で分析した場合に大きく異なる選択性を示しました。最初に使用するカラムとして BEH C₁₈ または HSS T3 を用いた場合には、全ての化合物を完全に分離するためにさらなる分析法の最適化が必要となります。幅広いカラムを迅速にスクリーニングし、初期の段階で良好な分離度を示すカラムを選択することで、上記したような分析法のさらなる開発の必要性を回避することができます。ここに示す例では、医薬品有効成分ピークからの不純物の分離度を向上しシャープなピークを得るために CSH (Charged-Surface-Hybrid) C₁₈ カラムが最適な選択となります。

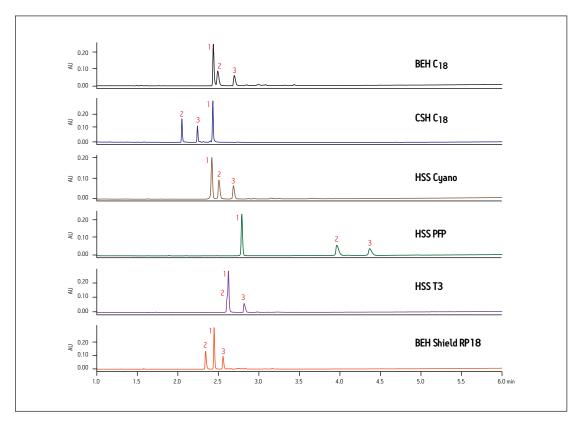


図 様々なカラムにおけるZiprasidone塩基分解サンプルの選択性の違い。番号を表示したピークの質量電荷 比 (m/z): (1) 445 (不純物)、(2) 413 (Ziprasidone API)、(3) 417 (不純物)

合成反応混合物

合成反応混合物には未反応の出発原料、試薬、反応の副産物、目的の化合物などが含まれ、これらを分離する必要があります。目的の化合物または製品の不純物を同定または分離することが重要である状況においては、様々な固定相のカラムにおける分離を適切に評価することが必要不可欠です。選択性の変更により対象とする目的ピークの分離度が向上し、同定や分離をより大きなカラムサイズにスケールアップした際の分取精製が容易になります。3,4-dihydroxy phenylacetic acid のアセチル化反応物の分離は図 2 に示しましたが、CSH C₁₈ カラムでは BEH C₁₈ カラムと比べて保持と溶出順序に違いが見られました。これらの違いは、サンプル中のイオン性化合物に対する CSH パーティクルの表面チャージの影響によるものです。

CSH Fluoro-Phenyl では CSH C_{18} および BEH C_{18} に比べて溶出順序が変更し全体の保持が低減しました。本反応混合物のいくつかの分析種は芳香族性をもつため、CSH Phenyl-Hexyl では分析種と官能基との間の相互作用により溶出順序がシフトし選択性が変わりました。HSS Cyano カラムでは、分析種と短鎖シアノ官能基との間の相互作用により全体として疎水性分析種の保持が低減し、スクリーニングに用いた他のどのカラムとも異なる選択性が得られました。

HSS PFP カラムは CSH Fluoro-Phenyl カラムと同じ Fluoro-Phenyl 官能基ですが、CSH パーティクルの代わりに HSS パーティクルに結合しています。基材パーティクルの特性の違いにより、2 種類のカラムでは溶出順序と 保持が大きく異なります。最後の HSS T3 カラムでは BEH C_{18} カラムと同様の溶出順序ですが、ピーク 5/6 間 とピーク 7/8 間の分離度がそれぞれ向上しています。この例では、BEH C_{18} カラムにより 8 種類の化合物に 対して十分な分離度が得られますが、もし対象とする目的ピークとしてピーク 6 に焦点を当てるとすると、HSS T3 カラムで最良の分離度とピーク形状が得られます。

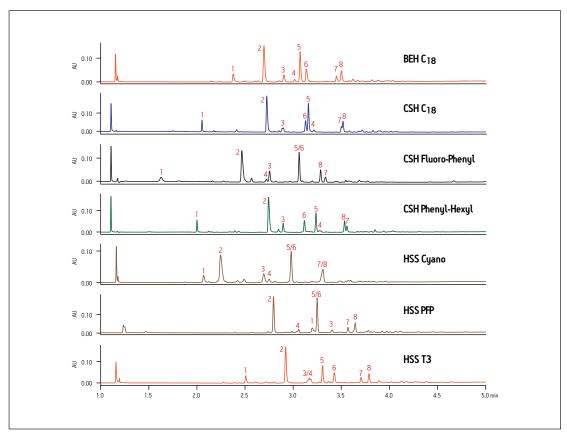
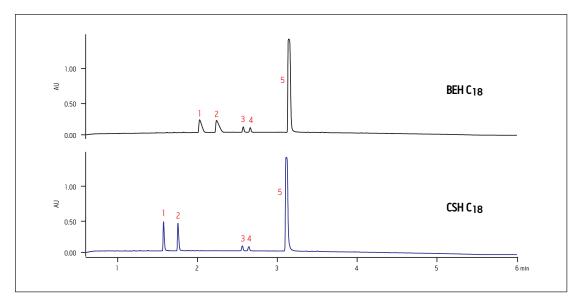


図2 様々なカラムにおける3,4-dihydroxy phenylacetic acidアセチル化反応物の選択性の違い。番号を表示 したピークの質量電荷比 (m/z):(1) 286, (2) 270, (3) 268, (4) 300, (5) 284, (6) 165, (7) 481, (8) 476

カラムを選択する際には、固定相のローディングキャパシティーについても考慮することが重要です。塩基性化合物は高 pH で使用可能な BEH や CSH などのハイブリッドパーティクルカラムを用いて高 pH 条件下で分離した場合に良好なピーク形状とローディングが得られる場合が多く、従来の C_{18} カラムを用いてギ酸などの低イオン強度移動相条件下ではピーク形状が悪化し良好なローディングが得られない傾向にあります 2 。しかしながら CSH カラムではギ酸を用いた低 pH 移動相条件下でも良好なローディングが得られるため、よりシャープなピーク形状で検出感度も向上します。Nadolol のアセチル化物の分析によりローディングの限界を示していますが、ピーク 1 および 2 で示した反応生成物は BEH C_{18} カラムではオーバーロードのピーク形状を示しています(図 3)。一方、CSH 3 カラムではこれらのピークはよりシャープで、ローディングおよび感度が向上します。低 pH でこれら塩基性化合物の感度やピーク形状が大きく改善することで、分析スケールでより迅速な不純物同定が可能となり、分取スケールで目的のピークをより容易に単離できます。



天然物抽出液のスクリーニング

多種類の化合物を含む天然物抽出液をスクリーニングする際は、幅広い選択性のカラムをスクリーニングすることが非常に重要です。抽出液を様々なカラムケミストリーで分析すると大きく選択性が異なり、適切なスクリーニングを行わないと複雑な粗抽出液中の微量成分同定は失敗しやすくなります。図4には、ウォーターズのカラム選択性チャート(www.waters.com/selectivitychart)で選択性の幅が広い4種類の異なるカラムケミストリーを用いて比較したashwagandha root 抽出液のクロマトグラフィープロファイルを示しました。

BEH C₁₈ カラムでは CSH Fluoro-Phenyl、HSS Cyano、HSS PFP カラムに比べて疎水性化合物の保持が向上しました(図 4)。全てのカラムでピーク溶出順序と保持が大きく異なり、特にピーク 2 からピーク 4 の範囲でその傾向が顕著に見られました。CSH Fluoro-Phenyl と HSS PFP カラムではここでも顕著な選択性の違いがみられました。どちらも同じ官能基を採用していますが、基材パーティクルの違いにより選択性が大きく異なり、この 2 種類のカラムはカラムスクリーニングにおいて良好な補完的選択肢となります。この例では、ピーク 7 は BEH C₁₈ カラムではっきりと分離していますが、ピーク 2 の分離同定は HSS Cyano カラムでより容易に実現でき、異なるカラムケミストリーに渡るスクリーニングの有用性を示しています。幅広い選択性のカラムを用いた抽出液の初期スクリーニングにより、対象ピークを分離できる可能性が高くなって質量分析を用いてより正確に化合物を同定できるようになることで複雑な混合物中における微量成分の迅速同定が促進されます。

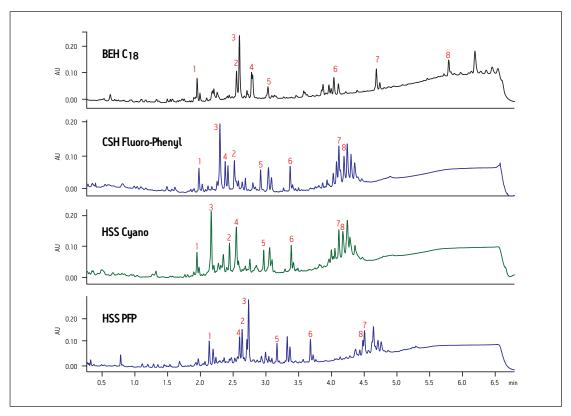


図4 幅広い選択性のカラムを用いたAshwagandha 抽出液スクリーニング。表示ピークの質量電荷比 (m/z): (1) 422, (2) 471, (3) 263, (4) 418, (5) 576, (6) 362, (7) 425, (8) 481

結論

基材パーティクルおよび結合相ケミストリーを考慮した適切なカラム選択は、効果的な分離を得られる分析法 を迅速に開発する上での非常に重要なツールとなります。新規分析法の開発初期において不適当なカラム 選択を行ってしまうと、コストがかかりかつ不必要な二次的最適化実験を行わなければならない可能性が 生じます。カラムテクノロジーの進歩に伴って、最適なクロマトグラフィーを実現するための様々なパーティ クル基材や官能基のカラムの選択肢が増加しています。どのようなマトリックス中からの成分の分離におい ても、幅広いカラムケミストリーを用いたサンプルのスクリーニングを考慮すべきです。様々な化学的特性 のカラムはウォーターズのカラム選択性チャートを用いて容易に選択できます。様々なカラムを用いたサン プルスクリーニングはカラムマネージャおよび Empower 3 ソフトウェアを備えた ACQUITY UPLC H-Class シス テムを用いて自動化できます。これらのツールを用いることで様々なカラムでの迅速スクリーニングを各サ ンプルに対して行うことができ、分離を向上したより迅速で効率的な分析法開発を実現できます。

参考文献

- 1. U.D. Neue, HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997, p.316.
- 2. McCalley, D. V. Anal. Chem. 2006, 78, 2532.



THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters および UPLC、ACQUITY UPLC は Waters Corporationの登録商標です。 Empower、CSH および The Science of What's Possible は Waters Corporationの商標です。 その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。