

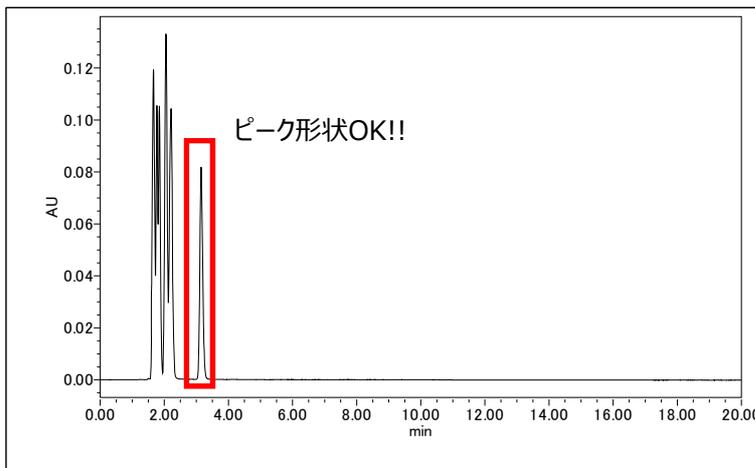
「時間短縮に向けたメソッド開発」

分離の改善を試みるとき、どの条件を変えますか？手軽に変えられる条件といえば、カラムの長さ・組成・温度が挙げられます。しかし、これらで解決できれば苦労はいりませんが多成分で様々な性質を持つ化合物を分析する場合には緩衝液の選択、pHの選択など検討事項が山のように出てきます。このテクニカルレポートは時間短縮を念頭にしたメソッド開発を弊社がどのようにアプローチしているかをご紹介します。今後、ゼロからメソッドを開発するときの参考になればと思います。

1. まずはピークが出るか確認

何はともあれ、ピークが出ないことには先へ進めません。初期の設定としては、有機溶媒/水（もしくは緩衝液）=50/50にて設定しておきます。もし、この設定で分離・形状ともに良好であれば言うことナシですが、とりあえずピークがどのように出るのか確認してみましょう。

分析例：サルファ剤の分析



サルファ剤の分析には検出器にLC/MSを導入するケースがあるため、移動相には0.1%ギ酸を使用しました。50%メタノール条件において、9種類のサルファ剤は分離できていませんが、一番最後のピークを見る限りではピーク形状も良好なので、0.1%ギ酸でも分析が可能と判断できます。もし、この段階でピーク形状が悪い場合には別の移動相を選択するかカラムを変えるなどの検討が必要になります。特に、LC/MSを見据えたメソッドを開発するためには使用できる移動相に限りがあるため早い段階で良好な形状を得られる条件を見つけ出すことが重要です。

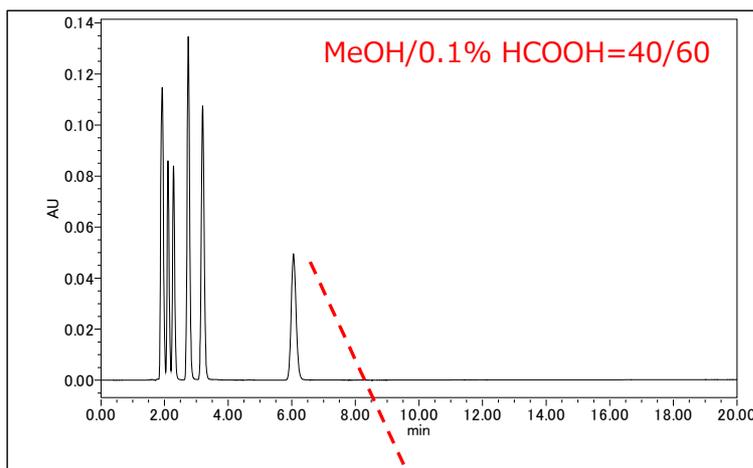
Analytical conditions;
Column: Develosil HSR C18,5um (4.6x150mm)
Mobile phase: Methanol/0.1% HCOOH=50/50
Flow rate: 1.0mL/min
Temperature: 40℃
Sample: Sulfa drugs (9mixture)
Injection volumn: 2.0uL
Detection: UV275nm
System: Waters alliance

•LC/MSで使用できる溶媒
酢酸
ギ酸
酢酸アンモニウム
ギ酸アンモニウム
etc...

これで測定できれば楽!!

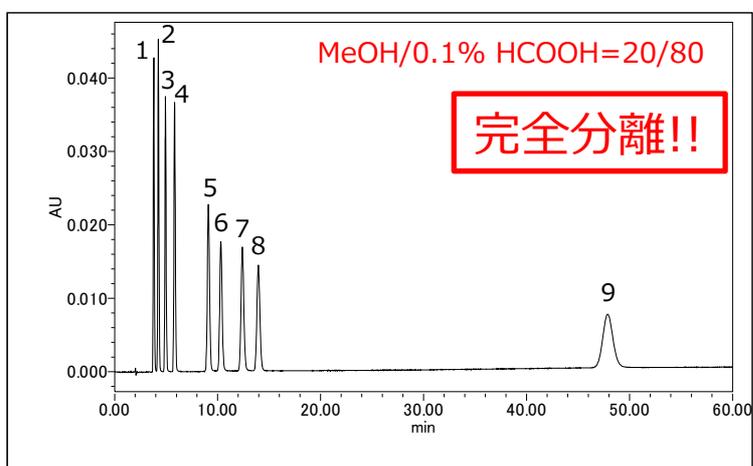
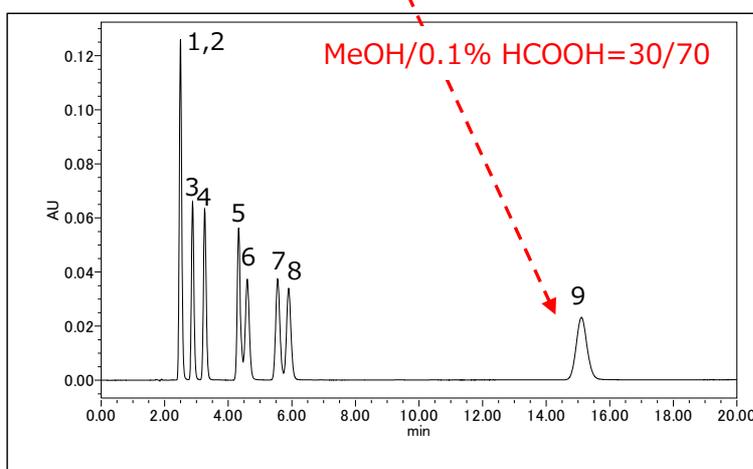
2. 組成を変えて分離させる

1においてピーク形状に問題がなければ分離させていきましょう。ほぼ分離は不完全なので10%間隔で水組成（ここでは0.1%ギ酸）を増やしていきます。グラジエントを使用するかどうかはまだ先の話しで、とりあえずアイソクラティックでどこまでいけるかやってみましょう。



0.1%ギ酸組成を増やすことにより徐々に分離されていくのが分かります。30%MeOH条件においてはまだ重なる部分もありますが、同定ができる状態にあります。

また、最後に溶出するサンプル(9)においてはわずか10%の違いにも関わらず大きな保持を示しています。この時点でグラジエントを用いるのが良さそうですが、全てはアイソクラティックで完全に分離させてからにしましょう。



Sample:

- 1.Sulfadiazine(0.04mg/mL)
- 2.Sulfathiazole(0.05mg/mL)
- 3.Sulfapyridine(0.06mg/mL)
- 4.Sulfamerazine(0.06mg/mL)
- 5.Sulfamethazine(0.06mg/mL)
- 6.Sulfamethoxypyridazine(0.06mg/mL)
- 7.Sulfachloropyridazine(0.05mg/mL)
- 8.Sulfamethoxazole(0.05mg/mL)
- 9.Sulfadimethoxine(0.08mg/mL)

20%MeOHの条件にて9種類のサルファ剤は完全に分離されました。ただ、サンプル(9)においては異様に保持が強いためグラジエントを使用して時間短縮をする必要があります。グラジエント条件を組むのも面倒かもしれませんが、今までの結果より導くことができますので比較的簡単です。

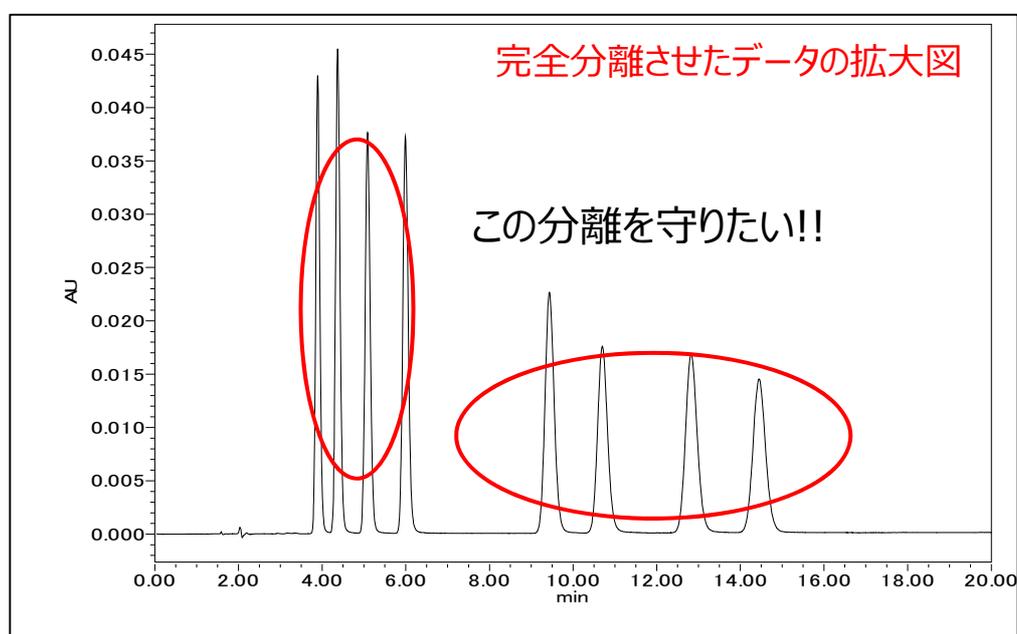
Analytical conditions;
 Column: Develosil HSR C18,5um (4.6x150mm)
 Mobile phase: Methanol/0.1% HCOOH=20/80
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 40°C
 Sample: Sulfa drugs (9mixture)
 Injection volumn: 2.0uL
 Detection: UV275nm
 System: Waters alliance

3. グラジエント溶出

時間短縮は誰もが望む事だと思います。粒子径を更に微細なものに変更し、カラム長さを短くする事も有効ですが、今回のケースのように約50分ほど時間が空いてしまうと短縮といっても大きな感動は生まれません。。。この方法を行う前にグラジエント溶出を行ってから時間短縮を試みてみましょう！

○初期値の設定

グラジエントを設定する際に問題となるのが初期値の設定です。先ほどの完全分離させたデータは20%MeOHが条件になりますが、この条件からスタートさせてしまうと保持が早まり分離が崩れてしまう可能性があります。



そのような時には水組成を10%増やした状態を初期値としてみてください。つまり、**MeOH/0.1% HCOOH=10/90**が初期値となります。

○勾配の設定

初期値が決まったらどこまで何%の勾配をかけるかという設定になります。今回、約15分以降から大きな空時間がありますので15分を目安にしていきます。次に何%まで有機溶媒をあげるかという事になりますが、先ほど取得した有機溶媒組成の変化を参考してみてください。40%MeOHと30%MeOHにおいてサンプル(9)には大きな時間差が生じています。したがって、30%MeOHではせっかくの時間短縮が無意味なものになってしまうためMeOHを40%まで上げる設定にします。その後は、適度な時間まで平衡状態にさせて最後のピークがどこに出るかを確認します。

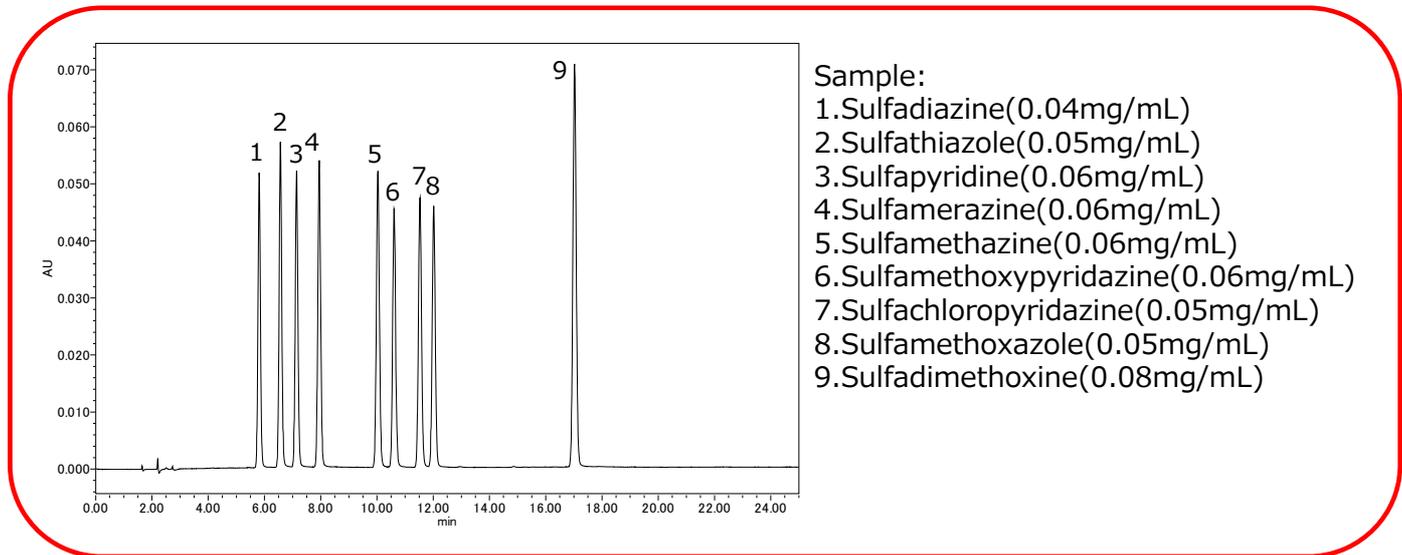
○設定条件の評価と更なる時間短縮
 これまでのグラジエント条件設定をまとめると、

Analytical conditions:
 Column: Develosil HSR C18, 5um(4.6x150mm)
 Mobile phase: A) Water+0.1% HCOOH
 B) Methanol+0.1%HCOOH
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 40℃
 Sample: Sulfa drugs(9mixture)
 Injection volume: 2.0uL
 Detection: UV275nm
 System: Waters alliance

ポイント
 グラジエントの場合、全体の緩衝作用またはイオン抑制を維持させるためにもAとBの両方と同じ緩衝液（添加剤）を入れておきます。

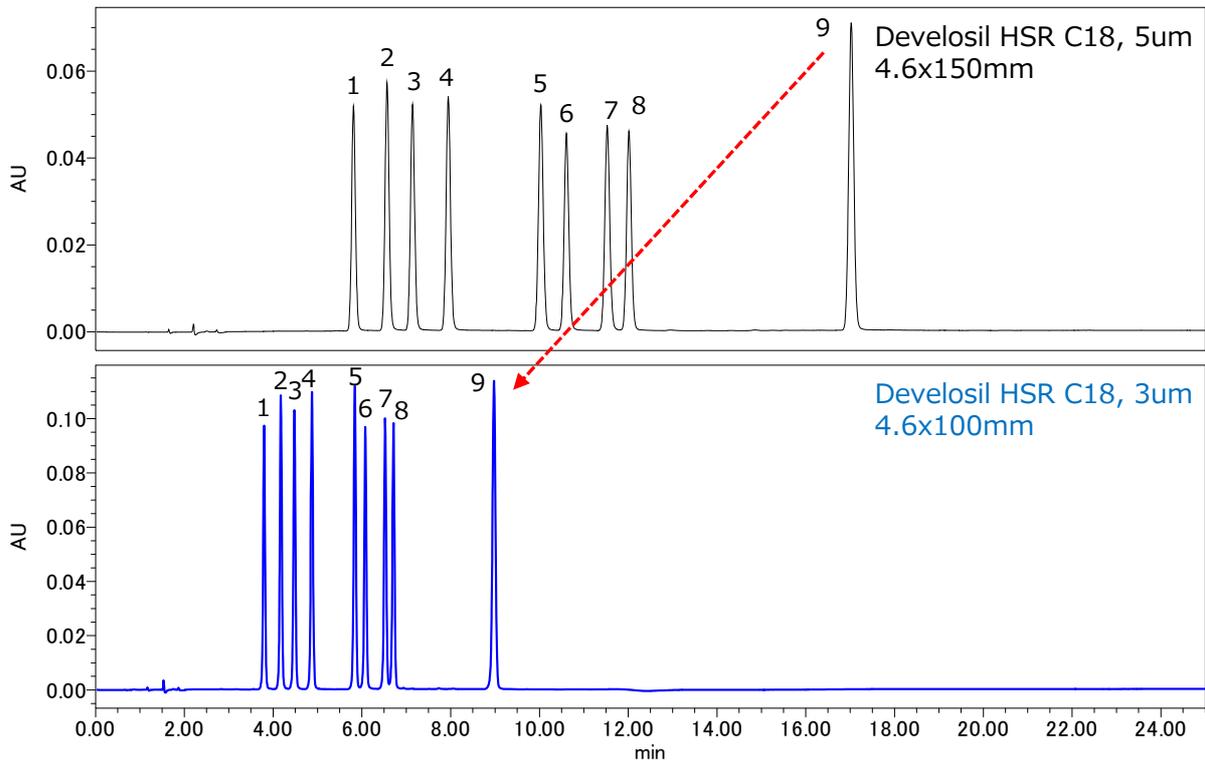
Gradient:	Time(min)	Flow(mL/min)	%A	%B	Curve
	0.0	1.0	90	10	6
	15.0	1.0	60	40	6
	25.0	1.0	60	40	6
	25.1	1.0	90	10	6

という設定になります。一度、この条件にて測定を試みましょう。



いかがでしょうか？分離および時間的にも申し分ない条件だと思われます。この結果にてOKという方もいらっしゃるかもしれませんが、粒子径をさらに小さくしてより時間短縮を試みてみましょう。

3. さらなる時間短縮



Analytical conditions;
 Column: Develosil HSR C18,3um (4.6x100mm)
 Mobile phase: A)Water+0.1% HCOOH
 B)MeOH+0.1% HCOOH
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 40℃
 Sample: Sulfa drugs (9mixture)
 Injection volumn: 2.0uL
 Detection: UV275nm
 System: Waters alliance

Time(min)	Flow(mL/min)	%A	%B	Curve
0.0	1.0	90	10	6
6.0	1.0	60	40	6
10.0	1.0	60	40	6
10.1	1.0	90	10	6

※このグラジエントパターンはメソッド変換ソフトウェアを使用しました。

Sample:
 1.Sulfadiazine(0.04mg/mL)
 2.Sulfathiazole(0.05mg/mL)
 3.Sulfapyridine(0.06mg/mL)
 4.Sulfamerazine(0.06mg/mL)
 5.Sulfamethazine(0.06mg/mL)
 6.Sulfamethoxypridazine(0.06mg/mL)
 7.Sulfachloropyridazine(0.05mg/mL)
 8.Sulfamethoxazole(0.05mg/mL)
 9.Sulfadimethoxine(0.08mg/mL)

粒子径を5um→3umへ変更し、カラム長さを100mmにすることで全てのピークを溶出するのにわずか10分と更なる時間短縮を達成することができました。粒子径の変更に伴うカラムサイズの変更は、
 4.6x150mm 5um→4.6x75mm 3um **時間半分**
 4.6x150mm 5um→4.6x100mm 3um **同分離度**
 を目安にして下さい。今回は時間よりも分離度に注意をする必要があるようでしたら4.6x100mm 3umを選択しました。十分に分離度があるようでしたら4.6x75mm 3umにて大幅な時間短縮を狙うのもありかと思います。

野村化学では目的にあったカラムを選定する「カラム選定サービス」、メソッドを0から弊社で作りに上げる「メソッド開発プラン」をご用意しております。詳しくは下記問い合わせいただくかHPをご覧ください!!



野村化学株式会社

〒489-0004 愛知県瀬戸市日の出町15
 TEL:0561-48-1853 FAX:0561-48-1434

E-mail: info@develosil.net
 Web: www.develosil.net