

通过将具有不同固定相的色谱柱之间的分离选择性差异进行可视化，高效搜索最佳色谱柱

藤崎 真一、周 毅婷

使用者效益

- ◆ Shim-pack Arata™ C18 具有独特的分离选择性，因此有望改善迄今为止难以分离的样品的分离情况。
- ◆ LabSolutions MD 通过绘制设计空间，可将多种色谱柱的分离选择性的差异进行可视化。
- ◆ 通过对多种色谱柱最小分离度的设计空间进行比较，能够高效搜索最佳色谱柱。

前言

在分析方法开发中，色谱柱的选择会对分析物的保留行为造成很大影响。因此，为获得最佳分离，较为理想的方法是对具有不同保留行为的多种色谱柱进行研究。LabSolutions MD 是一款分析方法的开发支持软件，基于分析质量源于设计 (AQbD) 并充分考虑了科学依据和风险，为高效的分析方法开发提供支持。基于 AQbD 的分析方法开发由分析方法的初筛、优化和稳健性评价等阶段组成。本文将介绍通过绘制多个品牌的 C18 色谱柱的设计空间，高效筛选色谱柱的示例。具体而言，针对 6 个品牌的色谱柱，通过整个变化区域内的设计空间，对综合改变流动相和梯度条件等各种参数时的分离选择性差异进行了可视化。由此，明确了可良好分离的区域，并能够以更少的分析次数搜索出最佳的色谱柱。结果表明，与其他 C18 色谱柱相比，Shim-pack Arata C18 具有独特的分离选择性。

分析条件

通过设计空间将 6 个不同品牌的 C18 色谱柱之间的分离选择性差异进行可视化，对分析条件进行评价 (分析条件: 表 1)。为评价色谱柱之间的分离选择性差异，将碱性化合物 (阿米替林)、酸性化合物 (苯甲酸) 和中性化合物 (苯酚) 列为分析对象成分。水相流动相使用 0.1% 甲酸水溶液、有机流动相使用乙腈和甲醇的混合溶液，通过等度洗脱进行分析。将有机流动相中的乙腈比例以 20% 为单位在 30% 到 70% (3 个级别) 的范围内变化、将有机流动相的初始浓度以 5% 为单位在 40% 到 50% (3 个级别) 的范围内变化，通过共 9 (3×3) 次的分析，绘制各色谱柱的分离度设计空间。

表 1 分析条件

System: Nexera™X3(Method Scouting System)	
Compound : Amitriptyline Benzoic acid Phenol	
Mobile Phase: A) 0.1% formic acid in water B) Acetonitrile/Methanol = 30 : 70, 50 : 50, 70 : 30 (3 patterns)	
Column :	
1 : Shim-pack Arata C18	(100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) ¹⁾
2 : Column A (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.8 μm)
3 : Column B (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 2.5 μm)
4 : Column C (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)
5 : Column D (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)
6 : Column E (C18 column)	(100 mm × 3.0 mm I.D., 3 μm)

Analytical Conditions (Isocratic):

B Conc.	: 40, 45, 50% (3 patterns)
Column Temp.	: 40 °C
Flow Rate	: 0.5 mL/min
Injection Vol.	: 1 μL (80 mg/L)
Detection	: 254 nm (SPD-M40, UHPLC cell)

*1 P/N 227-32802-03

通过设计空间对分离度进行可视化

针对 6 个品牌的色谱柱，纵轴取有机流动相的初始浓度、横轴取有机流动相中的乙腈比例，绘制了阿米替林、苯甲酸、苯酚 3 种化合物之间的最小分离度的设计空间 (图 1)。图中的红色区域表示分离度大，蓝色区域表示分离度小。

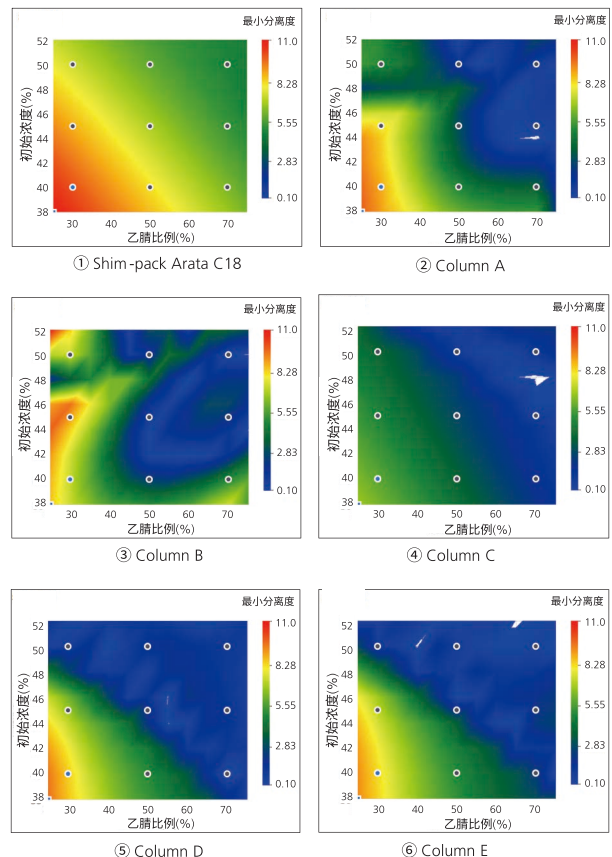


图 1 各色谱柱 (共 6 个品牌) 的最小分离度的设计空间

* 图中黑圈 (共 9 点) 为已进行分析的点

* 图中 (②、④、⑥) 白色区域为分离度低于下限值 (0.1) 的区域

由图可知，与其他品牌的色谱柱相比，①的 Shim-pack Arata C18 的设计空间中分离度较大的区域（红色）更宽，整个设计空间内不存在分离度较小的区域（蓝色）。这表明，针对有机流动相的混合比例和初始浓度等各种参数的整个变化区域，Shim-pack Arata C18 与其他色谱柱相比具有不同的分离选择性，能够提供良好的分离。因此，通过设计空间对色谱柱的分离选择性进行可视化，便能够轻松掌握各色谱柱的分离选择性差异，高效搜索最佳的色谱柱和分析条件。

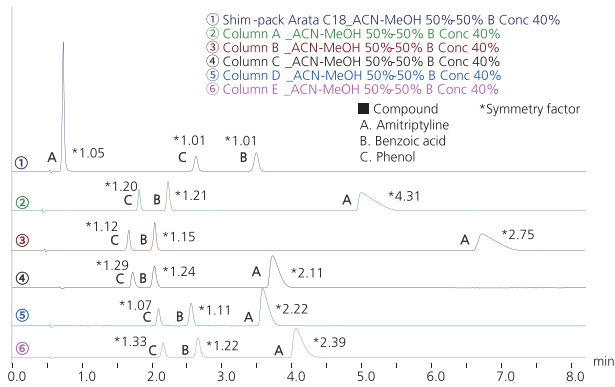


图 2 由各色谱柱制得的色谱图
有机流动相 乙腈/甲醇 = 50 : 50、初始浓度 : 40%

在有机流动相中乙腈比例为 50%、初始浓度为 40% 的条件下制得的色谱图一览如图 2 所示。针对阿米替林（峰 A），Shim-pack Arata C18 具有出色的峰形（对称因子：1.05），而其他色谱柱则观察到因与硅胶填充剂表面的硅烷醇基相互作用而导致的峰对称性变差（对称因子：2.11~4.31）。此外，针对苯甲酸（峰 B）和苯酚（峰 C），Shim-pack Arata C18 也表现出与其他色谱柱同等或更佳的峰对称性。还探明了 Shim-pack Arata C18 具有碱性化合物洗脱较快、酸性化合物洗脱较慢的特性，与其他色谱柱相比具有不同的分离选择性。由于 Shim-pack Arata C18 具有这种独特的分离选择性，因此即使增加有机流动相的乙腈比例并缩短分析时间，也能保持良好的分离（图 3）。

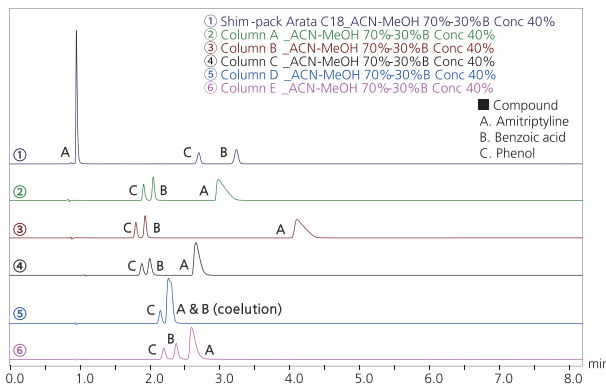


图 3 由各色谱柱制得的色谱图
有机流动相乙腈/甲醇 = 70 : 30、初始浓度 : 40%

有机流动相中乙腈比例为 70%、初始浓度为 40% 时的色谱图如图 3 所示。与图 2 相比，在②~⑥的色谱柱中，苯甲酸（峰 B）和苯酚（峰 C）的分离因乙腈比例的增加而恶化，而 Shim-pack Arata C18 保持了良好的分离。因此，与其他 C18 色谱柱相比，Shim-pack Arata C18 有望利用其对碱性化合物的优秀峰形和独特的分离选择性来改善分离。

提高最佳分析条件的搜索效率

LabSolutions MD 通过重叠设计空间来提高最佳分析条件的搜索效率。作为示例之一，将各色谱柱最小分离度 ≥ 6 ，且与阿米替林最为接近的峰之间的分离度 ≥ 18 的情况视为标准，满足该条件的区域如图 4 所示。在①的 Shim-pack Arata C18 中，图中蓝线内的区域表示最小分离度 < 6 ，红线内表示阿米替林的分离度 < 18 的区域，除此以外的区域（黑色影线）为满足标准的条件区域。已知在 6 种品牌的色谱柱中，具有独特分离选择性的 Shim-pack Arata C18，满足上述标准的区域最大。因此，通过重叠设计空间，能够简单快速地针对多个峰搜索满足所设置任意分离度标准的条件区域。

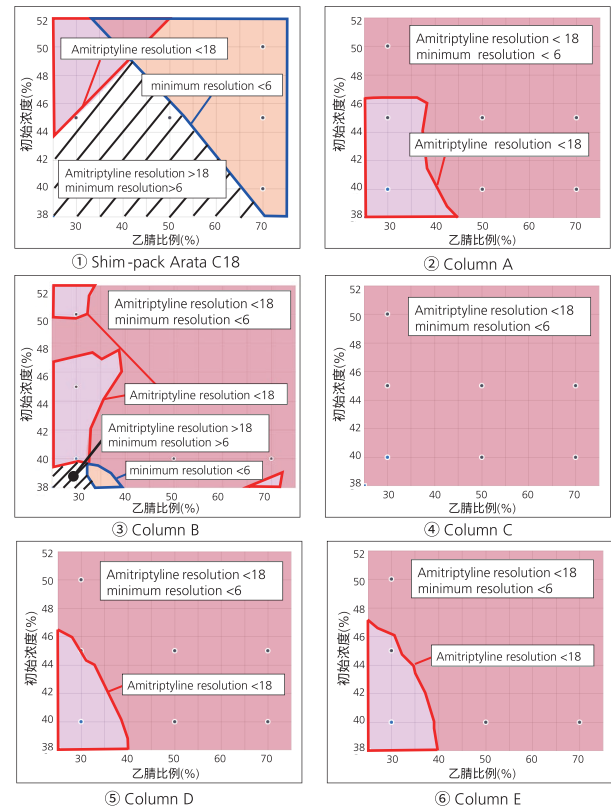


图 4 重叠最小分离度 < 6 和阿米替林分离度 < 18 的区域的设计空间

总结

LabSolutions MD 通过对多种色谱柱描绘设计空间，对色谱柱之间的分离选择性差异进行可视化并进行比较，能够高效搜索最佳的色谱柱和分析条件，而无需依赖直觉和经验。

* 本文在撰写时还参考了浅川直树先生（原卫材株式会社）的意见。

岛津应用云

