

低 pH および高 pH における Agilent Poroshell HPH C18 の安定性

アプリケーションノート

著者

William Long
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

HPLC カラムの安定性は、メソッドの成功の決め手となる重要な要素の 1 つです。逆相 LC 分析プロトコルの開発中およびこのプロトコル検証に先立って、分析担当者は通常さまざまな問題を考えます。最も重要な問題は、特定の分析条件下でカラムをどのくらいの期間使用できるかです。シリカには逆相 HPLC カラムのサポートとしての多くの優れた特性があります。しかし、移動相が pH 7~8 以上になるとシリカの溶解度は大幅に高まります。Rockland Technologies での高 pH に対するシリカ HPLC カラムの安定性の実験では、いくつかの重要な所見が得られました。エンドキャップ処理によりシリカの溶解を防止でき、高密結合相によりカラムの安定性が向上し、ほぼ同じ高 pH では有機移動相緩衝液の方がリン酸緩衝液よりもカラム寿命を大幅に延ばすことができることが示されました。各実験から、pH 9~10 での結合相のパッキングの劣化は主にシリカサポートの溶解によるもので、共有結合しているシロキサン加水分解が主な原因となって生じるものではないことが分かりました。原理上、逆相カラムの化学的安定性と熱安定性は基質と結合相の向上と開発によって強化することができます [1-4]。

分析対象物が酸性、中性、塩基性のいずれであっても、逆相メソッドの開発は低 pH 移動相から始めることが一般的に推奨されています。これらのガイドラインの従うのには複数の正当な理由があります。低 pH では、酸性分析対象物は中性化合物となり良好に保持されます。パッキングのシリカ表面の残存シラノールがプロトン化されます。この結果、酸性および塩基性の分析対象物とシリカ表面との間で二次的な相互作用が減少します。残念なことに、塩基性化合物は低 pH で正電荷を運ぶため、保持力が低くなることが多く、これらの条件下ではピーク形状が悪化します。低 pH を使用するもう 1 つの理由は、高 pH でシリカカラムの安定性が悪いからです。



Agilent Technologies

以前に報告されているように、シリカ HPLC カラムで高 pH での安定性を達成するには、2つの方法があります。安定性を高めるための1つの方法は、Agilent ZORBAX Extend C18 カラムのように、特殊な結合の採用です [3]。ZORBAX Extend C18 は、高 pH でのシリカの溶解を防ぐために二座型結合相を使用しています。高 pH での安定性を実現するもう1つの方法は、シリカ自体を修飾し、溶解しにくくする方法です。この方法を用いて、2.7 μm および現在の 4 μm Poroshell 粒子は有機修飾され、高 pH で侵食されにくくなっています。

今回の実験では、アセトニトリルによるグラジエント分析を使用し、一般的な低 pH 移動相 (0.1% TFA) と高 pH 移動相 (10 mM の炭酸水素アンモニウム pH 10) を用いて Agilent Poroshell HPH C18 の寿命を評価しました。

機材とメソッド

次の製品で構成される Agilent 1290 Infinity システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ、最大 1,200 bar での送液に対応 (G4220A)、溶媒バイパスバルブのシールを PEEK シールに変更 (ロータシール PEEK FL p/n 5068-0171)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (TCC) (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A) の PEEK ロータシール付き (5068-0170 ロータシール PEEK FL)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4220A)、10 mm 光路長、1 μL フローセル搭載
- Agilent OpenLAB バージョン C.01.05、HPLC のコントロールとデータ処理用
- Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 \times 50 mm、4 μm (p/n 699770-702)

サンプルは、キニン、ノルトリプチリン、アミトリプチリン、ヘキサノフェノン、アセトフェノン、4-クロロケイ皮酸、2-ヒドロキシ-5-メトキシベンズアルデヒドそれぞれが、50:50 の水/アセトニトリルに 1 mg/mL で含まれるように調整されました。0.1% のトリフルオロ酢酸 (TFA) および炭酸水素アンモニウム緩衝液などのラボでよく使用される移動相を使用しました。緩衝液の作成にあたっては、炭酸水素アンモニウムを水に溶解させて 10 mM 溶液を作成し、濃縮した塩基 (水酸化アンモニウム) を使用して目的の pH になるように調整しました。緩衝液の作成に使用した二塩基性リン酸ナトリウムと塩基性リン酸ナトリウムは Sigma-Aldrich Corp から購入しました。アセトニトリルは Burdick and Jackson 製で Honeywell から購入し、水は Millipore 18 MW でした。

UV 検出器は 254 nm、80 Hz で動作させました。

結果と考察

安定性テストは、低 pH 移動相 (0.1% TFA) と高 pH 移動相 (10 mM 炭酸水素アンモニウム、pH 10) を用いて実行しました。

0.1% TFA での安定性

最初の実験で、新品のカラムに 2,000 回注入しました。キニン、フェノール、ノルトリプチリン、アセトフェノン、4-クロロケイ皮酸、ヘキサノフェノンを含むサンプルが 4 分ごとに注入されました。サンプルには、困難なサンプルによくある代表的なタイプの酸、塩基、中性化合物が含まれていました。TFA 0.1% はよく使用されるクロマトグラフィー用移動相 (pH 2 以下) です。実験を通してピークはすべて同じ溶出量で維持されていたことが分かります。つまり、Poroshell HPH-C18 カラムは安定しており低 pH でのルーチン分析に有用であることが示されました (図 1)。ピークの形状もこの実験を通して良好に維持されていました。このメソッドの分析時間は 1 注入あたり約 7 分で、約 10 日の期間とアセトニトリルおよび水性移動相がそれぞれ約 5 L 必要です。

10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 10 での安定性

2つ目の実験には、10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 10 を使用しました (図 2)。これは標準シリカ HPLC カラムで通常使用されず、ハイブリッドカラムでよく使用される移動相です。この移動相は、良好な緩衝能を備え pH を制御することができ、緩衝液は揮発性があるため MS 検出が可能になります。グリシンおよびホウ酸塩などの緩衝液よりも炭酸塩緩衝液によってシリカカラムが損傷することが報告されています [5]。0.1% TFA テストで使用したのと同じカラムを高 pH で寿命テストサンプルとして使用しました。2つのテストでの大きな相違は溶出順序でした。図 3 に示すように移動相の pH を変えると分析対象物の溶出順序が変わり、選択性に顕著な変化がありました。

この実験では、炭酸水素アンモニウムおよびアセトニトリルを pH10 で用いたグラジエントメソッドにより、Poroshell HPH-C18 カラムを検証しました。図 2 に示すように、2000 回の注入全体を通して、ノルトリプチリンを除くすべての化合物のリテンションタイムが安定しました。他メーカーのカラムでも、ノルトリプチリンでピークシフトが低下する類似の結果が以前に報告されています [6]。

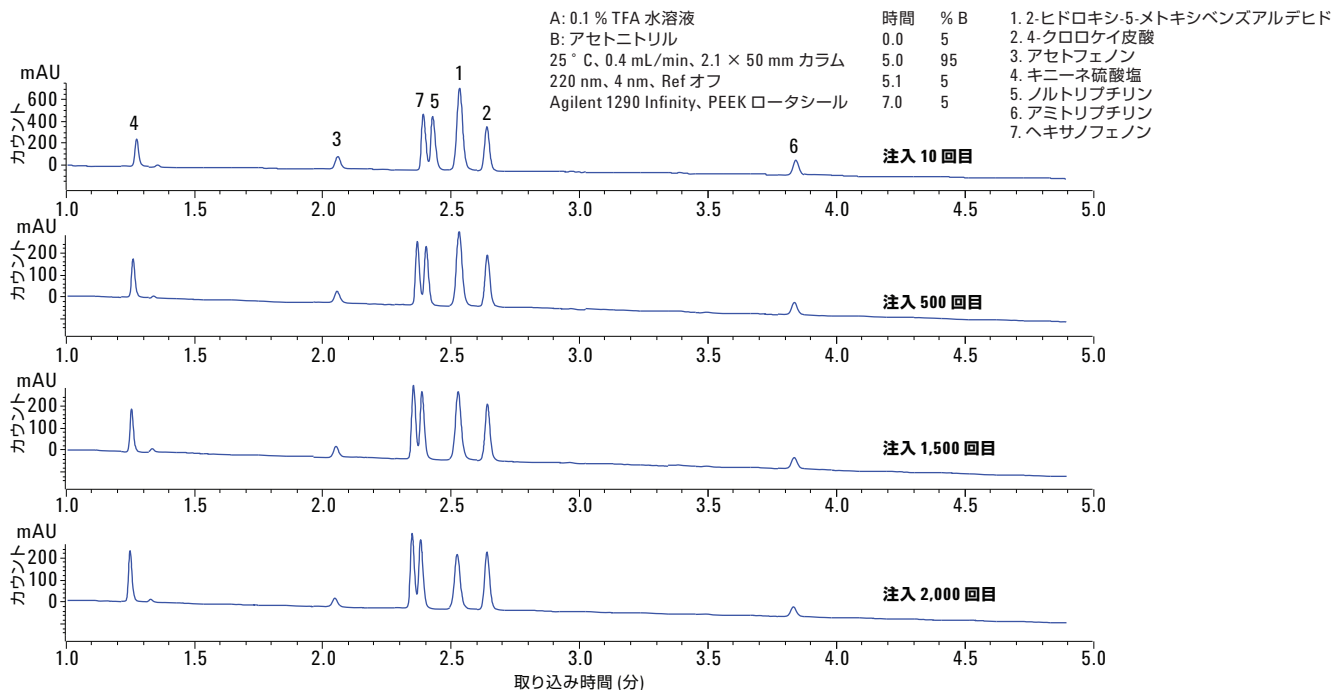


図 1. よく使用される酸性移動相 0.1 % TFA の 2,000 回注入での Agilent Poroshell HPH C18 の寿命

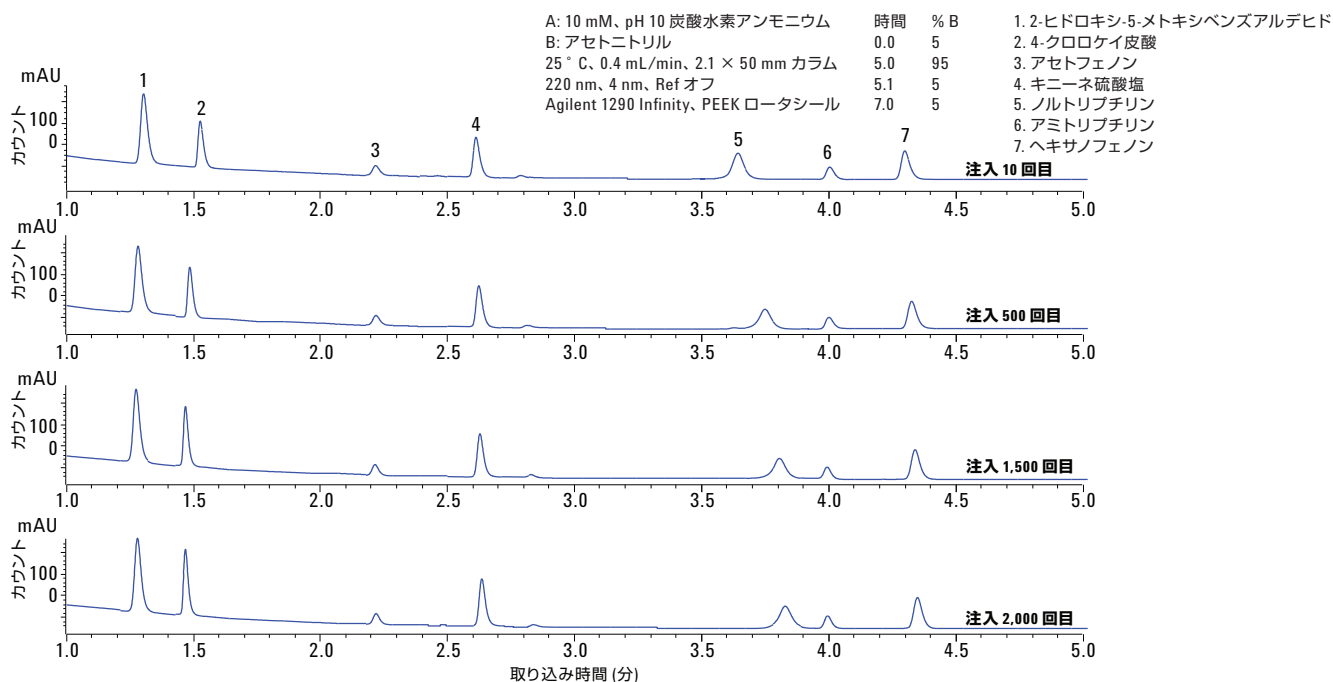


図 2. 塩基性移動相 10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 10 の 2,000 回注入での Agilent Poroshell HPH C18 の寿命

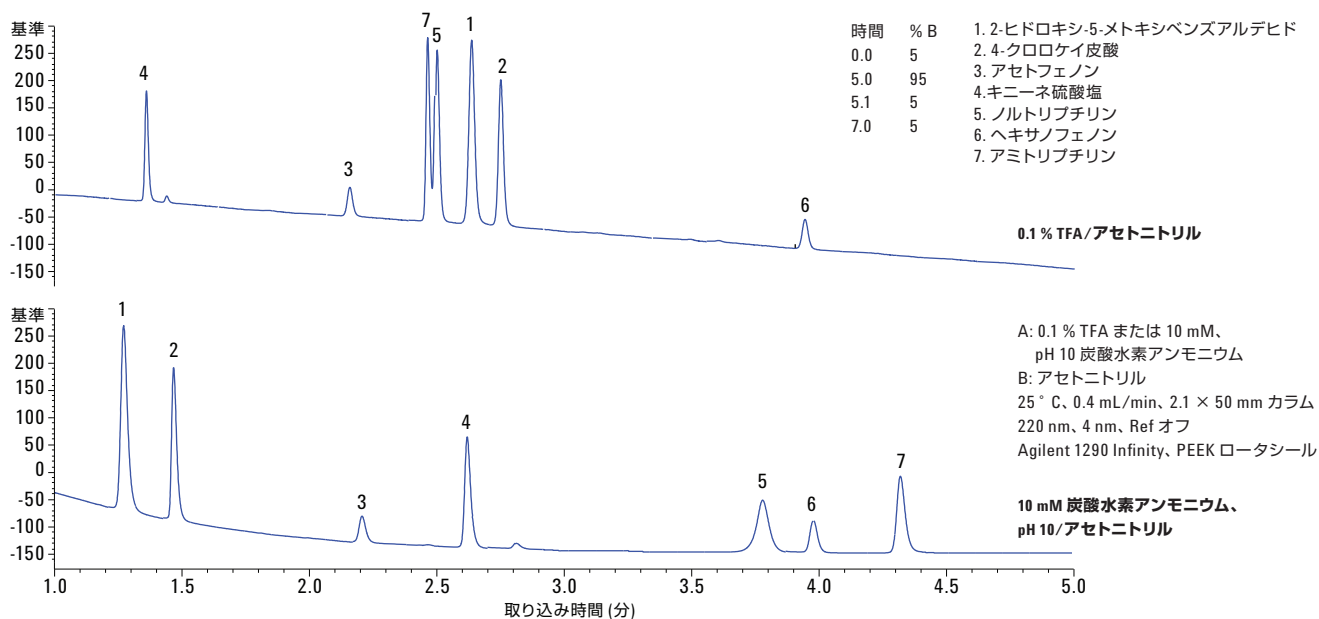


図 3. Agilent Poroshell HPH C18 は、0.1 % TFA の低 pH でも 10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 10 の高 pH でも使用でき、さまざまな選択性を実現できます。

結論

炭酸水素アンモニウムなどの高 pH 移動相緩衝液により従来のシリカ HPLC カラムは劣化する場合がありますが、Agilent Poroshell HPH-C18 カラムはこの移動相でも優れた性能を示します。また、TFA も加水分解により結合相を除去することで HPLC カラムを劣化させる可能性があります。このカラム技術により、分析者はハイブリッド粒子と表面多孔質粒子の機能を組み合わせて利用することができます。Poroshell HPH 粒子は、表面多孔質粒子の高効率かつ低背圧な高性能を併せ持つため、他の Poroshell 120 相でも使用されています。Poroshell HPH カラムは表面多孔質粒子の利点を維持するだけでなく、高 pH 移動相条件下で化学的安定性を提供します。

参考文献

1. J. J. Kirkland; J. W. Henderson; J. J. DeStefano; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, 762, 97-112.
2. J. J. Kirkland; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **1995**, 691, 3-19. □
3. J. J. Kirkland; J. B. Adams Jr.; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4344-4352.
4. C. Ye; G. Terfloth; Y. Li, A. Kord. A systematic stability evaluation of analytical RP-HPLC columns. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2009**, 50, 426-431.
5. H. A. Claessens; M. A. van Straten; J. J. Kirkland. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **1996**, 728, 259-270.
6. W. J. Long. *Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH Stable Poroshell HPH chemistries*; Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5022EN, **2014**.

詳細

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

©Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan

December 15, 2015 5991-6525JAJP



Agilent Technologies