



芳香族酸の分析の改善: 1.9 μm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムによる 時間、溶媒、サンプル、コストの大幅な削減

アプリケーションノート

農業、食品検査、低分子医薬品

著者

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

概要

6種類の芳香族酸を、ギ酸とアセトニトリルのグラジエントを用いて分析しました。この分離で4種類のカラムの性能を評価しました。最初の分析を4.6 × 250 mm、5 μm の Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 全多孔質粒子カラムで実施し、1.9 μm 、2.7 μm 、4 μm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 表面多孔質粒子カラム (2.1 × 50 mm のフォーマット) による分析と比較しました。すべてのカラムの選択性は類似しているため、カラム間の比較によるメソッド開発は不要でした。すべてのカラムで芳香族酸の分離に成功し、その最小分離能は1.8でした。5 μm の長いカラムと比べて、1.9 μm の短い InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムの最小分解能は高く (2.9 vs 2.4)、速度は12倍でした。また移動相の使用量を96%、サンプルの使用量を75%削減できました。メソッドを修正すると、1.9 μm の InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムによるこれら6種類の芳香族酸の分解速度はさらに向上し、0.35分で完全に分解できました。最小分解能は2.3で、最初の分析と比べて速度が103倍に向上しました。



Agilent Technologies

はじめに

表面多孔質粒子 LC カラムは、液体クロマトグラフィーでよく使用されるツールです。表面多孔質粒子カラムは、全多孔質粒子カラムの同等製品¹と比べて低圧で高効率を実現できます。これは主に、カラム内での物質移動距離が短く、粒子径の実質的な分布幅が狭いためです²。表面多孔質粒子の現在の傾向は、さらに効率を高めるために粒子サイズが小さくなっています。効率が高まれば分解能や感度が向上するため分析速度が上がり結果の改善につながります。

アジレントの LC カラムファミリでは、メソッドの移管やスケラビリティが簡単にできるようにこれまで大変な労力を費やしてきました。Agilent ZORBAX 全多孔質粒子カラムと Agilent InfinityLab Poroshell 表面多孔質粒子カラムの固定相ケミストリは似ているため、メソッドを追加で開発しなくても簡単に更新できます³。

この実験によって、従来の 5 µm による分析と比べ、芳香族酸の分離を改善できるのは Poroshell 粒子のサイズであることがわかります。Poroshell カラムを使えば、時間、溶媒、サンプル、コストを大幅に節約できます。

分析条件

この実験では、Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。システムの標準構成を変更して、システムボリュームと分散を減らしました。表 1 は、この実験で使用した構成の詳細と 4 種類の Agilent LC カラムを示しています。

表 2 は、すべての分析の LC メソッドパラメータを示しています。1.9 µm による高速分析を除き、カラム容量に応じてすべてのメソッドを幾何学的にスケリングして、カラム間のクロマトグラフィーによる分離を維持しました。

表 1. UHPLC システム構成

Agilent 1290 Infinity LC システム構成	
Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)	35 µL 溶媒ミキサー : Agilent Jet Weaver、35 µL/100 µL (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A)	シートアセンブリ、超低分散、Agilent 1290 Infinity オートサンプラ用 (G4226-87030) ヒーターのオートサンプラ: キャピラリー、ステンレス、0.075 × 220 mm、SV/SLV (5067-4784) バイアル、スクリュートップ、茶色 (ラベル付)、認定済み、2 mL、100 個 (5182-0716) ふた、ネジ、青色、PTFE/赤色のシリコンセパタム、100 個 (5182-0717) バイアルインサート、250 µL、ガラス (樹脂足付)、100 個 (5181-1270)
Agilent 1290 Infinity サーマスタット付カラムコンパートメント (G1316C)	熱交換器、低分散、1.6 µL、ダブル (G1316-60005) ヒーター - カラム間: InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、105 mm、0.075 mm (5067-5961) カラム - フローセル間: キャピラリー、ステンレス、0.075 × 220 mm、SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)	Agilent 超低分散 Max-Light カートリッジフローセル、10 mm (G4212-60038)
Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition、リビジョン C.01.05 [35]	G4220A: B.06.53 [0013] G4226A: A.06.50 [003] G1316C: A.06.53 [002] G4212A: B.06.53 [0013]
Agilent LC カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 250 mm、5 µm (959990-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、1.9 µm (699675-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、2.7 µm (699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、4 µm (699770-902)

表 2. UHPLC メソッドパラメータ

カラム	移動相	流量 (mL/min)	グラジエント	注入量 (µL)	サンプル	カラムコンパートメント (°C)	ダイオードアレイ検出器
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 250 mm、5 µm	A) 0.2 % ギ酸水溶液 B) アセトニトリル	1.0	8 ~ 35 %B 36 分	20	プロトカテク、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、4-アミノ安息香酸 (PABA)、パニコリン酸、シリンジ酸、サリチル酸の 0.01 mg/mL 水溶液	25	280 nm、80 Hz
Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、1.9 µm		0.5	8 ~ 35 %B 3 分	5			
Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、2.7 µm					化合物は溶出順序で表示。構造については図 1 を参照。		
Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、4 µm							
Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、1.9 µm (高速)		2.2	8 ~ 26 %B 0.3 分			60	280 nm、160 Hz

この実験では、6種類の芳香族酸を分析しました。これらの構造式は図1のとおりです。これらの各化合物とギ酸の移動相調整剤は、Sigma-Aldrich製です。アセトニトリルはHoneywell (Burdick and Jackson)製のものです。用いた水はMilli-Qシステム (Millipore) の0.2 μmろ過水18 MWです。

結果と考察

最初に6種類の芳香族酸を、4.6 × 250 mm、5 μmのZORBAX Eclipse Plus C18全多孔質粒子カラムで分離しました。この分離にかかった時間は、最小分解能2.4で36分でした。図2は、2.1 × 50 mm、1.9 μmのInfinityLab Poroshell 120 EC-C18表面多孔質粒子カラムに移管した同じLCメソッドを示しています。ZORBAX Eclipse Plus C18とPoroshell 120 EC-C18では、全体的に相関性の高い結合相を有しています。このため、メソッドの変更が不要です。ただしカラム寸法が異なるため、小さいカラム容量に合わせてグラジエント、流量、注入量を幾何学的にスケールアップします。また、1.9 μmのPoroshellカラムでは流量を増やし、この小さい粒子に最適な流量で分析します。この結果、クロマトグラムの速度が12倍向上し、移動相使用量を96%、サンプル注入量を75%削減できます。最小分解能2.9は維持されます。

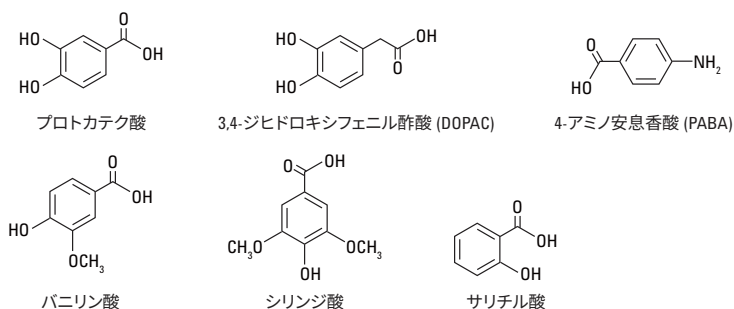


図1. 対象化合物

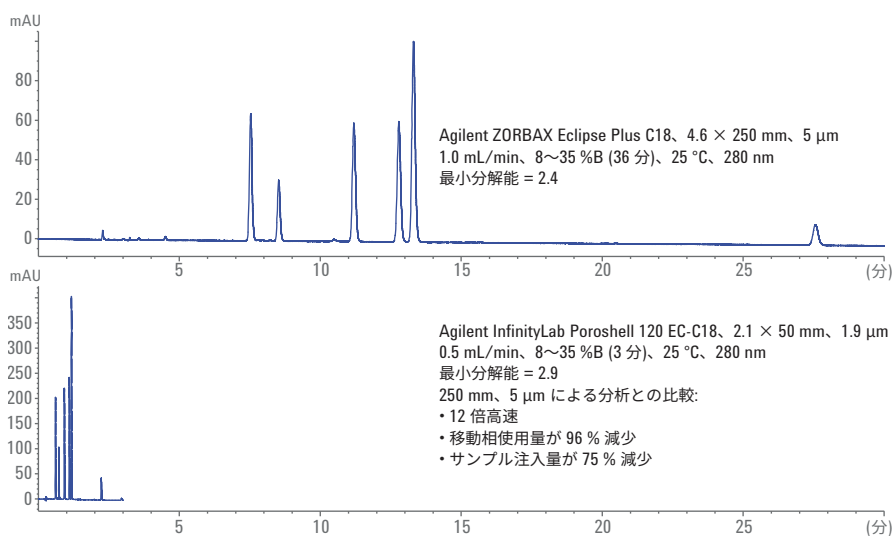


図2. 250 mm、5 μmのAgilent ZORBAXによる芳香族酸の分析は、50 mm、1.9 μmのAgilent InfinityLab Poroshell高性能カラムに移管することで改善できます。最小分解能を上げ、時間、サンプル、溶媒、コストを節約できます。

1.9 μm の Poroshell による分析で生成される圧力は 472 bar です。機器の圧力の仕様によっては、この圧力で使用できない可能性があります。Agilent Poroshell 120 ファミリーには、3 種類の粒子サイズオプション(1.9、2.7、4 μm)があります。これらの異なる粒子サイズで、同じ結合相を使用して簡単にメソッドを移管できます。図 3 では、この芳香族酸の分離を使用する 3 種類の粒子サイズの選択性がすべて同じであることを示しています。すべてのメソッドパラメータも同じです。粒子サイズが大きくなると圧力は減少します。ただし、粒子サイズが大きくなると分解能とピークキャパシティが低下します。このような場合は、ニーズに最適なカラムを選択する必要があります。カラムが既存の機器の使用圧力によって制限されるのか、可能な限り高い分解能を求めているのかなどを考慮します。

小さい表面多孔質粒子を使用する利点は、高効率と分解能です。LC システムの圧力上限に問題がなければ、この高性能を利用した超高速分析が可能です。図 4 では、1.9 μm の Poroshell カラムの上限値に達しています。高温によって移動相の粘度を下げ、流量を 2.2 mL/min まで増やして、圧力は 1,150 bar でした。また、この芳香族酸のサンプルを用いてこのカラムで分離できる最高速度を実現するために、以前のメソッドからグラジエントを少し調整しました。この結果、6 種類の化合物をすべて最小分解能 2.3、0.35 分で分離できました。250 mm、5 μm の Eclipse Plus メソッドと比較すると、この分析方法では最小限の分解能を維持しながら、速度を 103 倍に上げ、移動相の使用量を 98 % 削減できます。

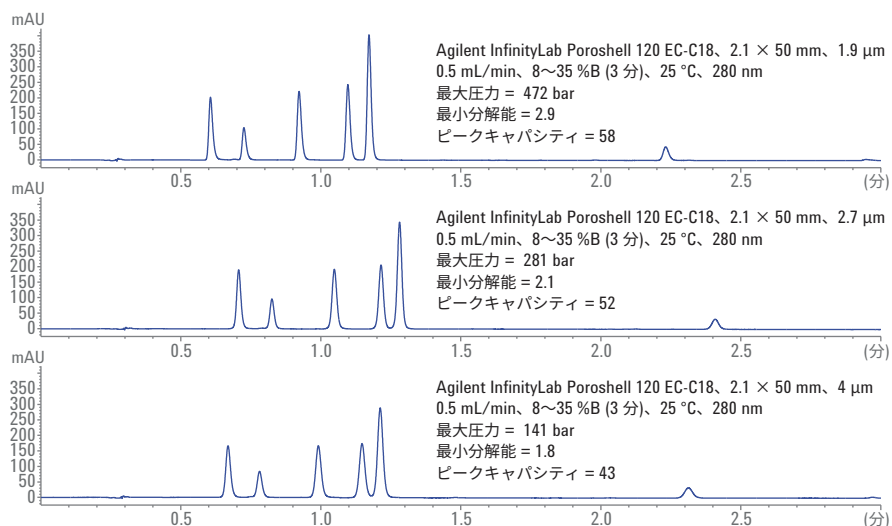


図 3. Agilent InfinityLab Poroshell の粒子サイズ間では選択性が類似しているため、機器の圧力上限やメソッドの性能要件に基づいてカラム構成を選択できます。追加のメソッドを開発する必要はありません。

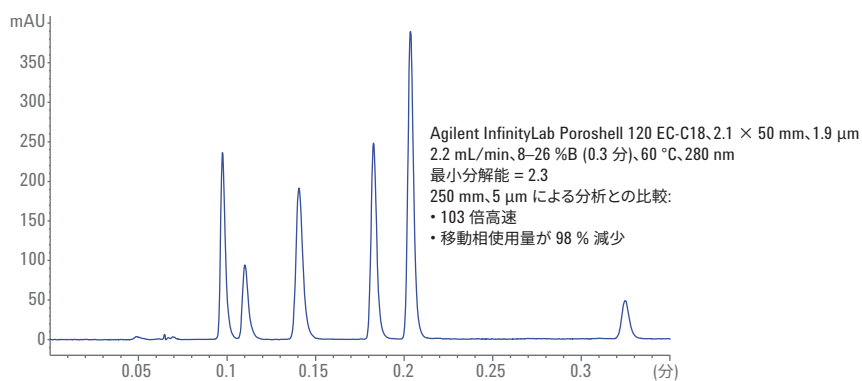


図 4. 50 mm、1.9 μm の Agilent InfinityLab Poroshell 高性能カラムを、メソッド性能を低下させずに圧力上限に近い条件で使用すると、時間、溶媒、コストをさらに削減できます。

表 3 は、すべてのクロマトグラフィーの結果の概要と比較を示しています。

表 3. 各種 LC カラムによる芳香族酸の分析の比較

カラム	圧力 (bar)	最小分解能	ピーク キャパシティ (nC)	分析時間 (分)	移動相の使用量 (mL)
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 4.6 × 250 mm、5 μm	193	2.4	88	36	5 μm による最初の分析 36 5 μm による最初の分析
Agilent Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 50 mm、1.9 μm	472	2.9	58	3.0	5 μm による最初の分析と 比べて 12 倍高速 1.5 5 μm による最初の分析と比べて、 移動相の使用量が 96 % 減少
Agilent Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 50 mm、2.7 μm	281	2.1	52		
Agilent Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 50 mm、4 μm	141	1.8	43		
Agilent Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 50 mm、1.9 μm (超高速)	1150	2.3	37	0.35	5 μm による最初の分析と 比べて 103 倍高速 0.77 5 μm による最初の分析と比べて、 移動相の使用量が 98 % 減少

結論

効率の高い 1.9 μm の InfinityLab Poroshell 120 カラムを使用すると、5 μm の ZORBAX Eclipse Plus C18 などの従来のカラムを使った既存のメソッドを改善できます。Poroshell ファミリーと ZORBAX ファミリーは結合相ケミストリーが似ているため、多くの場合に追加のメソッド開発なしでメソッドを簡単に移管できます。1.9 μm の粒子で生成される圧力が LC システムの上限と比べて高過ぎる場合は、同じ選択性を持つ Poroshell 120 の 2.7 μm および 4 μm の粒子も使用できます。ただし、LC システムの圧力上限に問題がない場合は、1.9 μm の Poroshell カラムを使用して超高速分離を実行すれば、従来の LC カラムと比べて時間、溶媒、サンプル、コストを大幅に節約できます。

参考文献

1. Gratzfield-Huguen, A.; Naegele, E. Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 Columns, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5602EN, **2016**.
2. Meyer, V. R. In *Practical High Performance Liquid Chromatography*. Fourth Edition, Wiley: 2004; p. 34.
3. Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-6588EN, **2011**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, November 1, 2016

5991-7518JAJP



Agilent Technologies