

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 1.9 μm カラムによる超高速分離

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.

概要

2.1 \times 50 mm、1.9 μm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムにより、10 種類の化合物を 0.3 分、最小分離度 2.2 でベースライン分離できました。InfinityLab Poroshell カラムでは、同じ分析を Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 \times 250 mm、5 μm カラムで実施した場合と比べ、分析スピードが 120 倍向上し、移動相を 98 % 節約することができました。また、両カラムの選択性はほぼ同じであるため、メソッド変換が容易です。



Agilent Technologies

はじめに

液体クロマトグラフィーには、表面多孔質粒子の LC カラムが広く使用されています。表面多孔質粒子のカラムでは、それに相当する全多孔質粒子のカラムに比べ、より低圧で高い分析効率が得られます [1]。これは主に、物質移動距離がより短く、カラムに充填されている粒子の粒子サイズ分布がきわめて狭いためです [2]。現在、表面多孔質粒子は、効率をさらに高めるため小粒子化が進んでいます。カラムの効率が高いほど、分析を高速化できるだけでなく、分解能と感度が向上し、より信頼性の高い結果が得られます。

アジレントの LC カラムファミリには、メソッド変換を容易にし、スケーラビリティを確保するために数々の改善が重ねられてきました。全多孔質粒子の Agilent ZORBAX カラムと表面多孔質粒子の Agilent InfinityLab Poroshell カラムは、固定相自体にほとんど違いがないため、メソッドを容易に更新できます。新たにメソッドを開発しなおす必要はありません [3]。

今回の調査では、粒子径の小さい Poroshell カラムを使用することで、従来型の 5 μm カラムと比較して、アルキルフェノン類の分離効率をどの程度高めることができるかを調べました。その結果、InfinityLab Poroshell カラムでは、時間、溶媒、サンプル、およびコストを大幅に節約できることが実証されました。

実験方法

今回の調査には、Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。システムボリュームと分散を抑えるため、標準構成のシステムに変更を加えました。表 1 に、システム構成の詳細と、調査に使用した 2 種類の Agilent LC カラムを示します。

表 2 に、すべての分析に用いた LC メソッドパラメータを示します。カラム間のクロマトグラフィー分離条件を一定にするために、1.9 μm カラムによる高速分析を除き、すべてのメソッドをカラムボリュームに応じて幾何学的にスケールアップしました。

今回の調査では、10 種類の化合物を分析しました。9 種類のアルキルフェノン類は、アジレントから標準溶液として購入しました。また、チオ尿素を Sigma-Aldrich 社から購入し、標準溶液に加えてポイドボリュームマーカーとして使用しました。アセトニトリルは Honeywell 社 (Burdick and Jackson) から購入しました。水は、Milli-Q システム (Millipore 社) で生成された、0.2 μm フィルタでろ過した 18 MW のものを使用しました。

表 1. UHPLC システムの構成

Agilent 1290 Infinity LC システムの構成

Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)	35 μL 溶媒ミキサー : Jet Weaver、35 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)	シートアセンブリ、超低分散、Agilent 1290 Infinity オートサンブラ用 (G4226-87030) オートサンブラからヒーター : キャピラリ、ステンレス製、0.075 \times 220 mm、SV/SLV (5067-4784) 茶色のスクリュートップバイアル、ラベル付き、認定済み、2 mL、100 個 (5182-0716) 青のスクリュキャップ、PTFE/赤色シリコンセパタム、100 個 (5182-0717) バイアルインサート、250 μL 、ガラス製、樹脂製の脚付き、100 個 (5181-1270)
Agilent 1290 Infinity 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) ヒーターからカラム: InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、105 mm、0.075 mm (5067-5961) カラムからフローセル: キャピラリ、ステンレス製、0.075 \times 220 mm、SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)	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 \times 250 mm、5 μm (959990-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 \times 50 mm、1.9 μm (699675-902)

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 (μ L)	サンプル	カラム コンパートメント ($^{\circ}$ C)	ダイオード アレイ検出器
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 4.6 \times 250 mm、5 μ m	A) 水 B) アセトニトリル	1.0	36 分で 35 ~ 95 %B	20	p/n 5188-6529 (約 1 mL) + 0.1 mL の 1 mg/mL チオ尿素	25	254 nm、80 Hz
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 \times 50 mm、1.9 μ m		0.5	3 分で 35 ~ 95 %B	1			254 nm、80 Hz
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 \times 50 mm、1.9 μ m (高速)		2.3	0.3 分で 50 ~ 100 %B	1		60	254 nm、160 Hz

結果と考察

基準として、10 種類の化合物を全多孔質粒子の Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 \times 250 mm、5 μ m カラムにより分離しました。この分離にかかった時間は 36 分、最小分離度は 6.1 でした。結果のクロマトグラムを図 1 に示します。図 1 には、同じ LC メソッドを表面多孔質粒子の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 \times 50 mm、1.9 μ m カラム用に変換して分析した結果も示されています。ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムの結合相は非常によく似ており、全

体的な選択性に高い相関性があるため、メソッドの変更は不要でした。ただし、カラム寸法が異なることから、より小さいカラムボリュームに合わせてグラジエント、流量、および注入量を幾何学的にスケールアップしました。また、InfinityLab Poroshell 1.9 μ m カラムでは、この粒子径に最適な流量で分析するために、流量を上げました。その結果、分析スピードが 12 倍向上し、移動相消費量は 96 %、サンプル量は 95 % 減少しましたが、最小分離度 5.5 という良好な性能が維持されました。

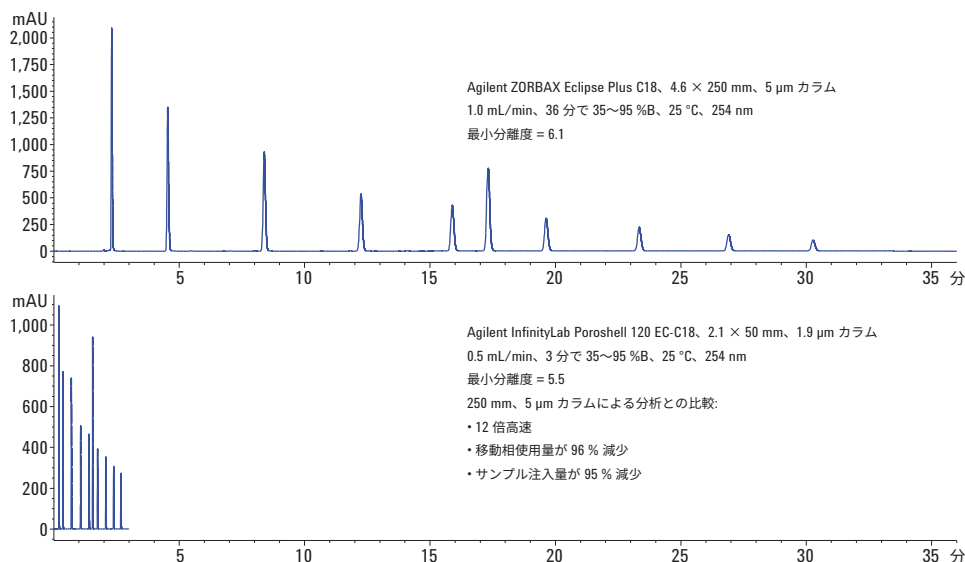


図 1. アルキルフェノン類の分析メソッドを Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 \times 250 mm、5 μ m カラムから高性能の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 \times 50 mm、1.9 μ m カラムへ変換することにより、時間、サンプル、溶媒、およびコストを大幅に節約することができます。

粒子径の小さい表面多孔質粒子の利点は、非常に高い分析効率と分解能が得られることです。LC システムの圧力上限以下であれば、この優れた性能を利用して超高速分析を行うことができます。図 2 に、InfinityLab Poroshell 1.9 μm カラムの圧力上限で分析した結果を示します。その際、移動相の粘度を低減するために高温にしました。これにより、流量を 2.3 mL/min まで上げ、圧力を 1,150 bar に抑えることができました。また、10 種類の化合物を含むサンプルの分離時間を最大限に短縮するために、カラムの比較時に用いたメソッドのグラジエントをわずかに調整しました。その結果、10 種類すべての化合物を 0.3 分、最小分離度 2.2 で分離する

ことができました。Eclipse Plus 250 mm、5 μm カラムを用いたメソッドでの分析結果と比較すると、分析スピードが 120 倍向上し、移動相消費量は 98 % 減少しましたが、良好な最小分解能が維持されました。

表 3 に、すべてのクロマトグラフィー結果の比較をまとめます。

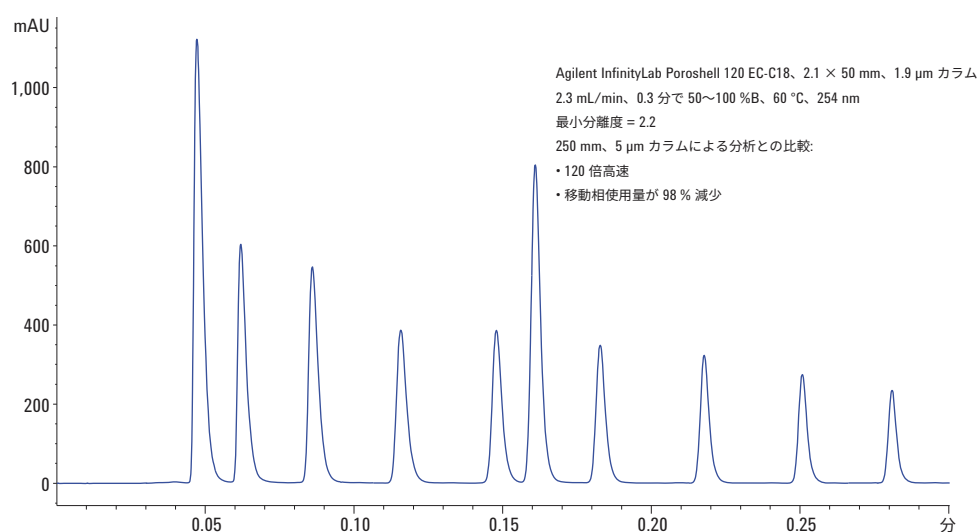


図 2. 高性能の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 \times 50 mm、1.9 μm カラムを用い、カラムの上限圧力に近い圧力で分析することにより、メソッドの分析性能を損なうことなく時間、溶媒、およびコストをさらに節約することができます。

表 3. 2 種類の LC カラムによるアルキルフェノン類の分析結果の比較

カラム	圧力 (bar)	最小分離度	条件付き		移動相消費量 (mL)		
			ピークキャパシティ (nC)	分析時間 (分)			
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 4.6 \times 250 mm、5.0 μm	181	6.1	134	36	基準となる 5 μm での 分析	36	基準となる 5 μm での分析
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 \times 50 mm、1.9 μm	420	5.5	91	3.0	基準となる 5 μm での 分析より 12 倍高速	1.5	基準となる 5 μm での分析より 移動相消費量が 96 % 減少
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 \times 50 mm、1.9 μm (超高速)	1150	2.2	43	0.3	基準となる 5 μm での 分析より 120 倍高速	0.69	基準となる 5 μm での分析より 移動相消費量が 98 % 減少

結論

分離効率に優れた Agilent InfinityLab Poroshell 120、1.9 μm カラムを使用することで、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、5 μm カラムなど従来型カラムを用いた既存のメソッドを改善することができます。InfinityLab Poroshell カラムと ZORBAX カラムは同様の結合相を持つため、メソッド変換が容易で、新たにメソッドを開発しなおす必要はほとんどありません。また、LC システムの圧力上限以下であれば、InfinityLab Poroshell 1.9 μm カラムにより超高速分離を実現できます。このメソッドでは、従来の LC カラムと比べ、時間、溶媒、サンプル、およびコストを大幅に節約することが可能です。

参考文献

1. A. Gratzfield-Huguen, E. Naegel. 「Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムによる効率の最大化」、アジレントテクノロジーアプリケーションノート、資料番号 5990-5602JAJP, **2016**.
2. V. R. Meyer. Practical High Performance Liquid Chromatography. Fourth Edition, p. 34. Wiley (2004).
3. 「Poroshell 120 EC-C18 カラムと ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム間でのメソッド変換」、アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、資料番号 5990-6588JAJP, **2011**.

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。
アジレント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。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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おりません。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 2, 2016

5991-7540JAJP



Agilent Technologies