

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムでの水溶性ビタミンの分析

著者

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムを用いて、8 種類の水溶性ビタミンを 4 分でベースライン分離しました。カラムの形状は 2.1 × 100 mm で、2.7 μm の表面多孔質粒子です。Agilent 1290 Infinity LC での分離には、酢酸アンモニウムとアセトニトリルグラジエントを使用しました。

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。これらのカラムは全多孔質粒子カラムの同等製品と比べて、低圧で高効率です¹。これは主に、表面多孔質粒子カラムのほうが物質移動距離が短く、カラム内の粒子サイズ分布が実質的に狭いためです。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を得られます。

従来、表面多孔質粒子は主に逆相分離に使用されてきました。表面多孔質粒子技術の進化に伴い、その他のケミストリおよびクロマトグラフィー技術用のアプリケーション、例えば親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) なども使用できるようになっています。HILIC は、逆相モードでの保持および分離が難しい場合がある極性対象化合物の分析に最適です。このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.7 μm カラムの UHPLC 性能と、8 種類の水溶性ビタミンのベースライン分離機能について説明します。図 1 にこれらの化合物を示します。

分析方法

この研究には、低分散設定の Agilent 1290 Infinity LC を使用しました。表 1 に詳細を示します。表 2 に使用したクロマトグラフィーメソッドを示します。すべての化合物は個別の標準として注入しました。使用した濃度とサンプル溶媒は表 3 のとおりです。

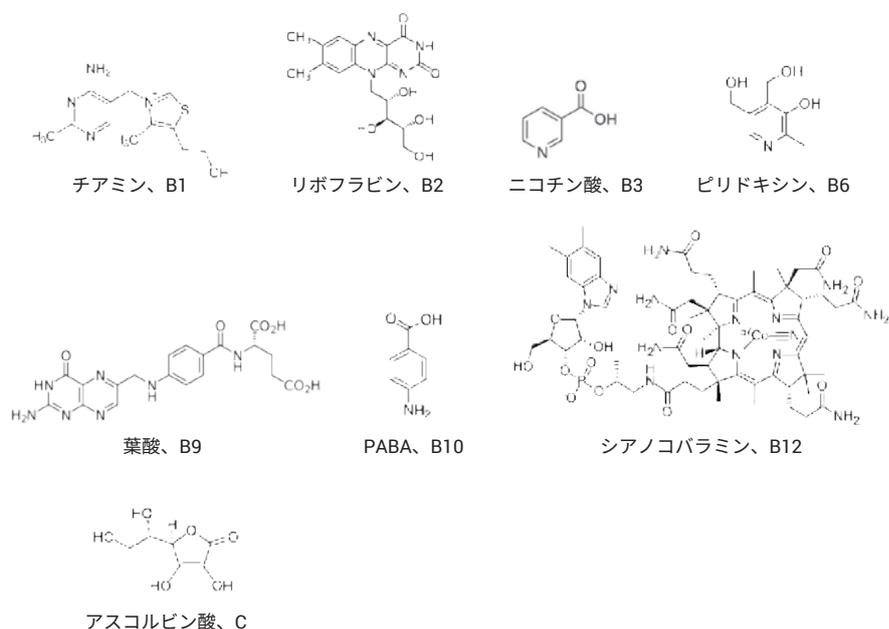


図 1. 水溶性ビタミン

表 1. Agilent 1290 Infinity LC システムの構成

パラメータ	設定値
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 オートサンブラ G4226A	<ul style="list-style-type: none"> シートアセンブリ、超低分散、Agilent 1290 Infinity オートサンブラ G4226A 用 (G4226-87030) オートサンブラとヒーター : 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、2 mL、100 個 (5182-0716) キャップ、スクリュュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム、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 サーモスタット付 カラムコンパートメント G1316C	<ul style="list-style-type: none"> 熱交換器、低分散、1.6 μL、ダブル (G1316-60005) ヒーターとカラム: Agilent InfinityLab クイックコネクアセンブリ、105 mm、0.075 mm (5067-5961) カラムとフローセル: 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)	超低分散 Agilent 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]	<ul style="list-style-type: none"> 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 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 μm (685775-601)

表 2. LC メソッドパラメータ

カラム	移動相	流量 (mL/min)	移動相の組成	注入量 (μL)	カラムコンパートメント (°C)	ダイオードアレイ検出器
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 μm	A) 100 mM 酢酸アンモニウム + 0.5 % 酢酸 B) アセトニトリル	0.5	87 %B で 0.5 分間、87 ~ 50 %B で 3.5 分間、3 分間の再平衡化	1.0 サンプル情報については表 2 を参照	40	260 nm、80 Hz

この研究で分析する 8 種類のビタミンは、Sigma-Aldrich から個別の粉末として購入しました。酢酸アンモニウムと酢酸は Sigma-Aldrich から購入しました。アセトニトリルは Honeywell (Burdick and Jackson) から購入しました。水は、Milli-Q システム (Millipore) で生成された、0.2 μm フィルタでろ過した 18 分子量のものを使用しました。

結果と考察

8 種類のビタミン化合物を Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムでベースライン分離しました。図 2 にクロマトグラムを示します。分離時間は 4 分で、ビタミン B2 および B10 の重要な化合物ペアの間の最小分解能は 2.7 でした。

2.7 μm の InfinityLab Poroshell 120 粒子では、アジレントのその他の HILIC 相 (HILIC-Z や HILIC など) を使用できます。これらのビタミン化合物の分離には、これらの相も検討しました。ただし図 3 のとおり、InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 ほど高い性能は出ませんでした。Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムは 8 種類の化合物すべてで優れたピーク形状を示しましたが、これらのメソッド条件ではビタミン B1 および B3 が分離されませんでした。Poroshell 120 HILIC カラムは直行型選択性に優れていますが、ビタミン B9 および C についてはピーク形状が良好ではありません。

表 3. サンプル前処理

水溶性ビタミン (B、C)	濃度 (mg/mL)	サンプル溶媒
チアミン (B1)	0.4	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)
リボフラビン (B2)	0.1	CH ₃ CN/DMSO (9:1)
ナイアシン/ニコチン酸 (B3)	0.4	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)
ピリドキシン/ピリドキソール (B6)	0.4	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)
葉酸塩/葉酸 (B9)	0.4	CH ₃ CN/DMSO (9:1)
4-アミノ安息香酸/PABA (B10)	0.2	CH ₃ CN/H ₂ O (95:5)
シアノコバラミン (B12)	0.4	H ₂ O
アスコルビン酸 (C)	0.2	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)

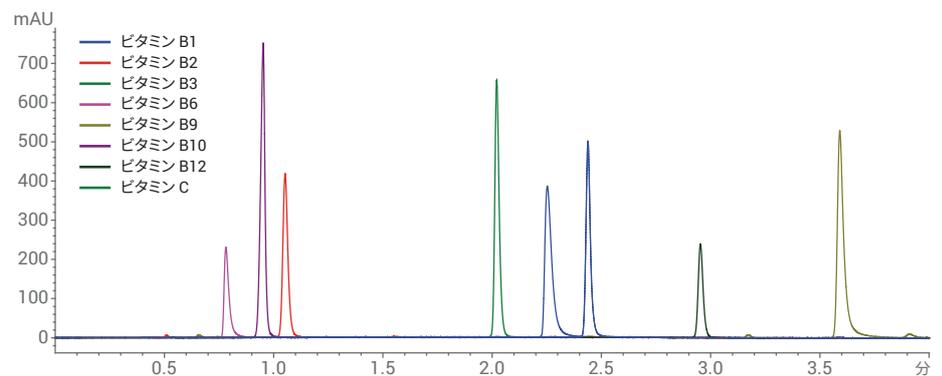


図 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムでの水溶性ビタミンの分離

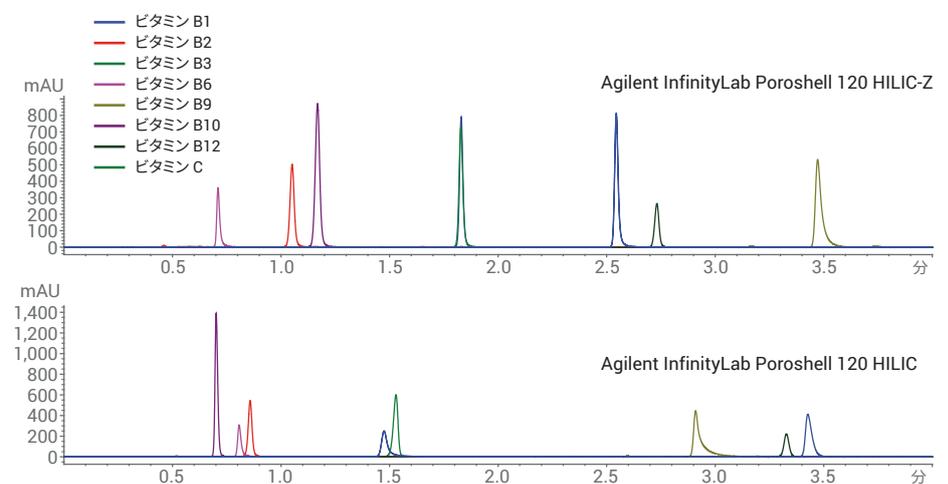


図 3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 の代替相での水溶性ビタミンの分離

結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムは、水溶性ビタミンの分離に最適です。このカラムは、すべての化合物で優れた分解能とピーク形状を示します。この分離では、他の HILIC 化学形態相でも評価しましたが他の相での分解能は適切ではなく、最適な分離条件を評価するには、さらにメソッド開発が必要です。

参考文献

1. Gratzfield-Huguen, A.; Naegel, E. Maximizing efficiency using Agilent InfinityLab Poroshell 120 Columns, Agilent Technologies Application Note, publication number 5990-5602EN, **2016**.

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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, November 29, 2017

5991-8780JAJP