

粒子サイズ 2.7 μm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl カラムによる有機酸 11 種の分離

著者

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl (2.1 \times 150 mm、2.7 μm) カラムを使用してリン酸緩衝液とアセトニトリルのグラジエントにより 11 種類の有機酸を分析した結果を紹介します。構造類似性の高い 11 種類の化合物を最小分離度 1.5 という良好な分離能で 3 分以内に分離することができました。

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。表面多孔質粒子カラムは、それに相当する全多孔質粒子カラムよりも低い圧力でより高い分離効率を発揮します¹。質量移動距離が短いこと、またカラムに充填されている粒子の粒子サイズ分布が大幅に狭いことが、この性能の大きな要因となっています²。表面多孔質粒子カラムで一般的に使用されている粒子サイズは 2.5～3 μm です。より粒子サイズが大きく、

カラム長の長い InfinityLab Poroshell 120 を使用することで、UHPLC の優れた効率を活かしながら、圧力上限を超えることなく容易に分離能を最大化することができます。

今回の実験では、粒子サイズ 2.7 μm の長い (150 mm) InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl カラムについて、その UHPLC 性能と、関連性の高い化合物 11 種に対する分離能を評価しました。

実験方法

今回の実験には、Agilent 1290 Infinity II LC を使用し、システムボリュームと分散を抑えるために標準構成のシステムに改良を加えました。表 1 に構成の詳細を示します。カラムには、表 1 に示す 3 種類の Agilent LC カラムを使用しました。表 2 は LC メソッドパラメータを示しています。

表 1. システム構成

Agilent 1290 Infinity II LC システムの構成	
Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104A)	デガッサ
	シールウォッシュポンプ
	35 μL 溶媒ミキサー : Agilent Jet Weaver, 35 μL/100 μL (p/n G4220-60006)
	ファームウェア: B.07.23 [0009]
Agilent 1290 Infinity II バイアルサンプル (G7129B)	サンプルサーモスタット (p/n G7167-60101)
	計量パラメータ: シートアセンブリ PEEK 0.12 mm, サンプルループ 20 μL, 分析ヘッド 20 μL
	オートサンプルラ & ヒーター : キャピラリ, ステンレス製, 0.12 × 105 mm, SL/SL (p/n 5500-1238)
	バイアル, スクリュートップ, 茶色, ラベル付き, 認定, 2 mL, 100 個 (p/n 5182-0716)
	キャップ, スクリュー, 青, PTFE/赤シリコンセプタム, 100 個 (p/n 5182-0717)
	バイアルインサート, 250 μL, ガラス製, 樹脂足付き, 100 個 (p/n 5181-1270)
ファームウェア: D.07.23 [0009]	
Agilent InfinityLab LC シリズー一体型カラムコンパートメント (G7130A)	内蔵タイプ: G7129B
	3.0 μL 熱交換器
	ヒーター & カラム: InfinityLab クイックコネクタアセンブリ, 105 mm, 0.075 mm (p/n 5067-5961)
	カラム & フローセル: キャピラリ, ステンレス製, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (p/n 5067-4784)
ファームウェア: B.07.23 [0009]	
Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)	超低分散 Max-Light カートリッジフローセル, 10 mm, 0.60 μL (p/n G4212-60038)
	UV ランプ (p/n 5190-0917)
	ファームウェア: D.07.23 [0009]
Agilent LC カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (p/n 693775-912)
	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (p/n 693775-408)
	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-Aq, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (p/n 683775-914)

表 2. 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)	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 InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm	A) 水 B) アセトニトリル C) n/a D) 200 mM リン酸ナトリウム + 1% リン酸 (85%), pH 約 2	0.4	グラジエント 3分でBを0%から30%に増加、分析中はDを10%に維持、4分で再平衡化	0.1	それぞれ 0.4～3 mg/mL の水溶液 正確な濃度については、表 3 を参照 分子構造については、図 1 を参照	28	210 nm, 80 Hz

今回の実験で分析した 11 種類の有機酸は、Sigma-Aldrich 社 (米国ミズーリー州セントルイス) から購入しました。図 1 に、その分子構造を示します。また、表 3 に、それぞれの分析濃度を示します。リン酸ナトリウムおよびリン酸も Sigma-Aldrich 社から購入しました。アセトニトリルは、Honeywell 社 (Burdick and Jackson、米国ミシガン州マスキーゴン) から購入しました。水は、Milli-Q システム (Millipore 社、米国マサチューセッツ州バーリントン) で製造し、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 3. サンプル組成

成分	水溶液濃度 (mg/mL)
酢酸	2.8
t-アコニット酸	0.044
クエン酸	1.3
フマル酸	0.046
乳酸	3.2
マレイン酸	0.043
リンゴ酸	1.4
マロン酸	1.3
シュウ酸	0.45
コハク酸	1.8
酒石酸	0.86

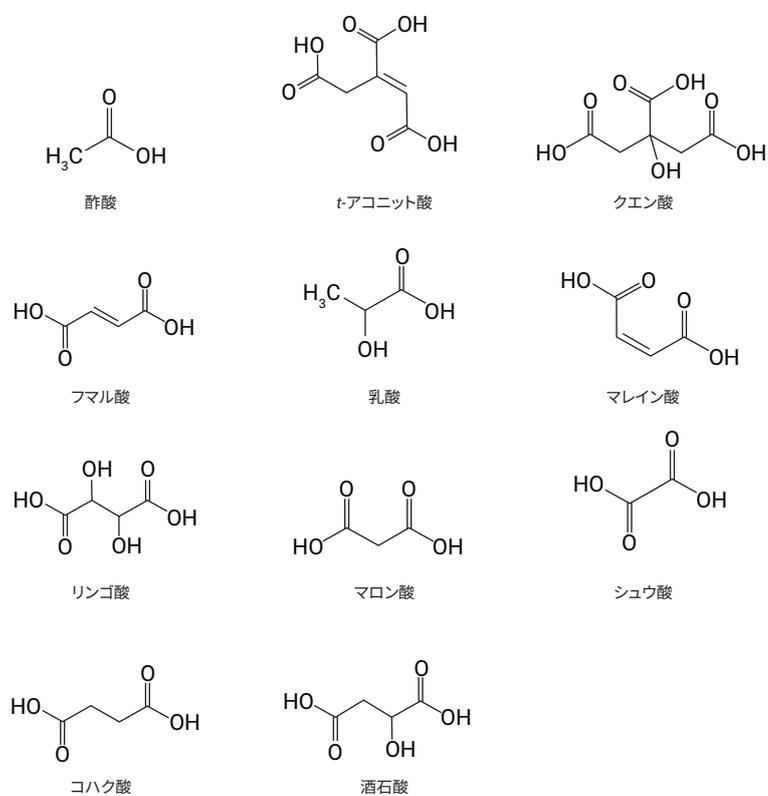


図 1. 対象化合物

結果と考察

図 2 は、最適な充填剤を特定するために、3種類の InfinityLab Poroshell 120 カラムを使用して水性移動相による単純なイソクラティックメソッドで有機酸を分析した結果です。これらの3種類の充填剤は、100%の水性移動相に対応でき、ディウェッティング(移動相が粒子ポアから排除され浸透しない現象)のリスクが生じないことを条件に選択しました。この機能は、今回サンプルとして用いた有機酸をはじめとする極性化合物を逆相 LC モードで保持するうえで重要になります。溶出の早い有機酸の分離能は Phenyl-Hexyl カラムが最も高く、次いで Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-Aq カラムがほぼ同等の性能を示しました。ただし、SB-Aq 充填剤では、リンゴ酸と乳酸が十分に分離されませんでした。

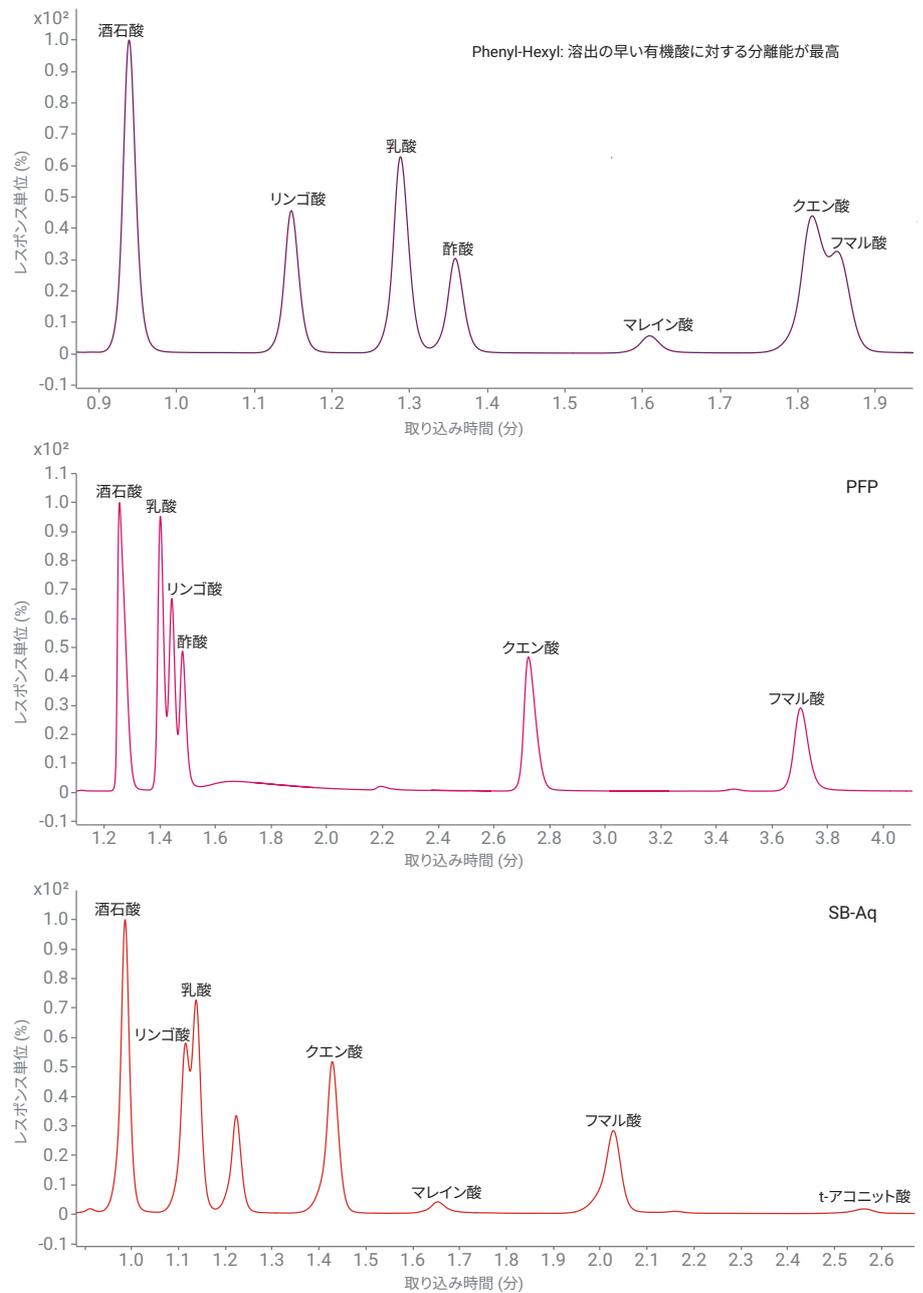


図 2. 充填剤の異なる Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムによる有機酸の分離結果。
 A: 水, D: 200 mM リン酸ナトリウム + 1% リン酸 (85%), pH 約 2 の移動相による 90% A/10% D のイソクラティックメソッドを使用して、流量 0.4 mL/min、温度 20 °C で分離し、波長 210 nm で検出しています。Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムには 2.1 × 150 mm、2.7 μm のものを使用しました。

Phenyl-Hexyl カラムで見られたクエン酸とフマル酸の部分的な共溶出は、カラム温度を上げることで、図 3 に示すように解決されました。

図 4 は、InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、 2.1×150 mm、 $2.7 \mu\text{m}$ カラムによる有機酸 11 種の最終的な分離クロマトグラムです。すべての化合物が、最小分離度 1.5 という良好な分離能で 3 分以内に分離されています。有機酸は、極性が非常に高いことから保持されにくく、また構造類似性が高いため (図 1) 分離が容易ではありません。ただし、カラム長 150 mm、粒子サイズ $2.7 \mu\text{m}$ の Phenyl-Hexyl カラムは、このサンプルを確実に保持し、分離することのできる十分な分離効率と分離能を備えていることがわかりました。

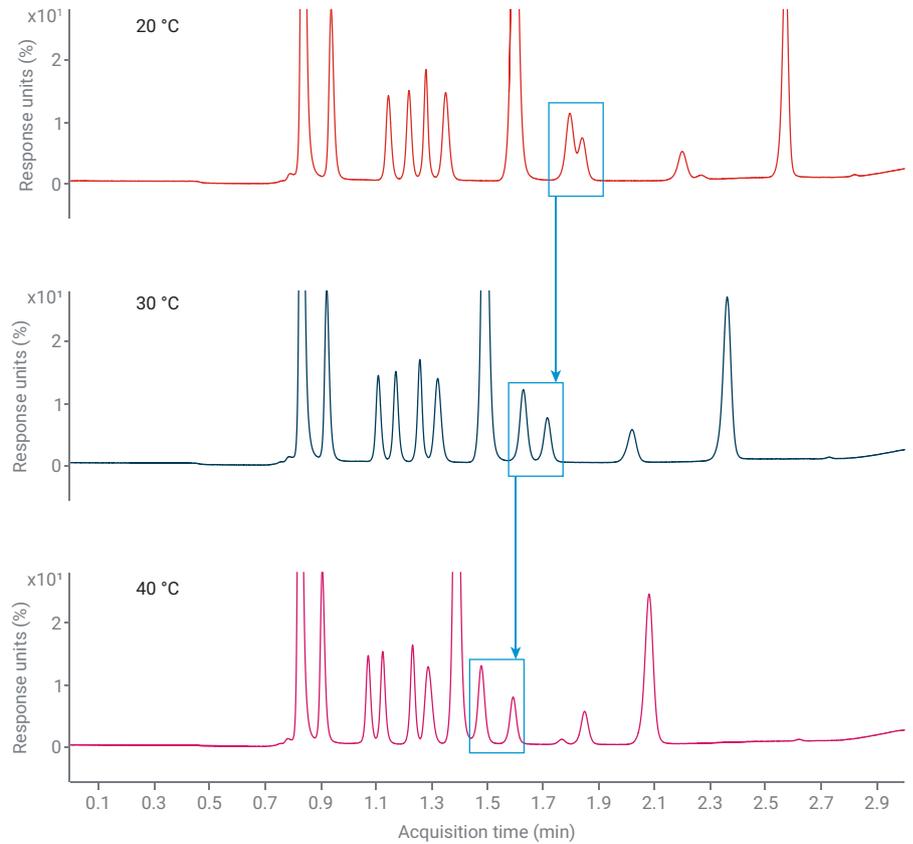


図 3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl カラムによる有機酸の分離に最適なカラム温度の評価

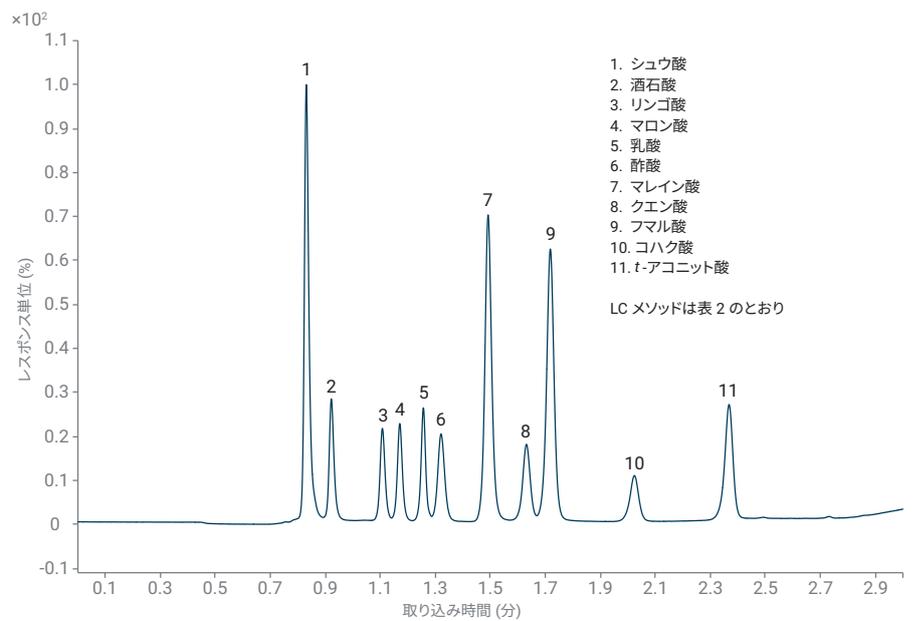


図 4. Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl カラムによる有機酸 11 種の実験的な分離クロマトグラム

結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120、2.7 μm カラムを使用して、分離困難な有機酸 11 種を分離しました。2.1 \times 150 mm のカラムを用いることで、この表面多孔質粒子カラムの優れた分離効率により、関連性の高い化合物の分離に十分な分離能が得られました。

参考文献

1. Gratzfield-Huguen, A.; Naegele, E. Maximizing Efficiency Using Agilent InfinityLab Poroshell 120 Columns. Agilent Technologies Application Note, publication number 5990-5602EN, **2016**.
2. Meyer, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Fourth Edition, p. 34. Wiley, **2004**.

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. 2019
Printed in Japan, June 26, 2019
5994-1082JAJP