

Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムを用いた塩基性成分のピーク形状の 改善

ギ酸移動相を用いた従来の C18 カラムとの比較における
LC/MS 感度の向上

著者

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.

概要

6 種類の塩基性医薬品化合物を、ギ酸とアセトニトリルのグラジエントで分離します。荷電表面の Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムと従来の C18 結合相カラムという 2 種類の表面多孔質粒子 C18 カラムを比較します。単純なギ酸移動相と塩基性成分に対して、荷電表面カラムは従来の C18 カラムと比較して、より良好なピーク形状を示しました。より複雑な緩衝液入り移動相を使用すると従来の C18 カラムの性能を改善できますが、緩衝液塩によるイオン抑制の結果として LC/MS 感度が低下します。

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較して、低圧で高効率です。¹この効率の良さは主に、物質移動距離がより短く、カラムに充填されている粒子サイズの分布がきわめて狭いためです。²

表面多孔質粒子カラムで最も一般的な粒子サイズは 2.5 ~ 3 μm です。これらの粒子の効率は従来のサブ 2 μm カラムと同等ですが、約 50 % の背圧が生成されます。この分離効率の高さが、近接して溶出するピークの分解能を高め、また低い背圧により、使用できる LC 機器の幅が広がります。

アジレントは先頃、2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 粒子に関する新しい結合相ケミストリを開発しました。この相は、シリカ表面に正電荷を加えた後、C18 結合相で粒子を官能化することにより作成しました。InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムは、ギ酸のような弱イオン強度の移動相条件下での塩基性成分に対して、ロード性能とピーク形状を向上させます。ギ酸は理想的な移動相添加剤であり、LC 分析においてシンプルで再現性の高い条件を生成します。ギ酸を使用することにより、LC/MS 検出での優れた互換性など、LC 検出器間での高度な移管メソッドが実現可能になります。非常に柔軟性の高い 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムは多数の機器および検出器プラットフォーム間で使用できるため、さまざまな機器を備えたラボ間で簡単に移管できます。

この研究では、荷電表面多孔質粒子カラムである InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムの性能について示します。このカラムを使用すると、従来の C18 カラムと比較して、塩基性医薬品化合物のピーク形状と感度が向上します。

実験方法

この実験では、Agilent 1290 Infinity II LC システムと Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS (LC/TQ) 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に、標準構成のシステムに改良を加えました。表 1 に、詳細なシステム構成を示します。カラムには、表 1 に示す 2 種類の LC カラムを使用しました。表 2 ~ 4 は、LC と TQ の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)	<ul style="list-style-type: none"> 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 バイアルサンプラ (G7129B)	<ul style="list-style-type: none"> 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、スクルー、青、PTFE/赤シリコンセブタム、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 シリーズ 一体型カラムコンパートメント (G7130A)	<ul style="list-style-type: none"> 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 Ultivo LC/TQ (G6465A)	<ul style="list-style-type: none"> Agilent Jet Stream ESI イオン源
Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ 検出器 (G7117B)	<ul style="list-style-type: none"> 超分散 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	<ul style="list-style-type: none"> Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-942) 従来の C18、表面多孔質粒子、2.1 × 100 mm、2.7 μm

表 2. UHPLC メソッドパラメータ

メソッド	カラム	移動相	溶出条件	注入量	カラム温度
1	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-942)	A: 水 B: アセトニトリル C: 2% ギ酸水溶液	0.4 mL/min、5 分で 2 ~ 35 % B、分析を通して 5 % C で一定に保持	5 μL の 5 μg/mL 標準 ---または--- 0.5 μL の 50 ng/mL 標準	30 °C
2	従来の C18、表面多孔質粒子、2.1 × 100 mm、2.7 μm	A: 水 B: アセトニトリル C: 2% ギ酸水溶液	0.4 mL/min、5 分で 10 ~ 50 % B、分析を通して 5 % C で一定に保持		
3	従来の C18、表面多孔質粒子、2.1 × 100 mm、2.7 μm	A: 水 B: アセトニトリル C: 200 mM ギ酸アンモニウム水溶液、pH 3.0	0.4 mL/min、5 分で 11 ~ 51 % B、分析を通して 10 % C で一定に保持		

今回の実験で分析した 6 種類の医薬品化合物は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。図 1 に、化合物の構造を示します。また、表 5 に、それぞれの分析濃度を示します。ギ酸アンモニウムも Sigma-Aldrich から購入しました。ギ酸 (p/n G2453-85060) および LC/MS グレードのアセトニトリル (p/n G2453-85050) はアジレントから入手しました。水は、Milli-Q システム (Millipore 社、バーリントン、マサチューセッツ州、米国) 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。

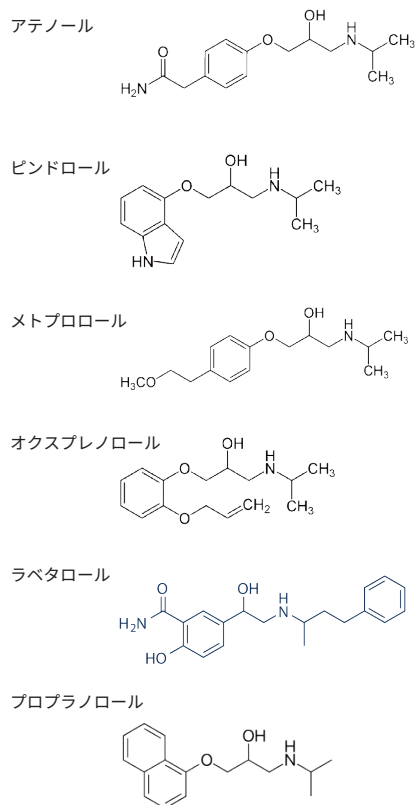


図 1. 対象化合物

表 3. LC/TQ イオン源メソッドパラメータ

MS ソース	設定ポイント
ガス温度	150 °C
ガス流量	12 L/min
ネブライザ	20 psi
シーガス温度	250 °C
シーガス流量	5 L/min
キャピラリー電圧	2000 V

表 4. LC/TQ 取り込みメソッドパラメータ

化合物名	プリカーサ (m/z)	プロダクト (m/z)	フラグメンタ (V)	CE (V)	極性
アテノール	267	145	110	28	ポジティブ
アテノール	267	56	110	28	ポジティブ
ラベタロール	329	161.9	110	35	ポジティブ
ラベタロール	329	91	110	60	ポジティブ
メトプロロール	268.2	133	110	20	ポジティブ
メトプロロール	268.2	77	110	69	ポジティブ
オクスプレノロール	266	116	113	12	ポジティブ
オクスプレノロール	266	72	113	16	ポジティブ
ビンドロール	249	116	110	16	ポジティブ
ビンドロール	249	56	110	28	ポジティブ
プロプラノロール	260	116	95	16	ポジティブ
プロプラノロール	260	56	95	28	ポジティブ

表 5. 標準の濃度

成分 (溶出順序)	高濃度標準 (水で前処理)	低濃度標準 (水で前処理)
アテノール	5 $\mu\text{g/mL}$	50 ng/mL
ビンドロール	5 $\mu\text{g/mL}$	50 ng/mL
メトプロロール	5 $\mu\text{g/mL}$	50 ng/mL
オクスプレノロール	5 $\mu\text{g/mL}$	50 ng/mL
ラベタロール	5 $\mu\text{g/mL}$	50 ng/mL
プロプラノロール	5 $\mu\text{g/mL}$	50 ng/mL

結果と考察

図 2 は、表 5 に示す高濃度標準を使用し、表 2 の 3 種類の分析シナリオの性能を比較したものです。上段のクロマトグラムは、InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムと単純なギ酸移動相による 6 種類の塩基性医薬品化合物の分離を示しています。中段のクロマトグラムは、従来の C18 カラムと同一移動相による性能を示しています。ここでは、荷電表面の C18 と比較してより幅の広いピークが生成されました。下段のクロマトグラムは、ギ酸アンモニウム緩衝液入り移動相を使用することにより、従来の C18 カラムのピーク幅

が改善できることを示しています。ピーク幅の図により改善されていることがわかります。これらの各分離では、このクロマトグラフィーの比較内のすべての成分に対して同等の全リテンションを保証するために、アセトニトリルのグラジエントを多少変更しました。

荷電表面および従来の C18 カラムを図 3 で再度比較しました。ここでは、表 5 に示す低濃度の同じ成分を使用しています。各カラムに対して最適な性能条件を選択しました。つまり、CS-C18 とギ酸、および従来の C18 とギ酸アンモニウムです。両方のカラムのすべての成分に対してピーク形状は許容範囲内では

たが、従来の C18 では感度が低下しました。これは、移動相塩であるギ酸アンモニウムのイオン抑制によるものでした。

InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムとギ酸移動相を使用することにより、高濃度および低濃度での LC/MS 検出における塩基性医薬品化合物の分析結果が改善されています。

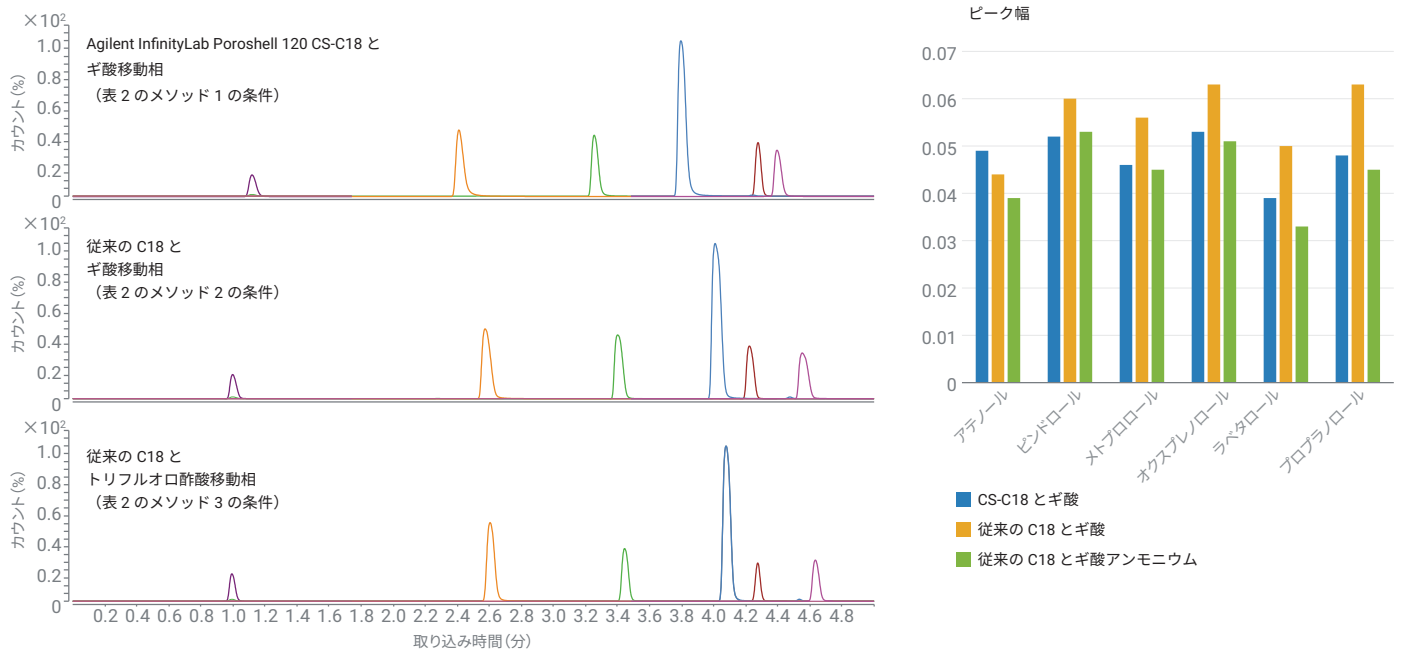


図 2. 塩基性医薬品化合物のクロマトグラフィー性能の比較

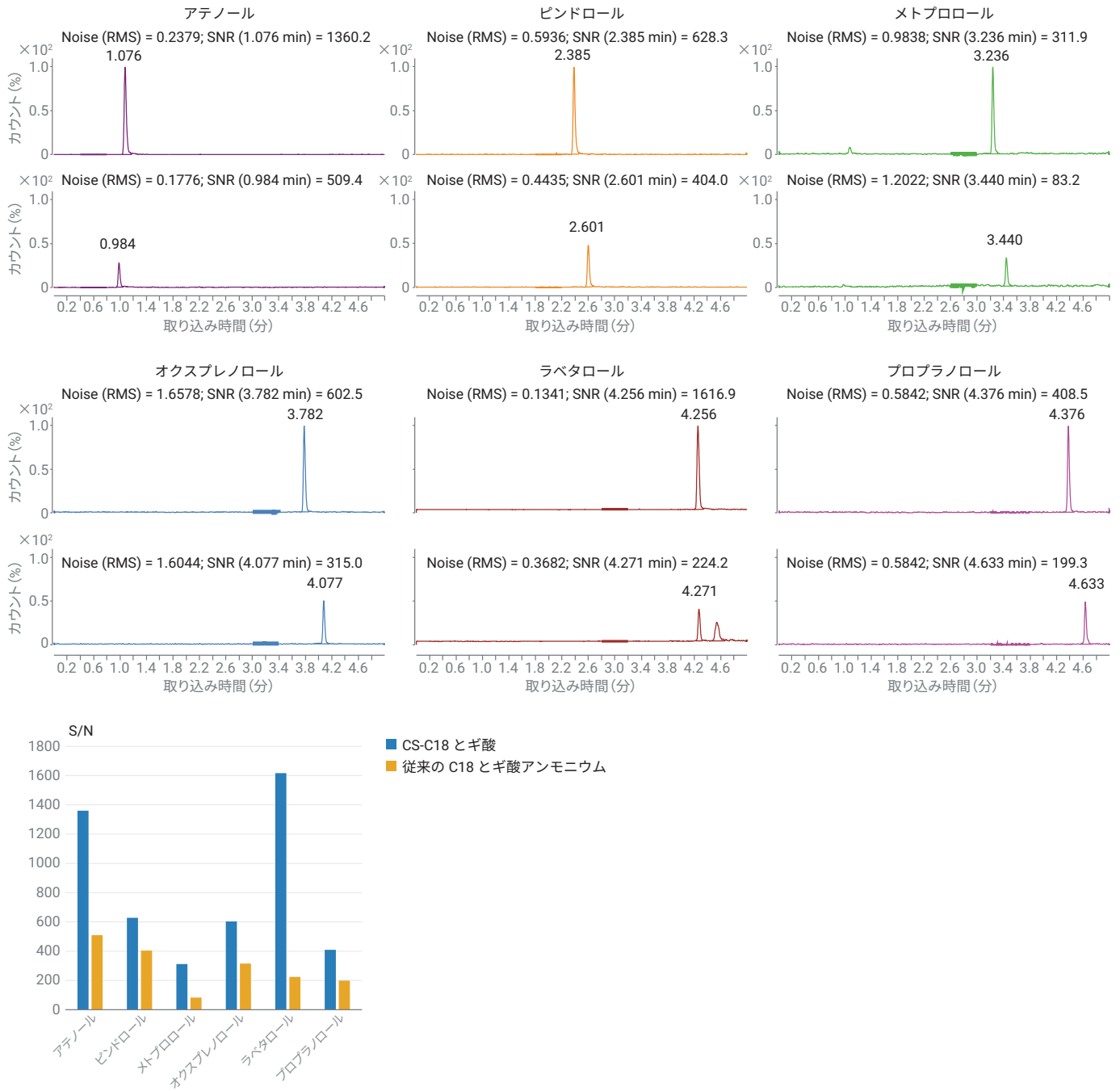


図 3. 低濃度標準での LC/MS 感度の比較

結論

荷電表面の InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムにより、塩基性成分の性能が改善されました。従来の C18 結合相と同一移動相と比較して、単純なギ酸移動相の条件下で性能が改善されました。非常に高くシャープな優れたピーク形状が得られており、これにより分解能と感度が向上しました。従来の C18 カラムでも、より複雑な緩衝液入り移動相を使用することにより、同等のピーク形状を生成できます。ただし、緩衝液塩のイオン抑制により、LC/MS 感度が低下しました。

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**.
2. Meyer, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Fourth Edition, Wiley, 2004; p. 34.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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. 2020
Printed in Japan, June 12, 2020
5994-2094JAJP
DE.2064930556