

塩基性化合物とギ酸移動相における 優れたサンプル保持能力

Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 と
従来の C18 カラムの比較

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した。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 カラムを比較しました。単純で汎用性の高い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。従来の C18 カラムの性能においてピーク形状を改善するには、好ましくはありませんがトリフルオロ酢酸移動相を使用する必要があります。詳細な調査により、荷電表面カラムがこれらの塩基性成分のサンプル保持容量も向上させ、不純物分析の検出下限を下げられることがわかりました。

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。Agilent 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ロード性能が向上しました。

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 5 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。

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、その分子構造を示します。また、表 5 に、それぞれの分析濃度を示します。トリフルオロ酢酸も 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。

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 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ (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) | <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 オートサンプル & ヒーター : キャピラリー, ステンレス製, 0.12 \times 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 : キャピラリー, ステンレス製, 0.075 \times 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] |
| LC カラム | <ul style="list-style-type: none"> Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm (p/n 695775-942) 従来の C18, 表面多孔質粒子, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm 従来のエンドキャップ C18, 表面多孔質粒子, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm 従来のエンドキャップ無し C18, 表面多孔質粒子, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm 従来の C18, 全多孔質粒子, 2.1 \times 100 mm, 1.7 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 | 検出 |
|------|---|--------------------------------------|---|---|-------|--|
| 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% 酢酸水溶液 | 0.4 mL/min、 21% B、5% C、 イソクラティック | ピーク形状の比較：1 μL の 5 μg/mL 6 種類の化合物標準 | 30 °C | UV 254 nm、 80 Hz ---および--- Ultivo/TQ ESI+ dMRM |
| 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% 酢酸水溶液 | 0.4 mL/min、 35% B、5% C、 イソクラティック | | | |
| 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：2% トリフルオロ酢酸水溶液 | 0.4 mL/min、 36% B、10% C、 イソクラティック | | | |
| 4 | 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% 酢酸水溶液 | 0.4 mL/min、 20% B、5% C、 イソクラティック | サンプル保持容量：0.5 μL の 1 mg/mL ~ 0.1 ng/mL アミトリプチリン水溶液 | | |
| 5 | 従来のエンドキャップ 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% 酢酸水溶液 | 0.4 mL/min、 32% B、5% C、 イソクラティック | | | |
| 6 | 従来のエンドキャップ無し 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% 酢酸水溶液 | 0.4 mL/min、 32% B、5% C、 イソクラティック | | | |
| 7 | 従来の C18、全多孔質粒子、 2.1 × 100 mm、1.7 μm | A：水 B：アセトニトリル C：2% 酢酸水溶液 | 0.4 mL/min、 32% B、5% C、 イソクラティック | | | |

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 |
| シースガス温度 | 250 °C |
| シースガス流量 | 5 L/min |
| キャピラリー電圧 | 2000 V |

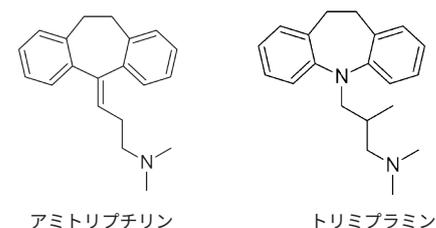
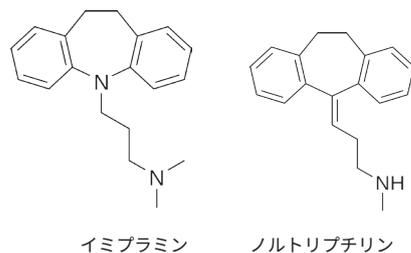
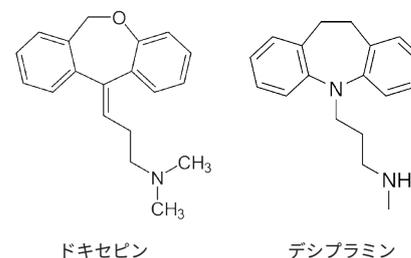


表 4. LC/TQ 取り込みメソッドパラメータ

| 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 |
|----------|-------------|-------------|------------|--------|-------|
| アミトリプチリン | 278.2 | 117.1 | 115 | 21 | ポジティブ |
| アミトリプチリン | 278.2 | 91 | 115 | 25 | ポジティブ |
| デシプラミン | 267.2 | 72.1 | 90 | 13 | ポジティブ |
| デシプラミン | 267.2 | 44.1 | 90 | 50 | ポジティブ |
| ドキシセピン | 280.2 | 115 | 115 | 50 | ポジティブ |
| ドキシセピン | 280.2 | 107.1 | 115 | 21 | ポジティブ |
| イミプラミン | 281.2 | 86.1 | 75 | 13 | ポジティブ |
| イミプラミン | 281.2 | 58.1 | 75 | 45 | ポジティブ |
| ノルトリプチリン | 264.2 | 233.2 | 100 | 13 | ポジティブ |
| ノルトリプチリン | 264.2 | 91.1 | 100 | 25 | ポジティブ |
| トリミプラミン | 295.2 | 100.2 | 90 | 25 | ポジティブ |
| トリミプラミン | 295.2 | 58.2 | 90 | 25 | ポジティブ |

図 1. 対象化合物

結果と考察

図 2 は、表 5 に示す 6 種類の化合物標準を使用して、表 2 の最初の 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。従来の C18 カラムでは、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す。下段のクロマトグラムは、ピーク幅の図が示すように、トリフルオロ酢酸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

表 5. 標準の濃度

| 成分 (溶出順序) | 6 種類の化合物標準 (水で前処理) | 不純物標準 (水で前処理) |
|--------------|-----------------------|------------------|
| ドキシセピン | 5 µg/mL | N/A |
| デシプラミン | 5 µg/mL | N/A |
| イミプラミン | 5 µg/mL | 2 µg/mL |
| フルトリプチリン | 5 µg/mL | N/A |
| アミトリプチリン | 5 µg/mL | 0.8 mg/mL |
| トリミプラミン | 5 µg/mL | 2 µg/mL |

が改善できることを示しています。トリフルオロ酢酸は pH が極端に低いため、好ましくない移動相とみなされることがよくあります。pH が低いと悪影響を与え、カラムと LC システムから完全にクリーニングするのが困難になる

場合があります。また LC/MS 分析では、トリフルオロ酢酸はイオン抑制により信号強度も大幅に低減させます。

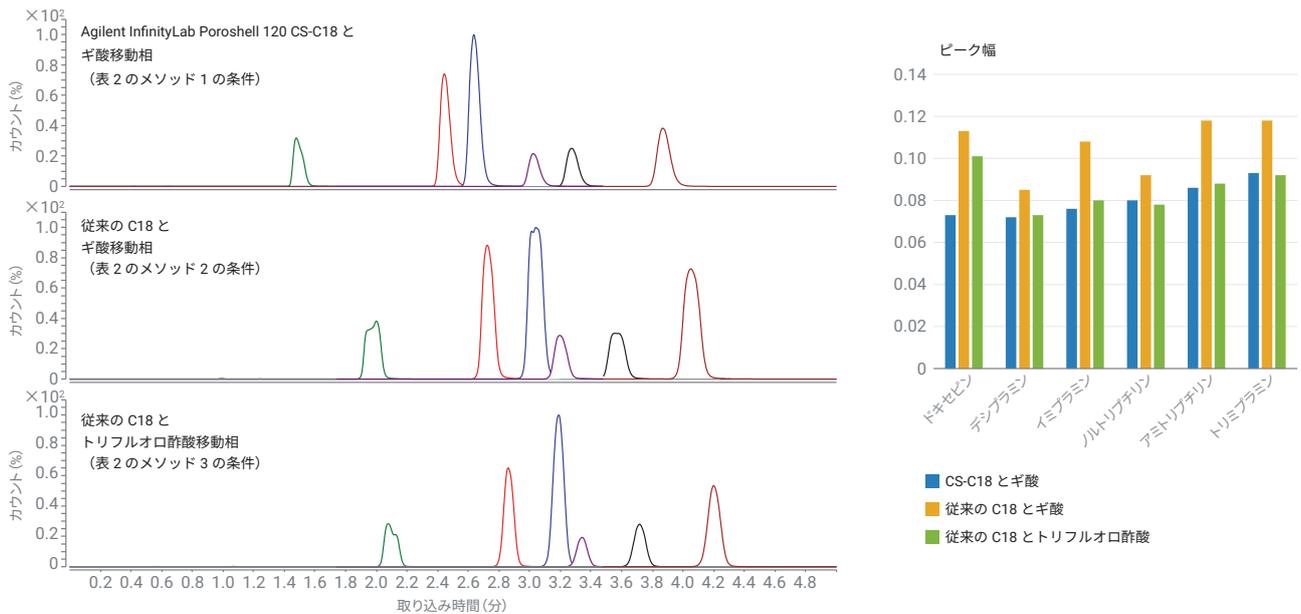


図 2. 塩基性医薬品化合物のクロマトグラフィー性能の比較

図 3 に、塩基性成分の保持容量をさらに調査した結果を示します。この研究では、アミトリプチリンを段階希釈して調整し、4 種類の C18 カラムに注入しました。カラム性能の指標として、ピーク半値幅を追跡しました。使用した各 C18 カラムでは、アミトリプチリンに対して同等の全リテンション ($k' = 7$) を保証するために、アセトニトリルの内容量を多少変更

しました。ピーク形状が低下した際に、カラムに注入したサンプル量の関数としてオーバーロードを評価しています。カラムにさらにサンプルを注入し、各 C18 カラムをある程度のオーバーロード状態にしています。図 3 のように、このオーバーロードは、より高いサンプルロードでのピーク幅の増大によって示されます。対応するクロマトグラムを図 4 に示しま

す。ただし、図 3 と 4 の両方から明らかのように、アミトリプチリンに対して荷電表面の CS-C18 が一貫して狭いピーク幅を維持しています。他の 3 種類の従来の C18 カラムと比較して、カラムがオーバーロード状態の場合でも、狭いピーク幅が維持されています。

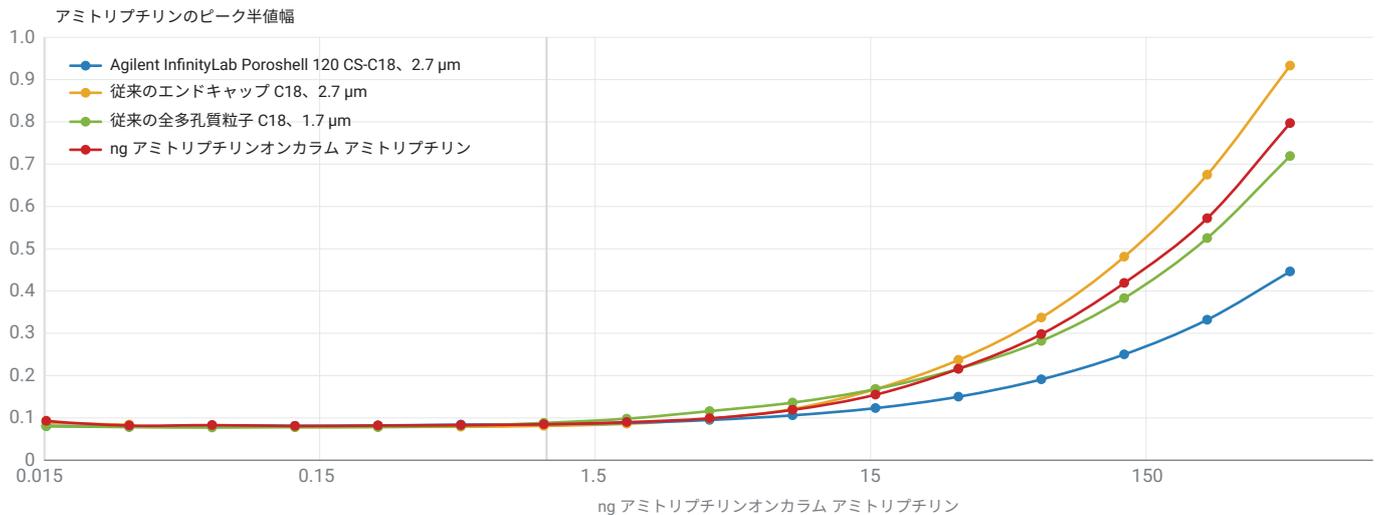


図 3. CS-C18 および従来の C18 カラムのサンプル保持容量曲線。表 2 のメソッド 4~7

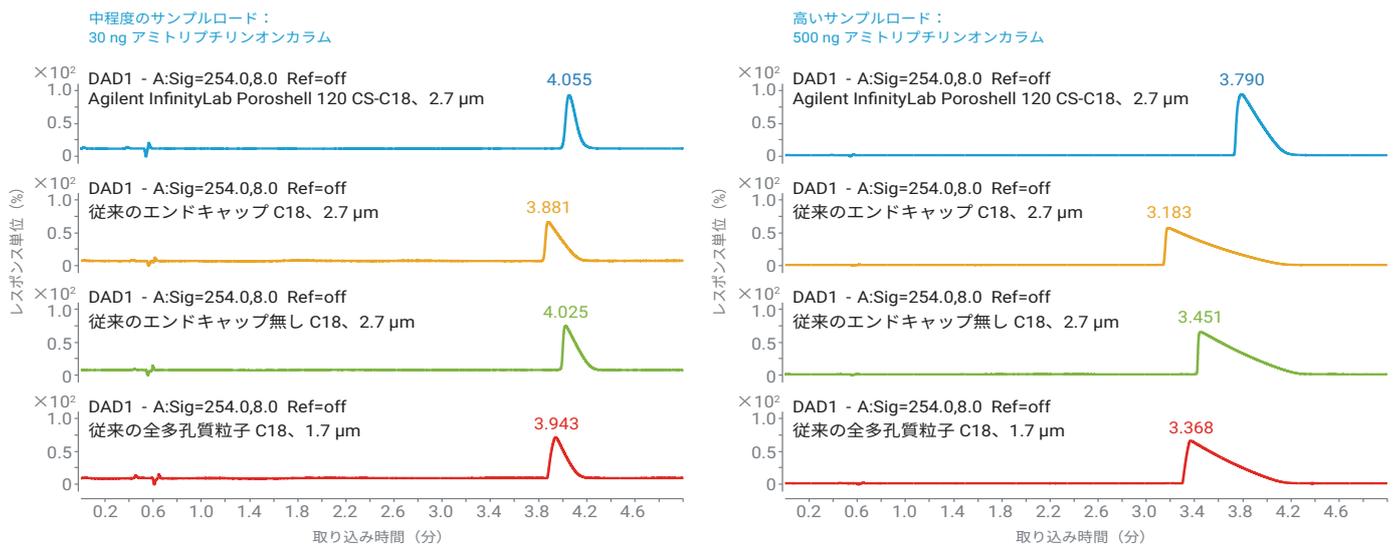


図 4. 中および高サンプルロードでの CS-C18 と従来の C18 の性能上の違い

InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムでこのオーバーロードの影響を低減することは、塩基性化合物の不純物分析において優れた結果が得られることを意味します。不純物分析では通常、主要化合物の濃度が高く、対象とするその他の成分の濃度は低くなっています。図 5 の不純物分析は、アミトリプチリンのサンプル濃度が高く、不純物の重量濃度が 0.25 % であることを示しています。低濃度の不純物を十分に検出して定量できるように、注入量を徐々に増大させています。ただし、注入量が増大すると、カラムのアミトリプチリンの量がオーバーロード点を通過し、ピーク幅の広がりやテーリングを引き起こしてしま

ず。InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムを使用した場合、メインピークはその前後の不純物を適切に分離するのに十分な狭さを維持しています。一方、従来の C18 の場合、メインピーク幅の極端な広がりが早くに溶出した不純物に影響を与えていると同時に、大幅なピークテーリングが遅く溶出した不純物のピーク形状を歪ませています。荷電表面の CS-C18 は、隣接ピークのクロマトグラフィーを損なうことなく、主要化合物の大量注入に対応できます。大量注入により塩基性化合物の不純物分析の感度が増大するため、従来の C18 カラムと比較して、極微量濃度レベルの不純物を検出して定量することが可能になります。

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 UV および 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。

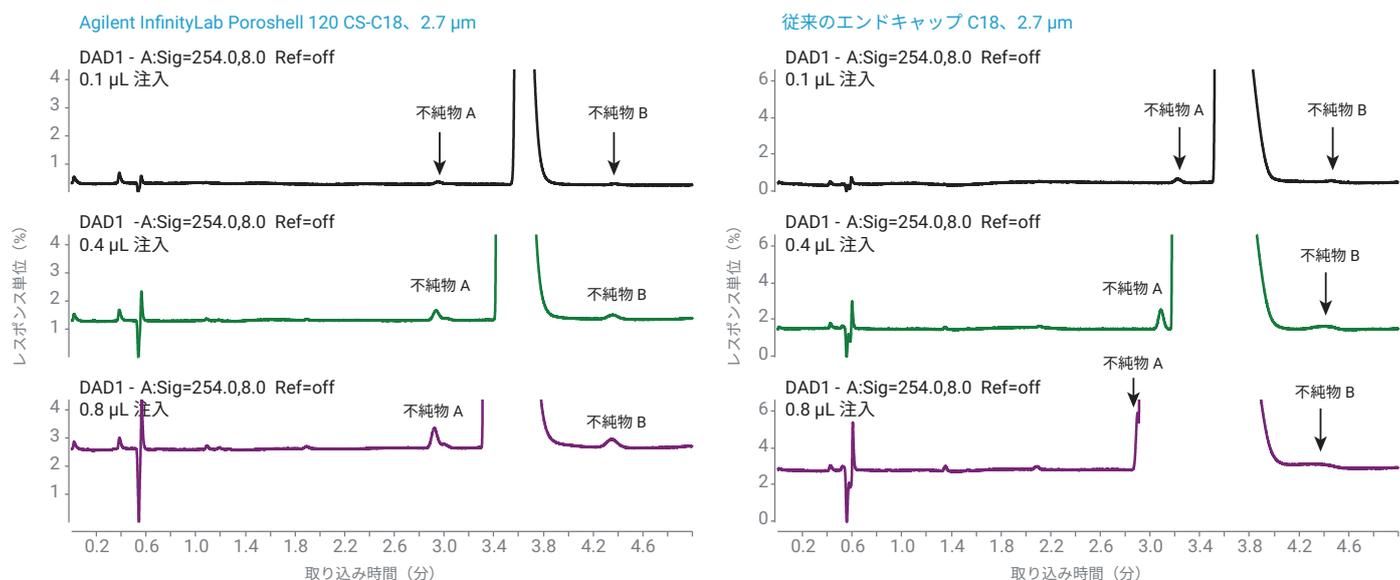


図 5. CS-C18 および従来の C18 でのアミトリプチリン + 0.25 % 不純物による不純物分析。表 2 のメソッド 4~5

結論

荷電表面の Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムは、従来の C18 結合相と同一移動相の場合と比較して、単純なギ酸移動相の条件下で塩基性成分に対する性能が改善されています。非常に高くシャープな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ています。また、CS-C18 はサンプル保持容量も増大しており、塩基性化合物の優れたピーク形状を維持し、より高感度の不純物分析を実施できます。従来の C18 カラムでは、同等のピーク形状を得るためにトリフルオロ酢酸移動相を使用する必要があります。トリフルオロ酢酸は、好ましくない移動相添加剤です。これは、システムとカラムを汚染し、LC/MS で大幅なイオン抑制を引き起こすことがあるためです。

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, 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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, June 12, 2020
5994-2095JAJP
DE.2090277778

