

Agilent Polaris C18-A カラムを用いた 有機酸の分離

著者

Rongjie Fu
Agilent Technologies
(Shanghai) Co. Ltd.

Cuiling Wu
Agilent Technologies (China)
Co. Ltd.

概要

Agilent Polaris C18-A カラム (4.6 × 250 mm、5 μm) と含水率の高い水性移動相を用いて、イソクラティック HPLC メソッドにより、6 つの有機酸を分析しました。また、このメソッドを、粒子径の小さい短いカラム (Agilent Polaris C18-A、3.0 × 150 mm、3 μm) を用いて分析、比較を行いました。双方のカラムで、対象としたすべての有機酸を良好に分離できました。

はじめに

酒石酸やリンゴ酸などの多くの有機酸は極性が強く、逆相カラムで保持するのは困難です。そのため、多くの場合、目的の分離状態を達成するのに、高含水率の水性移動相または緩衝化水性移動相が必要となります。多くの逆相カラムでは、含水率の高い水性移動相を使用すると、時間の経過とともに保持が劇的に減少します。高含水率の移動相において分析対象成分の保持が失われるこの現象は、「相崩壊」と呼ばれています¹。極性化合物の分析では、相崩壊のため、極性基で修飾された逆相カラムがよく使われるようになってきています。Agilent Polaris HPLC カラムでは、さまざまな特性の極性相が用意されており、極性および非極性物質の混合物を確実に、優れたピーク形状で分離するように設計されています。極性基が埋め込まれた C8 および C18 結合相は、水 100 % の移動相の利用も可能です。USP L1 および USP L7 に準拠しつつも、同等の選択性が実現できます。

本アプリケーションノートでは、中国メソッド GB5009.157-2016² に従って、Polaris C18-A (4.6 × 250 mm、5 μm) カラムを有機酸の分析に使用しました。このメソッドを、粒子径が小さく口径が狭い Polaris C18-A カラム (3.0 × 150 mm、3 μm) でも実施しました。

実験方法

試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。メタノールは Merck (ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) から購入しました。水は、ELGA PURELAB Chorus システム (ハイ・ウィカム、英国) を使用して精製しました。リン酸は Sigma-Aldrich から購入しました。標準液は Anpel Laboratory Technologies (上海、中国) から購入しました。標準混合溶液は、有機酸を水に溶かして調製しました。個々の化合物の濃度はそれぞれ次のとおりです。酒石酸 50 μg/mL、リンゴ酸 100 μg/mL、乳酸 50 μg/mL、クエン酸 50 μg/mL、コハク酸 250 μg/mL、フマル酸 0.25 μg/mL です。

機器と材料

- **カラム入口** : Agilent InfinityLab クイックコネクタ LC フィッティング (部品番号 5067-5965)
- **カラム出口** : Agilent InfinityLab クイックターン LC フィッティング (部品番号 5067-5966)
- Agilent バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付、認定、2 mL (部品番号 5182-0716)

- Agilent 圧着スクリュージャップ、圧着、青、PTFE/赤シリコンセプタム (部品番号 5190-7024)
- Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L (部品番号 9301-6526)
- Agilent InfinityLab セーフティキャップ、GL45、3 ポート、1 ベントバルブ (部品番号 5043-1219)

装置構成

次のモジュールで構成される Agilent 1260 Infinity II LC システムを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7111B)
- Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129A)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、InfinityLab クイックチェンジバルブヘッド付き、4 カラムセレクタ、800 bar (5067-4279)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G4212B)

表 1. HPLC 条件

カラム	移動相の組成	流量 (mL/min)	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 Polaris C18-A, 4.6 × 250 mm, 5 μm (p/n A2000250X046)	0.1 % H ₃ PO ₄ 水溶液 97.5 %/2.5 % メタノール、 または 0.1 % H ₃ PO ₄ 水溶液 100 %	1.0	20	40	210 nm、10 Hz
Agilent Polaris C18-A, 3.0 × 150 mm, 3 μm (p/n A2001150X030)		0.425	5	40	210 nm、20 Hz

結果と考察

図 1 に、Agilent Polaris C18-A カラムで分析した簡単な高含水率イソクラティックメソッドによる有機酸の分析結果を示します。図 1 のクロマトグラムは、0.1 % リン酸水溶液 97.5 % とメタノール 2.5 % を使用し、イソクラティック移動相の下で規制メソッドに従って得られたものです。6 つの化合物がすべて、うまく保持され分離されました。飲料サンプルをこの方法でテストしました。サンプルでは、クエン酸が検出されました。

このカラムは極性基埋め込み型 C18 結合相です。相崩壊のリスクなしで 100 % 水性移動相を用いることができます。この分析は 0.1 % リン酸水溶液 100 % で実施することができました。図 2 に示すサンプルでは、リンゴ酸やクエン酸など一部の分析対象物の分離が良くなりました。図 3 に示すように、100 % 水性移動相を用いて 10 回の連続注入を行ったところ、再現性は良好でした。

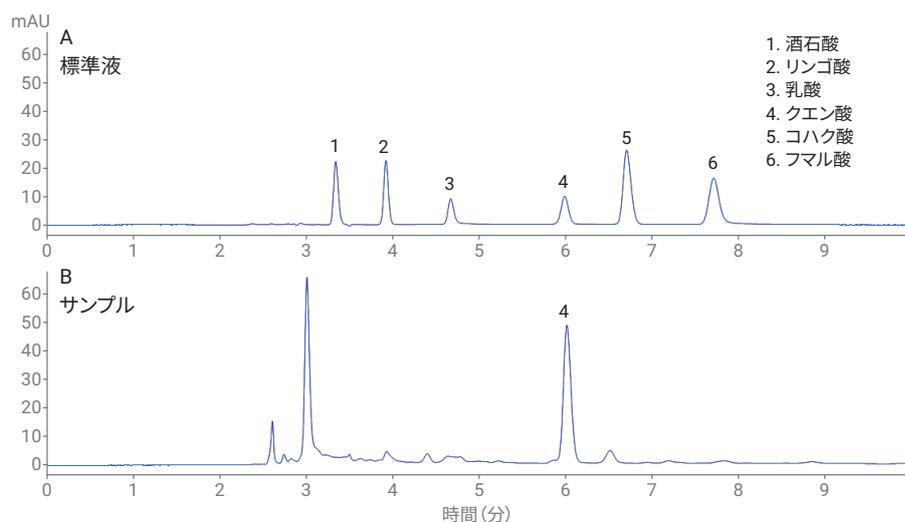


図 1. Agilent Polaris C18-A カラム (4.6 × 250 mm, 5 μm) を使用した標準およびサンプルの分析。移動相は 0.1 % H₃PO₄ 水溶液 97.5 % / メタノール 2.5 % を使用

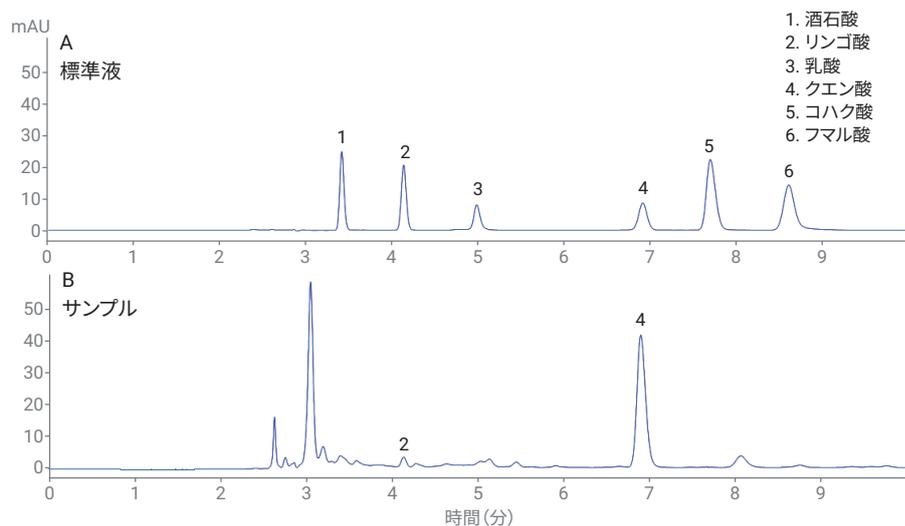


図 2. Agilent Polaris C18-A カラム (4.6 × 250 mm, 5 μm) を使用した標準およびサンプルの分析。移動相には 0.1 % H₃PO₄ 水溶液 100 % を使用

HPLC 分析では、分離を同等に保ちながら分析時間と溶媒消費量を節約するために、粒子径の小さいカラムがよく使用されます。アジレントでは、3 μm と 5 μm サイズの Polaris C18-A カラムを提供しています。本アプリケーションノートでは図 4 に示すように、5 μm の Polaris C18-A カラムを使用したメソッドを Polaris C18-A、3.0 \times 150 mm、3 μm カラムに移行しました。どちらのカラムも 6 つの化合物すべてをベースライン分離できましたが、Polaris C18-A、3.0 \times 150 mm、3 μm カラムでは分析時間が 40 %、溶媒消費量が 74.5 % 節約できました。

結論

多くの食品サンプルに含まれる 6 つの有機酸の分析に Agilent Polaris C18-A カラムを使用しました。極性基が埋め込まれた C18 結合相で、有機酸のような極性化合物を保持し、相崩壊なく分離できました。粒子径の小さいカラム (3 μm) では、5 μm カラムと比較して同等の分離で分析時間と溶媒消費量を大幅に削減できました。

参考文献

1. Bidlingmeyer, B. A.; Broske, A. D. The Role of Pore Size and Stationary Phase Composition in Preventing Aqueous-Induced Retention Time Loss in Reversed-Phase HPLC, *Journal of Chromatographic Science* **2004**, 42.
2. Determination of Organic Acids in Food, National Standards of Food Safety, GB5009.157-2016.

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. 2020
Printed in Japan, July 30, 2020
5994-2244JAJP
DE.9669675926

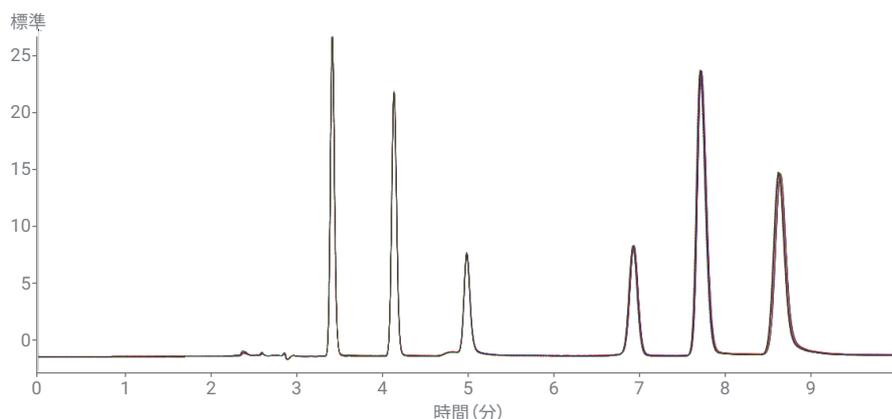


図 3. Agilent Polaris C18-A カラム (4.6 \times 250 mm、5 μm) を使用した 6 つの有機酸標準の連続注入によるクロマトグラムの重ね書き。移動相には 0.1 % H_3PO_4 水溶液 100 % を使用

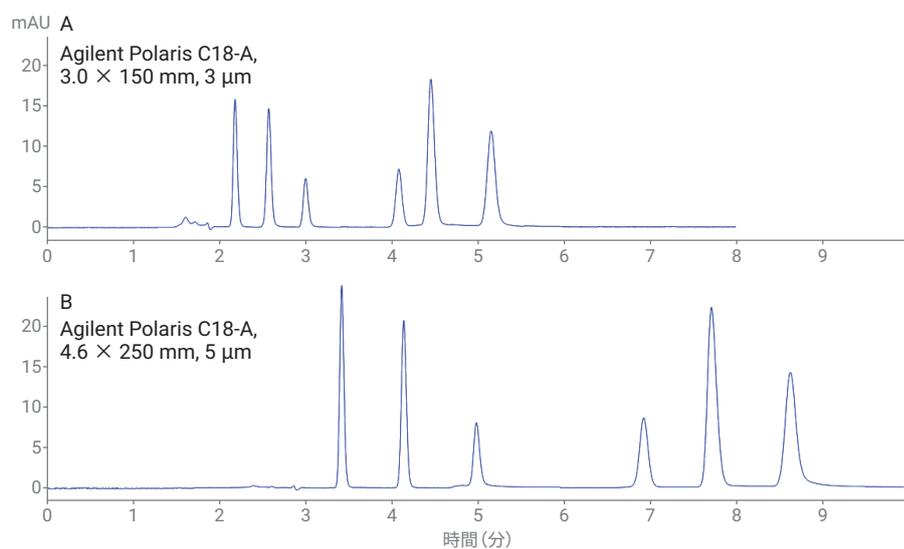


図 4. Polaris C18-A、3.0 \times 150 mm、3 μm カラムを使用した分析 (A) と Agilent Polaris C18-A、4.6 \times 250 mm、5 μm カラムを使用した分析 (B) の比較。移動相には 0.1 % H_3PO_4 水溶液 100 % を使用