

# メソッド開発ツールとしての pH と Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 の活用

## 著者

Anne Mack  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 の低および高 pH での安定性について説明します。複数のバッファと一般的なアセトニトリルのグラジエント 5 ～ 95 % を組み合わせることにより、広範囲の移動相 pH の重要性について調査します。農業混合物を含む 2 種類のサンプルを使用して、酸性、塩基性、および中性化合物において移動相の pH が成分の保持にどのように影響を与えるのかを示します。

はじめに

液体クロマトグラフィーには、表面多孔性粒子の 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性粒子カラムの同等製品と比較して、低圧で高効率です。<sup>1</sup>これは主に、物質移動距離がより短く、カラムに充填されている粒子の粒子サイズ分布がきわめて狭いためです。<sup>2</sup>

表面多孔性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、背圧はその約 50 % になります。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 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、粒子に C18 官能基を結合して作成しました。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の塩基性成分に対して優れたロード性能とピーク形状を実現します。また、この相は移動相の低および高 pH の両方に対応しており、イオン性化合物の保持および分離を制御するのに非常に有効です。非常に柔軟性の高い 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムを使用すると、多数の機器および検出器プラットフォーム間で、さまざまなタイプの成分を効率的かつ堅牢に分析できます。

この研究では、荷電表面多孔質粒子カラムである Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 の性能と、低および高 pH の両方において優れた寿命を実現する能力について説明します。このカラムは、イオン性化合物のメソッド開発に最適です。

実験方法

今回の実験では、Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent Ultivo 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。

今回の実験で分析した 9 種類の化合物は Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入しました。2 種類の農薬標準品はアジレントから購入しました（p/n 5190-0469-1、5190-0469-2）。すべてのサンプルを表 2 に示します。

ギ酸アンモニウムは 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）        | デガッサ<br>シールウォッシュポンプ<br>35 μL 溶媒ミキサー：Agilent Jet Weaver、35 μL/100 μL（p/n G4220-60006）<br>ファームウェア：B.07.23 [0009]                                                                                                                                                                                                                                     |
| Agilent 1290 Infinity II バイアルサンプラ（G7129B）         | サンプルサーモスタット（p/n G7167-60101）<br>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<br>オートサンブラ & ヒーター：キャピラリー、ステンレス製、0.12 × 105 mm、SL/SL（p/n 5500-1238）<br>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）<br>キャップ、スクリュ、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個（p/n 5182-0717）<br>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）<br>ファームウェア：D.07.23 [0009] |
| Agilent InfinityLab LC シリザー一体型カラムコンパートメント（G7130A） | 内蔵タイプ: G7129B<br>3.0 μL 熱交換器<br>ヒーター & カラム：InfinityLab クイックコネクトアセンブリ、105 mm、0.075 mm（p/n 5067-5961）<br>カラム & フローセル：キャピラリー、ステンレス製、0.075 × 220 mm、SV/SLV（p/n 5067-4784）<br>ファームウェア：B.07.23 [0009]                                                                                                                                                    |
| Agilent Ultivo LC/TQ（G6465A）                      | Agilent Jet Stream ESI イオン源                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 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）<br>UV ランプ（p/n 5190-0917）<br>ファームウェア：D.07.23 [0009]                                                                                                                                                                                                                                       |
| Agilent LC カラム                                    | Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18、2.1 × 50 mm、2.7 μm（p/n 699775-942）<br>Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm（p/n 695775-942）                                                                                                                                                                                        |

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                                                                                               | 温度    | 注入量/サンプル                                                                        | 検出                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>1</b><br>低 pH 寿命         | Agilent InfinityLab<br>Poroshell 120 CS-C18、<br>2.1 × 50 mm、2.7 μm<br>(p/n 699775-942)  | A : 2 % TFA 水溶液<br>B : メタノール                           | 0.3 mL/min、<br>50 % B イソクラディック、<br>分析時間 60 分<br>試験シーケンス :<br>連続注入                                  | 85 °C | 1 μL のウラシル、トルエン                                                                 | DAD : 254 nm、<br>80 Hz |
| <b>2</b><br>高 pH 寿命         | Agilent InfinityLab<br>Poroshell 120 CS-C18、<br>2.1 × 50 mm、2.7 μm<br>(p/n 699775-942)  | A : 水<br>B : アセトニトリル<br>C : 10 mM 炭酸水素<br>アンモニウム pH 10 | 0.4 mL/min、<br>QC : 60 % B、40 % A<br>ストレスバッファ : 100 % C を 2 時間<br>試験シーケンス :<br>5× QC、ストレスバッファ、繰り返し | 50 °C | 0.5 μL のウラシル、フェノール、<br>4-クロロニトロベンゼン、ナフタレン                                       | DAD : 254 nm、<br>80 Hz |
| <b>3</b><br>低 pH メソッド<br>開発 | Agilent InfinityLab<br>Poroshell 120 CS-C18、<br>2.1 × 100 mm、2.7 μm<br>(p/n 695775-942) | A : 水<br>B : アセトニトリル<br>C : 2 % 酢酸水溶液                  | 0.4 mL/min、<br>10 分で 5 ~ 95 % B、<br>分析を通して 5 % C で一定に保持                                            | 30 °C | 0.8 μL のウラシル、アミトリプチリン、<br>ブチルパラベン、フタル酸ジプロピル、<br>アセナフテン                          | DAD : 254 nm、<br>80 Hz |
|                             |                                                                                         |                                                        |                                                                                                    |       | 0.2 μL の Agilent 塩基性農薬<br>(p/n 5190-0469-1) + 酸性農薬<br>(p/n 5190-0469-2)、1:3 に混合 | MSD : 表 3 および<br>4 を参照 |
| <b>4</b><br>高 pH メソッド<br>開発 | Agilent InfinityLab<br>Poroshell 120 CS-C18、<br>2.1 × 100 mm、2.7 μm<br>(p/n 695775-942) | A : 水<br>B : アセトニトリル<br>C : 200 mM 酢酸<br>アンモニウム pH 10  | 0.4 mL/min、<br>10 分で 5 ~ 95 % B、<br>分析を通して 5 % C で一定に保持                                            | 30 °C | 0.8 μL のウラシル、アミトリプチリン、<br>ブチルパラベン、フタル酸ジプロピル、<br>アセナフテン                          | DAD : 254 nm、<br>80 Hz |
|                             |                                                                                         |                                                        |                                                                                                    |       | 0.2 μL の Agilent 塩基性農薬<br>(p/n 5190-0469-1) + 酸性農薬<br>(p/n 5190-0469-2)、1:3 に混合 | MSD : 表 3 および<br>4 を参照 |

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 | 2,000 V  |

表 4. LC/TQ SIM 取り込みメソッドパラメータ

| No. | 化合物名      | 質量 (m/z) | ドウェル<br>(ミリ秒) | フラグメンタ (V) | 極性    |
|-----|-----------|----------|---------------|------------|-------|
| 1   | アミノカルブ    | 209.3    | 10            | 135        | ポジティブ |
| 2   | チアベンダゾール  | 202.1    | 10            | 135        | ポジティブ |
| 3   | イマザリル     | 297.1    | 10            | 135        | ポジティブ |
| 4   | メタザクロル    | 278.0    | 10            | 135        | ポジティブ |
| 5   | カルボフラン    | 222.1    | 10            | 135        | ポジティブ |
| 6   | アトラジン     | 216.1    | 10            | 135        | ポジティブ |
| 7   | ペンタゾン     | 239.1    | 10            | 135        | ネガティブ |
| 8   | 2,4,5-T   | 252.9    | 10            | 135        | ネガティブ |
| 9   | シルベックス    | 266.9    | 10            | 135        | ネガティブ |
| 10  | ジノセブ      | 239.1    | 10            | 135        | ネガティブ |
| 11  | アシフルオルフェン | 360.0    | 10            | 135        | ネガティブ |

## 結果と考察

2本の別々の Agilent InfinityLab Poroshell 120 LC カラムに対して、一方は低 pH 条件、もう一方は高 pH 条件によりストレスを加えました。この結果を図 1 に示します。

高濃度溶液の 2 % トリフルオロ酢酸 (pH 1) を使用して、温度を 85 °C に上昇させ、CS-C18 カラムにストレスを加えました。カラムを常にこのストレス条件にさらし、トルエンを繰り返し QC 注入して性能の変化を追跡しました。pH 1 と 85 °C でのカラム容量の 20,000 倍を超える移動相負荷に対して、保持力とピーク形状はほとんど変化せず、優れた低 pH 安定性を示しました。

CS-C18 の高 pH での安定性を試験するために、カラムをナフタレンサンプル注入と、高 pH ストレスバッファの 10 mM 炭酸水素アンモニウム (pH 10) に 2 時間さらすことを交互に行ないました。この処理を、合計カラム容量の 50,000 倍のストレスバッファにさらすまで繰り返し実行するとともに、カラム温度を 50 °C に上昇させ、カラム固定相にさらにストレスを加えました。この場合も、CS-C18 は高 pH 条件下で高い堅牢性を示し、試験期間を通してピーク形状と保持力が維持されました。

CS-C18 は非常に広範囲で pH 安定性を実現しているため、イオン性化合物を使用したメソッド開発に最適です。逆相 LC (RPLC) モードで動作させた場合、分析対象物は中性状態で大部分が保持されています。酸性化合物は低 pH で多数が保持され、塩基性化合物は高 pH で多数が保持されています。中性化合物は、移動相の pH の影響を受けていません。同様に、イオン化状態を変化させない酸性および塩基性化合物にも、移動相の pH の変化による影響はありません。

図 2 に、メソッド開発ツールとして使用される pH の簡単な例を示します。サンプルには、1 種類の酸性化合物、1 種類の塩基性化合物、および 3 種類の中性化合物が含まれていました。分析は一般的なアセトニトリルのグラジエント 5 ~ 95 % で実施し、低 pH 移動相で実施してから、再度、高 pH 移動相で実施しました。赤色の矢印は、酸性化合物の移動を示しており (pH が増加するにつれて保持が喪失)、青色の矢印は、塩基性成分の移動を示しています (pH が増加するにつれて保持を獲得)。一方、黒色の矢印は、中性化合物が移動相の pH により保持を変化させないことを示しています。

図 3 は、低および高 pH における別の一般的なアセトニトリルのグラジエントでのスクリーニング結果を示していますが、ここでは酸性および塩基性農薬のさらに複雑なサンプルを使用しています。図 3 のピーク番号は、表 4 の対応する化合物番号により識別できます。ピークの色は、低および高 pH クロマトグラム間で一致させています。図からわかるように、pH 2.7 と 10 の異なる移動相間で、顕著なピーク移動と非常に異なる選択性が見られました。

図 4 は、図 3 のピークを簡略化したもので、酸性化合物は赤色、塩基性化合物は青色で色分けしています。これにより、酸性農薬は低 pH のギ酸で多数が保持されている一方、塩基性農薬は高 pH の pH 10 ギ酸アンモニウムバッファで多数が保持されていることが簡単にわかります。また注目すべきことは、黒色で示されている 2 つのピークです。これらはイオン性化合物ですが、その pKa は試験した pH 範囲 2.7 ~ 10 を外れています。したがって、これらの化合物は 2 種類の移動相間でイオン化状態を変化させておらず、中性化合物と同様に保持も変化しません。

前に説明した分離で使った単純なアセトニトリルのグラジエントは、メソッド開発の優れた開始点です。イオン性化合物が存在する場合は、サンプルを広範囲の移動相の pH でスクリーニングすることにより、選択性が大幅に変化します。これにより、すべての成分を保持して分離する可能性を高めることができます。

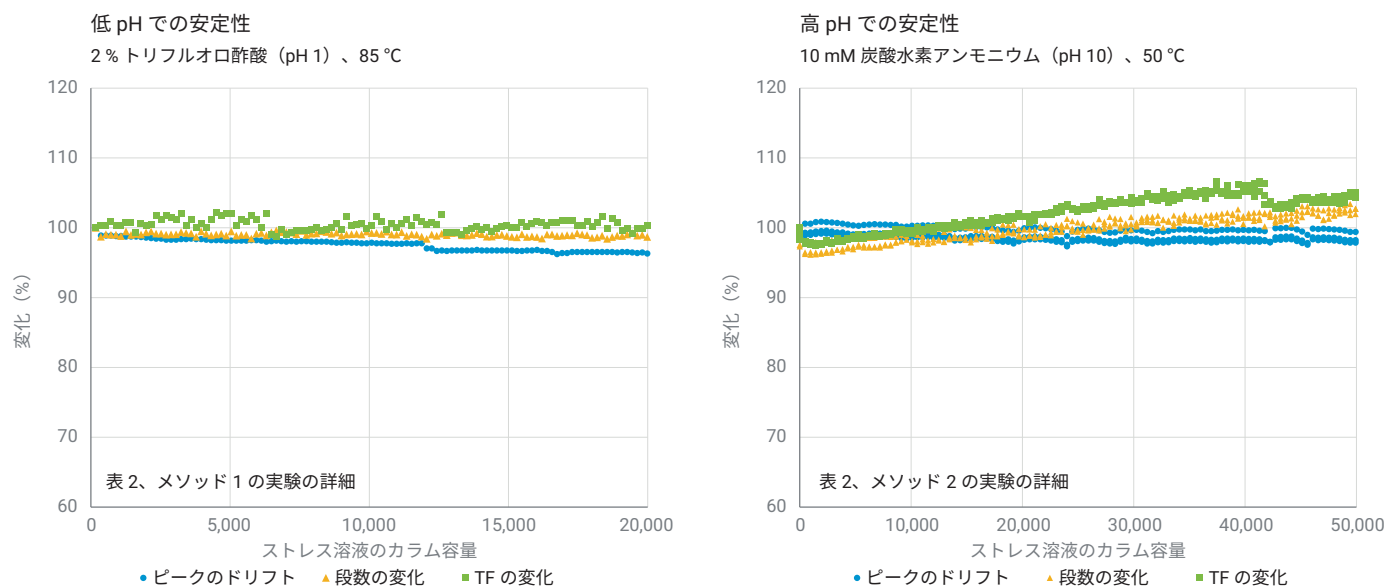


図 1. Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 は、ストレスの多い高温分析の場合でも、低および高 pH 移動相の両方での使用に対して安定しています。

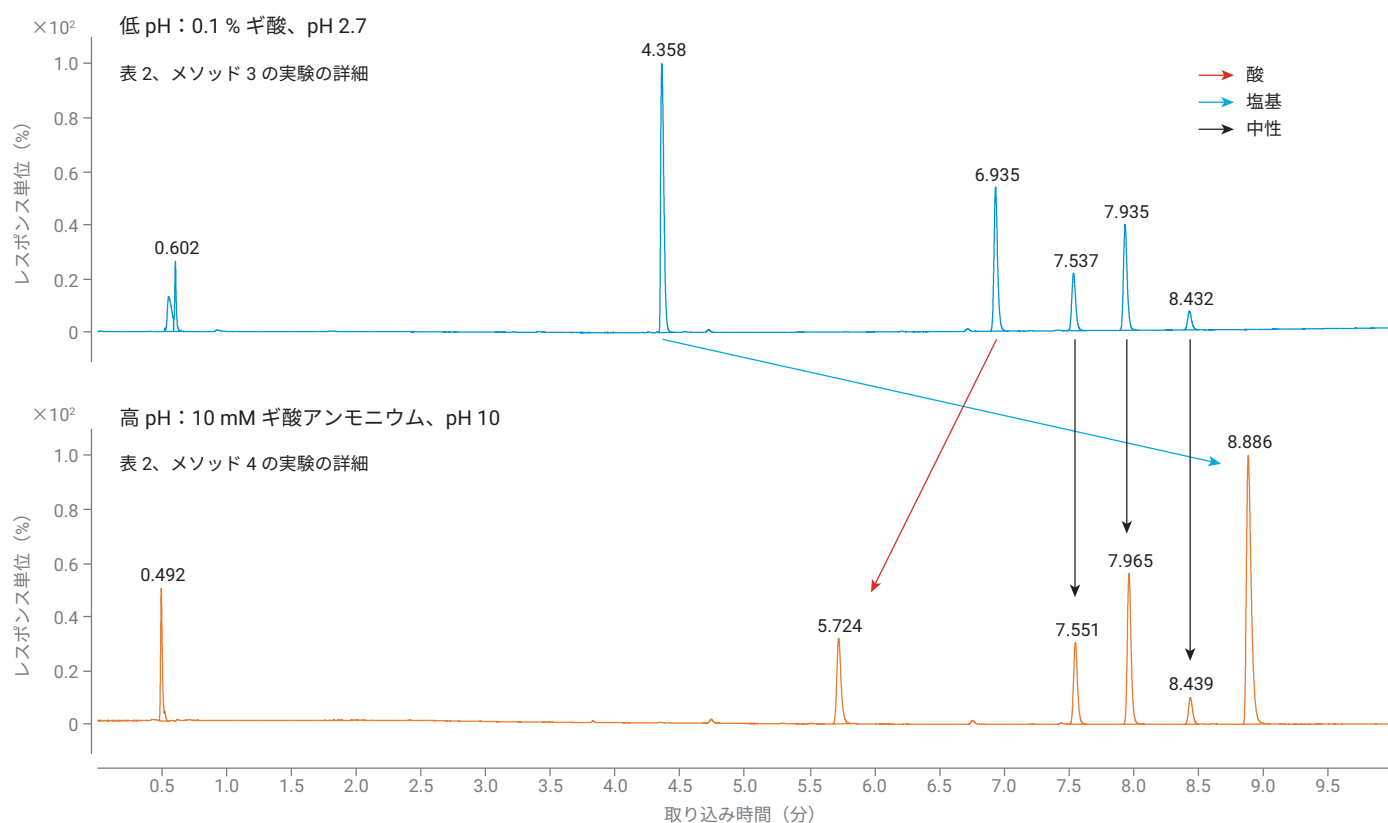


図 2. 移動相の pH は、Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 によるイオン性化合物の分離における強力なメソッド開発ツールです。





## 結論

荷電表面の Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 カラムは、ストレスの多い高温の条件が加えられた場合でも、移動相の低および高 pH の両方において優れた寿命を実現します。メソッド開発ツールとして移動相の pH を使用する有効性を、2 種類のサンプル混合物により示しました。分析対象物は、中性状態の場合に RPLC モードで多数が保持されています。酸性化合物は低 pH で多数が保持され、塩基性化合物は高 pH で多数が保持されており、中性化合物は移動相の pH の変化による影響を受けていません。広い pH 範囲全体に対応するカラムを使用することにより、イオン性化合物のメソッドをきわめて柔軟に開発することができます。

## 参考文献

1. Gratzfield-Huguen, A.; Naegel, E. Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムによる 効率の最大化  
*Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5602JAJP, **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](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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, August 17, 2020  
5994-2274JAJP  
DE.2693171296