

# Agilent InfinityLab Poroshell 120 C18 カラムの直交型選択性を用いた低 pH に おけるメソッド開発

## 著者

Anne Mack  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

このアプリケーションノートでは、LC メソッド開発における分離度について考察します。理論上、クロマトグラフィー分離に影響を与える変数として最も重要な因子は選択性です。このアプリケーションノートでは、ギ酸とアセトニトリルの単純なグラジエントを使用して、動物用医薬品サンプルに関する、4 種類の Agilent InfinityLab Poroshell 120 C18 カラムのユニークな選択性について説明します。

## 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。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>

表面多孔質粒子カラムで最も一般的な粒子サイズは 2.5 ~ 3  $\mu\text{m}$  です。これらの粒子の効率は全多孔質粒子カラムのサブ 2  $\mu\text{m}$  と同等ですが、約 50 % の背圧で分析できます。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。

アジレントは現在、逆相 LC 分離で使用する 2.7  $\mu\text{m}$  InfinityLab Poroshell 120 粒子に関する 12 種類の結合相ケミストリを提供しています。これらの結合相のうちの 4 種類は C18 であり、それぞれがユニークな分離能力を備えています。このアプリケーションノートは、すべての C18 が同じであるとは限らないことを示しており、LC メソッド開発時に複数の選択性オプションを用意することの重要性について示します。

## 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 4 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。

この研究で分析した 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、それぞれ 0.01 mg/mL の水溶液を調製しました。すべての化合物を図 1 に示します。

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  $\mu\text{m}$  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"><li>• デガッサ</li><li>• シールウォッシュポンプ</li><li>• 35 <math>\mu\text{L}</math> 溶媒ミキサー : Agilent Jet Weaver, 35 <math>\mu\text{L}/100 \mu\text{L}</math> (p/n G4220-60006)</li><li>• ファームウェア : B.07.23 [0009]</li></ul>
Agilent 1290 Infinity II バイアルサンプラ (G7129B)	<ul style="list-style-type: none"><li>• サンプルサーモスタット (p/n G7167-60101)</li><li>• 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 <math>\mu\text{L}</math>, 分析ヘッド 20 <math>\mu\text{L}</math></li><li>• オートサンブラ &amp; ヒーター : キャピラリ, ステンレス製, 0.12 <math>\times</math> 105 mm, SL/SL (p/n 5500-1238)</li><li>• 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)</li><li>• キャップ, スクリュー, 青, PTFE/赤シリコンセパタム, 100 個 (p/n 5182-0717)</li><li>• バイアルインサート, 250 <math>\mu\text{L}</math>, ガラス製, 樹脂足付き, 100 個 (p/n 5181-1270)</li><li>• ファームウェア : D.07.23 [0009]</li></ul>
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"><li>• 内蔵タイプ : G7129B</li><li>• 3.0 <math>\mu\text{L}</math> 熱交換器</li><li>• ヒーター &amp; 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)</li><li>• カラム &amp; フローセル : キャピラリ, ステンレス製, 0.075 <math>\times</math> 220 mm, SV/SLV (p/n 5067-4784)</li><li>• ファームウェア : B.07.23 [0009]</li></ul>
Agilent Ultivo LC/TQ (G6465A)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agilent Jet Stream ESI イオン源</li></ul>
Agilent 1290 Infinity II ダイオード アレイ検出器 (G7117B)	<ul style="list-style-type: none"><li>• 超高分散 Max-Light カートリッジフローセル, 10 mm, 0.60 <math>\mu\text{L}</math> (p/n G4212-60038)</li><li>• UV ランプ (p/n 5190-0917)</li><li>• ファームウェア : D.07.23 [0009]</li></ul>
Agilent LC カラム	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 <math>\times</math> 100 mm, 2.7 <math>\mu\text{m}</math> (p/n 695775-942)</li><li>• Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 2.1 <math>\times</math> 100 mm, 2.7 <math>\mu\text{m}</math> (p/n 685775-902)</li><li>• Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 <math>\times</math> 100 mm, 2.7 <math>\mu\text{m}</math> (p/n 695775-902)</li><li>• Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18, 2.1 <math>\times</math> 100 mm, 2.7 <math>\mu\text{m}</math> (p/n 695775-702)</li></ul>

表 2. UHPLC メソッドパラメータ

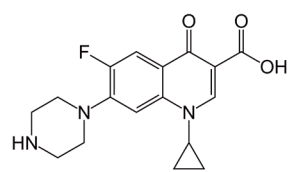
パラメータ	設定値
移動相	A : 水 B : アセトニトリル C : 2 % ギ酸水溶液
溶出条件	0.4 mL/min、15 分で 0 ~ 95 % B、 分析を通して 5 % C で一定に保持
カラム温度	30 °C
注入量	0.05 µL
サンプル	0.01 mg/mL の標準品水溶液 (図 1 の化合物)
検出	LC/MS/MS : 表 3 ~ 4 を参照

表 3. LC/TQ イオン源メソッドパラメータ

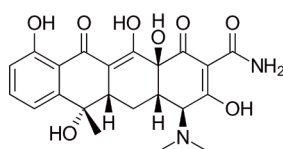
MS ソース	設定ポイント
ガス温度	150 °C
ガス流量	12 L/min
ネブライザ	20 psi
シースガス温度	250 °C
シースガス流量	5 L/min
キャピラリー電圧	2,000 V

表 4. 動物用医薬品の LC/TQ 取り込みメソッドパラメータ

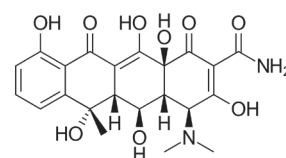
化合物名	プリカーサ (m/z)	プロダクト (m/z)	フラグメンタ (V)	CE (V)	極性
シプロフロキサシン	332	314.3	100	20	ポジティブ
エンロフロキサシン	360.1	342.4	150	15	ポジティブ
エリスロマイシン	734.68	158.2	150	20	ポジティブ
オキサシリン	402.4	160.3	75	7	ポジティブ
オキシテトラサイクリン	461.1	426.4	125	10	ポジティブ
ペニシリン-G	335.17	176	125	7	ポジティブ
スルファメラジン	265.18	92.1	100	20	ポジティブ
スルファメタジン	279	124.3	125	20	ポジティブ
テトラサイクリン	445.2	410.3	125	10	ポジティブ



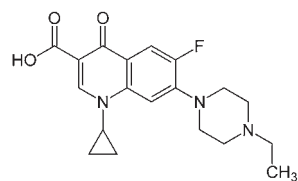
シプロフロキサシン



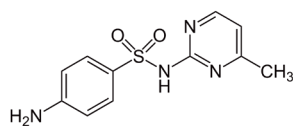
オキシテトラサイクリン



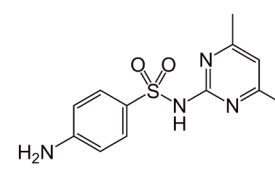
テトラサイクリン



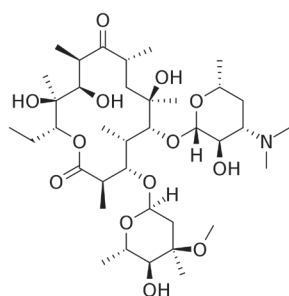
エンロフロキサシン



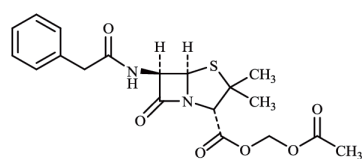
スルファメラジン



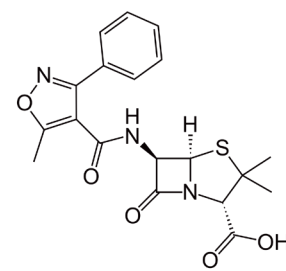
スルファメタジン



エリスロマイシン



ペニシリン-G



オキサシリン

図 1. 対象化合物

## 結果と考察

クロマトグラフィー分離能は、LC メソッド開発者には一般的な分離基準です。すべての成分に対してベースライン分離能を達成することにより、ダイオードアレイ、蛍光、屈折率、蒸発光散乱のような非選択的検出器を使用した場合でも正確な積分と定量を実行できます。質量分析計のような高度な検出器においても、クロマトグラフィー分離能の達成は、異性体ペアを分析する場合や、イオン抑制による化学種の共溶出を防止するうえで有用です。

分離能について十分に理解するために、図 2 に分離能の式を示します。図 2 は、効率性、選択性、保持がどのようにクロマトグラフィー分離能に影響を与えるのかを示しています。ただし、図 3 に示すように、これらはさまざまな程度で影響を与えます。

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) N^{0.5} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k}{1 + k}\right)$$

分 離 能
効 率 性
選 択 性
保 持

図 2. 分離能の式

図 3 に、理論上の分離能値を示します。この値は、一度に 1 つのクロマトグラフィー因子を変動させて、他の 2 つを一定に保持することにより生成しました。このプロットの目的は、分離能に関する各変数の単独での影響を示すことです。問題の 3 つの変数は、k'、段数、アルファです。

成分の保持係数 k' は、分離能に影響を与える 1 つの因子です。保持を増大させるには、移動相の強度を低減させます。これは、逆相 LC の場合、有機物の含有量を低減させることを意味します。成分を長時間保持すると、分離能が増大する場合があります。ただし、図 3 からわかるように、k' を 2 から 12 に増大させても、理論上の分離能は 1 から 1.5 にしか増大しません。

段数、つまり効率を増大させるには、LC カラムの長さを長くするか、または粒子サイズを小さくします。図 3 は、段数を 5,000 ~ 25,000 に増大させた状態を示しています。これは、カラム長を 5 倍長にしたことに相当します。ただし、このように N を大幅に増大させても、理論上の分離能は 1 から 2.5 にしか増大しません。

アルファ、つまり選択性について考えた場合、これが分離能に影響を与える主要な因子といえます。図 3 では、アルファは 1.1 から 2.1 にしか増大していません。ただし、理論上の分離能は 1 ~ 6 を超えて増大しており、理論上の分離能に大きな影響を与えていることがわかります。クロマトグラフィー分離能に最も大きな影響を与える因子は選択性です。選択性を変更するには、クロマトグラフィーシステムのケミストリ、つまり移動相またはカラム固定相を変更する必要があります。移動相の場合、有機溶媒のタイプ（アセトニトリルとメタノール）が選択性に影響を与えます。移動相の pH も選択性に影響を与えます。これは、アジレントアプリケーションノート『Using pH as a Method Development Tool with Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18』（メソッド開発ツールとしての pH と Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 の使用）（資料番号 5994-2274EN）に示されています。<sup>3</sup>

カラム固定相の変更は、選択性を変更して分離能を向上させる可能性のある別の方法です。図 4 は複数の種類の C18 結合相が、溶出順序の変更とクロマトグラフィー分離能に影響を与えるのに十分な差異が生じていることを示しています。

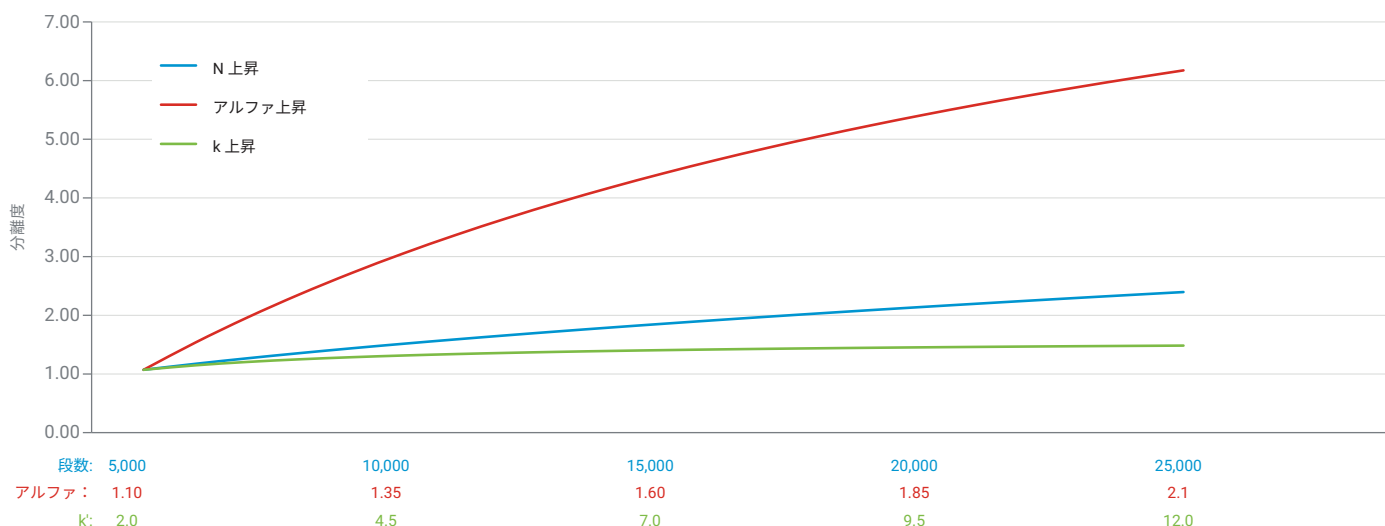


図 3. 分離能に影響を与える因子

図 4 は、動物用医薬品と低 pH 移動相に対する 4 種類の InfinityLab Poroshell 120 C18 カラムの直交型選択性を示しています。このアプリケーションノートで実施したように、複数のカラムをギ酸とアセトニトリルの単純なグラジエントでスクリーニングすることは、LC メソッド開発を開始する際の一般的な方法です。サンプルが複雑になるほど、カラムのスクリーニングが即座にすべての対象化合物のベースライン分離能を提供する可能性は低くなります。多くの場合は、追加のメソッド開発が必要になる場合もあります。ただし、この方法でメソッド開発を開始すると、分析に適したカラムを系統的に選択できます。

InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 は、例に示したように最も直交型の選択性を提供しており、最も適切な分離が実現しました。多数の医薬品化合物が塩基性であることを考えれば、これは驚くことではありません。CS-C18 の荷電表面ケミストリは、塩基性化合物の独自の保持をユーザーに提供するとともに、ギ酸のような弱イオン性移動相を使用した際に優れたピーク形状とロード性能を実現するように設計されています。

## 結論

前述の分離で使用したギ酸とアセトニトリルの単純なグラジエントは、メソッド開発の優れた開始点です。このシンプルなメソッドを、InfinityLab Poroshell 120 ファミリのカラムのような高効率カラムと組み合わせて使用することにより、複数のカラム固定相を短時間で評価できます。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。

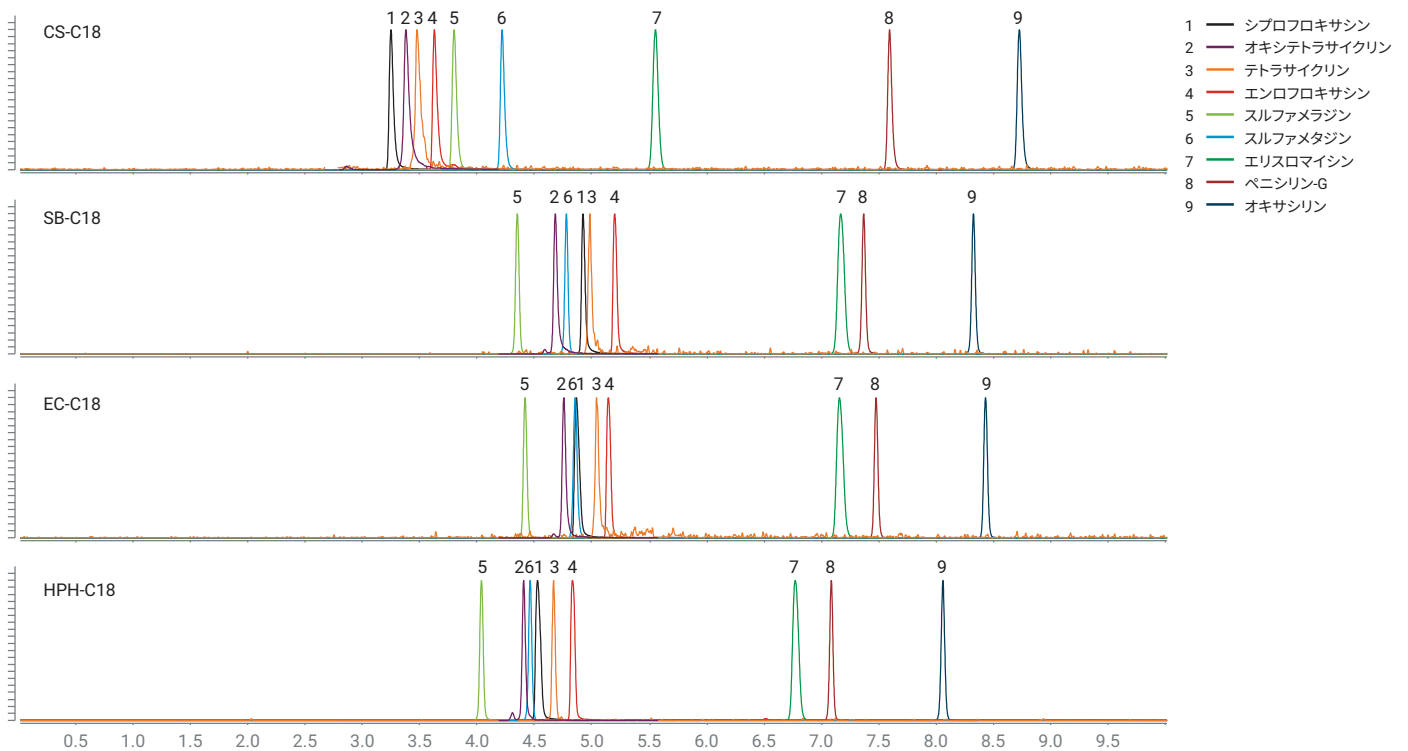


図 4. 低 pH 移動相を用いた 4 種類の異なる Agilent InfinityLab Poroshell 120 C18 カラムの動物用医薬品のクロマトグラムの比較

## 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**.
3. Mack, A. Using pH as a Method Development Tool with Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2274EN, **2020**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](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, September 4, 2020  
5994-2358JAJP  
DE.0273611111