

Agilent InfinityLab Poroshell 120 C18 カラムの直交型選択性を用いた 高 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の重要な要因である選択性について考察します。高 pH 条件におけるカラムの選択性を比較するために、高 pH で優れた安定性を発揮する 2 種類の Agilent InfinityLab Poroshell 120 C18 カラムを利用し、pH 10 に調整した移動相（ギ酸アンモニウムとアセトニトリル）の単純なグラジエントを使用した農薬サンプルの分析を行いました。

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、低背圧で高効率です。¹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。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。これらの粒子のカラム効率は従来のサブ 2 μm カラムと同等ですが、約 50 % の背圧で分析可能です。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 μm 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。これらの相のうちの 4 種類は C18 であり、それぞれが独自の分離能力を備えています。また、このうち 2 種類は高 pH 移動相で高い安定性を発揮します。このアプリケーションノートでは、すべての C18 カラムの選択性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 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。

2 種類の農業標準はアジレントから購入しました (p/n 5190-0469-1 および 5190-0469-2)。ギ酸アンモニウムおよび水酸化アンモニウムは Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。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 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 μL/100 μL (p/n G4220-60006) ファームウェア : B.07.23 [0009]
Agilent 1290 Infinity II バイアルサンプルラ (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 オートサンプルラ & 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、スクリュウ、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 シリズ-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]
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) Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-702)

表 2. UHPLC メソッドパラメータ

移動相	溶出条件	カラム温度	注入量	サンプル	検出
A) 水 B) アセトニトリル C) 200 mM ギ酸アンモニウム水溶液、28 ~ 30 % の水酸化アンモニウムで pH = 10 に調整	0.4 mL/min、10 分で 10 ~ 95 % B、分析を通して 5 % C で一定に保持	30 °C	0.5 μL	Agilent 塩基性農業 (p/n 5190-0469-1) + 酸性農業 (p/n 5190-0469-2)、1:2 に混合	LC/MS、ESI±、SIM : 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

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。

分離度と変数の詳細な説明については、アジレントアプリケーションノート『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』（資料番号 5994-2358JAJP）に示されています。³このアプリケーションノートでは、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が選択性であることを示します。

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。⁴

表 4. LC/TQ SIM 取り込みメソッドパラメータ

	化合物名	質量 (m/z)	ドウェル (ミリ秒)	フラグメンタ (V)	極性
1	メトスラム	418.1	10	135	ネガティブ
2	チアベンダゾール	202.1	10	135	ポジティブ
3	メトキシロン	229.1	10	135	ネガティブ
4	アシフルオルフェン	360.0	10	135	ネガティブ
5	アミノカルブ	209.3	10	135	ポジティブ
6	カルボフラン	222.1	10	135	ポジティブ
7	アトラジン	216.1	10	135	ポジティブ
8	イマザリル	297.1	10	135	ポジティブ
9	マラチオン	331.0	10	135	ネガティブ
10	ダイアジノン	305.2	10	135	ネガティブ
11	ピラクロストロピン	388.2	10	135	ネガティブ
12	ヘキサフルムロン	459.0	10	135	ポジティブ

カラム固定相の変更は、選択性を変更して分離度を向上させる可能性のある別の方法です。図 1 は、2 種類の C18 結合相が溶出順序を変更して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 1 は、農業と高 pH 移動相のサンプルに関する、2 種類の InfinityLab Poroshell 120 C18 カラムの直交型選択性を示しています。この研究で実施したように、複数のカラムを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

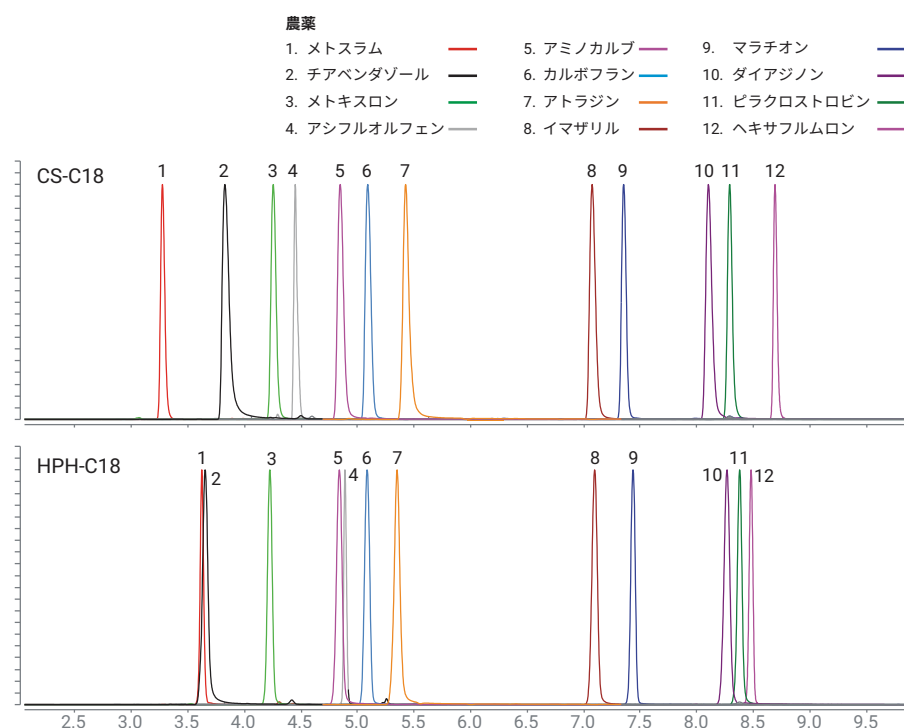


図 1. 高 pH の移動相を用いた 2 種類の Agilent InfinityLab Poroshell 120 C18 の塩基性農業分析の比較

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。また、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。

図 1 に示す農業サンプルには、多数の塩基性成分が含まれています。逆相 LC 分析では、塩基性成分は高 pH の移動相中で中性状態になり、LC カラムに保持されています。しかし、大部分のシリカベース LC カラムは、高 pH での長時間使用に対応していません。Agilent InfinityLab Poroshell 120 ファミリには、意図的に高 pH での安定性を実現するように設計された 2 種類の C18 固定相があります。これは、塩基性成分の保持と分離に有効です。CS-C18 と HPH-C18 はいずれも、高 pH 条件下での塩基性成分のメソッド開発に最適なカラムです。

今回の検討では、InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 が最も適切な分離を実現しました。多数の農業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、塩基の独自の保持をユーザーに提供するとともに、低 pH と高 pH の両方の条件下で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即座に評価できます。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。

参考文献

1. Gratzfield-Hugsen, A.; Naegele, 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. 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. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2358JAJP, **2020**.
4. 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

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, September 14, 2020

5994-2390JAJP

DE.0205671296