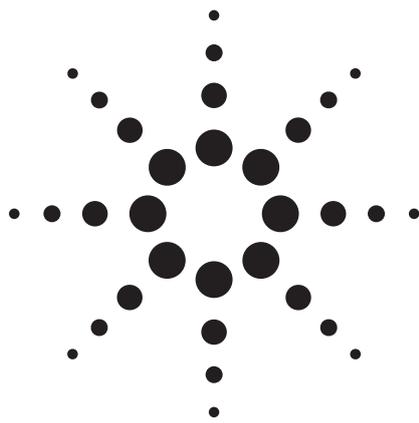


エストロゲン分離における Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムの優れた選択性



アプリケーション

製薬、環境

著者

John W. Henderson Jr. and William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

新しいZORBAX固定相であるAgilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexylを用いて、5種類のエストロゲン型ステロイドを良好に分離しました。このカラムはフェニル基を含む分析物において独特の選択性を備えていることから、同一の分離条件において、C18や他の3種類のフェニルカラムよりも良好に分離できました。分離能を最適化し、ピークを完全に分離するためには、選択性がもっとも重要な要素となること、本研究の比較により示されています。選択性は、カラムを異なる相を持つものに交換するだけで簡単に変えることができます。そのため、メソッド開発に利用できるカラム(固定相)が幅広く用意されていれば、最良のHPLCメソッドを得られるチャンスが大きくなります。シリカの改良、エンドキャップ、結合技術、フェニルヘキシル部分と分析物の芳香族基との分子作用といった 特性を持つEclipse Plus Phenyl-Hexylカラムは、メソッド開発には欠かせない貴重なカラムです。

はじめに

多くの逆相LCメソッド開発プロトコルには、移動相の有機溶媒の交換(通常はメタノールとアセトニトリル)、分析物がイオン性物質である場合の移動相の水性成分のpHの変更、移動相グラジエントの調節などが含まれます。温度や移動相のイオン強度といったその他の可変要素も、分離能の変更に効果を発揮します。多くの種類の固定相が市販されるようになってきていることから、カラムの交換も基本的な手法になっています。また、カラム切り替えバルブなどの機器の自動化や、LCメソッド開発ソフトウェアにより、カラム選択が容易になっています[1]。

選択性は分離能を左右するきわめて重要な要素であるため、最高の分離能を実現し、最良のメソッドを開発するためには、さまざまな固定相を試してみることが重要となります[2]。選択性を変化させれば、効率(N)や保持力(k')を高める以上に分離能を向上させることができます。

Eclipse Plus Phenyl-Hexylカラムは、メソッド開発においてカラム交換により選択性を変化させる場合の優れた選択肢となります。これにはいくつかの理由があります。Eclipse Plusカラムでは、高密度結合と精密なダブルエンドキャッピングプロセスにより、優れた性能が実現しています。改良型の高性能シリカ、新しいエンドキャッピング試薬、改良シリカ用に最適化された独特の結合プロセスという特長も備えています。また、固定相のフェニル基と芳香族物質との分子相互作用の向上により、さらなる保持メカニズムと選択性の向上が実現しています。さらに、固定相のヘキシル結合も、固定相の全体的な保持特性に大きく影響しています。



Agilent Technologies

本研究では、フェニル基を持つエストロゲンについて、ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexylの選択性の効果をZORBAX Eclipse Plus C18と比較しています。この2つの固定相の選択性が異なることは明白ですが、本研究ではEclipse Plus Phenyl-Hexylを他のフェニルカラムとも比較し、同様の分離能の変化を確認しました。本研究ではフェニルヘキシル相が最適な選択相でしたが、固定相の選択性は予測が不可能で、最適なものはそれぞれの実験によって決まるため、アルキル(C18、C8、C3)、フェニル、その他の相(シアノ、アミド結合など)といった各種の固定相も、メソッド開発プロトコルで試してみる価値があります。

実験手法

Agilent 1200 Rapid Resolution LC (RRLC) システムを用いて、カラムの比較を行ないました。

- G1312Bバイナリポンプ、移動相A: 水、移動相B: メタノール; 流速: 1 mL/min (40:60 A:B)
- G1376C自動液体サンプラ (ALS)、注入量3 μ L
- G1316B温度制御カラム恒温槽、25 $^{\circ}$ C
- G1315Cダイオードアレイ検出器 (DAD)、220 nm、G1315-60025フローセル (パス6-mm、容量5- μ L) を使用、反応時間を1秒に設定

カラム:

- ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 4.6 mm \times 100 mm、5 μ m、PN 959996-912
- ZORBAX Rapid Resolution Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 4.6 mm \times 100 mm、3.5 μ m、PN 959961-912
- ZORBAX Rapid Resolution HT Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 4.6 mm \times 100 mm、1.8 μ m、PN 959964-912
- ZORBAX Rapid Resolution Eclipse Plus C18 4.6 mm \times 100 mm、3.5 μ m、PN 959961-902
- 名前を挙げていない市販フェニルカラムは、すべて4.6 mm \times 100 mm、5 μ m、球形シリカです。

他社製カラムでは3.5- または1.8- μ mのサイズが利用できないため、選択性を直接比較するために、5- μ mカラムを使用しました。

手締めフィッティング (アジレント部品番号5065-4426[10個組]) を使用すれば、温度制御カラム恒温槽へのカラムの着脱やDADフローセルへの直接接続が容易になります。

バイアル: アンバースクリューキャップ
(アジレント部品番号5182-0716)

バイアルキャップ: 青色スクリューキャップ
(アジレント部品番号5282-0723)

5種類のエストロゲン系分析物をSigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から入手し、MeOHに溶解して濃度を約0.5 mg/mLとしました。その後、各エストロゲン溶液50 μ Lを混合して混合サンプルを作成し、250 μ Lの混合液を750 μ Lの水で希釈しました。図1に分析物の名称と構造を示しています。

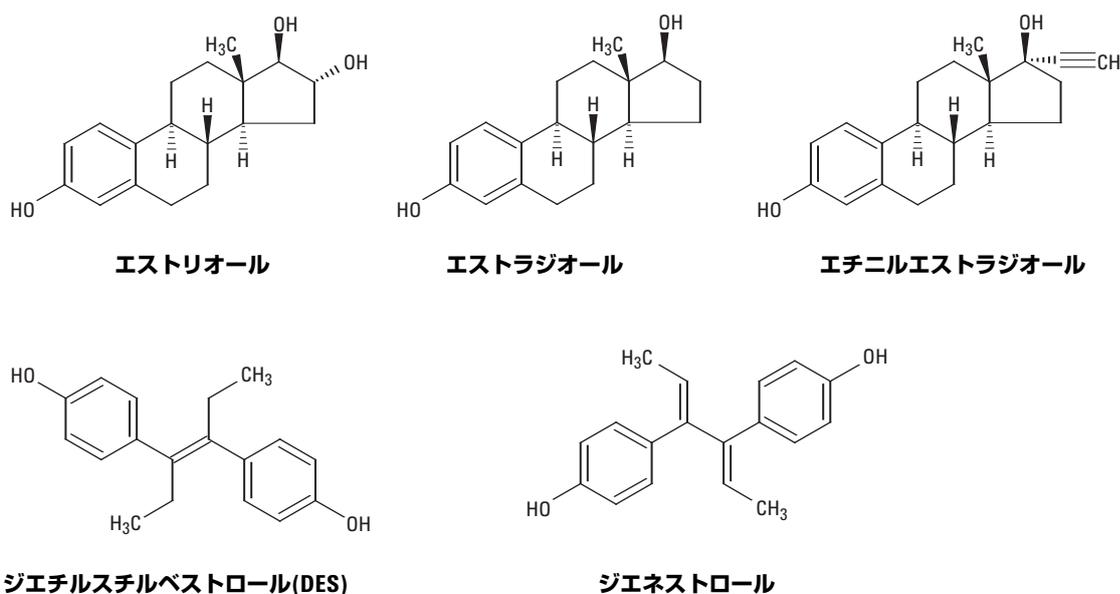


図1. 本研究で分析したエストロゲン

結果と考察

固定相を比較するために、カラムを除くすべてのクロマトグラフィパラメータを一定に保ちました。有機修飾剤には、アセトニトリルではなくメタノールを使用しました。これは、メタノールではフェニル基の分子相互作用が高まるためです [3]。アイソクラティック移動相組成は、メタノール60%、水40%としました。

必ずしもそうとは限りませんが、C18などのアルキル相は、フェニル相とは異なる選択性を示すため、異なる分離能を期待できます。このことは、図2に示されています。さらに興味深いことに、小さい粒子 (1.8 μm に対して3.5 μm) が使われているにもかかわらず、C18カラムでは分離能が低くなっています。同じ長さのカラムでは、粒子が小さくなるほど効率が高くなります。ただし、C18カラムの効率の高さは、エストロゲン分離におけるフェニルヘキシルカラムの選択性という利点を上回るものではないと言えます。

理論上のカラム効率 (N) は、以下の式で計算されます。

$$N = L/H$$

カラムの長さ (L) を理論段相当高さ (H) (2つの粒子直径の長さにはほぼ等しい) で割ったものがNとなります。したがって、5- μm カラムの理論上の効率は、 $N = 100,000 \mu\text{m} / (2) (5 \mu\text{m}) = 10,000$ となります。Rapid Resolution (3.5 μm) カラムのNは14,300で、効率は30%ほど高くなります。

図2を見ると、Eclipse Phenyl-Hexylが最良の選択肢であることがわかります。5- または3.5- μm のEclipse Plus Phenyl-Hexylカラムを使えば、2つの方法でメソッドをさらに最適化することが可能です。1つ目は、同じ長さのカラムで小さい粒径を使用して効率を上げる方法 (狭いバンド、感度および分離能の向上)、2つ目は、短いカラムで小さい粒径を使用して、クロマトグラフィ性能を維持しながら分析時間を短くする方法です。

各種のフェニルカラム間の選択性の違いは、C18カラムと比較した場合に比べるとそれほど明らかではないと思われるかもしれませんが、このエストロゲン化合物分析では、C18と比較した場合と同様の顕著な選択性の違いが見られました。4種類のフェニルカラムを用いたエストロゲン分析の結果を図3に示しています。図2のEclipse Plus C18の結果では、5種類のエストロゲンすべてがある程度は分離されていましたが、図3の2つのフェニルカラムでは、同一の条件下で、5種類中4種類しか分離されていません。すべてのC18カラムが同じではないように、フェニルカラムもすべて同じではありません。重要な違いとしては、シラノールエンドキャッピング、フェニル結合 (ヘキシル、エチル、プロピルなど)、炭素量、シリカ特性などがあります。エストロゲン分離において、4種類のフェニルカラムのなかでEclipse Plus Phenyl-Hexylカラムがもっとも優れた分離能を示したのは、こうした特性が組み合わされているためです。

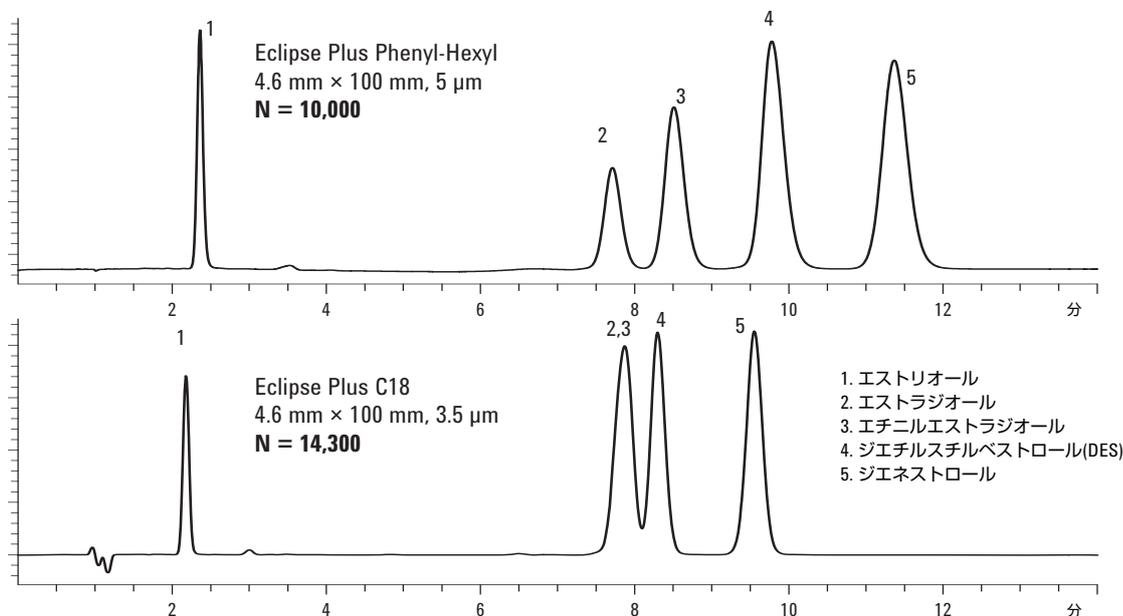


図2. 3.5- μm カラムでは効率が30%上昇しますが、カラムの選択性はそれ以上に分離能への影響があります。

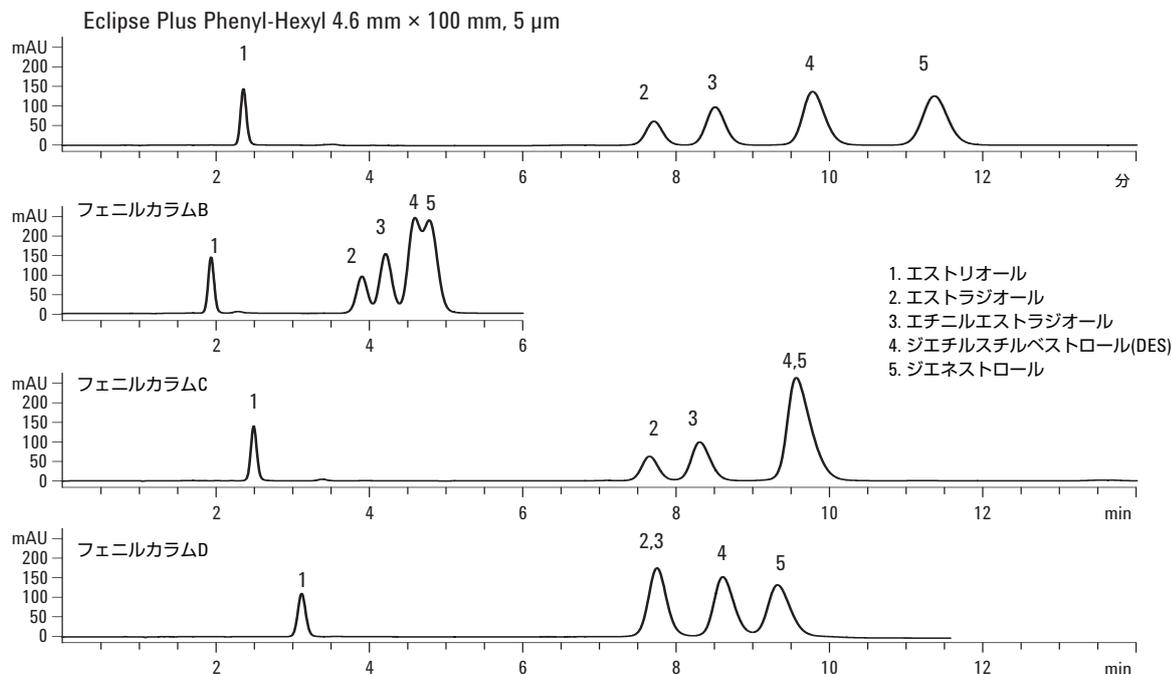


図3. フェニルカラムの選択性の違い

結論

Eclipse Plus Phenyl-HexylカラムなどのHPLCカラムのEclipse Plusシリーズは、シリカ製造や結合技術が改良されており、選択性の変更やクロマトグラフィ分離の改良に最適なカラムになっています。多くの場合、固定相の選択性の違いを予測するのは難しいため、実験ごとに最適な固定相を判断する必要があります。Eclipse Plus Phenyl-Hexylカラムは、エストロゲン分析においてEclipse Plus C18カラムとは大きく異なる選択性を示しましたが、他の市販フェニルカラムとの比較でも、同様に顕著な違いを示しました。シリカ製造や結合技術の改良に加えて、フェニルヘキシルリガンドと芳香族エストロゲンとの独特な分子相互作用という特性を持つEclipse Plus Phenyl-Hexylカラムは、本研究のエストロゲン分析に最適なカラムでした。

参考文献

1. “Automated Method Development Using Agilent 1100 Series HPLC Systems, ChemStation, and ChromSword Software,” Agilent Technologies publication 5988-8927EN
2. V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fourth Ed., p.34. Wiley, 2004
3. M. Yang, et al., “Impact of Methanol and Acetonitrile on Separations Based on π - π Interactions with Reversed Phase Phenyl Column” *J. of Chromatography*, 1097, 124-129, 2005

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
July 11, 2008
5989-9130JAJP

