

Agilent ZORBAX Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムおよび他の ZORBAX フェニルカラムを用いた 100% 水系移動相での極性化合物の分析

アプリケーションノート

医薬品および食品

著者

William J. Long, Anne E. Brooks,
and William Biazzo
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

HPLC で酸類や塩基類などの極性化合物を分析するには、一般的に、イオンペア剤または疎水的相互作用クロマトグラフ (HILIC) カラムを使用する必要があります。本アプリケーションノートでは、100% 水性移動相を使用しても相崩壊という不都合な現象を引き起こさないフェニルカラムの利便性を実証します。脂肪族系酸類とカテコールアミン類 (塩基類) の双方について、さまざまな Agilent ZORBAX フェニル相 (StableBond SB-フェニル、Eclipse XDB-フェニル、Eclipse Plus フェニル-ヘキシル) カラムの選択性を示します。また、こうした化合物に関する選択性が移動相添加剤によって変化することも明らかにします。



Agilent Technologies

はじめに

酸類や塩基類のような極性化合物は逆相液体クロマトグラフィで分離しにくい物質です。pH の値を上げれば塩基類は荷電化されないため、こうした化合物を保持しやすくなります。しかし、pH を上げると分離できなくなる他の化合物がサンプル内に含まれている場合もあります。別の対策としては、イオンペア剤を使用して保持能力を高めるという方法も考えられます。通常、質量分析法にはイオンペア剤を使用することができません。酸性化合物も分離の難しいサンプル、もしくは保持さえ難しいサンプルとされています。一般的には、分析対象化合物が完全にプロトン化 (非荷電化) される pKa 値未満の高い酸性度で作業を進めて移動相の有機含有率を引き下げる必要があります [1]。C8 や C18 相のようなアルキルカラムで起こりやすい問題は、有機含有率の低い移動相における保持能力の劣化や保持の再現性の低下です。フェニルカラムのユニークな特性の 1 つは、カラム崩壊と呼ばれることもある「ディウェッティング」に対する耐性です [2]。100% 水性移動相を利用する予定がある場合には、フェニルカラムが有力な選択肢になります。本アプリケーションノートでは、塩基性と酸性化合物の双方を 100% 水系移動相条件で分離します。

カテコールアミン類は神経伝達物質として働く塩基性化合物です。こうした物質の欠乏または過剰は多くの身体機能に変調をもたらします。カテコールアミン量の変化が各種病状の診断に役立つことが分かっています [3]。

酸性化合物やその塩類はさまざまな用途で食物に添加されています。たとえば、食物に風味を加える香味添加剤や、微生物の成長を抑制するための pH 調整剤、脂質酸化をまねく恐れのある金属イオン (Cu や Fe) の錯化剤、一部の果物や野菜の変色防止剤や防腐剤、ペクチンやタンパク質からなるゲル体の改質によって食感を変える薬剤などに利用されています [4]。

実験

HPLC 分析には次の構成の Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムを使用しました。

- G1312B バイナリポンプ SL、移動相チャンネル A のみ、各種移動相添加剤の水溶液、1 mL/min
- 1376C オートサンブラ (ALS) SL、注入量は 5 μ L
- G1316B 温度制御カラム (TCC) コンパートメント SL、温度は 25 $^{\circ}$ C
- G1316C ダイオードアレイ検出器 (DAD)、波長設定は 268.4 および 360.50 nm (カテコールアミン類の場合)、220.4 および 360.50 nm (酸性化合物の場合)、+ G1315-60024 マイクロフローセル (5 mm パス、6 μ L ボリューム)

ZORBAX カラム

- Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラム 4.6 mm \times 100 mm、5 μ m (部品番号 959996-912)
- Eclipse フェニルカラム 4.6 mm \times 100 mm、5 μ m (カスタム)
- StableBond フェニルカラム 4.6 mm \times 100 mm、5 μ m (カスタム)
- Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラム 4.6 mm \times 150 mm、3.5 μ m (部品番号 959961-912)
- Eclipse フェニルカラム 4.6 mm \times 150 mm、3.5 μ m (部品番号 963967-912)
- StableBond フェニルカラム 4.6 mm \times 150 mm、3.5 μ m (部品番号 863953-912)

化学薬品類

18 M Ω のミリ Q 水は実験室で調製しました。ギ酸、トリフルオロ酢酸 (TFA)、および酢酸、カテコールアミン類、エフェドリン、ノルエフェドリン、ドーパミン、レボドーパ、およびチロシンは、Sigma Aldrich 社 (ペンシルバニア州ベルボンテ) から購入しました。上記の各物質をそれぞれ 1 mg/mL の濃度で水に溶かして混ぜ合わせ、最終濃度 0.2 mg/mL の水溶液を調製しました。L-(+)-酒石酸、DL-リンゴ酸、DL-乳酸、酢酸、クエン酸、およびプロピオン酸をそれぞれ 1 mg/mL の濃度で水に溶かして混ぜ合わせ、最終濃度 0.2 mg/mL の水溶液を調製しました。各化合物のピークを同定し、不純物のないことを確認するために、すべての化合物について個別注入も行いました。各化学物質の化学構造と pKa 値を図 1 に示します。

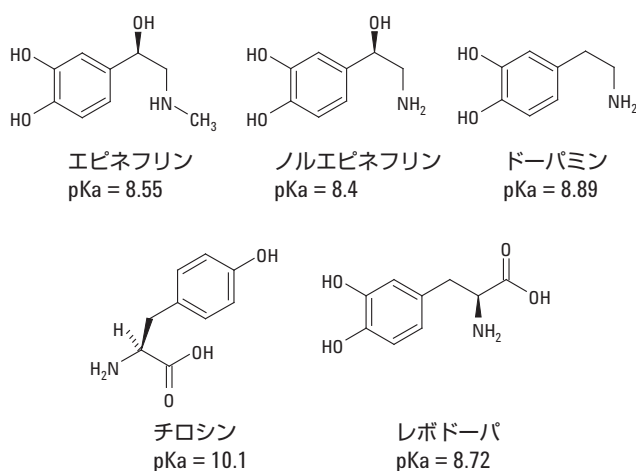


図 1a. カテコールアミン類の化学構造と pKa 値

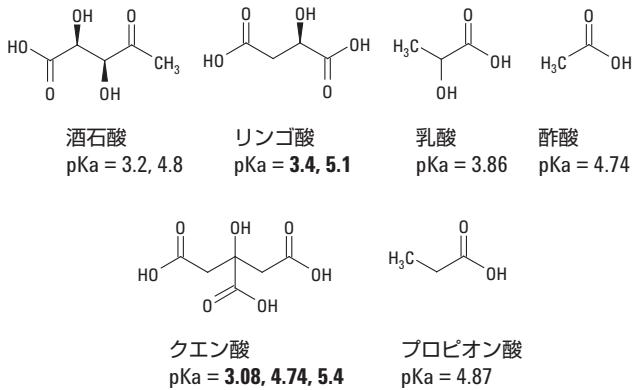


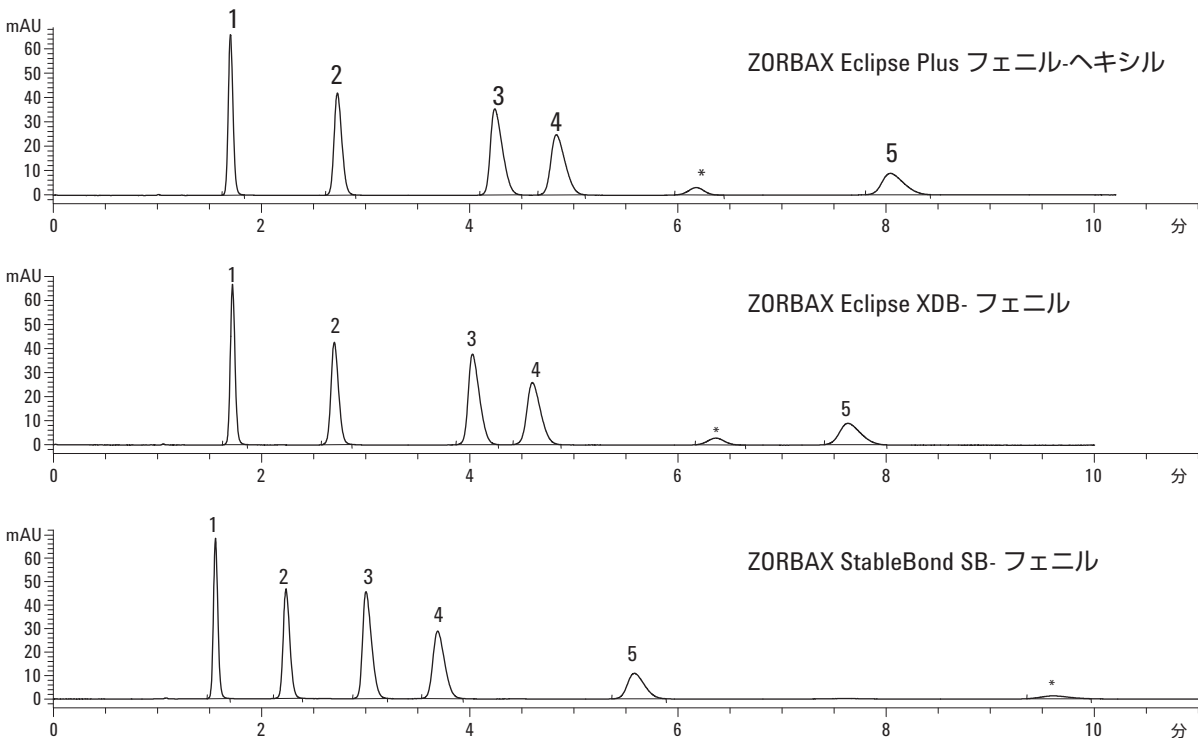
図 1b. 脂肪酸系酸類の化学構造と pKa 値

結果と検討

ZORBAX Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムと Eclipse XDB-フェニル (エチル-フェニル相) カラムは極めて似通った分離能を備えています (図 2 を参照)。混合液のほとんどの成分に関して、2 つのカラムの分離には他のカラムより高い類似性が見られます。最も注目すべき例外は、フェニル-ヘキシルカラムで

はチロシンが XDB- フェニルカラムよりもほんの少し多く保持されることです。おそらく吸着官能基の長いこと、つまり炭素量の多いことが原因と考えられます (9.5 % と 7 %)。StableBond SB- フェニルカラムでは、シリカ表面にシラノール基がむき出しになっていて大きな保護基がないため、異なる選択性が見られます。このカラムでは、大部分のピークが同じ順序で溶出しますが、不純物とチロシンのピーク位置が入れ替わります。多く保持されてあとから溶出してくる不純物ピークは、切り分けに最適な位置にあります。しかし、全般的に見ると、StableBond SB- フェニル分離のピークは、Eclipse XDB- フェニル (エンドキャップのあるエチル-フェニル) 分離のピークほど多く保持されません。

図 3 は、さまざまな酸性移動相を用いた Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムによる分析結果を示したものです。各分析対象化合物の pKa 値は図 1 にリストされています。標的化合物はすべてアミン化合物であるため、移動相の違いによってこの分離にどのような影響が出るかは興味深い内容です。すべての標的化合物が弱塩基であるにもかかわらず、トリフルオロ酢酸 (TFA) の濃度の高い移動相で最も高い保持力が観察されました。



ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン、レボドーパ、不純物^{*}、チロシンの濃度はそれぞれ 0.2 mg/mL、注入量 5 μ L、4.6 mm \times 100 mm の 5 μ m カラム
移動相 = 0.1% TFA 水溶液、1 mL/min、265 nm

図 2. ZORBAX フェニルカラムの選択性の比較 (0.1% TFA 移動相使用時)

図 3 に示した保持力の変化にはさまざまな理由が考えられます。分析時の酸性度が各化合物の官能基の pKa 値に近い場合、化合物の電荷が中和されれば保持力が高まるというのも理由の 1 つです。非荷電化合物は荷電化合物よりも多く保持されます [5, 6]。別の理由としては、イオンペア生成が考えられます。トリフルオロ酢酸 (TFA) とギ酸は一般にイオンペア剤と呼ばれていますが、酢酸はそうではありません。図を見れば分かる通り、TFA の濃度が高くなると保持力が高まります。図 4 に示した 2 種類のリン酸緩衝液による詳しい実験を見れば、pH が低くなるほど保持力の高まる傾向はあっても、TFA 移動相を使用した場合ほど顕著なものではないことが分かります [7, 8]。

図 5 では、分析対象の脂肪酸系酸類がフェニル-ヘキシルカラムとフェニル-エチルカラムでよく分離されています。このことから、極性の高い化合物の分離にはフェニルカラムの使用が適していると判断できます。長いアルキル架橋基を備えた ZORBAX Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムには、エチル-フェニル相の Eclipse XDB- フェニルカラムや Stable-Bond SB- フェニルカラムよりも高い脂肪酸親和性があります。さらに、こうした脂肪酸系酸類の pKa 値未満で作業を進めれば脂肪酸化合物を十分に分離できます。酸性化合物は、Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムより脂肪酸親和性の高い Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカ

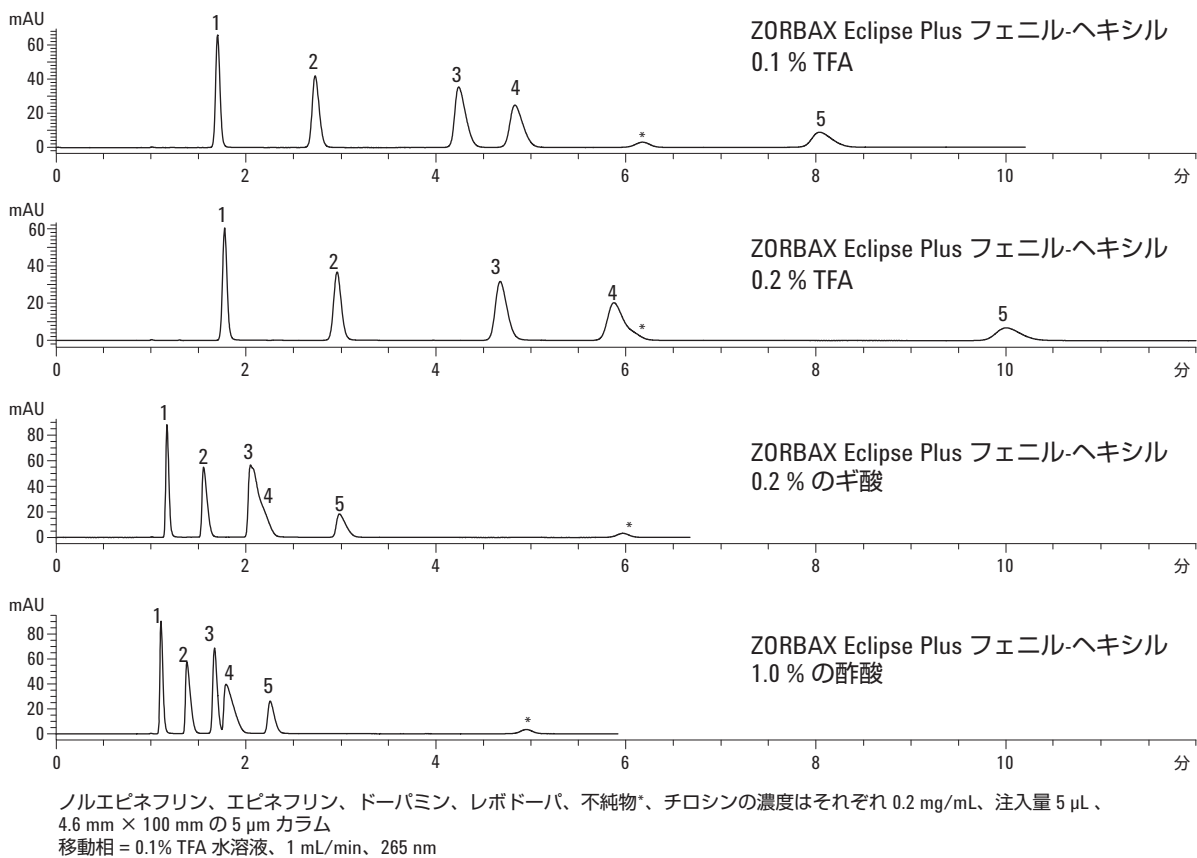
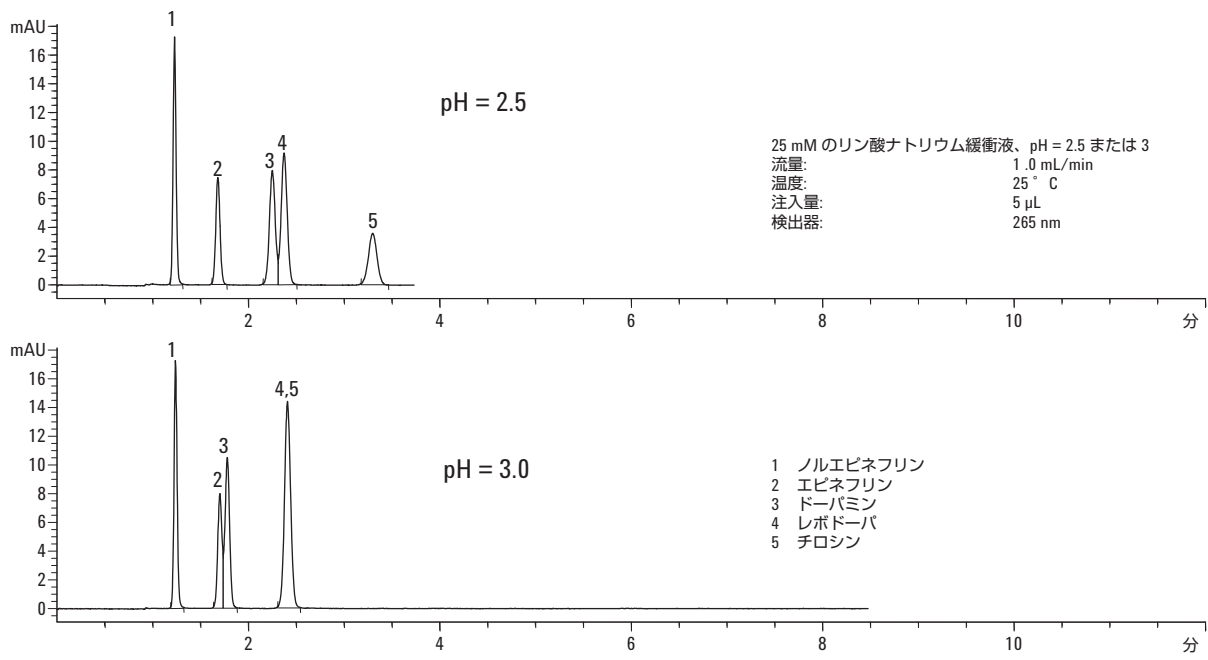


図 3. ZORBAX Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムによる移動相選択性の比較。



ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン、レボドーパ、チロシンの濃度はそれぞれ 0.2 mg/mL、
 注入量 5 µL、4.6 mm × 100 mm の 5 µm カラム
 移動相 = リン酸ナトリウム緩衝液 25 mM、1 mL/min、265 nm

図 4. ZORBAX Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムによる移動相選択性の比較 (イオンペア剤なし)

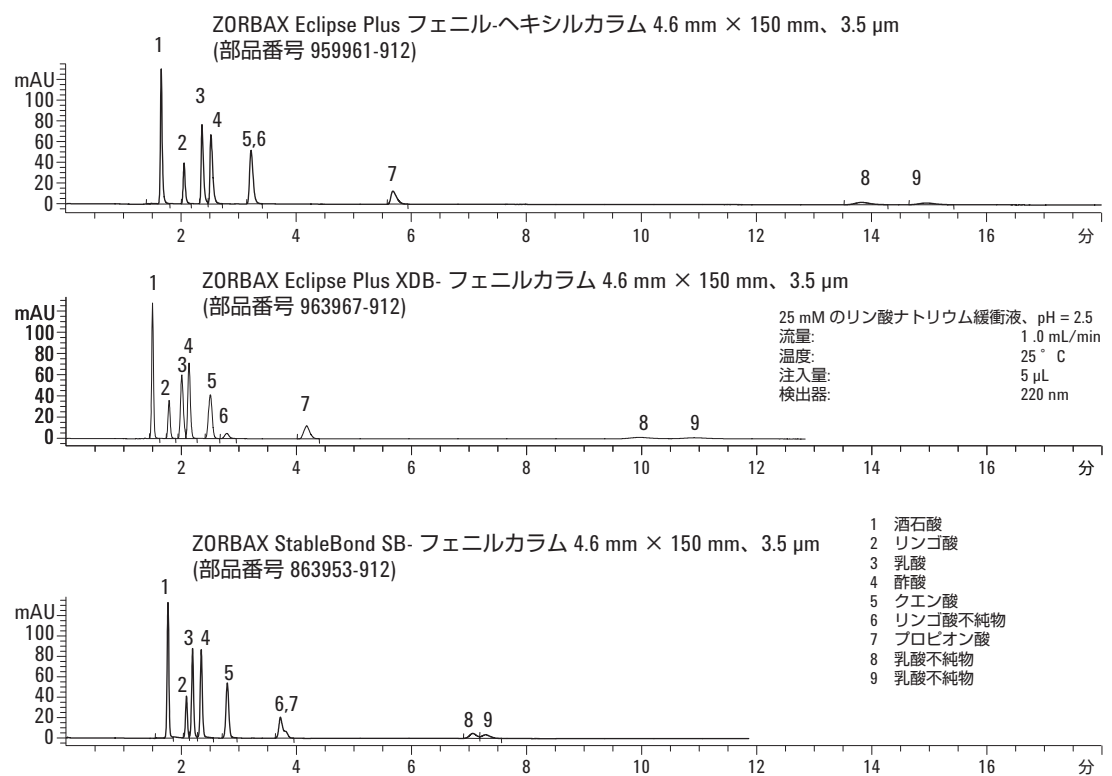


図 5. ZORBAX Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムによる移動相選択性の比較 (脂肪酸系酸類 25 mM、リン酸ナトリウム緩衝液)

ラムで最もよく保持されます。しかし、すべての化合物を分離できる最高の分離能を備えたカラムは Eclipse XDB-フェニルです (図 5 を参照)。このことは、図 5 のどの化合物もピークが重なっていないことを見れば分かります。

本調査では、100% 水系移動相による分離を示しました。ZORBAX フェニルカラムのよく知られていない特長の 1 つに、水性度の高い移動相で分離が行えるという能力があります。利用分野によっては、非極性 C18 固定相を使用して極性化合物を保持/分離しなければならない場合もあります。多くの場合、目的の分離能を得るためには移動相に水性度の高い溶液、つまり緩衝水溶液を使用する必要があります。多くの極性化合物は、溶解液の有機含有率が極めて低い場合 (5% 未満) を除いて逆相カ

ラムでは十分に保持されません。

C18 逆相カラムに有機化合物が結合すると、カラム表面に強い疎水性が生じます。移動相の有機含有率を上記のような低いレベル (5% 未満) にまで引き下げると、時間の経過と共に (もしくは、流れが止まることによって即座に) 分析対象化合物の保持力が失われる可能性があります。これは、「ディウエットिंग」、「リテンションロス」、または一般的に「相崩壊」と言われる現象です [2]。ディウエットिंगの発生時期は予測不能ですが、カラム内の溶解液の流れを止めることが発生の原因になることは知られています。図 6 は、注入と注入の間に流れを 30 分間繰り返し停止させたときの影響を示したものです。Eclipse Plus フェニル-ヘキシルカラムはこの試験に難なく合格

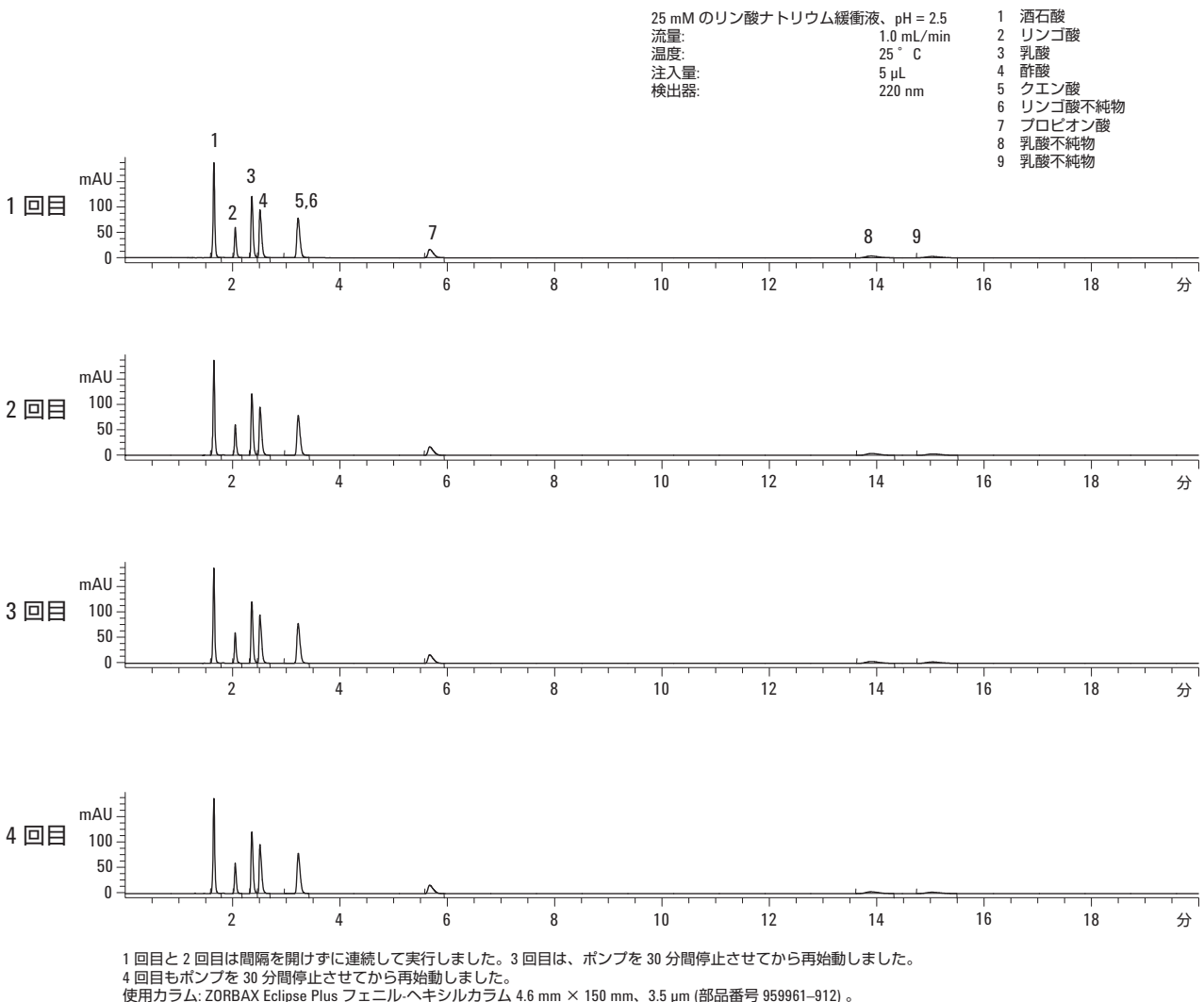


図 6. ディウエットिंगに対する耐性

しました。4 回のストップフロー試験の結果から分かる通り、リテンションタイムにもピークの形状にも有意な変化は認められません。参考文献 2 に記載されている調査では、水溶性ビタミン (ナイアシン) がプローブとして使用され、StableBond SB-フェニルカラムが極めて良い成績を示しています。

結論

ZORBAX Eclipse Plus フェニル-ヘキシル、Eclipse XDB- フェニル、および StableBond SB- フェニルカラムによる分離はほとんどの HPLC システムで実行できます。本アプリケーションノートで示した各メソッドは個々の研究者のニーズに合わせて簡単に変更できます。実施が容易で、複雑な組成の移動相も必要としません。これらの各フェニルカラムは、酸性化合物や塩基性化合物について多様な選択性と保持力を備え、相崩壊という厄介な現象を引き起こすこともありません。

参考文献

1. L. R. Snyder, J. L. Glajch, and J. J. Kirkland, Practical HPLC Method Development Second Edition, John Wiley and Sons, 1997.
2. B. A. Bidlingmeyer and A. D. Broske, "The Role of Pore Size and Stationary Phase Composition in Preventing Aqueous-Induced Retention Time Loss in Reversed-Phase HPLC," Journal of Chromatographic Science, Vol. 42, February 2004.
3. "Plasma Catecholamines: Their Measurement and Clinical Utility," Lab Med, 30, 512–516.
4. Self-Teaching Guide for Food Acidulants Bartek Corporation, <http://www.bartek.ca/pdfs/SelfTeachingGuide/STG.pdf>
5. W. Long and J. Henderson, "さまざまな酸の移動相添加剤を用いたサリチル酸不純物の分離," January 2008, 資料番号 5989-7731JAJP.
6. U. D. Neue, K. V. Tran, A. Mendezb, and P. W. Carr, "The Combined Effect of Silanols and the Reversed-Phase Ligand on the Retention of Positively Charged Analytes," Journal of Chromatography A, 1063 (2005) 35–45.
7. Handbook of Pharmaceutical Biotechnology, Wiley Interscience, 2007.
8. Evaluation of TFA as an Ion Pair Reagent in Separation of Small Molecules by Reversed Phased HPLC, Analytica Chimica Acta, 399 3 249–258 1999.

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。

www.agilent.com/chem/jp

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., 2009
Published in Japan
March 17, 2009
5990-3616JAJP



Agilent Technologies