

Agilent 1100 シリーズ LC と Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを 用いたサルファ剤の高速分析

アプリケーション

食品

著者

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

概要

10 種類のサルファ剤を分離する 4.6 x 250 mm、5- μ m カラムのメソッドを、Agilent 1100 シリーズ LC を用いた Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムに変換しました。メソッド変換の簡単なガイドラインを紹介します。変換後の新しいメソッドにより、所要時間が 30 分から 8 分に短縮されます。いずれのカラムも 2- μ m フリットを使っているため、サンプル前処理に変更を加える必要はありません。圧力はオリジナルメソッドよりも高くなりますが、400 bar を下回る範囲なので、ほぼすべての HPLC システムに問題なく変換できます。スルファジメトキシンを添加した未ろ過のタンパク質粉碎ミルクサンプルを用いて、1000 回を超える注入の耐久性を実証しています。



Agilent Technologies

はじめに

スルホンアミドは、ヒトへの細菌感染の治療や予防に体系的に用いられた最初の化学物質です。スルホンアミドは静菌性薬剤です。細菌を殺さずに、成長や繁殖を抑えることで機能します。ヒトにおけるもっとも一般的な用途は、尿路感染の治療です。ペーララクタム系抗生物質などのその他の新しい薬剤も、感染治療に用いられています。現在、サルファ剤は獣医アプリケーションの抗生物質として広く使用されています。おもに感染を予防するために家畜に与えます。また、ミツバチの疾病治療にも用いられています。こうした抗生物質の残留物は、ハチミツサンプルからしばしば検出されているため、毒性やアレルギー反応に関する消費者の懸念が高まっています [1,2]。

Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.7- μm カラムは、サブ 2- μm の全多孔性材料と同様の性能を備えています。5- μm カラムと同じ 2- μm カラムフリットを使用しているため、サンプル前処理を追加する必要はありません。そのため、いっそうシームレスなメソッド変換が可能になります。

この研究では、4.6 x 250 mm、5- μm カラムのグラジエントメソッドを、4.6 x 100 mm Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムに変換し、最適化しました。グラジエント時間は 30 分から 8 分に短縮されました。4.6 x 50 mm カラムを用いれば、分離能が若干犠牲になるものの、さらに 4 分未満にまで短縮できます。

実験手法

この研究では、Rapid Resolution LC 用に修正された Agilent 1100 シリーズ HPLC を使用しました。このシステムは、最高 400 bar の圧力に対応する G1312A バイナリポンプ、G1316A カラムコンパートメント (TCC)、G1376A 高性能オートサンブラ、光路長 3-mm のセミマイクロフローセルを備えた G1315B ダイオードアレイ検出器で構成されています。Poroshell 120 カラムを使用する際には、すべてのチューブをもっとも短い長さの内径 0.12 mm チューブに変更しました。ニードルシートは内径 0.12 mm 部品に変更しました。また、過去の文書や論文で示された最適化の推奨事項に従って、検出器のデータ採取レートを最高の設定 (40 Hz) まで上げました [3, 4]。データ採取には Agilent ChemStation バージョン A.10.02 を使用しました。この研究で使用したカラムは、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 x 250 mm、5- μm (部品番号 959990-902) と Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 100 mm カラム (695975-902) です。

次のサルファ剤を Sigma Aldrich から購入しました：スルファジアジン、スルファチアゾール、スルファピリジン、スルファメラジン、スルファメタジン、スルファメタゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファクロロピリダジン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシ。これらの化合物を 50/50 v/v アセトニトリル/水で 1 mg/mL に調製し、等量を混合して各 0.1 mg/mL の溶液を作成しました。

ミルクサンプルは Similac を使用しました。Similac は、母乳と同様の成分になるように開発された市販の乳児用調製粉乳です。この製品の組成は、メーカーにより厳密に管理されているため (Abbott Laboratories、オハイオ州コロンバス)、牛乳と違ってタンパク質組成が均質です。もっとも広く使用されている乳児用調製粉乳で、タンパク源として純粋な牛の乳清とカゼイン、脂質源として混合植物油、炭水化物源としてラクトースが含まれているほか、ビタミンと無機質の混合物などの成分も含まれています。

スルファメトキシを添加した Similac の 2-mL アリコートの水：アセトニトリル：ギ酸の 200:800:1 溶液 18 mL に加え、1 分間よく攪拌しました。その後、溶液を 3 分間放置し、アリコートを遠心分離管に移し、5000 rpm で 5 分間遠心分離しました。その後はろ過をおこなわずに、溶液をオートサンブラバイアルに移しました。

考察

粒子径の小さいカラムを用いた分析の高速化は、数年前からおこなわれています。しかし、5 μm や 3.5 μm のカラムとは異なり、粒子径の小さいカラムでは、カラムの充填剤をカラム内に保持するために小さいフリットが必要となります。5 μm や 3.5 μm 粒子では 2 μm フリットが使用されますが、3 μm 以下の粒子では、1 または 0.5 μm のフリットが必要です。全面多孔性粒子は、粒子径分布が表面多孔性粒子よりも 25 % ほど大きくなります。Poroshell 120 などの粒子径分布の幅が狭い充填剤は、2 μm フリットでカラム内に維持できます。変換後のカラムのフリットサイズが変換前のカラムのものよりも小さい場合は、メソッド変換の際に、サンプル前処理に注意を払い、汚れたサンプルによるフリットのつまりを避ける必要があります [5]。カラムフリットを大きいサイズのまま保てば、5 または 3.5 μm カラムから Poroshell 120 カラムにメソッドを変換する場合でも、サンプル前処理を追加する必要はなくなります。

図 1 に示すオリジナルメソッドでは、4.6 x 250 mm、5 μm カラムと 30 分のグラジエントを用いて、10 種類の化合物を分離しています。ほとんどの化合物がベースラインで分離され、最小分離能は 1 つのピーク対の 1.7 です。この分離では、時間のかかる実験が必要となるため、さらなる最適化を実施できない可能性があります。このメソッドを、いくつかの短いステップにより、2.7 μm 表面多孔性カラムに変換します。

1. グラジエントの変換 (オリジナルメソッドのグラジエントをカラムの長さ按比例して短縮し、オリジナルの分離を保ち、 k' を維持します)。オリジナルメソッドの所要時間は 30 分、オリジナルカラムの長さは 250 mm なので、同じ流速で 100 mm カラムを使えば、グラジエント時間は 100/250 (0.4) ほど短くなります。注入量も、同じ量だけ減少します [4,6,7]。この結果を図 2 に示しています。

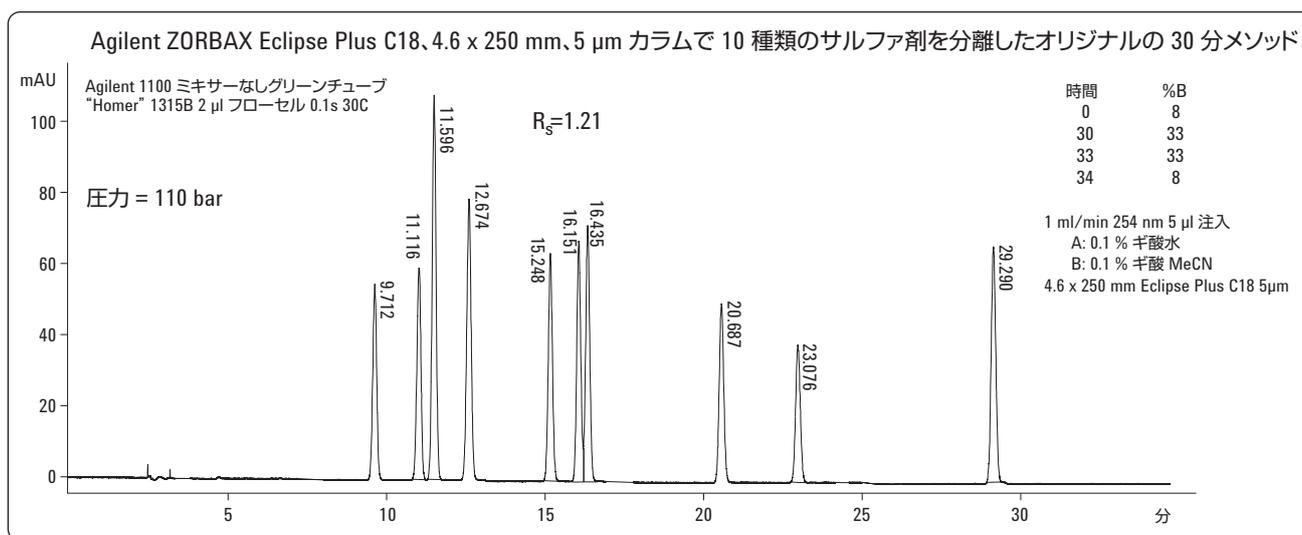


図 1. 酢酸/アセトニトリルグラジエントを用いて Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 x 250 mm、5 μm カラムで 10 種類のサルファ剤を 30 分で分離

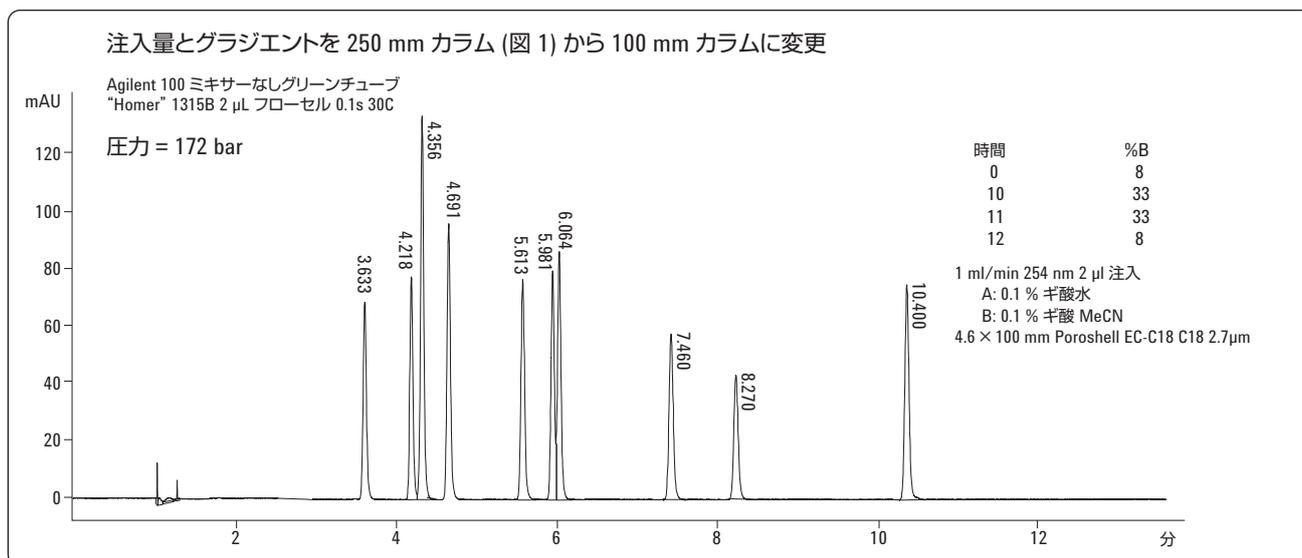


図 2. 酢酸/アセトニトリルグラジエントを用いて Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 100 mm、2.7 μm カラムで 10 種類のサルファ剤を 12 分で分離

2. 流速を速くしますが、図 3 に示すように、分離のカラム容量は維持します。同様のカラムでグラジエントの勾配 (G_s) を一定に保ち、k' を維持します。方程式 1 の公式を使用します。

流速を速くすれば、グラジエント時間を短縮できることがわかります。そこで、以下の公式に従い、流速 1 mL/min、10 分間で 8~33 % B というオリジナルの分離を、流速 1.5 mL/min、6.7 分間で 8~33 % B に変換し、最終的には流速 2 mL/min、5 分間で 8~33 % B に変換します (1 mL/min x 10 分 = 1.5 mL/min x 6.7 分 = 2 mL/min x 5 分)。

方程式 1. $G_s = (V_m/F)(\Delta\%B/t_G)$ [7]

方程式 3. $t_2 = t_1 \times \frac{F_1}{F_2}$

この方程式を次のように整理します。

方程式 2. $(F)(t_G) = ((\Delta\%B)(V_m) / G_s)$

記号の説明

記号の説明

F 流速

t₂ 変換後のグラジエント時間

t_G グラジエント時間

t₁ オリジナルのグラジエント時間

V_m カラム容量

F₂ 変換後の流速

Δ%B 溶媒強度の変化

F₁ オリジナルの流速

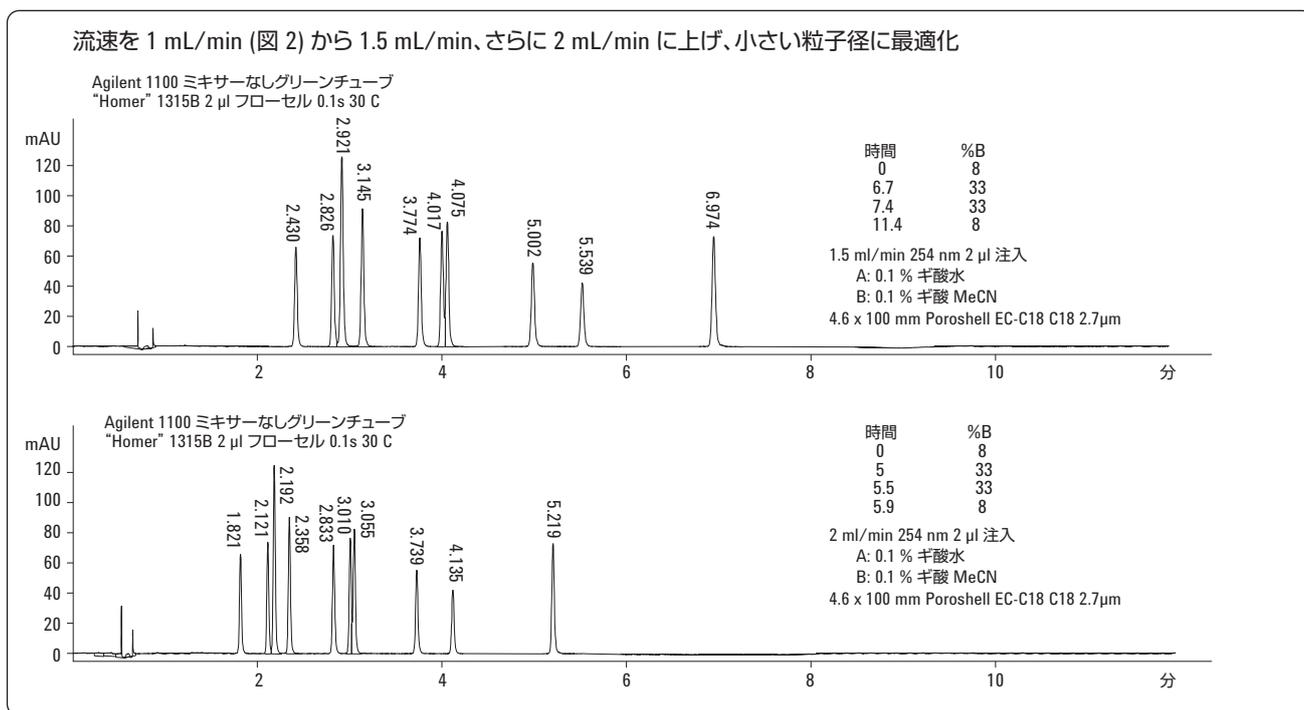


図 3. Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 100 mm、2.7 μm カラムを用いた 10 種類のサルファ剤の分離。流速とグラジエントを 1 mL/min (図 2) から 1.5 mL/min、最終的には 2 mL/min に上げ、ギ酸/アセトニトリルグラジエントの所要時間を 6 分に短縮しています

3. グラジエントの最適化。変換後の実験は、オリジナルの実験よりも大幅に短い時間で実施できるため、より高速な分離や、より高い分離能を得られるように、短時間で数回にわたってグラジエントを変更することができます。この変更は、1時間未満で実行できます。この研究の一部は、より長いカラムでも実施できますが、その場合は分析時間が長くなるため、このステップを完了するまでに4~8時間が必要となります。図4に、Poroshell 120 カラムの選択性を最適化するステップを示しています。

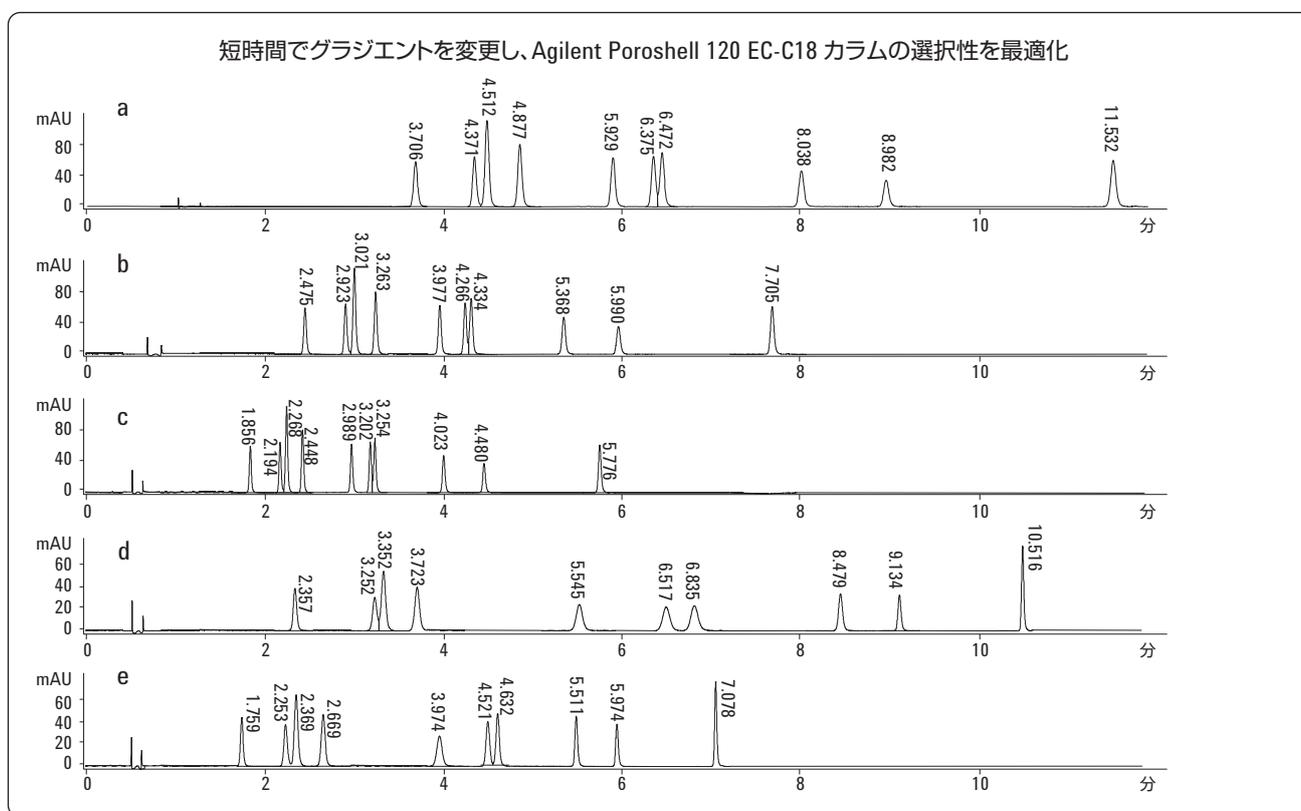


図 4. ギ酸/アセトニトリルグラジエントを調節し、2.7 μm Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムにおける 10 種類のサルファ剤の分離を最適化。(a) 250 mm カラム、1 ml/min のオリジナルスケールのクロマトグラム (図 2 にも表示) (b) 流速を 1.5 ml/min とし、分析時間を 33% に短縮したクロマトグラム (図 3 にも表示) (c) 流速を 2 ml/min とし、分析時間を 50% 短縮したクロマトグラム (d) グラジエントプログラムを調節し、ピーク対 6、7 の選択性を向上 (e) グラジエントプログラムを調節し、ピーク対 2、3 の選択性を向上

4. Agilent 1100 LC システムの最適化が完了しました。小さいカラムでは、機器構成に注意を払えば、性能をさらに向上できます。もっとも重要なパラメータは、検出器スピードです。このケースでは、検出器を最高の採取レート (40 Hz) に設定しました。そのほかの重要な要素としては、チューブを最小化する、フローセルを容量の少ないものに変えてピーク拡散を低減する、インジェクタシートを容量の小さいものに変更する、などがあります。図 5 に、オリジナルの 250-mm メソッドと変換後の 100-mm メソッドを重ねて表示しています。このクロマトグラムを見れば、時間が大幅に短縮されていることがわかります。変換後の高速メソッドでは、オリジナルの 5- μm メソッドで最初のピークが溶出する前に、最後のピークが溶出しています。

最後に、酸性アセトニトリルを用いたタンパク質の沈降により、スルファジメトキシンを添加した調整粉乳 Similac を抽出しました。サンプルを攪拌し、5 分間放置してから別の容器に移しました。散布図 (図 6) からわかるように、分析時間全体にわたって、圧力の変化は見られません。また、効率もほぼ一定に保たれています。この未ろ過タンパク質沈降ミルクサンプルの分析は、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムの堅牢性を示しています。

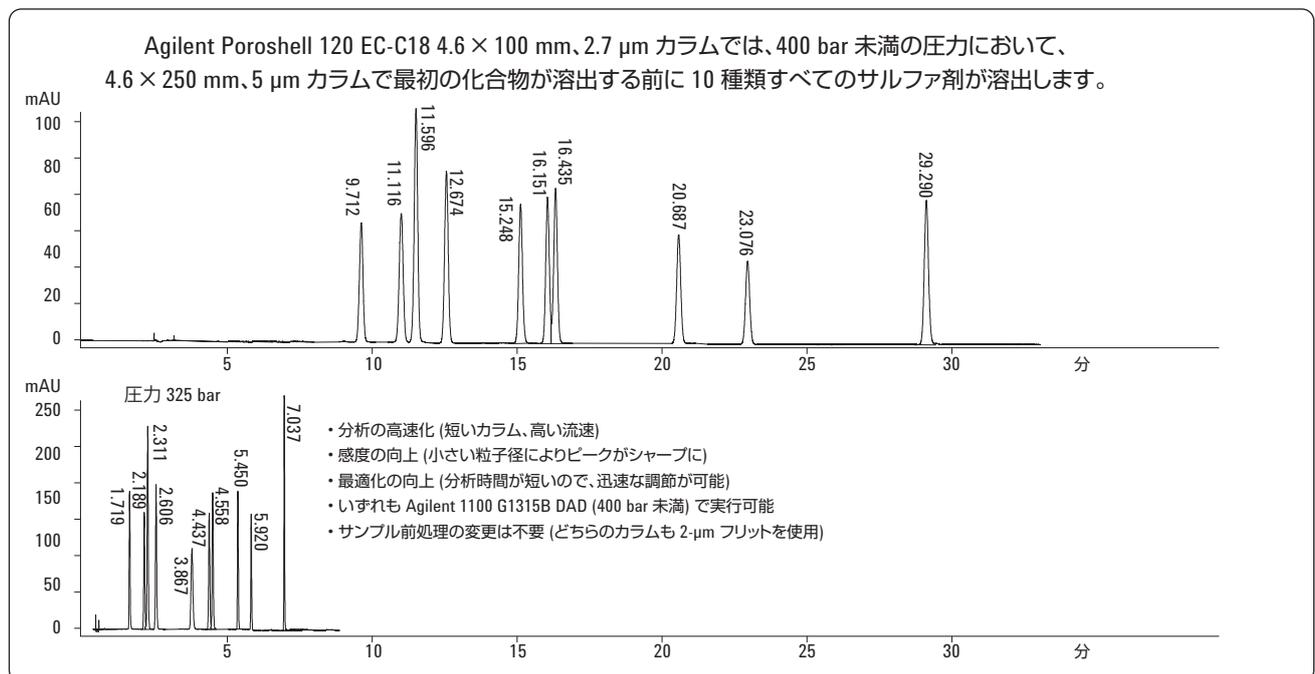


図 5. 10 種類のサルファ剤の分離メソッドを Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 × 250 mm, 5 μm カラムから Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 μm カラムに変換すると、ギ酸/アセトニトリルグラジエントを用いた分析時間が 30 分から 8 分に短縮されます。

結論

この研究により、4.6 x 250 mm、5 μ m C18 カラムを用いた既存のメソッドを、同様の分離を維持したまま、Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 100 mm カラムを用いた高速メソッドに容易に変換できることが示されています。変換後の最高圧力は 400 bar を大きく下回るため、変換後のメソッドにも従来の HPLC システムを使用できます。また、どちらのカラムも 2- μ m フリットを使っているため、サンプル前処理手順も変わりません。このメソッド変換により、時間と溶媒消費量を節約できるため、メソッドパラメータをさらに最適化することも可能になります。こうした細かい最適化は、分析時間が長い場合には不可能です。

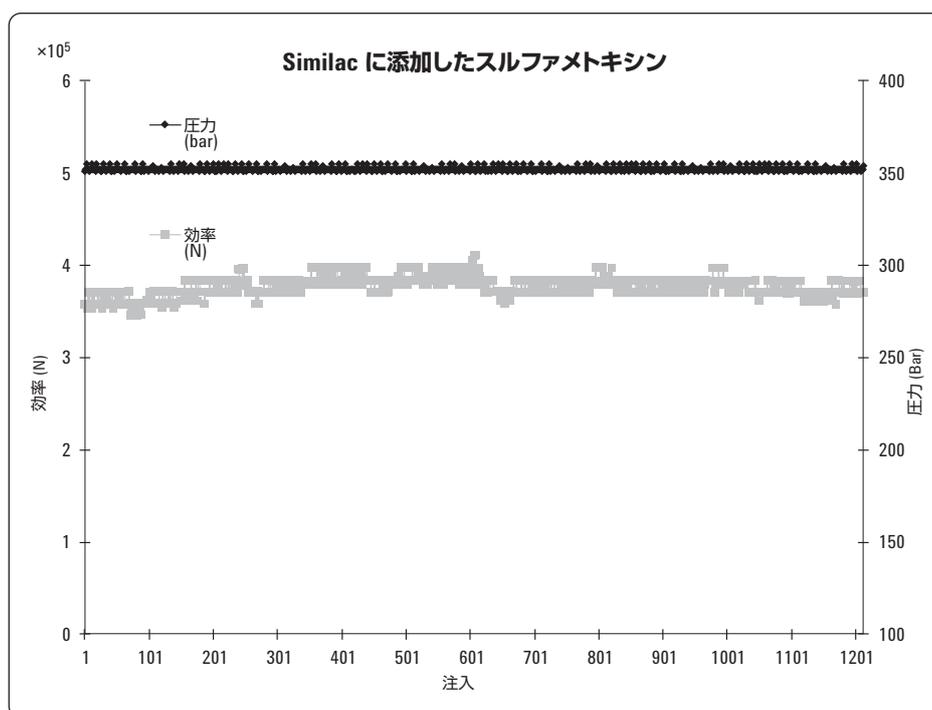


図 6. Agilent Poroshell 120 100-mm カラムの散布図 (タンパク質沈降 Similac の 1000 回以上の注入にわたって、スルファジメトキシシンの分離が維持されています。サルファ剤の効率をプロットしています。圧力の上昇は検出されていません)

参考文献

1. William J. Long and John. W. Henderson Jr., "Analysis of Sulfa Drugs on Eclipse Plus C18", September 11, 2006, 5989-5436EN
2. Carol A. Gonzalez and Karyn M. Usher, Anne E. Brooks and Ronald E. Majors, 「固相抽出および液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) 法による牛乳中の含有サルファ剤の定量」, March 11, 2009, 5990-3713JAJP
3. Fast, Faster Ultrafast: Optimization of Cycle Times in Liquid Chromatography for Optimal Speed and Resolution. Agilent Technologies February 1, 2005, 5989-2108EN
4. Michael Woodman, "Rapid Screening and Analysis of Components in Nonalcoholic Drinks", August 3, 2006, 5989-5178EN
5. Dorothy J. Phillips, Mark Capparella, Uwe Neue, Zouibar El Fallah, "A small, new particle packing for faster analysis with high resolution"
6. L.R. Snyder and J.W. Dolan, "High Performance Gradient Elution", Wiley-Interscience, New York, 2007
7. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", 2nd ED., Wiley-Interscience, New York, 1997.

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., 2010

Printed in Japan

June 2, 2010

5990-5572JAJP



Agilent Technologies