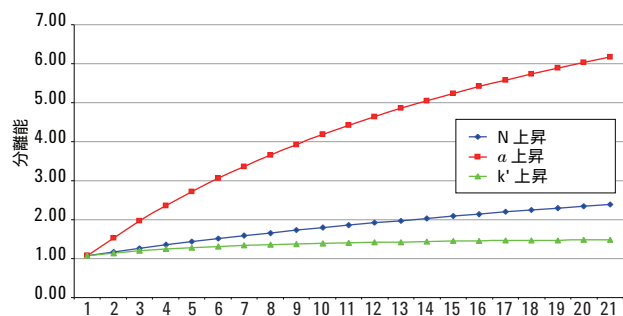


高 pH で使用可能なコアシェル型カラム、 Agilent Poroshell HPH-C18 による分析

技術概要

はじめに

化学および製薬分野の分析のための高速液体クロマトグラフィー (HPLC) メソッド開発は、困難な作業です。十分な分離能と堅牢な分離を得られるように、幅広いクロマトグラフィー条件をスクリーニングする必要があります。メソッド開発には、要素を 1 つずつ処理していく方法やクオリティ・バイ・デザイン (QbD) など、多くのアプローチがありますが、分離最適化に用いられる目標や要素はどれも同じです。複数の要素が、クロマトグラフィー分離能 (RS)、効率 (N - 粒子の粒度、粒子形態、カラムの長さによりコントロール)、リテンション係数 (k - 溶媒強度によりコントロール)、選択性 (α - 結合相の選択および移動相によりコントロール) に影響を与えます (図 1)。なかでも、選択性 (α) はもっとも影響の大きい要素です。



段数:	5,000	10,000	15,000	20,000	25,000
アルファ:	1.10	1.35	1.60	1.85	2.1
k':	2.0	4.5	7.0	9.5	12.0

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k}{(k + 1)}$$

図 1. 典型的なメソッド開発パラメータ。分離能における選択性、効率、リテンションの影響



メソッド開発には、単純な混合物や複雑な混合物の分離が伴います。選択性はいくつかの要素によりコントロールすることができます。たとえば、固定相の選択、有機溶媒の種類、グラジエントの勾配、流量、温度などの要素があります。イオン性化合物の場合、緩衝液の pH も影響の大きいパラメータとなります。イオン性化合物の分離を最適化し、堅牢な条件を特定することは、液体クロマトグラフィーのメソッド開発における重要な手順です [1]。ほとんどの医薬品および生物学的化合物には、カルボン基やアミノ基などのイオン性官能基が含まれます。逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) 分離では、きわめて強力な選択性ツールとして pH が利用されています。低 pH 分離にはプロトン化された酸および塩基が含まれますが、そうした酸や塩基は高 pH で脱プロトン化されます。逆相クロマトグラフィーのリテンションは成分の電荷に大きく影響されるため、pH を利用すれば、選択性を大きく変化させることができます。酸性 pH では、酸は中性になるためリテンションが最大になりますが、塩基は完全に荷電されるため、リテンションは最小になります。塩基性 pH (化合物の pKa より高い pH) では、塩基は中性になるためリテンションが最大になりますが、酸は完全にイオン化されるため、リテンションは最小になります。RPLC において、塩基性成分で最高のピーク形状、リテンション、サンプルローディングを得るためには、移動相の pH を分析対象化合物の pKa よりも 2 単位高くする必要があります。中性化合物のリテンションは、pH の影響を受けません。この研究では、Agilent Poroshell HPH-C18 カラムを用いて、pH の調節により選択性をコントロールしました。Agilent Poroshell HPH-C18 カラムは、高 pH 移動相で安定性が得られるように設計されています。

材料とメソッド

この研究には、Agilent 1260 Infinity LC を使用しました。

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ G1312B
- Agilent 自動液体サンブラ (ALS) G1367C
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (TCC) SL G1316C
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (DAD) G4220A (10-mm パス、1 μ L ボリューム)
- HPLC のコントロールとデータ処理には Agilent OpenLab バージョン C.01.05 を使用
- Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 \times 50 mm、2.7 μ m (p/n 699775-702) または Poroshell HPH-C18、4.6 \times 50 mm、2.7 μ m (p/n 699975-702)

一部の実験では、Agilent 6140D シングル四重極 LC/MS も使用しました。

表 1. リテンション相関に用いた化合物

サンプル名	
1,2-ジメトキシベンゼン	エストロン
1,2-ジニトロベンゼン	エチルエストラジオール
1,2,3-トリメトキシベンゼン	エチル-4-ヒドロキシベンゾエート
1,2,4-トリメトキシベンゼン	フェノプロフェン
1,2,5-トリメトキシベンゼン	フルオクセチン
1,3-ジメトキシベンゼン	フラソリドン
1,3-ジニトロベンゼン	ヘスピリジン
1,4-ジニトロベンゼン	ヒドロコルチゾン
2,3-ジメチルフェノール	イルガノックス 1330
2,4-ジクロロフェノール	ケトプロフェン
2,4-ジメチル安息香酸	ラベタロール
2,5-ジヒドロキシ安息香酸	m-ニトロフェノール
2,5-ジメチルフェノール	メフェナム酸
2-ヒドロキシ馬尿酸	ナルドロール
2-ナフタレンスルホン酸	ナプロキセン
3,4-ジメトキシ安息香酸	ナリンゲニン
3-ニトロフェノール	ニソルジピン
4-ヒドロキシベンズアルデヒド	酢酸ノルエチンドロン
4-ヒドロキシ安息香酸	ノトリプチリン
4-ニトロフェノール	p-クレゾール
5-ヒドロキシ-イソフタル酸	p-ニトロフェノール
8-ヒドロキシキノリン	ペンタクロロフェノール
アセプトロール	フェナセチン
アセチルサリチル酸	フェナントレン
アルブレノロール	ビンドロール
アミトリプチリン	ベベリジン
アンドロ	ピロキシカム
アンチピリン	ブラバスタチン
APAP	ブレドニゾン
アテノール	プロカイン
アトルバスタチン	プロゲステロン
ベータエストラジオール	プロマジン
ベクメタゾン	プロプラノロール
ベンゾカイン	プロトリプチリン
安息香酸	ピリメタミン
ベンゾフェノン	キニン
ベンジルアルコール	レソルシノール
ベタメタゾン	サリチル酸
ビフェニル (DMSO)	サリチル酸
ブタカイン	スルファクロルピリダジン
ブチルベンゼン	スルファジアジン
ブチルパラベン	スルファジメトキシ
ブチルヒドロキシアニソール	スルファメラジン
ブチルヒドロキシトルエン	スルファメチアジン
ブチロフェノン	スルファメチアゾール
カフェイン	スルファメトキサゾール
カテコール	スルファメトキシピリダジン
クロラムフェニコール	スルファモノメトキシ
コルチコステロン	スルファキノキサリン
デシプラミン	スルファチアゾール
デキサメタゾン	スリダク
ジクロフェナク	テストステロン
フタル酸ジエチル	テトラカイン
ジフルニサル	トルメチン
ジイソプロピルフタレート	トリアムシノロン
フタル酸ジオクチル	トリミプラミン
フタル酸ジプロピル	ウルトラノックス 276
ドキシセピン	ウラシル
	パレロフェノン

ギ酸アンモニウム緩衝液、酢酸アンモニウム、重碳酸アンモニウム緩衝液といった、質量分析法に適した移動相を使用しました。緩衝液の作成にあたっては、十分な量のギ酸アンモニウムまたは重碳酸アンモニウムを水に溶解させて 10 mM 溶液を作成し、適切な濃度の酸 (ギ酸または酢酸) または塩基 (水酸化アンモニウム) を用いて任意の pH に調整しました。酸 (アセチルサリチル酸、ジフルニサル)、塩基 (プロカインアミド、ジピリダモール、ジルチアゼム)、中性化合物 (ヘキサノフェノンおよび不純物 (パレロフェノン)) を含む混合物について検証しました。カフェインはイオン化しませんが、研究に含めました。

pH による選択性の調整

図 2 では、移動相の pH の変化に伴い、酸、塩基、中性化合物で構成される混合物の溶出順序が変化することが示されています。この研究では、有機溶媒 (アセトニトリル) を用いた 4 分にわたる一般的なグラジエントを使用しました。濃度範囲は 10~90 % です。質量分析法に適した緩衝液を用いた pH 3 (ギ酸アンモニウム)、pH 4.8 (酢酸アンモニウム)、pH 10 (重碳酸アンモニウム) のサンプルクロマトグラムを示しています。流量は 2 mL/min です。

図に示されているように、3 つのサンプルクロマトグラムでは、同じグラジエントおよびカラムを使用しています。中性化合物 (ヘキサノフェノン) およびイオン化しない化合物 (カフェイン) は、同じ溶出時間にとどまっています。これらの化合物は、pH 変化の影響を受けていません。移動相の pH が pH 4.8 から pH 10 へ上昇するにつれて、酸性化合物の電荷が大きくなり、リテンション時間が短くなりました。この点を、図 2 の赤い矢印で示しています。pH が高くなると、青の矢印で示しているように、塩基のリテンション時間は長くなりました。ピークの溶出順序と間隔は、大幅に変化しました。3 つのサンプルクロマトグラムすべてで、ピーク形状はきわめて良好でした。このケースでは、pH 10 の緩衝液を用いた場合に、他の緩衝液よりも化合物の間隔が広くなりました。高 pH 移動相を用いた場合は、低 pH 移動相に比べて塩基のリテンションが長くなるのに加えて、ピーク形状も良くなりました。

選択性を検証する別の方法として、2 つの異なる条件を用いて、一群の酸、塩基、中性化合物のリテンション時間をプロットする方法があります。この研究に用いた化合物のリストを表 1 に示しています。このケースでは、同じグラジエント、2 つの有機溶媒 (メタノールとアセトニトリル)、2 種類の pH (pH 3 と pH 10) を用いて、Poroshell 120 HPH-C18 カラムで 117 の化合物を分析しました。ここで用いた汎用グラジエントは、0.42 mL/min です。4 分まで有機溶媒濃度 5 % から 95 % へ上昇させ、この濃度で 2 分間維持しました。

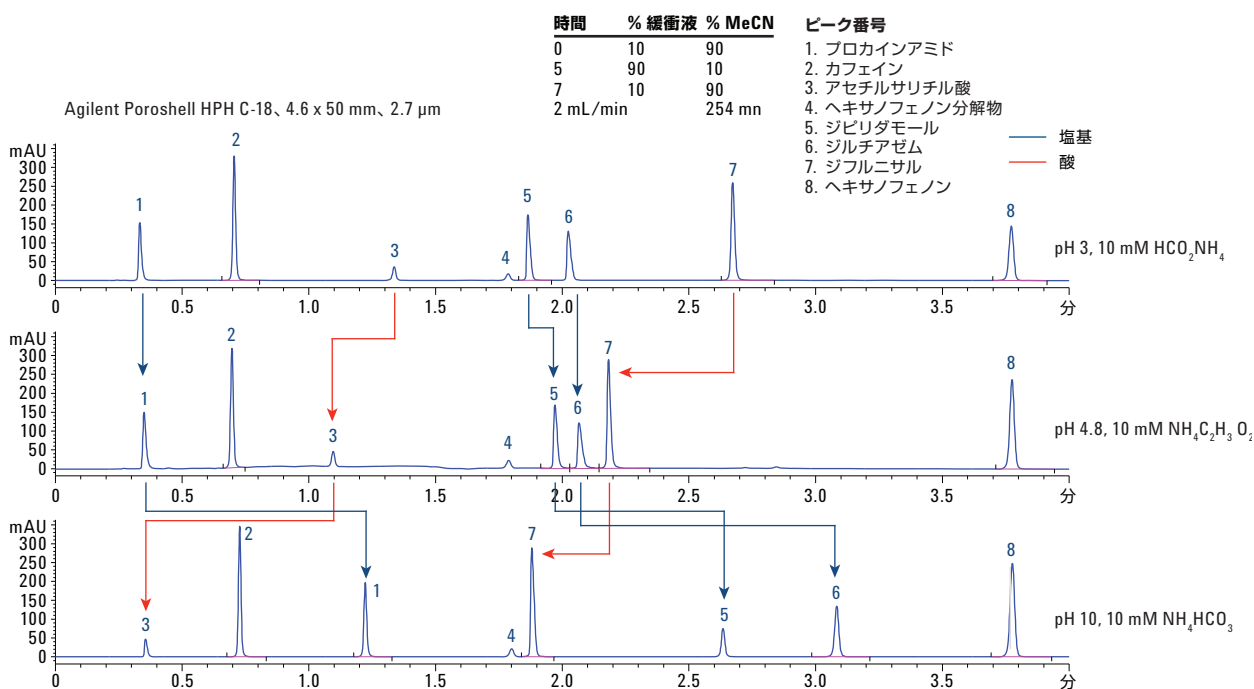


図 2. Agilent Poroshell HPH-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm LC カラムを用いた pH の変化による pH 3、4.8、10 における選択性のコントロール

図 3A に示すように、成分のサブグループが、傾き 1 の上に完璧に並びました。これらの化合物は、中性化合物か、有機溶媒のメタノールでイオン化しない化合物です。これらには置換ベンゼン、ステロイド、フェノール、フェノンが含まれます。これらの物質のリテンションタイムは、予想どおり、移動相の pH の影響は受けませんでした。このメソッドを適用および検討した過去の研究では、類似性の高い 2 つのカラム (Agilent Poroshell 120 EC-C18 と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18) が同じクロマトグラフィ条件で比較されています [2]。ラインよりも上の位置にある成分は塩基です。pH 3 では塩基性化合物は電荷を持ちますが、pH が 10 に上昇すると電荷を失い、リテンションタイムが長くなります。リテンションタイムの相関係数は、2 種類の pH 条件における分離の違いを示す指標となります。相関性の高いプロットでは、その値は 1 に近くなります。この値は、2 つのクロマトグラフィ分離がきわめてよく似ていることを示します。反対に、相関性のきわめて低い値 (0.5 近くかそれ以下) は、オーソゴナル (直交的) で違いの大きい分離を示します。2 つ目の比較を図 3B に示しています。この図では、有機溶媒にアセトニトリルを用いて、低および高 pH グラジエントを比較しました。このケースでは、メタノール使用時よりも相関係数が小さくなりました [2,3,4]。

高 pH における塩基性化合物の LC-MS 感度の向上

3 つ目の実験では、ポジティブモードのエレクトロスプレーで汎用グラジエントを用いて、高および低 pH における複数の塩基の LC/MS を比較しました。通常、分析対象分子のイオン化状態は移動相の pH に左右され、塩基性化合物が中性になる高 pH 移動相では、ポジティブイオンモードのエレクトロスプレーにおける LC/MS のイオン化効率が大幅に低くなるものと予想されます。しかし、各種のサンプル (タンパク質、ペプチド、アミノ酸など) を検証した多くの研究では、移動相 pH の変化に影響を受けないか、効率が上がる場合もあることが観察されています。

移動相に高 pH 緩衝液を用いた場合でも、ESI+ モードで塩基性化合物を問題なく検出できることが報告されています [5-10]。高 pH 移動相は、ESI+ における塩基性化合物のイオン化を抑制しません。ポジティブイオンが豊富に形成され、多くの場合、高 pH における分析対象成分のレスポンスは、酸性移動相よりも向上します。この知見は重要です。というのも、汎用的な溶出メソッドの適用範囲を、これまでは保持が難しかった極性のある塩基性化合物の分析にまで広げることが可能になるためです。

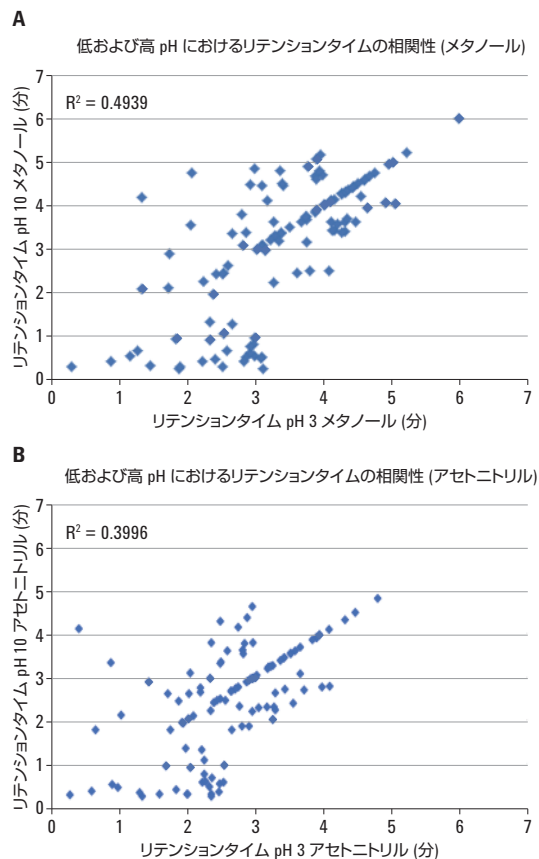


図 3. Agilent Poroshell HPH-C18 を用いたリテンションタイムの相関性、pH 3 と pH 10 の比較。A) メタノール、B) アセトニトリル

この実験では、有機溶媒にアセトニトリルを使用してグラジエント分析を行いました。水系溶媒には、0.1 % ギ酸または 10 mM pH 10 重炭酸アンモニウムが含まれます。上に示す例では、0.01 mg/mL の濃度でリドカインを水で調製しました。注入量は 1 μ L です。サンプルは Poroshell HPH-C18 カラムに注入しました。下の図では、低 pH でサンプルを分析しました。成分がわずかにしか保持されず、ピークテーリングが生じています。上の図では、成分が良好に保持され、ピーク形状が向上し、高さが 2 倍になっています。有機溶媒濃度の高い移動相で溶出することで、LC/MS 検出という点でも利点が得られ、ピーク面積も大幅に増大しました。一般に、揮発性の高い有機相でイオン化すると効率が高くなり、シグナル強度が増大します。

プロカインアミドとジルチアゼムも分析しました。これらの化合物におけるシグナル強度の増大幅は、リドカインほど大きくありませんでした。液滴形成の際の溶媒蒸発率は、移動相の蒸気圧に相関します。比率を大きくしたアセトニトリル:水系移動相は揮発性が高いため、ESI イオン化に有利に働きます。

図 4A~4C の結果からは、塩基性化合物の分析における高 pH 移動相の使用が、ESI+ LC/MS における低 pH 移動相に代わる優れた手法になることが見てとれます。

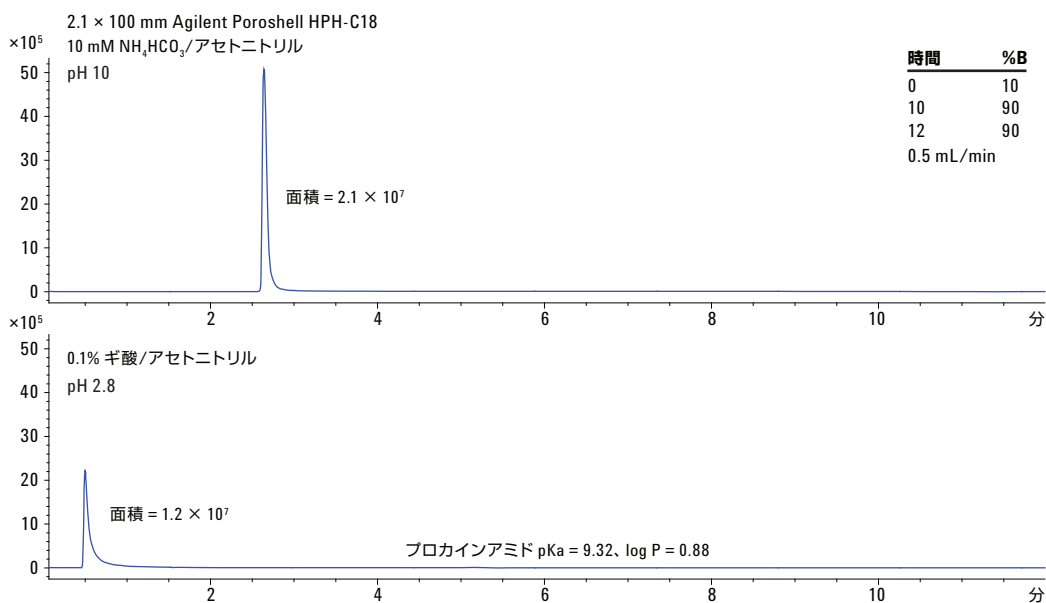


図 4A. 高および低 pH におけるポジティブイオンエレクトロスプレーモードの塩基 (プロカインアミド、pKa 9.32、logP 0.88) LC/MS 分析の比較。Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 × 100 mm

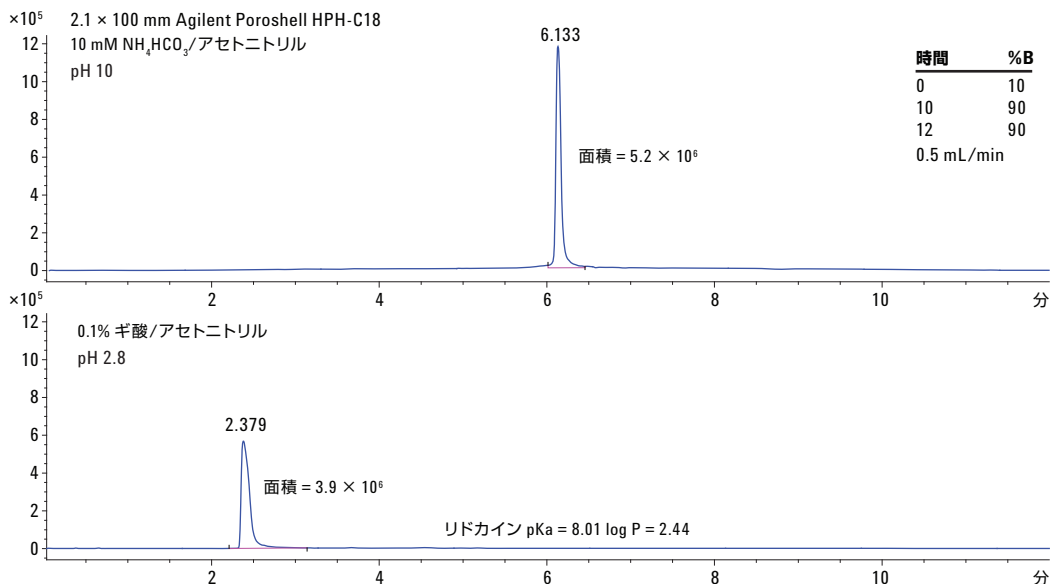


図 4B. 高および低 pH におけるポジティブイオンエレクトロスプレーモードの塩基 (リドカイン、pKa 8.01、logP 2.44) LC/MS 分析の比較。Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 × 100 mm

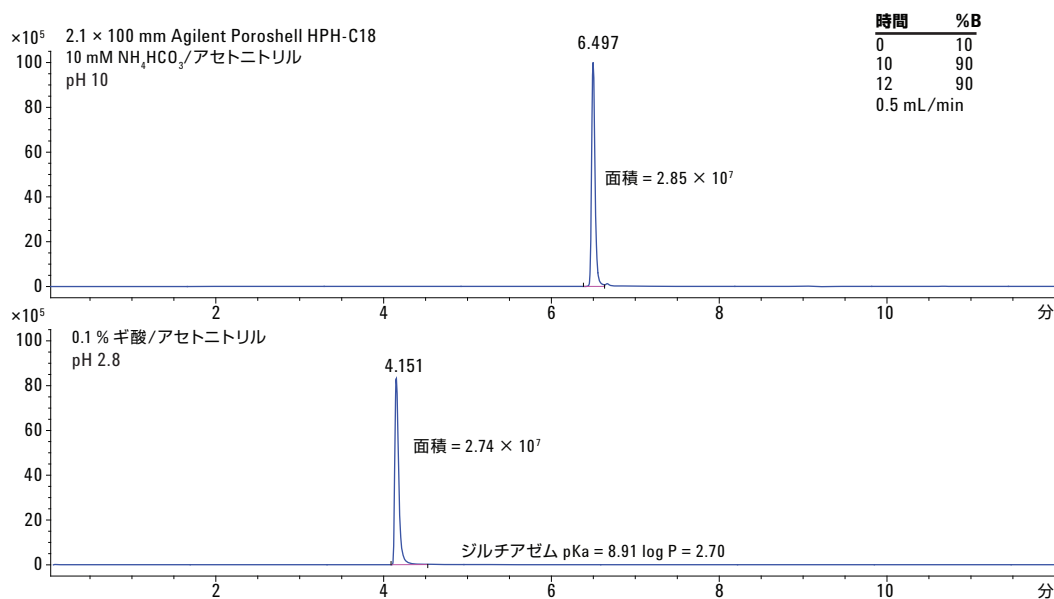


図 4C. 高および低 pH におけるポジティブイオンエレクトロスプレーモードの塩基 (ジルチアゼム、pKa 8.91、logP 2.70) LC/MS 分析の比較。Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 × 100 mm

高 pH における Poroshell HPH-C18 の安定性

HPLC カラムの安定性は、メソッド性能に影響を与える重要な要素で、これまでに広く研究されています。カラムの安定性は、温度、水系緩衝液の種類と濃度、有機溶媒の選択、添加剤、移動相 pH の影響を受けます。化合物とカラムをあらかじめスクリーニングすれば、より迅速に分離を成功させることができます。HPLC カラムの安定性は、メソッド性能に影響を与える重要な要素です。耐久性の高いカラムを用いた堅牢な HPLC メソッドは、新たな臨床プロジェクトや製造プロジェクトのサポートの成功につながります。メソッド開発の際にカラムが安定していないと、不正確な結果やフラストレーションの原因になります。

カラムの劣化の原因としては、シリカ溶解、結合相の剥離、およびエンドキャップの剥離によるシラノールの曝露 (加水分解) などがあります。シリカカラムの溶解と加水分解は、いずれも pH と温度に関係していることが知られています (高 pH/高温で劣化速度が上昇)。そのほかのカラム劣化の原因としては、不十分なサンプル前処理 (ダーティなサンプル) やカラムベッドの不安定性などがあります。

任意の pH におけるカラムの安定性を示すわかりやすい指標となるのが、500 回注入です。これにより、確立されたメソッドにおいて、カラムの開発、調整、使用を検証することができます。このセクションでは、重炭酸アンモニウムおよびアセトニトリルを pH 10 で用いたグラジエントについて、Poroshell HPH-C18 カラムを検証しました。酸性、中性、塩基性化合物を使用しました。各種のメーカーのカラムを検証するために、共通の負荷グラ

ジエントを使用し、分析対象成分を変更して選択性の違いに対応しました。いずれのケースでも、少なくとも 2 つの酸、塩基、中性化合物を使用しました。

ここで説明するプロトコルでは、カラムの安定性における重炭酸アンモニウムの影響を検証しました [11]。サンプルロード量がわずか μg 程度であるため、サンプル溶液の影響は最小限に抑えられました。カラム安定性におけるテストプローブそのものの影響ではなく、カラム性能を検証することを念頭に、テスト用混合物を選択しました。メソッド開発時のカラムベッド安定性に関する問題を最小限に抑えるために、低流量を使用しました。図 5A に示すように、2000 回の注入全体をつうじて、ノルトリプチリンを除くすべての化合物のリテンションタイムが安定しました。ノルトリプチリンは pKa が移動相の pH にきわめて近く、リテンションタイムが徐々に長くなりました。

別のブランドの 2 つ目のカラムについて、同じ実験条件を適用しました。2000 回の注入全体をつうじて、ほとんどの化合物でリテンションタイムが同じに保たれました。ノルトリプチリンについては、溶出時間が急速に遅くなりました。注入 500 回以内で、ノルトリプチリンと次の化合物である中性のヘキサノフェノンの共溶出がはじまりました。ノルトリプチリンのピークがヘキサノフェノンのピークのほうへ移動しつづけて、注入 2000 回までには完全に共溶出しました。この実験では、アジレント製以外のカラムの劣化が Poroshell HPH-C18 カラムよりも激しいことが示されています。サンプルの変化に伴い、ピーク高の違いが生じました。

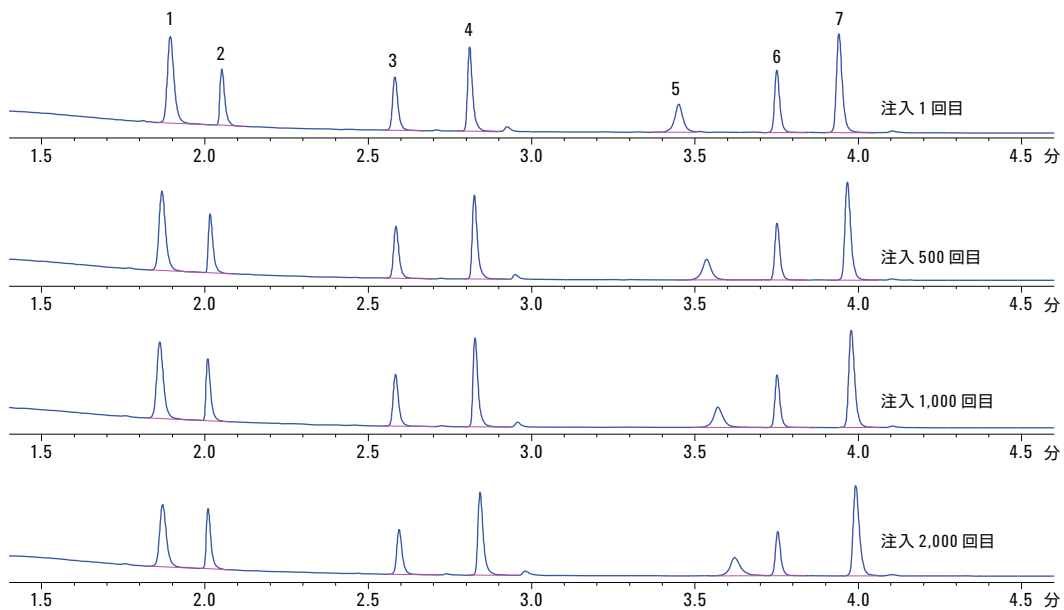


図 5A. 高 pH の重炭酸アンモニウム条件下でも優れたリテンションを示す Agilent Poroshell HPH-C18、 2.1×50 mm、 $2.7 \mu\text{m}$ カラム (総メソッド分析時間 = 7 分、流量 0.4 mL/min)

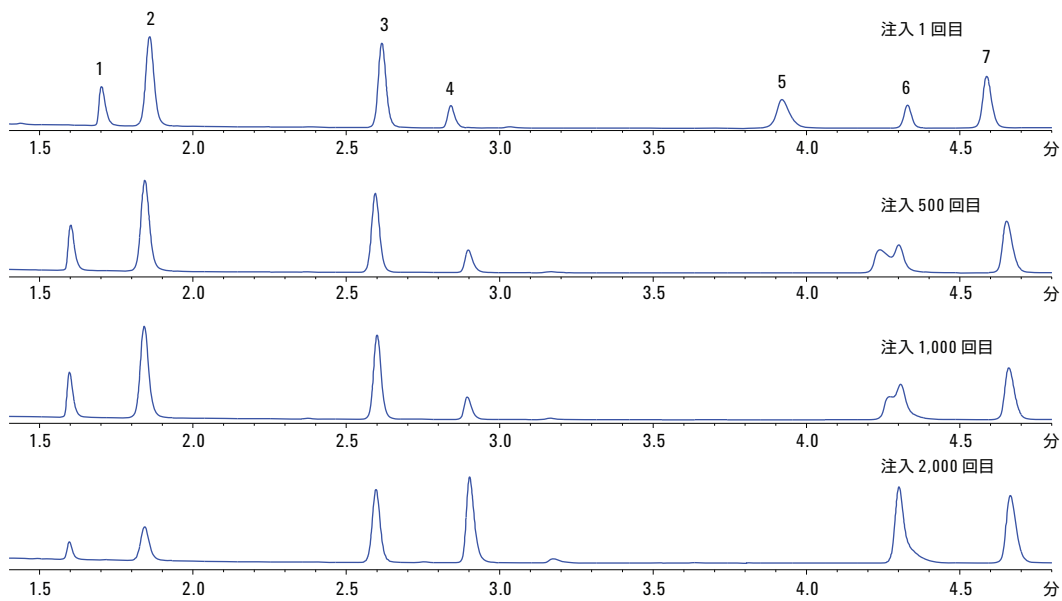


図 5B. 他社製 $3 \mu\text{m}$ カラムでは、高 pH 重炭酸アンモニウムによる劣化が激しくなっています。

結論

Agilent Poroshell HPH C18 を使えば、高 pH でもカラム寿命に悪影響を与えずに、pH を利用して選択性を調整することが可能です。グラジエントを一定に保って pH を変化させることで、8 つの酸、塩基、中性化合物の溶出順序を大幅に変化させ、ひいてはクロマトグラフィー分離能を変化させることができました。2 つ目の実験では、pH 3 および pH 10 についてプロットした汎用グラジエントを用いて、リテンションタイムの相関係数を測定しました。オーソゴナル (直交) 性の指標として R^2 を用いたところ、この 2 つの条件で選択性に違いが出るようになりました。pH をメソッド開発ツールとして使用することで、きわめて高い効率が得られました。特に、サンプルに酸性化合物や塩基性化合物が含まれている場合には効果が大きくなります。また、高および低 pH でのグラジエント HPLC を用いて、複数の塩基性化合物について、ポジティブイオンエレクトロスプレー質量分析法を検証しました。このケースでは、塩基性化合物のピーク形状が向上し、リテンションタイムが長くなるようになりました。ピーク面積の測定により、シグナルが増大したこともわかりました。この効果はすべてのケースで同じというわけではなく、化合物によって変わるものと考えられます。高 pH で塩基性化合物のシグナルが減少したケースはありませんでした。最後に、重炭酸アンモニウムを用いた pH 10、25 °C の条件下で Poroshell HPH C18 の耐久性を調べたところ、長期 (注入 2,000 回以上) にわたって使用できることがわかりました。高性能かつ長寿命の Poroshell カラムファミリーの一つである Poroshell HPH-C18 を用いると、メソッド開発の柔軟性を最大限に高められると同時に、長期間安定して分析を行うことができます。

参考文献

1. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Edition, p. 29. John Wiley & Sons, Inc., New York (2010).
2. Anon., 「Poroshell 120 EC-C18 カラムと ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム間でのメソッド変換」、アジレント・テクノロジー技術資料、資料番号 5990-6588JAJP, 2011
3. K. Croes, A. Steffens, D. Marchand, L. Snyder. *J. Chromatog. A.* **1098**, 123 (2005).
4. W. Long, A. Mack, Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns Using Acetonitrile or Methanol, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-4711EN, 2009.
5. Raluca-Iona Chirita-Tampu, C. West, L. Fougere, C. Elfakir, *LC.GC Europe*, **26**, 128 (2013).
6. H. P. Nguyen, K. A. Schug, *J. Sep. Sci.*, **31**, 1465 (2008).
7. S. Zhou, K. D. Cook, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, **11**, 961 (2000).
8. B. E. Boyes, Separations and Analysis of Peptides at High pH, 4th WCBP, San Francisco, Ca. (2000).
9. F. E. Kuhlmann, A. Apffel, S. M. Fischer, G. Goldberg, P. Goodley, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, **6**, 1221 (1995).
10. C. R. Mallet, Z. Lu, J. R. Mazzeo, *Rapid Commun. Mass Spec.*, **18**, 49 (2004).
11. C. Ye, G. Terfloth, Y. Li, A. Kord, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **50**, 426 (2009).

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。

本資料に記載の情報、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. 2014

Printed in Japan

July 2, 2014

5991-4893JAJP



Agilent Technologies