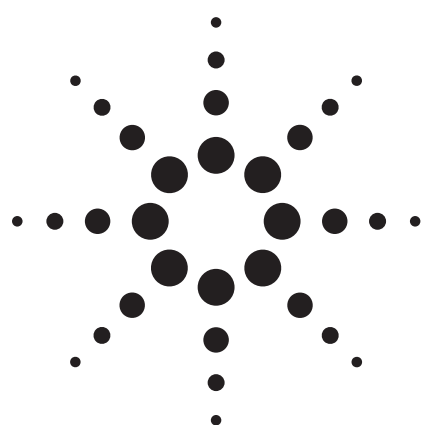


# さまざまな酸の移動相添加剤を用いた サリチル酸不純物の分離



アプリケーション

医薬品

## 著者

William J. Long and John W. Henderson Jr.  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808-1610  
USA

## 要旨

分離の最適化は、カラムの結合相と移動相を適切に選択することにより行います。このアプリケーションでは、トリフルオロ酢酸(TFA)や酢酸などを移動相に添加して選択性を変化させ、サリチル酸とその副生物の分離を行いました。1.8  $\mu\text{m}$  カラムを用いた高いサンプルスループットと、低い pH でも安定した固定相により、メソッド開発の際の重要なパラメータの評価を迅速に行うことができました。

## 緒言

### 低 pH HPLC の利点

有機酸の分析には、ZORBAX StableBond SB-Aq カラムが適しています。低 pH 条件でも耐久性が高く、有機溶媒をほとんど用いずに使用することができます。特許の結合相の化学的性質により、シリカ表面を立体的に保護するジイソプロピル基を側鎖に持ち、低 pH でのシロキサン結合の加水分解反応を抑制します。これにより、低 pH での分離において、優れた耐久性と再現性を発揮

します。StableBond SB-Aq を用いた分析例としては、フルーツジュース中の有機酸 [1]、水溶性ビタミン [2]、医薬品化合物、セフチブテンの異性体 [3] などがあります。

メソッド最適化で検討すべき主なパラメータは、有機溶媒の種類と移動相の pH です。アセトニトリルからメタノールに溶媒を変更することで得られる選択性の違いについては、参考文献 4 に記載されています。

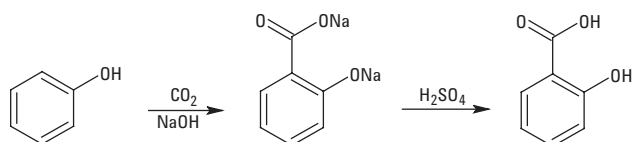
イオン性化合物はある pH の領域において電荷を持ちます。イオン性化合物である安息香酸は、保持、つまりクロマトグラフィ的な相互作用が、pH 3 と pH 7 で大きく異なります。安息香酸は pH 3 (プロトン化) ではよく保持されますが、pH 7 (イオン化) ではボイドボリューム近くに溶出します。極性があってもイオン化しないベンジルアルコールやニトロベンゼンのような極性化合物は、pH が変動してもリテンションタイムはあまり変動しません。

### サリチル酸分析

サリチル酸ナトリウムは、Kolbe-Schmitt 反応により高温/高圧でナトリウムフェノキシドと二酸化炭素から作られます。これを酸性化して、必要なサリチル酸を得ます。主反応を図 1 に示しますが、この反応では、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、5-ヒドロキシ-1,3-ベンゼンジカルボン酸、4-ヒドロキシ安息香酸、フェノール、サリチルグリシンなど、複数の副生成物が生成します。図 2 にこれらの化合物の一般名、構造、pKa 値を示します。



Agilent Technologies



Introduction to Organic Chemistry, Streitwieser and Heathcock, MacMillan, NY (1981). (参考文献 5)

図 1. Kolbe-Schmitt 反応を用いたサリチル酸の合成

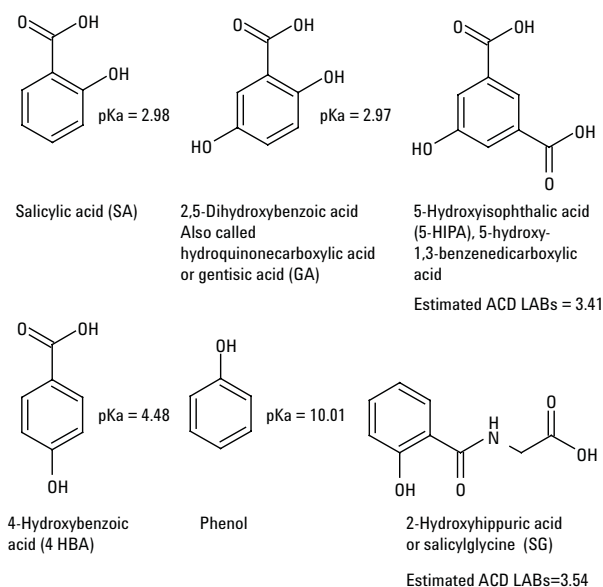


図 2. 主なサリチル酸不純物の構造式

水、メタノール、氷酢酸 (60:40:1) の酸性移動相と、一般的な 5  $\mu$ m C18 カラムを用いてサリチル酸の純度が測定されています。ここでは 3 つの不純物 (4-ヒドロキ安息香酸、4-ヒドロキシイソフタル酸、フェノール) について言及されており、移動相組成を変更すると溶出順序が変化する可能性があることが記されています [6]。これは、移動相組成が変わると移動相の pH も変化し、これらの化合物のイオン性が変化するからです。

この実験では、使用する移動相添加剤の種類を変えて分離の最適化を行いました。一般的な濃度の TFA、リン酸、酢酸、ギ酸を用い、サリチル酸と 5 つの不純物の分離を行いました。

## 実験

### LC システム

Agilent 1200 ラピッドレゾリューション液体クロマトグラフ (RRLC) (デガッサ、バイナリポンプ、ウェルプレートオートサンブラ、220 nm に設定したダイオードアレイ検出器)、StableBond SB-Aq、1.8  $\mu$ m、4.6 mm x 50 mm カラム (部品番号 827900-914) を使用。バイナリグラジエントは、メタノール (チャンネル B) を 10 分間で 5% ~ 30% に設定しました。メタノール (HPLC グレード) は Burdick and Jackson から入手しました。

対象化合物:

- ・サリチル酸 (SA)
- ・フェノール (Phe)
- ・4-ヒドロキシ安息香酸 (4-HBA)
- ・ゲンチシン酸 (GA)
- ・5-ヒドロキシイソフタル酸 (5-HIPA)
- ・2-ヒドロキシ馬尿酸 (SG)

上記は、Sigma Aldrich および ARCOS から入手しました。

チャンネル A に添加された修飾剤:

- ・トリフルオロ酢酸 禪 FA)、純度 99%、(pKa = 0.23)
- ・リン酸、ACS クラス、純度 85 %、(pKa = 2.12)
- ・氷酢酸、純度 99%、(pKa = 3.8)
- ・ギ酸、ACS クラス、純度 99 %、(pKa = 4.8)

リン酸、ギ酸、酢酸は EM Science から入手しました。TFA は Sigma Aldrich から入手しました。

### 結果と考察

HPLC 移動相の pH の調整には、リン酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、ギ酸が一般的に使用されます。水系移動相に酸を添加することは簡便な方法であり、緩衝液の代わりとして効果的な場合もあります。さらに、容量の小さいラピッドレゾリューション (RRHT) カラムを用いた高速グラジエントでは、わずか数分でカラムの平衡化が可能です。図 3 に、前述したグラジエント条件にて、4 つの異なる酸を一般的に使用される濃度で添加して測定したクロマトグラムを示します。はじめに不揮発性のリン酸を用いて分離を行いました。これは MS 検出器には適していません。TFA は対象化合物とイオンペアを形成し、イオンサプレッションを引き起こす可能性があるため、LC/MS には不適当な場合があります。しかし、MS 検出器の前で高濃度の異なる酸をポストカラムで添加し、TFA をイオンペア錯体から置き換えることができます。この手法には酢酸が用いられます。75% プロピオン酸:

25% イソプロパノールの溶液もイオンペアを置換します。図 3 のように TFA とリン酸は優れた分離が得られましたが、一般的に用いる濃度のギ酸と酢酸では 6 成分中 5 成分しか分離しませんでした。さらに、ギ酸と酢酸を用いた例では、TFA とリン酸の分析結果と 4-HBA と GA の溶出順序が入れ替わりました。

図 4 に、分離に対する酸濃度の効果を示します。全般にピーク形状がよくなり、SG のピーク形状が大幅に改善しました。酸をさらに添加することで移動相の pH が低くなり、化合物の解離が抑えられて良好なピーク形状が得られました。

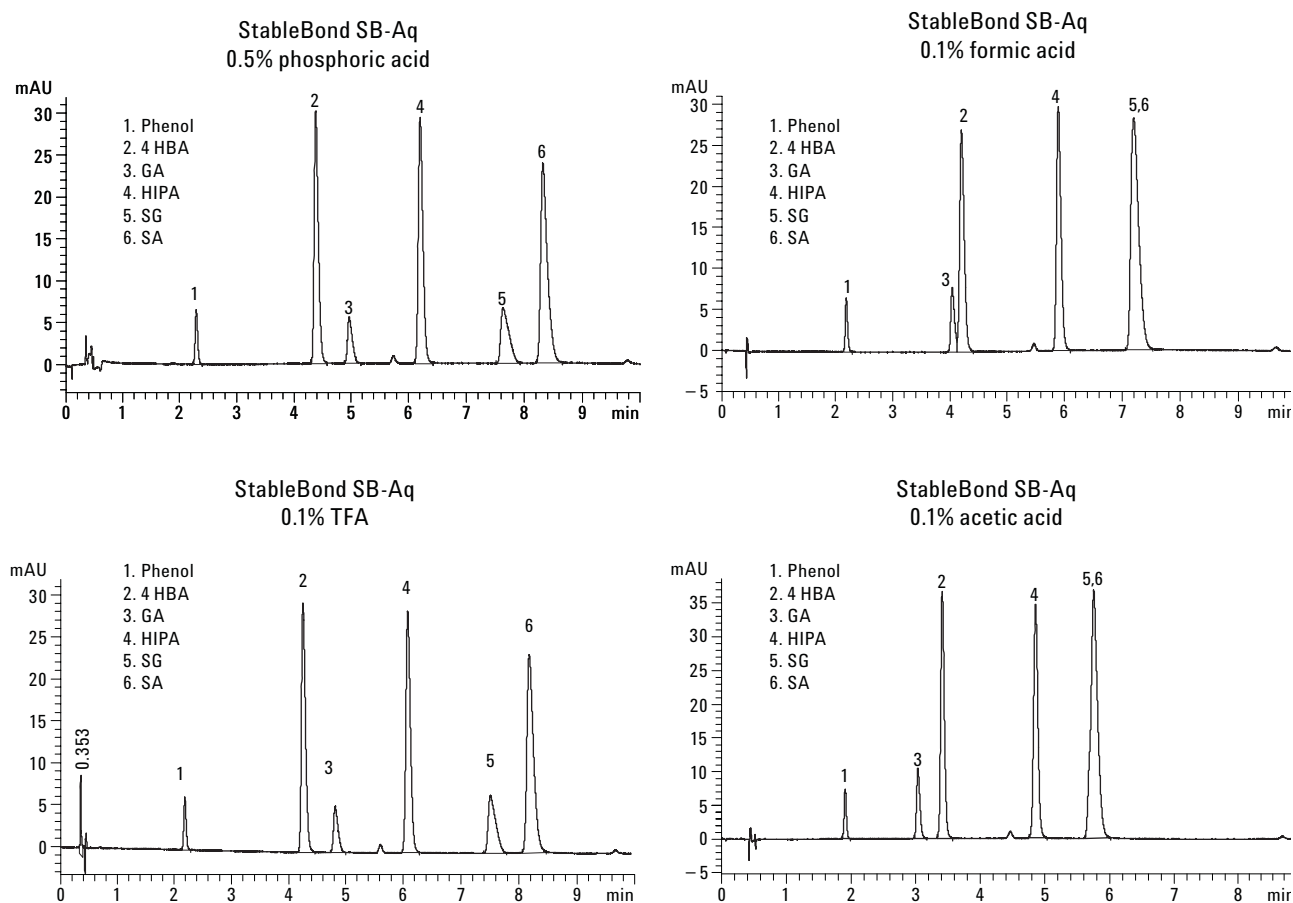


図 3. 移動相へ添加する酸の不純物の分離への効果

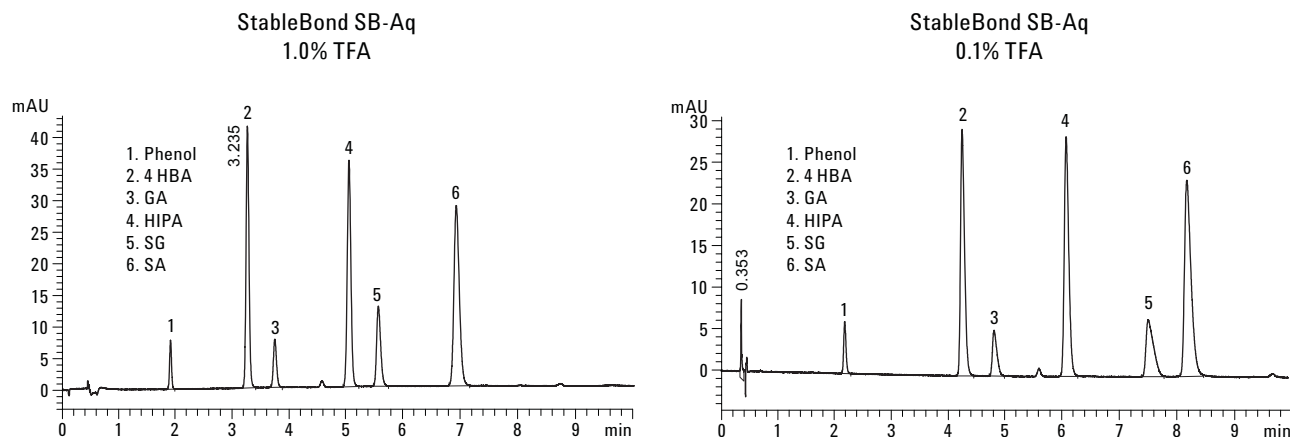


図 4. 分離とピーク形状への酸濃度の影響

## 結論

RRHT 50 mm カラムでの短い平衡時間と分析時間により、メソッド開発の際に移動相への添加剤を検討することが実用的になりました。添加する酸の種類を変えるだけで、優れたピーク形状と分離を実現できる場合があります。さらに、移動相の pH を対象化合物の pKa より下げる（イオン強度を上げる）ことで、ピーク形状を改善できます。RRHT SB-Aq カラムなどの短く低容量のカラムを用いることにより、短時間でメソッド開発を行うことができます。ここでは、pH の調整に単純に一つの酸を使用する方法を説明しましたが、この方法は異なる移動相緩衝液を評価する際や、緩衝液濃度の最適化の検討にも応用できます。

StableBond カラムは低い pH の移動相を用いたアプリケーションに適したカラムです。独自の化学的性質と SB-Aq などの豊富な種類の結合相により、低い pH での幅広い選択性、長寿命、再現性を可能にします。

## 参考文献

1. M.A. Van Straten, H A. Claessens A. Dams, "Analysis of Organic Acids in Aqueous Solutions," Agilent publication 5989-1265EN, 2006.
2. "Quick Screening and Quantification of Water-Soluble Vitamins Using Rapid Resolution LC/MS/MS" S. Mosin Poster THPH 115 ASMS 2007.

3. Adebayo O. Onigbinde, "Separation of Ceftibuten Stereo Isomers with 100% Aqueous Mobile Phase Using Zorbax SB-Aq," Agilent publication 5988-7625EN, 2002.
4. William J. Long and John W. Henderson Jr., "Unique Selectivity and High-Throughput Applications of SB-Phenyl RRHT," Agilent publication 5989-5057EN, 2007.
5. Introduction to Organic Chemistry, Streitweiser and Heathcock, MacMillan, NY (1981).
6. Salicylic Acid, USP 23 (1995) 1395.

## 詳細情報

アジレントの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](http://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。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan  
January 3, 2008  
5989-7731JAJP



Agilent Technologies