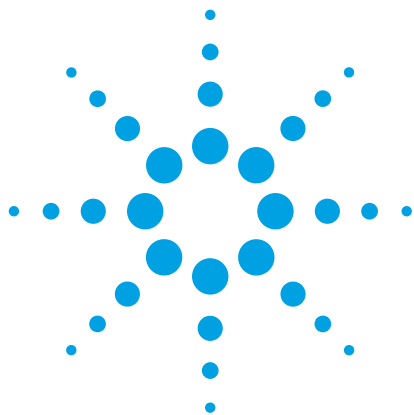




Agilent InfinityLab Poroshell 120 4 μm カラムによる容易なメソッド移管と 性能の向上

アプリケーションノート

食品検査・農業

著者

William Long

Agilent Technologies, Inc.

概要

もともとは 4.6×100 mm、5 μm カラムで開発され、9 個のフェノール化合物を分離するためのメソッドを、4 μm および 2.7 μm 粒子を充填した Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 4.6×100 mm カラムに移管しました。これらのカラムの性能を、1.8 μm 全多孔質粒子を充填した同様のサイズのカラムの性能と比較しました。グラジエントと流量がスケーリングされ、各カラムの最適な流量を決定するための一定のリテンションインデックスが維持されました。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4 μm カラムに切り替え、グラジエントを最適化することによって、ピークキャパシティが 50 から 67 に向上しました。このアプリケーションノートでは、メソッド移管のための簡単なガイドラインを提供します。4 μm メソッドの圧力は 200 bar 未満であり、任意の HPLC システムに容易に移管することができます。



Agilent Technologies

はじめに

ポリフェノールは植物の二次代謝物で、一般的に紫外線照射や病原体に対する生体防御と関連しています。過去 10 年間、食用植物としてポリフェノールへの関心が高まってきました [1 ~ 3]。

食品中で、ポリフェノールは苦味、渋味、彩色、香味、匂い、酸化安定性に寄与します。植物由来のフェノール化合物はすべて、共通の中間生成物、フェニルアラニン、または類似した前駆体、シキミ酸から生成されます [4]。

植物中のフェノール-フラボノイドには、エラグ酸、カテコール、没食子酸、ケルセチン、レゾルシノール、タンニン酸、バニリン、サリチル酸、アセチルサリチル酸、安息香酸が含まれます。

環境中のフェノール類は工業プロセスによって生成されています。これらのフェノール類には、プラスチックや農業に配合されている抗酸化剤、石炭、石油、木材の燃焼物、フェノール樹脂の製品があります。多くの場合、フェノール類は自然のプロセスで生成されます。しかし、これらの化合物は地下水への放出時に多くの水生生物を壊滅させる可能性があります。したがって、これらの化合物の毒性と広範囲での使用を考慮すると、フェノール化合物の分析測定が重要になります [5、6]。

長年にわたり、5 μ m HPLC カラムが分析測定の標準でした。多くの研究者が、高圧、不慣れな機器、カラムの詰まりのために、高い効率や堅牢性を犠牲にしてきました。Agilent InfinityLab Poroshell 120 4 μ m カラムの使用により、類似の 5 μ m カラムを使用したメソッドと比べて分離能力を向上させることができます。InfinityLab Poroshell 120 4 μ m カラムでは 5 μ m カラムよりもわずかに高い圧力が生じますが、同じ機器で簡単に使用できます。さらに、5 μ m カラムのものと同じ 2 μ m フリットを使用するため、カラムの詰まりに対して堅牢性があり、追加的なサンプル前処理は不要です。

今回の分析測定では、グラジエントメソッドを 4.6 $\times$ 100 mm、5 μ m カラムから InfinityLab Poroshell 120、4.6 $\times$ 100 mm、4 μ m カラムまたは InfinityLab Poroshell 120 2.7 μ m カラムへ移管しました。グラジエントをスケールリングして最適なピークキャパシティで流量を決定しました。最後に、各実験での圧力を比較し、InfinityLab Poroshell 120 カラムがどの LC でも容易に使用できることを実証しました。

分析方法

今回の研究全体において Agilent 1260 Infinity LC を使用しました。G1312B バイナリポンプ SL は移動相 A (0.1 % ギ酸水溶液) および移動相 B (0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液) を用いてセットアップしました。表 1 にグラジエントを示します。実験を通して一定のリテンションインデックスが得られるように、時間セグメントは流量に比例してスケールリングされています。ポンプはパルスダンパーとミキシングカラムを外して構成しました。

表 1. 4.6 $\times$ 100 mm カラムで使用したグラジエントプログラム

% B	時間 (分)						
5	4	2	1.33	1	0.8	0.67	0.34
40	34	17	11.33	8.5	6.8	5.67	2.84
40	40	20	13.33	10	8	6.67	3.34
5	42	21	14	10.5	8.4	7	3.5
5	50	25	16.67	12.5	10	8.34	4.17
流量 (mL/min)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5

G1367C 自動液体サンブラを 20 μ L 注入量で使用しました。G1316B サーモスタット付きカラムコンパートメントを 35 $^{\circ}$ C に設定しました。G4212A ダイオードアレイ検出器を 270.4 nm、リファレンス波長 360.100 nm に設定し、光路長 10 mm で容量 1 μ L の G4212-60008 フローセルと組み合わせました。Agilent OpenLAB ソフトウェアバージョン 1.05C を使用して HPLC を制御しデータを処理しました。

カラム

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 $\times$ 100 mm、4 μ m (p/n 695970-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 $\times$ 100 mm、2.7 μ m (p/n 695975-902)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 $\times$ 100 mm、1.8 μ m (p/n 959964-902)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 $\times$ 100 mm、5 μ m (p/n 959996-902)

図 1 に、分析対象化合物とその構造式を示します。各化合物を 1 mg/mL で水に溶解しました。各化合物の同量の水溶液を混合して混合サンプルを生成した後、水で 1/10 に希釈しました。すべてのサンプルでチオ尿素をボイドボリウムマーカースとして使用し、 t_0 を測定しました。

チオ尿素、ヒドロキノン、レゾルシノール、フェノール、4-ニトロフェノール、p-クレゾール、o-クレゾール、2,3-ジメチルフェノール、2,5-ジメチルフェノール、1-ナフトール、ギ酸は Sigma-Aldrich, Corp. 社から購入しました。アセトニトリルは Honeywell 社から購入しました。水は現場で 18 M Ω で Milli-Q で生成しました。

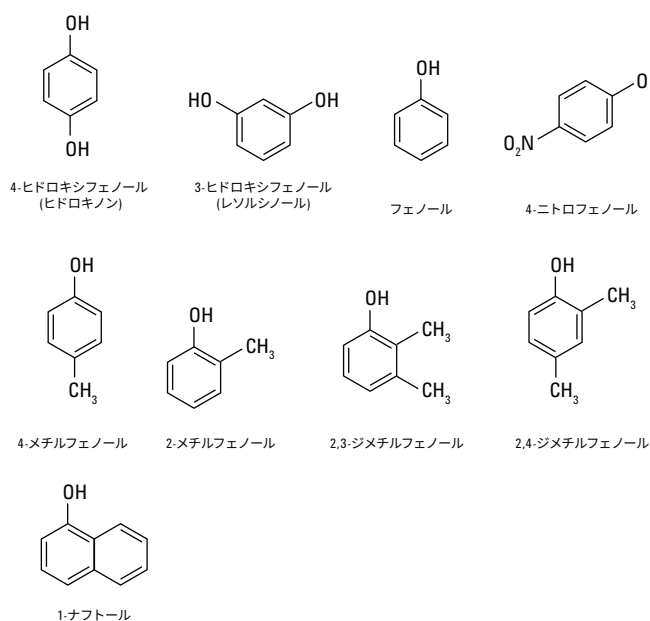


図 1. 対象化合物

結果と考察

Coman 氏と Moldovan 氏による研究 [6] では、飲料水中および表流水中で一般的に同定されるフェノール類の優れた分離および定量スキームが示されました。今回の研究の目的は、分析のピークキャパシティを向上させるか、またはクロマトグラフィーでの分析時間を大幅に短縮することによって、メソッドをクロマトグラフィーの面で改善することでした。酢酸の代わりにギ酸を使用することで移動相の pH が低くなります。また、水性移動相および有機移動相の両方でのギ酸の含有により、ベースラインがさらに平坦になります。しかし、ピークキャパシティが向上する一方で選択性が変化しないように、カラム条件を変える場合は k' 値を維持する必要があります。過去のアプリケーションノート [6] に記載されているように、最初のグラジエントをスケールリングし、カラム容量を一定に維持してメソッドの選択性を保持しました。今回の場合、流量は 0.5 mL/min 間隔で 0.5 ~ 3.5 mL/min の間で変動させました。式 1 をガイドラインとして使用し、表 1 に記載した条件を開発しました。この条件は手計算されたもので、100 mm カラムで使用したクロマトグラフィープログラムの基準でした。

$$k' = (t_g F) / (d/2) 2L(\Delta\%B)$$

式 1

ここで:

t_g はグラジエント時間

F は流量

L はカラム長

d はカラムの直径

$\Delta\%B$ はグラジエントセグメント全体での有機成分の変化率

図 2 に、1.8 μm および 5 μm 全多孔質 ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと 4 μm および 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムを使用した場合のサンプルクロマトグラムを示します。図から分かるように、溶出の順序および相対的な間隔は 4 つのカラムすべてで同じでした。しかし、2 つの表面多孔質カラム (4 および 2.7 μm) のリテンションタイムは他の 2 つの全多孔質カラム (5 および 1.8 μm) のものよりわずかに短くなりました。このメソッドは各カラム間で容易に移管されました。

図 3 は、4 つのカラムの圧力と粒子サイズの関係を示しています。粒子が大きくなると圧力が低くなりました。図 2 に示す条件下 (1.5 mL/min) では、5 μm カラムと 4 μm InfinityLab Poroshell 120 カラムの両方で圧力は 200 bar 未満でした。4 μm InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムによるほとんどのメソッドがこの流量で実行されました。

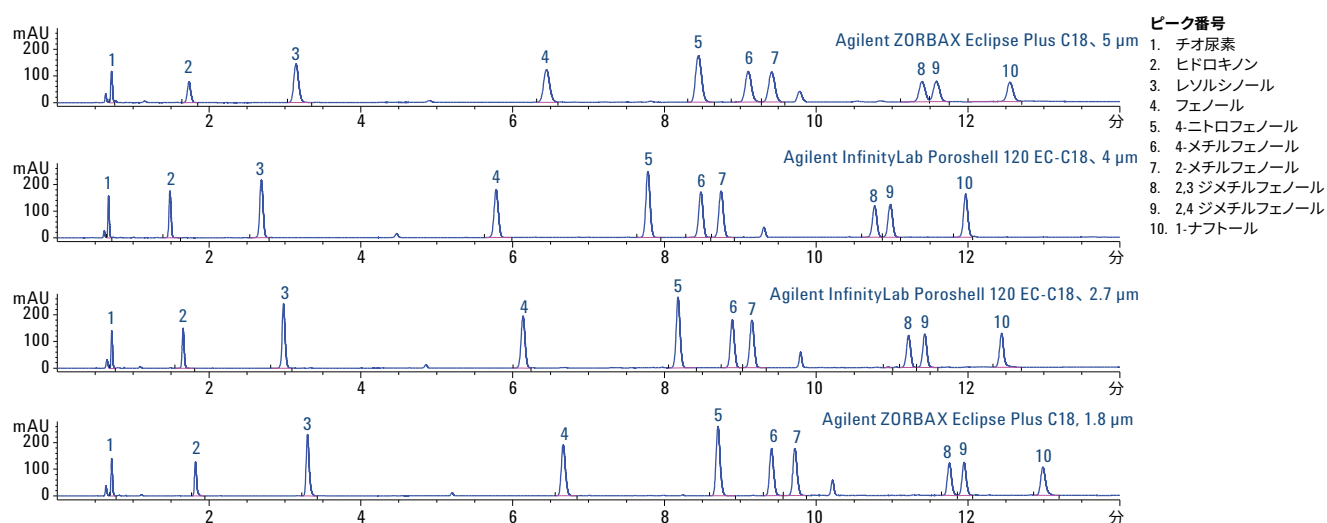


図 2. 1.5 mL/min でのクロマトグラムの重ね表示

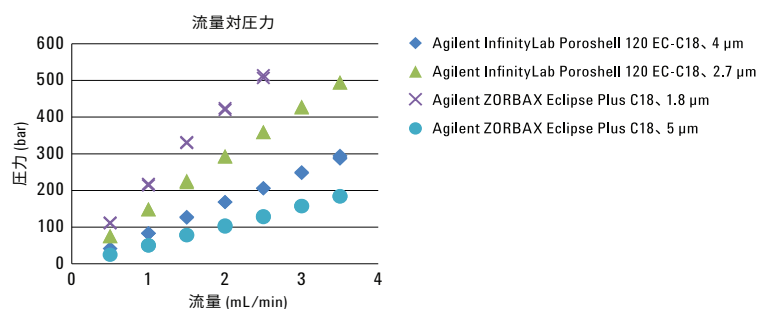


図 3. 4 種類のカラムの圧力対流量の比較

条件付きピークキャパシティ = $(t_{R,n} - t_{R,1})/w$

式 2

ここで:

$t_{R,n}$ と $t_{R,1}$ はそれぞれ最後と最初の溶出ピークのリテンションタイム

w は 4σ ピーク幅、つまり $= (W\% / 2.35) \times 4$

$W\%$ はピークの高さの半分の個所のピーク幅

図 4 に、クロマトグラムのそれぞれのピークキャパシティを示します。最も高いピークキャパシティは、1.8 μm ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを流量 2.5 mL/min で使用した場合に得られました。流量を増大させると、ピークキャパシティがさらに高くなる可能性があります。しかし、システムの圧力上限である 600 bar を超える恐れがあります。100 mm InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.7 μm カラムが次に高いピークキャパシティを 2 ~ 3 mL/min の間で示しました。

図 4 が示すように、より低い流量では 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 と 1.8 μm ZORBAX Eclipse Plus C18 のピークキャパシティはほぼ同じでした。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、100 mm、4 μm カラムでは次に高いピークキャパシティが 1 ~ 2 mL/min の間に示されました。これは内径 4.6 mm カラムを使用するほとんどの研究者の流量開始範囲です。

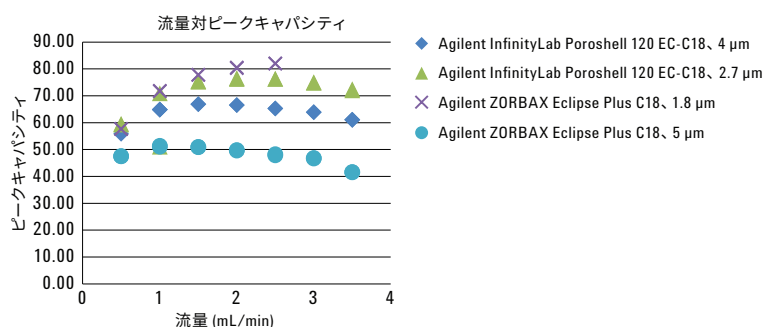


図 4. 0.5 ~ 3.5 mL/min でのピークキャパシティの最適化

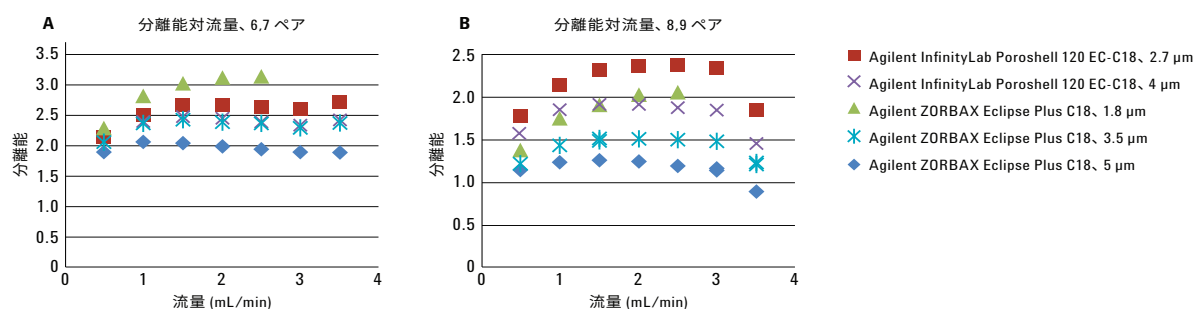


図 5. 0.5 ~ 3.5 mL/min での分離能の最適化

5 μm カラムは最適なピークキャパシティを 1 ~ 1.5 mL/min の間で示します。一般に、同じサイズの全多孔質カラムの場合、粒子が大きいカラムの方がより低い最適流量でより低いピークキャパシティを示します。

図 5A および 5B は、各カラムでの 2 個のピークペアの分離能がどのように変化したかを示しています。ピークペア 6/7 は 4-メチルフェノールと 2-メチルフェノールで、ピークペア 8/9 は 2,3-ジメチルフェノールと 2,4-ジメチルフェノールです。関係の強い化合物のこれらのピークペアは、多くのメソッド開発研究者が日々直面するような問題です。図 5B に示すように、最適なピーク分離能は、2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 では流量が 2.5 mL/min での 2.4、1.8 μm カラムでは流量が 2.5 mL/min での 2、4 μm InfinityLab Poroshell 120 では流量が 1.5 mL/min での 1.9、5 μm カラムでは流量が 1.5 mL/min での 1.2 でした。ピークキャパシティと同様に、粒子が大きいカラムの方がより低いピーク分離能を示しました。さらに、より大きい粒子の最適なピーク分離は、より低い流量で表れます。

結論

表面多孔質粒子質を充填した HPLC カラムには、従来の全多孔質粒子を充填したカラムを上回る利点が多数あります。Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4 μm カラムでは、5 μm の全多孔質カラムよりも効率とピークキャパシティが大幅に向上します。

表面多孔質 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 は、効率と選択性が 1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 と同等でありながら、高い背圧は不要です。InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムと ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムは選択性が同様であるため、メソッドを容易に移管して分析時間の短縮、スループットの向上、ピークキャパシティの増大を実現することができます。

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。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) をご覧ください。

参考文献

1. Rainha, N.; Koci, K.; Coelho, A. V.; Lima, E.; Baptista, J.; Fernandes-Ferreira, M. HPLC–UV–ESI–MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. *Phytochem.* **2013**, 86, 83-91.
2. Vagiri, M.; Ekholm, A.; Andersson, S. C.; Johansson, E.; Rumpunen, K. An optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 10501-10510.
3. Proestos, C.; Sereli, D.; Komaitis, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* **2006**, 95, 44-52.
4. Mradu, G.; Saumyakanti, S.; Sohini, M.; Arup, M. HPLC Profiles of Standard Phenolic Compounds Present in Medicinal Plants. *Int. J. Pharmacog. Phytochem. Res.* **2012**, 4, 162-167.
5. Coman, C.; Moldovan, Z. RP-HPLC Method for the Separation of Some Phenol Derivatives Using Gradient Elution and UV Detection. *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 699-701.
6. W. J. Long; A. E. Brooks. Fast Analysis of Environmental Phenols with Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 Columns. Agilent Technologies, Inc. Application Note, publication number 5990-6156EN, **2010**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, August 31, 2017

5991-5510JAJP



Agilent Technologies