

Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T カラムを用いた乳酸ナトリウムのキラル分析

著者

William J. Long and
Carl Griffin
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

エナンチオマーの高速分離は、生化学分析および医薬品業界において、ますます重要になっています。政府規制が強化されるとともに、多数の光学活性医薬品化合物が導入されているため、これらの化合物を分析する際には、迅速かつ高感度で信頼性の高いメソッドを考案することが重要になります。現在使用されている薬物はその半分以上がキラル化合物であり、これらのほぼ 90 % が、2 つのエナンチオマーの等モル混合物で構成されるラセミ化合物として販売されています。キラル薬物は化学構造は同じですが、その大部分の異性体は生物学的活性が大きく異なります。

セルロースまたはアミロースベースのキラル選択相（CSP）を用いた多数のキラル分離が実施され、ヘキサンなどの順相溶媒が使用されていますが、メタノールなどのより一般的な溶媒をベースにした分離では、他の相が要求されることが多くなっています。これらの相は、逆相メソッドを実施しているラボに簡単に組み込むことができます。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T (テイコブラニン) や Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V (バンコマイシン) のような糖ペプチドベースのキラルカラムは、逆相および順相高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、さらに超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) のさまざまな溶媒で使用できます。糖ペプチドは両性であり、イオン化した酸性および塩基性グループの両方が含まれています。そのため、糖ペプチドは移動相の pH に応じて、正に帯電するか、負に帯電するか、または中性になることができます。したがって、この種の CSP を用いてイオン性化合物を分離する際には、キラル認識にイオン性相互作用を関与させることができます。この種の CSP におけるキラル認識では、今述べたことが主要な役割を果たすと考えられています。キラル認識で CSP として抗生物質を使用することに関連して発生する可能性があるその他の相互作用には、水素結合、立体化、双極子-双極子、 π - π 相互作用、および疎水性相互作用があります。これらの相互作用は、使用する個別の成分と移動相モードの特性によって決定される、さまざまな組み合わせにおいて発生する場合があります。それぞれの分離モードは、キラル認識に対し、同時でありながら、異なる相互作用をもたらします。これにより、多数のキラル分離およびこの種の CSP で適切に分離されるさまざまなタイプのキラル化合物に関する情報が得られます。

糖ペプチドテイコブラニンは、表面多孔質シリカ粒子と共有結合することにより、耐溶媒性のある安定したクロマトグラフィー用メディアを生成します。これらの共有結合相は、一般的な HPLC 移動相およびメタノール、エタノール、IPA、THF、リン酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、ギ酸、TFA、TEA、 NH_4OH などの添加物に対する耐性があります。このアプリケーションノートでは、InfinityLab Poroshell 120 キラル-T を用いて、乳酸のような乳酸ナトリウムの分離メソッドを開発し最適化しました。

実験方法

この研究には、低分散で構成された Agilent 1290 Infinity LC を使用しました。表 1 は、機器構成を示しています。すべての化合物は、エナンチオマーの混合物、および同定のための個別標準として注入しました。

D,L-乳酸ナトリウムおよび L-乳酸ナトリウムは Sigma-Aldrich から購入しました。L エナンチオマーは 1 mg/mL で溶解しました。混合 D,L エナンチオマーは 2 mg/mL でメタノールに溶解されたサンプルです。図 1 に、乳酸ナトリウムの構造を示します。酢酸アンモニウムおよびギ酸アンモニウム (LC/MS グレード) も SigmaAldrich から購入しました。HPLC グレードのメタノールは Honeywell から購入しました。

2 g のギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウムをメタノールに溶解し、0.2 % w:v で移動相を前処理しました。低濃度も同様の方法で調製しました。

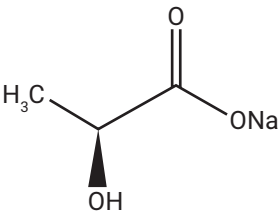


図 1. 酢酸ナトリウムの構造

結果と考察

一般的に、酸性キラル化合物 (アミノ酸やその他の化合物など) の良好な分離は、InfinityLab Poroshell 120 キラル-T カラムで実証されています。この研究では、InfinityLab Poroshell 120 キラル-T と 3 種類の移動相により、初期スクリーニングを実行しました。

1. MeOH/20 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.0 90/10 RP
2. MeOH/20 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.0 30/70 RP
3. 0.2 % w:v ギ酸アンモニウム移動相含有の MeOH

表 1. 機器構成と分析条件

1290 Infinity LC システム	
Agilent 1290 フレキシブルポンプ (G7104A)	
Agilent 高性能オートサンブラ (G4226A)	- シートアセンブリ、超低分散、Agilent 1290 Infinity オートサンブラ G4226A 用 (p/n G4226-87030) - オートサンブラとヒーター: キャピラリー、ステンレス製、0.075 × 220 mm (p/n 5067-4784) - バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付き、認定、2 mL、100 個 (p/n 5182-0716) - キャップ、スクリュ、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個 (p/n 5182-0717)
Agilent マルチカラムサーモスタット (MCT) (G7116B)	- 超低分散ヒーター (p/n 7116-60021) - ヒーターとカラム: InfinityLab クイックコネクタアセンブリ、105 mm、0.075 mm (p/n 5067-5961) - カラムと ELSD キャピラリー、ステンレス製、0.075 × 220 mm、SV/SLV (p/n 5067-4784)
Agilent 1290 ELSD II (G7102A)	- エバポレータ温度 30 °C - ネブライザ温度 30 °C - ガス流量 1 SLM - 40 Hz
Agilent OpenLab CDS、バージョン C.01.07	

0.2 % ギ酸アンモニウム を使用した初期スクリーニングは L 乳酸ナトリウムである程度の成功を示しましたが、D,L-乳酸のクロマトグラムではピーク形状が不良でした (図 2)。2 番目の実験では、ギ酸アンモニウムを 0.2 % 酢酸アンモニウムに変更しました。これにより、3 つのピークがすべて良好に分離され、優れたピーク形状が得られました (図 3)。最適化の試みとして、酢酸アンモニウムの濃度を下げたところ、最後のピークのリテンションタイムは大幅に長くなりましたが、分離能が大幅に向上することはありませんでした (図

4)。塩化ナトリウムのサンプルを注入することにより、この最後のピークはナトリウムと確認されました (図 5)。分離モードは極性イオン分離と呼ばれています。一般的に、極性イオン分離では、メタノールやアセトニトリルのような有機溶媒に少量の酸と塩基を加えて使用します。分離の最適化は多くの場合、酢酸/トリエチルアミンまたは水酸化アンモニウムを使用し、酸塩基比を変化させることで行います。または、アンモニウム塩を移動相に添加します (ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、またはトリフルオロ酢酸アンモニウム)。

スクリーニングに通常使用される移動相は 0.2 % w:v ギ酸アンモニウムで、InfinityLab Poroshell 120 キラル-V (バンコマイシン) または InfinityLab Poroshell 120 キラル-T (テイコブラニン) とともに使用します。

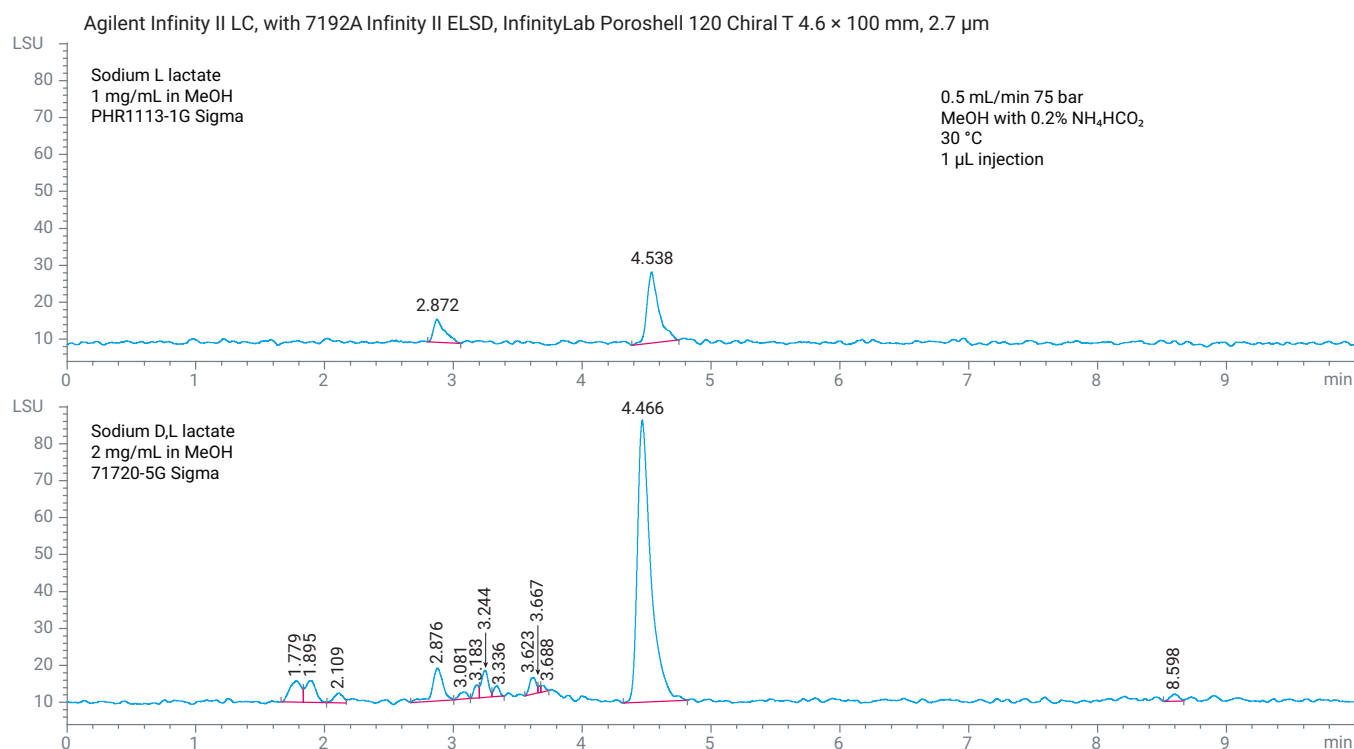


図 2. 0.2 % ギ酸アンモニウム中の D,L-乳酸ナトリウムの分離

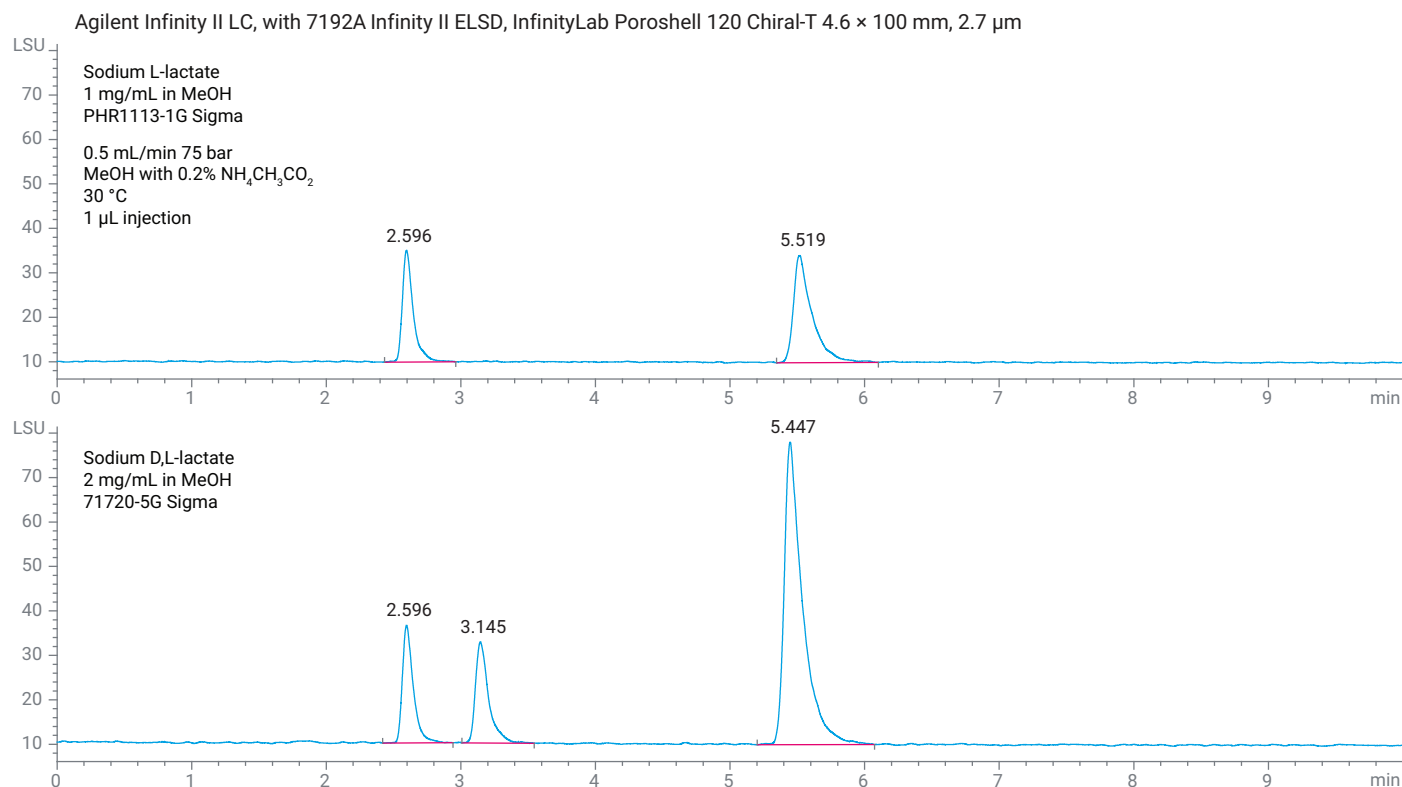


図 3. 0.2 % 酢酸アンモニウム中の D,L-乳酸ナトリウムの分離

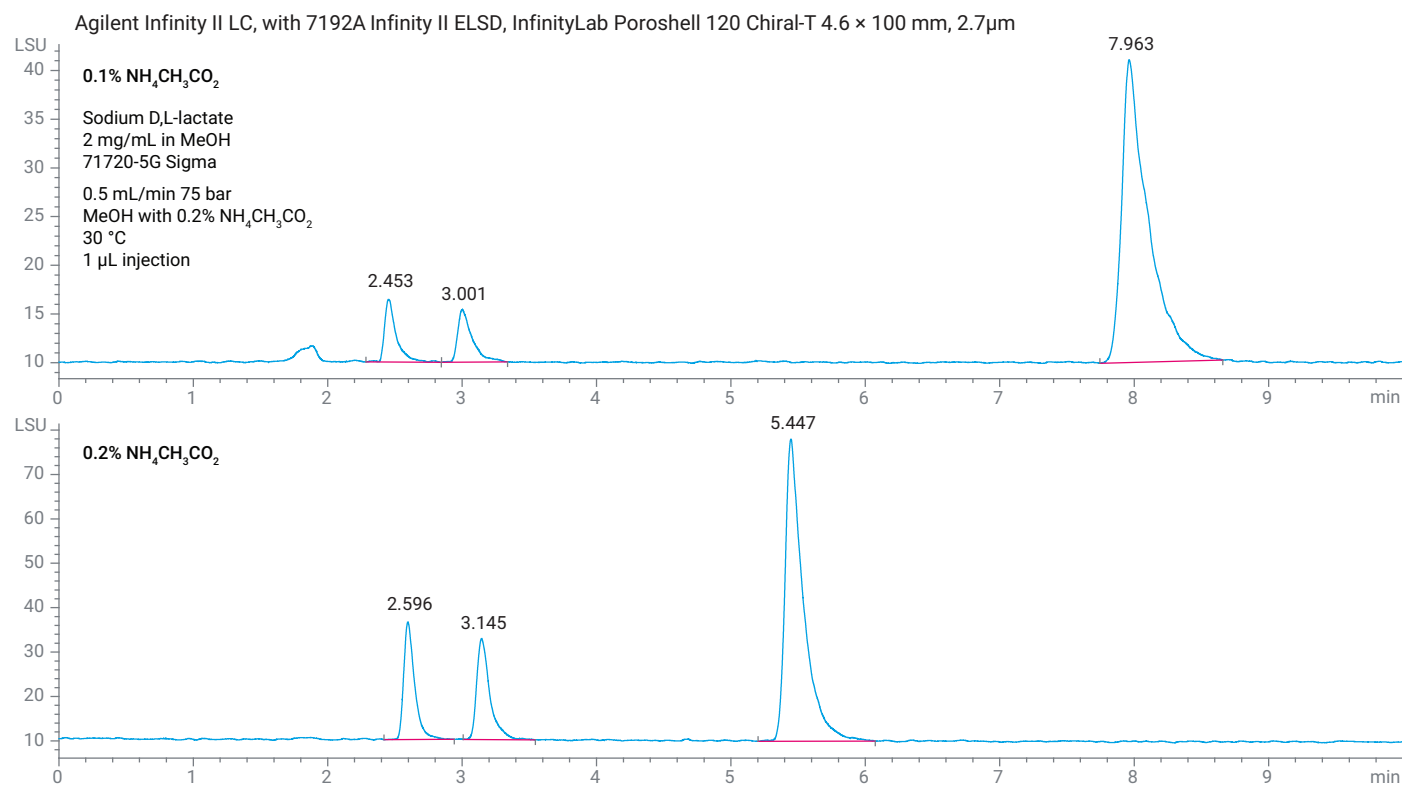


図 4. 酢酸アンモニウム濃度の評価

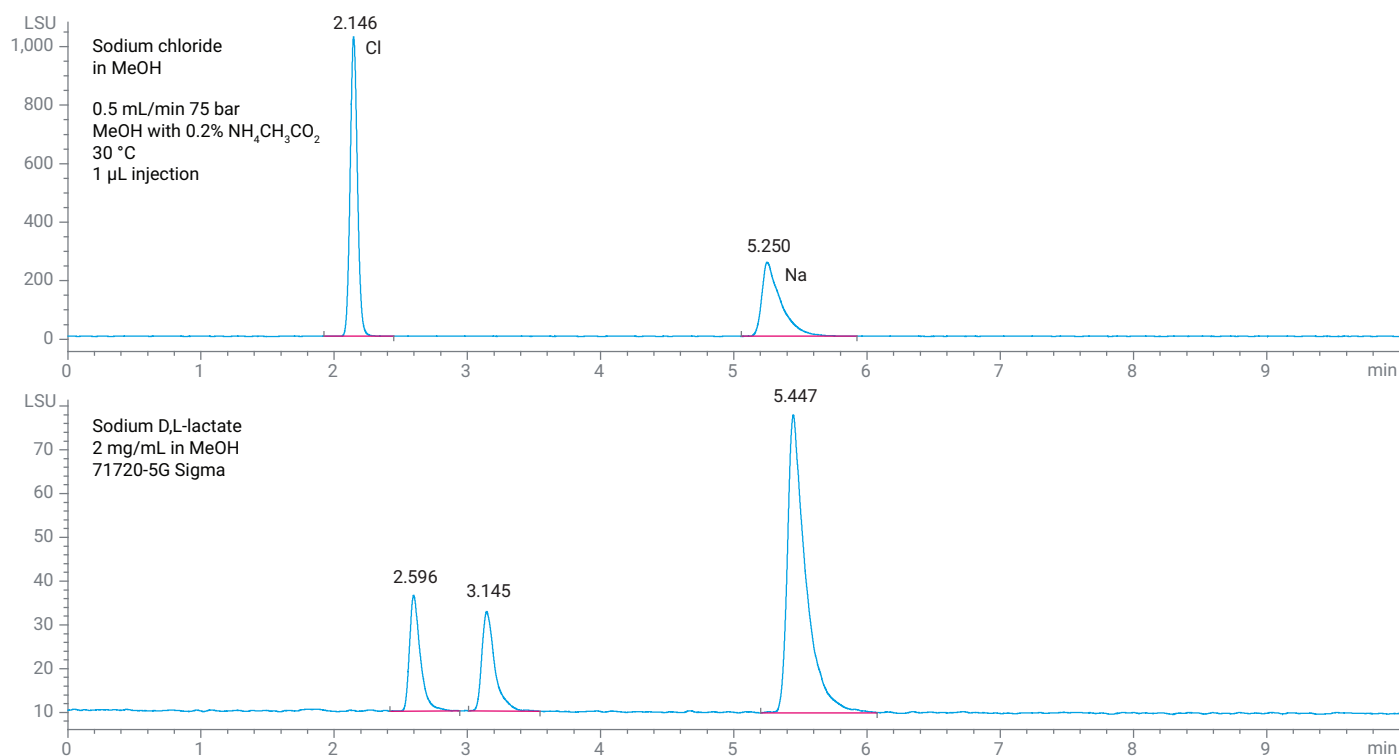


図 5. ナトリウムおよび乳酸エナンチオマーのピークの同定

結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-T カラムは、乳酸ナトリウムの分離のための堅牢なメソッドを促進します。このカラムは、調査したすべての化合物において良好な分離能とピーク形状を達成し、質量分析に対応できます。

参考文献

1. Bonner, W. A. Parity Violation and the Evolution of Biomolecular Homochirality. *Chirality* **2000**, 114.
2. Put InfinityLab Poroshell 120 Chiral Innovation to Work for Your Challenging Separations. *Agilent Technologies applications compendium*, publication number 5991-8450EN, **2017**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE80318618

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, October 6, 2022
5994-5421JAJP