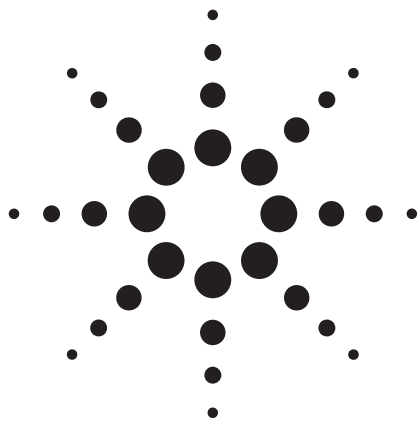




Agilent 1290 Infinity LC システムによる ファインケミカルに含まれる不純物の スクリーニング

アプリケーションノート

ファインケミカル

著者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

ダイオードアレイ検出器 (DAD) を備えた Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、オクチルジメチル-*p*-アミノ安息香酸に含まれる不純物を分析しました。カラムには、600 bar (9000 psi) または 1200 bar (18,000 psi) で使用可能な 1.8 μm の充填剤を充填した種々の長さの内径 3.0 および 2.1 mm の ODS を使用しました。高速分析条件で、長い高分離能カラムを粘性の低いアセトニトリル (ACN) および粘性の高いメタノール (MeOH) を移動相として使用した場合の 1290 Infinity LC システムの性能を示します。



Agilent Technologies

はじめに

さまざまな用途に用いられる出発物質、中間製品、および最終製品に含まれる不純物の分析は、製品の品質、性能、および消費者の安全を保証する上で不可欠です。高速液体クロマトグラフ (HPLC) によりこれらの不純物を正しく分析するには、一般的にグラジエント溶出と多波長検出が必要で、蒸発光散乱法 (ELSD) および質量分析計 (MS) などの検出器も有効です。不純物の定量が主要な目的であるため、紛らわしい分析結果をもたらすことがないように移動相、バイアル、および装置からのコンタミネーションを防止する必要があります。希釈液のブランクや、ろ過などのサンプル調製により起こりうるコンタミネーションのブランクを注意深く用意することも必要です。試料のほかに、溶媒や希釈液ブランクなども分析します。また、主要コンポーネントを最低濃度まで希釈して用意した検出下限標準試料が含まれることもよくあります。この場合、不純物の検出が必須となる可能性があります。さらに、信頼性のある高純度標準サンプルも一般的に欠かせません。

パラアミノ安息香酸 (PABA) は日焼け止めの紫外線吸収成分として使用されていましたが、これを使用すると皮膚がんのリスクが高くなるため、現在では PABA 誘導体であるオクチルジメチル-*p*-アミノ安息香酸 (OD-PABA) が一般的に使用されています。しかし、OD-PABA が分解して PABA が生成する場合があるため、OD-PABA 中の PABA をモニタリングすることが重要です。商品としての安全性と経済上の理由から、製造メーカーにとって OD-PABA の純度は重要です。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システム (最高使用圧 1200 bar の UHPLC システム) の能力を検証し、ダイオードアレイ検出器を使用した OD-PABA サンプル中の不純物分析を紹介します。

OD-PABAの構造式を図 1 に示します。

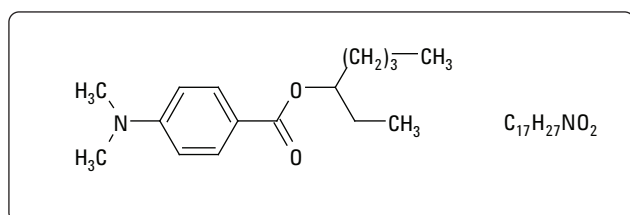


図 1. オクチルジメチル-*p*-アミノ安息香酸 (OD-PABA)

実験

サンプル調製

イソプロピルアルコール (IPA) 中で濃度 1 mg/mL の OD-PABA 溶液を作り、適宜希釈しました。試料注入量は 0.2 ~ 2 μ L としました。

LC メソッドの詳細

LC 条件

Agilent 1290 Infinity LC システム・バイナリポンプ G4220A、
Agilent 1290 Infinity LC システム・オートサンブラ G4226A
Agilent カラムコンパートメント G1316C (スイッチングバルブ搭載)
Agilent 1290 Infinity システム ダイオードアレイ 検出器 G4212A
(光路長 10 mm のファイバーオプティックフローセル搭載)

カラム: (具体的な使用方法はクロマトグラムを参照してください)

Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT, 3 mm x 50 mm、
1.8 μ m, 600 bar, 部品番号 827975-302
Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm x 100 mm、
1.8 μ m, 1200 bar, 部品番号 858700-902
Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm x 150 mm、
1.8 μ m, 1200 bar, 部品番号 859700-902

カラム温度: 40 °C

移動相: A = HPLC グレードの水
B = アセトニトリル (ACN) またはメタノール (MeOH)
(クロマトグラムを参照してください)

流量: クロマトグラムを参照してください

グラジエント: グラジエント: ACN は 40 % ~ 90 % で、MeOH は 50 % ~ 100 % のグラジエント条件で分析しました。グラジエントは、カラムボリュームあたりの有機溶媒の増加を 3.5 % に保ち、それに応じてグラジエント時間および流量を変更しました。これは、Agilent メソッドトランスレータを使用して計算しました。[1]

UV 条件

検出波長: 210、254、280、および 320 nm、バンド幅 4 nm、リファレンス; オフ

結果と考察

OD-PABA の分離例を図 2 に示します (OD-PABA は約 2 分に溶出しています)。複数波長でモニターすると、複数の不純物を容易に検出することができ、検出したすべての測定成分に最適な検出波長の選択にも役立ちます。

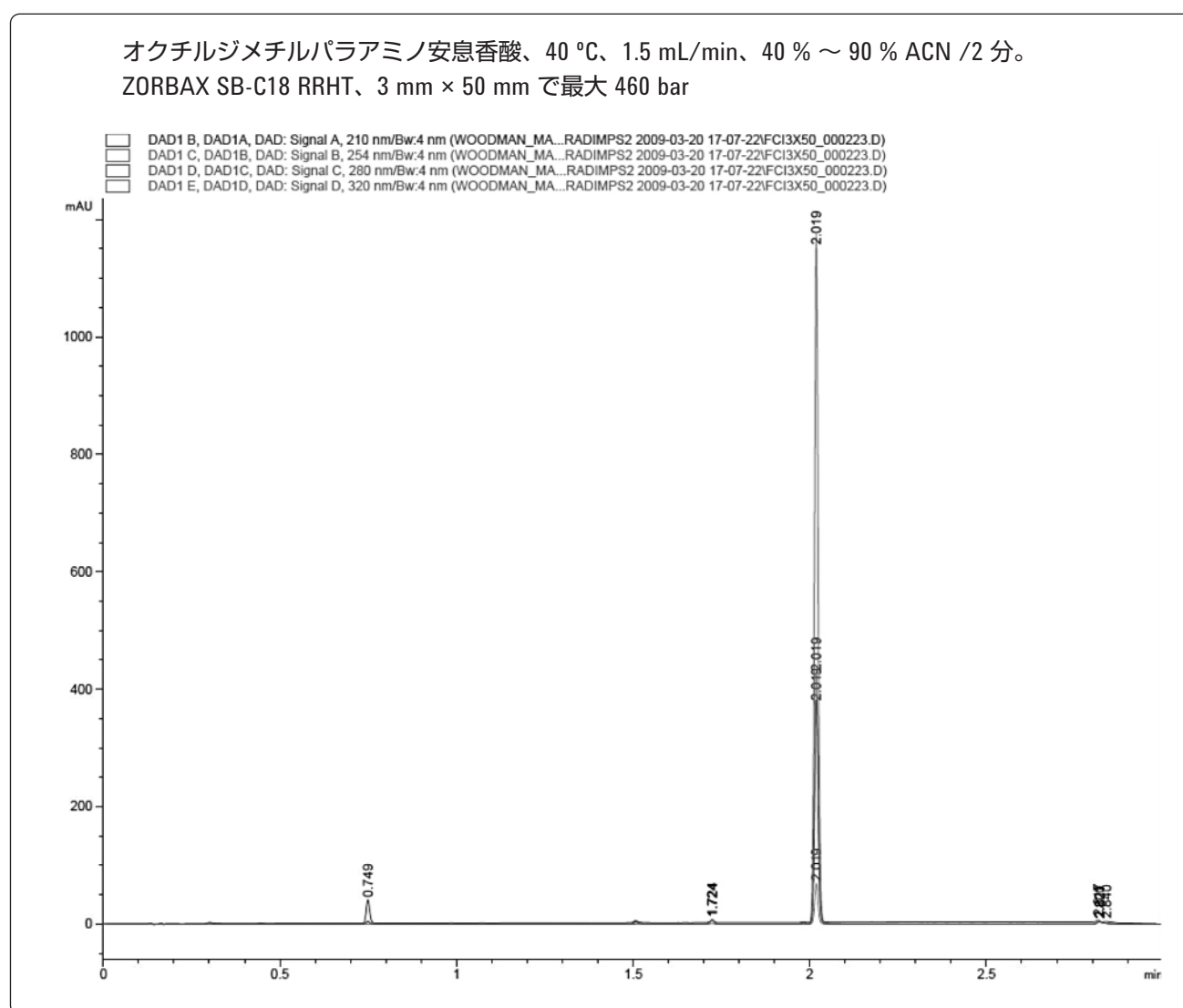


図 2. 3 mm × 50 mm ZORBAX RRHT カラムを使用した OD-PABA のクロマトグラム。このクロマトグラムは不純物分析における典型的な問題点を示しており、広いダイナミックレンジでの検出と高感度の不純物測定が必要ことがわかります。0.75 分のピークは、保持時間の比較と UV スペクトルにより、主要な不純物 PABA であることが確認できました。

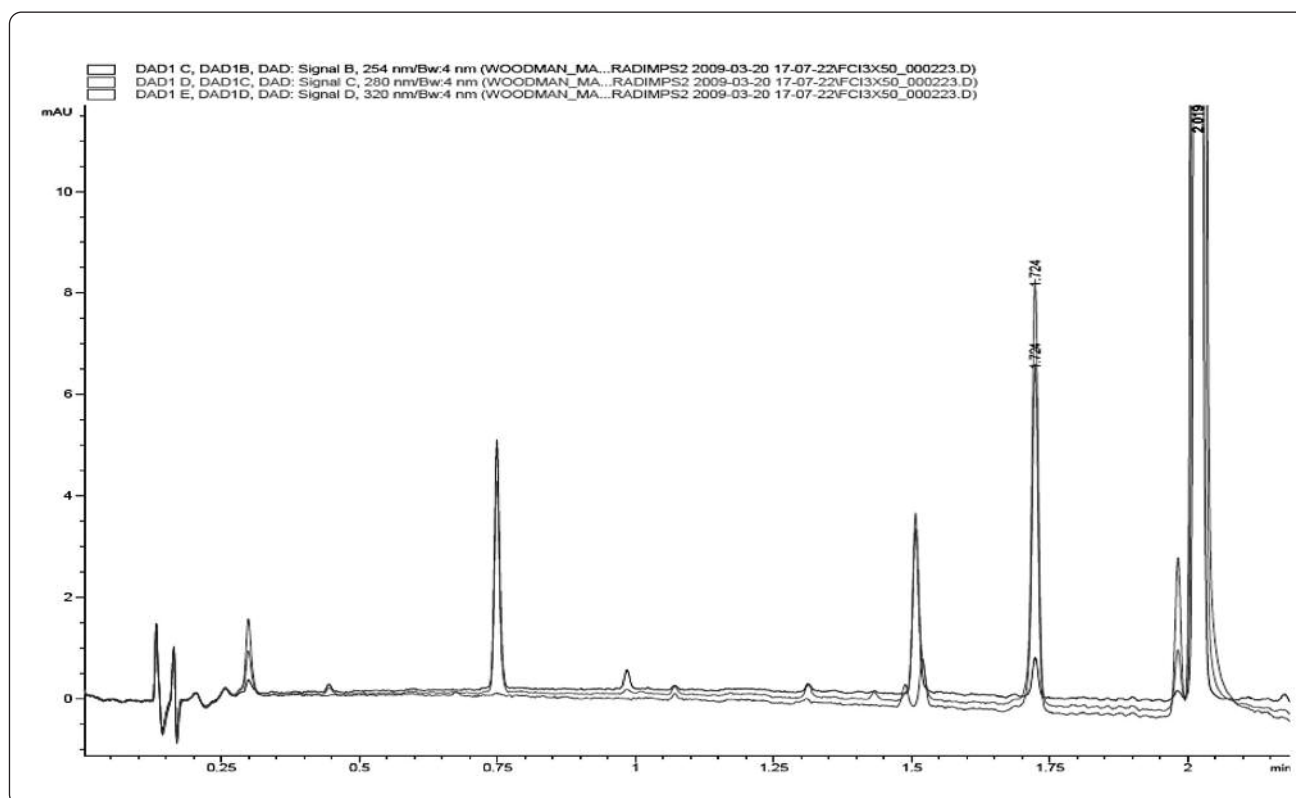


図 3. 図 2 のクロマトグラムの拡大表示

図 3 では、ベースライン付近を詳細に見ることができ、不純物の数がわかります。また、検出された成分の中には分離度が不十分であるものが複数存在します。このカラムの充填剤粒径は小さいにもかかわらずカラム長さが短いため、十分な分離度が得られていません。カラムを長くする場合、カラム内径を小さくし溶媒消費量を減らします。

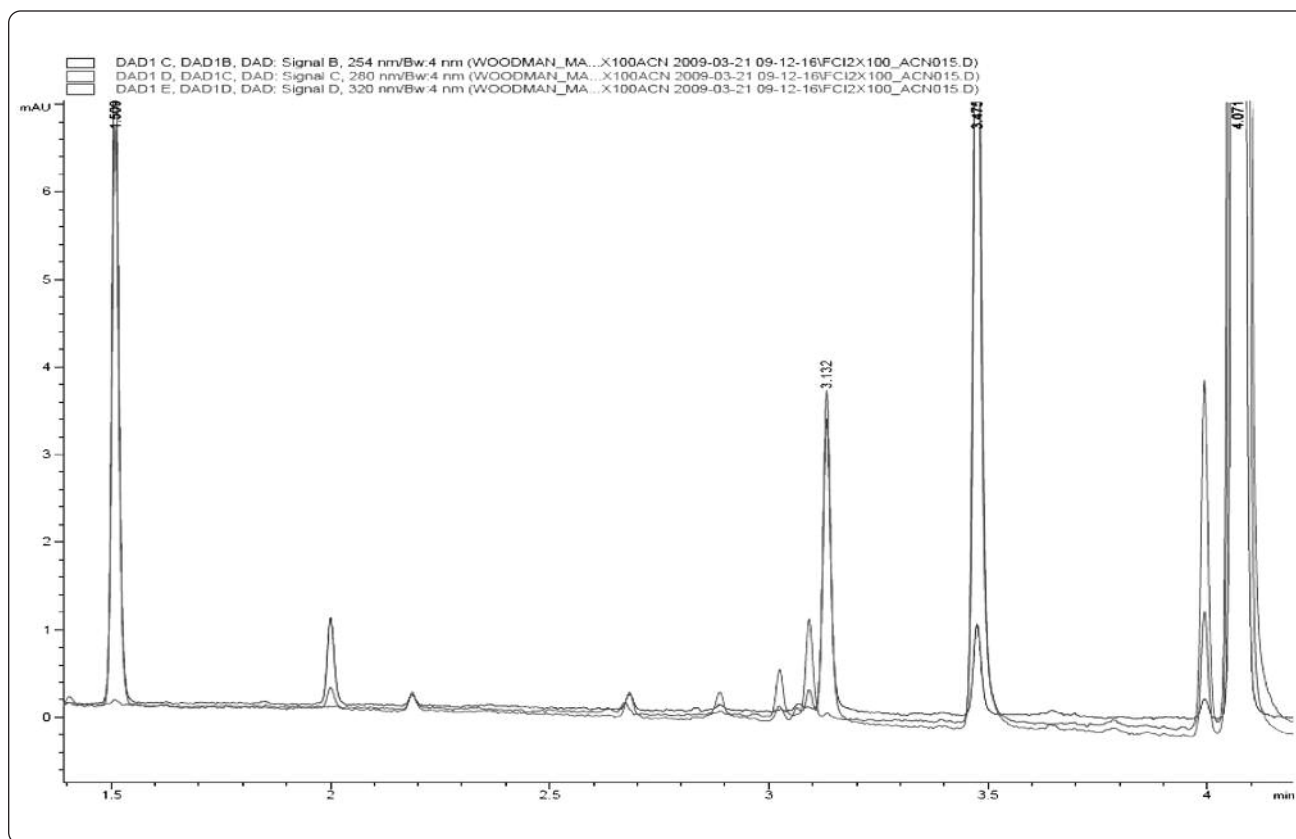


図 4. 2.1 mm × 100 mm Agilent ZORBAX RRHD SB-C18 (最高使用圧 1200bar) を使用した標準物質の分析。
 アセトニトリル/水グラジエント、流量 0.74 mL/min、グラジエント時間 4.0 分。

図 4 では、カラム長が長くなると、一部の成分で分離度が著しく向上することがわかります。分離度をさらに改善するには、より長いカラムを試すか、別の移動相またはカラム (固定相) を試すことが現実的です。

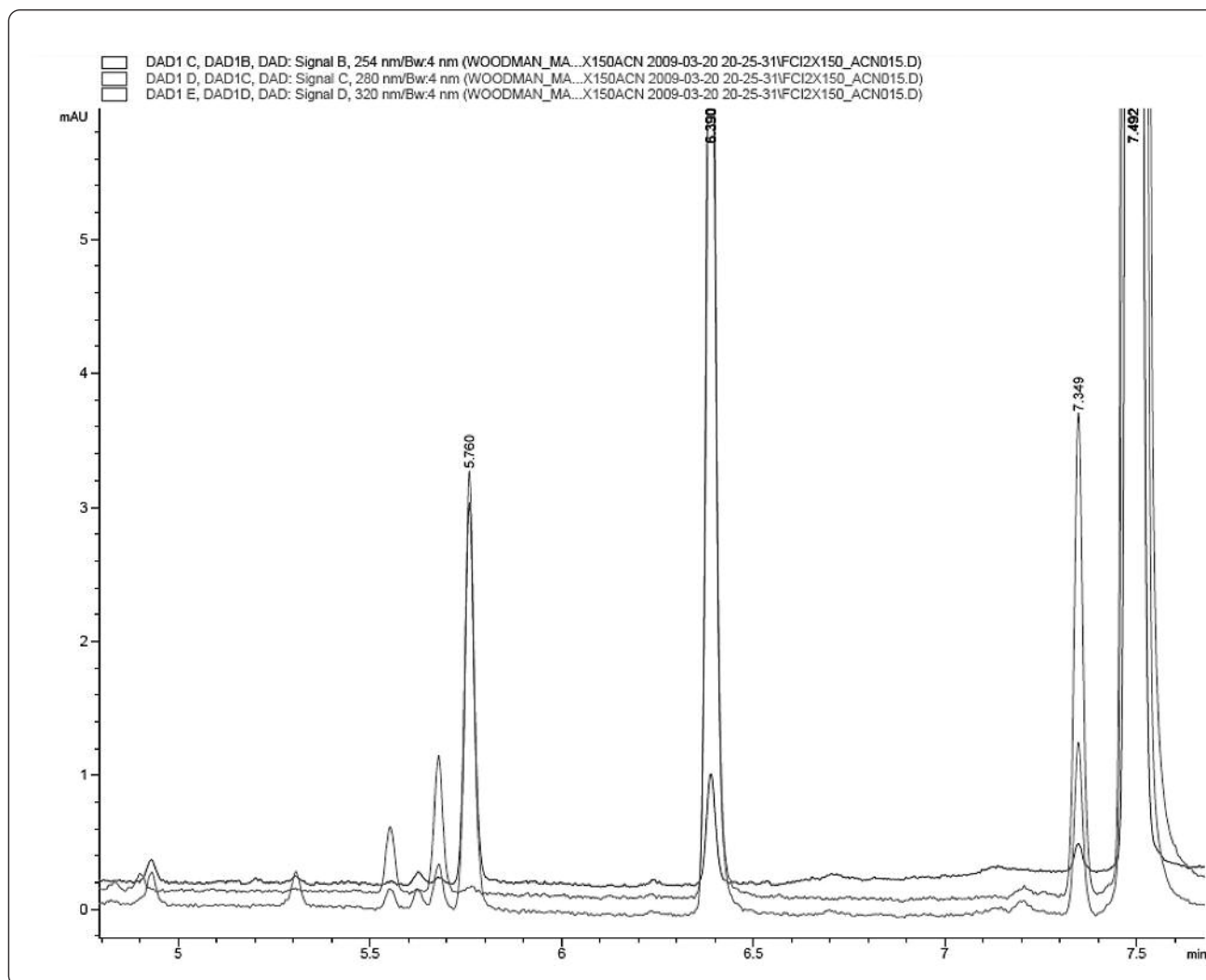


図 5. Agilent ZORBAX SB- C18 RRHD、2.1 mm × 150 mm、1.8 μm を用いて分析した時のクロマトグラム (ベースライン付近を拡大表示)。カラムボリュームあたりの ACN の増加率は図 4 と同じ。

カラムが長くなると分離度が明らかに向上しますが、背圧の増加によりシステムの最高使用圧を超えないように流量を制限する必要があります。Agilent 1290 Infinity LC システムとZORBAX RRHD カラムは、最高使用圧 1200 bar (約 18,000 psi) で使用することができます。

オクチルジメチルパラアミノ安息香酸、0.52 mL/min、50 % ~ 100 % メタノール/ 5.7 分。
Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD、2.1 mm × 100 mm、1.8 μm で最大 845 bar

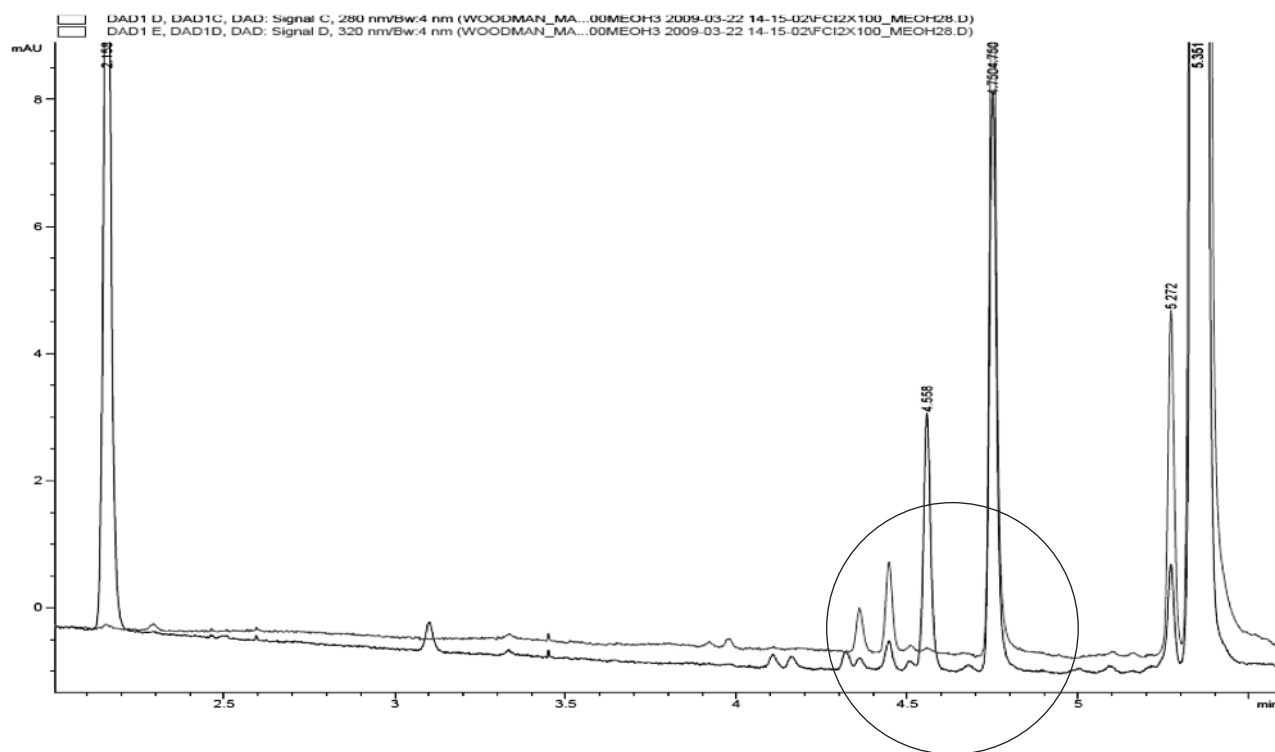


図 6. 有機溶媒としてメタノールを使用した場合の Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD、2.1 mm × 100 mm による分離。
5 % ~ 100 % メタノール/ 5.7 分。流量 0.52 mL/min、グラジエント時間 5.7 分。

分離の改善には、保持容量、選択性、および理論段数を調節することが必要です。カラムを長くすると、充填剤の粒径を小さくする場合と同様に効率は増加しますが、分離度向上に対する理論段数の寄与は比較的小さいため、選択性を改善し最適な保持容量が得られる条件を検討する必要があります。

図 6 では、有機溶媒を ACN から MeOH に変更して得られた分離の大きな変化を示しています。短波長での検出が必要な分析

の場合、MeOH の UV カットオフ波長 205 nm が問題になる可能性があります。しかし、この分析では主成分と関連する不純物の構造が類似しており、MeOH の UV カットオフ波長よりも長波長で高感度の検出が可能です。図 5 と同程度の分析時間で、非常に優れた選択性を実現し不純物の分離が向上しています。しかも、溶媒の総消費量を減らすことができ、高価な ACN を使用する必要がありません。

オクチルジメチルパラアミノ安息香酸、0.52 mL/min、50 % ～ 100 % メタノール/ 5.7 分。
Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD、2.1 mm × 100 mm、1.8 μm、40 °C で最大 845 bar。

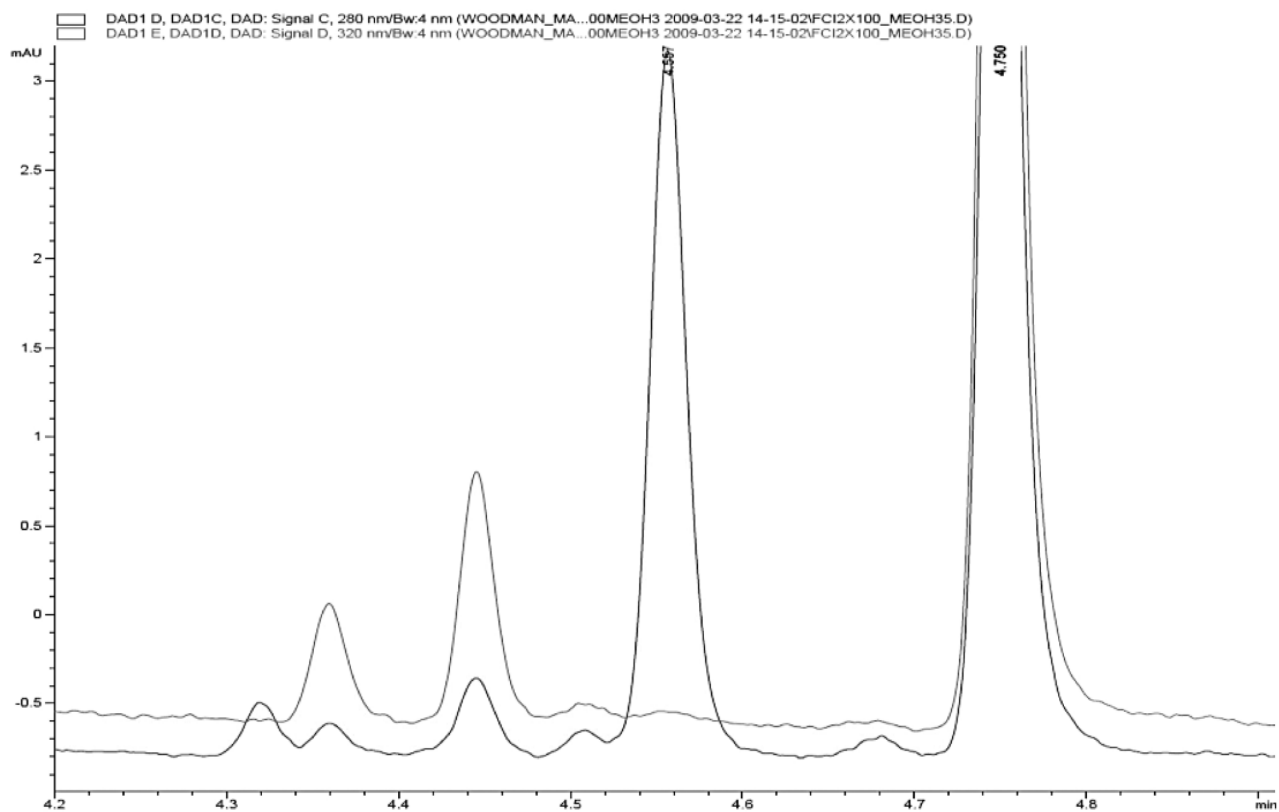


図 7. 図 6 のクロマトグラムの拡大表示。微量な不純物がかなり見られます。条件は図 6 と同一です。この図の最小ピークの推定濃度は、0.02 % 未満です。

結論

Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、UHPLC の性能を示しました。合成品や高度に精製した天然物に含まれる微量不純物の検出は、これらの物質の最終的な用途に対して極めて大きな意味を持ちます。高分離能カラムと最適な移動相を使用した HPLC による高速分析では、安定した分析結果を短時間で得ることができます。このシステムでは、流量を増やすと同時にグラジエント時間を短くすることで、同じグラジエント条件 (単位時間あたりの移動相の変化率) をより短い分析時間で再現できるため、スループットをさらに向上させることができます。

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

参考文献

1. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products/instruments/lc/pages/gp60931.aspx>

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., 2009
Published in Japan
August 3, 2009
5990-4293JAJP



Agilent Technologies