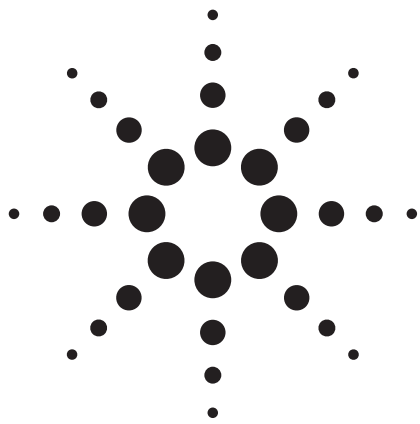




Poroshell 120 EC-C18 カラムと ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム間での メソッド変換

技術概要

はじめに

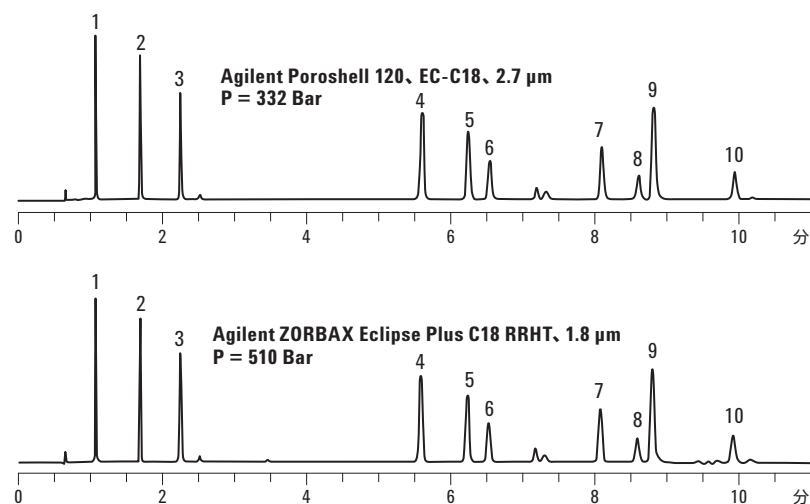
表面多孔性粒子の開発により、5 μm 全多孔性粒子や、サブ 2 μm 全多孔性粒子からのメソッド変換が可能になりました。5 μm 粒子のカラムからメソッドを変換する利点の 1 つは、時間を大幅に削減できることです。表面多孔性粒子は、より速い流速でも最適に動作するので、同じ分離能を維持しながら、カラムの長さを大幅に短くすることができます [1–4]。表面多孔性粒子は、物質移動距離が短く、粒子径分布範囲が大幅に狭いため、サブ 2 μm 全多孔性粒子とほぼ同じ効率が得られます。全面多孔性サブ 2 μm カラムからのメソッド変換が必要となるケースもあります。多くの開発ラボは、サブ 2 μm カラムの使用を選択しています。しかし、一部のケースでは、サブ 2 μm メソッドで求められる高い動作圧力を、すべての HPLC システムに適用できないこともあります。多くの場合、サブ 2 μm カラムを用いるメソッドは、大幅な調整なしで、表面多孔性粒子カラムに変換できます。特に、Agilent Poroshell 120 EC-C18 や Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 などのカラムは、類似した結合ケミストリなので、メソッド変換が容易です。また、表面多孔性粒子カラムでは、背圧を低くして、サブ 2 μm カラムと同じ分析をおこなうことができます。これにより、システムの圧力上限を超えずに、流速をあげてスループットを高めたり、カラムを長くして分離能を高めたりすることが可能になります。



Agilent Technologies

Agilent Poroshell 120 EC-C18 と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 を比較した最近の研究では、きわめて類似したクロマトグラフィー性能が得られることが示されています。Poroshell 120 は、Eclipse Plus C18 などのサブ 2 μm カラムの 90 % の効率を、およそ 60 % の圧力で得られるように設計されています。Poroshell 120 の表面多孔性粒子は、低圧損という利点をもちながら、サブ 2 μm 粒子と同等の性能も備えています。

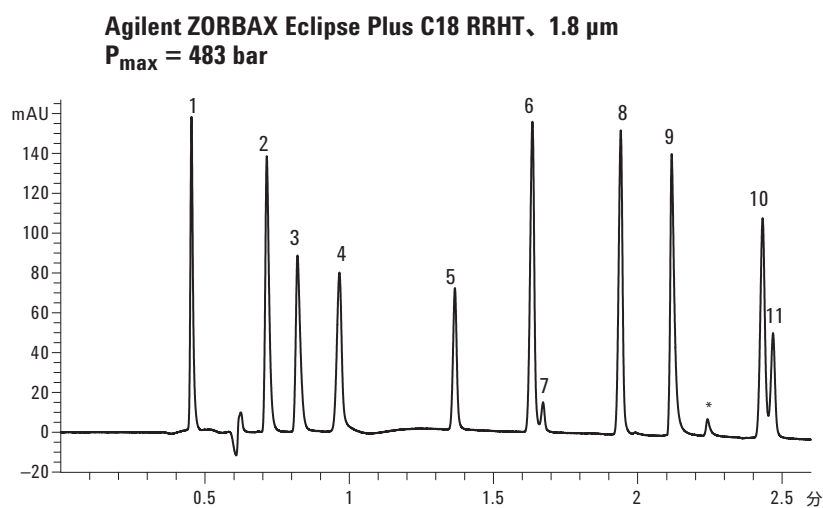
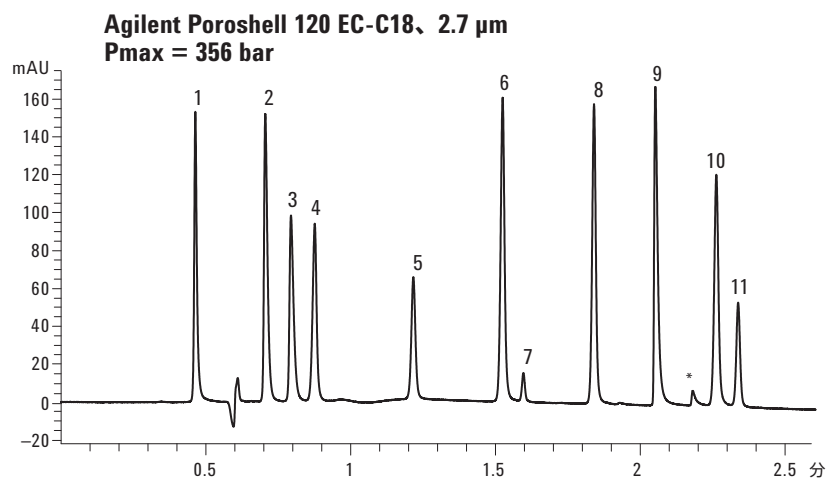
クロマトグラフィーの類似性を示す例を紹介します。図 1 では、0.1 % ギ酸を用いてフェノール類を分析しています。図 2 では、pH 4.8 の 10 mM 酢酸アンモニウムを用いて、ソフトドリンクの添加物を分析しています。いずれのケースでも、化合物の溶出順序は同じです。この 2 つの分析で類似性が得られたことから、より幅広い動作条件にわたる場合や、酸性、塩基性、中性物質を含むサンプルを分析する場合に、Poroshell 120 EC-C18 と Eclipse Plus C18 がどの程度の類似性を示すのかという点について、さらなる関心が生じています。



条件

カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm x 100 mm, 2.7 μm 部品番号 689975-902
	Agilent ZORBAX Eclipse Plus RRHT C18, 4.6 mm x 100 mm, 1.8 μm 部品番号 959964-902
移動相	A : 0.1 % ギ酸 B : MeCN + 0.1 % ギ酸
温度	40 °C
検出	275 nm
注入量	10 μL
流速	2 mL/min
グラジエント	0 - 10 (分) / 8 - 30 (B%)
1. ヒドロキノン	6. o-クレゾール
2. レソルシノール	7. 2-ニトロフェノール
3. カテコール	8. 2,3 ジメチルフェノール
4. 4-ニトロフェノール	9. 2,5 ジメチルフェノール
5. p-クレゾール	10. 1-ナフトール

図 1. フェノール類分析において、アセトニトリルおよびギ酸移動相を用いた Agilent Poroshell 120 EC-C18 と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 の比較



条件

カラム

Agilent Poroshell 120 EC-C18、3.0 mm x 100 mm、2.7 μ m

部品番号 695975-302

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHT、3.0 mm x 100 mm、1.8 μ m

部品番号 959964-302

移動相

A : 20 mM 酢酸アンモニウム、pH 4.80

B : アセトニトリル

グラジエント

0 - 2.1 (分) / 14 - 52 (B%)

流速

0.851 mL/min

温度

30 °C

1. アスコルビン酸

7. アスパルテーム

2. アセスルファム K

8. ソルビン酸

3. サッカリン

9. キニーネ

4. p-ヒドロキシ安息香酸

10. ジヒドロ酢酸

5. カフェイン

11. メチルパラベン

6. 安息香酸

* キニーネの不純物

図 2. ソフトドリンク添加物の分析において、アセトニトリルおよび酢酸アンモニウム移動相を用いた
 Agilent Poroshell 120 EC-C18 と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 の比較

実験手法

メソッド開発では、汎用グラジエントがベースとして頻繁に用いられます。短い Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 x 50 mm カラムを使えば、複数の移動相を迅速に評価することができます。この研究で用いた汎用グラジエントでは、流速を 2.0 mL/min とし、2 分間で有機溶媒 5 % から 95 % まで変化させ、この濃度を 1 分間維持しました。移動相には、質量分析装置にも適用できるギ酸アンモニウムバッファや酢酸アンモニウムバッファなどの、揮発性の緩衝液を用いました。

この研究では、Agilent 1200 Method Development Solution LC システムを使用しました。

- G1312B バイナリポンプ SL
- G1367D オートサンブラ (ALS) SL
- G1316C カラムコンパートメント (TCC) SL 2 つ
- G1315C ダイオードアレイ検出器 (DAD) SL、G1315-60024 マイクロフローセル (光路長 3-mm、容量 2- μ L) を使用
- HPLC のコントロールおよびデータ処理には ChemStation バージョン B.04.01 を使用

補正データの算出とプロットには、Microsoft Excel 7.0 を使用しました。

この研究では、以下のカラムを使用しました。

- Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 mm x 50 mm、2.7 μ m 部品番号 699975-902
- Agilent Poroshell 120 EC-C18、3 mm x 100 mm、2.7 μ m 部品番号 695975-302
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 mm x 50 mm、1.8 μ m 部品番号 959943-902
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、3 mm x 100 mm、1.8 μ m 部品番号 959964-302

表 1 に、この研究で用いた化合物をまとめています。これらの試料は、水または 50/50 水/アセトニトリルで調製し、個別に注入しました

表 1. 酸、塩基、中性物質を含む 66 種類の化合物。50/50 MeCN/水で調製し、個別に注入

分析対象化合物のリスト

フラゾリドン	フェナセチン
クロラムフェニコール	アセトアニリド
イミプラミン	フェノール
ノルエチンドロン	レゾルシノール
コルチゾン酢酸エステル	ヒドロキノン
クロラムフェニコール	4 ニトロフェノール
ブスピロン塩酸塩	o クレゾール
ベンゾカイン	1 ナフトール
ピリメタミン	インプラミン塩酸塩
スルファキノキサリン	3 4 ジヒドロキシ l フェニルアラニン
スルファモノメトキシシ	dl フェニルアラニン
ニモジピン	エフェドリン塩酸塩
スルファジメトキシシ	ロベラミド
スルファメトキサゾール	ジベンゾフラン
スルファクロロピリダジン	プロカイン塩酸塩
スルファメトキシピリダジン	エコナゾール硝酸塩
スルファメチゾール	ゲムフィプロシル
スルファメラジン	ベータエストラジオール
スルファチアゾール	メトプロロール
スルファジアジン	プロトリプチリン
ベンズアルデヒド	ヒドロキシフタル酸
フェナントレン	フルフェナム酸
ビフェニル	ブラモキシシ塩酸塩
アセナフテン	ナブロキセン
メトキシナフタレン	ジフェンヒドラミン
ジメトキシベンゼン	ジフルニサル
アルファヒドロキシプロゲステロン	ニソルジピン
プロゲステロン	ジクロフェナク
プレドニゾン	ヒドロコルチゾン
デオキシコルチコステロン	プロカインアミド塩酸塩
クロルフェナミン	リドカイン
ベルベリン	テルフェナジン
クロルテトラサイクリン塩酸塩	クロルフェニラミンマレイン酸塩

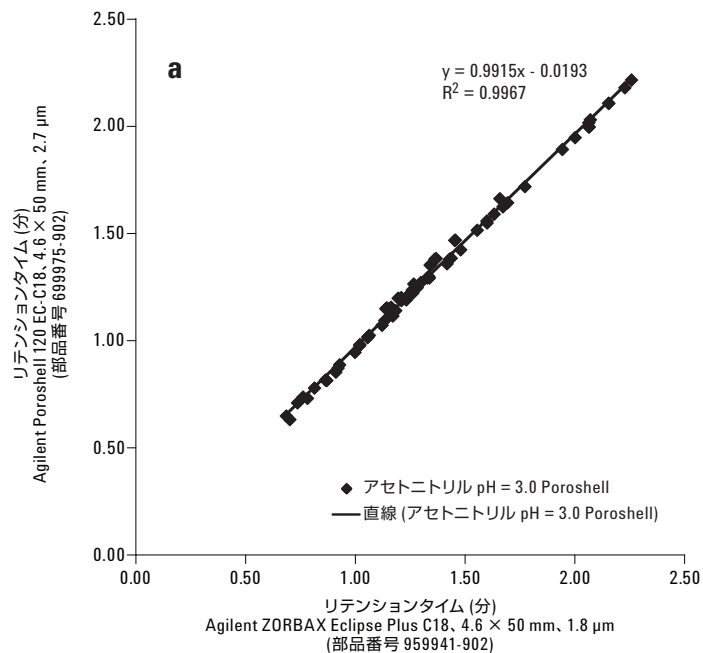
考察

カラム性能の違いは、Wilson、Nelson、Gilroy、Dolan、Snyder、Carr [5,6] など、多くの人が研究しています。米国薬局方は、多くのカラム [7] や、カラムの互換性を測定するためのツールを紹介しています。シリカケミストリや結合などの特性は、選択性を変化させることがあります。シラノール活性は、二次的な相互作用により、ピーク形状に大きな影響を与えます。また、H-結合やイオン交換により、選択性にも影響を及ぼします。これらの影響は、低 pH よりも高 pH でより顕著になります [8]。Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムに用いられているシリカはいずれも、アジレントで製造しています。どちらのカラムも、塩基性化合物で優れたピーク形状が得られるように設計されています。pH の影響のほか、溶媒の違いもシラノール活性に影響を与えます。メタノールはプロトン性溶媒で、非プロトン性のアセトニトリルよりも溶出力は低くなります [10]。幅広い条件を選ぶことで、選択性の違いを明らかにすることが可能です。

図 3 は、化学特性の異なる各種の化合物を用いた汎用グラジエント分析において、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムと Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムが 66 種類の化合物を同様に保持することを示しています。高い相関係数 (R^2) は、この 2 つの Agilent C18 カラムでの分離に伴う相互作用の類似性が高いことを示しています。また、傾きがおよそ 1 であることから、相互作用の強度が同様であると考えられます [9,10]。

**pH 3～6.5 の 10 mM ギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウムバッファを含む
アセトニトリルを用いた汎用グラジエント**

アセトニトリル pH 3.0、Agilent Poroshell 120 EC-C18 と
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18



アセトニトリル pH 3.8、Agilent Poroshell 120 EC-C18 と
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18

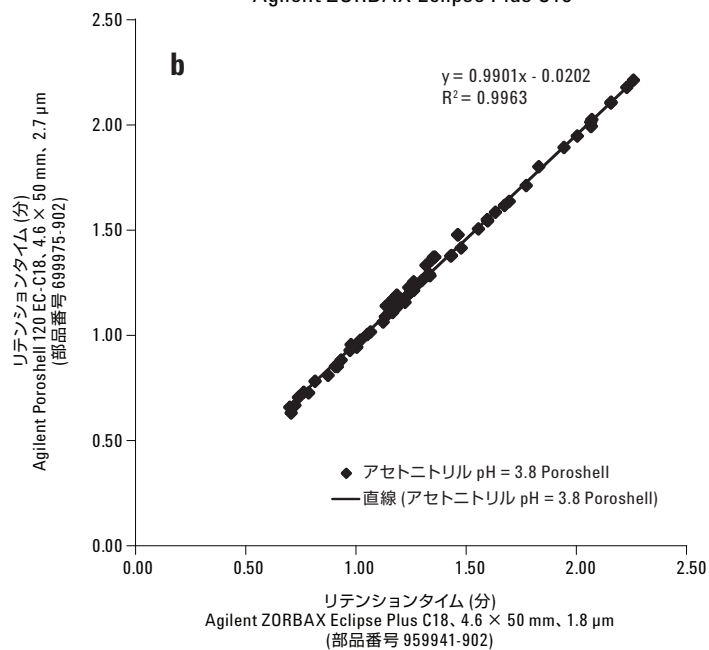
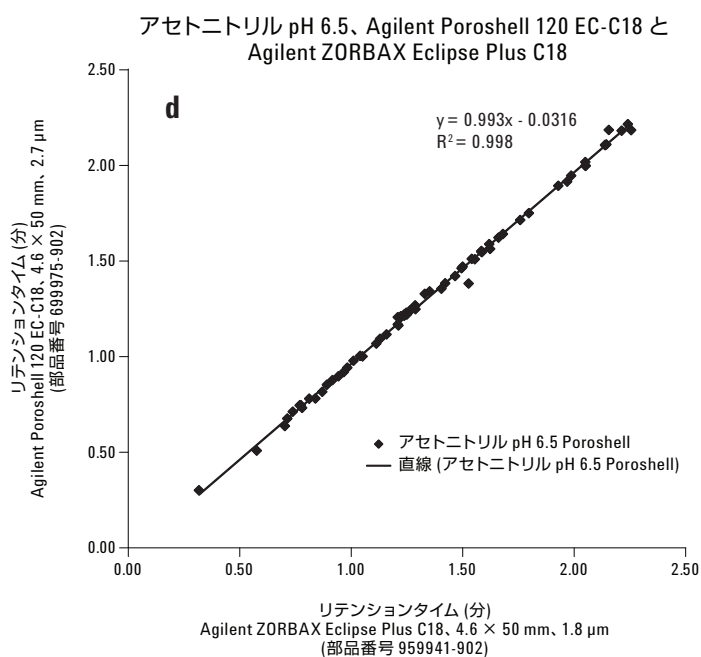
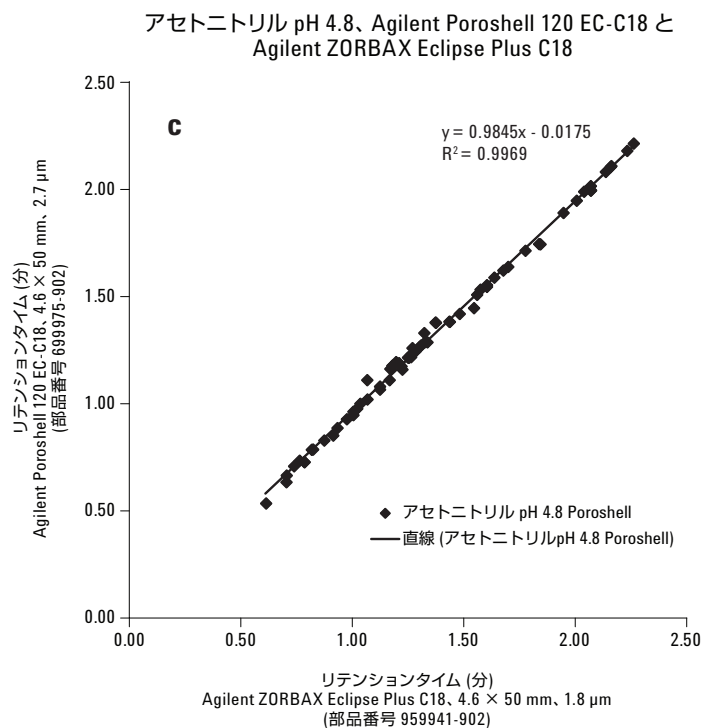


図 3. Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 x 50 mm、2.7 μ m と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 x 50 mm、1.8 μ m における 66 種類の化合物のリテンションタイムの散布図 (続く)



条件

移動相

A : 10 mM バッファ

B : アセトニトリル

グラジエント

0 - 2 - 3 (分) / 5 - 95 - 95 (B%)

流速

2 mL/min

サンプル

H₂O または H₂O/ACN 中の 1 mg/mL 標準 1 μL

図 3. Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 x 50 mm、2.7 μm と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 x 50 mm、1.8 μm における 66 種類の化合物のリテンションタイムの散布図

図 4 は、pH 3～6.5 までのアセトニトリルにおける 66 種類の化合物について、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムと Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムのリテンションタイムをプロットした散布図を示しています。図 2 は、pH 3～6.5 までのメタノールにおける散布図を示しています。これらの組み合わせの傾きと R^2 値を表 2 にまとめています。図からもわかるように、2 つの散布図の相関性はきわめて良好です。イオン性化合物では、リテンションタイムが変化することがありますが、この変化は両方のカラムで比例しています。アセトニトリルとメタノールのデータを比較した場合に、相関曲線の傾きのわずかな差が見られることは (傾き 0.99 と 1.01)、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 と Agilent Poroshell 120 EC-C18 において水素結合作用に若干の差があることを示していると考えられますが、この差はメソッド変換において問題になる可能性は低く、多数の実験や化合物の分析をおこなった場合にのみ測定できるものです。

**pH 3～6.5 の 10 mM ギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウムバッファを含む
メタノールを用いた汎用グラジエント**

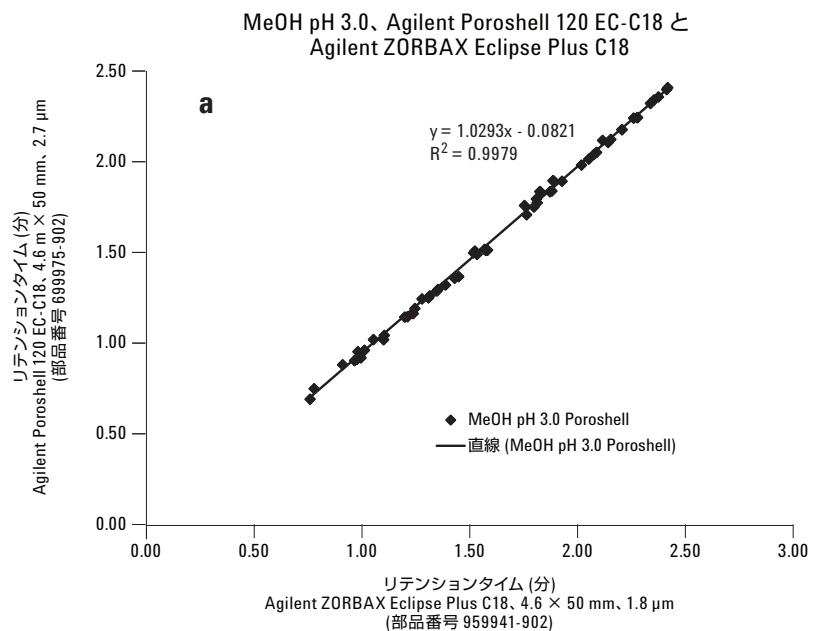


図 4. Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 x 50 mm、2.7 μm と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 x 50 mm、1.8 μm における 66 種類の化合物のリテンションタイムの散布図 (続く)

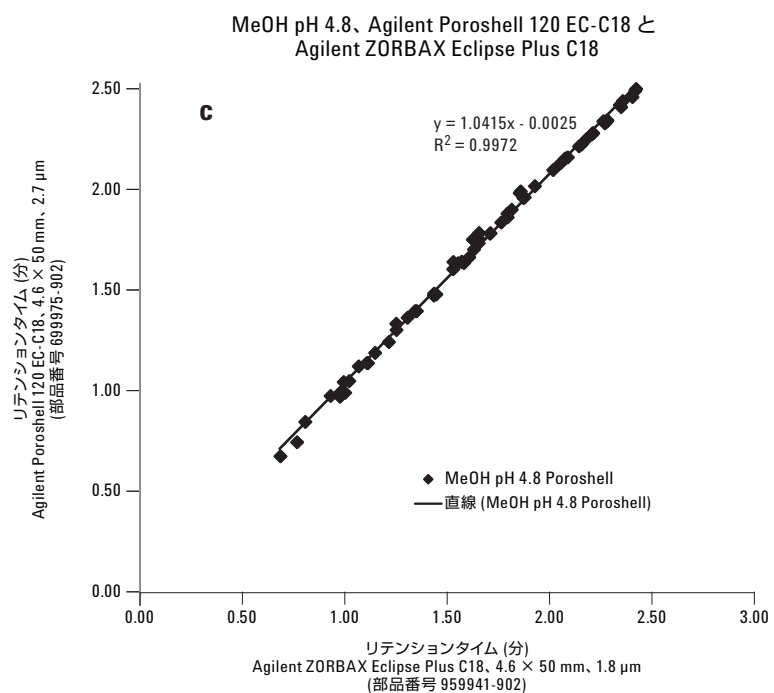
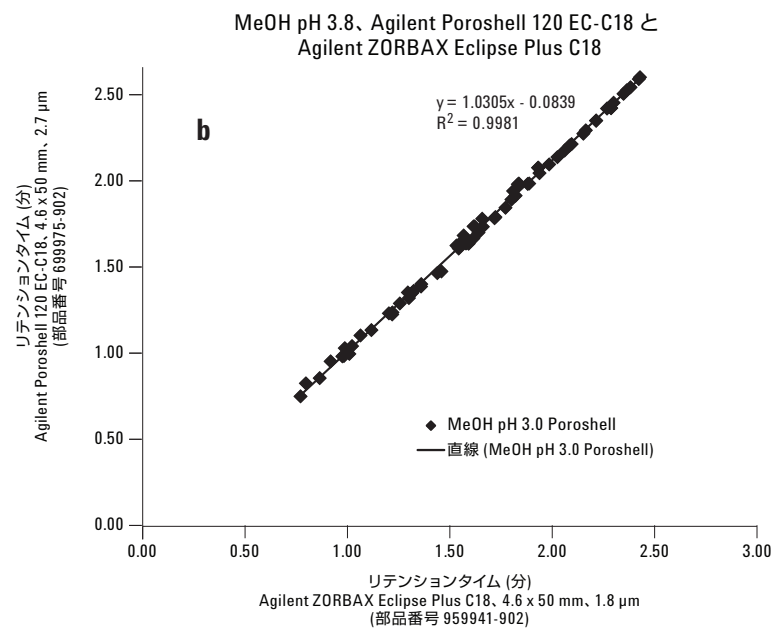
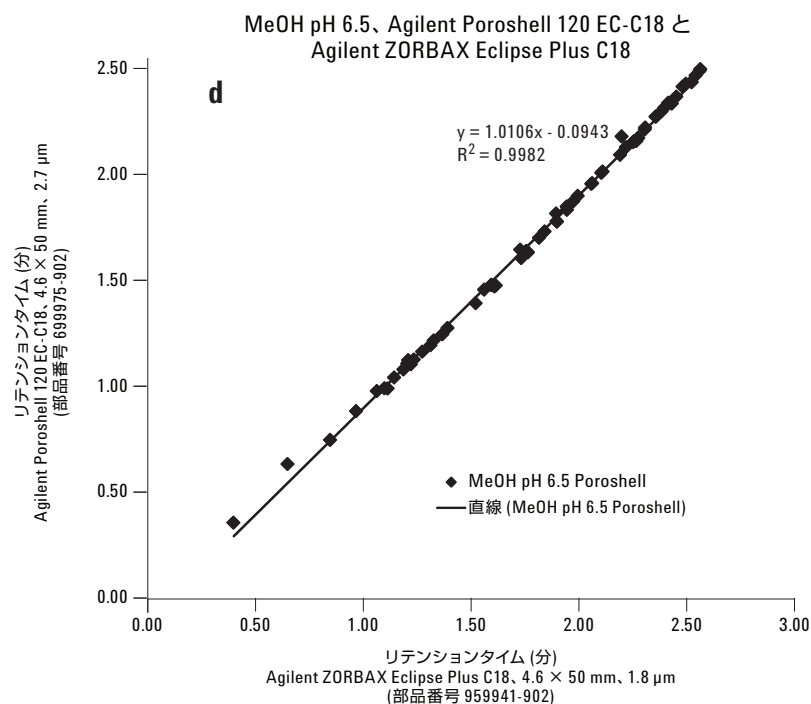


図 4. Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 50 mm, 2.7 μm と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μm における 66 種類の化合物のリテンションタイムの散布図 (続く)



条件

移動相: A: 10 mM バッファ
B: メタノール
グラジエント: 0 - 2 - 3 (分) / 5 - 95 - 95 (B%)
流速: 2 mL/min
サンプル: H₂O または H₂O/ACN 中の 1 mg/mL 標準 1 μL

図 4. Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 50 mm、2.7 μm と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 50 mm、1.8 μm における 66 種類の化合物のリテンションタイムの散布図

表 2. 相関性データの概要

アセトニトリル	メタノール
a. pH = 3.0 $y = 0.9915x - 0.0193$ $R^2 = 0.9967$	a. pH = 3.0 $y = 1.0293x - 0.0821$ $R^2 = 0.9979$
b. pH = 3.8 $y = 0.9901x - 0.0202$ $R^2 = 0.9963$	b. pH = 3.8 $y = 1.0305x - 0.0839$ $R^2 = 0.9981$
c. pH = 4.8 $y = 0.9845x - 0.0175$ $R^2 = 0.9969$	c. pH = 4.8 $y = 1.0415x - 0.002$ $R^2 = 0.9972$
d. pH = 6.5 $y = 0.993x - 0.0316$ $R^2 = 0.998$	d. pH = 6.5 $y = 1.0106x - 0.0943$ $R^2 = 0.9982$

サブ 2 μm と比べた場合の Agilent Poroshell 120 カラムのもう 1 つの利点は、カラム圧が低いことです。圧力は、カラムの粒子径に相関します。通常、粒子径が大きいほうが、小さい粒子よりも圧力が低くなります。粒子径のほか、カラム内で発生する圧力は、任意の組成や温度における溶媒の線速度、溶媒の粘度といったいくつかの要因にも左右されます。このグラジエント分析では、メタノール/水が 40/60~50/50 の溶媒組成のときに、もっとも粘度が高くなります。25 $^{\circ}\text{C}$ におけるこの溶媒の粘度は 1.62 cP です。もっとも粘度の高いアセトニトリル組成は、10/90 アセトニトリル/水です。25 $^{\circ}\text{C}$ におけるこの溶媒の粘度は 1.01 cP です [11]。参考文献でも示されているように、溶液の粘度は温度に反比例します。この両方の溶媒組成における Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムと Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8 μm カラムの線速度に対して圧力をプロットした図を、図 5 と 6 に示しています。このケースでは、100 mm カラムを使用しています。すでに述べたように、長いカラムを使えば、同じ圧力 (および大きな注入量) または高い流速を得ることができます。

ポアサイズの差が重要になる場合 (一般には 1500~2500 mw の化合物を分析する場合) には、選択性の差が生じる可能性が高くなります。形状による選択性が重要となる PAH などの化合物の分析でも、問題が生じることがあります。

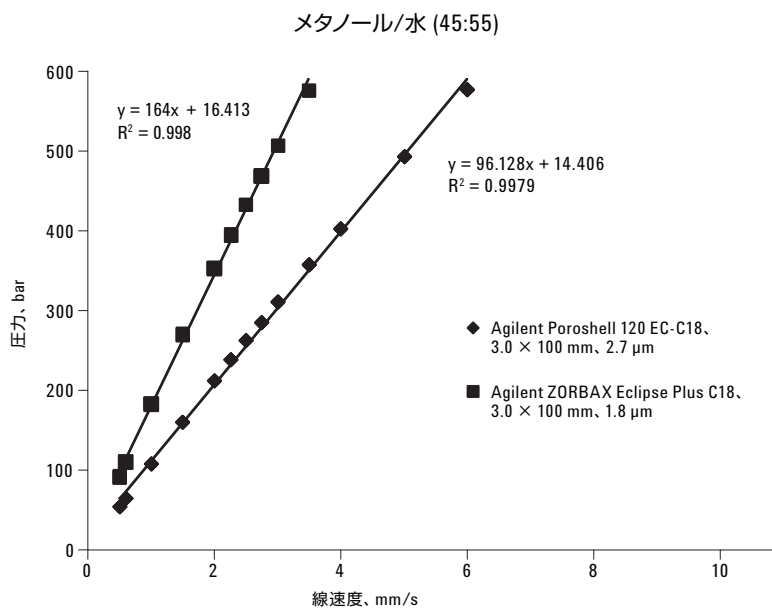


図 5. 各種の線速度で測定した圧力は、Agilent Poroshell 120 のカラム圧が同じ長さの 1.8 μm カラムよりも低いことを示しています

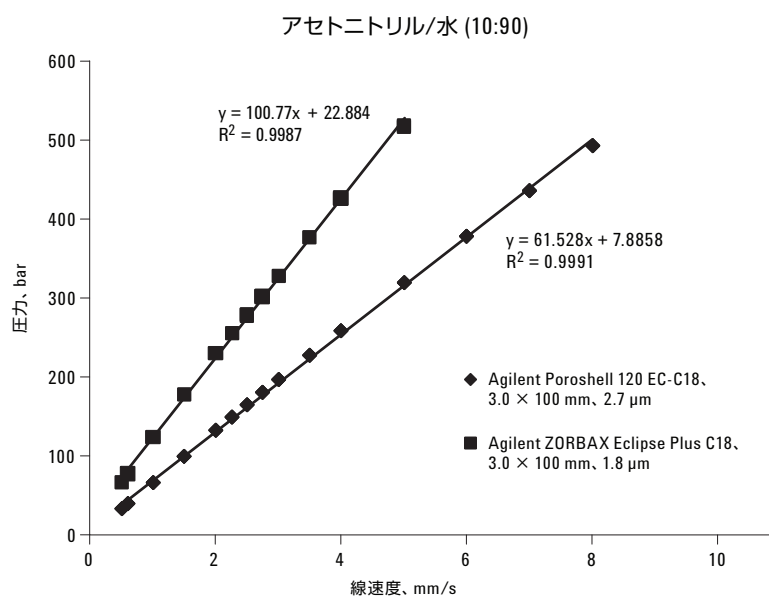


図 6. 各種の線速度で測定した圧力は、Agilent Poroshell 120 のカラム圧が同じ長さの 1.8 μm カラムよりも低いことを示しています

結論

この研究では、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムと Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムが、幅広い pH と移動相組成で同様の選択性を示すことを実証しました。この 2 つのカラムのケミストリは、同様の独自結合ケミストリをもつ同じ材料を用いて製造されています。いずれのカラムも、低 pH のピーク形状や他の化合物の分離性能を損なうことなく、塩基性化合物で優れたピーク形状が得られるように設計されています。Agilent Poroshell 120 EC-C18 を用いる利点は、低い背圧で高い効率が得られることです。この研究の結果は、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムで開発したメソッドを、低リスクで確実に Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムに変換できることを示しています。

参考文献

1. W. Long, A. Mack, "Fast Analysis of Environmental Phenols with Agilent Poroshell 120 EC-C18 Columns" August 3, 2010 5990-6156EN.
2. W. Long, A. Mack, "Transfer and Optimization of Existing Methods for Analysis of Antibiotics in Meat to Poroshell 120 EC-C18 Columns using MS/MS Detection" August 5, 2010 5990-6238EN.
3. A. Gratzfeld-Hüsken, E. Naegel, "Maximizing Efficiency using Agilent Poroshell 120 Columns" , Agilent Technologies Publication 5990-5602EN, 2010.
4. A. Mack, W. Long, Fast, "Low Pressure Analysis of Food and Beverage Additives using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 Columns" , Agilent Technologies Publication 5990-6082 EN, 2009.
5. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, "Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography IV. Type-B alkyl-silica columns" , Journal of Chromatography A, 1000 (2003) 757–778.
6. N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, "Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in condition" , Journal of Chromatography A, 961 (2002) 195–215.
7. United States Pharmacopeia "The PQRI approach for selecting columns of equivalent selectivity" [http://www.usp.org/US_部品番号 F/columnsPQRIapproach.html](http://www.usp.org/US_部品番号_F/columnsPQRIapproach.html).
8. V. Meyer, Practical High Performance Liquid Chromatography, Fourth Ed., p 34, Wiley, 2004.
9. K. Croes, A. Steffens, D. Marchand, L. Snyder, "Relevance of $\pi-\pi$ and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography" , Journal of Chromatography A, Volume 1098, Issues 1-2, 9 December 2005, Pages 123-130.
10. W. Long, A. Mack, "Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns using Acetonitrile or Methanol" , Agilent Technologies Publication 5990-4711EN, 2009.
11. Agilent Method Translator, June 1, 2006, 5989-5130EN.

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., 2011

Printed in Japan

February 9, 2011

5990-6588J.AJP



Agilent Technologies