Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

フッ素化フェニル固定相の選択性における利点についての検討

Mia Summers and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- 異なる選択性のカラムを用いた迅速分析法開発
- 自動カラムスクリーニングを用いた容易な分析法開発
- 特定のアプリケーションに適したカラムの選択法についての理解

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム（カラムマネージャ付）

ACQUITY UPLC CSH & HSS カラム

Waters® カラム選択性チャート

Empower® 3 ソフトウェア

TruView™ マキシマムリカバリーバイアル

キーワード

分析法開発、HPLC、UPLC、固定相、選択性、スクリーニング、分解、Fluoro-Phenyl、PFP、芳香族化合物、ハロゲン化化合物、CSH

はじめに

分析法開発において、試験する分析種に最も適したカラムの選択は常に検討されなければいけません。汎用性と多くのラボで一般的に入手できることから大抵は C_{18} カラムが選択されますが、多くの分離は C_{18} カラムで十分な結果が得られます。しかしながら、サンプルによっては、望ましい分離を得るために C_{18} カラムと異なる保持メカニズムや選択性をもつカラムを使用することが非常に有用なケースもあります。フッ素化フェニル固定相のようなカラムを使用する利点を理解することで、分析法開発の初期段階でサンプルに最も適したカラムを容易に選択でき、時間のかかる後期での分離最適化の必要性を低減できます。

本アプリケーションノートでは、ACQUITY UPLC HSS PFPとACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenylのフッ素化フェニル固定相を C_{18} およびフェニル固定相と比較しました。異なる化学的特性をもつ分析種に対するこれらカラムの選択性の違いを示すため、幅広いサンプルを用いて比較を行いました。サンプルの特性とカラムケミストリーを関連付けることで、より理想的なカラム選択とより良い分離を早い段階で達成することができ、迅速でより効率的な分析法開発プロセスが実現します。

実験方法

LC条件

システム： ACQUITY UPLC H-Class

移動相： A : 0.1%ギ酸水溶液
B : 0.1%アセトニトリル溶液

グラジエント： 8分間で 2-98%、
1分間ホールド、
2%Bで再平衡化

検出： UV@254nm（Paroxetineのみ295nm）

ニードル洗浄： 90:10　アセトニトリル/水

パージ溶媒： 90:10　水/アセトニトリル

シール洗浄： 50:50　メタノール/水

流速： 0.4mL/min

カラム温度： 30℃

注入量： 2µL

バイアル： TruView マキシマム
リカバリーバイアル
製品番号　186005662CV

カラム： ACQUITY UPLC
2.1×100mm,
1.7 – 1.8 µm

固定相： ACQUTY UPLC CSH C_{18}
製品番号　186005297
ACQUTY UPLC CSH
Phenyl-Hexyl
製品番号　186004507
ACQUTY UPLC CSH
Fluoro-Phenyl
製品番号　186005352
ACQUTY UPLC HSS PFP
製品番号　186005967

データ管理 Empower 3 CDS

サンプル調製

Paroxetine および類縁物質B、D、FのUSPスタンダードは50:50メタノール/水でそれぞれ濃度0.2mg/mL(Paroxetine) と0.02mg/mL(Paroxetine類縁物質) に調製し、TruViewマキシマムリカバリーバイアルに移して分析に用いました。

Amcinonideアルカリ分解：サンプル希釈液（80%メタノール水溶液）で1mg/mLに調製したAmcinonideスタンダードは、1N NaOHを1:1の比率で加えて60℃で30分間攪拌して反応を行いました。反応はHClで中和し、最終濃度0.25mg/mLにサンプル希釈液で希釈し、TruViewマキシマムリカバリーバイアルに移して分析に用いました。

FlavoneおよびFlavanone：FlavoneおよびFlavanoneスタンダードはメタノールで1mg/mLに調製し、1N NaOHを1:1の比率で添加して室温で1時間攪拌して反応を行いました。反応後1N HClで中和し、メタノールで最終濃度0.125mg/mLに希釈してTruViewマキシマムリカバリーバイアルに移して分析に用いました。

Famotidine酸分解：Famotidineの10mg錠剤サンプルは50:50 メタノール/水に溶解して濃度1mg/mLに調製しました。1N HCl（1:1）を添加して60℃で2時間攪拌して反応を行い、1N NaOHで中和し、最終濃度0.25mg/mLに希釈してTruViewマキシマムリカバリーバイアルに移して分析に用いました。

結果および考察

多くのラボでは、クロマトグラフィー分析法開発の出発点としてC_{18}カラムが一般的に使用されています。C_{18}カラムは非常に汎用性がありますが、サンプルマトリックスと対象分析種によって、常に最良の分離を提供できるとは限りません。化合物が近接して溶出する難しい分離には、選択性が大きく異なり（Waters カラム選択性チャート www.waters.com/selectivitychartで確認できます）別の保持メカニズムをもつカラムを使用することで望ましい分離を迅速に得ることができます。本アプリケーションではカラムマネージャを備えたACQUITY UPLC H-Classを用いて、カラムスクリーニングは自動で容易に行いました。試験したカラムは、ACQUITY UPLCカラムeCord™とEmpower 3ソフトウェアによりデータ解析時に容易に追跡することが可能です。選択性の変化はスタンダードおよびUVスペクトルプロファイルを用いたピークトラッキングによりモニターしました。

Paroxetineは芳香族基を数個とハロゲン官能基を1つもつ塩基性の医薬品です。Paroxetineの類縁物質（B、D、F）からの分離はまずCSH C_{18}カラムを用いてスクリーニングを行いましたが、図1Aに示すように類縁物質が分離しませんでした。次に、固定相のフェニル基と分析種の芳香族基とのπ-π相互作用による保持を利用するためにCSH Phenyl-Hexylで分析を行いました。しかしながら、図1Bに示すようにこれも最適な分離の達成には不十分でした。フッ素化フェニル固定相はπ-π相互作用による利点だけでなく、フッ素化フェニル環の周りで電子密度が変わることで分析種と固定相間の電荷移動と静電相互作用が変わります。また、

フッ素化フェニル環はフェニル単独よりも大きいため、立体障害により保持のプロファイルが変わる可能性も考えられます。図1Cに示すようにCSH Fluoro-Phenylカラムによる迅速スクリーニングでParoxetineはAPI（Active Pharmaceutical Ingredient）と3種類の類縁物質が分離し、分析法開発において最適化を大きく簡素化できます。

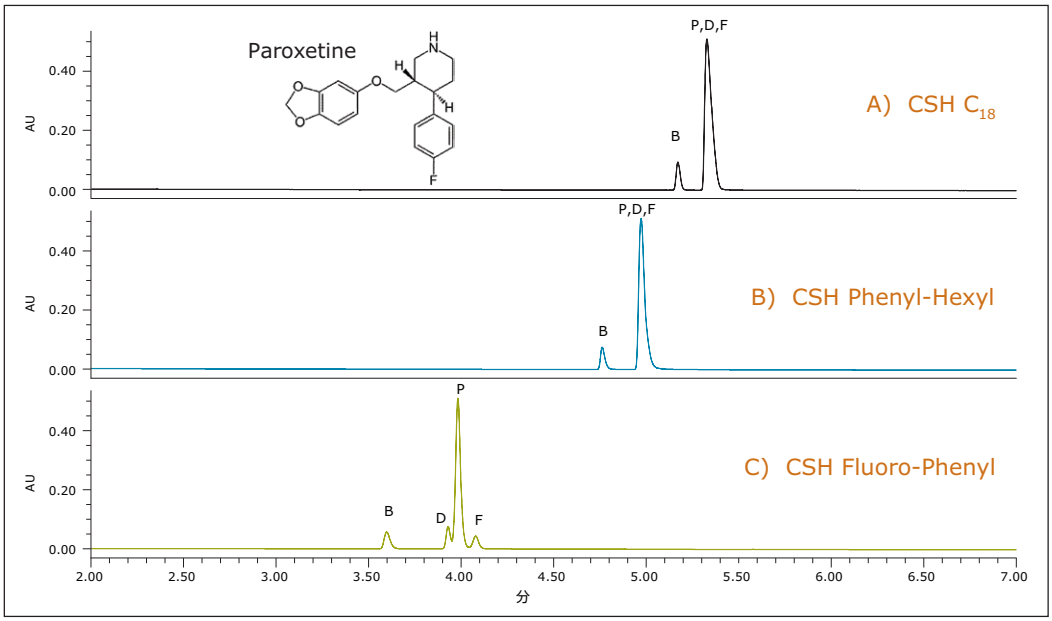

図1　Paroxetine (P)と類縁物質（B、D、F）のスクリーニングにおいて、CSH Fluoro-Phenylカラム（1C）ではC_{18}（1A）およびPhenyl-Hexyl（1B）と比べて分離が向上

フェニルベース官能基

芳香族基を含む化合物では、CSH Phenyl-HexylとFluoro-Phenylカラムのようなフェニルベースの官能基間における保持メカニズムの違いが分離選択性の違いに大きく影響します。図2には2種類の芳香族固定相におけるFlavanoneおよびFlavone分解物の分離を比較しました。Fluoro-Phenyl固定相を用いた際の静電相互作用や立体相互作用などの異なる保持メカニズムにより溶出順序が変わります。この例では、Phenyl-Hexyl相で全体的により良好な分離が得られ、分析法開発の初期に選択性を最大化して望ましい分離を迅速に得るために両方のフェニルベース官能基カラムをスクリーニングに用いる有用性を示しています。

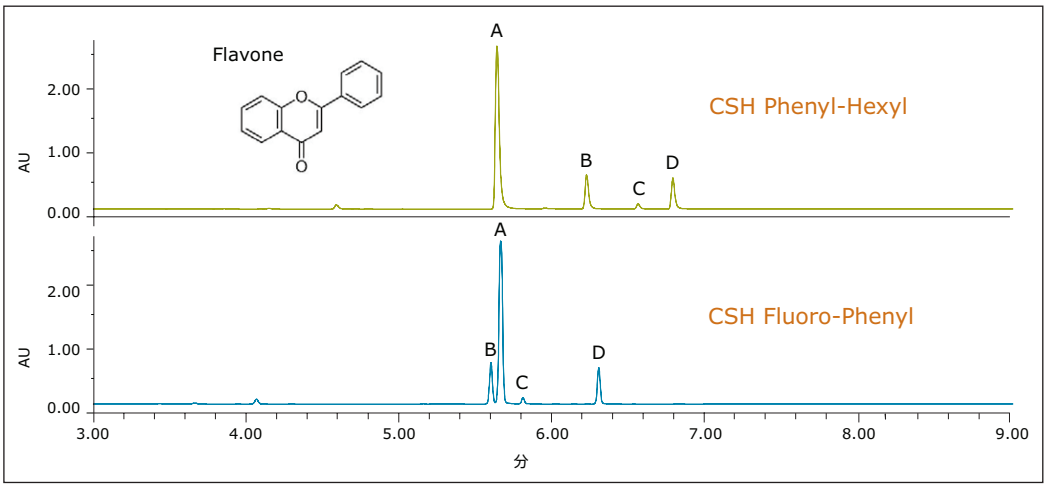

図2　芳香族化合物[Flavone (A)、Flavanone (B)、Flavanone塩基分解産物(C、D)]のフェニルベースCSH固定相における分離選択性の違い

パーティクル基材：分離への影響

官能基による保持に加え、パーティクル基材のケミストリーも保持に影響し、異なる分離選択性を提供します。図3に示すように、Amcinonideアルカリ分解産物の分離に同じフッ素化フェニル官能基の2種類のカラムを用いました。この例では、表面チャージハイブリッド（charged surface hybrid：CSH）パーティクルはピークAとBが近接して溶出しています。シリカベースのHSSパーティクルではピークAとBの分離が著しく向上し、全体としてずっと良好な分離が得られています。フッ素化フェニル官能基はどちらも同じなので、分離の違いは主にパーティクル基材の特性の違い（表面チャージハイブリッドvs. ノンエンドキャップシリカ）に起因し、ポアサイズや官能基密度の違いが少し寄与していると考えられます。

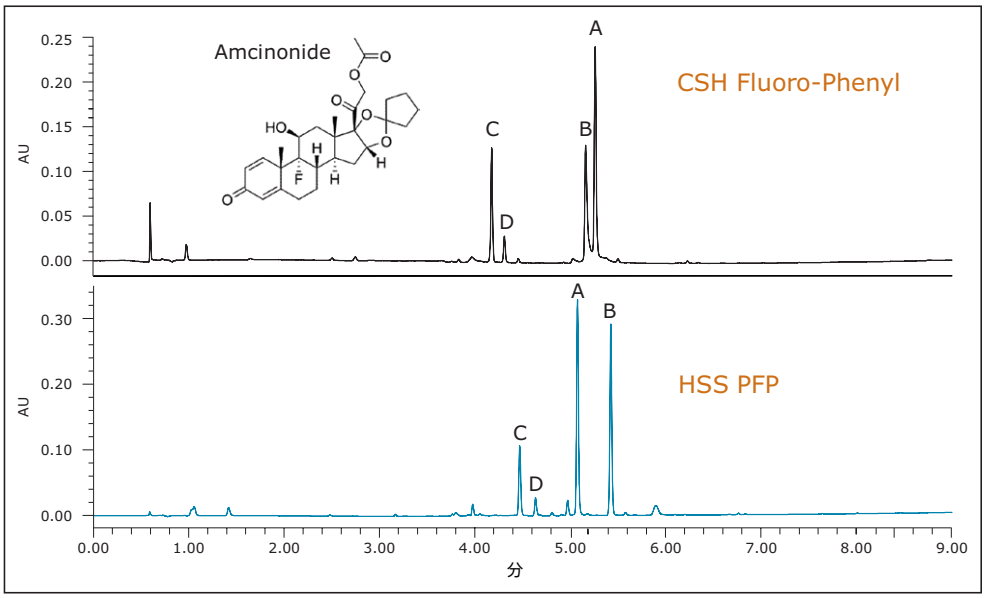

図3　異なるパーティクル基材（CSH vs. HSS）のフッ素化フェニル固定相を用いたAmcinonideアルカリ分解産物（A-D）の選択性の違い
注：Amcinonideは完全に分解

どちらのパーティクルでもPFPが官能基として用いられていますが、パーティクル基材の特性の違いがイオン性分析種の保持に大きく影響している点についても注意しておくことが重要です。例えば、塩基性化合物であるFamotidineの分解産物は、HSS PFPカラムと比較してCSH Fluoro-Phenylカラムではずっと保持が弱くなります。低pHではプラスにチャージしたFamotidine関連分析種とCSH固定相との間で電荷の反発が起こり保持が低減します。HSSパーティクル基材はチャージがないため、保持のモードがパーティクル表面との相互作用よりもむしろ官能基の特性に寄るため、塩基性化合物の保持が強い典型的なPFPカラムの挙動を示します。イオン性分析種では、結果として保持のプロファイルが大きく異なり、2種類のフッ素化フェニルカラム間における潜在的な選択性の違いが示されました。

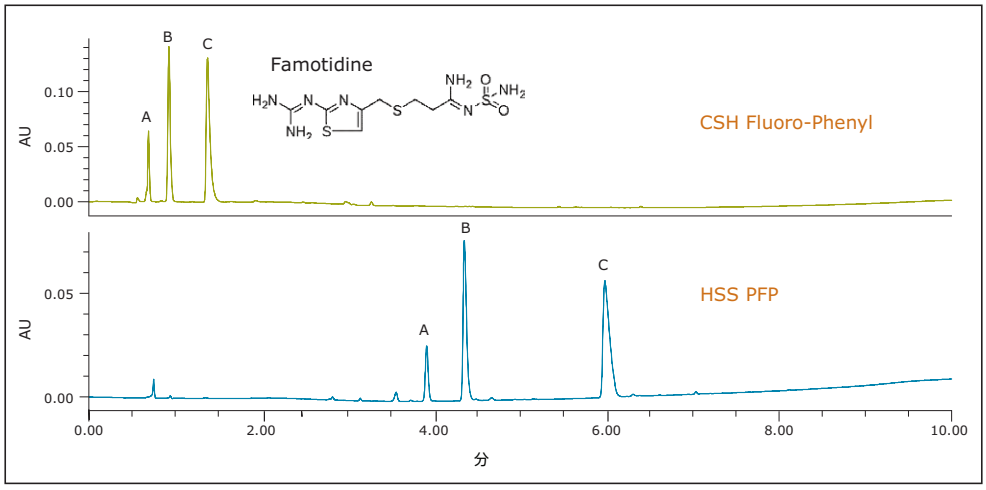

図4　パーティクル基材の保持への影響。Famotidine（A）とFamotidine錠剤分解産物（B、C）がCSH Fluoro-Phenylでは保持が弱いのに比較して、HSS PFP固定相では保持が向上

結論

従来のC_{18}官能基が理想的ではない分離においては、フッ素化フェニル固定相など異なる選択性のカラムをスクリーニングすることが適切です。分析種がハロゲンまたは芳香族基をもつことが既知の場合、これは特に当てはまります。イオン性の化合物の場合、フッ素化フェニルカラムを選択する際にパーティクル基材について考慮することも重要です。同じフッ素化フェニル官能基でも、HSS シリカベースカラムと比べて表面チャージハイブリッド（CSH）パーティクルカラムでのイオン性化合物の保持は大きく異なります。幅広い選択性範囲のカラムをスクリーニングし、分析種と固定相間の相互作用について理解することで、新しい分析法を開発する際に望ましい分離に最適なカラムを早い段階で確認し、多大な時間と労力を節約できます。

参考文献

1. Euerby M R, Petersson P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis. *Journal of Chromatography*. 2003; 994 (1-2):13-36.

2. Przybyciel M. Fluorinated HPLC Phases - Looking Beyond C_{18} for Reversed-Phase HPLC. *LCGC*. 2005; 23:554-565.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、ACQUITY UPLC および Empower は Waters Corporation の登録商標です。

CSH、Truview、eCord および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。

その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan.

2013年1月 720004485 JA PDF