[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ニトロ芳香族化合物分離に向けた CORTECS Phenyl カラムの独自の選択性

Lavelay Kizekai and Bonnie Alden
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- CORTECS Phenyl カラムを用いてニトロ芳香族化合物の迅速分析とスループット向上を達成
- 合理的な溶媒選択により、最適な選択性と分析を実現
- 溶媒使用量と廃棄量を削減することで、コストを削減

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC®

ACQUITY UPLC PDA 検出器

Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア (CDS)

CORTECS® Phenyl カラム

CORTECS C_8 カラム

中性化合物品質管理標準 (中性化合物 QCRM)

TruView™ LCMS 品質証明マキシマムリカバリーバイアル

キーワード

ACQUITY UPLC、ニトロ芳香、ACQUITY UPLC カラムカリキュレーター、1,3,5-Trinitrobenzene、1,3-Dinitrobenzene、nitrobenzene、CORTECS Phenyl、2.7 µm カラム

はじめに

ニトロ芳香族化合物は、自然に形成されることはめったにありません。主に合成され、染料、ポリマー、農薬、爆薬に使用されます。これらの化合物が幅広く製造され、結果として、土壌や地表水に汚染することで環境問題が引き起こされます。これら化合物においてニトロ基は化学的や機能的な多様性を提供するとともに、生分解が困難であることにも寄与しています。酸化分解に耐性があるため、その急性毒性や変異原性、発がん性芳香族アミンへ還元され易いことによりさらに困難の度合いが増しています [1]。ニトロ芳香族化合物は、環境保護庁 (EPA) により有害化合物として リストに記載され、ヒトの健康に有害であると考えられています。

本アプリケーションノートでは、CORTECS Phenyl カラムにより、これら化合物をいかに効果的かつ効率的に分離できるかについて検証しています。また、これら化合物の分離におけるアセトニトリルとメタノールの効果について検討しました。溶媒選択の選択性への影響を理解することは、コスト的にだけでなく、より良いクロマトグラフィー分析法を開発するために重要です。溶媒強度を計算する方法を用いることで、CORTECS C_8 および CORTECS Phenyl 2.7 µm ケミストリーでのアセトニトリルとメタノールの選択性の違いを実証しました [2]。

実験方法

ACQUITY UPLC 条件（QCRM）：

移動相：　70:30　アセトニトリル : 水

分離モード：　アイソクラティック

検出：　UV 254 nm

カラム：　CORTECS Phenyl、2.7 µm、2.1×100 mm
（製品番号 186008321）

CORTECS C_8、2.7 µm、2.1×100 mm
（製品番号 186008351）

カラム温度：　40℃

弱洗浄溶媒：　10:90　アセトニトリル : 水

強洗浄溶媒：　50:50　水 : アセトニトリル

シール洗浄：　20:80　アセトニトリル : 水

流速：　0.5 mL/min

注入量：　1.0 µL

ACQUITY UPLC 条件（ニトロ芳香族化合物）

移動相：　45:55　メタノール : 水

分離モード：　アイソクラティック

検出：　UV 254 nm

カラム：　CORTECS Phenyl、2.7 µm、2.1×100 mm
（製品番号 186008321）

CORTECS C_8、2.7 µm、2.1×100 mm
（製品番号 186008351）

カラム温度：　40℃

弱洗浄溶媒：　10:90　アセトニトリル : 水

強洗浄溶媒：　50:50　水 : アセトニトリル

シール洗浄：　20:80　アセトニトリル : 水

流速：　0.5 mL/min

注入量：　1.0 µL

バイアル：　TruView LCMS 品質証明透明ガラス
12 × 32 mm スクリューネック
マキシマムリカバリーバイアル、
プレスリット PTFE/ シリコンセプタム付
キャップ、1.5 mL
（製品番号 186005662CV）

QCRM：　中性化合物品質管理標準

データマネジメント：Empower 3 CDS

サンプル調製

ニトロ芳香族化合物は 100% メタノールに溶解して 10 µg/mL に調製し、TruView LCMS 品質証明透明ガラス 12 × 32 mm スクリューネックマキシマムリカバリーバイアル（プレスリット PTFE/ シリコンセプタム付キャップ、1.5 mL）に入れて分析に供しました。

結果および考察

本アプリケーションでは、効果的かつ効率的にニトロ芳香族化合物を分析するために、CORTECS Phenyl カラム、2.7 µm、2.1×100 mm（製品番号 186008321）および CORTECS C_8 カラム 2.7 µm、2.1×100 mm（製品番号 186008351）で分離を実施した場合の溶媒選択による選択性について検討しました。ウォーターズの中性化合物 QCRM（製品番号 186006360）を CORTECS C_8 および Phenyl 2.7 µm カラムの選択性の基準として用いました。強溶媒としてアセトニトリルを用いた場合、どちらのカラムでも、トータル分析時間 1 分以内で中性化合物 QCRM に含まれる化合物のベースライン分離を達成しました（図 1）。図 1 は、CORTECS C_8 および Phenyl が疎水性に関して非常に類似していることを示しています。CORTECS C_8 はアルキル鎖であるため、疎水性分子（ナフタレンおよびアセナフテン）が固定相に対して若干高い親和性を示しました。

次に、CORTECS C_8 および Phenyl 2.7 µm カラムを用いたニトロ芳香族化合物分離にアセトニトリルが与える影響について検討しました（図 2）。

ピーク 1 および 3 に対する CORTECS Phenyl カラムの選択性は CORTECS C_8 と異なりました。ピーク 1 と 2 も CORTECS Phenyl カラムでは CORTECS C_8 カラムよりも強く保持しました。CORTECS Phenyl カラムでの分離は、官能基と分析種との π - π 相互作用により、CORTECS C_8 カラムよりも優れていました。CORTECS Phenyl カラムでのピーク 3 と 2 の分離係数は 1.16 で、ピーク 2 と 1 の分離係数は 1.34 でした。理論的には、分離係数の許容値は 1.0 <です [3]。

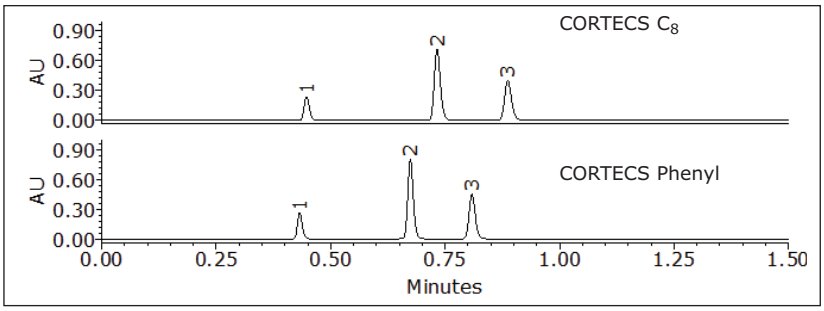

図 1. 中性化合物 QCRM（製品番号 186006360）を CORTECS C_8 および Phenyl 2.7 µm カラムで 70:30 アセトニトリル : 水を移動相として分離。ピーク 1) acetone 2) naphthalene 3) acenaphthene

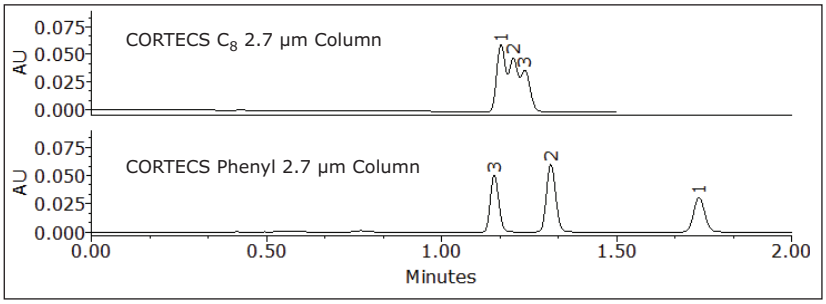

図 2. ニトロ芳香族化合物を CORTECS C_8 および Phenyl 2.7 µm カラムで 40:60 アセトニトリル : 水を移動相として分離。1) 1,3,5 –Trinitrobenzene 2) 1,3-Dinitrobenzene 3) nitrobenzene

π - π 相互作用を増強するために、非プロトン性のアセトニトリルをプロトン性のメタノールに換えて、CORTECS C_8 および Phenyl 2.7 µm カラムでのニトロ芳香族化合物の選択性を評価しました。下に示す式 1[1] は、アセトニトリルの溶媒強度に相当する適切なメタノールの濃度を決めるために用いました。ピークがベースライン分離していることがこの式を有効に利用するためには重要で、ここでは CORTECS Phenyl カラムで 40% アセトニトリルを用いたケース（図 2 参照）です。

$$\Phi_c = \Phi_b \frac{P_b}{P_c}$$

式 1.

ここで、Φ c は必要なメタノールの %、Φ b はアセトニトリルの %、Pb はアセトニトリルの P'（5.8）、Pc はメタノールの P'（5.1）を示します。P' 値は液体クロマトグラフィーで用いられる溶媒の特性により得られ[2]、各溶媒固有の極性に相当します。この式により、Φ c は 45%メタノールと計算され、強溶媒としてメタノールを用いた分離により得られたデータの表とクロマトグラムを示しました（表 1 および図 3）。

移動相としてメタノールを用いて 3 種類の化合物は良好に分離でき、全てのピークはベースライン分離しました。CORTECS C_8 カラムでは、化合物の保持はアセトニトリルの場合と同程度で、分離係数が若干変化しましたが、CORTECS Phenyl カラムでは、アセトニトリルに比べてメタノールを用いた場合には分離度の顕著な向上が見られました。メタノールのプロトン性の性質が、アセトニトリルの非プロトン性の性質（図 2 に見られる）よりも、芳香族化合物の分離に適したものとしています。

データ（表 1）は、どちらのカラムでも Rs＞1.5 かつ α＞1.0 であることを示しており、移動相としてメタノールを用いることで、アセトニトリルを用いた場合よりも選択性が向上しました。

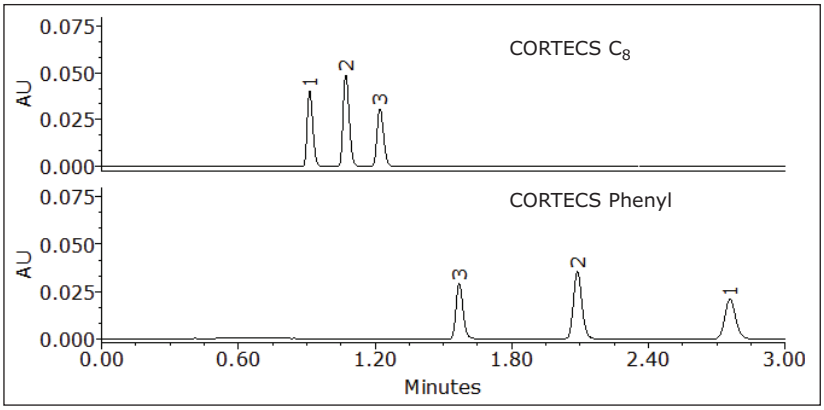

図 3. CORTECS C_8 および CORTECS Phenyl カラムで 45:55 メタノール : 水を用いてニトロベンゼンを分離したクロマトグラム

	CORTECS C_8 カラム			CORTECS Phenyl カラム		
化合物	1,3,5-TNB	1,3-DB	NB	NB	1,3-DB	1,3,5-TNB
保持時間	0.912	1.071	1.221	1.569	2.088	2.758
K prime （K'）	8.1	9.7	11.2	14.7	19.9	26.6
分離度（R_s）		3.3	2.9		8.2	8.4
分離係数（α）		1.20	1.15		1.35	1.34

表 1. 移動相有機溶媒としてメタノールを用いた場合の分離度および分離係数

ニトロ芳香族化合物に向けた EPA8330スタンダードMix AおよびMix Bの分析

爆薬の製造および爆薬の分解物に関連する、ニトロ芳香族化合物の 2 種類のスタンダード Mix である EPA8330 Mix A および Mix B を、CORTECS C_8 カラムと CORTECS Phenyl カラムで試験しました。図 4 に示すピーク 1 から 8 は Mix A、ピーク 9 から 14 は Mix B に含まれる分析種です。スタンダードは TruView LCMS 品質証明バイアルに入れ、45:55 メタノール : 水の移動相を用いて CORTECS カラムと CORTECS Phenyl カラムで分析しました（図 4）。

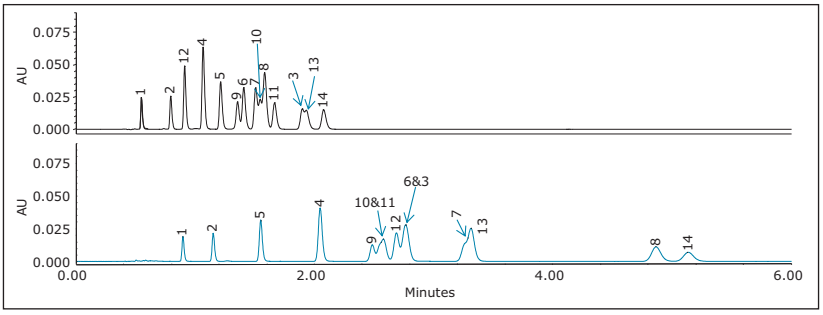

図 4. EPA8330 スタンダード Mix A および Mix B の CORTECS C_8 カラムと CORTECS Phenyl カラムでの分離。1）HMX, 2）RDX, 3）1,3,5-Trinitrobenzene, 4）1,3-Dinitrobenzene, 5）Nitrobenzene, 6）2,4,6-Trinitrotolluene, 7）2-Amino-4,6-dinitrotoluene, 8）2, 4-Dinitrotoluene, 9）Tetryl, 10）4-Amino-2,6-dinitrotoluene, 11）2,6-Dinitrotoluene, 12）2-Nitrotoluene, 13）4-Nitrotoluene, 14）3-Nitrotoluene

CORTECS Phenyl カラムとプロトン性溶媒を移動相に用いることで、ニトロ芳香族化合物に関して CORTECS C_8 カラムを用いた場合よりも良好な分離が得られます。Phenyl 官能基による選択性の向上は、分離ウィンドウを広げるだけでなく、多くのピーク間の分離度を著しく向上させます。例えば、図 4 に示すように、ピーク 8 はピーク 7、10、11 から完全に分離できました。メタノールで勾配の緩やかなグラジエントを用いることで、分離はさらに最適化できます。

結論

固定相の選択は分離選択性に影響しますが、移動相も同様に影響します。逆相クロマトグラフィーではアセトニトリルが好まれることが多くありますが、メタノールも選択性の高い代替となります。CORTECS C_8 カラムでアセトニトリルを用いた場合にはニトロ芳香族化合物は分離できませんでしたが、メタノールでは、そのプロトン性の性質により、CORTECS C_8 カラムおよび CORTECS Phenyl カラムでニトロ芳香族化合物に独自の選択性を提供しました。CORTECS Phenyl カラムは、π - π 相互作用により、アセトニトリルおよびメタノールどちらを使用した場合にも分離において独自の選択性を示しました。アイソクラティック分離に向けた溶媒選択の検討では、選択性を最適化し分析時間を増加させるために Snyder の式 2 が重要なツールとなります。CORTECS C_8 カラムおよび CORTECS Phenyl カラムは分析法開発に不可欠なツールとして、最適な分離を達成するために異なる溶媒の利点を効率的かつ効果的に活用できます。

参考文献

1. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation, Ju KS,[1] Parales RE. [1]Department of Microbiology, College of Biological Sciences, University of California, 226 Briggs Hall, 1 Shields Ave., Davis, CA 95616, USA.
2. L.R. Snyder & J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Chromatography Second Edition.*
3. FDA Validation of Chromatographic Methods.

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、CORTECS、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
TruView 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。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年3月 720005580JA PDF