Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

CORTECS Phenylカラムを用いた論理的な溶媒選択による選択性の最適化

Kenneth D. Berthelette, Thomas Swann, and Jacob Fairchild
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

CORTECS® Phenyl カラムを用いた分離における移動相の影響を理解することで、カラム選択性を最適化でき、分析法開発の成功率が向上

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

Xevo® TQD

CORTECS Phenyl カラム

Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア(CDS)

MassLynx® v4.1 CDS

キーワード

CORTECS Phenyl、ACQUITY UPLC H-Class、Empower 3、MassLynx 4.1、医薬品、スーダン色素

はじめに

逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）は、主に疎水性分析種と疎水性の結合相との相互作用による分析技術です。分析種はこの相互作用により保持され、水 / アセトニトリルもしくは水 / メタノール等の水と有機溶媒のグラジエントにより溶出します。同じ分析条件を用いても、様々な固定相の使用により大きく異なる結果が得られます。同様に、同じカラムで化合物を分析しても、異なる移動相の使用により異なる結果が得られます。

分析を実施する際には、メタノールとアセトニトリルのような有機溶媒間の違いについても考慮する必要があります。メタノールはプロトン供与溶媒で、水酸（-OH）基により水素結合の供与・受容ともに可能です。アセトニトリルは非プロトン性溶媒で、ニトリル（-CN）基により水素結合を受容します（供与はしない）。メタノールとは異なり、アセトニトリルは、分析種と固定相との間における他の相互作用（π - π相互作用）の要因となるπ電子をもっています。本アプリケーションノートでは、異なる選択性の違いを得るためにメタノールとアセトニトリル間のπ電子の違いを用いた 2 つの例を示します。

実験方法

システム条件 - 医薬品

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class システム

カラム：　CORTECS UPLC Phenyl、1.6 µm、2.1 × 50 mm
（製品番号：186008379）

移動相 A：　0.1% ギ酸水溶液

移動相 B：　0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

移動相 C：　0.1%ギ酸メタノール溶液

グラジエント：有機溶媒 5%から、4.5 分で 95%までリニアで増加

流速：　0.6 mL/min

カラム温度：30℃

注入量：　1.0 µL

検出：　254 nm

MS システム：Xevo TQD

システム条件 - スーダン色素

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class システム

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

移動相 A：　水

移動相 B：　アセトニトリル

移動相 C：　メタノール

グラジエント：有機溶媒を 5 分間で 20 -100%に増加、
100%で 4 分間ホールド

流速：　0.4 mL/min

カラム温度：45℃

注入量：　5 µL

MS システム：Xevo TQD

データマネジメント：Empower 3 CDS および MassLynx v4.1

サンプル調製

医薬品

12 種類の医薬品および医薬品様化合物を合わせてバイアルに入れ、溶解溶媒として水を用いて、各分析種の最終濃度が 20 µg/mL になるように調製し、分析に供しました。

スーダン色素

2 種類の色素、rhodamine B と sudan orange Gを合わせてバイアルに入れ、溶解溶媒としてメタノールを用いて、それぞれの濃度が 5 µg/mL になるように希釈し、分析に供しました。各色素の検出は MRM トランジションを用いて実施しました。

結果および考察

CORTECS Phenyl カラムは、従来の C18 固定相と比べて独自の選択性を提供します。図 1 に示すフェニルヘキシル基は、固定相の疎水性だけでなくπ - π相互作用によっても分析種と相互作用します。このπ - π相互作用の分離メカニズムがあることに加え、さらに異なる移動相を用いることで、この効果を制限もしくは増大できます。

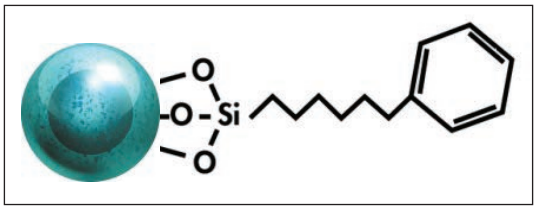

図 1. CORTECS ソリッドコアパーティクル基材に結合される Phenyl 官能基

アセトニトリルのようなπ電子をもつ溶媒は、分析種のπ電子系と相互作用し、分析種とフェニル固定相間のπ - π相互作用を低減します。逆に言うと、メタノールのようなπ電子を持たない溶媒を用いた場合には、同じ分析種でもフェニル固定相間とのπ - π相互作用が支配的になります。

CORTECS Phenyl カラムを用いた医薬品混合物の分離に、π電子が多い移動相と、π電子を持たない移動相がそれぞれどのように影響するのかを示した例を図 2 に示しました。クロマトグラフィーは、0.1%ギ酸水溶液と 0.1%ギ酸有機溶媒溶液を用いたグラジエントで、流速 0.6 mL/min で実施しました。有機溶媒濃度５%から開始して、4.5 分間で 95%までリニアグラジエントで増加させた後、開始条件に戻して 1 分間再平衡化を行いました。カラム温度は 30℃で、1 µL 注入して分析を実施しました。サンプルの分析には 254 nm で UV 検出を用いました。

移動相にアセトニトリルを用いた場合には、12 種類全ての化合物は分離できませんでした。この条件では、phenol（5）が quinidine（3）と共溶出し、どちらも pindolol（2）と一部共溶出していました。メタノールを用いた場合には、12 種類全ての化合物が分離しました。quinidine は、固定相の Phenyl 官能基とのπ - π相互作用が増加することで保持が向上し、選択性が有意に変化しました。

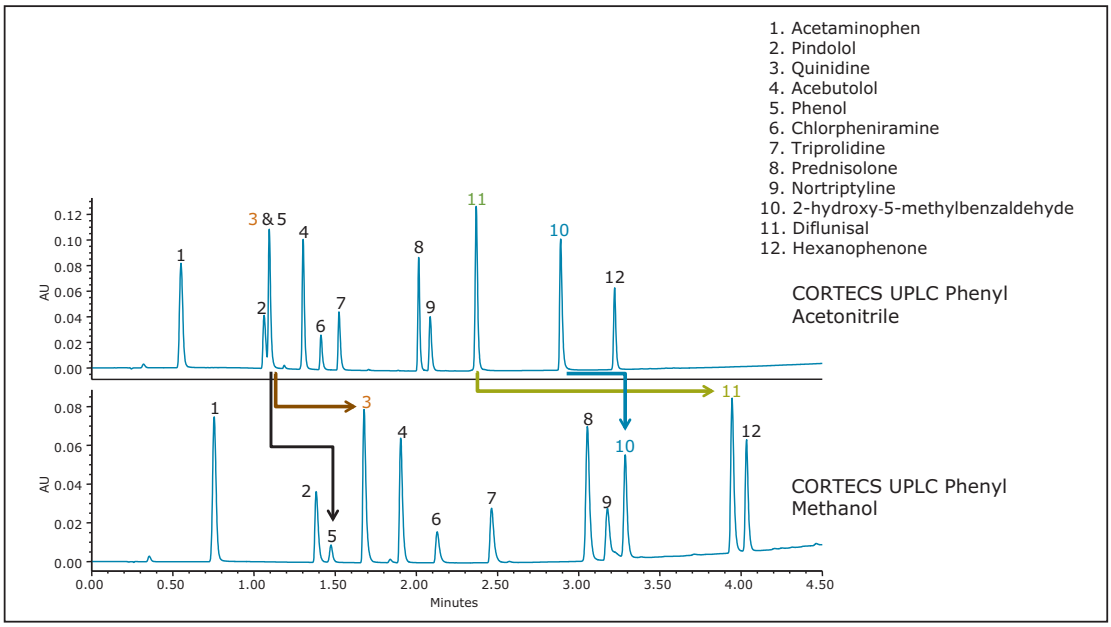

図 2. CORTECS UPLC Phenyl カラム　1.6 µm、2.1×50 mm（製品番号 186008379）を用いたアセトニトリル（上）とメタノール（下）グラジエントでの医薬品混合物の分離

diflunisal(11)および 2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde(10)も溶出順序が変わり、独自の選択性の違いを示しています。特に diflunisal は、メタノールを用いた場合には、Phenyl 官能基とずっと強く相互作用し、結果として大きく選択性が変化しました。使用溶媒による影響を受けた分析種の化学構造を図 3 に示しました。このサンプルにおけるメタノールの使用は、Phenyl 固定相と強いπ - π相互作用する化合物に対して、更なる選択性を提供しました。

ケースによっては、CORTECS Phenyl カラムを用いる際に、アセトニトリルを用いてπ - π相互作用をマスクすることが、選択性をコントロールする効率的な方法となる可能性もあります。rhodamine B（13）と sudan orange G（14）の 2 種類の色素の例について検討してみましょう。両化合物の構造は図 4 に示しました。

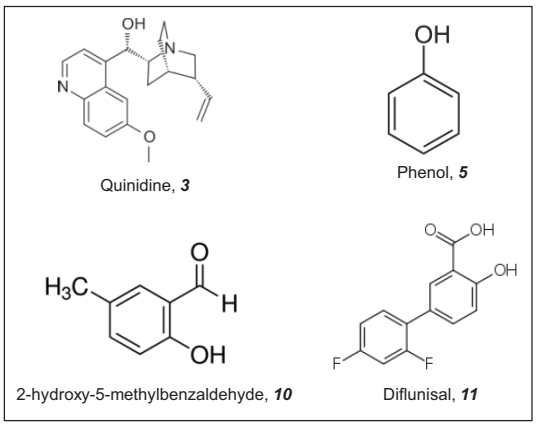

図 3. Phenyl 固定相とπ - π相互作用しやすい分析種の構造

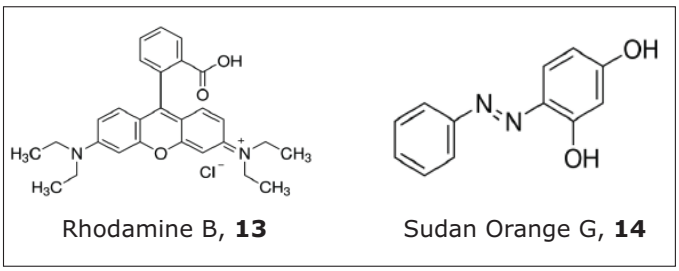

図 4. 本研究に用いた色素の構造

2 種類の色素は、ACQUITY UPLC H-Class システムで CORTECS Phenyl カラム　2.7 µm 2.1×100 mm（製品番号 186008321）を用いて、メタノールおよびアセトニトリルのグラジエントで分析しました。カラム温度は 45℃で、5 µL 注入して分析しました。流速は 0.4 mL/min で、有機溶媒濃度 20%から開始して、5 分間で 100%までリニアグラジエントで増加させた後 4 分間ホールドし、開始条件に戻して 3 分間再平衡化を行いました [1,2]。アセトニトリルとメタノールを用いて各化合物の分離を行ったクロマトグラムは図 5 に示しました。

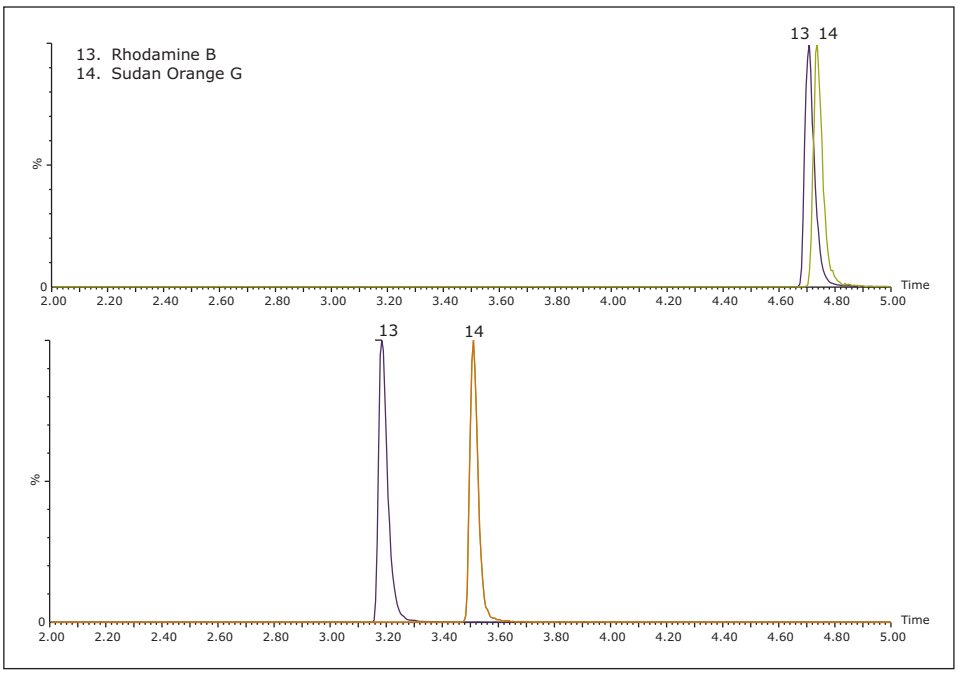

図 5. CORTECS Phenyl カラムを用いたメタノール（上）とアセトニトリル（下）グラジエントでの rhodamine B および sudan orange G スタンダードの分離クロマトグラム

移動相にメタノールを用いた場合、2 種の色素は共溶出しました。このクロマトグラフィー条件下では、各分析種の広範囲に渡るπ電子系が、自由に Phenyl 固定相のπ電子系と強く相互作用し、これが疎水性相互作用に対して支配的となります。一方、π電子の多いアセトニトリルを用いた場合は、これら 2 種類の色素を分離するのに必要な選択性が得られました。アセトニトリルが分析種と Phenyl 固定相との間のπ - π相互作用をマスクすることで、2 種類の色素は疎水性に基づいて分離します。rhodamine B は有意に疎水性が低いため、アセトニトリルを移動相に用いた場合、保持が弱くなり、sudan orange G と分離できます。

結論

移動相に有機溶媒を選択する際は、分析種の特性について常に考慮する必要があります。これは、CORTECS Phenyl カラムのような特異的な固定相の場合には特に当てはまります。メタノールのようなπ電子のない溶媒は、分析種と固定相とのπ - π相互作用を強める一方で、アセトニトリルのようなπ電子を多く含む溶媒では、他の相互作用がより支配的になります。分析種、移動相、固定相間の相互作用を理解することで、良好な分離が得られるクロマトグラフィー条件を調整することができます。

参考文献

1. Rapid Analysis of Sudan Dyes and Other Prohibited Dyes in Chili Powder Using the ACQUTIY UPLC H-Class System with Xevo TQD. Waters Application Note. Part Number: 720004975EN.
2. LC-MS Determination of Sudan Dyes in Chili Oleoresin Using the CORTECS C_{18}, 2.7µm Column. Waters Application Note. Part Number: 720005070EN.

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、UPLC、CORTECS および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
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4月 720005607JA PDF