

## 極性化合物分析における諸問題とカラム選択

○朝日優介<sup>1</sup>, Bonnie A. Alden<sup>2</sup>, Thomas H. Walter<sup>2</sup>, Jacob N. Fairchild<sup>2</sup>, Babajide Okandeji<sup>2</sup>, Jim Cook<sup>2</sup>, Daniel P. Walsh<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>日本ウォーターズ株式会社, <sup>2</sup>Waters Corporation

### はじめに

逆相クロマトグラフィーは再現性や適合性の高さゆえに幅広い化合物の分析に使用されている。一方で課題として、極性化合物の保持の低さが挙げられる。多くの場合、極性化合物の十分な保持を得るためには水系移動相の割合が高い条件 (>90%水) で分析する必要がある。

このような条件において、細孔径100 Å、疎水性官能基 (C18) の表面密度が高い典型的な逆相固定相では、水系移動相の固定相細孔への浸透がばらつくことにより再現性が低下する<sup>(1)</sup>。この問題を解決するために我々は極性化合物の保持と水系移動相への適合を目的としたソリッドコアパーティクルを設計した (CORTECS T3)。

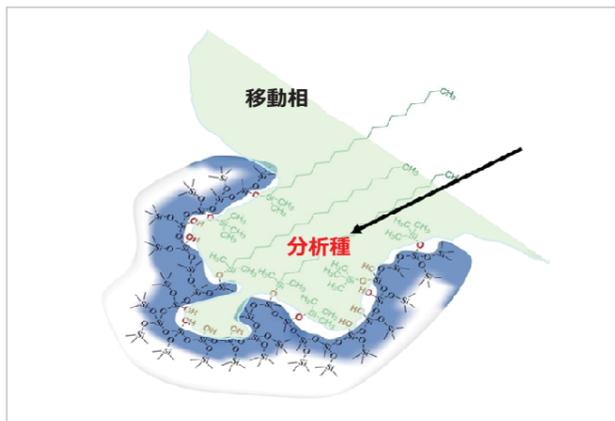


Figure 1. 固定相表面の適切な湿潤状態

### 分析手法

#### 分析条件

分析装置のコントロール、データ取得と加工には Waters Corporation (Milford, MA, USA) の Empower3 を用いた。クロマトグラフシステムは ACQUITY UPLC H-Class (サンプルマネージャ、フロースルーニードル、クオータナリーソルベントマネージャ、ACQUITY PDA、CM-Aカラムマネージャ) を使用した。カラム温度は30°C、流速は200 µL/min、送液停止前の保持時間と送液停止後の保持時間の減少 (%) の評価にはチオウレア (10 µg/mL) とチミン (12 mg/mL) を3 µLインジェクションしたものを使用した。保持時間は5回の測定の前平均とした。ポイドボリューム (V<sub>0</sub>) の測定にはアセトニトリル (ACN) 100% に溶解したチオウレア (10 µg/mL) を使用した。保持時間の減少の測定には pH 3 の 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液を移動相として使用した。カラムサイズは 2.1 × 50 mm のものを使用した。

#### 分析手順



### 結果

ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> 1.8 µm、ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm カラムを全多孔性カラムのベンチマークとして充填剤表面の官能基密度の影響を確認した。ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> は官能基密度が 3.2 µmol/m<sup>2</sup> と高く、チミンの保持時間の減少は 100% だった。ACQUITY UPLC HSS T3 では官能基密度を 1.6 µmol/m<sup>2</sup> まで低減しており、保持時間の減少は 7% だった (n = 5)。

ソリッドコアパーティクルにおける、保持時間の減少を評価するため CORTECS UPLC 1.6 µm ファミリーとそのプロトタイプを作製し、チミンの保持係数と保持時間の減少を測定した (Table 1)。

Table 1. 結合相の特性					
	細孔径	表面 チャージ	官能基密度 µmol/m <sup>2</sup>	% tR Loss	k Thymine
ACQUITY UPLC HSS C18	100	NA	3.2	101	3.73
ACQUITY UPLC HSS T3	100	NA	1.6	7	4.89
SC-C18-E	160	NA	1.7	4	2.22
SC-C18-F	160	NA	2.1	6	2.26
SC-C18-G	160	NA	2.5	7	2.21
SC-C18-B	120	LOW	2.3	5	2.67
SC-C18-C	120	MEDIUM	2.3	4	2.72
SC-C18-D	120	HIGH	2.0	3	2.63
SC-C18-A	90	MEDIUM	2.3	12	2.52
CORTECS UPLC C18	90	NA	2.7	88	2.69
CORTECS UPLC C18+	90	LOW	2.3	23	2.92
CORTECS UPLC C8	90	NA	3.4	98	1.75
CORTECS UPLC Phenyl	90	NA	3.2	1	1.96
CORTECS UPLC T3	120	NA	1.6	5	2.78
CORTECS UPLC Shield RP18	90	NA	3.2	3	1.44

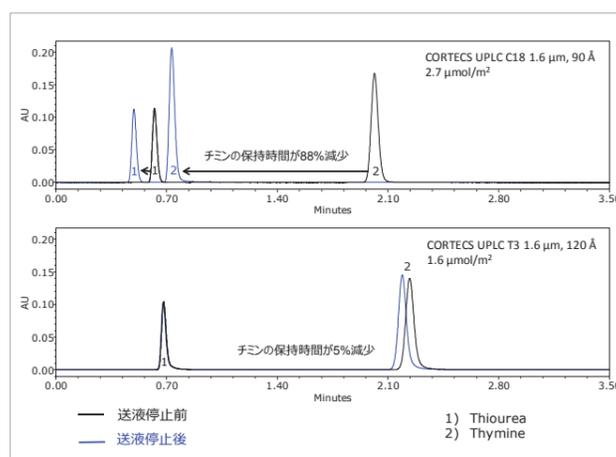


Figure 2. 細孔径とC18の表面密度が異なる固定相で100%水系移動相を10分間送液停止した際の影響

C18の官能基密度の影響を評価するため、細孔径160 Å、粒子径2.7 µmのソリッドコアシリカパーティクルを作製した。また、粒子表面の修飾によるチャージの影響を評価するため細孔径120 Å、粒子径2.7 µmのソリッドコア (SC) パーティクルを作製した。両方のパーティクルでチミンの保持時間 (t<sub>R</sub>) の減少はソリッドコアパーティクルのベンチマーク粒子 (SC-C18-A) (細孔径90 Å、粒子径2.7 µm、C18官能基密度2.3 µmol/m<sup>2</sup>、固定相のチャージの強さMEDIUM) に比べて小さくなった。

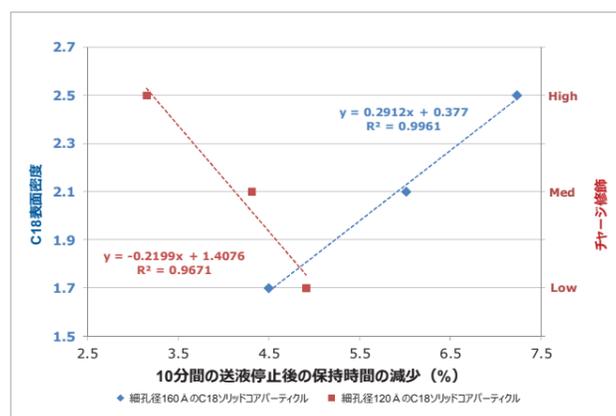


Figure 3. 細孔径160 Å、粒子径2.7 µmのソリッドコアパーティクルにおけるC18の表面密度の影響

#### References

1. T. H. Walter, P. Iraneta and M. Capparella J. Chrom. A 1075, 2005, 177.

### 考察

逆相クロマトグラフィーにおいて水系移動相の割合が高い条件では移動相が細孔から押し出されてしまうため十分な再現性が得られないことが分かっている<sup>(1)</sup>。逆相固定相の湿潤には、少なくとも以下の4つの要因：細孔径、官能基密度、官能基の種類、固定相表面のチャージ が関与しており保持時間の減少に影響を与えている。

CORTECS UPLC C<sub>18</sub> と CORTECS UPLC C<sub>8</sub> を評価するとチミンの保持時間の減少はそれぞれ88%と98%だった。この結果は小さい細孔径で高い官能基密度の固定相を使用した際に予想できる結果と一致した。

細孔径160 Å、粒子径2.7 µmのソリッドコアでC18の官能基密度を変更したプロトタイプを3種類作製した (SC-C18-E : 1.7 µmol/m<sup>2</sup>、SC-C18-F : 2.1 µmol/m<sup>2</sup>、SC-C18-G : 2.5 µmol/m<sup>2</sup>)。いずれもチミンの保持時間の減少は7%以下となり、官能基密度が保持時間の減少に与える影響を示した。(R<sup>2</sup> = 0.996) (Figure 3.) これは全多孔性粒子であるACQUITY UPLC HSS T3、C<sub>18</sub>と同様の傾向となった。CORTECS UPLC C<sub>18</sub>は保持時間の減少88%に対しCORTECS UPLC C<sub>18</sub>+は23%の減少となった。これは低いC18の表面密度 (2.3 µmol/m<sup>2</sup>) と、固定相表面に修飾された正のチャージにより結合相の湿潤性が改善されたためである。固定相のチャージをさらに増加すると (SC-C18-A) 保持時間の減少は12%に半減した。細孔径の増大と固定相表面のチャージの増加が100%水系移動相への適合性を高めるため、細孔径120 Åのソリッドコアパーティクルでチャージの量を変更した固定相を3種類作製した (SC-C18-B、SC-C18-C、SC-C18-D)。いずれも保持時間の減少は5%以下であり、固定相のチャージ量と保持時間の減少の関係はR<sup>2</sup> = 0.9671となった。

驚くべきことに細孔径90 Åの高官能基密度のソリッドコアパーティクルCORTECS UPLC Phenylではチミン保持時間の減少はわずか1%だった。さらに以前の結果<sup>(1)</sup>と同様に、極性基内包型官能基を埋め込まれたCORTECS UPLC Shield RP18でも保持時間の減少はたった3%だった。これらの固定相は100%水系移動相に適合可能だが、CORTECS UPLC T3ではこれらの官能基に比べ、30%ほど極性化合物の保持が強い。結論として、充填剤表面のC18の官能基密度を調整した固定相で粒子表面のチャージ修飾がなく、細孔径が120 Åのものが最も極性化合物の保持とdewettingのバランスが良かった。

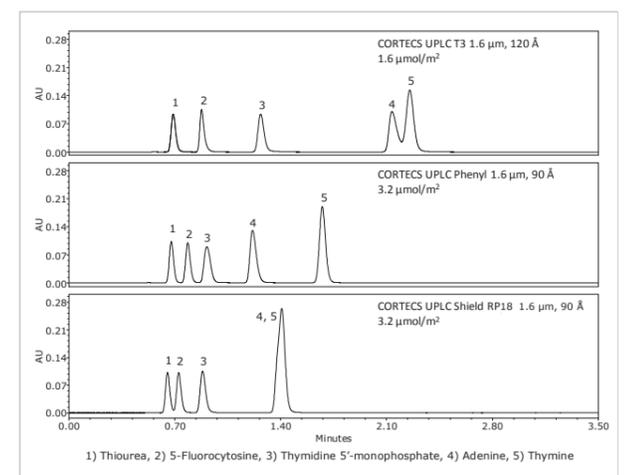


Figure 4. CORTECSの結合相の100%水系移動相における極性化合物の保持の比較

### 結論

- CORTECS UPLC T3は極性化合物の保持と100%水系移動相への適合を最適に実現するように設計されている。
- 官能基の種類、官能基濃度、表面チャージ、細孔径の選択は逆相固定相の湿潤性に大きな影響を与える。
- 細孔径の大きさを120 Åより大きくするとC18の表面密度の保持時間の減少に対する影響は低下する。
- 適切なC18の表面密度において、細孔径が90 Åのソリッドコアパーティクルであっても、固定相へのチャージ修飾により保持時間の減少を抑制できる。