

Application News

No. L447

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

高耐圧ステンレスフリー LC カラム “Mastro™” を用いたりん酸基含有化合物の分析

Analysis of Compounds Contain Phosphate Group Using The New High Pressure Resistance Stainless Steel Free LC Column “Mastro™”

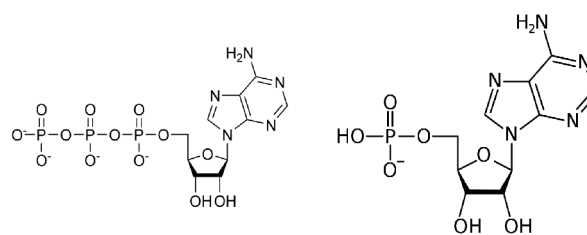
医薬品および代謝物中のりん酸基含有化合物や金属キレート性のある化合物は、HPLC システム流路の金属部分に吸着し、ピークテーリングが生じやすいことが知られています。これらの対処法として、移動相への塩やキレート剤の添加が一般的には行われていますが、このような不揮発性の溶離液の使用は、検出器に LC/MS を用いる場合には適切ではありません。

ここでは、配管の材質の違いが配位性化合物のピーク形状に与える影響を検証しました。

また、LC/MS 分析を想定し、ギ酸系の移動相を用いて、高耐圧ステンレスフリー分析カラム “Mastro™” による配位性化合物の金属吸着抑制効果を検証しました。

Y. Hirao Y. Sato ※

※ SHIMADZU GLC Ltd.



Adenosine triphosphate

Adenosine monophosphate

Fig. 1 ヌクレオチドの構造式

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Typical C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 μm)
Instrument	: Nexera
Mobile Phase	: 10 mmol/L Ammonium Formate in Water: Acetonitrile=99:1
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M20A at (254 nm)
Injection Vol.	: 1 μL

LC システム配管素材の影響について

Influence of HPLC Tube Material

LC/MS で使用するような移動相では、配位性のある化合物は LC システムのステンレス配管による吸着が起こるため、ピークのテーリングが起こる傾向があります。

LC/MS 適用可能な移動相と従来のカラムを用い、オートサンプリング出口配管 (600 mm) の素材の違いによるピーク形状に与える影響をヌクレオチド標準溶液を用いて確認しました。配管にはステンレス製、PEEK 製素材のものを用いました。

ヌクレオチドは、ヌクレオシドにりん酸基が結合した化合物で、ATP (アデノシン三リン酸) は 3 つのりん酸基が結合した化合物です (Fig. 1)。ATP、AMP をそれぞれ調製 (各成分濃度約 10 mg/L) し、Table 1 に示す分析条件を適用しました。

ステンレス製の配管を使用した場合には吸着による保持時間の遅れが確認されましたが、いずれの素材の配管においても、ピークの吸着によるテーリングに顕著な差異は認められませんでした。このことから、ピークのテーリングについては、カラムの寄与が大きいことが推定されます。

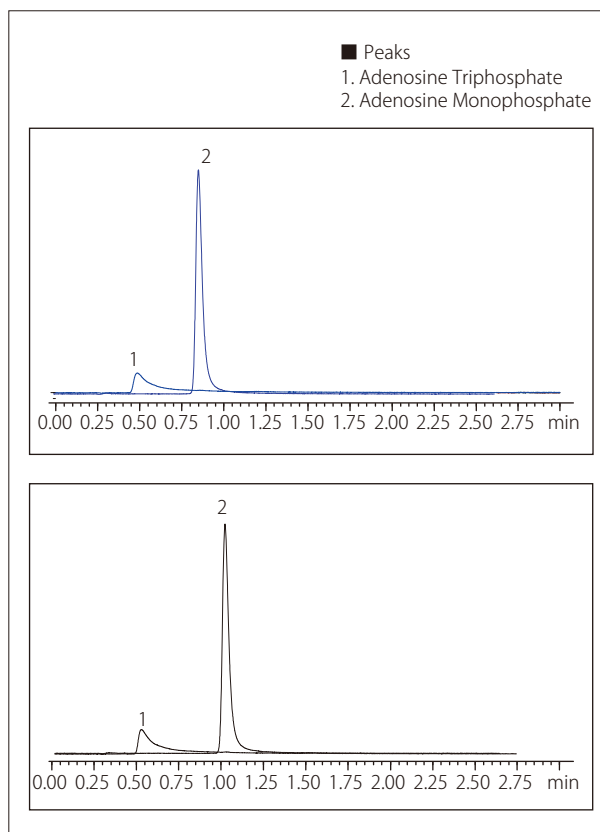


Fig. 2 配管の素材が与えるピーク形状の違い
(上: PEEK 製, 下: ステンレス製)

The Difference of the Peak Shape by the Tube Material

副腎皮質ホルモン製剤、 水溶性ヒドロコルチゾン製剤の分析

Hydrocortisone Sodium Phosphate and Hydrocortisone Sodium Succinate Analysis

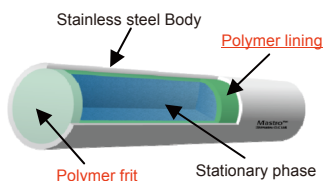


Fig. 3 Mastro™ カラム断面イメージ図
Mastro™ Column Image

次にステンレスフリーカラムとして、“Mastro™”を用いて検討しました。

高耐圧ステンレスフリーLCカラム“Mastro™”カラムでは、ステンレスボデー内面をポリマーコーティングし、フリットは高架橋ポリマー素材のものを採用し、金属活性を極限まで抑えているため、金属配位しやすい成分のカラム内における吸着の抑制を実現します (Fig. 3)。

副腎皮質ホルモン製剤の主成分は、ヒドロコルチゾンりん酸エステルナトリウムでりん酸基が含まれています。また、水溶性ヒドロコルチゾン製剤の主成分はヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウムでりん酸基が含まれません (Fig. 4)。

これらの化合物をLC/MSで使用可能な移動相で分析しました。Table 2 に分析条件を示します。

一般的なC18カラム (Typical C18) では、ヒドロコルチゾンりん酸エステルナトリウムはテーリング現象がみられ、保持時間が遅れ、吸着によるピークの入れ代わりが確認されましたが Mastro™ カラムでは、両成分でシャープなピーク形状が得られました (Fig. 5)。

LC/MS に適用可能な移動相での配位性化合物のピークテーリングの抑制にはカラムの要因が大きく、ステンレスフリーのカラムが有効であることが確認できました。

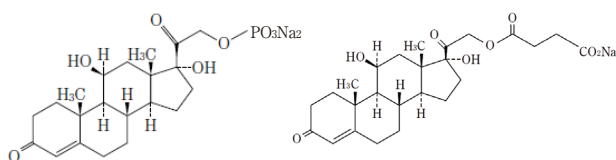


Fig. 4 ヒドロコルチゾンの構造式
Structure of Hydrocortisone

副腎皮質ホルモン製剤、水溶性ヒドロコルチゾン製剤の分析例は、静岡県立大学薬学部 生体機能分子分析学分野 轟木堅一郎先生との共同研究により得られたデータです。

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	Mastro™ C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 μm) Typical C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 μm)
Instrument	Nexera
Mobile Phase	0.1 % Formic Acid in Water: 0.1 % Formic Acid in Acetonitrile= 50:50
Flow Rate	0.2 mL/min
Column Temp.	40 °C
Detection	SPD-M20A at (254 nm)
Injection Vol.	1 μL

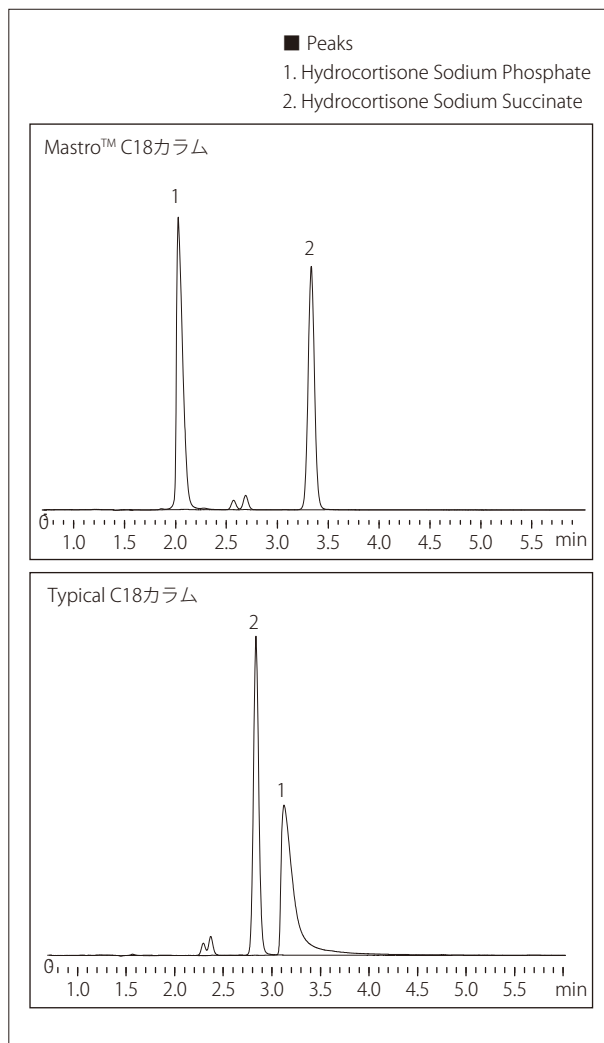


Fig. 5 副腎皮質ホルモン製剤、水溶性ヒドロコルチゾン製剤のクロマトグラム
Chromatograms of Hydrocortisone Sodium Phosphate and Hydrocortisone Sodium

Mastro™ カラムについての詳細は下記までお問い合わせください
株式会社島津ジーエルシー
TEL 03-5835-0120, gsupport@glc.shimadzu.co.jp