

## Alliance™ HPLC™ システムで MaxPeak™ Premier カラムを使用した、合成トリフェニルメタン色素の分析法開発

---

Kenneth D. Berthelette, Maureen DeLoffi, Kim Haynes

Waters Corporation

---

### 要約

構造が類似した成分の HPLC 分析法の開発は困難な作業になります。液体クロマトグラフィーの原理を理解し、それらを構造化され、合理化されたアプローチに適用することで、分析法開発のプロセスが加速するだけでなく、わかりやすい形式で作業のトレーサビリティが得られます。分析法開発のプロトコルが構造化されていることで、初心者ユーザーでも、クロマトグラフィーの専門家に監督してもらわずに、独自に分析法を開発できます。

構造化されたプロトコルである「体系的スクリーニングプロトコル」を使用して、構造的に類似した 8 種類の合成色素を分離する分析法を開発しました。色素はすべてトリフェニルメタン系に属し、同じコア構造にさまざまな部位が結合しています。分析法の開発に使用するプロトコルで、MaxPeak Premier カラムに搭載された MaxPeak™ High-Performance Surfaces (HPS) テクノロジーを活用することで、カラムと分析種の間に見られる非特異的吸着 (NSA) が低減します。このカラムテクノロジーを体系的スクリーニングプロトコルとともに採用することで、8 種類の色素すべてについて良好なピーク形状と完全な分離が得られる分析法が開発できました。

### アプリケーションのメリット

- 体系的スクリーニングプロトコルを使用した迅速な分析法開発
  - MaxPeak Premier カラムを使用して NSA を低減することで、初回の分析から正確な結果を取得
  - 100 mm カラムを使用して、20 分未満で 8 種類の合成色素の完全な分離に成功
-

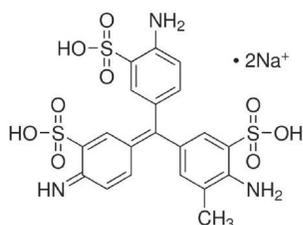
---

## はじめに

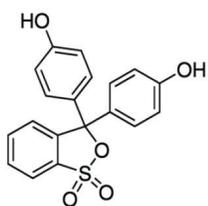
分析法の開発において、特に構造が類似した化合物においては、極性や pKa などの化学的特性が類似している可能性があるため、注意が必要です。経験の乏しい初心者の分析者が、プロジェクトの一環として分析法を開発するよう頼まれた場合などには、この課題がさらに大きくなります。分析法開発のプロトコルがない場合、初心者のユーザーは、専門家のユーザーに大きく頼るか、自分自身で苦勞してプロセスを進めることになります。いずれの場合も、分析法を開発することはできるかもしれませんが、そのペースが遅くなります。このアプリケーションノートで概説されているような構造化された分析法開発アプローチを活用することで、初心者ユーザーが経験を積むのに役立つだけでなく、分析法開発のプロセスに対する一定のレベルのトレーサビリティも得られます。各段階が概説され、各ステップに目標が割り当てられているため、分析法の条件選択の根拠が明らかです。分析法開発への体系的スクリーニングプロトコルのアプローチでは、前述のトレーサビリティが得られると同時に、開発のスピードと、分析対象のサンプルの正確な全体像を得るためにできるだけ多くのデータを取得することのバランスを取ります。

この体系的スクリーニングプロトコルでは、4つのステップを使用して分析法を開発します<sup>1-3</sup>。まず、分析者は、新しい分析法で満たす必要がある基準を決定する必要があります。これらの基準は、ピーク間の分離度が十分であることや、ピークが対称的であるなどの単純なもので構いません。次に、適切なカラムを使用して、高 pH および低 pH のスクリーニングを行います。このステップにより、プローブが最もよく保持される pH が決まります。このステップは、分析種の化学的性質を調査することで予測可能ですが、強制分解試験などの場合には、分析種の化学的性質が分からないので、このステップが分析法開発プロセスにおいて不可欠です。pH が選択できたら、アセトニトリルとメタノールの両方の移動相を、一連の多様な LC 固定相で使用して、従来のカラムおよび有機溶媒のスクリーニングを行います。このステップでは最も多くのデータが得られ、どの条件のセットで最適な分離が得られるかを評価します。最後に、必要に応じて、分析法の最適化を行って、分離の質をさらに高めることができます。最適化においては、グラジエントの傾き、移動相添加剤、カラム長、およびその他のパラメーターを、プロトコルの最初のステップで設定した基準を満たすように調整することができます。

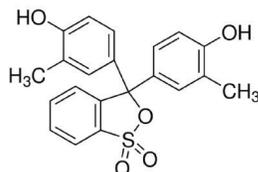
体系的スクリーニングプロトコルの使用を実証するために、8種類の合成色素の混合物を作成し、分析しました。8種類の分析種はすべてトリフェニルメタン色素で、骨格構造が同じです。この構造に対する各分析種の結合はそれぞれ異なりますが、構造が類似しているため、これらの化合物を分離するのが特に困難になります。図 1 に分析種の化学構造を示します。体系的スクリーニングプロトコルを使用してこれらの化合物を分離し、MaxPeak Premier High-Performance Surfaces (HPS) テクノロジーを採用した XBridge™ Premier カラムを使用して、すべての基準を満たす分析法を開発しました。これらのカラムは、分析種とカラムの金属表面の間の二次的相互作用が低減されているため、分析法開発に最適です。このような相互作用を排除することで、サンプルの最初の注入から、より正確で再現性の高い結果が得られます<sup>4-6</sup>。これで最終的な分析法を、サンプルの試験に使用したり、頑健性などについてさらにバリデーションしたりできるようになります。



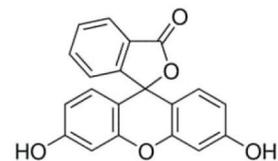
1) 酸性フクシン  
LogP : -1.21



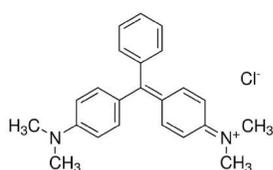
2) フェノールレッド  
LogP : 4.109



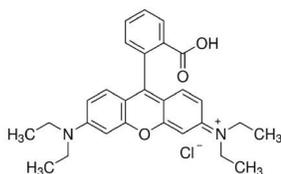
3) クレゾールレッド  
LogP : 5.136



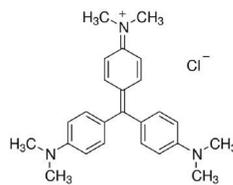
4) フルオレセイン  
LogP : 3.88



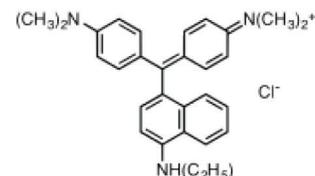
5) マラカイトグリーン  
LogP : 1.287



6) ローダミン B  
LogP : 1.781



7) クリスタルバイオレット  
LogP : 1.396



8) ビクトリアブルー R  
LogP : 3.066

図 1. このアプリケーションノートで使用した合成色素の化学構造

## 実験方法

### サンプルの説明

ストック溶液を 1 mg/mL で作製し、それらを合わせて最終的なサンプル濃度に行いました。酸性フクシン、マラカイトグリーン、フルオレセイン、フェノールレッドはそれぞれ 100 µg/mL でした。クリスタルバイオレット、ビクトリアブルー R、クレゾールレッドはそれぞれ 50 µg/mL でした。ローダミン B は 10 µg/mL でした。最終的なサンプル希釈剤は 95:5 水：アセトニトリルでした。

### LC 条件

LC システム:

TUV 検出器搭載 Alliance HPLC システム

検出:	UV @ 260 nm
カラム:	XBridge Premier BEH™ C <sub>18</sub> カラム 3.5 μm、4.6 × 100 mm (製品番号: 186010660) XBridge Premier BEH Phenyl カラム 3.5 μm、4.6 × 100 mm (製品番号: 186010676) XBridge Premier CSH C <sub>18</sub> カラム 3.5 μm、4.6 × 100 mm (製品番号: 186010643)
カラム温度:	30 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	10 μL
流速:	2.0 mL/分
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
移動相 D:	2% ギ酸水溶液または 200 mM 水酸化アンモニウム水溶液
グラジエント条件:	5% で一定の D で添加剤の濃度を維持します。16.43 分で 5 ~ 95% B/C の直線ランプ。95% 有機を 2.7 分間ホールドし、0.02 分で 5% 有機に戻します。5.51 分間カラムを再平衡化します。合計実行時間: 25 分

## データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア: Empower™ 3 Feature Release 5

## 結果および考察

サンプル分析の前に、分析法開発の目標を決める必要があります。この化合物の混合物では、良好なピーク形状でベースライン分離を達成することが必要です。使用しているシステムには質量分析計やフォトダイオードアレイが搭載されていないため、標準試料の注入によってピークが同定できるように、化合物を完全に分離できることが重要です。この研究では、開発には個別の標準試料を使用し、最適化にはこれらを合わせた混合物を使用しました。図2に、体系的スクリーニングプロトコルの詳細を示しています。

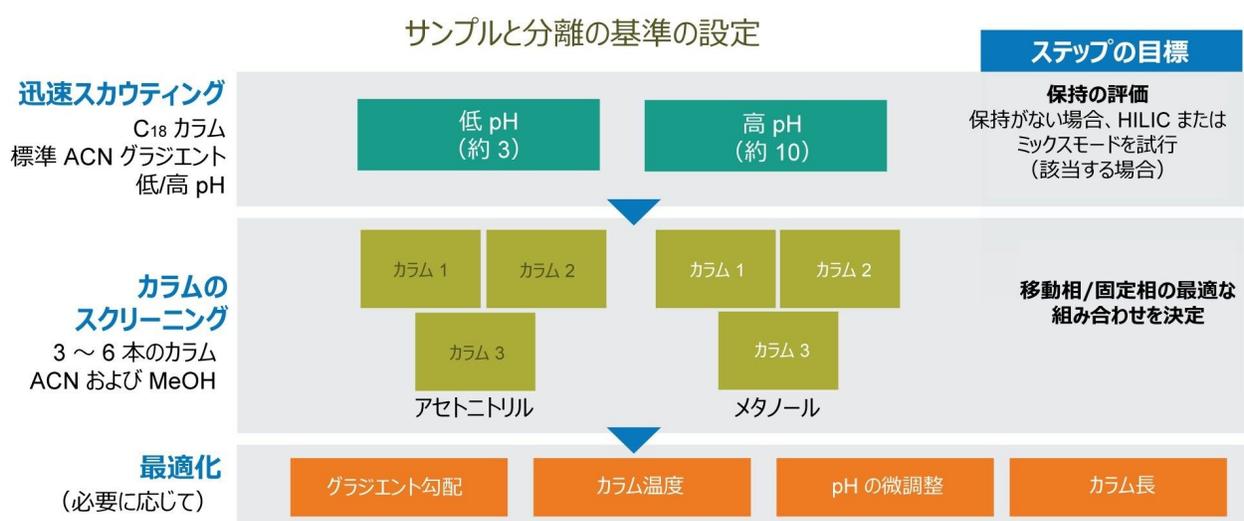


図 2.体系的スクリーニングプロトコルの概要

分析法の基準が決まったら、高 pH および低 pH の両方における分析種の保持を評価するための迅速なスカウティング実験が必要になります。これを行うには、高 pH で安定な固定相が必要です。純粋なシリカ固定相は、高 pH ではシリカの溶融によりカラムが劣化するため、この条件では安定しません。また、簡素化のため、カラムには、他の二次的相互作用ではなく、疎水性のみに基づいて化合物が保持される C<sub>18</sub> リガンドを使用する必要があります。この研究では、XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラムを選択しました。BEH 粒子が高 pH で安定しているだけでなく、MaxPeak HPS ハードウェアの採用により、分析種とカラム内の金属表面の間の二次的相互作用が低減します。これらの化合物の迅速なスカウティングの結果を図3に示します。

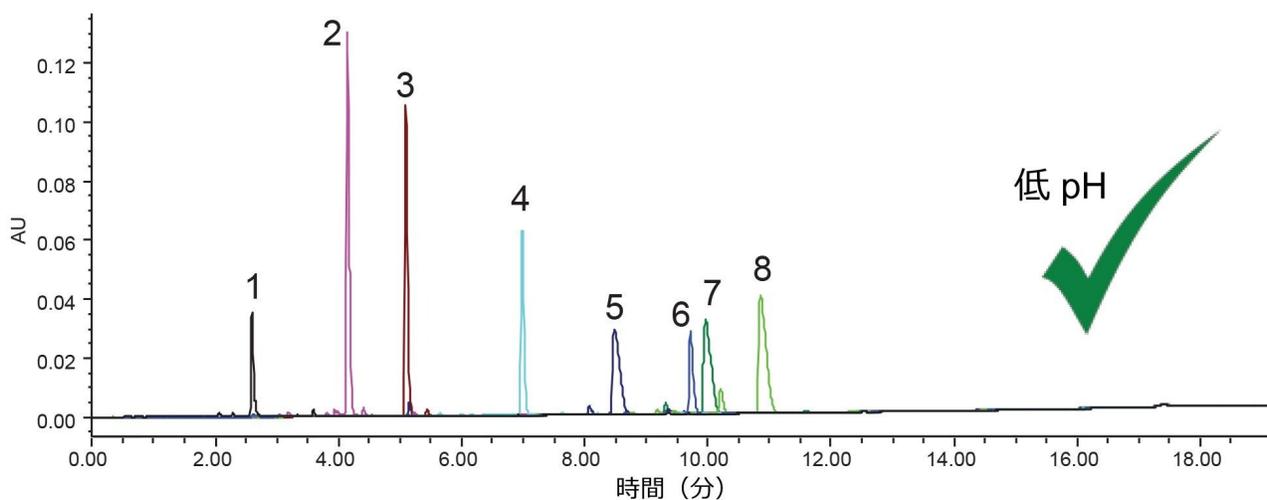
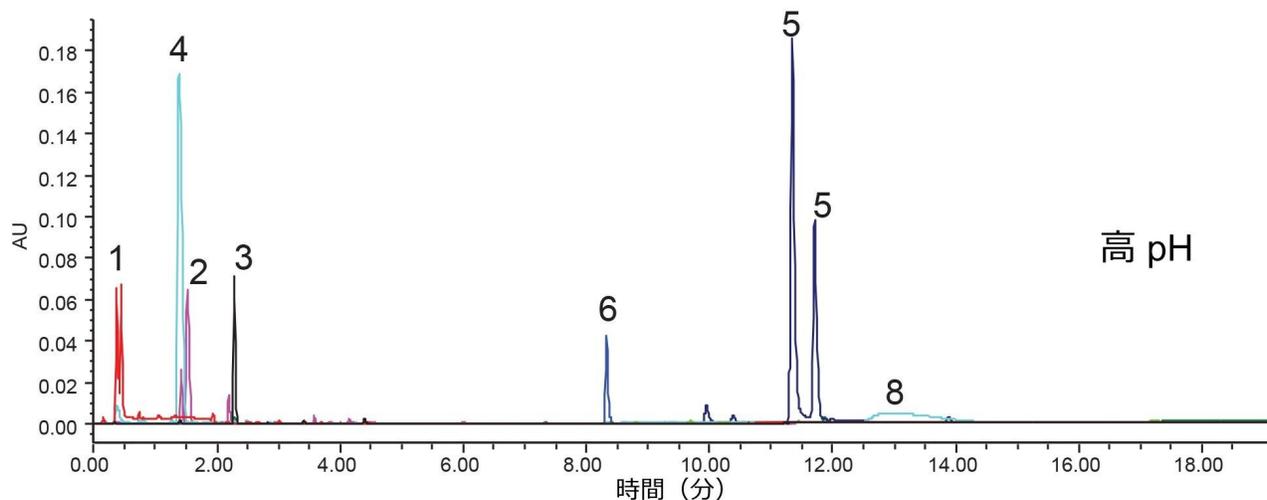


図 3. XBridge Premier BEH  $C_{18}$ 、 $4.6 \times 100$  mm、 $3.5 \mu\text{m}$  カラムへの、低 pH および高 pH での単一の標準試料注入の重ね描き。1) 酸性フクシン、2) フェノールレッド、3) クレゾールレッド、4) フルオレセイン、5) マラカイトグリーン、6) ローダミン B、7) クリスタルバイオレット、8) ピクトリアブルー R。

ギ酸移動相を使用した低 pH 試験で、これらの分析種について全体的に最適な保持が得られています。高 pH では、酸性フクシン（ピーク 1）は、化合物のすべての酸性部位が荷電して非常に極性が強くなるため、保持されません。さらに、クレゾールレッド（3）、フェノールレッド（2）、フルオレセイン（4）などの化合物も、高 pH では酸性部位の荷電によって極性が強まるため、保持されにくくなります。酸性フクシン、クレゾールレッド、フェノールレッドのスルホン酸基は、フルオレセインのカルボン酸基とともに、中性 pH または低 pH では部分的にしか荷電しませんが、高 pH では完全に荷電します。また、ピクトリアブルー R（8）、クリスタルバイオレット（7）などの一部の化合物は、

高 pH でよりよく保持されます。図 3 において、ピーク 8 はその標準試料の注入ウィンドウ外に溶出しており、シーケンスの次のサンプルと同じ分析で溶出しています。これによって、この化合物が非常に幅の広い小さなピークになっていることが説明できます。このピークは注入間でキャリアオーバーされており、大量のバンドの広がりにつながったと考えられるためです。クリスタルバイオレット (7) は、その標準試料の注入ウィンドウ外に溶出していますが、後続の注入では検出されていません。UV データが収集されない注入と注入の間に化合物が溶出している、あるいはバンドの広がりによってピークが完全に平らになり、検出できなくなっている可能性のいずれかが考えられます。最後に、高 pH により、マラカイトグリーンにピーク割れ効果が出ていますが、これは完全には説明できません。オフライン MS 分析では、この化合物が水和されていることが示されていますが、本研究の範囲外であるため、それ以上の分析は行いませんでした。

高 pH では問題が見られたことから、これ以降の試験には低 pH を選択しました。図 3 からわかるように、低 pH では、塩基性分析種のピーク形状が多少悪くなっているものの、良好な分離が得られています。このオーバーロードしているピーク形状は、これらの化合物のアミン官能基と BEH ベースパーティクルの間の二次的相互作用によるものです。荷電した塩基性部位が、ベースパーティクル上の遊離シラノールと相互作用して、ピークのテーリングを引き起こすことがあります<sup>7-9</sup>。

プロトコルの次のステップに移り、追加のカラムを 2 本選択して、これらの化合物を低 pH で分析しました。次に、XBridge Premier BEH Phenyl カラムを選択しました。結合リガンドによりこれらの化合物に対して独自の選択性が得られる可能性があるためです。各分析種に複数のフェニル環があるため、特にメタノール移動相を使用する場合、Phenyl 固定相が、疎水性相互作用だけでなく、 $\pi$ - $\pi$  相互作用を介してこれらを保持することができます。最後に XSelect™ Premier CSH<sub>18</sub> カラムを選択しました。このカラムは、前に使用したものと結合リガンドが同じですが、ベースパーティクルが異なります。CSH 粒子にはわずかに正電荷が含まれます。これにより、塩基性プローブと粒子の間の二次的相互作用が抑えられ、ピーク形状が改善するはずですが、さらに、粒子が荷電しているため、イオン交換機能が多少あって、これが酸性プローブの保持に役立ちます。図 4 に、選択した 3 種類のカラムでの、メタノールを使用した場合の分析種の分離を示します。

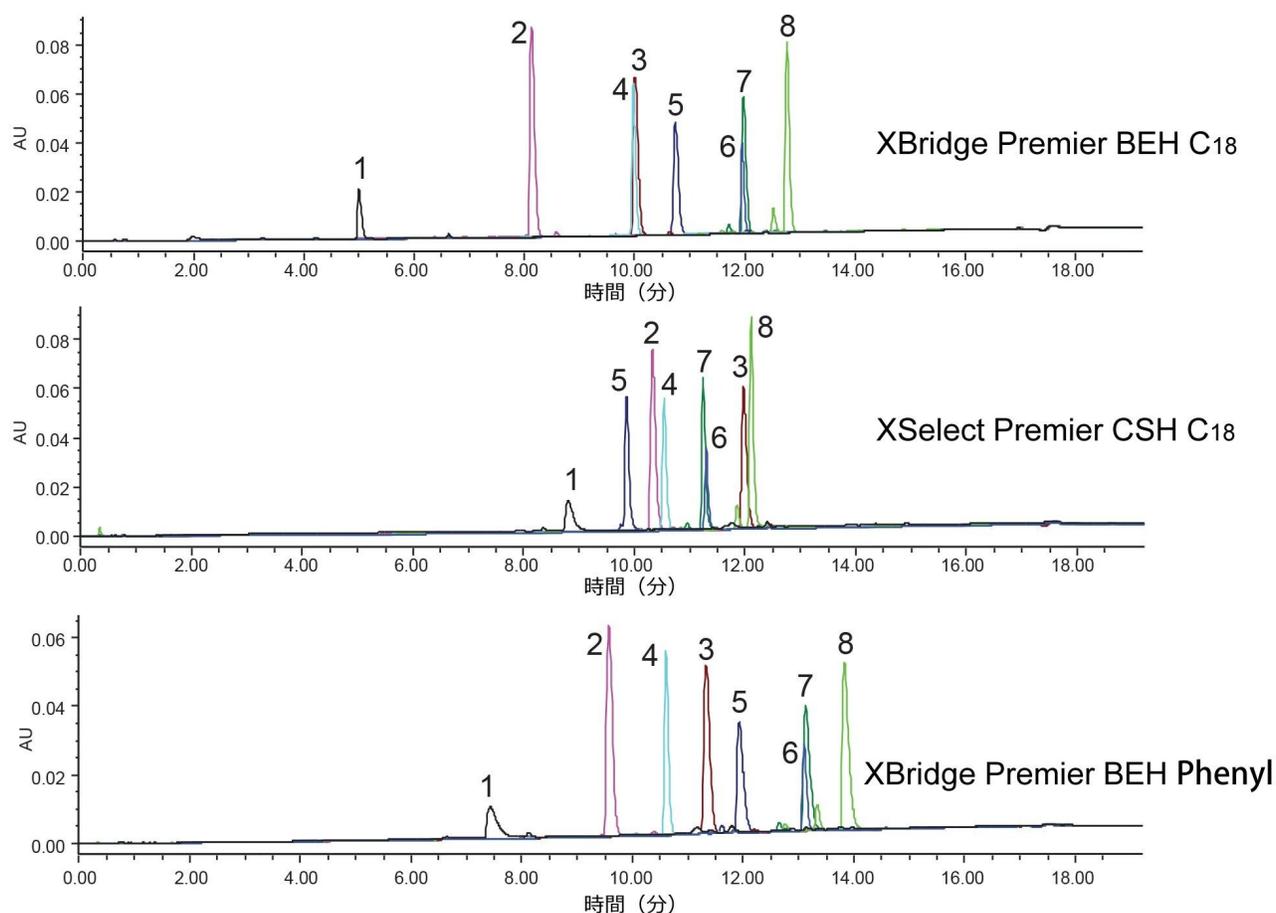


図 4.メタノール移動相を使用した場合の、低 pHでの単一の標準試料注入の重ね描き。1) 酸性フクシン、2) フェノールレッド、3) クレゾールレッド、4) フルオレセイン、5) マラカイトグリーン、6) ローダミン B、7) クリスタルバイオレット、8) ピクトリアブルー R。

これらの化合物について、3つの固定相の選択性の違いを判定することができます。まず、XSelect Premier CSH Premier C<sub>18</sub> カラムを使用したことで、塩基性プローブ（5～8）のピーク形状が改善されましたが、これらのプローブの保持がわずかに低下しました。一方、酸性プローブ（1～4）は、BEH C<sub>18</sub> カラムと比較して、CSH C<sub>18</sub> カラムでより強く保持されます。残念ながら、これらの化合物の混合物では、酸性プローブの保持が強まり塩基性プローブの保持が弱まることで化合物が共溶出するため、この違いは役に立ちません。XBridge Premier BEH Phenyl カラムも、BEH C<sub>18</sub> と異なる独自の選択性を示し、すべてのプローブがより強く保持されます。さらに、Phenyl カラムでは、BEH C<sub>18</sub> とは異なり、クレゾールレッド（3）とフルオレセイン（4）のピークが分離しています。残念ながら、メタノール移動相を使用すると、どのカラムでも良好な分離が得られませんでした。図 5 に、同じ 3 種類のカラムを用い、アセトニトリル移動相を使用した場合のサンプルの分離を示します。

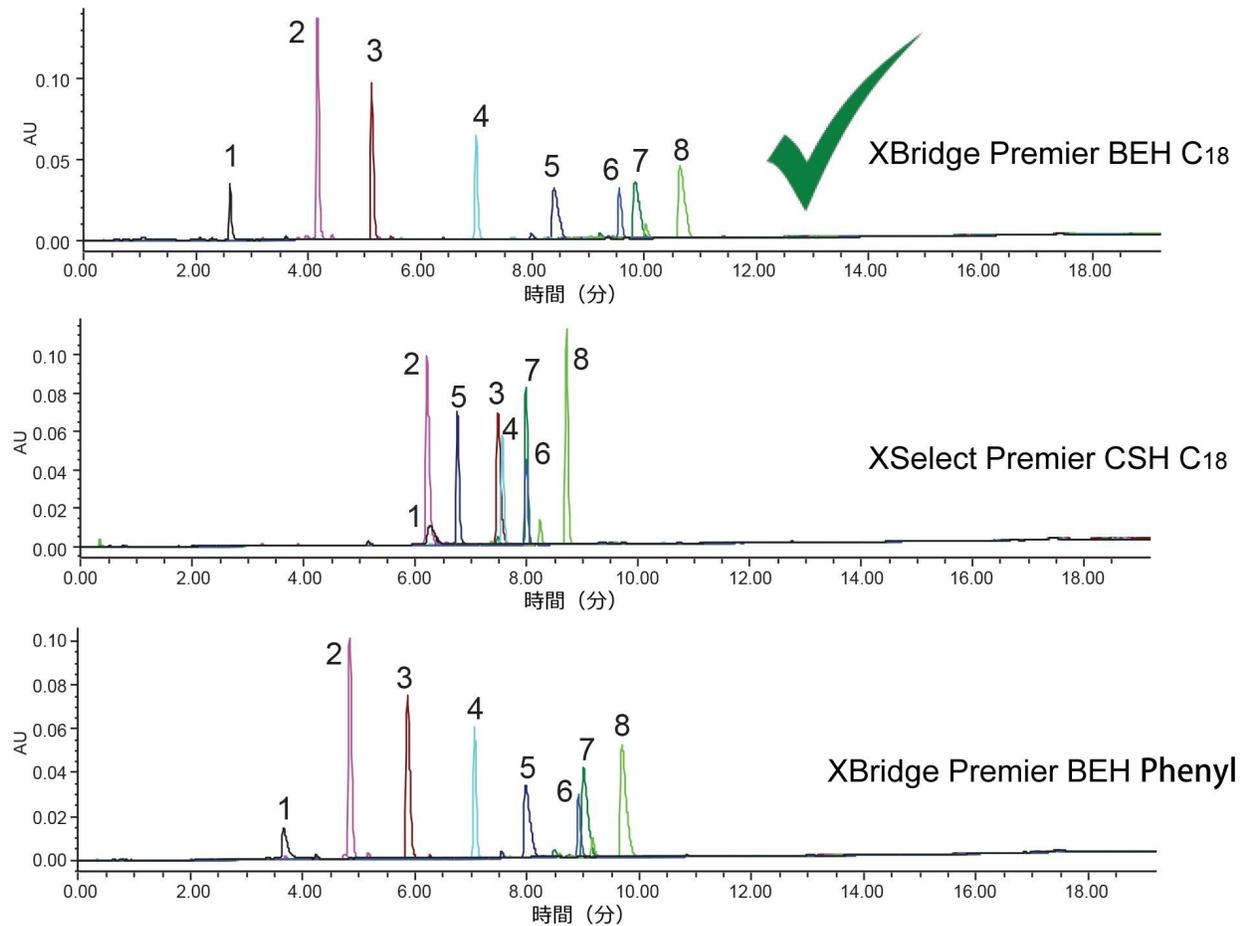


図 5. アセトニトリル移動相を使用した場合の、低 pH での単一の標準試料注入の重ね描き。1) 酸性フクシン、2) フェノールレッド、3) クレゾールレッド、4) フルオレセイン、5) マラカイトグリーン、6) ローダミン B、7) クリスタルバイオレット、8) ビクトリアブルー R。

アセトニトリル移動相でも、メタノールの場合と同様の結果が得られました。CSH C<sub>18</sub> カラムは、この条件でもイオン性相互作用を示し、これが保持とピーク形状の両方に影響しています。しかし、以前に示したように、これによってかなりの量のプローブの共溶出が起きます。アセトニトリル移動相を使用する場合、Phenyl 固定相は BEH C<sub>18</sub> ほど独自の選択性を示しません。Phenyl 相の独自の保持メカニズムは  $\pi$ - $\pi$  相互作用が主であり、アセトニトリルを使用するとこの相互作用が妨げられます。アセトニトリルにはかなりの量の  $\pi$  電子が含まれており、これによって分析種が固定相から「マスク」され、二次的な保持メカニズムが妨げられます。このような二次的相互作用がなければ、Phenyl リガンドでは、ビクトリアブルー R (8) のような疎水性が強いプローブの保持が若干弱くなります。酸性プローブ (1 ~ 4) は、C<sub>18</sub> よりも Phenyl 相に若干強く保持されますが、これはおそらくリガンドの疎水性とプローブの極性の違いに起因します。

妥当な分離が得られるカラムと移動相の唯一の組み合わせは、BEH C<sub>18</sub> カラムとアセトニトリルの使用になります。この組み合わせを最適化に選択し、分離性能を維持しつつ塩基性プローブのピーク形状を改善することを目標に決めました。これらのプローブのピーク形状を改善する方法の1つは、バッファー移動相を使用し、pHを低く保つことです。この場合は、異なる2つの濃度のギ酸アンモニウム (pH 3.0) を試験しました。これを行うには、グラジエントプロフィールを5～90% Bになるように調整し、移動相 D ラインを使用して、バッファー濃度を制御しました。図6に、先の0.1% ギ酸および異なる2つの濃度のギ酸アンモニウム (pH 3) バッファーを使用した場合の分析法最適化の結果を示します。

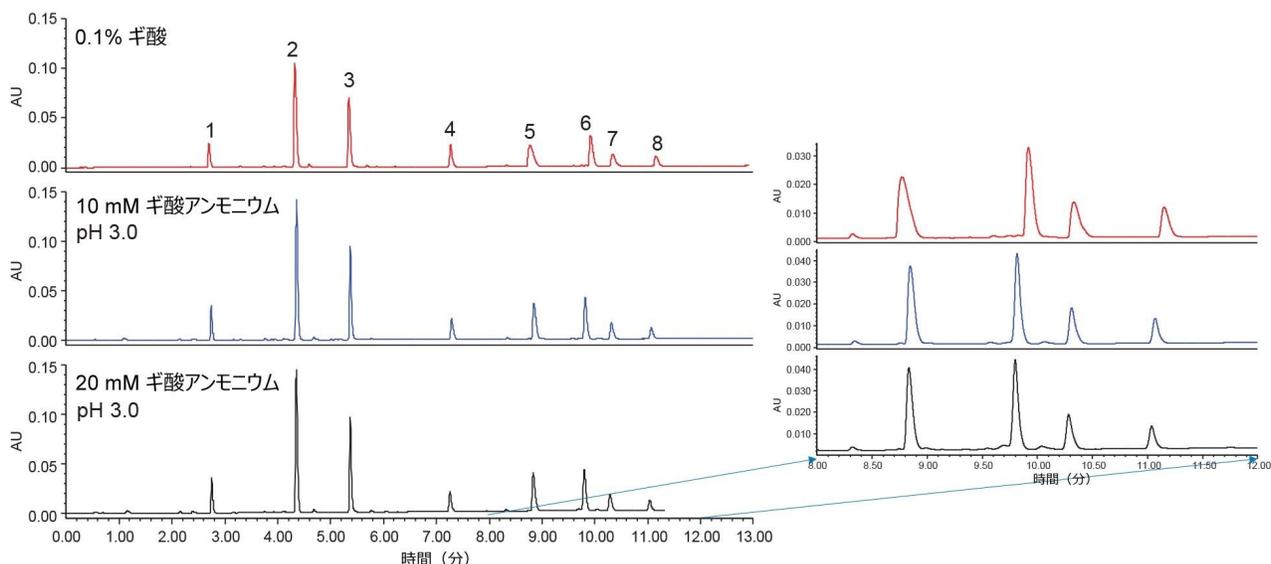


図6. XBridge Premier BEH C<sub>18</sub> カラムで、アセトニトリル移動相およびさまざまな移動相添加剤を使用して分離されたサンプル混合物。実験セクションに示した時間にわたる5～90% Bのグラジエントプロフィール。1) 酸性フクシン、2) フェノールレッド、3) クレゾールレッド、4) フルオレセイン、5) マラカイトグリーン、6) ローダミン B、7) クリスタルバイオレット、8) ビクトリアブルー R。

0.1% ギ酸を使用した結果では、塩基性プローブと BEH 粒子の間に二次的相互作用が引き続き見られます。これらの影響は、ピークテーリングおよびわずかなオーバーロード特性として見られます。一方、バッファー移動相を使用すると、これらの影響が軽減されます。10 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0) 添加剤により、これらのプローブのピーク形状の問題が大幅に軽減される一方で、保持および選択性はほとんど影響を受けません。ピーク形状の改善により、この分析法の基準が満たされ、開発を終了することができます。これでこの分析法は、サンプルの分析に使用することも、バリデーション作業に移すこともできます。体系的スクリーニングプロトコルと MaxPeak Premier カラムを使用して、構造的に類似した8種類の合成色素のための分析法を開発しました。これらの化合物はさまざまな化学的性質を有しま

すが、骨格構造が同じであるため、分離が特に困難です。

---

## 結論

MaxPeak Premier カラムを使用して、構造的に類似した 8 種類の合成色素を分離しました。これらのカラムは HPLC フォーマットで入手できるようになり、分析種とカラムハードウェアの金属表面の間の二次的相互作用を低減できます。これにより、初回の注入から正確で再現性のあるデータが得られるため、分析法開発に適した出発点となります。これらのカラムを使用することで、問題なく新しい分析法を開発することができました。これでこの分析法は、さらにバリデーションを行うことも、サンプルの分析に使用することもできます。

---

## 参考文献

1. Hong P, McConville P. A Complete Solution to Perform a Systematic Screening Protocol for LC Method Development. Waters White Paper. [720005268](#) <  
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005268en.pdf>> .
2. Maziarz M, Rainville P. Efficient Method Development for the Analysis of Naphazoline Hydrochloride, Pheniramine Maleate, and Associated Related Substances using a Systematic Screening Protocol. Waters Application note. [720007850](#). January 2023.
3. Method Development of Ten Antibiotic Compounds Using a Systematic Screening Protocol on an ACQUITY Arc with UV and QDa Detection. Waters Application Note. [720007352](#). August 2021.
4. Delano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel A, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal. Chem.* 93 (2021) 5773–5781.
5. Walter TH, Alden BA, Belanger J, Berthelette K, Boissel C, DeLano M, Kizekai L, Nguyen JM, Shiner S. Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects. *LCGC Supplements* (2022) 28–34.
6. Zabala G, Berthelette K, Gu W, Haynes K. Improved Reproducibility for Acetaminophen Assay USP Monograph Using MaxPeak Premier Columns after Modernization to 2.5 µm Particles. Waters Application Note. [720007938](#). July 2023.

7. Fountain KJ, Hewitson H, Iraneta P, Morrison D. Practical Applications of Charged Surface Hybrid (CSH) Technology. Waters Application note. [720003720](#). September 2010.
8. Summers M, Fountain K. Improved Analysis of Goldenseal Root Extract Using Charged Surface Hybrid (CSH) Column Technology. Waters Application Note. [720004098](#). September 2011.
9. Alden BA, Isaac G, Chen W, Lauber MA. Lipid Nanoparticle Compositional Analysis Using Charged Surface Hybrid Phenyl-Hexyl Separation with Evaporative Light Scattering Detection. Waters Application Note. [720007331](#). August 2021.

---

## ソリューション提供製品

Alliance HPLC システム <<https://www.waters.com/534293>>

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720008098JA、2023 年 10 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)