

こんなことができる！
耐アルカリ性カラムによる
HPLC及びLC/MS分析の最新情報

一般財団法人化学物質評価研究機構
東京事業所 クロマト技術部

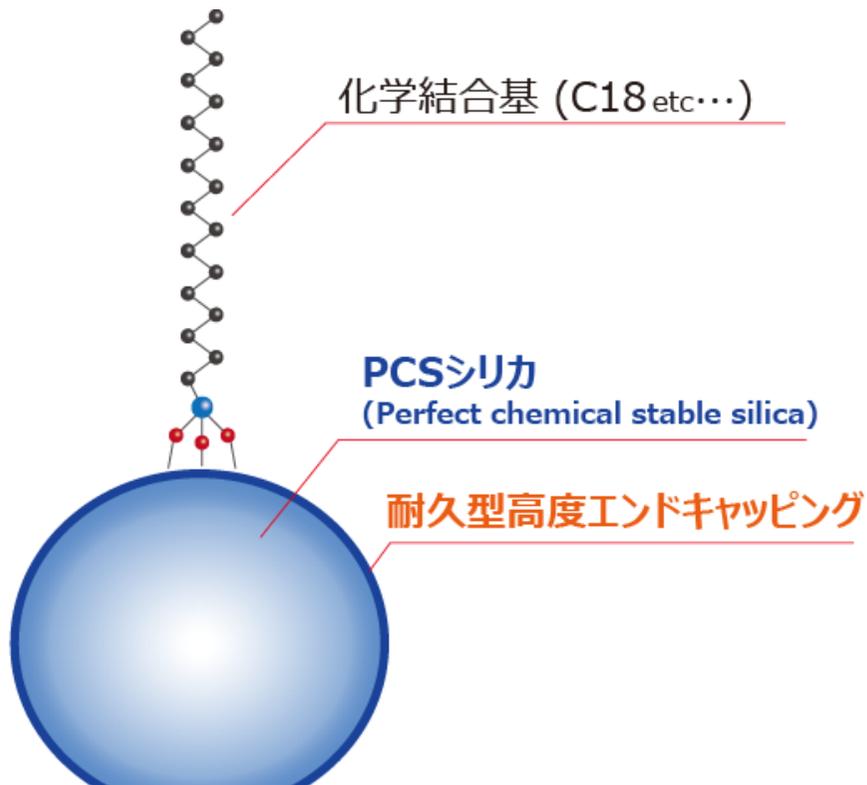
L-column3について

L-column3

移動相の使用可能なpH範囲

pH 1~pH 12

☆低吸着性



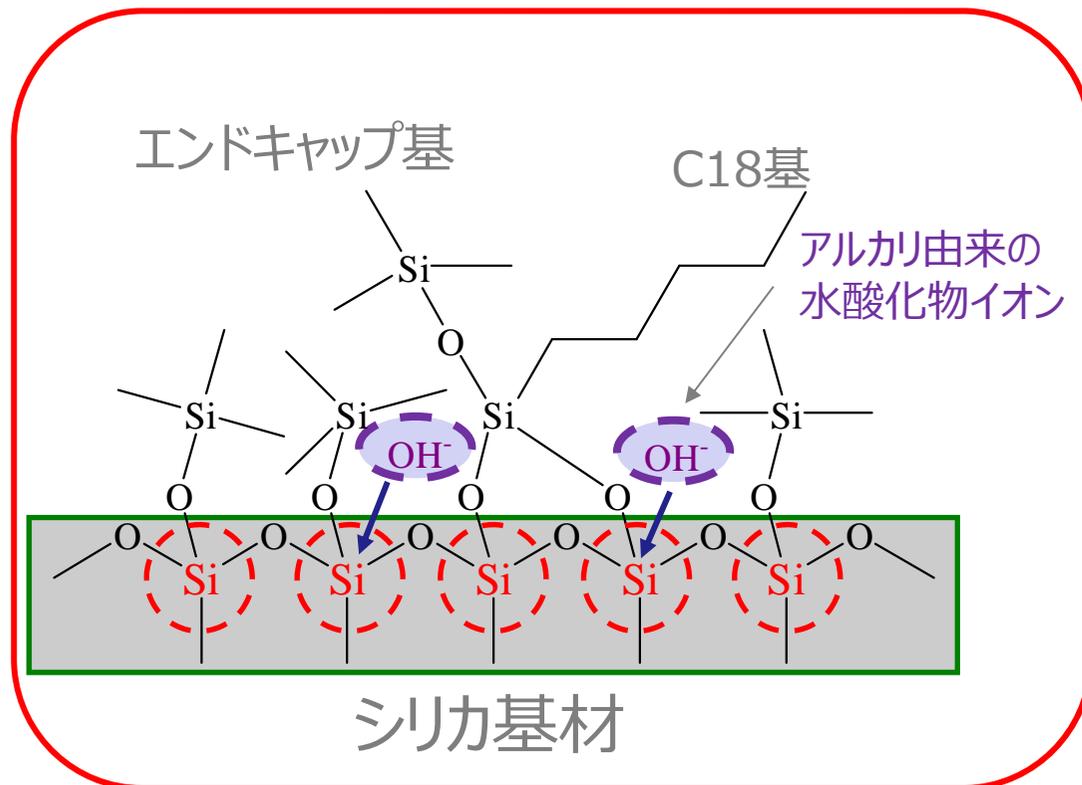
- 新開発の**PCSシリカ**
(Perfect chemical stable silica)
化学的耐久性（耐酸性、耐アルカリ性）が非常に高い全多孔性高純度シリカ
- 耐久型高度エンドキャッピング
L-column2 のエンドキャッピングの性能をさらに進化

移動相の使用可能なpH範囲 pH 1~pH 12

アルカリ性移動相によるシリカの劣化機構

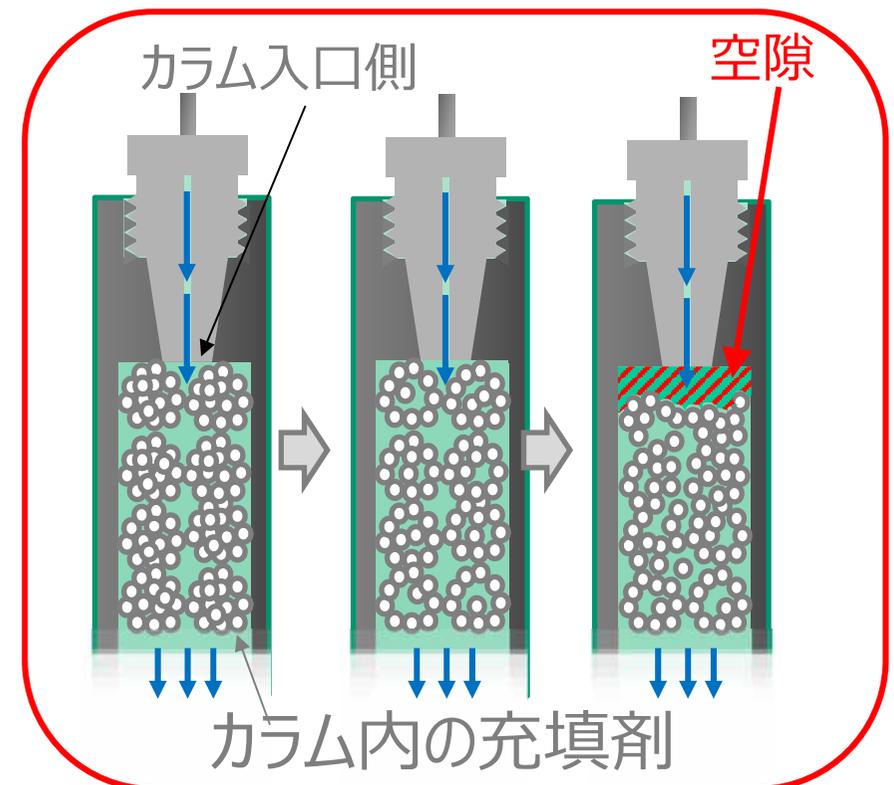
Step 1

アルカリ由来の水酸化物イオン
→ シリカ基材を侵食

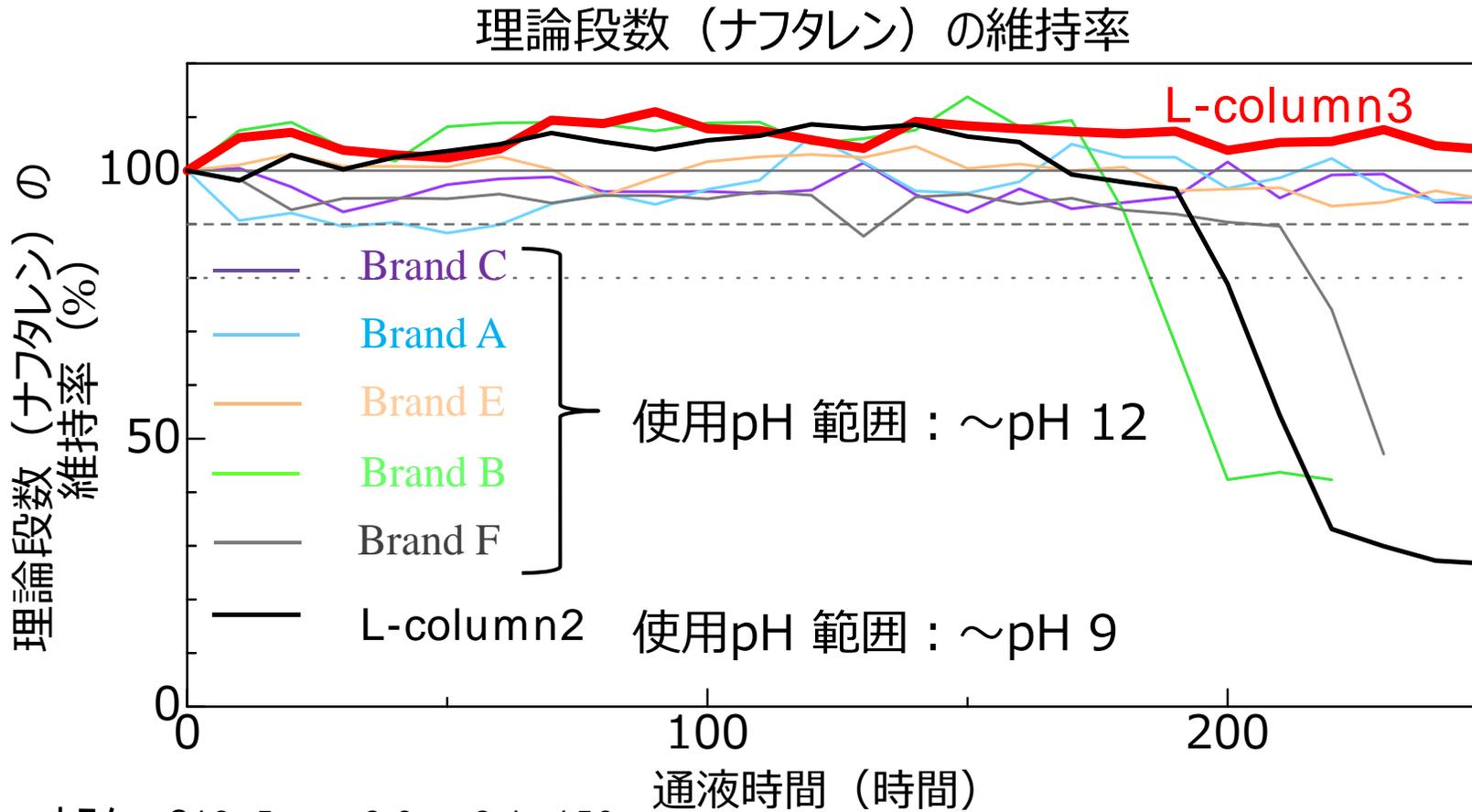


Step 2

シリカ基材が徐々に溶解
→ 空隙が発生して使用不能



L-column3の耐アルカリ性 通液劣化試験 トリエチルアミン (pH 12.2)



カラム : C18, 5 μ m, 2.0 or 2.1 \times 150 mm

【アルカリ溶液の通液条件】

移動相 : 54 mM トリエチルアミン pH 12.2 / メタノール (90/10) ; 流速 : 0.2 mL/min; カラム温度 : 50

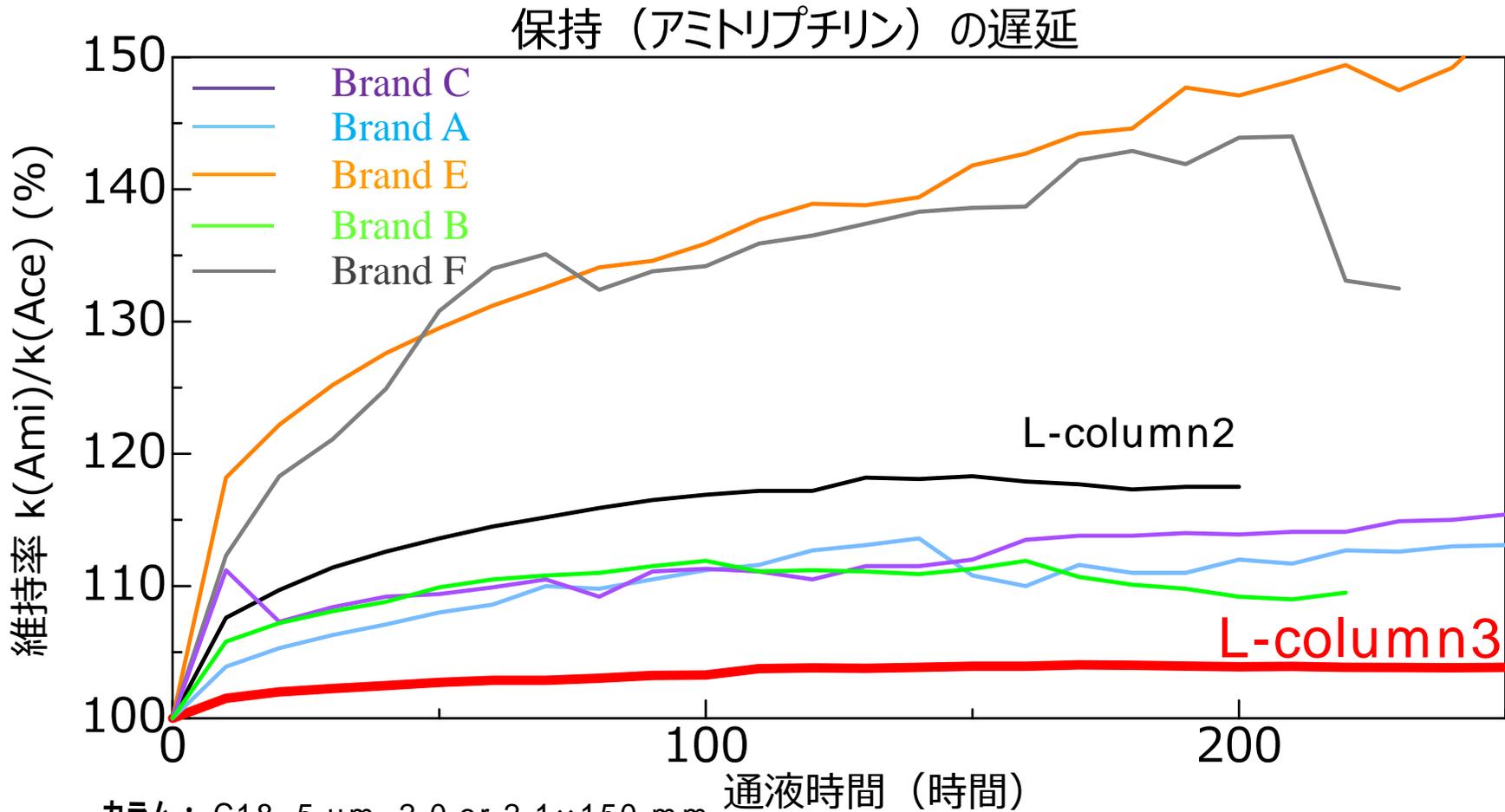
【分析条件】

移動相 : アセトニトリル/水 (60/40); 流速 : 0.2 mL/min; カラム温度 : 40 ; 検出 : UV254 nm

試料 : ナフタレン; 注入量 : 1 μ L

L-column3は250時間以上でも安定

L-column3の耐アルカリ性 通液劣化試験 トリエチルアミン (pH 12.2)



カラム : C18, 5 μ m, 2.0 or 2.1 \times 150 mm

[アルカリ溶液の通液条件]

移動相 : 54 mM トリエチルアミン pH 12.2 / メタノール (90/10) ; 流速 : 0.2 mL/min; カラム温度 : 50

[分析条件]

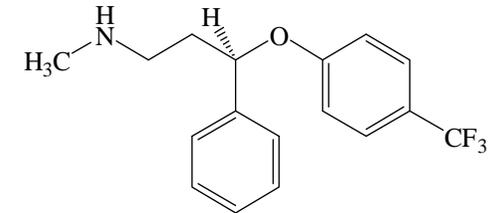
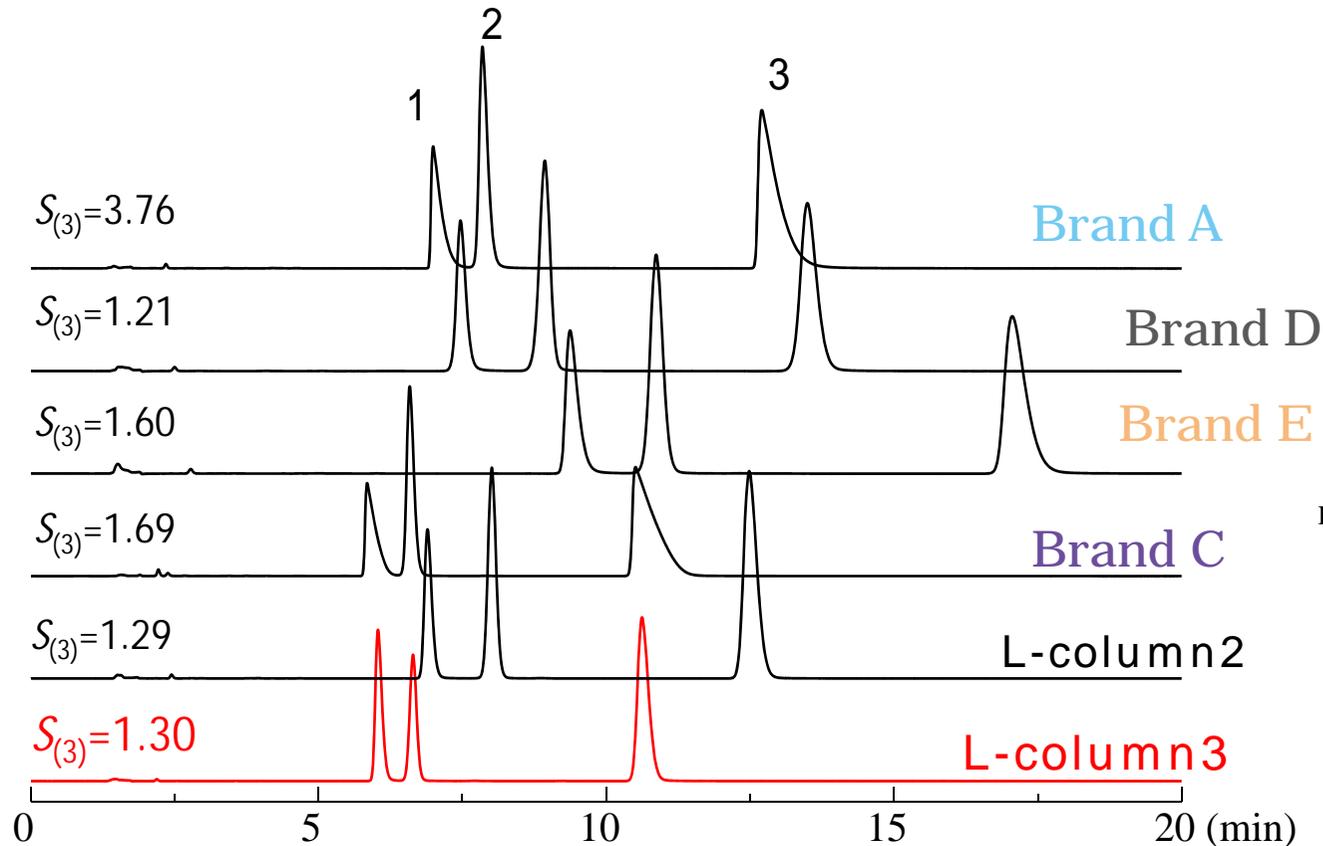
移動相 : メタノール / 25 mMリン酸緩衝液 (pH 7) (80/20); 流速 : 0.2 mL/min; カラム温度 : 40

検出 : UV254 nm; 試料 : アミトリプチリン; 注入量 : 1 μ L

L-column3の保持の遅延がL-column2と比較して大幅に改善

低吸着性

塩基性物質（残存シラノール基）



3. フルオキセチン

【分析条件】

カラム：C18 5 μm , 4.6 \times 150 mm; 移動相：アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 (pH 7) (35/65); 流速：1 mL/min
 カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$; 検出：UV 230 nm; 試料：1.パロキセチン、2.シタロプラム、3.フルオキセチン; 注入量：1 μL

残存シラノール基への吸着を抑えて、

テーリングのないシャープなピークを実現！

移動相のpHと分離パターン

解離性物質の分離を改善させたいときに・・・

➡ 酸性～アルカリ性移動相を使用することで、分離パターンが変化

試料

1. ケトプロフェン (酸性)
2. イブプロフェン (酸性), pKa 4.5
3. インドメタシン (酸性)
4. イソブチルパラベン (弱酸性)
5. フェキソフェナジン (両性), pKa 4.3, 9.5
6. フルボキサミン (塩基性)
7. トリプロリジン (塩基性)

分析条件

HPLC：島津NEXERA

カラム：L-column3 C18 5 μm、2.1×150 mm

移動相：

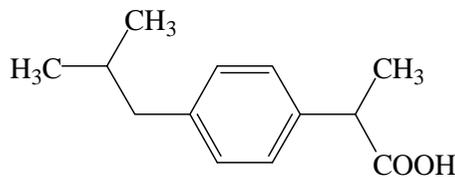
A：25 mMリン酸緩衝液 (pH 2, pH 7, pH 11)

B：アセトニトリル

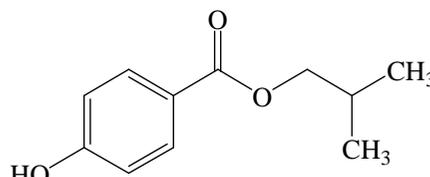
A/B：80/20-30/70 (0-20 min)

流速：0.3 mL/min；カラム温度：40℃

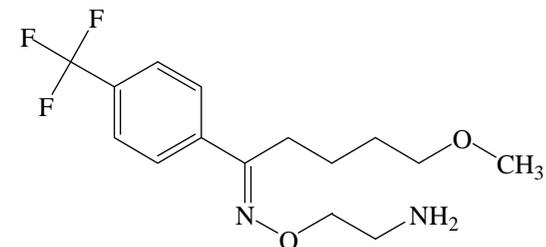
注入量：1 μL



2. イブプロフェン
pKa 4.5

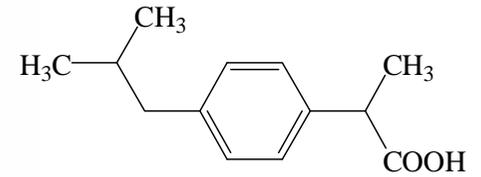
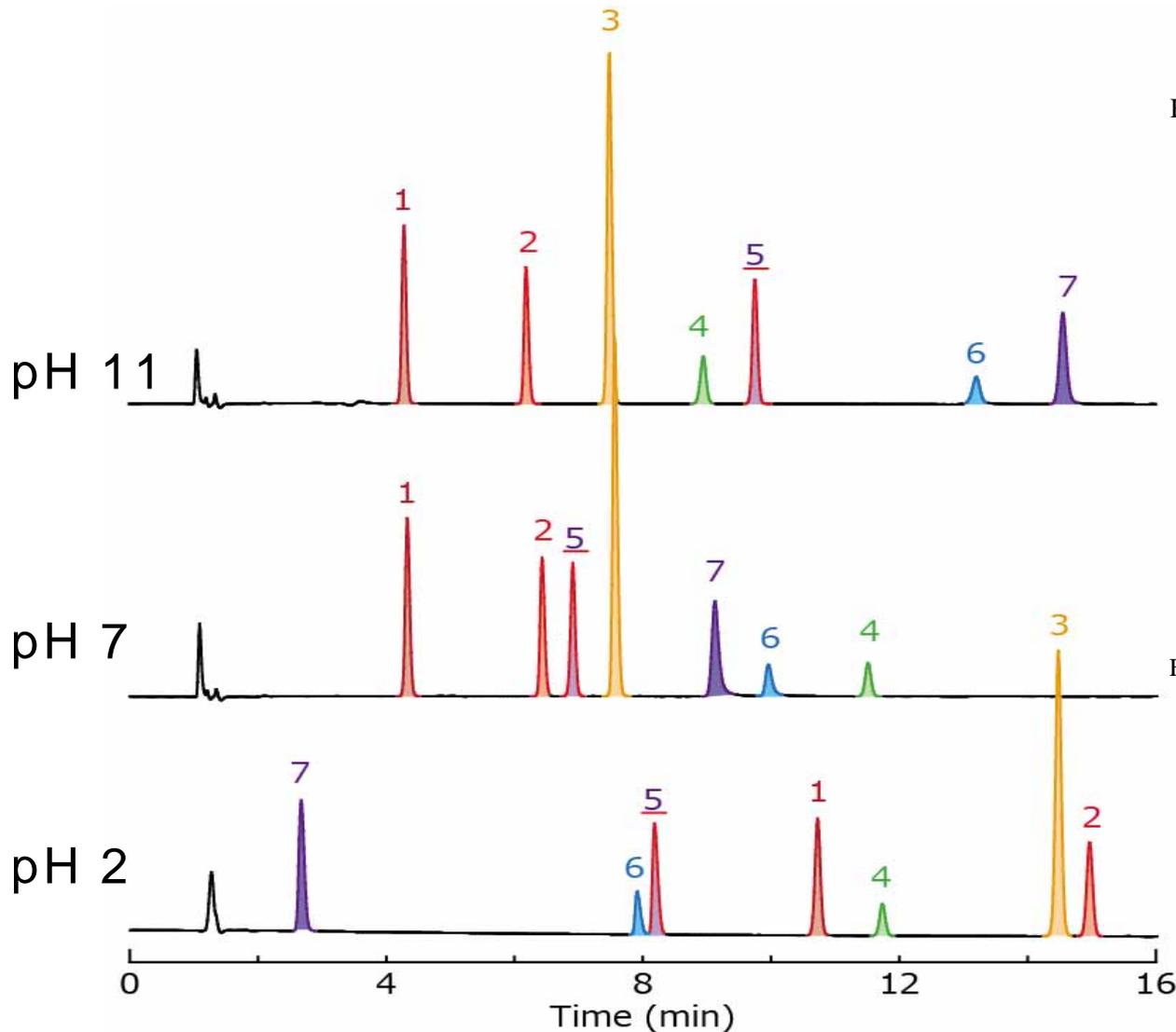


4. イソブチルパラベン

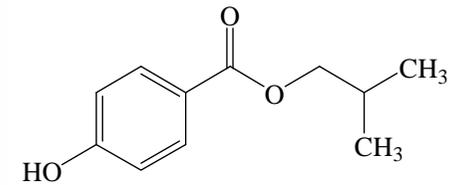


6. フルボキサミン

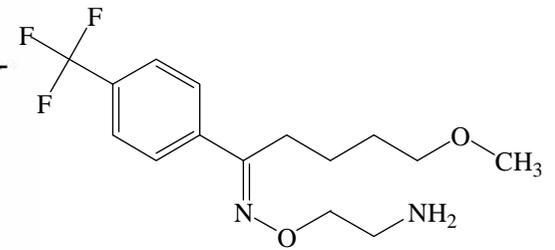
移動相のpHと分離パターン



2.イブプロフェン
pKa 4.5



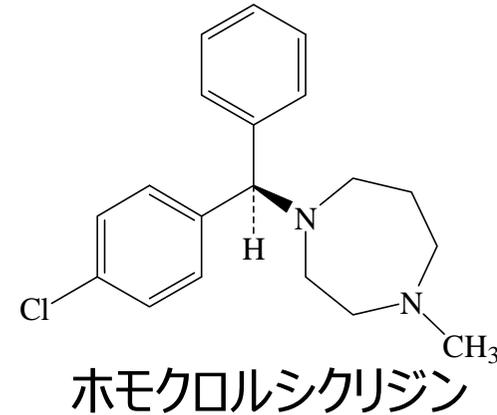
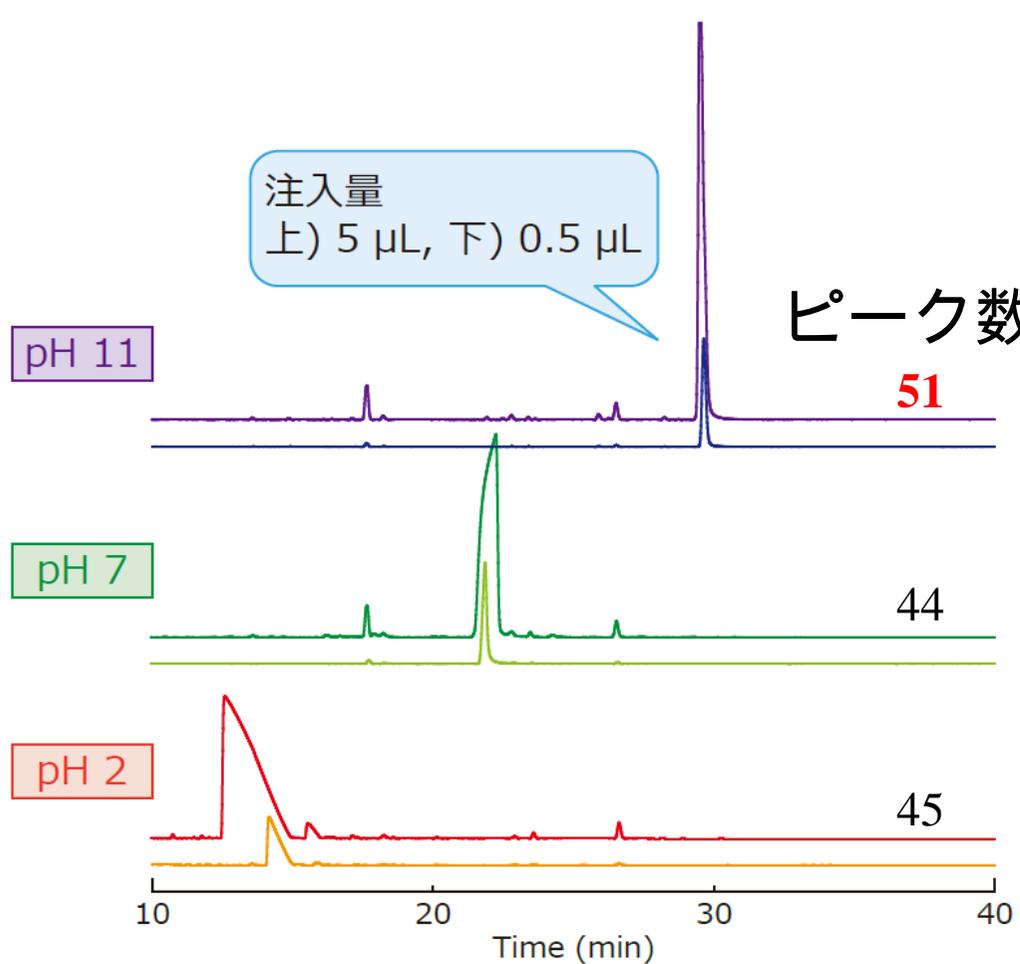
4.イソブチルパラベン



6.フルボキサミン

- 移動相のpHにより、分離パターンが変化
- フェノール性のOH基が解離

不純物分析



分析条件

HPLC : 島津NEXERA

カラム : L-column3 C18 5 μ m、2.1 \times 150 mm

移動相 :

A : 25 mM リン酸緩衝液 (pH 2, pH 7, pH 11)

B : アセトニトリル

A/B : 95/5-25/75-25/75 (0-30-40 min)

流速 : 0.2 mL/min ; カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 0.5, 5 μ L

試料 : 10 g/L ホモクロルシクリジンの分解物

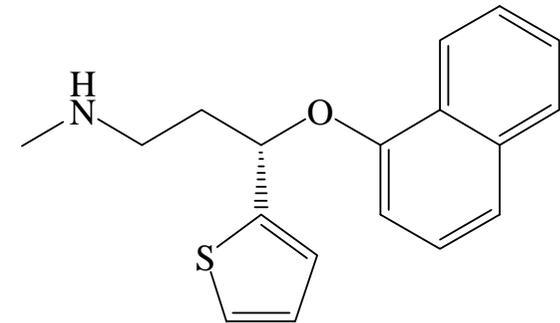
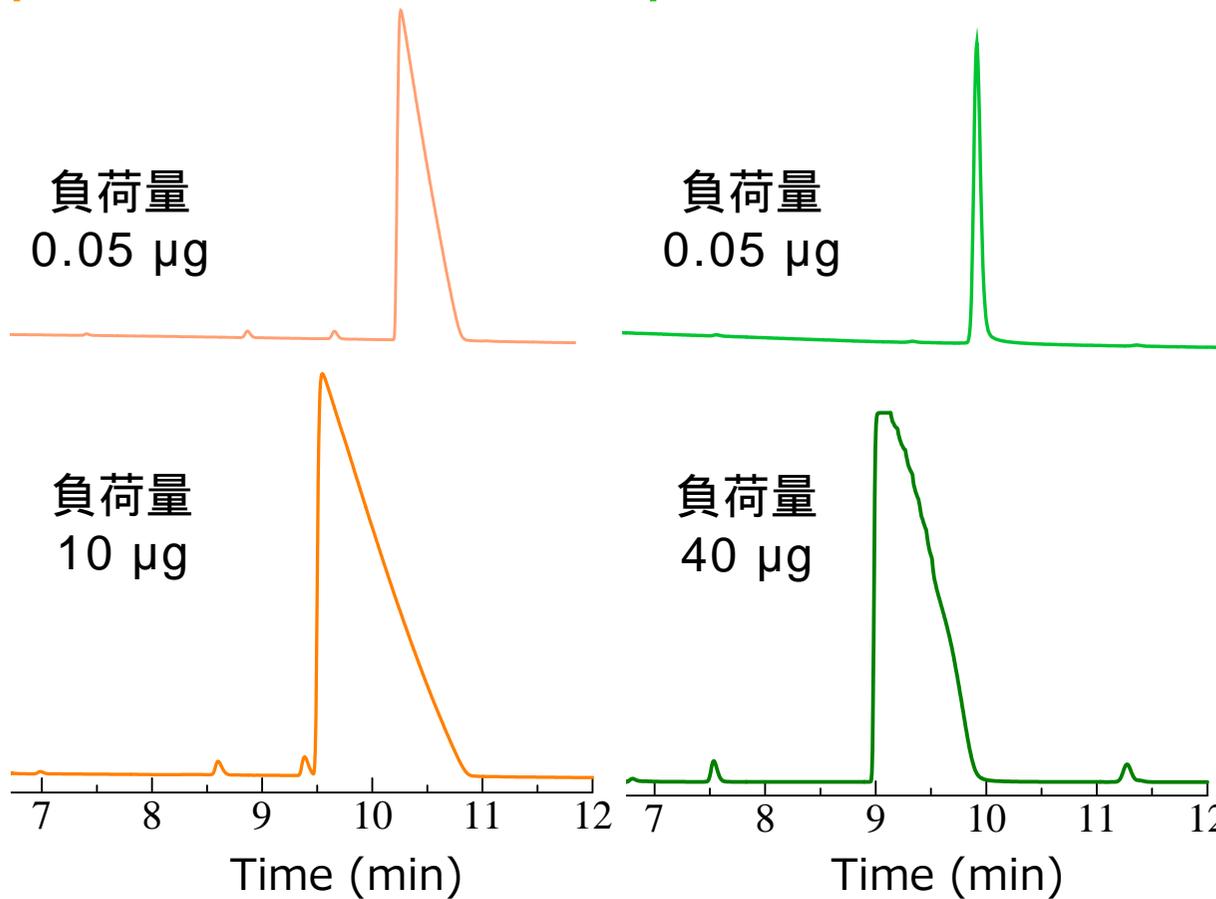
- 移動相pHを高くすることにより、多くのピークを分離・検出することが可能
- 医薬品などの不純物分析に有効

大量負荷における問題点

塩基性物質が解離する移動相のpHでは大量負荷することで、保持時間のズレやピーク形状が崩れる

pH 3

pH 7



デュロキセチン
pKa 8.1

分析条件

HPLC : 島津NEXERA

カラム : L-column3 C18 5 µm、4.6×150 mm

移動相 :

- ① pH 3 A:10 mMギ酸
B:アセトニトリル
A/B : 90/10-40/60 (0-15 min)
- ② pH 7 A:10 mMギ酸+アンモニア
B:アセトニトリル
A/B : 85/15-35/65 (0-15 min)

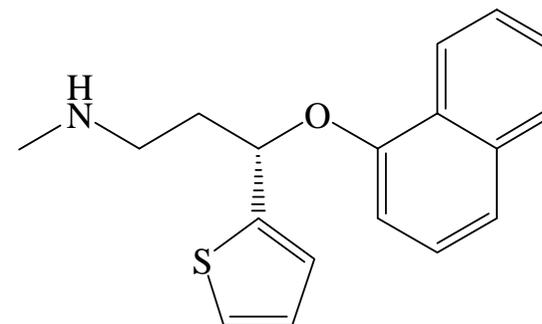
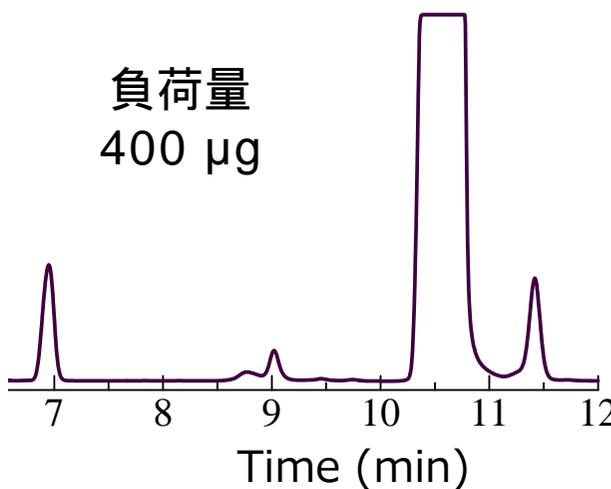
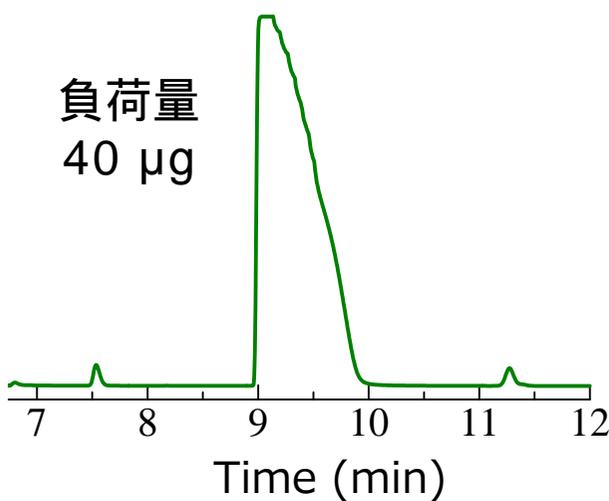
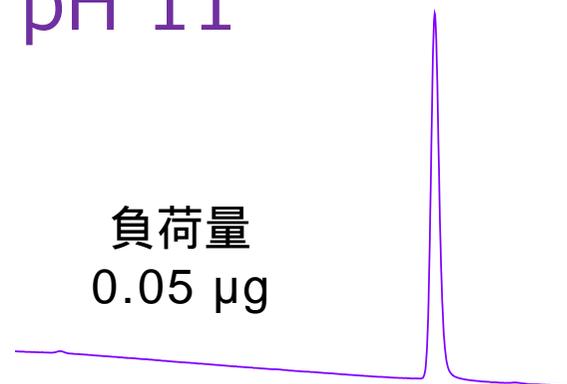
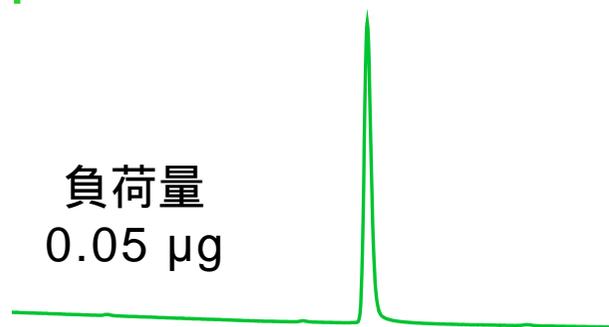
流速 : 1 mL/min ; カラム温度 : 40℃

保持時間にズレ

大量負荷における保持時間の変化

pH 7

pH 11



デュロキセチン
pKa 8.1

分析条件

HPLC : 島津NEXERA

カラム : L-column3 C18 5 µm、4.6×150 mm

移動相 :

① pH 7 A:10 mMギ酸+アンモニア
B:アセトニトリル

A/B : 85/15-35/65 (0-15 min)

② pH 11 A:10 mMギ酸+アンモニア
B:アセトニトリル

A/B : 70/30-20/80 (0-15 min)

流速 : 1 mL/min ; カラム温度 : 40°C

保持時間 : **ズレ**

保持時間 : **一致**

アルカリ性条件下（塩基性物質の解離が抑えられた状態）では、
大量負荷でも保持時間が変化しない

分取精製

アルカリ性移動相条件にてデュロキセチンを10 mg負荷

分析条件

カラム：L-column3 C18

5 μ m, 10 \times 150 mm

HPLC：島津NEXERA

移動相：

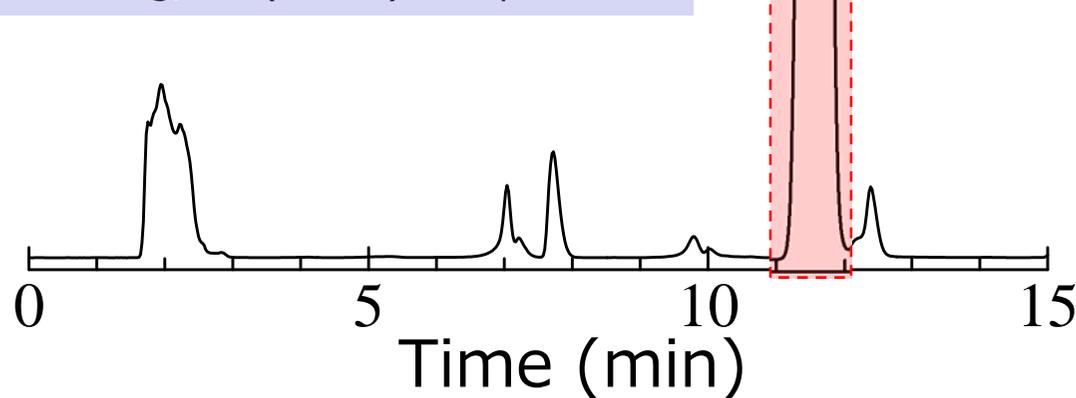
A：10 mMギ酸+アンモニア (pH 11)

B：アセトニトリル

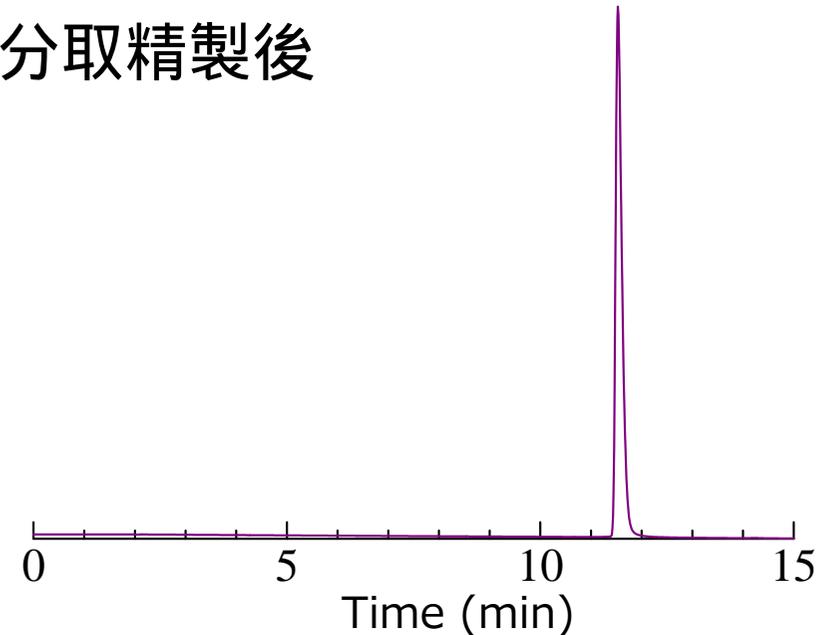
A/B：70/30 - 20/80 (0-15 min)

流速：4.0 mL/min；カラム温度：40 $^{\circ}$ C

試料：0.1 g/mL (DMSO) 100 μ L



分取精製後

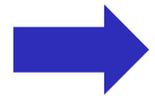


デュロキセチン純度
精製前 約90%
精製後 >99.9%

アルカリ性条件下では大量に負荷することができ、精製効率が向上

アンモニア水を用いたLC/MSによる感度の向上

低濃度の試料をより高感度に分析したい・・・



移動相にアンモニア水を使用することで、感度が向上

【農薬分析条件】

LC : Ultimate 3000 BioRS (Thermo Fisher Scientific K.K.)

カラム : L-column3 C18 3 μ m, 2.1 \times 150 mm

移動相 : A:5 mM アンモニア水 B: 5 mM アンモニア含有メタノール

A/B:85/15(0 min)-60/40 (1-3.5 min)-50/50(6 min)-
45/55(8 min)-5/95(17.5-30 min)

流速 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

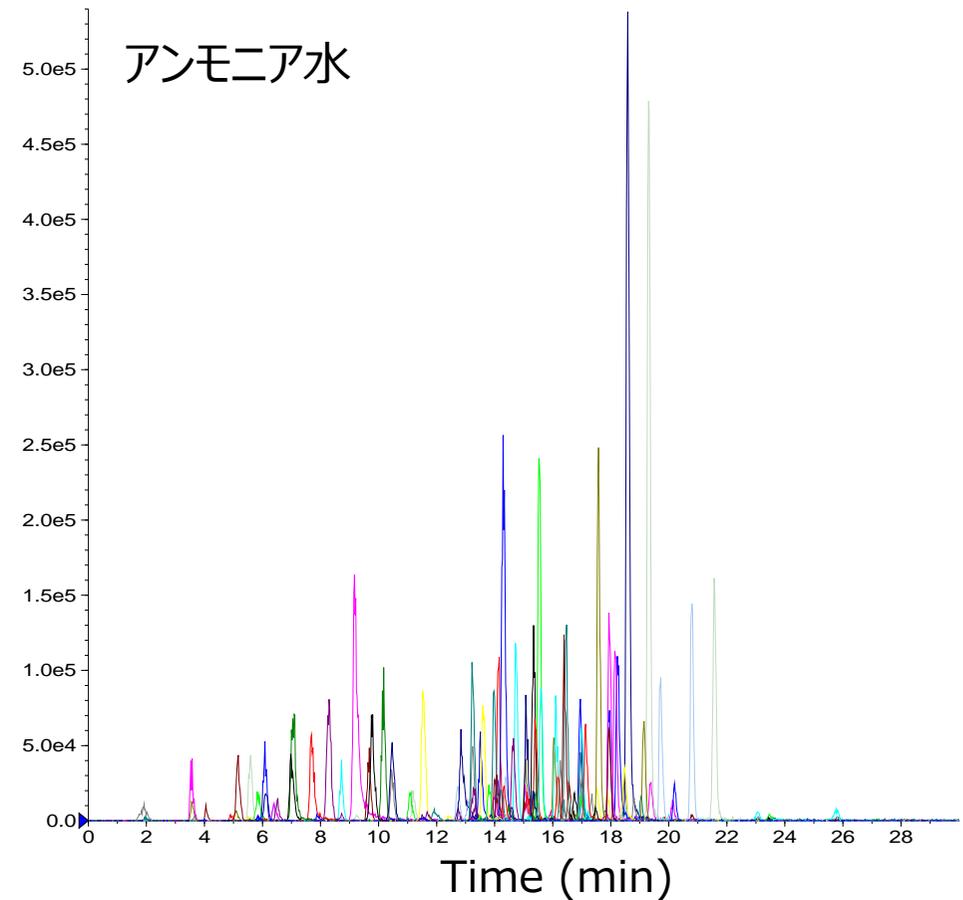
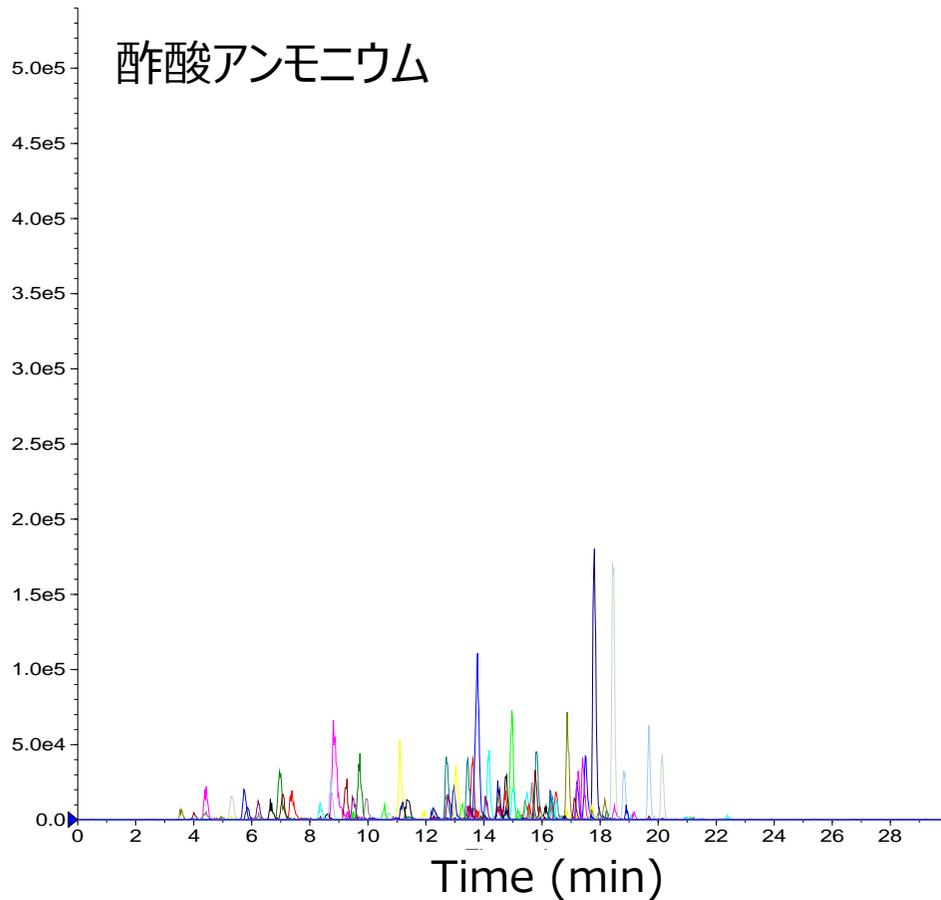
試料 : 0.1 mg/L 農薬117種 / 茶

注入量 : 5 μ L

MS/MS : 3200 QTRAP (SCIEX)

検出 : ESI-MS/MS (+)

アンモニア水を用いた移動相による農薬の一斉分析（茶）



アンモニア水を用いた移動相において
マトリクスに添加した農薬117種の**95%でS/Nが向上**（平均3.2倍）

まとめ

こんなことができる！ ①

移動相にアルカリ性移動相を用いることで今までとは異なる分離パターンが得られる

→医薬品などの不純物分析や分離に困っている方に最適

こんなことができる！ ②

移動相のpHを最適化することにより、負荷量を多くすることができる

→医薬品などの合成化合物の分取に最適

こんなことができる！ ③

LC/MS分析において、アンモニア水を使用することにより、感度の向上が得られる

→高感度、スクリーニング分析に最適