

HPLC及びLC/MS分析における 耐アルカリ性カラムを用いた 新たなアプローチ

従来のアプローチ

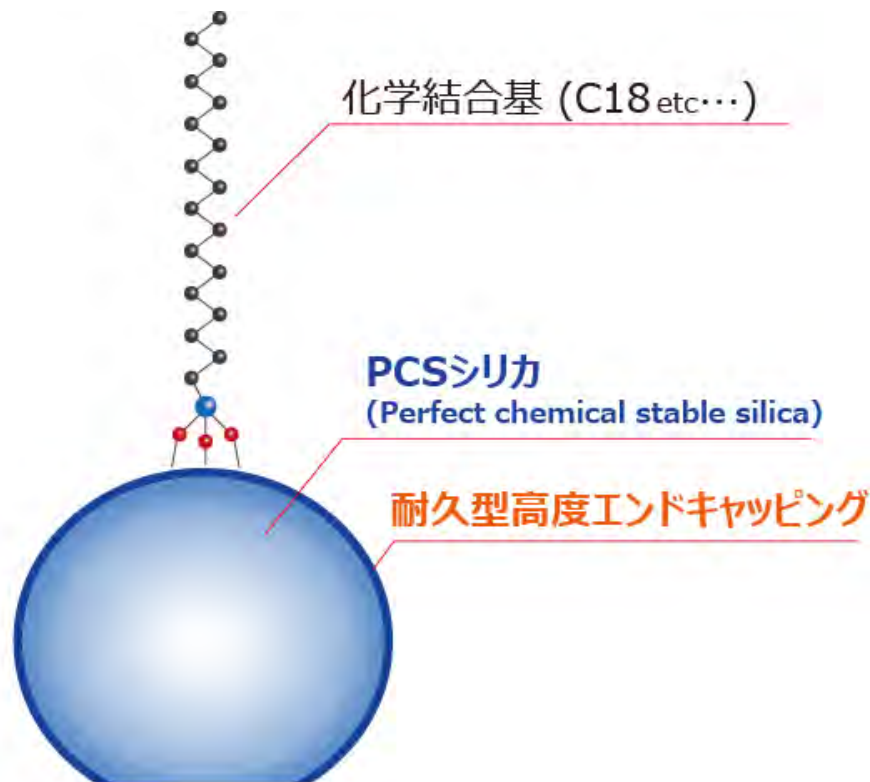
- ① 保持挙動を変えたい！成分間の分離を改善したい
 - ➡ 酸性～弱アルカリ性の溶離液を使用 or イオンペア試薬を使用
- ② 塩基性物質の分取精製をしたい！
 - ➡ 酸性～弱アルカリ性の溶離液を使用 or イオンペア試薬を使用
- ③ 検出感度を上げたい！
 - ➡ 大量注入や濃縮操作

新しいアプローチ

アルカリ性溶離液と耐アルカリ性カラム(*L-column3*)を組み合わせることですべて解決！！

L-column3 について

L-column3



- 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

特長①
溶離液の使用可能なpH範囲
pH 1～pH 12

特長②
低吸着性

溶離液の使用可能なpH範囲 pH 1～pH 12

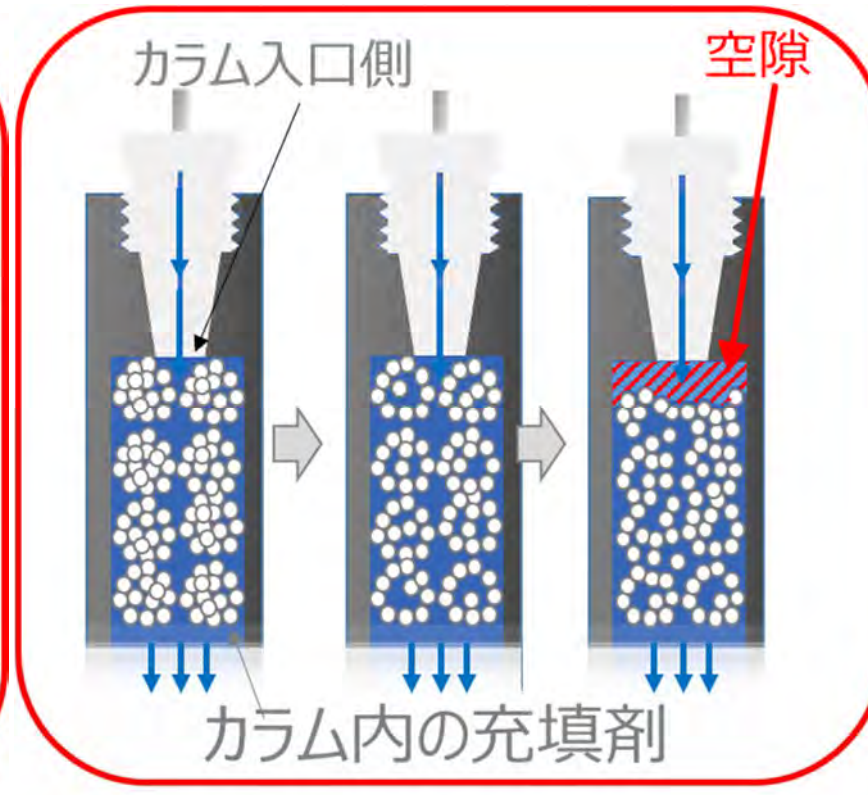
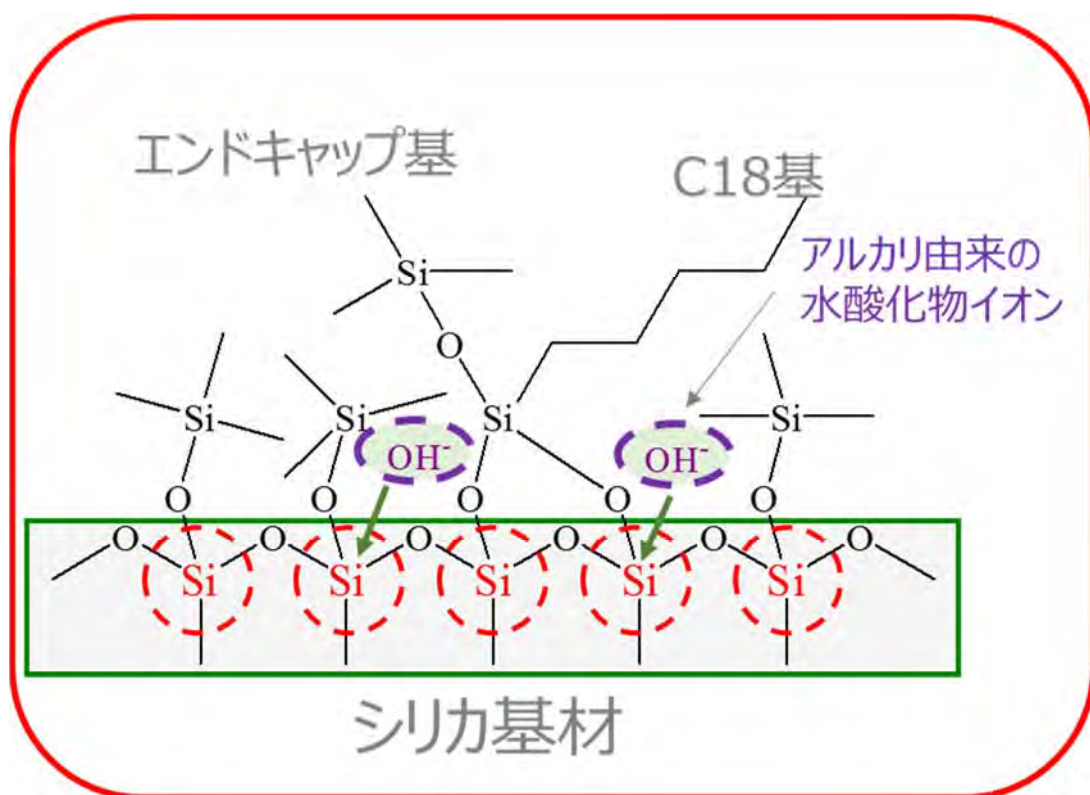
アルカリ性溶離液によるシリカ基材の劣化機構

Step 1

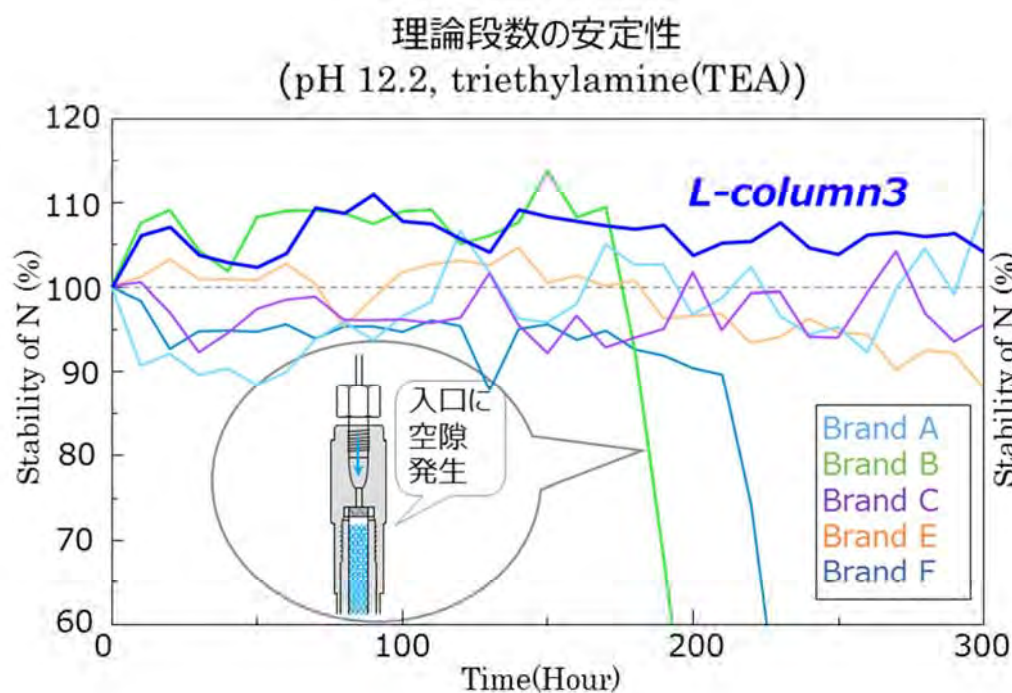
アルカリ由来の水酸化物イオン
→ シリカ基材を侵食

Step 2

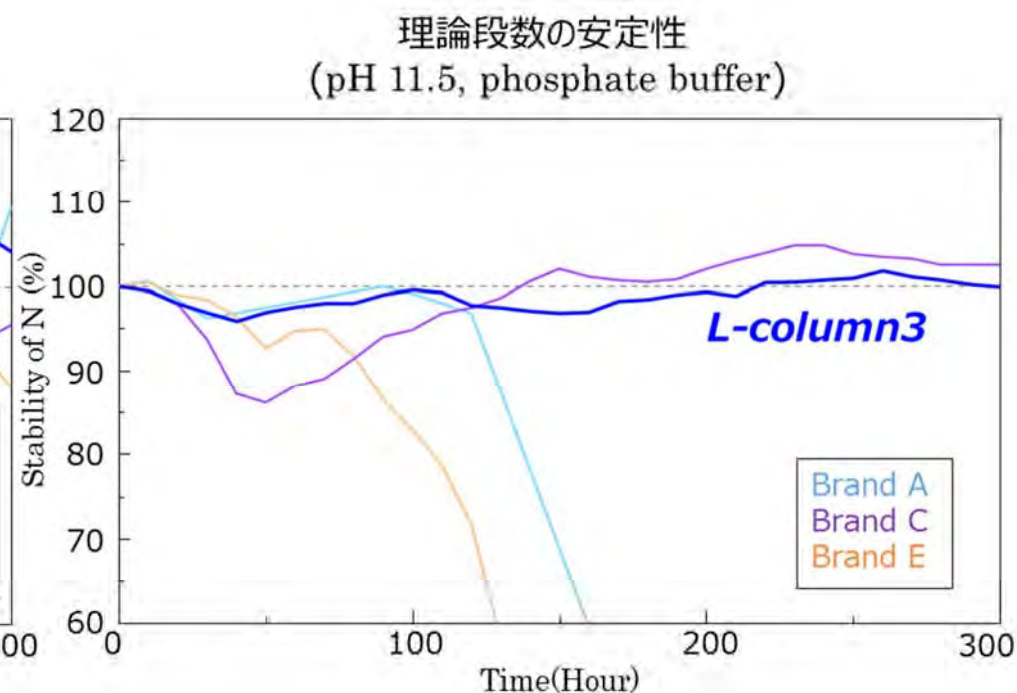
シリカ基材が徐々に溶解
→ 空隙が発生して使用不能



L-column3 の耐アルカリ性 通液劣化試験



Eluent: CH₃OH/54 mM TEA in H₂O (10/90)
Temperature: 50°C
Sample: Naphthalene



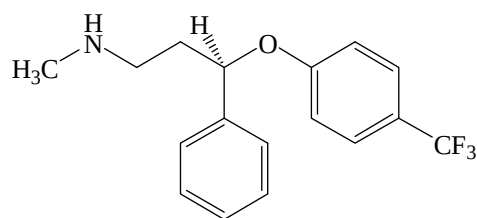
Eluent: CH₃OH/10 mM Phosphate buffer (10/90)
Temperature: 40°C
Sample: Naphthalene

アルカリ性の溶離液組成を変更しても、

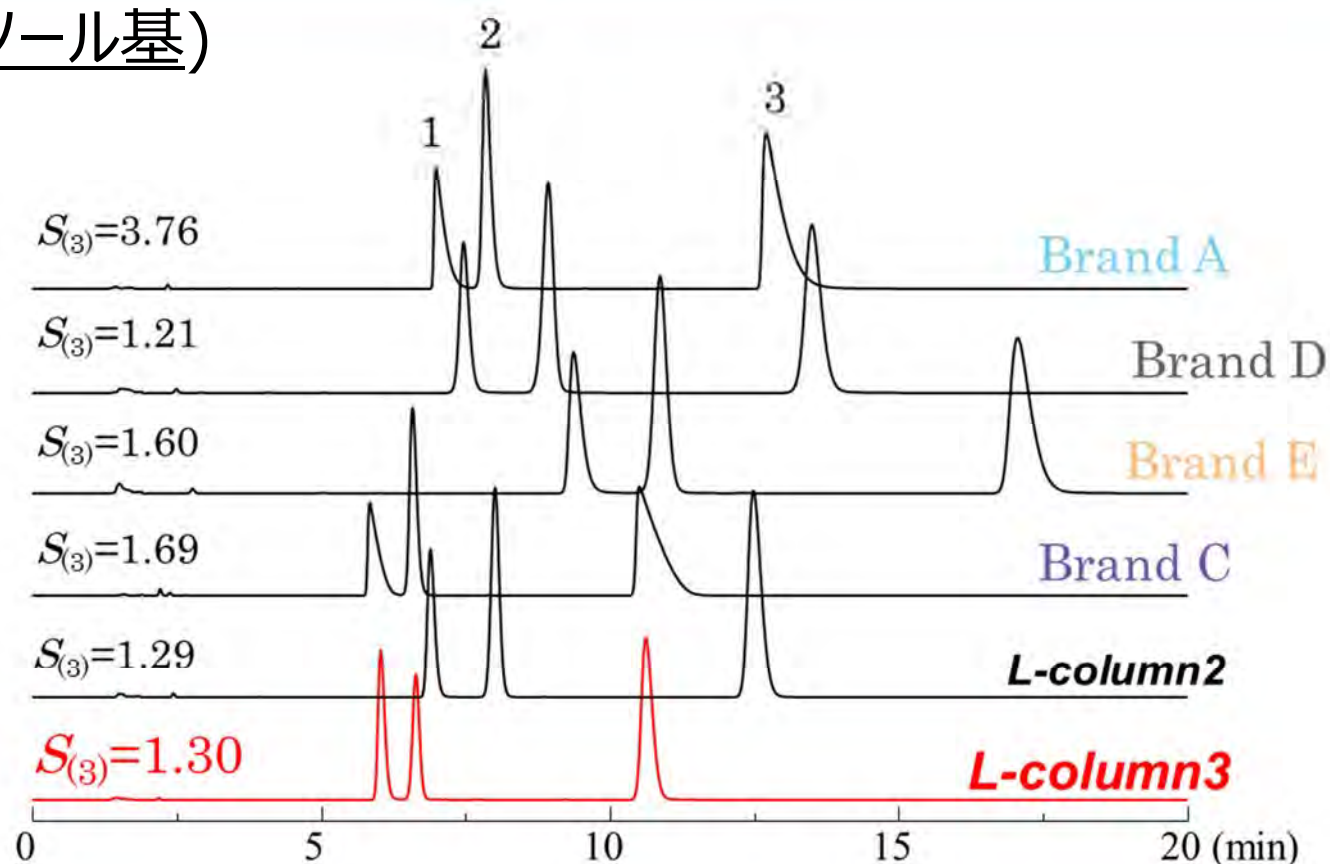
L-column3 は300時間以上安定

低吸着性

塩基性物質(残存シラノール基)



3. Fluoxetine



【Analytical Conditions】

Column: C18 5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm; Eluent: CH₃CN/25 mM Phosphate buffer(pH 7)(35/65); Flow rate: 1 mL/min

Temperature: 40°C; Detection: UV 230 nm; Sample: 1. Paroxetine, 2. Citalopram, 3. Fluoxetine; Injection volume: 1 μ L

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！

溶離液のpHによる解離性物質の保持挙動の変化

保持挙動を変えたい！成分間の分離を改善したい！

従来のアプローチ

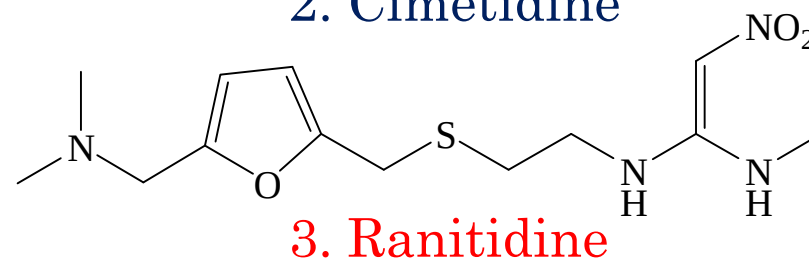
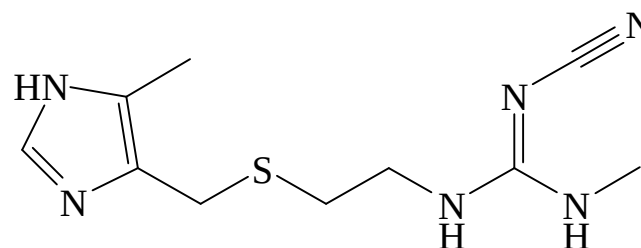
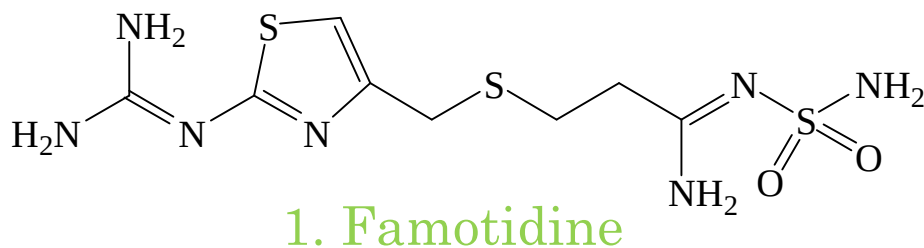
酸性～弱アルカリ性の溶離液を使用 or イオンペア試薬を使用

問題点

- 保持挙動の変化や成分間の分離が不十分
- イオンペア試薬による機器やカラムの汚染が懸念

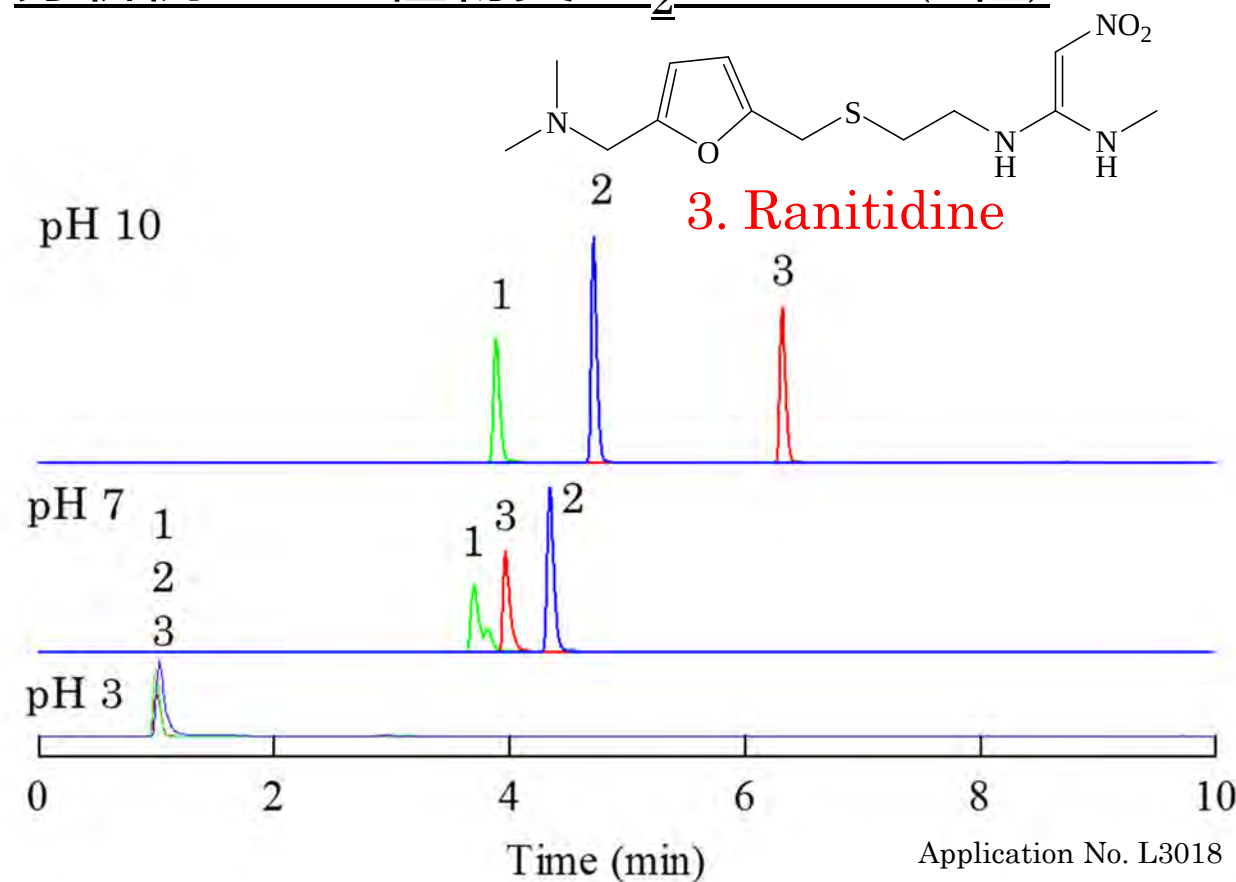
➡ アルカリ性溶離液を用いることで、保持挙動が劇的に変化

分析例：塩基性物質 H₂Brocker(3種)



溶離液のpHによる解離性物質の保持挙動の変化

分析例: 塩基性物質 H_2 Brocker(3種)



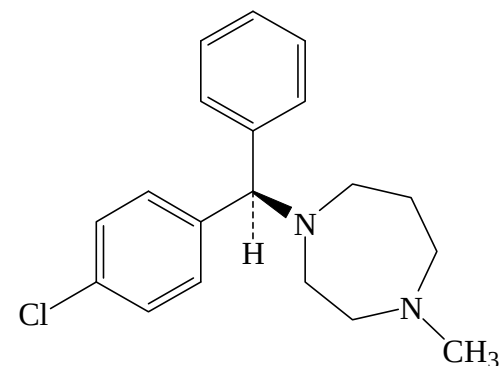
Analytical conditions

LC: Ultimate3000 BioRS
 Column: *L-column3 C18* 2 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm
 Eluent: A/B: 100/0 – 50/50 (0 – 25 min)
 pH 3 A: 5 mM HCOOH in H₂O
 B: CH₃CN
 pH 7 A: 5 mM CH₃COONH₄ in H₂O
 B: CH₃CN
 pH 10 A: 5 mM NH₃ in H₂O
 B: CH₃CN
 Flow rate: 0.3 mL/min
 Temperature: 40°C
 Injection volume: 1 μ L
 MS/MS: 3200QTRAP
 Detection: ESI-MS/MS(+)

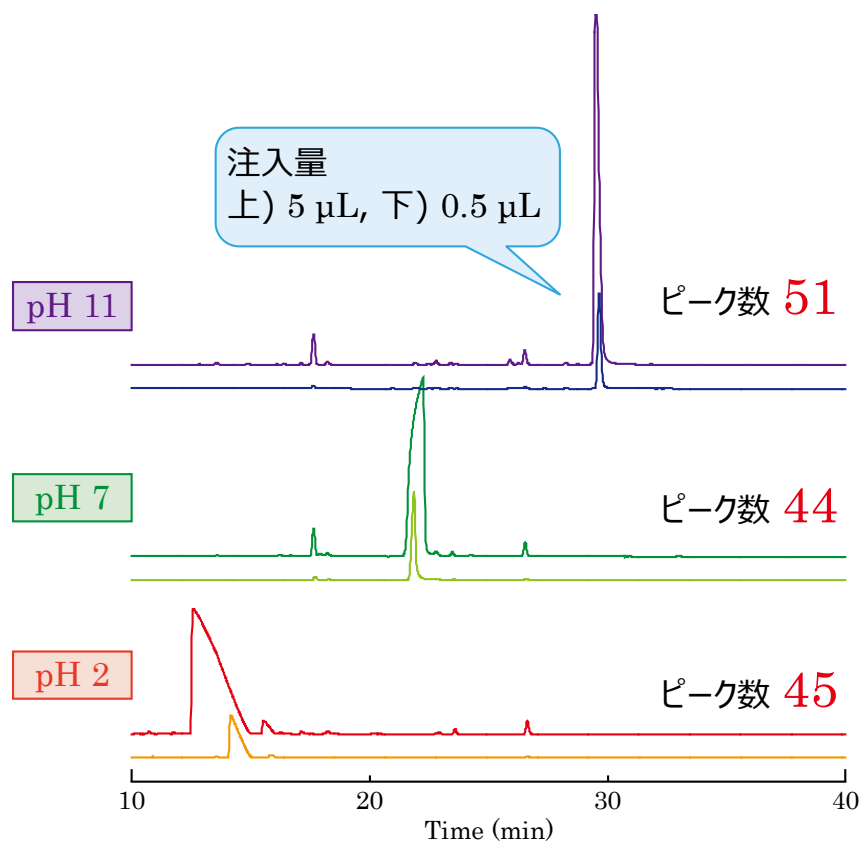
- 溶離液のpHにより、保持挙動が劇的に変化
- イオンペア試薬を使用せずに、分離が可能
- ピーク形状も良好

溶離液のpHによる解離性物質の保持挙動の変化

分析例: Homochlorcyclidine



Homochlorcyclidine



Analytical conditions

HPLC: Shimadzu NEXERA

Column: *L-column3 C18* 5 μm, 2.1×150 mm

Eluent:

A: 25 mM phosphate buffer (pH 2、pH 7、pH 11)

B: CH₃CN

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

Flow rate: 0.2 mL/min

Temperature: 40°C

Sample : 10 g/L Decomposition product of homochlorcyclidine

Injection volume: 0.5 μL or 5 μL

Application No. L3014

- 溶離液の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

溶離液のpHによる解離性物質の保持挙動の変化

分析例：解離性物質

Sample :

1. Ketoprofen (Acidic)
2. Ibuprofen (Acidic), pK_a 4.5
3. Indometacine (Acidic)
4. Isobutyl Paraben (Weak Acidic)
5. Fexofenadine (Amphoteric), pK_a 4.3, 9.5
6. Fluvoxamine (Basic)
7. Triprolysine (Basic)

Analytical conditions

HPLC: Shimadzu NEXERA

Column: *L-column3 C18* 5 μ m、2.1×150 mm

Eluent:

A: 25 mM phosphate buffer (pH 2、pH 7、pH 11)

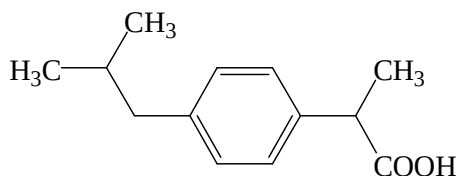
B: CH_3CN

A/B: 80/20 – 30/70 (0 – 20 min)

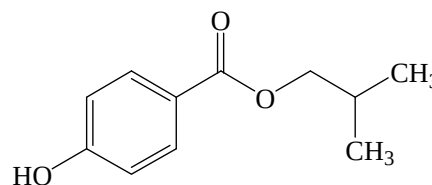
Flow rate: 0.3 mL/min

Temperature: 40°C

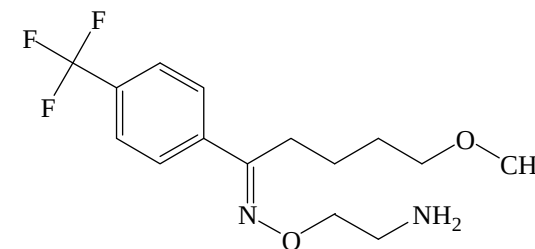
Injection volume: 1 μ L



2. Ibuprofen
 pK_a 4.5



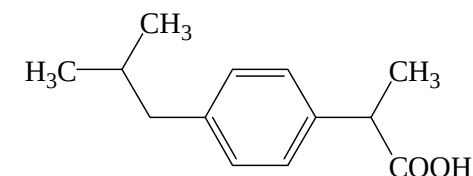
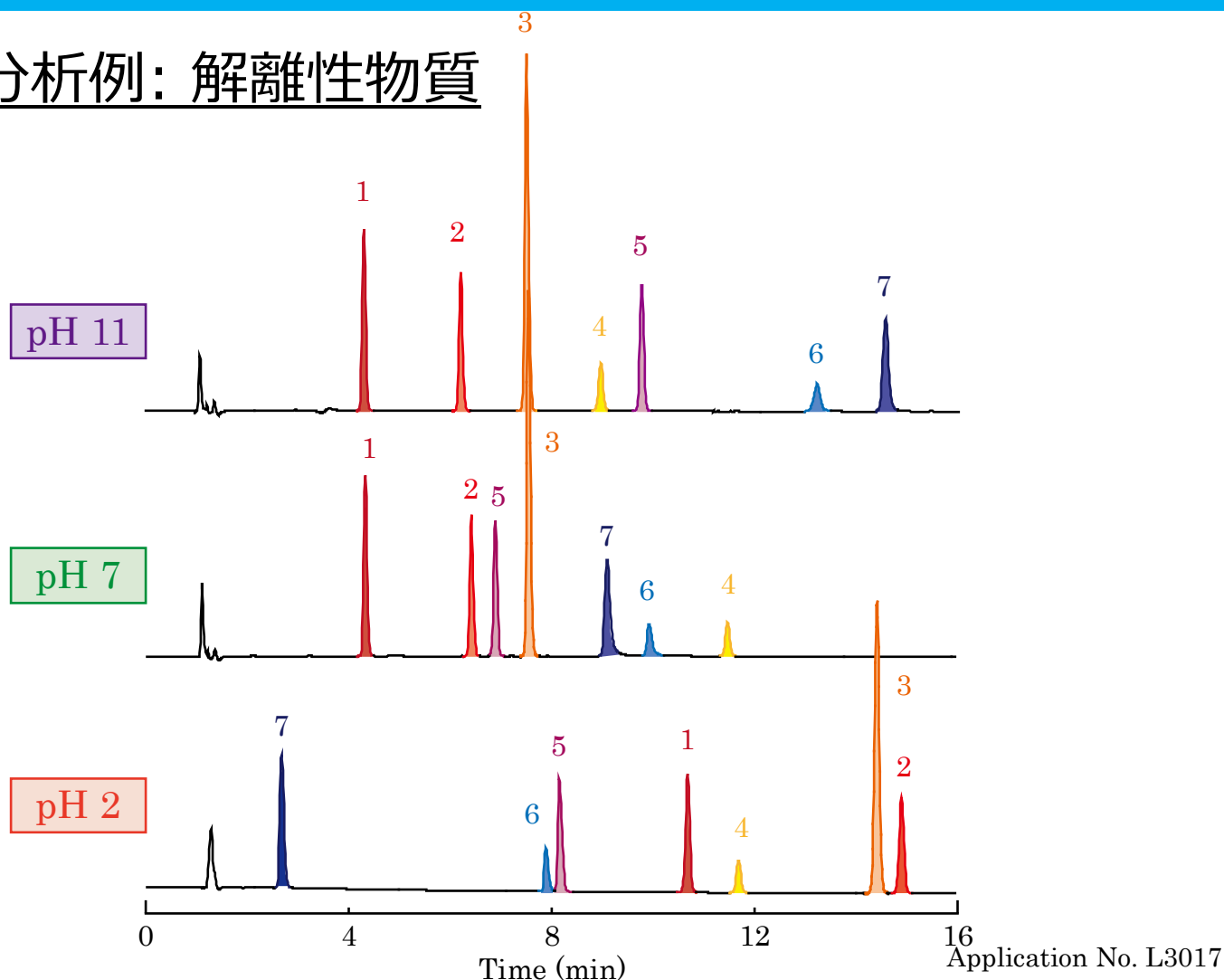
4. Isobutyl Paraben



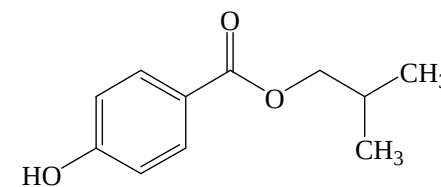
6. Fluvoxamine

溶離液のpHによる解離性物質の保持挙動の変化

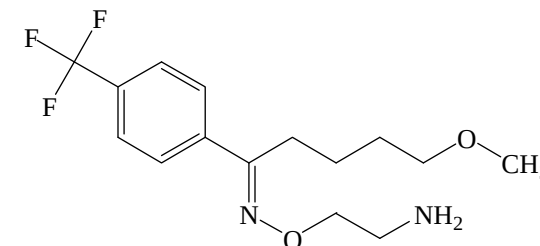
分析例：解離性物質



2. Ibuprofen
 pK_a 4.5



4. Isobutyl Paraben



6. Fluvoxamine

- 溶離液のpHにより、保持挙動が劇的に変化
- フェノール性のOH基が解離

塩基性物質の分取精製

塩基性物質の分取精製をしたい！

従来のアプローチ

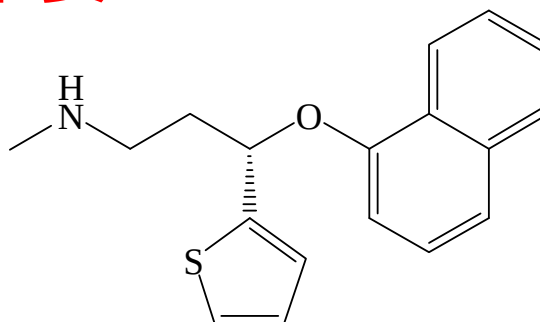
酸性～弱アルカリ性の溶離液を使用 or イオンペア試薬を使用

問題点

- ・分取した精製物からのイオンペア試薬の除去が煩雑
- ・イオンペア試薬による機器やカラムの汚染が懸念
- ・負荷量により、ピーク形状の劣化や保持時間のズレが発生

➡ アルカリ性溶離液を用いることで、大量負荷が可能
イオンペア試薬も不要

分析例: Duloxetine



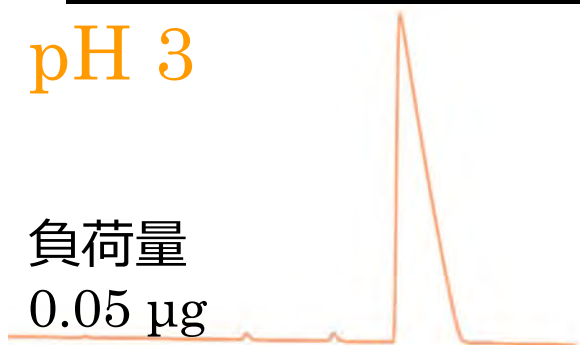
Duloxetine(pKa 8.1)

塩基性物質の分取精製

大量負荷における問題点

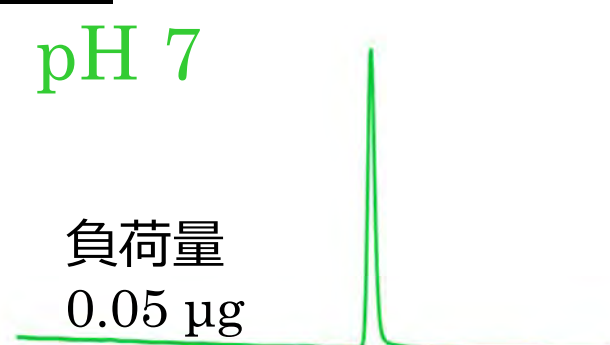
pH 3

負荷量
0.05 μg

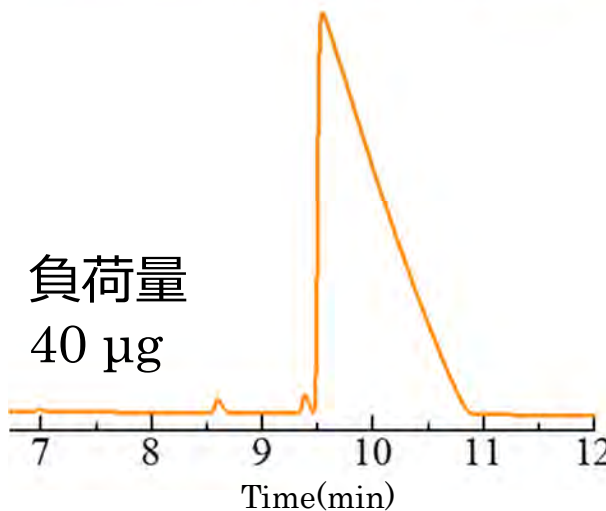


pH 7

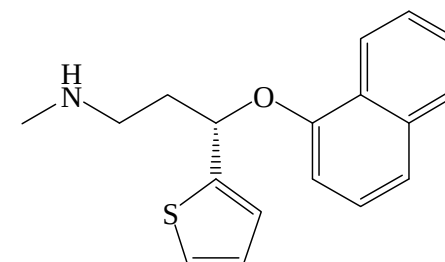
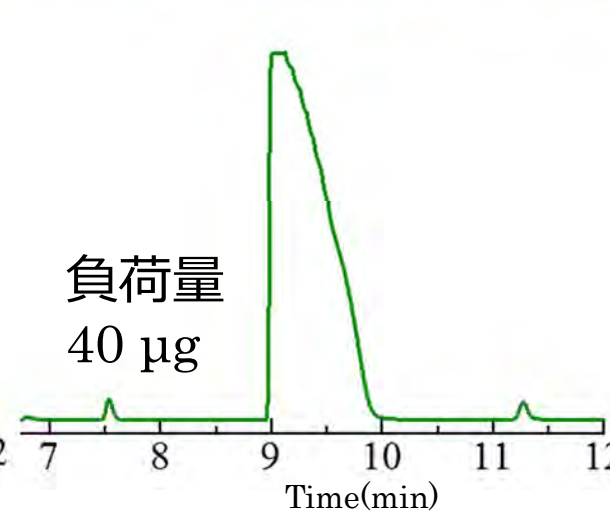
負荷量
0.05 μg



負荷量
40 μg



負荷量
40 μg



Duloxetine
 pK_a 8.1

Analytical conditions

HPLC: Shimadzu NEXERA

Column: *L-column3 C18* 5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm

Eluent:

pH 3 A: 10 mM HCOOH in H₂O

B: CH₃CN

A/B: 90/10 – 40/60(0 – 15 min)

pH 7 A: 10 mM HCOOH+NH₃ in H₂O

B: CH₃CN

A/B: 85/15 – 35/65(0 – 15 min)

Flow rate: 1 mL/min

Temperature: 40°C

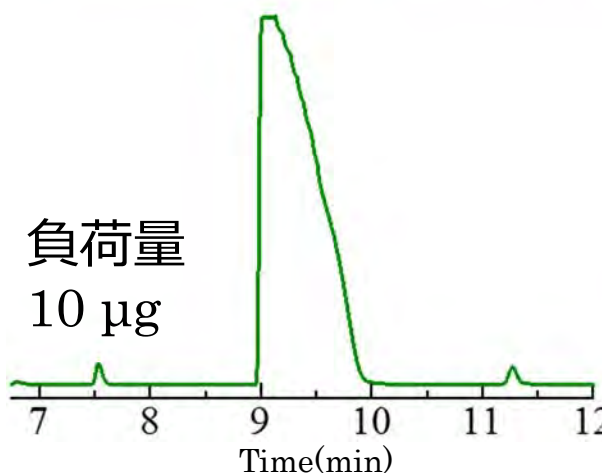
酸性及び中性条件下(塩基性物質が解離する溶離液のpH)では、
大量負荷することで、**ピーク形状の劣化や保持時間のズレが発生**

塩基性物質の分取精製

大量負荷における問題点

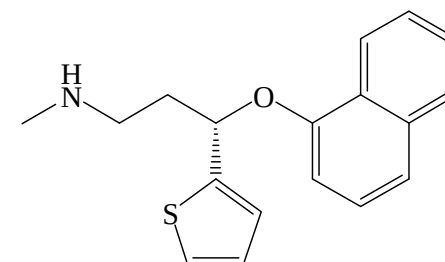
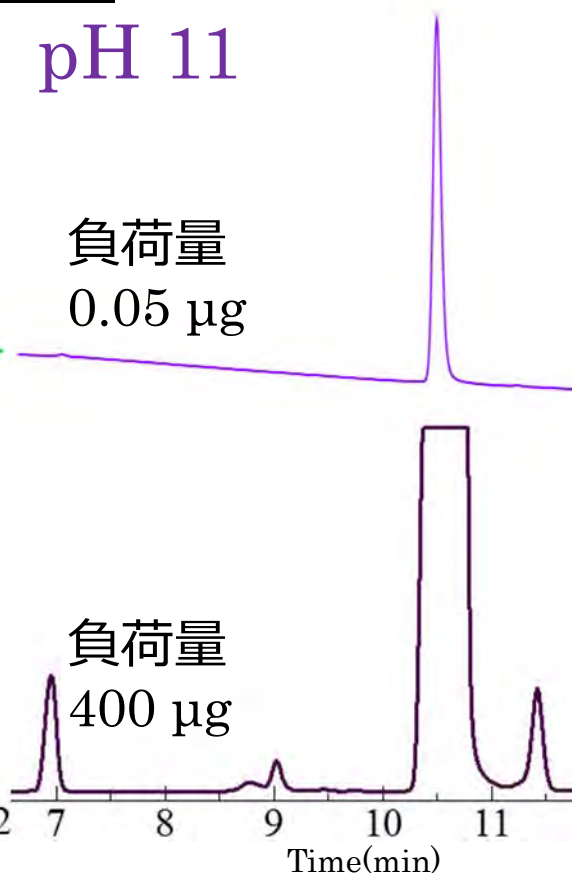
pH 7

負荷量
0.05 μg



pH 11

負荷量
0.05 μg



Duloxetine
 pK_a 8.1

Analytical conditions

HPLC: Shimadzu NEXERA

Column: *L-column3 C18* 5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm

Eluent:

pH 7 A: 10 mM HCOOH+NH₃ in H₂O

B: CH₃CN

A/B: 85/15 – 35/65(0 – 15 min)

pH 11 A: 10 mM HCOOH+NH₃ in H₂O

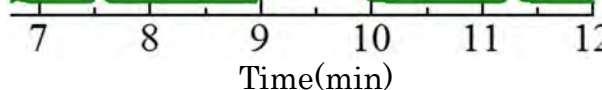
B: CH₃CN

A/B: 70/30 – 20/80(0 – 15 min)

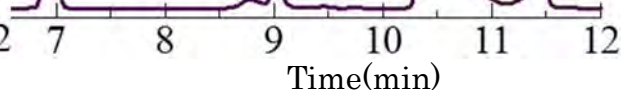
Flow rate: 1 mL/min

Temperature : 40°C

負荷量
10 μg



負荷量
400 μg



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、
大量負荷でもピーク形状は崩れず、保持時間も変化しない

塩基性物質の分取精製

アルカリ性溶離液の条件にて、Duloxetineを10 mg負荷

Analytical conditions

HPLC: Shimadzu NEXERA

Column: L-column3 C18 5 μ m, 10 $\times$ 150 mm

Eluent:

A: 10 mM HCOOH+NH₃ (pH 11)

B: CH₃CN

A/B: 70/30 – 20/80 (0 – 15 min)

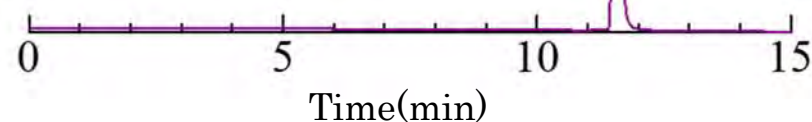
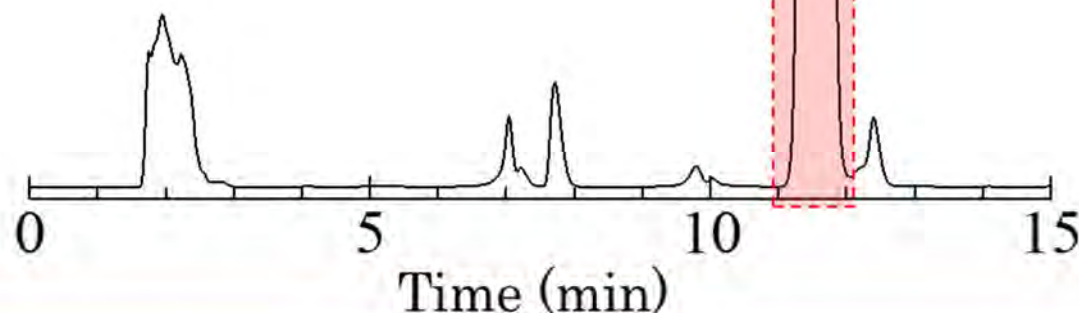
Flow rate: 4.0 mL/min

Temperature: 40°C

Sample concentration: 0.1 g/mL in DMSO

Injection volume: 100 μ L

分取精製後



Duloxetine純度

精製前 約90%

精製後 >99.9%

アルカリ性条件下で、

- 大量負荷することができ、精製効率が向上
- イオンペア試薬が不要となり、対イオンのない状態で分取が可能

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上

LC/MS分析で検出感度を上げたい！

従来のアプローチ

試料の大量注入、濃縮操作

問題点

- ・貴重な試料の大量注入は困難
- ・濃縮操作が面倒

➡ 溶離液にアンモニア溶液を用いることで、検出感度が向上

分析例: Pesticide(139成分)

Analytical conditions

LC: Ultimate 3000 BioRS

Column: *L-column3 C18* 3 μm , 2.1 $\times$ 150 mm

Eluent: A: 5 mM NH_3 in H_2O , B: CH_3OH (containing 5 mM NH_3)

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)

Flow rate : 0.2 mL/min

Temperature : 40°C

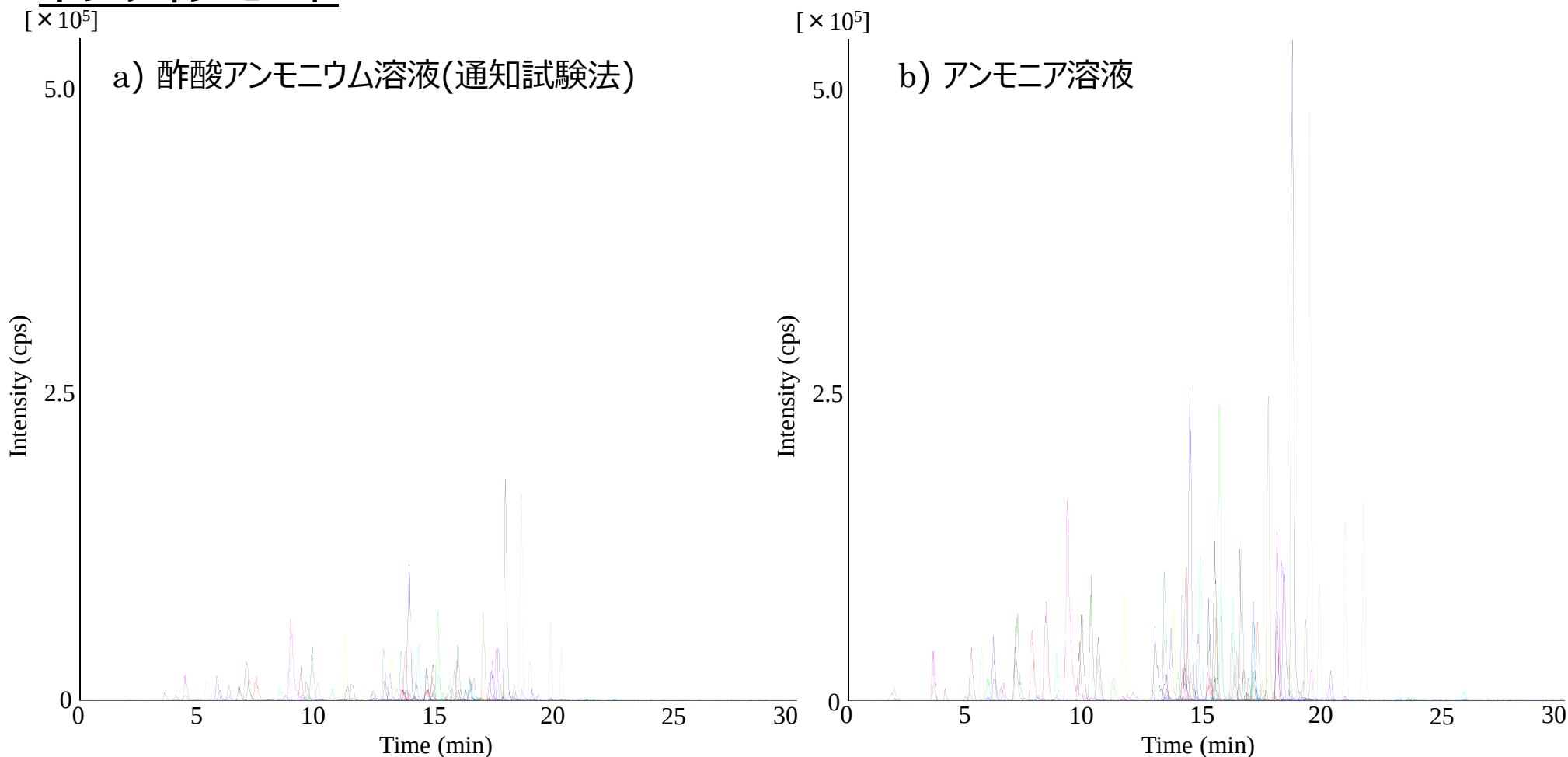
Sample concentration: 50 ppb

Injection volume : 5 μL

MS/MS: 3200 QTRAP; Detection: ESI-MS/MS (+), ESI-MS/MS(–)

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上

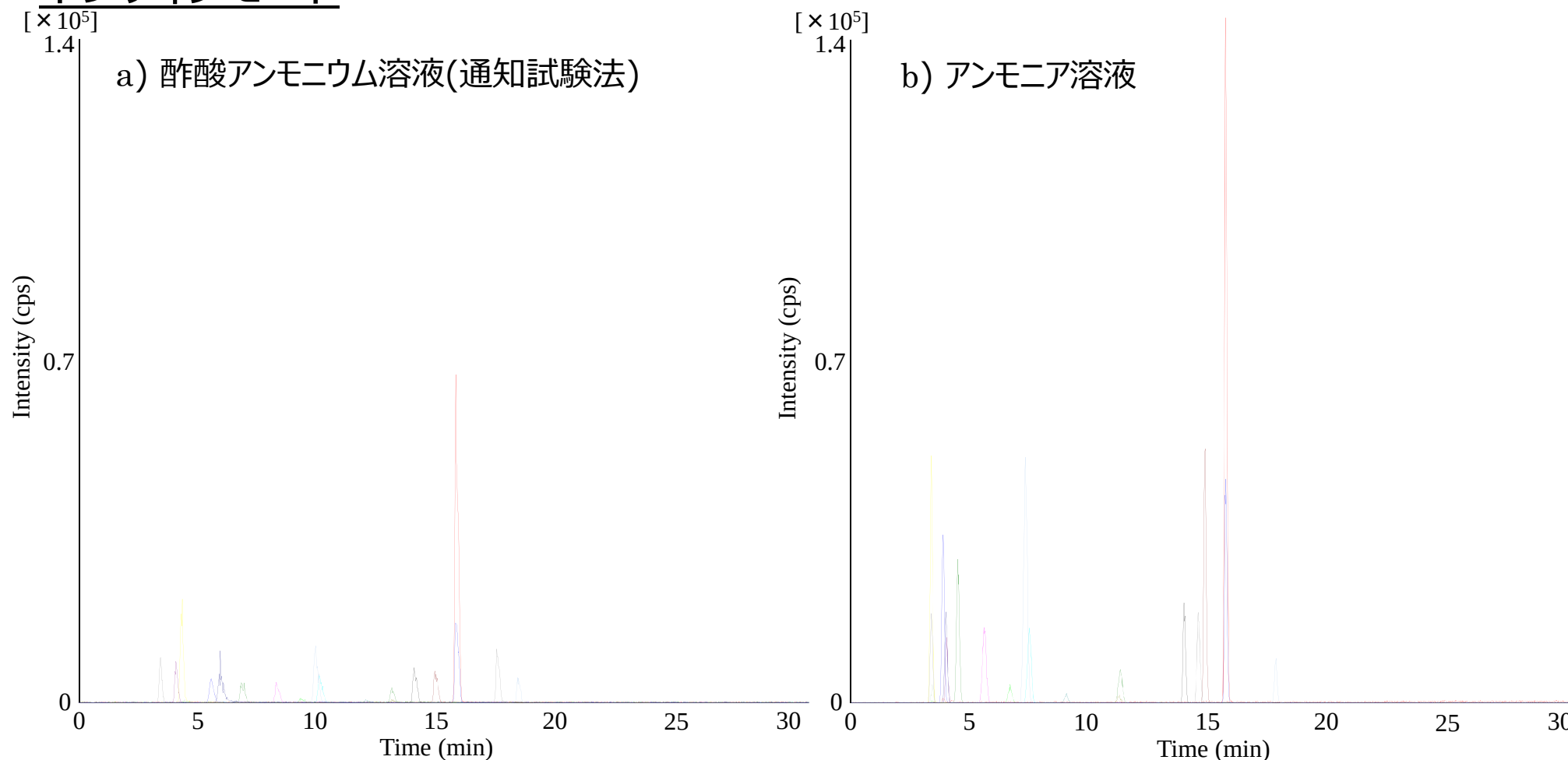
ポジティブモード



溶離液にアンモニア溶液を用いることで、
農薬139種の95%で S/N が向上(平均3.9倍)

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上

ポジティブモード



ネガティブモードでも、ポジティブモードと同様に検出感度が向上

➡ スクリーニング分析や貴重な試料の高感度検出に最適

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上 + α

カラムへの吸着やキャリーオーバーを低減させたい！

従来のアプローチ

リン酸を用いた流路のコーティングや溶離液へのEDTAを添加

問題点

・コーティングに時間が必要、析出が懸念

➡ **メタルフリーカラムを使用することで、吸着やキャリーオーバーを低減**

分析例：修飾ペプチド(6成分)

Sample :

1. Oxidized ACTH (1-10)
2. Glycosylated EPO (117-131)
3. Phosphorylated Angiotensin II
4. Nitrated Angiotensin I
5. Methylated Substance P
6. Acetylated Calcitonin (15-29)

Analytical conditions

LC: Ultimate 3000 BioRS

Column: *L-column3 C18* 3 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm or
L-column3 C18 3 μ m, 2.0 $\times$ 50 mm, Metal-free column

Eluent: A/B: 98/2 – 60/40(0 – 10 min)

pH 3 A: 5 mM HCOOH in H₂O, B: CH₃CN

pH 10 A: 5 mM NH₃ in H₂O, B: CH₃CN

Flow rate: 0.2 mL/min

Temperature: 40°C

Sample concentration: 1 pmol/ μ L

Injection volume: 1 μ L

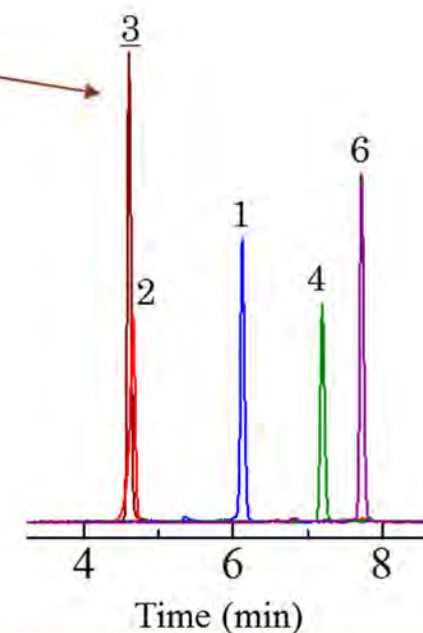
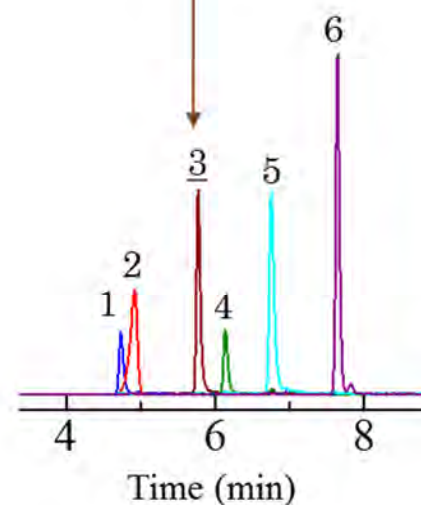
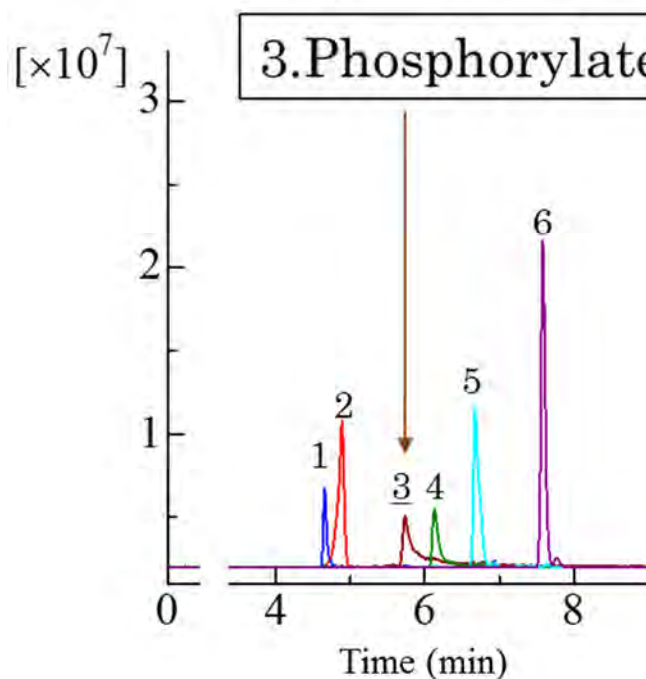
MS/MS: 3200 QTRAP; Detection: ESI-MS/MS (+)

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上+α

溶離液A: ギ酸溶液
ステンレスカラム

溶離液A: ギ酸溶液
メタルフリーカラム

溶離液A: アンモニア溶液
メタルフリーカラム



Application No. L3024

アンモニア溶液の使用とメタルフリーカラムの組み合わせにより、 S/N が向上

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上

分析例: ペプチド(7成分)

Sample :

1. Angiotensin II
2. Neurotensin
3. Angiotensin I
4. Renin substrate
5. [Ace-F-3, -2H-1] angiotensinogen (1-14)
6. Ser/Thr Protein Phosphatase (15-31)
7. [F14] Ser/Thr Protein Phosphatase (15-31)

Analytical conditions

LC: Ultimate 3000 BioRS

Column: *L-column3 C18* 2 μ m, 2.1×50 mm

Eluent: A/B: 95/5 – 50/50(0 – 5 min)

pH 3 A: 5 mM HCOOH in H₂O

B: CH₃CN

pH 10 A: 5 mM NH₃ in H₂O

B: CH₃CN

Flow rate: 0.3 mL/min

Temperature: 40°C

Sample concentration: 500~1000 ppm

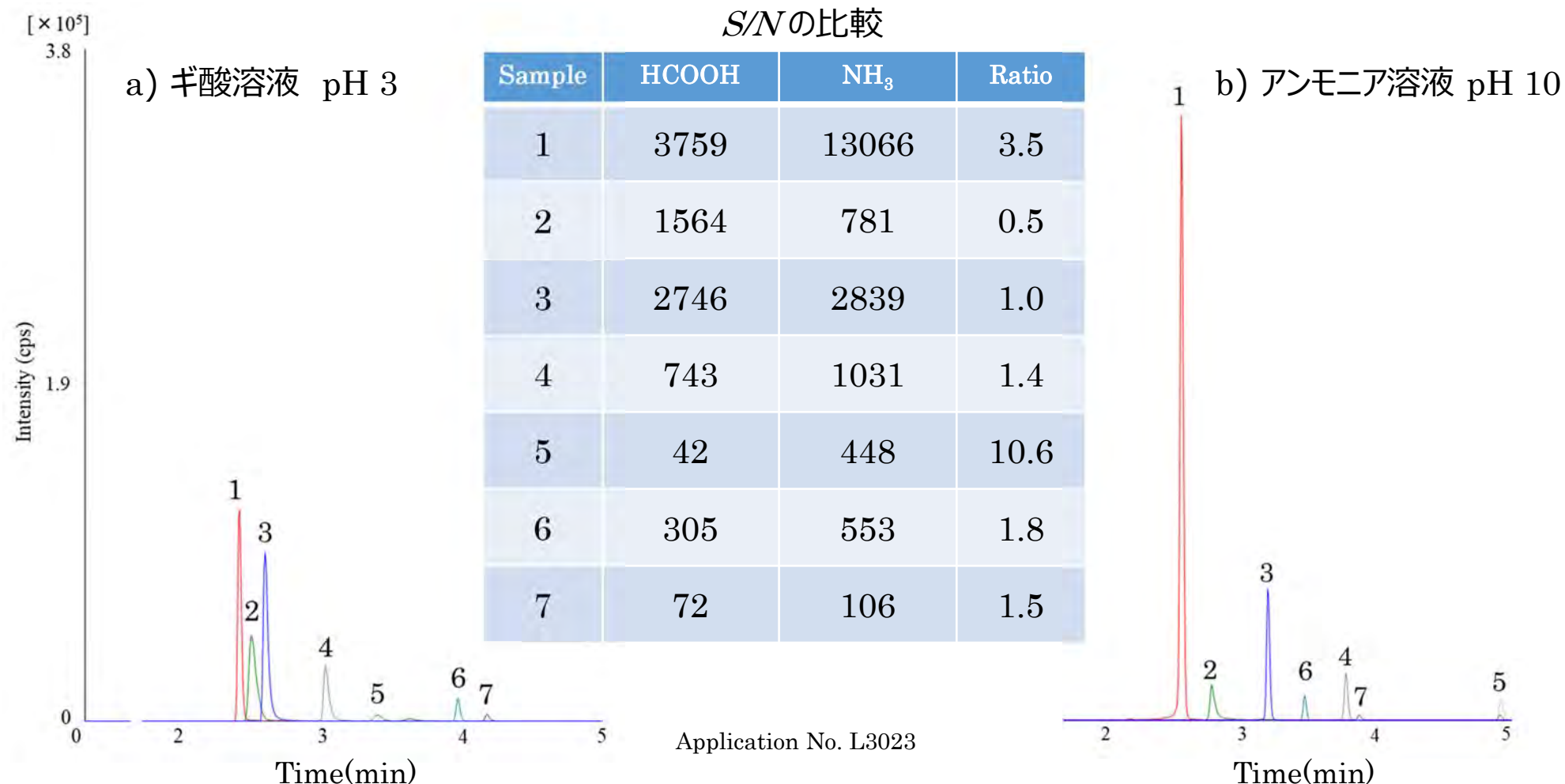
Injection volume: 0.5 μ L

MS/MS: 3200 QTRAP

Detection: ESI-MS/MS (+)

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上

分析例: ペプチド(7成分)



アンモニア溶液の使用とメタルフリーカラムの組み合わせにより、 **S/N が向上**

アルカリ性溶離液使用時の注意点

- ⚠ 耐アルカリ性の高いカラムを使用してください。
(カラムの使用可能なpH範囲を遵守)
- ⚠ システムによっては耐アルカリ性の部品交換が必要になります。

💡 より長くカラムを使用するためのヒント

- 有機系緩衝液(有機酸：ホウ酸、酢酸、クエン酸など)は無機系緩衝液(無機酸：リン酸、炭酸、塩酸など)よりカラムを劣化させにくい※。
- 緩衝液の陽イオンの種類は下記の順でカラムを劣化させにくい※。
劣化させにくい $\text{Li}^+ \leftarrow \text{Na}^+ \leftarrow \text{K}^+ \leftarrow \text{NH}_4^+$ 劣化させやすい
- 有機溶媒の比率が高い方がカラムを劣化させにくい。
- アセトニトリルとメタノールではアセトニトリルの方が劣化させにくい※。
- カラム温度は低い方がカラムを劣化させにくい※。
- 緩衝液の濃度はうすい方がカラムを劣化させにくい※。
- 使用後には、必ず緩衝液を含まない溶液でカラムを含めた流路を洗浄する。

※ Jacek Nawrocki *Journal of Chromatography A* 1997, 779, 29-71.

まとめ

アルカリ性溶離液と 耐アルカリ性カラム(L-column3)を組み合わせた 新しいアプローチを紹介

新たなアプローチ①

溶離液のpHによる解離性物質の保持挙動の変化

➡ 保持挙動が**劇的に変化**、成分間の**分離を改善**

新たなアプローチ②

塩基性物質の分取精製

➡ 大量負荷による**精製効率**が**向上**、イオンペア試薬が**不要**

新たなアプローチ③

アンモニア溶液を用いた検出感度の向上

➡ 低濃度な試料のスクリーニング分析や、貴重な試料の**高感度検出が可能**