

アセトニトリルからメタノールへの変更

逆相HPLCでは移動相の有機溶媒としてアセトニトリルやメタノールなどが用いられます。最近のアセトニトリルの入手困難な状況により、アセトニトリルからメタノールへ移動相を変更しなければならない場合があります。ここでは溶媒の特性と分析の際の注意点と実際の分析例を紹介します。

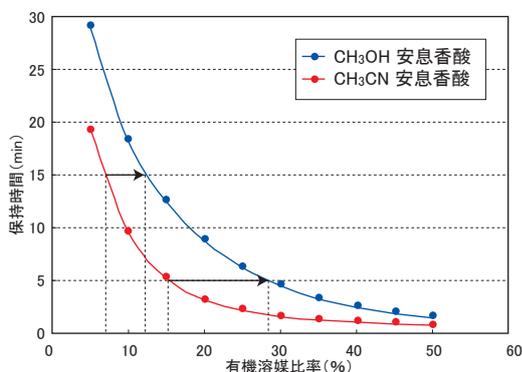
Keywords 溶媒の特性(保持時間・カラム圧力・UV吸収) 溶出挙動 ピーク形状

溶媒の特性

アセトニトリルは、粘度が低く、UV吸収が低いため、逆相HPLCにおいて移動相としてよく用いられます。このアセトニトリルをメタノールに変更するには、個々の特性を知ることが、上手に分析するポイントになります。

■ 保持時間

アセトニトリルはメタノールに比べ、極性が低いので、メタノールへ変更すると、保持時間が遅くなります。保持時間を同じにするには、物質によって異なりますが、一般に、有機溶媒比率が低い場合は、メタノール比率を5~15ポイント程度多くします(Fig.1)。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS 4.6 × 50 mm (3 μm, 12 nm)
Mobile phase: CH₃OH/20 mM H₃PO₄, CH₃CN/20 mM H₃PO₄
Flow rate: 1 mL/min Temp.: 40°C Detection: UV 254 nm
Syste: Alliance 2695 (Waters Co.)

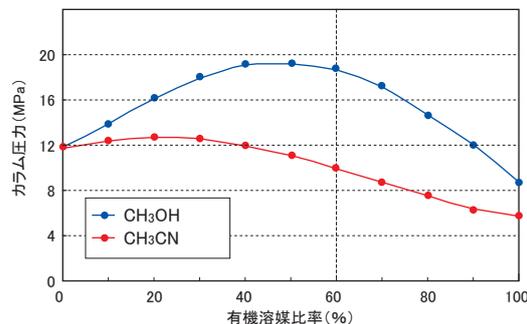
Fig.1 移動相の有機溶媒比率と保持時間の比較

■ カラム圧力

カラム圧力はメタノールの方が高くなります(Fig.2)。特に有機溶媒比率が60%のとき、メタノールはアセトニトリルの約2倍のカラム圧力になります。分析温度を上げると、カラム圧力を抑えることができます。保持時間が早くなりピーク形状も良くなります(Fig.3)。しかし分析温度を上げると、カラム劣化を促進させるので、より高耐久性のカラムが必要とされます。

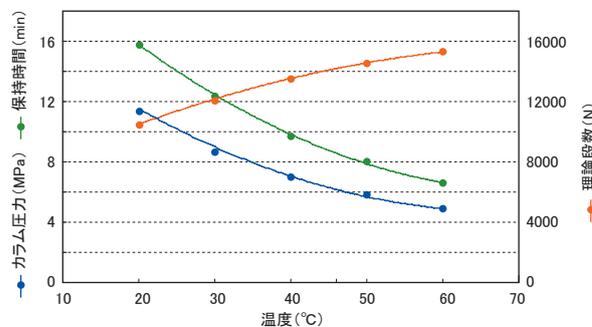
■ UV吸収

メタノールは低波長付近においてアセトニトリルより大きな吸収を持つので(Fig.4)、210~230 nm 付近でS/N比が高くなり、微量分析やグラジエント分析には適しません。但しHPLC用のメタノールを用いることで、多少はS/N比の改善ができます。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS 4.6 × 150 mm (3 μm, 12 nm)
Flow rate: 1 mL/min Temp.: 40°C

Fig.2 移動相の有機溶媒比率とカラム圧力の関係



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS 4.6 × 150 mm (5 μm, 12 nm)
Mobile phase: CH₃OH/20 mM Phosphate buffer pH7.0 (50/50)
Flow rate: 1 mL/min
Sample: Isopropyl p-hydroxybenzoate (1 mg/L) Inj.vol.: 1 μL

Fig.3 分析温度とカラム圧力、理論段数及び保持時間の関係

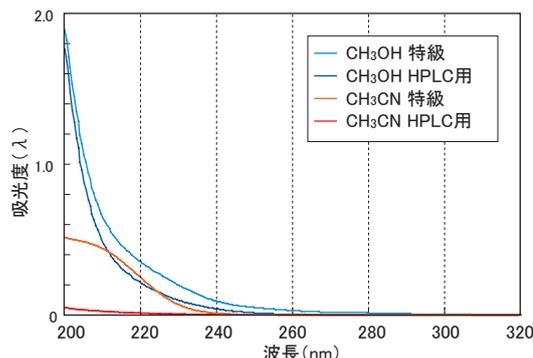


Fig.4 アセトニトリルとメタノールのUVスペクトル

クロマトグラムの比較

■ 溶出順序の違い

逆相HPLCでは、移動相の有機溶媒比率が高くなれば保持時間は早くなります。移動相に用いる有機溶媒の種類及びその比率と保持時間の関係は、物質により異なります。一斉分析では個々の物質の保持挙動が異なるため、アセトニトリルからメタノールに変更したとき、溶出順序の違いが生じることがあります。

Fig.5 は、安息香酸とフェノールの分析例を示しました。アセトニトリルを用いた場合には、アセトニトリルでは安息香酸が先に出るのに対して、メタノールではフェノールが先に溶出します。

これは、アセトニトリルが非プロトン性、メタノールがプロトン性によるものであるといわれています。

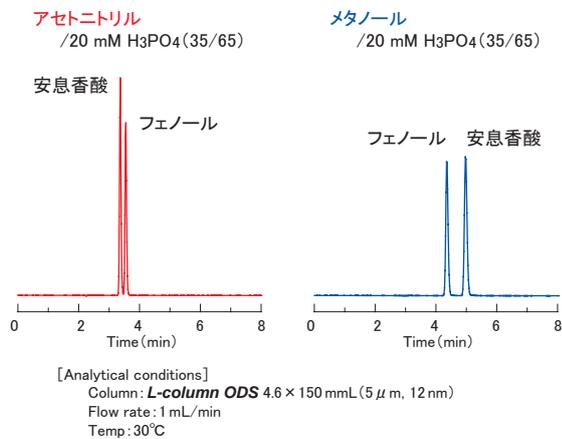


Fig.5 溶出順序の違い

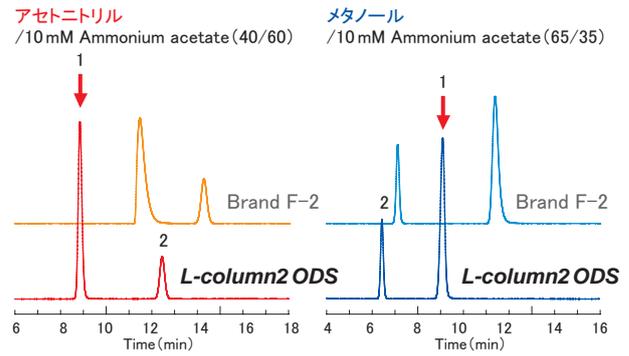
2007seminar

■ ピーク形状

塩基性医薬品など吸着しやすい物質の分析では、移動相の有機溶媒をアセトニトリルからメタノールに変更すると、ピークのテーリングが小さくなります (Fig.6)。これは移動相の有機溶媒が残存シリカと分析対象物質との相互作用に影響を与えていると考えられます。

L-column2 ODS は、どちらの有機溶媒でも最高のピーク形状と分離を示します。

Fig.7 は、Fig.6 及びリン酸緩衝液でのアミトリプチリンのテーリングファクターをカラムメーカー毎にグラフにしたものです。メタノール・アセトニトリルに関わらず使用できることは、カラム選択にあたって重要なポイントです。



[Analytical conditions]

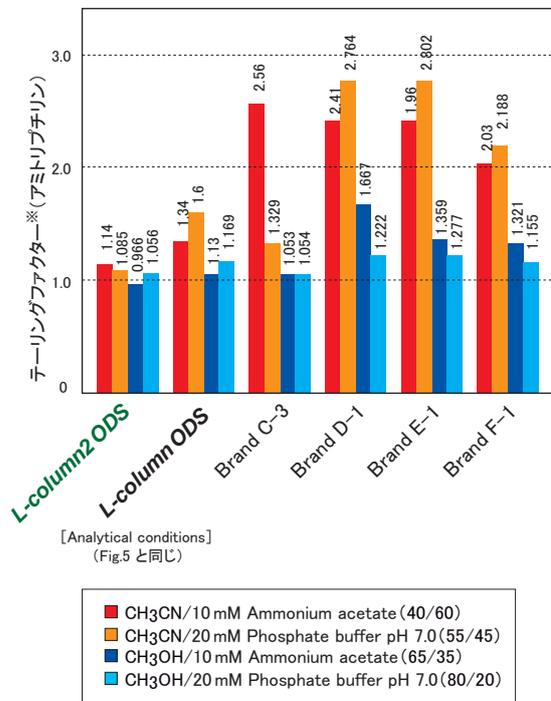
Column: 4.6 × 150 mmL (C18, 5 μm)

Flow rate: 1 mL/min Temp: 40°C

Sample: 1. アミトリプチリン 2. pドロキシ安息香酸-n-ブチル (100 mg/L each in CH₃CN)

Fig.6 アミトリプチリンのピーク形状の違い(1)

Catalog vol.5 p8



[Analytical conditions]

(Fig.5 と同じ)

■ CH₃CN/10 mM Ammonium acetate (40/60)
 ■ CH₃CN/20 mM Phosphate buffer pH 7.0 (55/45)
 ■ CH₃OH/10 mM Ammonium acetate (65/35)
 ■ CH₃OH/20 mM Phosphate buffer pH 7.0 (80/20)

※ USPテーリングファクター

Fig.7 アミトリプチリンのピーク形状の違い(2)

Catalog vol.5 p8

リーフレット内容に関してのお問い合わせは、最寄の代理店又は東京事業所クロマト技術部までご連絡ください

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構
 Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
<http://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部
 e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521
 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地