

緩衝液について

酸性物質や塩基性物質といった解離性物質を逆相HPLCで分析する場合は、移動相のpHのわずかな変化により解離性物質の解離平衡が移動し、保持時間が安定せず、ピーク形状も劣化します。緩衝液を移動相に用いることにより、解離平衡が一定に保たれ、再現性のよい分析が可能になります。

Keywords 緩衝液 緩衝作用 緩衝能 解離性化合物 pKa pH

緩衝液とは

■ 緩衝液の基礎知識

緩衝液は、弱酸とその共役塩基(または弱塩基と共役酸)との混合溶液であり、酸または塩基を加えたとき、pHをあまり大きく変化させないような溶液です。酢酸溶液を例にして説明します。酢酸は溶液中で解離して次のような平衡状態にあります。



平衡定数Kaは以下のように示されます(式中の[]は各成分の濃度)。

$$K_a = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

この式から次式が導かれます。

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

pHを1変えるためには酢酸と酢酸イオンの比率を10倍変えなければなりません。すなわち、酸や塩基を加えても、溶液のpHはあまり変化しません。

このようにpHを一定に保とうとする働きを「緩衝作用」といい、その作用を表す尺度を「緩衝能」といいます。その化合物のpKaと水溶液のpHが等しいとき、最大の緩衝能を持ちます。

緩衝能はその化合物のpKaの±1の水溶液のpH範囲で働きます。酢酸のpKaは4.76なので、約pH3.7~5.7の範囲で緩衝液として使用します(Fig.1)。

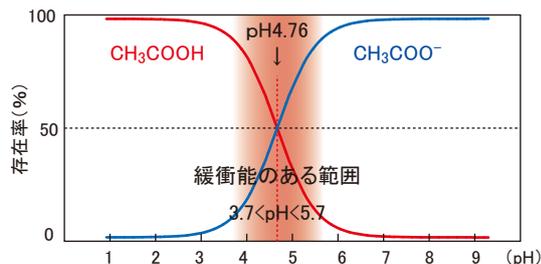


Fig.1 解離・非解離状態の存在率(酢酸)

0970747621

Table 1 化合物のpKaと緩衝能の範囲

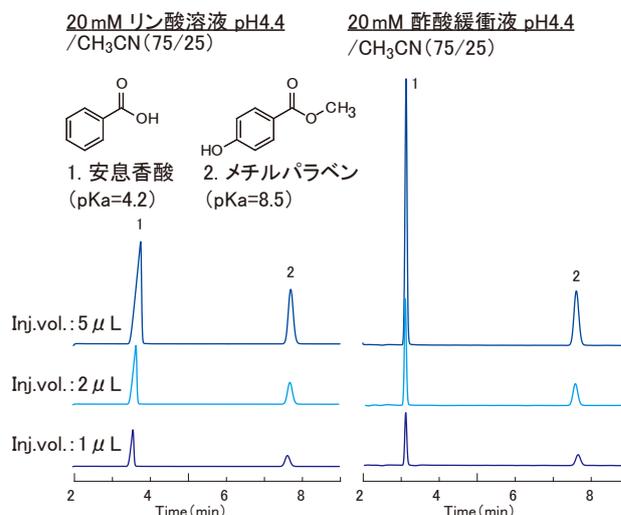
化合物	pKa	2	3	4	5	6	7	8	9	10
りん酸※1	1.83, 6.43, 11.46									
酢酸	4.76									
ギ酸	3.54									
アンモニア	9.36									
ほう酸※2	9.24									

※1 化学便覧第5版より抜粋 ※2 液クロ文の巻より抜粋

Table 1 に、LCで緩衝液に用いられる化合物のpKaを示しました。LC/MS(MS)は不揮発性の緩衝液は使えません。揮発性の酢酸やギ酸がよく使われます。

■ 緩衝液の選択

りん酸は緩衝能範囲が広く、低波長での吸収が低いので緩衝液として頻りに用いられますが、緩衝能のないpH範囲もあるので、目的のpHに合わせて、緩衝液として用いる化合物を選択します。緩衝能のない移動相で分析すると、ピークがひずんでしまいます(Fig.2)。注入量が多くなれば、保持時間のずれが大きくなります(Table 2)。また、カラム間差による保持時間の再現性も低下します(Table 3)。



[Analytical conditions(Fig.2, Table 2, Table 3)]

Column: L-column2 ODS 4.6 × 150 mm (5 μm, 12nm)

Flow rate: 1 mL/min Temp.: 40°C

Sample: 1. 安息香酸 2. メチルパラベン [100 μg/L in CH₃CN/H₂O(25/75)]

Fig.2 緩衝液と注入量の違いとクロマトグラム

0970747621

Table 2 注入量と保持時間の変化率

注入量	緩衝能なし		緩衝能あり	
	20 mM リン酸溶液 pH4.4		20 mM 酢酸緩衝液 pH4.4	
	安息香酸	メチルパラベン	安息香酸	メチルパラベン
1 μ L	100	100	100	100
2 μ L	102.2	100.8	99.7	99.1
5 μ L	105.6	101.1	99.9	99.3

*注入量1 μ Lの保持時間を100とした場合の保持時間の変化率(単位: %)

Table 3 カラム間差と保持時間の再現性

カラム Lot	緩衝能なし		緩衝能あり	
	20 mM リン酸溶液 pH4.4		20 mM 酢酸緩衝液 pH4.4	
	安息香酸	メチルパラベン	安息香酸	メチルパラベン
a	3.725	7.990	3.117	7.543
b	3.541	7.415	3.059	7.301
c	3.636	7.679	3.123	7.567
CV (%)	2.53	3.91	1.14	1.97

*注入量5 μ Lのときの保持時間(単位: min)

緩衝液使用のノウハウ

■ 緩衝液の調製のコツ

移動相に緩衝液を用いることは多くあります。分析条件に「25 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を調製する」とだけ記述があった場合、どのような調製方法が考えられるでしょうか。

- ① 25 mM リン酸水素二ナトリウムを調製し、酢酸を滴下し、pH7.0に調整
- ② 25 mM リン酸二水素ナトリウムを調製し、水酸化ナトリウムを滴下し、pH7.0に調整
- ③ 25 mM リン酸二水素ナトリウムを調製し、25 mM リン酸水素二ナトリウムを滴下し、pH7.0に調整

分析対象物質によっては、分析結果が異なる場合がありますので、調製方法を明確に記録します。

また、人為的誤差が生じやすい方法を避けるのも大切なことです。例えば上記の③の調製時に、容量を量っておけば、pHメーターの調整や手間が不要になり、非常に簡便です。

「25 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) の調製例」

リン酸二水素カリウム0.68g、リン酸水素二ナトリウム無水和物1.06gを水で溶解し、500 mLにメスアップ

■ 緩衝液使用上の注意

緩衝液を使用する際は以下の項目に注意します。

- ・ 緩衝液は緩衝能のある範囲で使用し、その化合物のUV吸収に注意する
- ・ 塩の析出に注意する(カリウム塩の方がナトリウム塩より溶解しやすい)
- ・ カラムの平衡化を十分に行なう

特に、一度塩が析出してカラム圧力が上がると、洗浄してもカラム性能が回復しないことがあります。グラジエント分析や移動相交換時の有機溶媒比率で析出しないことを、あらかじめ確認しておきます。一般に用いられる濃度は、5~50 mM です。適切な濃度で使用しましょう。

一度緩衝液を使うと、その後カラム洗浄をしても前の緩衝液の影響が残ります。緩衝液専用のカラムにするのが、分析の再現性を得るコツです。

L-column シリーズ&G-column デモカラムモニター募集

L-column2 ODSをはじめ、L-column ODS, L-column ODS-P, L-column C8 のデモも承っております。
GC分析でお困りなことはありませんか? 内径1.2 mmの大口径カラムG-columnをお試しください。

リーフレット内容に関してのお問合せは、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