

アルカリ性溶離液使用の利点 – L-column3 特集 –

LCの分析対象物質は多種多様です。分離度や感度が十分得られない物質もあるため、分析メソッドの再検討が必要となることも少なくありません。ここでは、逆相クロマトグラフィーで重要な溶離液のpHについて、アルカリ性の溶離液を使用する利点を紹介します。

Keywords L-column3 溶離液(移動相) pH 酸性 アルカリ性 pH12
感度 分離改善 解離性物質 塩基性物質 酸性物質

アルカリ性溶離液を使用する利点

■ L-column3 の耐アルカリ性

シリカを基材とする充填剤は、修飾基や粒子径が豊富です。それを充填したカラムは汎用的に用いられます。しかしアルカリ性溶液ではシリカを侵食します。それによりカラム先端に隙間が生じ、カラム性能が著しく低下するという欠点があるために、溶離液のpHが限られてしまいます。

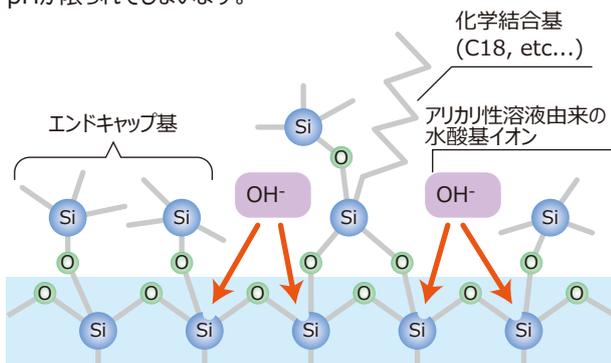


Fig. 1 アルカリ性溶液のシリカ侵食のイメージ

近年、アルカリ性溶離液で使用可能なカラムが多くのメーカーで市販されています。L-column2(はpH 2からpH 9までに対して、L-column3 はpH 1 から pH 12まで使用可能になりました (Fig. 2)。広いpH範囲で耐久性のあるカラムは、分析メソッドを開発する際にも経済的にも非常に有利なカラムです。高耐久性はカラムの選択における重要なファクターといえます。

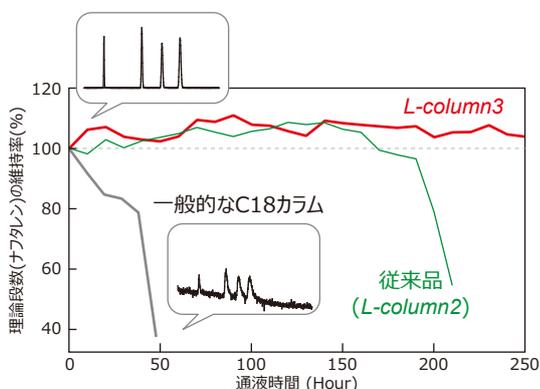


Fig. 2 アルカリ性溶離液(pH 12.2)の耐久性試験

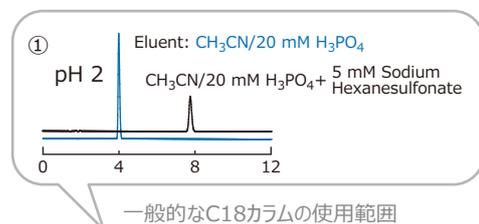
[Durability test conditions]
Column: C18, 5 μ m; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 50°C
Eluent: CH₃OH/54 mM TEA in H₂O (10/90)

■ アルカリ性の溶離液を使用する利点

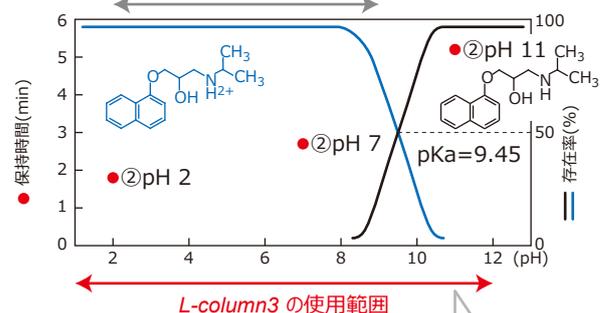
「解離が抑制された状態で分析可能」

塩基性物質は酸性から中性付近では解離しています。塩基性医薬品のプロプラノロールは、pH 9.45より低いpHでプロプラノロールイオンが多く存在し、pH 9.45より高いpHでプロプラノロール分子が多く存在します。プロプラノロールイオンでの保持は小さく、プロプラノロール分子での保持は大きくなります。一般的なC18カラムではプロプラノロールイオンでしか分析できないので、イオン対試薬を添加するなどして、保持を大きくします (Fig. 3①)。

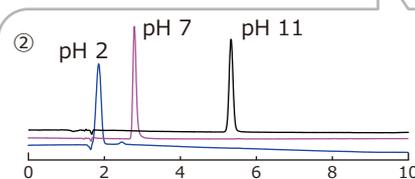
カラムの使用pH範囲が広い L-column3 は、塩基性物質も解離を抑えた状態でも分析できるので、単純な溶離液組成で保持を大きくすることが可能になります (Fig. 3②)。



一般的なC18カラムの使用範囲



L-column3 の使用範囲



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 5 μ m
Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: A) CH₃CN, B) 25 mM Phosphate buffer
A/B, 50/50-70/30 (0-15 min)
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C
Inj. vol.: 1 μ L; Detection: UV 255 nm

Fig. 3 pHによる存在率と保持時間(プロプラノロール)

「多成分一斉分析で解離性物質の分離挙動を変える」

溶離液のpHを変えると、解離性物質の保持挙動が変わります。Fig. 4は、様々なpKaを持つ成分を、リン酸緩衝液において、溶離液のpHを変えて分離挙動を比較しました。一般に酸性物質は溶離液のpHが高くなると保持は小さくなります。逆に塩基性物質は溶離液のpHが高くなると保持は大きくなります。アルカリ性溶離液を用いると、酸性から中性域とは異なる分離パターンが得られる可能性が高く、分離の改善が期待できます。

L-column3は、pH 12で使用可能なので、溶離液のpHを大きく変えることができます。pHを変えることで分離改善が可能です。

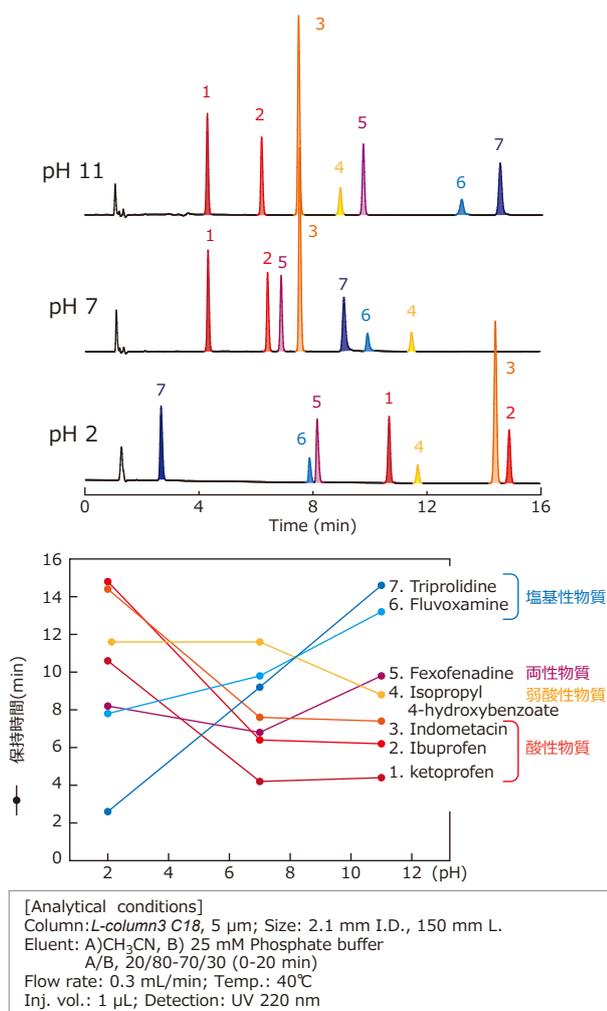


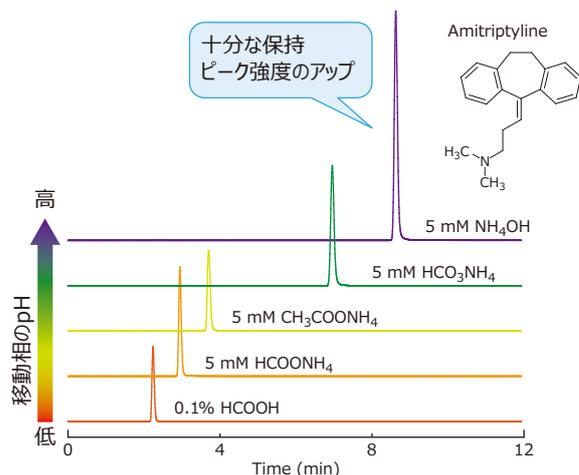
Fig. 4 分離挙動の比較(多成分医薬品) ※1

「ピーク強度の向上」

Fig. 5は、塩基性医薬品のアミトリプチリンを、様々な溶離液で分析しました。微量分析で使用されることの多いLC/MSでは、ピーク強度が重要です。pHが高くなると、塩基性物質のピーク感度が向上します。塩基性物質の分析において、十分な保持とピーク強度が得られるのは、アルカリ性溶離液を用いる利点です。

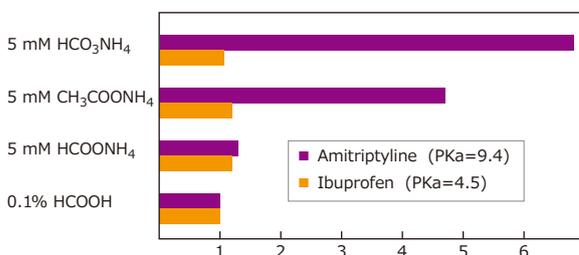
Fig. 6は、ギ酸を溶離液に用いたときのピーク面積を「1」としたときのピーク面積比です。酸性医薬品のイブuproフェンのピーク面積は、溶離液のpHが変わっても変化がほとんどありません。分析目的により溶離液のpHを選択しましょう。

※1 グラフは保持挙動を分かりやすくするために折れ線グラフにしています。実際は緩衝能の有無や緩衝塩の影響により、直線的に保持時間が変化することはありません。



[Analytical conditions]
 Column: L-column3 C18, 5 μm; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A) CH₃CN, B) Aqueous solution
 A/B, 40/60-90/10-90/10 (0-10-12 min)
 Flow rate: 0.3 mL/min; Temp.: 40°C
 Inj. vol.: 1 μL; MS: 3200QTRAP

Fig. 5 ピーク強度の比較(塩基性物質)



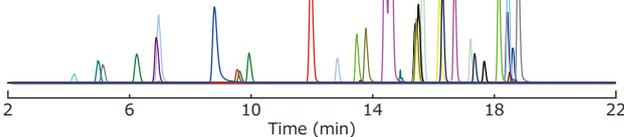
[Analytical conditions]
 Column: L-column2 ODS, 3 μm; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
 Eluent: A) CH₃CN, B) Aqueous solution, Gradient elution
 Temp.: 40°C; Inj. vol.: 5 μL

Fig. 6 ピーク面積比の比較

Fig. 7は、農薬34成分の一斉分析結果です。LC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)では中性溶離液を使用することになっています。同じグラジエント勾配で酢酸アンモニウムから水酸化アンモニウムに変えるだけで、分離の改善と感度向上が可能です。

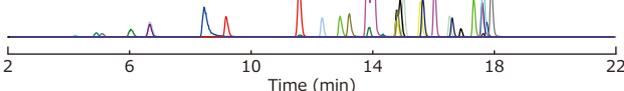
アルカリ性溶離液

A) 5 mM NH₄OH in H₂O
 B) 5 mM NH₄OH in CH₃OH



中性溶離液

A) 5 mM CH₃COONH₄ in H₂O
 B) 5 mM CH₃COONH₄ in CH₃OH



[Analytical conditions]
 Column: L-column3 C18, 3 μm; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A/B, 85/15-60/40-60/40-50/50-45/55-5/95-5/95
 (0-1-3.5-6-8-17.5-30)
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Inj. vol.: 5 μL; MS: ESI-MS/MS(+)

Fig. 7 アルカリ性溶離液での分離と感度の改善(農薬34成分)

「負荷量の増加」

Fig. 8は、塩基性医薬品のホモクロルシクリジンを、リン酸緩衝液において、溶離液のpHを変えて注入量によるピーク形状を比較しました。塩基性物質では、アルカリ性溶離液において解離が抑えられた状態になるので、注入量が多くなっても保持時間のずれもなく、シャープなピークが得られます。

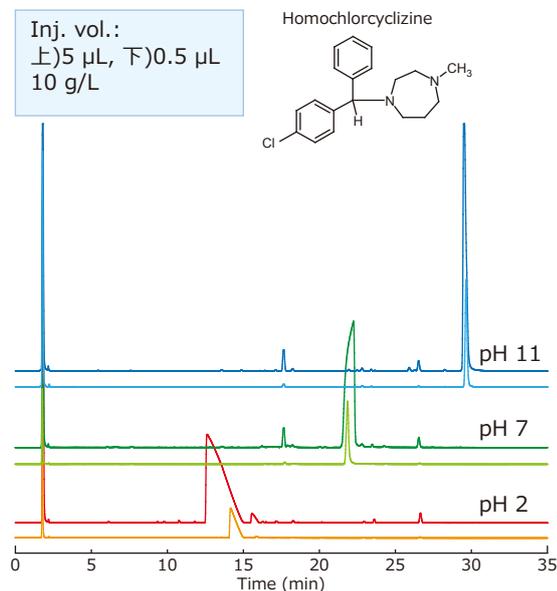


Fig. 8 注入量の比較(塩基性物質)

[Analytical conditions (Fig. 8, Fig. 9)]
Column: L-column3 C18, 5 μm; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: A) CH₃CN, B) 25 mM Phosphate buffer
A/B, 5/95-75/25-75/25 (0-30-40 min)
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C
Detection: UV 240 nm (Fig. 8), UV 220 nm (Fig. 9)

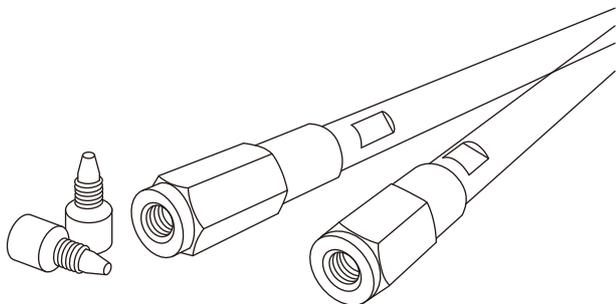


Fig. 9は、ホモクロルシクリジンの分解物 ※2 を大量注入してピーク数を比較しました。アルカリ性溶離液にすると、メインピークはシャープに検出され、分解物のピークが数多く検出されました。

これにより次の利点が挙げられます。

- ・ 塩基性物質の負荷量が増加し、分取効率がアップ
- ・ フリー体での分取が可能
- ・ 分解物や不純物の分離改善

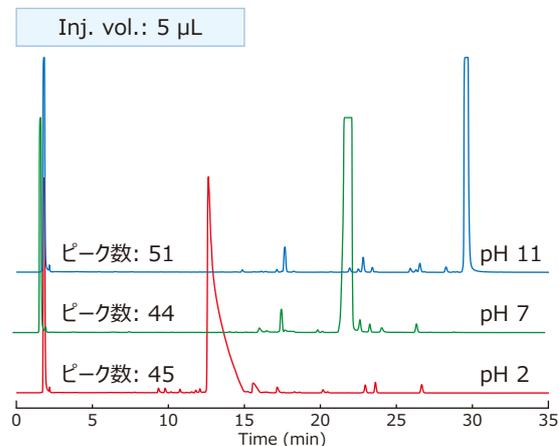


Fig. 9 塩基性医薬品の分解物の分析 ※2

(補足)

このTechnical Reportにおける溶離液の調製方法は次のとおりです。分析目的により試薬のグレード(HPLC用など)を選択してください。

0.1% ギ酸

ギ酸 1 mL を水で全量を 1000 mL にする

5 mM ギ酸アンモニウム

1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 5 mL
水で全量を 1000 mL にする

5 mM 酢酸アンモニウム

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 5 mL
水で全量を 1000 mL にする

5 mM 炭酸水素アンモニウム(重炭酸アンモニウム)

炭酸水素アンモニウム(M.W=79.06) 0.40 g
水で全量を 1000 mL にする

5 mM 水酸化アンモニウム(アンモニア水)

0.1 mol/L アンモニア水 50 mL
水で全量を 1000 mL にする

※2 10 g/L ホモクロルシクリジンに過酸化水素水を添加して70時間静置したものを使用しています。

アルカリ性溶離液を使用するときの注意

pHが高い溶離液は、耐アルカリ性のカラムでも厳しい条件です。分析目的により溶離液のpHを選択しましょう。

カラムの取扱説明書に従い、使用可能なpHを厳守してください。使用可能なpHでも、次のような場合はカラム性能の低下を促進します。

- ・ 有機溶媒比率が少ない
- ・ 高いカラム温度で使用する
- ・ 高濃度に添加している

使用するLCやLC/MSを耐アルカリ性の部品に交換する場合があります。詳しくは機器メーカーにお問合せください。

使用後は添加剤を含まない溶液でカラムを含めた流路を洗浄してください。

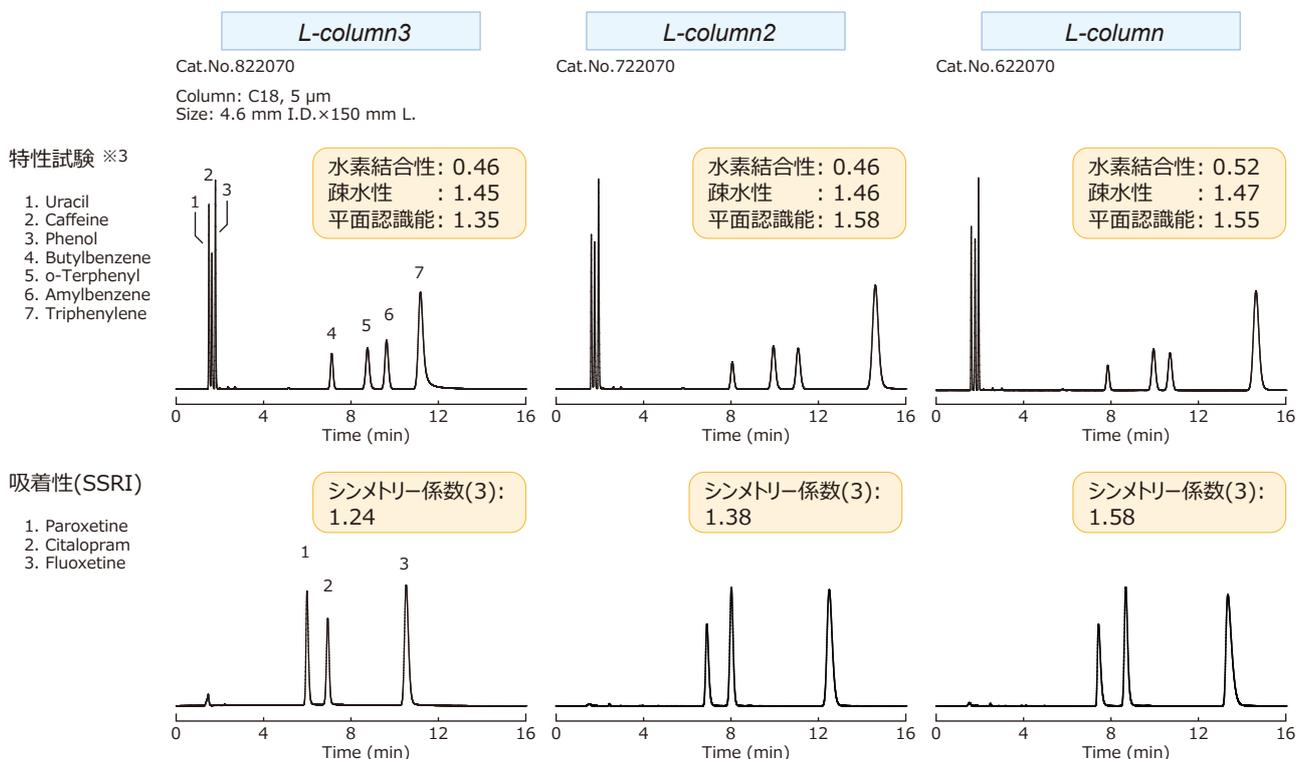
例)

アセトニトリル/5 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液(40/60)で分析した場合…

アセトニトリル/水(40/60)でカラム容量の10倍以上を送液します。分析時の半分程度の流速で送液してください。

L-column シリーズについて

L-column シリーズは、1990年に登場し、「低吸着」「高耐久性」「高分離能」「高再現性」をコンセプトに、ユーザーのニーズに対応して進化してきました。充填剤の製造方法が異なるため、同じC18(ODS)カラムでも、多成分一斉分析において分離パターンが異なる場合があります。



基材	PCSシリカ(全多孔質高純度シリカ)	全多孔質高純度シリカ	全多孔質高純度シリカ
エンドキャッピング	耐久型高度エンドキャッピング	高度エンドキャッピング	高温気相エンドキャッピング
使用 pH 範囲 ※4	pH 1 - pH 12	pH 2 - pH 9	pH 2 - pH 9
特徴	L-column、L-column2と比較し、保持が小さく、平面認識能は若干小さめです。低吸着性はL-column2と同等かそれ以上です。耐アルカリ性だけでなく、水比率の多い溶離液での耐久性も飛躍的に向上しました。	シラノール基の影響を極限まで抑えました。メタルフリーカラムなどラインアップが豊富です。	1990年から長年の安定供給により安心してお使いいただけます。

L-column3 C18

粒子径	3 μm, 5 μm
細孔径	12 nm
化学結合基	オクタデシル基(ODS)
USP category	L 1

(2018年1月現在。最新情報は、ホームページをご覧ください)

※3 特性試験では、次の値を評価しています。
 <水素結合性> $k(\text{Caffeine}) / k(\text{Phenol})$
 ODSやC8では、充填剤中のシラノール基と試料との水素結合の影響を表す値で、水素結合性の高いカフェインと水素結合性の低いフェノールの保持係数の比で表します。その値が大きいくほど充填剤と水素結合が起こりやすくなります。
 <疎水性> $k(\text{Amylbenzene}) / k(\text{Butylbenzene})$
 充填剤の保持力の大きさを表す値で、アミルベンゼンとブチルベンゼンの保持係数の比で表します。その値が大きいくほど疎水性が高く、保持時間が遅くなります。
 <平面認識能> $k(\text{Triphenylene}) / k(o\text{-Terphenyl})$
 平面認識能を表す値で、平面化合物であるトリフェニレンと非平面化合物のo-ターフェニルの保持係数の比で表します。その値が大きいくほど、平面化合物の保持が大きくなります。

※4 化学結合基がC18(ODS)の場合

リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店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