

親水性化合物の分析

逆相イオン対クロマトグラフィー

逆相クロマトグラフィーは、疎水性の固定相と水、アセトニトリル、メタノールなどの混合溶液を移動相に使用します。逆相クロマトグラフィーにおいて、親水性化合物の分析にはコツが必要です。ここでは、イオン対試薬を用いた親水性化合物の分析方法を紹介します。

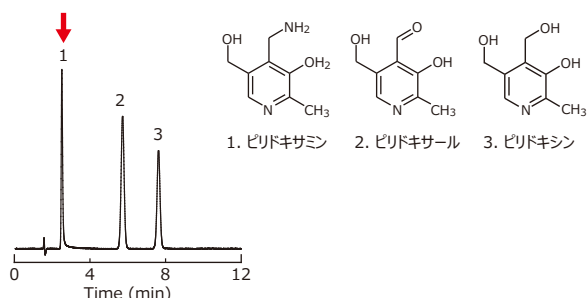
Keywords 親水性化合物 イオン対試薬(イオンペア試薬) 逆相イオン対クロマトグラフィー(逆相イオンペアクロマトグラフィー)

親水性化合物について

逆相クロマトグラフィーにおける親水性化合物について、疎水性化合物と比較してみましょう。

親水性化合物	疎水性化合物
水との相溶性が高いため、水と混ざりやすい。	水との相溶性が低いため、水と混ざりにくい。
固定相との疎水性相互作用が弱い、若しくは働かず、保持が弱い。	固定相との疎水性相互作用が強く働き、保持が強い。

C18(ODS)カラムの充填剤表面は疎水性です。親水性化合物のビタミンB₆群は、保持が弱いので、中性付近の水系溶離液100%で分析しました。このときピリドキサミンはほとんど保持していません。



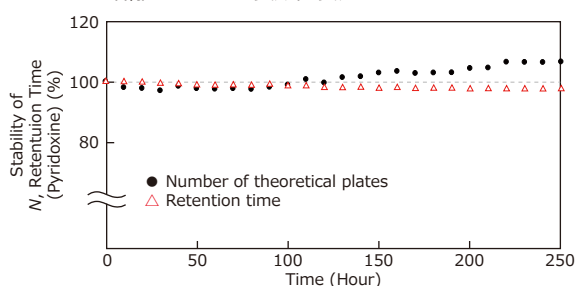
[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 5 μ m; Size: 2.1 mm I.D. $\times$ 150 mm L.
Eluent: 25 mmol/L Phosphate buffer pH 7
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 320 nm
Inj. vol.: 1 μ L

Application Data No.L3011

これでは保持のコントロールができないですね。

一般的なシリカ系カラムは、有機溶媒を含まない水100%の溶離液での使用は劣化を早めるので、おすすめしません。

参考: L-column3 は充填剤の化学的耐久性が非常に高いため、水100%の溶離液であっても長期間安定しています。



[Durability test conditions]
Column: L-column3 C18, 5 μ m; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: 25 mmol/L Phosphate buffer pH 7
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 50°C

親水性化合物のイオン性物質は、イオン形になるように溶離液のpHを調整して、逆の電荷のイオン対試薬を添加します。

イオン形？

ここで、おさらいです。

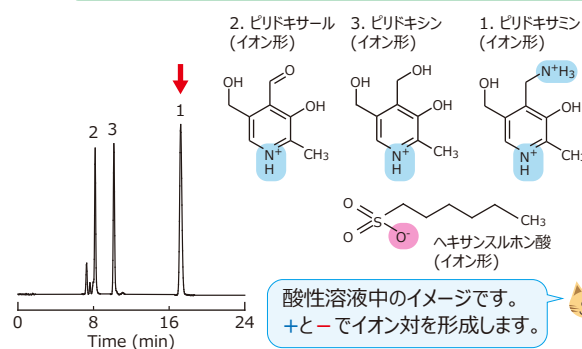
酸性物質	塩基性物質
pKa(酸解離定数)より高いpHで、イオン形 → 保持が弱い	pKa(酸解離定数)より高いpHで、分子形 → 保持が強い
低いpHで、分子形 → 保持が強い	低いpHで、イオン形 → 保持が弱い

LC Technical Report Vol.12 解離性物質の分析のコツ
LC Technical Report Vol.21 HPLC基礎(逆相クロマトグラフィー実践編)

実際の分析例です。

ピリドキサミンは、ピリジン環と一級アミンを有する塩基性物質です。酸性溶液中ではイオン形で存在します。溶離液を酸性にすると、ピリドキサミンのピリジン環の窒素原子とアミンの二カ所が解離し、添加したヘキサンスルホン酸とイオン対を形成します。結果、疎水性が増大します。

ピリドキサミンの保持が一番強くなりました。



酸性溶液中のイメージです。
+と-でイオン対を形成します。

[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μ m; Size: 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm L.
Eluent: A/B/C, 8/72/20
A: CH₃CN, B: 20 mmol/L H₃PO₄ in H₂O
C: 25 mmol/L C₆H₁₃SO₃Na in H₂O
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 210 nm
Inj. vol.: 20 μ L

Application Data No.L2032改

このように、イオン形の分析種とイオン対を形成するために添加する試薬をイオン対試薬といいます。この分離モードが「逆相イオン対クロマトグラフィー」です。水系溶液と有機溶媒の比率で保持をコントロールできます。

有機溶媒も含まれているので、カラムにも優しい条件ですね。

代表的なイオン対試薬の種類と特徴

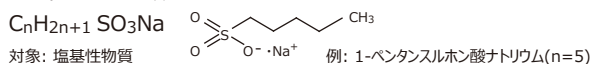
アミノ酸を例に説明します。アミノ酸は両性物質です。

■ 塩基性物質の分析に用いるイオン対試薬

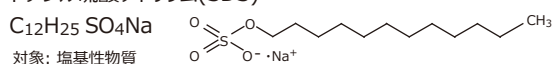
アミノ酸は、酸性溶液中でアミノ基が解離して、正の電荷を帯びています。ここにイオン対試薬(例: アルキルスルホン酸塩)を添加すると、電荷を打ち消しあってイオン対を形成します。



アルキルスルホン酸ナトリウム



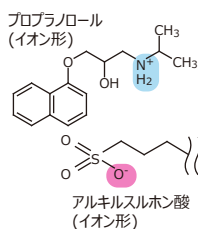
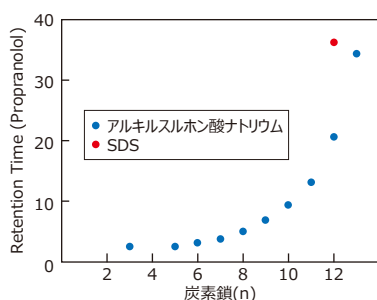
ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)



アルキルスルホン酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウムは強酸性です。pH 2付近ではイオン形になります。

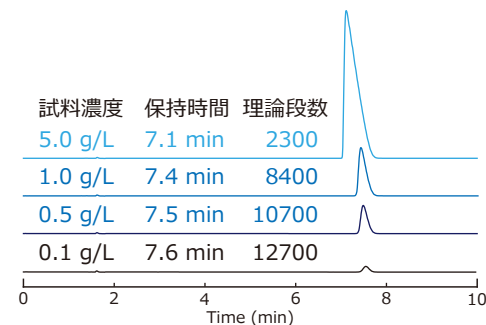
アルキルスルホン酸は、炭素鎖が長いほどイオン対を形成した分析種の疎水性が増し、保持が強くなります。炭素鎖が長いほど水に溶解しにくく、泡立ちやすいので注意が必要です。

保持を強くしたい場合は、水に溶解しやすいドデシル硫酸ナトリウムを使った方がいいですね。



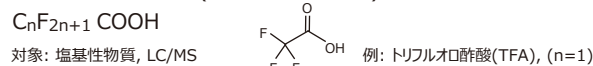
[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D.×150 mm L.
Eluent: A/B, 30/70
A: CH₃CN
B: 20 mmol/L H₃PO₄ and 10 mmol/L C_nH_{2n+1}SO₃Na or SDS in H₂O
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 230 nm
Inj. vol.: 1 μL; Sample: Propranolol (0.1 g/L)

試料濃度が高いと、安定してイオン対を形成できず、保持時間やピーク形状に影響します。このような場合、イオン対試薬の濃度を高めます。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D.×150 mm L.
Eluent: A/B, 30/70
A: CH₃CN, B: 20 mmol/L H₃PO₄ and 5 mmol/L C₆H₁₃SO₃Na in H₂O
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 230 nm
Inj. vol.: 1 μL; Sample: Propranolol

ペルフルオロカルボン酸(パーフルオロ脂肪酸)

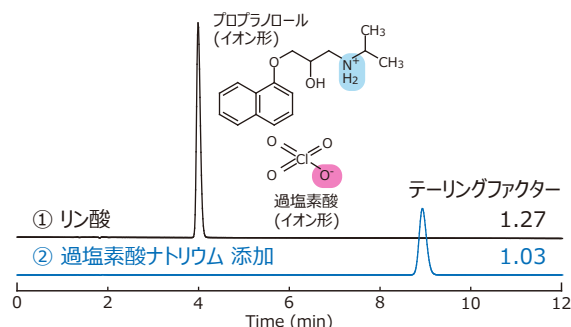


ペルフルオロカルボン酸は、LC/MSでも使えます。

過塩素酸ナトリウム



過塩素酸は親水性のイオン対試薬なので、イオン対を形成した分析種自体の疎水性により保持の強弱が決定します。有機溶媒への溶解度が高く、100~200 mmol/Lで使用します。塩基性物質のテーリング抑制効果が期待できます。

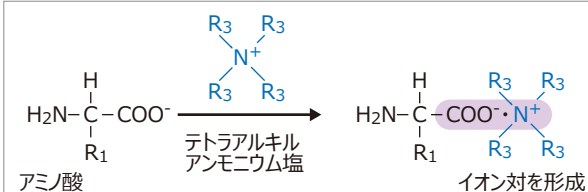


[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D.×150 mm L.
Eluent: A/B, 30/70
A: CH₃CN
B①: 20 mmol/L H₃PO₄ in H₂O
B②: 20 mmol/L H₃PO₄ and 100 mmol/L NaClO₄ in H₂O
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 230 nm
Inj. vol.: 1 μL; Sample: Propranolol

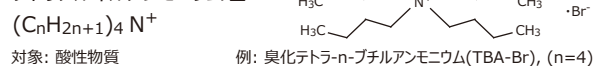
LC Technical Report No.12

■ 酸性物質の分析に用いるイオン対試薬

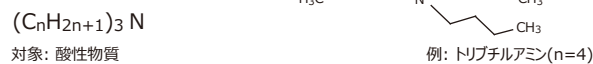
アミノ酸は、中性溶液中でカルボキシ基は解離して、負の電荷を帯びています。ここにイオン対試薬(例: テトラアルキルアンモニウム塩)を添加すると、電荷を打ち消しあってイオン対を形成します。



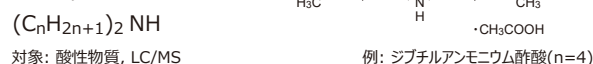
テトラアルキルアンモニウム塩



トリアルキルアミン



ジアルキルアンモニウム塩



これらアンモニウム塩やアミンは塩基性です。pH 7付近でイオン形になります。

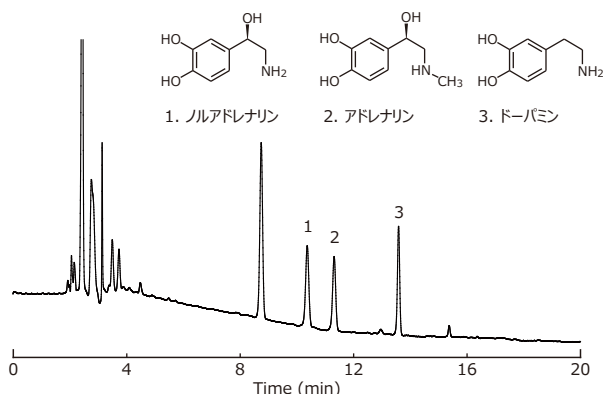
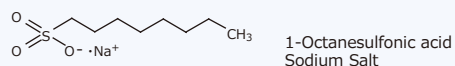
炭素鎖が長いほど、イオン対を形成した分析種の疎水性が増し、保持が強くなります。テトラアルキルアンモニウムは第四級アンモニウム塩です。リン酸、Cl、Brなどがあります。

実例で親水性化合物の分析方法を学ぶ

■ カテコールアミン

カテコールアミンは、中枢・自律神経系及び抹消組織などで作用する神経伝達物質です。血中や尿中の存在濃度は極低濃度なので高感度な検出法が必要となります。ここでは除タンパクした血清にカテコールアミンを添加した試料を分析しました。

分析対象 : 塩基性物質
溶離液 : 弱酸性(pH 5.7)
イオン対試薬 : オクタンスルホン酸ナトリウム

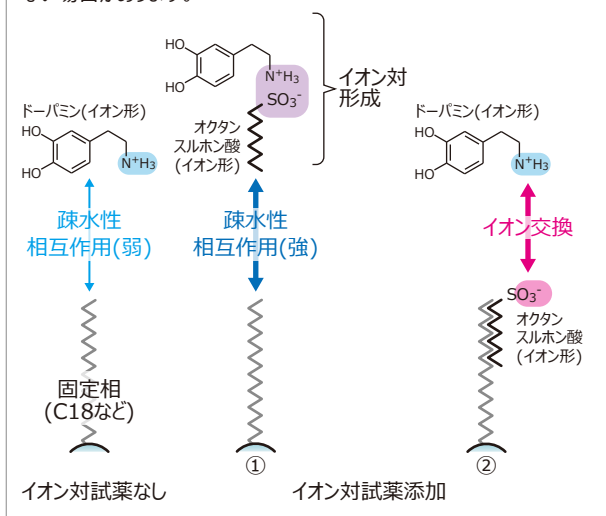


[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 5 µm; Size: 4.6 mm I.D.×250 mm L.
Eluent: A/B, 5/95-40/60 (0-20 min)
A: CH₃CN
B: 10 mmol/L C₈H₁₇SO₃Na in 100 mmol/L phosphate Buffer pH 5.7
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 20°C; Detection: UV 280 nm
Inj. vol.: 20 µL (5 mg/L)

Application Data No.L2154改

カテコールアミンとオクタンスルホン酸は、弱酸性付近でイオン形となり、電荷を打ち消しあってイオン対を形成します。

参考: イオン対試薬が分析種の分離に作用する機構について、主に①イオン対を形成し、分析種の疎水性が増す、とされています。他にも②固定相に蓄積し、分析種とイオン交換する、などがあります。これらは複雑に作用しているため、分離のメカニズムが明確に説明できない場合があります。



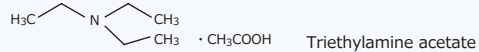
難しいけど大丈夫。まずは「イオン対形成」を考えましょう。保持時間やピーク形状などに問題があったら、他の分離機構が働いているか、考えて問題解決しましょう。

は〜い。

■ オリゴヌクレオチド

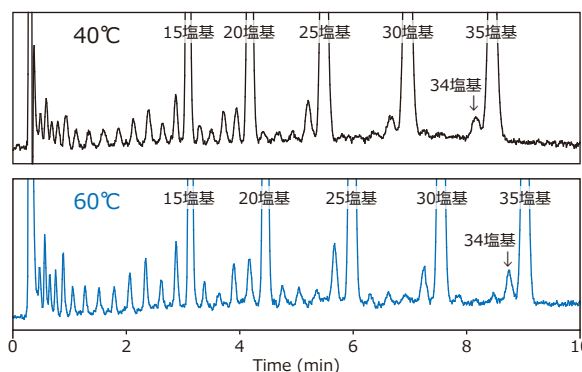
オリゴヌクレオチドは、核酸が直鎖状に重合したものです。このオリゴヌクレオチドを基本骨格として合成されるのが核酸医薬品です。ここでは、塩基の長さの異なるオリゴヌクレオチド(15〜35塩基)を分析しました。

分析対象 : 酸性物質
溶離液 : 中性(pH 7.0)
イオン対試薬 : 酢酸トリエチルアミン(TEAA)



中性では、リン酸基は解離、核酸塩基は解離していません。

温度が高いとカラム内での物質移動が早くなります。特に分子の大きな化合物は顕著で、ピークがシャープになります。ここではカラム温度を変えて分離を比較しました(10分以内に溶出するように溶離液比率を変えています)。60°Cでは塩基数が1つ少ない微量のオリゴヌクレオチドの分離が向上しました。



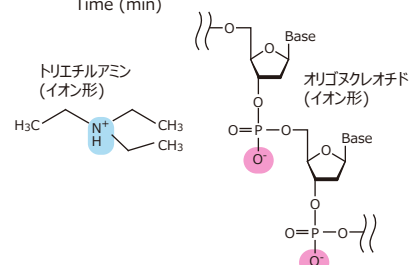
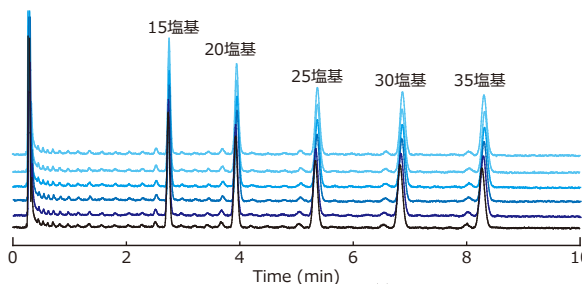
[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 2 µm; Size: 2.1 mm I.D.×50 mm L.
Eluent: (40°C) A/B, 50/50-56/44-61/39 (0-2-10 min)
(60°C) A/B, 46/54-52/48-59/41 (0-2-10 min)
A: 100 mmol/L TEAA in H₂O pH 7.0/CH₃CN (80/20)
B: 100 mmol/L TEAA in H₂O pH 7.0
Flow rate: 0.5 mL/min; Detection: UV 265 nm
Inj. vol.: 1 µL; Sample: Waters MassPREP OST Standard (10 µmol/L)

Application Data No.L3038

温度が高いと、カラムの劣化が心配です。

一般に温度が高いと劣化が早くなります。L-column3は非常に耐久性が高いので、このような中性溶離液と高温での分析条件にもオススメです。

60°Cでの再現性は良好です。25塩基の保持時間のCV値は、0.4%(n=6)でした。

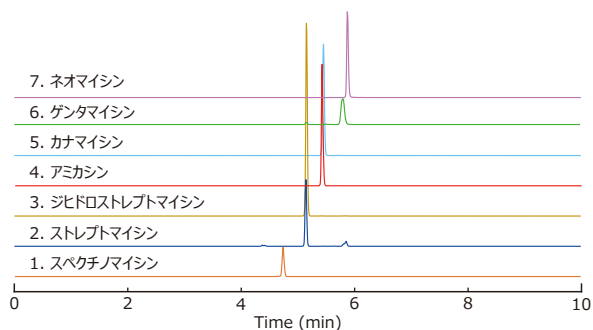
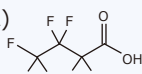


■ アミノグリコシド系抗生物質

アミノグリコシド系抗生物質(アミノ配糖体系抗生物質)は、細菌のタンパク質合成を阻害し、強い殺菌作用があるので、様々な医薬品に幅広く使われています。

分析対象 : 塩基性物質
溶離液 : 酸性(pH 1)
イオン対試薬 : ヘプタフルオロ酪酸(HFBA)

Heptafluorobutyric acid (Perfluorobutyric acid)

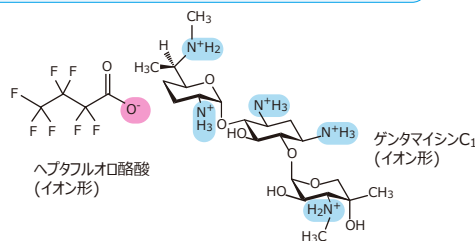


[Analytical conditions]

Column: L-column2 ODS, 3 μ m; Size: 2.0 mm I.D. $\times$ 150 mm L. (MF)
Eluent: A/B, 10/90-80/20 (0-10 min)
A: 5 mmol/L HFBA in CH_3CN
B: 5 mmol/L HFBA in H_2O
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ECI-MS/MS(+)
Inj. vol.: 5 μ L (1 mg/L)

Application Data No.L2139

HFBAは、揮発性のイオン対試薬なので、LC/MSで使用可能です。また溶液は酸性なので、pH調整は不要です。

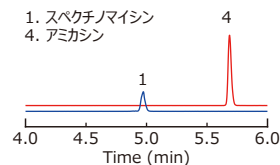
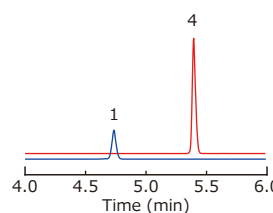


ここではメタルフリーカラムを用いました。
ステンレスカラムとの比較結果は以下のようになりました。

参考: アミノグリコシド系抗生物質は、化学構造に金属配位しやすいヒドロキシ基(-OH)やアミノ基(-NH₂)が複数あるため、配管やカラムへの吸着が懸念されます。メタルフリーなシステム環境と、メタルフリーカラムの組合せで再現性の良い結果が得られます。

メタルフリーカラム
2.0 mm I.D. $\times$ 150 mm L.

ステンレスカラム
2.1 mm I.D. $\times$ 150 mm L.



まとめ

親水性化合物の分析は、分析種の物性(pKa)と溶離液のpH、それらに合ったイオン対試薬を選択をすれば、逆相イオン対クロマトグラフィーで分析できます。

分離モードの中で最も使われている逆相モードで分析できるので、使用できる溶離液の種類が多く、分析例も豊富にあります。

■ イオン対試薬を用いた逆相イオン対クロマトグラフィーの注意

イオン対試薬を用いると、カラムと溶離液が平衡化するのに時間を要します。再現性を良くするために、次のことにも留意してください。

- 分析種とイオン対試薬が確実にイオン形になるように溶離液のpHを調整する(pKa $\pm$ 2以上離れたpHにする)
- イオン対試薬の濃度を最適化する(過剰に高濃度になると、カラム劣化が早くなる、析出しやすくなる)
- グラジエント溶離ではイオン対試薬の濃度が変わるので、再現性や析出ししないことを確認する
- イオン対試薬専用のカラムにする

疎水性が高いイオン対試薬は、ODSなどの固定相に蓄積しやすく、洗浄しても残留している場合があります。違う溶離液で使うと、後の分析に影響するかもしれません。

カラムの洗浄方法はコチラ
LC Technical Report Vol.15 カラムを長持ちさせるコツ

減圧脱気ユニットの樹脂膜に残存する、ともいわれています。
LCシステム全体の洗浄にも気を付けましょう。



は〜い。だいぶ分かってきました。



ちなみに、アルキルスルホン酸は界面活性剤です。環境水や錠剤など試料中に含まれる場合、イオン対試薬と同じように、固定相への蓄積したり、分析種と想定外のイオン対を形成することもあるので、注意しましょう。



……はい。がんばります。

参考文献

JIS K 0124: 2011 高速液体クロマトグラフィー通則

JIS K 0214: 2013 分析化学用語(クロマトグラフィー部門)

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。



一般財団法人 化学物質評価研究機構
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

<https://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