

温度の影響

温度をコントロールして分析メソッドをワンランクアップ

逆相クロマトグラフィーにおいて「温度」を分析条件の一つとして検討することは、あまり多くはありません。温度を固定して溶離液の種類を変えることがほとんどです。ここでは、温度を変えるとクロマトグラムなどがどのように変化するかを示しました。

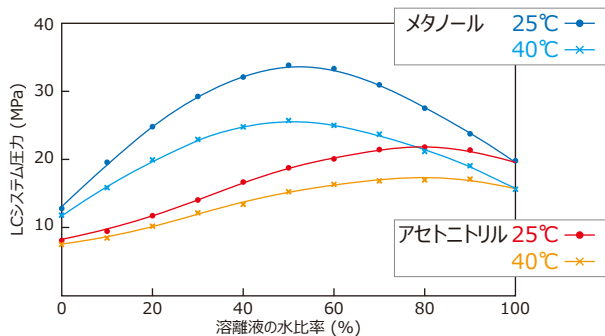
Keywords 温度 粘度(粘性率) 拡散係数(拡散率) イオン性化合物 互変異性 ペプチド オリゴヌクレオチド カラム劣化

温度がもたらす変化

液体の粘度が変わります

液体の温度が高くなると、粘度は低くなります。水の粘度は、他の液体よりも変化が大きいので、水との混合溶液では、温度による粘度の変化が大きくなります。
粘度が高くなると、送液時の抵抗が大きくなります。

粘度が高いと、カラムを含むLCシステム圧力が上昇します。溶離液としてよく使われる、メタノールとアセトニトリルの水混合溶液を送液したときのシステム圧力をプロットしました。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 2 µm; Size: 2.1 mm I.D.×50 mm L.
Eluent: CH₃CN or CH₃OH/H₂O; Flow rate: 0.4 mL/min
System: Agilent 1200 SL

低い温度の方が、システム圧力が高いですね。

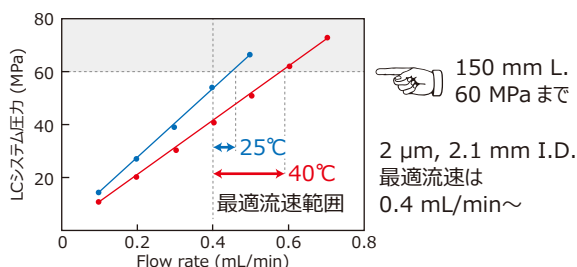
はい。粘度は温度にも関係しますが、有機溶媒と水の比率にも依存します。ちなみに各溶媒の粘度は以下のとおりです。

メタノール : 0.55 mPa·s (20°C)
アセトニトリル : 0.34 mPa·s (25°C)
水 : 1.00 mPa·s (20°C)

参考: 改訂2版高速液体クロマトグラフィーハンドブック

ポイント

カラムには使用可能な圧力上限が決まっています。温度を高くすれば、カラムを含むLCシステム圧が低くなるので、幅広い溶離液組成、最適な溶離液の流速を選択できます。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 2 µm; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃CN/H₂O (50/50); Temp.: 25°C or 40°C
System: Agilent 1200 SL

溶媒中の溶質の拡散係数(拡散率)が変わります

溶媒の温度が高くなると、粘度が低くなり、溶媒中の溶質の拡散係数が増加します。
一般に粘度(流れに対する抵抗)と拡散係数は反比例します。

ポイント

溶質(分析種)の拡散係数が大きく、固定相と移動相間の分配平衡が進むと、カラム効率が高くなります。

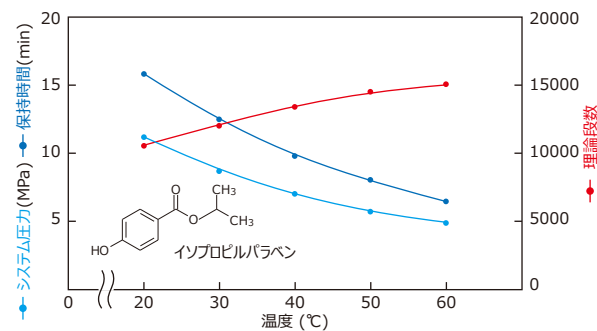
そのため、同じ溶媒なら、温度を高くして粘度を低下させた方が拡散係数を増加させることができ、有利です。

保持時間が変わります

「温度が高くなると、保持時間が早くなった」ということは誰もが経験していると思います。



化粧品の防腐剤として使用されるイソプロピルパラベンを用いて実験しました。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 µm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃OH/20 mM/L Phosphate buffer pH 7 (50/50)
Flow rate: 1 mL/min
Inj. Vol.: 1 µL; Sample: Isopropyl p-Hydroxybenzoate

予想通り、温度が高くなると、保持時間が早くなりました。

この実験では、温度上昇に伴い理論段数が高くなりました。理論段数は、ピーク幅だけでなく保持時間が関係しているのでこの実験結果と同じにならない場合もあります。

ちなみに理論段数(N)は、カラム効率を表す指標の一つです。理論段数は、次式によって定義されます。

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5h}} \right)^2$$

t_R : 保持時間
 W : ピーク幅
 $W_{0.5h}$: ピーク半値幅

液体クロマトグラフィーにおける「温度」は、ガスクロマトグラフィーと比較してあまり重要視されないファクターですが、上手にコントロールすると、思わぬ結果をもたらす場合があります。

次はその一例を紹介します。

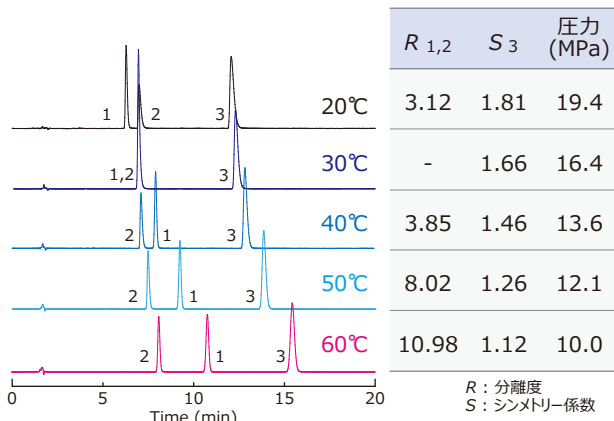
温度によるクロマトグラムへの影響①

■ イオン性化合物

一部のイオン性化合物は、温度変化によってpKa及びイオン化エンタルピーが変化するとされています。

参考: S. Heinisch, et al., J. Chromatogr. A, 1216, 642-658 (2009).

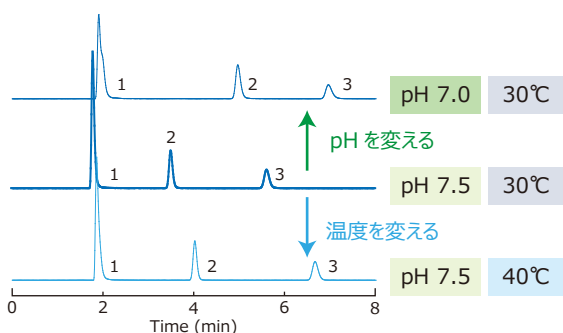
抗うつ薬 SSRI(塩基性物質)



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 3 µm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃CN/25 mmol/L Phosphate buffer pH 7(35/65)
Flow rate: 1 mL/min
Detection: UV 230 nm; Inj. vol.: 2 µL
Sample: 1. Paroxetine; 2. Citalopram; 3. Fluoxetine

- 温度が高くなると、保持時間が遅くなりました。
- 温度が高くなると、pKaが低下します。
塩基性物質は、温度上昇と共に分子形としての存在が多くなったため、疎水性が増し、保持が強くなったと考えられます。
- シンメトリー係数が小さくなりました。
パロキシセチン(ピーク1)とシタロプラム(ピーク2)の溶出順が逆転し、分離度が大きく変わりました。
- 温度を変えた時の保持やピーク形状の変化の傾向は、分析種によって異なります。温度を変えた際は注意しましょう。

アミノピリジン(塩基性物質)



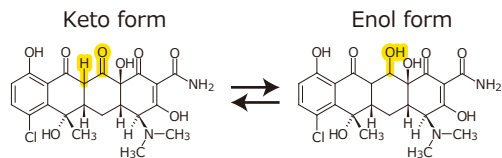
[Analytical conditions]
Column: L-column ODS, 5 µm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃OH/25 mmol/L Phosphate buffer pH 7.0 or pH 7.5 (10/90)
Flow rate: 1 mL/min
Detection: UV 254 nm; Inj. vol.: 2 µL
Sample: 1. 4-Aminopyridine; 2. 3-Aminopyridine; 3. 2-Aminopyridine

- イオン性化合物は、溶離液のpHで保持やピーク形状が変わります。温度を変えても、同じような変化になることがあります。
- pHを細かく調整するのは面倒です。温度で保持やピーク形状をコントロールの方が、簡単ですね。

■ 互変異性の化合物

相互変換できる構造異性体間の平衡を互変異性といいます。互変異性の多くは、水素原子の結合位置が異なる互変異性体間の平衡で、その代表的な例が、ケト-エノール互変異性です。

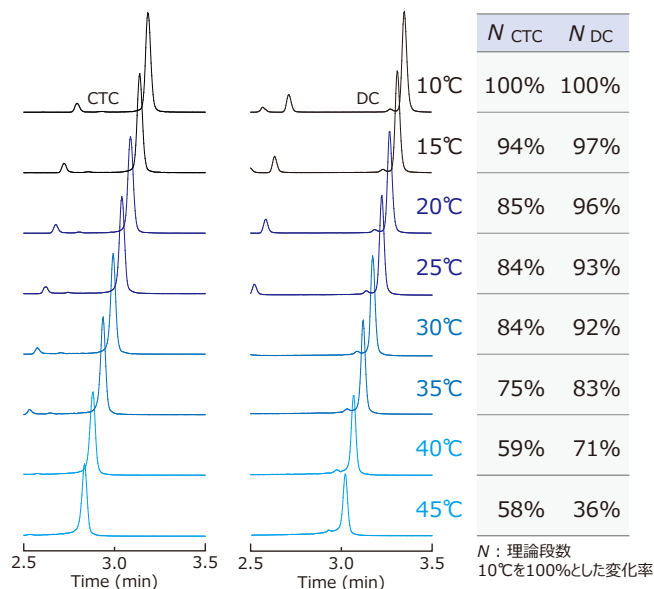
参考: 化学辞典第2版



Keto-enol tautomerism of CTC

温度を変えて、テトラサイクリン系抗生物質のクロルテトラサイクリン(CTC)とドキシサイクリン(DC)を分析しました。

テトラサイクリン系抗生物質



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 3 µm; Size: 2.0 mm I.D., 50 mm L., Metal-free
Eluent: A: CH₃CN, B: 0.1% HCOOH in H₂O; A/B, 5/95-50/50 (0-5 min)
Flow rate: 0.3 mL/min
Detection: ESI-MS/MS(+); Inj. vol.: 5 µL
Sample: Chlortetracycline (CTC); Doxycycline (DC)

Application Data No.L2124

温度が高くなると、保持時間が早くなり、ピーク形状が悪くなりました。なぜ?

これらのテトラサイクリン系抗生物質には、ケト体とエノール体が存在します。温度が高いと、カラム内でのケト体とエノール体の相互変換を促進するため、ピーク形状が悪くなったのです。

ポイント

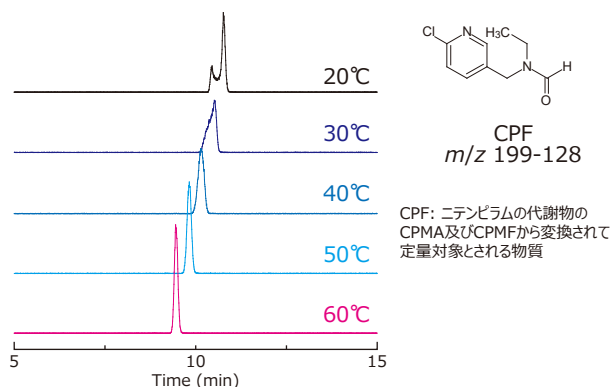
一般に温度が高くなると、保持時間が早くなり、ピークはシャープになります。しかし、温度により化学ポテンシャルが変化する分析種では、異なる傾向になる場合もあります。注意しましょう。

分析種のpKaは温度上昇とともに小さくなります。溶離液に用いる緩衝液のpHも同様で、温度上昇と共にわずかに小さくなります。温度が変わると、溶離液と分析種との分配係数も変化します。

このように、温度がクロマトグラムに与える影響は、様々な要因が複雑に関わっています。そのため、実際に分析してみなければ、分からないことが多くあります。

温度によるクロマトグラムへの影響②

ネオニコチノイド系農薬(ニテンピラムの代謝物)



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 3 μ m; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃CN/0.1% CH₃COOH and 5 mmol/L CH₃COONH₄ in H₂O A/B, 10/90-40/60 (0-15 min)
Flow rate: 0.2 mL/min
Detection: ESI-MS/MS(+); Inj. vol.: 3 μ L

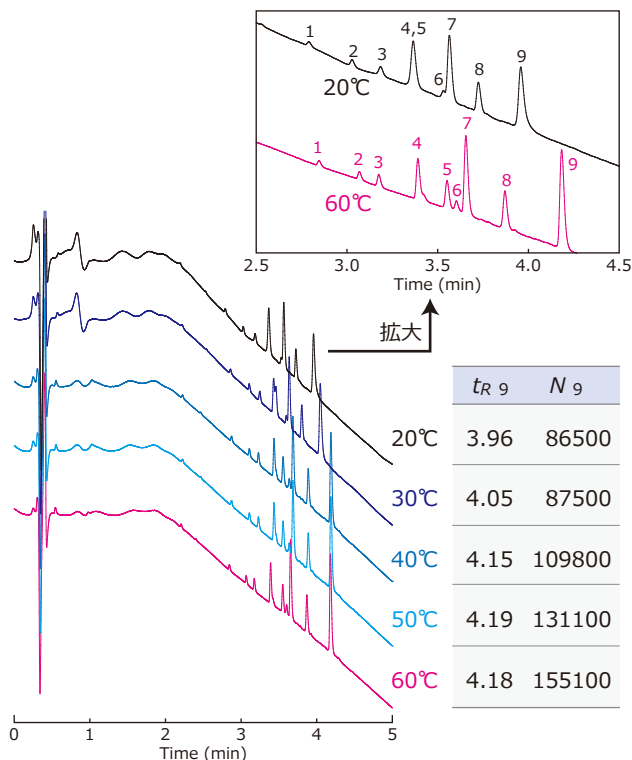
Application Data No.L2127

ペプチド

分子量が大きいほど、溶液中の拡散速度が遅くなります。



温度を変えて、ペプチド標準品を分析しました。



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 3 μ m; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
Eluent: A: CH₃CN, B: 0.1% HCOOH in H₂O; A/B, 5/95-50/50 (0-5 min)
Flow rate: 0.4 mL/min
Detection: UV 220 nm; Inj. vol.: 5 μ L
Sample: MRPlus Retention Time Marker(FMR-002), Funakoshi Co., Ltd.

Application Data No.L3045

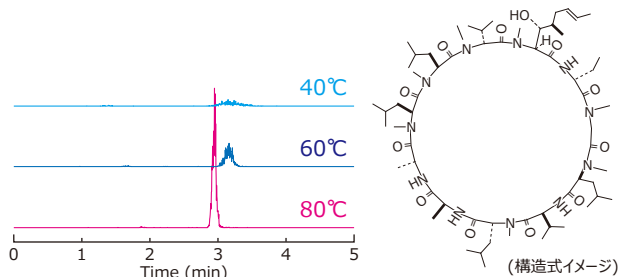


温度が高くなると、各ピークがシャープになりました。

温度が高くなると、拡散速度が大きくなります。固定相と移動相間の物質移動速度が速くなるので、ピークはシャープになります。その傾向は分子量が大きいほど顕著に現れます。



免疫抑制剤(環状ペプチド、シクロスポリンA)



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 3 μ m; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
Eluent: A: CH₃CN, B: 0.1% HCOOH in H₂O; A/B, 50/50-98/2 (0-5 min)
Flow rate: 0.4 mL/min
Detection: ESI-MS/MS(+); Inj. vol.: 2 μ L
Sample: Cyclosporine A

■「温度」に関する注意点

ここまでの分析例で分かるように、温度によって保持やピーク形状が変化します。再現性を良くするために、温度変化が起こらないようにしましょう。



溶離液の温度

二種類以上の物質を混合すると、「混合熱」が発生します。アセトニトリルと水の混合では「吸熱反応」、メタノールと水の混合では「発熱反応」が起こります。

手作業で溶離液を混合し、カラムオープンを使用せずに分析する場合は、溶離液を常温に戻して使用しましょう。



カラムオープンの使用

カラムオープンを用いると、分析場所の温度に影響を受けず、安定したクロマトグラムを得ることができます。カラムオープンには、空気循環とブロックヒーティングを用いた加熱(冷却)があります。また溶離液をカラム導入前に加熱するプレヒーターの有無によっても、カラムの温度が安定するまでの時間が違います。LCシステムを移管した場合は注意しましょう。

カラムオープンを使用している場合、次のようなときは、カラムの外側と中心部、カラムの入口と出口で温度勾配が生じて、ピークがブロードになる場合があります。注意しましょう。



- ・溶離液の流速が速い
- ・カラム内径が大きい
- ・カラム管が厚い
- ・分析場所とオープンの温度差が大きい



ポイント

化学分析方法則(JIS K 0050:2019)では、『標準温度は、20°Cとする。分析場所の温度は、常温(20 $\pm$ 5)°C又は室温(20 $\pm$ 15)°Cのいずれかとする』とあります。

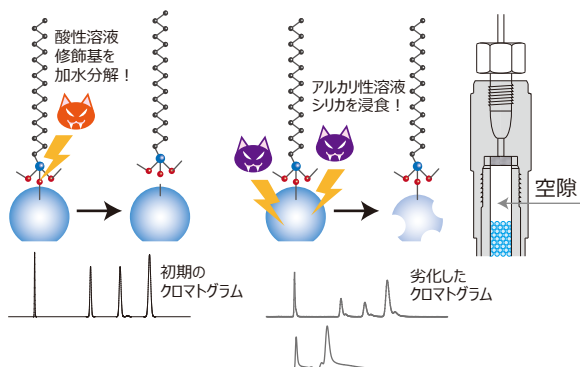
「常温」「室温」にも幅があります。温度変化は分析に影響するので、分析条件への温度は数値を記載することをお勧めします。

温度によるカラムへの影響

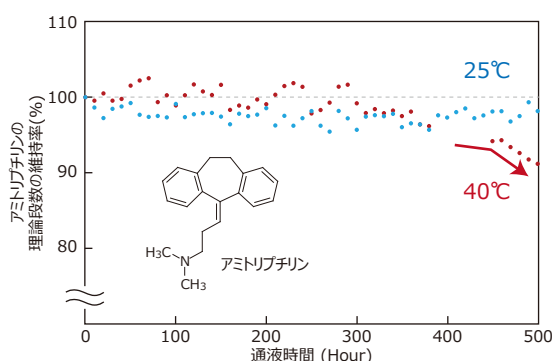
カラムの劣化が早くなります

カラム劣化には、異物の混入によるものと、充填剤へのダメージによるものがあります。充填剤へのダメージとは、C18やエンドキャッピング基など修飾基が離脱したり、シリカ基材が溶解することで、保持時間、ピーク形状、カラム圧力などが変化します。このような変化は温度が高いほど、早く起こります。

充填剤へのダメージのイメージ図です。



ホウ酸溶解液(pH 9)での、温度の違いによるアミトリプチリンの理論段数の維持率の比較です。400時間を超えると、温度の高い方が先に、カラム性能が低下(劣化)し始めました。



[Durability test conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 µm; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃OH/20 mmol/L Boric acid in H₂O pH 9(10/90)
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 25°C or 40°C

[Analytical conditions]
Eluent: CH₃OH/25 mmol/L Phosphate buffer pH 7(80/20)
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C

ポイント

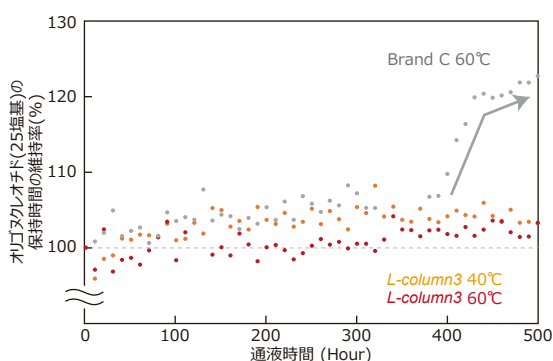
カラムの取扱説明書には、使用温度範囲が明記されていない場合が多いですが、40°C以下で使用すると、比較的長持ちします。

どのような溶離液でも、温度が高い方がカラム劣化は促進されます。特に中性～アルカリ性の溶離液は、加速度的に劣化は進みます。

オリゴヌクレオチド

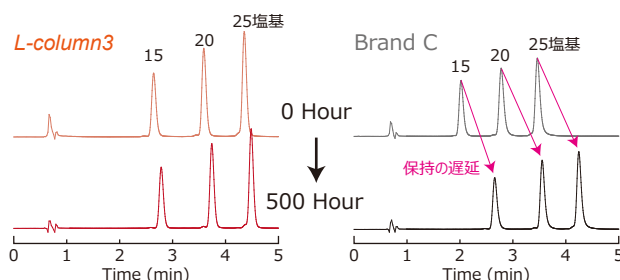
オリゴヌクレオチドは、核酸が直線状に重合したものです。HPLCでは、酢酸トリエチルアミン(TEAA)を添加して保持を大きくさせ、温度を上げてピークをシャープにする分析例があります。そのため、安定したクロマトグラムが得られる、高耐久性のカラムが求められます。

L-column3 は60°Cでも安定した分析結果が得られました。ちなみに、70°Cでは100時間程度安定して使用できます。



[Durability test conditions]
Column: C18, 3 or 3.5 µm; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
Eluent: CH₃CN/100 mmol/L TEAA in H₂O pH 7, Gradient elution
Flow rate: 0.2 mL/min

Application Data No.L3038



[Analytical conditions]
Column: C18, 3 or 3.5 µm; Size: 2.1 mm I.D., 50 mm L.
Eluent: A: CH₃CN, B: 100 mmol/L TEAA in H₂O pH 7, Gradient elution
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 60°C
Detection: UV 265 nm; Inj. vol.: 1 µL
Sample: Oligonucleotide Standard

Application Data No.L3038



温度を上げた分析条件でも、繰り返し安定した結果が得られる、L-column3 はいいですね。

本編中に記載がある文献の他に、以下も参照しました。

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