

クロマニックテクニカルノート 1002

LC/MS 用移動相での分離

0.1%ギ酸を移動相に用いた場合の塩基性化合物
(アミトリプチリン) のピーク形状について

クロマニックテクノロジーズ

長江徳和

0.1% ギ酸移動相での平衡化

問題点

・イオン強度の低い酸性条件(LC/MS用の移動相)において、一般のC18固定相は塩基性化合物の保持時間は数時間かけて、徐々に減少し、**安定するまでに時間がかかる**
・C18固定相内に微量に残存しているシラノール基は、C18アルキル基の疎水場の中に存在するため、シラノール基が平衡状態になるまでに**数時間から十数時間**かかる
また試料過負荷時に分配比の移動相へのずれが大きく、**ピーク形状は直角三角形**に近い形状になり、早く溶出するようになる

解決方法

・固定相内部に存在するシラノール基を極力減らすことにより、シラノール基そのものの影響を排除する

Sunniest C18

・粒子表面のイオン化を高め、疎水場の中にシラノール基が存在していても、シラノール基の周りのイオン化表面により、シラノール基の状態の平衡化を速くさせる充填剤も提案されている

1

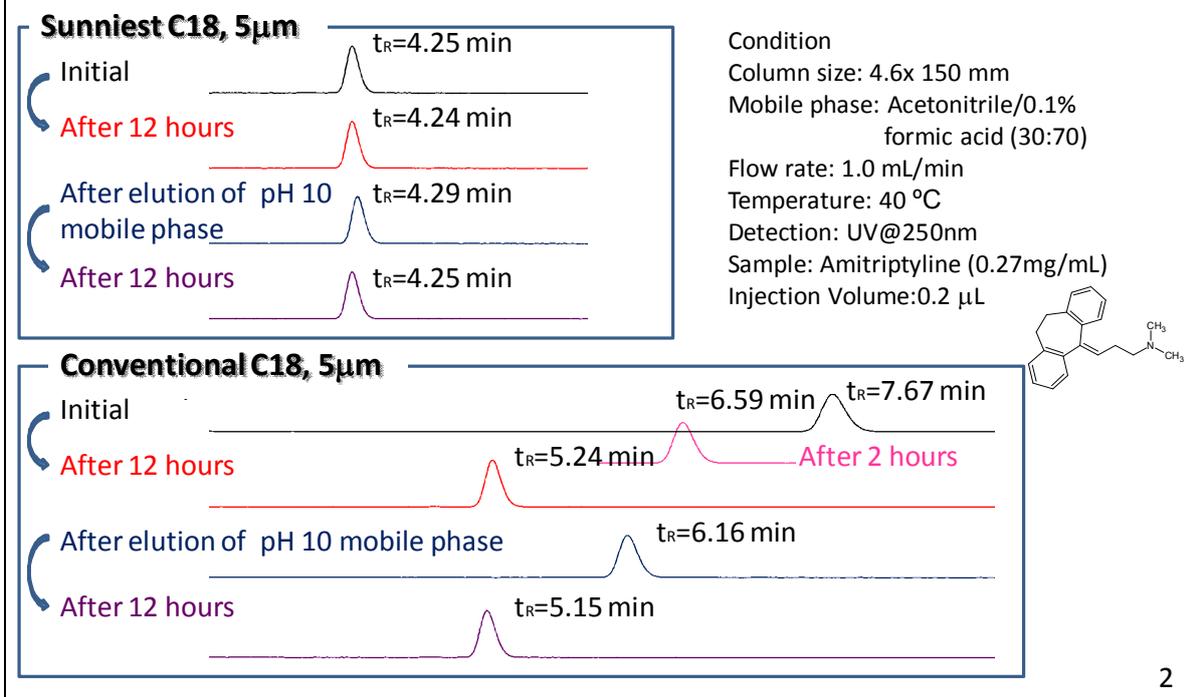
LC/MSで多用される0.1%ギ酸の様なイオン強度が低い酸性条件では、塩基性化合物であるアミトリプチリンはテーリングが起りやすいことが知られています。数年前には資生堂より酸洗浄を追加してピーク形状を改善する方法が発表されていましたが、今年のHPLC2010ではWatersから別の改善方法として、CSH (Charged Surface Hybrid) 技術が提案されました。

逆相モードの主な相互作用である疎水性相互作用のみが働く場合には試料負荷量は大きな値を示します。例えば中性化合物のナフタレンの様な多環芳香族炭化水素は、高い試料過負荷値を示します。しかし、イオン化している塩基性化合物の場合には疎水性相互作用以外の相互作用が働き、試料負荷量は小さくなります。疎水性以外の相互作用としては、シリカ系逆相固定相ではシラノール基による相互作用が考えられます。現在市販されている多くの逆相固定相(C18)は残存シラノール基の影響は非常に少なくなっていると言われておりますが、微量のシラノール基が存在し、塩基性化合物をテーリングさせているのも事実であります。アセトニトリル・10mM 酢酸アンモニウム移動相を用いたアミトリプチリンのピーク形状を比較しますと、程度の差はありますが、ほとんどのシリカ系逆相カラムでテーリングを示します。このように微量に残っているシラノール基とのイオン交換的な相互作用が働く場合に、試料負荷量はこのイオン交換相互作用の許容量が津速になります。このイオン交換相互作用の試料負荷量は疎水性相互作用の試料負荷量よりも、特にシリカ系逆相固定相では、低くなります。イオン交換相互作用が過負荷になった場合には固定相よりも移動相に試料成分が存在するようになりますので、保持時間が短くなり、テーリングを示し、直角三角形のようなピーク形状になります。

提案された改善方法はシラノール基の周りの疎水性が低くなるような操作であり、これによりシラノール基が水和しやすくなり、試料成分とシラノール基とのイオン交換速度が速くなると考えられます。イオン交換相互作用が速いため、安定時間が短く、試料過負荷が緩和されると考えられます。

以上のように微量に残る残存シラノール基が原因であるのであれば、シラノール基量をさらに減らせば問題解決になります。Sunniest C18はアセトニトリル・10mM 酢酸アンモニウム移動相を用いたアミトリプチリンのピーク形状もテーリングファクター(TF)は1.1以下であり、ほとんどテーリングしておらず、残存シラノール基の影響が最も少ないカラムであります。次ページのデータが示しているようにSunniest C18は保持時間の安定性や試料過負荷時のピーク形状が良好であるため、微量残存シラノール基が上記問題点の原因であると結論づけられます。

0.1%ギ酸酸性条件での 塩基性化合物の保持の安定性



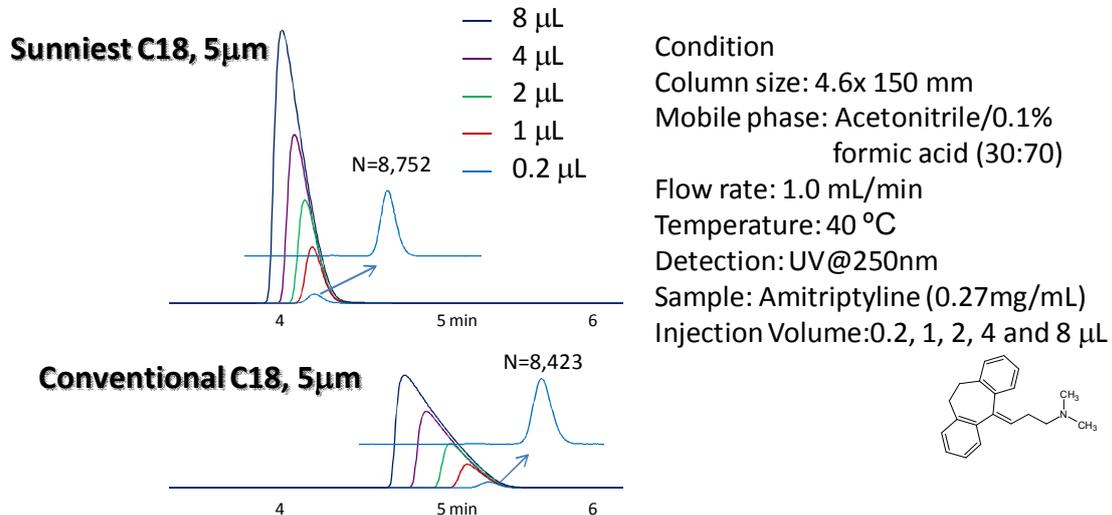
2

Sunniest C18と一般的なC18カラムにおいて、アミトリプチリンの保持時間の安定性比較を行いました。移動相はアセトニトリル・10mM 酢酸アンモニウム (30:70) を用い、カラム温度40°Cに設定しました。それぞれ新品のカラムを用い、Initialのクロマトグラムは移動相を1時間通液した後測定して得られたものです。その後1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後、14時間後に同様に測定しました。さらにアセトニトリル・10mM炭酸ナトリウム (pH10.9) (50:50) を25°Cで1時間通液後、再度同様にアミトリプチリンを測定しました。

0.27mg/mL濃度で0.2 μ L注入して、アミトリプチリンの絶対量が約0.5 μ gになるようにした場合には、両カラムともテーリングのないシャープなピーク形状になりました。塩基性化合物のアミトリプチリンの保持時間は、Sunniest C18はどの場合でもほとんど変化なく4.24minから4.29minでしたが、一般のC18では初期の保持時間から徐々に短くなり、12時間後にほぼ安定し、5.24minになりました。さらにアルカリ性移動相を1時間通液後には再度保持時間は6.16minと長くなり、12時間かけて5.15minまで保持時間は減少しました。

一般のC18は微量の残存シラノール基が存在しているため、アミトリプチリンの保持時間が安定するまでに時間がかかったと考えられ、Sunniest C18の保持時間が初めから変化なく安定しているのは、残存シラノール基が一般のC18よりさらに少なく、シラノール基の影響がほとんどないためであると考えられます。

0.1%ギ酸酸性条件での アミトリプチリンの負荷量



イオン強度の低い酸性条件ではアミトリプチリンの様な塩基性化合物は0.5 μ g程度の注入であれば十分な段数が得られます。過負荷になった状態では、残存シラノール基の影響がほとんどないSunniest C18は一般C18に比べテーリングも少なく、ピークがシャープになります。

3

アミトリプチリンの過負荷状態を比較しました。試料は移動相に溶かし、0.27mg/mL濃度にししました。注入量は0.2 μ L, 1 μ L, 2 μ L, 4 μ L, 8 μ Lとしました。Sunniest C18は2 μ Lから過負荷状態になり、ピーク幅が広がっています。また一般のC18では1 μ Lから過負荷になっており、Sunniest C18に比べピーク形状はテーリングが大きく、ピーク幅も広く、段数の低い状態になりました。WatersのCSH技術に基づく固定相でも同様な結果が示されており、CSH技術の詳細は分かりませんが、粒子表面にプラスとマイナスのイオンを付加させることにより、微量に残る残存シラノール基の状態を制御し、水和しやすくしていると思われます。この方法では充填剤の耐久性が犠牲になるようです。Sunniest C18は、残存するシラノール基そのものを制御するのではなく、残存するシラノール基そのものをさらに減らす結合技術を用いており、耐久性を犠牲にすることのない、よりポジティブな方法論で対処しております。残存シラノール基のさらなる減少で、耐久性もさらに向上します。

株式会社 クロマニックテクノロジーズ 代表取締役社長 長江 徳和
552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1
TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890
Email: info@chromanik.co.jp URL http://chromanik.co.jp