



トラブルシューティングガイド ～金属配位性化合物・金属錯体を より安定に分析するためのポイント～

株式会社ワイエムシイ

(U230619A)

金属配位性化合物・金属錯体のHPLC分析

配位性化合物は、金属イオンと配位結合をすることで金属錯体を形成します。このような配位性化合物やその金属錯体は、合成品か天然由来かを問わず数多く存在しており、医薬品やヘルスケア商品、食品添加物、農薬、電子材料など非常に多岐にわたる分野で利用されています。

このような配位性化合物や金属錯体を分析する方法のひとつとして、HPLC法が古くから多用されています。しかしながら配位性化合物のHPLC分析においては、ピーク形状や定量性の不良、あるいは分析再現性が得られにくいといった問題が発生するケースがしばしば見受けられます。これらは、主に分析環境中からの金属イオンの混入が原因で生じます。

配位性化合物や金属錯体をHPLCで分析する場合には、通常の化合物を分析する場合とは違った特別の配慮が必要となります。ここでは、配位性化合物や金属錯体のHPLC分析において発生するトラブルの主な原因とその解決法について紹介します。

配位性化合物・金属錯体の HPLC分析における問題の主な原因

■ カラム・充填剤に起因する不良

- カラム・充填剤中の金属不純物が影響
- カラムハードウェアの素材が影響

■ 装置に起因する不良

- 装置の汚れが影響
- 流路の金属製パーツが活性化していることが影響

■ サンプルに起因する不良

- サンプルの調製方法や保管状況が影響
- サンプルの安定性が影響

カラム・充填剤に起因する不良(1)

具体的なトラブル例

カラム・充填剤中の金属不純物による影響

充填剤中に残存している金属不純物と配位性化合物が相互作用することで、ピーク形状の不良や分析再現性不良が生じることがあります。金属不純物の多いカラムでは、配位性化合物が強く吸着してしまい溶出してこない場合もあります。

カラムハードウェアの素材による影響

金属配位性化合物がステンレス製のカラムハードウェア内面やフリットと相互作用してピーク形状が悪化する場合があります。

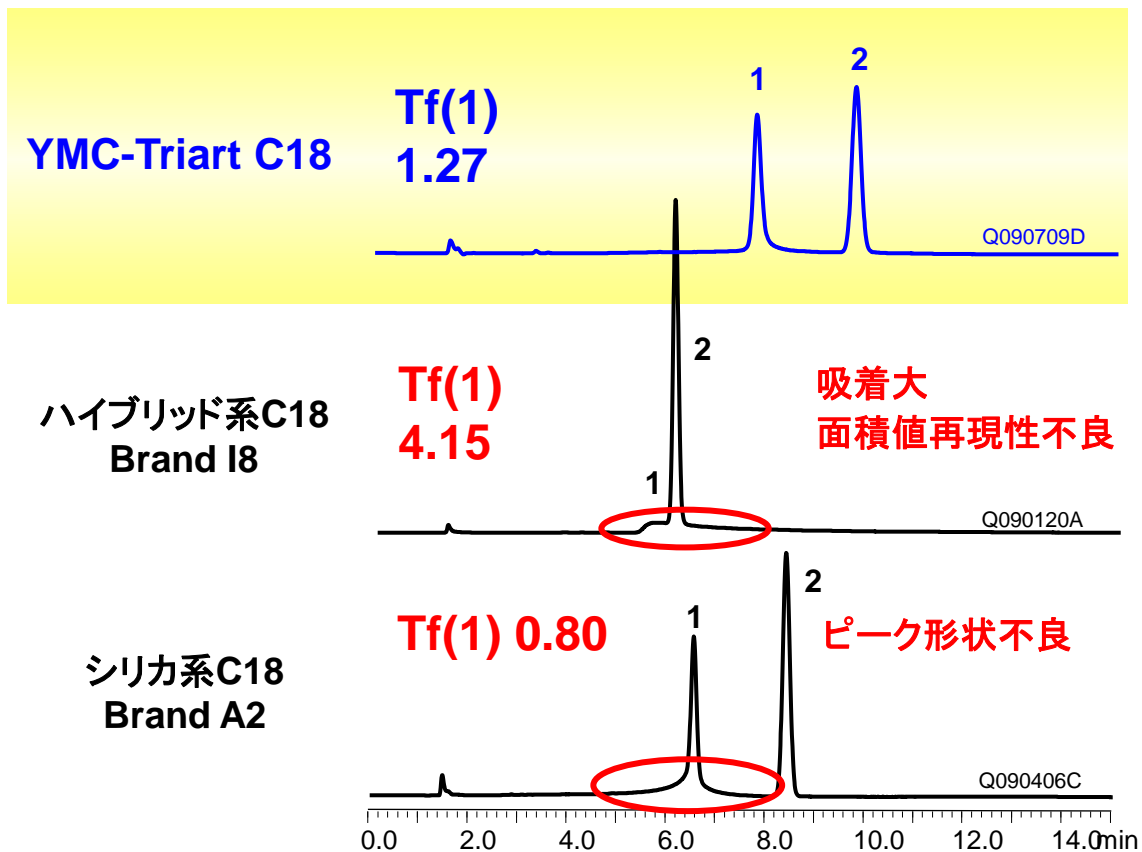
対処法

- 金属不純物の少ないカラムを使用する
- 酸を含む溶液の通液によりカラムの洗浄を行う
- イナートな素材のハードウェアのカラムを使用する
- 移動相に5 mM程度のEDTA・2Naを添加する

カラム・充填剤に起因する不良(2)

カラムの変更による改善

ヒノキチオール分析: 新品カラムによる比較

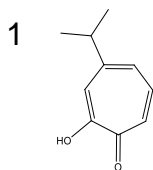


配位性の化合物は、充填剤に残存した金属不純物と相互作用することで、著しいピーク形状不良や分析再現性不良が生じることがあります。

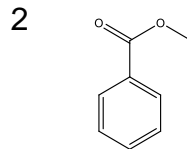
金属不純物の残存が少ないカラムを選定することで対処が可能です。

⇒従来よりも金属不純物の少ないハイブリッド粒子を使用した**YMC-Triart C18**は強配位性の化合物でも新品状態から良好に分析可能です。

Eluent : acetonitrile/0.1% H_3PO_4 (40/60)
 Temperature : 40°C
 Detection : UV at 254 nm



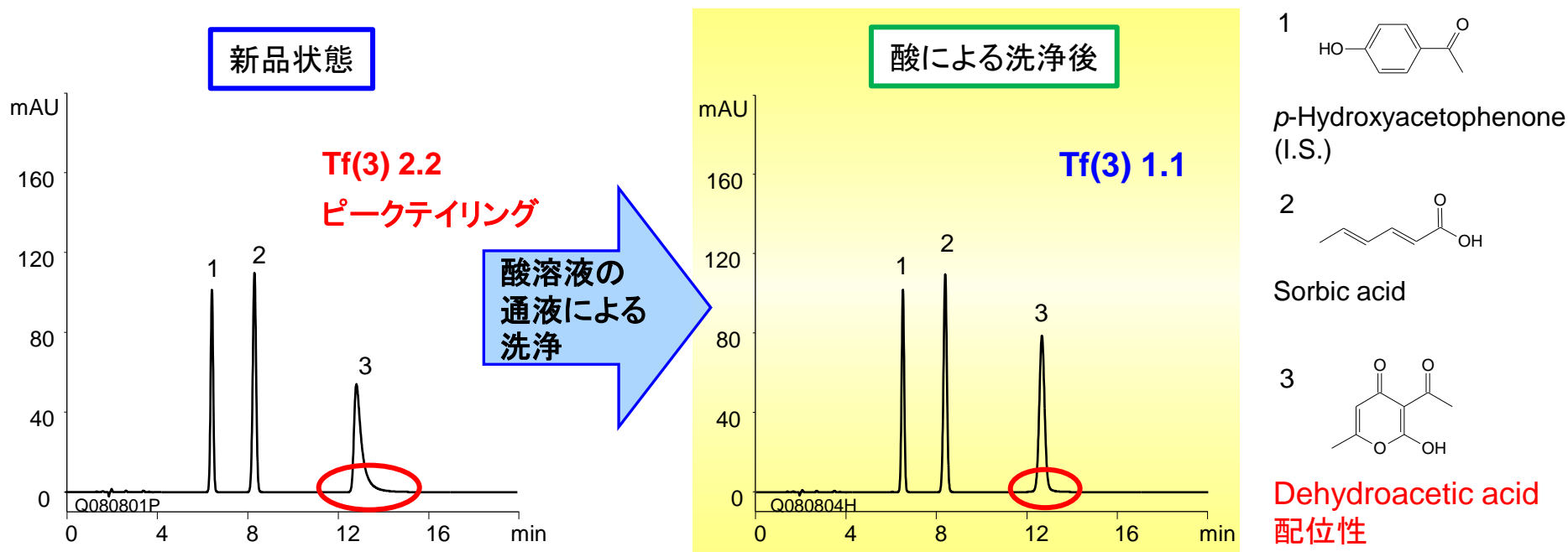
Hinokitiol
強配位性



Methyl benzoate (I.S.)

カラム・充填剤に起因する不良(3) 酸溶液の通液によるカラム洗浄

食品保存料の分析



酸溶液の通液によるカラム洗浄手順

20 mM リン酸/アセトニトリル(50/50)溶液を10カラム体積分通液

Column : シリカ系C18 150 X 4.6 mmI.D.
 Eluent : 20 mM CH₃COONa-CH₃COOH (pH 4.4)/acetonitrile (80/20)
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Temperature : 37°C
 Detection : UV at 230 nm

リン酸など酸を含む溶液の通液により充填剤に残存する金属不純物を洗浄することで、配位性化合物のピーク形状を改善できる場合があります。カラムを使用しているうちに徐々に汚れが蓄積し、配位性化合物のピーク形状不良が生じたケースも、このような酸洗浄によって同様に改善できる場合があります。

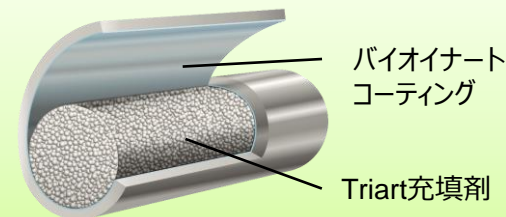
カラム・充填剤に起因する不良(4)

イナータな素材のハードウェアによる改善

Accura Triart

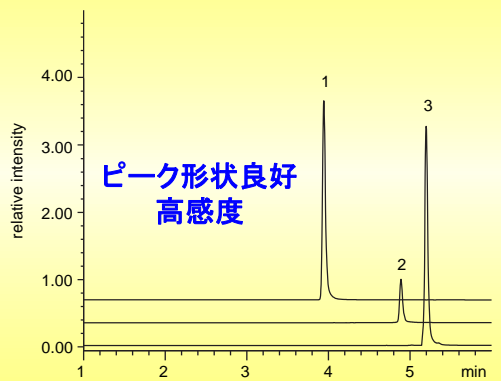
カラムハードウェアの接液部をバイオイナートコーティング処理しており、ステンレスと配位性化合物の接触を回避

生体試料だけでなく低分子の配位性化合物の分析にも有効

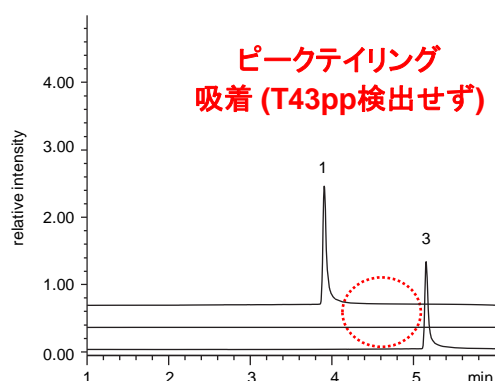


リン酸化ペプチドの分析

バイオイナートカラム



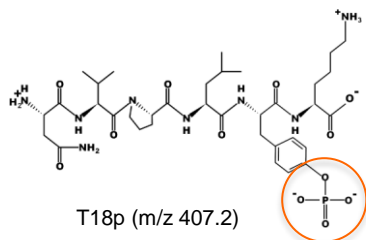
ステンレスカラム



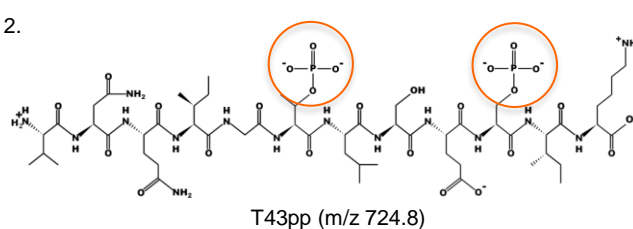
Column	: Triart C18 (1.9 μm , 12 nm) 100 X 2.1 mm I.D.
Eluent	: A) water/formic acid (100/0.1) B) acetonitrile/formic acid (100/0.1) 0.7-25%B (0-5 min), 25%B (5-6.6 min)
Flow rate	: 0.6 mL/min
Temperature	: 60°C
Detection	: ESI-MS
Injection	: 2 μL (10 pmol/ μL)
Sample	: Massprep Phosphopeptide Enolase Standard (Waters)
System	: Shimadzu Nexera XS inert Shimadzu LCMS 2020

Courtesy of Shimadzu Europa GmbH

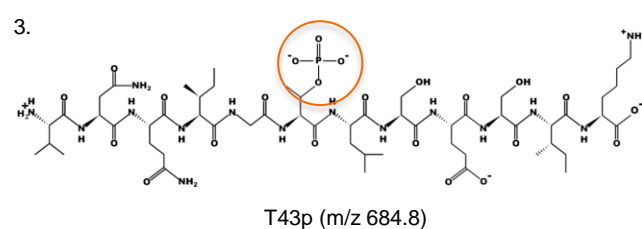
1.



2.



3.



金属配位性化合物とステンレス製のカラムハードウェア内面やフリットの相互作用が懸念される場合は、イナータカラムへ変更することでピーク形状、感度、定量性などが改善できる場合があります。

装置に起因する不良(1)

具体的なトラブル例

装置の汚染や流路の金属製パーツの活性化による影響

流路内部に蓄積した金属イオン性の汚れや、腐食等によって活性化した流路内の部位と、配位性化合物が相互作用することにより、ピーク形状不良が発生することがあります。

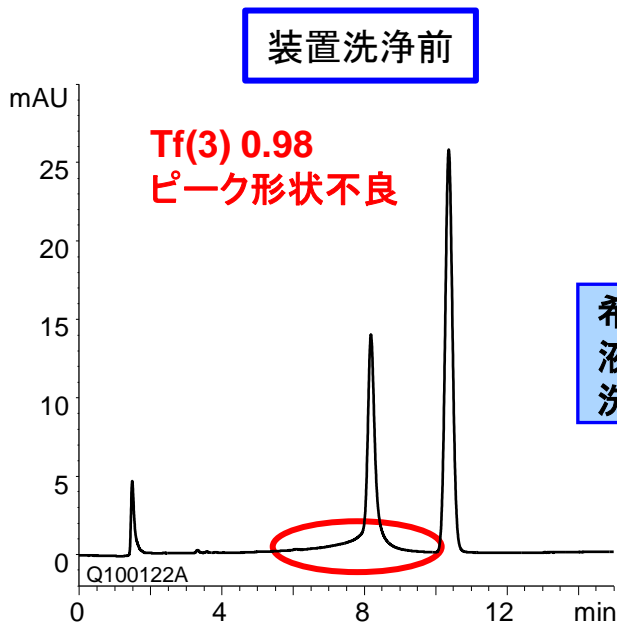
対処法

- 希硝酸溶液の通液により装置内の流路を洗浄する
- EDTA等のキレート剤を含む溶液の通液により装置内の流路を洗浄する
- 装置をメタルフリー化する

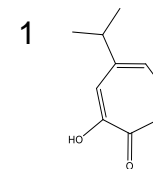
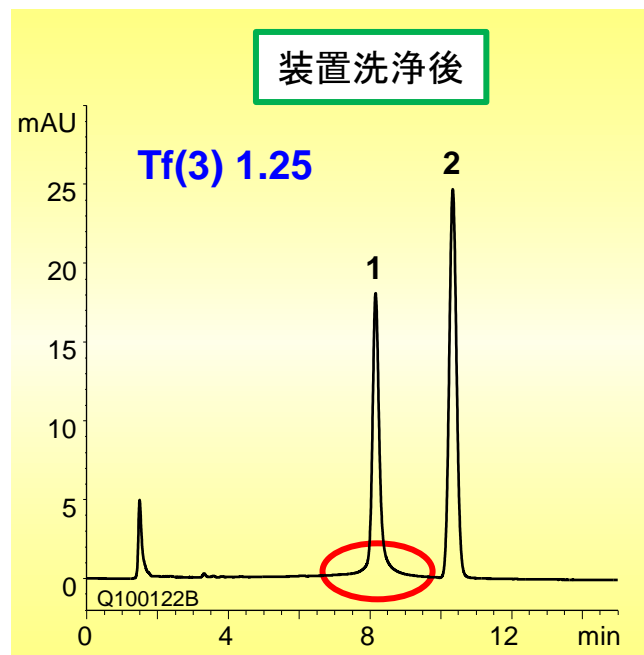
装置に起因する不良(2)

希硝酸溶液の通液による装置の洗浄

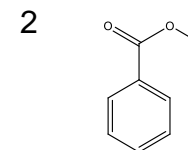
ヒノキチオールの分析



希硝酸溶液による
洗浄



Hinokitiol
強配位性



Methyl benzoate (I.S.)

装置洗浄手順

1. カラムを装置から外し、カラム部分に抵抗管を接続。なお、抵抗管出口は直接廃液へ流れるように接続。
2. 水⇒2 N硝酸^(注)⇒水⇒IPAの順にそれぞれ15 mL程度ずつ通液。

Column	: YMC-Triart C18 (5 μm, 12 nm) 150 X 3.0 mmI.D.
Eluent	: acetonitrile/ 0.1% H ₃ PO ₄ (40/60)
Flow rate	: 0.43 mL/min
Temperature	: 40°C
Detection	: UV at 254 nm

カラムに問題がない場合でも、装置配管の流路内部に蓄積した金属イオン性の汚れと配位性化合物が相互作用することによって、ピーク形状不良や分析再現性不良が発生することがあります。

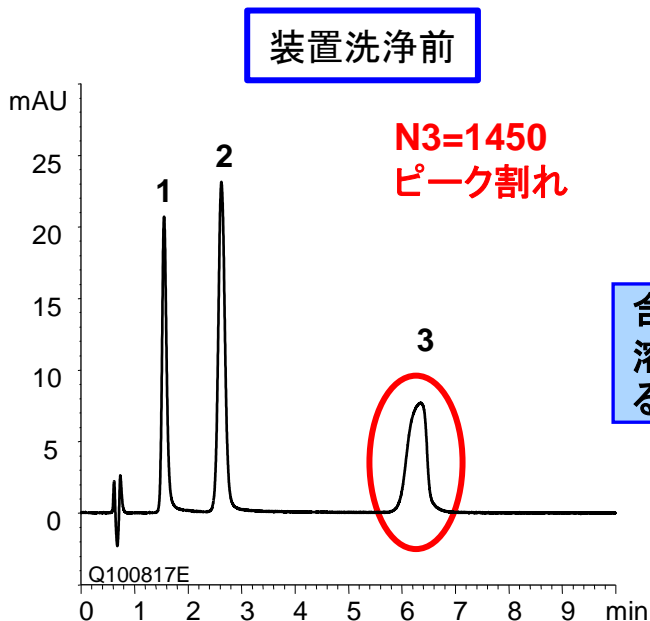
2-6 N程度の硝酸溶液による装置の通液洗浄により、ピーク形状や分析再現性を改善できる可能性があります。

(注) 硝酸の取扱いには十分ご注意ください。

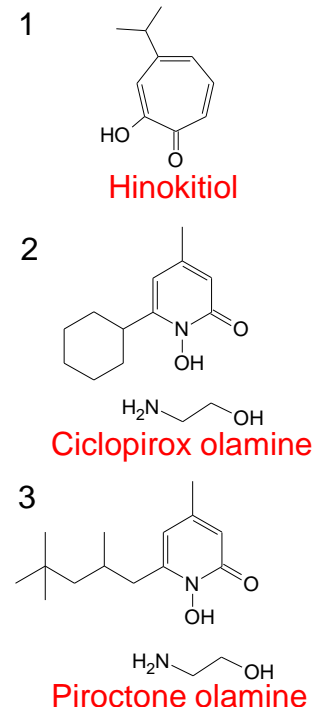
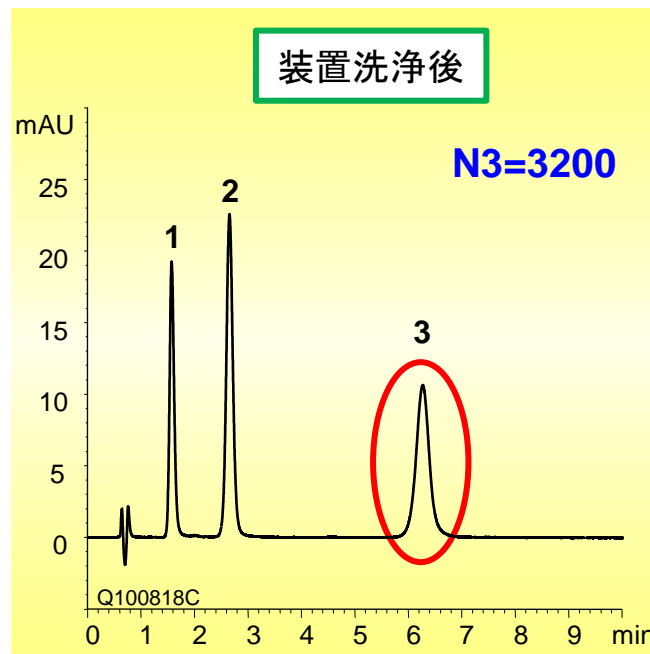
装置に起因する不良(3)

含EDTA溶液の通液による装置の洗浄

サンプル配合抗菌剤の分析



含EDTA
溶液による
洗浄



装置洗浄手順

1. カラムを装置から外し、カラム部分に抵抗管を接続。なお、抵抗管出口は直接廃液へ流れるように接続。
2. 水⇒1 mM EDTA・2Naを含む溶液[メタノール/水またはアセトニトリル/水 (50/50)など] ⇒水⇒IPAの順にそれぞれ15 mL程度ずつ通液。

Column	: YMC-Triart C18 (5 μm, 12 nm) 50 X 2.0 mm I.D.
Eluent	: methanol/water/HCOOH (65/35/0.1)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Temperature	: 40°C
Detection	: UV at 310 nm

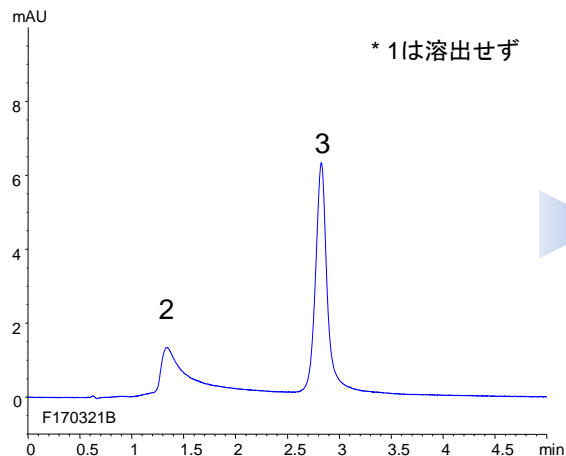
キレート形成能を有するEDTAを含む溶液による通液洗浄により、ピーク形状や分析再現性が改善する場合があります。

装置に起因する不良(4)

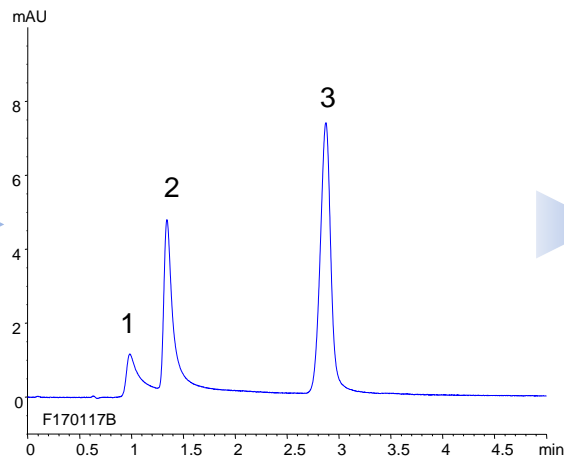
装置のメタルフリー化による改善

ヌクレオチドの分析

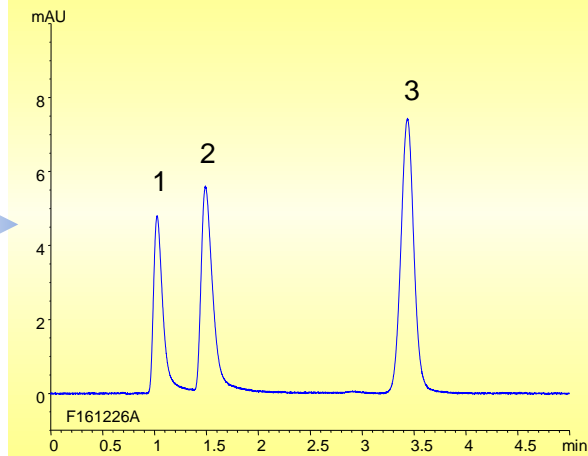
通常システム&ステンレスカラム



通常システム&メタルフリーカラム

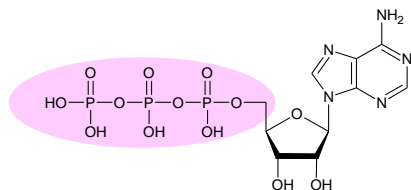


メタルフリー化システム&メタルフリーカラム

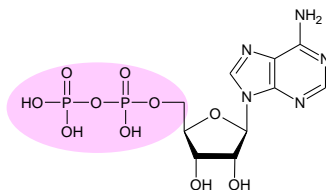


*メタルフリー化システム: サンプルループ、ニードルシート、インジェクタ-カラム配管にPEEKを使用

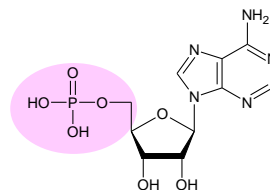
1. ATP



2. ADP



3. AMP



Column	: YMC-Triart C18 (3 μm, 12 nm)
	50 X 2.1 mmI.D.
Eluent	: 5 mM HCOONH ₄
Flow rate	: 0.21 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 265 nm
Injection	: 1 μL (10 μg/mL)

カラムハードウェアとともに、装置のステンレス製配管や部品をメタルフリー化することでピーク形状が大幅に改善できる可能性があります。

サンプルに起因する不良(1)

具体的なトラブル例

(ケース1) サンプル保管中の変化

サンプル調製に使用した試薬中に含まれる金属イオンの影響により、またはサンプル保管に使用した容器などへの配位性化合物の吸着や容器から溶出した金属イオンと配位性化合物との相互作用(錯形成)により、ピーク形状不良や再現性不良が発生することがあります。

対処法

- 金属イオン性不純物の含有量が少ない容器・器具や試薬・溶媒を使用する。
- 容器・器具から金属イオン性不純物を溶出させにくい試薬・溶媒でサンプルを調製する。

(ケース2) 金属錯体の分析中の安定性による影響

金属錯体の溶離液中での安定性が悪く、分析中に分解することでピーク形状不良が発生することがあります。

対処法

- 化合物が分析中安定に存在できる条件で分析を行う。

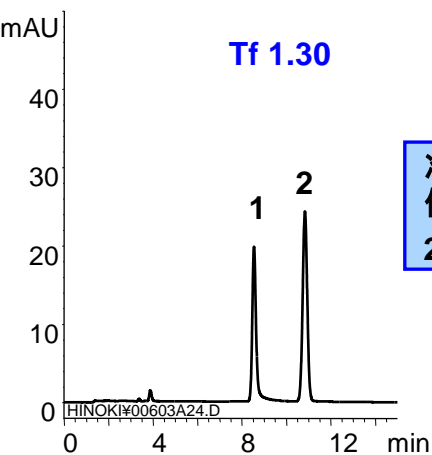
サンプルに起因する不良(2)

サンプル保管中の変化(1)

ヒノキチオール分析

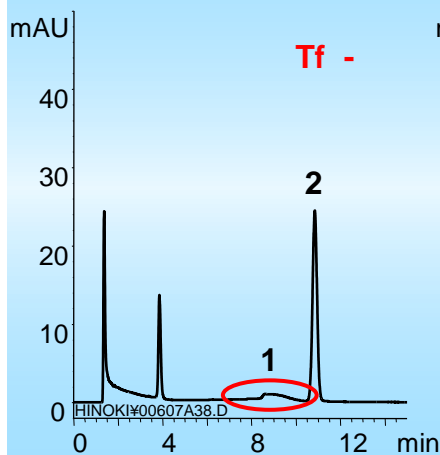
サンプル: 移動相である**0.1%ギ酸/アセトニトリル (60/40)**に溶解

調製直後(PP製容器)

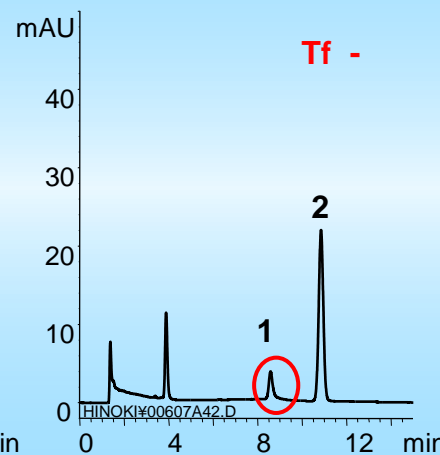


冷暗所
保管
2日後

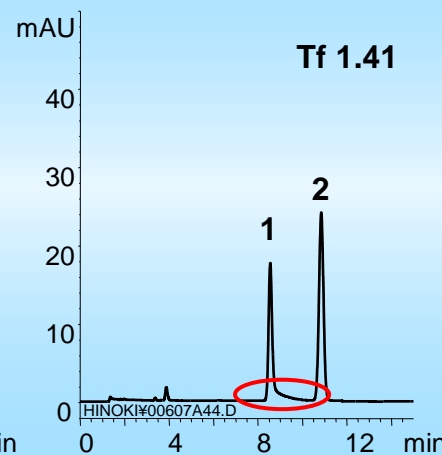
褐色ガラス瓶保管



ガラス製HPLC用
サンプルバイアル保管



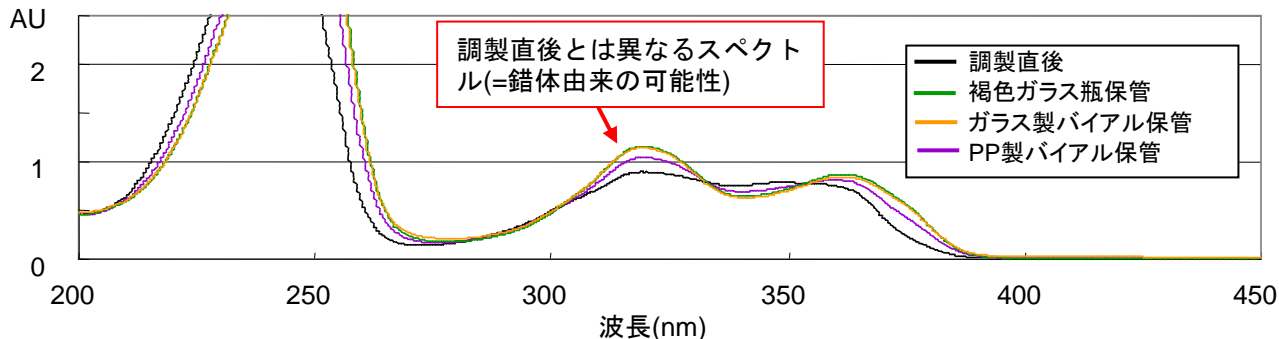
PP製バイアル保管



1. Hinokitiol
2. Methyl benzoate

Column : YMC-Triart C18 (5 μm, 12 nm)
150 X 3.0 mml.D.
Eluent : acetonitrile/0.1%HCOOH (40/60)
Flow rate : 0.43 mL/min
Temperature : 40°C
Detection : UV at 254 nm
Injection : 4 μL

保管前後のヒノキチオール溶液のUV吸収スペクトル



特にガラス容器からは金属イオンが多く溶出する場合があります。サンプル保管の際、容器表面に存在する金属への配位性化合物の吸着、または容器から溶出した金属イオンとの相互作用により、HPLC分析時にピーク形状や再現性が悪化する場合があります。

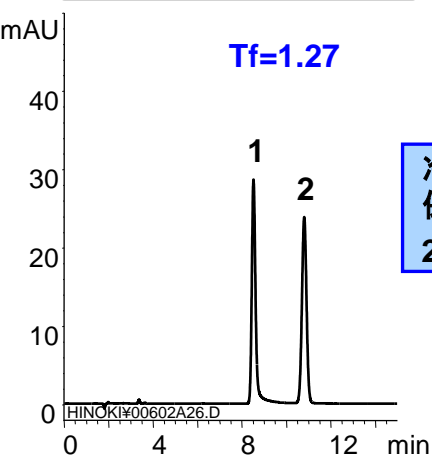
サンプルに起因する不良(3)

サンプル保管中の変化(2)

ヒノキチオール分析

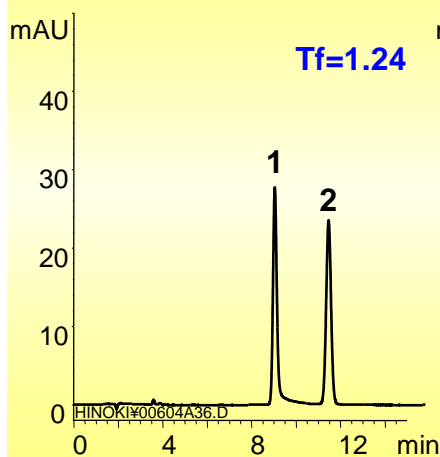
サンプル: 水/アセトニトリル (60/40)に溶解

調製直後(PP製容器)

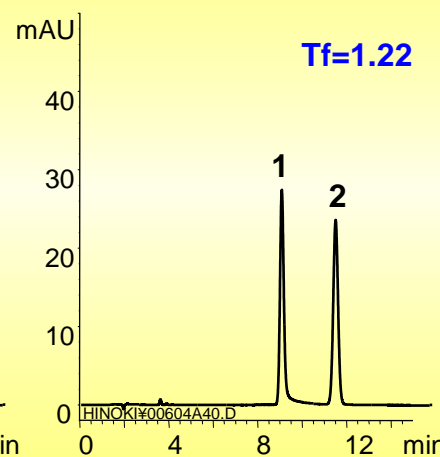


冷暗所
保管
2日後

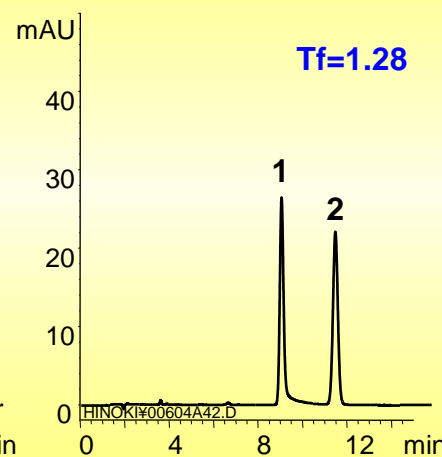
褐色ガラス瓶保管



ガラス製HPLC用
サンプルバイアル保管



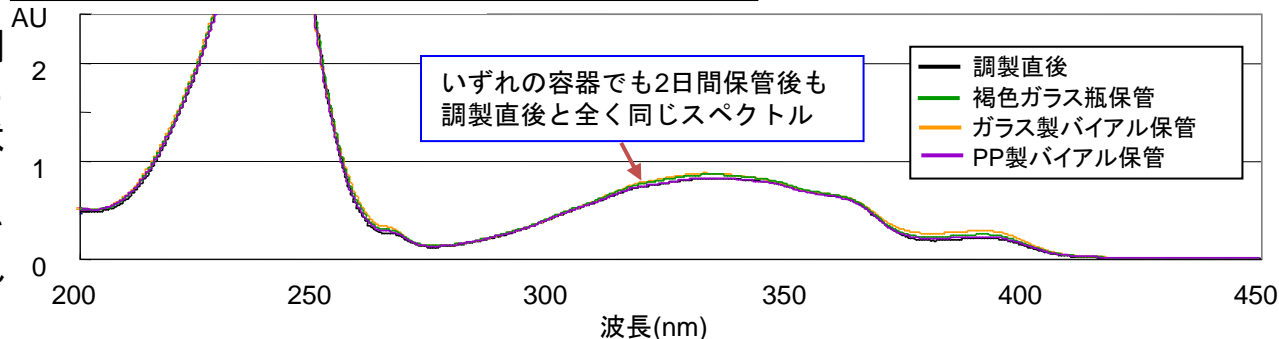
PP製バイアル保管



1. Hinokitiol
2. Methyl benzoate

酸を含まない溶液でサンプル調製した場合、いずれの容器でも調製直後と変わらずピーク形状は良好です。酸を含む溶液は、容器からの金属イオンの溶出を促進させやすいことが示唆されます。

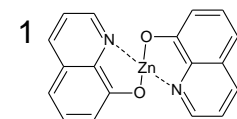
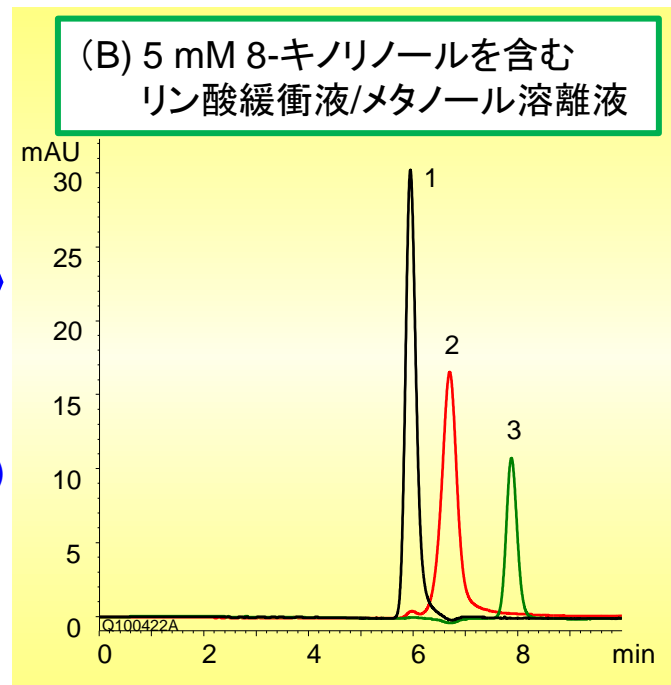
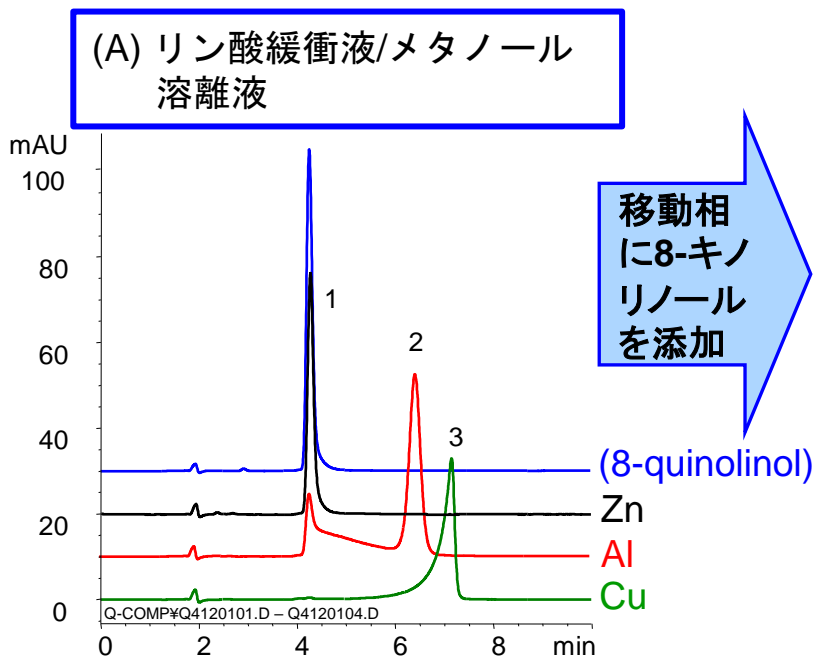
保管前後のヒノキチオール溶液のUV吸収スペクトル



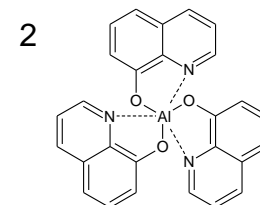
金属不純物の少ない容器、試薬や溶媒を使用し、容器から金属を溶出させやすい酸などを含まない溶液でサンプル調製することでピーク形状や再現性の不良を防ぐことができます。また、サンプルを用時調製することも有効です。

サンプルに起因する不良(4) 金属錯体の分析中の安定性による影響

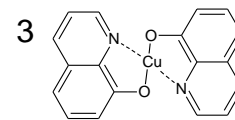
8-キノリノール錯体の分析



Bis(8-quinolinolato)
zinc



Tris(8-quinolinolato)
aluminium



Bis(8-quinolinolato)
copper

サンプル注入後に流路内で錯体の分解がおこると、(A)の例のようにピーク形状不良が発生するほか[Cu, Al]、完全に分解した場合には、配位子である8-キノリノールのピークのみしか検出されないことがあります[Zn]。

分析中に錯体が安定に存在できるように移動相に8-キノリノールを添加することにより、良好に分析できるようになりました(B)。

Column	: YMC-Triart C18 (5 μm, 12 nm) 150 X 3.0 mmI.D.
Eluent	: (A) 20 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH7.0)/methanol (35/65) (B) 20 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH7.0)/methanol (35/65) containing 5 mM 8-quinolinol
Flow rate	: 0.4 mL/min
Temperature	: 40°C
Detection	: (A) UV at 254 nm (B) UV at 375 nm

錯体をHPLCで分析する場合には、分析中に錯体が安定に存在できる条件を選択することで、ピーク形状および再現性良好に分析することが可能になります。

より安定に配位性化合物を分析するには

■ カラム・充填剤面での改善策

- 製造工程由来の金属不純物の残存が少ないカラムを使用する。
- リン酸などの酸を含む溶液を通液してカラムの洗浄を行う。
カラム使用中に配位性化合物のピーク形状や再現性が悪化してきた場合にも有効な場合あり。
- イナートな素材のハードウェアのカラム (Accura Triart) を使用する。

■ 装置面での改善策

- 2-6 Nの硝酸やEDTAを含む溶液で装置の洗浄を実施する。
- 移動相に接触する部品(特にサンプル注入部からカラムまで)をPEEK製などのメタルフリーなものに交換する。

■ サンプル面での改善策

- 微量金属分析用グレードなど金属イオンの含有量が少ない容器、溶媒や試薬を使用してサンプルを調製する。
 - 一般的なガラス製サンプル瓶は、金属イオンが溶出しやすい可能性があるため注意。
 - 微量金属分析用グレードの試薬等は、一般的にHPLCでの使用を保証していないので、有機系不純物の含有量には注意。
- サンプル調製の際、容器からの金属の溶出を促進させやすい酸などを含む溶液を使用しないことが望ましい。
- 錯体を再現性よく分析するには、分析中に錯体が分解しないようにすることが必要。
錯体が安定に存在し得るpH設定や、場合によっては移動相への配位子の添加も有効。