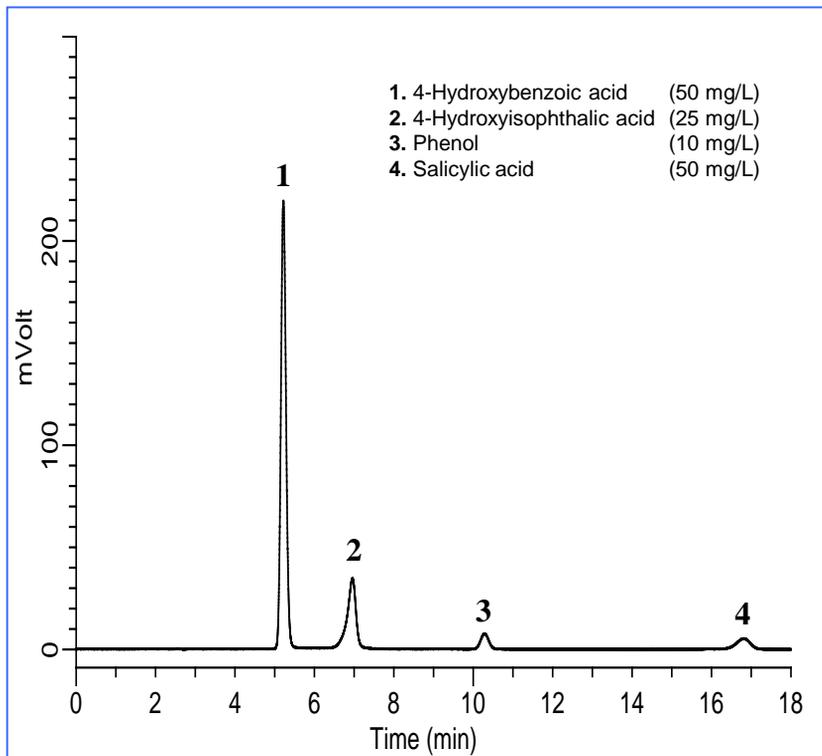


今回は、LC800高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてサリチル酸とその類縁物質(フェノール、4-ヒドロキシイソフタル酸、パラオキシ安息香酸)の分析した測定例をご紹介します。

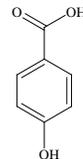
第十六改正日本薬局法では定量法としてHPLC法が採用されており、下記に示すシステム適合性項目が定められています。今回は、この条件をLC800 HPLCシステムとイナートシル ODS-Pカラムを用いることで達成し、サリチル酸とその類縁物質を良好に分析することができましたのでご報告いたします。

(K. Kanno)

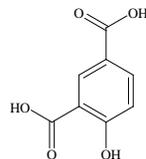
標準溶液測定例



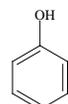
構造式



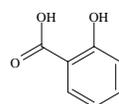
1. 4-Hydroxybenzoic acid



2. 4-Hydroxyisophthalic acid



3. Phenol



4. Salicylic acid

HPLC条件

カラム : Inertsil ODS-P
(5 μm, 150 x 4.6 mm I.D.)
移動相 : A) CH₃OH
B) H₂O,
C) CH₃COOH
A/B/C = 40/60/1, v/v/v
流量 : 0.45 mL/min[※]
カラム温度 : 35 °C
検出 : UV 270 nm
注入量 : 10 μL

※サリチル酸の保持時間が約17分になるように流量で調整

システム適合性試験

- 標準溶液を移動相で5倍希釈した溶液のピーク面積が標準溶液のピーク面積の14%から26%になる
- パラオキシ安息香酸、4-ヒドロキシイソフタル酸及びフェノールの順に溶出
- 4-ヒドロキシイソフタル酸とフェノールの分離度が4以上
- 分析を6回行った時、各ピーク面積の相対標準偏差がそれぞれ2.0%以下

今回の結果

ピーク面積 : **19.1%-19.6%** (表1)
溶出順 : **規定を満たす**
分離度 : **8.9***
相対標準偏差 : **0.52-0.89%** (表2)

*分離度についてはテクニカルノート No. 38をご参照ください。

*LC800 HPLCシステムでの分離度であって、汎用HPLCでは5から7程度です。

表1. 標準溶液及び標準溶液(5倍希釈)の面積値

	パラオキシ安息香酸	パラヒドロキシイソフタル酸	フェノール	面積値合計
標準溶液 ...①	1976153	580138	110912	2667203
標準溶液 2mL→10mL ...②	387427	110785	21288	519500
(②/①)%	19.6%	19.1%	19.2%	19.5%

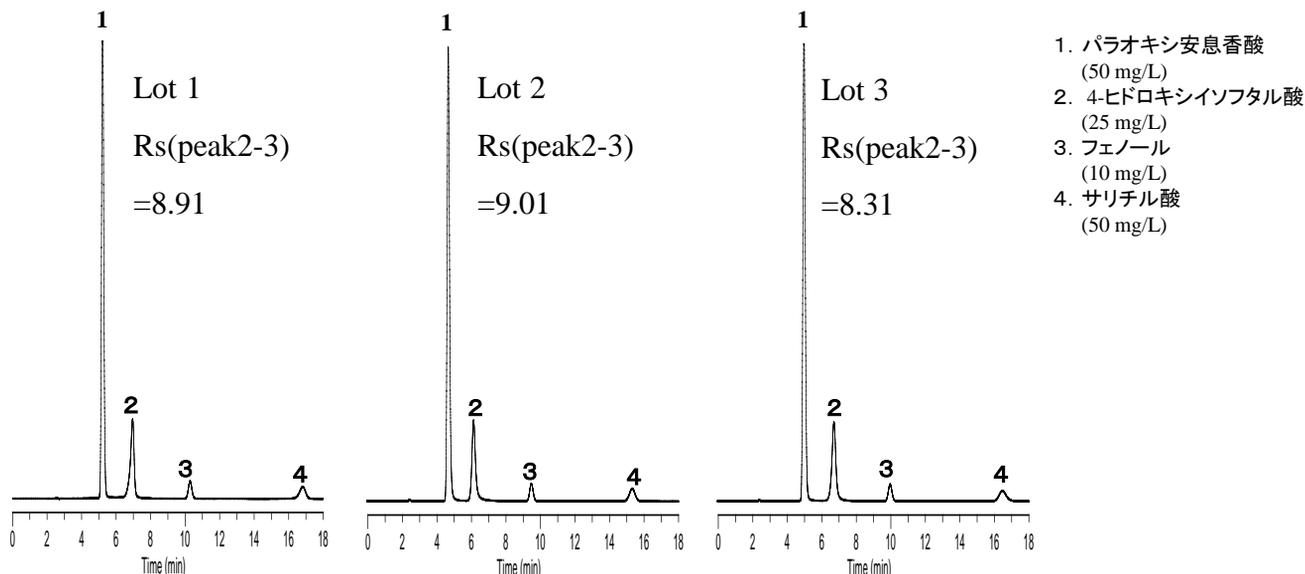
表2. 標準溶液6回分析時の面積値

	パラオキシ安息香酸	4-パラヒドロキシイソフタル酸	フェノール
1	1995725	584526	113249
2	1975382	580235	111195
3	1986803	583501	112378
4	1966460	574355	111362
5	1985628	582165	113034
6	1976153	580138	110912
標準偏差	10377	3615	1001
RSD%	0.52%	0.62%	0.89%

カラムロット間の再現性

カラムロット間にバラつきがあるとカラムを買い換えた際に、日本薬局方の規定を満たさない可能性が大きくなります。特に、4-ヒドロキシイソフタル酸とフェノールの分離度4以上という規定がカラムロット間のバラつきによって影響が顕著に見られる項目になります。

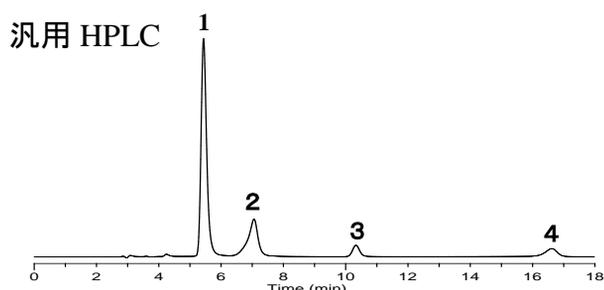
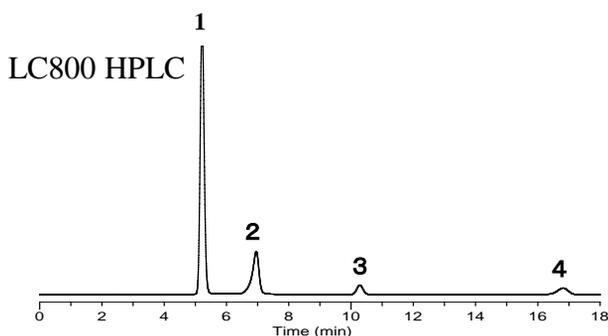
Inertsil ODS-Pは日本薬局方の条件によるサリチル酸とその類縁物質の分析に関してカラムロット間の再現性が確保されています。



システムデッドボリウムの影響

Inertsil ODS-P を用いてサリチル酸を分析する場合の流量は0.4 mL/minから0.6 mL/minとなります。この流量範囲で汎用HPLCシステムを用いて分析した場合、システムデッドボリウムが分離度に影響を与えます。

Inertsil ODS-Pは十分な分離度が得られるため汎用HPLCシステムであっても日本薬局方のシステム適合性を満たしますが、システムデッドボリウムを最小限に抑えたLC800HPLCシステムで分析することでより良好な分析を行うことができます。



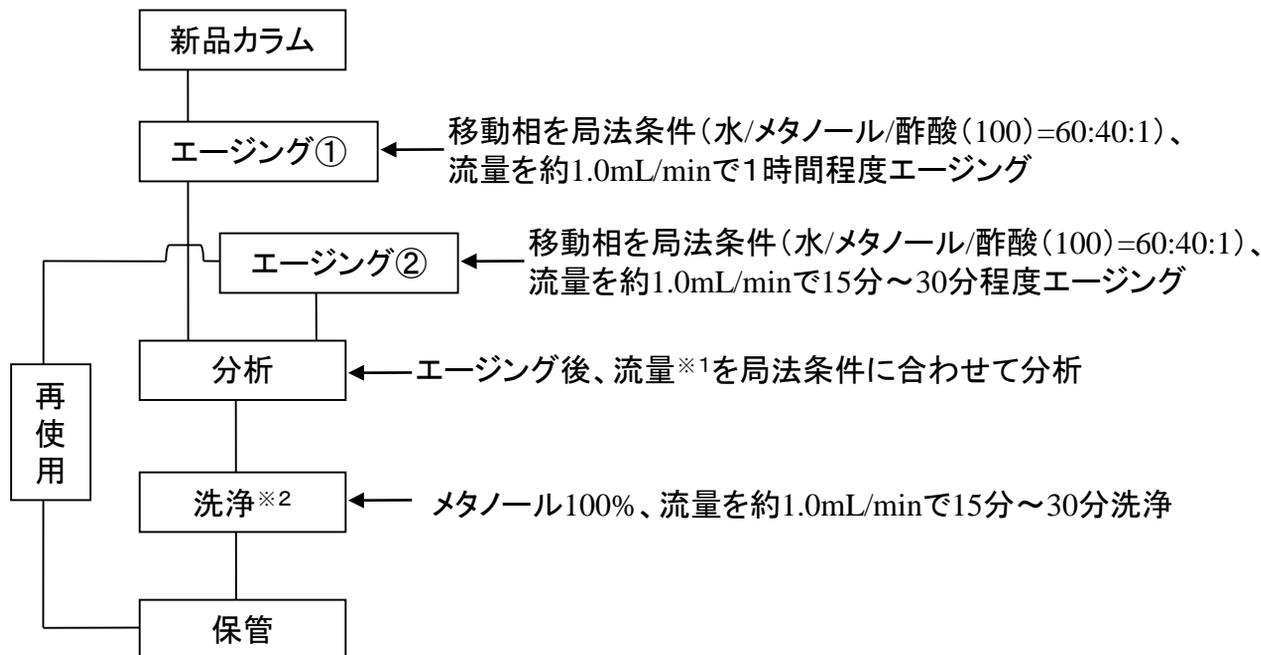
	理論段数 3.フェノール	分離度 ピーク2-3
LC800 HPLC	11283	8.9
汎用HPLC	9821	7.1

HPLC条件

- カラム : Inertsil ODS-P (5 μ m, 150 x 4.6 mm I.D.)
 移動相 : A) CH₃OH
 B) H₂O,
 C) CH₃COOH
 A/B/C = 40/60/1, v/v/v
 流量 : 0.45 mL/min
 カラム温度 : 35 °C
 検出 : UV 270 nm
 セル光路長 : セミマイクロセル5 mm (LC800 HPLC)
 汎用セル 10 mm (汎用HPLC)
 注入量 : 10 μ L
 サンプル : 1. 4-Hydroxybenzoic acid (50 mg/L)
 2. 4-Hydroxyisophthalic acid (25 mg/L)
 3. Phenol (10 mg/L)
 4. Salicylic acid (50 mg/L)

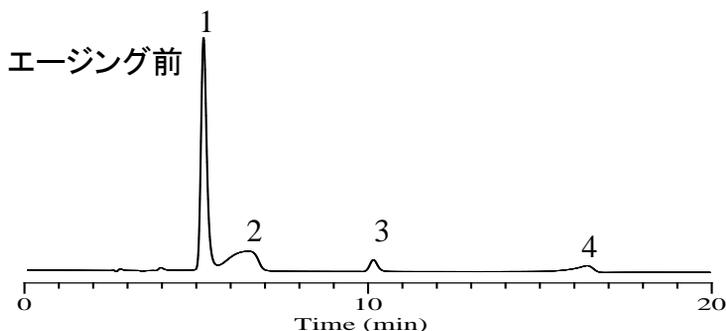
Inertsil ODS-Pでサリチル酸を上手に分析するために

Inertsil ODS-Pは炭素量が約29%です。通常のODSカラム(炭素量10%~15%程度)に比べて炭素量が多いポリメリックタイプのカラムとなっています。ポリメリックタイプカラムの特長として、カラムが安定(ピーク形状や保持時間)するまでに時間がかかります。充填剤表面が十分に移動相に馴染んでいない状態で、日本薬局方の条件にてサリチル酸とその類縁物質を分析すると、4-ヒドロキシイソフタル酸とサリチル酸のピーク形状が崩れますので、次のような操作を行ってから分析してください。



※1 Inertsil ODS-P(4.6 mm I.D. × 150 mm)の場合は流量0.4 mL/min~0.6 mL/min程度でサリチル酸の保持時間が約17分になります。

※2 カラムを数日以内に使用する場合は、『洗浄』を省いて移動相条件にて保管しても問題ありません。その際、保持時間が早くなる撥水現象(De-Wetting)に注意してください。万が一、保持時間が以前より早くなった場合は『洗浄』から行って分析してください。

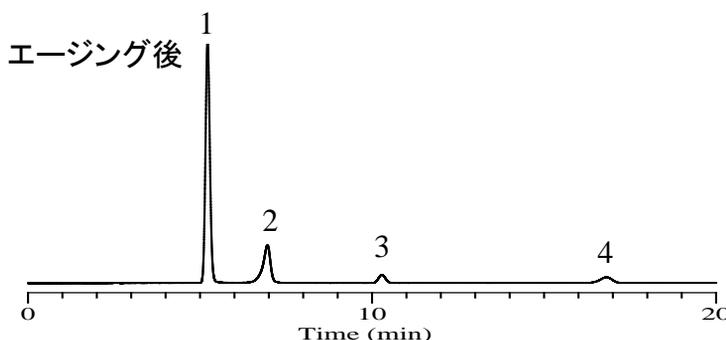


Analyte :

1.4-Hydroxybenzoic acid	(50 mg/L)
2.4-Hydroxyisophthalic acid	(25 mg/L)
3.Phenol	(10 mg/L)
4.Salicylic acid	(50 mg/L)

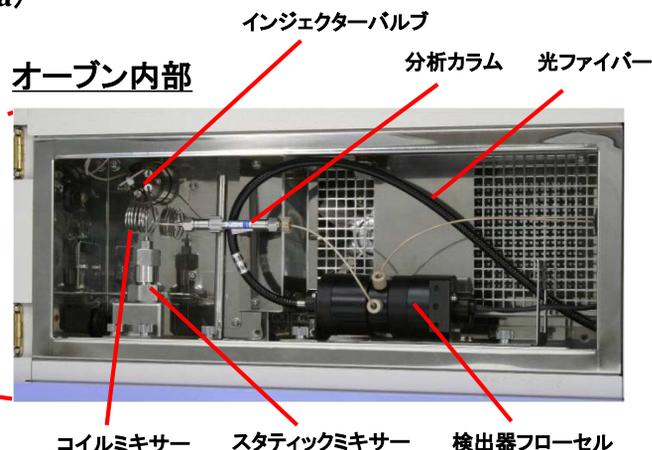
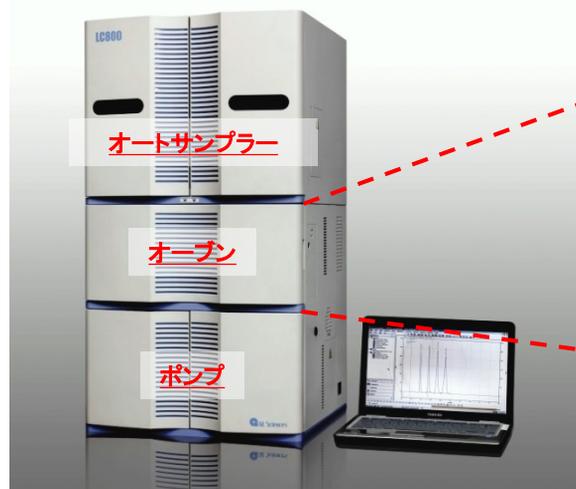
Conditions

System	: LC800 HPLC system
Column	: Inertsil ODS-P (5 μm, 150 x 4.6 mm I.D)
Column Cat. No.	: 5020-02001
Eluent	: A) CH ₃ OH, 1.0 % CH ₃ COOH B) H ₂ O, 1.0 % CH ₃ COOH A/B = 40/60
Flow Rate	: 0.45 mL/min
Col. Temp.	: 35 °C
Detection	: UV 270 nm
Injection Vol.	: 10 μL



分析装置: LC800

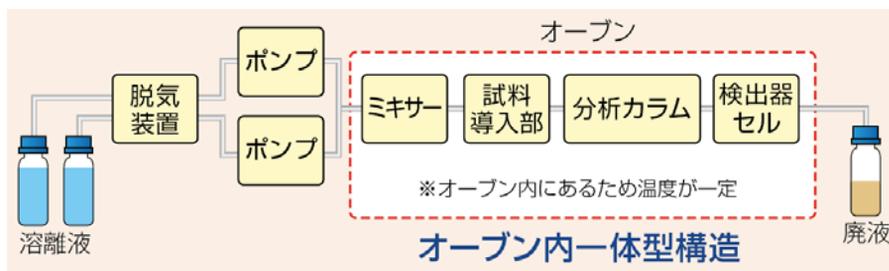
汎用 ~ 超高速分析に対応! (耐圧80 MPa)



- ・インジェクションバルブ後 ~ カラム手前 1 μL 以下
- ・カラム後 ~ フローセル手前 2 μL 以下
- ・UV検出器を含め、トータルで3.5 μL 以下

システムボリュームが極めて小さいHPLCシステム

LC800システム構成



*デッドボリュームについてはテクニカルノート No. 95をご参照ください。

HPLCカラム:

Inertsil ODS-P, 5 μm , 150 \times 4.6mm I.D.
Cat.No. 5020-02001



ジールサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお薦めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しましても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行っております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く 9:00-17:00)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@gl.s.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.gl.s.co.jp/technique/app/app_search.html