

逆相HPLCのノウハウ

内容

<基礎>

ODSの構造と特性

移動相

緩衝液

<分析方法のノウハウ>

解離性化合物

分離の改善

試料の注入テクニック

上手なカラムのダウンサイジング

2 μ m ODSカラムの使用

<トラブルシューティング>

保持時間が変化した

ピーク面積が変化した

水系100%に近い移動相

SNを大きくする

カラムの洗浄と保管

内容

<基礎>

ODSの構造と特性

移動相

緩衝液

<分析方法のノウハウ>

解離性化合物

分離の改善

試料の注入テクニック

上手なカラムのダウンサイジング

2 μ m ODSカラムの使用

<トラブルシューティング>

保持時間が変化した

ピーク面積が変化した

水系100%に近い移動相

SNを大きくする

カラムの洗浄と保管

シリカゲル基材

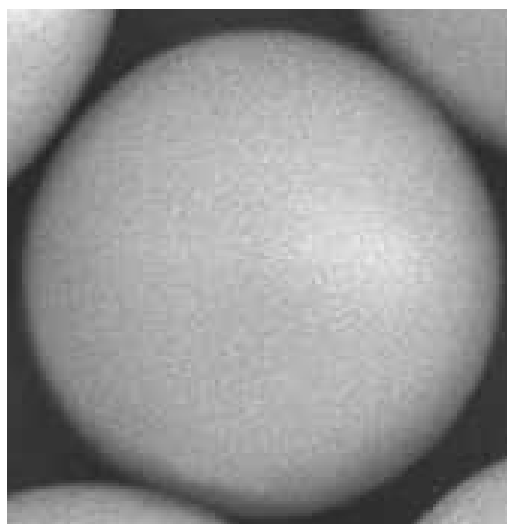
物性値 (*L-column*、*L-column2*)

平均粒子径: 2, 3, 5 μm

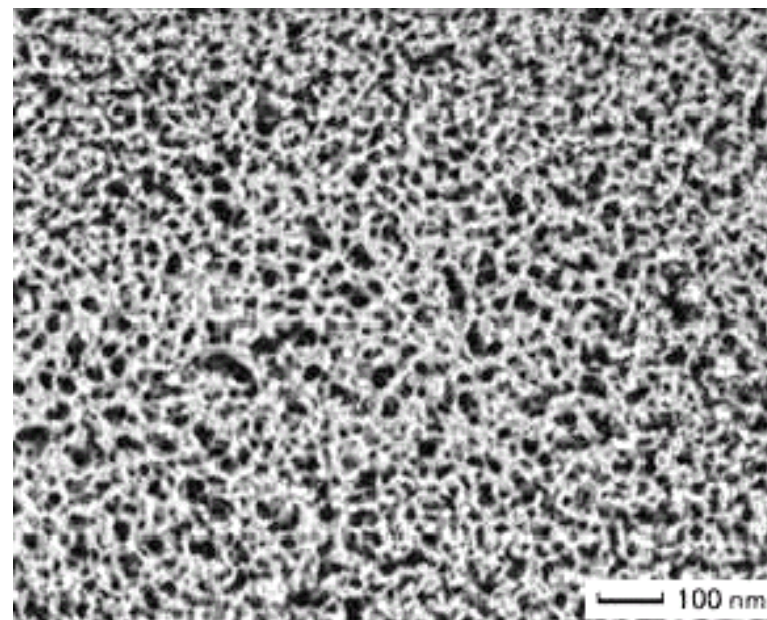
平均細孔径: 12 nm

比表面積: 340 m^2/g

細孔容積: 1.1 mL/g

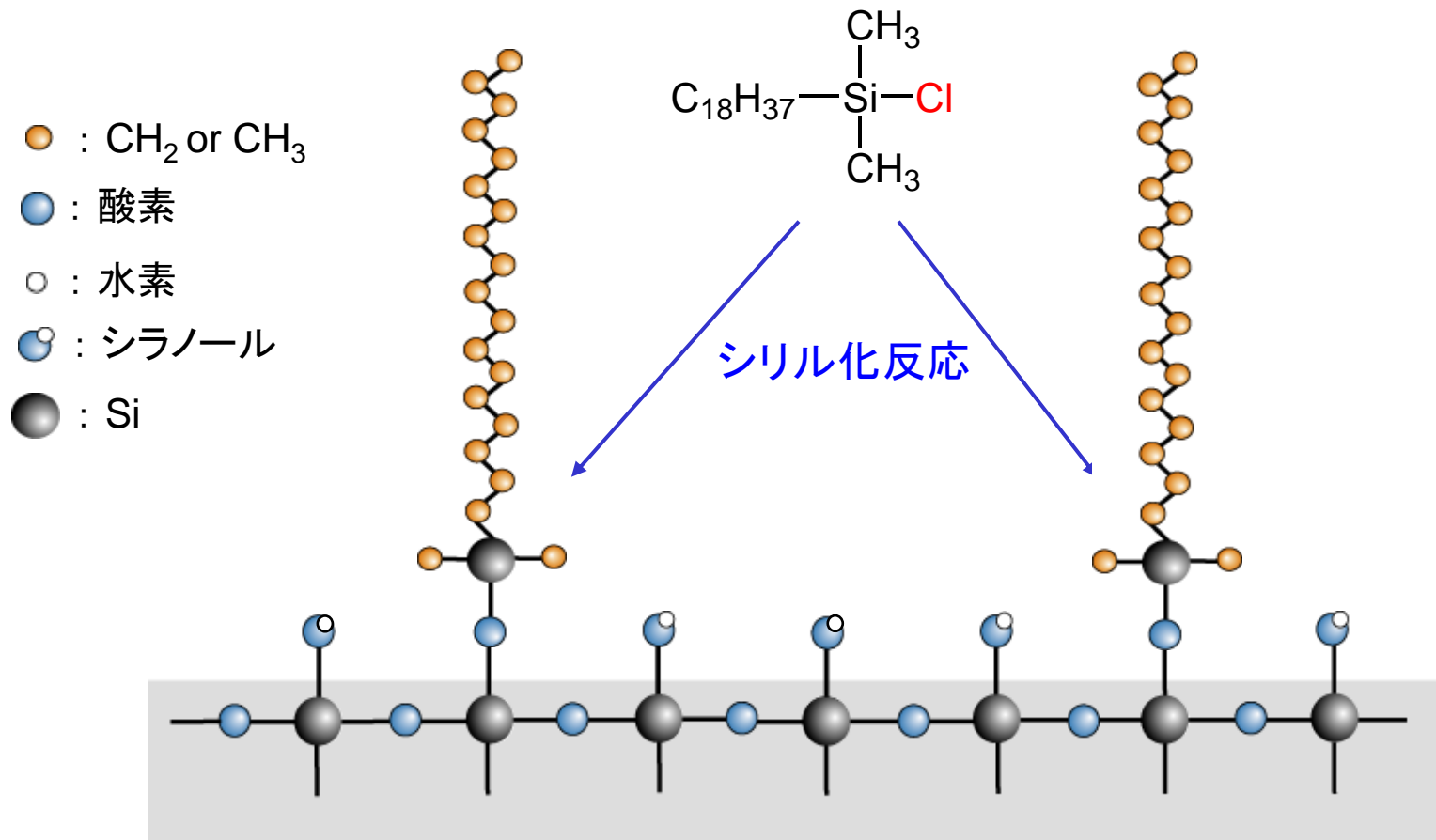


拡大



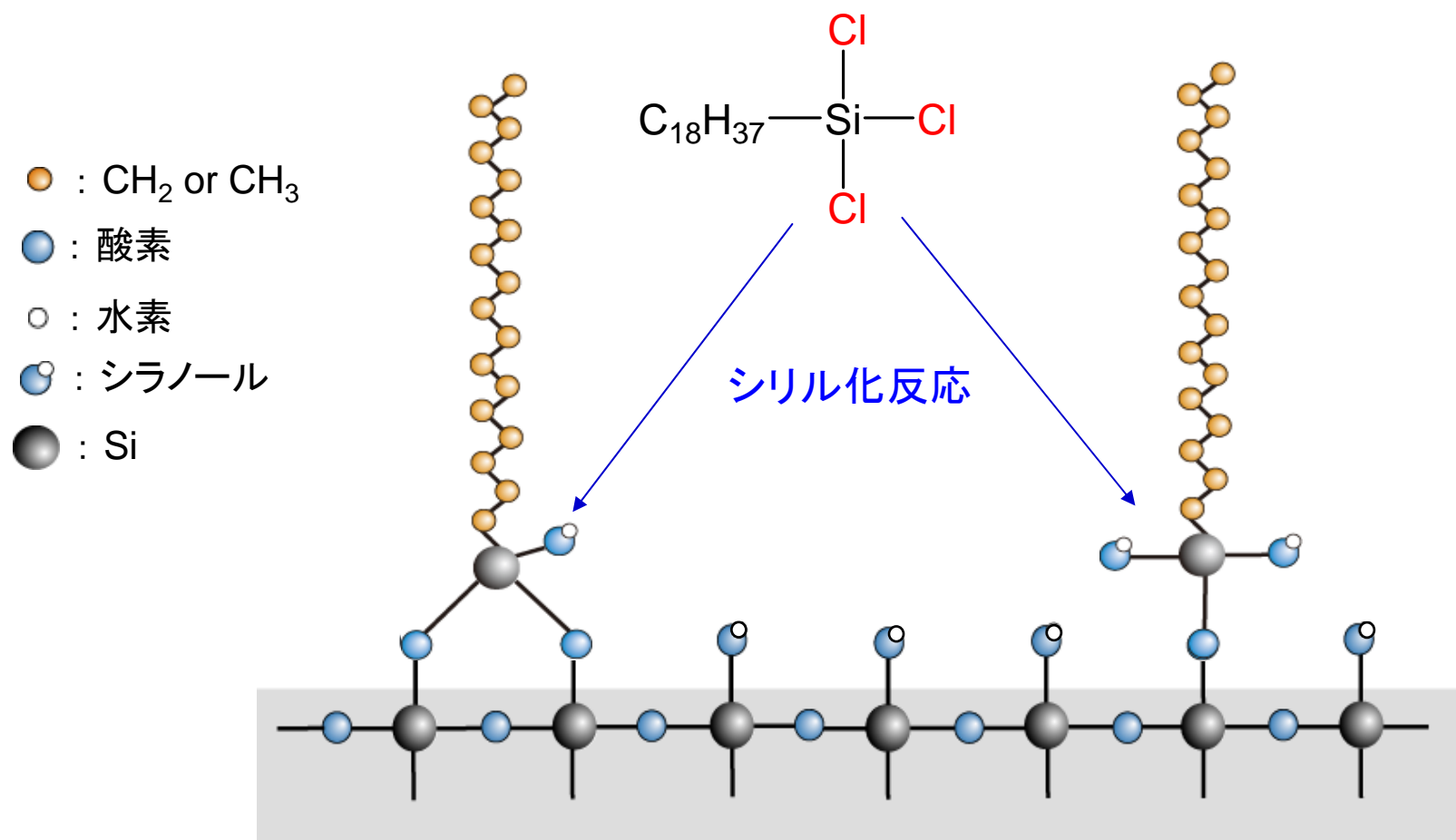
二次粒子 (一次粒子の集合)

①ODSの構造 (一官能性ODS)



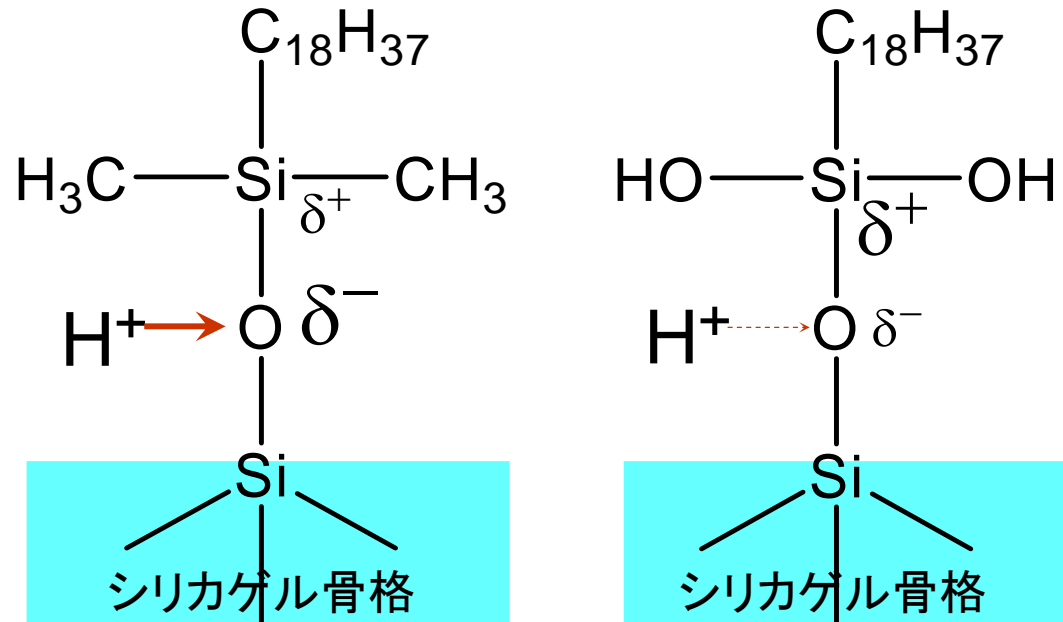
②ODSの構造

(三官能性ODS)



③ODSの構造

一官能性ODSと三官能性ODSの安定性の違い

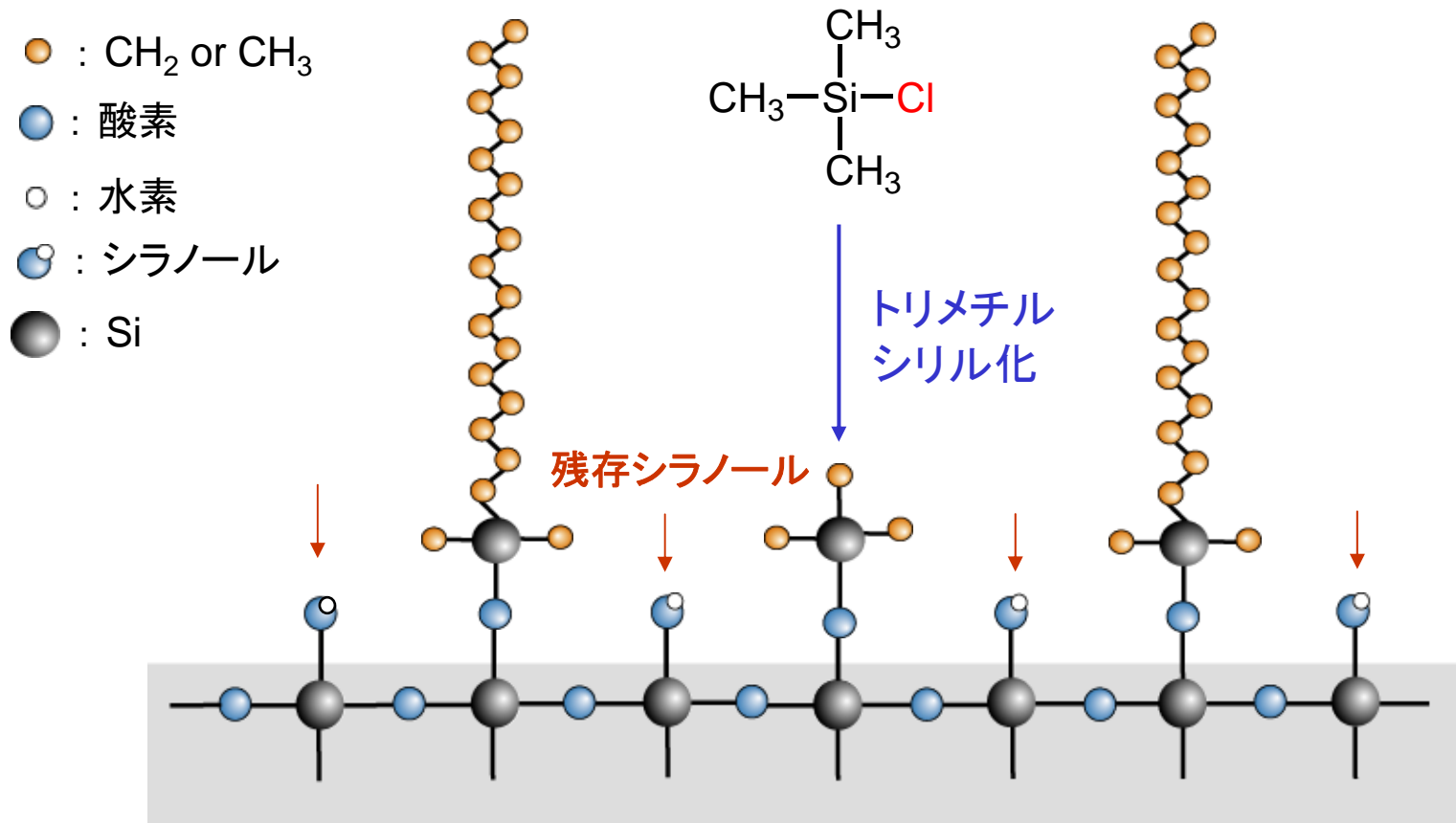


ポーリングの電気陰性度: $\text{O} > \text{C} > \text{H} > \text{Si}$
 3.5 2.5 2.1 1.8

W. Noll, Chemistry and Technology of Silicones, Academic Press, Orland, 1968, p.312.

④ODSの構造

エンドキャッピング(二次シリル化)



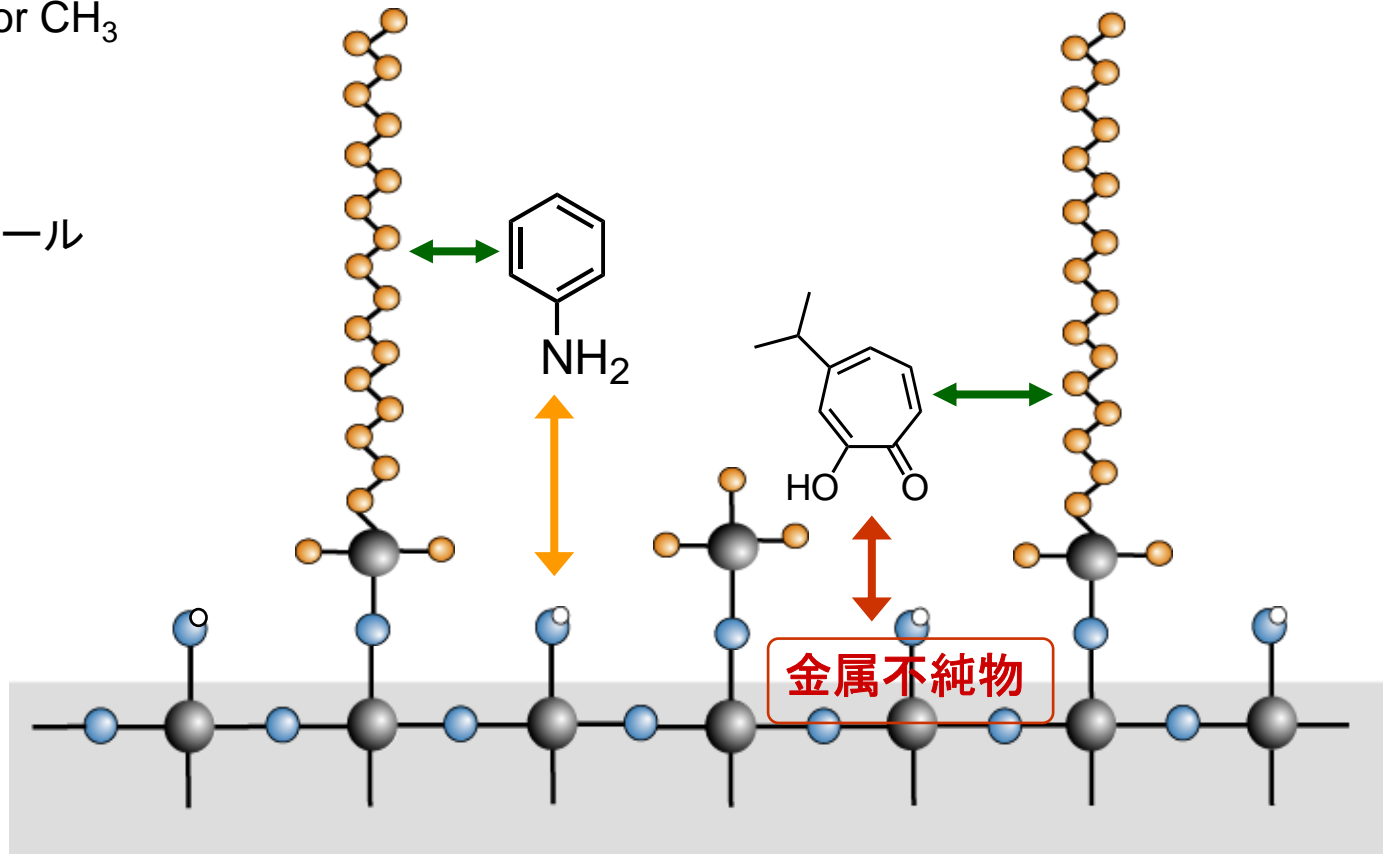
ODSにおける保持機構

疎水性相互作用
(本来の保持機構)

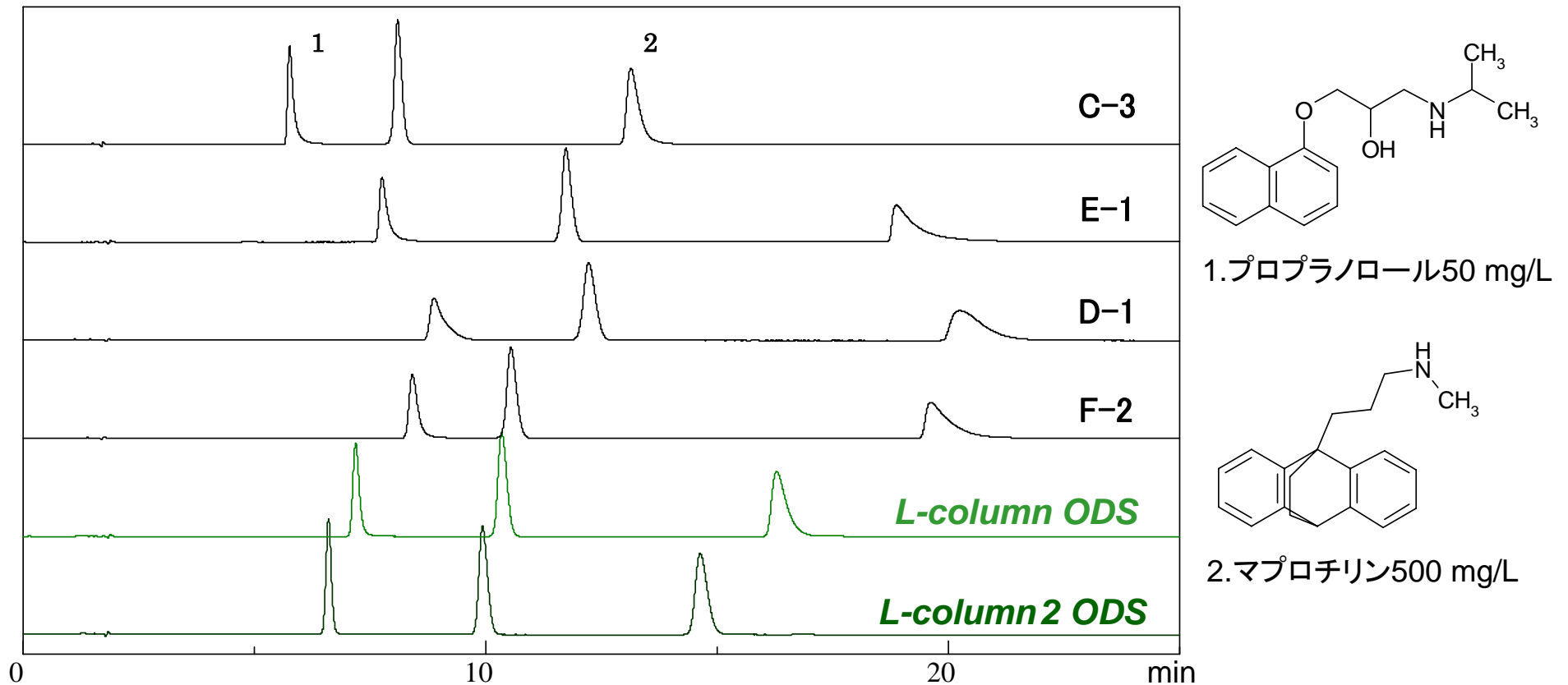
二次的相互作用
シラノールとの相互作用
金属不純物との相互作用

保持機構を
複雑化する

- : CH₂ or CH₃
- : 酸素
- : 水素
- : シラノール
- : Si



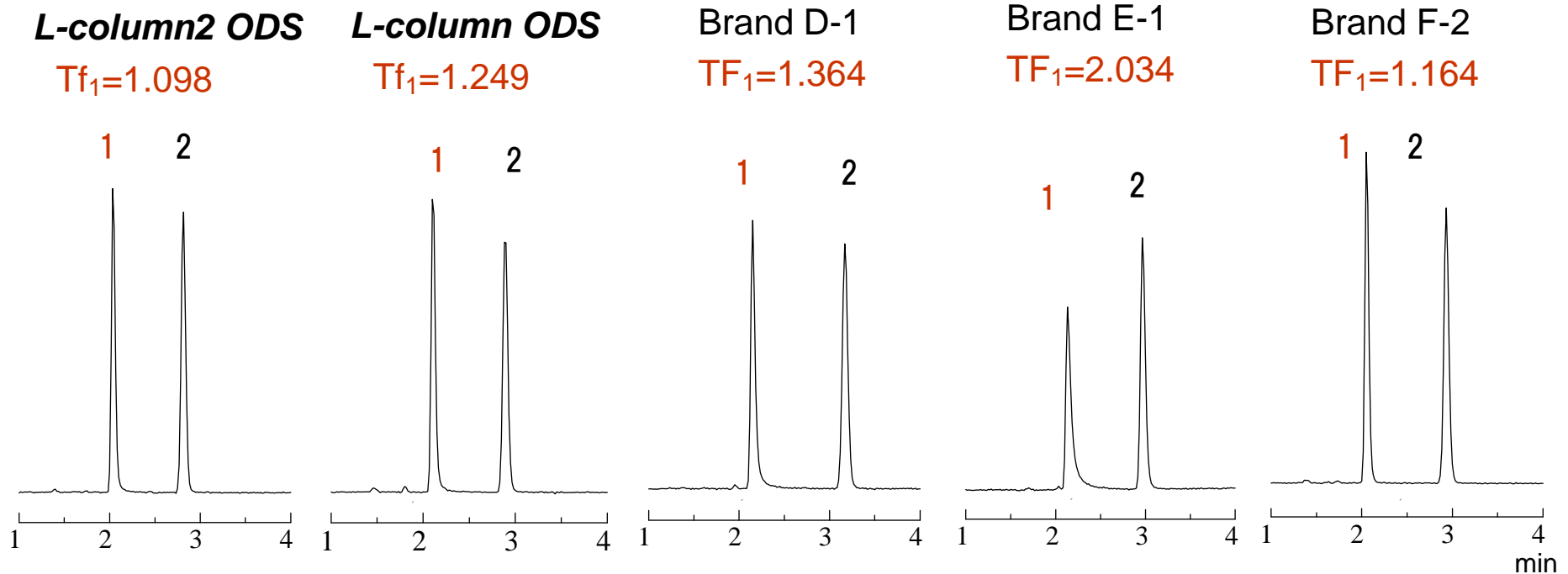
塩基性化合物分析によるカラム評価



カラムサイズ: 4.6 × 150 mm, 5 μm; 移動相: CH₃CN / 25 mM リン酸緩衝液 pH7 (3/7); 流量: 1 mL/min; 温度: 40°C; 検出: UV 220 nm; 試料: in CH₃CN, 1 μL

ピークテーリングの程度によりエンドキャッピングの優劣が分かる

酸性化合物分析によるカラム評価



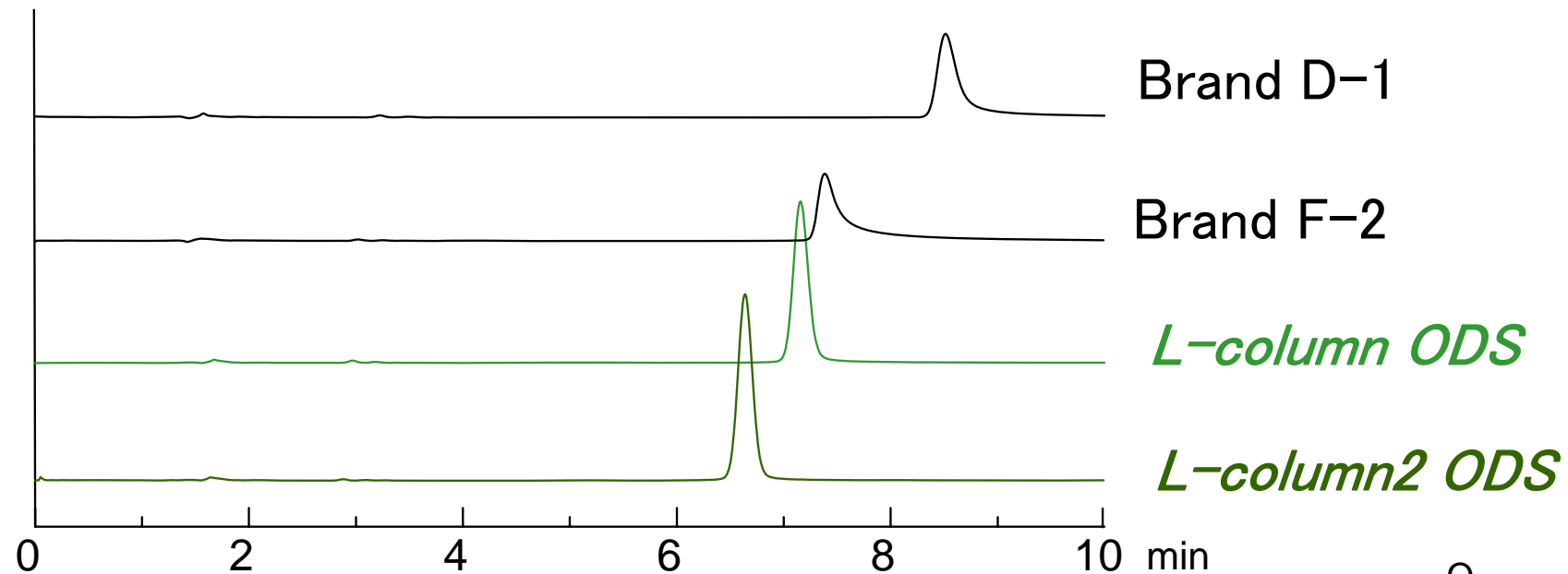
カラム: 4.6 x 150 mm (C18, 5 μ m)

移動相: アセトニトリル / 20 mM リン酸 (2/98)

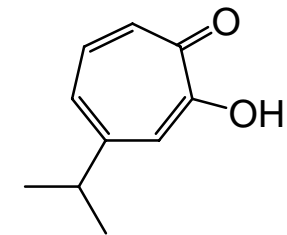
温度: 40°C; 流量: 1 mL/min; 検出: UV 210 nm; 試料: 1. ぎ酸 2. 酢酸

ピークテーリングの程度により基材シリカゲルの純度とエンドキャッピングの優劣がわかる

配位性化合物分析によるカラム評価



カラム: 5 μ m, 4.6 \times 150 mm
 移動相: CH₃CN / 20 mM H₃PO₄ (40/60)
 流量: 1 mL/min; 温度: 40°C; 検出: UV 254 nm
 試料: 0.5 mg/L ヒノキチオール in CH₃CN, 10 μ L



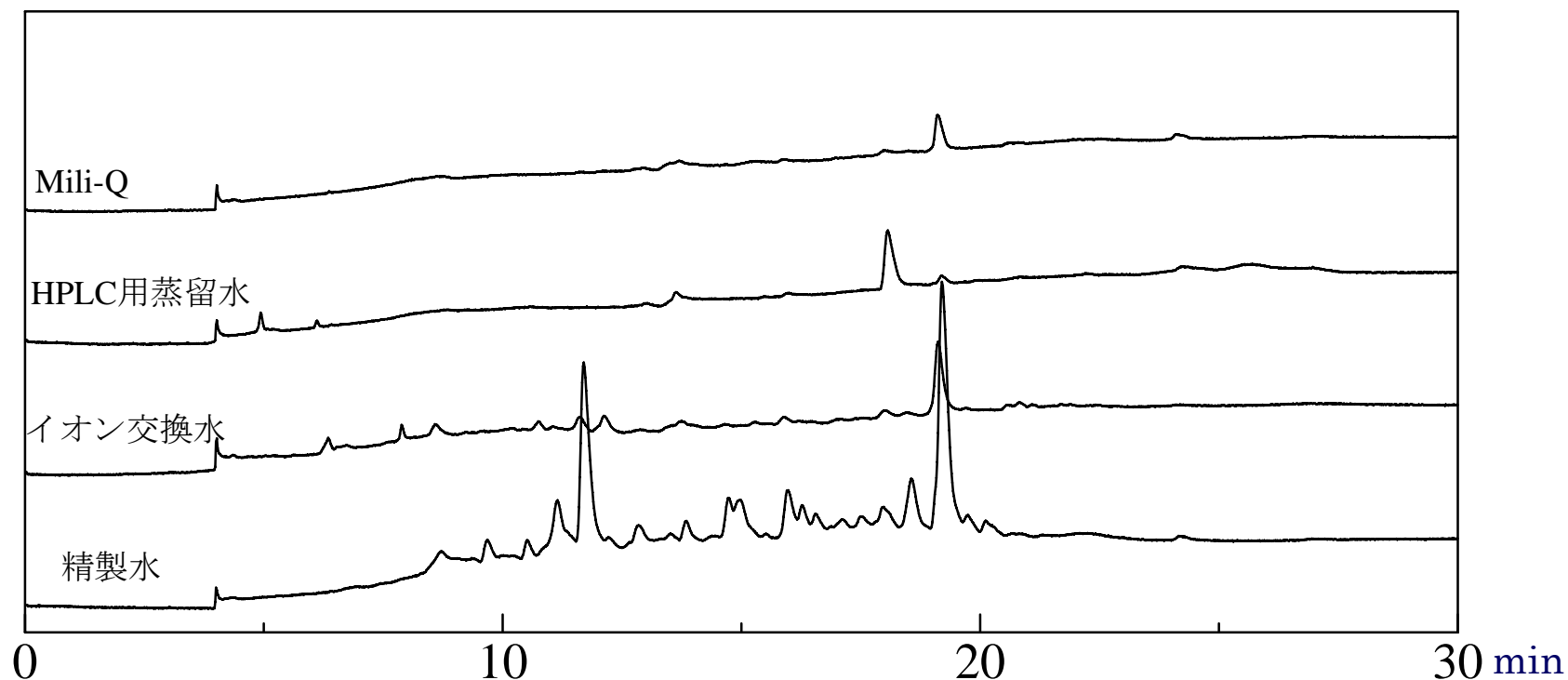
ヒノキチオール

ピークテーリングの程度により基材シリカゲルの純度とエンドキャッピングの優劣がわかる

逆相カラムの選び方

- ファーストチョイスは高性能なカラム
 - ・ 高理論段数
 - ・ 低吸着性
 - ・ 高耐久性
 - ・ ロット間のばらつきが少ない
 - ・ 低カラム圧力
- 目的成分にあったカラムを選ぶ
 - ・ メーカーのアプリケーションデータなどを検索
 - ・ デモカラムを試す

水の規格によるベースラインの比較

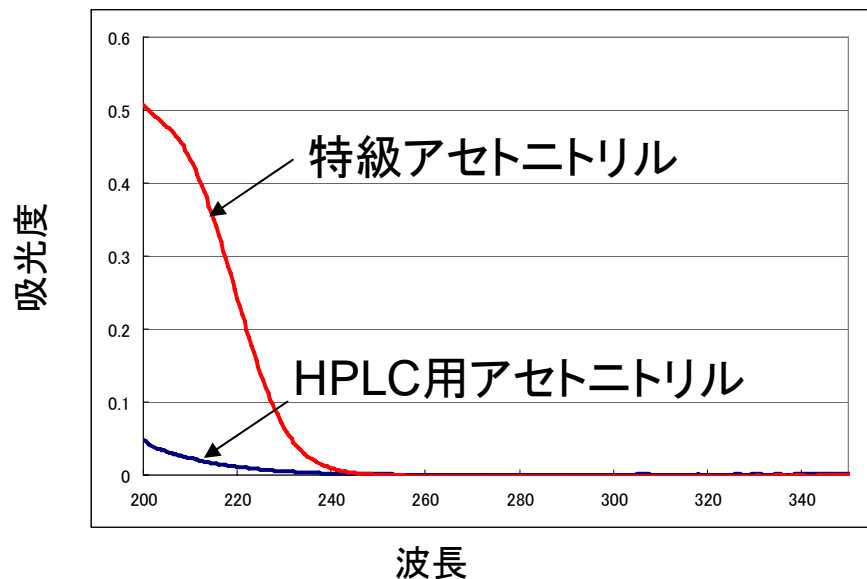


カラム : **L-column ODS** 5 μ m, 4.6 \times 150 mm; 検出 : UV 210 nm

移動相 : HPLC用アセトニトリル/水 (10/90 \rightarrow 100/0 0 \rightarrow 30 min); 流量 : 1 mL/min

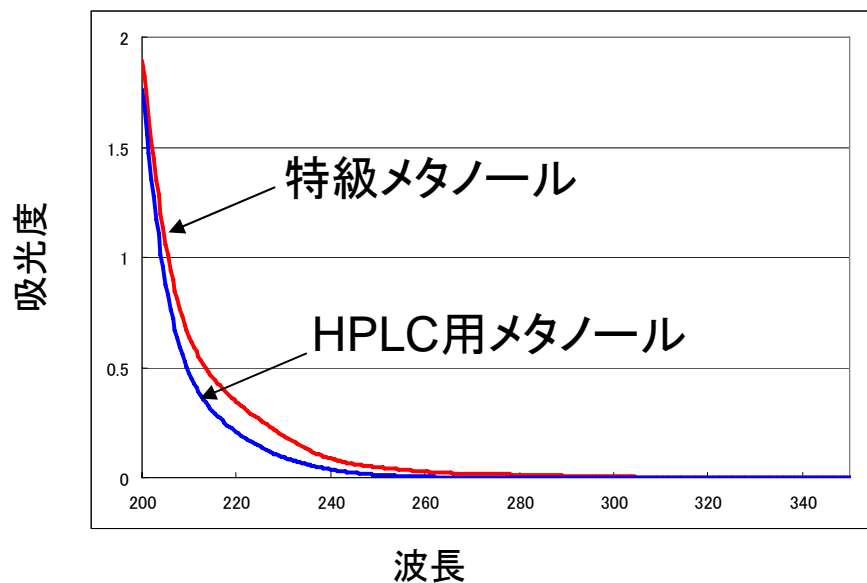
水に不純物が含まれていると、ベースラインが上昇したり、ゴーストピークが出現する

有機溶媒の規格によるUV吸収の比較



HPLC用アセトニトリル

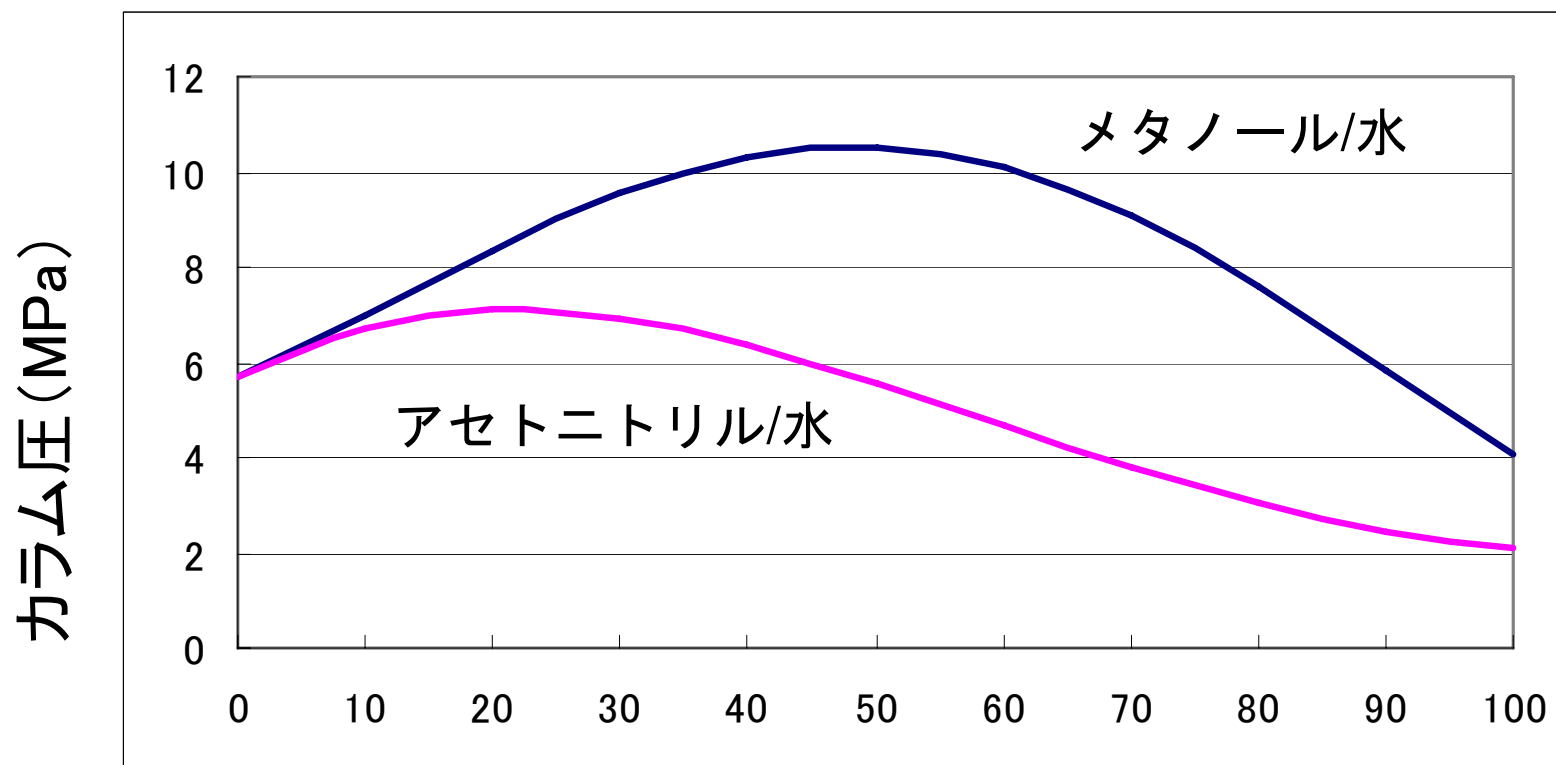
- 吸光度、相対蛍光強度、グラジエントの規格があり、低波長(250nm以下)での吸光度が低い



HPLC用メタノール

- 吸光度、相対蛍光強度の規格があるが、グラジエントの規格はない

カラム圧の比較



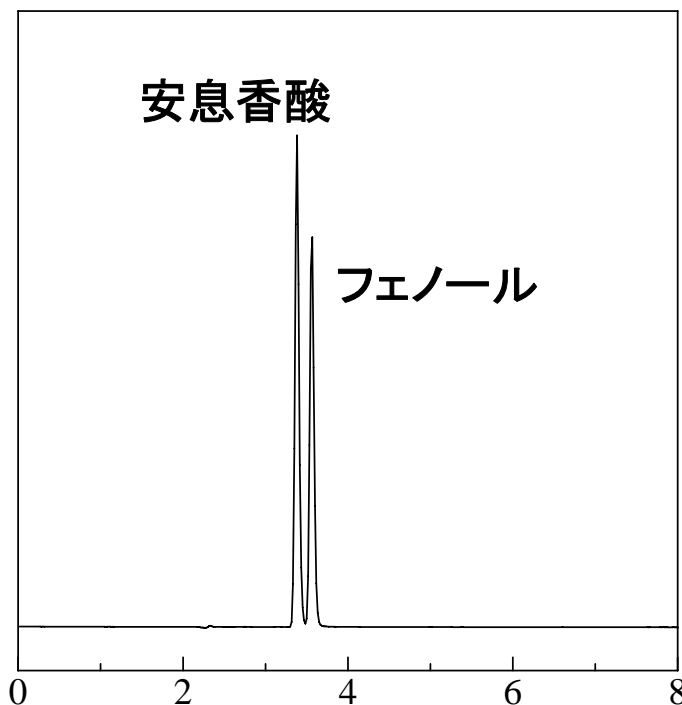
移動相の有機溶媒組成 (%)

カラム: **L-column ODS** 5 μ m, 4.6 \times 150 mm

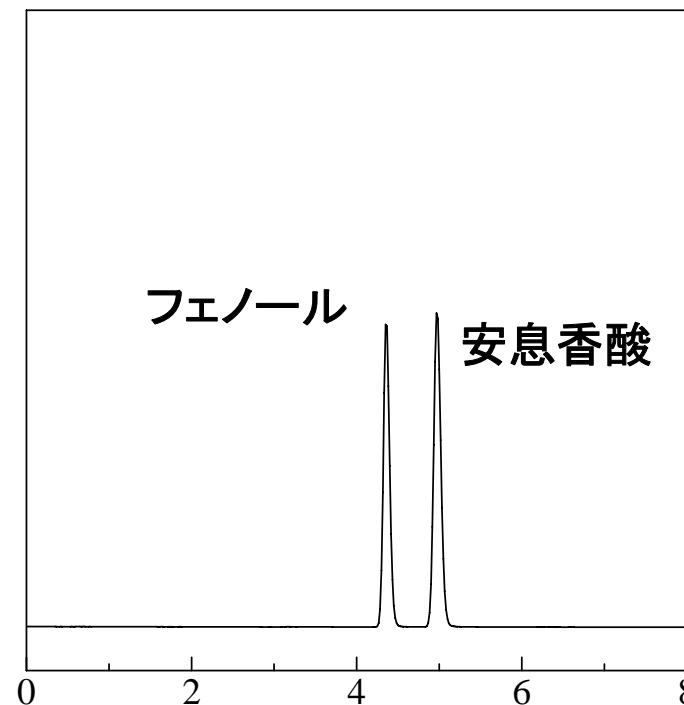
流量: 1 mL/min; 温度: 室温

有機溶媒の種類による溶出順序の違い

アセトニトリル/20 mM リン酸 (35/65)



メタノール/20 mM リン酸 (35/65)

カラム: *L-column ODS* 5 μ m, 4.6 \times 250 mm

流量: 1 mL/min; 温度: 30°C


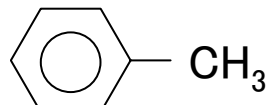
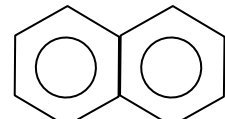
アセトニトリル(非プロトン性)とメタノール(プロトン性)で溶出順序が変わることがある

分配係数(Pow)とは

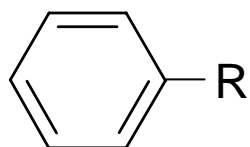
- ・ 水と1-オクタノールの中の分配係数
- ・ 物質の疎水性を表す

計算式: $Pow = C_o / C_w$ ※ C_o :オクタノール中の試料濃度
※ C_w :水中の試料濃度

Powが大きければ、疎水性が高い

構造式	名称	log Pow	保持時間
	ベンゼン	2.13	小  大
	トルエン	2.73	
	ナフタレン	3.3	

試料の疎水性が大きくなると溶出は遅くなる



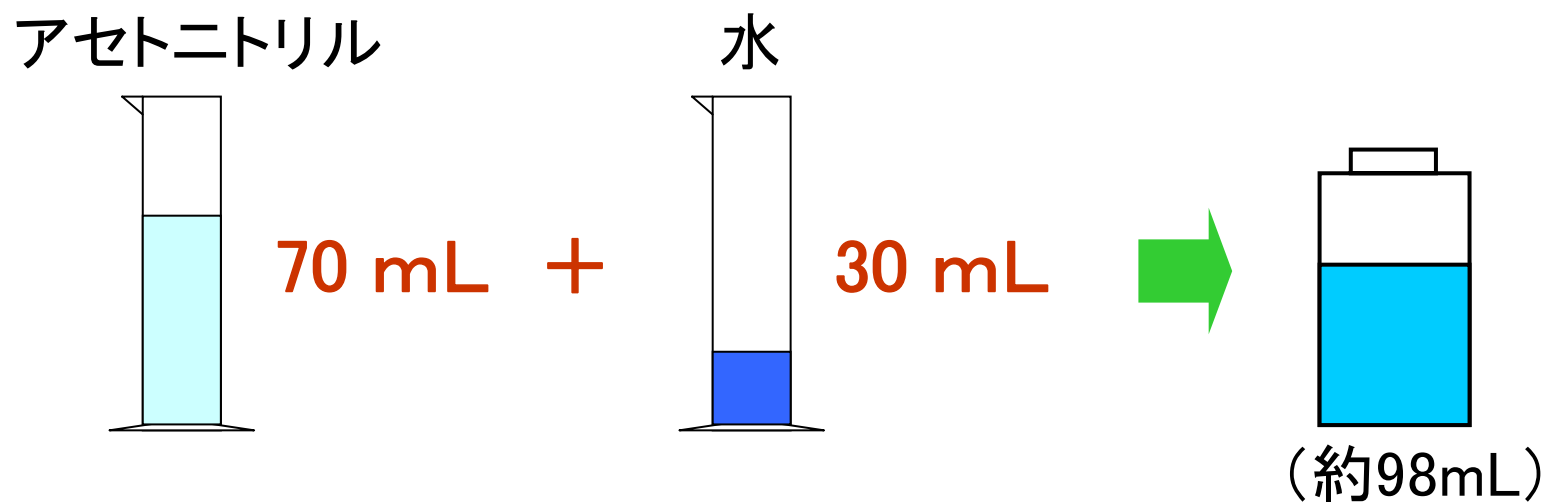
化合物の構造とlogPow

化合物	logPow	化合物	logPow
アニリン(-NH ₂)	0.9	エタノール	-0.31
フェノール(-OH)	1.46	n-ヘキシルアルコール	2.03
ベンズアルデヒド (-CHO)	1.48	n-ペンタン	3.39
安息香酸(-COOH)	1.87	シクロヘキサン	3.44
ベンゼン(-H)	2.13	n-ヘキサン	3.9
トルエン(-CH ₃)	2.73	n-ヘプタン	4.66
クロロベンゼン(-Cl)	2.84	n-オクタン	5.18

親水性の官能基が付くとlogPowが小さくなり、溶出が早くなる

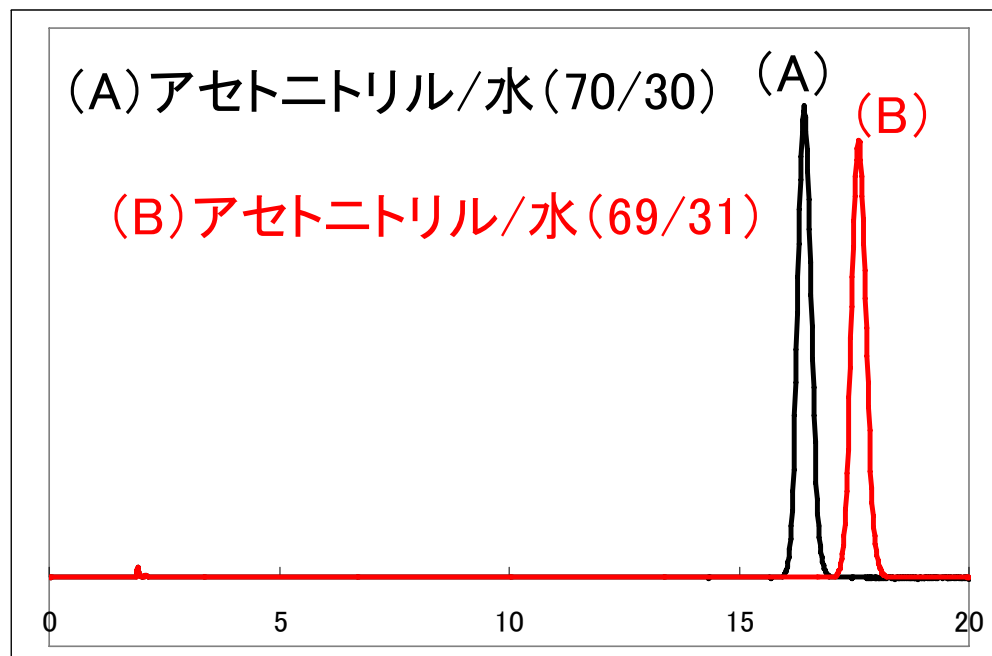
移動相の調製法

アセトニトリル/水 (7/3 v/v) を調製する場合



- ・それぞれを個別に量りとり、1つの容器に入れる
- ・各溶媒が室温になってから計る

移動相の調製誤差と保持時間



カラム: L-column ODS 4.6 × 150 mm

移動相: アセトニトリル/水

試料: p-ターフェニル

(in アセトニトリル)

移動相の有機溶媒が1%の差で
保持時間が**1.2分(7%)**変化した

移動相の脱気

脱気を行わず気泡が発生する事によるトラブル

- ・ポンプ内 → 保持時間の变化
- ・カラム内 → クロマトグラムに異変
- ・検出器内 → スパイクノイズ、ベースラインの変動

脱気方法

- ・アスピレータを用いた減圧脱気
- ・高分子膜を用いたインライン減圧脱気
- ・ヘリウムガスのバブリングによる脱気

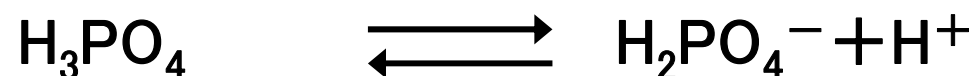
いつも同じ方法、同じ時間で脱気する

緩衝液とは

溶液に酸または塩基を加えた時や希釈した時に、pHの変化を緩める作用をもつ溶液を緩衝液 (buffer solution) という

弱酸 + 共役塩基 H_3PO_4 と H_2PO_4^-
(弱塩基 + 共役酸 NH_3 と NH_4^+)

例: リン酸緩衝液 (pH=1.83付近のとき)



緩衝作用が働く条件

- ・ H_3PO_4 と H_2PO_4^- が共存
- ・ pH が pKa ± 約1の範囲

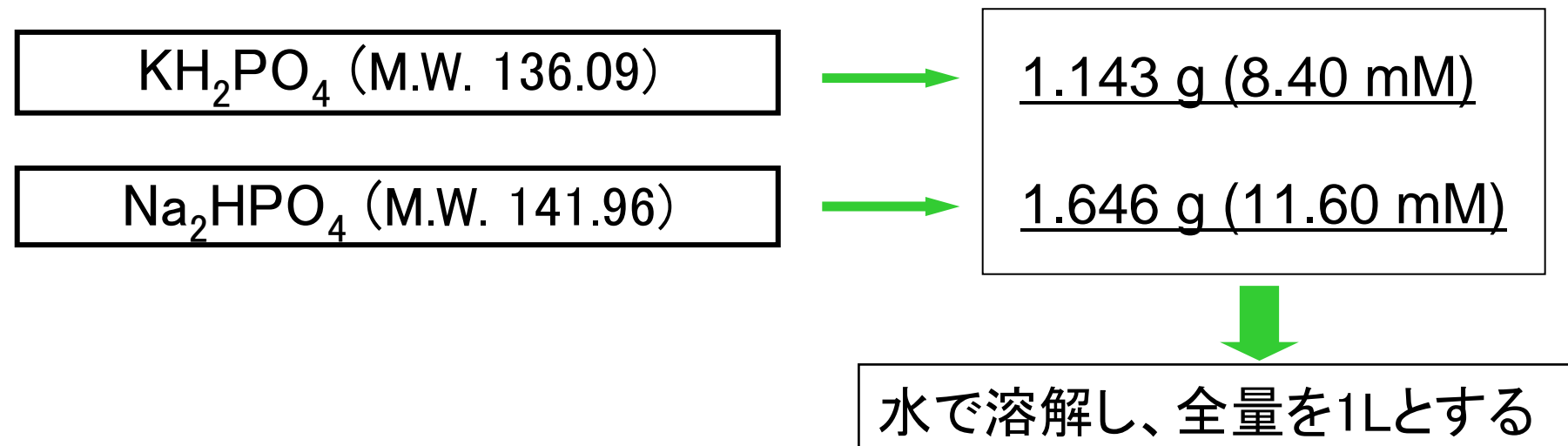
緩衝液を調製する方法

- pHメータを見ながら調製
(pH調整は有機溶媒との混合前の段階で行なう)
- 一定量を秤量し調製
(質量による調製は再現性が高い)

一定量を秤量し調製する方法

例：20 mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0) を調製する場合

➡ PO_4 の合計が20 mMとなるように調製



緩衝液の調製は一定量を秤量し調製すると
簡便で再現性が良い

緩衝液調製の計算

解離定数をKaとしてpKaをhとおくと、 $h = -\log Ka$
リン酸をX (mol/L)、リン酸二水素ナトリウムをY (mol/L)。
合計の濃度をM (mol/L)。
目的とするpHをPと置く。

電荷均衡より $[H^+] + [Na^+] = [H_2PO_4^-] + [OH^-]$
物質収支より $[NaH_2PO_4] + [H_3PO_4] = M$
解離定数 $Ka = [H^+][H_2PO_4^-] / [H_3PO_4] = 10^{-h}$

この連立方程式を解いて
XとYを得ることができる

① 1L調製する場合のモル数(計算による)

調製したいpH	10 mM		20 mM		30 mM	
	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄
6	8.79	1.21	17.58	2.42	26.36	3.64
6.2	8.21	1.79	16.41	3.59	24.62	5.38
6.4	7.43	2.57	14.85	5.15	22.28	7.72
6.6	6.45	3.55	12.91	7.09	19.36	10.64
6.8	5.34	4.66	10.69	9.31	16.03	13.97
7	4.20	5.80	8.40	11.60	12.60	17.40
7.2	3.14	6.86	6.27	13.73	9.41	20.59
7.4	2.24	7.76	4.48	15.52	6.72	23.28

(pKa=6.86を用いて計算。実際にpHを測定して用いること)

(単位:mmol)

② 1L調製する場合のモル数(計算による)

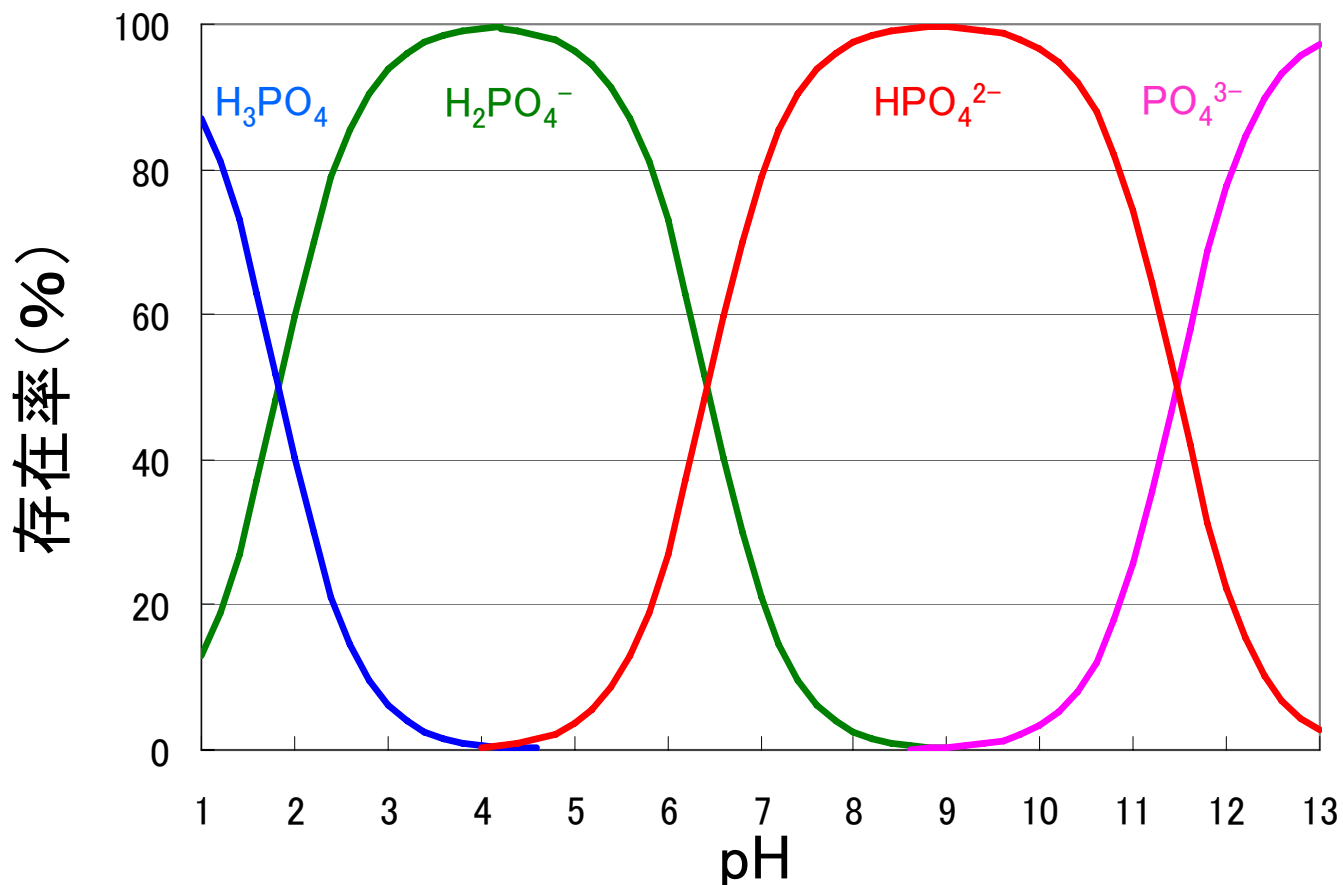
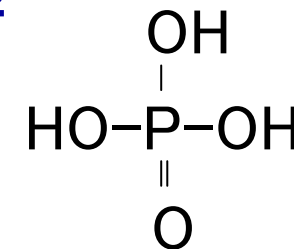
調製したいpH	5 mM		10 mM		20 mM	
	CH ₃ COOH	CH ₃ COONa	CH ₃ COOH	CH ₃ COONa	CH ₃ COOH	CH ₃ COONa
4.0	4.36	0.64	8.62	1.38	17.14	2.86
4.2	3.98	1.02	7.90	2.10	15.74	4.26
4.4	3.52	1.48	7.00	3.00	13.96	6.04
4.6	2.98	2.02	5.94	4.06	11.85	8.15
4.8	2.40	2.60	4.79	5.21	9.56	10.44
5.0	1.84	3.16	3.66	6.34	7.32	12.68
5.2	1.34	3.66	2.67	7.33	5.33	14.67
5.4	0.94	4.06	1.87	8.13	3.73	16.27

(pKa=4.76を用いて計算。実際にpHを測定して用いること)

(単位:mmol)

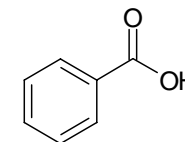
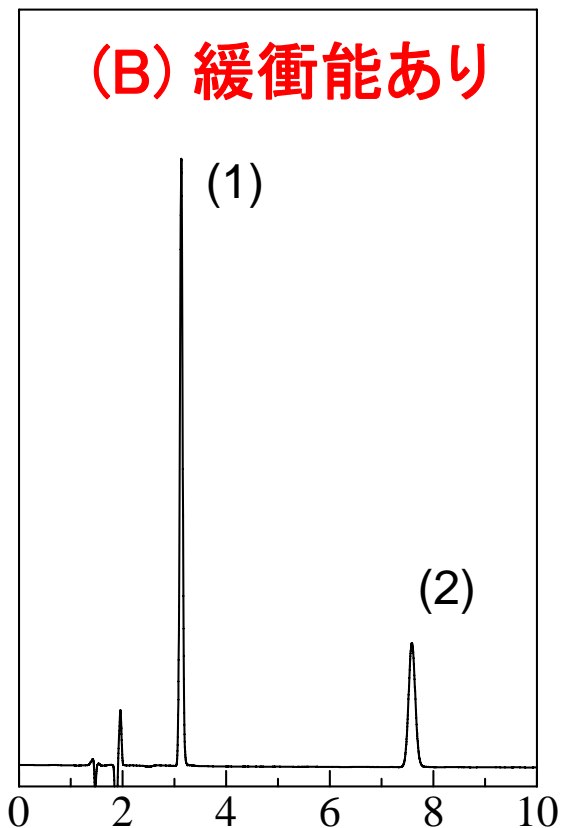
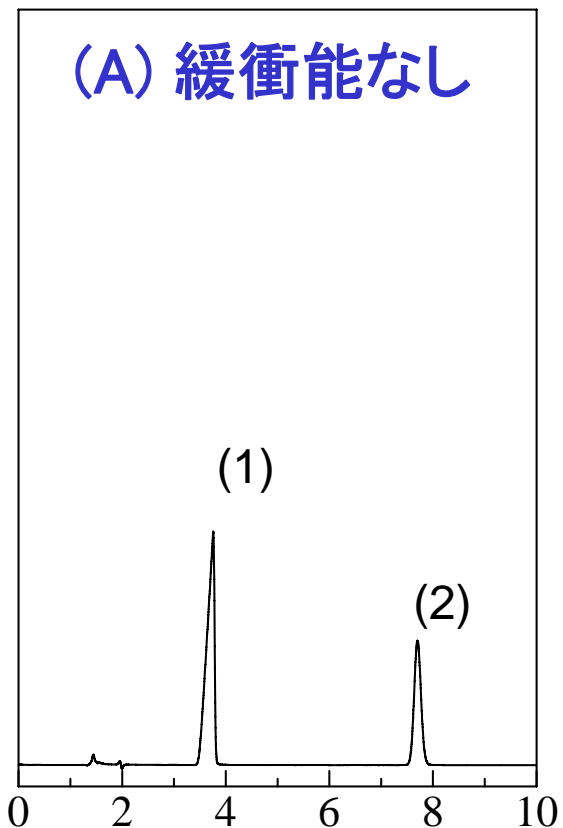
リン酸の解離、非解離状態の存在率

(リン酸のpKa 1.83 6.43 11.46)



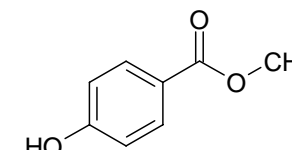
リン酸緩衝液はpH 4と9付近では緩衝能を持たない

①緩衝能の有無の比較(ピーク形状)



pKa=4.2

(1) 安息香酸 (100 mg/L)



pKa=8.5

(2) メチルパラベン (100 mg/L)

緩衝能のない移動相
で分析すると



pKaがpHに近い
解離性化合物の
ピークがひずむ

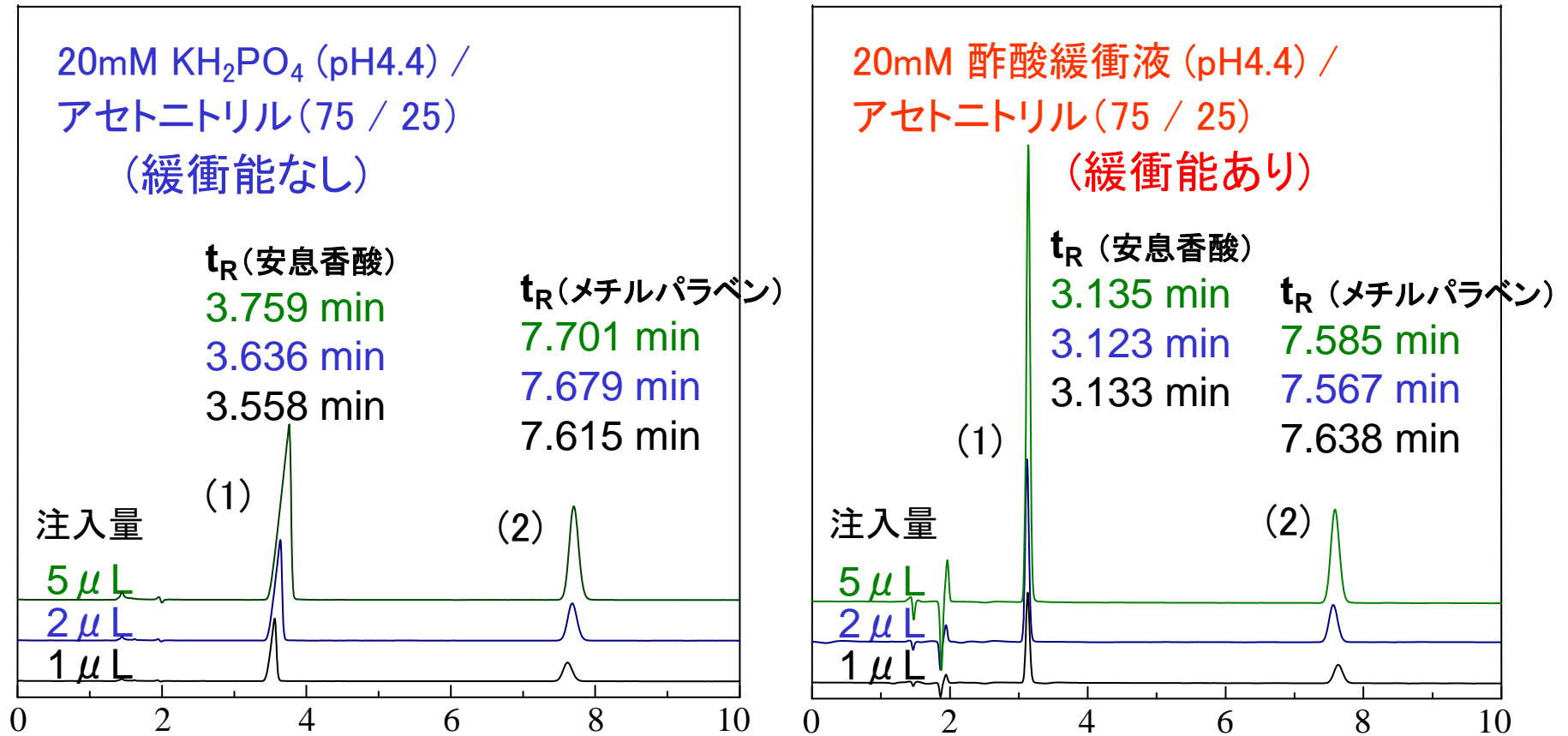
カラム : *L-column2 ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm

移動相 : (A) 20 mM KH_2PO_4 (pH4.4) / アセトニトリル (75 / 25)

(B) 20 mM 酢酸緩衝液 (pH4.4) / アセトニトリル (75 / 25)

注入量 : 5 μ L

②緩衝能の有無の比較（注入量の影響）



カラム : L-column2 ODS 5 μm, 4.6 × 150 mm

試料 : (1) 安息香酸 (100 mg/L), (2) メチルパラベン (100 mg/L)

緩衝能のない移動相
で分析すると



注入量が多くなるにつれ解離性化合物は保持時間が遅くなる

③緩衝能の有無の比較（再現性）

ロット番号	(A) 20mM KH ₂ PO ₄ (pH4.4)			(B) 20mM 酢酸緩衝液 (pH4.4)		
	安息香酸の保持時間	メチルパラベンの保持時間	分離度	安息香酸の保持時間	メチルパラベンの保持時間	分離度
E4311	3.725	7.990	19.523	3.117	7.543	26.555
E4312	3.541	7.415	18.794	3.059	7.301	26.386
E4313	3.636	7.679	18.754	3.123	7.567	26.4
CV(%)	2.53	3.91	2.28	1.14	1.97	0.354

カラム : *L-column2 ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm

移動相 : (A) 20mM KH₂PO₄ (pH4.4) / アセトニトリル (75 / 25)

(B) 20mM 酢酸緩衝液 (pH4.4) / アセトニトリル (75 / 25)

試料 : 安息香酸 (100 mg/L)、メチルパラベン (100 mg/L)

注入量 : 2 μ L

緩衝能のない移動相では解離性化合物のロット間のばらつきが大きくなる

逆相HPLCで使用される代表的緩衝液

添加剤	pKa	有効緩衝範囲	推奨使用条件
トリフルオロ酢酸	<1.0		0.02~0.1%
酢酸(NH ₄ 、Na、K)	4.76	3.76~5.76	0.1~1.0%
ギ酸(NH ₄ 、Na、K)	3.54	2.5~4.5	0.1~1.0%
りん酸	1.83 6.43 11.46	1~2.8 5.4~7.4	1~10mM
アンモニア	9.36	8.4~10.4	<10mM
重炭酸アンモニウム	9.87 (HCO ₃) 9.36 (NH ₄ ⁺) 6.11 (CO ₃ ²⁻)	8.9~10.9 8.4~10.4 5.1~7.1	5~10mM
ホウ酸	9.24	8.2~10.2	
クエン酸	2.90 4.35 5.69	1.9~3.9 3.4~5.4 4.7~6.7	

(化学便覧第5版、及び液クロ文の巻より)

緩衝液使用上の注意

- 用いるpHで緩衝能がある緩衝液を使う
- 緩衝液のUV吸収に注意が必要
- 塩の析出の恐れがある
 - ・有機溶媒と混合したとき
100 mMのリン酸カリウム水溶液の場合、
アセトニトリル > 70%、メタノール > 80%で析出する
ナトリウム塩よりカリウム塩のほうが溶解し易い
 - ・グラジェントのとき
組成の全ての範囲で析出しないこと
 - ・移動相の交換時
- カラムの平衡化に時間を要する
- 緩衝液を使わない移動相を使うと、前の移動相の影響が出る場合がある

内容

<基礎>

ODSの構造と特性

移動相

緩衝液

<分析方法のノウハウ>

解離性化合物

分離の改善

試料の注入テクニック

上手なカラムのダウンサイジング

2 μ m ODSカラムの使用

<トラブルシューティング>

保持時間が変化した

ピーク面積が変化した

水系100%に近い移動相

SNを大きくする

カラムの洗浄と保管

解離性化合物

解離性化合物とは、解離性の官能基をもった物質であり、pHによって解離しイオンになる性質を持つ(イオン性物質)

酸性官能基

芳香族水酸基(-OH)

カルボキシル基(-COOH)

リン酸基(-PO₃H)

スルホン酸基(-SO₃H)

塩基性官能基

アミノ基

第一級アミン(-NH₂)

第二級アミン(-NH-)

第三級アミン(-N-)

第四級アンモニウムイオン

(-N⁺)

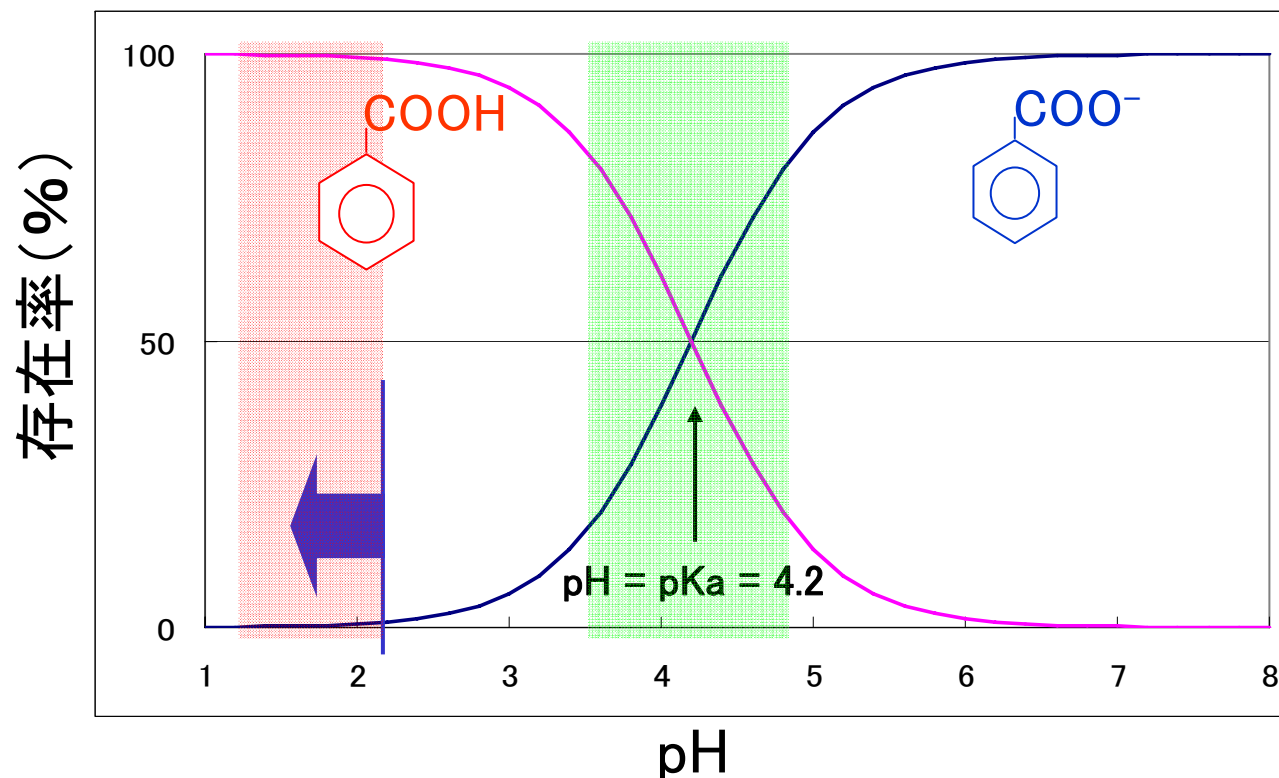
イミノ基 (=N-)

酸性化合物の分析法

- 緩衝液を使用する方法（解離を調節）
解離平衡を安定化させて分析する
（対象物質：弱酸性の化合物）
- イオンペアクロマトグラフィー
解離している化合物に、イオン対試薬を添加し
イオン対を形成させて固定相に保持させる
（対象物質：強酸性の化合物）

①緩衝液を使用する方法（解離を調節）

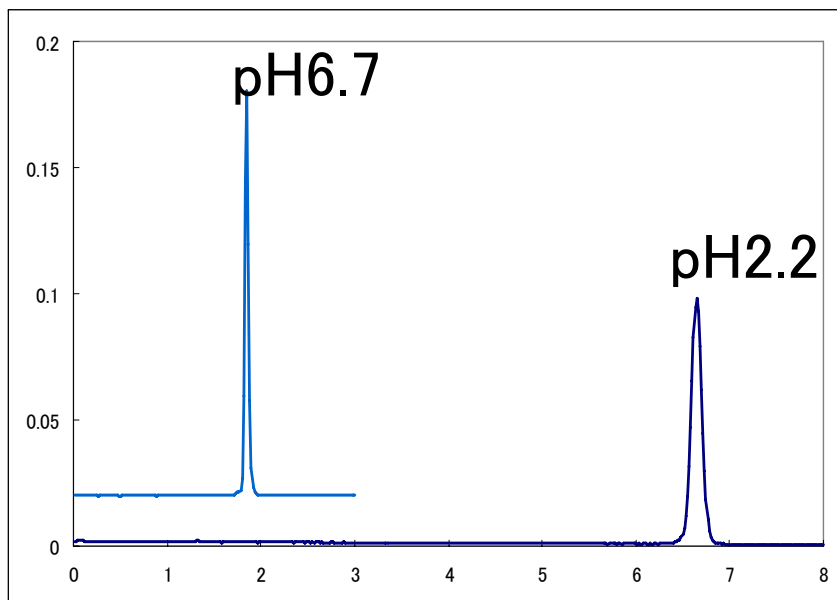
pHによる安息香酸の解離、非解離状態の存在率



- pKaから 2小さいpHにすると解離状態は1%となる(酸の場合)
- pH=pKaのとき、解離状態と非解離状態が1:1で存在する

②緩衝液を使用する方法（解離を調節）

pHが異なる場合のクロマトグラム



緩衝液のpHと保持時間

pH	保持時間 (分)	解離状態 (%)
2.2	6.65	1.0
6.7	1.85	99.7

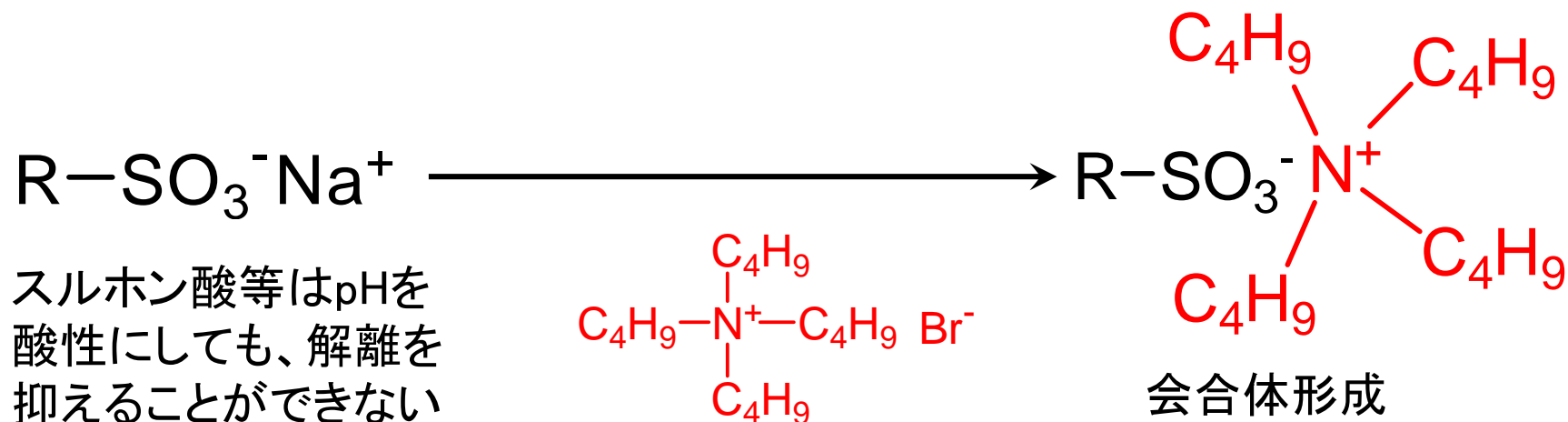
カラム: *L-column ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm

移動相: アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液 (25/75)

試料: 安息香酸

緩衝液のpHが変わると、解離平衡が移動し、それに合わせて保持時間が変わる

①イオンペアクロマトグラフィー



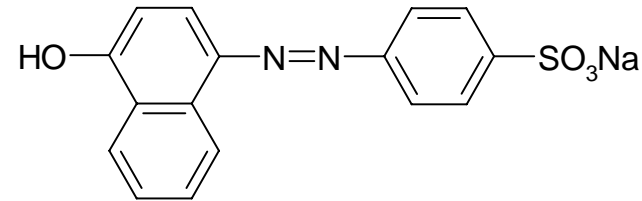
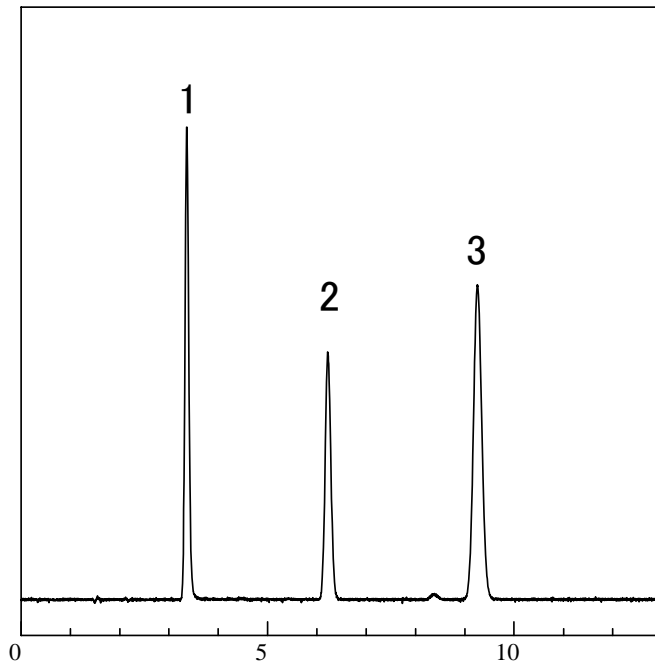
スルホン酸等はpHを酸性にしても、解離を抑えることができない

会合体形成
電荷を打ち消しあって疎水性が増加する

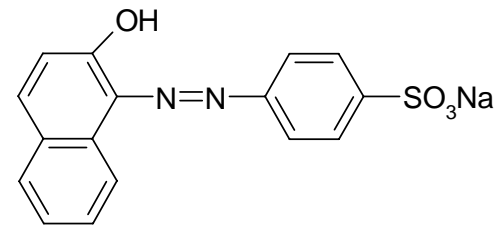
イオン対試薬(5 ~ 20 mM)

- ① テトラブチルアンモニウム (TBA) ブロマイド
価格が安いですが、低波長にUV吸収がある
- ② テトラブチルアンモニウム (TBA) ホスフェイト (水溶液)
価格は高いですが、UV吸収が小さい

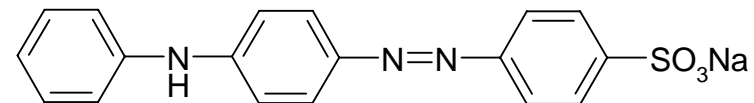
②イオンペアクロマトグラフィー (酸性染料の分析例)



1. α -ナフトールオレンジ



2. アシッドオレンジ7



3. アシッドオレンジ5

カラム: *L-column2 ODS* 5 μ m, 4.6 x 150 mm

移動相: アセトニトリル/水 (45/55, 10 mM TBA-PO₄); 流量: 1 mL/min;

検出: UV 430 nm; 注入量: 1 μ L

試料: 1. α -ナフトールオレンジ, 2. アシッドオレンジ7, 3. アシッドオレンジ5

イオン対試薬

塩基性化合物用

1-ペンタンスルホン酸ナトリウム
1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム
1-ペプタンスルホン酸ナトリウム
1-オクタンスルホン酸ナトリウム
ドデカン-1-スルホン酸ナトリウム
n-ドデシル硫酸ナトリウム

酸性化合物用

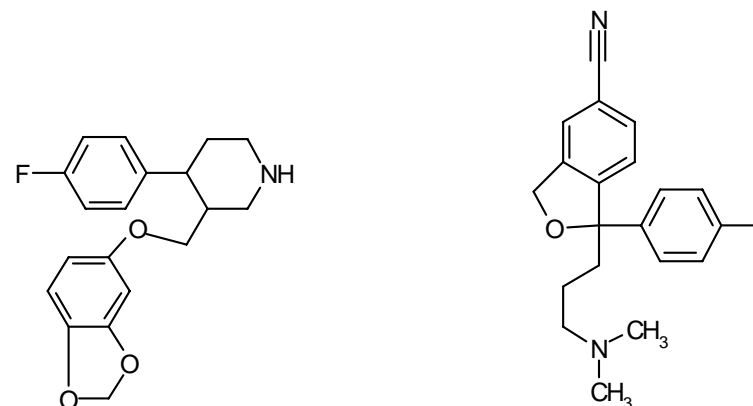
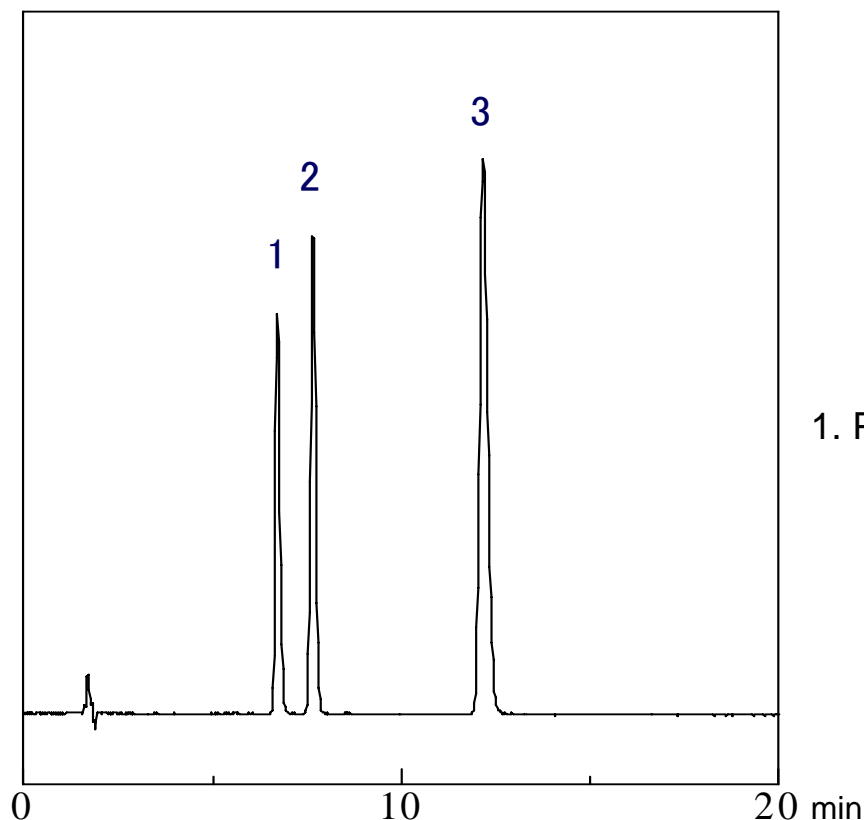
臭化テトラブチルアンモニウム
水酸化テトラブチルアンモニウム
リン酸テトラブチルアンモニウム

塩基性化合物の分析法

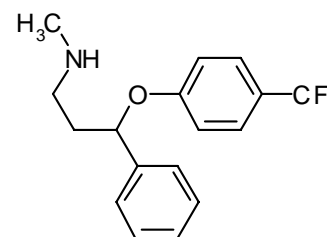
- 緩衝液を使用する方法（解離を調節）
 - ・ 解離平衡を安定化させて分析する

- イオンペアクロマトグラフィー
 - ・ 第一級～第三級アミン
移動相を酸性にして、溶質を十分に解離させて行う
 - ・ 第四級アンモニウムイオン
移動相のpH調整は必要ない

緩衝液を使用する方法



1. Paroxetine (400 mg/L) 2. Citalopram (200 mg/L)



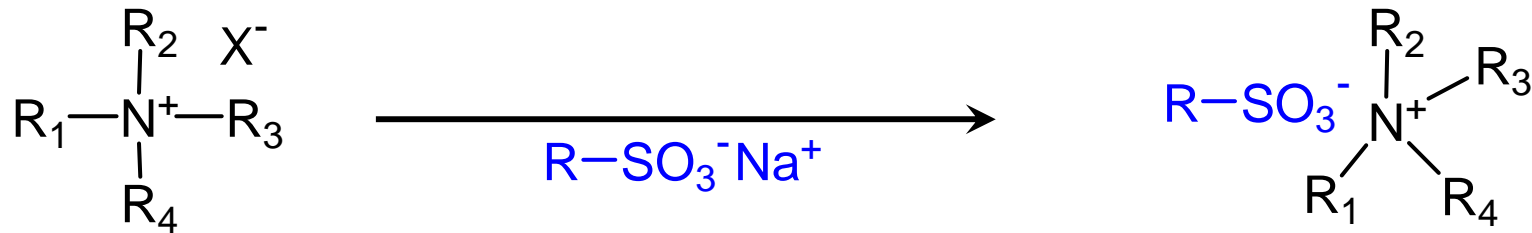
3. Fluoxetine (300 mg/L)

カラム: *L-column2 ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm ; 移動相: アセトニトリル/
25 mM リン酸緩衝液 pH7.0 (35/65); 流量: 1 mL/min; 温度: 40°C;
検出: UV230 nm; 注入量: 2 μ L

緩衝液を用いることで溶質の解離平衡が一定となり、シャープなピークが得られる

①イオンペアクロマトグラフィー

- ・ピーク形状の改善
 - ・保持をさせたい
- } イオンペアクロマトグラフィー



第四級アンモニウムイオンはpHで解離を抑えることはできない

イオン対試薬

(1) アルキルスルホン酸
移動相中5~10mMで用いる。

(2) 過塩素酸塩

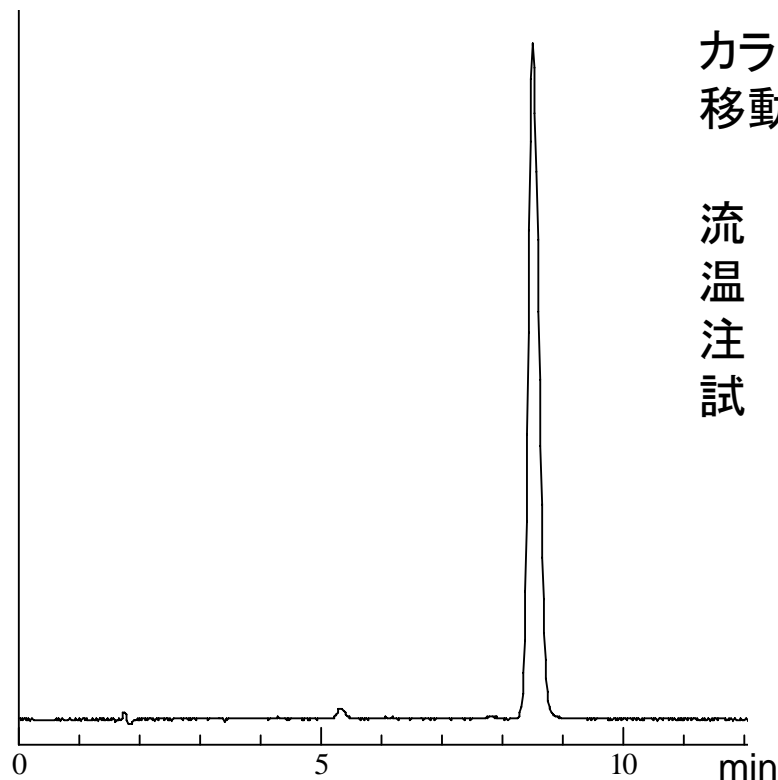
移動相中100~200mMで用いる。保持時間はそれほど大きくなならないが、テーリング防止効果が大い*。

会合体形成
電荷を打ち消し合って疎水性が増加する

イオン対試薬のアルキル基の長さ、試薬の濃度(5~10 mM)で保持時間を調整できる。

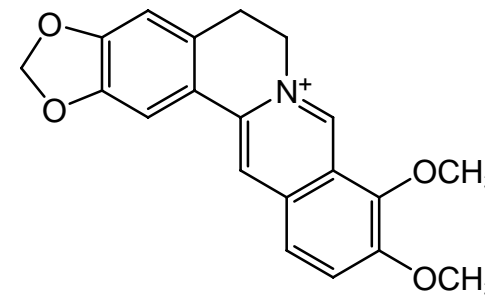
* 林守正, 島津評論, 45(1988)171.

②イオンペアクロマトグラフィー (第四級アンモニウムイオンの分析例)



カラム: *L-column2 ODS* 5 μm , 4.6 \times 150 mm
 移動相: アセトニトリル/水 (3/7,
 10 mMペンタンスルホン酸ナトリウム)

流 量: 1 mL/min
 温 度: 40°C
 注 量: 1 μL
 試 料: ベルベリン



第四級アンモニウムイオンはイオンペアクロマトグラフィーを使用することで理論段数が向上し、保持が強くなる

塩基性化合物のテーリング防止策

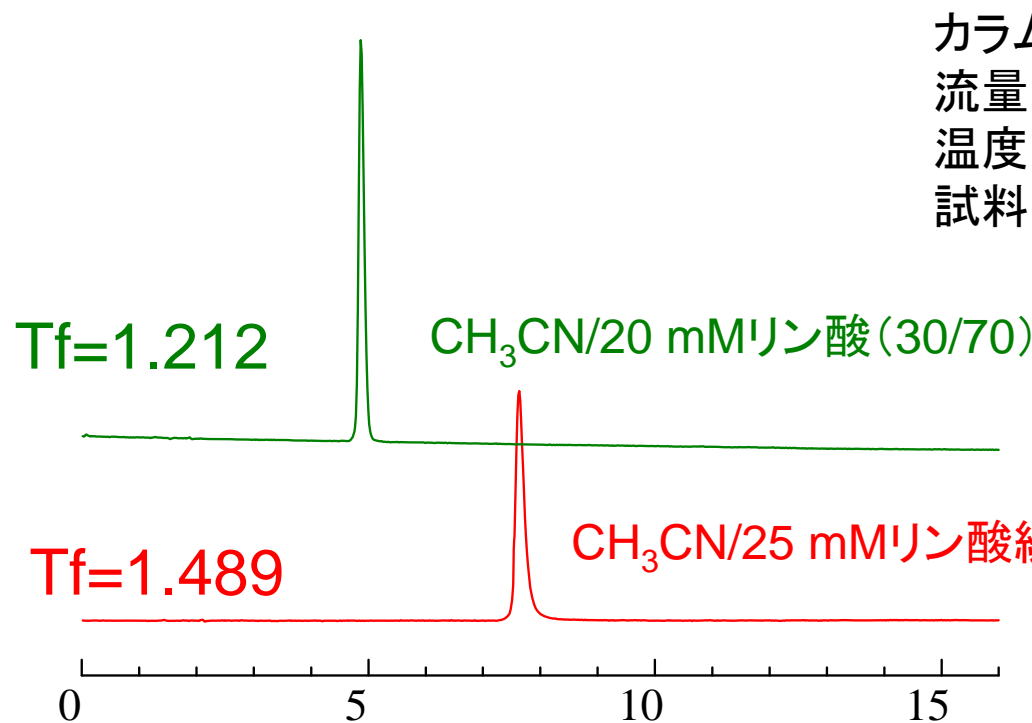
■ 移動相

- ・酸性移動相を使用する
- ・イオン対試薬を使用する
- ・アンチテーリング剤(アミン類)を使用する
- ・移動相にメタノールを使用する
- ・温度を高くする

■ カラム

- ・十分なエンドキャッピングのODSを使う
最も効果的で条件検討が容易

酸性移動相を使用する

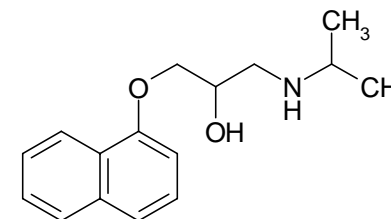


カラム: *L-column ODS* $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$

流量: 1 mL/min

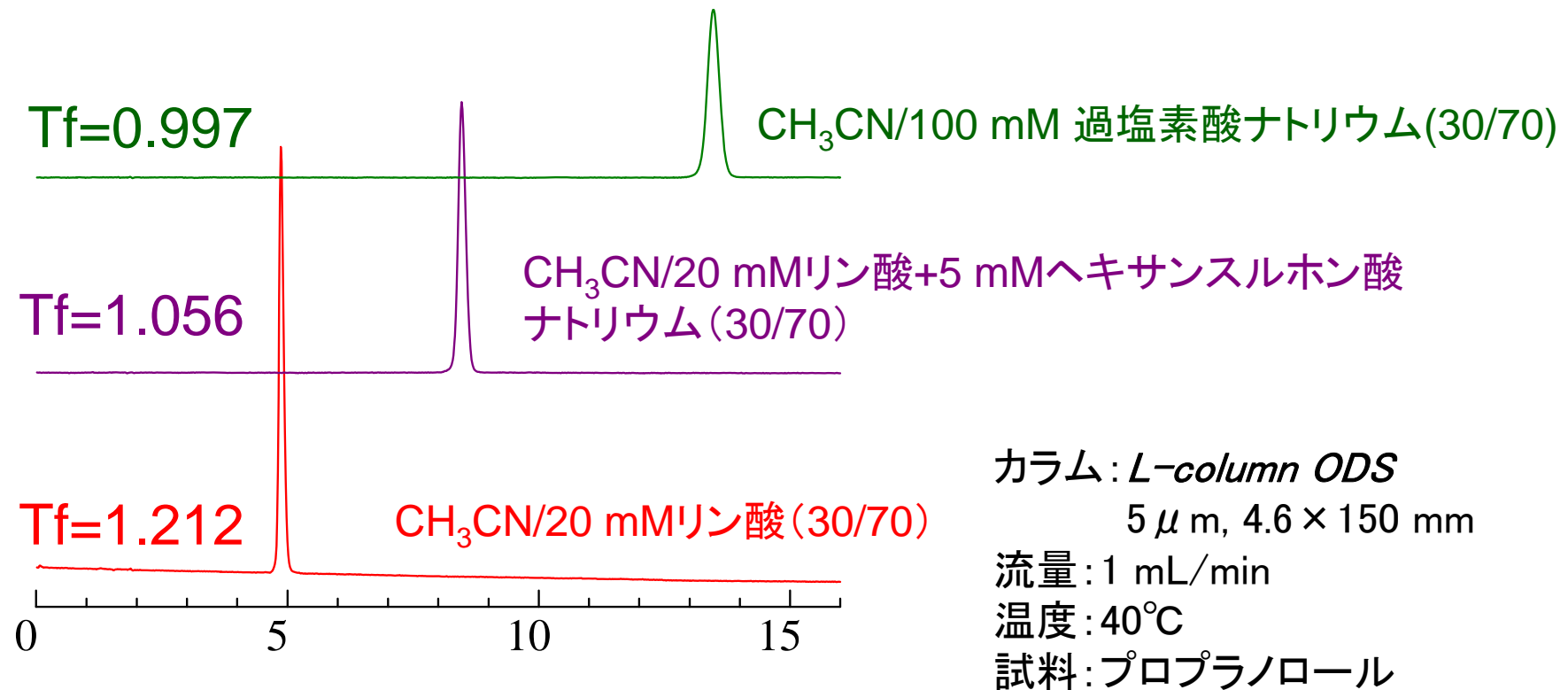
温度: 40°C

試料: プロプラノロール



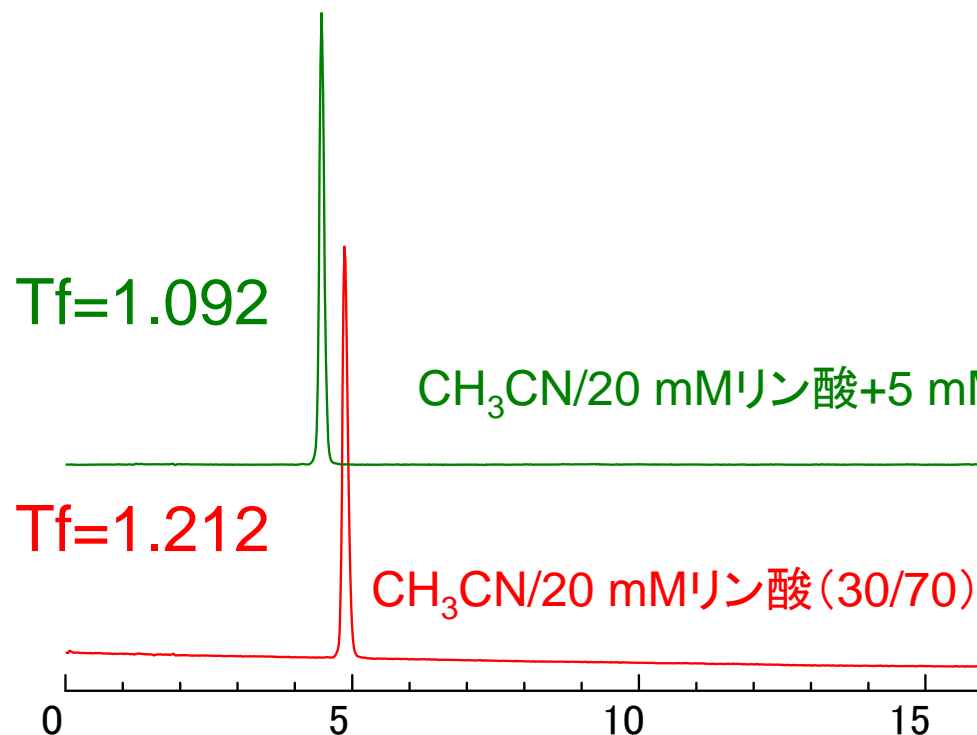
酸性にすると、残存シラノールの解離が抑えられ、塩基性物質が残存シラノールとイオン結合できない

イオン対試薬を使用する



塩基性化合物はイオン対試薬と結合するため、
残存シラノールと相互作用できない

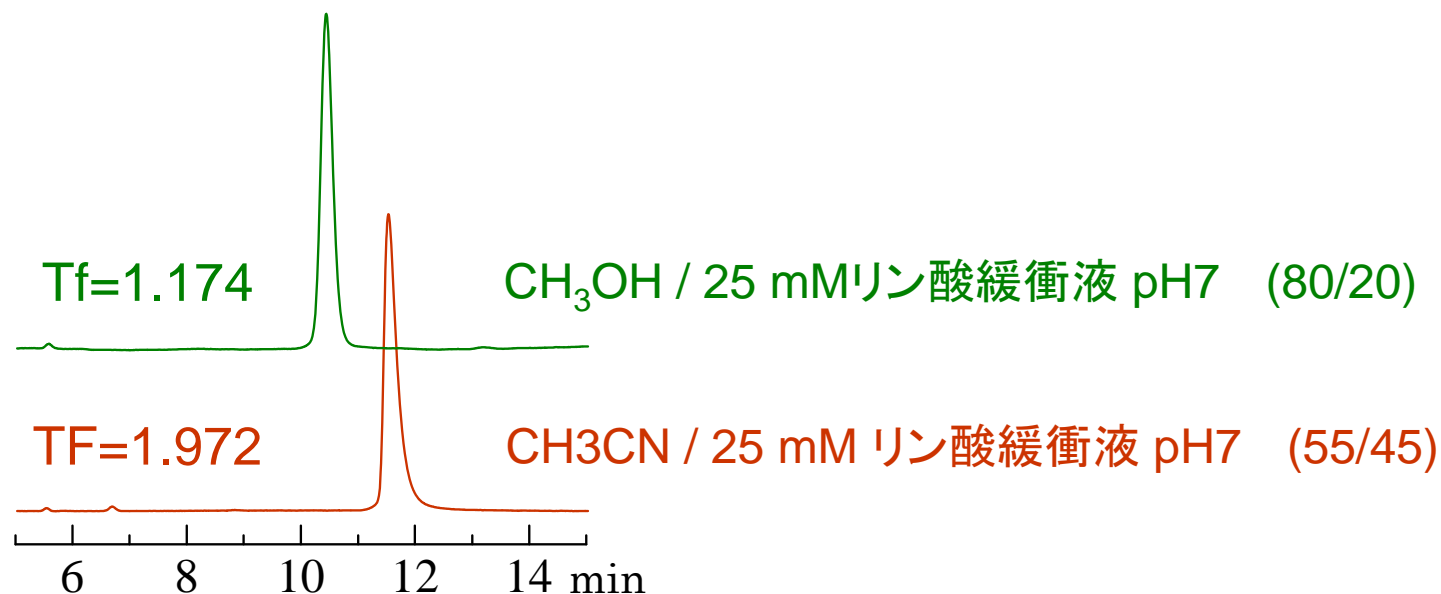
アンチテーリング剤(アミン類)を使用する



カラム: *L-column ODS*
5 μ m, 4.6 \times 150 mm
流量: 1 mL/min
温度: 40°C
試料: プロプラノロール

添加アミン類が残存シラノールと結合するため塩基性化合物は残存シラノールと相互作用できない

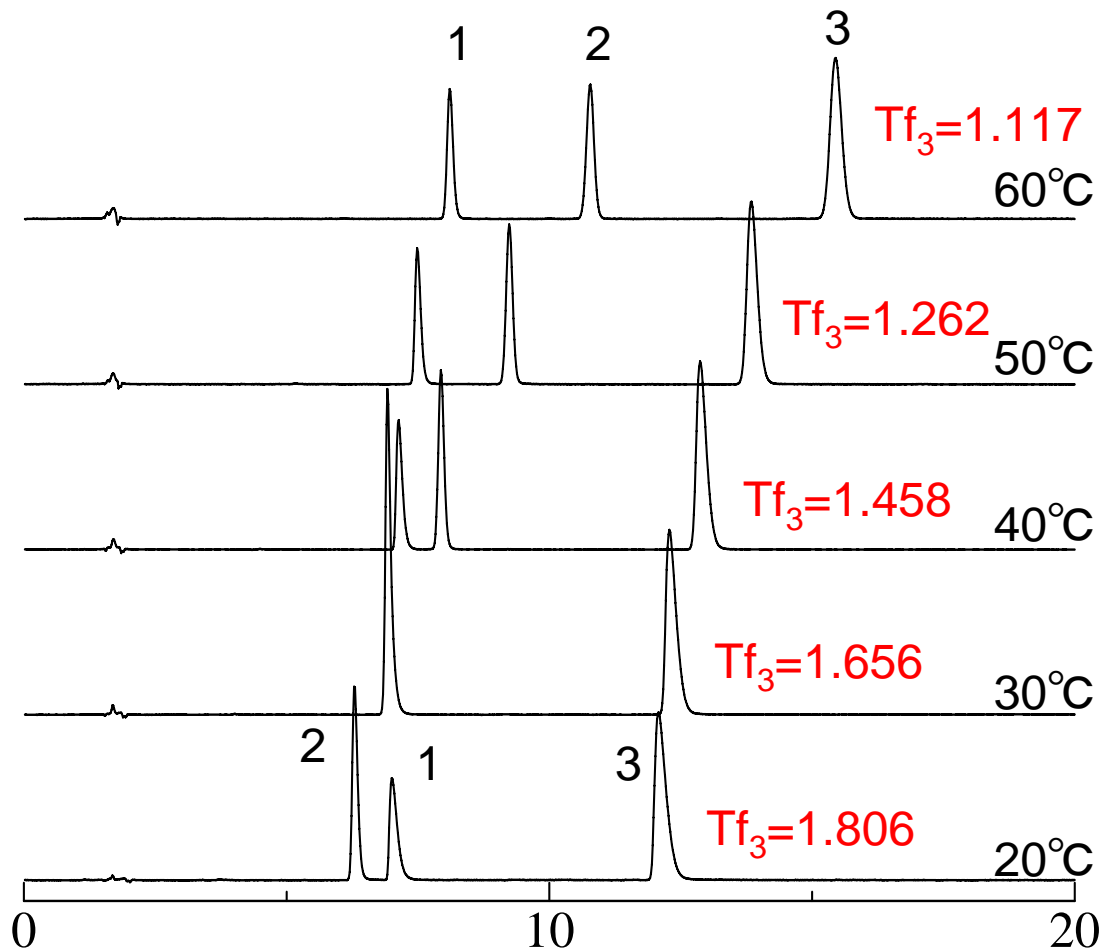
移動相にメタノールを使用する



カラム : *L-column ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm
流量: 1 mL/min; 温度: 40°C; 検出: UV 225 nm
試料: アミトリプチリン in CH₃CN; Inj.vol.1 mL

メタノールが残存シラノールと水素結合するため、塩基性化合物は残存シラノールと相互作用できない

温度を高くする



カラム: *L-column2 ODS*

3 μ m, 4.6 \times 150 mm

移動相: CH₃CN/25 mM リン酸

緩衝液 pH7 (35/65)

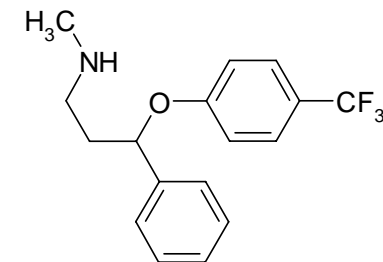
流量: 1 mL/min

試料: 1. パロキセチン

2. シタロプラム

3. フルオキセチン

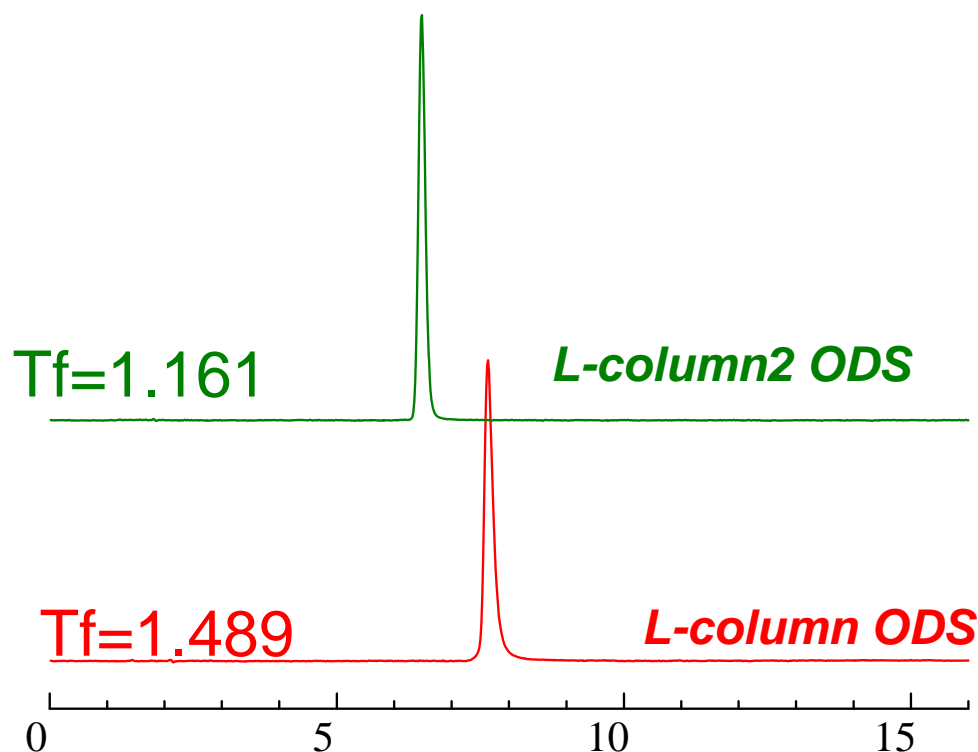
各 2 μ L



3. フルオキセチン

温度が高くなると塩基性化合物と残存シリノールの間の吸脱着速度が速くなり、テーリングが改善される

高度にエンドキャッピング されたカラムを使用する



カラム: $5\ \mu\text{m}$, $4.6 \times 150\ \text{mm}$
移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/25\ \text{mM}$ リン酸緩衝液
pH7 (30/70)
流量: $1\ \text{mL}/\text{min}$
温度: 40°C
試料: プロプラノロール

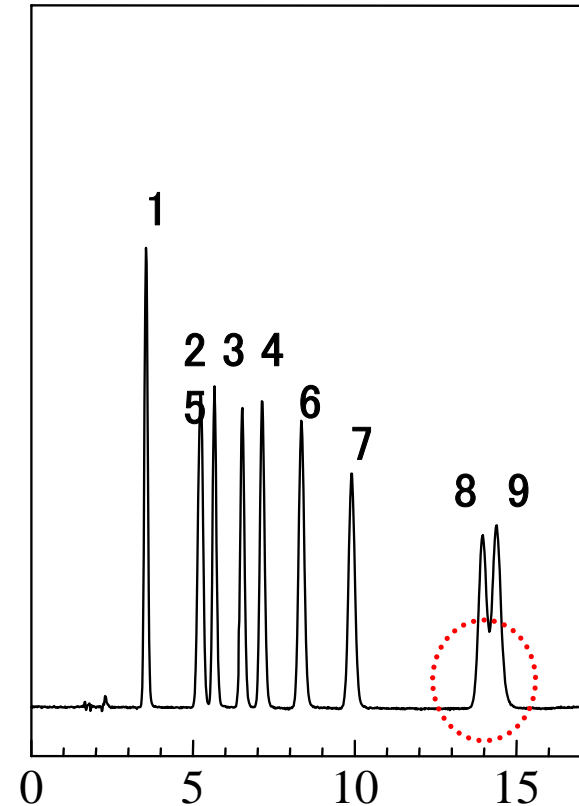
残存シラノールのほとんどないODSでは、
中性緩衝液でも良いピーク形状が得られる

分離の改善

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{1 + k} \quad \left[\begin{array}{l} R_s : \text{分離度}, N : \text{理論段数} \\ \alpha : \text{分離係数}, k : \text{保持係数} \end{array} \right]$$

- N を高くする
 - ・カラムを長くする、粒子径を小さくする
 - ・注入溶媒として貧溶媒を使用する
 - ・温度を高くする
- 分析条件の変更
 - ・pH、温度、有機溶媒の種類 $\rightarrow \alpha$ の増大
 - ・移動相の組成を変える $\rightarrow k$ の増大
- カラム種類の変更
 - ・高度にエンドキャッピングしたカラム $\rightarrow N$ の増大
 - ・充填剤修飾基 $\rightarrow \alpha$ の増大

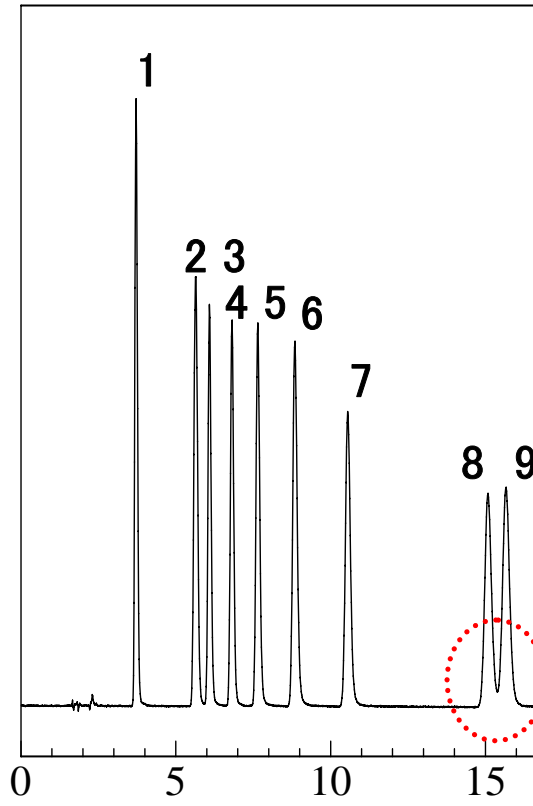
粒子径を小さくする



5 μm 4.6 × 150 mm

$N_7=11781$

$R_s(8,9) = 0.881$



3 μm 4.6 × 150 mm

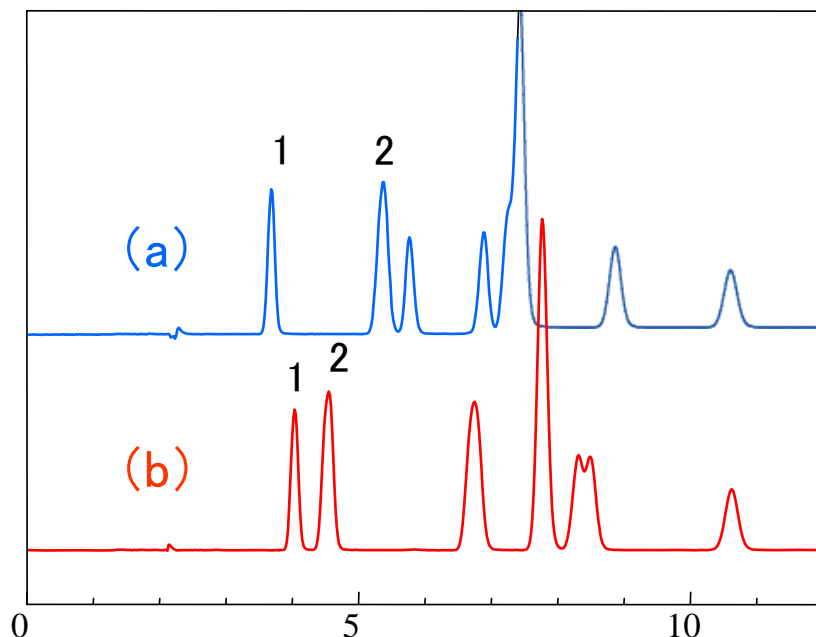
$N_7=20230$

$R_s(8,9) = 1.409$

- 1) サルファジアジン
- 2) サルフィソミジン
- 3) サルファチアゾール
- 4) サルファメキサゾール
- 5) サルファメラジン
- 6) サルファモノメキシシ
- 7) サルファドキシシ
- 8) サルファメキシピリダジン
- 9) サルファジミジン

粒子径を小さくすることで分離がよくなる

有機溶媒の種類の変更



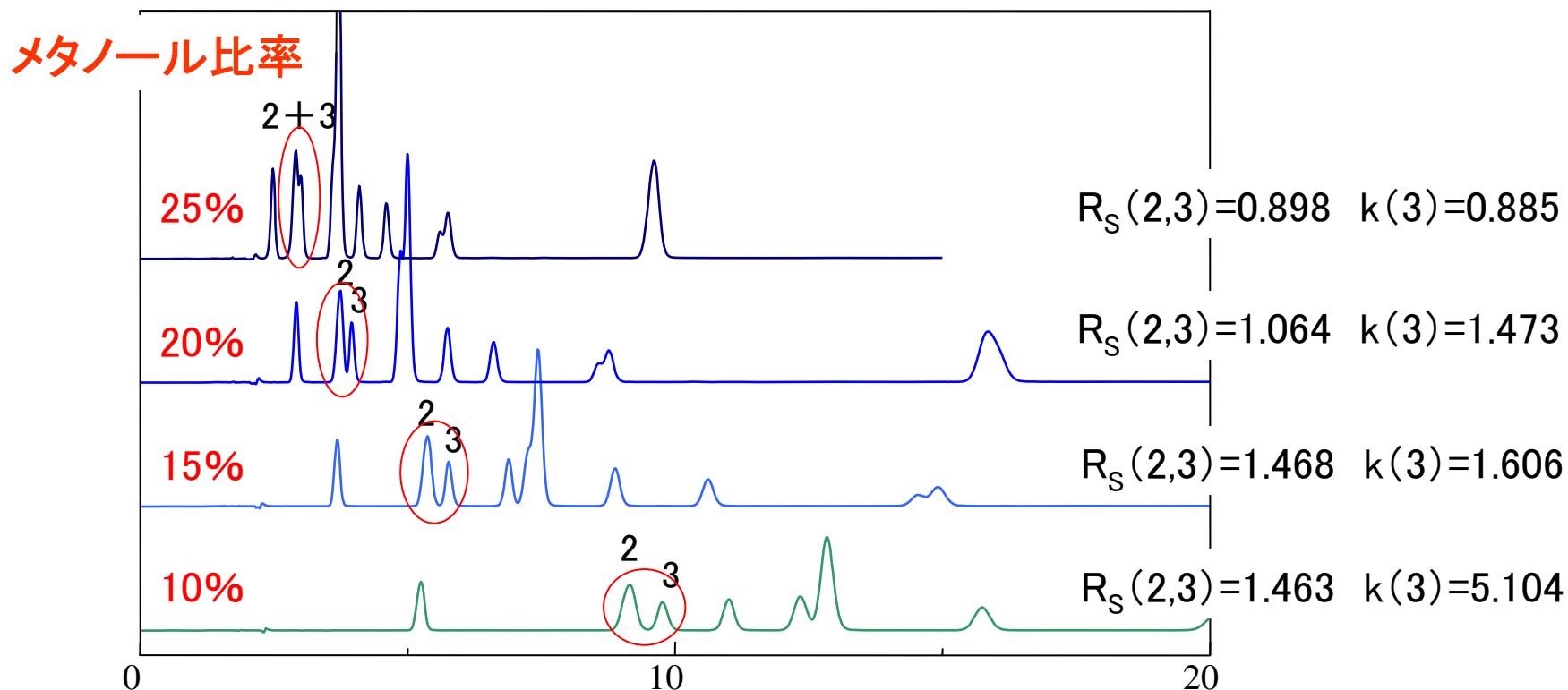
(a) メタノール/
 10mM 酢酸アンモニウム (15/85)
 $R_S(1,2)=6.576$ $\alpha(1,2)=1.80$

(b) アセトニトリル/
 10mM 酢酸アンモニウム (10/90)
 $R_S(1,2)=1.898$ $\alpha(1,2)=1.21$

カラム: *L-column ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm; 試料: サルファ剤

移動相の溶媒を変えることで分離が改善される場合がある

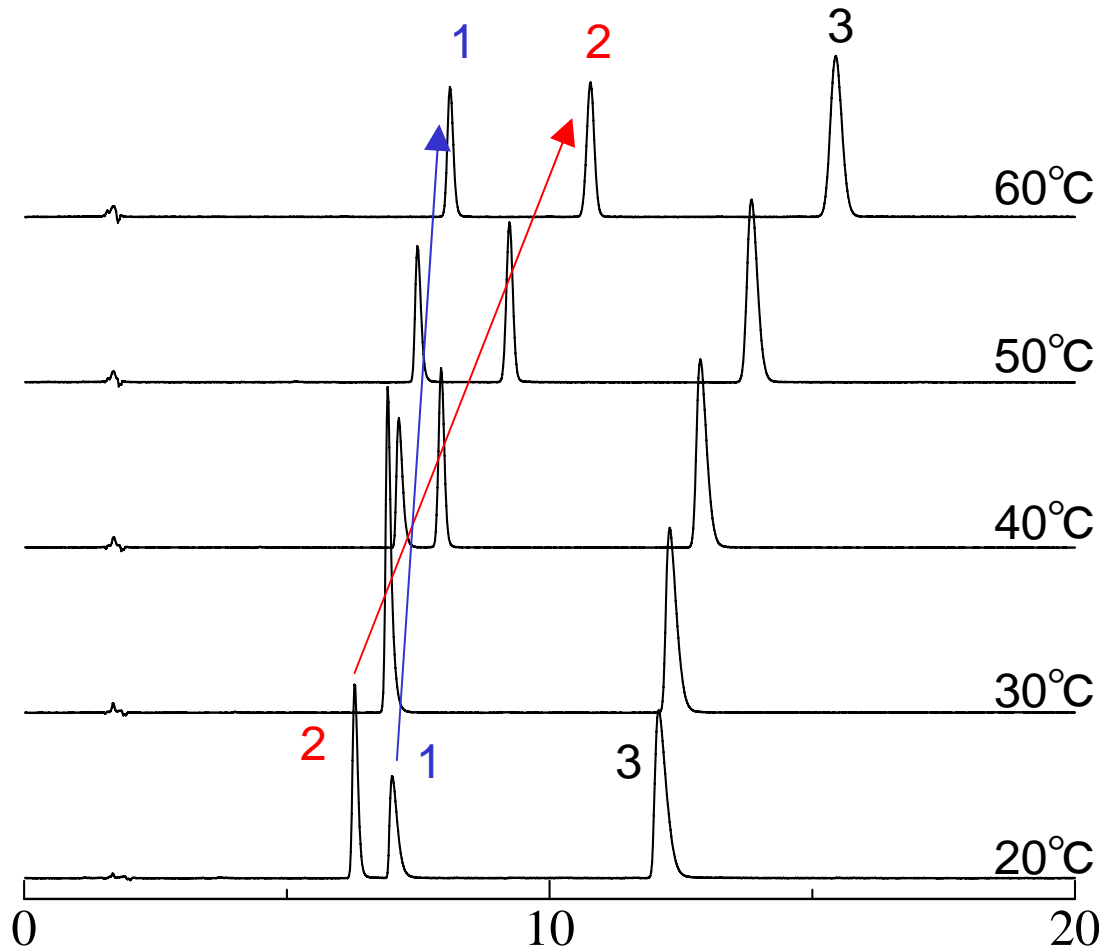
移動相の組成を変えて溶出を遅くする



カラム: *L-column ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm
 移動相: メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム

保持係数が2.5 (150 mmのカラムで約5分) 以下のときは遅く溶出して分離させる

温度を高くする



カラム: *L-column2 ODS*

3 μ m, 4.6 \times 150 mm

移動相: CH₃CN/25 mM

リン酸緩衝液 pH7 (35/65)

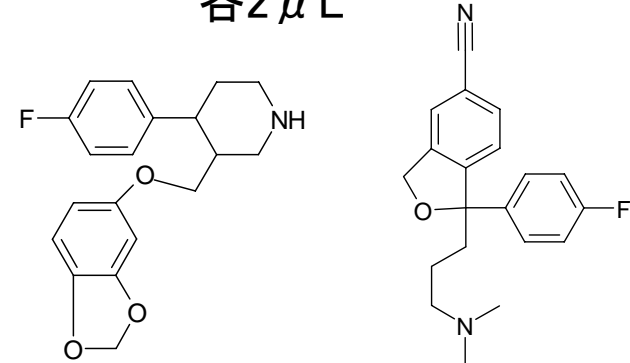
流量: 1 mL/min

試料: 1. パロキセチン

2. シタロプラム

3. フルオキセチン

各 2 μ L

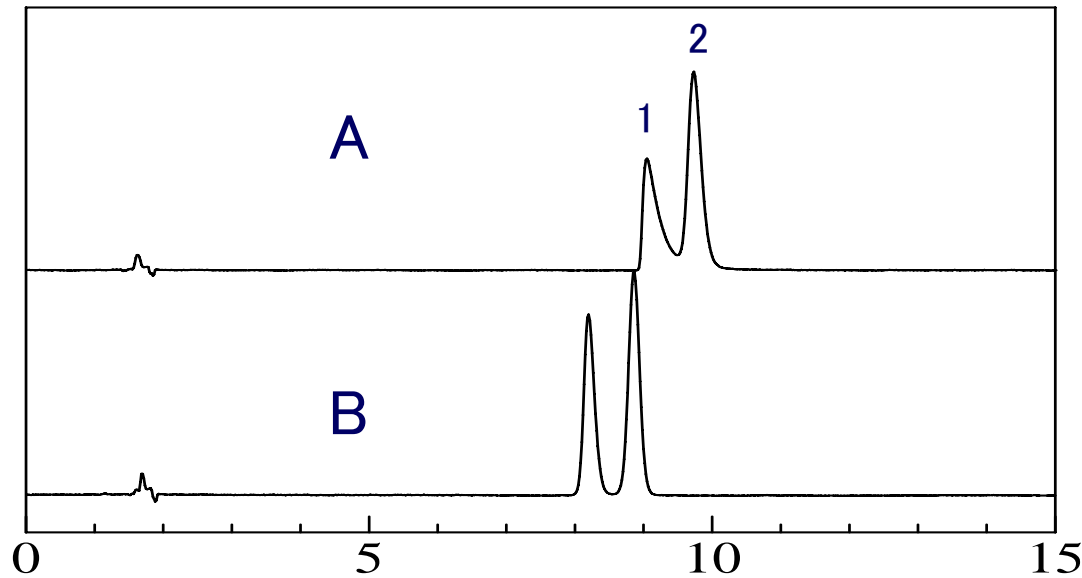


1. パロキセチン

2. シタロプラム

物質によって保持の温度依存性が異なる
(一般的には、温度が高くなると保持は早くなる)

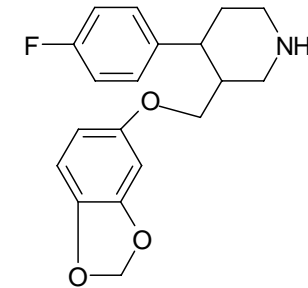
高度にエンドキャッピングしたカラムの使用



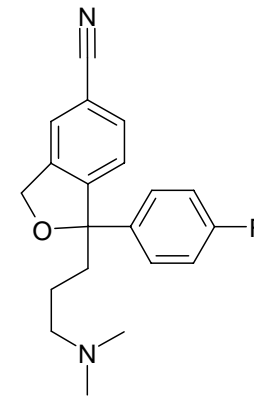
カラム : A: 他社カラム 5 μ m, 4.6 \times 150 mm

B: *L-column2 ODS* 5 μ m, 4.6 \times 150 mm

移動相 : CH₃CN/25 mM リン酸緩衝液 pH7.0 (33/67)



1. パロキセチン

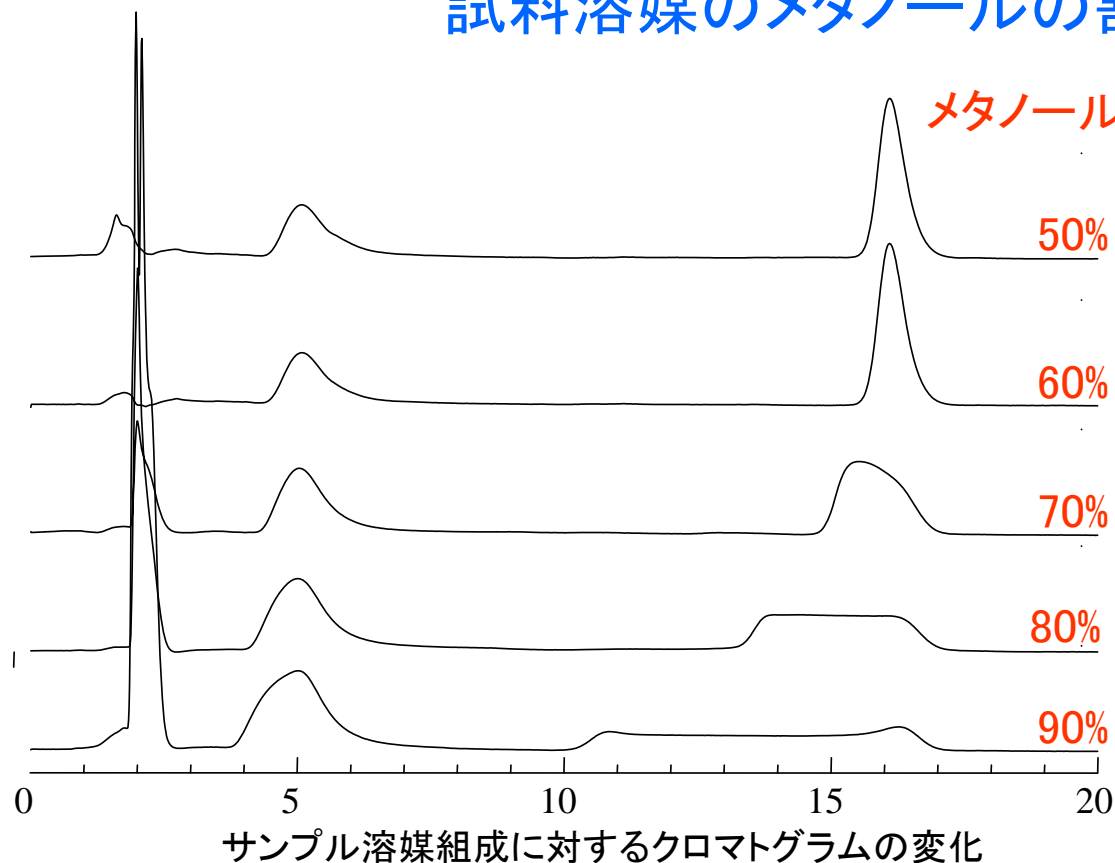


2. シタロプラム

エンドキャッピングが十分なカラムへ
変更することで分離が改善される

試料溶液の溶媒比率とピーク形状の関係

試料溶媒のメタノールの割合を変化



カラム : *L-column ODS*

5 μ m, 2.1x150 mm

試料 : 17 β -エストラジオール

(濃度: 1 μ g/mL)

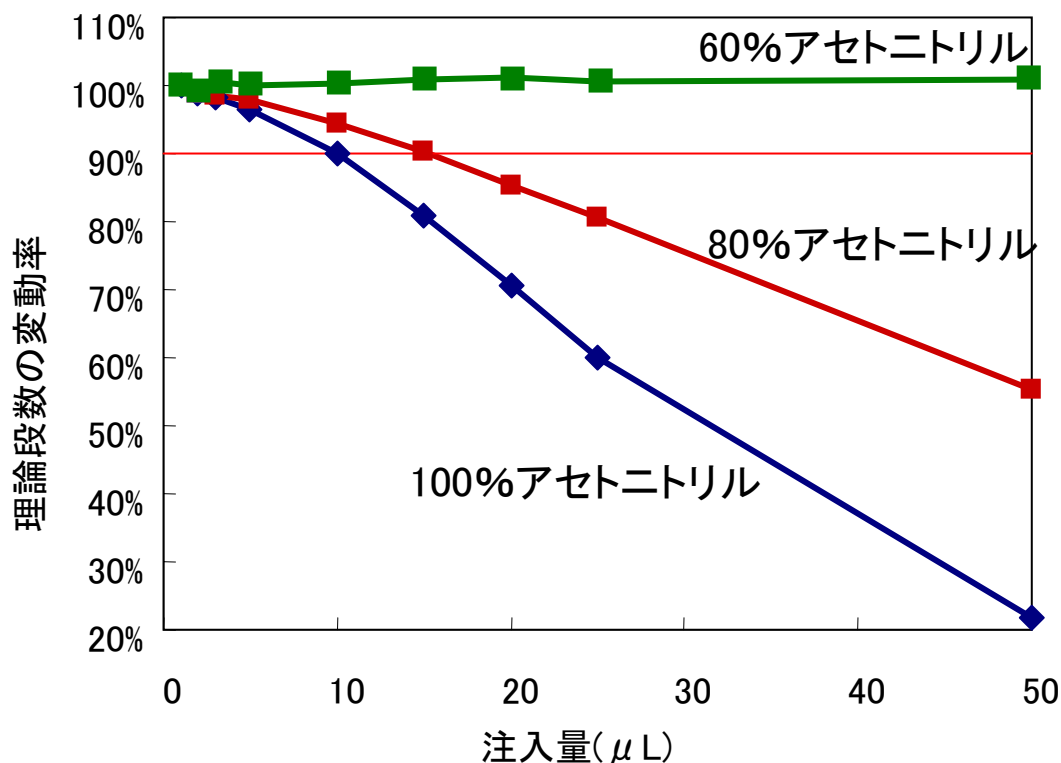
移動相 : メタノール/水 (55/45)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 100 μ L

有機溶媒比率が高いとピーク形状が悪くなる

試料溶媒の組成と注入量 による理論段数の変化



分析条件

カラム: *L-column ODS*

5 μm, 4.6 × 150 mm

移動相: アセトニトリル/水 (60/40)

試料: 1 mg/mL ナフタレン

移動相と同じ組成だと理論段数が変化しない

試料溶液中の有機溶媒が多い場合 ピーク形状が悪くなる理由

有機溶媒100%試料溶媒



水の比率の多い試料溶媒

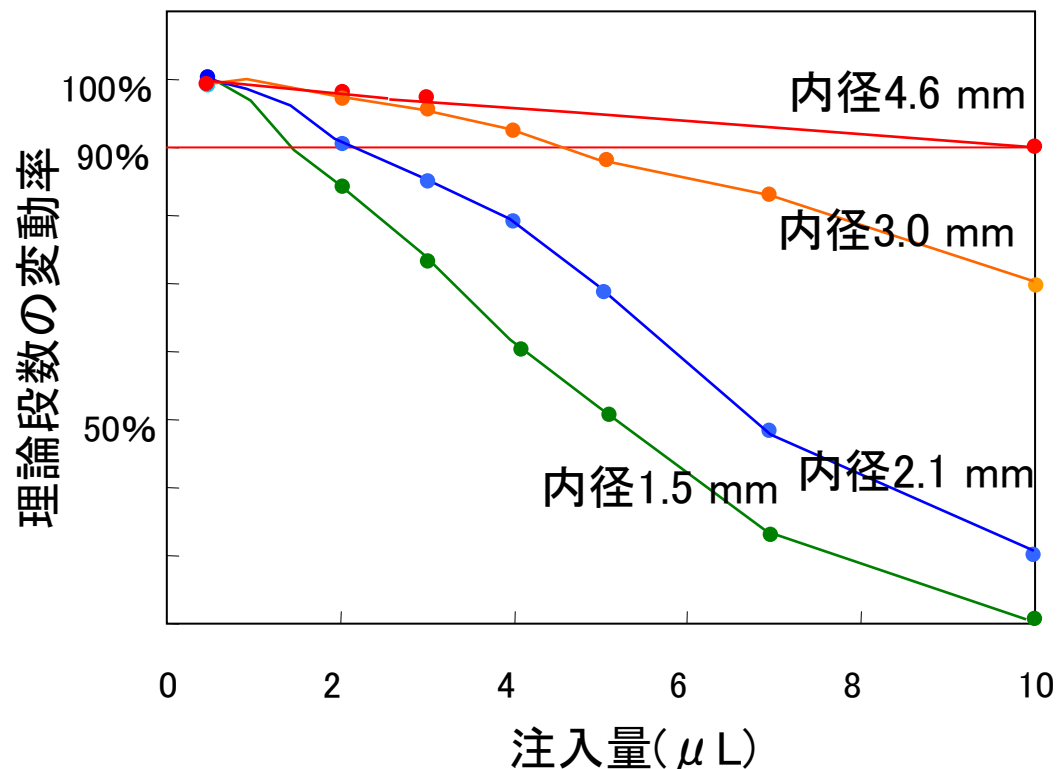


バンド幅が最初から広い!

カラム入口部で一旦濃縮される

- ・試料溶媒の基本は移動相と同じ組成
- ・注入量は、精度や感度に問題の無い範囲で少なく設定する

カラム内径と注入量



カラム: *L-column ODS*
 5 μm, 150 mmL.
 移動相: アセトニトリル/水 (60/40)
 試料: ナフタレン (1 mg/mL,
 アセトニトリル溶液)

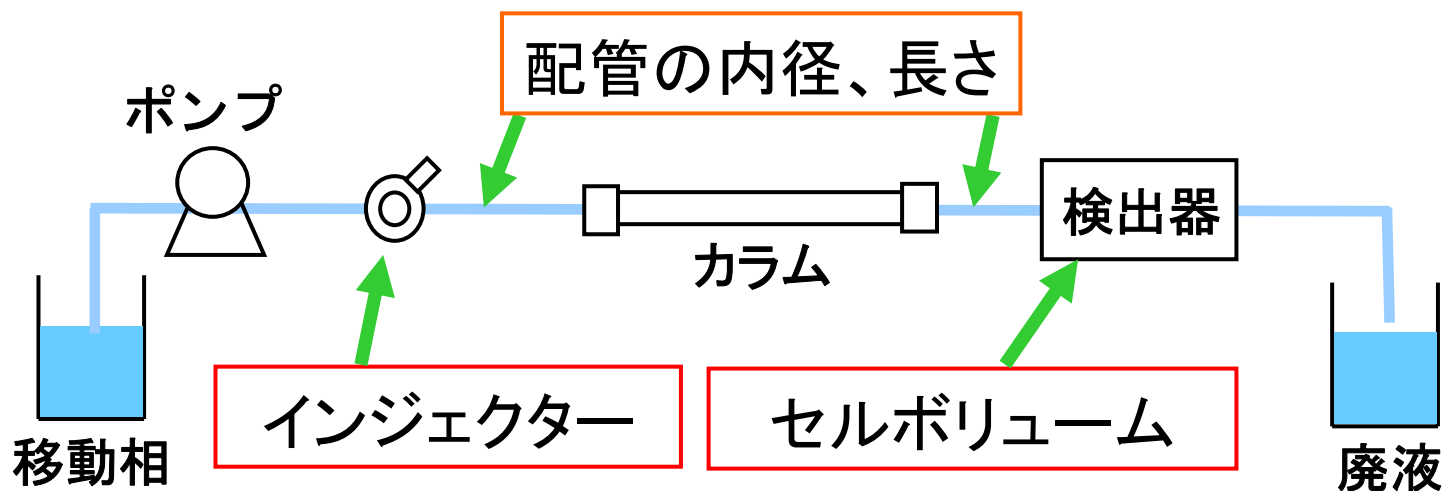
内径が小さいほど注入量によって理論段数へ影響

内径3 mmカラムの上手な使い方

変更項目	理論段数	
	旧型式HPLC	新型式HPLC
4.6 × 150 mm	12733 (100 %)	11888 (100 %)
カラムを3.0 × 150 mmへ変更	9848 (77 %)	10690 (89 %)
配管を0.13 mmへ変更	9981 (78 %)	11266 (94 %)
セミマイクロ用セルに変更	11680 (91 %)	11467 (96 %)

内径3 mmカラムはHPLCの型式
及びセル容量の影響を受け易い

① セミマイクロカラムの上手な使い方



システムの変更	理論段数
カラムは4.6 × 150 mm	13000 (100 %)
カラムを2.1 × 150 mmに変更	8936 (69 %)
セミマイクロ用のセルに変更	11537 (89 %)
セミマイクロ用のインジェクターに変更	11621 (89 %)

セミマイクロカラムはデッドボリュウムの影響を受け易い

② セミマイクロカラムの上手な使い方

配管の内径と長さの理論段数への影響

2.1 × 150 mmのカラムでのナフタレンの理論段数

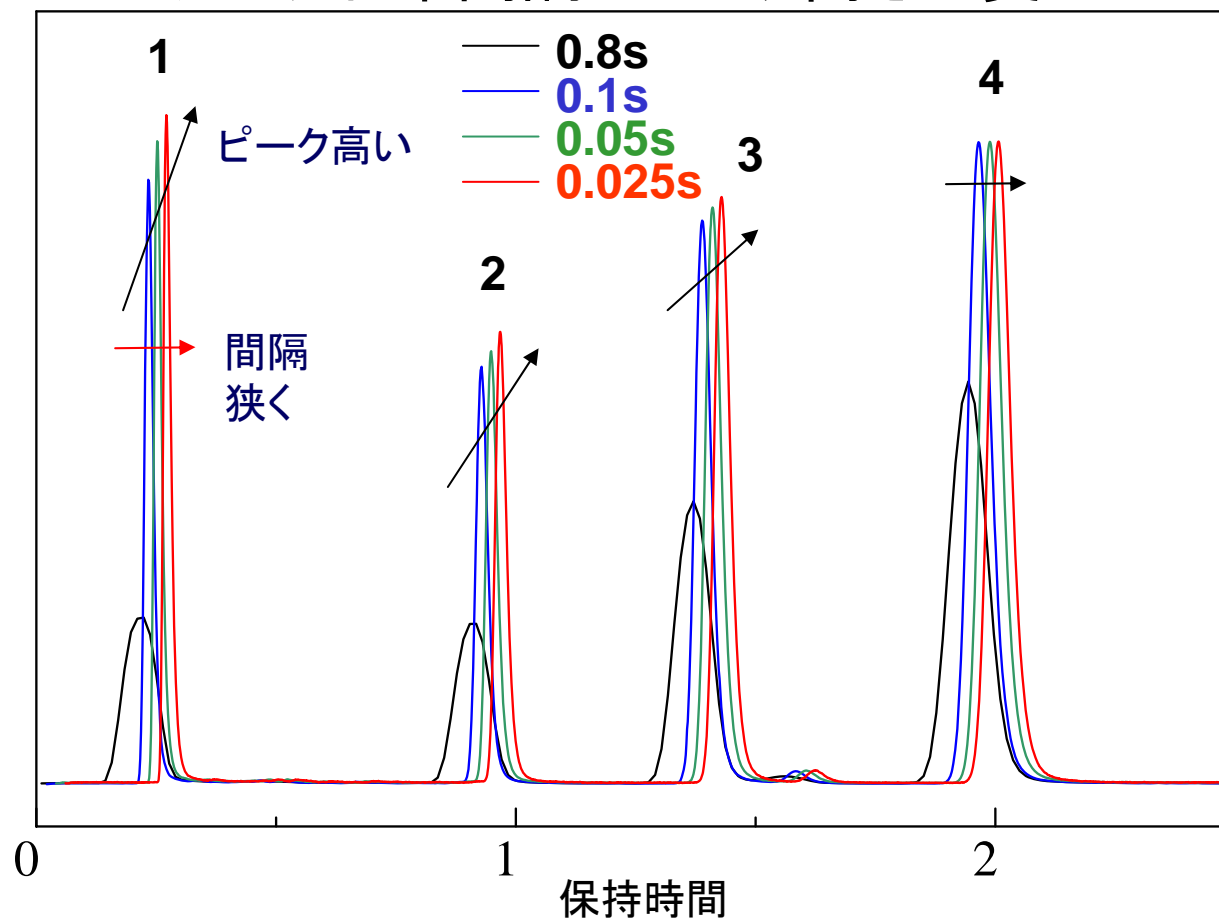
内径 (mm)	長さ(mm)		
	250	550	1050
0.13	12548 (108 %)	12464 (107 %)	12576 (108 %)
0.25	11621*1 (100 %)	11495 (99 %)	10356 (89 %)

* 1 : 内径0.25 mm長さ250 mmの配管を使用時の理論段数を基準(%)

- ・配管の内径が0.25 mmのとき、理論段数が低い
- ・配管の内径が0.13 mmのとき、長さは理論段数に影響しない

データ収集間隔

データ収集間隔とピーク高さの変化



LC: Agilent 1200SL
カラム: *L-column2 ODS* 2 μ m
2.1 \times 50 mm
移動相: CH₃CN/H₂O (50/50)
流量: 0.6 mL/min
温度: 25°C
検出: UV254 nm
注入量: 0.5 μ L
試料: 1.ウラシル、2.ベンゼン
3.トルエン、4.ナフタレン

保持時間の短いピークはデータ収集間隔を狭くする

データ収集間隔

データ収集間隔の選択の目安

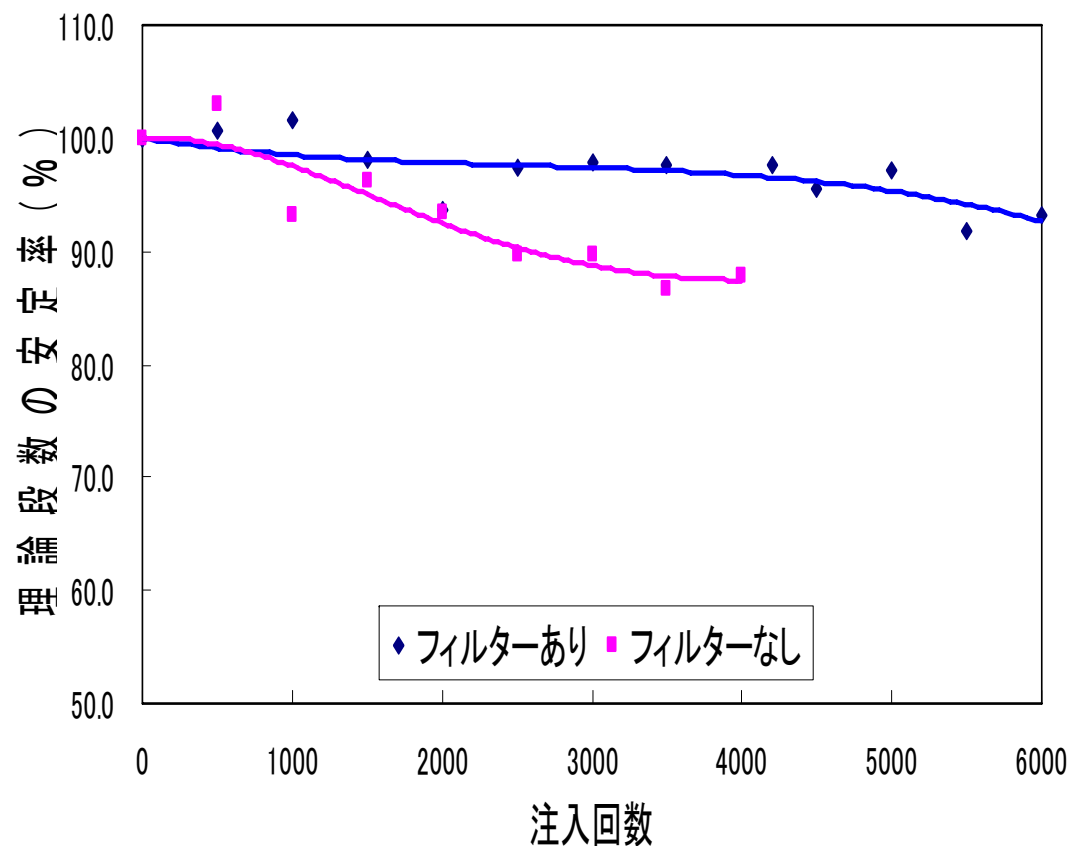
2.1 × 50 mmの場合

保持時間 (min)		データ収集間隔 (sec)				t_0 (min)
		0.5	1	2	3	
流量 (mL/min)	0.3	0.05	0.1	0.1	0.2	0.416
	0.6	0.025	0.05	0.1	—	0.217
	0.9	0.025	0.025	0.05	—	0.149

使用装置 : Agilent 1200SL

流量、保持時間により最適なデータ収集間隔は異なるので適切な値を選択する。ただし、増やしすぎるとノイズが大きくなる。

耐久性に及ぼすフィルターの効果



カラム: *L-column2 ODS* 2 μ m
2.1 \times 50 mm
移動相: CH₃CN/H₂O (60/40)
流量: 0.6 mL/min, 温度: 25°C
検出: UV254 nm, 注入量: 0.5 μ L
試料: ナフタレン

- フィルター使用で、耐久性が向上する
- 移動相や試料はろ過する
- 移動相や試料の時間を経たものは再調製する

内容

<基礎>

ODSの構造と特性

移動相

緩衝液

<分析方法のノウハウ>

解離性化合物

分離の改善

試料の注入テクニック

上手なカラムのダウンサイジング

2 μ mODSカラムの使用

<トラブルシューティング>

保持時間が変化した

ピーク面積が変化した

水系100%に近い移動相

SNを大きくする

カラムの洗浄と保管

保持時間が变化した

対処方法

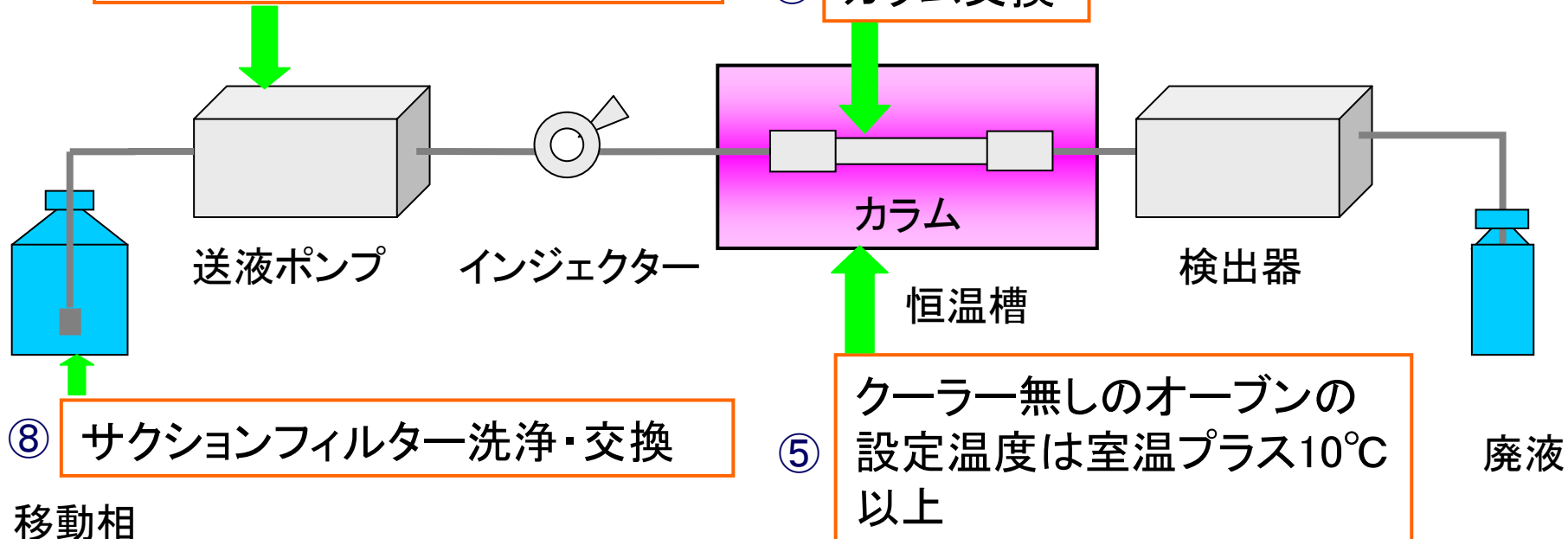
① 液漏れ確認: 接続タイプのチェック、増し締め、シール交換

② 設定条件の確認: 流量、移動相組成、温度

③ 圧力の変動:
エア抜き、チェックバルブ洗浄

④ 移動相が置き換わるまで待つ

⑦ カラム交換



⑧ サクションフィルター洗浄・交換

⑤ クーラー無しのオーブンの
設定温度は室温プラス10°C
以上

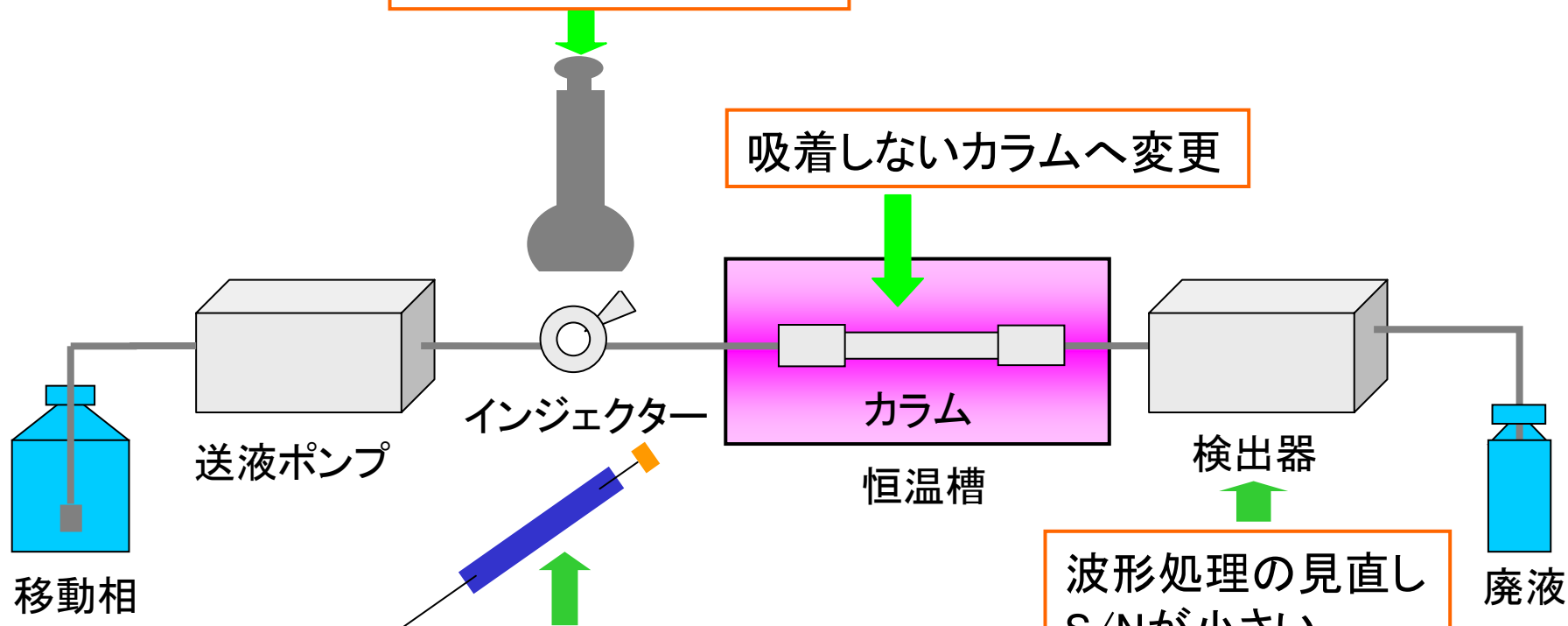
⑥ 再調製、pHの確認、移動相の脱気

ピーク面積が変化した

対処方法

サンプルの保管条件
十分に攪拌する
試料溶媒の変更

吸着しないカラムへ変更

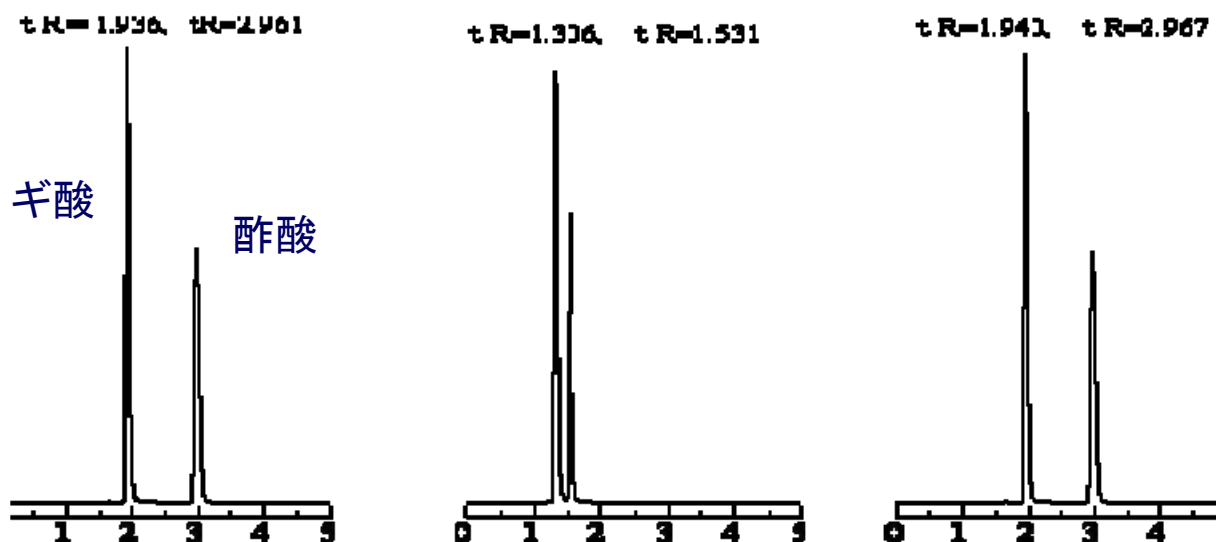


適切な容量のシリンジ
シリンジ内の気泡
洗浄回数の変更、洗浄液の変更

波形処理の見直し
S/Nが小さい

水系100%に近い移動相の場合

水系100%に近い移動相でカラム圧を下げると、保持時間が短くなるトラブルが発生する

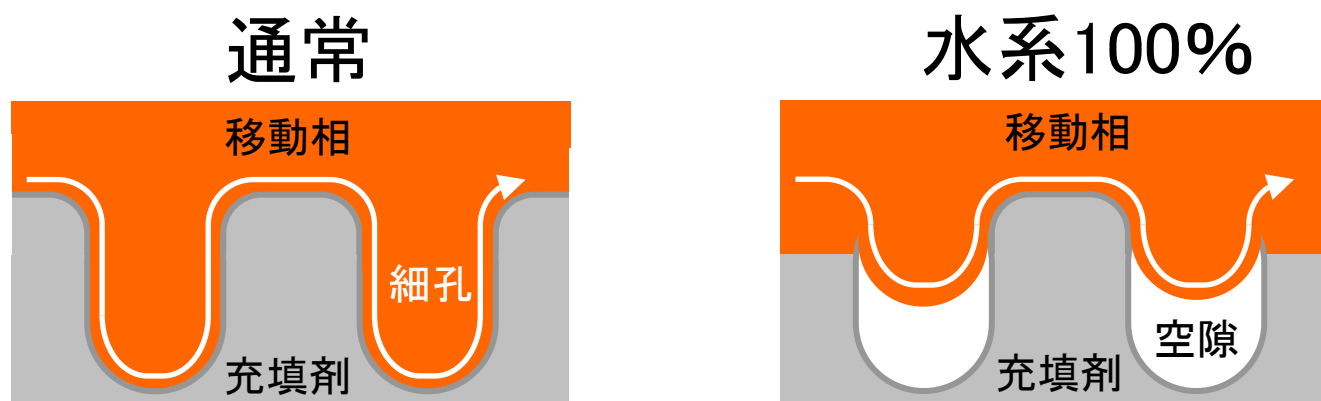


オリジナル → 保持時間減少 → 保持時間回復

L-column2 ODS 4.6 × 150 mm,
移動相: アセトニトリル/20mMリン酸 (5/95)

水系100%に近い移動相の場合

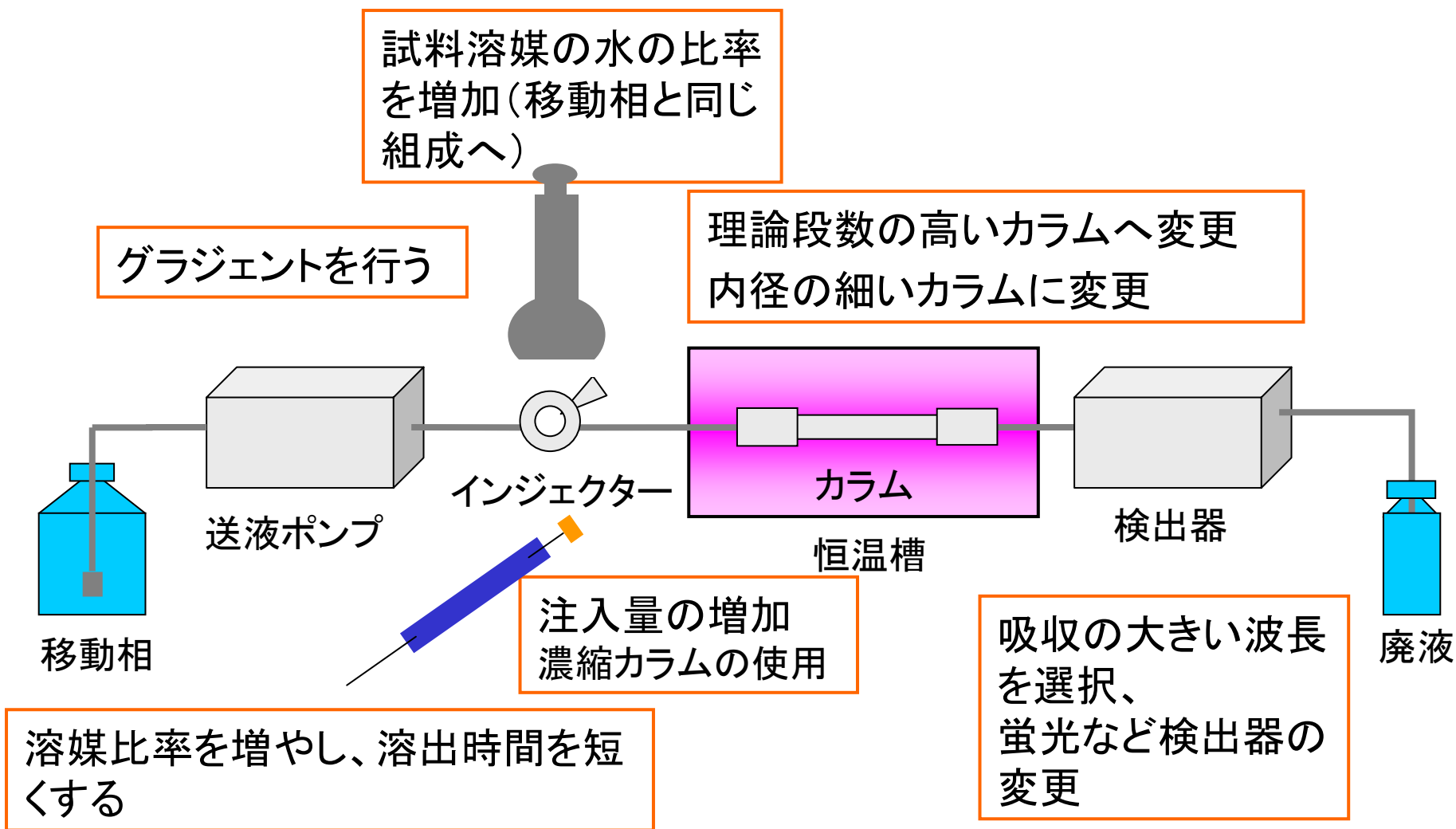
細孔から移動相が抜け出て表面積が
小さくなるために保持時間が短くなる



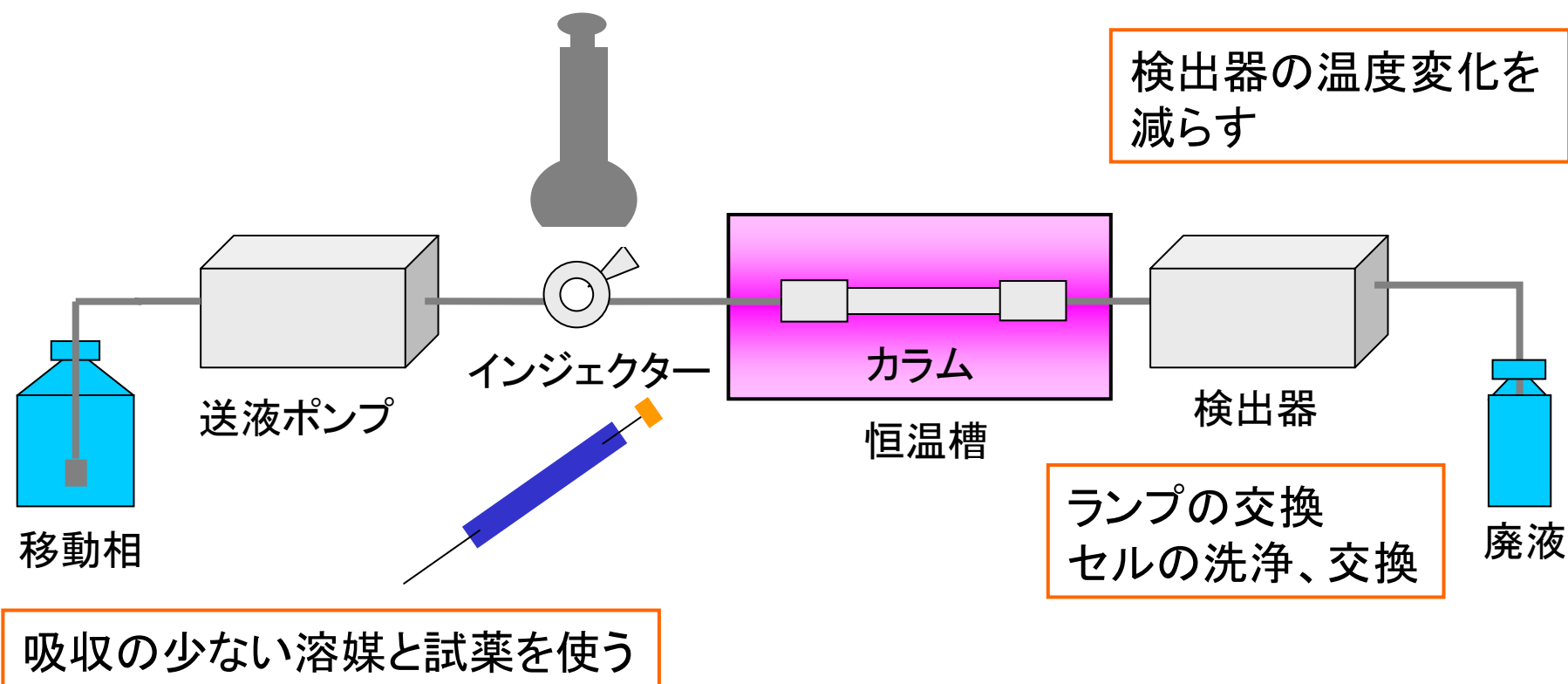
有機溶媒比率の高い移動相で一旦置換し、
ポンプを止めずに分析する

溶媒/水(50/50)以上の移動相での置換が必要
である(置換時間は10分で十分)

①SNを大きくする(シグナルを大きく)



②SNを大きくする(ノイズを減らす)



カラムの詰まりを防ぐには

- 試料、移動相（緩衝液）はあらかじめろ過する
（試料は移動相に溶かしてから、ろ過する）
- 緩衝液を含んだ移動相を流す前に一旦塩を抜いた移動相を流す
- 緩衝液を含んだ移動相を使った後、長期間使わないときはカラムを洗浄する
- 前処理の再検討（試料の夾雑物を減らす）
- 分析条件の再検討（注入量、塩濃度）
- システムのメンテナンス（プランジャーシールの交換）
- ガードカラムの使用
- 日常の圧力をチェック（早期発見）

ODSカラムの洗浄方法

実施例: 使用した移動相 メタノール/リン酸緩衝液 (20/80)

カラム *L-column ODS* 4.6 × 150 mm

1. 塩等を取り除いた移動相 : メタノール/水 20/80
2. 有機溶媒の濃度を上げた移動相 : メタノール/水 60/40
3. 有機溶媒100%で洗浄 : メタノール 100%

〔カラム容量の10倍程度の量で洗浄する
(1 mLなら約30分間)〕

脂溶性の夾雑物を多く含む試料の場合、THF(テトラヒドロフラン)
次にアセトニトリルで更に洗浄する。

ただし、無駄な洗浄はカラムの劣化を促進させる

ご案内

■ デモコラム

L-column, *L-column2* および *G-column* を対象に、購入前に最大2ヶ月間、分析条件や分離を試すことができます。

■ ホームページのご案内

アプリケーションや技術資料など、最新の情報を掲載しています。

<http://www.cerij.or.jp>

■ アンケートにご協力お願いします