

これでレベルアップ°

★逆相HPLC分析における メソッド開発に役立つノウハウと トラブルシューティングの解説★

一般財団法人 化学物質評価研究機構
クロマト技術部

逆相HPLC分析におけるメソッド開発

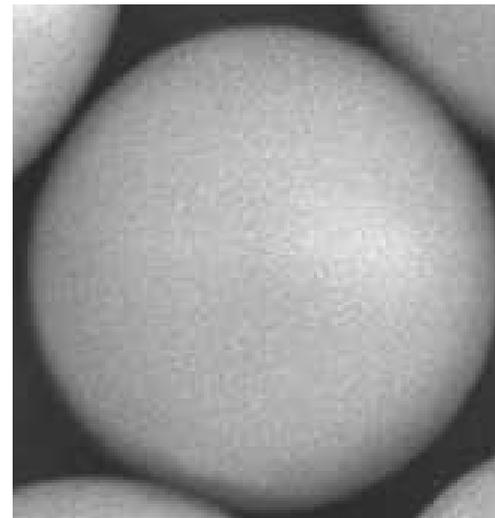
1. 逆相HPLC分析におけるメソッド開発

1.1 カラム

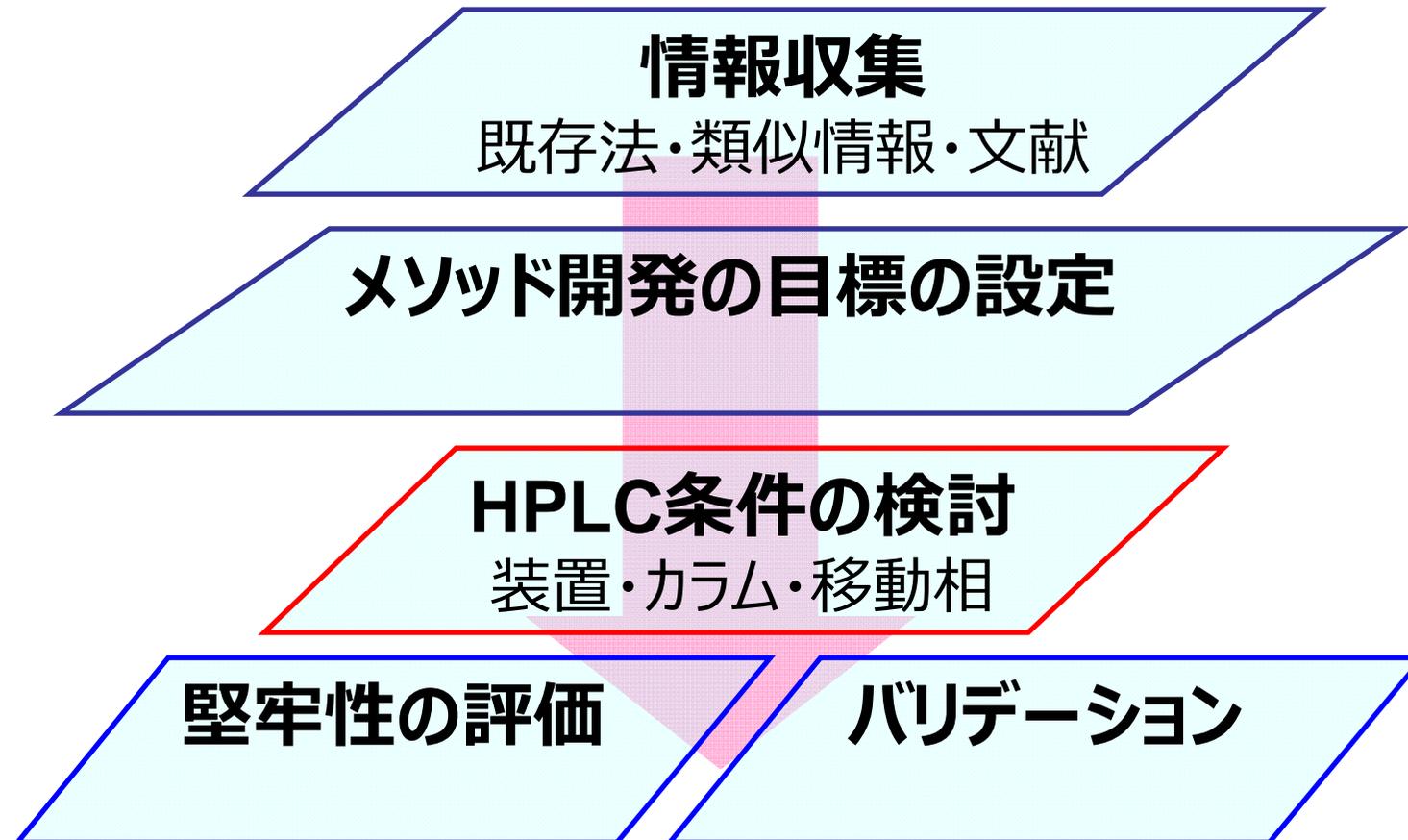
1.2 移動相

1.3 試料

2. トラブルシューティング



メソッド開発のフロー例



HPLC条件の検討項目

カラム
ブランド
修飾基
サイズ
粒子径

移動相
有機溶媒
緩衝液
pH

試料
注入量
試料溶媒

検討項目も多く、複雑
知識・経験・ノウハウが必要
どのように条件を決める？

HPLC条件の設定

化合物の性質・構造の利用 → 初期条件を設定する

解離性 pKa

- ▶ 酸性物質 → 酸性移動相
- ▶ 塩基性物質 → 中性、弱アルカリ性移動相

疎水性 log Pow

- ▶ 有機溶媒比率

分子量

- ▶ 5000以上 → 細孔径30 nmの充填剤

溶解性

- ▶ 有機溶媒

初期条件の設定例 (PDA、UV)

カラム: ODS 粒子径3 μm or 5 μm

カラムサイズ: 4.6 \times 150 mm

移動相: アセトニトリル+緩衝液

酸性物質: 10~50 mMリン酸

塩基性物質: 10~50 mMリン酸緩衝液pH7

流速: 1 mL/min

試料: 1 mg/mL程度の試料を1 μL 注入

検出: PDAで210~400 nm

時間短縮のため

粒子径 2 μm 、3 μm
2.1 \times 50 mm、4.6 \times 50 mm

メソッド開発のポイント → ODSカラム、移動相、試料

1.1 カラム

ODSカラムの選定

ブランド

- ▶ 分離(ODSの導入量)、ピーク形状(エンドキャッピング)、耐久性

サイズ

- ▶ 分離(長さ)、分析時間(長さ)、溶媒使用量(長さ、内径)

粒子径

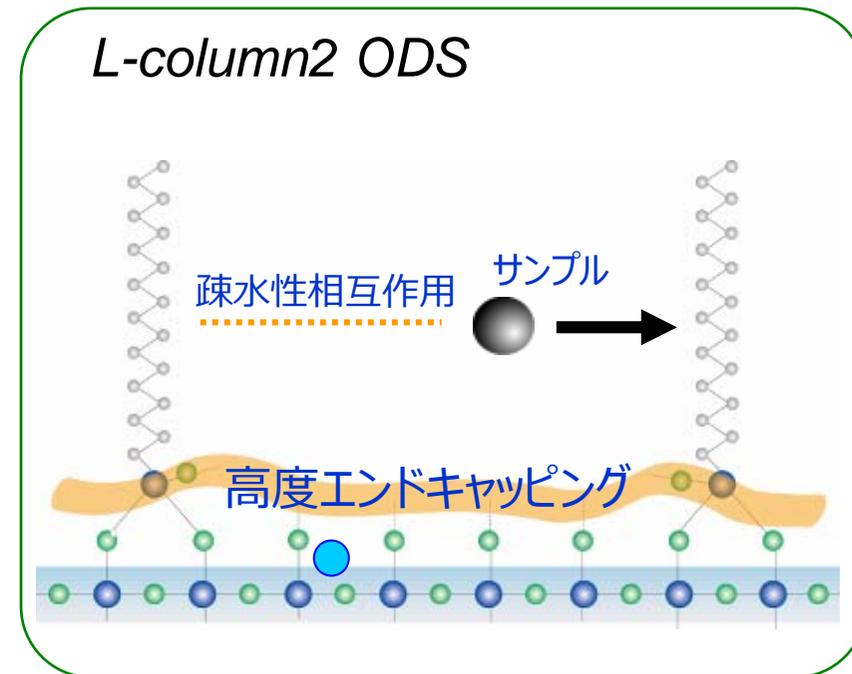
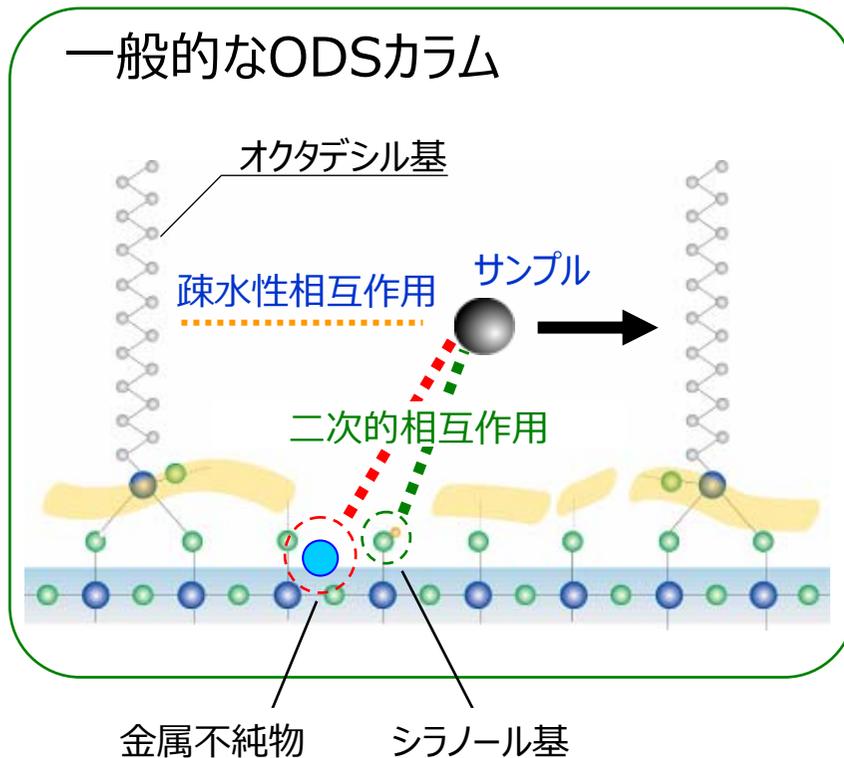
- ▶ 分離



分離は粒子径や長さでカバーできるが、ピーク形状はエンドキャッピング
でのみ改善できる → より高性能なカラムを使用する

ODSのエンドキャッピング

ODSカラムの表面構造

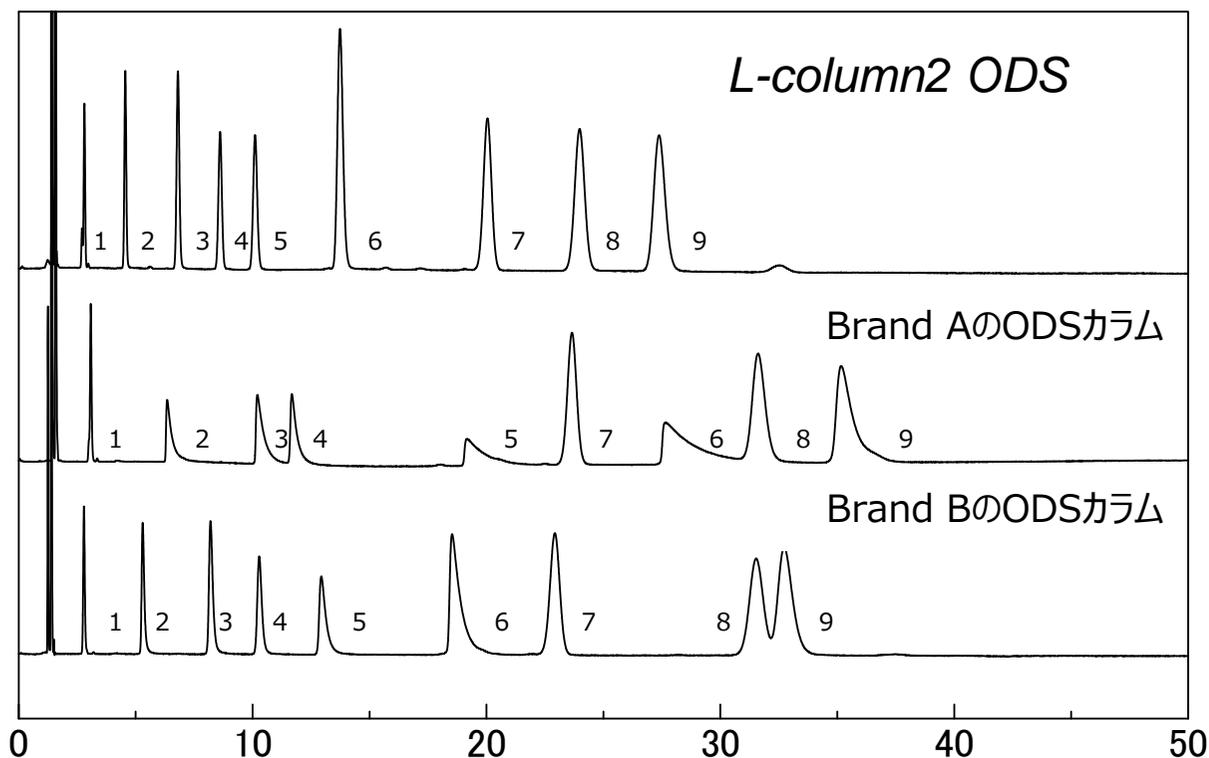


エンドキャッピングが不十分だと

→ 保持の変動、ピーク形状の悪化、耐久性の低下

カラムブランドの違い

塩基性物質(抗アレルギー剤)の一斉分析



【 Analytical conditions 】
Column: C18(ODS), 5 μ m
Column size: 4.6 \times 150 mm
Mobile phase: CH₃CN
/25 mM Phosphate buffer pH 7
(60/40)

Flow rate: 1 mL/min

Temp.: 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV 220 nm

Sample:

1. フェキソフェナジン
2. クロルフェニラミン
3. トリプロリジン
4. ジフェンヒドラミン
5. ジフェニルピラリン
6. ホモクロルシクリジン
7. ヒドロキシジン
8. アステミゾール
9. プロメタジン

カラムの違いによってピーク形状が大きく異なる

→ より高性能なカラムはメソッド開発時間の短縮になる

充填剤の粒子径

充填剤の粒子径を小さくすると

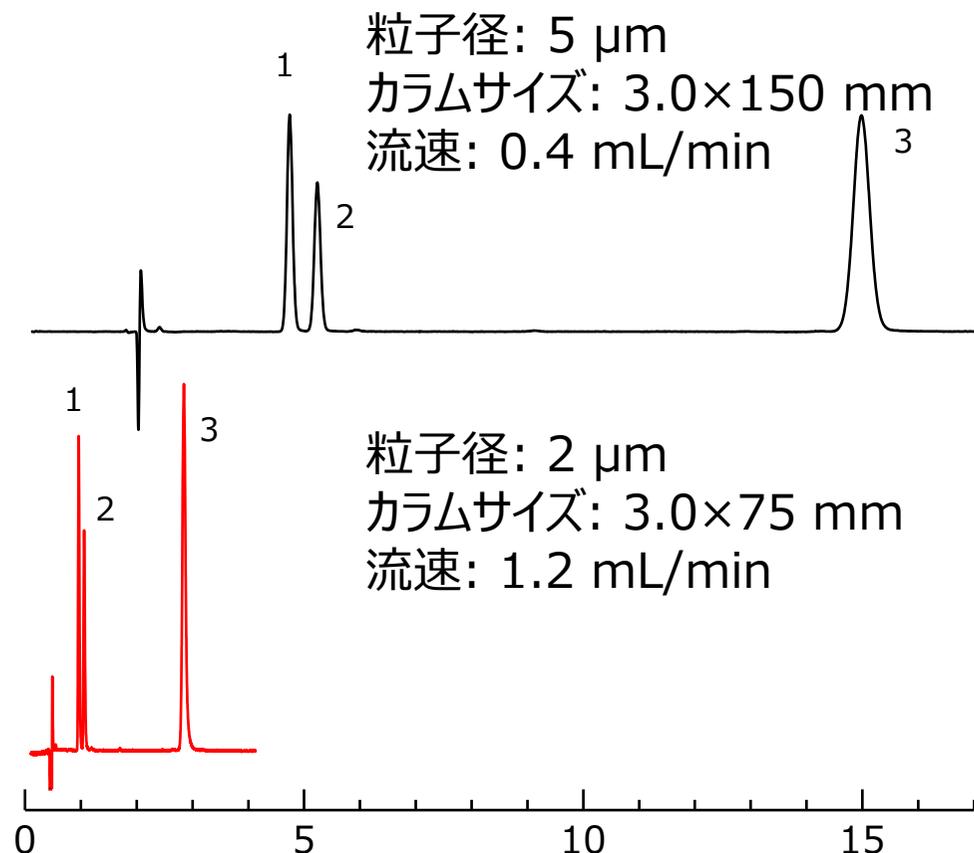
メリット

- ▶ 高理論段数、高流速での使用
 - 分離の向上
 - 分析時間の短縮

デメリット

- ▶ 圧力上昇、耐久性の低下、装置の変更
 - UHPLCの導入
 - カラム保護

分析時間の短縮



【 Analytical conditions 】
 Column: *L-column2 ODS*
 Mobile phase: CH₃OH/
 25 mM Phosphate buffer pH 7 (15/85)
 Temp.: 40°C
 Detection: UV 260 nm
 Inj.vol.: 1 μL
 Sample:
 1.テルブタリン (60 mg/L)
 2.サルブタモール (30 mg/L)
 3.プロカテロール (30 mg/L)
 in mobile phase
 System: Agilent 1200SL

| 粒子径 | $t_{R(3)}$ | $N_{(3)}$ | $Rs_{(1,2)}$ |
|------|------------|-----------|--------------|
| 5 μm | 14.9 | 11300 | 2.50 |
| 2 μm | 2.7 | 10900 | 2.24 |

t_R : 保持時間; N : 理論段数; Rs : 分離度

同等な分離で分析時間を1/6まで短縮できる

ODSカラムで分離しないときは？

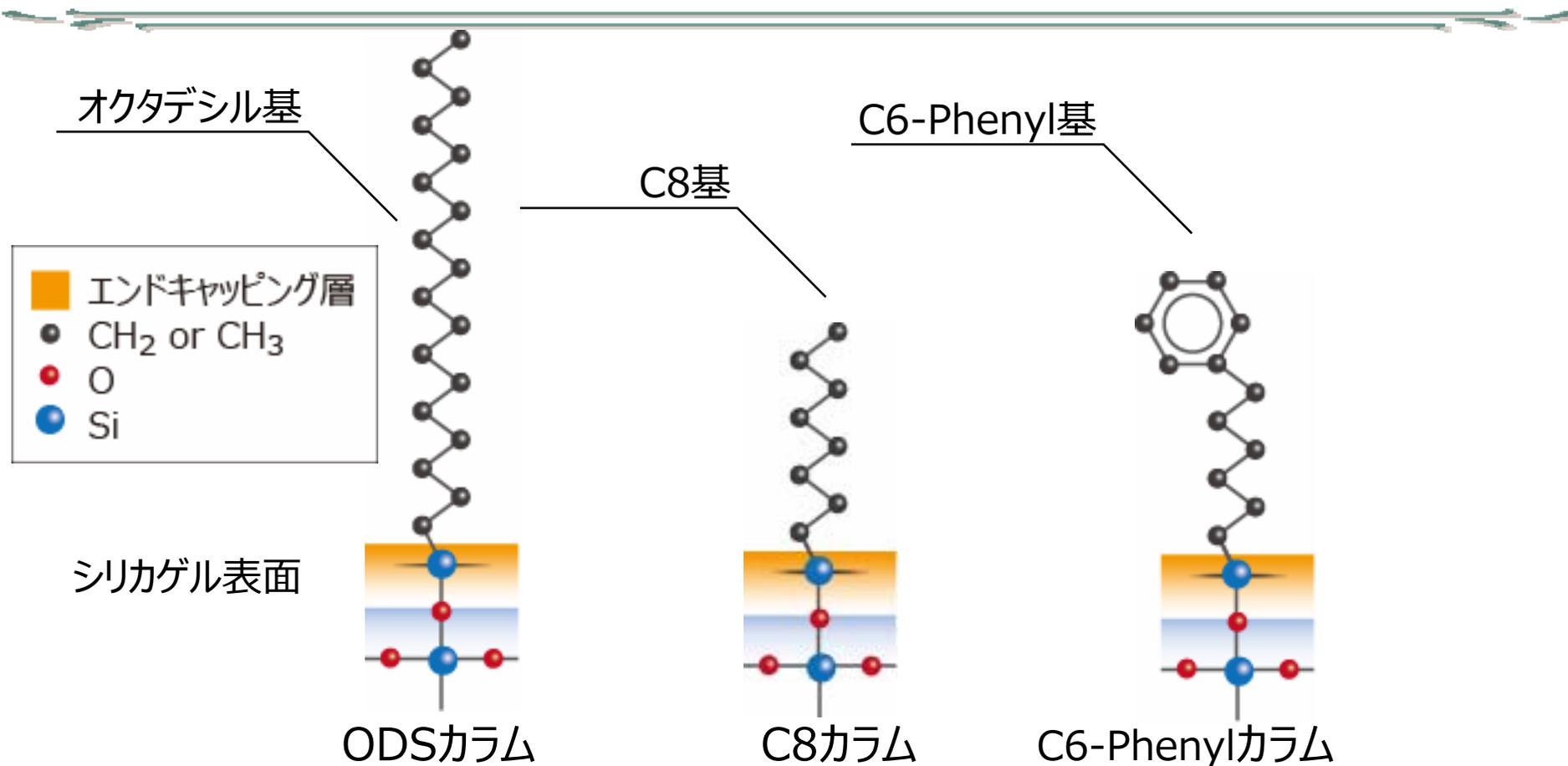
C8カラム

- ▶ 有機溶媒比率が小さいときの分離の改善
- ▶ 疎水性が小さいため、保持の大きい化合物の分析時間の短縮

C6-Phenylカラム

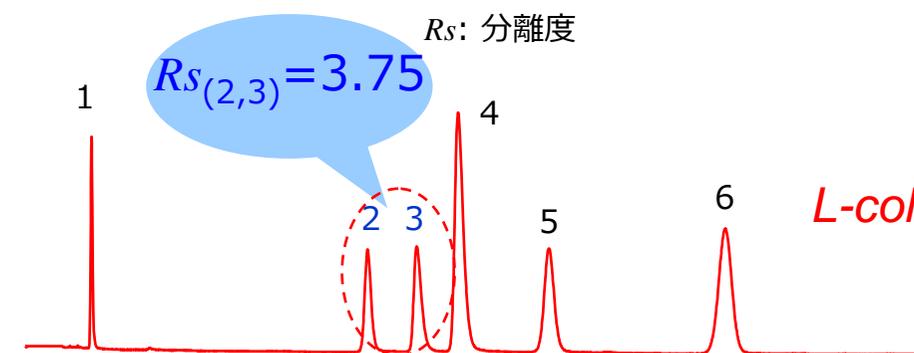
- ▶ 芳香族化合物や位置異性体の分離改善
- ▶ 疎水性が小さいため、保持の大きい化合物の分析時間の短縮

修飾基の違い

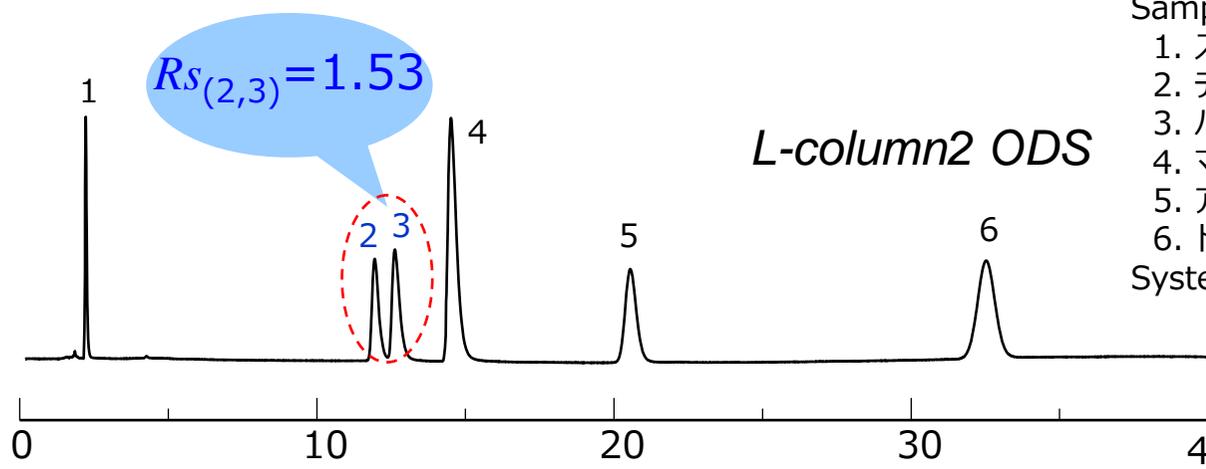


- ▶ ODS → 疎水性相互作用(大)
- ▶ C8 → 疎水性相互作用(中)
- ▶ C6-Phenyl → 疎水性相互作用(中)+ π - π 相互作用(小)

C8カラムによる分離の改善例

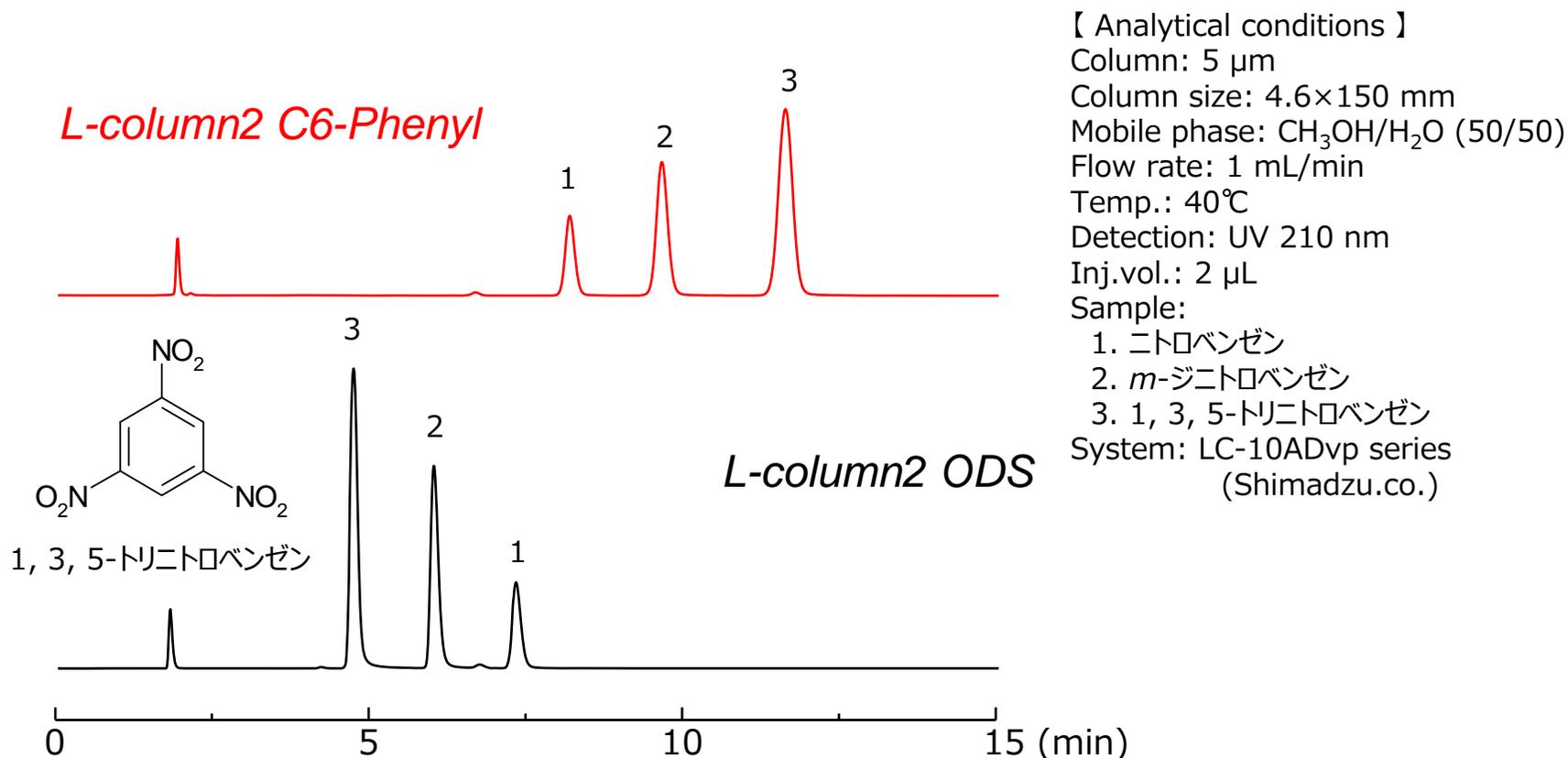


【 Analytical conditions 】
 Column: 5 μ m
 Column size: 4.6 \times 150 mm
 Mobile phase: CH₃CN / 25 mM Phosphate buffer pH 7 (30/70)
 Flow rate: 1 mL/min
 Temp.: 40 $^{\circ}$ C
 Detection: UV 220 nm
 Inj.vol.: 1 μ L
 Sample:
 1. スルピリド
 2. デシプラミン
 3. パロキセチン
 4. マプロキセチン
 5. アモキサピン
 6. トラゾドン
 System: LC-10ADvp series
 (Shimadzu.co.)



分析時間の短縮
 デシプラミン、パロキセチンの分離が改善する

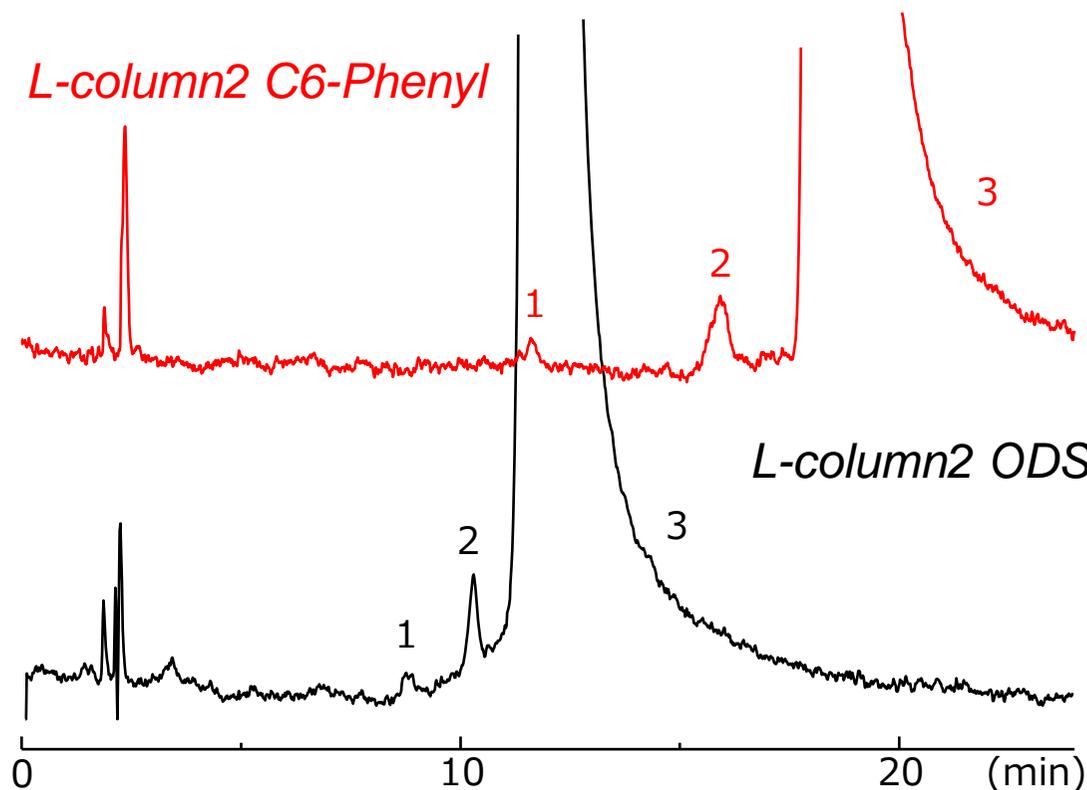
C6-Phenylカラムによる分離の改善例



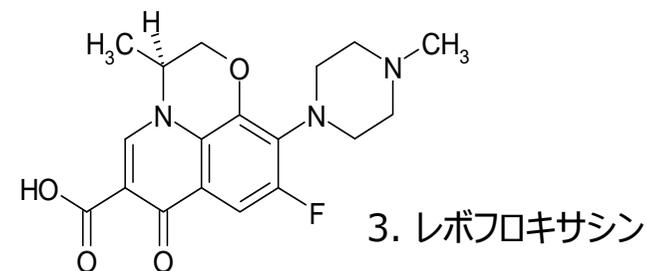
ニトロ基の多い化合物の保持が増加し、溶出順が逆転する
└ 疎水性の減少、ベンゼン環の電子密度の低下

C6-Phenylカラムによる分離の改善例

レボフロキサシンの不純物分析



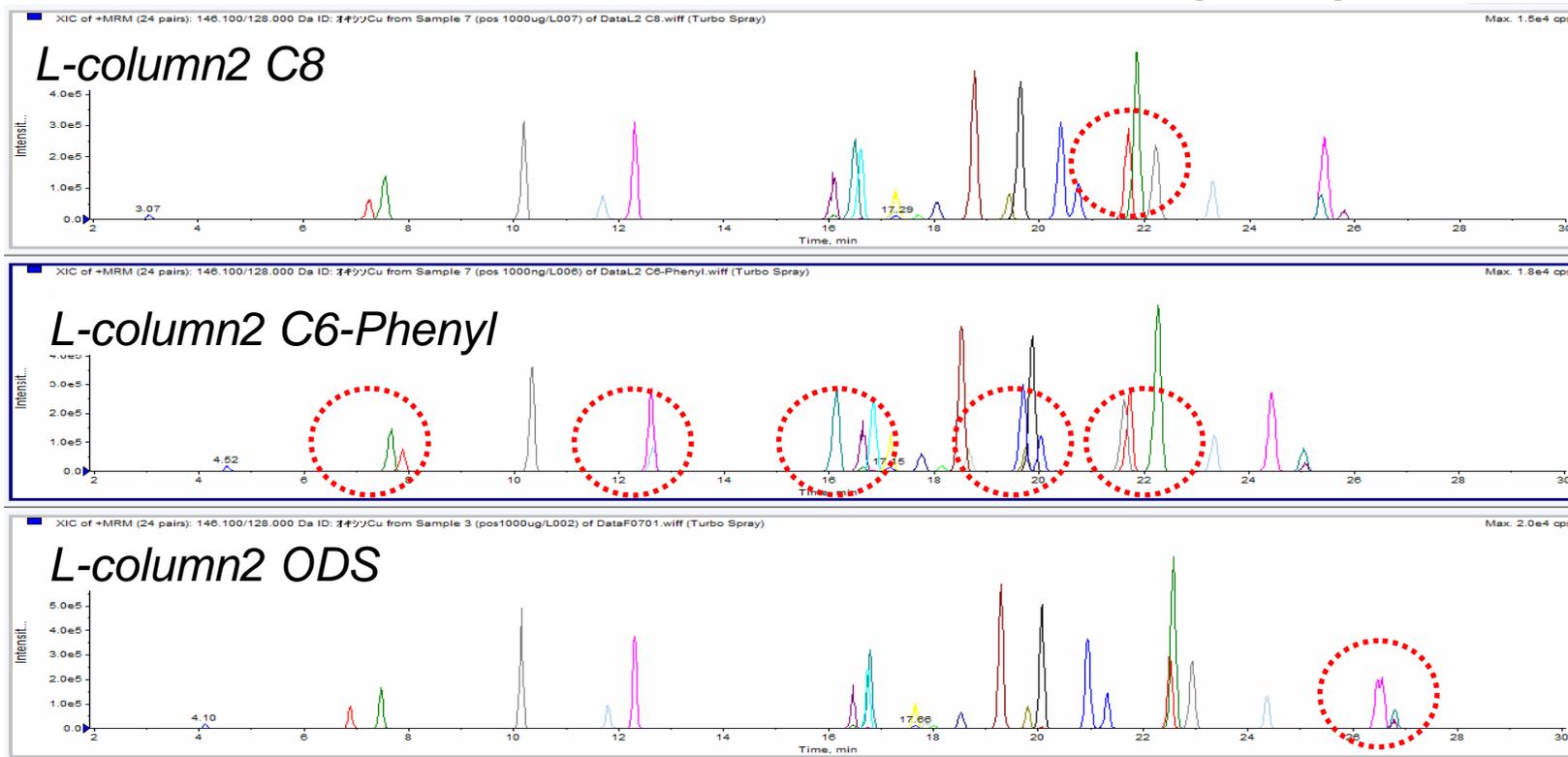
【 Analytical conditions 】
 Column: 5 μ m
 Column size: 4.6 \times 150 mm
 Mobile phase:
 CH₃OH/20 mM H₃PO₄ (10/90)
 Flow rate: 1 mL/min
 Temp.: 40 $^{\circ}$ C
 Detection: UV 294 nm
 Inj.vol.: 2 μ L
 Sample:
 1. 不純物 A
 2. 不純物 B
 3. レボフロキサシン
 System: LC-10ADvp series
 (Shimadzu.co.)



ODSカラムと同条件で、分離が改善する
 有機溶媒比率が低い移動相では保持が強くなる

LC-MS/MSによる分離パターンの違い

水道水の水質管理目標設定項目 別添方法18 (農薬)



特にLC-MSの一斉分析の場合、ODSカラムやC8カラムと比べてC6-Phenylカラムの分離パターンが大きく異なる

1.2 移動相

移動相の設定

逆相HPLCの移動相は有機溶媒系と水系の混合したものが良く用いられる

有機溶媒系

- ▶ アセトニトリル、メタノール

水系

- ▶ 水、緩衝液、イオン対試薬

緩衝液は解離性物質の移動相として使用する

イオン対試薬はピーク形状の悪い解離性物質や保持のない解離性物質の移動相に添加して使用する

有機溶媒

移動相の有機溶媒

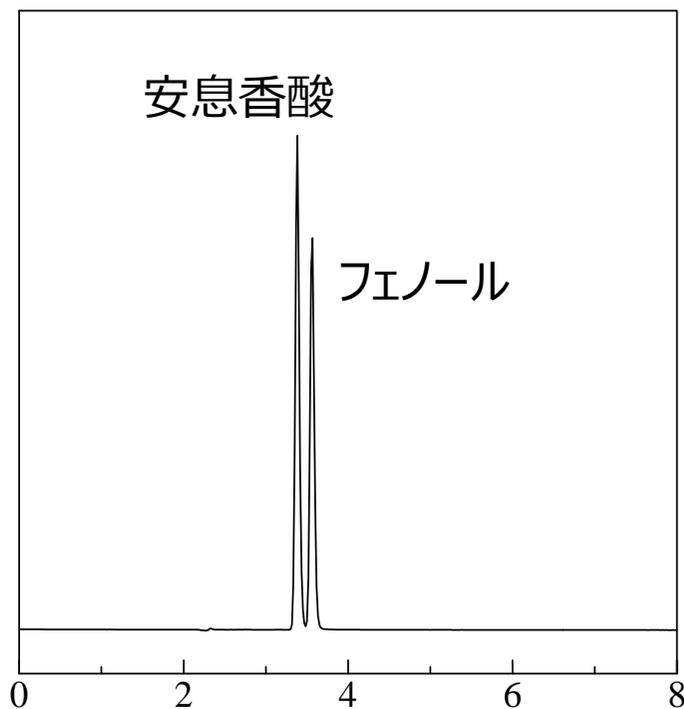
- ▶ アセトニトリル: カラム圧やUV吸収が低い
 - ファーストチョイス、3 μm 以下のカラムに最適
- ▶ メタノール: UV吸収があり、カラム圧が高い
 - UV 250 nm以上の波長
- ▶ テトラヒドロフラン: 溶出力は大きいですが、PEEK樹脂を膨潤させる
 - 試料が溶出しないときや、分離パターンの変更
- ▶ イソプロパノール、エタノール: 溶出力は大きいですが、カラム圧が高い
 - 試料が溶出しないときや、分離パターンの変更

HPLC用溶媒を使用する

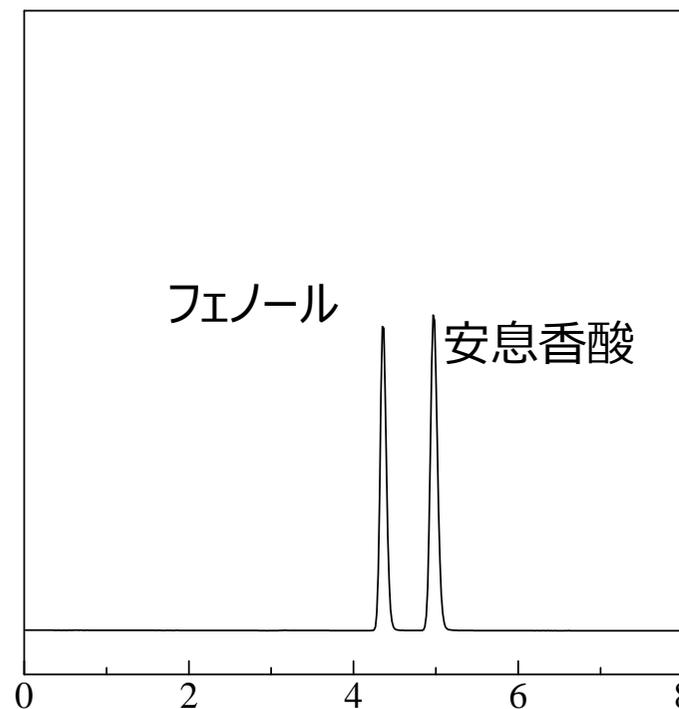
- ▶ 溶媒の規格により、ノイズや不純物が異なる
- ▶ 特級のテトラヒドロフランには安定剤であるBHTが含有されている

アセトニトリルとメタノール

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)



【 Analytical conditions 】

Column: *L-column* ODS, 5 μ m; Column size: 4.6 \times 150 mm; Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 30 $^{\circ}$ C

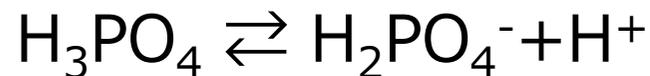
アセトニトリル(非プロトン性)とメタノール(プロトン性)で溶出順序が変わることがある

緩衝液

溶液に酸又は塩基を加えた時や希釈した時に、pHの変化を緩和す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^+)

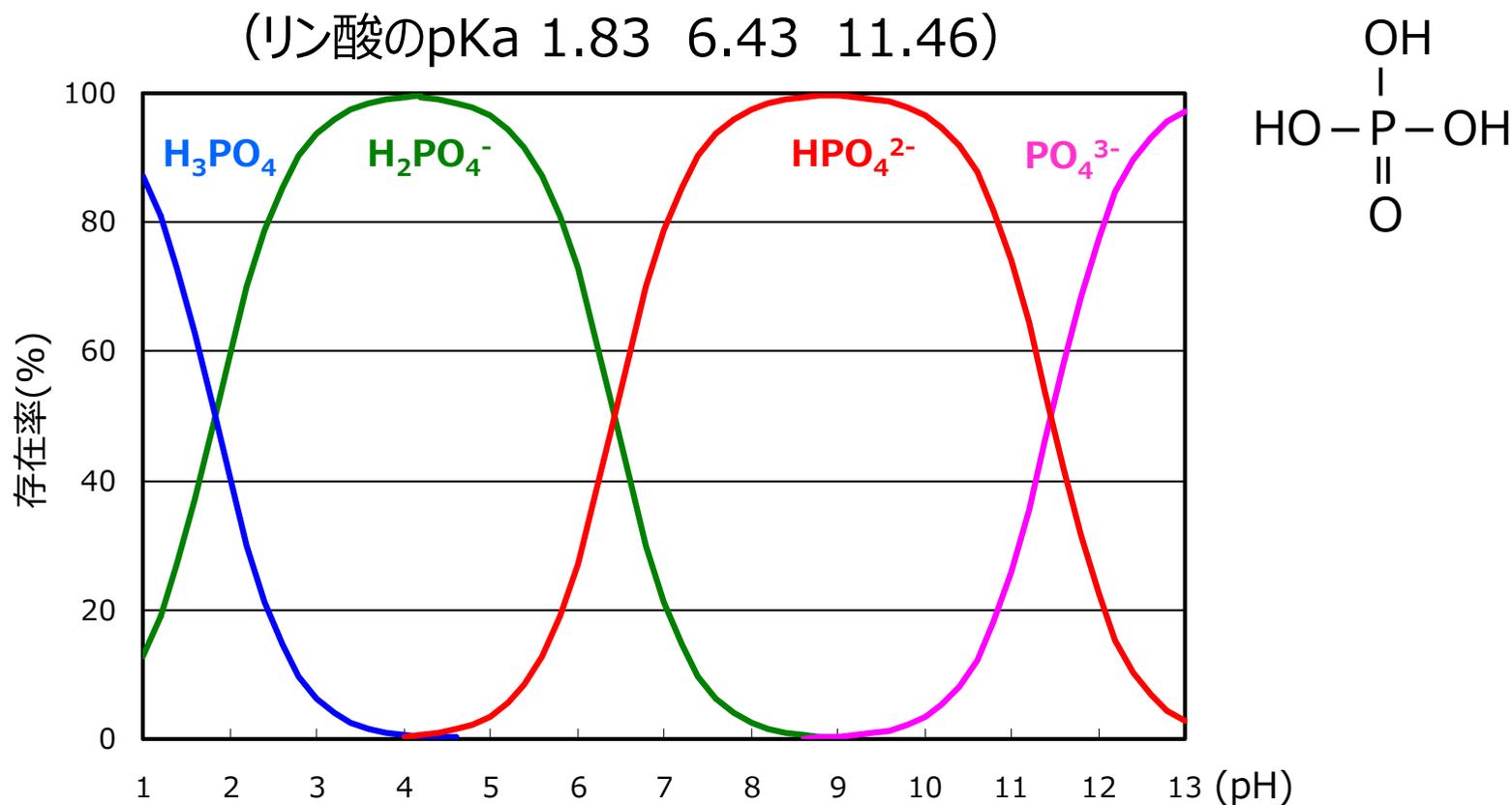
例: リン酸緩衝液(pH=1.83付近のとき)



緩衝作用が働く条件

- ▶ 弱酸と共役塩基が共存(1:1のときが最大)
- ▶ pH が 弱酸のpKa±約1の範囲

リン酸の解離、非解離状態の存在率



リン酸緩衝液はpH 4とpH9付近では緩衝能を持たない

逆相HPLCで使用される代表的緩衝液

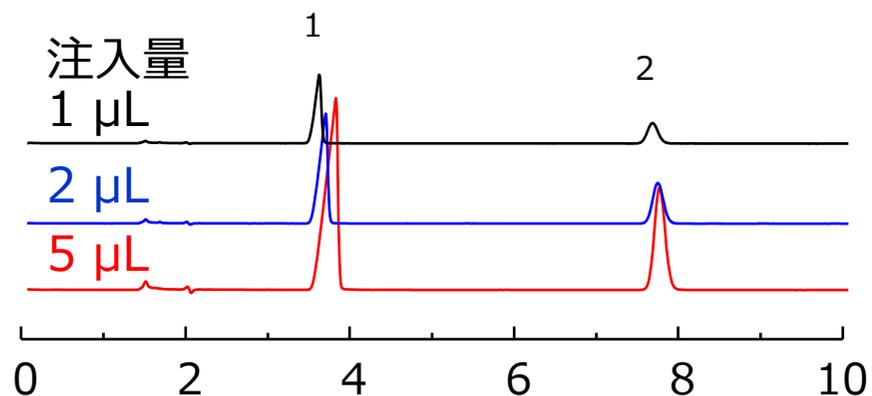
| 添加剤 | MS | pKa | 有効緩衝範囲 | 推奨使用条件 |
|-----------|----|--|---------------------------------|-----------|
| トリフルオロ酢酸 | ○ | <1.0 | | 0.02~0.1% |
| ギ酸 | ○ | 3.54 | 2.5~4.5 | 0.05~0.5% |
| 酢酸 | ○ | 4.76 | 3.76~5.76 | 0.1~1.0% |
| 重炭酸アンモニウム | ○ | 9.87(HCO ₃) 9.36(NH ₄ ⁺) 6.11(CO ₃ ²⁻) | 8.9~10.9 8.4~10.4 5.1~7.1 | 5~10 mM |
| アンモニア | ○ | 9.36 | 8.4~10.4 | <10 mM |
| リン酸 | | 1.83 6.43 11.46 | 1~2.8 5.4~7.4 | 5~50 mM |
| ホウ酸 | | 9.24 | 8.2~10.2 | |

(液クロムの巻、及び化学便覧第5版より)

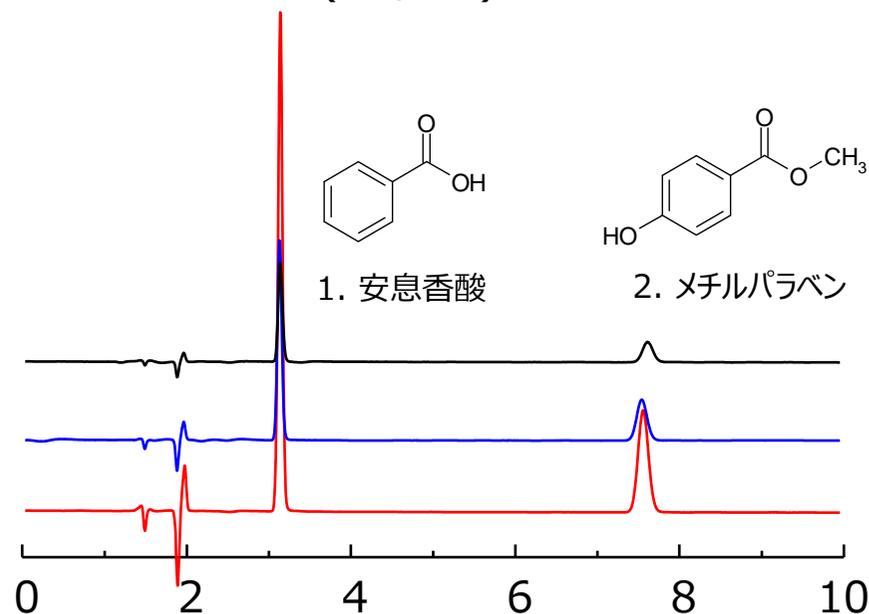
* MSのときの緩衝範囲はpKa±1で、濃度は10 mM(0.1%)以下

緩衝能の有無の比較 (注入量の影響)

A) 20 mM KH_2PO_4 (pH 4.4)
アセトニトリル(75/25) → 緩衝能なし



B) 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.4)
アセトニトリル(75/25) → 緩衝能あり



【 Analytical conditions 】

Column: *L-column2* ODS, 5 μm ; Column size; 4.6 \times 150 mm

Sample: 1. 安息香酸(100 mg/L); 2. メチルパラベン(100 mg/L)

緩衝能があると

- ▶ 安息香酸のピークがひずまない
- ▶ 注入量によって安息香酸の保持時間が変化しない

緩衝能の有無の比較(再現性)

| ロット番号 | A) 20 mM KH ₂ PO ₄ (緩衝能なし) | | B) 20 mM 酢酸緩衝液 (緩衝能あり) | |
|--------|--|-------|------------------------|-------|
| | 安息香酸の保持時間 | 分離度 | 安息香酸の保持時間 | 分離度 |
| E4311 | 3.725 | 19.52 | 3.117 | 26.55 |
| E4312 | 3.541 | 18.79 | 3.059 | 26.38 |
| E4313 | 3.636 | 18.75 | 3.123 | 26.40 |
| CV (%) | 2.53 | 2.28 | 1.14 | 0.354 |

【 Analytical conditions 】

Column: *L-column2 ODS*, 5 μm; Column size: 4.6×150 mm

Mobile Phase: A) 20 mM KH₂PO₄ (pH 4.4)/CH₃CN (75/25)

B) 20 mM Acetate buffer (pH 4.4)/CH₃CN (75/25)

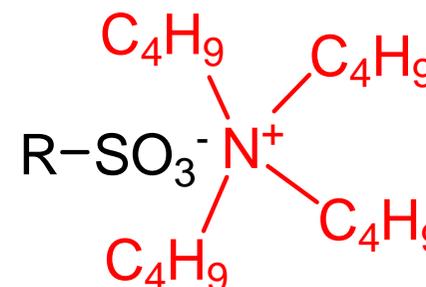
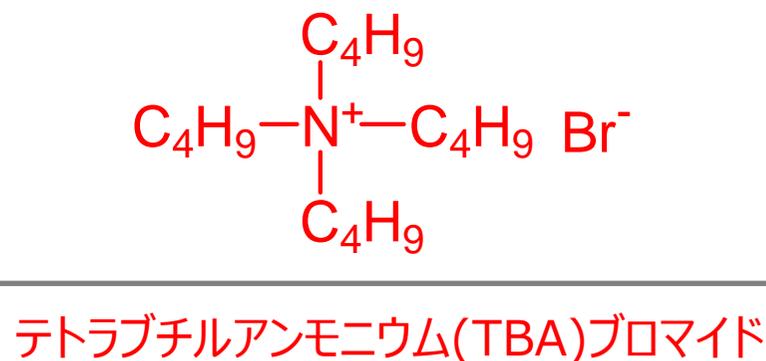
Inj.vol: 2 μL

Sample: 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は、解離性物質の保持時間や分離度のばらつきが大きくなる

イオン対クロマトグラフィー

スルホン酸

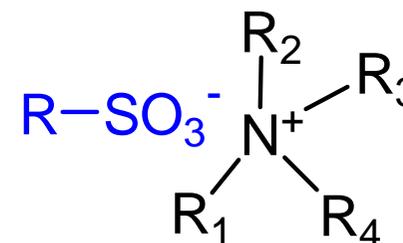
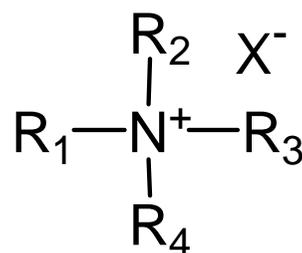


pHを酸性にしても、
解離を抑えることが
できない

イオン対形成

電荷を打ち消しあつて
疎水性が増加する

第四級アンモニウムイオン



pHで解離を抑えること
はできない

イオン対試薬

| 添加剤 | MS | 分子式 | 備考 |
|---------------------------|----|------------------------|--------------------------------------|
| アルキルスルホン酸ナトリウム | × | $C_nH_{2n+1}SO_3Na$ | $3 \leq n \leq 13$ 炭素鎖が長いと水に溶けにくい |
| n-ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) | × | $C_{12}H_{25}OSO_3Na$ | 水に溶けやすい |
| 過塩素酸ナトリウム | × | $NaClO_4$ | 溶解度が高い |
| パーフルオロ酢酸 | ○ | $C_nF_{2n+1}COOH$ | $1 \leq n \leq 7$ システムに残留しやすい |
| テトラブチルアンモニウムホスファート(TBA-P) | × | $(C_4H_9)_4N, H_2PO_4$ | Cl、Brなどの塩がある |
| ジアルキルアミン | ○ | $(C_nH_{2n+1})_2NH$ | $3 \leq n \leq 6$ |

* 試薬メーカーからイオン対クロマトグラフィー用の試薬が発売されている

酸性物質の分析のための移動相

酸性移動相

- ▶ 酸性物質を非解離の状態では分析する
メリット: 保持、負荷量の増加
デメリット: なし

中～弱アルカリ性移動相 (分離しないとき)

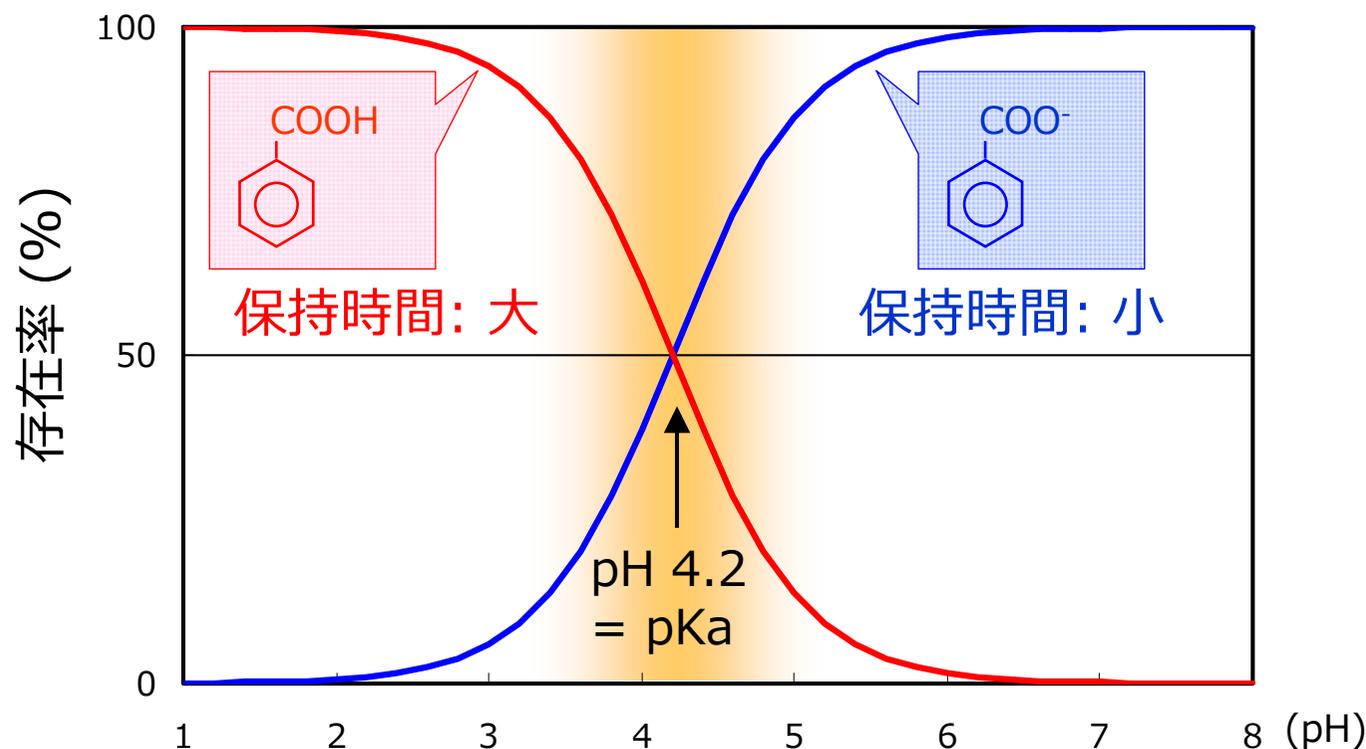
- ▶ 酸性物質を解離の状態では分析する
メリット: 分離の改善
デメリット: カラムの劣化、保持、負荷量の減少

イオン対クロマトグラフィー (保持の弱いとき)

- ▶ 解離している酸性物質に、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
メリット: 保持の増加、ピーク形状の向上
デメリット: カラムの専用化、調製が煩雑

酸性物質の緩衝液のpH設定

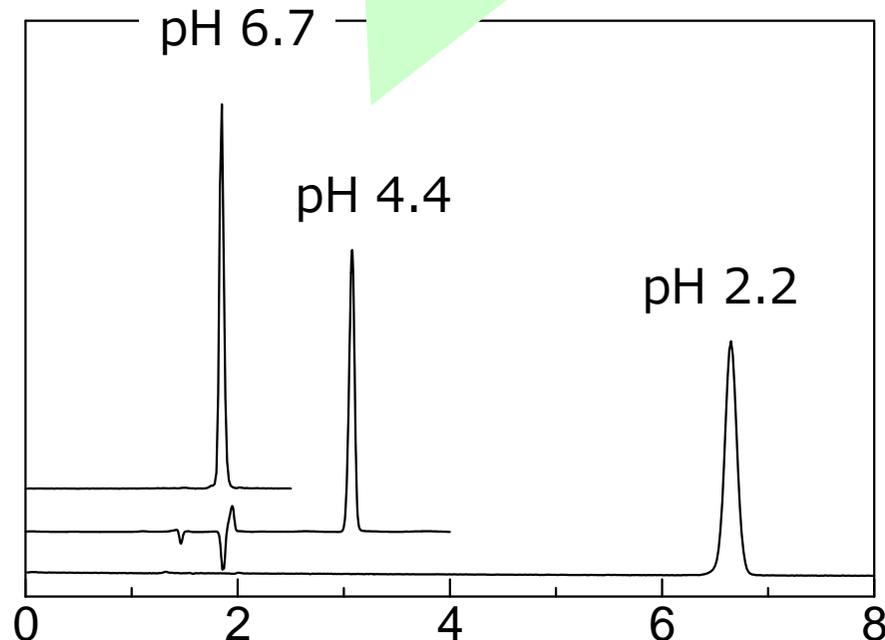
緩衝液のpHによる安息香酸の解離、非解離状態の存在率



酸性物質は、pHが小さいときは非解離状態が多く存在する
解離、非解離状態の存在率は保持時間に影響するので緩衝液の
pHは化合物のpKaより2以上離れたものが望ましい

緩衝液のpHと保持時間

解離平衡が非解離側に移動すれば
保持時間は長くなる



【 Analytical conditions 】
 Column: *L-column ODS*, 5 μm
 Column size: 4.6 \times 150 mm
 Mobile phase: CH_3CN
 /25 mM リン酸緩衝液 (25/75) (注)
 Flow rate: 1 mL/min
 Inj.vol.: 1 μL
 Sample: 安息香酸

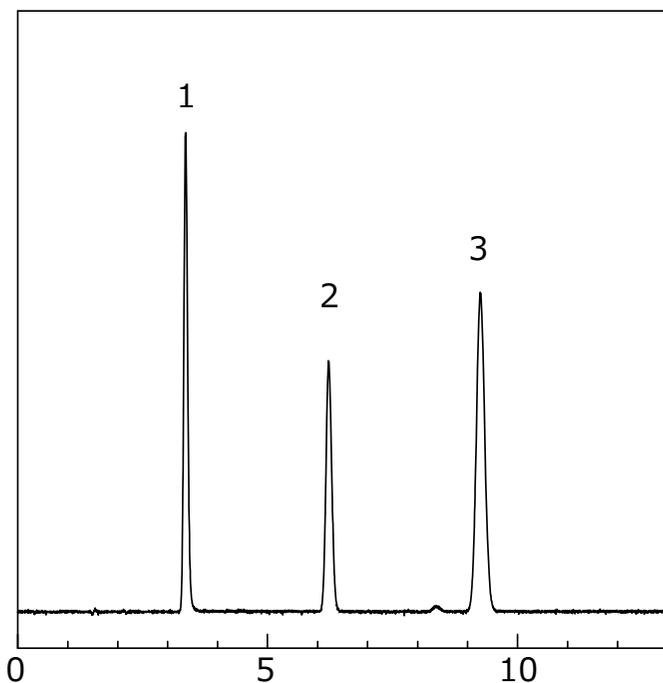
(注)pH 4.4のときは酢酸緩衝液を使用

緩衝液のpHと保持時間

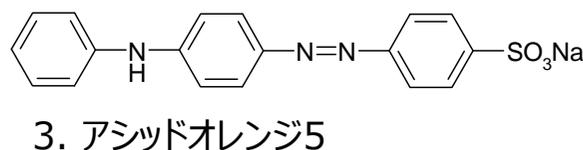
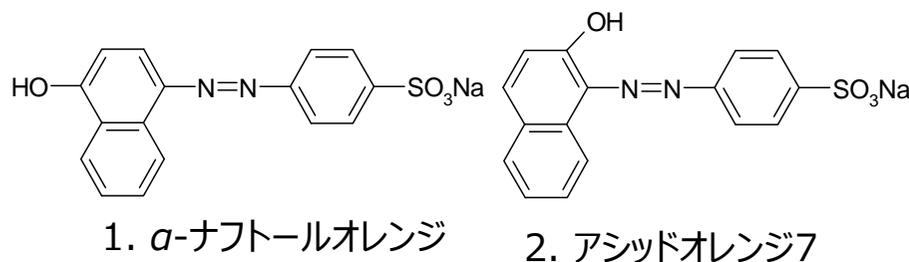
| pH | 保持時間 | 解離状態 |
|-----|----------|-------|
| 2.2 | 6.65 min | 1.0% |
| 4.4 | 3.08 min | 61.3% |
| 6.7 | 1.85 min | 99.7% |

緩衝液のpHにより解離平衡が移動し、それに合わせて保持が変わる
 酸性移動相では安息香酸が非解離の状態であるため保持が大きい

酸性物質のイオン対クロマトグラフィー



【 Analytical conditions 】
 Column: *L-column2 ODS*, 5 μm
 Column size: 4.6 \times 150 mm
 Mobile phase:
 CH₃CN/10 mM TBA-PO₄ in H₂O (45/55)
 Flow rate: 1 mL/min
 Detection: VIS 430 nm
 Inj.vol.: 1 μL



イオン対試薬により理論段数と保持が向上する

塩基性物質の分析のための移動相

酸性移動相

- ▶ 塩基性物質を解離させた状態で分析する
 - メリット: シラノールの影響を受けにくい
 - デメリット: 保持、負荷量の減少

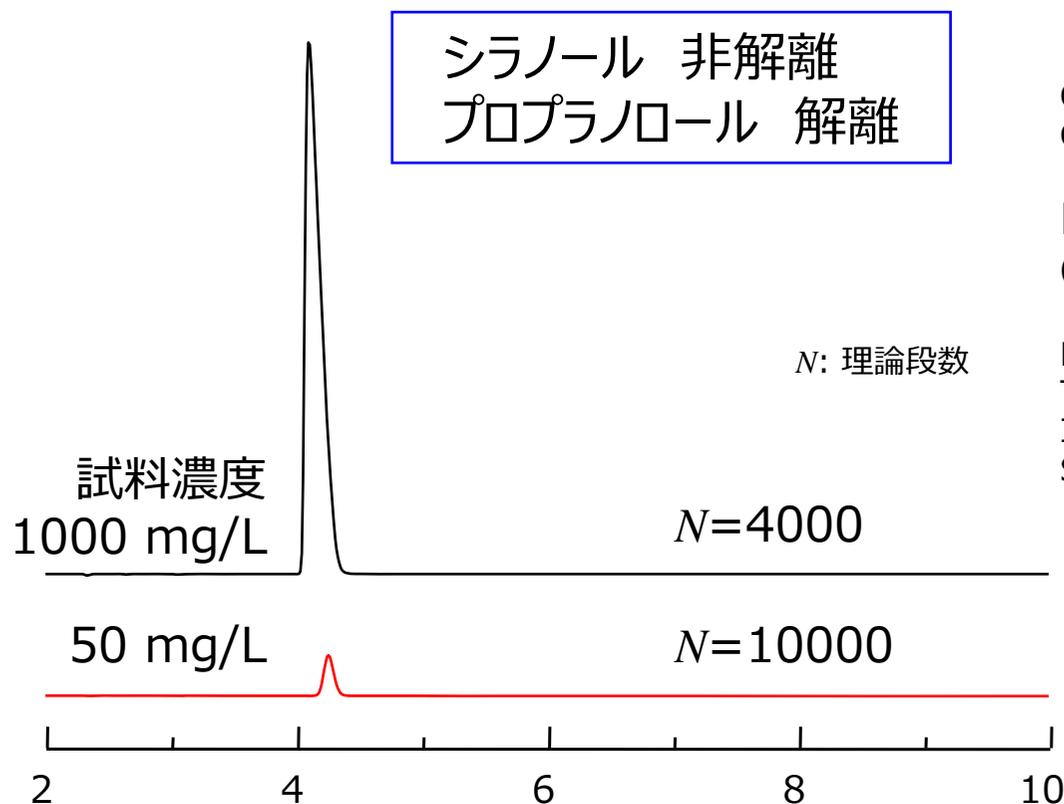
中～弱アルカリ性移動相

- ▶ 塩基性物質を解離～非解離させた状態で分析する
 - メリット: 保持、負荷量の増加
 - デメリット: シラノールの影響を受けやすい、カラムの劣化

イオン対クロマトグラフィー (保持の弱いとき)

- ▶ イオン対試薬を添加し、塩基性物質とイオン対を形成させて固定相に保持させる
 - メリット: 保持の増加、ピーク形状の向上
 - デメリット: カラムの専用化、調製が煩雑

塩基性物質の酸性移動相での分析



【 Analytical conditions 】

Column: *L-column2* ODS, 5 μ m

Column size: 4.6×150 mm

Mobile phase:

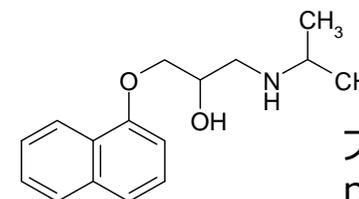
CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (30/70)

Flow rate: 1 mL/min

Temp: 40°C

Inj.vol.: 1 μ L

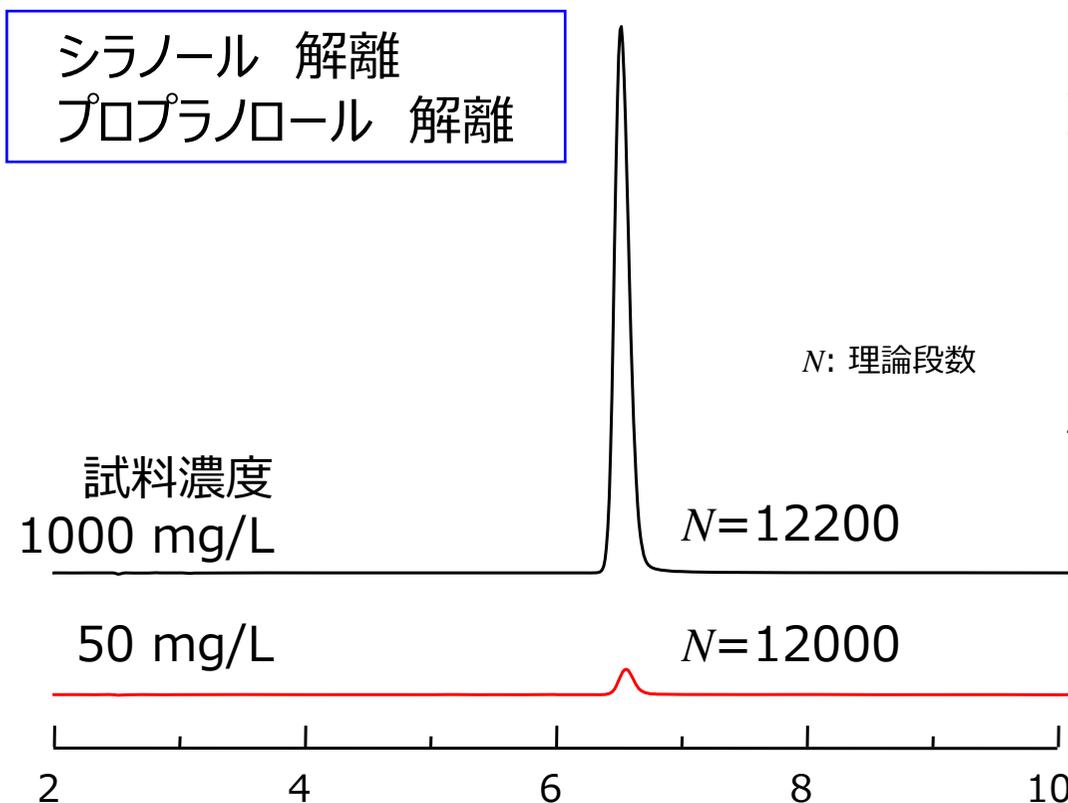
Sample: プロプラノロール



プロプラノロール
pKa 9.45

酸性移動相ではシラノール基の影響を受けなくなり、ピークがシャープになるが、試料の濃度が濃いとピーク形状が悪くなり、保持時間が短くなる → 負荷量の低下

塩基性物質の中性移動相での分析



【 Analytical conditions 】

Column: *L-column2* ODS, 5 μ m

Column size: 4.6 \times 150 mm

Mobile phase:

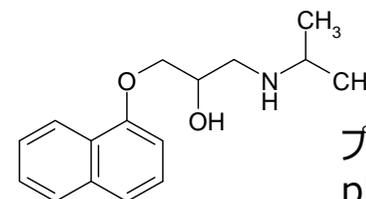
CH₃CN/25 mM リン酸緩衝液 pH 7
(30/70)

Flow rate: 1 mL/min

Temp: 40 $^{\circ}$ C

Inj.vol.: 1 μ L

Sample: プロプラノロール



プロプラノロール
pKa 9.45

中性移動相では試料の濃度によるピーク形状や保持時間の変化がない

→ **エンドキャッピングが完璧の場合、高い理論段数、負荷量の増加**

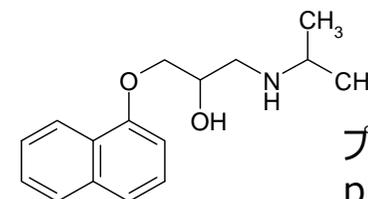
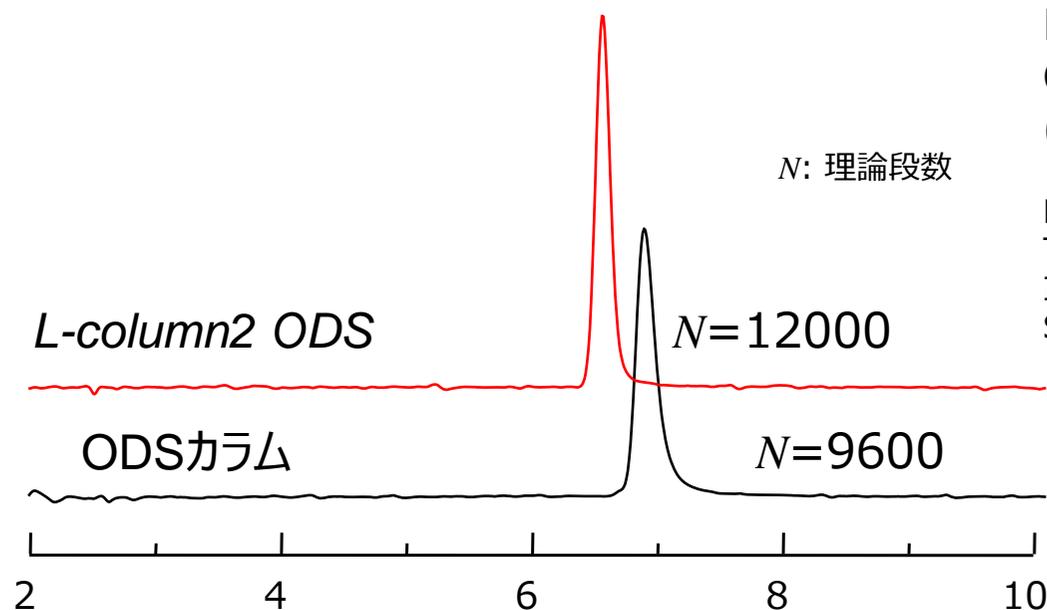
塩基性物質の中性移動相での分析

シラノール 解離
 プロプラノロール 解離

【 Analytical conditions 】
 Column: ODS(C18), 5 μm
 Column size: 4.6×150 mm

Mobile phase:
 CH₃CN/25 mM リン酸緩衝液 pH 7
 (30/70)

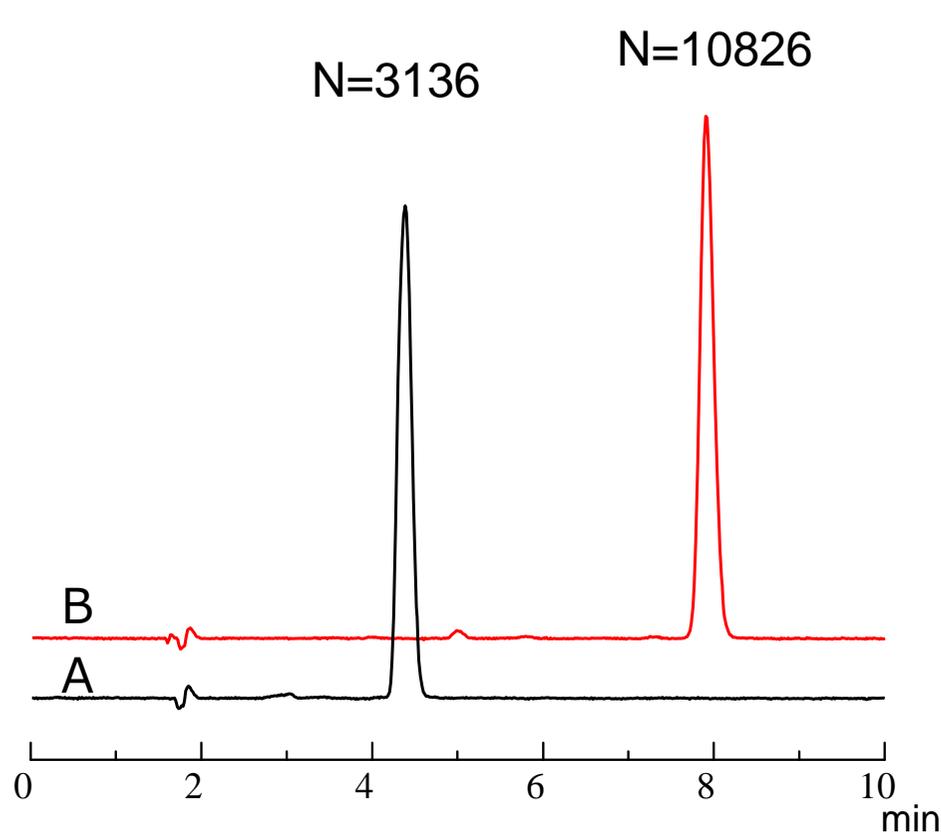
Flow rate: 1 mL/min
 Temp: 40°C
 Inj.vol.: 1 μL
 Sample: プロプラノロール(50 mg/L)



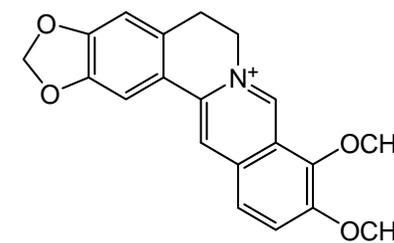
プロプラノロール
 pKa 9.45

中性移動相ではシラノール基の影響を受けやすくなり、カラムの差が生じやすい（エンドキャッピングの良し悪しがわかる）

塩基性物質のイオン対クロマトグラフィー



[Analytical conditions]
Column : *L-column2* ODS
4.6×150 mm (C18, 5µm)
Mobile phase :
A CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (30/70)
B CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ 10 mM C₅H₁₁SO₃Na(30/70)
Flow rate : 1 mL/min
Temp. : 40°C
Inj.vol. : 1 µL
Sample : ベルベリン

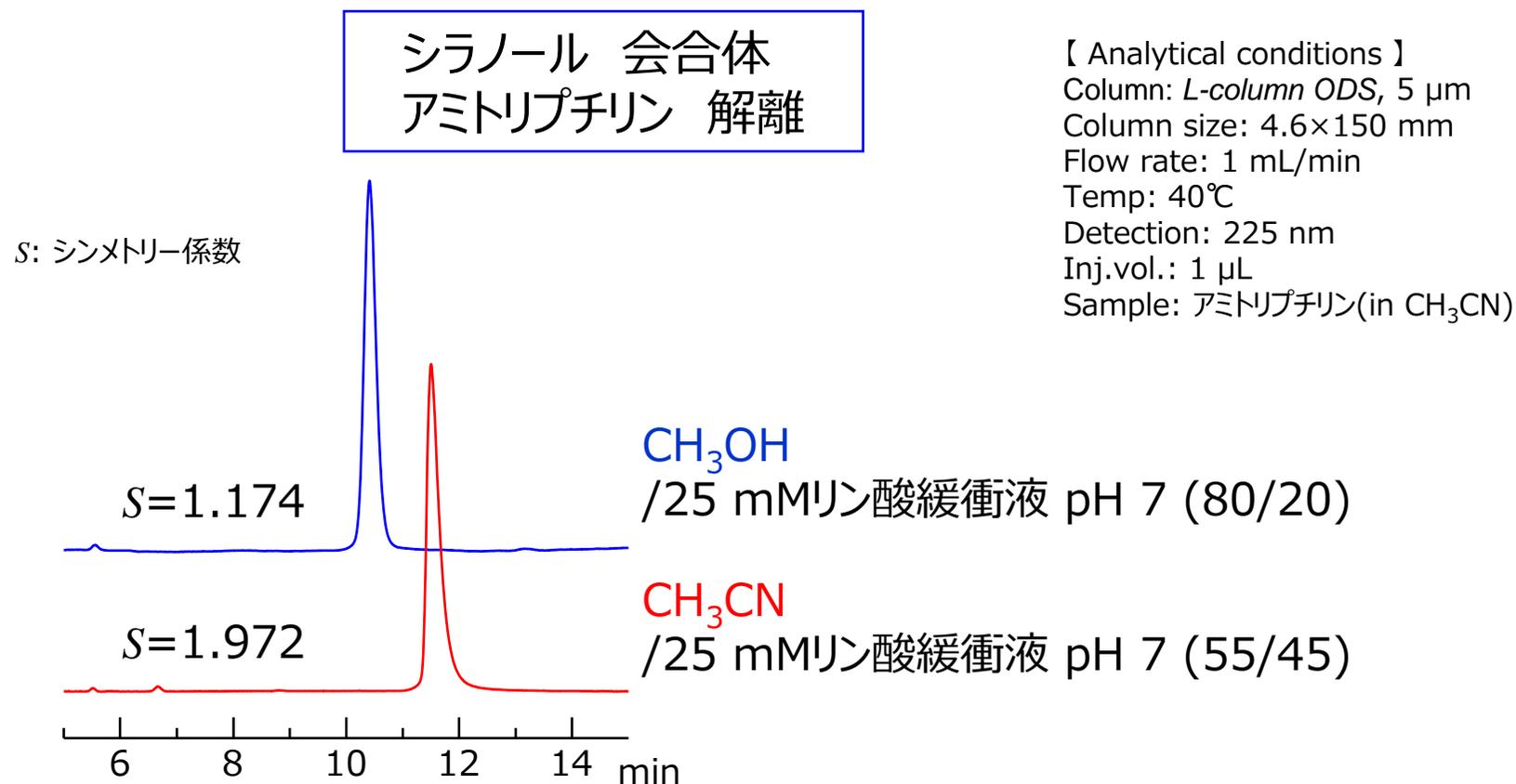


第四級アンモニウム塩は、イオン対試薬により理論段数と保持が増加する

塩基性物質のテーリング防止策

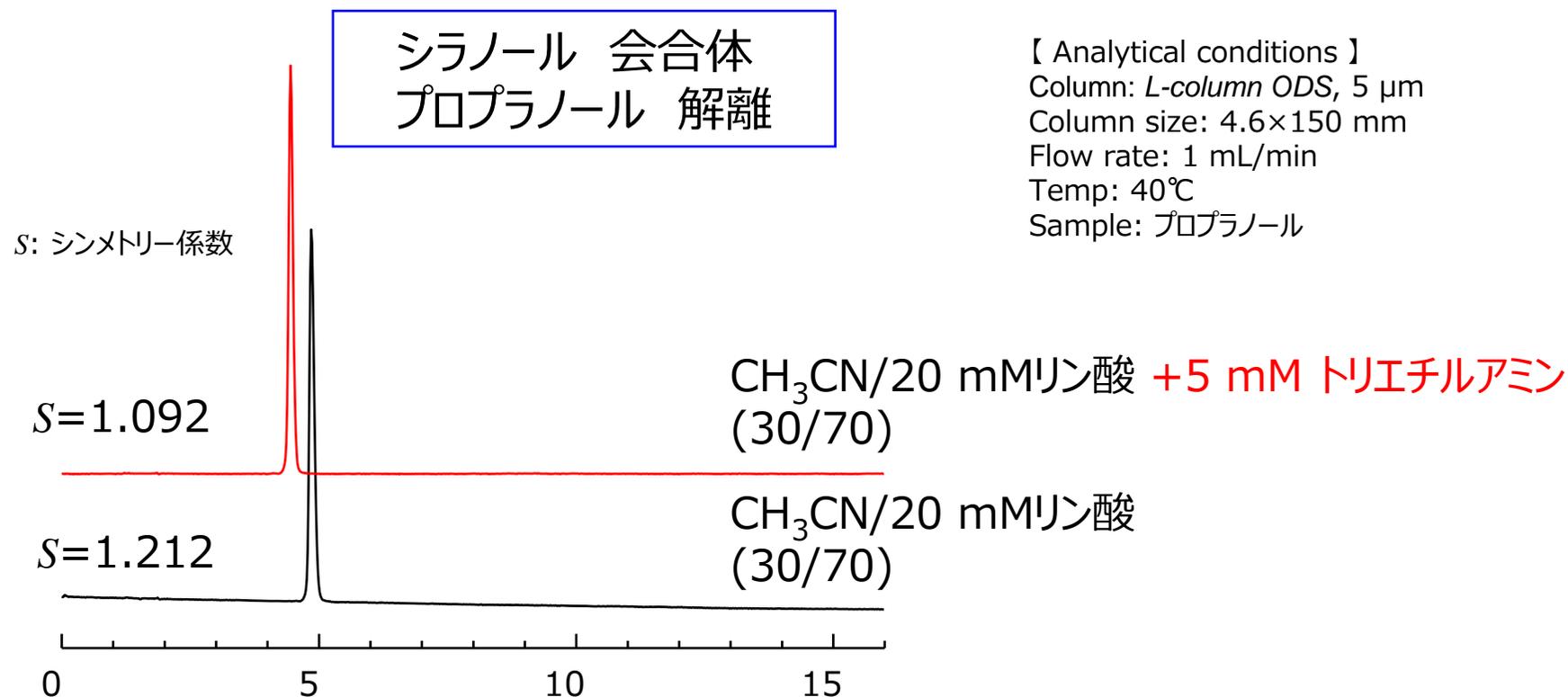
1. テーリングの起こりにくいカラムを使用する
2. 残存シラノールと試料が相互作用しないようにする
 - アセトニトリルからメタノールに変更する
 - アンチテーリング剤(アミン類)を使用する
 - 温度を高くする
 - イオン対試薬を使用する

移動相にメタノールを使用



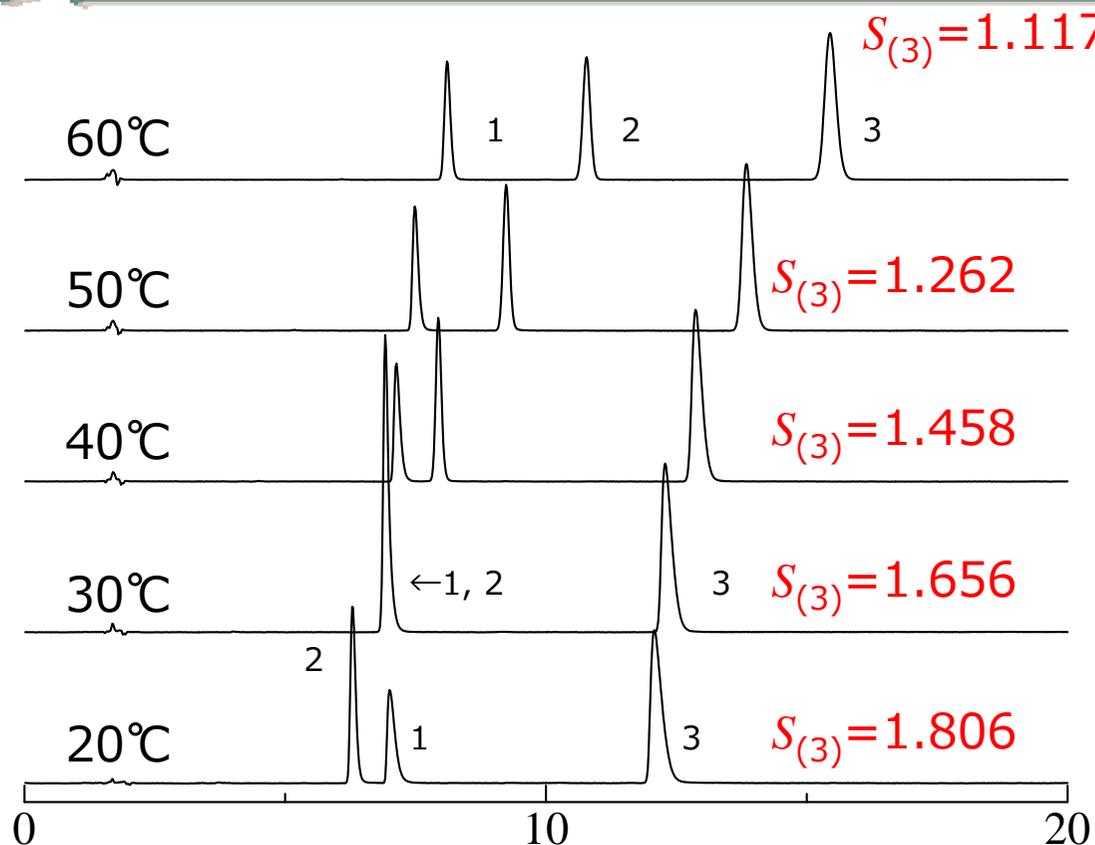
メタノールが残存シラノールと水素結合するため、塩基性物質は残存シラノールと相互作用できない。ただし、カラム圧は上昇する

アンチテーリング剤の使用



添加アミン類が残存シラノールと結合するため、塩基性物質は残存シラノールと相互作用ができない
ただし、カラムを専用化しなくてはならない。耐久性が悪くなる

温度を高くする



【 Analytical conditions 】

Column: *L-column2 ODS*, 3 μ m

Column size: 4.6 \times 150 mm

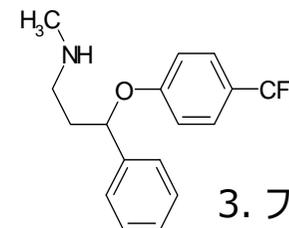
Mobile phase: CH₃CH

/25 mM Phosphate buffer pH 7 (35/65)

Flow rate: 1 mL/min

Sample:

1. パロキセチン
2. シタロプラム
3. フルオキセチン



3. フルオキセチン

S : シンメトリー係数

温度が高くなると、塩基性物質と残存シラノールとの吸脱着速度が速くなり、テーリングが改善される
ただし、カラムの耐久性は低下する

1.3 試料

注入量

注入量の増加は感度の上昇とピーク形状の悪化のおそれ

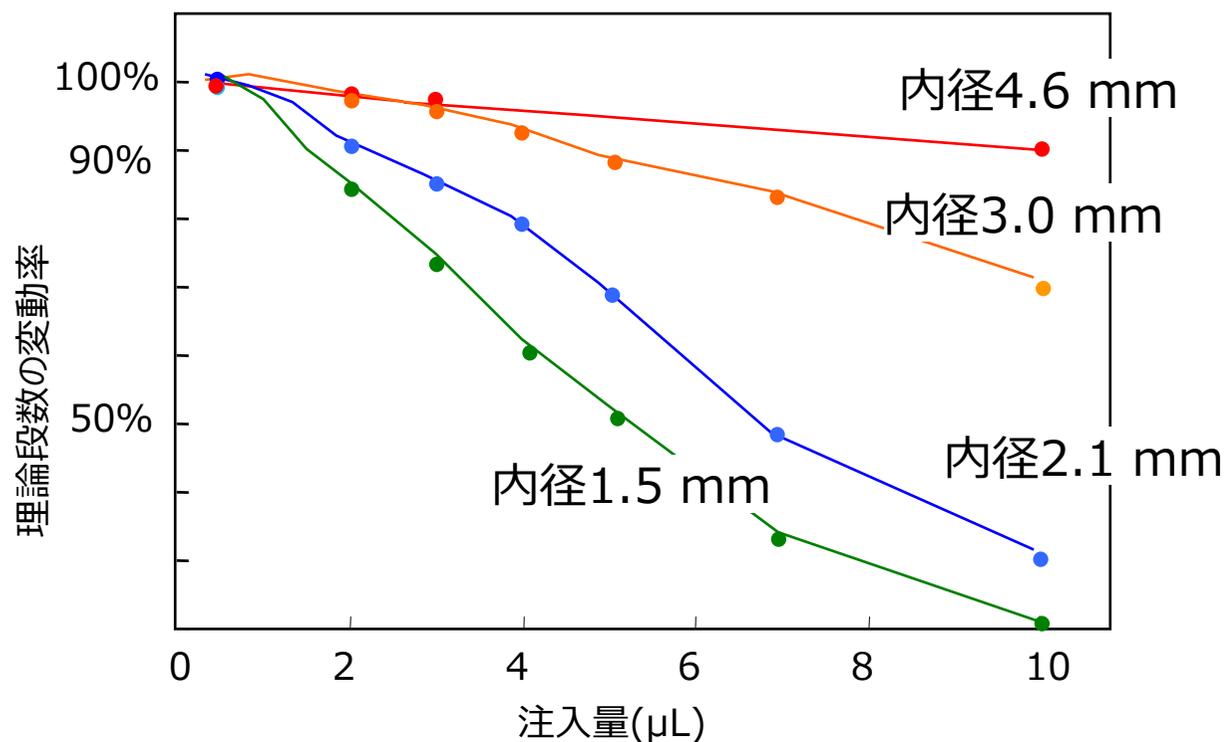
- ▶ カラムサイズ
内径が細くなるほど注入量が減少する
- ▶ オートサンプラーの再現性
ばらつきの少ない注入量を選ぶ

試料溶媒

有機溶媒比率が増えるとピーク形状が悪化する
前処理の最終溶媒は移動相に近い組成をお勧め

注入量とカラムサイズ

カラムサイズの違いによる注入量と理論段数



【 Analytical conditions 】

Column: *L-column ODS*, 5 μm

Column size: 150 mm L.

Mobile phase:

$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (60/40)

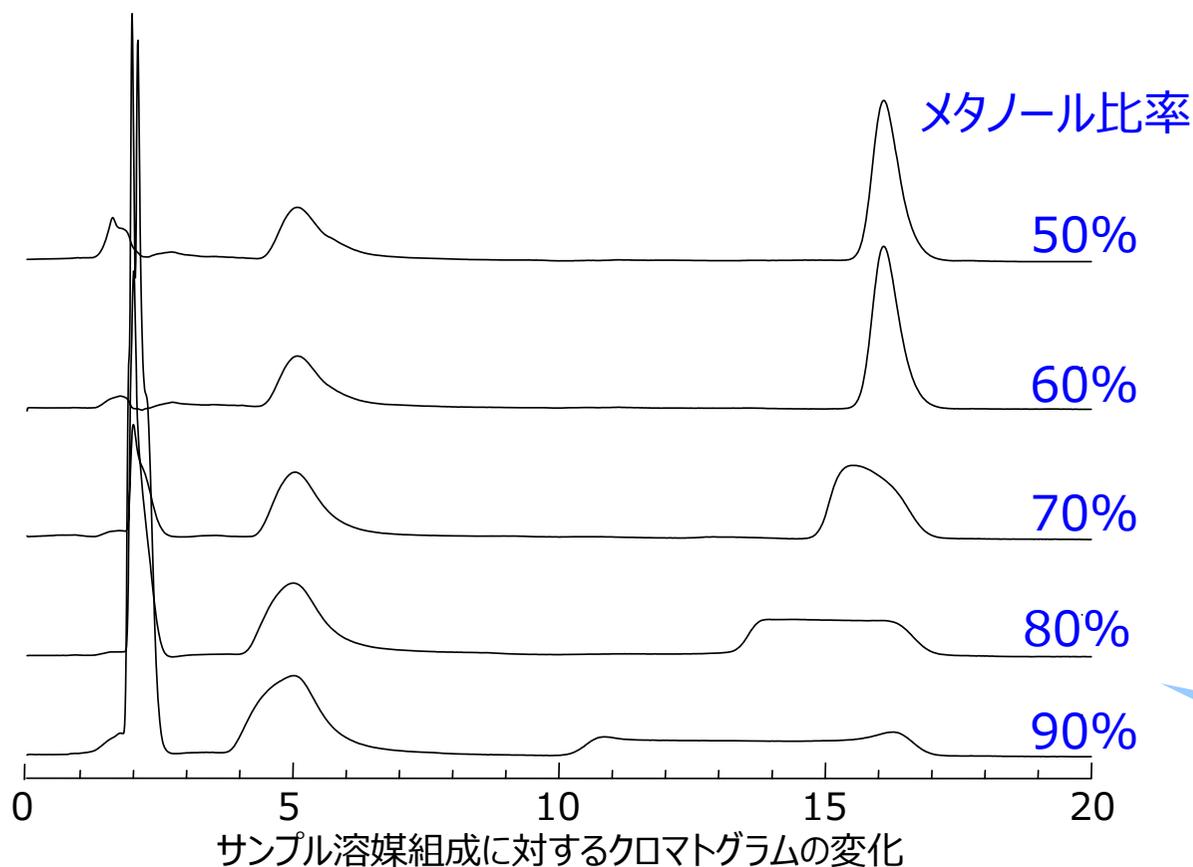
Sample:

ナフタレン

(1 mg/L in CH_3CN)

内径が小さいほど注入量によって理論段数へ影響する

試料溶媒の有機溶媒比率



【 Analytical conditions 】
 Column: *L*-column ODS, 5 μm
 Column size: 2.1×150 mm

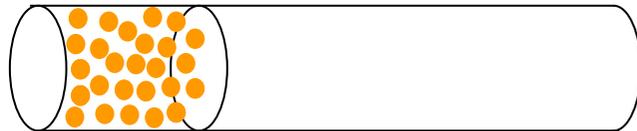
Mobile phase:
 CH₃OH/H₂O (55/45)
 Inj.vol: 100 μL
 Sample:
 17b-エストラジオール
 (1 μg/mL)

試料溶媒の
 メタノールの割合を変化

有機溶媒比率が高いとピーク形状が悪くなる

試料溶媒の有機溶媒比率

有機溶媒100%試料溶媒



バンド幅が最初から広い!

水の比率の多い試料溶媒

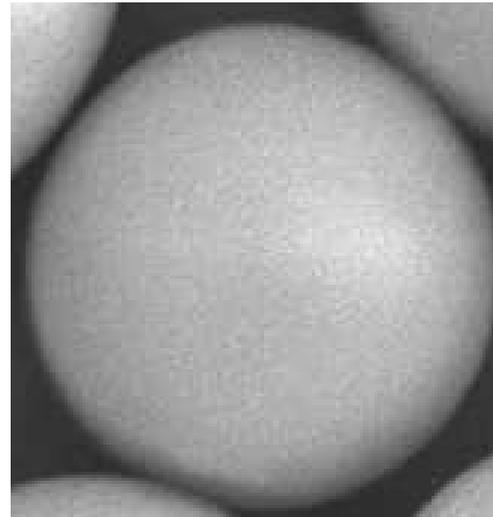


カラム入口部で一旦濃縮される

- ▶ 試料溶媒の基本は移動相と同じ組成にする
- ▶ 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

トラブルシューティング

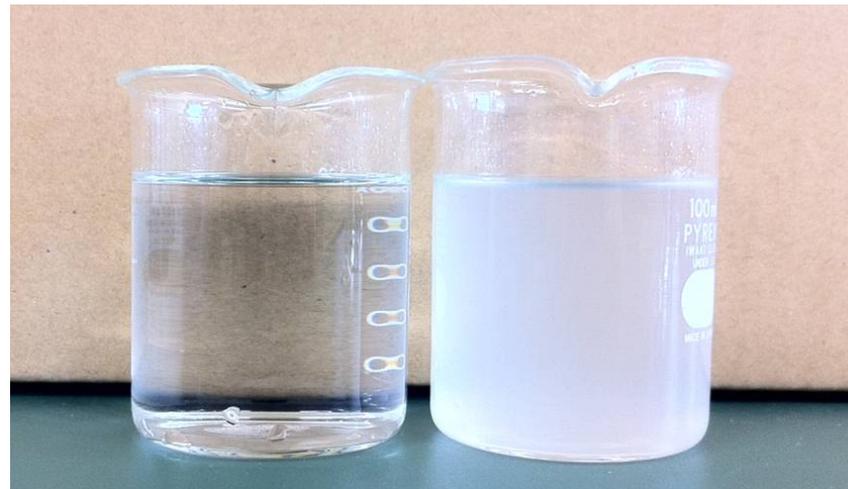
1. 逆相HPLC分析におけるメソッド開発
2. トラブルシューティング
 - 2.1 塩の析出
 - 2.2 カラムの劣化
 - 2.3 カラムの洗浄方法
 - 2.4 保持時間の変化
 - 2.5 ピーク面積の変化



2.1 塩の析出

緩衝液(塩)を使用すると有機溶媒比率が高いと塩が析出する

内径4.6 mmのカラムにアセト
ニトリル/25 mMリン酸緩衝液
pH 7 (80/20)を30 mL送液す
るとカラム圧力が20%上昇



アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液pH 7
左(75/25)、右(80/20)

次のような時は注意・確認が必要

→ 有機溶媒と混合、グラジエント分析、カラム交換、
ポンプが送液不良のとき

2.2 カラムの劣化

化学的要因

- ▶ 酸性移動相による修飾基の脱離 → シラノール基の生成
- ▶ アルカリ移動相による基材の溶解 → ボイドの発生
- ▶ 脂溶性成分などの蓄積 → 蓄積成分と試料の相互作用

物理的要因

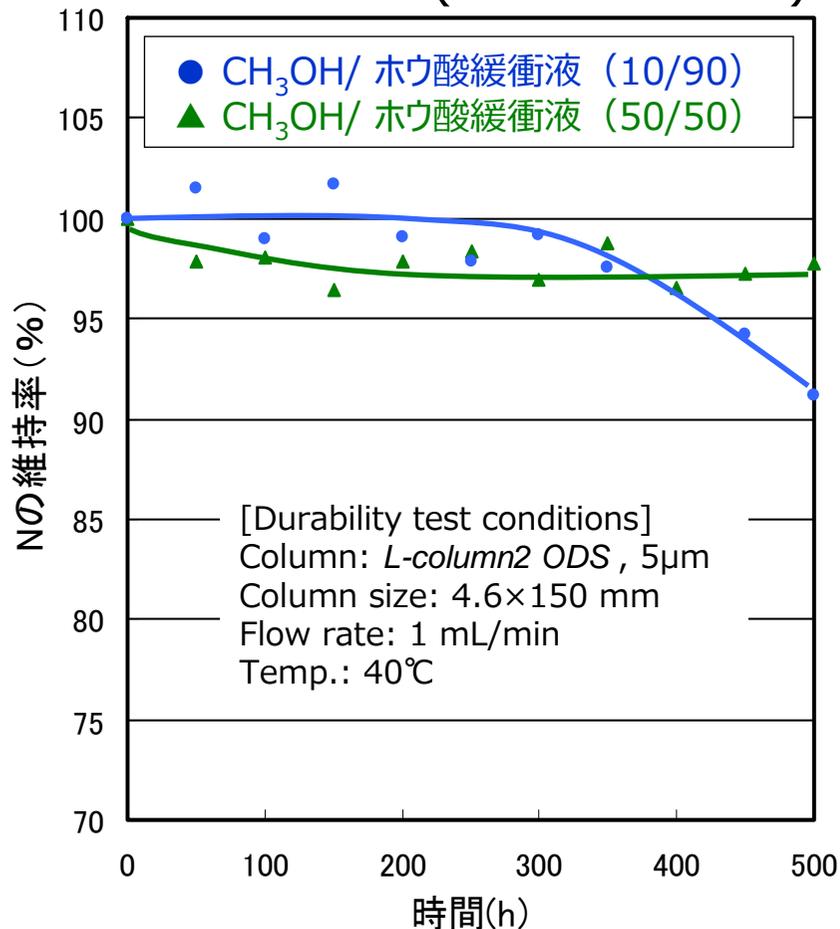
- ▶ システム、移動相、試料由来のごみなど不溶物の体積
→ カラム圧の上昇
- ▶ 緩衝液などの塩の析出 → カラム圧の上昇
- ▶ 急激な圧力変化や圧力上限以上での送液 → ボイドの発生

カラムの劣化を防ぐには

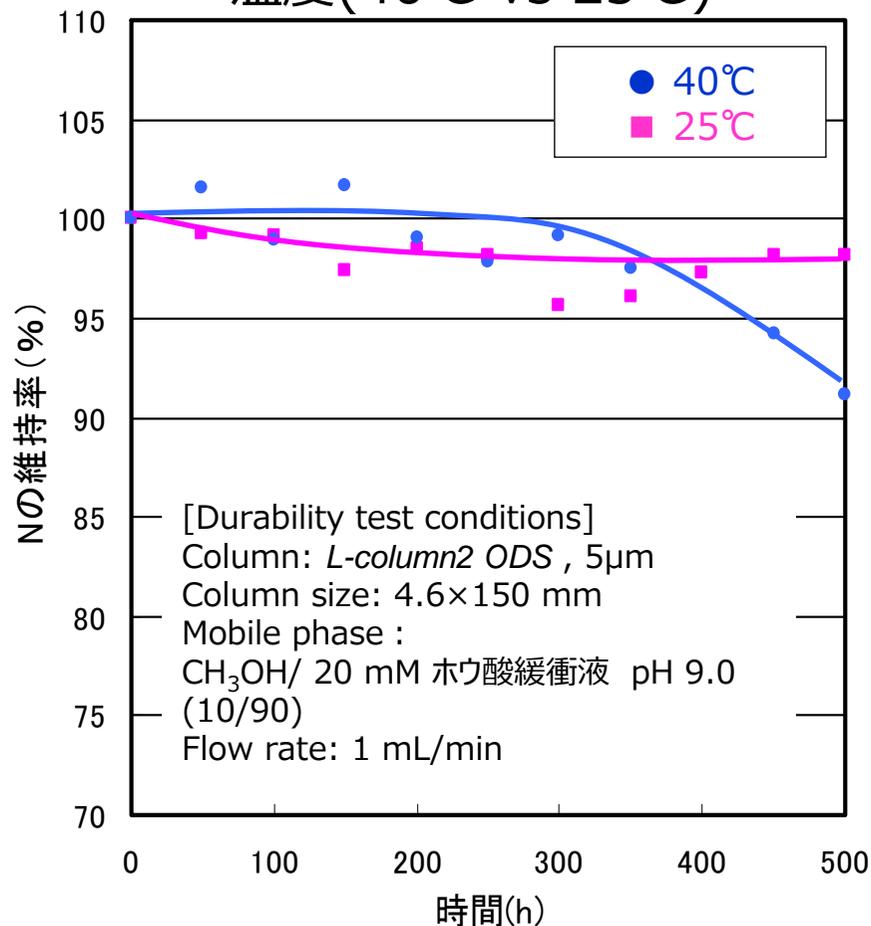
→ 移動相の条件見直し、ろ過、ガードカラム・プレカラムフィルター

カラムの劣化 pH9での有機溶媒比率と温度

メタノール比率(50% vs 10%)



温度(40 $^{\circ}$ C vs 25 $^{\circ}$ C)



有機溶媒比率が低い、温度が高い → 劣化しやすい

カラムの圧力上昇

症状: カラム圧が上昇し、ピーク割れが発生

カラム: *L-column2 ODS*, 3 μm

カラムサイズ: 4.6 \times 150 mm

使用期間: 2~3週間 (300時間以内)

移動相: アセトニトリル/リン酸緩衝液(pH 6.5) のグラジエント

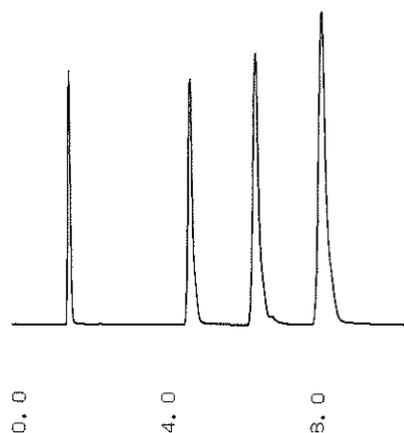
試料: 医薬品など

注入量: 5~10 μL

圧力上昇の原因は？

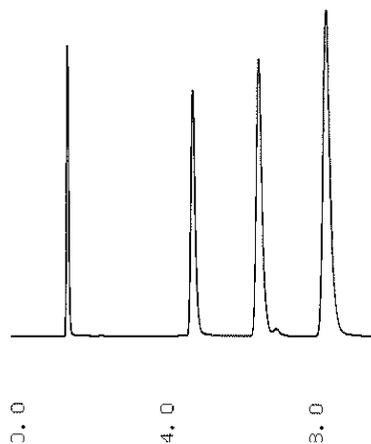
洗浄前

$N_{(4)} = 7000$
 $P = 17.5 \text{ MPa}$



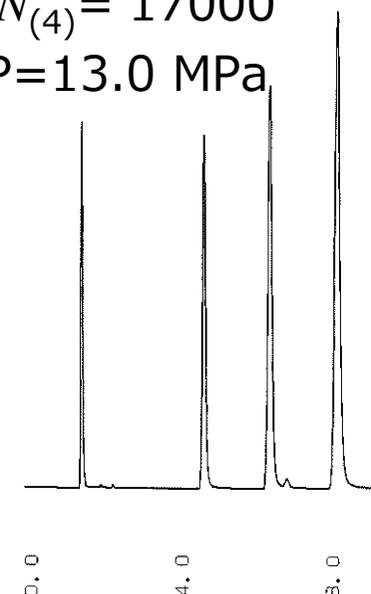
洗浄後

$N_{(4)} = 8500$
 $P = 17.0 \text{ MPa}$



フィルター交換後

$N_{(4)} = 17000$
 $P = 13.0 \text{ MPa}$



N : 理論段数

カラム入口側のエンドフィット内のフィルターを交換すると、カラム性能が回復した

原因: カラムの入口付近に不溶物が蓄積し、カラムが劣化した
 ↳ 試料由来? 移動相由来?

移動相の劣化

有機溶媒

- ▶ 分析時にノイズが大きくなる → 毎日調製

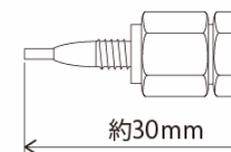
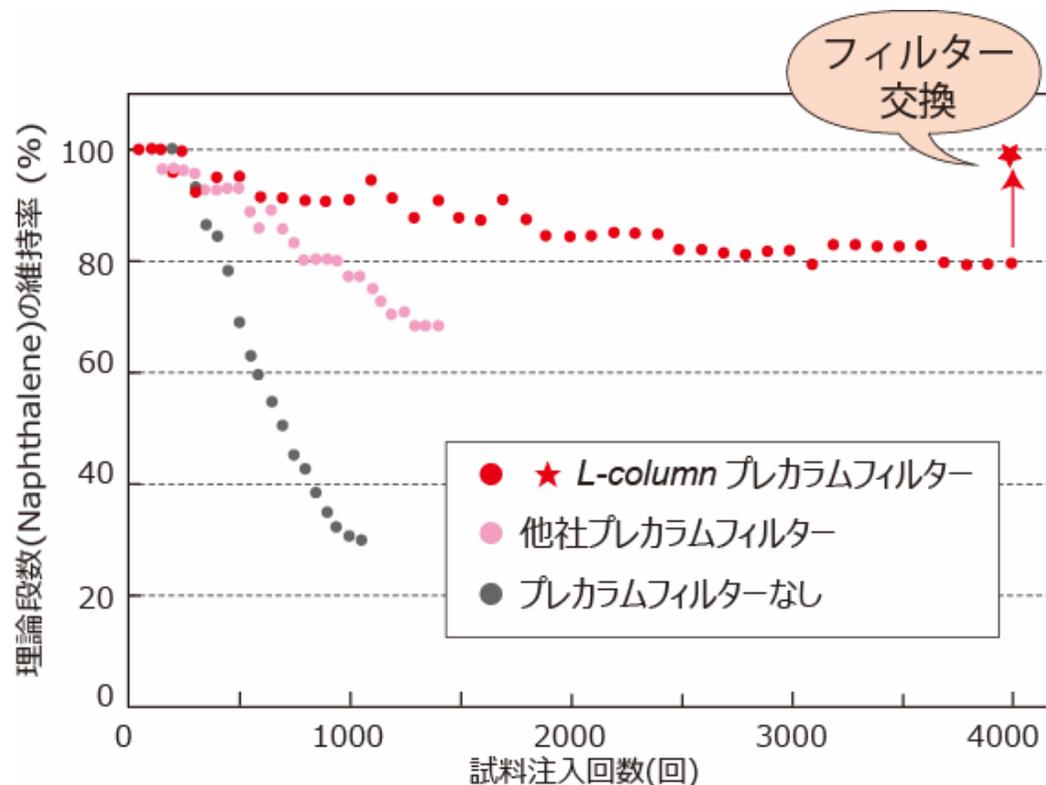
リン酸(緩衝液)

- ▶ 微生物が発生し、カラムを詰まらせる → 毎日調製

有機酸

- ▶ 酸が揮発し、濃度が変わる → 毎日調製

カラムの保護



L-column プレカラムフィルター

【 Analytical conditions 】

Column: L-column2 ODS, 2 μm; Column size: 2.1×100 mm

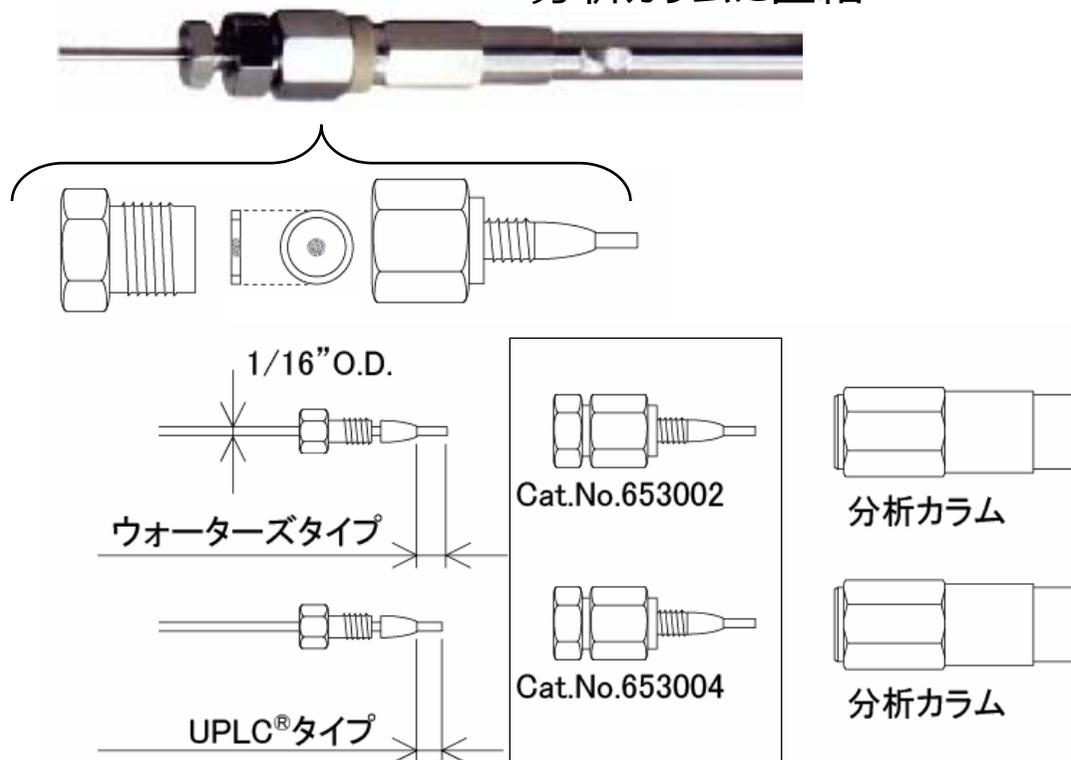
Mobile Phase: CH₃CN/H₂O (60/40); Flow rate: 0.4 mL/min; Temp. 40°C; Detection: UV 254 nm;

Inj.vol: 0.5 μL; Sample: ナフタレン

プレカラムフィルターの装着によりカラムの寿命が向上する

L-column プレカラムフィルターの構造

分析カラムに直結



- ▶ 死容積が小さい → 分離に影響なし
- ▶ フィルターのみ交換可能 → 低コストで経済的
- ▶ 接続タイプの変換 → UPLC接続からウォーターズ接続へ

カラムを長持ちさせるためには

充填剤の劣化を抑える(化学的要因)

- ▶ 移動相のpHは弱アルカリ性よりも酸性が良い
- ▶ 移動相の有機溶媒比率を高くする
- ▶ 緩衝液の濃度を薄く、無機系より有機系が良い
- ▶ カラム温度を低くする

カラムに不溶物を入れない(物理的要因)

- ▶ 移動相や試料をろ過する
- ▶ 注入量を少量に抑える
- ▶ 移動相はこまめに再調整する（特にリン酸緩衝液）
- ▶ ガードカラムやプレカラムフィルターを使用する
- ▶ 定期的にカラムを洗浄する

2.3 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-column2 ODS*, 4.6×150 mm

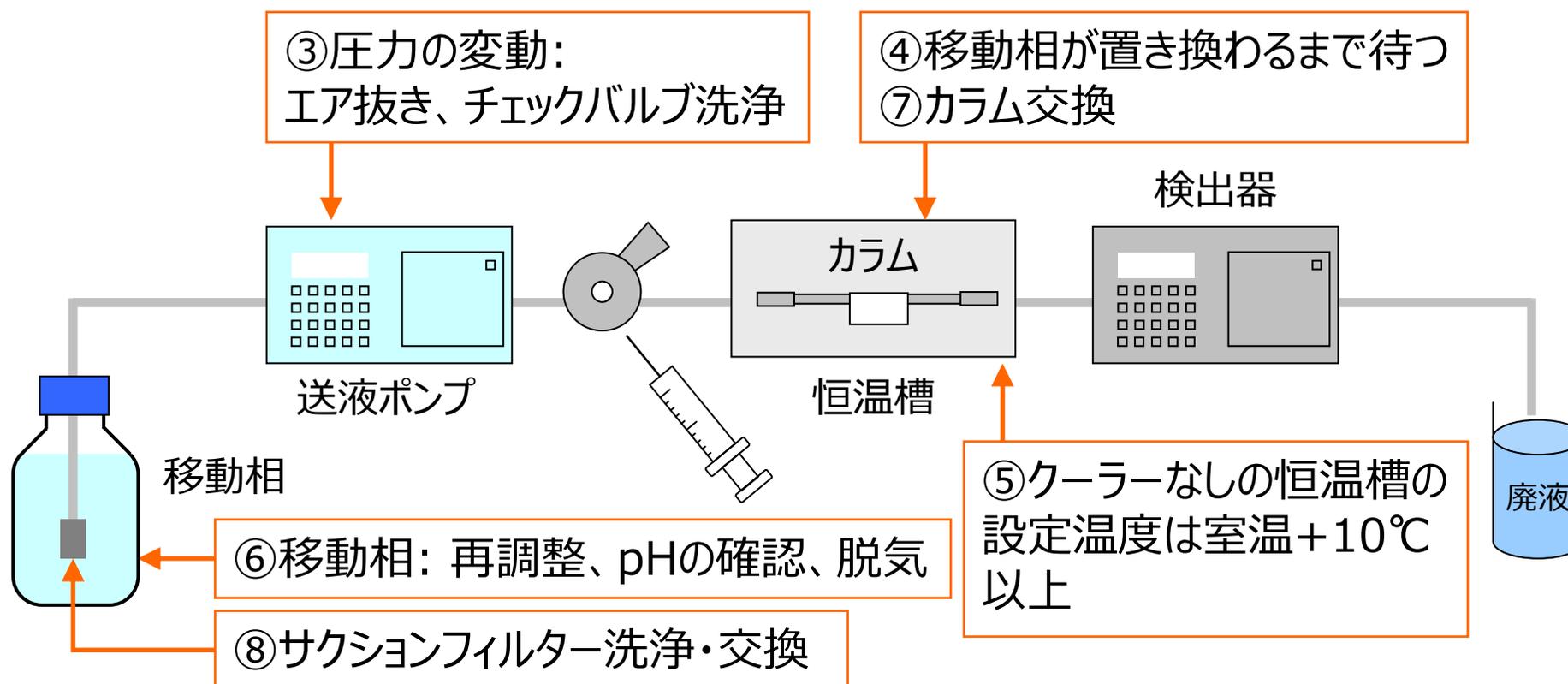
- | | |
|-------------------|-----------------|
| 1. 塩等を取り除いた移動相 | : メタノール/水 20/80 |
| 2. 有機溶媒の濃度を上げた移動相 | : メタノール/水 60/40 |
| 3. 有機溶媒100%の移動相 | : メタノール/水 100/0 |

- ▶ カラム容量の20倍程度の量で洗浄する(1 mL/minなら約30分)
- ▶ 塩を析出させない
- ▶ 脂溶性の夾雑物を多く含む試料の場合、THFで洗浄する
- ▶ *L-column* シリーズの場合、カラムを逆向きで洗浄することも有効(マイクロカラム以外)

2.4 保持時間の変化

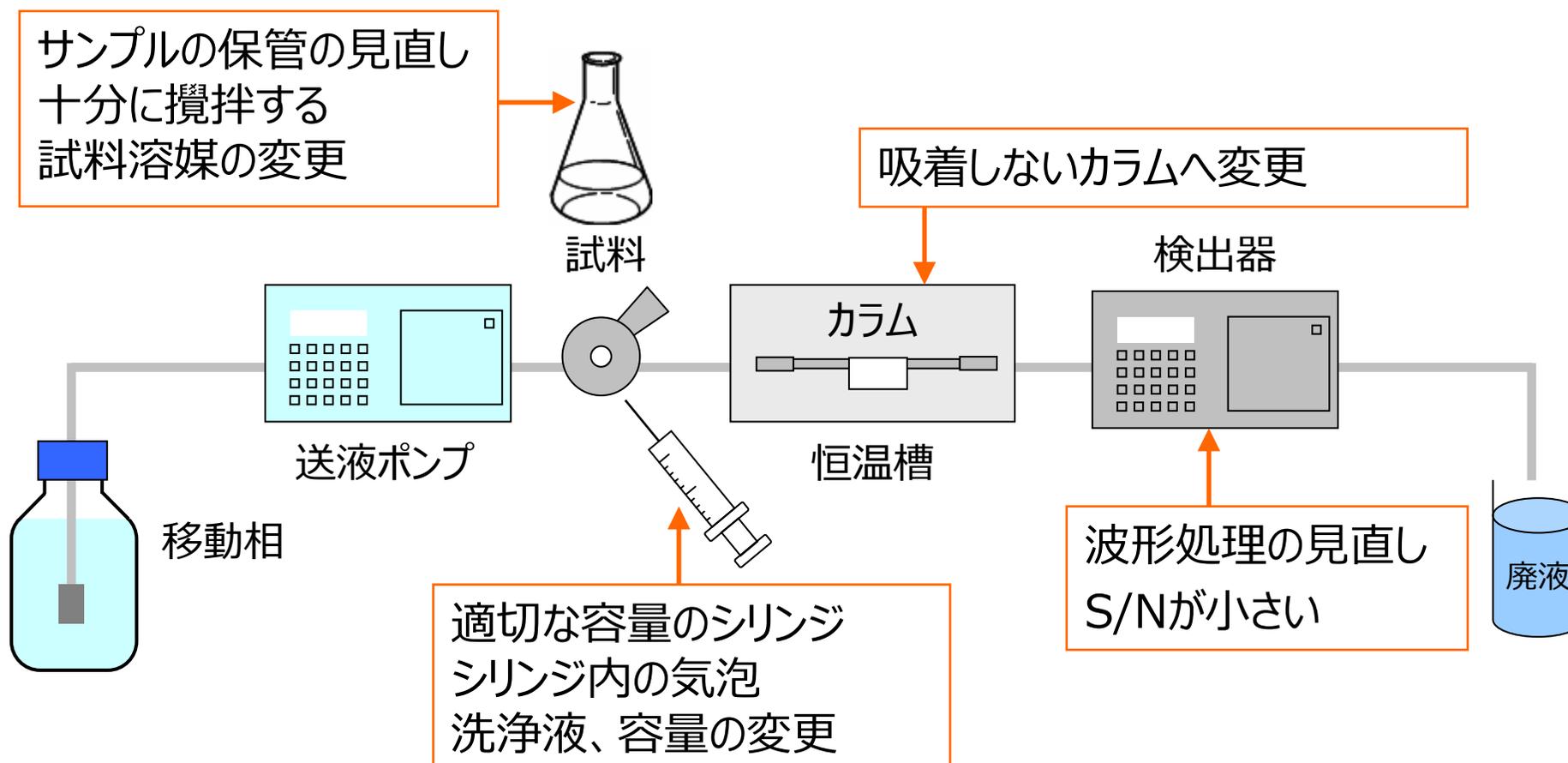
対処方法:

- 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



2.5 ピーク面積の変化

対処方法:



カスタマーサービスのご案内

デモコラム

- ▶ *L-column2* 及び *G-column* を対象に、購入前に最大2か月間、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
- ▶ ホームページアドレス <http://www.cerij.or.jp>

分析相談承ります

- ▶ *L-column* シリーズ、*G-column* を使用している方
- ▶ これから *L-column* シリーズ、*G-column* を使おうと考えている方

連絡先:

メール chromato@ceri.jp 電話代表 0480-37-2601