

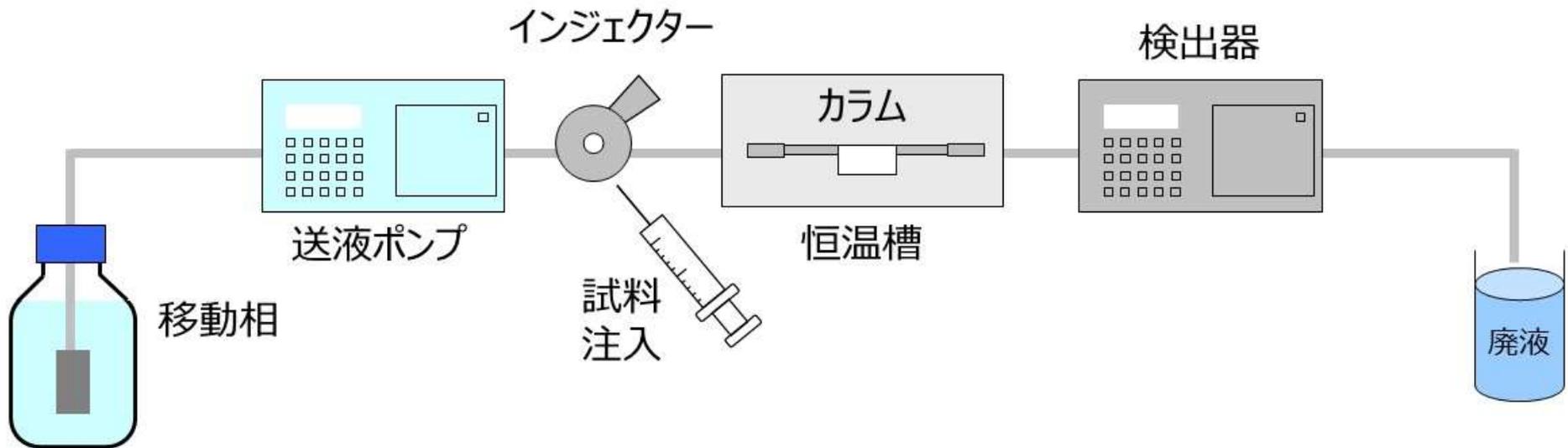
---

# ワンランク上の逆相HPLC分析のために 基礎からノウハウまで

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分析とは？

固定相に移動相よりも極性の低い物質を用いる  
液体クロマトグラフィーの手法  
⇒ 試料は疎水性の差に従って分離検出される



【逆相HPLCの装置概略】

# 移動相の調製

有機溶媒 と 水 を混合したもの

有機溶媒	水系	添加剤
アセトニトリル メタノール テトラヒドロフラン イソプロパノール エタノール etc……	水 緩衝液※1	イオン対試薬※2 キレート防止剤※3

※1 解離性物質の分析に使用する

※2 ピーク形状の悪い、保持の弱い及び解離を抑制できない物質の分析で使用  
イオン対を形成するアミンやスルホン酸塩などを用いる

※3 キレート化合物の分析で使用。EDTA(エチレンジアミン四酢酸)等を用いる

# 移動相の脱気

移動相に、常に気体が溶け込む

- ・ ポンプ内 → 流速が変動し、保持時間に誤差
- ・ カラム内 → 分離やピーク形状の悪化
- ・ 検出器(UV-VIS)内 → ベースラインにノイズやドリフト



これらのトラブルを防ぐため、脱気が必要

【例】オフライン脱気(アスピレーターによる減圧+超音波照射)

# 有機溶媒の選択

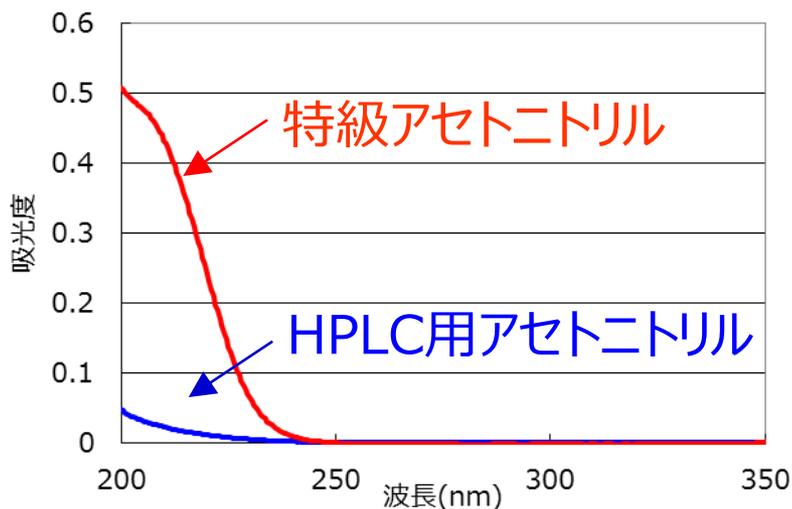
種類	長所	短所	備考
アセトニトリル	<ul style="list-style-type: none"> <li>カラム圧が低い</li> <li>UV吸収が低い</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>最も汎用</li> <li>3 <math>\mu\text{m}</math>以下のカラムに最適</li> </ul>
メタノール	<ul style="list-style-type: none"> <li>安価</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>UV吸収がある</li> <li>カラム圧が高くなる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>UV 250 nm以上の波長</li> </ul>
テトラヒドロフラン	<ul style="list-style-type: none"> <li>溶出力: 大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PEEKチューブを劣化させる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>試料が溶出しないときや、分離パターンを変えたいとき</li> </ul>
イソプロパノール エタノール	<ul style="list-style-type: none"> <li>溶出力: 大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>カラム圧が高くなる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>試料が溶出しないときや、分離パターンを変えたいとき</li> </ul>



HPLC用溶媒を使用すること

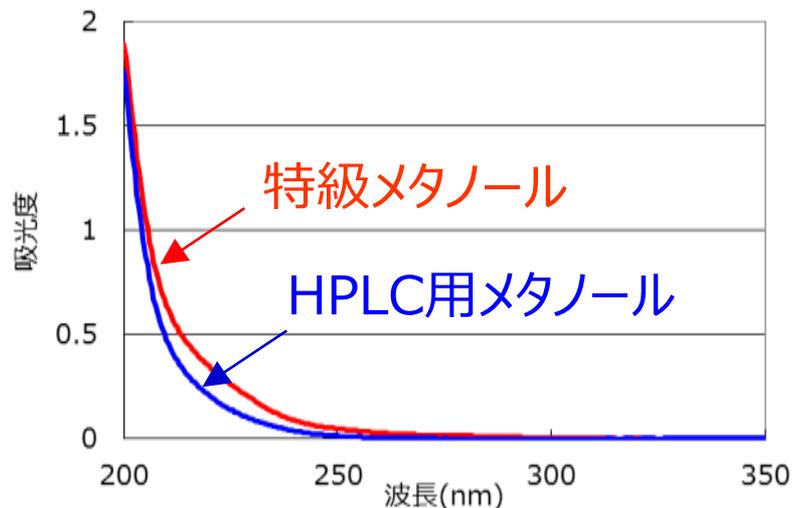
汎用のUV検出器の性能を妨害しないよう  
品質が管理されている

# 有機溶媒の規格とUV吸収の関係



## HPLC用アセトニトリル

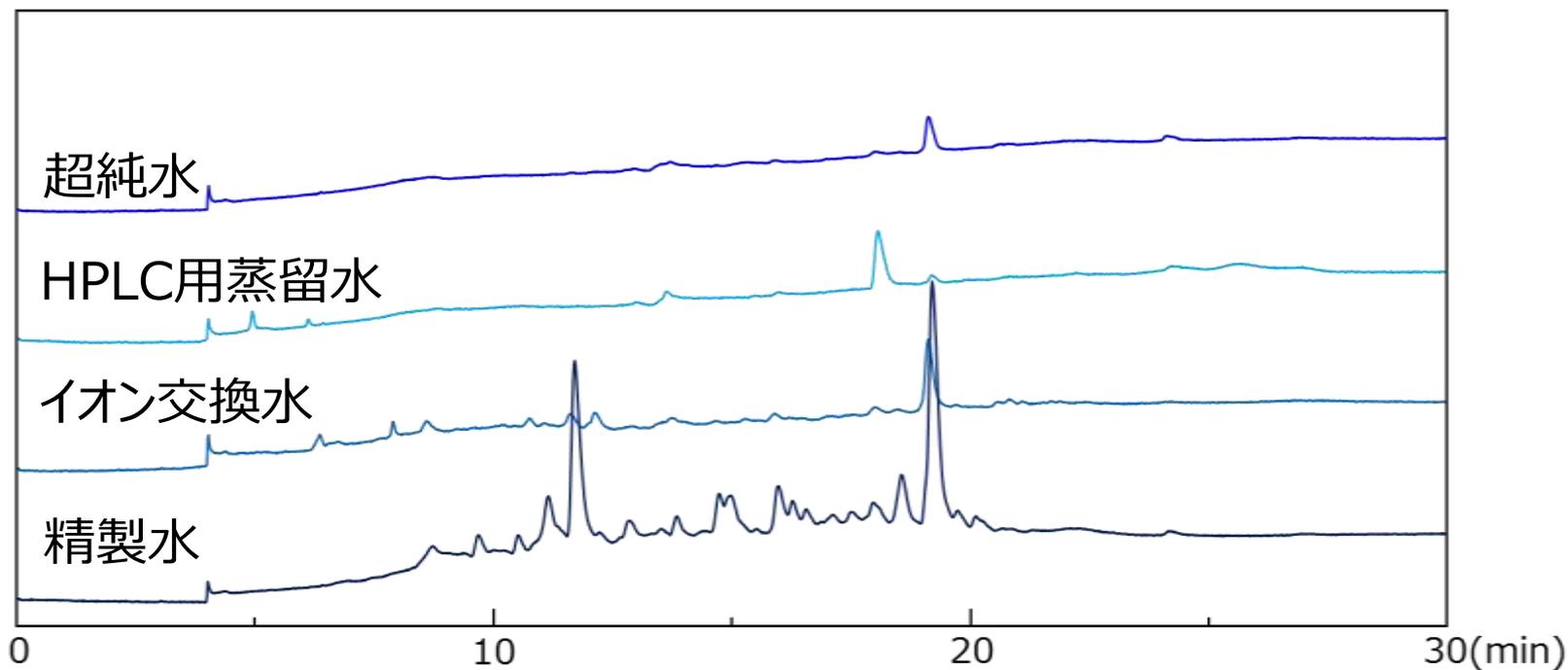
- 吸光度、相対蛍光強度、グラジエントの規格があり、低波長 (250 nm以下)での吸光度が低い



## HPLC用メタノール

- 吸光度、相対蛍光強度の規格がある
- グラジエントの規格はない

# 水の選択



【分析条件】 カラム: *L-column ODS*, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.  
移動相: アセトニトリル/水(10/90 $\rightarrow$ 100/0, 0 $\rightarrow$ 30 min); 流速: 1 mL/min

分析精度を落とさぬようHPLC用蒸留水 or 超純水を推奨

# 緩衝液とは？

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持つ溶液

弱酸 + 共役塩基     $\text{H}_3\text{PO}_4$  と  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$

or

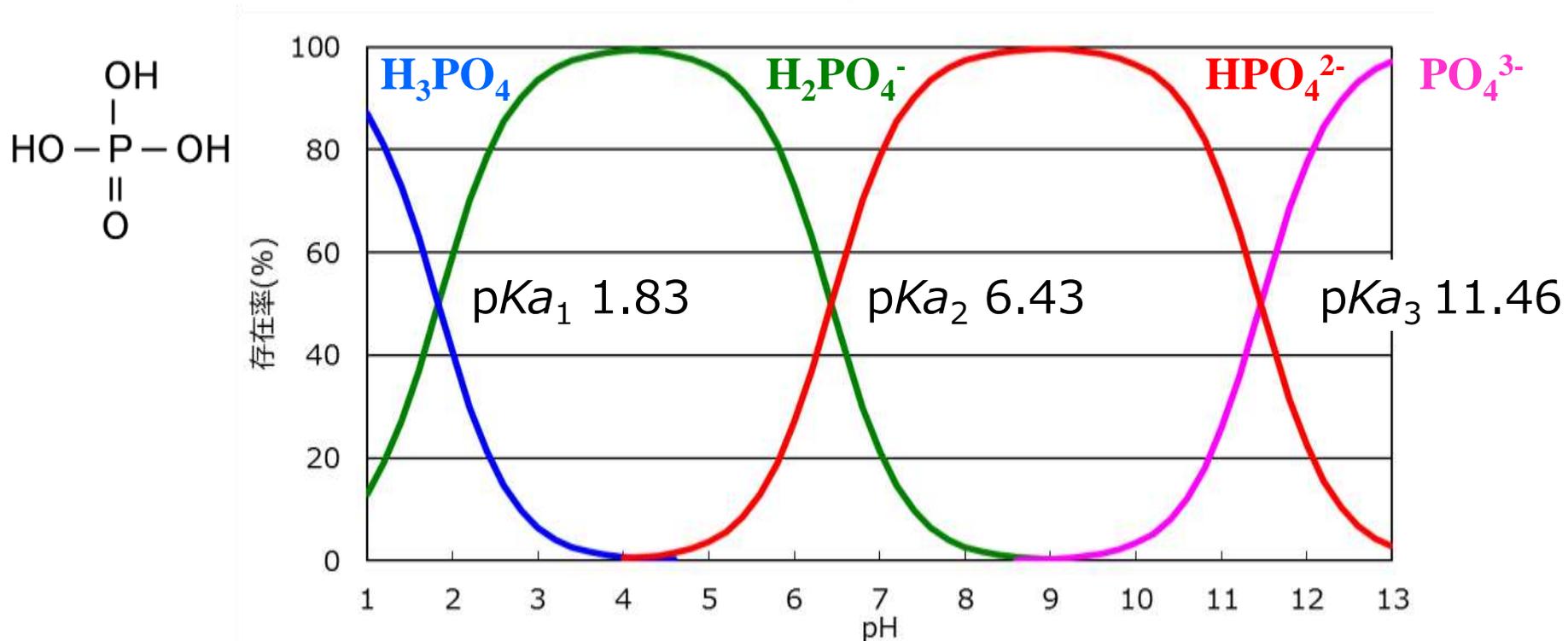
弱塩基 + 共役酸     $\text{NH}_3$  と  $\text{NH}_4^+$

例: リン酸緩衝液(pH 1.83付近のとき)



# リン酸の解離、非解離状態の存在率

(リン酸の  $pK_a$  1.83、6.43、11.46)



緩衝作用が働く条件

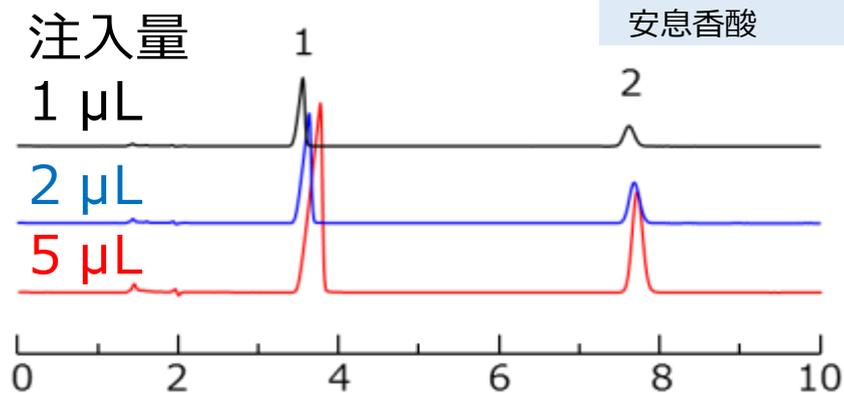
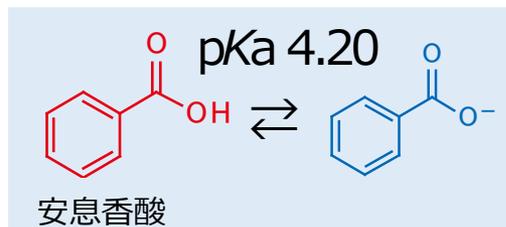
弱酸と共役塩基が共存(1:1のときが最大)

pH が 弱酸の $pK_a \pm$  約1の範囲

# 緩衝液の効果

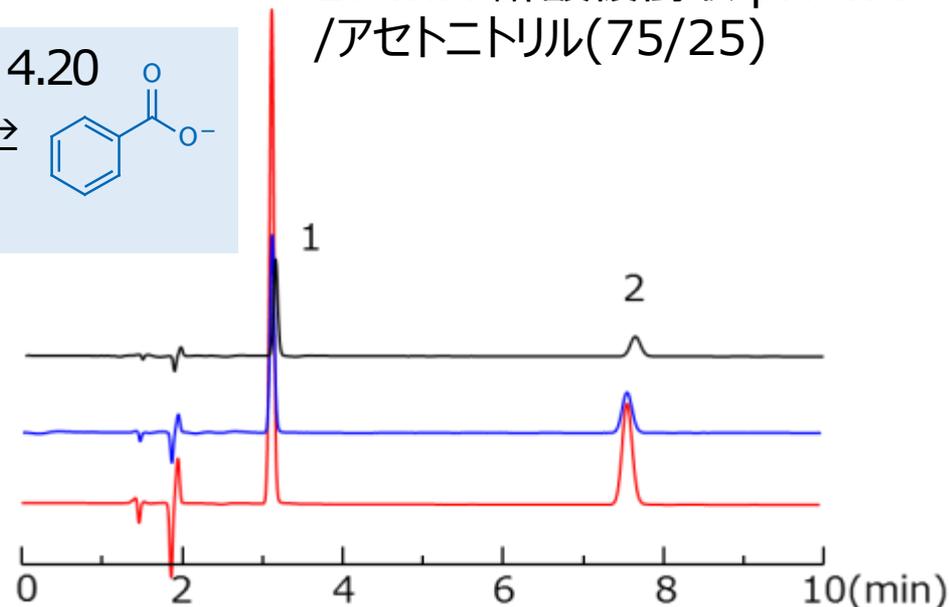
## a) 緩衝能なし

20 mM リン酸二水素カリウム pH 4.4  
/アセトニトリル(75/25)



## b) 緩衝能あり

20 mM 酢酸緩衝液 pH 4.4  
/アセトニトリル(75/25)



【分析条件】 カラム: *L-column2 ODS*, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.  
試料: 1. 安息香酸(100 mg/L), 2. メチルパラベン(100 mg/L)

- ・ ピーク形状がシャープ
- ・ 注入量の変化に対し保持時間が安定

# 緩衝液の効果

緩衝能の有無がロット間の再現性に及ぼす影響

ロット番号	緩衝能なし A)20 mM リン酸二水素カリウム		緩衝能あり B)20 mM 酢酸緩衝液	
	安息香酸の保持時間 (min)	分離度	安息香酸の保持時間 (min)	分離度
Lot. A	3.73	19.52	3.12	26.55
Lot. B	3.54	18.79	3.06	26.38
Lot. C	3.64	18.75	3.12	26.40
CV (%)	<b>2.53</b>	<b>2.28</b>	<b>1.14</b>	<b>0.35</b>

【分析条件】 カラム: L-column2 ODS, 5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.×150 mm L.; 移動相: A)20 mMリン酸二水素カリウム溶液 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: 2  $\mu$ L; 試料: 1. 安息香酸(100 mg/L), 2. メチルパラベン(100 mg/L)

解離性物質の保持時間や分離度の再現性を改善できる

# 代表的な緩衝液

添加剤	MS	pKa	pHの有効緩衝範囲	推奨使用条件
ギ酸	○	3.54	2.5~4.5	0.05~0.5%
酢酸	○	4.76	3.8~5.8	0.1~1.0%
重炭酸アンモニウム	○	9.87(HCO <sub>3</sub> ) 9.36(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) 6.11(CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	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	1.0~2.8 5.4~7.4	5~50 mM
ホウ酸	×	9.24	8.2~10.2	

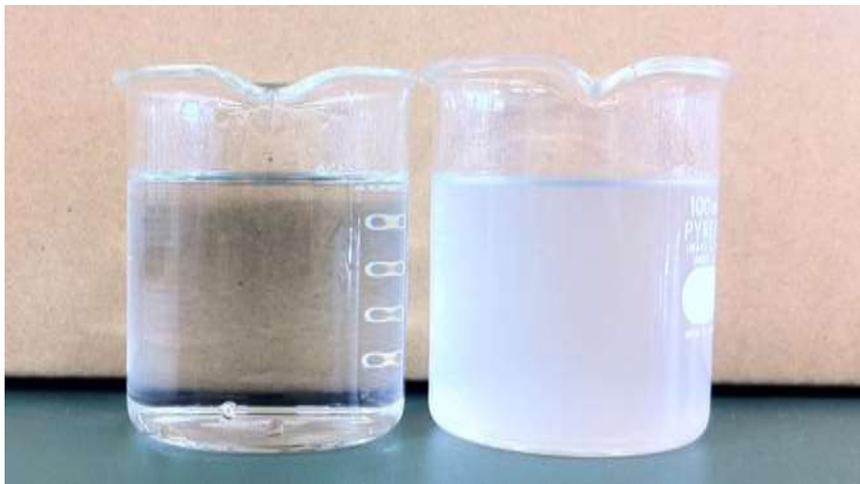
(液クロ文の巻及び化学便覧第5版より)

ただし、検出器に質量分析計(MS)を用いる場合は濃度10 mM(0.1%)以下を推奨

# 緩衝液 + 有機溶媒の注意点

塩を含む緩衝液を使用する場合・・・

有機溶媒比率がUP ⇒ 塩の析出が発生！



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

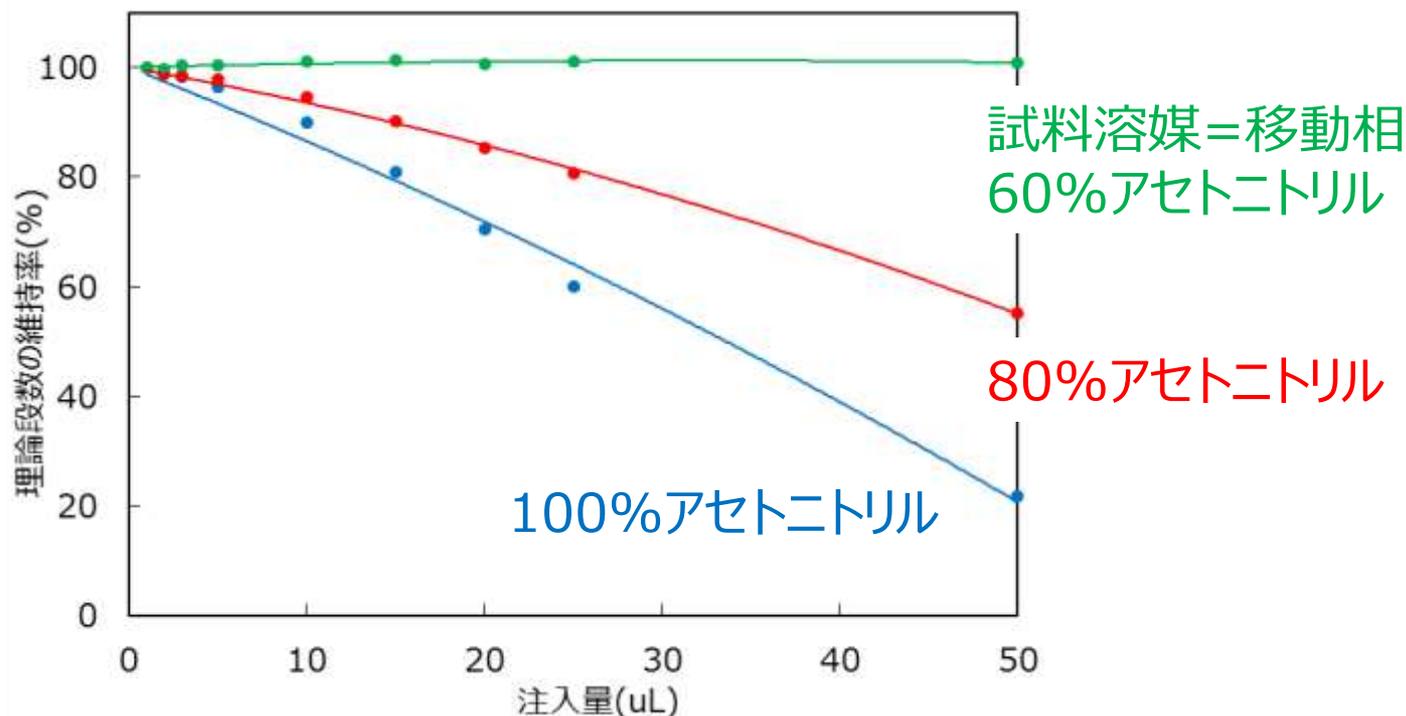
## 【実例】

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  
→ カラム圧力が20%上昇

- ・ グラジエント分析
- ・ カラム交換後
- ・ ポンプの送液不良時

塩が析出しないように注意

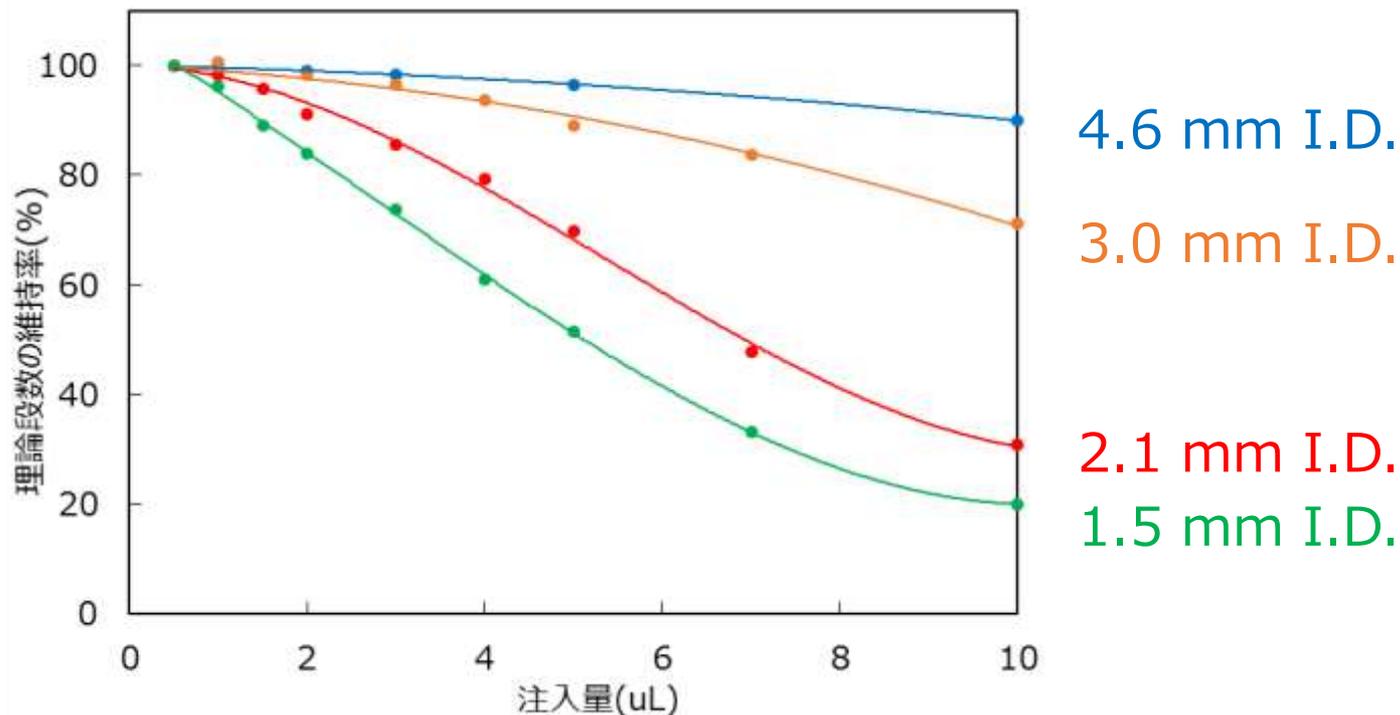
# 注入量の増加による理論段数の低下



【分析条件】 カラム: *L-column ODS*, 5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.  
移動相: アセトニトリル/水(60/40); 試料: ナフタレン(1000 mg/L)

移動相と同じ有機溶媒比率  $\Rightarrow$  理論段数が安定  
『試料溶媒 = 移動相』が基本

# カラム内径が注入量に及ぼす影響



【分析条件】 カラム: *L-column ODS*, 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm L.  
移動相: アセトニトリル/水(60/40); 試料: ナフタレン(1000 mg/L in アセトニトリル)

カラム内径が細かい程、理論段数の低下は顕著

# 試料溶媒がピーク形状に影響する理由

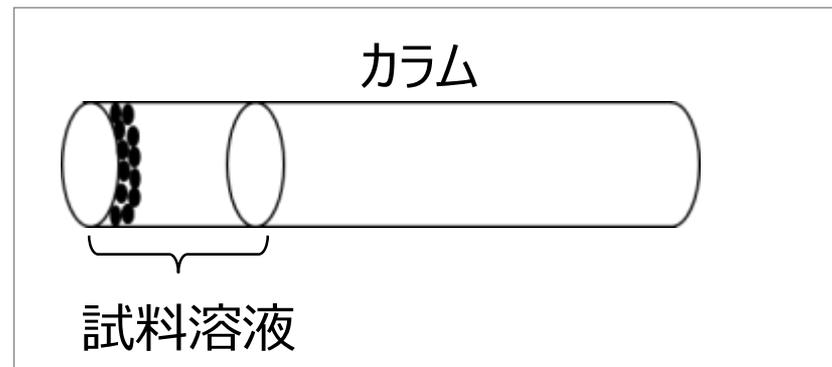
## 【試料溶媒：有機溶媒≫水】



あたかも  
溶出力の高い移動相として働く

⇒ カラム導入時に試料が保持されにくく、試料溶媒に流されバンド幅が広がる

## 【試料溶媒：水≫有機溶媒】

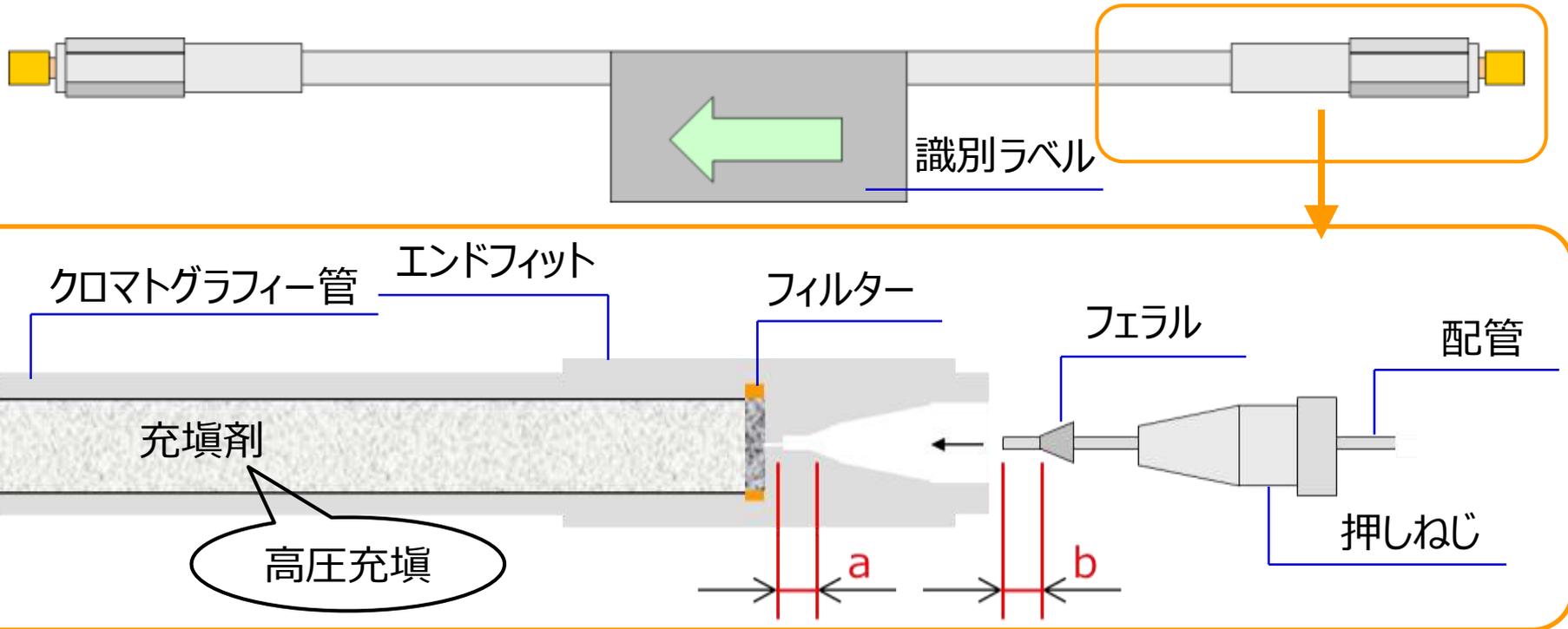


あたかも  
溶出力の低い移動相として働く

⇒ カラム導入時から試料がしっかり保持されるため濃縮効果がある

カラム導入時において試料溶媒は移動相として働く

# カラムの構造



【クロマトグラフィー管の材質】  
 一般的にはステンレス、ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)が多用

接続の種類

ウォーターズ接続:

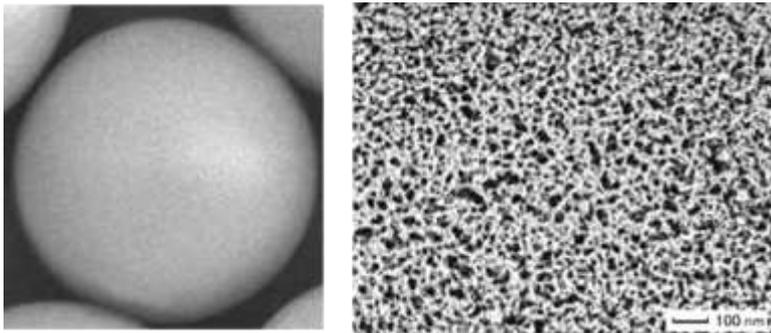
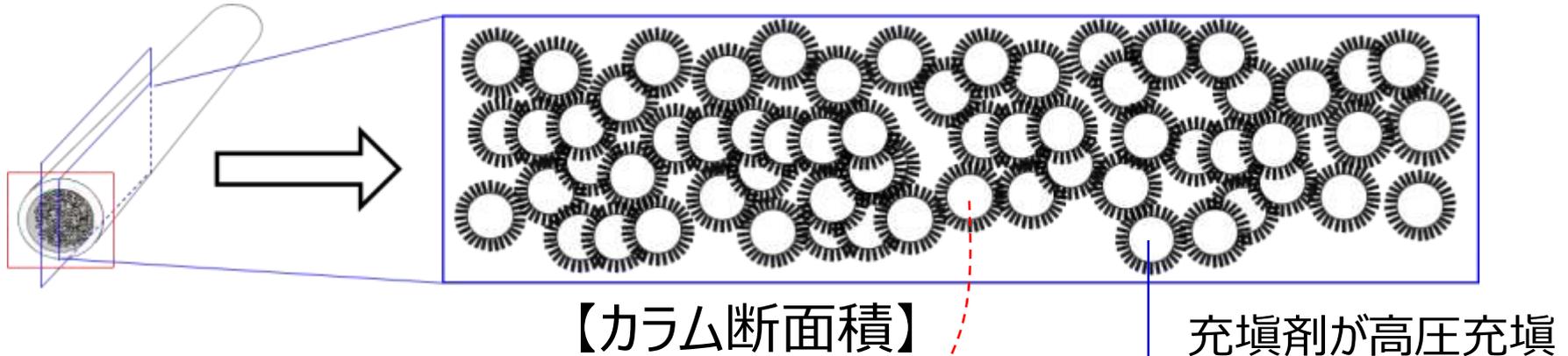
島津接続:

a, bの長さ

約3.5 mm

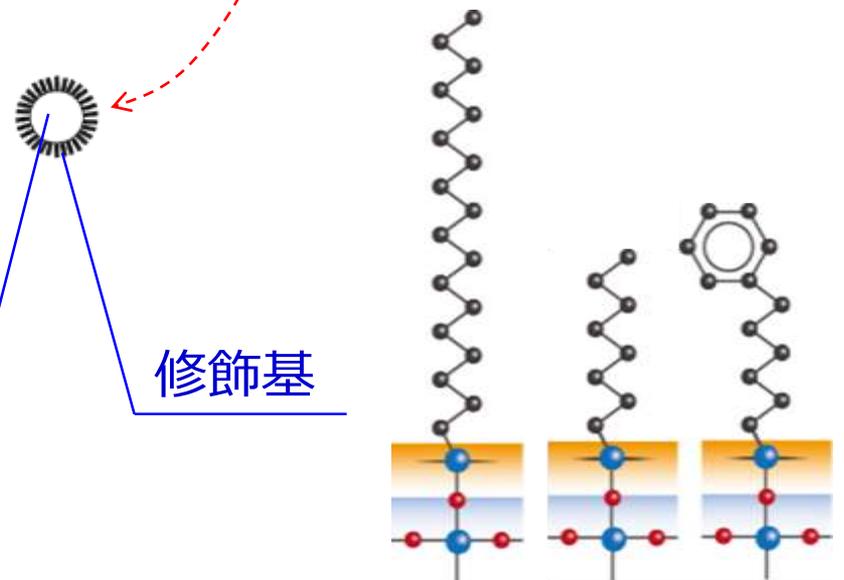
約2.3 mm

# 充填剤



シカゲル粒子(左)と表面の細孔(右)

基材(粒子径 : 1~20 μm)



C18

C8

フェニル

# 充填剤の選択

基材	機械的強度	理論段数	耐アルカリ性
シリカゲル	○	○	×
有機シリカゲル (メチル基、エチレン基導入)	△	△	△
ポリマー	×	×	○

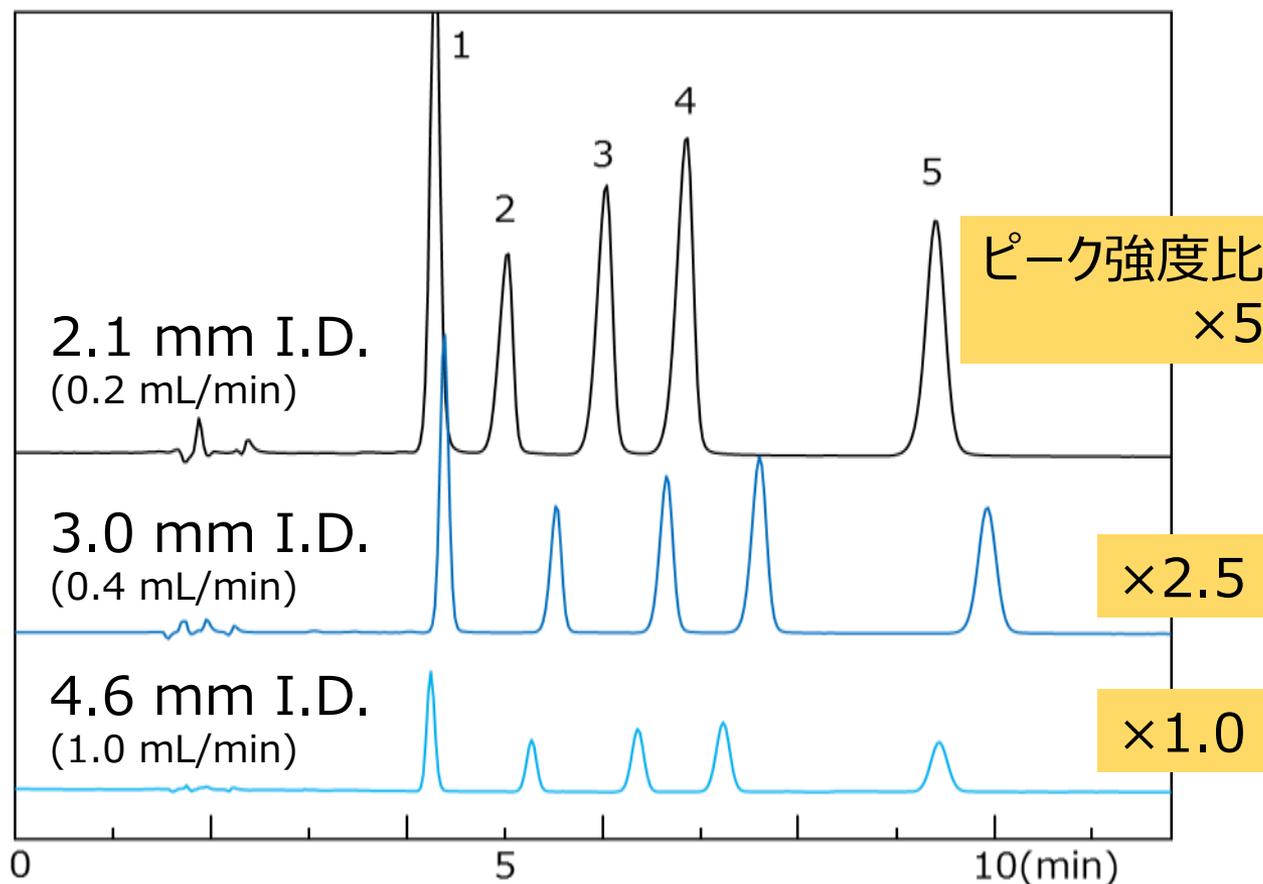
修飾基	特徴
C18	最も汎用
C8	C18と比べ疎水性の小さい物質を保持
フェニル	$\pi$ - $\pi$ 相互作用が加わる

## エンドキャッピング

各社独自の方法  
(実際には非開示)

吸着性(塩基性物質、配位性化合物)、耐久性、  
ロット間差に大きく寄与するためカラム性能を握る技術

# カラムの内径とピーク強度



## 【分析条件】

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

移動相: メタノール/5 mM 酢酸アン  
モニウム(20/80)

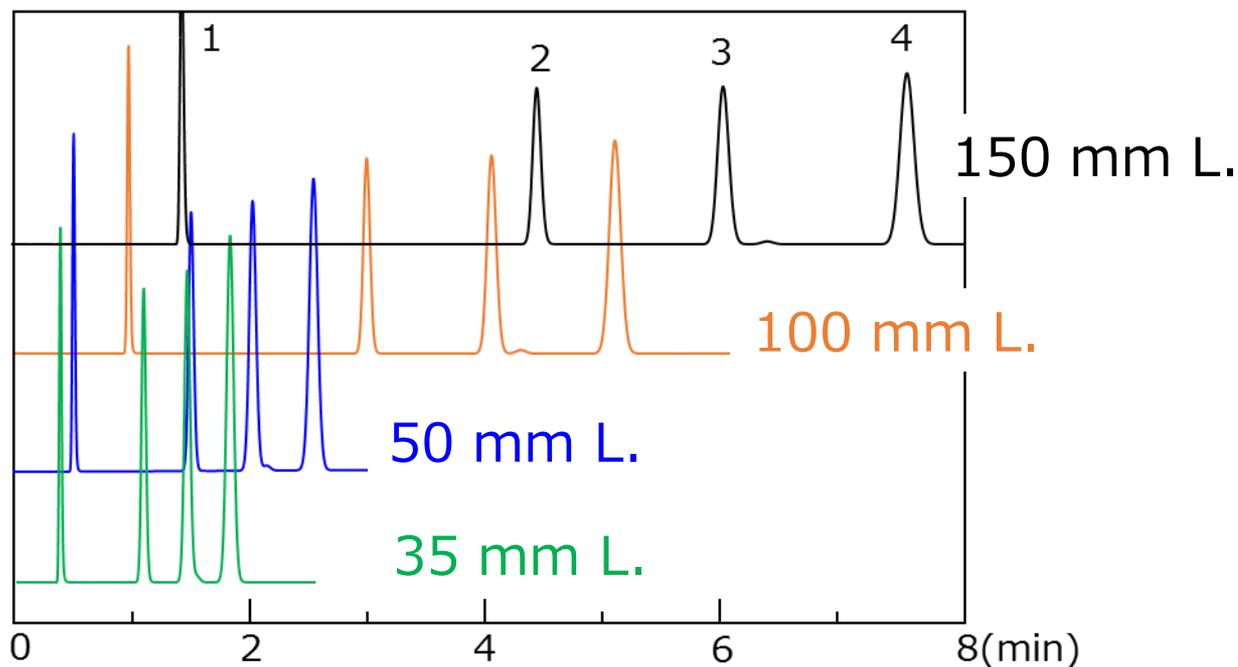
温度: 40°C

注入量: 5  $\mu\text{L}$

試料: 1. スルファチアゾール  
2. スルファメトキサゾール  
3. スルファモノメトキシ  
4. スルファドキシ  
5. スルファジミジン  
(5 mg/L)

同じ注入量なら、カラムでの試料の希釈が少ないため、  
内径が細かいほうが感度が良い

# カラム長さ



【分析条件】  
 カラム: L-column2 ODS, 5  $\mu$ m  
 4.6 mm I.D.  
 移動相: アセトニトリル/水(60/40)  
 流速: 1 mL/min  
 温度: 40°C  
 検出: UV 254 nm  
 注入量: 1  $\mu$ L  
 システム圧: 11.5 MPa  
 試料: 1. ウラシル  
 2. ベンゼン  
 3. トルエン  
 4. ナフタレン

長さ(mm)	$t_{R(4)}$ (min)	$N_{(4)}$	P(MPa) <sup>※</sup>
150	7.51	16495	3.9
100	5.03	11521	2.4
50	2.52	5466	1.1
35	1.79	3908	0.7

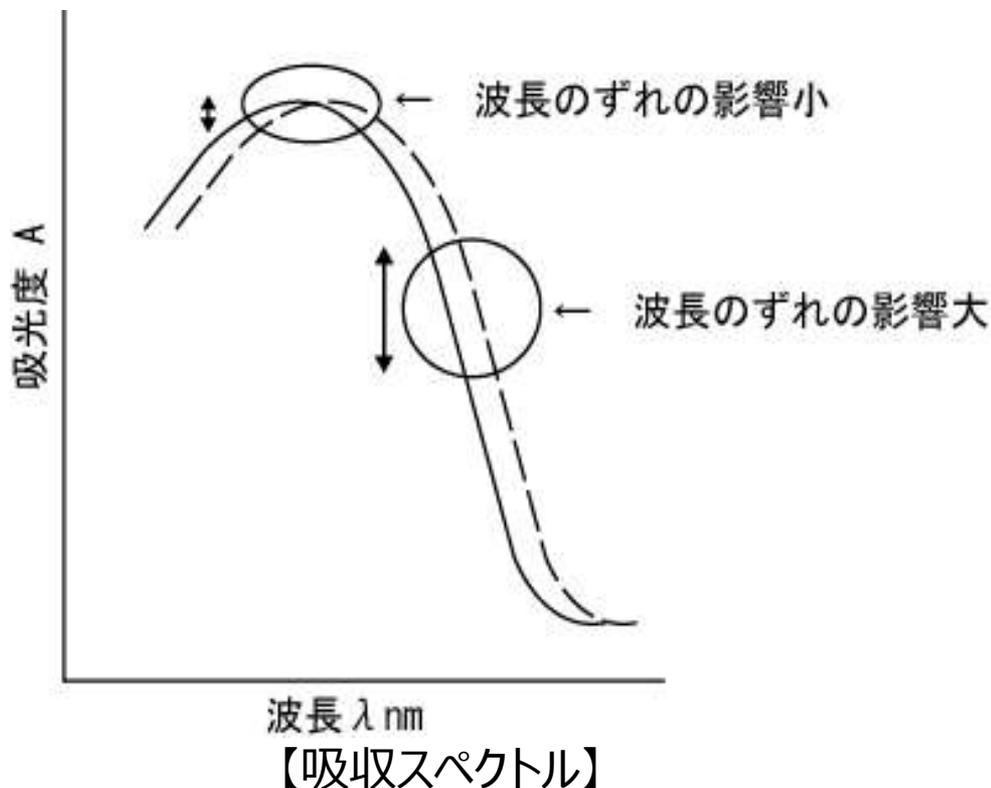
※: カラム圧 - システム圧

カラム長さに比例して  
理論段数が上がる  
(ただし圧力も上昇)

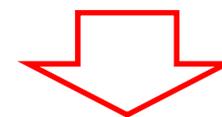
# 検出器の種類

検出器	長所	短所
紫外可視吸光光度検出器(UV/VIS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>多くの物質に対し感度あり</li> <li>汎用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>UV吸収のない化合物は適用できない</li> </ul>
示差屈折率検出器(RI)	<ul style="list-style-type: none"> <li>UV吸収の小さい脂肪族化合物、糖アルコールに適用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>感度がかかなり低い</li> <li>温度・流動変化に敏感</li> <li>グラジエント分析できない</li> </ul>
蛍光検出器	<ul style="list-style-type: none"> <li>高感度(UV検出器の10~100倍)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>蛍光ラベル化が必要</li> <li>検出セルの耐圧が弱い</li> </ul>
電気化学検出器	<ul style="list-style-type: none"> <li>高感度(≧蛍光検出器)</li> <li>カテコールアミン類、フェノール類、生体成分の高感度定量</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>温度や圧変動に敏感</li> <li>検出セルの耐圧が弱い</li> </ul>
質量分析計	<ul style="list-style-type: none"> <li>MSスペクトルが得られる</li> <li>特定の質量数の選択的検出により高感度、高選択的な定量が可能</li> <li>妨害成分の多い環境試料や生体試料中の薬物や代謝物の定量に威力を発揮</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高価</li> <li>塩の析出するような移動相は使用できない</li> </ul>

# 検出波長の設定



わずかな波長のずれで  
吸光度に影響する

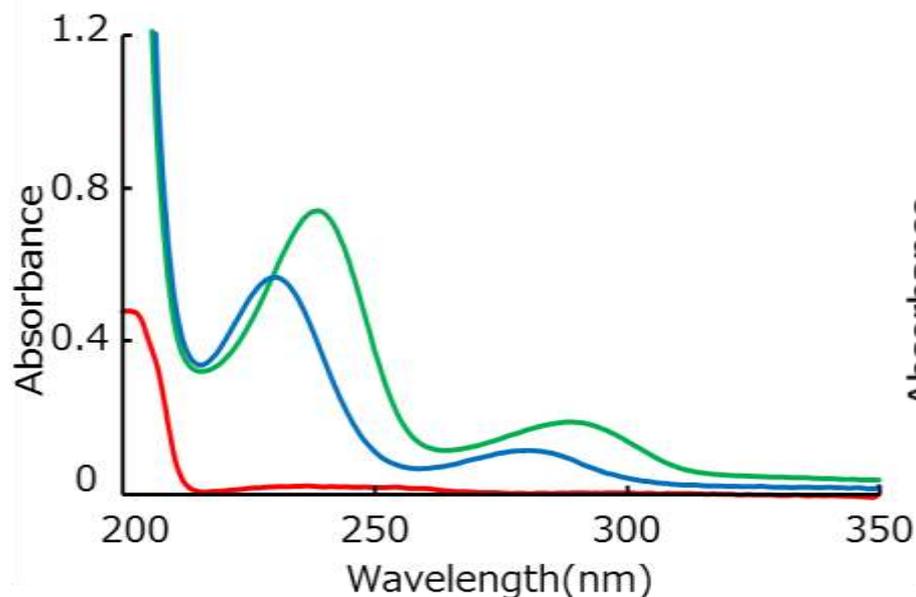


- 定量の再現性に問題
- 機種間差が大

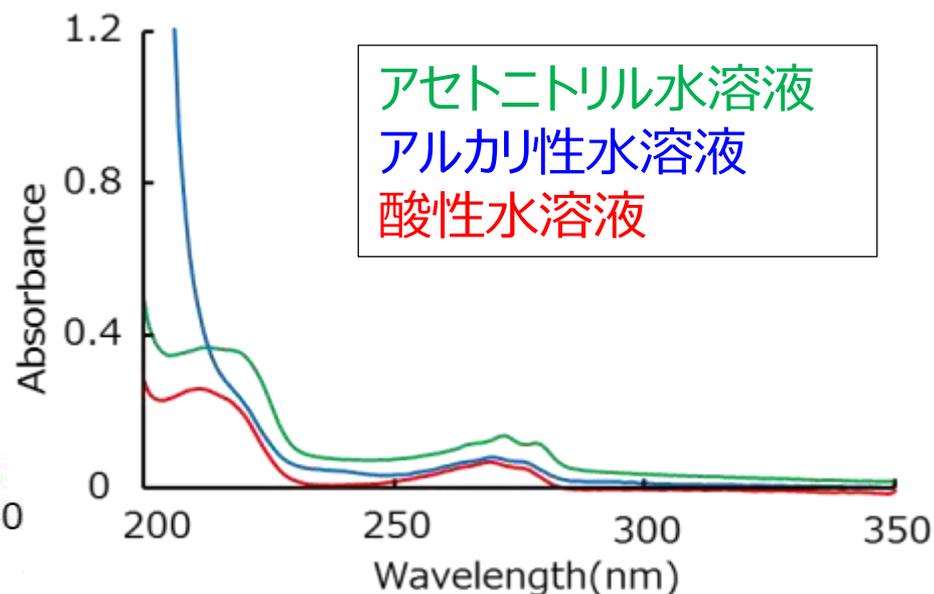
吸収スペクトルのピークトップを選択

# 解離性物質の吸収スペクトル

解離する物質は、溶媒のpHによりUV吸収が変化する場合がある



【アニリンの吸収スペクトル】



【フェノールの吸収スペクトル】

分析で使用する移動相を溶媒に用いて、  
UV吸収を測定するのが良い

# 分離の改善の理論

2成分の分離の程度は分離度  $R_s$  で表わされる  
( $R_s > 1.5$ で完全分離)

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{1 + k}$$

$R_s$  : 分離度  
 $N$  : 理論段数  
 $\alpha$  : 分離係数  
 $k$  : 保持係数

$N$ : 理論段数  $N = 5.54 \times \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)$

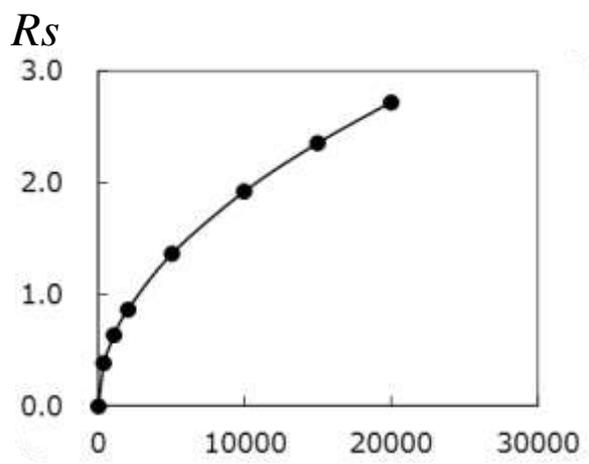
$\alpha$ : 分離係数  $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$

$k$ : 保持係数  $k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

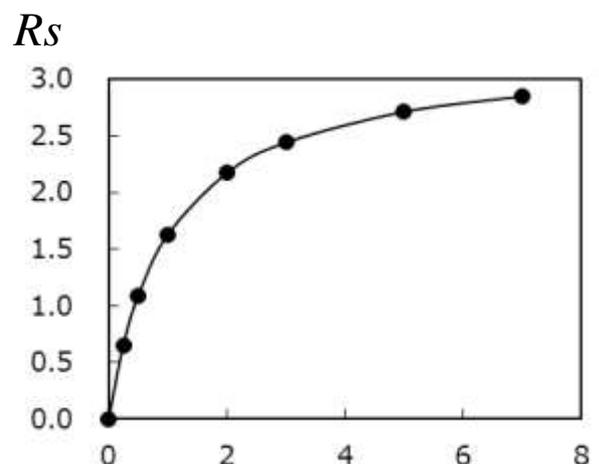
$t_R$  : 保持時間  
 $W_{1/2}$  : ピークの半地幅  
 $t_0$  : 移動相のカラム通過時間

分離を改善するためには  $N$ 、 $\alpha$ 、 $k$  を上げれば良い

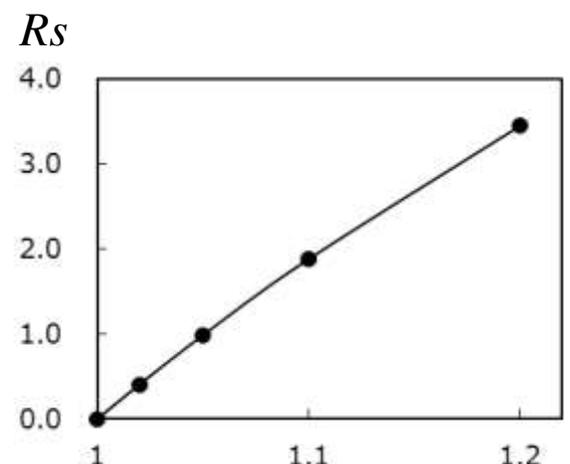
# 分離を改善する方法 ( $N$ 、 $\alpha$ 、 $k$ )



理論段数  $N$



分離係数  $\alpha$

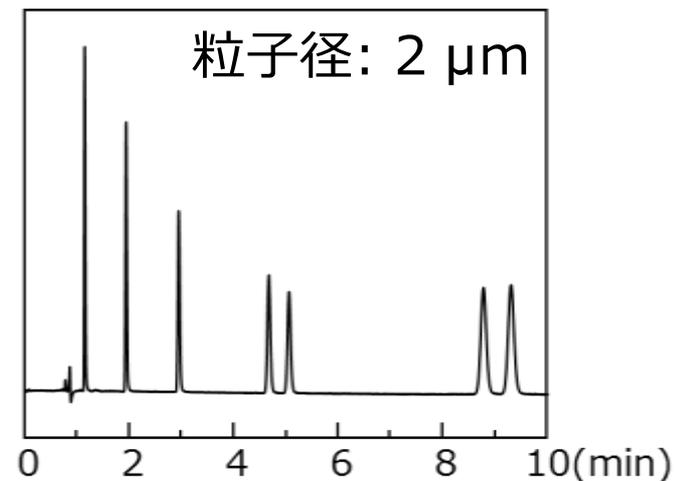
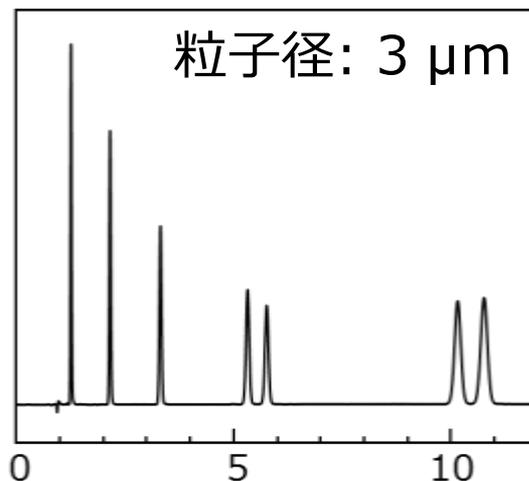
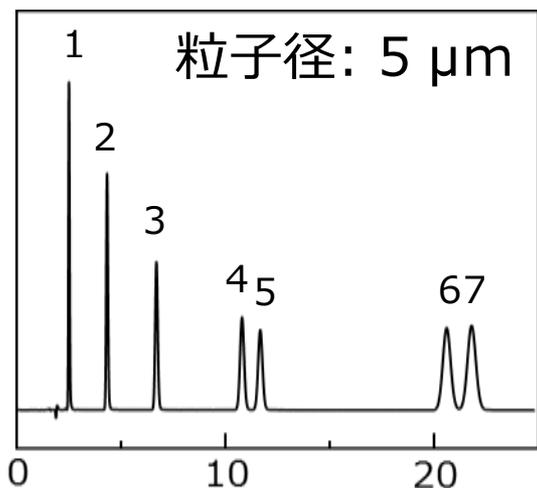


保持係数  $k$



<p>充填剤の粒子径</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 分布が狭い(<math>d_{10}/d_{90}</math>が1に近い)</li> <li>• 微小化</li> </ul>	<p>移動相の種類組成 pH } を変える</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 温度を変える</li> <li>• カラムを変える</li> </ul>	<p>移動相の水系の比率を増やし調整 (<math>k &lt; 2</math>の範囲で有効)</p>
<p>エンドキャッピングが優れておりテーリングしない</p>		
<p>カラムを長くする(ただし圧が上昇)</p>		

# 充填剤の粒子径の微小化

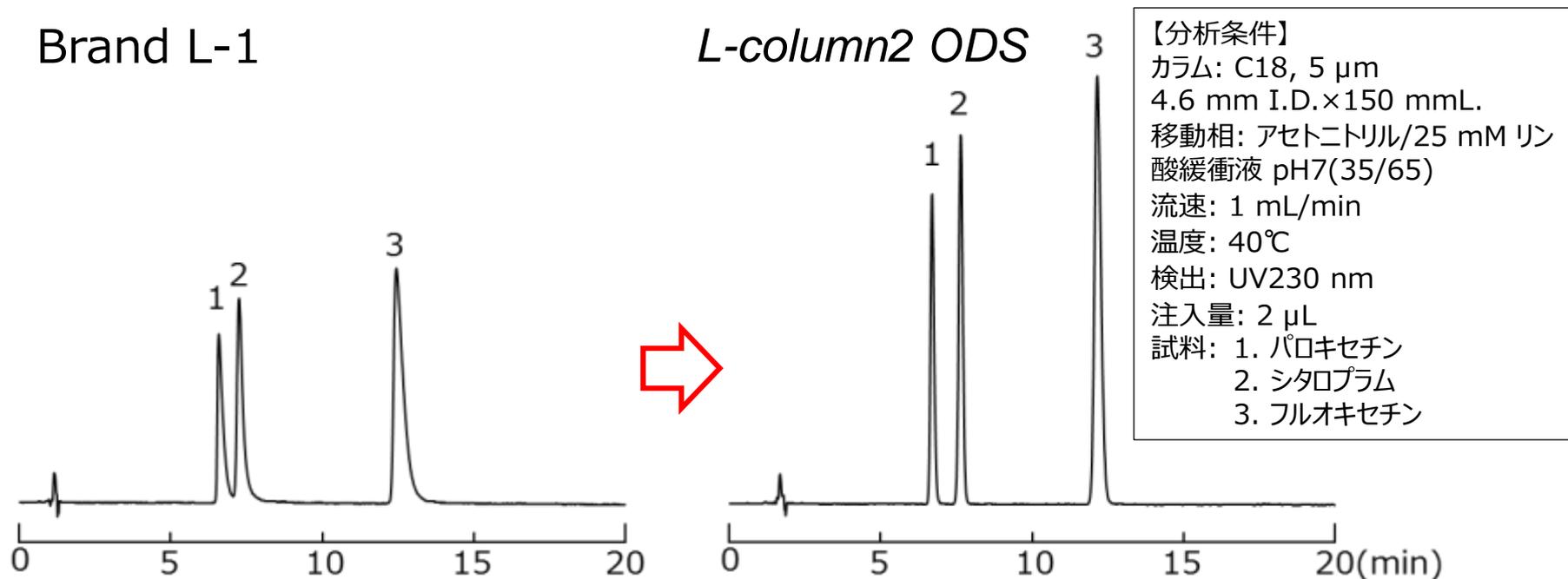


粒子径	流速(mL/min)	$t_{R(7)}$ (min)	$N_{(7)}$	$R_{S(6,7)}$	P(MPa)
5 $\mu\text{m}$	0.2	22.0	12813	1.60	4.0
3 $\mu\text{m}$	0.4	10.8	21543	2.13	23.5
2 $\mu\text{m}$	0.5	8.4	30619	2.55	54.2

【分析条件】 カラム: *L-column2 ODS*, 2.1 mm I.D.×150 mm L.; 移動相: アセトニトリル/20 mM リン酸(50/50); 温度: 25°C; 検出: UV 254 nm; 注入量: 0.5  $\mu\text{L}$ ; 試料: 1. *p*-ヒドロキシ安息香酸, 2. *p*-ヒドロキシ安息香酸メチル, 3. *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル, 4. *p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル, 5. *p*-ヒドロキシ安息香酸プロピル, 6. *p*-ヒドロキシ安息香酸イソブチル, 7. *p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル

粒子径を小さくすると、理論段数が高くなり、分離度が向上する

# エンドキャッピングの優れたカラムによる分離

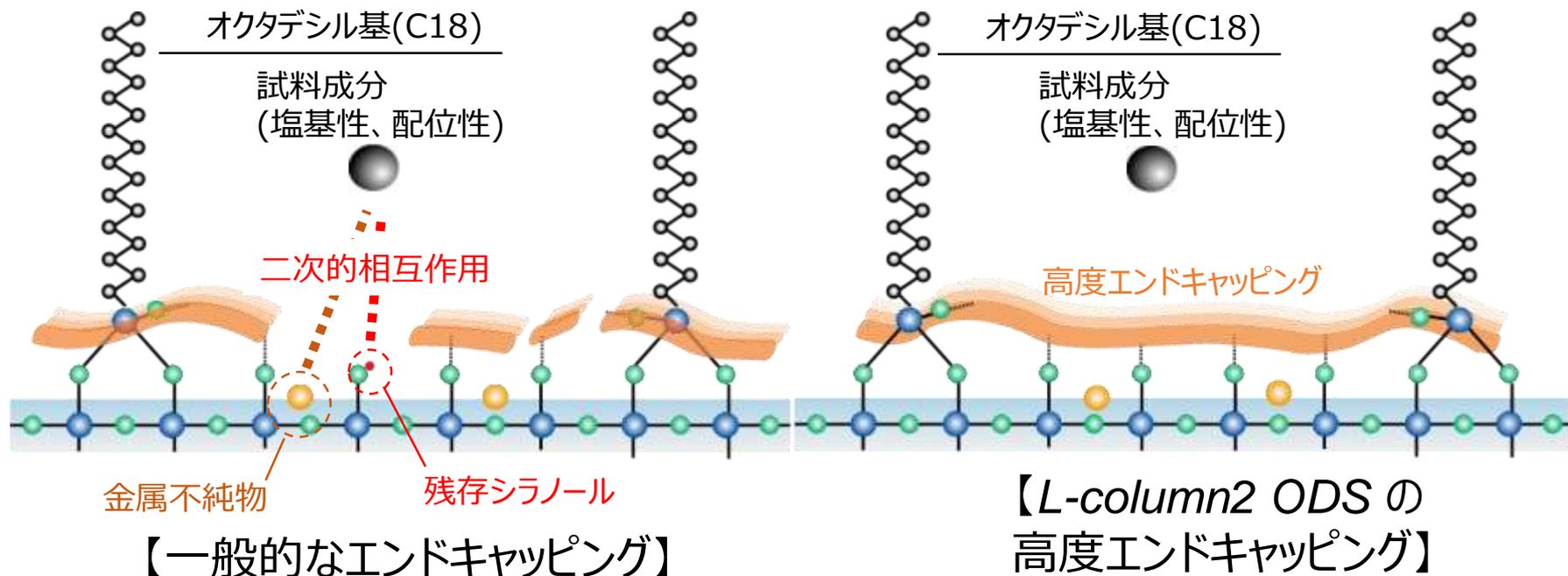


Brand	$N_{(2)}$	$R_{s(1,2)}$
L-column2 ODS	14900	3.99
Brand L-1	6400	2.05

Application No.L2052

エンドキャッピングが優れたカラムへ変更することで分離が改善される

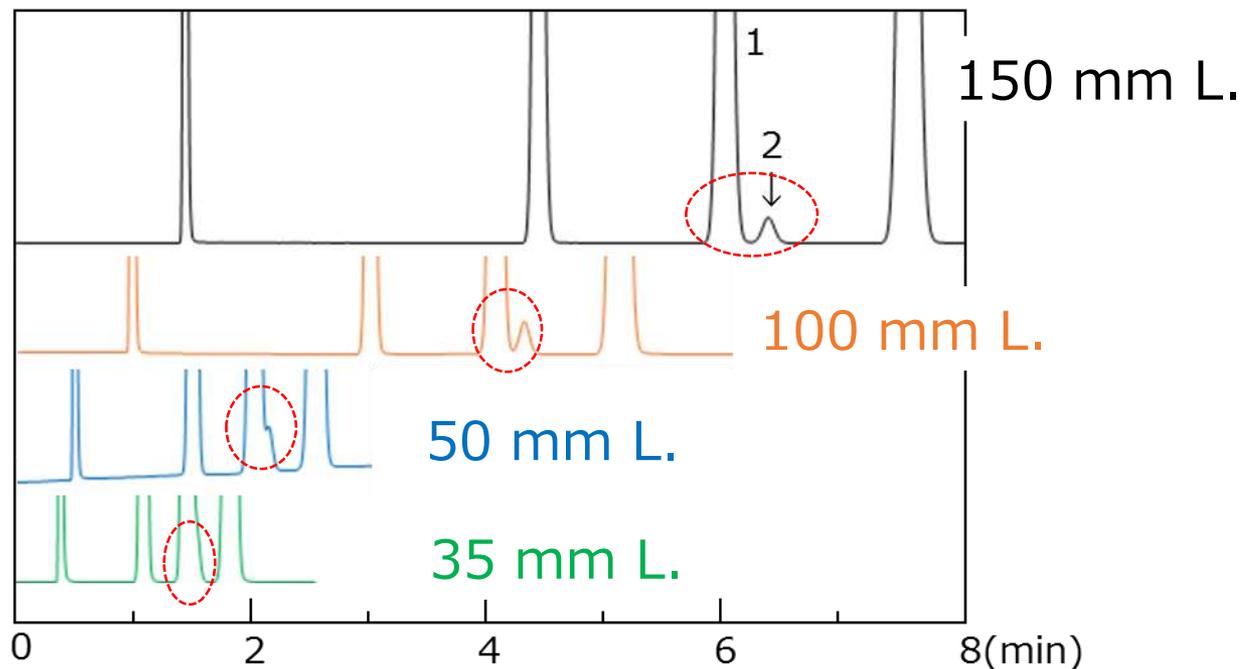
# エンドキャッピングが優れるとテーリングしない理由



塩基性物質や配位性化合物は、シリカゲル表面の残存シラノール、金属不純物に吸着する

エンドキャッピングが優れると、残存シラノールや金属不純物などの吸着点が不活性化されるため、テーリングしない

# カラムを長くする

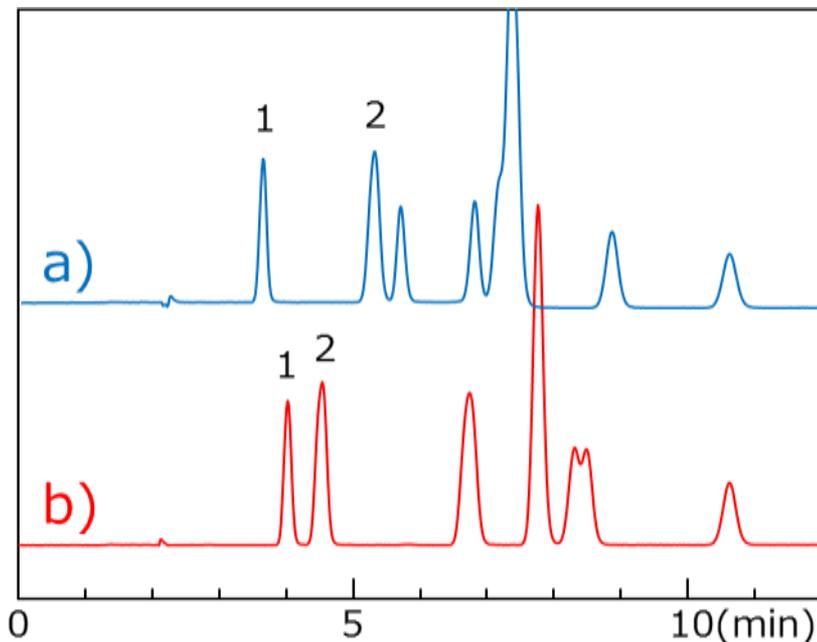


【分析条件】  
 カラム: L-column2 ODS, 5  $\mu$ m  
 4.6 mm I.D.  
 移動相: アセトニトリル/水(60/40)  
 流速: 1 mL/min  
 温度: 40°C  
 検出: UV 254 nm  
 注入量: 1  $\mu$ L  
 試料: 1. トルエン  
 2. 不純物

長さ(mm)	$R_{s(1,2)}$
150	1.99
100	1.69
50	0.65
35	0.47

カラムを長くすることで  
分離が改善

# 移動相の種類を変える



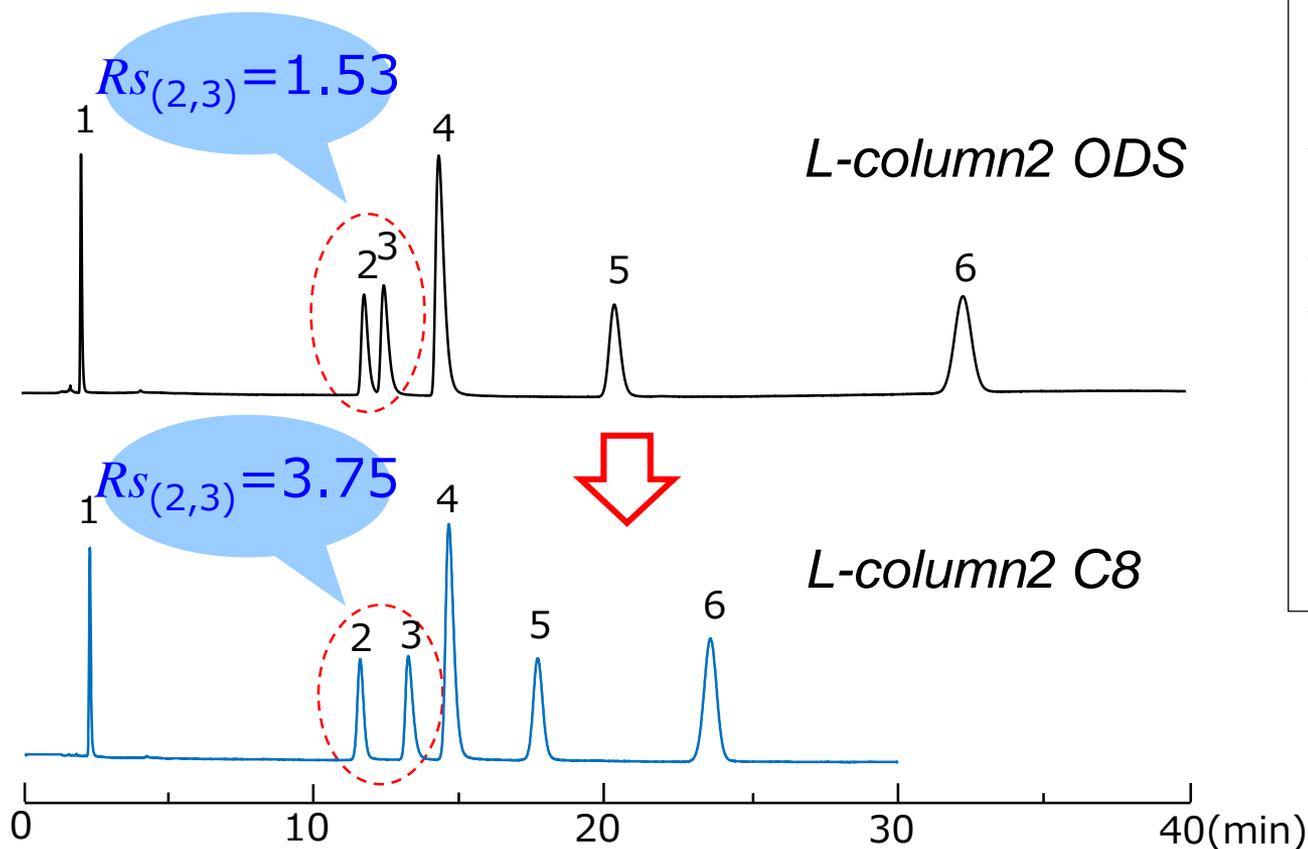
a)メタノール  
/10 mM 酢酸アンモニウム(15/85)  
 $R_{s(1,2)}=6.58$        $\alpha_{(1,2)}=1.80$

b)アセトニトリル  
/10 mM 酢酸アンモニウム(10/90)  
 $R_{s(1,2)}=1.90$        $\alpha_{(1,2)}=1.21$

【分析条件】 カラム: *L-column ODS*, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.  
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

# カラムを変える(C18⇒C8)

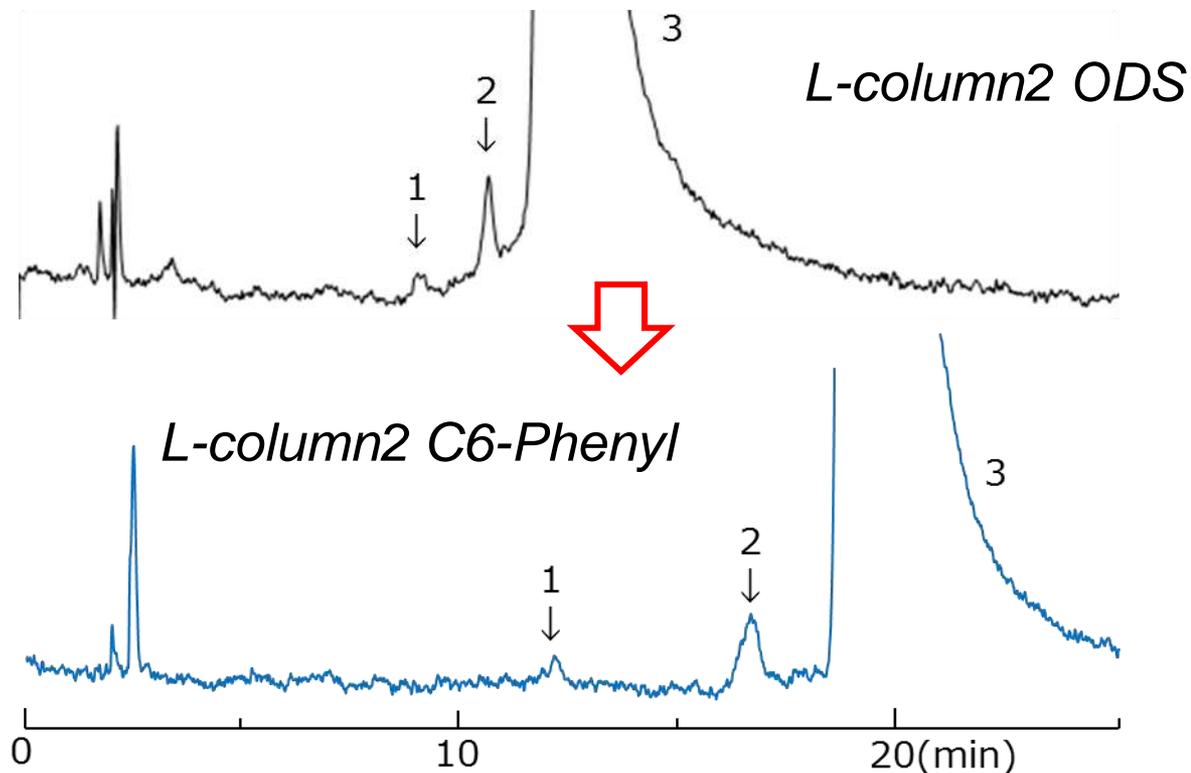


【分析条件】  
カラム: 5  $\mu$ m  
4.6 mm I.D.×150 mm L.  
移動相: アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH7(30/70)  
流速: 1 mL/min  
温度: 40°C  
検出: UV220 nm  
注入量: 1  $\mu$ L  
試料: 1. スルピリド  
2. デシプラミン  
3. パロキセチン  
4. マプロキセチン  
5. アモキサピン  
6. トラゾドン

デシプラミン、パロキセチンの分離が改善する

# カラムを変える(C18⇒フェニル)

## レボフロキサシンの不純物分析



### 【分析条件】

カラム: 5  $\mu$ m

4.6 mm I.D.×150 mmL.

移動相: メタノール/20 mM リン酸  
(10/90)

流速: 1 mL/min

温度: 40°C

検出: UV294 nm

注入量: 2  $\mu$ L

試料: 1. 不純物A

2. 不純物B

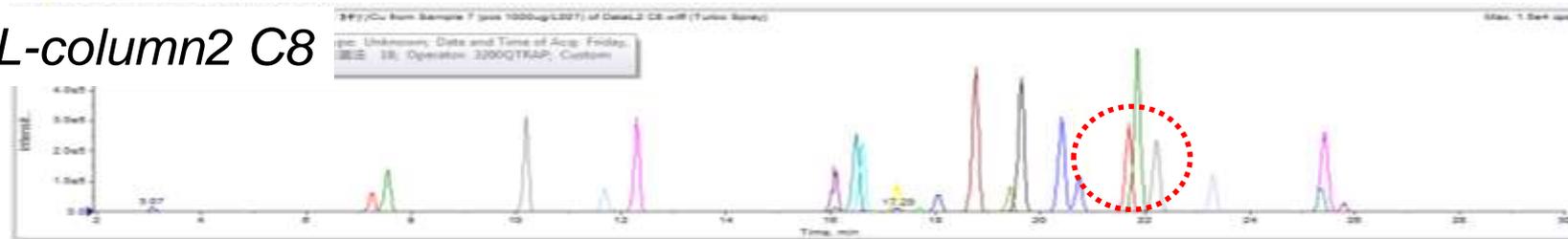
3. レボフロキサシン

レボフロキサシンと不純物の分離が改善する

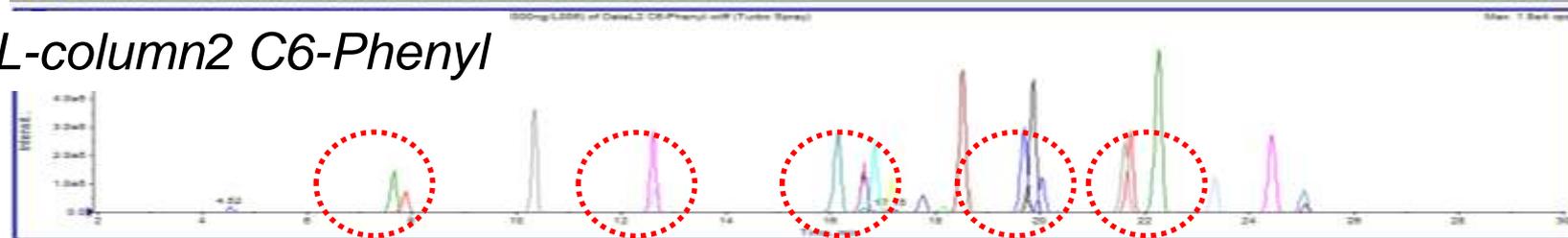
# カラムを変える(LC/MS一斉分析)

水道水の水質管理目標設定項目 別添方法18(農薬)

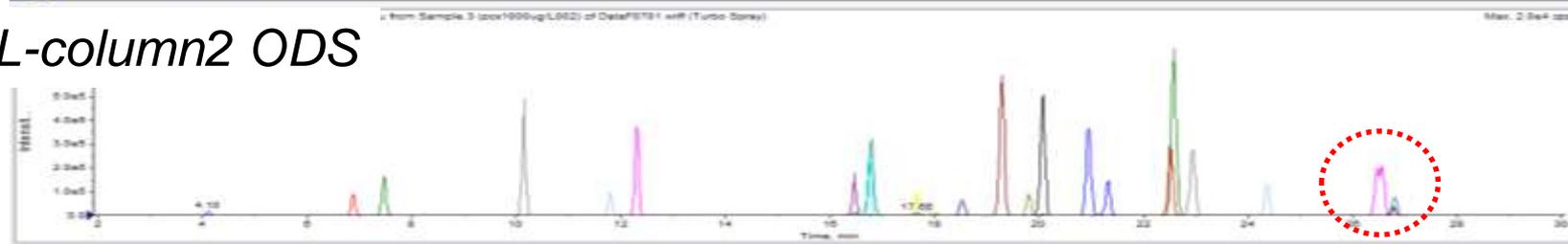
*L-column2 C8*



*L-column2 C6-Phenyl*

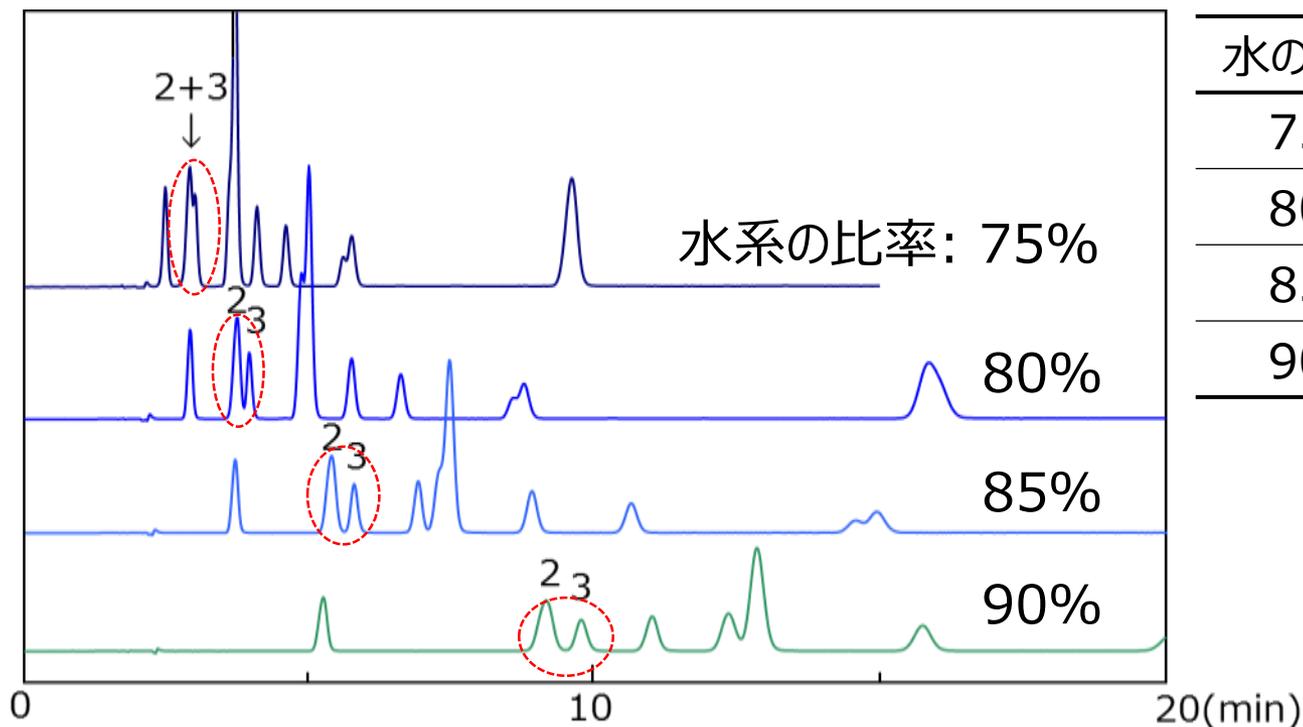


*L-column2 ODS*



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

# 移動相の水系の比率を増やし調整

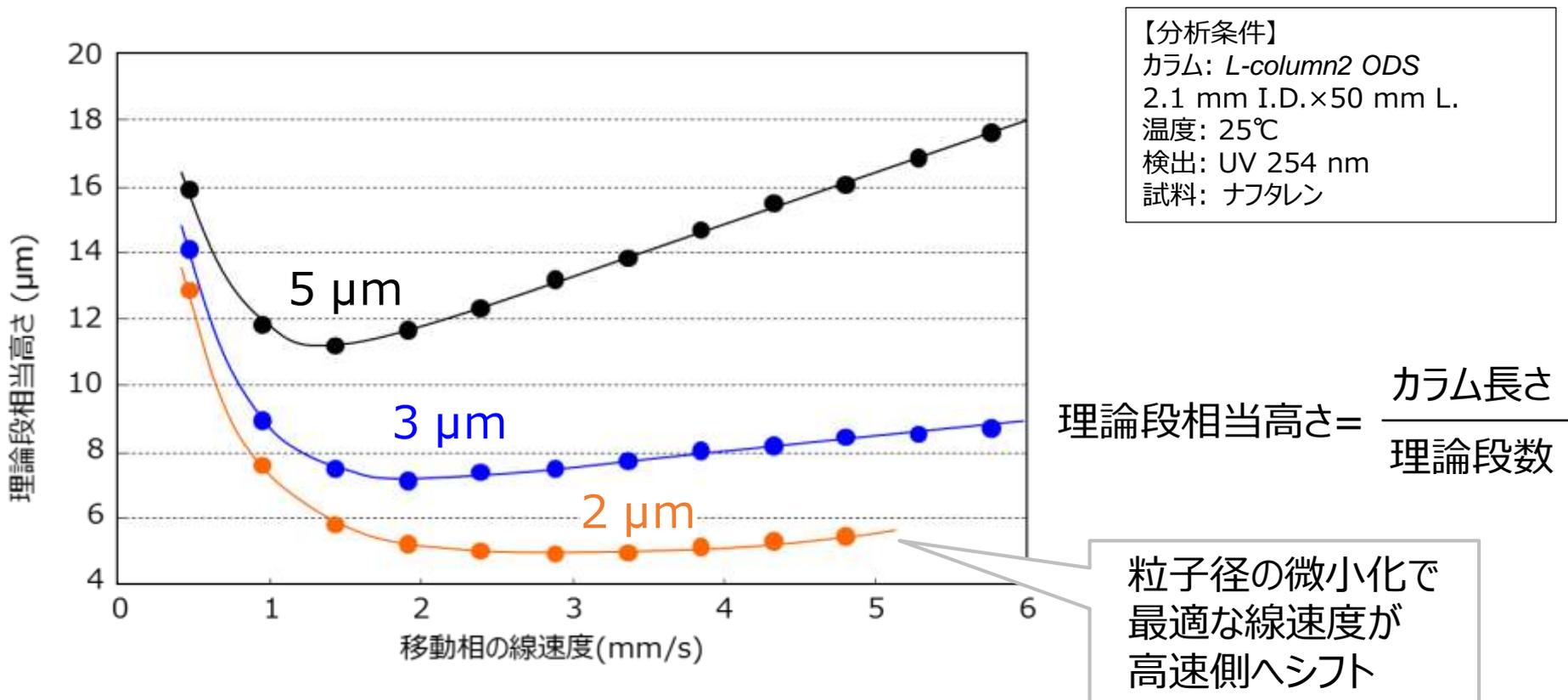


水の比率	$R_{S(2,3)}$	$k_{(3)}$
75%	0.90	0.89
80%	1.06	1.47
85%	1.47	2.61
90%	1.46	5.10

【分析条件】 カラム: *L-column ODS*, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.  
 移動相: メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム; 試料: サルファ剤

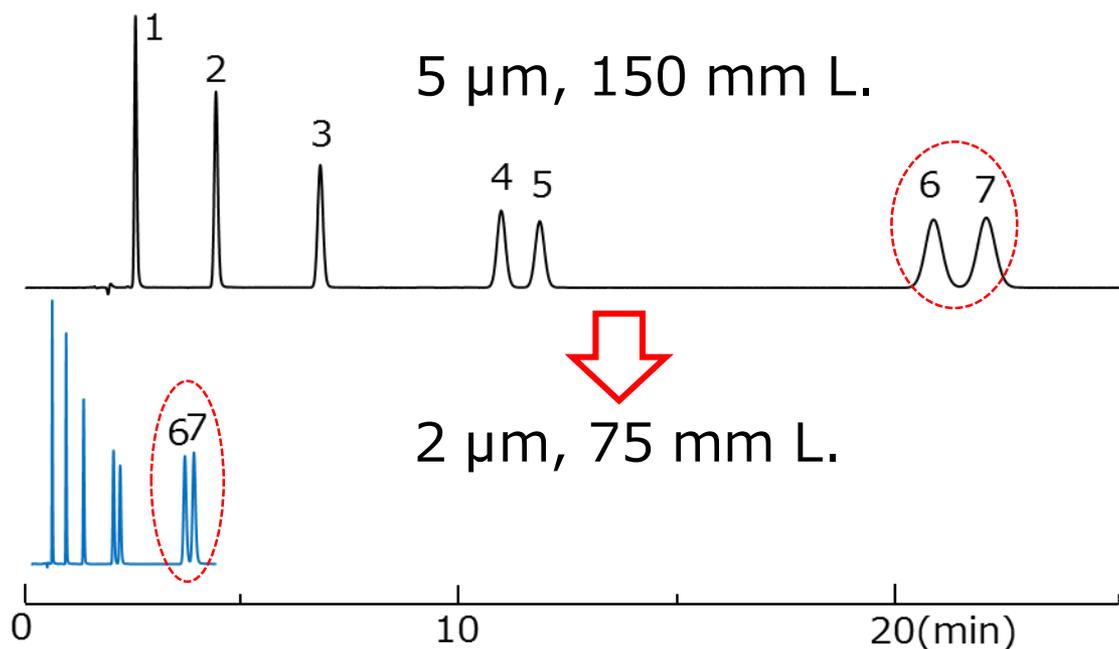
保持係数  $< 2$  の範囲※であれば、遅く溶出させることで、  
 分離が改善できる(※: 150 mmのカラムで約5分)

# 充填剤の微小化のもうひとつの利点



粒子径の微小化により、高理論段数が得られるだけでなく、  
移動相の流速UPが可能

# 充填剤の微小化による分析時間の短縮



## 【分析条件】

カラム: L-column2 ODS

2.1 mm I.D.

移動相: アセトニトリル/20 mM リン酸(35/65)

温度: 40°C

注入量: 0.5  $\mu\text{L}$ 

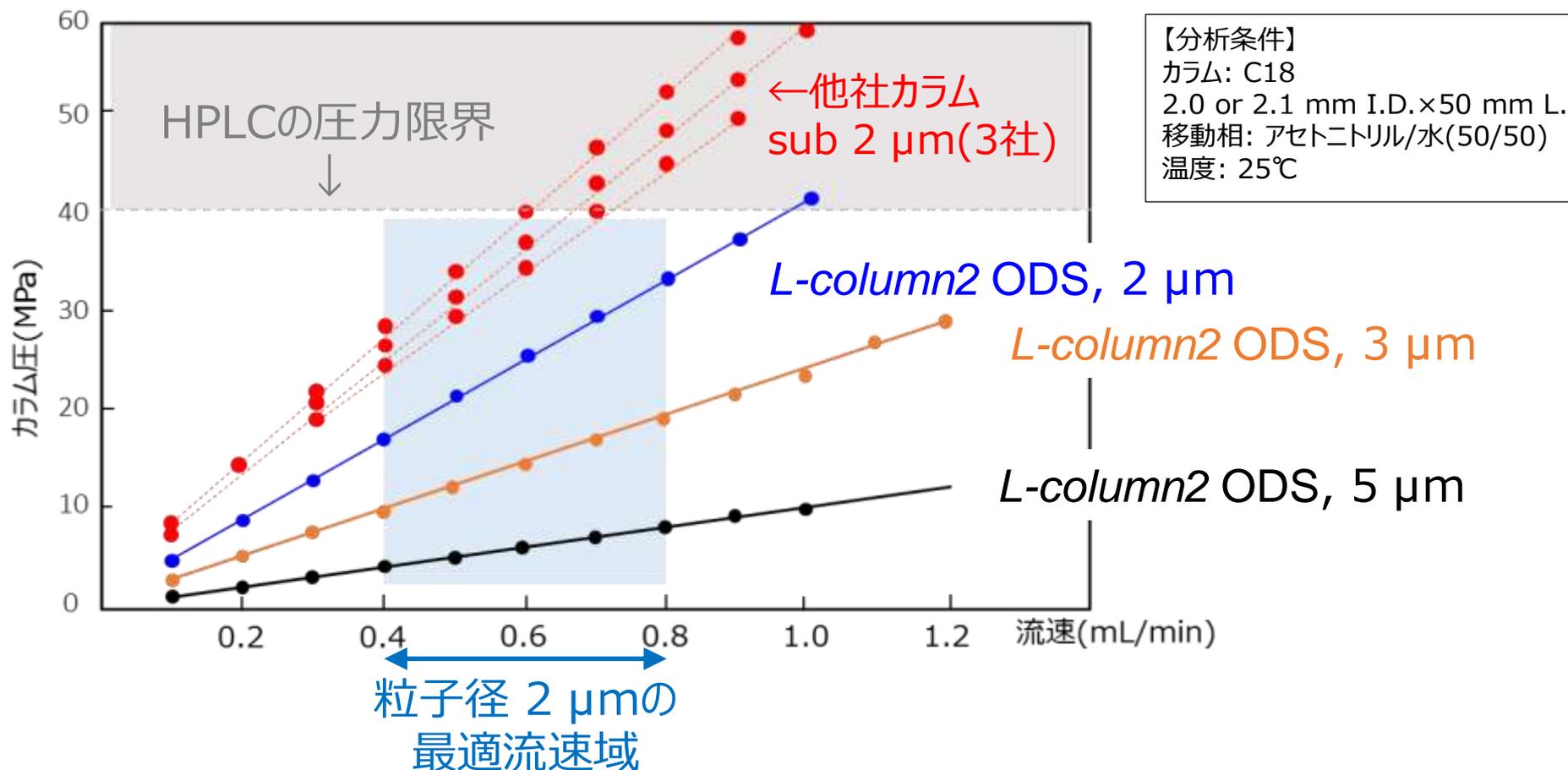
試料:

1. *p*-ヒドロキシ安息香酸
2. *p*-ヒドロキシ安息香酸メチル
3. *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル
4. *p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル
5. *p*-ヒドロキシ安息香酸プロピル
6. *p*-ヒドロキシ安息香酸イソブチル
7. *p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル

粒子径	流速(mL/min)	$t_{R(7)}$ (min)	$N_{(7)}$	$R_{S(6,7)}$	P(MPa)
5 $\mu\text{m}$	0.2	22.0	12813	1.60	4.2
		∨	≡	≡	
2 $\mu\text{m}$	0.6	3.7	13866	1.69	34.6
		( $\times 1/6$ )	(同等)	(同等)	

L-column2 ODS, 2 $\mu\text{m}$ は、分析時間が顕著に短縮

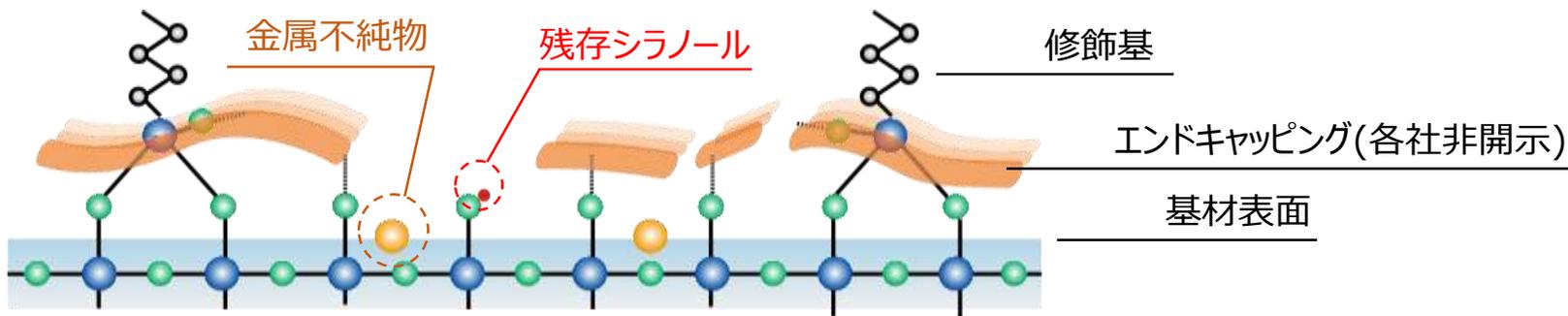
# 充填剤の微小化による圧力上昇



充填剤の微小化はカラム圧の顕著な上昇をまねく  
(L-column2 ODS, 2 μmのカラム圧はHPLCの耐圧範囲内)

# エンドキャッピングの重要性

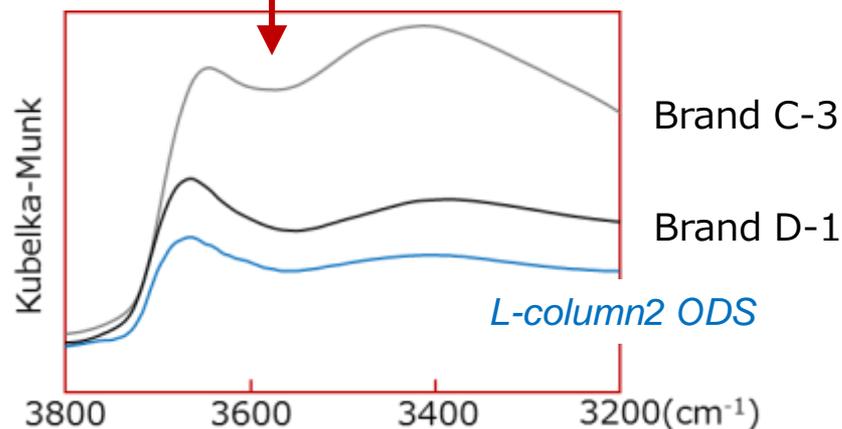
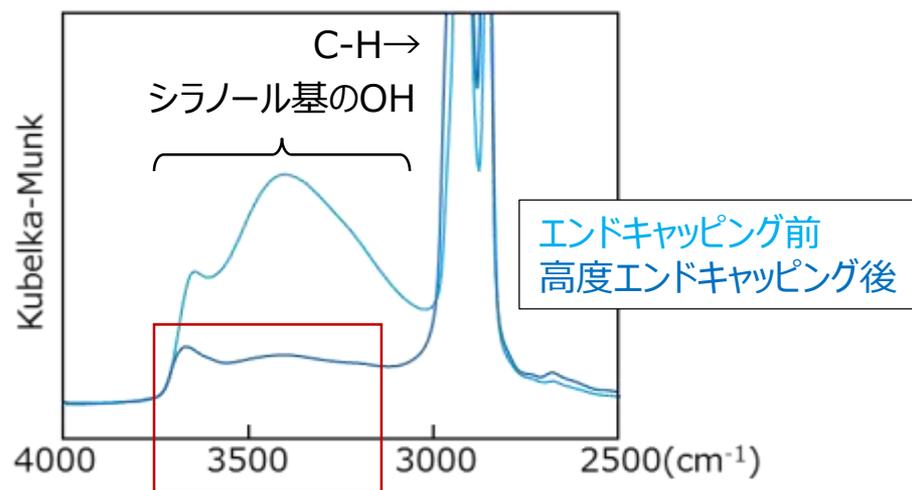
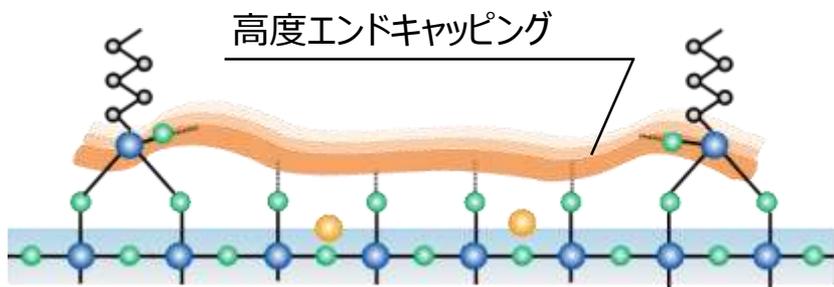
エンドキャッピング × (残存シラノールが僅かに存在)	エンドキャッピング ◎ (残存シラノール≒0)
<ul style="list-style-type: none"> <li>塩基性物質、配位性化合物がテーリング、不検出</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>塩基性物質、配位性化合物がシャープに検出</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>ロット間差が拡大</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ロット間差が低減</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>耐久性の低下</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高耐久性</li> </ul>



使いやすいカラムであるためには、  
 エンドキャッピングが優れていることが基本

# *L-column2* の高度エンドキャッピング

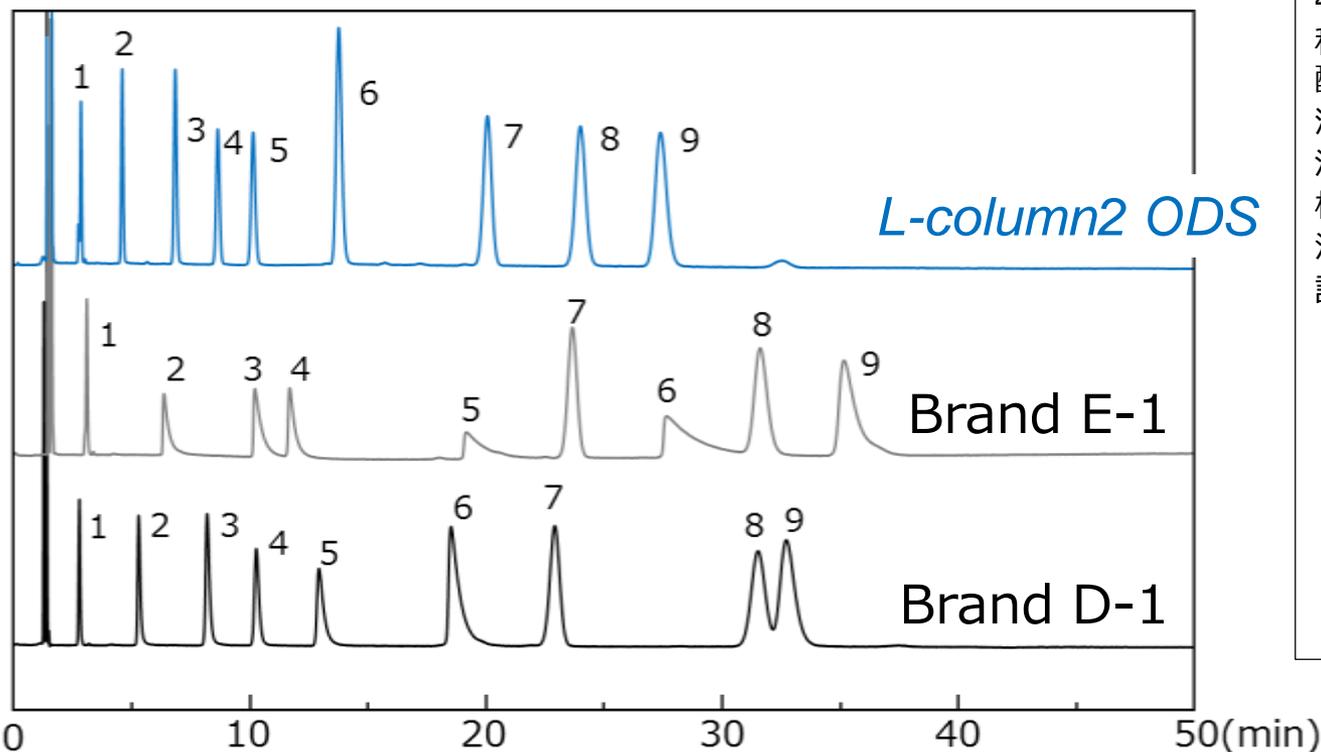
高度エンドキャッピング技術により  
低吸着性・高再現性・高耐久性  
を持った使いやすいカラム



【充填剤のFT-IRスペクトル】

# L-column2 の低吸着性

## 塩基性物質(抗アレルギー剤)の一斉分析

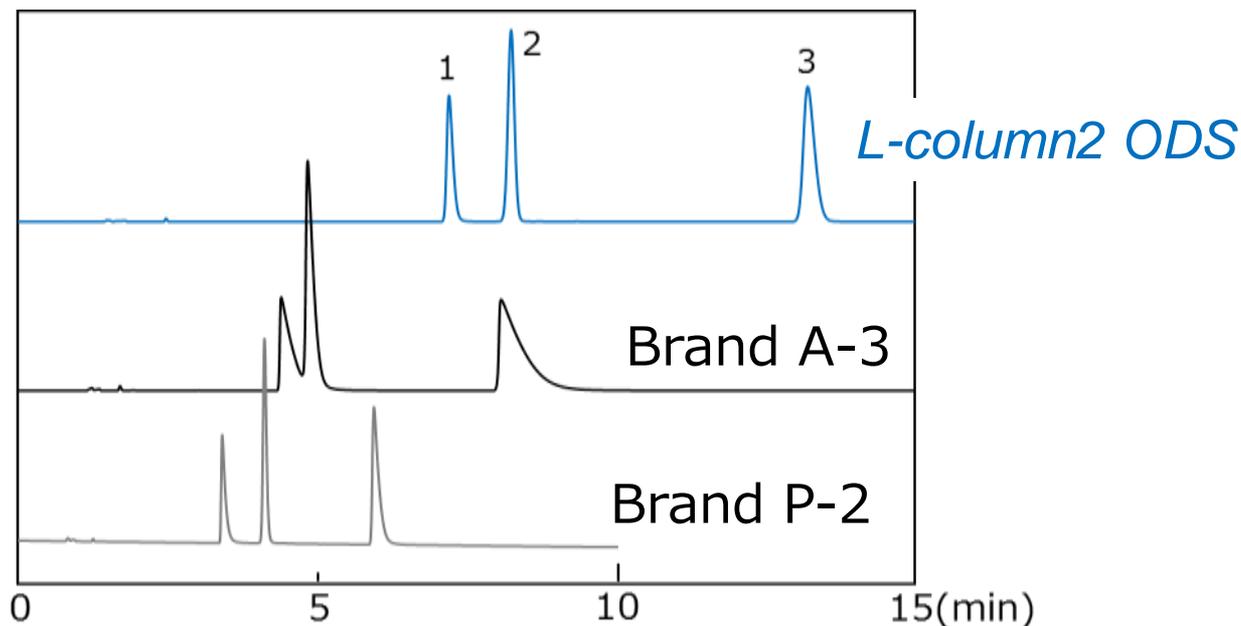


### 【分析条件】

- カラム: C18, 5  $\mu\text{m}$   
4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm L.
- 移動相: アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH7(60/40)
- 流速: 1 mL/min
- 温度: 40 $^{\circ}\text{C}$
- 検出: UV 220 nm
- 注入量: 1  $\mu\text{L}$
- 試料: 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

高度エンドキャッピング技術により、  
テーリングや保持の遅延のない良好な分離が得られる

# L-column2 vs コアシエルカラム

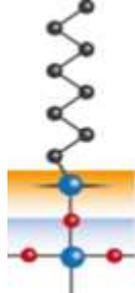


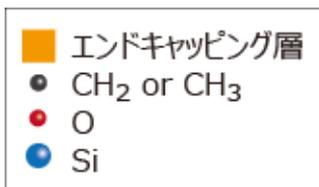
【分析条件】  
 カラム: C18  
 4.6 mm I.D.×150 mmL.  
 移動相: アセトニトリル/25 mM リン  
 酸緩衝液 pH7(35/65)  
 流速: 1 mL/min  
 温度: 40℃  
 検出: UV230 nm  
 注入量: 2  $\mu$ L  
 試料: 1. パロキセチン  
 2. シタロプラム  
 3. フルオキセチン

Brand	理論段数 (テーリングファクター)		
	パロキセチン	シタロプラム	フルオキセチン
L-column2 ODS, 3 $\mu$ m	22183 (1.48)	25559 (1.03)	22141 (1.37)
コアシエル Brand A-3, 5 $\mu$ m	—	—	2154 (6.62)
コアシエル Brand P-2, 2.6 $\mu$ m	12076 (2.53)	23521 (1.24)	15254 (2.45)

コアシエルカラムでも吸着すると段数は激減 ⇒ やはり低吸着性は重要！

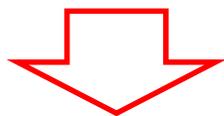
# L-column2 充填剤のラインアップ

製品名	L-column2 ODS	L-column2 C8	L-column2 C6-Phenyl
分離機構	疎水性相互作用	疎水性相互作用	疎水性相互作用 + $\pi$ - $\pi$ 相互作用
			
修飾基	C18	C8	C6-Phenyl
粒子径( $\mu\text{m}$ )	5, 3, 2	5, 3	5, 3
比表面積	340 $\text{m}^2/\text{g}$	340 $\text{m}^2/\text{g}$	340 $\text{m}^2/\text{g}$
基材	全多孔質性	全多孔質性	全多孔質性
用途	ファーストチョイス	分析時間短縮	分離の改善

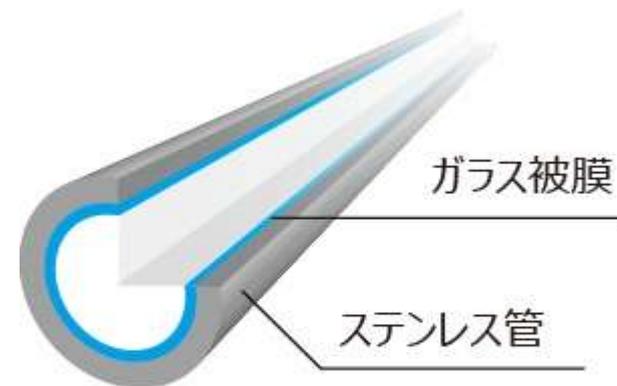


# L-column2 メタルフリーカラムのコンセプト

- ・ ガラスライニング ステンレス管
- ・ 非金属系フリット
- ・ 高度エンドキャッピングされた充填剤



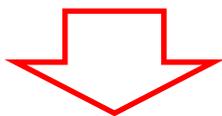
超低吸着性カラム  
「L-column2 メタルフリーカラム」  
を開発！



ガラスライニングステンレス管

## L-column2 メタルフリーカラムの特長

- S/Nの向上(ピーク強度の向上とノイズの低減)
- キャリーオーバーの低減
- 定量性の向上



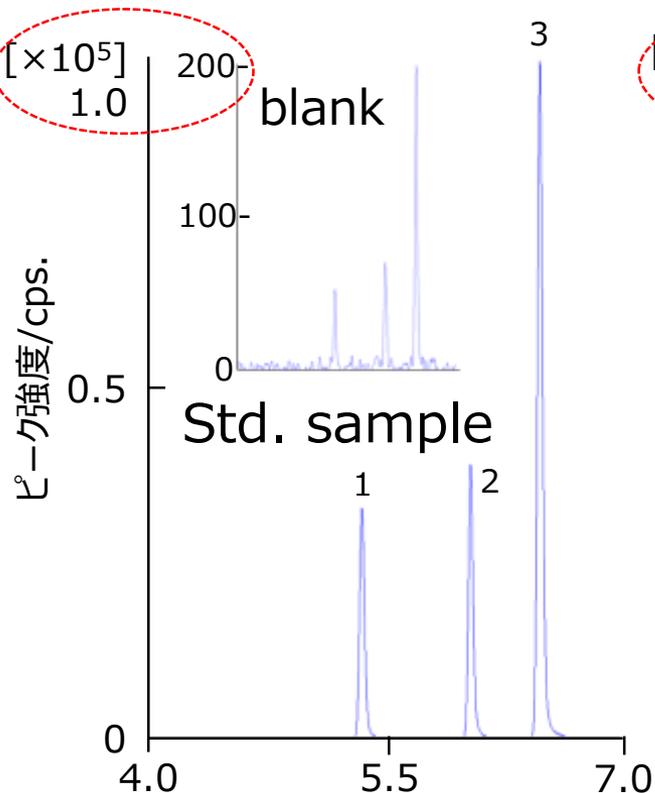
LC/MSを使用した 配位性化合物から医薬品までの、  
様々な分析に最適

例えば...

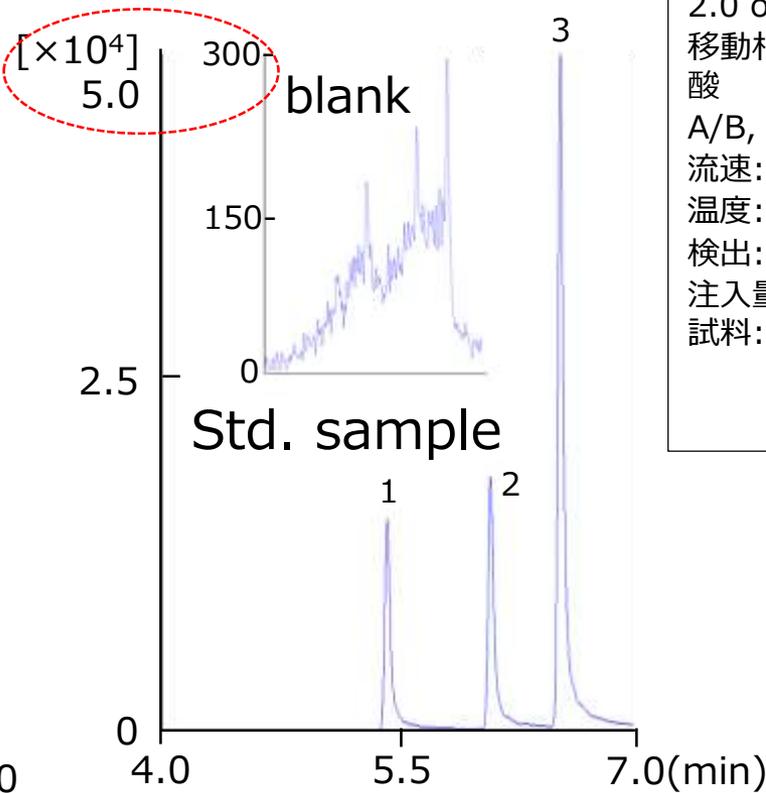
- リン酸化ペプチド、核酸などの生体分子、メタボロミクス分析
- 医薬品などの薬物動態
- カビ毒、天然毒、抗生物質などの食品衛生のための分析

# メタルフリーカラムの効果(フモニシン)

L-column2 メタルフリーカラム



ステンレスカラム

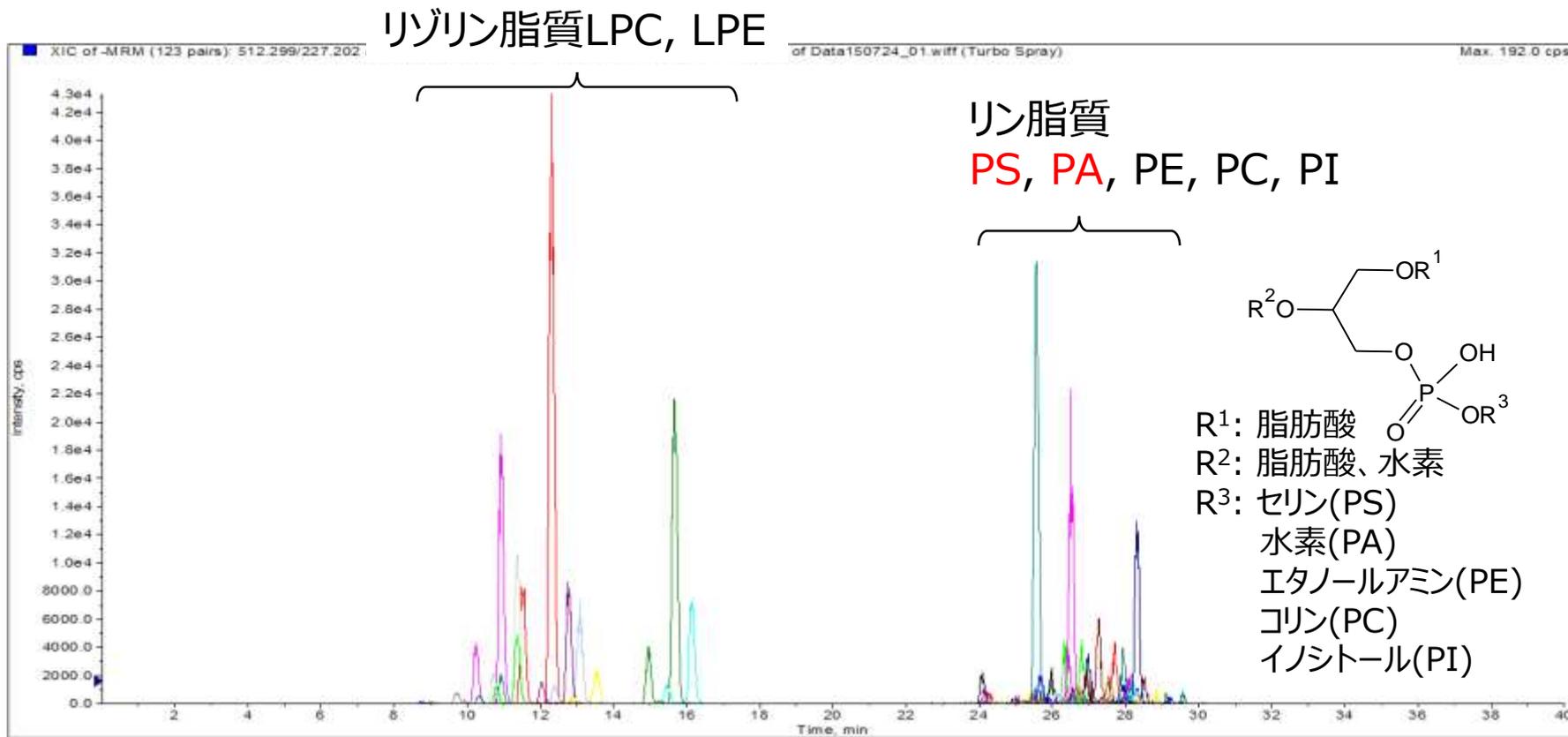


【分析条件】  
 カラム: C18, 3  $\mu$ m  
 2.0 or 2.1 mm I.D.  $\times$  150 mm L.  
 移動相: A)アセトニトリル, B)0.1%ギ酸  
 A/B, 20/80-70/30(0-10 min)  
 流速: 0.2 mL/min  
 温度: 40 $^{\circ}$ C  
 検出: ESI-MS/MS(+)  
 注入量: 3  $\mu$ L  
 試料: 1. FB<sub>1</sub>  
 2. FB<sub>3</sub>  
 3. FB<sub>2</sub>

ピーク形状の向上、ピーク強度の上昇、キャリアオーバーの低減

# メタルフリーカラムの効果(リン脂質)

## マウス血漿中のリン脂質の分析例



分析の難しいPSやPAが、検出可能 !!

# ハイスループット分析に求められるカラム環境

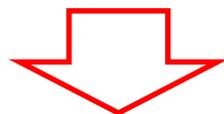
例えば・・・

1日1000回の分析を行わなければならない場合・・・

1分析でかけられる時間はたった1.5分!!



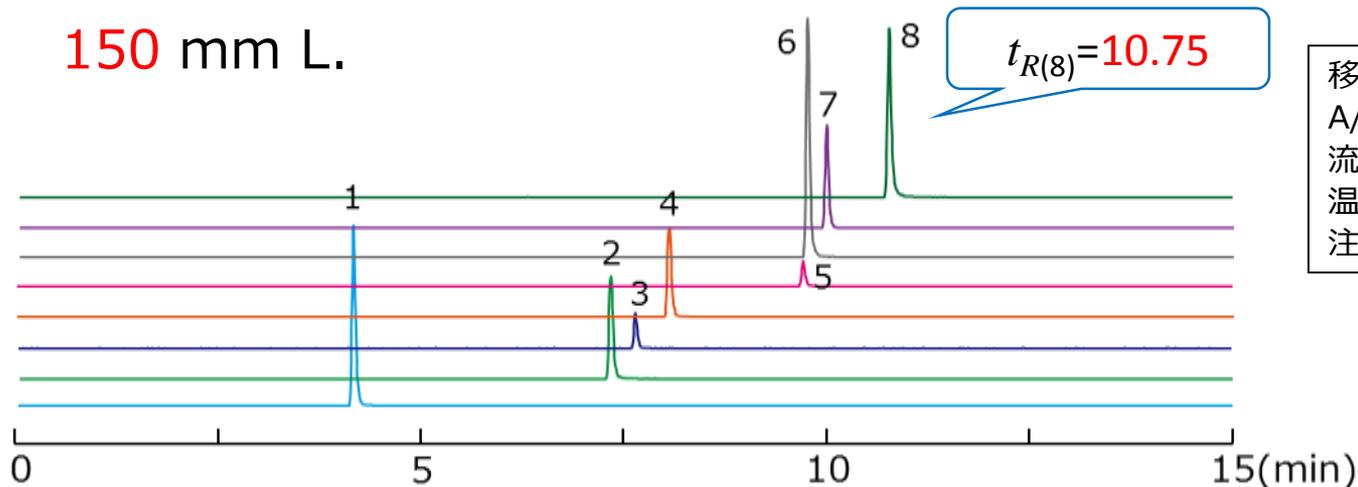
カラム長さ(mm)	10	20	30	50	100	150	250
分析時間(分)	1.0	2.0	3.0	5.0	10.0	15.0	25.0



カラム長さ10 mmのショートカラムを用い、1.0分のグラジエント分析を行う方法で1日1000分析が達成可能 !!

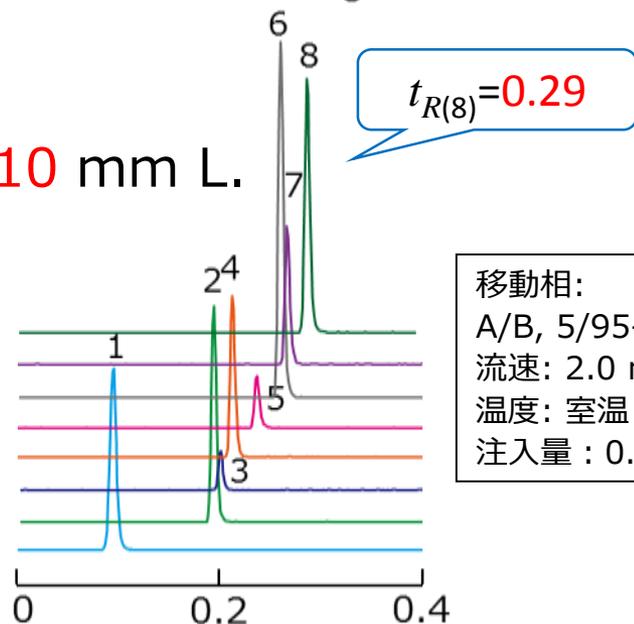
# ショートカラムによるハイスループット分析

150 mm L.



移動相:  
A/B, 5/95-70/30(0-15 min)  
流速: 0.2 mL/min  
温度: 40°C  
注入量: 2  $\mu$ L

10 mm L.

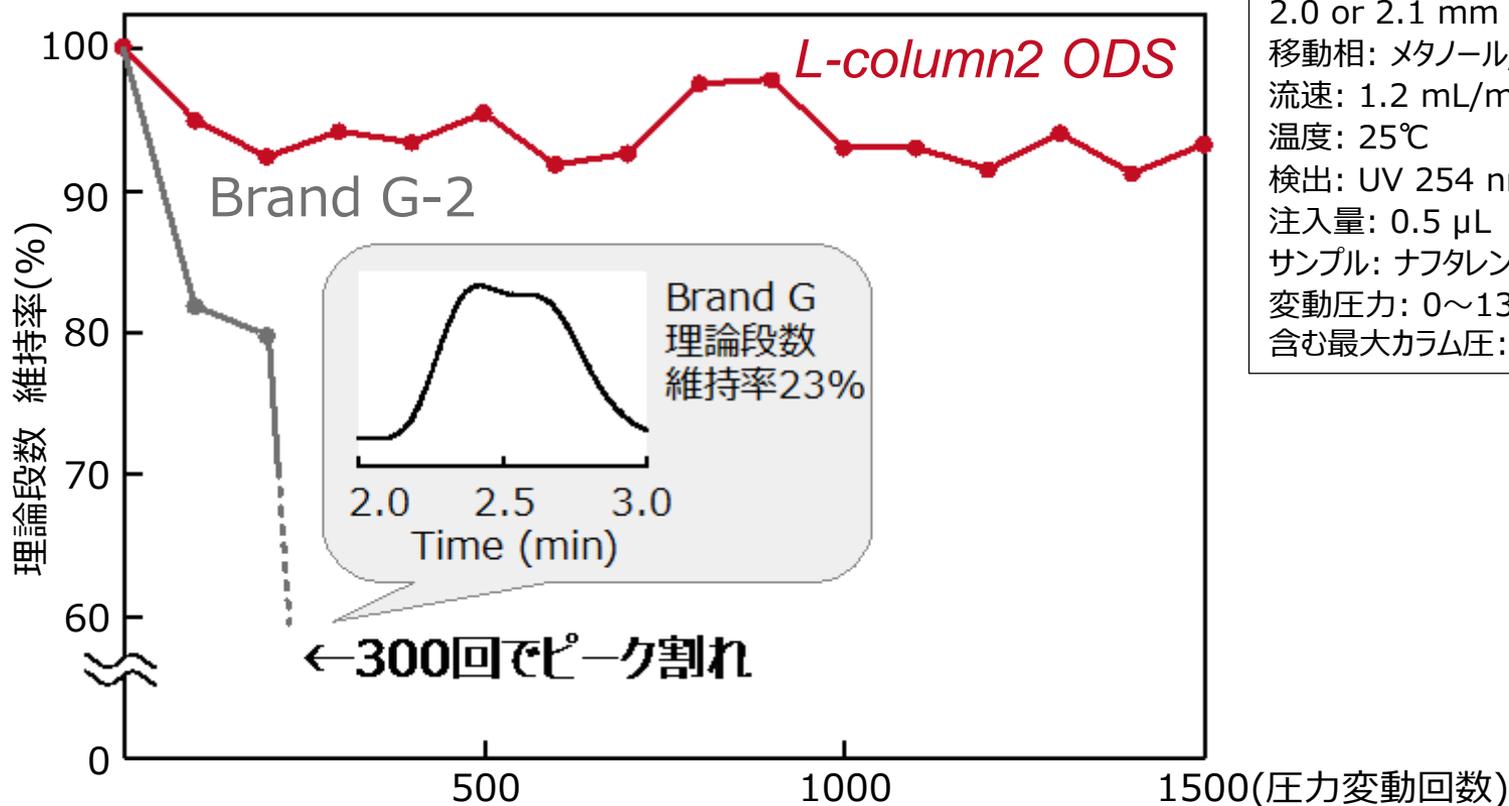


移動相:  
A/B, 5/95-70/30(0-0.3 min)  
流速: 2.0 mL/min  
温度: 室温  
注入量: 0.5  $\mu$ L

【分析条件】  
カラム: L-column2 ODS, 3  $\mu$ m  
2.1 mm I.D.  
移動相: A)アセトニトリル, B)0.1%ギ酸  
検出: ESI-MS/MS(+)  
注入量: 1  $\mu$ L  
試料: 1. スルピリド, 2. ミルナシプラン, 3. タンドスピロン,  
4. ミアンセリン, 5. トラゾドン, 6. デシプラミン, 7. ノルトリ  
プチリン, 8. クロンプラミン(100  $\mu$ g/L)

分析時間が大幅に短縮可能 !!

# ショートカラムの耐久性



【耐久性試験条件】  
 カラム: 3 μm  
 2.0 or 2.1 mm L.×10 mm I.D.  
 移動相: メタノール/水(50/50)  
 流速: 1.2 mL/min  
 温度: 25℃  
 検出: UV 254 nm  
 注入量: 0.5 μL  
 サンプル: ナフタレン  
 変動圧力: 0~13 MPa(システム圧  
 含む最大カラム圧: 27 MPa)

長期間安定して使用可能