

# 逆相HPLC分析のノウハウ一挙公開2010!

未公開情報も満載!!

一般財団法人化学物質評価研究機構

クロマト技術部

坂牧 寛

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

sakamaki-hiroshi@ceri.jp

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

**L-column2 C8**の発売  
**L-column**プレカラムフィルターの発売  
展示ブースのご案内  
その他のご案内

# 目次

## <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

塩基性化合物のテーリング防止策

分離の改善

2  $\mu$  mODSカラムの使用

カラムを長持ちさせるためには

再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相

カラムの洗浄と保管

カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

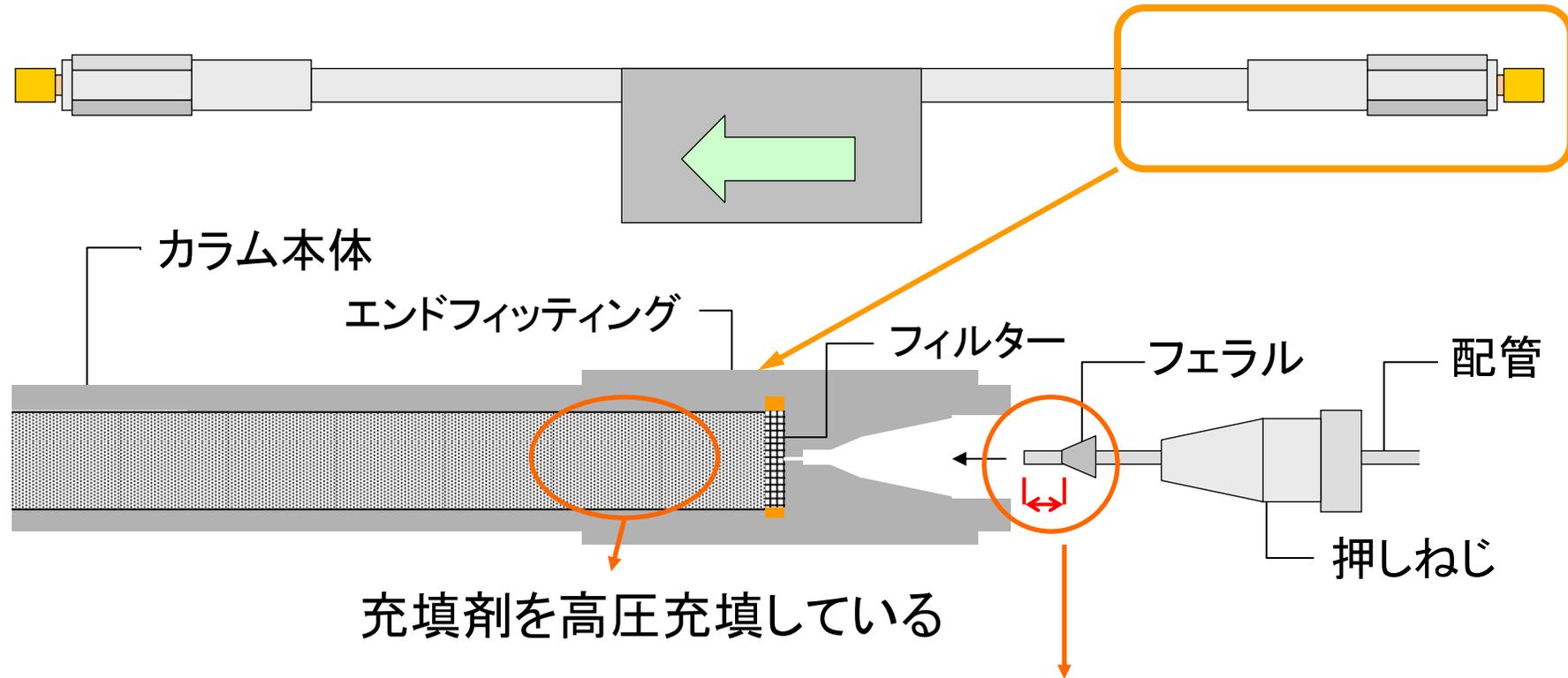
*L-column2 C8*の発売

*L-column*プレカラムフィルターの発売

展示のブースのご案内

その他のご案内

# カラムの構造



## カラムの材質

カラム本体: SUS316

エンドフィッティング: SUS316

フィルター: SUS焼結フィルター

## 接続の種類

ウォーターズ接続: 約3.5 mm

島津接続: 約2.3 mm

## シリカゲル基材

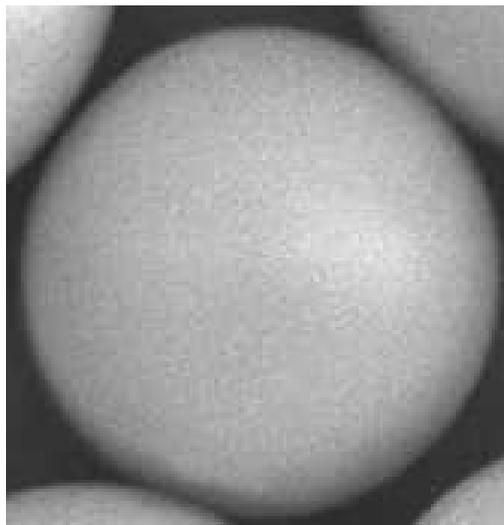
### 物性値 (*L-column*シリーズ)

平均粒子径:  $1.5 \sim 10 \mu\text{m}$  ( $2, 3, 5 \mu\text{m}$ )

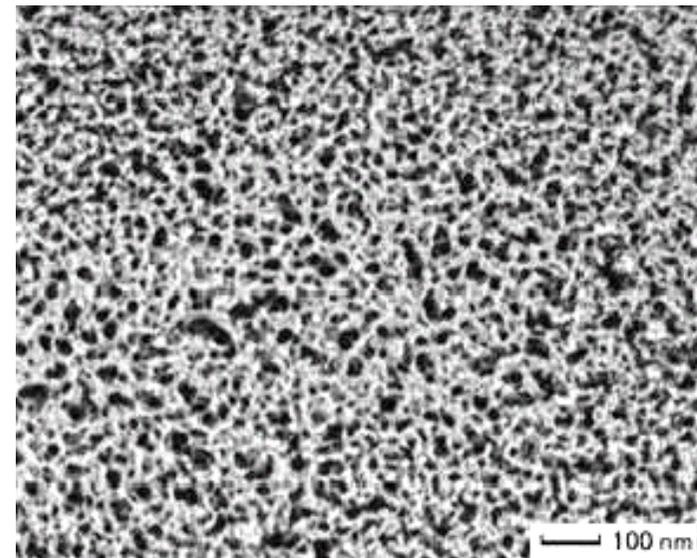
平均細孔径:  $8 \sim 12 \text{ nm}$  ( $12 \text{ nm}$ )

比表面積:  $250 \sim 500 \text{ m}^2/\text{g}$  ( $340 \text{ m}^2/\text{g}$ )

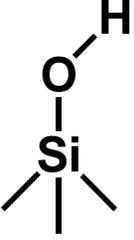
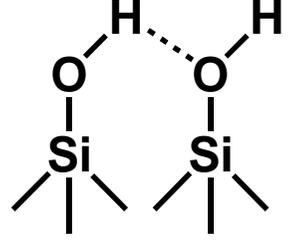
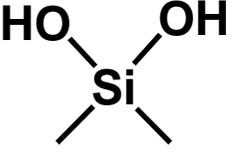
細孔容積:  $0.8 \sim 1.2 \text{ mL/g}$  ( $1.1 \text{ mL/g}$ )



拡大



# シラノールの種類と性質

孤立シラノール	ビスナルシラノール	ジェミナルシラノール
		
酸性で活性、反応性が高い <sup>1)</sup>	活性度が低い <sup>1)</sup>	活性、反応性が高い <sup>2)</sup>
IR 3750cm <sup>-1</sup> <sup>3)</sup>	IR 3550cm <sup>-1</sup> <sup>3)</sup>	<sup>29</sup> Si NMR <sup>2)</sup>

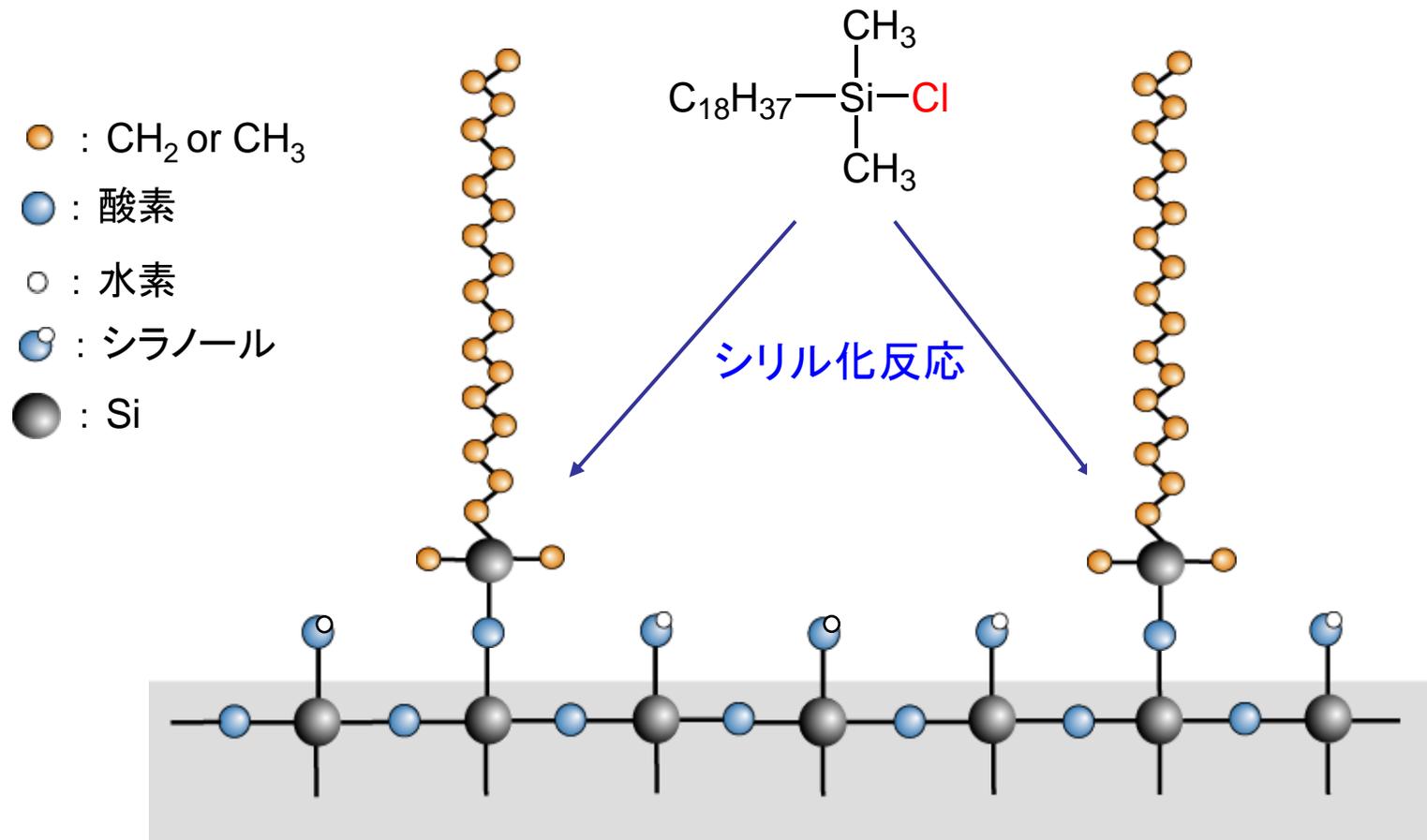
- 孤立シラノールの多いシリカゲルから合成されたODSは、塩基性化合物に対する吸着が強い<sup>1)</sup>
- 孤立シラノールの割合はシリカゲルの合成条件によって異なる<sup>1)</sup>

1) J.J.Kirkland etc., J. Chromatogr., 352 (1986) 275.

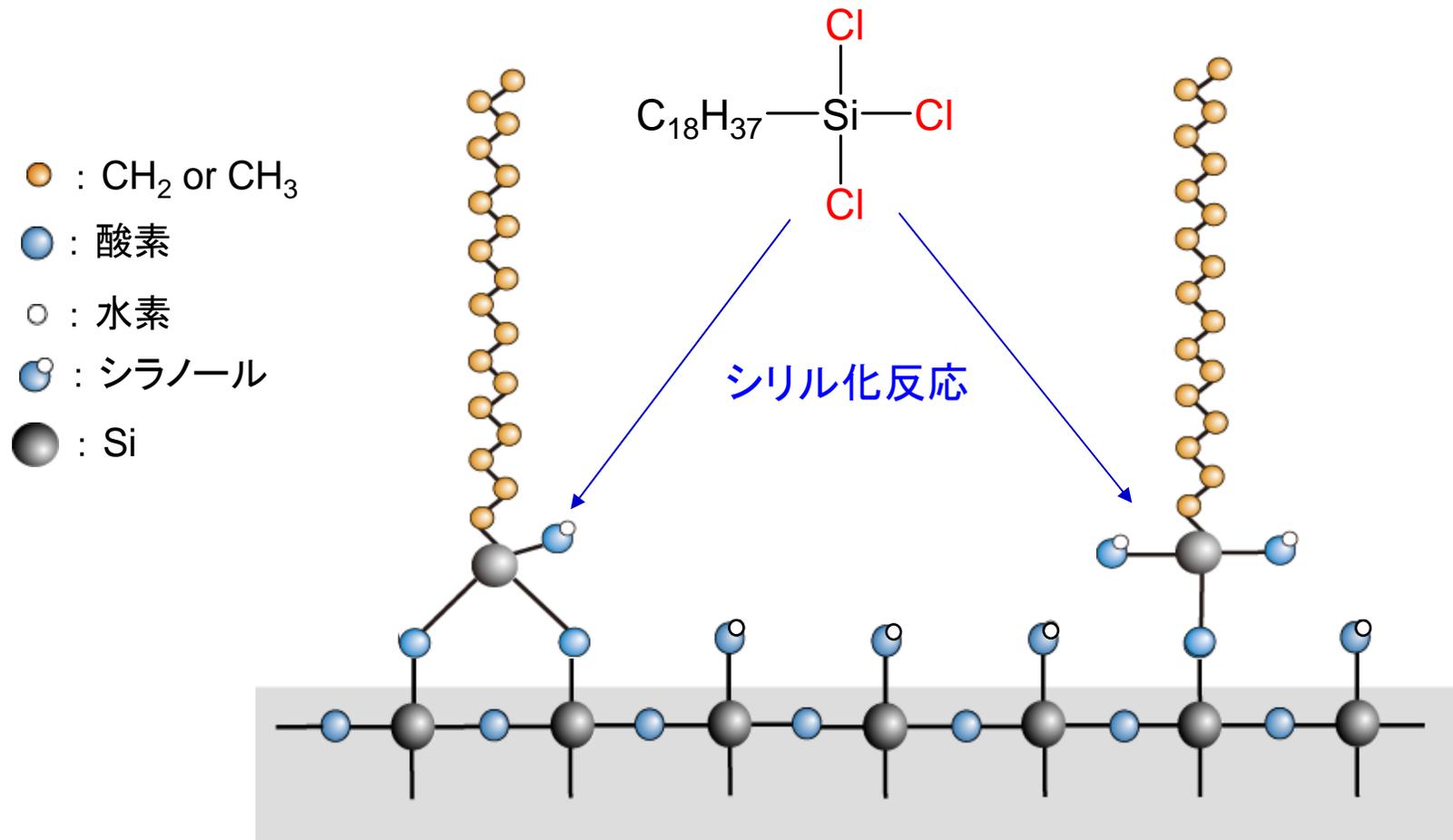
2) M.L.Miller etc., J. Chromatogr., 319 (1985) 9.

3) K.K. Unger, Porous Silica, Elsevier, Amsterdam, 1979.

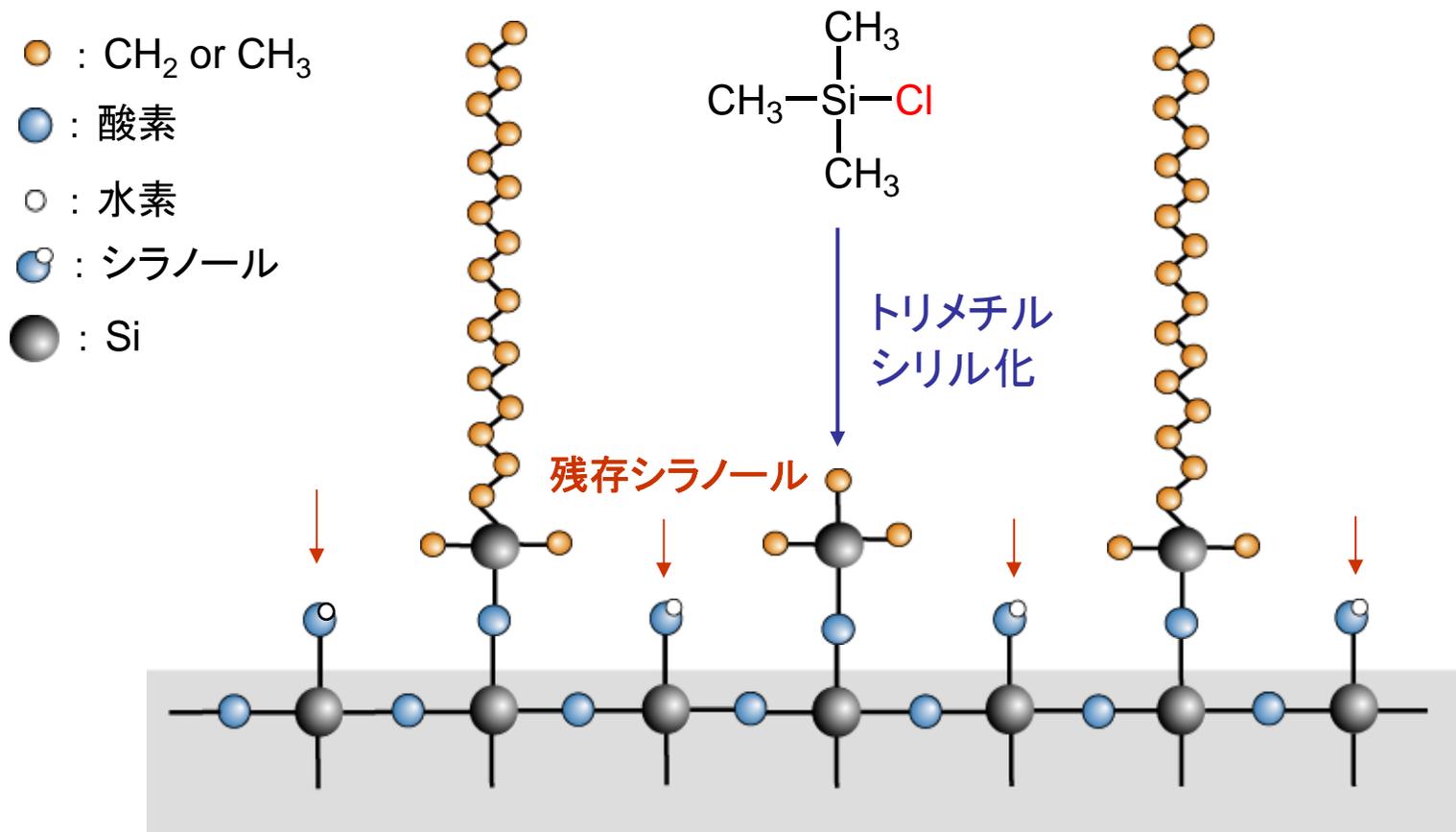
# 一官能性ODSの構造



# 三官能性ODSの構造



# エンドキャッピング



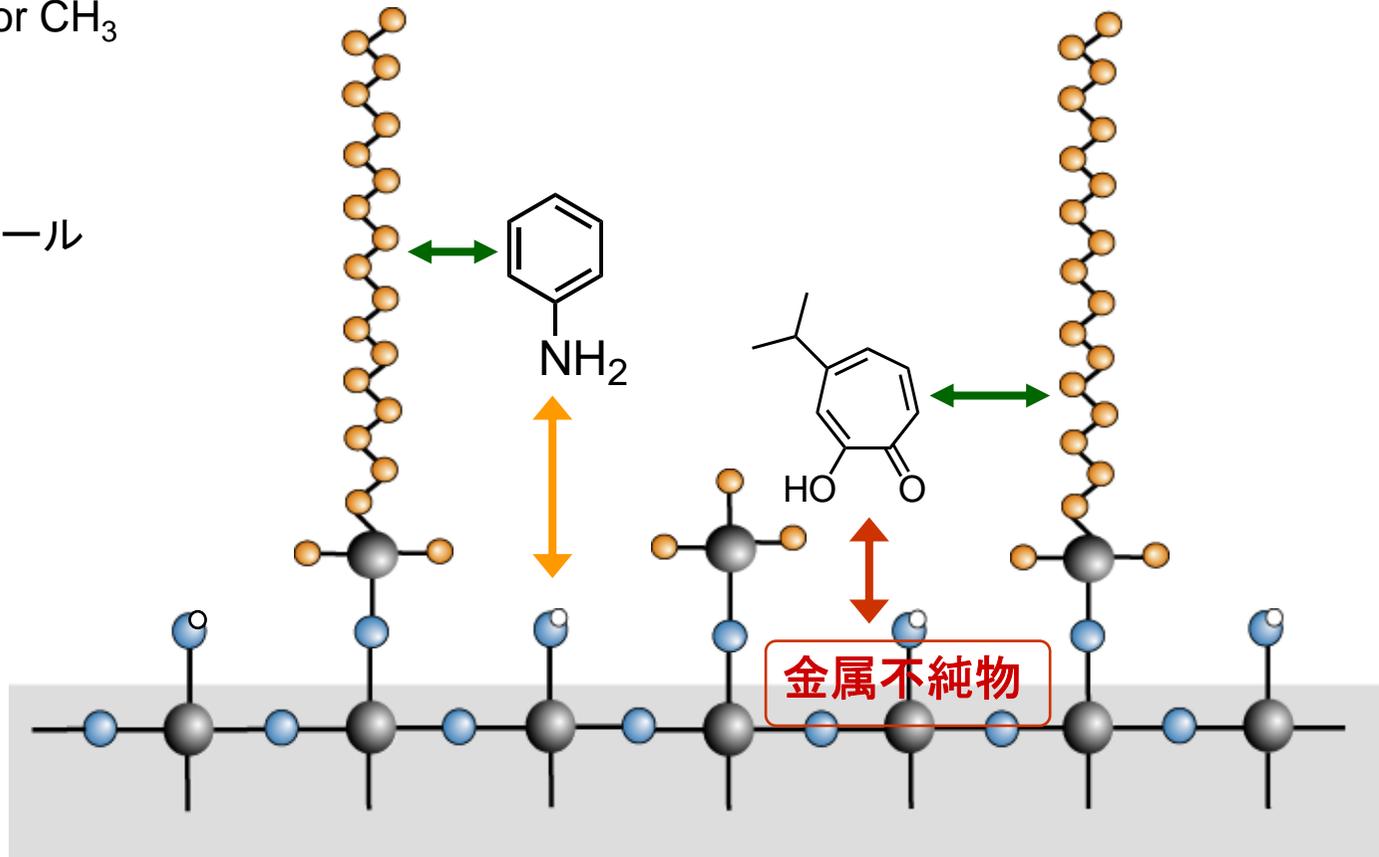
# ODSにおける保持機構

疎水性相互作用  
(本来の保持機構)

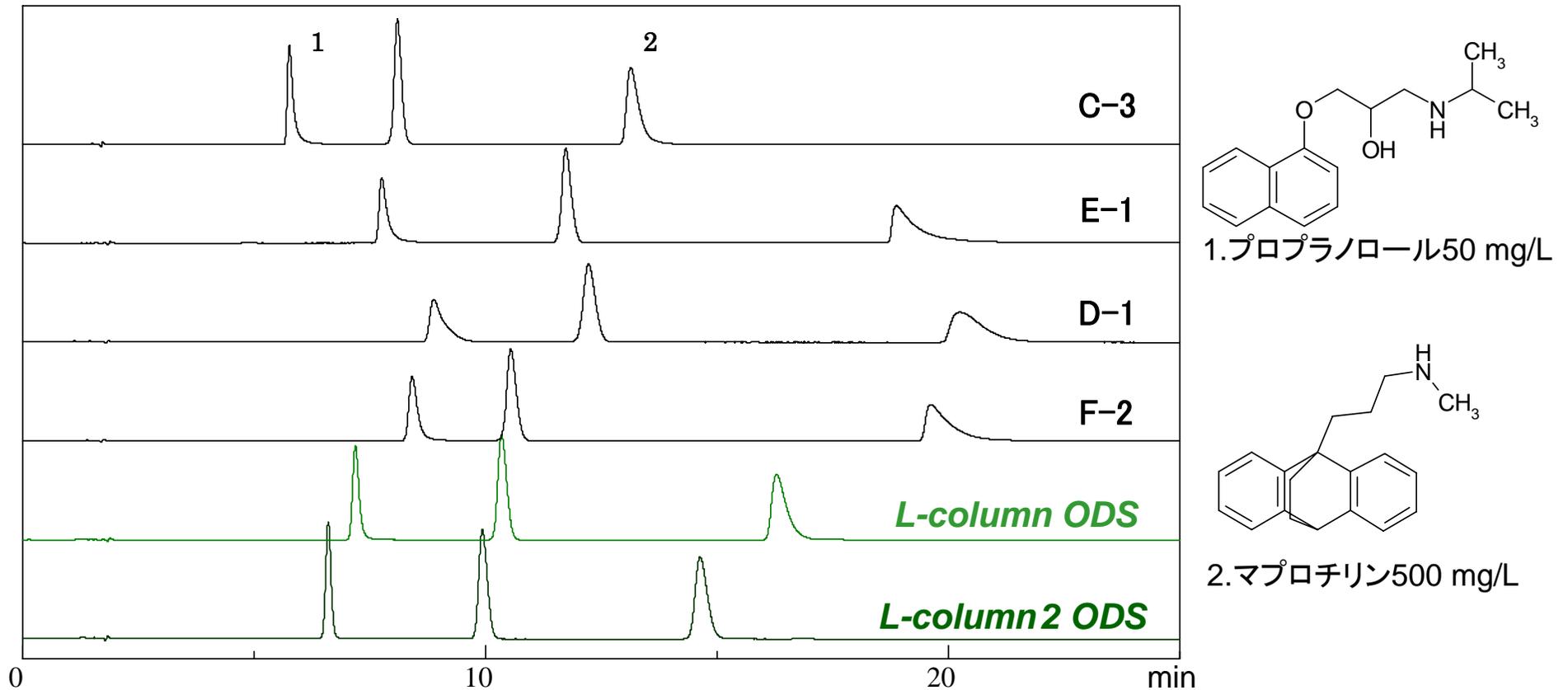
二次的相互作用  
シラノールとの相互作用  
金属不純物との相互作用

保持機構を  
複雑化する

- : CH<sub>2</sub> or CH<sub>3</sub>
- : 酸素
- : 水素
- : シラノール
- : Si



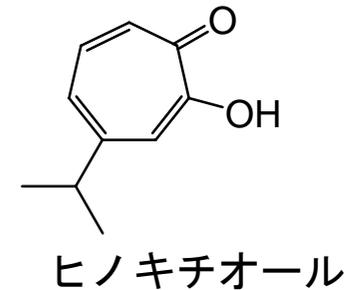
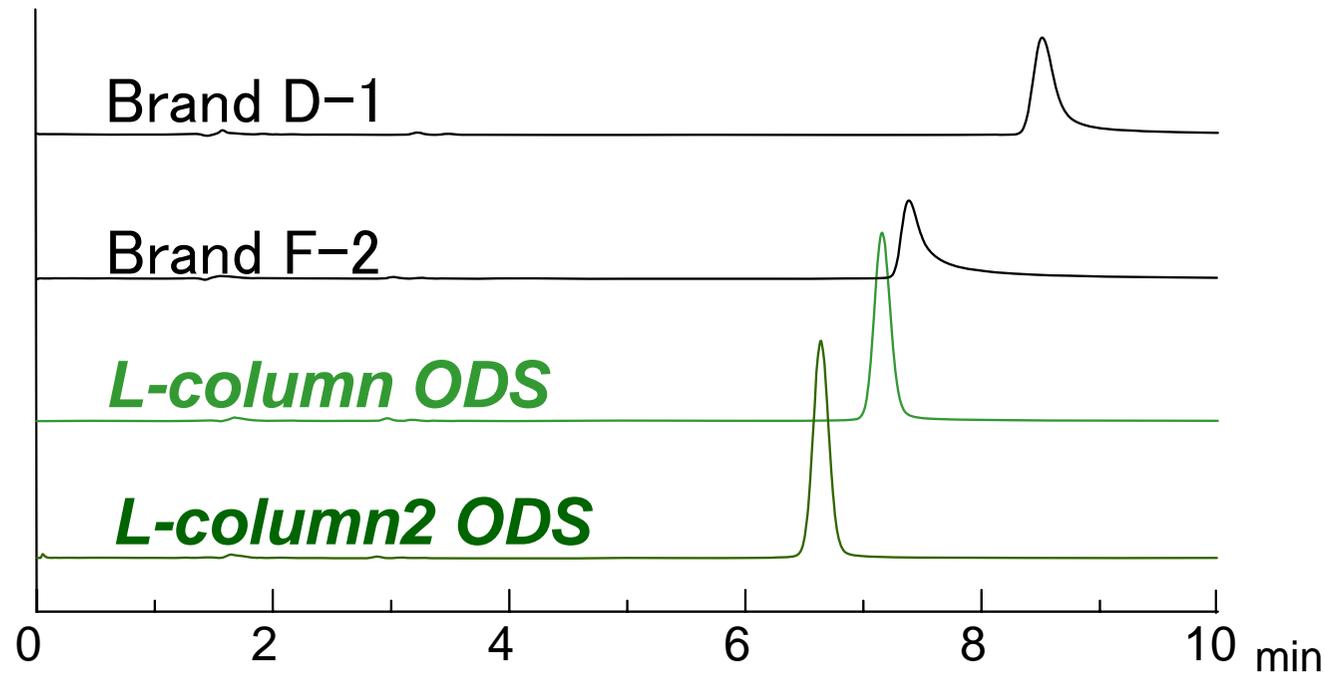
# 塩基性化合物分析によるカラム評価



カラムサイズ: 4.6 × 150 mm, 5 μm; 移動相: CH<sub>3</sub>CN / 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 CH<sub>3</sub>CN, 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

# 配位性化合物分析によるカラム評価



カラム: 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm 移動相: CH<sub>3</sub>CN / 20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (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 CH<sub>3</sub>CN, 10  $\mu$ L

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分かる

# 目次

## <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

塩基性化合物のテーリング防止策

分離の改善

2  $\mu$  mODSカラムの使用

カラムを長持ちさせるためには

再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相

カラムの洗浄と保管

カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

*L-column2 C8*の発売

*L-column*プレカラムフィルターの発売

展示のブースのご案内

その他のご案内

## 移動相

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**: 高価だがカラム圧やUV吸収が低い

**メタノール**: 安価だがUV吸収がある

**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

**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

### ・水系

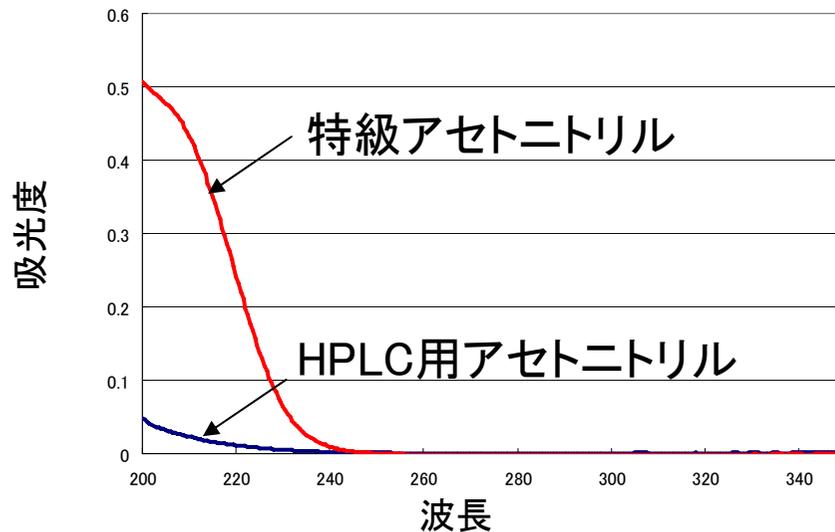
**水**: 解離性化合物には不向き

**リン酸**: 緩衝能が高いがLC/MSで使用できない

**ギ酸**: UV吸収がある

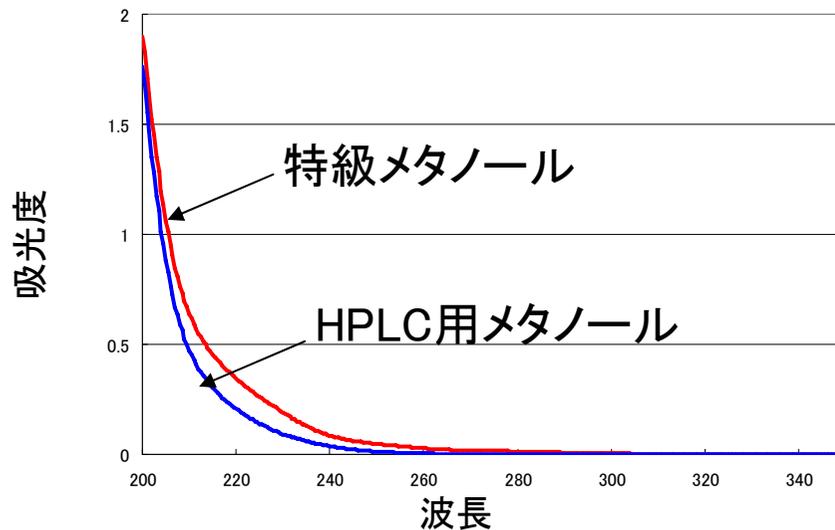
**酢酸**: UV吸収がある

# 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

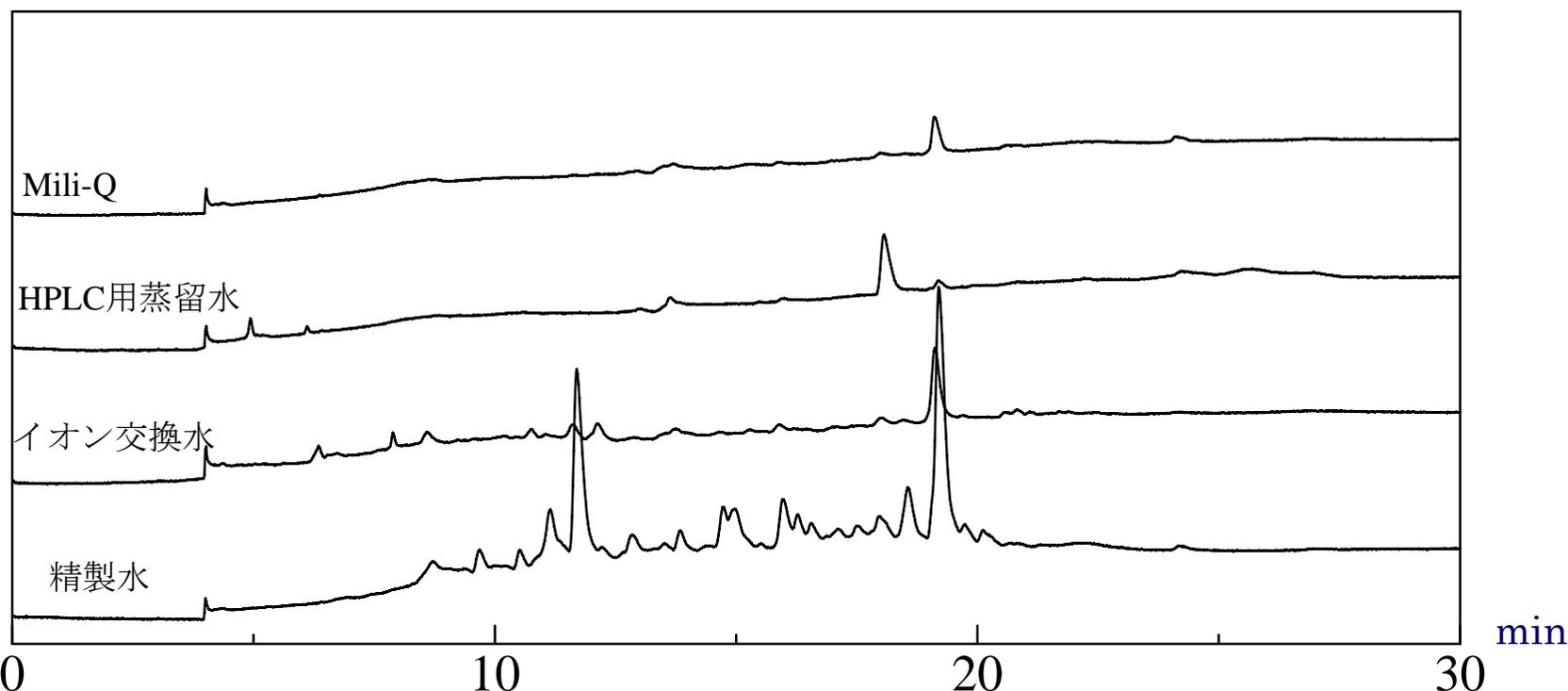
- 吸光度、相対蛍光強度、グラジエントの規格があり、低波長(250nm以下)での吸光度が低い



## 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

## 水の規格によるベースラインの比較



カラム : **L-column ODS** 5  $\mu$ 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

## 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、送液不良
- ・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

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

*L-column2 C8*の発売  
*L-column*プレカラムフィルターの発売  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

## 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  $\text{H}_3\text{PO}_4$  と  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$

(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)



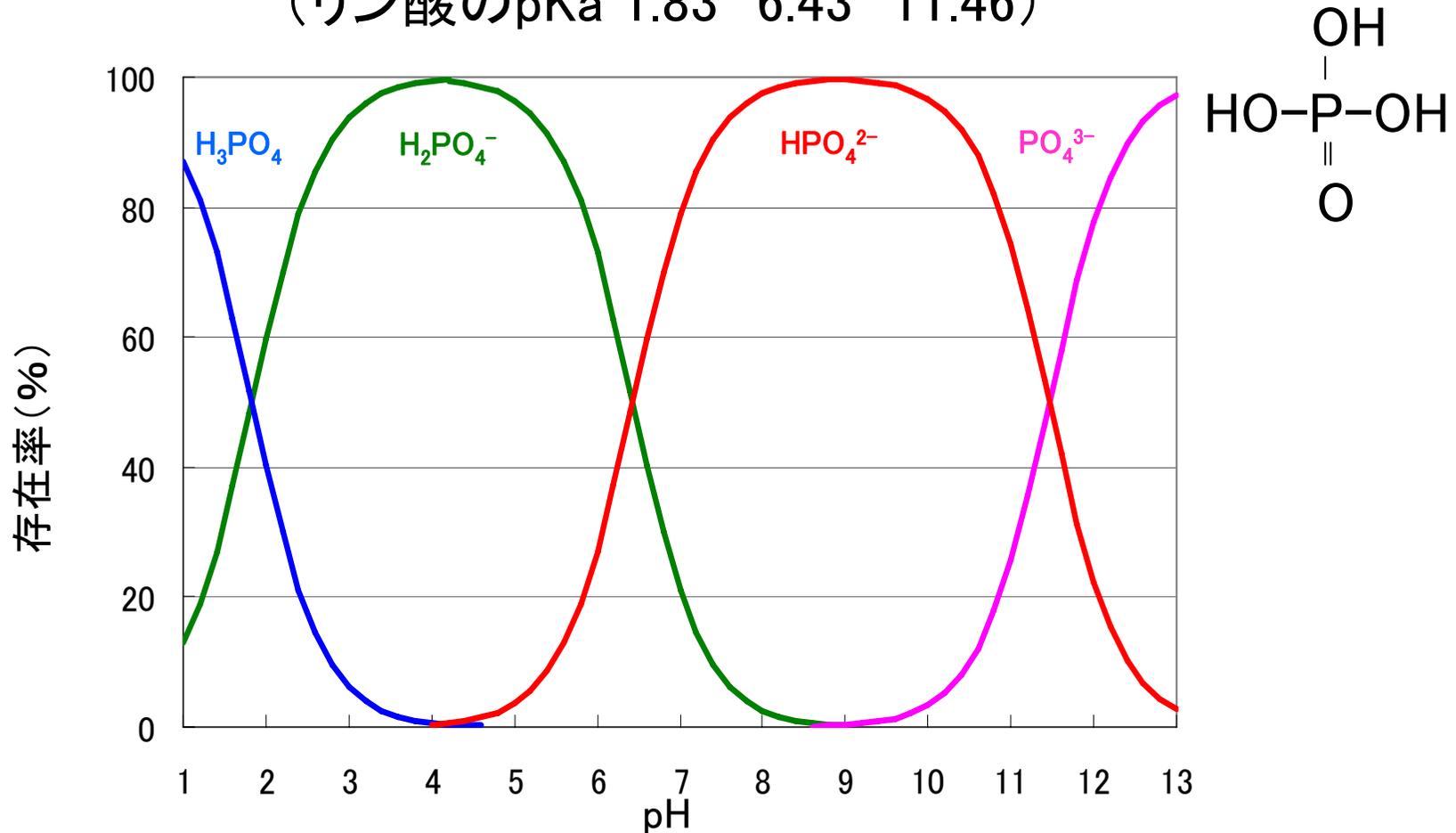
### 緩衝作用が働く条件

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)

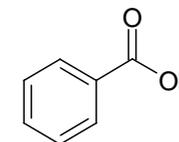
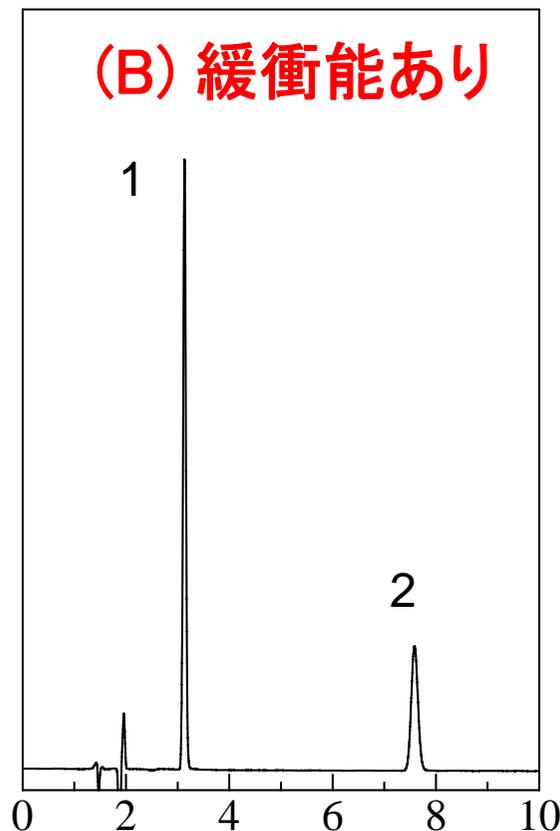
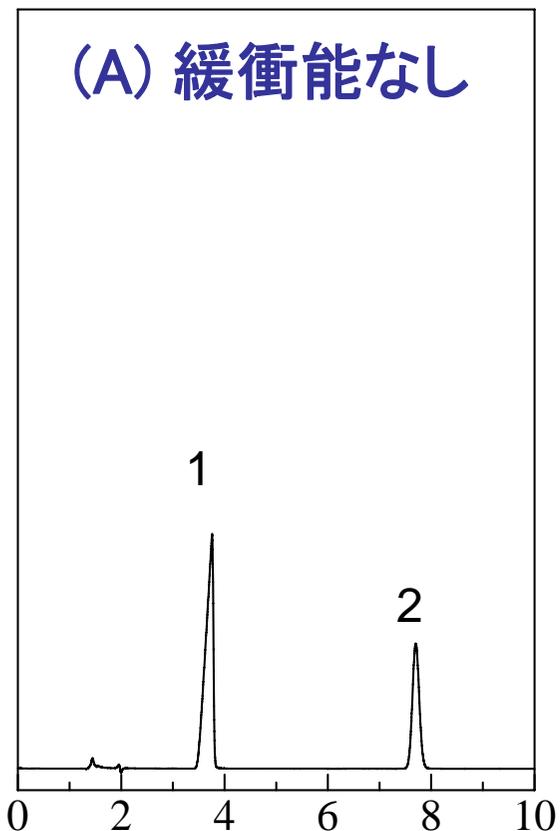


リン酸緩衝液はpH 4と9付近では緩衝能を持たない

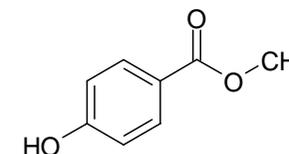
## 緩衝能がない移動相の場合

- ピーク形状がひずむ（リーディング）
- 注入量によって保持時間が変動
- 再現性の悪化

# 緩衝能の有無の比較(ピーク形状)



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  
ではピークがひずむこ  
ともある

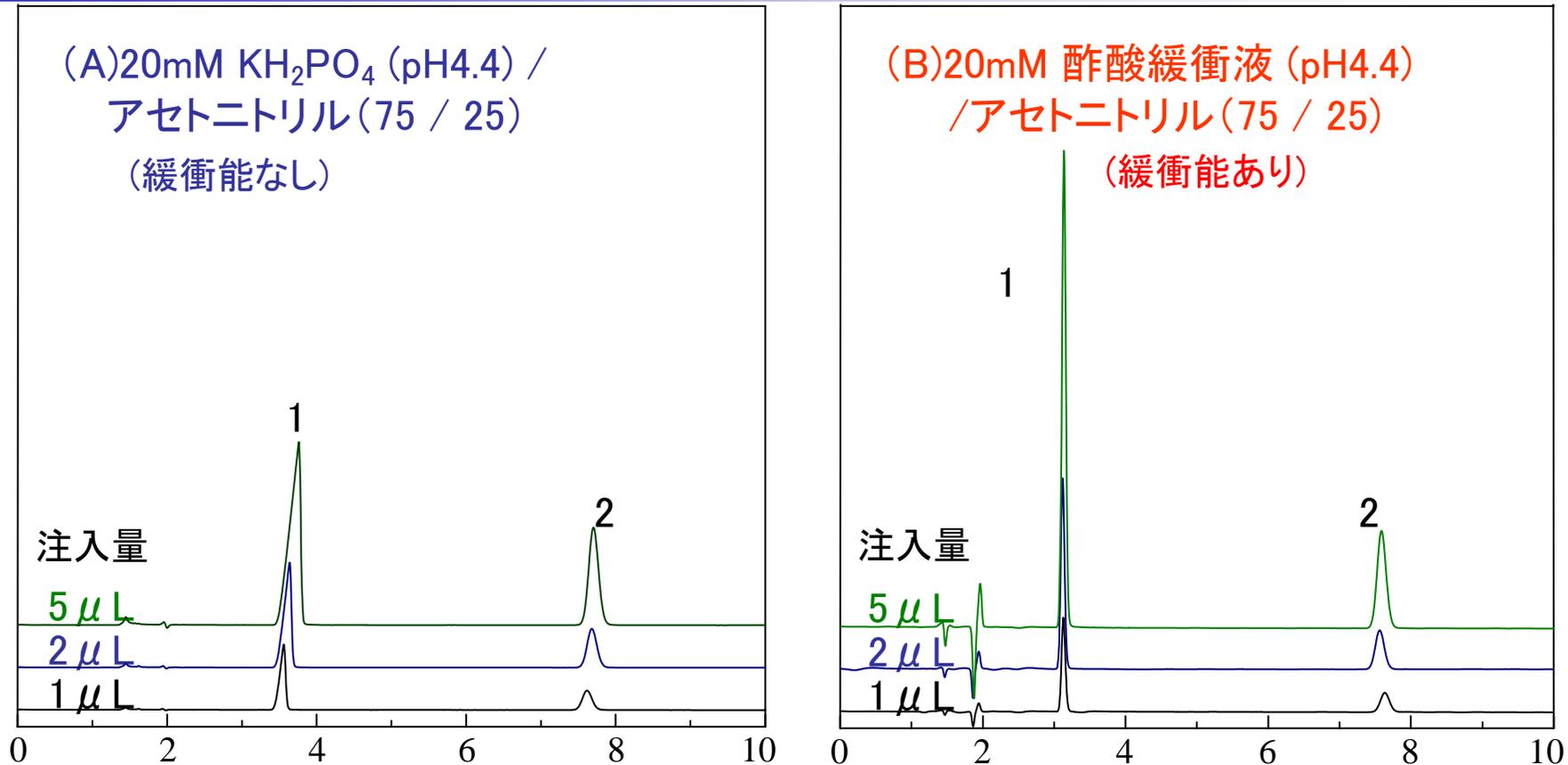
カラム : **L-column2 ODS** 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm

移動相 : (A) 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (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  $\mu$ L

# 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

# 緩衝能の有無の比較（再現性）

ロット番号	(A) 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH4.4)			(B) 20 mM 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	19.52	3.117	7.543	26.55
E4312	3.541	7.415	18.79	3.059	7.301	26.38
E4313	3.636	7.679	18.75	3.123	7.567	26.40
CV(%)	2.53	3.91	2.28	1.14	1.97	0.354

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

移動相 : (A) 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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  $\mu$  L

緩衝能のない移動相では解離性化合物のカラム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	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 <sub>3</sub> ) 9.36 (NH <sub>4</sub> +) 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
りん酸		1.83 6.43 11.46	1~2.8 5.4~7.4	5~50 mM
クエン酸		2.90 4.35 5.69	1.9~3.9 3.4~5.4 4.7~6.7	
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)

## 緩衝液の調製方法

- ・ 弱酸とその塩を等モルで混合するとpKa付近のpHの緩衝液になる  
例 10 mM酢酸緩衝液pH4.76(=pKa)  
酢酸0.3g(5 mmol)と酢酸ナトリウム0.41g(5 mmol)  
を1Lの水に溶かす
- ・ pHメーターを見ながら調製する
- ・ 計算で量を求める→pHメーターで確認する  
例 25 mMリン酸緩衝液pH7.0  
リン酸二水素カリウム1.36 g (10 mmol)とリン酸水素二ナトリウム2.12 g (15 mmol)を1Lの水に溶かす

## 緩衝液のノウハウ

- ・ 用いるpHで緩衝能がある緩衝液を使う（pH4前後のリン酸は緩衝能がない）
- ・ 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
  - グラジエントのとき
  - 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

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

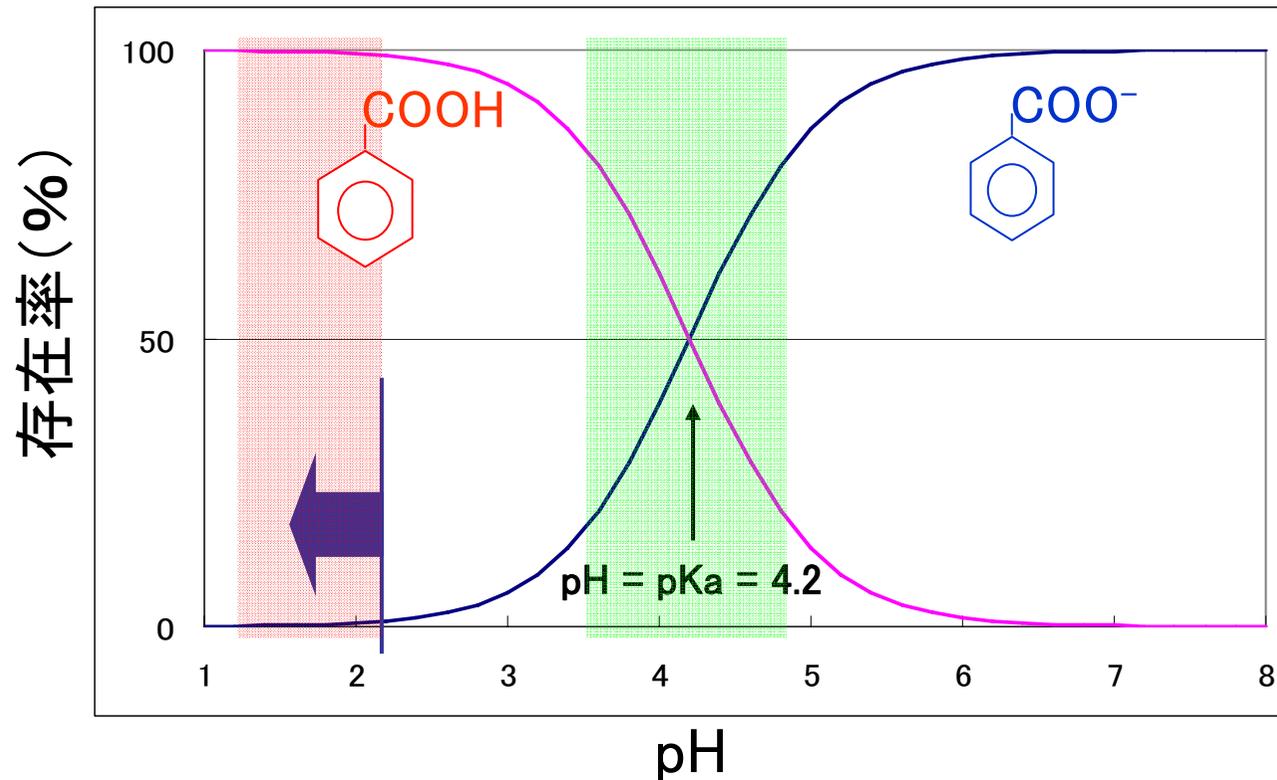
*L-column2 C8*の発売  
*L-column*プレカラムフィルターの発売  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

## 解離性化合物の分析法

- 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  
解離している化合物に、イオンペア試薬を添加し、イオン対を形成させて固定相に保持させる  
保持の弱い化合物（水溶性ビタミンなど）  
強酸性、強塩基性化合物（4級アンモニウム塩など）

# 緩衝液を使用する方法

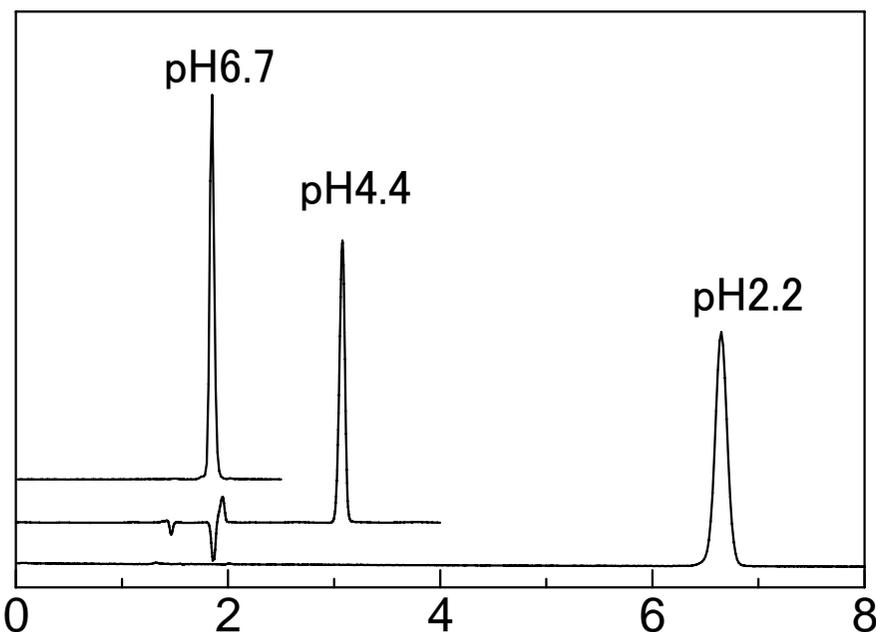
pHによる安息香酸の解離、非解離状態の存在率



pKaから 2小さいpHにすると解離状態は1%で保持が大きくなり、pHのばらつきによる影響が低減され、再現性が向上する

# 緩衝液を使用する方法(酸性化合物)

解離平衡が非解離側に移動すれば保持時間は長くなる



カラム: **L-column ODS** 5  $\mu$ 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)

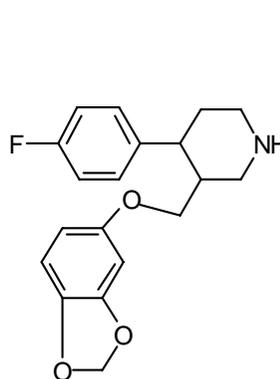
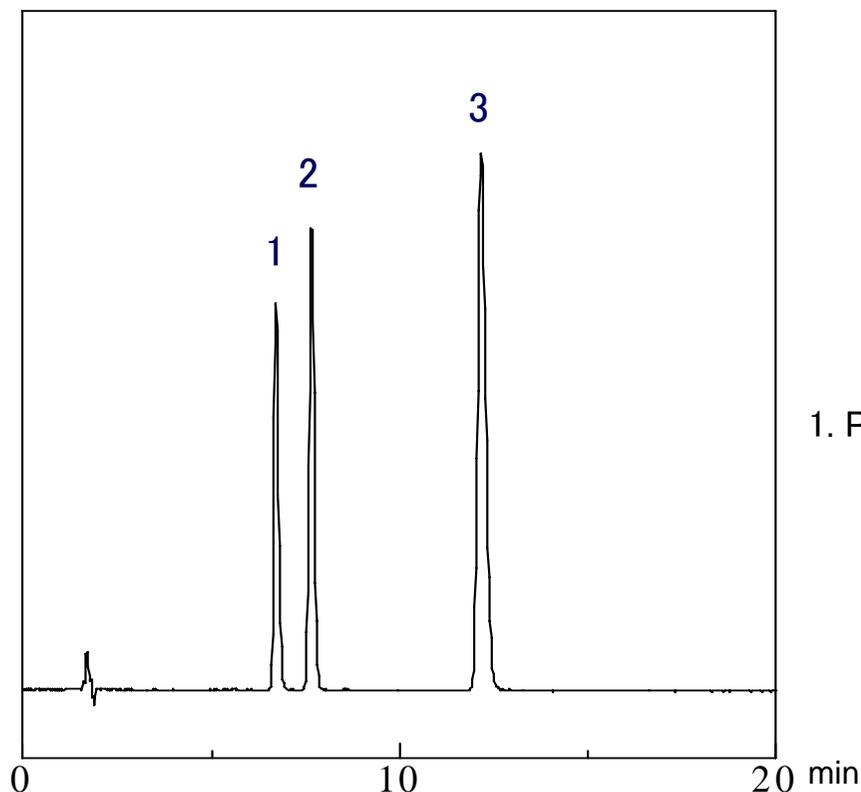
試料: 安息香酸

緩衝液のpHと保持時間

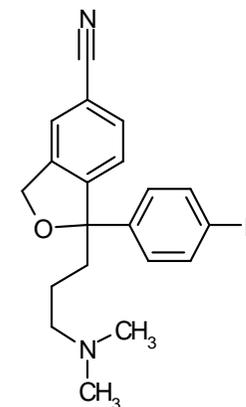
pH	保持時間 (分)	解離状態 (%)
2.2	6.65	1.0
4.4	3.08	61.3
6.7	1.85	99.7

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

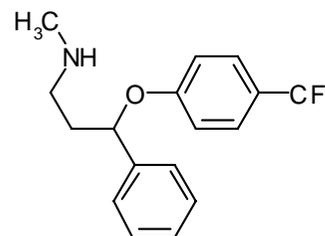
# 緩衝液を使用する方法(塩基性化合物)



1. Paroxetine (400 mg/L)



2. Citalopram (200 mg/L)



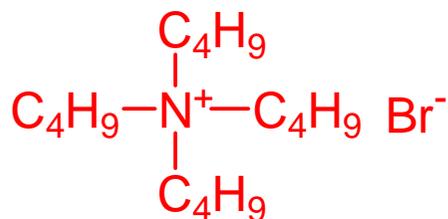
3. Fluoxetine (300 mg/L)

カラム: **L-column2 ODS** 5  $\mu$ 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  $\mu$ L

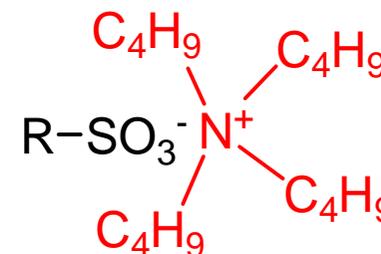
緩衝液を用いることで溶質の解離平衡が一定となり、  
シャープなピークが得られる

# 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

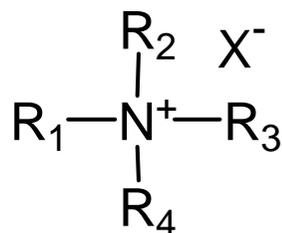


テトラブチルアンモニウム (TBA) ブロマイド

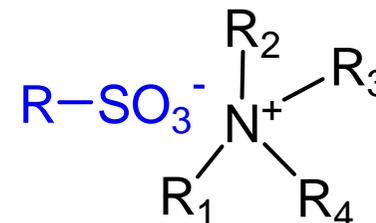


## イオン対形成

電荷を打ち消しあって疎水性が増加する

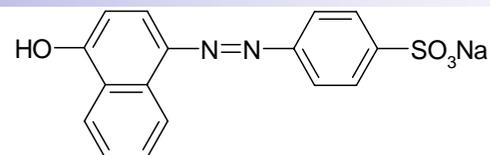
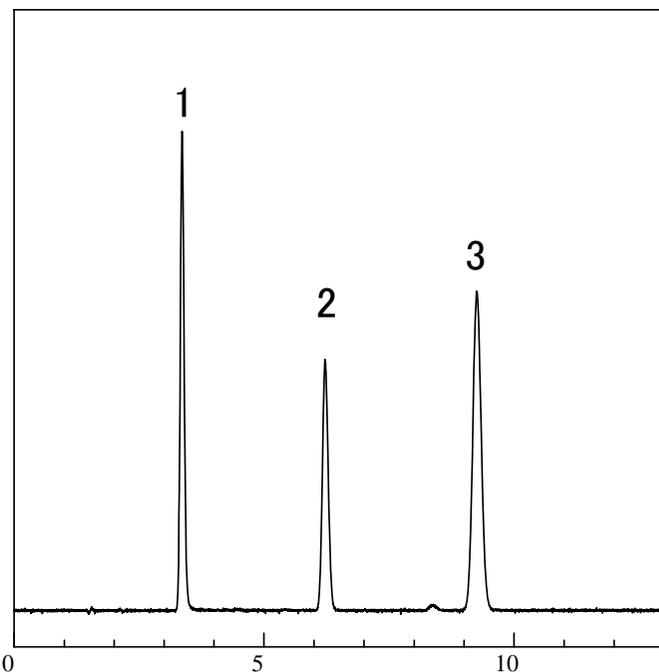


- (1) アルキルスルホン酸
- (2) 過塩素酸塩

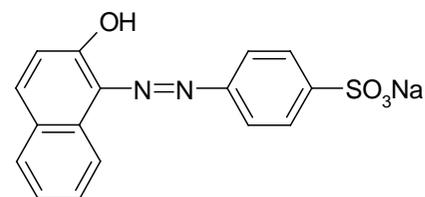


第四級アンモニウムイオンはpHで解離を抑えることはできない

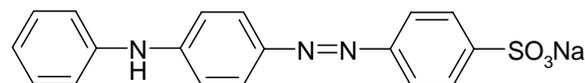
# イオンペアクロマトグラフィー(酸性化合物)



1.  $\alpha$ -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  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

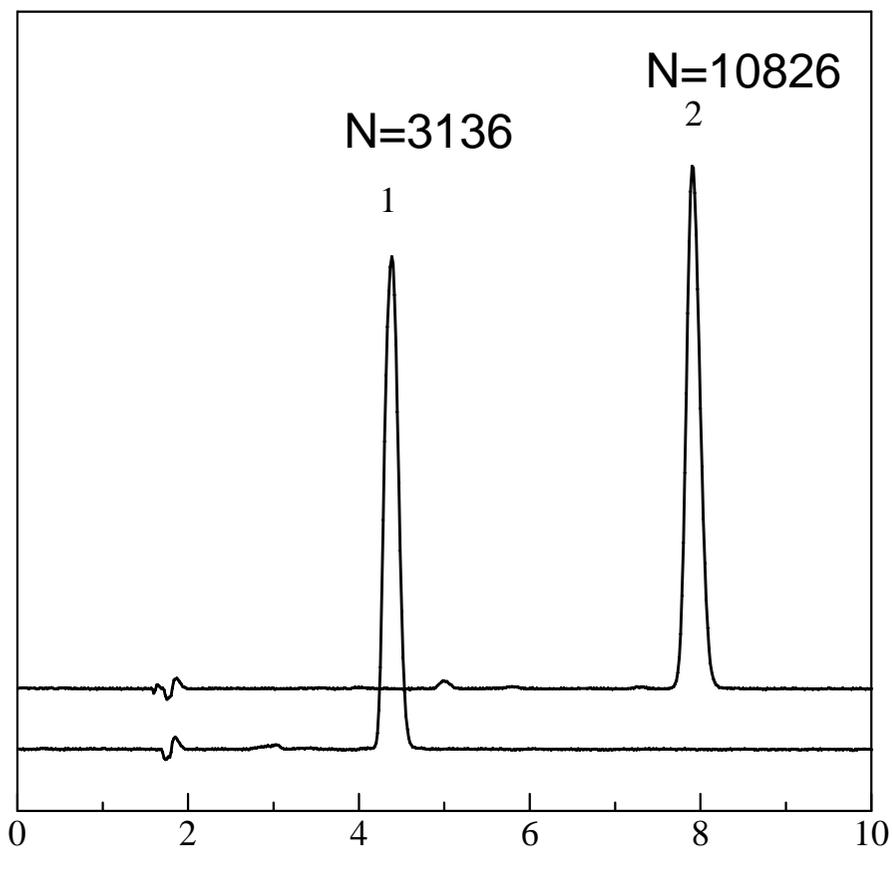
移動相: アセトニトリル/水 (45/55, 10 mM TBA-PO<sub>4</sub>); 流量: 1 mL/min;

検出: UV 430 nm; 注入量: 1  $\mu$ L

試料: 1.  $\alpha$ -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

イオンペア試薬により理論段数と保持が向上する

# イオンペアクロマトグラフィー(塩基性化合物)



【HPLC条件】

カラム: **L-column2 ODS** (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm)

移動相: (1) アセトニトリル/20 mMリン酸 (3/7)

(2) アセトニトリル/20 mMリン酸 (3/7)

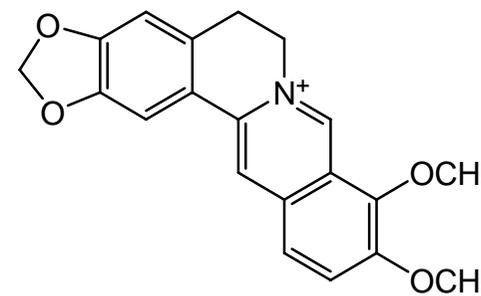
+ 10 mMペンタンスルホン酸ナトリウム

流量: 1 mL/min

温度: 40°C

注量: 1  $\mu$ L

試料: ベルベリン



第4級アンモニウム塩はイオンペア試薬により理論段数と保持が向上する

## イオンペア試薬

添加剤	MS	分子式	使用濃度	備考
アルキルスルホン酸Na		$C_nH_{2n+1}SO_3Na$	5-20 mM	$3 \leq n \leq 13$ 炭素鎖が長いと水に溶けにくい
n-ドデシル硫酸Na (SDS)		$C_{12}H_{25}OSO_3Na$	5-10 mM	水に溶けやすい
過塩素酸Na		$HClO_4$	100-200 mM	テーリング防止効果大
パーフルオロ酢酸	○	$C_nF_{2n+1}COOH$	<5 mM	$1 \leq n \leq 7$ システムに残留しやすい
テトラブチルアンモニウム塩 (TBA)		$(C_4H_9)_4N$	5~20mM	Cl、Br、OHなどの塩がある
ジアルキルアンモニウム	○	$(C_nH_{2n+1})_2NH$	<5 mM	$3 \leq n \leq 6$

## 解離性化合物の分析のノウハウ

- ・ 移動相には緩衝能がある緩衝液を使用
- ・ 試料を非解離状態にすると保持が大きくなる
- ・ イオンペア試薬はアルキル基鎖長や濃度(5~20 mM)により保持時間を変えることができる
- ・ イオンペア試薬はカラムなどに残存しやすいのでカラムを専用化する

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

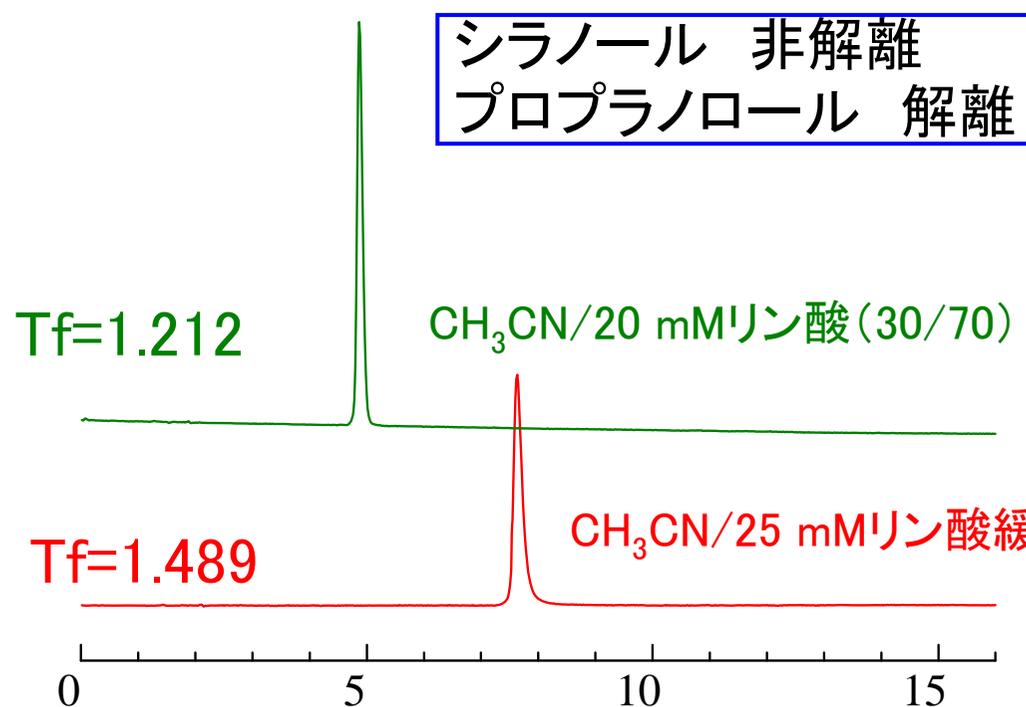
*L-column2 C8*の発売  
*L-column*プレカラムフィルターの発売  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

# 塩基性化合物のテーリング防止策

## 残存シラノールと試料が相互作用しないようにする

- ・ 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

## 酸性移動相の使用



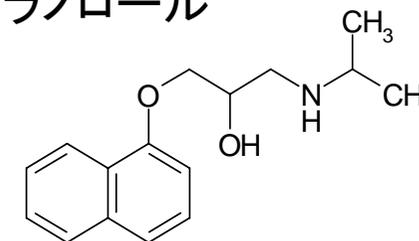
カラム: **L-column ODS**

5 μm, 4.6 × 150 mm

流量: 1 mL/min

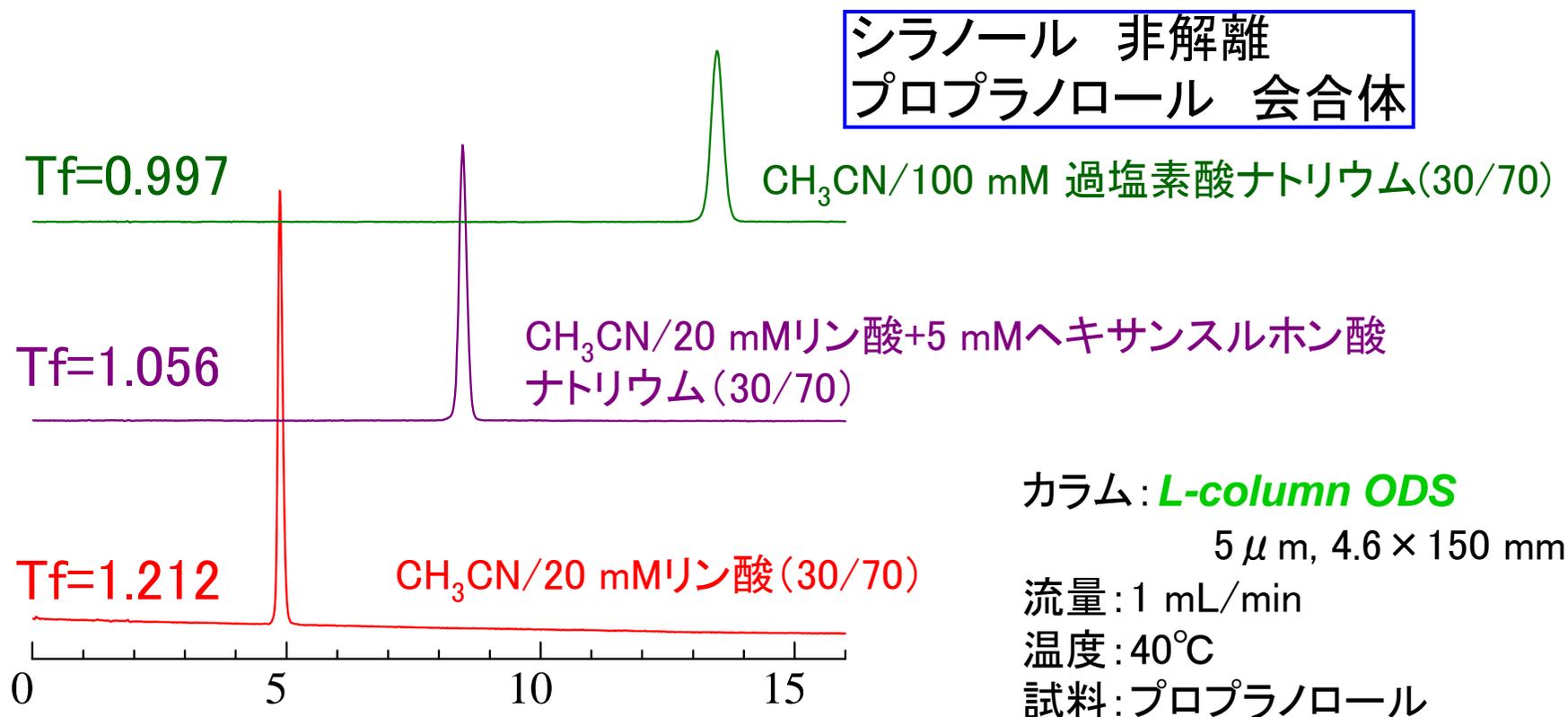
温度: 40°C

試料: プロプラノロール



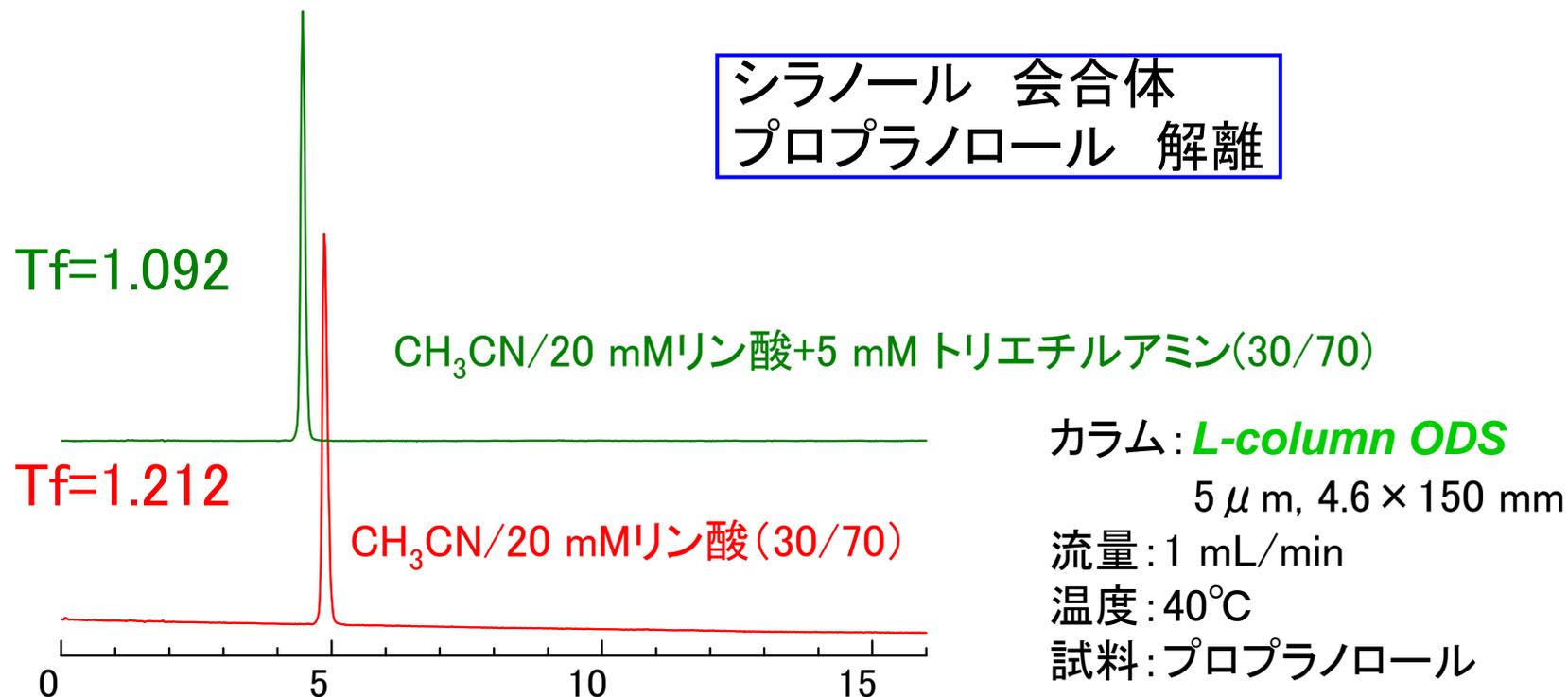
残存シラノールの解離が抑えられ、塩基性物質が残存シラノールとイオン結合できない  
ただし、保持が小さくなる

# イオン対試薬の使用



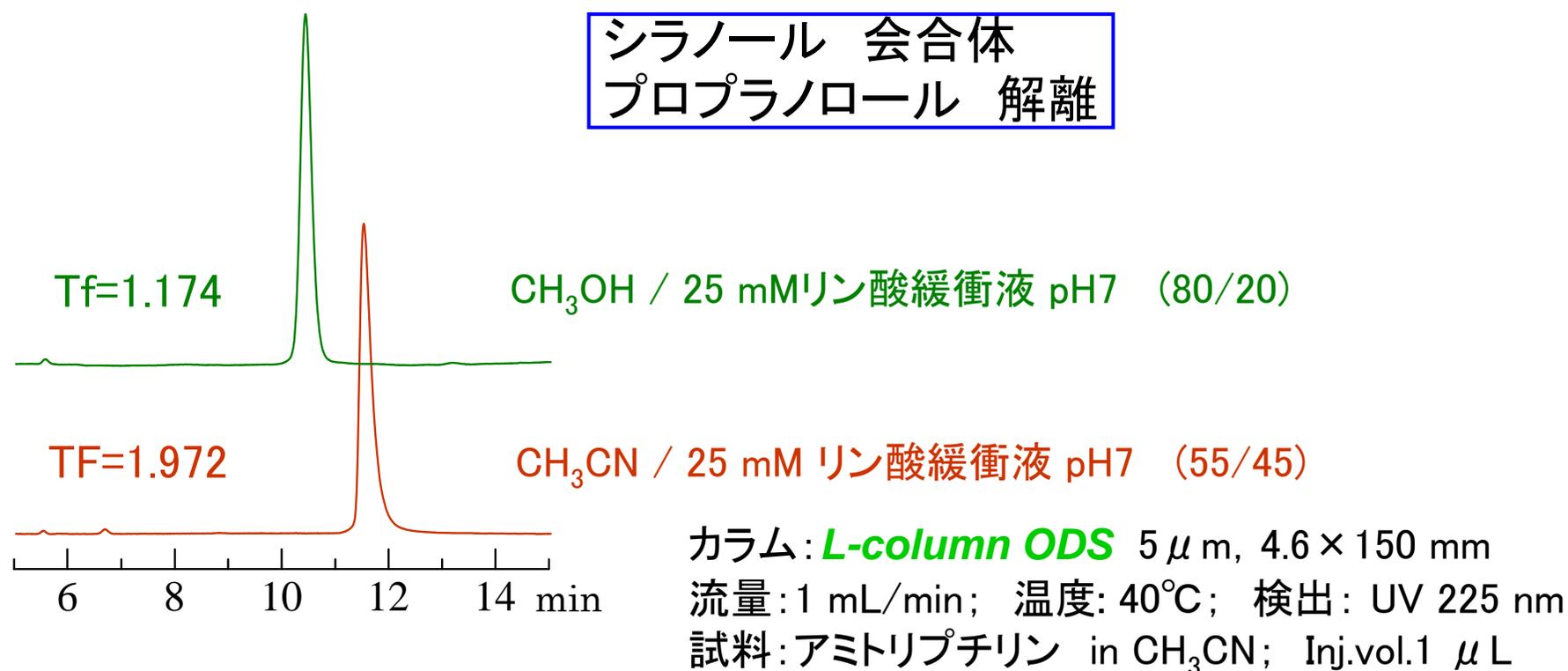
塩基性化合物はイオン対試薬と結合するため、残存シラノールと相互作用できない  
ただし、カラムを専用化しなくてはならない

# アンチテーリング剤の使用



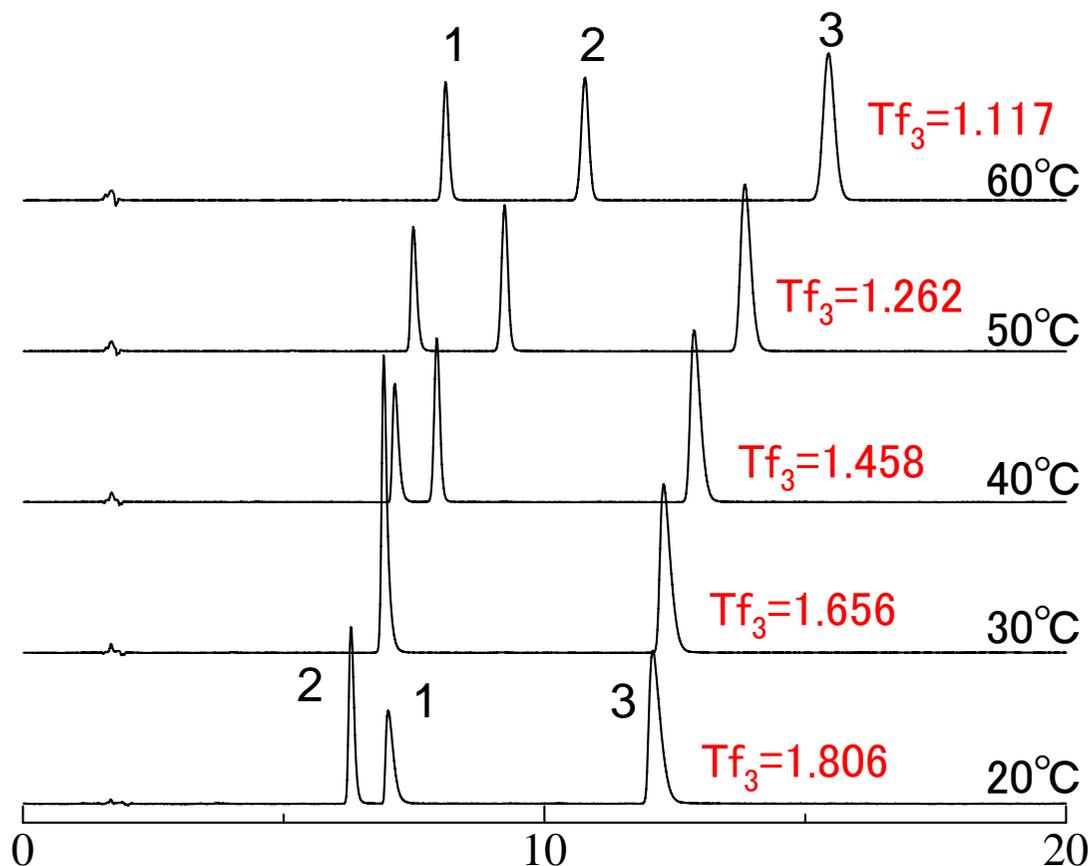
添加アミン類が残存シリノールと結合するため塩基性化合物は  
残存シリノールと相互作用できない  
ただし、カラムを専用化しなくてはならない  
耐久性が悪くなる

## 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、塩基性化合物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

## 温度を高くする



カラム: **L-column2 ODS**

3  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm

移動相: CH<sub>3</sub>CN/25 mM リン酸

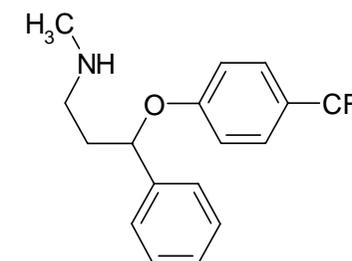
緩衝液 pH7 (35/65)

流量: 1 mL/min

試料: 1. パロキセチン

2. シタロプラム

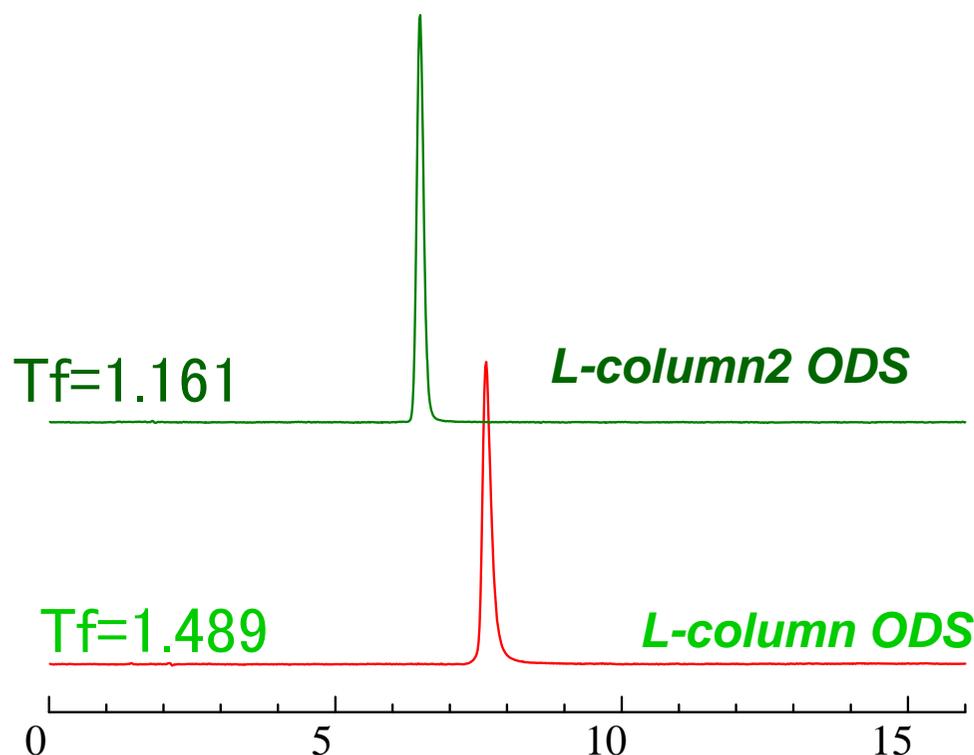
3. フルオキセチン 各2  $\mu$  L



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ラノールの間  
の吸脱着速度が速くなり、テーリングが改善される  
ただし、カラムの耐久性は低下する

# 十分なエンドキャッピングをしたカラムの使用



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:  $40^\circ\text{C}$   
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

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

*L-column2 C8*の発売  
*L-column*プレカラムフィルターの発売  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

# 分離度 $R_S$

分離度  $R_S$  は2成分の分離の程度を表す

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

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

$N$  は理論段数  $N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)$   $t_R$  保持時間  
 $W_{1/2}$  ピークの半値幅

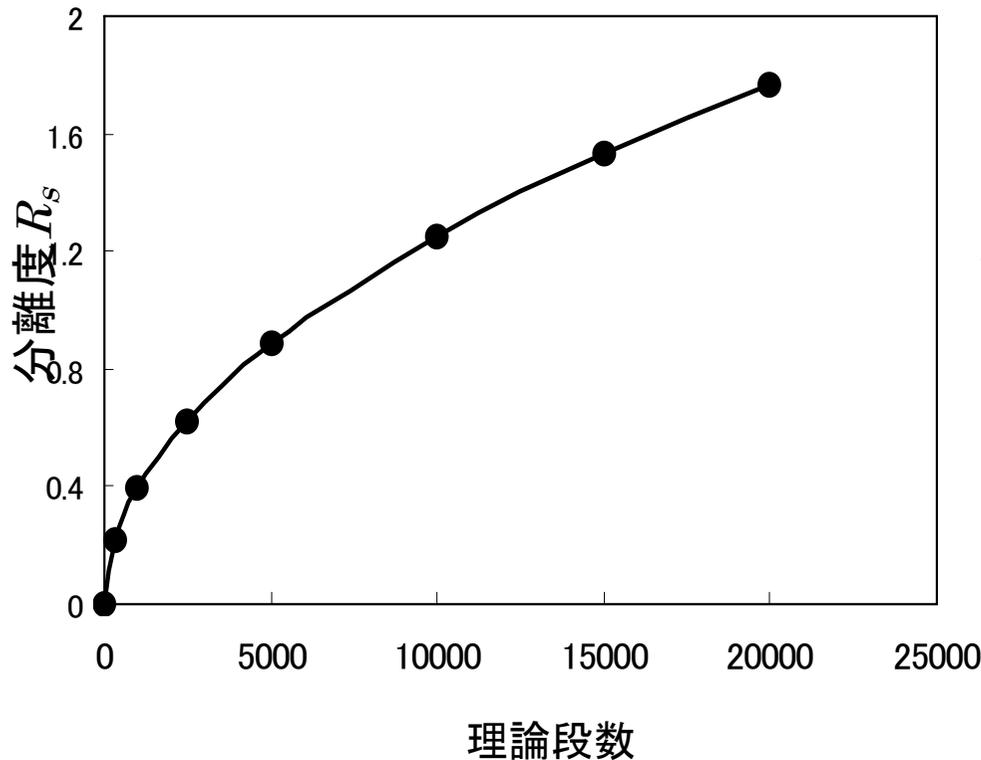
$\alpha$  は分離係数  $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$

$k$  は保持係数  $k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$   $t_0$  デッドタイム

# 理論段数 $N$ の $R_s$ への寄与

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

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$



【モデル条件】

$\alpha = 1.2$

$k = 2.3$

カラムを長くする

カラム長さ 150 mm  $\rightarrow$  250 mm  
 で  $N$  は 1.67 倍、 $R_s$  は 1.29 倍

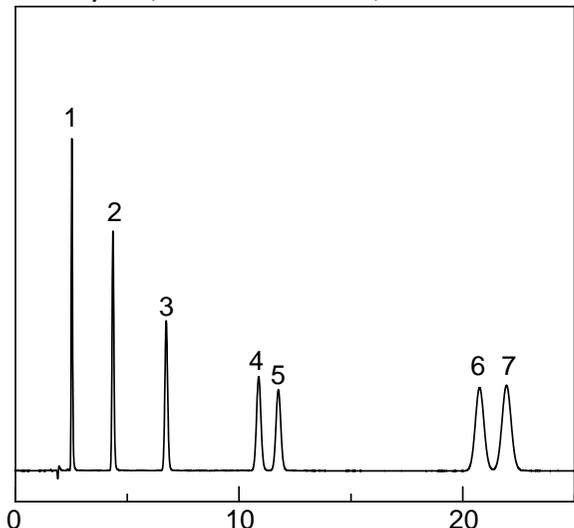
充填剤粒子径を小さくする

粒子径  $5 \mu\text{m} \rightarrow 2 \mu\text{m}$  で  $N$  は  
 2.5 倍、 $R_s$  は 1.58 倍

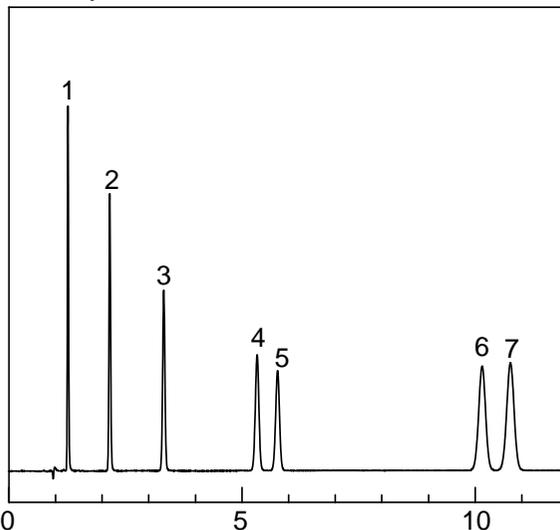
いずれも圧力の上昇を伴う

# 粒子径を小さくする

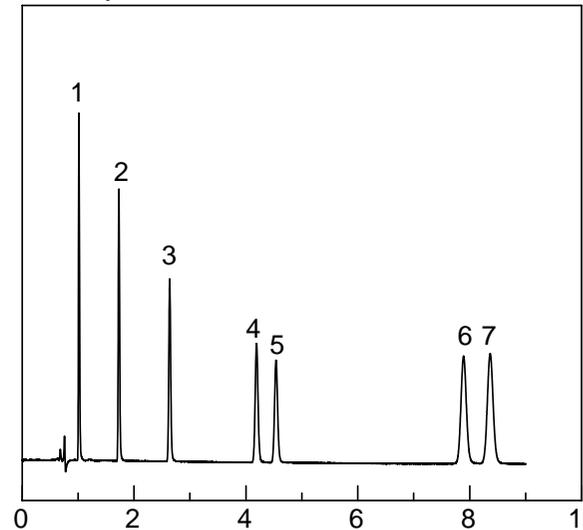
(A) 5  $\mu$  m, 2.1  $\times$  150 mm, 0.2 mL/min



(B) 3  $\mu$  m, 2.1  $\times$  150 mm, 0.4 mL/min



(C) 2  $\mu$  m, 2.1  $\times$  150 mm, 0.5 mL/min



粒子径, カラムサイズ, 流量	$t_{R7}$ (min)	$N_7$	$R_{S\ 6,7}$	P(MPa)
5 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm, 0.2 mL/min	22.0	12813	1.60	4.0
3 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm, 0.4 mL/min	10.8	21543	2.13	23.5
2 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm, 0.5 mL/min	8.36	30638	2.55	57.2

【分析条件】装置:Agilent 1200SL; 移動相:アセトニトリル/20mMリン酸(50/50)  
 温度:25°C; 検出:UV254 nm; 注入量:0.5  $\mu$  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.同エチル, 4.同イソプロピル, 5.同プロピル, 6.同イソブチル, 7.同ブチル

# 分離係数 $\alpha$ の $R_s$ への寄与

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

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2}$$

【モデル条件】

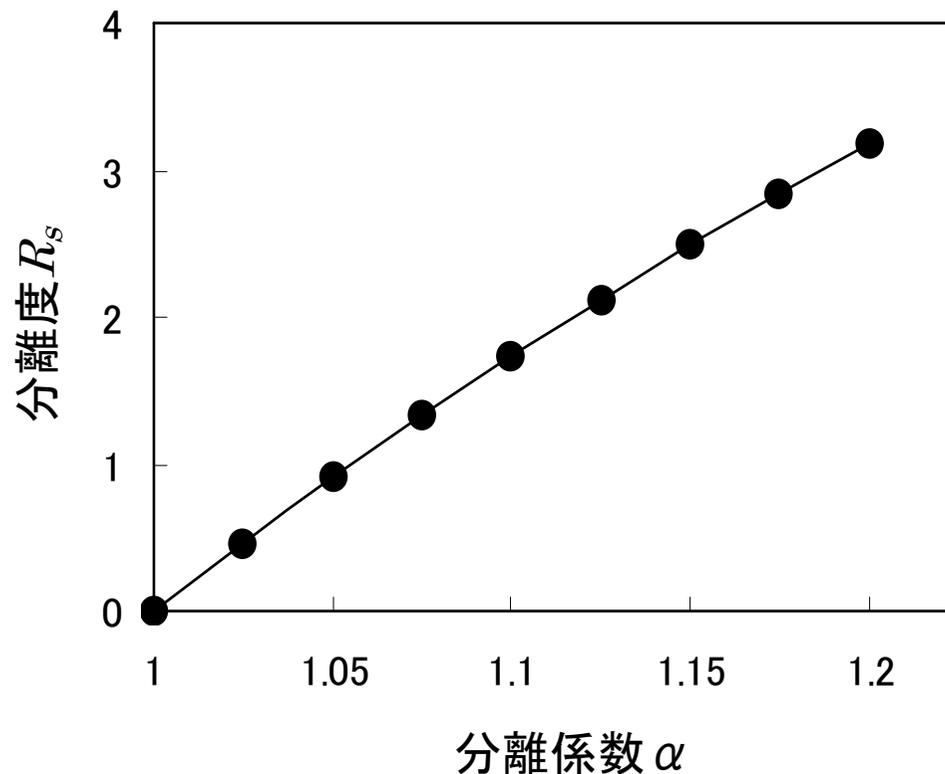
カラムサイズ: 4.6 × 150 mm

粒子径: 5 μm

$t_0 = 1.5$

$t_R = 5$

$N = 12000$

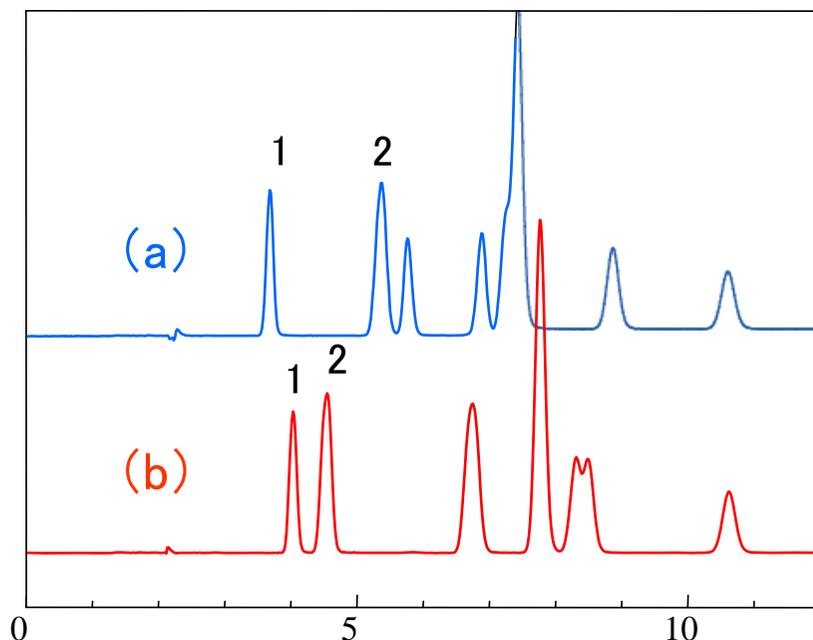


分析条件の変更

移動相の種類、組成、温度、  
pH、カラムなど

$R_s$ を改善するには効果的

# 有機溶媒の種類の変更



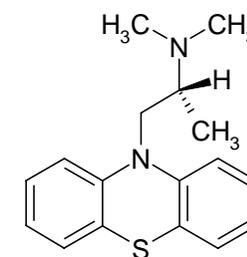
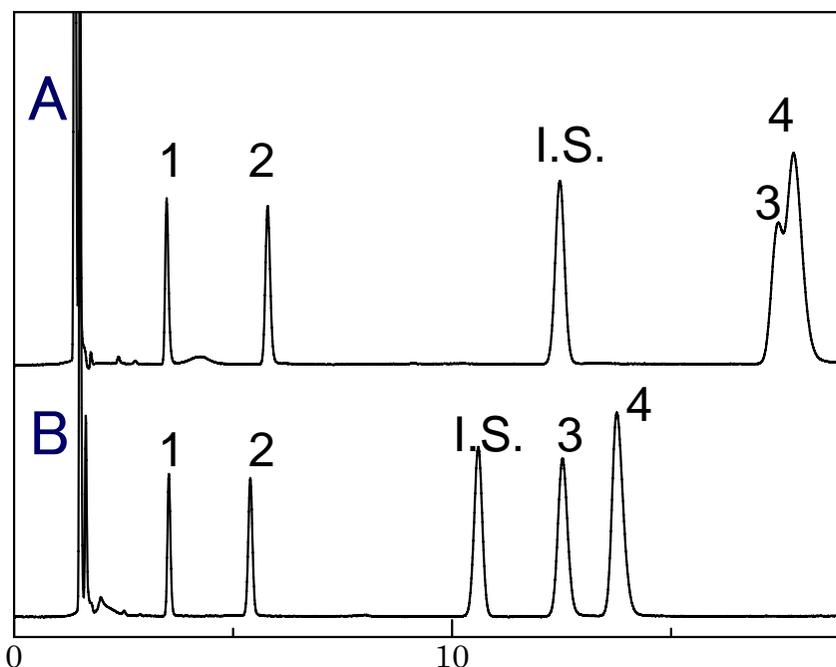
(a) メタノール/  
 10mM 酢酸アンモニウム (15/85)  
 $R_S(1,2)=6.576$   $\alpha(1,2)=1.80$

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

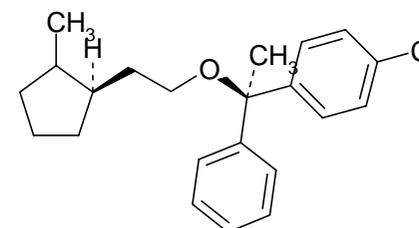
カラム: **L-column ODS**  $5\mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 150\text{ mm}$ ; 試料: サルファ剤

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

# 充填剤の変更 (C8)



3. Promethazine (11.5 mg/L)



4. Clemastine (20 mg/L)

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

B **L-column2 C8** 5 μm, 4.6 × 150 mm

移動相: CH<sub>3</sub>CN/25 mM リン酸緩衝液 pH7.0 (40/60)

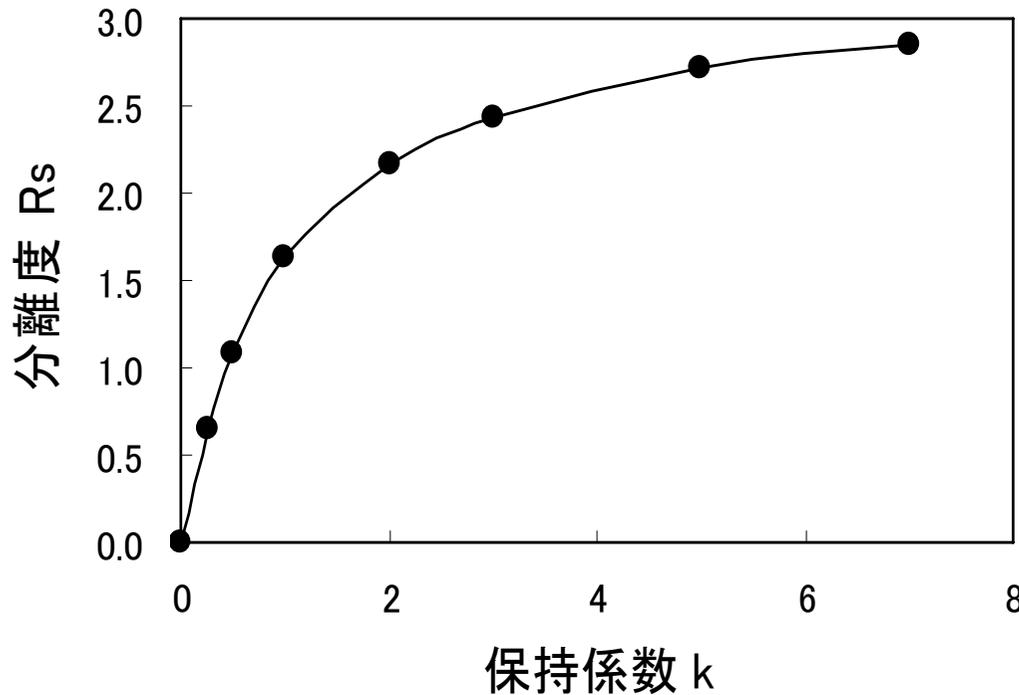
流量: 1 mL/min; 温度: 40°C; 検出: UV 220 nm; Inj.vol.1 μL

C8に変更すると分離が改善される

# 保持係数 $k$ の $R_s$ への寄与

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

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

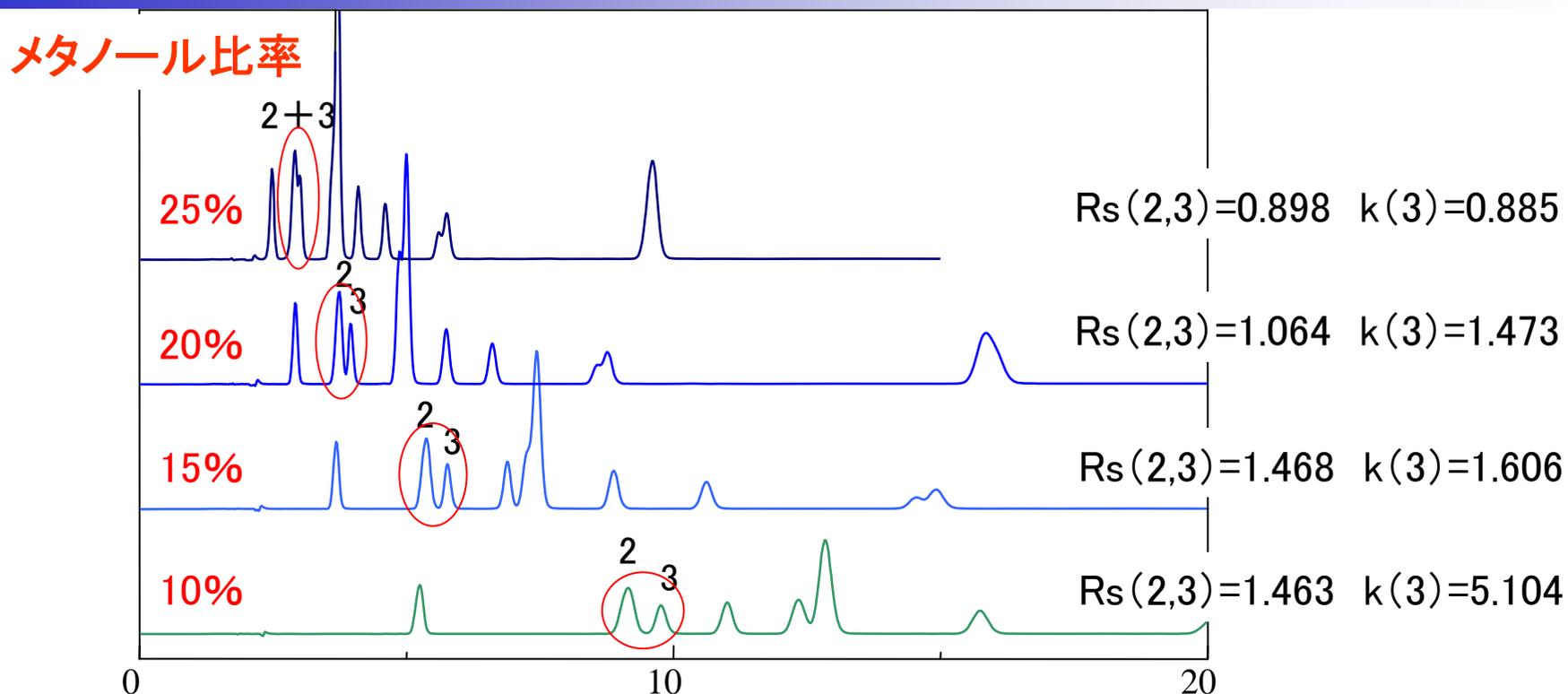


保持時間を遅くする

移動相の有機溶媒と水の比率  
を変えて  $k$  を調整する

$k$  が 2 程度まで有効

# 移動相の組成を変えて溶出を遅くする

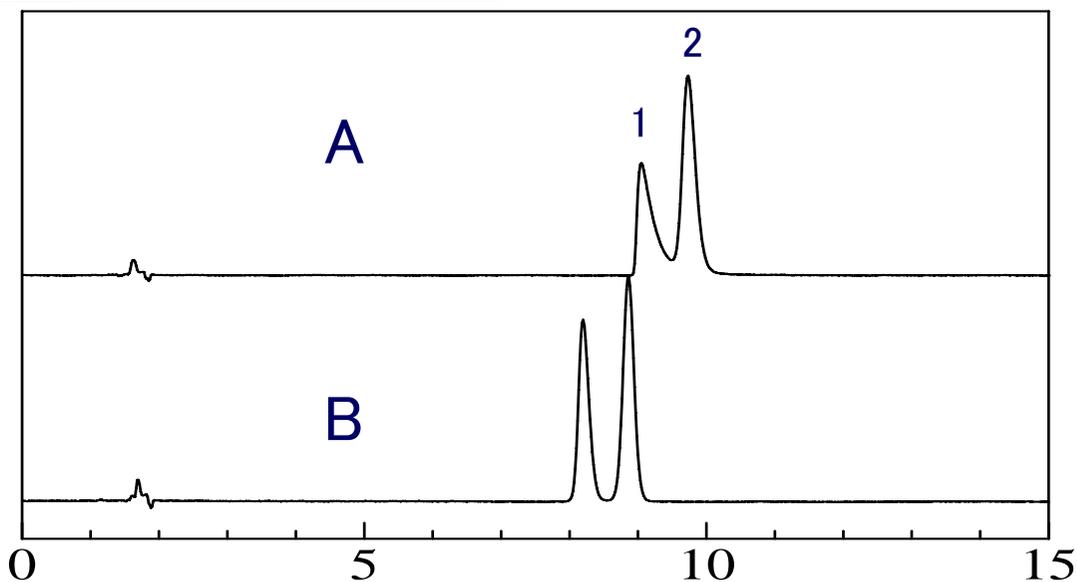


カラム: **L-column ODS** 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm

移動相: メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム

保持係数が2 (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

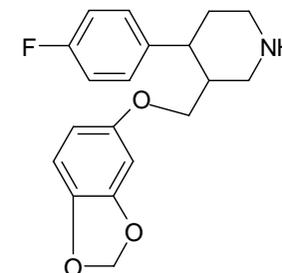
# 高度にエンドキャッピングしたカラム



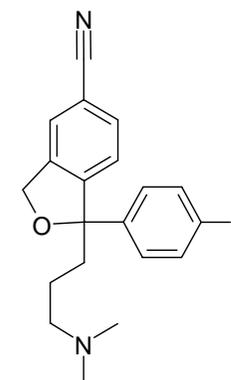
カラム : A: 他社カラム 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm

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

移動相 : CH<sub>3</sub>CN/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

## 分離の改善のノウハウ

- ・ 理論段数を大きくすることは圧力の上昇を伴う
- ・ 選択性を変えることが最も有効である
- ・ 保持係数を大きくすることは2程度まで有効(150mmのカラムで5分程度まで)
- ・ ピーク形状が悪い場合、カラムを変えることが有効である

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

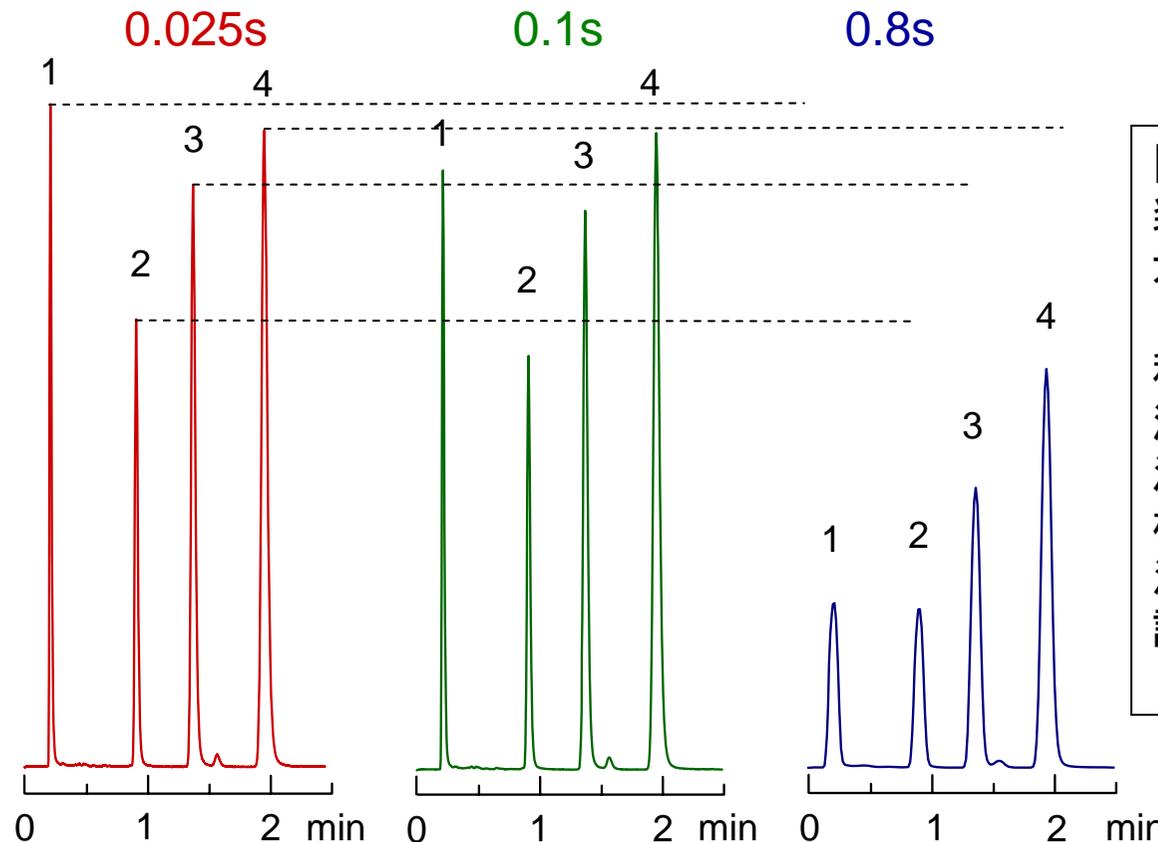
*L-column2 C8*の発売  
*L-column*プレカラムフィルターの発売  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

## 2 $\mu$ mODSカラム使用のノウハウ

- データサンプリング周期は流量、保持時間によって最適化する
- デッドボリュームを最小にする
- プレカラムフィルターの使用は耐久性を向上させる
- 移動相及び試料はろ過する

# データサンプリング周期の影響

検出器のデータサンプリング周期が長いと  
保持時間の短いピークはブロードになる



【分析条件】  
装置: Agilent 1200SL  
カラム: **L-column2 ODS** 2  $\mu$  m  
(2.1  $\times$  50 mm)  
移動相: アセトニトリル/水 (50/50)  
流速: 0.6 mL/min  
温度: 25°C  
検出: UV254 nm  
注入量: 0.5  $\mu$  L  
試料: 1.ウラシル、2.ベンゼン  
3.トルエン、4.ナフタレン

# データサンプリング周期

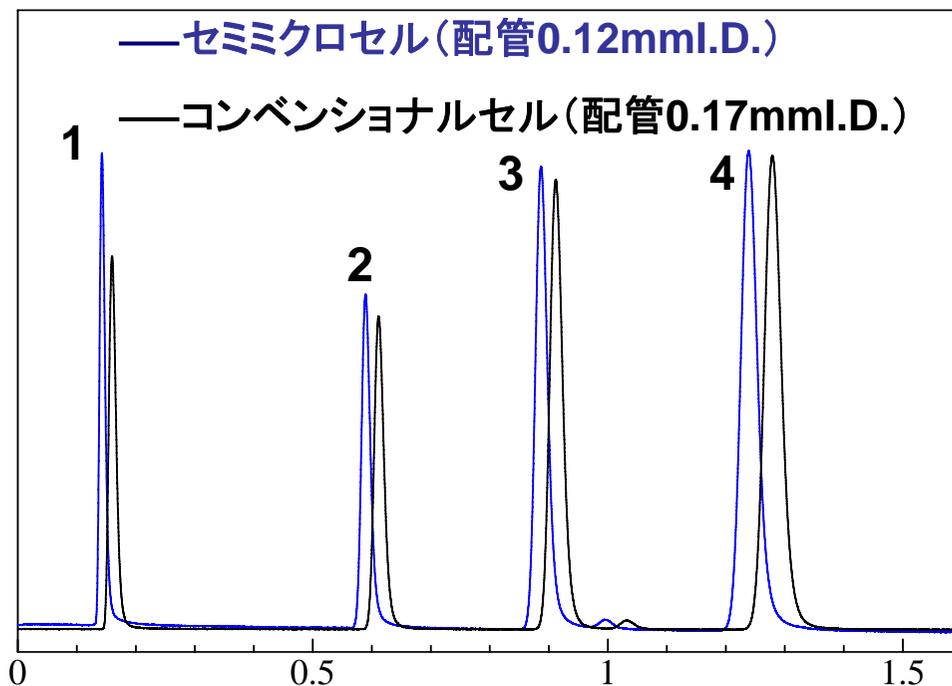
## データサンプリング周期の選択の目安 (2.1 $\times$ 50 mm)

保持時間 (min)		データサンプリング周期 (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

装置: Agilent 1200SL

流量、保持時間により最適なデータサンプリング周期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。

# デッドボリュームの影響

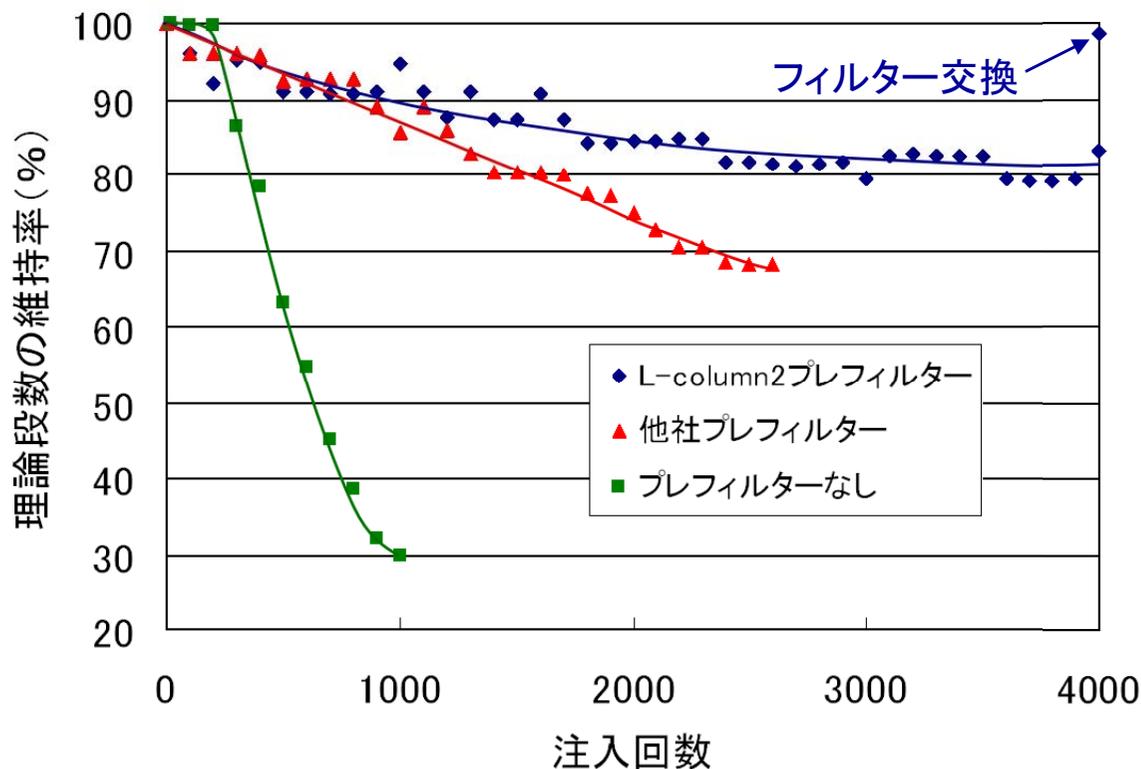


装置: Agilent 1200SL  
 カラム: **L-column2 ODS** 2  $\mu$  m  
 2.1  $\times$  50 mm  
 移動相: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50/50)  
 流量: 0.6 mL/min  
 温度: 25°C  
 検出: UV254 nm  
 注入量: 0.5  $\mu$  L  
 試料: 1.ウラシル、2.ベンゼン、3.トルエン、4.ナフタレン

	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>
セミマイクロセル	970	7272	8679	9009
コンベンショナルセル	795	6305	7885	8691

保持時間が短い化合物ほどセミマイクロセルと0.12 mmI.D.の配管が必要

# プレカラムフィルターの必要性



【分析条件】カラム: **L-column2 ODS 2 μm** (2.1 × 100 mm); 移動相: アセトニトリル/水 (60/40); 流速: 0.4 mL/min; 温度: 40°C; 検出: UV254 nm; 注入量: 0.5 μL; 試料: ナфтаレン

プレカラムフィルターの装着により耐久性が向上

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

*L-column2 C8*の発売  
*L-column*プレカラムフィルターの発売  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

## カラムを長持ちさせるためには

### 充填剤の劣化を抑える

- ・ 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

- ・ 移動相や試料をろ過する
- ・ 注入量を少量に抑える
- ・ ガードカラムやプレカラムフィルターを使用する
- ・ 定期的にかラムを洗浄する

# 再現性を向上させるためには

## カラム

- ・ 残存シラノールの少ないカラムを使用する
- ・ 定期的にカラムを洗浄する

## 分析条件

- ・ 緩衝能のある緩衝液を使用する
- ・ 注入量を少量に抑える

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性の向上させるためには

## <トラブルシューティング>

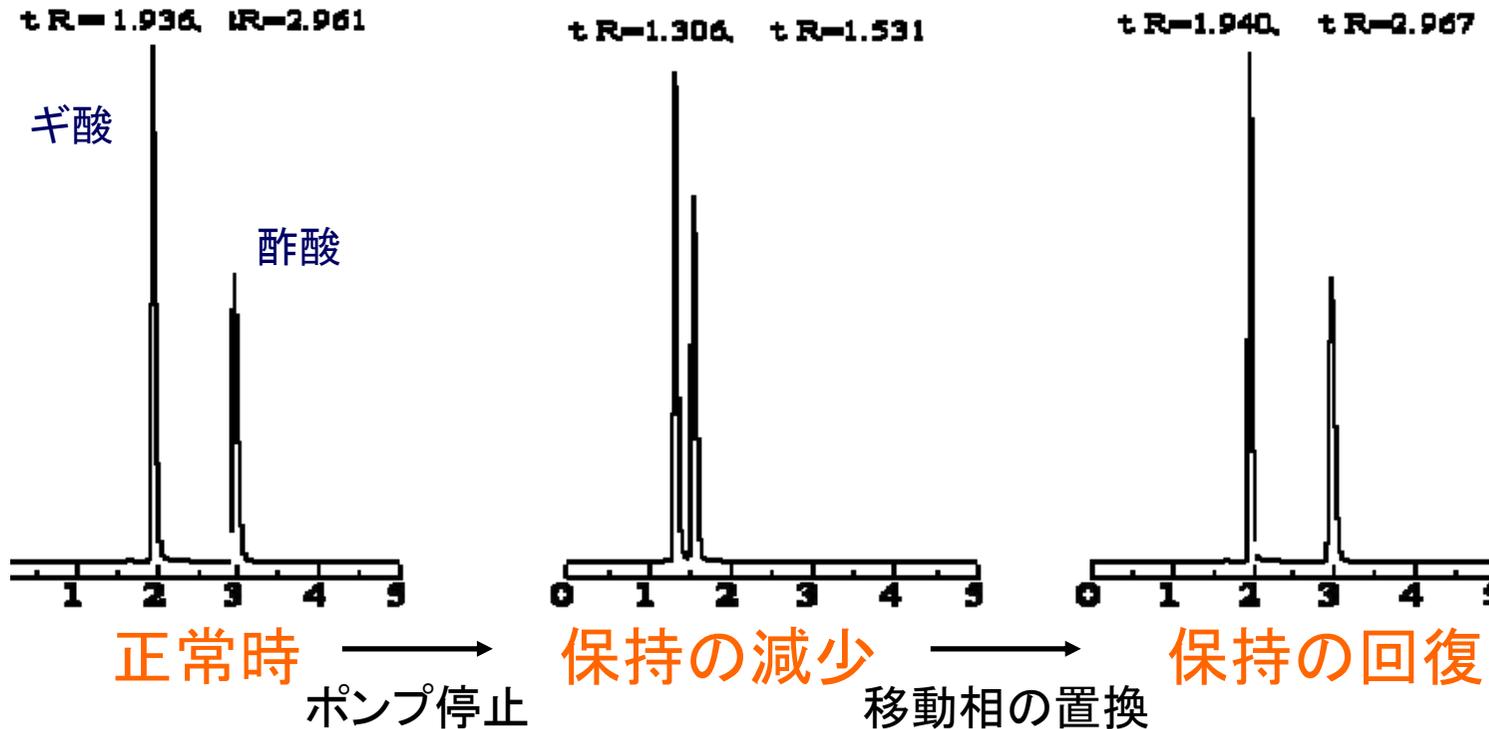
水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムの詰まりのトラブル

## <お知らせ>

*L-column2 C8*の発売  
*L-column*プレカラムフィルターの発売  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

# 水系100%に近い移動相

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



カラム: **L-column2 ODS** 4.6 × 150 mm  
移動相: アセトニトリル/20 mMリン酸 (2/98)

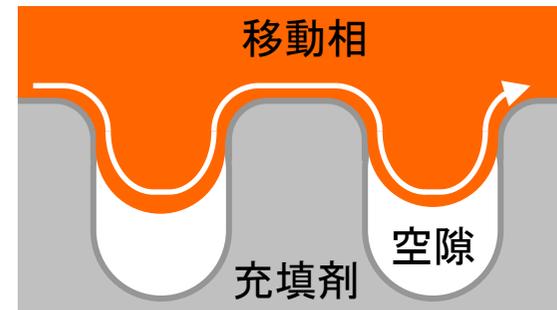
## 水系100%に近い移動相

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

正常時



保持の減少時



- 有機溶媒比率の高い移動相(50%程度)で置換する
- ポンプを止めずに分析する
- 保持の大きい化合物がカラム先端にたまっていくので、こまめに洗浄する

## 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-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%で洗浄 : メタノール 100%

〔カラム容量の20倍程度の量で洗浄する  
(1 mL/minなら約30分間)〕

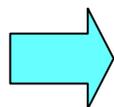
- ・塩を析出させない
- ・脂溶性の夾雑物を多く含む試料の場合、THFで洗浄する
- ・**L-column** シリーズの場合、カラムを逆向きで洗浄することも有効(マイクロカラム以外)

## ODSカラムの保管について

長期間使用しない場合

カラムの洗浄方法に従って洗浄を行う

(最後はメタノールまたはアセトニトリルで置換する)



プラグ(栓)をして保管

(温度変化の少ないところで保管)

## カラムの詰まりのトラブル

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  $\mu$ m 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pH6.5のグラジエント

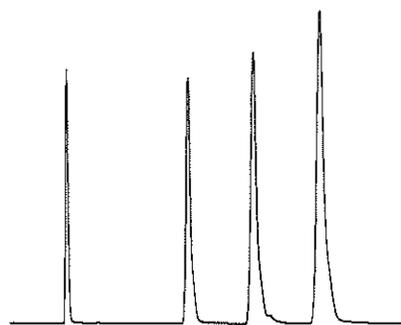
試料：医薬品など

注入量：5～10  $\mu$ L

# 劣化カラムの調査

洗浄前

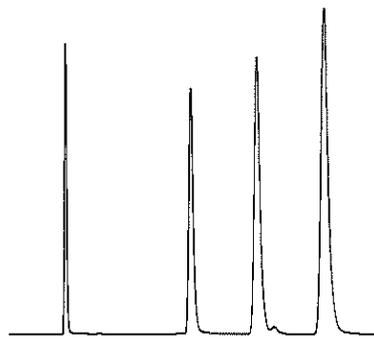
N=7000、P=17.5MPa



3.0 4.0 5.0

洗浄後

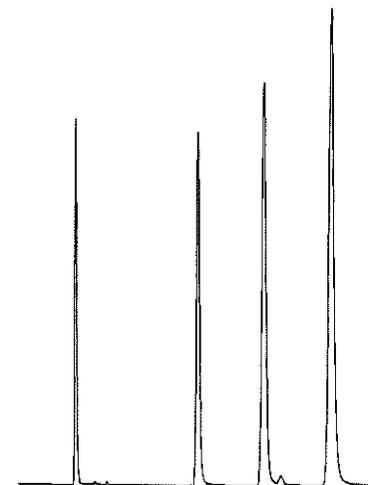
N=8500、P=17.0MPa



0.0 4.0 5.0

フィルター交換後

N=17000、P=13.0MPa



3.0 4.0 5.0

カラムの入り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復活した

原因:カラムの入り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？

## カラムの詰まりの防止策

### 試料由来

ろ過、注入量を減らす、ガードカラムの使用

### 移動相由来

作り直す、ろ過、ガードカラムの使用

**中性のリン酸緩衝液ではバクテリアの発生が多い**

作り直す、有機溶媒を添加、ろ過、ガードカラムの使用

# 目次

## <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  
塩基性化合物のテーリング防止策  
分離の改善  
2  $\mu$  mODSカラムの使用  
カラムを長持ちさせるためには  
再現性を向上させるためには

## <トラブルシューティング>

水系100%に近い移動相  
カラムの洗浄と保管  
カラムのつまり

## <お知らせ>

**L-column2 C8の発売**  
**L-columnプレカラムフィルターの発売**  
展示のブースのご案内  
その他のご案内

# L-column2 C8 新発売

**新発売**

## L-column2 C8

ついに L-column2 にオクチルカラムが登場します

高度エンドキャッピングのもたらす高性能がオクチル(C8)カラムでも実現しました。疎水性物質の迅速分析に最適です。ODSカラムでは分離が不十分な一斉分析が、C8カラムを用いることで、立体認識能や極性の違いにより、分離が飛躍的に改善することがあります。

■ 低吸着性

L-column2 C8 は、高度エンドキャッピングにより残存シラノール基を極限まで抑え、L-column C8 を超えた高性能カラムです。  
L-column2 ODS 同様、酸性物質から塩基性物質、さらに配位化合物まで幅広い化合物の分析に対応できます。  
Fig.1は、抗ヒスタミン剤を一斉分析した例です。プロメタジンやクレマスタンは塩基性で吸着しやすい物質ですが、L-column2 C8 は、シャープなピークが得られています。

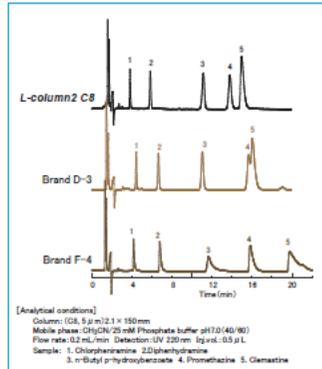


Fig.1 カラム比較(抗ヒスタミン剤)

L-column2 C8

平均粒子径 5 μm  
炭素含有量 10%  
エンドキャッピング法 高度エンドキャッピング  
平均細孔径 12 nm  
使用範囲 pH2~7.5 ※

※ 使用可能な範囲は、有機溶媒含有量・カラム長さなどにより異なります



● 2010年9月現在の価格(税別)になります  
● 本記事とは異なる1.8 μmタイプ(カラム長さ)があります  
● 一貫した品質・サービスは、お問合わせください

Line-up

内径 (mm)	長さ (mm)	Cat.No.	価格 (円)
1.5	50	712131	44,000
	100	712181	50,000
	150	712011	54,000
2.1	35	712241	44,000
	50	712141	44,000
	100	712171	50,000
150	712021	54,000	
	250	712221	62,000
	4.8	35	722251
50		722151	40,000
100		722181	45,000
150	722071	50,000	
250	722081	62,000	



■ 分析時間の短縮

一般に、同じ分析条件ではC8カラムはODSカラムに比較し保持時間が短いため、溶出時間が早くなります。疎水性物質ほど、分析時間の短縮ができ、溶媒の使用量が削減できます。  
Fig.2は脂溶性ビタミンを同じ条件で比較した例です。ビタミンKは疎水性が高くODSでは分析に時間がかかりますが、L-column2 C8 では約1/4の分析時間で済みます。

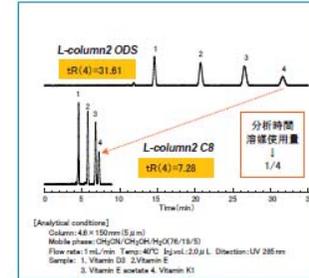


Fig.2 分析時間の短縮(脂溶性ビタミン)

■ ODSカラムと分離挙動の違い

同じ分析条件でODSカラムとC8カラムを比較した場合、すべての物質でC8の方が溶出時間が早くなるわけではありません。  
ODSカラムとは分離挙動が異なることがあるので、ODSでは分離が不可能な場合でも、C8カラムでは分離改善できることもあります。  
Fig.3の抗うつ剤の一斉分析では、L-column2 ODS では分離が不十分だったシタラミンとパロキセチンが、L-column2 C8 では完全分離しています。

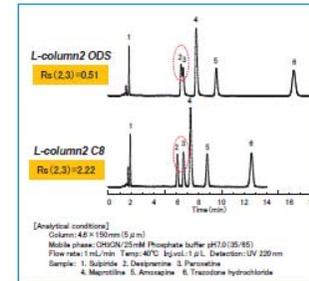


Fig.3 分離の改善(抗うつ剤)

■ 耐久性

L-column2 C8 は L-column2 ODS と同じ高度エンドキャッピングを施しているため、化学的に安定で長持ちします。

2010年9月発売 L-column プレカラムフィルター

L-columnプレカラムフィルターは、分析カラムに直接した構造により、デッドボリュームをなくしました。理論段数が低下することなく、ゴミを効率的に捕集できます。

リーフレット内容に関してのお問い合わせは、最寄の代理店または東京事業所クロマト技術部までご連絡ください

一般財団法人 化学物質評価研究機構  
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan  
<http://www.cerij.or.jp>

東京事業所 クロマト技術部  
e-mail chromat@cerij.jp  
TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521  
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地

# L-columnプレカラムフィルター新発売

**新発売**

## L-column プレカラムフィルター

「試料や移動相はフィルターでろ過しているのに、カラム圧が上がってしまう」(吸着しやすい物質がないのにピーク形状が悪くなる)その原因は、「ゴミ」のせいかもしれません。プレカラムフィルターは、試料中の不溶物やプランジャーシールから生じるゴミ等のカラムへの進入を防ぎます。カラムを長持ちさせるためには、プレカラムフィルターが不可欠です。

### L-column プレカラムフィルターの特徴

- ✓ 分析カラムに直結した構造によりデッドボリュームをなくしました
- ✓ カラムオープン内でもコンパクトに収まります
- ✓ カートリッジ式なので経済的です
- ✓ ホルダー(キャップ)の接続タイプに、ウォーターズタイプとUPLC®タイプの2種類ご用意しました。今までネジのタイプが合わなかったために、UPLC®に直接L-columnを接続できなかった方も、プレカラムフィルターを介することで、L-columnを簡単にお使いいただけます



### Line-up

名称	内容	Cat.No.	価格(円)
ファーストキット(LC配管:W®, カラム:W®)	フィルター1個、専用ホルダー	653002	18,000
ファーストキット(LC配管:UPLC®, カラム:W®)	フィルター1個、専用ホルダー	653004	18,000
交換フィルター	フィルター5個/箱	653003	9,800

※ W®=ウォーターズタイプ      \* 2010年8月現在の価格(税別)になります

### L-column プレカラムフィルター仕様



### ■ 耐久性の向上

Fig.1は理論段数の安定率をプロットしたグラフです。プレカラムフィルターをつけていないと、ゴミの進入によりバイパスができるため、ピークがブロードになってしまいます。プレカラムフィルターを装着すると、カラム手前でゴミをトラップできるので、長期間安定しています。フィルターを交換すれば、初期性能に戻ります。プレカラムフィルターは各メーカーで形状やフィルター部分の構造が異なります。L-column プレカラムフィルターはゴミを効率的に捕集できるので、フィルターの交換頻度が抑えられ、経済的です。

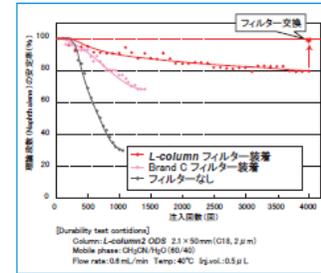
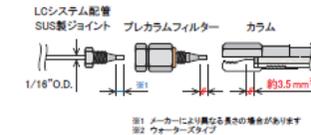


Fig.1 耐久性試験

### ■ L-column プレカラムフィルターの構造

L-column プレカラムフィルターは分析カラムに直結した構造により、デッドボリュームをなくしたので、理論段数が低下しません。Fig.2では、プレカラムフィルターの有無で分析し、結果を比較しました。保持時間やピーク形状、カラム圧力にほとんど違いはなく、分析に影響しません。L-column プレカラムフィルターのホルダー(キャップ)のタイプは、ウォーターズタイプとUPLC®タイプの2種類あるので、ほとんどのLCで取り付け可能です。LC配管とのジョイントタイプはメーカーにより異なる場合があります(下図※1の長さ)、デッドボリュームが生じないようにタイプを合わせてください。



※1 メーカーにより異なる長さの場合があります  
※2 ウォーターズタイプ

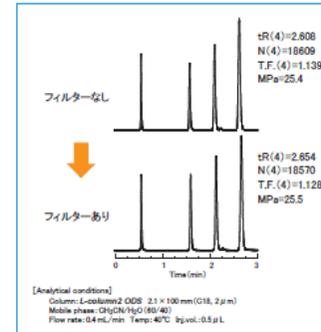


Fig.2 プレカラムフィルターの影響

### 2010年9月発売 L-column2 C8

L-column2 C8は、L-column2 ODSと同じ高度エンドキャッピング法を施しています。ピークがシャープに検出するのはもちろん、高耐久性で使いやすいカラムです。疎水性物質の迅速分析、それに伴う省溶媒化に最適です。

リーフレット内容に関するお問い合わせは、最寄の代理店または東京事業所クロマト技術部までご連絡ください

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構  
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan  
<http://www.cerij.or.jp>

L-column2 品質保証

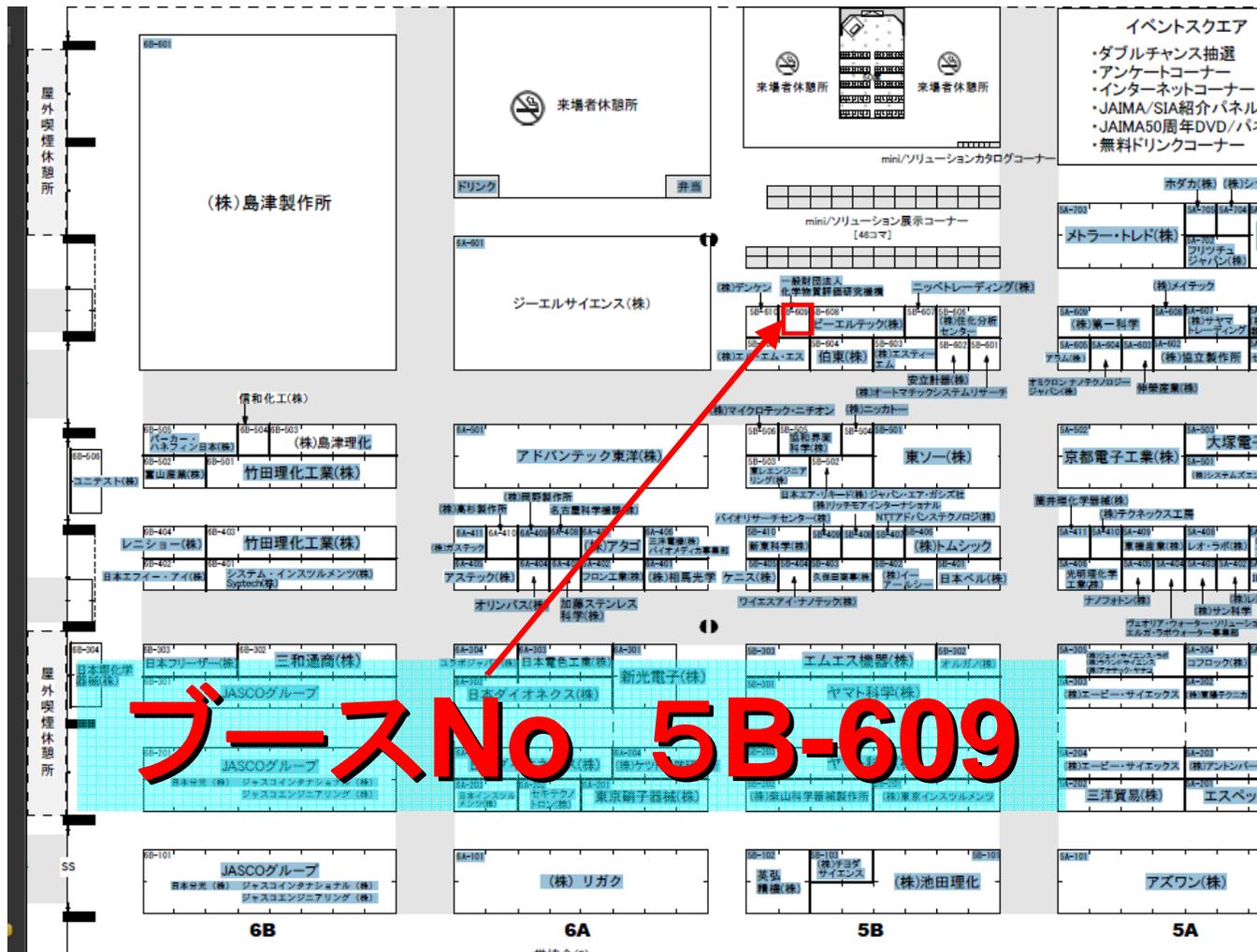


東京事業所 クロマト技術部  
e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521  
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地

2010/08

# 展示ブースのご案内



**ブースNo 5B-609**

## その他のご案内

- デモカラム  
**L-column**, **L-column2**及び**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

---

ご静聴ありがとうございました  
アンケートは出入口の担当者にお渡してください