

逆相HPLC分析のノウハウ一挙公開2011! 未公開情報も満載!!

目次

<カラムのノウハウ>

逆相カラムの構造と特徴

ODSとC8

UHPLCカラム

<移動相のノウハウ>

HPLCに使用される有機溶媒

解離性物質のための移動相

緩衝液

イオン対クロマトグラフィー

<トラブルシューティング>

カラムの詰まり

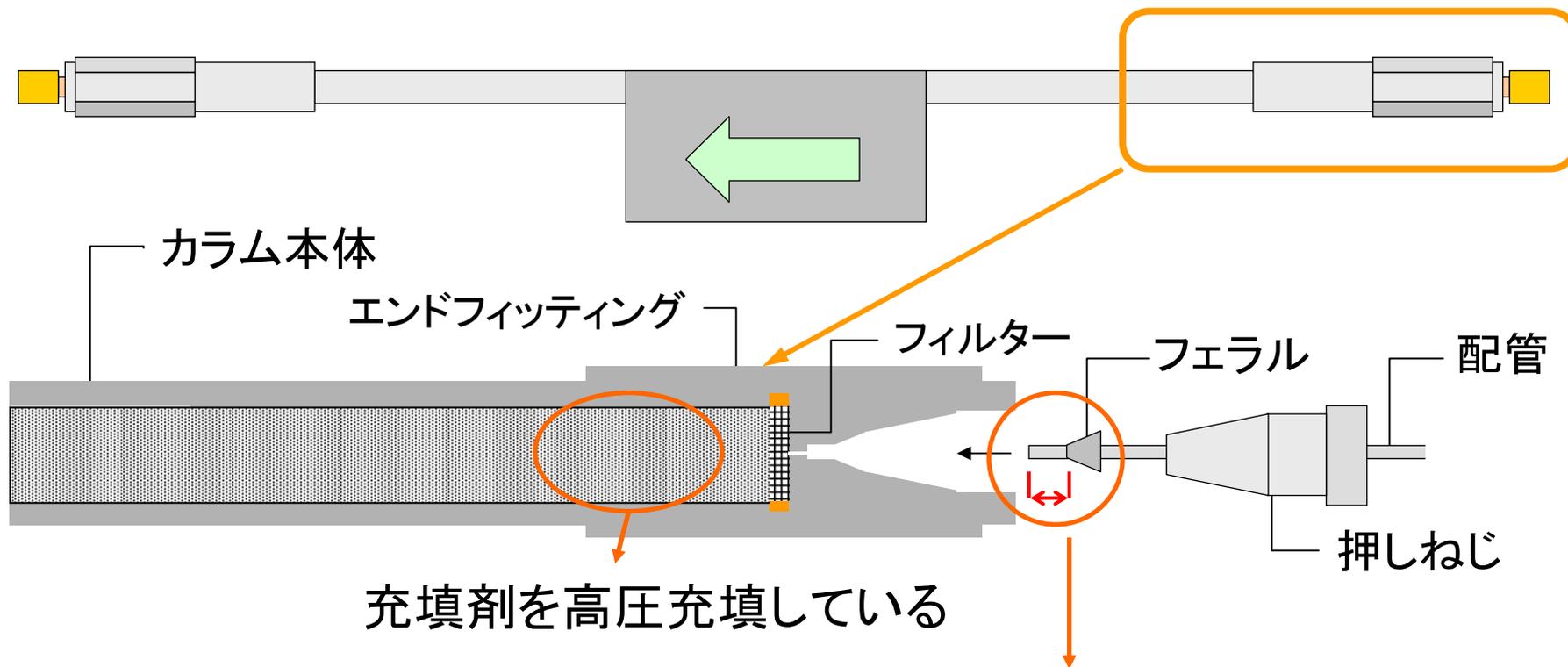
洗浄と保管

カラムを長持ちさせるコツ

再現性を向上させるコツ

<お知らせ>

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

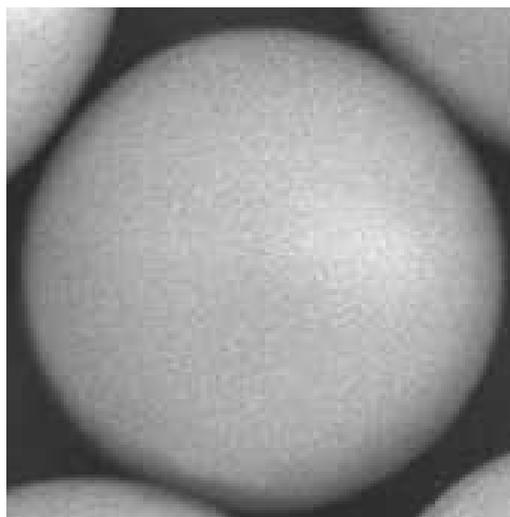
粒子径: $1.5 \sim 10 \mu\text{m}$ (2, 3, $5 \mu\text{m}$)

細孔径: $8 \sim 12 \text{ nm}$ (12 nm)

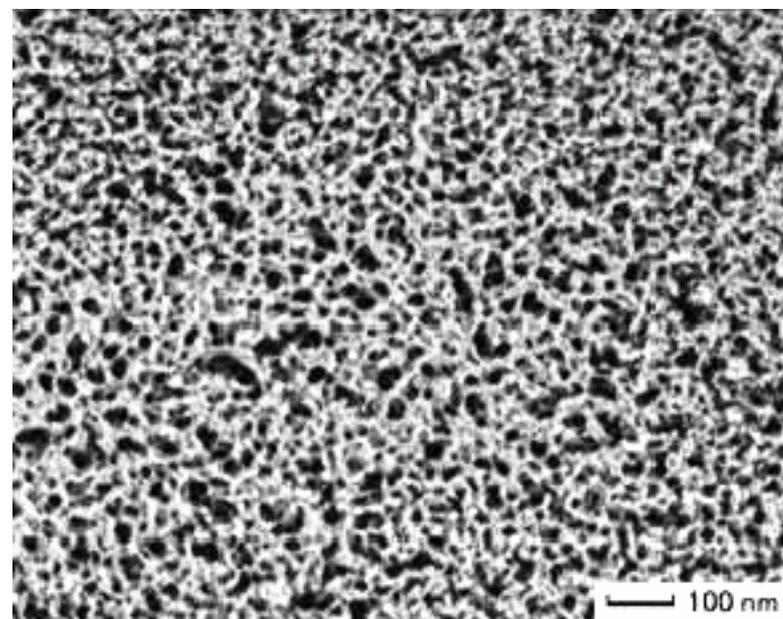
比表面積: $250 \sim 500 \text{ m}^2/\text{g}$ ($340 \text{ m}^2/\text{g}$)

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

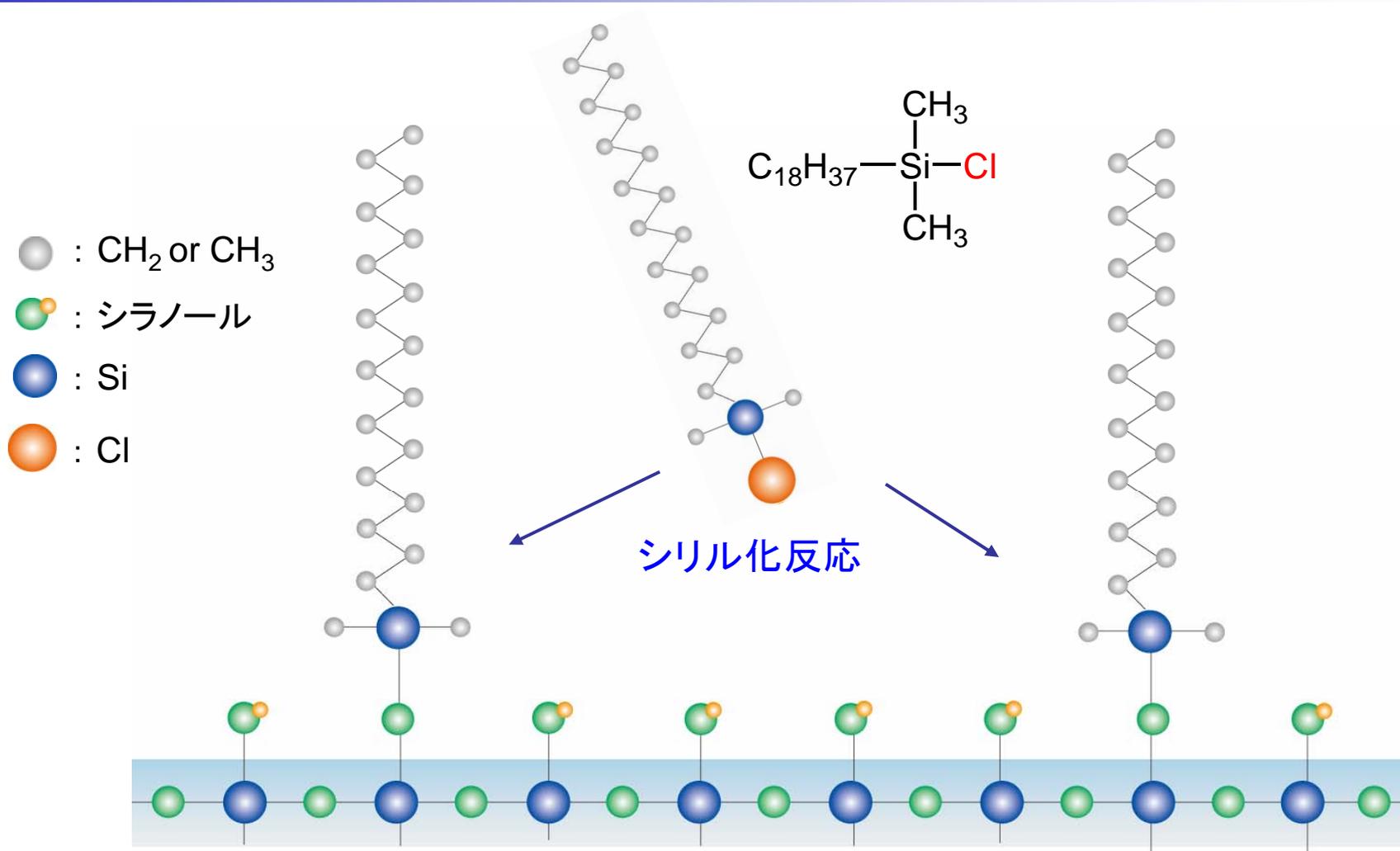
(): **L-column**シリーズ



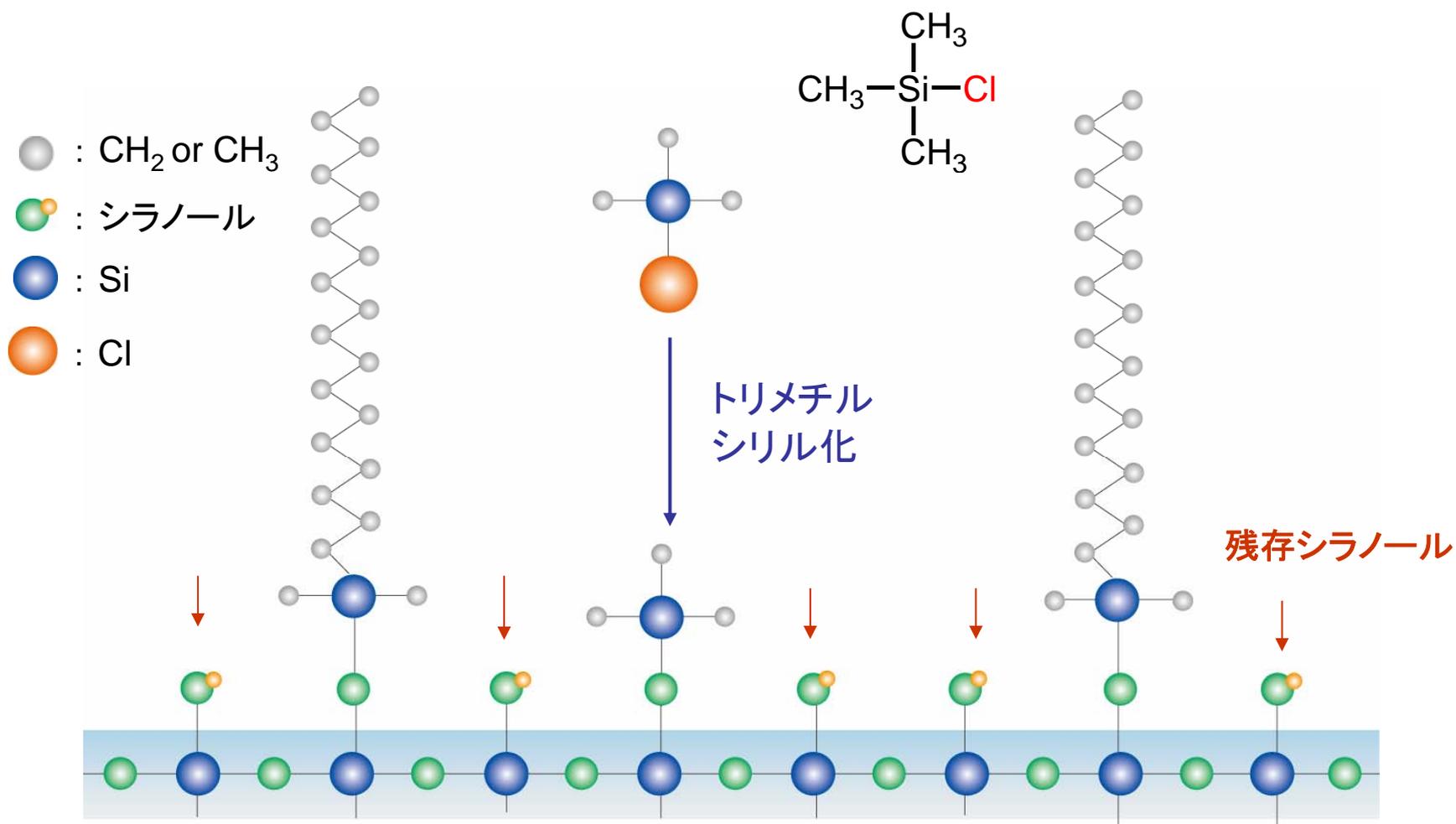
拡大



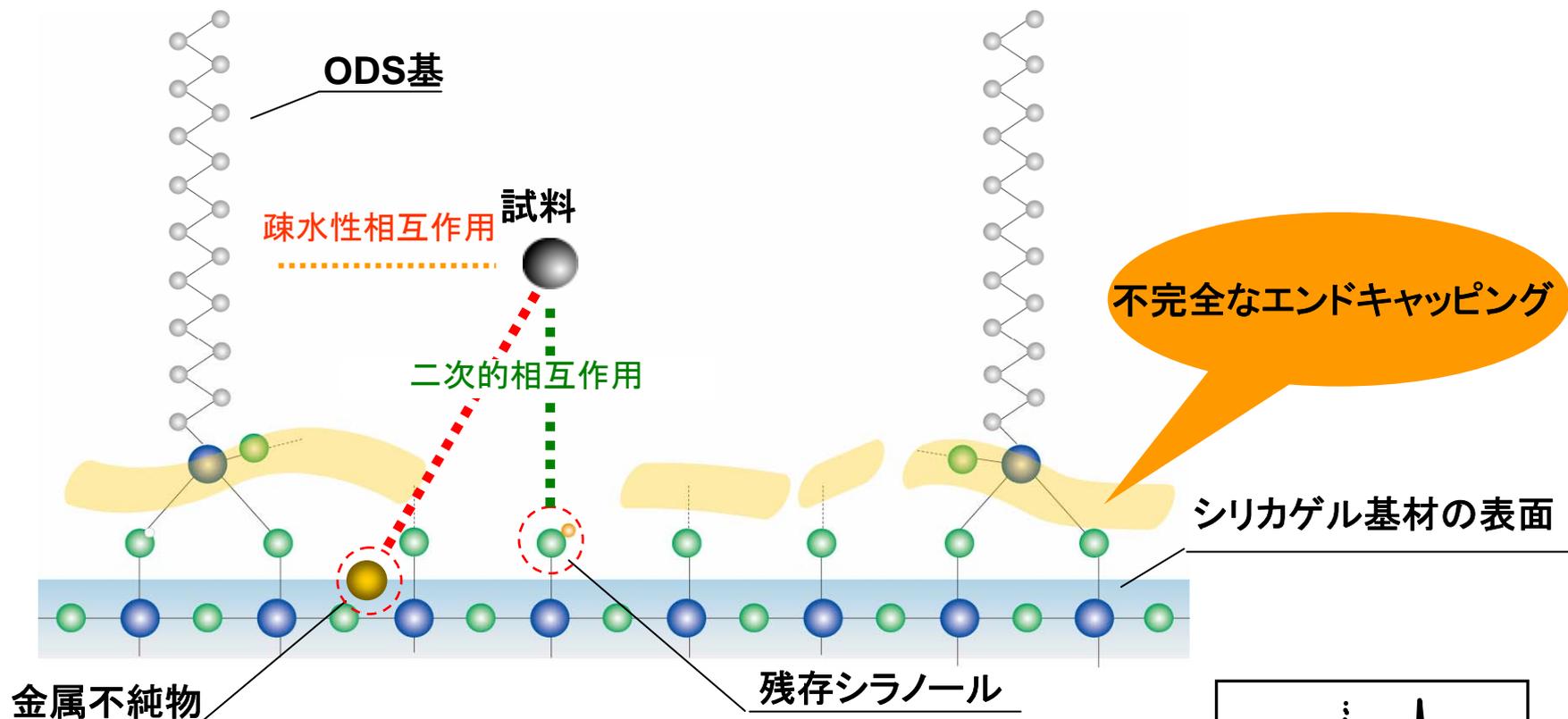
ODS基の導入



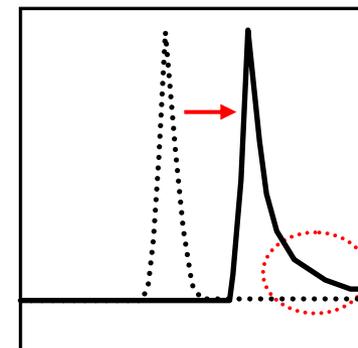
エンドキャッピング



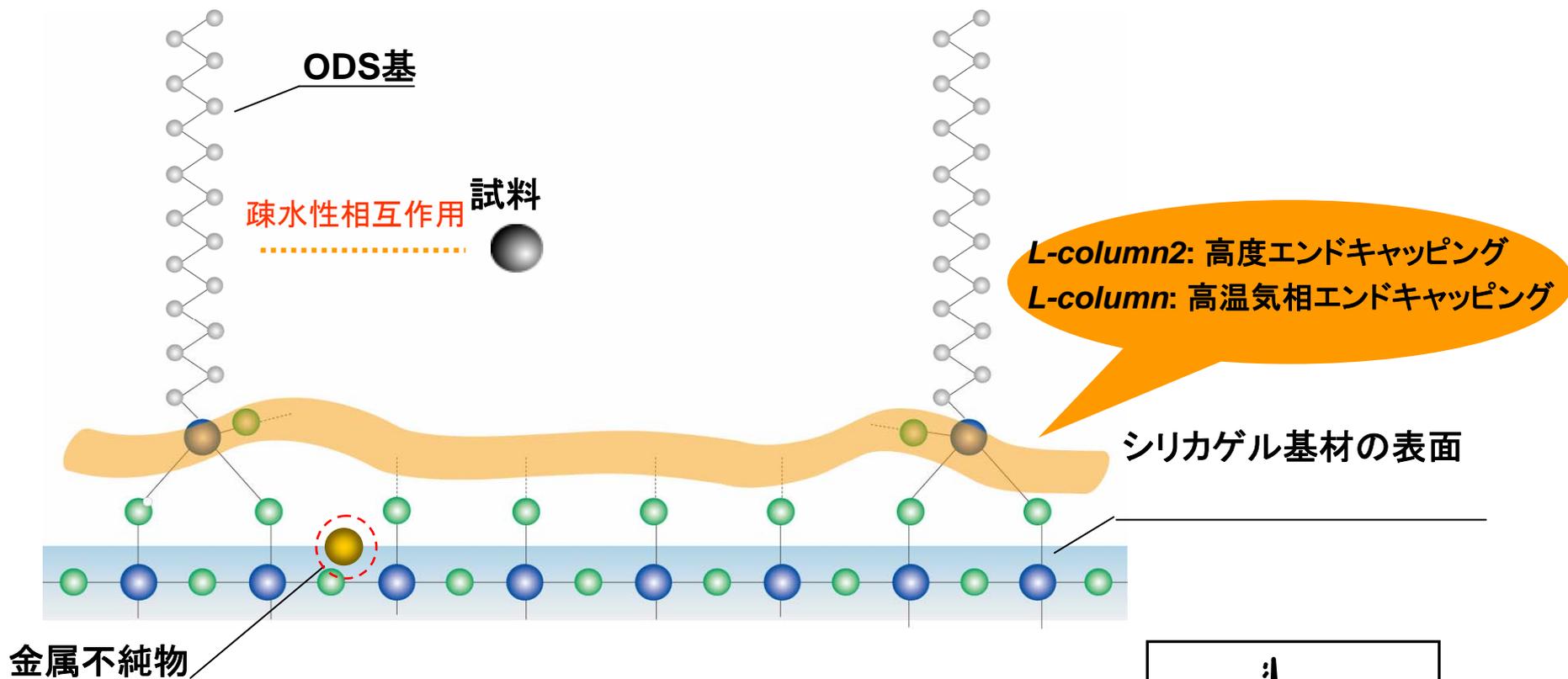
二次的相互作用の影響



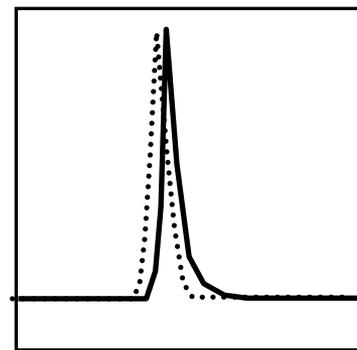
・残存シラノール
 ・金属不純物
 ⇒ピークがテーリング



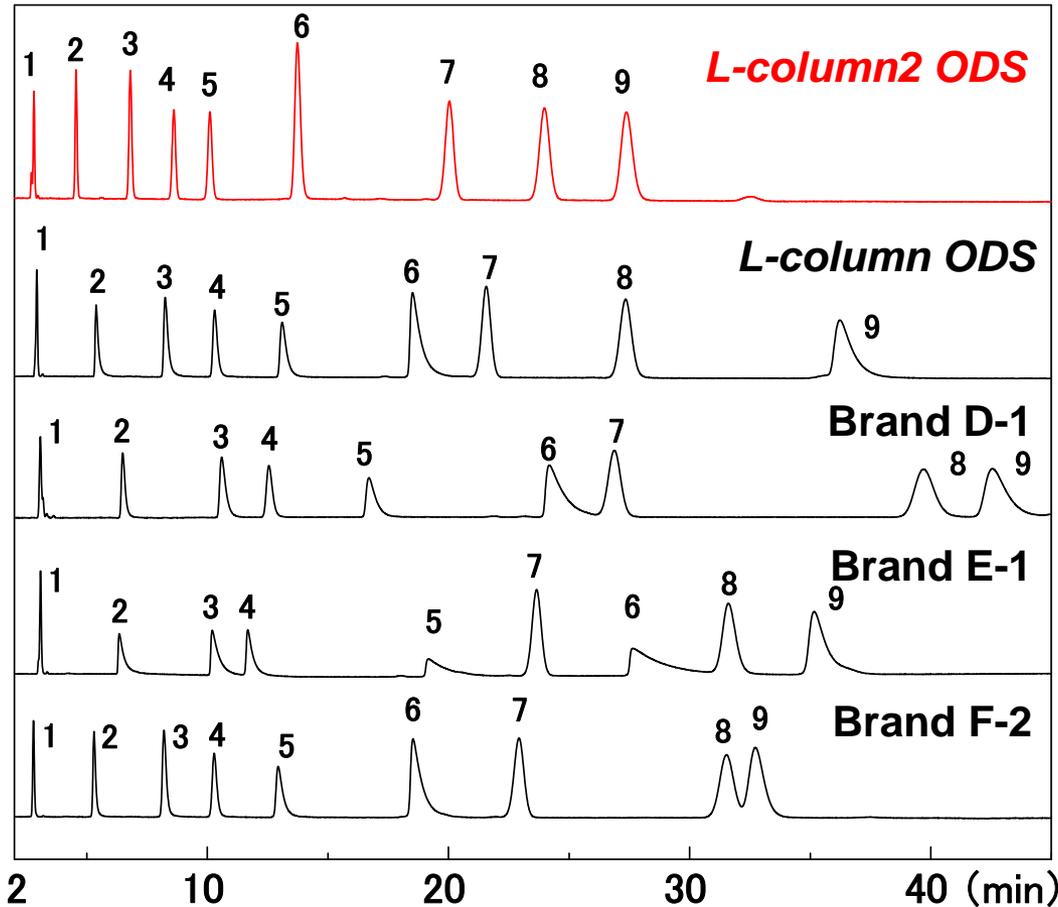
L-columnシリーズのエンドキャッピング技術



疎水性相互作用のみによる理想的な分離



残存シラノールの評価(塩基性物質)



[Analytical conditions]

Column: 4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)

Mobile phase: CH₃CN/

25 mM Phosphate buffer pH 7.0

(40/60)

Temp.: 40°C

Flow rate: 1 mL/min

Detection: UV 220 nm

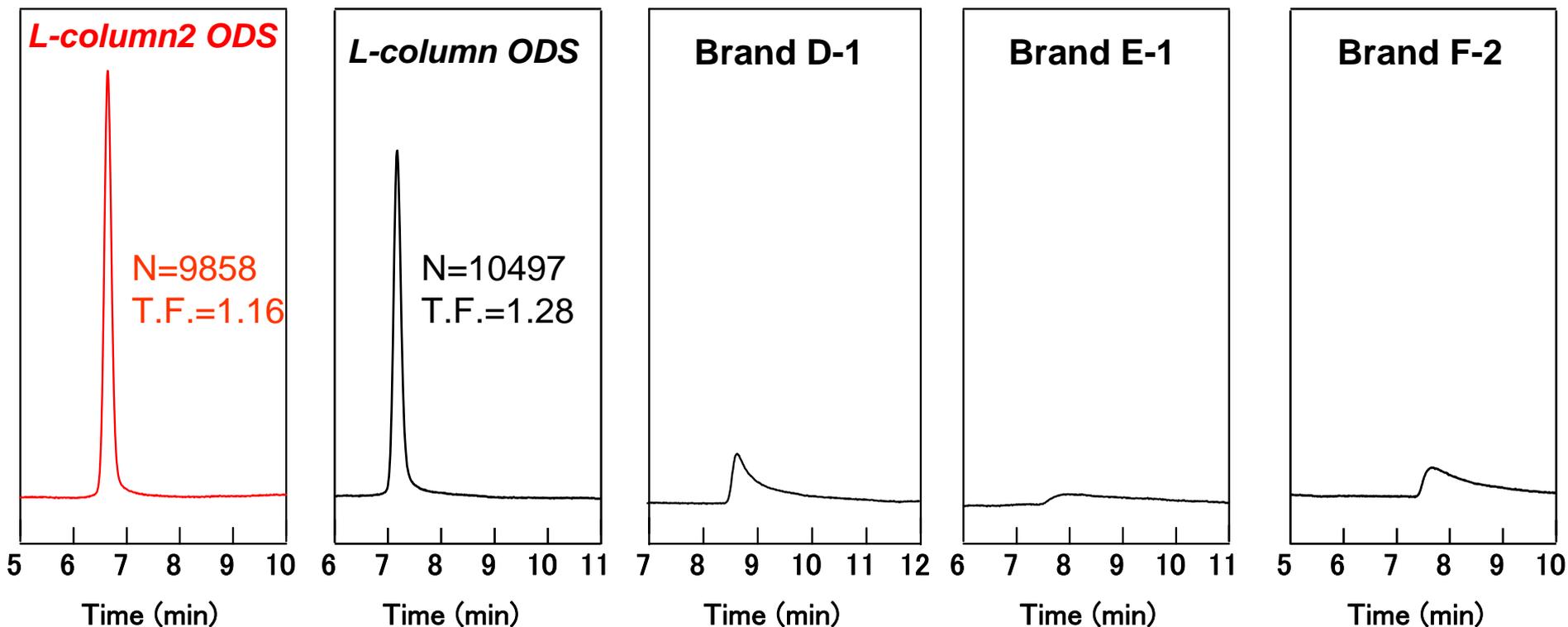
Inj.vol.: 1 μL

Sample:

1. Fexofenadine
2. Chlorpheniramine
3. Triprolidine
4. Diphenhydramine
5. Diphenylpyraline
6. Homochlorcyclizine
7. Hydroxyzine
8. Astemizole
9. Promethazine

L-column2 ODSは塩基性物質に対して低吸着

金属不純物の評価(配位化合物)



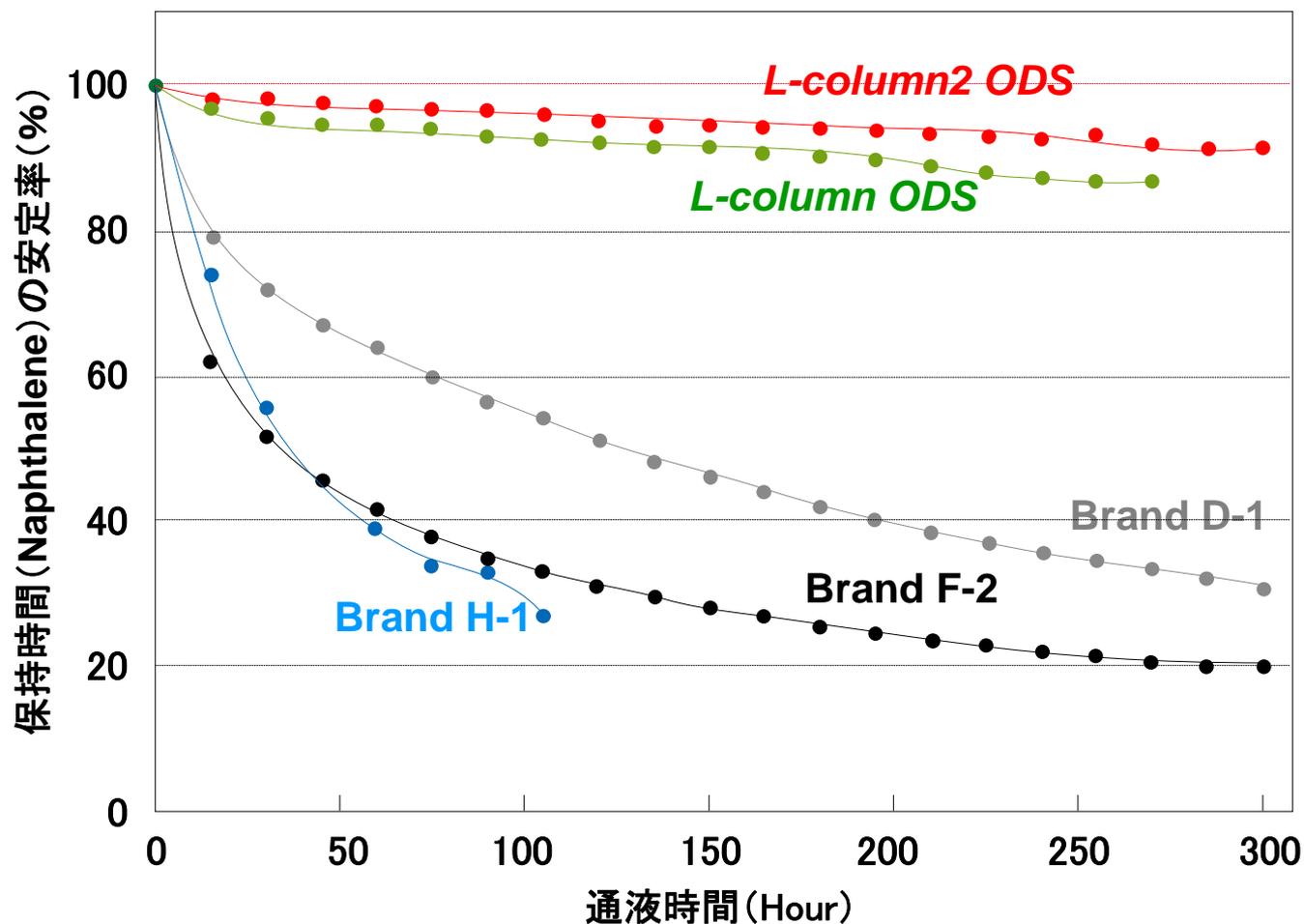
[Analytical conditions]

Column: 4.6 × 150 mm (C18, 5 μm); Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (40/60)

Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 254 nm; Inj.vol.: 10 μL; Sample: Hinokitiol (0.5 mg/L)

L-column2 ODSは配位化合物に対して低吸着

耐久性テスト(2%TFA)



[Durability test conditions]
Column:
4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)
Mobile phase:
2% TFA in CH₃OH
/2% TFA in H₂O (10/90)
Flow rate: 1 mL/min
Temp.: 90°C

L-column2 ODSは低pHでも高耐久性

目次

<カラムのノウハウ>

逆相カラムの構造と特徴

ODSとC8

UHPLCカラム

<移動相のノウハウ>

HPLCに使用される有機溶媒

解離性物質のための移動相

緩衝液

イオン対クロマトグラフィー

<トラブルシューティング>

カラムの詰まり

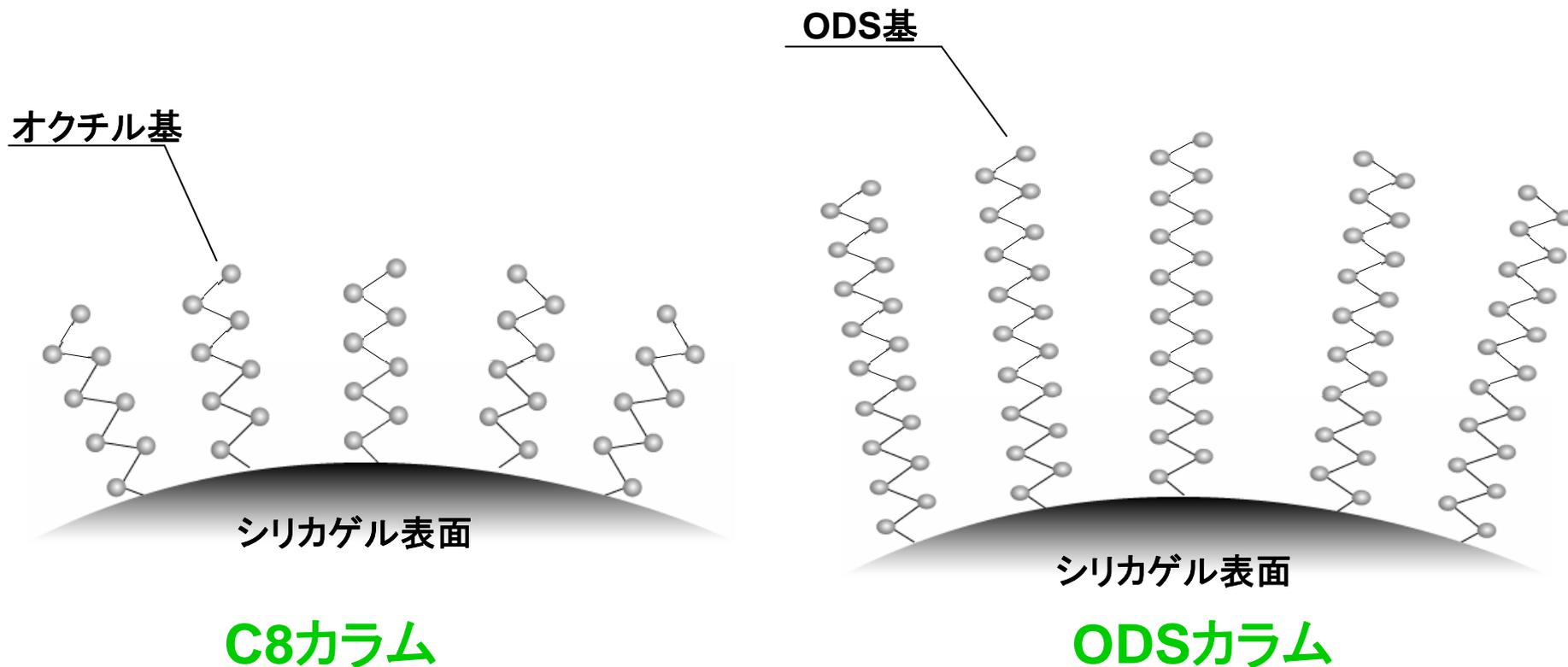
洗浄と保管

カラムを長持ちさせるコツ

再現性を向上させるコツ

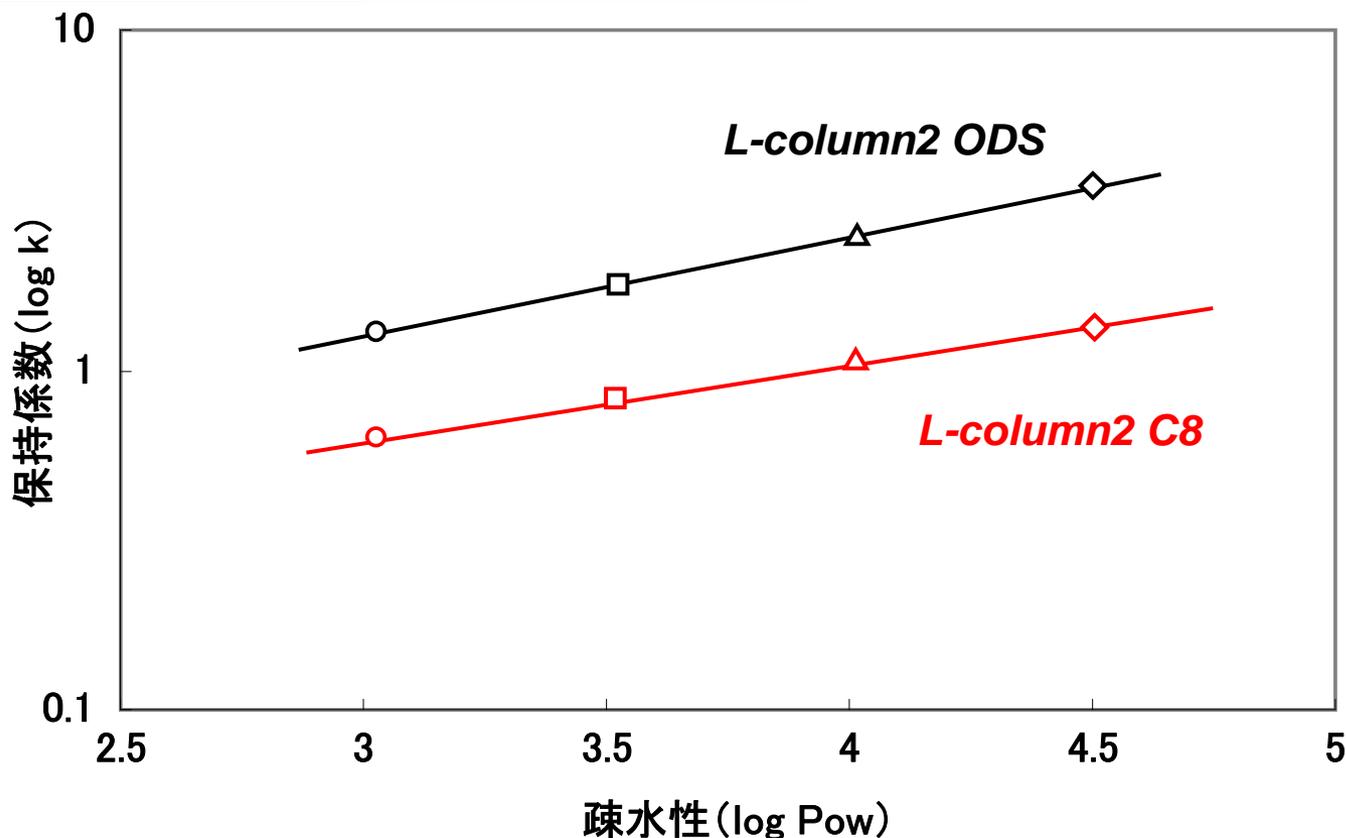
<お知らせ>

充填剤の表面構造



ODSカラムと比べ、結合した炭素鎖が短い

疎水性と保持係数の関係



[Analytical conditions]
 Column: 4.6 × 150 mm (5 μm)
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O
 (85/15)

Temp.: 40°C
 Flow rate: 1 mL/min
 Detection: UV 254 nm
 Inj.vol.: 1 μL
 Sample: ○ . Ethylbenzene
 □ . Propylbenzene
 △ . n-Butylbenzene
 ◇ . Amylbenzene
 System: LC-10ADvp series
 (Shimadzu Co.)

- ODSカラムと比べ、保持が小さい
- 疎水性が高い物質ほど、その差は大きい

ODSかC8か、選択のコツ

- ・疎水性の高い物質の**分析時間の短縮**
- ・物質によっては、C8カラムはODSカラムより、**分離が改善**

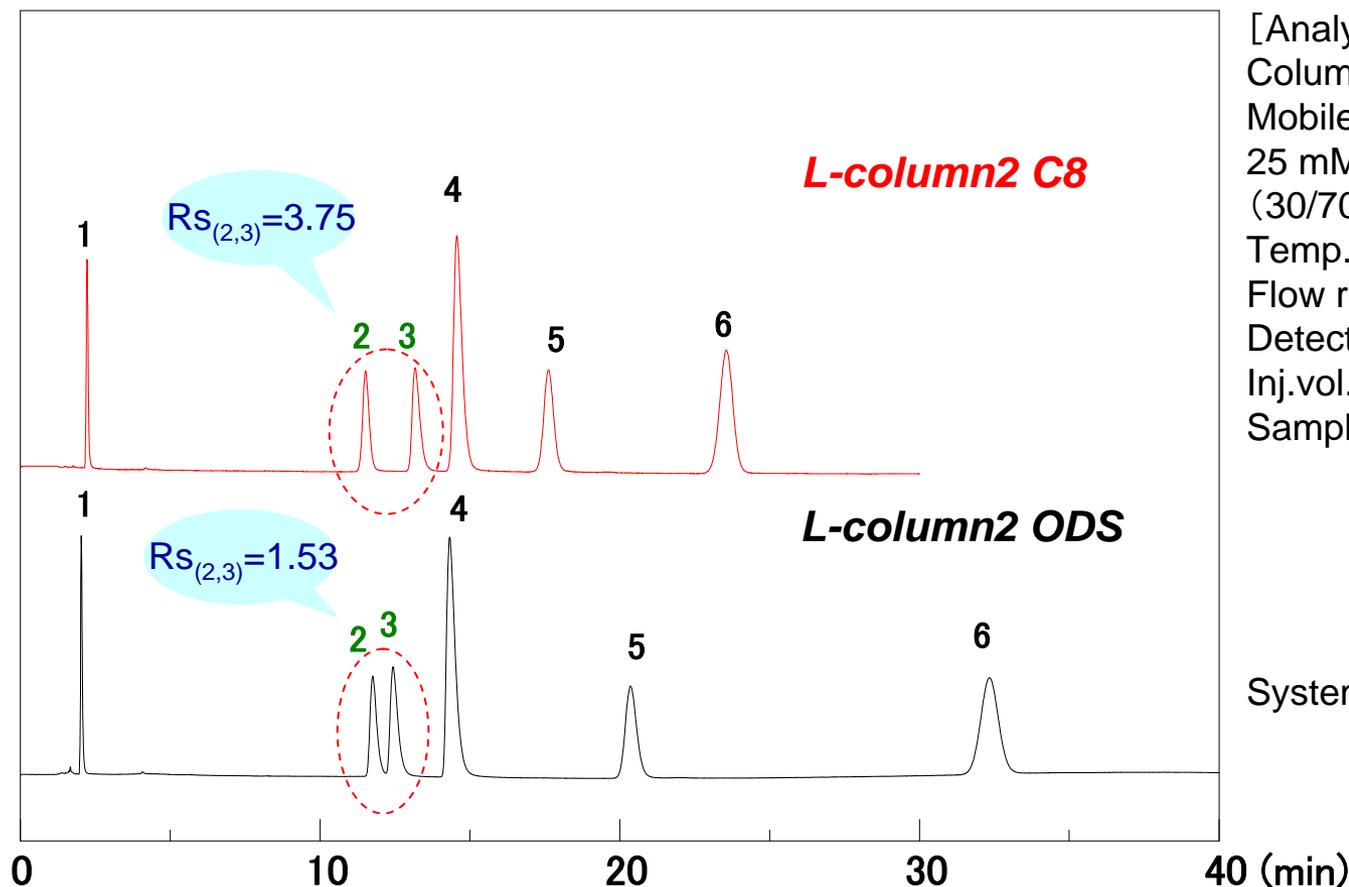


ODSカラムで分離が困難な物質にC8カラムを試す

【例】・抗うつ剤(デシプラミン、パロキセチン)

・アルデヒド(プロピオンアルデヒド、アクロレイン)

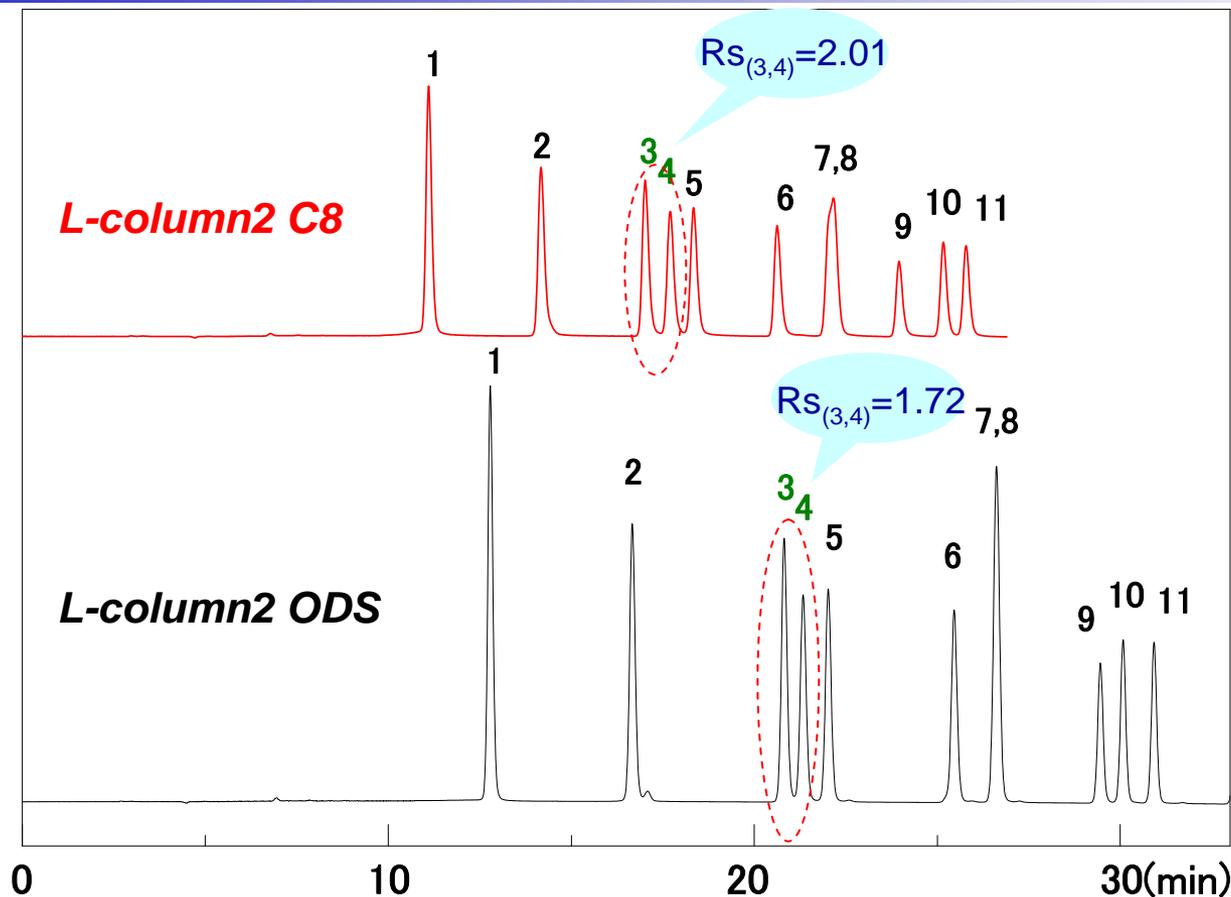
抗うつ剤の分析



[Analytical conditions]
 Column: 4.6 × 150 mm (5 μm)
 Mobile phase: CH₃CN/
 25 mM Phosphate buffer pH7.0
 (30/70)
 Temp.: 40°C
 Flow rate: 1 mL/min
 Detection: UV 220 nm
 Inj.vol.: 1 μL
 Sample: 1. Sulpiride
 2. Desipramine
 3. Paroxetine
 4. Maprotiline
 5. Amoxapine
 6. Trazodone;
 System: LC-10ADvp series
 (Shimadzu.co.)

- デシプラミン、パロキセチンの分離が改善
- 分析時間が短縮(特に疎水性の高い物質)

アルデヒドの分析



[Analytical conditions]
 Column: 4.6 × 250 mm (5 μm)
 Mobile phase:
 A) CH₃OH/CH₃COOC₂H₅/H₂O(37/3/60)
 B) CH₃OH
 A/B, 80/20 - 10/90 (0 - 40 min)
 Temp.: 40°C
 Flow rate: 1 mL/min
 Detection: UV 360 nm
 Inj.vol.: 5 μL
 Sample: 1. Formaldehyde-DNPH;
 2. Acetaldehyde-DNPH;
 3. Propionaldehyde-DNPH;
 4. Acrolein-DNPH;
 5. Aceton-DNPH;
 6. iso-Butyraldehyde-DNPH;
 7. n-Butyraldehyde-DNPH;
 8. Crotonaldehyde-DNPH;
 9. iso-Valeraldehyde-DNPH;
 10. n-Valeraldehyde-DNPH;
 11. Benzaldehyde-DNPH;
 System: LC-10ADvp series
 (Shimadzu.co.)

- プロピオンアルデヒド、アクロレインの分離が改善
- 分析時間が短縮

目次

＜カラムのノウハウ＞

逆相カラムの構造と特徴

ODSとC8

UHPLCカラム

＜移動相のノウハウ＞

HPLCに使用される有機溶媒

解離性物質のための移動相

緩衝液

イオン対クロマトグラフィー

＜トラブルシューティング＞

カラムの詰まり

洗浄と保管

カラムを長持ちさせるコツ

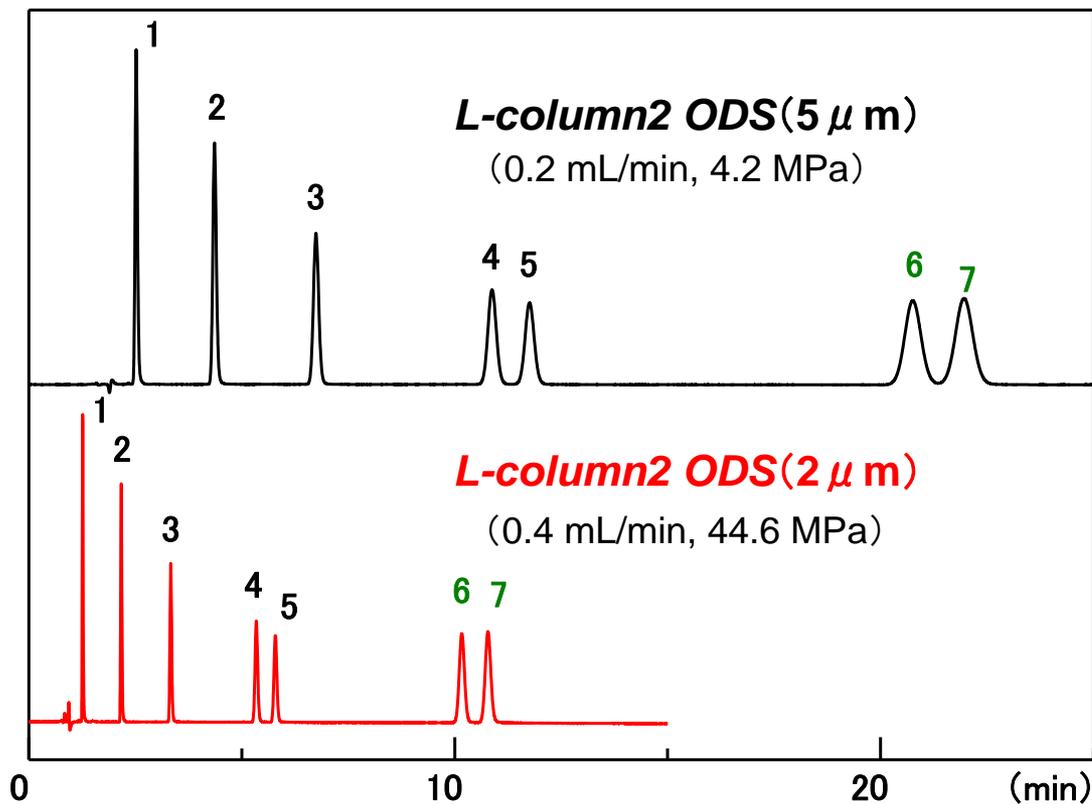
再現性を向上させるコツ

＜お知らせ＞

UHPLCカラムの特徴

- 高理論段数
→分離の向上
- 高流速でも理論段数の低下が小さい
→分析時間の短縮
- カラム圧が高い
→流速やカラム長さに制限

粒子径と理論段数



粒子径	N_7	$Rs_{(6,7)}$
5 μm	12813	1.60
	∧	∧
2 μm	30638	2.56
	(× 2.4)	(× 1.6)

Sample:

1. *p*-Hydroxybenzoic acid
2. Methyl *p*-hydroxybenzoate
3. Ethyl *p*-hydroxybenzoate
4. Isopropyl *p*-hydroxybenzoate
5. Propyl *p*-hydroxybenzoate
6. Isobutyl *p*-hydroxybenzoate
7. Butyl *p*-hydroxybenzoate in CH₃CN

[Analytical conditions]

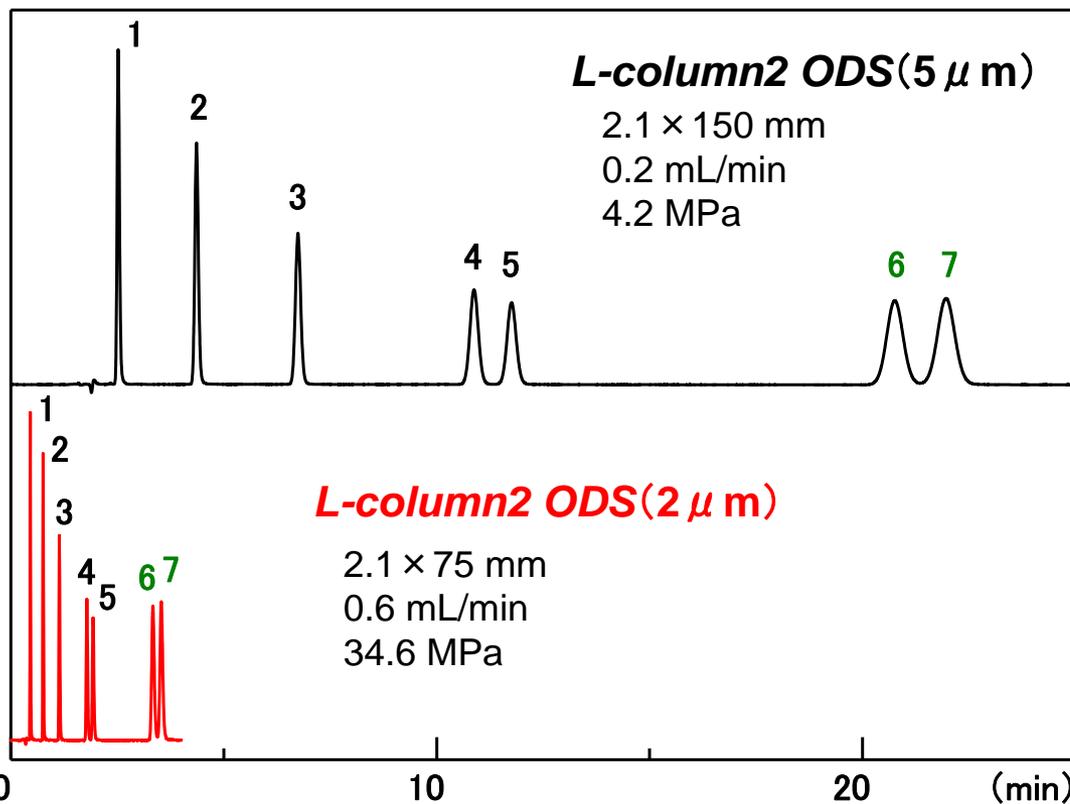
Column: **L-column2 ODS** 2.1 × 150 mm; Mobile phase: CH₃CN/

20 mM H₃PO₄ (35/65); Temp.: 40°C; Inj.vol.: 0.5 μL; System: Agilent 1200SL

L-column2 ODS(2 μm)は、高理論段数

⇒分離度が改善

分析時間 (5 μ mカラムと同等の分離時)



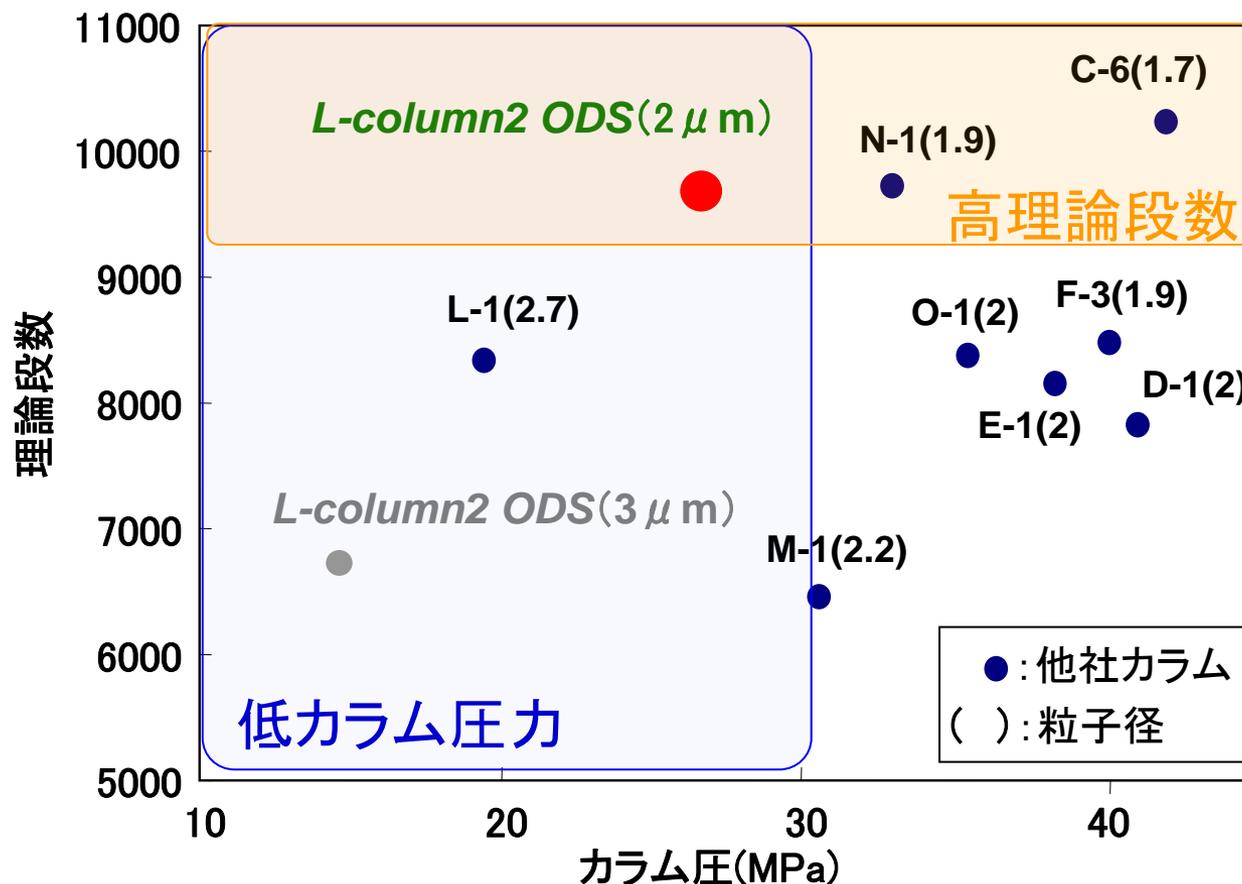
t_{R7} (min)	N_7	$Rs_{(6,7)}$
23.0	12813	1.60
\checkmark	\parallel	\parallel
3.7	13866	1.69
($\times 1/6$)	(同等)	(同等)

Sample:

1. *p*-Hydroxybenzoic acid
2. Methyl *p*-hydroxybenzoate
3. Ethyl *p*-hydroxybenzoate
4. Isopropyl *p*-hydroxybenzoate
5. Propyl *p*-hydroxybenzoate
6. Isobutyl *p*-hydroxybenzoate
7. Butyl *p*-hydroxybenzoate in CH_3CN

**L-column2 ODS(2 μ m) は、分析時間が顕著に短縮
 (5 μ mカラムと同等の分離時)**

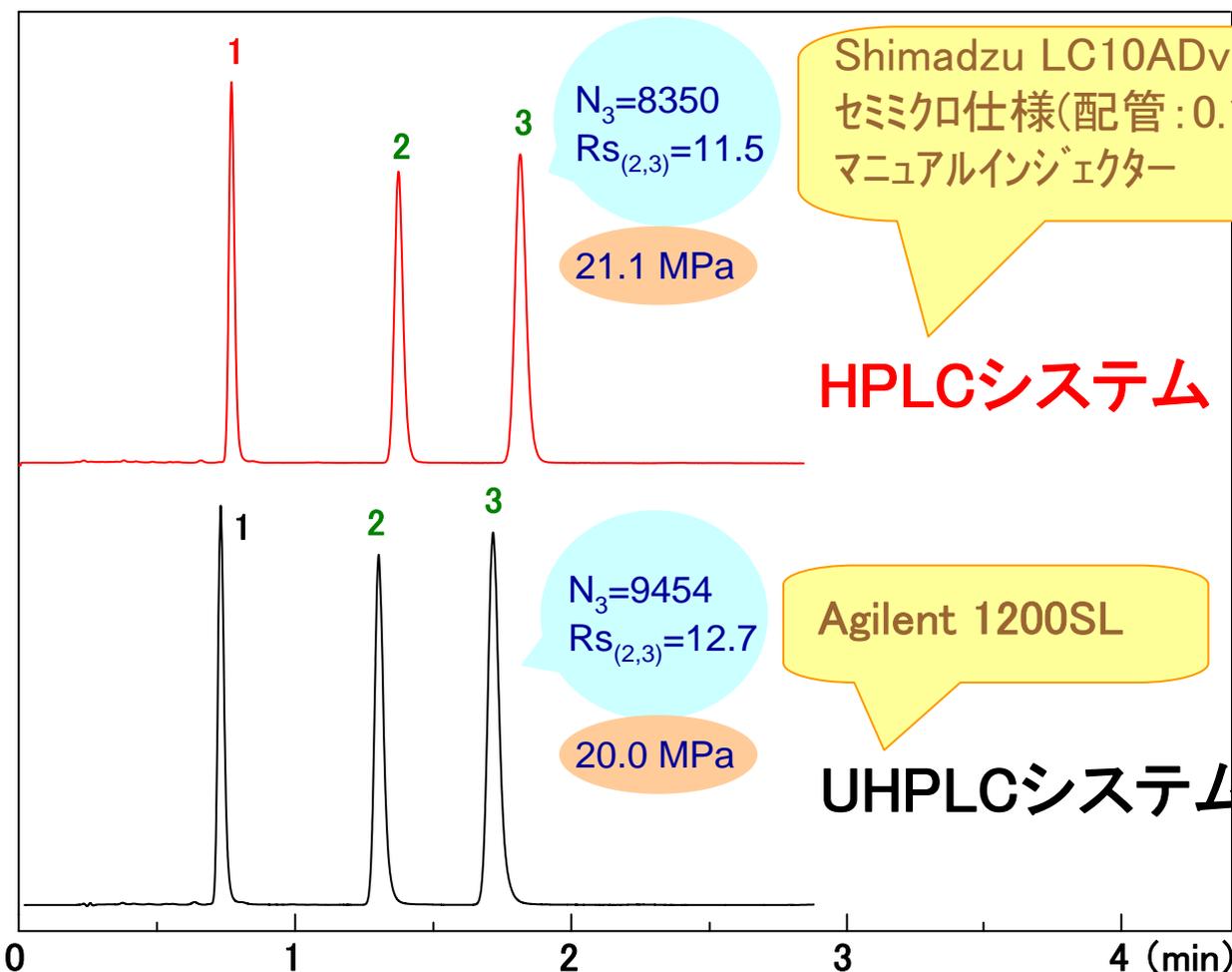
カラム圧と理論段数



[Analytical conditions]
 Column: 2.0 × 50 mm
 2.1 × 50 mm (C18)
 Mobile phase:
 CH₃CN/H₂O (50/50)
 Temp.: 40°C
 Flow rate: 0.6 mL/min
 Detection: UV 254 nm
 Inj.vol.: 1 μL
 Sample: Naphthalene
 System: Agilent 1200SL

**L-column2 ODS(2 μm)は、他社カラムと比べ、
低カラム圧かつ高理論段数**

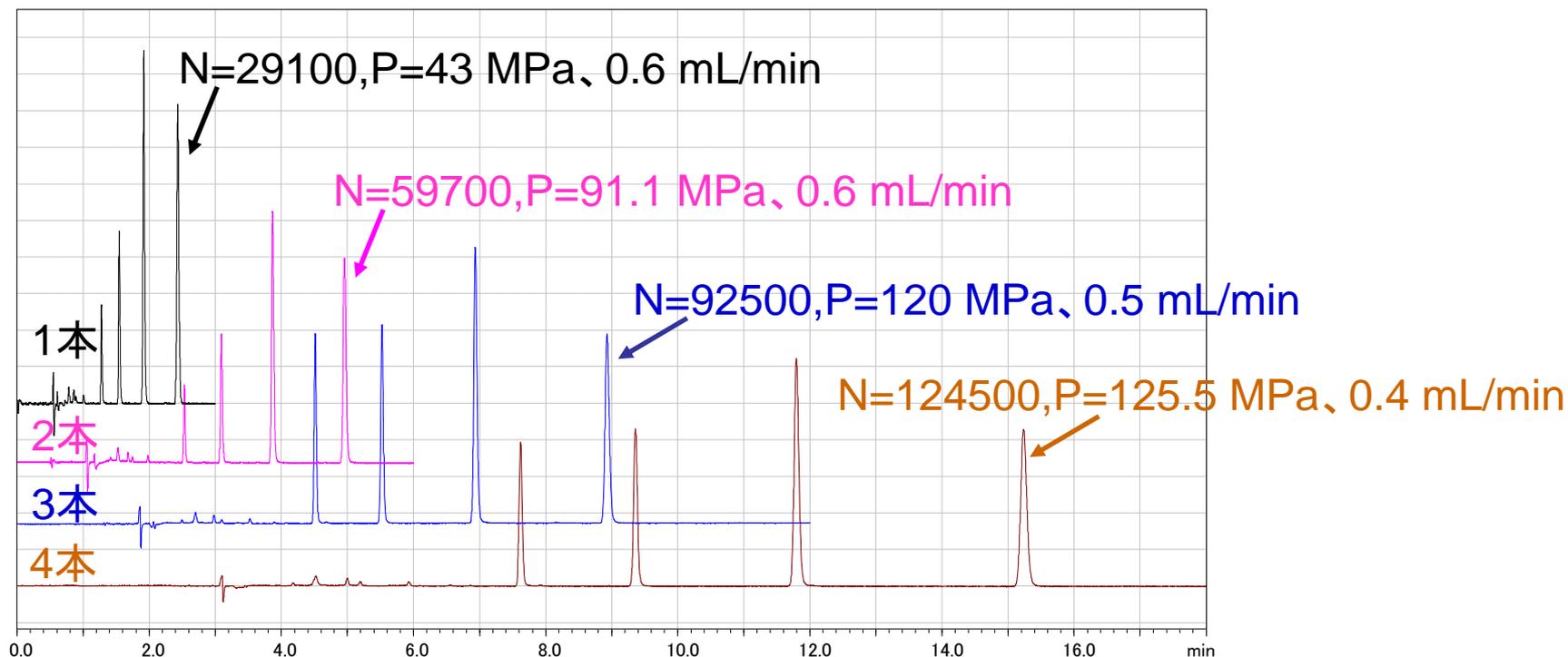
HPLC、UHPLCシステムによる分析比較



[Analytical conditions]
Column: **L-column2 ODS**
2.1 × 50 mm (C18, 2 μm)
Mobile phase:
CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (55/45)
Temp.: 40°C
Flow rate: 0.6 mL/min
Detection: UV 240 nm
Inj.vol.: 1 μL
Sample: 1. Fluvastatin
2. Mevastatin
3. Lovastatin

HPLCシステムでUHPLCシステムと同等の分離

カラムの連結



[Analytical conditions]

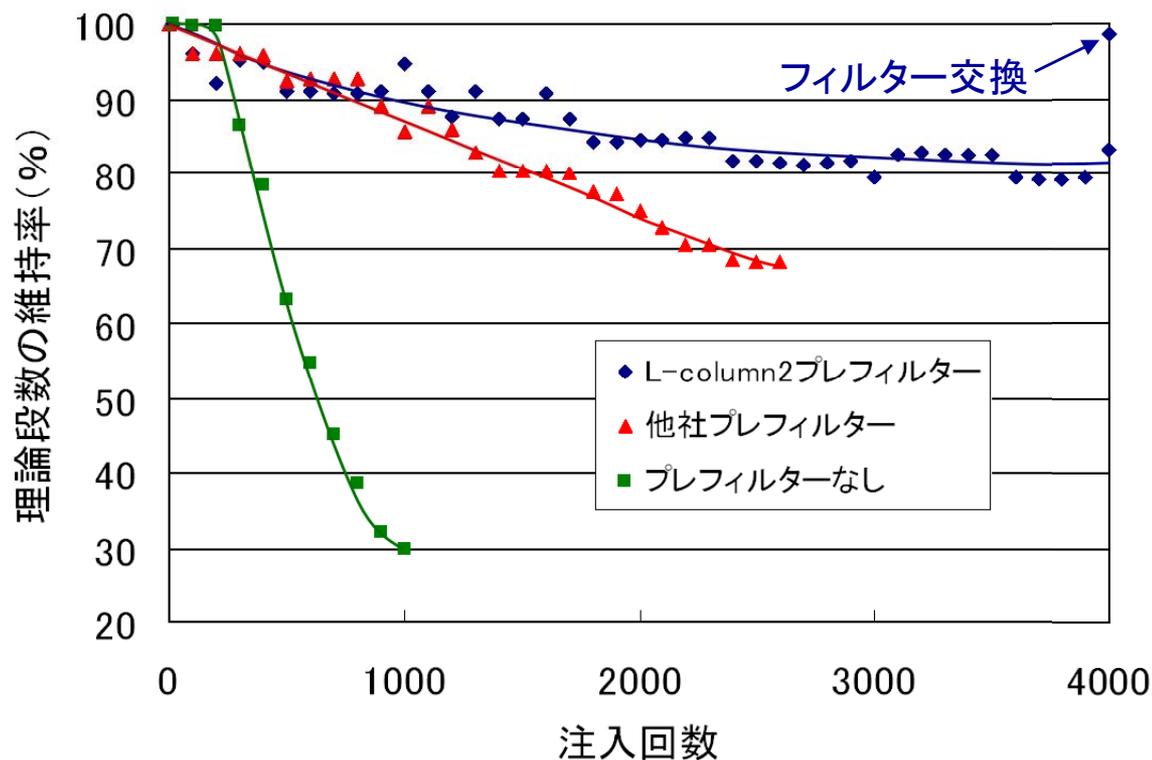
Column: **L-column2 ODS** 2.1 × 150 mm (C18, 2 μm)

Mobile phase: CH₃CN/H₂O (80/20)、Temp.: 40°C、Detection: UV 254 nm

Inj.vol.: 0.5 μL、Sample: Amylbenzen、System: Nexera (Shimadzu co.)

L-column2 ODS 2 μmはカラム圧が低いのでUHPLCの耐圧を最大限利用してGC以上の理論段数を実現できる

プレカラムフィルターの必要性



[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 2.1 × 100 mm (C18, 2 μm)、Mobile phase: CH₃CN/H₂O (60/40)
 Flow rate: 0.4 mL/min、Temp.: 40°C、Detection: UV 254 nm、Sample: Naphthalene

プレカラムフィルターの装着により耐久性が向上

UHPLCカラム使用のノウハウ

- デッドボリウムを最小にする
- プレカラムフィルターの使用は耐久性を向上させる
- 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
- 移動相及び試料はろ過する

目次

＜カラムのノウハウ＞

逆相カラムの構造と特徴

ODSとC8

UHPLCカラム

＜移動相のノウハウ＞

HPLCに使用される有機溶媒

解離性物質のための移動相

緩衝液

イオン対クロマトグラフィー

＜トラブルシューティング＞

カラムの詰まり

洗浄と保管

カラムを長持ちさせるコツ

再現性を向上させるコツ

＜お知らせ＞

逆相HPLCに使用される有機溶媒

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

- アセトニトリル** : 高価だがカラム圧や低波長でのUV吸収が低い
- メタノール** : 安価だが低波長での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** : 溶出力は大きいですが、カラム圧が高い
- エタノール**

目次

＜カラムのノウハウ＞

逆相カラムの構造と特徴

ODSとC8

UHPLCカラム

＜移動相のノウハウ＞

HPLCに使用される有機溶媒

解離性物質のための移動相

緩衝液

イオン対クロマトグラフィー

＜トラブルシューティング＞

カラムの詰まり

洗浄と保管

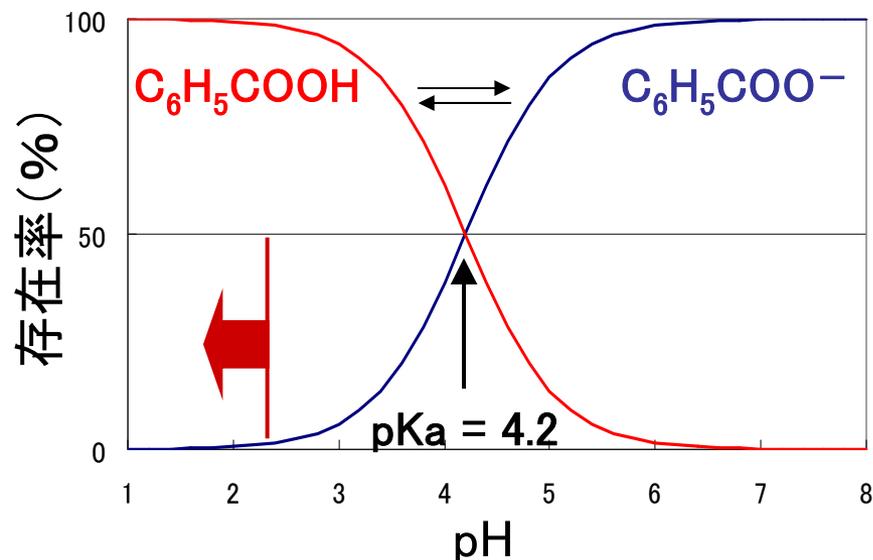
カラムを長持ちさせるコツ

再現性を向上させるコツ

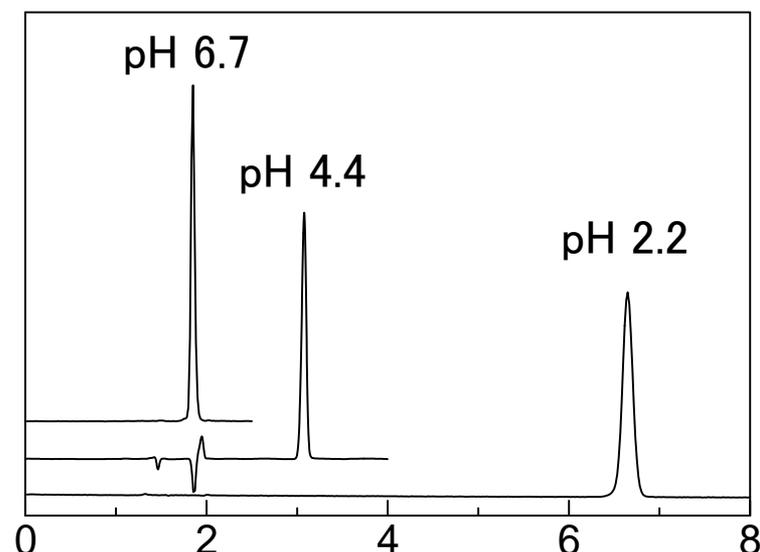
＜お知らせ＞

解離性物質のための移動相

pHによる解離、非解離状態の存在率



移動相pHと保持時間



解離性物質の逆相HPLC

- ・緩衝液による解離平衡の安定化
- ・完全解離状態でのイオン対クロマトグラフィー

緩衝液とは

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持つ溶液を緩衝液 (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)

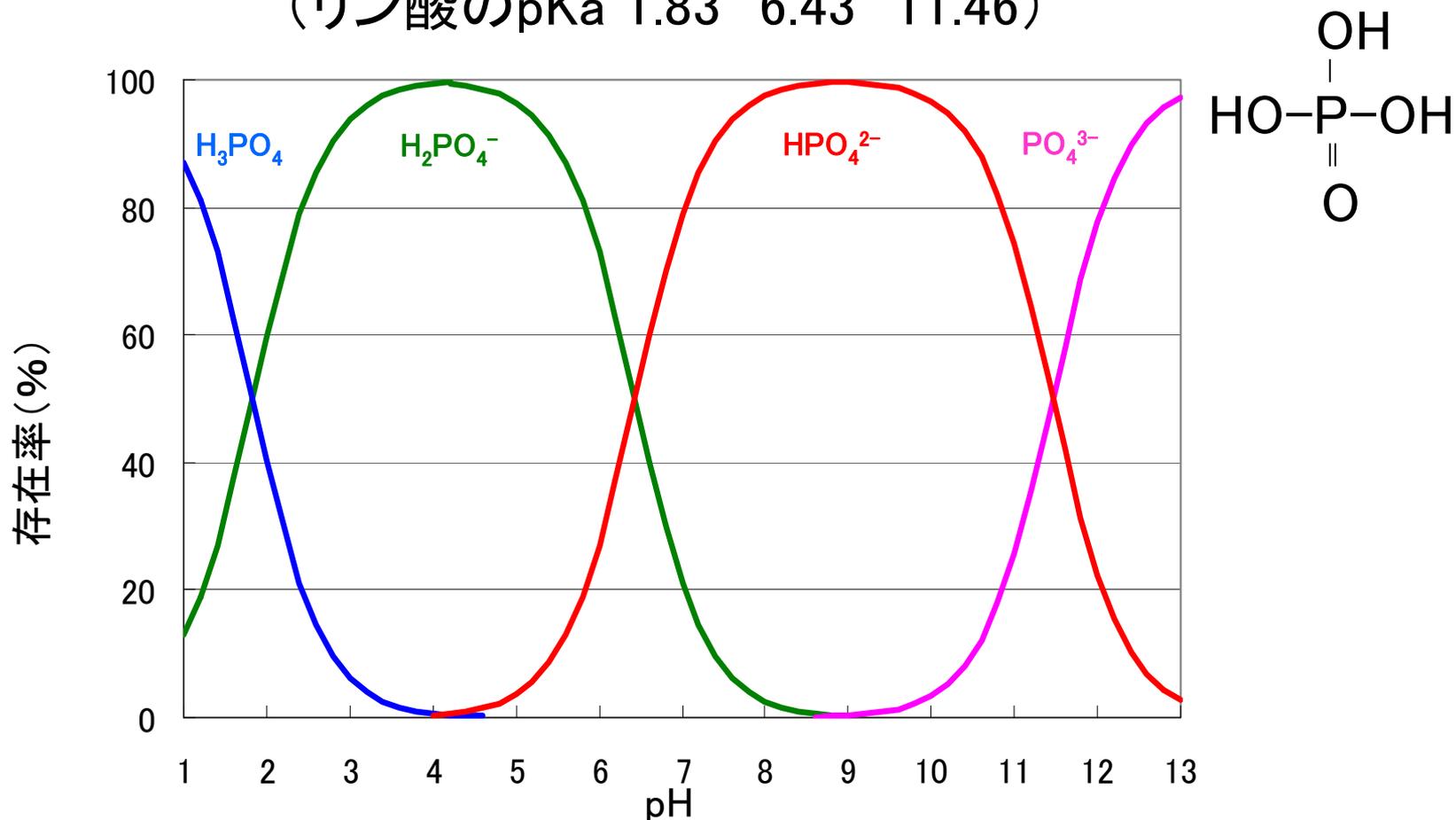


緩衝作用が働く条件

- ・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

(リン酸のpKa 1.83 6.43 11.46)



リン酸溶液は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

- 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

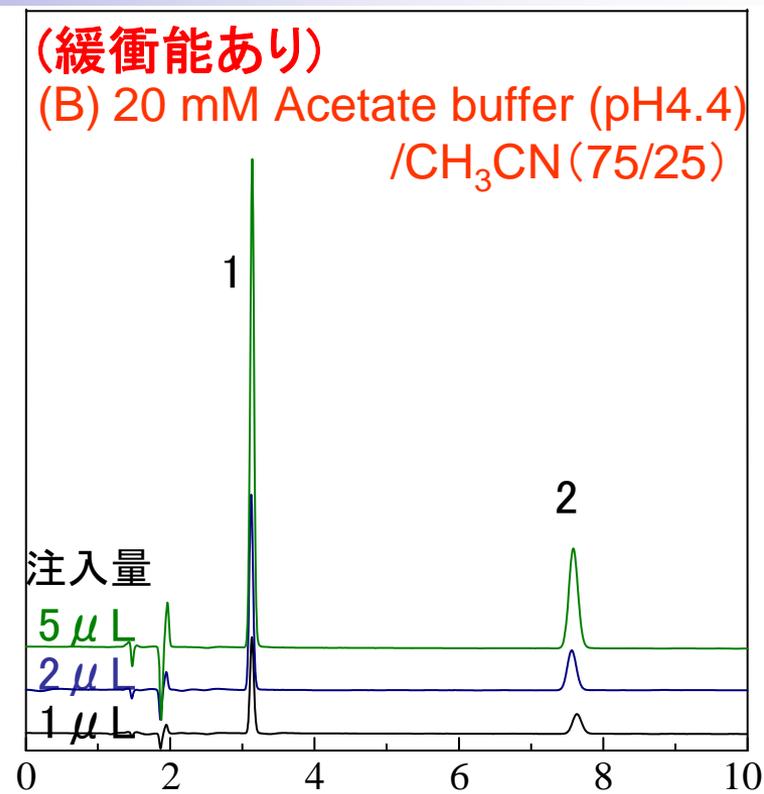
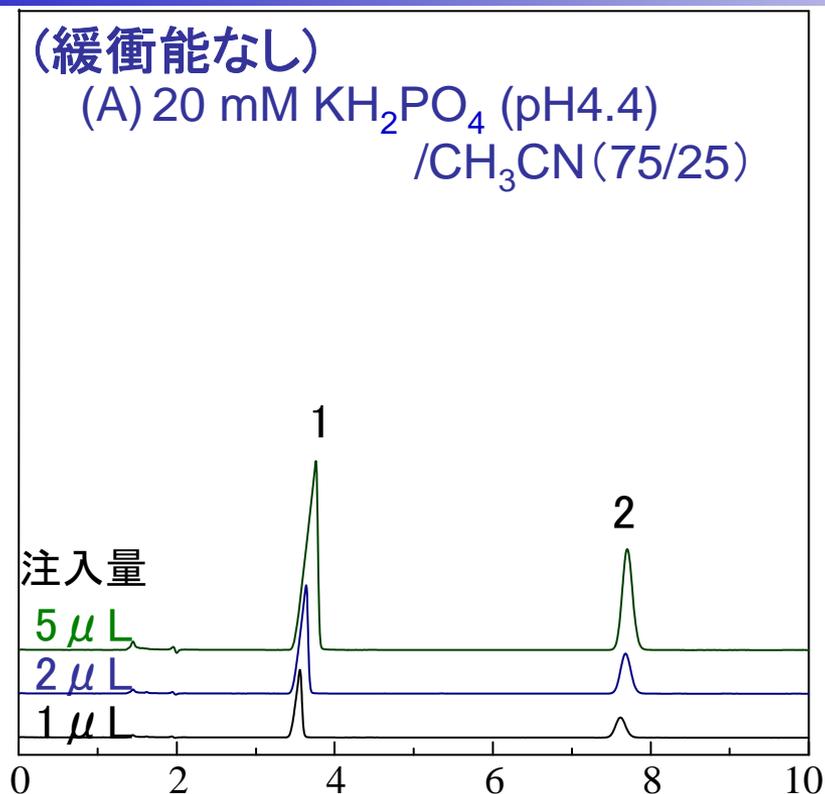
昔の公定法に多いのが『リン酸緩衝液pH4~5』

リン酸二水素カリウム

リン酸二水素ナトリウム

酢酸アンモニウム

緩衝能の有無の比較



[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 4.6 × 150 mm (C18、5 μm)

Sample: 1.Benzoic acid(0.1 g/L), 2.Methyl *p*-hydroxybenzoate (0.1 g/L)

緩衝能のない移動相を使用すると注入量が多くなるにつれ
解離性物質は保持時間が遅くなり、ピーク形状も悪い

緩衝能の有無の比較（再現性）

ロット番号	(A) 20 mM KH ₂ PO ₄ (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

[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 4.6 × 150 mm (C18、5 μm)

Mobile phase: (A) 20 mM KH₂PO₄ (pH4.4) / CH₃CN(75/25)

(B) 20 mM Acetate buffer (pH4.4) / CH₃CN(75/25)

Sample: Benzoic acid(0.1 g/L), Methyl *p*-hydroxybenzoate (0.1 g/L)

Inj.Vol. : 2 μL

緩衝能のない移動相では解離性物質の
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 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
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

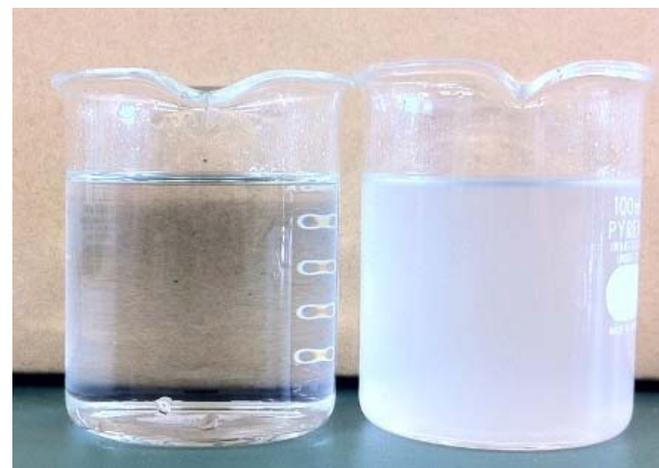
塩の析出

- 緩衝液(塩)を使用すると有機溶媒比率が高くなると塩が析出する

→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pH7 (80/20)を30 mL送液するとカラム圧力が20%上昇

このような時は注意が必要

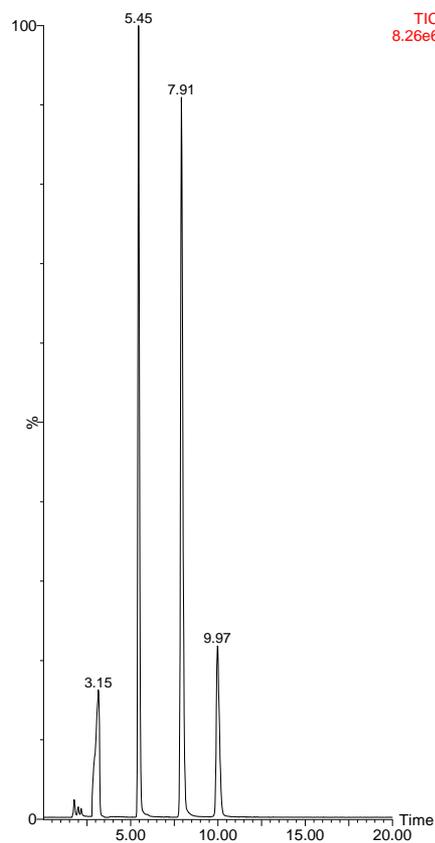
- ・有機溶媒と混合
- ・カラム交換
- ・ポンプが送液不良のとき



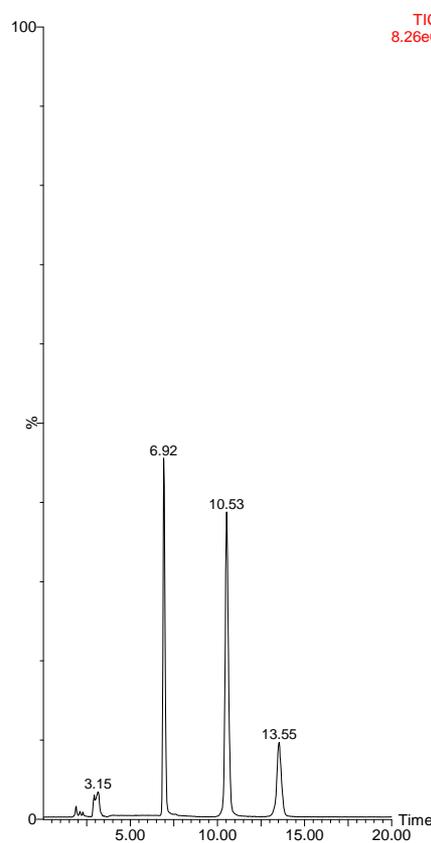
アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液pH7
左(75/25)、右(80/20)

緩衝液の濃度による影響 (LC/MS)

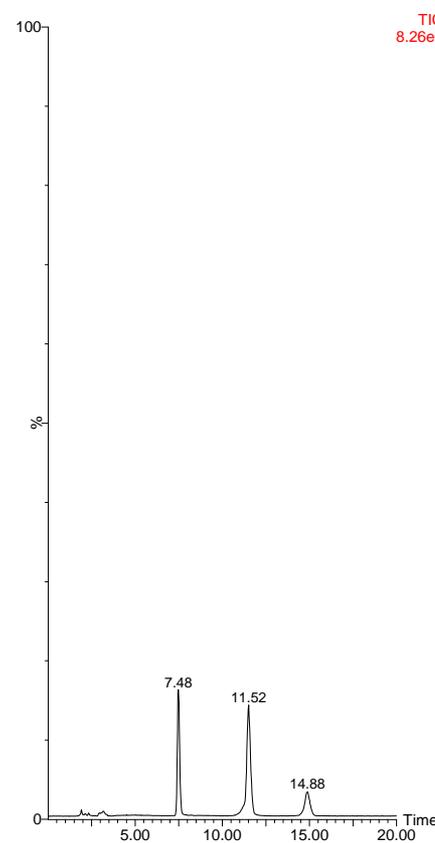
アセトニトリル/0.01%ギ酸



アセトニトリル/0.5%ギ酸



アセトニトリル/0.1%ギ酸



LC/MSの場合、濃度が薄いとピークが高くなる

緩衝液のノウハウ

- 目的のpHで緩衝能がある緩衝液を使う（pH4前後のリン酸溶液は緩衝能がない）
- 緩衝液のUV吸収に注意が必要
- 塩の析出の恐れがある
- LC/MSの場合、使用する種類や濃度によって感度が異なる
- 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、前の移動相の緩衝液の影響が出る場合がある

目次

<カラムのノウハウ>

逆相カラムの構造と特徴

ODSとC8

UHPLCカラム

<移動相のノウハウ>

HPLCに使用される有機溶媒

解離性物質のための移動相

緩衝液

イオン対クロマトグラフィー

<トラブルシューティング>

カラムの詰まり

洗浄と保管

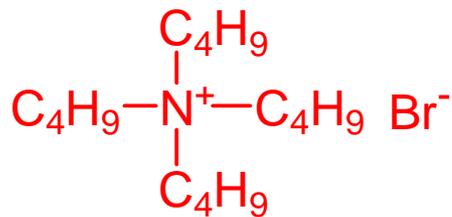
カラムを長持ちさせるコツ

再現性を向上させるコツ

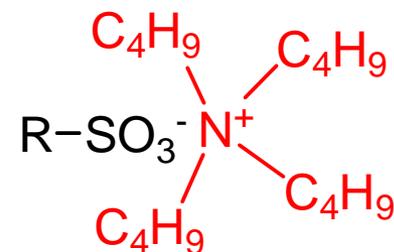
<お知らせ>

イオン対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

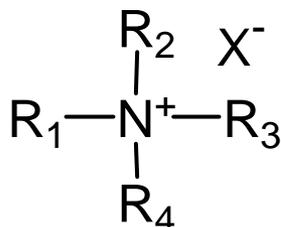


テトラブチルアンモニウム
(TBA)ブロマイド

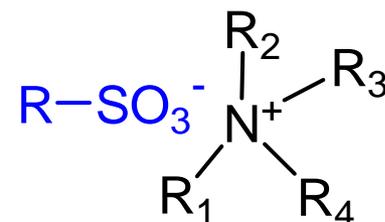


イオン対形成

電荷を打ち消しあって疎水性が増加する



アルキルスルホン酸

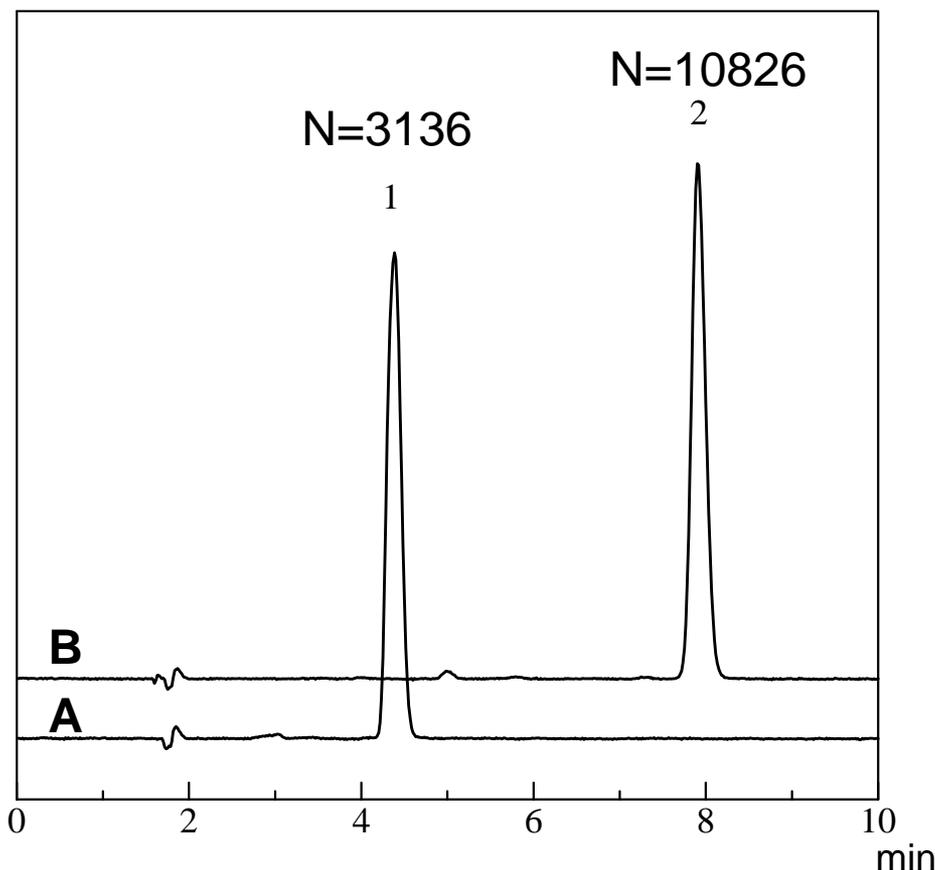


第四級アンモニウムイオンはpHで解離を抑えることはできない

イオン対クロマトグラフィーの特徴

- 保持の増加、ピーク形状の向上、分離の向上
- 試薬の種類が多い
- 移動相の調製が難しい
- カラムの平衡化に時間を要する

イオン対クロマトグラフィー(塩基性物質)



[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS**

4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)

Mobile phase: A CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (30/70)

B CH₃CN/20 mM H₃PO₄

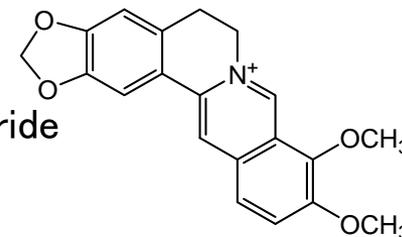
+ 10 mM C₅H₁₁SO₃Na(30/70)

Flow rate: 1 mL/min

Temp.: 40°C

Inj.vol.: 1 μL

Sample: Berberine chloride



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

イオン対試薬

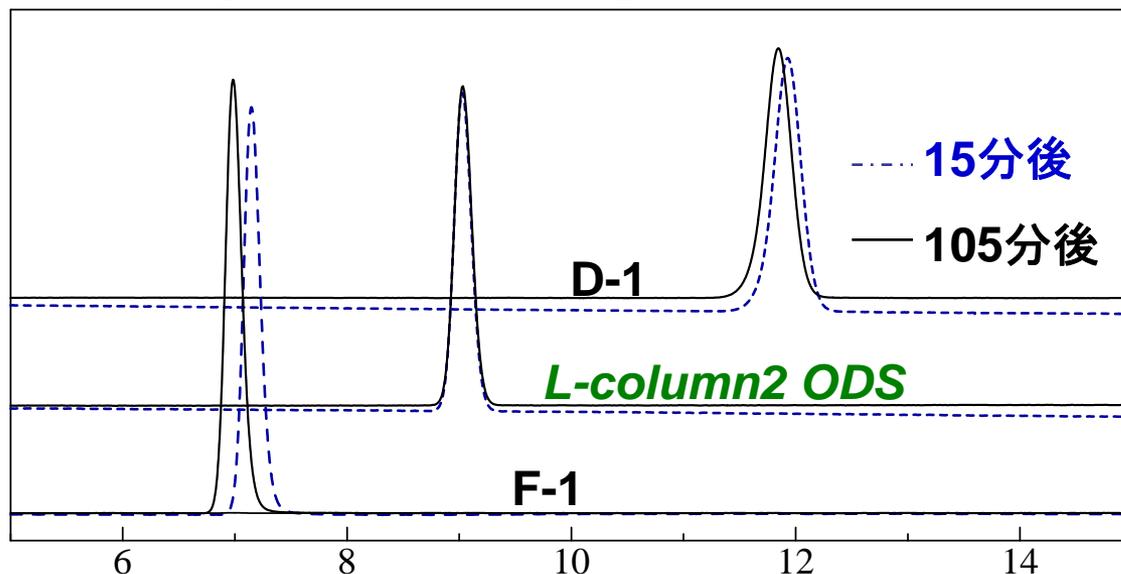
添加剤	MS	分子式	備考
アルキルスルホン酸Na	×	$C_nH_{2n+1}SO_3Na$	$3 \leq n \leq 13$ 炭素鎖が長いと水に溶けにくい
n-ドデシル硫酸Na (SDS)	×	$C_{12}H_{25}OSO_3Na$	水に溶けやすい
過塩素酸Na	×	$HClO_4Na$	溶解度が高い
パーフルオロ酢酸	○	$C_nF_{2n+1}COOH$	$1 \leq n \leq 7$ システムに残留しやすい
テトラブチルアンモニウム ホスファート(TBA-P)	×	$(C_4H_9)_4N, H_2PO_4$	Cl、Brなどの塩がある
ジアルキルアンモニウム	○	$(C_nH_{2n+1})_2NH$	$3 \leq n \leq 6$

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

平衡化時間

カラムのコンディショニング

CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (30/70) 60 min → 移動相15 min



	15分後	105分後
D-1	11.929	11.846
<i>L-column2 ODS</i>	9.028	9.031
F-1	7.101	6.984

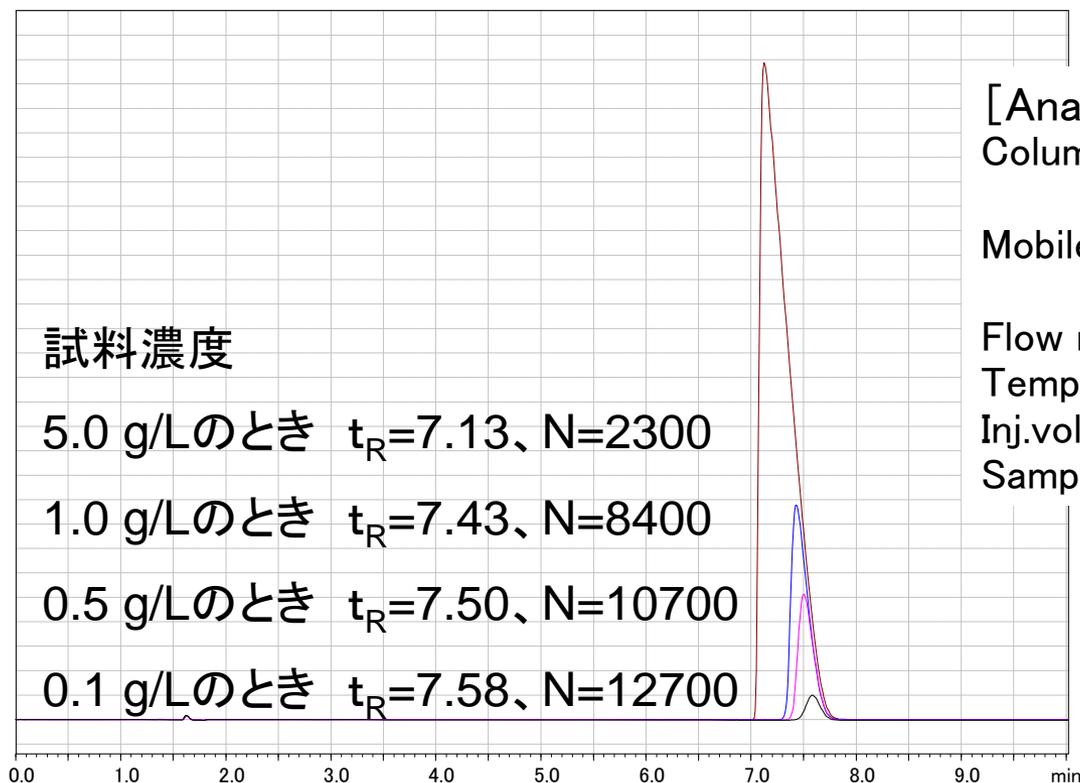
[Analytical conditions]

Column: 4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)、Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄ + 10 mM C₆H₁₃SO₃Na (30/70)、Flow rate: 1 mL/min、Temp.: 40°C、Inj.vol.: 1 μL、Sample: Propranolol (0.1g/L)

カラムによって移動相(イオン対試薬含有)の
平衡化時間が異なる

試料濃度の影響

イオン対試薬の濃度が薄いとき



[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS**

4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)

Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄

+ 5 mM C₆H₁₃SO₃Na(30/70)

Flow rate: 1 mL/min

Temp.: 40°C

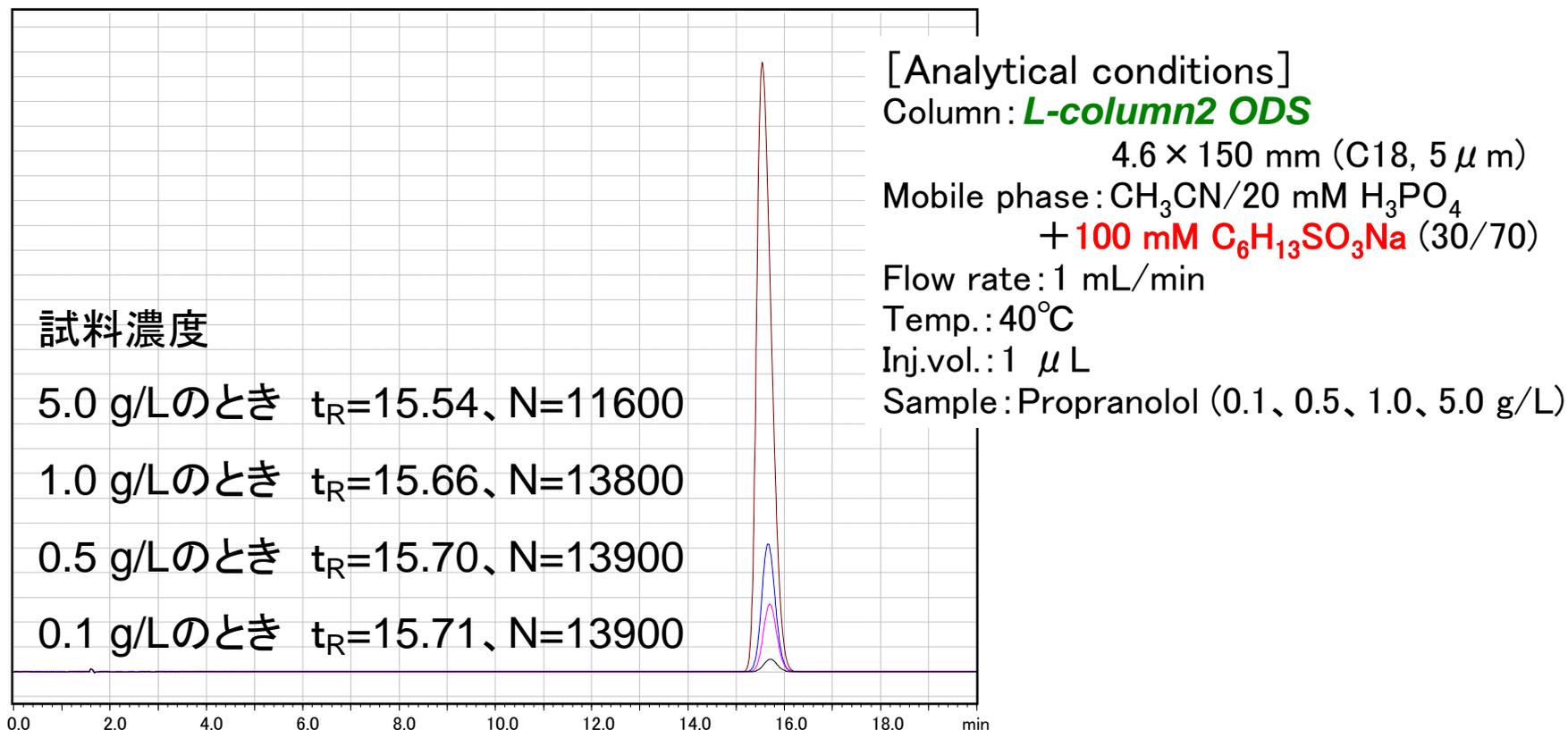
Inj.vol.: 1 μL

Sample: Propranolol (0.1、0.5、1.0、5.0 g/L)

イオン対試薬の濃度が薄いと試料濃度によって
保持時間、ピーク形状が変化する

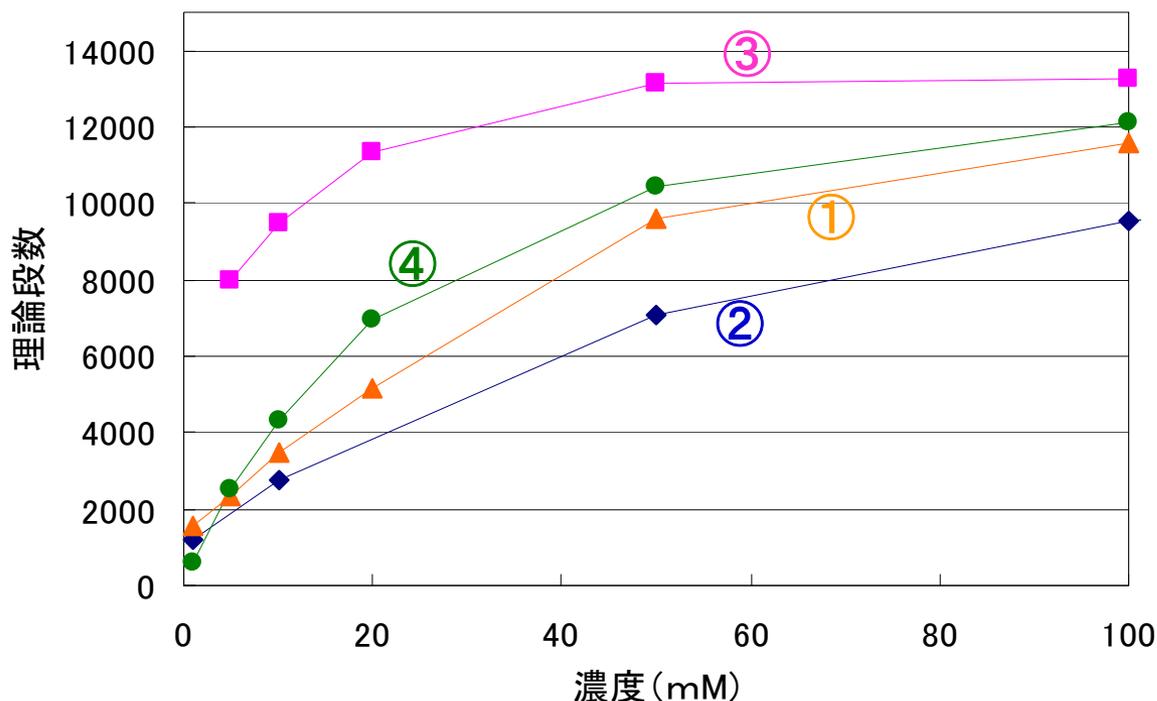
試料濃度の影響

イオン対試薬の濃度が濃いとき



イオン対試薬の濃度を濃くすると、試料濃度が濃くても問題ない

イオン対試薬の濃度と理論段数



[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS**

4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)

Mobile phase:

① CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ C₆H₁₃SO₃Na (30/70)

② CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ HClO₄Na (30/70)

③ CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ C₁₂H₂₅OSO₃Na (45/55)

④ CH₃CN/TBA-P (50/50)

Flow rate: 1 mL/min

Temp.: 40°C

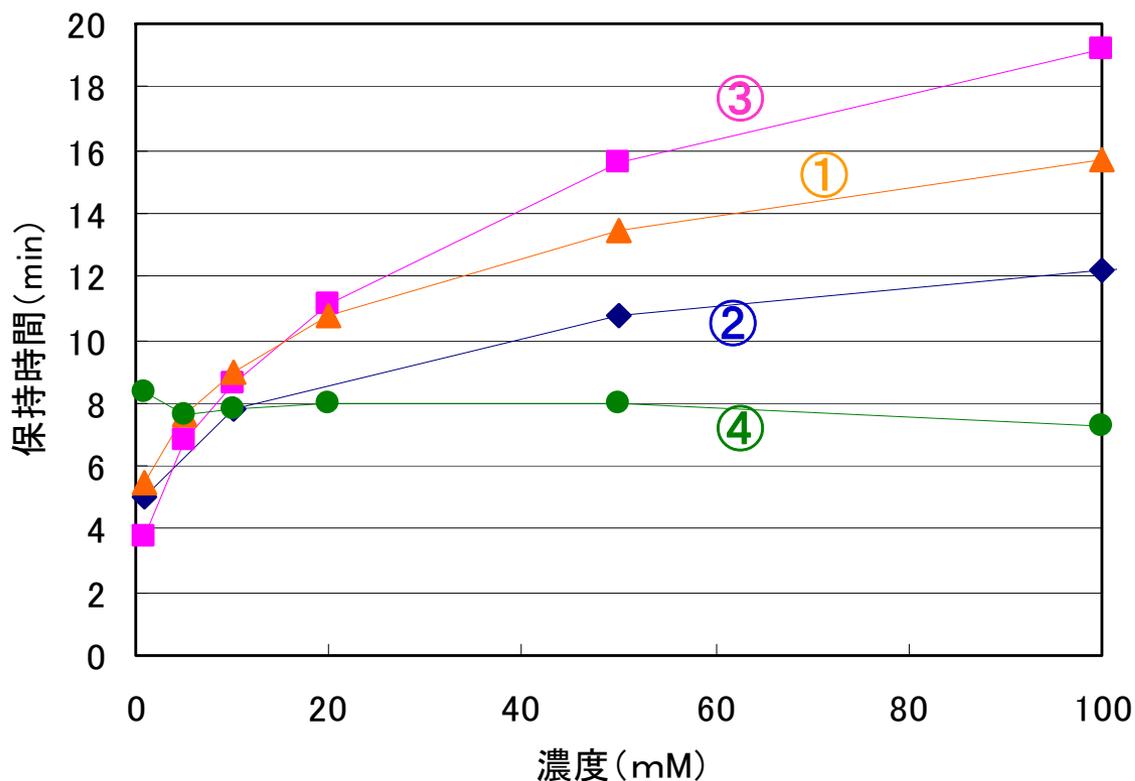
Inj.vol.: 1 μL

Sample: ①②③ Propranolol (5.0 g/L)

④ Acid Orange5 (5.0 g/L)

- イオン対試薬の濃度を濃くすると理論段数が高い
- イオン対試薬のアルキル基が長いと理論段数が高い

イオン対試薬の濃度と保持時間



[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS**

4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)

Mobile phase:

① CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ C₆H₁₃SO₃Na (30/70)

② CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ HClO₄Na (30/70)

③ CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ C₁₂H₂₅OSO₃Na (45/55)

④ CH₃CN/TBA-P (50/50)

Flow rate: 1 mL/min

Temp.: 40°C

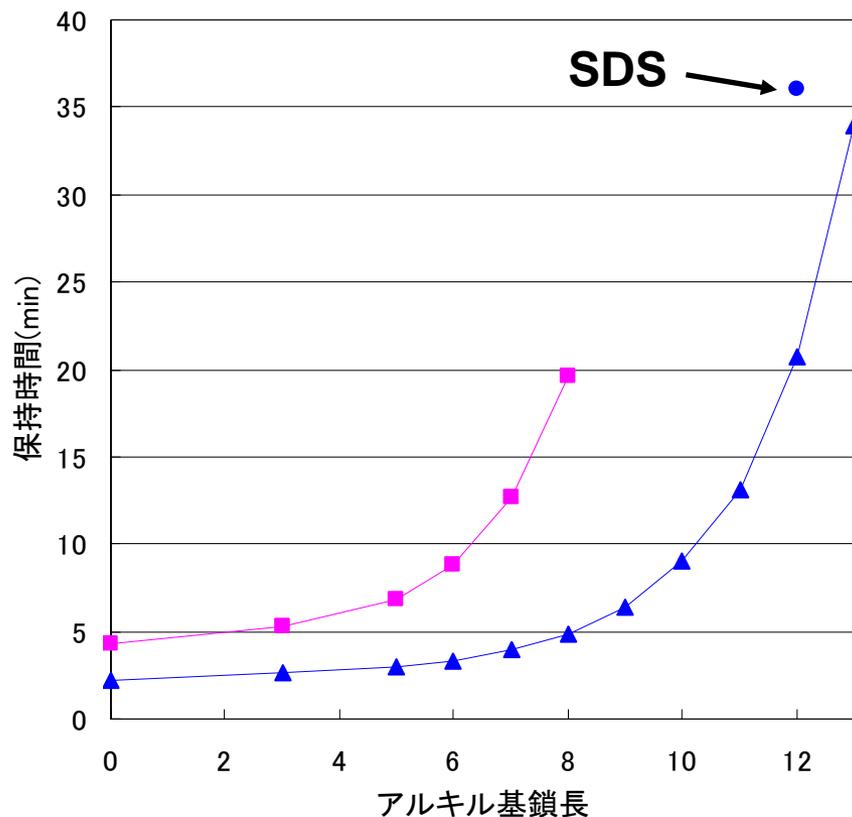
Inj.vol.: 1 μL

Sample: ①②③ Propranolol (0.1 g/L)

④ Acid Orange5 (0.1 g/L)

イオン対試薬 (TBAを除く) の濃度を濃くすると
保持が増加する

イオン対試薬のアルキル基の長さの効果



[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS**

4.6 × 150 mm (C18, 5 μm)

Mobile phase:

① CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ C_nH_{2n+1}SO₃Na (30/70)

② CH₃CN/20 mM H₃PO₄
+ C_nH_{2n+1}SO₃Na (40/60)

Flow rate: 1 mL/min

Temp.: 40°C

Inj.vol.: 1 μL

Sample: Propranolol (0.1 g/L)

イオン対試薬のアルキル基が長いと保持が増加する

イオン対クロマトグラフィー

- 平衡化時間はカラムによって異なり、30分以上必要
→ **L-column**は平衡化時間が短い
- イオン対試薬の濃度は試料濃度によって異なる
- イオン対試薬 (TBAを除く) の濃度によって保持時間が異なる
- アルキルスルホン酸塩はアルキル基鎖長によって保持が異なる
- アルキルスルホン酸塩は泡立つので調製しにくい (高濃度、C10以上)
- 過塩素酸Naはヘキサンスルホン酸と同等の保持



SDSのようにアルキル基が長いイオン対試薬は保持が大きく、高濃度の試料に対しても高い理論段数を示す

目次

<カラムのノウハウ>

逆相カラムの構造と特徴

ODSとC8

UHPLCカラム

<移動相のノウハウ>

HPLCに使用される有機溶媒

解離性物質のための移動相

緩衝液

イオン対クロマトグラフィー

<トラブルシューティング>

カラムの詰まり

洗浄と保管

カラムを長持ちさせるコツ

再現性を向上させるコツ

<お知らせ>

カラムの詰まり

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 μ 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

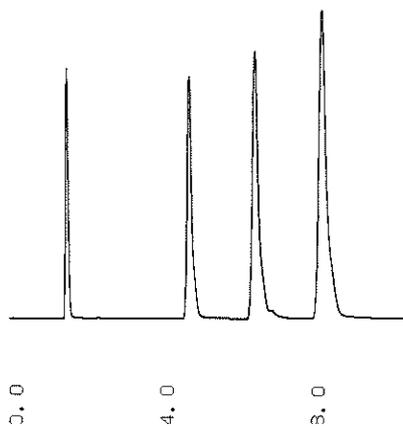
試料：医薬品など

注入量：5～10 μ L

劣化カラムの調査

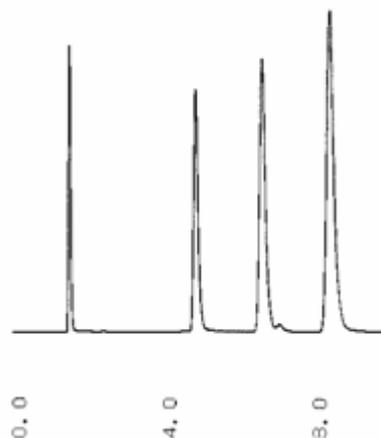
洗浄前

N=7000、P=17.5 MPa



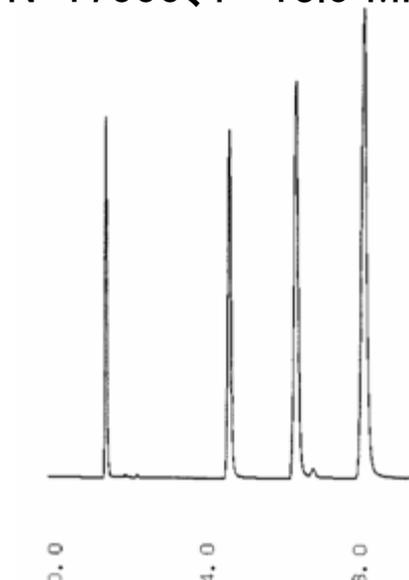
洗浄後

N=8500、P=17.0 MPa



フィルター交換後

N=17000、P=13.0 MPa



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

再現性を向上させるコツ

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

カラムを長持ちさせるコツ

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
- ・ 定期的にカラムを洗浄する

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)〕

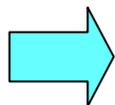
- ・塩を析出させない
- ・脂溶性の夾雑物を多く含む試料の場合、THFで洗浄する
- ・**L-column**シリーズの場合、カラムを逆向きで洗浄することも有効(マイクロカラム以外)

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

(温度変化の小さい所で保管)