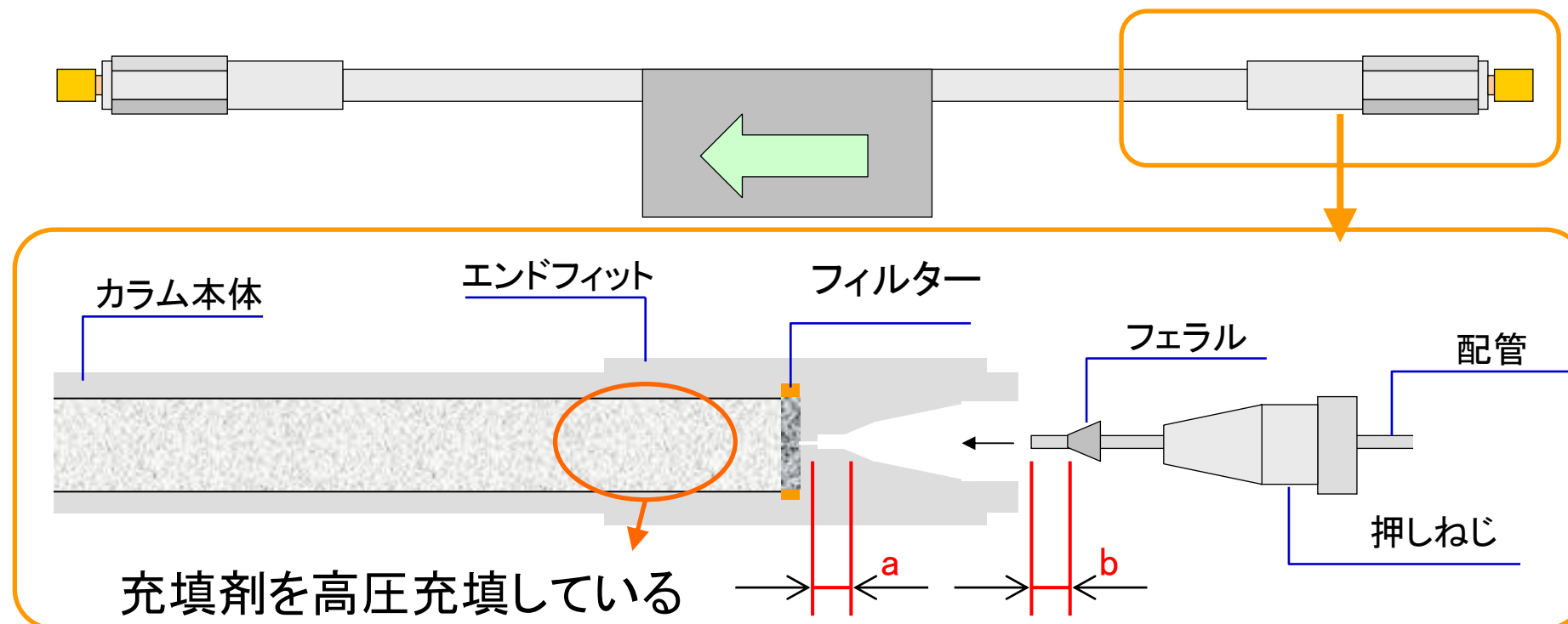


JASIS2012 新技術説明会

# 逆相HPLC分析のノウハウ一挙公開 2012

一般財団法人化学物質評価研究機構  
クロマト技術部

# カラムの構造



## カラムの材質

カラム本体: SUS 316

エンドフィッティング: SUS 316

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:

島津接続:

a, bの長さ

約3.5 mm

約2.3 mm

# シリカゲル基材

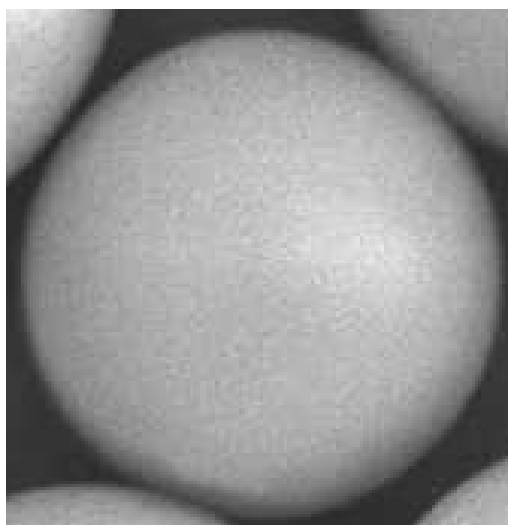
## 一般的な物性値

粒子径: 1.5~10  $\mu\text{m}$   
 細孔径: 8~12 nm  
 比表面積: 250~500  $\text{m}^2/\text{g}$   
 細孔容積: 0.8~1.2  $\text{mL/g}$

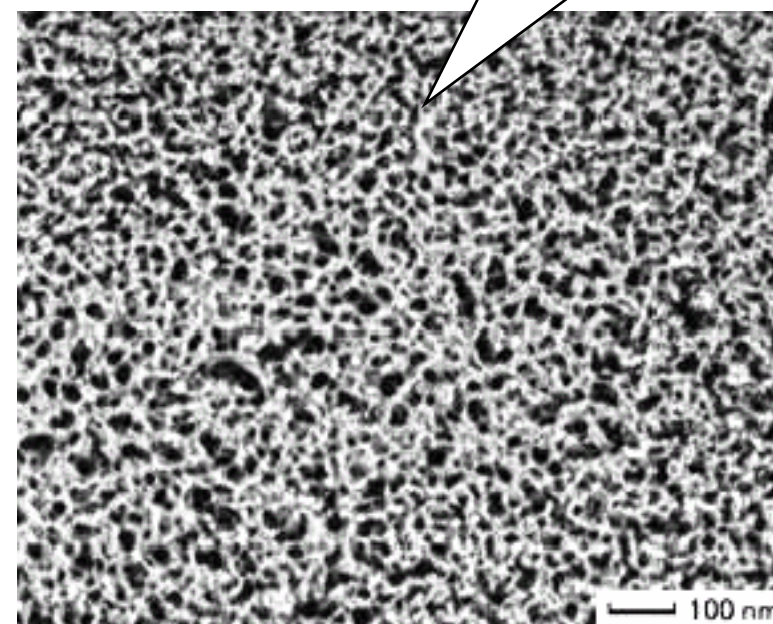
## L-column シリーズの物性値

2  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$   
 12 nm, 30 nm  
 340  $\text{m}^2/\text{g}$ , 150  $\text{m}^2/\text{g}$   
 1.1  $\text{mL/g}$

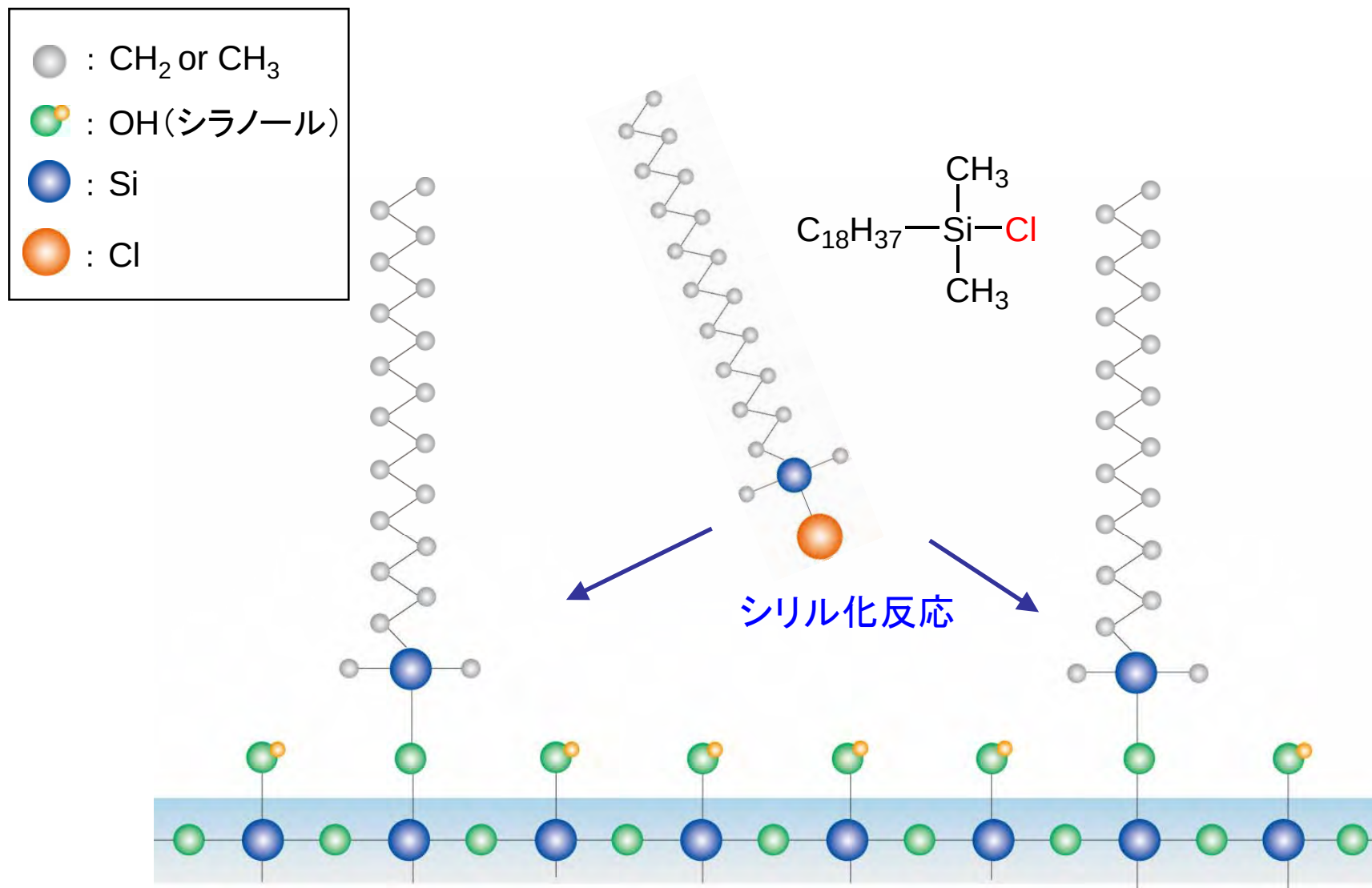
白い部分  
: シリカゲル骨格  
 黒い部分  
: 細孔



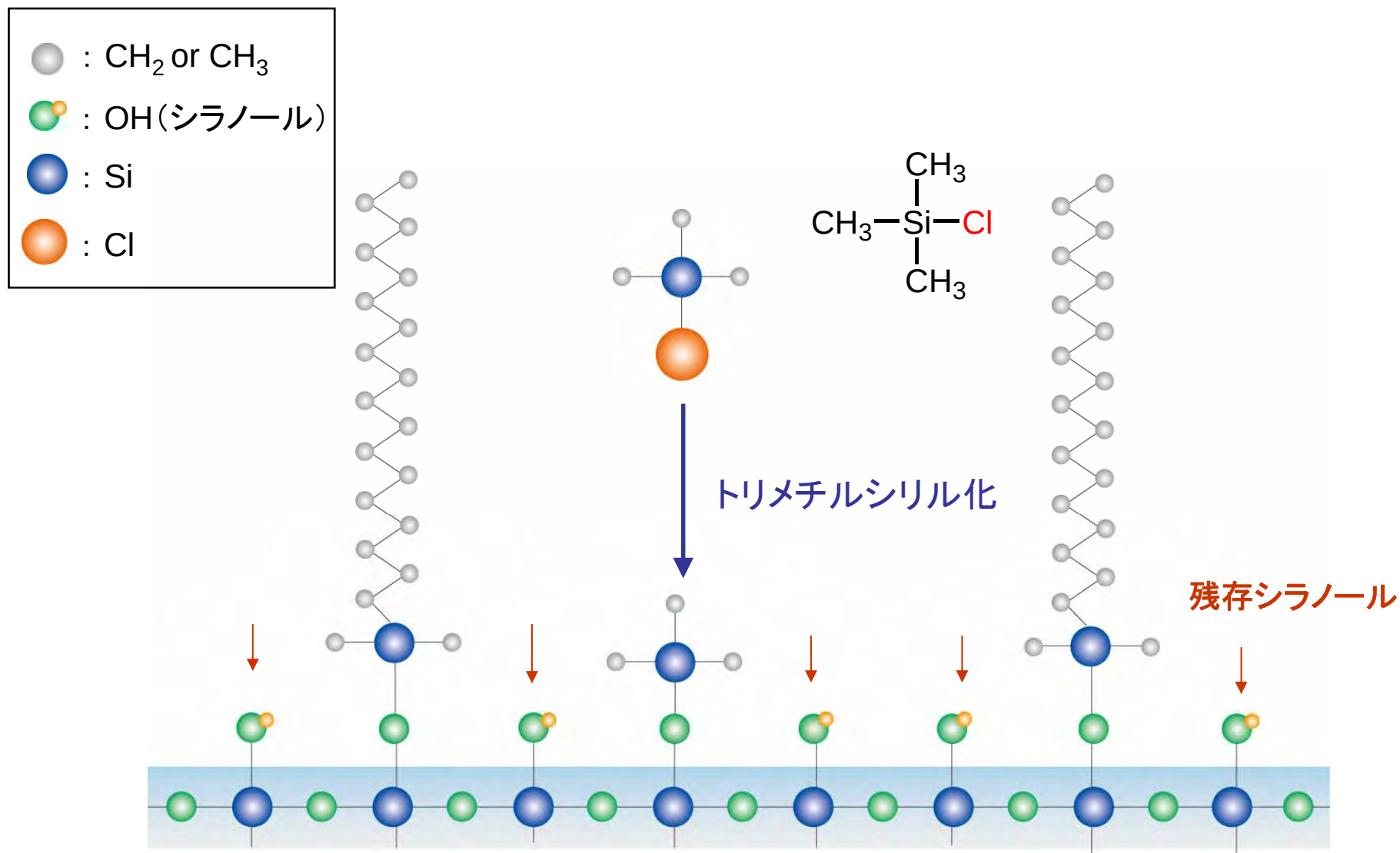
表面  
拡大



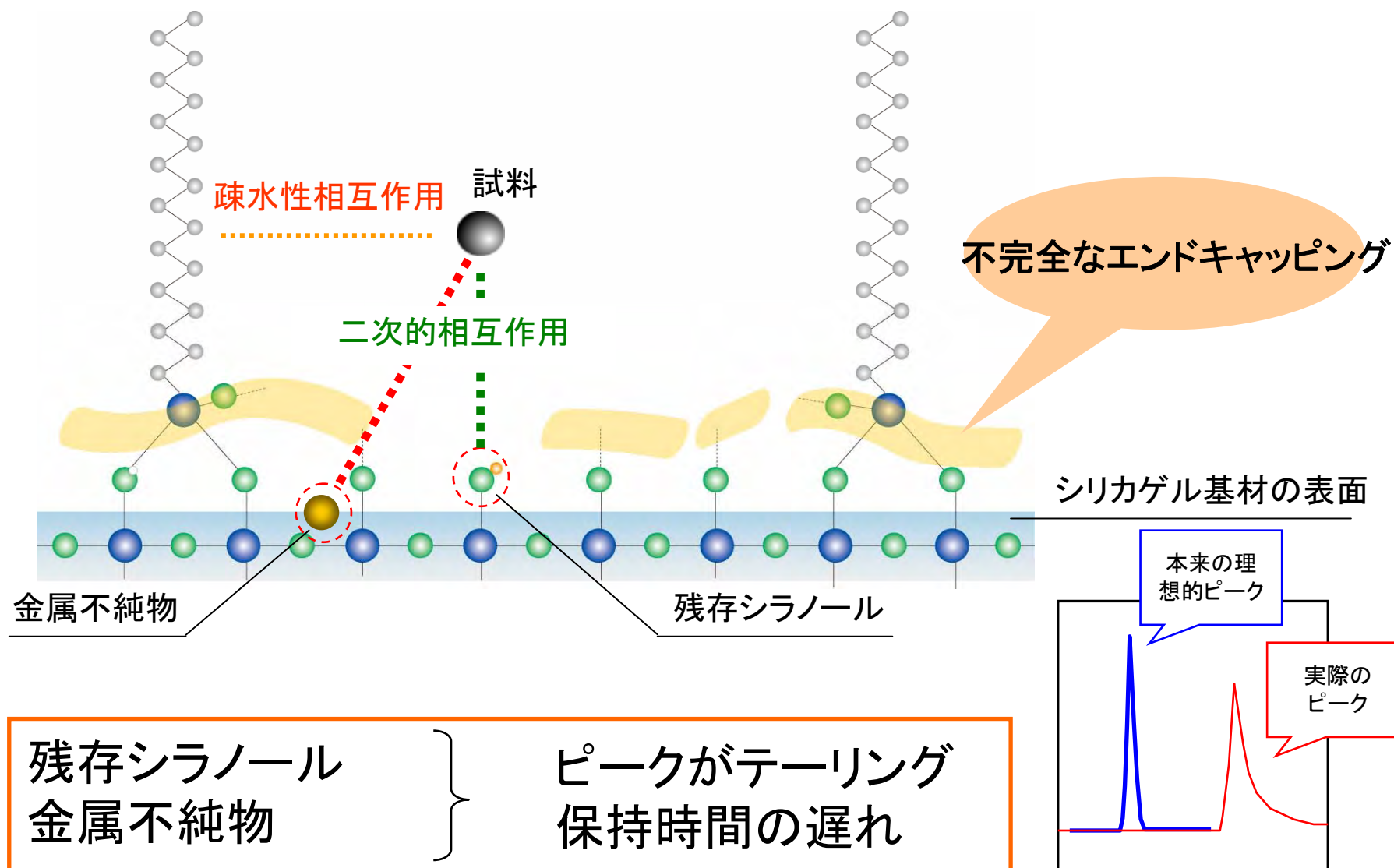
# ODS基の導入



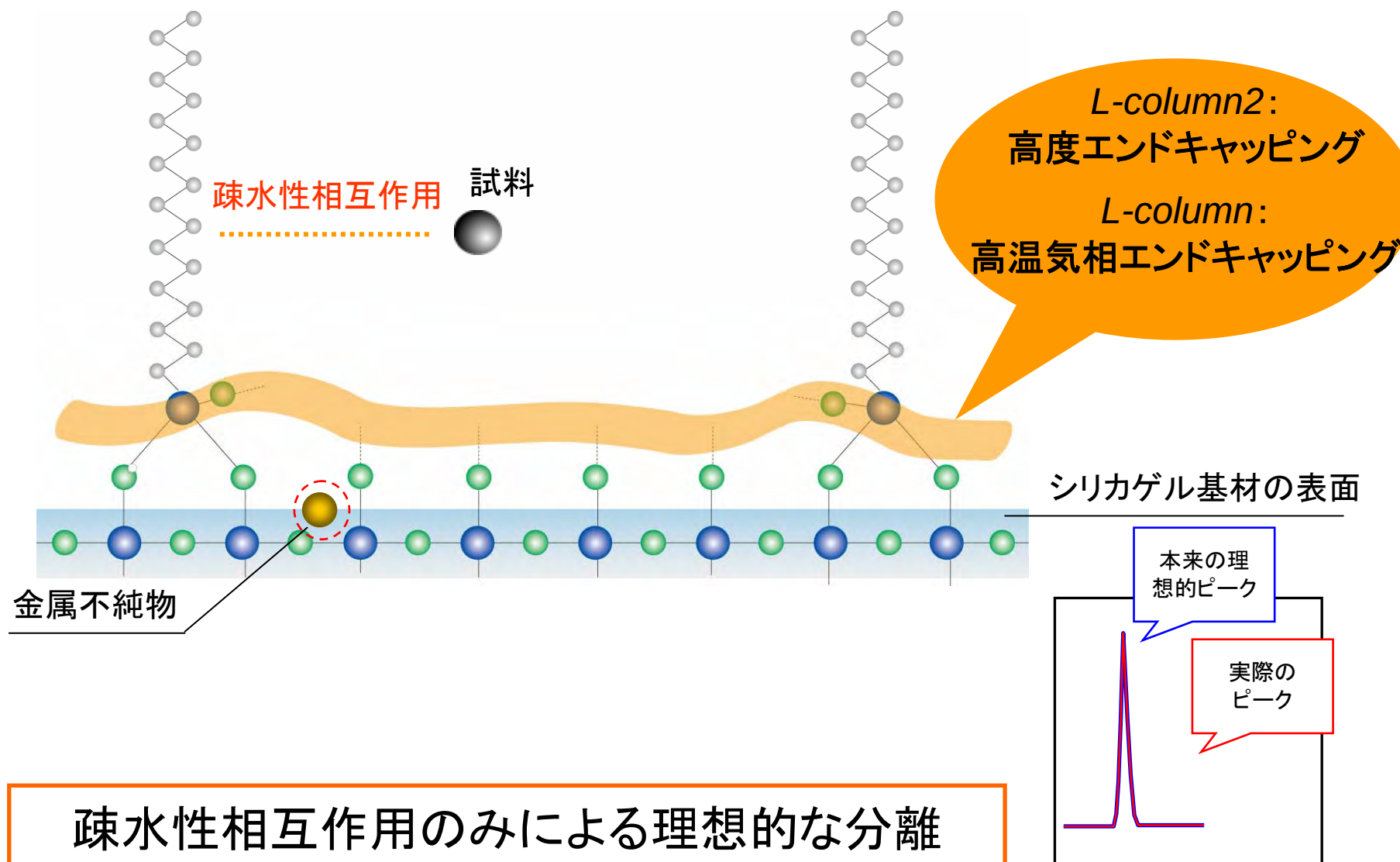
# エンドキャッピング



## 二次的相互作用の影響

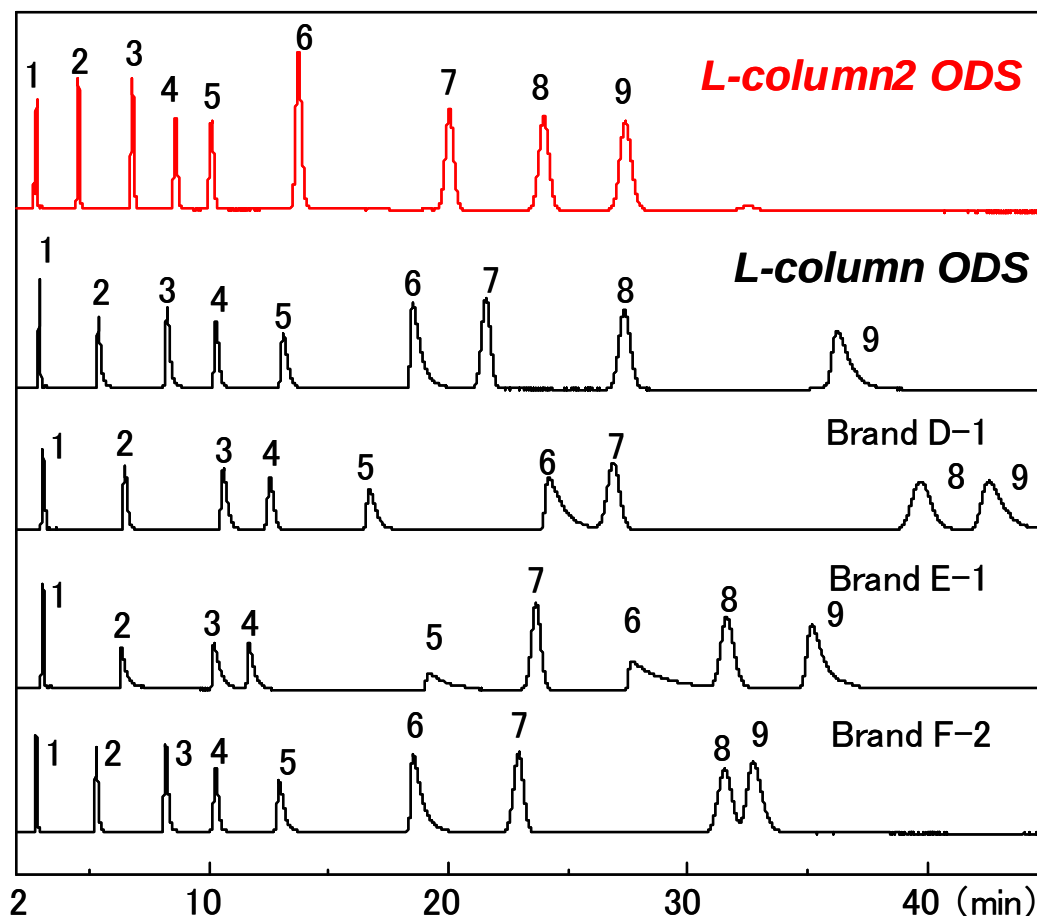


# L-column シリーズのエンドキャッピング技術





# 残存シラノールの評価(塩基性物質)



[Analytical conditions]

Column: 5  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm (C18)

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/

25 mM Phosphate buffer pH 7.0 (40/60)

Temp.: 40°C

Flow rate: 1 mL/min

Detection: UV 220 nm

Inj.vol.: 1  $\mu$  L

Sample: 1. Fexofenadine

2. Chlorpheniramine

3. Triprolidine

4. Diphenhydramine

5. Diphenylpyraline

6. Homochlorcyclizine

7. Hydroxyzine

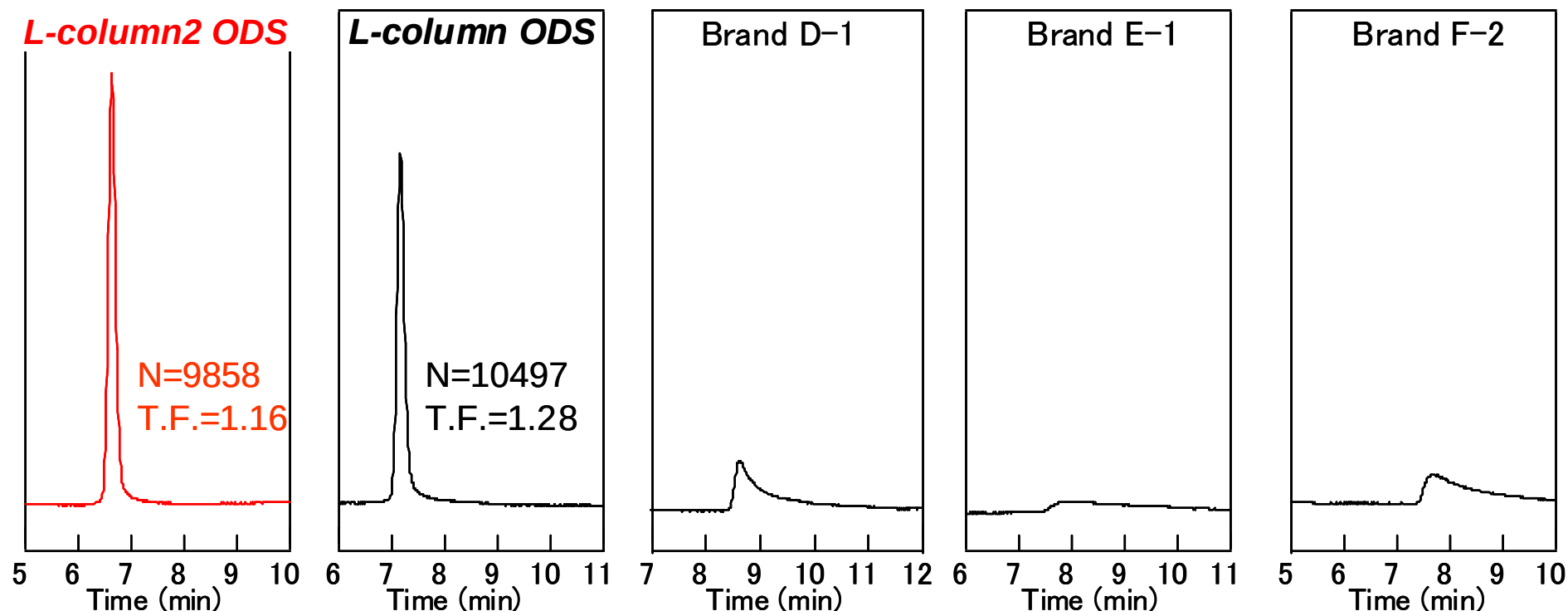
8. Astemizole

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)



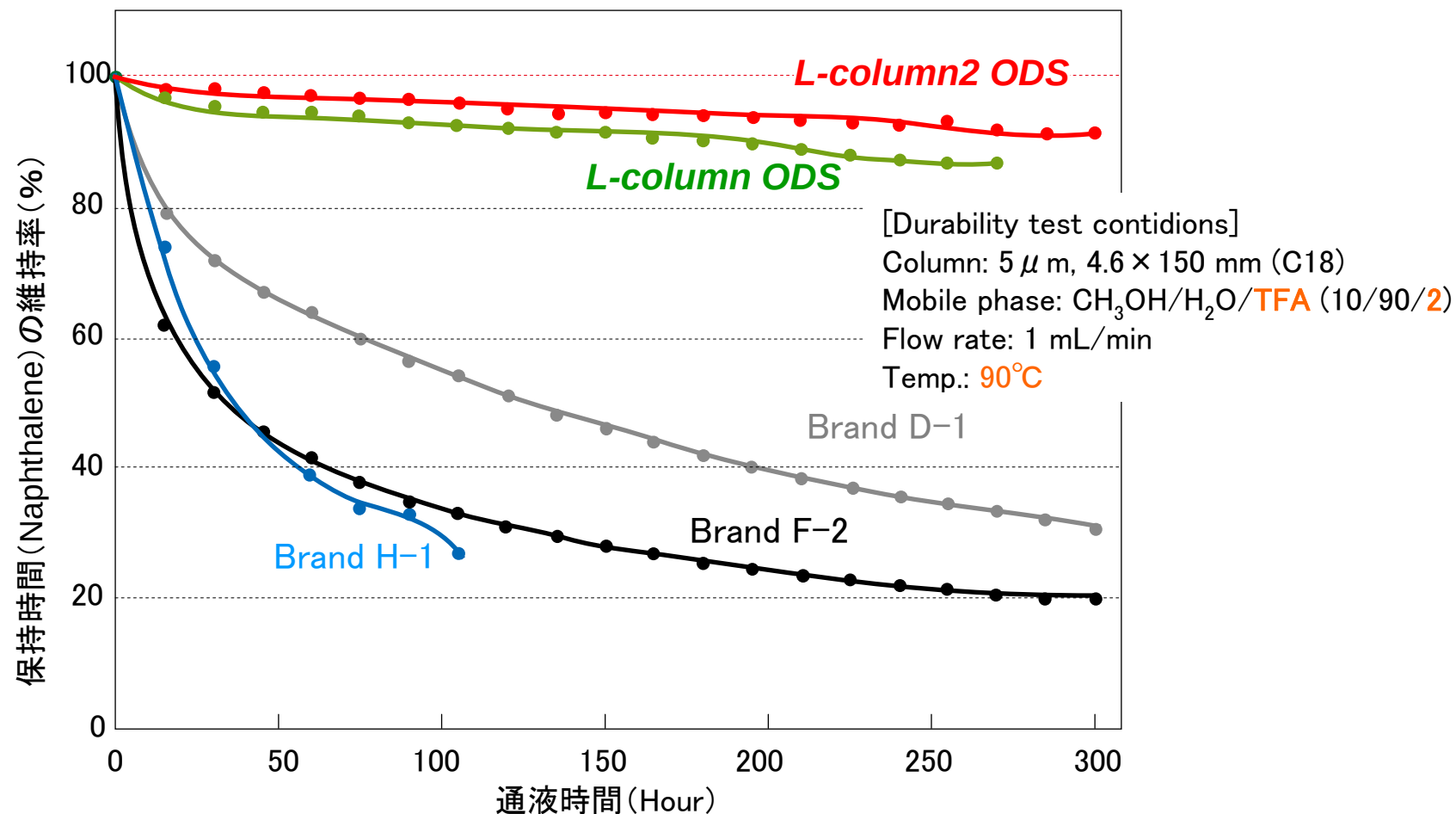
[Analytical conditions]

Column: 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm (C18); Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (40/60)

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

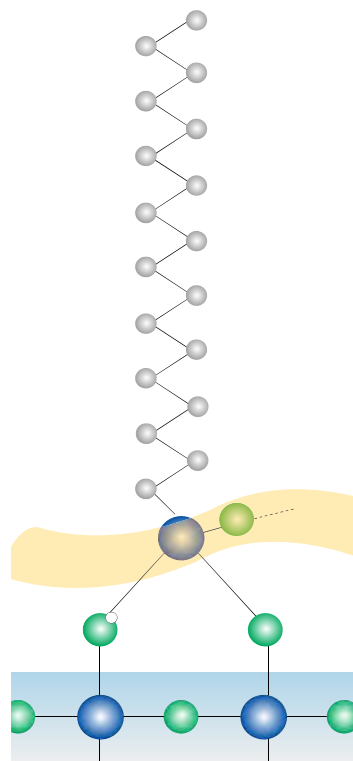
**L-column2 ODS は配位化合物に対して低吸着**

## 耐久性テスト(2%TFA)

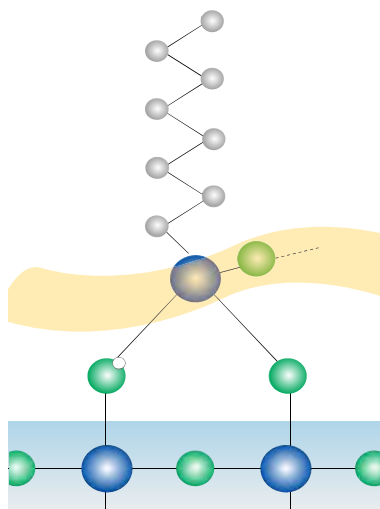


**L-column2 ODS** は低pHでも高耐久性

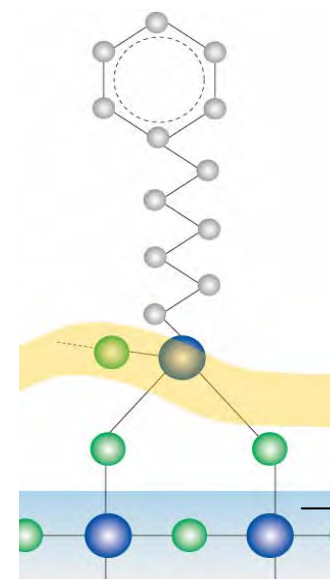
## 各種修飾基の表面構造



ODSカラム



C8カラム

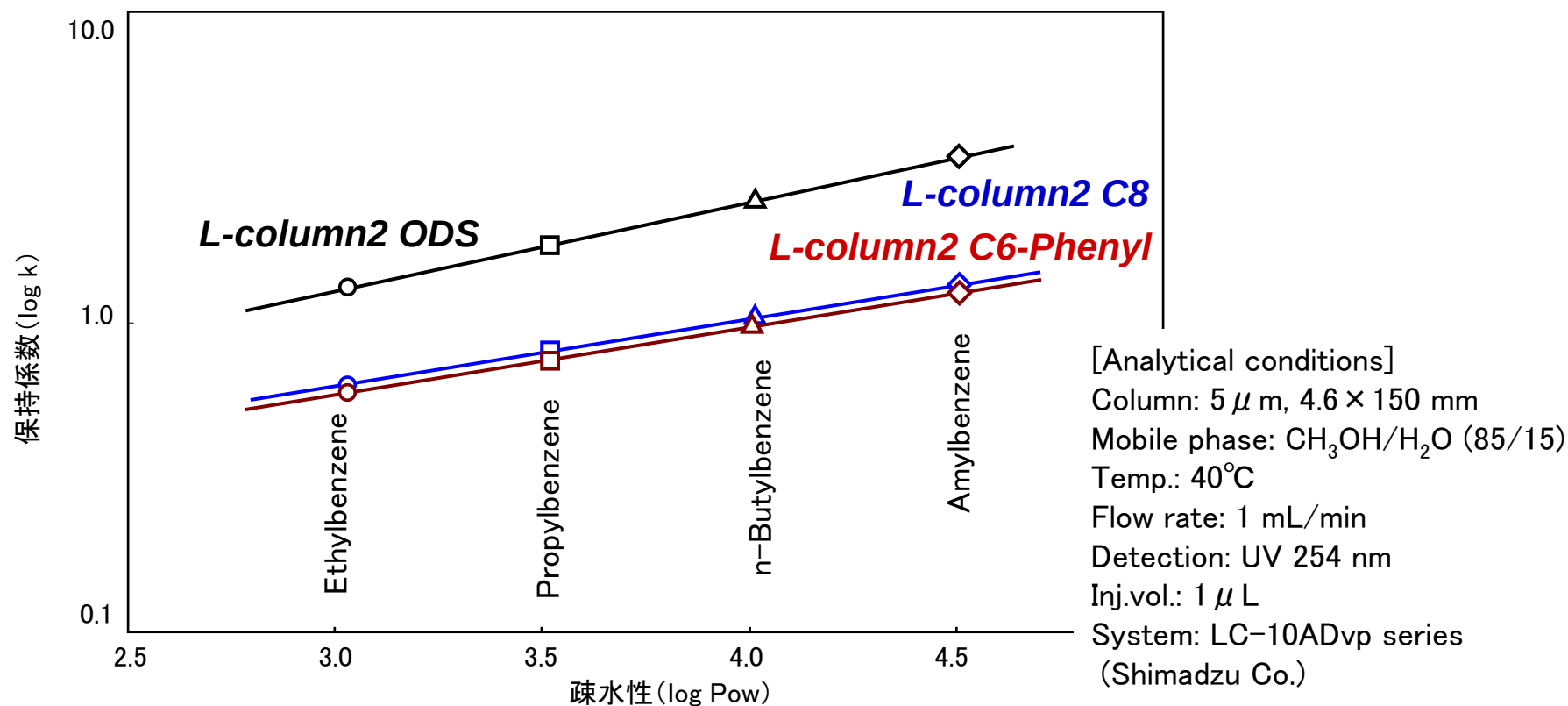


フェニルヘキシル(C6-Phenyl)カラム

シリカゲル基材  
の表面

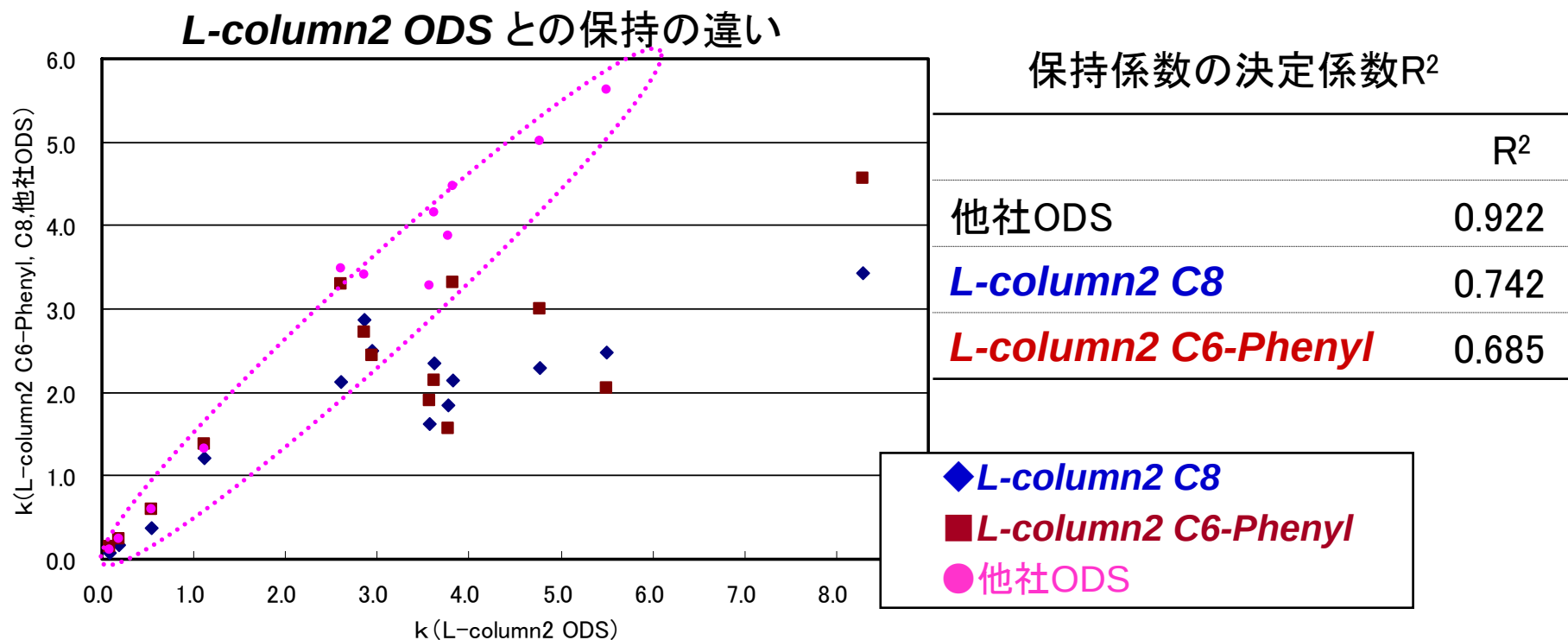
|            |                                |
|------------|--------------------------------|
| ODS:       | 疎水性相互作用(大)                     |
| C8:        | 疎水性相互作用(中)                     |
| C6-Phenyl: | 疎水性相互作用(中)+ $\pi$ - $\pi$ 相互作用 |

## 疎水性と保持係数の関係



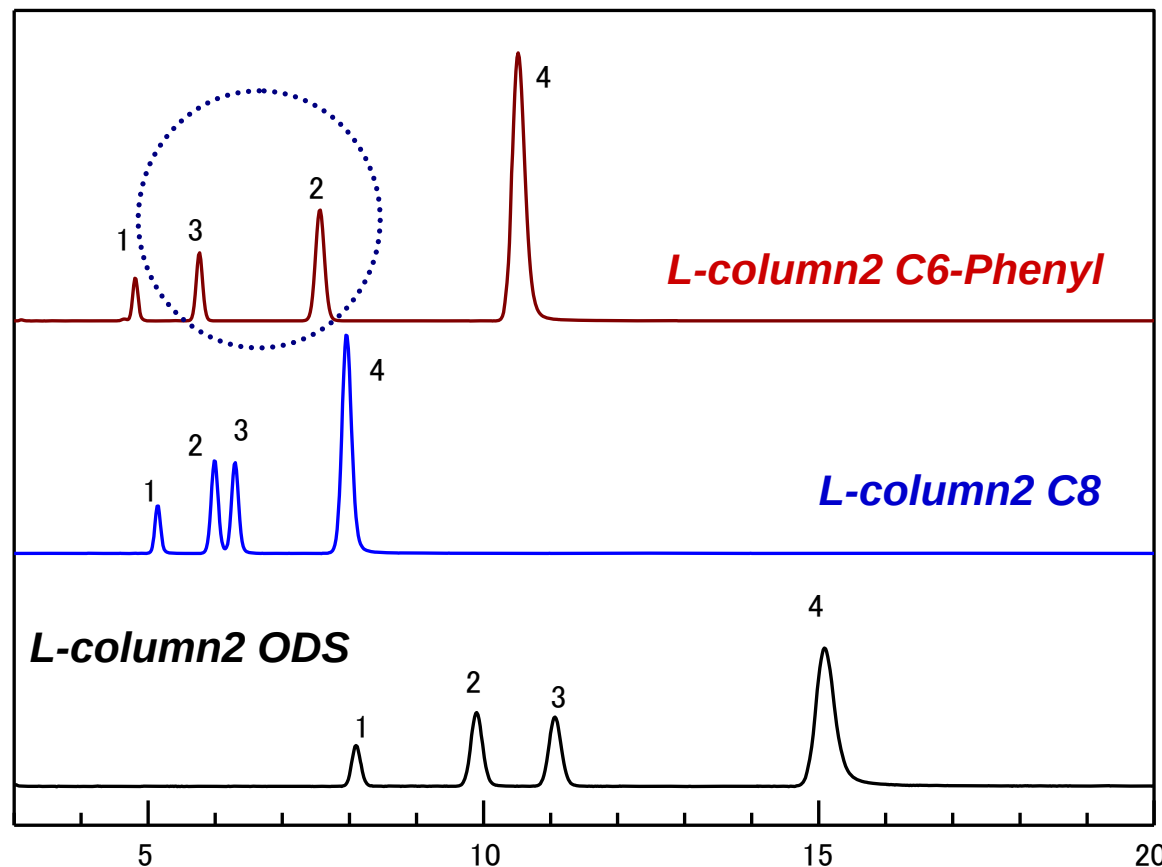
- ・ ODSカラムと比べ、保持力が弱い
- ・ 疎水性が高い物質ほど、その差は大きい

# 保持係数の違い

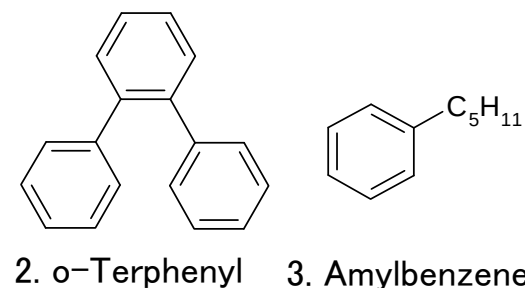


- ・ 保持の小さい化合物は同等の保持
- ・ 保持の大きい化合物はODSカラムの保持が大きい
- ・ 決定係数 $R^2$ はODSカラムよりもC8、C6-Phenylが小さい  
⇒分離パターンが異なる、分離の改善

# 分離パターンの違い



[Analytical conditions]  
 Column: 5  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (80/20)  
 Temp.: 40°C  
 Flow rate: 1 mL/min  
 Detection: UV 254 nm  
 Inj.vol.: 1  $\mu$  L  
 Sample: 1. Butylbenzene  
           2. o-Terphenyl  
           3. Amylbenzene  
           4. Triphenylene  
 System: LC-10ADvp series  
 (Shimadzu Co.)



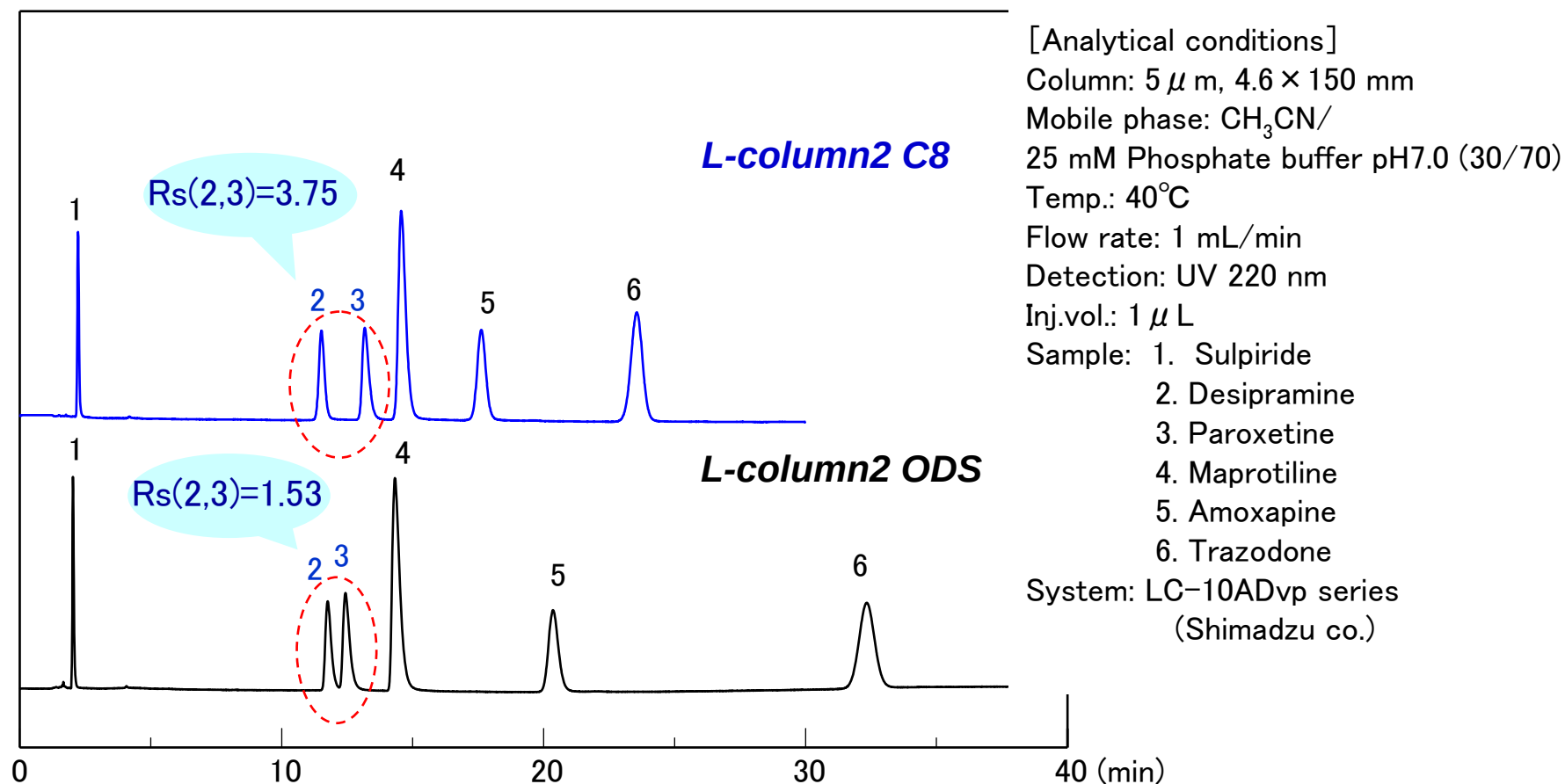
C6-Phenylは芳香族化合物の保持が大きい

## ODSの次の選択は？

- ・ ODSカラム  
ファーストチョイス
- ・ C8カラム  
疎水性が小さいため、分析時間の短縮  
→ 保持の大きい化合物  
分離の改善  
→ 有機溶媒比率が30%以下のとき
- ・ C6-Phenylカラム  
疎水性が小さいため、分析時間の短縮  
→ 保持の大きい化合物  
分離の改善  
→ 芳香族化合物、位置異性体

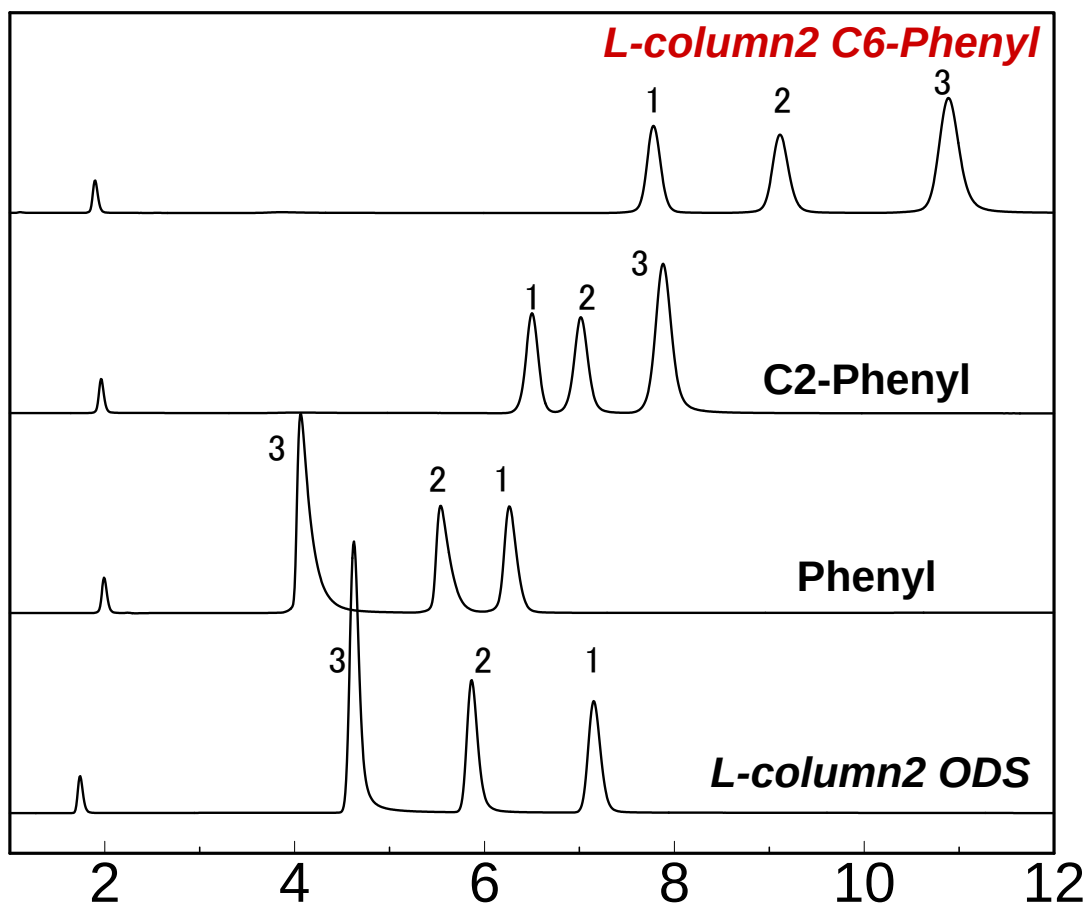


## C8カラムによる分離の改善例



- ・ 分析時間が短縮
- ・ デシプラミン、パロキセチンの分離が改善

# C6-Phenylカラムによる分離の改善例



[Analytical conditions]

Column: 5  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O(50/50)

Temp.: 40°C

Flow rate: 1 mL/min

Detection: UV 210 nm

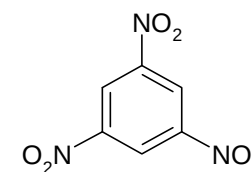
Inj.vol.: 2  $\mu$  L

Sample: 1. ニトロベンゼン

2. m-ジニトロベンゼン

3. 1,3,5-トリニトロベンゼン

System: LC-10ADvp series (Shimadzu co.)

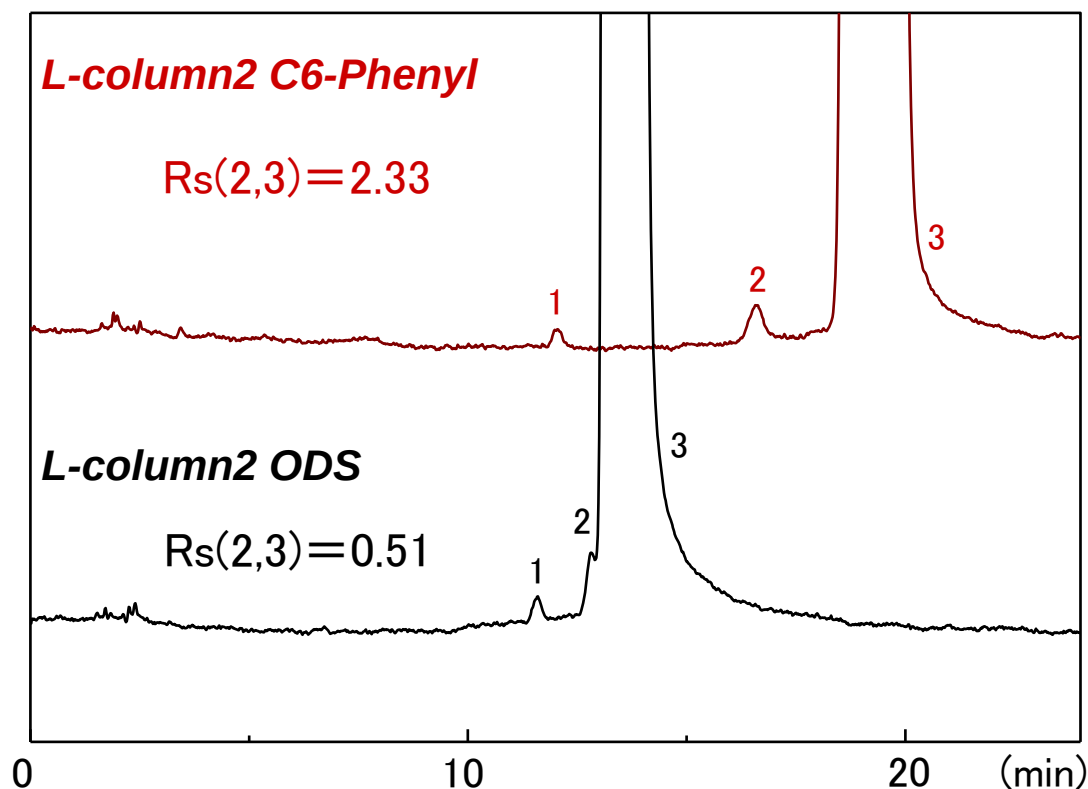


1,3,5-トリニトロベンゼン

- ・フェニル基のスペーサーが長いと、 $\pi$  -  $\pi$  相互作用が強くなる
- ・ニトロ基の多い化合物の保持が増加し、分離パターンが逆転

## C6-Phenylカラムによる分離の改善例

### レボフロキサシンの不純物分析



[Analytical conditions]

Column:  $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$

Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM H}_3\text{PO}$  (10/90)

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

Flow rate:  $1 \text{ mL/min}$

Detection: UV 294 nm

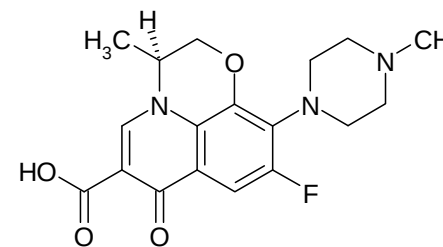
Inj.vol.:  $2 \mu\text{L}$

Sample: 1. Impurity A

2. Impurity B

3. Levofloxacin

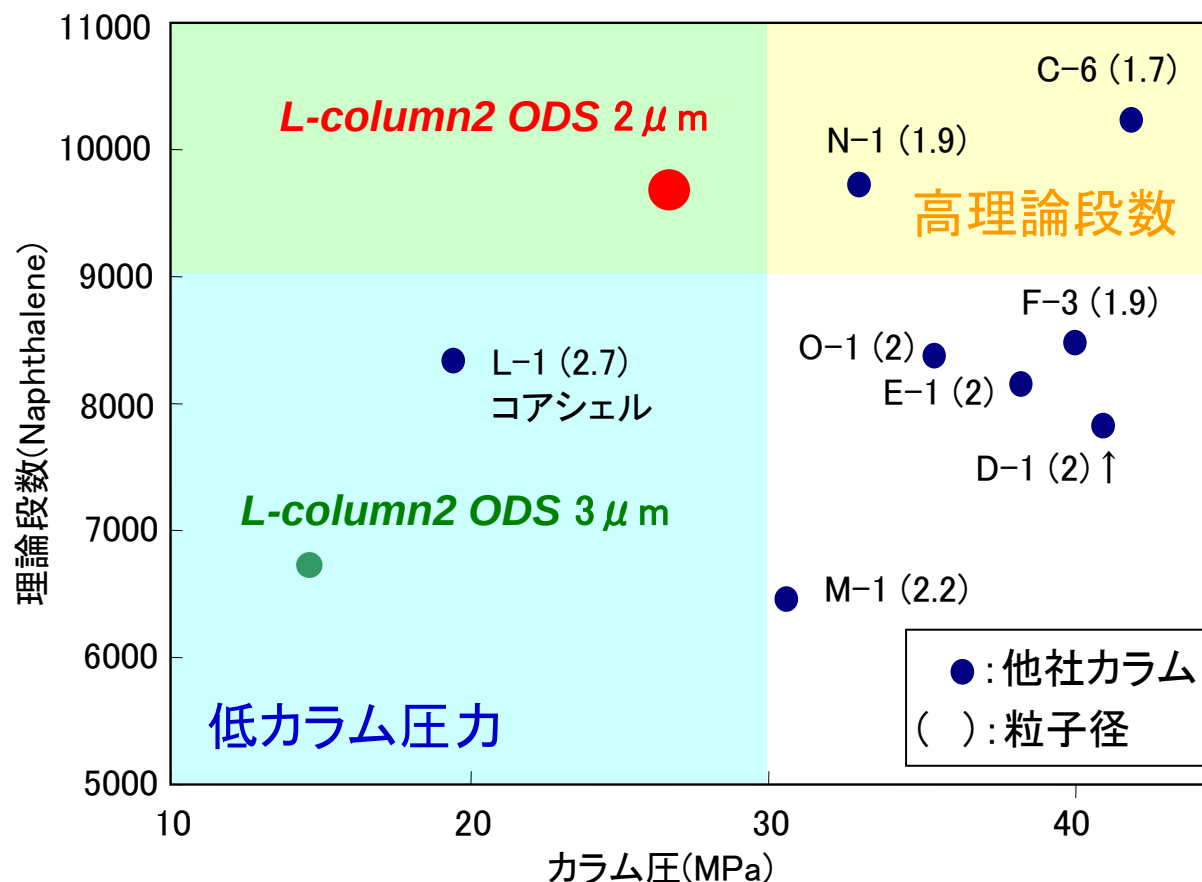
System: LC-10ADvp series (Shimadzu co.)



3. Levofloxacin

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

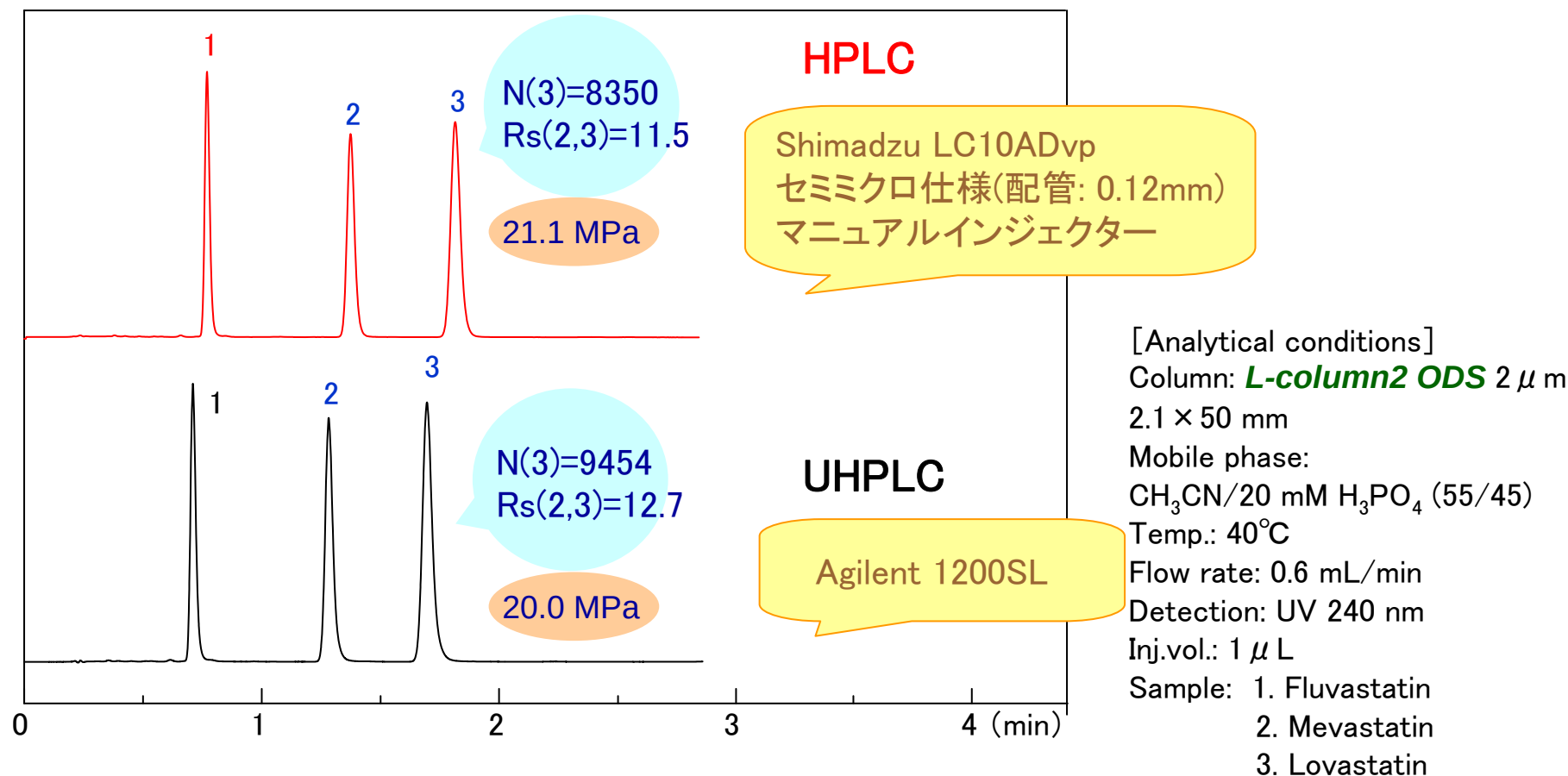
# カラム圧と理論段数



[Analytical conditions]  
Column: 2.0  $\times$  50 mm  
2.1  $\times$  50 mm (C18)  
Mobile phase:  
CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50/50)  
Temp.: 40°C  
Flow rate: 0.6 mL/min  
Detection: UV 254 nm  
Inj.vol.: 1  $\mu$ L  
Sample: Naphthalene  
System: Agilent 1200SL

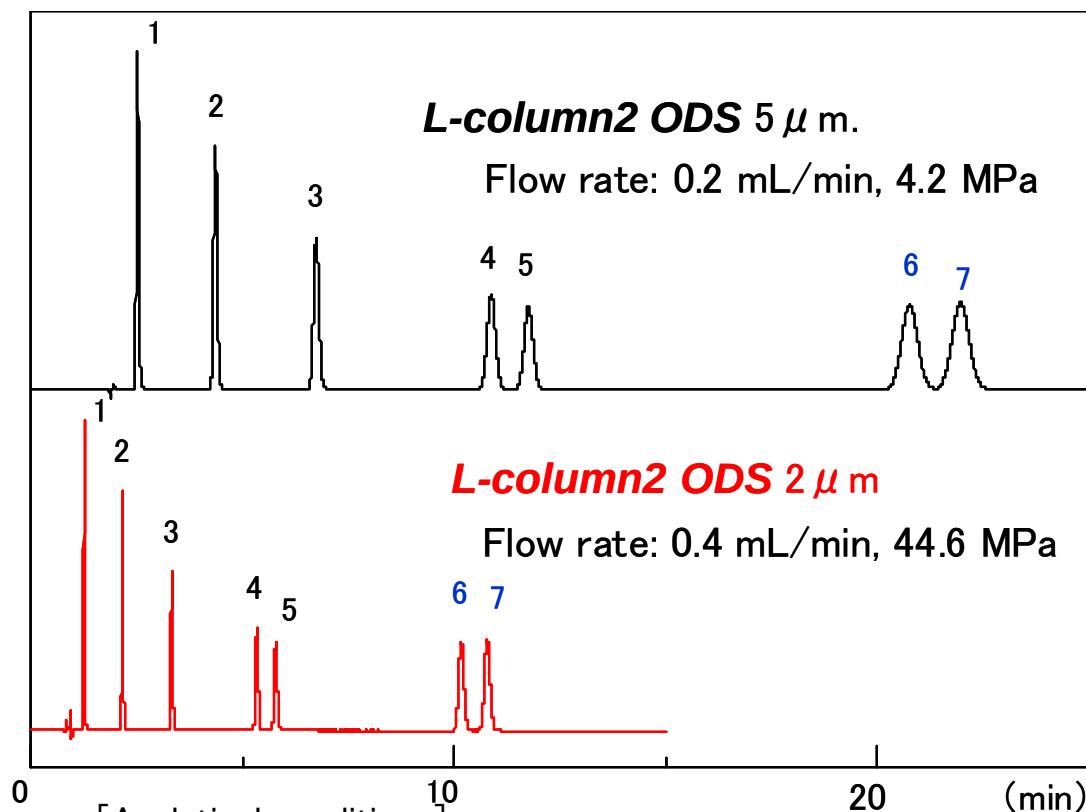
UHPLC用カラムである **L-column2 ODS 2  $\mu$ m** は、他社カラムと比べ、低カラム圧かつ高理論段数

# HPLC、UHPLCシステムによる分析比較



***L-column2 ODS*, 2  $\mu$  mは、汎用システムで分析可能  
(UHPLCと同等の分離)**

## 高理論段数



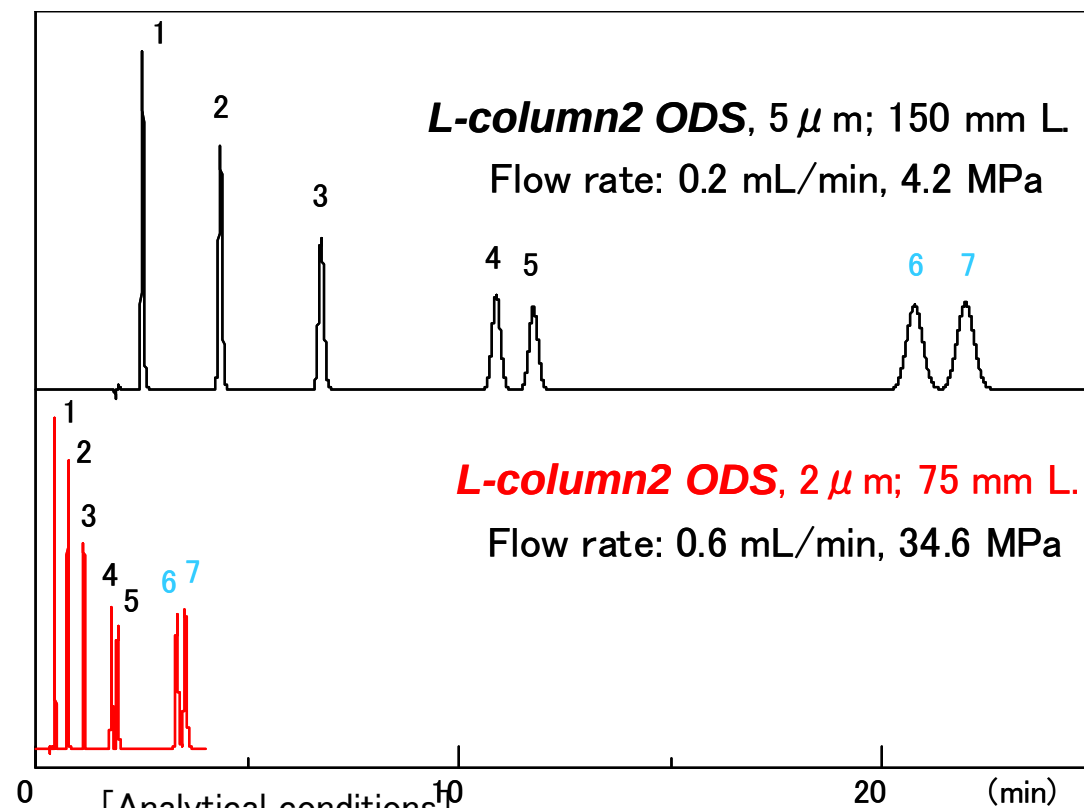
| 粒子径       | N(7)                  | Rs (6,7)             |
|-----------|-----------------------|----------------------|
| 5 $\mu$ m | 12813<br>$\wedge$     | 1.60<br>$\wedge$     |
| 2 $\mu$ m | 30638<br>$\times 2.4$ | 2.56<br>$\times 1.6$ |

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 CH<sub>3</sub>CN

**L-column2 ODS 2  $\mu$  mは、高理論段数⇒分離度が改善**

# 高速分析



Column: **L-column2 ODS** 2.1 mm I.D.; Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (35/65);  
Temp.: 40°C; Inj.vol.: 0.5  $\mu$  L; System: Agilent 1200SL

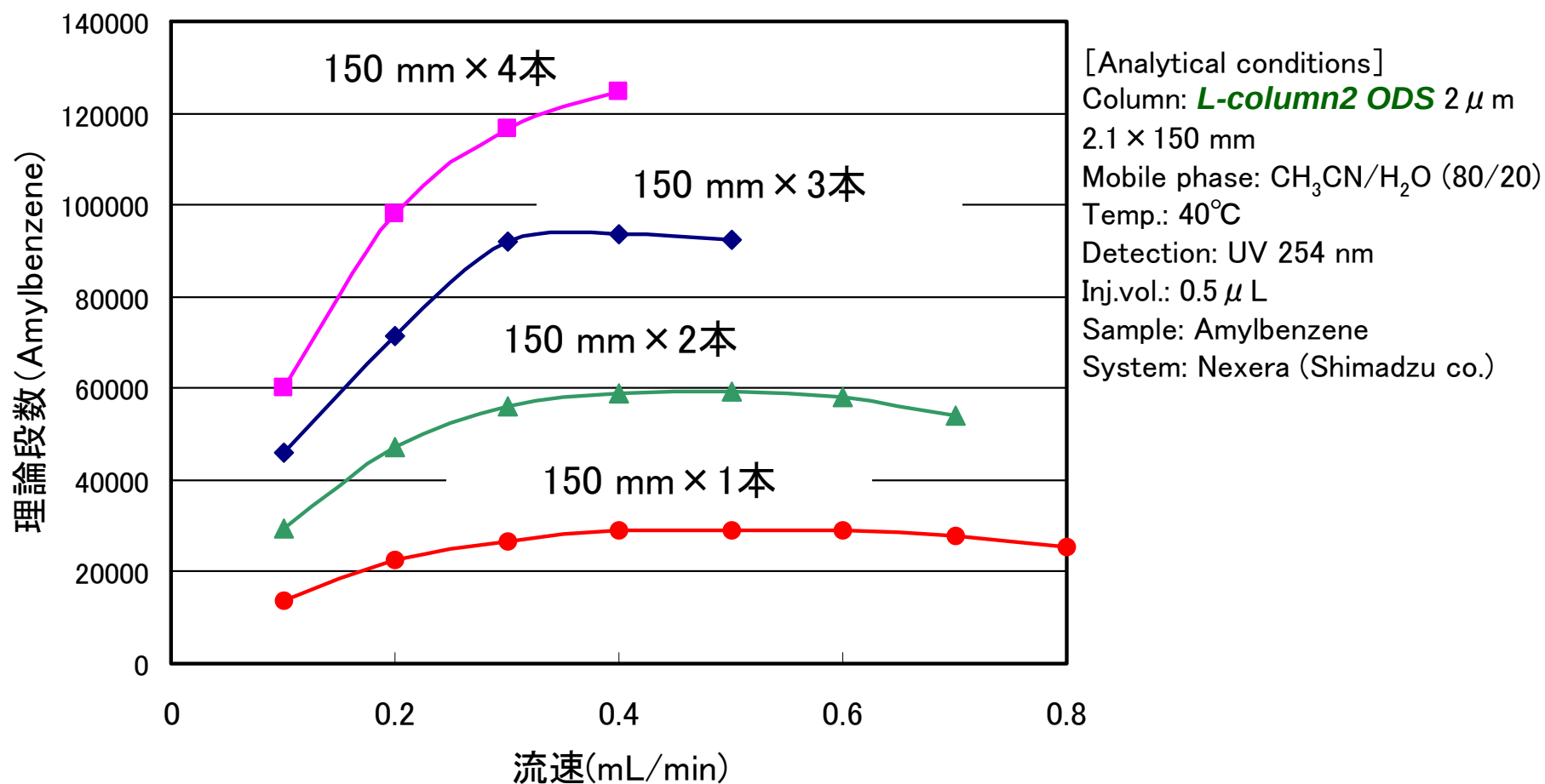
| 粒子径       | $t_R(7)$     | N(7)  | $R_s(6,7)$ |
|-----------|--------------|-------|------------|
| 5 $\mu$ m | 23.0         | 12813 | 1.60       |
|           | $\nabla$     |       |            |
| 2 $\mu$ m | 3.7          | 13866 | 1.69       |
|           | $\times 1/6$ | 同等    | 同等         |

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<sub>3</sub>CN

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

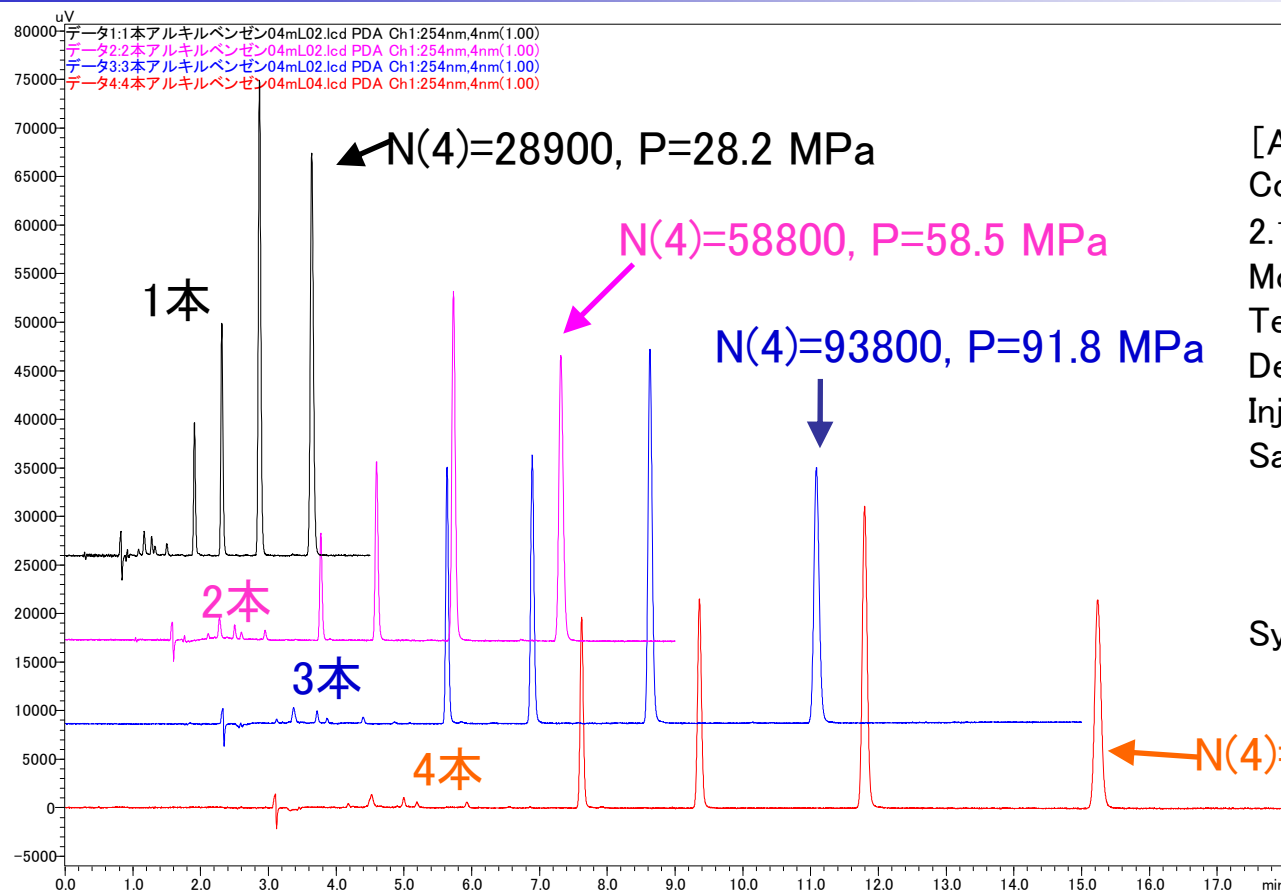
# カラムの連結



低圧なのでカラムを連結可能⇒理論段数の向上



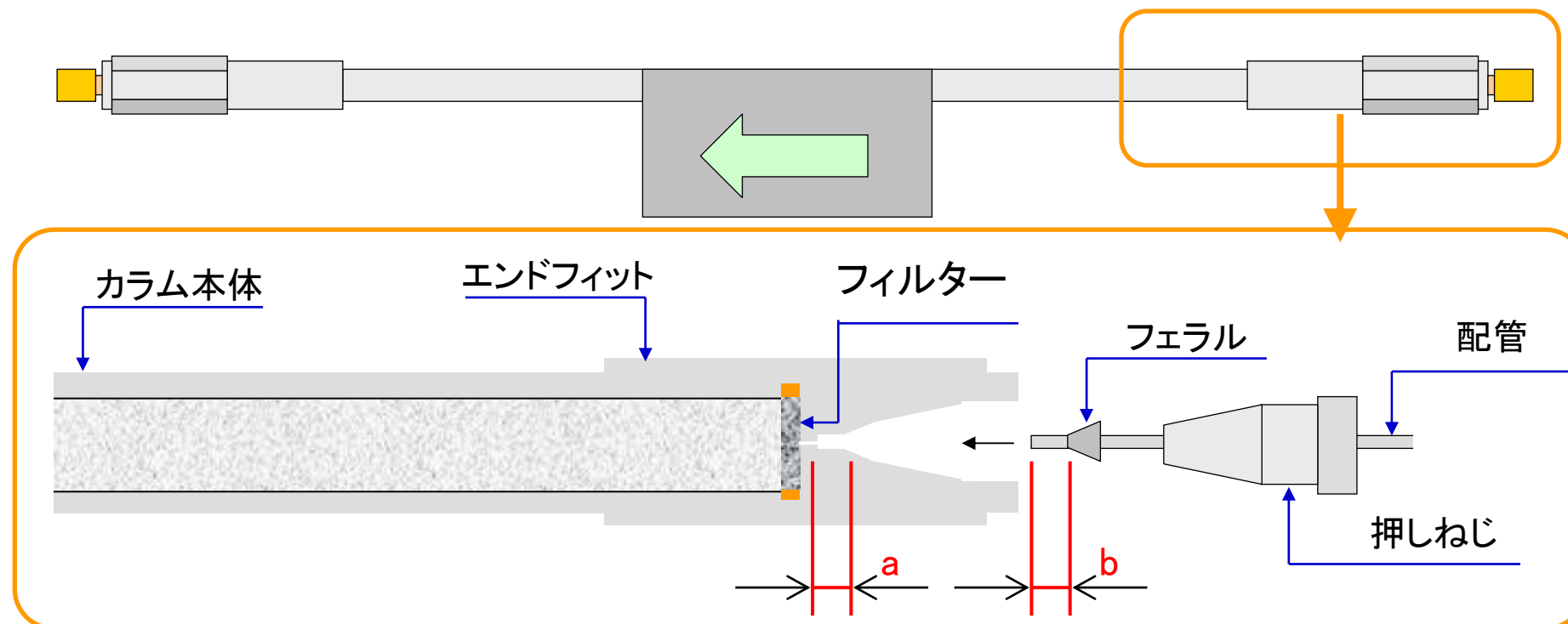
# カラムの連結



[Analytical conditions]  
Column: **L-column2 ODS** 2  $\mu$  m  
2.1  $\times$  150 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (80/20)  
Temp.: 40°C  
Detection: UV 254 nm  
Inj.vol.: 0.5  $\mu$  L  
Sample: 1. Ethylbenzene  
2. Propylbenzene  
3. Butylbenzene  
4. Amylbenzene  
System: Nexera (Shimadzu co.)

カラムを連結することでGC以上の理論段数を実現できる

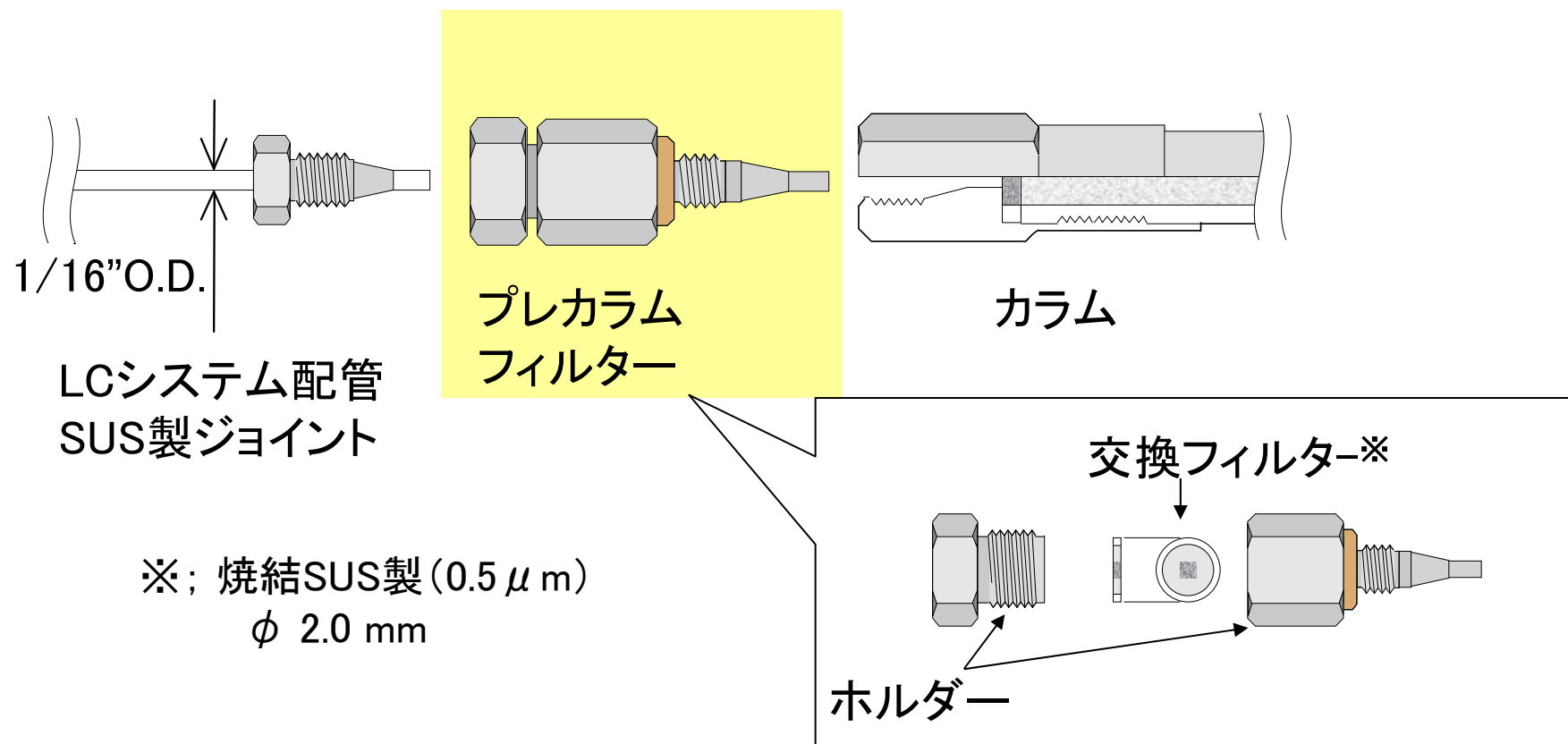
# UHPLC用カラムの接続



配管の先端の長さが違うと  
( $a \neq b$ )  
理論段数が低下する  
液漏れする

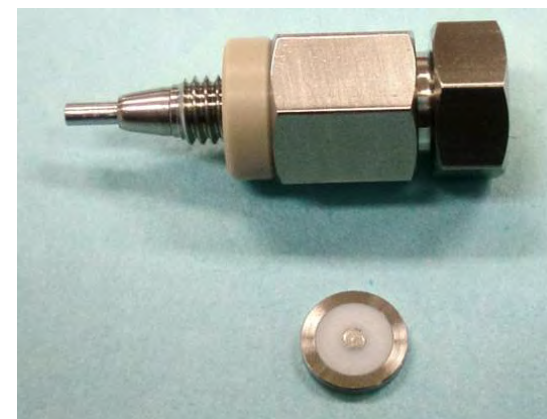
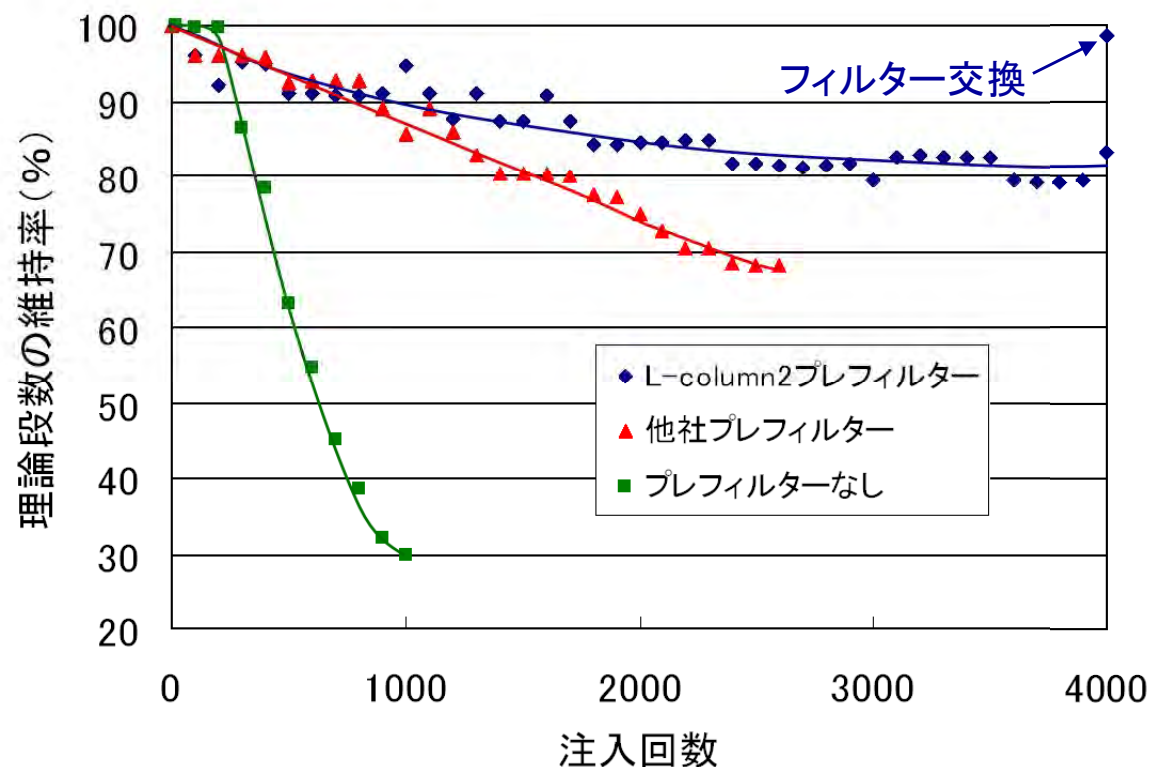
| 接続の種類                 | a, bの長さ |
|-----------------------|---------|
| ウォーターズ接続:             | 約3.5 mm |
| 島津接続:                 | 約2.3 mm |
| UPLC®接続:<br>(押しねじが長い) | 約2.3 mm |

# プレカラムフィルターの構造



接続タイプの変換⇒ UPLC接続からウォーターズ接続へ  
デッドボリュームが小さい ⇒ 分離に影響なし

# プレカラムフィルターの必要性



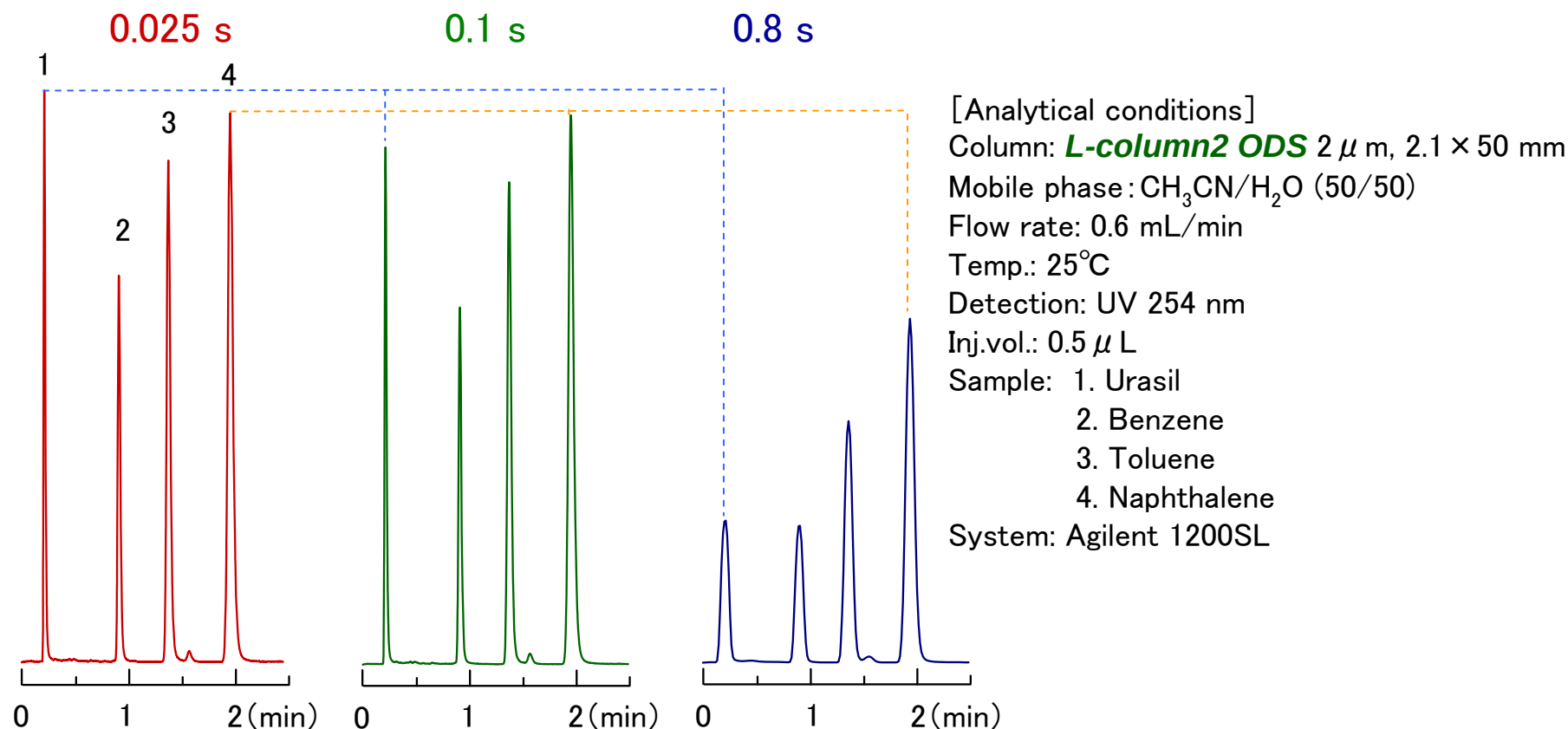
[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 2  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm; Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60/40);

Flow rate: 0.4 mL/min; Temp.: 40°C; Inj.vol.: 0.5  $\mu$ L; Sample: Naphthalene

プレカラムフィルターの装着によりカラム寿命が向上  
フィルターのみ交換可能  $\Rightarrow$  低コストで経済的

# データポイント周期の設定について



データポイント周期が短いほどピークがシャープになる  
(保持時間の短い試料ほど顕著)

## UHPLC用カラムのノウハウ

- ・ データポイント周期は流量、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

# HPLCに使用される移動相

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、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、カラム圧が高い

## 水系

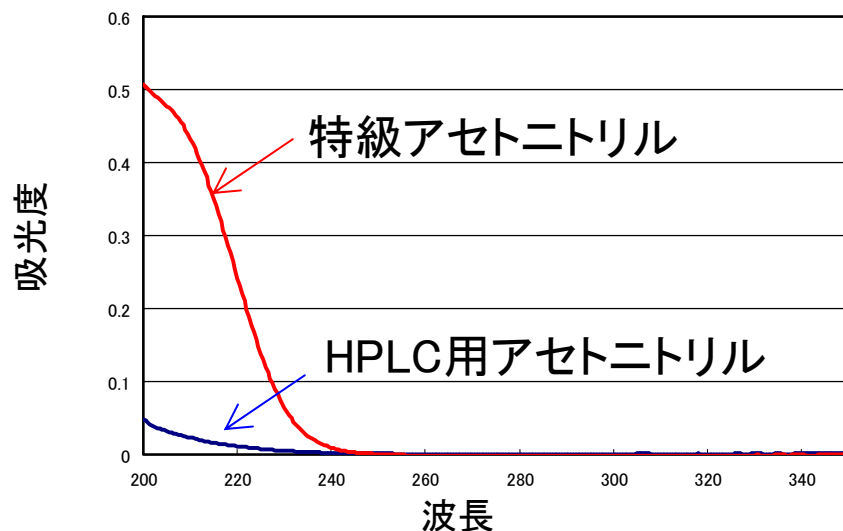
**水**: 解離性化合物には不向き

**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

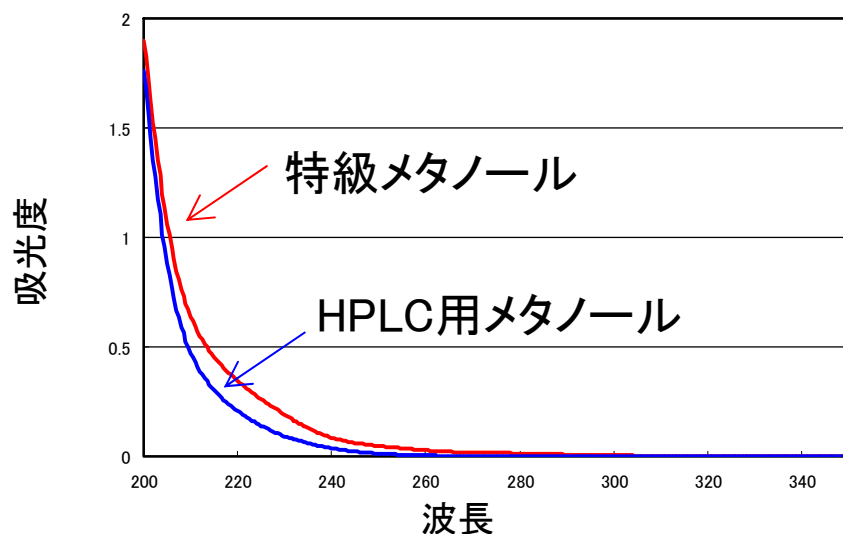
**酢酸**: UV吸収がある

# 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 (250 nm以下)での吸光度が低い

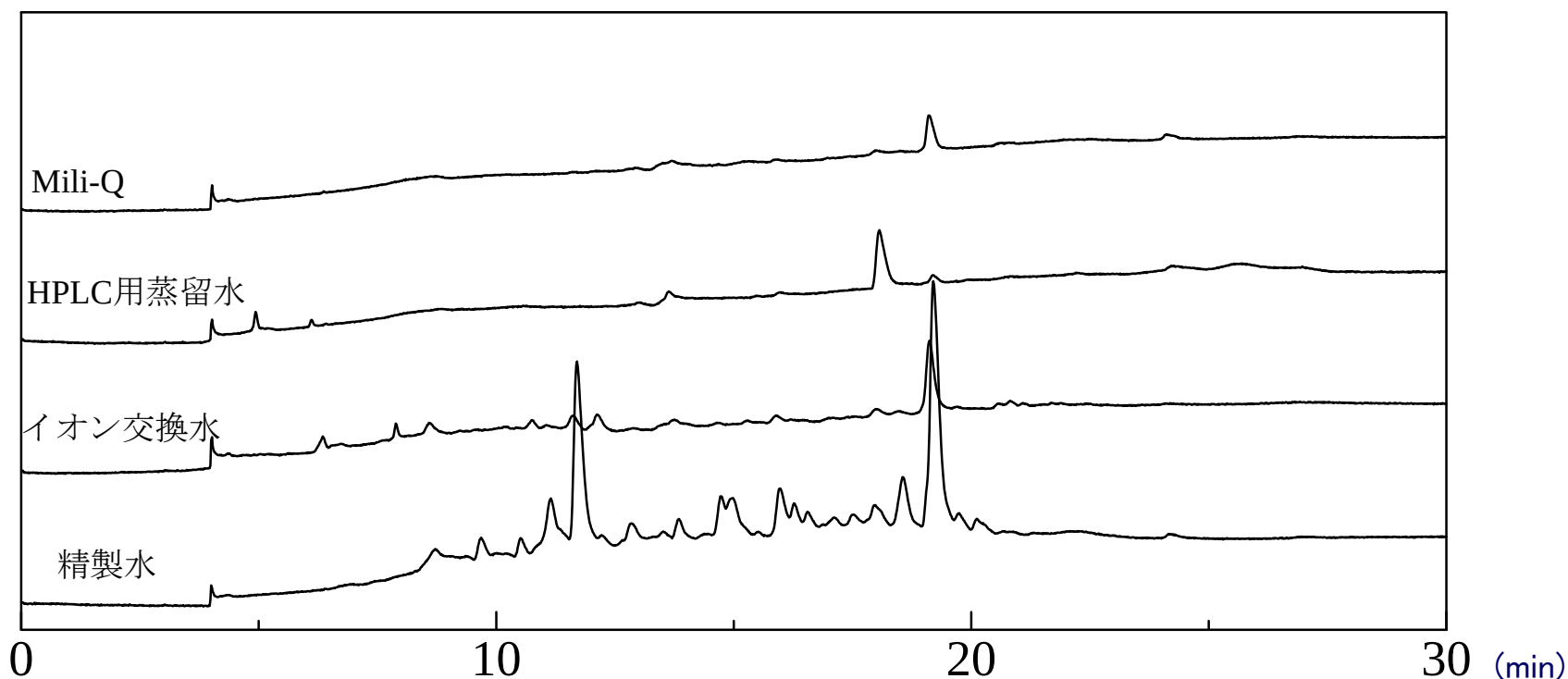


## HPLC用メタノール

- 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



[Analytical conditions]

Column: **L-column ODS** 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm; Detection: 210 nm;

Mobile phase: A) HPLC用アセトニトリル, B) 水; A/B, 10/90  $\rightarrow$  100/0 (0  $\rightarrow$  30 min); Flow rate: 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

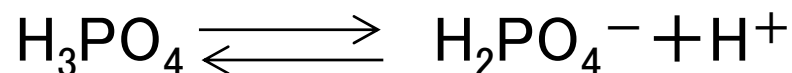
## 緩衝液とは

解離性化合物の分析には移動相に緩衝液を使用する

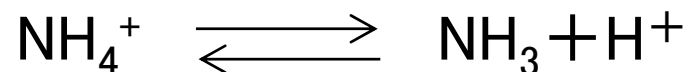
緩衝液とは

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もつ溶液を緩衝液 (buffer solution) という

例: リン酸緩衝液 (pH=1.83付近のとき)



例: アンモニア緩衝液 (pH=9.36付近のとき)



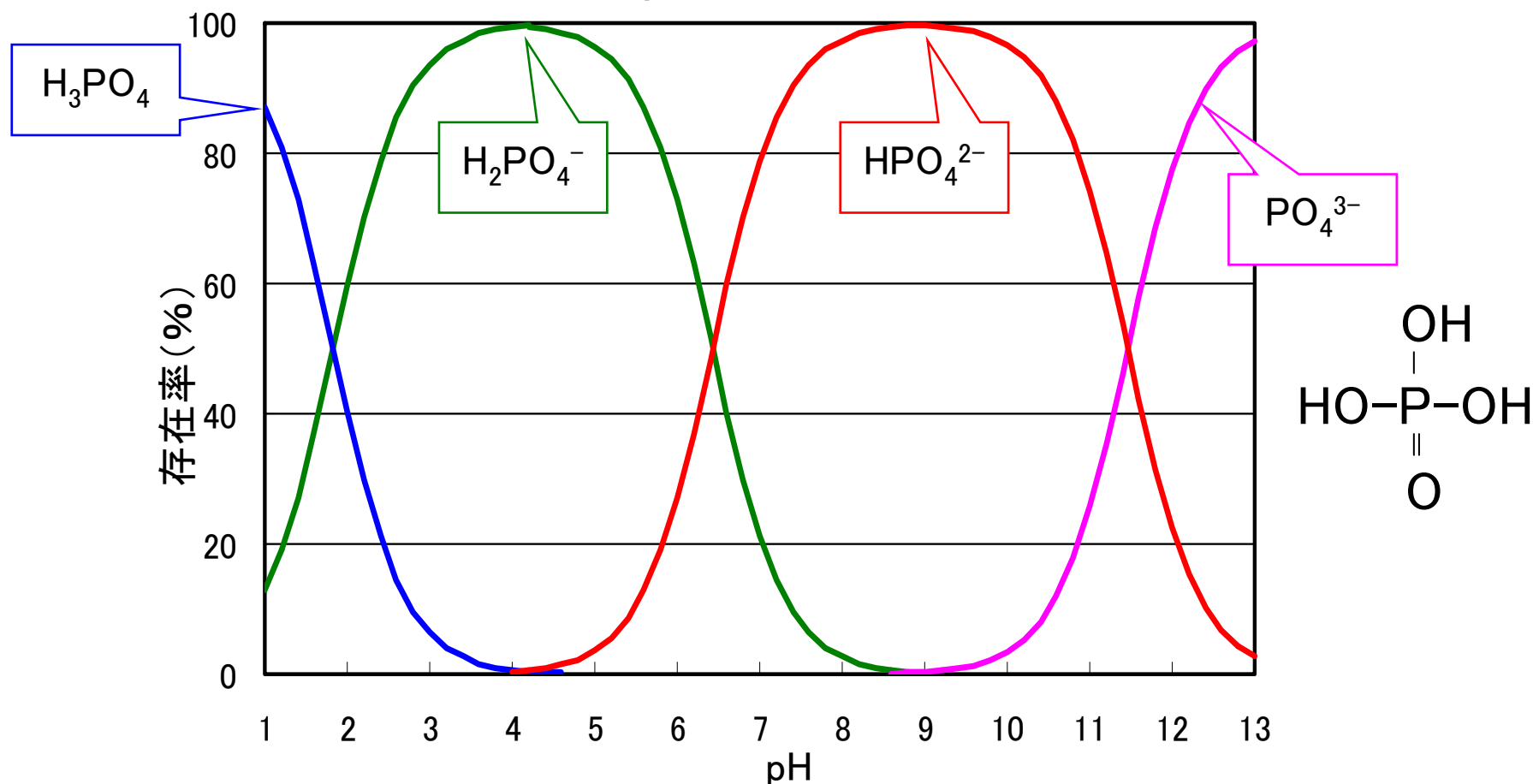
緩衝作用が働く条件

⇒ 弱酸と共役塩基が共存 (1:1のときが最大)

⇒ pHが 弱酸のpKa±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

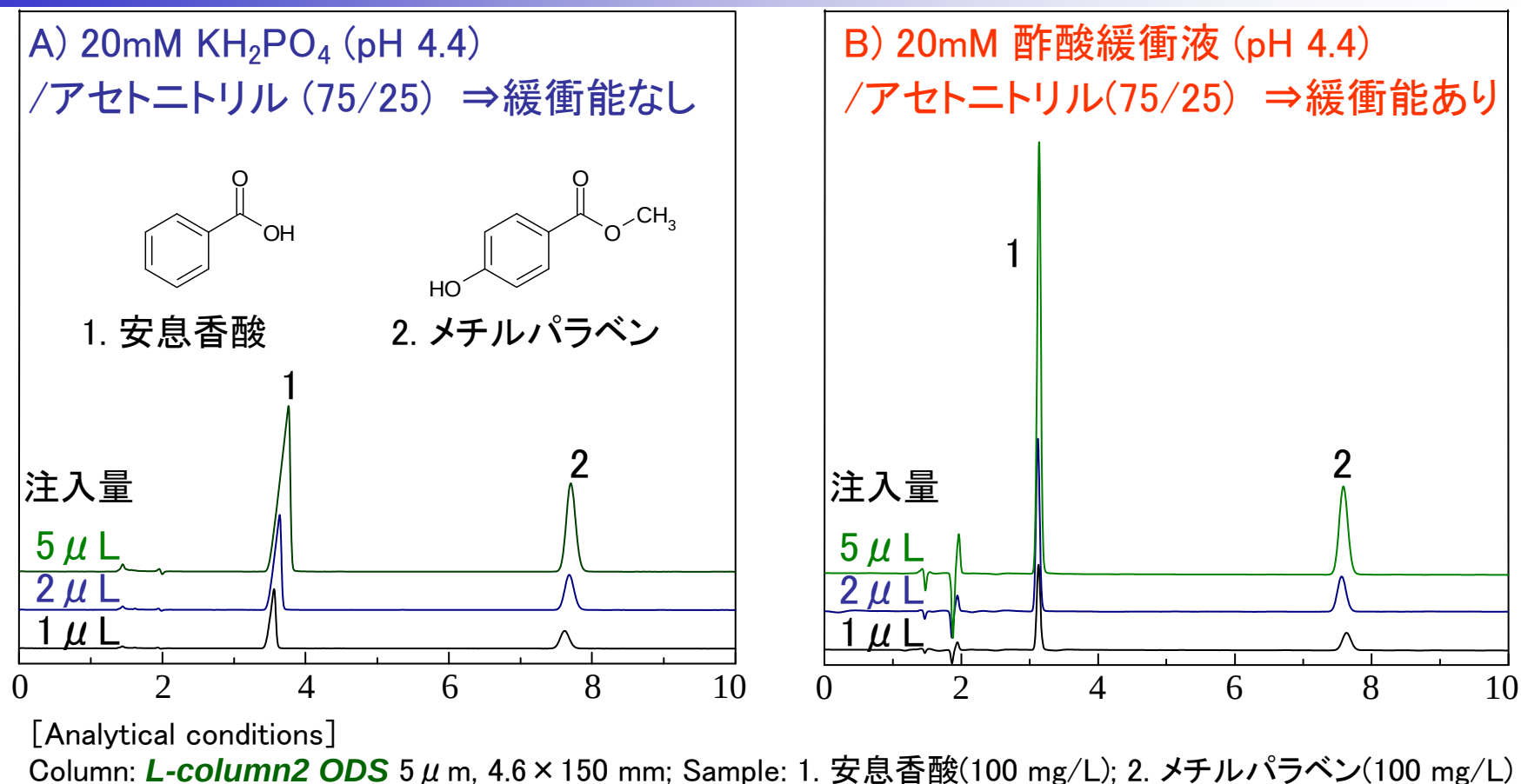
間違った緩衝液の例

リン酸緩衝液pH 4

リン酸二水素カリウム溶液

酢酸アンモニウム

# 緩衝能の有無の比較（注入量の影響）



- ・ピークがひずむ
- ・注入量が多くなるにつれ解離性化合物は保持時間が変化する

## 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> (pH 4.4) |                  |       | B) 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.4) |                  |       |
|-------|---------------------------------------------------|------------------|-------|-------------------------|------------------|-------|
|       | 安息香酸の<br>保持時間                                     | メチルパラベンの<br>保持時間 | 分離度   | 安息香酸の<br>保持時間           | メチルパラベンの<br>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** 5  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm;

Mobile phase: 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)

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

緩衝能のない移動相では、解離性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で使用する代表的緩衝液

| 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> )<br>9.36 (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )<br>6.11 (CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) | 8.9~10.9<br>8.4~10.4<br>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<br>6.43<br>11.46                                                                                     | 1~2.8<br>5.4~7.4                | 5~50 mM   |
| クエン酸      |    | 2.90<br>4.35<br>5.69                                                                                      | 1.9~3.9<br>3.4~5.4<br>4.7~6.7   |           |
| ホウ酸       |    | 9.24                                                                                                      | 8.2~10.2                        |           |

## 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pH 4.76 (=pKa)

酢酸0.3 g (5 mmol)と酢酸ナトリウム0.41 g (5 mmol)を  
1 L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pH 7.0

リン酸二水素カリウム1.36 g (10 mmol)

リン酸水素二ナトリウム2.12 g (15 mmol)を

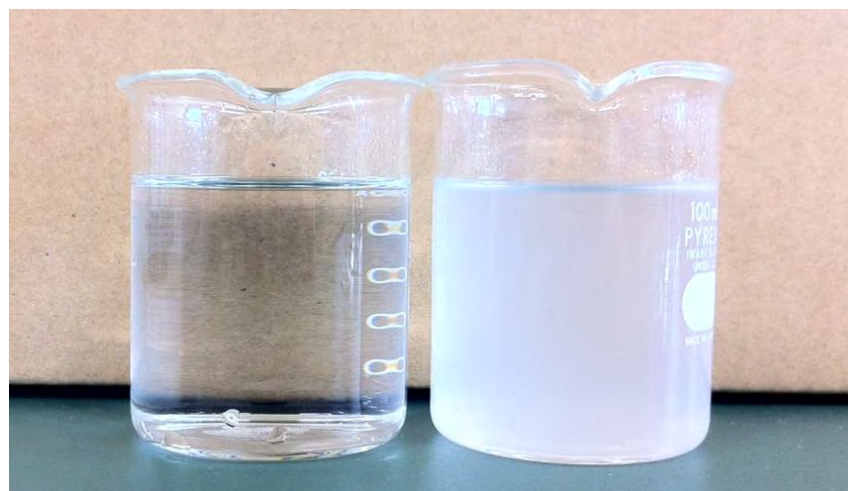
1 Lの水に溶かす



## 塩の析出

- 緩衝液(塩)を使用すると有機溶媒比率が高いと塩が析出する  
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送液するとカラム圧力が20%上昇した

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

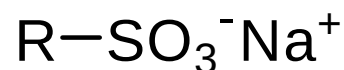


アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液pH 7  
左(75/25)、右(80/20)

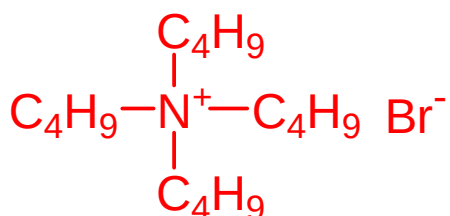
## 緩衝液のノウハウ

- ・ 用いるpHで緩衝能がある緩衝液を使う(pH 4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
- ・ カラムの平衡化に時間を要する
- ・ 緩衝液を用い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

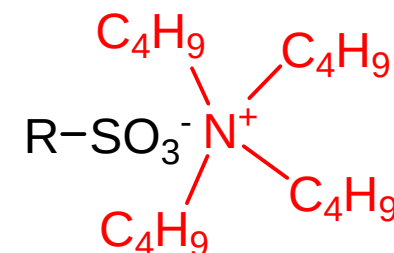
## イオン対クロマトグラフィー



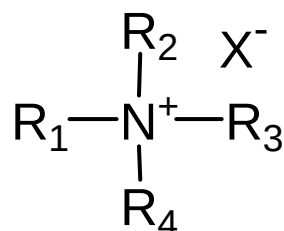
スルホン酸等はpHを酸性にしても、解離を抑えることができない



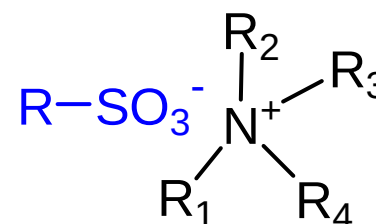
テトラブチルアンモニウム  
(TBA)ブロマイド



イオン対形成  
電荷を打ち消しあって疎水性が増加する



$\text{R-SO}_3^-\text{Na}^+$   
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

データ1: ベルベリン酸ヘキサゲル50ug1uL0.03.1cd PDA Ch1:230nm,4r  
データ2: ベルベリン酸ヘキサゲル50ug1uL0.03.1cd PDA Ch1:230nm,4r  
データ3: ベルベリン酸ヘキサゲル50ug1uL0.03.1cd PDA Ch1:230nm,4r

## [Analytical conditions]

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

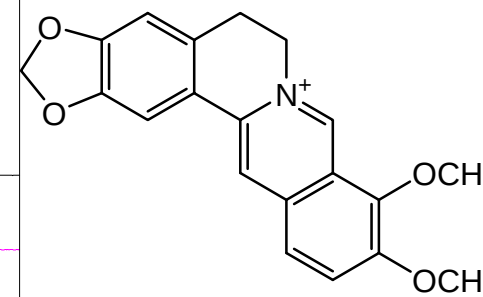
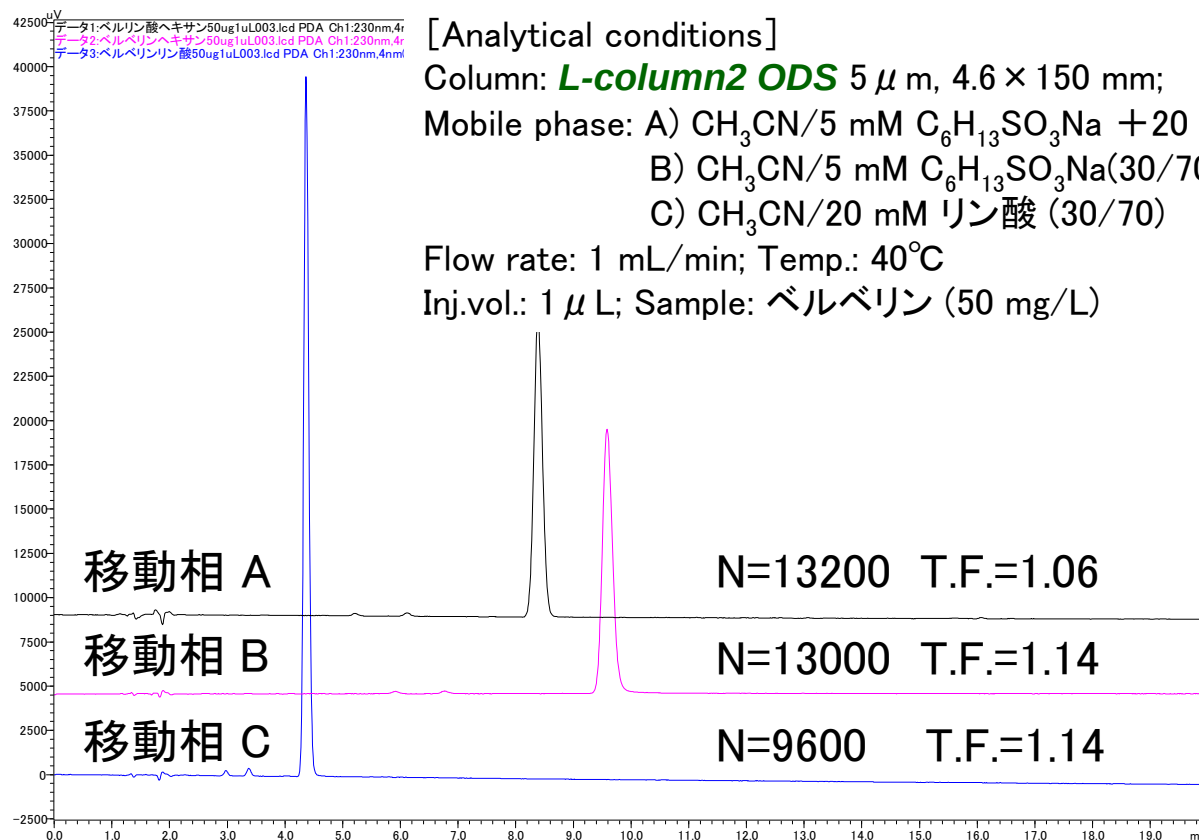
Mobile phase: A) CH<sub>3</sub>CN/5 mM C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>SO<sub>3</sub>Na + 20 mM リン酸 (30/70)

B) CH<sub>3</sub>CN/5 mM C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>SO<sub>3</sub>Na (30/70)

C) CH<sub>3</sub>CN/20 mM リン酸 (30/70)

Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C

Inj.vol.: 1  $\mu$  L; Sample: ベルベリン (50 mg/L)



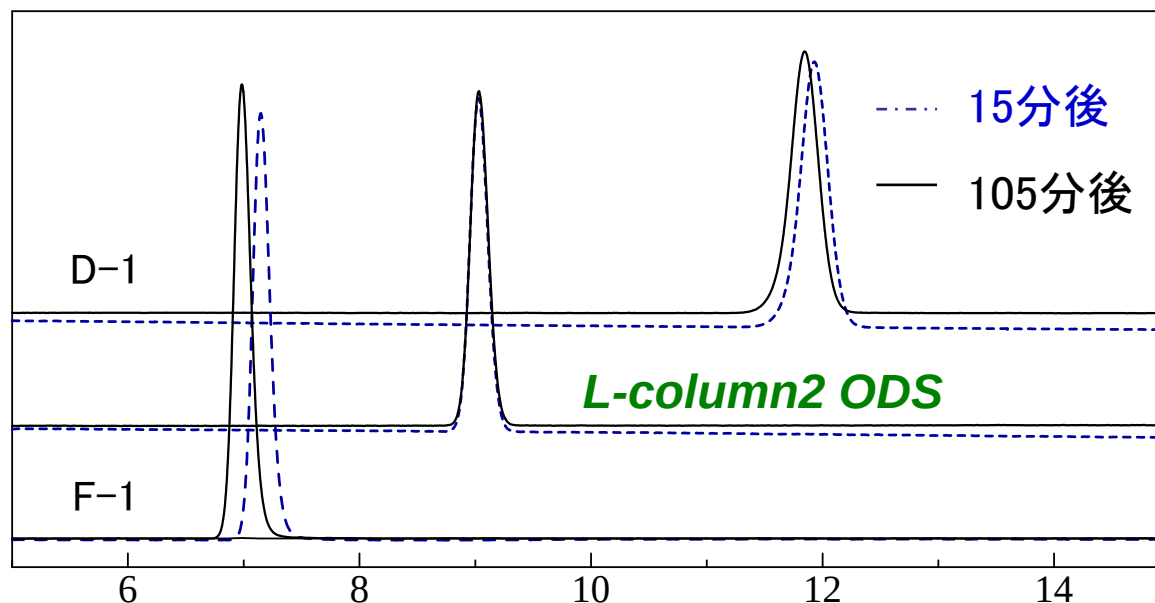
四級アミンはイオン対試薬を添加するとピーク形状が向上する

# イオン対試薬

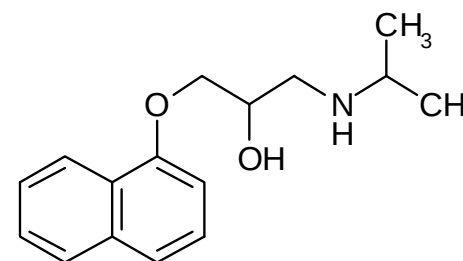
| 添加剤                           | MS | 分子式                         | 備考                                   |
|-------------------------------|----|-----------------------------|--------------------------------------|
| アルキルスルホン酸ナトリウム                | ×  | $C_nH_{2n+1}SO_3Na$         | $3 \leq n \leq 13$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



|                      | 15分後  | 105分後 |
|----------------------|-------|-------|
| D-1                  | 11.93 | 11.85 |
| <b>L-column2 ODS</b> | 9.03  | 9.03  |
| F-1                  | 7.10  | 6.98  |



[Analytical conditions]

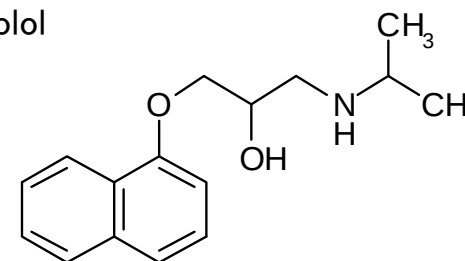
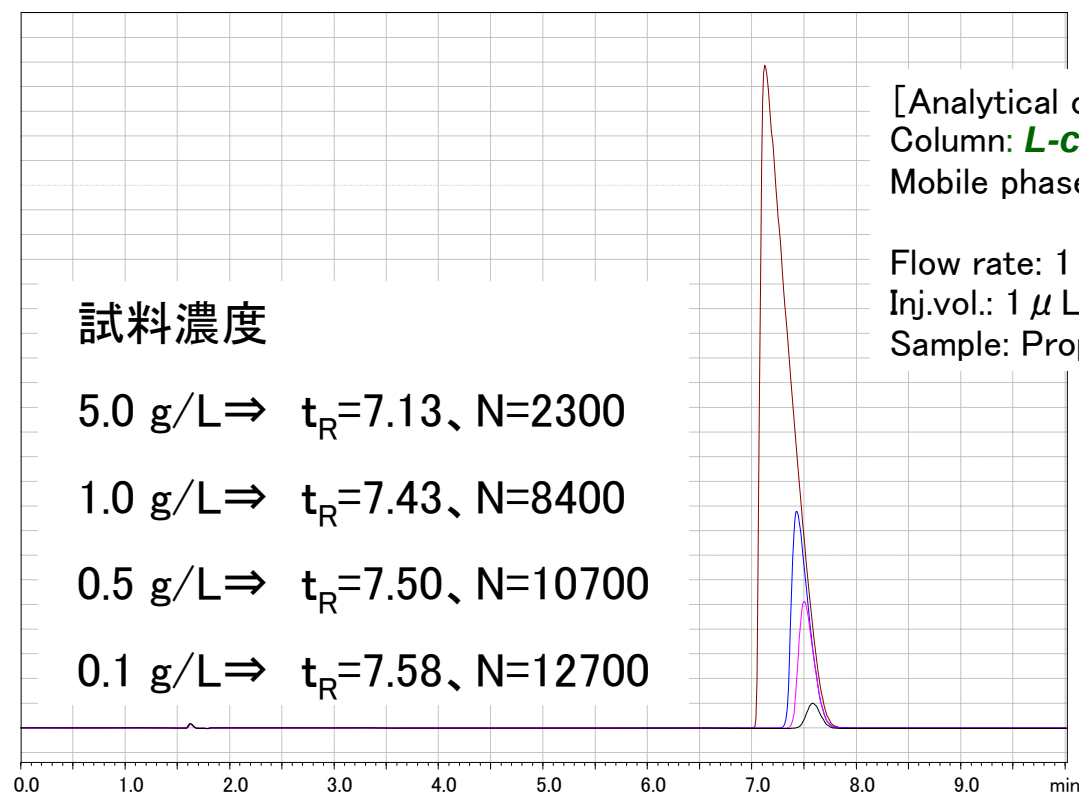
Column: 5  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm (C18); Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 10 mM C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>SO<sub>3</sub>Na (30/70);

Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Inj.vol.: 1  $\mu$  L; Sample: Propranolol (0.1 g/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

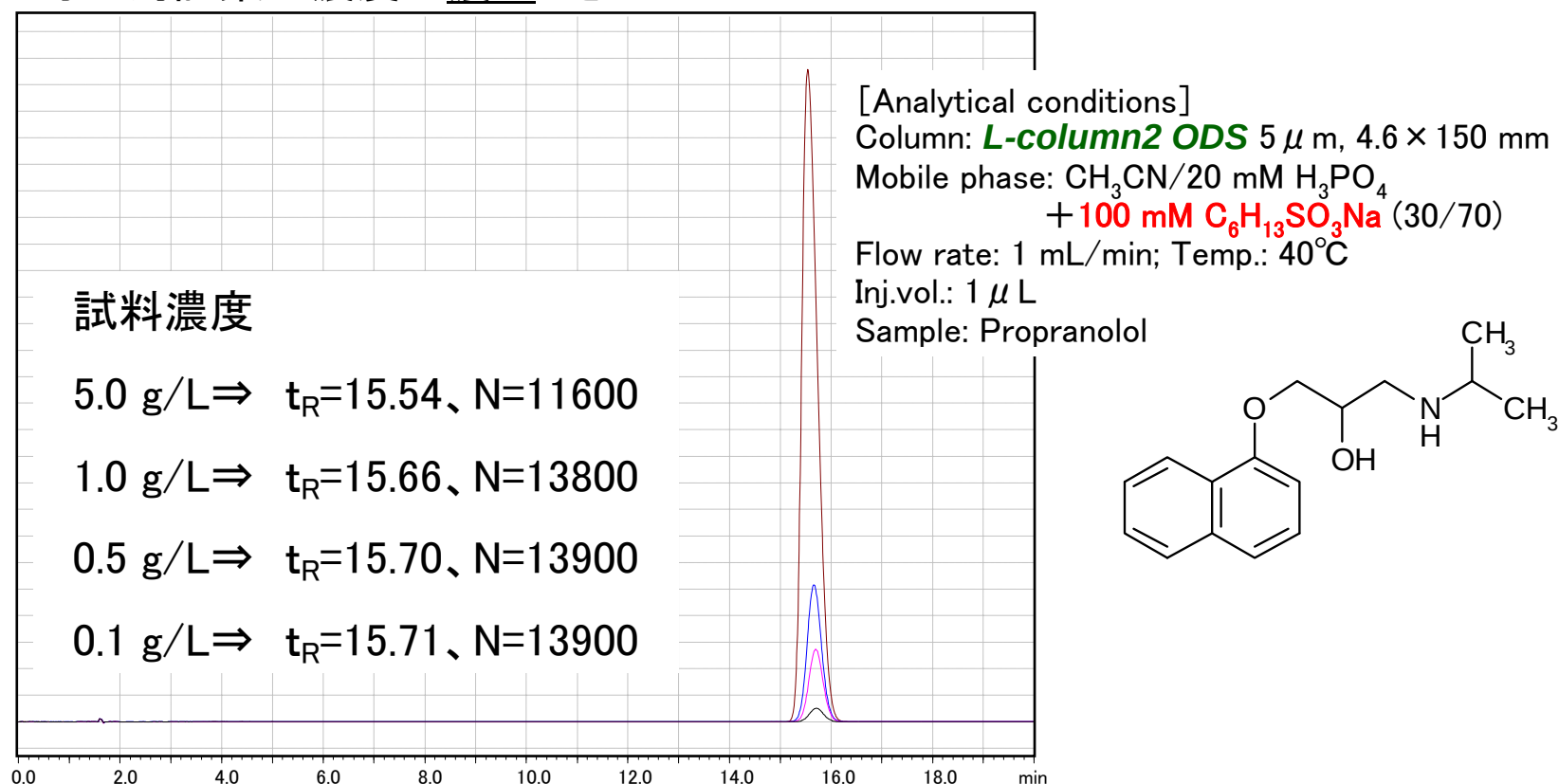
イオン対試薬の濃度が薄いとき



イオン対試薬の濃度が薄いとき、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

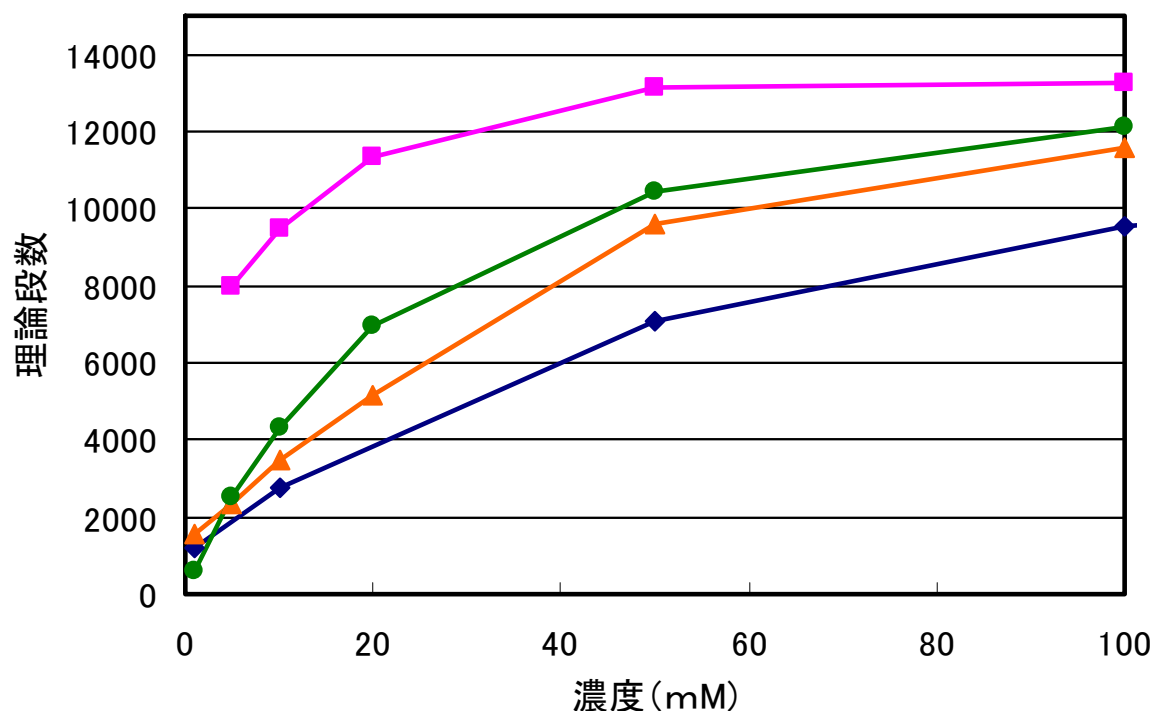


イオン対試薬の濃度が濃いとき、試料濃度の影響が小さい



# イオン対試薬の濃度と理論段数

試料濃度が濃いとき



③  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM } \text{H}_3\text{PO}_4$   
+  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$  (45/55)

④  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TBA-P}$  (50/50)

①  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM } \text{H}_3\text{PO}_4$   
+  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{SO}_3\text{Na}$  (30/70)

②  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM } \text{H}_3\text{PO}_4$   
+  $\text{NaClO}_4$  (30/70)

[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS**  $5 \mu\text{m}$

$4.6 \times 150 \text{ mm}$ ;

Flow rate:  $1 \text{ mL/min}$

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

Inj.vol.:  $1 \mu\text{L}$

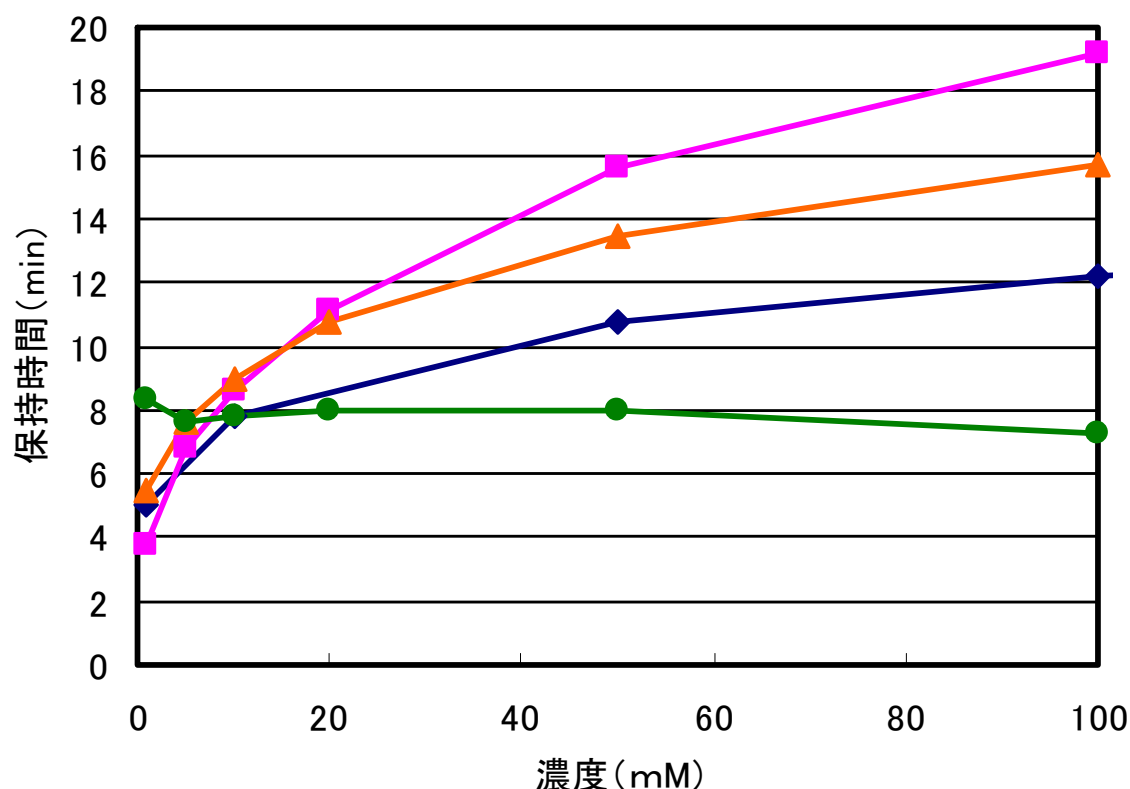
Sample: ①②③Propranolol ( $5 \text{ g/L}$ )

④Acid Orange5 ( $5 \text{ g/L}$ )

イオン対試薬の濃度を濃くすると、理論段数が高くなる

# イオン対試薬の濃度と保持時間

試料濃度が濃いとき



③  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM } \text{H}_3\text{PO}_4$   
+  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$  (45/55)

①  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM } \text{H}_3\text{PO}_4$   
+  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{SO}_3\text{Na}$  (30/70)

②  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM } \text{H}_3\text{PO}_4$   
+  $\text{NaClO}_4$  (30/70)

④  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TBA-P}$  (50/50)

[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS**  $5 \mu\text{m}$

$4.6 \times 150 \text{ mm}$ ;

Flow rate:  $1 \text{ mL/min}$

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

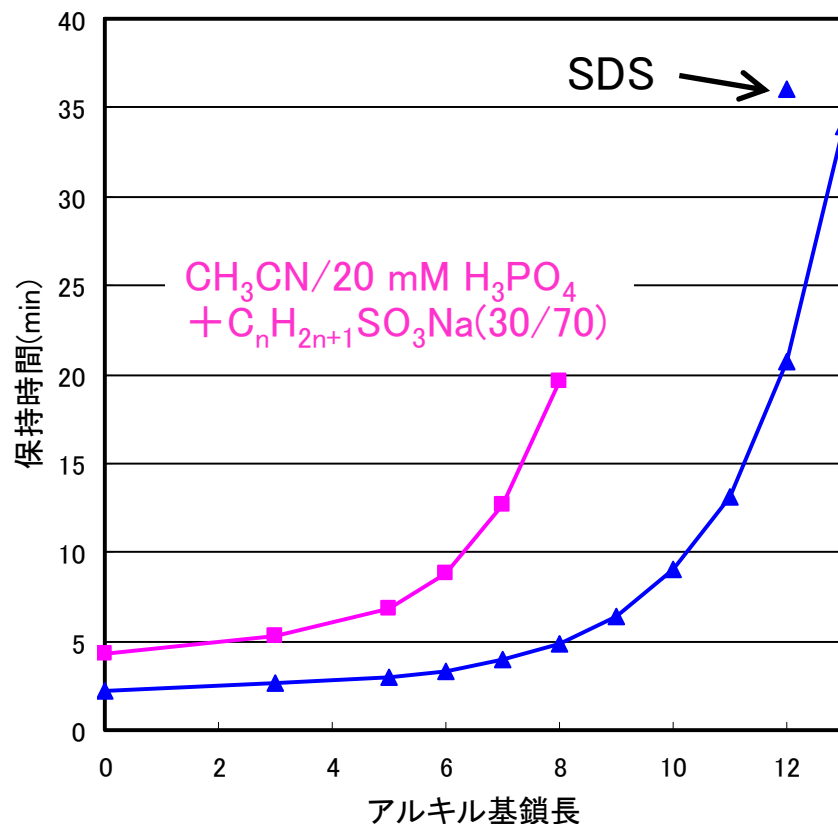
Inj.vol.:  $1 \mu\text{L}$

Sample: ①②③Propranolol ( $5 \text{ g/L}$ )

④Acid Orange5 ( $5 \text{ g/L}$ )

- ・塩基性物質用イオン対試薬の濃度を濃くすると、保持が増加する
- ・TBAは保持の変化が小さい

# イオン対試薬のアルキル基の長さの効果



CH<sub>3</sub>CN/20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
+ C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>SO<sub>3</sub>Na(40/60)

[Analytical conditions]

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

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のノウハウ

- ・ 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
- ・ 塩基性物質用イオン対試薬の濃度によって保持時間が異なる
- ・ TBAは保持の変化が小さい
- ・ 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）
- ・ 過塩素酸ナトリウム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

# 酸性物質のための移動相

## 酸性移動相

試料を非解離状態で分析する

メリット: 保持、負荷量の増加

デメリット: なし

## 中～アルカリ性移動相

試料を解離状態で分析する

メリット: なし

デメリット: カラムの劣化、保持、負荷量の減少

## イオン対クロマトグラフィー

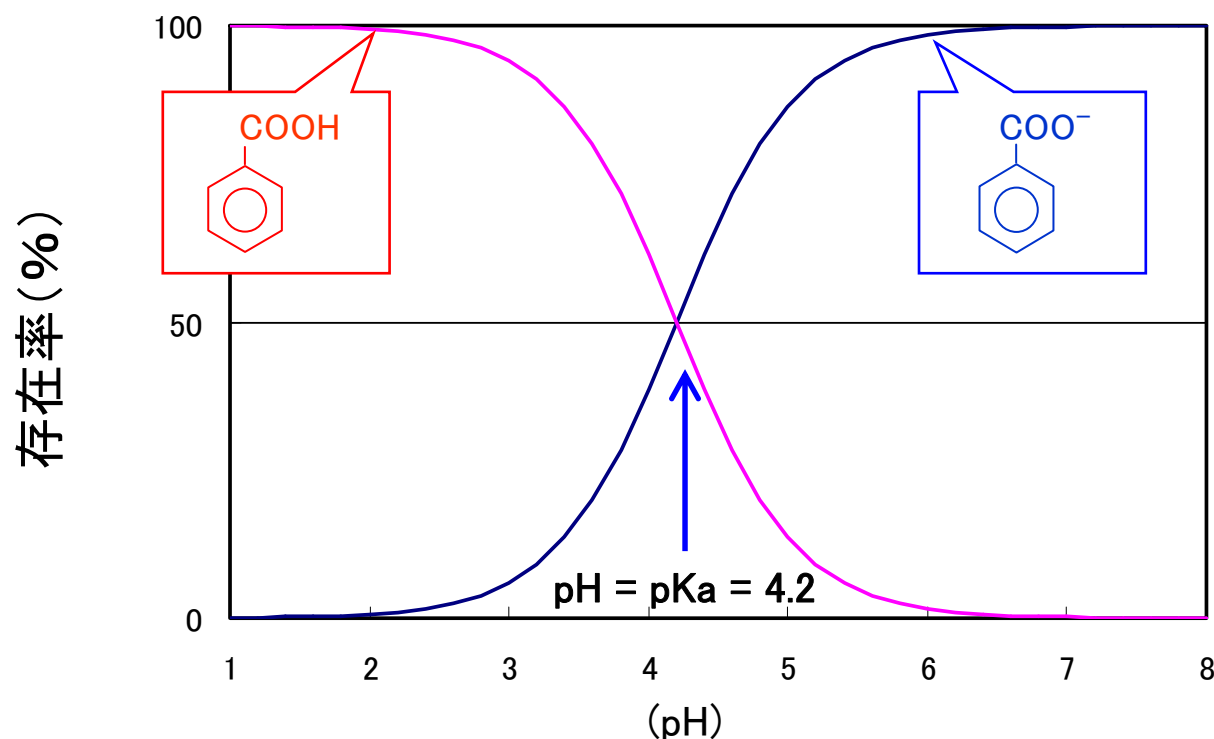
解離している化合物に、イオン対試薬を添加し、イオン対を形成させて固定相に保持させる

メリット: 保持の増加、ピーク形状の向上

デメリット: カラムの専用化、調製が煩雑

## 移動相のpHと存在率

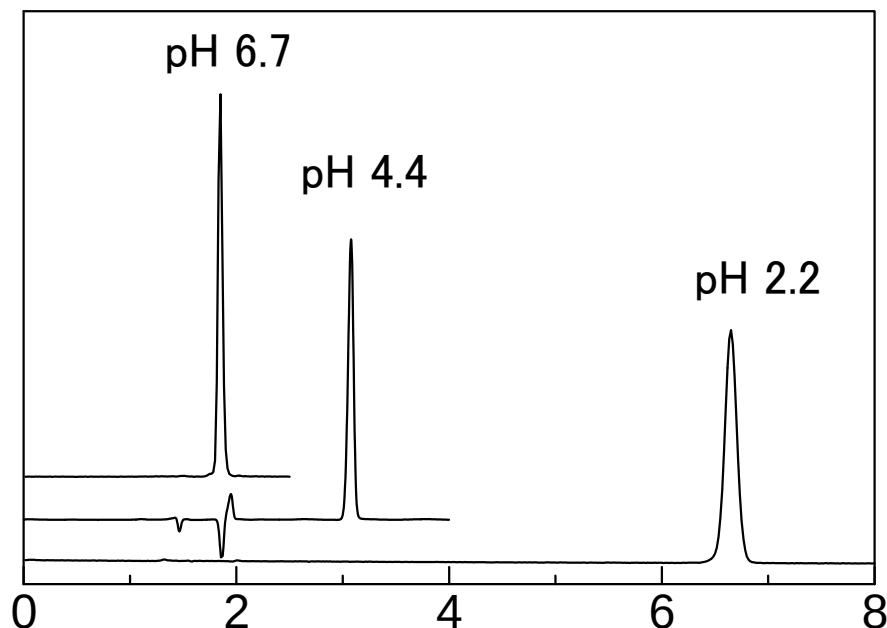
pHによる安息香酸の解離、非解離状態の存在率



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

## 移動相のpHと保持時間

解離平衡が非解離側に移動すれば保持時間は長くなる



[Analytical conditions]

Column: **L-column ODS** 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm; Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/25 mM リン酸緩衝液(25/75);

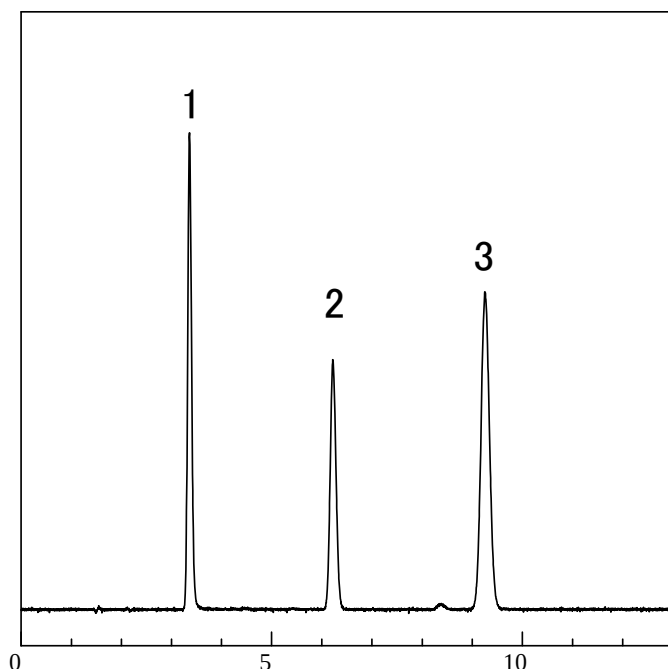
Flow rate: 1 mL/min; Sample: 安息香酸 ※pH 4.4のときは酢酸緩衝液を使用

緩衝液のpHと保持時間

| pH  | 保持時間(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

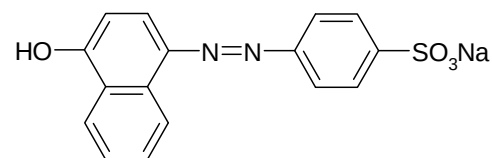
# イオン対クロマトグラフィー(酸性物質)



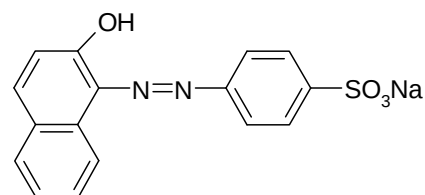
[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm; Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45/55) + 10 mM TBA-PO<sub>4</sub>

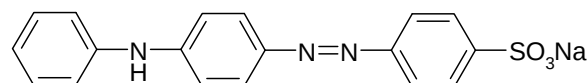
Flow rate: 1 mL/min; Detection: UV 430 nm; Inj.vol.: 1  $\mu$ L



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

イオン対試薬により理論段数と保持が向上する



## 酸性物質の分析法のノウハウ

- ・ 緩衝液を使用する
- ・ 酸性移動相を使用することにより、保持が増加する
- ・ 強酸性物質は解離を抑えることが出来ないのでイオン対試薬を使用する

# 塩基性物質のための移動相

## 酸性移動相

試料を解離状態で分析する

メリット: シラノールの影響を受けにくい

デメリット: 保持、負荷量の減少

## 中～アルカリ性移動相

試料を解離～非解離状態で分析する

メリット: 保持、負荷量の増加

デメリット: シラノールの影響を受けやすい、カラムの劣化

## イオン対クロマトグラフィー

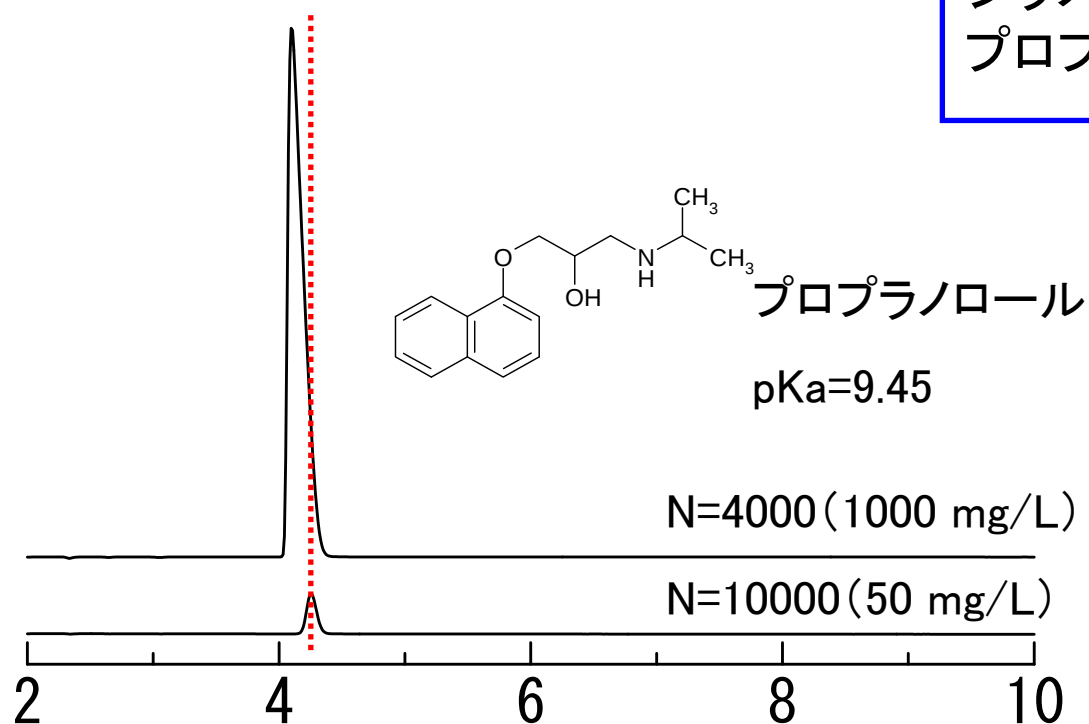
イオン対試薬を添加し、試料とイオン対を形成させて固定相に保持させる

メリット: 保持の増加、ピーク形状の向上

デメリット: カラムの専用化、調製が煩雑

## 酸性移動相での塩基性物質の分析

シラノール： 非解離  
プロプラノロール： 解離

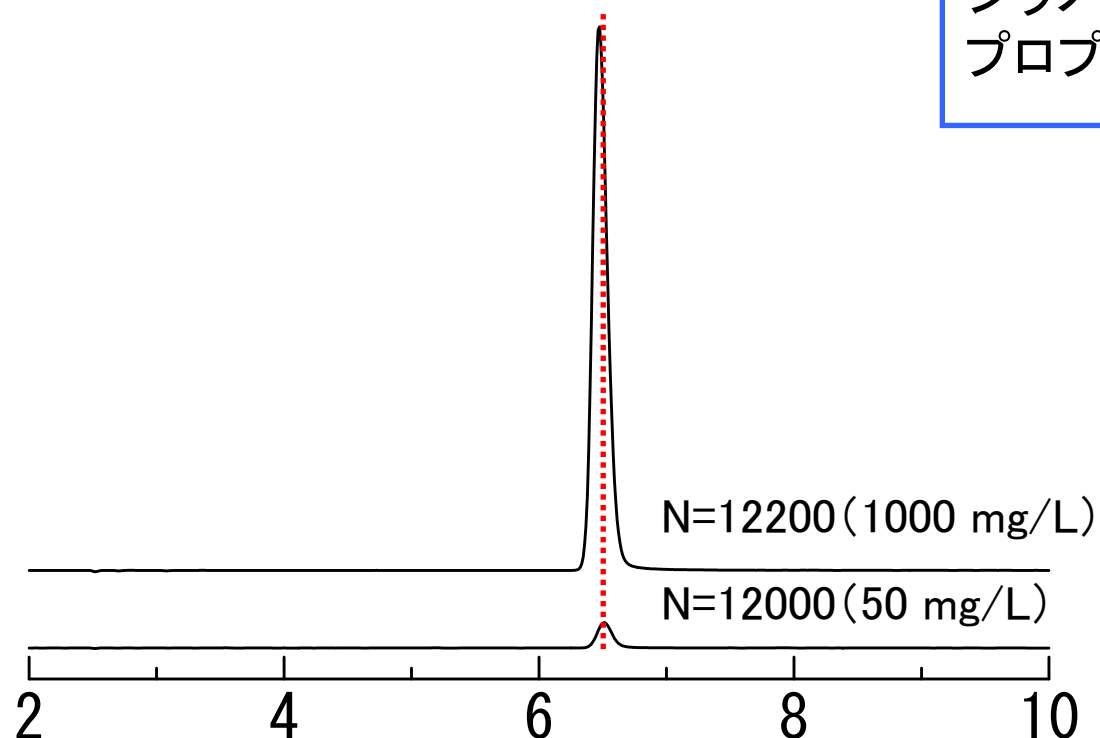


[Analytical conditions]  
Column: **L-column2 ODS** 5  $\mu$ m,  
4.6  $\times$  150 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN  
/20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30/70)  
Flow rate: 1 mL/min  
Temp.: 40°C  
Inj.vol.: 1  $\mu$ L  
Sample: プロプラノロール

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

## 中性移動相での塩基性物質の分析

シラノール： 解離  
プロプラノロール： 解離

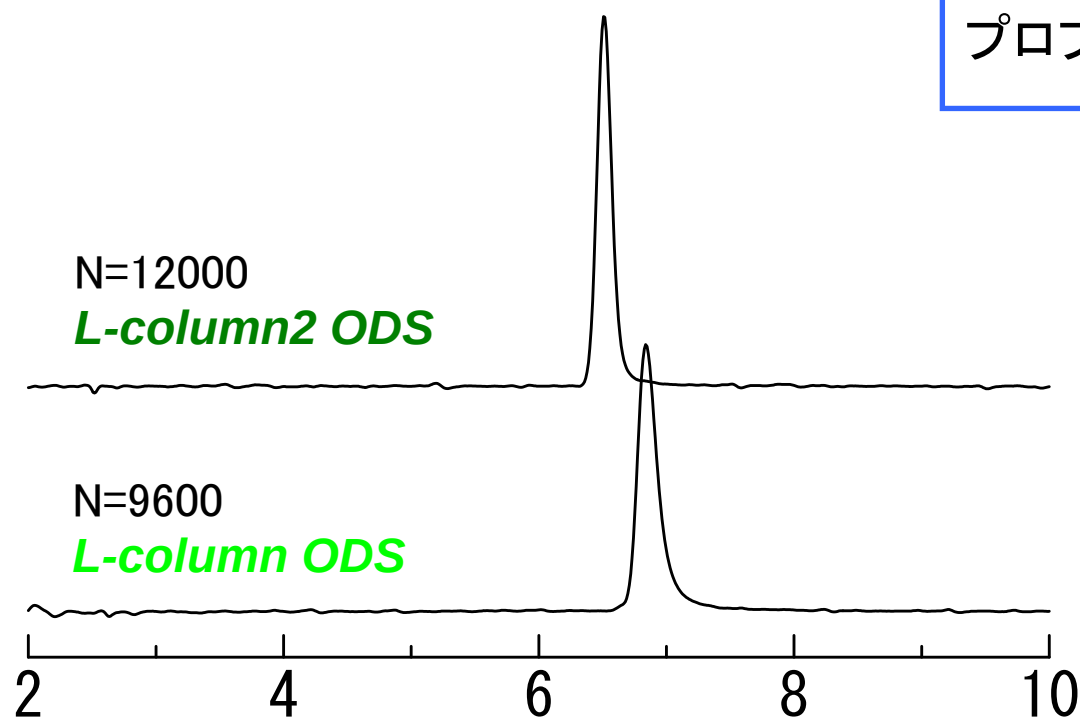


[Analytical conditions]  
Column: **L-column2 ODS** 5  $\mu$  m,  
4.6  $\times$  150 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN  
/25 mM リン酸緩衝液pH7 (30/70)  
Flow rate: 1 mL/min  
Temp.: 40°C  
Inj.vol.: 1  $\mu$  L  
Sample: プロプラノロール

- 試料の濃度によるピーク形状や保持時間の変化がない
- エンドキャッピングが完璧の場合、高い理論段数、負荷量の増加

## 中性移動相での塩基性物質の分析

シラノール： 解離  
プロプラノロール： 解離



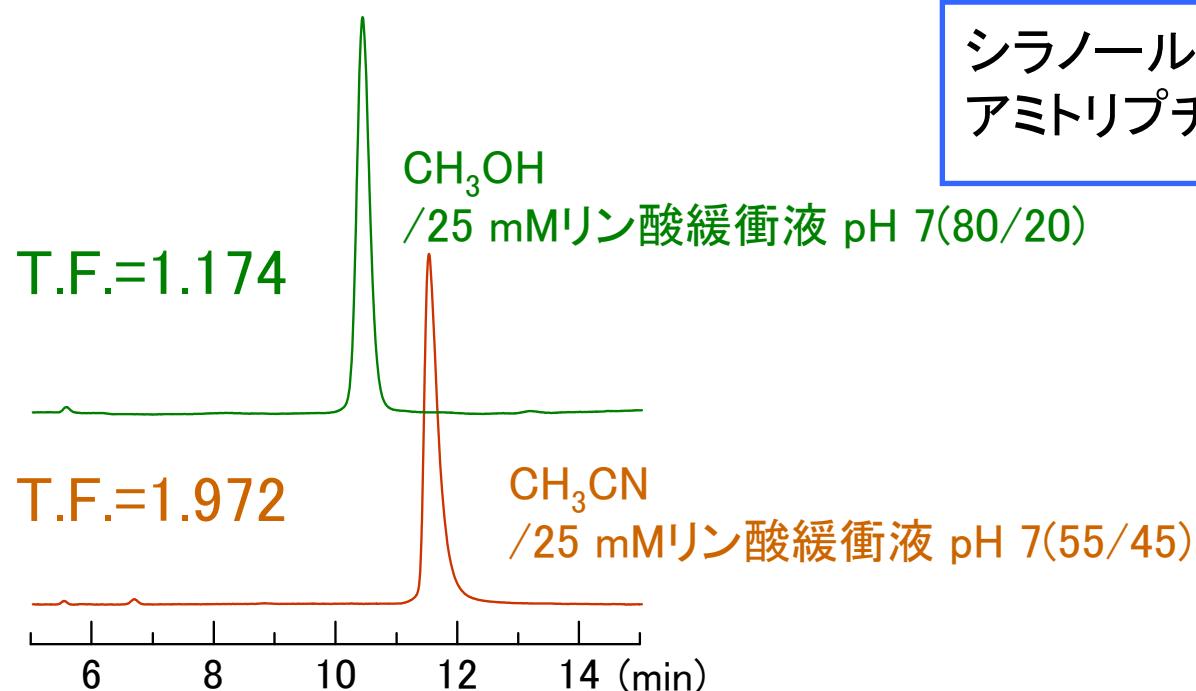
[Analytical conditions]  
Column: 5  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN  
/25 mM リン酸緩衝液pH7 (30/70)  
Flow rate: 1 mL/min  
Temp.: 40°C  
Inj.vol.: 1  $\mu$  L  
Sample: プロプラノロール

中性移動相ではシラノール基の影響を受けやすくなり、多くのカラムではピーク形状が悪くなる

# 塩基性物質のテーリング防止のノウハウ

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

## 移動相にメタノールを使用

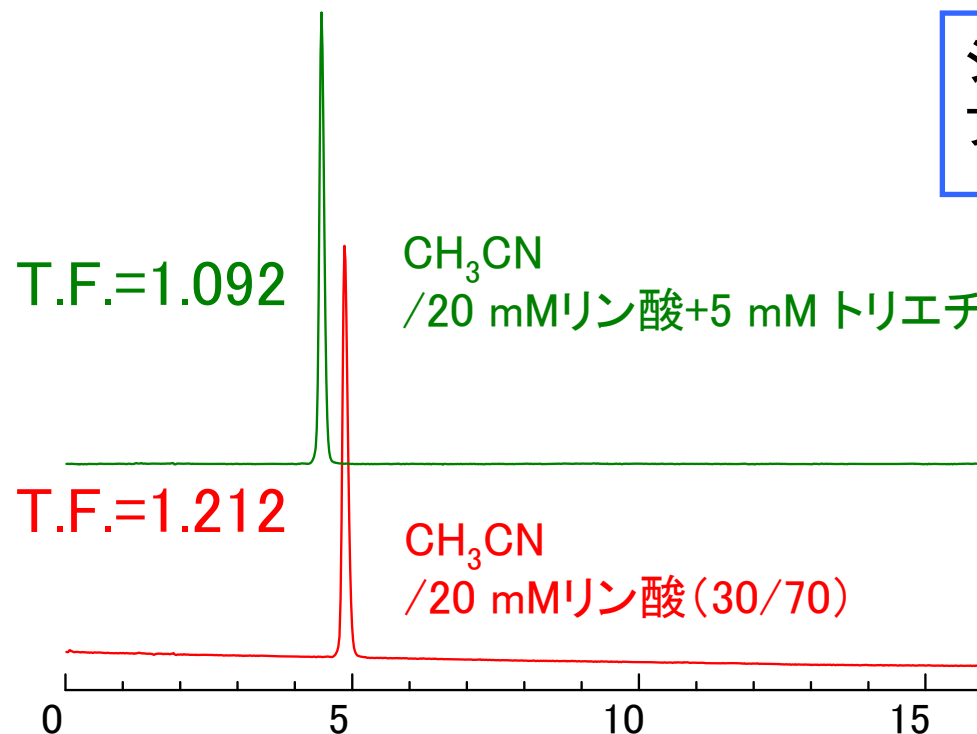


シラノール： 会合体  
アミトリプチリン： 解離

[Analytical conditions]  
Column: **L-column ODS** 5  $\mu$ m,  
4.6  $\times$  150 mm  
Flow rate: 1 mL/min  
Temp.: 40°C  
Detection: UV 225 nm  
Sample: アミトリプチリン in CH<sub>3</sub>CN

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

## アンチテーリング剤の使用



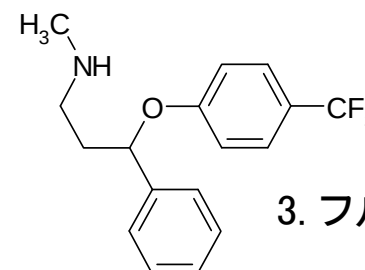
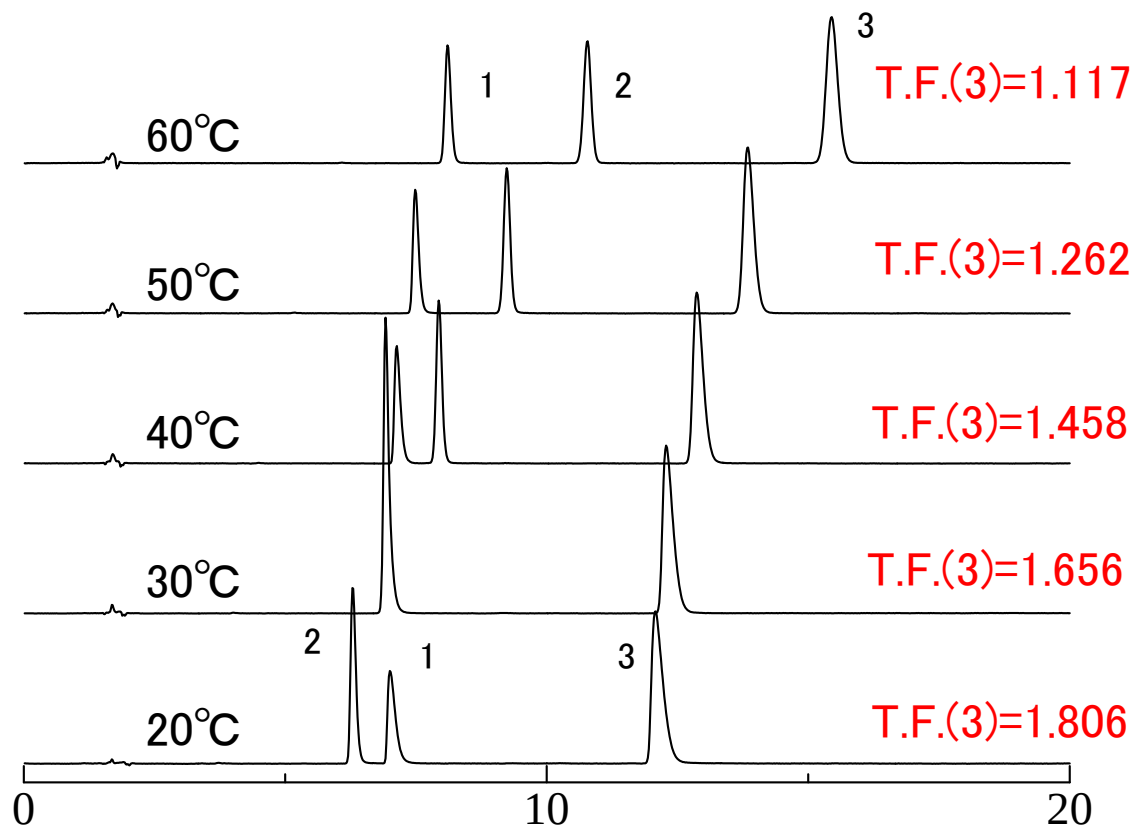
シラノール： 会合体  
プロプラノール： 解離

[Analytical conditions]  
Column: **L-column ODS** 5  $\mu$  m,  
4.6  $\times$  150 mm  
Flow rate: 1 mL/min  
Temp.: 40°C  
Sample: プロプラノール

- 添加アミン類が残存シラノールと結合するため塩基性物質は残存シラノールと相互作用できない
- カラムの専用化、耐久性の低下



# 温度を高くする



3. フルオキシセチン

[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 3  $\mu$  m,  
4.6  $\times$  150 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN  
/25 mM リン酸緩衝液pH7(35/65)

Flow rate: 1 mL/min

Sample: 1. パロキシセチン

2. シタロプラム

3. フルオキシセチン 各2  $\mu$  L

- 温度が高くなると塩基性物質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
- 耐久性の低下

## カラムの劣化

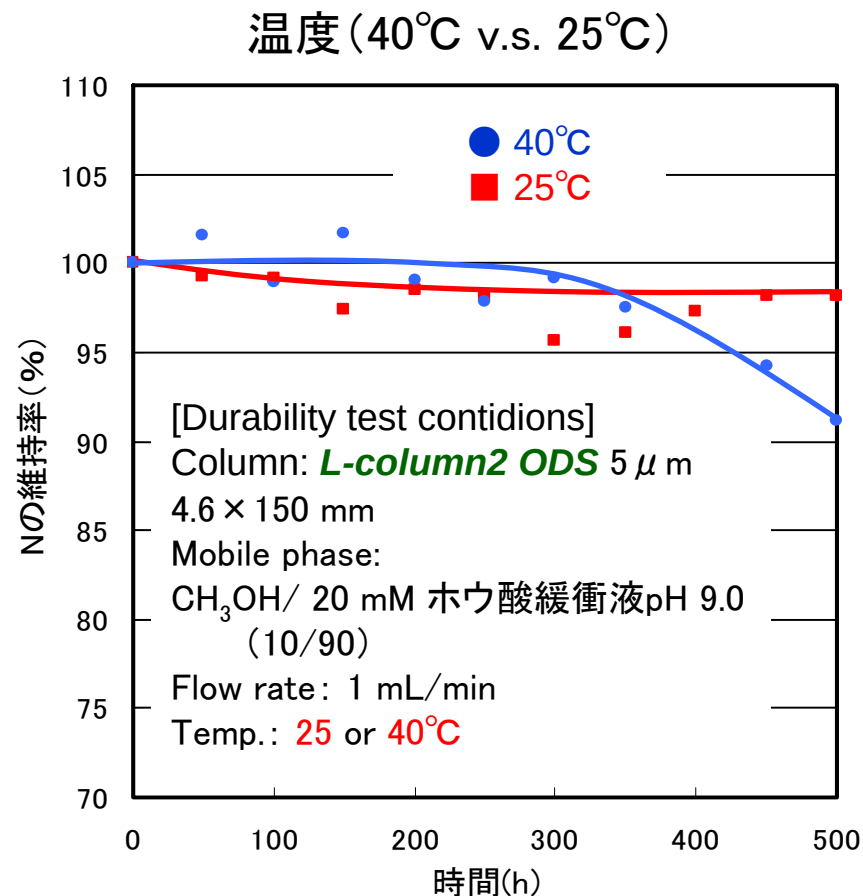
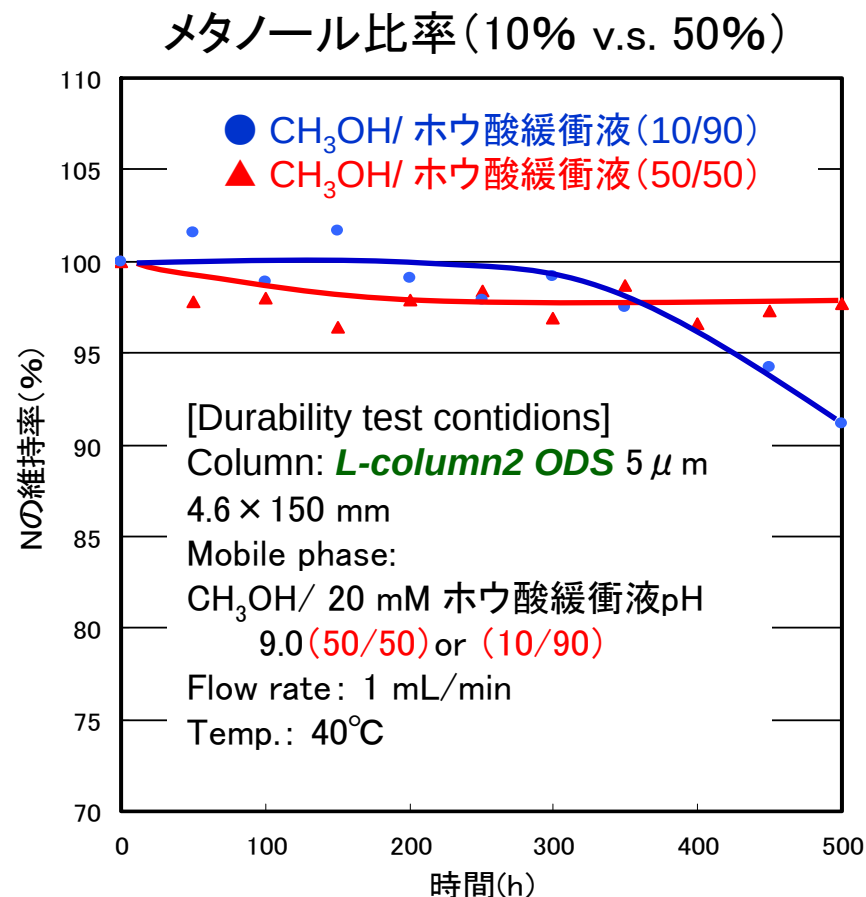
### 化学的要因

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

### 物理的要因

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

# カラムの劣化 有機溶媒比率と温度



有機溶媒比率が低い  
温度が高い

劣化しやすい

## カラムの詰まりのトラブル

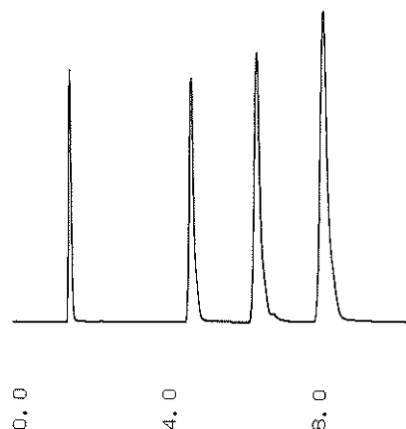
症状：カラム圧が上昇し、ピーク割れが発生

- ・ 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pH 6.5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

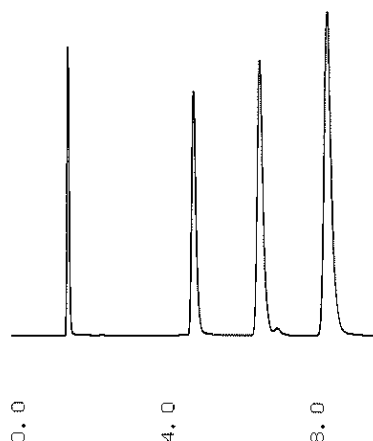
洗浄前

N(4)=7000、P=17.5MPa



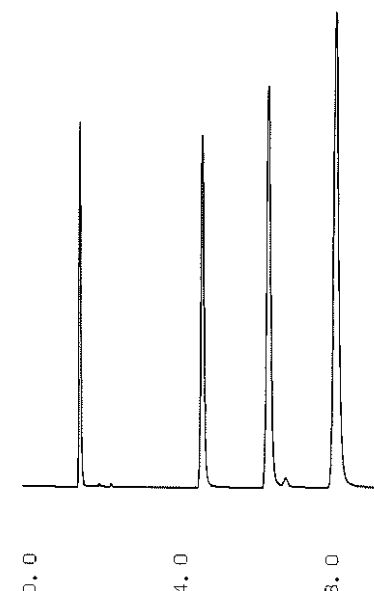
洗浄後

N(4)=8500、P=17.0MPa



フィルター交換後

N(4)=17000、P=13.0MPa



カラムの入口側のエンドフィット内のフィルターを交換するとカラム性能が復活した

原因 ⇒カラムの入口付近に不溶物が蓄積し、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

## カラムを長持ちさせるためには

化学的要因(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

物理的要因(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** 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  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/水 | 100/0 |

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

- ・ 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(ミクロカラム以外)



## 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
- ・ 最後はメタノール又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)

# 保持時間の変化

## 対処方法

①液漏れ確認：接続タイプのチェック、増し締め、シール交換

②設定条件の確認：流量、移動相組成、温度

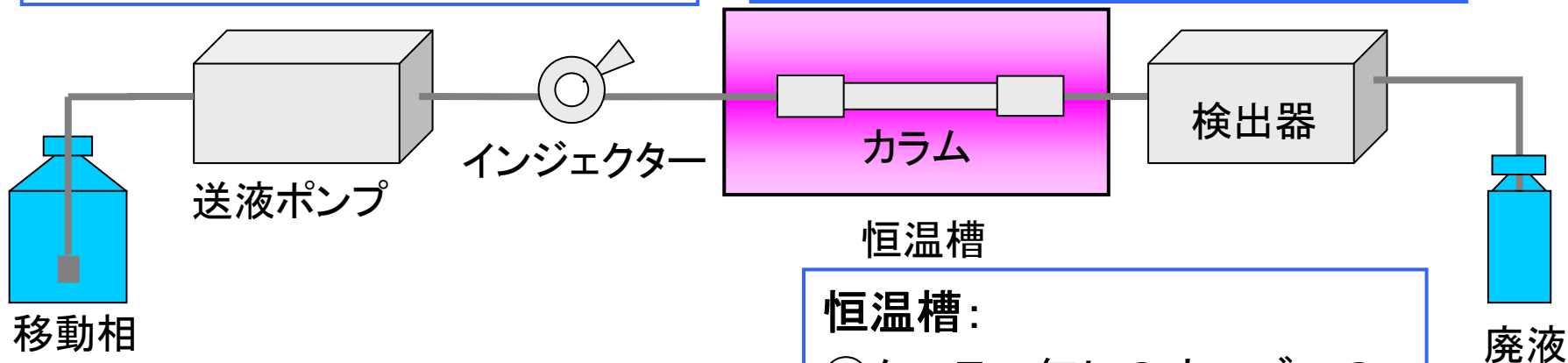
(送液ポンプ)圧力の変動：

③エア抜き、チェックバルブ洗浄

カラム：

④移動相が置き換わるまで待つ

⑦カラム交換



移動相：

⑥再調製、pHの確認、移動相の脱気

⑧サクシヨンフィルター洗浄・交換

恒温槽：

⑤クーラー無しのオーブンの  
設定温度は室温プラス10℃  
以上

# 面積の変化

## 対処方法

