

# 逆相HPLCの分析法開発に役立つノウハウと トラブルシューティングの解説

一般財団法人 化学物質評価研究機構  
クロマト技術部

# 発表内容

---

1. 移動相  
有機溶媒、緩衝液、イオン対クロマトグラフィー
2. 分離の改善と分析時間の短縮  
カラムの変更、分離度、粒子径
3. ダウンサイジング
4. トラブルシューティング
5. お知らせ

# 1. 移動相

---

## 移動相の設定

逆相HPLCの移動相は有機溶媒系と水系を混合したものが良く用いられる

### 有機溶媒系

- アセトニトリル、メタノール、テトラヒドロフラン、イソプロパノール、エタノール

### 水系

- 水、緩衝液、イオン対試薬  
緩衝液は解離性物質の移動相として使用する  
イオン対試薬はピーク形状の悪い解離性物質や保持の弱い解離性物質の移動相に添加して使用する

# 有機溶媒

## 移動相の有機溶媒

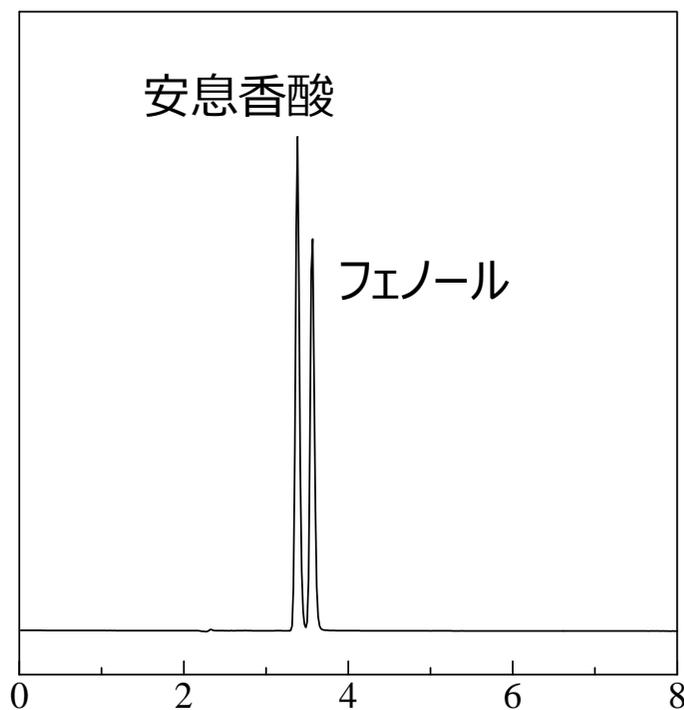
- アセトニトリル: カラム圧やUV吸収が低い  
→ ファーストチョイス、3  $\mu\text{m}$ 以下のカラムに最適
- メタノール: UV吸収があり、カラム圧が高い  
→ UV 250 nm以上の波長
- テトラヒドロフラン: 溶出力は大きいですが、PEEK樹脂を膨潤させる  
→ 試料が溶出しないときや、分離パターンの変更
- イソプロパノール、エタノール: 溶出力は大きいですが、カラム圧が高い  
→ 試料が溶出しないときや、分離パターンの変更

## HPLC用溶媒を使用する

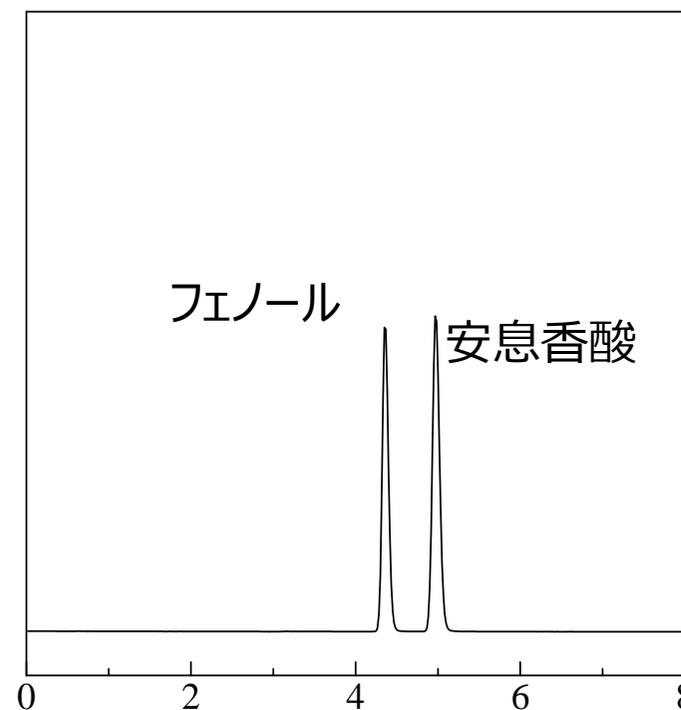
- 溶媒の規格により、ノイズや不純物が異なる
- 特級のテトラヒドロフランは安定剤であるBHTを含有している

# アセトニトリルとメタノール

アセトニトリル/20 mM リン酸 (35/65)



メタノール/20 mM リン酸 (35/65)



【 Analytical conditions 】

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

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

# 緩衝液

溶液に酸又は塩基を加えた時や希釈した時に、pHの変化を緩和する作用を持つ溶液を、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  $\text{NH}_4^+$  )

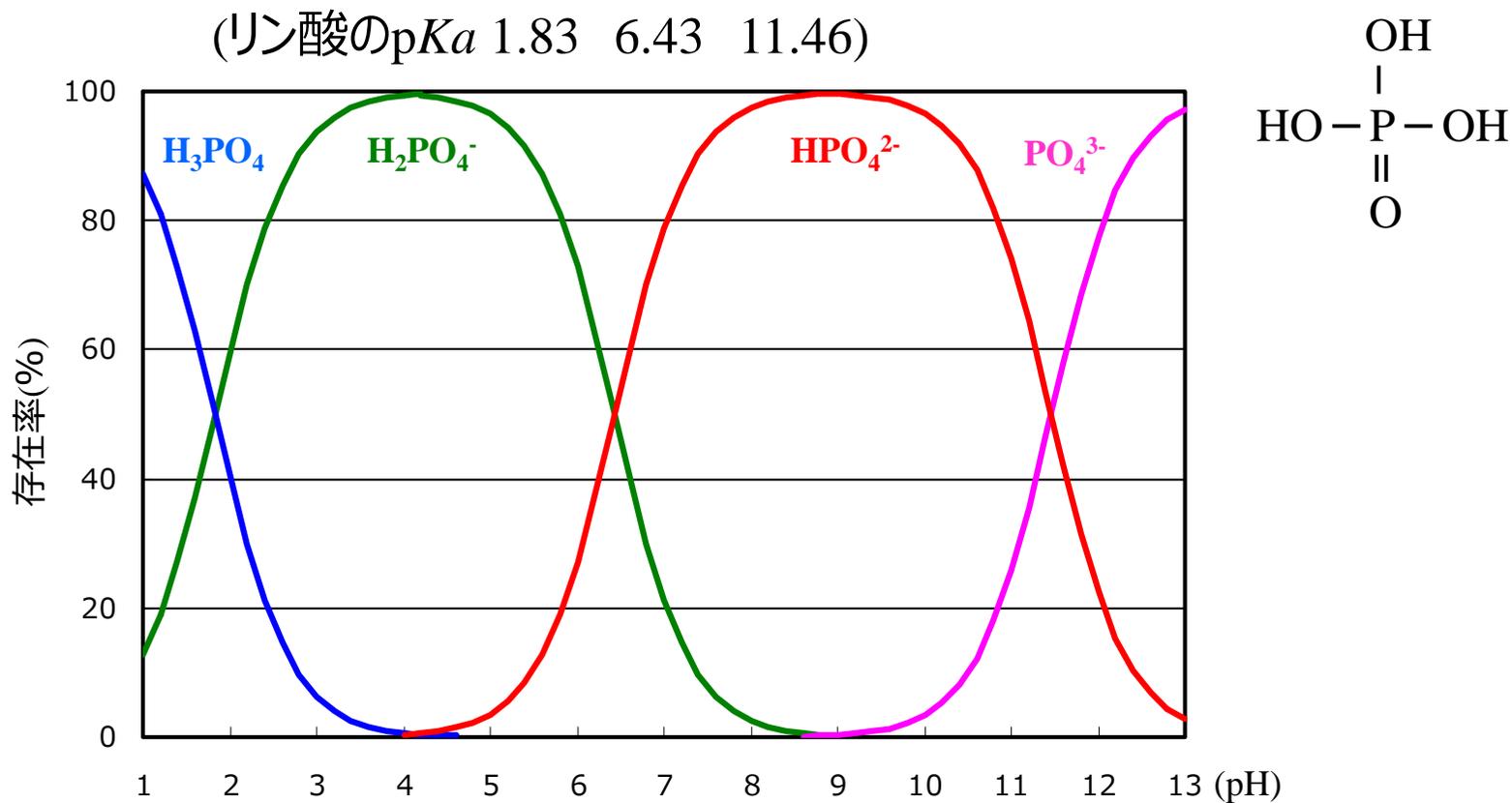
例: リン酸緩衝液(pH 1.83付近のとき)



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 $pK_a \pm$ 約1の範囲

# リン酸の解離、非解離状態の存在率



リン酸緩衝液はpH 4とpH 9付近では緩衝能を持たない

# 逆相HPLCで使用される代表的緩衝液

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

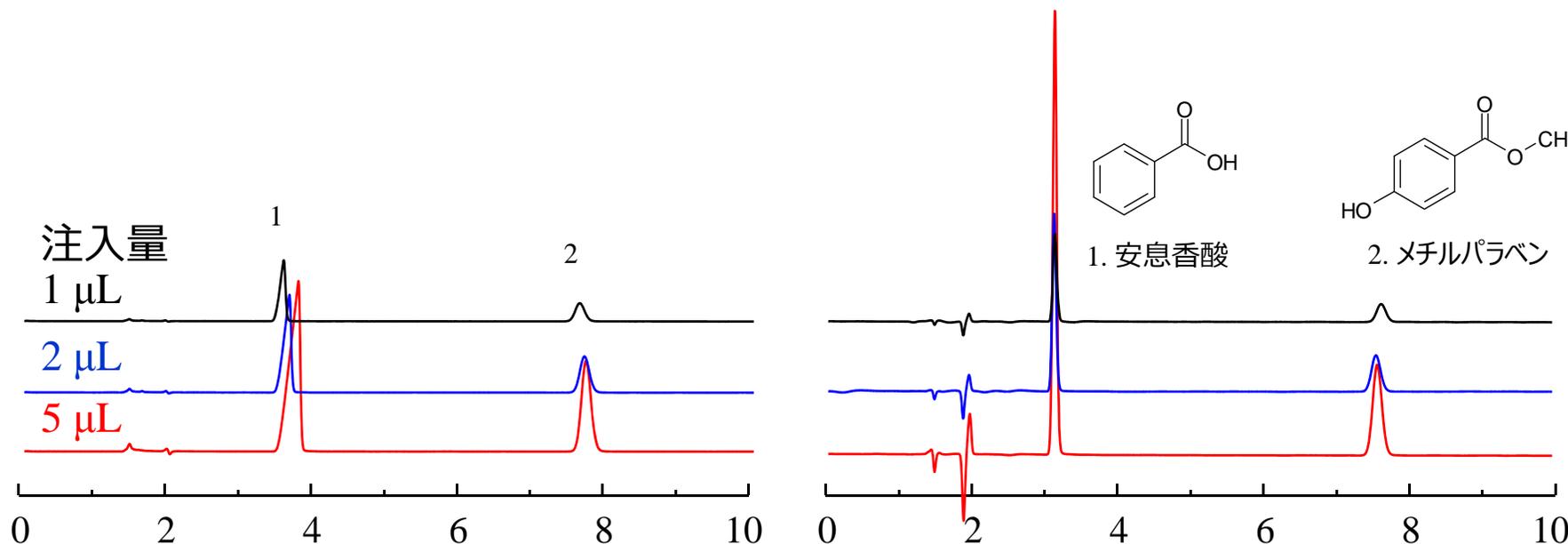
(液クロムの巻及び化学便覧第5版より)

\* MSのときの緩衝範囲はpKa±1で、濃度は10 mM(0.1%)以下

# 緩衝能の有無の比較 (注入量の影響)

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

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



【Analytical conditions】

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

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

緩衝能があると

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

## 緩衝能の有無の比較(再現性)

ロット番号	A) 20 mM リン酸二水素カリウム (緩衝能なし)		B) 20 mM 酢酸緩衝液 (緩衝能あり)	
	安息香酸の保持時間 (min)	分離度	安息香酸の保持時間 (min)	分離度
E4311	3.73	19.52	3.12	26.55
E4312	3.54	18.79	3.06	26.38
E4313	3.64	18.75	3.12	26.40
CV (%)	2.53	2.28	1.14	0.35

【 Analytical conditions 】

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

Mobile Phase: A) 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 4.4)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (75/25)

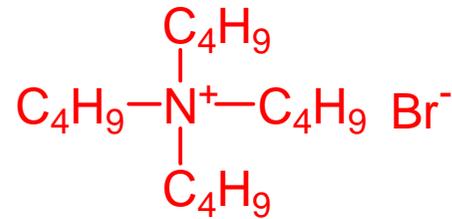
B) 20 mM Acetate buffer (pH 4.4)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (75/25)

Inj.vol: 2  $\mu$ L

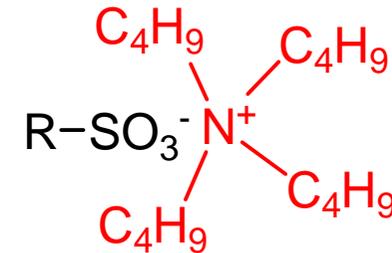
Sample: 1. 安息香酸(100 mg/L); 2. メチルパラベン(100 mg/L)

緩衝能のある移動相では、解離性物質の保持時間や分離度のばらつきが小さくなる

# イオン対クロマトグラフィー

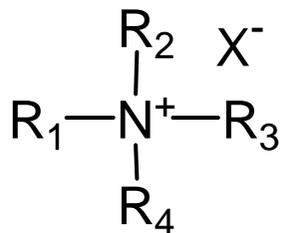


テトラブチルアンモニウム  
(TBA)ブロマイド

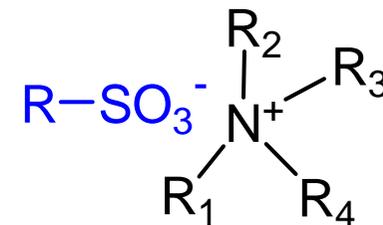


スルホン酸等はpHを酸性にしても、解離を抑えることができない

イオン対形成  
電荷を打ち消しあって疎水性が増加する

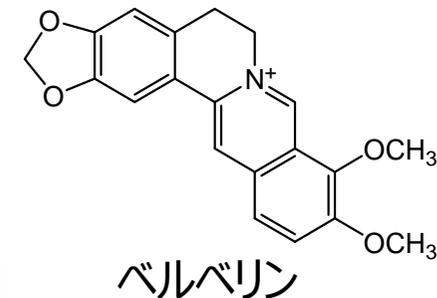
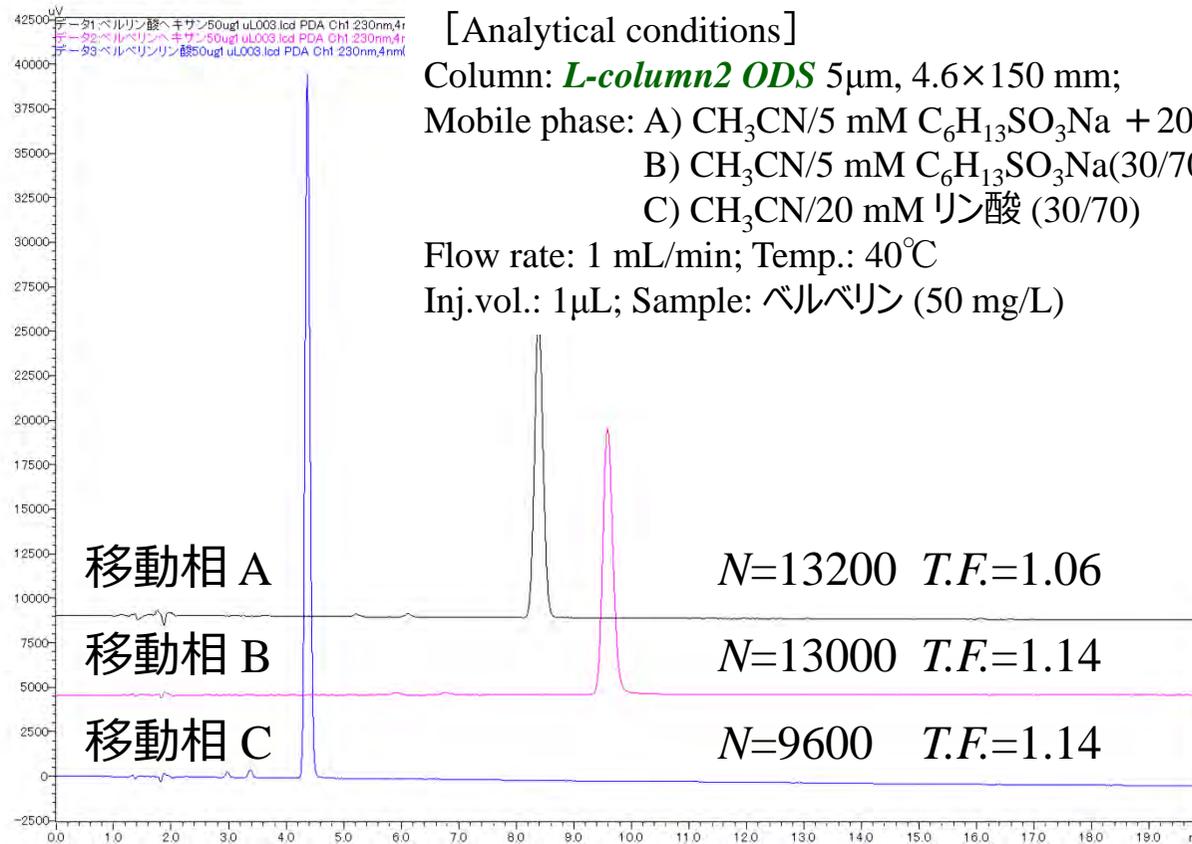


$\text{R-SO}_3^- \text{Na}^+$   
アルキルスルホン酸ナトリウム



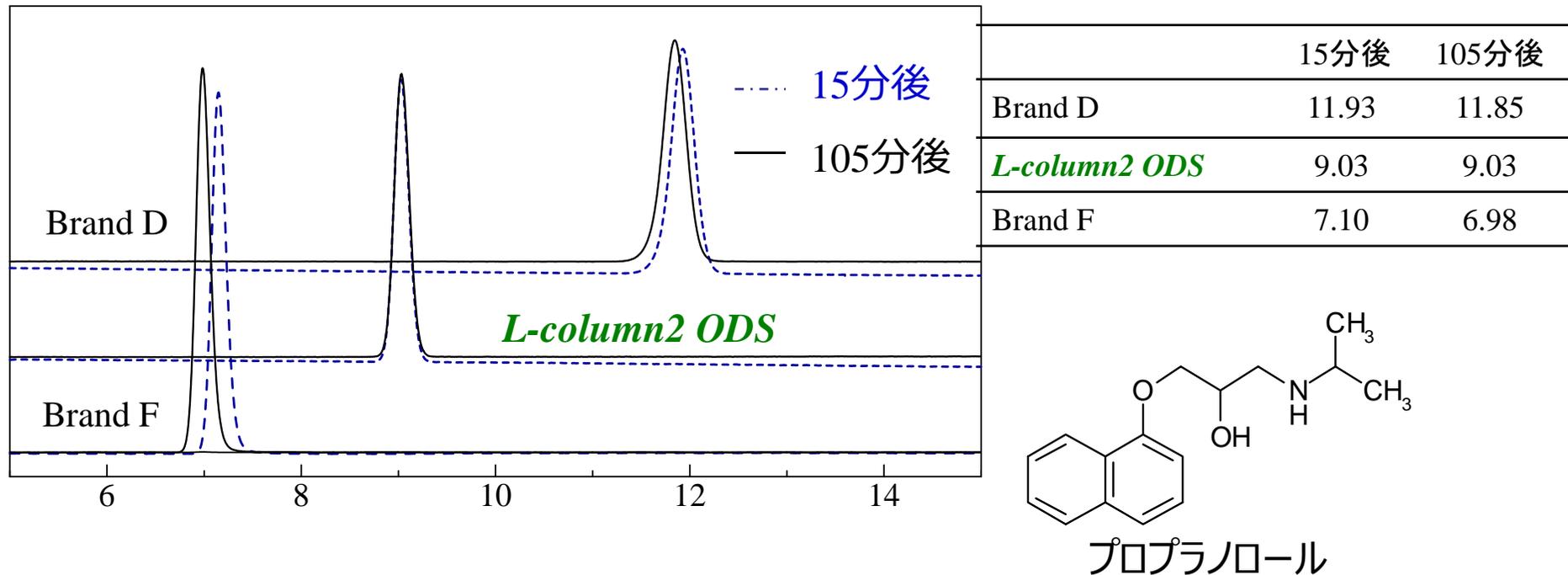
第四級アンモニウムイオンはpHで解離を抑えることはできない

# イオン対クロマトグラフィー



四級アンモニウムイオンはイオン対試薬を添加するとピーク形状が向上する

# イオン対試薬含有の平衡化時間



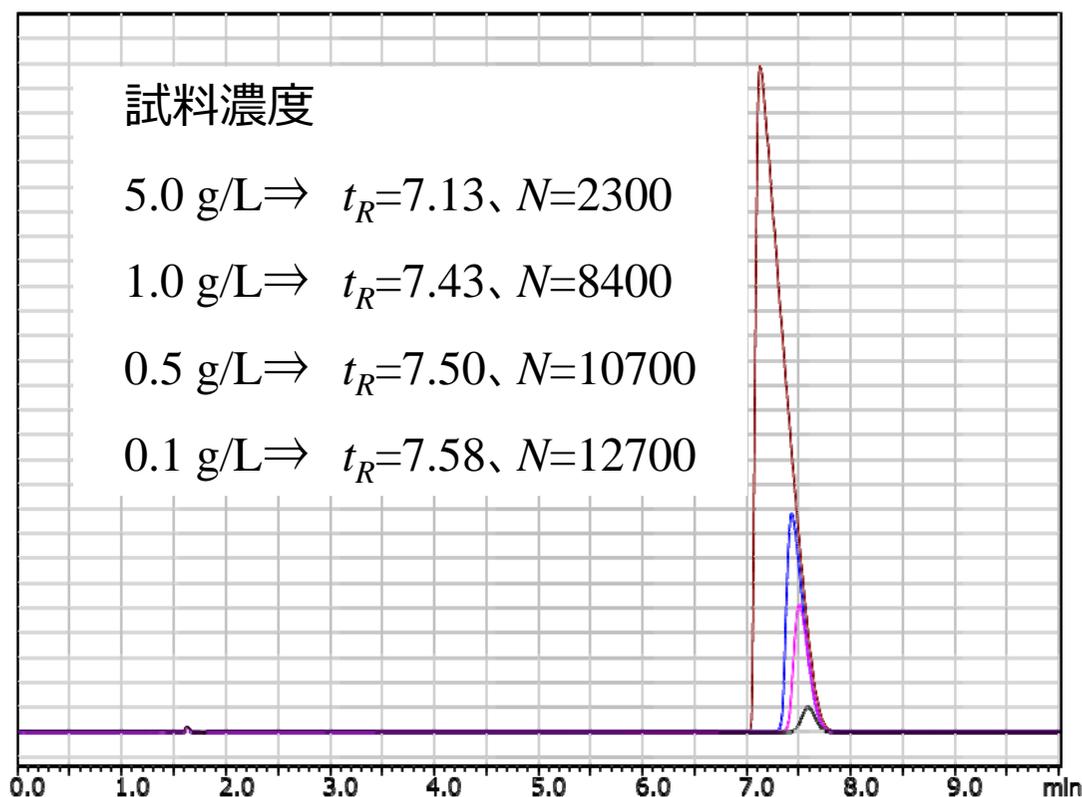
[Analytical conditions]

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)

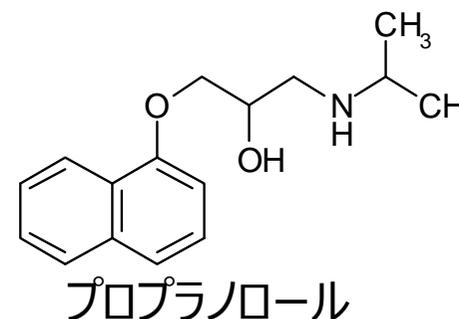
カラムによって、移動相(イオン対試薬含有)の平衡化時間が異なる

# イオン対試薬含有の試料濃度の影響

## イオン対試薬の濃度が薄いと



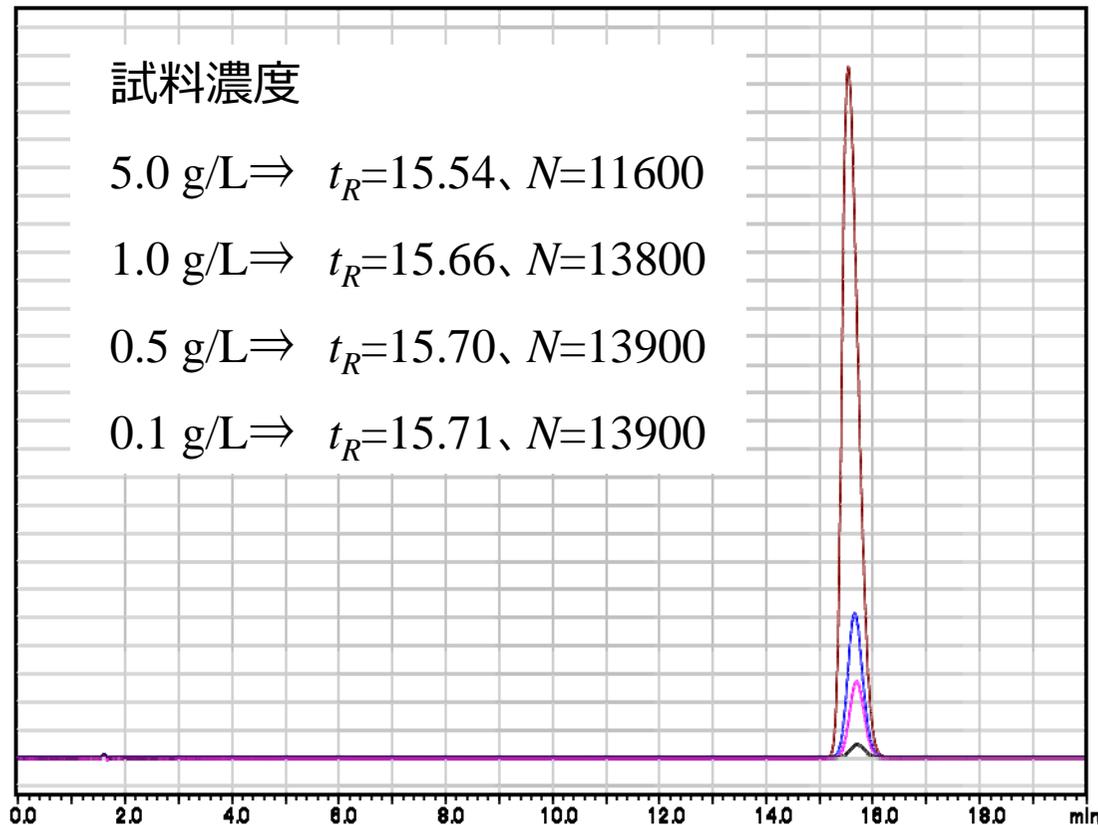
[Analytical conditions]  
Column: *L-column2 ODS* 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm  
Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM H}_3\text{PO}_4$   
+ **5 mM  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{SO}_3\text{Na}$**  (30/70)  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40 $^\circ\text{C}$   
Inj.vol.: 1  $\mu\text{L}$   
Sample: Propranolol



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

# イオン対試薬含有の試料濃度の影響

## イオン対試薬の濃度が濃いとき



[Analytical conditions]

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

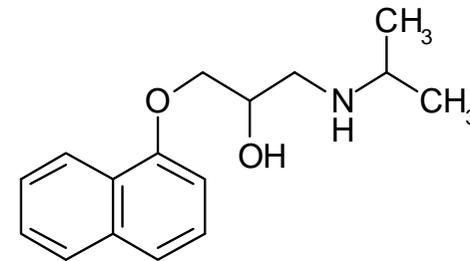
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

+ **100 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

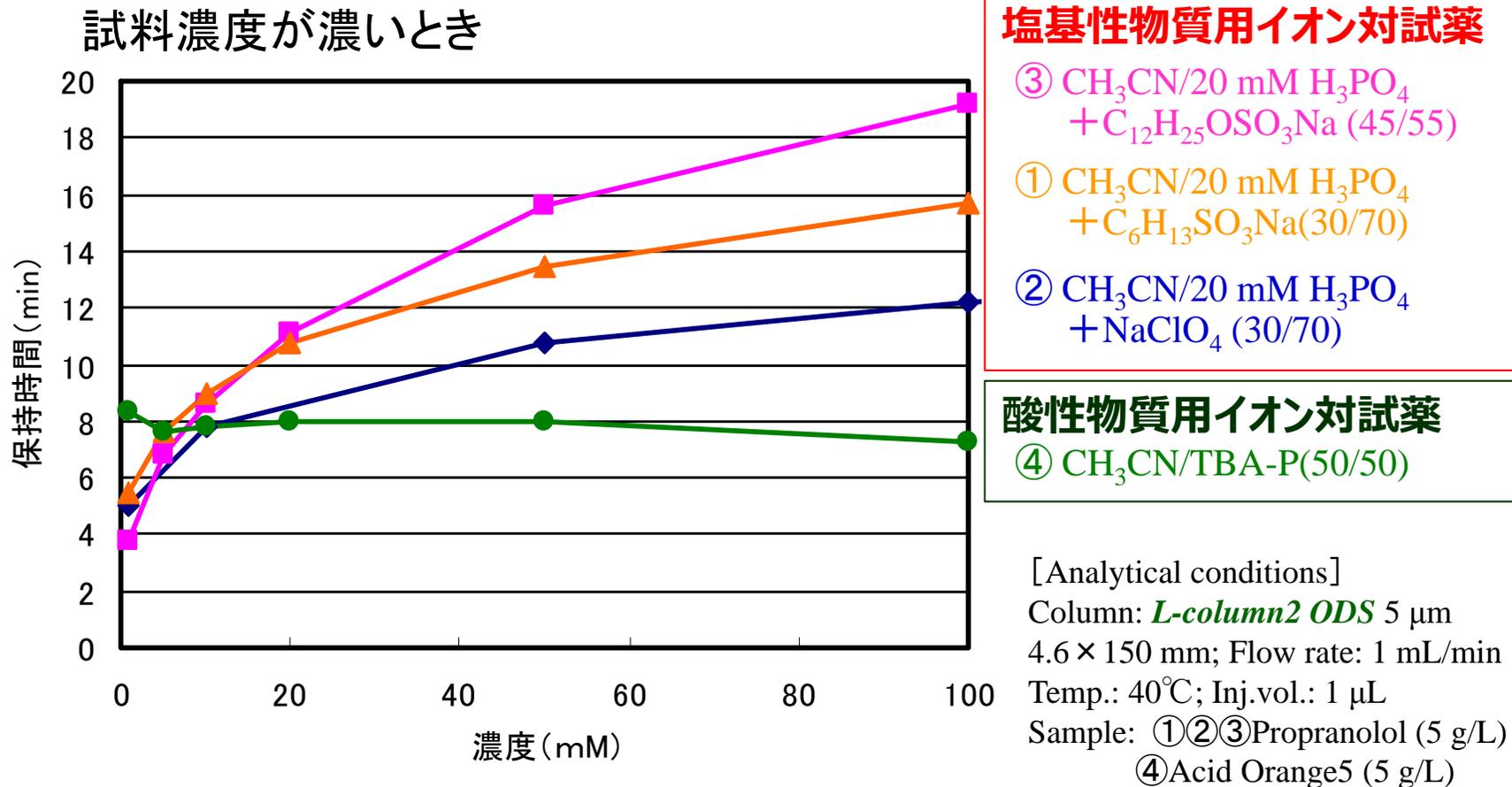
Sample: Propranolol



プロプラノロール

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保持時間



- 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

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

## 2.分離度の改善

分離度  $R_S$  は 2 成分の分離の程度を表す

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

$\left[ \begin{array}{l} R_S : \text{分離度}, N : \text{理論段数} \\ \alpha : \text{分離係数}, k : \text{保持係数} \end{array} \right]$

$N$  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

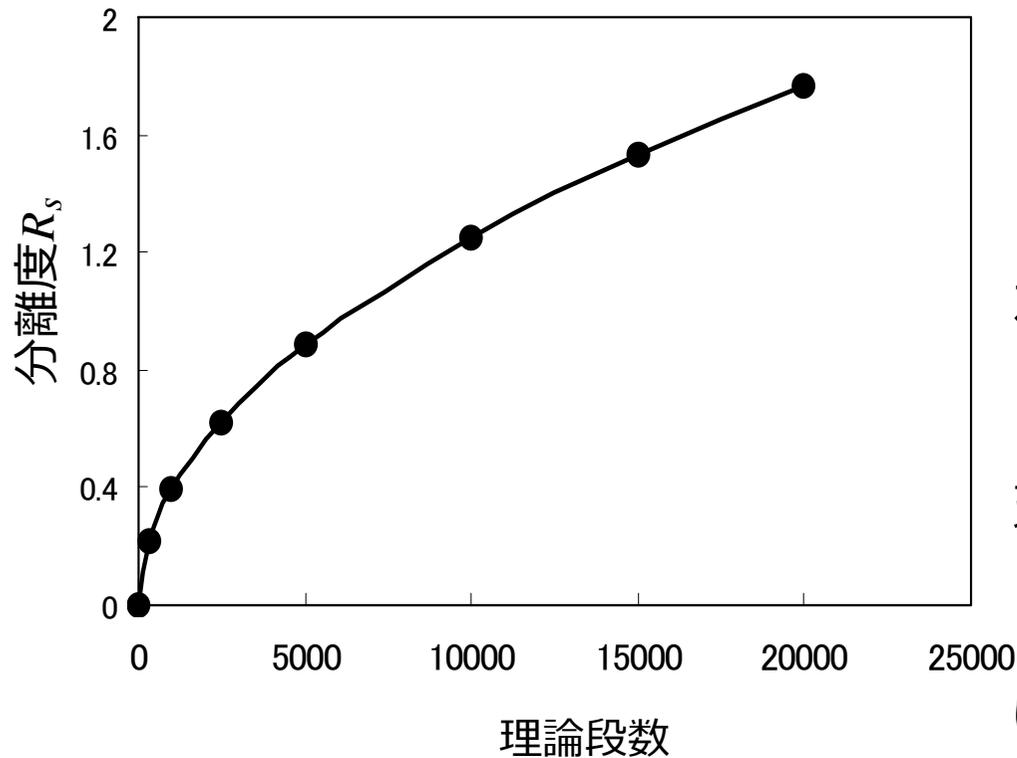
$\alpha$  は分離係数  $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$

$k$  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

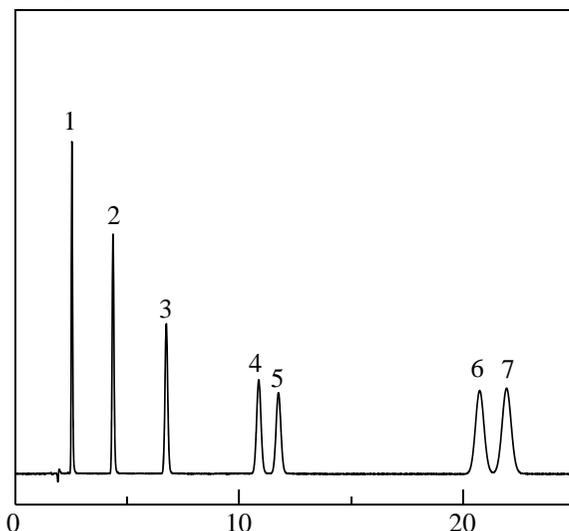
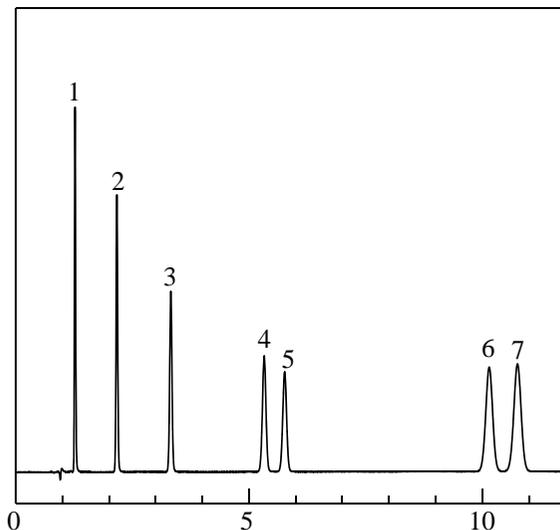
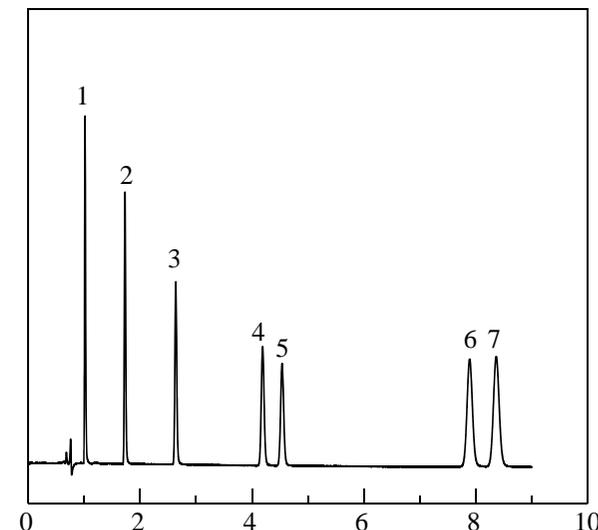
カラム長さ150 mm → 250 mmで $N$ は1.67倍、 $R_s$ は1.29倍

充填剤粒子径を小さくする

粒子径5  $\mu\text{m}$  → 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	$t_{R(7)}$ (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 $^{\circ}$ 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. p-ヒドロキシ安息香酸エチル, 4. p-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル, 5. p-ヒドロキシ安息香酸プロピル, 6. p-ヒドロキシ安息香酸イソブチル, 7. p-ヒドロキシ安息香酸ブチル

粒子径を小さくすると、理論段数が高くなり、分離度が向上する

# 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】

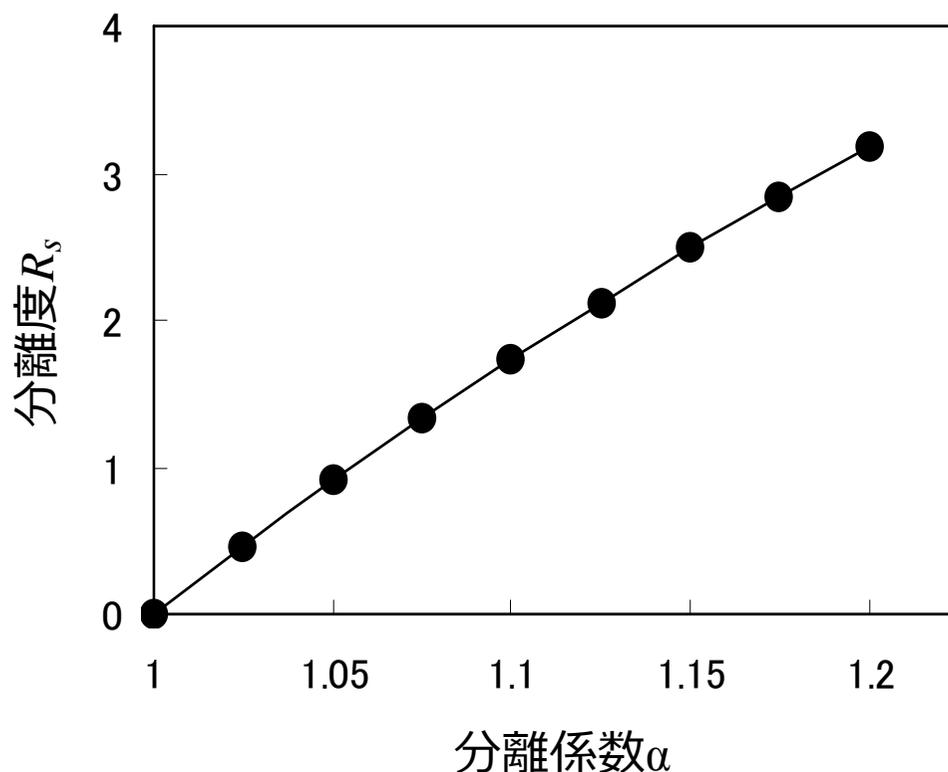
カラムサイズ：4.6×150 mm

粒子径：5  $\mu\text{m}$

$t_0=1.5$

$t_R=5$

$N=12000$

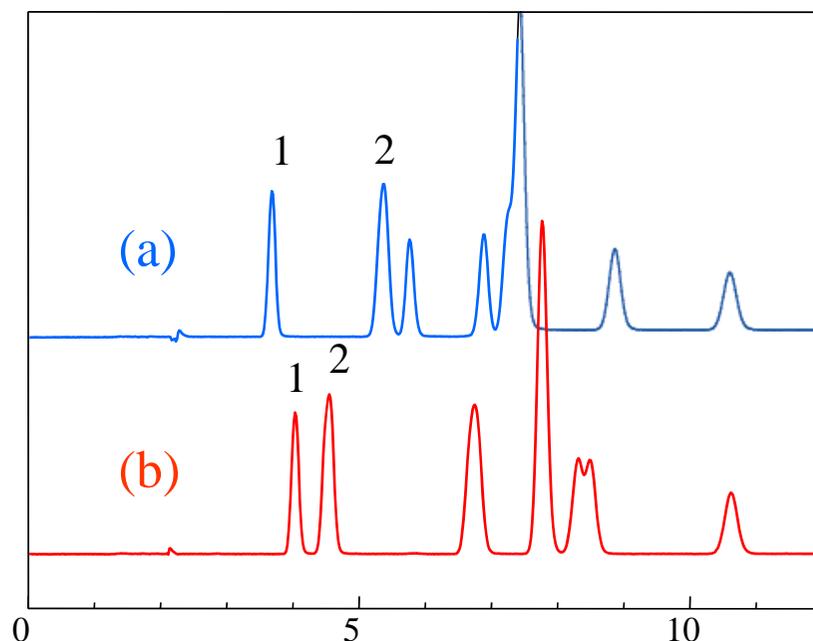


分析条件の変更

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/

10 mM 酢酸アンモニウム (15/85)

$$R_{S(1,2)}=6.576 \quad \alpha_{(1,2)}=1.80$$

(b)アセトニトリル/

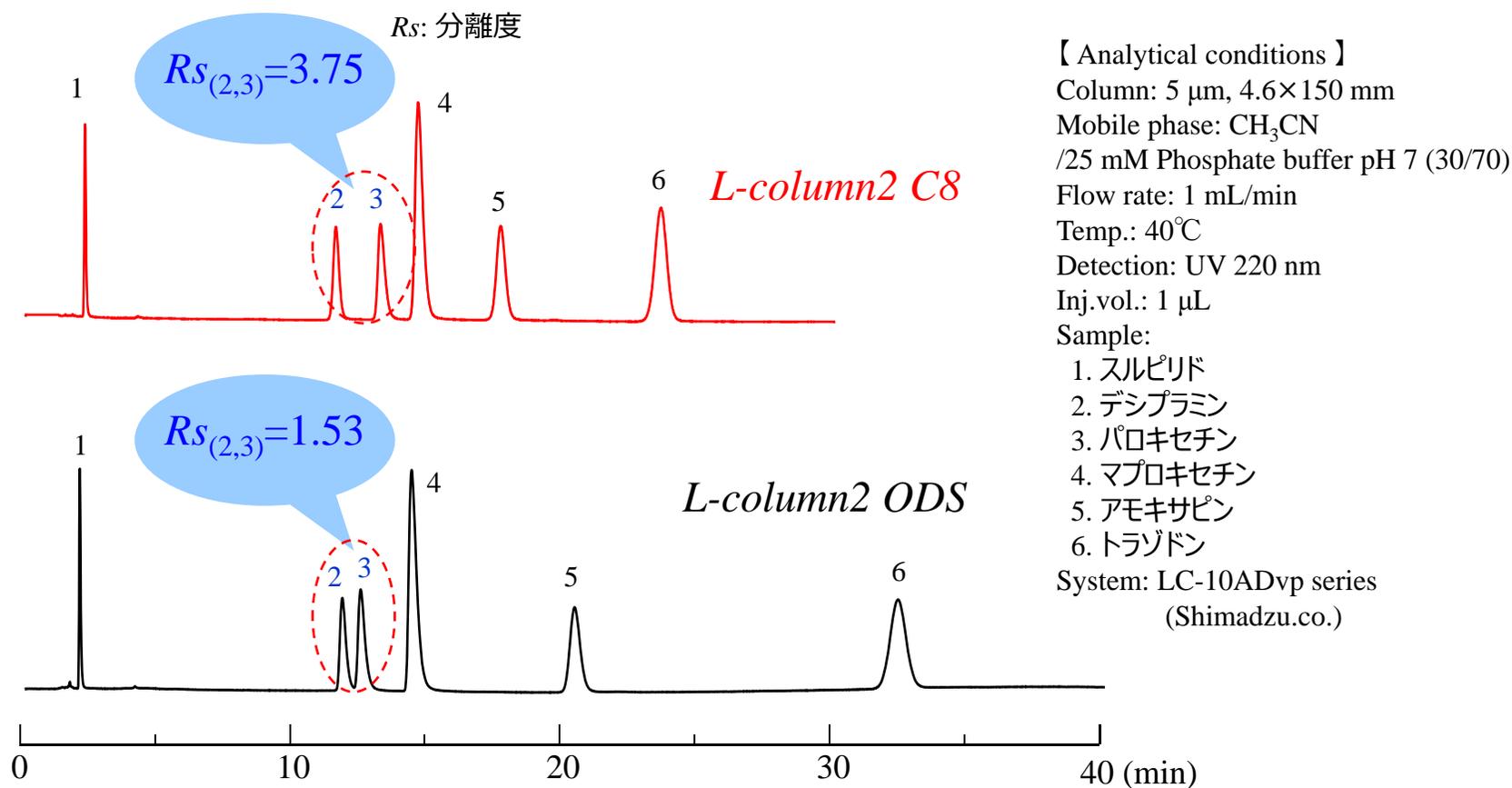
10 mM 酢酸アンモニウム (10/90)

$$R_{S(1,2)}=1.898 \quad \alpha_{(1,2)}=1.21$$

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

# C8カラムによる分離の改善例

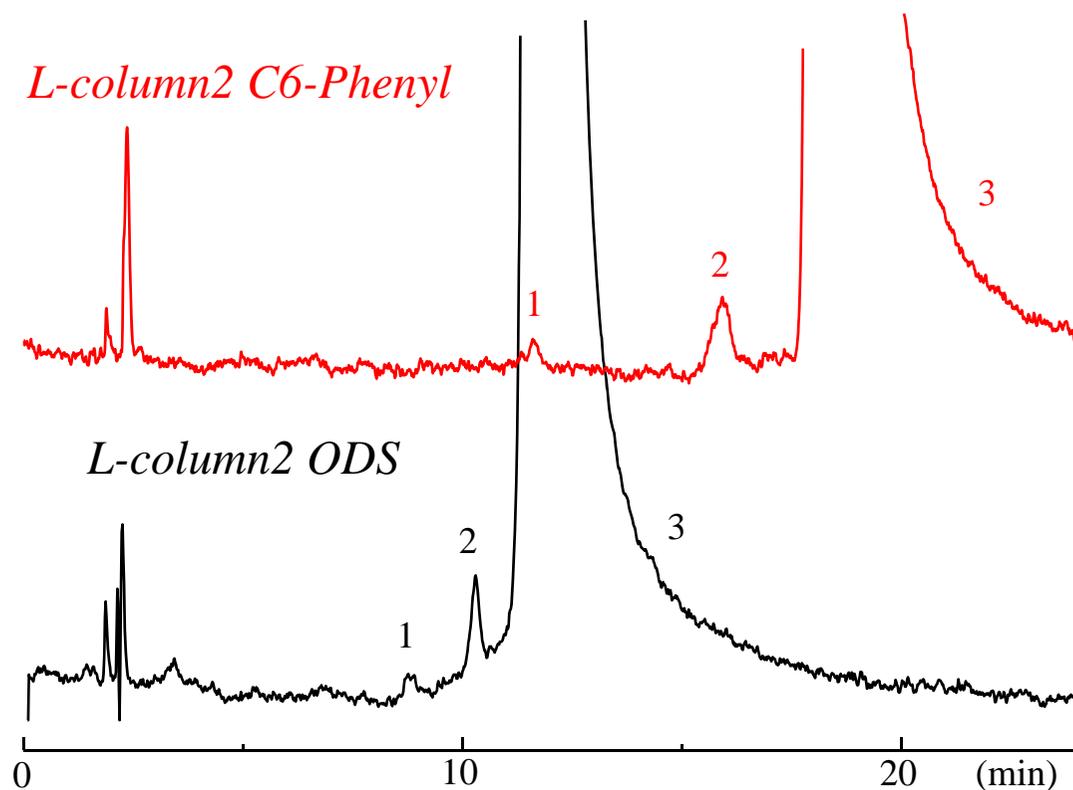


分析時間の短縮

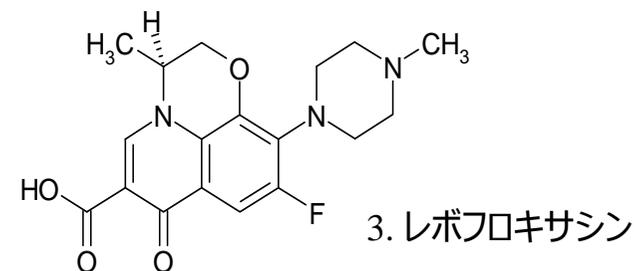
デシプラミン、パロキセチンの分離が改善する

# C6-Phenylカラムによる分離の改善例

## レボフロキサシンの不純物分析



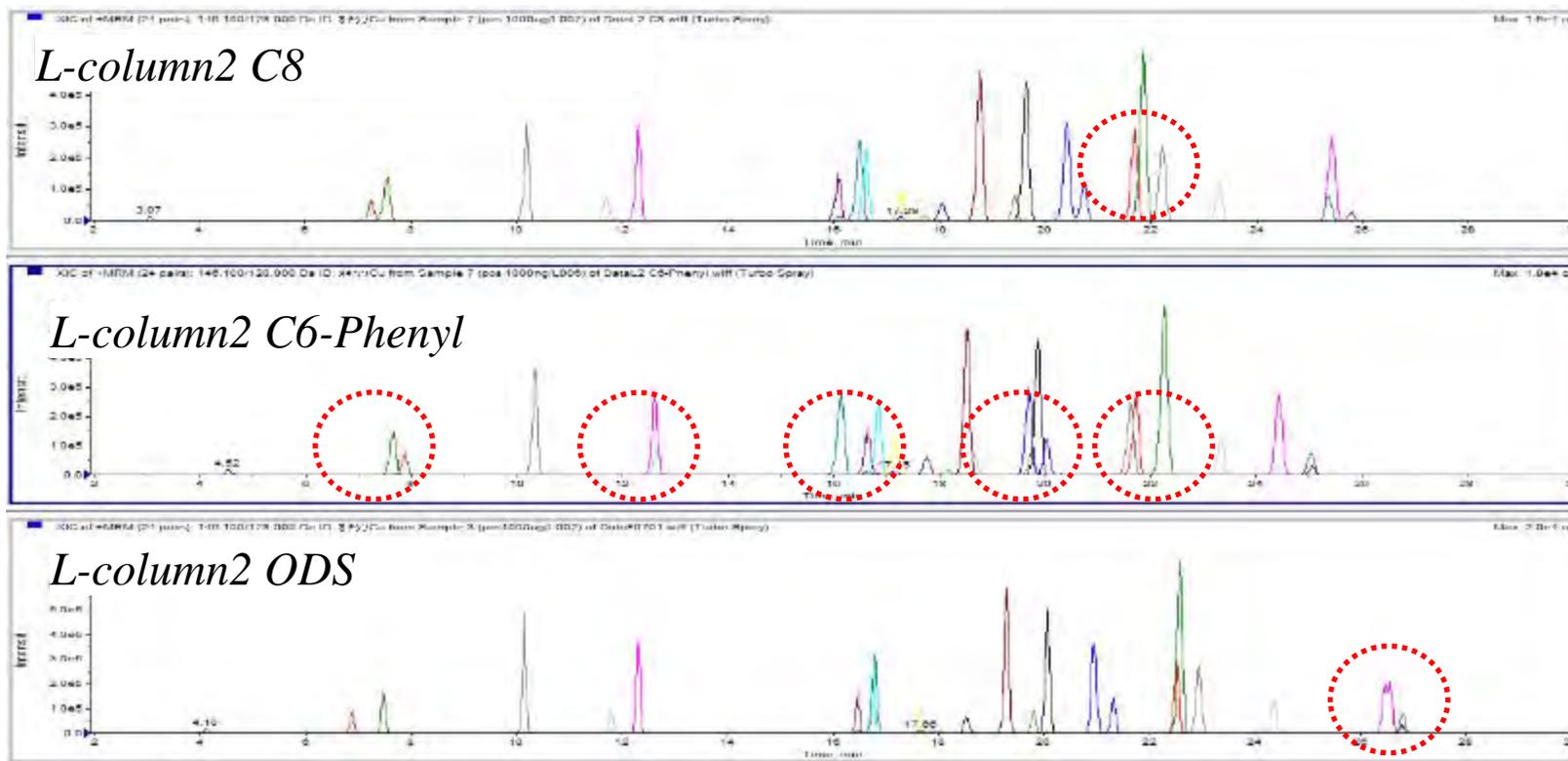
【 Analytical conditions 】  
 Column: 5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm  
 Mobile phase:  
 CH<sub>3</sub>OH/20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10/90)  
 Flow rate: 1 mL/min  
 Temp.: 40°C  
 Detection: UV 294 nm  
 Inj.vol.: 2  $\mu$ L  
 Sample:  
 1. 不純物 A  
 2. 不純物 B  
 3. レボフロキサシン  
 System: LC-10ADvp series  
 (Shimadzu.co.)



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

# 充填剤による分離パターンの違い

水道水の水質管理目標設定項目 別添方法18 (農薬)

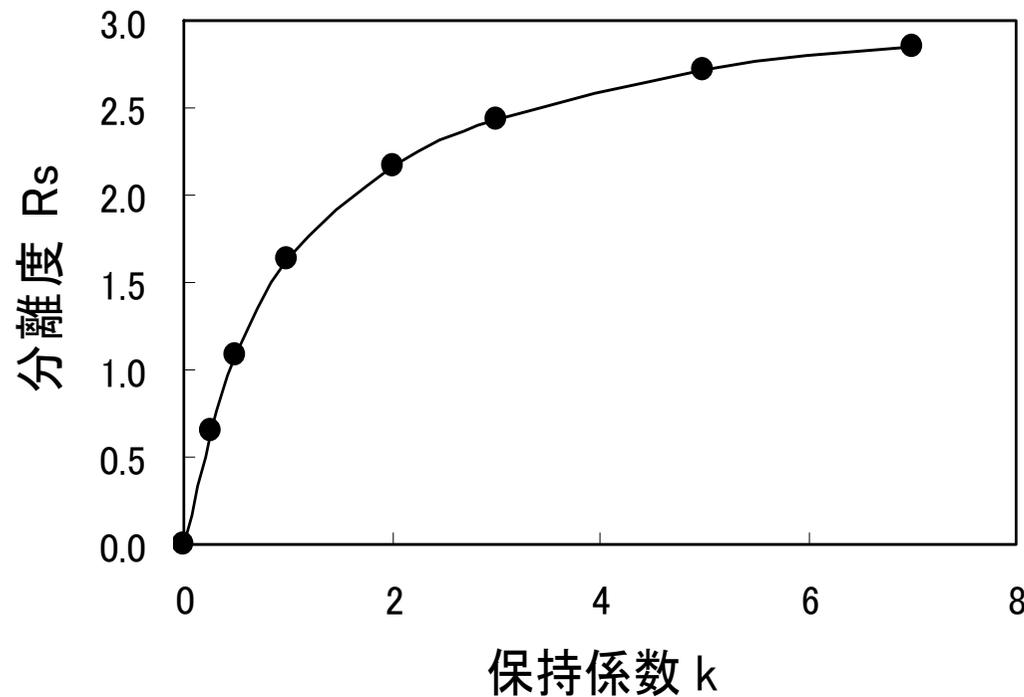


特にLC/MSの一斉分析の場合、ODSカラムやC8カラムと比べてC6-Phenylカラムの分離パターンが大きく異なる

# 保持係数 $k$ の $R_s$ への寄与

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

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



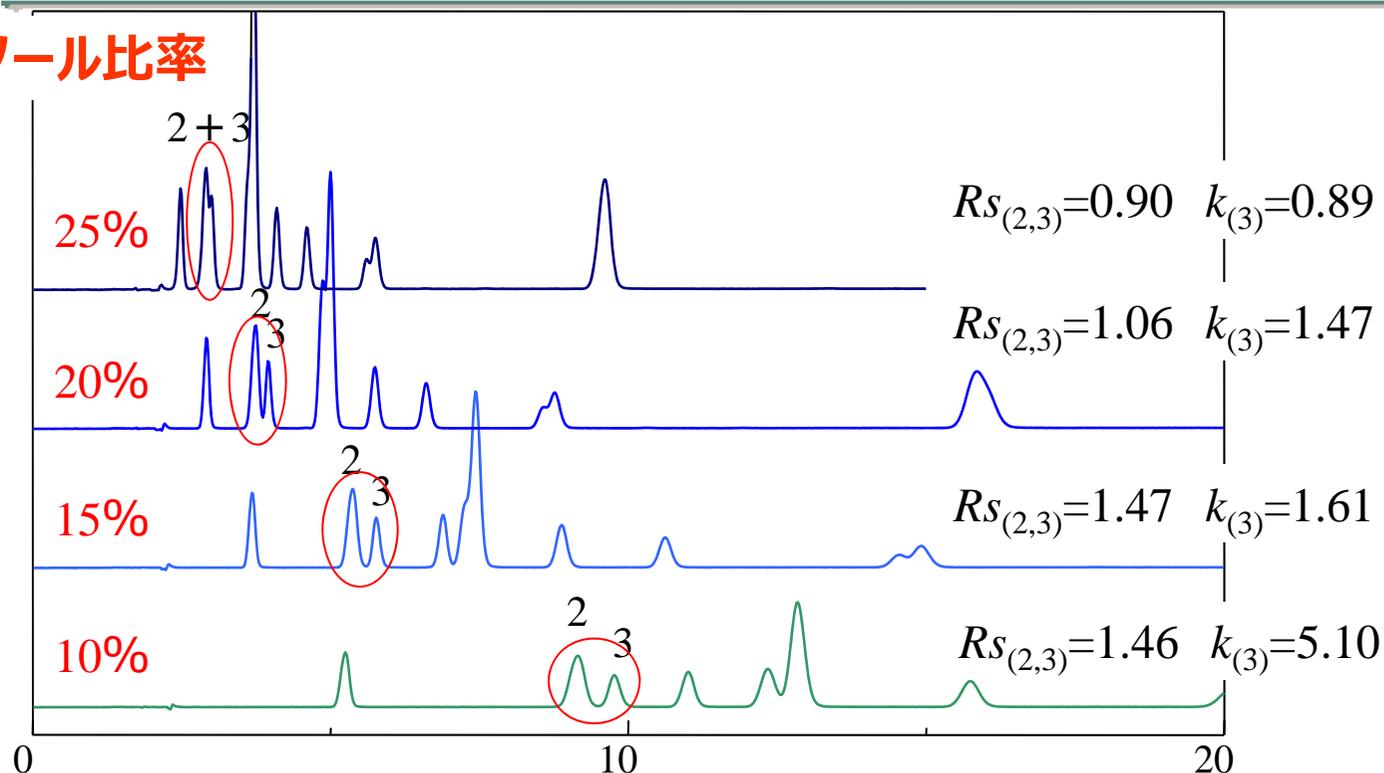
保持時間を遅くする

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

メタノール比率



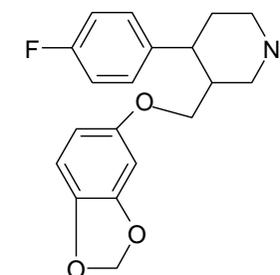
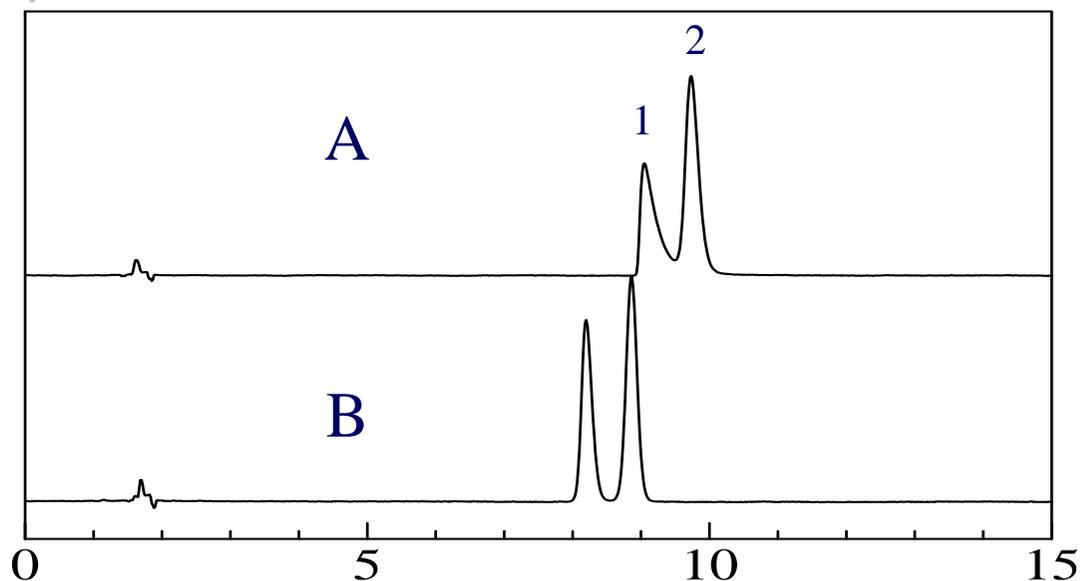
カラム : **L-column ODS** 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm

移動相 : メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム

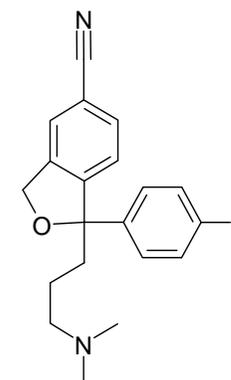
試料 : サルファ剤

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させることで分離できる

# 高度にエンドキャッピングしたカラム



1. パロキセチン



2. シタロプラム

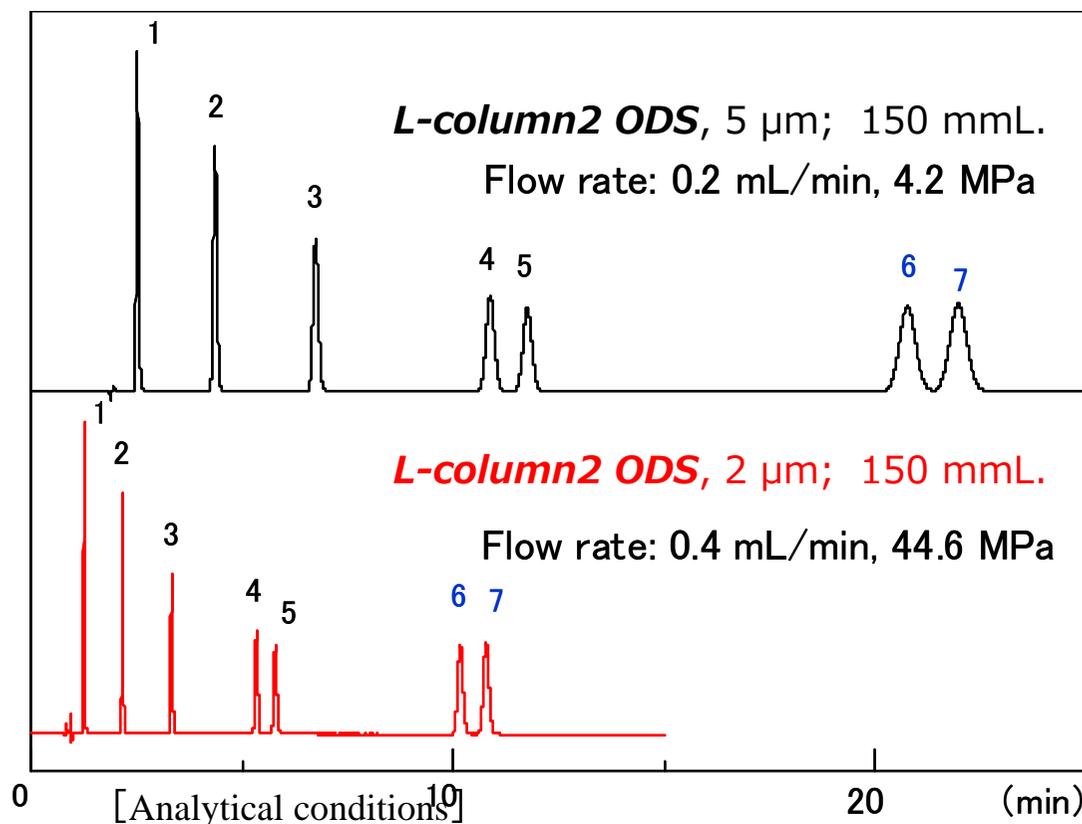
カラム : A: 他社カラム 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm

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 pH 7.0 (33/67)

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

# 分析時間の短縮



粒子径	$N_{(7)}$	$Rs_{(6,7)}$
5 $\mu$ m	12813	1.60
	^	^
2 $\mu$ m	30638	2.56
	× 2.4	× 1.6

Sample:

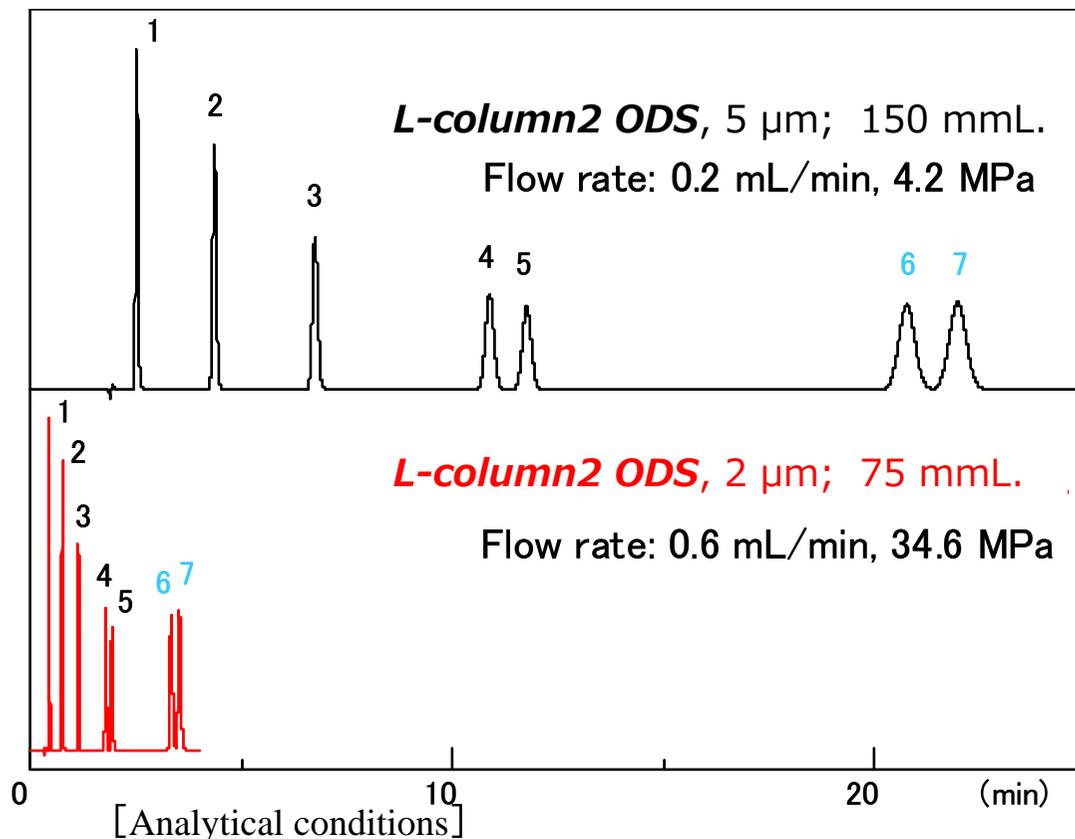
1. p-Hydroxybenzoic acid
2. Methyl p-hydroxybenzoate
3. Ethyl p-hydroxybenzoate
4. Isopropyl p-hydroxybenzoate
5. Propyl p-hydroxybenzoate
6. Isobutyl p-hydroxybenzoate
7. Butyl p-hydroxybenzoate  
in  $\text{CH}_3\text{CN}$

Column Size: 2.1  $\times$  150 mm; Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM H}_3\text{PO}_4(35/65)$

Temp.: 40°C; Inj.vol.: 0.5  $\mu$ L; System: Agilent 1200SL

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

# 分析時間の短縮



Column size: 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.: 0.5μL; System: Agilent 1200SL

粒子径	$t_{R(7)}$	$N_{(7)}$	$R_{s(6,7)}$
5μm	23.0	12813	1.60
	∇	∥	∥
2μm	3.7	13866	1.69
	×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 2μmは、分析時間が顕著に短縮  
(5μmカラムと同等の分離時)**

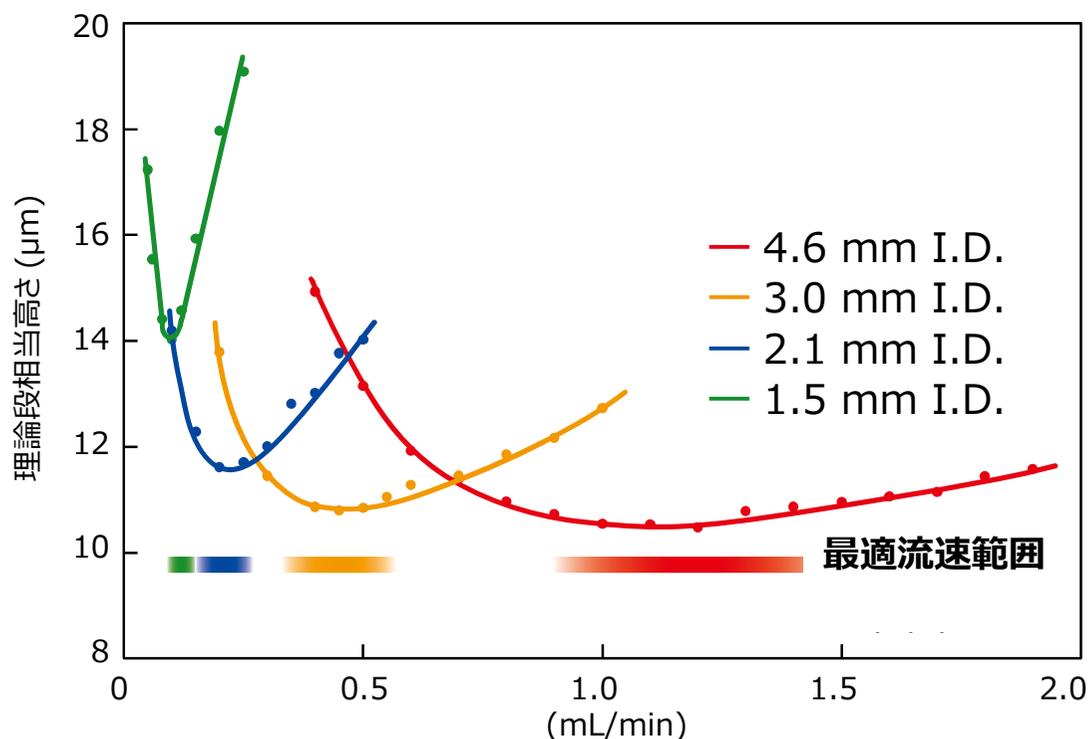
## 3. ダウンサイジング

### カラム内径による分類

内径	名称
10 mm以上、50 mm未満	セミ分取カラム
3 mm以上、10 mm未満	汎用カラム
1 mm以上、3 mm未満	セミマイクロカラム
1 mm未満	マイクロカラム

- JIS K 0124:2011より
- 0.1 mm未満をナノカラムと分類する場合も有り

# 移動相流速と理論段相当高さ



[Analytical conditions]

Column: *L-column2 ODS*, 3 μm

Column size: 150 mm L.

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60/40)

Temp.: 40°C

Detection: UV 254 nm

Inj. vol. 1 μL (in CH<sub>3</sub>CN)

Sample: Naphthalene

System: Nexera (Shimadzu Co.) セミマイクロ仕様

$$H = \frac{L}{N}$$

$H$ : 理論段相当高さ

$L$ : カラム長さ

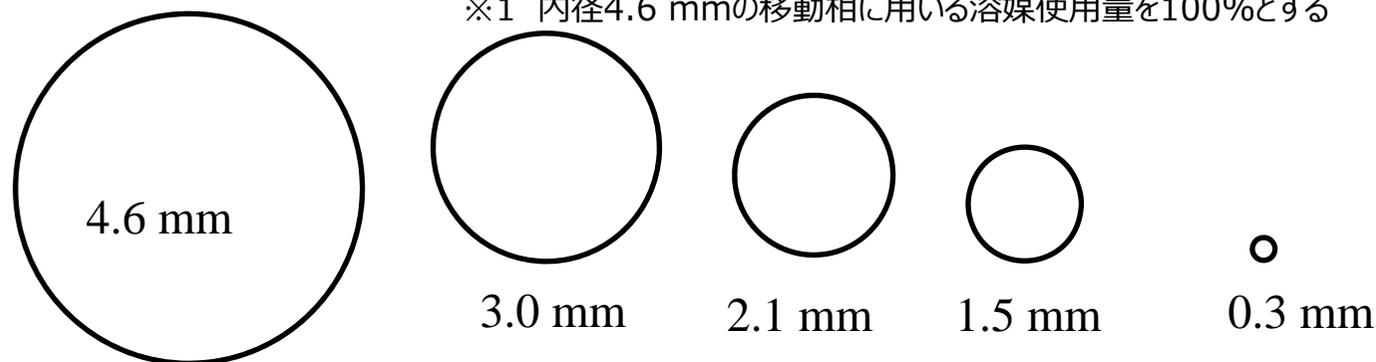
$N$ : 理論段数

- 内径を細くする = 最適な移動相流速が小さくなる
- 理論上、内径にかかわらず理論段相当高さは同じ
- 同じLCシステムで比較した場合、カラム容積に対し、フィルターや配管などの試料拡散の要因となるデッドボリュウムの割合が大きくなるため、内径が細かいほどカラム効率が低くなる = システムの最適化がポイント

# 最適流速・溶媒削減

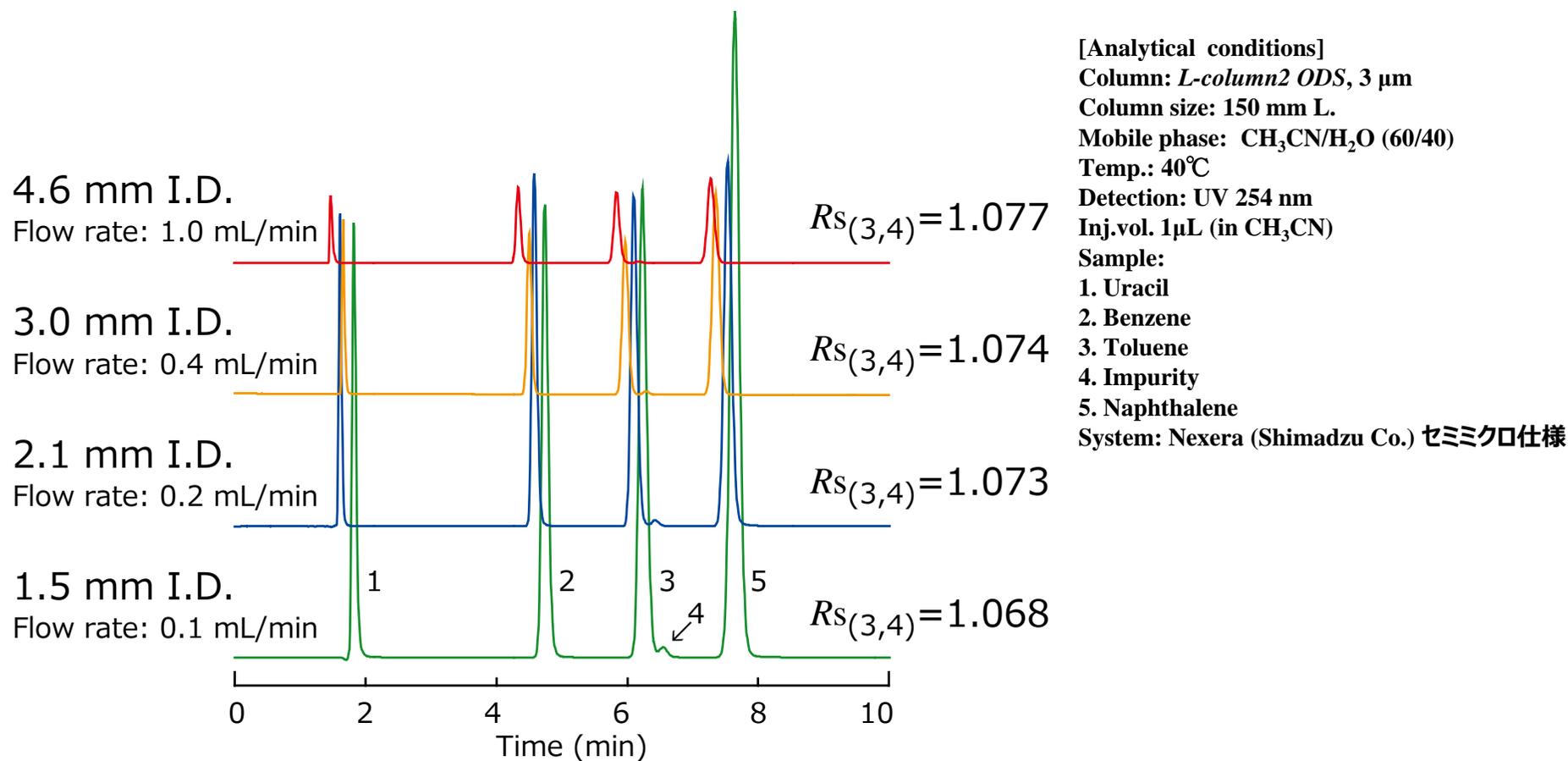
内径(mm)	断面積(mm <sup>2</sup> )	最適流速	溶媒削減率※1
4.6	16.61	1.0 mL/min	—
3.0	7.07	0.4 mL/min	60%削減
2.1	3.46	0.2 mL/min	80%削減
1.5	1.77	0.1 mL/min	90%削減

※1 内径4.6 mmの移動相に用いる溶媒使用量を100%とする



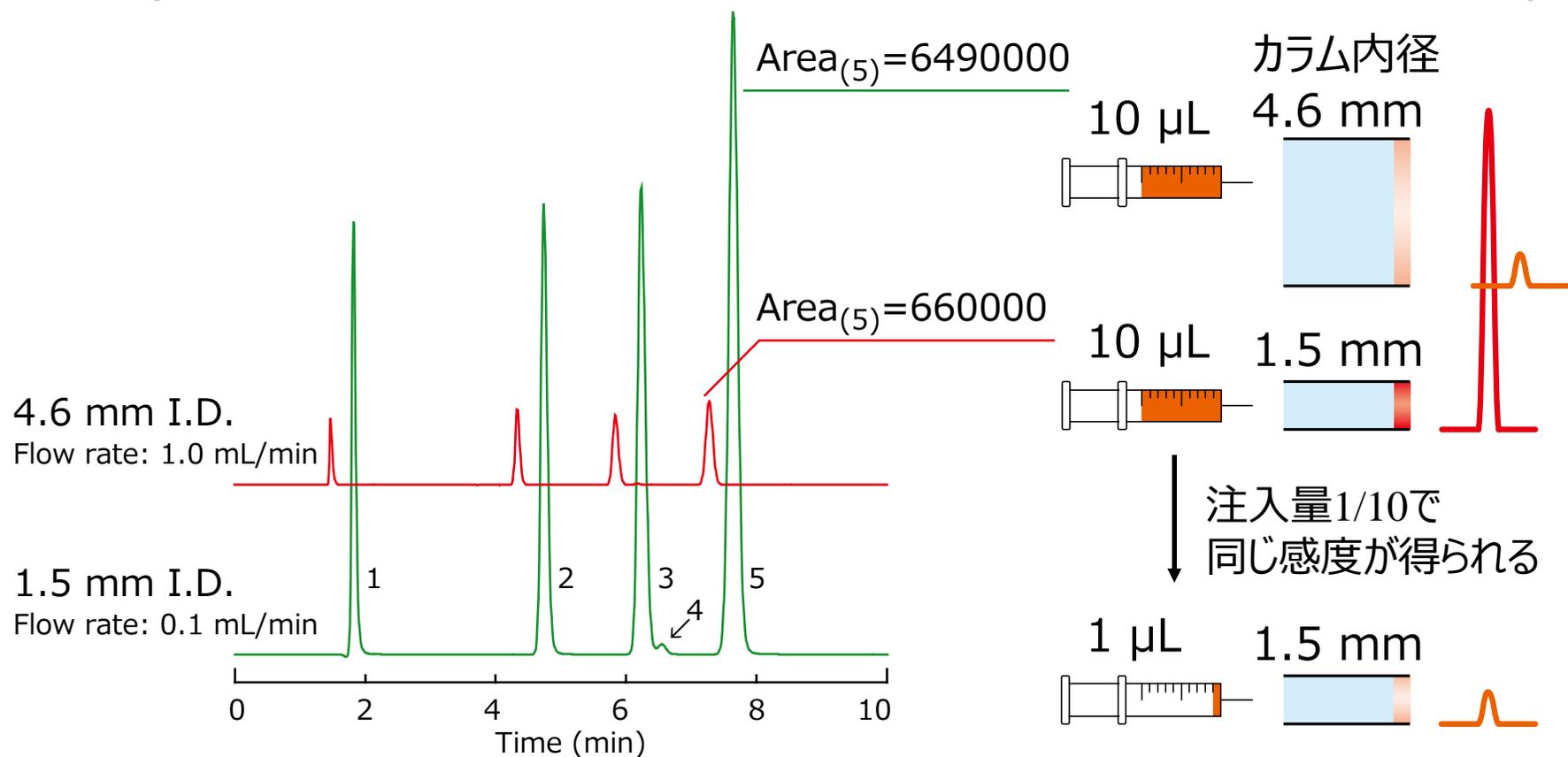
- 最適流速は、内径の断面積に比例
- 内径を細くして、最適流速で分析することで、分析からカラム洗浄や移動相置換を含めた、一連の溶媒使用量が削減できる

## 保持時間・分離度



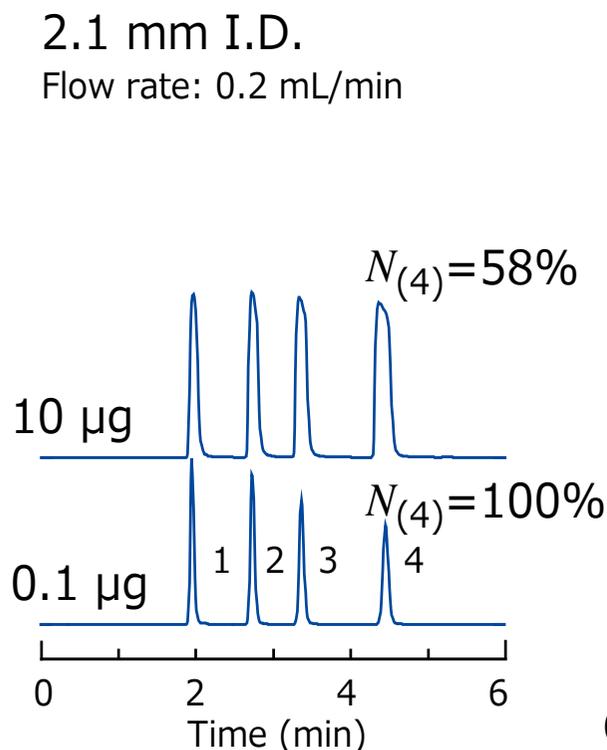
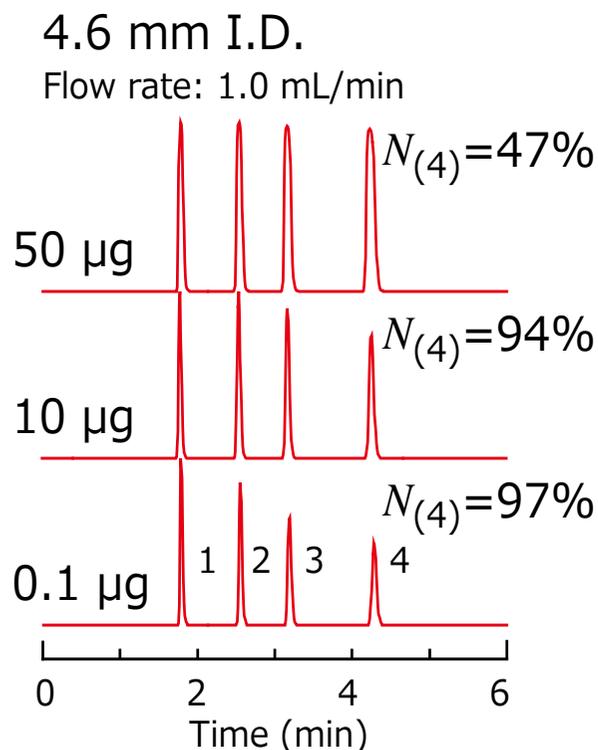
移動相線速度が同じならば、内径が異なっても保持時間や分離度は、ほとんど変わらない

# 感度



- 内径を細くする = 感度が高くなる [内径4.6mm(1) → 1.5mm(10)]
- 内径の断面積に応じて注入量は少なくできるため、試料量が制限される分析ではセミマイクロカラムが有効 = 注入量が少ないため、注入の正確性がポイント

# 試料濃度とピーク形状



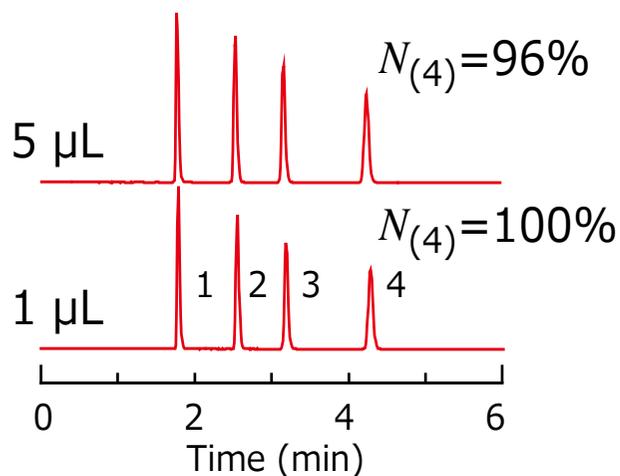
[Analytical conditions]  
 Column: *L-column2 ODS*, 3  $\mu\text{m}$   
 Column size: 150 mm L.  
 Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/$   
 20 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$  (50/50)  
 Temp.: 40°C  
 Detection: UV 280 nm  
 Inj.vol. 1  $\mu\text{L}$  (in Mobile phase)  
 Sample:  
 1. 4-Hydroxybenzoic Acid  
 2. Methyl *p*-Hydroxybenzoic Acid;  
 3. Ethyl *p*-Hydroxybenzoic Acid  
 4. *n*-Propyl *p*-Hydroxybenzoic Acid  
 System: Nexera (Shimadzu Co.) セミマイクロ仕様

0.02  $\mu\text{g}$ のときを100%とする

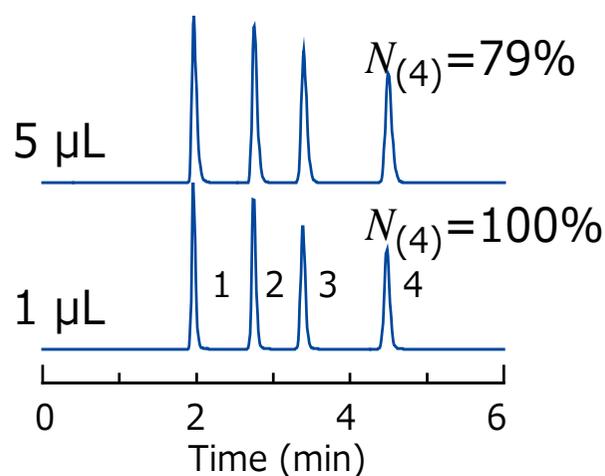
- 内径を細くする = 試料負荷量が小さくなる[内径4.6mm(1)→2.1mm(1/5)]
- 試料負荷量を超えるとピークが歪む(内径が細かいほど顕著)

# 注入量とピーク形状

4.6 mm I.D.  
Flow rate: 1.0 mL/min



2.1 mm I.D.  
Flow rate: 0.2 mL/min



[Analytical conditions]  
Column: *L-column2 ODS*, 3  $\mu$ m  
Column size: 150 mm L.  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/  
20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O (50/50)  
Temp.: 40°C  
Detection: UV 280 nm  
Inj.mass. 0.5 $\mu$ g (in Mobile phase)  
Sample:  
1. 4-Hydroxybenzoic Acid  
2. Methyl *p*-Hydroxybenzoic Acid;  
3. Ethyl *p*-Hydroxybenzoic Acid  
4. *n*-Propyl *p*-Hydroxybenzoic Acid  
System: Nexera (Shimadzu Co.) セミマイクロ仕様

1 $\mu$ Lのときを100%とする

同じ試料濃度でも、注入量の影響を受けピーク形状が悪くなることもある(内径が細かいほど顕著)

## ダウンサイジングのポイント

- 注入量(負荷量)が多いとピーク形状が悪化する  
→ 試料の注入量とその溶媒
- デッドボリュームの影響でピークが広がり、溶出時間が遅くなる  
→ カラム外体積(ミキサー、配管の内径)
- 配管等の接続が難しい  
→ nanoViper、PEEKsil

例 内径2.1 mmのカラムから1.0 mm、0.3 mm  
にダウンサイジングした

## 分析条件

システム : UltiMate3000 RSLC+3200QTRAP

カラム : *L-column2 ODS*, 3  $\mu\text{m}$

サイズ : 2.1 $\times$ 150 mm、1.0 $\times$ 150 mm、0.3 $\times$ 150 mm

移動相 : アセトニトリル/0.1%ギ酸

20/80-70/30-95/5(0-15-18 min)

流速 : 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ (2.1 mm)、50  $\mu\text{L}/\text{min}$ (1.0 mm)、5  $\mu\text{L}/\text{min}$ (0.3 mm)

温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

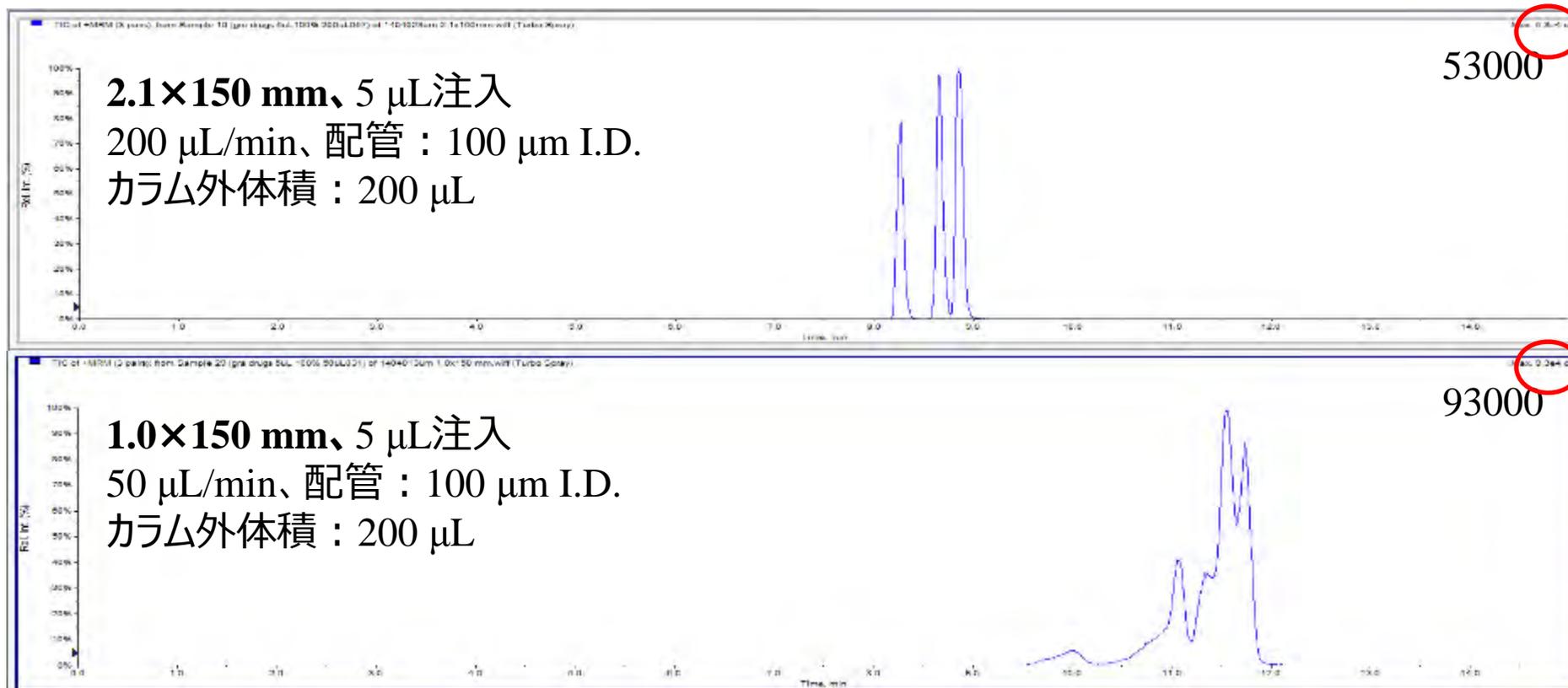
試料 : Amitriptyline、Nortriptyline、Dosulepin(100  $\mu\text{g}/\text{L}$ )

注入量 : 1  $\mu\text{L}$ (0.3 mm)、5  $\mu\text{L}$

検出 : ESI-MS(+)

# 最適化していないと

試料溶媒：アセトニトリル

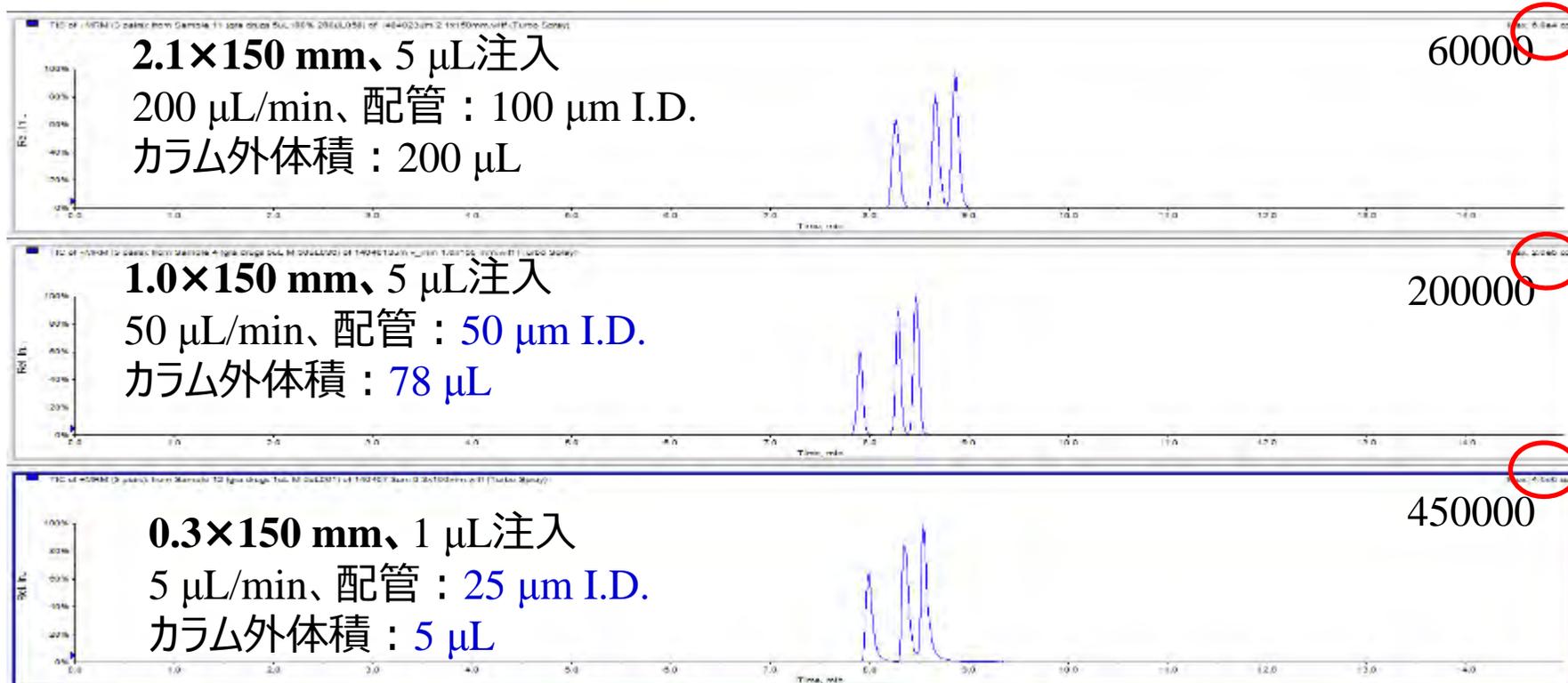


内径1.0 mmのカラムでは

- 試料溶媒の影響でピーク形状が悪化
- 保持時間の遅延

# カラム内径の違いとピーク高さ

試料溶媒：30%アセトニトリル



システムや試料溶媒を最適化すれば、カラムの内径が  
細かいほど感度が上がる

## 4. トラブルシューティング

緩衝液(塩)を使用する場合、有機溶媒比率が高いと塩が析出する

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



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

次のような時は注意・確認が必要

→ 有機溶媒と混合、グラジエント分析、カラム交換、  
ポンプが送液不良のとき

## カラムの劣化

### 化学的要因

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

### 物理的要因

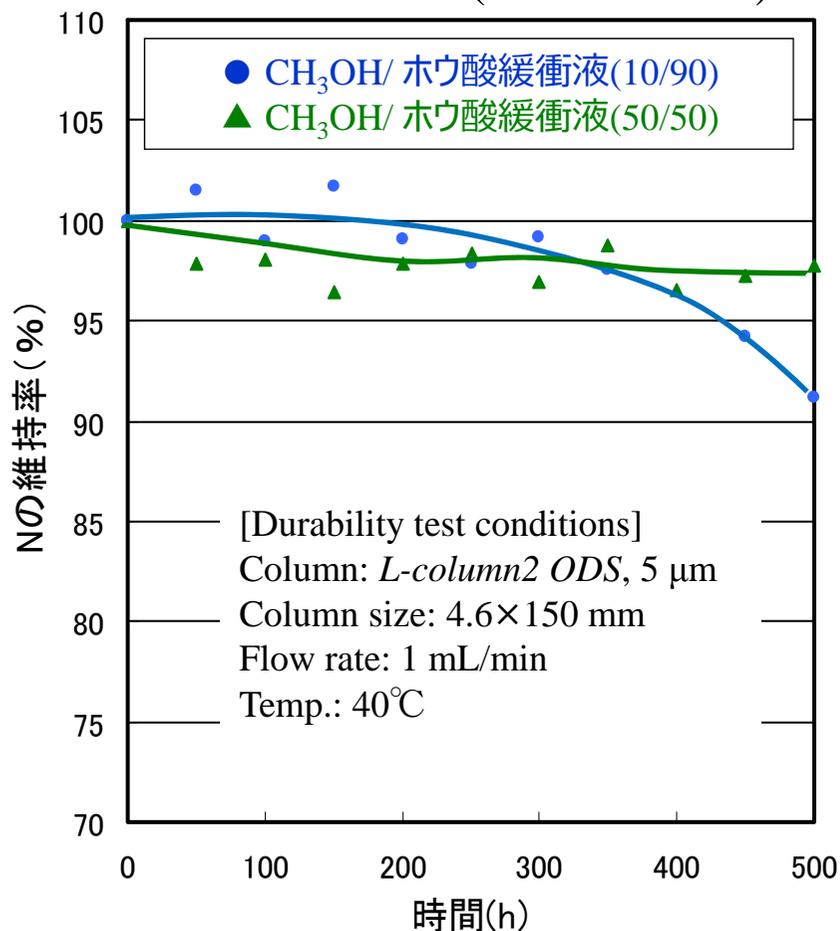
- ▶ システム、移動相、試料由来のごみなど不溶物の詰まり → カラム圧の上昇
- ▶ 緩衝液などの塩の析出 → カラム圧の上昇
- ▶ 急激な圧力変化や圧力上限以上での送液 → ボイドの発生

カラムの劣化を防ぐには

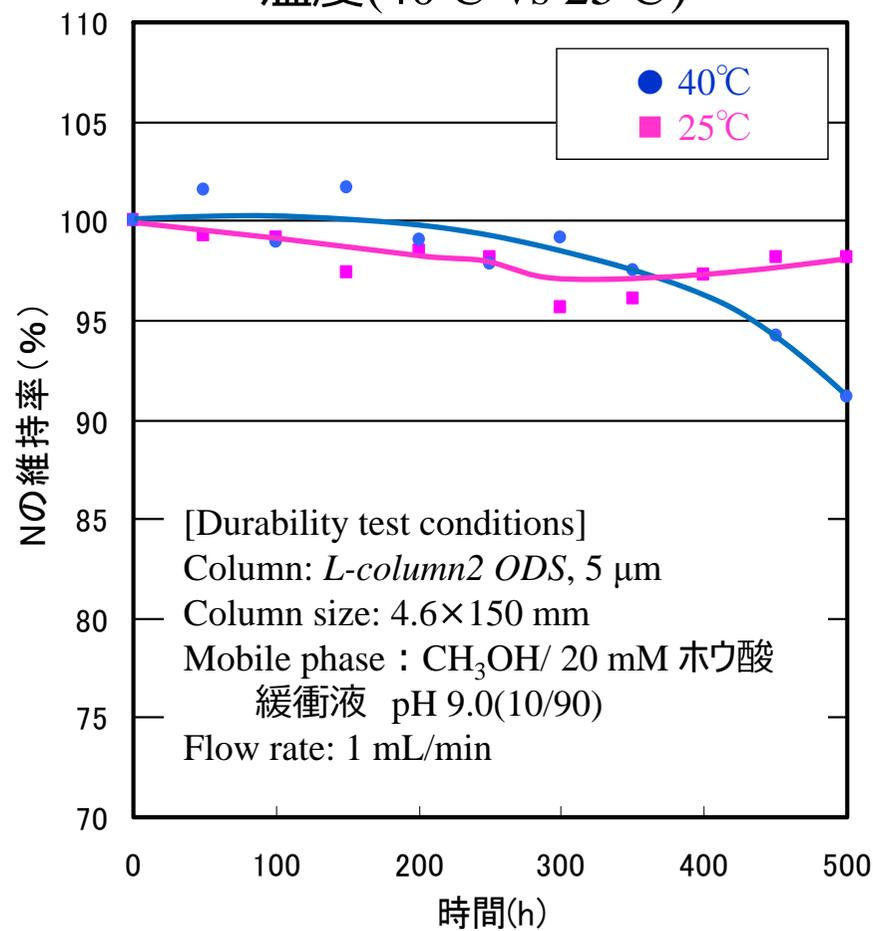
→ 移動相の条件見直し、ろ過、ガードカラム・プレカラムフィルター

# カラムの劣化 pH 9.0での有機溶媒比率と温度

メタノール比率(50% vs 10%)



温度(40°C vs 25°C)



有機溶媒比率が低い、温度が高い → 劣化しやすい

## カラムの圧力上昇

症状: カラム圧が上昇し、ピーク割れが発生

カラム: *L-column2 ODS*, 3  $\mu\text{m}$

カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

使用期間: 2~3週間(300時間以内)

移動相: アセトニトリル/リン酸緩衝液(pH 6.5) のグラジエント

試料: 医薬品など

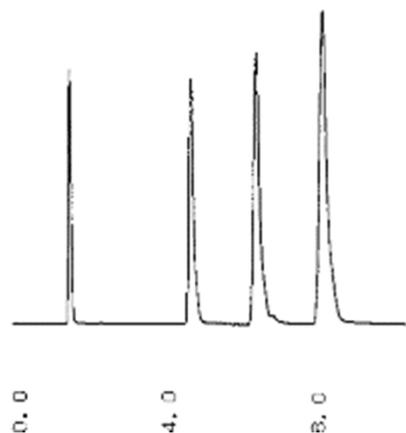
注入量: 5~10  $\mu\text{L}$

# 圧力上昇の原因は？

洗浄前

$$N_{(4)}=7000$$

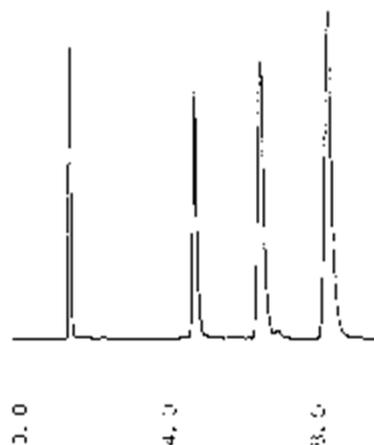
$$P=17.5 \text{ MPa}$$



洗浄後

$$N_{(4)}=8500$$

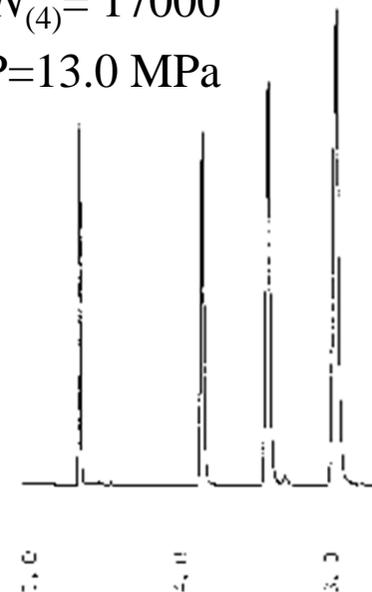
$$P=17.0 \text{ MPa}$$



フィルター交換後

$$N_{(4)}=17000$$

$$P=13.0 \text{ MPa}$$



N: 理論段数

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

原因: カラムの入口付近に不溶物が詰まり、カラムが劣化した  
試料由来？ 移動相由来？

## カラムの劣化の原因

---

### 移動相の由来

中性の緩衝液の劣化（リン酸や酢酸アンモニウムなど）

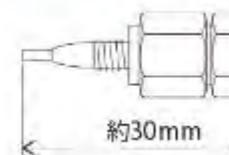
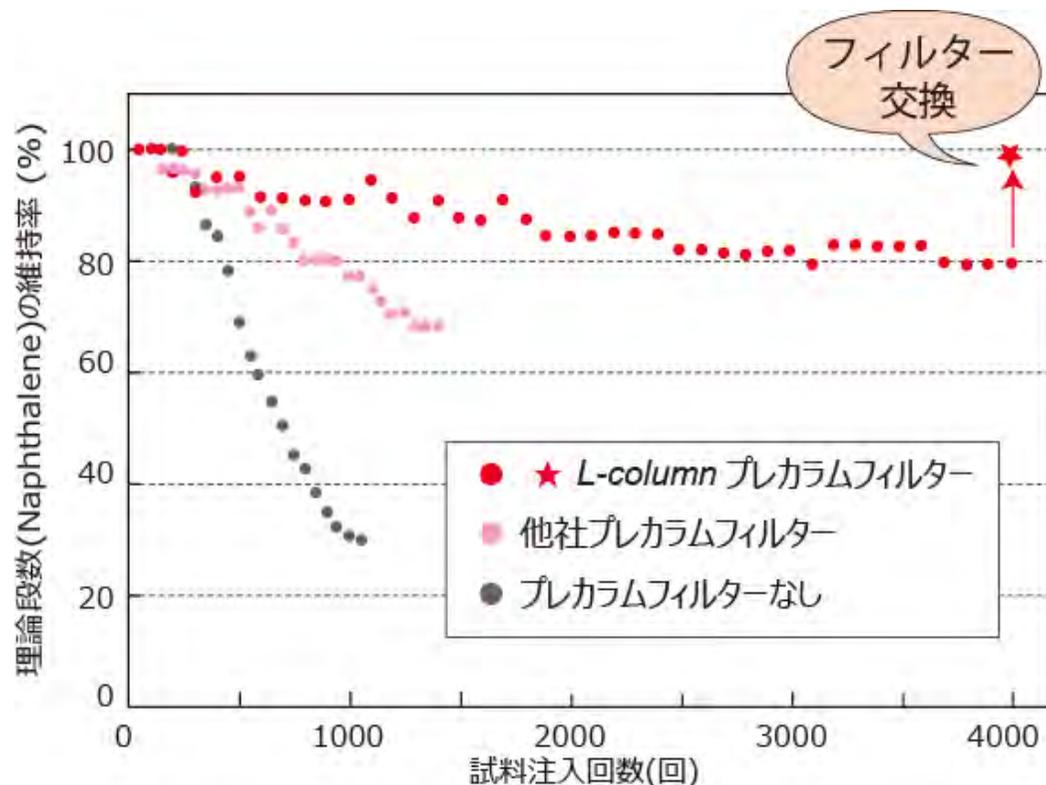
- 微生物が発生し、カラムを詰まらせる → 毎日調製

### 試料由来

前処理の不十分

- タンパク、脂質の除去 → 前処理改善
- 微粒子の除去 → ろ過

# カラムの保護



L-column プレカラムフィルター

## 【 Analytical conditions 】

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

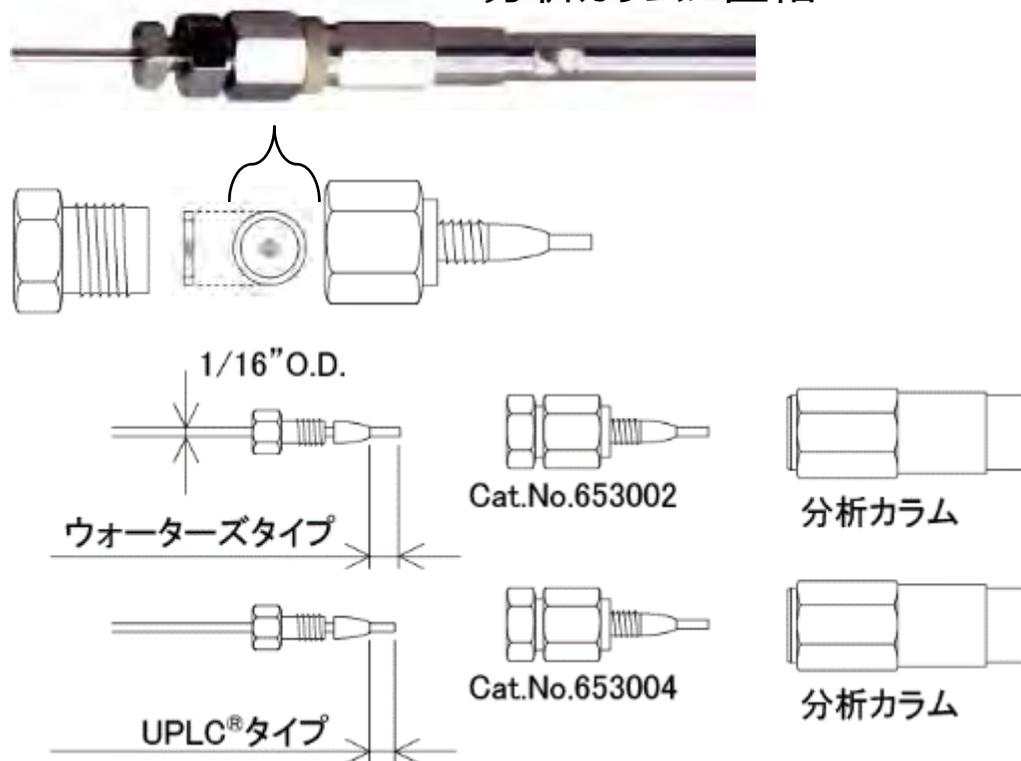
Mobile Phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60/40); Flow rate: 0.4 mL/min; Temp. 40°C; Detection: UV 254 nm;

Inj.vol: 0.5 μL; Sample: ナフタレン

プレカラムフィルターの装着によりカラムの寿命が向上する

# L-column プレカラムフィルターの構造

分析カラムに直結



- デッドボリュームが小さい → 分離に影響なし
- フィルターのみ交換可能 → 低コストで経済的
- 接続タイプの変換 → UPLC接続からウォーターズ接続へ

## 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*

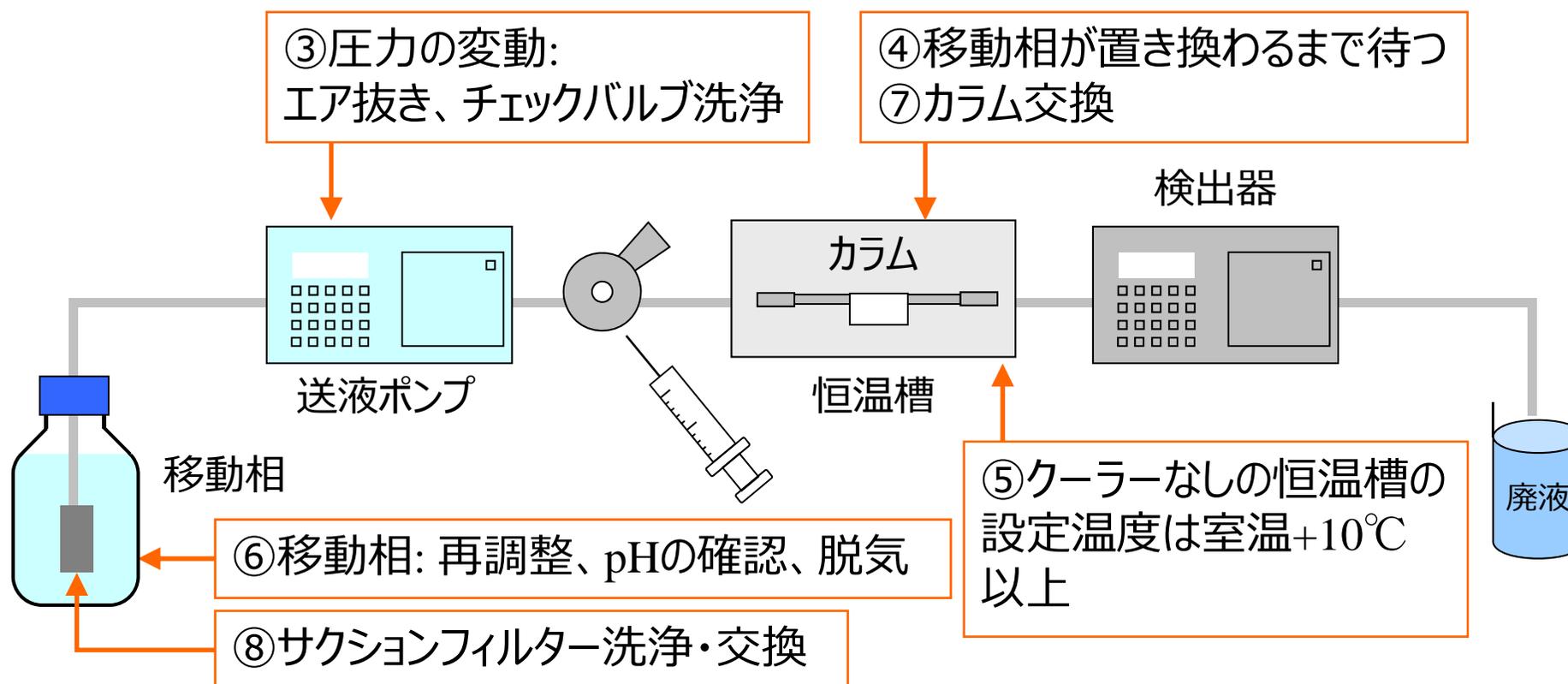
1. 塩等を取り除いた移動相 : メタノール/水 20/80
2. 有機溶媒の濃度を上げた移動相 : メタノール/水 60/40
3. 有機溶媒100%の移動相 : メタノール 100%

- 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)
- 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)

# 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



# ピーク面積の変化

対処方法:

- ① 注入の確認
- ② サンプルの確認

