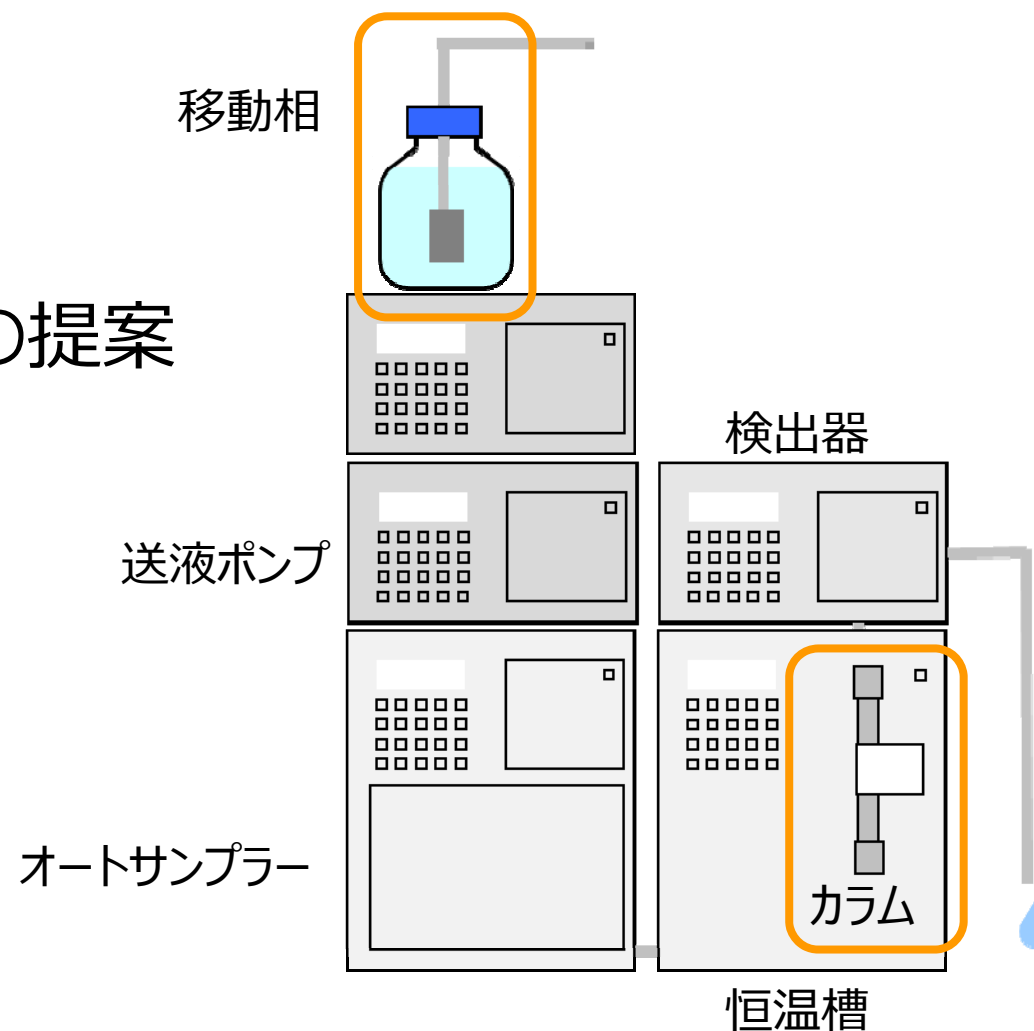


ワンランク上の逆相HPLC分析のために LCからLC/MSまで

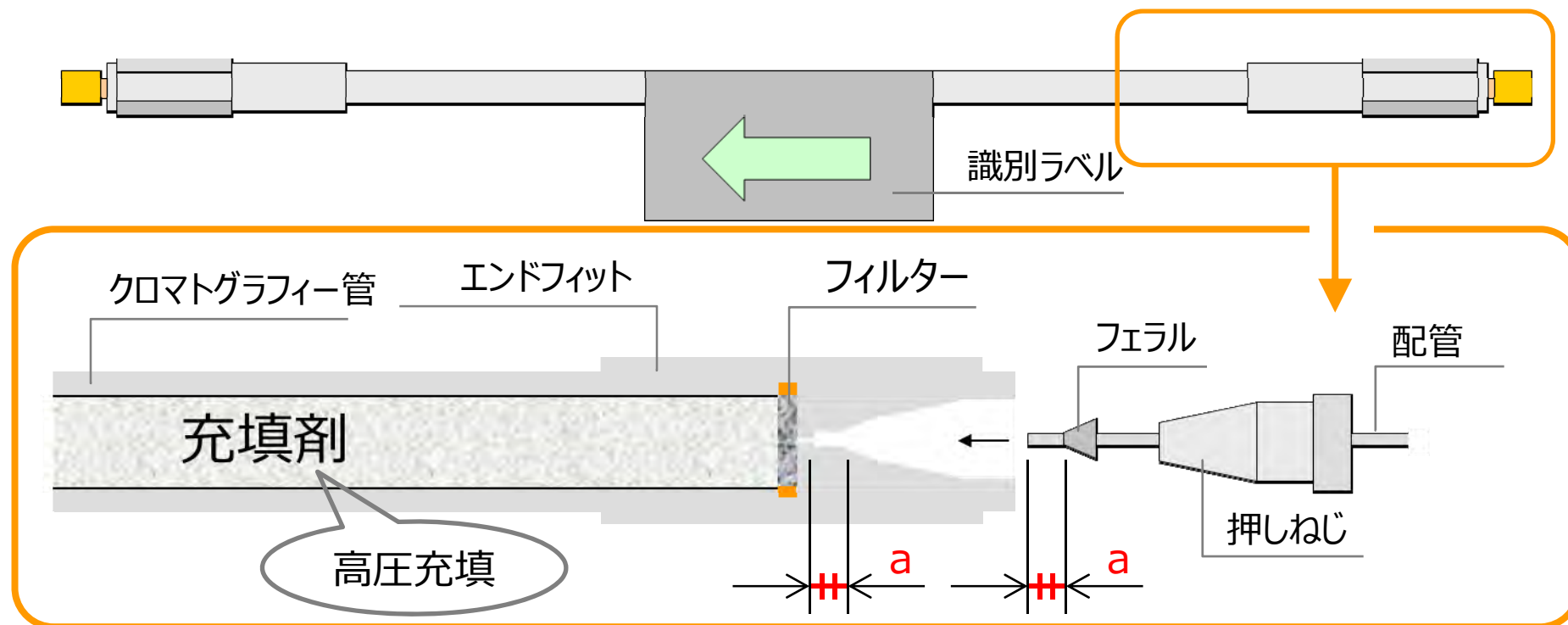
一般財団法人化学物質評価研究機構
クロマト技術部

目次

1. カラム
2. 移動相
3. よりよい分析メソッドへの提案



カラムの構造

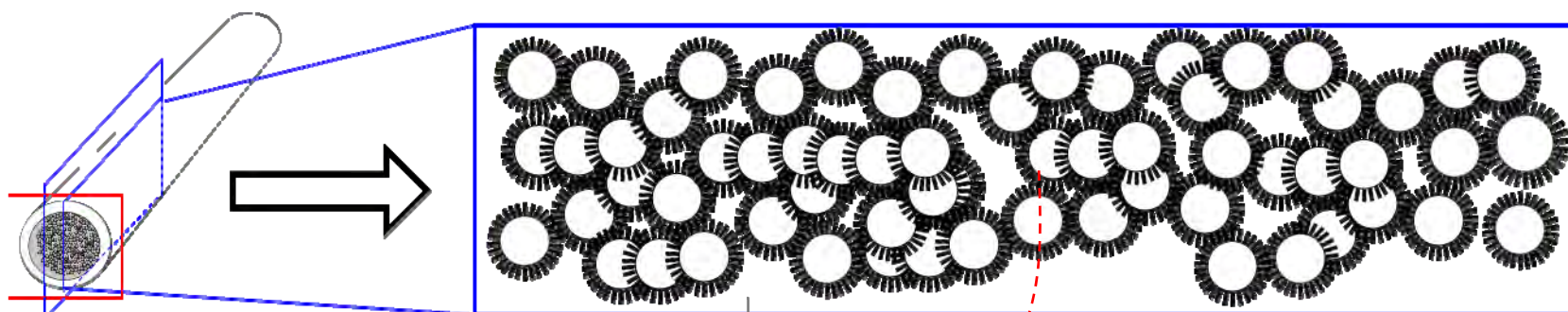


【クロマトグラフィー管の材質】
 ステンレス
 エーテルエーテルケトン(PEEK)
 etc.

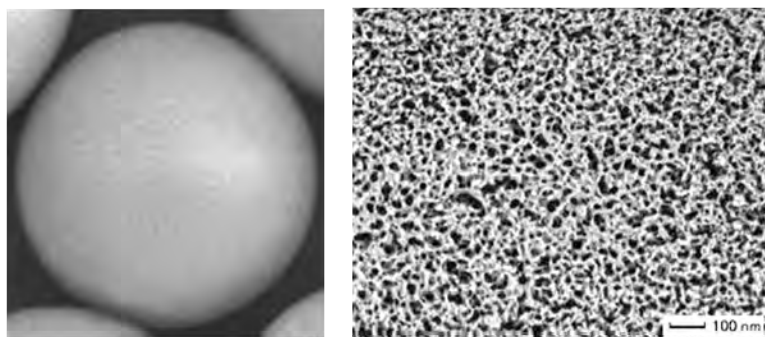
【接続の種類】
 接続タイプ : a の長さ
 ウォータース接続 : 約 3.5 mm
 島津接続 : 約 2.3 mm

充填剤

カラム断面図(イメージ)



充填剤が高压充填

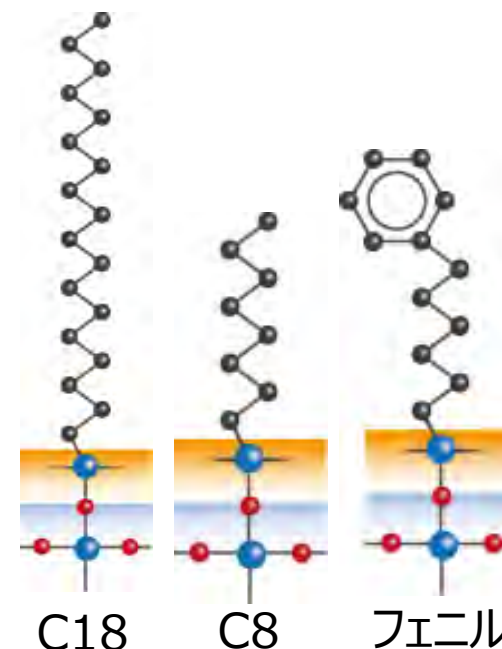


シリカゲル粒子(左)と表面の細孔(右)

基材(粒子径：1～20 μm)



修飾基

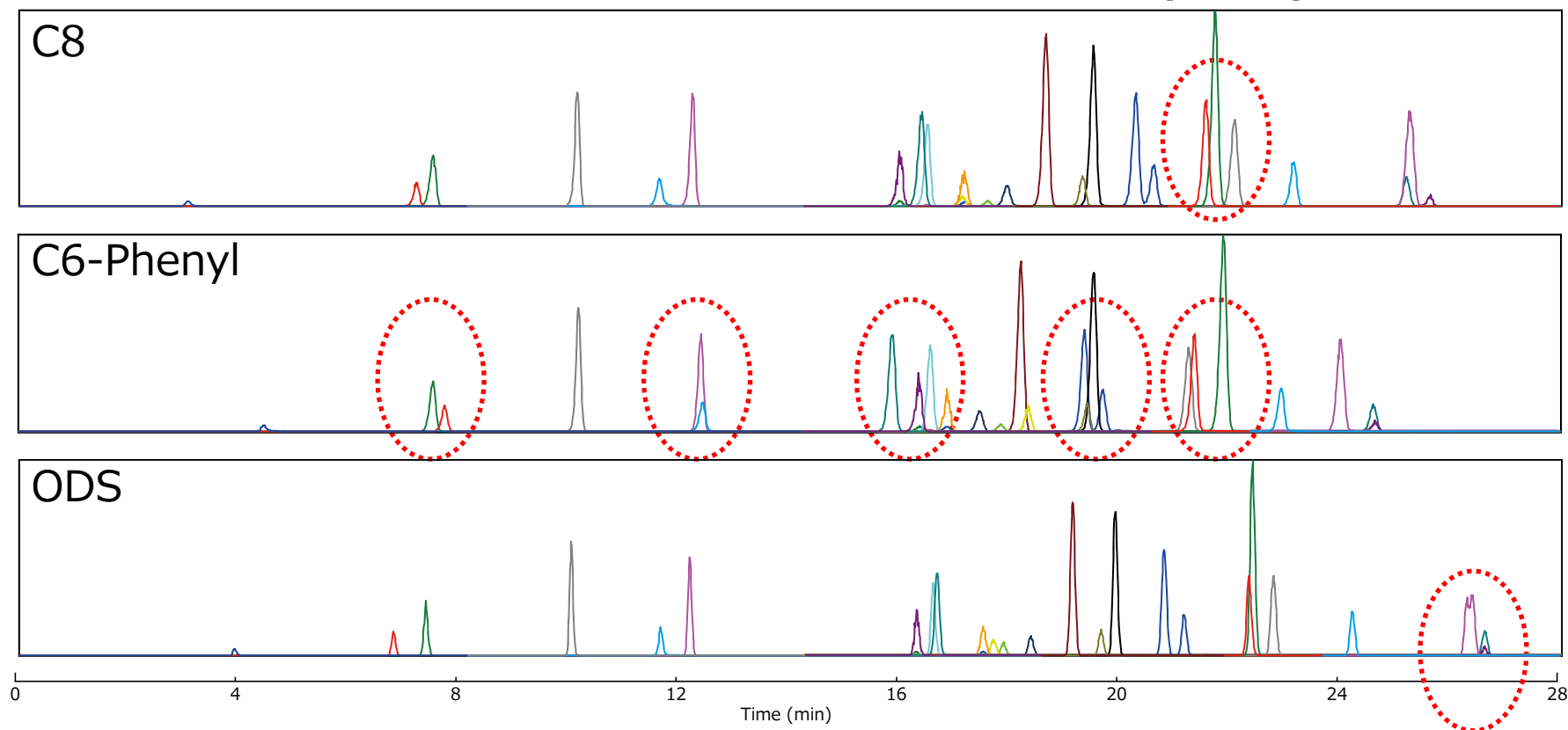


カラムの選択

		種類	ポイント
充填剤	修飾基	C18 C8、C4 フェニル	ファーストチョイス 分析時間の短縮 分離(π - π 相互作用)
	エンドキャッピング	TMS (多くは非公開)	塩基性物質のピーク形状
	粒子径	サブ 2 μ m 3 μ m 5 μ m	高分離、スピード 汎用 汎用
サイズ	長さ	50 mm 100~150 mm 250 mm	スピード 汎用 高分離

充填剤の違いによる分離パターンの比較

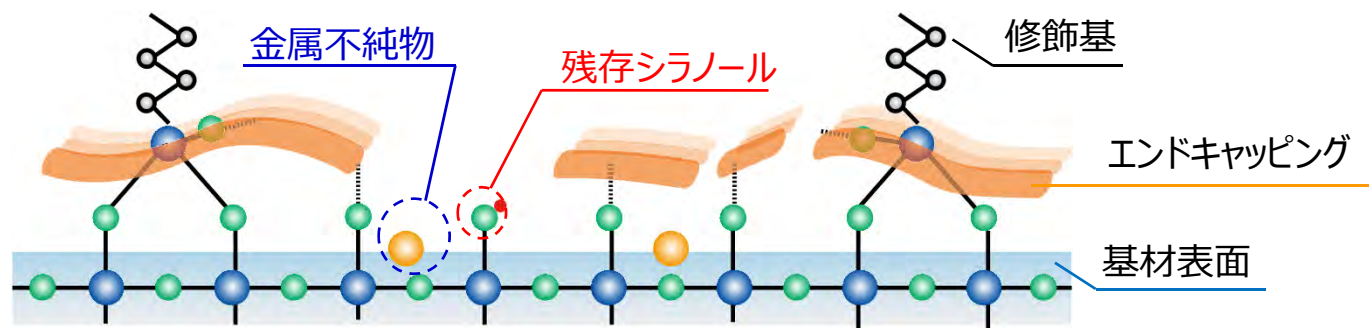
水道水の水質管理目標設定項目 別添方法18 (農薬)



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

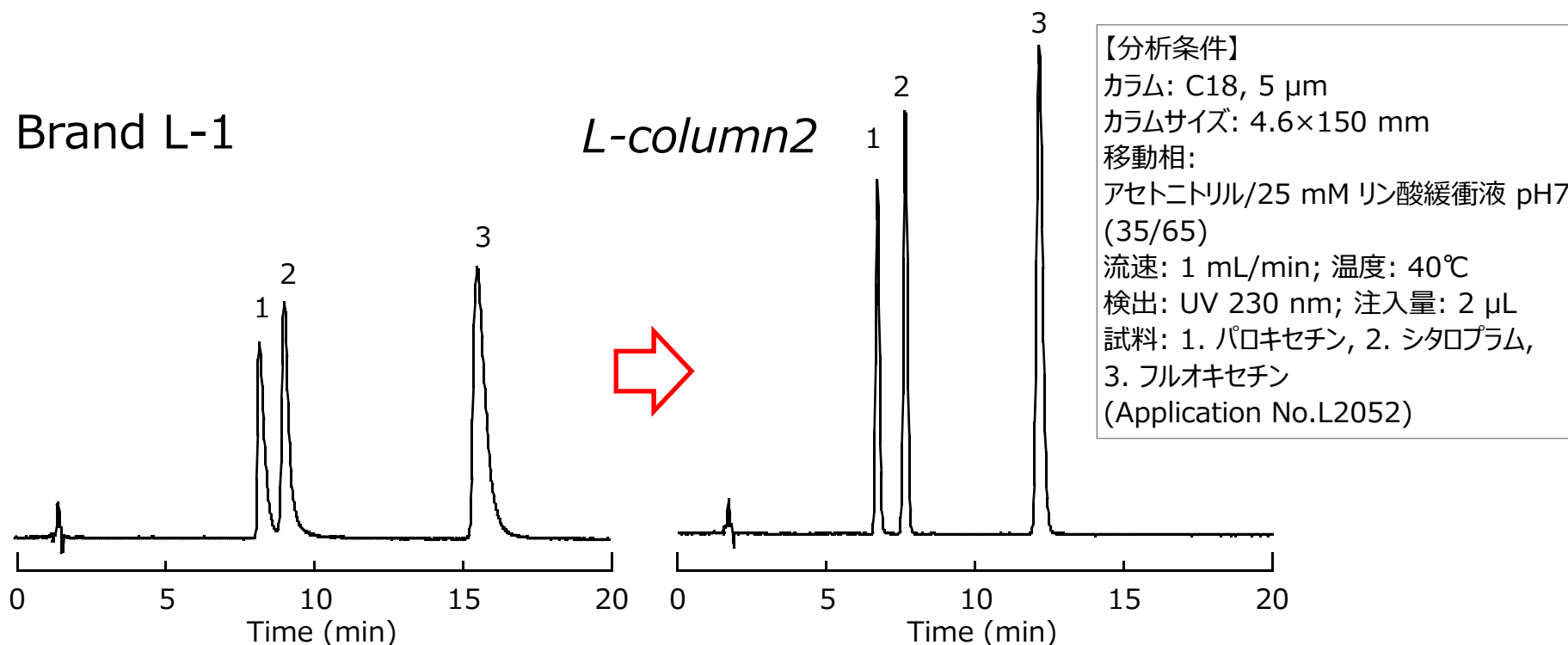
エンドキャッピングの重要性

エンドキャッピング ✕ (残存シラノールが僅かに存在)	エンドキャッピング ◎ (残存シラノール≒0)
塩基性物質、配位性化合物が テーリング、不検出	塩基性物質、配位性化合物が シャープに検出
ロット間差が拡大	ロット間差が低減
耐久性の低下	高耐久性



使いやすいカラムであるためには
エンドキャッピングが優れていることが基本

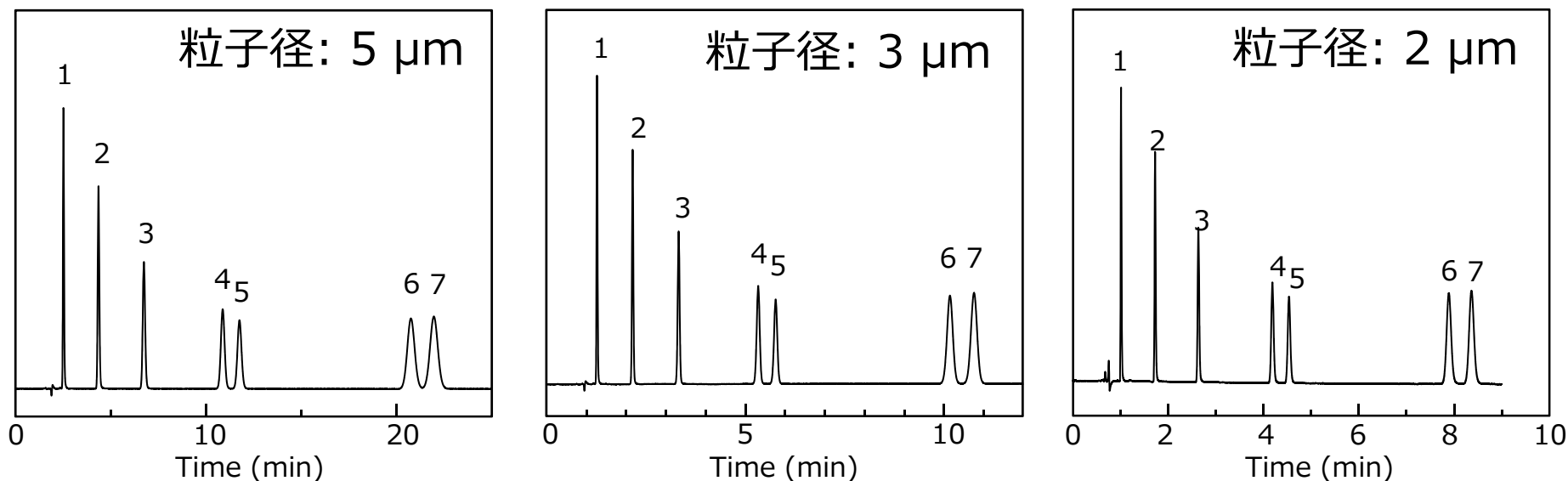
エンドキャッピングの差による分離・ピーク形状の違い



	$N_{(2)}$	$Rs_{(1,2)}$
Brand L-1	6400	2.05
<i>L-column2</i>	14900	3.99

エンドキャッピングが優れたカラムへ変更することで分離・テーリングが改善

充填剤の粒子径の微小化

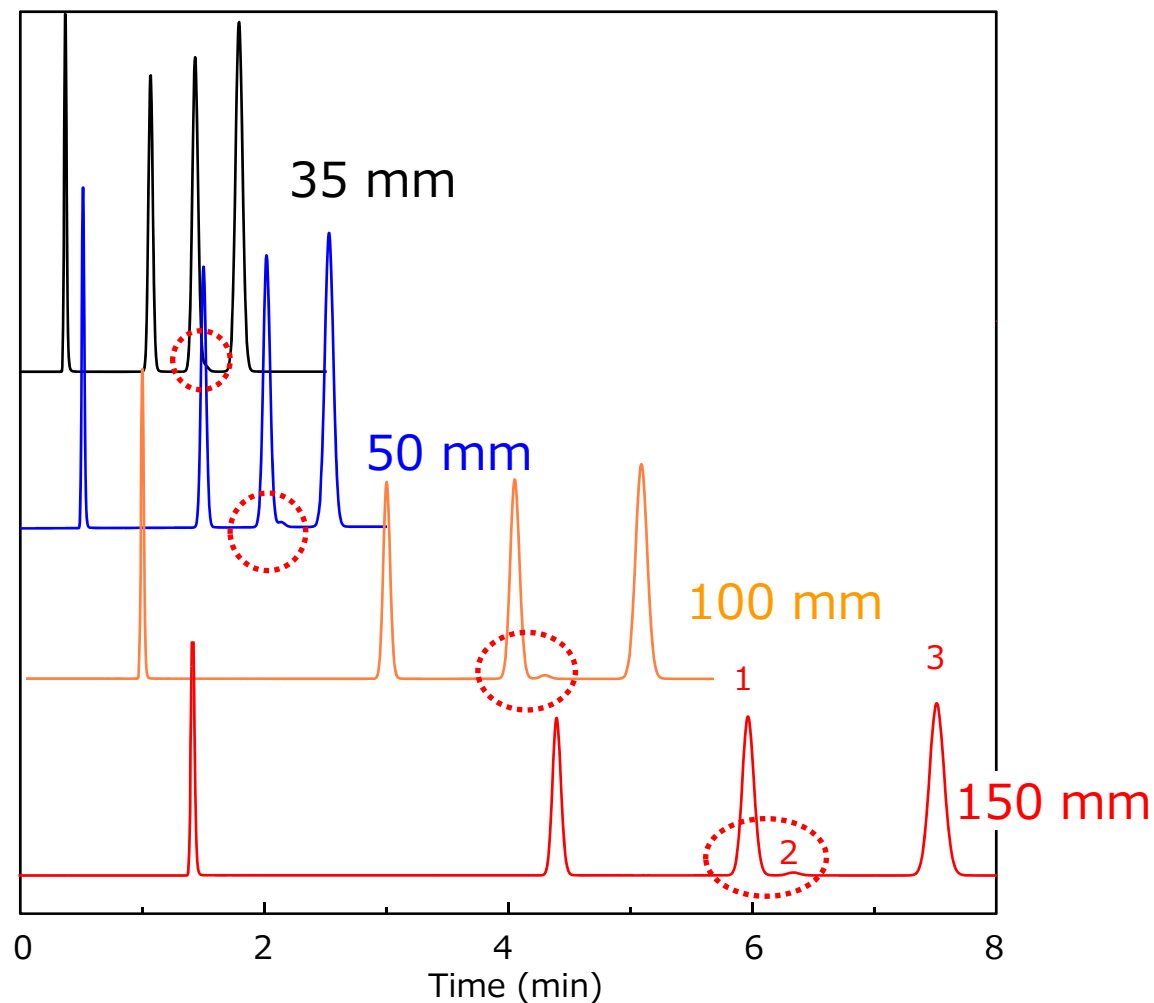


	流速(mL/min)	$t_{R(7)}$ (min)	$N_{(7)}$	$Rs_{(6,7)}$	P(MPa)
5 μm	0.2	22.0	12813	1.60	4.0
3 μm	0.4	10.8	21543	2.13	23.5
2 μm	0.5	8.4	30619	2.55	54.2

【分析条件】カラム: L-column2 ODS; カラムサイズ: 2.1×150 mm; 移動相: アセトニトリル/20 mM リン酸(50/50); 温度: 25℃
 検出: UV 254 nm; 注入量: 0.5 μL ; 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

カラムの長さの違いによる分離の比較



【分析条件】

カラム: *L-column2* ODS, 5 μ m
カラムサイズ: 4.6 mm I.D.
移動相: アセトニトリル/水(60/40)
流速: 1 mL/min
温度: 40°C
検出: UV 254 nm
注入量: 1 μ L
試料: 1. トルエン, 2. 不純物,
3. ナフタレン

カラム長さ	$R_{S(1,2)}$
35 mm	0.47
50 mm	0.65
100 mm	1.69
150 mm	1.99

カラムを長くすることで分離が改善

移動相の調製

有機溶媒と水 を混合したもの

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

※1 解離性物質の分析に使用する。

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

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

有機溶媒の選択

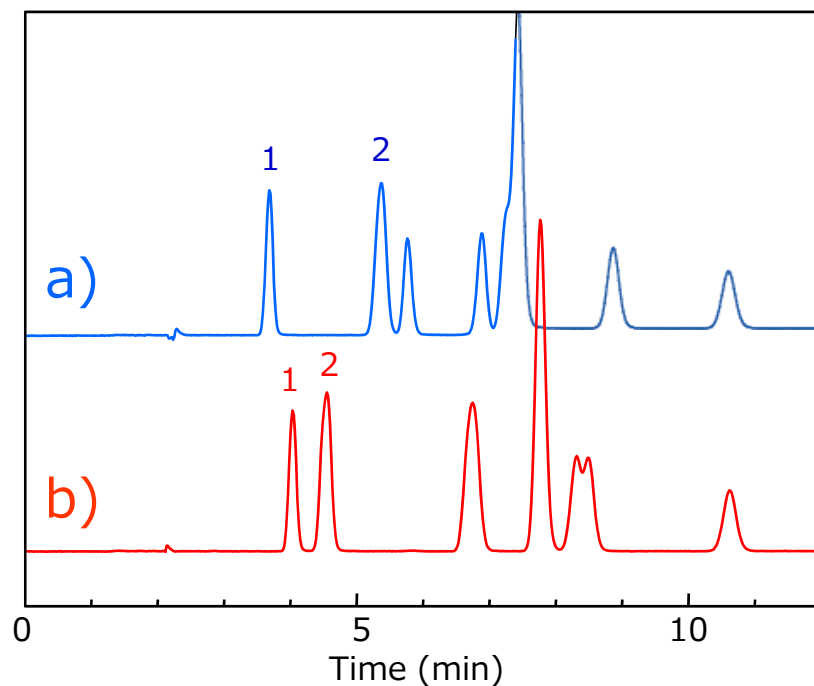
種類	長所	短所	備考
アセトニトリル	カラム圧が低い。 UV吸収が低い。		最も汎用 3 μm 以下のカラムに最適
メタノール	安価	UV吸収がある。 カラム圧が高くなる。	UV 250 nm以上の波長
テトラヒドロフラン	溶出力：大	PEEKチューブを 劣化させる。	試料が溶出しないときや、 分離パターンを変えたいとき
イソプロパノール エタノール	溶出力：大	カラム圧が高くなる。	試料が溶出しないときや、 分離パターンを変えたいとき



HPLC用溶媒以上のグレードを使用すること

それ以外のグレードを使用する際は、分析目的に適しているか確認する

有機溶媒の変更



a)メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム
(15/85)

$$R_{S(1,2)} = 6.58$$

b)アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム
(10/90)

$$R_{S(1,2)} = 1.90$$

【分析条件】 カラム: *L*-column ODS, 5 μ m; カラムサイズ: 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

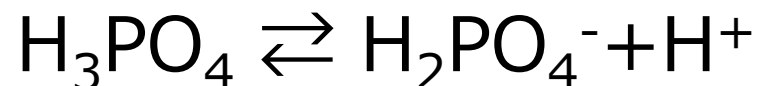
緩衝液とは？

酸又は塩基を加えた時や希釈した時に
pHの変化を緩和する作用を持つ溶液

弱酸 + 共役塩基 H_3PO_4 と H_2PO_4^-
or

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)



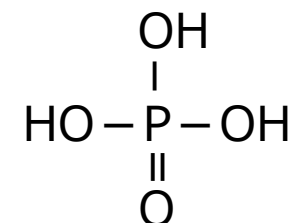
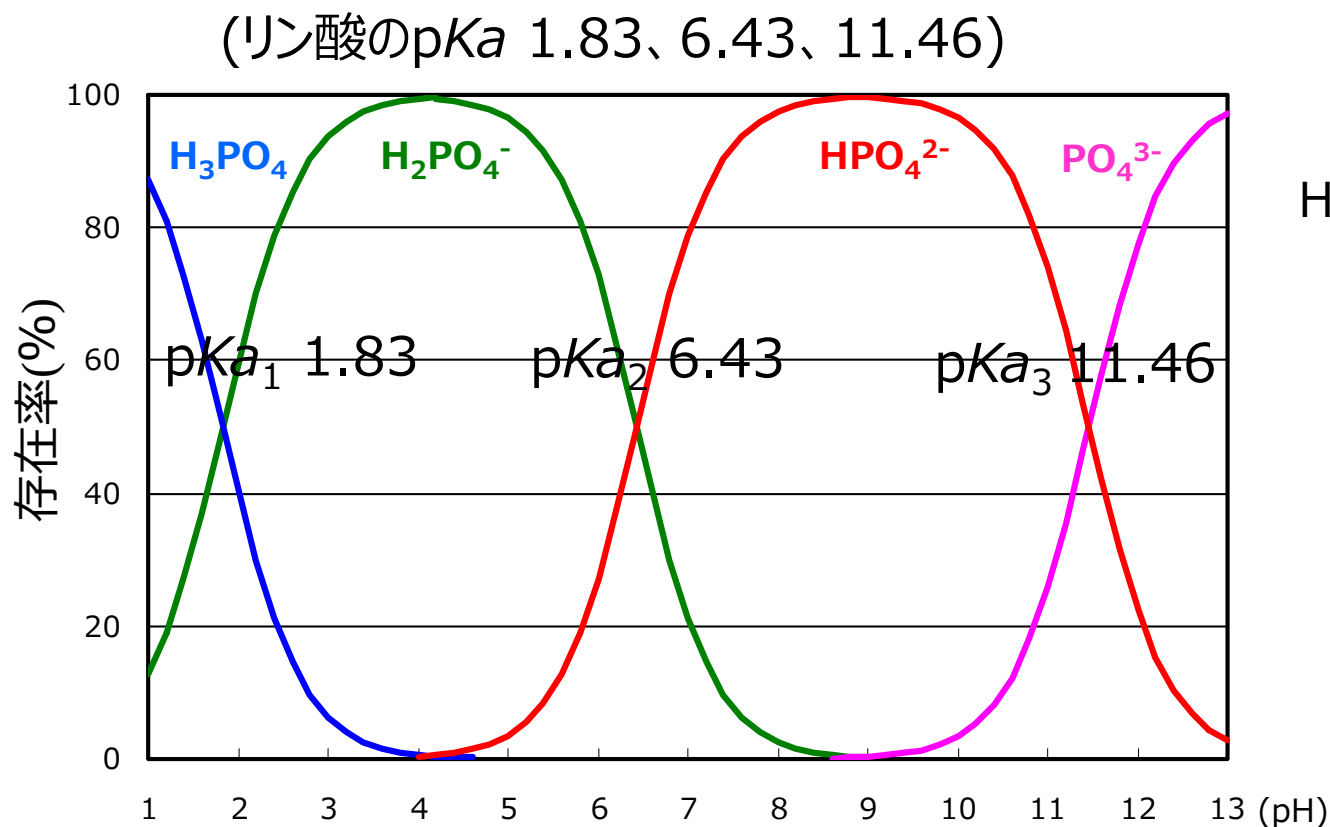
代表的な緩衝液

添加剤	MS	pKa	pHの有効緩衝範囲	推奨使用条件
ギ酸	○	3.54	2.5~4.5	0.05~0.5%
酢酸	○	4.76	3.8~5.8	0.1~1.0%
重炭酸アンモニウム	○	9.87(HCO 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
リン酸	×	1.83 6.43 11.46	1.0~2.8 5.4~7.4	5~50 mM
ホウ酸	×	9.24	8.2~10.2	

(液クロ文の巻及び化学便覧第5版より)

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

リン酸の解離、非解離状態の存在率



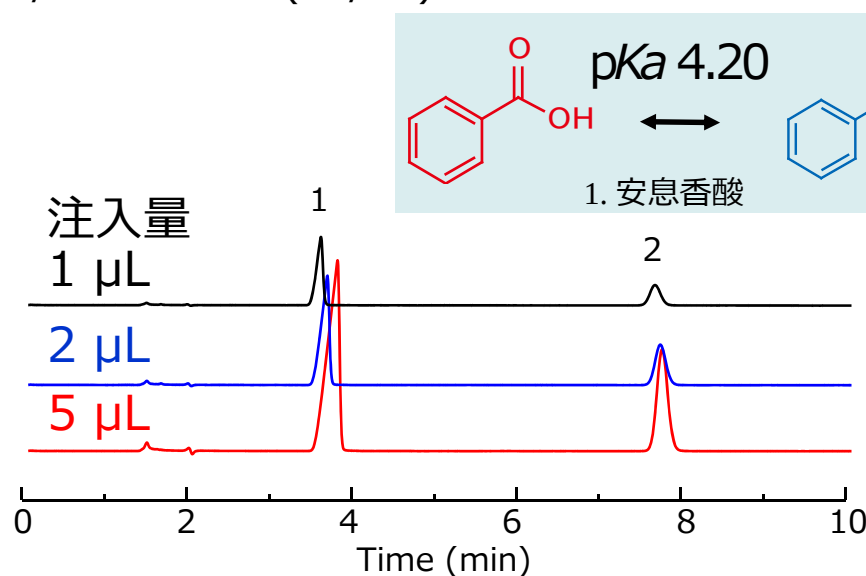
緩衝作用が働く条件

- 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

緩衝液の効果

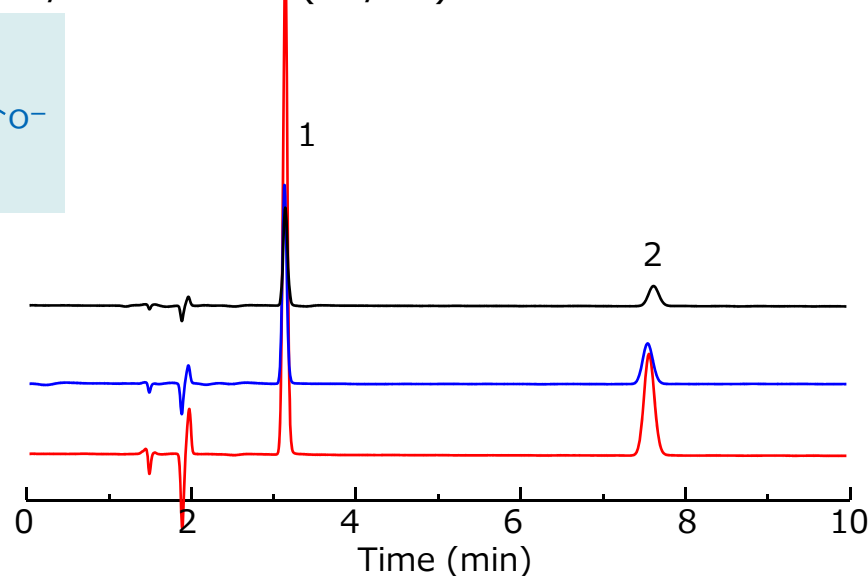
a) 緩衝能なし

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



b) 緩衝能あり

20 mM 酢酸緩衝液 pH 4.4
/アセトニトリル (75/25)



【分析条件】 カラム: *L-column2 ODS*, 5 μ m; カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 m
移動相: a) 20 mM リン酸二水素カリウム溶液 pH4.4/アセトニトリル(75/25), b) 20 mM 酢酸緩衝液 pH4.4/アセトニトリル(75/25)
注入量: 2 μ L; 試料: 1. 安息香酸(100 mg/L), 2. メチルパラベン(100 mg/L)

- ・ ピーク形状がシャープ
- ・ 注入量の変化に対し保持時間が安定

緩衝液の効果

緩衝能の有無がロット間の再現性に及ぼす影響

ロット番号	緩衝能なし a)20 mM リン酸二水素カリウム		緩衝能あり b)20 mM 酢酸緩衝液	
	安息香酸の保持時間 (min)	R_s (1,2)	安息香酸の保持時間 (min)	R_s (1,2)
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

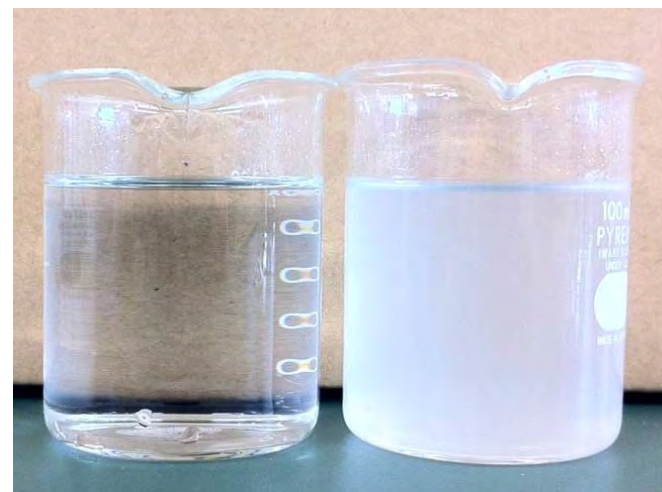
【分析条件】 カラム: *L-column2 ODS*, 5 μ m; カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 m
 移動相: a)20 mM リン酸二水素カリウム溶液 pH4.4/アセトニトリル(75/25), b)20 mM 酢酸緩衝液 pH4.4/アセトニトリル(75/25)
 注入量: 2 μ L; 試料: 1. 安息香酸(100 mg/L), 2. メチルパラベン(100 mg/L)

解離性物質の保持時間や分離度の再現性を改善できる

緩衝液の析出

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)

次のようなときは、注意・確認が必要

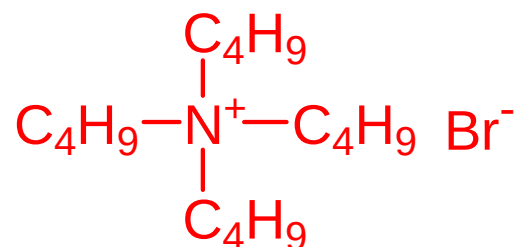
→ 有機溶媒と混合するとき、グラジエント分析のとき
カラム交換するとき、ポンプが送液不良のとき

イオン対クロマトグラフィー

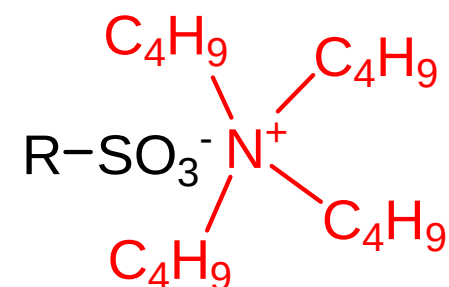
スルホン酸



pHを酸性にしても、
解離を抑えることができない



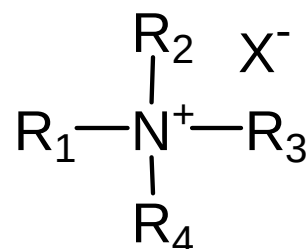
テトラブチルアンモニウム(TBA)ブロマイド



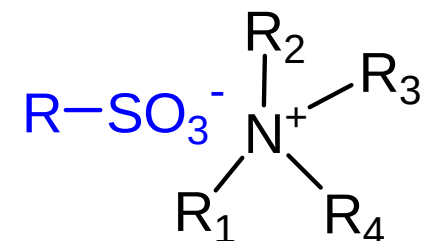
イオン対形成

電荷を打ち消しあって
疎水性が増加する

第四級アンモニウムイオン



アルキルスルホン酸ナトリウム



pHで解離を抑えることはできない

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	×	$NaClO_4$	水に易溶 アルコールに溶けやすい
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 スフェート(TBA-P)	×	$(C_4H_9)_4N, H_2PO_4$	Cl、Brなどの塩がある
ジアルキルアミン	○	$(C_nH_{2n+1})_2NH$	$3 \leq n \leq 6$

* 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

酸性物質の分析のための移動相

酸性移動相

- ▶ 酸性物質を非解離の状態で分析する
 - メリット : 保持、負荷量の増加
 - デメリット : なし

中～弱アルカリ性移動相(分離しないとき)

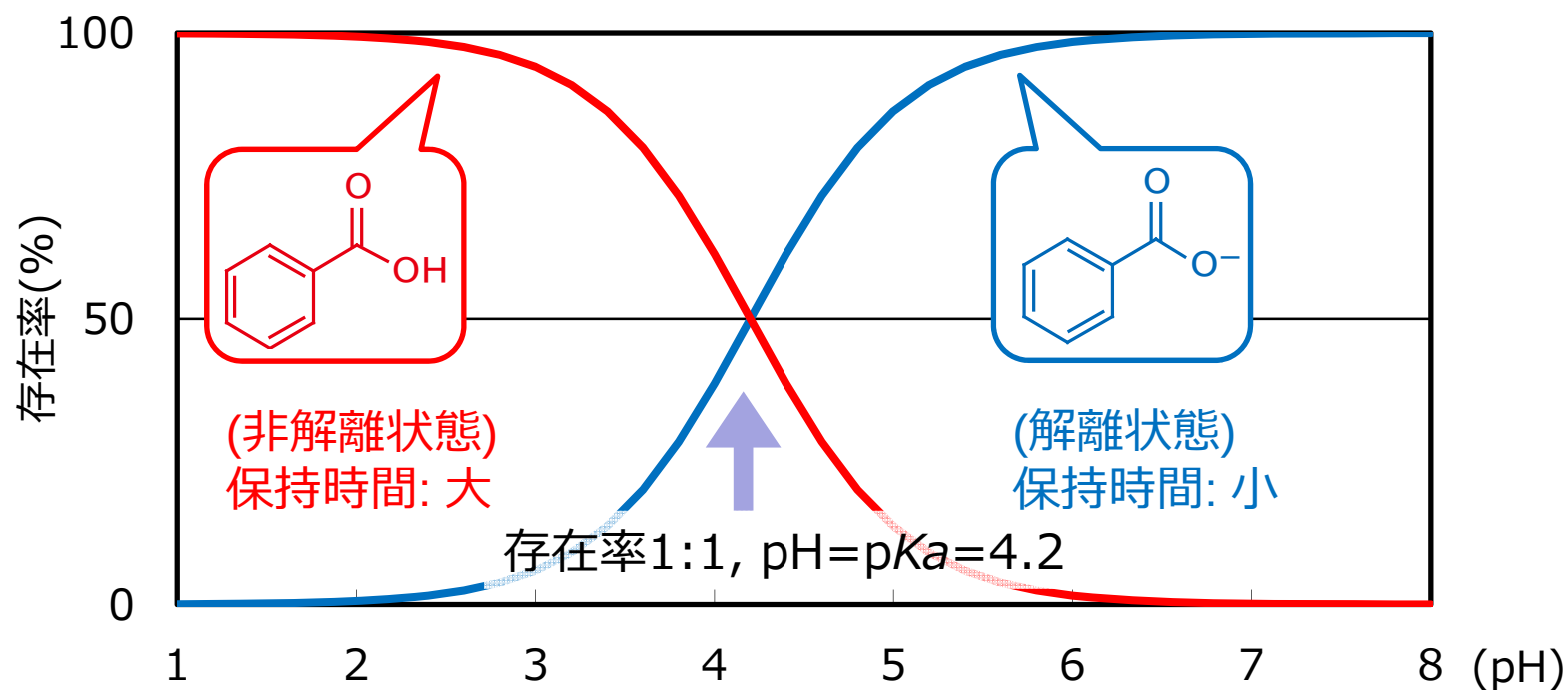
- ▶ 酸性物質を解離の状態で分析する
 - メリット : 分離の改善
 - デメリット : カラムの劣化、保持、負荷量の減少

イオン対クロマトグラフィー(保持の弱いとき)

- ▶ 解離している酸性物質に、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

酸性物質の緩衝液のpH設定

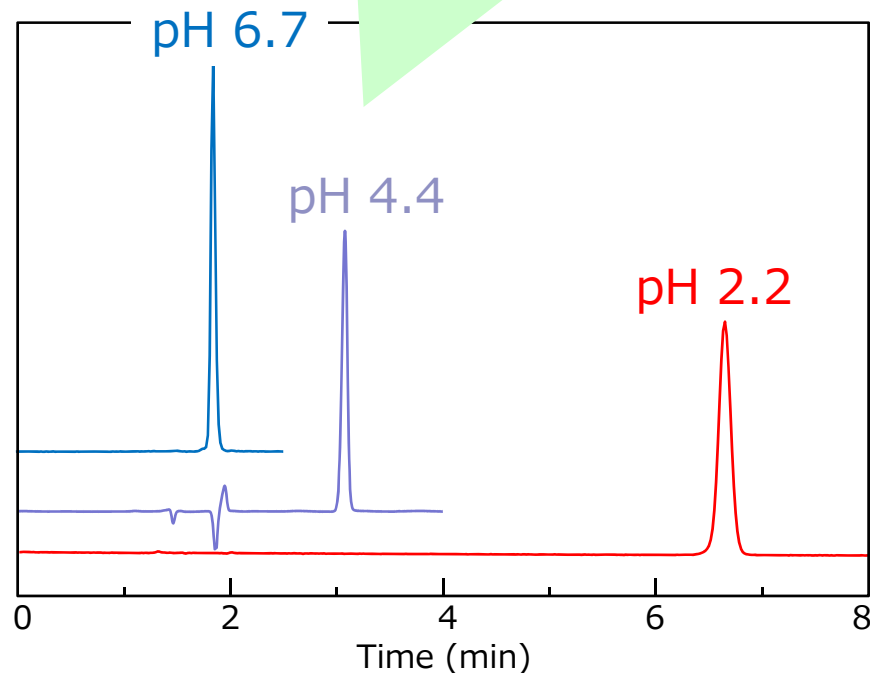
緩衝液のpHによる安息香酸の解離、非解離状態の存在率



- ・ 酸性物質は、pHが小さいときは非解離状態が多く存在する
- ・ 解離、非解離状態の存在率は保持時間に影響するので、緩衝液のpHは化合物の pK_a より2以上離れたものが望ましい

緩衝液の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



【分析条件】

カラム: *L*-column ODS, 5 μ m

カラムサイズ: 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) (注)

流速: 1 mL/min

注入量: 1 μ L

試料: 安息香酸

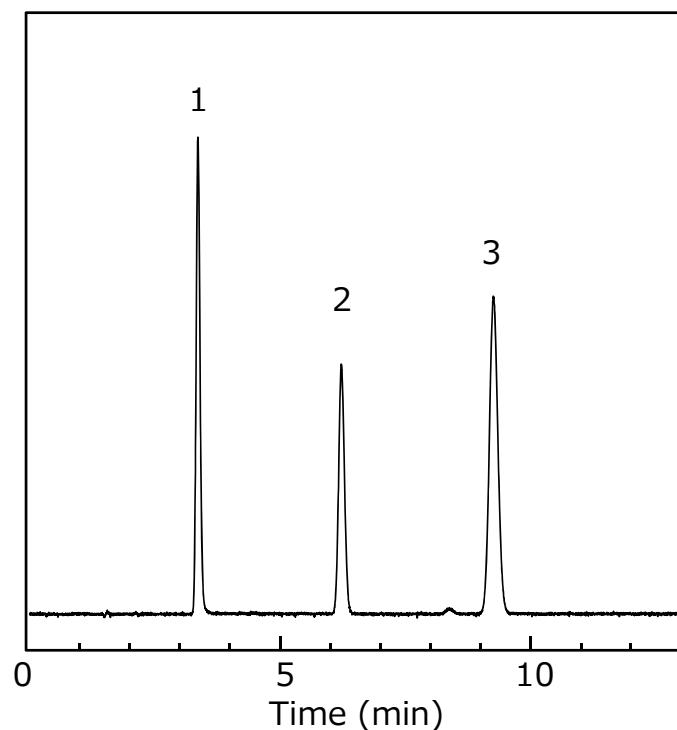
(注)pH 4.4のときは酢酸緩衝液を使用

緩衝液のpHと保持時間

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

- ・ 緩衝液のpHにより解離平衡が移動し、それに合わせて保持が変わる
- ・ 酸性移動相では安息香酸が非解離の状態であるため保持が大きい

酸性物質のイオン対クロマトグラフィー



【分析条件】

カラム: *L-column2 ODS*, 5 μm

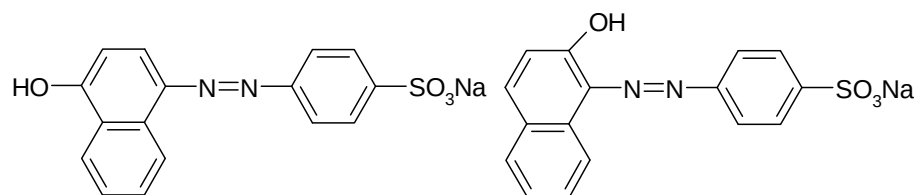
カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

移動相: アセトニトリル/10 mM TBA-P in H_2O (45/55)

流速: 1 mL/min

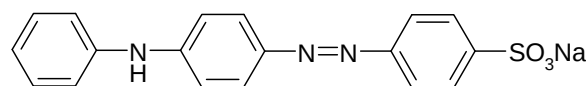
検出: VIS 430 nm

注入量: 1 μL



1. α -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

塩基性物質の分析のための移動相

中～弱アルカリ性移動相

- ▶ 塩基性物質を非解離の状態で分析する
 - 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

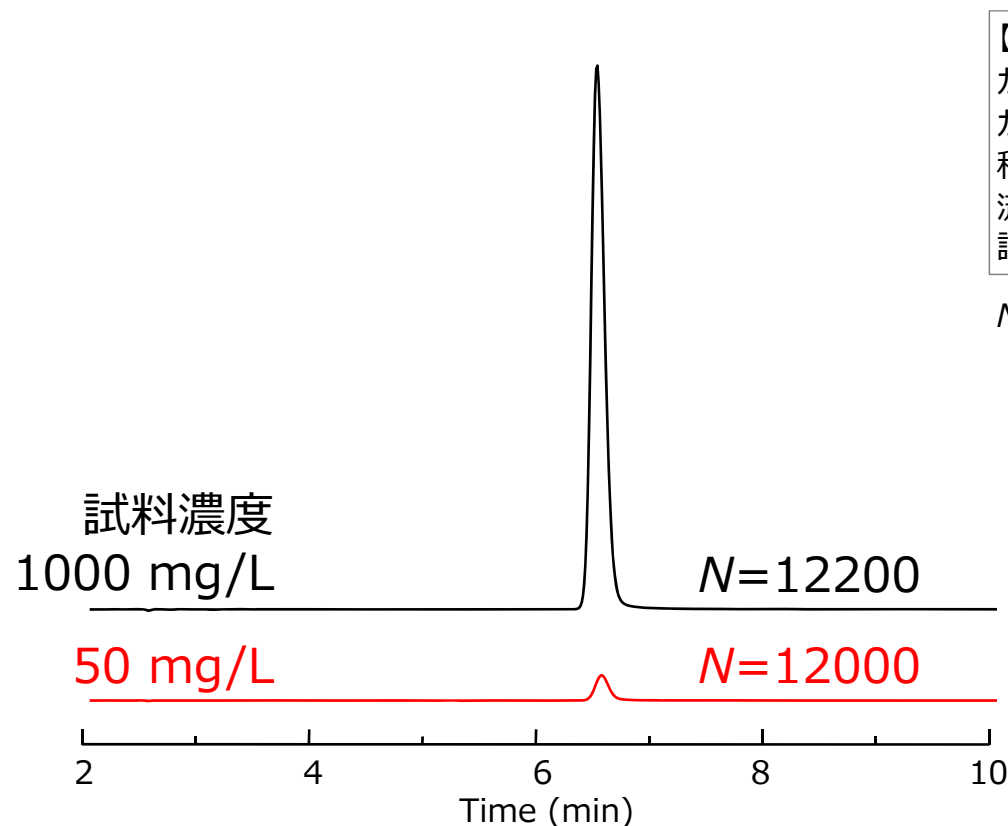
酸性移動相

- ▶ 塩基性物質を解離の状態で分析する
 - 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

イオン対クロマトグラフィー(保持の弱いとき)

- ▶ 解離している塩基性物質に、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

塩基性物質の中性移動相での分析



【分析条件】

カラム: *L*-column2 ODS, 5 μ m

カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

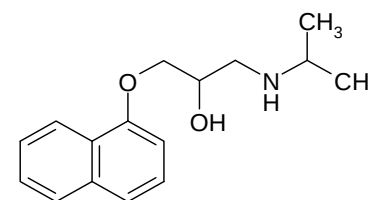
移動相: アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH 7(30/70)

流速: 1 mL/min; 温度: 40 $^{\circ}$ C; 注入量: 1 μ L

試料: プロプラノロール

N : 理論段数

シラノール基 : 解離
プロプラノロール: 解離

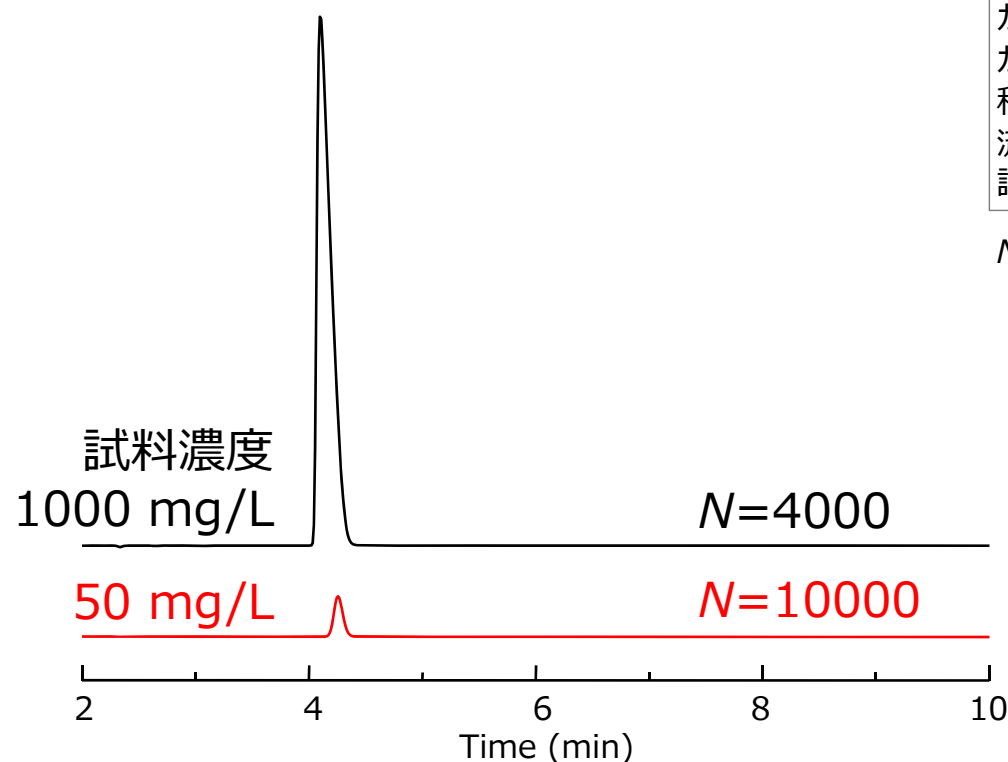


プロプラノロール
pKa 9.45

中性移動相では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

塩基性物質の酸性移動相での分析



【分析条件】

カラム: L-column2 ODS, 5 μ m

カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

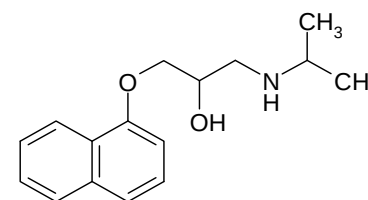
移動相: アセトニトリル/20 mM リン酸(30/70)

流速: 1 mL/min; 温度: 40 $^{\circ}$ C; 注入量: 1 μ L

試料: プロプラノロール

N: 理論段数

シラノール基 : 非解離
プロプラノロール: 解離



プロプラノロール
pKa 9.45

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り、保持時間が短くなる。試料の濃度が高いとピーク形状が悪くなる
→ 負荷量の低下

塩基性物質の中性移動相での分析

【分析条件】

カラム: C18, 5 μ m

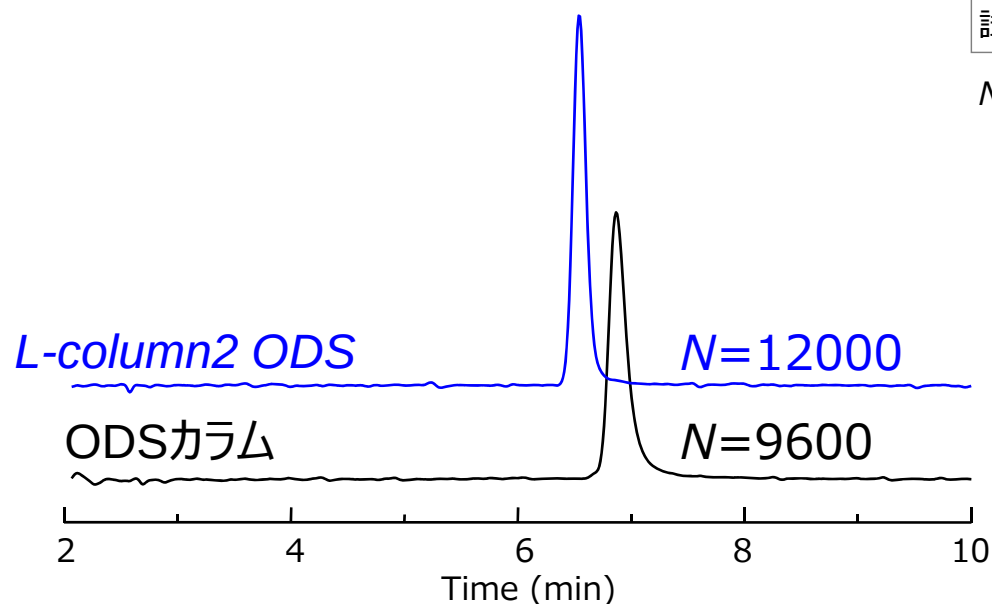
カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

移動相: アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH 7(30/70)

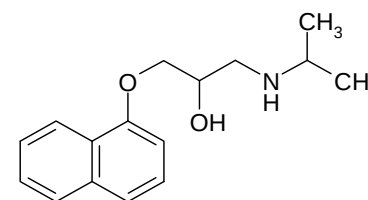
流速: 1 mL/min; 温度: 40 $^{\circ}$ C; 注入量: 1 μ L

試料: プロプラノロール(50 mg/L)

N: 理論段数



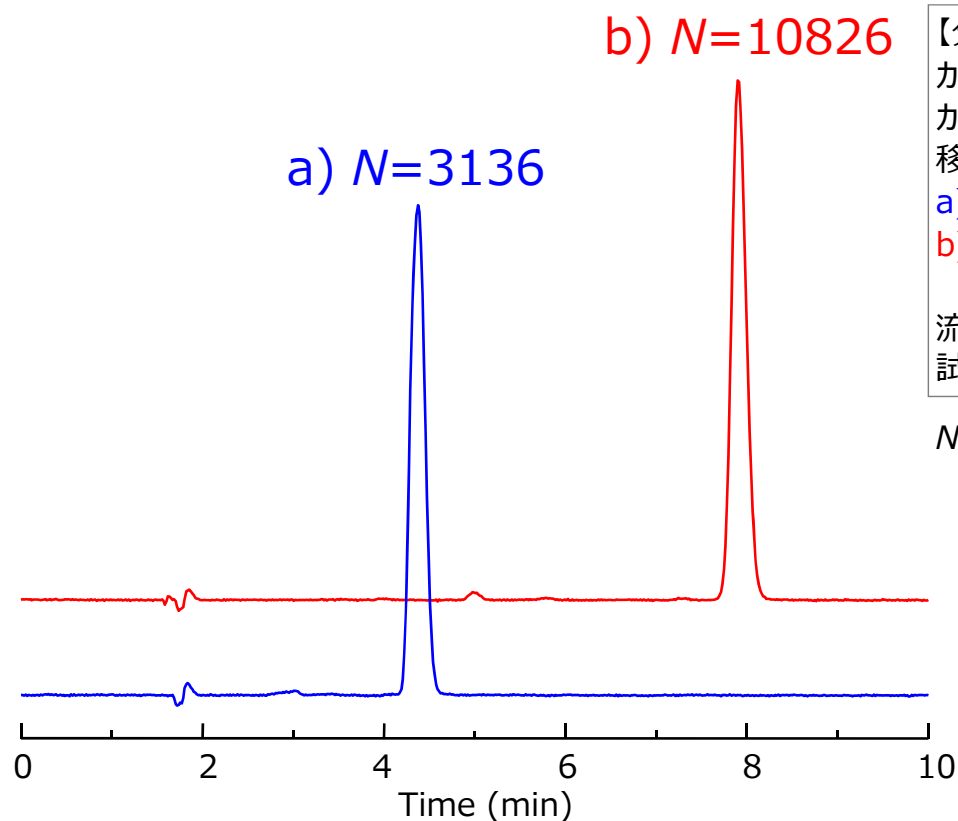
シラノール基 : 解離
プロプラノロール: 解離



プロプラノロール
pKa 9.45

中性移動相ではシラノール基の影響を受けやすくなり
カラムの差が生じやすい(エンドキャッピングの良し悪しがわかる)

塩基性物質のイオン対クロマトグラフィー



【分析条件】

カラム: *L*-column2 ODS, 5 μ m

カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

移動相:

a) アセトニトリル/20 mM リン酸(30/70)

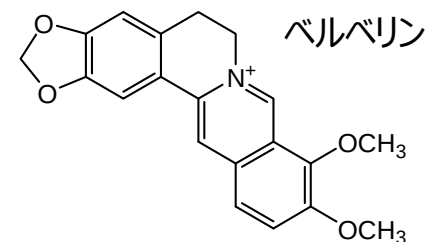
b) アセトニトリル/20 mM リン酸

+10 mM $C_5H_{11}SO_3Na$ (30/70)

流速: 1 mL/min; 温度: 40 $^{\circ}$ C; 注入量: 1 μ L

試料: ベルベリン

N : 理論段数

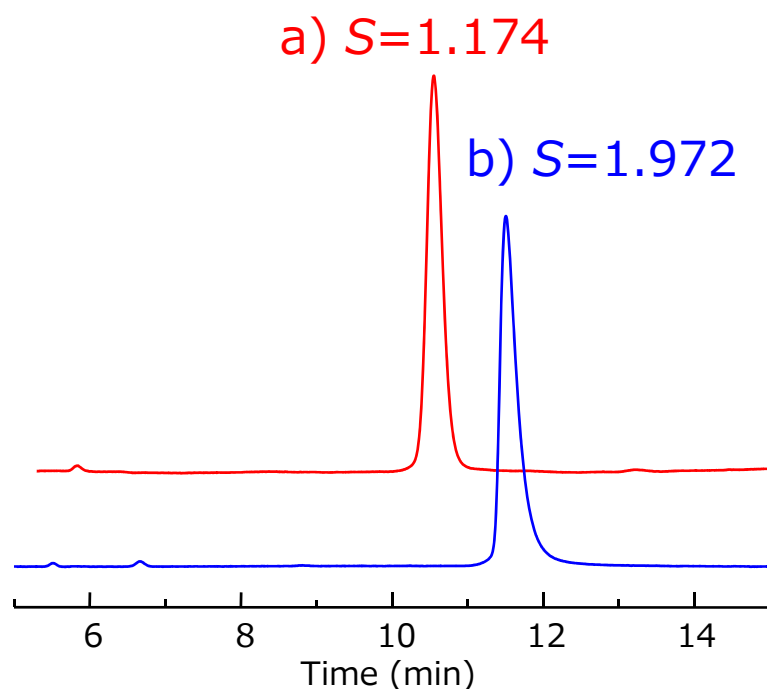


第四級アンモニウム塩を添加すると
イオン対試薬により理論段数と保持が増加する

塩基性物質のテーリング防止策

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



【分析条件】

カラム: L-column ODS, 5 μ m

カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

移動相:

a)メタノール/25 mM リン酸緩衝液 pH 7(80/20)

b)アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH 7(55/45)

流速: 1 mL/min; 検出: UV 225 nm; 温度: 40 $^{\circ}$ C; 注入量: 1 μ L

試料: アミトリプチリン(in アセトニトリル)

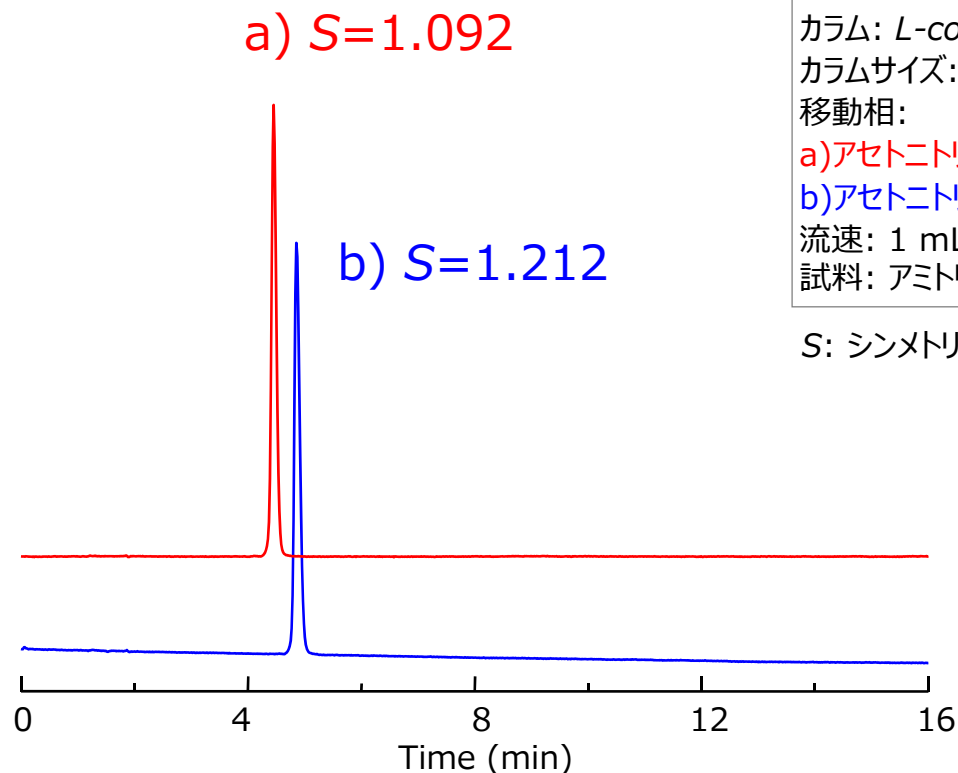
S: シンメトリー係数

シラノール基 : メタノールと水素結合
アミトリプチリン : 解離

シラノール基 : 解離
アミトリプチリン : 解離

- ・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



【分析条件】

カラム: *L*-column ODS, 5 μ m

カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

移動相:

a) アセトニトリル/20 mM リン酸+5 mM トリエチルアミン(TEA)(30/70)

b) アセトニトリル/20 mM リン酸(30/70)

流速: 1 mL/min; 温度: 40 $^{\circ}$ C

試料: アミトリプチリン

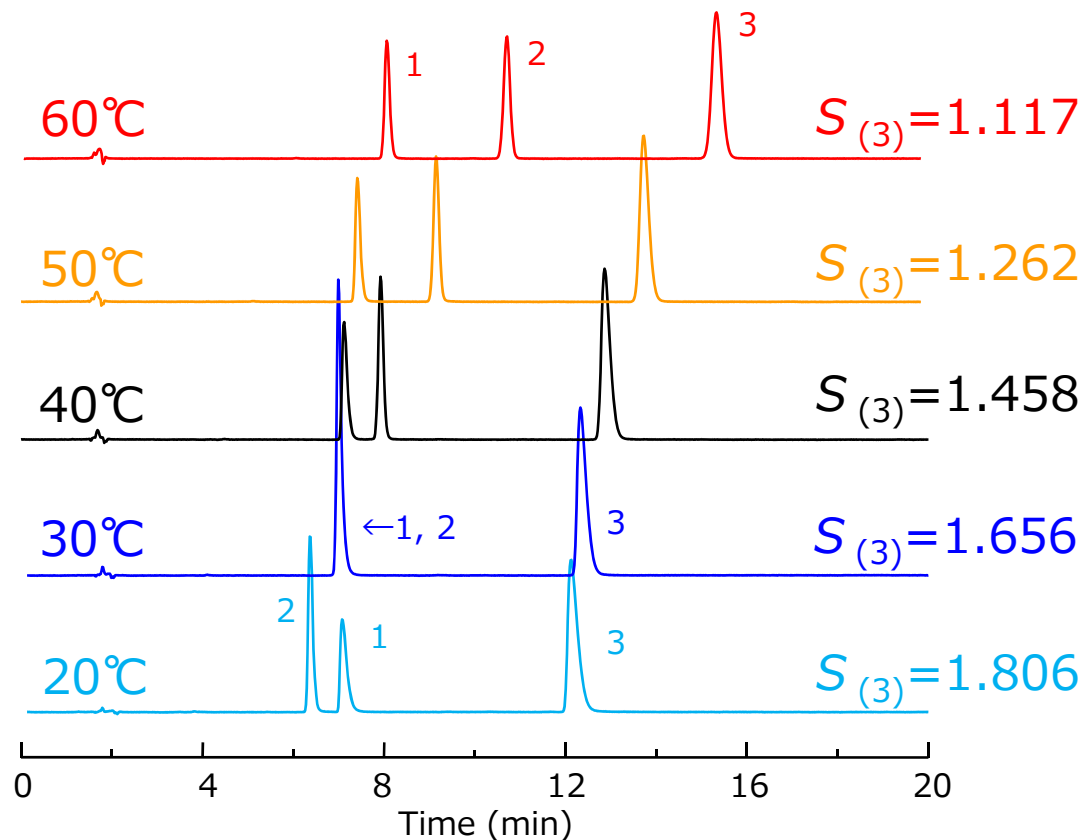
S: シンメトリー係数

シラノール基 : TEAと会合体
アミトリプチリン : 解離

シラノール基 : 非解離
アミトリプチリン : 解離

- 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ができない
- カラムを専用化しなくてはならない。カラムの耐久性は低下する

温度を高くする



【分析条件】

カラム: L-column2 ODS, 3 μ m

カラムサイズ: 4.6×150 mm

移動相:

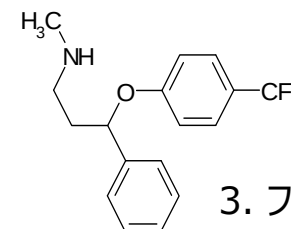
アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH 7 (35/65)

流速: 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

S: シンメトリー係数



3. フルオキセチン

- 温度が高くなると、塩基性物質と残存シリ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
- カラムの耐久性は低下する

LC/MSで使用する移動相

移動相の種類や濃度によって感度やピーク形状が異なる

使用した移動相: アセトニトリルのグラジエント分析

濃度の比較: 0.01~0.2% ギ酸

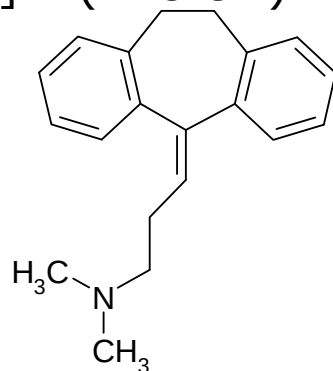
種類の比較: 0.1% ギ酸、0.1%酢酸

5 mM ギ酸アンモニウム

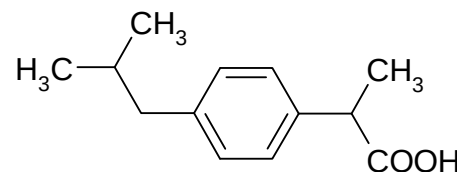
5 mM 酢酸アンモニウム

5 mM 重炭酸アンモニウム

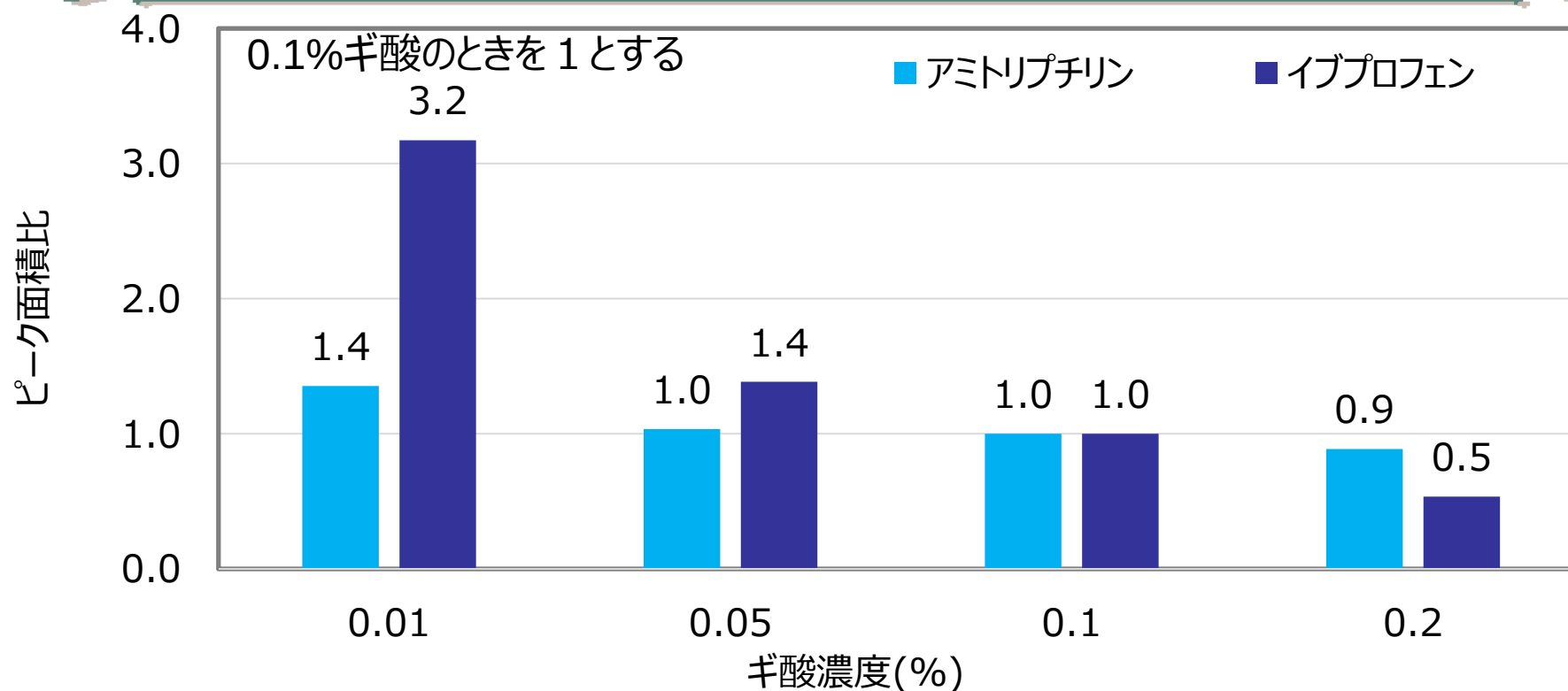
試料: アミトリプチリン(pKa 9.4)
[M+H]⁺ (278-91)



イブプロフェン(pKa 9.4)
[M+H]⁺ (208-91)



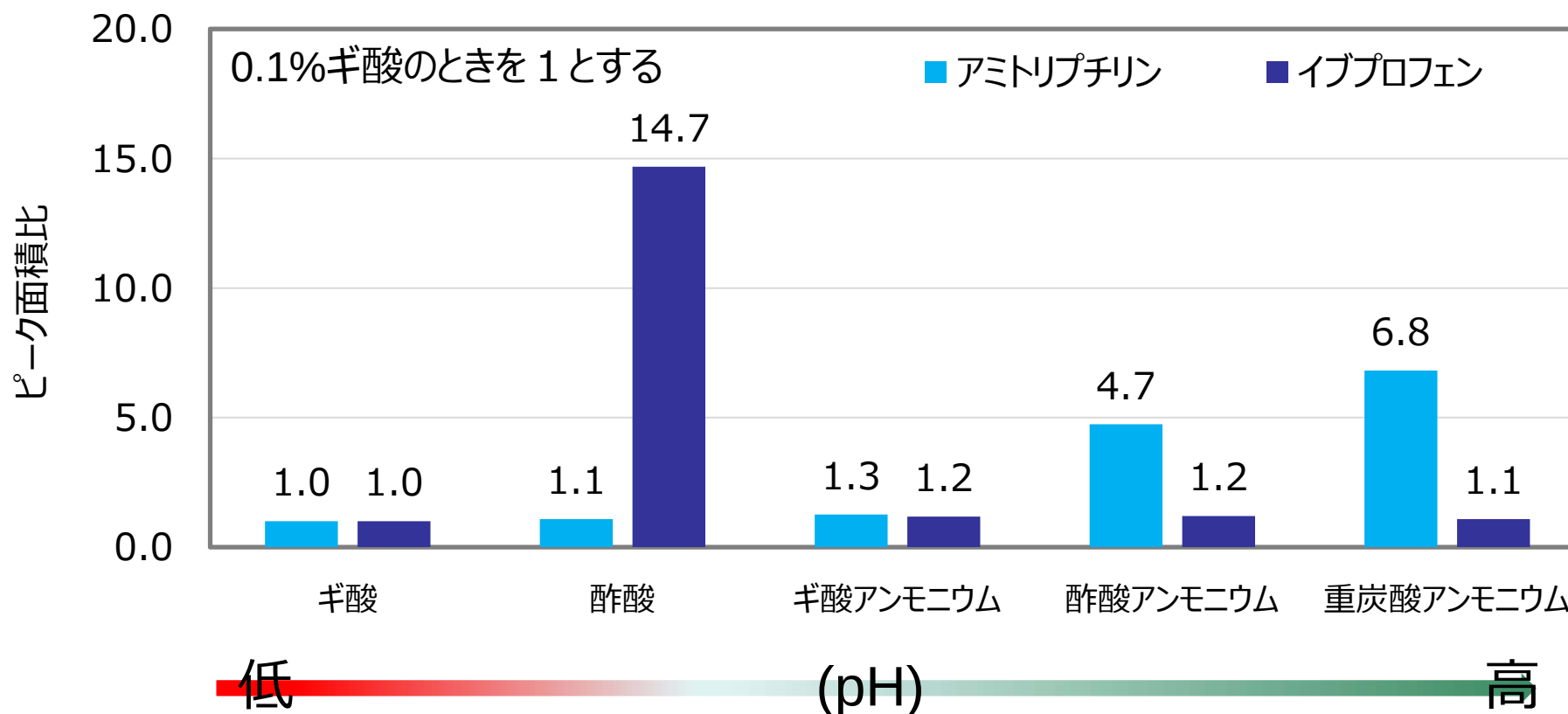
ギ酸濃度(%)とピーク面積比



移動相のギ酸濃度が高くなると、感度は低下する

- ・ アミトリプチリン : ピーク形状がシャープ
- ・ イブプロフェン : ピーク形状に変化なし

移動相の違いによるピーク面積比

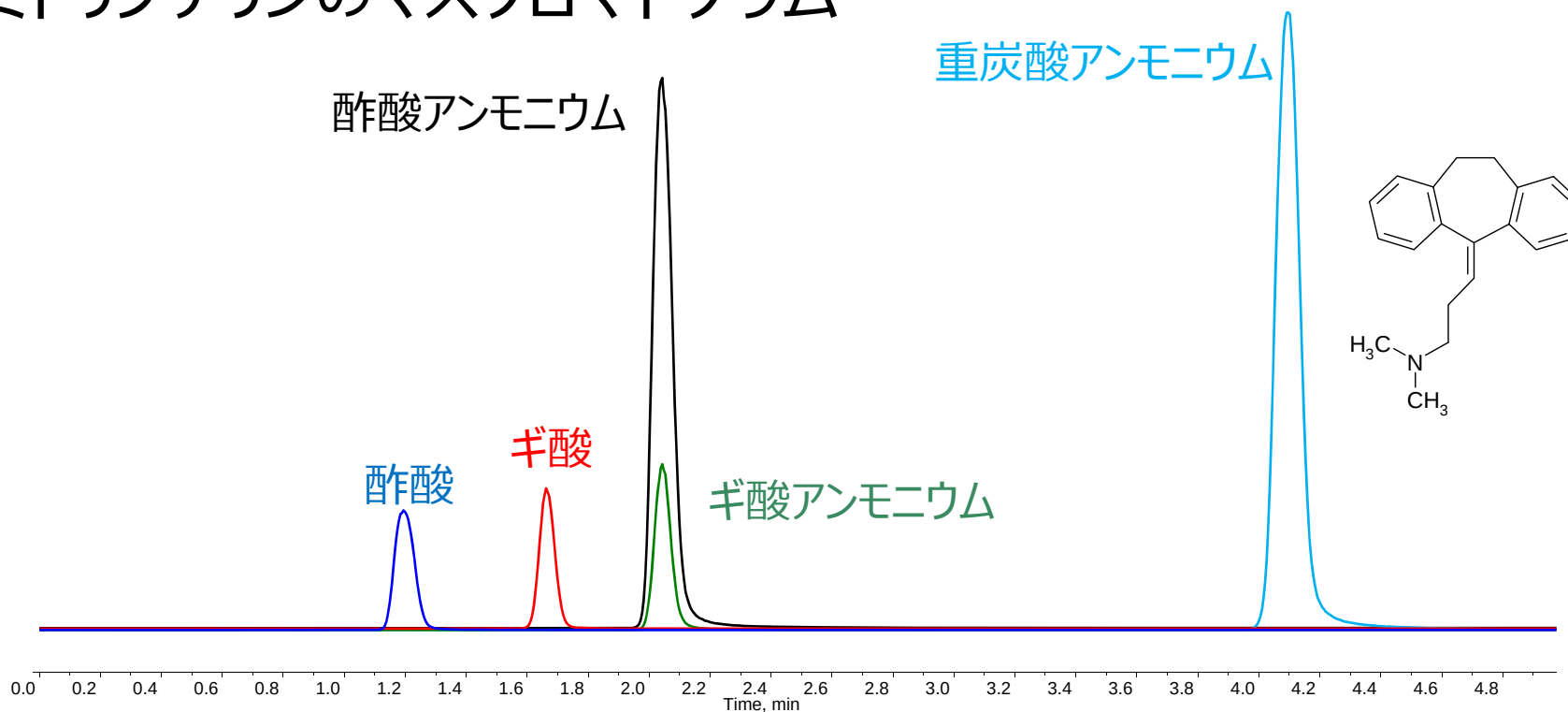


移動相のpHが高くなると

- ・ アミトリプチリン : ピーク面積増加(ピーク幅が広い)
- ・ イブプロフェン : 酢酸緩衝液でピーク形状最大(ピーク幅が広い)

移動相の違いによるマスクロマトグラム

アミトリプチリンのマスクロマトグラム



- ギ酸とギ酸アンモニウムはピークがシャープ
- 酢酸アンモニウムは感度が高い
- 重炭酸アンモニウムは感度が高く、保持が大きい、ピーク幅が広い

LCシステムの配管の内径の最適化

『配管は細く・短く』が鉄則

内径4.6 mmカラム：配管の内径0.25～0.3 mm

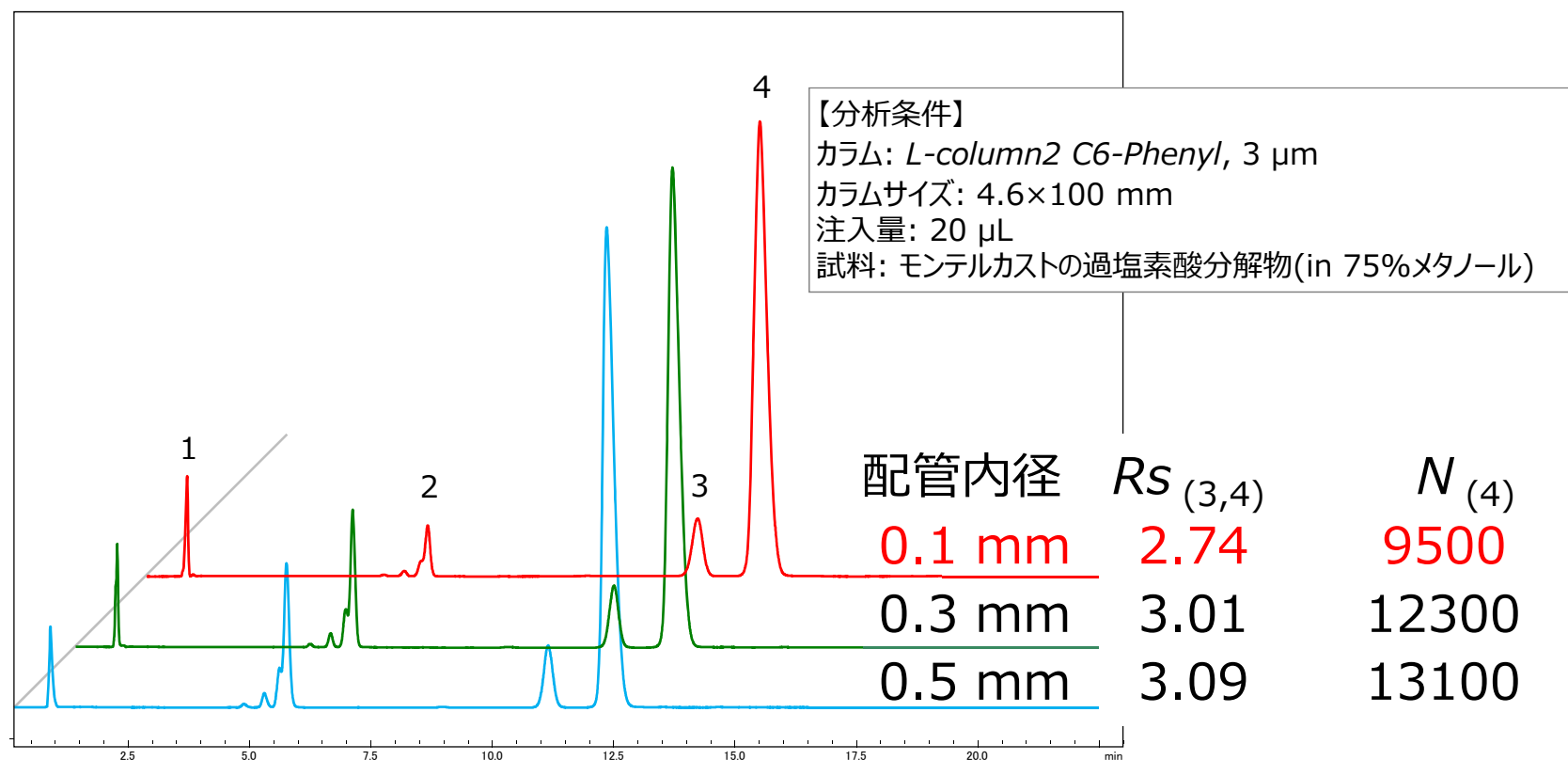
内径2.1 mmカラム：配管の内径0.1～0.13 mm

しかし、注入量を多くするとピーク形状が崩れることがある

グラジエント分析で注入量が多いときは
カラム内径の1/10程度の配管の内径を目安に選択する

カラム入り口配管の影響(HPLC)

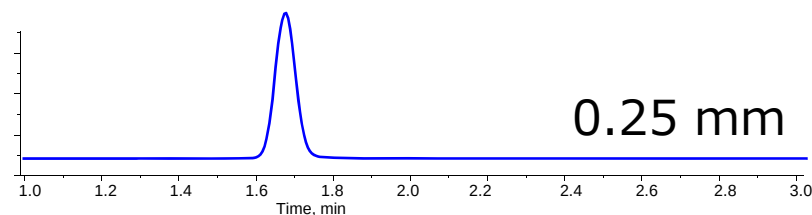
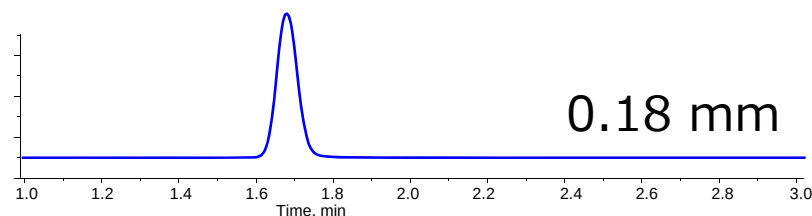
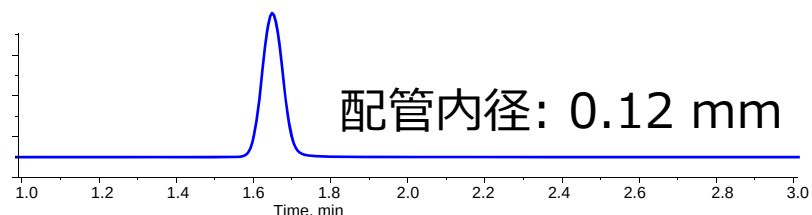
モンテルカストナトリウム錠の定量法：システム適合性(第十七改正日本薬局方)



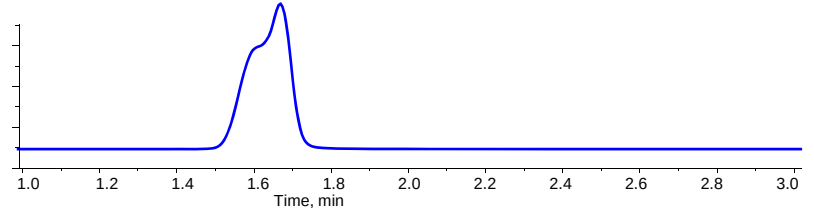
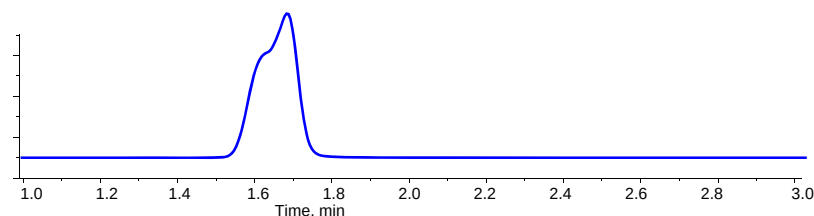
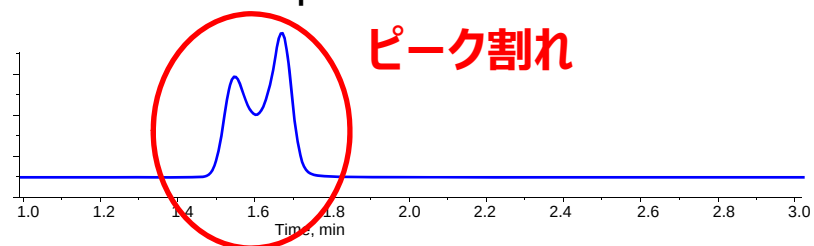
グラジエント分析のとき、カラム入り口配管の内径が小さいと
注入量(試料溶媒)の影響を受け、ピーク形状が悪化する

カラム入り口配管の影響(LC/MS/MS)

注入量: 5 μ L



注入量: 10 μ L



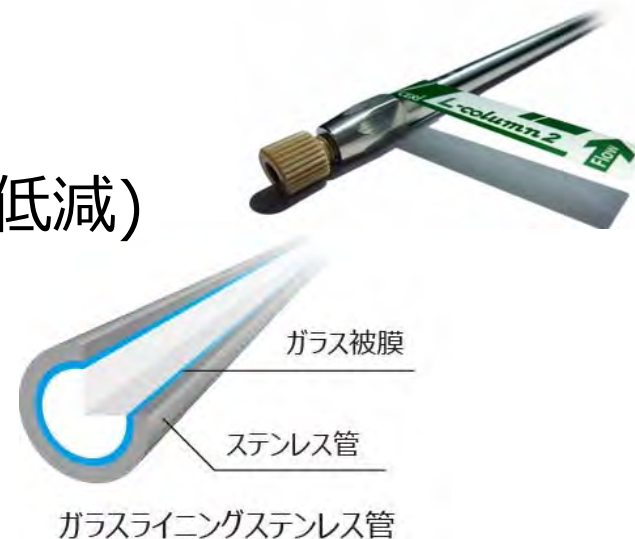
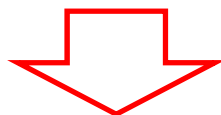
【分析条件】カラム: *L-column2 ODS*, 3 μ m; カラムサイズ: 2.1×50 mm; 試料: アミトリプチリン(in 50%アセトニトリル)

カラム入り口配管の内径が小さいと
注入量(試料溶媒)の影響を受け、ピーク形状が悪化する

LC/MSのメタルフリー環境への提案

L-column2 メタルフリーカラムの特長

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

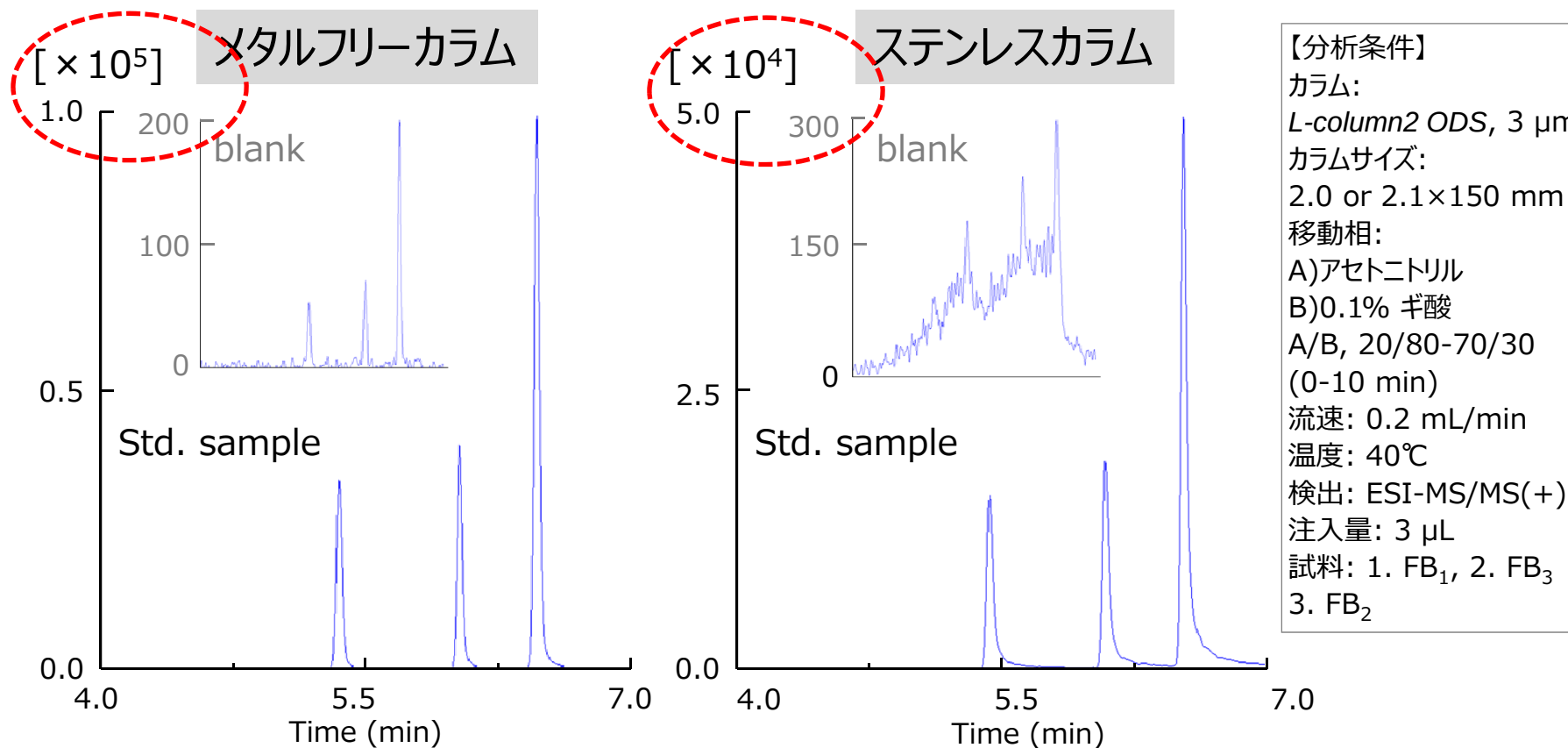


LC/MSを使用した配位性化合物、医薬品などの様々な分析に最適

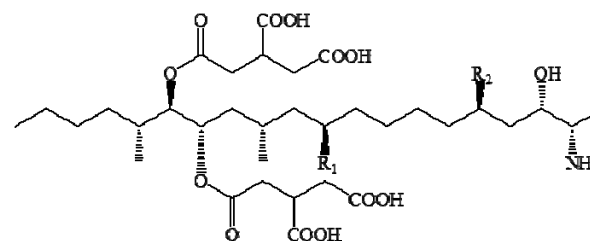
例えば・・・

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

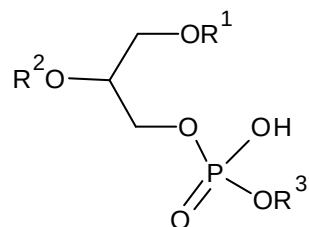
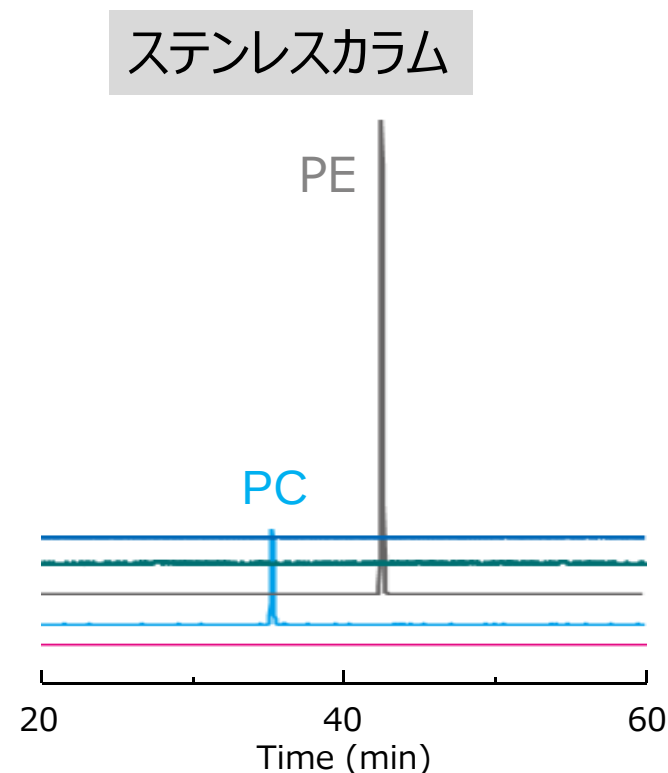
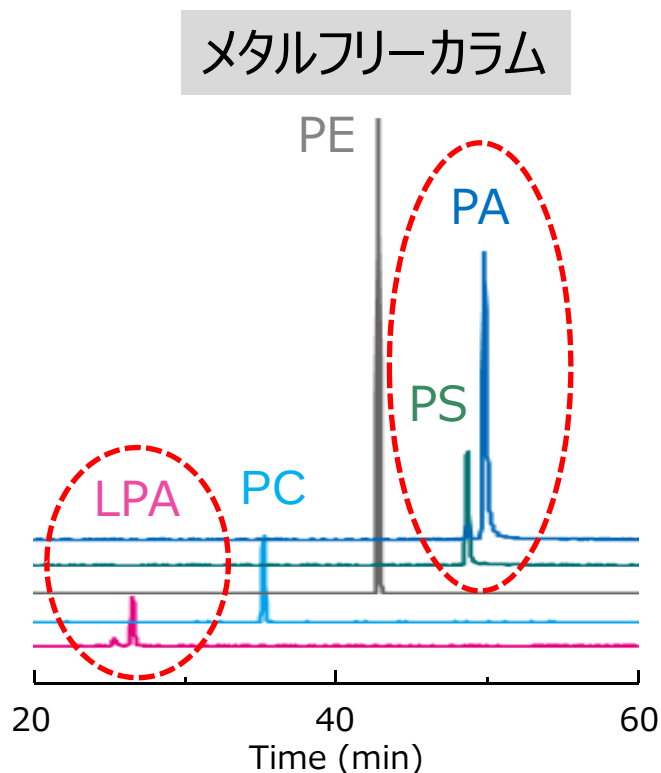
メタルフリーカラムの効果(フモニシン)



- ・ピーク形状の改善
- ・ピーク強度の上昇
- ・キャリアオーバーの低減



メタルフリーカラムの効果(リン脂質)



R¹ : 脂肪酸

R² : 脂肪酸、水素

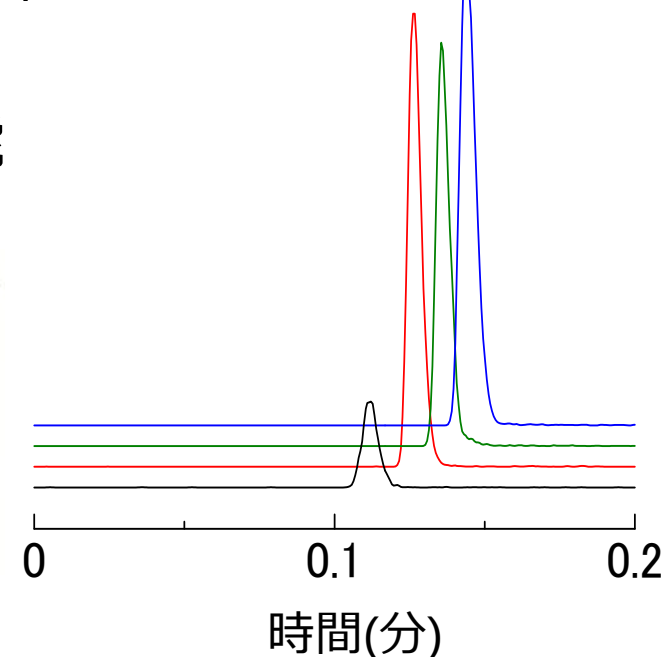
R³ : セリン(PS)、水素(PA)、エタノールアミン(PE)、コリン(PC)

分析の難しいPS(LPS)やPA(LPA)が、検出可能 !!

分析時間短縮への提案

ハイスループット分析用ショートカラムの特長

- ・ カラム内径2.1 mm、カラム長さ10, 20, 30 mmをラインナップ
- ・ 分析時間の大幅な短縮が可能
- ・ 10秒の分析で2000回/日以上が可能
- ・ 高理論段数
- ・ 高耐久性
- ・ 低価格

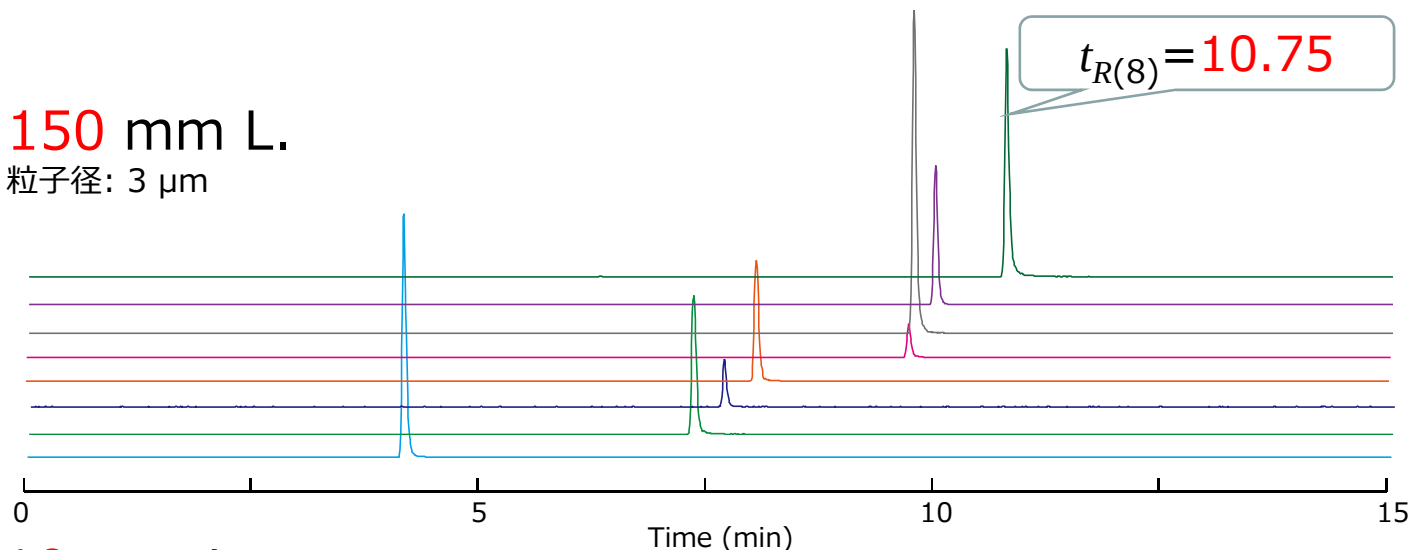


数千以上の検体数のあるLC/MS/MSを用いた
ハイスループット分析に最適

10 mmカラムを用いた分析時間の短縮

150 mm L.

粒子径: 3 μm



【分析条件】

カラム:

L-column2 ODS

カラムサイズ:

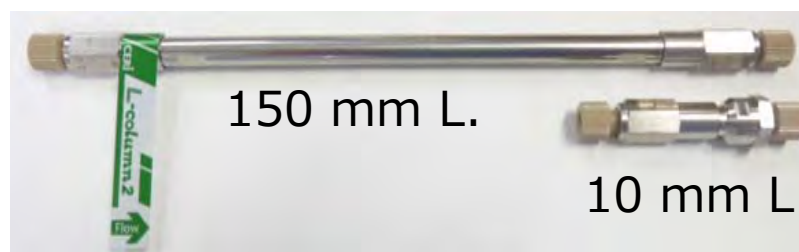
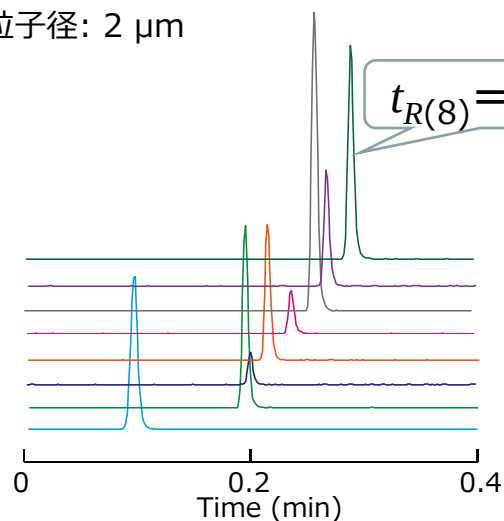
2.1 mm I.D.

試料:

1. Sulpiride
2. Milnacipran
3. Tandospirone
4. Mianserin
5. Trazodone
6. Desipramine
7. Nortriptyline
8. Clomipramine (100 $\mu\text{g/L}$ each)

10 mm L.

粒子径: 2 μm



- 分析時間の大幅な短縮が可能
- 低マトリックスでピーク数が少ないときに最適

カラムの劣化

化学的要因

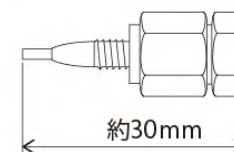
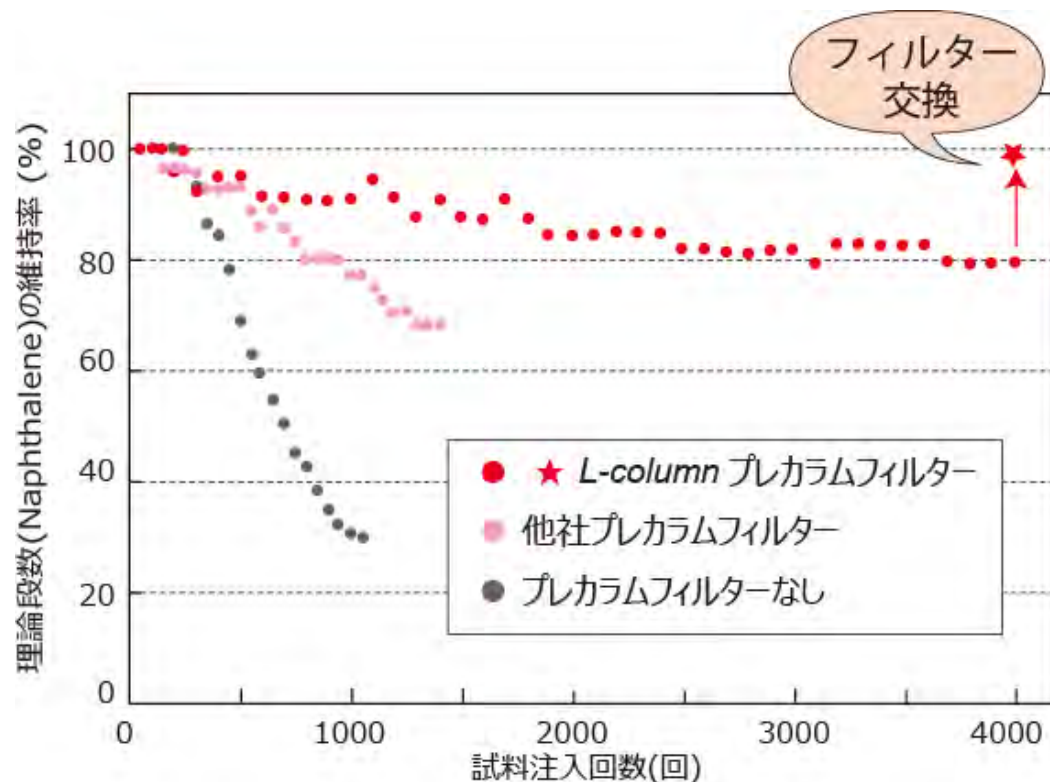
- ▶ 酸性移動相による修飾基の脱離 → シラノール基の生成
- ▶ アルカリ移動相による基材の溶解 → ボイドの発生
- ▶ 脂溶性成分などの蓄積 → 蓄積成分と試料の相互作用

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、
移動相や試料のろ過、ガードカラム・プレカラムフィルターの装着

カラムの保護



L-column プレカラムフィルター

【分析条件】カラム: L-column2 ODS, 2 μ m; カラムサイズ: 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℃; 検出: UV 254 nm; 注入量: 0.5 μ L
試料: 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

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)

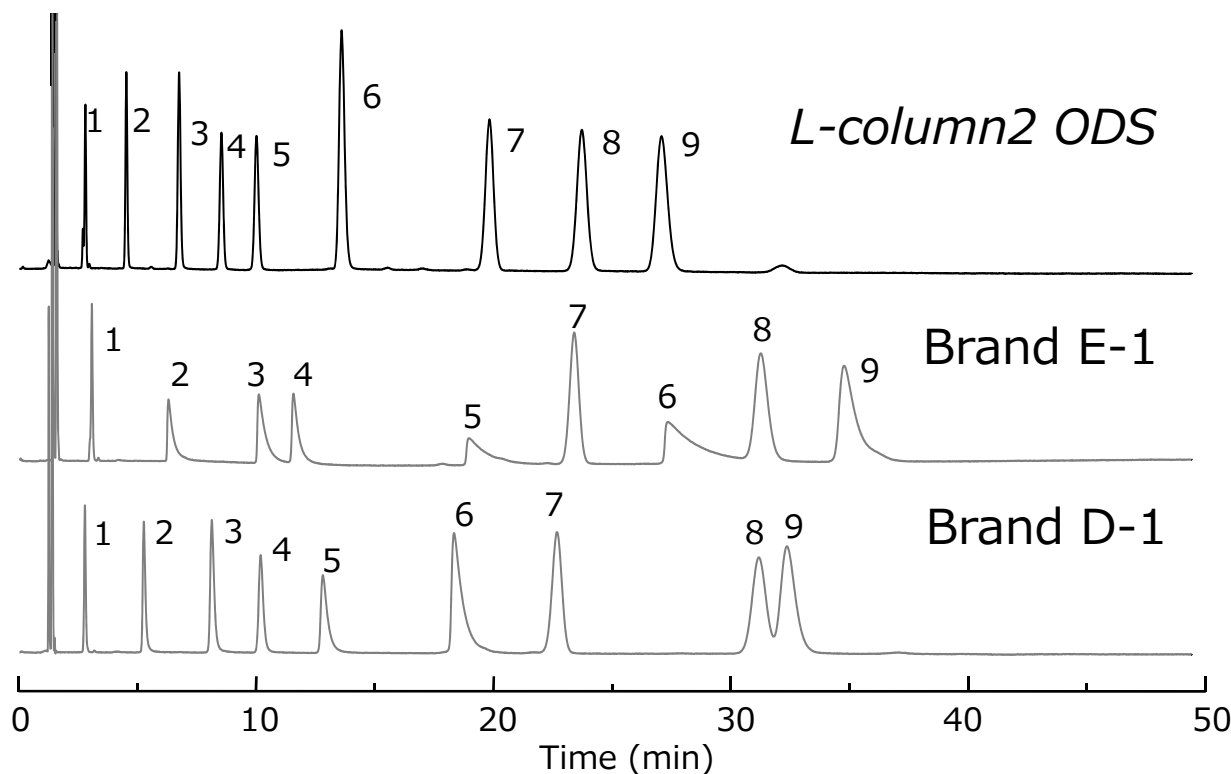
カラム: *L-column2 ODS*

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)

より低吸着性なカラムの選択

塩基性物質(抗アレルギー剤)の一斉分析



【分析条件】

カラム: C18, 5 μ m

カラムサイズ: 4.6 $\times$ 150 mm

移動相:

アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH7 (60/40)

流速: 1 mL/min

温度: 40 $^{\circ}$ C

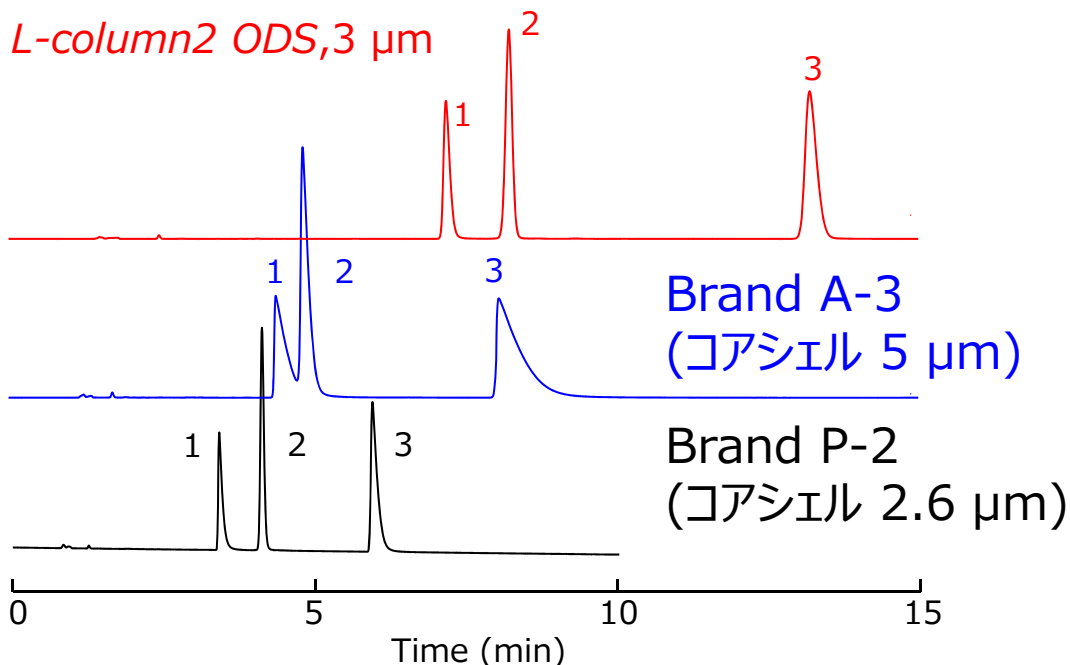
検出: UV 220 nm

注入量: 1 μ L

試料: 1. フェキソフェナジン,
2. クロルフェニラミン, 3. トリプロリジン,
4. ジフェンヒドラミン, 5. ジフェニルピラリン,
6. ホモクロルシクリジン, 7. ヒドロキシジン,
8. アステミゾール, 9. プロメタジン

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

L-column2 VS コアシェルカラム



【分析条件】

カラム: C18

カラムサイズ: 4.6×150 mm

移動相:

アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH7 (35/65)

流速: 1 mL/min

温度: 40℃

検出: UV 230 nm

注入量: 2 μL

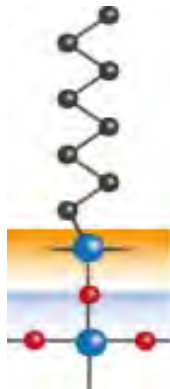
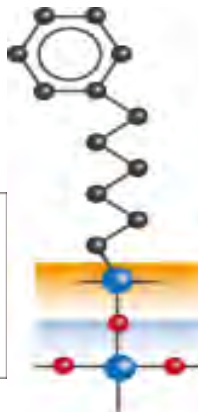
試料:

1. パロキセチン, 2. シタロプラム,
3. フルオキセチン

	理論段数, ()内: シンメトリー係数		
	パロキセチン	シタロプラム	フルオキセチン
L-column2 ODS, 3 μm	22183 (1.48)	25559 (1.03)	22141 (1.37)
Brand A-3 5 μm(コアシェル)	—	—	2154 (6.62)
Brand P-2 2.6 μm(コアシェル)	12076 (2.53)	23521 (1.24)	15254 (2.45)

コアシェルカラムでも吸着すると段数は激減 → 低吸着性は重要！

L-column2 充填剤のラインアップ

製品名	<i>L-column2</i> ODS	<i>L-column2</i> C8	<i>L-column2</i> C6-Phenyl
分離機構	疎水性相互作用	疎水性相互作用	疎水性相互作用 + π - π 相互作用
修飾基	 C18	 C8	 C6-Phenyl
粒子径	5 μ m, 3 μ m, 2 μ m	5 μ m, 3 μ m	5 μ m, 3 μ m
比表面積	340 m ² /g 全多孔質性	340 m ² /g 全多孔質性	340 m ² /g 全多孔質性
用途	ファーストチョイス	分析時間短縮	分離の改善