こんなこともできる！！
カラムを活かせば分離が改善
★逆相HPLC分析のコツ★

一般財団法人 化学物質評価研究機構
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
クロマト技術部

© CERI 2018, Japan

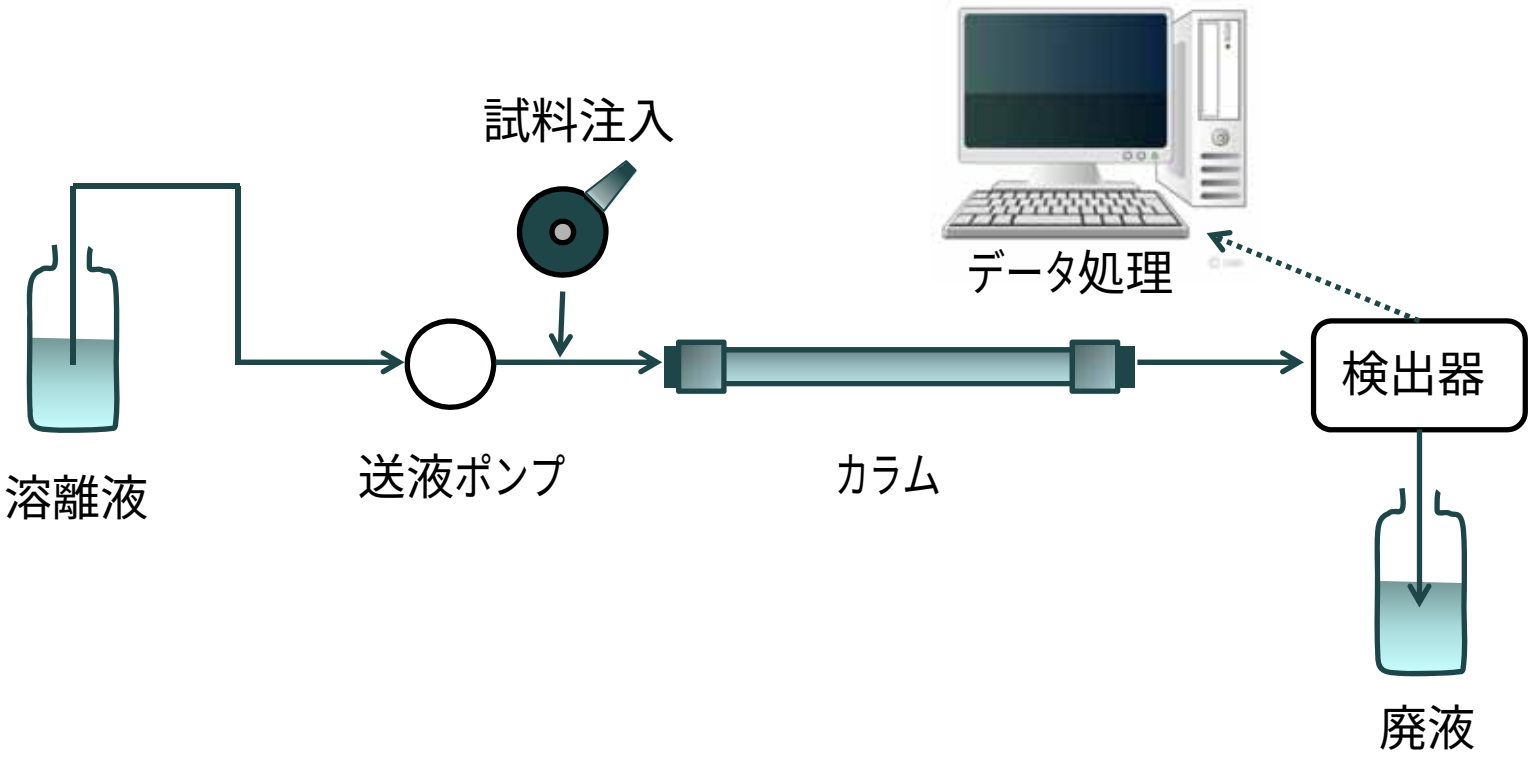
HPLCシステム外観

高速液体クロマトグラフィー

(**H**igh **P**erformance **L**iguid **C**hromatography)

© CERI 2018, Japan

HPLCシステムのしくみ



【試料注入→カラム分離→検出→データ処理】
つまり、**カラムで試料が分離されること**がもっとも本質的な部分!!

© CERI 2018, Japan

HPLCにおける分離モード

分離モード	固定相	保持機構	適した分析種
吸着	吸着剤	吸着力	親水性化合物
分配	液体、擬似液体	溶解度	疎水性化合物
イオン交換	イオン交換体	イオン交換能	イオン（性化合物）
サイズ排除	多孔性分子ふるい剤	三次元網目構造体への浸透度	高分子化合物

さらに分配クロマトグラフィーを分類すると・・・

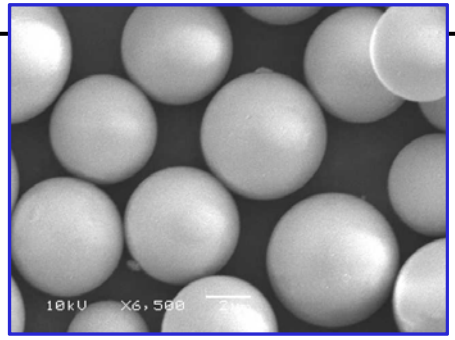
分離モード	極性	典型的固定相	典型的移動相	適した分析種
順相分配	固定相＞移動相	シリカゲル	i-PrOH/ヘキサン	親水性化合物
逆相分配	固定相＜移動相	ODS	メタノール/水	疎水性化合物

ちょっと詳しい液クロのコツ　分離編　丸善出版㈱より抜粋

ODSカラムはHPLCカラムの75%程度を占めるといわれている。

© CERI 2018, Japan

カラムの構造



充填剤のSEM写真

逆相系カラムでは
シリカ基材に化学結合基が修飾された
ものがよく用いられる。

© CERI 2018, Japan

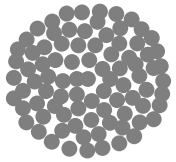
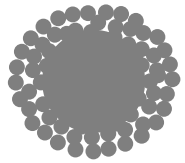
カタログからわかるカラム性能に関する情報

項　目	説　明
基材の種類	シリカ、ポリマー、ハイブリッド
粒子径	5 μm、3 μmが汎用される。 微小なほど分離能が上がる。
比表面積	化学結合基の導入量を制御。保持の強さと比例することが多い。
細孔径（ポアサイズ）	低分子の分離を想定して12 nm程度のカラムが汎用。ペプチド、タンパクなど高分子の分離にはより大きい細孔径のカラムを使用する。
移動相の使用可能なpH範囲	シリカは狭い(アルカリ性溶液により侵食されるため)。 ポリマーは広い。
化学結合基の種類	ODS(C18)、C8、フェニル、ペンタフルオロフェニル（PFP）、アミノ、アミド、ジオール・・・
エンドキャッピングの有無	塩基性物質や配位性化合物をテーリングさせる。 残存シラノール基に対する不活性化処理

：基材に関すること　　：化学修飾に関すること

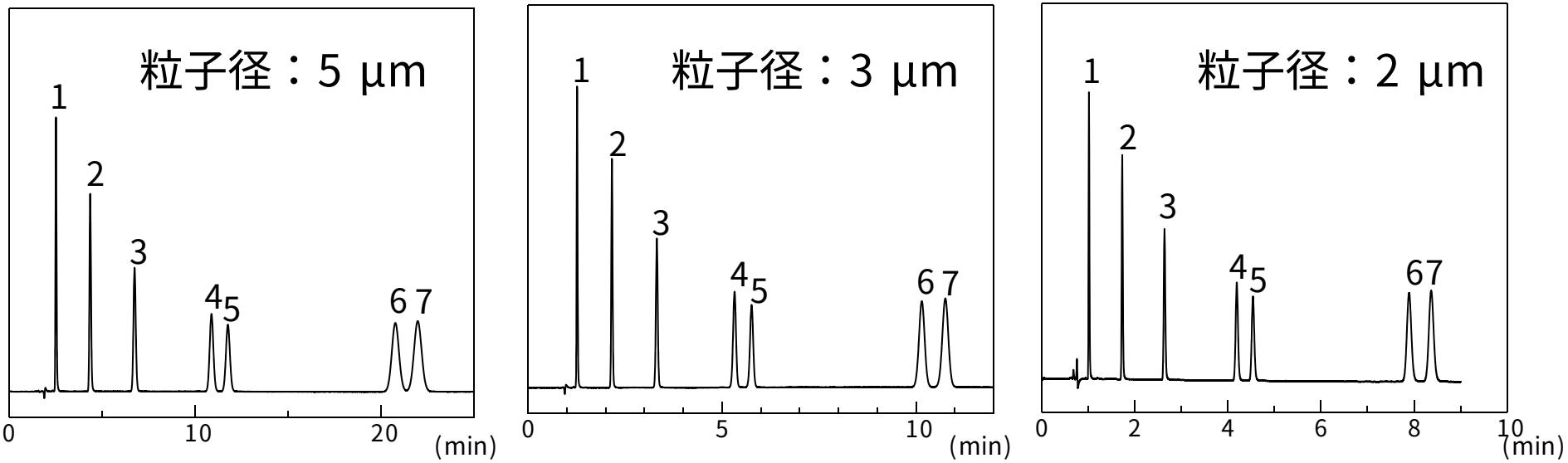
© CERI 2018, Japan

基材

形　状	全多孔質性(FPP) 		表面多孔質性(SPP) (コアシェル)  FPPより高理論段数 or 低カラム圧
材　質	シリカ 理論段数：高 使用可能pH範囲：狭	ハイブリッド 中間	ポリマー 理論段数：低 使用可能pH範囲：広
粒子径 (μm)	低分離 低カラム圧 ⟷ 高分離 高カラム圧 5 μm　3 μm　2 μm		
比表面積	化学結合基 導入量：少 保持：弱 ⟷ 化学結合基 導入量：多 保持：強 200 m^2/g　340 m^2/g　400 m^2/g		

© CERI 2018, Japan

粒子径の微小化のメリット（高分離）



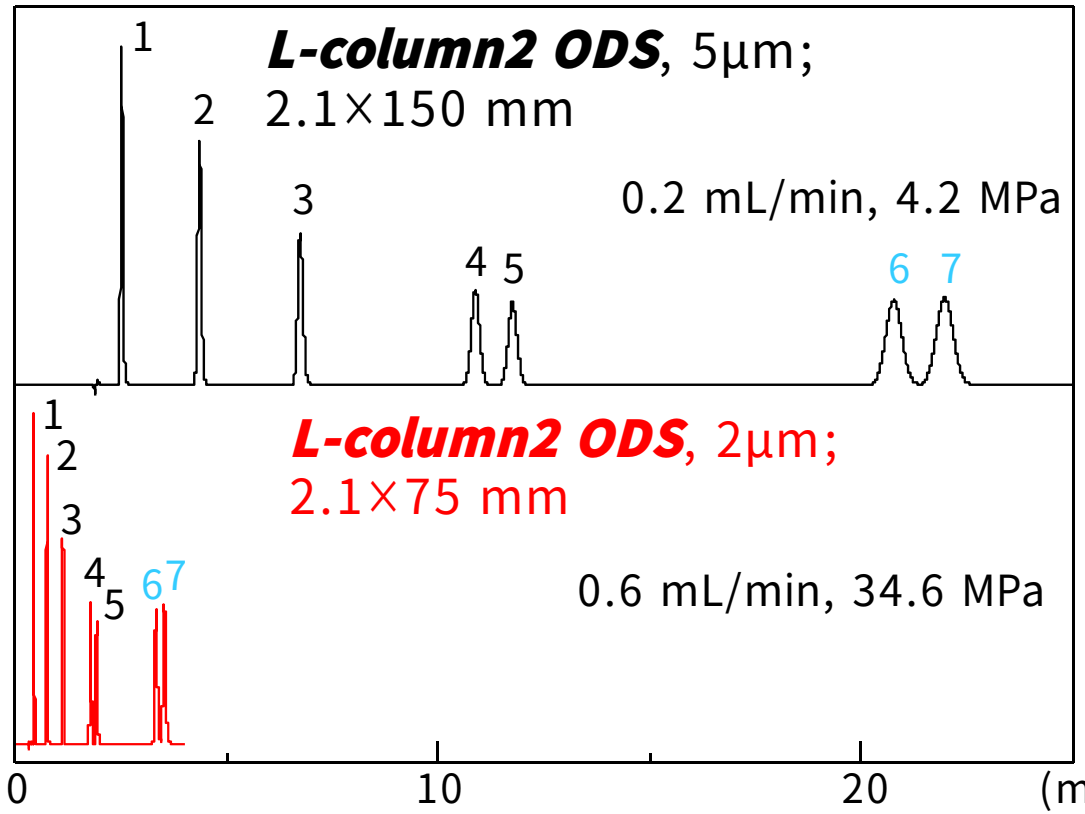
粒子径	流速(mL/min)	$t_{R(7)}$ (min)	$N_{(7)}$	$R_{S(6,7)}$	P(MPa)
5 µm	0.2	22.0	12813	1.60	4.0
3 µm	0.4	10.8	21543	2.13	23.5
2 µm	0.5	8.4	30619	2.55	54.2

【分析条件】カラム：***L-column2 ODS***, 2.1×150 mm; 移動相：アセトニトリル/20 mMリン酸(50/50); 温度：25°C
検出：UV254 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5 µm→2 µm で理論段数･分離度が向上。しかしカラム圧に注意

© CERI 2018, Japan

粒子径の微小化のメリット（分析時間短縮）



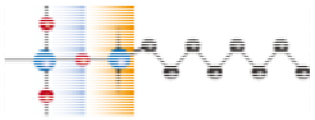
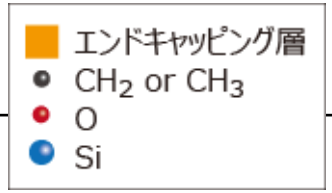
粒子径	$t_{R(7)}$	$N_{(7)}$	$Rs_{(6,7)}$
5 µm	23.0	12813	1.60
	⋙		
2 µm	3.7	13866	1.69
	×1/6	同等	同等

【分析条件】移動相：アセトニトリル/20 mMリン酸(35/65)；温度：40°C；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5 µm → 2 µm に変更することで分析時間が大幅に短縮

© CERI 2018, Japan

化学結合基

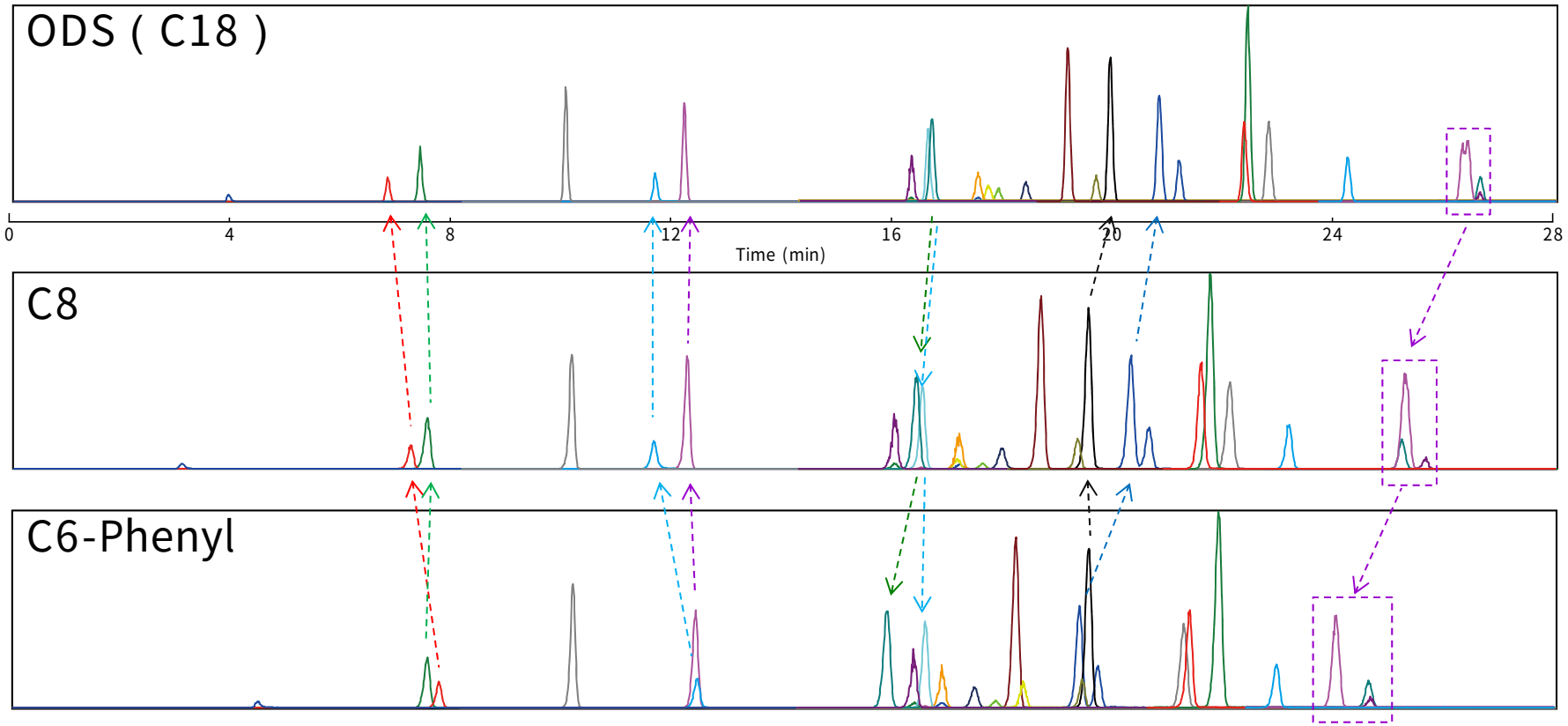
化学結合基	分子構造	分離機構
ODS（C18）	ODS(C18)	疎水性相互作用
オクチル（C8）	 C8	
フェニル	 C6-Phenyl	疎水性相互作用 + π-π 相互作用
その他	ペンタフルオロフェニル(PFP)、C30、アミノ、アミド、ジオール　etc・・・	

© CERI 2018, Japan

化学結合基による分離パターンの変化

農薬の一斉分析

水道水の水質管理目標設定項目、別添4（最終改正
平成25年3月28日健水発0328第4号）の、別添方法18

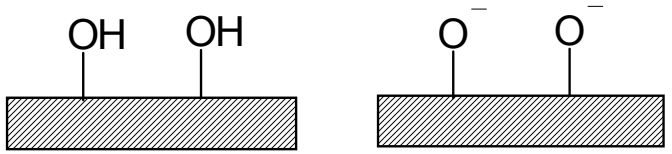


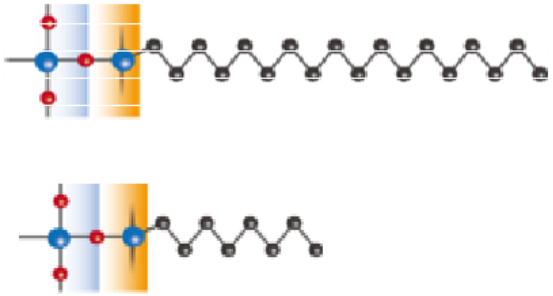
化学結合基により分離パターンの変化が期待できる。
一般的には・・・　ODS　C8≠C6-Phenyl

© CERI 2018, Japan

エンドキャッピング

多孔質シリカの比表面積は膨大（例： 1 gあたり340 m^2）。
表面はシラノール基が無数に存在し、そこに化学結合基を修飾してカラムを製造する。
このとき修飾率は60％以下ともいわれる。

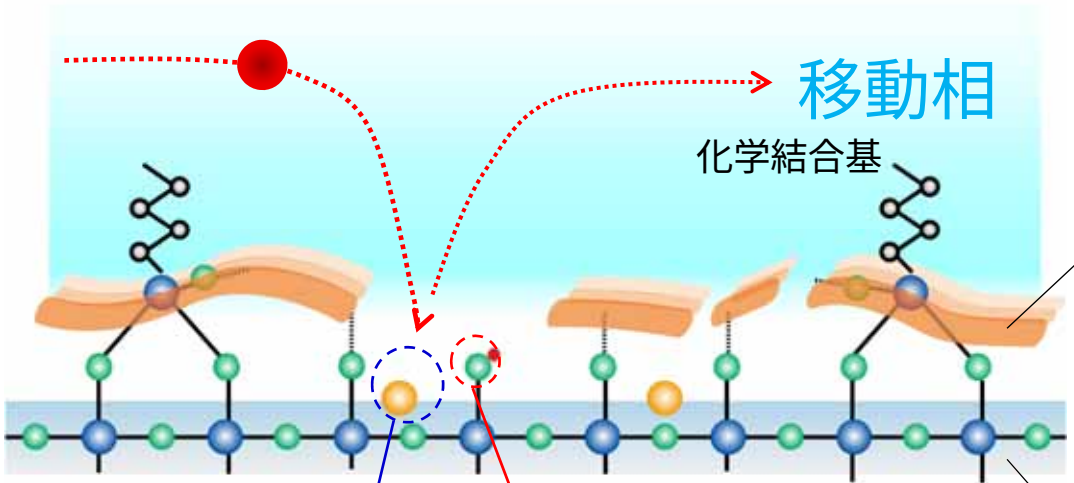


化学結合基	分子構造	実際の分離機構
ODS（C18）カラム オクチル（C8）カラム		疎水性相互作用 ＋ イオン的な相互作用(不均一)
フェニルカラム		〃
その他		〃

残存シラノール基により分離に不都合な2次的相互作用が生じる。

© CERI 2018, Japan

エンドキャッピング（続き）



エンドキャッピング

各社非公開のケースが多い。

【例】・ダブルエンドキャッピング
・多段階エンドキャッピング
・高温気相エンドキャッピング

強力な吸着点や基材へのダメージ発生の起点となりうる!!

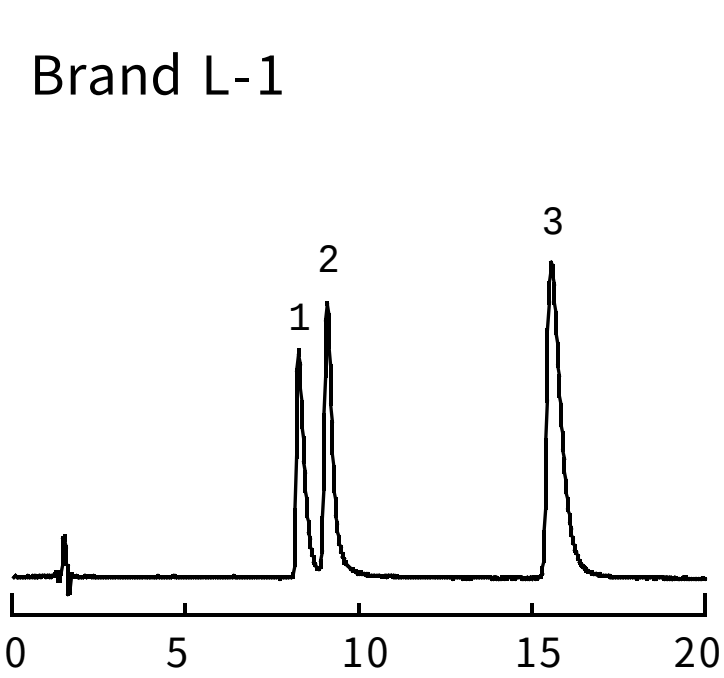
エンドキャッピングが劣ると・・・

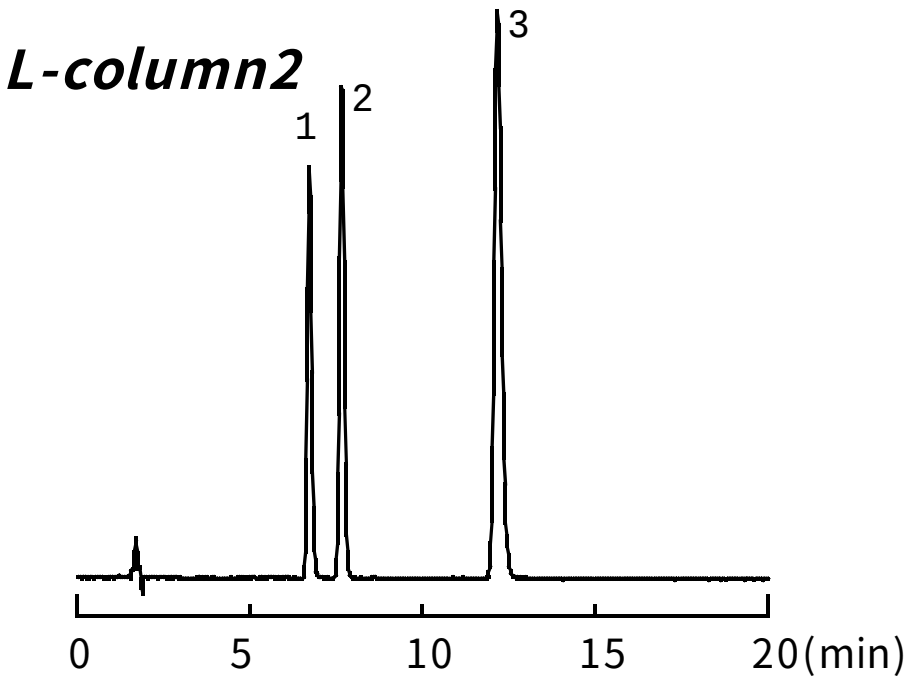
- 塩基性物質や配位性化合物が吸着しピークがテーリングする。
- カラムのロット間のばらつきが大きくなる。
- カラムの耐久性が落ちやすい。

© CERI 2018, Japan

エンドキャッピングによるピーク形状の差１

Application No.L2052





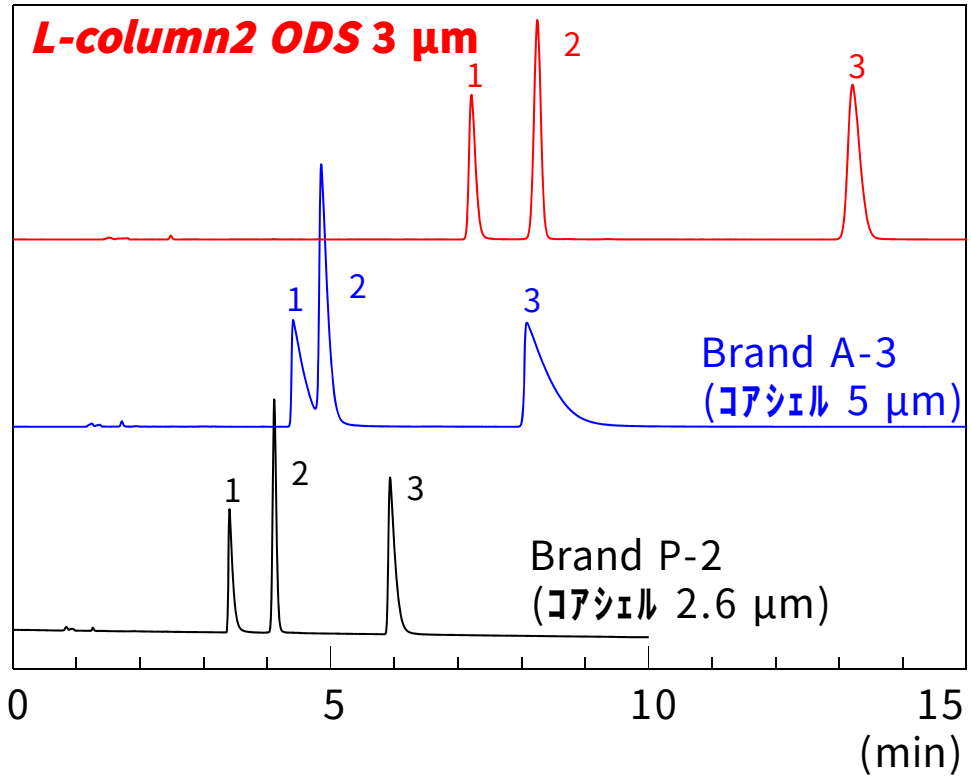
【分析条件】
カラム：C18, 5 µm, 4.6×150 mm
移動相：アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液(pH7)(35/65)
流速：1 mL/min; 温度：40°C; 検出：UV230 nm
注入量：2 µL
試料：1. パロキセチン, 2. シタロプラム, 3. フルオキセチン

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

エンドキャッピングが不十分 ⇒ 分離性能が格段に落ちる。

© CERI 2018, Japan

エンドキャッピングによるピーク形状の差２



【分析条件】
カラム：C18, 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：UV230 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

カラム	理論段数(T.f.)
	フルオキセチン
L-column2 ODS 3 µm	22141 (1.37)
Brand A-3	2154 (6.62)
Brand P-2	15254 (2.45)

コアシェルカラムでも吸着すると段数は激減 ⇒ やはり低吸着性は重要！

© CERI 2018, Japan

カラムサイズのラインアップ（例）と用途

	スケール（mm）	名称	用途
内径	～0.1	ナノカラム	MS、省溶媒 検出感度向上
	0.1～1.0	ミクロカラム	
	1.5、2.1	セミミクロカラム	
	3.0～6.0	コンベンショナルカラム	汎用
	6.0～	セミ分取カラム 分取カラム	分取精製
長さ	～50 100～150 250	ショートカラム ― ―	ハイスループット 汎用 高分離

© CERI 2018, Japan

まとめ (カラムの基礎)

- カラムはHPLC分析の最も本質的な部分
- ODSカラムは、シリカ基材にODS基が修飾されたものであり、HPLCカラムの75%程度を占める。
- シリカ系カラムは高い理論段数が得られ機械的強度も高い。
- 粒子径を小さくすると、理論段数・分離度が向上 or 分析時間が大幅に短縮。しかしカラム圧が著しく上がる。
- 化学結合基の種類により分離パターンを変化させることが可能
- 低吸着性（エンドキャッピング）は非常に重要
（テーリング、保持の遅延、ロット間差、耐久性低下を防ぐ。）

© CERI 2018, Japan

分離の改善の理論

２成分の分離の程度は分離度 R_S で表わされる。
（$R_S > 1.5$で完全分離）

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

R_S ：分離度
N ：理論段数
α ：分離係数
k ：保持係数

N ：理論段数　$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)$

α ：分離係数　$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$

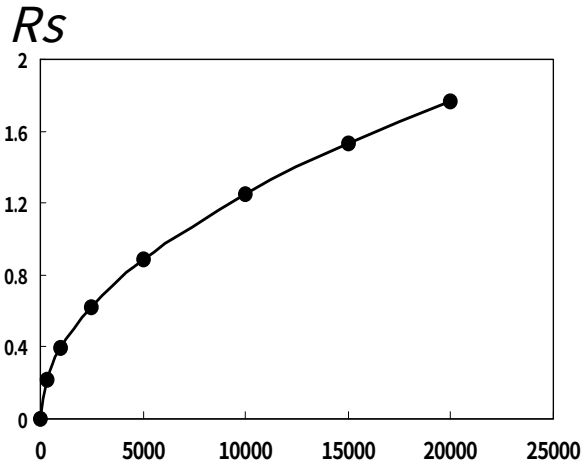
k ：保持係数　$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

t_R ：保持時間
$W_{1/2}$ ：ピークの半値幅
t_0 ：移動相のカラム通過時間

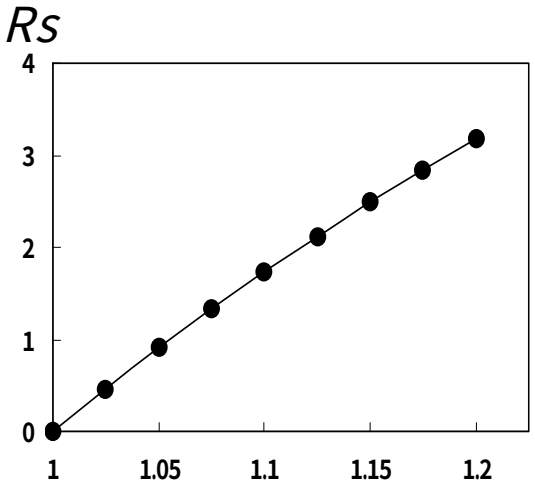
分離を改善するためには N、α、k を上げれば良い。

© CERI 2018, Japan

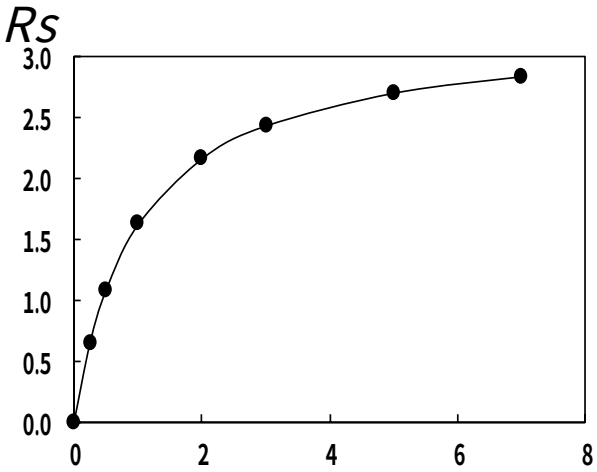
分離を改善する方法 （N、α、k）



理論段数 N



分離係数 α



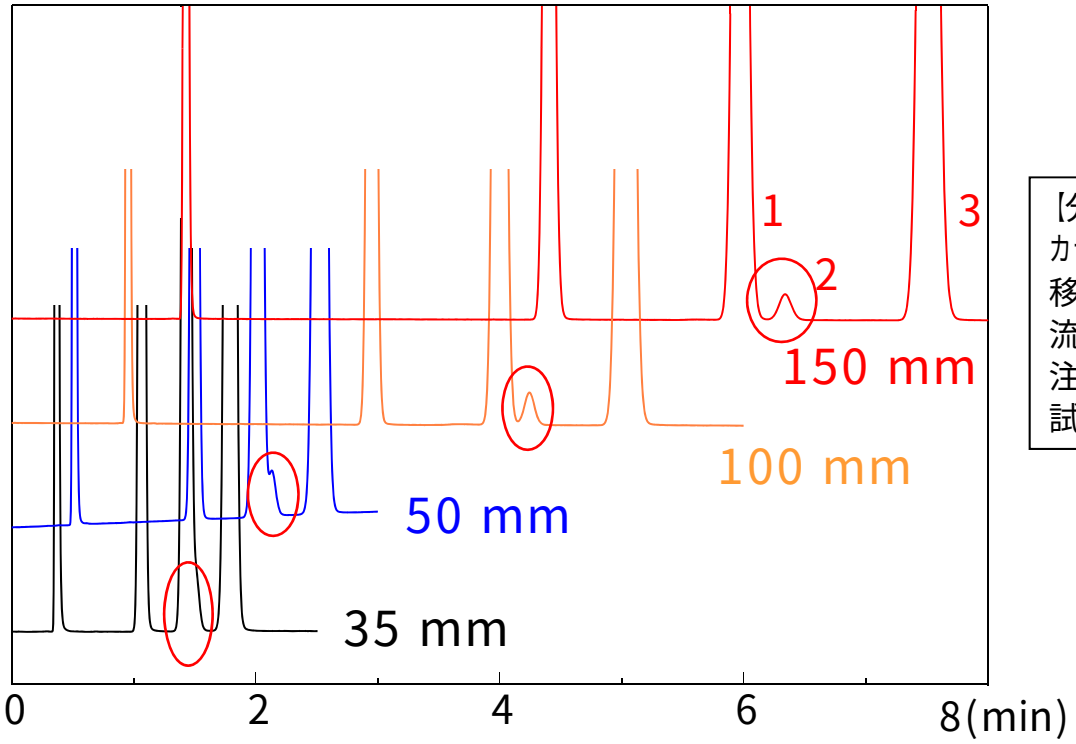
保持係数 k

理論段数 N	分離係数 α	保持係数 k
充填剤の粒子径 ・粒度分布が狭い。 ・微小化	カラム(化学結合基)を変える。	移動相の水系の比率を増やし調整 （k＜2の範囲で有効）
エンドキャッピングが優れており テーリングしない。	移動相の種類、組成、pHを変える。カラム温度を変える。	
カラムを長くする。(ただし圧が上昇)		

：カラムに関すること
：分析条件に関すること

© CERI 2018, Japan

カラムを長くする



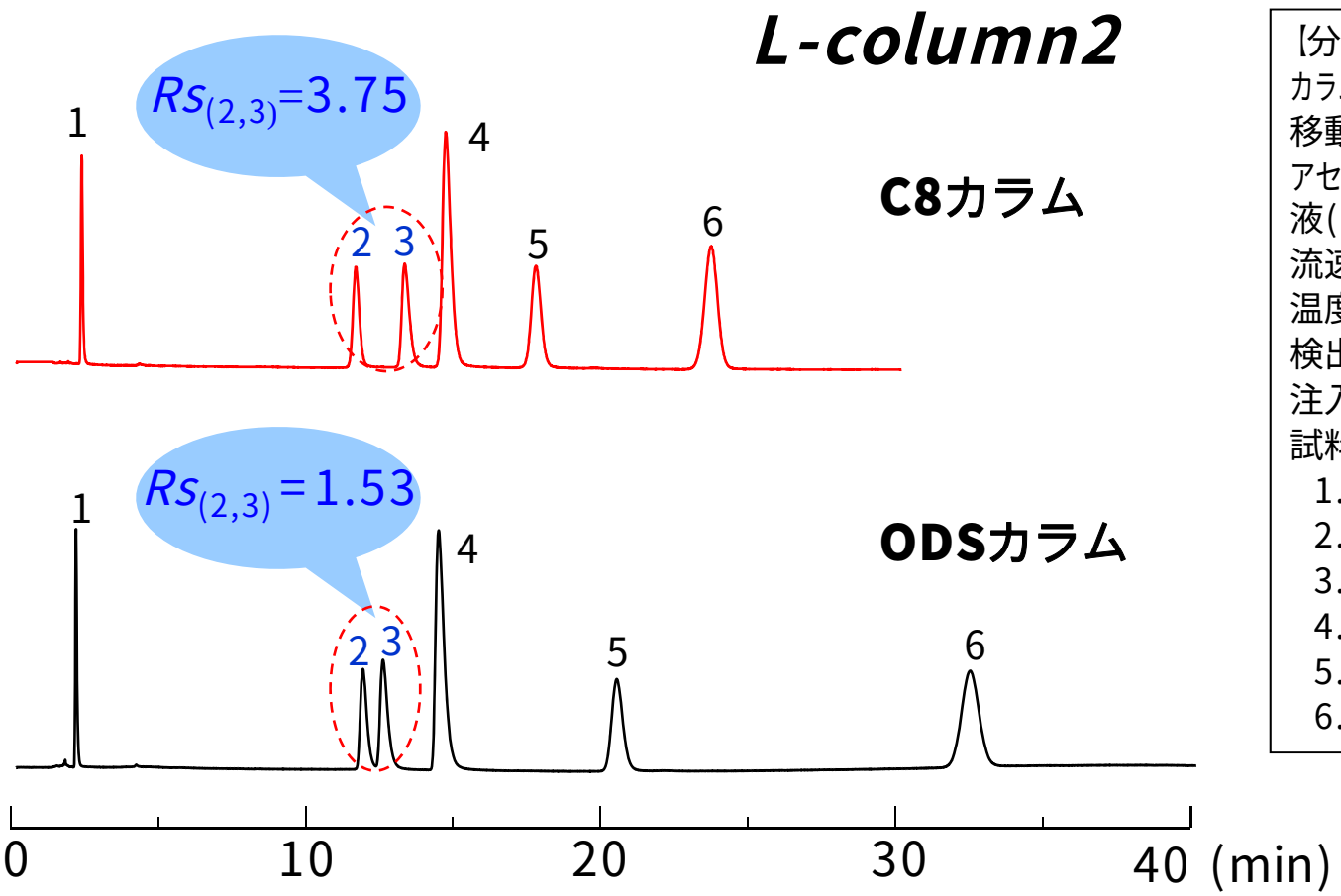
【分析条件】
カラム：***L-column2 ODS*** 5 µm, 4.6 mm i.d.
移動相：アセトニトリル/水(60/40)
流速：1 mL/min; 温度：40°C; 検出：UV254 nm
注入量：1 µL
試料：1. トルエン, 2. 不純物, 3. ナフタレン

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

カラムを長くすることで分離を改善できる。

© CERI 2018, Japan

化学結合基を変える（ODS⇒C8）



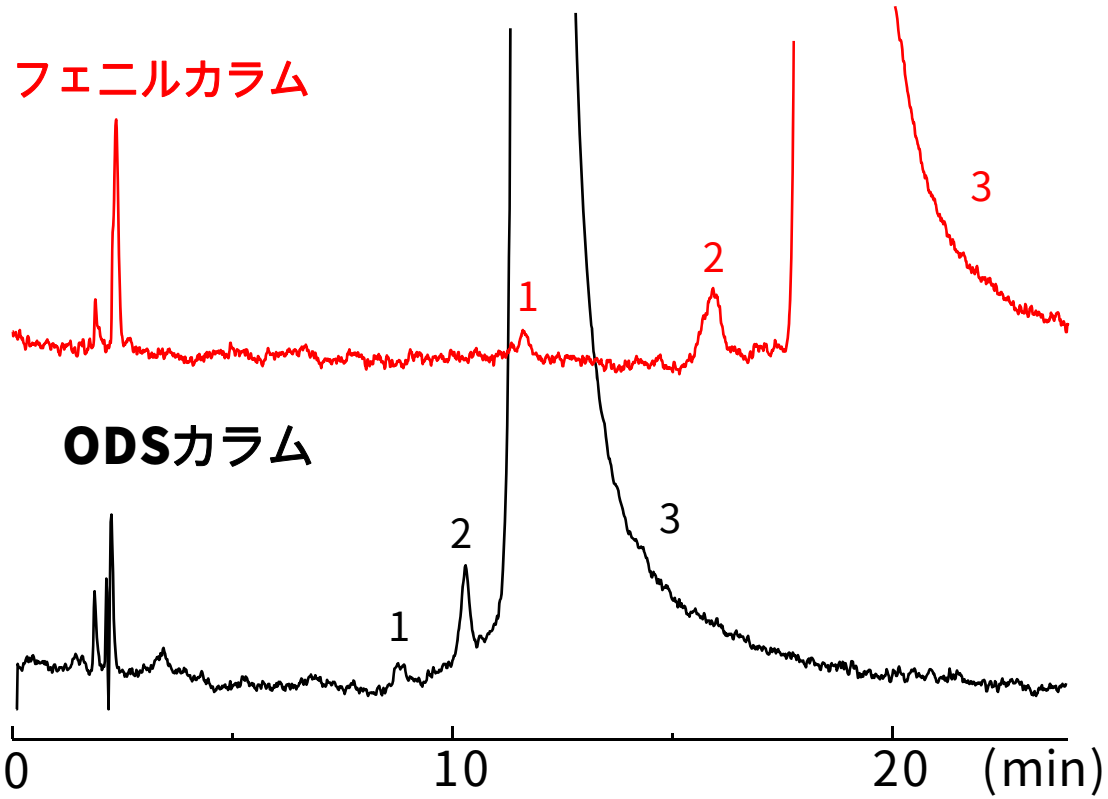
【分析条件】
カラム：5 µm, 4.6×150 mm
移動相：
アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液(pH7)(30/70)
流速：1 mL/min
温度：40℃
検出：UV220 nm
注入量：1 µL
試料：
1. スルピリド
2. デシプラミン
3. パロキセチン
4. マプロキセチン
5. アモキサピン
6. トラゾドン

デシプラミン、パロキセチンの分離が改善する。

© CERI 2018, Japan

化学結合基を変える（ODS⇒フェニル）

レボフロキサシンの不純物分析

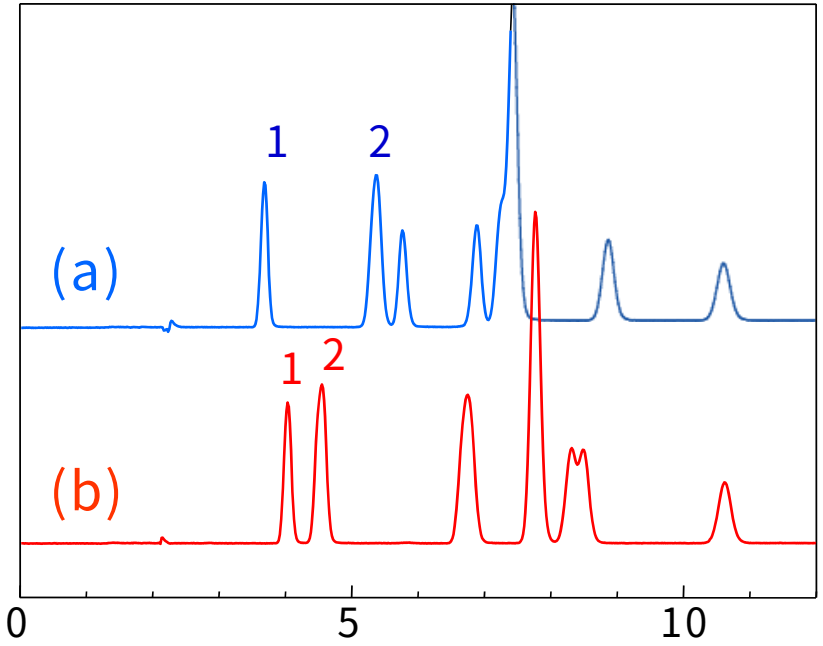


【分析条件】
カラム：5 µm, 4.6×150 mm
移動相：
メタノール/20 mMリン酸溶液
(10/90)
流速：1 mL/min
温度：40°C
検出：UV294 nm
注入量：2 µL
試料：
1. 不純物 A
2. 不純物 B
3. レボフロキサシン

レボフロキサシンと不純物の分離が改善する。

© CERI 2018, Japan

移動相の種類を変える



(a)メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム (15/85)

$R_{S(1,2)}$=6.58　$\alpha_{(1,2)}$=1.80

(b)アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム (10/90)

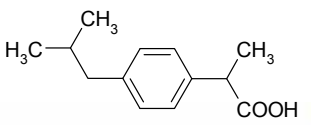
$R_{S(1,2)}$=1.90　$\alpha_{(1,2)}$=1.21

【分析条件】カラム：***L-column ODS***, 5 μm, 4.6×150 mm；試料：サルファ剤

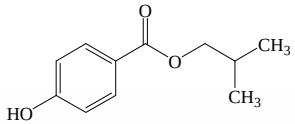
移動相の溶媒を変えることで分離が改善される場合がある。

© CERI 2018, Japan

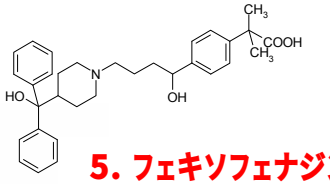
移動相のpHを変える（解離性物質）



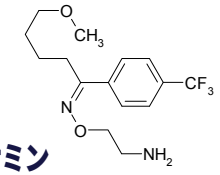
2. イブプロフェン
pKa＝4.5



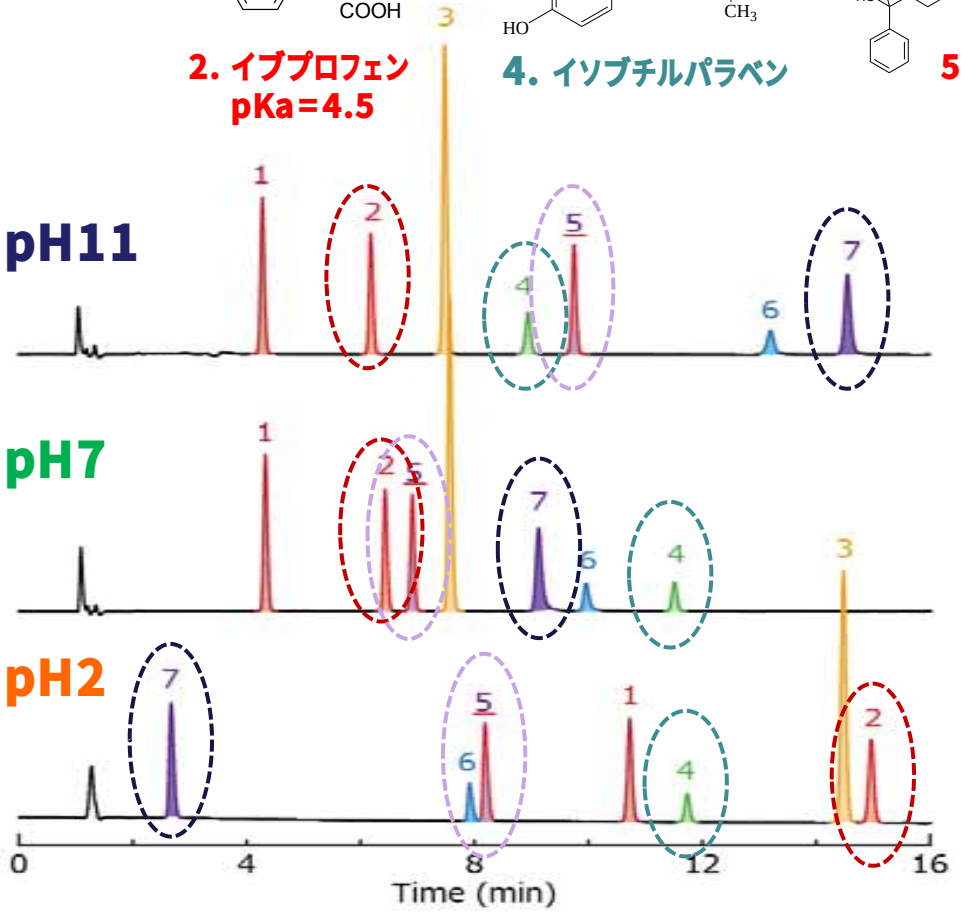
4. イソブチルパラベン



5. フェキソフェナジン
pKa＝4.3, 9.5



7. フロボキサミン
pKa＝9.2



分析条件

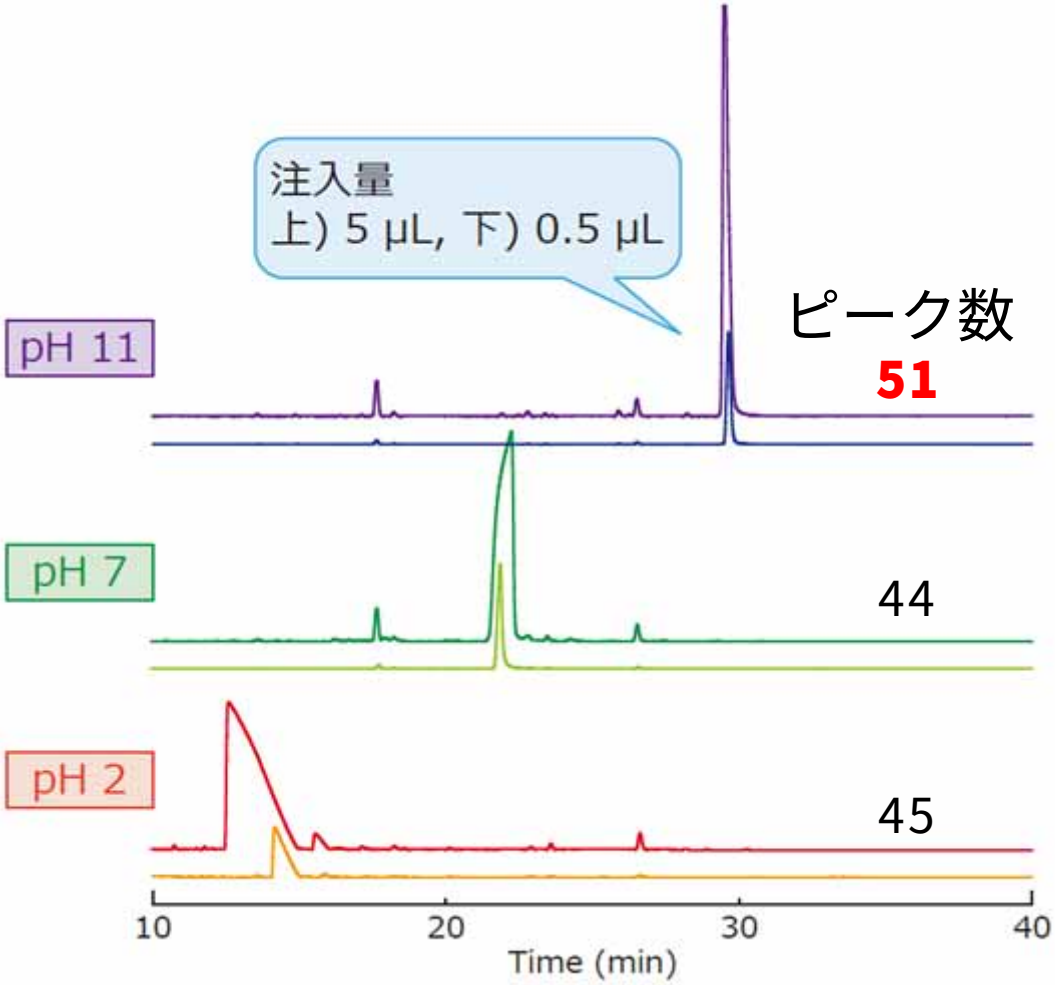
HPLC：島津NEXERA
カラム：***L-column3 C18*** 5μm、2.1×150 mm
移動相：
A；25 mMリン酸緩衝液（pH2, 7, 11）
B；アセトニトリル
A/B、80/20-30/70（0-20min）
温度：40℃、流速：0.3 mL/min
注入量：1 μL

Sample
1.ケトプロフェン(酸性)
2.イブプロフェン(酸性)
3.インドメタシン(酸性)
4.イソブチルパラベン(弱酸性)
5.フェキソフェナジン(両性)
6.トリプロリジン(アルカリ性)
7.フルボキサミン(アルカリ性)

解離性物質について移動相のpHで分離パターンが変化。
ただし、カラムの耐久性に注意（特にシリカ系カラム）

© CERI 2018, Japan

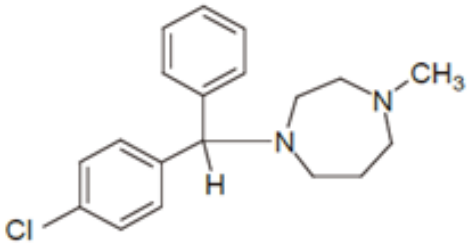
移動相のpHを変える（ホモクロルシクリジン分解物）



分析条件

HPLC：島津NEXERA
カラム：***L-column3 C18*** 5 µm、2.1×150 mm
移動相：
A：25 mM リン酸緩衝液（pH 2, pH7, pH11）
B：アセトニトリル
A/B：95/5-25/75-25/75（0-30-40 min）
温度：40°C; 流速：0.2 mL/min
注入量：5 µL
試料：10 g/L ホモクロルシクリジンの分解物

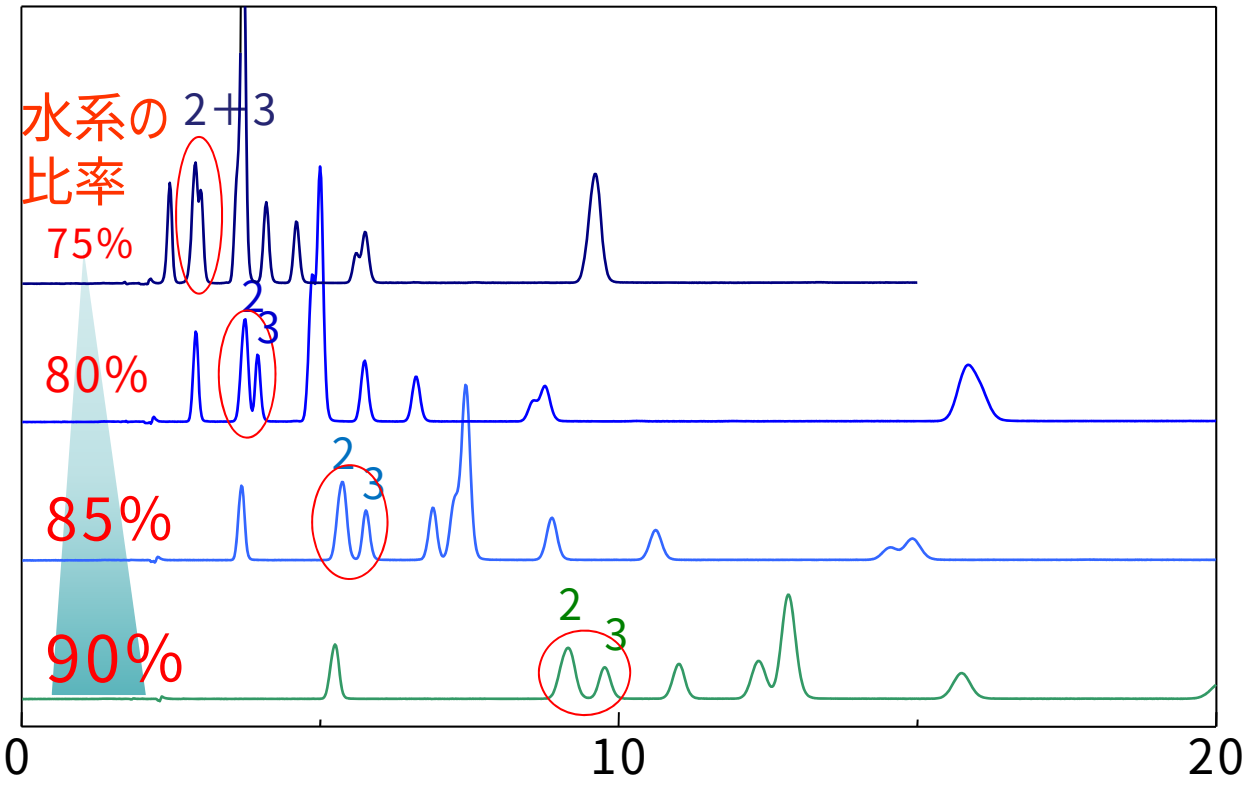
Homochlorcyclizine



アルカリ性移動相の使用により、高濃度試料においても
ピーク形状が良好で、なおかつ多くの不純物を分離検出

© CERI 2018, Japan

移動相の水系の比率を増やし調整



水系の比率(%)	$Rs_{(2,3)}$	$k_{(3)}$
75	0.90	0.89
80	1.06	1.47
85	1.47	2.61
90	1.46	5.10

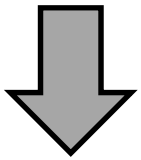
【分析条件】カラム：***L-column ODS***, 5µm, 4.6×150 mm ； 移動相：メタノール/10 mM酢酸アンモニウム；試料：サルファ剤

保持係数＜2 の範囲※であれば、遅く溶出させることで分離が改善できる。　　(※;150 mm**のカラムで約5分**)

© CERI 2018, Japan

まとめ (分離改善のノウハウ)

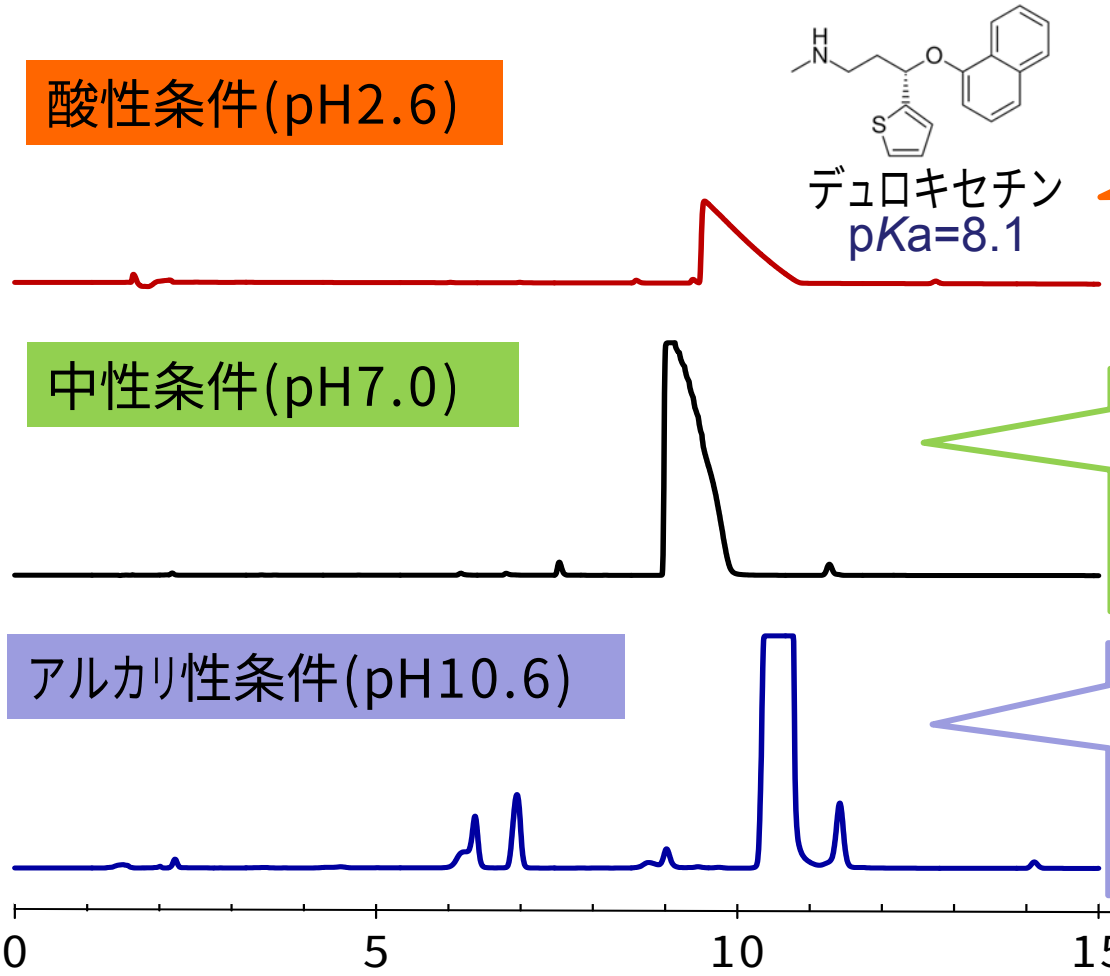
・分離度*Rs*を改善するためには 理論段数*N*、分離係数α、保持係数*k* を上げれば良い。
・ *N*、α、*k* はカラム性能と分析条件（移動相・pHなど）に依存する。



・カラム性能で分離能力は限定されるため、
ファーストチョイスとしてはなるべく**高性能なカラム**がよい。
・カラムの分離性能を極力引き出す。（分析条件の最適化）

© CERI 2018, Japan

デュロキセチン（塩基性物質）の大量負荷



デュロキセチン
p*K*a=8.1

負荷量：**10 µg**
移動相条件
A：10 mMギ酸溶液 (pH 2.6)
B：アセトニトリル
A/B ：90/10-40/60 (0-15 min)

負荷量：**40 µg**
移動相条件
A：10 mMギ酸溶液＋アンモニア (pH 7.0)
B：アセトニトリル
A/B ：85/15-35/65 (0-15 min)

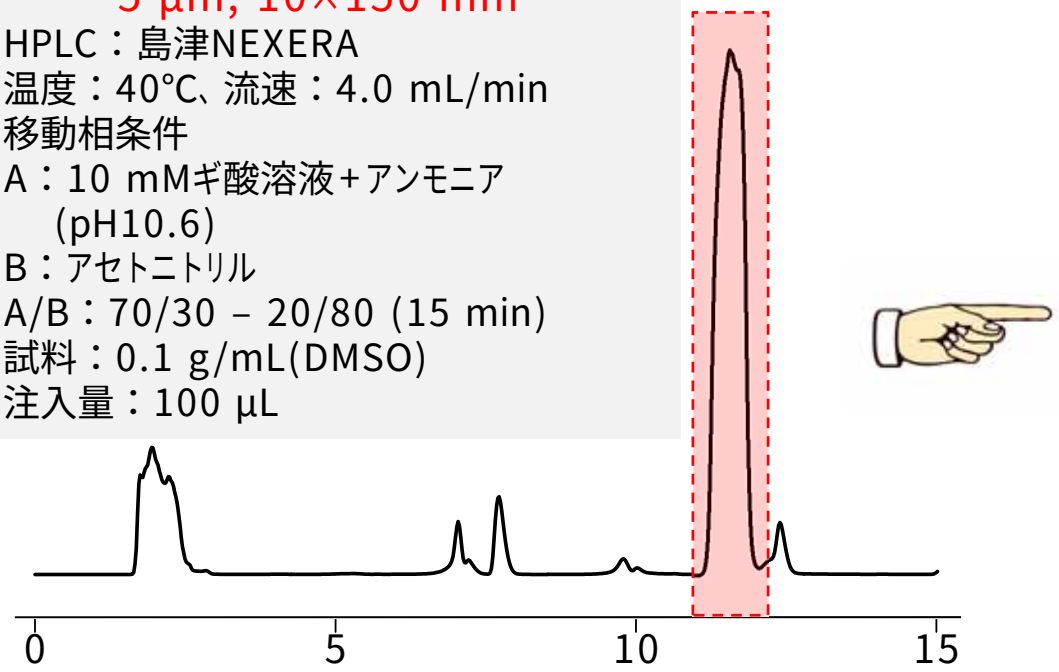
負荷量：**>400 µg**
移動相条件
A：10 mMギ酸溶液＋アンモニア (pH 10.6)
B：アセトニトリル
A/B ：70/30-20/80 (0-15 min)

アルカリ性移動相（解離を抑えた状態）の使用により
シャープなピーク形状を維持したまま負荷量を稼げる!!!

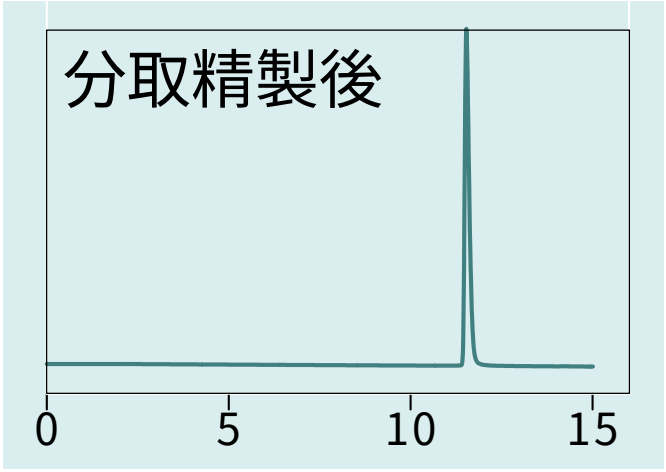
© CERI 2018, Japan

デュロキセチン(10mg)の分取

分析条件
カラム：***L-column3 C18***
5 μm, 10×150 mm
HPLC：島津NEXERA
温度：40°C、流速：4.0 mL/min
移動相条件
A：10 mMギ酸溶液+アンモニア
(pH10.6)
B：アセトニトリル
A/B：70/30 – 20/80 (15 min)
試料：0.1 g/mL(DMSO)
注入量：100 μL



純度（精製前）：約90%



精製後＞99.9%

アルカリ性条件下では大量に負荷することができ、精製効率が向上

© CERI 2018, Japan

LC/MS/MSにおける検出感度の向上(農薬)

【農薬分析条件】

ＬＣ： Ultimate 3000 Bio RS (Thermo Fisher Scientific K.K.)

カラム： ***L-column3 C18*** 3μm, 2.1×150 mm

移動相：A 5 mMアンモニア溶液, B 5 mMアンモニア溶液含有メタノール

A/B, 85/15(0 min)-60/40 (1-3.5 min)-50/50(6 min)
-45/55(8 min)-5-95(17.5-30 min)

流速： 0.2 mL/min

注入量： 5 μL

試料：0.1 mg/L 農薬混合標準液 in 茶マトリックス

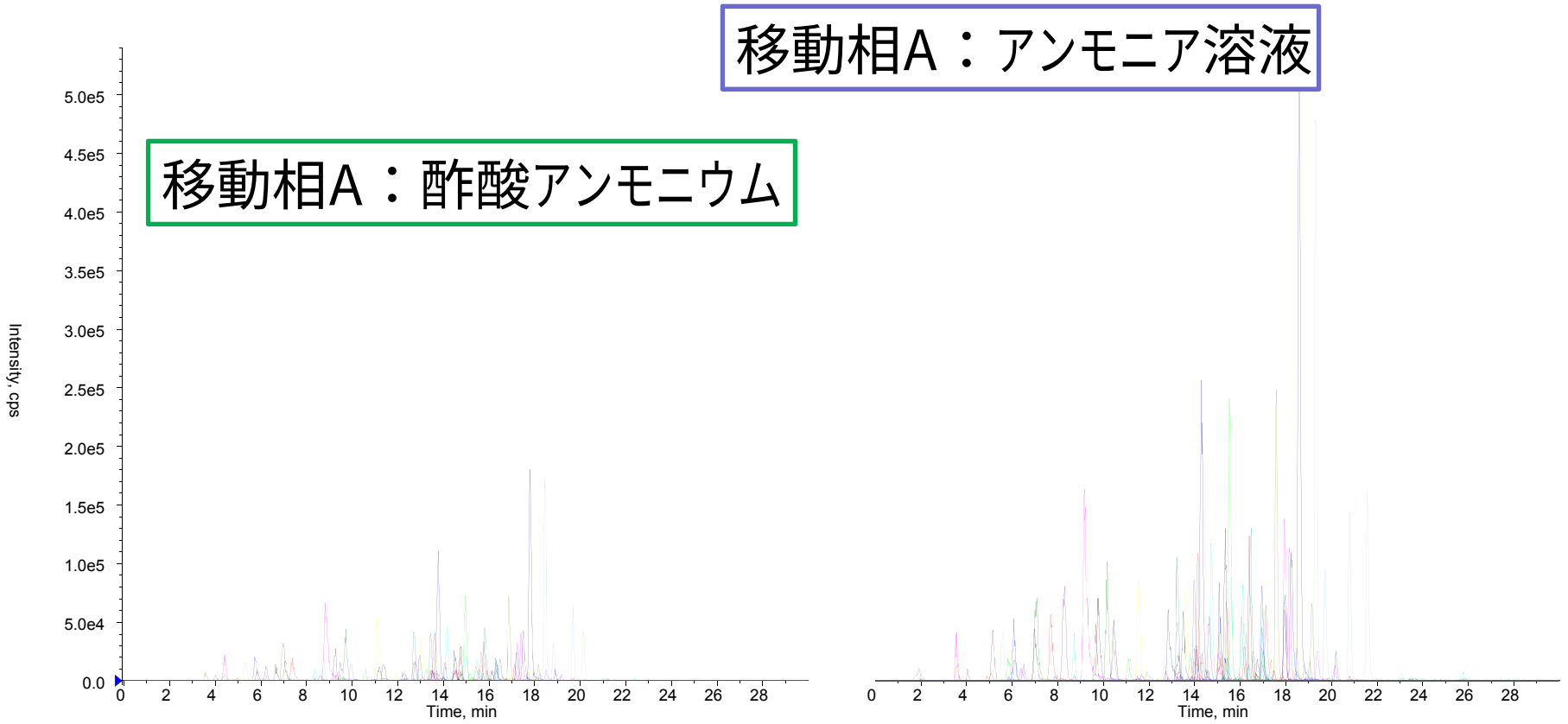
MS/MS： 3200 QTRAP (Sciex)

検出：ESI-MS/MS

公定法の5mM酢酸アンモニウムを5mMアンモニア溶液に変更

© CERI 2018, Japan

LC/MS/MSにおける検出感度の向上(農薬)



アンモニア溶液を用いた移動相において
茶葉マトリックスに添加した農薬117種の
95%でS/N比が向上（平均3.2倍）

© CERI 2018, Japan

LC/MS/MSにおける検出感度の向上(TC)

【テトラサイクリン(TC)分析条件】

LC：Ultimate 3000 Bio RS (Thermo Fisher Scientific K.K.)

カラム：***L-column3　C18*** 3 μm, 2.0×50 mm

移動相： A:5 mM アンモニア溶液 or 5 mM ギ酸溶液

B:アセトニトリル

A/B:99/1-40/60 (0-5 min)

流速：0.2 mL/min

カラム温度：15℃

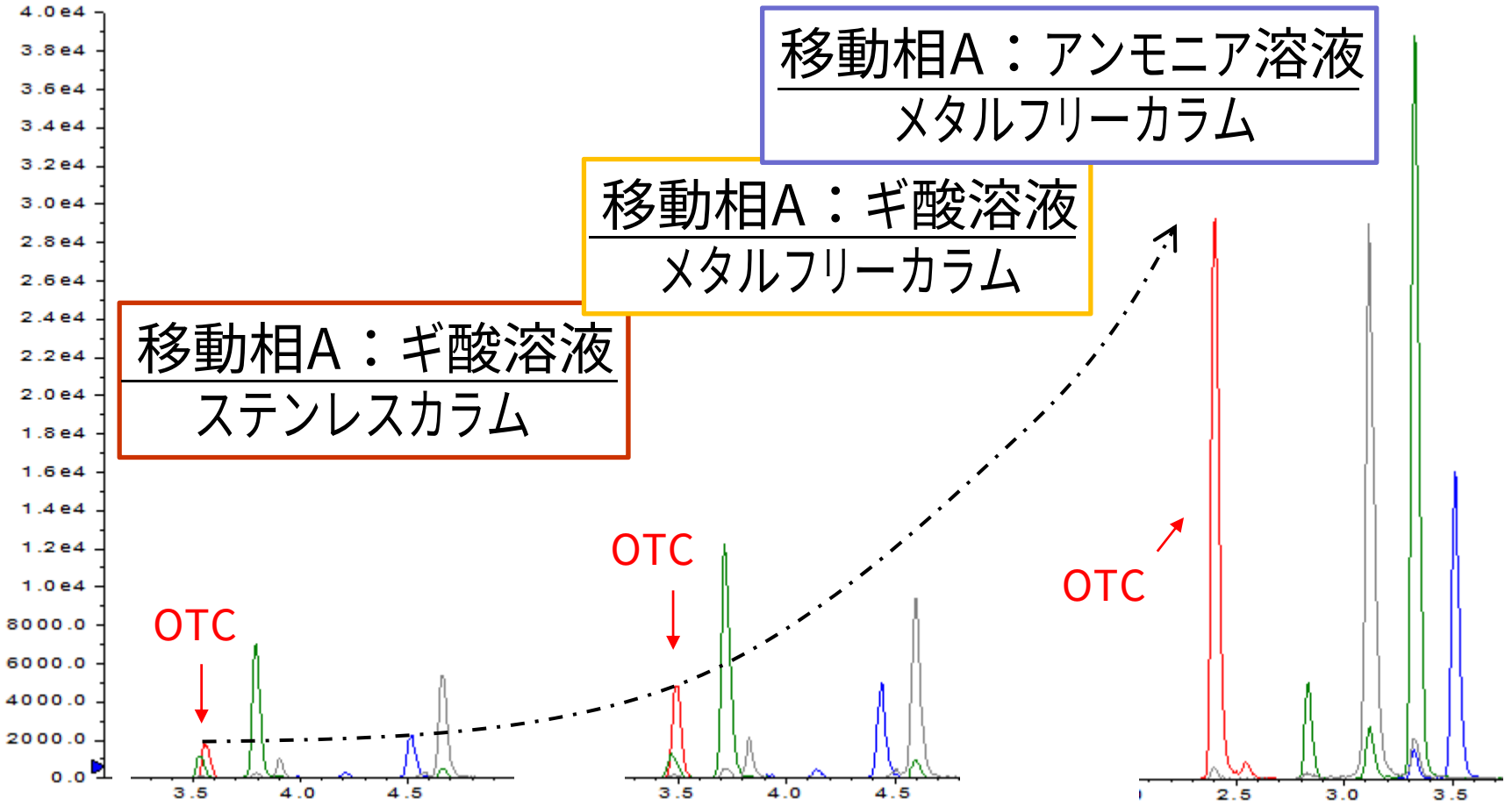
試料：50 μ g/L　4種テトラサイクリン（TC、CTC、OTC、DC）

注入量： 1 μL;MS/MS： 3200 QTRAP (Sciex)

検出：ESI-MS/MS （+）

© CERI 2018, Japan

LC/MS/MSにおける検出感度の向上(TC)



アンモニア溶液の使用とメタルフリーカラムにより、感度が大幅向上

© CERI 2018, Japan

カラムの劣化原因と対策

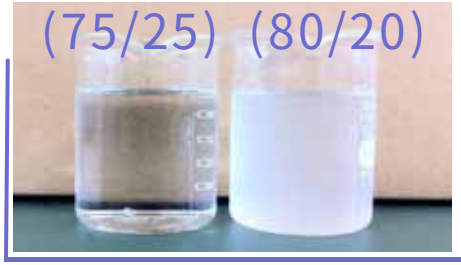
化学的要因

- 酸性移動相による化学結合基の脱離・シラノール基の生成
  → 保持の減少・塩基性物質のテーリング
- アルカリ性移動相による基材の侵食 → 理論段数の激減

物理的要因

- システム、移動相、試料由来の不溶物の詰まり
- 緩衝液由来の塩の析出
- 脂溶性成分などの蓄積

→ カラム圧の上昇



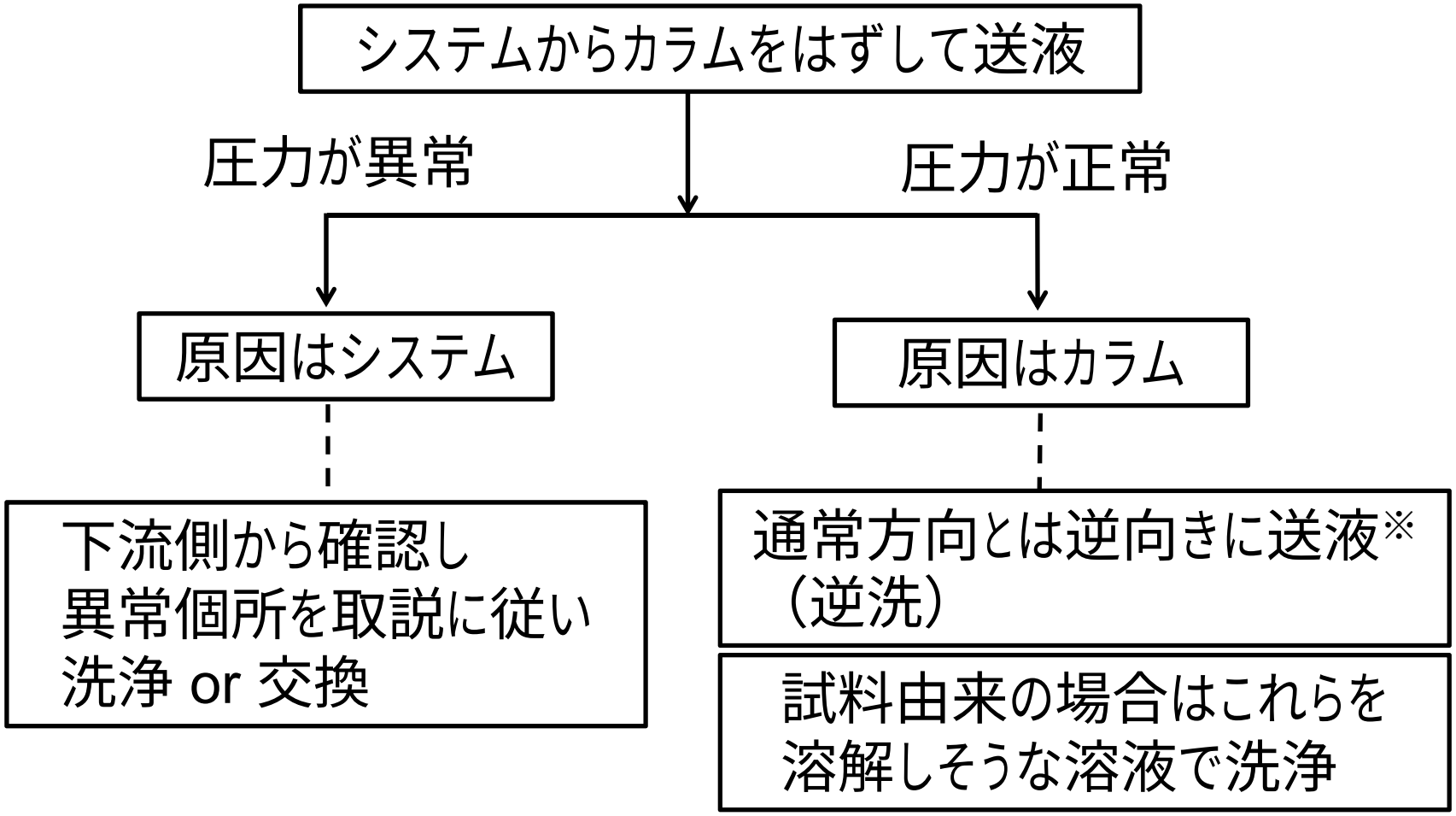
アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液pH 7

- 急激な圧力変化や圧力上限を超えた送液 → 理論段数の激減

移動相条件の再検討、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

© CERI 2018, Japan

システム圧が上昇したときの対処



※；必ず事前にカラムの取説を参照し逆洗可能か確認してください。また、
物理的に不溶物が詰まった場合は洗浄で完全に除去できるケースは少ないです。
*L-column*シリーズは、基本的に逆洗可能（ただし内径1 mm未満のミクロカラムは不可）

© CERI 2018, Japan

カラムの洗浄方法

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***

Step 1．塩等を含まない移動相を送液　：メタノール/水　20/80

Step 2．有機溶媒の濃度を上げて送液　：メタノール/水　60/40

Step 3．有機溶媒100%で送液　：メタノール　100%

- 各Stepでカラム容量の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、最後にテトラヒドロフラン(THF)で洗浄する。
- *逆洗*も有効（*逆洗可能なカラムか確認が必要！*）

© CERI 2018, Japan

【実例】カラム圧の上昇

[症状]
短期間でカラム圧が上昇し、ピーク割れが発生した。

[使用状況]
カラム　　：***L-column2 ODS***, 3 µm
サイズ　　：4.6 mm ×150 mm
移動相　　：アセトニトリル/リン酸緩衝液(pH6.5)グラジエント
試料　　：医薬品など
使用期間：2～3週間(300時間以内)

© CERI 2018, Japan

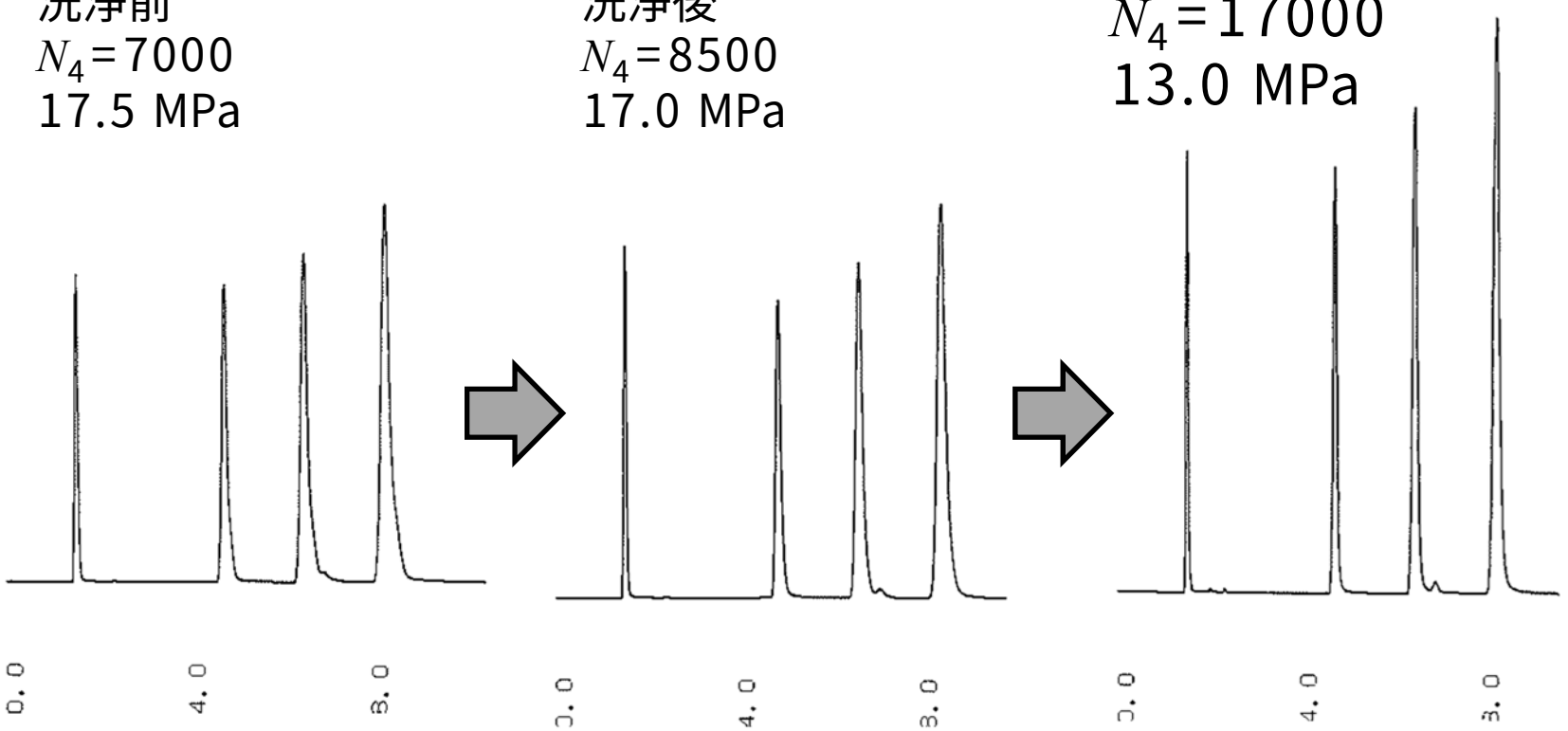
【実例】カラム圧の上昇（続き）

[原因究明]

洗浄前
N_4=7000
17.5 MPa

洗浄後
N_4=8500
17.0 MPa

入口側のフィルターを交換
N_4=17000
13.0 MPa



[結果]カラムの入口付近での不溶物の蓄積

その後の調査で、蓄積した不溶物はリン酸緩衝液のボトル内で繁殖した雑菌であることが判明。溶離液調製の際は容器も取り替えることを推奨

フィルタの交換には技術が必要です。無理に外すと性能が元に戻らないことがあります。

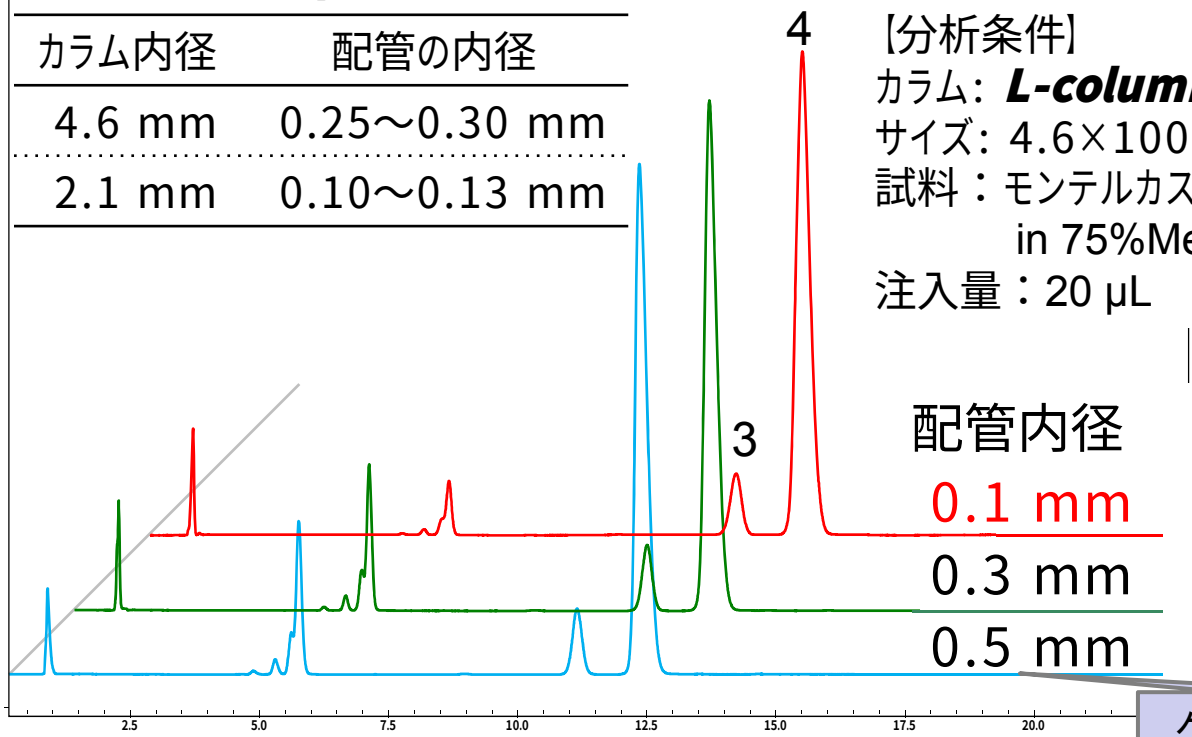
© CERI 2018, Japan

配管(カラム入口側)の内径の影響(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)

『配管は細く・短く』が基本

カラム内径	配管の内径
4.6 mm	0.25～0.30 mm
2.1 mm	0.10～0.13 mm



【分析条件】
カラム: ***L-column2 C6-Phenyl***, 3 μm
サイズ: 4.6×100 mm
試料：モンテルカストの過塩素酸分解物
in 75%MeOH
注入量：20 μL

配管内径	$Rs_{(3,4)}$	$N_{(4)}$
0.1 mm	2.74	9500
0.3 mm	3.01	12300
0.5 mm	3.09	13100

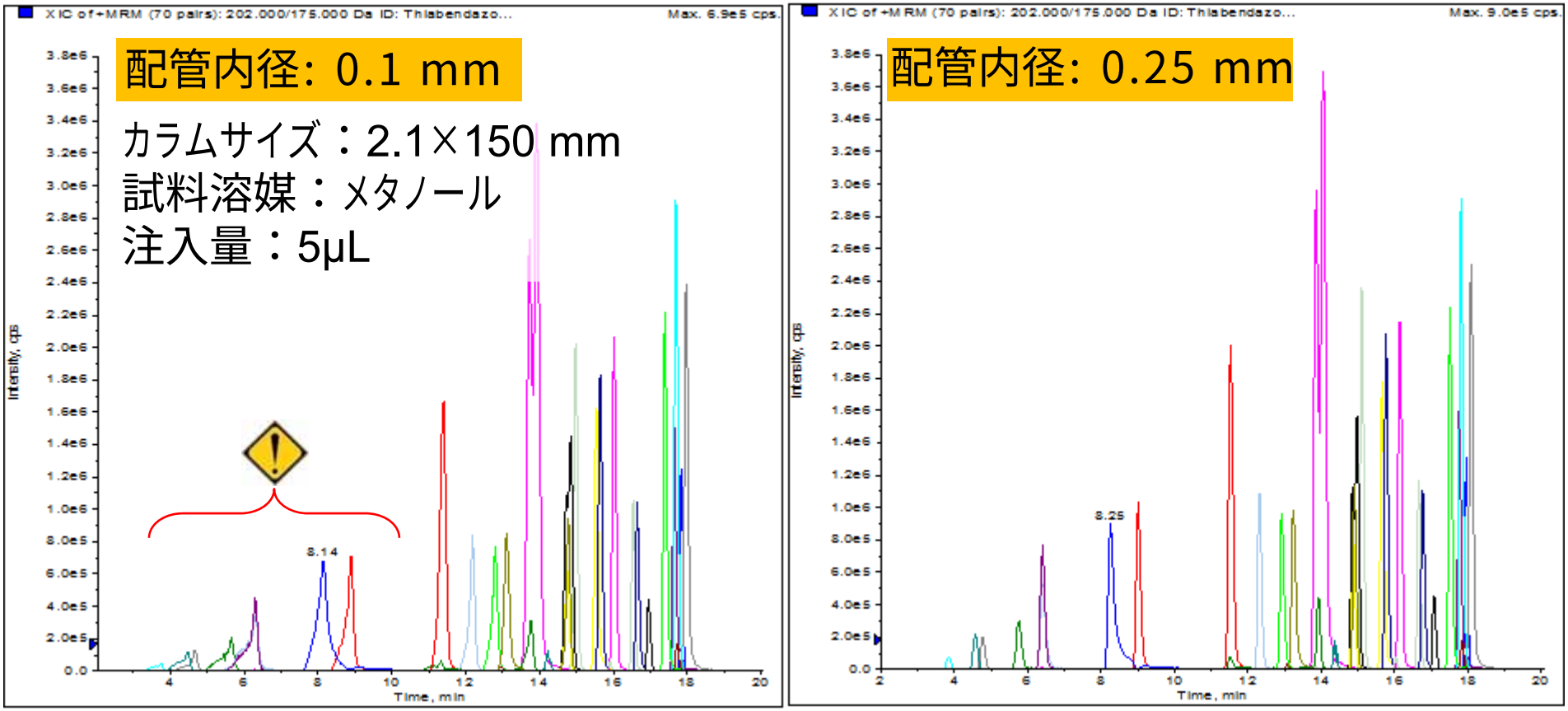
グラジエントで注入量多

配管の内径が細すぎると、ピーク形状が悪化
→グラジエント分析 and 注入量:多 ⇒ カラム内径の1/10が目安

© CERI 2018, Japan

【実例】ピーク割れ・リーディング（LC/MS/MS）

LC/MS/MSを用いた食品中の残留農薬の一斉分析



グラジエント分析で注入量が多いケース
→ カラム内径の1/10程度の配管の内径を目安に選択

© CERI 2018, Japan