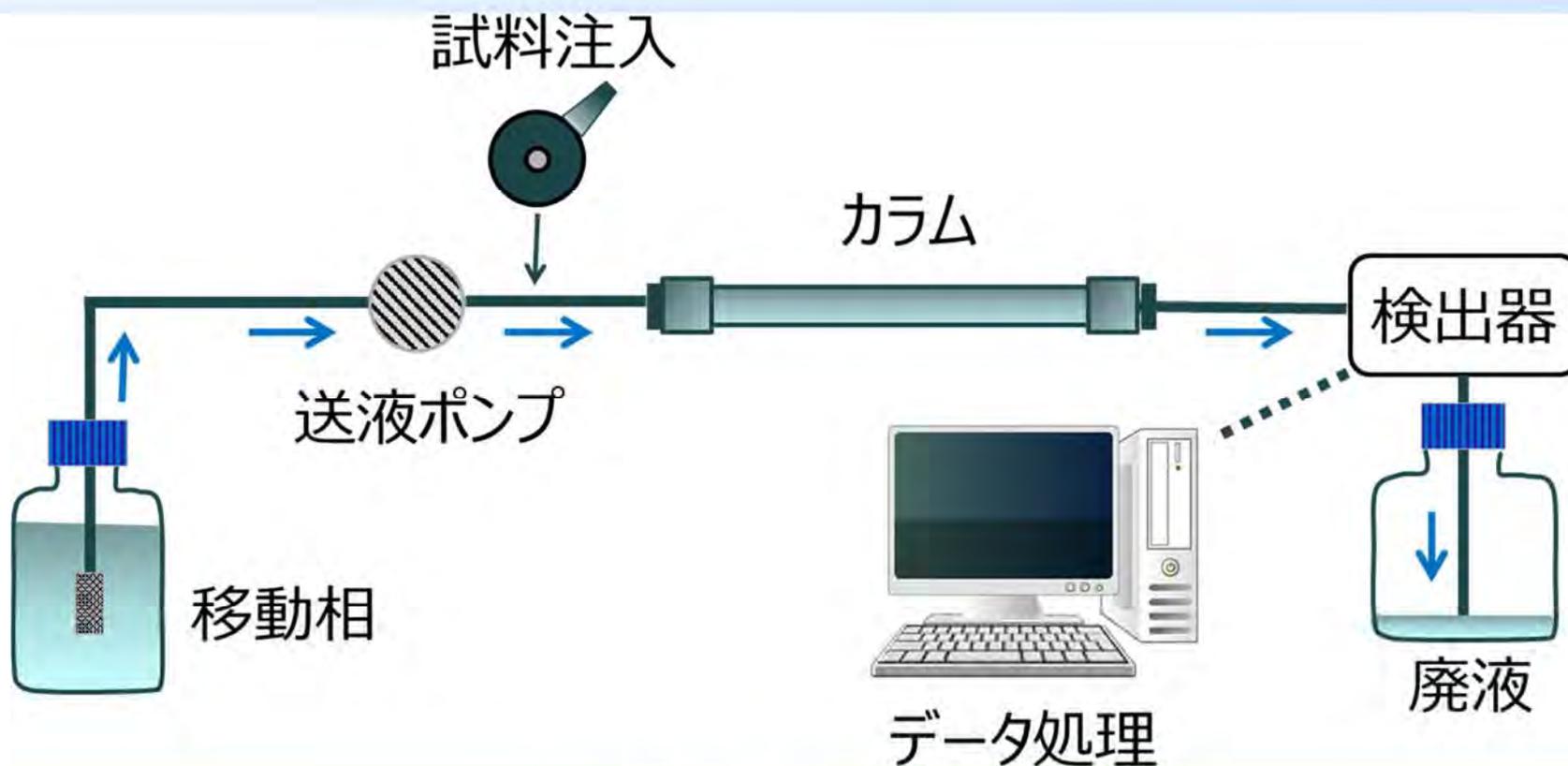


これで解決!! 逆相HPLC分析の問題 －カラムの基本と分離のノウハウ－

HPLCシステムのしくみ



高速液体クロマトグラフィー

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

【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 !!

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	C18(ODS) [※]	メタノール/水	疎水性化合物

※ オクタデシルシリル化シリカ

ちょっと詳しい液クロのコツ 分離編 丸善出版(株)より抜粋

C18カラムはHPLCカラムの75%程度を占めるといわれている。

カラムの構造

外観

断面図

充填剤(SEM写真)

製造工程

```
graph TD; A[高純度多孔性シリカ] --> B[化学結合基を修飾]; B --> C[エンドキャッピング]; C --> D[充填剤]; E[高圧充填] --> D;
```

カラム充填剤に関する情報

項目		説明	
充填剤	基材	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。 微小なほど分離効率(理論段数)が上がる。
		比表面積	比表面積に比例して化学結合基の導入量が増す。 保持の強さと比例傾向がある。
		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される。 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	化学結合基 の種類	C18(ODS)、C ₈ 、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のテーリングを防ぐために 残存シラノール基を不活性化処理する。	

充填剤基材

項目	種類		
形状	全多孔性 FPP(Fully porous particle) 	表面多孔性 SPP(Superficially porous particle)  FPPより高理論段数	
材質	シリカ 理論段数: 高 使用可能pH範囲: 狭	ハイブリッド シリカとポリマーの 中間的性質	ポリマー 理論段数: 低 使用可能pH範囲: 広
粒子径 (μm)	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> 低分離 低カラム圧 5 μm </div> <div style="text-align: center; flex-grow: 1;"> ← → </div> <div style="text-align: center;"> 高分離 高カラム圧 2 μm </div> </div>		
比表面積	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> 化学結合基 導入量: 少 保持: 弱 200 m²/g </div> <div style="text-align: center; flex-grow: 1;"> ← → </div> <div style="text-align: center;"> 化学結合基 導入量: 多 保持: 強 400 m²/g </div> </div>		

カラムサイズのラインアップと用途

	カラムサイズ (mm)	名称	用途
内径	1未満	マイクロカラム	LC/MS、省溶媒 検出感度向上
	1以上、3未満	セミマイクロカラム	
	3以上、10未満	汎用カラム	汎用
	10以上、50未満	セミ分取カラム	分取精製
長さ	～50	ショートカラム	ハイスループット
	100～150	—	汎用
	250	—	高分離

分離の改善: 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)

2つのピーク幅が等しい場合

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

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 $N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5h}} \right)^2$

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

$W_{0.5h}$: 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。

分離を改善する方法: N 、 α 、 k

分析条件

①移動相
(種類、有機溶媒比率、pH)

②カラム温度

カラム

③充填剤の粒子径

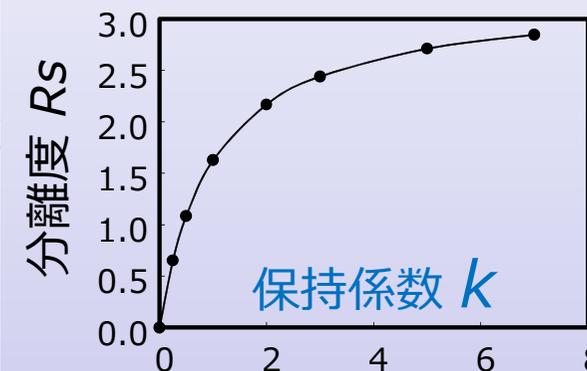
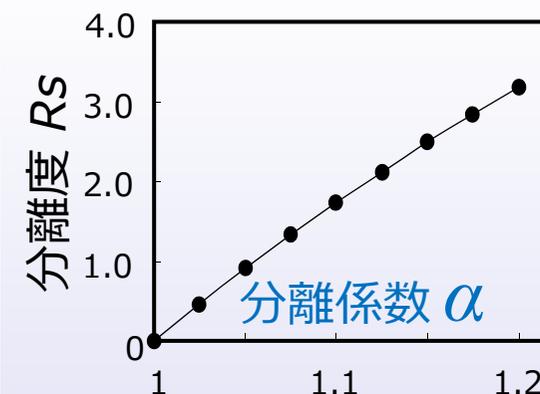
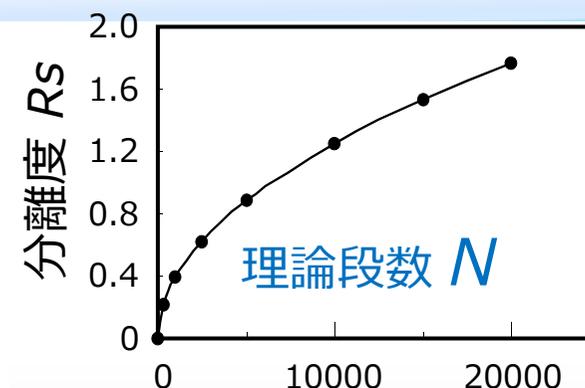
④カラム長さ

⑤化学結合基

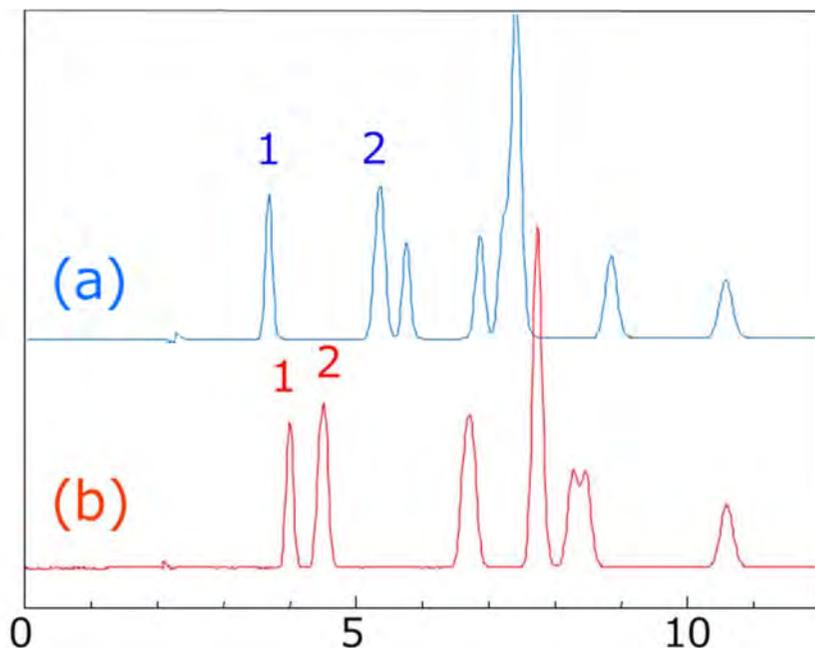
⑥エンドキャッピング

青字 : 熱力学因子 → 条件検討を行い改善

黒字 : 動力学的因子 → すべて一律に改善



①移動相: 種類



a)メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム溶液 (15/85)

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

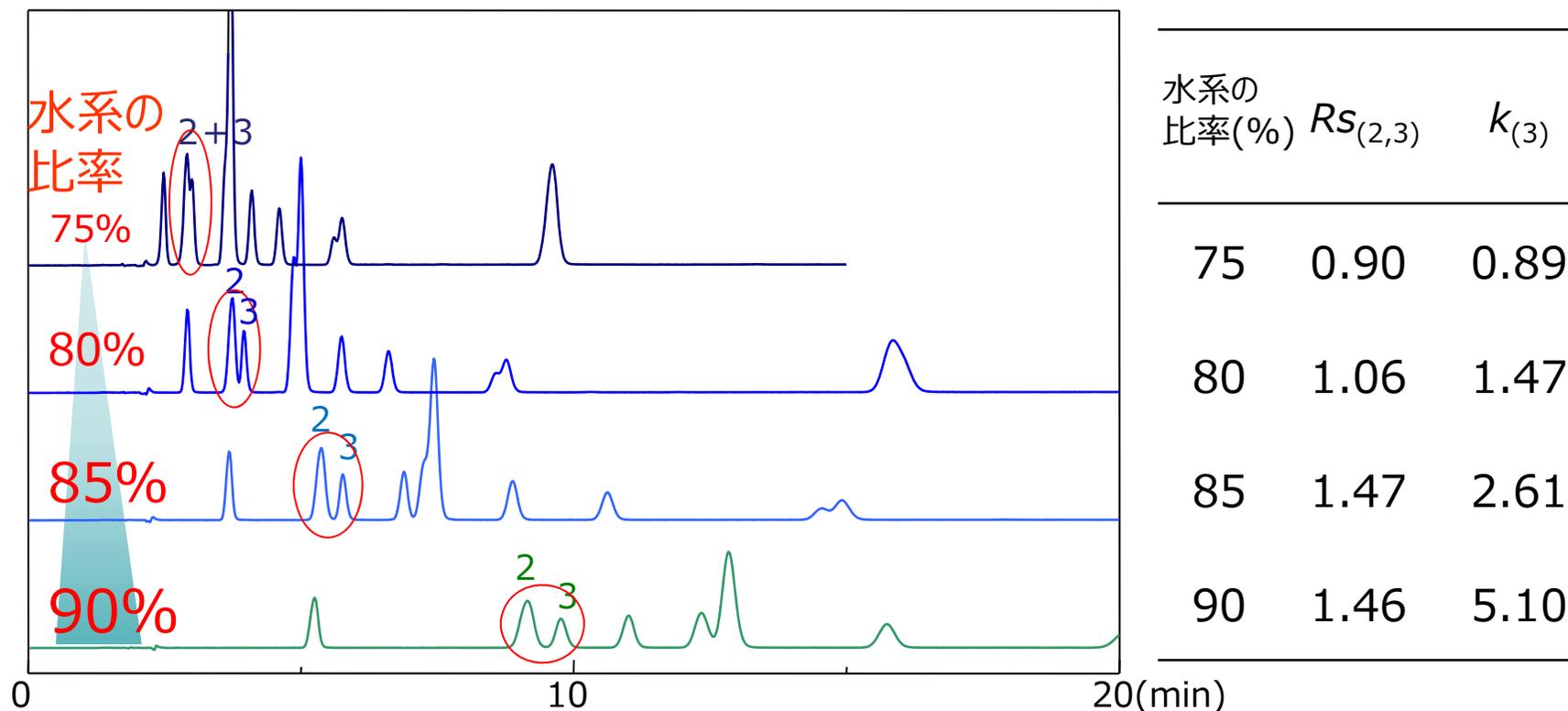
b)アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム溶液(10/90)

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

【分析条件】 カラム: *L-column ODS*, 5 μ m; 4.6 \times 150 mm; 流速: 1 mL/min; 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。

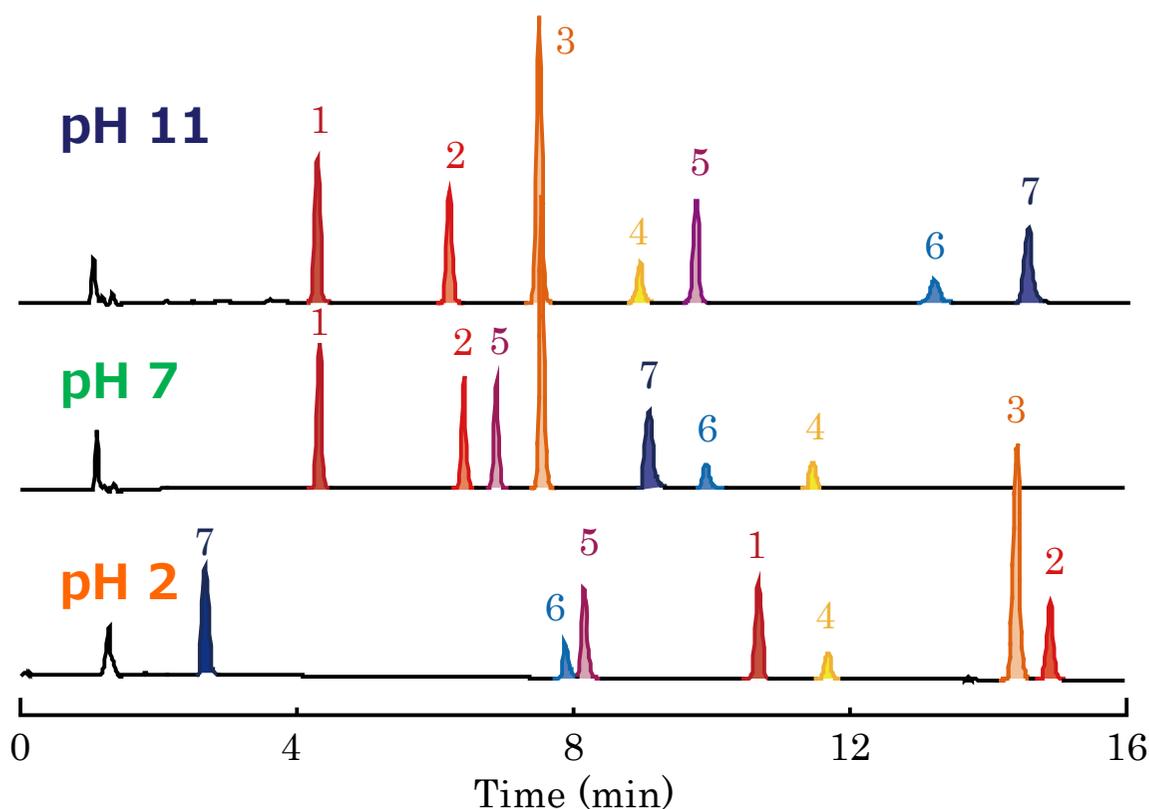
①移動相: 有機溶媒比率



【分析条件】カラム: *L-column ODS*, 5 μ m; 4.6 \times 150 mm; 移動相: メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム
 流速: 1 mL/min; 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分以内)

①移動相: pH

**【分析条件】**

カラム: L-column3 C18, 5 μ m
2.1 \times 150 mm

移動相: A: アセトニトリル
B: 25 mMリン酸緩衝液
(pH 2, pH 7, pH 11)
A/B, 20/80-70/30(0-20 min)

温度: 40 $^{\circ}$ C

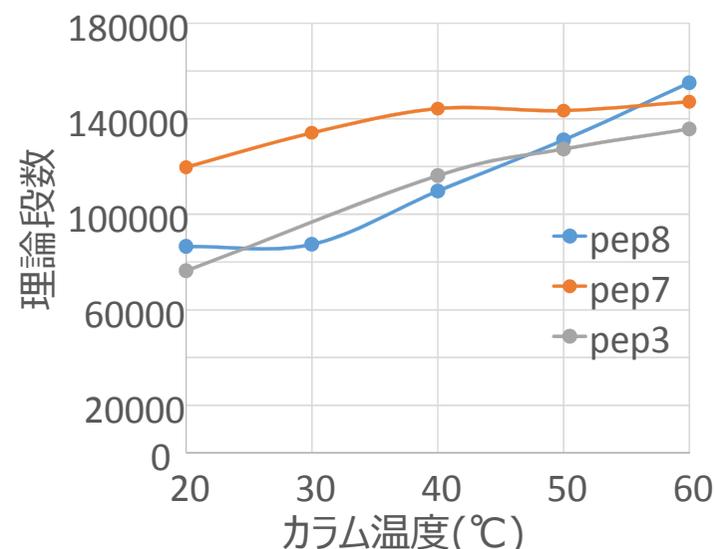
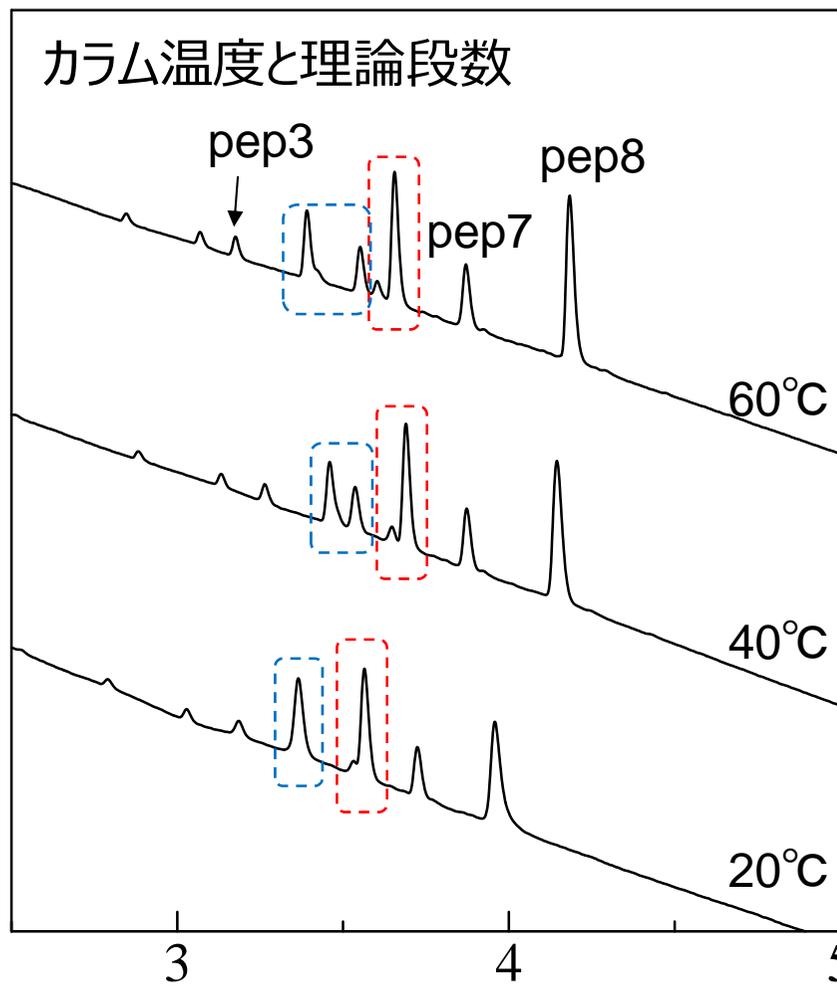
流速: 0.3 mL/min

注入量: 1 μ L

試料: 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. フルボキサミン (アルカリ性)
7. トリプロリジン (アルカリ性)

解離基を持つ成分に対しては、
移動相のpHで分離パターンを変化させることができる。

②カラム温度



【分析条件】

カラム: *L-column3 C18*, 2 μ m; 2.1 \times 50 mm

移動相: A: アセトニトリル

B: 0.1%ギ酸

A/B, 5/95-50/50 (0-5 min)

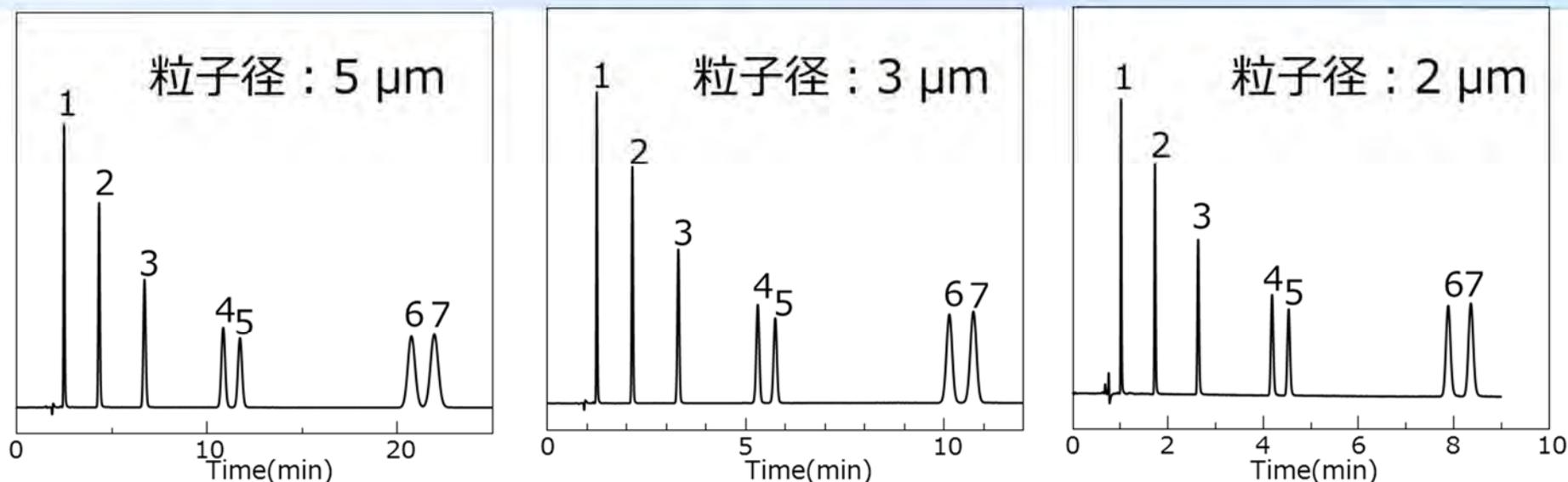
流速: 0.4 mL/min; 検出: UV220 nm; 注入量: 5 μ L

試料: ペプチド混合物12種

(MRMplus Retention Time Marker フナコシ(株)製)

分子量の大きく拡散速度が遅い試料成分は、カラム温度が高いほど、ピーク形状が改善し分離度が上がる。(物質移動速度が速くなるため)

③ 充填剤の粒子径



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	4.2
3 μm	0.4	10.8	21543	2.13	22.6
2 μm	0.5	8.4	30619	2.55	54.2

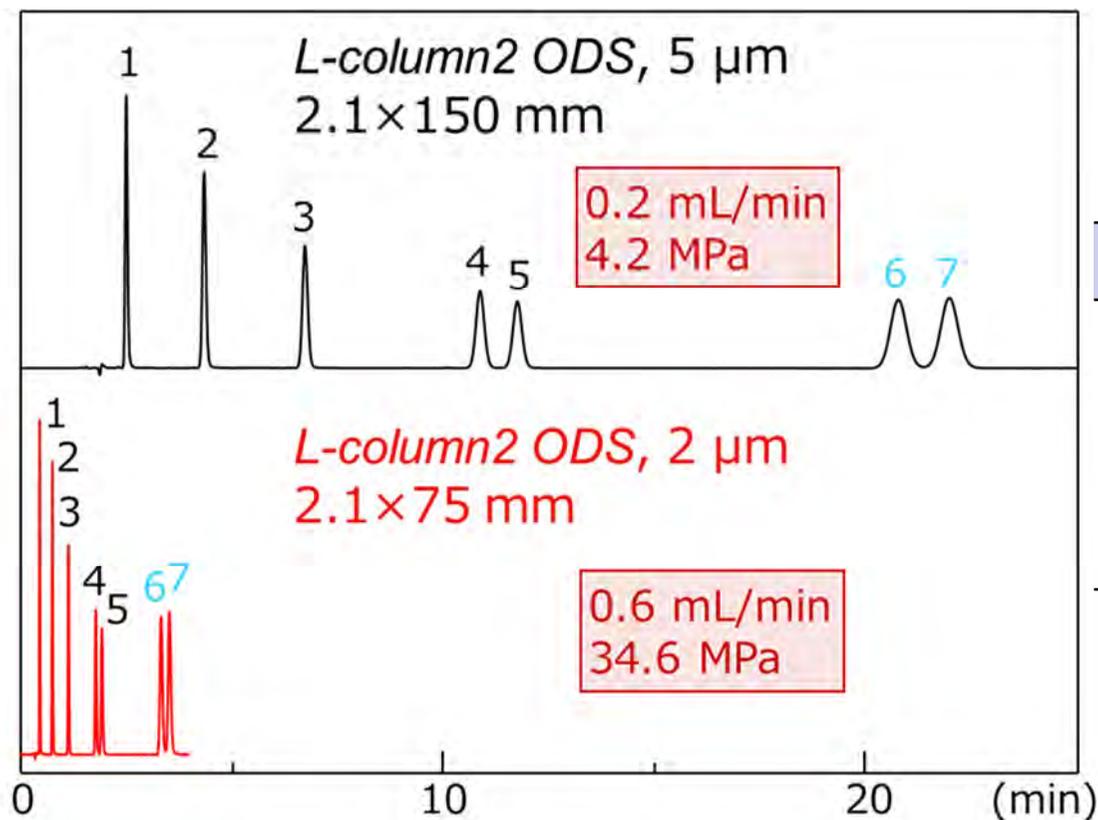
【分析条件】カラム: L-column2 ODS; 2.1×150 mm

移動相: アセトニトリル/20 mMリン酸(35/65); 温度: 40°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

- 粒子径に反比例して、理論段数が向上し分離度が改善する。
- ただし、カラム圧は粒子径の2乗に反比例して増大。

③ 充填剤の粒子径：微小化による分析時間短縮



粒子径	$t_{R(7)}$	$N_{(7)}$	$Rs_{(6,7)}$
5 μm	22.0	12813	1.60
	∇	∥	∥
2 μm	3.7	13866	1.69
	×1/6	同等	同等

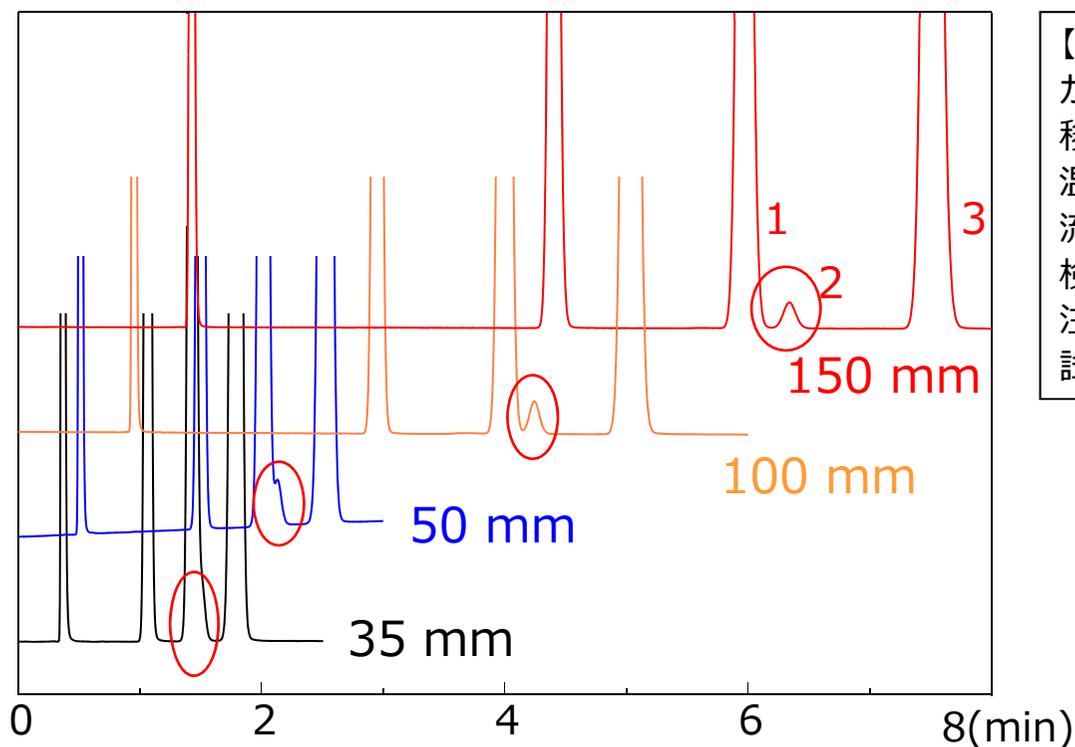
【分析条件】カラム: L-column2 ODS; 2.1 mm i.d.

移動相: アセトニトリル/20 mMリン酸(35/65); 温度: 40°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

分離度はそのままに、分析時間を大幅に短縮することも可能である。

④カラム長さ

**【分析条件】**カラム : L-column2 ODS, 5 μ m; 4.6 mm i.d.

移動相: アセトニトリル/水(60/40)

温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 1 mL/min

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

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

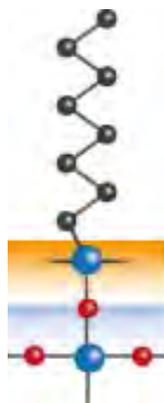
カラムを長くすれば分離が改善する。(ただし分析時間が長くなる)

⑤化学結合基：逆相系カラムの場合



C18(ODS)

疎水性
相互作用



C8

疎水性
相互作用



C6-Phenyl

疎水性
相互作用

+

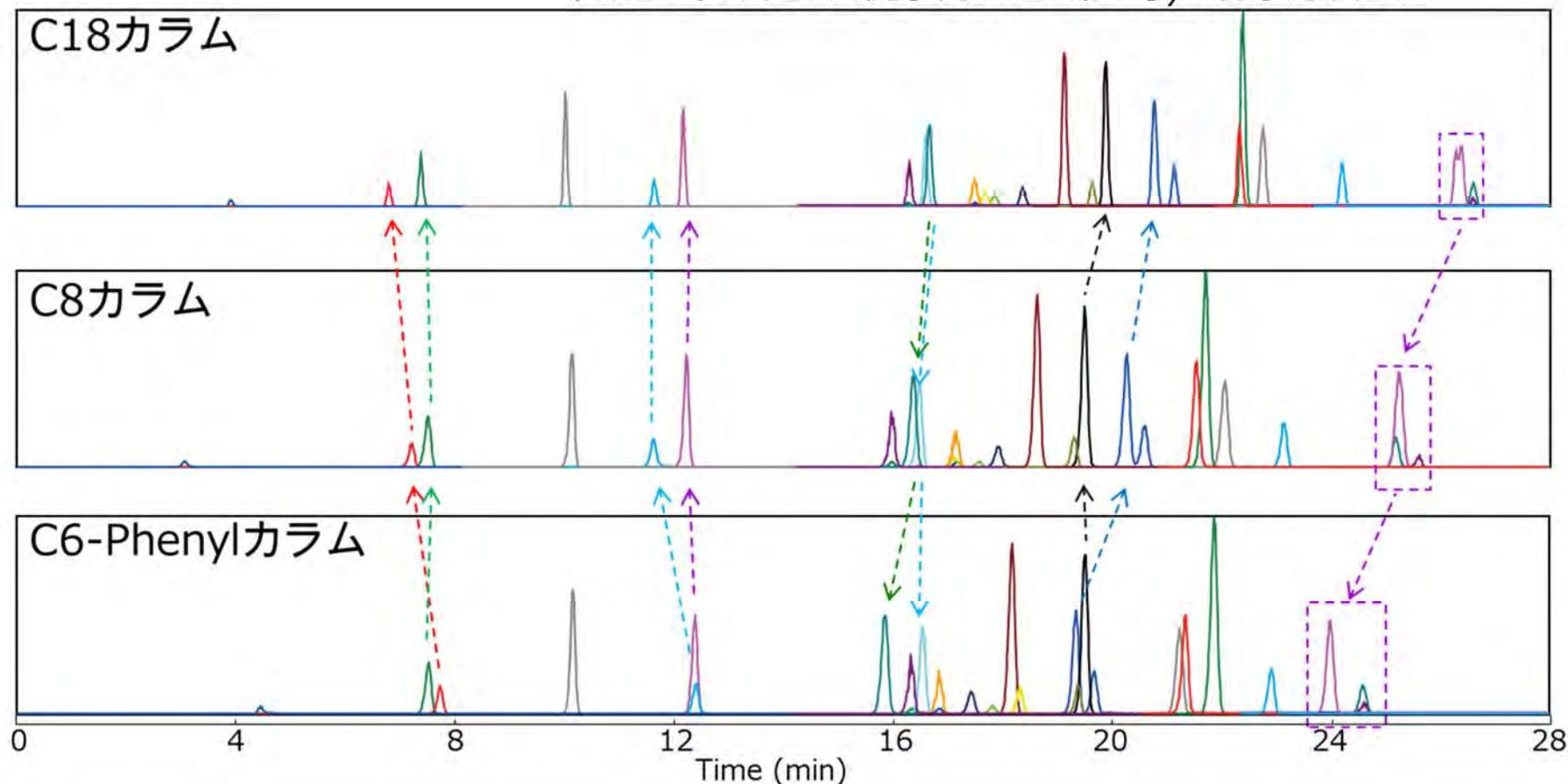
$\pi - \pi$ 相互作用

■	エンドキャッピング層
●	CH ₂ or CH ₃
●	O
●	Si

⑤化学結合基: 分離パターンの変化

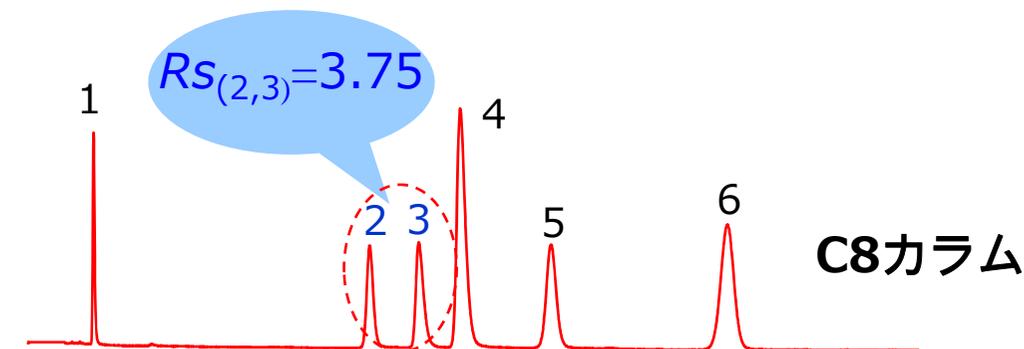
農薬の一斉分析

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・・・ C18≠C8≠C6-Phenyl

⑤化学結合基: C18カラム → C8カラム

**【分析条件】**

カラム: L-column2, 5 μ m
4.6×150 mm

移動相: アセトニトリル
/25 mMリン酸緩衝液 pH 7(30/70)

温度: 40°C

流速: 1 mL/min

注入量: 1 μ L

試料: 1.スルピリド

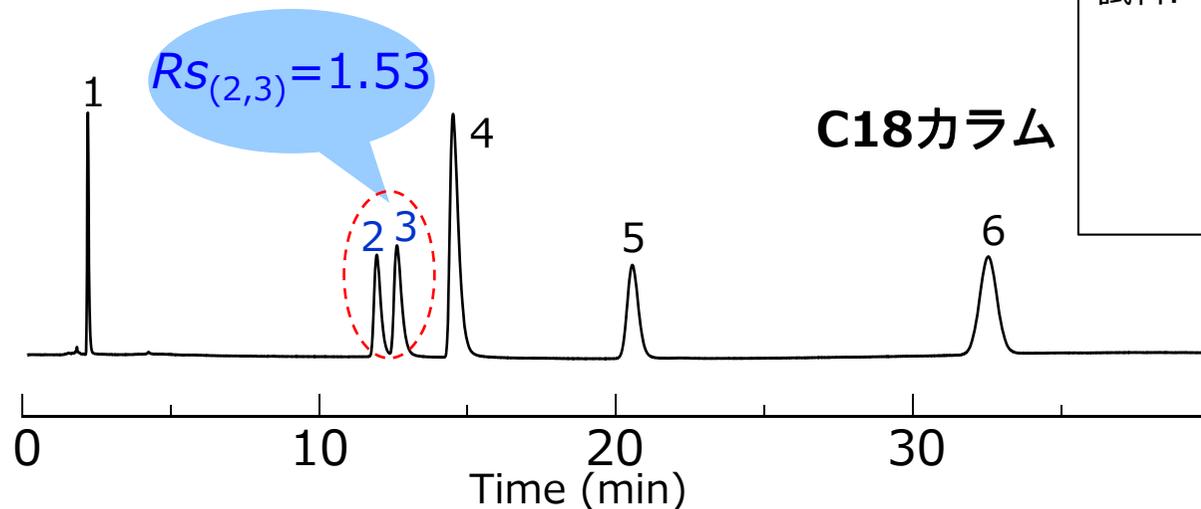
2.デシプラミン

3.パロキセチン

4.マプロキセチン

5.アモキサピン

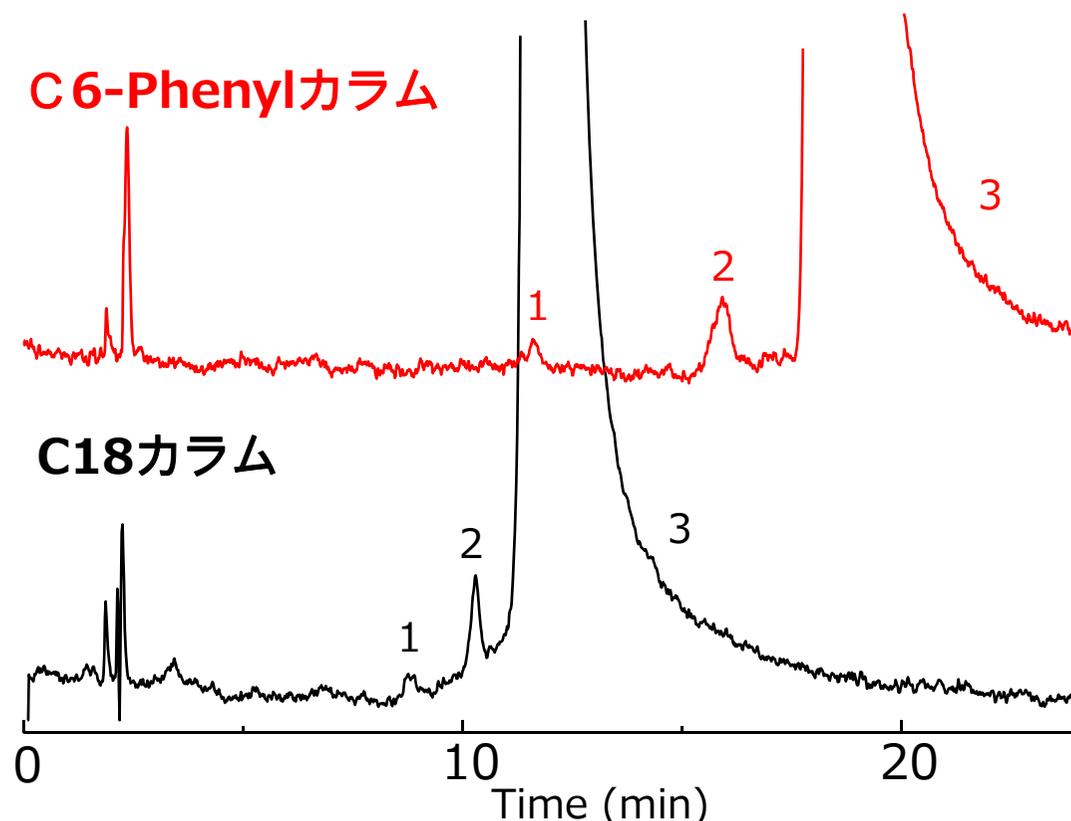
6.トラゾドン



C18カラムから、C8カラムに変えることで、
デシプラミン、パロキセチンの分離が改善できる。

⑤化学結合基: C18カラム ➡ C6-Phenylカラム

レボフロキサシンの不純物分析



【分析条件】

カラム: L-column2, 5 μ m
4.6 \times 150 mm

移動相: メタノール/20 mMリン酸溶液
(10/90)

温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 1 mL/min

検出: UV 294 nm

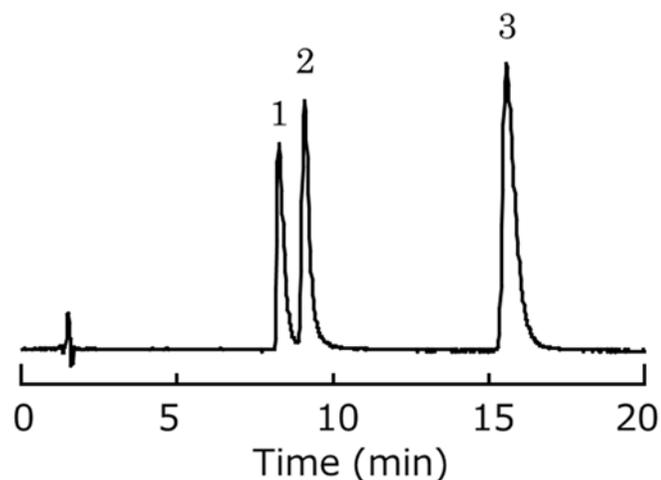
注入量: 2 μ L

試料: 1.不純物 A
2.不純物 B
3.レボフロキサシン

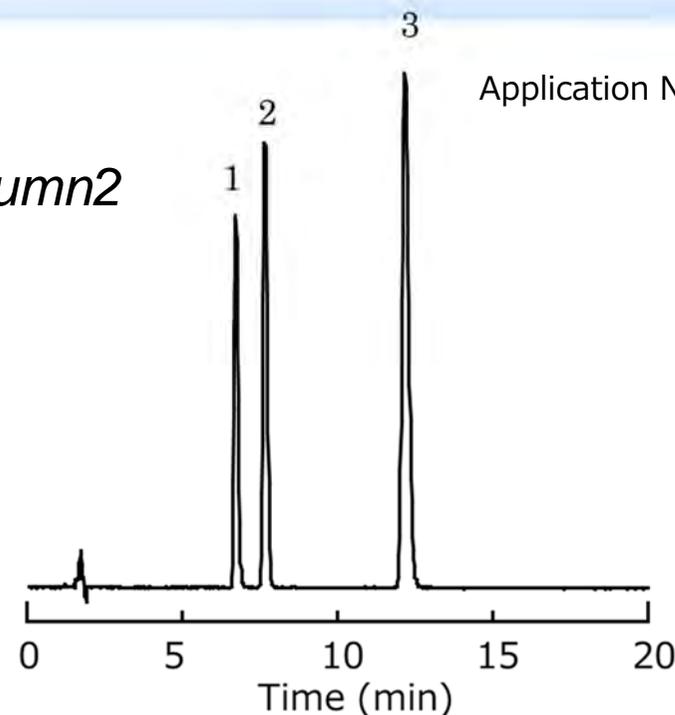
C18カラムから、C6-Phenylカラムに変えることで、
レボフロキサシンと不純物の分離が改善できる。

⑥エンドキャッピング: ピーク形状の比較 1

Brand L-1



L-column2



Application No.L2052

【分析条件】

カラム: C18, 5 μm ; 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 (35/65)

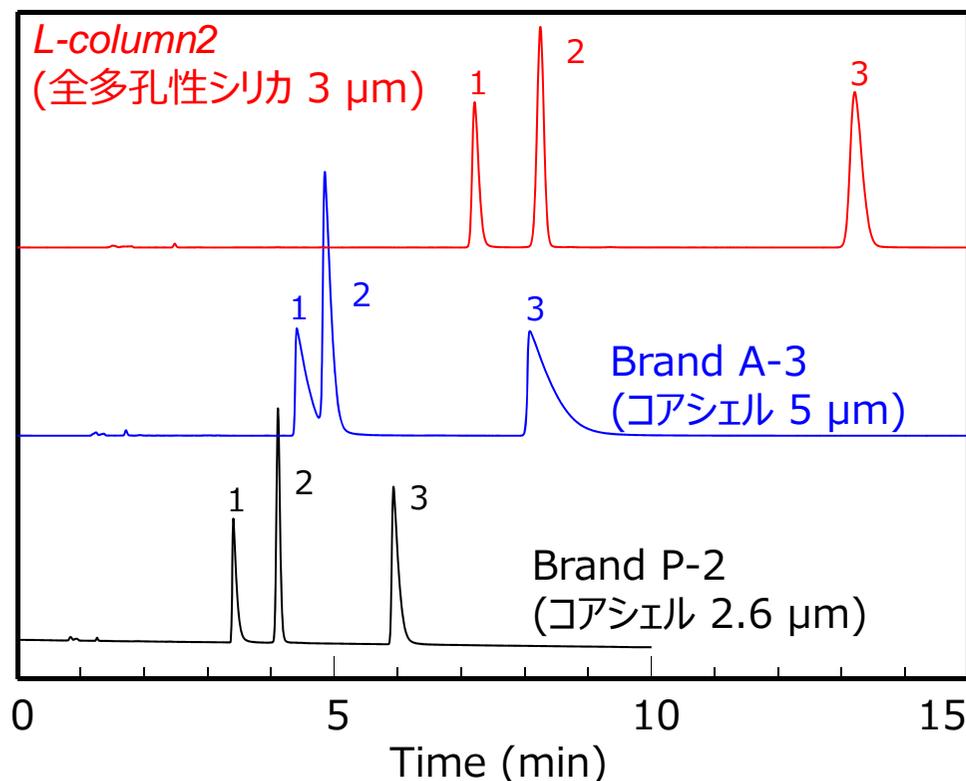
温度: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1 mL/min; 検出: UV 230 nm注入量: 2 μL

試料: 1. パロキセチン, 2. シタロプラム, 3. フルオキセチン

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

塩基性物質を中性移動相で分析するとき、エンドキャッピングが不十分であると、保持の遅延やピークが著しくテーリングする。

⑥エンドキャッピング：ピーク形状の比較 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 pH 7 (35/65)

温度: 40℃

流速: 1 mL/min

検出: UV 230 nm

注入量: 2 μL

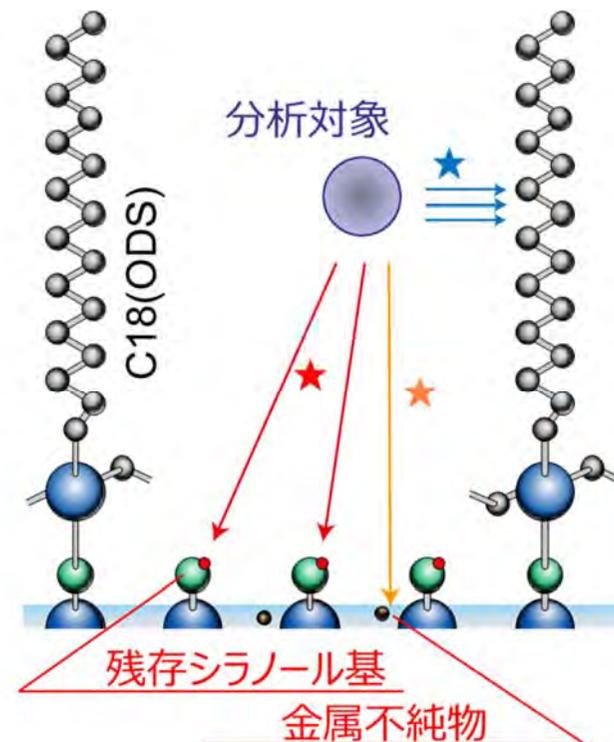
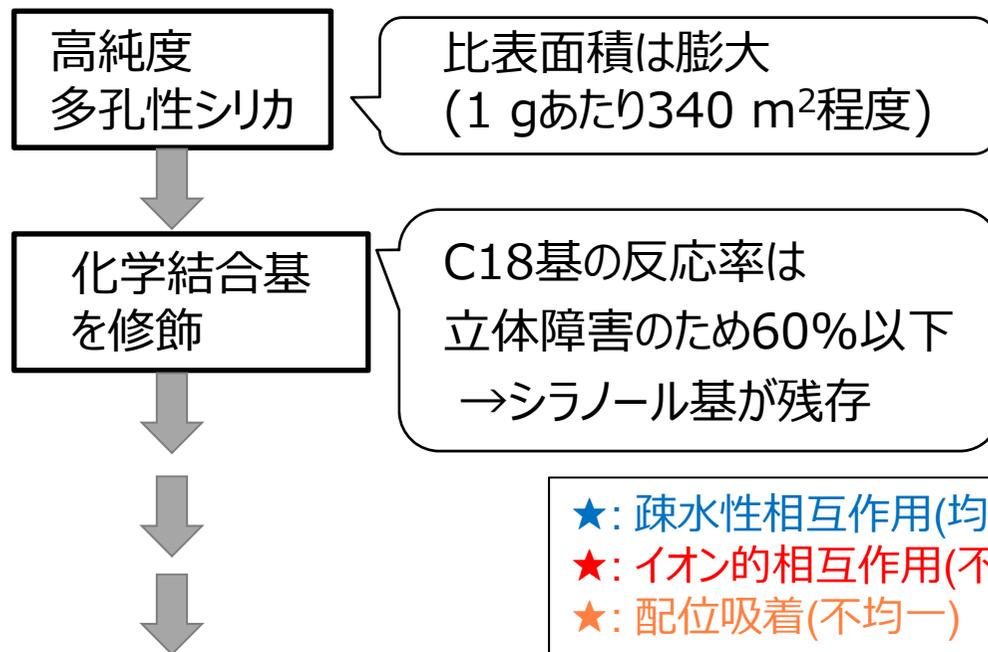
試料: 1. パロキセチン, 2. シタロプラム, 3. フルオキセチン

カラム	理論段数(T.f.)
	フルオキセチン
L-column2 (FPP, 3 μm)	22141 (1.37)
Brand A-3 (SPP, 5 μm)	2154 (6.62)
Brand P-2 (SPP, 2.6 μm)	15254 (2.45)

高分離を有するコアシェルカラムの性能も、
エンドキャッピングが不十分であると発揮できない。

⑥エンドキャッピング：なぜ必要か

【逆相シリカ系カラムの製法】



エンドキャッピングを施さないで・・・

- 塩基性の試料成分は中性移動相で解離した残存シリノールからイオンの相互作用(不均一)を受ける。
- 配位性の試料はシリカ表面の金属不純物に配位吸着する。
- カラムのロット間のばらつき増大や耐久性の低下を招く。

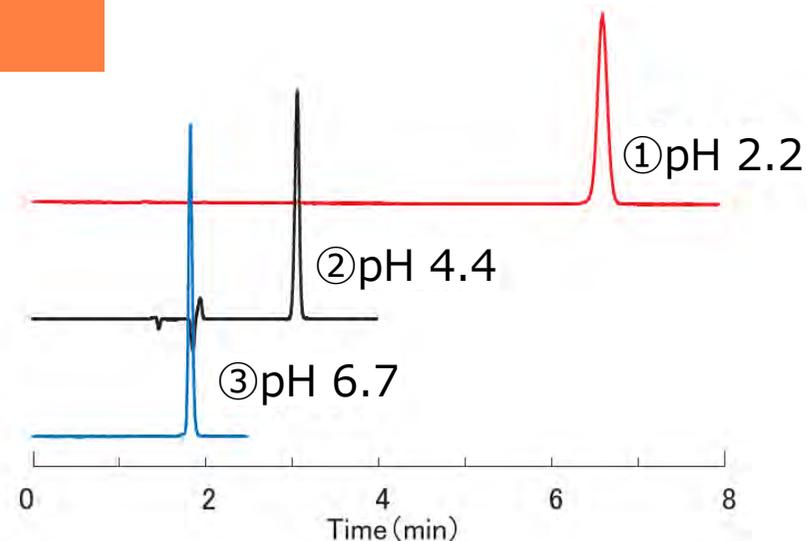
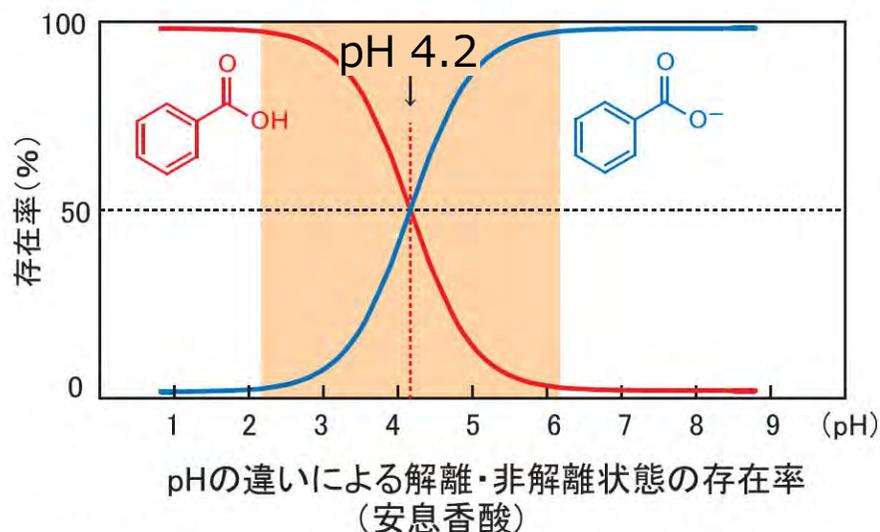
イオン抑制法

解離しやすい官能基の解離を抑制することで
分析対象成分の固定相への親和性を強め
保持させる方法

液クロ武の巻 筑波出版会 P41 より

解離抑制と保持：酸性物質

酸性物質(安息香酸：pKa4.2)



【分析条件】

カラム: L-column ODS, 5 μ m; 4.6 \times 150 mm

移動相: ①アセトニトリル/25 mM リン酸溶液(25/75)

②アセトニトリル/25 mM 酢酸溶液(25/75)

③アセトニトリル/25 mM リン酸溶液(25/75)

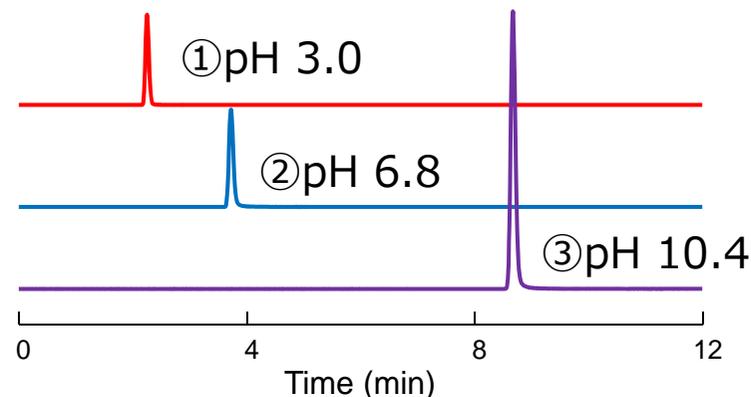
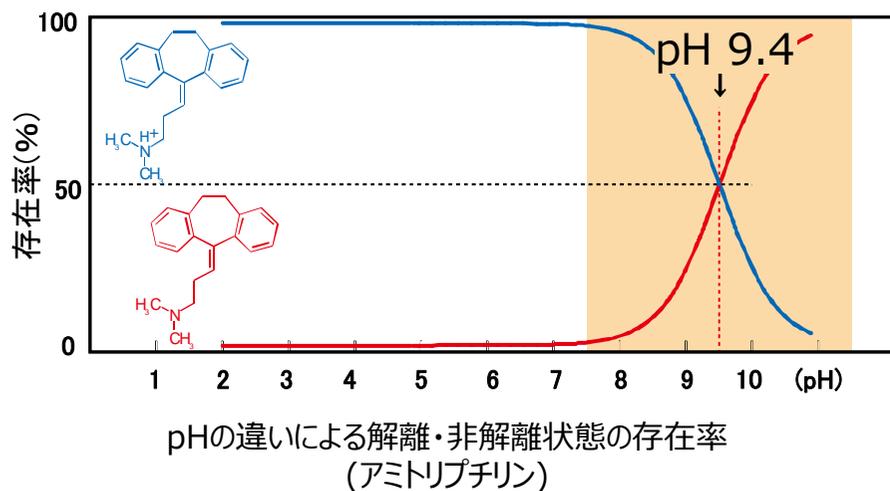
温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 1 mL/min

試料成分が酸性物質のときは、それらのpKaより
低い移動相pHにすることで解離が抑制される。 ➡ 保持が強くなる。

解離抑制と保持: 塩基性物質

塩基性物質(アミトリプチリン)pKa:9.4



【分析条件】

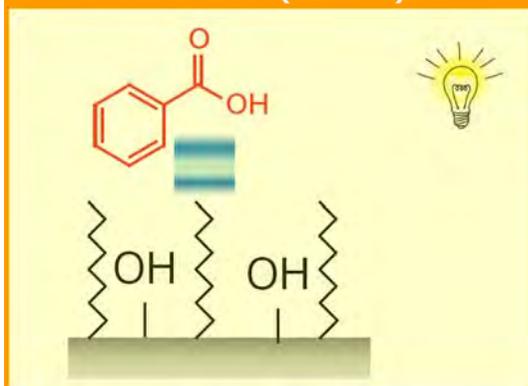
カラム: *L-column3 C18*, 5 μm ; 2.1 \times 150 mm
移動相: A/B: 40/60-90/10-90/10 (0-10-12 min)
A: アセトニトリル
B: ①0.1% ギ酸溶液
②5 mM 酢酸アンモニウム溶液
③5 mM アンモニア溶液
温度: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.3 mL/min

試料成分が塩基性物質のときは、それらのpKaより
高い移動相pHにすることで解離が抑制される。 ➡ 保持が強くなる。

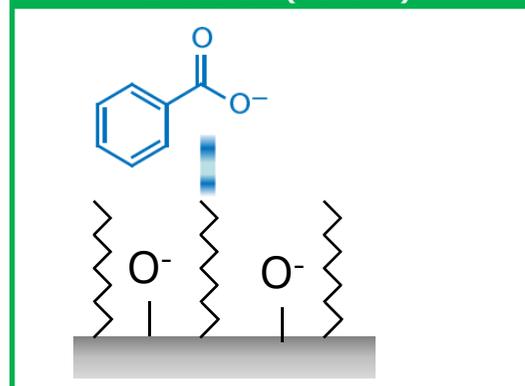
カラム内での解離状態

酸性物質

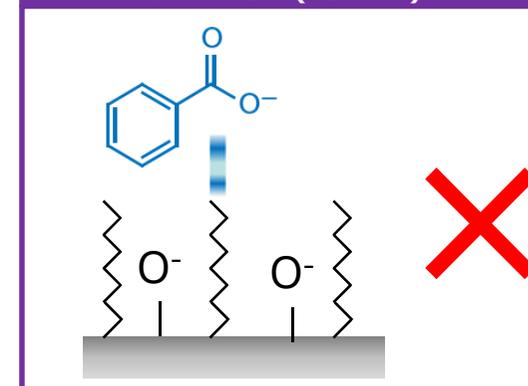
移動相(酸性)



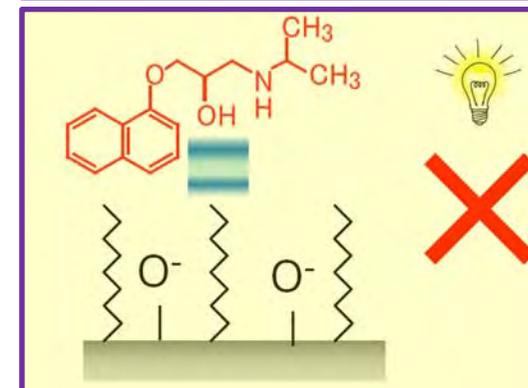
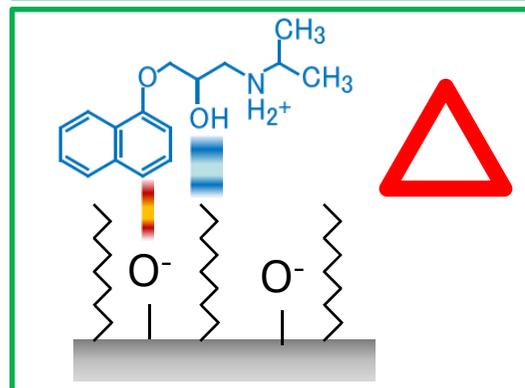
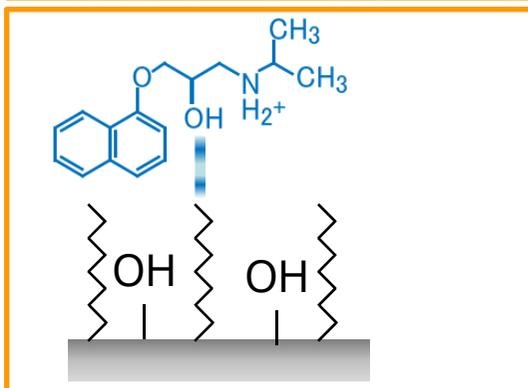
移動相(中性)



移動相(中性)

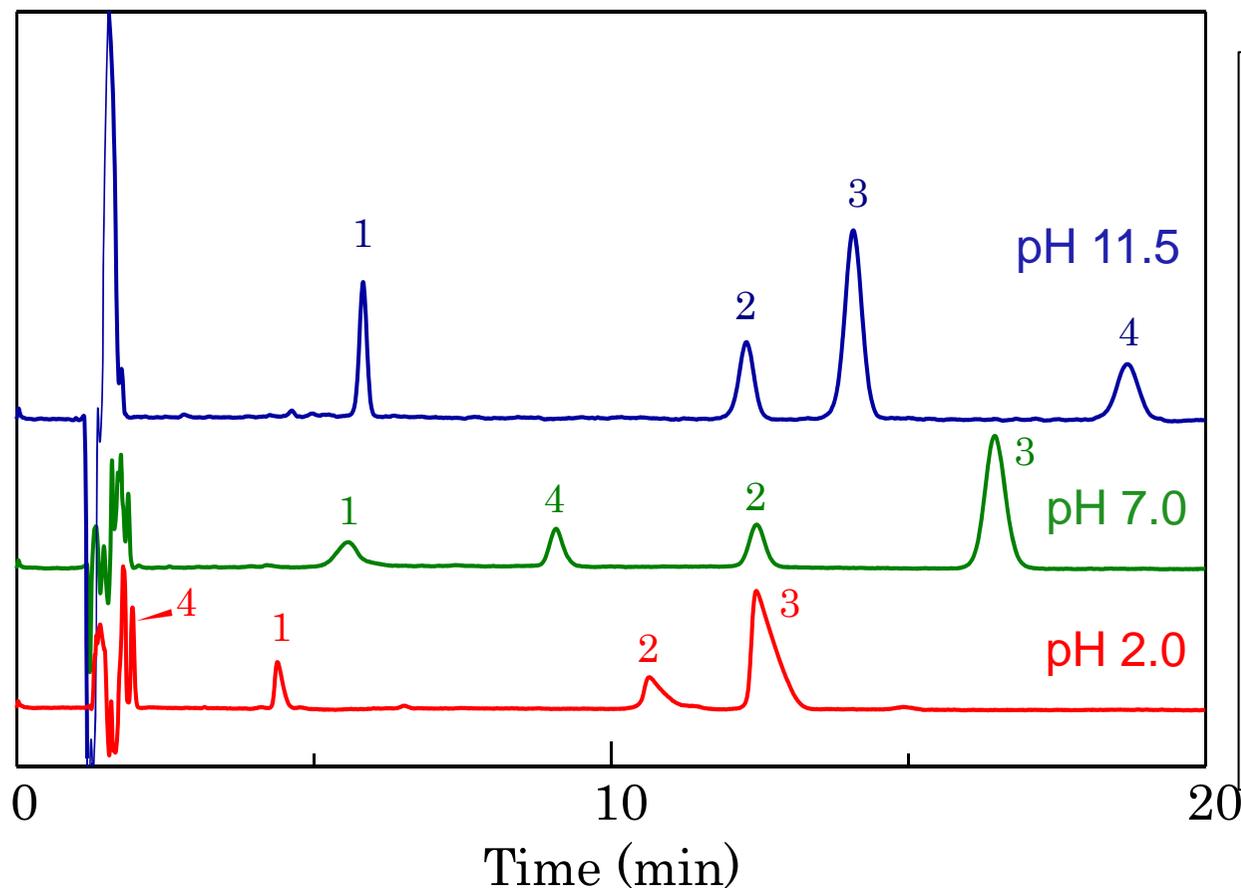


塩基性物質



- 解離を抑制して分析することが理想的(💡)。
- 耐アルカリ性が高く低吸着なカラムなら、以下のような心配はない。
O-によって塩基性物質が吸着してしまう(△)。
pH使用可能範囲外(×)。

イオン抑制法: マクロライド系抗生物質(塩基性物質)

**【分析条件】**カラム: *L-column3 C18*, 5 μ mサイズ: 4.6 \times 150 mm

移動相: A: 25 mM リン酸緩衝液

B: アセトニトリル

A/B, 55/45 (pH 11.5)

40/60 (pH 7.0)

32/68 (pH 2.0)

温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 0.2 mL/min

検出: UV 210 nm

注入量: 10 μ L

試料: 1. エリスロマイシン

2. クラリスロマイシン

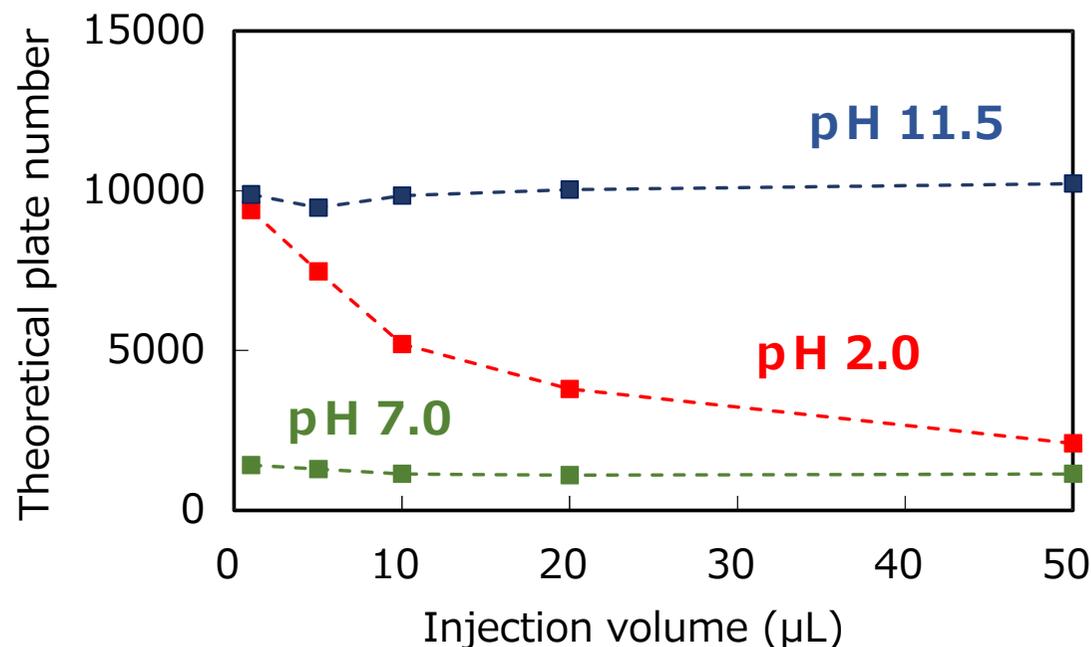
3. ロキシスロマイシン

4. アジスロマイシン

0.25 g/L in メタノール/水(1:1)

アルカリ性移動相の使用により、試料成分の解離を抑制し、
良好なピーク形状が得られる。

イオン抑制法: マクロライド系抗生物質(塩基性物質)

**【分析条件】**

カラム: L-column3 C18, 5μm

サイズ: 4.6×150 mm

移動相: A: 25 mM リン酸緩衝液

B: アセトニトリル

A/B, 55/45 (pH 11.5)

40/60 (pH 7.0)

32/68 (pH 2.0)

温度: 40℃

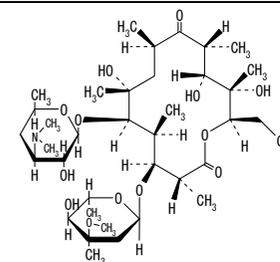
流速: 0.2 mL/min

検出: UV 210 nm

注入量: 10 μL

試料: 1. エリスロマイシン

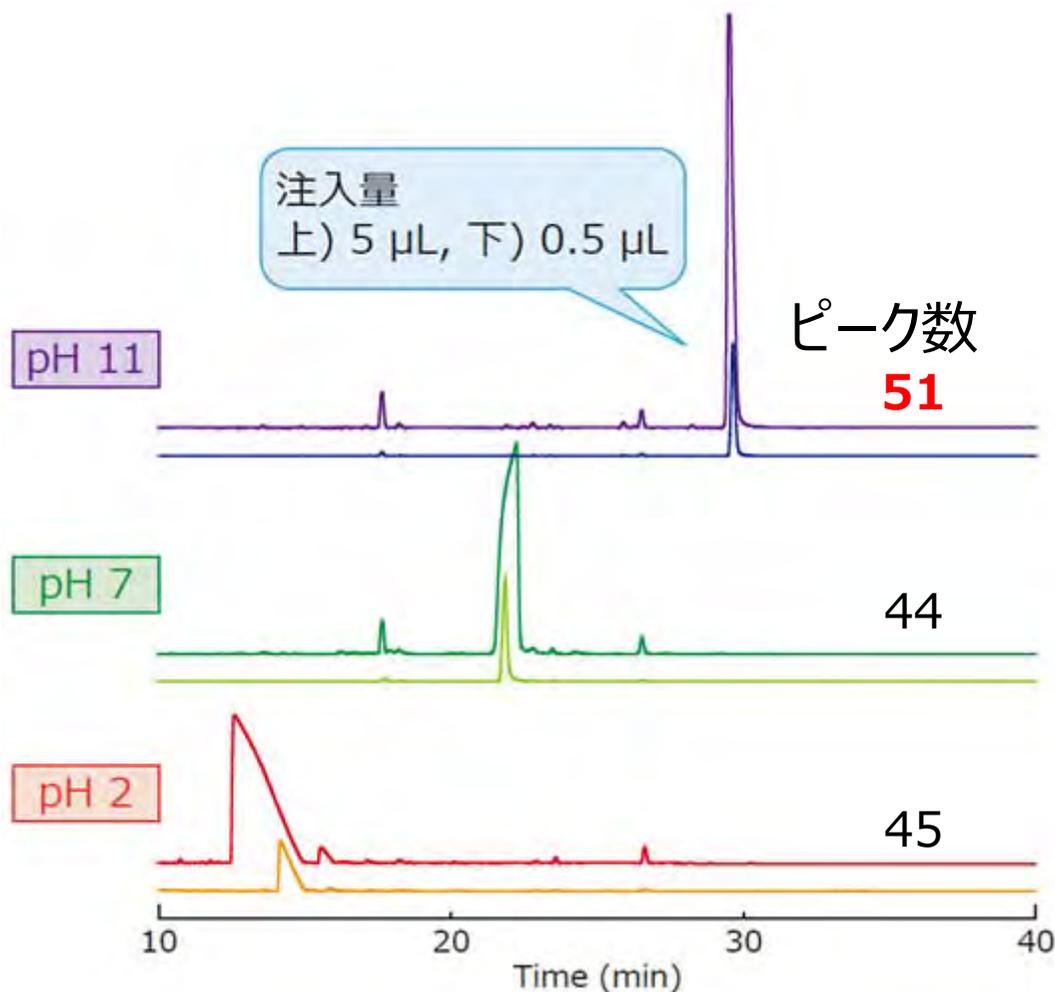
0.25 g/L in メタノール/水(1:1)



注入量による理論段数の変化(1. エリスロマイシン)

試料成分の解離を抑制すれば、
負荷量の変化に対して理論段数が安定する。

イオン抑制法: ホモクロルシクリジン分解物(塩基性物質)

**【分析条件】**カラム: *L-column3 C18*, 5 μ m; 2.1 \times 150 mm

移動相: A: 25 mM リン酸緩衝液

(pH 2, pH 7, pH 11)

B: アセトニトリル

A/B, 95/5-25/75-25/75

(0-30-40 min)

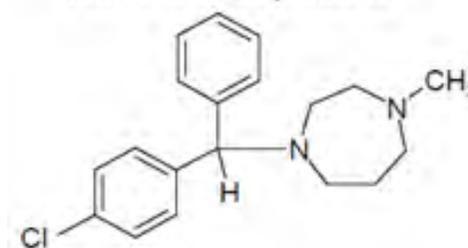
温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 0.2 mL/min

注入量: 5 μ L

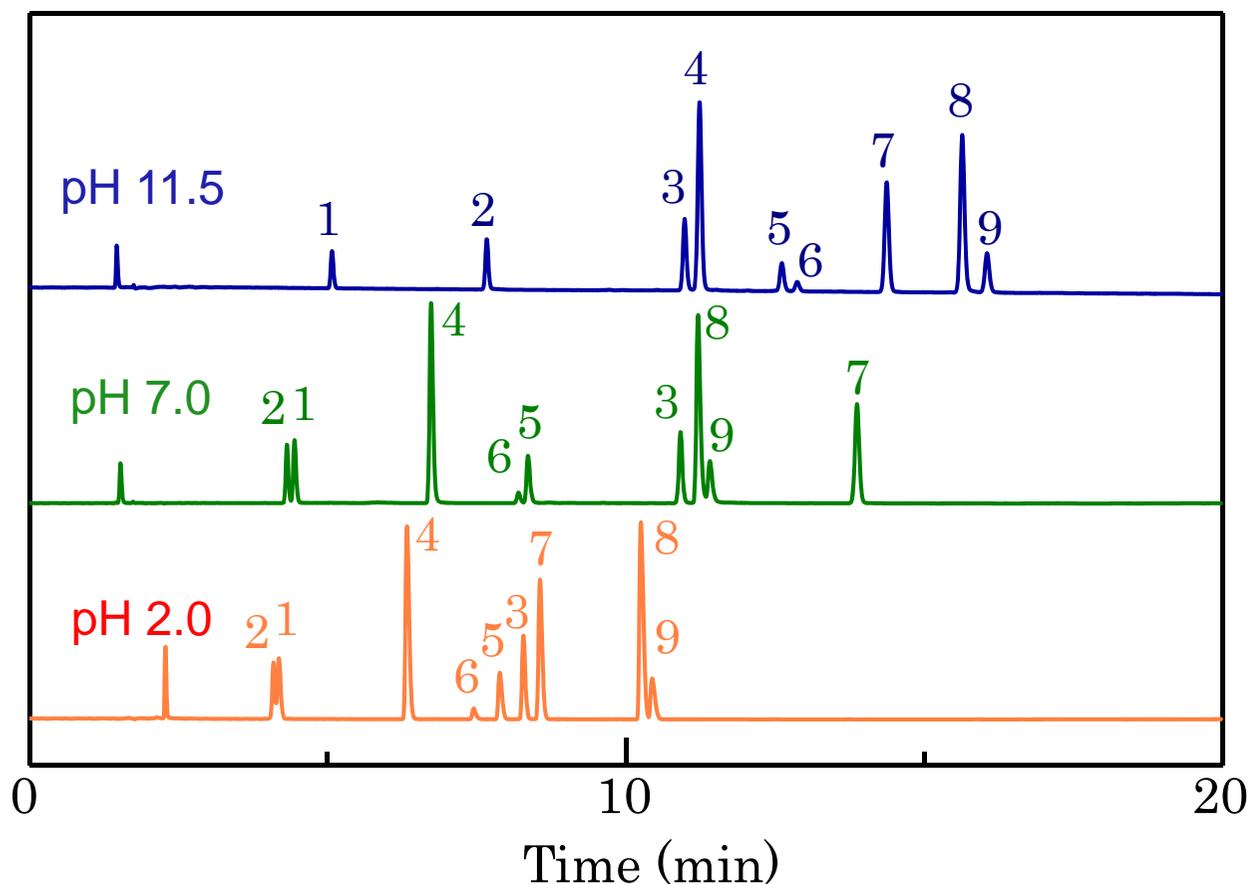
試料: ホモクロルシクリジンの分解物(10 g/L)

Homochlorcyclizine



アルカリ性移動相の使用により、高濃度試料注入においても、ピーク形状が良好で、なおかつ多くの分解物を分離検出できる。

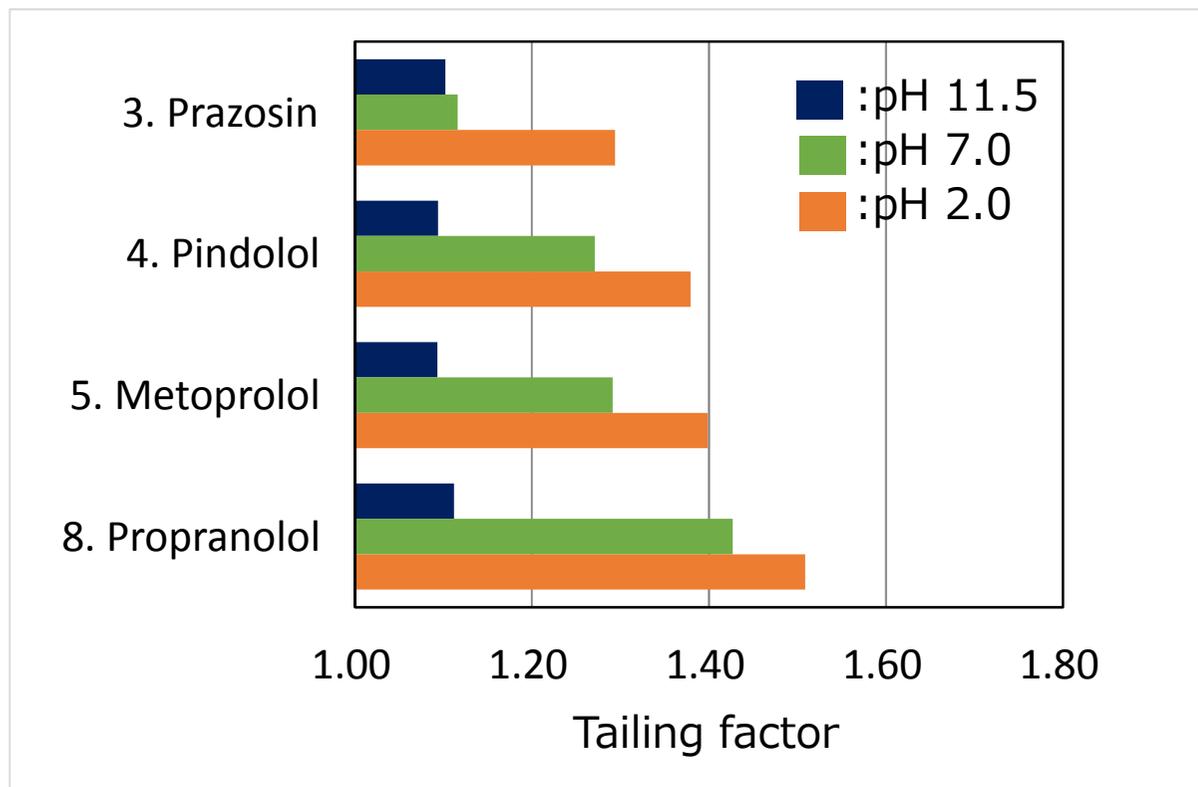
イオン抑制法: α 遮断薬, β 遮断薬(塩基性物質)

**【分析条件】**

カラム: L-column3 C18, 5 μ m
4.6 \times 150 mm
移動相: A: アセトニトリル
B: 25 mM リン酸緩衝液
A/B, 5/95-75/25
(0-20 min)
温度: 40 $^{\circ}$ C
流速: 1 mL/min
注入量: 5 μ L
検出: UV 220 nm
試料: 1. Sotalol
2. Atenolol
3. Prazosin
4. Pindolol
5. Metoprolol
6. Timolol
7. Yohimbine
8. Propranolol
9. Alprenolol
110 mg/L in メタノール/水(4:5)

アルカリ性移動相の使用により、試料成分の解離を抑制し、
9成分の分離が改善する。

イオン抑制法: α 遮断薬, β 遮断薬(塩基性物質)

**【分析条件】**

カラム: L-column3 C18, 5 μ m
4.6 \times 150 mm

移動相: A: アセトニトリル
B: 25 mM リン酸緩衝液
A/B, 5/95-75/25
(0-20 min)

温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 1 mL/min

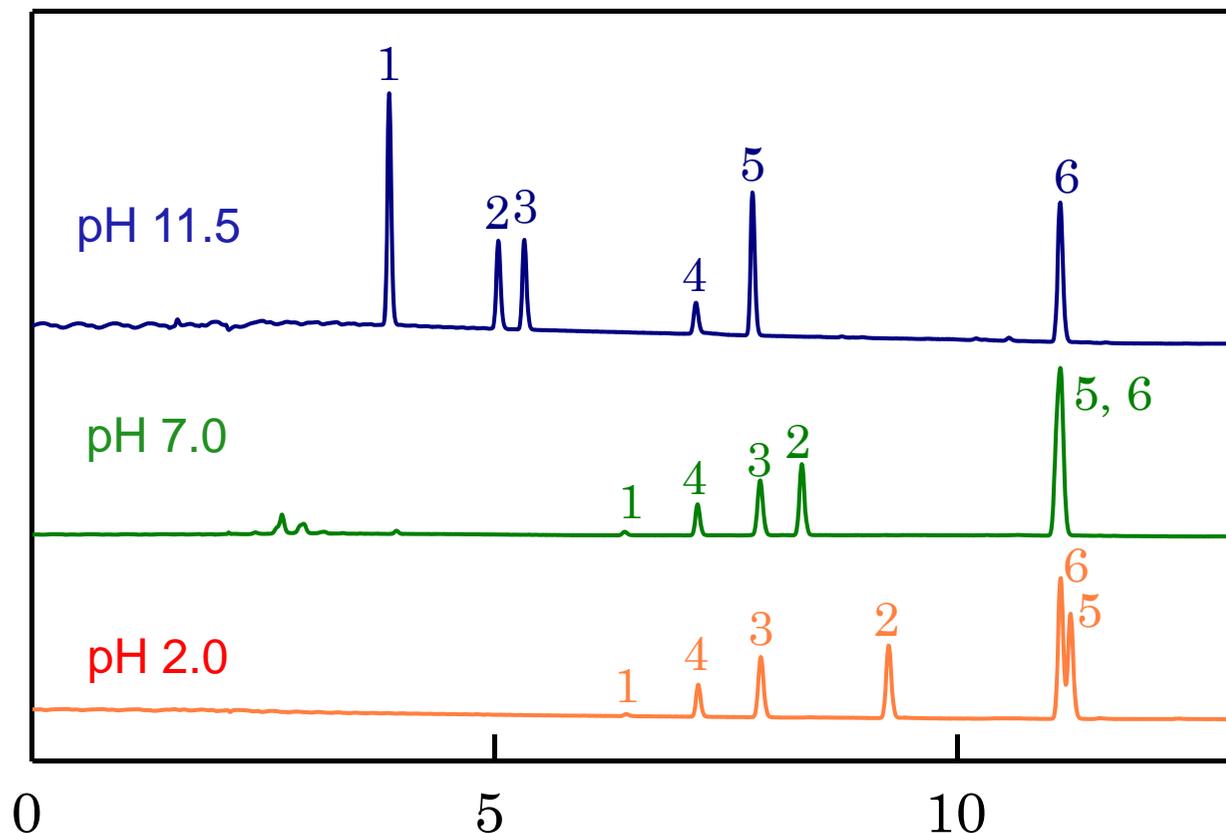
注入量: 5 μ L

検出: UV 220 nm

試料: 1. Sotalol
2. Atenolol
3. Prazosin
4. Pindolol
5. Metoprolol
6. Timolol
7. Yohimbine
8. Propranolol
9. Alprenolol
110 mg/L in メタノール/水(4:5)

試料成分の解離を抑制すれば、ピークのテーリングも抑制される。

イオン抑制法: 抗てんかん剤(酸性物質)

**【分析条件】**

カラム: L-column3 C18, 5 μ m
4.6 \times 150 mm

移動相: A: アセトニトリル
B: 25 mM リン酸緩衝液
A/B, 5/95-45/55-45/55
(0-10-20 min)

温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 1 mL/min

検出: UV 220 nm

注入量: 2 μ L

試料: 1. Primidone(50 mg/L)
2. Phenobarbital(100 mg/L)
3. Zonisamide(100 mg/L)
4. Ethosuximide(100 mg/L)
5. Phenytoin(100 mg/L)
6. Carbamazepine(50 mg/L)
in メタノール/水(1:1)

- 酸性移動相の方が強く保持する。
- アルカリ性移動相は… \rightarrow プリミドンのピーク強度が劇的に改善する
 \rightarrow ピーク5と6が重ならずに分離が達成できる。

代表的緩衝液のpH

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 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	1~2.8 5.4~7.4	5~50 mM
ホウ酸	×	9.24	8.2~10.2	

イオンペア法

イオン性またはイオン化し得る成分に適当な対イオンを加え、電荷をもたないイオン対を生成させ、逆相系の固定相に保持させる方法

液クロ武の巻 筑波出版会 P41 より

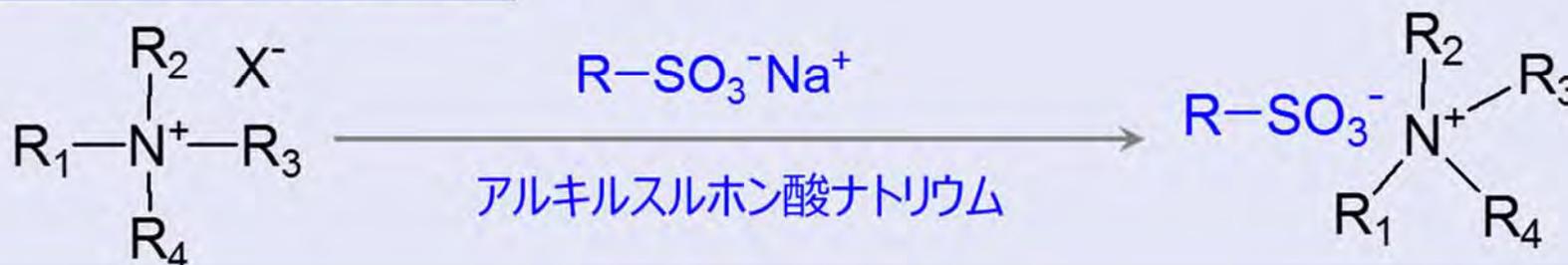
イオン対の形成

- 解離が強くイオン抑制法では抑えることができない場合。
- 疎水性が低いため逆相系固定相ではまったく保持しない場合

スルホン酸イオン



第四級アンモニウムイオン

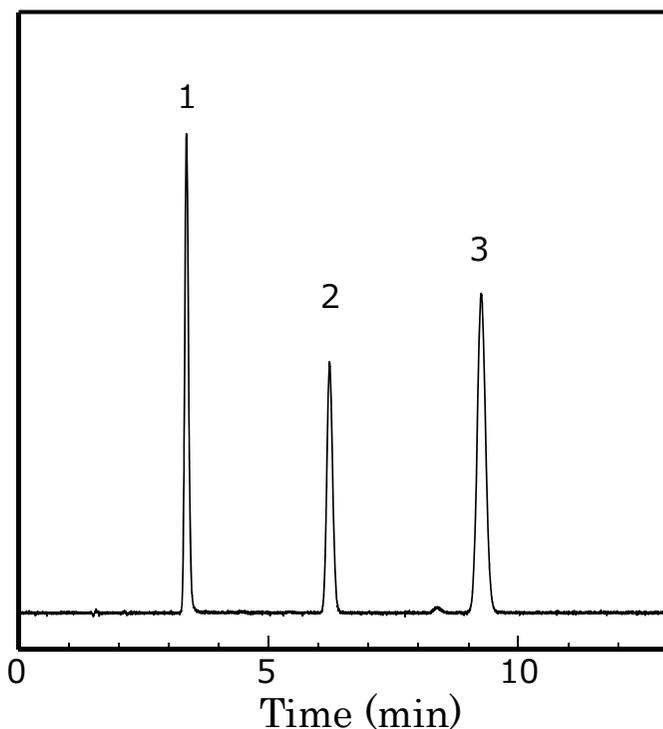


イオン対を形成し、電荷を打ち消しあって疎水性が増大する。

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	×	$C_nH_{2n+1}SO_3Na$ ($3 \leq n \leq 13$)	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	○	$(C_nH_{2n+1})_2NH$	$3 \leq n \leq 6$

イオンペア法: 酸性染料(酸性物質)



【分析条件】

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

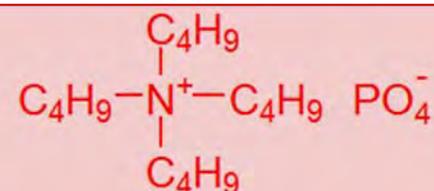
移動相: アセトニトリル

/10 mM トリブチルアンモニウムリン酸塩 in 水 (45/55)

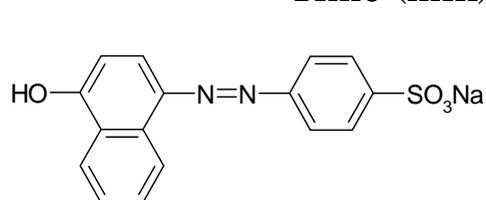
流速: 1 mL/min

注入量: 1 μL

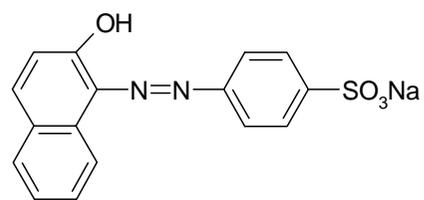
検出: VIS 430 nm



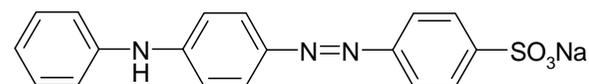
トリブチルアンモニウムリン酸塩 (TBA-P)



1. α-ナフトールオレンジ



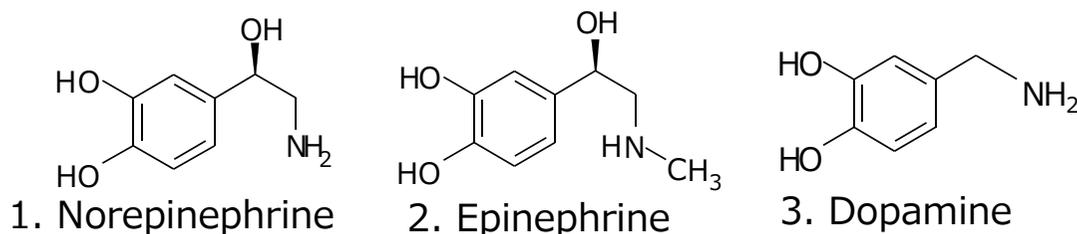
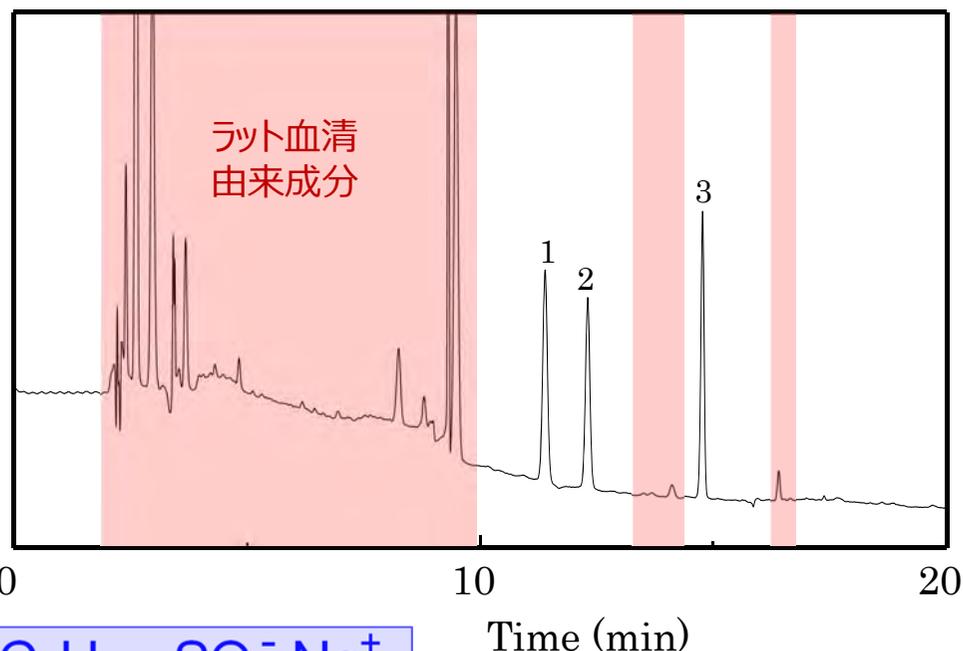
2. アシッドオレンジ7



3. アシッドオレンジ5

イオン対試薬により、保持が得られピーク形状がシャープになる。

イオンペア法: カテコールアミン(塩基性物質)



【分析条件】

カラム: L-column2 ODS, 5 μ m; 4.6 \times 250 mm

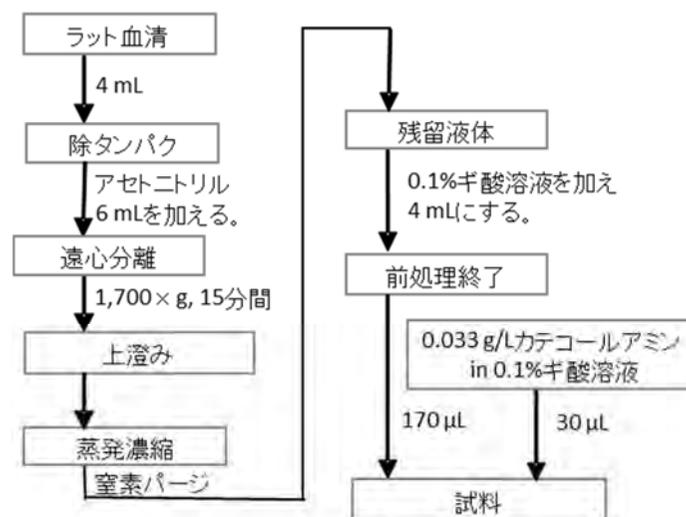
移動相: A: アセトニトリル

B: 10 mM オクタンスルホン酸ナトリウム
in 100 mMリン酸緩衝液(pH 5.7)

A/B, 5/95-40/60 (0-20 min)

流速: 1 mL/min

温度: 20 $^{\circ}$ C; 検出: UV 280 nm; 注入量: 20 μ L



カテコール基は親水性が高く、カテコールアミンは保持できない。
イオンペア法により保持が可能となり、血清成分から完全に分離できる。

カラムの劣化：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
 - ▶ 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
- カラム圧の上昇



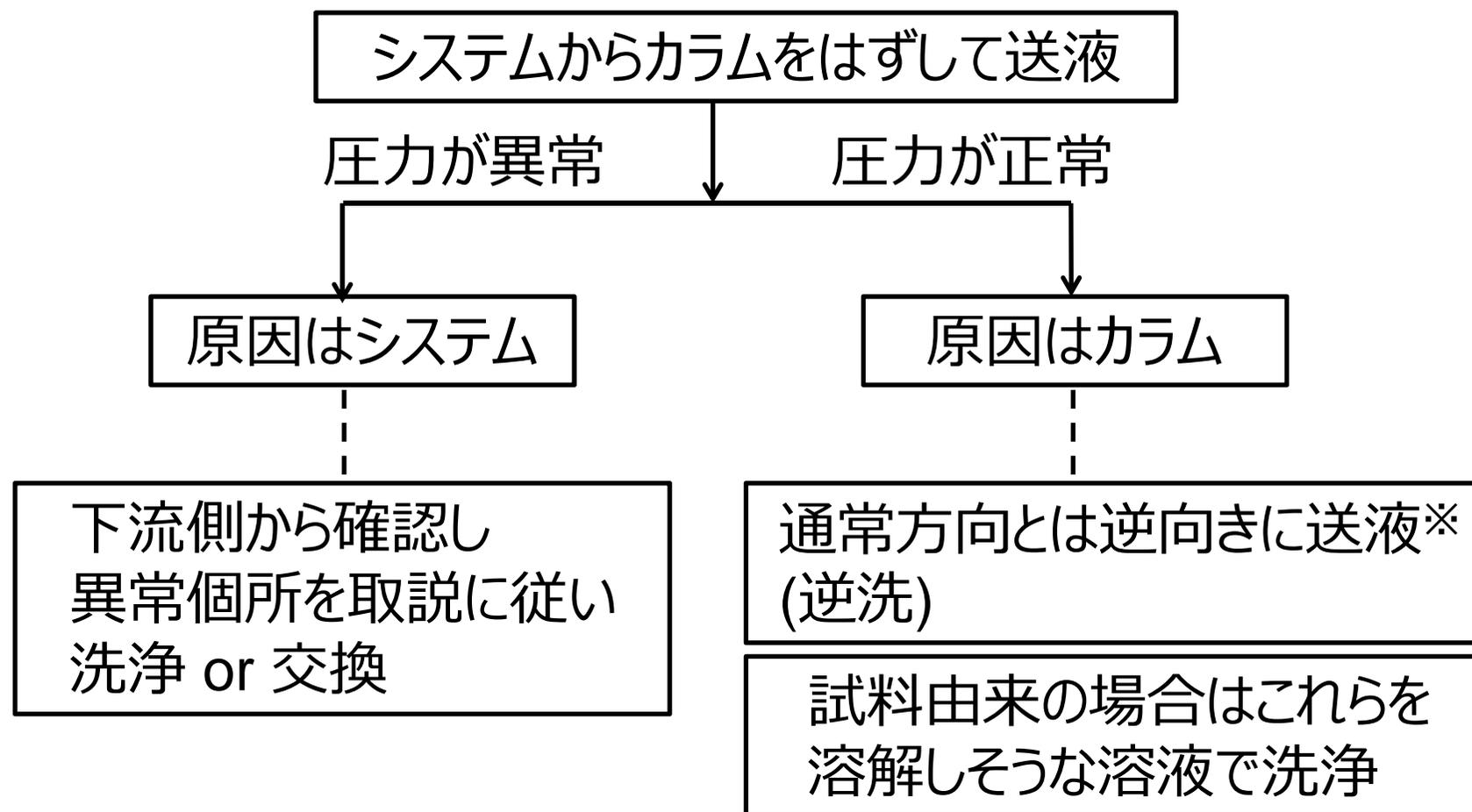
アセトニトリルと25 mMリン酸緩衝液pH 7の組成比
左：75/25
右：80/20…析出により白濁

緩衝液由来の塩の析出

予防策

- 移動相条件を再検討する。
- あらかじめフィルターでろ過した移動相や試料を用いる。
- ガードカラム、プレカラムフィルターで異物を除去する。

システム圧が上昇してしまったときの対処



※ 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未満のマイクロカラムは不可)

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)

使用したカラム : *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。
(サイズ: 4.6×150 mm、1 mL/min の場合…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！)

カラムの劣化: 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 ; 4.6 mm \times 150 mm
移動相 : アセトニトリル/リン酸緩衝液 pH 6.5 , 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)

カラムの劣化: カラム圧の上昇

洗浄前

 $N_4 = 7000$

17.5 MPa

洗浄後

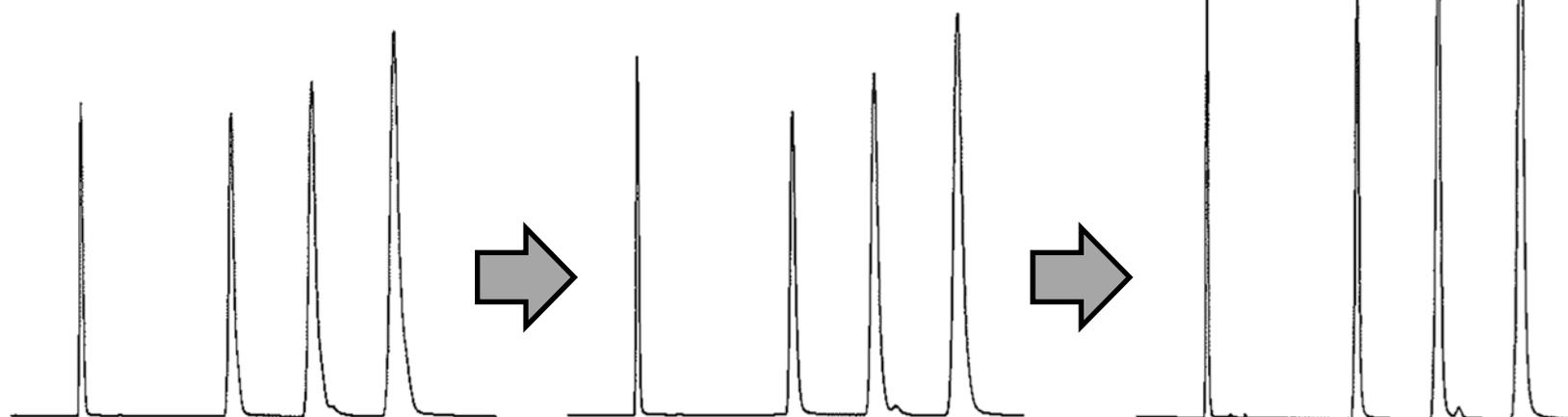
 $N_4 = 8500$

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。移動相調製の際は容器も取り替えることを推奨

不溶物の蓄積により
充填剤が着色



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。

カラムの劣化: 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
- ➡ 塩基性物質の保持の遅延やテーリング

アルカリ性移動相による基材シリカの侵食

- ➡ 理論段数の激減

予防策

- 移動相条件を再検討する。(有機溶媒組成を上げる、カラム温度を下げる、pH条件を緩和にする)
- 使用後には必ず緩衝液を含まない溶液でカラムを洗浄する。

アルカリ性移動相使用時の注意点

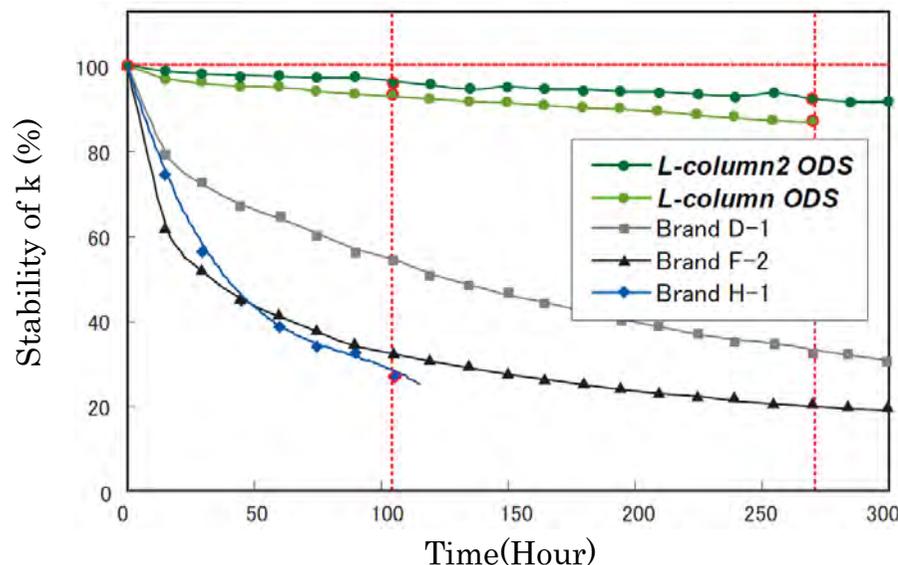
- ⚠ 耐アルカリ性の高いカラムを使用してください。
(カラムの使用可能pH範囲を遵守)
- ⚠ システムによっては耐アルカリ性の部品への交換が必要になります。

💡 より長くカラムを使用するためのヒント

- ・ 有機系緩衝液(有機酸：ホウ酸、酢酸、クエン酸など)は無機系緩衝液(無機酸：リン酸、炭酸、塩酸など)よりカラムを劣化させにくい※。
- ・ 緩衝液の陽イオンの種類は下記の順でカラムを劣化させにくい※。
(劣化させにくい) $\text{Li}^+ \leftarrow \text{Na}^+ \leftarrow \text{K}^+ \leftarrow \text{NH}_4^+$ (劣化させやすい)
- ・ 有機溶媒比率の高い方がカラムを劣化させにくい。
- ・ アセトニトリルはメタノールよりカラムを劣化させにくい※。
- ・ カラム温度の低い方がカラムを劣化させにくい※。
- ・ 緩衝液の濃度のうすい方がカラムを劣化させにくい※。
- ・ 使用後には、必ず緩衝液を含まない溶液でカラムを含めた流路を洗浄する。

※ Jacek Nawrocki *Journal of Chromatography A* **1997**, 779, 29-71.

カラムの耐久性: 耐酸性

**【耐アルカリ性試験条件】**カラム : C18, 5 μ mサイズ : 4.6 mm \times 150 mm

流速 : 1 mL/min

【理論段数 測定条件】移動相 : CH₃CN/H₂O (60/40)注入量 : 1 μ L温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出 : UV 254 nm

流速 : 1 mL/min

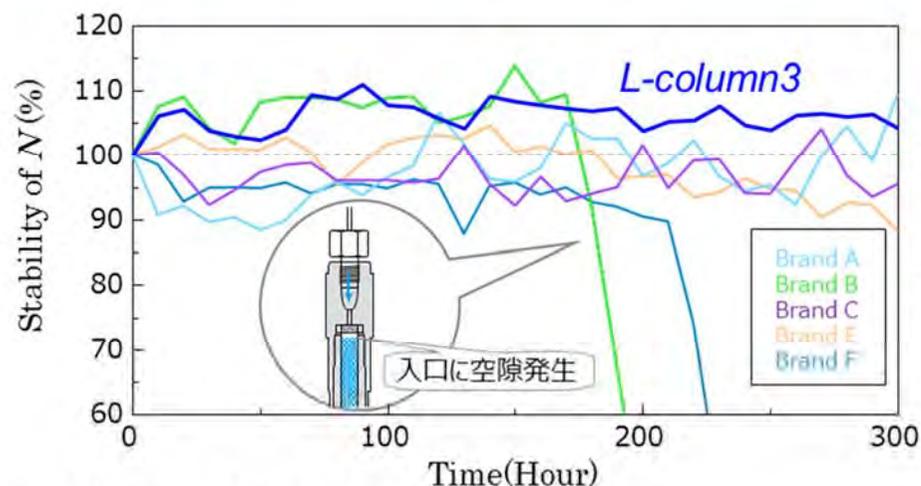
試料 : ナフタレン (1 g/L)

保持時間の安定性 (pH 1, トリフルオロ酢酸(TFA))

移動相 : 2% TFA in CH₃OH/ 2% TFA in H₂O (10/90)
温度 : 90 $^{\circ}$ C

- 化学結合基が基材に3箇所結合したカラムは保持時間が安定。(トリファンクショナル、三官能性)
- L-column シリーズ は耐酸性が非常に高い。

カラムの耐久性: 耐アルカリ性

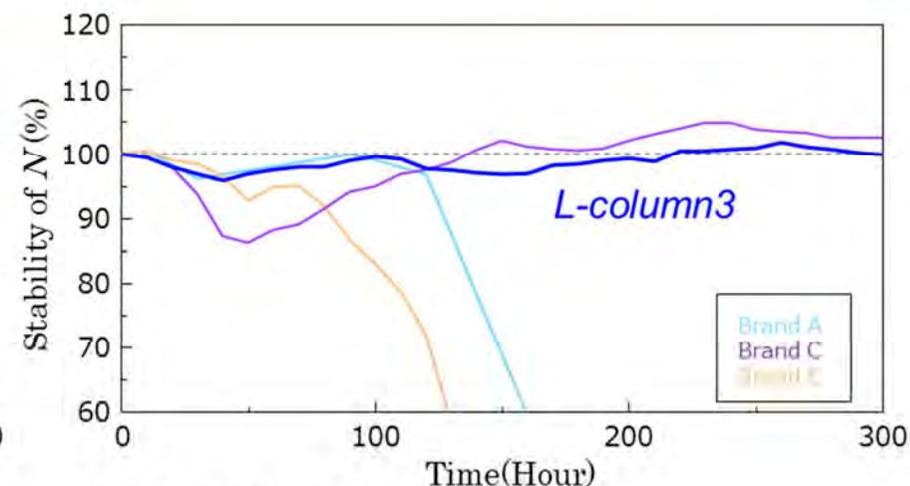


理論段数の安定性
(pH 12.2, トリエチルアミン(TEA))

移動相 : CH₃OH/ 54 mM TEA in H₂O (10/90)
温度 : 50℃

【耐アルカリ性試験条件】

カラム : C18, 5 μm
サイズ : 2.0 or 2.1 mm × 150 mm
流速 : 0.2 mL/min



理論段数の安定性
(pH 11.5, リン酸緩衝液)

移動相 : CH₃OH/ 10 mM リン酸緩衝液 (10/90)
温度 : 40℃

【理論段数 測定条件】

移動相 : CH₃CN/H₂O (60/40) 注入量 : 1 μL
温度 : 40℃ 検出 : UV 254 nm
流速 : 0.2 mL/min 試料 : ナフタレン (1 g/L)

- 耐アルカリ性の高いカラム(PCSシリカ、ハイブリッド系)を使用する。
- L-column3 は耐アルカリ性が非常に高い(業界トップクラス)。