

## 移動相使用量の削減

逆相HPLCでは移動相にアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒が用いられます。コスト削減や環境への配慮、最近のアセトニトリルの入手困難な状況により、移動相の溶媒使用量の削減が求められています。ここではシステムにコストをかけずに、カラムサイズを変えての移動相使用量の削減のノウハウを紹介します。

**Keywords** カラム内径を細くする 内径 3.0mm カラム長さを短くする 粒子径 3  $\mu$ m LCシステムの最適化

### カラム内径を細くする

#### ■ カラム内径と流量

カラム内径を変えても、移動相の線速度(流量/断面積)が等しければ、保持時間や分離度は変わりません。Table 1に線速度を合わせたときの流量の例を示します。内径4.6mmから内径3.0mmへ変更したとき流量は2/5に、内径2.1mmならば1/5になるので、分析からカラム洗浄や置換を含めた一連の溶媒使用量が削減できます。

Table 1 カラム内径と流量及び溶媒使用量

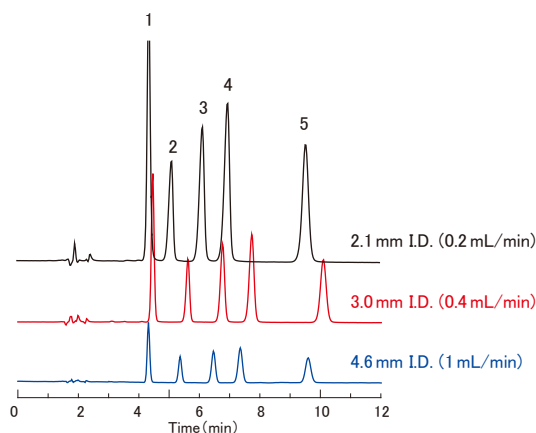
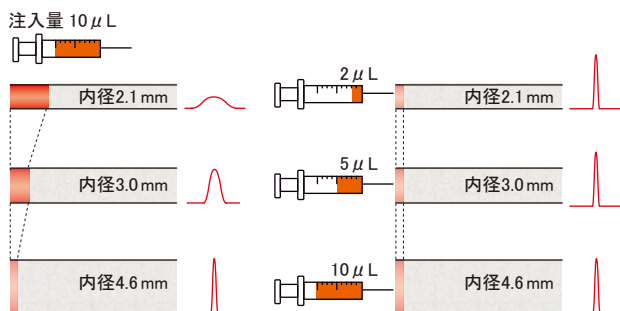
内径(mm)	断面積(cm <sup>2</sup> )	流量※1	溶媒使用量
2.1	0.035	0.2	1/5
3.0	0.071	0.4	2/5
4.6	0.166	1.0	1

同じ線速度で分析したとき、カラム内を移動する試料のバンド幅は変わらないので、断面積に応じて感度が向上します。Fig.1は動物医薬品のサルファ剤を分析した例です。保持時間がそのままに感度が向上しているのがわかります。

#### ■ 注入量のノウハウ

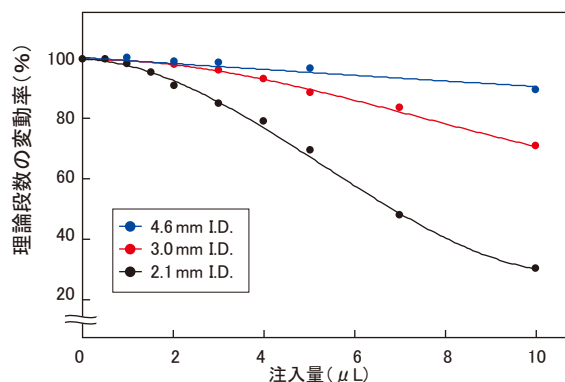
内径が細くなると、注入量がピーク形状に影響してきます。(Fig.2)。理論段数が低下するほどピークはブロードになります。これは内径に対する試料のバンド幅が広がるためです。注入量を断面積に応じて変えるとピーク形状を変えずに同じ感度が得られます。

注入量が変わらない場合は、試料溶媒を移動相と同じ、または移動相より極性を高くすることで、試料溶媒の影響を抑えることができます。



[Analytical conditions]  
Column: **L-column ODS** 150 mmL (5  $\mu$ m, 12 nm)  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/5 mM Ammonium acetate in H<sub>2</sub>O (20/80)  
Sample: 1. Sulfathiazole 2. Sulfamethoxazole 3. Sulfamonomethoxine  
4. Sulfamethoxine 5. Sulfamethazine (5 ppm)  
Inj.vol.: 5  $\mu$ L

Fig.1 内径の違いによるクロマトグラム比較(サルファ剤) 増田2006



[Analytical conditions]  
Column: **L-column ODS** 150 mmL (5  $\mu$ m, 12 nm)  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60/40)  
Sample: Naphthalene (1 mg/mL in CH<sub>3</sub>CN)

Fig.2 内径と注入量による理論段数の比較

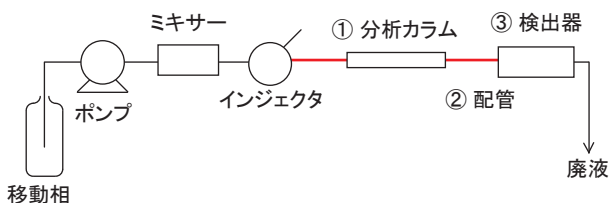
2007分析展

※1 内径4.6 mmの流量が1.0 mL/minのとき、線速度を同じにした場合(単位: mL/min)

### ■ LCシステム最適化のノウハウ

内径を細くすると、内径4.6 mm では問題とならなかったデッドボリューム※2が、ピーク形状に大きく影響し、理論段数が低下します。インジェクタ～検出器までの試料拡散の原因となる箇所を変更します。

内径3.0 mm は、汎用のLCシステムで使用可能と言われていますが、メーカーや型式の新旧によっては、理論段数の低下が生じる場合があるので注意してください(Fig.3)。

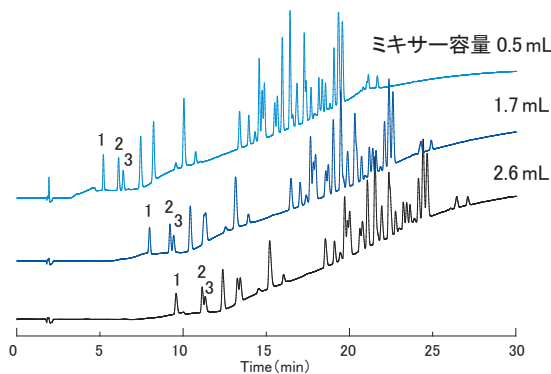


	理論段数(%)	
	旧型式	新型式
4.6 × 150 mm を使用	12733 (100)	11888 (100)
① カラムを 3.0 × 150 mm へ変更	9846 (77)	10690 (89)
② 配管を 0.12 mm へ変更※3	9981 (78)	11266 (94)
③ セミマイクロ用フローセルに変更	11680 (91)	11467 (96)

[Analytical conditions]  
 Column: L-column2 ODS 150 mm L (5 μm, 12 nm)  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60/40)  
 Flow rate: 1 mL/min (4.6 mm I.D.), 0.4 mL/min (3.0 mm I.D.)  
 Temp.: 40°C  
 Sample: Naphthalene (1 mg/mL in CH<sub>3</sub>CN)

Fig. 3 LCシステムの違いによる理論段数の比較

グラジエント分析ではミキサー容量が大きいと、実際のグラジエント開始が遅れるので、保持時間は遅くなり、早い時間に溶出する成分はピーク形状が悪くなります(Fig.4)。内径・流量を変えたときは、流量に合わせてミキサー容量を変更します。保持時間を合わせたいときは、ミキサー～カラム入口までが置き換わる時間を調整してください。



[Analytical conditions]  
 Column: L-column2 ODS 3.0 × 150 mm L (5 μm, 12 nm)  
 Mobile phase: A 5 mM Ammonium acetate in CH<sub>3</sub>OH  
 B 5 mM Ammonium acetate in H<sub>2</sub>O  
 A/B 15/85-40/60-40/60-50/50/55/45/95/5  
 (0-1-3.5-6-8-17.5-30 min)  
 Flow rate: 0.4 mL/min Temp.: 40°C  
 Sample: 農薬37種(関東化学株式会社農薬標準液44) (10 ppm)  
 Inj.vol.: 5 μL  
 System: LC10ADvp (Shimadzu Co.)

Fig.4 ミキサー容量の違いによるクロマトグラム比較(農薬)

※2 配管やUV検出器のフローセルの容量  
 ※3 汎用システムでは内径0.25~0.3 mm の配管が使用されています

## カラム長さを短くする

カラム長さを短くすれば、分析時間は短くなるので、移動相使用量の削減になります。

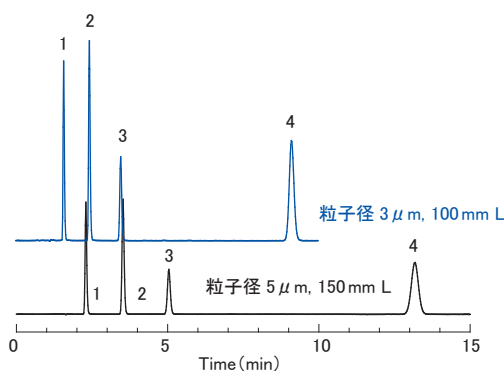
カラム長さ(理論段数)は比例するので、長さを短くすれば分離能は低下します。分離能を維持しつつ、分析時間の短縮を図るためには、粒子径を小さくする必要があります。

### ■ 粒子径3 μmの使用のノウハウ

理論段数は粒子径に反比例するので、粒子径3 μmは5 μmの約1.7倍の理論段数の向上になります。よって粒子径3 μmのカラムでは5 μmの約2/3の長さで同等の分離能が得られます。Fig.5は粒子径3 μmを使用することにより、分離能を損なわずに移動相使用量を2/3にした例です。同等の分離能のカラムへの変更は以下のようになります。

粒子径5 μm, 長さ 250 mm → 粒子径3 μm, 長さ 150 mm  
 粒子径5 μm, 長さ 150 mm → 粒子径3 μm, 長さ 100 mm

粒子径3 μmについては「LC Technical Report Vol.07 粒子径3 μmの上手な使い方」をご覧ください。



内径 × 長さ(粒子径)	tR(4)	N(4)	Rs(1,2)	P
4.6 × 100 mm (3 μm)	9.105	15442	10.765	8.3 MPa
4.6 × 150 mm (5 μm)	13.195	13951	9.767	4.3 MPa

[Analytical conditions]  
 Column: L-column2 ODS 4.6 mm I.D. (12 nm)  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/25 mM Phosphate buffer pH 7.0 (40/60)  
 Flow rate: 1 mL/min  
 Temp.: 40°C Detection: UV 230 nm  
 Sample: 1. クロロタリドン 2. チクロアジド 3. インダナミド 4. スピロラクトン  
 Inj.vol.: 1 μL

Fig.5 粒子径5 μm から3 μm への移行(利尿剤)

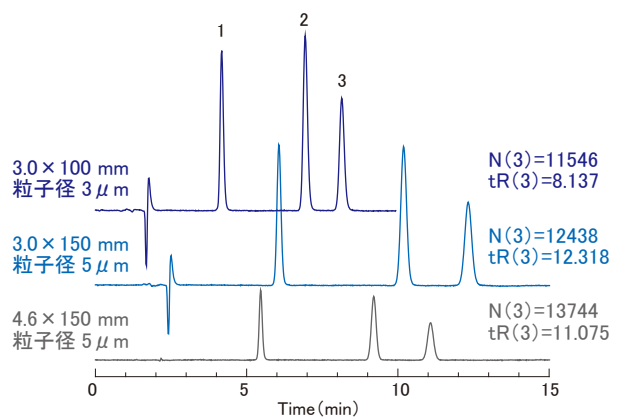
Report 7-8

## 省溶媒への最適化

### ■ 内径3.0 mm, 粒子径3 μmを用いた分析

内径・長さ及び粒子径の全てを変更すれば、移動相使用量は最大限に削減できます。

Fig.6に内径4.6 mm, 長さ150 mm, 粒子径5 μmから、内径3.0 mm, 長さ100 mm, 粒子径3 μmに変更したときの省溶媒化の例を示します。流量及びシステムを最適化することで、分離能を損なわず溶媒使用量の削減と高感度化が実現します。



内径×長さ(粒子径)	流量※1	移動相量※4	Rs(2,3)	カラム圧
3.0×100 mm(3 μm)	0.4	4 mL	4.25	8.3 MPa
3.0×150 mm(5 μm)	0.4	6 mL	5.27	3.7 MPa
4.6×150 mm(5 μm)	1.0	15 mL	5.54	4.4 MPa

[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 150 mmL (5 μm, 12 nm)  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/25mM Phosphate buffer pH7.0 (10/90)  
 Temp.: 40°C  
 Sample: 1. Famotidine 2. Cimetidine 3. Ranitidine  
 System: Alliance 2695 (Waters Co.)

Fig.6 カラムサイズとクロマトグラム比較

※4 カラム長さ150 mmは分析時間15分、100 mmは分析時間10分に要する移動相の使用量

## 分析例

カラムの内径及び長さ、充填剤の粒径、(中略)移動相の流量(中略)は、システム適合性の規定に適合する範囲で一部変更することができます。(第15改正日本薬局方第一追補より抜粋)

### ■ ケトプロフェンの分析

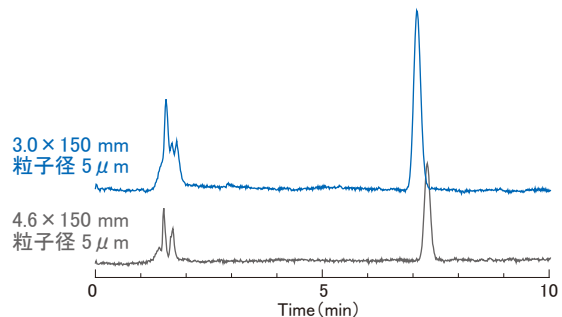
第15改正日本薬局方では、「純度試験(3)類縁物質」の試験を液体クロマトグラフィーにて行うとされています。カラムには「内径4.6 mm、長さ15 cmのステンレス管に5 μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシル化シリカゲル」と規定され、流量はケトプロフェンの保持時間が約7分になるように調整します。

システム適合性のシステムの性能では、「ケトプロフェンのピークの理論段数及びシンメトリー係数は、それぞれ8000段以上、1.5以下である」とされており、カラム内径を4.6 mmから3.0 mmに変更しても規定に適合しています(Fig.7)。

この条件での移動相使用量は以下のとおりです。

内径4.6 mm → 10 mL  
 内径3.0 mm → 4.5 mL

このように、移動相使用量は半分以下に削減することができます。



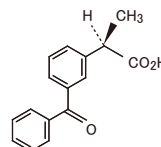
内径×長さ(粒子径)	保持時間	理論段数	シンメトリー係数
3.0×150 mm(5 μm)	7.074	8979	1.062
4.6×150 mm(5 μm)	7.316	13931	1.024

[Analytical conditions]

Column: **L-column2 ODS** 150 mmL (5 μm, 12 nm)  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/Phosphate buffer pH3.5 (430/550/20)  
 Flow rate: 1 mL/min (4.6 mm I.D.) 0.45 mL/min (3.0 mm I.D.)  
 Temp.: 25°C Detection: 233 nm  
 Sample: Ketoprofen (2 mg/L) Inj. vol.: 20 μL

Fig.7 ケトプロフェン(第15改正日本薬局方準拠)

No.2058



【ケトプロフェン Ketoprofen】炎症にともなう腫れや痛みをやわらげ、熱をさげる作用があり、慢性関節リウマチ、変形性関節症、腰痛、症候性神経症、外傷後、手術後などの高背炎症・鎮痛・解熱に用いられます。  
 (お薬ナビより抜粋)

<http://www.okusuri-navi.com/39/post-937/>

## Information

### ■ Application No.2055 セラミド類の分析 Ceramide

セラミドは人の角質に多く存在し、肌の乾燥や細菌から守る役割があります。アトピー性皮膚炎の原因や細胞のシグナル伝達物質としてよく知られており、その構造はスフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合したものです。今回 **L-column2 ODS** によるLC/MS一斉分析を行いました。

### ■ LC Technical Report Vol.09 アセトニトリルからメタノールへの移行

最近のアセトニトリルの入手困難な状況により、アセトニトリルからメタノールへ移動相を変更しなければならない場合があります。溶媒の特徴と注意点や実際の分析例を紹介します。

その他アプリケーションや技術資料はホームページをご覧ください。

(クロマト技術部へのアドレスはこちらです)

[http://www.cerij.or.jp/service/09\\_chromatography/L-column\\_01.html](http://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/L-column_01.html)

## Line-up 省溶媒用カラム

### L-column2 ODS 細孔径12 nm

粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	内径 (mm)	カラム長さ(mm)					
		50		100		150	
		Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)
3 $\mu\text{m}$	2.1	711140	47,000	711170	52,000	711020	57,000
	3.0	721490	47,000	721330	52,000	721260	57,000
5 $\mu\text{m}$	2.1	712140	44,000	712170	50,000	712020	54,000
	3.0	-	-	722330	50,000	722260	54,000

### L-column ODS 細孔径12 nm

粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	内径 (mm)	カラム長さ(mm)					
		50		100		150	
		Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)
3 $\mu\text{m}$	2.1	611140	45,000	611170	50,000	611020	55,000
	3.0	621490	45,000	621330	50,000	621260	55,000
5 $\mu\text{m}$	2.1	612140	42,000	612170	47,000	612020	52,000
	3.0	-	-	622330	47,000	622260	52,000

※ 2014年4月現在の価格(税別)になります  
 ※ ネジ型は全て1/16"ウォーターズジョイント(W)になります  
 ※ 一覧にないサイズは、お問合せください

## L-column2 シリーズ&G-column デモカラムモニター募集

L-column2 ODSをはじめ、L-column2 C8, L-column2 C6-Phenyl のデモを承っております。  
 GC分析でお困りなことはありませんか? 内径1.2 mmの大口径カラムG-column をお試しください。

リーフレット内容に関してのお問合せは、最寄の代理店又は東京事業所クロマト技術部までご連絡ください。

**CERI** 一般財団法人 化学物質評価研究機構  
 Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan  
<http://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部  
 e-mail [chromato@cerij.jp](mailto:chromato@cerij.jp)

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521  
 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地