

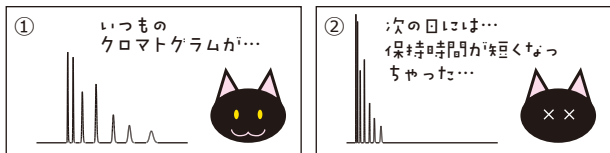


# 水100%溶離液(水比率の高い溶離液)で分析する

## トラブル その1 保持時間が短くなる

水比率の高い溶離液で分析していると、急に保持時間が短くなることがあります。これは送液停止した後、分析を再開したときによく起こります。連続分析では問題なく分析できるので、この溶離液条件をルーティン化するとトラブルを生じかねません。

L-column ODS, L-column2 ODS では有機溶媒比率10%未満の溶離液で、保持時間の減少が生じる場合があります。



これは充填剤と溶離液の極性の差が原因です。

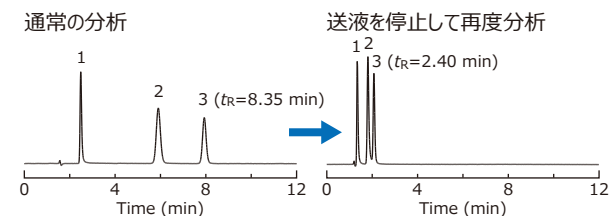
カラムメーカーは、シリカなど基材の物性、化学結合基の種類、結合密度などを改良し、水100%溶離液(水比率の高い溶離液)でも、保持時間の再現性が得られるC18カラムを上市しています。

L-column シリーズの中では、L-column3 が水100%の溶離液で分析しても保持時間の再現性が得られます。

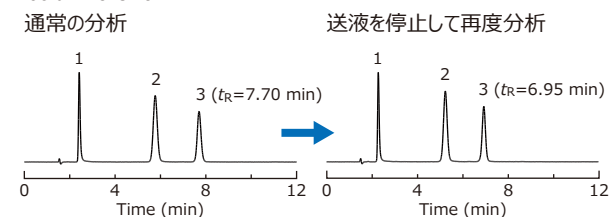
## 【水溶性ビタミン(ビタミンB6)の分析】

りん酸塩緩衝液を溶離液に用いて、ピリドキサミン、ピリドキサル、ピリドキシンを分析しました。送液を停止後、再度分析すると、L-column2 は極端に保持時間が短くなりました。L-column3 の保持時間の変化が小さいことが分かります。

### L-column2 ODS



### L-column3 C18



[Analytical conditions]  
Column: ODS(C18), 5 μm; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: 25 mmol L<sup>-1</sup> Phosphate buffer pH 7  
Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C  
Detection: UV 320 nm; Inj. vol.: 1 μL  
Sample: 1. Pyridoxamine; 2. Pyridoxal; 3. Pyridoxine

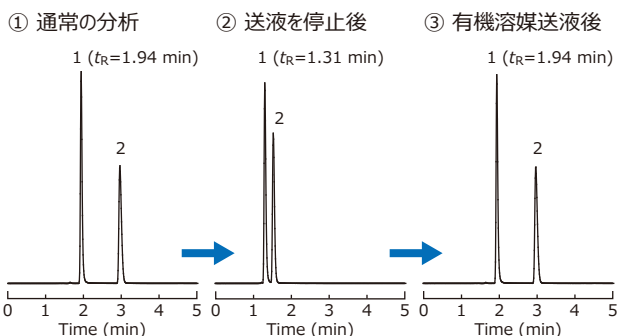
Application No.L3011

L-column3 は水100%で使えますね！

はい。しかし L-column3 もわずかに保持時間の減少が生じました。これを改善するには、送液停止後、再度分析する前に、有機溶媒比率の高い溶液を送液します。この操作により保持時間の再現性が得られるようになります。極端に保持時間が短くなった L-column2 も問題なく使用することができます。

## 【有機酸(ぎ酸, 酢酸)の分析】

- りん酸水溶液で有機酸を分析しました。
- 送液を停止後、再度分析すると、極端に保持時間が短くなりました。ほとんど保持していません。
- 有機溶媒を含む溶液を送液後、再度分析をすると、保持時間が①に戻りました。



[Analytical conditions]  
Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: CH<sub>3</sub>CN/20 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2/98)  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C  
Detection: UV 210 nm; Inj. vol.: 1 μL  
Sample: 1. Formic acid; 2. Acetic acid

Application No.L2008

まず「グラジエント溶離」できるLCを使ってください。カラム圧力を大気圧に戻さず、③の操作を行うことがポイントです。

あらかじめ有機溶媒とりん酸水溶液をそれぞれLCにセットします。有機溶媒を含んだ溶液を送液後、ポンプを止めずに分析条件のりん酸水溶液に戻し、平衡化してから分析しました。

アセトニトリル及びメタノールについて、有機溶媒比率と送液時間を変化させ、ぎ酸の保持時間を比較した結果を下表に示します。本実験条件では、アセトニトリル30%、メタノール50%で10分間送液することで、保持時間の再現性が得られることが分かりました。

## ■ 有機溶媒比率と送液時間による保持時間再現性の効果

送液時間	有機溶媒比率(%)				
	50	40	30	20	
アセトニトリル	10分	99.8%	99.7%	99.8%	91.2%
	30分	100.0%	100.2%	99.8%	84.0%
	60分	99.9%	100.0%	99.8%	84.3%
メタノール	10分	100.1%	92.4%	81.0%	76.6%
	30分	99.7%	92.2%	80.5%	76.5%
	60分	99.4%	92.0%	80.7%	76.5%

流量: 1 mL/min  
③のぎ酸の保持時間/①のぎ酸の保持時間×100(%)

## 再現性を得るための、有機溶媒送液について

有機溶媒比率、送液時間は溶離液の種類(水、又は緩衝液)、緩衝液の種類と濃度、温度によって異なります。送液時間を長くするより有機溶媒比率を高くする方が、より効果が現れます。

カラムに送液する溶液の組成を変えるときは、カラム圧力が急激に変動しないようにします。(有機溶媒比率を徐々に変化させる、分析条件より少ない流量で送液する、など)

塩を含む緩衝液を溶離液に使用している場合は、塩が析出しないように、注意してください。

ここでは、りん酸水溶液を使っているため、問題なく有機溶媒を含む溶液を送液することができました。

## トラブル その2 塩の析出

塩を含む緩衝液を用いる場合、塩の析出に注意してください。分析終了後はカラムと送液ラインから塩を除去してください。

面倒ですが、重要なことです。塩を除去する操作を怠るとカラムだけでなくLCにも不具合が生じます。



**事例1**  
次の日に使うので、カラムを付けたままにしていた。翌日、誤って有機溶媒比率の高い溶離液を流してしまい、圧力が上昇しました。カラム内で塩が析出してしまったようです。

**事例2**  
分析終了後、カラムを付けたまま1週間ほどLCを放置していました。LCを再稼働したところ、圧力が上昇しました。検出器が原因のようで、確認するとUVセル内で塩が結晶化していました。配管出口側は開放状態なので乾燥してしまったようです。

下は試験管に入れた25 mmol/L りん酸塩緩衝液です。アセトニトリル比率を75%から80%に増やすと、白濁しました。これが塩が析出している状態です。



同じ有機溶媒比率の場合、アセトニトリルはメタノールと比較して塩が析出しやすくなります。塩の種類と濃度、温度によっても、塩が析出する有機溶媒比率は異なります。分析前に塩が析出しない有機溶媒比率を確認してください。

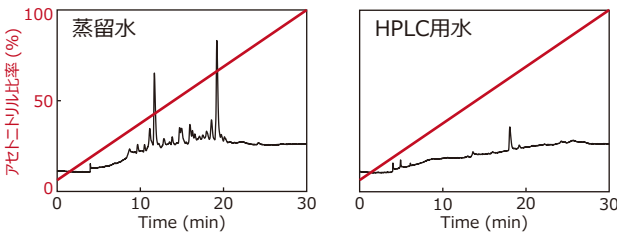


アセトニトリル/りん酸塩緩衝液 (75/25) → アセトニトリル/りん酸塩緩衝液 (80/20)

## トラブル その3 疎水性物質が充填剤に蓄積する

溶離液、試料などに含まれる疎水性物質は、水比率の高い溶離液で分析を続けると、充填剤に蓄積し、不明ピークが溶出したり、分析種のピーク形状に影響を及ぼしたりします。

疎水性物質は、溶離液の有機溶媒比率を高くすると溶出します(下のクロマトグラムのピークは溶離液由来の不純物です)。水比率が高い溶離液で分析し続けると、これら不純物はカラム内に留まったまま蓄積していきます。



[Analytical conditions]  
Column: L-column ODS, 5  $\mu$ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 10/90-100/0 (0-30 min)  
Flow rate: 1 mL/min; Detection: UV 210 nm

不純物をなるべく除去した試薬を選択することも大切です。

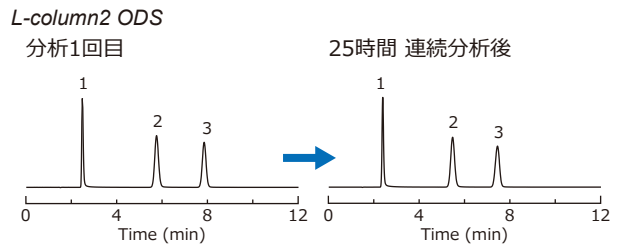
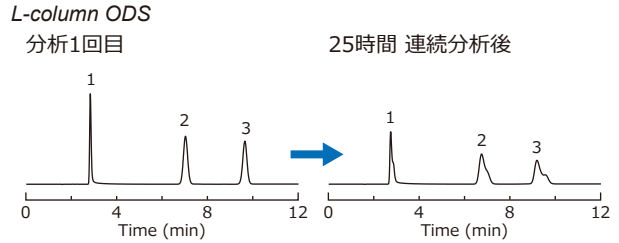
特級の試薬でも汚れているの？

純度100%の試薬は存在せず、わずかな不純物が含まれています。作業空間中の有機物の混入などによっても汚染されます。これらの不純物に起因するトラブルは、比較的高い頻度で発生します。

## トラブル その4 カラム劣化が早い

【水溶性ビタミン(ビタミンB6)の分析】

りん酸塩緩衝液を溶離液に用いて、ピリドキサミン、ピリドキサル、ピリドキシンを分析しました。送液を止めていないので保持時間はあまり変化しません。L-column はピーク割れを起こしましたが、L-column2 は問題なく分析できました。

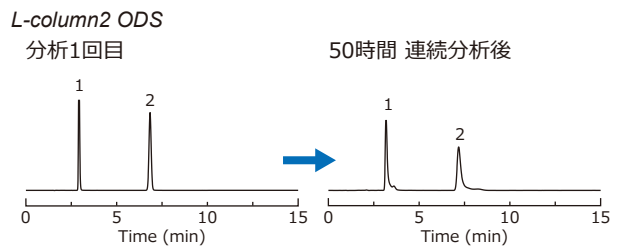
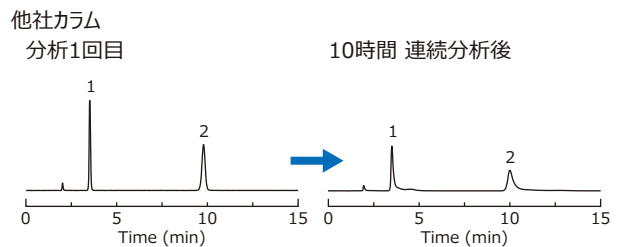


[Analytical conditions]  
Column: ODS(C18), 5  $\mu$ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: 25 mmol L<sup>-1</sup> Phosphate buffer pH 7  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C  
Detection: UV 320 nm; Inj. vol.: 1  $\mu$ L  
Sample: 1. Pyridoxamine; 2. Pyridoxal; 3. Pyridoxine

カラムの劣化は、基材の物性、表面処理、充填状態(均一に充填剤が詰まっているか、高圧充填されているか)などが関係します。水比率の高い溶離液で長時間分析していると溶離液のpH、圧力が取扱説明書の範囲内であっても、カラムの劣化は早くなります。

【水溶性ビタミン(ビタミンB3)の分析】

りん酸塩緩衝液を溶離液に用いて、ニコチン酸、ニコチン酸アミドを分析しました。水100%で使用可能と謳っている他社カラムは、10時間送液後ピーク形状が悪くなりました。L-column2 は50時間送液後ピーク形状が悪くなりました。



[Analytical conditions]  
Column: ODS(C18), 5  $\mu$ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: CH<sub>3</sub>CN/25 mmol L<sup>-1</sup> Phosphate buffer pH 7 (2/98)  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C  
Detection: UV 260 nm; Inj. vol.: 1  $\mu$ L  
Sample: 1. Nicotinic acid; 2. Nicotinamide

ピーク形状が悪くなったカラムを洗浄して、性能回復を試みましたが、ピーク形状は改善しませんでした。

## 「水100%で分析するコツ」のまとめ

### 定期的に有機溶媒比率の高い溶液を送液する

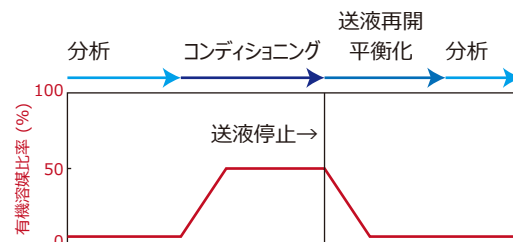
これには、次の目的があります。

- ・ カラム内に蓄積した疎水性物質を除去するため
- ・ カラムの劣化を抑制するため

前ページの「トラブル その4」は水比率の高い溶離液で連続分析をしているため、早く劣化しました。分析の合間に(○回連続分析後、1日の分析終了後、など)定期的に有機溶媒比率の高い溶液を送液することで(カラムのコンディショニング※2)、カラム性能をより長く維持することができます。

### 分析終了後、送液停止時には、有機溶媒40～50%含んだ溶液でカラム内を満たしておく(塩が析出しないこと)

送液再開時は、グラジエント溶離で分析条件の溶離液に設定しそのまま平衡化すれば、保持時間が短くなるトラブルが回避できます。



### 塩を含まない緩衝液を選択する

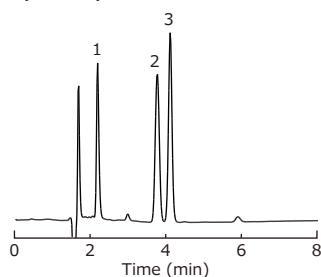
塩を含む緩衝液を使用している場合、有機溶媒比率の高い溶液を送液する前に塩の除去が必要となり、時間と手間がかかります。塩を含まない緩衝液を選択することをお勧めします。

※2 液体クロマトグラフィーでは、カラム内に残留し分析を妨害する物質を、測定条件よりも強い溶媒強度の移動相で除外する操作、及び適切な移動相によって固定相の官能基を測定に適した状態に導く操作を示します。(JIS K 0214:2013参照)

## アプリケーションデータ

### 【分岐鎖アミノ酸(BCAA)】

Sample  
1. Valine  
2. Leucine  
3. Isoleucine

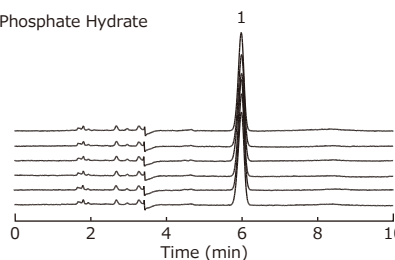


[Analytical conditions]  
Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: 25 mmol L<sup>-1</sup> Phosphate buffer pH 7  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: Room temperature  
Detection: UV 210 nm; Inj. vol.: 20 μL

Application No.L2038

### 【ピリドキサルリン酸エステル水合物(日本薬局方※3)】

Sample  
1. Pyridoxal Phosphate Hydrate

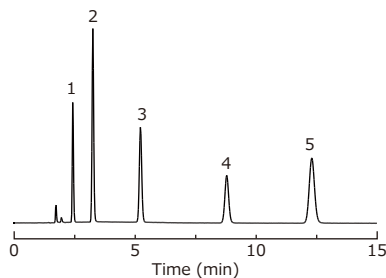


[Analytical conditions]  
Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 250 mm L.  
Eluent: Phosphate buffer※4  
Flow rate: 1.5 mL/min; Temp.: 30°C  
Detection: UV 254 nm; Inj. vol.: 5 μL

Application No.L2153

### 【核酸塩基】

Sample  
1. Cytosine  
2. Uracil  
3. Guanine  
4. Thymine  
5. Adenine



[Analytical conditions]  
Column: L-column3 C18, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: 25 mmol L<sup>-1</sup> Phosphate buffer pH 7  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C  
Detection: UV 260 nm; Inj. vol.: 5 μL

Application No.L3009

### 純度試験

(4)類縁物質 システム適合性(システムの性能、システムの再現性)

	n=6	結果	規格値
理論段数		6500	≥ 3000
シンメトリー係数		0.9	≤ 1.5
ピーク面積の相対標準偏差		0.3%	≤ 2.0%

※3 第十七改正日本薬局方 第一追補

※4 リン酸二水素カリウム3.63 g、無水りん酸水素二ナトリウム5.68 gを水で溶かし、1 Lとする

日本薬局方においても、100%緩衝液の溶離液として用いた分析法が採用されています。しかし日本薬局方には、水比率の高い溶離液を用いた分析に関する具体的な工夫やノウハウは記載されていません。本レポートが、こうした分析条件下で生じるトラブル解決の一助を担えれば幸いです。



リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店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

<https://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部

e-mail 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