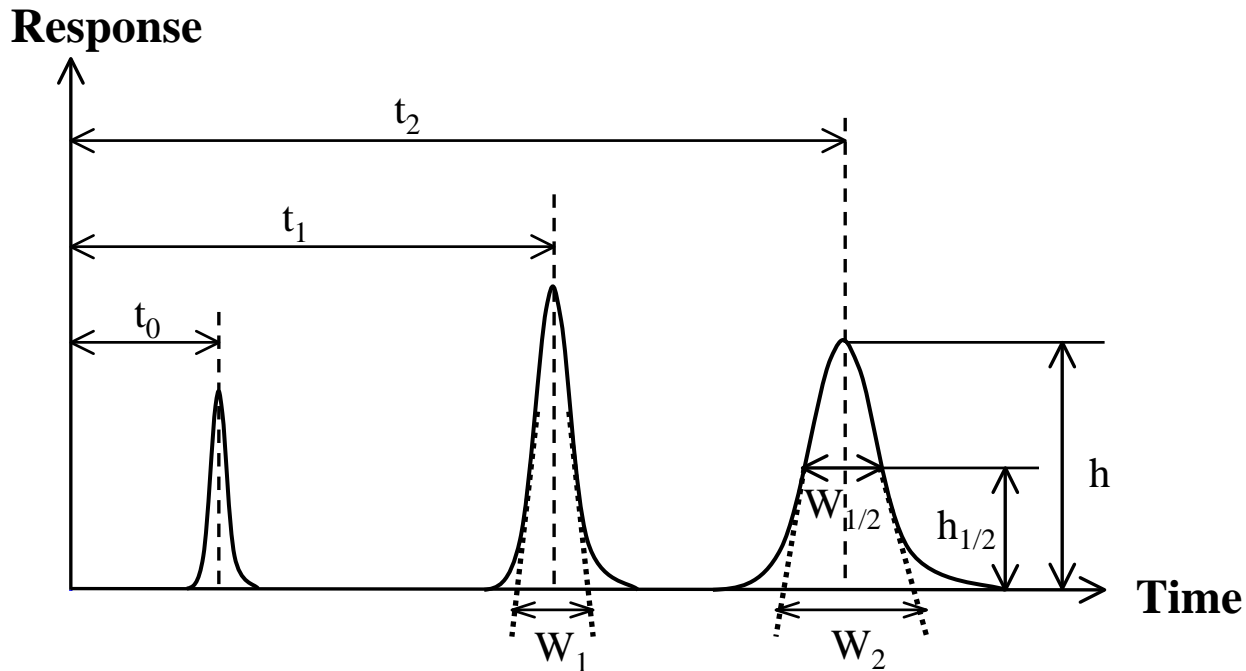


# 用語 (1) - クロマトグラム -



$t_0$  : 保持されない成分の溶出時間

$t_1$  : 成分1の溶出時間

$W_1$  : 成分1のピーク幅

$h$  : ピーク高さ

$h_{1/2}$  : 半値幅 (ピーク高さが1/2の部分のピーク幅)

$t_2$  : 成分2の溶出時間

$W_2$  : 成分2のピーク幅

## 用語 (2) - クロマトグラフィー特性 -

$$\text{容量比 } k' = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$

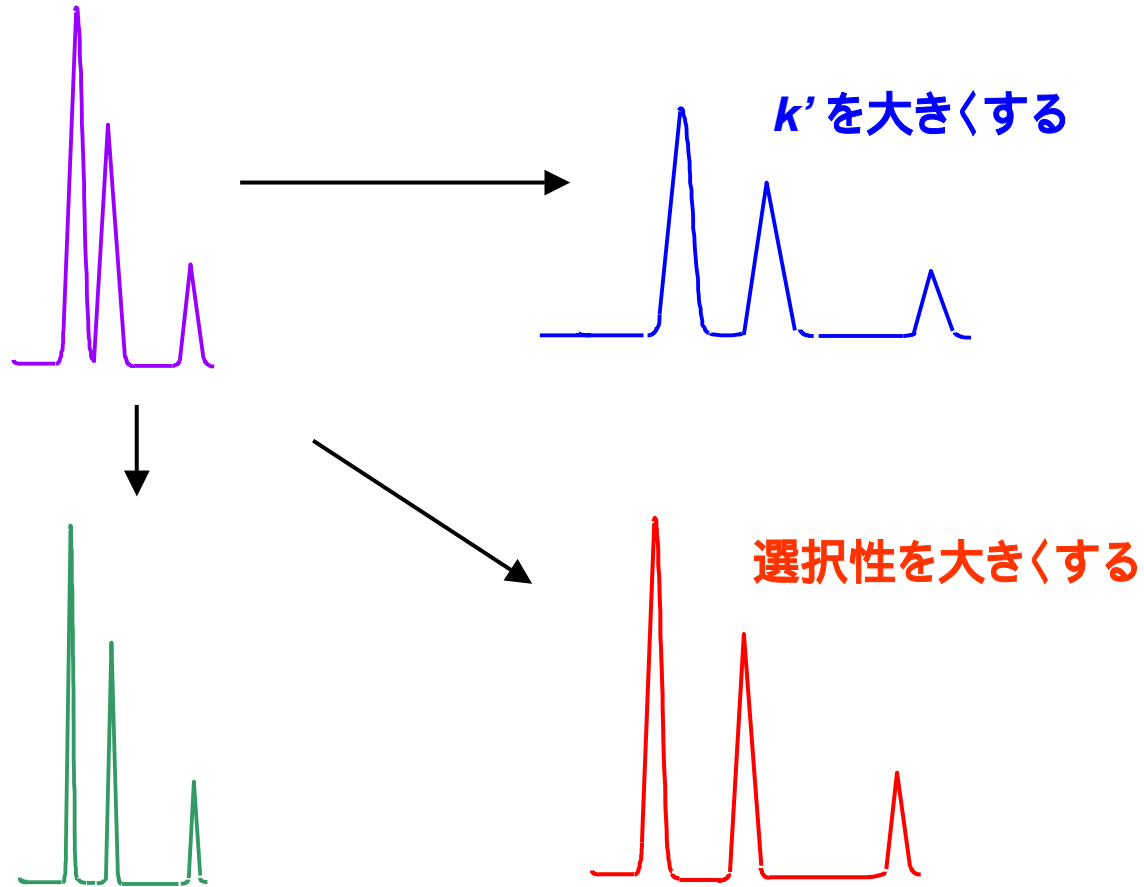
$$\text{選択性 } \alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

$$\text{理論段数 } N = 5.54 \times \left[ \frac{t_1}{W_{1/2}} \right]^2 = 16 \times \left[ \frac{t_1}{W_1} \right]^2$$

$$\text{理論段高さ } h = \frac{L}{N}$$

$$\text{分離度 } R_s = \frac{\Delta t}{W} = \frac{\Delta t}{\frac{W_1 + W_2}{2}}$$

# 分離の調節



分離効率を良くする

$k'$  を大きくする

選択性を大きくする

# 分離度に関するパラメータと分析条件

$$R_s = \frac{Dt}{w} = \frac{1}{4} \times \left[ \frac{k'}{k'+1} \right] \times \sqrt{N} \times \frac{a-1}{a}$$

	$k'$	N	$\alpha$
<b>移動相</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 溶出強度</li> <li>• 極性</li> <li>• pH</li> <li>• 線流速</li> <li>• 粘度</li> </ul>		-	-
<b>固定相</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 保持強度</li> <li>• 極性</li> <li>• 粒子径</li> </ul>		-	-
<b>カラムサイズ</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 長さ</li> <li>• 直径</li> </ul>	( )	( )	( )
<b>カラム温度</b>	( )	( )	( )
<b>サンプル量</b>	-		-

# 逆相分配クロマトグラフィー1

## - 有機溶媒比の影響 -

カラム：Excelpak SIL-C18/5B. 4.6x150 mm

移動相：methanol:0.05M phosphate buffer pH 6.0

温度：40 °C

試料：1. Aminophenol

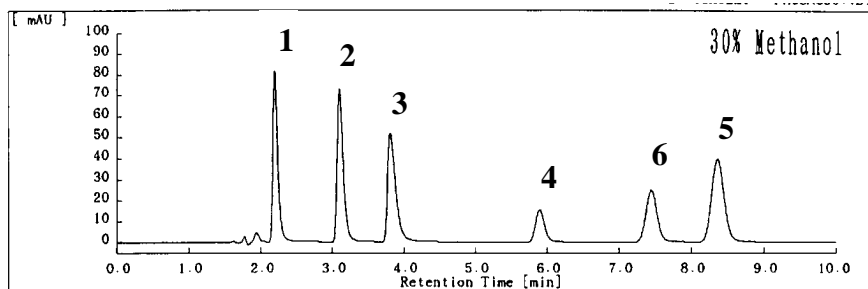
2. Benzoic acid

3. Salicylic acid

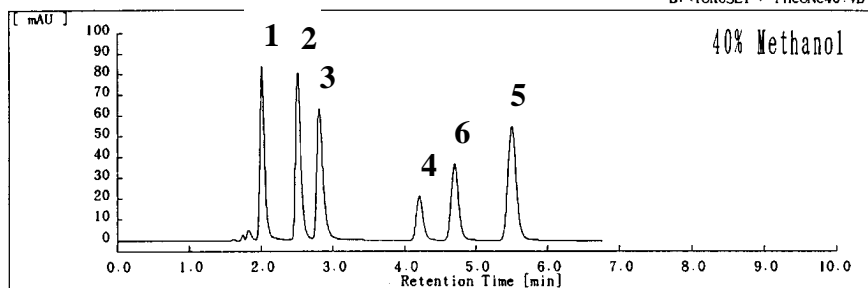
4. Aniline

5. Phenol

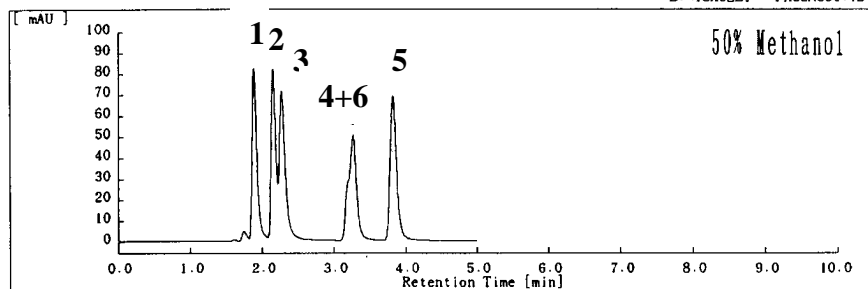
6. Nitroaniline



B:<TOKUSEI > PHCONC40.VDI



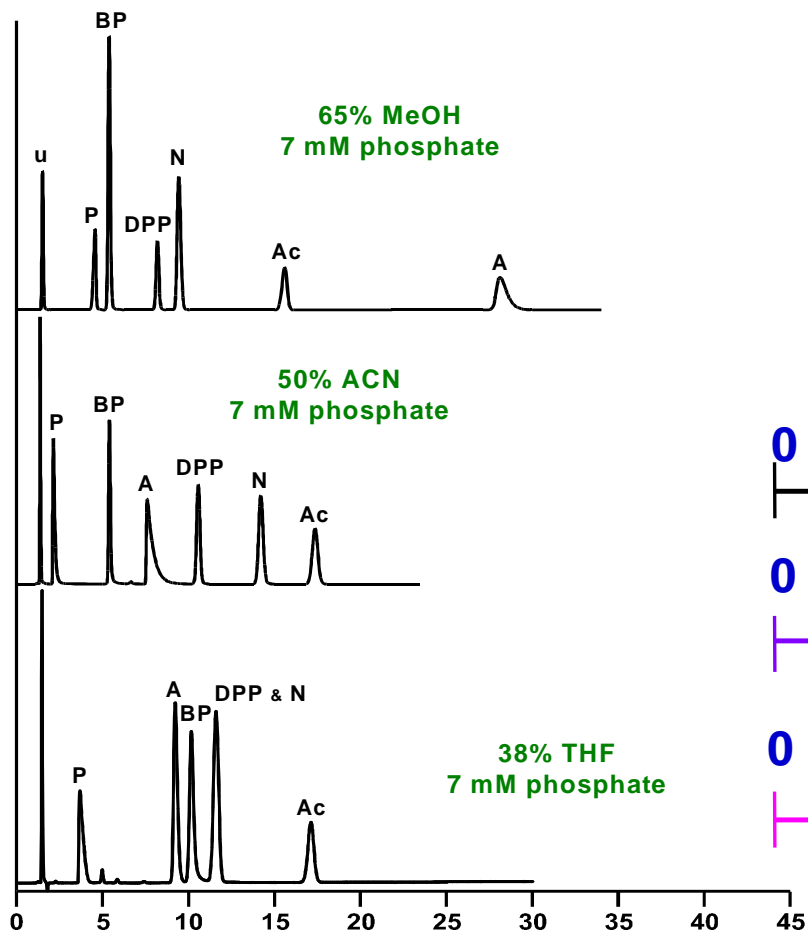
B:<TOKUSEI > PHCONC50.VDI



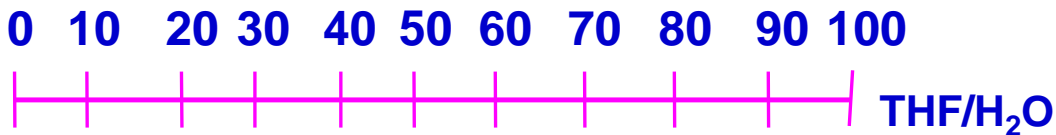
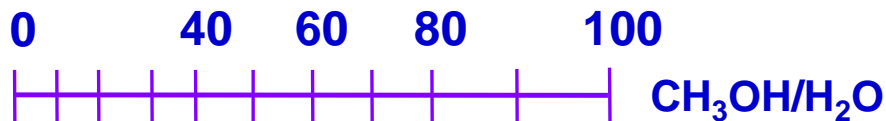
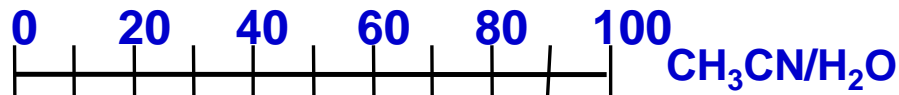
		$pka_1$	$pka_2$
1	<chem>Nc1ccc(O)cc1</chem>	8.50	10.30
2	<chem>O=C(O)c1ccccc1</chem>	4.20	
3	<chem>O=C(O)c1cc(O)ccc1</chem>	2.98	12.38
4	<chem>Nc1ccccc1</chem>	4.60	
5	<chem>Oc1ccccc1</chem>	9.99	
6	<chem>Nc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>	1.01	

# 逆相分配クロマトグラフィー2

## - 有機溶媒の影響 -

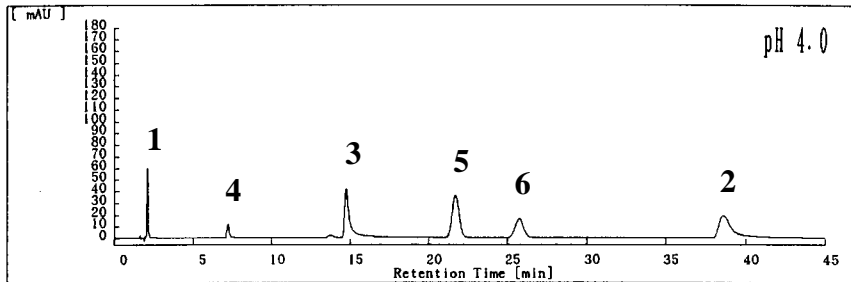


u = uracil  
P = propranolol  
BP = butylparaben  
DPP = dipropylphthalate  
N = naphthalene  
Ac = acenaphthene  
A = amitriptyline

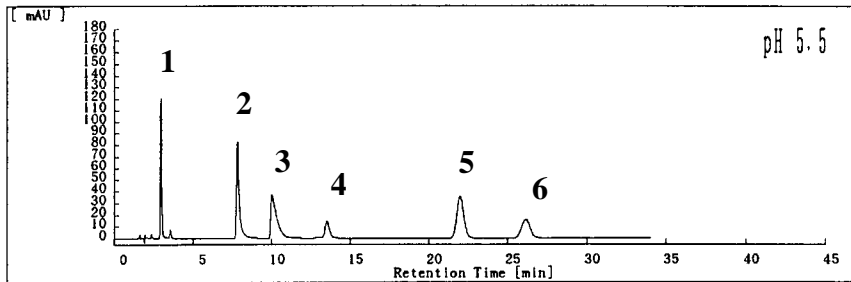


# 逆相分配クロマトグラフィー3

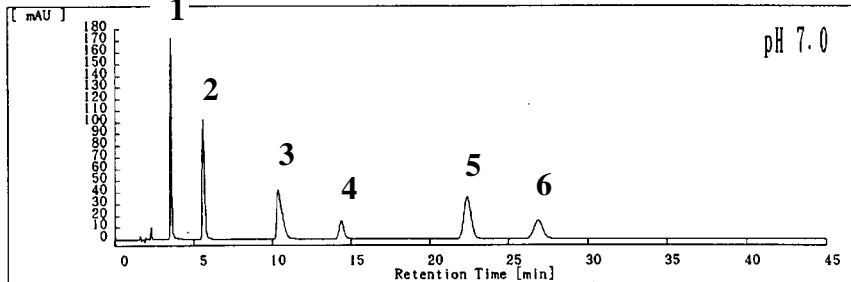
## - 緩衝液のpHの影響 -



B:<TOKUSEI > PH0554 .VDI



B:<TOKUSEI > PH0704 .VDI



カラム : Excelpak SIL-C18/5B, 4.6x150 mm

移動相 : methanol:0.05M phosphate buffer=10:90

温度 : 40 °C

試料 : 1. Aminophenol

2. Benzoic acid

3. Salicylic acid

4. Aniline

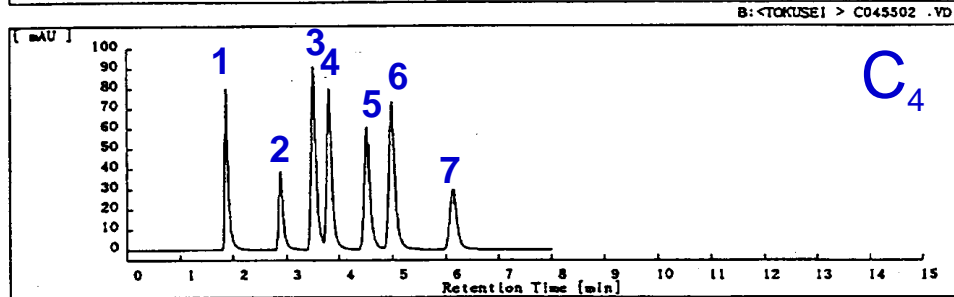
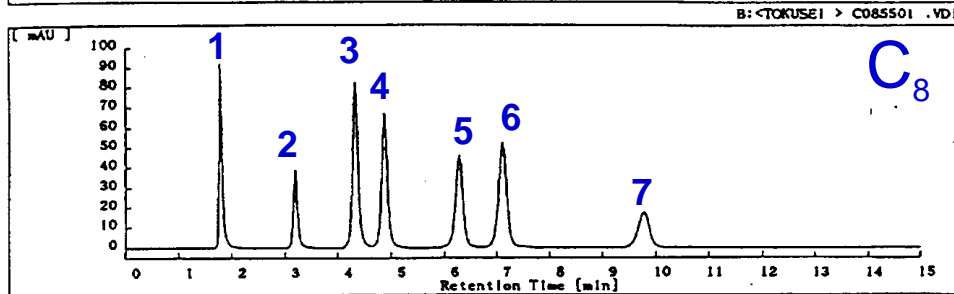
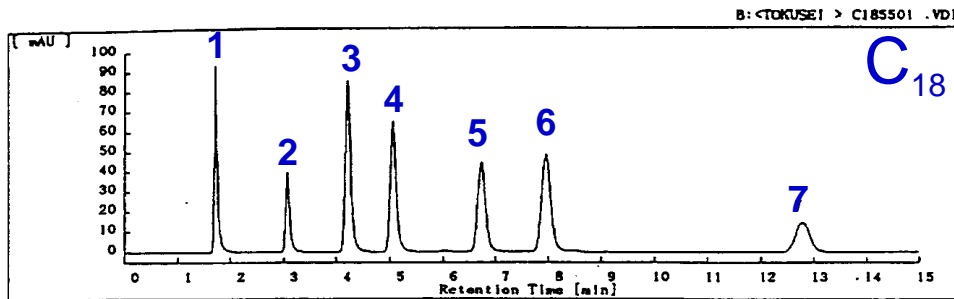
5. Phenol

6. Nitroaniline

		pka <sub>1</sub>	pka <sub>2</sub>
1	<chem>Nc1ccc(O)cc1</chem>	8.50	10.30
2	<chem>OC(=O)c1ccccc1</chem>	4.20	
3	<chem>OC(=O)c1cc(O)ccc1</chem>	2.98	12.38
4	<chem>Nc1ccccc1</chem>	4.60	
5	<chem>Oc1ccccc1</chem>	9.99	
6	<chem>Nc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>	1.01	

# 逆相分配クロマトグラフィー4

## - 固定相の種類の影響 (1) -



分析条件

移動相: 水 / MeOH=55/45

流量 : 1.0 mL/min

温度 : 40

試料 : 1 ウラシル

2 フェノール

3 フタル酸ジメチルエステル

4 ニトロベンゼン

5 安息香酸メチルエステル

6 ニトロアニリン

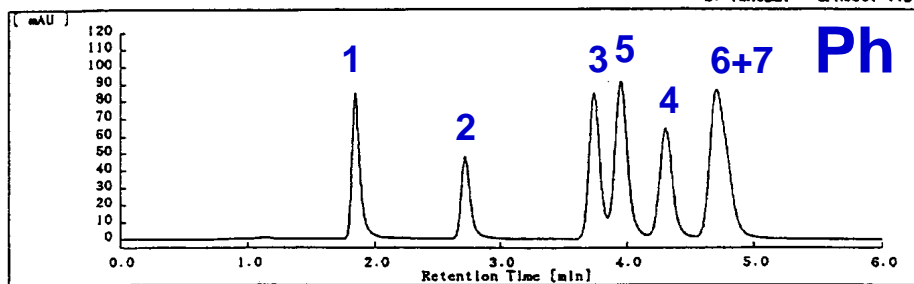
7 トルエン



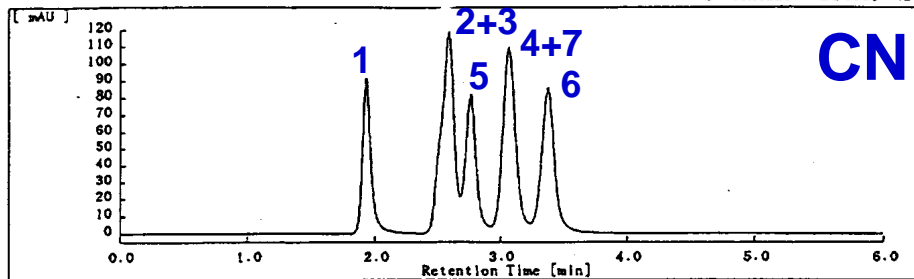
# 逆相分配クロマトグラフィー5

## - 固定相の種類の影響(2) -

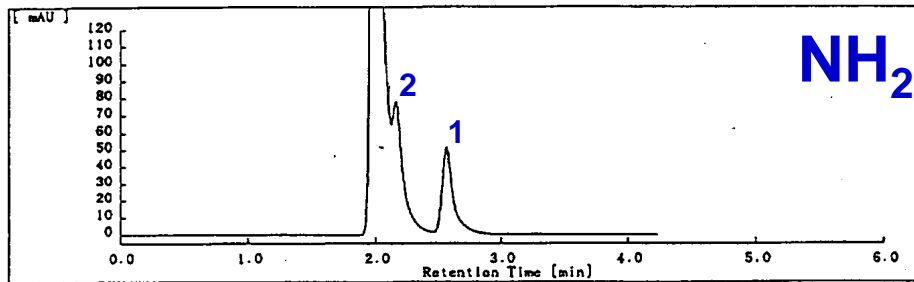
B:<TOKUSEI > CPH5501 .VDI



B:<TOKUSEI > CNP5501 .VDI



B:<TOKUSEI > CNH5504 .VDI



分析条件

移動相:水 / MeOH=55/45

流量 :1.0 mL/min

温度 :40

試料 :1 ウラシル

2 フェノール

3 フタル酸ジメチルエステル

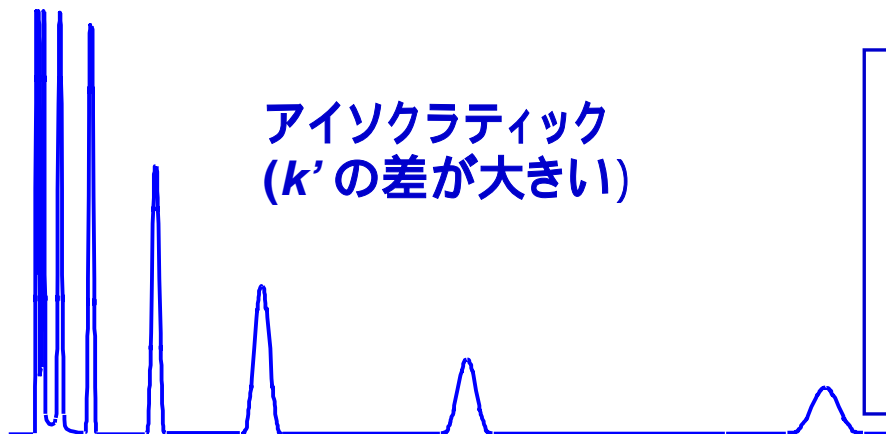
4 ニトロベンゼン

5 安息香酸メチルエステル

6 ニトロアニリン

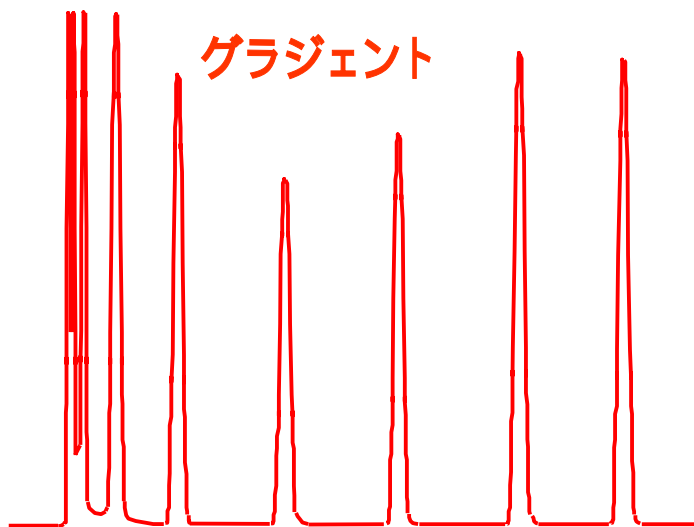
7 トルエン

# アイソクラティックとグラジエント



## \* 単一の移動相組成で分離

- ❖ 溶出の早い成分の分離が悪い
- ❖ 溶出の遅い成分のピーク幅が広く、ピーク高さも低い
- ❖ 分析時間が長い

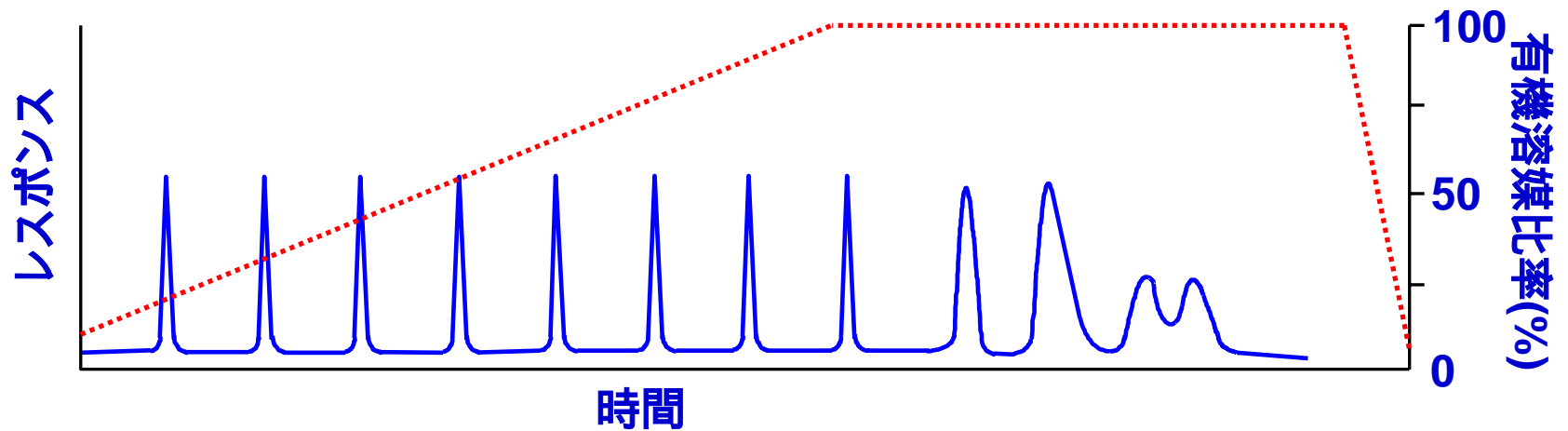


## \* 移動相組成を変化させながら分離

- ❖ 各成分の分離が向上
- ❖ 溶出の遅い成分もシャ - プなピークで溶出  
(全ピークのピーク幅が同じ)
- ❖ 分析時間が短い

・未知試料のチェック } にも有用  
・カラムの洗浄 }

# グラジエント分析での分離の調節



## 検討する項目

- ❖ 有機溶媒の種類
- ❖ 移動相の初期条件
- ❖ 移動相の変化率と変化曲線
- ❖ 流量
- ❖ カラムの再平衡化
- ❖  $2 < k' < 10$  にピークを溶出させる

# カラム内径のダウンサイズ

## \*メリット

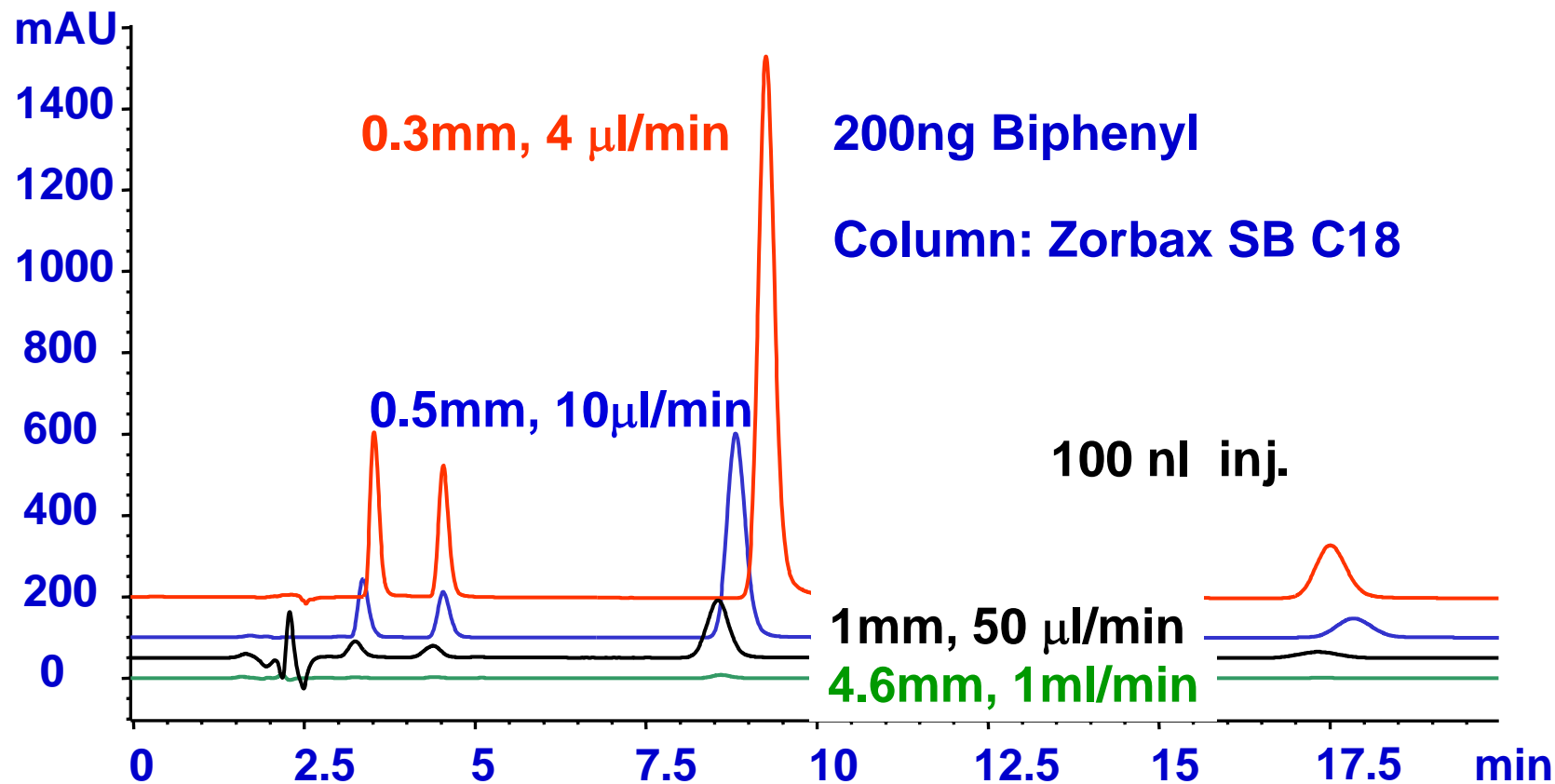
- ❖ 移動相の消費量が減少する
- ❖ 検出感度が向上する
- ❖ LC/MS との結合が容易

セミマイクロ / ミクロ / キャピラリ HPLC  
のメリットを最大限に生かすためには、  
最適化されたシステムが必要

# セミミクロHPLC、ミクロHPLC、 キャピラリHPLC

Application	Column I.D.	Flow rate $\mu\text{l}/\text{min}$
Conventional HPLC	4.0, 4.6 mm	1000
Semi-micro HPLC	2.1 mm	200
Micro LC	1mm	40
	800 $\mu\text{m}$	20
Capillary LC	300 $\mu\text{m}$	4
	180 $\mu\text{m}$	2
Nano LC	100 $\mu\text{m}$	0.3
	75 $\mu\text{m}$	0.18
	50 $\mu\text{m}$	0.08

# カラム内径のダウンサイズとピーク高さ



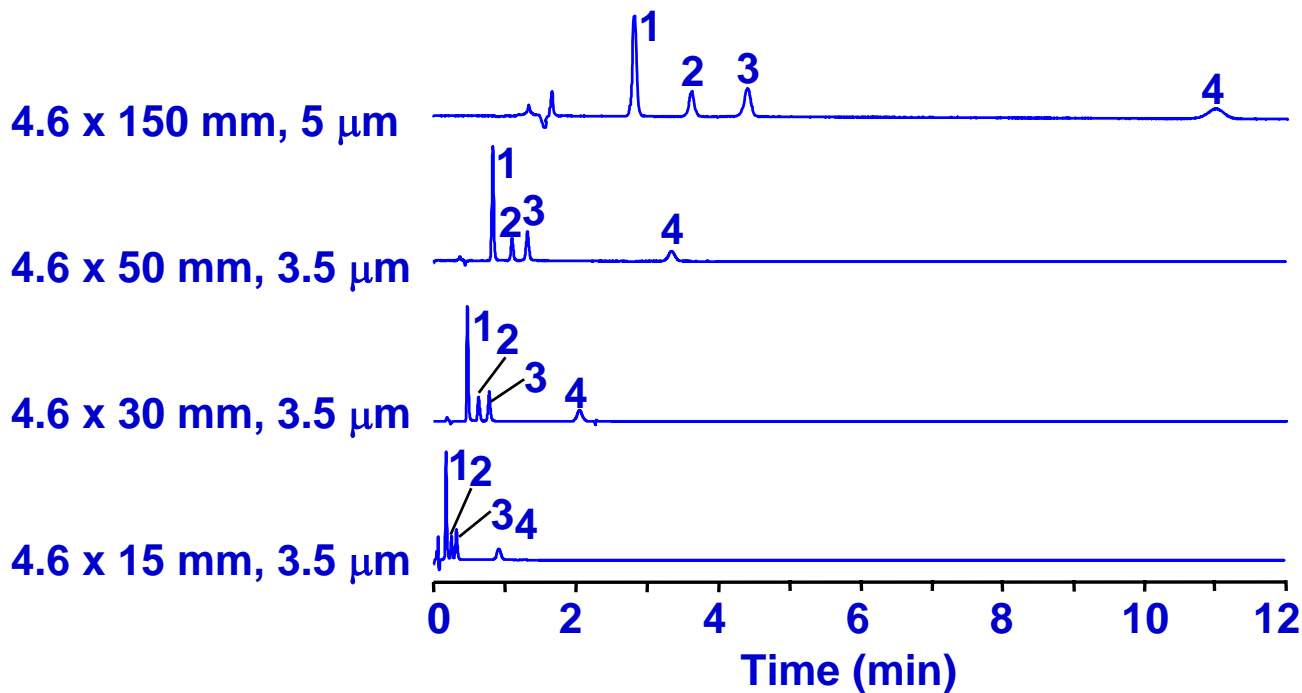
# ハイスループット1 - 高速分析 -

- ❖ 分析時間を最小限に抑える
- ❖ 大量のサンプルを効率よく分析する
- ❖ ベースライン分離を維持する
- ❖ LC/MSでは分離を犠牲にすることも可



微小粒径の充てん剤を充填したショートカラムを使用して、高速かつ高分解能のクロマトグラムを得る。

# ハイスループット2 - 高速分析 -



Column: StableBond SB-C18

Flow Rate: 1.0 mL/min

Sample: 1. Phenylalanine

3. Asp-phe

Mobile Phase: 0.1% TFA/ACN = 85/15

Temperature: 35 ° C

2. 5-Benzyl-3,6-dioxo-2-piperazine acetic acid

4. Aspartame