



メソッド開発 & トラブルシューティング

GC メソッド開発	250-253
GCトラブルシューティング	254-255
HPLC メソッド開発	256
HPLCトラブルシューティング	257-258

A spectacular fiery display created during the manufacture of SGE Diamond syringe barrels.

ガスクロマトグラフィーのメソッド開発を行うとき、3つの重要な考慮すべき事があります。

1. 装置
2. カラム選択
3. 迅速で高品質の分離のためのパラメーターの最適化

1. + 2. 装置とカラム選択のための考慮すべきポイント

試料注入

新しい試料を分析するために、最初に考慮すべき点は試料の揮発性です。下表に試料の揮発性について考慮すべき点を示します。

	揮発性試料	半揮発性試料	高沸点試料
沸点範囲	ガス体または揮発性試料	沸点50~300°C	沸点250°C以上
サンプル例	飲料水中揮発成分、医薬品残留溶媒	EPA半揮発成分、農薬成分、FAMES、香料	蒸留シミュレート、ワックス分析、トリグリセリド分析
システム条件	GCオープン冷却装置が必要	インレットライナーと注入モードの適切な組み合わせ	インレットライナーと注入モードの適切な組み合わせ
注入方法	水試料のダイレクト注入、溶媒を使用しない方法については下記その他の推奨方法をご参考下さい。	1) スプリット注入、カラム内径に従って条件を調整します。 2) スプリットレス注入は微量成分分析に適しています。高水準の正確さ要求される場合はパラメーターの設定は難しくなります。	オンカラム注入
ライナー	ConneCTiteライナー	フォーカスライナー（不活性石英ウール入）	テーバーフォーカスライナー
セプタム	耐熱温度200°C以上のセプタム	耐熱温度300°C以上のセプタム	耐熱温度400°Cのセプタム
その他の推奨方法	ヘッドスペースやバージ&トラップ装置は分析のオートメーション化が可能で内径の細いライナーが適しています。	感度を高めるための注入法として大量注入法があります。	PTV (rogrammable Temperature Vaporize)注入、スプリット注入、ダイレクト注入

メソッド開発 & トラブルシューティング

検出器の選択

装置の検出器は分析目的や対象成分にあわせて選択する必要があります。FIDとMS検出器は、普遍的な検出器として最も広く使われています。しかし、ECD、TCD、FPDのような特異的な選択性のある検出器やさらに高性能な他の検出器を検討することも重要です。

カラムサイズ

一般的なカラムサイズの選別例は以下の通りです。

1. 検出器の種類とサンプル濃度からカラム内径を決定
2. 分析すべき化合物数からカラム長さを決定
3. 試料の揮発性から膜厚の厚さを決定

分析可能な範囲でなるべく短く膜厚の薄いカラムを選択することで良い分析結果を得られる可能性が高くなります。

	大気圧検出器	MS検出器
カラム内径	0.18 mm ~ 0.53 mm	0.1 mm ~ 0.32 mm

試料中の化合物数	幅広い沸点範囲と化学的性質の少数の化合物	10~50の化合物数	50を超える化合物数
カラム内径	10 ~ 15 m	30 m	50 mまたは60 m(まれなケースで、100 mの長さまたは120 mが使われます。)

試料タイプ	揮発性化合物	一般的な揮発性化合物 (5~175°Cの範囲の 沸点)	広範囲の中沸点化合物	高沸点化合物
膜厚	化合物が十分に保持され分離 できる厚さの膜厚： 3~5 µm films, PLOT (Porous Layer Open Tubular)カラム	1~2 µm films	0.25 µm films	薄い膜厚 0.1 µm films

カラム固定相

カラムの固定相を選択する際には試料の組成を考慮する必要があります。試料中の化合物は無極性、中極性、もしくは強極性に大別できます。

化合物極性	無極性化合物	中極性化合物	強極性化合物(短鎖) (アルコール、アルデヒド、 エステル、ケトン、中沸点の芳香族化合物)
固定相極性	微極性	中極性	強極性
推奨カラム	BP1及びBPX5	BPX35, BPX50及びBP10	BP20, SolGel-WAX™, BPX70及びBPX90

内径0.25mmID、膜厚0.25µm、長さ30mのBPX5カラムは広範囲の試料に使うことができる一般的カラムです。このカラム一般的なGC分析の約80%の分析の遂行が可能です。SGEのGCカラムの固定相・極性についての詳細は76-80ページご参照下さい。

メソッド開発 &
トラブルシューティング

3. 迅速で高分離のためのパラメーター最適化

カラムサイズ

パラメーターの最初の設定はキャリアガスの選定とキャリアガス線速度の設定です。

	窒素	ヘリウム	水素
再生可能資源	Yes	No	Yes
最適線速度	10~15 cm/sec	30~35 cm/sec	40~45 cm/sec
最適線速度での分析時間	長い	中位	短い
制限事項	長い分析時間	高価	爆発の危険(リークなどで空気の水素濃度が4%以上になると爆発限界に達します。)
制限事項の小限化	-	-	1) 水素ガス発生装置の使用(流量調整器やガス漏れが発生しても自動でストップする機能を持つ装置) 2) 安全システム(例:もしオープン空気の水素濃度が2-3%レベルを超えた場合にGCオープン等を制御して、暖房やキャリアガスを止めるシステム等)
最適条件	少数化合物の混合物でのアイソサーマル分析	GC/MSの真空システムに適しています。また標準的なGCでの使用においてもいくつか利点があります。	内径が細かいカラムを使用する分析に適しています。

Van Deemterの式より最善の平均気体速度が決定することができます。

$$\text{HETP} = A + B/u + Cu$$

HETP = 理論段高さ

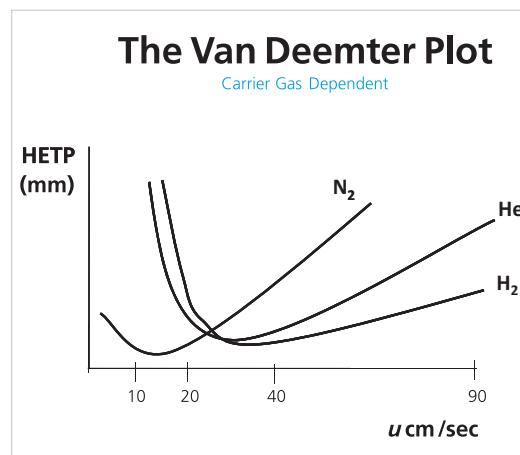
A = 多流路拡散

B = 分子拡散

C = 物質移動抵抗

u = キャリアガスの平均線速度

この式を使用することにより、Van Deemter Plots が計算することができます(右記のグラフを見て下さい)。



非保持成分の保持時間[デッドボリューム] (秒)

カラム長さ(m)	ヘリウム(24cm/sec)	水素(40cm/sec)
12	48	29
15	60	37
25	100	60
30	120	73
50	200	120
60	240	146
100	400	240

各カラム内径と平均線速度のための平均カラム流量 (mL/min)

カラム内径	線速度(cm/sec)									
	10	20	25	30	35	40	50	60	70	80
0.1	0.05	0.09	0.12	0.14	0.16	0.19	0.24	0.28	0.33	0.38
0.15	0.11	0.21	0.27	0.32	0.37	0.42	0.53	0.64	0.74	0.85
0.22	0.23	0.46	0.57	0.68	0.80	0.91	1.14	1.37	1.60	1.82
0.25	0.29	0.59	0.74	0.88	1.03	1.18	1.47	1.77	2.06	2.36
0.32	0.48	0.97	1.21	1.45	1.69	1.93	2.41	2.90	3.38	3.86
0.53	1.32	2.65	3.31	3.97	4.63	5.29	6.62	7.94	9.27	10.59

注意：上記の平均カラム流量は平均の線速度からの計算値で絶対測定値ではありません。

$$F (\text{mL/min}) = F (\text{cm/sec}) \cdot 60 \pi \left(\frac{d}{20} \right)^2$$

d = カラム内径(mm)

F(cm/sec)からF(mL/min)を求めることも可能です。

$$F (\text{cm/sec}) = \frac{F (\text{mL/min})}{60 \pi \left(\frac{d}{20} \right)^2}$$

オープン温度

	定温分析	昇温プログラム
試料タイプ	シンプルな混合物向け	最終溶出化合物の溶出に多くの時間を要してブロードピークの場合、もしくは低沸点化合物の中に分離の問題がある場合に適しています。
最適注入	スプリット注入	ダイレクト注入
温度設定	初期温度、主要な化合物の沸点 - もし完璧な分離ができていれば、温度を上げることができます。分離不足があれば、温度を下げて下さい。	温度プログラムは初めに溶出する化合物の分離を確保できる最低温度にして下さい。昇温速度を変えることで、溶出する化合物の分離度を変更できます。最終温度は、最後の化合物が溶出できる高い温度にして下さい。高沸点化合物の焼き出しのためカラムの上限温度より少し低い温度で保持して下さい。初期保持時間を延ばすことで、低沸点化合物の分離度は向上しますが、初期保持時間ははできる限り短くして下さい。
メリット	GCオープンの冷却サイクルが無く、試料の分析を連続して行なうことができます。もしカラムが高沸点化合物で汚染しなければカラム寿命を長くできます	上で示す温度パラメーターを調節することによって、分析を最大限に活用することができます。昇温速度を細かく設定(2ステップの温度プログラム昇温途中に一定温度での保持を含める)することで分離度をコントロールできます。ピーク分離が十分に得られる範囲で昇温速度を上げて分析時間を短くして下さい。

検出器温度及び注入口温度とスプリット比

パラメーター	条件
検出器温度	検出器の温度はオープン温度プログラムの最終温度より少し高い温度が同じ温度で設定します。
注入口温度	注入口の温度は温度プログラムの最終温度と同じくらいの温度で設定します。一般的に250°C付近での設定がほとんどの試料に適応します。試料の沸点より少し低い温度で設定すると分析が安定する場合があります。しかし、試料中に熱に不安定に化合物がある場合にはさらに注入口温度について考慮が必要となります。
スプリット比	スプリット比を低い値(5:1か10:1)に設定するとピークがブロードする可能性があります。低濃度の試料の場合にスプリット比を高い値で設定すると、カラムに入る試料量が減少し十分な感度が得られない場合があります。一般的カラム(長さ30m x 内径0.25mm x 膜厚0.25µm)では50:1~100:1の間が適切なスプリット比です。

メソッド開発 & トラブルシューティング

カラムパフォーマンス計算

保持係数

$$K = (t_R - t_m) / t_m = t'_R(N+n) / t_m$$

理論段数

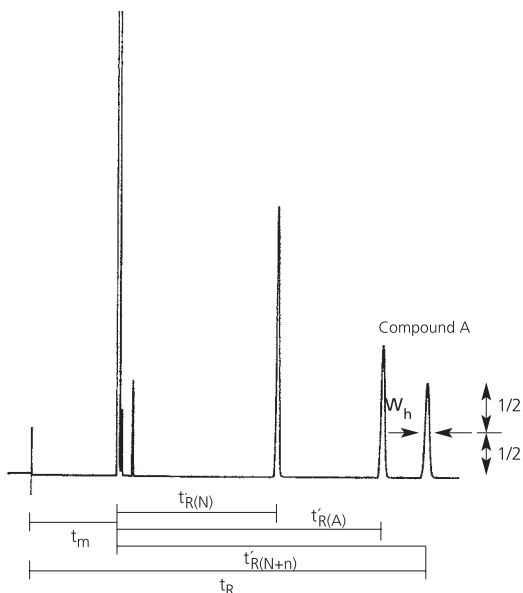
$$\text{理論段数}(N) = 5.54 (t_R / W_h)^2$$

$$\text{有効理論段数}(N_{\text{eff}}) = 5.54 ((t_R - t_m) / W_h)^2$$

Kovats 保持指標


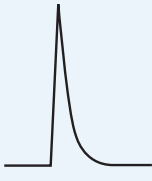
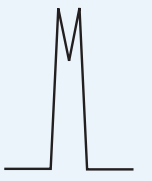
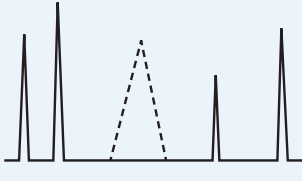
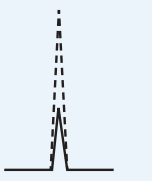
$$I_A = 100N + (100n (\log t'_R(A) - \log t'_R(N) / \log t'_R(N+n) - \log t'_R(N)))$$

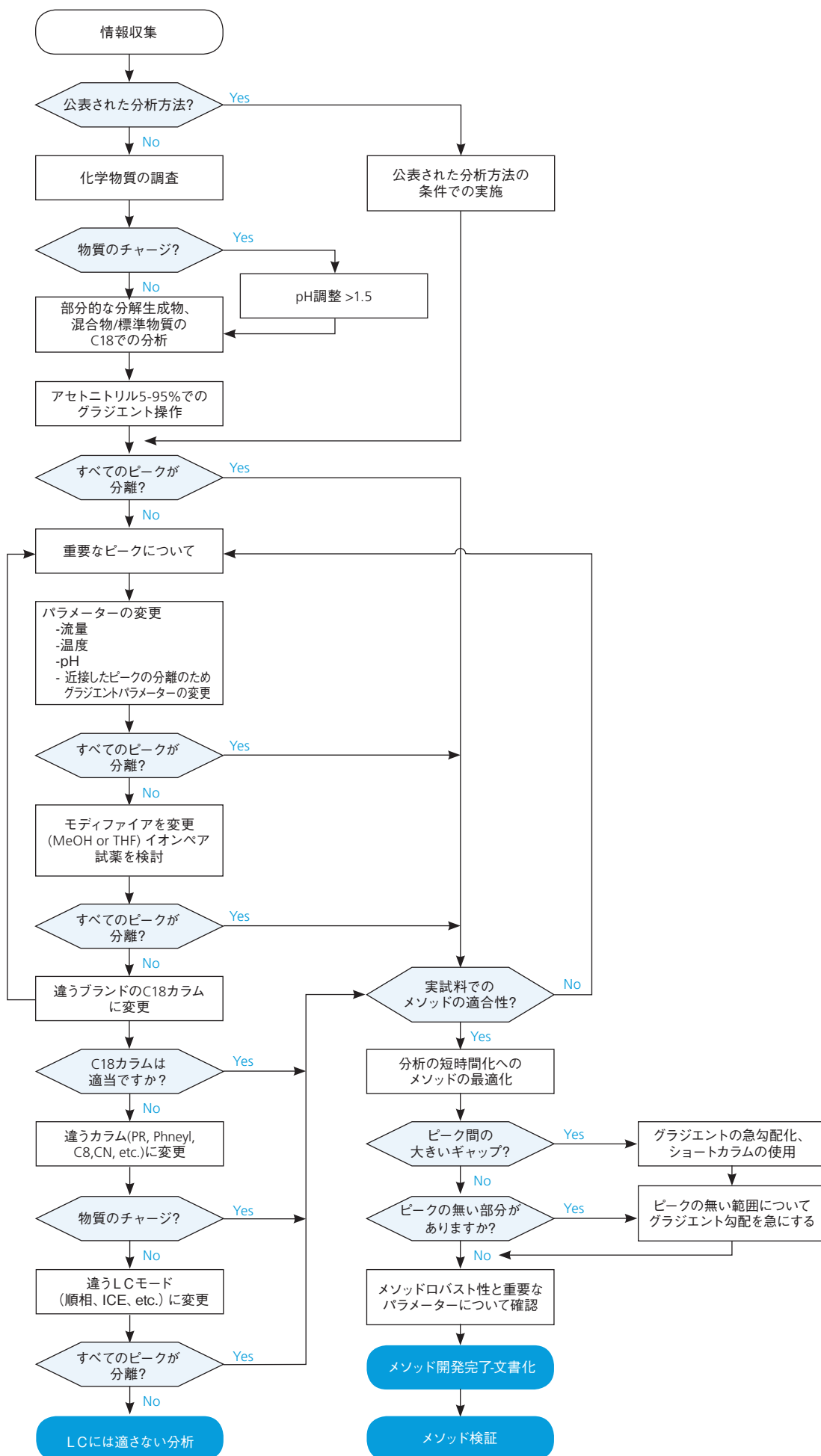
I_A は2つのn-アルカン(炭素数が1つもしくは2つ違う)の間で溶出している化合物Aのアルカンの保持時間から計算された保持指標値です。



現象	対策
カラム流量の問題	<p>キャリアガス流量を確認/調整して下さい。 注入口でのガス漏れを確認して下さい(セプタムの交換等)。 カラムの破損を確認して下さい(カラムの交換か、一部分の破損であれば破損箇所をカット)。</p>
高いカラムブリード	<p>カラムの使用最高温度を確認して下さい。 キャリアガスの流量/線速度、カラムの長さ/種類を確認して必要ならば調整して下さい。 カラムが検出器内で動いていないか確認して下さい。 グラファイト/ベスベルフェルールのリークを確認して下さい。 ガストラップ管(酸素フィルター)の寿命や漏れを確認して下さい。必要ならば交換して下さい。 検出器の温度が最終のオープン温度より高いことを確認して下さい。 検出器の汚れを確認して下さい。必要ならば洗浄して下さい。 カラムの再コンディショニングを行って下さい。 カラムの入口側の50cmをカットして下さい。</p>
リテンションタイムの変動	<p>温度プログラムを確認して下さい。 注入口の温度を確認して下さい。 マニュアル注入が一定していることを確認して下さい。 キャリアガス流量/線速度を確認して下さい。 注入口の漏れを確認して下さい。 使用している溶媒が同じかを確認して下さい。 カラムの汚染-カラムを洗浄するか交換して下さい。 カラムの入口側の50cmをカットして下さい。 カラム固定相の損傷-カラムを交換して下さい。</p>
ピーク分離度の不足や低下	<p>正しいカラム/固定相を使用しているかを確認して下さい。 異なる温度プログラムを使用していないかを確認して下さい。 溶媒と分析対象物のために適切な注入口温度に設定されているかを確認して下さい。 注入方法を確認して下さい。 キャリアガスの流量/線速度を確認して下さい。 試料の過負荷-スプリット比を高くして下さい。 カラムのコンタミネーション-カラムを洗浄するか交換して下さい。 カラム固定相の損傷-カラムを交換して下さい。</p>
カラム固定相の損傷	<p>キャリアガスの漏れを確認して下さい。 ガストラップ管(酸素フィルター)の寿命や漏れを確認して下さい。必要ならば交換して下さい。 使用最高温度以上の温度でのカラムの使用-カラムを交換して下さい。 カラムの汚染-カラムを交換して下さい(可能な限りクリーンアップされて試料で分析して下さい)。 試料からのダメージ-強酸性や塩基性の試料は注入しないで下さい。</p>
検出器感度の不足や低下	<p>分析対象物の濃縮のための注入方法を見直して下さい。 注入方法に適切したライナーが使われているか確認して下さい。 シリンジニードルが詰まってないか、プランジャーからの漏れはないかを確認して下さい。 スプリット注入の場合はスプリット比を確認して下さい。 注入口の温度が正しく設定されているか確認して下さい。 検出器の温度が正しく設定されているか確認して下さい。 検出器のメーカーアップガス流量を確認して下さい。</p>
検出器のトラブル	<p>PID - 検出器の汚れ-メーカーの仕様書に従って洗浄して下さい。 ELCD - リアクターチューブの不良 - アルコールでの汚染 - 正しくないアルコール流量 ECD - 窒素の不純物 - 検出器の汚れ-メーカーの仕様書に従って洗浄して下さい。 NPD - 悪いピーズ FID - ジェットのつまり FPD - 正しくないガス流速 - フィルターの設置ミス TCD - 流量のバランスをとって下さい。</p>

ピーク形状の問題

現象	原因	対策
ピークのリーディング 	カラムのオーバーロード	試料注入量・濃度を少なくする。 スプリット比を高くする。
	分析対象物に適さない間違ったカラム(固定相)の使用	適したカラム(固定相)を使用して下さい。 (80-81ページをご参照下さい。)
ピークのテーリング 	カラムの劣化	カラムの先端50cmをカットして下さい。必要であればカラムを交換して下さい。
	注入口ライナーの活性化	新品のライナーに交換して下さい。(SGEの不活性処理済ライナーについては157ページをご参照下さい。)
	分析に適さない間違ったカラムの使用	適したカラムを使用して下さい。 (80-81ページをご参照下さい。)
	カラム接続に問題	カラムの入口/出口側を確認して下さい。
ピークの割れ 	注入方法に問題	注入スピードを早くして下さい。
	混合溶媒の使用	単一の溶媒に変更して下さい。
	ピーク分離不足	違うカラムに交換して下さい。温度プログラムを変更して下さい。
ゴーストピーク 	何も注入せずに分析を行って下さい。もしゴーストピークが消えれば問題は多分シリンジあるいは洗浄溶媒です。もし、ゴーストピークがまだ存在しているならば、問題はセプタムかカラムもしくは注入口の汚染です。	
	シリンジもしくは溶媒のコンタミ	シリンジの洗浄か溶媒を交換して下さい。
	セプタムブリード	セプタムを交換して下さい。(セプタムについては167-180ページをご参照下さい。)
	カラム固定相の損傷	カラムの交換か違う固定相を選択して下さい。
	クロマトグラムの一部のピークがブロードして出現	全てのピークが溶出するまで分析時間を長くして下さい。
ピーク感度の低下 	カラムの損傷	カラムの先端50cmをカットして下さい。必要であればカラムを交換して下さい。
	注入口ライナーの活性化	新品のライナーに交換して下さい。(SGEの不活性処理済ライナーについては157ページをご参照下さい。)
	試料量の計算ミス	計算を確認して下さい。
	FIDのガス流量の変動	流量を確認し再調整して下さい。



現象	原因	解決策
システム関係		
圧が低い/圧が不安定	漏れ	全ての接続で漏れ有無をチェックして、増し締めかシールを交換して下さい。
	ポンプの気泡混入	移動相の脱気及びシステムバージを行って下さい。
	ポンプの逆止弁の汚れ(バルブが閉じることができないかどうか調べて下さい。)	初めに汚れを除去するために高流量でのバージを試して下さい。次に逆止弁を分解して、超音波洗浄等の洗浄を行って下さい。
圧が高い	配管の詰まり(汚れ)	検出器側から配管を外し流路中の詰まりを確認して下さい。キャピラリーラインの洗い流し、インラインフィルターやガードカラムの交換、注入バルブの洗浄、検出器を外してからの流路逆流を行って下さい。
	詰まり(移動相中のバッファーからの塩の析出)	システムや移動相組成の変更を起こることがあります。再びバッファー塩を溶かすために、カラムを外してから純水を用いて低流量で流路を洗浄して下さい。
	移動相粘度が高い	温度を上げる、移動相を変える、流量を減して下さい。
	充填剤粒径が小さい	温度を上げる、流量を減らす、短いカラムを使う
	充填剤粒子の破損(急激な圧力は充填剤の変形を生じます。)	カラムの交換(208-210ページのProteCol HPLCをご参照下さい)。
ベースラインの変動、傾き、ノイズ	システムコンタミネーション	カラムを外して、酸性混合液(10%硝酸溶液もしくは15%リン酸溶液)を短時間、75%アセニト/25% IPA溶液で一晩が流してシステム内を洗浄して下さい。(カラムには酸性溶液を通さないで下さい。)
	UVランプの劣化	UVランプを交換して下さい。
	温度変動	カラムオープンを使用して下さい。
	グラジエントによるベースラインの変動	グラジエント溶液を確認して高純度溶媒の使用と長波長の検出器を使用して下さい。
ベースラインの規則的な脈動	ポンプの気泡混入(背圧の脈動を引き起こします。)	移動相の脱気及びシステムバージを行って下さい。
	逆止弁の汚れ(背圧の脈動を引き起こします。)	初めに汚れを除去するために高流量でのバージを試して下さい。次に逆止弁を分解して、超音波洗浄等の洗浄を行って下さい。
	検出器セル中の気泡	移動相の脱気及びシステムバージを行って下さい。
クロマトグラム		
ピークのテーリング	間違ったpH(いくつかのピークがテーリング)	測定する化合物のpKa \pm 1.5の範囲内のpHでは、保持時間の変動やピーク形状の変化が起こりやすくなります。pHを調整して下さい。
	カラム容量が大きい(全てのピークがテーリング)	すべての接続を確認して、ガードカラムや分析カラムを換えてください
	非特異性相互作用(全てもしくは一部の化合物が流路、残存シラノール基、チューブとフリットの金属表面などの活性部位で相互作用します。)	不活性なカラムに交換、金属の管類を不活発なPEEKsil チューブ(238-239ページ)と交換して下さい。移動相に緩衝液(EDTA等)を加えて、シラノール基が解離しないためにpH < 2.5にして下さい
ピークのテーリング/フローティング	チャネリング(異常流路)の発生	チャネリングはカラムの性能の深刻な低下を引き起こします。カラムの交換が必要です。解決策のひとつとしてカラムをリバーパスする方法があります。
	Viscous Finger(粘性突起)-試料と移動相の粘性に大きな相違がある時起こります。	移動相と試料の粘性をできる限り近づけて下さい。試料の希釈剤として移動相を使ってください。
	固定相の劣化	カラムが極端なpHで使用されたときや非常に古いカラムを使用したときに起こります。カラムを交換して下さい。
	カラムへの試料のオーバーロード	試料量を減らして下さい。

メソッド開発 & トラブルシューティング

現象	原因	解決策
対称的なピークブロード	カラムへのオーバーロード/注入試料量が多過ぎる。	注入試料量を減らすかあるいはより大きな内径のカラムを使ってください。
	カラム効率が悪い	条件(流量、温度)の最適化を行なって下さい、必要であればより小さい充填剤粒子のカラムを使ってください。
	前の試料の溶出の遅いピークの出現	ダブルインジェクションを使って下さい。遅く溶出成分は2番目の分析で現われます。分析時間を長く、強い抽出洗浄溶媒および強いグラジエントを使ってください。
ゴーストピーク	注入部の汚れ	注入部およびシステムをブランクが無くなるまで洗浄して下さい。
	溶媒の汚れ	HPLCグレードの溶媒で新しい移動相を作成して下さい。
	気泡の混入	気泡混入が原因でシャープなスパイクが出現します。溶媒の脱気を行って下さい。
	電氣的ノイズ	電源を確認して下さい。独立した電源を使ってください。
保持時間の変動	温度の変動	カラムオープンを使用するか、温調設備がある実験室で分析を行って下さい。
	移動相の不混和	移動相(グラジエント溶媒)の混和を確認して下さい。ポンプやミキサーの動作の確認を行って下さい。
	溶媒蒸発	溶媒ボトルの蓋などを確認して下さい。
	カラムのコンタミネーション	非溶出成分の蓄積はカラムの選択性や性能を変えてしまう場合があります。定期的な間隔でカラムの洗浄やカラムの交換して下さい。
低感度	検出器の設定	検出器を確認して下さい。必要であれば他種類の検出器(UV、フォトダイオードアレイ、示差屈折率、蛍光、電気化学検出器)に変えて下さい。
	ブロードなピーク	条件(流量、温度)の最適化を行なって下さい、必要であればより小さい充填剤粒子のカラムや強い溶出溶媒、グラジエント溶媒を使ってください。
	非特異的吸着や反応による試料のロス	不活性なHPLCシステム：不活性なHPLCカラムを使ってください。非特異的吸着や反応を防いで下さい。