

分離とクロマトグラムの基礎

2017年5月26日

第350回 ガスクロマトグラフィー研究講演会

Restek 内海 貝

 **RESTEK**

Pure Chromatography

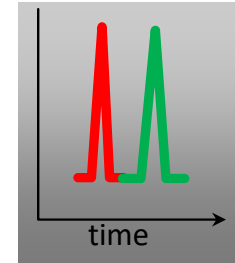
www.restek.com

本日の内容

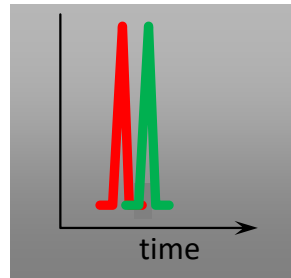
- 分離に影響を与える要因
 - カラム外の要因
 - カラムに関わる要因
- トラブルシューティング

クロマトグラフィーによる分離

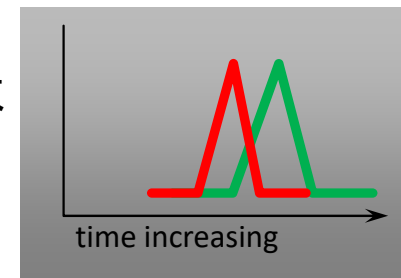
- カラムでは、分析種に対する保持の差によって分離がおこなわれます



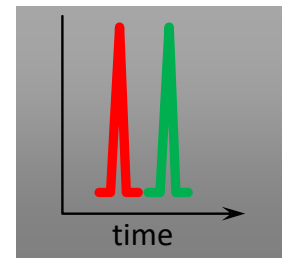
- ただし、保持時間が增大すると共にピーク幅は広くなります



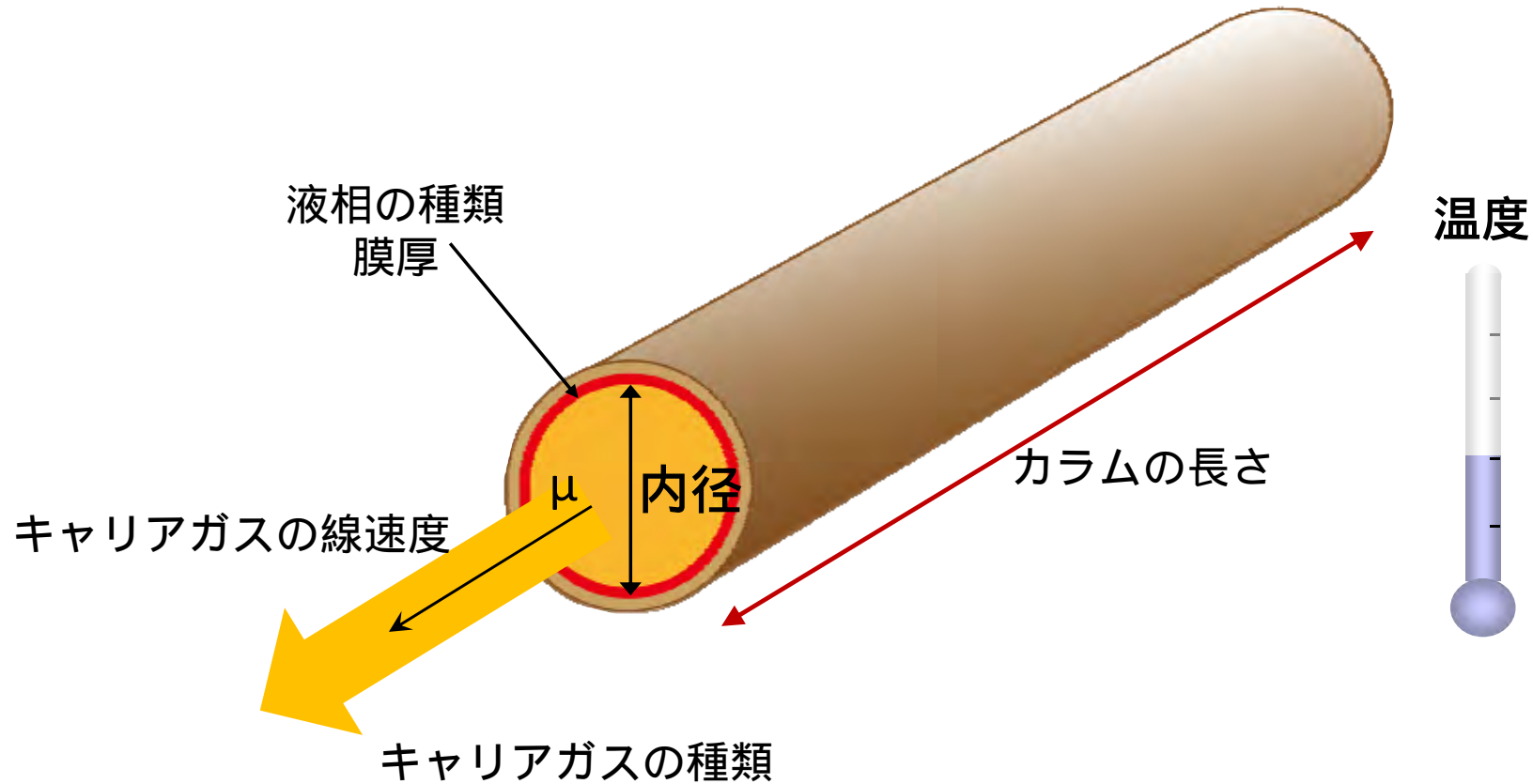
保持時間の増大



- 従って、ピークが重なることなく、ピークが分離するのに十分な程度に保持することが必要となります



分離に影響を与える要因



カラム外の要因

- 温度
- キャリアガスの種類
- キャリアガスの線速度



温度

- 分析種がカラムの液相にいる時間が長いほど、保持の差は出やすい
- つまり、より高い温度にすると
 - = 液相にいる時間が短くなり
 - = 保持の差が出にくくなる（選択性が悪くなる）

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o} = \frac{t_r'}{t_o}$$

キャリアガスの種類と線速度

van Deemter Equation

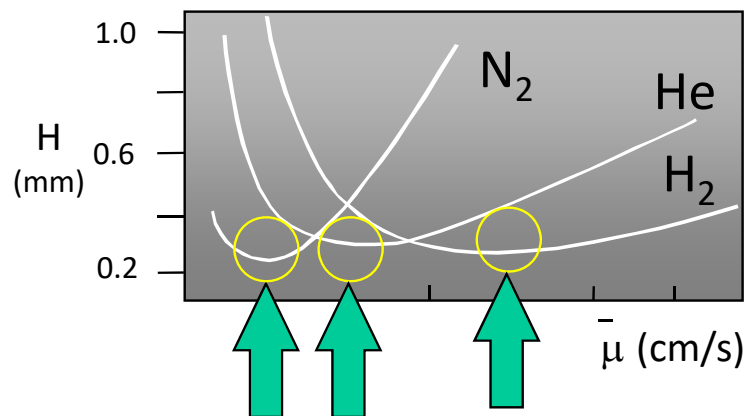
$$H = A + B + \frac{C\mu}{\mu}$$

H = height equivalent theoretical plate (HETP)

A = Eddy diffusion term

B = Molecular diffusion in column axis division
(contributes to band broadening)

C = Resistance to mass transfer
(contributes to band broadening)

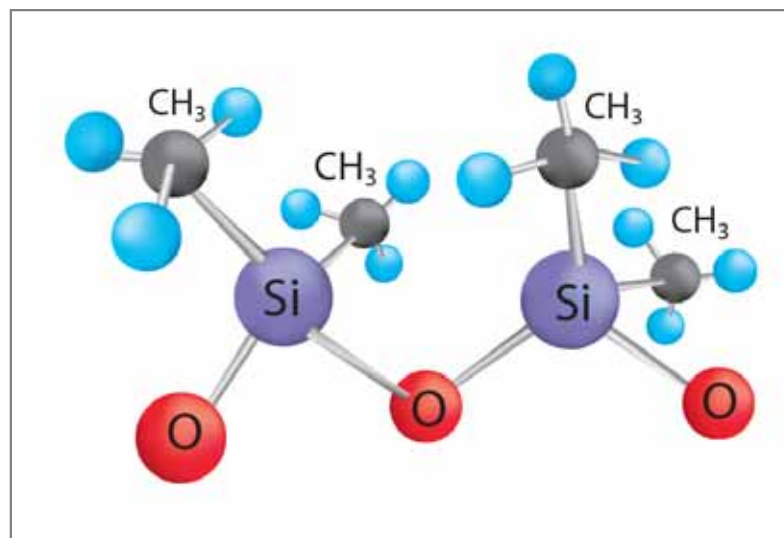


$\bar{\mu}_{\text{optimum}} = 40 \text{ cm/s H}_2$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{H}} \times \frac{k}{k+1} \times \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

カラムに関する要因

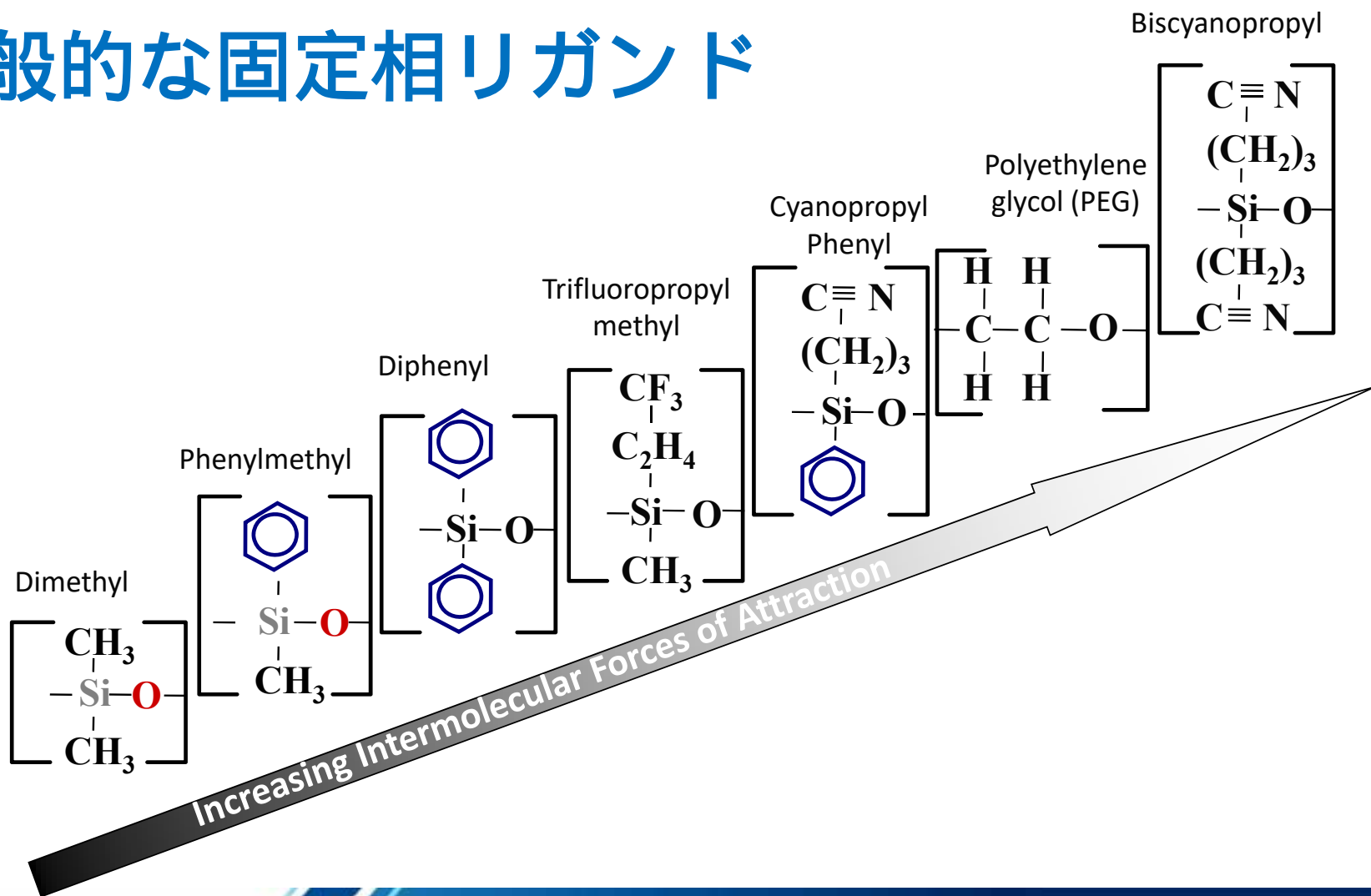
- 液相の種類
- 膜厚
- カラム内径
- カラム長さ



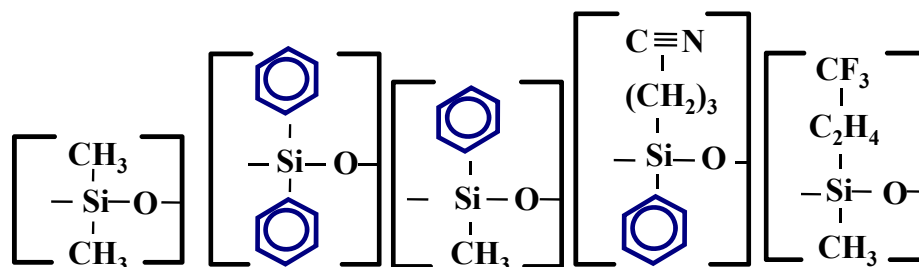
分離に与える影響

パラメータ :	影響 :
☆液相の種類	溶解度、負荷容量、効率、分離度(R)、保持時間(t_R)、分析温度、ブリード
☆膜厚	負荷容量、効率、R、 t_R 、ブリード
☆内径	負荷容量、効率、 t_R
☆長さ	効率、R、 t_R 、コスト

一般的な固定相リガンド



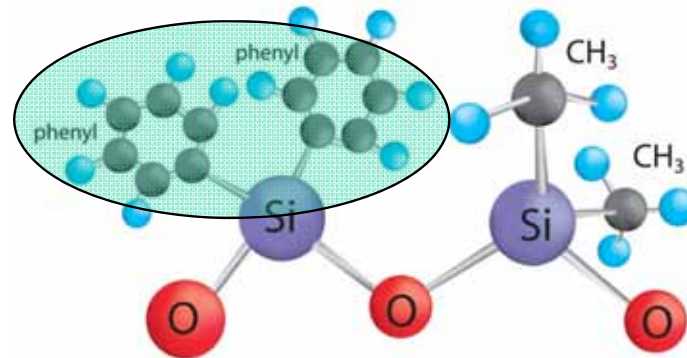
一般的な液相



Rxi-1ms/Rtx®-1	100%	
Rxi-5ms/Rtx®-5	95%	5%
Rtx®-20	80%	20%
Rtx®-35 / Rtx®-35MS	65%	35%
Rtx®-17	50%	50%
Rtx®-50		100%
Rtx®-65	35%	65%
Rtx®-200		100%
Rtx®-624 or 1301	94%	6%
Rtx®-1701	86%	14%

液相による影響

- 官能基の種類と組み合わせ
- 官能基の割合 (%)
(Rtx[®]-5 vs. Rtx[®]-35)
- “Likes dissolve likes(似たもの同士はよく溶ける)”



カラムの膜厚による効果

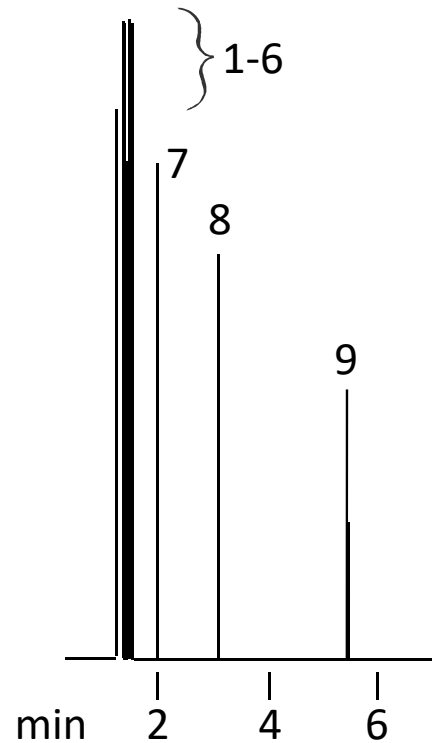
- 膜厚が厚いほど保持時間は増加
- 効率、つまり分離度は膜厚が厚いほど減少する
 - 厚い膜厚は沸点の低いものに有効
 - 薄い膜厚は沸点の高いものに有効
- 膜厚が厚いほど負荷容量は増加
- 膜厚が厚いほどブリードは高くなる

膜厚の影響

0.25 μ m Rtx[®]-1

30m, 0.32mm ID, 0.25 μ m

McReynolds probes



1. 1-butanol
2. benzene
3. 2-pentanone
4. C₇
5. 1-nitropropane
6. pyridine
7. C₈
8. C₉
9. C₁₀ 5.5 min

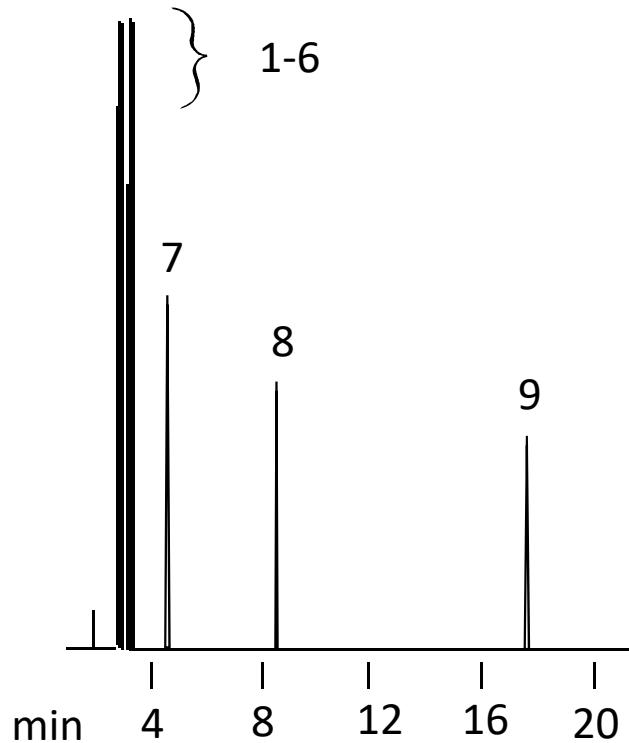
70°C isothermal

膜厚の影響

1.0 μ m Rtx[®]-1

30m, 0.32mm ID, 1.0 μ m

McReynolds probes



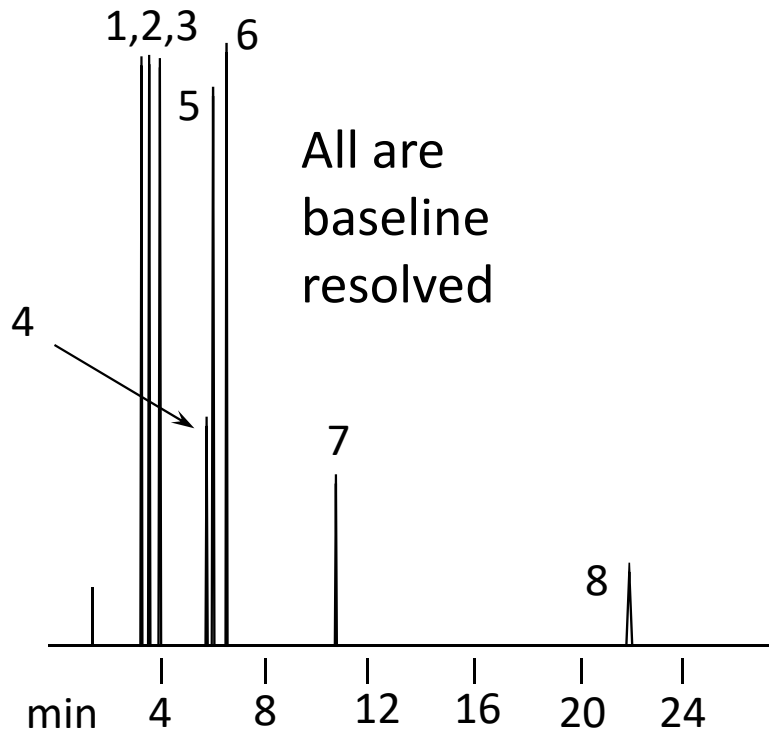
1. 1-butanol
2. benzene
3. 2-pentanone
4. C₇
5. 1-nitropropane
6. pyridine
7. C₈
8. C₉
9. C₁₀ 18 min.

70°C isothermal

膜厚の影響

3.0 μ m Rtx[®]-1

30m, 0.32mm ID, 3.0 μ m



McReynolds probes

1. 1-butanol
2. benzene
3. 2-pentanone
4. C₇
5. 1-nitropropane
6. pyridine
7. C₈
8. C₉
9. C₁₀ 68 min.

70°C isothermal

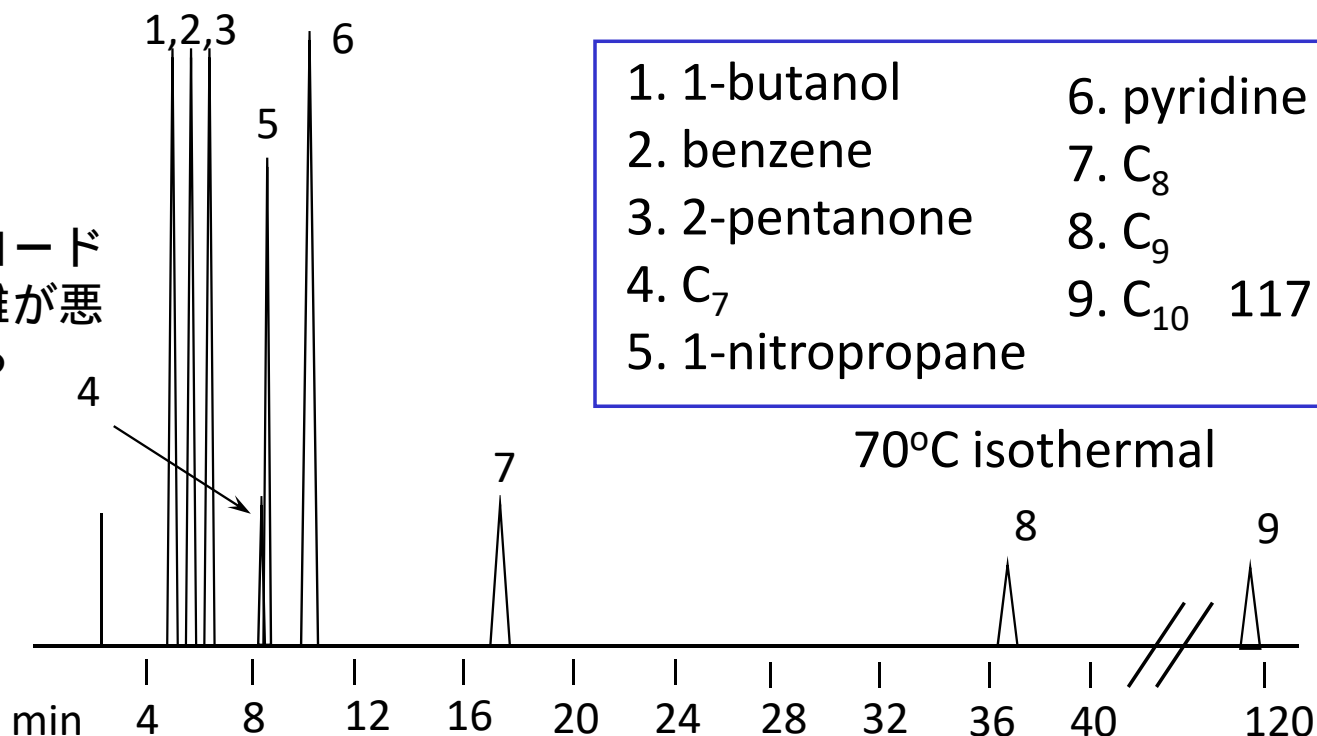
膜厚の影響

5.0 μ m Rtx[®]-1

30m, 0.32mm ID, 5.0 μ m

McReynolds probes

ピークがブロード
になり、分離が悪
くなっている

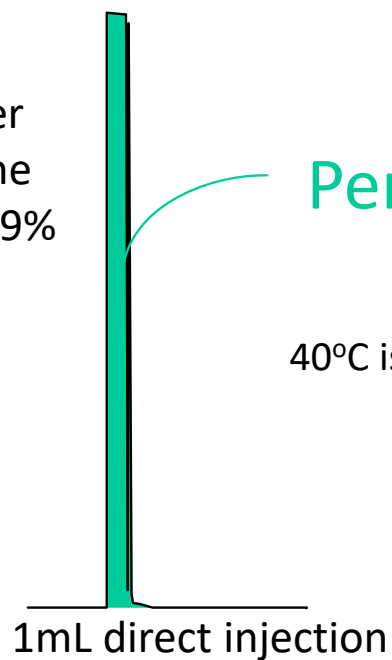


膜厚と低質量数の化合物 ☆溶媒の純度測定☆

Rtx[®]-1: 30m, 0.53mm ID, **0.25mm**

Rtx[®]-1: 30m, 0.53mm ID, **5.0mm**

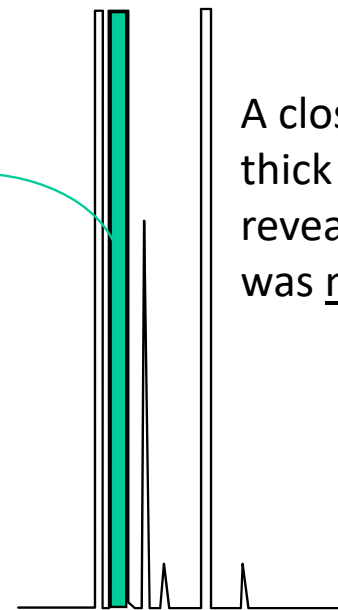
The supplier reported the purity as 99% using this column.



Pentane

40°C isothermal

A closer look on a thick film column revealed that it was not.

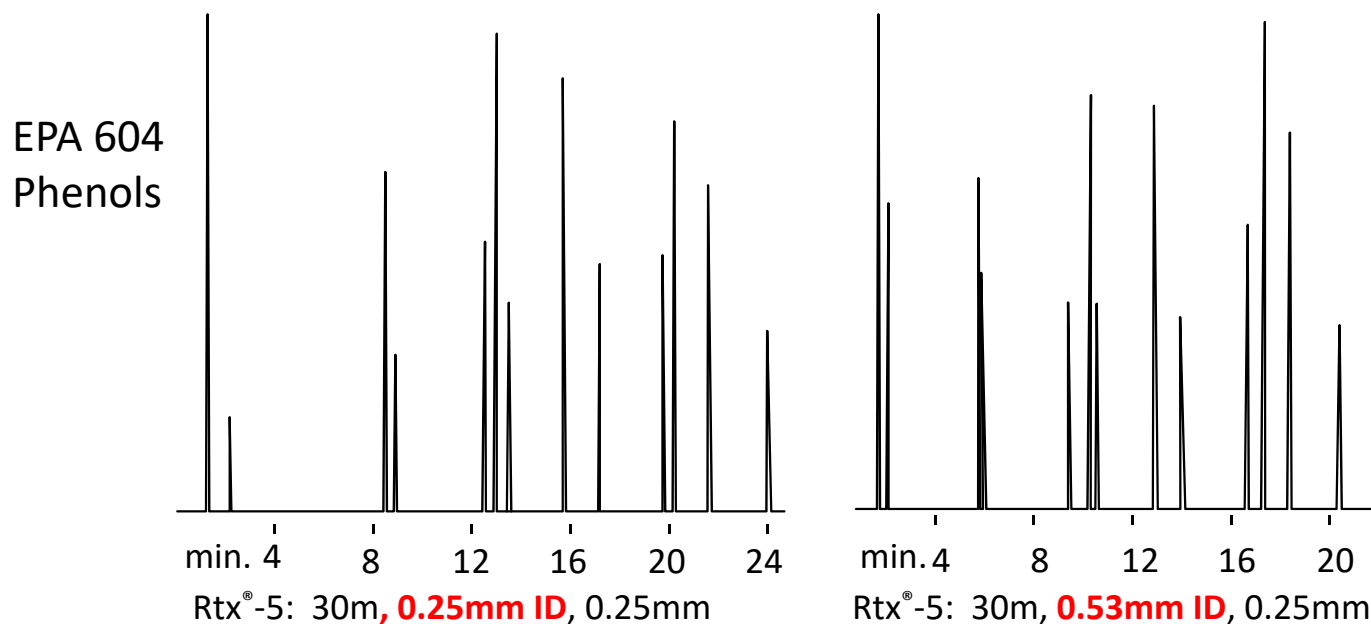


カラムの内径

0.10mm ID 0.18mm ID 0.25mm ID	<p>最も良い分離度；負荷容量は小さい</p> <p>複雑なサンプル、スプリット注入、GC/MS 0.1mm ID - fast GC</p>
0.28mm ID 0.32mm ID	<p>より良い分離度；負荷容量は中程度</p> <p>複雑なサンプル、濃度範囲が広い、スプリットレス、スプリットもしくはダイレクト注入</p>
0.45mm ID 0.53mm ID	<p>良い分離度；負荷容量は大きい</p> <p>純度分析、ダイレクト注入、パージ&トラップ、ヘッドスペース、大容量注入、オンカラム注入、パッキドカラムからの切り替え</p>

カラムの内径 分離度と保持時間に与える影響

膜厚が同じ場合、内径が大きいものは膜厚が薄い場合のように作用します
(ただし、内径が小さい場合に比べると負荷容量は大きくなります)



トラブルシューティング

☆クロマトグラムに見られる異常☆

- ピークの分離
- ブリード
- ゴーストピーク
- 再現性
- ベースラインが不安定
- テーリングピーク
- フロンティングピーク
- スプリットピーク

ピーク分離

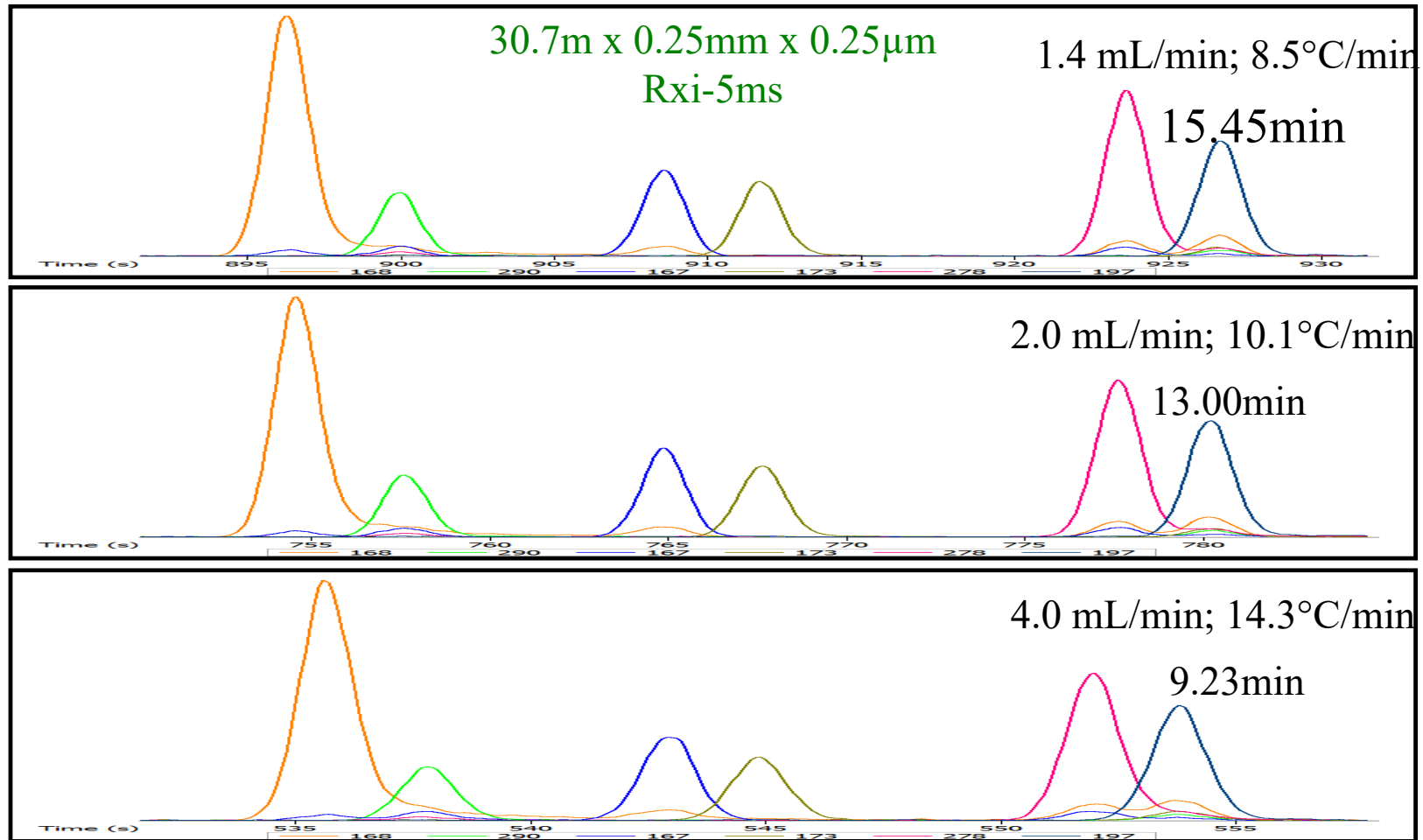
原因

- 選択性のない液相
- カラム効率
- 分析条件が最適化されていない

対策

- 適切な液相およびカラムサイズを選択する
- 最適な線速度を設定する
- オープンプログラムの最適化

昇温速度の最適化



ブリード

原因

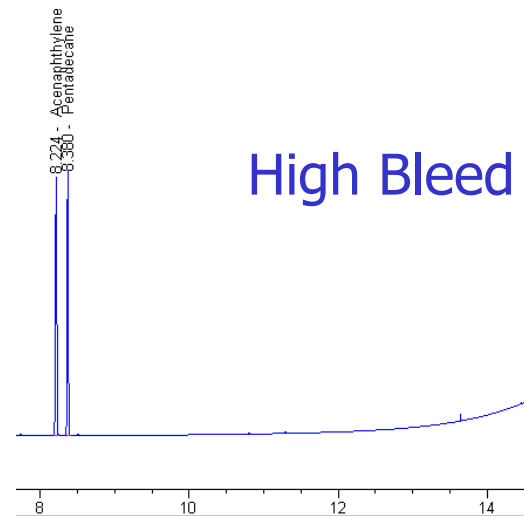
- 不適切なコンディショニング
- 液相やコーティングの質が悪い
- 汚染
- 酸化

対策

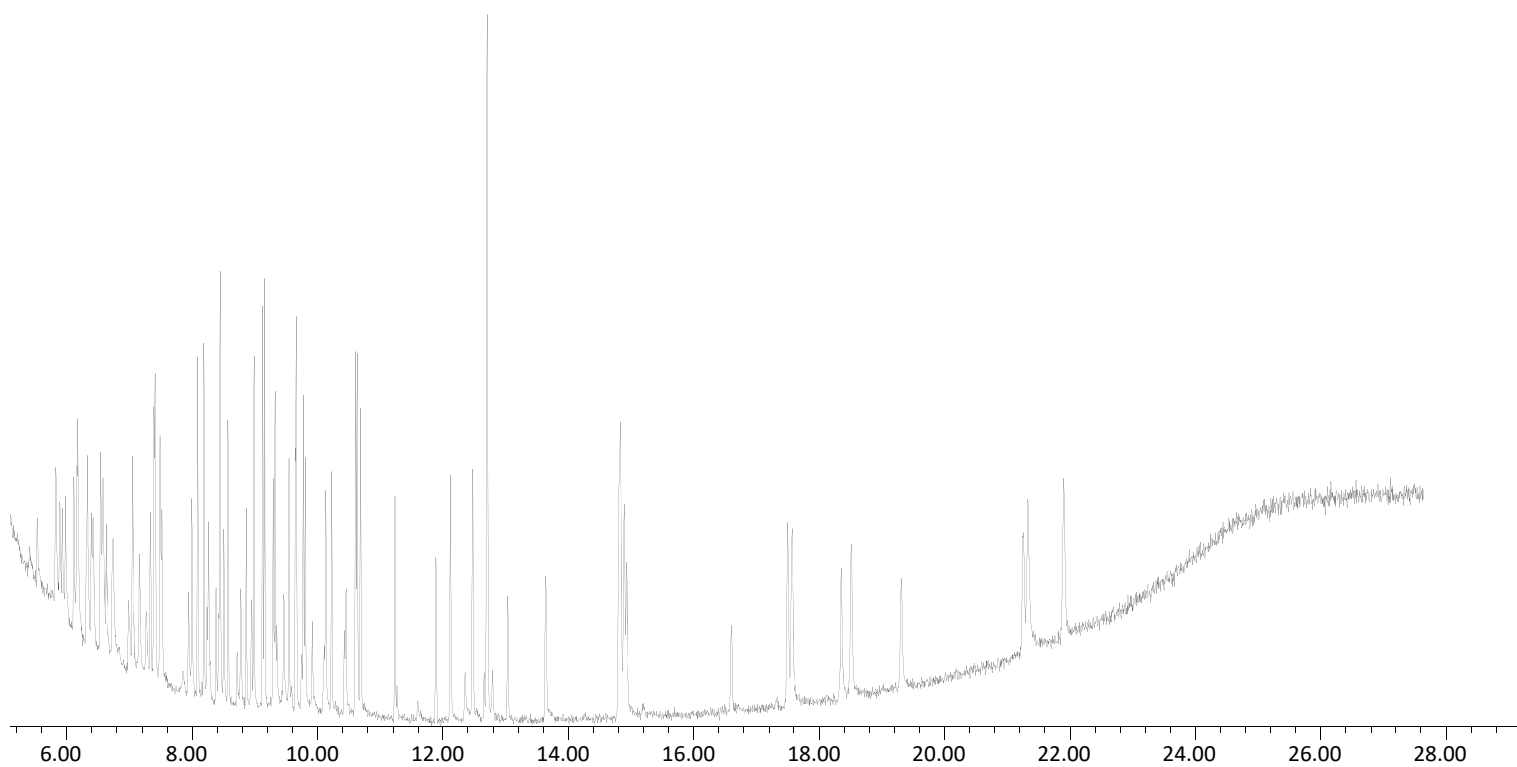
- リークの確認
- 再度コンディショニングをおこなう / より高温でコンディショニングをおこなう
- カラムカット
- カラム洗浄
- キャリアガスラインのトラップの交換
- キャリアガスを交換
- カラムを交換

適切なコンディショニング

- 最高使用温度を確認する
- キャリアガスが流れていること、およびリークがないことを確認する
- コンディショニング中は検出器側は接続しない
- アプリケーションに適したコンディショニングをおこなう

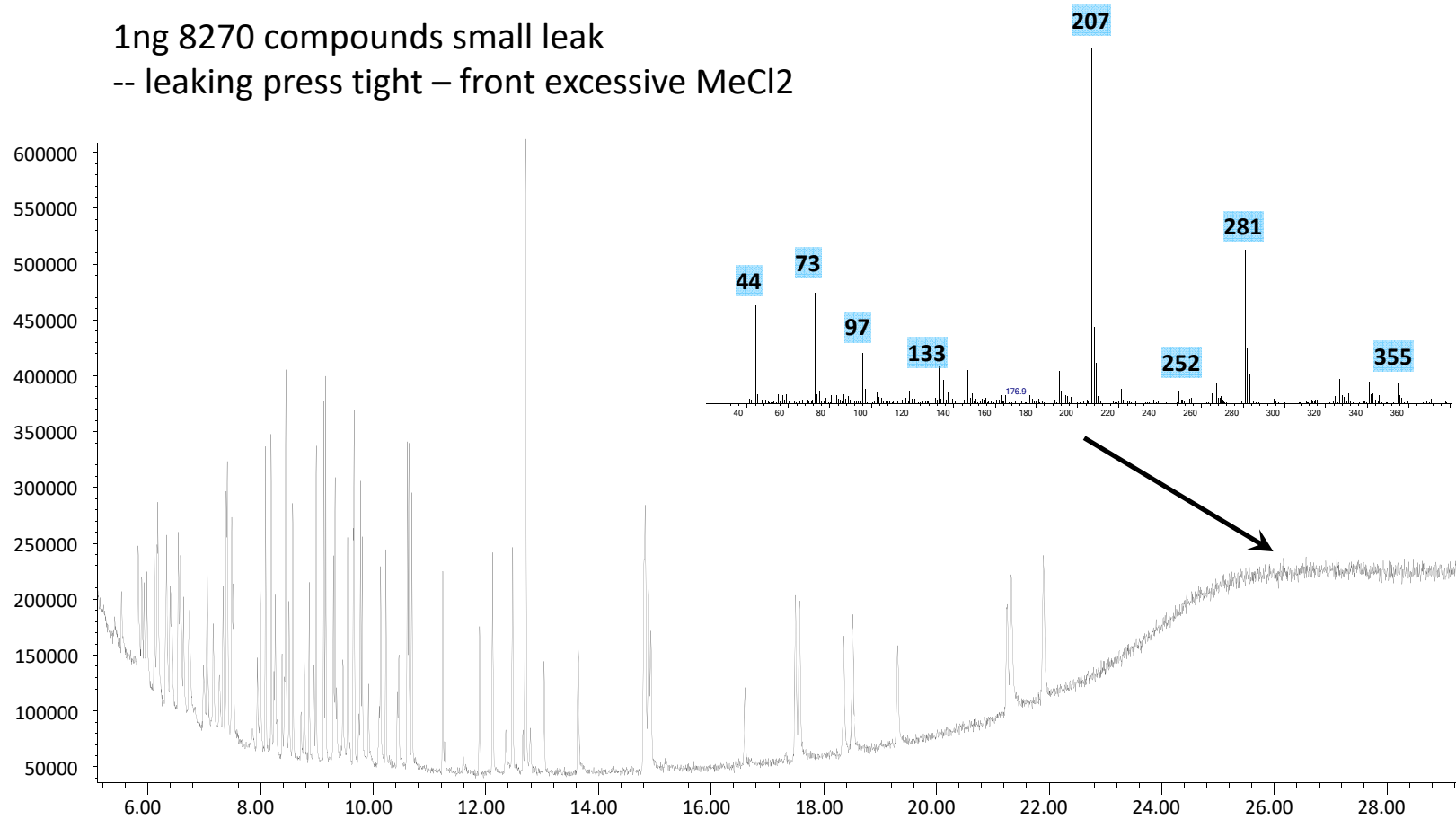


High Bleed

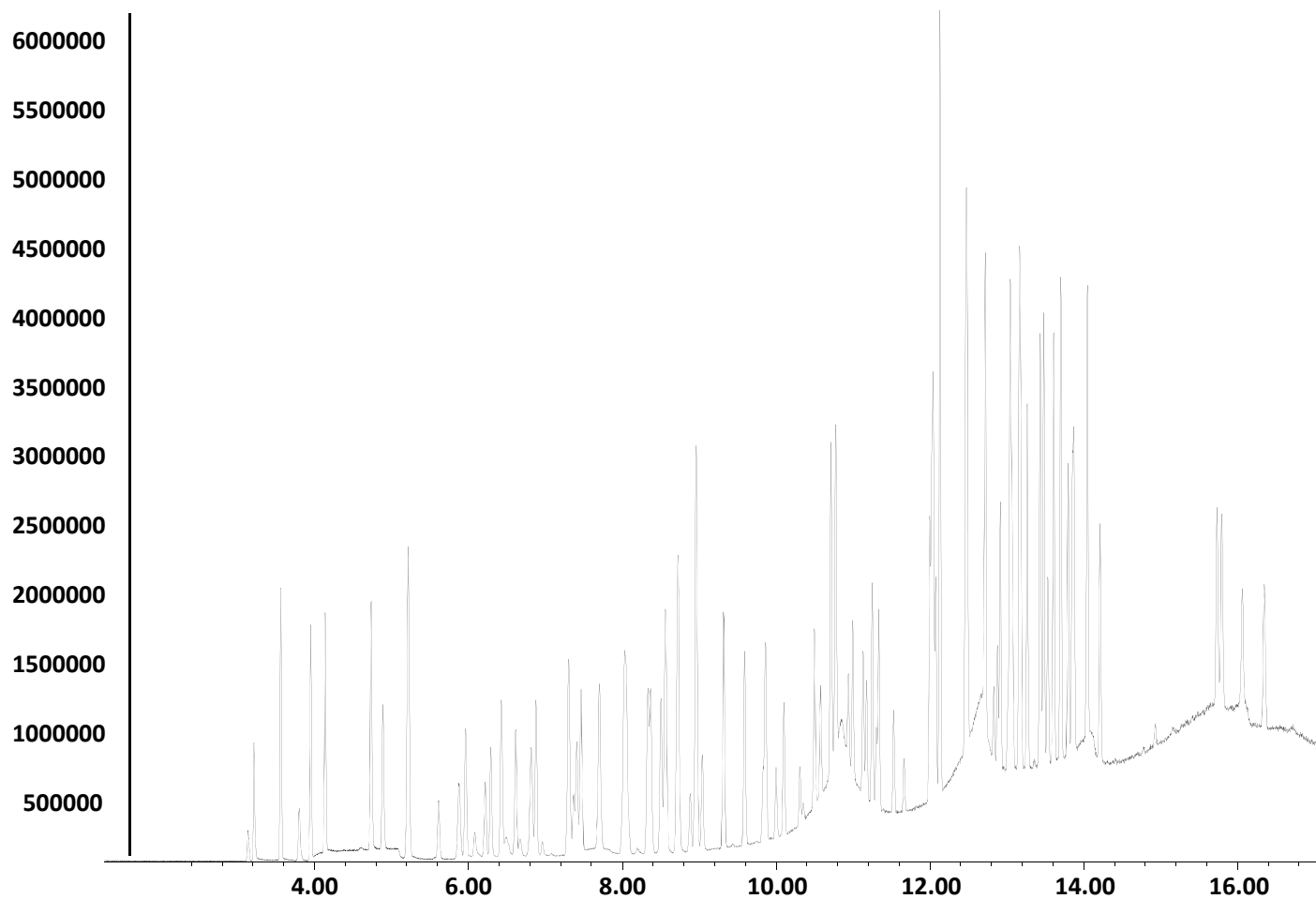


High Bleed

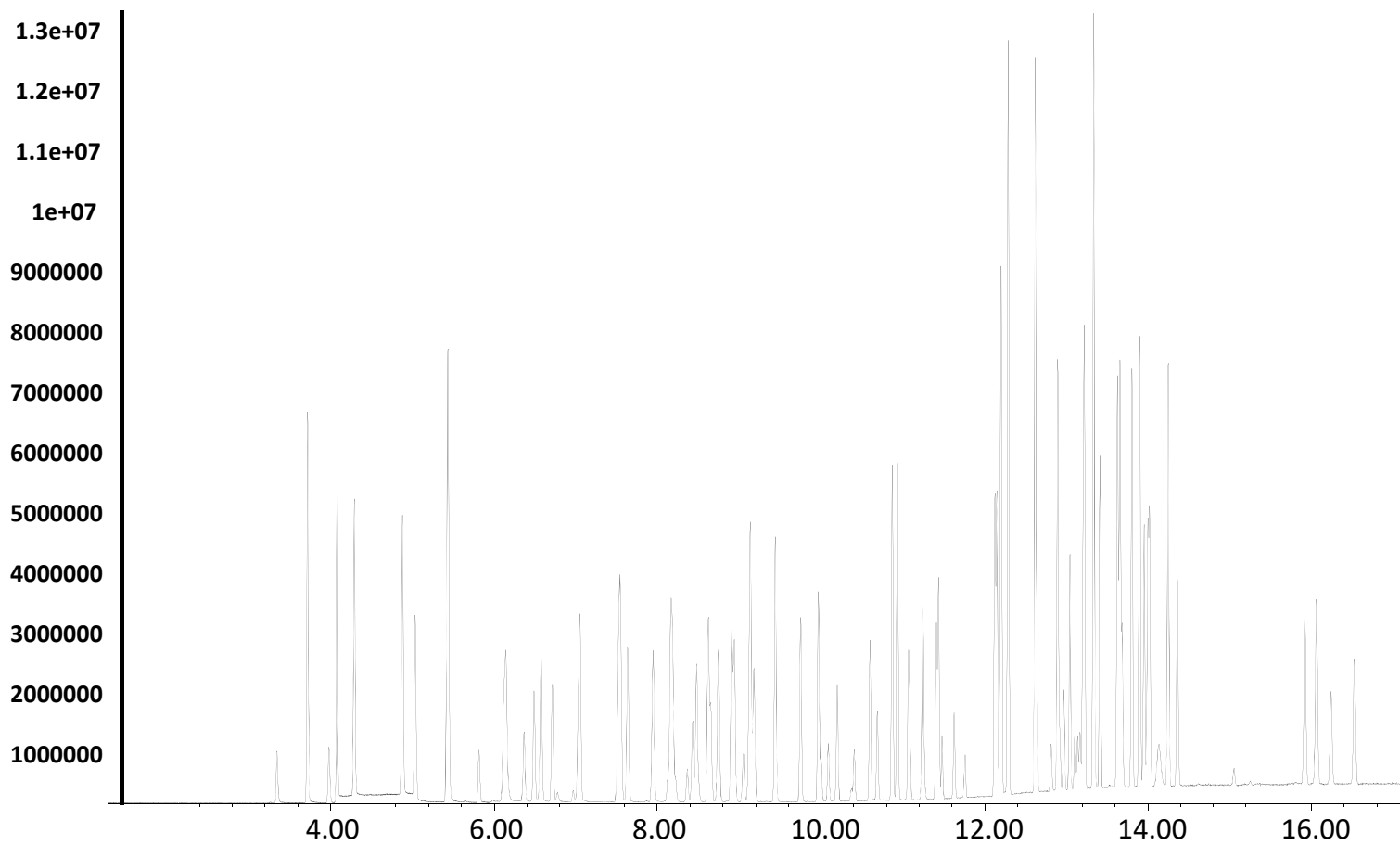
1ng 8270 compounds small leak
-- leaking press tight – front excessive MeCl₂



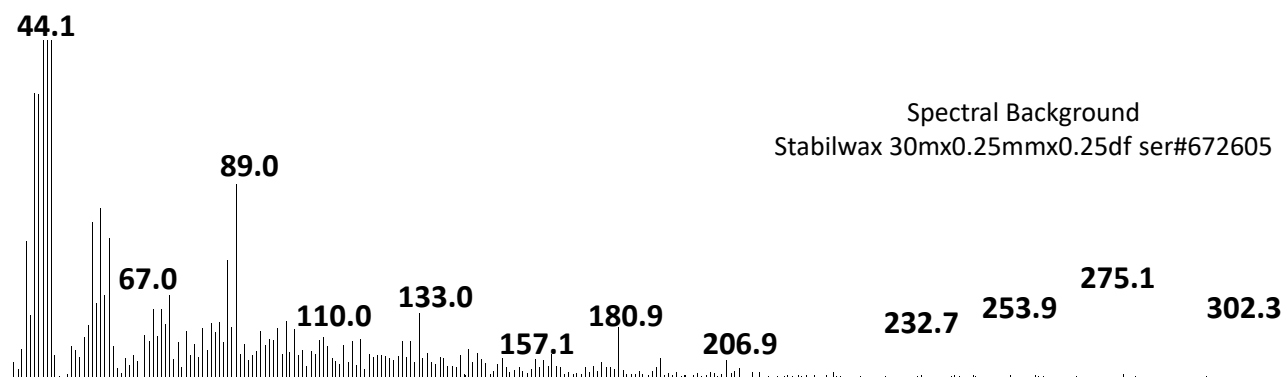
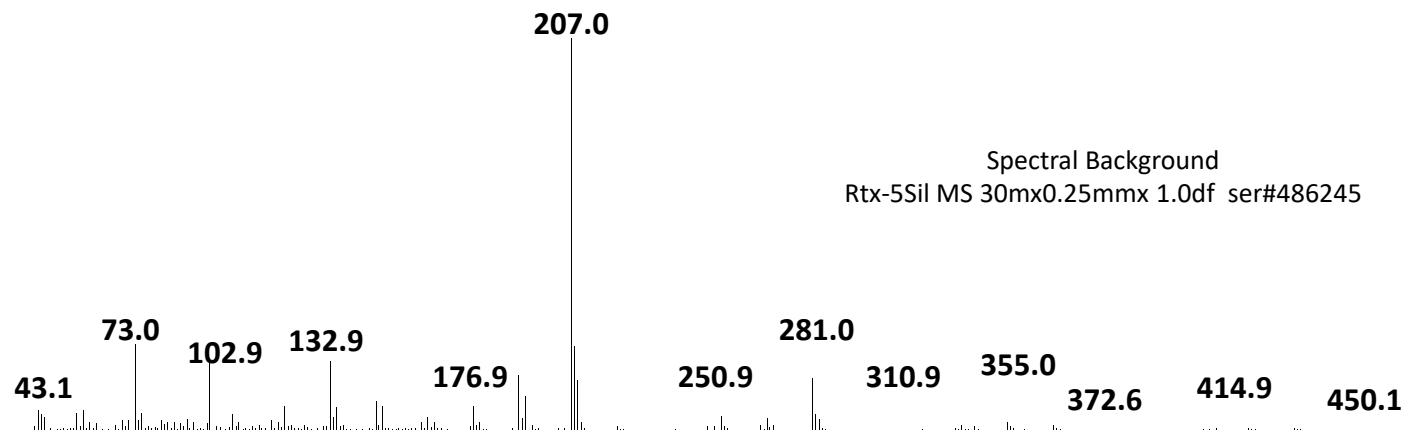
High Bleed



Bleed fixed



カラムブリードタイプ PEG vs. PDMS



<http://www.restek.com/blog/?post=44-I-WANT-ANSWERS-PEG-aka-Wax-phases-for-my-GCMS---Seriously-Why-Not>

ゴーストピーク

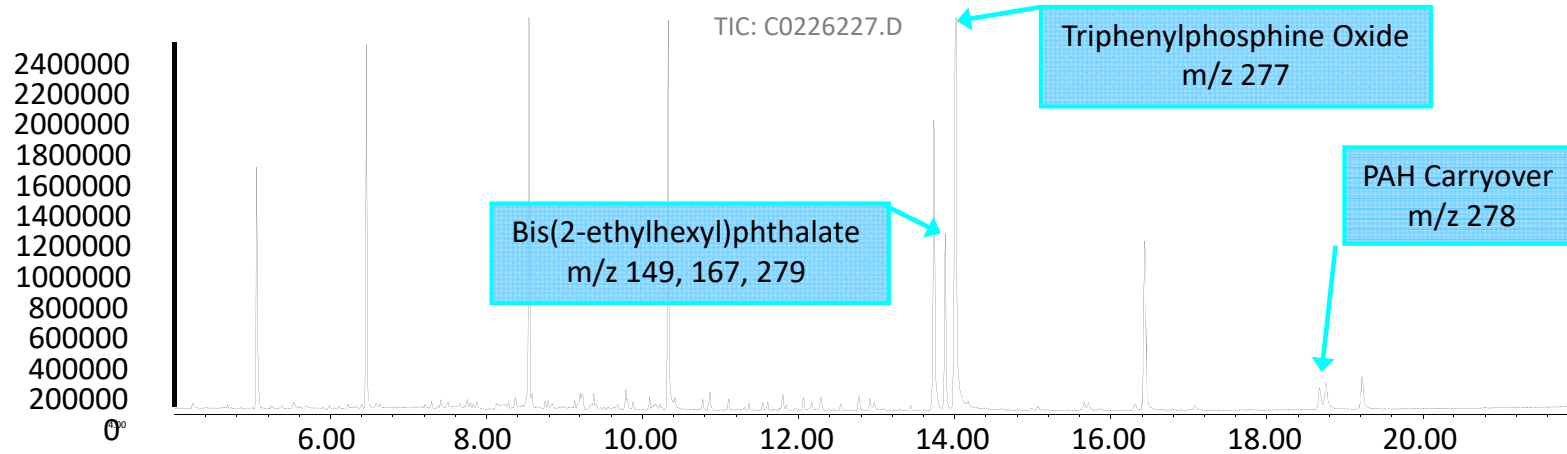
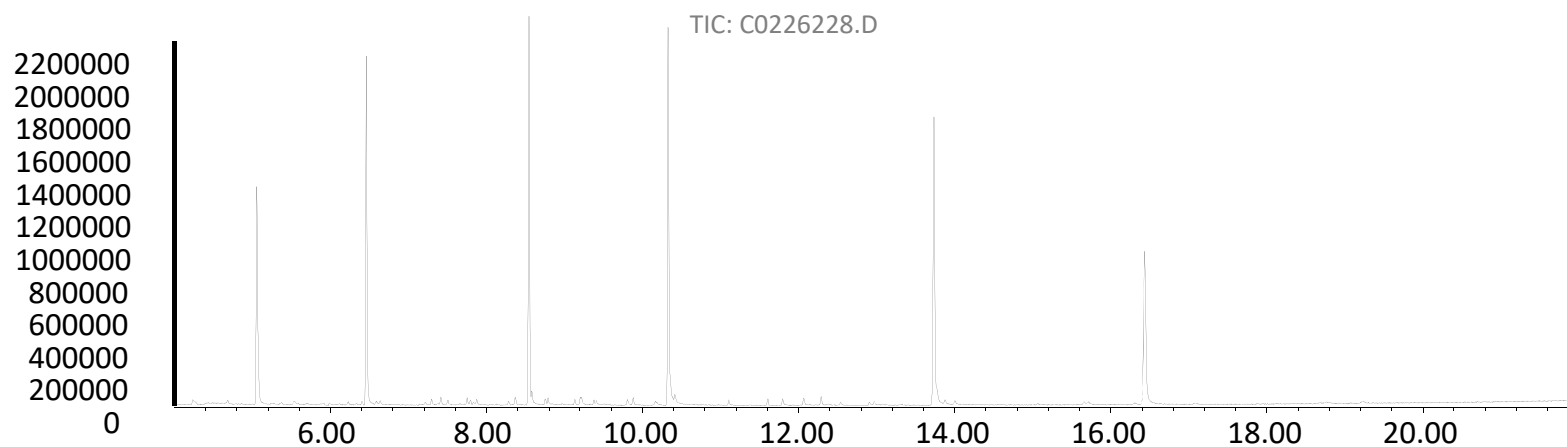
原因

- シリンジの汚染
- バックフラッシュ
- 洗浄溶媒の汚染

対策

- シリンジのクリーニング
- 洗浄溶媒の交換
- バックフラッシュをやめる

ゴーストピーク



<http://www.restek.com/blog/?post=84> Unraveling-the-Mysteries-of-Ghost-Peaks-It146s-Time-to-Pull-the-Sheet-Off

再現性

原因

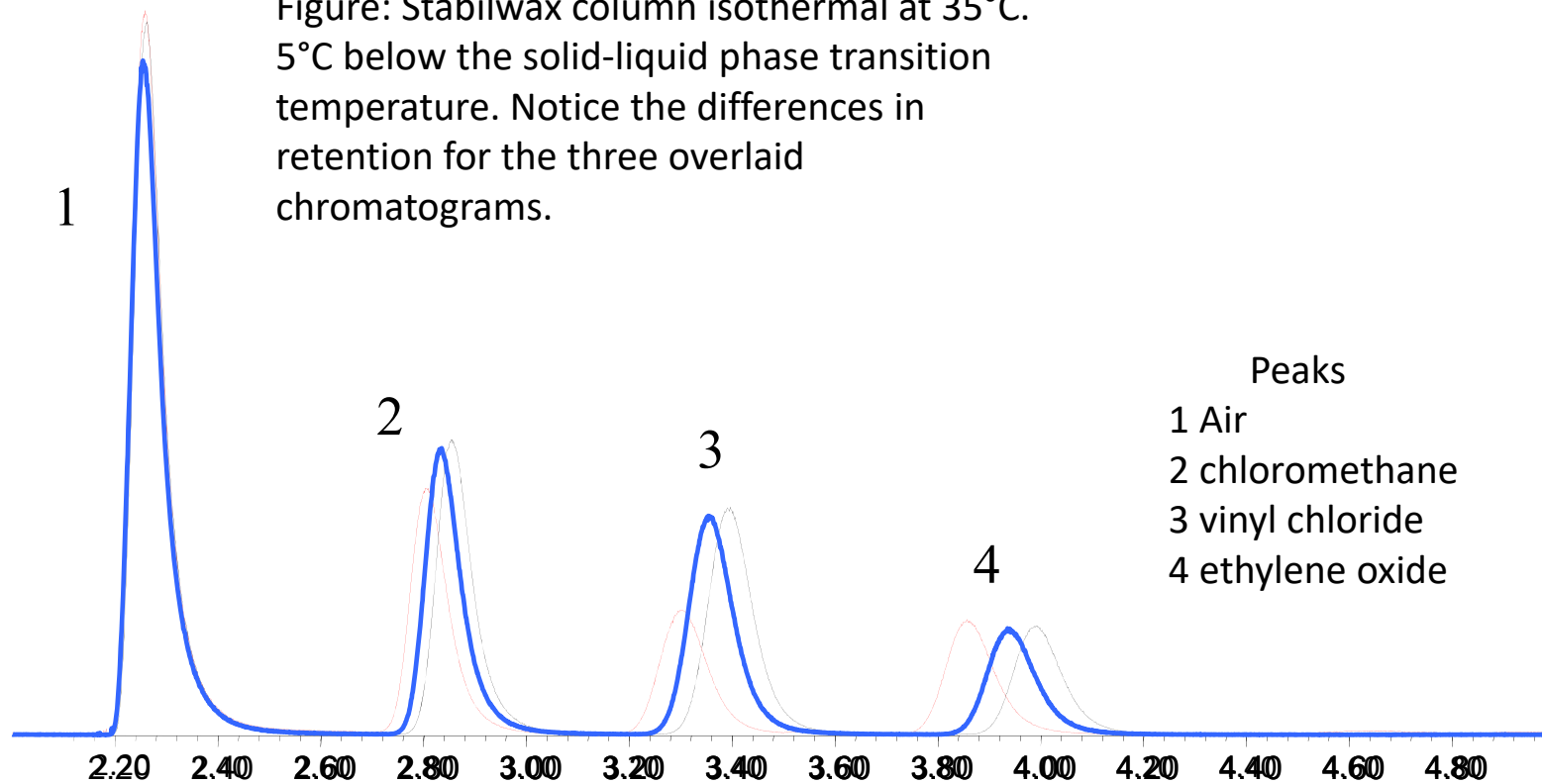
- ディスクリミネーション
- 試料の吸着
- 分離・積分の問題
- 不活性化処理
- 分析条件

対策

- 適切な注入法
- 内部標準の使用
- システムのクリーニングもしくはプライミン
- 適切な不活性化処理をされたものを使用する
- 分析条件を最適化する

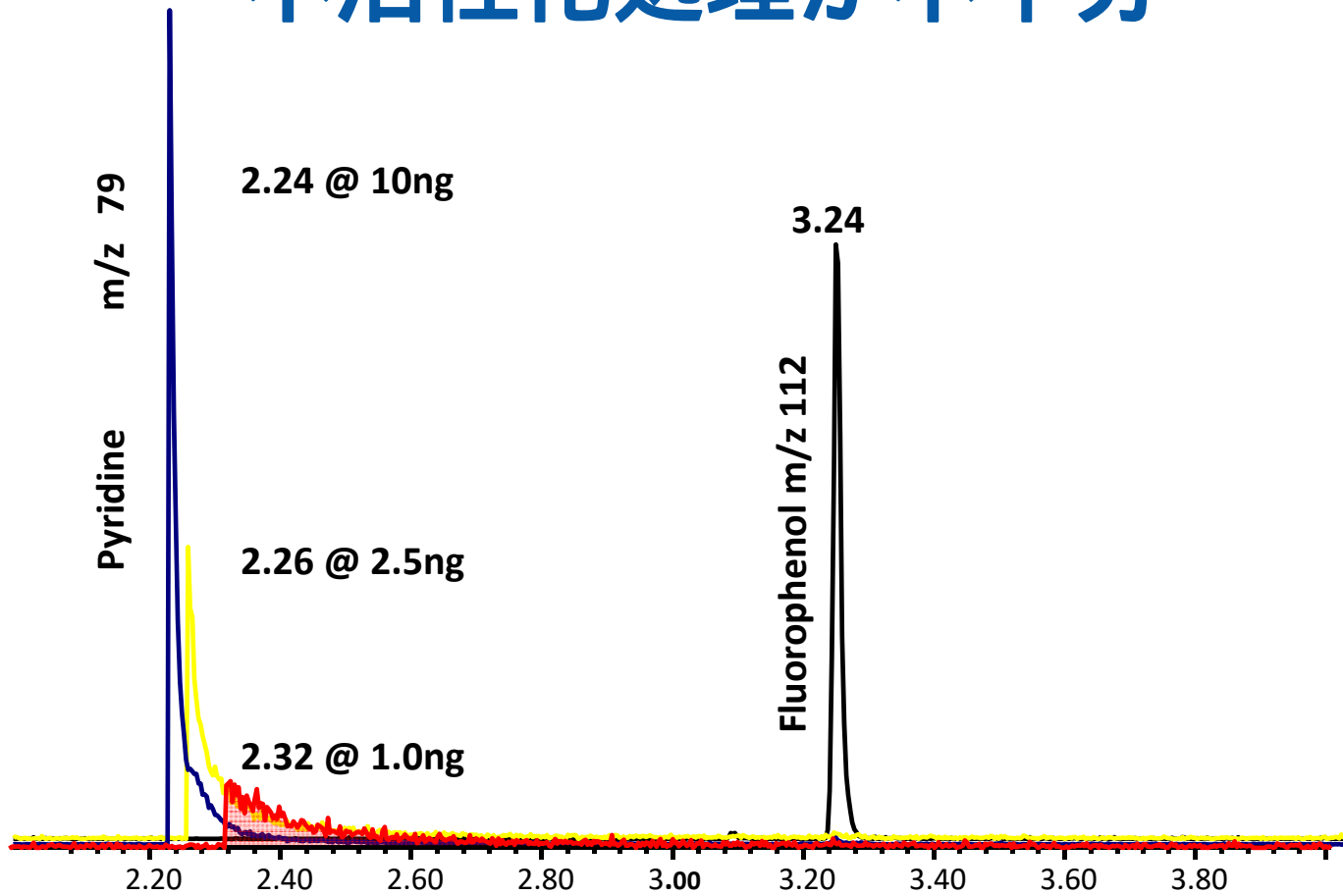
再現性

Figure: Stabilwax column isothermal at 35°C.
5°C below the solid-liquid phase transition
temperature. Notice the differences in
retention for the three overlaid
chromatograms.



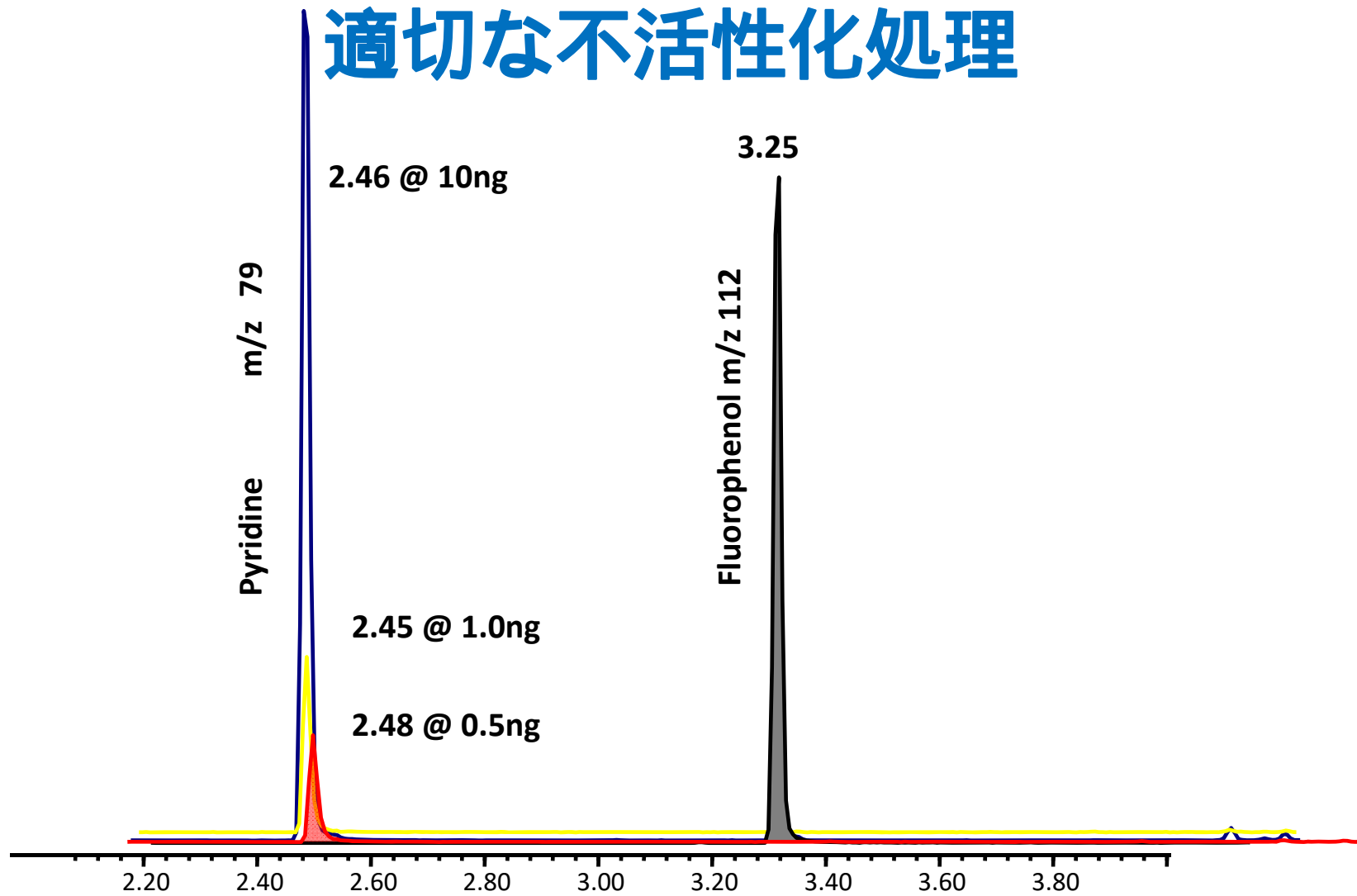
<http://www.restek.com/blog/?page=20> Volatiles-PEG-Phase-Look-Out-for-that-Swicky-Glass-Transition-Temperature

不活性化処理が不十分

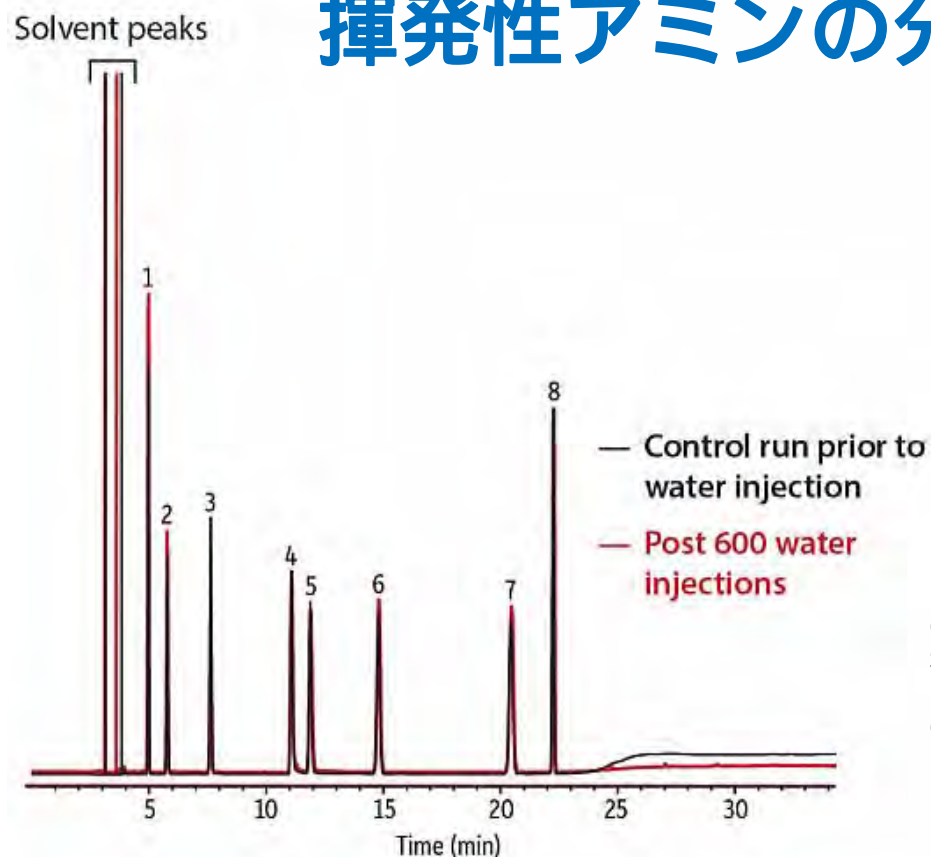


Fails 8270D Revision 4 Criteria for RRT 0.06 min

適切な不活性化処理



Rtx-Volatile Amineカラムを用いた 揮発性アミンの分析



1. Pyridine
2. 1,2-Butanediol
3. Nonane
4. Diethylenetriamine
5. Diethanolamine
6. 2-Nonanol
7. 2,6-Dimethylamine
8. Dodecane

Column: Rtx-Volatile Amine, 60 m, 0.32 mm ID (cat.# 18078)
Sample: Volatile amine column test mix (cat.# 35008)
Diluent: Methanol:dichloromethane (50:50)
Conc.: 900-1,800 µg/mL snap and shoot
Inj. Vol.: 1 µL split (split ratio 17.8:1)

ベースラインが安定しない

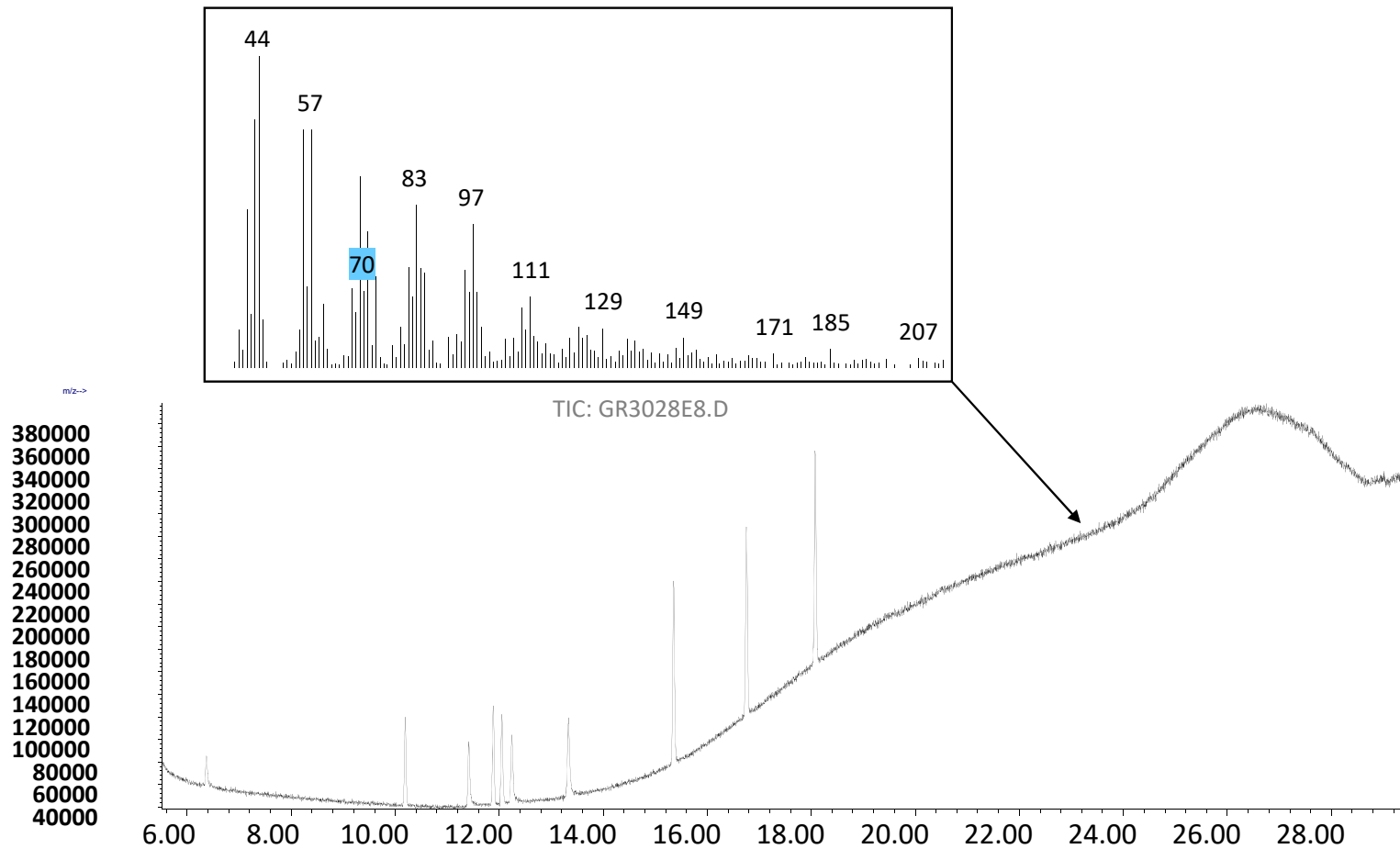
原因

- キャリアガスのリーク
もしくは汚染
- セプタムブリード
- インジェクタ、カラム
もしくは検出器の汚染
- カラムブリード
- 新品の装置
 - 一般的な炭化水素

対策

- リークの確認
- セプタムの交換
- インジェクタや検出器
のメンテナンス
- カラムのトリミング及
びコンディショニング
- キャリアガス純度の確認

ベースラインが安定しない



テーリングピーク

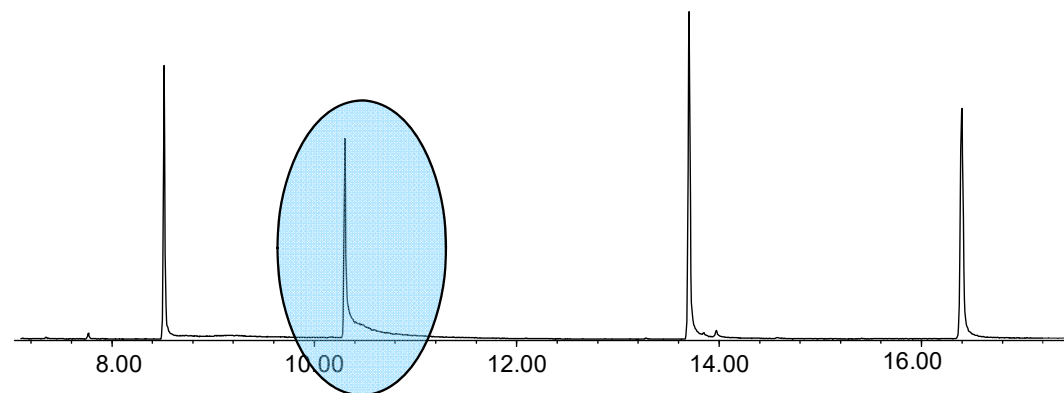
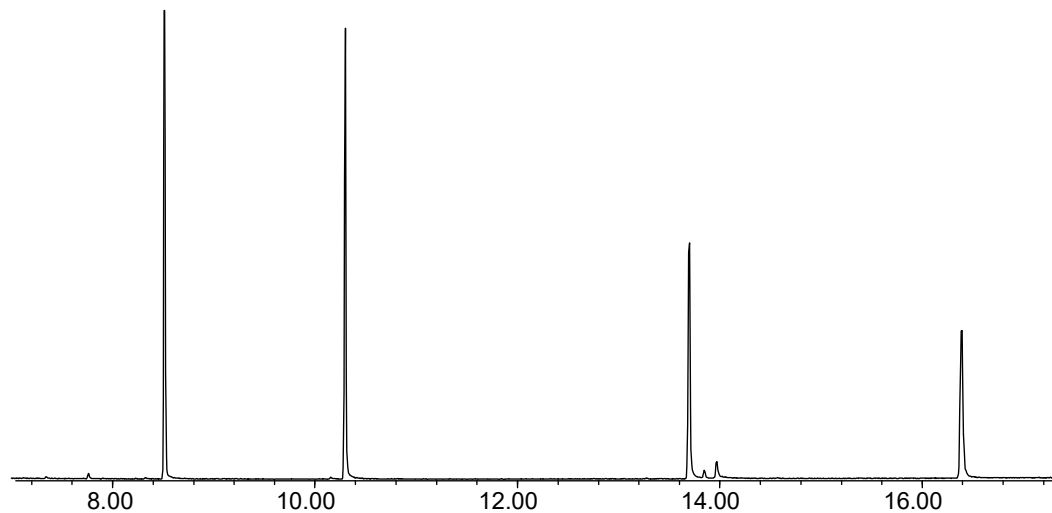
原因

- 吸着
- リーク
- 取付けの問題

対策

- リークの確認
- 適切に不活性化処理されたものを使用する
- デッドボリユームの最小化
- 分析条件の最適化

テーリングピーク



フロンティングピーク

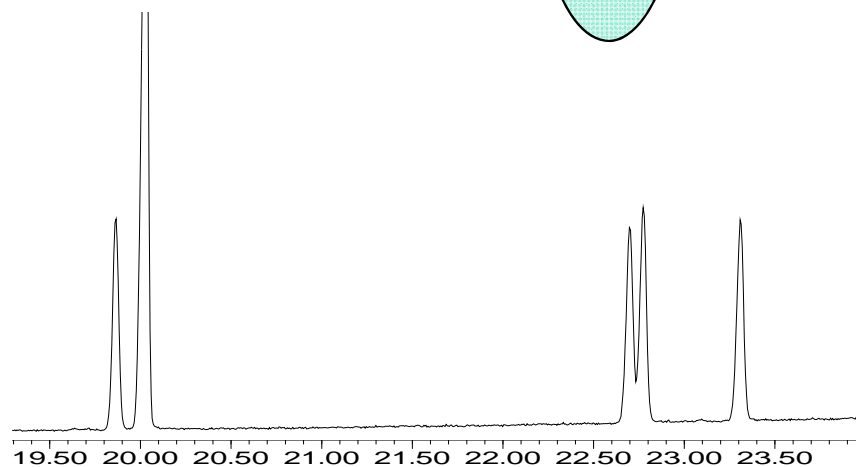
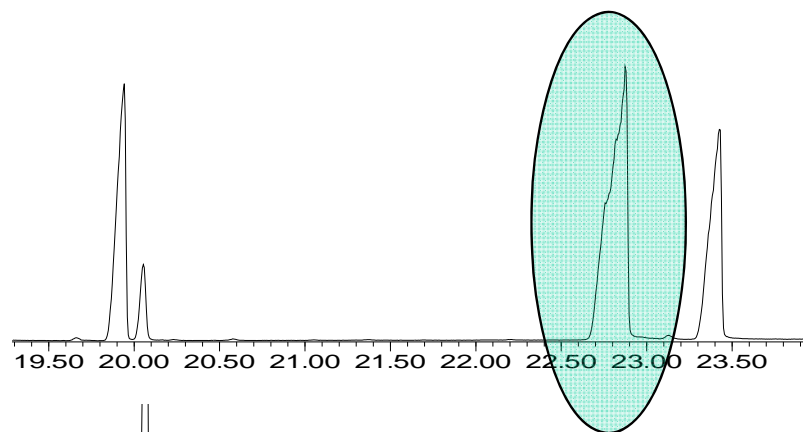
原因

- 適した液相ではない
- オーバーローディング

対策

- 適切な液相を選択する
- 注入量を減らす。もしくはカラム内径 / 膜厚を変更する

フロンティングピーク



スプリットピーク

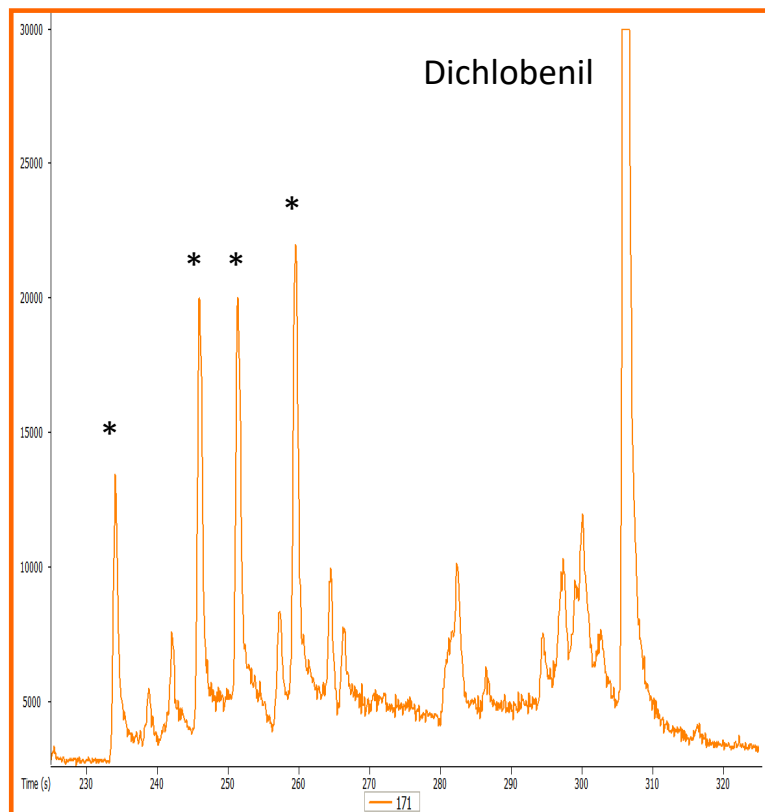
原因

- サンプル溶媒と液相の極性のミスマッチ
- 気化が不完全

対策

- ウェットイングが適切におこなわれるように溶媒または液相を調整する
- 気化を促進するために、ウール入りライナーを使用する
- 分析条件の最適化

スプリットピーク



Dichlobenil in Acetonitrile
Peak Splitting
Oven Temperature
Start 40°C

スプリットピーク

