

## Prominence

High Performance Liquid Chromatograph

# Technical Report No. 45

## ▶ 逆相分析におけるゴーストピークの原因と対策

### 1. ゴーストピークの問題点

LC分析で頭を悩ませる問題のひとつとしてゴーストピークがあります (Fig.1参照)。ゴーストピークとは、クロマトグラム上に現れる正体不明 (原因を特定しにくい) ピークであり、「目的ピーク近傍に現れた場合、定性を誤る」あるいは「目的ピークと重なると定量誤差が生じる」ためにデータの信頼性を損なうことになります。また、目的成分由来の不純物ではないにも関わらず、あたかも不純物が存在しているかのように出現する場合、その原因究明に多大な時間を費やすことになります。

とりわけ近年では、UV検出器の高感度化が進んで低濃度でも検出できるようになったために、ゴーストピークの問題がクローズアップされています。そこで、本レポートでは、UV検出器を使用した逆相分析に注目して、ゴーストピークの原因と対策を考えてみます。

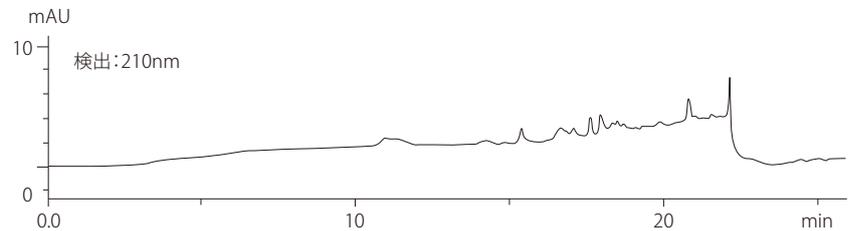


Fig.1: ゴーストピーク例 (データ提供: 第一三共株式会社様)

### 2. 逆相分析におけるゴーストピーク

ゴーストピークの由来は、目的成分以外の夾雑物やLC装置内の汚れ、移動相中の不純物などさまざまですが、以下の3つに大別できます。

- (1) 装置由来
- (2) 試料由来
- (3) 移動相由来

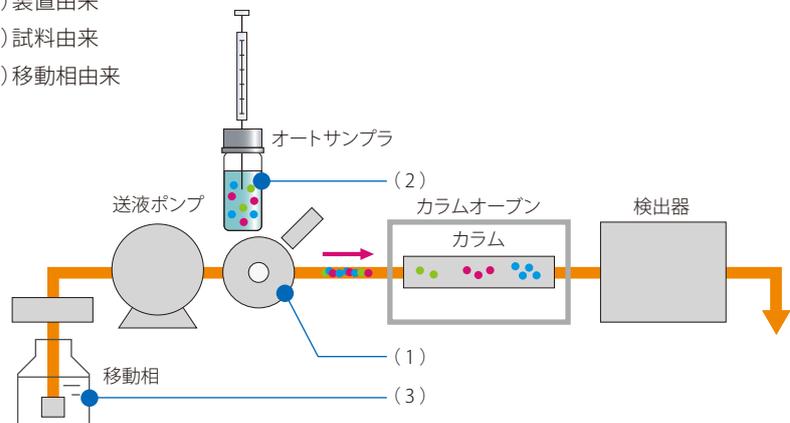
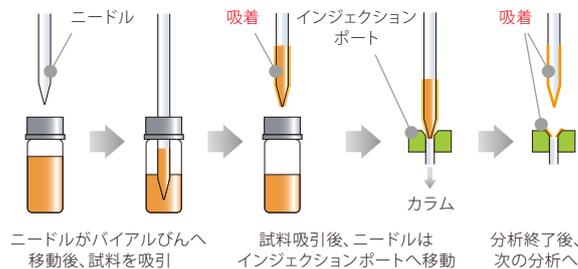


Fig.2: ゴーストピークの原因

## 2-1. 装置由来のゴーストピーク

装置由来のゴーストピークとして最も顕著なものは、オートサンブラ(またはマニュアルインジェクタ)に起因するキャリーオーバーです。ニードルはサンプルを吸引するために、バイアルびんの中に浸かりますが、このときにニードルの外面および内面にキャリーオーバーの原因となる試料中の成分が吸着します。ニードルを洗浄しても除去できなかった成分が次の分析時に持ち越され(キャリーオーバーされ)、これがゴーストピークとして出現します。とりわけ吸着性の強い成分は、ブランク分析(移動相を注入した分析)を何度か繰り返しても出現するため、オートサンブラに起因していると気づきにくい場合があります(Fig.3参照)。

一方、装置に由来する上記以外のゴーストピークとして、装置の汚れがあります(詳細は2-3を参照)。



	Carryover
ブランクテスト (1回目)	0.0006%
ブランクテスト (2回目)	0.0003%
ブランクテスト (3回目)	0.0004%

Chlorhexidine (2,000ug/uL) を注入した後  
ブランクテストを3回連続して実施

Fig.3: キャリーオーバー

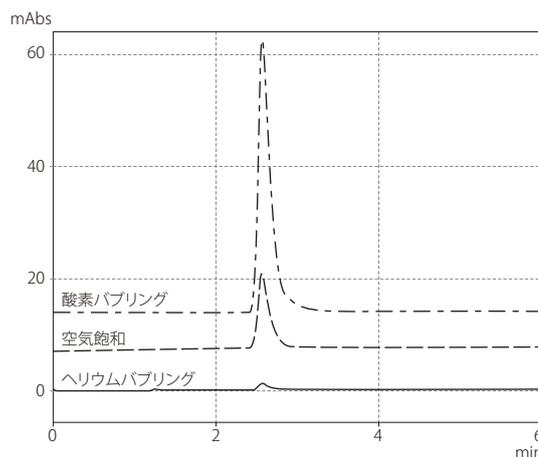
## 2-2. 試料由来のゴーストピーク

目的化合物と同じ吸収波長を持つ夾雑物が試料中に含まれると、これがゴーストピークとなります。

試料由来のゴーストピークは、ブランク分析(移動相を注入した分析)では出現しないため、原因の究明が比較的簡単です。

その対策としては、ディスポフィルターを使用する、サンプルの前処理を工夫する、などにより夾雑物を除去します。また、ゴーストピークの発生が試料の分解性に起因する場合は、バイアルびんを冷却する機能が付いているオートサンブラを使用して、その分解を抑制します。

一方、試料そのものに由来するものではなく試料溶媒中の溶存空気量(UV検出の場合は溶存酸素量)がゴーストピークの原因となる場合があります。Fig.4には酸素をバブリングした試料と試料びんを開放して空気を飽和させた試料、そしてヘリウムをバブリングし溶存酸素を除去した試料を分析し、比較した結果を示しました。この結果からも移動相と試料溶液中の溶存酸素量の違いがゴーストピークを出現させることがわかります。



バイアルびんに試料を入れた後に、酸素、空気、ヘリウムのそれぞれをバブリングしたときのピーク

Fig.4: 試料溶媒中の溶存酸素

## 2-3. 移動相由来のゴーストピーク

移動相がゴーストピークを発生させる場合があります。その原因として、

- ・移動相を長期使用することにより、移動相中に有機物が発生する。あるいは空気中の有機物が溶け込む。
- ・移動相を継ぎ足して長期使用することにより、移動相ビンが汚染される。
- ・移動相で使用する有機溶媒や水に由来する不純物。
- ・移動相試薬由来の不純物。

などがあります。移動相の場合は消費量が多く、しかも比較的長期間使用し続けることから、試料の場合のようにフィルタや前処理での除去は現実的ではありません。

また、そうした汚れが装置内部や配管等に付着し、これが送液の過程において、わずかながらではあるものの移動相と共にカラムに送り込まれ、ゴーストピークとして検出される場合もあります。とりわけグラジエント溶離による逆相分析では、そうしたゴーストピークの「原因物質」は、分析開始時にカラムに保持され、そして有機溶媒比率が上がったときに溶出するため、目的化合物と似た挙動を示す場合は分離が非常に難しくなります。

このように、移動相由来のゴーストピークは原因の特定が難しく、しかもメソッド上の変更では対応が難しいというのが現状です。

### 3. 「ゴーストラップ DS」の活用

2-3のようにゴーストピークの原因を特定することが難しく、また抜本的な防止策が難しい場合は、その原因となる物質をトラップすることによって、ゴーストピークの出現を抑制する方法が有効です。

Fig.5およびTable 1には、ゴーストピークをトラップするカートリッジ「ゴーストラップ DS」を示します。これを移動相流路にオンライン接続することにより、UV検出器を使用した逆相分析、とりわけグラジエント溶離法におけるゴーストピークの原因となる物質を吸着します。カラムには、そうした物質が取り除かれた移動相が送り込まれるため、ゴーストピークの出現を防ぐことができます。

「ゴーストラップDS」は、LC装置の状況や分析の用途に合わせて、さまざまな位置に接続することができます (Fig.6参照)。Fig.7には下記 (a)～(e) の位置に接続した

場合のクロマトグラムの比較結果を示します。

- (a) ゴーストラップDSは未使用
- (b) 送液ポンプA(水系ポンプ)の後部に使用した場合
- (c) 送液ポンプB(有機溶媒系)の後部に使用した場合
- (d) グラジエントミキサーの前部に使用した場合
- (e) グラジエントミキサーの後部に使用した場合

この結果より、今回の条件下では、送液ポンプAの流路由来(もしくは送液ポンプAで使用している移動相由来)のゴーストピークが多いことがわかります。また、「ゴーストラップ DS」をグラジエントミキサーの前または後ろに接続した場合にゴーストピークのパターンがわずかに異なることから、グラジエントミキサーの汚れに由来するゴーストピークも存在することがわかります。Fig.7 (e)のように「ゴーストラップ DS」は、グラジエントミキサーの下流にも接続できるため、より確実なゴーストピークの除去ができることがわかります。



Fig.5: 「ゴーストラップ DS」の外観

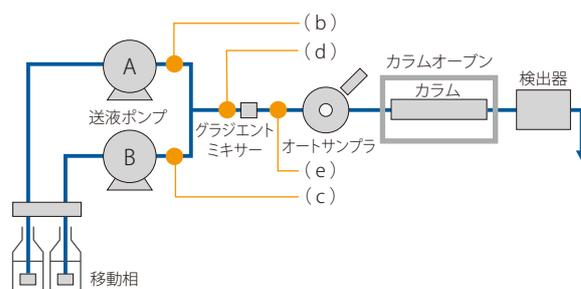


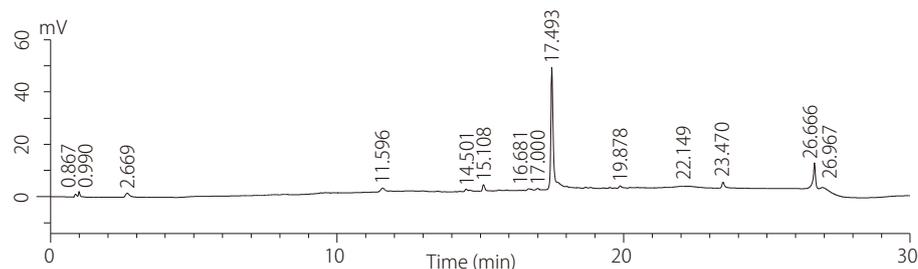
Fig.6: 「ゴーストラップ DS」のテスト箇所

Table 1: 「ゴーストラップ DS」のラインアップ

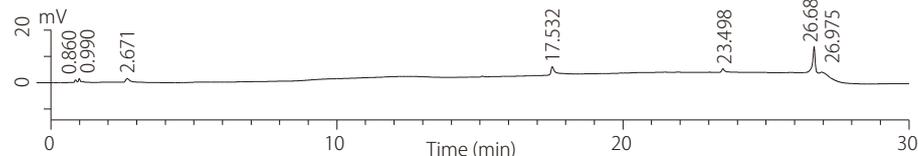
品名	P/N	内容(数量)	サイズ	内部容量	耐性
ゴーストラップDS	228-59921-91	カートリッジ(2個)	7.6 mmID × 30 mm	約700 μL	35MPa
	228-59921-92	カートリッジ(2個) ホルダ(1個)			
	228-59921-93	カートリッジ(2個)	4.0 mmID × 20 mm	約150 μL	
	228-59921-94	カートリッジ(2個) ホルダ(1個)			

- (注)・グラジエントミキサー、またはポンプ合流後に本製品を取り付けた場合、グラジエント分析時には内部容量分だけ遅れ容量が発生しますのでご注意ください。
- ・質量分析計を検出器とした場合、本製品由来のブリードノイズが生じる場合があります。
  - ・イオンペア試薬を用いた分析では、イオンペア試薬が本製品に保持され、保持時間やピーク形状に影響を与える場合があります。
  - ・ご使用時には、分析カラムを接続する前に必ず移動相(グラジエント分析時の最終濃度付近)でよく洗浄してからご使用ください。
  - ・全ての不純物を除去できるわけではありませんので、予めご了承ください。

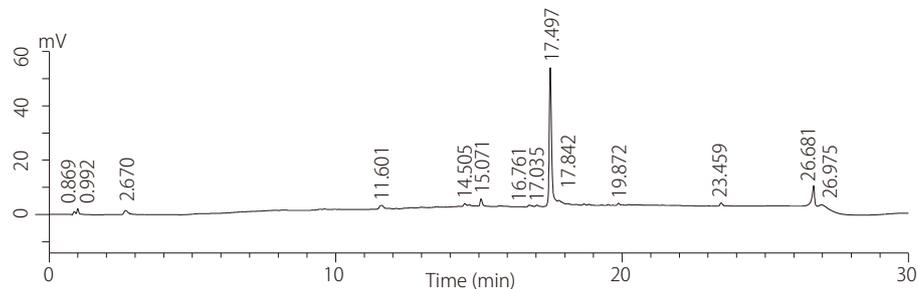
(a) ゴーストラップDSは未使用



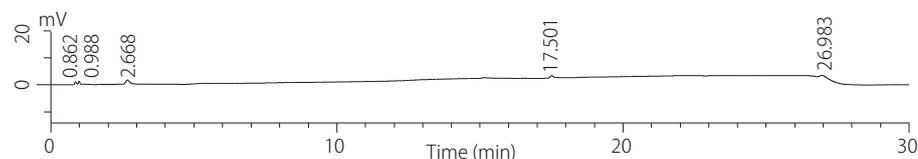
(b) 送液ポンプAの後ろに使用



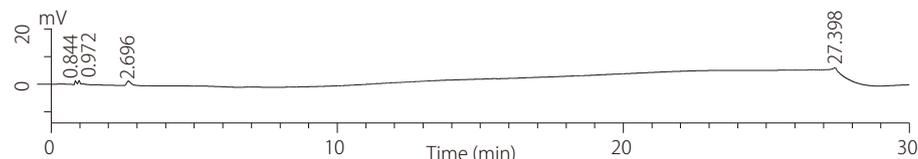
(c) 送液ポンプBの後ろに使用



(d) グラジエントミキサーの前に使用



(e) グラジエントミキサーの後ろに使用



分析カラム: ODS系カラム

移動相 : A; 25 mmol/L (Potassium) phosphate buffer (pH 4.0) / Acetonitrile = 9 / 1 (vol/vol)  
B; Water / Acetonitrile = 1 / 9 (vol/vol)

流速 : 0.65 mL/min

オープン : 45°C

検出器 : UV210mm

Fig. 7: 「ゴーストラップ DS」によるゴーストピークの除去例 (データ提供: 第一三共株式会社様)

本レポートの掲載情報は著作権により保護されています。本情報を商業利用を目的として販売、複製または改ざんして利用することはできません。また、掲載情報については充分検討を行っていますが、正確性や完全性を当社は保証するものではありません。従って掲載情報に関連して何らかの業務もしくは契約を行おうとされる場合は、別途あらためて当社営業担当と打ち合わせして、ご確認や契約をしていただく必要があります。本レポートは発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行: 2011年1月