

HPLC分析の準備をしよう

5_分析手順書や試験法などに記載されている分析条件の読み方

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター

分析条件を読み解く

●分析条件とは？

ある分析における各ハードウェアの設定値や使用する移動相の組成などを示したもの

つまり

誤って分析条件を読み解くと、その分析が再現できない

たとえば...

Analytical Conditions;
Column : Shim-pack VP-ODS (150 ×4.6 mm I.D.,5 μm)
Mobile Phase : Water / Acetonitrile =3:7
Flow Rate : 1.0 mL/min
Column Temp. : 40 °C
Detection : UV 245 nm

正しく条件を読み解くことができますか？

分析条件を読み解く

Analytical Conditions;

Column : Shim-pack VP-ODS (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm)

Mobile Phase : Water / Acetonitrile = 3:7

Flow Rate : 1.0 mL/min

Column Temp. : 40 °C

Detection : UV 245 nm



カラム : 分離カラムの種類 → Shim-pack VP-ODS
 分離カラムのサイズ → 長さ150 mm, 内径4.6 mm
 充填剤の粒子径 → 5 μm

移動相 : 水とアセトニトリルを3 : 7で混合したもの

この2つの条件から、
 分離モードが
 逆相であることがわかる

流量 : 送液ポンプで移動相を送液する量 → 1.0 mL/min

カラム温度 : カラムオープンで温調する値 → 40 °C

検出方法 : 検出器および検出に関する設定値 → UV(紫外吸光光度検出器), 検出波長245 nm

事例 – 試験法Aの場合

ある農薬の試験法（食品残留農薬試験法）から抜粋

- ・装置 : 紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-UV)
- ・測定条件
 - カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.0~6.0 mm, 長さ150 mm, 粒径 5 μm
 - カラム温度 : 40°C
 - 移動相 : アセトニトリル及び水 (5 : 6) 混液
 目的成分(対象とする成分)が約10分で流出する流速に調整する
 - 検出条件 : 吸光波長230 nm
- ・検量線の作成
 - 標準品の0.01~1 mg/Lアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液溶液を数点調製し,
 それぞれ20 μLをHPLCに注入し, ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する

試験法Aから分析条件を考える カラム

・装置：紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

・測定条件

-カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.0～6.0 mm，長さ150 mm，粒径 5 μm

-カラム温度：40°C

-移動相：アセトニトリル及び水（5：6）混液

目的成分(対象とする成分)が約10分で流出する流速に調整する

-検出条件：吸光波長230 nm

・検量線の作成

-標準品の0.01～1 mg/Lアセトニトリル及び水（1：1）混液溶液を数点調製し，それぞれ20 μLをHPLCに注入し，ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する

・カラムの種類：ODS系のカラム

(例：○○ODS，C18△△という名前のカラム)

・カラムサイズ：内径4.0～6.0 mm，長さ150 mm，粒径5 μm

試験法Aから分析条件を考える 移動相

・装置：紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

・測定条件

-カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.0～6.0 mm，長さ150 mm，粒径 5 μm

-カラム温度：40°C

-移動相：アセトニトリル及び水（5：6）混液

目的成分(対象とする成分)が約10分で流出する流速に調整する

-検出条件：吸光波長230 nm

・検量線の作成

-標準品の0.01～1 mg/Lアセトニトリル及び水（1：1）混液溶液を数点調製し，それぞれ20 μLをHPLCに注入し，ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する

・移動相の種類：アセトニトリルと水を5：6*で混合した液

・移動相の流量：流量を一定の値に設定し，
目的成分の保持時間を確認しながら調整

*この場合は体積比（重量比の場合もあるので、試験法毎に要確認）

試験法Aから分析条件を考える 装置

・装置：紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-UV)

・測定条件

-カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.0~6.0 mm, 長さ150 mm, 粒径 5 μm

-カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

-移動相：アセトニトリル及び水 (5 : 6) 混液
目的成分(対象とする成分)が約10分で流出する流速に調整する

-検出条件：吸光波長230 nm

・検量線の作成

-標準品の0.01~1 mg/Lアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液溶液を数点調製し、それぞれ20 μL をHPLCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する

・注入量：20 μL

・カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

・検出器：紫外吸光光度検出器(UV)

・検出波長：230 nm

事例 – 試験法Bの場合

ある医薬品の試験法 (日本薬局方) から抜粋

・試験条件

- 検出器：紫外吸光光度計(測定波長：210 nm)

- カラム：内径4.6 mm, 長さ15 cmのステンレス管に5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする

- カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 付近の一定温度

- 移動相：ラウリル硫酸ナトリウム0.4 gを薄めたリン酸(1 \rightarrow 1000) 500 mLに溶かした後、水酸化ナトリウム試液でpH3.0に調整する。
この液240 mLにテトラヒドロフラン70 mLを加えて混和する

- 流量：医薬品Bの保持時間が約16分になるように調整する

・システムの適合性

- システムの性能：標準溶液20 μL につき、上記の条件で操作する時、内標準物質、医薬品Bの順に溶出し、その分離度は3以上である

- システムの再現性：標準溶液20 μL につき、上記の条件で試験を6回繰り返す時、内標準物質のピーク面積値に対する医薬品Bのピーク面積値の比の相対標準偏差は1.5 %以下である

試験法Bから分析条件を考える カラム

-カラム：内径4.6 mm，長さ15 cmのステンレス管に5 μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする

- ・カラムの種類：ODS系のカラム
- ・カラムサイズ：内径4.6 mm，長さ150 mm，粒径5 μm

試験法Bから分析条件を考える 移動相

- 移動相：ラウリル硫酸ナトリウム0.4 gを薄めたリン酸(1→1000) 500 mLに溶かした後，水酸化ナトリウム試液でpH3.0に調整する
この液240 mLにテトラヒドロフラン70 mLを加えて混和する

水酸化ナトリウム(特級)4.3 gを水に溶かし，100 mLとする(1 mol/L)

注) 試験法で使用するカラム，試薬，試液については，使用する試薬や調製方法が規定されている場合がある

溶液の濃度の希釈方法を表す

ここではリン酸1 mLを純水で1000 mLに定容することを意味する

イオン対試薬の一種

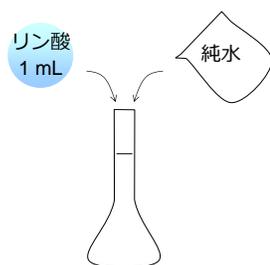
カラムの安定化のため，一晩低流量で移動相をカラムに通液しておく

試験法Bから分析条件を考える 移動相

- 移動相：ラウリル硫酸ナトリウム0.4 gを薄めたリン酸(1→1000) 500 mLに溶かした後、水酸化ナトリウム試液でpH3.0に調整する
この液240 mLにテトラヒドロフラン70 mLを加えて混和する

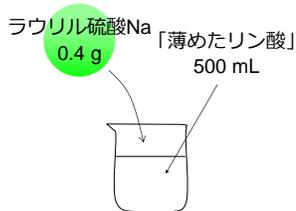
内の作業イメージ

①「薄めたリン酸」の調製



1000 mL メスフラスコ

②ラウリル硫酸Naを溶かす



*この場合は体積倍率（重量の場合もあるので、試験法毎に要確認）

LAAN-E-LC213

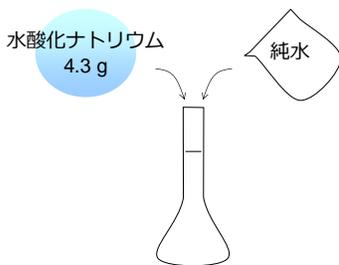
11

試験法Bから分析条件を考える 移動相

- 移動相：ラウリル硫酸ナトリウム0.4 gを薄めたリン酸(1→1000) 500 mLに溶かした後、水酸化ナトリウム試液でpH3.0に調整する
この液240 mLにテトラヒドロフラン70 mLを加えて混和する

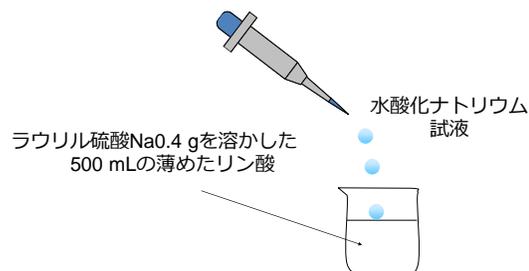
内の作業イメージ

①「水酸化ナトリウム試液」の調製



100 mL メスフラスコ(樹脂製)

②「水酸化ナトリウム試液」を使って「ラウリル硫酸Na0.4 gを溶かした500 mLの薄めたリン酸」のpHを3.0に調整



LAAN-E-LC213

12

まとめ

- 水, 有機溶媒, 試薬(塩類など)の選び方
- 移動相の脱気, 試料前処理の方法
- 分析手順書や試験法などに記載されている分析条件の読み方

ご清聴ありがとうございました

動画の内容は掲載時点の情報であり、最新のものとは異なる場合があります。

本発表内に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本発表中では「TM」、「®」を明記していません。