

A background image featuring a molecular structure with spheres representing atoms and lines representing bonds, set against a light green gradient.

# 20

## インフォメーション

カラムの取り扱い .....	266
ODSの移動相 .....	267
HPLC溶出曲線の取り扱い .....	268
検査成績書について .....	269
登録商標について .....	270

# カラムの取り扱い

## 1 はじめに

ワイエムシィではHPLCカラムの製造にあたり厳格な品質管理を行い、かつ出荷前のカラム検査に合格したものをお客様にお届けしております。お届けしましたカラムの性能を十分に発揮させ、長期間ご使用いただくために以下の説明をご一読のうえ、正しくご使用いただけますようお願いいたします。

## 3 移動相

- ・逆相系のカラムは、水系から非水系溶媒まで使用できますが、極性が極端に異なる溶媒の置換を繰り返すとカラム性能が低下する恐れがあります。使用可能な一般的な有機溶媒はアセトニトリル、メタノール、テトラヒドロフランなどです。
- ・CNカラムは順相、逆相の両モードで使用できますが、ご使用にあたってはどちらかのモードに専用化してください。順相モードでご使用になる場合は、まず最初に2-プロパノールなどでカラム内の溶媒を置換してください。（この時、流量は必ず圧力が15 MPa以下となるよう設定してください。）
- ・SILカラムは一般的には非水系溶媒で使われます。n-ヘキ

## 2 出荷時封入溶媒

出荷時の封入溶媒は、カラムに添付の検査成績書 COLUMN INSPECTION REPORTまたは使用説明書に記載されています。使用する移動相との混和性に注意してください。また、カラムを長期間保管する場合には、出荷時封入溶媒で置換してください。

## 4 移動相置換および洗浄（一般的方法）

### (A) 逆相カラム

- ・緩衝液や塩類を含まない移動相の場合、移動相を構成する有機溶媒の濃度を高めて洗浄してください。
- ・緩衝液や塩類を含む移動相の場合、これらを含まない水/有機溶媒混合液（移動相と同等比率）で置換した後、有機溶媒の濃度を高めて洗浄してください。
- ・pH限界付近でカラム使用後、水のみで洗浄するとカラム劣化を引き起こす場合があります。前述の水/有機溶媒混合液で置換してください。
- ・カラムの圧力が上昇した場合は、逆フロー（カラムラベルに示された矢印の逆方向での通液）でカラムを洗浄してください。洗浄溶媒は、一般的には移動相を構成する有機溶媒の濃度を高めたものを用いますが、注入した試料の特性を

考慮して試料が溶解しやすい溶媒を選択してください。

- ・タンパク質や多糖類などの高分子化合物がカラムに吸着している場合、有機溶媒で洗浄することは一般的に困難です。これらの成分を含む試料は、あらかじめ前処理をするかガードカラムの使用が望まれます。

### (B) 順相カラム

- ・移動相を構成する極性の高い溶媒の濃度を高めて洗浄してください。極性物質の吸着が推定される場合は、2-プロパノールなどで洗浄してください。
- ・酸、アルカリを含む移動相を使用した場合は、酸、アルカリを含まない溶媒に置換した後保管してください。[例 n-ヘキサン/2-プロパノール/酢酸 (90/10/0.1) → n-ヘキサン/2-プロパノール (90/10)]

## 5 ガードカラム

- ・ガードカラムはメインカラムと同じ充填剤のもので、内径がメインカラムと同じまたはやや小さいものを使用してください。
- ・YMCガードカートリッジカラムはカートリッジホルダーとカートリッジカラムから構成され、ホルダー部分は繰り返し使用できます。内径4.0 mmのガードカートリッジカラムは内径4.0 ~ 6.0 mmの分析カラムに使用できます。

- ・分析カラム用のガードカラムとして、ガードカートリッジカラムとパックドカラム型のガードカラムの2種類がある製品についてはガードカラムの交換頻度を目安にしてガードカートリッジカラムまたはガードカラムを選択してください。夾雑物が多くガードカラムの交換頻度が高い場合は、ガードカートリッジカラムをおすすめします。

## 6 その他の環境

- ・カラム圧力、温度の上限は製品によって異なります。Webサイト掲載の使用説明書をご覧ください。
- ・試料注入を繰り返すとカラム圧力が上昇する場合があります

す。試料はあらかじめYMC Duo-Filter (0.2 μm) などです。試料はあらかじめYMC Duo-Filter (0.2 μm) などです。試料はあらかじめYMC Duo-Filter (0.2 μm) などです。また、カラムフリットに目詰まりするような試料はプレカラムフィルタを使用してください。

# ODS の移動相

HPLCでは移動相の組成が分離に大きく影響します。分離の最適化のためには、溶質と固定相の性質と移動相組成の関係を考慮する必要があります。

HPLCカラムの中でも使用頻度の高いODSには種々の移動相が使用されます。移動相組成で注意することは、溶媒同士の混和性はもちろんのこと、検出手段に与える影響（たとえばUV吸収）やカラムに与える影響（たとえば圧力やpHなどによるカラム劣化）、そして分離の再現性や溶質の安定性などが考えられます。これらを考慮しながら最適な分離条件を確立するための、ODSカラムに有用な溶媒と留意点を示しました。

## 基本溶媒

水、アセトニトリル（ACN）、メタノール（MeOH）、テトラヒドロフラン（THF）はODSカラムを使用するうえで重要な溶媒です。

水は、イオン交換や蒸留、逆浸透などによって精製された純度の高い純水を使用することが大切です。有機物やイオン性の不純物が存在すると、低波長UV検出時におけるゴーストピークなどのトラブルの原因になります。

ACNは低UV吸収および低粘度であることから、HPLC溶媒として多用されています。MeOHは粘度がやや高めですが、ACNとは異なる分離選択性を示すことなどから、ACNとともに一般的に使用される溶媒です。THFはACNやMeOHとともに分離最適化の検討には欠かせない溶媒です。環状のエーテル構造がACNやMeOHとは異なる分離特性を示す場合があります。ただしUV吸収があることと、粘度や酸化性の点において留意する必要があります。通常は酸化防止剤を含まないHPLC用THFを使用します。

三種類の有機溶媒を単独もしくは混合することによって、適切な分離条件を見つけられます。

## 緩衝液など

酸としては、酢酸、リン酸、トリフルオロ酢酸（TFA）などが一般的です。緩衝液としてはリン酸緩衝液（ナトリウム、カリウム、アンモニウム）や酢酸緩衝液などが挙げられます。またリン酸一塩はpH 4.6を示し、単独で使用するのに便利なpH調整剤です。

アミンやカルボン酸などの解離基を有する溶質を再現性良く分離するには、移動相のpHを調整する必要があります。溶質の解離基のpKaから少なくとも1以上離れたpHに調整することが望まれます。pKa付近ではピークの幅が広がったり、ピーク割れの現象が起きたりします。

これらの緩衝液は通常20 mM程度の濃度で使用しますが、溶質の解離性や固定相との相互作用によっては50 ~ 100 mM必要になる場合があります。また、酸やアルカリはODSを劣化させやすい溶媒のため、濃度やpHに充分配慮する必要があります。TFAやリン酸は一般に0.1%以下で使用されます。

酸や緩衝液（塩類）を使用した後の保存溶媒としては、約60%アセトニトリル水溶液が便利です。ただしカラムを継続的に使用する場合や、移動相置換に時間がかかりすぎる、置換によってカラム劣化が生じやすい、という場合は置換や保管に関する配慮が必要です。

極性の高い溶質をODSに保持させたり、分離やピーク形状を改善するためのイオン対試薬として、テトラブチルアンモニウム塩や過塩素酸ナトリウムなどがあります。これらの添加剤を使用するときは、できるだけアルキル鎖長の短い試薬を選択する必要があります。たとえばSDSのようにアルキル鎖の長い試薬はODSに保持されやすく、分離の再現性においてしばしば問題になります。

## その他

溶質の保持や分離を改善する目的で、エタノールや2-プロパノール、酢酸エチル、クロロホルムなどを添加することも可能です。場合によっては、*n*-ヘキサンやベンゼンを移動相にしなければならないこともあります。疎水性の溶媒を移動相にするときは、カラム内の溶媒と混和するかどうかの配慮が必要です。また、低極性溶媒はカラムの充填状態に変化を起こしやすいので、溶媒置換時の慎重な取り扱いが求められます。

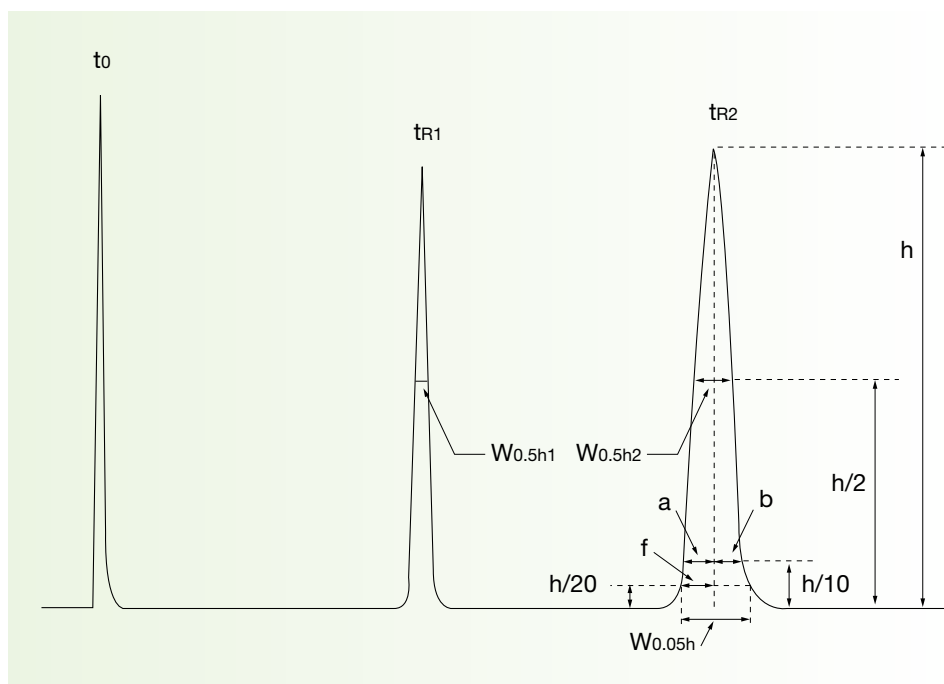
# HPLC 溶出曲線の取り扱い

カラム性能を評価する基本的要素としては、カラム効率や溶質の保持・分離特性、ピーク形状やカラム圧力などが挙げられます。ODSをはじめとする分配クロマトグラフィーのワイエムシにおける溶出曲線の取り扱いを示しました。

カラムの性能を評価するうえで最も大切な特性であるカラム効率は、一般に理論段数の測定によって評価されます。通常は半値幅を用いて計算されます。ある保持時間におけるピークの幅が狭いほど、理論段数は高い値を示します。カラムが長くなるほど、また充填剤粒子径が小さくなるほど、この理論段数は大きな値を示す傾向があります。ただし同じカラムであっても、溶出条件や溶質の構造によっては理論段数が同じ値になるとは限りません。これは線流速と溶質のカラム内拡散の関係、あるいは溶質や移動相と固定相の相互作用が原因となるためです。

溶質の固定相に対する保持・分離挙動は、保持係数や分離係数などで評価されます。これらの値は固定相の特性を表す指標でもあり、保持時間とは違って、基本的にはカラムの内径や長さに依存しません。

溶出ピークの形状もカラム性能を評価するための重要な要素です。比較的簡単な処理方法としてはテイリング係数があります。ピーク高さの5%点における計算が一般的です。

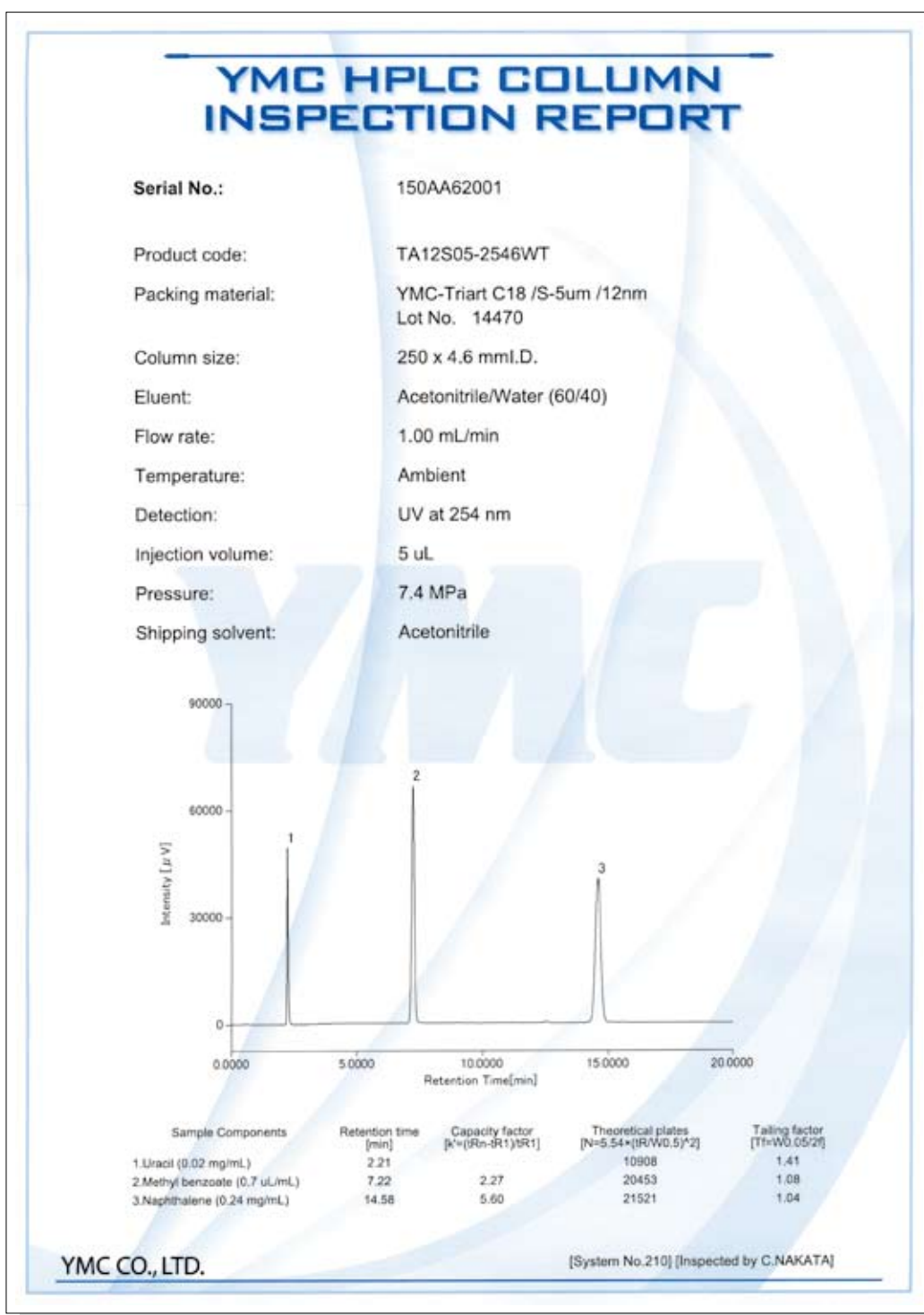


<b>t<sub>0</sub></b>	ボイドボリューム、非保持時間、Void volume, Column dead-time	
<b>t<sub>R</sub></b>	保持時間、Retention time	
<b>h</b>	ピーク高さ、Peak height	
<b>W<sub>0.5h</sub></b>	半値幅、Bandwidth at half-height	
<b>N</b>	理論段数、Theoretical plate number	$N=5.54 \times (t_R/W_{0.5h})^2$
<b>k'</b>	保持係数、Retention factor	$k' = (t_R - t_0) / t_0$
<b>α</b>	分離係数、Separation factor	$\alpha = k'_2 / k'_1$
<b>R<sub>s</sub></b>	分離度、Resolution	$RS = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0.5h1} + W_{0.5h2})$
<b>A<sub>s</sub></b>	非対称係数、Asymmetry factor	$As = b/a$
<b>Tf</b>	テイリング係数、Tailing factor	$Tf = W_{0.05h} / 2f$

# 検査成績書について

ワイエムシィではすべての充填剤の特性に関して品質管理を実施し、batch-to-batchの再現性を得ています。この他column-to-columnの保証を行うために、基本的にすべてのカラムの性能を検査し、個々の規格をクリアした製品のみを出荷しています。その一例として、カラム出荷時に添付されている検査成績書を示しました。

出荷検査条件による分析は、ひとつのカラム性能評価方法であるとともに、カラムの寿命を判断するための有用な検査方法でもあります。ワイエムシィでは、カラムユーザーが購入カラムの劣化状態を評価するときの利便性を考慮し、主な製品の検査成績書には試料濃度も含めたすべての分析条件を記載しています。



カラム選択の  
てびき  
カラム分離用  
カラム充填剤  
カラム交換  
カラム拍体  
SEC用カラム  
有機シリカハイ  
ブリッドカラム  
コアシェル  
カラム  
汎用分析用  
カラム ODS  
汎用分析用  
カラム 逆相系  
汎用分析用  
カラム 順相系  
ナノマイクロ  
LC用カラム  
脂肪酸分離用  
カラム充填剤  
分取用カラム  
SEC用カラム  
バルク充填剤  
サンプリング処理  
アクセサリ  
分取システム  
フロー反応器  
テム周辺機器  
受託精製  
取扱製品

## 登録商標について

- ・ SUMICHIRALは株式会社住化分析センターの登録商標です。
- ・ MCIは三菱ケミカル株式会社の商標です。
- ・ 本カタログに記載されている製品名は一般に各開発メーカーの登録商標あるいは商標です。

なお、本文中ではTM、(R)マークは明記しておりません。

MEMO

MEMO