

# 14

## インフォメーション



カラムの取り扱い	236
ODSの移動相	237
HPLC溶出曲線の取り扱い	238
検査成績書について	239
FAQ	240,241
トラブルシューティング	242,243
登録商標について	244

# カラムの取り扱い

## 1 はじめに

YMC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きますようお願いいたします。

## 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。使用する溶離液との混和性に注意してください。また、カラムを長期間保存する場合には、出荷時封入溶媒で置換してください。

## 3 溶離液

- ・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、逆相併用可能ですが、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15MPa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います。n-ヘキ

- サン、クロロホルムなどを基本として、極性成分の溶出を早めるためには2-プロパノール、酢酸エチルなどを適宜加えてください。
- ・アミノカラム (Polyamine II, NH<sub>2</sub>) 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。
- ・通液はカラムラベルに示された矢印の方向に行います。
- ・溶離液として使用可能なpHの範囲は製品によって異なります。カラムに添付の使用説明書をご覧ください。使用説明書がお手元にない場合はお問い合わせください。

## 4 溶離液置換および洗浄 (一般的方法)

### (A) 逆相カラム

- ・緩衝液や塩類を含まない溶離液の場合、溶離液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場合、これらを含まない水/有機溶媒混合液 (溶離液と同等比率) で置換してください。50mM程度の緩衝液や塩類であれば約60%アセトニトリル水溶液で直接置換できます。
- ・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/有機溶媒混合液もしくは約60%アセトニトリル水溶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、一般的には溶離液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

- ・溶離液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、アルカリを含む溶離液を使用した場合は、酸、アルカリを含まない溶媒に置換した後 [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)] 保存してください。

## 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はカートリッジホルダーとガード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4.0mmのガードカートリッジは内径4.0~6.0mm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をお奨めします。

## 6 その他の環境

- ・カラム圧力は長さ150mm以下が20MPa程度、250mmが25MPa程度を上限としてください (ポリマー基材のカラムは除く)。ただし、内径が10mm以上のカラムは10MPa程度を上限の目安としてください。YMC-UltraHTシリーズについてはカラムに添付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。試料はあらかじめYMC Duo-Filter (0.2μm) などでろ過してください。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。
- ・逆相カラム、SILカラムについては、カラム温度は50℃を上限としてください。ただし、溶離液のpHなどの条件によってはカラム寿命に影響をおよぼす場合があります。通常は20℃から40℃の間で使用してください。逆相カラム、SILカラム以外のカラムの使用温度についてはカラムに添付の使用説明書をご覧ください。

## 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、溶媒どうし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pH4.6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20mM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50～100mM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ですから、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は、移動相置換に時間がかかりすぎるとか、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存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、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、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。

NEW PRODUCTS

ODS 汎用分析カラム

逆相系 汎用分析カラム

順相系 汎用分析カラム

HPLC用 逆相系カラム

HPLC用 逆相系カラム

HPLC用 逆相系カラム

HPLC用 逆相系カラム

分取用カラム

YMC \* GEL 充填剤

サンプル前処理・アクセサリ

分取装置・マイクログラフ

委託業務

取扱製品

14

1-237-1-22 インデックス

237

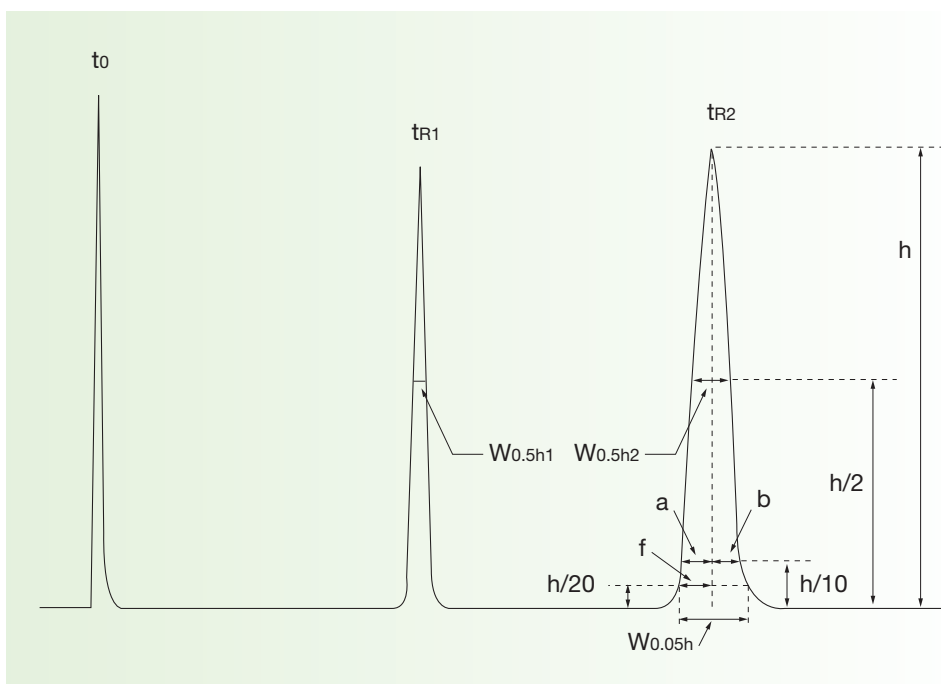
# HPLC 溶出曲線の取り扱い

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のYMC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。

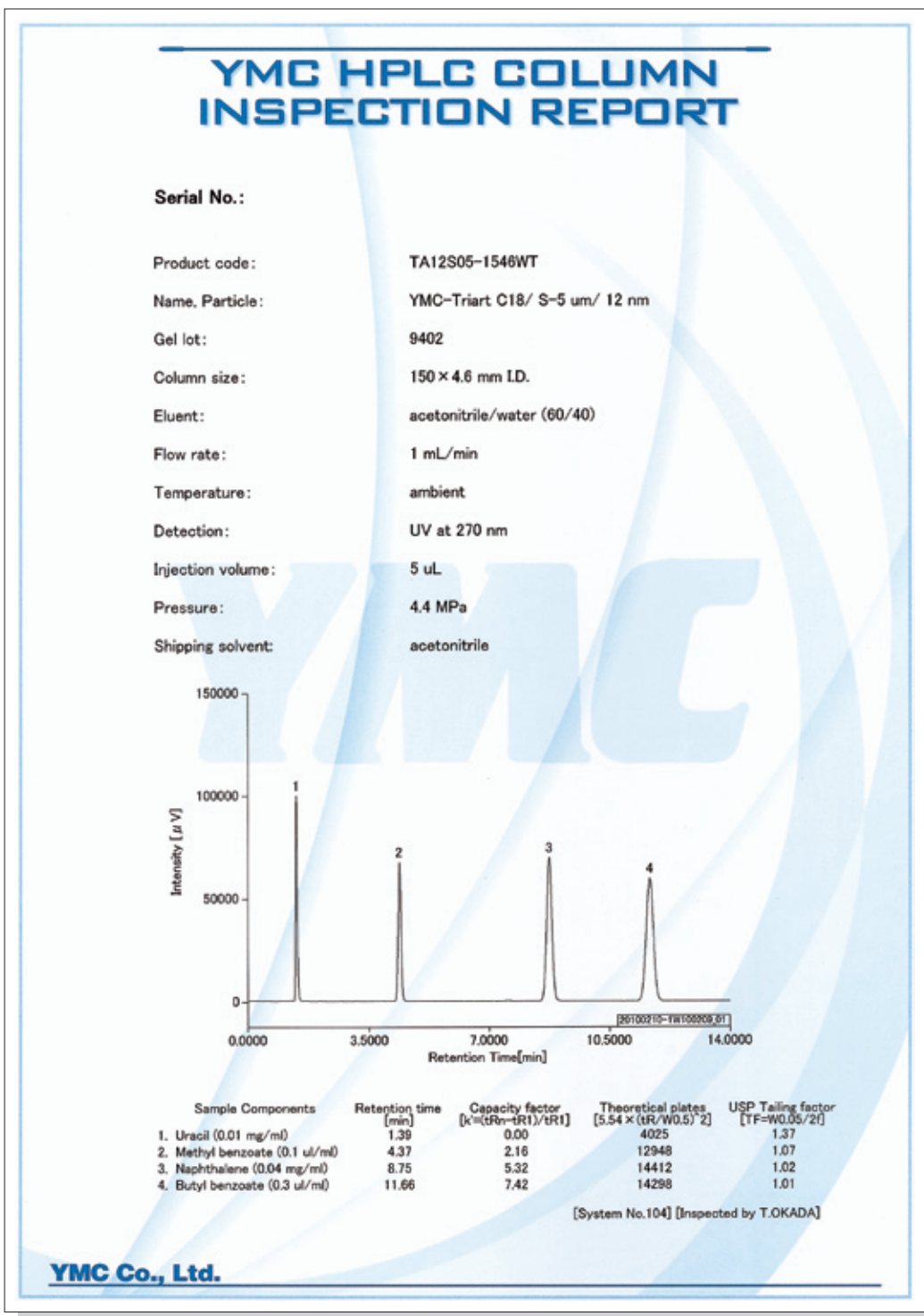


<b>t<sub>0</sub></b>	ボイドボリューム、非保持時間、Void volume, Column dead-time	
<b>t<sub>R</sub></b>	保持時間、Retention time	
<b>h</b>	ピーク高さ、Peak height	
<b>W<sub>0.5h</sub></b>	半値幅、Bandwidth at half-height	
<b>N</b>	理論段数、Theoretical plate number	$N=5.54 \times (t_R/W_{0.5h})^2$
<b>k'</b>	保持係数、Capacity factor	$k' = (t_R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

# 検査成績書について

YMC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の保証を行なうために、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。YMC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。



NEW PRODUCTS  
 ODS 汎用分析カラム  
 逆相系 汎用分析カラム  
 順相系 汎用分析カラム  
 HPLC用 極性カラム  
 パイロマテリヤル 光学異性体分離用カラム  
 脂肪酸分析用 分取用カラム  
 YMC GEL サンプル前処理・マイクロリアクタ  
 受託業務  
 取扱製品

## 充填剤の基本的な性質について

### Q YMCのODSカラムのそれぞれの違いは？

**A** YMCには12種類のODSカラムがあります。まず大きく分けるとハイブリッド基材を用いたYMC-Triart C18、シリカ基材を用いたProシリーズ、YMC-Pack ODSシリーズ、J'sphereシリーズとポリマー基材を用いたYMC-Pack PolymerC18となります。Triart C18はシリカ基材のカラムと比較して耐久性が高く、低圧で使用できるカラムです。シリカ基材を用いたカラムでは、Proシリーズはエンドキャッピング効率の面でYMC-Pack ODSシリーズ、J'sphereシリーズの上位シリーズに位置づけられます。それぞれのカラムの特長については、カラム紹介のページをご覧ください。

### Q YMC-Pack ODS-A、AM、AQそれぞれの違いは？

**A** ODS-AとAMは汎用型ODS、ODS-AQはAやAMよりも炭素含有率が低く、親水性化合物の分離に適した製品です。また、AとAMは基本的物性（基材、炭素含有率、分離特性など）は同じで品質管理基準がAMの方が厳しいという違いがあります。  
YMC-Pack ODS-A P.56,57 YMC-Pack ODS-AQ P.60,61  
YMC-Pack ODS-AM P.58,59

### Q 水100%移動相で使用できるODSカラムってあるの？

**A** あります。YMCでは「Hydrosphere C18」、「ODS-AQ」というカラムが水100%移動相で使用可能です。一般的なODSカラムでは水100%移動相を使用した場合、保持時間が短くなる現象が起こります。これは疎水性の大きな充填剤表面と水がなじみ難く、充填剤の細孔から水が抜け出すため起こると考えられます。一方、「Hydrosphere C18」、「ODS-AQ」はC18官能基の導入率を下げることによって、充填剤表面の親水性が大きく移動相との溶媒和を実現しているため保持時間の減少がほとんど起こりません。

### Q YMC-Pack Polyamine IIとPA-G、NH<sub>2</sub>それぞれの違いは？

**A** Polyamine II、PA-Gはポリアミンを化学結合したタイプ、NH<sub>2</sub>はアミノプロピル基を化学結合したタイプになります。そのため、耐久性の面でPolyamine II、PA-Gの方がNH<sub>2</sub>より優れています。また選択性にも若干の違いがあります。Polyamine IIとPA-Gは、結合しているポリアミンの構造が異なります。Polyamine IIはPA-Gの上位種に位置づけられ、耐久性が向上しています。

## カラムの取り扱いについて

### Q ガードカラムは付けたほうがいいのか？

**A** 夾雑物の多いサンプルを分析される場合は、ガードカラムの使用が有効です。メインカラムの寿命を延ばすことができます。ガードカラムはメインカラムと同じ充填剤のものを使用されることを推奨します。異なるガードカラムを使用するとピーク形状不良や再現性が得られないといった問題が生じることがあります。ガードカラムには、通常タイプの他にカートリッジタイプものがあります。頻りにガードカラムを交換される場合にはカートリッジタイプをお奨めします。また、ガードカラムはメインカラムの内径と同じか、やや小さいものを選択してください。

### Q カタログの“接続 (W)” ってなに？

**A** “接続 (W)” はウォーターズタイプの接続を意味しています。現在市販されているカラムのほとんどはこのタイプの接続です。ウォーターズタイプ以外では、島津タイプや日本分光タイプ、日立タイプといった種類があります。これらの違いはフェラルの先端から出ている配管部分の長さです。フェラル一体型のピーク製のオシネを使用している場合には問題になりませんが、ステンレス製の配管、オシネを使用されている場合は、配管とカラムのフィッティングがうまくいかず、液漏れ、ピーク形状不良を起こしたりします。ご使用のシステムがウォーターズタイプ以外の場合、接続変換アダプタを用いるか、フェラルを付け直す処置が必要です。

### Q カラムの使用可能pH、温度は？

**A** 使用可能pH範囲はProシリーズODSでpH2-8、それ以外のODS、C8、C4等の逆相系カラム、SIL、Polyamine II等の順相系カラムではpH 2.0-7.5になります。また、以下のカラムのように広いpH範囲で使用できるカラムもあります。  
YMC-Triart C18 pH1-12  
YMC-Pack Pro C18 RS pH1-10  
J'sphere ODS-H80 pH1-9  
YMC-Pack PolymerC18 pH2-13  
使用可能な温度の上限は50℃を目安としてください。推奨使用温度は20-40℃です。上述した使用条件に当てはまらないものもありますので、ご使用の際は使用説明書をご覧ください。

### Q カラムの性能をチェックするには？

**A** カラムの性能をチェックするには、購入時に添付されていた検査成績書と同じ条件で検査をしてください。保持時間、理論段数、ピーク形状等に異常がなければカラム性能に変化がなく、使用可能といえます。ただし、購入後数年経過したカラムではこの性能チェックで異常が見られなくても、イオン性化合物等では分離特性が変化している可能性があります。新しい分析メソッド開発の目的には使用しないでください。新しく購入したカラムで再現性が得られない場合があります。

### Q カラムの洗浄方法は？

- A**
1. 高疎水性の吸着物除去のための洗浄  
一般的に使用している条件よりも溶出力の強い溶媒で洗浄します。例えば逆相系の場合、有機溶媒の比率を上げた溶離液で洗浄します。カラム容積の10倍量程度を目安に通液してください。
  2. 充填剤表面状態復元のための洗浄（ピーク形状や保持時間に異常が認められるとき）  
シリカ系充填剤の場合、残存シラノール基の解離・非解離の状態によって分離挙動に影響を与える場合があります。これを復元するのに酸洗浄が有効な場合があります。0.1%リン酸水溶液/有機溶媒の混液（有機溶媒の比率は10～60%程度）で洗浄することによって、シラノール基を非解離の状態に戻すことができます。

### Q カラムの保管はどうしたらいいの？

**A** 長期間カラムを使用されない場合には、カラムに添付の検査成績書に記載されている出荷時封入溶媒に置換し、あまり高温にならない所に保管してください。また、短期間であっても塩や酸を含む移動相での保管は出来るだけ避けるようにしてください。カラム内の溶媒が揮発しないように、密栓をしっかり閉めるようにしてください。

## トラブル解決について

### Q カラムの圧力が上昇してしまった時の対処方法は？

- A** 1. フリットの目詰まりの場合  
カラム洗浄方法「1. 高疎水性の吸着物除去のための洗浄」に従い、逆フローで洗浄してください。このとき、カラム圧が高くなりすぎないように必要に応じて流速を下げてください。
2. 充填剤への吸着物による場合  
カラム洗浄方法「1. 高疎水性の吸着物除去のための洗浄」に従い、洗浄してください。1、2いずれの場合も圧力上昇がたびたび起こる場合は、試料の前処理やガードカラムの装着など圧力上昇の防止策をとってください。

### Q ゴーストピークが発生します。どうしたらいいの？

- A** 1. インジェクタの汚れ  
サンプルを注入せず移動相のみをインジェクションしてみてください。ゴーストピークが発生する場合、インジェクタを洗浄してください。
2. グラジエント分析時  
カラムに吸着した不純物が溶出力の強い溶媒組成になったとき、ゴーストピークとして検出されることがあります。カラムの洗浄方法「1. 高疎水性の吸着物除去のための洗浄」に従い洗浄してください。それでも改善されない場合は、溶媒の不純物が検出されている可能性があります。使用溶媒のグレードを上げたり、ミキサー前にガードカラムを付け不純物をトラップするといった処置をしてください。

### Q ピーク形状が悪いときの対処方法は？

- A** 1. 移動相条件が不適切  
サンプルがイオン性の化合物の場合、サンプルのpKaと移動相のpHが近いとピーク形状不良を起こします。移動相pHをpKaから離れた値に設定してください。
2. サンプル溶解溶媒の影響  
サンプル溶解溶媒が移動相と異なると、ピーク形状不良が起こる場合があります。その場合は、サンプル溶液を移動相で希釈するか注入量を少量にするといった処置をしてください。
3. サンプル注入量の過負荷  
サンプル注入量が過負荷の場合にもピーク形状不良が起こります。サンプル注入量を減らしてください。
4. 平衡化不足  
前回の分析がpH調整をした条件で、今回の移動相とpH差が大きいつきや、移動相の塩濃度が低いときなどは、カラムの平衡化に時間がかかる場合があります。
5. カラムの汚れ、劣化  
カラムの汚れが原因の場合、「1. 高疎水性の吸着物除去のための洗浄」に従い洗浄してください。劣化の場合は回復は不可能です。新しいカラムを購入してください。
6. システムの問題  
セミマイクロカラム使用時など、低流速で使用している場合、インジェクタからカラムIN側の配管や検出器セル内で拡散が生じ、ピークテイリングの原因となります。システムをセミマイクロ対応のものにすることが望まれます。

### Q イオンペア試薬を添加しても、保持が伸びない。なぜ？

- A** イオンペア試薬の濃度が高すぎるのが原因です。一般にイオンペア試薬の濃度が高いほど保持は大きくなりますが、イオンペア試薬の濃度が一定以上になるとミセルを形成するため、逆に保持が短くなる場合があります。イオンペア試薬の濃度は分析スケールで通常5mM～20mM程度で使用しますが、濃度が高くなるほど充填剤の劣化が早くなるためできるだけ低濃度に設定してください。

### Q カラムを乾燥させてしまったら？

- A** まず、通常の分析時より低い圧力（1/2以下）で溶媒（シリカ以外：MeOH、シリカ：ヘキサン）を流し、エアを抜いてください。エアが抜けきったことを確認したら、カラムに添付されている検査成績書の条件をトレースして性能チェックをしてください。

### Q 再現性がとれません。どうしたらいいの？

- A** 1. 移動相条件が不適切  
イオン性化合物の分析で、移動相のpHコントロールをしない、または移動相の塩（酸）濃度が低い場合、再現性が得られ難いことがあります。この場合は塩濃度を高めてください。移動相のpHがサンプルのpKa付近に設定されていると、移動相調整時の微妙なpHのずれで保持時間が大きく変動してしまいます。サンプルのpKaから離れた値に移動相のpHを設定してください。
2. システムの差異  
システムが異なると、クロマトグラムの再現が取れない場合があります。ポンプや検出器、インジェクタ等のメーカーが異なるとデッドボリュームが異なり、システム間でピーク形状の再現が取れない場合があります。また、カラム恒温槽のメーカーが異なる場合、同じ温度設定であってもカラムにかかる温度が異なり、保持時間などに影響することがあります。一連の分析は同一システムで分析されることをお奨めします。
3. カラムの使用履歴  
同じ種類のカラムでも、使用履歴が異なるとクロマトグラムの再現が取れない場合があります。例えばイオンペア試薬を含む移動相条件でカラムを使用していたり、疎水性の高い試料が吸着したりして充填剤の表面状態が変わってしまい、再現の取れないケースがあります。同一分析は同じカラムを使用されることを推奨します。
4. 水100%移動相の使用  
一般的なODSカラムの場合、水100%移動相を使用すると保持時間が短くなる現象が起こり、クロマトグラムの再現が得られません。この様な場合、現在当社より水100%移動相使用可能なカラムが販売されていますので、それらを使用されることを推奨します。YMCでは「Hydrosphere C18」、「ODS-AQ」というカラムが水100%移動相で使用可能です。
5. 移動相のグレードの違い  
移動相に用いる溶媒のグレードが異なると、クロマトグラムの再現が得られない場合があります。低グレードの溶媒に含まれている不純物が塩の動きをすることによって、クロマトグラムに影響を与える場合があります。使用する溶媒はHPLC用をお奨めします。

# トラブルシューティング

## 1 逆相クロマトに使用される有機溶媒のお話

逆相クロマトグラフィにおいてメタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等によく用いられる有機溶媒です。これらの有機溶媒はHPLCグレードが用意されているにもかかわらず、特級グレードを用いたことにより貴重な時間を無駄にしてしまった。というトラブルを耳にすることがあります。このグレードの違いはどのような差となって現れるのでしょうか？

～～メタノール・アセトニトリルの場合～～

特級グレードはHPLCグレードと比べて紫外吸収を持つ不純物の量が多いため、グラジエント分析や微量分析の際には使用することが困難かと思われます。特に検出波長が短波長の場合はベースラインの安定性や検出感度に大きな差があらわれます。場合によっては

(検出波長によっては) 特級グレードでの分析も可能ですが、安定したクロマトグラムを得るためにはHPLCグレードの溶媒を使用することをおすすめします。

～～テトラヒドロフランの場合～～

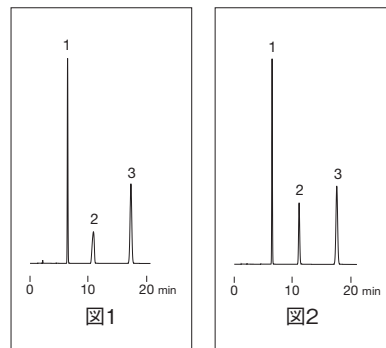
テトラヒドロフランは過酸化物を生じ易いため、通常酸化防止剤が添加されています。この酸化防止剤はゴーストピークの原因となるため、HPLCでは酸化防止剤を含まないものを使用する必要があります。また、テトラヒドロフランに含まれる過酸化物等もベースラインの安定性に大きく影響するため(グレードの差は他の有機溶媒より大きい)このような不純物含量の少ないHPLCグレードを使用することをおすすめします。

## 2 溶離液について

HPLC分析でデータのトレースができないときはカラムに原因があると考えがちですが、装置のメンテナンス不足などカラム以外に原因がある場合も多くあります。ここでは使用する溶媒のグレードの違いがピーク形状に影響する例を紹介いたします。アセトニトリル/水を溶離液にして塩基性化合物を分析したクロマトグラムを示します。ピーク2が塩基性化合物です。

図1はHPLC用のアセトニトリルを、図2は特級のアセトニトリルを使用した場合で、その他の条件は同一です。HPLC用のアセトニトリルではブロードであったピーク形状が、特級のアセトニトリルでは良好になっています。また、特級のアセトニトリルではメーカーによってもピーク形状に差が認められました。この原因はアセトニトリルに含まれる微量の不純物が溶離液に添加する塩と同様の動きをしているためだと考えられます。溶離液をアセトニトリル/5mM酢酸アンモニウムに変更すると、特級、HPLC用いずれのアセトニトリルを使用しても図2のようなクロマトグラムが得られました。

このような溶媒のグレードの違いの影響を避けるためにHPLC用の溶媒を用いる必要があります。また、解離基を持つ化合物でも酸や塩を含まない溶離液で分析できる場合もありますが、再現性を重視する場合は塩などを含む溶離液を使用するようにしてください。



## 3 ピーク形状の異常

HPLCで比較的良好に起こるトラブルにピークのテリングやピーク割れなどのピーク形状の異常があります。

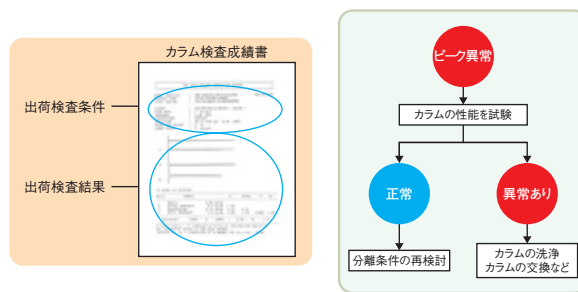
このような問題を解決するためには、原因を的確に判断する必要があります。原因の多くは、カラムや溶離液の選択など分離条件が適切でないか、あるいはカラムに隙間が発生しているなどのカラムの異常と考えられます。ここでは、どちらに原因があるのかを確認する方法を紹介いたします。

最も簡単な方法は、カラムに添付されているカラム検査成績書に記載の「出荷検査条件」によりカラムの性能を試験することです。この試験においてピーク形状に異常がなければ、分離条件が適切でないためにピーク異常が起きていると考えられます。溶離液などの分離条件を再検討する必要があります。

一方、前述の試験においてピーク異常が認められた場合にはカラムに異常があると考えられます。カラムの洗浄(カラムへの不純物の蓄積が予想される場合)や、交換が必要です。カラムの劣化による

分離時のトラブルを未然に防ぐために、定期的に一定の条件でカラムの性能を試験することをおすすめします。

YMCではお客様が購入カラムの性能を試験するときの利便性を考慮し、主な製品のカラム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。



## 4 カラムの圧力が上昇したら

HPLCのトラブルのひとつに圧力上昇があります。ここでは、逆相分離における圧力上昇時の対処法を紹介します。

圧力上昇が発生したら、カラムをはずして通液し、ライン圧を確認してください。ライン圧が高い場合は、配管等に詰まりがあると考えられます。ライン圧に問題がなければ、カラムの圧力が高くなっていると考えられます。カラムを洗浄してください。逆フローでの洗浄が効果的です。一般的には有機溶媒の組成比を上げて洗浄しますが、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洗浄溶媒としてください。逆相分離では試料中の蛋白質が充填剤に吸着し

て圧力上昇を起こすことも多くあります。このような場合は、有機溶媒で洗浄するよりも0.1% TFAを含むアセトニトリル/水のグラジエント法による洗浄が有効です。試料中の不溶物や分離時の試料の析出が原因と考えられる場合は、カラムのフリット（フィルタ）の洗浄や交換が有効な場合もあります。

しかし実際には、カラムの圧力が一度上昇すると洗浄しても回復困難な場合が多いのが現実です。試料のろ過はもちろん除蛋白などの前処理や、ガードカラムの使用など、カラム圧力の上昇を防止することが望まれます。

## 5 ゴーストピークの原因

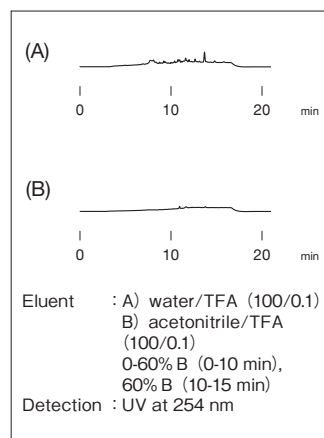
グラジエント分離の検討過程で試料を注入していないブランクランで図の(A)のように無数のピークが認められる現象がありました。カラムを取り外して同様の操作を行うと(B)のようにゴーストピークは認められません。したがって、カラムに原因があると考えられます。

しかし、カラムを洗浄しても、交換しても改善されません。そこで、カラム以外の要因を検討したところ溶離液の調製に使用している水が原因であることが判りました。間違えて通常の蒸留水（HPLC用でないもの）を使用していたため、HPLC用の蒸留水に変更するとカラムの有無に関わらず(B)のようなベースラインが得られました。

このように、グラジエント溶出では水の純度がベースラインに影響します。また、HPLC用の蒸留水であっても開封（購入）後、日数が経過すると汚染され、やはりゴーストピークの原因となります。アイソクラティックでは問題にならない場合でも、グラジエントではトラブルが起こる可能性があります。グラジエント溶出では有機溶媒

の組成比が低い条件でカラムを初期化するので、この時、溶離液中の不純物がカラムに吸着して濃縮されます。分析を開始して、有機溶媒の組成を上げていくと吸着されていたものが溶出してゴーストピークとなります。ゴーストピークの大きさは初期化の時間が長いほど大きくなります。カラムを装着しない場合に、ゴーストピークが認められなかったのは初期化時に吸着、濃縮が起らないためです。

グラジエント分析では溶媒のグレードや管理に特に注意してください。

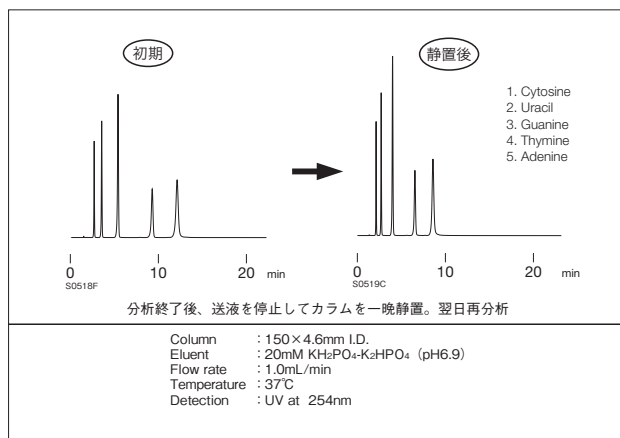


## 6 カラムの再生について

逆相HPLCでは、カラムが劣化するとピーク形状が悪くなったり保持時間が短くなったりします。カラムの劣化はC18などの官能基が脱離したり、基材のシリカゲルが溶解するなど充填剤が化学的に変化するために起こります。したがってこのような状態のカラムを再生して使用することは困難です。

ところで、ODSカラムにおいて有機溶媒を含まない水100%溶離液を使用する場合、図のように化合物の保持が急激に減少することがあります。このように保持時間が短くなってしまうと、カラムの劣化だと考えられる方も多いと思います。しかし、実際はカラムの劣化ではなく、疎水性の大きいC18官能基が結合した充填剤表面と溶離液の水との極性の差が大きいため、充填剤表面が溶媒とされにくく、充填剤の見かけの疎水性が小さくなり保持時間が減少していると考えられます。この場合、有機溶媒を50%以上含む溶離液をカラム容量の10倍程度通液することで簡単に初期の保持時間に回復させることができます。これは、溶離液とC18官能基の反撥が小さくなって溶媒和しやすくなるためと考えられます。水100%溶離液の

使用において保持時間の減少が見られた場合には有機溶媒/水の混液を通液してカラムの再生を試みてください。

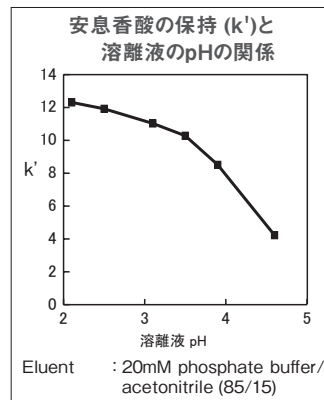


## 7 溶離液のpH設定

逆相HPLCでイオン性化合物を分析する場合、酸や緩衝剤で溶離液のpH調整をおこないます。しかし、化合物に対して不適切なpH範囲で分析をおこなうと、ピーク割れやブロードニングなどのトラブルを引き起こす場合があります。また、ピーク形状に問題がない場合でも保持時間の再現性が得られない場合もあります。

右のグラフは安息香酸の保持と溶離液のpHの関係を示しています。溶離液のpHが2から3.5の範囲ではk'の変化が比較的小さいのに対して、pH3.5から4.5では大きく変化しています。安息香酸のpKaは4.2であり、pKa付近でk'の変化が大きいためです。溶離液のpHをこのようなk'の変動が大きいpKa付近に設定すると、溶離液pHのわずかな調整誤差が分離に影響して再現性のある結果が得られなくなる可能性があります。実際、溶離液のpHが0.1異なるだけで分離に影響することもあります。したがって、分析条件を

設定するにあたって、溶離液のpHはpKaから1以上離れたところに設定することが望まれます。pKaが判らない場合は、溶離液のpHと保持時間の関係を充分検討して、溶離液pHの分離への影響が小さいところに設定してください。検討過程では、分析条件として設定しようとしているpH付近で、pHをわずかに変えた溶離液を何種類か調整して分離への影響の有無を確認することも重要です。



NEW PRODUCT  
ODS  
逆相系  
順相系  
HPLC用  
新品カラム  
バッチマシナリ用  
光学異性体分離用  
脂肪酸分析用  
分取用カラム  
YMC GEL  
充填剤  
サンプル前処理  
アクセサリ  
分取装置  
マイクロリアクタ  
委託業務

14  
2015年12月  
インデックス

## 登録商標について

- POROSはApplied Biosystemsの登録商標です。
- HYPERDはCIPHERGEN Biosystems,inc.の登録商標です。
- SUMICHIRALは株式会社住化分析センターの登録商標です。
- MCIは三菱化学株式会社の登録商標です。
- 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)マークは明記していません。