19

インフォメーション

カラムの取り扱い ---------- 240
HPLC溶出曲線の取り扱い ---------- 241
検査成績書について ---------- 242
登録商標について ---------- 243

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きますようお願いします。

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Webサイト掲載の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。

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（このとき、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用します。*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_2）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。
・移動相として使用可能なpHの範囲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。

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。

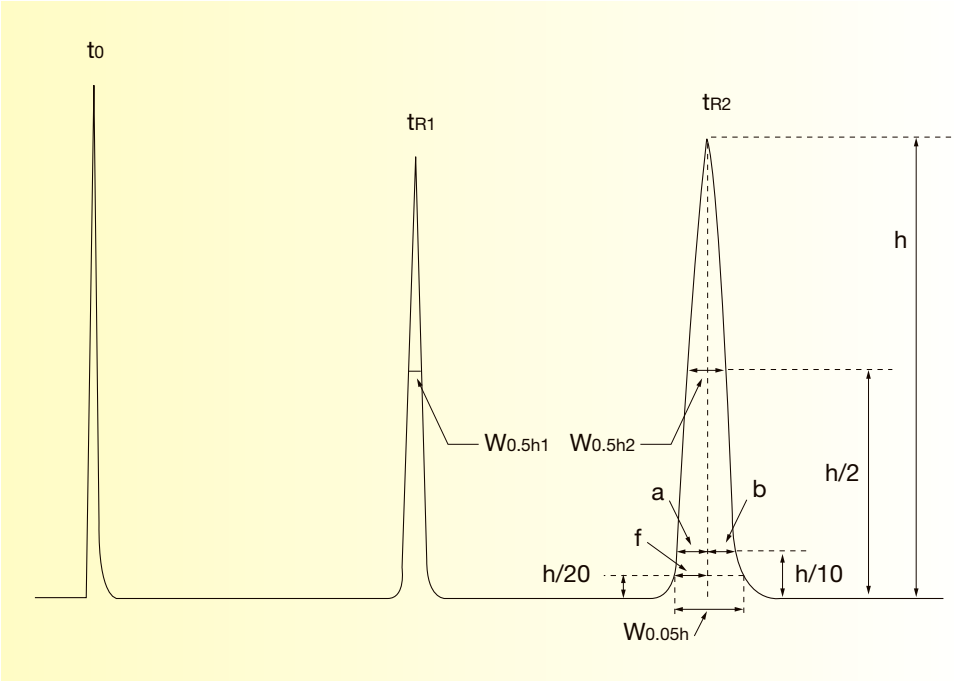
6 その他の環境

・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。試料はあらかじめYMC Duo-Filter（0.2 μm）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。

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。C18カラムをはじめとする分配クロマトグラフィーのワイエムシィ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。



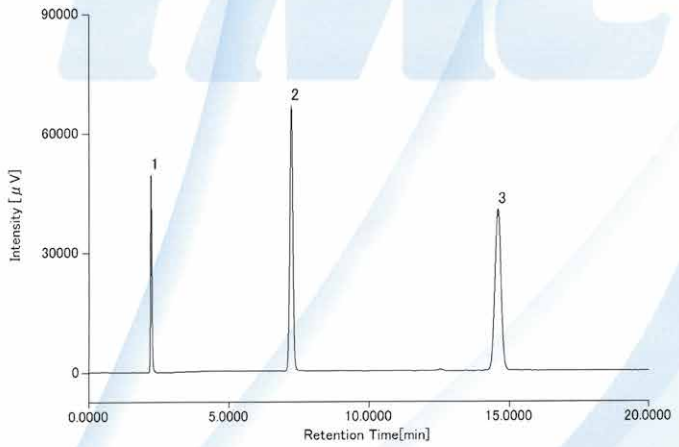
t_0	ボイドボリューム、非保持時間、Void volume、Column dead-time	
t_R	保持時間、Retention time	
h	ピーク高さ、Peak height	
$W_{0.5h}$	半値幅、Bandwidth at half-height	
N	理論段数、Theoretical plate number	$N=5.54\times(t_R/W_{0.5h})^2$
k'	保持係数、Retention factor	$k'=(t_R-t_0)/t_0$
α	分離係数、Separation factor	$\alpha=k'_2/k'_1$
Rs	分離度、Resolution	$Rs=1.18\times(t_{R2}-t_{R1})/(W_{0.5h1}+W_{0.5h2})$
As	非対称係数、Asymmetry factor	$As=b/a$
Tf	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。

YMC HPLC COLUMN INSPECTION REPORT

Serial No.:	150AA62001
Product code:	TA12S05-2546WT
Packing material:	YMC-Triart C18 /S-5um /12nm Lot No. 14470
Column size:	250 x 4.6 mmI.D.
Eluent:	Acetonitrile/Water (60/40)
Flow rate:	1.00 mL/min
Temperature:	Ambient
Detection:	UV at 254 nm
Injection volume:	5 uL
Pressure:	7.4 MPa
Shipping solvent:	Acetonitrile



Sample Components	Retention time [min]	Capacity factor [k'=(tRn-tR1)/tR1]	Theoretical plates [N=5.54×(tR/W0.5)^2]	Tailing factor [Tf=W0.05/2f]
1.Uracil (0.02 mg/mL)	2.21		10908	1.41
2.Methyl benzoate (0.7 uL/mL)	7.22	2.27	20453	1.08
3.Naphthalene (0.24 mg/mL)	14.58	5.60	21521	1.04

YMC CO., LTD. [System No.210] [Inspected by C.NAKATA]

登録商標について

・EXPはOptimize Technologies, Inc.の登録商標です。
・デルリン、テフロンはDuPont de Nemours, Inc.の登録商標です。
・MarvelXはIDEX Health & Science LLC の登録商標です。