

1) カラムの選択

1. C₁₈ カラムの選択

逆相クロマトグラフィー用カラムは優れた分離特性、高い理論段数、使いやすさ、優れたコストパフォーマンスなどにより、広く用いられています。その中でもアルキル基を結合した固定相であるオクタデシル基結合型シリカゲル(C₁₈、ODS)が最も使用されています。C₁₈ カラムは、シリカゲルの物性(シリカゲルの純度、細孔径など)の違いや化学修飾する際のシリル化剤の種類、合成法などの違いによって、性質の異なる充填剤ができるため、多くの種類が存在しています。

弊社コスモシルシリーズでは、異なった分離特性を持つ6つのC₁₈ カラムを用意しています。

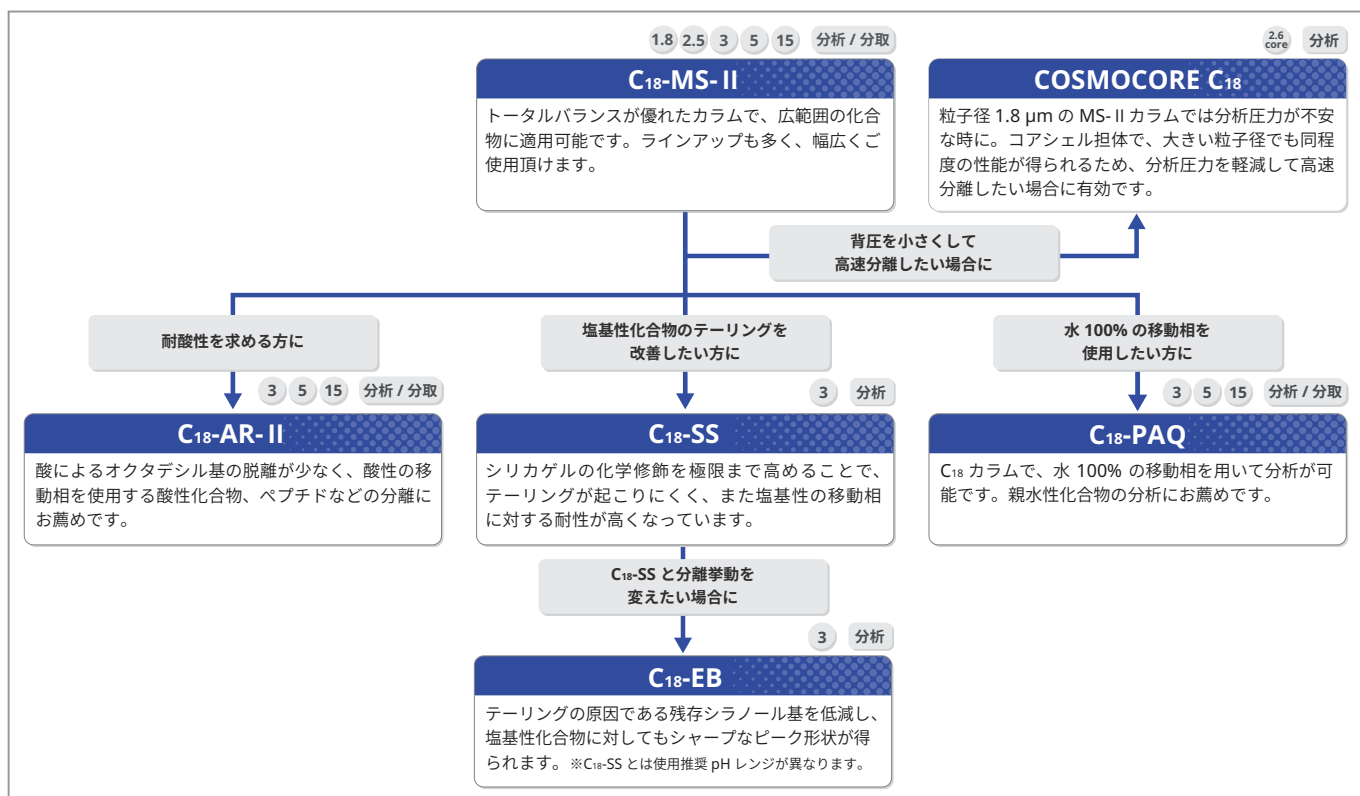


図1. コスモシルC₁₈ シリーズ

【COSMOSIL(コスモシル)について】

コスモシルは、ナカライテスクが販売している HPLC 用パッキドカラムのブランド名です。コスモシルは、逆相クロマトグラフィーで最も使用されている C₁₈ カラムをはじめ、さまざまな固定相カラムを幅広くラインアップしています。その中でも「分離不十分」と「保持が小さい」といった C₁₈ カラムの課題を解決でき、かつ C₁₈ カラムに近い感覚で使用できる製品を取りそろえているのがコスモシルの特長です。詳細は p. 59 をご参照ください。

● 固定相の結合形式について

一般的に C₁₈ といえばモノメリック型 C₁₈ カラムを指し、これは固定相であるオクタデシル基とシリカゲルの結合数が1個であることを示します。モノメリック型カラムは合成再現性に優れ、ロットのバラツキが少なく、また移動相の平衡時間が短いのが特長です。

一方、ポリメリック型 C₁₈ カラムは、固定相であるオクタデシル基がシリカゲルと2～3カ所で結合しています。このため、固定相の結合が切れにくく、モノメリック型カラムよりも耐酸性を有しています(図2)。

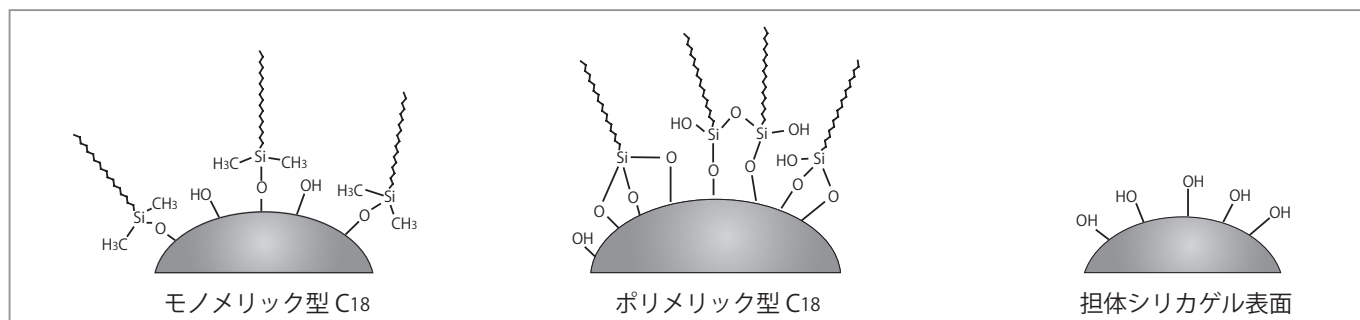


図2. 結合形式の模式図(エンドキャップ処理前)

2. C₁₈ 以外の固定相カラムの選択

C₁₈ カラムは、適応範囲が非常に広く、疎水性が異なる化合物に対して高い分離能を示します。しかし、C₁₈ カラムの分離は、疎水性相互作用が主となり、疎水性の異なる化合物を識別して分離するため、「疎水性に差がない化合物は分離不十分になりやすい」「疎水性が低い化合物は保持が小さい」という問題に直面することがあります。その時は、① 移動相条件の再検討、② 分離特性が異なる C₁₈ カラムの使用、③ 疎水性以外の相互作用を有するカラムの使用、などの対策が一般的に採られます。弊社では、特に ③ が最も有効な解決手段であると考えており、用途に合ったカラムを多種用意しています。詳細は p. 64 をご参照ください。以下にコスモシルシリーズの固定相構造によるカラム選択フローを示します。

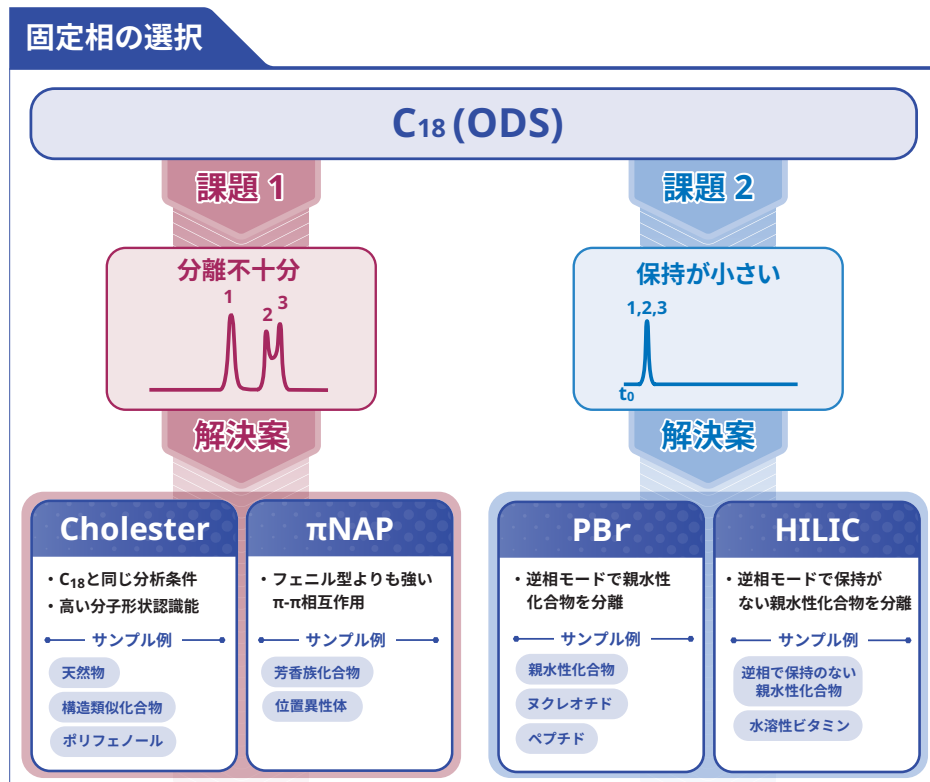


図 3. 固定相によるカラム選択フロー

3. 粒子径の選択

全多孔性球状シリカゲル充填剤の粒子径の主流は 5 μm ですが、高分離と高速分析を追求して 3 μm や、さらに微粒子である sub-2μm が販売されています。粒子径を小さくすることで分離の向上や、カラム長と移動相の流速との組み合わせで分析時間の短縮が可能になります。また、近年では、全多孔性球状シリカゲル充填剤の sub-2μm カラムに相当する分離能を有しながら、比較的低い圧力で使用できるコアシェル型シリカゲル充填剤も販売されています。コスモシルシリーズにおいても、さまざまな粒子径を用意していますので、以下の選択フローに従い、用途に合わせてお使いいただけます。

*sub-2 は 2 μm 以下を指します。具体的には、通常は 1.7 ~ 1.8 μm などの粒子径が使用されます。



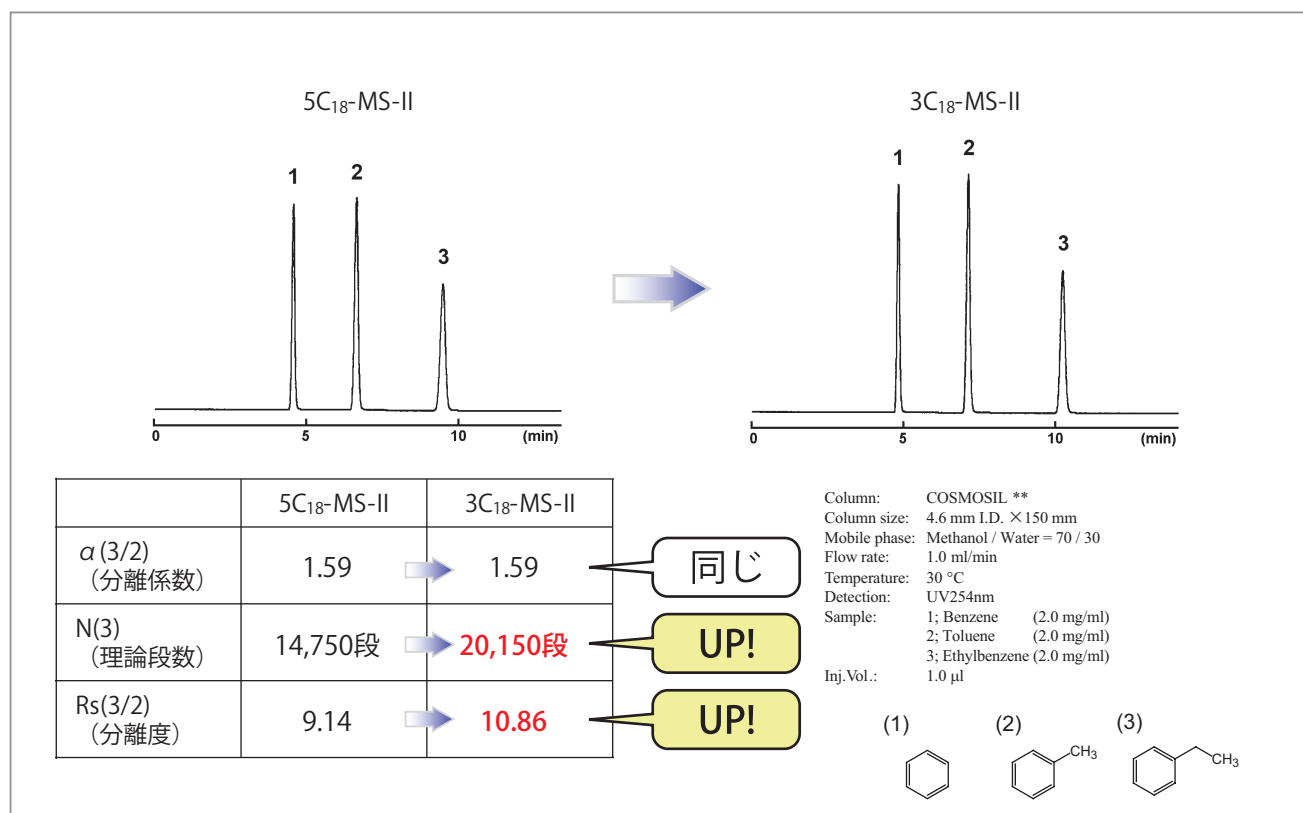
図 4. 粒子径によるカラム選択フロー

03 分析条件の設定

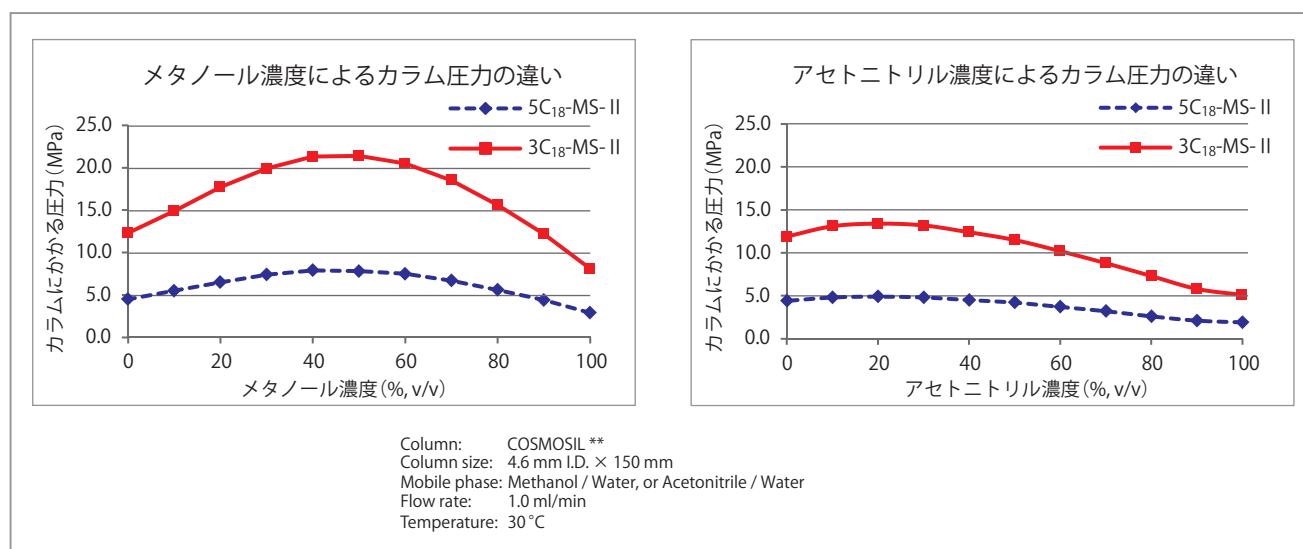
● 分離の向上

粒子径 3 μm のカラムは、広く用いられている粒子径 5 μm のカラムと比較して、高分離な結果が得られます。粒子径が小さくなると、分離係数(α)は同じですが理論段数(N)が大きくなるため、分離度(R_s)の値が良くなります。

※分離係数、理論段数、分離度 (p.5 参照)



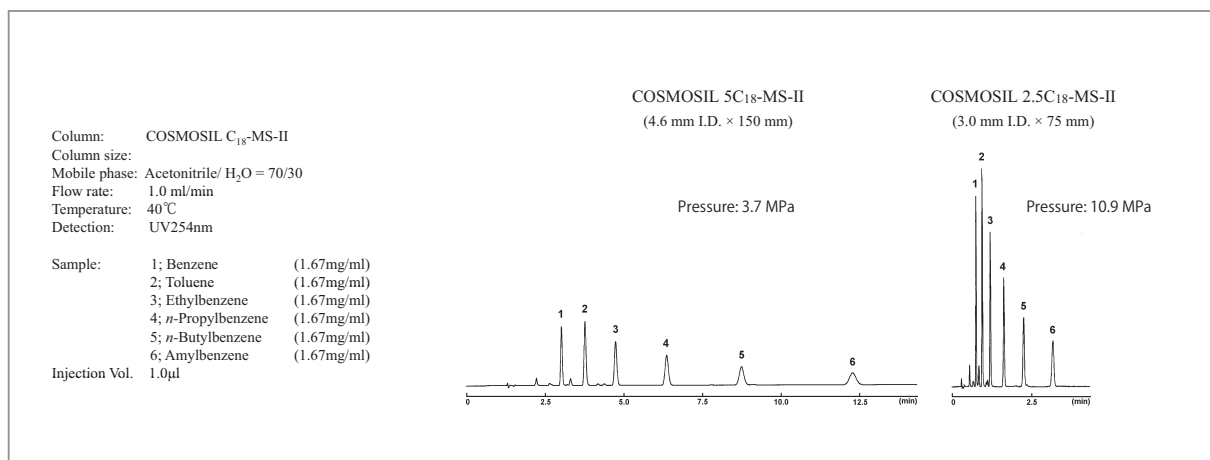
粒子径を小さくすると、同じカラムサイズ・同じ流速では、分析圧力が高くなります。しかし粒子径 3 μm では、カラム長が 150 mm であっても高圧対応の分析装置(耐圧: 100 MPa 以上など)を用いる必要はなく、通常の分析装置(耐圧: 20 ~ 30 MPa)をご使用いただけます。※装置の耐圧上限にご注意ください。



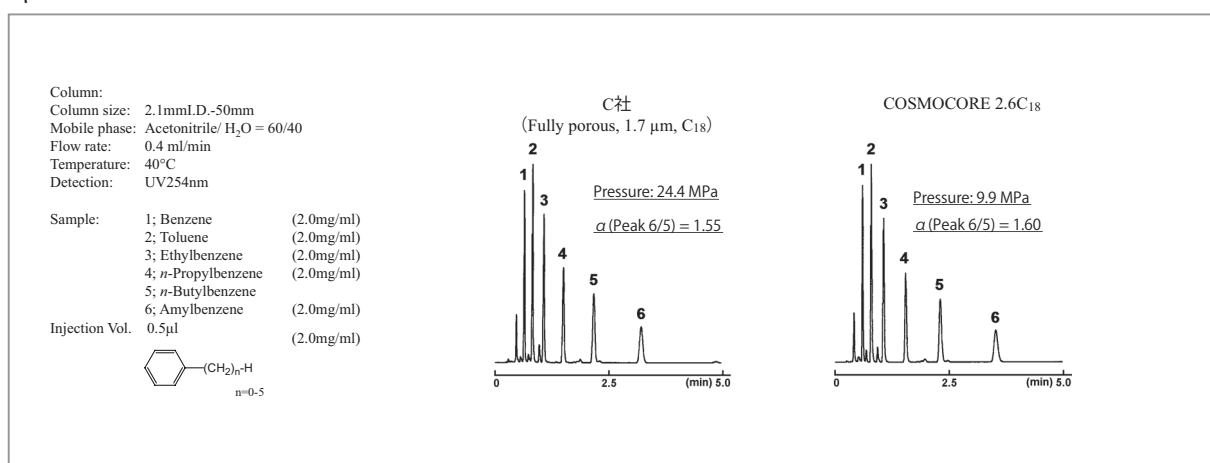
03 分析条件の設定

● 分析時間の短縮

充填剤の粒子径を微小化すると短いカラムでも同等の分離性能が得られ、分析時間を短縮することができます。コスモシル C18-MS-II カラムを用いて、粒子径を 5 μm から 2.5 μm へ、またカラム長を 150 mm から 75 mm へと変更した例を以下に示します。同等の分離性能で、大幅に分析時間が短縮できています。



sub-2 μm カラムと呼ばれる粒子径 2 μm 以下の微粒子充填剤を用いたカラムを使用することで、さらに高速化・高分離化を実現することもできます。しかしながら、粒子径を小さくしたことで圧力が上昇し、HPLC ではなく UHPLC* 装置が必要になります。このような場合には、全多孔性球状シリカゲル充填剤ではなく、粒子径 2.6 μm の Core-Shell 型シリカゲル充填剤を使用することで、圧力が抑えられ、汎用 HPLC 装置を使用したままでも、sub-2 μm カラムに相当する分離能を同様の分析時間で得ることが可能です。



* UHPLC (超高速液体クロマトグラフィー) は、粒子径 2 μm 前後の微粒子充填剤を用いたカラムを使用することにより、高速化、高分離化を実現した液体クロマトグラフィーです。弊社では、全多孔性球状シリカゲル充填剤を用いたコスモシル 2.5 μm シリーズと、コアシェル型シリカゲル充填剤を用いたコスモコア 2.6 μm シリーズをラインアップしています。

2) C₁₈ カラムの移動相条件設定

1. はじめに

逆相クロマトグラフィーで分析を行うための条件を設定する際には、文献や、メーカーが提供する分析例を参考にしたり、経験に基づいて条件設定が行われています。

ここでは、以前から一般的に行われている分析条件の設定法と、あらかじめ構造式が判明しているサンプルを分析する際に、その構造式より分析条件を設定する、簡易条件設定法を示しました。ただし、この方法は、目的化合物がある程度保持され、比較的短時間(30 分以内)で溶離できる移動相中の有機溶媒濃度を推定するためのものであり、最適の分離条件を決定できるものではありません。

なお、今回の分析条件設定には、分析用カラムとして最も一般的である C₁₈ カラムを使用しました。

充填剤 : COSMOSIL 5C₁₈-MS-II、COSMOSIL 5C₁₈-AR-II

カラムサイズ: 内径 4.6 mm、長さ 150 mm

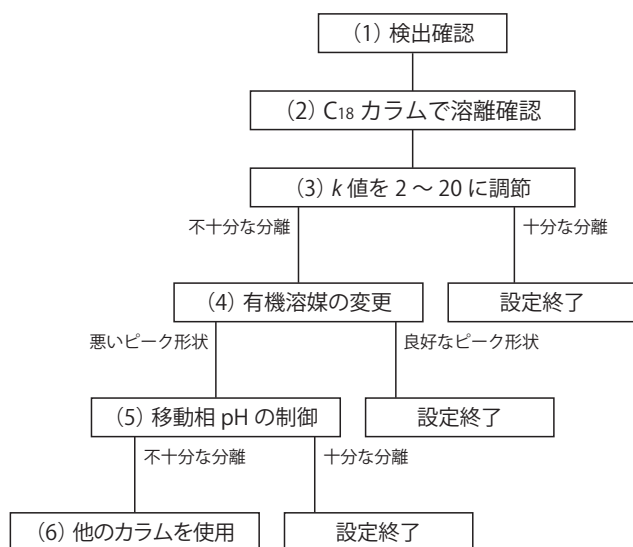
2. 分離条件の設定法

液体クロマトグラフィーは、移動相組成を変化させずに溶離を行う「イソクラティック溶離法」と、分析中に移動相の有機溶媒含量を変化させる「グラジエント溶離法」が用いられます。どちらにおいても再現性を保つためには、移動相の一定した調製方法、カラムの温度制御が必要です。

● イソクラティック溶離法

一般的な逆相クロマトグラフィーにおける分離条件の設定は、次のように行われています。まず、溶離力の強い溶媒を移動相に用いてサンプルを溶離し、サンプルが検出できるか確認してから、保持の大きさを調節して分離を行います。保持の大きさは移動相組成を変化させて調節します。このとき、溶離力の強い有機溶媒濃度を増加すると保持は小さくなり、減少させると保持は大きくなります。酸やアミン類などイオン解離性のサンプルを分析する場合、緩衝液での pH 制御が必要になります。サンプルがイオン化する pK_a 付近の pH で、保持が急激に減少することを利用するイオン化制御法と、サンプルがイオンとして存在している pH において、イオンペア試薬(塩基性化合物に対してはアルキルスルホン酸塩、酸性化合物に対しては四級アンモニウム塩など)を移動相中に添加してサンプルとイオン対を形成させるイオン対クロマトグラフィー法とがあります。

分析条件の設定手順(例)



- (1) 溶離力の強い移動相を使用して、サンプルが検出可能か確認します。このとき、カラムの代わりにユニオン(p. 10 参照)を接続しても検出可能か確認することができます。
- (2) 文献やサンプルの炭素数を参考に、溶離力が強めのメタノール / 水系移動相、C₁₈ カラムで溶離するか確認します。
- (3) メタノール含有量を調節して、k 値を 2 ~ 20 として分析を行います。
- (4) 分離が不十分であれば、移動相とする有機溶媒をアセトニトリルにするか、テトラヒドロフランを移動相中に添加して、選択性に变化を与えます。
- (5) 塩基性化合物などで、ピーク形状が悪い場合(テーリングなど)、移動相に緩衝液を添加して、pH を制御します。
- (6) 移動相の調節で良好な分離が得られない場合、カラムをほかの C₁₈ 系充填剤か他種の充填剤(アルキル系充填剤、芳香族系充填剤など)に変えます。

この方法では(3)~(5)の段階で経験に頼ることが多く、分析条件の設定は手間のかかる作業となります。

● グラジエント溶離法

グラジエント溶離法は、移動相の有機溶媒含有量を(連続的に)変化させる溶離法です。サンプルの疎水性や分子量が広範囲でサンプル全体の溶出時間が長すぎる場合や、わずかな有機溶媒含有量の差で保持が大きく変化する場合は分離時間の短縮に有効で、ペプチドなど高分子量の化合物の分離には欠かすことのできない溶離法です。この方法は、逆相クロマトグラフィー系の平衡化が極めて速いことを利用していますが、示差屈折検出器は使用できないという問題点もあります。この溶離法の設定には経験に頼る部分が大きいため、ここでは省略します。

3. 簡易条件設定法

逆相クロマトグラフィーには、順相クロマトグラフィーの条件設定に利用されている薄層クロマトグラフィーのような簡便な分離条件の設定法がありません。そのため、特に移動相組成(有機溶媒濃度)の決定について、試行錯誤を繰り返すことになりがちです。

ここでは、分析対象化合物の構造がすでに判明している場合に、移動相中の有機溶媒濃度を簡単に設定できる考え方を紹介します。

基本骨格の最適有機溶媒濃度 + 置換基の効果 = 分析対象化合物の最適有機溶媒濃度

● 条件設定

図5に示すような基本的な構造をもつ化合物(基本骨格)の保持時間を基準に、ヘテロ原子や置換基が保持時間に与える影響を考慮して条件設定を行います。

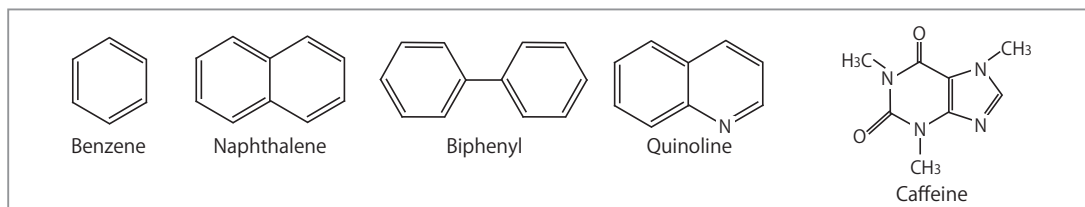
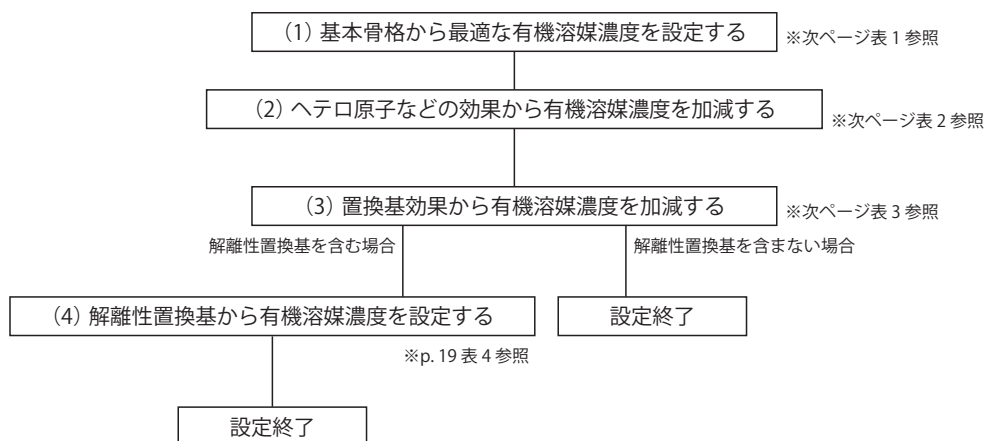


図5. 条件設定に用いる基本骨格の構造



03 分析条件の設定

- (1) まずはじめに、図 5(前ページ)から分析対象化合物の構造と類似する基本骨格を選びます。そして表 1 を参考に有機溶媒濃度を設定します。

表 1. 主な基本骨格となる化合物の保持時間

主な基本骨格となる化合物	カラム	各メタノール濃度でのおよその保持時間(分)						
		80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%
Benzene	5C ₁₈ -MS-II	—	4	7	11	20	—	—
	5C ₁₈ -AR-II	—	4	7	13	23	—	—
Naphthalene	5C ₁₈ -MS-II	5	8	18	—	—	—	—
	5C ₁₈ -AR-II	5	10	22	—	—	—	—
Biphenyl	5C ₁₈ -MS-II	8	13	—	—	—	—	—
	5C ₁₈ -AR-II	7	15	—	—	—	—	—
Quinoline	5C ₁₈ -MS-II	—	—	—	—	6	11	—
	5C ₁₈ -AR-II	—	—	—	—	8	17	—
Caffeine	5C ₁₈ -MS-II	—	—	—	—	—	4	9
	5C ₁₈ -AR-II	—	—	—	—	—	4	9

Column size: 4.6 mm I.D. × 150 mm

Flow rate: 1.0 mL/min

Detection: UV 254 nm

- (2) 次に、表 2 を参考に有機溶媒濃度を加減します。

表 2. 複素環、多環芳香族のときの有機溶媒濃度の加減

複素環、多環芳香族の種類		サンプル例	5C ₁₈ -MS-II	5C ₁₈ -AR-II
共役系の環	1 個	ベンゼンなど	+10%	+10%
	S1 個	チオフェンなど	±0%	±0%
複素環ヘテロ原子	O1 個	フランなど	-5%	-5%
	N1 個	ピリジンなど	-20%	-10%
カルボニル基	1 個	キノンなど	-5%	-5%
二重結合	1 個	—	-5%	-5%

- (3) 次に、表 3 を参考に置換基の種類によって有機溶媒濃度を加減します。

表 3. 置換基の効果

置換基	メタノール濃度の変化		置換基	メタノール濃度の変化
	5C ₁₈ -MS-II	5C ₁₈ -AR-II		
-F	0	0	-CH ₂ - (Alkyl-chain) 基本骨格の MeOH 濃度が	
-Cl	+10%	+10%		
-Br	+10%	+10%		
-I	+20%	+15%		
-CONH ₂	-40%	-40%		
-COCH ₃	-10%	-10%	100 ~ 90%	4 個で +10%
-COOCH ₃	0	0	90 ~ 80%	3 個で +10%
-OCH ₃	0	0	80 ~ 60%	2 個で +10%
-CHCH ₂ O	-10%	-10%	60% 以下	1 個で +10%
-CH ₂ OH	-30%	-30%	-Phenyl 基本骨格の MeOH 濃度が	
-OH	-30%	-30%		
-NO ₂	-10%	-5%		
-CN	-20%	-15%		
-NH ₂	-40%	-30%	100 ~ 90%	1 個で +5%
-SCH ₃	+10%	+10%	90 ~ 60%	1 個で +10%
			60% 以下	1 個で +20%

Column size: 4.6 mm I.D. × 150 mm

Flow rate: 1.0 mL/min

Detection: UV 254 nm

※置換基の位置によって効果が多少ずれることがあります。

03 分析条件の設定

- (4) さらに、解離性置換基をもつ化合物の場合、移動相の pH が保持に大きく影響するので、移動相の pH を一定に制御する必要があります。表 4 に酸性 (pH 2) と中性 (pH 7) での置換基が保持に与える影響を示しました。表 4 に示す量だけ移動相中の有機溶媒濃度を減少すると、保持時間はその置換基で置換されていない化合物の保持時間とほぼ同じになります。

表4. 主な解離性置換基の有機溶媒濃度に対する効果

解離性置換基	メタノール濃度の変化 (pH 2)	メタノール濃度の変化 (pH 7)
-COOH	-10 ~ -20%	-30 ~ -40%
-SO ₃ H	-20 ~ -40%	-30 ~ -40%
-PO ₄ H ₂	-20%	-50%
-BO ₂ H ₂	-20%	-20%
-NH ₂	(分子型)	-60%
	(環状アミン)	-50 ~ -60%
	(イオン型)	—
		-40 ~ -50%

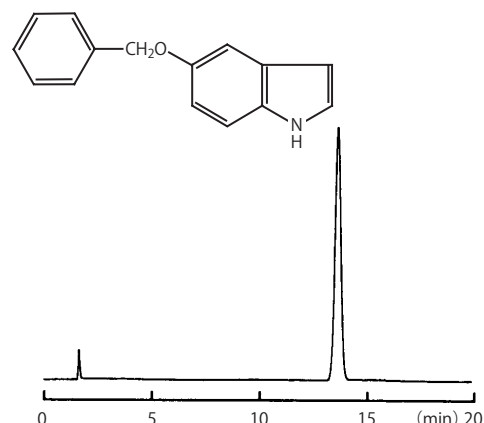
Column: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm
 Buffer: pH 2: 20 mmol/L H₃PO₄
 pH 7: 20 mmol/L H₃PO₄/Na₂HPO₄ = 2/3
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Detection: UV 254 nm

● 条件設定例

カラム: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm

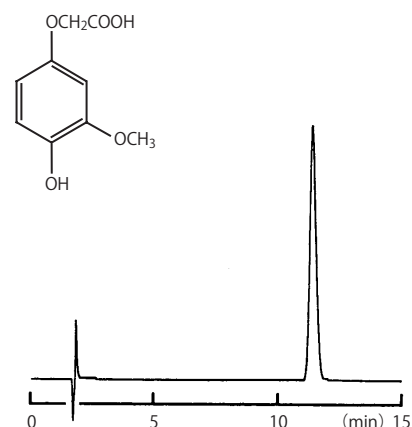
(1) 5-Benzyloxyindole

- 〈予測〉 基本骨格 Naphthalene 類似 + (複素環 N)
 = 70% + (-20%)
 = 50%
 置換基 (Phenyl) + (-OCH₂- は -OCH₃ と同等)
 = (+10%) + (+0%)
 基本骨格 + 置換基 = 50% + (+10%) = 60%
 のメタノール濃度が必要
 〈結果〉 60% メタノール (メタノール / 水 = 60 / 40)
 における保持時間 = 13.7 分



(2) Homovanillic Acid

- 〈予測〉 基本骨格 Benzene = 60%
 非解離性置換基 (-OH) + (-OCH₃) + (-CH₂)
 = (-30%) + (0%) + (+10%)
 = -20%
 解離性置換基 -COOH = -10 ~ -20% (pH 2)
 -30 ~ -40% (pH 7)
 基本骨格 + 置換基 = 酸性領域 (pH 2) で 30 ~ 20%
 中性領域 (pH 7) で 10 ~ 0%
 のメタノール濃度が必要
 〈結果〉 pH 2 のとき 30% メタノールにおいて
 保持時間 = 5.7 分
 20% メタノールにおいて
 保持時間 = 11.7 分
 pH 7 のとき 10% メタノールにおいて
 保持時間 = 4.0 分
 0% メタノールにおいて
 保持時間 = 12.1 分



※解離性化合物の保持予測では、分子固有の解離状態が保持時間に影響を及ぼすために算出した有機溶媒濃度に対して、実際には±10%程度の誤差を生じる場合があります。

03 分析条件の設定

3) メーカーから提供される既存データの分析条件の活用

メーカーが公開している分析例を参考にすることができます。弊社には以下の3種類があります。

1. COSMOSIL Application を参照する

COSMOSIL Application は、サンプル名・CAS RN®・サンプルのカテゴリー・カラム名から検索することができます。目的のサンプルがございましたら参考にしてください。(https://www.e-nacalai.jp/ec2/EC-CsmoSrchTop.cfm)
目的とするサンプルまたは類似化合物が見つからず、分析条件設定に困られた場合は、お問い合わせフォームをご利用ください。分析条件を提案させていただきます。

CAS RN は American Chemical Society の登録商標です。

● 検索方法

1 Web siteトップページ (https://www.nacalai.co.jp/)

3 COSMOSIL Application (分析例検索ページ)

5 分析例

2 COSMOSILトップページ

4 分析例一覧表示画面

6 e-Nacalai Search Version (オンラインカタログ)

2. 日本薬局方掲載薬物の分析例を参照する

日本薬局方解説書において HPLC 分析が規定されている薬物をコスモシルパックドカラムで分析したデータ集を作成し、Web ページ (https://www.nacalai.co.jp/products/chromatography/applications.html) で公開しています。薬局方試験のカラム選定の際はもちろんのこと、医薬品成分・生薬などの分析条件の検討にご利用ください。

3. 文献などで記載のあった条件を参照する

コスモシルはさまざまな学術文献に掲載されています。文献情報は各製品ページ (https://www.nacalai.co.jp/products/chromatography/) の「参考文献」をご参照ください。著作権の関係で弊社より文献をご提供することはできませんのでご了承ください。

4) 参考資料 カラム内径について

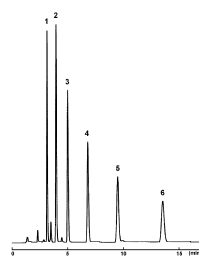
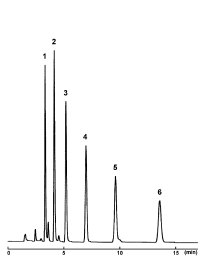
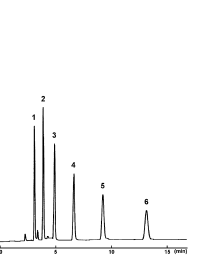
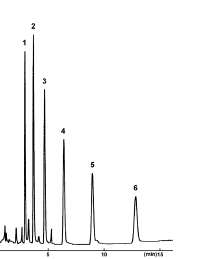
1. カラム内径および各種パラメーター

下表にカラム内径と、標準流速、使用装置、配管内径、用途、4.6 mm I.D. カラムとの面積比、推奨粒子径を、一覧にまとめました。最も使用されているカラム内径 4.6 mm からスケールアップ、スケールダウンされる場合の、サンプル負荷量、消費溶媒の概算などにご利用いただけます。

内径(mm I.D.)	1.0	2.0	3.0	4.6	10	20	28	50
標準流速(mL/min)	0.05	0.2	0.4	1.0	5.0	19	37	118
検出器 セル・インジェクター	セミマイクロ用		分析用		分取用			
配管内径(mm)	0.05	0.1	0.2~0.3			1.0		
用途	省溶媒 / LC-MS		標準装置で 省溶媒	標準	分取(小)	分取(中)	分取(大)	分取 (特大)
4.6 mm I.D. との面積比	0.05	0.19	0.43	1.00	4.73	18.90	37.05	118.15
推奨粒子径(μm)	3 or 5				5		15 以上	

2. スケールダウン例(セミマイクロ化)

内径 4.6 mm カラムから内径の小さなカラムにスケールダウンする場合(カラム長は同じ)、移動相の流速とサンプルの注入量は、カラムの断面積に比例させます。内径 3.0 mm カラムは従来の装置を変更することなく高感度、省溶媒を実現します。内径 2.0 mm、1.0 mm カラムは HPLC 装置の配管、インジェクター、検出器のセルなどをセミマイクロ用に変更することにより、さらに高感度となり微量成分の分析が可能となります。

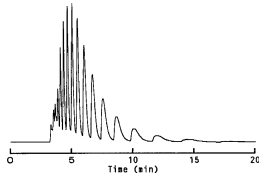
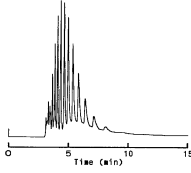
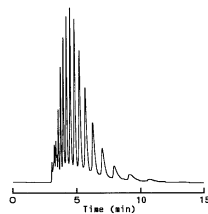
カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 150 mm	3.0 mm I.D. × 150 mm	2.0 mm I.D. × 150 mm	1.0 mm I.D. × 150 mm
クロマトグラム				
標準流速 (mL/min)	1.0	0.4	0.2	0.05
分析圧力 (MPa)	3.4	3.6	3.8	3.6
サンプル注入量 (μL)	1.0	0.4	0.2	0.05
検出器セル・インジェクター	分析用		セミマイクロ用	
検出器感度 (AUFS)	0.08		0.04	
配管内径 (mm)	0.25		0.10	0.05
Column: COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II Mobile phase: Acetonitrile / H ₂ O = 70 / 30 Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 30°C Detection: UV 254 nm Sample: 1. Benzene 2. Toluene 3. Ethylbenzene 4. Propylbenzene 5. Butylbenzene 6. Amylbenzene				

03 分析条件の設定

3. スケールアップ例(分取精製*へ)

内径 4.6 mm カラムから内径の大きなカラムにスケールアップする場合(カラム長は同じ)、移動相の流速とサンプルの注入量は、カラムの断面積に比例させます。

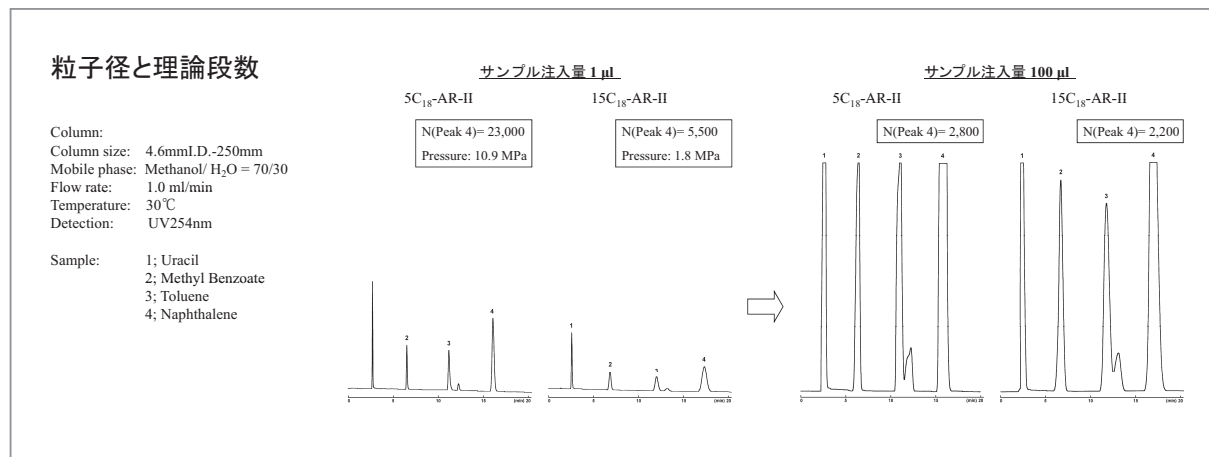
*分取とは、分析カラムで分離した後、サンプルの成分のうちの一成分を取り出すことを言います。分取カラムは内径が大きく、一回に処理できる量を増やすことができます。

カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 250 mm	10 mm I.D. × 250 mm	20 mm I.D. × 250 mm
クロマトグラム			
標準流速 (mL/min)	1.0	5.0	18.9
分析圧力 (MPa)	5.5	5.9	5.8
サンプル注入量 (μL)	125	625	2,500
検出器セル・インジェクター	分析用		分取用
配管内径 (mm)	0.25		1.0
Column : COSMOSIL 5SL-II Mobile phase : Ethyl Acetate / Ethanol = 4 / 1 Temperature : 30°C Detection : UV 254 nm Sample : Triton X-100			

Triton はユニオン・カーバイド・コーポレーションの登録商標です。

4. 粒子径の比較

5 μm の粒子を 15 μm に変更することにより、理論段数 (N) は 1/3、圧力は 1/9(いずれも理論値) になります。下の例のようにサンプルを少量注入した場合、5 μm と 15 μm では理論段数に大差がありますが、サンプルを大量に注入した場合にはほとんど差はなくなります。そのため内径 28 mm 以上のカラムを使用し分取される場合は、圧力の低い 15 μm の充填剤を推奨しています。



5) 参考資料 Core-Shell カラムから全多孔性分取カラムへの移行

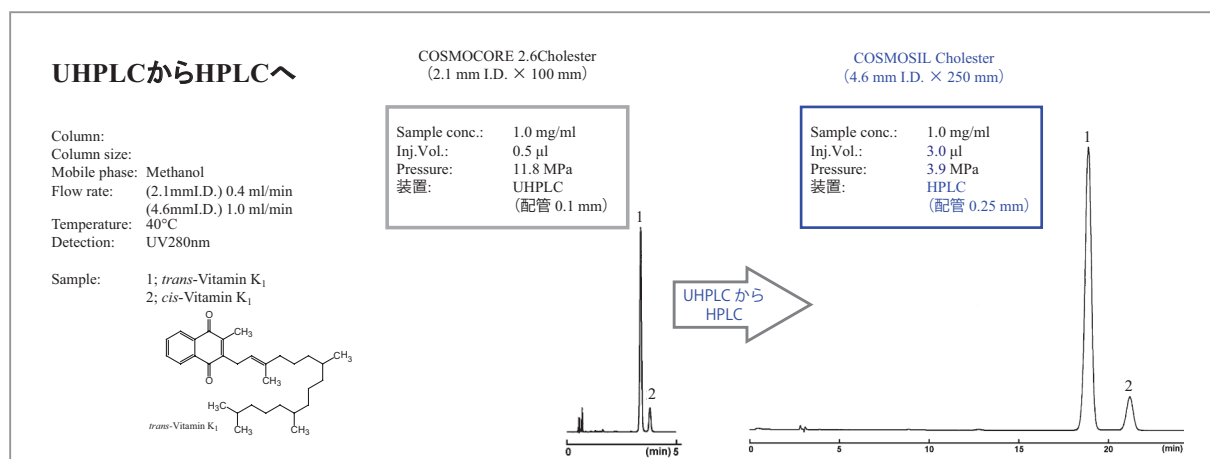
1. スケールアップ COSMOCORE 2.6Cholester から COSMOSIL Cholester へ

● UHPLC 条件から HPLC 条件へ変更

カラム	COSMOCORE 2.6Cholester	COSMOSIL Cholester
シリカゲル	Core-Shell型シリカゲル	全多孔性球状シリカゲル
粒子径(μm)	2.6	5
平均細孔径(nm)	9	12
比表面積(m ² /g)	150	300
化学結合基	コレステリル基	
カラムサイズ	2.1 mm I.D. × 100 mm	4.6 mm I.D. × 250 mm
装置	UHPLC	HPLC
標準流速(mL/min)	0.4	1.0
配管内径(mm)	0.1	0.25

● UHPLC から HPLC へ

UHPLC 条件から HPLC 条件へ変更する場合、同等程度分離性能で移行することができます。コスモコア 2.6Cholester(内径 2.1 mm)からコスモシル Cholester(内径 4.6 mm)に変更する場合、注入量を 5 倍以上に増やすことにより、適した条件で移行することができます。



2. 最大負荷量の決定

内径の大きなカラムでのスケールアップを行う前に、分析カラムで注入量を徐々に増やし、最も分取効率の高いサンプル負荷量を決定します。その後 p. 22 のスケールアップ例に従って分取サイズに移行します。

