

これから始める方に！ 

カラムメーカーが教える

液クロ HPLC入門

自ら考え、問題を解決できる
力を身に付けよう。

基礎 から
▼
実践 まで

- ✓ HPLC の基礎
- ✓ HPLC 関連製品
- ✓ 分析条件の設定
- ✓ 移動相の調製
- ✓ サンプルの前処理
- ✓ よくあるご質問
- ✓ トラブルシューティング

01 HPLC を始める前に : HPLC の基礎 4

HPLC の歴史	4
HPLC 装置	4
クロマトグラム	5
HPLC の分離モードと特長	6
移動相溶媒	7
定量分析法	8

02 HPLC を始める前に : HPLC 関連製品 9

1) 日常の分析時に使用	9
2) メンテナンス時 ~ 消耗品のストックと工具 ~ (常備しておきたいもの)	10

03 分析条件の設定 12

1) カラムの選択	12
2) C ₁₈ カラムの移動相条件設定	16
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	20
4) 参考資料 カラム内径について	21
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	23

04 移動相の調製 24

1) 有機溶媒と水混合の移動相	24
2) 緩衝液の調製	25

05 サンプルの前処理 26

1) ろ過	26
2) 除タンパク (タンパク質変性沈殿法)	27
3) 限外ろ過	27
4) 溶媒抽出法	28
5) イオン交換	29
6) 固相抽出	30

06 分析前の準備・分析終了後 31

1) 分析前の準備	31
2) 分析終了後	32

07 よくあるご質問・トラブルシューティング 33

1) よくあるご質問・トラブルシューティング一覧	33
2) よくあるご質問 (Q1 ~ Q29)	34
Q13・Q14 	37
3) トラブルシューティング (T1 ~ T14)	41
4) 分析圧力上昇時の対処方法 	48
5) グラジエント溶離法におけるベースラインの乱れ	50

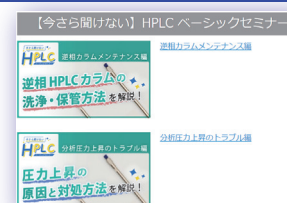
※ QR コードで動画へアクセス！



動画アイコンを記載している箇所は解説動画をご視聴いただけます。

▶ よくあるトラブルの対処方法などを動画で解りやすく！

特にお問い合わせの多い「逆相 HPLC カラムの洗浄・保管方法」、
「圧力上昇の原因と対処方法」を動画で解りやすく解説！



視聴方法

アイコンの付いた箇所の後に QR コードを記載しています。

QR コードをクリックするか、スマートフォンなどで読み取ることでアクセスいただけます。



08 参考資料	51
1) HILIC カラムの上手な使い方	51
2) SFC 用カラムの上手な使い方	53
3) ガードカラムの選択と効果	57
09 COSMOSIL について	59
10 COSMOSIL・COSMOGEL・COSMOCORE 充填剤一覧表	60
1) HPLC(高速液体クロマトグラフィー)充填剤一覧表	60
2) SFC(超臨界流体クロマトグラフィー)充填剤一覧表	61
11 COSMOSIL・COSMOGEL・COSMOCORE サンプル別カラム選択ガイド	62
12 COSMOSIL シリーズ / 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用	64
1) 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用の違いによる分離への効果	64
2) 極性基に対する選択性	65
3) 双極子に対する選択性	66
4) 多環芳香族化合物に対する選択性	67
5) 分子形状認識能	68
6) ハロゲン化物に対する選択性	69
7) 疎水性に対する選択性	70
13 COSMOSIL シリーズ / 金属不純物が与える影響(旧型カラムとの性能比較)	71
1) COSMOSIL 5C18-MS-II と(旧型)5C18-MS、および 5C18 との性能比較	71
2) COSMOSIL 5C18-AR-II と(旧型)5C18-AR との性能比較	72

<商標について>

・COSMOSIL COSMOGEL COSMOCORE
コスモシル、コスモゲル、コスモコア、COSMONICE、コスモナイスは、ナカライテスク株式会社の登録商標です。

01 HPLC を始める前に：HPLC の基礎

HPLC の歴史

1906～1907年にTswettは、吸着剤にチョーク粉末(CaCO_3)を用いて葉緑素が緑色と黄色に分離することを発見しました。そしてTswettはこの方法を「クロマトグラフィー(chromatography)」と名付けました。「chromatography」の語源は、ギリシア語の「色」を意味する「chroma」と、「描く」を意味する「graphos」に由来しています。

その後、この吸着クロマトグラフィー以外に、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーが創始され、1971年にKirklandが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC: High Performance Liquid Chromatography)の開発につながる完全多孔性球状充填剤の製造に成功しました。これによって今日では重要な分析法の1つであるHPLCの基礎が確立しました。

HPLC 装置

HPLC装置は基本的に以下に示した構成になっており、移動相(カラムに保持されているサンプルを溶出させるために流す液体。詳細はp.7参照)の流れに沿って移動相貯槽、脱気装置、ポンプ、インジェクター(オートサンプラーまたは、マニュアルインジェクター)、カラム、検出器、データ処理器の順に配置されています。ポンプによって移動相を送りだし、インジェクターより移動相中にサンプルを注入してカラムに送り、カラムでサンプルを分離します。分離されたサンプルの成分がカラムから出てきたところを検出器で検出し、データ処理器がクロマトグラムとして描き出します。このクロマトグラムより、さまざまなデータを読み取ります。

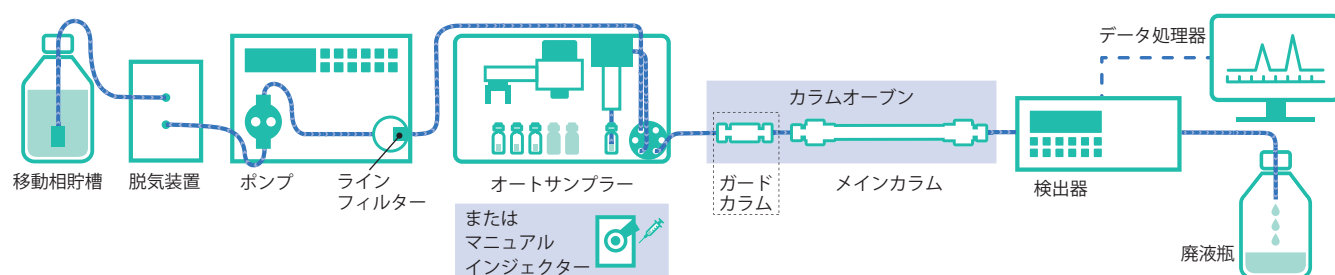


図 1. HPLC の基礎装置構成

移動相貯槽	通常ガラス製瓶や三角フラスコが用いられます。移動相中の不溶性物質の吸入を防止するため、サクションフィルターを取り付けた吸入口を移動相貯槽に入れます。
脱気装置 (デガッサー)	移動相には気体が溶存しています。この気体が流路中で気泡となり、ベースラインの安定に影響をおよぼします。脱気装置は移動相貯槽とポンプの間に接続して、移動相の脱気を行います。
ポンプ	移動相を一定流量、あるいは、一定圧力で送液します。ポンプを2台接続することにより、高圧グラジエント溶離が可能になります。
インジェクター	マイクロシリンジを使って、移動相中に分析するサンプルを注入します。サンプルを自動的に注入することのできるオートサンプラー(オートインジェクター)も数多く用いられています。
カラム	カラム: ステンレス製やガラス製などのクロマト管に充填剤が詰められたものです。カラムの両端には、充填剤が流出しないように多孔質焼結フィルターがついています。インジェクターから注入されたサンプルを分離します。 ガードカラム: メインカラムを保護するために使用します。詳細は「3) ガードカラムの選択と効果」p.57参照
カラムオープン (カラム恒温槽)	カラムの温度を一定に保ちます。HPLCではカラムの温度コントロールが重要で、 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 以内に保つことが望ましく、水もしくは空気の循環恒温槽が多用されています。
検出器	カラムから溶離したサンプルの各成分を検出し、電気信号に変換します。
データ処理器	検出器から得られた電気信号をデータ処理し、クロマトグラムとして目に見えるようにします。ピークの保持時間・面積・理論段数などのデータが自動計算されます。現在ではPCが汎用されています。

01 HPLC を始める前に : HPLC の基礎

クロマトグラム

カラムからサンプルが流れ出る現象を溶離と言い、サンプルがカラム中に注入されてから溶離するまでに要した時間を保持時間と言います。その保持時間を横軸に、サンプルの濃度分布を縦軸に表したものをクロマトグラム (図 2) と言います。このクロマトグラムから以下のデータが読み取れます。

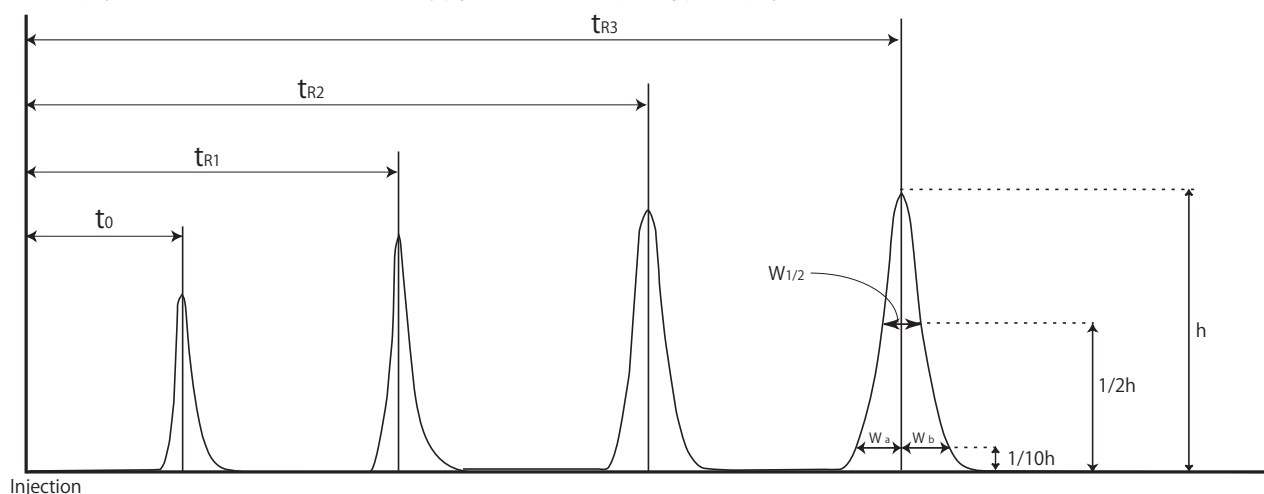


図 2. クロマトグラム

(1) t_0 (Hold up time)	ホールダップタイム
	固定相に全く保持されない物質の溶出時間。逆相クロマトグラフィーではウラシルの溶出時間がよく用いられます。
(2) t_R (Retention time)	保持時間
	ピークトップからベースラインに垂線を下ろし、その交点から分析開始点までの時間
(3) h (Peak height)	ピーク高さ
	ピークトップからベースラインに下ろした垂線の長さ
(4) $W_{1/2}$ (Peak width at half height)	半値幅
	ピーク高さの半分でのピーク幅
(5) k (Retention factor)	保持係数、 $k = (t_R - t_0) / t_0$
	この値が大きいほど、サンプル中の各成分が固定相に長く保持されたことを示しています。保持係数は、同一条件下 (充填剤、移動相、温度) において、各成分で同じ値を示します。
(6) N (Theoretical plate number)	理論段数、 $N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2$
	カラムが複数の段から構成されていて、その一つ一つで分離が起こっていると考えたとき、その段の数を計算した値です。この値が大きいとカラムの性能が高いことを示します。充填剤の粒子径や充填状態に左右されます。
(7) S (Peak asymmetry)	ピーク対称性、 $S = W_b / W_a$
	W_a : ピーク高さの 1 / 10 で垂線から前のピーク幅 W_b : ピーク高さの 1 / 10 で垂線から後ろのピーク幅 この値が 1 のとき最も対称性の良いピークとなり、1 より大きいとテーリング、小さいとリーディングしていることを示します。テーリングやリーディングは、充填剤の性能や充填状態が悪いときだけでなく、分析条件がサンプルに適していないときや負荷量が多すぎるときにもみられます。
(8) α (Separation factor)	分離係数、 $\alpha = k_2 / k_1$ (k_1 , k_2 はサンプルの各成分の保持係数)
	この値が大きいと、2 つのピークのピークトップが離れていることを示します。
(9) R_s (Resolution)	分離度、 $R_s = (\sqrt{N} / 4) \cdot \{(\alpha - 1) / \alpha\} \cdot \{k_2 / (1 + k_2)\}$
	2 つの成分が分離できているかどうかの目安となる数値です。 R_s が 1.5 のときに 2 つのピークがほぼ完全に分離された状態であり、それよりも小さければ、ピークの一部が重なっていることを示しています。

01 HPLC を始める前に：HPLC の基礎

HPLC の分離モードと特長

HPLC の分離モードは基本的に次のように分類されています。

● 順相クロマトグラフィー

シリカゲル、アルミナなどの吸着剤を充填剤に用います。サンプルは充填剤に対する吸着力の相違によって、おののおの異なった速度で移動することにより分離され、充填剤に吸着しやすいサンプルほど、移動速度は遅くなります。

● 逆相クロマトグラフィー

サンプルは移動相と固定相に分配され、この二相間への分配の相違による移動速度差によって分離されます。固定相に分配されやすいほど、サンプルの移動速度は遅くなります。充填剤には、シリカゲルに化学結合基(オクタデシル基、オクチル基、フェニル基、シアノ基など)を結合したものが多用されています。これらは熱や加水分解には安定ですが、強酸・強塩基性移動相では不安定であるため、使用することはできません。化学結合基の種類や導入率、エンドキャップ処理などが分離に影響します。

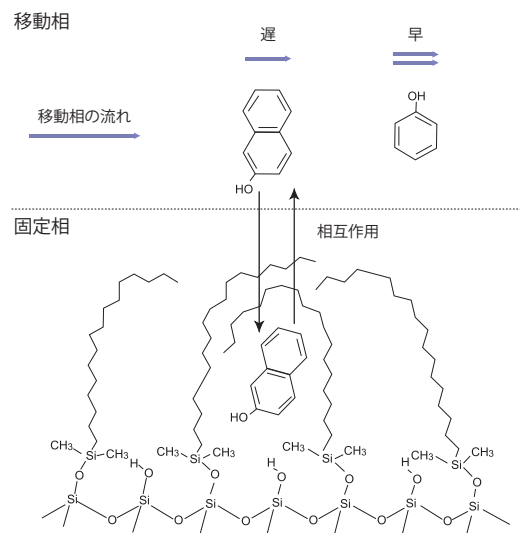


図 3. 分離の様子(逆相)

● 親水性相互作用クロマトグラフィー

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) は順相クロマトグラフィーの一種です。HILIC では高極性官能基のシリカゲルなどが用いられ、有機溶媒比率が高い移動相で分離を行います。逆相クロマトグラフィーとは反対に、親水性の低い(疎水性の高い)成分から先に溶出します。したがって、逆相モードで保持されにくい高極性化合物の分析ができます。また、揮発性の高い有機溶媒含量が高い移動相を使用することから LC-MS 分析にも適した分離モードです。

● イオン交換クロマトグラフィー

固定相であるイオン交換体の官能基に対イオンが結合して中和状態になっており、荷電したサンプルは固定相に結合している対イオンとイオン交換反応を行います。サンプルは固定相への親和性の相違による移動速度差によって分離されます。充填剤にはデキストラン交換体、セルロース交換体、ポリスチレン交換体などがあります。イオン交換基は、陽イオン交換と陰イオン交換に大別されます。分離性能を左右するイオン交換容量はイオン交換体粒子の形状や種類によって異なります。

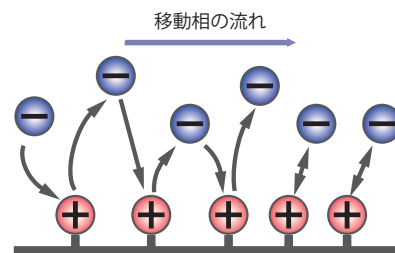


図 4. 分離の様子(イオン交換)

● サイズ排除クロマトグラフィー

充填剤の細孔径より小さいサンプルは細孔内に浸透し、細孔径より大きいサンプルは細孔内に浸透しないことを利用し、サンプルの大きさ(分子量)によって分離されます。主に高分子化合物(分子量 2,000 以上)の分離に用いられます。充填剤にはデキストラン、ポリアクリルアミドなどの有機系の膨張型ゲルとシリカゲル、ガラスなどの無機系ゲルがあります。デキストラン、ポリアクリルアミドは親水性の高いゲルです。機械的強度は弱いですが、アルカリ耐性があるため、アルカリ条件下での分析も可能です。一方、シリカゲルは、アルカリ条件下では使用できないという欠点がありますが、高い理論段数が得られ、機械的強度も高いです。

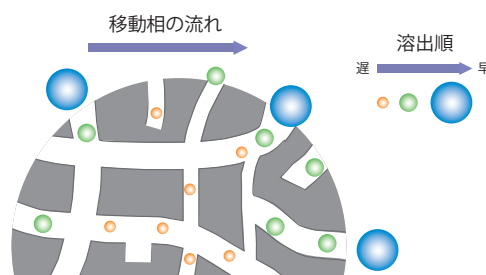


図 5. 分離の様子(サイズ排除)

移動相溶媒

HPLC の移動相として選択、使用する際の留意点を以下に示しました。

1. サンプルの成分を溶解できる。
2. 混和性が良い。
3. 検出妨害がない。
4. 可能な限り、低粘度の溶媒を使用する。
5. カラム温度と溶媒の沸点との温度差を十分に取る。
6. 安全性が高い。
7. 安価である。
8. HPLC グレードを使用する。

次に、分離モード別に移動相としての選択指針を下に示しました。

● 順相クロマトグラフィー

一般には低極性溶媒に、より高い極性の溶媒を混合し、その混合比率の変化で分離係数 (p. 5 参照) を調節します。その際、溶媒の極性の尺度である溶媒強度^{*1} や溶解度パラメーター^{*2} を参考にします。主に、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、クロロホルム、トルエンが使用されています。

*1 カラム内に保持したサンプルの成分を溶出するときの溶媒の溶出力を表します。サンプルの成分を早く溶出させる溶媒は、遅く溶出させる溶媒より「溶媒強度が強い」と言います。

*2 物質の溶解性に用いられる値

● 逆相クロマトグラフィー

水、メタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフランが多用され、これらの混合比率で分離係数を調節します。また、イオン性物質を含有するサンプルをシリカゲル担体の充填剤で分析する場合、pH 2 ～ 7.5 の範囲内の移動相を使用します。この範囲外で使用すると酸性側では固定相の剥離、塩基性側ではシリカゲルの溶解を生じます。pH 調整には過したりん酸緩衝液、酢酸緩衝液などが使用されます。

● 親水性相互作用クロマトグラフィー

高濃度のアセトニトリルを含む水または緩衝液が用いられます。緩衝液には、揮発性の塩である酢酸アンモニウムや、ギ酸アンモニウムが使用されます。また、電荷をもつ HILIC 固定相の場合、サンプルとの静電的相互作用に基づく選択性を有します。静電的相互作用の強さは、塩濃度によって調整できます。

● イオン交換クロマトグラフィー

水に緩衝液を添加し、塩濃度 (イオン強度) および pH で分離係数を調節します。イオン強度が増加するにつれてサンプル成分が早く溶出します。また、陰イオン交換の場合は pH を低くすると分離係数が減少し、陽イオン交換の場合は逆に増大します。陰イオン交換ではアンモニア、アミン類などの陽イオン性緩衝液を、陽イオン交換では酢酸塩、ギ酸塩、くえん酸塩などの陰イオン性緩衝液を使用します。

● サイズ排除クロマトグラフィー

一般には単一溶媒を移動相として使用し、分離係数を調節するために移動相溶媒を変えることはありません。非水系ではテトラヒドロフラン、クロロホルム、トルエン、ジメチルホルムアミドなどが使用されます。水系では緩衝液を希釈して使用し、移動相の pH やイオン強度を調節することで吸着、分配、イオン交換などの作用を抑えます。

01 HPLC を始める前に：HPLC の基礎

定量分析法

クロマトグラムのピーク面積あるいはピーク高さからサンプルの成分の組成または含有量を算出するには絶対検量線法や内標準法などが使用されています。詳細は「高速液体クロマトグラフィー通則」(JIS K 0124 : 2011)をご覧ください。

● 絶対検量線法

- (1) 分析対象成分の標準液を3段階以上の濃度^{*1}に調製します。
- (2) 各希釈標準液の一定量を導入しクロマトグラムを記録してピーク面積を測定します。
- (3) 導入された希釈標準液中の分析対象成分の量を横軸に、ピーク面積を縦軸にして図6に示すような検量線を作成します。なお、検量線は測定点を代表するように引きます。
- (4) 同一条件の下でサンプルを導入し、クロマトグラムを記録し、ピーク面積(y)から検量線によって分析対象成分の量(x)を求め、サンプル中の濃度を算出します。

この方法は、全測定操作を厳密に一定条件にして行わなければなりません。
この測定方法を外標準法ともいいます。

*1 内検量線が原点を通る直線であることがあらかじめ確かめられている場合は、分析対象成分の濃度を一点だけとしてこれを導入した場合の A_x/A_s を測定し、これに基づいて検量線を求めてもよい。

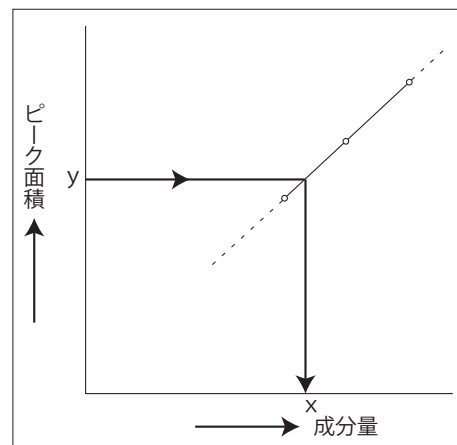


図6. 絶対検量線法による検量線

出典：(JIS K 0124 : 2011) 10.4 絶対検量線法 図 15

● 内標準法

- (1) 一定濃度の内標準物質^{*2}を含む、3段階以上の濃度の分析対象成分希釈標準液を調製します。
- (2) 各希釈標準液を一定量導入し、クロマトグラムを記録してピーク面積を測定します。
- (3) 導入された分析対象成分の量(M_x)と内標準物質の量(M_s)との比(M_x/M_s)を横軸に、分析対象成分のピーク面積(A_x)と内標準物質のピーク面積(A_s)との比(A_x/A_s)を縦軸にして、図7に示すような検量線を作成します。なお、検量線は測定点を代表するように引きます。
- (4) サンプル溶液に、希釈標準液とほぼ同じ濃度になるように内標準物質を既知量添加^{*3}した測定用サンプル溶液を調製します。このとき、分析対象成分のピーク面積(A_x')と、内標準物質のピーク面積(A_s')との比(A_x'/A_s')が検量線の範囲内になるようにします。この測定用試料溶液を希釈標準液と同一条件の下で導入してクロマトグラムを記録します。
- (5) クロマトグラムから分析対象成分のピーク面積(A_x')と内標準物質のピーク面積(A_s')との比(A_x'/A_s')を算出し、検量線から分析対象成分量と内標準物質の量の比を求め、導入された内標準物質の量から分析対象成分の量を算出します。これからサンプル中の分析対象成分の濃度を求めます。

*2 内標準物質には、分析対象成分および化学的性状が類似した安定な物質で、そのピークが分析対象成分ピークの位置になるべく近く、サンプル中の成分ピークとも完全に分離するものを選択する。

*3 サンプル溶液に内標準物質を添加したとき、分析対象成分と内標準物質の濃度に変化を生じさせる沈殿などの化学変化があってはなりません。

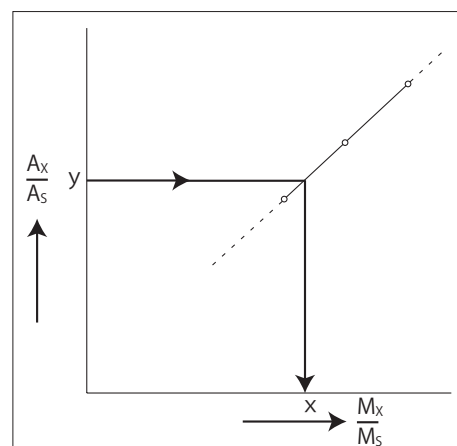


図7. 内標準法による検量線

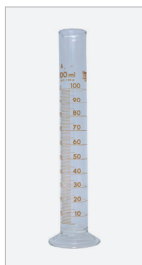
出典：(JIS K 0124 : 2011) 10.5 内標準法 図 16

02 HPLC を始める前に : HPLC 関連製品

1) 日常の分析時に使用

1. 移動相の調製時

- ・メスシリンダー / メスフラスコ / 洗瓶 / 耐圧瓶 / ピペット / 移動相ろ過用フィルターなど



メスシリンダー



洗瓶



移動相ろ過用フィルター

- ・ HPLC 用溶媒
- ・ 移動相調製用添加剤、緩衝液調製用試薬
- ・ イオンペア試薬
逆相クロマトグラフィーにおいて、保持時間が短い親水性の高い化合物を保持させるための試薬
- ・ pH 計 (pH インジケーターなど)
- ・ 移動相脱気用装置 (アスピレータ / 超音波洗浄機)

2. サンプル調製時

- ・ 標準サンプル
- ・ メスフラスコ / メスピペット / サンプル瓶 (バイアル)
- ・ HPLC 用溶媒
- ・ てんびん
- ・ ろ過用フィルター (シリンジ装着タイプ・遠心ろ過タイプ)
詳細は p. 26 参照



シリンジ装着タイプ



遠心ろ過タイプ

3. サンプルの前処理

- ・ 固相抽出用カートリッジ
- ・ 遠心式限外ろ過フィルターユニット など



固相抽出用カートリッジ



遠心式限外ろ過フィルターユニット

4. その他

- ・ マイクロシリンジ (マニュアルインジェクター用)
- ・ カラム接続用スパナ
- ・ 廃液瓶
- ・ ウェス
- ・ アルミホイル (移動相の揮発防止、ごみ混入防止などのため)



マイクロシリンジ



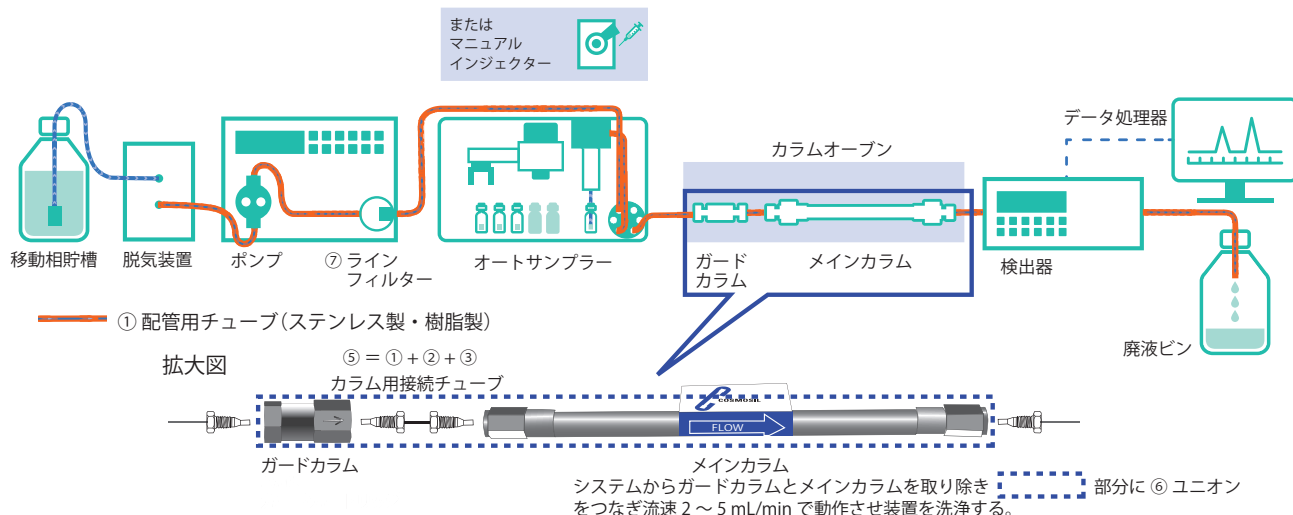
ウェス (例)

02 HPLC を始める前に：HPLC 関連製品

2) メンテナンス時～消耗品のストックと工具～（常備しておきたいもの）

1. 配管

- ① チューブ / ② オシネジ + ③ フェラル(ツープースタイプ) / ④ フィッティング(ワンピースタイプ) / ⑤ カラム用接続チューブ(=① + ② + ③) / ユニオン / ラインフィルター(配管用部品)



① 配管用チューブ(ステンレス製・樹脂製)



② オシネジ ③ フェラル
ツープースタイプ



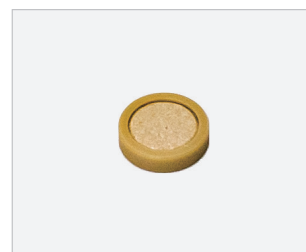
④ フィッティング(樹脂製)
ワンピースタイプ



⑤ カラム用接続チューブ



⑥ ユニオン



⑦ ラインフィルター

※配管用部品は上記以外にも各社よりさまざまな製品が発売されていますので、目的にあったものをご使用ください。

図 1. HPLC 基本装置と消耗品

- ・ カッター / ヤスリ / スパナ(配管用工具)



ステンレスチューブ用
ベンチカッター
(内径がつぶれない構造)



両刃ヤスリ
(ステンレスチューブ
端面の仕上げに)



各種スパナ

02 HPLC を始める前に : HPLC 関連製品

2. マニュアルインジェクター

- ニードルポートクリーナー
- 洗浄用シリンジ(ガラス製シリンジにニードルポートクリーナーを装着)
- ローターシール



洗浄用シリンジ



ローターシール

3. カラム洗浄

- 逆相クロマトグラフ用カラム洗浄キット (#08966-30)



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。

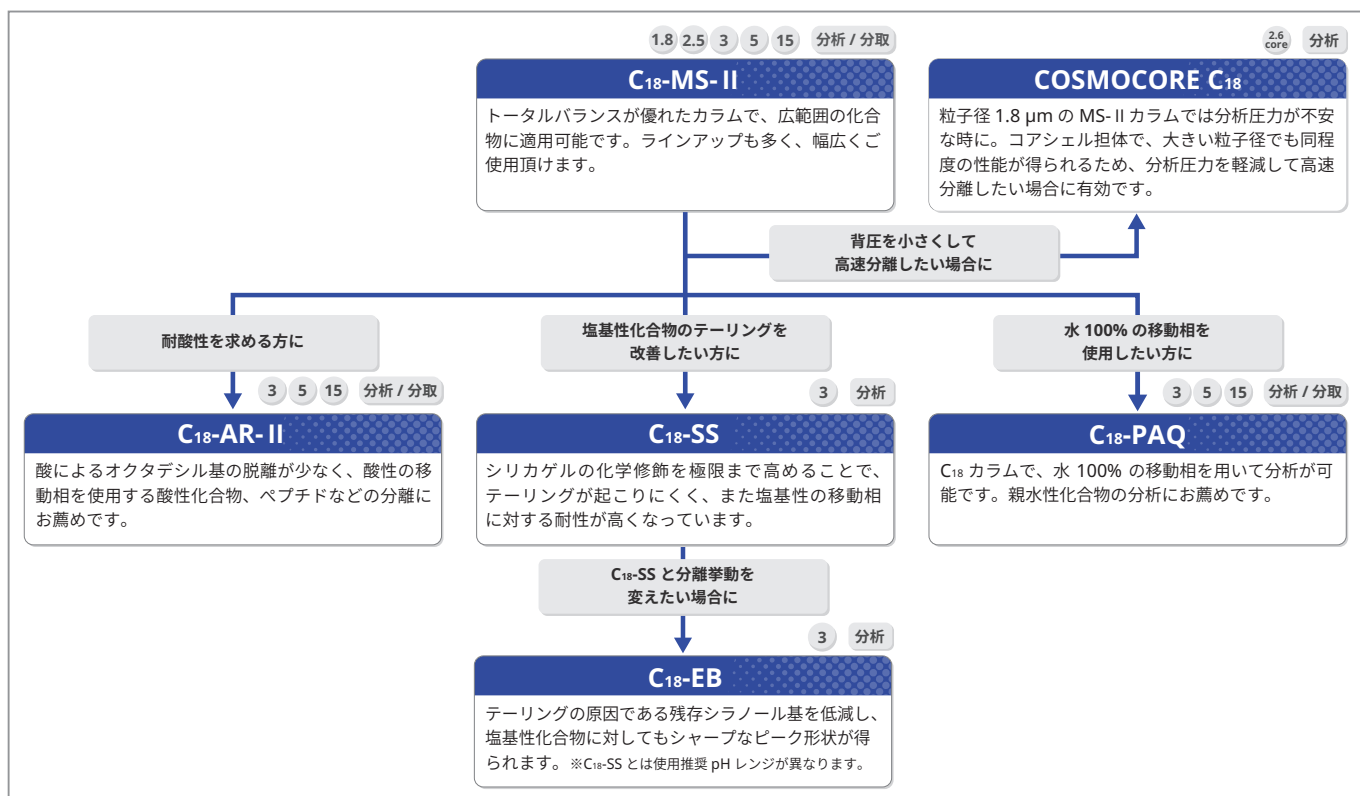


図1. コスモシルC₁₈ シリーズ

【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 用パッキン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利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)。

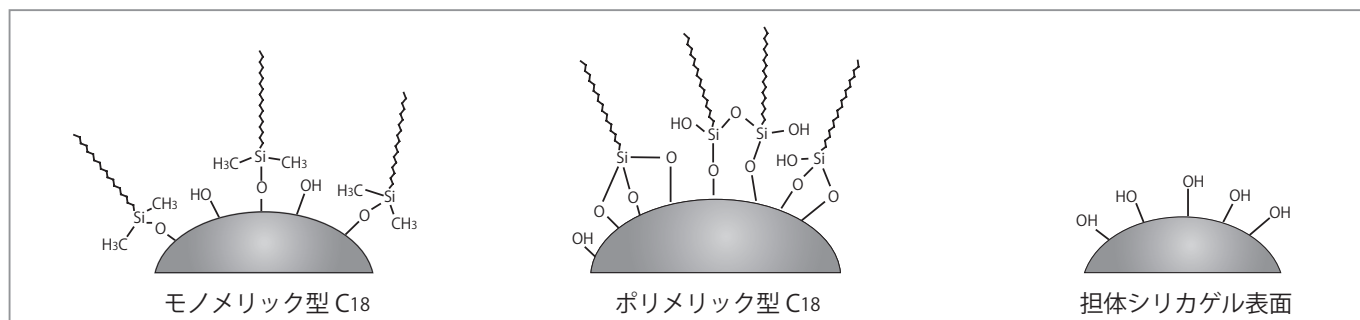


図2. 結合形式の模式図(エンドキャップ処理前)

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。

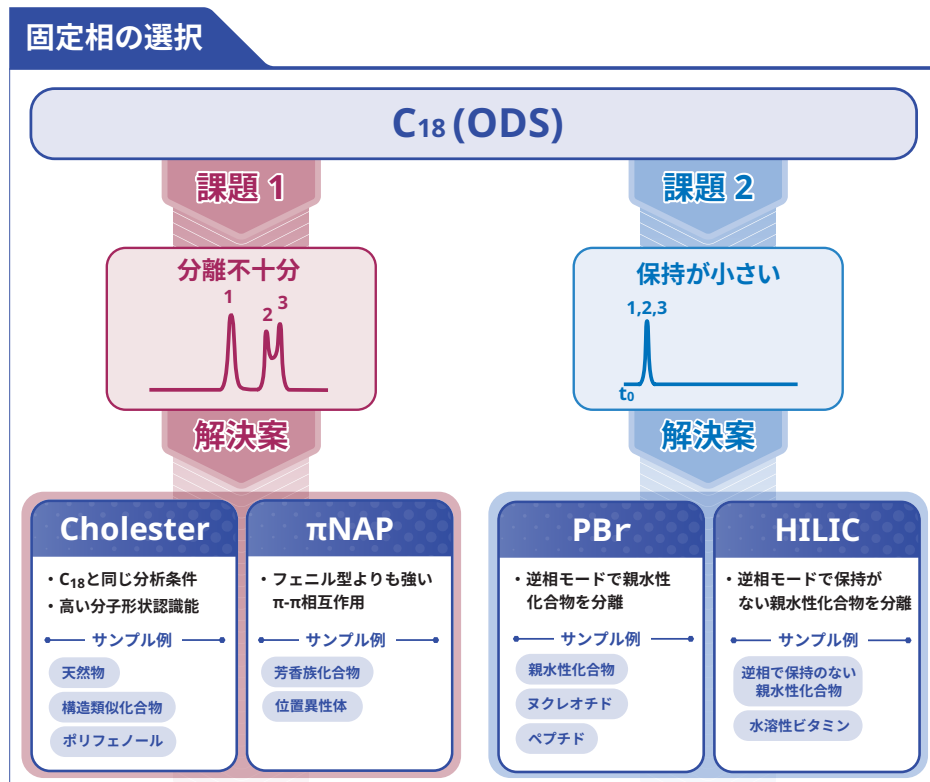


図 3. 固定相によるカラム選択フロー

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-2 μm 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-2 μm 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。



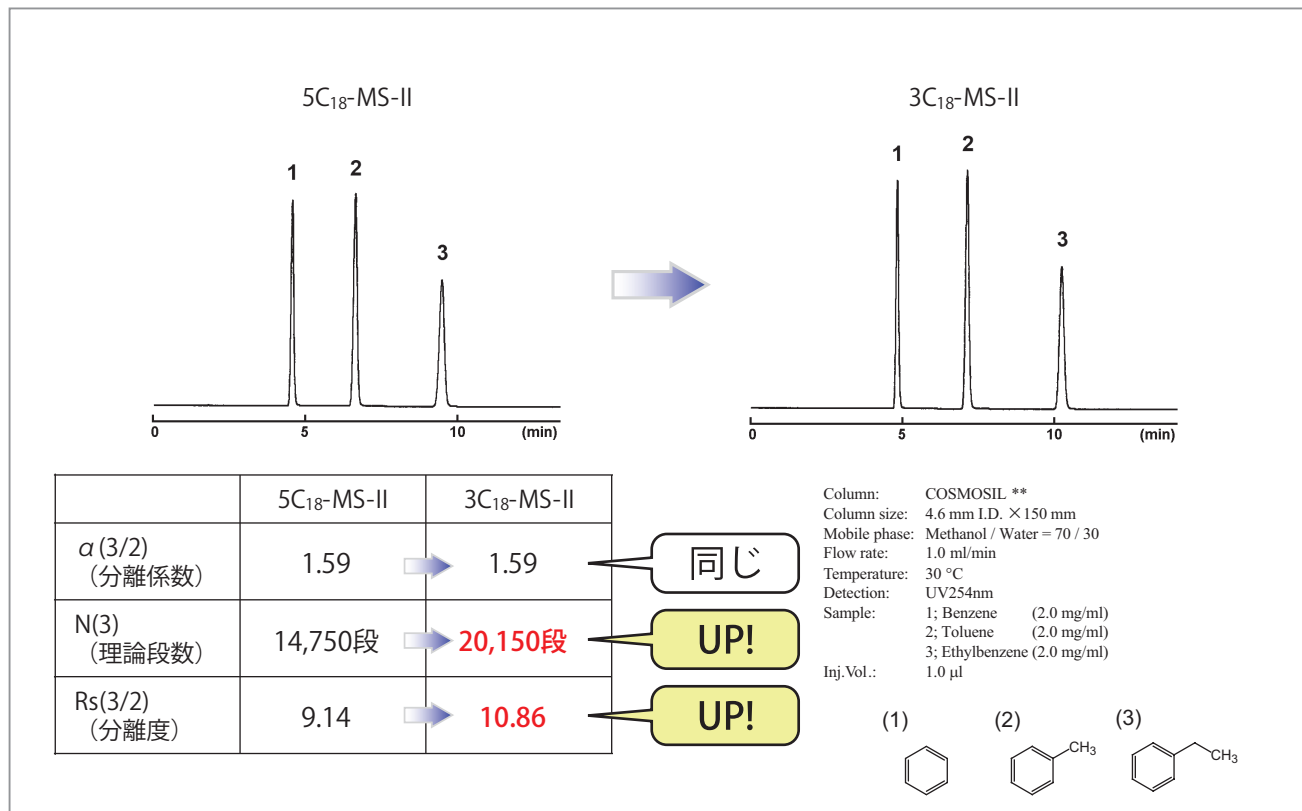
図 4. 粒子径によるカラム選択フロー

03 分析条件の設定

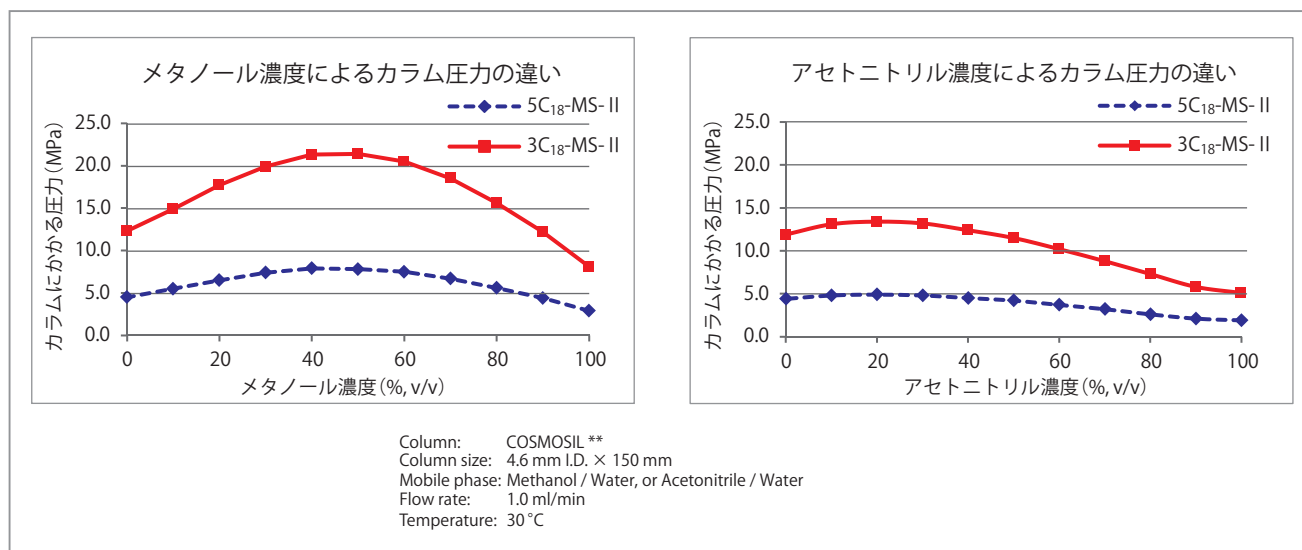
● 分離の向上

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)



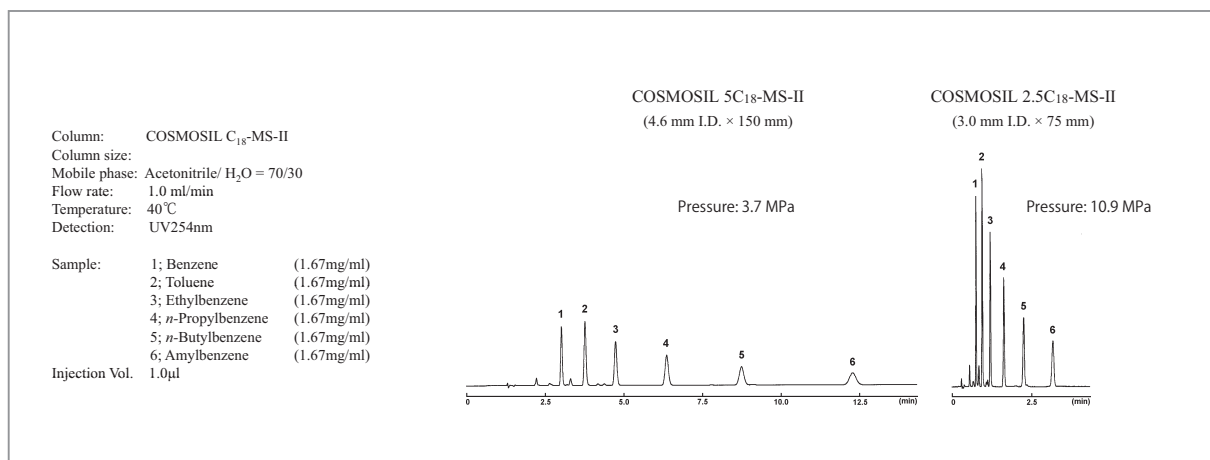
粒子径を小さくすると、同じカラムサイズ・同じ流速では、分析圧力が高くなります。しかし粒子径 3 μm では、カラム長が 150 mm であっても高圧対応の分析装置(耐圧: 100 MPa 以上など)を用いる必要はなく、通常の分析装置(耐圧: 20 ~ 30 MPa)をご使用いただけます。※装置の耐圧上限にご注意ください。



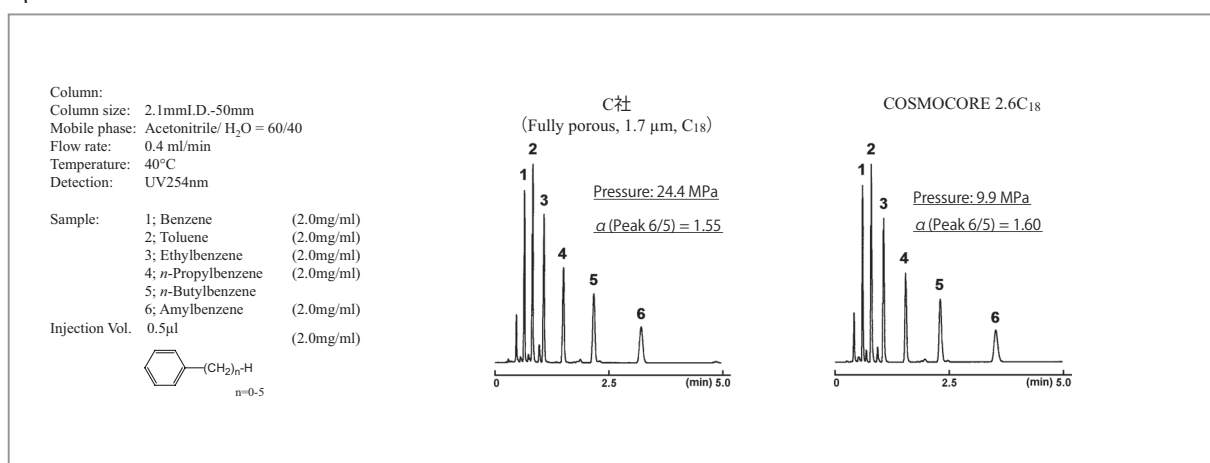
03 分析条件の設定

● 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

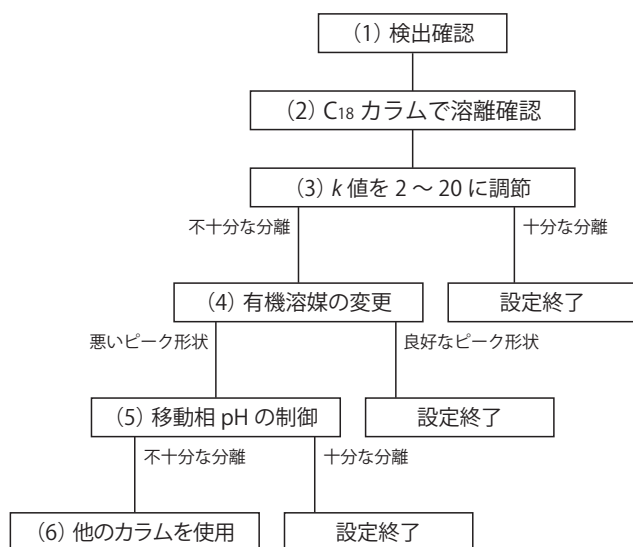
2. 分離条件の設定法

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、選択性に変化を与えます。
- (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。

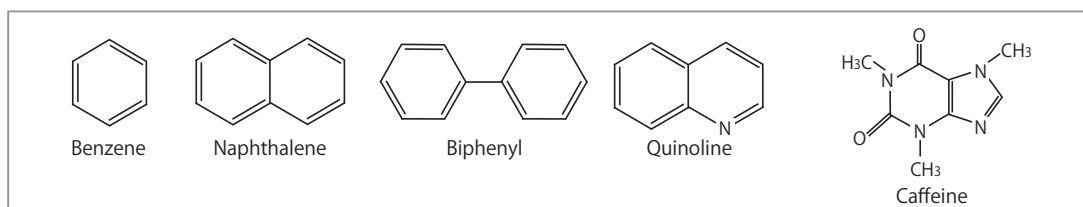
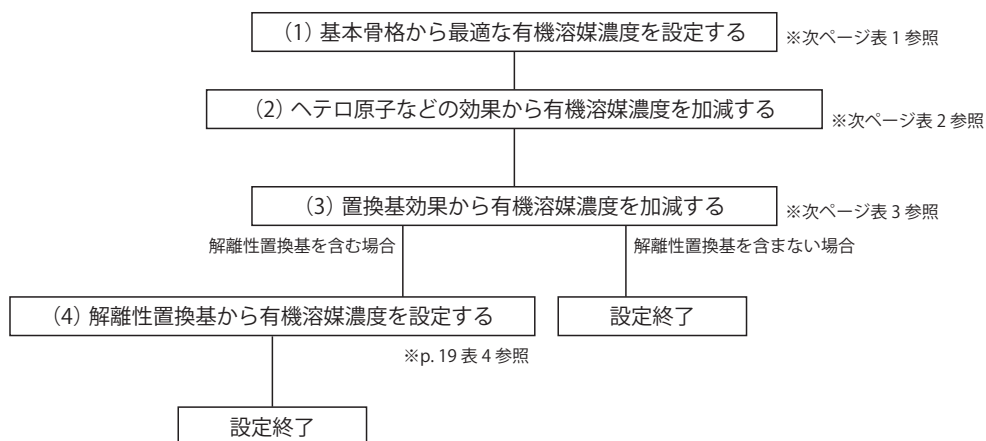


図5. 条件設定に用いる基本骨格の構造



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)	—

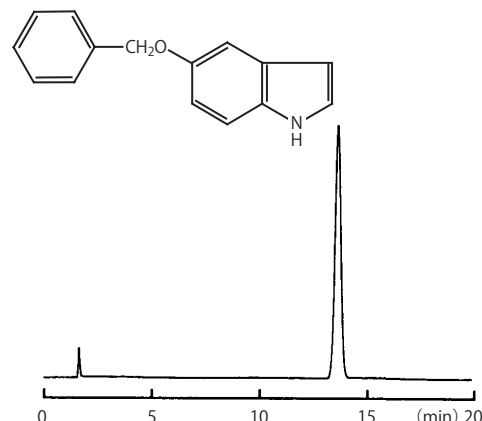
Column: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm
 Buffer: pH 2: 20 mmol/L H₃PO₄
 pH 7: 20 mmol/L H₃PO₄/Na₂HPO₄ = 2/3
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Detection: UV 254 nm

● 条件設定例

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

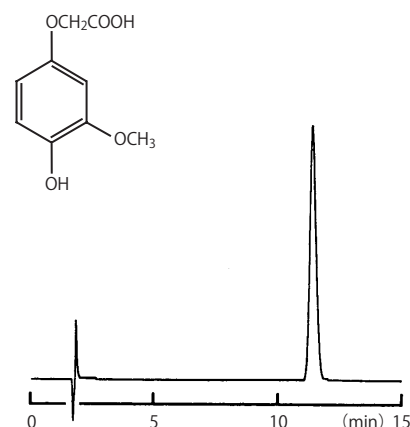
(1) 5-Benzyloxyindole

- 〈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/)

2 COSMOSILトップページ

3 COSMOSIL Application (分析例検索ページ)

4 分析例一覧表示画面

5 分析例

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

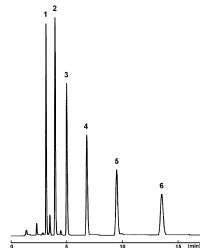
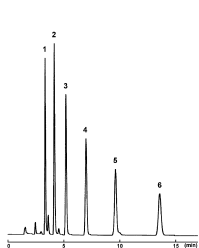
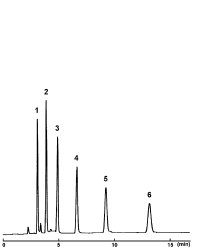
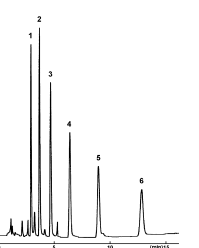
1. カラム内径および各種パラメーター

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。

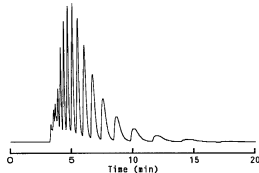
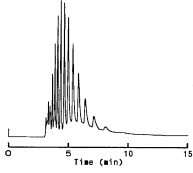
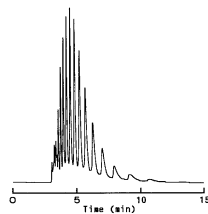
カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 150 mm	3.0 mm I.D. × 150 mm	2.0 mm I.D. × 150 mm	1.0 mm I.D. × 150 mm
クロマトグラム				
標準流速 (mL/min)	1.0	0.4	0.2	0.05
分析圧力 (MPa)	3.4	3.6	3.8	3.6
サンプル注入量 (μL)	1.0	0.4	0.2	0.05
検出器セル・インジェクター	分析用		セミマイクロ用	
検出器感度 (AUFS)	0.08		0.04	
配管内径 (mm)	0.25		0.10	0.05
Column: COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II Mobile 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。

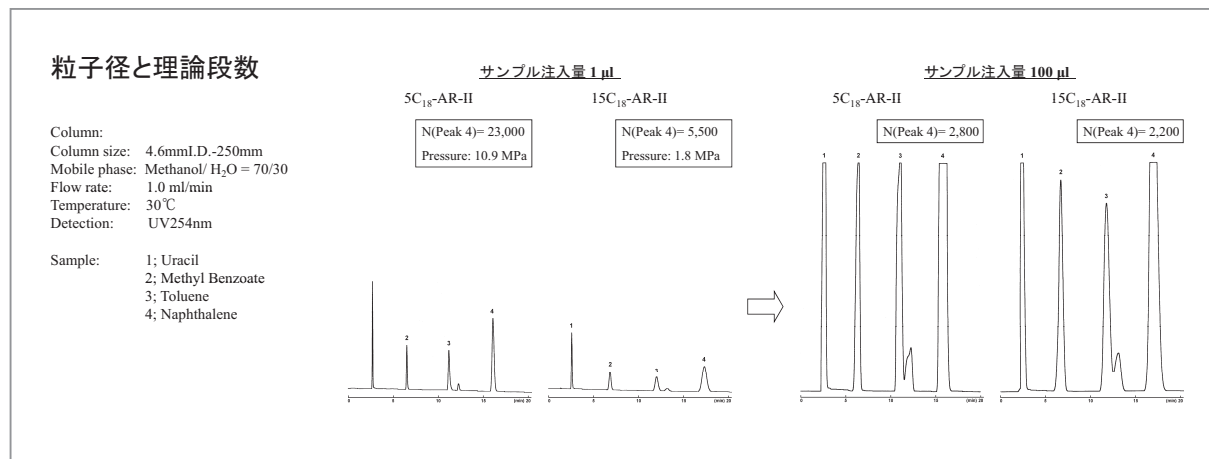
*分取とは、分析カラムで分離した後、サンプルの成分のうちの一成分を取り出すことを言います。分取カラムは内径が大きく、一回に処理できる量を増やすことができます。

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

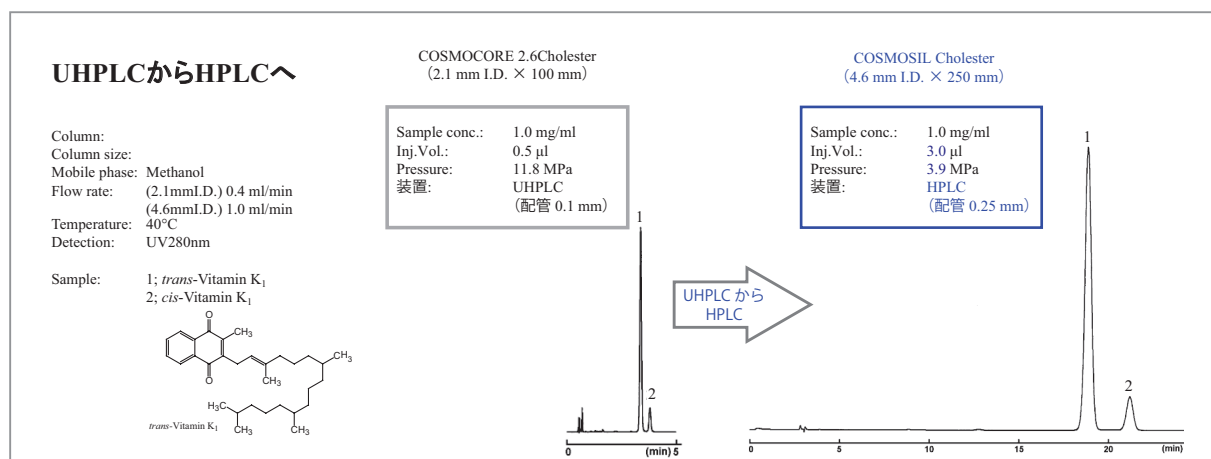
1. スケールアップ COSMOCORE 2.6Cholester から COSMOSIL Cholester へ

● 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

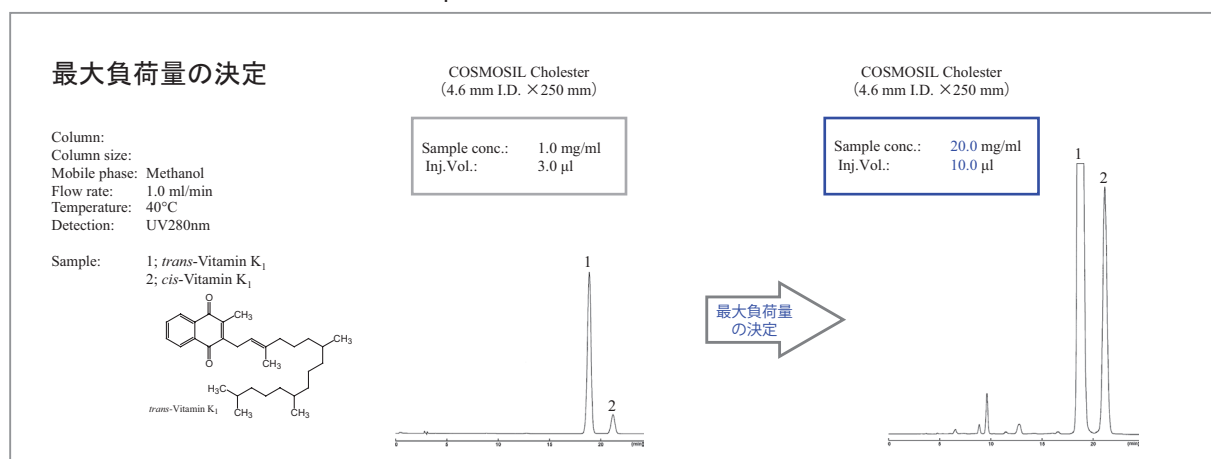
● UHPLC から HPLC へ

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。



04 移動相の調製

1) 有機溶媒と水混合の移動相

(例) メタノール / 水 = 70 / 30 1 L

特別に表記がない場合には、体積比 (v/v) で移動相を調製します。

- ① メタノール 700 mL をメスシリンダーに量り取る。
- ② 蒸留水 300 mL を別のメスシリンダーに量り取る。
- ③ ①②を十分に混合した後、脱気を行う。

※溶媒の体積は温度によって変化するため、精密性・再現性よく量るためには、容量を比重換算した重量で計量し調製します。
下表にその調製例を示します。

メタノール / 水 移動相 1 Lの組成表

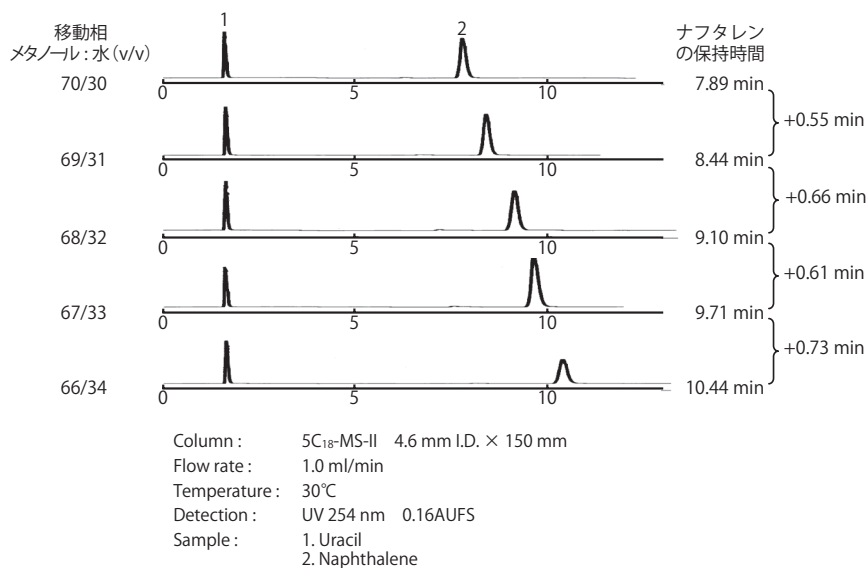
メタノール / 水	メタノール (g)	蒸留水 (g)
90 / 10 (v/v)	711.9	99.8
80 / 20 (v/v)	632.8	199.6
70 / 30 (v/v)	553.7	299.5
60 / 40 (v/v)	474.6	399.3
50 / 50 (v/v)	395.5	499.1
40 / 60 (v/v)	316.4	598.9
30 / 70 (v/v)	237.3	698.7
20 / 80 (v/v)	158.2	798.6
10 / 90 (v/v)	79.1	898.4

アセトニトリル / 水 移動相 1 Lの組成表

アセトニトリル / 水	アセトニトリル (g)	蒸留水 (g)
90 / 10 (v/v)	707.4	99.8
80 / 20 (v/v)	628.8	199.6
70 / 30 (v/v)	550.2	299.5
60 / 40 (v/v)	471.6	399.3
50 / 50 (v/v)	393.0	499.1
40 / 60 (v/v)	314.4	598.9
30 / 70 (v/v)	235.8	698.7
20 / 80 (v/v)	157.2	798.6
10 / 90 (v/v)	78.6	898.4

※メタノール、アセトニトリルは医薬用外劇物です。取り扱いには手袋・保護メガネ・マスクを着用し、ドラフト内で行ってください。

【参考】移動相の有機溶媒濃度の違いに対する保持時間の変化



メタノール濃度が1%違うだけで保持時間は大きく変わります。移動相は正確に調製してください。

2) 緩衝液の調製

(例 1) 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5) の調製

- ① 20 mmol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液を調製する。(1 L のメスフラスコにリン酸二水素ナトリウム (無水) (#31720-65) 2.40 g を量りとり、蒸留水で 1 L にメスアップする)
- ② 20 mmol/L リン酸水溶液を調製する。(1 L のメスフラスコにリン酸 (純度 85%) (#08964-92) 2.31 g を量りとり、蒸留水で 1 L にメスアップする)
- ③ pH メーターで測定しながら、pH 2.5 になるように ① と ② を混合する。
- ④ ミリカップ -HV (0.45 μ m) (#44054-89) を用いて減圧ろ過する。
※塩類は不溶性固体を含有している場合があり、ポンプのシールの劣化や、カラムの詰まりの原因になるので、必ずろ過してください。
- ⑤ 有機溶媒と混合する場合には前ページ例と同様に体積比で混合してください。
※混合時に塩が析出していないか確認してください。時間経過後、析出する場合があります。

調製済みの緩衝液〔リン酸緩衝液 (pH2.5) (5 倍濃縮) (#08969-71)〕を販売していますのでご利用ください。

(例 2) 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の調製

- ① 20 mmol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液を調製する。(1 L のメスフラスコにリン酸二水素ナトリウム (無水) (#31720-65) 2.40 g を量りとり、蒸留水で 1 L にメスアップする)
- ② 20 mmol/L リン酸水素二ナトリウム水溶液を調製する。(1 L のメスフラスコにリン酸水素二ナトリウム (無水) (#31801-05) 2.84 g を量りとり、蒸留水で 1 L にメスアップする)
- ③ pH メーターで測定しながら、pH 7.0 になるように ① と ② を混合する。
- ④ ミリカップー HV (0.45 μ m) (#44054-89) を用いて減圧ろ過する。
※塩類は不溶性固体を含有している場合があり、ポンプのシールの劣化や、カラムの詰まりの原因になるので、必ずろ過してください。
- ⑤ 有機溶媒と混合する場合には前ページ例と同様に体積比で混合してください。
※混合時に塩が析出していないか確認してください。時間経過後、析出する場合があります。

調製済みの緩衝液〔リン酸緩衝液 (pH7.0)(5 倍濃縮) (#08968-81)〕を販売していますのでご利用ください。

(例 3) 5 mmol/L 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5) の調製

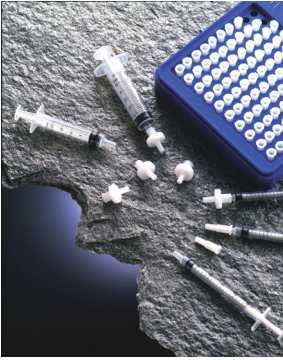
- ① 5 mmol/L 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、20 mmol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液を調製する。
(1 L のメスフラスコに、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム (#31529-24) 0.94 g と、リン酸二水素ナトリウム (無水) (#31720-65) 2.40 g を量りとり、蒸留水で 1 L にメスアップする)
- ② 5 mmol/L 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム、20 mmol/L リン酸水溶液を調製する。
(1 L のメスフラスコに、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム (#31529-24) 0.94 g と、リン酸 (純度 85%) (#08964-92) 2.31 g を量りとり、蒸留水で 1 L にメスアップする)
- ③ pH メーターで測定しながら、pH 2.5 になるように ① と ② を混合する。
- ④ ミリカップー HV (0.45 μ m) (#44054-89) を用いて減圧ろ過する。
※塩類は不溶性固体を含有している場合があり、ポンプのシールの劣化や、カラムの詰まりの原因になるので、必ずろ過してください。
- ⑤ 有機溶媒と混合する場合には前ページ例と同様に体積比で混合してください。
※混合時に塩が析出していないか確認してください。時間経過後、析出する場合があります。

05 サンプルの前処理

サンプルに分析妨害物質が含まれる場合やサンプル濃度が低い場合には、適当な前処理を施してから HPLC 分析を行う必要があります。前処理を行うことによって、夾雑物の除去による分析信頼性の向上、カラムの保護、感度の向上などが期待できます。前処理にはサンプルごとに適した方法があるため、個々に検討する必要があります。ここでは、一般的な前処理法について紹介します。

1) ろ過

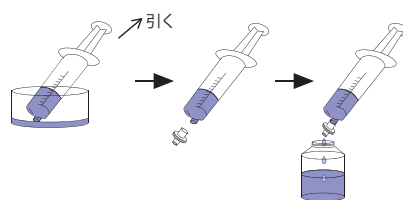
サンプルをろ過することにより微粒子、沈殿物、コロイド粒子などを除去します。カラムへの汚染を最小限にとどめるため、カラムの寿命を延ばすことができます。また、安定的なデータが取得できます。以下に弊社でよく使用される 2 種類の前処理フィルターについて紹介します。

項目	シリンジフィルター	遠心式フィルターユニット
使用法	シリンジに装着	遠心分離機を利用
種類	主に PTFE (ポリテトラフルオロエチレン) 水系 / 溶媒系、PVDF (ポリフッ化ビニリデン) 水系 / 溶媒系、PES (ポリエーテルスルホン) 水系、ナイロン 水系 / 溶媒系。その他各メーカーにより多種あり。	
孔径	主に 0.2 μm 、0.45 μm 。その他各メーカーにより多種あり。	
別途必要	シリンジ・ろ液回収瓶	遠心分離機
弊社製品		
製品名	コスモナイスフィルター	コスモスピンフィルター
製品形状		
種類	PTFE (W・水系)、PTFE (S・溶媒系)	H-PTFE (水系 / 溶媒系)
孔径	0.45 μm	0.2 μm ・0.45 μm

● コスモナイスフィルター

使用方法：

- ① シリンジなどでサンプル溶液を吸引します。
- ② シリンジにコスモナイスフィルターを装着します。
- ③ シリンジのプランジャーを押し、サンプルをろ過します。
※不溶物が多い場合、プランジャーを押しには強い力が必要です。
- ④ ろ液を HPLC サンプルとします。

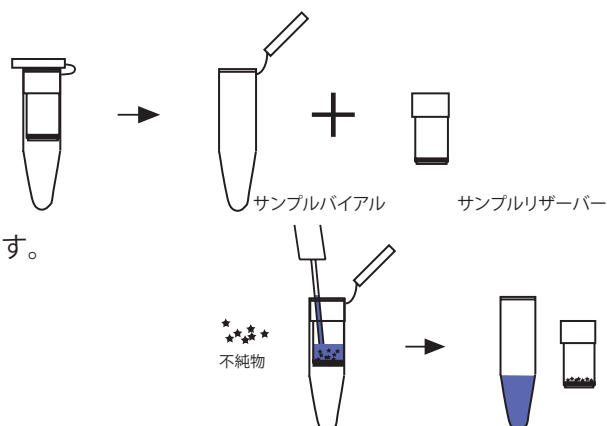


● コスモスピンフィルター

製品構成：・ サンプルバイアル
・ サンプルリザーバー

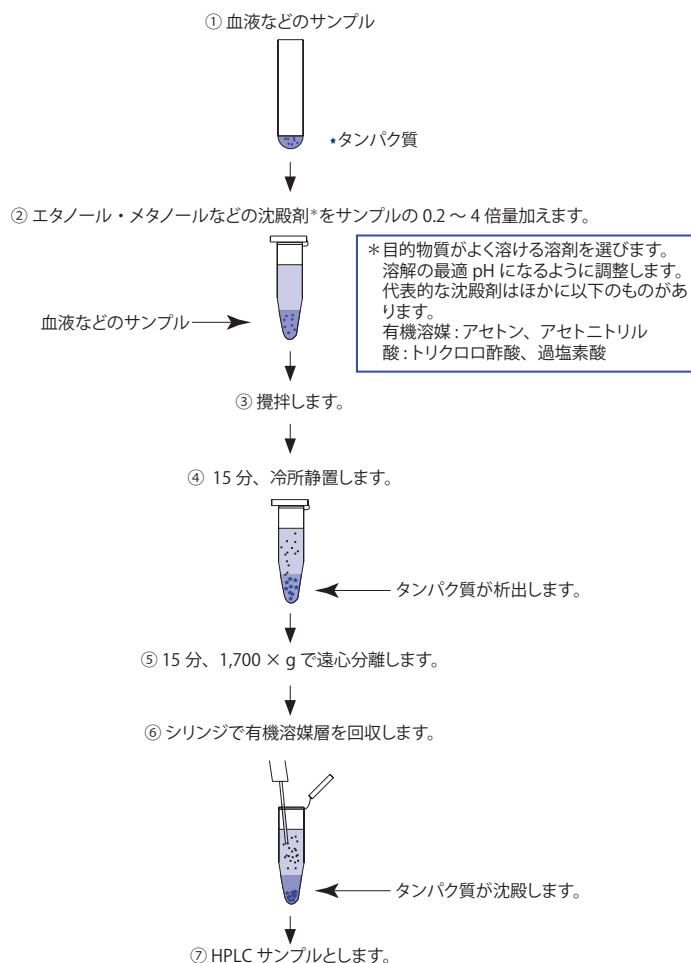
使用方法：

- ① サンプルリザーバーをサンプルバイアルにセットします。
- ② シリンジなどでサンプル溶液をサンプルリザーバーに入れます。
- ③ キャップをした後、遠心分離します。
- ④ 不純物が除かれて、ろ液がサンプルバイアルにたまります。
- ⑤ ろ液を HPLC サンプルとします。



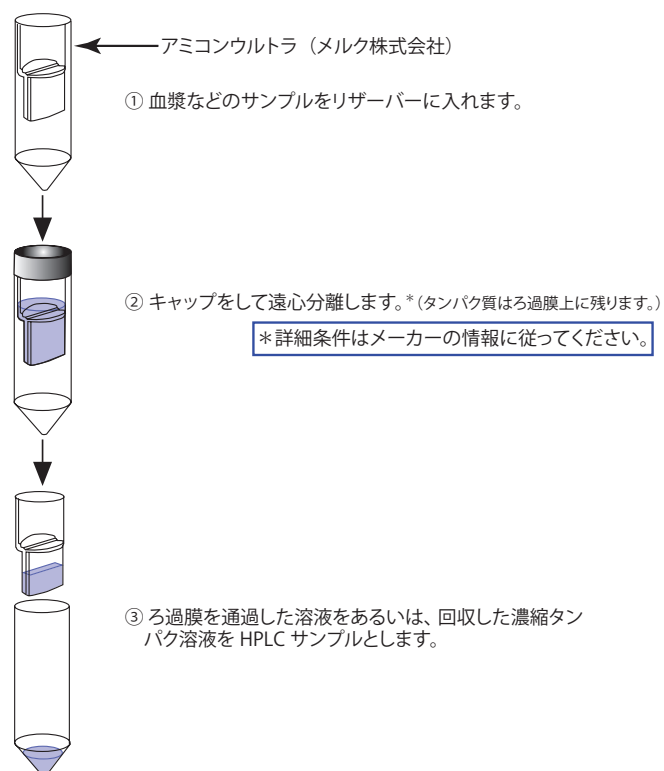
2) 除タンパク (タンパク質変性沈殿法)

血液中の薬物を分析する場合などはサンプル中にタンパク質が共存することが多く、そのまま HPLC 分析を行うとタンパク質がカラムに吸着しカラムの劣化を早めることになります。このため、サンプル中に共存するタンパク質を除くことが必要になります。



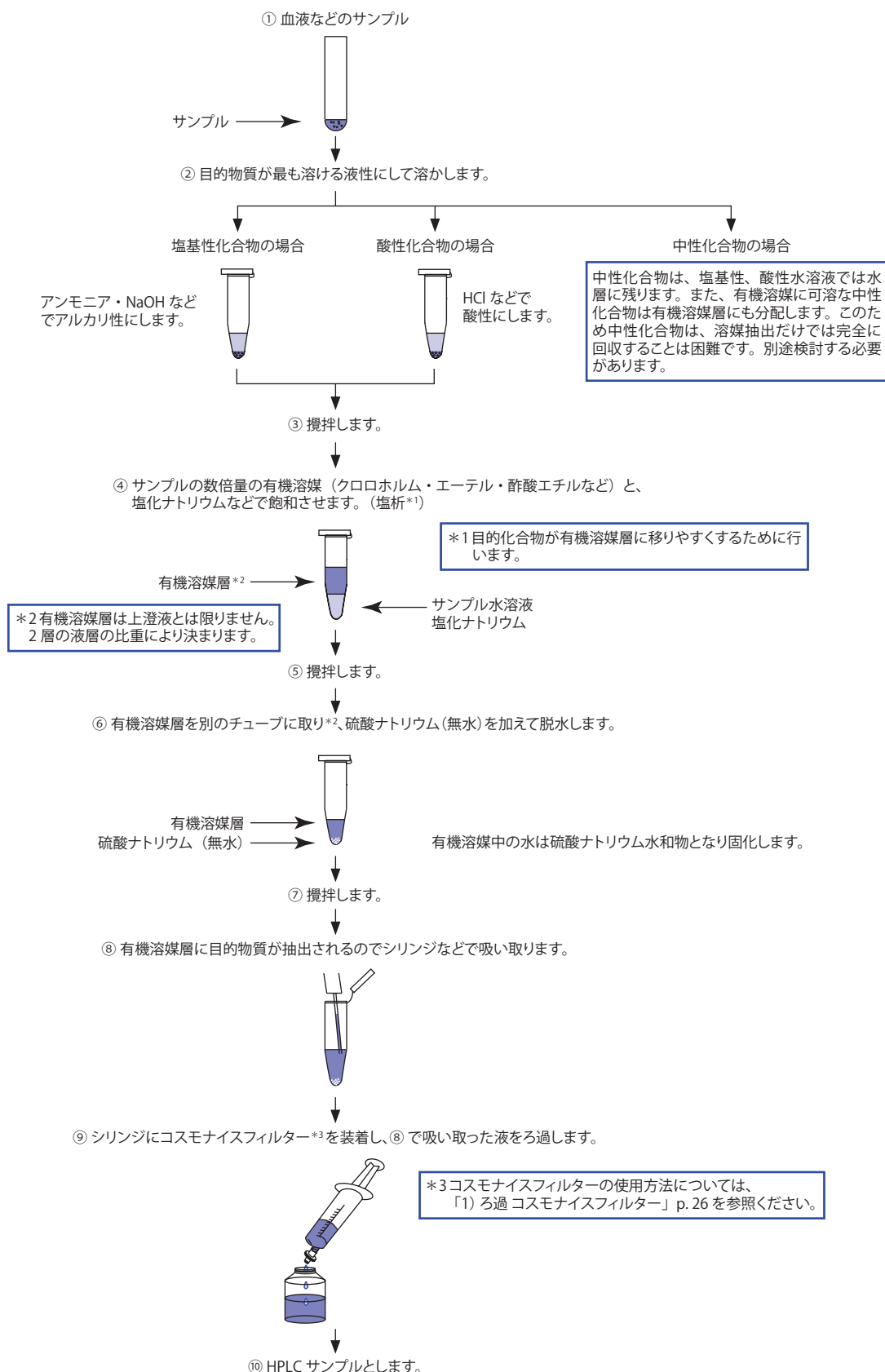
3) 限外ろ過

限外ろ過は、限外ろ過膜の細孔径よりも大きな分子と、小さな分子を分離する方法です。血清や血漿などの高濃度タンパク質溶液からの除タンパクや、尿などの希薄タンパク質溶液からのタンパク質の濃縮、または脱塩などに利用されます。



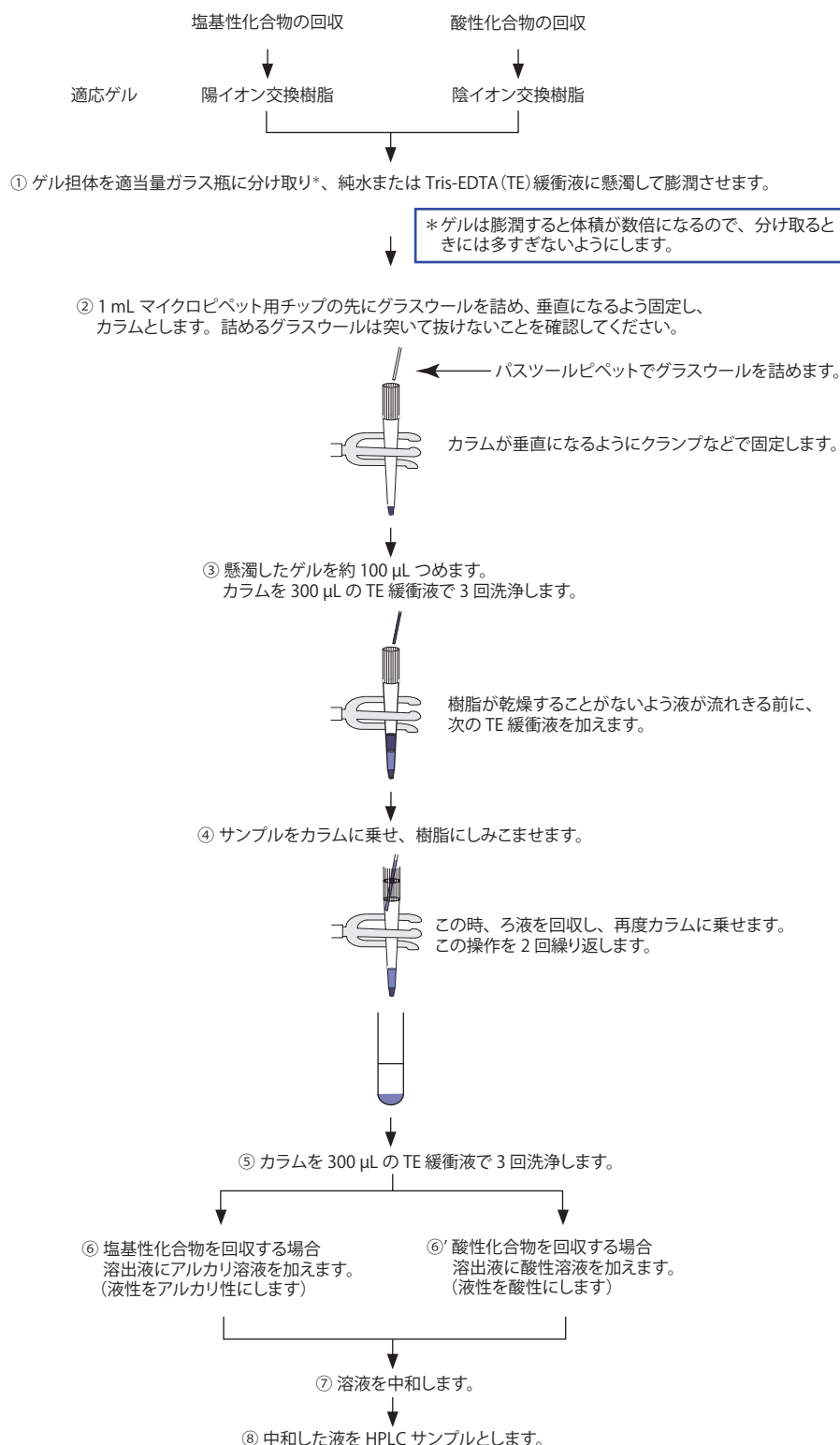
4) 溶媒抽出法

疎水性の高い薬物に適用される方法で、サンプルに緩衝液を加えて適当な pH に調整し、エーテル・クロロホルムなどの有機溶媒で目的物質を抽出します。この方法は濃縮が容易なため感度を高めることが可能ですが、目的物質がタンパク質と結合している場合には抽出できないことがあります。



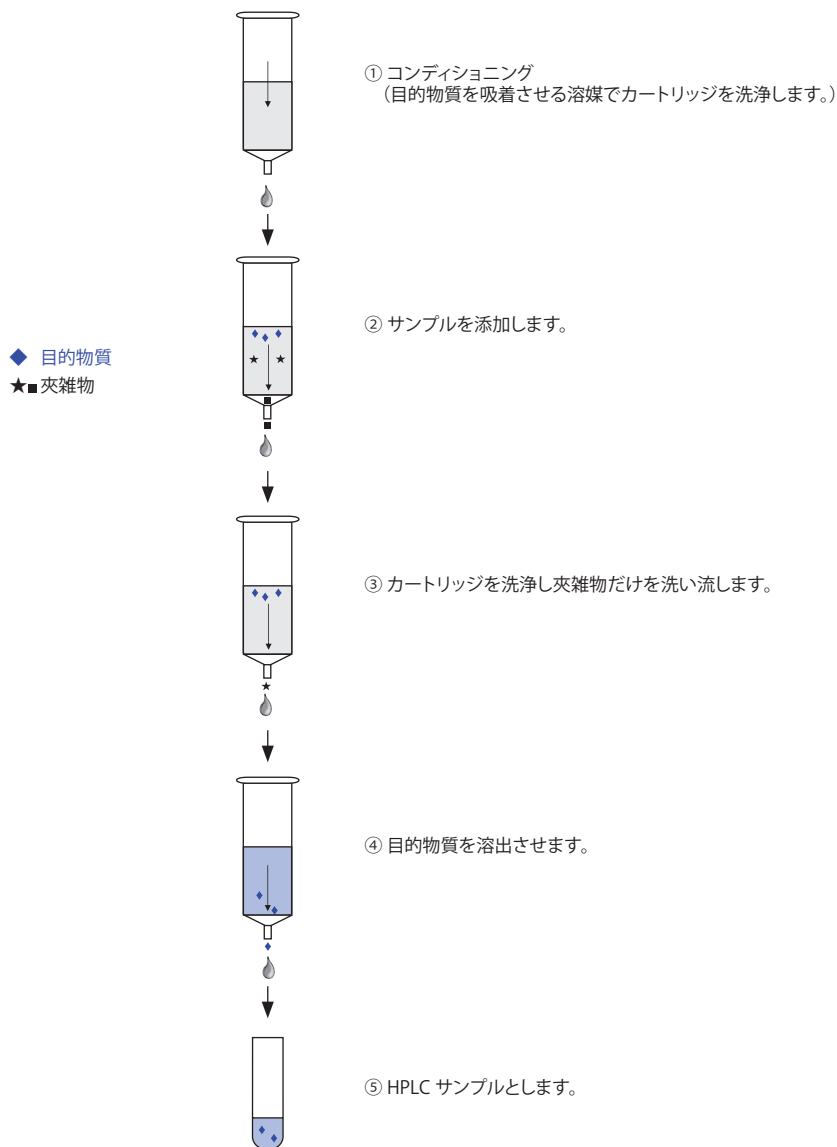
5) イオン交換

溶媒抽出では乳化したりして水層と有機溶媒層の分離が行えない場合などには、イオン交換樹脂(イオン交換体)を用いた前処理が有効です。ただし樹脂の交換容量とサンプル濃度の関係ならびに樹脂の吸着性などの問題をあらかじめ予備実験で確認しておく必要があります。例えば、目的化合物が負に強く電荷している場合 DEAE セルロース樹脂などの陰イオン交換樹脂に強く吸着します。このため、結合力の弱い他の夾雑物を洗い流した後、緩衝液の塩濃度を上げる、または pH を調整して溶出させることで目的化合物を回収できます。



6) 固相抽出

固相抽出とは、成分の固相への吸着（保持）と脱着を利用し、混合サンプルから目的物質を選択的に精製、濃縮を行う方法です。主として固相（充填剤）を充填したカートリッジカラムを利用します。また、夾雑物をカートリッジに吸着させて、目的物質のみを溶出させる方法もあります。



06 分析前の準備・分析終了後

1) 分析前の準備

- ① 分析室の空調のスイッチを ON にする (ベースラインの安定化のため、必要に応じて空調を入れ、室内の温度を最適化する)。
- ② HPLC 装置 (ポンプ、検出器、カラムオープン、データ処理器など) のスイッチを ON にする。
- ③ 移動相を調製する。「移動相の調製」p. 24、25 をご参照ください。
- ④ HPLC 装置の始動前に以下を確認する。

確認場所	確認ポイント
移動相貯槽 (a)	浮遊物が入っていないか？ →移動相を調製後、時間が経過している場合再調製する。 →調製直後はろ過をする。 容量は十分入っているか？
インレットチューブ (b)	気泡が入っていないか？ →ドレインバルブを開け、装置のパージ機能を使用して、十分に気泡を追い出してください。
ポンプのラインフィルター (c)	例：ポンプの出口配管を外してポンプの出口に何もつながっていない状態で水を 1 mL/min で送液したとき、圧力表示値が 0.3 MPa 以下 (詳細についてはポンプの取扱説明書をご参照ください)。
廃液瓶 (d)	廃液瓶に十分空きはあるか？

- ⑤ 移動相の置換を行う。
- ⑥ カラムを接続する。
- ⑦ 移動相を送液後、以下を確認する。

確認場所	確認ポイント
HPLC システム全体の流路 (e)	流路の接続部に漏れはないか？
オートサンプラー (g)	十分な量の洗浄溶媒が入っているか？ 測定サンプルのバイアル位置がずれていないか？
検出器 (i)	セルから液漏れしていないか？

- ⑧ 以下を確認後、分析を開始してください。
※グラジエント分析の場合は、ブランク分析 (サンプルを含まない水や溶媒のみの分析) を行ってから測定サンプルを分析してください。

確認場所	確認ポイント
ポンプ (f)	圧力は安定しているか？ 安定していない場合は、「T7. 送液ポンプの圧力が変動する」p. 45 をご参照ください。
カラムオープン (カラム恒温槽) (h)	温度は設定値に達しているか？
データ処理器 (j)	ベースラインは安定しているか？ 安定していない場合は、「T4. ベースラインが安定しない」p. 44 をご参照ください。

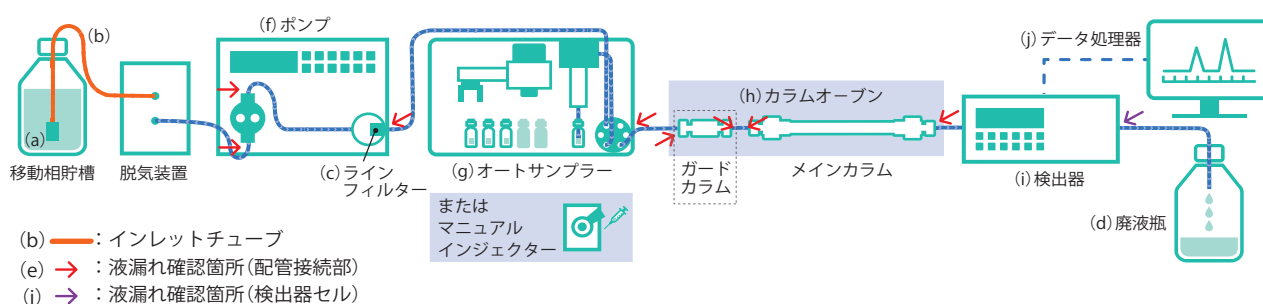


図 1. HPLC 基本装置の分析前確認ポイント

2) 分析終了後

しばらく分析を行わない場合は、カラムを洗浄した後、装置から取り外して保管してください。

- ① カラムの洗浄
カラムによって異なるため、取扱説明書を確認してください。コスモシールの場合は、よくあるご質問の「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 を参考にしてカラムを洗浄してください。
- ② カラムの保管
カラムによって異なるため、取扱説明書を確認してください。コスモシールの場合は、よくあるご質問の「Q14. カラムの保管方法は？」p. 38 を参考にしてカラムを保管してください。
- ③ 装置の洗浄
装置によって異なるため、取扱説明書を確認してください。
- ④ 各装置のスイッチを OFF にする。
- ⑤ 分析室の空調のスイッチを OFF にする。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

1) よくあるご質問・トラブルシューティング一覧

● よくあるご質問		掲載ページ
Q1	カラムの使用可能な圧力の上限は？	34
Q2	移動相の流速の上限は？	
Q3	カラムの使用可能なpHは？	
Q4	緩衝液や塩の濃度は？	
Q5	移動相の調製方法は？	35
Q6	移動相に用いる溶媒のグレードは？	
Q7	アセトニトリルとメタノールの違いは？	
Q8	LC-MSやELSD検出器で使用できる移動相は？	36
Q9	イオンペア試薬を使用するときの注意点は？	
Q10	移動相の送液方向は？	37
Q11	カラムの使用可能な温度は？	
Q12	カラム出荷時の封入溶媒は？	
Q13	カラムの洗浄方法は？	
Q14	カラムの保管方法は？	38
Q15	カラムの寿命は？	
Q16	劣化したカラムに起こる症状は？	
Q17	カラムの劣化状態の調べ方は？	
Q18	セミマイクロカラムを使用するときの注意点は？	39
Q19	UHPLCカラムを使用するときの注意点は？	
Q20	分取カラムで精製できる量は？	
Q21	同じ装置で逆相と順相の両方を使用するときの注意点は？	
Q22	水100%移動相で使用できるC ₁₈ カラムは？	
Q23	装置とカラムとの接続は？	
Q24	検出器の使い分けは？	
Q25	圧力の表示単位は？	40
Q26	デッドボリュームとは？	
Q27	サンプルの前処理方法は？	
Q28	内標準物質の選定方法は？	
Q29	取扱説明書の入手方法は？	

● トラブルシューティング		掲載ページ
T1	ピーク形状が悪い	41
T2	ゴーストピークが出る	42
T3	ピークが出てこない	43
T4	ベースラインが安定しない	44
T5	保持時間が安定しない	45
T6	カラム圧力が上昇した	
T7	送液ポンプの圧力が変動する	
T8	C ₁₈ カラムでサンプルの分離が悪い	46
T9	逆相クロマトグラフィーで保持がほとんどない	
T10	逆相クロマトグラフィーで分析時間が長い	
T11	分離の状態が以前と変わった	
T12	新品のカラムに変えると分離状態が変わった	47
T13	カラムからの溶出液が着色している(サンプル由来でない場合)	
T14	カラムを枯らしてしまった(カラムを乾燥させてしまった)	

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

2) よくあるご質問

Q1. カラムの使用可能な圧力の上限は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

カラム		カラムサイズなど	圧力の上限
以下を除く COSMOSIL カラム (主に逆相クロマトグラフィー用カラム)	粒子径 5、15 μm	分析用カラム (内径 1.0 ~ 7.5 mm)	20 MPa
		分取用カラム (内径 10 mm 以上)	15 MPa
	粒子径 3 μm	—	30 MPa
	粒子径 2.5 μm	—	
	粒子径 1.8 μm	—	80 MPa
COSMOCORE カラム		—	60 MPa
光学異性体分離用カラム (COSMOSIL CHIRAL シリーズ)		—	30 MPa
サイズ排除クロマトグラフィー用カラム (COSMOSIL 5Diol-II、CNT カラム)		5Diol-120-II、300-II は 20 MPa まで使用可能	15 MPa
RNA 分離用カラム		—	15 MPa
SFC 用カラム	カラム内径 (2.1 mm I.D.、4.6 mm I.D.、10 mm I.D.)		30 MPa
	カラム内径 (20 mm I.D.)		23 MPa

※使用可能な範囲内であっても大きな圧力変動はカラムに負担をかけ、劣化につながる恐れがありますのでできるだけ避けてください。

Q2. 移動相の流速の上限は？

Q1. に記載の使用可能な圧力以下であれば、流速をあげることが可能です。

※できるだけ「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 に示した標準流速での使用をお薦めします。一般的にカラム圧が高くなるほどカラムの寿命は短くなります。

Q3. カラムの使用可能なpHは？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

カラム		使用可能な pH
COSMOSIL シリーズ(全多孔性球状シリカゲル)	COSMOSIL C ₁₈ -MS-II、COSMOSIL 3C ₁₈ -EB	pH 2 ～ 10*
	COSMOSIL C ₁₈ -AR-II、COSMOSIL Protein-R	pH 1.5 ～ 7.5*
	COSMOSIL CHiRAL A、B、C	pH 2 ～ 9*
	上記以外のカラム	pH 2 ～ 7.5
COSMOCORE シリーズ(Core-shell 型シリカゲル)	COSMOCORE 2.6C ₁₈	pH 1.5 ～ 10*
	COSMOCORE シリーズ(2.6C ₁₈ 以外)	pH 2 ～ 7.5
COSMOGEL シリーズ(親水性ポリマー)	COSMOGEL IEX シリーズ	pH 2 ～ 12

*シリカベースのカラムでは一般的な推奨 pH は 2 ~ 7.5 の範囲になります。推奨 pH 外での使用は可能ですが劣化を早める恐れがあります。

Q4. 緩衝液や塩の濃度は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

分離モード	緩衝液、塩の濃度
逆相、順相、HILIC	緩衝液濃度範囲 (りん酸緩衝液など) : 0.005 ~ 0.1 mol/L 添加剤濃度 (トリフルオロ酢酸、ギ酸、酢酸など) : 0.1 ~ 1.0%
サイズ排除、疎水クロマト、イオン交換	緩衝液濃度上限 : 0.5 mol/L 以下 塩濃度上限 : 2 mol/L 以下
SFC	酸性化合物 : 0.1 % トリフルオロ酢酸、0.1 % 酢酸、0.1 % ギ酸 塩基性化合物 : 0.1 % ジエチルアミン

※

- 不溶物はカラムの劣化につながります。緩衝液や塩の溶液は必ずろ過してから使用してください。
例えばミリカップ -HV (#44054-89) を用いると簡単にろ過することができます。
- 分析中に塩が析出するとカラムや装置の故障の原因になりますので塩が析出しない濃度でご使用ください。
- 有機溶媒と混合後に塩が析出する場合がありますので、HPLC 装置内で移動相を混合する場合には特にご注意ください。
- 装置やカラム内に有機溶媒を多く含む場合、まず塩を含まない移動相で置換した後、塩を含む移動相を送液してください。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

Q5. 移動相の調製方法は？

「移動相の調製」p. 24、25 をご参照ください。

※

1. 有機溶媒比率、緩衝液の濃度や pH は分析結果に影響を与えるため正確に調製してください。
2. 有機溶媒と水溶液を混合した後は必ず脱気(脱気装置・超音波・アスピレーターなどで)を行ってください。
なお、脱気装置を使用する場合は脱気する必要はありません。

Q6. 移動相に用いる溶媒のグレードは？

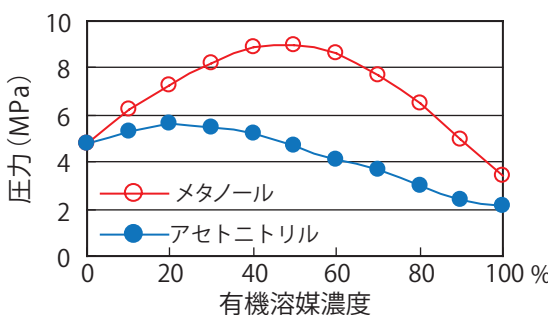
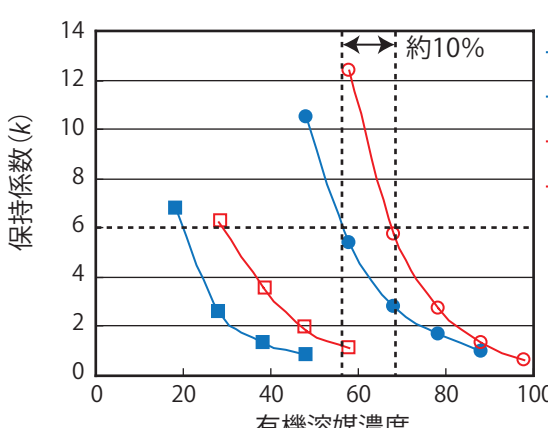
HPLC 用溶媒を使用することをお薦めします。HPLC 用溶媒については、Web ページ(<https://www.nacalai.co.jp/products/256/>)をご参照ください。

※

1. HPLC 以外のグレードの場合は、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には適していません。
特に 210～220 nm など短波長で検出する場合、ベースラインの安定性や検出感度に大きな差が生じ適正な分析ができない恐れがあります。
2. 酸化防止剤含有の HPLC 以外のグレードの溶媒(テトラヒドロフラン、クロロホルムなど)を使用すると含有されている酸化防止剤がゴーストピークの原因となります。
3. トリフルオロ酢酸など変質しやすい添加剤は、HPLC 用以外のグレードを使用するとベースラインの乱れの原因となる恐れがあります。

Q7. アセトニトリルとメタノールの違いは？

逆相クロマトグラフィーでは、有機溶媒としてアセトニトリルとメタノールがよく用いられます。
その違いを表にまとめたので、ご参照ください。

アセトニトリル(HPLC用)とメタノール(HPLC用)の比較		
圧 力	 Column: 5C₁₈-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm Flow rate: 1.0 ml/min Temperature: 30°C 圧力 (MPa) 有機溶媒濃度 メタノール アセトニトリル	カラムにかかる圧力は、有機溶媒の種類や混合比によって異なります。 同じ濃度の場合、アセトニトリルのほうがメタノールより圧力は低くなります。
溶出力	 Column: 5C₁₈-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm Flow rate: 1.0 ml/min Temperature: 30°C 保持係数 (k) 有機溶媒濃度 アセトニトリル(サンプル: トルエン) アセトニトリル(サンプル: フェノール) メタノール(サンプル: トルエン) メタノール(サンプル: フェノール)	同じ濃度比の(アセトニトリル/水)と(メタノール/水)では溶出力は(アセトニトリル/水)の方が強くなります。有機溶媒濃度約30%～80%の範囲では、(アセトニトリル/水)の有機溶媒濃度を約10%上げた(メタノール/水)でほぼ同等の溶出力となります。(例: アセトニトリル/水 = 60/40 → メタノール/水 = 70/30)
アセトニトリル(HPLC用)		メタノール(HPLC用)
吸光度	・低波長(250 nm以下)でのUV吸収が小さい ・低波長の分析に◎	・低波長(250 nm以下)でのUV吸収が大きい ・低波長の分析には×
移動相調製時	・水と混ぜると吸熱する ・気泡が抜けにくく脱気しにくい	・水と混ぜると発熱する ・気泡が抜けやすく脱気しやすい

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

Q8. LC-MSやELSD検出器で使用できる移動相は？

液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) や蒸発光散乱検出器 (ELSD) では揮発性の移動相を使う必要があります。HPLC で汎用されるりん酸緩衝液は使用できません。なお、LC/MS において HPLC 用の溶媒が汎用されていますが、高感度分析を行う場合には LC/MS 用の溶媒を推奨します。

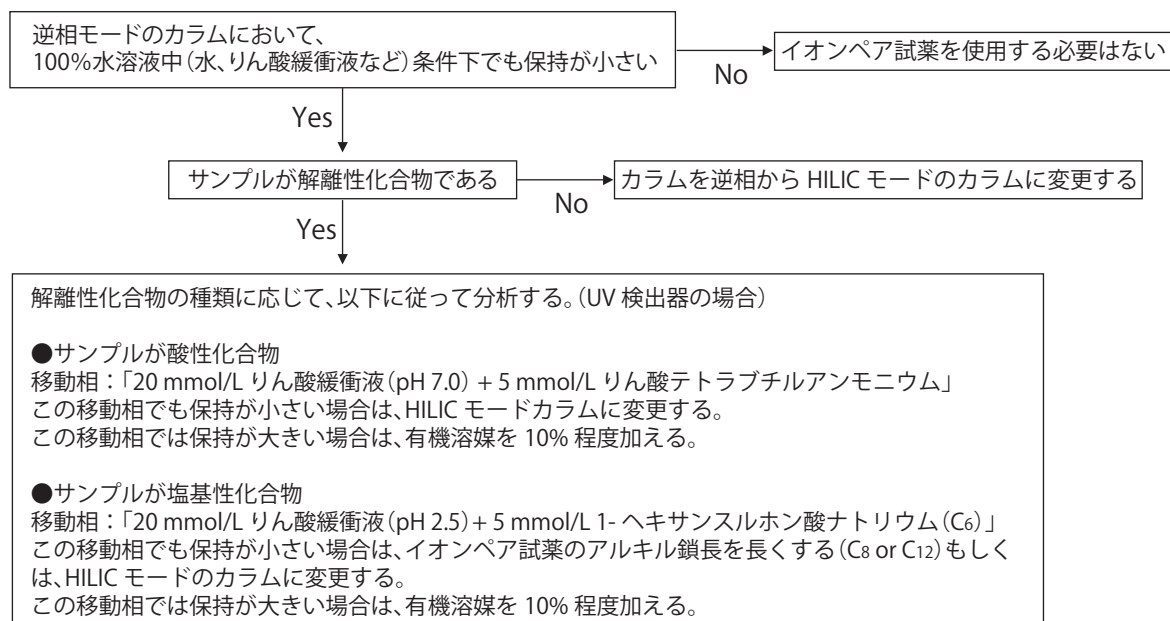
分類	使用可能な溶媒・添加剤
溶媒	メタノール、エタノール、アセトニトリル、水など
pH 調整試薬	酢酸、ギ酸、アンモニア水、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムなど
イオンペア試薬	ジブチルアミン、トリエチルアミンなど

※トリフルオロ酢酸は揮発性ですが、強酸であるためイオン化を妨害して感度低下を招くためあまり用いられていません。

その他、DMSO (ジメチルスルホキシド)、DMF (ジメチルホルムアミド) など揮発しにくい溶媒は少量であればメタノールやアセトニトリルと混合して使用することは可能です。ただし含有量が増えると揮発性が減少し感度が低下する恐れがあります。

Q9. イオンペア試薬を使用するときの注意点は？

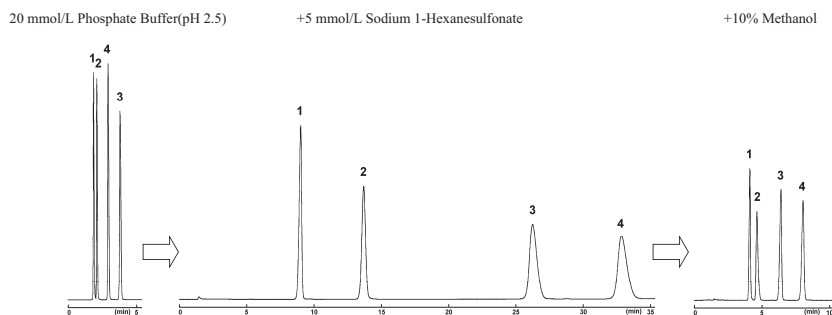
- ・イオンペア試薬の濃度は通常 5 ～ 10 mmol/L 程度で行ってください。
- ・酸性イオンペア試薬の場合は pH 7 の移動相、塩基性イオンペア試薬の場合は pH 2.5 の移動相で行います。
- ・平衡化時間を十分とってください。
- ・以下に弊社が推奨するイオンペア試薬の条件設定方法を示します。



イオンペア試薬の条件設定

Column: 5C₁₈-PAQ
Column size: 4.6 mm I.D. × 150 mm
Mobile phase: 20 mmol/L Phosphate Buffer (pH 2.5) + 5 mmol/L Sodium 1-Hexanesulfonate + 10% Methanol
Flow rate: 10 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV 270 nm

Sample: 1; L-Noradrenaline
2; L-Adrenaline
3; L-DOPA
4; Dopamine



※

1. イオンペア濃度が高くなるほど保持時間は長くなります。
2. 移動相の pH はサンプルが十分にイオン化する pH に設定してください。
3. イオンペア試薬を含まない移動相に比べて長い平衡化時間が必要です。
4. イオンペア試薬を用いるとカラムの洗浄を行っても完全にイオンペア試薬を除去することは難しいため、カラムをイオンペア試薬使用専用にご使用することをお勧めします。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

Q10. 移動相の送液方向は？

カラムのラベルに記載されている方向に送液してください。

※逆方向に送液するとカラム内部の充填剤の充填状態が乱れ、理論段数の低下の原因となります。

また、カラムの入り口側の先端部分に不純物が吸着していることがあるため、検出器や配管を汚し、ノイズの原因にもなります。

Q11. カラムの使用可能な温度は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

70℃程度まで分析可能ですが、通常は 20～50℃の一定温度で分析を行ってください。SFC 用カラムは、50℃以下でご利用ください。

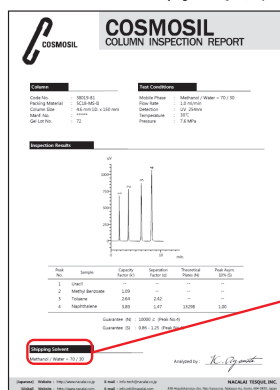
※

1. アルカリ性・酸性条件下での高温分析は、特に劣化を早める恐れがあります。
2. カラムの温度によって保持時間は変動するので分析中は一定の温度を保ってください。なお、一般的に温度が高いほどカラム圧力は低く、保持時間は短くなります。

Q12. カラム出荷時の封入溶媒は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。

コスモシールに関しては、カラムの検査成績書の下部に記載されています。



Shipping Solvent

Methanol / Water = 70 / 30

Q13. カラムの洗浄方法は？

- ① カラム内の緩衝液、塩、酸を除去する方法

ご使用の移動相から緩衝液、塩、酸を抜いた溶媒で 10～15 分洗浄後、保管してください。

(例：メタノール / 20 mmol/L リン酸緩衝液 = 50 / 50 を使用していた場合は、メタノール / 水 = 50 / 50 で洗浄してください。)

※有機溶媒と水の比率を変えると、緩衝液の成分が析出する場合があります。

- ② カラム内の吸着物を洗浄する方法、ベースラインが安定しない場合の改善方法

サンプルをよく溶かし、かつ、溶出力の強い溶媒で洗浄してください。コスモシールに関しては以下に示します。

分離モード / 用途	使用可能な溶媒・添加剤
逆相 p. 38 へ	(1) サンプルがタンパク質でない場合 メタノールやテトラヒドロフランなど 逆相クロマトグラフ用カラム洗浄キット (#08966-30) (2) サンプルがタンパク質の場合 0.1% 程度トリフルオロ酢酸含有の 50～70% 程度のアセトニトリル / 水 ※タンパク質の種類により有機溶媒濃度が高くなると析出する場合があります。
順相	メタノール、テトラヒドロフラン、エタノールなど
キラル分離用カラム	使用条件(逆相、順相)によって異なります。上記をご参照ください。
HILIC	アセトニトリル / 水 = 50 / 50 Sugar-D および HILIC は水 100% での洗浄も可能です。
サイズ排除	(例) 蒸留水など
疎水クロマト	(例) 蒸留水など
イオン交換	20～50 mmol/L 緩衝液 (pH 4.5～9.5) など
フラーレン用カラム	1,2,4- トリクロロベンゼンなど
SFC 用カラム	メタノール、アセトニトリルなど

※シリカゲルを溶解するような pH 7.5 以上のアルカリ性水溶液および、固定相を剥離するような pH 1.5 以下の強酸の溶液は使用できません。シリカベースのカラムでは一般的な使用推奨 pH は 2～7.5 の範囲になります。推奨 pH 外での使用は可能ですが、劣化を早める恐れがあります。

- ③ カラムの入り口側の先端部分につまった不溶物を除去する方法

カラムの送液方法とは逆向きに、通常分析時の半分程度の流速で洗浄します。

※カラムの出口側は検出器から外した状態で行ってください。

- ④ カラム圧力が高い場合には、「4) 分析圧力上昇時の対処方法」p. 48 をご参照ください。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

Q14. カラムの保管方法は？

カラムによって異なるため、メーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

① 短期間(数日)の保管

ご使用の移動相から緩衝液、塩、酸を抜いた溶媒で 10 ～ 15 分洗浄後、密栓して保管してください。

(例: メタノール / 20 mmol/L リン酸緩衝液 = 50 / 50 を使用していた場合は、メタノール / 水 = 50 / 50 で洗浄してください)

コスモゲル IEX(イオン交換カラム)は、20 ～ 50 mmol/L 緩衝液 (pH 4.5 ～ 9.5) で保存してください。

② 長期間(1 ヶ月以上)の場合

カビの発生、カラムの乾燥、充填剤の劣化を防ぐため以下の溶媒に置換してください。

分離モード / 用途	推奨の保存溶媒
逆相 	メタノール / 水 = 70 / 30、アセトニトリル / 水 = 70 / 30 など
順相	ハロゲンや酸を含まない有機溶媒 (ヘキサン / エタノール = 90 / 10 など)
キラル分離用カラム	【順相】 n-ヘキサン / 2-プロパノール = 90 / 10 など 【逆相】 エタノールなど
HILIC	アセトニトリル / 水 = 90 / 10 など
サイズ排除、疎水クロマト、イオン交換	0.05% アジ化ナトリウム水溶液など
フラーレン用カラム	トルエンなど
SFC 用カラム	メタノール、エタノールなど

※いずれの場合も密栓をしっかり締め、振動のない冷暗所で保管してください。

動画はこちら！



逆相 HPLC カラムの
洗浄・保管方法



Q15. カラムの寿命は？

使用条件(サンプルの種類、移動相の有機溶媒濃度・塩の種類・酸の種類・pH など)によってカラムの寿命は変化するため一概には言えません。

※カラム寿命が短い場合、原因がサンプル由来であることがほとんどです。サンプルの前処理についてご検討いただくことをお勧めします。サンプルの前処理については p. 26 ～ をご参照ください。

Q16. 劣化したカラムに起こる症状は？

カラム圧力の上昇、理論段数の低下、保持時間の減少、ピーク形状の崩れ、分離度の低下などが起こります。

※対処法については「3) トラブルシューティング」p. 41 ～ をご参照ください。

Q17. カラムの劣化状態の調べ方は？

カラムに添付されています、「検査成績書」と同条件もしくは同等条件で測定し、カラムの劣化の程度を評価してください。評価される場合は毎回同じ装置で測定し、記録をとっておくと劣化の程度がよく分かります。

各項目についてカラム交換の基準を設け、外れている場合はカラム交換をお勧めします。

評価項目	評価内容
保持係数(k)	固定相が切断されると保持係数が小さくなります。
理論段数(N)	充填剤の汚れや充填状態の変化によって低下します。
ピーク対称性(S)	充填状態の乱れ、汚れの吸着によってピーク対称性が悪くなります。
圧力	カラムのフィルターの目詰まり、充填剤へのサンプルの吸着、充填剤の微細化などにより、高くなります。

【参考】コスモシールに関しては以下に示します。

カラム交換の基準については使用される方の状況によるため一概には言えませんが、目安として 5C₁₈-MS-II(4.6 mm I.D. × 150 mm) での参考値を示します。

- 保持係数(k) : ナフタレンの k が初期値の 90% 以下
- ピーク対称性(S) : 0.86 ～ 1.25 の範囲から外れる
- 理論段数(N) : 9,000 以下
- 圧力 : 20 MPa 以上

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

Q18. セミマイクロカラムを使用するときの注意点は？

インジェクター、配管、検出器のセルをセミマイクロ用にしてください。

※移動相の流速をカラムの断面積に比例して設定してください。具体的には、「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 をご参照ください。

Q19. UHPLCカラムを使用するときの注意点は？

- ・UHPLC 対応の装置を使用してください。
- ・一般の HPLC 装置をご使用の場合には、検出器のレスポンスを短く (例: 0.02 sec) してください。
- ・インジェクター、配管、検出器の検出セルをセミマイクロ用にしてください。
- ・カラムは、使用可能な圧力の上限值以下でご使用ください。コスモシール 2.5 μm シリーズ (全多孔性球状シリカゲル) は 30 MPa 以下、コスモコア シリーズ (Core-Shell 型シリカゲル) は、60 MPa 以下でご使用ください。

Q20. 分取カラムで精製できる量は？

サンプルの分離度や移動相に対する溶解性により大きく異なります。まず分析用カラムで最大負荷量を決定し、カラムの内径の断面積比から最大分取量を決定します。

※カラムの内径、流速、配管などは「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 をご参照ください。

Q21. 同じ装置で逆相と順相の両方を使用するときの注意点は？

エタノールなど、どちらの移動相にも混じりあう溶媒で置換してから使用する移動相に切り替えてください。

※逆相系の移動相 (メタノール / 水など) と順相系の移動相 (*n*-ヘキサンなど) は混じりあわないため、直接移動相を交換すると、溶媒置換がうまくできません。

Q22. 水100%移動相で使用できるC₁₈カラムは？

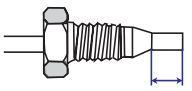
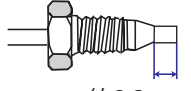
カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

COSMOSIL C₁₈-PAQ と COSMOSIL 3C₁₈-EB が該当します。なお、C₁₈ カラム以外のカラムについては、お問い合わせください。

Q23. 装置とカラムとの接続は？

装置側の接続パーツには、主に 2 種類の形状が存在します。下図 (左) の接続パーツ (Waters 型と呼ばれ、一般的な HPLC 装置に汎用されています) と下図 (右) の接続パーツ (UHPLC 装置に汎用されています) があり、それぞれチューブ先端の長さが異なります。また、カラム側のジョイントの形状はメーカーによって異なり、間違ったものを接続するとデットボリュームが生じたり、液漏れの原因となるため、注意してください。

弊社では、コスモシール、コスモゲルカラムは下図 (左) と接続可能であり、コスモコアカラムは下図 (右) と接続可能です。なお、可動式の接続パーツをご使用の場合には、いずれのカラムも接続することが可能です。初めて使用になられる場合には、念のため使用されている装置のメーカーに接続パーツの形状をお問い合わせください。

	HPLC 装置型 コスモシール、コスモゲル	UHPLC 装置型 コスモコア
接続可能な装置の 接続パーツの形状	 約3.3 mm	 約2.3 mm

フェラル先端から出ているチューブの長さが異なります。

Q24. 検出器の使い分けは？

検出器の選択はサンプルの性質や測定の目的に応じて選択してください。

検出器	特長
紫外可視光度検出器 (UV/VIS 検出器)	【検出方法】 サンプルの吸光度を検出 【適用化合物】 UV 吸収がある化合物やラベル化したサンプル (高感度での分析が可能) UV 吸収がない化合物には適用不可 【特長】 簡便であり、最も汎用されています
蛍光検出器 (FLD 検出器)	【検出方法】 光を照射して励起されたサンプルの蛍光を検出 【適用化合物】 蛍光性を持っているサンプル 【特長】 UV 吸収が小さい、あるいはない化合物を蛍光ラベル化したサンプルの分析や検出感度が高いため微量成分の分析にも使用します
示差屈折率検出器 (RI 検出器)	【検出方法】 サンプルと移動相の屈折率の差によって検出 【適用化合物】 全サンプル 【特長】 UV 吸収が小さい、あるいはない化合物 (糖・アルコール類・アミノ酸など) の分析に使用されます 欠点として温度・移動相組成・流量変化に非常に敏感であり取り扱いには注意が必要です グラジエント分析には適用不可

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

電気化学検出器 (ECD 検出器)	【検出方法】 電極表面のサンプルの酸化還元反応により流れた電流を測定し検出 【適用化合物】 酸化・還元性化合物など電気化学的に活性化化合物 【特長】 UV より高感度に検出できるので生体マトリックス内の微量成分の分析などに使用
蒸発光散乱検出器 (ELSD 検出器)	【検出方法】 移動相を蒸発させることにより目的化合物を微粒子化し、その散乱光を測定し検出 【適用化合物】 UV 吸収が小さい、あるいはない化合物（糖・アルコール類・アミノ酸など） 【特長】 グラジエント分析にも使用可能 欠点として不揮発性の移動相は使用できません
質量分析検出器 (MS 検出器)	【検出方法】 サンプルをイオン化し、m/z に応じて分離・検出する 【適用化合物】 液体に溶解しイオン化する化合物 【特長】 分離した成分の MS スペクトルを測定することができ、定性分析に有用です 欠点として不揮発性の移動相は使用できません

Q25. 圧力の表示単位は？

多くは SI 単位である MPa (メガパスカル) で表示されています。

※海外製や古い装置ではほかの表示も見られます。(換算式: 1 MPa = 10.197 kgf/cm² = 145.0 psi = 10 bar)

Q26. デッドボリウムとは？

デッドボリウムとは、インジェクターから検出器までの流路で、カラム以外での分離に関係のない容積を指します。

※

1. デッドボリウムが大きいと、サンプルの拡散が起こり、ピーク形状の異常を引き起こす恐れがあります。
2. インジェクターや検出器のセル、インジェクターから検出器までの配管は、カラム内径にあったものを選択しデッドボリウムをできるだけ減らす必要があります。

配管の内径、セルの選択については「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 をご参照ください。

Q27. サンプルの前処理方法は？

「サンプルの前処理」p. 26 ～ をご参照ください。

Q28. 内標準物質の選定方法は？

内標準物質は以下のような条件を満たせばどのような化合物でも使用可能です。

- ・目的物質とピークが重ならず、かつ近い位置にピークが現れること
- ・テーリングや吸着を起こさないこと
- ・入手が容易で安価であること
- ・化合物として安定であること

日本薬局方では、Methyl *p*-Hydroxybenzoate ～ Butyl *p*-Hydroxybenzoate が汎用されています。

Q29. 取扱説明書の入手方法は？

弊社の場合、各製品ページ (<https://www.nacalai.co.jp/products/chromatography/>) の「関連資料」から入手ください。

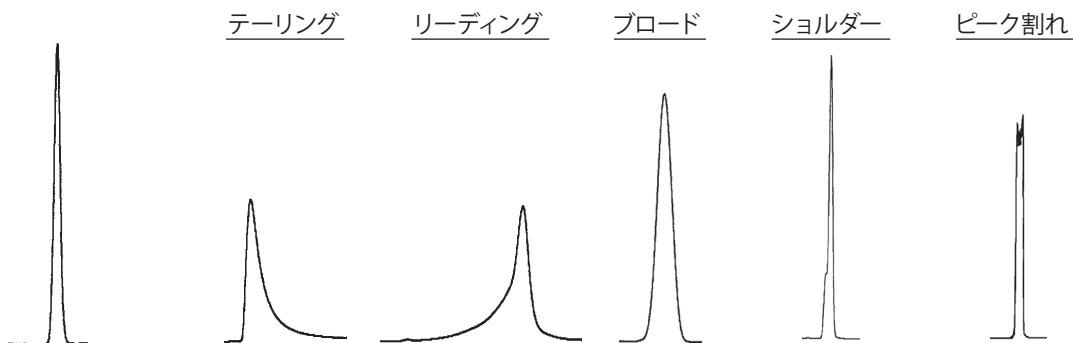
07 よくあるご質問・トラブルシューティング

3) トラブルシューティング

T1. ピーク形状が悪い

正常なピーク形状

異常なピーク形状



症状	原因	対処法
特定のピークのみテーリングしている。	塩基性化合物と充填剤が好ましくないイオン性相互作用をしている可能性があります。	残存シラノールの少ないカラムに変更してください。コスモシルでは、3C ₁₈ -EB または C ₁₈ -MS-II をお勧めします。あるいは、移動相に酸を 0.1 ~ 1.0% 程度添加します。
	金属配位性化合物と充填剤が好ましくない配位性相互作用をしている可能性があります。	移動相に 5 mmol/L 程度のエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム (EDTA・2Na) を添加します。
	サンプルと充填剤が好ましくない水素結合性相互作用をしている可能性があります。	有機溶媒の種類を変更します。 (例: アセトニトリルからメタノールに変えるなど)
全てのピークがテーリングしている。	充填剤に隙間が発生している。もしくはカラムが劣化している可能性があります。	カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。
	カラムを交換しても改善しない場合は、カラム外でバンド拡散している可能性があります。	デッドボリウムを減らしてください。(デッドボリウムに関しては「Q26. デッドボリウムとは？」 p. 40 をご参照ください。
ピークがリーディングしている。	移動相と比べて溶出力や pH の差が大きいサンプル溶媒を大量に注入したことが原因である可能性があります。	サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒を少量用いて溶かし、移動相で希釈してください。 注入量を 1/2 ~ 1/10 程度に減らしてください。
ピークがブロードになる。 タンパク質などの高分子 (一般的な目安: 分子量 2,000 以上) を分析している。	分子サイズの大きなタンパク質が充填剤の細孔径に入れないことが原因である可能性があります。	大きな細孔を持つ充填剤のカラムに変更してください。コスモシルでは、細孔径が大きいタンパク質分離用逆相クロマトグラフィー用カラムである Protein-R (細孔径 30 nm) をお勧めします。
	サンプルが過負荷である可能性があります。	注入量を 1/2 ~ 1/10 程度に減らしてください。
	特定のピークのみブロードになる場合、充填剤に化合物が吸着を起こしている可能性があります。	吸着が起こりにくいカラムに変更してください。コスモシルでは、タンパク質分離用逆相クロマトグラフィー用カラムである Protein-R をお勧めします。
	全てのピークがブロードになる場合、カラムが劣化している可能性があります。	カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。
ピークがブロードになる。 低分子(分子量 2,000 以下) を分析している。	疎水クロマトグラフィー用カラム(HIC)において、サンプル溶液中の硫酸アンモニウム濃度が低すぎる可能性があります。	硫酸アンモニウム濃度を 1 mol/L 以上にして再調製してください。
	サンプルが過負荷である可能性があります。	注入量を半分~ 1/10 程度に減らしてください。
	特定のピークのみブロードになる場合、充填剤に化合物が吸着を起こしている可能性があります。	例えば、サンプルが塩基性化合物やフェノール性化合物の場合、移動相に酸を添加して再検討してください。酸を添加しても改善しないときは、異なる充填剤のカラムへ変更してください。 コスモシルでは、3C ₁₈ -EB、C ₁₈ -MS-II をお勧めします。
	全てのピークがブロードになる場合、カラムが劣化している可能性があります。	カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

症状	原因	対処法
特定のピークのみショルダーやピーク割れしている。	2つ以上の成分が含まれており、わずかに分離している可能性があります。	2つ以上の成分をより分離できる分析条件を検討してください。
	移動相とサンプル溶媒において、溶出力やサンプルの溶解性が大きく異なる可能性があります。	サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒に溶かし移動相で希釈してください。 注入量を 1/2 ～ 1/10 程度に減らしてください。
	イオン性のサンプルにおいて、解離・非解離が混在している可能性があります。	イオン性のサンプルにおいては、移動相の pH をイオン性サンプルの pKa ± 2 以上に設定しなおしてください。
	糖の HILIC 分析の場合、アノマー分離している可能性があります。	糖においては、アノマー分離しにくい分析条件を検討してください。 コスモシールでは、Sugar-D をお勧めします。
全てのピークがショルダーやピーク割れを起こしている。	移動相とサンプル溶媒において、溶出力やサンプルの溶解性が大きく異なる可能性があります。	サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒に溶かし移動相で希釈してください。 注入量を 1/2 ～ 1/10 程度に減らしてください。
	カラムが劣化している可能性があります。	カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。

T2. ゴーストピークが出る

該当する分離モード	原因	対処法
<逆相> グラジエント溶離法を用いている。	水に含まれる不純物ピークである可能性があります。	新しい HPLC 用蒸留水をご使用ください。 プレカラムを接続してください。 「5) グラジエント溶離法におけるベースラインの乱れ」 p. 50 をご参照ください。
<逆相> タンパク質の分析を行っている。	前に分析したサンプルの一部がカラムに吸着し、次の分析時に溶出しています。	カラムを洗浄してください。洗浄方法は「Q13. カラムの洗浄方法は？」 p. 37 をご参照ください。 コスモシールでは、吸着が起こりにくい Protein-R をお勧めします。
<全ての分離モード> サンプル溶媒と移動相が異なっている。	サンプル溶媒のピークである可能性があります。	サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒に溶かし移動相で希釈してください。
<全ての分離モード> ブランク分析として移動相を注入した時にピークが出現(分析ごとにピーク面積の減少が見られる)	インジェクターの汚染が考えられます。	汚れを溶解するような溶媒(メタノールなど)をシリンジを用いて 20 mL 程度注入して洗浄してください。 オートインジェクターの場合は洗浄方法(溶媒、量、回数など)をご確認ください。
	マイクロシリンジの汚染が考えられます。	汚れを溶解するような溶媒(メタノール、クロロホルム、水など)で洗浄してください。超音波洗浄が有効です。
上記以外	サンプルのコンタミネーションや劣化が考えられます。	サンプルを再調製してください。
	移動相の安定剤。	安定剤を含まない HPLC 用溶媒で調製してください。
	サクションフィルターが汚れている可能性があります。	サクションフィルターを 2-プロパノールに浸し、超音波洗浄器で 5 分洗浄してください。

T3. ピークが出てこない

【原因特定方法】まず、 t_0 を分析してください。

※ t_0 とは、カラムに全く保持されない物質の溶出時間のことです。カラムに添付されている検査成績書の一番前のピークの物質などをご使用ください。(クロマトグラム p.5 をご参照ください)

t_0 を分析した結果	該当する項目
t_0 の保持時間はいつもと変わらない	カラム別対処法
t_0 の保持時間がいつもと違う	ポンプの異常
t_0 が検出されない	検出器の異常

● カラム別対処法(※コスモシールについて記載)

該当するカラム	原因	対処法
逆相クロマトグラフィー用カラム	サンプルの疎水性が高い場合は、カラム内にとどまっている可能性があります。	サンプルが溶出してくる程度まで、移動相の溶出力を高めてください。 ① メタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒濃度を上げてください(最大 100% まで)。 ② それでも溶出しない場合は、さらに溶出力の高い有機溶媒(テトラヒドロフランやクロロホルムなど)を 10 ~ 30% 程度メタノールやアセトニトリルに混ぜた移動相に変更してください(例: テトラヒドロフラン / メタノール = 30 / 70)。
	金属配位性化合物や塩基性化合物などがカラムに吸着している可能性があります。	塩基性化合物の場合 残存シラノールの影響が考えられます。コスモシール 3C ₁₈ -EB または C ₁₈ -MS-II など残存シラノールの少ないカラムへ変更してください。あるいは、移動相に酸(トリフルオロ酢酸や酢酸など)を 0.1 ~ 1.0% 程度添加してください。 金属配位性化合物の場合 充填剤に含まれる微量の金属不純物との配位が考えられます。移動相に 5 mmol/L 程度エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム(EDTA・2Na)を添加してください。
順相クロマトグラフィー用カラム	サンプルの親水性が高い場合は、カラム内にとどまっている可能性があります。	サンプルが溶出してくる程度まで、移動相の溶出力を高めてください。例えば、溶出力の高い有機溶媒(エタノールなど)へ変更、もしくは含有量を高めてください。
	金属配位性化合物や塩基性化合物などがカラム内で吸着している可能性があります。	移動相に酸(トリフルオロ酢酸や酢酸など)を 0.1 ~ 1.0% 程度添加してください。
糖分析専用カラム (Sugar-D・NH ₂ -MS)や親水性クロマトグラフィー用カラム(HILIC)	コスモシール 5NH ₂ -MS を使用している場合は固定相のアミノ基にサンプルが吸着している可能性があります。	吸着を起こしにくい コスモシール Sugar-D を使用してください。
	サンプルの親水性が強い場合はカラム内にとどまっている可能性があります。	サンプルが溶出してくる程度まで、移動相の水の割合を増やしてください。 例: コスモシール Sugar-D やコスモシール HILIC の場合 水 100% の条件まで使用可能です。 例: コスモシール 5NH ₂ -MS の場合 水 50% の条件(例アセトニトリル / 水 = 50 / 50)まで使用可能です。
	HILIC カラムにおいては、りん酸基のある化合物は溶出しない可能性があります。	移動相をりん酸緩衝液にしてください。
サイズ排除クロマトグラフィー用カラム(Diol)	サンプルとシラノール基が、イオンの相互作用を起こしている可能性があります。	移動相のイオン強度を高めるため、0.3 mol/L 程度塩化ナトリウムなどの塩を加えてください。 イオンの相互作用を起こさないように、移動相を pH 5.5 以下に調整してください。
	疎水的吸着を起こしている可能性があります。	移動相に 10 ~ 50% 程度有機溶媒(メタノールなど)を、添加してください。
疎水クロマトグラフィー用カラム(HIC)	サンプルの疎水性が高すぎる可能性があります。	5% 程度有機溶媒(メタノールやアセトニトリルなど)を、添加してください。
	インジェクションする前に、サンプルが硫酸沈殿している可能性があります。	硫酸アンモニウム濃度を 0.5 mol/L 以下まで下げ、沈殿しないようにしてください。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

● ポンプの異常

原因	対処法
ポンプ内で気泡が発生している。	気泡を抜いてください。「T7. 送液ポンプの圧力が変動する」p. 45 をご参照ください。
液漏れしている。	増締めや配管の交換をしてください。

● 検出器の異常

原因	対処法
検出器が正しく接続されていない。	検出器付属の取扱説明書を参考に正しく接続してください。
検出器からレコーダーに信号が適切に送られていない。	信号が出ていないなど検出器自体に問題がある場合は、機器メーカーにお問い合わせください。
サンプルの UV 吸収にあう領域で分析していない。	サンプルに対して適切な UV 吸収領域で分析してください。UV 吸収がない、もしくは UV 吸収が小さい場合は、示差屈折率 (RI) 検出器や蒸発光散乱 (ELSD) 検出器などサンプルにあった検出器を使用してください。またはサンプルをラベル化してください。

T4. ベースラインが安定しない

原因	対処法
カラム内に不純物などが蓄積されて汚れており、その汚れが溶出している可能性があります。	「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 に示す溶出力の強い溶媒で洗浄を行ってください。
コスモシル PE-MS・ π NAP・PYE・NPE・PBr・Cholest などで固定相自体に UV 吸収があるカラムを使用している場合、微量の固定相の剥離によって (UV 吸収があるため) ベースラインが安定しない可能性があります。	「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 に示す溶出力の強い溶媒で洗浄を行ってください。
ポンプの圧力が変動している場合は、ポンプに空気が混入している可能性があります。	気泡を抜いてください。「T7. 送液ポンプの圧力が変動する」p. 45 をご参照ください。
示差屈折率検出器 (RI 検出器) を使用している場合	
温度変化が激しいことが原因である可能性があります。	カラムオープンを用いてカラムの温度を一定にするだけでなく、エアコンの風が直接 RI 検出器や配管に当たらないようにしてください。 ※装置や配管をエアコンの風が当たらないように覆うなども有効です。
(移動相中の) 残存ガス量が増加していることが原因である可能性があります。	脱気 (脱気装置・超音波・アスピレーターなど) を必ず行ってください。
紫外可視光度検出器において針のようなピークが出ている場合	
カラムおよび検出器に気泡が混入している可能性があります。	検出器の出口を押さえ、加圧し気泡を抜いてください。 ※圧力をかけすぎるとセルが破損する恐れがありますので注意してください。それでも改善しない場合は、カラムを装着していない状態で粘度の高い溶媒 (2- プロパノール など) を 15 分程度流してください。
カラムの温度が移動相の沸点以上になっており、カラム内に気泡が発生している可能性があります。	適切なカラムの温度で分析してください。通常カラムの温度は 20 ～ 50℃で行います。 ※正確な分析を行うために、移動相の沸点より 20 ～ 50℃低い温度に設定することをお勧めします。(例: メタノール [沸点 (b.p) : 64.7℃] の場合、45℃以下で分析を行うことをお勧めします)
移動相に緩衝液やイオンペア試薬を使用している場合	
カラムの平衡化不足が原因である可能性があります。	平衡化時間を長くしてください。特に、緩衝液やイオンペア試薬を使用した場合、塩を含まない移動相に比べて長い平衡化時間が必要です。
移動相中に塩などが析出している可能性があります。塩が析出している場合は、移動相貯槽が濁っている、もしくは沈殿があるなど目視で確認することができます。	(a) 緩衝液の濃度を下げる。 (例: 100 mmol/L から 20 mmol/L へ) (b) 緩衝液の種類を変更する。 (例: リン酸バッファーから酢酸バッファーへ) (c) 有機溶媒濃度を下げる。 (例: 70% アセトニトリル / 緩衝液 = 70 / 30 から 50 / 50 へ) (d) 有機溶媒を変更する。 (例: アセトニトリルからメタノールへ)

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

T5. 保持時間が安定しない

● カラムに原因

該当するカラム	原因	対処法
逆相クロマトグラフィー用カラム	移動相にイオンペア試薬を使用している場合、カラムの平衡化不足が原因である可能性があります。 C ₁₈ カラムで移動相を水 100% で分析している場合、C ₁₈ 基の寝込みが原因ではないかといわれています。	カラムの平衡化時間を長めにしてください。イオンペア試薬を用いるとイオンペア試薬を用いない分析に比べてカラムの平衡化時間が長くなります。 水 100% の条件でも使用可能なカラムに変更してください。コスモシールでは、C ₁₈ -PAQ を用いることをお勧めします。 ※保持時間の再現性が悪くなってしまったカラムは 50% 以上の有機溶媒：水（例：メタノール / 水 = 70 / 30 など）で洗浄すると再生する場合があります。
順相クロマトグラフィー用カラム	有機溶媒中に含まれる微量の水が保持時間に影響を与える可能性があります。	水を含まない移動相を検討してください。 水を含むサンプル溶媒を使用している場合は、サンプル溶媒を変更するか、もしくは注入量を減らしてください。水が入ってしまった場合は、エタノールを用いて洗浄することにより再生することが可能です。
糖分析用専用カラム（Sugar-D・NH ₂ -MS）や親水性クロマトグラフィー用カラム（HILIC）	固定相の微量な剥離。	コスモシール Sugar-D および コスモシール HILIC の場合は、水 100% で、また コスモシール NH ₂ -MS では、アセトニトリル / 水 = 50 / 50 で 15 分程度洗浄することによって改善される可能性があります。

● その他

原因	対処法
ポンプのチェックバルブに気泡が発生しています。	気泡を抜いてください。「T7. 送液ポンプの圧力が変動する」p. 45 をご参照ください。特に順相クロマトグラフィーで用いる溶媒は、沸点が低いため気泡が発生しやすく、また粘度が低いため気泡が流れ出にくくなります。
ポンプが液漏れしている可能性があります。	液漏れ箇所の増締めや締めなおしを行ってください。それでも改善しない場合は、部品の交換を行ってください。
カラムオープンを用いていない場合は、季節や時刻によってカラムの温度が変化します。	恒温槽やカラムオープンを用いて一定温度で分析を行ってください。 ※恒温槽やカラムオープンは室温の影響も受けますので設定温度が室温に近い場合には室温 +5℃ 以上に設定することをお勧めします。

T6. カラム圧力が上昇した

「4) 分析圧力上昇時の対処方法」p. 48 をご参照ください。

T7. 送液ポンプの圧力が変動する

原因	対処法
ポンプのチェックバルブの部分に気泡が発生している。	ポンプの取扱説明書に従って（ドレインバルブをあけ、送液を行うなど）、チェックバルブの気泡を抜いてください。 それでも改善しない場合は、チェックバルブの洗浄を行ってください。チェックバルブの洗浄方法も、ポンプの取扱説明書に従って行ってください。例えば水に浸して、超音波洗浄をするなども有効な方法です。

※

- 順相クロマトグラフィー用カラムにおいて、本現象が頻繁に発生する場合は、プレカラムを接続し分析圧力を上げることで気泡が流れ出やすくなります。
- 気泡が発生しないように、移動相は必ず脱気（脱気装置・超音波・アスピレーターなどで）を行ってください。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

T8. C₁₈カラムでサンプルの分離が悪い

対処法	補足
カラム長を長くします。	ある程度分離できているが、もう少し分離したい場合に有効です。カラム長に比例して圧力が上昇します。分析時間が長くなります。
移動相条件を変えます。 (pH、有機溶媒の種類や濃度など)	ある程度の知識や経験が必要になります。 複雑な条件は再現性に欠ける場合が多いので注意が必要です。
疎水性以外の相互作用を持つ充填剤を使用します。	分子形状やπ電子などサンプルの疎水性以外の特性を識別し分離します。 弊社ではさまざまな相互作用を持つ充填剤を販売しています。「COSMOSIL シリーズ / 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用」p. 64 ~をご参照ください。

T9. 逆相クロマトグラフィーで保持がほとんどない

対処法	補足
イオンペア試薬を使用します。	疎水性のあるイオンペア試薬とサンプルとがイオン対を形成することにより、固定相に分配されるようになり保持が生じます。非解離性のサンプルには適用できません。
コスモシル PBr を使用します。	C ₁₈ カラムで保持が小さい場合に効果を発揮する逆相クロマトグラフィー用カラムです。
親水性クロマトグラフィー (HILIC) 用カラムを使用します。	逆相クロマトグラフィーとは異なり、疎水性の低いサンプルほど強く保持される傾向があります。

T10. 逆相クロマトグラフィーで分析時間が長い

対処法	補足
グラジエント溶離法を用います。	分析中に移動相の有機溶媒濃度を変化させることにより分析時間の短縮が可能になります。欠点としては、装置間差がある、ベースラインが上昇する、分析ごとに平衡化が必要などがあげられます。
UHPLC 用カラムを使用します。	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 1.8 μm シリーズ (https://www.nacalai.co.jp/products/419/)、コスモシル 2.5 μm シリーズ (https://www.nacalai.co.jp/products/298/)、および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 (https://www.nacalai.co.jp/products/299/) をラインアップしています。
移動相条件を検討します。	pH、有機溶媒の種類や濃度などを検討することにより改善する可能性があります。
疎水性の低い充填剤を使用します。	弊社ではコスモシル CN-MS を推奨しています。

T11. 分離の状態が以前と変わった

該当する現象	原因	対処法
理論段数の低下	充填状態の劣化(充填剤の乱れ・へこみ・亀裂など)やシリカゲルが溶解している可能性があります。	カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。
保持時間の減少や分離度の低下	充填剤への不純物の蓄積が起こっている可能性があります。	カラムを洗浄することにより再生する可能性があります。
	固定相の剥離が起こり、保持時間が低下している可能性があります。	カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

T12. 新品のカラムに変えると分離の状態が変わった

原因	対処法										
使用初めのカラムの平衡化不足が考えられます。	移動相の平衡化時間を長くしてください。標準サンプルを何度か注入してください。										
以前使っていたカラムの劣化が考えられます。	カラムが劣化すると保持時間の減少、ピーク形状の変化などが起こります。その場合は、新しいカラムでの分析結果が正しい分離の状態となります。										
カラムのロット間差の可能性があります。	カラムの名称と製造番号、現在の分離の状態などを弊社までご連絡ください。 (a) 分析条件設定時に、3 ロットの充填剤を評価する。 弊社では、コスモシールの高い再現性を証明するために充填剤ロットの異なる 3 種類のカラムの提供を行っています。詳細はお問い合わせください。以下の 4 製品については 3 ロット 4.6 × 150 mm の 3 本セットをご用意しています。 <table border="1"> <thead> <tr> <th>充填剤</th><th>製品番号</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>COSMOSIL 5C₁₈-MS-II</td><td>09397-73</td></tr> <tr> <td>COSMOSIL 5C₁₈-AR-II</td><td>09396-83</td></tr> <tr> <td>COSMOSIL Cholester</td><td>07970-03</td></tr> <tr> <td>COSMOSIL HILIC</td><td>09385-23</td></tr> </tbody> </table> (b) ロット間の影響が出にくい分析条件を設定する。	充填剤	製品番号	COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II	09397-73	COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II	09396-83	COSMOSIL Cholester	07970-03	COSMOSIL HILIC	09385-23
充填剤	製品番号										
COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II	09397-73										
COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II	09396-83										
COSMOSIL Cholester	07970-03										
COSMOSIL HILIC	09385-23										
移動相、流速、温度などカラム以外の要因。	原因箇所の特定をしてください。										

T13. カラムからの溶出液が着色している (サンプル由来でない場合)

原因	対処法
固定相の微量な剥離物や以前の分析時にカラムに吸着していたサンプルが溶出しています。	溶出力(メタノールなど)の強い溶媒や逆相クロマトグラフ用カラム洗浄キット(# 08966-30)でカラムを洗浄してください。

※固定相の剥離においては、微量であるため保持時間にはほとんど影響ないと考えられます。

T14. カラムを枯らしてしまった(カラムを乾燥させてしまった)

粘度の低い溶媒(メタノールなど)を分析時の半分程度の流速で 1 時間程度流した後、カラムの性能評価を行ってください。問題なければそのままご使用ください。

カラムの性能評価は「Q17. カラムの劣化状態の調べ方は？」p. 38 をご参照ください。

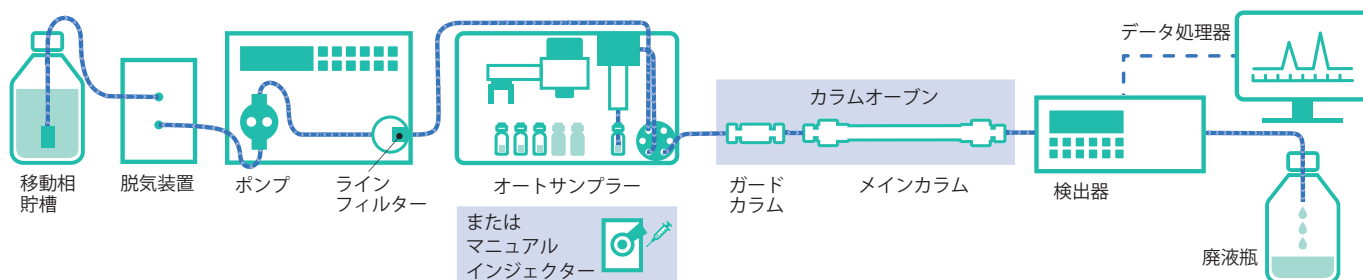
※カラムを枯らさないために、カラムは密栓をして、高温にならないところに保管してください。

4) 分析圧力上昇時の対処方法

分析を繰り返すことにより分析圧力が高くなる場合があります。高圧の状態での使用を続けると、カラムの劣化の促進や装置への過負荷による故障の原因になります。ここでは分析圧力が高くなった場合の対処方法を示します。

1. 異常箇所の探索

分析圧力が高くなった場合、カラムを含めた流路に目詰まりが起こって、圧力が高くなります。また、装置にも負荷がかかっている場合があるため、まず、目詰まりを起こしている箇所を探します。



移動相を送液しながら HPLC システムの流路の後ろ側から (検出器より) 順次、配管を外し、圧力を測定し、異常に圧力がかかっている箇所を探します。通常、装置部分には圧力はほとんどかかりません。ガードカラムと分析カラムは、使用初期の圧力と比較することにより判断します。

2. 装置が高圧のときの対処方法

上記異常箇所の探索に従って原因箇所を特定してください。

(ケース 1) 配管が高圧

原因: 塩の析出やゴミの詰まりの可能性があります。

対処: カラム・検出器を接続しない状態で配管に水を送液してください。配管を逆に接続して洗浄するのも有効です。改善しない場合は配管を交換してください。

※分析圧力上昇とは、直接関係ありませんが、配管が塩の析出やゴミの詰まりで分析圧力上昇の可能性がある場合、移動相貯槽中のサクシオンフィルターも同様に詰まっている可能性があります。サクシオンフィルターが詰まるとポンプに負担がかかりますので、水などに浸し、超音波洗浄器で 5 分洗浄してください。

(ケース 2) 送液ポンプが高圧

原因: ポンプのラインフィルターの汚れが考えられます。

対処: ラインフィルターを取り外して洗浄します。洗浄方法は、ラインフィルターを溶媒に浸して超音波によって洗浄してください。改善しない場合は交換してください。

(ケース 3) マニュアルインジェクターが高圧

原因: 汚れやゴミの詰まりの可能性があります。

対処: 汚れを溶解するような溶媒 (メタノールなど) をシリンジで 20 mL 程度注入しインジェクターを洗浄してください。その場合、LOAD と INJECT の両方の流路を洗浄してください。汚れがひどい場合には、インジェクターを分解して超音波で洗浄してください。ゴミの詰まりの場合、逆方向からの洗浄が有効です。

動画はこちら! /



圧力上昇の
原因と対処方法



3. カラムが高圧のときの対処方法

(ケース 1) 移動相中に塩が析出している、または、緩衝液使用後に有機溶媒濃度が高い移動相を送液した

原因: 塩がカラム内に析出している可能性があります。

対処: 析出している塩を溶かすために、10% 程度の有機溶媒(メタノールやアセトニトリルなど)水溶液を用いて通常分析時の半分程度の流速で 30 分程度洗浄してください。改善しない場合は、水 100% で同様に洗浄してください。

予防: 緩衝液使用後に有機溶媒濃度が高い移動相を送液する場合は、使用の移動相から緩衝液や塩を抜いた溶媒で洗浄した後に有機溶媒が高い移動相を送液してください。

(例) アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5) = 10 / 90 からアセトニトリル / 水 = 90 / 10 に変更する場合、まずアセトニトリル / 水 = 10 / 90 で 15 分程度洗浄した後にアセトニトリル / 水 = 90 / 10 を送液してください。

(ケース 2) サンプルが完全に溶解していない、または、サンプルをろ過していない

原因: サンプル由来の不溶物によるカラムのフィルターの詰まりの可能性があります。

対処: カラムを逆向きに装着し、分析に使用している移動相を通常分析時の半分程度の流速で 30 分程度カラムを洗浄してください。洗浄しても改善しない場合は、カラムの入り口側のエンドフィッティングの交換によって改善する場合があります。エンドフィッティングの交換は有償にてお請けしています。詳しくはお問い合わせください。

予防: サンプルのろ過を行うことをお勧めします。詳細は「サンプルの前処理 1) ろ過」p. 26 をご参照ください。

※頻繁に逆向きに装着し送液すると、充填状態が乱れ、カラムが劣化する可能性があります。

(ケース 3) 天然物やタンパク質などカラムに吸着しやすいサンプルを分析している、または、サンプルが移動相に溶けにくい

原因: サンプルが、充填剤に吸着している、もしくはカラム内に析出している可能性があります。

対処: カラムを洗浄してください。カラム別洗浄方法は、「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 をご参照ください。

予防: (a) サンプルに適した前処理を行ってください。詳細は「サンプルの前処理」p. 26 をご参照ください。
(b) ガードカラムをご使用ください。詳細は「3) ガードカラムの選択と効果」p. 57 をご参照ください。

※

1. カラムを洗浄する際はカラムの出口側を接続せずに通液してください。

2. 長時間の洗浄はカラムの性能を低下させる恐れがあります。

3. シリカゲルベースの充填剤では、pH 7.5 以上のアルカリ性水溶液および pH 1.5 以下の強酸の溶液は使用できません。シリカベースのカラムでは、一般的な使用推奨 pH は 2 ~ 7.5 の範囲になります。推奨 pH 外での使用は可能ですが、劣化を早める恐れがあります。

4. 洗浄後は、出荷時の溶媒に置換して保管してください。

5. ケース 1 ~ 3 の対処をされても改善されない場合、カラムを交換することをお勧めします。

(ケース 4) 長期間の使用によりカラム圧力が徐々に上昇した

原因 1: 長期間の使用によりカラムに吸着物がたまっている可能性があります。

対処: (ケース 3) のようにカラムを洗浄してください。

原因 2: 長期間の使用によりカラム内のシリカゲルが割れて微細化し、圧力が上がっている可能性があります。

対処: カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。

改善されない場合

ピーク形状などに変化を起こしていない、使用のカラムの耐圧を超えていない場合はそのまま使用することも可能です。しかしながら、装置への負担がかかるため、早期にカラムを交換することをお勧めします。

5) グラジエント溶離法におけるベースラインの乱れ

グラジエント分析を行う場合、移動相の混合不足な場合や、水に含まれる不純物によって、ベースラインが乱れることがあります。

1. 移動相を均一に混合するには

移動相の混合不足によるピークは、ミキサーを取り付けることによって改善できます(ベースライン 1 → 2)。

2. 水に含まれる不純物を除去するには

逆相クロマトグラフィー用カラムにおいてグラジエント分析を行う場合、一般に有機溶媒濃度の低い移動相を初期移動相とし、徐々に有機溶媒濃度を高めていきますが、このとき水に含まれる不純物に由来するピークが生じる場合があります。これは、水中の不純物が有機溶媒濃度の低い条件下でカラムに吸着され、有機溶媒濃度が高くなるとその吸着した不純物が溶出してくることに起因します。

このピークはプレカラムを取り付けることにより、水中の不純物をトラップできるため改善できます(ベースライン 2 → 3)。プレカラムには、C₁₈ カラムの 4.6 mm I.D. × 10 mm や 10 mm I.D. × 20 mm などを使用してください。

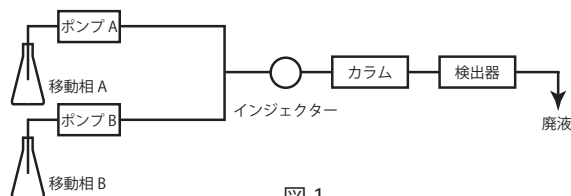
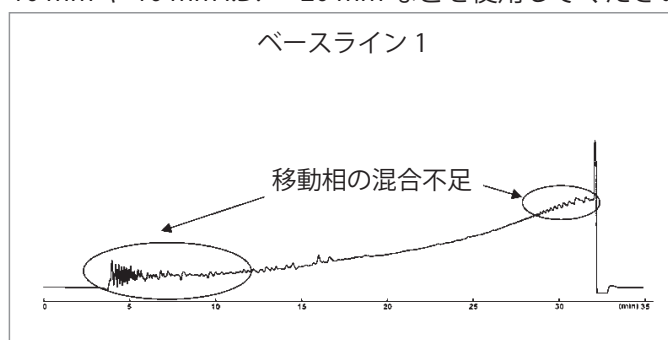


図 1.



↓ + ミキサー

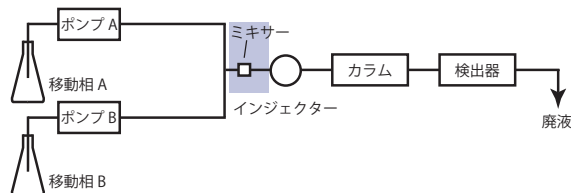
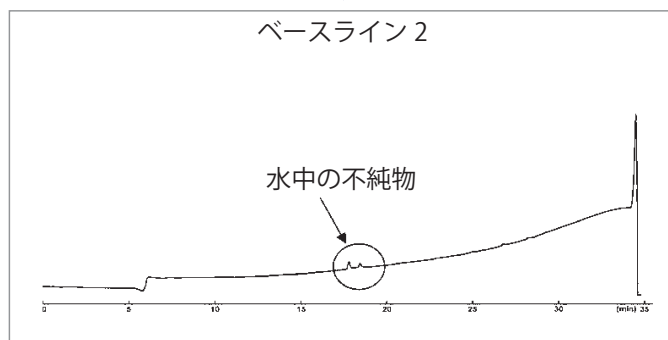


図 2.



↓ + プレカラム

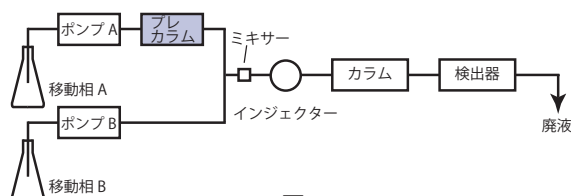
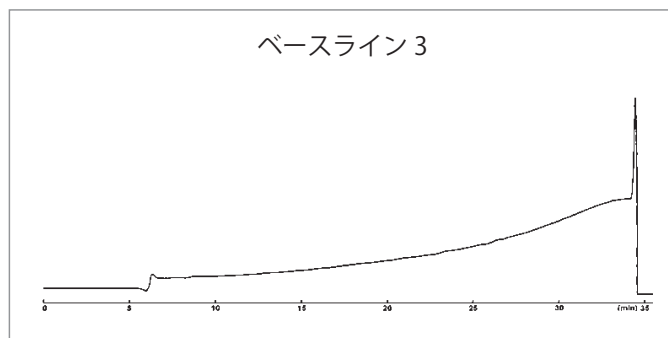


図 3.



Column : COSMOSIL 5C₁₈-AR-300 4.6 mm I.D. × 150 mm Flow rate : 1.0 mL/min
 Pre-column : COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6 mm I.D. × 10 mm Temperature : 30°C
 Mobile phase : A ; 0.1% TFA containing H₂O Detection : UV 220 nm
 B ; 0.1% TFA containing 95% Acetonitrile
 B 0 → 100% 30 min Linear gradient

1) HILICカラムの上手な使い方

HILIC カラムは、普段逆相カラムを使用している方にとっては、分析条件設定が、難しく感じられることがあります。また、HILIC で使用される固定相も多種多様であることから、カラムによって使い方も異なります。ここでは、コスモシル HILIC カラムの上手な使い方を説明します。コスモシル HILIC カラムは、固定相であるトリアゾール由来の親水性相互作用(主に水素結合による)と陰イオン交換能によって、保持と分離を行います。以下をご覧ください。適切な移動相条件を選択してください。

1. 有機溶媒の種類と濃度の効果

- ・通常は、アセトニトリル / 水系の移動相を使用します。
- ・アセトニトリル濃度を高くすると保持は大きくなり、低くすると保持は小さくなります(図1)。
- ・アセトニトリル濃度は 0 ~ 95% (通常 50 ~ 95%) の範囲でご使用ください。
- ・メタノール / 水系は保持が小さくなります(図2)。
- ・有機溶媒および水は、必ず HPLC 用をご使用ください。

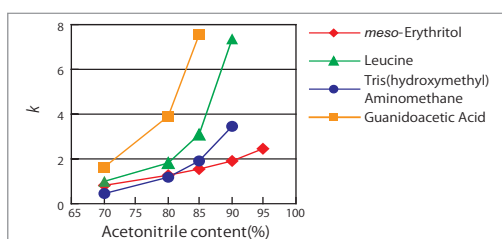


図 1. アセトニトリル濃度と保持との関係

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Acetonitrile / 10 mmol/L CH₃COONH₄

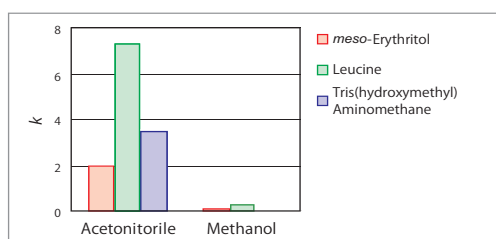


図 2. アセトニトリルとメタノールの保持力の違い

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Organic solvent / 10 mmol/L CH₃COONH₄ = 90 / 10

2. pH の効果

- ・移動相の pH は 2 ~ 7.5 の範囲でご使用ください。
- ・中性付近の pH で使用すると保持は大きくなります(図3)。

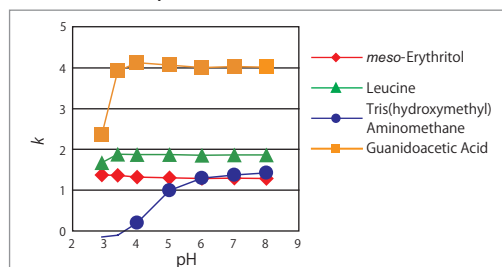


図 3. pH と保持との関係

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Acetonitrile / 10 mmol/L Buffer = 90 / 10

3. 緩衝液の種類と濃度の効果

- ・解離性のサンプルを分析する場合は、移動相に塩や緩衝液を添加する必要があります。
- ・HILIC では高濃度のアセトニトリルを移動相としますが、アセトニトリルは塩に対する溶解性が低いので注意が必要です。逆相クロマトグラフィーで汎用されるりん酸塩は溶解性が低いために HILIC で使用される場合には、アセトニトリル濃度を 70% 以下にしてください。また、使用前に移動相に塩が析出していないか、必ず確認してください。
- ・緩衝液の種類は、高濃度のアセトニトリル中でも溶解性の高い、酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムを推奨します。
- ・緩衝液の濃度は、5 ~ 100 mmol/L の範囲でご使用ください。また、アセトニトリルと混合後、塩の析出がないか確認してください。
- ・塩濃度を高くすると、イオン交換能が抑制され、保持が小さくなります(図4)。
- ・移動相に緩衝液を使用する場合は、使用前に必ず 0.45 μm 以下のフィルターでろ過してください。

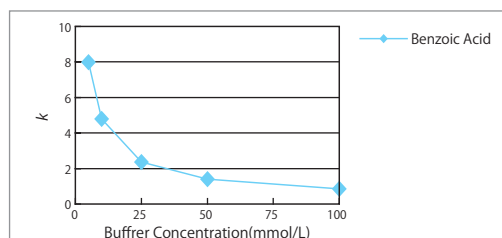


図 4. 塩濃度と保持との関係

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Acetonitrile / CH₃COONH₄ = 50 / 50

4. 移動相選択フロー

ここでは、化合物の特性から、第一選択の移動相を提示します。保持時間の増減は主にアセトニトリル濃度で調整してください。

- ・ 中性化合物 → Acetonitrile / Water = 90 / 10
- ・ 塩基性化合物 → Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 90 / 10
- ・ 両性化合物 → Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 70 / 30
- ・ 酸性化合物 → Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 50 / 50 → 溶出しえない場合は、Acetonitrile / 10 mmol/L Phosphate Buffer(pH 7.0) = 50 / 50

5. 相互作用の使い分け

コスモシル HILIC カラムは、2つの相互作用(親水性相互作用と陰イオン交換)によって、保持と分離を行います。移動相を選択することにより、相互作用を使い分けることができます。

陰イオン交換能は塩濃度によって調整できます。塩濃度を上げることにより陰イオン交換能を抑制することが可能です。一方、親水性相互作用は、アセトニトリル濃度によって調整できます。アセトニトリル濃度を上げることにより親水性相互作用を強めることができます。

下図では、酸性化合物であるアスコルビン酸とイソアスコルビン酸の分離について示しています。4. の項で推奨している移動相(Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 50 / 50)では、陰イオン交換能が強く働き保持が生じていますが、2つの化合物間での陰イオン性の差が少ないため、分離が不十分です。そのため、塩濃度を高めて陰イオン交換能を抑え、さらに親水性相互作用を強めるためにアセトニトリル濃度を上げました。その結果、親水性相互作用によって十分な分離が達成できました。

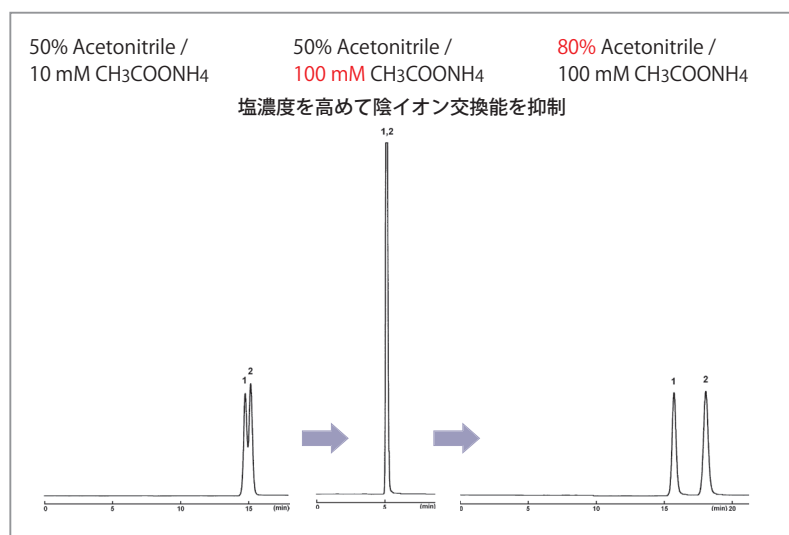


図 5. 親水性相互作用による分離

Column : COSMOSIL HILIC 4.6 mm I.D. × 250 mm
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 30°C
Detection : UV 245 nm
Sample : 1; Isoascorbic Acid (0.5 mg/mL)
2; Ascorbic Acid (0.5 mg/mL)
Inj.Vol. : 2.0 µL

6. テーリング時の対処方法

ピークがテーリングする場合には、以下の移動相を試してください。ピーク形状が改善する場合があります。

- ・ 移動相に 5 mmol/L の EDTA を添加する。
- ・ くえん酸緩衝液にする。〔例 10 mmol/L Citrate Buffer(pH 7.0)〕

以下では 5 mmol/L EDTA を添加した例を示します。

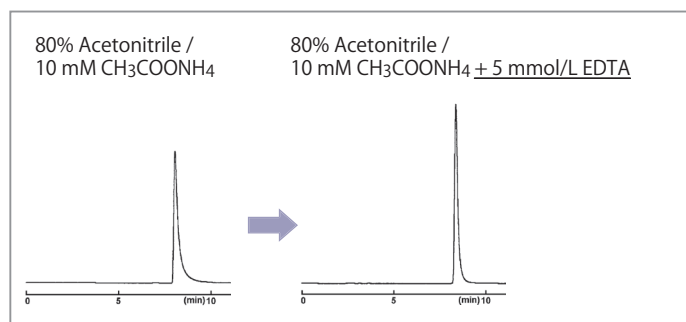


図 6. ピーク形状の改善

Column : COSMOSIL HILIC 4.6 mm I.D. × 250 mm
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 30°C
Detection : UV 254 nm
Sample : Tryptophan (1 ng)

7. カラムの洗浄

ベースラインが乱れる場合には、50% アセトニトリルを 30 分程度送液して洗浄してください。

2) SFC用カラムの上手な使い方

超臨界流体を移動相として使用する超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) は、液体クロマトグラフィー (LC) よりも有機溶媒の使用量が極めて少ないこと、分取精製後の溶媒留去が容易であること、LC とは異なる分離挙動を示すことなどから、注目されている分離技術です。SFC 用カラムは、LC 用カラムとは分析条件の影響が異なります。SFC 用カラムをご使用いただく上で、分析条件の影響を紹介します。

1. SFC

● 超臨界流体

物質には固体、液体、気体の状態があります。温度、圧力を加えても液体と気体の区別がつかなくなる終点があり、これを臨界点といい、臨界点の温度 (T_c) および圧力 (P_c) を超えた状態にある流体を超臨界流体といいます (図 1)。超臨界流体は、気体の粘度と拡散性、液体の溶解性を併せ持ちます (表 1)。比較的簡単な条件 (臨界温度 31°C 、臨界圧力 7.38 MPa) で超臨界流体にすることができる二酸化炭素が SFC の移動相として汎用されています。

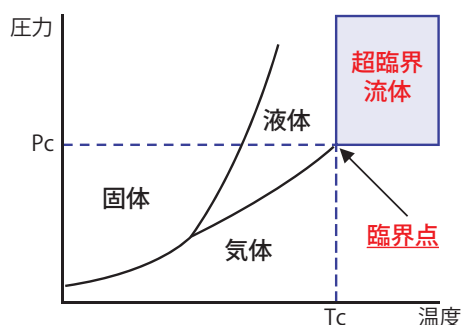


図 1. 物質の状態図

	密度 (g/cm^3)	粘度 ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)	拡散係数 (cm^2/s)
気体	$(0.6 \sim 2.0) \times 10^{-3}$	$(1 \sim 3) \times 10^{-5}$	$0.1 \sim 0.4$
超臨界流体	$0.2 \sim 0.9$	$(1 \sim 9) \times 10^{-5}$	$(0.2 \sim 2.0) \times 10^{-3}$
液体	$0.6 \sim 1.6$	$(0.2 \sim 3.0) \times 10^{-3}$	$(0.2 \sim 2.0) \times 10^{-5}$

表 1. 気体、液体、超臨界流体の物性値の比較*

* 参考文献: 村田 誠四郎 (2004) 化学便覧 基礎編 改訂 5 版 丸善株式会社

2. 超臨界流体クロマトグラフと液体クロマトグラフとの主な違い

超臨界流体クロマトグラフの基本的な流路図を図 7 に示します。液体クロマトグラフとの主な違いは、 CO_2 ポンプと背圧制御弁 (BPR: Back Pressure Regulator) が必要です。

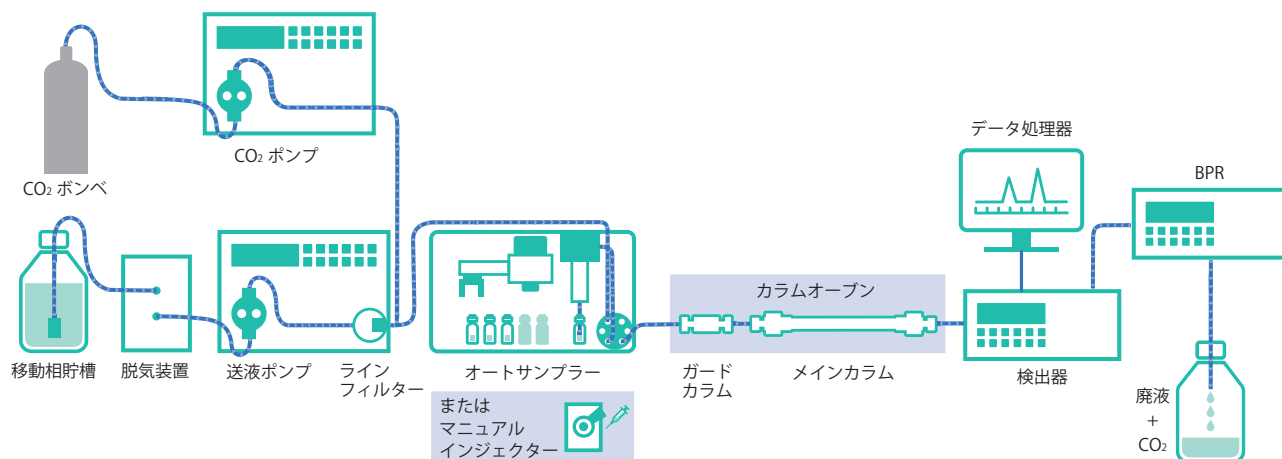


図 7. 超臨界流体クロマトグラフの基本的な流路

3. 分析条件の影響

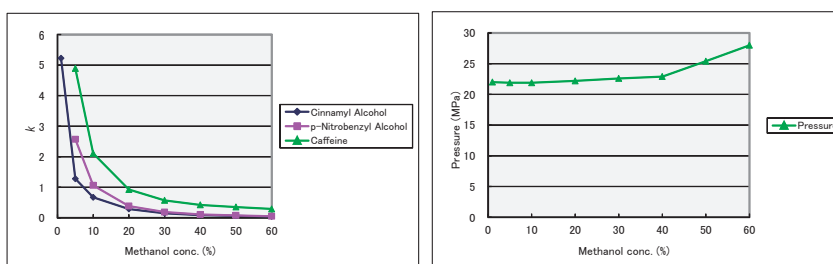
分析条件の設定方法はLCと異なります。安定した分析をするためには、適切な分析条件を設定する必要があります。それぞれの分析条件の影響について評価しました。SFCは、順相HPLCと同様の挙動を示す傾向があることが知られています。今回、順相HPLCで汎用されているシリカゲルカラムを用いて分析条件の影響を評価しました。弊社ラインアップのSFC用コスモシルカラムにおいて、分析条件の影響は同様の傾向を示します。

● 移動相の有機溶媒濃度の影響

SFCの移動相は、二酸化炭素にモディファイア（移動相の性質を変化させる添加剤）としてメタノールなどの有機溶媒を添加します。有機溶媒濃度を増加すると保持は小さくなる傾向を示します。有機溶媒濃度を増減することで保持時間を調整することができます。ただし、有機溶媒濃度が高い条件下では超臨界状態ではなくなるので、圧力の変化や保持挙動に注意が必要です。

移動相の有機溶媒濃度の影響

Column: COSMOSIL 5SL-II
Column size: 4.6mm I.D.-250mm
Mobile phase: A: CO₂
B: Methanol
B conc. ***%
Flow rate: 3.0 ml/min
BPR: 10 MPa
Temperature: 40 °C
Detection: UV254nm
Sample: Cinnamyl Alcohol
p-Nitrobenzyl Alcohol
Caffeine

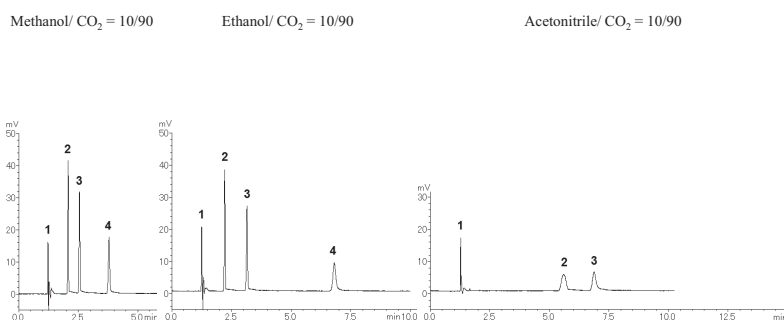


● 移動相の溶媒種の影響

モディファイアはメタノール、エタノール、アセトニトリルなどが汎用されています。モディファイアの有機溶媒はサンプルの移動相への溶解性やカラムの特性を考慮し選択してください。モディファイアとして水を使用することは推奨していません。

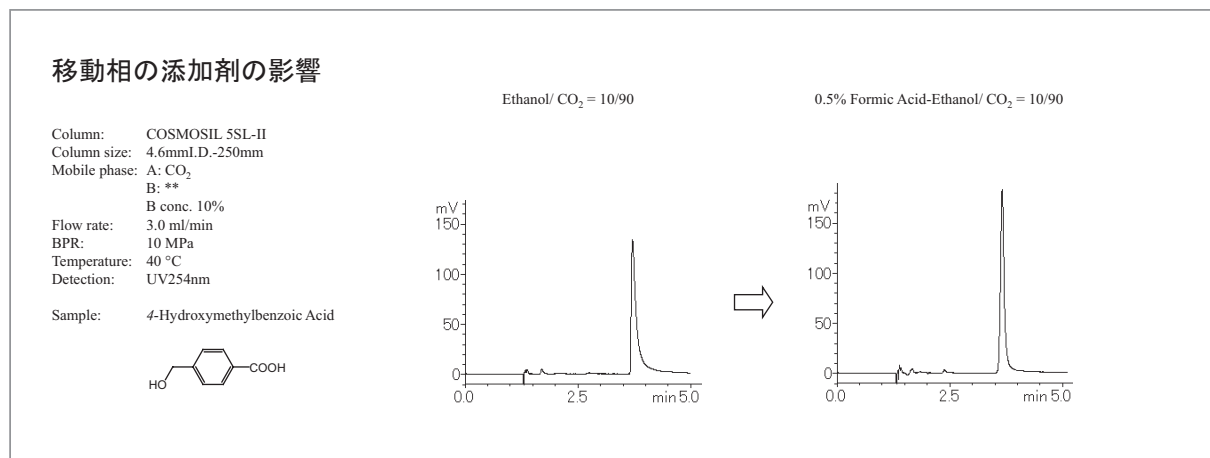
移動相の溶媒種の影響

Column: COSMOSIL 5SL-II
Column size: 4.6mm I.D.-250mm
Mobile phase: A: CO₂
B: **
B conc. 10%
Flow rate: 3.0 ml/min
BPR: 10 MPa
Temperature: 40 °C
Detection: UV254nm
Sample: 1: p-Xylene
2: Cinnamyl Alcohol
3: p-Nitrobenzyl Alcohol
4: Caffeine



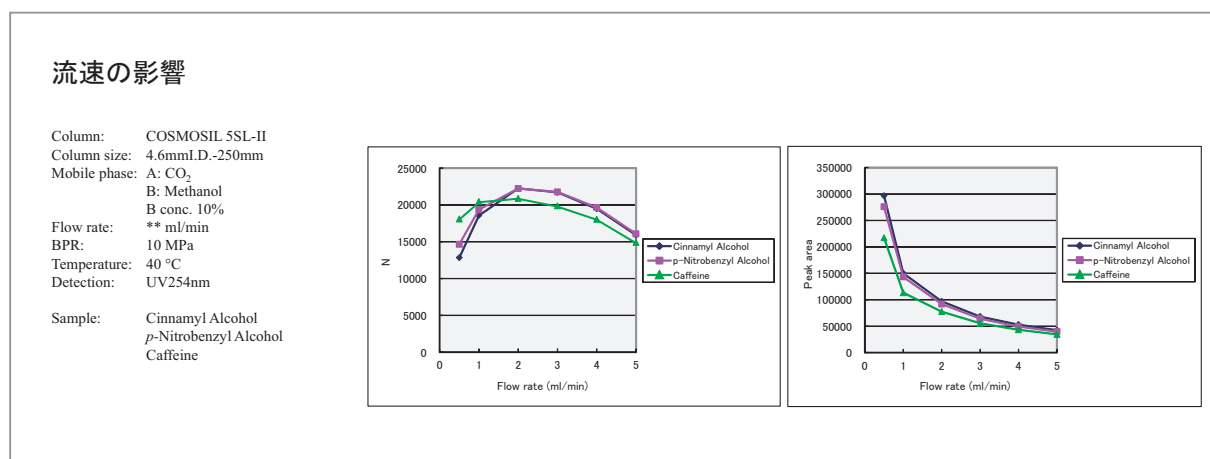
● 移動相の添加剤の影響

解離性化合物を分析する場合、モディファイアに添加剤を加えないと吸着やテーリングを起こすことがあります。添加剤として、ギ酸や酢酸アンモニウムが汎用されます。



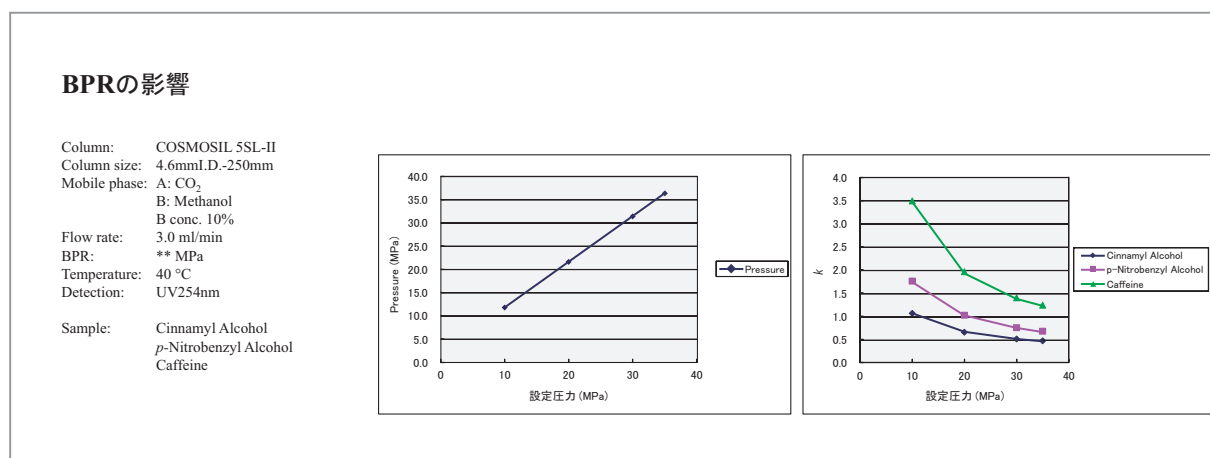
● 流速の影響

内径 4.6 mm カラムの流速は、3 mL/min を推奨します。流速を速くすると UV の検出感度は低下します。



● BPR の影響

装置内を超臨界状態に保つため、検出器の出口側に BPR を接続します。BPR の設定圧力を変えると保持時間は変化します。安定した分析をするために BPR は一定条件に設定することが必要です。通常は 10 MPa に設定してください。

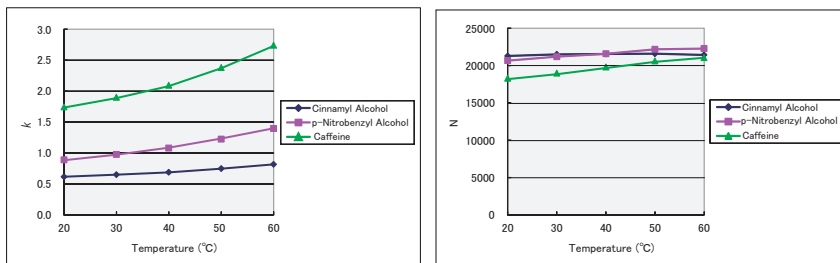


● カラム温度の影響

カラム温度が高いと保持時間が大きくなる傾向を示します。理論段数(N)はカラム温度が高いとやや高くなります。温度が低くなると超臨界状態を保つことが難しくなるので、通常は 40℃ 以上に設定してください。

カラム温度の影響

Column: COSMOSIL 5SL-II
 Column size: 4.6mm I.D.-250mm
 Mobile phase: A: CO₂
 B: Methanol
 B conc. 10%
 Flow rate: 3.0 ml/min
 BPR: 10 MPa
 Temperature: ** °C
 Detection: UV254nm
 Sample: Cinnamyl Alcohol
 p-Nitrobenzyl Alcohol
 Caffeine

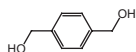


● サンプル負荷量の影響

サンプルの移動相への溶解性が低い場合、サンプル負荷量が増加するとピークはリーディングする傾向があります。有機溶媒濃度や有機溶媒の種類を変更し、移動相へのサンプル溶解性を高めることでピーク形状を改善することができます。

サンプル負荷量の影響

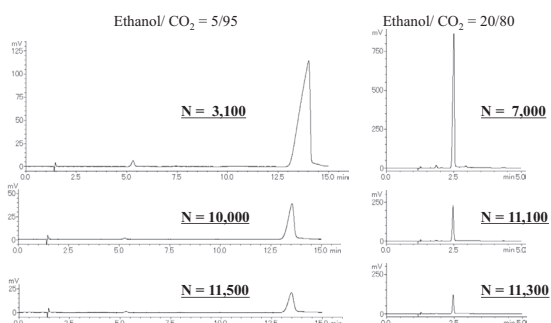
Column: COSMOSIL 5SL-II
 Column size: 4.6mm I.D.-250mm
 Mobile phase: A: CO₂
 B: Ethanol
 B conc. **%
 Flow rate: 3.0 ml/min
 BPR: 10 MPa
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV254nm
 Sample: 1,4-Benzenedimethanol (**mg/ml)
 Inj. Vol.: 5.0 µl



50 mg/ml (250 µg)

10 mg/ml (50 µg)

5 mg/ml (25 µg)



3) ガードカラムの選択と効果

カラムのフィルターの詰まりや充填剤へのサンプルの吸着によりカラムは劣化しますが、そのほとんどがカラムの入り口側のみで生じています。そのため、分析および分取カラム(メインカラム)の前にガードカラムを接続することにより、メインカラムの劣化を防ぐことができます。

1. ガードカラムの選択

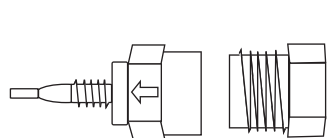
ガードカラムの充填剤には、メインカラムと同じ充填剤を選択してください。カラムサイズについて、内径はメインカラムと同じか、あるいは細く、長さは短いカラム(10 ~ 50 mm)を選択してください。なお、コスモシルカラムの製品番号や価格は、各製品ページ(<https://www.nacalai.co.jp/products/chromatography/>)の「価格表」をご覧ください。

(例) メインカラム 5C18-MS-II (20 mm I.D. × 250 mm) → ガードカラム 5C18-MS-II (10 mm I.D. × 20 mm)

2. ガードカートリッジについて

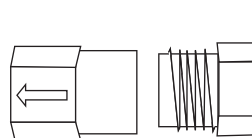
通常ガードカラムに加え、汎用サイズ(4.6 mm I.D. × 10 mm、2.0 mm I.D. × 10 mm)については、安価なカートリッジタイプも用意しています。コスモシルガードカートリッジは、ガードカートリッジホルダーにセットして使用します。ガードカートリッジホルダーは以下の2種類があります。① ダイレクトカートリッジホルダー(内径 4.6 mm 用) ② ガードカートリッジホルダー(内径 2.0 mm 用)を用意しています。なお、ホルダーは繰り返し使用できます。

① ダイレクトカートリッジホルダー(内径 4.6 mm 用)



分析カラムに直接接続します。

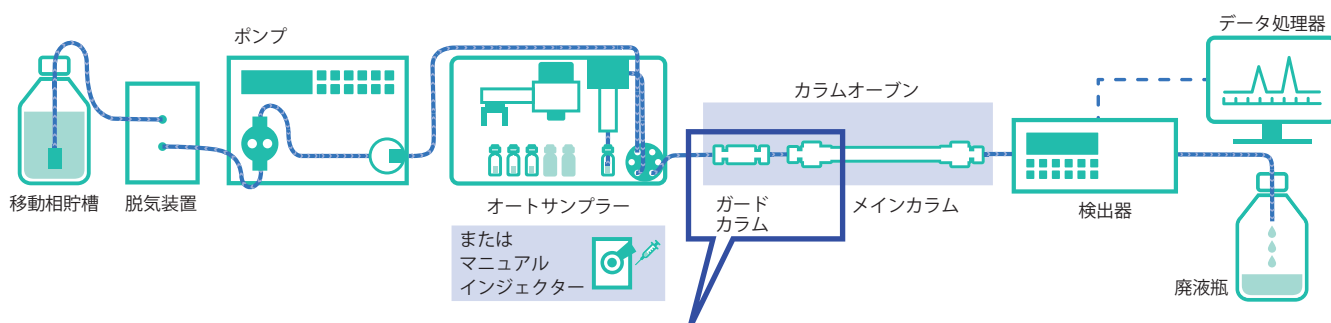
② ガードカートリッジホルダー(内径 2.0 mm 用)



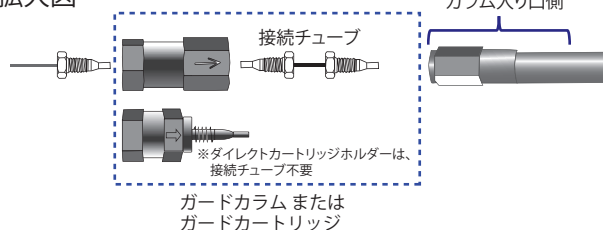
カラム用接続チューブ(別売り)を用いて分析カラムと接続します。

3. ガードカラムの接続

ガードカラムおよびガードカートリッジの接続には接続チューブを使用してください。接続チューブは、内径 0.1 mm と 0.25 mm の2種類を用意しています。内径 0.1 mm (#12570-41)は内径 3 mm 以下のメインカラム、内径 0.25 mm (#37843-69)は内径 4.6 mm ~ 10 mm のメインカラムとの接続に適しています。

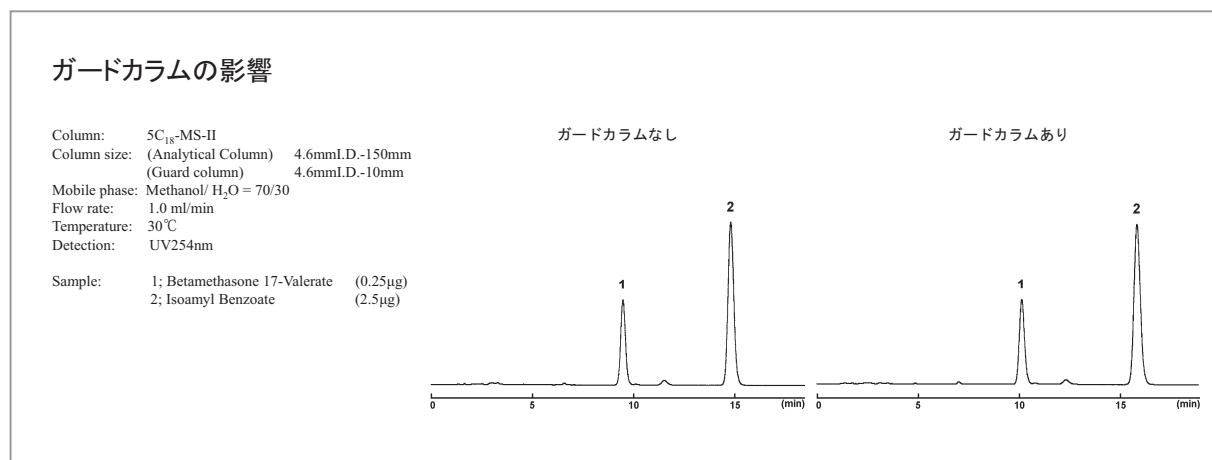


拡大図



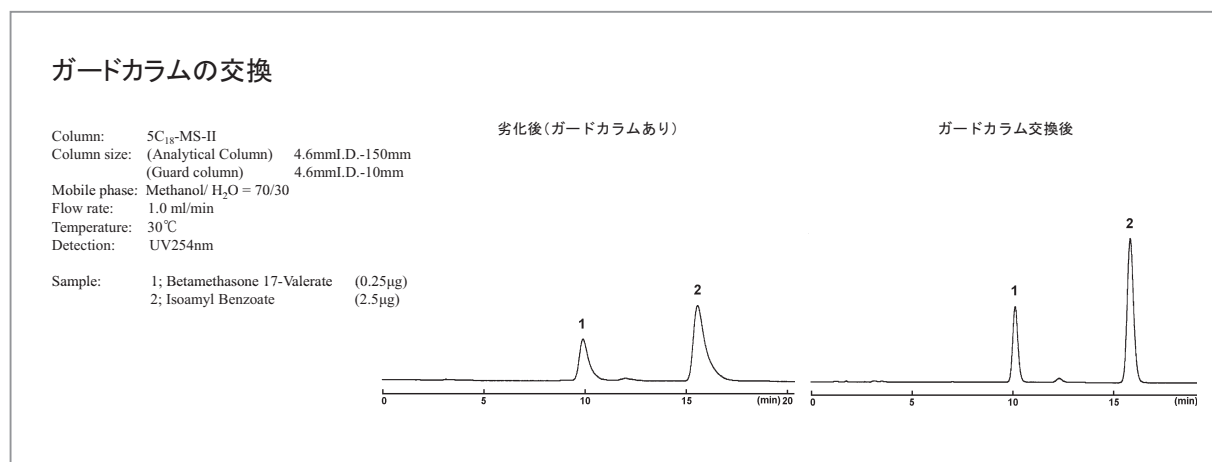
4. 使用例

コスモシールのガードカラムシリーズは、分析用、分取用カラムと同一の高性能充填剤を高圧充填しているため、メインカラムの性能を落とすことなく保護します。



5. ガードカラムの交換

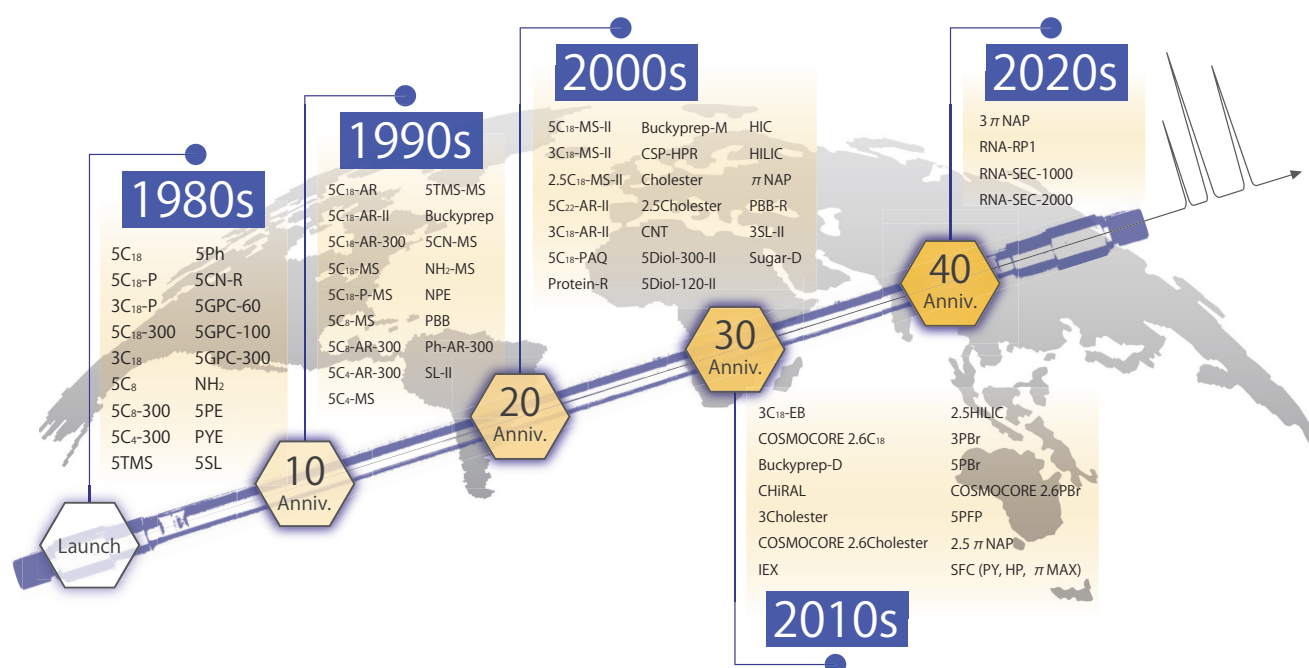
下図の分析例は、ガードカラムの劣化後、交換によってピーク形状が回復した例を示しています。それ以外にも、分析中に分析圧の上昇、ゴーストピークの出現、ベースラインの上昇など、不具合が生じたときには速やかに新しいガードカラムと交換してください。劣化したガードカラムを使用し続けると、メインカラムまで劣化してしまいます。





COSMOSIL の歴史

ナカライテスクは、1980 年に「COSMOSIL(コスモシール)」というブランドを作り、弊社初の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用パックドカラム「COSMOSIL 5C₁₈」を発売しました。以来コスモシールは HPLC 用パックドカラム・充填剤のブランドとして数々の製品を世に送り出しています。



COSMOSIL 独自のアプローチで課題を解決

HPLC の歴史は C₁₈ カラムの進化とともにあり、コスモシールも C₁₈ カラムの改良と進化を繰り返してきました。特に 1990 年に発売した酸性移動相に強い「5C₁₈-AR」カラムは、当時としては珍しいトリファンクショナルの結合様式で多くのユーザーにご愛用いただきました。

また、C₁₈ カラムの進化と並行して、弊社独自の固定相開発にも着手し、1989年に弊社オリジナル固定相である「PYE」カラムを発売しました。その後、弊社はオリジナルカラムの開発に注力し、多くの製品を販売してきました。特に「Cholester」「PBr」カラムは、C₁₈ カラムユーザーの【分離不十分】【保持が小さい】という課題・問題に対して、C₁₈ カラムと近い感覚で利用できるカラムをコンセプトに開発しました。

これからもコスモシールは独自のカラム開発を行い、今までにないアプローチでユーザーの問題・課題解決を目指していきます。

10 COSMOSIL・COSMOGEL・COSMOCORE 充填剤一覧表

1) HPLC(高速液体クロマトグラフィー) 充填剤一覧表

分離モード	充填剤	化学結合基	結合型	平均粒子径 (μm)	平均細孔径 (約 nm)	特長・用途	USP カテゴリー				
逆相	C18-MS-II	オクタデシル基	モノメリック	1.8	11.5	広範囲の化合物に対応	L1				
				2.5	13						
				3, 5, 15	12						
			C18	オクタデシル基	ポリメリック	2.6 (Core-Shell)		9	耐酸性にすぐれる、酸性化合物、ペプチドに最適		
			C18-AR- II			3, 5, 15		12			親水性の高い化合物に最適、水 100%移動相使用可能
			C18-PAQ								汎用性が高い、耐アルカリ性に優れる
			C18-SS								塩基性化合物に最適
	C18-EB	モノメリック	3								
	Cholester	コレステリル基	モノメリック	2.5	13	C18 と同じ分析条件で使用可能、セカンドチョイスカラム	L101				
				2.6 (Core-Shell)	9						
				3, 5	12						
	PBr	ペンタブロモベンジル基		2.6 (Core-Shell)	9	分散力による分離 親水性化合物を逆相条件で分析可能	—				
				1.8	12						
				3, 5							
	PFP	ペンタフルオロフェニルプロピル基		5		弱く双極子を識別	L43				
	π NAP	ナフチルエチル基		2.5	13	フェニルカラムを超えるπ-π相互作用	—				
				3, 5							
	PYE	ピレニルエチル基				最強のπ-π相互作用	申請中				
	NPE	ニトロフェニルエチル基				双極子を識別	—				
	CN-MS	シアノプロピル基				疎水性の大きく異なる化合物をグラジエントなしで分離	L10				
	C22-AR-II	ドコシル基	ポリメリック			5	C18 以外のアルキル基結合型	—			
	C8-MS	オクチル基	モノメリック					L7			
	C4-MS	ブチル基		L26							
	TMS-MS	トリメチル基		L13							
	PE-MS	フェニルエチル基		π-π相互作用	L11						
	Protein-R	オクタデシル基	ポリメリック		30	C18 と C4 の長所を併せ持つワイドポア型	L1				
	C18-AR-300	オクタデシル基				ワイドポア型	L1				
	C8-AR-300	オクチル基					L7				
	C4-AR-300	ブチル基					L26				
	Ph-AR-300	フェニル基					L11				
	RNA-RP1	オクタデシル基	—		—	100 nt 以上の核酸の分離に	—				
順相	SL-II	なし	—	3, 5, 15	12	分取精製に適する	L3				
親水性相互作用 (HILIC)	HILIC	トリアゾール	—	2.5	13	逆相で保持のない親水性化合物の分離に	L104				
					12						
	Sugar-D	ポリアミン	—	5	—	単糖、オリゴ糖の分離に、糖分離のファーストチョイス	—				
	NH2-MS	アミノプロピル基	ポリメリック		12	一級アミン結合型	L8				
疎水クロマト	HIC	—	—	5	30	タンパク質を変性させずに分離	—				

10 COSMOSIL・COSMOGEL・COSMOCORE 充填剤一覧表

1) HPLC(高速液体クロマトグラフィー) 充填剤一覧表 つづき

分離モード	充填剤	化学結合基	結合型	平均粒子径 (μm)	平均細孔径 (約 nm)	特長・用途	USP カテゴリー
サイズ排除	Diol-120-II	ジオール基	—	5	12	球状タンパク質測定可能 分子量範囲 5,000 ~ 100,000 直鎖状水溶性高分子測定可能 分子量範囲 1,000 ~ 20,000	L20
	Diol-300-II				30	球状タンパク質測定可能 分子量範囲 10,000 ~ 700,000 直鎖状水溶性高分子測定可能 分子量範囲 5,000 ~ 100,000	
	Diol-1000-II				100	直鎖状水溶性高分子測定可能 分子量範囲 50,000 ~ 500,000	
	RNA-SEC-1000	親水性基	—		100	100 nt 以上の核酸の分離に	—
	RNA-SEC-2000				200		—
	CNT-300	親水性基(中性)	—		30	可溶性カーボンナノチューブの分離に	—
	CNT-1000				100		
	CNT-2000				200		
キラル分離	CHiRAL A	アミローストリス (3,5-ジメチルフェニルカルバメート)	—	3, 5	—	結合型充填剤を採用することで、耐久性が向上 ヒット率の高い3種類の固定相	L 99
	CHiRAL B	セルローストリス (3,5-ジメチルフェニルカルバメート)					—
	CHiRAL C	セルローストリス (3,5-ジクロロフェニルカルバメート)					—
—	Buckyprep	ピレニルプロピル基	モノメリック	5	12	フラーレン分離のスタンダード	—
	Buckyprep-D	ニトロカルバゾリル基				誘導体化フラーレン分離に	
	Buckyprep-M	フェノチアジニル基				金属内包フラーレン分離に	
	PBB	ペンタプロモベンジル基				保持力大きく C ₆₀ 、C ₇₀ の大量分取に	

2) SFC(超臨界流体クロマトグラフィー) 充填剤一覧表

分離モード	充填剤	化学結合基	結合型	平均粒子径 (μm)	平均細孔径 (約 nm)	特長・用途	USP カテゴリー
SFC	PY	ピリジニル基	—	3, 5	12	2-Ethylpyridineカラムに類似した選択性、保持が大きい	—
	HP	3-ヒドロキシフェニル基				PY とは異なる選択性 塩基性化合物の保持が大きい	
	Diol	ジオール基				保持が大きい、イオン交換作用の影響が少ない	
	Cholester	コレステリル基				C ₁₈ カラムよりも保持が大きく分離能が高い	
	π MAX	ピレニルエチル基				フェニルカラムよりも格段に強いπ-π相互作用	
	PBr	ペンタプロモベンジル基				強い分散力によるユニークな分離	

11 COSMOSIL・COSMOGEL・COSMOCORE サンプル別カラム選択ガイド

サンプル分類	小分類	分離モード	推奨カラム	備考
低分子医薬品	—	逆相	C ₁₈ -EB COSMOCORE C ₁₈	優れたエンドキャッピング処理
		親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しない高極性化合物に
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
ビタミン	水溶性ビタミン	逆相	C ₁₈ -PAQ	水 100% 移動相で使用可能
		親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しないときに
	脂溶性ビタミン	逆相	C ₁₈ -MS-II Cholester	逆相カラムのスタンダード C ₁₈ カラムとは異なる選択性
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
		逆相	C ₁₈ -MS-II Cholester PBr π NAP	さまざまな相互作用を駆使して分離 「1) 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用の違いによる分離への効果」 p. 64 ~をご参照ください。
天然物	—	順相	SL-II	分取後の溶媒濃縮が容易
		親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しない高極性化合物に
		逆相	C ₁₈ -PAQ	水 100% 移動相で使用可能
有機酸	—	親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しないときに
		逆相	C ₁₈ -AR-II Cholester	酸性移動相に強い C ₁₈ カラムとは異なる選択性
脂肪酸	—	逆相	C ₁₈ -MS-II	逆相カラムのスタンダード
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
りん脂質	分子種	逆相	C ₁₈ -MS-II	逆相カラムのスタンダード
	クラス種	順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
農薬	—	逆相	C ₁₈ -MS-II Cholester	逆相カラムのスタンダード C ₁₈ カラムとは異なる選択性
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
		親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しない高極性化合物に
		逆相	C ₁₈ -MS-II Cholester	逆相カラムのスタンダード C ₁₈ カラムとは異なる選択性
代謝物	—	順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
		親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しない高極性化合物に
		逆相	C ₁₈ -MS-II Cholester	逆相カラムのスタンダード C ₁₈ カラムとは異なる選択性
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
食品添加物	—	親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しない高極性化合物に
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
		逆相	C ₁₈ -MS-II Cholester	逆相カラムのスタンダード C ₁₈ カラムとは異なる選択性
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
その他の低分子化合物	—	逆相	C ₁₈ -MS-II Cholester	逆相カラムのスタンダード C ₁₈ カラムとは異なる選択性
		順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
		親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しない高極性化合物に
		逆相	C ₁₈ -MS-II C ₁₈ -AR-II Cholester π NAP PYE NPE PBr PFP	さまざまな相互作用を駆使して分離 「1) 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用の違いによる分離への効果」 p. 64 ~をご参照ください。
構造異性体 構造類似体	—	順相	SL-II	順相カラムのスタンダード
		逆相	C ₁₈ -MS-II C ₁₈ -AR-II Cholester π NAP PYE NPE PBr PFP	さまざまな相互作用を駆使して分離 「1) 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用の違いによる分離への効果」 p. 64 ~をご参照ください。

11 COSMOSIL・COSMOGEL・COSMOCORE サンプル別カラム選択ガイド

サンプル分類	小分類	分離モード	推奨カラム	備考
光学異性体	—	順相・逆相	CHiRAL A Type, B Type, C Type	ヒット率の高い3種類のキラルセクター
アミノ酸	フリーアミノ酸	逆相	PBr	芳香族アミノ酸を保持する
		親水性相互作用	HILIC	逆相で保持しないアミノ酸に
	誘導体化アミノ酸	逆相	C ₁₈ -AR-II	酸性移動相に強い
ペプチド、タンパク質	分子量 3,000 以下	逆相	C ₁₈ -AR-II	酸性移動相に強い
		親水性相互作用	PBr	オリゴペプチドの分離に
	分子量 3,000 以上	逆相	Protein-R	ワイドポアタイプ
			C ₁₈ -AR-300	
			C ₄ -AR-300	
		サイズ排除	Diol-II	分子サイズによる分離
		イオン交換	IEX	電荷の違いによる分離
核酸	核酸塩基	逆相	PBr	逆相でも保持可能
		親水性相互作用	HILIC	逆相とは異なる分離
	ヌクレオチド ヌクレオシド	逆相	C ₁₈ -PAQ	水 100% 移動相で使用可能
			PBr	C ₁₈ カラムよりも強い保持力
		親水性相互作用	HILIC	逆相とは異なる分離
	オリゴ核酸	逆相	C ₁₈ -MS-II、C ₁₈ -EB	逆相カラムのスタンダード
	100 nt 以上	逆相	RNA-RP1	疎水性による分離
		サイズ排除	RNA-SEC-1000 RNA-SEC-2000	分子サイズによる分離
糖類	単糖	親水性相互作用	Sugar-D	誘導体化せずに分離可能
			NH ₂ -MS	
	誘導体化糖	逆相	C ₁₈ -PAQ	ピリジルアミノ (PA) 化した糖の分離に
		親水性相互作用	Sugar-D NH ₂ -MS	逆相との二次元分離に
	オリゴ糖	逆相	PBr	逆相でも保持可能
		親水性相互作用	Sugar-D NH ₂ -MS	誘導体化せずに分離可能
	多糖	サイズ排除	Diol-II	分子サイズによる分離
フラーレン	フラーレン全般	—	Buckyprep	フラーレン分離のスタンダード
	金属内包フラーレン	—	Buckyprep	金属内包フラーレンの選択性が異なる
			Buckyprep-M	
	誘導体化フラーレン	—	Buckyprep Buckyprep-D	トルエン移動相で分離
カーボン ナノチューブ	—	サイズ排除	CNT	専用カラム
水溶性ポリマー	—	サイズ排除	Diol-II	分子サイズによる分離

12 COSMOSIL シリーズ / 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用

1) 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用の違いによる分離への効果

はじめに

逆相クロマトグラフィーは優れた分離能、高理論段数、使いやすさなどの理由により広範囲の化合物の分離に用いられています。逆相クロマトグラフィーに使用するカラムとしては、オクタデシル基結合型 (C₁₈、ODS) 充填剤を用いたカラムが最も使用されています。しかし、C₁₈ カラムはアルキル基由来の疎水性相互作用によってサンプルの疎水性の違いを識別するために、疎水性の類似したサンプルに対する分離能が低いという問題点があります。近年、LC-MS の発達によりカラムでの高度な分離が必ずしも必要でない場合もありますが、分子量が同じ異性体は MS での識別は不可能であり、カラムでの分離が必要であると考えられます。

カラムによって疎水性が類似する化合物の高分離を達成するには、何らかの工夫が必要となります。例えば、移動相を変える、カラム長を長くする、分析温度を変えるなどがありますが、疎水性以外の相互作用をもつ充填剤を使用して分離パターンを変えることは最も有効な解決手段であると考えられます。

コスモシル逆相クロマトグラフィー用充填剤は、表 1 に示すようなさまざまな相互作用を持つ充填剤を取りそろえています。サンプルの保持は、相互作用の総和によって決定されるため、それぞれの相互作用を理解することは、サンプルに適したカラムを選択するために有用です。この資料ではサンプルの官能基からそれぞれの相互作用について紹介します。

表 1. 充填剤の固定相構造と主な相互作用

充填剤名称	C ₁₈ -MS-II	C ₁₈ -AR-II	Cholest	PYE	π NAP	PE-MS	NPE	PBr	PFP	C ₈ -MS
シリカゲル	全多孔性球状シリカゲル									
平均粒子径	5 μ m (p. 65 ~ p. 70 のデータで使用する粒子径)									
平均細孔径	約 12 nm									
比表面積	約 300 m ² /g									
固定相構造										
化学結合基	オクタデシル基	オクタデシル基	コレステリル基	ピレニルエチル基	ナフチルエチル基	フェニルエチル基	ニトロフェニル基	ペンタブロモベンジル基	ペンタフルオロフェニルプロピル基	オクチル基
結合形式	モノメリック型	ポリメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型
主な相互作用	疎水性	疎水性	疎水性 分子形状認識能	疎水性 π - π 分散力 分子形状認識能	疎水性 π - π	疎水性 π - π	疎水性 π - π 双極子*	疎水性 分散力	疎水性 π - π 双極子*	疎水性
エンドキャッピング	あり									

* 双極子—双極子相互作用

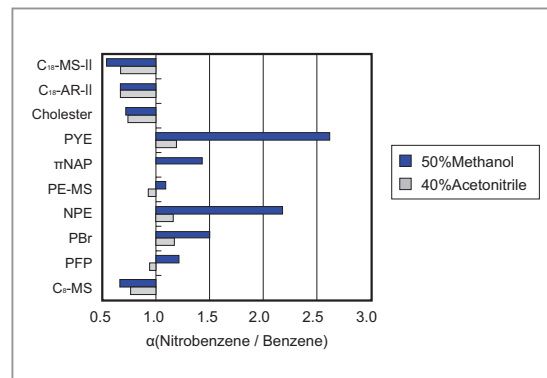
2) 極性基に対する選択性

選択性評価

ベンゼンとベンゼン環に極性基であるニトロ基あるいはメトキシ基が結合した分子構造をもつサンプルを分析し、極性基に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。C₁₈ では疎水性の高さの順にサンプルが溶出しますので、極性基であるニトロ基やメトキシ基は保持を小さくする効果があります。

一方、芳香環を固定相にもつ充填剤では、サンプルと固定相の間に π - π 相互作用が働くため、ニトロ基やメトキシ基は、保持を大きくする効果があり、C₁₈ とは溶出順が逆転します。 π - π 相互作用の大きさは芳香環の数が多いPYE や、ニトロ基を持つNPE で大きくなりました。

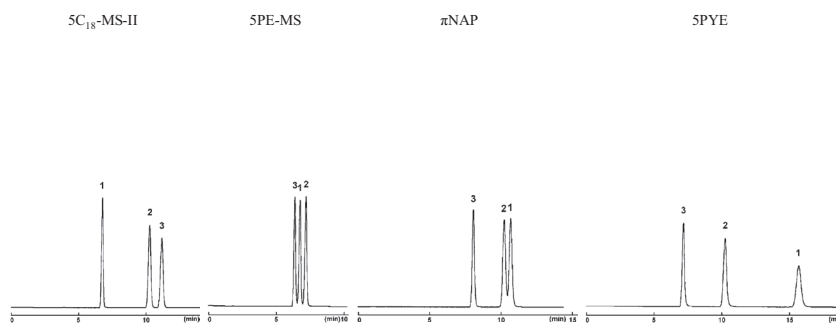
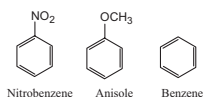
移動相については、アセトニトリルは π 電子を多く持つため、サンプルと固定相との π - π 相互作用を阻害します。そのため、 π - π 相互作用を利用する場合にはメタノール系の移動相の方がより有利だと考えられます。



極性基に対する選択性

Column: 4.6mm I.D. -150mm
 Column size: 4.6mm I.D. -150mm
 Mobile phase: Methanol / H₂O = 50/50
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Nitrobenzene (0.13μg)
 2; Anisole (1.5μg)
 3; Benzene (4.0μg)



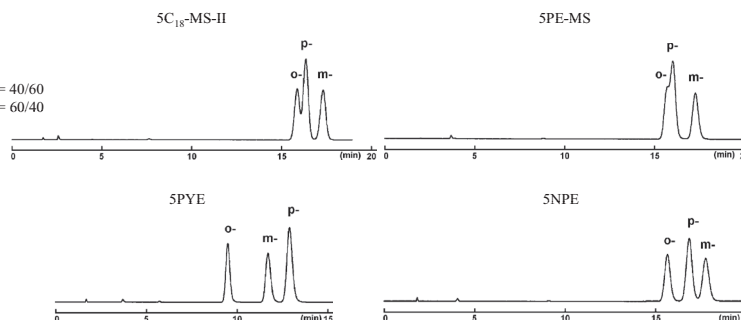
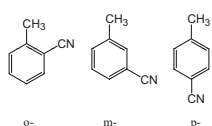
分析例

● トルニトリルの位置異性体の分離

トルニトリルは、ベンゼン環に極性基であるニトリル基と、疎水性基であるメチル基をもつ化合物であり、3種の位置異性体が存在します。C₁₈ や、 π - π 相互作用の小さいPE-MS では、オルト位とパラ位の分離が不十分でした。一方、強い π - π 相互作用を示すPYE やNPE では3種が完全に分離できました。そしてPYEは、NPEと異なりメタ位とパラ位の溶出順が逆転しました。

Column: 4.6mm I.D. -150mm
 Column size: 4.6mm I.D. -150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II, 5PE-MS, 5NPE
 5PYE
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: o-Tolunitrile (2.0μg)
 m-Tolunitrile (2.0μg)
 p-Tolunitrile (1.0μg)



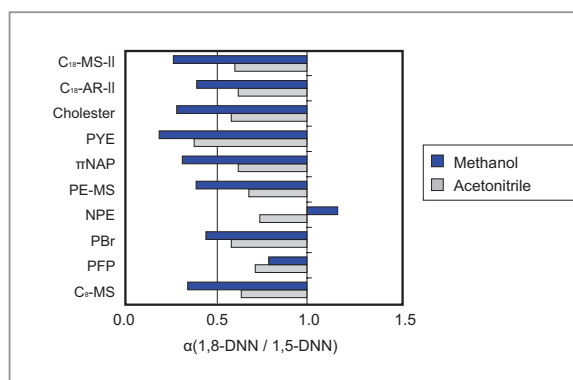
3) 双極子に対する選択性

選択性評価

ナフタレンとナフタレン環に、メチル基やニトロ基が結合した分子構造をもつサンプルを分析し、双極子に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

C₁₈ では、ニトロ基は保持を小さくし、メチル基は保持を大きくする効果がありました。芳香環を持つ充填剤では、 π - π 相互作用によりニトロ基は保持を大きくする効果があり、C₁₈ とは溶出順が逆転しました。

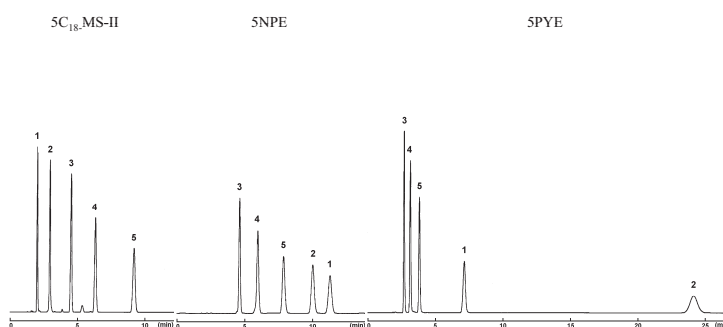
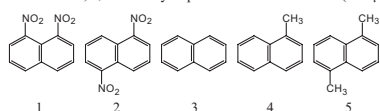
次に、ジニトロナフタレンの溶出順序について、C₁₈ や PYE などは、1,5- ジニトロナフタレンを長く保持するのに対して、NPE だけは 1,8- ジニトロナフタレンを長く保持しました。ニトロ基は電子吸引性基であり、ニトロ基が片側に偏っている分子構造をもつ 1,8- ジニトロナフタレンでは、大きな双極子が生じます。NPE の固定相であるニトロフェニル基にも双極子が生じており、双極子-双極子相互作用により 1,8- ジニトロナフタレンを長く保持したと考えられます。



双極子に対する選択性

Column size: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: C₁₈-MS-II Methanol / H₂O = 80/20
NPE Methanol / H₂O = 70/30
PYE Methanol / H₂O = 90/10
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample:
1; 1,8-Dinitronaphthalene (I,8-DNN) (0.21 µg)
2; 1,5-Dinitronaphthalene (I,5-DNN) (0.11 µg)
3; Naphthalene (0.25 µg)
4; 1-Methylnaphthalene (0.35 µg)
5; 1,5-Dimethylnaphthalene (0.42 µg)



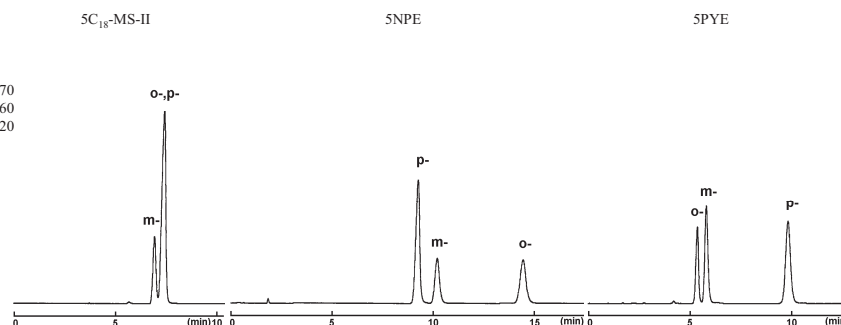
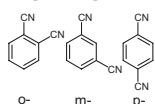
分析例

● フタロニトリルの位置異性体の分離

フタロニトリルは、ベンゼン環に電子吸引性基であるニトリル基が 2 個結合した化合物であり、3 種の位置異性体が存在します。C₁₈ では、分離が不十分ですが、NPE や PYE では π - π 相互作用により分離ができています。また、NPE では、大きな双極子をもつオルト位を強く保持しています。

Column: 5C₁₈-MS-II
Column size: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol / H₂O = 30/70
5NPE Methanol / H₂O = 40/60
5PYE Methanol / H₂O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample:
o-; Phthalonitrile (0.3 µg)
m-; Isophthalonitrile (3.0 µg)
p-; Terephthalonitrile (0.15 µg)

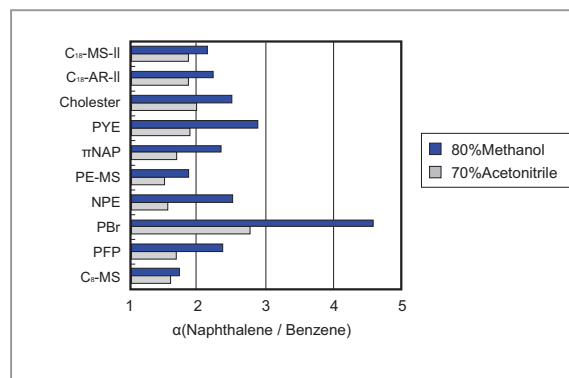


4) 多環芳香族化合物に対する選択性

選択性評価

ベンゼン環の構成数が異なるベンゼン、ナフタレン、アントラセンを分析し、ベンゼン環に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

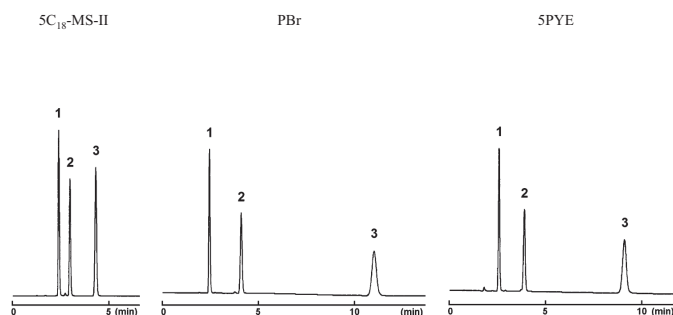
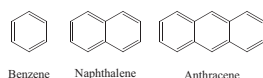
ベンゼン環の構成数が増加するにつれて疎水性が高くなるため、全てのカラムで保持が増加しましたが、特に PBr、PYE での保持の増加が顕著でした。PBr は、疎水性相互作用の他にも、固定相の 5 個の臭素原子によって大きな分散力を示すため、電子が動きやすく大きな分散力をもつ多環芳香族をより強く保持し、高い選択性を示したと考えられます。また、PYE では疎水性、分散力に加え、 π - π 相互作用が働いていると考えられます。



多環芳香族化合物に対する選択性

Column: 4.6mm I.D. - 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol/H₂O = 90/10
 PBr Methanol/H₂O = 90/10
 5PYE Methanol/H₂O = 80/20
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67 µg)
 2; Naphthalene (0.11 µg)
 3; Anthracene (0.0063 µg)



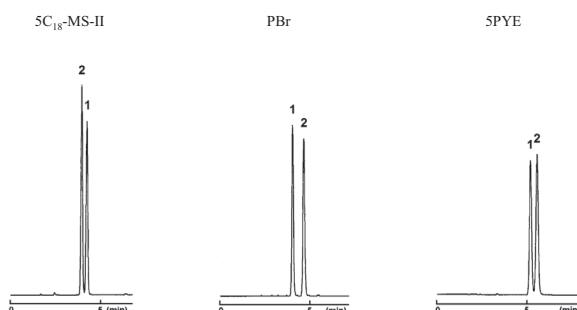
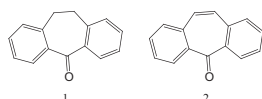
分析例

● ジベンゾスベロン、ジベンゾスベレノンの分離

2 個のフェニル基がビニレン基で結合した分子構造をもつジベンゾスベレノンと、メチレン基で結合した分子構造をもつジベンゾスベロンとの分離を行いました。C₁₈ はジベンゾスベロンを長く保持しましたが、PBr と PYE は、共役した分子構造をもつジベンゾスベレノンをより長く保持しました。

Column: 4.6mm I.D. - 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol/H₂O = 80/20
 PBr Methanol
 5PYE Methanol/H₂O = 90/10
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Dibenzosuberone (0.1 µg)
 2; Dibenzosuberone (0.025 µg)

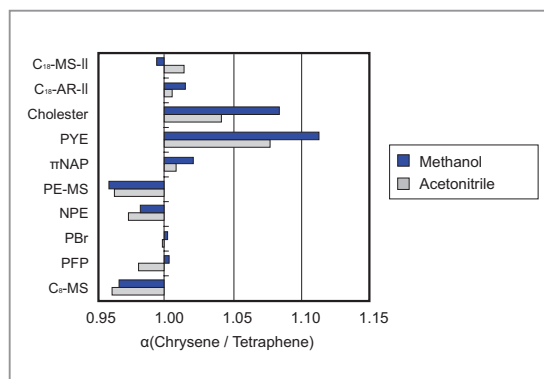


5) 分子形状認識能

選択性評価

4つのベンゼン環より構成され、結合位置の違う多環芳香族の異性体の分析を行いました。これらの化合物は、疎水性や芳香性がほぼ同じで分離が困難ですが、分子形状の違いを識別できるカラムでは、分離が可能となります。分子形状に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

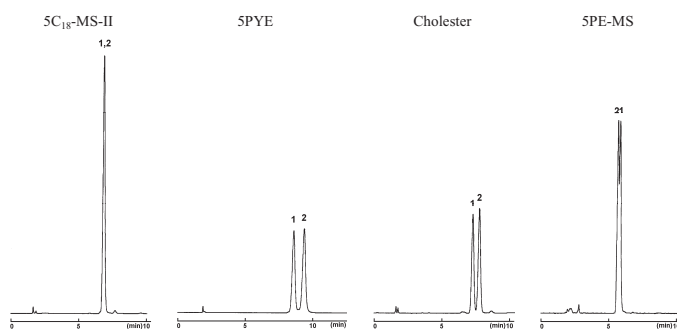
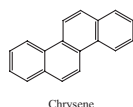
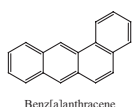
C₁₈ では低い選択性しか示しませんでした、PYE や Cholesterol は、高い選択性を示し分離することができました。



分子形状認識能

Column: 4.6mm I.D. - 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II, 5PYE
 Cholesterol
 5PE-MS
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

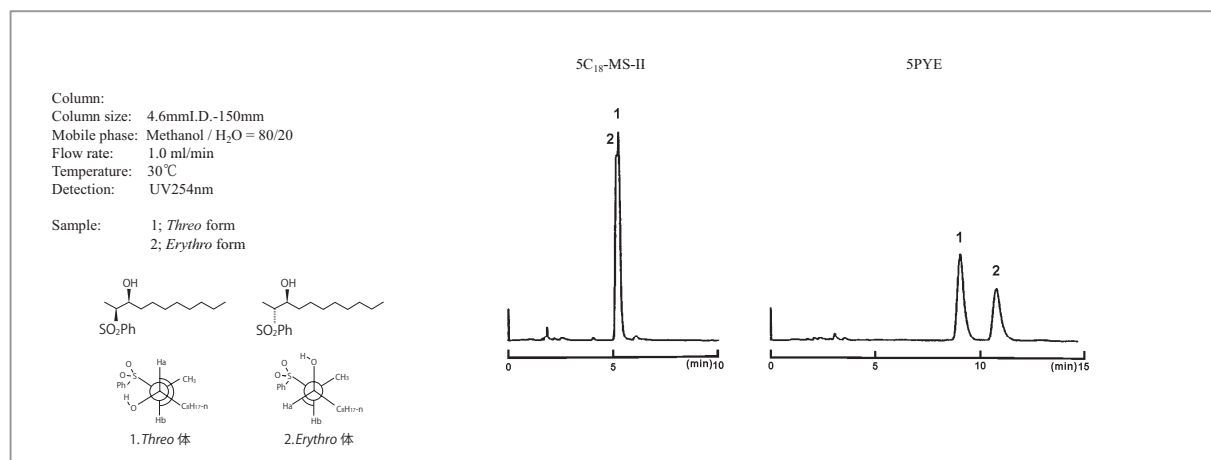
Sample: 1; Tetraphene [Benz[a]anthracene] (0.04μg)
 2; Chrysene (0.04μg)



分析例

● ジアステレオマー (*threo* 体、*erythro* 体) の分離

C₁₈ ではほとんど分離できていませんが、PYE ではかさ高い分子構造をもつ *threo* 体よりも、平面な分子構造をもつ *erythro* 体をより強く保持するため、完全分離が達成できました。

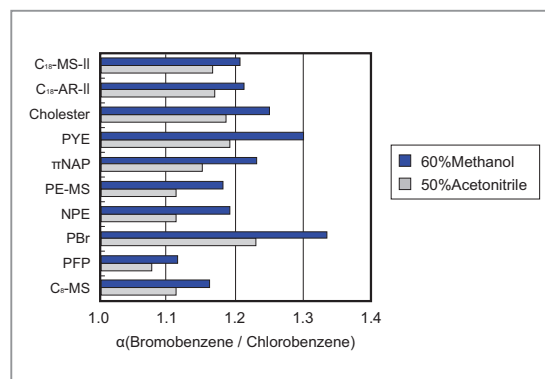


6) ハロゲン化物に対する選択性

選択性評価

ベンゼン環にメチル基、塩素、臭素が結合した分子構造をもつサンプルを分析し、ハロゲン化物に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

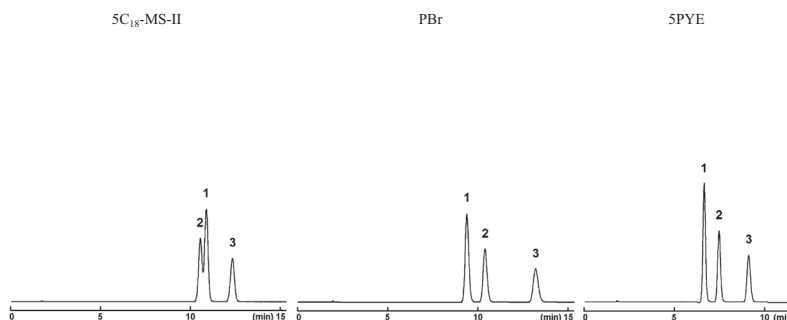
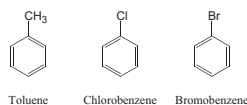
PBr は 5 個の臭素原子に基づく分散力によって、電子が動きやすく大きな分散力をもつクロロ基やブロモ基に対して高い選択性を示しました。また、PYE も PBr より小さいながらピレン環に基づく分散力が働いていると考えられます。



ハロゲン化物に対する選択性

Column: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/ H₂O = 60/40
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Toluene (3.3μg)
2; Chlorobenzene (3.3μg)
3; Bromobenzene (3.3μg)



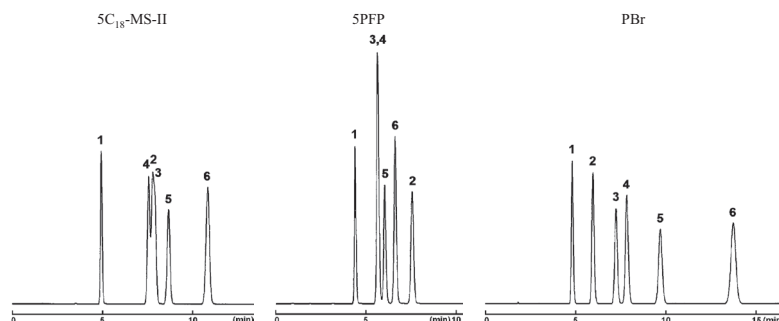
分析例

● ハロゲン化ベンゼンの分離

PBr は、分子量の大きいハロゲンをより強く保持する特性があるため、C₁₈ では分離できないハロゲン化合物を分離することができます。

Column: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/ H₂O = 65/35
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

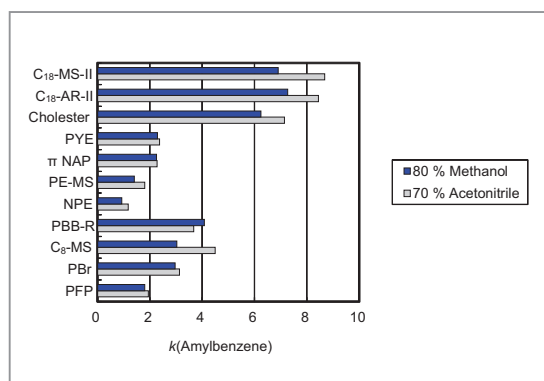
Sample: 1; Fluorobenzene (1.0mg/ml)
2; α,α,α-Trifluorotoluene (0.25mg/ml)
3; Toluene (2.5mg/ml)
4; Chlorobenzene (5.0mg/ml)
5; Bromobenzene (5.0mg/ml)
6; Iodobenzene (2.0mg/ml)
Inj. Vol.: 1.0μl



7) 疎水性に対する選択性

選択性評価

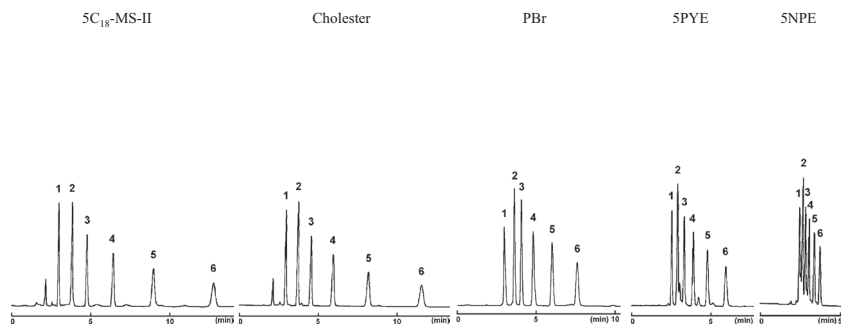
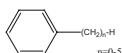
アルキル鎖長の異なるアルキルベンゼンを分析し、疎水性の高さを示す図と、クロマトグラムの一部を示しました。
シリカゲルとの結合形式が異なる2種のC₁₈とCholesterは、ほぼ同程度の疎水性の高さを示しました。ほかのカラムは、C₁₈と比較して小さな疎水性相互作用を示しました。



疎水性に対する選択性

Column: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/H₂O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67μg)
2; Toluene (1.67μg)
3; Ethylbenzene (1.67μg)
4; Propylbenzene (1.67μg)
5; Butylbenzene (1.67μg)
6; Amylbenzene (1.67μg)

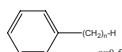


逆相クロマトグラフィーでは、移動相の有機溶媒濃度を下げると保持は大きくなります。今回評価したカラムの中で最も疎水性相互作用の小さいNPEでは、メタノール濃度を20%下げるとC₁₈と同程度の保持時間になりました。

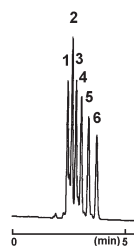
保持時間の調整

Column: 5NPE
Column size: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/H₂O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

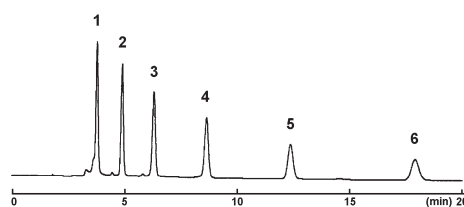
Sample: 1; Benzene (1.67μg)
2; Toluene (1.67μg)
3; Ethylbenzene (1.67μg)
4; Propylbenzene (1.67μg)
5; Butylbenzene (1.67μg)
6; Amylbenzene (1.67μg)



Methanol/H₂O = 80/20



Methanol/H₂O = 60/40

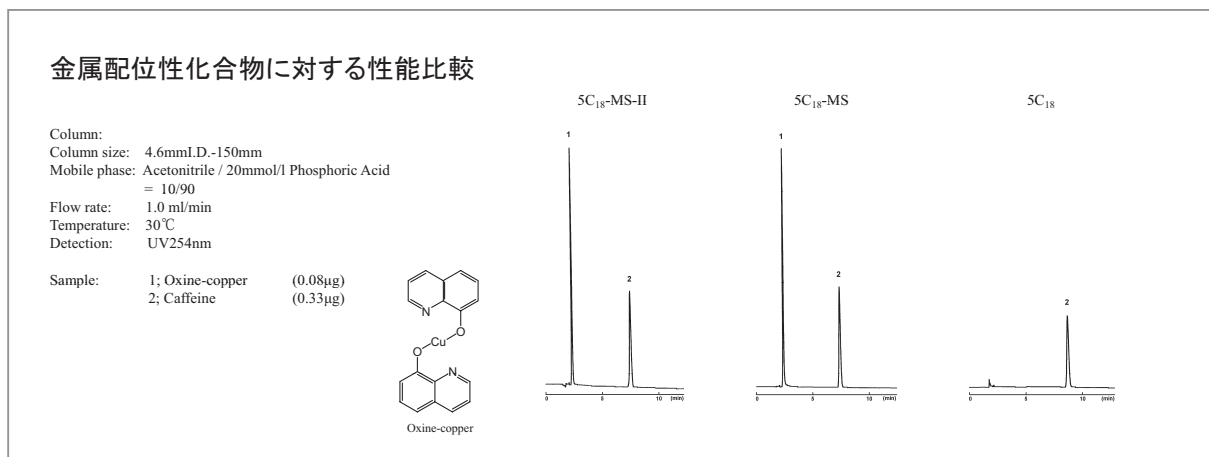


13 COSMOSIL シリーズ / 金属不純物が与える影響 (旧型カラムとの性能比較)

1) COSMOSIL 5C18-MS-II と旧型カラム (5C18-MS、および 5C18) との性能比較

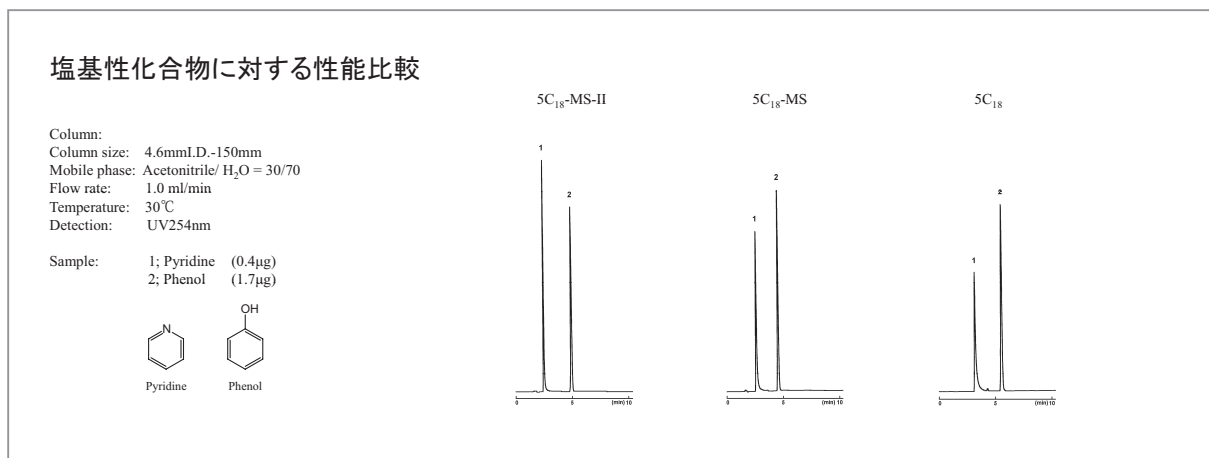
1. 金属配位性化合物の分析

コスモシル 5C18 では、原料シリカゲル中に金属不純物が含まれているため、オキシシン銅などの金属配位性化合物は吸着され溶出しませんでした。しかし、5C18-MS および 5C18-MS-II では、高純度シリカゲル (99.99% 以上) を原料としているので、金属配位性化合物もシャープに溶出します。



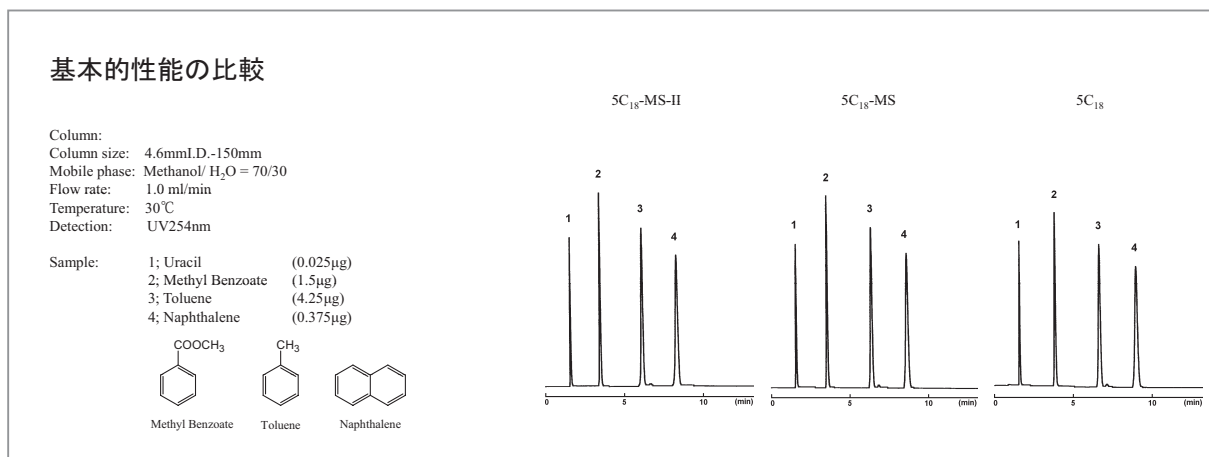
2. 塩基性化合物の分析

コスモシル 5C18-MS-II は、5C18-MS や 5C18 よりエンドキャップ処理を改良したため、塩基性化合物をよりシャープに溶出するようになりました。



3. 基本的性能

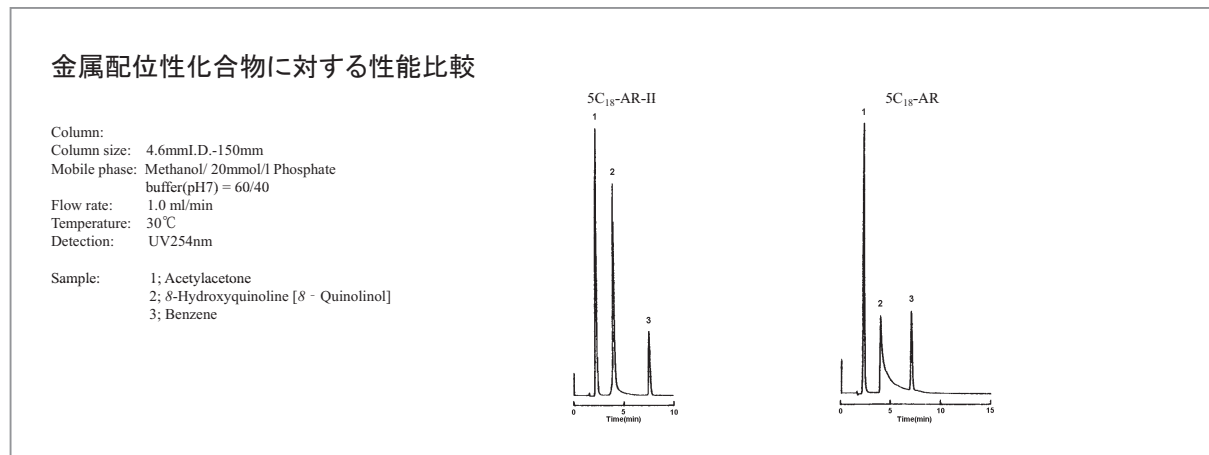
単純な有機化合物を分析する場合、コスモシル 5C18-MS-II、5C18-MS、5C18 のどの充填剤も分離パターンに大きな差は見られません。そのため、現在使用されている分析条件を、そのまま 5C18-MS-II に適用することができます。



2) COSMOSIL 5C18-AR-IIと旧型カラム(5C18-AR)との性能比較

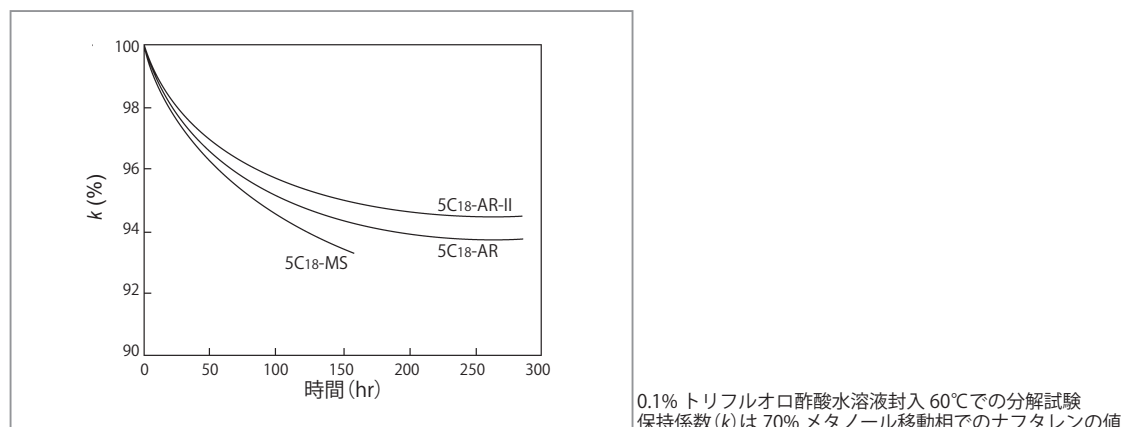
1. 金属配位性化合物の分析

8-Quinolinol などの金属配位性化合物を分析する場合、高純度シリカゲル(99.99% 以上)をベースにしているコスモシール 5C18-AR-II ではシャープに溶出するようになり、高純度シリカゲルではない 5C18-AR よりも高性能カラムであることを証明しています。



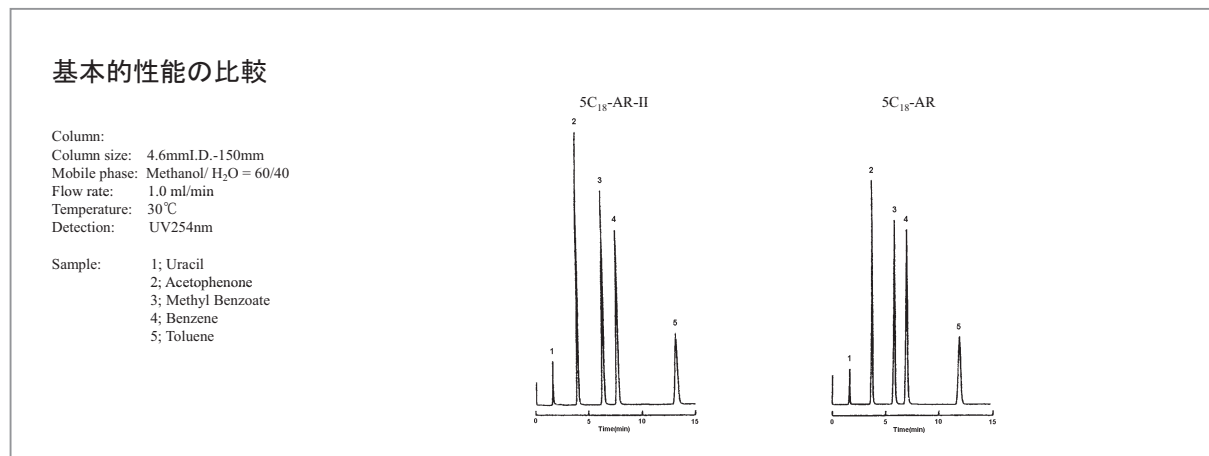
2. 耐酸性評価

コスモシール 5C18-AR-II は、従来の 5C18-AR よりも耐酸性が向上しています。



3. 基本的性能

単純な非解離性有機化合物を分析する場合、コスモシール 5C18-AR-II と 5C18-AR では分離パターンはほとんど変わりません。これは、どちらの充填剤もオクタデシル基の導入量に差がないことを示しています。



実際によくいただく質問をもとに

FAQやトラブルシューティングを充実させました！

豊富なFAQや トラブルシューティング

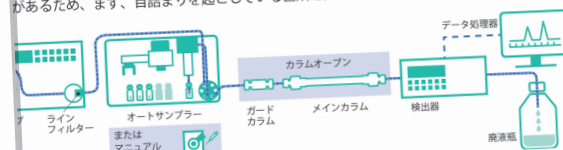
07 よくあるご質問・トラブルシューティング

4) 分析圧力上昇時の対処方法

分析を繰り返すことにより分析圧力が高くなる場合があります。高圧の状態での使用を続けると、カラムの劣化の促進や装置への過負荷による故障の原因になります。ここでは分析圧力が高くなった場合の対処方法を示します。

1. 異常箇所の探索

場合、カラムを含めた流路に目詰まりが起こって、圧力が高くなります。また、装置にも負があるため、まず、目詰まりを起こしている箇所を探します。



HPLCシステムの流路の後ろ側から(検出器より)順次、配管を外し、圧力を測定し、異常箇所を探します。通常、装置部分には圧力はほとんどかかりません。ガードカラムと分析カラムと比較することにより判断します。

の対処方法

従って原因箇所を特定してください。

一部動画あり



イラストで
わかりやすい！

07 よくあるご質問・トラブルシューティング

1) よくあるご質問・トラブルシューティング一覧

よくあるご質問	掲載ページ
Q1 カラムの使用可能な圧力の上限は？	34
Q2 移動相の流速の上限は？	
Q3 カラムの使用可能なpHは？	
Q4 緩衝液や塩の濃度は？	
Q5 移動相の調製方法は？	35
Q6 移動相に用いる溶媒のグレードは？	
Q7 アセトニトリルとメタノールの違いは？	
Q8 LC-MSやELSD検出器で使える移動相は？	
Q9 イオンペア試薬を使用するときの注意点は？	36
Q10 移動相の逆液方向は？	
Q11 カラムの使用可能な温度は？	
Q12 カラム出荷時の封入溶媒は？	
Q13 カラムの洗浄方法は？	37
Q14 カラムの保管方法は？	
Q15 カラムの寿命は？	
Q16 劣化したカラムに起こる症状は？	
Q17 カラムの劣化状態の調べ方は？	38
Q18 セミマイクロカラムを使用するときの注意点は？	
Q19 UHPLCカラムを使用するときの注意点は？	
Q20 分散カラムで精製できる量は？	
Q21 同じ装置で逆相と順相の両方を使用するときの注意点は？	39

Name:

ナカライテスク株式会社



URL

<https://www.nacalai.co.jp/>

試薬はこちら

0120-489-552

価格・納期のご照会

製品に関する技術的なご照会

<https://www.e-nacalai.jp/URL/?P=Contact>

※ 試験・研究用以外には使用しないでください。

※ 掲載内容は予告なく変更になる場合があります。

※ QRコードは株式会社デンソーウェブの登録商標です。

2509P