



# LC ハンドブック

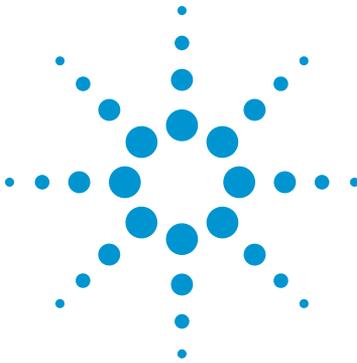
LC カラムの選択方法と  
メソッド開発のガイド



Agilent Technologies







# LC ハンドブック

LC カラムの選択方法と  
メソッド開発のガイド



**Agilent Technologies**

# 目次

## はじめに

## クロマトグラフィーの重要な概念

効率 (N)	7
保持係数 (k)	8
分離係数 ( $\alpha$ ) (選択性)	8
分離度 ( $R_s$ )	9
圧力	10
van Deemter 曲線	11
グラジエントの式	11

## LC 機器の基本

ポンプ - LC システムの中心	14
圧力範囲	14
• Agilent 1200 Infinity シリーズのポンプのパワーレンジ	15
• 溶媒の混合	16
• ディレイボリュウム	18
• カラム外ボリュウム	18
ワークフロー自動化ソリューションを動かすオートサンブラ	19
• 固定ループオートサンブラとフロースルーピークオートサンブラ	19
• 注入の精度と真度	21
• 柔軟性とサンプル数	21
• 注入サイクル時間	21
• キャリーオーバー	22
• 新しいサンプリング手法と自動化	23
カラムコンパートメントによる温度調整	23
検出器 - 検知機能部分	24
検出器の感度	26
• 直線範囲	26
• データレート	27

## 5 HPLC カラムの選択 28

HPLC モード	29
カラムの選択に関する基本情報: 従来のカラム	30

## 6

• 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用カラム	31
• UHPLC カラム	32
• 表面多孔質粒子カラム	32
• LC/MS 用カラム	33
• ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、およびゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) 用カラム	34
• 生物学的特性解析用カラム	34

## 13

カラムの特性	35
• シリカ	35
• 結合相	35
• ポリマー	35
• ボアサイズ	36
• 粒子サイズ	36
• カラムサイズ	37
カートリッジカラムシステム	38

## 効能向上の鍵:

## カラムの構成と設定 41

カラム外ボリュウムの軽減の重要性	42
完全なフィッティング接続の準備	43
フィッティング接続の要件	43
調整不可能な金属フィッティング	43
調整可能なフィンガータイトフィッティング	45
Agilent A-line フィッティング	45
200 回以上再接続できる堅牢性	47
別のブランドのカラムとの互換性	47
試料の注入	47
データ収集レートの設定	48

ドウェルボリュームとクロマトグラフィーに与えるその影響	49		
• システムのドウェルボリュームの測定	51		
• ドウェルボリュームの影響の評価	53		
• ドウェルボリュームと分析時間	54		
キレート化合物	54		
pH および移動相の添加剤	55		
グラジエントの使用	56		
カラムの再平衡化の最適化	57		
カラムの劣化	59		
• 結合相の喪失	59		
逆相シリカ系カラムのクリーニング	59		
順相シリカ系カラムのクリーニング	60		
逆相ポリマー系カラムのクリーニング	60		
<b>メソッド開発</b>	<b>62</b>		
メソッド開発: どこから始めるべきか	63		
• モードの選択	63		
• カラムサイズと充填剤の選択	66		
• 固定相の選択	67		
逆相クロマトグラフィーのメソッド開発	67		
逆相クロマトグラフィーの固定相の選択	67		
逆相クロマトグラフィーの移動相溶媒の選択	70		
• 移動相の通液	70		
• 移動相および移動相添加剤のトラブルシューティング	70		
• 移動相の混合	71		
• 移動相の脱気	71		
緩衝液による移動相の pH の管理	71		
• UV 検出器に一般に使用される緩衝液	73		
• LC/MS についての注意事項	74		
• 緩衝液を使用した移動相のトラブルシューティング	76		
• トラブルシューティングの例: ベースラインのドリフト	76		
		• トラブルシューティングの例: 高い pH によって発生する広がりまたはピーク割れ	78
		• トラブルシューティングの例: 移動相修飾剤と選択性	78
		逆相クロマトグラフィーのクロマトグラフィー条件の最適化	80
		• イソクラティックの最適化	81
		• グラジエントの最適化	84
		逆相クロマトグラフィーのポリマー系カラム	86
		逆相クロマトグラフィーの「実践的な」イソクラティックメソッドを開発するためのフロー	87
		従来のカラムから高効率カラムにメソッドを変換する際のヒント	89
		メソッド開発の自動化ツール	91
		他の HPLC モードのメソッド開発	93
		• HILIC	93
		• 順相クロマトグラフィー	95
		• イオン交換クロマトグラフィー	97
		• サイズ排除クロマトグラフィー	98
		<b>LC/MS 機器の基本</b>	<b>99</b>
		LC/MS とは	99
		LC/MS から取得できる情報	100
		LC/MS 機器の種類	101
		• シングル四重極機器	101
		• トリプル四重極機器	101
		• 飛行時間型機器と四重極飛行時間型機器	101
		均一電場イオンモビリティ	102
		MS/MS – 高い特異性で化合物を分解	102

次のページに続く

化合物のイオン化	103	カラムの取り扱いと保管	118
・ エレクトロスプレーイオン化	103	・ カラム寿命の最大化	118
・ 大気圧化学イオン化	103	・ 保管時の注意	120
・ 大気圧光イオン化	103	・ カラムの目詰まり防止	120
LC/MS によるメソッド開発のヒント	104	カラムの劣化を簡単に判断する方法	120
・ ESI-MS 用の溶媒の選択	104	あらゆる場所でのメソッドの再現性の確保	121
・ APCI-MS および APPI-MS 用の溶媒の選択	105	・ メソッドの堅牢性の強化	121
・ MS を使ったイオンペアクロマトグラフィー用の溶媒の選択	105	・ ドウエルボリュームの意味について	122
サンプル前処理法	106	<b>トラブルシューティング</b>	
・ マトリックス成分	106	<b>クイックリファレンス</b>	<b>123</b>
・ 濃縮の問題	106	有効なトラブルシューティングのためのヒント	123
イオン抑制の考慮事項	106	<b>参考情報一覧</b>	<b>129</b>
LC/MS と高速高分離カラムの使用に関する考慮事項	107	USP	129
・ 感度の向上	107	溶媒の混和性	135
・ MS スキャン速度	108	一般的なHPLC溶媒の特性	135
・ システム分散	108	移動相修飾剤の UV カットオフ	138
LC/MS ソフトウェア	109	固相抽出の充填剤	139
・ スキャンの種類 – TIC、EIC、および SIM の比較	109	SPE 充填剤の条件	140
・ パーソナル化合物データベースライブラリ	110	その他の推奨文献	141
		その他のアジレントの参考資料	141
<b>よりよいクロマトグラフィーの結果を得るために</b>	<b>112</b>	<b>用語集</b>	<b>142</b>
スケーラビリティ	113	<b>索引</b>	<b>170</b>
高品質グレードの溶媒を使用することの重要性	116	<b>アジレントの製品と詳細情報</b>	<b>175</b>
UHPLC についての特別な考慮事項	116		
インラインフィルタ	117		
・ 低ボリュームインラインフィルタ	117		
ガードカラム	118		
溶媒飽和カラム	118		
カラムインレットフリット	118		

# はじめに

液体クロマトグラフィーは、幅広いアプリケーションをカバーする、有用な分析技術です。

世界中で HPLC 技術を使用して、食品および水の安全性の確認、医薬品の開発、環境の保護や公衆衛生の監視を行っています。しかし、これだけに留まりません。クロマトグラフィーについて知れば知るほど、このすばらしい技術を使用して多くを成し遂げることができます。

今日では、拡大し続ける用途に適合する多くのカラムや充填剤が手に入ります。現在、アジレントでは、最も幅広いアプリケーションや条件に対応する、2,000 を超えるカラムを用意しています。したがって、ニーズに最適なカラムを選択できるチャンスも広がっています。

液体クロマトグラフィーから最高の結果を引き出すため、アジレントはこの LC ハンドブックを作成しました。このガイドには、ラボの業務をより容易にし、生産性を向上させるための多くのヒントや秘訣が含まれています。さらに、40 年以上に及ぶ経験を生かし、カラムやフィッティングの毎日の使用で一般に発生する問題の解決方法に関する提案も行っています。このガイドでは、LC で使用される主要なカラム、特に逆相高速液体クロマトグラフィーに重点を置いて説明します。

このガイドの使用方法：

- 参照しやすいように各章項を色分けしています。
- 巻末の用語集は十分な情報源となるように作成していますが、スペースに制約があるため、すべての用語については取り上げていません。
- このガイドでは主に逆相 HPLC について説明します。

# クロマトグラフィーの 重要な概念

学生時代に数学を学んだとき、それが実際にどのように役立つのか疑問を持ったことがある方も多いでしょう。実際、分析には数学が重要です。この章では、その理由について説明します。

ここでは、クロマトグラフィーの多くの概念の基礎となる方程式と理論について簡単に説明します。これらの概念を理解することは、最高の結果を得るため、また問題が発生したときのトラブルシューティングを行うために役立ちます。

次の性能の基本情報から説明を始めます。

- 効率
- 保持力
- 選択性
- 分離度
- 圧力

これらはいずれも、結果を最適化し、正しいメソッドを開発する方法を理解するために非常に重要です。

さらに複雑な次の概念についても説明します。

- van Deemter 曲線
- グラジエントの式

これらの2つのトピックもメソッド開発には重要です。

## 効率 (N)

さまざまなカラムの性能を比較するには、カラムの効率を使用します。これは、おそらく最も頻繁に言及されるカラム性能のパラメータであり、理論段数 N で表されます。

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_t} \right)^2$$

効率      保持時間      ベースにおけるピーク幅

式 1. 効率の式

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

保持時間      半値幅

式 2. 効率を計算するための別の式

理論段数の多いカラムの方が効率が高くなります。N が大きいカラムは、N が小さいカラムよりも特定の保持時間におけるピークが狭くなります。

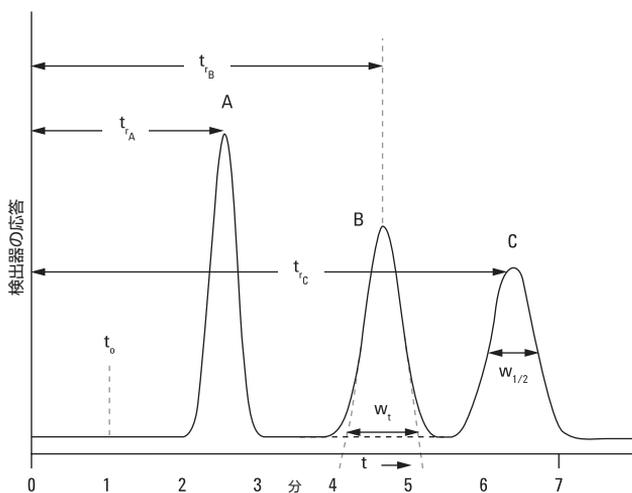


図 1. クロマトグラフィーの効率、保持係数、分離係数の説明

### 効率

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_t} \right)^2$$

ピーク B では、 $16(4.5 \text{ min.}/0.9 \text{ min.})^2 = 400$  段

$$k = (t_R - t_0)/t_0$$

### 保持係数

$$k_A = (2.5 - 1)/1 = 1.5$$

$$k_B = (4.6 - 1)/1 = 3.6$$

$$k_C = (6.2 - 1)/1 = 5.2$$

### 分離係数 (選択性) C - B

$$\alpha = k_2/k_1$$

$$\alpha = k_C/k_B = 5.2/3.6 = 1.44$$

$$\alpha = 1.44$$

### 分離係数 (B-A)

$$\alpha = k_2/k_1$$

$$\alpha = k_B/k_A = 3.6/1.5 = 2.4$$

$$\alpha = 2.4$$



分離係数は、保持係数の比として定義されます。図 1 では、ピーク B と C の間よりもピーク A と B の間の分離係数の方が優れていることがわかります。

これを証明するための計算を示します。分離係数は、移動相の構成や固定相を変えることで変更することができます。温度も分離係数を調整するための要因になります。

## 分離度 ( $R_s$ )

分離度は、カラムが対象のピークを分離する能力を表します。したがって、分離度が高いほど、2 つのピークのベースライン分離が容易になります。式 5 からわかるように、分離度では効率、分離係数、保持係数を考慮します。

これらのパラメータの 1 つを向上することで分離度を上げることができます。

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{k}{(k+1)}$$

式 5. 分離度の式

図 2 では、各要素が分離プロセスに与えるさまざまな影響がわかります。これらはすべて収獲遞減を示しています。つまり、分離度を上げようとしていすれの要素を大きくしようとしても、その効果は徐々に下がります。

カラムの長さを 2 倍にすると理論段数は増えますが、分離にも 2 倍の長さが必要になります。つまり、分離度の向上は 2 の平方根、つまりわずか 1.4 倍に留まります。

測定可能な分離を行い、十分な定量を行うための分離係数の最小値は 1 です。高さの等しい 2 つのピーク間の谷を識別するには、0.6 の値が必要です。堅牢なメソッドでは、通常は 1.7 以上の値を必要とします。分離係数が 1.6 あれば、ベースライン分離を提供し、精度の高い正確な定量の結果をもたらすと考えられています。

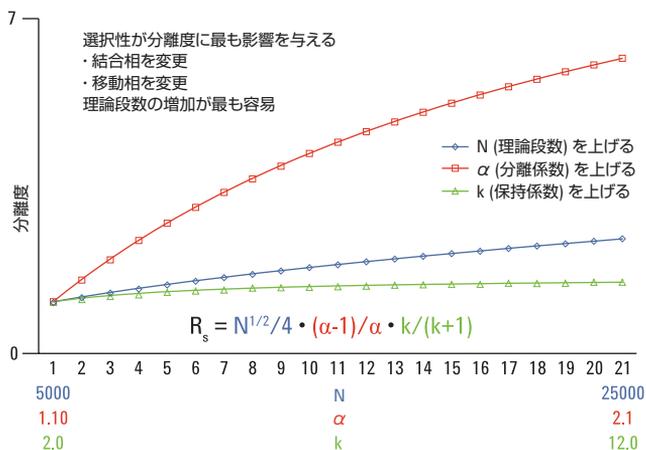


図 2. 分離係数、カラム効率 (理論段数)、または保持係数の関数としての分離度

## 圧力

圧力の式 (式 6) は、システムの圧力に影響を与える 5 つの主要要素、溶媒粘度 ( $\eta$ )、流速 (F)、カラム長 (L)、カラム半径 (r)、粒子径 ( $d_p$ ) を示しています。システムの圧力に影響を与えるこれらの主要要素について理解するには、この圧力の式に精通しておくことをお勧めします。

圧力の変化

$$\Delta P = \frac{\eta F L}{K^0 \pi r^2 d_p^2}$$

粘度      流速      カラムの長さ

カラムの透過率      カラム半径      粒子径

式 6. 圧力の式

この式に示すように、粒子径 ( $d_p$ ) がわずかに小さくなっただけでも、背圧には大きな影響があります。

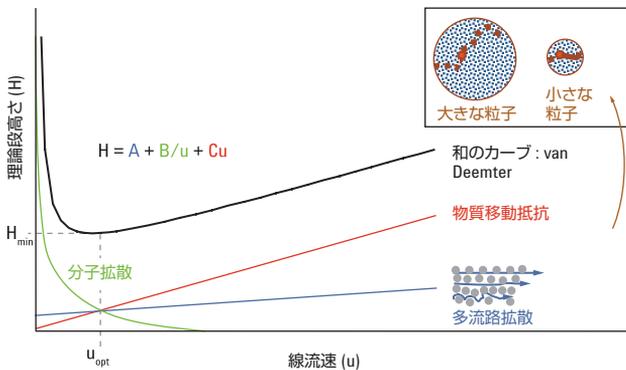
## van Deemter 曲線

van Deemter 式は、線流速 ( $u$ ) または流速の関数として効率 ( $H$ ) を評価します (式 7 を参照)。理論段高さと呼ばれる  $H$  は、カラム長 ( $L$ ) を理論段数の計算値で割ることにより求めます。小さい理論段高さを達成することが目標です。これは、粒子径の小さいカラム、最適な線流速、および粘度の低い移動相によって最も効率的に実現することができます。粒子サイズが小さくなると、最適な線流速が大きくなります。

$$H = A + B/u + Cu$$

$$H = L/N$$

式 7. van Deemter の式



理論段高さが低いほど理論段数が高くなり、分離は良くなる

図 3. van Deemter 式の説明

多くの場合、さまざまなカラムの性能を評価するために、また、メソッドに最適な線流速 ( $u_{opt}$ ) を理解するために van Deemter 曲線をプロットします。

## グラジエントの式

試料内に幅広い成分が含まれる場合、インクラティック溶出 (移動相の組成が一定) では、適当な時間内にすべての成分の分離を行うのが困難なことがあります。グラジエント溶出は、時間の関数として移動相の強度を上げ、その結果として高速分析と優れたピーク形状、および定量を可能にするプロセスです。グラジエント溶出では、通常はピーク幅は狭く、一定です (グラジエントの詳細については 55 ページを参照)。

グラジエントの式 (式 8) には、分析に影響を与え、考慮しないとクロマトグラフィーに問題が発生する可能性がある重要な変数が含まれます。この式は、保持係数が流速 ( $F$ )、グラジエント時間 ( $t_G$ )、グラジエント範囲 ( $DF$ )、カラム体積 ( $V_M$ ) の影響を受けることを示しています。

保持係数を一定に維持するためには、分母の変化を、それに比例する分子の変化で相殺し、分子の変化を分母の変化で相殺する必要があります。

保持係数  $k$  (グラジエントでは  $k^*$ ) を大きくすることは、分離度を上げる簡単な方法ですが、図 2 に示すように、効率や選択性を上げた場合ほどには有効ではありません。グラジエント時間を増やして保持係数を上げると、式 8 に示すように分析時間が長くなります。

$$k^* = \frac{t_G F}{S \Delta\Phi V_m}$$

この式において、 $t_G$  はグラジエント時間、 $F$  は流速、 $S$  は定数、 $\Delta\Phi$  は B 溶媒の変化率、 $V_m$  はカラムの空隙体積、 $k^*$  はグラジエントの保持を示します。

式 8. グラジエントの式

グラジエントの式では、 $S$  は定数で、分離対象の分子のサイズによって異なります。小さい分子では、 $S$  の値は約 4~6 になります。

ペプチドやタンパク質では、 $S$  は 10~1,000 です。今日では、カラムのサイズを短いものか (スループットを上げるため)、内径の小さいもの (LC/MS 用) に変更することが一般的です。カラムボリュームが減少した場合は、それに比例するグラジエント時間 ( $t_G$ ) の短縮または流速 ( $F$ ) の減少により相殺する必要があります。同じカラムを使用してグラジエント範囲 ( $DF$ ) を変更したときに、グラジエント勾配と  $k^*$  の値を同一のまま維持する場合は、それに比例したグラジエント時間 ( $t_G$ ) や流速 ( $F$ ) の変更によって調整しなければなりません。

異なるサイズのカラムにメソッドを転送する場合は、アジレントのメソッド変換ソフトウェアが役立ちます。[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) の検索フィールドに「LC Method Translator」と入力すると、メソッド変換ソフトウェアを見つけることができます。

# LC 機器の基本

一般的な液体クロマトグラフィーシステムは、分析対象物の混合物を分離し個々の化合物を検出するために HPLC や UHPLC で使用されるもので、4 つの主要コンポーネントで構成されます。

ここでは、これらのコンポーネントとその最も重要な機能について説明します。LC システムの運用や選択においては、これらの機能を慎重に検討して、堅牢で一貫性のある結果と最大限の効率を実現できるようにします。

一般的な LC システムの各コンポーネントやモジュールは、分離プロセスや検出プロセスにおいて、等しく重要なそれぞれの機能を果たします。これらの機能を理解するため、システム全体の流路を見てみましょう。図 4 では、ポンプから注入口、カラム、検出器までの流路を示しています。

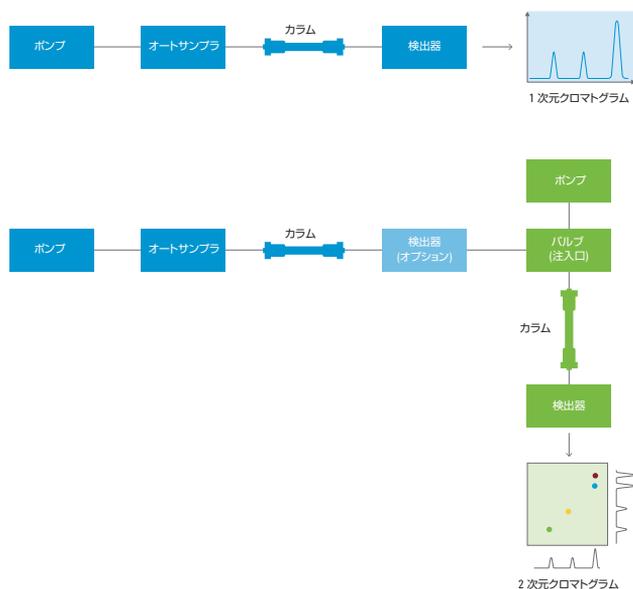


図 4. 一般的な最新の LC システムのコンポーネント。

## Agilent 1290 Infinity II LC

新しい Agilent 1290 Infinity II LC は、UHPLC の未来を具現化する LC システムです。アジレントならではの優れた信頼性と堅牢性に加えて、効率化を最大限に高める革新的な技術を備えています。

- 分析効率を最大化: 比類のない分離性能および検出性能により、最高品質の分析データを提供し、分析結果に究極の信頼性を提供します。
- 装置効率を最大化: 最高のサンプルキャパシティと最速の注入サイクル時間、および最適化した操作性により、あらゆるアプリケーションで最高のスループットを実現します。

## ポンプ – LC システムの中心

ポンプでは、移動相をシステムに供給する前に、溶媒を一定の割合 (イソクラティック) または多様な割合 (グラジエント) で混合します。グラジエントモードでは、ポンプによって、移動相の 2 番目の成分の割合を徐々に上げていきます。移動相の 2 番目の成分を溶媒 B と呼ぶことにします。溶媒 B の溶出強度は、移動相の最初の成分である溶媒 A より高いです。多くのポンプには、溶媒中に溶解した空気を除去するためのデガッサユニットも付いています。溶媒の脱気によって、ドリフトやノイズなど、検出器のベースラインの変動を減らすことができます。

### 圧力範囲

HPLC と UHPLC のポンプから、固定相を含むカラムを通じて移動相が供給されます。カラム内の固定相の抵抗に対応するには、ポンプから 50 ~ 1300 bar の高圧で移動相を送る必要があります。

標準的な HPLC カラムには通常、5  $\mu\text{m}$  のシリカベースの粒子が含まれます。通常、400 bar の圧力で流せるポンプであれば、長さ 50 ~ 300 mm、内径 4.6 mm の標準的な HPLC カラムで使用するには十分です。これに対し、最新の UHPLC で使用されるカラム粒子は 2  $\mu\text{m}$  未満の場合があります。全多孔質粒子が小さく (2  $\mu\text{m}$  未満)、内径が小さい (2.1 mm 未満)、長いカラム (300 mm など) の場合、1000 bar 以上の高圧に対応できるポンプが必要です。分析 LC アプリケーションの一般的な流量は、100  $\mu\text{L}/\text{min}$  ~ 10  $\text{mL}/\text{min}$  です。アジレントでは、ポンプのパワーレンジ、すなわち流量と圧力機能の組み合わせによってポンプを分類しています。

## Agilent 1200 Infinity シリーズのポンプのパワーレンジ

Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプのパワーレンジは、1300 bar (最大 2 mL/min) ~ 800 bar (最大 5 mL/min) です。図 5 を参照してください。

表 1 は、各種カラムに適したポンプを示しています。

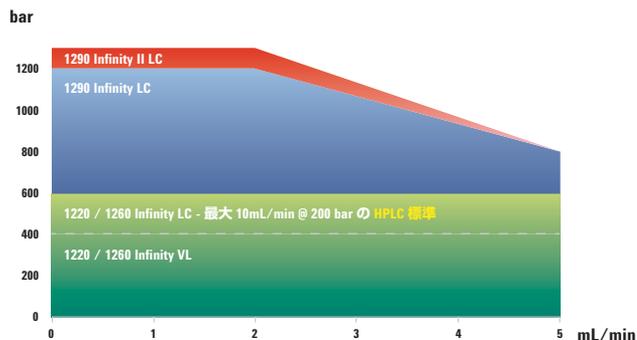


図 5. 一般的な最新の LC システムのコンポーネント。

カラムの種類 粒子	HPLC 3~5 μm	HPLC 表面	UHPLC 2 μm 未満 (STM)			UHPLC 表面多孔				
カラム長/mm	50~300	50~250	短 30~50			長 100~150			30~150	
カラム内径/mm	3.0~4.6	3.0~4.6	2.1	3.0	4.6	2.1	3.0	4.6	2.1	3.0~4.6
最大圧力/bar	400	400	1200	1200	600	1200	1200	600	600	600
アシレントのカラムの種類	条件により 異なる	Poroshell 120 4 μm	RRHD	RRHD	RRHT	RRHD	RRHD	RRHT	Poroshell 120 2.7 μm	Poroshell 120 2.7 μm
1290 ハイスピード - 1300 bar										
1290 フレキシブル - 1300 bar										
1260 バイナリポンプ - 600 bar						2)				
12600/1220G - 600 bar			1)			2)			1)	
従来の LC 400 bar			2)	2)		2)	2)		3)	3)

### 凡例

最良	1) デイレイボリウムによる。
良	2) デイレイボリウムと圧力による。
可	3) 圧力による。
不可	STM 短: 2 μm 未満の粒子、長さ 30 ~ 50 mm STM 長: 2 μm 未満の粒子、長さ 100 ~ 150 mm HPLC: 3 ~ 5 μm の粒子

表 1. SPE 充填剤の条件に関するガイドライン

## 溶媒の混合

ポンプには、移動相を供給するだけでなく、高い真度と精度で溶媒を混合するという機能があります。イソクラティック溶出の場合、ポンプで精密な一定の割合の溶媒を作る必要があります。また、2種類以上の溶媒の割合が時間とともに変化する溶媒グラジエントも作る必要があります。溶媒を正確に混合し、再現性の高い流量を実現する機能によって、ポンプの保持時間の再現性が決まります。保持時間は液体クロマトグラフィーにおける基本パラメータの1つであり、カラムと移動相の特定の組み合わせで分離される物質の保持特性を示すものです。通常は、2種類のポンプが使用されます。この2種類のポンプは、溶媒の混合方法によって区別します。

クォータナリポンプでは、溶媒を低圧で混合します。最大4本の溶媒ラインがマルチチャンネルバルブにつながっており、プリセットした割合で組み合わせで混合されます。このポンプではこの方法で、2成分、3成分、4成分のグラジエントを作ることができます。溶媒は、ポンプの低圧側で混合されます。図6を参照してください。割合の調整や混合時での気泡の形成を防ぐには、溶媒を適切に脱気することが重要です。通常は、内蔵ユニットまたは外部ユニットで溶媒を脱気します。次に、高圧シリンダから注入口に混合溶媒(移動相)が送られます。

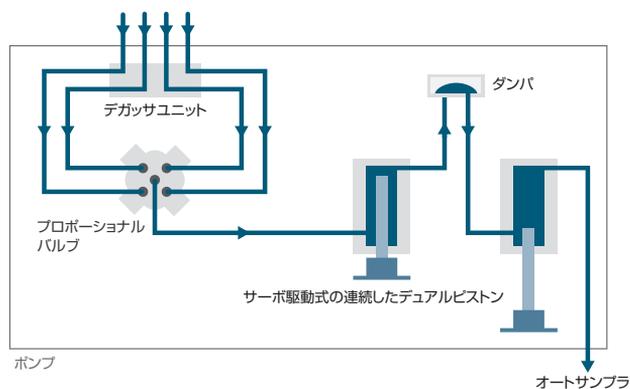


図6. デガッサユニット、プロポーションバルブ、ポンプシリンダによる、グラジエントの低圧混合送液システムの概要。

バイナリポンプでは、ポンプの高圧側で溶媒が混合されます。通常は、2種類の溶媒だけを混合できます。バイナリポンプの主な利点は、溶媒成分の1つを低い割合で混合した場合に、溶媒混合の真度と精度が大幅に上がることです。この方法で混合すると、溶媒グラジエントの開始時と終了時の溶媒組成の精度が上がります。図7を参照してください。高圧混合バイナリポンプのもう1つの利点は、ディレイボリュームが小さくなることです。ディレイボリュームとは、混合ポイントからカラム内でのグラジエントの開始までに供給される移動相の量です。ディレイボリュームが小さくなると分析速度が上がり、分析時間が短くなります。高圧混合の場合、気泡の形成はあまり問題にはなりません。溶媒が混合時に加圧されるためです。

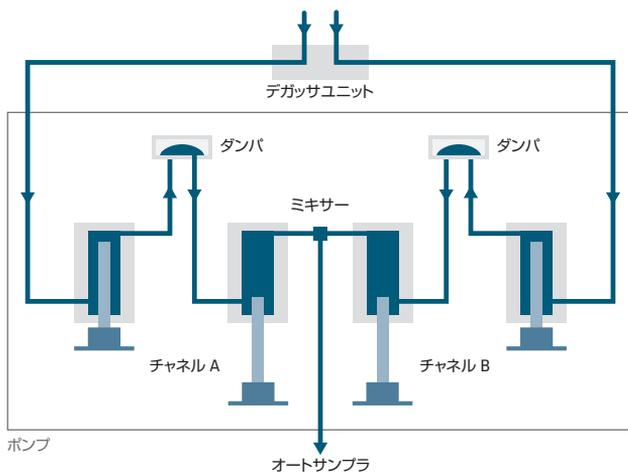


図 7. バイナリ溶出グラジエント生成用の 2 つの溶媒チャンネルによる、グラジエントの高圧混合送液システムの概要。

クォータナリポンプはバイナリポンプより柔軟性が高く、バイナリグラジエントだけでなく 3 成分グラジエントや 4 成分グラジエントも供給できます。また、クォータナリポンプではオンラインで添加物と移動相を混合できます。低圧ミキシングポンプには 1 個のポンプしか付いていないため、2 個のポンプが必要な高圧ミキシングポンプと比べて、通常は低価格です。表 2 を参照してください。

	イソクラティック	クォータナリ	バイナリ
溶媒	1	4	2
混合	混合なし	低圧混合	高圧混合
グラジエント	グラジエントなし、イソクラティックのみ	2 成分、3 成分、4 成分グラジエント	2 成分グラジエントのみ
ディレイボリューム	グラジエントなし、ディレイなしのボリューム	高ディレイボリューム	低ディレイボリューム
デガッサ		脱気が必須	脱気を推奨
グラジエントの混合性能	なし	グラジエントの中心では高く、末端では低くなる (1290 Infinity II フレキシブルポンプを除く)	高

表 2. LC ポンプでの混合原理の比較。

## ディレイボリューム

ディレイボリュームまたはドウェルボリュームとは、移動相の混合ポイントからカラムヘッドまでのシステムボリュームです。ディレイボリュームは、分析速度に大きく影響します。ディレイボリュームに影響を与える主なシステム要素は、溶媒のミキサーとダンパー、接続キャピラリー、注入口の水圧量、および熱交換器の量です。この結果、ポンプと注入口の設計が、実質的に分析速度に影響します。最新のUHPLCポンプは、混合性能を下げずにディレイボリュームを最小限に減らすことができるように設計されています。

### Agilent 1290 Infinity II のフレキシブルポンプとハイスピードポンプのディレイボリューム

Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプは、他の市販のクォータナリポンプとは異なります。このポンプは、高圧のミキシングポンプと同等の混合性能を有しており、溶媒の割合に関係なく、再現性の高いグラジエントを生成できます。Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプはディレイボリュームが非常に小さいため、分析時間を簡単に短縮できます。

Agilent 1290 Infinity II ポンプの新技術によって、ディレイボリュームを最小限に減らすことができます。Agilent Jet Weaver および Inlet Weaver ミキサーは、少量で効率的に混合できます。Agilent 1290 Infinity II のフレキシブルポンプとハイスピードポンプでは、移動相の圧縮率特性を考慮したアクティブダンピングを使用しています。アクティブダンピングではピコリットル単位の精度で計量でき、物理ダンパーを使用する場合より優れています。

## カラム外ボリューム

カラム外ボリュームとは、注入ポイントと検出器のアウトレットの間のシステムボリュームです。カラム外ボリュームの主な構成は、キャピラリー、熱交換器、コネクタとフィッティング、および検出器のフローセルです。カラム外ボリュームが大きいと、サンプルの拡散や分析対象物のバンド幅拡大の原因となり、分離度や感度が低下します。キャピラリーコネクタの取り扱いや、システムへのカラムの取り付けには、特に注意してください。コネクタを慎重に取り扱わないと、予想外の見つけにくいデッドボリュームが生まれ、分離性能が大幅に低下する場合があります。インクラティック分離で小さいカラム内径 (2.1 mm 以下) を使用する場合は、カラム外ボリュームと小さいキャピラリー内径について、特に慎重に考慮する必要があります。

### Agilent A-Line クイックコネクタカラムフィッティング

慎重に設計したシステムで Agilent A-line クイックコネクタカラムフィッティングなどの使いやすいコネクタを使用すれば、デッドボリュームを実質的に排除して、ユーザーの能力に関係なく確実な液体クロマトグラフィーを実現できます。



## ワークフロー自動化ソリューションを動かすオートサンブラ

自動液体サンブラやオートサンブラは、マニュアルインジェクタに代わるもので、キャピラリー経由で確実に、正確に複数のサンプルを注入できます。ユーザーによる操作は不要です。HPLC などの分析オートサンブラでは、100 nL ~ 100  $\mu$ L のサンプル量を注入できます。これらのオートサンブラでは、少し変更を加えれば、高希釈サンプルやセミ分取のアプリケーション向けに注入量を増やすことができます。UHPLC の場合は通常、使用するカラム内径が小さいため、オートサンブラの注入量が少なくなります。優れた分離性能を実現するには、オーバーロードにならないようにする必要があります。

### 固定ループオートサンブラとフロースルーオートサンブラ

オートサンブラには、固定ループとフロースルーという 2 種類の設計方式があります。固定ループ設計の場合、サンプルはサンプルループに吸引され、このループがサンプル流路に切り替えられます。図 8 を参照してください。

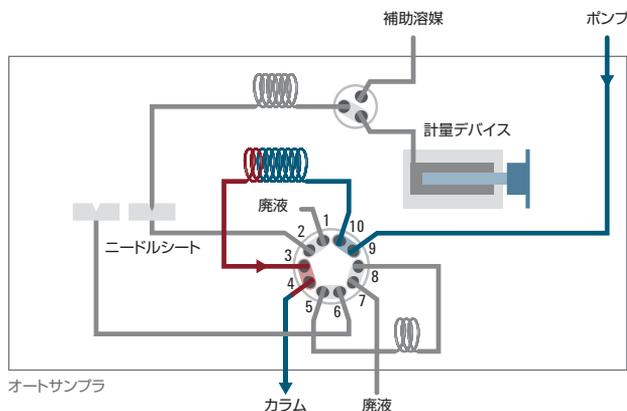


図 8. サンプルループが流路に切り替えられる、オートサンブラの固定ループ設計。

フロースルーオートサンブラの場合、移動相がサンプルループ、計量デバイス、および注入ニードルを経由します。フロースルー設計の主な利点は、注入量の範囲を柔軟に調整できることです。図 9 を参照してください。固定ループ設計の場合、高い再現性を実現するには、サンプルループを常にオーバーロードする必要があります。ループの一部だけに注入することはできますが、再現性は低下します。固定ループオートサンブラの注入量の変更が必要な場合は通常、サンプルループを変更する必要があります。

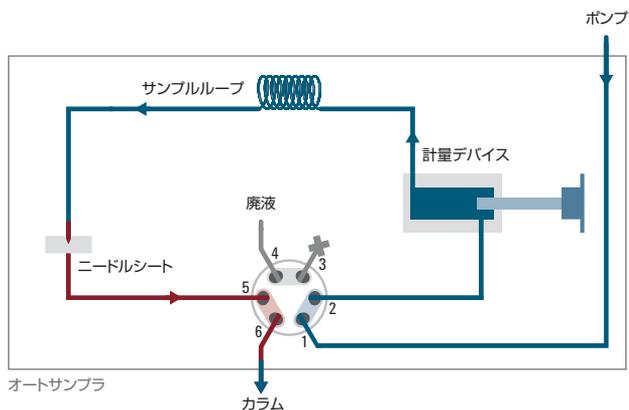


図 9. フロースルー設計のオートサンブラでサンプルをカラムに流すフロー。

フロースルー設計のもう 1 つの利点は、キャリーオーバーが少ないことです。キャリーオーバーとは、以前の分析のサンプル成分が、その後の分析のクロマトグラムに出現することです。これは、表面、チューブ、コネクタ、またはカラムの素材に付着した成分が、その後の分析で放出されることが原因です。フロースルーオートサンブラでは、オートサンブラのすべての部品がグラジエントごとにフラッシュされます。このため、クロマトグラフィー分析中に計量デバイス、サンプリングループ、ニードルの内側表面を効率的かつ確実に洗浄できます。表 3 は、固定ループオートサンブラとフロースルーオートサンブラの違いをまとめたものです。

	固定ループオートサンブラ	フロースルーオートサンブラ
原理	サンプリングループの溶媒ストリームへのスイッチイン/スイッチアウト	サンプリングループ、ニードル、および計量デバイスの溶媒ストリームへのスイッチイン/スイッチアウト
サンプル廃液	高 (サンプリングループの過充填による)	なし
ハードウェア変更なしの注入量の柔軟性	低い精度で、少量の部分的なループ充填が可能	高
注入量の直線性	低 (さまざまな種類のループを使用するため)	高
ディレイボリウム	低	高
キャリーオーバー	中	低 (すべての液体部品がグラジエント分離中にフラッシュされるため)

表 3. 固定ループオートサンブラとフロースルーオートサンブラの比較

HPLC や UHPLC のアプリケーションで使用する場合、高品質な結果を出すには、いくつかの重要なオートサンブラパラメータを考慮する必要があります。これらのパラメータについては、次のセクションで説明します。

## 注入の精度と真度

毎回の分析で高い定量再現性を実現するには、注入精度が非常に重要です。注入精度とは、毎回の分析で同じサンプル量を注入できるオートサンプラの機能のことです。これに対して注入真度とは、プリセットした注入量の絶対値を達成する機能のことです。最新の UHPLC 機器では、常に 0.15 % RSD 未満の注入精度を達成できます。

## 柔軟性とサンプル数

現代の最新ラボは、サンプルスルーットの向上と全体的なコスト削減の大きな課題に向き合っています。また、UHPLC 機器がマルチユーザー環境や高スルーットモードで使用される機会が増えています。オートサンプラはサンプルのエントリーポイントであるため、このモジュールには、中断やサンプルの再形成なしでさまざまなワークフローをサポートできる柔軟なサンプル容器が必要です。このような環境で使用されるオートサンプラは、複数のサンプル容器形状に対応できる必要があります。いっぽう、大容量要件に対応するために大きなサンプラデバイスが使用されることがありますが、広いラボスペースが必要となるためコストが上がります。

### Agilent 1200 Infinity シリーズのオートサンプラ

Agilent Infinity シリーズのほとんどのオートサンプラはフロースルー設計であり、柔軟性に優れています。新しい Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラは、最小限のラボスペースで、柔軟性と高サンプル数の両方に適切に対応しています。ユーザーの現在のニーズに合わせて、さまざまなサンプルドローワーを使用、構成、変更できます。容量が最適化されているため、384 ウェルプレートを使用すれば、Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラの 1 台で 6000 個を超えるサンプルに対応できます。



## 注入サイクル時間

注入サイクル時間は、液体クロマトグラフィーで過小評価されているパラメータです。現在、新しい UHPLC 機器と 2  $\mu$ m 未満の粒子カラム技術によって、分離度の低下なしで 1 分未満、場合によっては 30 秒で分析できます。注入において、前回の分析が終了してからサンプルを取り込み、最終的にサンプルを注入して次の分析を開始するまでの時間は、これらの分析時間の近似値となるか、超える場合があります。多数のサンプルを分析し、迅速に結果を得るためには、非生産的なオーバーヘッド時間はできるだけ短縮する必要があります。新しいオートサンプラ設計では、高速ロボティクスと前の分析中に開始されるアクションを組み合わせて、これらの要件に対応しています。このため、分析のオーバーヘッド時間を 10 分未満に短縮できます。

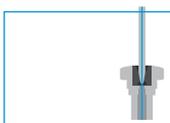
## キャリーオーバー

近年、液体クロマトグラフィーの検出下限は、特にハイエンドの質量分析計と組み合わせた場合に大幅に下がっています。非常に低濃度の不純物が存在していても、簡単に検出できます。最低検出下限を実現するには、クリーンな溶媒と機器を使用する必要があります。以前の分析で分離、検出された化合物が、次回やその後の分析で検出されることがあってはなりません。サンプルシーケンス中の結果と定量の品質低下につながります。オートサンプラは、キャリーオーバーを最小限に減らせるように、慎重に設計する必要があります。オートサンプラでは、注入ニードルとニードルシートの間のインタフェースが重要です。粘着性の化合物はこれらの部品の表面に付着することが多く、その除去に手間がかかる場合があります。材料の表面は、非極性分析対象物との相互作用が発生しないように設計する必要があります。わずかなデッドボリュームもなく、傷や研磨による機構上の影響が出ないように慎重に接続します。

強溶媒を使ってニードルを洗浄すると、必ずキャリーオーバーを大幅に減らすことができます。最新のオートサンプラにはニードル洗浄ステーションが内蔵されており、サンプルを抽出した後や、サンプルを注入口に移動する前に、ニードルの外側表面を洗浄できます。ニードルの外側表面を適切に洗浄しないと、キャリーオーバーの大きな原因になります。

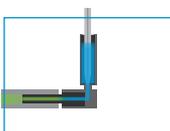
### Agilent 1200 Infinity シリーズのマルチサンプラによるキャリーオーバーの解消

新しい Agilent 1200 Infinity シリーズのマルチサンプラでは、キャリーオーバーの防止機能が向上しています。これらのオートサンプラにはマルチウォッシュ機能が搭載されているため、ニードルの外側表面を洗浄できるだけでなく、キャリーオーバーのもう 1 つの主要な原因であるニードルシートを、最大 3 種類の溶媒で効率的にバックフラッシュできます。マルチウォッシュ機能によってクロルヘキシジンのキャリーオーバー値を 10 ppm 未満にすることができるため、このマルチサンプラはハイエンドのトリプル四重極質量分析に最適です。



#### ニードル内側の洗浄

フロースルー原理によってニードル内部を徹底的に洗浄し、溶離液を安定して流せるようにします。



#### ニードル外側の洗浄

3 種類の外部溶媒を選択して、ニードル外側の洗浄手順をプログラムします。



#### アクティブなニードルシートバックフラッシュ

3 種類の外部溶媒を選択して、シートをバックフラッシュします。

## 新しいサンプリング手法と自動化

オートサンブラは、ユーザーによる操作なしでサンプルを注入するための単なるインジェクタではありません。オートサンブラを使用すれば、さまざまな方法でサンプルを操作および前処理したり、並行作業によって時間を節約したりすることができます。また最新のオートサンブラは、サンプルを注入して分析結果を得るだけの初心者ユーザーでも使用できる簡単なインタフェースと、事業の優先順位に基づいて連続的な分析を簡単にスケジュールするインテリジェントなサンプルオーガナイザが組み合わされています。

オートサンブラによって、個々の操作をプログラムすることもできます。この機能によって、サンプルを混合したり、内部標準を追加したり、希釈手順を実行したりすることができます。たとえば、アミノ酸分析の誘導体化を直接オートサンブラで自動化できます。

### Agilent 1200 Infinity シリーズのマルチサンブラによるデュアルニードル機能

注入以外にサンブラ機能を拡張する例としては、Agilent 1200 Infinity シリーズマルチサンブラに搭載されている新しいデュアルニードル機能があります。2 個のニードルループアセンブリをさまざまな方法で使用できます。2 本の同量の校正済みニードルを切り替えることで、スループットを大幅に上げることができます。最初の分析中に 2 本目のニードルの洗浄とサンプル取り込みが実行されるため、最初の分析が終了すると、すぐに注入開始する準備ができています。また、2 本のニードルをサイズが異なるループに取り付けると、UHPLC による少量の注入と従来のメソッドによる大容量の注入を選択的に実行したり、デレイボリウムが大きくても分析速度の低下なしで濃縮を実行したりすることができます。デュアルニードルを使用することで、特定のワークフロー、サンプル、標準試料用に 1 本のニードルを取っておいたり、実質上すべてのクロスコンタミネーションの発生可能性を防いだりすることができます。

## カラムコンパートメントによる温度調整

カラムコンパートメントは、LC システムで過小評価されがちな部品です。ただしこのモジュールは、分離カラムの環境を安定させ、再現性の高い結果を出すために非常に重要です。1 日の間でラボの室温が変化したり、メソッドをサイト間で移動する必要がある場合は、安定した環境が特に重要です。温度は保持係数 (k) とサンプルの分離度に影響します。また温度は、メソッド開発でのパラメータの 1 つとしても使用されます。

カラムコンパートメントは、カラムの周囲をプリセットした温度 (通常は 80 °C まで) に加熱する単一カラムのオープンまたはヒーターの場合もあります。最新のカラムコンパートメントには溶媒熱交換器が付いており、プリセットした温度まで溶媒を加熱することもできます。メソッド開発の場合、ペルチェ式のカラムコンパートメントが使用されます。これらのデバイスでは非常に迅速に温度を変更できます。温度はクロマトグラフィーマソッドの開発時に変動する可能性のあるパラメータの 1 つだからです。また、ペルチェ式のカラムコンパートメントを使用すると、溶媒とカラム環境を加熱するだけでなく、カラムを冷却したり、温度を所定の室温近くで安定させたりすることができます。ほとんどのアプリケーションで、分離は約 40 °C で実行されます。これより高温であると、保持が低下して溶出が早まる可能性があります。低温では、特に逆相分離の場合に保持が高くなる可能性があります。

UHPLC アプリケーションでは、溶媒の粘度を下げて小粒子と高流量による背圧を下げるため、高温を使用します。このため、UHPLC 用のカラムコンパートメントは、最大 100 °C 以上になる場合があります。

カラムコンパートメントは、頻繁なユーザー操作を必要とする LC モジュールです。選択性の変更やより高い分離度が必要な場合は、カラムの取り付けや取り外しが必要です。またカラムコンパートメントには、自動メソッド開発、カラム切り替え、濃縮、カラム再生の切り換えなどをサポートするため、複数のカラムやバルブ、またはその両方が含まれる場合もあります。カラムの取り付け時に簡単に操作でき、デッドボリュームやリークなどのエラーが発生しないようにするには、使いやすさが非常に重要です。

#### Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタットの柔軟性と使いやすさ

Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタットでは、複数のキャピラリー付きのカラム、熱交換器、バルブを数秒で簡単に取り付けられます。Agilent A-line クイックコネクタカラムフィッティングを使用すれば、カラム接続で誤って少量のリークが生じることはありません。



### 検出器 - 検知機能部分

LC システムには、さまざまな種類の検出器を統合できます。最も一般的な検出器の種類は、吸光、蛍光、屈折率、蒸発光散乱、および質量分析を利用したものです。ここでは吸光検出器について重点的に説明します。この種類の検出器は、2/3 以上の LC システムで使用されているためです。

検出器の種類によって、感度、選択性、直線範囲が異なります。感度とは、検出可能な化合物の最低濃度のことです。選択性は、検出器である化合物をどの程度細かく検出できるかを示します。直線範囲とは、検出器から直線的レスポンス信号が出力されるときに化合物の濃度範囲のことです。

また、破壊型検出器と非破壊型検出器という区別もあります。UV 吸収、蛍光、および示差屈折率の検出器は非破壊型です。検出セルを通過する化合物はそのままの状態で回収できます。これに対し、蒸発光散乱や質量分析を使った検出器は、検出プロセス中に化合物が破壊されるため、破壊型です。

UV 吸収測光の定量は、ランベルト・ベールの法則に基づいています。吸光 (A) は、溶出媒体を通過する前後の光の強度の対数比率であり、吸光化合物の濃度 (C)、光路長 (d)、およびモル吸光係数 (ε) の積です。

$$\text{Log}_{10} (I_0/I) = A = \epsilon cd$$

最新の HPLC と UHPLC で最も汎用的な検出器の種類は、紫外線 (UV) と可視光の吸光に基づくものです。この種の検出器は、多くの化合物で高い感度を示します。ただし、化合物が検出されるには、190 ~ 600 nm の UV または可視領域で吸光する必要があります。

吸光検出器では、2種類の光学技術が使用されています。直接光学系では、対象となる波長の光が検出セルを通過し、発光が1つのフォトダイオードによって捕捉されます。直接光学による吸光検出器は、固定波長検出器と呼ばれます。図10を参照してください。逆光学では、190～600nmのすべての波長の光がフローセルを通過します。発光はグレーティングによって構成波長に分離され、その結果のスペクトル情報がフォトダイオードアレイで取得されます。逆光学による吸光検出器とフォトダイオードアレイは、ダイオードアレイ検出器と呼ばれます。図11を参照してください。ダイオードアレイ検出器を使用すると、複数の波長で検出しやすくなるだけでなく、UVスペクトルを生成して特定の化合物を明確に同定できます。

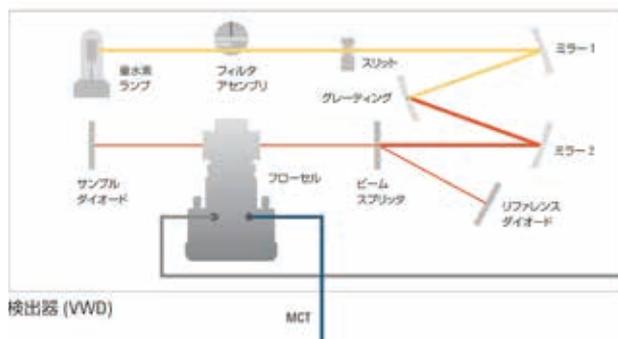


図10. 直接光学系による可変波長検出器の検出原理。

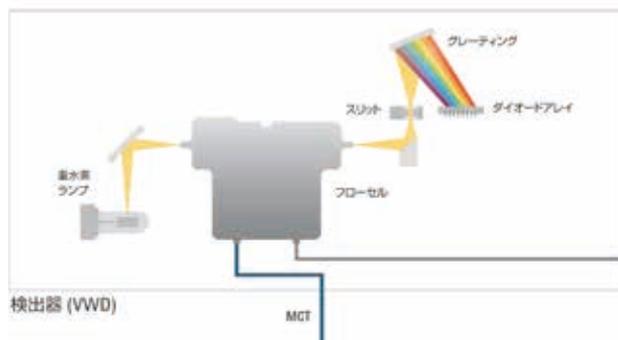


図11. 逆光学系によるダイオードアレイ検出器の検出原理。

## 検出器の感度

検出下限 (LOD) は、検出器のノイズと区別できる化合物の最低濃度です。図 12 を参照してください。LOD は信号の高さと検出器のノイズによって決まり、これらの比率から「信号のピーク高さ=ノイズ高さ x3」と計算されます。

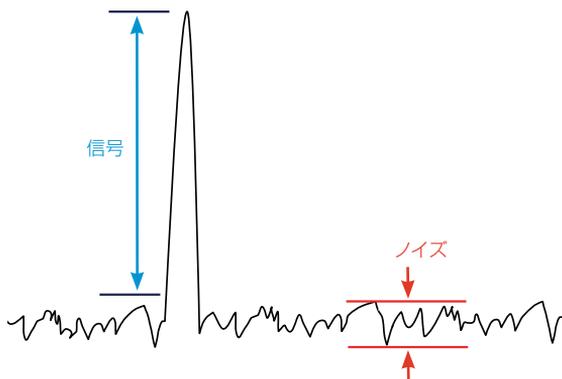


図 12. 直接光学系による可変波長検出器の検出原理。

UV 検出の場合、信号の高さは化合物固有の吸光係数、光路長、ピーク拡散、および検出波長によって変わります。検出器のノイズは、光の強度、ポンプの脈流、電氣的ノイズ、データレート、RI 効果、温度、流量、フローセルの設計などのさまざまな要因によって変わります。

感度を最大限に上げるには、フローセルの内部容量を増やさずに光路長を長くして、検出器のノイズレベルをできるだけ低く維持します。古いフローセルでは検出セルの流路がコニカル設計の場合がありますが、最新の検出器には全反射を容易にするフローセルが付いています。

## 直線範囲

検出器の直線範囲は、幅広い濃度での定量が必要な場合に重要です。また、分析対象化合物の濃度と UV レスポンスが多様な場合にも重要です。たとえば、主要な化合物に不純物が少しだけ含まれるサンプルなどの場合です。このようなサンプルでは、すべての化合物の定量情報を同時に取得する必要があります。

最新の LC 用 UV 検出器は、直線範囲が 4 ~ 5 桁違います。1 回の分析で低濃度と高濃度を定量化する検出ソリューションを使用すれば、この範囲を大幅に拡張できます。この方法では、主要成分と微量成分、およびその不純物 (合剤など) の定量を、簡単に同時実行できます。一連の希釈と複数回の分析が不要なため、時間とコストを大幅に削減できます。

## データレート

データレートは、検出器で取得できる秒単位のデータポイント数です。データレートが最大 20 Hz の従来の UV 検出器でも標準的な HPLC 分析には十分ですが、UHPLC で狭いピークの高速分析を実行する場合、正確に定量するにははるかに高いデータレートが必要です。

### Max-Light フローセル搭載のアジレントダイオードアレイ検出器

Agilent Max-Light 高感度フローセルではオプティカルダイクス (光学流体) 導波路技術を使用しており、光路長が 60 mm でも分散量はたった 4  $\mu$ l です。図 13 を参照してください。このフローセルは Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器に導入されており、以前の検出器と比べて 10 倍もの高感度を実現しています (図 14)。また、Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器では 240 Hz のレートでデータを取得できるため、たった数秒間の高速分析でも正しい定量が可能です。アジレントの高ダイナミックレンジ検出ソリューションを使用すれば、直線検出範囲を大幅に拡張できます (図 15)。長短の光路長フローセルの付いた 2 種類の検出器を組み合わせれば、1 回の分析で低濃度と高濃度の定量を簡単に実行できます。



図 13. Agilent 1260/1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (Agilent Max-Light フローセル付き) のオプティカルダイクス (光学流体) 導波路。

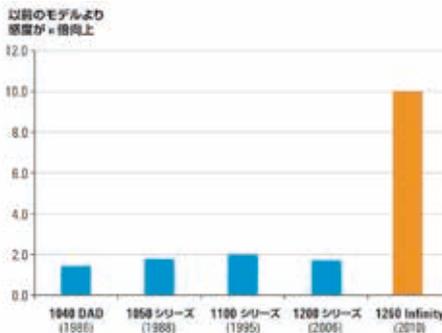
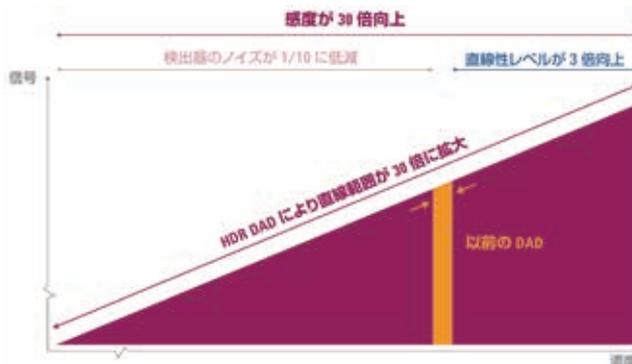


図 14. ダイオードアレイ検出器の感度向上  
Agilent 1260/1290 Infinity ダイオードアレイ検出器の導入により、感度が 10 倍以上向上。



図 15. Agilent 1200 Infinity シリーズの DAD-HDR ソリューションによる直線範囲の拡大。



# HPLC カラムの選択

カラムの選択は科学であり、技術でもあります。アプリケーションに合わせたカラムの結合相、システムの圧力限界に適切なサイズなど、考慮すべき選択基準が存在します。

多くの場合、確立されたメソッドについては結合相やカラムサイズを明確に指定できるため、これらの仕様を満たし、信頼性の高い、高品質のカラムプロバイダ (アジレントをお勧めします) を確保することがカラム選択には重要です。

さらに、メソッド開発では、アプリケーションに最適な選択性を得るためにさまざまな固定相と移動相の性能を試験するため、より効率的な選択が可能になります。

この章では、最初に次の基本情報を確認します。

- HPLC モード
- 一般的な HPLC カラムの材料

次に、今日最もよく使用されているカラムの主な種類と、それぞれの特徴について詳しく説明します。

- HPLC カラム
- UHPLC カラム
- 表面多孔性粒子を使用したカラム
- LC/MS 用カラム
- ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、およびゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) 用カラム
- バイオクロマトグラフィー用カラム

カラムの主な特性についても説明します。

- 充填剤 – シリカ、結合相、ポリマー
- ポアサイズ
- 粒子サイズ
- カラムサイズ

この章の最後に、ガード、セミ分取、分取およびプロセスカラムなど、カラムカートリッジスタイルのカラムの概要を説明します。

この章の情報は、「メソッド開発」の章 (61 ページ) のカラムの選択情報とあわせて使用してください。この章以降で、カラムの固定相と選択性に関する多くの情報を提供します。

## HPLC モード

HPLC モードは、カラムの評価を開始する前に決定する最も重要な要素です。今日では、次のように数多く一般的な HPLC モードまたは手法が使用されています。

- 逆相
- HILIC
- 順相
- イオン交換
- サイズ排除

一般に、すべての分析技術者の 95 % が、作業のある段階で逆相クロマトグラフィーを使用していることが調査によりわかっています。このため、このガイドでは、主にこの手法に重点を置いて説明します。ただし、他のいくつかの手法についても簡単に説明して主な違いを示し、詳細が記載された適切な参考資料も紹介します。

さまざまなモードの違いの詳細については、62～64 ページを参照してください。

## カラムの選択に関する基本情報：従来のカラム

液体クロマトグラフィー用のカラムは、ステンレスまたはポリマー（まれにガラス）製のカラム管に化学結合型シリカゲルやポリマー粒子が充填されています。アプリケーションのさまざまなニーズに適した数多くのサイズのカラムが用意されています。ハイスループット LC/MS 用の短いナローボアカラムから、内径 (ID) 50 mm の分取カラム、パイロット、スケールアップ、および製造施設のための最大 200 mm のサイズを持つ分取カラムパッキングステーションまで、広範囲に及びます。カラムのサイズは感度と効率に影響を与え、カラムに負荷できる試料の量を決定します。例えば、内径が小さいカラムを使用すると、内径が大きいカラムに比べて感度が上がりますが、試料の負荷量は小さくなります。

最新のステンレス分析カラム（内径 1~4.6 mm、長さ 20~250 mm）では、デッドボリュームが非常に小さい、またはゼロのフィッティングを使用しています。カラムの充填剤は、両端にあるステンレスフリットにより所定位置に保持されています。



図 16. カラムの図

カラムの構造	カラムの種類	カラム内径 (mm)	粒子の種類	粒子サイズ (μm)	用途
HPLC					
ステンレス	分析	4.0~4.6	シリカ、ポリマー	1.8~10	従来の定量分析
	分析溶剤セーバ	3	シリカ	1.8~5	溶剤消費量の削減
	分析ナローボア	2.0~2.1	シリカ	1.8~5	溶剤消費量の削減
	分析マイクロボア	1	シリカ、ポリマー	3~5	感度の向上、 試料サイズ ng~μg
	分析キャピラリー	0.3~0.5	シリカ、ポリマー	3~5	試料サイズ pg~ng
	分析ナノ	0.075~0.1	シリカ、ポリマー	3	試料サイズ < 1 pg
	分取またはセミ分取	9.4~50	シリカ、ポリマー	5~50	試料精製

表 4. 液体クロマトグラフィー用カラムの特性

次のページに続く

カラムの構造	カラムの種類	カラム内径 (mm)	粒子の種類	粒子サイズ (μm)	用途
LC/MS UHPLC/MS					
ステンレス	分析	3	シリカ	1.8~5	アジレント MS の流速機能に適した最適な選択肢
	分析ナローボアおよびマイクロボア	1~2.1	シリカ、ポリマー	1.8~10	高い感度または専用の検出器が必要な場合
フューズドシリカ	分析キャピラリー	0.3~0.5	シリカ、ポリマー	1.8~10	MS 検出器との組み合わせ
UHPLC					
ステンレス	分析	4.6	シリカ	1.8~2.7	すべての高速/高分離アプリケーション
	分析ソルベントセーバ	3	シリカ	1.8~2.7	
	分析ナローボア	2.1	シリカ	1.8~2.7	
分取					
ステンレス	分取	10~100	ポリマー	10~50	化合物の単離
プロセス					
ステンレス	プロセス	10~100 cm	ポリマー	10~50	化合物生成

注：一部の bioHPLC カラムには、メタルフリーの試料経路を確保するために PEEK 製のものもあります。

**600 bar までは、ZORBAX ラビッドレゾリューションハイスルーブット (RRHT)、1.8 μm カラムおよび Poroshell 120、2.7 μm カラムを使用してください。1300 bar までは、ZORBAX ラビッドレゾリューション High Definition (RRHD)、1.8 μm カラムを使用してください。**

### 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用カラム

シリカゲルは、順相吸着 HPLC の固定相として一般に使用されており、多くの化学結合型固定相の担体です。シリカの表面は、無極性移動相内の分子と相互作用を起こす、または化学結合の反応部位として機能する、強い極性を持つシラノール基で覆われています。順相 HPLC は水に不溶性の分析種に適しており、順相 HPLC で使用される有機溶媒は、逆相 HPLC で使用される一部の一般的な緩衝液よりも MS 検出に適しています。ただし、この手法では保持時間の再現性が低くなる場合があります。これは、水またはプロトン性有機溶媒 (水素原子が酸素または窒素原子に結合している) がシリカの水和状態を変化させるからです。これは、HPLC の手法として主流となった逆相 HPLC では問題になりません。逆相クロマトグラフィーシステムでは、シリカ粒子は化学修飾されて無極性または疎水性になり、移動相は極性のある液体です。

## UHPLC カラム

一般に、超高性能液体クロマトグラフィー (UHPLC) とは、長い間一般的な HPLC システムの最大システム動作圧力であった 400 bar (6000 psi) を超える圧力の下で行われる液体クロマトグラフィーのことです。通常は UHPLC カラムには小さい粒子 (<3  $\mu\text{m}$ ) が含まれ、この粒子が、3~5  $\mu\text{m}$  粒子が充填された従来の HPLC カラムよりも優れた分析速度、分離度、効率を提供します。ただし、圧力の式 (9 ページの式 6) が示すように、粒子が小さくなるほど、カラムに移動相を通すために必要な背圧が大きくなるため、UHPLC カラムは 400 bar (6,000 psi) を超える圧力で動作するように設計されています。

UHPLC 用に、アジレントは、600 bar までの ZORBAX ラピッドレゾリューションハイスループット (RRHT) カラム (粒子サイズ 1.8  $\mu\text{m}$ )、2.7  $\mu\text{m}$  の表面多孔性粒子を使用した Poroshell 120 カラム (最大圧力 600 bar)、1300 bar まで安定した ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) 1.8  $\mu\text{m}$  カラムの 3 種類のカラムを用意しています。UHPLC で達成できる分離速度は非常に高速です。通常は、UHPLC による分離は高速で、10 分未満で完了します。一般に、1 分未満の分離が超高速と呼ばれます。

UHPLC のその他の特長として、1.8  $\mu\text{m}$  の充填剤を使用した長い UHPLC カラムでの効率とピークキャパシティの向上があります。150 mm までの分析カラム長と、4.6 mm までの内径が用意されています。現在では、ほぼ 300 % のピークキャパシティの向上が可能になりました。これは、薬物探索から、農薬スクリーニングなどの食品安全性および環境アプリケーションまで、多くの複雑な分離を改善するために有効です。



ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) カラム

## 表面多孔質粒子カラム

表面多孔質粒子 (SPP) カラムでは、以前の「ペリキュラー (薄膜)」粒子カラムより小さいサイズの粒子を分析できます。図 17 のように、Agilent Poroshell 120 の 2.7  $\mu\text{m}$  の粒子は、ソリッドコア (直径 1.7  $\mu\text{m}$ ) とその周囲の多孔質シリカ層 (厚さ 0.5  $\mu\text{m}$ ) で構成されています。

従来の全多孔質カラムを使用する研究者にとって、Poroshell 120 はメソッド開発上の大きな利点があります。ソリッドコアではなく多孔性外層で拡散が発生するため、同じサイズの全多孔質粒子より効率が上がります。実際に、2.7  $\mu\text{m}$  の SPP と 1.8  $\mu\text{m}$  の全多孔質粒子は効率が同じであり、4  $\mu\text{m}$  の SPP の効率は 5  $\mu\text{m}$  の全多孔質粒子の約 2 倍です。圧力は間接的に粒子サイズに比例するため、大きい 2.7  $\mu\text{m}$  の SPP カラムによる圧力は 2  $\mu\text{m}$  未満のカラムよりずっと小さくなります。このため研究者は、流量を増やして、高い分離度を実現しながら分析速度を上げることができます。また、Agilent Poroshell 120 カラムには 2  $\mu\text{m}$  の標準フリットが付いているため、汚れたサンプルに対する耐性が強く、小さいフリット付きのカラムと違って詰まりにくいことを知っておくことも重要です。

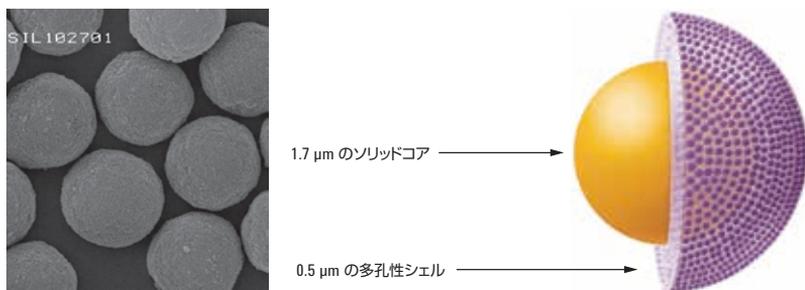


図 17. Agilent Poroshell 120 の 2.7 μm の粒子

タンパク質やペプチドなどの生体分子の分離は困難です。これらの分子は拡散が遅く、通常は低い流量を維持してピークの拡大を防ぐ必要があるためです。アジレントは、表面多孔質粒子に基づくカラムをいくつか提供しています。

- Poroshell 300: 5 μm の粒子、0.25 μm の多孔質層、300 Å のポア径
- AdvanceBio RP-mAb: 3.5 μm の粒子、0.25 μm の多孔質層、450 Å のポア径
- AdvanceBio ペプチドマッピング: 2.7 μm の粒子、0.5 μm の多孔質層、120 Å のポア径
- AdvanceBio Glycan マッピング: 2.7 μm の粒子、0.5 μm の多孔質層、120 Å のポア径
- AdvanceBio オリゴヌクレオチド: 2.7 μm の粒子、0.5 μm の多孔質層、100 Å のポア径

この技術によって拡散距離が短くなり、500 Da ~ 1,000 kDa の生体分子を高速で HPLC 分離できます。

### LC/MS 用カラム

試料に応じて多くの LC/MS 用カラムがあります。単純な分析試料では、短いカラム (分離度が高いもの) を使用して、ハイスループット LC/MS の分析時間を短縮します。

高い分離度が必要な場合は、長いカラムを使用します。流速もカラムの選択に影響を与えます。通常は、LC/MS システムは 1 μL/min ~ 1 mL/min の流速で動作します。したがって、アジレントソルベントセーバ (ID 3.0 mm)、ナローボア (ID 2.1 mm)、キャピラリーおよびナノボアカラムなどの内径の小さいカラム (15 ページの表 1 を参照) が高感度/高速分析に適したオプションとなります。



Agilent 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS システム

結合相には高性能エンドキャップ C18 結合相が最適です。この結合相は広い pH 範囲で安定し、ギ酸や酢酸など、LC/MS で使用される一般的な揮発性の移動相添加物に対応します。

Agilent 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS システムは、医薬品の ADME/DMPK 研究、バイオマーカーのバリデーション、臨床研究、食品安全、法医学、毒物学、および環境分析における定量アプリケーションにおいて多くの実績を持つ製品です。

## ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、およびゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) 用カラム

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、およびゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) は、溶液中の分子サイズに従って生体高分子などのポリマーを分離するためのクロマトグラフィーの手法を表す用語です。これは、ポリマー分子量の特性解析に使用されます。カラムは通常はステンレス製で、ポアサイズが厳密に制御されたゲルまたは架橋構造ポリマー、あるいはシリカが充填されています。分離のメカニズムは、溶液中の分子サイズだけに左右され、他の分離モードとは異なり試料と固定相との間の相互作用は関係しません。SEC は溶液中の分子サイズに基づいて試料を分離するクロマトグラフィー全般をさす用語で、主に合成高分子を分子サイズで分離する (移動相には有機溶媒が多用されます) 場合には GPC、水溶液中で生体高分子 (核酸や多糖類、タンパク質など) を分子サイズで分離する場合には GFC という用語も用いられます。



GPC/SEC の機器、カラム、標準溶液

GPC/SEC の総合ガイドとして、アジレントの『Introduction to Gel Permeation Chromatography and Size Exclusion Chromatography』(アジレント資料番号 5990-6969EN) をお勧めします。

## 生物学的特性解析用カラム

バイオクロマトグラフィーカラムまたはバイオカラムは、タンパク質やペプチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ウイルス粒子のようなその他の生体分子や複合体など、生体分子を分離するためのカラムです。バイオカラムは、試料と充填剤の間で生じる不可逆的な、または非特異的な結合を最小限に抑えるか排除して、生物学的機能 (酵素活性) を保持するように設計されています。多くの場合、バイオカラムは、活性金属が試料と接触しないように作成されており、ポリマー (PEEK など)、フューズドシリカ、ガラスライナー付きステンレス、またはカラムにバイオコンパティビリティ性を持たせるためにコーティングが施された金属製のカラム管が使われます。



バイオカラムファミリ

## カラムの特性

### シリカ

シリカは、クロマトグラフィーの理想的な材料であり、化学結合型 HPLC カラムの主要な基材として数十年の間使用されてきました。シリカ粒子は堅牢で、流れによって発生する圧縮に耐えます。これは、粒子サイズが 5  $\mu\text{m}$  以下で高い圧力が必要な場合に特に重要です。そのきわめて大きい表面積が HPLC および UHPLC に吸着能力を提供し、粒子表面のシリノール基 (Si-OH) が化学結合相の理想的な結合部位となります。

カラム充填剤に使用するシリカ粒子には、さまざまなサイズ、純度、および酸性度のものがあります。最新の充填剤はタイプ B のシリカです。これは不純物金属が非常に少なく、古いタイプ A のシリカよりも酸性度が低く抑えられています。酸性度の低いシリカでは、塩基性分析種とシリカ表面のシリノール基が相互作用を起こす可能性が低く、その結果ピーク形状が向上します。高純度のシリカからなるカラムは、今日において最も一般的に使用されているカラムです。

### 結合相

逆相クロマトグラフィーで最も一般的な結合相は C18 (オクタデシルシラン、ODS) です。これは、シリカ粒子の表面に結合される数多くのタイプのアルキル鎖または炭素鎖の 1 つに過ぎません。その他にも、直鎖アルキルシラン相には一般に C8 と C4 が選択されます。フェニルヘキシル、ジフェニル、AQ、CN、PPF などの結合相は、直鎖アルキル相とは大きく異なる選択性を提供できるため、十分な分離を提供します。結合相の選択肢はますます増えており、水の割合が高い水系移動相やその他のアプリケーションに固有の結合相もあります。

一般に、タンパク質などの大きい溶質は、ワイドポアシリカゲル (ポアサイズ: 300Å) に結合された短鎖逆相カラム (C3、CN、ジオール) で最もよく分離されます。ペプチドや低分子は長鎖カラムで分離されます (C8、C18)。ただし、この方法が当てはまらない場合も数多くあります。したがって、最初に中程度の疎水性の結合相を選択し (C8 など)、次に最初の結果と試料の溶解性に基づいて、より疎水性の高い結合相や親水性の高い結合相を選択します。

イオン交換、サイズ排除または HILIC クロマトグラフィーでは、他にも考慮すべき点があります。これらについては、93~98 ページで詳細に説明します。

### ポリマー

非常に低い pH や高い pH で使用できるカラムが必要な場合は、ポリマー系充填剤をシリカ系の代わりに使用できます。ポリマー粒子は化学的に安定で、可溶性化学種や微粒子が生成しないため、特に LC/MS などの小さなスケールのクロマトグラフィーに理想的です。例えば、PLRP-S カラムなどで使用される逆相球形ポリマー充填剤は、本質的に疎水性の表面を持つスチレン/ジビニルベンゼン共重合体に基づいています。通常、ポリマー粒子を使用した逆相クロマトグラフィーには結合相は不要です。これらの堅牢なクロポラス粒子は、弱および強陽イオンおよび陰イオン交換カラムなどさまざまな機能を持つようにコーティングし、誘導体化することができます。

## ポアサイズ

ポアサイズの選択は、分析対象成分の分子量によって決まります。低分子の逆相分離では、ポアサイズの小さい (60~120 Å) カラム充填剤を選択します。低分子やペプチドには 80~150 Å を、ペプチドや多くのタンパク質には 200~450 Å を、高分子量タンパク質やワクチンには 1,000 Å および 4,000 Å を使用します。

SEC 分離では、通常は分離可能な分子量の範囲がポアサイズの情報とともに提供されるため、適切なカラムを選択することができます。この情報が含まれる表をカラムの選択肢と共に示します。

## 粒子サイズ

HPLC カラムの標準の粒子サイズは、3.5 μm がメソッド開発の主流となる 1990 年代中頃まで、長い間 5 μm でした。最近になり、より高い分析速度と高い分離度が必要になるとアジレントの 1.8 μm 粒子を含む 2~3 μm 未満の充填剤が使用されるようになりました。このような小さい粒子サイズで短いカラム長のカラムを使用すると、高速で分離度の高い分析を行うことができます。3.5 μm の粒子サイズは日常的な圧損で使用でき、圧力限界が 400 bar の LC を含むすべての LC で使用できます。短い (50 mm 以下) 1.8 μm カラムは、最適化された標準 LC で使用することができ、長いカラムには、600~1300 bar で使用可能な高圧 LC (ラビッドレゾリューション LC または UHPLC) が必要です。最近になり、2 μm 未満のカラムに類似した性能を持つにもかかわらず背圧が低い新しい技術 (表面多孔性粒子) が開発されたため、従来の HPLC 機器で使用できるようになりました (32 ページの表面多孔性粒子を参照)。

カラムの粒子サイズを 1/2 にすると、理論段数が 2 倍になります (カラム長が同じ場合)。ただし、粒子サイズが半分になると、カラムの背圧が 4 倍に増加します ( $1/d_p^2$ )。カラム長が 2 倍になると、理論段数と分析時間も 2 倍になります。カラム長が長くなるほど背圧は直線的に増加します。例えば、3.5 μm の粒子が充填された 2.1 x 100 mm のカラムの理論段数は、約 12,000~14,000 です。これは、多くの試料を十分に分離できる効率です。粒子サイズを 3.5 μm から 1.8 μm に下げると、同じ 2.1 x 100 mm カラムの効率が 2 倍になり、理論段数は約 24,000 になります。ただし、このカラムの背圧は、3.5 μm の粒子が充填された同じサイズのカラムの圧力の 4 倍になります。

ほとんどの場合は、24,000 の理論段数は不要なため、カラム長を半分の 50 mm にすることで、予測される効率は 12,000 段となります。この短いカラムを使用すると分析時間は半分になり、背圧は、3.5 μm 粒子を充填した 100 mm カラムのわずか 2 倍になるだけです。

## カラムサイズ

粒子径が 5  $\mu\text{m}$  の 4.6 x 150 mm または 4.6 x 100 mm カラムが、長い間分析メソッド開発用カラムとして推奨されてきました。高い分離度が必要な場合の推奨カラムは 4.6 x 250 mm のカラムでした。しかし、新しいカラムが幅広く入手可能になるにつれて、3.5  $\mu\text{m}$  または 2.7  $\mu\text{m}$  の表面多孔性粒子を使用した 4.6 x 100 mm カラムによるメソッド開発が出发点として推奨されるようになりました。

メソッド開発では、アプリケーションのその他の目標 (感度や溶媒の使用など) や特定の機器タイプ (キャピラリー、ナノ、分取カラム) との互換性を満たすカラムの内径 (2.1 または 3.0 mm など) を選択します。

ナノ、キャピラリー、またはマイクロボアカラムは、感度の向上が必要な場合、または試料が極めて限られている場合に使用します。

- 試料サイズが 1 pg 未満、流速が nL/min の場合はナノカラム
- 試料サイズが pg~ng、流速が約 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  の場合はキャピラリーカラム
- 試料サイズが ng~ $\mu\text{g}$ 、通常の流速が約 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  の場合はマイクロボアカラム

アプリケーション	適したカラム内径 (mm)
超高感度、LC/MS、ペプチド、タンパク質	0.1, 0.075
超高感度、微量サンプル、LC/MS、ペプチド、タンパク質	0.3, 0.5
高感度、微量サンプル、LC/MS 用	1.0
溶媒を節約、システムボリュームの小さい装置が利用できる	2.1
特殊検出器用、マススペクトルなど	2.1
高感度、微量サンプル	2.1
溶媒を節約、標準 HPLC 機器で使用、LC/MS 用	3.0
標準分離用	4.6
小量 (mg) 分取用	9.4
大量分取 (100 mg~g) 用	21.2
大量分取 (100 mg~g 以上) 用	30, 50
パイロットおよび分取スケール	100 mm~1 m

表 5. アプリケーションとカラム内径

ルーチンメソッドを確立する必要がある場合は、カラムサイズを分析や機器で使用可能な最も小さいサイズにします。多くの場合、小さいカラムの方が低価格で、使用する溶媒量も少なくなります。場合によっては、カラムの内径を半分にすると、感度は 4~5 倍に向上します (注入量を一定にすると仮定)。例えば、試料を内径 2.1 mm のカラムに注入すると、同じ量の試料を内径 4.6 mm のカラムに注入したときと比較して、ピークの高さは最適化された LC で約 3~5 倍になります。低容量カラム向けに機器が最適化されている場合は、線流速が維持されている限り、カラム効率、理論段数、背圧、および分析時間は、カラムの内径を小さくしても大きな影響を受けません。

開発用カラムで生成されたデータを使用することにより、短いカラムでも長い開発用カラムと同じ結果が得られるかどうかを容易に計算できます。単純な計算を使用した意思決定によって時間が大幅に短縮されます。アジレントのメソッド変換ソフトウェア ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) で検索フィールドに「LC Method Translator」と入力すると検索されます) がこのような計算に役立ちます。

## カートリッジカラムシステム

カートリッジは既存のカラムハードウェアに接続可能なため、カートリッジシステムによって柔軟性と経済性がもたらされます。分析システムのカートリッジが充填済みであるのに対し、分取およびセミ分取アプリケーションでは、充填剤をバルクで購入し、ご自身のシステムに充填することができます。

カートリッジの種類	特徴	効果
分析カラムと分析/ガードの組み合わせ		
Agilent HPLC カートリッジ	エンドフィッティングにコレットを逆に接続して、ガードカートリッジを追加できます	安価 カラムの寿命延長 迅速なカラム交換が可能 2、3、4、4.6 mm カートリッジを使用可能
	カートリッジは両端にフィルタとシーブが付いています	詰まり防止に有効
ChromSep : ホルダ、分析カートリッジ、ガードカラムで構成されるスタンドアロンシステム	カラム長と内径の幅広い組み合わせ カートリッジとガードのマルチパック 特殊な工具は不要	モジュール式の柔軟性 経済的 使いやすい
ZORBAX ラピッドレゾリューションおよびラピッドレゾリューション HT カートリッジカラム : 1.8 および 3.5 μm 充填剤、スタンドアロンシステム	ハイスループット LC/MS、LC/MS/MS、およびコンビナトリアル分離用 Eclipse XDB を充填 (pH 2 ~ 9) StableBond を充填 (低 pH) 1 本または 3 本入りで提供	全種類の分析種用 全種類の分析種用 低ブリード 全種類の分析種用
ガード		
ZORBAX ガードカートリッジ : スタンドアロンシステム	高効率、スタンドアロン、低デッドボリュームカートリッジ 金属面に対して漏れをなくした樹脂カートリッジ 再使用可能なフィッティング	最高 340 bar まで使用可能 ガスケットは必要なし 1/16 インチ LC フィッティングへの接続に使用

表 6. カートリッジシステム

次のページに続く

カートリッジの種類	特徴	効果
セミ分取ガード		
ZORBAX セミ分取ガード HPLC ハードウェアキット: スタンドアロンシステム	簡単な低デッドボリュウムアセンブリ	最高 135 bar (2,000 psi、13.5 MPa) まで 使用可能
	金属面に対して漏れをなくしたチューブ (ポリフェニレンスルホン)	ガスケットは必要なし
	再使用可能なフィッティング	1/16 インチ LC フィッティングへの接続に 使用
ZORBAX および Agilent 分取カートリッジカラム およびガード HPLC システム: スタンドアロン および一体型ハードウェア オプション	簡単な低デッドボリュウムアセンブリ	カラムの寿命を伸ばす
	再使用可能なフィッティング	迅速なカラム交換が可能
	一体型または外部ガード用のハードウェア オプション	内径 21.2 mm および 30 mm のカラムに 使用可能
分取		
ロード & ロック分取 カラムおよびバックギン ステーション: 動的および 静的「ロック」軸圧縮用 スタンドアロンシステム	ラボおよびプロセス精製用、3 つのカラム サイズで高品質および大容量、内径最大 24 インチ	g から数 kg の量に容易にスケールアップ
	可動式バックギンステーション	どこでも使用可
	圧縮空気で稼働	危険な環境での使用も安全
	数分間で充填、充填剤の取り出し	生産性を最大化
動的分取カートリッジ カラムおよびガード: スタンドアロン動的軸 圧縮システム	再使用可能なエンドフィッティングを 使用したモジュール設計	ハードウェアコストを削減
	内径 10、21.4、および 41.4 mm	容易なスケールアップ
	一体型ガードカラムオプション	複雑な試料でもカラム寿命を伸ばす
プロセス		
ポリマー PLRP-S、 PL-SAX、PL-SCX	高い試料スループトを提供する幅広い ポアサイズおよび粒子サイズ	生産性の向上
	化学安定性と熱安定性により所定位置での クリーニングと浄化が可能	カラム寿命を伸ばす
	プロセスハードウェアのための堅牢な 充填方式	バックドカラム性能を向上

カラムの種類	ガードカートリッジホルダ	内径 (mm)	相
カートリッジ/ガードカートリッジシステム互換性ガイド*			
カートリッジカラムカートリッジ ホルダ 5021-1845 	ガードカートリッジ (内部システム)	2.0	Asahipak
	カートリッジホルダ	3.0	LiChrospher
	5021-1845	4.0	Nucleosil
		4.6	Purospher
			Superspher ZORBAX
標準フィッティング 	カラムガードカートリッジ (スタンドアロン) カートリッジ ホルダ 820888-901	2.1	ZORBAX
		3.0	
		4.6	
ラピッドレゾリューションカートリッジホルダ 820555-901 	ガードカートリッジホルダなし	4.6	ZORBAX
セミ分取カラム 	セミ分取ガードカートリッジ (スタンドアロン) カートリッジ ホルダ 840140-901	9.4	ZORBAX
PrepHT (写真なし)	ガードカートリッジ 820444-901	21.2	ZORBAX Agilent Prep
			

\* スタンドアロンのガードカートリッジは、アジレントが販売するすべてのカートリッジおよびフィッティングカラムに適合します。

表 7. カートリッジ/ガードカートリッジシステム互換性ガイド

# 性能向上の鍵： カラムの構成と設定

クロマトグラフィーについては数多くの書籍があり、多くの「性能向上の鍵」が示されています。

この章では、見過ごされることの多い、または混乱を引き起こす傾向がある項目について説明します。

システムに関連する項目から説明を始めます。

- カラム外ボリュームの低減
- 良好なフィッティング
- 試料の注入
- システムのドウェルボリュームの理解と測定
- 高効率カラムのデータ収集レートの設定

次に、クロマトグラフィーのプロセスとメソッド開発に関連するトピックについて説明します。

- キレート化合物について
- pH の評価
- グラジエントの使用
- カラムの再平衡化の最適化

最後に、時間の経過とともに対応が必要になる項目について説明します。

- カラムの劣化
- カラムのクリーニング – 逆相 (シリカ系とポリマー系) および順相

## カラム外ボリュームの軽減の重要性

カラム外ボリュームは、システムの一部であるカラムにとっては「余分な」または「外部の」容積です。明確には、LC コンポーネントとカラムの間で試料が通る接続配管、注入量、およびフローセル容量です。

カラムが大きくなるほどカラムボリューム ( $V_m$ ) が大きくなり、カラム外ボリュームを低減する必要性は小さくなります。しかし、Poroshell 120 や 2  $\mu\text{m}$  未満の粒子が充填されたカラムなど、カラムボリュームが小さく高効率なカラムを使用している場合は、カラム外ボリュームをできる限り小さくして、クロマトグラフィーの結果に与える影響を低減しなければなりません。不要なカラム外ボリュームは効率の低下につながり、場合によってはテーリングを発生させることがあります。

次の例にカラム外ボリュームの影響を示します (図 18)。カラム外ボリュームがわずか 10  $\mu\text{L}$  では良好な分離結果です。配管を追加することでカラム外ボリュームが 50  $\mu\text{L}$  となった同じカラムでは、クロマトグラムの最初の 3 つのピークを比較することで、ピークが広がり、分離度が失われたことがわかります。多くの場合、このような状況は、容量を認識しないで配管を導入したことが原因で発生します。長すぎる配管または大きい内径を持つ短い配管を追加すると、非常に高い効率を持つカラムで不十分なクロマトグラムが得られることがあります。使用している配管の内径と、その配管により増える容積を確認しておくことが重要です。また、低容量カラムを使用している場合は、マイクロまたはセミマイクロフローセルを使用する必要があります。標準フローセルでは、カラム外ボリュームが増加します。

ガイドラインとして、システムの最大カラム外ボリューム (配管ボリューム、注入量、および検出器セル容量) はカラムボリュームの 10 % を超えてはなりません。

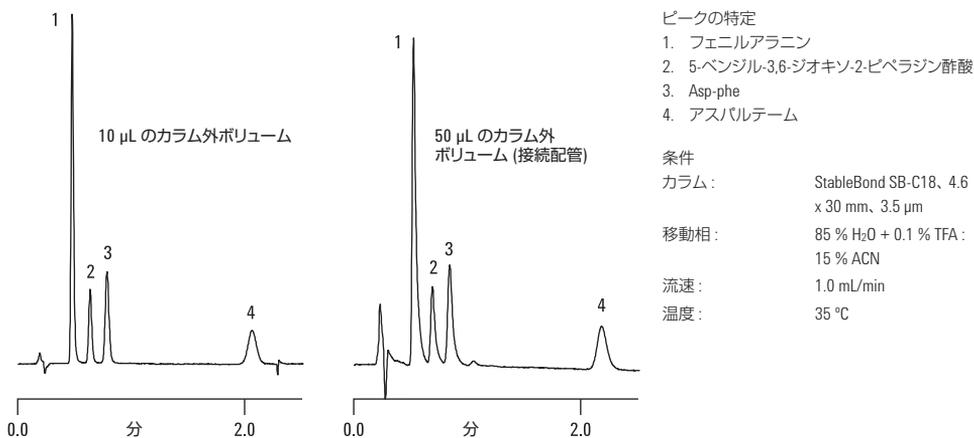


図 18. クロマトグラフィーの性能に与える配管容量の影響

アジレントは、キャピラリー配管とさまざまなサイズの Swagelok コネクタが含まれるキャピラリーキットを販売しているため、接続と配管の容量を最小限に抑える最適な長さのものを見つけることができます。配管は、配管の内径を識別できるように色分けしてあります。高効率カラムに移行する場合は、内径の小さい赤い配管 (内径 0.12 mm) を、従来の HPLC 機器で頻繁に使用される緑色の内径 0.17 mm 配管の代わりに接続に使用します。

## 完全なフィッティング接続の準備

HPLC や UHPLC を使って作業している研究者は、ピークテーリング、ピークの拡大、ピークの割れ、キャリアオーバーなどの問題に遭遇する場合があります。トラブルシューティングにおいて見過ごされがちで時間がかかる一般的な原因の 1 つとして、不完全なチューブ接続があります。チューブ接続のデッドボリュームや微量のリークが、クロマトグラフィー分析の性能と再現性に大きく影響する場合があります。最新の UHPLC カラムや高速 LC カラムでは、この傾向が特に顕著です。

## フィッティング接続の要件

フィッティング接続が、分析対象物のピーク形状に大きく影響する場合があります。理想的なフィッティング接続には、次の特徴があります。

- チューブと接続先のポートの間のデッドボリュームがゼロである
- 超高压や温度上昇の環境でもリークが生じない
- 長期間使用できる堅牢性があり、チューブがずれない
- 使いやすい

## 調整不可能な金属フィッティング

UHPLC で最も汎用的なフィッティングは、2 部品または 3 部品で構成される調整不可の金属製フィッティングです。このフィッティングは恒久的なもので、取り付け後に調整することはできません [3]。さまざまな機器メーカーのカラムハードウェア間でカラム末端のフィッティング設計が異なるため (図 19)、新しいチューブおよびフィッティングセットは、それぞれのブランドのカラムに合うようにかしめる必要があります。これでステム長 (フェラル底部とチューブ末端の間の長さ) が完全に一致します (図 20)。

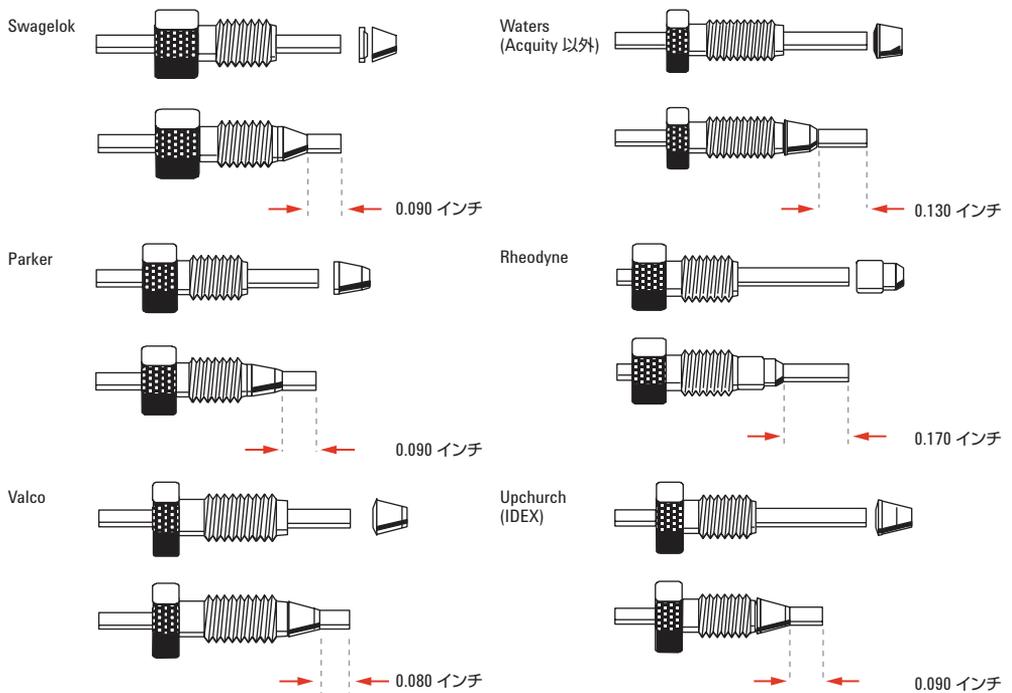
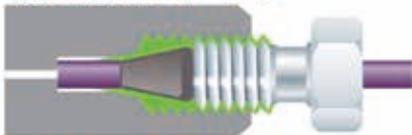


図 19. HPLC で使用されるカラムコネクタ

ステム長が短すぎるとデッドボリュームができ、ピーク形状の劣化、分離度の低下、キャリアオーバーの原因となります (図 20)。ステム長が長すぎると、フェラルを正しく取り付けることができず、リークが発生します (図 20)。また従来のフィッティングとフェラルでは、レンチを使用すると締め過ぎになり、フィッティングがカラムから外れなくなってしまう場合があります。

**A: ステム長が長過ぎる → リーク**



**B: ステム長が短過ぎる → デッドボリューム**



**C: 適切にフィットしたチューブ、デッドボリュームなし**



図 20. 正しいフィッティング接続と正しくないフィッティング接続の比較

## 調整可能なフィンガータイトフィッティング

従来のフィッティングの問題を解決するため、さまざまなカラムに対応した調整可能なフィンガータイトフィッティングが開発されています。これらのフィッティングには (PEEK などの) ポリマーフェラルが付いています。このため、フェラルがチューブに接続されたままにならず、フィッティングを再利用できます。ただし、次のような欠点もあります。

- ツールがないと 1,300 bar の超高压を達成できない
- 締め過ぎを防ぐには、回転角度の精密なトルクや範囲について、厳密なガイドラインに従う必要がある
- 再接続の後に、毎回リークがないかどうかをチェックする必要がある
- フィッティングはときどき締めなおす必要がある
- ポリマーフェラルがチューブをしっかりとグリップしていないと、超高压や圧力サイクルによって接続先のポートが抜け、デッドボリュームが生じることになる

## Agilent A-line フィッティング

Agilent A-Line UHPLC フィッティングにはこのような欠点がなく、再現性のあるリークのないカラム接続が可能です。A-line フィッティングには、次の 2 種類があります。A-Line クイックコネクフィッティング (図 21A) は、レンチなしで 1,300 bar の気密性を実現するカラム接続に適しています。A-Line クイックターンフィッティング (図 21B) は、カラムのインレット/アウトレット、バルブなどのさまざまな流路接続や、その他の接続に適しています。このフィッティングでの気密性は、フィンガータイトの場合は最大 600 bar (ユーザーと接続位置によって異なります)、レンチを使った場合は最大 1,300 bar です。

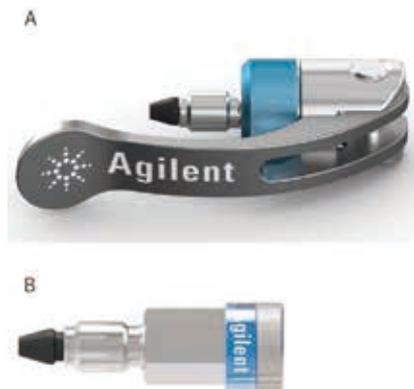


図 21. Agilent A-Line フィッティング  
A. クイックコネクフィッティング、B. クイックターンフィッティング

どちらのフィッティングも、接続先のポートにチューブを継続して押し付ける新しいスプリング式设计 (図 22) を採用しています。このため、デッドボリュームのない再現性の高い接続によって、一貫したクロマトグラフィ性能を実現できます。ステム長はスプリングによって調整可能なため、どちらのフィッティングもすべての種類の LC カラムで使用できます。また A-Line クイックコネクットフィッティングでは独自のレバー式设计を使用しています。この設計ではレバーなどのスプリングアセンブリによって、一定の力でフェラルがチューブに押し付けられるため、チューブがずれることがありません。ツールを使用しなくても、少しの力でフィッティングを 1,300 bar (18,850 psi) まで締めることができます。最初に手応えを感じるまで、ナットを 1 回手で締めて、レバーを押し下げます (図 23)。



図 22. Agilent A-Line フィッティング独自のスプリング式设计

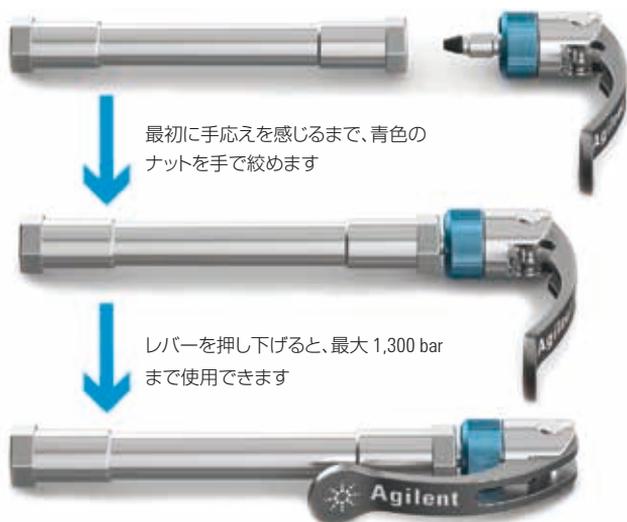


図 23. Agilent A-Line クイックコネクットフィッティングの取り付け

## 200 回以上再接続できる堅牢性

Agilent A-Line の再利用性と堅牢性を評価するには

クイックコネクットフィッティングについては、取り外しと再接続を 200 回繰り返しました。200 回再接続しても、フィッティング接続にデッドボリュームやリークは生じませんでした。

## 別のブランドのカラムとの互換性

フィッティング接続の設計はカラム機器メーカーによって異なり、フィッティングのステム長が適切でないと、リークが生じたりピーク形状が悪化したりします。Agilent A-Line フィッティングと他のカラムブランドとの互換性についてはホームページをご覧ください。

作業中の接続のヒントの詳細については、「LC Troubleshooting series」([www.agilent.com/chem/Ictroubleshooting](http://www.agilent.com/chem/Ictroubleshooting))の「Peak Broadening Video」を参照してください。

Agilent A-Line の詳細情報: [www.agilent.com/chem/a-line](http://www.agilent.com/chem/a-line)

## 試料の注入

試料の注入量はピーク形状に重要な影響を与えます。注入量が多すぎると、カラムがオーバーロードの状態になり、ピークが広がる可能性があります。ピークのリーディングが最も頻繁に発生し、場合によってはピークのテーリングが発生します。

図 24 に、1、2、5、および 10  $\mu\text{L}$  の注入量を使用した注入を示します。注入量が増えるに従ってピークが広がるのがわかります。

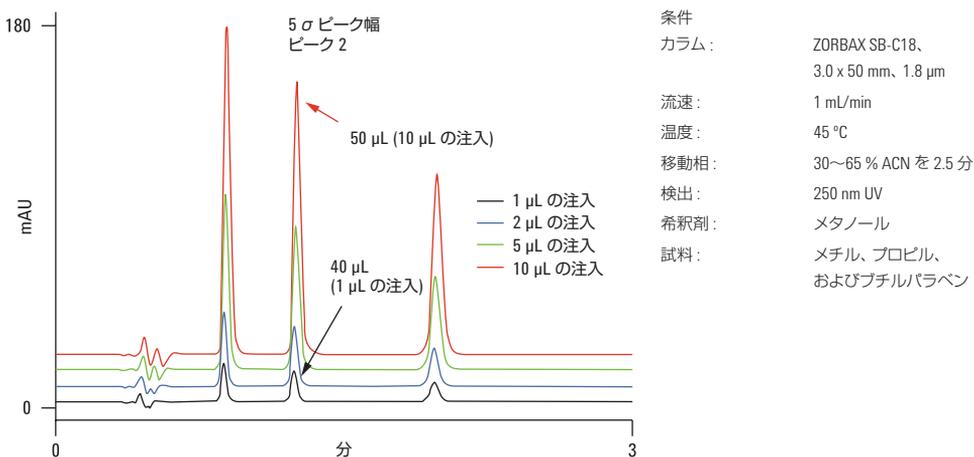


図 24. 試料のロードボリュームの比較

注入量を決定した後、注入溶媒と移動相に十分な類似性があり、バンドの広がりやスプリットを低減できることを確認する必要があります。

試料注入溶媒と注入量がピーク形状に影響を与えることがあります。例 (図 25) では、パラベン類のメタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入しただけで、ピークバンドが広がり始めることが明白にわかります。逆相カラムのサイズは 3 x 50 mm で、低分散の HPLC システムを使用しました。10  $\mu\text{L}$  を注入するとピークの対称性が明らかに失われています。逆相 LC の大容量注入で 100 % 有機溶媒、または 100 % 強溶媒 (この場合はメタノール) に溶解した試料を使用すると、成分の溶出が一時的に速くなる (有機用溶媒が移動相として作用する) ため、ピークの歪みが発生します。この問題は、少量注入を使用できるように、試料を濃縮して注入量を少なくすることにより解決できます。または、注入溶媒を水で希釈して移動相との適合性を上げると、ピークの歪みが発生させずに大容量注入を可能にすることができます。

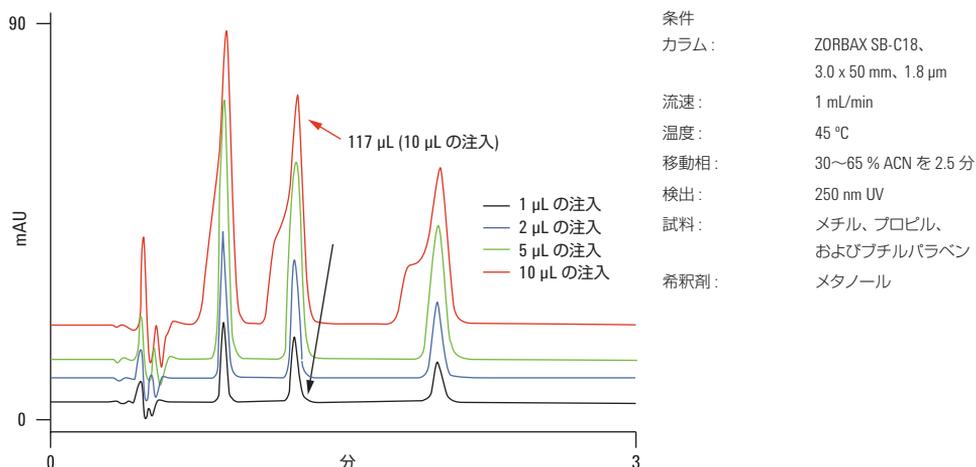


図 25. 溶媒効果: 注入量が 1~10  $\mu\text{L}$  の強い希釈剤

## データ収集レートの設定

小容量カラムを使用する場合は、データ収集レートが「人工的な」ピークの広がり一般的な原因となります。早く溶離するピークの場合、データシステムのアルゴリズムがピーク幅、ピーク面積、保持時間を正確に測定できるように、ピーク全体で十分な数のポイントがサンプリングされることを確認します。低速でサンプリングすることで取り込むポイントの数が少なくなり過ぎると (低いデータ収集レートなど)、カラムから溶離するときのピークは実際よりも広がって見えます。使用しているカラムに最適なデータ収集レートが設定されていることを確認します。図 26 にデータ収集レートの影響を示します。

Agilent Method Translator を現在のカラムおよびグラジエント条件で使用している場合は、その条件下で予測されるピーク幅 (5  $\sigma$ ) を概算することができます。この情報は、初期メソッドを設定する場合に有効です。

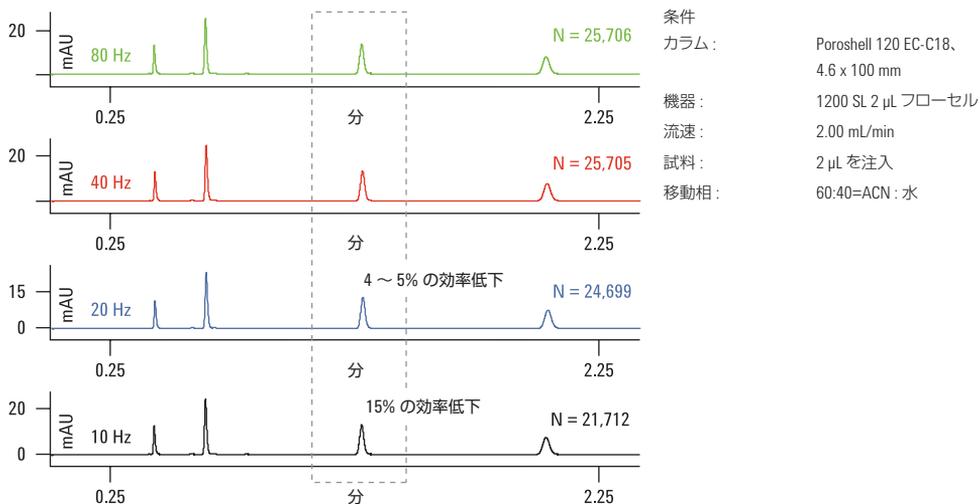


図 26. さまざまなデータ収集レートを使用したときの Poroshell 120 EC-C18、4.6 x 100 mm のピーク効率の比較

ここでは効率を測定しています。図からわかるように、使用するデータ収集レートが高くなるほど効率が上がります。

検出器設定と時間定数を、S/N 比を損なわない範囲でできる限り高速の値に調整することで、データ収集レートを最適化することができます。ChemStation のピーク幅制御機能により、分析のピーク幅またはレスポンス時間を選択することができます。ピーク幅は、ChemStation ソフトウェアで定義されているように半値幅です。ピーク幅を、試料の予測される最も狭いピークに設定します。ベースラインにおけるノイズが大きくなるため、必要以上に速いレスポンス時間は使用しないでください。

## ドウェルボリュームとクロマトグラフィーに与えるその影響

低圧混合システムのドウェルボリュームは、プロポーショニングバルブから、ポンプやその他のシステムコンポーネントを通じて、カラムヘッドまでのすべてのボリュームになります (図 27)。高圧混合システムのドウェルボリュームは、2つの送液ポンプの後、溶媒が最初に混合される場所からカラムヘッドまでのすべてのボリュームになります (図 28)。

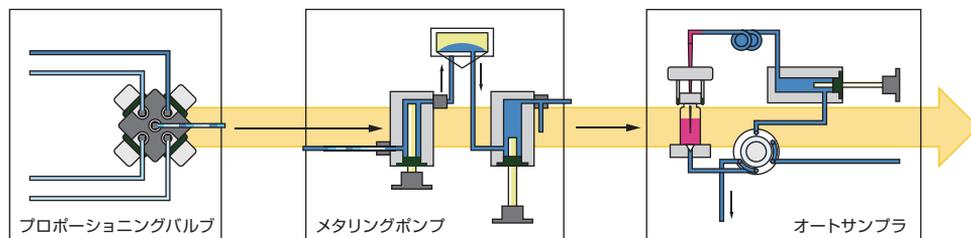


図 27. ドウェルボリューム: 低圧混合オートナリポンプ

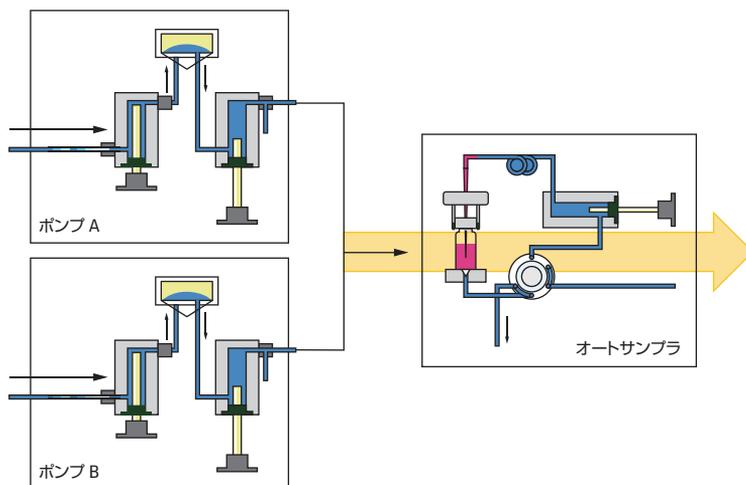


図 28. ドウェルボリューム：高圧混合バイナリポンプ

グラジエント分離では、ドウェルボリュームは、グラジエント開始点の事実上のイソクラティックホールド時間であり、ドウェルボリュームを流速で割った値に等しくなります。ドウェルボリュームが大きすぎると、一部の機器がナローボアグラジエント分離には実用的でなくなるか、使用できなくなります。

ナローボアカラムを使用する場合は、機器構成が非常に重要です。ナローボアカラム (内径 2.1 mm) とマイクロボアカラム (内径 1 mm および < 1 mm) の使用を最適化するには、ドウェルボリュームとカラム外ボリュームの両方を最小化しなければなりません。

図 29 に、ドウェルボリュームが分析結果に与える影響を表すクロマトグラフィーの例を示します。早く溶離するピークの方が幅が広いことに注意してください。ここでの問題は、早く溶離するピークがドウェルボリュームのためにかなり遅くなり、これらのピークはほとんどイソクラティック溶出されています。これが分離や検出に影響を与える場合は、ドウェルボリュームを小さくするか、またはアプリケーションを別のシステムに移行する必要があります。

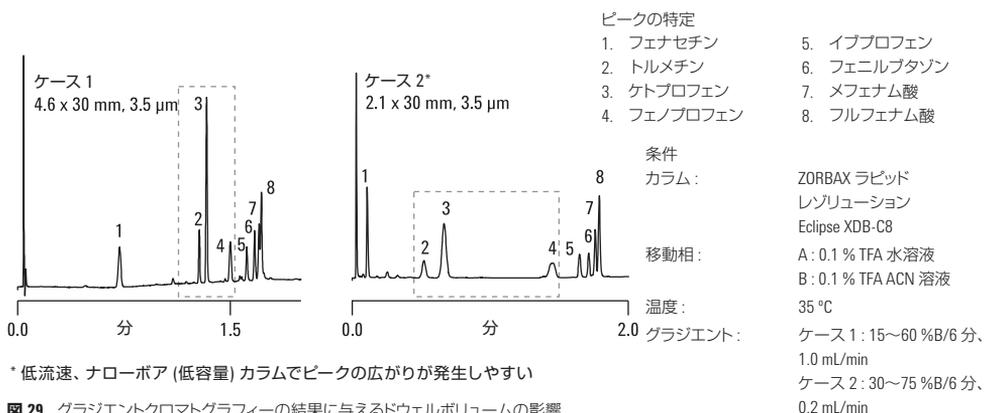


図 29. グラジエントクロマトグラフィーの結果に与えるドウェルボリュームの影響

## システムのドウェルボリュームの測定

最初に、カラムを短い HPLC ステンレス配管に交換します。次のように移動相の成分を調整します。A – 水 (UV 透過)、B – 水 + 0.2 % アセトン (UV 吸収)。265 nm でモニターします。グラジエントプロフィールを 0 ~ 100 % B / 10 分、1.0 mL/min で実行します。グラジエントトレースを記録し、印刷します (図 30)。

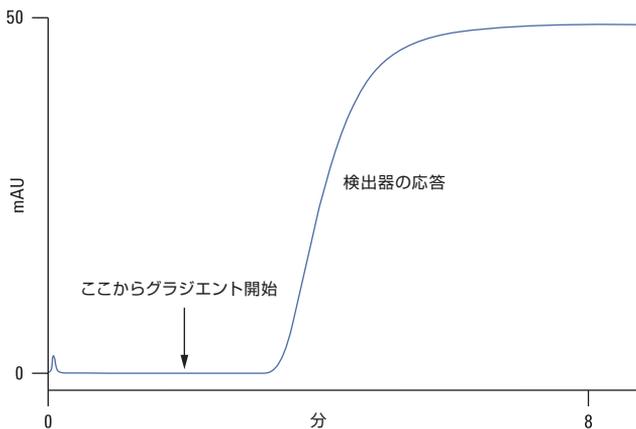


図 30. ドウェル (ディレイ) ボリュームの計算、手順 1

紙の上で定規を使用するか、または PowerPoint にラインを挿入し、次のポイントで x または y 軸に平行な直線を描きます。

1. 90 % B の保持で定義されるゼロの信号
2. 100 % B の領域で定義される最大安定信号
3. 2.0 分における垂直線。図は図 31 のようになるはずです。

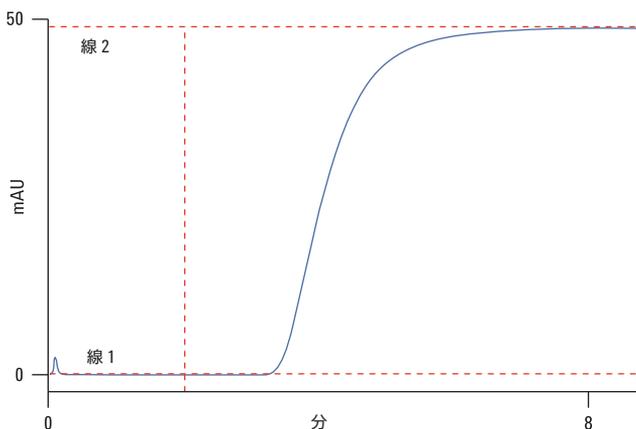


図 31. ドウェル (ディレイ) ボリュームの計算、手順 2

3本の線を加えた後、さらに2本の線を追加します。この手順の50%レスポンスを計算し(この場合は24.5 mAU)、図を横切る水平線を引きます。次に、50%レスポンスの線と観察された検出器信号の交点を横切る垂直線を引きます。新しい図は図32のようになります。

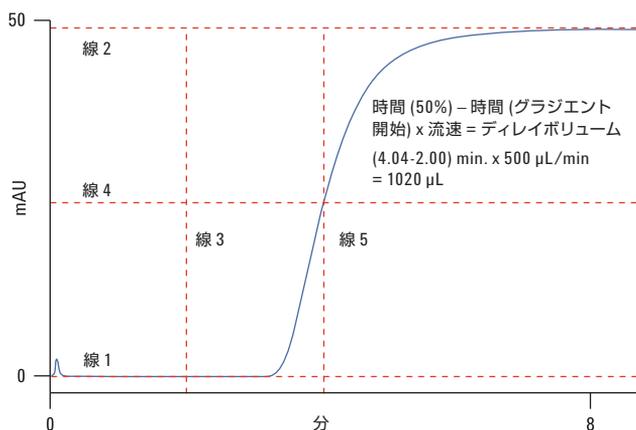


図 32. ドウエル (ディレイ) ボリュームの計算、手順 3

x 軸を 50%B の垂直線までたどり、50% のレスポンスが観察された時間をできる限り正確に測定します。試験を 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  の流速で実行したと仮定すると、0.1 分のエラーは、ディレイボリュームの概算で 50  $\mu\text{L}$  のエラーになります。この例では、概算により 50% の時間が 4.04 分となりました。

ドウエルボリュームを計算する単純な式は、時間 (50%) - 時間 (グラジエント開始)  $\times$  流速 = ドウエルボリュームです。この例では、(4.04 - 2.00) 分  $\times$  500  $\mu\text{L}/\text{min}$  = 1020  $\mu\text{L}$  となります。

この測定は長さ 100 cm、内径 0.062 mm (0.0025 インチ) の PEEK リストリクタを備えた Agilent 1200 RRLC システム (1200 SL) で、水移動相として使用して行いました。このシステムには標準ミキサとパルスダンパが含まれ、ポンプからリストリクタまでの通常の流路にオートサンプラ (バイパスモードではない) が接続されており、セル容積 2  $\mu\text{L}$  フローセルが接続されています。

### ドウェルボリュームの影響の評価

さまざまなドウェルボリュームを持つ機器でメソッドを実行すると、図 33 に示すように溶出時間、分離度が異なる結果が得られます。

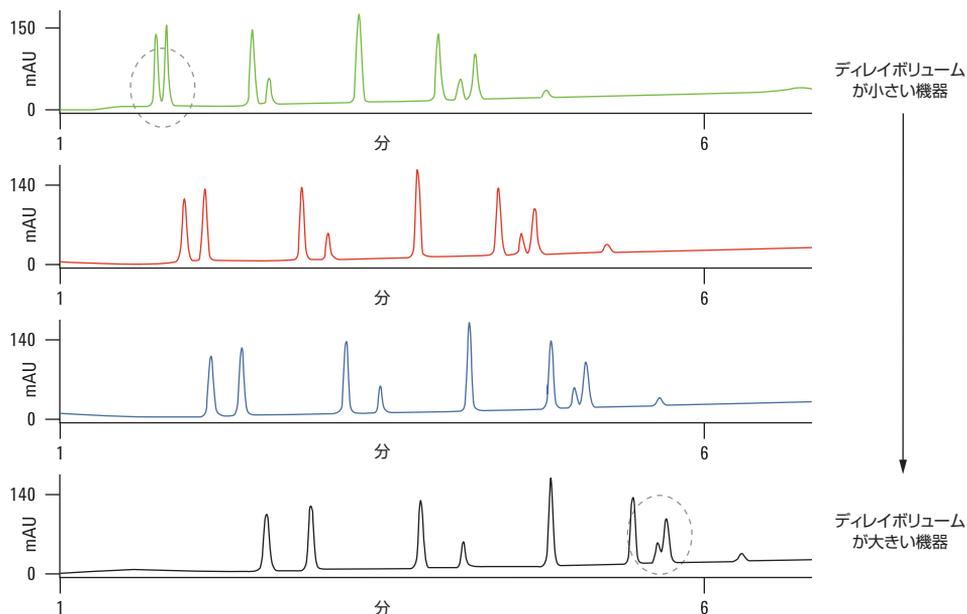


図 33. ドウェルボリュームと分離度

ここでは、ドウェルボリュームが最小および最大のシステムでは良好な結果が得られません。このメソッドは、中程度の範囲のドウェルボリュームを持つ機器で最初に開発された可能性があります。

グラジエント分離に対するドウェルボリュームの影響を調べるために、グラジエント分析の開始時点のインクラティックホールドを大きくするか、小さくすることができます。

ドウェルボリュームの小さいシステムで大きいドウェルボリュームをシミュレートするには、グラジエントプログラムの開始時点のホールド時間を、2つのドウェルボリュームの差 (mL) を流速 (mL/min) で割った値に設定します。

機器のドウェルボリュームよりも小さいドウェルボリュームをシミュレートするには、同一のドウェル時間に等しい注入遅延時間が適用されるように、インジェクタプログラムを変更する必要があります。機器によって、この機能を持つものと持たないものがあります。

異なる機器を使用する別のラボにメソッドを転送する場合は、メソッド開発で使用した機器のドウェルボリュームと、分離に与えるドウェルボリュームの影響を、メソッドのドキュメントに文書化することが重要です。

## ドウェルボリュームと分析時間

ドウェルボリュームにはインジェクタボリュームも含まれるため、内部ボリュームとインジェクタの周りの接続配管を最小限に抑えることが重要です。ほとんどのアジレントオートサンブラは、バイパスモードで動作する、または自動ディレイボリューム削減 (ADVR) 機能を使用するオプションを備えています。このオプションでは、試料が試料ループからフラッシュされた後にインジェクタがロードポジションに戻ります。使用しているインジェクタに応じて、システムのボリュームは最大で 300  $\mu\text{L}$  まで減少します。標準の Agilent 1200SL または 1260 Infinity バイナリグラジエント機器で、約 1100  $\mu\text{L}$  のディレイボリュームから開始し、内径の小さい配管に変更し、オートサンブラのバイパス機能を使用し、ミキサとダンパを取り外すことで、約 280  $\mu\text{L}$  までボリュームを下げるすることができます。

高速グラジエント分離では、注入をオーバーラップさせることで分析時間を短縮することができます。オーバーラップした注入では、オートサンブラが直前の試料の分析中に試料を吸引し、システムの準備が整ったところで注入します。この結果、1回の分析あたり約 30 秒以上の実行時間を短縮することができます。高速のグラジエントコンビナトリアルケミストリ分析を実行している場合は、最大で分析時間の 1/3 まで短縮されます。

キャピラリーカラムやマイクロボアカラムなど、非常に小さいカラムでグラジエント分離を多く実行する予定がある場合は、280  $\mu\text{L}$  のディレイボリュームは大きすぎます。これらのカラムには、アジレントキャピラリー LC 機器を選択することが重要です。

カラム外ボリュームを最小限に抑え、適切な試料希釈剤を注入することも重要です。この結果、分離度を低下させるバンドの広がり が最小限に抑えられます。

さらに、前述のように、早く溶離するピークで十分なポイントを取り込むことができるように、検出器のレスポンスタイムが正しく設定されていることを確認する必要があります。正しく設定されていない場合は、歪んで人工的に広がったピークが現れる可能性があります。

## キレート化合物

一部の分析種は、金属キレートを形成するのに適した構造を持っています。フリットまたはカラムの壁面の金属がキレート形成能のある化合物と反応することがあります。この問題の解決にはリン酸洗浄が役立ちます。

金属が原因で問題が発生したかどうかを確認するための適切な方法をここに示します。孤立電子対を持つ化合物では、金属の存在下で環状構造が形成され、この結果、再現性のない保持やピーク形状の問題が発生することがあります (図 34)。

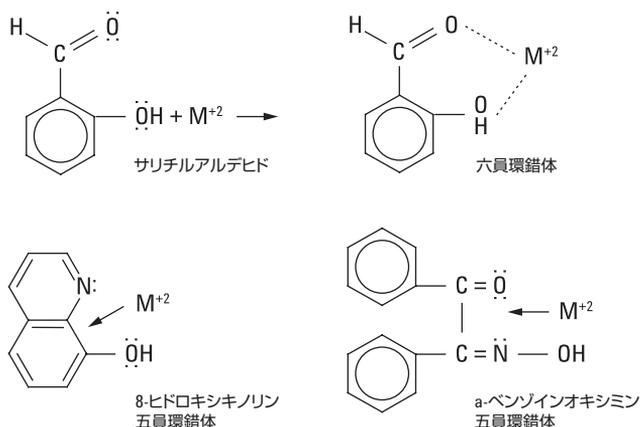


図 34. キレートの問題を特定するための化合物の評価

このような場合には、リン酸洗浄が有効です。洗浄「前」のクロマトグラムで、化合物 2 のピークテーリング係数が高いことに注意してください (図 35)。酸洗浄の後、化合物 2 でよりシャープなピークとテーリング係数の改善を確認できます。1% リン酸洗浄は、酸性条件に耐性を持つように設計されている ZORBAX StableBond カラムで使用できます。Eclipse-XDB、Eclipse Plus または中程度の pH 範囲用に設計されたその他のエンドキャップ付きカラムを使用している場合は、酸濃度を 0.5% まで下げてください。

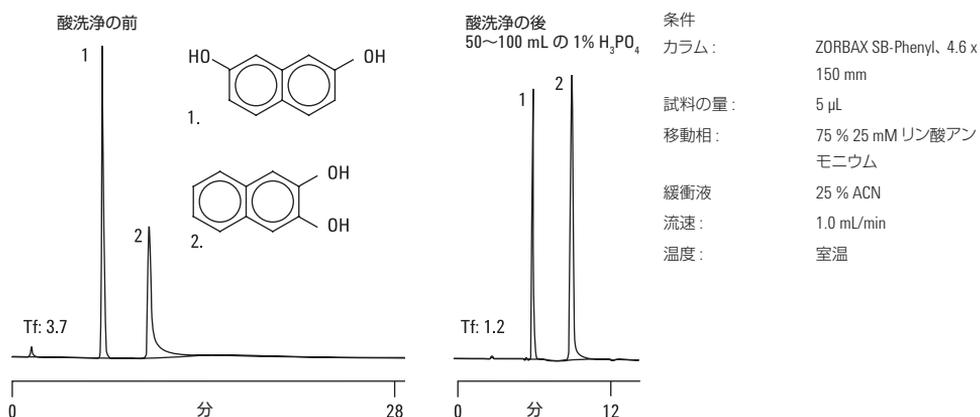


図 35. リン酸洗浄によるキレート化合物のカラム性能の回復

## pH および移動相の添加剤

移動相と試料の pH は、メソッド開発に大きな影響を与えます (詳細については、「移動相の使用」の項と「メソッド開発」の章を参照)。可能であれば、極端に高い pH や低い pH を避けることをお勧めします。このような極端な pH 値では、カラム寿命が短くなる可能性があります。

最適な pH 範囲については、使用しているカラムの推奨 pH 範囲を参照してください。ほとんどの分離は pH 2~8 の範囲で行われます。酸イオンおよび塩基イオン化可能な分析種の保持は pH に対する感度が高く、pH によって劇的に変化することが頻繁にあります。分離に最適な pH の評価はメソッド開発の重要な部分です。詳細については、「メソッド開発」の章で説明します。

## グラジエントの使用

試料が複雑になるほど、グラジエントメソッドを使用する可能性が高まります。グラジエント分離は、極性の大きく異なる化合物や、ペプチドやタンパク質などの分子量が非常に大きい化合物に有効です。

イソクラティックメソッドは容易に使用できますが、溶出の遅いピークが広がる可能性があります。これは、ピーク幅が保持時間とともに大きくなるからです。グラジエント溶離では、溶出の遅いピークの保持を下させることでこの問題を解決することができます。グラジエントのメリットとして、グラジエント圧縮効果によるシャープなピークや、グラジエントによって段階的に溶媒強度が強くなる移動相がカラムに通液されることによる汚染物質の蓄積の減少などがあります。

図 36 に、イソクラティックメソッドとグラジエントメソッドの比較を示します。イソクラティック分離では、この 8 つの成分からなる農薬混合物は 70 分間では完全には分離されず、成分 1 と 2 が共溶出します。ピーク 1 と 2 を分離するために有機溶媒比を下げて、許容できない保持時間と、ピーク 8 についてのおそらく許容できない限界値が得られるだけです。20~60 % のグラジエントを使用すると、8 つのすべての成分は 30 分未満で十分に分離され、検出下限は基本的に同じになります。これよりも高い有機濃度からグラジエントを開始すると、分析時間をさらに短縮することができます。このための 1 つの方法として、有機溶媒比を 25~65 % にすることができます。

逆相クロマトグラフィーのグラジエント分離は、2~4 つの移動相成分を使用して実行することができます。バイナリグラジエントでは、これらの成分は通常は A および B と呼ばれます。溶媒 A の方が弱く (多くの場合は水や緩衝水溶液)、分析種はカラムからゆっくりと溶離します。溶媒 B はこれよりも強く、分析種はより迅速に溶離します。B は、アセトニトリル (ACN)、メタノール (MeOH)、テトラヒドロフラン (THF)、イソプロパノール (IPA) など、水と混合可能な有機溶媒です。最初に、グラジエント開発中に試験を行います。

グラジエントを作成するための主な手順は次のとおりです。

1. 最初に、5~10 % から 100 % 有機溶媒の直線的なグラジエントを使用し、設定された時間に試験を実行します。緩衝液が溶媒 B に溶解しない場合は、グラジエントを約 70 % までとします。
2. すべての試料成分が確実に溶出するように、最後の成分にはホールド時間を追加します。
3. クロマトグラムを確認し、適切な初期グラジエント組成とグラジエントプロフィールを決定します。

ほとんどのグラジエント分離は、有機溶媒比を時間の経過とともに一定の割合で変化させる線形グラジエントを使用して実行することができます。ただし、他の種類のグラジエントも使用できます。例えば、一部のグラジエントプログラムには、異なる時間における異なる勾配や、必要な分離度や保持時間に応じた A および B の相対濃度の急激な変化などが含まれます。

グラジエントの詳細と例については、「メソッド開発」の章を参照してください。

分析時間を短縮し、ピーク検出を向上させるために、グラジエントを単純にし (短いグラジエント時間を使用)、短いカラム (50~75 mm) を使用してください。

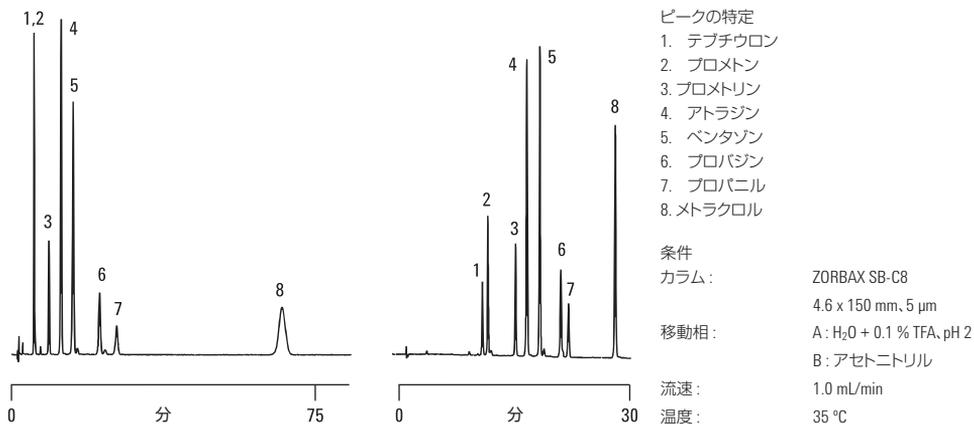


図 36. イソクラティック分析とグラジエント分析の比較

## カラム再平衡化の最適化

メソッド開発時またはメソッド移管時の保持時間に再現性を持たせるには、カラムの十分な平衡化が必要です。このグレープフルーツジュース分析のグラジエント分離 (図 37) を見ると、カラムのボイドボリュームと、カラムの再平衡化に必要な時間がわかります。

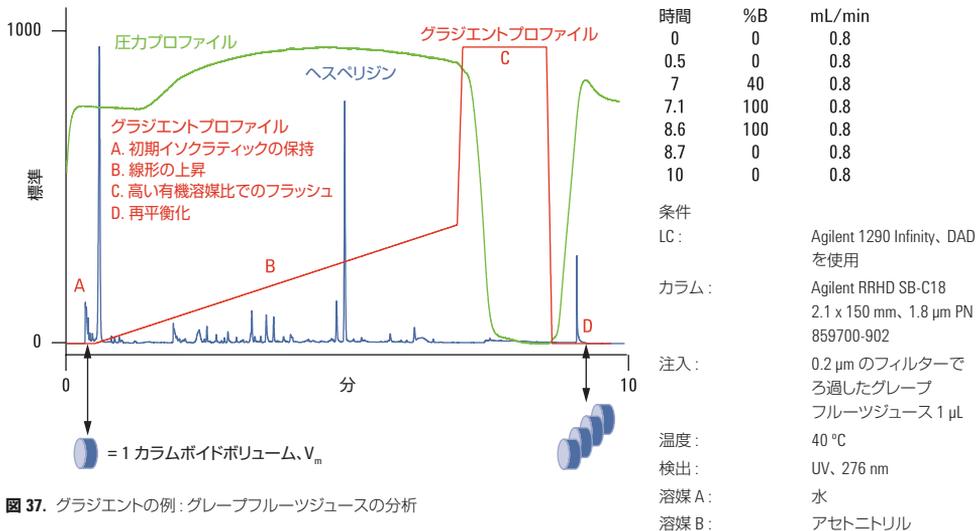


図 37. グラジエントの例: グレープフルーツジュースの分析

これは、直前のグラジエントを実行した後にカラムを開始時点の移動相条件に戻すために必要な時間です。この場合の再平衡化時間は 1.4 分間で、このカラムサイズの 4 カラムボリュームに相当します。

カラムのポイドボリュームは、クロマトグラムを確認し、クロマトグラムの開始時点から、ベースラインの最初の乱れまでの時間を測定することで概算できます。この時間 (分) を流速 (mL/min) で割ることで、ポイドボリューム (mL) が得られます。または、ポイドボリュームを自動的に計算する Agilent Method Translator を使用します。

おおまかには、メソッド開発時に 10 カラムボリュームの平衡化を使用します。ただし、確立されたメソッドでは、この場合の 4 カラムボリュームのように、平衡時間を評価し、短縮することができます。最小平衡化時間は、グラジエントを繰り返し実行し、保持の変化を確認することで、試行錯誤で求めなければならないものです。図 28 に示すように、何回か注入を繰り返しても同一になる場合は、平衡化時間は十分です。

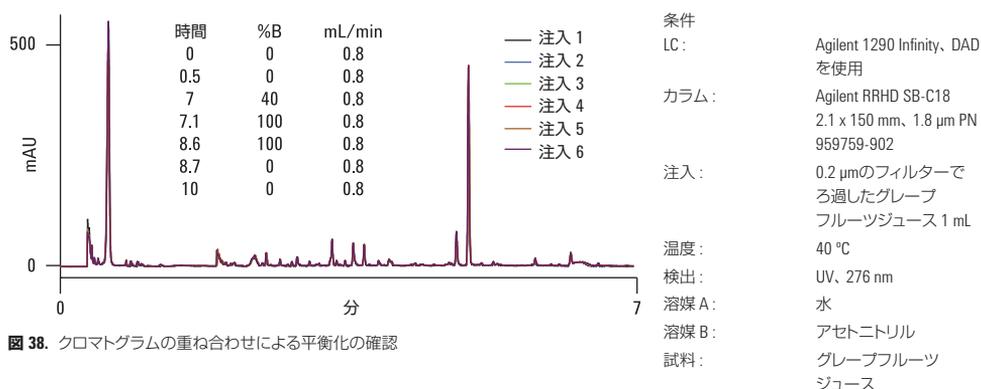


図 28. クロマトグラムの重ね合わせによる平衡化の確認

これを試行錯誤で行わなければならないのはなぜでしょうか。

- 開始時点の状態に戻すための固定相の再平衡化速度はさまざまです。この速度は、使用する移動相の溶媒、緩衝液、グラジエントの範囲によって異なります。これが、次に行う実験に向けて固定相が確実に再平衡化されるように、カラムのポイドボリュームの 10 倍をメソッド開発に推奨している理由です。希望の分離能が得られたら、再平衡化時間の短縮を検討することができます。
- 平衡化ボリュームには機器のドウェルボリュームが含まれるため、この追加のボリュームも機器によって異なります。ドウェルボリュームは、イソクラティックメソッドの保持力には影響を与えませんが、グラジエントメソッドの保持力には大きな影響を与えます。システムのドウェルボリュームがわからない場合は、ドウェルボリュームがカラムボリュームよりも大幅に大きいことがあるため、これが重大な意味を持つことがあります。グラジエントメソッドを 1 つの機器から別の機器に移動したときに保持時間がシフトする場合は、2 つのシステムのドウェルボリュームを比較してください。流路ボリュームが近いほど、保持時間も近づきます。

ヒント: オンライン信号ウィンドウの圧カトレースを確認します。移動相の組成が変化すると、圧力も変化します。圧カトレースが開始値に戻ると、再平衡化に近いことがわかります。

ヒント：システムのドウェルボリュームを確認してください。その方法については、50 ページを参照してください。システムのドキュメントを確認するか、アジレント技術サポートにお問い合わせください。このガイドのアジレントの参考資料の章を参照してください。

## カラムの劣化

カラムは、さまざまな移動相、分析種、試料マトリックスに曝される間に、これらの相互作用の影響をわずかに受けて、分離度が徐々に変化することがあります。新しいカラムの試験クロマトグラムを保存しておき、性能の経時変化を比較し、理解することが重要です。良好な定量を行うための許容値を超えるまで分離度が劣化した場合は、カラムを廃棄し、新しいカラムと交換する必要があります。

### 結合相の喪失

カラムの汚染は、シリカ系カラムの性能低下の最も一般的な理由の 1 つであるため、結合相の喪失によって保持力が徐々に変化します。適合性がない特定の溶媒を移動相に使用すると、基材であるシリカから結合相が外れて、分離度や保持時間が変化し、ピークのテーリングを増加させることがあります。結合相の喪失は、pH 2 未満で最も顕著です。結合相が安定化されたカラムを使用するか、pH 2~7、60 °C 以下の範囲で操作することによりこの影響を制限することができます。高 pH 側では、シリカゲルの溶解によって充填剤が失われ、空隙ができ、不十分なピーク形状が得られることがあります。9 を超える pH での操作が必要な場合は、この操作に適した専用の結合相を持つカラムか、pH の高い移動相に十分な耐久性を持つポリマー系カラムを必ず使用してください。

カラムの劣化時期を確認するには、容量係数、選択性、テーリング係数の変化を監視し、確認しなければなりません。これは、カラムの交換が必要な時期を予測する場合にも役立ちます。

## 逆相シリカ系カラムのクリーニング

場合によっては、カラムをクリーニングすることで、圧力上昇またはピークのテーリングの問題が緩和されることがあります。カラムをクリーニングする前に、検出器から取り外し、洗浄溶媒をビーカーまたはその他の容器に入れることをお勧めします。場合によっては、クリーニング中にカラムをバックフラッシュすることを推奨します。この結果、カラムの汚染物質がカラム内を移動することを防止できます。この前に、カラムメーカーに確認するか、カラムに付属の操作手順を確認してください。

カラムのクリーニングには移動相よりも強い溶媒が必要です。分析カラムのクリーニングには、各溶媒が少なくともカラムボリュームの 10 倍必要です (図 29 を参照)。逆相カラムのクリーニングについては、次の手順を参照してください。カラムのクリーニングが終了したら、メーカーが推奨する流れの向きにカラムを戻します。

圧力の問題は、カラムの詰まりが原因ではなく、破損してシステム内に入り込んだシールや、インラインフィルタのフリットに蓄積した粒子が原因です。カラムをクリーニングする前に、インラインフィルタのフリットを交換してみてください。

カラムのインレットフリットは交換しないでください。今日のカラムの充填には高効率プロセスが使用されているため、交換によってカラムに不可逆的な損傷を与えることがあります。



カラム管のボリューム =  $\pi r^2 L$

カラム管のボリューム =  $\pi (0.23)^2 (15) = 2.49 \text{ cm}^3 = 2.5 \text{ mL}$



2.5 mL x 65 % (カラムの充填剤が入っていない部分の容積) = 1.5 mL = 1 カラムボリューム

図 39. カラムボリュームの計算

ヒント：システムに不揮発性の緩衝液を使用している場合に沈殿を防止するには、最初に緩衝液が含まれない水系移動相でフラッシュした後、純粋な有機溶媒を導入します。

カラムのバックフラッシュまたはクリーニングの手順：

1. カラム出口から検出器までの配管を外し、配管をカラムの端に接続してビーカーの中に入れ、廃液を収集します。
2. 最初に、緩衝塩が含まれない移動相 (水/有機溶媒) を使用します。
3. 次に、100 % 有機溶媒 (メタノールおよびアセトニトリル) を使用します。
4. 圧力をチェックして、正常な状態に戻ったことを確認します。戻っていない場合は、
5. カラムを廃棄するか、または 75 % アセトニトリル / 25 % イソプロパノールなどの強い条件の使用を検討します。
6. 100 % イソプロパノール
7. 100 % 塩化メチレン\*
8. 100 % ヘキサン\*

\*ヘキサンや塩化メチレンを使用している場合は、カラムを使用する前と逆相移動相に戻す前に、イソプロパノールでフラッシュします。

緩衝塩が沈殿し、カラム内部の背圧が大きくなることがあります。このような状況が発生したら、カラム内に温水をゆっくりと流して沈殿物を取り除きます。

プロパノールが含まれる洗浄溶液を使用すると、粘度が上昇し、動作圧力が大きくなります。クリーニングのこの段階で流速を下げ、安全な圧力による動作を維持する必要があります。

### 順相シリカ系カラムのクリーニング

順相では、有機溶媒以外は使用できません。使用しているカラムが従来の分析用 4.6 x 250 mm カラムであると仮定し、各溶媒を 50 ml 以上使用します (カラムボリュームの 20 倍)。次の溶媒を、強度が低いほうから順に使用します。

1. 50 % メタノール : 50 % クロロホルム
2. 100 % 酢酸エチル

順相モードで使用するカラムのクリーニングは、試料の種類によって異なります。これらの溶媒でクリーニングできない場合は、アジレントにお問い合わせください。お客様のアプリケーションや試料マトリックスにより効果的な溶媒をご提案します。

### 逆相ポリマー系カラムのクリーニング

ポリマー系逆相カラムを使用する場合は、移動相に 1 % 以上の有機溶媒を入れておくことを強くお勧めします。100 % 水系溶離剤を長期間使用した後に有機移動相を再度導入すると、カラムの性能が低下することがあります。または、カラムを 100 % 水系緩衝液で「洗浄」しないでください。流れの方向を逆にすることができます。開始圧力が高い場合は、流速を減らします。逆相ポリマー系カラムのクリーニング手順を次に示します。

1. 現在の移動相を使用してクリーンアップグラジエントを実行し、有機溶媒比の高い (95 %) 溶媒に変えて、カラムボリュームの数倍の量を流します。この手順を 2 回または 3 回繰り返します。有機溶媒比が高いと緩衝液が沈殿することがあります。移動相に緩衝液が含まれる場合は、有機溶媒比を約 70 % に制限するか、クリーニングの前に、移動相から緩衝液を取り除いたもので緩衝液をフラッシュします。
2. TFA などの強度の高い有機添加剤を使用して、疎水的に結合した汚染物質を取り除きます。
3. ペプチドまたはタンパク質による汚染は、場合によっては 1.0 % v/v TFA が含まれる水系/ACN により除去できます。
4. 強酸や 1 M 水酸化ナトリウムなどの強塩基を所定のクリーニングや脱パイロジェンに使用することができます。

ヒント: サンプルのフィルタリングによって、カラムの寿命を延ばし、機器の摩耗を減らすことができます。

# メソッド開発

確立された HPLC メソッドがない場合は、堅牢で再現性のある分析を実行するためのメソッド開発が必要です。最適なメソッドを開発するためのスキルがあれば、今後の困難な分析への対応にも役立ちます。

この章では、最初に HPLC モードに関する概要を説明します。

- メソッド開発の主な手順
- 分離モードの選択
- カラムの充填剤とカラムサイズ
- 固定相の選択

次に、逆相メソッド開発について説明します。

- 逆相クロマトグラフィーの固定相の選択
- 逆相クロマトグラフィーの移動相の選択
- 移動相調製についてのヒント
- 移動相と移動相緩衝液のトラブルシューティングの例
- 移動相緩衝液による pH の管理
- pH のトラブルシューティングの例
- ポリマー系カラムを使用した逆相メソッド開発
- 従来のカラムによる既存メソッドを表面多孔性粒子を使用したカラムへのメソッドに変換する際のヒント
- 「実践的な」メソッド開発の手順に沿ったガイド
- メソッド開発の自動化

この章の最後に、その他の HPLC モードのメソッド開発についても説明します。

- HILIC
- 順相クロマトグラフィー
- イオン交換クロマトグラフィー
- ゲル浸透/サイズ排除クロマトグラフィー
- LC/MS

### メソッド開発：どこから始めるべきか

メソッド開発の全体の目標は、目的とする分析種の分離を可能な限り短時間で最適化することです。メソッド開発の検討を始める場合は、分離度に影響を与える主な要因を再確認することをお勧めします。最初に「クロマトグラフィーの重要な概念」の章からスタートしてもよいでしょう (6~12 ページ)。

代表的なメソッド開発スキームには次の手順が含まれます。これらについて説明します。

1. 分離モードの選択
2. カラムサイズとカラム充填剤の選択
3. 固定相の化学結合相の選択
4. 移動相の溶媒の選択
5. その分離モードで必要な場合は、移動相の pH の調整
6. 限界条件を定義するための初期イソクラティックまたはグラジエント分析の実行
7. 実験条件の最適化

### モードの選択

最初に HPLC の分離モードを選択します。通常、分離モード選択は分析対象成分の種類と溶解性、分子量 (MW)、試料マトリックス、適切な固定相とカラムの有無に応じて決定します。図 40 および 41 に、化合物の分子量と使用する溶媒に基づく最適な分離モードの選択手順の概要を示します。

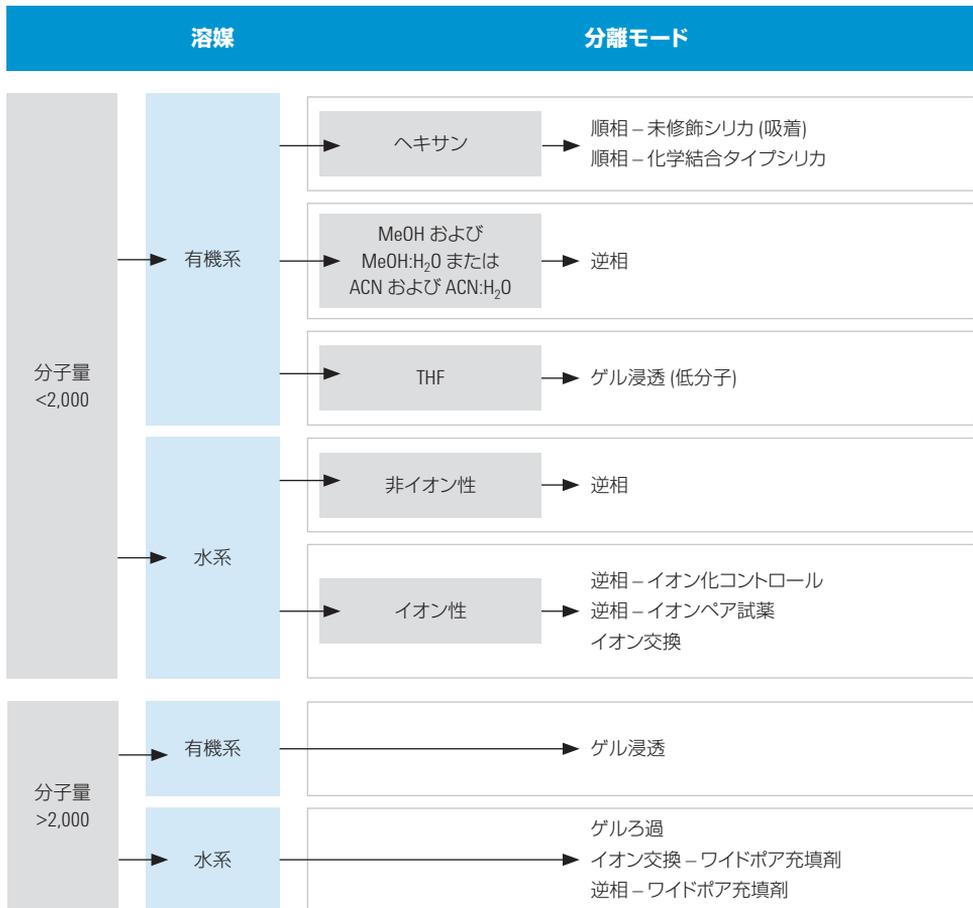


図 40. 溶媒と分離モードによる LC および LC/MS カラムの選択

分子サイズ	溶媒	化合物	分離メカニズム	
小	水系/有機系	脂質	銀イオン錯体形成	
		多環芳香族炭化水素	逆相 C18	
		有機酸	配位子相互作用逆相イオンペア	
			配位子相互作用	
		単糖類および二糖類	順相アミノ	
			イオン交換	
		オリゴ糖	配位子相互作用およびイオン交換	
		糖アルコール	配位子相互作用	
		順相	順相アミノ/シアノ/ジオール	
		塩基性、極性	極性逆相 C8、C18 または HILIC	
			逆相 C18 イオン抑制	
		水素結合	逆相 C8 または C18	
		位置異性体	逆相 C8	
		芳香族または構造的に類似	逆相フェニル/フェニルヘキシル/ ジフェニル	
		高極性	逆相その他または HILIC	
	極端な条件	逆相ポリマー系		
	有機系	無極性	順相 Si	
		極性	順相アミノ/シアノ/ジオール	
大	水系	合成多分散系および制限された MW 範囲	サイズ排除	
		合成ペプチド	逆相	
		合成オリゴヌクレオチド DNA/RNA	逆相イオンペア、陰イオン交換	
		ポリマー	水系 GPC	
		遺伝子組み換えペプチドおよびタンパク質	逆相、陰イオンまたは陽イオン交換	
		巨大分子プラスミド	逆相または陰イオン交換	
			有機系	合成多分散系およびその他の有機可溶性ポリマー
			オリゴマー	逆相

図 41. 分析種と分離メカニズムによる LC および LC/MS カラムの選択

場合によっては、特定の分析種に複数の分離モードを使用できることがあります。例えば、イオン性化合物は、ポリマーまたはシリカ系カラムによるイオン交換クロマトグラフィー、または逆相カラムでイオンペア分配クロマトグラフィーを使用して分離することができます。

多くの分析技術者は、数多くのアプリケーションが公開されている逆相 HPLC から開始します。逆相クロマトグラフィーは無極性、非イオン性、イオン性、および極性化合物に使用でき、移動相と分析条件を適切に選択すれば、分析全体をこのモードだけで実行することもできます。他の分離モードについては、逆相について説明した後説明します。

## カラムサイズと充填剤の選択

図 42 に、カラムの固定相とカラムサイズを検討するときを考慮する必要があるいくつかのパラメータを示します。ハイスループット分析を実行するには、小さい粒子径 (2  $\mu\text{m}$  未満) の短いカラムが選択肢として最適です。多くの試料成分が含まれる複雑な分離の場合は、カラムの圧力が劇的に上がることに注意しながら、小さい粒子径 (2  $\mu\text{m}$  未満) の充填剤が充填された長いカラムを選択することができます。質量分析を実行している場合は、MS 検出器に使用される流速が小さいため、内径の細い (内径 2.1 mm など) カラムが選択されます。分取クロマトグラフィーでは、多くの場合、大きな粒子径 (5 から 10  $\mu\text{m}$  以上) を内径の大きいカラムに充填したものが使用されます。そのようなカラムでは、分取カラムの最適流速に適合するように、流速の大きいポンプを使用することをお勧めします。

分子が固定相と相互作用を起こすためには細孔構造に「適合」しなければならないため、充填剤のポアサイズは重要です。ポアサイズの小さい充填剤 (ポアサイズ 80~120  $\text{\AA}$ ) は、分子量 2000 までの低分子に最適です。

分子量が 2000 を超える高分子では、ポアサイズの大きい充填剤が必要です。例えば、タンパク質向けの一般的なポアサイズは 300  $\text{\AA}$  です。ほとんどの分離では、ステンレス製カラムハードウェアで十分です。ただし、特定の生体分子など、金属表面と相互作用を起こす壊れやすい分子を分析している場合は、PEEK やガラスライナー付きステンレスなどのカラム原料を使用することができます。微量陽イオンの分離では、場合によっては PEEK カラムが最も不活性です。ただし、PEEK カラムの耐圧が 400 bar に制限されていることに注意してください。

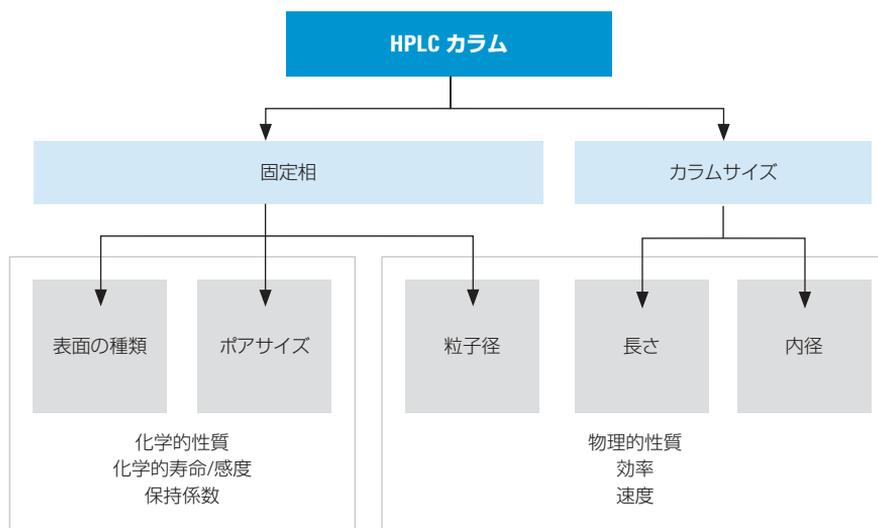


図 42. 一部のカラムと性質の影響

## 固定相の選択

各分離モードに使用できる幅広い固定相があります。逆相クロマトグラフィーを使用している多くの分析技術者は、特に低分子の分離では、最も一般的な結合相、オクタデシルシラン (C18) からメソッド開発を開始します。逆相の分離について次に重点的に説明します。他の分離モードについては、この章の後半で説明します。

## 逆相クロマトグラフィーのメソッド開発

逆相クロマトグラフィーは、HPLC で使用される最も一般的なタイプのメソッドです。おそらくすべてのメソッドの約 60 % を占めており、分析技術者の 95 % 近くが使用しています。

逆相クロマトグラフィーでは、順相クロマトグラフィーとは逆に、極性の移動相と無極性の固定相により分析種を分けます。通常は、分析種と疎水性の固定相の間で無極性の非特異的な相互作用が発生します。これは、試料が固定相で分離されるという意味です。極性、または分子の芳香族構造に基づいて、C18、C8、フェニル、または C3 などの固定相を使用し分離します。

逆相クロマトグラフィーでは、極性の高い分析種は、無極性分析種よりも保持が弱くなります。保持力は、分析種の疎水性にほぼ比例します。大きい疎水基と長いアルキル鎖を持つ分析種は、構造内に極性官能基 (アミン、ヒドロキシルなど) を持つ分析種よりも強く保持されます。C12、C14、C16、C18 などの一連の脂肪酸がある場合は、C12 が最も保持されにくく、C18 が最もよく保持されます。

移動相は、次の 2 つの主要な部分で構成されています。

1. 水や任意の緩衝液 (または pH 調整用の酸または塩基)
2. 水混和性のある有機溶媒

逆相クロマトグラフィーはきわめて多機能で、場合によっては同じクロマトグラムに含まれる無極性、極性、およびイオン性分子の分離に使用できます。一般に、イオン性化合物では、保持とピークの形状を向上するために、移動相に緩衝液を添加して pH と保持力を制御します。

## 逆相クロマトグラフィーの固定相の選択

逆相クロマトグラフィーメソッドを開発するためのアプローチについて考えます。図 43 に特定の分析種の分子量に基づいて、適切な固定相を選択する方法の一般的なフローチャートを示します。最初に、分析対象成分の分子が充填剤のポア内部の疎水性の固定相と確実に相互作用を起こすようにポアサイズを選択します。次に固定相を選択します。ほとんどの場合は、最初に C18 を選択します。メソッドの最終的な目的に応じてコンベンショナル分析カラムを選択することも、ハイスループトットを求めているのであれば、「高速分析用」逆相クロマトグラフィーカラムを選択することもできます。

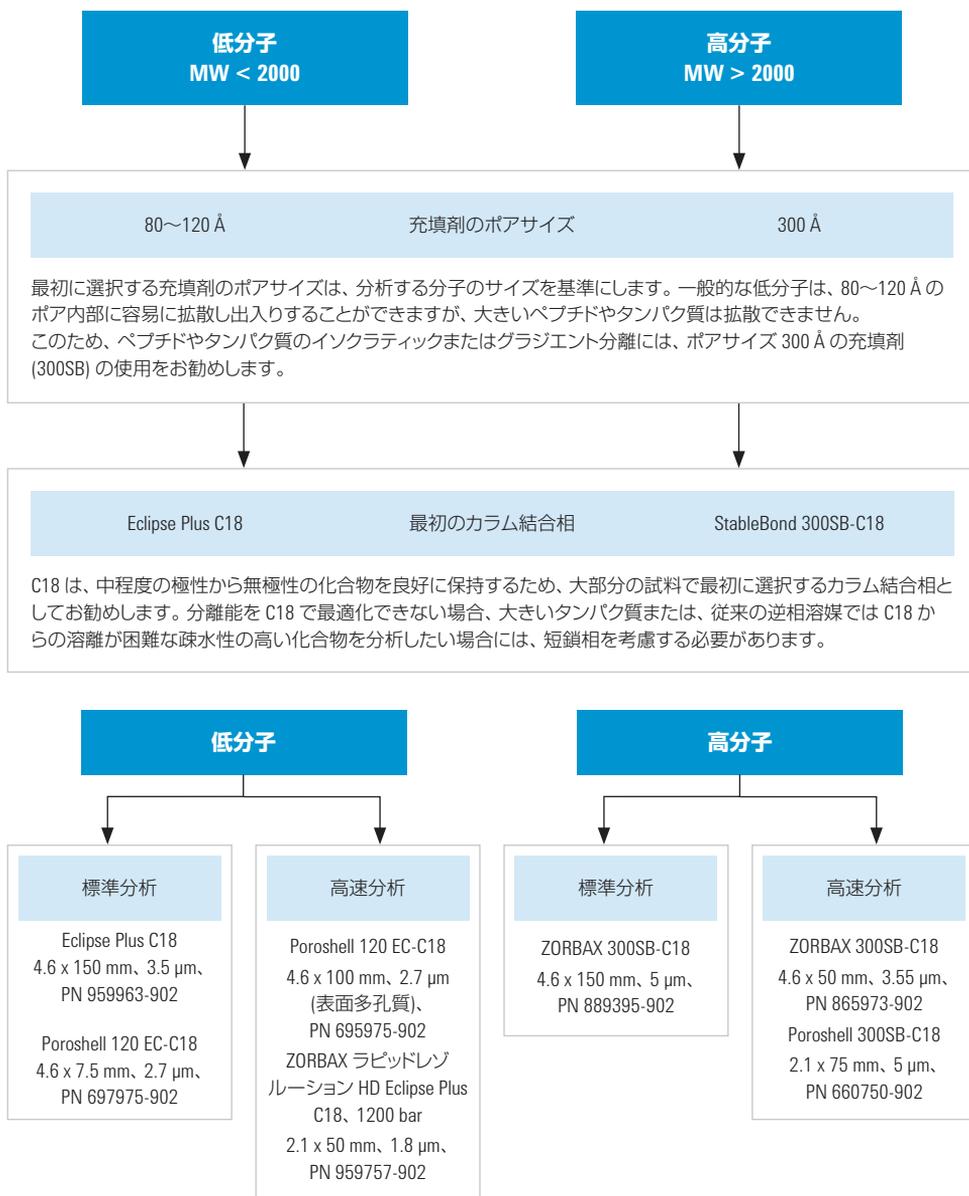


図 43. 逆相クロマトグラフィー：固定相の選択の概要

ほとんどの分析技術者は最初に C18 固定相を使用しますが、図 44 に示すように、C18 では分離できない場合に役立つ異なる選択性を他の固定相が持っていることがあります。この例では、2 μm 未満の異なる充填剤が充填された短いラピッドレゾリューション HT カラムで、pH 3.0 に調整された 70 % リン酸緩衝液と 30 % アセトニトリルの移動相を使用して心臓病治療薬をイソクラティック分離しています。

すべてのカラムが、試料中の5つの薬物をそれぞれ完全に、または部分的に分離していますが、SB-CN カラムは、十分な分離度で最も迅速な分離が行われました。

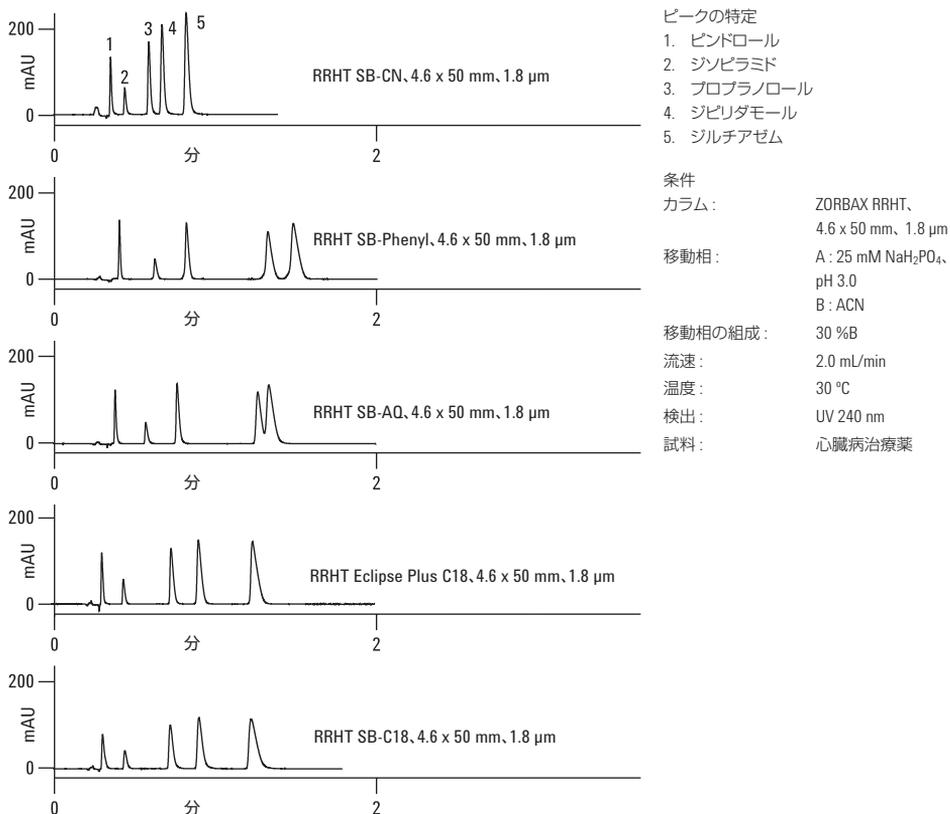


図 44. 逆相クロマトグラフィーの結合相の選択性の違い

基本的には、試料の要件に一致する化学結合相を選択する必要があります。疎水性低分子を分析する場合は、C18 などの長鎖アルキル相を最初に選択する必要があります。C18 で保持力が強すぎる場合は、これよりもアルキル鎖の短い C8 または C3 を選択します。通常は、C8 は C18 と選択性が類似していますが、保持力はわずかに低下します。非常に疎水性の高い分子では、C3 のようにアルキル鎖が非常に短い相を使用することをお勧めします。分析種の分子が芳香族の特性を持ち、アルキル相では十分に分離できない場合は、フェニルまたはジフェニルなどの芳香環が結合された相を使用することができます。希望の分析種の極性が強く、一般的な逆相クロマトグラフィーの充填剤に保持されない場合や、保持がわずかな場合は、HPLC モードの代わりに親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) の使用を検討してください (93 ページの HILIC に関する項を参照)。メソッド開発中に高い pH を使用する必要があることがわかった場合は、Extend-C18 などの高 pH 用に設計された固定相や、PLRP-S などのポリマー充填剤を選択してください。短鎖結合相を使用したシリカゲルカラムは、長鎖の結合相と比較してシリカが溶解しやすいため高い pH 値では不安定になることがあります。

## 逆相クロマトグラフィーの移動相溶媒の選択

逆相 LC の一般的な移動相には、水と、有機溶媒としてアセトニトリルまたはメタノールが使用されます。使用頻度は下がりますが、テトラヒドロフラン (THF) やイソプロパノールなどの有機溶媒もあります。常に HPLC グレード以上の溶媒を使用することをお勧めします。UHPLC については、LC/MS グレード以上の溶媒だけを使用することをお勧めします。選択性と試料の保持力は、移動相によって大きく異なります。試料の溶解度も選択性と保持力が異なる可能性が高く、使用できる溶媒や溶媒の組み合わせに影響を与えます。

逆相クロマトグラフィーでは、移動相の水系部分の pH とイオン強度の両方が、分析条件の小さい変動に左右されない堅牢なメソッドの開発において重要です。イオン性化合物では、一般的な分析種の保持は pH によって大幅に変化します。そのような逆相システムで保持と選択性を安定化させるには、pH を制御することが非常に重要です。一般に pH の範囲が 2~4 の場合は、pH の変動に対する保持の変動が軽微であるため、塩基性化合物や弱酸性化合物を含むほとんどの試料に対するメソッド開発を開始するには、この pH 範囲を推奨します。再現性を得るためには、使用する pH が、分析対象成分の  $pK_a$  または  $pK_b$  の  $\pm 1$  pH 以上離れていなければなりません。

分析種の  $pK_a$  が不明なことがあるため、複数の移動相の pH の試験を行うことで最適な結果が得られることがあります。ほとんどの逆相カラムは pH 2~8 あるいはそれ以上で使用できるため、広い範囲で分離のための最適な移動相 pH を見つけることができます。移動相の pH は、最も高い精度と再現性の結果を得るために、有機溶媒と混合する前に測定し調整してください。

### 移動相の通液

購入した直後の新しいカラムを使用する場合は、出荷時の溶媒と混和性がある溶媒を使用してください。緩衝液がカラム内部で沈殿しないように、100% 有機溶媒で出荷された、または保存されていたカラムに逆相分析のための緩衝液をそのまま流さないでください。最初に緩衝液を含まない移動相でカラムを平衡化させてから、緩衝液が含まれる移動相で平衡化することをお勧めします。CN と NH<sub>2</sub> のカラムは、いずれも順相および逆相溶媒が使用できるため、溶媒が出荷時溶媒と混和性があることを確認してから、平衡化します。順相カラムを逆相カラムに変換する場合は、イソプロパノールなど、両方に混和性のある溶媒でフラッシュする必要があります。次に、目的の移動相で平衡化します。溶媒の混和性については、巻末の「有効な参考資料」の章を参照してください。

HPLC カラムで発生する問題の潜在的な原因は移動相であると考えてください。潜在的な問題を回避するには、参考資料の章の一般的な溶媒の特性や混和性に関する情報が含まれる表 (135 ページを参照) を確認してください。

### 移動相および移動相添加剤のトラブルシューティング

図 45 に正常な性能を持つ古いカラム (カラム 1) で最初に行った分析の例を示します。新しいカラム (カラム 2) を使用したところ、主要な成分の分離度が大きく異なっており、新しいカラムがこの違いの「原因として特定」されました。しかし、新しい移動相の緩衝液を調製すると右側のクロマトグラムに示すように分離度が正常に戻りました。この場合は、添加剤として使用した TEA またはリン酸に問題が絞られました。これらの試薬は長い間使用されており、変化や汚染が発生していました。緩衝液の使用方法や移動相の詳細については、次の項を参照してください。

試料は、移動相と同じ溶媒で調製することが重要です。移動相よりもかなり強い溶媒を使用したときに発生するバンドの広がりとピーク割れについては、48 ページの例を参照してください。

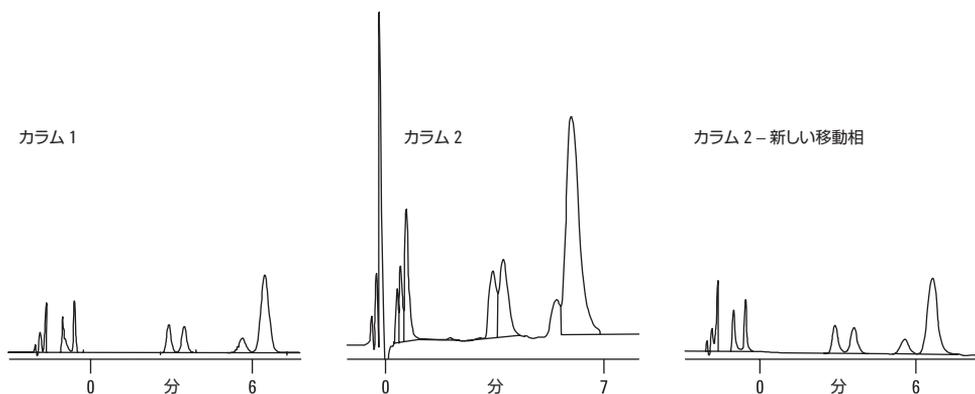


図 45. 移動相の違いが結果に大きな影響を与えることがある

### 移動相の混合

場合によっては、ラボでの混合方法などの単純な原因によって移動相に違いが生じることがあります。例えば、50/50 メタノール/水の混合溶液をオフラインで調製する場合は、混合する前に個々の体積をガラス容器に個別に計量することが重要です。これは、MeOH:H<sub>2</sub>O の混合溶液の体積が、個々の成分の体積の和よりも小さくなるからです。1 つの容器を使用して混合した場合は、混合溶液の総体積はこれとは異なります。したがって、これらの 2 つの移動相を異なる方法で調整すると、同一の組成にはなりません。

### 移動相の脱気

移動相を脱気することも重要です。溶媒中に溶存するガスが溶液から出ること、流路に気泡が形成され、ポンプや検出器の性能に影響を与える可能性があります。

幸いに、ほとんどの LC システムにデガッサが内蔵されています。ただし、デガッサを使用しない、デガッサがない、または正しく動作していない場合は、ヘリウムをバブリングするか、またはその他の手段を使用して必ず脱気してください。

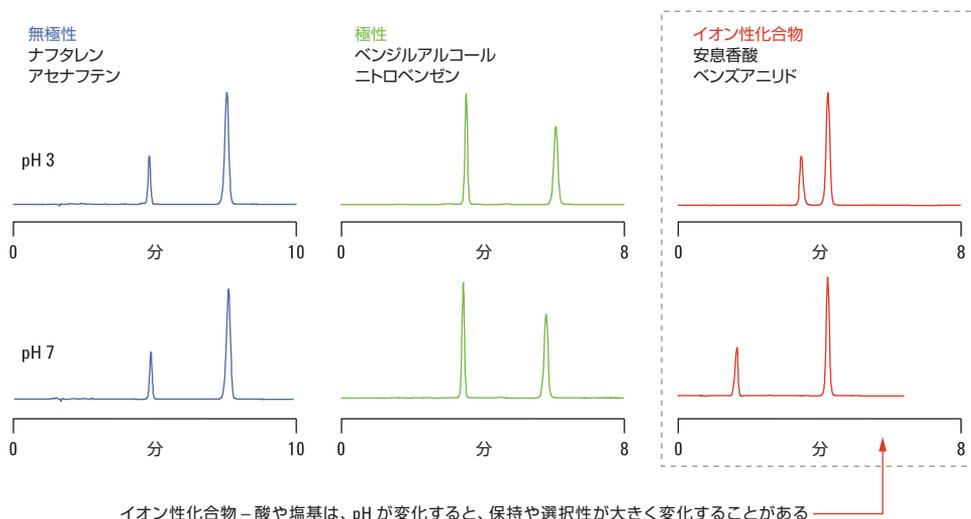
### 緩衝液による移動相の pH の管理

移動相の pH がさまざまな面でクロマトグラフィーに影響を与えることがあります。分析対象成分に応じて、pH が選択性、ピーク形状、保持に影響を与えることがあります。無極性に近い化合物や中極性の化合物であれば、一般に pH は分離度や保持に大きな影響を与えません。

pH が分離度に与える影響の簡単な例については、図 46 を参照してください。左側は、無極性試料を pH 3 および pH 7 で分析したものです。

2 つのクロマトグラムに大きな違いがない点に注意してください。中央の極性化合物では、C18 カラムへの保持が弱くなる傾向があります。pH が化合物の保持時間やピーク形状にはほとんど、またはまったく影響を与えないことに注意してください。

酸や塩基などのイオン性化合物を分析している場合は、pH が変化すると、保持や選択性が大きく変化することがわかります。右側の安息香酸とベンズアニリドの例で、保持係数が pH によって変化していることに注意してください。中性化合物であるベンズアニリドの保持はほとんど変化しませんが、安息香酸は、pH が 3 から 7 に変化すると保持に大きな変化が発生します。安息香酸の  $pK_a$  を大きく上回る pH 7 では、解離して安息香酸陰イオンとして存在します。この状態はイオン性が高く、水系移動相との親和性が高くなります。主に非解離状態で存在する pH 3 と比較すると、かなり速くカラムから溶出します。



イオン性化合物 - 酸や塩基は、pH が変化すると、保持や選択性が大きく変化することがある

図 46. pH および分離度

イオン性化合物の分析種のメソッド開発を検討している場合は、非イオン性分析種がイオン性分析種よりも保持力が強いことを認識しておくことが重要です。

酸性の分析種がある場合は、分析種がイオン化されないように、移動相の緩衝液に低い pH を選択します。分析種の  $pK_a$  を認識しておく、移動相の pH を効果的に選択することができます。緩衝液は、緩衝液のイオンが持つ  $pK_a$  の  $\pm 1$  pH 単位の範囲で効果があるため、移動相を最適化するためには多少の柔軟性があります。例えば、酢酸の  $pK_a$  は 4.8 であるため、pH 3.8~5.8 で緩衝作用があります。ギ酸はこれよりも酸性度が高く、pH 2.8~4.8 で緩衝作用があります。低い pH で酸性分析種がイオン化されない場合は、緩衝液の選択性が広がります。緩衝液の詳細については、138 ページの章を参照してください。

塩基性化合物が含まれる場合は、カラムに適さない高 pH で非解離状態が存在する可能性があります。ただし、多くの塩基性化合物は低い pH で十分に保持されます。非解離状態の方が保持力が高くなりますが、これは実際ではなく、すべての塩基性化合物に必要なわけでもありません。

\*一般に、「非イオン性」は、「イオン抑制」という言葉に置き換えることができます。

酸および塩基性化合物の保持に影響を与えるその他の問題として、シリカ表面のシラノールが中性域でイオン化することがあげられます。通常は、これらのシラノールは脱プロトン化され、負電荷を持つようになります。この結果、アミンなどの正電荷を持つ化合物の保持が強まり、一種の二次的な相互作用であるイオン交換相互作用が発生することがあります。最終的に、逆相カラムで期待されている分配による保持以外に、相互作用によるピークの広がりやピークのテーリングが頻繁に発生します。このような状況は低い pH では発生することはありません。これが、イオン性化合物の逆相クロマトグラフィーによる分離に酸性の移動相が好まれるもう 1 つの理由です。

#### 緩衝液を選択するためのヒント

- HPLC で正しい分析を行うために完全にイオン化を抑制する必要はありません。移動相に十分な緩衝能がある場合は、通常は 90 % の抑制で十分です。
- 移動相の緩衝能は、調製時のモル濃度と、希望する移動相の pH と緩衝イオンの pKa との近さに関連しています。
- 緩衝作用は、通常は緩衝イオンが持つ pKa の  $\pm 1$  pH 単位で有効です。一般的な緩衝液の pKa および pH の範囲の表については、138 ページの参考資料の章を参照してください。
- 分析技術者は、pH を変更するために緩衝能のない移動相を選択することもできます。酸性分析種のクロマトグラフィー分析を、単純な酸性溶液を使用して行うこともめずらしくありません。そのような溶液では酸濃度が十分であるため、必要する pH よりも大幅に低い値に設定することができます。
- アルカリ側では選択肢は制限されます。TEA (トリエチルアミン) は水への可溶性が低く、高い pH (11) を持っています。アンモニア自体は高い可溶性を持っていますが、ほとんどのカラムには pKa が高すぎます。

#### UV 検出器に一般に使用される緩衝液

緩衝液の選択は検出方法に大きな影響を与えます。UV 検出器を使用する分析技術者の立場からは、緩衝液は測定に使用する波長で十分な透過性を持っている必要があります。UV カットオフが 220 nm 未満の緩衝液が最適です。一般に使用される多くの緩衝液、特に HPLC グレード以上のものは必要な UV 透過性を備えています。例えば、リン酸とリン酸塩は UV 透過性に優れているため、ACN (アセトニトリル) とともに、多くの分析技術者にとってメソッド開発の適切な出発点となります。塩基性化合物の場合は、TEA-リン酸をその代わりに使用できます。リン酸塩には有機溶媒への溶解性に限界があるため (リン酸塩の欠点)、リン酸塩を含む移動相では有機溶媒比が 70 % を超えないようにすることをお勧めします。幸運なことに、通常はイオン化制御が必要な化合物は極性が高く、非解離状態でもほとんどの逆相カラムから溶離するため、非常に高い有機溶媒比は不要です。酢酸塩はギ酸塩や TFA と同様に、約 240nm 以下の波長では UV バックグラウンドの原因となり、高濃度では 210 nm 未満での使用が非常に困難です。UV 検出を利用する分析技術者は、低波長からクロマトグラムおよび 3D スペクトルを得るため、ACN/リン酸塩の組み合わせは多くの開発要件を確実に満たします。

ヒント : 138 ページの参考資料の章に、一般的な緩衝液の UV カットオフを示す表が含まれます。波長が下がり、緩衝液の UV カットオフに近付くにつれて、検出の問題が発生し始めます。

## LC/MS についての注意事項

MS 検出器を LC に接続して使用する場合は、イオン源の汚損を防ぐために、移動相から、また場合によっても試料からも不揮発性物質を除外することがきわめて重要です。これは、移動相が噴霧され、その一部がイオン源で乾燥されるからです。例えば、試料マトリックス中の大量の無機塩が溶媒先端に出てきてイオン源に入ることがあります。UV 検出で開発したメソッドを後に LC/MS でも使用しなければならないことがあるため、多くの分析技術者は、リン酸、リン酸塩、不揮発性の対イオン、またイオン源でイオン化抑制の原因となることがわかっているすべての揮発性修飾剤 (TFA と TEA は最も一般的な例) の使用を避けています。

その結果、今日では、緩衝液として、ギ酸および酢酸とそのアンモニウム塩を主に使用する傾向が強くなっています。これらは有機溶媒への溶解性が高く、揮発性があり、HPLC または LC/MS に適した高純度のものがありますが、低波長で UV 検出する場合には大きな問題が発生します。緩衝液は水相と有機相に添加する必要がありますが、有機溶媒では吸収特性が異なるため、多くの場合はわずかに低い濃度の緩衝液 (通常は水相の 85 %) を有機相に加えます。さらに、ELSD (蒸発光散乱検出器) にも完全に揮発性のある移動相が必要なため、かつて UV や RID (示差屈折率検出) で分析を行っていた多くのアプリケーションにも、LC/MS が普及する以前の一般的な緩衝液が使用しにくくなってきました。

化合物	式量 <sup>1</sup>	密度	およその濃度 <sup>2</sup>	モル濃度 (M)	規定度 (N)	1000 mL の溶液を調製するために必要な体積 (mL) <sup>3</sup>	
						1 M	1 N
酢酸 (CH <sub>3</sub> COOH)	60.062	1.05	99.8 %	17.4	17.4	57.5	57.5
ギ酸 (HCOOH)	46.026	1.13	90 %	23.6	23.6	42.5	42.5
水酸化アンモニウム (NH <sub>4</sub> OH)	35.046	0.90	56.5 % <sup>4</sup>	14.5	14.5	69	69

1. 原子量表に基づく (32 °C = 12)

2. 代表値、w/w %

3. 最も近い 0.5 mL に丸める

4. 28.0 % w/w NH<sub>3</sub>

表 8. LC/MS の移動相緩衝液

サンプルのろ過には、溶出物の少ない Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタをご利用ください。LC/MS での使用に適していることを示す証明書付きです。



図 47. Syringe filters

pHに関するいくつかの注意点：

- 非解離状態の分析種 (低 pH における酸や高 pH における塩基) の方が強く保持されます。
- シリカ上のシラノールは中性 pH でイオン化し、塩基性分析種の保持を強めます (イオン交換相互作用)。
- メソッド開発時の保持と選択性を最適化する移動相 pH を選択します。
- カラム寿命を伸ばすために極端な (非常に高い/低い) pH 値は避けます。pH 値を変えるために緩衝液を使用することができます。緩衝液は一定の pH を維持し、再現性を向上します。
- 移動相に使用する緩衝液を選択する場合は検出器を必ず考慮してください。UV 検出器で正しく機能する緩衝液も MS 検出器では正しく機能しないことがあります。
- Eclipse Plus は幅広い pH 範囲 (pH 2~9) で使用することができます。
- 高 pH (Extend-C18、高分子相) および低 pH (StableBond、高分子相) については他の選択肢もあります。

酢酸トリエチルアミンまたはリン酸トリエチルアミンを混合する場合は、最初にリン酸または酢酸を入れ、ここにトリエチルアミンを加えます。これは、純粋なトリエチルアミンは水に溶解しないからです。

緩衝液の混合に関する推奨事項：

1. 適切な pH 計を使用します。対象とする pH を挟んで pH 計のキャリブレーションを行います。これは、pH 計を使用して高い信頼性で pH を測定するために重要です。
2. 試薬ができる限り新しいものであることを確認します。
3. 必要となる最終的な体積に非常に近い量の液体を用意して固体を溶かします。混合液を必要な pH に調整した後、追加の液体を加えて、溶液を正しい体積にします。
4. pH の調整は、有機溶媒を加える前に水溶液で行う必要があります。有機溶媒を加えた後に高い信頼性で pH を測定する方法はありません。
5. 緩衝液が完成したら、HPLC で使用する前にろ過し、水や固体の緩衝液中の粒子を取り除きます。ほとんどの HPLC アプリケーションには 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルタを、UHPLC アプリケーションには 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルタを使用します。

ヒント：酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムなどの一部の塩は特に吸湿性が高いため、長い間棚に保管しておくと、開封後の使用期間が長いと、水を含むようになります。メソッド開発では、これらの塩のモル濃度をさまざまに変えて、このような避けられない変動に対応できる十分な堅牢性をメソッドが持っていることを確認するようお勧めします。

## 緩衝液を使用した移動相のトラブルシューティング

二次的な相互作用がピーク形状や保持の問題の原因であるかどうかを確認するには、移動相の pH を変えます。トリフルオロ酢酸 (TFA) の添加が有効ですが、移動相に添加する成分が増えるとエラーが発生する可能性が上がる点に注意してください。添加剤を使用する前に、まず低い pH を使用してみます。pH を変えた移動相の出発点としては、「単純にしておく」ことが重要です。

アセトニトリルが好まれる理由の 1 つに、UV カットオフが 190 nm と低い点があります (メタノールは 205 nm、THF は 212 nm)。215 nm における THF でさえも、グラジエントで使用するには難しいほどの高い吸収を持っています。酸素に触れないように保護された新しい THF では非常に良い結果が得られますが、維持することは困難です。蓋を開けてから時間が経過すると UV 吸光度が高くなります。グラジエントの範囲に依りて、THF の吸光度は最大で 2 AU までになります。254 nm などの高い波長ではこのような問題は発生しません。

溶媒の選択と緩衝液についての検討は重要です。1 % 酢酸の UV カットオフは 230 nm、0.1 % TFA は 205 nm です。6 ページの「クロマトグラフィーの重要な概念」の章を参照してください。

歴史的に、多くのクロマトグラフィーのユーザーはリン酸緩衝液を使用するか、リン酸を希釈してきました。これらは、酸性 pH と中性 pH の両方で優れた UV 透過性を示します。ただし、リン酸には溶解性の問題があり揮発性であるため、質量分析装置での使用には適していません。特に、沈殿が発生する可能性がある高濃度の有機移動相では、約 25~50 mM を超えるリン酸緩衝液の使用は避ける必要があります。

理想的には、移動相 A と B の両方で同じレベルの緩衝液を使用する必要があります。つまり、グラジエントで有機溶媒の濃度だけが変化する場合に最高のクロマトグラフィーが得られます。もちろん、常に例外はあります。場合によっては、緩衝液を使用する必要はなく H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> で十分です。

### トラブルシューティングの例：ベースラインのドリフト

一部の緩衝液の吸光度は水とアセトニトリルでは異なるため、グラジエントが形成されるとドリフトが発生します (図 48 を参照)。TFA はそのような例の 1 つです。TFA を使用する場合は、溶媒 A では 0.1 % TFA を、溶媒 B では約 0.09 % を使用します。

図 49 では、もし移動相 A と B の両方に 0.1 % TFA を使用すると、215 nm でグラジエントのベースラインがドリフトします。B の TFA 濃度を調整して 0.09 % のように低い値にすると、ベースラインを水平にし、問題を解決することができます。254 nm などの高い波長の使用もこの問題の解決に役立ちますが、検出可能性の理由から、この方法を常に利用できるわけではありません。

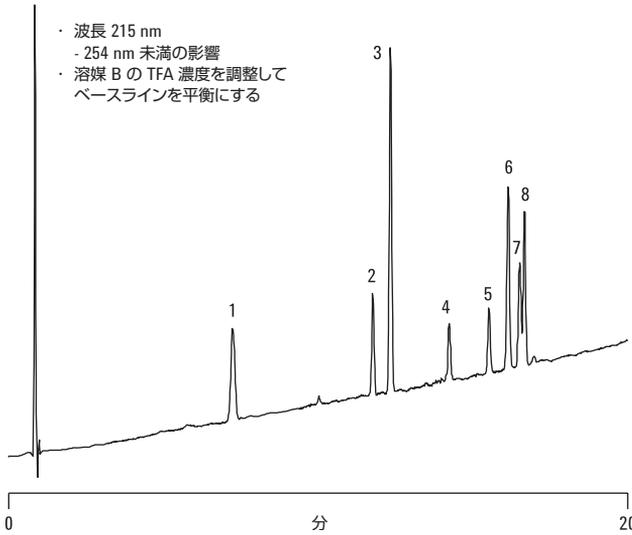


図 48. ベースラインに与える TFA の影響

ピークの特定

1. フェナセチン
2. トルメチン
3. ケトプロフェン
4. フェノプロフェン
5. イブプロフェン
6. フェニルブタゾン
7. メフェナム酸
8. フルフェナム酸

条件

カラム: Eclipse XDB-C8、  
4.6 x 150 mm、5 μm  
 溶媒 A: 0.1 % TFA 水溶液  
 溶媒 B: 0.1 % TFA ACN 溶液  
 温度: 35 °C  
 グラジエント: 30 分間で 5~100 %B  
 流速: 2.0 mL/min

図 49 では平坦なベースラインを持つクロマトグラムが得られています。  
 (図 48 とは別の分析です)

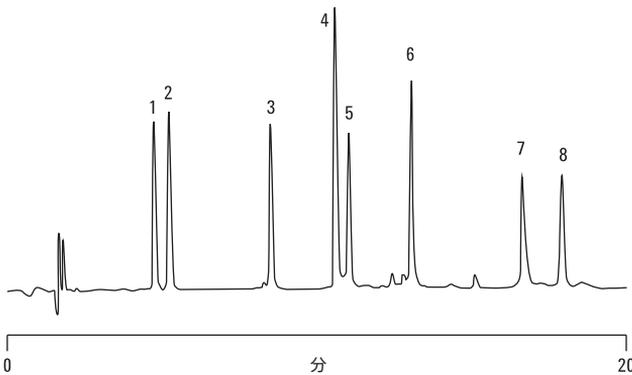


図 49. 望ましい平坦なベースラインを持つグラジエント分離

ピークの特定

1. ロイシンエンケファリン
2. アンジオテンシン
3. リボヌクレアーゼ A
4. インスリン
5. チトクローム C
6. リゾチーム
7. ミオグロビン
8. 炭酸脱水酵素

条件

カラム: ZORBAX 300SB-C3、  
4.6 x 150 mm、5 μm  
 グラジエント: 19 分間で 15~35 %B  
 移動相: A: 95:5 H<sub>2</sub>O:ACN +  
0.1 % TFA  
 B: 5:95 H<sub>2</sub>O:ACN + 0.085 %  
TFA

移動相 A に 0.1 % TFA を、B に 0.085 % を使用します。

その結果、良好であるだけでなく、ピークの積分にも有効な水平なベースラインが得られました。

### トラブルシューティングの例：高い pH によって発生する広がりまたはピーク割れ

図 50 に、高 pH での使用を意図して設計されていない ZORBAX StableBond カラムの劇的な例を示します。分析技術者が 0.2 % TEA が含まれる移動相を用意し、pH を下げるのを忘れたため、この移動相の pH は実際には 11 になっていました。一連のクロマトグラフィー分析を一晩実施し、翌日確認したところ、30 回の注入後に右側のクロマトグラムが得られました。pH 11 によってシリカが溶解され空隙が形成されたため、破壊的なバンドの広がりが発生しています。新しいカラムに交換する以外の選択肢はありませんでした。

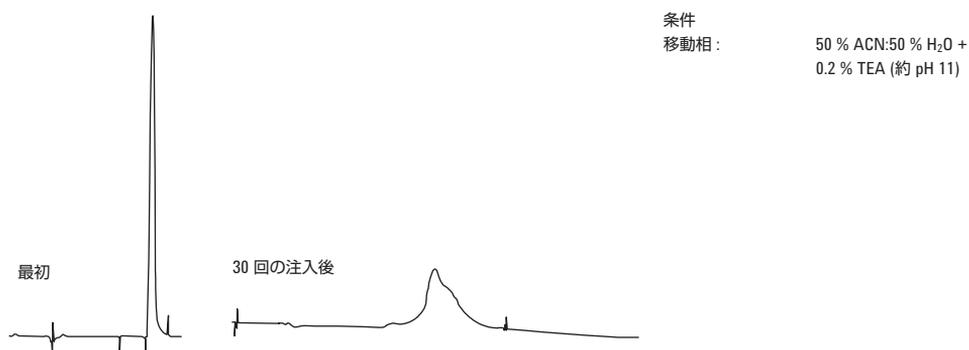


図 50. 高 pH におけるシリカ系カラムの使用の影響

したがって、pH を主要なメソッド開発パラメータと見なす必要があります。これは、pH が分析種の保持とカラムの寿命に大きな影響を与えるからです。pH を制御し、一定に維持できる緩衝液を使用することをお勧めします。

### トラブルシューティングの例：移動相修飾剤と選択性

移動相の緩衝液や添加剤を選択する場合は、その緩衝能の範囲が分析に必要な範囲をカバーしていることを確認します。緩衝液が有効に機能する範囲を確認し、その範囲 (通常は、緩衝液の共役酸 (または塩基) の pKa の  $\pm 1$  pH 単位まで) を使用します。一般的な緩衝液の範囲については、巻末の参考資料の章を参照してください。

低 pH アプリケーションのいくつかのメソッド開発スキームを確認します (図 51)。このスキームでは、低 pH で ZORBAX Eclipse Plus C18 を使用します。緩衝液または弱酸性の溶液を使用し、有機溶媒比を調整して、ピーク保持力を制御します。

中性 (約 pH 4~7) の方が良好な選択性を提供し、試料との適合性が高い可能性があります。中性域で分析条件を検討する方法は低 pH の場合と同じです。Eclipse Plus は中性 pH で卓越した性能を提供します。選択性の向上を望む場合は、別の結合相を検討することもできます。

Eclipse Plus カラムはメソッド開発に理想的です。このカラムは 2~9 と pH 範囲が非常に広く、低 pH または中性 pH 範囲でのメソッド開発に理想的です。優れたピーク形状と効率性を提供します。

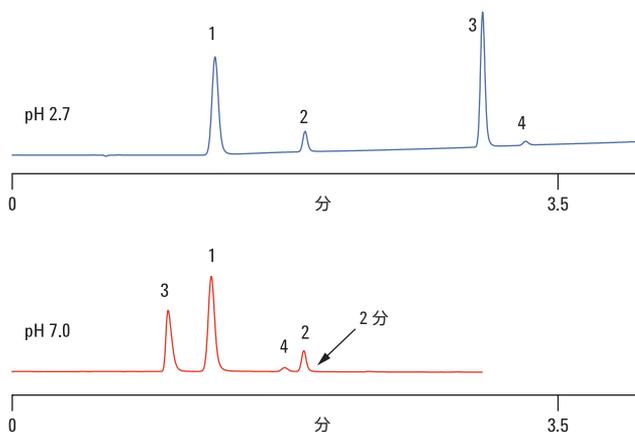


図 51. pH 2 と pH 7 における選択性の劇的な違い

ピークの特定

1. アセトアミノフェン
2. カフェイン
3. アセチルサリチル酸
4. 不明

条件

カラム:	Eclipse Plus C8, 4.6 x 50 mm, 5 μm, PN 959946-906
グラジエント:	3 分間で 10~60 %B
pH 2.7 -	A : 0.1 % 酢酸 B : 0.1 % FA ACN 溶液
pH 7.0 -	A 20 mM リン酸 ナトリウム、リン酸で pH 7.0 に調整 B : ACN
試料:	「一般的なエキセドリン 錠剤」

中性の範囲でも分離度の問題が解決しない場合は、高 pH の使用も検討してください。場合によっては、低 pH レベルまたは中性 pH レベルのアプリケーションでは正しく機能せず、希望する保持が得られないことがあります。高 pH のアプリケーションでは、非解離状態で分析することにより、塩基性化合物の保持を高め、選択性を向上することができます。

ZORBAX Extend-C18 は、高 pH の移動相への耐性が高い二座型カラムです。また Poroshell HPH-C18 と HPH-C8 の化学的構造は、pH 安定性を高める独自のプロセスによって Poroshell 120 粒子を化学変化させたものです。Poroshell HPH を使用した場合、ZORBAX カラムと Poroshell カラムはどちらも pH 11 まで使用でき、長寿命性にも優れています。低 pH でのメソッド開発と同様に、有機溶媒の濃度を調節して最適な分離度を実現できます。ここでは、逆相クロマトグラフィーのメソッド開発の推奨スキームについて詳しく説明します。



pH 計と電極

容易で信頼性の高い pH テスト

アジレントは幅広い種類の pH 計と電極を提供しています。これらの pH 計は、直感的な操作性と卓越した堅牢性をラボに提供します。詳細については、お問い合わせください。

低 pH < 3	中性 pH 7	高 pH > 9
領域 A	領域 B	領域 C
逆相 HPLC カラムのシリノールが解離していない低 pH でメソッド開発を始めることで、シリノール/塩基性化合物の相互作用を排除し、ピークテーリングを最小限に抑えます。	pH に多少の変化が生じてでも保持の変動を最小限に抑えるために、 $pK_a$ が少なくとも 1 離れた条件でメソッドを開発します。	塩基性化合物は遊離塩基として存在している可能性が高くなります。
低 pH では、塩基性化合物は正に荷電し、その保持は低下することがあります。	シリカ表面の SiOH 基は、pH 4~5 で SiO <sup>-</sup> になるため、テーリングが発生する可能性があります。	塩基性化合物の保持と分解能が高まります。
酸性化合物はプロトン化され、保持力が増します。	エンドキャッピングされたカラムを選択するか、TEA (トリエチルアミン、あまり望ましくない) などの添加剤を使用するか、または極性基内包型の結合相を使用して、相互作用を最小限に抑えます。	この領域では保持はほとんど変化せず、そのため堅牢なメソッド開発ができます。
通常、保持時間は pH の小さな変化に対して安定しており、堅牢なメソッドになります。	シリカの溶解は、革新的な結合技術や、シリカの分解は、革新的な二座型エンドキャッピング、金属含有量が低いためにシリノール活性が低い非常に高純度のシリカ (Rx-SiL) の使用により防止されます。	シラン、エンドキャッピング、Rx-SiL の使用、最適な移動相により防止されます。
LC/MS には、ギ酸や TFA などの揮発性移動相がよく使用されます。		水酸化アンモニウムなどを、高 pH での優れた揮発性移動相として使用できます。

表 9. シリカカラムのさまざまな pH におけるメソッド開発

## 逆相クロマトグラフィーのクロマトグラフィー条件の最適化

カラムサイズ、適切な固定相を持つカラム充填剤、移動相の溶媒および添加剤を選択したら、メソッドの最適化を開始する必要があります。最適化は最終的な目的によって異なります。品質管理のためのメソッドを開発している場合は、メソッドの変数を少なく抑えるためにインクラティック分離を開発します。最大の分離を達成することが目的で、時間の短縮を優先しない場合は、すべての成分を最大限に分離するために長いカラムを選択します。速度が重要な場合は、短いカラムと高い流速を使用します。保持レベルの異なるいくつかの分析対象成分が含まれる複雑な試料の場合は、インクラティック分離は実用的ではないため、グラジエントメソッドを開発し、最適化する必要があります。

条件の最適化についての次の 2 つのアプローチを検討します。

1. インクラティック (移動相の組成が一定)
2. グラジエント (移動相の強度を変化させる)

この説明では、主に二成分系溶媒システムを扱いますが、同じアプローチを三成分系または四成分系移動相でも使用することができます。一般的な名称として、逆相クロマトグラフィーの溶出力が弱い方の溶媒である水系溶媒を移動相「A」と呼び、有機溶媒比率が高い、溶出力が強い溶媒を溶媒「B」と呼びます。Bの割合を高めると、逆相クロマトグラフィーモードの保持力は一般に低下します。試料を分析できるメソッドがない場合は、HPLCメソッドの開発者は「試行錯誤」のアプローチを使用し、さまざまな移動相条件を試して、最適な条件を見つけ出します。

### インクラティックの最適化

インクラティックの最適化の一般的なアプローチは、適切な保持範囲に達するまで移動相の強度(%B)を変化させる方法です。このアプローチは「溶媒スカウティング」と呼ばれることがあります。単純な分離では、kの値を1~10にする必要があります。kが小さすぎると(<1など)、早く溶離するピークが保持されないピークやマトリクス成分と同時に溶出し、定量が非常に困難になったり、再現性が低下することがあります。さらに、kが小さいピークはその他のカラム効果の大きな影響を受け、ピーク幅が広がる場合があります。kの値が大きすぎると(>10など)、分離時間が過剰になり、広いピークによって検出下限が高くなる場合があります。

逆相クロマトグラフィーのインクラティックメソッド開発では、移動相の有機溶媒の割合を最大の値から開始し、徐々に下げていきます。移動相の強度を下げる前に、すべての成分をカラムから確実に溶離させることが重要です。成分がカラム上に残っていると、低い%B値で溶離し、次の分析に予期しない「ゴースト」ピークが現れることがあります。通常は、移動相%の変更は、+/-10%(90%B、80%B、70%Bなど)または+/-20%の単位で行います。最近の一部のソフトウェア(ChromSwordのChromSword、ACDのAutoChromなど)では、保持プロファイルが明らかになると、システムは最適な条件になるように迅速に自動調整を行います。手動の場合は、最適なインクラティック条件に近付くにつれて、変化させる単位を5%または3%に下げる必要があります。

移動相の成分「A」に高濃度の緩衝液(25mM以上など)が含まれる場合は、100%の「B(有機溶媒)」には注意が必要です。これは、%Bを下げて2つの溶媒系の混合を開始したときに塩が沈殿する可能性があるからです。

最適な保持が確立されたときに、対象のピークが完全に分離されない場合は、選択性( $\alpha$ )の向上を進めます。微調整して位置の近いピークを分離するには、いくつかの実験パラメータを調整しなければなりません。温度も変数として使用することができます。最新の機器はカラム温度制御機能を備えており、ほとんどの逆相カラムは60°Cまでの(場合によってはそれ以上の)温度に対する耐性を持っています。一般に、温度が上昇するにつれて、ピークの保持時間が短くなりますが、一部の成分は他の成分とは影響の受け方が異なり、選択性が変化することがあります。

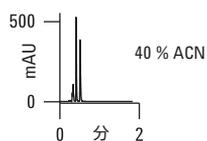
選択性を変えるために使用できる変数には次のようなものがあります。

1. pH(イオン化可能な化合物)
2. 緩衝液(イオン)強度
3. 緩衝液の種類(希望のpH範囲に応じて、リン酸や酢酸またはギ酸)
4. 移動相の有機溶媒(アセトニトリルからメタノールまたはその2つの混合液への変更など、三成分または四成分移動相溶媒混合液を使用可能)
5. 流速(通常は、流速を下げるとう率が向上するため、わずかに分離度が上がるが、常にそうなるとは限らない。次のヒントを参照)
6. イオンペア試薬の濃度(イオンペアRPCを使用している場合)

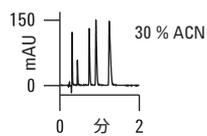
これらのパラメータを調整しても分離度が向上しない場合は、カラムまたは固定相の変更が最適な解決策になることがあります。カラムは長くなるほど理論段数が増え、分離に役立ちますが、分離度が $\sqrt{N}$ の割合だけで向上する点に注意してください。カラムの長さを2倍にすると、分析時間と溶媒消費量が2倍になり、感度が低下しますが、分離度は約40%向上するだけです。小さい粒子径を使用しても理論段数が増えますが、 $1/d_p^2$ の割合で圧力も上昇します。新しい固定相に変更するには(C18からフェニルへなど)、新しい溶媒スカウティングの実験が必要になり、多くの時間が掛かりますが、最高の分離度が得られることがあります。交換用に異なる固定相を持つ別の逆相カラムを何本か用意しておく便利です。

粒子径が小さくなると最適な流速が高くなるため、2  $\mu\text{m}$  未満のカラムでは、従来のカラムで使用している流速よりも高い流速を使用して分離を最適化する必要があります。

一連のスカウティング実験を確認し、5つの成分を持つ単純な多成分試料に最適なイソクラティック条件を探します。図52に、10%の単位で変化させた(有機溶媒比率40%、30%、20%)3つのクロマトグラムを示します。有機溶媒比率が高くなると、すべての成分が早く溶離しますが(図はなし)、有機溶媒比率が20%未満になると非常に時間が掛かります(図はなし)。有機溶媒比率30%では、5つのすべての成分が十分に分離され、分析が迅速に行われました。必要に応じて、30%付近で1~2%の小さい単位で有機溶媒比率を変化させ、この分離をさらに最適化することができます。これらの実験では、他のすべての条件を同一のままにし、有機溶媒比率だけを変更して、このイソクラティックメソッドを最適化している点に注意してください。使用したカラムはEclipse Plus C18、4.6 x 50 mm、1.8  $\mu\text{m}$  カラムです。このカラムを使用すると実験を迅速に実施し、メソッド開発のスカウティングプロセスも効率的に実行できます。



- ピークの特定
1. ビンドロール
  2. ジンピラミド
  3. プロプラノロール
  4. ジピリダモール
  5. ジルチアゼム



- ・ 良好な分離
- ・ 高速分析
- ・ No time wasted

条件  
 カラム: ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$   
 移動相: A: 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.0, B: ACN  
 流速: 2.0 mL/min  
 温度: 30  $^\circ\text{C}$   
 検出: UV 240 nm

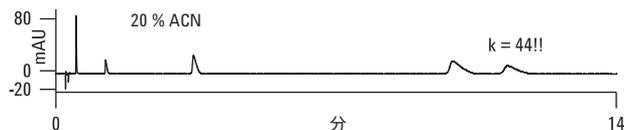


図 52. 有機溶媒比率の調整によるイソクラティックメソッドの最適化の例

分離度を向上するアプローチをさらに詳しく説明するために、図 53 に異なる固定相の比較を示します。各カラムには同一の最適な移動相を使用し、結合相だけを変えました。この場合は、従来の C18 ではなく、別の結合相で最適な分離が得られました。このアプローチは「固定相スカウティング」と呼ばれることもあり、1 つまたは複数の異なる固定相を使用して実行できます。多くのラボには、移動相が固定されたこのアプローチを使用する「ウォークアップ」LC および LC/MS システムがあります。カラム選択バルブを利用することでイソクラティックまたはグラジエント溶離を行い、さまざまな固定相で分離を開発、最適化することができます。

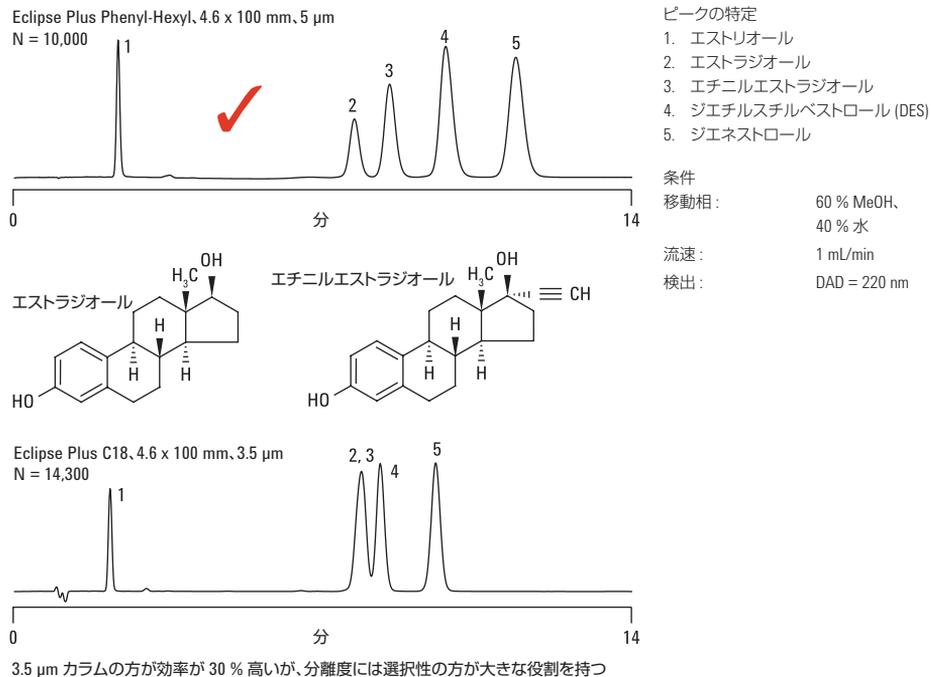


図 53. イソクラティックメソッドの選択性スカウティング

## グラジエントの最適化

幅広い成分が含まれる混合試料では、1つの移動相成分を選択しても満足な結果が得られないことがあります（一般的な溶離の問題）。例えば、極性の非常に高い試料成分は、逆相カラムから非常にすばやく溶離することがありますが、疎水性成分が疎水性の高い C8 または C18 相に非常に強く結合し、決して溶離しないことがあります。この問題の解決策は、徐々に移動相の組成を変化させることです（グラジエント溶離）。ほとんどの場合、最初の移動相は溶出力が非常に弱く（水の比率が高いなど）、有機溶媒の割合を徐々に（通常は直線的に）上げていきます（図 54）。

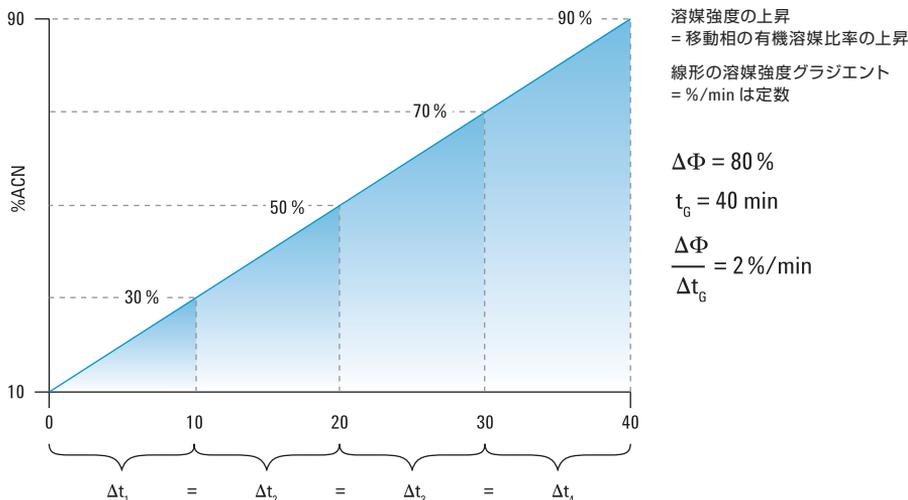


図 54. グラジエント溶離：この例では、アセトニトリルを 20% ずつ変化させる ( $\Delta t = 10$  分間)

次の 2 つの場合に、グラジエント溶離をメソッド開発に使用できます。1つのアプローチでは、グラジエントを使用して、逆相分離に最適なイソクラティックの開始条件を予測します。ほとんどのメソッド開発ソフトウェア (DryLab、ChromSword、AutoChrom など) には、少なくとも 2 つのグラジエントを実行し、最適なイソクラティック条件を予測する機能があります。次に、これらの条件を使用してイソクラティック分離をさらに最適化することができます。

2 つ目のアプローチはグラジエントメソッドの開発です。範囲の広い高速グラジエント (10 分間で 5~95 %B など) を使用して、分析対象成分の最適な範囲に的を絞ります。実際には、一部のソフトウェアシステムが、クロマトグラフィーデータシステム/コントローラとやり取りすることで分離を実際に最適化し、最適なグラジエント条件を作成します。ただし、対象ピークが溶離するときの組成に注意してこの操作を手動で行い、次のグラジエントを微調整して、グラジエント分離を適切な時間内で実行できるように  $k^*$  (グラジエントにおける  $k$ ) の範囲を調整することもできます。

次に、イソクラティックの最適化と同様に、適切な分離時間に達したら選択性を最適化する必要があります。

比較的複雑な 10 種類のサルファ剤混合物の分析の簡単な最適化については、図 55～57 を参照してください。最初に、図 55 に示すように、比較的高速の範囲の広いグラジエントを実行します。ここでは、250 mm のカラムを使用して、8～90 %B のグラジエントを 20 分間で実行します。この最初のクロマトグラムからいくつかの点がわかります。まず、12.5 分を経過した後はピークが溶出しません。これは、必要な %B を基準にすると 90 % が高すぎることを示します。また、ピーク 5 と 6、ピーク 7 と 8 を分離できませんでした。

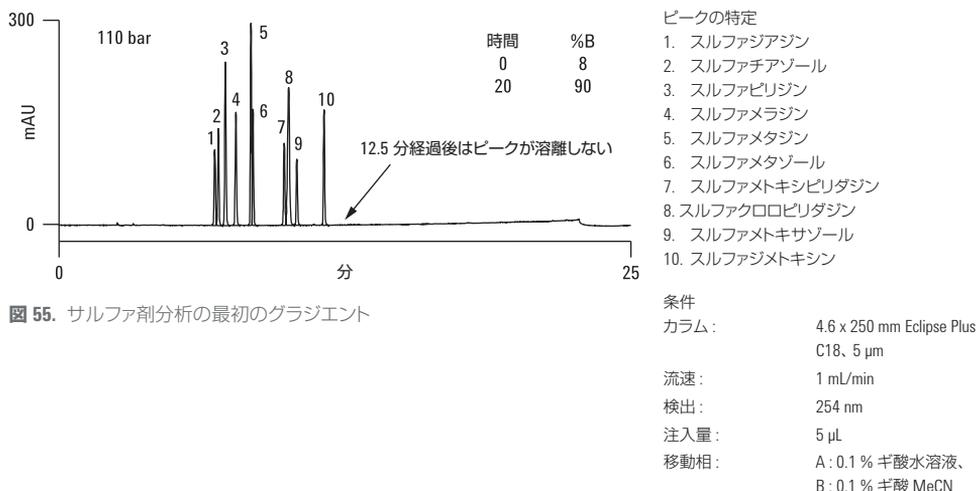


図 55. サルファ剤分析の最初のグラジエント

次の手順では、グラジエントの保持、 $k^*$  を大きくするために有機溶媒比率の範囲を狭めてグラジエント時間を延ばしました。その結果、図 56 のような最適な分離が得られました。このグラジエントを最適化するために中間の手順 (図なし) を実行しました。この手順では、最適な分離が得られるまでグラジエント時間と %B を調整します。

この時点で、10 個の成分についてベースライン分離が得られましたが、分析に 30 分を費やしています。カラムサイズと流速を最適化することで、グラジエントメソッドをさらに最適化することができます。カラムサイズと流速を変更する場合は、11 ページで説明したように、グラジエントをそれに応じて調整する必要があります。点に注意してください。

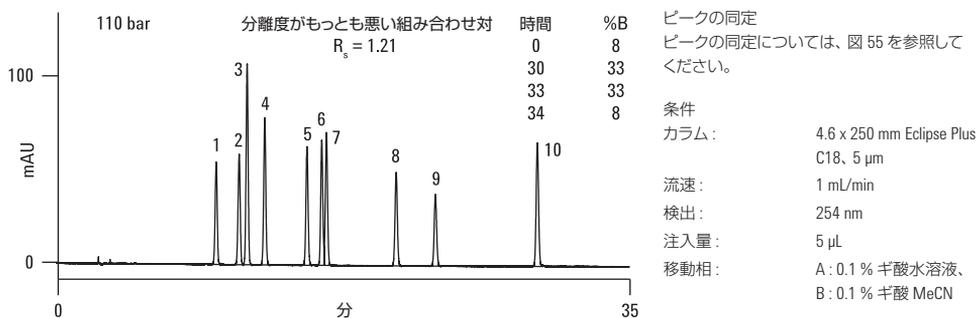


図 56. 250 mm カラムで最適化されたグラジエント

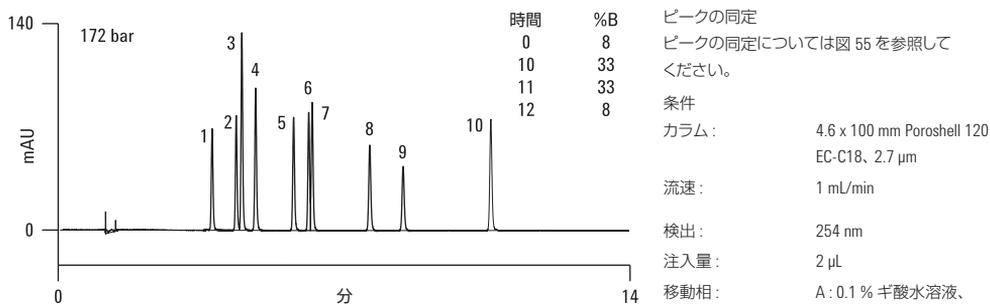


図 57. 250 mm カラムから 100 mm Poroshell 120 カラムへの注入ボリュームとグラジエントのスケールアップ

ここでは、長さ 100 mm の Poroshell 120 カラムを使用することで、分析時間が 10 分をわずかに超えるまでに短縮され、優れた分離度が得られました。流速をさらに最適化することで、分析時間をさらに短縮することができます。

### 逆相クロマトグラフィーのポリマー系カラム

ポリマー系カラムは「困難な」試料の分析に大きなメリットをもたらし、化学的安定性と極端な pH における安定性が優れています。これらのカラムには活性部位がなく、ポリマーが持つ特性により、固定相は極端な pH 環境でも溶解しません。

ポリマー系カラムを使用した逆相グラジエント分離では、0.1 % TFA を含む ACN/水径の移動相でグラジエントのスクリーニング (5~95 % ACN) を行うのが適切です。この場合も、グラジエントを変更し、分析対象成分が溶出する位置に応じてすべての成分の分離を向上させることができます。

ポリマー系充填剤には、酸性、中性、および塩基性移動相を使用することができます。例えば、合成ペプチドを、4 つの異なる pH レベルで ACN を使用してスクリーニングすることができます (0.1 % TFA, pH 5.5 の 20 mM 酢酸アンモニウム、pH 9.5 の 20 mM 炭酸アンモニウム、pH 10.5 の 20 mM 水酸化アンモニウム)。さらに複雑な試料では、溶解度の限界や夾雑成分が原因で、希望の純度や収率、またはその両方を達成することが難しい場合があります。ペプチドの正味荷電は緩衝液の pH によって異なり、等電点 (pI) では電荷ゼロとなります。したがって、逆相 HPLC では、移動相の pH を変更すると、試料や密接に関連する成分の正味荷電も変化し、その結果、保持や分離の選択性も変化します。

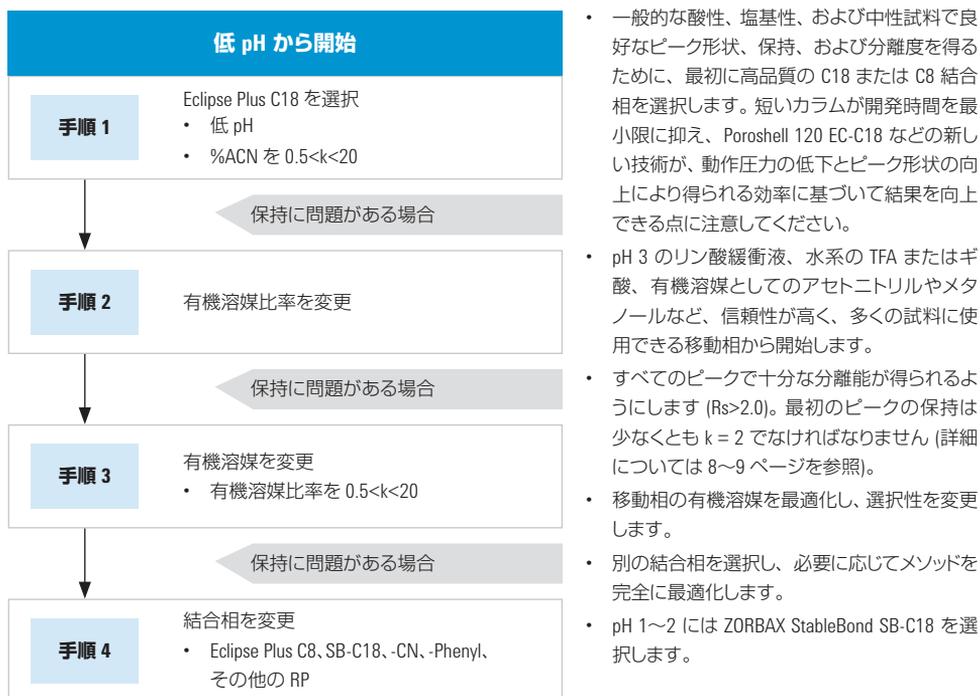
## 逆相クロマトグラフィーの「実践的な」イソクラティックメソッドを開発するためのフロー

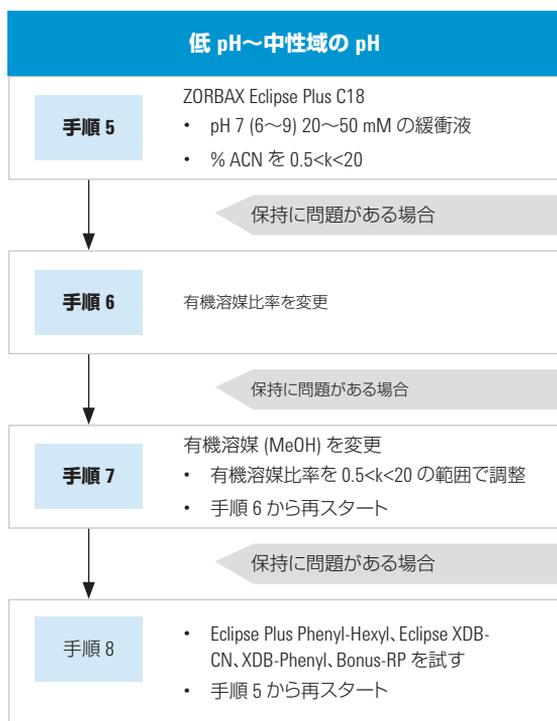
最も頻繁に使用されるメソッドの開発方法は「実践的な」アプローチです。図 58 に、このアプローチを使用したメソッド開発の流れを示します。この方法では、特定のカラムまたは結合相を選択することで希望のメソッド開発スキームに従うことができます。移動相の変更は、pH の調整によって、または別の有機溶媒の使用によって行います。

メソッド開発ソフトウェアを使用することもできます。何回か実験を行い、最適なメソッドについての予測を得ます。

複数のカラムや複数の移動相を手動または自動で評価する方法を選択することもできます。ここでは、異なる移動相と複数の異なるカラムを接続し、さまざまな組み合わせを試してみます。

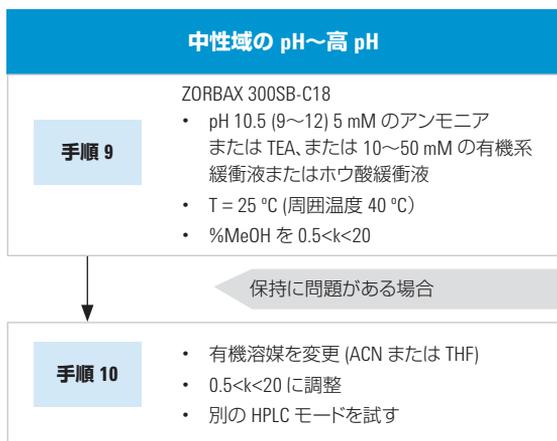
ヒント : ZORBAX Eclipse Plus カラムは、幅広い pH 範囲でメソッド開発を行うための、特に堅牢で柔軟性の高いカラムです。





中性域の pH は優れた選択性を提供：

- 試料との適合性が向上する可能性があります。
- 中性域の pH を検討する方法は低 pH の場合と同じです。
- ZORBAX Eclipse Plus および Poroshell 120 カラムは、中性領域で卓越した性能を提供します。
- 適切な緩衝液を使用しているときに (中性域の pH では酢酸アンモニウムまたはギ酸、低 pH ではリン酸緩衝液、リン酸、ギ酸、および TFA)、選択性を向上させたい場合は別の結合相も検討する必要があります。



高い pH を検討する理由：

- 電荷を持たない状態で分析することにより、塩基性化合物の保持を向上させる
- 選択性を向上させる

図 58. メソッド開発のフローチャート

高 pH での緩衝液の使用に関する注意：緩衝能によっては、これらの緩衝液は CO<sub>2</sub> を非常に吸収しやすく、緩衝液に炭酸塩が加わることによって pH が変化します。これを防止するには、アスカライトトラップの使用以外には、移動相の容器を覆って空気が入らないようにすることが唯一の方法です。

## 従来のカラムから高効率カラムにメソッドを変換する際のヒント

UHPLC/Fast LC 用の高効率カラムは分析速度と分離度の向上に役立ちます。使用している機器の構成に応じて、これらのカラムを最大限に活用するには多少の調整が必要な場合があります。

Poroshell 120 カラムは外径 2.7  $\mu\text{m}$  の粒子を使用していますが、これらはソリッドコアと多孔質シェルを持つ表面多孔性粒子です。多孔質シェルへの、またはシェルからの拡散が高速であることと非常に均一性の高い充填層により、これらのカラムは 2  $\mu\text{m}$  未満の粒子に匹敵する分析性能を提供しますが、圧力は 2.7  $\mu\text{m}$  の粒子程度に抑えられています。最大 600 bar の圧力で使用できるため、Poroshell 120 カラムを使用して UHPLC の性能を最大限に引き出すことができます。2  $\mu\text{m}$  未満のカラムは 1300 bar の圧力まで使用することができます。

この高い効率により、非常に狭いピークが高効率カラムからかなり迅速に溶離します。最近の HPLC 機器やデータシステムはこれらの粒子のメリットを活用することができますが、最高の結果を得るためには機器の構成に注意することが重要です。

これらのカラムの選択性は同様の修飾がされた全多孔性充填剤などの固定相と非常に似ているため、メソッドを変換し、優れた結果を得ることは容易です。日常的な LC の最適化の一部を確認するだけです。

メソッドの変換手順：

- 機器が既に高効率カラム用に構成されていることがあるため、機器に付属の仕様と手順を確認します。構成されていない場合は、作業を続けます。
- データサンプリングレートを最適化します (高速のレスポンスタイムを持つ 40 Hz 以上の検出器)。高速の Poroshell 120 カラムでは、2  $\mu\text{m}$  未満のカラムで得られるものと類似した狭いピークを期待できます。検出器を最速に設定し、次に 2 番目の高速設定に変更して、分離の違いを評価します。詳細については、48 ページを参照してください。
- セミマイクロまたはマイクロフローセルを使用します。Agilent 1200 の標準フローセルの光路長/ボリウムは 10 mm/13  $\mu\text{L}$  です (すべての検出器のフローセルが同一ではない点に注意)。これによって、Poroshell 120 カラムを使用した場合に得られる性能が低下します。最高の性能を得るためには、セミマイクロ (6 mm/5  $\mu\text{L}$  またはマイクロ (3 mm/2  $\mu\text{L}$ )) などの小容量フローセルをお勧めします。一般に、フローセルのボリウムが小さくなるほど光路長が短くなり、感度も低下します。一部の小容量フローセルが、絶対ピーク高さを下げる光路長の短縮によってこれを達成していることに注意してください。
- 機器の配管ボリウムを最小化します。試料が通過するボリウムがわずか 1/2 になるため、赤 (内径 0.12 mm) の配管を緑色 (内径 0.17 mm) の配管の代わりに使用します。この結果、カラム外のバンド拡散を抑えることができます。接続ができる限り短くなっていることを確認します (詳細については 42 ページを参照)。配管の変更が必要な箇所が 3 または 4 箇所あるため、必要な接続の長さにご注意ください。
  - オートサンブラのニードルシート
  - オートサンブラからカラムコンパートメント (TCC) まで
  - TCC からカラムまで
  - カラムからフローセルまで (一体型フローセルのインレットキャピラリーの内径を含む)

メソッドで高温を使用していない場合は、ショートカットをしてオートサンブラをカラムに直接接続し、カラムからフローセルに接続することができます。この結果、カラム外ボリュウムを排除できます。温度コントロールしていない場合は、分析対象成分によってはこの操作が原因で問題が発生することがあります。これらの特定の配管はすべて、必要な長さをものをアジレントから注文することができます。

- 正しい接続を行います。** Swagelok フィッティングをフロントおよびバックフェラルと共にお勧めします。このフィッティングを使用すると、LC システム全体に最適なシール性が提供されます (バルブ、ヒータなど機器の接続に使用)。60 MPa (600 bar) までは A-Line フィッティングを強くお勧めします。Poroshell 120 のカラム接続にはフィッティング (PN 5042-8957) を使用します。フィッティングの詳細については、43 ページを参照してください。
- 流速を最適化します。** Poroshell 120 では、内径 2.1 mm を使用している場合は、開始流速として 0.42 mL/min をお勧めします。内径 3.0 mm の Poroshell 120 カラムでは、0.85 mL/min から、内径 4.6 mm では 2 mL/min から開始することをお勧めします。

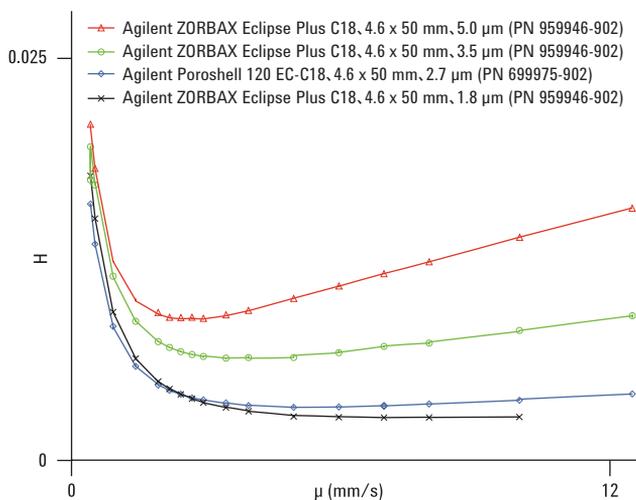


図 59. van Deemter プロットの重ね表示: Poroshell 120 の最適な流速は 5 または 3.5 μm カラムよりも高速

- ・ **グラジエントプロファイルと注入量を調整します。**グラジエント溶離を使用して分析条件を最適化している場合は、グラジエントプロファイルと注入量を新しい小さいカラムに合わせて調節したことを確認し、メソッドを変換して、オーバーロードを回避します。アジレントの Web サイトで利用できる無料のメソッド変換ソフトウェアを使用して、適切な条件の選択に役立ててください (141 ページの「アジレントのその他の参考資料」を参照)。イソクラティックおよびグラジエント溶離では、カラムの大きさに合わせて注入量を確実に調整してください。
- ・ **カラムでの試料の分散を最小限に抑えます。**特に、イソクラティックメソッドを使用する場合は、溶媒強度が移動相と同じかそれ以下の溶媒で試料調製する必要があります。これは、どのカラムについても広くお勧めする方法です。高効率のカラムではさらに重要です。

これらの手順については、[www.agilent.com/chem/poroshell120video](http://www.agilent.com/chem/poroshell120video) のビデオ (英語) を参照してください。

## メソッド開発の自動化ツール

多くのラボでは、カラムを入れ替え、溶媒を交換し、メソッドを編集するといった面倒な作業を行って LC メソッドを開発しています。しかし、現在ではメソッド開発の負担を軽減するシステムや自動化ソフトが開発されています。Agilent 1200 Infinity シリーズマルチメソッドソリューションは、優れたハードウェアと専用のソフトウェアソリューションにより、メソッド開発を容易にする理想的なツールです。



Agilent 1200 Infinity シリーズマルチメソッドソリューション

Agilent 1290 Infinity II の優れたフローと圧力範囲、そして少ないグラジエントディレイボリウムの組み合わせにより、市販されているほぼすべての他社製 HPLC および UHPLC システムでメソッド開発が容易になります。分析条件の設定を支援するために必要となるソフトウェアの要件は、分離の複雑さにより異なります。使いやすくて効率のよい Agilent ChemStation メソッドスカウティングウィザードでは、シーケンスやすべてのメソッドを作成し、カラムや溶媒、グラジエント、温度といった多次元のマトリックスをスクリーニングすることができます。

Agilent 1200 Infinity II シリーズマルチメソッドソリューションは、1260 Infinity モジュールのシステムでも 1290 Infinity モジュールのシステムでも、最大 3 つのカラムコンパートメント (TCC) を組み合わせることができます。Quick-Changeバルブにより、キャピラリーフィッティングへのアクセスが容易になり、簡単な設置とメンテナンスを実現します。

## システム概要

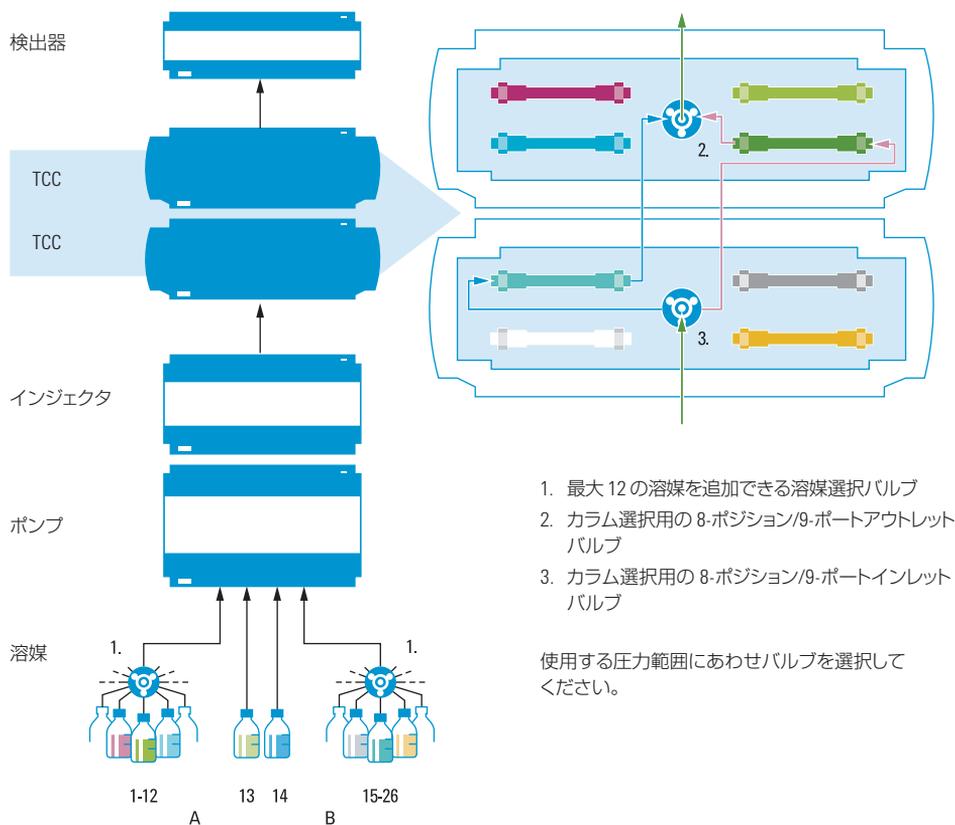


図 60. フレキシブルかつ自動的なメソッド開発

12 チャンネル選択バルブを用いることで、使用する溶媒数を増やすことができます。ソフトウェアで設定を行い、リストから溶媒を選択するだけです。バルブと配管キットにより、適切で最適化された設定が可能です。このシステムのバイナリポンプでは、最大 169 通りの溶媒の組み合わせが可能です。クォータナリポンプでは、最大 193 通りの組み合わせを作成できます。つまり、8 つのカラムを設置する場合は、1000 種類を超える分離条件を使用できることになり、自動的かつ簡単に実行できます。アジレントのシステムでは、あらゆるサイズの分析カラムを使用できます。

メソッド開発を簡単にする Agilent 1200 Infinity シリーズマルチメソッドソリューションの詳細は、専用カタログ (5990-6226JAJP) をご覧ください。ホームページで公開しています。

## 他の HPLC モードのメソッド開発

### HILIC

「水系順相」(ANP)とも呼ばれる親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) は、数十年間に亘り使用されてきた手法です。この手法は、逆相カラムに保持されない、またはわずかに保持される極性化合物の分析用として、ここ数年、再び脚光を浴びています。また、この手法は MS および MS/MS 検出にそのまま適用することができます。有機溶媒比率の高い移動相で HILIC による分離を行うと、水の比率が高い緩衝液系よりもイオン抑制が低くなるため、MS 感度が高くなります。

HILIC では、シリカ、アミノ、混合モード、双性イオン性などの極性固定相と、水の比率が低く (体積比で少なくとも 2.5 %) 有機溶媒比率が高い水混和性の移動相を使用します。

HILIC メソッドでは、極性を持つ帯電した親水性化合物が、疎水性の中性化合物よりもよく保持されます。これは逆相クロマトグラフィーと対照的です。

移動相に水を追加すると、保持力が低下します。HILIC では、順相と比較して極性の高い溶質で良好なピーク形状が得られます。親水性化合物が保持され、多くの場合は溶離の順序が逆になるため、これは逆相クロマトグラフィーの補助的な分離モードです。

HILIC メソッドを開発する場合は、注意して次のパラメータを最適化する必要があります。

- 固定相
- 有機溶媒の濃度
- 緩衝液の種類
- 緩衝液 (塩) の濃度
- pH
- 温度

HILIC メソッドでは、一般に次のカラムが使用されます。

- シリカ
- アミノ
- 混合モード (アルキル - ジオール、アルキル - カルボニル、C18 - アミド、芳香族 - シアノ、アルキルヒドロキシル、C18 - SCX、ポリヒドロキシルアスパルトアミド)
- 水素化物および修飾された水素化物
- 双性イオン性 (テトラアルキルアミン - スルホン酸など)
- その他

図 61~63 に、逆相クロマトグラフィーおよび HILIC メソッドを使用した 2 つの薬物 (ラニチジンおよびパロキセチン) の分離の結果と MS データを示します。この結果は HILIC モードの主なメリットを示しています。HILIC の方がラニチジンが強く保持され、MS ではかなり高い感度を示しています。

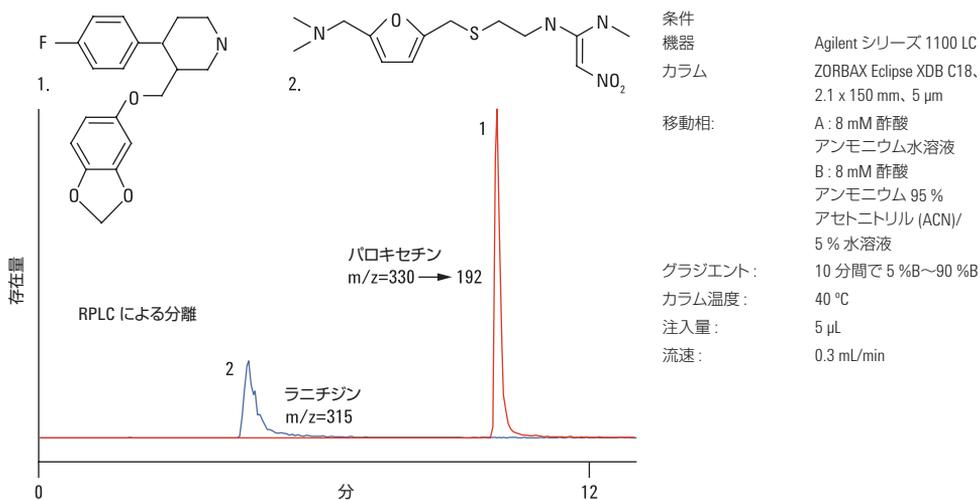


図 61. ZORBAX Eclipse XDB-C18 カラムでのパロキセチンとラニチジンの LC/MS/MS による分離 (逆相 HPLC モード)

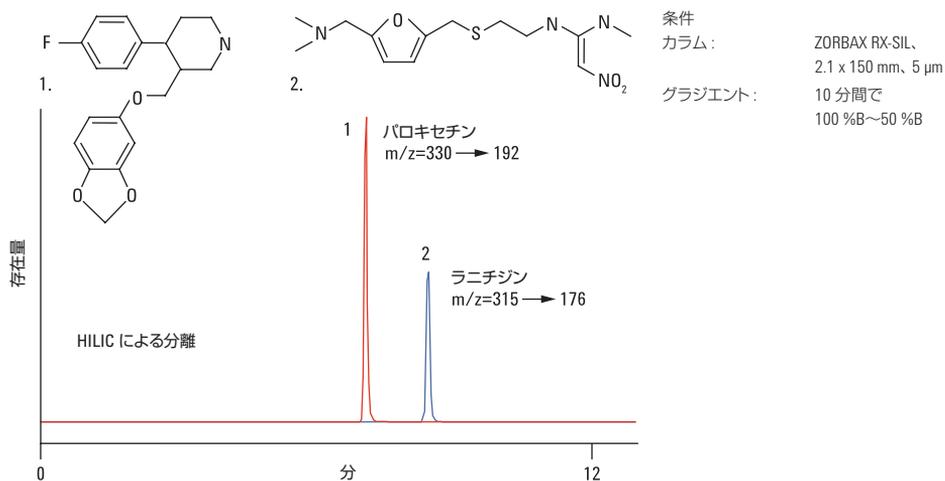
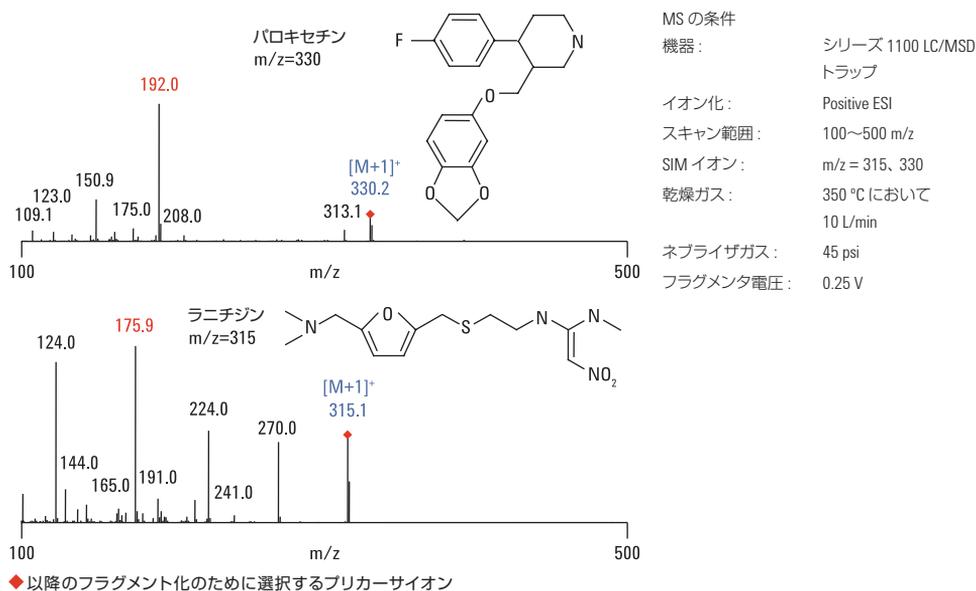


図 62. ZORBAX Rx-SiL カラムでのパロキセチンとラニチジンの LC/MS/MS による分離 (HILIC モード) - 100 ppb レベル



◆以降のフラグメント化のために選択するプリカーサイオン

図 63. 薬剤標準の MS/MS スペクトル

## 順相クロマトグラフィー

順相または吸着クロマトグラフィーは、逆相クロマトグラフィーよりも前から使用されていました。「順」という用語は、固定相が極性を持ち、移動相に極性がなく、極性成分がより強く保持されるという元来の考え方によるものです。

順相クロマトグラフィーでは、シリカや、短鎖アミンまたはジオールなど、その他の極性固定相を使用します。移動相は無極性あるいは低極性で、通常は、炭化水素、ジクロロメタン、酢酸エチル、その他の水と混和しない溶媒が使用されます。順相クロマトグラフィーでは、極性化合物がより強く保持されます。移動相の極性が大きくなると、保持力は低下します。移動相の極性が高いほど、分析対象成分は速く溶離します。シリカカラムを使用した順相グラジエント分離では、ヘキサンなどの無極性溶媒から開始し、5% 酢酸エチルから 95% 酢酸エチルのように極性溶媒を導入していきます。分析対象成分の溶出挙動に応じて、グラジエントを変更してすべての成分の分離を向上させることができます。場合によっては、一定量の水や少量のイソプロパノールを加えて、シリカゲル充填剤の表面活性を変化させることがあります。結合相カラムには水は不要で、多くの場合はアルコールが移動相として使用されます。検出器が UV または蛍光タイプの場合は、溶媒表の UV カットオフを参照してください。一般的な溶媒の UV カットオフについては、138 ページの参考資料の章を参照してください。

順相クロマトグラフィーを使用する理由の1つに、より極性の高い成分を保持できる点があります。このモードは、逆相クロマトグラフィーでは強く保持される疎水性化合物を溶離するためにも使用できます。

順相クロマトグラフィーには他にもいくつかの用途があります。幾何異性体や位置異性体の分離にも適切です。逆相クロマトグラフィーよりも分離することが可能です。順相クロマトグラフィーは、水混和性の溶媒がない場合に使用することができます。移動相に水が含まれず、蒸発しやすい分取分離でも使用されます。

まとめ：順相

- カラム充填剤は極性が高い：シリカ (最も強い) > アミノ > ジオール > シアノ (最も弱い)
- 移動相は無極性が低極性：ヘキサン、イソオクタン、塩化メチレン、酢酸エチルなど
- 極性化合物が強く保持される
- 移動相の極性が大きくなると、保持力が低下する

次の場合に順相を選択：

- 強く保持される疎水性試料の分離
- 異性体の分離
- 試料の試料調製溶媒が無極性/水混和性なし
- 無極性溶媒の回収

## イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーでは、イオン性およびイオン化可能な化合物を分離できます。このモードでは、分析対象成分とは逆の電荷を持つイオン性官能基を持つ充填剤を使用します。強陽イオン交換 (SCX) クロマトグラフィーでは、正の電荷を持つ分子または陽イオンを分析するため、陰イオンまたは負の電荷を持つ固定相を使用します。負の電荷を持つ分子または陰イオンを分析するのであれば、陽イオンまたは正の電荷を持つ固定相を使用します。

この手法では、一般に緩衝液や塩を含む、水の比率が高い移動相を使用します。連続的なグラジエントやステップグラジエントでイオン強度 (塩濃度) を上げていくことによって溶離します。このモードは、一般に分子量の大きい生体分子の分離に使用されますが、アミノ酸や無機陽イオンおよび陰イオン、アミンやカルボン酸などのイオン化可能な化合物など、低分子の分離にも有効です。

図 64 の例ではタンパク質を分離しています。タンパク質は 2 つのイオン性官能基を持つため (正電荷と負電荷の両方が存在) 帯電しています。正味電荷に応じて、タンパク質とペプチドは陽イオンまたは陰イオン交換カラムで分離することができます。

イオン交換のまとめ:

- カラム充填剤にはイオン性官能基 (スルホン酸、テトラアルキルアンモニウムなど) が含まれる
- 移動相は水系化合物 (リン酸、ギ酸、TRIS など)
- 逆相クロマトグラフィーよりも使用頻度が低い
- イオンペアクロマトグラフィーに類似 (詳細は用語集を参照)

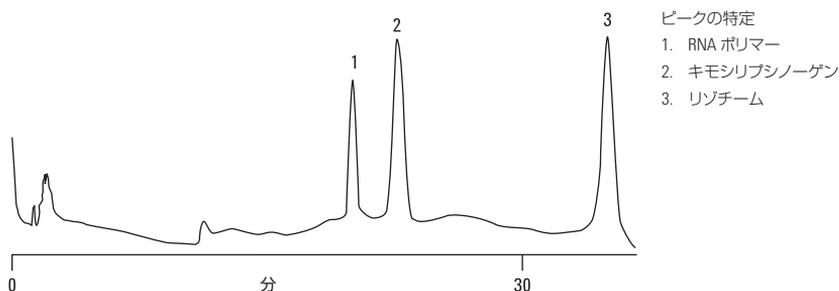


図 64. 強陽イオン交換カラムの塩基性タンパク質 (-SO<sub>3</sub>)

## サイズ排除クロマトグラフィー

SEC では、試料化合物と充填剤との間に相互作用はありません。分子は多孔質ポリマーまたはシリカ充填剤のポア内部に拡散していきます。これらの分子は、ポアサイズを基準にし、そのサイズに応じて分離されます。ポアの開口部よりも大きい分子は粒子内に拡散せず、小さい分子は粒子内に入るため、分離することができます。逆相クロマトグラフィーとは異なり、大きな分子が最初に溶離し、分子が小さくなるほど溶離が遅くなります。

一般に、高分子はポアから排除されるため、排除限界としてカラムからすばやく溶離します。最も小さい分子はカラムのすべてのポアに浸透し、最後に「浸透限界」として溶離します。その他のすべての分子はその間に溶離し、したがってサイズごとに分離されます。個々の成分の分子量 (MW) の値や分子量の全体的な分布を推定するには、分子量既知の標準試料を使用して、log MW 対溶離ボリュームのキャリブレーションを行います。次に、標準試料と同じ条件でポリマー試料を分析し、ポリマーの分子量と分子量分布を推定することができます。

移動相は、主に分析対象成分を溶解する目的で選択します。

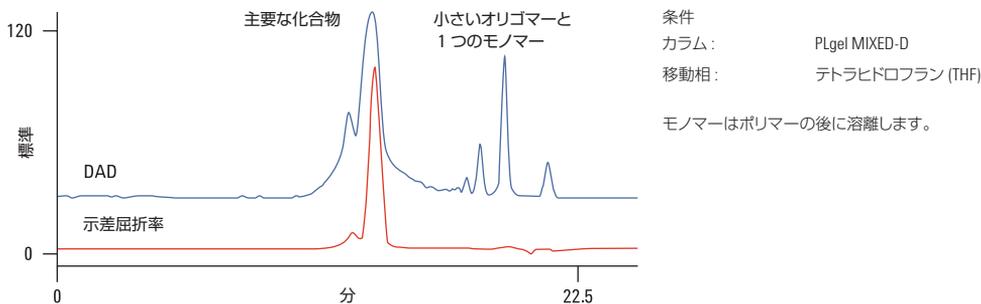


図 65. 非水系 GPC/SEC カラムでのポリブタジエンポリマーのゲル浸透クロマトグラム

GPC/SEC のまとめ：

- ・ 非水系および水系 (非水系は GPC、水系は GFC と呼ばれることがある)
- ・ サイズ排除クロマトグラフィーでは、試料化合物と充填剤との間に相互作用はない。分子は多孔質充填剤のポアに内部に拡散する。これらの分子は、ポアサイズを基準にし、溶液内でのサイズに応じて分離される。溶解する溶媒が異なると流体力学半径が異なる
- ・ 移動相は、主に試料を溶解する目的で選択する
- ・ ポリマーの特性解析、ポリマーの分子量の測定、タンパク質の分離に主に使用される



GPC のカラムと標準溶液

# LC/MS 機器の基本

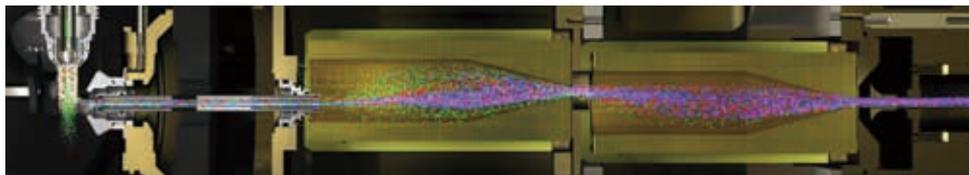
液体クロマトグラフィーに加えてさらに優れている可能性がある化合物の分析方法について説明します。

## LC/MS とは

LC/MS とは、液体クロマトグラフ (LC) と質量分析 (MS) の分離能力を組み合わせ、複雑なサンプル中の 1 種類または複数の化合物を分析する方法です。LC/MS という表記は、液体クロマトグラフィーと化合物の質量 (正確には質量電荷比 ( $m/z$ )) という、2 種類の分離技術の組み合わせを示しています。この技術を分析に使用するには、液相で分離した化合物を、イオン化プロセス中にイオン化分子種に変換する必要があります。このプロセスは、LC 機器と MS 機器の間のインターフェースとして機能する、質量分析計のイオン源内部で実行されます。一般的に、LC/MS は UV 検出より感度、選択性、特異性で優れています。

過去数十年間で、LC/MS の使用は急速に拡大しています。技術の進歩によって、LC/MS 技術をラボに導入しやすくなっています。イオン化技術の進歩によって、LC/MS で分析できる化合物の範囲は広がっています。現在、薬物動態、法医学、毒物学、プロテオミクスなどの多くの分野で、LC/MS の使用が標準的な分析ツールとなっています。

今や LC/MS 機器は、化学分析を必要とするほぼすべての業界で使用されています。医薬品、食品安全性、環境、化学、エネルギーなどにおけるあらゆるラボが、LC/MS の導入によって分析上の課題を解決しています。



イオン化され装置内を通過し検出器に到る基本的なサンプルのフロールー

## LC/MS から取得できる情報

LC/MS 分析で生成されるデータは多次元です。化合物は、さまざまな溶媒およびカラム条件での LC 保持に基づいて分離され、ガス相での質量電荷比に基づいて分離され、検出されます。一番レベルの高いデータは全イオンクロマトグラム (TIC) です。TIC は、クロマトグラフィー分析全体で検出される全イオン強度を示します。TIC 内の各サンプリングポイントをさらに詳しく分析できます。各ポイントが特定の質量スペクトルに関連するためです。質量スペクトルによって、そのクロマトグラフィーの保持時間において存在する質量と、その強度がわかります。

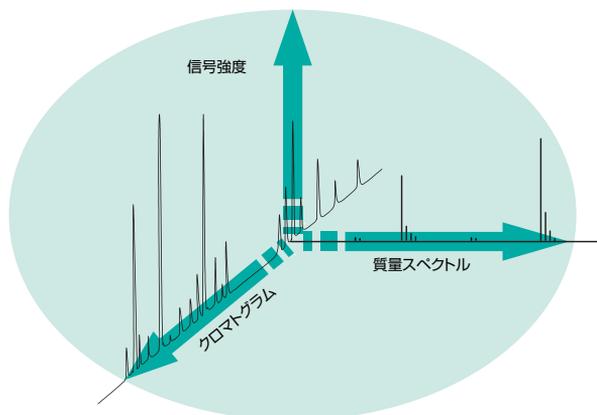


図 66. LC/MS 分析における多次元のデータ取得の概念図

質量スペクトルのピークの分離度と真度は、質量分析計の重要な性能条件です。約  $\pm 0.1$  Da の真度レベルで質量を同定できる機器は、ノミナル質量精度またはユニット質量精度を満たしていると言われます。これらは通常、シングル四重極やトリプル四重極などの四重極ベースの機器です。LC 分離と組み合わせた場合、このノミナル質量精度が、多くのアプリケーションに用いられています。

高分解能の精密質量機器を使用すると、 $\pm 0.1$  mDa というはるかに高い真度でイオンの  $m/z$  比を測定できます。このように質量精度が上がると、化合物の同定の信頼性が大幅に向上します。また、質量分解能が上がると、化合物の同位体を高精度で測定できるため、化合物の分子量と構造特性も確認できます。これらは、主に飛行時間型 (TOF) またはイオントラップ技術に基づいています。

化合物の応答の増加を記録する LC/MS 機器の性能は、直線ダイナミックレンジの直線性とと呼ばれます。この直線の範囲は、特にサンプル中の化合物の定量などの正確な測定に重要です。

## LC/MS 機器の種類

LC/MS 機器にはさまざまな種類があり、各種技術によって、さまざまな分析機能と性能を備えています。

### シングル四重極機器

シングル四重極 LC/MS 機器では、ノミナル質量精度でデータを取得できます。この LC/MS 機器は、LC 機器と組み合わせて使用する検出器として最初にラボに導入されることがよくあります。シングル四重極機器では、四重極マスフィルタによって、サンプル中に生成されるイオンの  $m/z$  を検出します。また質量範囲をスキャンして、スクリーニング分析をおこなったり、分析対象の特定の  $m/z$  値のイオンを選択したりすることができます。この種類の LC/MS 機器は、機器の設計向上により簡単に操作できるため、ルーチンの質量分析に使用されます。

### トリプル四重極機器

トリプル四重極 LC/MS 機器は最も広く使用されている機種です。1 台の装置に 2 個のマスフィルタが付いているため、タンデム質量分析計と呼ばれることもあります。この構造によりプリカーサイオンを分離し開裂させ、その結果発生するフラグメントイオンを検出して、MS/MS データを得ます。マルチプルリアクションモニタリング (MRM) は、トリプル四重極で最も汎用的な実験方式です。MRM は最も感度が高く、再現性と選択性に優れているためです。

### 飛行時間型機器と四重極飛行時間型機器

飛行時間型と四重極飛行時間型 (Q-TOF) の LC/MS 機器は、特定の運動エネルギーを持つイオンの飛行時間が、質量と電荷によって異なるという原理を利用しています。これらの飛行時間を正確に測定すると、サンプル中に存在するイオンの  $m/z$  比を正確に同定できます。この機器は質量スペクトル分解能が高く、5 ppm 以内の質量精度で測定できます。四重極飛行時間型の機器は、プリカーサイオンを断片化して得られたフラグメントイオンをフライトチューブにより分析して、MS/MS データを測定することもできます。

## Agilent 6000 シリーズ LC/MS ソリューション

アジレントは、本書で説明するすべてのシステムを含む LC/MS ソリューションの豊富なポートフォリオを提供して、信頼性の高い定量分析と定性分析をサポートしています。右側は、トリプル四重極および Q-TOF システムのさまざまな例です。



Agilent 6100 シリーズシングル四重極 LC/MS システム



Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS システム



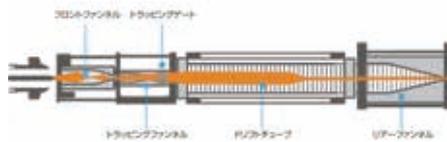
Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS システム

## 均一電場イオンモビリティ

均一電場イオンモビリティは、イオンモビリティの分離能力と質量分析を組み合わせたものです。この技術では正確な衝突断面積を直接測定することで、新たな分離次元を加えることができます。また、分子組成の構造特性が維持され、複雑なサンプルの中での化合物同定におけるカバー範囲が拡大します。

### アジレントのイオンモビリティ技術

Agilent 6560 IMS-Q-TOF LC/MS 装置は、高性能なイオンモビリティ測定と、正確かつ精密な衝突断面積 (CCS) 測定が可能です。化合物種に応じたキャリブレーションは必要ありません。



## MS/MS – 高い特異性で化合物を分解

一部の LC/MS 機器では、プリカーサイオンを意図的に開裂させ、フラグメントイオンの質量数に基づいて化合物の構造組成に関する情報を取得できます。同じコリジョンエネルギーが加えられた場合、化合物の断片化には再現性があります。このため、インタクトな分子の質量数とフラグメントイオンの質量数のパターンを調べることで、特定の化合物を検索できます。これで化合物の同定における特異性が非常に向上します。質量分析の複数の段階を示す意味で LC/MS-MS と通称されます。

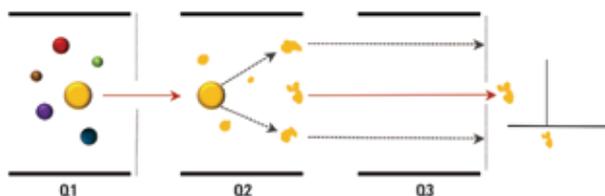


図 67. トリプル四重極装置における MS/MS の概念図

トリプル四重極機器では、最初の四重極を利用して元のイオンまたはプリカーサイオンを分離し、そのイオンを 2 番目領域で断片化してから、3 番目の四重極で生成されるフラグメントイオンを検出します。これらの機器では、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) という方法でデータを取得できます。MRM では、最初の四重極でプリカーサイオンを、3 番目の四重極でフラグメントイオンまたはプロダクトイオンを特異的に分析します。高速で断片化できるため、多くの MRM を同時にモニタリングできます。これは、分析の対象となるさまざまな化合物が含まれる可能性がある農薬、食品、毒物の分析では一般的な方法です。MRM 実験は再現性が高い上に、最高レベルの感度を実現できます。ダイナミック MRM (dMRM) はより高度な MRM 方式であり、1 回の LC/MS 分析で複数の分析対象物 (200 種類以上の化合物) を高感度で定量分析できます。

四重極飛行時間型機器または、イオントラップ機器の中には、精密質量を用いて MS/MS 測定が可能なシステムがあります。目的化合物の最高レベルの精密質量、同位体情報、フラグメント情報を測定することができます。

## 化合物のイオン化

質量分析計で化合物を分析するには、必ず化合物がガス相で帯電している必要があります。このため、液体中の中性分子を何らかの方法で気相中でイオン化する必要があります。イオン化には、いくつかの方法があります。

### エレクトロスプレーイオン化

エレクトロスプレーイオン化 (ESI) は、現在最も汎用的な LC/MS イオン化技術です。これはソフトなイオン化技術と見なされており、イオン化させる分子の構造を維持できます。このため、インタクトのタンパク質分子やオリゴヌクレオチドなどの巨大分子や、熱に不安定な化合物など、さまざまな化合物を分析できます。

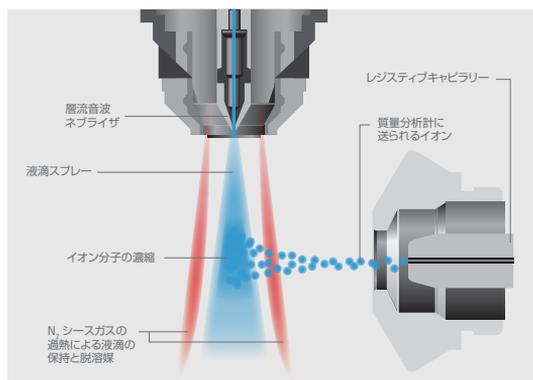


図 68. Agilent Jet Stream ESI イオン源

### 大気圧化学イオン化

大気圧化学イオン化 (APCI) では、高帯電プローブを利用して、中性化合物からイオンを生成します。この方法は、ステロイド、芳香族構造、脂質などの無極性化合物に適しています。

### 大気圧光イオン化

大気圧光イオン化 (APPI) では、高強度ランプで生成される光子を利用して、サンプルからイオンを生成します。APPI は極性の非常に低い化合物のイオン化に適しています。

### アジレントのイオン源

これら 3 種類の主要技術を利用した、さらなるイオン化技術があります。Agilent Jet Stream イオン源は、エレクトロスプレーを高度化したイオン化技術です。この方法では、高温ガス供給による蒸発を利用して、LC/MS の導入部にイオンを収束させます。アジレントのマルチモードイオン源では、ESI と APCI を使用して同時にイオン化でき、イオン化できる化合物の範囲が広がります。ナノスプレーおよび Chip Cube イオン源を用いるナノフロー HPLC アプリケーションでは、微量の溶媒量を用いる系において、飛躍的に感度が向上します。

## LC/MS によるメソッド開発のヒント

### ESI-MS 用の溶媒の選択

LC/UV 移動相には通常、MS イオン源で固着してしまう可能性のある非揮発性緩衝液が含まれます。一般的に、同じ pH の揮発性緩衝液に合わせる簡単な解決方法です。ESI-MS に適した緩衝液の濃度は 25 mM 未満で、10 mM 未満が最適です。通常は、流速も低く、0.5 mL/min 未満に維持します。ただし、Agilent Jet Stream では、ESI に 5  $\mu$ L/min ~ 2 mL/min の流速を使用できます。金属イオンを含む緩衝液はイオン化の妨げとなるため、通常は使用しないでください。

たとえば、pH 3 のリン酸を使用する場合、ギ酸を使用すると移動相の pH も 3 となり、質量分析計とのインタフェースとして適切です。MS 検出ではイオンの生成が必要であるため、移動相を使って荷電成分を作る必要があります。つまり、移動相の pH 情報とサンプルの pKa 情報が重要です。堅牢なメソッドを実現するには、分析対象物の pH が pKa から 1 ~ 2 単位離れている必要があります。分析対象物が正電荷または負電荷となる移動相の pH を選択すると、感度が上がります。低い pH では通常、塩基性化合物がイオン化されます。酸性化合物の場合、pH 領域 2 ~ 5 で pKa 値を得られる可能性が高いため、移動相の pH をより慎重に選択する必要があります。通常、酸性移動相にはポジティブモードのイオン化が適しており、0.1 ~ 1 % のギ酸、0.1 ~ 1 % の酢酸、0.05 ~ 0.2 % のトリフルオロ酢酸 (TFA) が含まれます。TFA はイオン抑制の原因となりますが、サンプル濃度が適切であれば使用できます。塩基性移動相には通常、ネガティブモードのイオン化が適しています。酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、トリエチルアミン、ジエチルアミン、ピペリジン、炭酸水素アンモニウムは、ネガティブモードの ESI 用によく検討されます。

緩衝液に含まれる酢酸やアンモニウムなどのイオンと関連する場合は、中性物質も分析できます。エレクトロスプレープローブに電圧をかけるとイオン生成が誘発されますが、移動相を適切に選択して移動相の中ですでにイオン化している分子を供給することで、イオン生成が大幅に増え、感度が上がります。

有機移動相に関しては、メタノールよりアセトニトリルが適している場合があります。メタノールも LC/MS で使用できますが、アセトニトリルと水の混合溶液は粘性が低く、メタノールと水の混合溶液より表面張力が低くなります。粘性が低い方がイオン源内部でより小さい液滴を生成できるため、より簡単に気化します。

このような MS に対応する移動相の組成は、逆相、HILIC、順相のクロマトグラフィーに適しています。

図 69 は、ESI による茶の分析メソッド用の LC/MS 対応の移動相の検討例を示しています。選択性とピーク形状は、使用する移動相に関係なく一定です。分析対象物の信号強度に基づいて、最適な移動相が選択されます。酢酸アンモニウム緩衝液とトリフルオロ酢酸移動相では、イオン抑制が大きくなっています。ギ酸と酢酸の 2 つは拮抗しており、酢酸移動相での信号強度がギ酸より少し強くなっています。最も高感度の酢酸移動相と最も低感度の酢酸アンモニウム移動相を比較した場合、酢酸の感度は酢酸アンモニウムの 5 倍です。

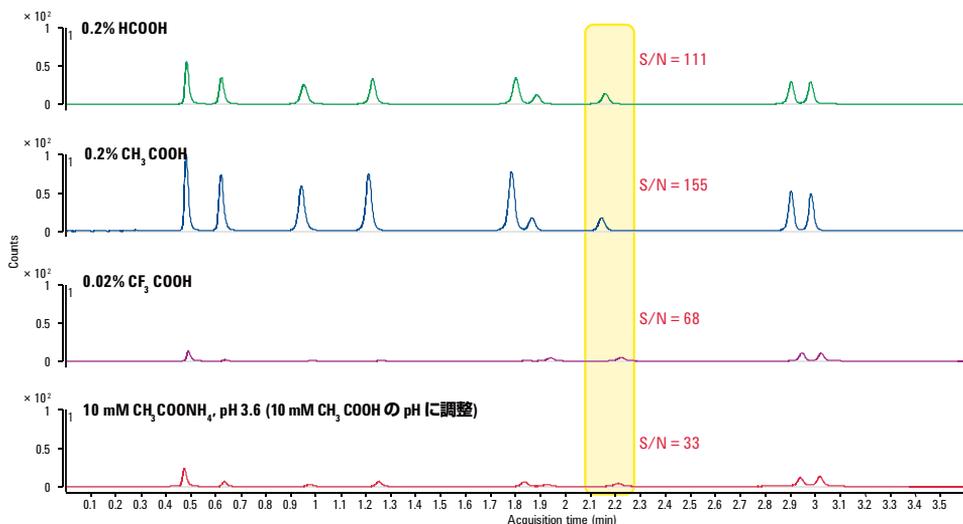


図 69. Agilent Poroshell 120 SB-C18 カラムによる、ESI を使った茶の分析用の LC/MS 対応移動相のスクリーニング

### APCI-MS および APPI-MS 用の溶媒の選択

APCI と APPI は、ESI-MS ではイオン化されにくい低極性分子でよく使用されます。一部の LC 移動相溶媒で (例: アセトニトリルなど) 問題が発生する場合がありますので、まずメタノールを溶媒としてお試しください。ESI と同様に、APCI と APPI は非揮発性緩衝液には対応しません。ただし APCI と APPI は ESI とは異なり、最大 100 mM (流速は最大 1.5 mL/min) という幅広い緩衝液濃度を使用できます。流速が 0.75 mL/min 以上の場合、APCI と APPI は ESI と比べて感度が高くノイズが少ないというメリットがあります。安全確保のため、引火性の高い溶媒は使用しないでください。

### MS 用のイオンペアクロマトグラフィー溶媒の選択

イオンペアクロマトグラフィーと LC/MS を使用する場合、移動相には非揮発性イオンペア試薬 (スルホン酸アルキルやテトラアルキルアンモニウム塩など) が含まれ、一般的な移動相には、ヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) とトリブチルアミン (TBA) が含まれており、イオンペア試薬は、イオン化プロセスを阻害する場合があります。この阻害が分析に大きい影響を及ぼす場合は、クロマトグラフィーの代替モードとして HILIC を使用できます。

## サンプル前処理

前述のとおり、適切な移動相緩衝液と pH を選択することは、堅牢かつ高感度な MS 性能を実現するために不可欠です。HPLC-UV-MS 分析が成功するには、サンプル前処理も重要です。サンプル前処理が適切でないと、イオン信号の抑制や干渉が発生する場合があります。ESI-MS の前に検討が必要な重要項目は、マトリックス成分と濃度の問題です。

### マトリックス成分

塩はイオン化プロセスを抑制します。洗浄剤は蒸発プロセスを阻害します。高いサンプル濃度は検出器の飽和の原因になる場合があります。マトリックス、塩、または洗浄剤の影響を防ぐための一般的な手法としては、限外ろ過、溶媒抽出や脱塩、液/液抽出、固相抽出 (SPE)、イムノアフィニティ、オンカラム濃縮、カラムスイッチング (LC/LC) などがあります。塩や洗浄剤が不可避の場合は、クロマトグラフィー (短いカラムで十分です) またはカットオフフィルタで除去してください。

### 濃度の問題

濃度の問題を解消するには、LC メソッドの開始時の溶媒組成でサンプルを希釈します。

### イオン抑制の考慮事項

イオン抑制は分析対象化合物のイオン化効率低下の結果として LC/MS で発生する、有害な作用です。信号抑制は、移動相やサンプルマトリックス中の成分が、分析対象物のイオン化と競合したりイオン化を抑制したりすると発生する場合があります。イオン抑制の化学的および物理的原因は完全には解明されていませんが、分析対象成分と他の抑制の原因となりうる分子種の共溶出は、できるだけ避ける必要があります。イオン抑制を防ぐには、LC/MS 分析の前に、複雑なサンプルをクロマトグラフィーで分離するのが良い方法です。また、サンプルを希釈し、流速を減らすと、イオン化の際の抑制分子種の量を減らせる場合があります。

## LC/MS における高速高分離カラムの使用

### 感度の向上

LC/MS は高感度の技術であり、低濃度化合物の分析に最適です。LC/MS と高速高分離 UHPLC カラムを組み合わせると、感度を大幅に上げることができます。図 70 は、モルヒネ代謝物 (M3G、M6G) の分析を示しています。2  $\mu\text{m}$  未満の高速高分離 UHPLC カラムを用いて得られるピークは、従来の 5  $\mu\text{m}$  カラムより非常に高くシャープになっています。固定相粒子の化学的性質など、これらの各分析のメソッドパラメータは同じであり、粒子サイズのみが異なります。M3G と M6G は同位体であるため、 $m/z$  462 という同じ質量数で検出されます。これらの EIC を同じスケールに当てはめた場合、粒子カラムが小さくなると、ピーク幅が改善されるだけでなく、ピーク高も異なることがわかります。M6G ピークの S/N 比を比較した場合、2 ミクロン未満の高速高分離 UHPLC カラムの MS 感度は、従来の 5  $\mu\text{m}$  カラムの 5 倍に向上します。

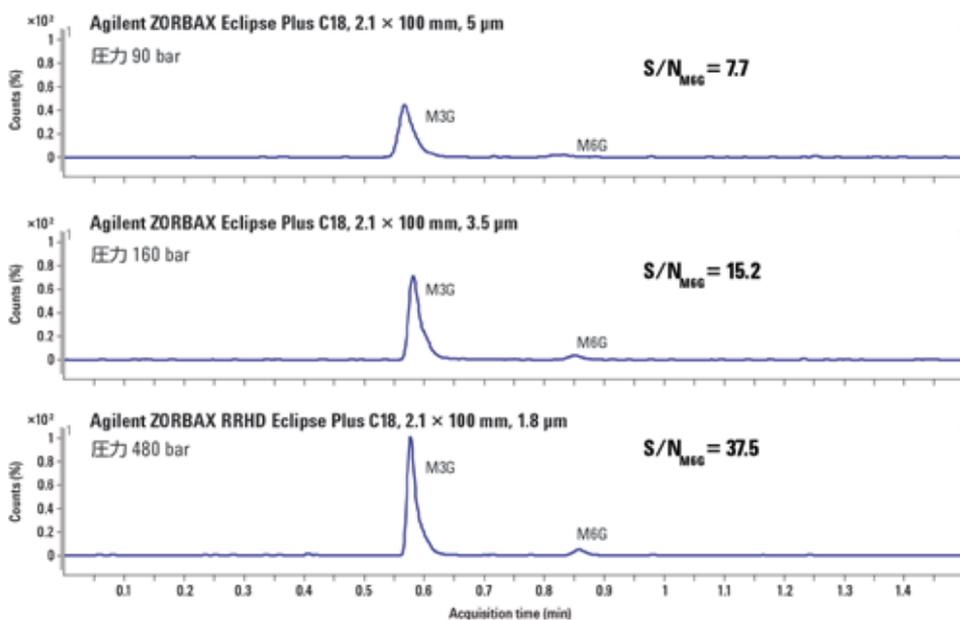


図 70. モルヒネ代謝物の分析では、2  $\mu\text{m}$  未満の粒子で高速高分離 UHPLC カラムを使用した場合に、感度が向上しています。

## MS スキャン速度

LC/MS システムを最大限に利用するには、各メソッドパラメータの最適化に注意することが必要です。高速高分離カラムを使用する場合、データ収集レートを適切に高速に設定して、シャープなピーク全体で十分なデータポイントを採取し、信頼性の高い結果を出すことが重要です。図 71 は、茶で一般的に検出される 10 種類のカテキンの高速分離を示しています。さまざまなデータ収集レートにおけるクロマトグラフィー (UV、MS スキャン、MS SIM、および MS/MS) の結果が表示されています。同様の傾向が、すべてのモードで見られます。質量分析計の速度は、この高速分析に必要なデータ収集には十分です。逆に採取されるデータポイントが多過ぎると、データ採取レートを上げた場合に悪影響が出ます。最速のデータ収集レートではピーク幅が最も狭くなりますが、生成されるベースラインノイズも最大となり、S/N 比が低下します。分析において感度が最も重要な場合は、ピーク幅が少し広がったとしても、少し低いデータ収集レートを使用してください。

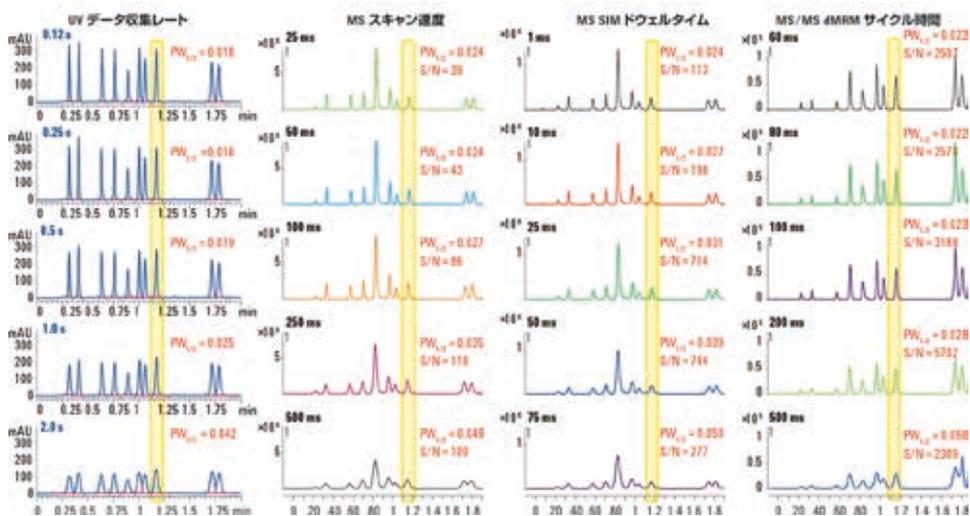


図 71. Agilent ZORBAX RRHD SB-C18 カラムによる、茶で一般的に検出される 10 種類のカテキンの分析。

## システムの分散

理想的な LC/MS 分析のためには、メソッドパラメータの最適化だけでなく、機器ハードウェアも検討する必要があります。小容量の高速高分離カラム (内径 2.1 mm、2 μm 未満など) は、システムのカラム外ボリュームによって大きな影響を受ける場合があります。図 72 は、内径 0.12 mm のキャピラリーで構成した標準的な LC 機器と、より短い内径 0.075 mm のキャピラリーで低分散用に最適化した機器で、モルヒネおよびその代謝物の LC/MS/MS 分析を比較したものです。低分散 LC/MS システムでは、ピークが高く狭くなっていることがわかります。サンプル経路の容量が少ないため、低分散システムの保持時間も少し短くなっていることがわかります。抽出された MRM クロマトグラムを見れば、LC/MS 分析によってシステム分散を最小限に抑えて UHPLC カラムを最適化することの重要性がわかります。通常 MS では不分離ピークを分離できますが、この例では M6G と M3G は等圧であり、定量と定性のイオントランジションが同じであるため、クロマトグラフィーによるベースライン分離が必要です。カラム外ボリュームを 60 % 減らすと、これら 2 つのピークの分離度が 37 %、感度が 30 % 向上します。

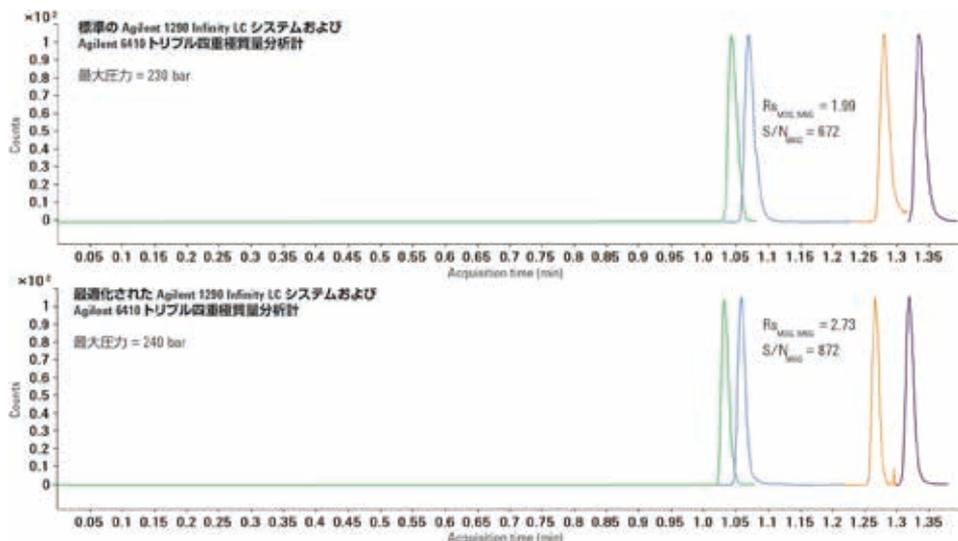


図 72. 標準および最適化された Agilent 1290 Infinity LC でのモルヒネおよびその代謝物の LC/MS/MS 分析の比較。  
標準的な Agilent 1290 Infinity LC は内径 0.12 mm のキャピラリーで構成されているのに対し、超高分散で最適化された Agilent 1290 Infinity LC では内径 0.075 mm の短いキャピラリーを使用しているため、カラム外ボリュームが 60 % 減っています。

## 切り替えバルブ

すべての Agilent LC/MS 機器には、切り替えバルブが付いています。LC 移動相は、イオン源への導入の前に切り替えバルブを通過します。切り替えバルブを経由せずに、移動相を直接ネプライザに送ることはお奨めしません。このバルブには重要な機能があるためです。分析対象以外の大量の化合物を溶出する LC/MS メソッドを実行する場合は、これらの化合物を直接廃液に流すことができます。これらの化合物をイオン源に入れたくない場合は、廃液に流せばイオン源の洗浄頻度を減らすことができます。また、これらの化合物の MS データを取得しない場合は、スペクトルの保存機能をオフにしておけばディスク容量を節約できます。これらの機能は、ソフトウェアの時間「time segment」タブにあります。

## LC/MS ソフトウェア

### スキャンの種類 – TIC、EIC、および SIM の比較

全イオンクロマトグラム (TIC) では、ユーザーが選択した機器の性能範囲内の質量数の範囲がスキャンされます。化合物の分子量がわかっている場合は、抽出イオンクロマトグラム (EIC) を使用して、複雑な TIC クロマトグラムから特定の成分を抽出できます。この結果、特定の質量数のイオンのみのシンプルなクロマトグラムが得られます。図 73 は、15 種類の鎮痛薬化合物を 0.4 分で高速分離した結果を示しています。MS スキャン速度は、これらのシャープなピーク全体 (不分離ピークを含む) で十分なデータポイントを採取できる速度に設定されているため、信頼性の高いデータを取得できます。一番上の TIC は、いくつかの部分的な不分離ピークを示しています。トルメチンについては特に赤い矢印で示しています。各成分は固有の質量数で同定されるため、分析者は EIC によって各成分を個別に表示できます。たとえばトルメチンの  $m/z$  257 の EIC は、一番下のクロマトグラムです。EIC を個別に表示すると、目的の化合物の統合と定量を簡単に行うことができます。

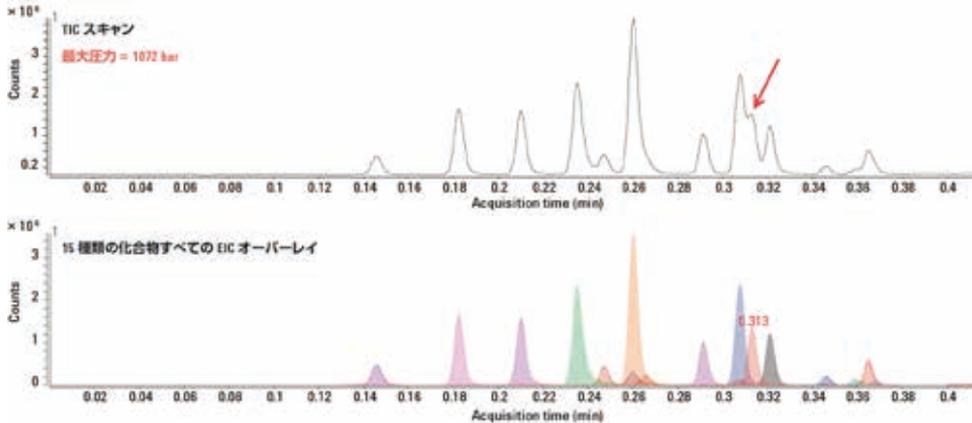


図 73. Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラム (1.8  $\mu\text{m}$ ) による 15 種類の鎮痛薬化合物の 0.4 分での高速分離例

TIC モードは複雑なサンプル、特に未知の化合物が存在する可能性があるサンプルの分析に便利です。既知の特定の成分を対象としたメソッドの場合は、イオンモニタリング (SIM) モードを選択するように LC/MS を設定します。このモードでは対象成分のデータのみが採取され、EIC に似たクロマトグラムになります。SIM モードでは、複数のイオンを同時にモニタリングでき、データは化合物クロマトグラムまたは個々の EIC として表示できます。TIC モードで EIC を抽出するのではなく、SIM モードで LC/MS を使用する利点は、SIM モードではターゲット化合物の感度を上げられることです。

### パーソナル化合物データベースライブラリ

ノンターゲットスクリーニングを実行する場合は、化合物の同定が課題になります。標準物質を購入して、化合物の同定に役立つスペクトルを測定できますが、多くのラボでは、新しい標準物質の購入やテストにかかるリソースや時間がありません。パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) は、対象の化合物の同定の信頼性をより高める正確な質量 MS/MS ライブラリを使用できます。また PCD および PCDL は柔軟にカスタマイズ可能です。

サードパーティの PCDL としては、たとえばメタボロミクス用の METLIN データベースや、Broecker, Herre & Pragst が公開している法医学および毒物学の PCD/PCDL があります。アジレントは研究者と協力して、マイコトキシンや危険ドラッグなどの最新の混入異物に対応できる、便利な PCDL を開発しています。



図 74. MassHunter 定性分析 (Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアの一部) では、精密質量、保持時間、同位体パターン、MS/MS データによって、非常に信頼性の高い代謝物の同定が可能です。

# よりよいクロマトグラフィーの 結果を得るために

再現性は、クロマトグラフィーの最も重要な品質の1つです。良好な再現性は、高品質のカラムと堅牢な HPLC メソッドを使用することから始まります。

再現性の向上とカラム寿命の延長に役立つ手法があります。

この章では、これらの手法についてワークフローの順序で説明します。

- 試料の前処理
- 高品質の溶媒の使用
- UHPLC の溶媒に関する特別な考慮事項
- インラインフィルタ
- インレットフリット
- ガードカラム
- 溶媒飽和カラム

次にカラムの取り扱いについて説明します。

- カラム寿命の最大化
- カラムの目詰まり防止
- カラムの劣化を示す兆候

最後に、メソッドを他のラボに渡すときのメソッドの保護に関する注意点を挙げます。

- あらゆる場所でのメソッドの再現性の確保
- ロット間での保持または選択性の変化



サンプル前処理ハンドブック (5991-3326JAJP) は、アジレントのホームページから入手できます。

アジレントのサンプル前処理ポートフォリオの詳細については、ホームページを参照してください。

## スケーラビリティ

過去 5 ~ 7 年間で表面多孔性カラム (SPP) をメソッドに導入するユーザーが増え、このカラムの利用が大幅に拡大しています。従来使用されてきた全多孔質カラムの利点に関する認知度も上がっています。新しいメソッドの場合、SPP カラムの方が 2  $\mu\text{m}$  未満のカラムより人気が高く、よく使用されています。この主な理由はその堅牢性、高効率、低背圧にあります。ただし、多くのユーザーが最新の 2.7  $\mu\text{m}$  SPP カラムを使い始めています。従来の 5  $\mu\text{m}$  のカラムに対して、圧力上昇の懸念があるためです。

アジレントは最近、Poroshell 120 の 4  $\mu\text{m}$  カラムファミリーをリリースしました。このファミリーでは、分析担当者およびメソッド開発者向けのスケーラブルなソリューションによって、Poroshell 120 プラットフォームが拡張されます。このプラットフォームの拡張は EC-C18、EC-C8、Phenyl-Hexyl、PPF、HILIC ケミストリで構成されており、Poroshell 120 ファミリーを非常に簡単に導入できます。適度のパフォーマンスの向上を必要とするお客様は、アジレントの 2.7  $\mu\text{m}$  Poroshell 120 カラムの半分のカラム圧力で従来の全多孔質カラムのほぼ 2 倍の効率を実現する 4  $\mu\text{m}$  Poroshell 120 カラムを、メソッドに簡単に導入できます。

Poroshell 120 ファミリーへの比較的簡単な変換にとっての鍵は、その方法が簡単であることです。このためには、スケーラビリティとメソッド変換のしやすさが重要です。Poroshell 120 の相ケミストリは、その他の ZORBAX 相ケミストリに対する拡張性があるため、従来の全多孔質 5  $\mu\text{m}$  カラムからのメソッド変換が非常に簡単です。図 75 は、Eclipse Plus C18 と Poroshell 120 EC-C18 のスケーラビリティを比較したものです。

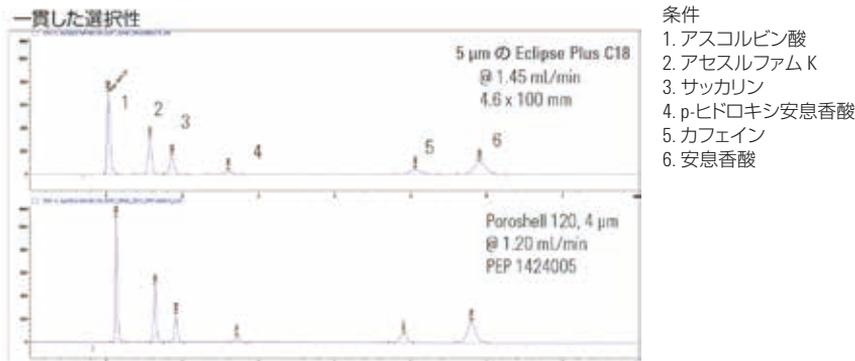
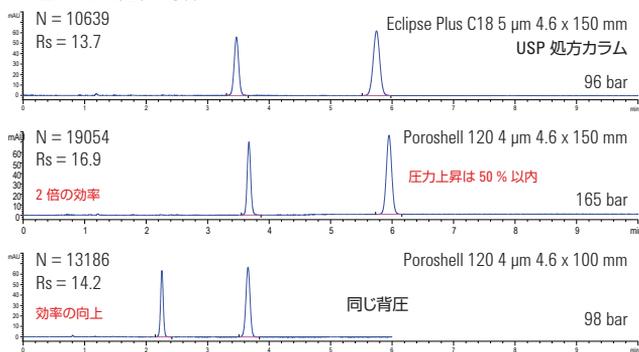


図 75. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、5  $\mu\text{m}$  (上段) から Poroshell 120、4  $\mu\text{m}$  (下段) へのスケーラビリティ (0.2 % のギ酸、メタノール 35 %、両カラムとも 4.6 x 100 mm、流量は Eclipse Plus で 1.45 mL/min、Poroshell 120 で 1.2 mL/min)

これは、変換が非常に簡単になったことを示しています。以前の Eclipse Plus ファミリーから新しい高性能の Poroshell 120 ファミリーに、既存のメソッドを簡単に変換できるためです。

メソッド変換では、ある相から別の相へのスケーラビリティが重要ですが、粒子径をまたがるスケーラビリティも非常に重要です。メソッドは組織全体や世界中で変換されるため、さまざまな機器で実行される可能性があります。このため、研究者は特定のカラムケミストリを複数の粒子サイズで使用できることの確認が必要な場合があります。Poroshell 120 ケミストリは 2.7  $\mu\text{m}$  と 4  $\mu\text{m}$  の両方の粒子で使用できるため、粒子サイズ間のスケーラビリティが簡単に向上し、Agilent Poroshell 120 ファミリーの柔軟性が高くなります。図 76 にこの例を示します。

ナプロキセンの従来の分析



条件  
 移動相: 50:49:1 MeCH:H<sub>2</sub>O  
 酢酸  
 流量: 1.2 mL/min

1. ナプロキセン
2. プチロフェノン

図 76. 従来の 5  $\mu\text{m}$  カラムの代わりに 4  $\mu\text{m}$  の Agilent Poroshell 120 カラムを代替として使用

このナプロキセンの USP 分析メソッドでは、従来は 5  $\mu\text{m}$  の全多孔質カラムが使用されています。ただしこの場合、元のメソッドで必要とされているのが 4.6 x 150 mm、5  $\mu\text{m}$  C18 カラムです。5  $\mu\text{m}$  の Eclipse Plus C18 カラムを使用した場合、メソッド要件を簡単に満たすことができ、4  $\mu\text{m}$  の Poroshell 120 EC-C18 に変換すると、選択性はそのまま効率約 2 倍になることがわかります。このため少し短いカラムを使用しても、分析速度を上げることができます。4  $\mu\text{m}$  カラムは 2.7  $\mu\text{m}$  の Poroshell 2.7 カラムほど高速ではないものの、2.6  $\mu\text{m}$  または 2.7  $\mu\text{m}$  の表面多孔カラムの約 50 % の背圧で、5  $\mu\text{m}$  カラムよりも優れた分離能と効率を実現します。

図 77 は、2.7  $\mu\text{m}$  および 4  $\mu\text{m}$  の Poroshell 120 カラムを 5  $\mu\text{m}$  の代わりに使用した分析例を示しています。ここでは、牛乳に含まれるキノロンを分析しています。

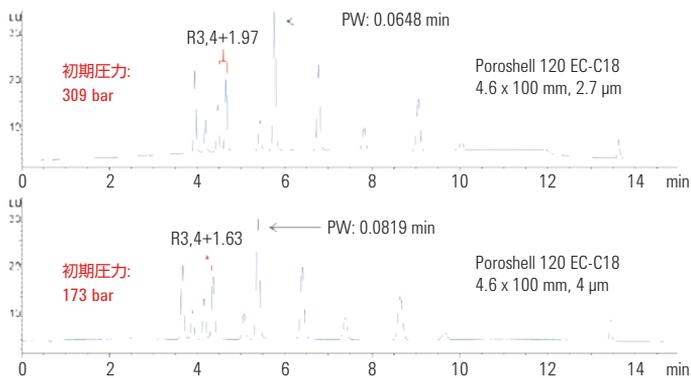


図 77. Agilent Poroshell 120 EC-C18、4 μm および 2.7 μm のカラムによる牛乳中のキノロンの分析

このグラジエント、メソッドでは、2.7 μm と 4 μm の Poroshell 120 カラム間のスケールビリティは十分に予測できるものになっています。またこの特定の分析では、2.7 μm の Poroshell 120 の使用によってピーク幅と分離度が改善されていますが、4 μm カラムとは違い背圧が低下しています。

スケールビリティは、メソッド開発で高い柔軟性を実現するために重要な要素です。ファミリー内で粒子サイズ間のスケールビリティを堅牢かつ予測可能にすることで、粒子サイズに関係なくカラム間のシームレスな変換を可能にし、適切なシステムで最適なパフォーマンスを維持できます。以前の最適化されていないシステムの場合、Poroshell 120 の 4 μm が分離性能に最適なソリューションであり、今後はそれらのメソッドを Poroshell 120 の 2.7 μm に簡単に変換できます。変換の際には性能と選択性が予測可能であるため、メソッドの最適化と変換の障壁を最小限に減らすことができます。

## 高品質グレードの溶媒を使用することの重要性

一般に、HPLC アプリケーションには HPLC グレード以上の溶媒を使用します。すべての緩衝液をろ過します。特に UHPLC アプリケーションには 0.22  $\mu\text{m}$  フィルタを推奨します。0.45  $\mu\text{m}$  フィルタは、標準の HPLC アプリケーションに使用することができます。HPLC グレード以上の有機溶媒は、通常はろ過の必要がありません。実際には、クロマトグラフィー対応のきれいなフィルタとガラス器具を使用しないと、ろ過によって汚染物質が加わることがあります。

適宜カラムをフラッシュしてください。1 日の終わりにシステムから緩衝液をフラッシュし、移動相を水/有機溶媒にしておきます。試料溶媒との混和性がある移動相を使用します (このガイドの巻末にある表を参照)。移動相 A に水または 5 % 以下のエタノールを使用している場合は、長期間放置すると、バクテリアが繁殖し始めます。

この結果、圧力の問題が発生することがあります。また、この問題は解決が困難なため、毎日、または少なくとも数日おきに新しい緩衝液に交換してください。

## UHPLC についての特別な考慮事項

高効率カラムの粒子は非常に小さいため、このような粒子をカラム内に留めるには、カラムの両端に小さいポアサイズのフリットが必要です。このフリットは、システム内に入り込む微粒子をトラップするフィルタですが、このために圧力が上がることがあります。したがって、システム内に汚染物質がない状態にすることが、高圧の UHPLC アプリケーションではさらに重要になります。

UHPLC については、認定された HPLC/MS グレードの溶媒だけを使用することをお勧めします。溶媒の提供先に必ず次の点を確認してください。

- 少量の試料や不明試料との干渉を軽減するために、溶媒と金属の不純物が少ないこと
- 微量金属の仕様が非常に低いこと (最大で 5 ppb を推奨)
- ポジティブモードおよびネガティブモードの仕様があること
- LC-MS での試験とその他の QC 試験 (QC 試験を多く実施するほど、優れた溶媒が得られる) が行われていること

溶媒の使用についてのヒント：

- 高圧操作には、ガラスよりも堅牢なステンレス製のフィルタをお勧めします。
- 高濃度 (>50 mM) の緩衝液を使用すると沈殿が生成する可能性があります。有機溶媒を使用するとこの可能性が特に大きくなります。
- 一般的な濃度で添加剤を慎重に混合してください。
- 内径の小さいカラムを使用する場合は、分析に使用する溶媒の量が少なくなります。必ず古い緩衝液を頻繁に廃棄し、溶媒をできる限り新しい状態に維持します。
- 未使用の溶媒は冷蔵庫に保管し、毎日交換します。

## インラインフィルタ

インラインフィルタは、オートサンプラとカラムの間に設置します。このフィルタにより微粒子が捕捉されるため、微粒子がカラム上部のフリットを詰まらせることを防止できます。3.5  $\mu\text{m}$  のカラムを使用している場合は、2  $\mu\text{m}$  のフリットが適切です。1.8  $\mu\text{m}$  のカラムには 0.5  $\mu\text{m}$  のフリットを使用します。



インラインデバイスの使用による背圧の問題の防止

### 低ボリュームインラインフィルタ

フィルタはすべてのカラムに用意されており、微粒子からカラムを保護します。インラインフィルタを使用すると、(ろ過していない試料や移動相、またはその両方の) 微粒子による分析カラムフリットの目詰まりを防止できるため、分析カラムの寿命が長くなります。ガードカラムを使用すると、非常に低容量のカラムや、粒子径が非常に小さいカラムの効率が低下することがあります。このようなカラムでは、低容量インラインフィルタを強くお勧めします。

1290 Infinity LC (PN 5067-4638) のインラインフィルタには、低キャリアオーバー用に設計された 0.3  $\mu\text{m}$  フィルタが含まれます。1200 bar の圧力まで使用でき、デッドボリュームは 1.3  $\mu\text{L}$  です。この同じフィルタを 1260 および 1220 Infinity LC に加えて 1200 RRLC でも使用することができます。

## ガードカラム

ガードカラムを使用しないで汚れた試料を注入すると、注入回数に応じて分析カラムの寿命が短くなる場合があります。一般的な注入回数と試料の種類をもとに判断される経済的な選択肢は、ガードカラムを使用することです。

ガードカラムは、分析カラム直前に設置します。

ガードカラムは、微粒子や強く吸着する物質によって生じる損傷を防ぎます。試料に含まれる不純物に対応する十分な容量を維持するために、カラムの内径に近い内径を持つガードカラムを選択してください。理想的には、ガードカラムの充填剤は、分析カラムのクロマトグラフィーに変化がないように、分析カラムと同じでなければなりません。ガードカラムは分離に寄与するため、メソッド開発にはガードカラムのインラインを接続した状態で行う必要があります。

ガードカラムの交換時期についての判断は難しく、経験によって判断します。おおまかに言って、理論段数、圧力、または解像度の変化が10%を超えた場合は、おそらくガードカラムの交換が必要です。ガードカラムの交換頻度の判断は、アプリケーションの種類に応じて行う必要があります。



UHPLC 保護分析カラム用高速カードカラム

## 溶媒飽和カラム

7を超えるpHや40℃の温度、50mMを超える緩衝液塩濃度など、非常に厳しい移動相条件を使用している場合は、溶媒またはシリカ飽和カラムが分析カラムの保護に有効です。溶媒飽和カラムをポンプとインジェクタの間に配置すると、移動相がこのカラムを通過するときにシリカを放出し、プロセス内の移動相を飽和させます。この結果、分析カラムに対するシリカの溶解が防止され、カラムの寿命が長くなります。溶媒飽和カラムによってドウェルボリュームとディレイグラジエントの影響が加わることもあり、これが、グラジエント技術を使用するときの欠点となります。再現性を確保するには、メソッドの移管時に、このドウェルボリュームの追加を考慮する必要があります。

## カラムインレットフリット

ガードカラムまたはインラインプレカラムフィルタなしにHPLCカラムを使用している場合は、分析カラムが詰まる可能性があります。今日では高効率充填プロセスが使用されているため、多くのカラムではカラムインレットフリットの交換はできず、交換はお勧めしません。フリットを交換するとカラム効率が低下します。

## カラムの取り扱いと保管

### カラム寿命の最大化

現在のカラムは堅牢で、通常のクロマトグラフィー条件下で長い期間使用できるように設計されています。仕様内で使用することで、カラムの寿命を最大化することができます。最終的なメソッドの使用を開始する前に、必ず仕様を確認してください。

ヒント:	追加情報
ガードカラムとインライン 0.5 μm フィルタを使用する	118 ページの「ガードカラム」の項を参照してください。
強い溶媒でカラムを頻繁にフラッシュする	100 % B 溶媒を使用します。圧力の上昇が疑われる場合は、さらに強い溶媒を使用します。59 ページのカラムのクリーニングに関するガイドラインを参照してください。
「汚れた」試料を前処理して、強く保持される成分と微粒子を最小限に抑える	固相抽出、液液抽出、0.45 μm フィルタまたは UHPLC 用の 0.22 μm フィルタによる試料のろ過、高速遠心分離を行います。
カラムの最高温度の制限についてメーカーの仕様に従う	一部のカラムは耐高温性を備えています。理想的には、カラムは指定された最高温度以下で使用する必要があります。
最大圧力限界以下で使用する	圧力を最大圧力よりも低く (理想的には 10 % 低く) 抑えた流速を選択します。
マークで指定された方向でカラムを使用する。カラムのバックフラッシュが可能かどうかについては、カラムのマニュアルを参照するか、またはメーカーに確認する	疑問点は、必ずメーカーにお問い合わせください。
カラム寿命を最大化するために pH 2~7 の移動相を使用する	この pH 範囲外で操作する場合は、StableBond カラム (低 pH 用)、高 pH 用に設計されたカラム (Eclipse Extend-C18 など)、またはポリマー系カラムを使用します。
新しい溶媒を使用してバクテリアの繁殖を抑える	バクテリアの繁殖が問題になっている場合は、移動相の保存溶液を調製し、これを冷蔵庫に入れて、毎日必要な量だけ使用します。バクテリアの繁殖を抑えるためにアジ化ナトリウムが使用されてきましたが、発ガン性があるため注意が必要です。
カラムを保管する場合は、塩と緩衝液をバージする。カラムは、純粋なアセトニトリルか、純水とアセトニトリルの 50/50 溶液に保管する	これにより、カラムへの緩衝塩の沈殿を防止できます。水溶性移動相やアルコール移動相では固定相の加水分解速度が速まるため、アセトニトリルが保管用の優れた溶媒です。
温度を上げる場合は、必ず移動相を流しながらカラム温度を徐々に上げる	分析後、室温に達するまでカラムに移動相を流し続けます。
カラムを機器に接続する場合に、カラムのエンドフィッティングを締めすぎないように注意する。エンドフィッティングの締めすぎを防ぐためにハンドルの短いレンチ/スパナを使用する	カラムには 3/8 インチのエンドナットを使用しているため、短い 3/8 インチのスパナまたはレンチを使用してカラムを機器に接続し、エンドフィッティングの締めすぎに注意します。

表 10. カラム寿命を伸ばすためのヒント

## 保管時の注意

金属の腐食を防ぐために、ハロゲン化溶媒 (塩化ブチル、塩化メチレンなど) でのカラムの長期保管は避けなければなりません。緩衝液が含まれる移動相でカラムを使用していた場合は、カラムをカラムボリュームの 20~30 倍の ACN と水でパージした後、同じ体積の純粋な有機溶媒でパージする必要があります。カラムに緩衝液を入れたままにすると、バクテリアの繁殖を促進し、カラムまたはフリットを目詰まりさせたり、ゴーストピークを発生させたりすることがあります。未修飾シリカカラムは、その他のほとんどの液体で保管することができます。THF、TEA、TFA などの劣化しやすい溶媒での保管は避けます。

一晩保管する場合は、0.1~0.2 mL/min の流速で溶媒を流しておくことも可能です。このようにすることで、翌日の平衡化時間も短縮されます。長期間の保管には、カラムメーカーが推奨する溶媒を使用します。多くの場合、これは新しいカラムの出荷時に使用する溶媒です。

## カラムの目詰まり防止

背圧が上昇し、カラムの目詰まりが疑われる場合は、バックフラッシュすることができます。カラムを検出器から取り外し、移動相を逆向きに通します (この操作が安全であることをメーカーが示している場合)。カラムのクリーニングの詳細については、59 ページを参照してください。

## カラムの劣化を簡単に判断する方法

カラム性能を示す試料のクロマトグラムを使用開始時の状態に維持することに加えて (122 ページを参照)、本来のクロマトグラフィーの重要な概念に立ち戻り、カラムの交換時期を評価することができます。

パラメータ	劣化を示す兆候
理論段数、N (効率)	カラム内の空隙発生やカラムのコンタミネーションにより、効率は徐々に低下します。ピークの広がりは効率低下の兆候です。N を監視することで、これらの問題を検出することができます。詳細については、7 ページを参照してください。
保持係数、k	保持係数は、流速とカラムサイズに依存しない保持力を測定します。k の変化は、結合相の損失の問題や、溶離しない化合物によるカラムのコンタミネーションの問題を示すことがあります。カラムの問題に間違われる、移動相の変化に関連していることもあります。詳細については、8 ページを参照してください。
分離係数、 $\alpha$	分離係数のシフトは、k と共に、結合相の損失、カラムのコンタミネーション、移動相条件の変化に関する問題のもう 1 つの指標となります。詳細については、8 ページを参照してください。
テーリング係数、Tf	テーリング係数はピークの対称性の指標です。テーリング係数の上昇はカラムの空隙発生の問題を示していますが、結合相の損失によって発生する極性溶質とシリカノール部位の間の相互作用によっても発生します。
カラム背圧、P	背圧の上昇は、ほとんどの場合、カラムインレットフリットへの微粒子の目詰まりによって発生します。ただし、カラム充填剤の崩壊によって生じるカラムの空隙により圧力が急激に上がることもあります。詳細については、10 ページを参照してください。

表 11. カラム性能の監視に役立つパラメータ

## あらゆる場所でのメソッドの再現性の確保

カラムの履歴の違いが保持にしばしば影響を与えます。あるカラムでメソッドを開発し、他のカラムでそのメソッドを実行したところ異なる結果になったとしたら、2 番目のカラムは1 番目のカラムと同じ条件で使用されていなかった可能性があります。

ある分析技術者がメソッドを開発し、平衡化に関する明確な指示のないままこのメソッドを他の分析技術者に再現してもらおうとすると、不十分なあるいは再現性のない平衡化が行われることがあります。ユーザーによって平衡化の方法が異なるため、結果に多少の違いが発生することがあります。開発者と同じ方法でカラムを平衡化すれば、同じ結果が得られます。

保持が変化する別の原因として、不適切なカラム/移動相の組み合わせ (メソッドが堅牢でない場合もあるため)、移動相や流速の変化、その他の機器の問題、充填カラムごとのカラムベッドボリュームのわずかな変化などがあります。

### メソッドの堅牢性の強化

カラムのロット間に化合物固有の変動がある場合があります。試薬もロット間で変化することがあり、クロマトグラフィーの結果に影響を与えます。メソッド開発時の推奨する方法として、複数のロットを試験し、ロット間のわずかな変化に条件が対応するかどうかを評価する方法があります。メーカーはロット間の再現性を保証できるよう試みっていますが、違いは常に発生します。慎重にメソッド開発を行うことが後の問題解決に役立ちます。

ロット間の変化を評価する場合は、最初に、カラム間のすべての問題を解決したことを確認します。次にメソッドの堅牢性を確認します。イオン性化合物を扱っている場合は、緩衝液を使用して、分析対象成分の  $pK_a$  に近い pH になっていないことを確認します。さらに、試料とカラムの pH 変化に対する影響と 2 次的な相互作用を確認します。pH 変化に対する影響を確認できたら、メソッドを再評価する必要があります。

この例 (図 78) では、ロット間の変化に pH が関連しています。このメソッドは、ロット 1 を使用して pH 4.5 で開発されたものです。シラノールが約 pH 4.5 で塩基性化合物に対して活性化されていることに注意してください (pH とメソッドの詳細については、71 ページを参照)。良好なピーク形状を持つ 2 つの塩基性化合物を確認できます。ロット 2 では、塩基 2 が劇的にシフトし、ピーク形状はシャープではありません。この問題の解決策としては、TEA の追加や pH の低下などがあります。ここでは pH を下げました。pH 3 ではロット 1 の選択性が変化しましたが、それでも良好なベースライン分離が維持されています。さらに、pH 3 におけるロット 1 とロット 2 の間の再現性も良好でした。ピーク 4 が小さくなっていますが、これは試料の劣化が原因です。

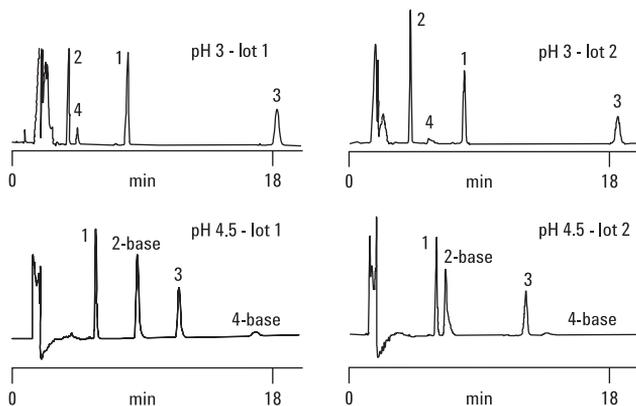


図 78. pH レベルによるロット間の保持の変化

要約すると、ロット間で保持は変化します。

- カラム間の選択性の変化の原因をすべて排除する
- メソッドの堅牢性を再評価し、メソッドを変更する
- pH 変化に対する影響を確認し、再びメソッドを変更する
- さまざまな選択性の変化を分類し、メーカーに連絡する

### ドウェルボリュームの意味について

ドウェルボリュームを理解することは、ラボ間のメソッド移管にとって非常に重要です (ドウェルボリュームの詳細については、49 ページを参照)。1 つのラボで使用されている HPLC 機器のドウェルボリュームが別のラボの機器とは異なるときに、両方のラボで同じメソッドを使用すると、このメソッドの結果は、ほとんどの場合同じになりません。この不一致の理由は、カラムヘッドに達するまでに、2 つ (またはそれ以上) の移動相の混合ポイントで形成されるグラジエントが機器の流路で費やす時間が異なる点にあります。このため、注入後の分析対象成分に対する移動相の組成が時間の関数として変化し、その保持と分離度が影響を受けます。したがって、ドウェルボリュームが小さい方の機器にボリュームを追加することで、ドウェルボリュームを調整する必要があります。または、ドウェルボリュームが大きい機器の接続チューブの内径や長さを小さくすることで、小さい機器のドウェルボリュームに合わせることもできます。別の方法として、メソッドにグラジエント遅延を導入し、フローシステムでの異なる滞留時間を補正する方法もあります。ただし、一部のバリデーション済みメソッドでは、この変更を分析に使用することはできません。

# トラブルシューティング クイックリファレンス

毎日の分析をスムーズに進めるためのヒントとガイドを集めました。

疑問点やトラブルが生じた際にはこの章を参照してください。問題の原因をすばやく特定できるように、現場の分析技術者からアジレントの技術サポートチームに寄せられる最も一般的な問題をまとめたクイックガイドを用意しました。この表に、問題の対応に役立つ時間短縮のためのヒントを示します。特定の問題に関する詳細については、このガイドの他の項目を参照してください。

## 有効なトラブルシューティングのためのヒント

原則として、正常な動作がわかっている場合にのみ、問題の発生に気付くことができるということを心にとめておいてください。ここでは、トラブルシューティングをする際に役立つ、ラボでの2つの取り組みについて説明します。

- **新しいカラムを使用する際に試験分析を実施する** – 新しいカラムを使用する際、まずカラムのチェックのため、試験分析を実施しクロマトグラムを確認します。通常、試験には、ラボで一般に使用されている、または薬品サプライヤから購入できる入手が容易な化学薬品を用います。試験用試料を調製し(それぞれ 0.1 mg/mL が開始濃度として適切)、新しいカラムを取り付けた機器で実行して比較します。この初めての試験注入は、最適な結果が得られない原因となるシステムの問題がないかどうかを特定するために役立ちます。試験用混合試料とアプリケーションとの関連性を考慮し、独自の試料や標準試料が好ましい場合もあります。試験分析はイソクラティック条件の採用が最適です。これは、グラジエントでは、「圧縮された」ピークによって不十分なカラム性能がごまかされ、人工的にシャープに見えることがあるからです。ご自身の試験クロマトグラムをこのオリジナルの試験分析のクロマトグラムと経時的に比較することで、カラムの効率が低下したかどうか、または性能に影響を与える他の変化があったかどうかを評価することができます。6~12 ページで説明した式を使用して、効率 (理論段数)、分離係数、分離度、圧力などのパラメータを算出することをお勧めします。カラムの相対的な性能を知ること、問題の潜在的な原因を特定しやすくなります。
- **最適化された機器のシステムマップを保持する** – 機器を設置し、メソッドを最適化したら、機器の積み重ねの方法、すべての接続チューブおよびアクセサリ、すべてのケーブルの部品番号と長さを正確に書き留めておきます。このマップは、問題が発生したときに、誰もシステムの構成を変更していないこと、それによって結果や機器の性能が変化していないことを確認するための便利なりファレンスとなります。

問題	考えられる原因	解決策
<b>圧力</b>		
背圧が高い (詳細については、 10 ページの圧力 の式を参照)	カラムのインレットフリットの 目詰まり	カラムを交換する；カラムをバックフラッシュする (バックフラッシュ可能な場合) (60 ページを参照)
	カラムの目詰まり (化学物質による コンタミネーション)	溶媒でカラムをクリーニングするか、回復しない場合はカラムを交換する
	カラムの粒子径が小さすぎる	カラムの選択を確認する (30 ページを参照)
	インラインフィルタのフリット またはガードカラムの目詰まり	フィルタのフリットを調べ、必要に応じて交換する
	チューブの目詰まり	チューブを取り外し、それが原因かどうかを確認する； 必要に応じて交換する
	ポリマー系カラム：溶媒の変更に よって膨張する	メーカーの溶媒適合性情報を確認する
	移動相の粘性が高すぎる	粘性の低い溶媒を使用するか、温度を上げる
	塩/緩衝液が沈殿する	移動相と緩衝液との適合性を確認する
圧力変動	ポンプ内の気泡	溶媒を脱気する (71 ページを参照)；溶媒をヘリウムで脱気するか、インラインデガッサを使用する
	チェックバルブまたはシールの漏れ	チェックバルブを交換するか、クリーニングする； ポンプシールを交換する
圧力低下または 圧力が上がらない	ポンプからの流速が不十分	移動相のリザーバをベントする；リザーバのインレットラインのフリットを交換する；チューブが挟まれていないことを確認する；流速の設定を確認する；システム全体で漏れを確認する
	ポンプのチェックバルブまたは シールの漏れ	チェックバルブを交換するか、クリーニングする； ポンプシールを交換する；残留塩を確認する
	ポンプの泡かみ	溶媒を脱気する；溶媒リザーバからポンプへのラインの障害物を確認する；インレットラインのフリットを交換する
<b>ピーク形状</b>		
ピークがない	機器の問題	すべての HPLC コンポーネントがオンになり、動作していることを確認する；移動相が検出器出口のチューブから流れていることを確認する；システムの適合性を確認するために保持されない成分を注入する；溶媒強度を上げるか、グラジエントを実行する
	移動相または固定相の間違った 組み合わせ	
余分なピークま たは「ゴースト」 ピーク	直前の注入の分析成分が 残っている	10 % ACN~90 % ACN を 10~15 分間などの高速グラジエントを使用して、試料中の成分の数とその相対的な保持を予測する；75 % MeOH などの強い移動相や高い流速でフラッシュし、成分をカラムから迅速に溶離させる
	移動相のコンタミネーション	高純度 HPLC グレード以上 (LC/MS またはグラジエントグレード) の溶媒だけを使用する；市販の HPLC 用超純水、または純水製造システムから得られた高純度の水を使用する
	サンプル前処理法/汚染の サンプル前処理	通常は、ろ過、SPE、液液抽出、遠心分離などのサンプル前処理によって汚染を軽減

表 12. トラブルシューティングの簡単なヒント

次のページに続く

問題	考えられる原因	解決策
ピーク形状、続き		
余分なピークまたは「ゴースト」ピーク続き	システムのコンタミネーション	試料溶媒を注入し、問題の原因が試料溶媒中にないことを確認する；試料分析の合間にブランク注入を行い、キャリアオーバーが原因のゴーストピークがないことを証明する  オートサンブラを流路から外し、ブランク分析を行って、ゴーストピークが消えるかどうかを確認する；消える場合は、オートサンブラをクリーニングする；消えない場合は、別のシステムコンポーネントまで流路を逆にたどって原因を切り離す
	カラムのコンタミネーション (注：ゴーストピークの原因としては一般的ではない)	カラムをバックフラッシュする (バックフラッシュ可能かどうかはメーカーの情報を確認)；カラムをクリーニングする (59 ページを参照)
ピークのリーディング	カラムのチャネリング	カラムを交換する；ガードカラムを使用する
	カラムのオーバーロード	容量の大きいカラムを使用する (長さまたは内径を大きくする)；試料の量を減らす
ピークのテーリング	シラノールの相互作用 (シリカ系カラム)	エンドキャップ処理済みのカラムを使用する；緩衝液の濃度を上げる；移動相の pH を下げてシラノールの相互作用を抑える；競合する塩基を添加する；試料を誘導体化して極性相互作用を変化させる；もし、これらの処置で効果がないときはカラムを逆方向の向きに取り付け、分析を実行する；もし、この処置で結果が向上し現象が改善した場合は、カラムのコンタミネーションが原因と考えられるため、カラムをクリーニングするか、交換する
	カラム外ボリュームの影響	モジュール間に長い配管がないかどうか、システムを確認し、できるだけ短い接続長のものに交換する；高効率カラムを使用している場合は、緑色の内径 0.18 mm の配管と赤い 0.12 mm の配管に交換する
	高温におけるカラムの劣化 (シリカ系カラム)	温度を 40 °C 未満まで下げる；立体保護されたシリカ、ハイブリッド、ポリマー、ジルコニア系など、高温に対応するカラムを使用する
	高 pH におけるカラムの劣化 (シリカ系カラム)	高 pH 用の対応範囲の広いカラムまたは二座型相のカラム (ZORBAX Extend-C18 など) を使用するか、またはポリマー系、ハイブリッドまたはジルコニア系逆相カラムを使用する
	カラムの空隙	カラムを逆向きに取り付け分析を実行する；すべてのピークについて不十分な形状やピークが二重になる場合は、カラムに空隙がある可能性が高い；カラムを廃棄する
	共溶出ピークの干渉	移動相の組成を調整して (70 ページを参照)、または新しい固定相を選択して選択性を向上する；試料のクリーンアップを向上する
ピークのスプリット/ 二重のピーク	成分の干渉	前処理を行い試料をクリーンアップする；移動相または固定相を変更して選択性を調整する  直前に注入した成分が残っていることが疑われる場合は、分析の最後に強い溶媒でカラムをフラッシュする；高い溶媒濃度でカラムを洗浄するプロセスをメソッドに追加する；分析時間を延長する

次のページに続く

問題	考えられる原因	解決策
<b>ピーク形状、続き</b>		
ピークの スプリット/ 二重のピーク、 続き	カラムフリットが部分的に 詰まっている	カラムをバックフラッシュする (可能な場合) (59 ページを参照); インジェクタとカラムの間に 0.2 $\mu\text{m}$ または 0.5 $\mu\text{m}$ (UHPLC) のイ ンラインフィルタを使用する; 試料をろ過する; ガードカラムを 使用する (118 ページ)
	カラムの空隙	カラムを交換する; 今後はガードカラムを使用して分析カラム を保護する (118 ページを参照); カラムにダメージを与えない 移動相条件を使用する
	注入溶媒の影響	移動相または強度の弱い注入溶媒を使用する (47~48 ページを参照)
	試料のオーバーロード	試料の注入量を少なくする (47 ページを参照)
	試料溶媒に移動相との 適合性がない	移動相または弱い混和性のある溶媒を注入溶媒として 使用する
	インジェクタのローターシールが 摩耗している	インジェクタのローターシールを交換する
	ピークの広がり/ 広いピーク	不適切なフィッティング/接続
システムの余分なチューブ ボリューム		カラム外ボリュームを排除するために、できる限り配管が細く 短いを確認する (42 ページを参照)
注入量が多すぎる		注入量を減らす (47 ページを参照)
システム設定 (データサンプリングレートが 条件には低すぎるなど)		データサンプリングレートを確認する; 検出器の設定と 時定数を、S/N 比を損なわないでできる限り高速の値に調整する (48 ページを参照)
試料の希釈液の溶媒強度が 高すぎる		希釈液の溶媒強度を下げる (47 ページを参照)
グラジエントの場合: ドウェルボリューム		グラジエントの初期濃度を下げてピークの拡散を抑制する; またはインジェクタのプログラミングを使用して、試料を注入 する前にグラジエントを開始する (49 ページを参照); インクラ ティックではなくグラジエント部分でピークが 溶離していることを確認する
<b>保持</b>		
保持時間の シフト	カラムが古くなっている	得られたクロマトグラムを試験分析のクロマトグラムと 比較して (123 ページを参照) カラムの劣化状態を確認する; ガードカラムを使用してカラム寿命を伸ばす
	不適切なカラムサイズと流速の 組み合わせ	メソッドパラメータを確認し、カラムサイズに応じた流速が設定 されているかどうか確認する (36~37 ページを参照); これは グラジエントで特に重要
	カラム/移動相の組み合わせが 分析種には不適切 (結合相の 保持が不十分、pH が $\text{pK}_a$ に 近すぎる、カラムの pH 範囲が 移動相と適合しないなど)	移動相の調製を毎回同じ方法で行ったことを確認する; 緩衝液と溶媒をきれいなガラス器具に個別に計量し、その後 に混合する; 移動相を脱気する; 古くなった移動相を交換する (78~80 ページを参照)
	グラジエント分析の場合: カラムの再平衡化が不十分	カラムのボイドボリュームとシステムのドウェルボリュームを 測定し、メソッドに最適な平衡化時間を確認する (56 および 84 ページを参照)

次のページに続く

問題	考えられる原因	解決策
<b>保持、続き</b>		
保持の減少	カラム充填剤の活性部位	移動相の添加剤、競合する塩基 (トリエチルアミンなどの塩基性化合物) を使用するか、緩衝液の強度を上げる ; リガンドカバレッジ率の高いカラム充填剤を使用する
	試料のオーバーロード	試料の量を減らすか、内径が大きい、または長いカラムを使用する
	化学結合相またはベースシリカの溶解	pH 2~8 の移動相を使用する ; 高 pH または低 pH 専用のシリカ系カラム、ポリマー系、またはその他の高/低 pH で使用可能なカラムを使用する
	カラムの劣化	ガードカラムを使用する ; 安定性の高い、ポリマー系、ハイブリッドカラム、またはジルコニア、チタン、グラファイトカーボン等のカラムを使用する
<b>保持の増加</b>		
	流速の減少	ポンプ流速を確認し、リセットする ; ポンプの泡かみを確認する ; ピストンシール、チェックバルブ、その他のシステムで漏れを確認する
	移動相の組成の変化	溶媒リザーバにカバーを付ける ; グラジエントシステムの組成が正しいことを確認する ; イソクラティック分析の場合移動相をあらかじめ混合しておく (70 ページを参照)
	化学結合相の損失	通常のシリカ系カラムでは、移動相の pH を 2~8 に維持する ; 非常に高い pH (>10) または非常に低い pH (<2) での分析には、安定性の高い結合相か、ポリマー系あるいは安定性の高い固定相のカラムを使用する
<b>ベースライン</b>		
ベースラインのドリフト	グラジエント分析の場合 : 移動相 A または B の吸光度	負のドリフトの場合 : UV 吸光性のない移動相溶媒を使用する ; HPLC グレードの移動相溶媒を使用する ; 移動相 A の UV 吸光性の添加剤を移動相 B に加え、ドリフトのバランスを取る/補正する  正のドリフトの場合 : 測定対象成分を検出できる範囲で、なるべく長波長の波長を使用する ; UV 吸光性のない移動相溶媒を使用する ; 移動相 B に加える UV 吸光性の化合物の量を減らし、ドリフトのバランスを取る/補正する (76 ページ)
	うねり・室温変動	カラムを断熱するか、カラムオープンを使用する ; 示差屈折率検出器にカバーを付け、空気の流れにあてない
	正の方向 - LC/MS、固定相ブリード	低ブリードの MS 用または安定性の高い固定相カラムを使用する
	正の方向 - MS のコンタミネーション	MS インタフェースをクリーニングし、PEEK チューブカラムには THF や塩素系溶媒を使用しない
	カラムのコンタミネーション (カラムからのブリード)	強い溶媒でカラムをフラッシュする ; 試料のクリーンアップを改善する ; ガードカラムを使用/交換する ; 分析カラムを交換する
	継続的に発生する問題 : 検出器ランプとフローセルを確認	UV ランプを交換し、フローセルをフラッシュして洗浄する

次のページに続く

問題	考えられる原因	解決策
ベースライン、続き		
ベースラインのドリフト、続き	グラジエントまたはイソクラティックの場合： 溶媒の混合不足	適切な混合ミキサーを使用する；片方の溶媒に UV 吸光性化合物をスパイクし、UV 吸光検出器のシグナルを確認することで混合比の精度を確認する
	グラジエントまたはイソクラティックのプロポーショニング・プロポーショニングバルブの誤動作	プロポーショニングバルブをクリーニングするか、交換する；溶媒の一部を事前に混合する (A に 5 % B を、またはその逆になど)
	時折発生するシャープなスパイク・外部からの電氣的干渉	定電圧装置/定電圧電源を LC システムに使用する；サイクルオープンなどのローカルの干渉源を確認する；独立した電流を使用する
	周期的・ポンプのパルス	パルスダンパを修理または交換する；ポンプから空気を追い出す；チェックバルブをクリーニングするか、交換する；移動相を脱気する
	ランダム・汚染物質の蓄積	強い溶媒でカラムをフラッシュまたはバックフラッシュする (可能な場合) (59 ページを参照)；試料をクリーンアップする；HPLC グレードの溶媒を使用する
	スパイク・検出器内の泡	移動相を脱気する (71 ページ)；背圧リストリクタを検出器出口で使用する；すべてのフィッティングが締められ、漏れていないことを確認する (43 ページを参照)

# 参考情報一覧

この章では分析に役立つ情報をまとめました。

メソッド開発の参考になる有用な情報を紹介します。

- USP 表記
- 溶媒特性の表 (極性指標と UV カットオフを含む)
- 溶媒の混和性の表
- 一般に使用される移動相修飾剤の UV カットオフ
- 固相抽出 (SPE) 相の概要
- SPE 充填剤の使用条件

## USP (米国薬局方) 表記

USP では、メーカーではなく充填剤の種類でカラムを指定しています。ほとんどのカテゴリには、粒子径、粒子形状、カーボンロード、または表面積が異なる、複数のさまざまな種類のカラムが含まれます。このような場合、USP によるカラムの指定は非常に幅広く、複数の種類のカラムが基本的な仕様を満たしています。例えば、L1 の仕様では、多孔質シリカまたはセラミックのマイクロ粒子 (内径 1.5~10  $\mu\text{m}$ ) に化学結合したオクタデシルシラン、またはモノリスロッドが必要です。

多くの市販のカラムは基本的な仕様を満たしており、全多孔性、表面多孔性、モノリスなど、粒子タイプが異なります。ただし、すべての C18 カラムが類似しているわけではなく、希望する分離を実際に提供できるのは、限られた数の C18 カラムだけです。効率と分離度を向上するには、球状の全多孔性または表面多孔性粒子 (1.5~3.5  $\mu\text{m}$ ) を推奨します。USP では、ニーズを満たす最適なカラムを柔軟に決定することができます (表 13)。

## USP 表記 (2010 年 12 月)

USP メソッド	USP 充填剤	カラム	粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	ポア サイズ ( $\text{\AA}$ )
L1	多孔質シリカまたはセラミック マイクロ粒子 (粒径 1.5~10 $\mu\text{m}$ ) に 化学結合したオクタデシルシラン、 またはモノリスロッド	Poroshell 120 EC-C18	2.7	120
		Poroshell 120 SB-C18	2.7	120
		Poroshell HPH-C18	2.7	100
		ZORBAX Eclipse Plus C18	1.8、3.5、5	95
		ZORBAX Eclipse XDB-C18	1.8、3.5、5、7	80
		ZORBAX SB-C18	1.8、3.5、5、7	80、300
		ZORBAX Rx-C18	3.5、5	80
		ZORBAX Extend-C18	1.8、3.5、5、7	80、300
		ZORBAX ODS	3.5、5、7	70
		ZORBAX ODS Classic	5	70
		ZORBAX 300SB-C18		
		ZORBAX 300 Extend C18		
		AdvanceBio Peptide Mapping		
		AdvanceBio Oligonucleotide		
		Pursuit XRs C18	3、5、10	100
		Pursuit C18	3、5、10	200
		L3	多孔質シリカ粒子 (粒径 5~10 $\mu\text{m}$ )、 またはモノリスシリカロッド	Polaris C18-A
Polaris C18-Ether	3、5			200
SepTech ST60 C18	10			60
SepTech ST150 C18	10			150
ZORBAX SIL	5			70
ZORBAX Rx-Sil	3.5、5			80、300
Pursuit XRs Si	3、5、10			100
Polaris Si-A	5、10	180		

表 13. USP 表記と対応するアジレントのカラム

次のページに続く

## USP 表記 (2010 年 12 月)

USP メソッド	USP 充填剤	カラム	粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	ポア サイズ ( $\text{\AA}$ )
L7	全多孔質シリカ粒子 (粒径 1.5~10 $\mu\text{m}$ ) にオクチルシランを化学結合した 充填剤、またはモノリスシリカロッド	Poroshell 120 EC-C8	2.7	120
		Poroshell 120 SB-C8	2.7	120
		Poroshell HPH-C8	2.7	100
		ZORBAX Eclipse Plus C8	1.8、3.5、5	95
		ZORBAX Eclipse XDB-C8	1.8、3.5、5、7	80
		ZORBAX SB-C8	1.8、3.5、5、7	80、300
		ZORBAX Rx-C8	1.8、3.5、5、7	80
		ZORBAX C8	5	70
		Pursuit XRs C8	3、5、10	100
		Pursuit C8	3、5、10	200
		Polaris C8-A	3、5	180
		Polaris C8-Ether	3、5	200
		ZORBAX 300SB-C8		
		AdvanceBio RP-mAb SB-C8		
L8	全多孔質シリカゲル担体に単分子層 のアミノプロピルシランを化学 結合した充填剤 (粒径 3~10 $\mu\text{m}$ )	ZORBAX NH2	5	70
		Polaris NH2	5	180
L9	強酸性陽イオン交換基を化学結合 した不規則または球状全多孔質 シリカゲル (粒径 3~10 $\mu\text{m}$ )	ZORBAX SCX	5 球状	300
L10	多孔質シリカ粒子 (粒径 3~10 $\mu\text{m}$ ) に ニトリル基を化学結合した充填剤	ZORBAX CN	5	70
		ZORBAX SB-CN	3.5、5、7	80、300
		ZORBAX 300SB-CN		
		ZORBAX Eclipse XDB-CN	3.5、5	80
		Poroshell 120 EC-CN	2.7	120
L11	多孔質シリカ粒子 (粒径 1.5~10 $\mu\text{m}$ ) に フェニル基を化学結合した充填剤	ZORBAX Eclipse XDB Phenyl	5	70
		ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl	1.8、3.5、5	95
		ZORBAX SB-Phenyl	3.5	80
		ZORBAX 300-Diphenyl	1.8	300
		Poroshell 120 Phenyl-Hexyl	2.7	120
		Pursuit XRs Diphenyl	3、5、10	100
Pursuit Diphenyl	3、5、10	200		

次のページに続く

## USP 表記 (2010 年 12 月)

USP メソッド	USP 充填剤	カラム	粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	ポア サイズ ( $\text{\AA}$ )
L13	多孔質シリカ粒子 (粒径 3~10 $\mu\text{m}$ ) に トリメチルシリランを化学結合した 充填剤	ZORBAX TMS	5	70
L14	強塩基性第4級アンモニウム陰イオン 交換基を化学結合したシリカゲル (粒径 5~10 $\mu\text{m}$ )	ZORBAX SAX	5	70
		IonoSpher A	5	120
L17	水素型のスルホン化架橋スチレン - ジビニルベンゼン共重合体 (粒径 7 ~11 $\mu\text{m}$ ) からなる強陽イオン交換 樹脂	Hi-Plex H	8	N/A
		Bio SCX NP10		
L19	カルシウム型のスルホン化架橋 スチレンジビニルベンゼン共重合体 (粒径 9 $\mu\text{m}$ ) からなる強陽イオン 交換樹脂	Hi-Plex Ca	8	N/A
		Hi-Plex Ca (Duo)	8	N/A
L20	多孔質シリカ粒子 (粒径 3~10 $\mu\text{m}$ ) に ジヒドロキシプロパン基を化学 結合した充填剤	LiChrospher Diol	5	N/A
L21	硬質球状スチレン - ジビニル ベンゼン共重合体 (直径 5~10 $\mu\text{m}$ )	PLRP-S	3、5、8、10、 10-15、15-20、 50	100
		PLRP-S	3、5、8、10、 10-15、15-20、 50	300
		PLRP-S	5、8、10、30、 50	1000
		PLRP-S	5、8、10、30、 50	4000
		PLgel	3、5、10、20	50、100、500、 103、104、 105、106、 MIXED
L22	スルホン酸基を持つ多孔質 ポリスチレンゲル (約 10 $\mu\text{m}$ のサイズ) からなる陽イオン交換樹脂	Hi-Plex H	8	N/A

次のページに続く

## USP 表記 (2010 年 12 月)

USP メソッド	USP 充填剤	カラム	粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	ポア サイズ ( $\text{\AA}$ )
L25	中性、陰イオン、および陽イオン水溶性ポリマーに適用される、分子量範囲 1,000~5,000 Da (ポリエチレンオキシドとして) の化合物を分離できる充填剤。ポリヒドロキシ化エーテル (表面にカルボキシル官能基が多少残存する) により架橋されたポリメタクリル酸エステル樹脂ベースが適切であることが確認されている	PL aquagel-OH	5, 8	30
L26	AdvanceBio RP-mAb C4			
L33	分子量範囲 4,000~500,000 Da でデキストリン質を分離できるシリカを基本とする球状充填剤で、pH 安定性を持たせるように処理	ZORBAX GF-250	4	150
		Bio SEC-3	3	100、150、300
		Bio SEC-5	5	100、150、300、500、1000、2000
		ProSEC	5	300
L34	鉛型のスルホン化架橋スチレン-ジビニルベンゼン共重合体 (粒径約 9 $\mu\text{m}$ ) からなる強陽イオン交換樹脂	Hi-Plex Pb	8	N/A
L35	単分子層の親水性 (ジオールタイプ) 単分子層結合相を持つ、ジルコニウムで安定化した球状シリカ充填剤 (ポアサイズ 150 $\text{\AA}$ )	ZORBAX GF-250	4	150
		ZORBAX GF-450	6	300
L43	プロピル基を介してシリカ粒子 (粒径 5~10 $\mu\text{m}$ ) にベンタフルオロフェニル基を化学結合した充填剤	Pursuit PFP	3、5	200
		Poroshell 120 PFP	2.7	120
L45	多孔質シリカ粒子 (粒径 5~10 $\mu\text{m}$ ) に結合した $\beta$ シクロデキストリン	ChiraDex Chiral	5	100
L50	逆相保持および、強陰イオン交換機能を持つ多機能樹脂。この樹脂は、架橋度 55 % のエチルビニルベンゼンジビニルベンゼン共重合体で (粒径 3~15 $\mu\text{m}$ ) を基材としており、表面積は 350 $\text{m}^2/\text{g}$ 以上。基材は第 4 級アンモニウムを持つ架橋スチレンジビニルベンゼンのラテックス粒子でコーティングされている。	ZORBAX 300SCX	5	300

次のページに続く

## USP 表記 (2010 年 12 月)

USP メソッド	USP 充填剤	カラム	粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	ポア サイズ ( $\text{\AA}$ )
L52	スルホプロピル基を持つ多孔質シリカ (粒径 5~10 $\mu\text{m}$ ) からなる弱陽イオン交換樹脂	IonSpher C	5	120
L53	架橋度 55 % のエチルビニルベンゼンジビニルベンゼン共重合体 (粒径 3~15 $\mu\text{m}$ ) からなる弱陽イオン交換樹脂。基材表面は、カルボン酸やリン酸で修飾されている。容量は 400 $\mu\text{Eq}$ /カラム以上。	Bio SAX	3、5、10	300
L56	全多孔質シリカ粒子 (粒径 3~10 $\mu\text{m}$ ) にプロピルシランを化学結合した充填剤	ZORBAX SB-C3 ZORBAX 300 SB-C3	1.8、3.5、7	80、300
L57	不斉認識能を持つタンパク質、オボムコイドをシリカ粒子 (粒径約 5 $\mu\text{m}$ 、ポアサイズ 120 $\text{\AA}$ ) に化学結合した充填剤	Ultron ES-OVM	5	120
L58	ナトリウム型のスルホン化架橋スチレンジビニルベンゼン共重合体 (粒径約 6~30 $\mu\text{m}$ ) からなる強陽イオン交換樹脂	Hi-Plex Na Hi-Plex Na (Octo)	10 8	N/A N/A
L60	球状、多孔質シリカゲル、粒径 10 $\mu\text{m}$ 、アルキルアミドが化学結合で導入されエンドキャップ処理された表面	Bonus-RP Poroshell 120 Bonus-RP Polaris Amide-C18	1.8、3.5、4.6、 5 2.7 3、5	80 120 180
L68	Glycan マッピングカラム	AdvanceBio Glycan マッピング	2.7、1.8	N/A

## 溶媒の混和性

液体クロマトグラフィーでは、さまざまな溶媒の混和性を理解していることが重要です。これは、混和性のない複数の溶媒を使用することにより、クロマトグラフィーの結果にエラーが引き起こされることがあるからです。混和性とは、ある溶液全体が別の溶液と混ざり合い、新しい均一な溶液になる能力のことです。

有機化合物では、溶媒の極性によって、その溶媒に溶ける化合物の種類と、その溶媒が混和する他の溶媒が決まります。一般に、「似ているもの同士はよく溶ける」と言われるように、極性溶媒には極性化合物が最もよく溶け、無極性溶媒には無極性化合物が最もよく溶けます。したがって、水 (高極性) とヘキサン (無極性) には混和性がなく、よく振った後も 2 つの層にすばやく分かれます。

## 一般的な HPLC 溶媒の特性

溶媒	粘度 (20 °C に おける cP)	沸点 (°C)	UV カット オフ (nm)	極性指数 (P')	混和性番号 (M)
アセトン	0.36	56.29	330	5.1	15、17
アセトニトリル	0.38*	81.60	190	5.8	11、17
n-酢酸ブチル	0.74	126.11	254	4.0	22
n-ブチルアルコール	2.98	117.50	215	3.9	15
n-塩化ブチル	0.45	78.44	220	1.0	
クロロベンゼン	0.80	131.69	287	2.7	21
クロロホルム	0.57	61.15	245	4.1	19
シクロヘキサン	1.00	80.72	200	0.2	28
シクロペンタン	0.44	49.26	198	0.1	
o-ジクロロベンゼン	1.32**	180.48	295	2.7	
ジクロロメタン	0.44	39.75	233	3.1	20
ジメチルアセトアミド	2.14	166.10	268	6.5	
N,N-ジメチルホルムアミド	0.92	153.00	268	6.4	12
ジメチルスルホキシド	2.24	189.00	268	7.2	9
1,4-ジオキサン	1.37	101.32	215	4.8	17
酢酸エチル	0.45	77.11	256	4.4	19
エタノール	1.10	78.32	210		
エチルエーテル	0.24	34.55	215	2.8	23
二塩化エチレン	0.79	83.48	228	3.5	
ヘプタン	0.42	98.43	200	0.1	29

表 14. 溶媒特性

次のページに続く

## 一般的な HPLC 溶媒の特性

溶媒	粘度 (20 °C に おける cP)	沸点 (°C)	UV カット オフ (nm)	極性指数 (P')	混和性番号 (M)
ヘキサン	0.31	68.70	195	0.1	29
イソオクタン	0.50	99.24	215	0.1	29
イソブチルアルコール		107.70	220	4.0	15
イソプロピルアルコール	2.40	82.26	205	3.9	15
ミリスチン酸イソプロピル		192.60			
メタノール	0.59	64.70	205	5.1	12
メチル t-ブチルエーテル	0.27	55.20	210	2.5	
メチルエチルケトン	0.43	79.64	329	4.7	17
メチルイソブチルケトン	0.58	117.40	334	4.2	
N-メチルピロリドン	1.67**	202.00	285	6.7	
ペンタン	0.23	36.07	190	0.0	
石油エーテル				0.1	
n-プロピルアルコール	2.30	97.20	210	4.0	
プロピレンカーボネート		241.70	220	6.1	
ピリジン	0.95	115.25		5.3	16
テトラヒドロフラン	0.55	66.00	212	4.0	17
トルエン	0.59	110.62	284	2.4	23
1,2,4-トリクロロベンゼン		213.50	308		
トリエチルアミン	0.36**	89.50			
トリフルオロ酢酸	0.93	71.80	210		
水	1.00	100.00	190	10.2	
o-キシレン	0.81	144.41	288	2.5	

\* 15 °C における cP

\*\* 25 °C における cP

欠けている値は、そのデータが得られていないことを示します。

混和性 (M) 番号：

1. M 番号の違いが 15 単位以下のすべてのペアは、15 °C においてどのような割合でも混和します。
2. M 番号の違いが 16 の各ペアは、25 °C と 75 °C の間に臨界共溶温度 (通常は 50 °C) があります。
3. 違いが 17 以上の場合は、混和性がないことを、または臨界共溶温度が 75 °C 以上であることを示します。

この表の情報は Honeywell Burdick & Jackson® ([www.honeywell.com/contactbandj](http://www.honeywell.com/contactbandj)) から提供されたものです。

## 溶媒の混和性の表

	アセトン	アセトニトリル (ACN)	n-ブチルアルコール	クロロホルム	シクロヘキサン	ジクロロメタン (DCM)	N,N-ジメチルホルムアミド	ジメチルスルホキシド (DMSO)	1,4-ジオキサン	酢酸エチル	エタノール	エチルエーテル	二塩化エチレン	ヘプタン	ヘキサン	イノクタナ	インプロパノール (IPA)	メタノール	メチルt-ブチルエーテル	メチルエチルケトン	ペンタン	テトラヒドロフラン (THF)	トルエン	水	o-キシレン
アセトン																									
アセトニトリル (ACN)																									
n-ブチルアルコール																									
クロロホルム																									
シクロヘキサン																									
ジクロロメタン (DCM)																									
N,N-ジメチルホルムアミド																									
ジメチルスルホキシド (DMSO)																									
1,4-ジオキサン																									
酢酸エチル																									
エタノール																									
エチルエーテル																									
二塩化エチレン																									
ヘプタン																									
ヘキサン																									
イノクタナ																									
インプロパノール (IPA)																									
メタノール																									
メチルt-ブチルエーテル																									
メチルエチルケトン																									
ペンタン																									
テトラヒドロフラン (THF)																									
トルエン																									
水																									
o-キシレン																									

混和しない
  混和する

表 15. 溶媒の混和性

この表では、2つの溶媒が2つの個別の相を形成せずに、どのような割合でも混合できる場合に混和性ありと分類します。この表の情報は Honeywell Burdick & Jackson® から提供されたものです。ご質問は、B&J ([www.honeywell.com/contactbandj](http://www.honeywell.com/contactbandj)) までお問い合わせください。

## 移動相修飾剤の UV カットオフ

移動相の添加剤は、さまざまな要件のバランスをとって選択します。その添加剤は、カラムの仕様の範囲で安定した pH の溶液を生成し、(イオン抑制、イオンペア、またはこれらの組み合わせによって) 分析対象成分のイオン化を制御するのに適切でしょうか。その添加剤の揮発性、MS 検出におけるイオン抑制、UV 透過性などの異なる特性が、検出器の性能に大きな影響を与えないでしょうか。限られた添加剤しか使用できないため分析技術者は分析対象成分の選択性を向上させるために、より広範囲に固定相 (C8 や C18 のような一般的なアルキル相に加えて、極性基埋込み型、アルキルフェニル、フッ素置換アルキル/フェニルなど) を検討しなければならないこともあります。

次の表に、一般的な HPLC 移動相修飾剤の UV カットオフを示します。

	v/v	25 °C における pK <sub>a</sub>	最大 pH 範囲	UV カットオフ (nm)
トリフルオロ酢酸 (TFA)	0.1 %	0.3		210
	0.05 %	0.3		210
	0.01 %	0.3		210
リン酸塩、pK <sub>1</sub>		2.1	1.1 – 3.1	<200
リン酸塩、pK <sub>2</sub>		7.2	5.2 – 8.2	<200
リン酸塩、pK <sub>3</sub>		12.3	11.3 – 13.3	<200
クエン酸塩、pK <sub>1</sub>		3.1	2.1 – 4.1	230
クエン酸塩、pK <sub>2</sub>		4.7	3.7 – 5.7	230
クエン酸塩、pK <sub>3</sub>		6.4	5.4 – 7.4	230
炭酸塩、pK <sub>1</sub>		6.1	5.1 – 7.1	<200
炭酸塩、pK <sub>2</sub>		10.3	9.3 – 11.3	<200
ギ酸塩		3.8	2.8 – 4.8	210 (10 mM)
酢酸 (HAC)	1.0 %	4.8	3.8 – 5.8	210
酢酸塩		4.8	3.8 – 5.8	210 (10 mM)
アンモニア		9.2	8.2 – 10.2	200 (10 mM)
ホウ酸塩		9.2	8.2 – 10.2	n/a
トリエチルアミン (TEA)		10.8	9.8 – 11.8	<200
TRIS-HCl		8.3	7.3 – 9.3	205 (120 mM)

影付きの部分は、LC/MS アプリケーションでより一般的に使用される緩衝液を示します。

表 16. 一般的な移動相修飾剤の UV カットオフ

## 固相抽出の充填剤

分離のメカニズム	一般的な相	構造
無機 (吸着)	アルミナ	AlOH
	Florisil	Mg <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>
順相 (極性結合相 - シリカベース)	シリカ	Si-OH
	シアノ	-CN
	アミノ	-NH <sub>2</sub>
	ジオール	-CH(OH)-CH(OH)-
逆相 (無極性結合相 - 強い疎水性シリカベース)	オクタデシルシロキサン (C18)	(-CH <sub>2</sub> -) <sup>17</sup> CH <sub>3</sub>
	オクチルシロキサン (C8)	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>
逆相 (無極性結合相 - 中程度の疎水性シリカベース)	シクロヘキシル	
	フェニル	
逆相 (無極性結合相 - 低い疎水性シリカベース)	エチル (C2)	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
	メチル (C1)	-CH <sub>3</sub>
ポリマー逆相 (親水性修飾)	PS-DVB	PS-DVB
	DVB	DVB
WAX (弱陰イオン交換)	アミノ	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>
	1級、2級アミノ	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
SAX (強陰イオン交換)	4級アミン	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
WCX (弱陽イオン交換)	カルボン酸	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> COOH
SCX (強陽イオン交換)	アルキルスルホン酸	(-CH <sub>2</sub> -) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H
	芳香族スルホン酸	SO <sub>3</sub> H

表 17. 固相抽出 (SPE) 相の概要

## SPE 充填剤の条件

分離のメカニズム	分離する分析種の特徴：	ローディング溶媒	溶離溶媒
順相 (吸着)	わずかな極性～ 中程度の極性	低極性 (P') (ヘキサン、 CHCl <sub>3</sub> など)	高極性 (P') (メタノール、 エタノールなど)
順相 (極性結合相 - シリカベース)	中程度の極性～ 高極性	低 P' (ヘキサン、CHCl <sub>3</sub> など)	高 P' (メタノール、 エタノールなど)
逆相 (無極性結合相 - 高い疎水性 - シリカベース)	疎水性 (高い無極性)	高 P' (H <sub>2</sub> O、CH <sub>3</sub> OH/ H <sub>2</sub> O、 CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O など)	低 P' (ヘキサン、CHCl <sub>3</sub> など)
逆相 (無極性結合相 - 中程度の疎水 性 - シリカベース)	中程度の無極性	高 P' (H <sub>2</sub> O、CH <sub>3</sub> OH/ H <sub>2</sub> O、 CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O など)	中程度 (塩化メチレン、 酢酸エチルなど)
逆相 (無極性結合相 - 低い疎水性 - シリカベース)	わずかに極性～ 中程度の極性	高 P' (H <sub>2</sub> O など)～中程度 の P' (酢酸エチルなど)	高 P' (アセトニトリル、 メタノールなど)
ポリマー系逆相 (疎水性修飾)	酸性、塩基性、中性	水または緩衝液	高 P' (アセトニトリル、 メタノールなど)
WAX (弱陰イオン交換)	イオン性 (イオン化可 能)、酸性	水または緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> + 2)	A. 緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> - 2) B. pH 値 (充填剤または 分析種は中性) C. イオン強度の高い緩衝液
SAX (強陰イオン交換)	イオン性 (イオン化可 能)、酸性	水または緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> + 2)	A. 緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> - 2) B. pH 値 (分析種は中性) C. イオン強度の高い緩衝液
WCX (弱陽イオン交換)	イオン性 (イオン化可 能)、塩基性	水または緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> - 2)	A. 緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> + 2) B. pH (充填剤または 分析種は中性) C. イオン強度の高い緩衝液
SCX (強陽イオン交換)	イオン性 (イオン化可 能)、塩基性	水または緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> - 2)	A. 緩衝液 (pH = pK <sub>a</sub> + 2) B. pH 値 (分析種は中性) C. イオン強度の高い緩衝液

表 18. SPE 充填剤の条件のガイドライン

## その他の推奨文献

*Sample Preparation Fundamentals for Chromatography*, Agilent Technologies 2013,  
pub no. 5991-3326EN

Snyder, Lloyd R, Kirkland, Joseph J. and Dolan, John W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*.  
Third Edition, John Wiley & Sons Inc., 2010.

*An Introduction to Gel Permeation Chromatography and Size Exclusion Chromatography*, Agilent Technologies 2011,  
pub no. 5990-6969EN.

Meyer, Veronika R., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Fourth Edition, John Wiley &  
Sons, Inc., 1999.

Snyder, Lloyd R. and Dolan, John W., *High-Performance Gradient Elution*, John Wiley & Sons, Inc., 2007.

Snyder, Lloyd R. Kirkland, Joseph J. and Glajch, Joseph L., *Practical HPLC Method Development*,  
John Wiley & Sons, Second Edition, 1997.

Cunico, Robert L.; Gooding, Karen M. and Wehr, Tim, *Basic HPLC and CE of Biomolecules*,  
Bay Bioanalytical Laboratory, Inc., 1998.

Neue, Uwe D., *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice*, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

## その他のアジレントの参考資料

詳細情報の確認には次の Web サイトをお勧めします。(一部を除き英語での提供となります)

参照先	詳細
LC カラムとサンプル前処理ナビゲータ	お客様のアプリケーションに最適な HPLC カラムとサンプル前処理製品を推奨する対話形式のオンラインツールです。 <b><a href="http://www.agilent.com/chem/navigator">www.agilent.com/chem/navigator</a></b>
LC Method Translator	このオンラインツールは、カラムの長さ、内径、システム流速などの変化をすばやく考慮する場合に役立ち、メソッドに対する調整を計算します。これは、グラジエントメソッドを正確に調整する場合に特に有効です。 <b><a href="http://www.agilent.com/chem/jp">www.agilent.com/chem/jp</a></b> で「LC Method Translator」を検索してください。
LC Flow Rate Calculator アプリケーション	スマートフォンをお持ちの場合は、他のメソッドの変更に対応するために流速をすばやく調整できる、この無料のアプリケーションをご利用いただけます。 <b><a href="http://www.agilent.com/chem/lcapp">www.agilent.com/chem/lcapp</a></b> でこのアプリケーションを検索してください。
Agilent CrossLab Selection Tool	このオンラインツールでいくつかの簡単な質問に答えるだけで、お客様の他社機器に最適な推奨消耗品がわかります。 <b><a href="http://www.agilent.com/chem/SelectCrosslab">www.agilent.com/chem/SelectCrosslab</a></b>
Vial Selector	多くの選択オプションがあるため、お客様のアプリケーションに最適なバイアル、キャップ、セプタを選択することは難しく時間がかかるものです。この対話的ツールを使用すれば、このプロセスが簡単になります。 <b><a href="http://www.agilent.com/chem/SelectVials">www.agilent.com/chem/SelectVials</a></b>
Syringe Filter Online Selection Guide	このツールを使用すると、アプリケーションに最適なシリジフィルターを迅速かつ簡単に選択できます。 <b><a href="http://www.agilent.com/chem/SelectFilters">www.agilent.com/chem/SelectFilters</a></b>
<b><a href="http://www.agilent.com/chem/lctroubleshooting">www.agilent.com/chem/lctroubleshooting</a></b>	このガイドに含まれるいくつかのポイントを説明する一連のビデオを作成しました。他のビデオも徐々に追加していく予定です。

表 19. その他のアジレントの参考資料

# 用語集

**2 μm 未満 (Sub-2 μm)** : 平均粒径が 2 μm 未満の多孔性充填剤の使用を指す用語。現在の製品では、1.5~2.0 μm の範囲の粒径が使用されています。

**2 次元クロマトグラフィー (Two-dimensional chromatography)** : 分離された試料成分の一部またはすべてを第 2 の分離ステップへ導入するクロマトグラフィー。最初のカラムから溶離された特定の画分を、異なる分離特性を持つ第 2 のカラムまたはシステムに導入することで実行できます。最初の展開後プレートを 90° 回転させた後に第 2 の展開液を適用する 2 次元 TLC などの技術も含まれます。LC と GC の後に LC を接続するシステムや、逆相クロマトグラフィーと SEC による分離の後に逆相クロマトグラフィーを連続的に行うような 1 つの分離モードの後に別のモードで分離する方法もこの技術の例です。多次元クロマトグラフィーも参照してください。

## A

**α** : 分離係数を参照してください。

**A 項 (A term)** : van Deemter の式の最初の項。多流路分散の項と van Deemter の式を参照してください。

**A 溶媒 (A solvent)** : 通常は、二成分からなる移動相、またはグラジエント溶離分離の弱い方の溶媒。逆相液体クロマトグラフィー (LC) では、A 溶媒は、一般に水または水分子の大きい混合液です。

## B

**β** : 相比も参照してください。

**Bar** : 圧力の単位。1 atm、約 15 lb/in.<sup>2</sup>、または 0.1 Mpa と等価です。

**BET メソッド (BET method)** : Bruner, Emmett、および Teller (BET) によって開発された、液体窒素温度におけるポアの窒素吸着凝縮を使用して固体の表面積を測定する手法。ポアボリュームとポアサイズの分布も BET メソッドの計算から得られます。

**B<sub>0</sub>** : 浸透性を参照してください。

**B 項 (B term)** : van Deemter の式の 2 番目の項。カラムの軸方向の拡散および分子拡散も参照してください。

**B 溶媒 (B solvent)** : 通常は、二成分からなる移動相、またはグラジエント分離の強い方の溶媒。一般には、有機溶媒か、逆相 LC に水が含まれるときの有機溶媒比が高い二成分混合液です。

## C

**C18** : オクタデシルシランを参照してください。

**C4、C8、C18 など (C4, C8, C18, etc.)** : 化学結合型逆相用充填剤のアルキル鎖の長さを指します。

**C8** : オクチルシランを参照してください。

**CE** : キャピラリー電気泳動。

**CEC** : キャピラリー電気クロマトグラフィーを参照してください。

**CGE** : キャピラリーゲル電気泳動を参照してください。

**C<sub>s</sub>** : ラングミュア等温式を参照してください。

**CZE** : キャピラリーゾーン電気泳動を参照してください。

**C 項 (C term)** : van Deemter の式の固定相 - 移動相間での物質移動の項。物質移動と van Deemter の式も参照してください。

## D

**DEAE** : ジエチルアミノエチルを参照してください。

**Denaturing HPLC (変性 HPLC)** : 逆相 HPLC を使用し、DNA の塩基対を調べることで遺伝子突然変異を確認します。

**D<sub>M</sub>** : 拡散係数を参照してください。

**d<sub>p</sub>** : 粒子径を参照してください。

**Δp** : ヘッド圧力を参照してください。

**D<sub>S</sub>** : 拡散係数を参照してください。

## E

**E** : 分離インピーダンスを参照してください。

**ε** : 粒子間空隙率を参照してください。

**ε<sub>e</sub>** : 間隙空隙率を参照してください。

**ε<sub>i</sub>** : 粒子内空隙率を参照してください。

**ε<sub>T</sub>** : 全空隙率を参照してください。

## F

**F** : 流速も参照してください。

**F** : 流動抵抗パラメータも参照してください。

**Fast protein LC (FPLC) (高速タンパク質 LC)** : タンパク質を分離するための特別な HPLC 手法。通常は、FPLC にはガラス製カラム、中程度の圧力、球形の充填剤を使用します。

**Foley-Dorsey 式 (Foley-Dorsey equation)** : カラム外のバンドの広がりからピークテーリングの段数と保持時間を補正します。参考資料 3 を参照してください。

**FPCLC** : 高速タンパク質 LC を参照してください。

## G

**g** : 妨害または屈曲係数。分子拡散の用語。屈曲も参照してください。

**GFC** : ゲルろ過クロマトグラフィーを参照してください。

**GPC** : ゲル浸透クロマトグラフィーを参照してください。

## H

**h** : 換算理論段高さ。HETP/ $d_p$  と定義されます。ここで、HETP は理論段高さ、 $d_p$  は粒子径です。換算理論段高さも参照してください。

**H** : HETP と同一です。効率も参照してください。

**$\eta$**  : 粘度を参照してください。

**$H_{\text{eff}}$**  : 有効理論段高さも参照してください。

**HETP** : 理論段高さ。蒸留理論から転用されて使用されている用語。カラム効率の尺度。HETP =  $L/N$ 。ここで、 $L$  はカラムの長さ、 $N$  は理論段数です。HETP は、十分に充填された一般的な粒径  $5 \mu\text{m}$  の HPLC カラムでは約  $2 \sim 3 d_p$  です。HETP (または  $H$ ) の値は、通常は  $0.01 \sim 0.03 \text{ mm}$  の範囲内です。効率および  $h$  も参照してください。

**HPLC** : 高速液体クロマトグラフィーを参照してください。

## I

**IC** : イオンクロマトグラフィーを参照してください。

## K

**$k'$**  : IUPAC の定義で保持係数 ( $k$ ) に置き換えられた古い用語。

**$k$**  : 保持係数を参照してください。

**$K$**  : 分離係数を参照してください。

**$k_{A/B}$**  : 選択性係数を参照してください。

**$K_C$**  : 分配定数 (係数) を参照してください。

**Knox 方程式 (Knox equation)** : John Knox が開発した van Deemter 式の修正版。この方程式では、多流路分散を表す  $A$  項に  $u^{1/3}$  を掛けます。ここで、 $u$  は間隙溶離速度です。通常は、無次元の、または換算後の理論段高さ ( $h$ ) と換算速度 ( $v$ ) で表します。 $h = Av^{1/3} + B/v + Cv$  です。van Deemter の式も参照してください。

## L

**L** : カラム長さを参照してください。

**LC** : 液体クロマトグラフィーを参照してください。

**log  $k_w$**  :  $\log k$  と逆相 LC の移動相の有機溶媒の体積分率の関係を示すプロットの切片を外挿により求めたものです。S も参照してください。

## M

**$\mu$**  : 電気泳動移動度を参照してください。

**MECC** : ミセル導電キャピラリークロマトグラフィーを参照してください。

**MEKC** : ミセル導電キャピラリークロマトグラフィーを参照してください。

## N

**$n$**  : ピークキャパシティを参照してください。

**$N$**  : 換算速度を参照してください。

**$N$**  : 理論段数。 $N = 16 (t_R/w_h)^2$ 。ここで、 $t_R$  は保持時間、 $w_h$  はベースラインにおけるピーク幅です。カラムの効率の尺度。 $N = 5.54 (t_R/w_{1/2})^2$  で測定されることもあります。ここで、 $w_h$  (または  $w_{1/2}$ ) は半値幅 (ピーク高さの  $1/2$  におけるピーク幅) です。効率および理論段数も参照してください。

**NanoLC** : 内径  $100 \mu\text{m}$  未満のカラムを利用する LC。試料量に制限があり高感度な分析が必要とされるプロテオミクス研究でよく用いられます。

**$N_{\text{eff}}$**  : 有効理論段数を参照してください。

## O

**ODS** : オクタデシルシランを参照してください。

## P

**Pa** : パスカルを参照してください。

**Pirkle 型カラム (Pirkle column)** : 3,5-ジニトロベンゾイルフェニルグリシンを導入したシリカゲルによるブラシ型キラル固定相で、幅広いエナンチオマーの分離に使用されています。開発者であるイリノイ大学の William Pirkle 氏にちなんで名付けられました。

**Poppe プロット (Poppe Plot)** : オランダ、アムステルダム大学の Hans Poppe 教授にちなんで名付けられたプロット (J. Chromatogr. A 778, 3 (1997))。カラム性能の限界を粒径、カラムの圧損などの関数として評価するために、 $\log (t_R/N)$  を  $\log (N)$  に対してプロットします。Kinetic プロットとも呼ばれます。

**PS-DVB** : ポリスチレンジビニルベンゼン樹脂を参照してください。

## R

**r** : 保持比を参照してください。

**Re** : レイノズル数を参照してください。

**R<sub>s</sub>** : 分離度を参照してください。

## S

**σ<sup>2</sup>** : ピークの分散を参照してください。

**S** : 逆相クロマトグラフィーにおける溶媒強度パラメータ。ある溶質の log<sub>10</sub> k に対して有機溶媒の体積分率をプロットしたときの傾きで、溶質に依存します。S は、移動相の種類、固定相、温度によって異なります。

**SAX** : 強陰イオン交換体を参照してください。

**SCX** : 強陽イオン交換体を参照してください。

**SEC** : サイズ排除クロマトグラフィーおよび立体排除クロマトグラフィーを参照してください。

**SFC** : 超臨界流体クロマトグラフィーを参照してください。

**Snyder ε<sup>o</sup>** : 吸着クロマトグラフィーにおける溶媒強度パラメータ。溶媒が占める単位表面積あたりの溶媒吸着のエネルギー。

**SPE** : 固相抽出を参照してください。

## T

**t<sub>0</sub>** : ボイド時間を参照してください。

**t<sub>R</sub>'** : 調整済み保持時間および保持時間を参照してください。

**t<sub>R</sub>** : 保持時間を参照してください。

**t<sub>w</sub>** : バンド幅を参照してください。

## U

**u<sub>e</sub>** : 間隙流速を参照してください。

**u<sub>m</sub>** : 移動相速度を参照してください。

**UHPLC** : 超高性能液体クロマトグラフィー (Ultra High Performance Liquid Chromatography) を指します。一般的なポンプの圧力上限 (400 bar) を超える圧力領域での分離に対して広く使用されています。

**u<sub>s</sub>** : 見掛け流速を参照してください。

**u<sub>z</sub>** : ゾーン速度を参照してください。

## V

**van Deemter の式 (van Deemter equation)** : クロマトグラフィーのバンドの広がりをも説明した関係式。この式は理論段高さ (HETP) に影響する 3 項目の拡散について記述しています。A 項は、線速度の不均一性によって発生する多流路分散または拡散を表します。B 項は溶質の分子拡散

または軸方向の拡散の寄与を示します。C 項は相間における溶質の物質移動の寄与を表します。最も簡単に表すと、 $h = A + B/v + Cv$  となります。換算理論段高さおよび換算速度も参照してください。

**V<sub>c</sub>** : カラムボリュームを参照してください。

**V<sub>d</sub>** : デッドボリュームを参照してください。

**V<sub>e</sub>** : 間隙ボリュームを参照してください。

**V<sub>i</sub>** : 粒子内ボリュームを参照してください。

**V<sub>M</sub>** : ホールドアップボリュームを参照してください。移動相ボリュームも参照してください。

**V<sub>o</sub>** : 排除ボリュームを参照してください。

**V<sub>p</sub>** : 全浸透ボリュームを参照してください。

**V<sub>R</sub>'** : 調整済み保持ボリュームを参照してください。

**V<sub>R</sub>** : 保持ボリュームと溶離ボリュームを参照してください。

**V<sub>t</sub>** : 総移動相ボリュームを参照してください。

## W

**WAX** : 弱陰イオン交換体を参照してください。

**w<sub>b</sub>** : ピーク幅を参照してください。

**WCX** : 弱陽イオン交換体を参照してください。

**Wilke-Chang の式 (Wilke-Chang equation)** : 液体の拡散係数を、溶質分子サイズと溶媒粘度の関数として推算するために使用する半経験的な方程式。

## ア

**アウトレットチェックバルブ (Outlet Check Valve)** : チェックバルブを参照してください。

**アガロース (Agarose)** : パイオクロマトグラフィーの分離用媒体として使用される高分子の多糖類。多くの場合、ゲルろ過クロマトグラフィーの充填剤として水系移動相とともに使用されます。

**アシンメトリー係数 (Asymmetry factor)** : ピークの形状を表す係数。アシンメトリー係数はクロマトグラフィーのピークから求めます。ピーク頂点から垂線を下ろし、ピーク高さの 10 % の位置に水平線を引きます。その交点から水平線に沿ったピークの後ろ側までの距離 (距離 B) を、水平線に沿ったピークの前側までの距離 (距離 A) で割ることにより、ピークのアシンメトリー係数と呼ばれる比を求めます (図 61 を参照)。対称ピークではこの比は 1 になり、リーディングが発生したピークでは 1 より小さく、テーリングが発生したピークでは 1 よりも大きくなります。この値が大きくなるほどピークの対称性は低くなり、2 を超える値は許容されません。

**アダプタ (Adapter)** : 両端に異なるコネクタを接続するためのユニオン。通常は、コネクタや外径の異なる 2 本のチューブを接続するために使用します。

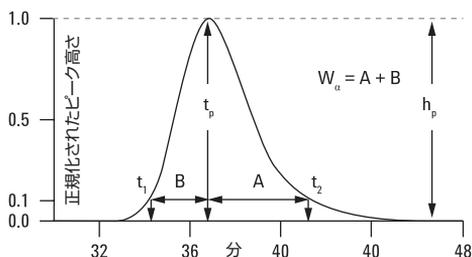


図 79. テーリングが発生したピークの例 (参考資料 3 の許可を得て変更)

**アフィニティクロマトグラフィー (Affinity chromatography)**: 酵素、抗原、ホルモンなど、対象とする高分子の特異的な配位子を固体担体 (またはキャリア) に結合することによって生体特異性を持つ吸着剤を利用するクロマトグラフィー。この固定化された配位子は、選択的に結合できる分子だけと相互作用を起こします。結合しない分子は保持されずに溶出します。保持された化合物は、後に純粋な状態で溶離することができます。アフィニティクロマトグラフィーは、通常はオン/オフ分離技術として実行されます。

**アミノ相 (Amino phase)**: 順相クロマトグラフィーで使われる化学結合型充填剤のプロピルアミノ相。アルデヒド類や、アミンと反応する移動相添加剤などに対して多少の反応性があります。アミノ相は弱陰イオン交換体のアプリケーションで適用されることもあり、水/アセトニトリルを移動相として炭化水素の分離にも使用されます。比較的不安定な結合相です。

**アルコキシシラン (Alkoxysilane)**: 化学結合型固定相の合成に使用される試薬。 $R_3SiOR + \equiv SiOH \rightarrow \equiv Si-OSiR_3 + ROH$  のようにシリカゲルと反応します。ここで、R はアルキル基です。

**アルミナ (Alumina)**: 吸着クロマトグラフィーで使用される順相モードの吸着剤。アルミナは表面がわずかに塩基性の多孔質の吸着剤です。中性または酸性にすることも可能です。塩基性アルミナには、表面が酸性とされているシリカよりも多くの利点があります。

## I

**イオン緩和分配クロマトグラフィー (Ion-moderated partitioning chromatography)**: 特定の陽イオン (カルシウム、水素、銀など) を対イオンとする強陽イオン交換充填剤を使用して炭化水素を分離する技術。この分離メカニズムは、イオン交換というよりも、むしろ錯体形成です。

**イオン強度 (Ionic strength)**: イオン強度は電解質溶液の特性です。通常は、電解質のイオン間の平均静電相互作用で表します。イオン強度は電解質濃度に関連していますが、イオンの電荷が大きくなれば、濃度は同じでもイオン強度は大きくなる点が主な違いです。移動相のイオ

ン強度が高くなるほど、イオン性部位または吸着部位における移動相と分析種との競合も強くなります。

**イオンクロマトグラフィー (IC) (Ion chromatography)**: 低濃度の有機および無機陰イオンまたは陽イオンを、低イオン交換容量のイオン交換体と低塩濃度の緩衝液を使用して測定するイオン交換技術。多くの場合、電気伝導度が検出器を使用します。IC には 2 つの形式があります。サブレッサー方式の IC では、第 2 のカラムまたはイオン交換膜を使用して、移動相および分析種の対イオンを水素または水酸化イオンと置き換えます。移動相は電荷がない、もしくは解離度の低い化学種に変換されることで、バックグラウンドが低下して感度が増大します。ノンサブレッサー方式の IC では、低濃度の弱導電性移動相を使用し、溶出液全体をそのまま検出器に通すことで、バックグラウンド上でイオンを検出します。

**イオン交換クロマトグラフィー (ion exchange chromatography)**: イオン性物質が充填剤の陰イオンまたは陽イオン交換基で分離されるクロマトグラフィーのモード。試料イオン (通常対イオンを伴っている) は、既に充填剤のイオン交換基上にあるイオンと交換されます。保持はイオン交換基に対するさまざまなイオンの親和性や、pH、イオン強度、対イオンの種類など、その他の溶液パラメータに基づいて決まります。イオンクロマトグラフィーは、基本的にはイオン交換技術です。

**イオン交換容量 (ion exchange capacity)**: イオン交換に関わることのできる、イオン交換樹脂上のイオン交換基の量。交換容量は、グラムあたりのミリ当量 (mequiv) で表します。一般的なスチレンジビニルベンゼン強陰イオン交換樹脂の容量は 3~5 mequiv/g です。IC の交換体の容量は非常に低く、弱陰イオンおよび陽イオン交換体の容量は pH によって大きく変化します。

**イオン遅滞 (ion retardation)**: イオン分子の溶離を遅らせ、非イオン分子または非電解質を優先して溶離する両性イオン交換樹脂の使用を指します。

**イオン排除 (ion exclusion)**: イオン交換樹脂を使用し、イオン化されていない、または部分的にイオン化した溶質からイオン化した溶質を分離できるプロセス。分離は、イオン性溶質が固定相よりも高い濃度で溶液中に存在し、非イオン性溶質は移動相と樹脂の間に均等に分散されるドナン電位を利用して行います。したがって、イオン性溶質は、非イオン性溶質よりも速くカラムから溶出します。イオン排除は、シラノール基がイオン化する pH 域で陰イオンが分離される逆相クロマトグラフィーで発生します。

**イオンペアクロマトグラフィー (ion-pair chromatography)**: 溶液中のイオンをイオン対化または中性化し、逆相カラムでイオンペアとして分離する形式のクロマトグラフィー。通常、イオンペア試薬は炭化水素鎖を含むイオン性化合物で、特定の疎水性を持っているため、イオンペアを逆相カラムに保持することができます。保持力は、疎水鎖の長さといオン対添加物の濃度に比例します。イオン対化は、イオンペアを形成する化合物の片方

が吸着剤に動的にロードされたときに順相クロマトグラフィーでも発生します。ただし、この技術は逆相クロマトグラフィーほどは広く使用されていません。イオン相互作用クロマトグラフィーまたは動的イオン交換クロマトグラフィーとも呼ばれるこの技術では、添加剤による保持力の制御のメカニズムの詳細がユーザーには正確にわかりません。

**イオン抑制 (Ion suppression)** : 溶質のイオン化を抑制するための、特定の pH における水系移動相での緩衝作用。例えば、弱いカルボン酸は、pH をその pK<sub>a</sub> 値よりも低い値に調整することでイオンを抑制することができます。逆相クロマトグラフィーの弱酸および塩基のピーク形状を改善するために有効です。

**イソクラティック (Isocratic)** : 移動相の組成を変化させない LC で使用します。

**移動相 (Mobile phase)** : 溶質をカラムに通す溶媒。LC では、移動相は溶質と固定相の両方と相互作用するため、分離に大きな影響を与えることがあります。

**移動相強度 (Mobile phase strength)** : 溶媒強度を参照してください。

**移動相速度 (u<sub>m</sub>) (Mobile phase velocity)** : 移動相が充填ベッドを通る速度。u<sub>m</sub> = L/t<sub>m</sub>。ここで、L はカラム長さ、t<sub>m</sub> はホールドアップ時間です。調整済み保持ボリューム、ホールドアップボリューム、デッドボリュームも参照してください。

**移動ゾーン (Moving zone)** : 移動相から区別するために、このゾーンは、カラム移動相の空隙スペースを占有する部分を指します。固定相も参照してください。

**イムノアフィニティクロマトグラフィー (Immunoaffinity chromatography)** : 抗体が固定相の表面に結合または固定化されている特殊な形式の分離。分子認識メカニズムに基づき、抗体の特異的なターゲットとなる分析種を抗原-抗体反応により複雑な混合物の中から選択的に保持することができます。干渉物質を洗い流した後、強い結合を壊すように移動相条件を変更することで、保持された分析種を溶離することができます。

**陰イオン交換 (Anion exchange)** : 陰イオンの分離に使用するイオン交換手法。合成高分子やシリカゲルに陰イオン交換基を導入した充填剤や、その他の金属酸化物をこのモードで分析できます。一般的陰イオン交換官能基として、強陰イオン交換体となる4級アンモニウム塩があります。アミノ基を結合させた充填剤は、弱陰イオン交換体の一例です。

**インプリント相 (Imprinted phases)** : テンプレートまたはプリント分子の存在下で合成されるポリマーおよびシリカゲルをベースとした固定相。これらの固定相によりテンプレートとなる分子の選択性が增強されました。

**インラインフィルタ (Inline filter)** : 微粒子によるカラムの損傷を防止するデバイス。最近の低容量インラインフィルタは、バンドの広がりやほとんど起こすことなく、インジェクタとカラムの間に接続することができます。この

位置にあるフィルタは、試料粒子が充填ベッドやカラムインレットフリットに入ることを防止します。

**インレット (Inlet)** : 溶媒と試料が入るカラムの最初の部分。通常は、インレットフリットは充填剤をカラム内の留め漏出を防止しますが、充填ベッドを保護することもあります。

**インレット/アウトレットチェックバルブ (Inlet/outlet check valves)** : LC ポンプ上のチェックバルブで、これにより移動相が一方方向に流れ、逆方向には流れないようになります。インレットチェックバルブによって、溶媒ボトルからポンプへの一方方向の流れが可能になり、アウトレットバルブによって、移動相がポンプからカラム一方方向に流れます。

**インレットフィルタ (Inlet filter)** : ポンプのインレットラインに接続されたフィルター。溶媒がポンプに連する前に移動相から微粒子を除去します。溶媒フィルタは、溶媒ボトル内のインレットフィルタです。

## エ

**エアロゲル (Aerogel)** : ゲル系から分散媒を取り除いてもゲル構造が壊れない充填剤。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に使用するシリカゲルおよびガラスビーズは、高圧でも構造を保持できる、HPLC に使用されるエアロゲルの例です。合成高分子で作られたゲルの多くは分散媒を取り除くと収縮し、元のゲル構造を維持することができません。キセロゲルも参照してください。

**液液クロマトグラフィー (Liquid-liquid chromatography)** : HPLC の最も初期の分離モードの 1 つ。1970 年初頭に化学結合相を使用する方法に移行しました。分離クロマトグラフィーと同一です。

**液固クロマトグラフィー (Liquid-solid chromatography)** : 吸着クロマトグラフィーと同一です。

**液体クロマトグラフィー (LC) (Liquid chromatography)** : 移動相として液体を使用する分離技術。ほとんどの場合はカラムを使用して行われます。

**エナンチオマー化合物 (Enantiomeric compound)** : 光学活性を示す化合物。光学異性体の分離には、R-体と S-体を区別できる分離メカニズムが必要で、この目的には専用のカラムを使用します。

**塩析効果 (Salting-out effect)** : 高濃度の塩緩衝液を移動相で使用し、低極性の分析種の水への溶解度を下げることで、その結果、低極性の分析種は溶液から沈殿または析出します。タンパク質の疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) で使用されます。疎水性相互作用クロマトグラフィーでは、最初に高濃度の移動相でタンパク質を沈殿させ、順次塩濃度の低い移動相を流すグラジエント溶離を行います。

**エンドキャップ (Endcapping)** : オクタデシルトリクロロシランなど、大きいシリル化剤との反応後にシリカゲルの残存シラノール基 (未反応のシラノール基) を除去するために使用する技術。小さいシリル化剤 (トリメチルクロロシランやジクロロジメチルシランなど) をシリカゲル系充填剤表面の残存シラノール基と結合させた場合、そのカラムはエンドキャップされていると言えます。逆相充填剤で、塩基性化合物、イオン性化合物、およびイオン化合物の好ましくない吸着を最小限に抑えるために充填剤の処理としてよく使用されます。エンドキャップ反応は、ポリメリック相の末端のシラノール基を除去するためにも使用されます。

**エンドフィッティング (Endfitting)** : HPLC に使用される配管を接続できるようにカラムの端に付けるフィッティング。ほとんどの HPLC エンドフィッティングには充填剤がカラムから漏出しないようにするためのフリットがあり、バンドの拡張を最小限に抑えるために低デッドボリュームに作られています。通常はステンレス製ですが、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) やその他のポリマー材料も使用されます。

## オ

**オーバーロード (Overload)** : 分取クロマトグラフィーでは、オーバーロードは、それ以上試料の量を増やすと効率と分離度が影響を受け始める、カラムに注入する試料の質量として定義されています。試料容量も参照してください。

**オクタデシルシラン (Octadecylsilane)** : HPLC で最も広く利用されている逆相系化学結合相。直鎖の C18 基を持ち、シリカゲルやポリマーに導入されます。モノメリック相とポリメリック相があります。充填剤としては、ODS や C18 のように省略されます。

**オクチルシラン (Octylsilane)** : HPLC で利用されている逆相系化学結合相の一つ。直鎖の C8 基を持ち、シリカゲルやポリマーに導入されます。C18 に比べて保持がやや弱い性質があります。充填剤としては C8 のように省略されます。

**オンカラム検出 (On-column detection)** : カラム自体が HPLC または CE-CEC のフローセルとして機能する検出。一般に、フュージドシリカキャピラリーを使用する HPCE で使用される用語です。フュージドシリカキャピラリーのポリイミド被覆を除去し、光が透過できるようにして作成します。

**温度プログラミング (Temperature programming)** : 分離中にカラム温度を変化させます。HPLC ではほとんど使用されません。使用する場合は、通常は温度を段階的に変化させます。

**温度プログラムクロマトグラフィー (Programmed-temperature chromatography)** : 温度を変化させながら分離を行います。LC ではほとんど使用されません。

**オンライン予備濃縮 (Online preconcentration)** : プレカ

ラムをカラム切替バルブを介して分離カラムと接続し、分析種を濃縮してから分離カラムに導入します。分離カラムとは異なる保持機構 (疎水性相互作用、吸着、または酵素反応) などを使用して、任意の時間、分析種を保持させ、濃縮された分析種を移動相により分離カラムに導入します。

## カ

**カートリッジカラム (Cartridge column)** : エンドフィッティングがなく、カートリッジホルダに収納されるカラムのタイプ。カラムは、パイプとその両端にあるフリットにより保持される充填剤で構成されます。カートリッジは交換が容易で、エンドフィッティング付きの従来のカラムよりも低価格で便利です。

**カーボンロード (Carbon load)** : 化学結合型シリカゲルで、担体表面の反応可能なシラノール基が結合相で置き換えられる程度を説明するために使用する用語。カーボンロードが大きくなるほど、残留シラノール数の数が少なくなります。通常は、カーボンロードは % カーボンで表します (12 % カーボンなど)。逆相 LC では、カーボンロードが大きくなるほど分析種が強く保持されます。

**回収率 (Recovery)** : 注入した量に対する、カラムから溶出した溶質または試料の量。優れた回収率は、適切な定量、分取分離 (特に生体分子)、優れたピーク形状と分離度を得るために重要です。回収率が不十分になる理由には、溶質と充填剤の活性部位やカラムフリット、カラムチューブと相互作用などがあります。分離している間に化合物が分解すると回収率に影響を与えることがあります。

**カイネティックプロット (Kinetic Plot)** : カイネティックプロットは、カラム性能の実質的な限界を特性付ける方法です。理論段数 (H) と分離インピーダンス (E) が、圧力低下により制限される段数 (N) の関数としてプロットされます。カイネティックプロットには、van Deemter プロットに表示される情報に加えて、充填ベッドの浸透性に関する情報も含まれます。Poppe プロットを参照してください。

**化学吸着 (Chemisorption)** : 充填剤との化学結合によって生じる吸着。これらのほとんどの反応は不可逆で、通常は、シラノール基などの反応性官能基を持つ充填剤や化学結合で導入されたアミノ相で発生します。化学吸着は、強いルイス酸部位を持つ金属酸化物の固定相でよく普通に見られます。

**架橋結合 (Cross-linking)** : 3 次元マトリックスを形成する合成高分子の共重合プロセスでは、二官能性モノマー (架橋剤) を追加し、隣接したポリマー鎖の間に架橋結合を形成します。架橋結合の程度は、重合反応に使用する架橋剤の量によって決まります。例えば、ジビニルベンゼンは、ポリスチレンイオン交換樹脂を合成するための一般的な架橋剤です。合成高分子ゲルの膨潤およびゲル内への溶質の拡散特性は、その架橋結合の程度によって決まります。

**拡散係数 ( $D_M$  または  $D_S$ ) (Diffusion coefficient)** : ガス、溶液 ( $D_M$ )、または固定相 ( $D_S$ ) 内の分子の基本的なパラメータ。平方センチメートル/秒で表します。 $D_M$  は溶質の分子量、温度、溶媒粘度、溶質のモル体積に依存します。一般的な逆相クロマトグラフィーの条件 (室温) では、 $100\text{-Da}$  の分子の一般的な値は  $10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$  です。

**活性度 (Activity)** : 吸着クロマトグラフィーの充填剤表面の相対的な強度。シリカゲルでは、吸着点となるシラノール基が多いほど表面の活性度が上がります。活性度は、活性点と水素結合する水や極性の添加剤を移動相に加えることにより、表面の活性度を下げることで制御できます。

**カラム外効果 (Extracolumn effects)** : クロマトグラフィーシステムのカラム外部のすべての部品によるバンドの広がりの効果。カラムの効率を維持するには、カラム外効果を最小限に抑える必要があります。バンドの広がり原因として、インジェクタのデザイン、注入量、配管、エンドフィッティング、フリット、検出器セルのボリューム、検出器内部の配管などがあります。これらのすべてが加算されます。

**カラム外ボリューム (Extracolumn volume)** : カラムの部分を除く、注入ポイントと検出ポイントの間の容積。この容積は、インジェクタと配管、フリット、検出器のボリュームから成ります。これによってカラム外効果が決まります。

**カラム切り替え (Column switching)** : スイッチングバルブによって接続された複数のカラムを使用すると、クロマトグラフィー分離や試料のクリーンアップの性能が向上します。1 次カラムから得られた画分を複数の 2 次カラムに切り替え、さらに多くのカラムや検出器に分割することができます。多次元クロマトグラフィーと呼ばれることもあります。

**カラムクロマトグラフィー (Column chromatography)** : カラムまたはチューブを使用して固定相を保持する形式のクロマトグラフィー。オープンカラムクロマトグラフィー、HPLC、およびオープンチューブキャピラリークロマトグラフィーは、すべてカラムクロマトグラフィーの 1 つの形式です。多くの場合、分取スケールの分析に使用するオープンカラムクロマトグラフィーを指します。

**カラム充填剤 (Column packing)** : 通常は多孔質で分析種を特異的に保持する特性を持ち、カラムに充填される固体。表面が化学的に活性なものと不活性なものがあります。固定相と呼ばれます。一般的な充填剤として、未就職および化学結合型シリカゲル、合成高分子、無機/有機ハイブリッド粒子、グラファイトカーボンなどがあります。

**カラム性能 (N) (Column performance)** : カラムの効率を指します。特定の試験化合物に対する理論段数。

**カラム段数 (N) (Column plate number)** : カラム効率を指します。段数が大きくなるほど、カラムの理論段数が増えます。粒径  $5\text{ }\mu\text{m}$  の多孔質充填剤が  $150 \times 4.6\text{ mm}$  のカラムに十分に充填された一般的なカラムの理論段数は

$10,000\sim 12,000$  段です。

**カラムデッドタイム (Column dead time)** : デッドボリュームに関連する時間。デッドボリュームを流速で割ることで算出します。逆相 LC では、多くの場合、ウラシルをデッドボリュームとデッドタイムの測定に使用します。

**カラム長さ (L) (Column length)** : HPLC のカラムの長さ、CE のキャピラリーの長さ。

**カラムの軸方向の拡散 (Longitudinal diffusion)** : 分子拡散の項と同一です。van Deemter の式の B 項。van Deemter の式も参照してください。

**カラム背圧 (Column backpressure)** : ヘッド圧力を参照してください。

**カラムボリューム ( $V_c$ ) (Column volume)** : 未充填のカラムの容積。 $V_c = A_c L$ 。ここで、 $A_c$  および  $L$  は、それぞれパイプの断面積とパイプ長さです。

**間隙空隙率 ( $\epsilon_e$ ) (Interstitial porosity)** : 粒子間空隙率と同じ。

**間隙ボリューム ( $V_e$ ) (Interstitial volume)** : 粒子間の容積。粒子のポアの容積は含みません。排除ボリューム (SEC を参照) および粒子間ボリュームとも呼ばれます。どのポアにも浸透しない、粒子表面との相互作用を起こさない化合物を注入することで測定します。SEC では、このボリュームは  $V_0$  と呼ばれます。

**間隙流速 ( $u_e$ ) (Interstitial velocity)** : カラム内で粒子の周りを移動相が流れるときの実際の速度。 $u_e = F/A_{ce}$ 。間隙流速は、換算速度を計算するときの基礎となります。

**換算速度 (v) (Reduced velocity)** : さまざまな充填カラムを比較するために換算理論段高さとともに使用されます。移動相内の溶質の拡散係数 ( $D_M$ ) をカラム充填剤の粒径と関連付けます ( $d_p$ )。  $v = u d_p / D_M$ 。ここで、 $u$  は平均空隙移動相線流速です。  $K_{noX}$  方程式も参照してください。

**換算理論段高さ (h) (Reduced plate height)** : さまざまなカラムの効率を比較するために使用されます。  $h = H/d_p$ 。ここで、 $H$  は理論段高さ、 $d_p$  は粒径です。最適な速度で  $h$  の値が 2 以下の場合には、十分に充填された HPLC カラムと見なされます。

**緩衝液 (Buffer)** : 希釈や少量の酸または塩基が添加されても一定の pH を維持する性質を持つ溶液。

**緩衝液強度 (Buffer strength)** : イオン強度を参照してください。

**緩衝容量 (Buffer capacity)** : 緩衝溶液の pH 緩衝能力の定量的な尺度 (1 L の緩衝溶液に 1 pH 単位の変化を発生させる強酸または強塩基の当量数で定義)、または単純に、緩衝液を使用した試料溶液の注入に対し、緩衝液が移動相の pH を変化させずに耐えることのできる能力。pH、緩衝液に使用する酸および塩基の  $pK_a$ 、および緩衝液濃度によって決まる容量。

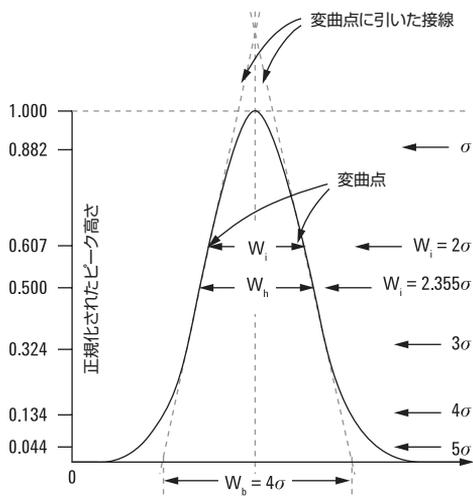


図 80. ピークの標準偏差 ( $\sigma$ ) の関数としてのさまざまな高さにおけるガウス形ピークの幅 (参考資料 2 の許可を得て変更)

**間接検出 (Indirect detection)** : UV 吸収または蛍光を持たない分析種の分析に使用します。UV 吸収または蛍光化合物を移動相に添加することにより、検出器からの信号はバックグラウンドの高い状態が維持されます。UV 吸収や蛍光を持たない分析種が溶離すると、バックグラウンドが希釈され、その分析種の溶出位置に分析種の濃度に応じた負のピークが観察されます。分析種により移動相に添加した UV 吸収や蛍光のある化合物の濃度が上昇する場合は、正のピークが観察されます。通常は検出器の負の信号は反転して出力します。

**ガードカラム (Guard column)** : インジェクタと分析カラムの間に配置する小さいカラム。このカラムは、試料中の微粒子や強固に保持される化学種などの汚染物質から分析カラムを保護します。通常は、ガードカラムには分析カラムと同じ充填剤が充填され、多くの場合は内径が同じです。長さは大幅に短く、低コストで、通常は汚染されたら廃棄します。別のガードカラムと分析カラムを接続する接続チューブによって生じるカラム外効果を最小限に抑えるために、多くの場合は一体型のガード分析カラムシステムが好まれます。

**ガウス曲線 (Gaussian curve)** : 数学関数に基づく標準誤差曲線。対称性を持ち、鈴のような形状のバンドまたはピークになります。ほとんどのクロマトグラフィーの理論では、ガウス形ピークになることを想定しています。ピークの最大値の位置を保持の尺度として使用すると、前述の効率の式はガウス形ピークの形状を想定したものととなります。図 62 を参照してください。

**ガウス形ピーク (Gaussian peak)** : 形状が式  $C = C_{\max} \exp[-(t - t_R)^2/2\sigma^2]$  に非常に近いピーク。

## キ

**気圧 (atm) (Atmosphere)** : HPLCカラムやHPLCシステムの圧損の表示に用いられる圧力の単位。1 atm = 14.7 lb/in.<sup>2</sup> (psi)。bar およびパスカルも参照してください。

**気孔率 (Porosity)** : 多孔性粒子のポアの容積と粒子が占める容積の比。ポアボリュームは気孔率の尺度であり、通常はミリリットル/グラムで表します。

**キセロゲル (Xerogels)** : 異なる溶媒で膨張および収縮する SEC で使用されるゲル。可溶性ケイ酸塩の酸化により生成され、非晶構造、大きい表面積、高い空隙率、固い粒子を生成するシリカ系充填剤のことも指します。

**キャップ (Capping)** : エンドキャップと同一です。

**キャピラリー LC (Capillary LC)** : 通常は、フーズドシリカまたはその他の種類のキャピラリーカラムを使用する HPLC を指します。内径は、一般に 0.5 mm 未満です。マイクロ LC とも呼ばれていました。

**キャピラリーカラム (Capillary column)** : 内径 0.5 mm 未満のカラムを指します。

**キャピラリーチューブ (Capillary tubing)** : クロマトグラフのさまざまな部品やモジュールを接続し、移動相を送液しサンプルを搬送するためのチューブ。HPLC で使用されるほとんどのキャピラリーチューブは、内径 0.004 インチ (約 0.1 mm) から 0.02 インチ (約 0.5 mm) です。

**キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) (Capillary electrochromatography)** : キャピラリーカラムにクロマトグラフィー吸着剤を充填し、圧力ではなく電気浸透流によってカラムに移動相を流すハイブリッド技術。この技術は、HPLC の固定相を利用した選択性とキャピラリー電気泳動 (CE) の高い効率性を備えています。

**キャピラリーミセル電気クロマトグラフィー (Capillary micellar electrochromatography)** : ミセル導電キャピラリークロマトグラフィー (MEKC) の CEC バージョン。

**キャリア (Carrier)** : アフィニティクロマトグラフィーで最も頻繁に使用される用語。活性の高い配位子を (通常は共有結合により) 結合する担体を指します。液液クロマトグラフィーなどの他のクロマトグラフィーモードの担体を指すこともあります。

**キャリアガス (Carrier gas)** : ガスクロマトグラフィー (GC) の移動相。

**球形充填剤 (Spherical packing)** : 球形の固体充填剤材料を指します。分析 HPLC では、球形充填剤が不規則形状粒子よりも一般に好まれますが、不規則形状粒子は低コストであるため、分取 HPLC でしばしば使用されます。

**吸収 (Absorption) :** 溶質が液体に類似した層に分配することによる保持プロセス。

**吸着 (Adsorption) :** 主に溶質と吸着剤表面との間の相互作用に基づく保持プロセス。吸着の力には、強い力(水素結合)と弱い力(van der Waals 力)があります。シリカゲルでは、シラノール基が吸着の原動力となり、シラノール基と相互作用を起こす溶質のすべての官能基をシリカゲルに保持することができます。吸着という語では、担体に被覆または結合された固定相との相互作用ではなく、担体自体の表面との相互作用に注目しています。

**吸着 (Sorb) :** 吸着、吸収、分配などの保持メカニズムが不明な場合に固定相に保持されるときのプロセス。

**吸着クロマトグラフィー (Adsorption chromatography) :** 活性を持つ固体の表面への吸着を利用して分離を行う基本的な LC モードの 1 つ。シリカゲルとアルミナは最も頻繁に使用される順相モードの吸着剤であり、極性官能基と、シリカゲルのシラノール基など表面の官能基との間の相互作用によって分子が保持されます。炭素は、逆相モードの吸着剤としても使用されます。

**吸着剤 (Adsorbent) :** 吸着クロマトグラフィーで使用される充填剤。シリカゲルおよびアルミナは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で最も頻繁に使用される吸着剤です。

**吸着剤 (Sorbent) :** LC で使用される充填剤を指します。一般的な充填剤にはポリマー、シリカゲル、アルミナ、チタニア、ジルコニア、化学修飾された材料などがあります。

**吸着等温線 (Adsorption isotherm) :** 吸着クロマトグラフィーの単位体積あたりの移動相に含まれる試料の平衡濃度に対して、単位重量あたりの固定相に含まれる濃度をプロットしたものです。吸着等温線の形状によって、ピークのテーリング、ピークのリーディング、カラムのオーバーロードなど、クロマトグラフィーでの溶質の挙動が決まります。

**強陰イオン交換体 (Strong anion exchanger) :** テトラアルキルアンモニウム基などの強塩基性イオン交換基を持つ陰イオン交換充填剤。

**競合塩基 (Competing base) :** トリエチルアミンやジメチルオクチルアミンなどの少量の塩基性化合物を 10~50 mM の濃度で逆相クロマトグラフィーの移動相に加え、塩基性の分析種と残存シラノールとの相互作用を防ぎます。競合塩基の濃度が分析種の濃度よりもかなり大きいいため、質量作用の法則によって機能します。添加剤も参照してください。

**強陽イオン交換体 (Strong cation exchanger) :** スルホン酸基などの強酸性イオン交換基を持つ陽イオン交換充填剤。

**強溶媒 (Strong solvent) :** 一般に、化合物の良溶媒を指します。クロマトグラフィーでは、分析種をカラムからより迅速に溶離させる高い溶媒強度を提供する移動相成分を指します。逆相 LC の水 / アセトニトリルの二成分溶媒系では、アセトニトリルが強溶媒と見なされます。

**極性 (Polar) :** 化学極性は、1 つの分子の正電荷の部分と、別の分子または同じ分子の負電荷の部分との双極子-双極子分子間力を指します。分子の極性は、分子を構成する原子の電気陰性度の違いや、分子の構造の非対称性によって異なります。例えば、水は電子の存在が偏るため極性があります。しかし、メタンは炭素に結合している水素原子が全て等価で、分子全体で電子が均一に共有されるため、無極性とされます。

**キラル固定相 (Chiral stationary phases) :** エナンチオマー混合物を分離するように設計された固定相。キラル認識相は、担体に被覆または結合すること、固体担体の表面で *in situ* で作成すること、または表面の空洞として存在させることが可能で、一方のエナンチオマーと特異的な相互作用を起こします。

**キラル認識 (Chiral recognition) :** キラル固定相が 2 つのエナンチオマーとそれぞれ異なる相互作用を起こし、HPLC での分離を可能にする能力。

**金属アフィニティクロマトグラフィー (Metal-affinity chromatography) :** 特定の金属陽イオン (通常は銅 (II)、亜鉛 (II)、鉄 (III)) に対する特別な親和性を使用して生体高分子の分離に用いる特殊な形式の配位子交換クロマトグラフィー。

**ギガポア (Gigapores) :** 灌流クロマトグラフィーを参照してください。

**疑似移動床 (Simulated moving bed) :** 複数のカラムとバルブから構成されており、疑似的に固定相を移動相の流れに対して逆方向に移動させ、分離した化合物を連続的に取り出し、かつ連続的に再注入することができるクロマトグラフィーシステム。分取スケールクロマトグラフィーで使用される複雑な形式のリサイクルクロマトグラフィー。

**逆相クロマトグラフィー (Reversed phase chromatography) :** HPLC で最も頻繁に使用されるモード。シリカゲルまたは中性ポリマービーズにオクタデシル基やオクチル基を化学結合させた充填剤を使用します。一般に、移動相は、水 (緩衝液) と、メタノールまたはアセトニトリルなどの水と混和性のある有機溶媒の混合溶液です。測定成分の疎水性が高くなるほど保持が強くなり、水溶性が高くなるほど保持が弱くなります。このモードには、さまざまな添加剤を移動相に添加することによって選択性が異なる多くのバリエーションがあります。例えば、緩衝液とテトラアルキルアンモニウム塩を陰イオン分析の移動相に追加すると、イオンペアが生成し、イオン交換クロマトグラフィーに匹敵する分離を行うことができます。HPLC 分析種の 90 % 以上が逆相クロマトグラフィーで分析されています。

## ク

**空隙 (Void) :** 通常はカラムのヘッドに形成される空間またはギャップ。カラム充填剤の沈下または崩壊により発生します。カラムの空隙によって効率が低下し、分離度が損なわれます。小さい空隙でも、小粒子充填剤のカラムでは大きな問題になることがあります。場合によっては、空隙をガラスビーズやカラムと同じ多孔性充填剤で埋めることができます。

**鎖の長さ (Chain length) :** 化学結合型逆相用充填剤の炭化水素部分の炭素鎖の長さ。炭素原子の数で表します (C8、C18 など)。明確には、エンドキャッピングに使用される短い炭素鎖 (通常はメチル、イソプロピル、sec-ブチル基) は除きます。

**屈曲度または屈曲係数 (Tortuosity or tortuosity factor) :** カラムの軸に沿って溶質が拡散するときの軸方向の拡散を抑制する充填カラムの特性。van Deemter の式の B 項は屈曲度に比例します。B 項、 $\gamma$ 、および分子拡散の項も参照してください。

**クロマトグラフ (Chromatograph) :** 名詞として : クロマトグラフィーを実行するために使用する。動詞として (IUPAC) : クロマトグラフィー層を通じた溶離による分離操作。

**クロマトグラフィー条件 (Chromatographic conditions) :** 分析を実行する方法を説明するクロマトグラフィーメソッドの実験パラメータ。検証のために分析を繰り返し実行できるように、十分な情報が含まれている必要があります。

**クロマトグラム (Chromatogram) :** クロマトグラフィープロセス実行時の、検出器信号の出力または試料濃度対時間または溶離ボリュームのプロット。

**クロロシラン (Chlorosilane) :** シロキサン結合により結合相を担体に導いた充填剤の合成に使用する試薬。反応性は、モノクロロシラン < ジクロロシラン < トリクロロシランの順に高くなります。アルキル部分 (オクタデシル、オクチルなど) によって、得られる結合相の疎水性が決まります。アルコキシシランも使用できますが、反応性は劣ります。

**グラジエント (Gradient) :** 時間の関数として溶媒強度を変化させる (通常は溶媒強度を上げる) ことで、より強く保持されている分析種を漸次溶離するプロセス。一般に、グラジエントは二成分系、三成分系、および四成分系溶媒混合液で、適切な強度に達するように溶媒を混合します。

**グラジエントディレイボリューム (Gradient delay volume) :** ドウエルボリュームを参照してください。

**グラジエント溶離 (Gradient elution) :** 移動相の強度を徐々に上げながら分離時間を短縮してクロマトグラフィー分離を行う技術。溶媒プログラミングとも呼ばれます。グラジエントには移動相の強度を連続的に変化させるものとステップワイズに変化させるものがあります。HPLC では、二成分系、三成分系、および四成分系溶媒グラジエントが日常的に使用されてきました。

**グラファイトカーボン (Graphitized carbon) :** グラファイトカーボンは、黒鉛化熱処理によって非黒鉛炭素から生成された、ほぼ完全な 3 次元の六方晶系構造を持つ黒鉛状炭素です。この材料は、水系試料や水と混和する有機溶媒による抽出物に含まれる極性化合物に高い親和性を持っています。一般に食品試料の農業分析に使用されます。

**グラファイトカーボン充填剤 (Graphitized carbon packing) :** 純粋なグラファイトカーボンで構成された逆相用充填剤。o、m、および p- 芳香族置換体およびシス・トランス異性体のような幾何異性体の高選択分離など、興味深い吸着剤特性を持っています。

## ケ

**ケイソウ土 (Kieselguhr) :** カラムクロマトグラフィーで使用されます。試料をクリーンアップするための充填剤としても使用されます。吸着が弱く、液液クロマトグラフィーの担体として使用することができます。HPLC ではめったに使用されません。

**系方向拡散 - 分散 (Radial diffusion-dispersion) :** LC カラムの径方向への拡散 - 分散。試料をカラムの中心に正確に注入すると、カラムを通過していくときに軸方向だけではなく径方向へも広がり、その結果、移動相速度がカラムの中心とは異なる壁面領域にも溶質が達します。

**結合相クロマトグラフィー (Bonded-phase chromatography) :** 担体に化学結合された相を固定相として分離に使用する、LC で最も一般的なモード。結合相クロマトグラフィーの最も一般的な担体は微粒子シリカゲルで、最も一般的な結合相は逆相クロマトグラフィー用のオクタデシルシランなどの有機シランです。すべての HPLC アプリケーションの約 70 % が、化学結合型の固定相で行われます。

**結合相濃度 (Bonded-phase concentration) :** 被覆率を参照してください。

**ゲル (Gel) :** ゲルクロマトグラフィーまたはゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) で使用される固体の充填剤。実際のゲルは、分散した媒体 (固体部分) とそれを分散させる媒体 (溶媒) で構成されています。また、固体が連続した相である、固体と液体のコロイド状の分散としても定義されています。

**ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) (Gel permeation chromatography) :** 有機系移動相を使用して行われる SEC。ポリマーの分離や特性解析に使用します。水系移動相を使用する SEC は水系 GPC、GFC、または水系 SEC と呼ばれます。

**ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) (Gel filtration chromatography) :** 水系サイズ排除クロマトグラフィーとも呼ばれます。水系移動相で行われます。通常は、ポリデキストランなどの柔らかいゲルで行われる分子サイズ分離を指しますが、高度に架橋されたポリマー、シリカゲル、その他の多孔質充填剤も使用されます。ほとん

どのゲル過分離には、バイオポリマーと、ポリアクリル酸などの親水性ポリマーが使用されます。

## コ

**高圧混合 (High pressure mixing)** : 溶媒が複数のポンプ (通常は 2 台、バイナリ) の高圧側で混合されるグラジエント HPLC システムの構成。このシステムでは、溶媒が 1 台のポンプの前のプロポーショナルバルブによって混合される低圧混合システムよりもグラジエントディレイボリュームが低くなります。

**交換容量 (Exchange capacity)** : イオン交換容量を参照してください。

**光学活性を持つ樹脂 (Optically active resin)** : 光学異性体を分離できるように、光学活性を持つ官能基がイオン交換樹脂に導入されています。HPLC アプリケーション向けの市販の樹脂はほとんどありません。

**高性能 CE (High performance CE)** : 内径の小さいキャピラリー内で、緩衝液を使用した導電性溶液に高電圧 (最大 30,000 V) を印加することによりイオンの電気泳動移動度の差に基づいてイオン性分子を分離する技術。非イオン性 (中性) 分子は MEKC によって分離できます。

**高速 LC (Fast LC)** : 小さい粒子 (粒径 3 または 5  $\mu\text{m}$ ) が充填された内径 2~6 mm の短いカラム (1.5~7 cm) を使用した HPLC。分離時間は数分または数秒が一般的です。

**高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (High performance liquid chromatography)** : 小さい粒子との充填剤を固定相とし、移動相を高圧で送液する完全に自動化された液相クロマトグラフィー技術。高圧 LC と呼ばれることもあります。

**効率 (N または H) (Efficiency)** : 通常は  $N = 16(V_R/w_b)^2 = 16(t_R/w_b)^2$  ( $w_b$  はベースラインで測定したピーク幅) から算出される理論段数 (N) により求められる尺度 (図 62 を参照)。ピーク幅を半分の高さで測定する場合は、 $N = 5.545 (V_R/w_b)^2$  を使用します。理論段高さ (H) または HETP は  $H = L/N$  によって求めます。非対称ピークの効率は、ピーク形状の数学的解析から得られるピークの重心と分散から適切に求めることができます。Foley-Dorsey 式も参照してください。

**固相抽出 (SPE) (Solid phase extraction)** : 小さいプラスチックカートリッジ、ディスク、または 96 ウェルフロースループレートのウェルに入れた粒径 20~40  $\mu\text{m}$  の固相充填剤 (吸着剤と呼ばれる) を使用した試料前処理技術。使用する吸着剤は HPLC 充填剤と同じです。クロマトグラフィーとの関連はありますが、SPE の原理は HPLC とはやや異なり、デジタルクロマトグラフィーと呼ばれることもあります。最も頻繁に実行されるプロセスには、吸着剤のコンディショニング、試料の負荷、不純物の洗い流し、少量の強溶媒による扱い訂正分の溶離の 4 つのプロセスが必要です。

**固体担体 (Solid support)** : 担体と同一です。

**固定化金属アフィニティクロマトグラフィー (Immobilized metal-affinity chromatography)** : 金属アフィニティクロマトグラフィーを参照してください。

**固定相 (Stationary phase)** : クロマトグラフィープロセスで移動せずに静止している相。LC の固定相には、固体相、担体に結合、固低下、または被覆された相をもつもの、あるいは壁に被覆された相があります。多くの場合、固定相で LC モードが特徴づけられます。例えば、シリカゲルは吸着クロマトグラフィーに使用され、オクタデシルシラン結合相は逆相クロマトグラフィーに使用されます。

**固定ゾーン (Stationary zone)** : 固定相とは区別します。固定ゾーンには、停滞移動相と、クロマトグラフィーで活性の高い固定相が含まれます。

**混合モードの分離 (Mixed-mode separation)** : 1 本のカラムで二つ (以上) の保持機構を利用することによる保持と選択性から得られる分離。例えば、残存シラノール基を持つ ODS カラムでは、中~高 pH の移動相を用いることで疎水性相互作用と解離したシラノール基によるイオン性相互作用による分離を行うことができます混合モードの分離は選択性の面で非常に有効なことがあります。ピークの対称性は悪くなる場合があることや、二つ (以上) の保持機構のバランスをバッチ間で再現することが難しいなどの問題点もあります。

**混合ベッドカラム (Mixed-bed column)** : 同一のカラムで複数の固定相を組み合わせます。ほとんどの場合は、IEC (混合陰イオンおよび陽イオン樹脂) および SEC (さまざまなポアサイズの充填剤の組み合わせ) で使用されます。IEC での利点は、陽イオンと陰イオンの両方の化合物を完全に除去できる点です。SEC では一つのカラムで幅広い分子量範囲に対応できるため、有効です。

## サ

**最小理論段高さ (Minimum plate height)** : H (理論段高さ) 対  $v$  (線流速) のプロットから得られる van Deemter 曲線の最小値。この値は、あるカラムと移動相の系で得られる理論段に最大値があることを表しています。最適な理論段高さとも呼ばれます。通常は、良好に充填されたカラムの粒子径の 2~3 倍になります。

**サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (Size exclusion chromatography)** : 立体排除クロマトグラフィーと同一です。

**再生 (Regeneration)** : グラジエント溶離の後、カラム内その初期状態に戻すこと。初期組成の移動相をカラムに通液することで、移動相の組成と、固定相の状態 (溶媒和の状態など) が初期条件に戻されます。イオン交換の再生には、イオン交換基の対イオンを元の対イオンに戻すプロセスが含まれます。再生は、カラムを元の状態に戻すこと (強溶媒を使用して不純物を除去することなど) を指すこともあります。

**サプレッサーカラム (Suppressor column)** : イオン交換カラムの後に配置し、電気伝導度検出において、バックグラウンドの低下と測定対象イオンの電気伝導度をさせ、イオンの検出感度を向上させます。場合によっては、カラムではなくイオン交換膜のサプレッサーが使用されます。

**三成分系移動相 (Ternary mobile phase)** : 3種類の溶媒または緩衝液を混合させた移動相。

**サンプリングレート (Sampling Rate)** : データ取り込みレートを参照してください。

**残存シラノール (Residual silanols)** : 結合相を充填剤表面に導入後、充填剤表面に残っているシラノール (-Si-OH) 基。非常に小さいポアに存在する可能性があるこれらのシラノール基と、かさ高い有機シラン (オクタデシルジメチルクロロシランなど) は反応できない可能性があります。しかし、小さいシラン化合物などは反応することができます。多くの場合、トリメチルクロロシランなどの小さい有機シランを使用してエンドキャップすることにより除去されます。エンドキャップも参照してください。

## シ

**シアノ相 (Cyano phase)** : 末端がシアノ基の化学結合相。順相で中程度の極性を持つ充填剤として、また逆相で短鎖結合相として使用することができます。

**シクロデキストリン (Cyclodextrins)** : キラル HPLC および CE 分離で使用される、複数の D-(+)-グルコピラノースユニットから成る環状オリゴマー。一般的なものとして、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、および  $\gamma$ -シクロデキストリンがあります。錐台の形状を持ち、比較的疎水性の高い空洞があり、1級および2級水酸基が末端にあります。シクロデキストリンにはその空孔へエナンチオマーの一方より強く包摂する性質があり、これによりエナンチオマー混合物が分離されます。水酸基によって修飾されたシクロデキストリンも選択性の調節に使用されます。

**示差屈折率ピーク (Refractive index peak)** : 吸光度やその他の検出器において、セル内で発生した屈折の変化によって生じる、疑似ピーク。通常はデッドボリュームの近くに見られます。空ピークも参照してください。

**指数関数的に修正されたガウス形ピーク (Exponentially modified Gaussian peak)** : ガウス形ピークが検出器を過度に遅く通過、もしくは過剰なボリュームをもつ検出器を通過することによって生じる非対称のピーク。カラム自体に原因があるピークのテーリングをモデル化するために頻繁に使用されます。Foley-Dorsey 式の基礎となります。Foley-Dorsey 式も参照してください。

**質量移動 (相間) (Mass transfer (interphase))** : 移動ゾーンと固定ゾーンの間で溶質が移動するプロセス。van Deemter の式の C 項は相間質量移動の項と呼ばれます。質量移動プロセスが高速になるほど、カラム効率が高くなります。HPLC では、低速の質量移動はカラム効率に影響を与える最も重要な要因です。その速度は、粒径の小

さい充填剤、薄い層の固定相、低粘度の移動相、および高温を使用して上げることができます。

**修飾剤 (Modifier)** : 移動相の特性を変えるために使用する有機溶媒。例えば、メタノールは逆相分離において強溶媒であり、修飾剤と呼ばれることがあります (水は弱い溶媒)。トリエチルアミンやイオンペア試薬などは修飾剤と呼ばれることもありますが、通常は添加剤と呼ばれません。添加剤も参照してください。

**シラノール (Silanol)** : シリカゲルの表面にある Si-OH 基。シラノールは、その場所、互いの関係、シリカの金属含有量に応じて強度が変化します。最も強いシラノールは酸性で、クロマトグラフィーで塩基性化合物と好ましくない相互作用を起こします。

**シラノファイル (Silanophile)** : シリカ表面の高活性または酸性シラノール基に対して高い親和性を持つ化合物。通常は強塩基性のアミンです。

**シリカゲル (Silica gel)** : 最も幅広く使用されている HPLC 充填剤。非晶質、多孔質で、シロキサンとシラノール基で構成されています。LC のすべてのモードで使用され、吸着モードでは未修飾充填剤として、液-液クロマトグラフィーまたは化学結合相では担体として、およびさまざまなポアサイズの SEC 充填剤として使用されます。平均粒子径が 3、5、および 10  $\mu\text{m}$  の微粒シリカが HPLC で使用されています。最近の分析 HPLC カラムでは、充填の再現性が高く、圧力降下が小さいため、球形シリカの方が不規則シリカよりも好まれます。シリカと呼ばれることもあります。

**試料容量 (Sample capacity)** : オーバーロードを発生させずに LC カラムに注入できる試料の量を指します。多くの場合、充填剤の単位重量あたりの試料の重量 (通常 g/g) で表されます。オーバーロードは、カラム効率が 10% 低下したときの注入試料量 (重量) として定義されます。試料負荷量と呼ばれることもあります。

**シリル化 (Silylation)** : 有機クロロまたは有機アルコキシシランと、反応性官能基を含む化合物との反応プロセス。LC では、検出可能にするための、または固定相との好ましくない相互作用を防止するために行う、プレカラム誘導体化を指します。化学結合相を固体担体に導入するプロセス、または充填剤表面の活性を抑えるための不活性化を指すこともあります。

**シロキサン (Siloxane)** : Si-O-Si 結合。シリカゲル、またはシリル化合物や結合相で見られる主要な結合。高 pH 値の場合を除き、高い安定性を持っています。HPLC の分離にはほとんど影響を与えません。

**親水性 (Hydrophilic)** : 水を好むことを表すギリシャ語。水との親和性がある固定相や水溶性分子を一般に指します。タンパク質の分離に使用される多くのカラム (イオン交換、SEC、アフィニティカラムなど) は親水性の特性を持っているため、水系環境でタンパク質を不可逆的に吸着したり、変性したりしません。

**親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic interaction chromatography)** : RPC にわすかに保持される高極性分析種を分離するための逆相 HPLC (RPC) の代替技術。HILIC と略されます。HILIC には、順相クロマトグラフィー (NPC) の要件と同様に、極性の高い固定相と固定相より極性の低い移動相が必要です。ただし、ヘキサンや塩化メチレンなどの無極性溶媒を使用して移動相から水を排除しようとする NPC とは異なり、HILIC には、分析種が選択的に分配する充填剤表面の水和相を維持するために、移動相に水が必要です。さらに NPC では水と混和しない溶媒が使用されるのに対し、HILIC では水と混和する有機溶媒が使用されます。HILIC では、未修飾シリカ、化学結合型ジオールやアミノ相、ポリヒドロキシエチルアスパルトアミド (両性イオン交換基) などの充填剤が使用されます。極性分析種はよく保持され、親水性が上がる順序で溶離します。これは RPLC の場合と正反対です。

**浸透 (Permeation)** : 充填剤ポアに溶質が入る SEC プロセスを指します。

**浸透性 ( $B_0$ ) (Permeability)** : カラムの透過性および固有透過性とも呼ばれます。移動相の流れに対する充填剤カラムの抵抗を表す用語。充填剤カラムでは、 $B_0 \approx d_p^2 \cdot \epsilon^2 / [180(1-\epsilon)^2] \cdot 5 d_p^2 / 1000$  となります。高い透過性を持つカラムでは圧損が小さくなります。

**ジエチルアミノエチル (DEAE)** : 生体分子の分離に使用する弱陰イオン交換基。

**ジオール相 (Diol phase)** : 順相および逆相で有効な結合相ジオール構造を持っています脂肪族の隣接した炭素原子上に 2 つの -OH 基が結合している構造 (ジオール構造) を持っています。順相では、シリカよりも極性が低くなります。逆相クロマトグラフィーでは、タンパク質とポリペプチドを分離するために使用されてきました。

**弱陰イオン交換体 (Weak anion exchanger)** : ジエチルアミノエチル基などの弱塩基性イオン交換基を持つ陰イオン交換充填剤。

**弱陽イオン交換体 (Weak cation exchanger)** : カルボキシル基などの弱酸性イオン交換基を持つ陽イオン交換充填剤。

**弱溶媒 (Weak solvent)** : 一般に、化合物の溶解性が低い溶媒を指します。クロマトグラフィーでは、逆相 LC の水/アセトニトリルの二成分溶媒系で分析種をカラムからよりゆっくりと溶離させる低い溶媒強度を提供する移動相成分を指します。水が弱溶媒と見なされます。

**充填剤 (Packing)** : HPLC カラムで使用される吸着剤、ゲル、または担体。ほとんどの分析 HPLC 用充填剤は、粒径が 10  $\mu\text{m}$  未満で、現時点では 5  $\mu\text{m}$  が最もよく使用されています。

**樹脂 (Resin)** : イオン交換分離で使用するポリマー系充填剤。最も一般的な樹脂は、粒径が 10  $\mu\text{m}$  未満の PS-DVB 共重合体です。樹脂にはイオン交換基が導入されています。

**順相クロマトグラフィー (Normal phase chromatography)** : 固定相の極性が移動相よりも高いクロマトグラフィーのモード。典型的な順相システムは、ヘキサン/ジエチルエチルエーテルなどの低極性有機溶媒の混合物を移動相として使用し、シリカゲルまたはアルミナを固定相とする吸着クロマトグラフィーです。シアノまたはアミノなどの極性結合相の使用することもあります。

**ジルコニア (Zirconia)** : 多孔質の酸化ジルコニウム。通常はポリマー有機相で被覆、もしくはポリマー有機相を結合させてクロマトグラフィー用吸着剤として使用されます。

## ス

**水籠 (Elutriation)** : ストークスの終末速度の違いに基づいて充填剤を分級するために使用する技術。アミノ酸分析用など、特に狭い粒度分布が必要なイオン交換樹脂の分級に最も頻繁に使用されます。この技術では、大きい管の中で水を上向きに流します。分級されていない粒子をこの流水の中に入れると、粒子はその密度と粒子径に応じてそれぞれのレベルで留まります。管内の特定のレベルを取り除くことにより分級を行います。高純度の球形シリカゲルが水籠によって分級されることもあります。

**スケーラビリティ (Scalability)** : 分析から分取クロマトグラフィーへの移行において、同じ粒径と結合相の充填剤を使用する場合に内径が異なるカラム間での分離の再現性を指します。通常は、大きい直径のカラムを使用して容量を上げます。直線的なスケールアッププロセスでは、最小限の時間で分取条件の最適化を行うことができます。

**スラリー充填 (Slurry packing)** : HPLC カラムに微粒子を充填するために最も頻繁に使用される技術。充填剤を約 10 % (w/v) のスラリー状にして、特殊な高圧ポンプを使用して空のカラムにすばやく注入されます。

**スルホン酸型陽イオン交換体 (Sulfonyl cation exchanger)** : 樹脂系充填剤に見られる強陽イオン交換基 (通常はプロピル  $\text{SO}_3\text{H}$ )。ナトリウム、アンモニウム、銀、カルシウムなどが対イオンになります。

## セ

**制御された表面多孔質担体 (Controlled surface porosity support)** : 多孔質層ビーズおよび薄膜充填剤と同一です。

**生体適合性 (Biocompatible)** : カラムまたは機器コンポーネントが、タンパク質などの生体分子を不可逆的に、または強固に吸着したり非活性化したりしないことを示す用語。多くの場合、メタルフリーの、またはセラミック製の表面やコンポーネントを示します。

**石けんクロマトグラフィー (Soap chromatography)** : イオンペアクロマトグラフィーの初期の名称。長鎖石けんまたは洗剤を移動相に添加して使用していました。

**セミ分取クロマトグラフィー (Semi-preparative chromatography)** : 分析カラム (内径 4~5 mm) や、それよりもわずかに大きいカラム (内径 6~10 mm) で実行する分取 LC を指します。通常の注入サイズは、ミリグラムから数グラムサイズの試料です。

**線形 溶離 吸着 クロマトグラフィー (Linear elution adsorption chromatography)** : 吸着等温線の線形部分で行われる吸着クロマトグラフィーを指します。これは Lloyd Snyder による造語です。

**選択性係数 ( $k_{A/B}$ ) (Selectivity coefficient)** : イオン交換クロマトグラフィーで、質量作用の法則をイオン交換体に適用し、電気浸透流を使用して同じ溶液に存在する 2 つのイオンをイオン交換体が選択する能力を解析することで得られた平衡化係数。例えば、 $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  との交換では、 $k_{\text{Na}/\text{H}} = ([\text{Na}]_s[\text{H}]_M)/([\text{Na}]_M[\text{H}]_s)$  となります。

**選択性または選択性係数 ( $\alpha$ ) (Selectivity or selectivity factor)** : 分離係数に置き換えられた古い用語。相対保持力と呼ばれることもあります。

**線流速 ( $u$ ) (Linear velocity)** : カラム内を移動する移動相の速度。センチメートル/秒で表します。流速をカラムの断面積で割った値に関連しています。カラム長さ ( $l$ ) を保持されない化合物の保持時間で割ることで求めます。ポイド時間も参照してください。

**ゼロデッドボリューム (Zero dead volume)** : デッドボリュームゼロのフィッティングまたはコンポーネント。

**全空隙率 ( $\epsilon_T$ ) (Total porosity)** : カラム内の移動相の総体積と総カラムボリュームとの比。  $\epsilon = V_M/V_C = \epsilon_0 + \epsilon_1 (1 - \tau\epsilon_0)$ 。ここで、 $V_M$  は移動相ボリューム、 $V_C$  はカラムボリューム、 $\epsilon_0$  は空隙空隙率、 $\epsilon_1$  は粒子内空隙率です。

**全浸透ボリューム ( $V_p$ ) (Total permeation volume)** : 最小のポアよりも小さいすべての分子が溶離する、SEC 充填剤の保持ボリューム。つまり、すべての分子はすべてのポアに  $V_p$  で完全に浸透し、1 つのピークとして溶離されます。 $V_M$  と同一です。

**全多孔性充填剤 (Totally porous packing)** : 固定相が多孔性材料で作成されている、溶質がこの多孔性材料に浸透し、固定相との相互作用が発生します。

**前端クロマトグラフィー (Frontal chromatography)** : 前端分析と同一です。

**前端分析 (Frontal analysis)** : カラムに試料を連続的に注入し、最も高速に移動する最も吸着力の弱い化合物だけが純粋な状態で得られるクロマトグラフィー技術。次に吸着力が弱い化合物は、最初に溶離する化合物と一緒に溶離し、3 番目に吸着力が弱い化合物は最初の化合物と 2 番目の化合物と一緒に溶離します (つまり 2 番目以降の化合物は混合物の状態で溶離される)。カラム出口から元の試料が溶離するまで、このように溶離され続けます。前端分析はほとんど使用されることがなく、主に分取用の技術です。

## ソ

**総移動相ボリューム ( $V_t$ ) (Total mobile-phase volume)** : SEC カラムの移動相の総体積。完全内包ボリュームとも呼ばれます。 $V_M$  と同一です。

**双性イオン (Zwitterions)** : 溶液内で正と負の両方の電荷を持つ化合物。

**相対 ( $\beta$ ) (Phase ratio)** : カラム内の移動相に対する固定相の相対的な量。分配クロマトグラフィーでは、 $b = V_S/V_M$  となります。ここで、 $V_S$  および  $V_M$  は、それぞれカラム内の固定相および移動相の体積です。保持係数は、相対と分配係数の積です。

**層流 (Laminar flow)** : 粘性力が慣性力より強い条件下で液体が移動するとき生じる、時間に左右されないスムーズな流れ。層流は、低いレイノルズ数によって特性付けられます (レイノルズ数を参照)。円筒チューブでは、中心の液体流がチューブの壁付近よりも高速なため、軸方向の液体速度に放射状の放物線分布が発生します。充填ベッドの間隙のこのような軸速度の不均一性により、充填カラムではピークの大きな広がりも発生します。

**疎水クロマトグラフィー (Hydrophobic interaction chromatography)** : 極性の低い (非炭化水素系) 充填剤を使用して、分析種の疎水部分と充填剤表面の疎水部分との相互作用により分子を分離する技術。高濃度の塩溶液を移動相に使用し、塩濃度を変化させることで分離を行います。この技術は、溶液から分子を脱塩する操作と類似しています。グラジエントは、塩濃度を下げることで実行します。この技術は、多くの場合、通常の逆相クロマトグラフィーで使用される有機溶媒では変性しやすいタンパク質の分離に使用されます。通常、疎水性相互作用クロマトグラフィーでは、有機溶媒は移動相ではほとんど、またはまったく使用されません。

**疎水性 (Hydrophobic)** : 水を好まないことを表すギリシャ語。水との親和性がない固定相や、一般に水に対する親和性がほとんどない分子を指します。疎水性分子には極性官能基がほとんどなく、炭化水素系の脂肪族および芳香族の官能基が多く含まれます。

**ゾーン (Zone)** : バンドを参照してください。

**ゾーン速度 ( $u_z$ ) (Zone velocity)** : 溶質ゾーンが移動する速度。  $u_z = u_M/(1 + k) = l/t_R$ 。ここで、 $u_M$  は移動相の速度、 $k$  は保持係数、 $l$  はカラム長さ、 $t_R$  は保持時間です。

**ゾルゲル (Sol gel)** : シリカゾルの凝集によって形成されたシリカゲル。古いタイプ A のシリカゲルに比べて、表面の酸性度が低い、微量金属含有量が低い、表面積と空隙率が小さい、pH 安定性が高い、といった特徴をもつタイプ B のシリカゲルを生成します。

## タ

**対イオン (Counterion) :** イオン交換プロセスにおいてイオン交換基から対象イオンを交換するために使用する溶液中のイオン。イオンペアクロマトグラフィーでは、溶液中に電気的に中性なイオン対を形成するために移動相に添加される、測定対象成分と反対の電荷を持つイオンです。

**タイプ A シリカ (Type A silica) :** 可溶性ケイ酸塩のゲル化によって形成されたシリカゲル。通常は、タイプ B のシリカよりも酸性度が高い、表面積と空隙率が大きい、微量金属含有率が高い、高 pH における安定性が低い、などの特徴があります。

**タイプ B シリカ (Type B silica) :** ゾルゲルを参照してください。

**多孔質層ビーズ (Porous-layer bead) :** 多孔性薄膜で被覆された小さいガラス製ビーズ。薄膜は、吸着剤、樹脂、または化学結合型の吸着剤などです。これらの充填剤は、HPLC で最初に使用されていた充填剤の 1 つです。粒径は 20~40  $\mu\text{m}$  で、今日の一般的な充填剤よりもサイズが大きいです。充填が容易で、当時としては十分な効率が得られていました。表面多孔性制御担体およびベリキュラー材料とも呼ばれます。

**多孔性ポリマー (Porous polymer) :** 一般に球形の合成ポリマーを使用した充填剤。一般的な例として、PS-DVB、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリブタジエンなどがあります。

**多孔性粒子 (Porous particle) :** 決められた直径とポアボリュームの連続したポアを持つカラム充填剤粒子を指します。HPLC では、分析技術者は通常直径が 10  $\mu\text{m}$  未満の多孔性粒子を使用します。これよりも大きい粒子は、コストが低く、カラム透過性が高いため、分取クロマトグラフィーで使用されています。

**多次元クロマトグラフィー (Multidimensional chromatography) :** 分離を向上させるために複数のカラムまたはクロマトグラフィー技術を使用すること。これは、試料のクリーンアップ、分離度の向上、スループットの向上、ピークキャパシティの向上に有効です。画分を収集し、これを第 2 のカラムに注入することによりオフラインで、またはスイッチングバルブを使用してオンラインで行うことができます。カラムスイッチング、マルチカラムクロマトグラフィー、ボックスカークロマトグラフィーとも呼ばれます。

**多分散粒子 (Polydisperse particles) :** 粒径分布が広い粒子 (>10%)。

**多流路拡散の項 ( $\lambda$ ) (Eddy dispersion (diffusion) term) :** van Deemter の式の A 項。この項は、粒子径と充填剤の形状に加えて、壁面効果によって生じるカラム軸方向の流速の不均質性から理論段高さへの寄与を示します。 $A = 2\lambda d_p$  となります。ここで、 $\lambda$  は経験から得られたカラム定数です。十分に充填されたカラムの一般的な  $\lambda$  の値は 0.8~1.0 です。いくつかのクロマトグラフィーの理論で

は、理論段高さ (HETP) に速度依存があることを示しています。カラム内の流れの不均質性によってピークの広がりが生じます。van Deemter の式も参照してください。

**担体 (Support) :** 固体粒子を指します。担体は、HPLC の未修飾の、被覆された、または化学結合された相です。通常は、担体はクロマトグラフィープロセスには寄与しません。

**単分散粒子 (Monodisperse particles) :** 粒度分布が非常に狭い粒子。多分散粒子も参照してください。

**第 4 級アンモニウム型陰イオン交換樹脂 (Quaternary ammonium anion exchanger) :** 強陰イオン交換樹脂。ペアイオンは通常、塩化物イオン。

**脱塩 (Desalting) :** 分子量の小さい塩やその他の化合物を非イオン性化合物や高分子量化合物から除去する技術。この例として、逆相充填剤を使用して、疎水効果により測定対象成分を保持し、塩を保持させずに通過させる方法があります。もう 1 つの例として、SEC カラムを使用して高分子と分子量の小さい塩を分子サイズの違いで分離する方法もあります。

**脱気 (Degassing) :** 使用前、または使用中に移動相から溶存ガスを取り除くプロセス。溶存ガスが検出器セル内で気泡を発生することで、ベースラインにスパイクやノイズが発生することがあります。溶存空気は、電気化学検出器 (反応によって) や蛍光検出器 (クエンチングによって) などの検出器に影響を与えることがあります。溶存ガスによってポンプによる移動相の吸引が円滑に行われないうちもあります。脱ガスは、溶媒の加熱、ヘリウムパージ、減圧 (減圧に耐える容器を使用) によって、または、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) などのガス透過膜を利用したオンライン真空脱気を使用して行います。

**段階的溶離 (Stepwise elution) :** 分離中に移動相の組成を段階的に変化させて分析種を溶出させること。ステップグラジエント移動相とも呼ばれます。これらの移動相は、ポンプまたはセレクトバルブを使用して段階的に追加します。グラジエント溶離は、溶媒組成の変化を連続的に行う溶離です。

**段数 (Plate number) :** カラム段数を参照してください。

**段または段数 (Plate or plate number) :** 充填カラムの理論段を指します (IUPAC)。理論段も参照してください。

## チ

**チェックバルブ (Check valve) :** 流体の流路に挿入され、流体が一方だけに流れるようにするデバイス。ほとんどの HPLC ポンプの入口と出口で使用されます。

**置換クロマトグラフィー (Displacement chromatography) :** 試料をカラム先端に吸着させ、試料中の化合物よりも強く吸着される化合物で置換するクロマトグラフィープロセス。試料分子は互いに、またはより強く吸着する化合物によって置き換えられます。その結果、溶離された試料溶質ゾーンがシャープになります。置換技術

は、主に分取 HPLC のアプリケーションで使用されてきました。

**チャネリング (Channeling)** : 充填剤に生じた空隙によって移動相と溶質が平均流速よりも速く移動することにより発生し、その結果バンドが広がります。空隙は、不完全な充填や充填ベッドの崩壊によって形成されます。

**中空カラム (Open tubular columns)** : HPLC、超臨界流体クロマトグラフィー (SFC)、CE での使用が現在検討されている内径の小さいカラム (100  $\mu\text{m}$  未満)。固定相はカラムの内側の壁に結合されます。最も頻繁に使用されるカラム材料はフーズドシリカチューブです。ルーチン HPLC や SFC ではほとんど使用されませんが、CE ではよく使用されます。

**注入溶媒 (Injection solvent)** : 試料を HPLC カラムに注入するために使用する溶媒。溶媒の強度は、移動相と同じか、または移動相よりも低くなければなりません。これは、強い溶媒の存在によって試料の溶出が部分的に早くなることを防ぐためです (このようなことが起こると、ピーク形状が悪くなります)。

**調整済み保持時間 ( $t_R'$ ) (Adjusted retention time)** : 保持時間をホールドアップ時間で調整したもの。  $t_R' = t_R - t_{M0}$ 。ここで、 $t_R$  は保持時間、 $t_M$  はホールドアップ時間 (ポアに完全に浸透する、保持されない低分子化合物がカラムから溶出されるまでの時間) です。

**調整済み保持ボリューム ( $V_R'$ ) (Adjusted retention volume)** : 保持ボリュームをホールドアップボリュームで調整したもの。  $V_R' = V_R - V_M$ 。ここで、 $V_R$  は対象ピークの保持ボリューム、 $V_M$  はホールドアップボリューム (カラム内の移動相の総体積に対応する体積) です。デッドボリュームとホールドアップボリュームも参照してください。

**超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) (Supercritical fluid chromatography)** : 超臨界流体を移動相として使用する技術。この技術は、LC (検出に問題があるため) や GC (揮発性がないため) では効果的に処理できない基質の分離に適用されてきました。例として、トリグリセリド、炭化水素、脂肪酸の分離などがあります。GC 検出器と HPLC ポンプは、ともに SFC で使用されてきました。

**直交性 (Orthogonality)** : 2 次元の分離 (クロマトグラフィー) において、それぞれの次元の溶出時間を統計的に独立したものとして処理できること。2 つの次元が完全に異なる保持メカニズムを持つこと (逆相と順相、イオン交換と逆相など) が理想的です。

**沈降 (Sedimentation)** : イオン交換樹脂の分級に利用される技術。粒度分布の広い粒子を、溶媒 (多くの場合は水) を入れた容器の中に投入すると、粒子は粒径と密度に基づいて異なる速度で沈下するため、サイズ勾配がされ、粒径の異なる画分が取り除くことができます。沈降によって、非常に粒度分布の狭い粒子を得ることができます。

## テ

**テーリング (Tailing)** : 通常のガウス形ピークのアシンメトリ係数が 1 を超える現象。このピークではトレーリングエッジが長くなります。テーリングは、溶質に対する保持力が通常よりも高く、脱着速度が遅い充填剤の部位が原因で発生します。テーリング現象の一般的な例として、中性 pH 値における、被覆率の低い逆相充填剤の残留シリノール基に対するアミンの強い吸着があります。テーリングは、試料の大量注入、充填が不十分なカラム、過剰なカラム外ボリューム、不適切なフィッティング、過剰な検出器ボリューム、遅い検出器レスポンスなどが原因で発生することもあります。図 61 を参照してください。

**テーリング係数 (Tailing factor)** : 米国薬局方規定されているピーク非対称性の尺度。日本薬局方のシンメトリ係数と同じ。ピークの 5 % 高さにおけるピーク幅と、ピーク頂点からピーク前側の 5 % 高さまでの水平方向の距離を 2 倍して求めた長さの比。テーリングしているピークでは、この係数は 1 よりも大きくなります。アシンメトリ係数も参照してください。

**低圧混合 (Low pressure mixing)** : 高圧混合を参照してください。

**停滞移動相 (Stagnant mobile phase)** : 移動相のうち、粒子のポアに含まれる部分。

**添加剤 (Additive)** : 分離または検出特性を向上するために移動相に追加される物質 (シリノールの効果を打ち消すための塩基、不純物金属をブロックするためのキレート試薬、関節吸光度を行うための UV 吸収のある化合物など)。

**データ取り込みレート (Data acquisition rate)** : 検出器のサンプリングレートを指す用語。クロマトグラフィーのピークを解析するには、少なくとも 1 ピークあたり 20~30 個のデータポイントを集める必要があります。通常は Hz の単位で測定されるデータ取り込みレートは、ピークが検出器を通過するとき集める 1 秒あたりのデータポイントの数を定義します。ピーク幅の狭いピークでは、ピークの特長解析に必要なデータポイント数が得られるように十分な速さのデータ取り込みレートを設定する必要があります。UHPLC では 80~160 Hz のデータレートが使われます。データレートやサンプリングレートとも呼ばれます。

**デキストラン (Dextran)** : ポリデキストラン系充填剤は、低圧バイオクロマトグラフィーで主に使用します。この例として、セファデックス (GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ) があります。

**デッドボリウム ( $V_M$ ) (Dead volume)** : カラムのデッドボリウムは、充填剤のすべてのポアに完全に浸透できる低分子が到達可能なカラム内の全空間で、 $V_M$  と表します。 $V_M$  には空隙ボリウム (充填剤の隙間のボリウムの合計) とポアボリウム (充填剤内部のポアボリウムの合計) が含まれます。システムのデッドボリウムには、インジェクタと検出器をカラムに接続する配管の容積も含まれます。システムのデッドボリウムは、通常は、少量の基本的に充填剤に保持されない化合物を注入することで近似されます。ウラシル、アセトン、およびチオ尿素は、逆相クロマトグラフィーのデッドボリウム測定で一般的に使用されますが、最近では硝酸イオンや亜硝酸イオンもよく用いられます。調整済み保持ボリウム、ホールドアップボリウム、ボイドボリウムも参照してください。

## ト

**等温クロマトグラフィー (Isothermal chromatography)** : 定温条件を使用します。すべての LC のほとんどが等温条件下で実行されます。

**等温線 (Isotherm)** : 吸着等温線を参照してください。

**トリエチルアミン (Triethylamine)** : 塩基性分析種を分離するときに逆相クロマトグラフィーのシラノール基をブロックするために使用する添加剤。

**トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid)** : 逆相クロマトグラフィーでペプチドやタンパク質に使用する添加剤。

**トリプシン消化 (Trypsin digestion)** : トリプシン (消化酵素) を用いてタンパク質を特定の部位で切断しペプチドを得る方法。得られたペプチドはグラジエント溶離による逆相 LC で分離することができ、元のタンパク質の解析に有用な分離パターンを与えます。

**ドウェル時間 (Dwell time)** : ドウェルボリウムに相当する時間。流速とドウェルボリウムの積によって求めます。

**ドウェルボリウム (Dwell volume)** : 溶媒の混合ポイント (通常は混合ミキサー、または液体クロマトグラフのプロポーショニングバルブ) と LC カラムの先端部間のボリウム。溶媒組成を変化させるグラジエント溶離では、組成の変化した移動相ができる限り短時間でカラムへ到達するようにするために重要です。低圧混合システムでは、高圧混合システムよりも通常はドウェルボリウムが大きくなります。

**動的被覆 (Dynamic coating)** : 充填剤やキャピラリーチューブの壁の表面に吸着する化合物を移動相 (あるいは得移動液) に添加することで、HPLC の充填剤または CE のキャピラリーの壁に in-situ で被膜を形成します。動的被覆の目的は、新しい固定相を調製したり、充填剤またはキャピラリーの壁を非活性処理して、不要な相互作用を防止したりすることです。固定相を親水性ポリマー材料で被覆し、タンパク質の吸着を防止する操作は 1 つの例です。

## ナ

**内包ボリウム (Included volume)** : 完全内包ボリウムとも呼ばれます。充填剤のポア全体を移動する低分子が溶離する体積。サイズ排除クロマトグラフィーも参照してください。

**ナローボアカラム (Narrow-bore column)** : HPLC で使用される内径 2 mm 未満のカラム。マイクロボアとも呼ばれます。

## ニ

**二座型シラン (Bidentate silane)** : 2 つのシロキサン基によって担体表面に結合されているシランの 2 つのケイ素原子を短い炭化水素で架橋した特別な結合相。

**二成分系移動相 (Binary mobile phase)** : 2 つの溶媒または緩衝液で構成される移動相。

## ネ

**粘度 ( $\eta$ ) (Viscosity)** : 移動相粘度とも呼ばれます。移動相の粘度はカラム温度によって変動します。粘度が低い移動相は一般に高い効率を示します。これは、拡散係数が溶媒の粘度に反比例するからです。例えば、逆相クロマトグラフィーにおいて、アセトニトリルは粘度の高いイソプロパノールより高いカラム効率を得られます。カラムの背圧は溶媒の粘度に直接比例します。

## ノ

**ノイズ (Noise)** : ベースラインノイズを参照してください。

## ハ

**ハートカット (Heart cutting)** : 分取 LC で純度が最大になるピークの中心部を収集することを指します。この用語はカラム切り替えでも使用されます。

**背圧 (Backpressure)** : ヘッド圧力およびカラム圧力と同一です。

**背圧レギュレータ (Backpressure regulator)** : 検出器の後ろにオンラインで配置されるデバイスで、フローセルの正の圧力を保持し、検出器における気泡の発生を最小限に抑えます。

**配位子 (Ligand)** : 配位子交換クロマトグラフィーでは、固定相との配位子交換の対象となる分析種を指します。アフィニティクロマトグラフィーでは、酵素、抗体、ホルモンなど、担体 (キャリア) と結合してアフィニティカラムを形成する生体特異性物質を指します。結合相クロマトグラフィーでは、表面に共有結合された部分を指します。

**配位子交換クロマトグラフィー (Ligand exchange chromatography)** : キレート配位子を移動相に添加し、充填剤に吸着させる技術。これらの吸着された分子は、特

定の溶質のキレート試薬として機能します。例えば、アミノ酸のキレート形成と分離のために銅塩を移動相に追加することができます。キレート樹脂は同様に作用し、キレート基がポリスチレンなどの担体に化学結合されます。

**排除クロマトグラフィー (Exclusion chromatography) :** イオン排除クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを参照してください。

**排除限界 (Exclusion limit) :** サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) において、排除ボリュームより小さい溶出ボリュームで溶出できる分子量 (溶媒中における分子サイズ) の上限。多くの SEC 充填剤はその排除限界で区別します。例えば、多孔質シリカゲルの 105 カラムは、分子量がポリスチレン換算で 100,000 を超える化合物を排除します。

**排除ボリューム (Excluded volume) :** 間隙ボリュームを参照してください。

**排除ボリューム ( $V_0$ ,  $V_{ei}$ ) (Exclusion volume) :** SEC において、最大のポアよりも大きいサイズを持つすべての分子が完全に排除される最小溶出ボリューム。これらの分子はポアに浸透することができず、カラムの間隙 (粒子間) ボリュームで溶出されます。

**ハイフネーテッド技術 (Hyphenated techniques) :** LC-質量分析 (MS)、LC-フーリエ変換赤外分光法 (FTIR)、LC-MS-MS など、略語の形式でよく知られている技術を指します。多次元クロマトグラフィーも参照してください。

**ハイブリッドシリカ (Hybrid silica) :** 有機部分と無機部分の両方で構成されるシリカゲル。ポリマー系充填剤とシリカ系充填剤の特性を合わせ持っています。有機官能基が含まれるシランから合成します。無機シリカゲルとは特性 (充填剤としての選択性など) が異なりますが、高 pH での安定性は優れています。

**破砕型充填剤 (Irregular packing) :** カラムの充填剤の形状の一つ。破砕型充填剤には微粒子サイズのものがあります。破砕型充填剤は、固体物質を細かく砕いて小さい粒子にし、分級機を使用して狭い粒度分布に分級することで得られます。現在では、球形の充填剤が破砕型充填剤よりも頻繁に使用されています。

**バックフラッシュ (Backflushing) :** インジェクタとカラムの間に置かれた 4 方向バルブにより、移動相をどの方向にも流すことができるカラム切り替え技術。バックフラッシュは、強く保持された化合物をカラムの先端部から溶離するために使用します。これらの化合物の分析や、カラムからの単純な除去にも使用できます。

**バンド (Band) :** カラム内を移動しカラムから溶離するクロマトグラフィーのピークを指します。

**バンドの広がり (Band broadening) :** カラム内を移動するときに幅が広がり、それに伴ってクロマトグラフィーのバンドが希釈されるプロセス。注入時のサンプルは狭いバンドとなっています。分離された各成分は純粋な化合物として狭い幅で溶離されることが理想です (バンドの広がりが少ない場合)。バンドの広がり (R) の尺度はバンド幅 ( $t_w$ ) で

すが、より正確にはカラムの理論段数 (N) になります。場合によっては、バンドの拡散とも呼ばれます。図 62 を参照してください。

**バンド幅 ( $t_w$ ) (Bandwidth) :** カラムから溶離するときのクロマトグラフィーのバンドの幅。通常は、ピークを表すガウス曲線上の変曲点で接線を引き、ベースラインで測定します。通常は、小さいバンド幅は効率的な分離を表します。ピーク幅とも呼ばれます。図 62 を参照してください。

**パーセント B 溶媒 (%B 溶媒) (Percent B solvent (% B solvent)) :** 二成分溶媒混合液の溶離強度の強い方の溶媒を指します。%A 溶媒は、これに対応する弱い方の溶媒です。

**パーフュージョンクロマトグラフィー (Perfusion chromatography) :** スルーポア (メガポアまたはギガポア) と呼ばれる非常に大きいポア (4000~8000 Å) を持つ粒子を使用するクロマトグラフィーを指します。移動相は、大きなポア間と、拡散ポアと呼ばれる粒子内部で貫通孔につながっている 300~1000 Å のポアを通じて流れます。高分子の分取分離に最適です。

**パスカル (Pa) (Pascal) :** 圧力の単位。1 MPa は約 10 bar (気圧) または 150 psi です。

## ヒ

**非水系逆相クロマトグラフィー (Non-aqueous reversed phase chromatography) :** 逆相用充填剤と水を含まない移動相とを使用する逆相クロマトグラフィーをさします。カラムから溶出しにくい、または 100 % メタノールまたはアセトニトリルでカラムからの溶離が困難な無極性の化合物に使用します。このような場合は、溶媒 A はアセトニトリル、溶媒 B はテトラヒドロフランなどのそれよりも強い溶媒でなければなりません。通常、逆相と同じように非水系逆相クロマトグラフィーでも、分析種の無極性が高くなるほど保持力が高くなります。

**非対称性 (Asymmetry) :** クロマトグラフィーのピーク形状を説明する指標。クロマトグラフィーの理論では、ガウス曲線形の対称なピークを想定しています。定量的な尺度として、ピークのアシンメトリー係数があります。これは、ピーク高さの 10 % の位置で測定した、ピークを基準としたピーク後半とピーク前半の距離の比です。特に米国薬局方 (USP) メソッドでは、他の非対称性の尺度も頻繁に使用されています。図 61 を参照してください。Foley-Dorsey 式も参照してください。

**非多孔性充填剤 (Nonporous packing) :** 粒子径が 5  $\mu\text{m}$  未満でポアを有しない粒子。多くの場合、粒径は 2  $\mu\text{m}$  未満です。短いカラムに充填して高速分離に使用します。カラムの一般的な略語として、非多孔性シリカを示す NPS、非多孔性樹脂を示す NPR、非多孔性ジルコニアを示す NPZ があります。

**非多孔性粒子 (Nonporous particle) :** ペリキュラー型充填剤あるいは表面多孔性充填剤のコアとして使用されるポアを有しない粒子を指します。かつてのペリキュラー型

充填剤は粒径約 40 μm ですが、現在は粒径 3 μm 未満の非多孔性シリカおよびポリマーをコアとする表面多孔性充填剤があります。

**ヒドロキシアパタイト (Hydroxyapatite)** : 骨や歯に化学的に類似した多孔質水酸化リン酸カルシウムの固体。核酸成分、モノクローナル抗体、タンパク質用のバイオクロマトグラフィーの充填剤として使用されます。

**比表面積 (Specific surface area)** : 窒素吸着を使用した BET メソッドなどの一般的に受け入れられている技術によって測定した LC 充填剤の表面積。

**被覆率 (Coverage)** : 化学結合型シリカゲル充填剤において、シリカゲル表面のシラノール基に結合している結合相の量を指します。被覆率は、通常はミリモル/平方メートルで表します。

**標準物質 (Standards)** : 既知量の分析対象化合物が含まれる試料。標準物質を使用すれば、その溶出時間と、同じ条件下で試料を注入したときの保持時間とを比較することで、試料ピークを特定することができます。定量の場合、外部標準物質は、検出器出力 (ピーク面積またはピーク高さ) 対濃度の検量線を作成するために使用する化合物です。試料中の分析対象化合物の濃度は、検量線を用いて確認します。内部標準物質は、分析対象化合物とは異なる時間に溶出する既知濃度の化合物です。これを試料に添加し、内部標準物質と試料中の分析対象化合物の相対的な検出器レスポンスを比較して、定量を行います。

**表面積 (Surface area)** : 窒素吸着を用いる BET メソッドなどによって測定した、吸着剤の固体表面の総面積を指します。シリカゲルなどの一般的な多孔性吸着剤の表面積は 100~600 m<sup>2</sup>/g です。

**表面多孔性充填剤 (Superficially porous packing)** : 多孔質層ビーズと同一です。

**表面被覆率 (Surface coverage)** : 通常は、LC 担体に結合された単位面積あたりの固定相の質量を差します。多くの場合、表面の平方メートルあたりのマイクロモル数で表します。場合によっては、炭素パーセンテージが表面被覆率のインジケータとして使用されます。

**微粒子 (Microparticulate)** : 一般に、粒子径が 10 μm 未満の充填剤は微粒子と見なされます。

**微粒子 (Particulates)** : 通常は、フリットを詰まらせて背圧の問題を引き起こす、移動相中の小さい粒子を指します。HPLC カラムに充填される小さい粒子のことも指します。

**微量成分の濃縮 (Trace enrichment)** : 弱い移動相または溶液から微量の化合物を分離またはプレカラムに保持させ濃縮した後、強い移動相を通過することにより溶離する技術。この技術は、逆相充填剤を使用した水からの多環芳香族炭化水素の濃縮など、微量の疎水性化合物の濃縮で適しています。アセトニトリルなどの強溶媒は濃縮された化合物を溶離します。

**ピーク (Peak)** : カラムから溶離して検出器を通過する分析種のプロファイル。通常は、検出器の電気的応答に基

づいて、レコーダまたはプリンタの目に見える出力として描かれます。

**ピーク拡散 (Peak dispersion)** : バンドの広がりを参照してください。

**ピークキャパシティ (n) (Peak capacity)** : クロマトグラムのホールドアップボリュームと特定の保持上限との間で、一定の分離度以上で分離できるピークの数 (n)。Rs=1 の場合は、n は近似式  $1 + 0.25[(N)1/2 \ln(1 + k_{en})]$  で得られません。ここで、Rs は分離度、N は理論段数、k<sub>en</sub> はピーク n の保持係数です。

**ピーク形状 (Peak shape)** : ピークのプロファイルを説明するもの。理論上はガウス形ピーク (完全に対称) を想定しています。図 61 および 62 を参照してください。非対称も参照してください。

**ピーク高さ (Peak height)** : ベースラインからピーク頂点までを測定したピークの高さ。ピーク高さは、ピーク中に溶離されている分析種の量に関連しています

**ピークダブルット (Peak doublet)** : 一般にカラムの空隙により発生するスプリットピーク。溶出時間が近い化合物の場合もあります。

**ピークトラッキング (Peak tracking)** : メソッド開発時に、さまざまな分離条件で溶出位置が異なる分析種のピークを同定する方法。単一の純粋な分析種に特有の情報 (定性情報) を利用します。ダイオードアレイ検出器と質量分析計は、その特異性によりピークトラッキング用の最適な検出器となっています。

**ピークの変動 (σ<sup>2</sup>) (Peak variance)** : 保持時間に関するピークの第 2 の中心モーメント。ガウス形ピークでは、変動はピーク幅を制御する基本的なパラメータです。図 62 を参照してください。ガウス形ピークも参照してください。

**ピーク幅 (W<sub>b</sub>) (Peak width)** : バンド幅と同一です。図 62 を参照してください。

**ピークボリューム (Peak volume)** : 検出器を通過する一つのピーク全体の体積。V<sub>R</sub> = F x W<sub>b</sub>。図 62 を参照してください。

**ピーク面積 (Peak area)** : ピークから測定される面積。通常は、インテグレーターまたはデータ処理システムによって測定します。ピーク面積は、ピーク中に溶離されている分析種の量に関連しています。

## フ

**フェニル相 (Phenyl phase)** : ジメチルフェニルクロロまたはアルコキシシランとシリカゲルの反応により合成される無極性結合相。芳香環を含む化合物に対する親和性があり、アルキル結合相と異なる選択性を持つと言われていました。

**不可逆吸着 (Irreversible adsorption)** : 吸着剤に対して非常に強い親和性を持つ化合物をカラムに注入すると、非常に強く吸着されるため、カラムから溶離できません。試

料と吸着剤表面の間の化学反応は不可逆吸着の例です。化学吸着も参照してください。

**負荷量 (Loadability) :** カラムに注入できる分析種の最大量。これ以上の量では、希望する純度または回収率のレベルで化合物を単離できなくなります。分取クロマトグラフィーで重要です。

**フリット (Frit) :** カラムの両端に置かれたフィルター。カラムパイプの先端に取り付けられますが、エンドフィッティングに取り付ける方が一般的です。フリットは、焼結ステンレス製や多孔質 PTFE やポロプロピレンなど、不活性金属またはプラスチック製です。フリットの孔径は、充填剤の最も小さい粒子よりも小さくなければなりません。大きい場合は、充填剤がフリットを通過し、カラムから漏出します。

**フルオロ相 (Fluoro phase) :** 大部分の水素原子がフッ素原子に置換された脂肪族あるいは芳香族化合物から成る逆相モードの結合相。フルオラス相またはペルフルオロ相と呼ばれることもあります。通常は、これらの相は炭化水素相とは選択性が異なります。

**ブレイクスルーボリューム (Breakthrough volume) :** カラムに連続的に注入される特定の溶質が溶出を始めるときの体積。これは、カラムボリュームと溶質の保持係数に関連します。特定の溶質についてのカラムの総試料負荷量を確認する場合には有効です。

**分画範囲 (Fractionation range) :** SEC において分子サイズを基準にして充填剤が分子を分離できる範囲。この範囲の一端では、サイズが大きすぎるためにポアの中に浸透しない分子が排除されます。範囲のもう一端では、すべてのポアの中に完全に浸透できる分子が最終浸透ボリュームで溶出されます。

**分級 (Classification) :** カラムに充填する粒子を選別するプロセス。一般に、HPLC では粒子径の分布が狭いと優れた効率を得られ、微粒子がないと高い透過性が得られます。分級は、沈降、水簸、遠心分離技術によって行われます。

**分子インプリント相 (Molecularly imprinted phases) :** インプリント相を参照してください。

**分子拡散の項 (B 項) (Molecular diffusion term) :** van Deemter の式の B 項 (第 2 項)を参照してください。縦方向拡散または軸方向拡散の項とも呼ばれます。この項は低流速では理論段高さを大きくする原因となりますが、一般的な流速以上ではその影響は小さくなります。B 項への寄与は溶質の移動相への拡散から生じ、 $2\gamma D_M$  となります。ここで、 $\gamma$  は妨害係数 (通常は 0.6~0.8)、 $D_M$  は拡散係数です。van Deemter の式も参照してください。

**分取クロマトグラフィー (Preparative chromatography) :** 構造や特性を調べるために十分な量の化合物を単離する目的で LC を使用するプロセスを指します。医薬品またはバイオテクノロジーの精製では、数グラムの原料に直径数フィートの大きいカラムを使用することができます。数マイクログラムの貴重な天然物を単離する場合には

内径 4.6 mm の分析カラムが使用されます。クロマトグラフィーのニーズに応じて、カラムのサイズが選択されます。

**分子量分布 (Molecular weight distribution) :** ポリマー試料に含まれる分子の分子量分布。分布は分子量の平均と数の平均として定義することができます。

**分析カラム (Analytical Column) :** 定性および定量分析に使用する HPLC カラム。一般的な分析カラムは内径 4.6 mm x 長さ 50~250 cm ですが、これよりも内径の小さい (最小で内径 0.05 mm) のカラムも分析カラムと考えることができます。ステンレス、ガラス、ガラスライナー付きステンレス、PEEK、その他の金属および非金属材料で構成される場合があります。

**分析種 (Analyte) :** HPLC によって分析する測定対象成分。

**分配クロマトグラフィー (Partition chromatography) :** 2 つの異なる液相の 1 方が担体上に固定され (固定相)、もう 1 方がカラム内を自由に移動する (移動相) ことでクロマトグラフィーが行われる分離プロセス。溶質は、個々の分配係数に基づいて 2 相間で分配され分離されます。液-液クロマトグラフィーはその例です。現在の化学結合型充填剤を利用するクロマトグラフィーは、液相の 1 つが実際には担体に結合して固定相となっているため、分配クロマトグラフィーの 1 つと見なされています。分配クロマトグラフィーの分離機構には、担体に含浸、被覆、または化学結合された固定相に溶質が少なくとも部分的に溶け込むことが含まれていると考えられています。吸着では対照的に、溶質の固定相への浸透 (溶解) はありません。

**分配係数 (K) (Partition coefficient) :** 固定相の溶質の平衡濃度と、移動相の溶質の平衡濃度の比。 $K_D$  (Distribution coefficient、分配係数) あるいは  $K_c$  (Distribution constant、分配定数) とも呼ばれます。

**分布定数 (係数) ( $K_c$ ) (Distribution constant) (coefficient) :** あらゆる形態のまたは固定相上の成分の平衡時の総濃度を、移動相中の成分の平衡時の濃度で割ったもの。分布係数、または分配クロマトグラフィーでは分配係数と呼ばれることもあります。分配クロマトグラフィーでは、固定相の濃度が相の単位体積あたりの値として表される場合に  $K_c$  が使用されます ( $V_R = V_M + K_c V_S$ )。固体の固定相では  $K_V$  を使用し、乾燥した固定相の質量 (重量) あたりの値として表します。既知の表面積を持つ、特性が十分に解析された充填剤を使用する吸着クロマトグラフィーでは、固定相の濃度を表面積あたりの値として表します。

**分離インピーダンス (E) (Separation impedance) :** 分析時間と圧力降下の両方を正規化して 2 つのクロマトグラフィーシステムの効率を比較するために John Knox によって開発された性能指数。  $E = t_R 4\gamma / N^2 v (1 + k)$ 。ここで、 $t_R$  は保持時間、 $4\gamma$  は圧力降下、 $N$  は効率、 $v$  は換算速度、 $k$  は保持係数です。E の値が低くなるほど優れたシステムになります。

**分離係数 ( $\alpha$ ) (Separation factor) :** 2 つの溶質の相対的な保持力の尺度となる力学係数。以前は、選択性または選択性係数と呼ばれていました。相対的な保持力。  $\alpha =$

$t_{R2}'/t_{R1}' = k_2/k_1$ 。ここで、 $t_{R2}'$  および  $t_{R1}'$  は、それぞれピーク 2 および 1 の調整済みの保持時間、 $k_2$  および  $k_1$  は対応する保持係数です。

**分離度 (Rs) (Resolution) :** カラムがピークを分離する能力。Rs =  $(t_{R2} - t_{R1}) / [(W_{b1} + W_{b2}) / 2]$ 。ここで、 $t_{R2}$  および  $t_{R1}$  は 2 つのピークの保持係数、 $W_b$  はベースラインにおけるピーク幅です。通常は、2 つのピークの間隔で表します。良好な定量を行うには 1 以上が必要とされています。高さの等しい 2 つのピーク間の谷を識別するには、0.6 が必要です。高さの等しい 2 つのピークのベースライン分離には 1.5 以上あれば十分と考えられています。堅牢なメソッドでは、通常は 1.7 以上の値を必要とします。図 62 を参照してください。

**分離度の式 (Resolution equation) :** 一般的な分離度の式および Purnell 方程式とも呼ばれます。R =  $4N^{1/2}[(\alpha - 1)/\alpha] [k/(1+k)]$ 。ここで、N は効率、 $\alpha$  は分離係数、k は保持係数です。

**プレカラム (Precolumn) :** ポンプとインジェクタの間に配置する小さいカラム。移動相に含まれる微粒子を取り除き、固定相の成分で移動相を事前に飽和させて、固定相の喪失や分析カラムの溶解を防止します。また、分離に干渉する可能性がある化合物を化学的に吸着します。このカラムの容積はインクラティック溶離にはほとんど影響を与えませんが、グラジエント溶離ではグラジエントディレイの一部となります。

**プレカラムフィルタ (Precolumn Filter) :** インジェクタとカラム (またはガードカラム) の間で使用するフィルタで、不要な固形物 (おもに試料由来) がカラムに入るのを防ぎます。インラインフィルタと呼ばれることもあり、場合によってはインレットフィルタとも呼ばれます。

**プロセススケールクロマトグラフィー (Process-scale chromatography) :** 製造スケールレベルにおける LC を指します。一般に、特別設計のカラム (通常は直径 > 5 cm)、溶媒の回収装置、低コストの充填剤 (大きい不規則な形状の粒子)、ラボスケールの HPLC と比べて試料を過負荷で分離する条件が必要になります。



**平均ポア径 (Mean pore diameter) :** 多孔質充填剤のポアの直径の平均値。ほとんどの場合は BET メソッドにより測定されます。均一な円筒形のポアという仮定に基づき、固有のポアボリュームの 4 倍を固有の表面積 (4V/A) で割った値として報告されています。ポア径は、溶質が固定相と相互作用できるようにポア内の外へ溶質分子が自由に拡散できなければならないという点で重要です。さらに、ポアは連続した流路を構成しており行き止まりが最小限で、溶質分子がポアのどの部分にもアクセスできなければなりません。SEC では、充填剤はさまざまなポア径を持っているため、異なるサイズの分子を分離することができます。シリカゲルなどの一般的な基質では、60 および 100 Å などのポアサイズが最も一般的です。300 Å を超えるポア径は生体高分子の分離に使用されます。通常

は、ポアはマイクロ (<20 Å)、メソ (20~500 Å)、マクロ (>500 Å) と分類されます。

**平面クロマトグラフィー (Planar chromatography) :** 平面状の固定相を使用する分離技術 (IUPAC)。一般的な形式としてペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーなどがあります。

**壁面効果 (Wall effect) :** 固い HPLC カラムの壁の付近で、充填密度が低いために生じる結果。移動相は、壁の近くでは、局所浸透性によりわずかに流速が速くなる傾向があります。壁付近にある溶質分子は溶質バンドの平均速度よりも高速で運ばれるため、バンドの拡散が発生し、カラムの効率が低下します。

**ヘッド圧力 ( $\Delta p$ ) (Head pressure) :** カラムの入口と出口の間の圧力差。代表的な内部空隙率 (0.5) の球形粒子が充填されたカラムでは、 $\Delta p = 3000L\eta/t_M d_p^2$  で近似することができます。ここで、L はカラム長さ (cm)、 $\eta$  は移動相の粘度 (センチポアズ)、 $t_M$  はカラムのホールドアップ時間 (分)、 $d_p$  は粒子径 ( $\mu\text{m}$ ) です。圧力は、ポンド/平方インチ (psi)、bar、atm、またはパスカル (Pa) で表すことができます。

**ヘリウムバージ (Helium sparging) :** 脱気を参照してください。ヘリウムは、ほとんどの一般的な液体に対して非常に低い溶解度を持っています。

**ベースライン (Baseline) :** ベースラインは記録デバイスによって描かれる線で、移動相だけが通過するときの検出器からの信号を表します。多くの場合は、このポイントからピークの計算を行い、ピーク面積やピーク高さを測定します。

**ベースラインノイズ (Baseline noise) :** 電気ノイズまたは温度変動、フローセルでの気泡の発生、または混合が不十分な移動相などの原因によって生じるクロマトグラフィーベースラインの不規則な変動 (短期間)。

**ペアードイオンクロマトグラフィー (Paired-ion chromatography) :** イオンペアクロマトグラフィーと同一です。

**ペリキュラー型充填剤 (Pellicular packing) :** 多孔質層ビーズを参照してください。

## ホ

**ホールドアップボリューム ( $V_M$ ) (Holdup volume) :** カラム内の移動相の総体積。 $V_M = V_e + V_i$ 。ここで、 $V_e$  は間隙ボリューム、 $V_i$  は粒子内ボリュームです。カラムのボイドボリュームとも呼ばれます。IUPAC では、厳密にはデッドボリュームは移動相が流れない領域のボリュームであり、クロマトグラフィーの分野では使用すべきではないとされています。ホールドアップボリュームは、すべてのポアに入り込むことができ、かつ保持されない化学種を注入することで測定します。間隙空隙率および粒子内空隙率を参照してください。

**包括的 2 次元クロマトグラフィー (Comprehensive two-dimensional chromatography)** : サンプル中の全成分に適用される 2 次元クロマトグラフィー。2 次元クロマトグラフィーも参照してください。

**飽和カラム (Saturator column)** : プレカラムを参照してください。

**保持係数 (k) (Retention factor)** : 試料成分が固定相上にある時間と、移動相内にある時間の比。調整済み保持時間をホールドアップ時間で割ることで算出します。  $k = (t_R - t_M) / t_M$ 。ここで、 $t_R$  は試料ピークの保持時間、 $t_M$  は保持されないピークの保持時間です (以前は  $k'$  が使用され、容量係数または容量比と呼ばれていた)。

**保持時間 ( $t_R$ ) (Retention time)** : 総保持時間とも呼ばれます。注入してからピークの最大値 (ピークトップ) が現れるまでの時間。総保持ボリューム ( $V_R$ ) は、保持時間に流速を掛けることで求めます。調整済み保持時間 ( $t_R'$ ) は、ポイドボリュームで調整したものです。  $t_R' = t_R - t_M$ 。通常は、注入からピークの頂点までで測定しますが、非対称ピークの場合は、ピークの重心までを測定する必要があります。

**保持比 (r) (Relative retention)** : 標準物質に対する相対的な保持力。  $r = t_R' / t_{R(SI)'} = k/k_{SI}$ 。ここで、 $t_R'$  は対象化合物の調整済み保持時間、 $t_{R(SI)'}$  は標準物質の調整済み保持時間、 $k$  および  $k_{SI}$  は対応する保持係数です。2 つの隣接したピークでは、 $\alpha$  は保持比を表し、分離係数 (以前は選択性または選択性係数と呼ばれていた) と呼ばれます。  $\alpha = t_{R2}' / t_{R1}' = k_2/k_1$  と計算されます。ここで、 $t_{R2}'$  および  $t_{R1}'$  は、ピーク 2 および 1 の調整済み保持時間、 $k_2$  および  $k_1$  は対応する保持係数です。

**保持ボリューム ( $V_R$ ) (Retention volume)** : カラムから測定成分を溶離するために必要な移動相の体積。  $V_R = F t_R$  または  $V_R = V_M + K_D V_S$ 。ここで、 $V_M$  はポイドボリューム、 $K_D$  は拡散係数、 $V_S$  は固定相ボリュームです。保持時間も参照してください。

**ポイド時間 ( $t_0$ ) (Void time)** : 保持されないピークの溶出時間。デッドタイムおよびホールドアップ時間と呼ばれることもあります ( $t_M$ )。ポイドボリュームは、ポイド時間に流速を掛けることで求めます。

**ポイドボリューム ( $V_M$ ) (Void volume)** : カラム内の移動相の総体積。カラムの残りの部分は充填剤で占められています。この体積は、充填剤に保持されない溶質を注入することで測定できます。デッドボリュームとも呼ばれます。多くの場合、記号  $V_0$  はポイドボリュームを表すために使用されます。これは、非多孔性粒子が充填されたカラムだけで有効です。  $V_0$  は、SEC で排除ボリュームを表すために使用する場合に有効です ( $V_e$ )。

**膨潤 - 収縮 (Swelling-shrinkage)** : 溶媒によって樹脂やゲルの体積が増減するプロセス。膨潤は架橋の程度によって異なります。低架橋度の樹脂は高架橋度の樹脂よりも膨潤/収縮が大きくなります。充填カラム中で充填剤が膨潤すると、背圧が上昇し、カラム効率が影響を受けることがあります。

**ボックスカークロマトグラフィー (Boxcar chromatography)** : カラム切り替えを参照してください。

**ポア径 (Pore diameter)** : 平均ポア径と同一です。

**ポアサイズ (Pore size)** : 多孔性充填剤のポアの平均サイズ。この値はオングストローム (Å) またはナノメートルで表されます。ポアサイズによって、分子が拡散して充填剤を出入りできるかどうかが決まります。平均ポア径も参照してください。

**ポアボリューム (Pore volume)** : 多孔性充填剤のポアの容積の合計。通常はミリリットル/グラムで表します。正しくは固有ポアボリュームと呼びます。これは窒素吸着の BET メソッドによって、または高圧下で水銀をポアに注入する水銀圧入ポロシメトリーによって測定します。

**ポリアクリルアミドゲル (Polyacrylamide gel)** : 水系 SEC で使用される中性の親水性ポリマー充填剤。アクリルアミドと N,N'-メチレンビスアクリルアミドの共重合によって合成されます。

**ポリエチレンイミン (Polyethyleneimine)** : シリカゲルまたはポリマー系担体に被覆または結合させて使用する陰イオン性ポリマー。タンパク質とペプチドの分離によく使用されます。

**ポリスチレンジビニルベンゼン樹脂 (Polystyrene-divinylbenzene resin, PS-DVB)** : イオン交換クロマトグラフィーの充填剤で最も一般的に担体として利用されるポリマー。イオン性官能基はさまざまな化学反応により導入されます。中性の (官能基を導入していない) PS-DVB ビーズは逆相クロマトグラフィーで使用されます。空隙率および機械的強度は、架橋度 (DVB の含有率) を変えることで変化させることができます。

**ポリマー系充填剤 (Polymeric packings)** : 通常は球形の合成ポリマーを使用した充填剤 (合成ポリマー自身を充填剤とする場合と担体として使用する場合があります)。LC で使用する一般的なポリマーとして、ポリスチレンジビニルベンゼン (PS-DVB)、ポリジビニルベンゼン、ポリアルキルアミド、ポリメタクリレート、ポリエチレンオキサライド、ポリデキストラン、多糖類などがあります。

**ポリメリック相 (Polymeric phase)** : 2 官能もしくは 3 官能シラン化合物をシリカゲルと反応させ、ポリマー状になっている化学結合相。

## マ

**マイクロ-LC (Micro-LC)** : 従来よりも内径の小さいカラムを使用して分離を行う技術の総称。マイクロ-LC という用語は、内径が 0.5 mm 未満のカラムでの HPLC で最も頻繁に使用されます。マイクロ-LC は、試料の量に制限がある場合の高感度分析や、イオン源に導入できる流速に制限があるような LC/MS 分析流に使用されます。

**マイクロチップデバイス (Microchip devices)** : シングルまたはマルチチャネルのマイクロ流体をシリコン、ガラス、およびその他に微細加工でチップに作成し、さまざま

な実験をマイクロスケールで行うデバイス。これらのデバイスは CE および CEC に使用できます。低コストで廃棄可能でなければなりません。分離でのマイクロデバイスの使用は始まったばかりですが、応用範囲は徐々に広がっていきとされます。

**マイクロポア (Microbore) :** HPLC で通常よりも小さい内径のカラムを使用することを指します。2 mm 未満のカラムは一般にマイクロポアサイズと言われ、0.5 mm 以下の内径はマイクロ・LC カラムと言われます。

**マクロポーラス樹脂 (巨大網状樹脂) (Macroporous resin (macroreticular)) :** 分子スケールのマイクロポアに加えて数百 Å のマクロポアがある、架橋構造を持つイオン交換樹脂。これらの高い多孔性を持つ樹脂は、高分子がアクセス可能な大きい内部表面積を持っています。

### 三

**見掛け流速 (us) (Superficial velocity) :** 同じカラムを充填しないで、同じ流速で使用した場合の移動相の仮想速度。  $u_s = F/A_c$ 。ここで、F は流速、 $A_c$  はチューブの断面積です。

**ミクロポーラス樹脂 (Microporous resin) :** 巨大網状樹脂と同一です。

**ミクロ網状樹脂 (Microreticular resin) :** 分子サイズに対応する径のポアを有する架橋構造の合成イオン交換樹脂。狭いポアへの拡散は制限されるため、大きな分子ではイオン交換速度と性能の低下が occurs。

**ミセルクロマトグラフィー (Micellar chromatography) :** ミセルを移動相に追加して行うクロマトグラフィー。ミセルは置換または分配試薬として機能し、選択性を変化させる新たなパラメータとなります。ミセルクロマトグラフィーと MEKC では、臨界ミセル濃度を超える濃度の界面活性剤が使用されます。

**脈流 (Pulsating flow) :** プランジャー型ポンプで発生する圧力の変動。パルスダンパ、圧力フィードバック制御、またはアクティブダンパポンプなどによって低減されます。電気化学および示差屈折率検出器などの検出器は脈流の大きな影響を受けます。

### ム

**無極性 (Non-Polar) :** 無極性分子は、電子が対称に分布しているため、分子内に電荷の偏りがない分子です。電荷はすべて互いに打ち消されています。無極性の化合物や溶媒、結合相は、ヘキサンなどの無極性、低極性の有機溶媒に容易に溶解し、水には容易に溶解しません。

**無限内径カラム効果 (Infinite diameter column effect) :** 特定の長さを持つカラムで、充填ベッドの中心に注入された試料がカラムの直径方向の拡散によって広がるにもかかわらず、壁面効果によりバンドの広がりが発生するカラム壁に決して達することがないこと。John Knox によって観察された現象で、カラム出口の中心で集めた試料がカ

ラム壁近くで集めた試料より高い効率を示す。無限の内径の効果は、カラムの長さ、内径、粒子径、移動相の特性によって異なります。HPLC で適用されることはめったにありません。

### メ

**メガポア (Megapores) :** パーフュージョンクロマトグラフィーを参照してください。

**メソッド開発 (Method development) :** 再現性の良い堅牢な分析を実現するための試料の前処理など、分析を最適化するためのプロセス。通常は、最適でなくとも十分な分離が得られる固定相、移動相、およびカラム温度の組み合わせを見つけることを重視します。

**メソッドバリデーション (Method validation) :** 分析メソッドが測定対象成分の特異性、定量性などについて望ましい精度、真度が得られることを検証するプロセス。

**メタロファイル (Metalophile) :** シリカ表面の高活性酸性シラノール基に対し高い親和性を持つ化合物。通常は、強塩基アミンまたは多官能基カルボン酸塩またはフェノール。

### モ

**モノマー相 (Monomeric phase) :** 結合相が 1 分子の層として担体に結合している結合相を指します。シリカゲルでは、アルキルまたはアリールモノクロロまたはアルコキシシラン化合物 (単官能シラン化合物) の反応によって合成します。ポリマー相は、ジまたはトリクロロシランまたはアルコキシシラン化合物 (2 官能、3 官能シラン化合物) を水の存在下で反応させて合成します。

### ユ

**有機修飾剤 (Organic modifier) :** 逆相 HPLC で分離を実行するために水系移動相に追加する、水と混和性のある有機溶媒。一般的な有機修飾剤には、アセトニトリル、メタノール、イソプロパノール、テトラヒドロフランがあります。

**有効理論段数 ( $N_{\text{eff}}$ ) (Effective theoretical plates) :** IUPAC では、有効段数とも呼ばれます。デッドボリュームの理論段数を補正しているため、これがカラムの真の段数です。  $N_{\text{eff}} = 16[(t_R/w_b)^2]$ 。ここで、 $t_R$  は調整済み保持時間、 $w_b$  はピークのパンド幅です (図 62 を参照)。これは、構成と相比が大きく異なる装置の効率を比較する際に、単純な段数よりも優れた指標です。

**有効理論段高さ ( $H_{\text{eff}}$ ) (Effective plate height) :** カラム長さを有効段数で割った値。

### ヨ

**陽イオン交換クロマトグラフィー (Cation exchange chromatography) :** 陽イオンを分離できる官能基を持つ

樹脂または充填剤を使用するイオン交換クロマトグラフィー。強陽イオン官能基の例としてスルホン基が、弱陽イオン交換官能基の例としてカルボキシル基があります。

**溶質 (Solute) :** 分析種も参照してください。

**溶出液 (Effluent) :** カラムから流れ出る移動相と溶質。eluate と同一です。

**溶媒 (Solvent) :** HPLC カラムまたは CE キャピラリーへの注入のために試料の溶解に使用する液体。使用する移動相を指すこともあります。移動相も参照してください。

**溶媒強度 (Solvent strength) :** 溶媒が特定の溶質または化合物をカラムから溶離させる能力を指します。Snyder は、アルミナを使用した吸着クロマトグラフィー (液-固クロマトグラフィー) で定性的に説明し、溶離力系列で溶媒を定量的に評価しました。シリカや炭素系吸着剤では得られるデータの幅が狭くなります。Snyder  $e^0$  も参照してください。

**溶媒選択三角形法 (Solvent-selectivity triangle) :** バンドスペースを変化させるためにさまざま溶媒から選択する際の有効なガイド。溶媒の選択性は、溶媒分子の双極性モーメント、酸性度、および塩基性度に依存します。

**溶媒の選択性 (Solvent selectivity) :** 溶媒が選択性に影響を与える能力。例えば、溶媒 B の溶媒強度を 5% から 10% に変化させると、または有機溶媒をメタノールからアセトニトリルに変えると、バンドスペースに影響を与えます。

**溶媒分離 (Solvent demixing) :** 強度が非常に異なる 2 つの溶媒 (A は弱い溶媒、B は強い溶媒) を未修飾シリカまたはアルミナで使用したときに発生します。強い溶媒 (B) は、固定相の活性点 (吸着点) に飽和するまで強く吸着されます。この時点までに、弱い溶媒 (A) はカラムを通過するときに濃縮または分離されます。最終的に、カラム全体が溶媒 B で飽和されると、この溶媒は溶離し、溶媒 A と最初の強度で混合され、溶媒強度の急激な変化によって試料成分が溶離されます。

**溶離 (Elute) :** 溶離クロマトグラフィーによりクロマトグラフを動作させます。古い専門用語の展開 (develop) よりも、溶離という用語の方が好まれます。

**溶離 (Elution) :** 溶質をカラムの下まで移動するために移動相をカラムに通すプロセス。

**溶離物 (Eluent) :** 分離を行うために使用する移動相。

**溶離クロマトグラフィー (Elution chromatography) :** 最も一般的に使用されるクロマトグラフィーメソッド。試料はカラムの先端部に狭いゾーンとして導入され、個々の分析種が分離され、カラムのもう一端から溶出されます。置換クロマトグラフィーや前駆分析と比較してください。

**溶離物 (Eluite) :** 溶離する化学種、分析種、または試料。

**溶離ボリューム ( $V_R$ ) (Elution volume) :** カラムから溶質を溶離するために必要な移動相の体積を指します。これは、注入ポイントから対象ピークの最大濃度 (頂点) までの体積です。 $V_R = F t_R$ 。ここで、F は流速、 $t_R$  は対象ピークの保

持時間です。

**容量 (Capacity) :** 試料負荷量を参照してください。

**溶離力系列 (Eluotropic series) :** 液固または吸着クロマトグラフィーで一般に使用される溶媒の強度の順序。順相クロマトグラフィーでは、ペンタンなどの無極性溶媒はこの尺度の低い方にあり、塩化メチレンなどの中程度の溶媒は中間に、メタノールなどの極性の高い溶媒は高い方にあります。逆相クロマトグラフィーでは逆の順序の強度が観察されます。水が弱く、アセトニトリルが強くなります。したがって、メソッドの開発またはグラジエント溶出時に溶媒を選択する場合は、溶離力系列が役立ちます。Snyder  $e^0$  も参照してください。

**予備濃縮 (Preconcentration) :** 微量濃縮を参照してください。

**四成分系移動相 (Quaternary mobile phase) :** 4 つの溶媒または緩衝液で構成される移動相。

**四成分系溶媒移動相 (Quaternary-solvent mobile phase) :** 4 つの個別の溶媒で構成され組成を微調整可能な移動相。この移動相の送液は低圧混合 4 液グラジエントポンプが用いられます。

## ラ

**ラジアル圧縮 (Radial compression) :** 壁面が柔軟なカラムに放射状の圧力をかけて、壁面効果を減少させます。

**ラングミュア等温式 (Langmuir isotherm) :** 特殊な形式の等温線。 $C_S = N_0 C_M / (K_d + C_M)$ 。ここで、 $C_S$  および  $C_M$  は、溶質の平衡固定相および移動相濃度、 $N_0$  は吸着に使用できる表面の部位の総数、 $K_d$  は吸着結合定数です。

**乱流 (Turbulence) :** あるポイントで流体の速度がランダムに変動する状態。レイノルズ数および乱流 (turbulent flow) も参照してください。

**乱流 (Turbulent flow) :** スムーズで安定した流れが止まり、無秩序になって時間変動が見られる流体の動き。同じ体積流速を得る場合に層流領域で外挿により求めた圧力に比べて大幅な圧力降下が見られるという特徴があります。

**乱流クロマトグラフィー (Turbulent flow chromatography) :** 高レイノルズ数を使用した条件下で、大きい粒子を用いて非常に高い線流速で行うクロマトグラフィー。この条件の H 対  $v$  の曲線は、 $v$  が大きくなると H が小さくなります。図 62 を参照してください。

## リ

**リーディング (Leading) :** クロマトグラムのピークの前側 (頂点よりも前) がピークの後ろ側よりも幅が広がること。フロンティング (Fronting) とも言われます。つまり、前側の勾配が後ろよりも緩くなります。このピークの分布は非対称になり、前縁部を持ちます。リーディングピークのアシンメトリー係数の値は 1 よりも小さくなります。テー

リングはこれとは反対の現象です。リーディングは、試料の負荷量が多い場合（等温線の正の曲率が原因）や充填が不十分なカラムを使用した場合に発生することがあります。

**リサイクルクロマトグラフィー (Recycling chromatography) :** カラムの溶出液をカラムの入口に循環させ、実質的にカラム長さを長くする技術。溶出液をポンプに再び通すことにより 1 本のカラムで行うことができます。スイッチングバルブによって接続された 2 本のカラムを使用する方法もあります。サイズ排除クロマトグラフィーでよく使用されます。

**立体排除クロマトグラフィー (Steric exclusion chromatography) :** 試料が溶液中のサイズの違いによって分離される LC の主要なモード。サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーとも呼ばれます。立体排除クロマトグラフィーは、ポリマーの分離や特性解析に最も頻繁に使用されます。

**立体保護された結合相 (Sterically protected bonded phase) :** イソプロピルやイソブチルなどの立体保護作用を持つ高い官能基が、表面のシロキサン結合を取り囲む結合相。3 未満の低 pH 域におけるシロキサン結合の加水分解による結合相の脱落などを防ぎます。

**粒径 ( $d_p$ ) (Particle size) :** LC カラムの充填剤の平均粒径。充填剤は単一の粒径ではないため、粒径 5  $\mu\text{m}$  のカラムには一定の粒度分布の粒子が充填されます。単分散粒子、粒径分布、および多分散粒子を参照してください。

**粒径分布 (Particle size distribution) :** LCカラムの充填に使用する粒子の粒径分布の尺度。HPLC では、狭い粒径分布が望まれます。粒径の分布が  $d_p \pm 10\%$  の場合は、平均粒径 10  $\mu\text{m}$  の充填剤の粒子の 90% が 9~11  $\mu\text{m}$  であるという意味です。

**粒子間空隙率 ( $\epsilon_p$ ) (Interparticle porosity) :** 充填カラムの単位カラムボリュームあたりの粒子間ボリューム。  $\epsilon_p = V_p/V_c$ 。ここで、 $V_p$  は空隙ボリューム、 $V_c$  は総カラムボリュームです。空隙空隙率も参照してください。

**粒子間ボリューム ( $V_p$ ) (Interparticle volume) :** 移動相の粒子外部の容積。

**粒子内空隙率 ( $\epsilon_i$ ) (Intraparticle porosity) :** 粒子ボリュームに対するポアボリュームの割合。  $\epsilon_i = V_{\text{pore}}/V_{\text{particle}}$

**粒子内ボリューム ( $V_i$ ) (Intraparticle volume) :** 粒子のポア内部の容積。内部および内包ボリュームとも呼ばれます。BET メソッドまたは水銀圧入ポロシメトリーで測定することができます。

**流速 (F) (Flow rate) :** LC カラムを通る移動相の単位時間当たりの体積。通常の流速は、従来の内径 4.6 mm の HPLC カラムで 1~2 mL/min です。

**流体力学ボリューム (Hydrodynamic volume) :** 自由溶液中の分子の有効直径によって定義される分子体積。ここでの流体力学的球形は、溶液内で中心軸の周りに回転したときの分子により定義される球形です。SEC で、分子形

状を定義するとき、また同じ分子量を持つ分子の溶離ボリュームが異なることが頻繁に発生する理由を説明するときに使用する用語。ストークス半径を調べることで測定します。

**流動抵抗パラメータ ( $\phi$ ) (Flow resistance parameter) :**  $\phi = d_p^2/B_0$ 。ここで、 $B_0$  は浸透性です。浸透性も参照してください。

**両性イオン交換樹脂 (Amphoteric ion exchange resin) :** 正と負の両方のイオン基を持つイオン交換樹脂。これらの樹脂は、同じ物質内に陰イオンと陽イオンの両方の機能を備えており、すべてのイオン性物質を溶液から取り除くことができるため、イオン遅滞での使用が最も有効です。

**理論段 (N) (Theoretical plate) :** Martin と Synges が提唱した概念。クロマトグラフィーに蒸留による分離の理論を適用します。この概念におけるカラムの長さは理論段高さと呼ばれます。HETP も参照してください。段数は  $N = 16(V_R/w^b)^2 = 16(t_R/w^b)^2$  と計算します。ここで、 $V_R$  は保持ボリューム、 $w^b$  はベースラインにおけるピーク幅、 $t_R$  は保持時間です。N も参照してください。

**理論段高さ (H) (Plate height) :** HETP を参照してください。

**臨界ミセル濃度 (Critical micelle concentration) :** 凝集によりミセルを形成し始めるイオン性界面活性剤の濃度。移動相に追加されたミセルは、分配機構により、HPLC および CE (MEKC) の非イオン性物質の分離を向上します。

## リ

**レイノルズ数 (Re) (Reynolds number) :** 流体の慣性力と粘性力の比。充填物のない滑らかなパイプでの流れを測定したとき、 $Re = ud/\eta/\rho$ 。ここで、 $u$  は平均速度 (センチメートル/秒)、 $d$  はパイプの直径、 $\eta$  は粘度 (グラム/センチメートル秒)、 $\rho$  は密度 (グラム/立方センチメートル) です。低い Re では粘性摩擦が優勢となり、流体運動を制御して、ゆっくりと確実に動くようになります。充填物のないパイプでは、Re が 4200 を超えると流れが完全に乱れます。充填層では、 $u$  が平均空隙流速に置き換えられ、 $\rho$  が平均粒子径と置き換えられます。Re が約 10 を超える充填層では乱流となりはじめますが、Re が 100~200 を超えるまでは完全には乱流にはなりません。

**連結カラム (Coupled columns) :** セレクタバルブによって 2 本の 2 次カラムに接続された 1 次カラムを使用するカラム切り替えの 1 つの形式。最初のカラムの画分を第 2 および第 3 のカラムに選択的に送液し、さらに分離することができます。この用語は、理論段数を増やすために直列に接続された複数のカラムを説明するためにも使用されます。



**ローディング (相のローディング対試料のローディング)  
(Loading (phase loading versus sample loading))** : 担体

に被覆または結合されている固定相の量。液液クロマトグラフィーでは、充填剤 1 グラムあたりの液相の量 (ミリグラム)。結合相クロマトグラフィーでは、ローディングをマイクロモル/平方メートルまたはカーボンパーセンテージ (w/w) で表すことができます。被覆率または表面被覆率とも呼ばれます。これとは関連がない別の意味として、分析または分取スケールカラムに注入される試料の量という意味もあります。分取スケールカラムは、スループット上の理由により過負荷の条件で使用することが頻繁にあります。

## Glossary references

---

- 1: R.E. Majors and P.W. Carr, LCGC 19 (2) 124-162 (2001).
- 2: 'Nomenclature for Chromatography', Pure and Appl. Chem. 65 (4), 819-872 (1993).
- 3: J.P. Foley and J.G. Dorsey, Anal. Chem. 55, 730 - 737 (1983)
- 4: L.R. Snyder, P.W., Carr, and S.C. Rutan, J. Chromatogr. A 656, 537 (1993).

## Glossary authors

---

**Peter W. Carr:** Peter W. Carr is a professor of chemistry in the Department of Chemistry, University of Minnesota, 207 Pleasant Street SE, Minneapolis, MN 55455-0431, and is a member of LCGC's editorial advisory board.

**Ronald E. Majors:** Ronald E. Majors, 'Column Watch' and 'Sample Prep Perspectives' Editor Ronald E. Majors is Senior Chemist, Columns and Supplies Division, Agilent Technologies, Life Sciences Chemical Analysis, Wilmington, Delaware, and is also a member of LCGC's editorial advisory board.

## Acknowledgements

Special thanks to the Agilent chromatographers who contributed to this book:

Paul Boguszewski, Sample Prep Product Manager

Aaron Boice, LC/Q-TOF Product Manager

William Champion, LC Columns Technical Support Specialist

John W. Henderson Jr., Applications Chemist

Maureen Joseph, PhD., LC Columns Strategic Marketing Manager

Jason Link, PhD., Small Molecule LC Columns Product Marketing Manager

Linda Lloyd, PhD., Large Molecule LC Columns Product Manager

William Long, PhD., LC Senior Applications Scientist

Anne Mack, Small Molecule LC Columns Applications Scientist

Ron Majors, PhD., Senior Scientist

Maggie Ostrowski, Single Quadrupole Product Manager, GC/MS and LC/MS

Rita Steed, LC Columns Technical Support Specialist

Lester Taylor, Small Molecule Pharma Segment Manager

Martin Vollmer, PhD., Marketing Manager Analytical and Preparative HPLC

Michael Woodman, Applications Specialist, LC and LC/MS

# 索引

## 性能に影響する要素の索引

緩衝液 (移動相も参照) 56、58 ~ 59、68、70、71、73、74、86、102 ~ 103、113、135

容量係数 7、8、57

キャピラリー 16、22、88、105、178、181 ~ 182

### カラム

劣化 .....39、57、124

取り扱い .....115

キレート .....39、52 ~ 53

サイズ .....27、28、35、64、78、81、23

寿命を伸ばす .....36 ~ 37、116

平衡化/再平衡化 ..... 55 ~ 56、117、118、123

保管 .....115 ~ 117

選択 ..... 28、62 ~ 63、121

表面多孔質 .....26、30、60

カラムコンパートメント .....21

データ収集レート 25、39、46 ~ 47、87、105、123

脱気 13 ~ 15、69

ディレイ (ドウェル) ボリューム 14 ~ 16、18、21、49 ~ 50、52、89、189

### 検出

データレート ..... 25、105

ダイオードアレイ ..... 23、25

イオン化 .....101

直線範囲 .....24、98

質量分析 .....22、97

感度 .....24、97

シングル四重極 MS .....99

ソフトウェア ..... 106 ~ 107

溶媒/緩衝液の選択 .....71、102、110

飛行時間型 MS .....99

トリプル四重極 MS ..... 99、100

紫外線 (UV) 22 ~ 23、24、25、71、73、97、124

希釈剤の強さ .....123

効率 ..... 5 ~ 8、10 ~ 11、30

カラム外ボリューム .....16、40、48、88

インラインフィルタ ..... 89、157

## フィッティングと接続

A-Line クイックコネクタカラムフィッティング . 16

正しい使用 ..... 42 ~ 45

デッドボリューム .....28

高圧 .....

正しいフィッティングの接続方法 .....42

Parker .....42

PEEK (ポリケトン) .....43

ポリマー .....43

再使用可能 .....43

フィッティングの種類 .....44

ステンレス .....

Swagelok .....88

トラブルシューティング .....116、122、124

## グラジエント

Agilent 1290 LC .....89

Agilent Method Translator ..... 46

カラムのクリーニング .....57

ドウェルボリューム .....48、49、51、52、119

グラジエントの式 ..... 10 ~ 11

イオン交換 .....95

メソッド開発 61

順相 .....93

最適化 ..... 78、82 ~ 83

ペプチド/タンパク質アプリケーション .....75

ポリマー系カラム .....84

逆相 .....84

プロファイルのスケーリング .....89

溶媒飽和 .....115

固定相の選択 ..... 65 ~ 66

サルファ剤アプリケーション .....83

トラブルシューティング .....74、120 ~ 125

「ウォークアップ」システム .....81

使用 ..... 54 ~ 56

メソッド変換 55、87、115

## 移動相

LC/MS .....71、102 ~ 103

混合	13 ~ 15、68、69、73、119、125	ドウエルボリュウム	49
順相	93	グラジエントの式	10 ~ 11
強度	10、78、79	グラジエントの最適化	82
修飾剤/緩衝液の選択	53、71、135	グラジエント	54
溶媒の選択	68、102 ~ 103	イソクラティックの最適化	79、85 ~ 86
トラブルシューティング	68 ~ 69	LC/MS	73
UHPLC	13、113	メソッド開発	65 ~ 67、86
変動	68 ~ 69、73	移動相の修飾剤	53、68 ~ 71
pH	53、69 ~ 74、76、77、84、119	移動相の選択	68
圧力の式	9、30、121	順相	93 ~ 94
ポンプ	13	カラムの再平衡化の最適化	55 ~ 56
バイナリ	14	ポリマー系カラム	84
ディレイボリュウム	16	分離度	8
イソクラティック	15	保持係数	7
圧力範囲	13	トラブルシューティング	68、76 ~ 79、117 ~ 119、121、123 ~ 124
クォータナリ	15	UHPLC	29
溶媒の混合	14	USP 表記	130
分離度	8 ~ 9	サンプル注入	45
カラムの劣化	57	オートサンブラ	17 ~ 21
カラムサイズ	35	キャリアオーバー	
薬剤アプリケーション	67	プロファイルのスケーリング (グラジエント)	89
ドウエルボリュウム	16、51、52、119	トラブルシューティング	68、76、120 ~ 125
カラム外ボリュウム	16、40	サンプル前処理	103、109
グラジエントの最適化	83 ~ 84	選択性	
ガードカラム	115	カラムの劣化	57
イソクラティックの最適化	80 ~ 81、85	カラムの特性	33
LC/MS	31	カラムの選択	64 ~ 66
メソッド開発	60	効率	6
移動相の修飾剤	69 ~ 71	グラジエントの最適化	82
順相	93、94	イソクラティックの最適化	79 ~ 81、85
粒子サイズ	34	LC/MS	72
保持係数	7	メソッドの再現性	118 ~ 119
固定相の選択	66	メソッド変換	87
トラブルシューティング	68、74 ~ 78、87、120	移動相の修飾剤	69 ~ 70、135
UHPLC	13、30、113	移動相の選択	68
USP 表記	126	ポリマー系カラム	84
保持		分離度	8
キレート化合物	52	保持係数	7
カラムの劣化	57	選択性の式	7 ~ 8
カラムの選択	64	選択性係数	7 ~ 8
データ収集レート	46	分離係数	7 ~ 8

トラブルシューティング	76、117、120 ~123
溶媒効果	46、123
溶媒のセーフティキャップ	185
トラブルシューティング	120
ベースライン	74~75、124~125
移動相	68~69
移動相修飾剤	74、76~77
圧力	121
ピーク形状	97
保持	123~124
USP 表記	126~131
van Deemter 曲線	10、88

## Index of products

columns, cartridge systems		<i>Hi-Plex Na (Octo)</i>	131
HPLC cartridge	36	<i>Hi-Plex Pb</i>	130
<i>ChromSep</i>	36	<i>PL-SAX</i>	37
<i>Dynamax Preparative Columns</i>	37	<i>PL-SCX</i>	37
<i>Load &amp; Lock Preparative Columns</i>	37	<i>ZORBAX 300SCX</i>	130
<i>PLRP-S</i>	37	<i>ZORBAX SAX</i>	129
<i>PL-SAX</i>	37	<i>ZORBAX SCX</i>	128
<i>PL-SCX 3</i>	7	columns, normal phase	
<i>ZORBAX Guard Cartridge</i>	36	<i>Polaris Amide-C18</i>	131
<i>ZORBAX RR</i>	36	<i>Polaris NH2</i>	128
<i>ZORBAX RRHT</i>	36	<i>ZORBAX CN</i>	128
<i>ZORBAX Semi-Preparative Guard</i>	37	<i>ZORBAX Eclipse XDB-CN</i>	128
chiral columns		<i>ZORBAX NH2</i>	128
<i>ChiraDex Chiral</i>	130	<i>ZORBAX Rx-SIL</i>	92, 127
columns, HILIC		<i>ZORBAX SB-CN</i>	128
<i>ZORBAX Eclipse XDB-C18</i>	92, 127	columns, polymers	
<i>ZORBAX Rx-SIL</i>	92, 127	<i>Bio SEC-3</i>	130
columns, ion-exchange		<i>Bio SEC-5</i>	130
<i>Bio SAX</i>	131	<i>Hi-Plex Ca</i>	129
<i>Hi-Plex Ca</i>	129	<i>Hi-Plex Ca (Duo)</i>	129
<i>Hi-Plex Ca (Duo)</i>	129	<i>Hi-Plex H</i>	129
<i>Hi-Plex H</i>	129	<i>Hi-Plex Na</i>	131
<i>Hi-Plex Na</i>	131	<i>Hi-Plex Na (Octo)</i>	131
		<i>Hi-Plex Pb</i>	130
		<i>PL aquagel-OH</i>	130
		<i>PLgel</i>	129
		<i>PLgel MIXED-D</i>	96
		<i>PLRP-S</i>	33, 37, 67, 129
		<i>PL-SAX</i>	37
		<i>PL-SCX</i>	37
		<i>ProSEC</i>	130
		<i>SepTech ST150 C18</i>	127
		<i>SepTech ST60 C18</i>	127
		columns, reversed-phase columnsP	
		<i>AdvanceBio Glycan Mapping</i>	131
		<i>AdvanceBio Peptide Mapping</i>	127
		<i>Bio SEC-3</i>	130
		<i>Bio SEC-5</i>	130
		<i>IonSpher C</i>	131
		<i>LiChrospher Diol</i>	129
		<i>PL aquagel-OH</i>	130

<i>PLgel</i> .....	129
<i>PLgel MIXED-D</i> .....	96
<i>PLRP-S</i> .....	33, 37, 67, 129
<i>Polaris C18-A</i> .....	127
<i>Polaris C18-Ether</i> .....	127
<i>Polaris C8-A</i> .....	128
<i>Polaris C8-Ether</i> .....	128
<i>Polaris Si-A</i> .....	127
<i>Poroshell 120</i> .....	30, 31, 40, 66, 77, 84-88, 110
<i>Poroshell 120 Bonus-RP</i> .....	131
<i>Poroshell 120 EC-C18</i> .....	127
<i>Poroshell 120 EC-C8</i> .....	128
<i>Poroshell 120 PFP</i> .....	130
<i>Poroshell 120 SB-C18</i> .....	127
<i>Poroshell 300</i> .....	31
<i>Poroshell HPH-C8</i> .....	128
<i>Poroshell HPH-C18</i> .....	127
<i>ProSEC</i> .....	130
<i>Pursuit C18</i> .....	127
<i>Pursuit C8</i> .....	128
<i>Pursuit Diphenyl</i> .....	128
<i>Pursuit PFP</i> .....	130
<i>Pursuit XRs C18</i> .....	127
<i>Pursuit XRs C8</i> .....	128
<i>Pursuit XRs Diphenyl</i> .....	128
<i>Pursuit XRs Si</i> .....	127
<i>SepTech ST150 C18</i> .....	127
<i>SepTech ST60 C18</i> .....	127
<i>ZORBAX 300SB-C3</i> .....	75
<i>ZORBAX 300SB-C18</i> .....	66, 127
<i>ZORBAX C8</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse Extend-C18</i> .....	
<i>ZORBAX Eclipse Plus</i> .....	76, 85-86
<i>ZORBAX Eclipse Plus C18</i> ....	76, 86, 104, 110, 127
<i>ZORBAX Eclipse Plus C8</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse XDB</i> .....	92
<i>ZORBAX Eclipse XDB Phenyl</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse XDB-C18</i> .....	127
<i>ZORBAX Eclipse XDB-C8</i> .....	128
<i>ZORBAX Extend-C18</i> .....	77, 86, 122, 127
<i>ZORBAX GF-250</i> .....	130
<i>ZORBAX GF-450</i> .....	130

<i>ZORBAX ODS</i> .....	127
<i>ZORBAX ODS Classic</i> .....	127
<i>ZORBAX Phenyl</i> .....	
<i>ZORBAX Rapid Resolution Eclipse XDB-C8</i> .....	48
<i>ZORBAX RRHD</i> .....	
<i>ZORBAX RRHD SB-C18</i> .....	105
<i>ZORBAX RRHT</i> .....	67
<i>ZORBAX Rx-C18</i> .....	127
<i>ZORBAX Rx-C8</i> .....	128
<i>ZORBAX SB-C18</i> .....	45, 46, 127
<i>ZORBAX SB-C3</i> .....	131
<i>ZORBAX SB-C8</i> .....	55, 128
<i>ZORBAX SB-Phenyl</i> .....	53, 128
<i>ZORBAX SIL</i> .....	127
<i>ZORBAX StableBond</i> .....	76
<i>ZORBAX TMS</i> .....	129
<i>Ultron ES-OVM</i> .....	131
columns, silica	
<i>IonSpher C</i> .....	131
<i>Polaris C18-A</i> .....	127
<i>Polaris C18-Ether</i> .....	127
<i>Polaris C8-A</i> .....	128
<i>Polaris C8-Ether</i> .....	128
<i>Polaris Si-A</i> .....	127
<i>Poroshell 120</i> .....	30, 31, 40, 66, 77, 84-88, 110
<i>Poroshell 120 EC-C18</i> .....	127
<i>Poroshell 120 EC-C8</i> .....	128
<i>Poroshell 120 SB-C18</i> .....	128
<i>Poroshell 300</i> .....	31
<i>Pursuit C18</i> .....	127
<i>Pursuit C8</i> .....	128
<i>Pursuit Diphenyl</i> .....	128
<i>Pursuit PFP</i> .....	130
<i>Pursuit XRs C18</i> .....	127
<i>Pursuit XRs C8</i> .....	128
<i>Pursuit XRs Diphenyl</i> .....	128
<i>Pursuit XRs Si</i> .....	127
<i>ZORBAX 300SB-C3</i> .....	75
<i>ZORBAX 300SB-C18</i> .....	66, 127
<i>ZORBAX Bonus-RP</i> .....	
<i>ZORBAX C8</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse Extend-C18</i> .....	
<i>ZORBAX Eclipse Plus</i> .....	76, 85-86

ZORBAX Eclipse Plus C18 .....	76, 86, 104, 110, 127	HPLC Cartridge .....	36
ZORBAX Eclipse Plus C8 .....	128	frits	
ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl .....	128	Poroshell 120 .....	30
ZORBAX Eclipse XDB .....	92	lam	
ZORBAX Eclipse XDB-C8 .....	128	ps	183
ZORBAX Eclipse XDB-C18 .....	92, 127	LC instruments	
ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl		1100 LC .....	93
ZORBAX Extend-C18 .....	77, 86, 122, 127	1200 RRLC .....	50, 114
ZORBAX GF-250 .....	130	1200SL .....	52
ZORBAX GF-450 .....	130	1260 Infinity LC .....	188
ZORBAX ODS .....	127	1290 Infinity LC .....	106, 114
ZORBAX ODS Classic .....	127	1290 Infinity II LC .....	13
ZORBAX Rapid Resolution Eclipse XDB-C8 .....	48	LC/MS	
ZORBAX RRHT .....	67	Agilent Solvent Saver .....	31
ZORBAX RRHD SB-C18 .....	105	PLRP-S .....	33, 37, 67, 129
ZORBAX Rx-C18 .....	127	ZORBAX Eclipse XDB-C18 .....	92, 127
ZORBAX Rx-C8 .....	128	ZORBAX Rapid Resolution HT Cartridge Columns	
ZORBAX SB-C18 .....	45, 46, 127	ZORBAX Rx-SIL 9 .....	2, 127
ZORBAX SB-C3 .....	131	phases, amino	
ZORBAX SB-C8 .....	55, 128	Polaris Amide-C18 .....	131
ZORBAX SB-Phenyl .....	53, 128	Polaris NH2 .....	128
ZORBAX SIL .....	127	ZORBAX NH2 .....	128
ZORBAX StableBond .....	76	phases, C3	
ZORBAX TMS .....	129	ZORBAX 300SB-C3 .....	75
Ultron ES-DVM .....	131	ZORBAX SB-C3 .....	131
columns, size exclusion		phases, C8	
Bio SEC-3 .....	130	Polaris C8-A .....	128
Bio SEC-5 .....	130	Polaris C8-Ether .....	128
PL aquagel-OH .....	130	Poroshell 120 EC-C8 .....	128
PLgel .....	129	Pursuit C8 .....	128
PLgel MIXED-D .....	96	Pursuit XRs C8 .....	128
ProSEC .....	130	ZORBAX C8 .....	128
detectors		ZORBAX Eclipse Plus C8 .....	128
1290 Infinity II diode array .....	25	ZORBAX Eclipse XDB-C8 .....	128
6000 series LC/MS .....	99	ZORBAX Rapid Resolution Eclipse XDB-C8 .....	48
guards		ZORBAX Rx-C8 .....	128
ZORBAX Guard Cartridge .....	36	ZORBAX SB-C8 .....	128
ZOBAX Semi-Preparative Guard		phases, C18	
filters		Polaris Amide-C18 .....	131
1200 RRLC .....	114		
1260 Infinity LC .....	188		
1290 Infinity LC .....	114		

<i>Polaris C18-A</i> .....	127
<i>Polaris C18-Ether</i> .....	127
<i>Poroshell 120 EC-C18</i> .....	127
<i>Poroshell 120 SB-C18</i> .....	127
<i>Pursuit C18</i> .....	127
<i>Pursuit XRs C18</i> .....	127
<i>SepTech ST150 C18</i> .....	127
<i>SepTech ST60 C18</i> .....	127
<i>ZORBAX 300SB-C18</i> .....	127
<i>ZORBAX Eclipse Extend-C18</i>	
<i>ZORBAX Eclipse Plus C18</i> .....	76, 86, 104, 110, 127
<i>ZORBAX Eclipse XDB-C18</i> .....	92, 127
<i>ZORBAX Extend-C18</i> .....	77, 86, 122, 127
<i>ZORBAX RRHD SB-C18</i> .....	105
<i>ZORBAX Rx-C18</i> .....	127
<i>ZORBAX SB-C18</i> .....	46, 127
phases, CN	
<i>ZORBAX CN</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse XDB-CN</i> .....	128
<i>ZORBAX SB-CN</i> .....	128
phases, phenyl	
<i>Pursuit Diphenyl</i> .....	128
<i>Pursuit PFP</i> .....	130
<i>Pursuit XRs Diphenyl</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl</i> .....	128
<i>ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl</i>	
<i>ZORBAX Phenyl</i>	
<i>ZORBAX SB-Phenyl</i> .....	53, 128
UHPLC	
<i>Poroshell 120</i> .....	30, 31
<i>ZORBAX RRHD</i> .....	30
<i>ZORBAX RRHT</i> .....	30

## 製品と詳細情報

この後のページでは、主要製品とその部品番号を掲載しています。

# Agilent LC カラム

Poroshell 120 カラムを使用すると、HPLC/UHPLC 機器よりも効率と分析スピードが上がります。詳細については、30 ~ 32 ページを参照してください。

Poroshell 120 - 粒子サイズ 2.7 µm						
	サイズ (mm)	Eclipse Plus EC-C18 (USP L1)	Eclipse Plus EC-C8 (USP L7)	Eclipse Plus EC-CN	StableBond SB-C18 (USP L1)	StableBond SB-C8 (USP L7)
アナリティカル	4.6 x 150	693975-902	693975-906	693975-905	683975-902	683975-906
アナリティカル	4.6 x 100	695975-902	695975-906	695975-905	685975-902	685975-906
アナリティカル	4.6 x 75	697975-902	697975-906		687975-902	
アナリティカル	4.6 x 50	699975-902	699975-906	699975-905	689975-902	689975-906
アナリティカル	4.6 x 30	691975-902	691975-906		681975-902	
ソルベントセーバ	3.0 x 150	693975-302	693975-306	693975-305	683975-302	683975-306
ソルベントセーバ	3.0 x 100	695975-302	695975-306	695975-305	685975-302	685975-306
ソルベントセーバ	3.0 x 75	697975-302	697975-306		687975-302	
ソルベントセーバ	3.0 x 50	699975-302	699975-306	699975-305	689975-302	689975-306
ソルベントセーバ	3.0 x 30	691975-302	691975-306		681975-302	
ナローポア	2.1 x 150	693775-902	693775-906	693775-905	683775-902	683775-906
ナローポア	2.1 x 100	695775-902	695775-906	695775-905	685775-902	685775-906
ナローポア	2.1 x 75	697775-902	697775-906		687775-902	
ナローポア	2.1 x 50	699775-902	699775-906	699775-905	689775-902	689775-906
ナローポア	2.1 x 30	691775-902	691775-906		681775-902	
Fast Guard	4.6 x 5	820750-911			820750-912	
Fast Guard	3.0 x 5	823750-911			823750-912	
Fast Guard	2.1 x 5	821725-911			821725-912	

次のページに続く

Poroshell 120 - 粒子サイズ 2.7 $\mu\text{m}$					
	サイズ (mm)	StableBond SB-Aq	Phenyl-Hexyl (USP L11)	Bonus-RP (USP L60)	HILIC
アナリティカル	4.6 x 150	683975-914	693975-912	693968-901	693975-901
アナリティカル	4.6 x 100	685975-914	695975-912	695968-901	695975-901
アナリティカル	4.6 x 50	689975-914	699975-912	699968-901	699975-901
ソルベントセーバ	3.0 x 150	683975-314	693975-312	693968-301	693975-301
ソルベントセーバ	3.0 x 100	685975-314	695975-312	695968-301	695975-301
ソルベントセーバ	3.0 x 50	689975-314	699975-312	699968-301	699975-301
ナローボア	2.1 x 150	683775-914	693775-912	693768-901	693775-901
ナローボア	2.1 x 100	685775-914	695775-912	695768-901	695775-901
ナローボア	2.1 x 50	689775-914	699775-912	699768-901	699775-901

Poroshell 120 - 粒子サイズ 2.7 $\mu\text{m}$				
	サイズ (mm)	HPH-C18	HPH-C8	PFP
アナリティカル	4.6 x 150	683975-702	693975-706	693975-408
アナリティカル	4.6 x 100	685975-702	695975-706	695975-408
アナリティカル	4.6 x 50	689975-702	699975-706	699975-408
ソルベントセーバ	3.0 x 150	683975-702	693975-706	693975-408
ソルベントセーバ	3.0 x 100	685975-702	695975-706	695975-408
ソルベントセーバ	3.0 x 50	689975-702	699975-706	699975-408
ナローボア	2.1 x 150	683775-702	693775-706	693775-408
ナローボア	2.1 x 100	685775-702	695775-706	695775-408
ナローボア	2.1 x 50	689775-702	699775-706	699775-408

Poroshell 120 - 粒子サイズ 4 $\mu\text{m}$						
	サイズ (mm)	EC-C18	EC-C8	PFP	Phenyl-Hexyl	HILIC
アナリティカル	4.6 x 250	690970-902	690970-906	690970-408	690970-912	690970-901
アナリティカル	4.6 x 150	693970-902	693970-906	693970-408	693970-912	693970-901
アナリティカル	4.6 x 100	695970-902	695970-906	695970-408	695970-912	695970-901
アナリティカル	4.6 x 50	699970-902	699970-906	699970-408	699970-912	699970-901
ソルベントセーバ	3.0 x 250	690970-302	690970-306	690970-308	690970-312	690970-301
ソルベントセーバ	3.0 x 150	693970-302	693970-306	693970-308	693970-312	693970-301
ソルベントセーバ	3.0 x 100	695970-302	695970-306	695970-308	695970-312	695970-301
ソルベントセーバ	3.0 x 50	699970-302	699970-306	699970-308	699970-312	699970-301

次のページに続く

Poroshell 120 - 粒子サイズ 4 µm						
	サイズ (mm)	EC-C18	EC-C8	PPF	Phenyl-Hexyl	HILIC
ナローボア	2.1 x 250	650750-902	650750-906	650750-408	650750-912	650750-901
ナローボア	2.1 x 150	693770-902	693770-906	693770-408	693770-912	693770-901
ナローボア	2.1 x 100	695770-902	695770-906	695770-408	695770-912	695770-901
ナローボア	2.1 x 50	699770-902	699770-906	699770-408	699770-912	699770-901

### Poroshell 120 ガードカラム - 粒子サイズ 4 µm

品名	サイズ (mm)	部品番号
Poroshell 120 UHPLC ガード, EC-C18	4.6	820750-916
Poroshell 120 UHPLC ガード, EC-C18	3	823750-916
Poroshell 120 UHPLC ガード, EC-C18	2.1	821725-916

Poroshell 120 のより多くの相が開発される予定です。詳細については、[www.agilent.com/chem/poroshell120](http://www.agilent.com/chem/poroshell120) を参照してください。

アジレントのすべてのカラムについては、[www.agilent.com/chem/getguides](http://www.agilent.com/chem/getguides) でアジレントの最新の「カラム分析器部品カタログ」を請求してください。

### AdvanceBio Glycan マッピング、粒子サイズ 2.7 µm - 表面多孔質、耐圧 60 MPa

	サイズ (mm)	AdvanceBio カラム
アナリティカル	4.6 x 250	680975-913
アナリティカル	4.6 x 150	683975-913
アナリティカル	4.6 x 100	685975-913
ナローボア	2.1 x 250	651750-913
ナローボア	2.1 x 150	683775-913
ナローボア	2.1 x 100	685775-913
Fast Guard	2.7, 2.1	821725-906

### AdvanceBio ペプチドマッピング - 粒子サイズ 2.7 µm

	サイズ (mm)	AdvanceBio カラム
アナリティカル	4.6 x 150	653950-902
ソルベントセーバ	3.0 x 150	653950-302
ナローボア	2.1 x 250	651750-902
ナローボア	2.1 x 150	653750-902
ナローボア	2.1 x 100	655750-902
Fast Guard*	4.6	850750-911
Fast Guard*	3.0	853750-911
Fast Guard*	2.1	851725-911

### AdvanceBio Glycan マッピング、粒子サイズ 1.8 µm、耐圧 120 MPa

	サイズ (mm)	AdvanceBio カラム
ナローボア	2.1 x 150	859700-913
ナローボア	2.1 x 100	858700-913
Fast Guard	2.1, 1.8	821725-905

Agilent Advanced Bio の詳細については、[www.agilent.com/chem/AdvanceBio](http://www.agilent.com/chem/AdvanceBio) を参照してください。

## Agilent LC カラム

### ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) カラム、耐圧 120 MPa

	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse XDB-C18 (USP L1)	Extend-C18 (USP L1)
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 μm	959759-902	959759-906	981759-902	759700-902
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 μm	959758-902	959758-906	981758-902	758700-902
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 μm	959757-902	959757-906	981757-902	757700-902
RRHD, 3.0 x 150 mm, 1.8 μm	959759-302	959759-306	981759-302	
RRHD 3.0 x 100 mm, 1.8 μm	959758-302	959758-306	981758-302	758700-302
RRHD 3.0 x 50 mm, 1.8 μm	959757-302	959757-306	981757-302	757700-302
	StableBond SB-C18 (USP L1)	StableBond SB-C8 (USP L7)	StableBond SB-Phenyl (USP L11)	StableBond SB-CN (USP L10)
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 μm	859700-902	859700-906	859700-912	859700-905
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 μm	858700-902	858700-906	858700-912	858700-905
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 μm	857700-902	857700-906	857700-912	857700-905
RRHD 3.0 x 150 mm, 1.8 μm	859700-302	859700-306		
RRHD 3.0 x 100 mm, 1.8 μm	858700-302	858700-306	858700-312	858700-305
RRHD 3.0 x 50 mm, 1.8 μm	857700-302	857700-306	857700-312	857700-305
	Eclipse PAH (USP L1)	StableBond SB-Aq	HILIC Plus	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 μm	959759-918	859700-914	959759-901	959759-912
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 μm	959758-918	858700-914	959758-901	959758-912
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 μm	959757-918	857700-914	959757-901	959757-912
RRHD 3.0 x 100 mm, 1.8 μm	959758-318	858700-314	959758-301	959758-312
RRHD 3.0 x 50 mm, 1.8 μm	959757-318	857700-314	959757-301	959757-312
	Bonus-RP			
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 μm	857768-901			
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 μm	858768-901			
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 μm	859768-901			

その他の RRHD 相も開発中です。  
入手可能なすべての部品番号については、  
[www.agilent.com/chem/rrhd](http://www.agilent.com/chem/rrhd) を参照してください。

### 300Å (タンパク質およびペプチド分析用)

	StableBond 300SB-C18	StableBond 300SB-C8	StableBond 300SB-C3 (USP L56)	300- Diphenyl (USP L11)	300-HILIC
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 μm			857750-909	857750-944	857750-901
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 μm	858750-902	858750-906	858750-909	858750-944	858750-901
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 μm	857750-902	857750-906			

## Agilent LC カラム

ZORBAX Eclipse Plus						
	サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (USP L11)	Eclipse Plus PAH (USP L1)
アナリティカル	4.6 x 250	5	959990-902	959990-906	959990-912	959990-918
アナリティカル	4.6 x 150	5	959993-902	959993-906	959993-912	959993-918
アナリティカル	4.6 x 100	5	959996-902	959996-906	959996-912	959996-918
アナリティカル	4.6 x 50	5	959946-902	959946-906		
ラピッドレゾリューション	4.6 x 150	3.5	959963-902	959963-906	959963-912	959963-918
ラピッドレゾリューション	4.6 x 100	3.5	959961-902	959961-906	959961-912	959961-918
ラピッドレゾリューション	4.6 x 75	3.5	959933-902	959933-906	959933-902	
ラピッドレゾリューション	4.6 x 50	3.5	959943-902	959943-906	959943-912	959943-918
ラピッドレゾリューション	4.6 x 30	3.5	959936-902	959936-906	959936-912	
ラピッドレゾリューション ハイスループット、60 MPa	4.6 x 100	1.8	959964-902	959964-906	959964-912	959964-918
ラピッドレゾリューション ハイスループット、60 MPa	4.6 x 75	1.8	959951-902			
ラピッドレゾリューション ハイスループット、60 MPa	4.6 x 50	1.8	959941-902	959941-906	959941-912	959941-918
ラピッドレゾリューション ハイスループット、60 MPa	4.6 x 30	1.8	959931-902	959931-906	959931-912	959931-918
ソルベントセーバ	3.0 x 250	5				959990-318
ソルベントセーバ	3.0 x 150	5	959993-302	959993-306		
ソルベントセーバプラス	3.0 x 150	3.5	959963-302	959963-306	959963-312	
ソルベントセーバプラス	3.0 x 100	3.5	959961-302	959961-306	959961-312	
ソルベントセーバ RRHD、 120 MPa	3.0 x 150	1.8	959759-302	959759-306		
ソルベントセーバ RRHD、 120 MPa	3.0 x 100	1.8	959758-302	959758-306		
ソルベントセーバ RRHD、 120 MPa	3.0 x 50	1.8	959757-302	959757-306		
ソルベントセーバ HT、60 MPa	3.0 x 100	1.8	959964-302	959964-306	959964-312	
ソルベントセーバ HT、60 MPa	3.0 x 50	1.8	959941-302	959941-306	959941-312	
ナローポア	2.1 x 250	5				959790-918
ナローポア	2.1 x 150	5	959701-902	959701-906	959701-912	959701-918
ナローポア	2.1 x 50	5	959746-902	959746-906		

次のページに続く

## Agilent LC カラム

ZORBAX Eclipse Plus						
	サイズ (mm)	粒子サイズ (µm)	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (USP L11)	Eclipse Plus PAH (USP L1)
ナローボア RR	2.1 x 150	3.5	959763-902	959763-906	959763-912	
ナローボア RR	2.1 x 100	3.5	959793-902	959793-906	959793-912	959793-918
ナローボア RR	2.1 x 50	3.5	959743-902	959743-906	959743-912	
ナローボア RR	2.1 x 30	3.5	959733-902	959733-906	959733-912	
ナローボア RRHD、120 MPa	2.1 x 150	1.8	959759-902	959759-906		
ナローボア RRHD、120 MPa	2.1 x 100	1.8	959758-902	959758-906		
ナローボア RRHD、120 MPa	2.1 x 50	1.8	959757-902	959757-906		
ナローボア RRHT、60 MPa	2.1 x 100	1.8	959764-902	959764-906	959764-912	959764-918
ナローボア RRHT、60 MPa	2.1 x 50	1.8	959741-902	959741-906	959741-912	959741-918
ナローボア RRHT、60 MPa	2.1 x 30	1.8	959731-902	959731-906	959731-912	

ZORBAX Eclipse Plus: ガードカートリッジ						
	サイズ (mm)	粒子サイズ (µm)	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (USP L11)	Eclipse Plus PAH (USP L1)
ガードカートリッジ 4 個	4.6 x 12.5	5	820950-936	820950-937	820950-938	820950-939
ガードカートリッジ 4 個	2.1 x 12.5	5	821125-936	821125-937	821125-938	821125-939
ガードハードウェア キット			820999-901	820999-901	820999-901	820999-901

これは、使用可能な相とカラムのほんの一例です。アジレントはさらに、タンパク質とペプチドを高速かつ正確に分離するためのさまざまな BioHPLC カラムを用意しています。

入手可能なすべての部品番号については、アジレントの Web サイトを参照するか、[www.agilent.com/chem/getguides](http://www.agilent.com/chem/getguides) でアジレントの『カラム分析器部品カタログ』または『バイオ HPLC カラムセレクションガイド』を請求してください。

# アジレントのキャピラリーと フィッティング

アプリケーションに適したカラムをお選びください。

最適な分析性能を実現するには、適切なキャピラリーを使用することが重要です。従来の HPLC および UHPLC システム用の推奨フィッティングは次のとおりです。

標準システムキャピラリー : 1290 シリーズ - 120 MPa								
接続元 (A)	接続元 (B)	材質	内径 (mm)	長さ (mm)	フィッティングの種類 接続元	フィッティングの種類 接続先	特徴	
ポンプ	オートサンプラ	SS	0.17	300	S	S	A および B に 固定済み	5067-4657
ポンプ	冷却 オートサンプラ	SS	0.17	450	S	S	A および B に 固定済み	5067-4658
オートサンプラ	TCC	SS	0.12	340	S	S	A に固定済み	5067-4659
カラム	DAD	SS	0.12	220	S	S	A に固定済み	5067-4660
1290 システム	CTC オートサンプラ	SS	0.17	600	S	SH	A に固定済み	5067-4670
CTC オートサンプラ	カラム	SS	0.12	600	S	S		5067-4669
検出器	廃液	PTFE	0.8	5000*			フィンガータイト フィッティング (0100-1516、2 個) なし	5067-2462

## 材質

凡例	説明
SS	ステンレス
S	Swagelok 1.6 mm ポート (内径)
SH	Swagelok 1.6 mm ポート (内径)、ロングヘッド
SL	Swagelok 1.6 mm ポート (内径)、ロング
SLV	Swagelok 1.6 mm ポート (内径)、ロング、120 MPa
SX	Swagelok 1.6 mm ポート (内径)、エキストラロング
M	Metric M4 0.8 mm ポート (内径)

## 1290 バルブヘッドの接続: 60~120 MPa

接続元 (A)	接続元 (B)	材質	内径 (mm)	長さ (mm)	フィット テイング の種類 接続元	フィット テイング の種類 接続先	特徴	バルブ 情報	部品 番号
オートサンブラ	バルブ、 Swagelok ポート付き	SS	0.12	340	S	SX	Aに固定済み		5067-4684
オートサンブラ	バルブ、 Swagelok ポート付き	SS	0.12	340	S	SX	Bに固定済み	G4231A/B 2 ポジション/6 ポートバルブヘッド、60/120 MPa	5067-4647
オートサンブラ	バルブ、 M4 ポート 付き	SS	0.12	340	SLV	M		G4232A 2 ポジション /10 ポートマイクロバルブヘッド、60 MPa	5067-4744
オートサンブラ	バルブ、 M4 ポート 付き	SS	0.12	500	SLV	M		G4234A/B 6 カラムセクタバルブ、60/120 MPa	5067-4745
バルブ、10/32 Swagelok ポート付き	熱交換器	SS	0.12	90	SX	S	AおよびBに固定済み	G4231A/B 2 ポジション/6 ポートバルブヘッド、60/120 MPa	5067-4649
バルブ、M4 ポート付き	熱交換器	SS	0.12	90	M	SL	Bに固定済み	G4232A 2 ポジション /10 ポートマイクロバルブヘッド、60 MPa	5067-5106
ショートカラム	バルブ、 M4 ポート 付き	SS	0.12	130	SV	M		G4234A/B 6 カラムセクタバルブ、60/120 MPa	5067-4735
ショートカラム	バルブ、 M4 ポート 付き	SS	0.12	150	SV	M		G4232A 2 ポジション /10 ポートマイクロバルブヘッド、60 MPa	5067-5104
ロング カラム	バルブ、 M4 ポート 付き	SS	0.12	280	SV	M		G4232A 2 ポジション /10 ポートマイクロバルブヘッド、60 MPa	5067-5107
ショートカラム	バルブ、 Swagelok ポート付き	SS	0.12	150	SL	SX	Bに固定済み	G4231A/B 2 ポジション/6 ポートバルブヘッド、60/120 MPa	5067-4650
ショートカラム	バルブ、 10/32 Swagelok ポート付き	SS	0.12	150	SL	SX		G4232B 2 ポジション /10 ポートバルブヘッド、120 MPa	5067-4686
ロング カラム	バルブ、 Swagelok ポート付き	SS	0.12	280	SL	SX	Bに固定済み	G4231A/B 2 ポジション/6 ポートバルブヘッド、60/120 MPa	5067-4651

次のページに続く

## 1290 バルブヘッドの接続: 60 ~ 120 MPa

接続元 (A)	接続元 (B)	材質	内径 (mm)	長さ (mm)	フィッ ティング の種類 接続元	フィッ ティング の種類 接続先	特徴	バルブ 情報	部品 番号
バルブ、 Swagelok ポー ト付き	検出器	SS	0.12	200	SX	S	A および B に 固定済み	G4231A/B 2 ポジショ ン/6 ポートバルブヘッ ド、60/120 MPa	5067-4653
ロングカラム	バルブ、 Swagelok ポート 付き	SS	0.12	280	SL	SX		G4232B 2 ポジション /10 ポートバルブ ヘッド、120 MPa	5067-4687
バルブ、 Swagelok ポー ト付き	検出器	SS	0.12	200	SX	S	A に固定済み	G4232B 2 ポジション /10 ポートバルブ ヘッド、120 MPa	5067-4689
バルブ、M4 ポート付き	検出器	SS	0.12	250	M	SLV		G4232A 2 ポジション /10 ポートマイクロバ ルブヘッド、60 MPa	5067-4746
熱交換器	バルブ、 M4 ポー ト 付き	SS	0.17	90	SL	M	A に固定済み	G4232A 2 ポジション /10 ポートバルブ ヘッド、120 MPa	5067-5109
カラム	バルブ、 M4 ポー ト 付き	SS	0.17	90	SV	M		G4232A 2 ポジション /10 ポートバルブ ヘッド、120 MPa	5067-5110
カラム	バルブ、 M4 ポー ト 付き	SS	0.17	150	SV	M		G4232A 2 ポジション /10 ポートバルブ ヘッド、120 MPa	5067-5111
カラム	バルブ、 M4 ポー ト 付き	SS	0.17	280	SV	M		G4232A 2 ポジション /10 ポートバルブ ヘッド、120 MPa	5067-5112
G4232A 2 ポジ ション/10 ポー トバルブヘッ ド、120 MPa		SS	0.17	250	SL	M	A に固定済み	G4232A 2 ポジション /10 ポートバルブ ヘッド、120 MPa	5067-5113

## フィッティング

品名	凡例	単位	部品番号
Swagelok 1.6 mm ステンレスフィッティング	S	10 個	5062-2418
Swagelok 1.6 mm ステンレスフィッティング、ロングスクリュー	SL	10 個	5065-4454
Swagelok 1.6 mm ステンレスフィッティング、エキストラロングスクリュー	SX	10 個	5062-9967
Swagelok 1.6 mm 120 MPa、フィッティング交換型	SV	各 1 個	5067-4733
Swagelok 1.6 mm 120 MPa、フィッティング交換型、ロングスクリュー	SLV	各 1 個	5067-4738
Swagelok 1.6 mm 120 MPa、フィッティング交換型、エキストラロングスクリュー	SXV	各 1 個	5067-4739

### A-Line クイックコネクTFitting - アセンブリ\*

推奨使用箇所	キャピラリー接続の長さ (mm)	部品番号
カラムと検出器間	0.12 x 280	5067-5960
カラムと検出器間	0.12 x 220	5067-5959
プレヒーターとカラム間	0.12 x 150	5067-5958
プレヒーターとカラム間	0.12 x 105	5067-5957
プレヒーターとカラム間	0.075 x 105	5067-5961



\* すべてのアセンブリには、一方の端部にクイックコネクTFitting、もう一方の端部に未固定 Swagelok Fittingを取り付けたキャピラリーが付属しています。クイックコネクTFittingは、上の表に記載の専用キャピラリーのみ使用できます。

### A-Line クイックコネクTFitting - 単体部品

品名	部品番号
ステンレスキャピラリー 0.12 x 280 mm、未固定 Swagelok Fitting x 1	5500-1170
ステンレスキャピラリー 0.12 x 220 mm、未固定 Swagelok Fitting x 1	5500-1171
ステンレスキャピラリー 0.12 x 150 mm、未固定 Swagelok Fitting x 1	5500-1172
ステンレスキャピラリー 0.12 x 105 mm、未固定 Swagelok Fitting x 1	5500-1173
ステンレスキャピラリー 0.075 x 105 mm、未固定 Swagelok Fitting x 1	5500-1174
フロントフェラル	5043-0924
単体のクイックコネクTFitting (別途キャピラリーとフェラルが必要)	5067-5965

Agilent A-Line クイックコネクTFittingの詳細については、[www.agilent.com/chem/A-Line](http://www.agilent.com/chem/A-Line) を参照してください。

## A-Line クイックターン - フィッティングとフェラル

品名	部品番号
クイックターン UHPLC フィッティング	5067-5966
フロントフェラル	5043-0924

## A-Line クイックターン - キャピラリー

品名	部品番号
ステンレス、0.17 x 500 mm ロングソケット	5500-1197
ステンレス、0.17 x 280 mm ロングソケット	5500-1196
ステンレス、0.17 x 200 mm ロングソケット	5500-1195
ステンレス、0.17 x 150 mm ロングソケット	5500-1194
ステンレス、0.17 x 105 mm ロングソケット	5500-1193
ステンレス、0.12 x 500 mm ロングソケット	5500-1192
ステンレス、0.12 x 280 mm ロングソケット	5500-1191
ステンレス、0.12 x 200 mm ロングソケット	5500-1190
ステンレス、0.12 x 150 mm ロングソケット	5500-1189
ステンレス、0.12 x 105 mm ロングソケット	5500-1188
ステンレス、0.075 x 105 mm ロングソケット	5500-1198

クイックターンフィッティングには、上の表に記載の専用キャピラリーのみ使用できます。

Agilent A-Line クイックターンフィッティングの詳細については、[www.agilent.com/chem/A-Line](http://www.agilent.com/chem/A-Line) を参照してください。



# アジレントのランプ (LC 機器用)

## 長寿命の性能の実現

標準品以外の LC ランプを使用すると、不安定な光の強度、ベースラインのノイズ、システムのダウンタイム、コスト上昇の原因となる場合があります。LC システムの真度、再現性、信頼性を確保するには、アジレント認定の重水素ランプに替えてください。このランプは ISO 9001 規格に準拠して作られています。アジレントのランプの性能は、次のような点で優れています。

- 最適な性能: 正しい動作電圧、一貫した光の強度、適切なアラインメント
- 50 % の長寿命化: 2,000 時間超使用可能
- S/N 比の向上: 開口部が大幅に狭くなったため、光の強度が上がりノイズが減少
- 感度の向上: Agilent 1200 Infinity シリーズおよび 6100 シリーズの四重極 MS の検知機能が向上し、既存の HPLC メソッドまたは RRLC メソッドを実行可能

### ダイオードアレイ検出器/多波長検出器

検出器	ランプの種類	部品番号
G1315A/B G1365A/B	長寿命重水素ランプ	5182-1530
G4212A/B	長寿命 HiS 重水素ランプ (8-ピン)、RFID タグ付き	5190-0917
G1315C/D G1365C/D	長寿命重水素ランプ、RFID タグ付き	2140-0820
G1315A/B/C/D G1365A/B/C/D	タングステンランプ	G1103-60001

### 可変波長検出器

検出器	ランプの種類	部品番号
G1314D/E/F	長寿命重水素ランプ、RFID タグ付き	G1314-60101
G1314A/B/C 1120 Infinity LC 1220 Infinity LC	長寿命重水素ランプ	G1314-60100

## Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタによる真度の向上

HPLC、UHPLC、GC/MS、LC/MS 分析前のサンプルのろ過は、最適なシステム性能を得るために非常に重要です。Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタは、業界最高速の流量とロード容量により、これまでにならぬ高速のプロセスを実現します。幅広いメンブレンタイプとポアサイズから、お客様のニーズに適したものをとお選びください。

**その他の製品と Captiva フィルタ製品の詳細については、[www.agilent.com/chem/filtration](http://www.agilent.com/chem/filtration) を参照してください。**

### プレミアムシリンジフィルタ (100 個)

メンブレン	直径/ポアサイズ					
	4 mm		15 mm		25 mm	
	0.2 µm	0.45 µm	0.2 µm	0.45 µm	0.2 µm	0.45 µm
PTFE	5190-5082	5190-5083	5190-5084	5190-5085	5190-5086	5190-5087
ナイロン			5190-5090	5190-5091	5190-5092	5190-5093
PES	<a href="#">5190-5094</a>	5190-5095	<a href="#">5190-5096</a>	5190-5097	<a href="#">5190-5098</a>	5190-5099
再生セルロース	5190-5106	5190-5107	5190-5108	5190-5109	5190-5110	5190-5111
酢酸セルロース					5190-5116*	5190-5117*
ガラスマイクロファイバ			<a href="#">5190-5120</a>		5190-5122*	
多層フィルタ: ガラス/PTFE			5190-5126	5190-5127	5190-5128	5190-5129
多層フィルタ: ガラス/ナイロン			5190-5132	5190-5133	5190-5134	5190-5135

注記: \*大きい方の直径は (25 mm ではなく) 28 mm です。青文字の PN は LC/MS で認定されています。その他のすべての PN は LC/UV で認定されています

# アジレントの溶媒のセーフティキャップ

## ラボの安全性の向上

Agilent A-Line セーフティキャップを使用すれば、溶媒が空気中へ放出されるのを 99.9 % 防ぐことができるため、ラボで働く分析者の健康を守ることができます。時間の経過とともに溶媒濃度が変化し、クロマトグラフィーの結果に影響を及ぼす場合があります。機密性の高い A-Line セーフティキャップを使用して溶媒を保存し、濃度の変化を防ぐことで、移動相とクロマトグラフィーの結果の一貫性を長期的に維持できます。A-Line セーフティキャップには、ベントバルブの交換時期がわかるタイムストリップが付いています。

### A-Line セーフティキャップ GL45

品名	ポート	ベント	フィルタ	廃液
 1 ポート 1 ベントバルブ、 タイムストリップ付き (5043-1190)	1 x 3.2 mm	1		5043-1217
 2 ポート 1 ベントバルブ、 タイムストリップ付き (5043-1190)	2 x 3.2 mm	1		5043-1218
 3 ポート 1 ベントバルブ、 タイムストリップ付き (5043-1190)	3 x 3.2 mm	1		5043-1219
 4 ポート 1 リークホース	2 x 3.2 mm、 1 x 2.3 mm、 1 x 1.6 mm		1	1 5043-1220



Agilent A-Line セーフティキャップの詳細については、  
[www.agilent.com/chem/A-Line](http://www.agilent.com/chem/A-Line) を参照してください。

**NS29/32 グラウンドネックボトル用**

セーフティキャップ II、ポート x 2 - NS29/32	5043-0221
基本キャップ x 1、PP、青、NS29/32、PTFE コーン、2 ポート付き	付属
一体型フィッティング x 2、PFA、3.2 mm、(青 x 1、赤 x 1)	付属
1 µm のベントバルブ x 1、PTFE メンブレン	付属

**GL 45 スレッド溶媒ボトル用**

セーフティキャップ II、ポート x 2 - GL45	5043-0222
基本キャップ x 1、PP、青、GL45、PTFE コーン、2 ポート付き	付属
フィッティング x 2、3.2 mm の PFA、(青 x 1、赤 x 1)	付属
ベントバルブ x 1、1 µm、PTFE メンブレン	付属
セーフティキャップ I、ポート x 1 - GL45	5043-0223
基本キャップ x 1、PP、青、GL45、PTFE コーン、1 ポート付き	付属
一体型フィッティング x 1、PFA、3.2 mm、黒	付属
ベントバルブ x 1、1 µm、PTFE メンブレン	付属
セーフティキャップ II (2 個のストップコック付き) - GL45	5043-0224
基本キャップ x 1、PP、青、GL45、PTFE コーン、2 ポート、2 ストップコック付き	付属
フィッティング x 2、3.2 mm の PFA、(青 x 1、赤 x 1)	付属
フィッティング x 2、PTFE 3.2 mm、(白)	付属
1 µm のベントバルブ x 1、PTFE メンブレン	付属
セーフティキャップ I (1 個のストップコック付き) - GL45	5043-0225
基本キャップ x 1、PP、青、GL45、PTFE コーン、1 ポート、1 ストップコック付き	付属
一体型フィッティング x 1、PFA、3.2 mm、黒	付属
フィッティング x 1、PTFE 3.2 mm、(白)	付属
1 µm のベントバルブ x 1、PTFE メンブレン	付属

アジレントのセーフティキャップは自由に回転し、すべての溶媒ボトルおよび廃液容器の PTFE および PFA スクリューキャップは、ラボの HPLC システムで使用されます。これらのキャップによって、クロマトグラフィーの結果に影響する可能性がある溶媒放出を最大 70 % 削減し、リークと蒸発を防ぐことができます。また、自由回転キャップの設計により溶媒交換を最適化し、容器の交換中のチューブのねじれを防ぐことができます。

# アジレントのインラインフィルタ

## LCシステムの保護

カラムインレットフリットの汚染によって、カラムの背圧が上昇し、効率が下がる場合があります。マイクロポアカラムの詰まりは特に問題です。インレットフリットの直径が小さいためです。詰まりを防ぐには、必ず使用している LC システムに適したフィルタを使用してください。アジレントは、HPLC システム用の高圧インラインフィルタキットを数種類提供しています。

低分散インラインフィルタ: カラムのすぐ前に設置されており、サンプルと注入システムから粒子を除去します。たった 2.1 mm のフリット径とテーパードインサートによって、外部バンド拡散を最小限に抑えます。あらゆるマイクロポアカラム、高速カラム、または標準の分析カラムで使用できます。

汎用インラインフィルタ: LC ポンプとインジェクタの間に取り付けて、溶媒から粒子を除去します。高容量フィルタを使用します。このフリットはインサートのテーパードエッジ間に配置されており、フィルタリングフリット全体に溶媒を均等に分散できます。

HPLC インラインフィルタ					
品名	フリット多孔性 (μm)	フリットインレット内径 (mm)	備考	部品番号	交換フリット
RRLC インラインフィルタ、接続キャブラリ	0.2	4.6	最大 60 MPa	5067-1553	5067-1562、10 個
RRLC インラインフィルタ、接続キャブラリ	0.2	2.1	最大 60 MPa	5067-1551	5067-1555、10 個
低分散インラインフィルタ、2 個のフリット付き	2	2.1	1 mL/min 未満	01090-68702	280959-904、10 個 (2 μm)
	0.5				280959-907、10 個 (0.5 μm)
汎用インラインフィルタ、フリット x 2、インサート付き、130 x 0.25 mm の接続キャピラリー	2	4.8	1 ~ 5 mL/min	01090-69703	01090-27609、2 個
セミ分取フィルタ	0.5	12.7	1 ~ 5 mL/min	5064-8273	5022-2185
高圧セミ分取フィルタ	10	19	5 ~ 10 mL/min	5022-2165	5022-2166、10 個
分取フィルタ	10		10 ~ 100 mL/min	5065-4500	5065-9901、交換用ガラスカートリッジ
G1311A 用インラインフィルタ	高い塩濃度を使用する場合に推奨			G1311-60006	
Agilent 1290 Infinity インラインフィルタ (0.3 μm)	0.3	2.0	120 MPa	5067-4638	5023-0271、5 個

# Agilent 1200 Infinity シリーズ LC ポートフォリオ

100 万台以上のモジュールの販売実績を持つ Agilent 1200 Infinity シリーズは、アジレントの 40 年にわたる経験をもとに開発・製造された、最高の品質を備えた液体クロマトグラフィーです。アジレントは、現在の Agilent 1200 Infinity シリーズと従来の 1100 や 1200 シリーズとの間で、ほぼ完全なシステム/モジュール互換性を提供しています。このアジレントの特長により、現在、将来を問わず、あらゆるアジレント製 LC ではフレキシブルで段階的なアップグレードが可能になります。

## 最高のコストパフォーマンス

Agilent 1220 Infinity LC は、HPLC によるルーチン分析から高度な UHPLC 分析に対応する高品質な一体型システムで、最高のコストパフォーマンスを実現します。

- 最高 5 mL/min で 600 bar のパワーレンジ (圧力流量範囲)、80 Hz の検出器スピード、最先端の LC カラム技術の活用を可能にします。
- Agilent 1200 Infinity シリーズの他のすべてのアジレント検出器、および 6100 シリーズ四重極 MS との完全な互換性があります。
- 1260 Infinity および 1290 Infinity II LC システムと同じ技術と部品を使用しています。

## 限りなく高い信頼性

Agilent 1260 Infinity LC は性能の標準を引き上げ、信頼性の高い結果を提供します。UHPLC レベルの生産性、データ品質、および堅牢性を、すべて一般的な HPLC システムの価格範囲で実現します。

- 流量最大 10 mL/min の 600 bar の圧力範囲と 80 Hz の検出器速度および最大 10 倍の UV 検出感度 - 現在と将来の課題に対応します。
- あらゆる HPLC メソッドに 100 % 対応し、リスクを冒すことなく既存の機器と置き換えられます。
- 同じ予算でより多くの価値を提供 - 以前の 1200 シリーズ HPLC と同様の予算で UHPLC の機能を実現します。

## 非常に高い効率

新しい Agilent 1290 Infinity II LC は UHPLC の将来を具現化したもので、アジレントに期待される卓越した信頼性と堅牢性に加えて、きわめて優れたクロマトグラフィー性能と最大の効率化を提供します。

- 最大の分析効率化: 卓越した分離性能と検出性能で、最高品質の分析データを提供し、分析結果に対して究極の信頼性を実現します。
- 最大の機器効率化: 最高のサンプル数、最高速の注入サイクル、最高の操作性、あらゆるアプリケーションで最高のスループットを実現します。
- 最大のラボ効率化: 現在のラボ環境とシームレスに統合し、従来の装置からのスムーズなメソッド変換を行うことで、最高の生産性と最小のシステム維持費を実現する、無駄のないラボを構築します。

アジレントの機器の最新技術情報については、[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) を参照してください。

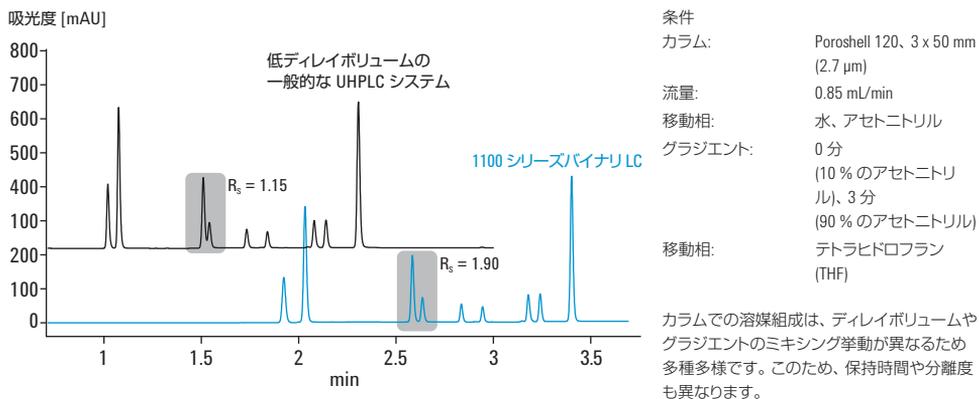
# Agilent 1290 Infinity II LC と ISET

## インテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) によって、異なる LC 機器間のメソッド変換の問題を解消

パワーレンジ、ディレイボリューム、ミキシング挙動、温度制御、エクストラカラムボリューム、検出器セル設計といった LC 機器間の設計の違いは、すべてシステム間のメソッド変換に影響を与えます。このため、同じ LC メソッドを異なる LC 機器で使用すると、保持時間やクロマトグラフィー分離度が異なる場合があります。

## ディレイボリュームとグラジエントミキシングの影響

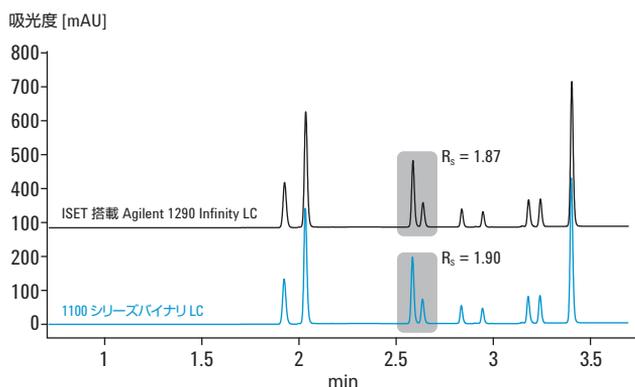
LC システムのディレイ (ドウェル) ボリュームは、グラジエントがカラムに達する速度を左右します。また、ミキシング挙動は、グラジエントプロファイルに影響を与えます。これらの要素 (ディレイ (ドウェル) ボリュームとミキシング挙動) は機器の設計によって決まります。またメソッド変換の結果、保持時間と分離度が変わります。



## 機器間のメソッド変換を可能にするソリューション:

### Agilent 1290 Infinity II LC と ISET

インテリジェントシステムエミュレーション技術により、マウスをクリックするだけで他の HPLC および UHPLC メソッドを実行でき、機器や元の分析メソッドをまったく変更することなく同じクロマトグラフィーの結果が得られるため、1290 Infinity II LC は真に汎用的な LC システムとなっています。



結果: 機器や元のメソッドを変更しなくても、保持時間と分離度は同じです。

## メソッド開発と QA/QC の生産性を高め、コストを削減

1290 Infinity II LC と ISET を使用すると、メソッド開発の生産性が向上します。UHPLC の持つ高い性能によりメソッド開発をスピードアップさせたあと、目的のシステムをエミュレートしてメソッドを微調整することができます。意図したとおりにメソッドを確実に実行することが可能です。元のメソッドを開発した LC システムをエミュレートするだけです。ISET で旧メソッドを実行すると同時に、1290 Infinity II LC の持つ UHPLC のスピード、分離度、感度を最大限に活用できます。ISET を使用すれば、古い既存の LC システムを維持しておく必要はありません。

この技術およびアジレント機器の最新技術情報については、

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) を参照してください。

ハト

ハト

ハト



Agilent CrossLab は、アジレント・テクノロジーの革新的なラボサービス、  
ラボ用ソフトウェア、消耗品の技術を結集し、重要かつ実行可能な  
見えない価値を目に見える成果へ導く、科学的かつ技術的なエキス  
パートで構成されたグローバルチームです。見えない価値を目に見える成果につなげ、複雑な  
ものをシンプルにし、最大限の経済的成果、運用上の成果、科学的成果へと導きます。

Agilent  
CrossLab

Agilent CrossLab は、包括的なソリューションと革新的な製品を独自に組み合わせ、短期的な成果  
のみならず、長期的な効果ももたらします。私たちはお客様とともに、世界中のあらゆるラボ、  
あらゆる場面で新たなチャンスを生み出しています。  
詳細については、[www.agilent.de/crosslab](http://www.agilent.de/crosslab) を参照してください。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることが  
あります。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる  
損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, February 1, 2016

5990-7595JAJP



Agilent Technologies