

LCカラムの基礎

— 分離・保持・選択性の考え方 —

アジレント・テクノロジー株式会社
カラム消耗品統括部門
アプリケーションエンジニア
澤田 有司



本日のお話

はじめに

クロマトグラフィー、HPLC、用語の説明

LCカラムの基礎

分離、保持、選択性の考え方

メソッド開発

トラブルシューティング

はじめに

クロマトグラフィー、HPLC、用語の説明



クロマトグラフィーとは？ HPLCとは？

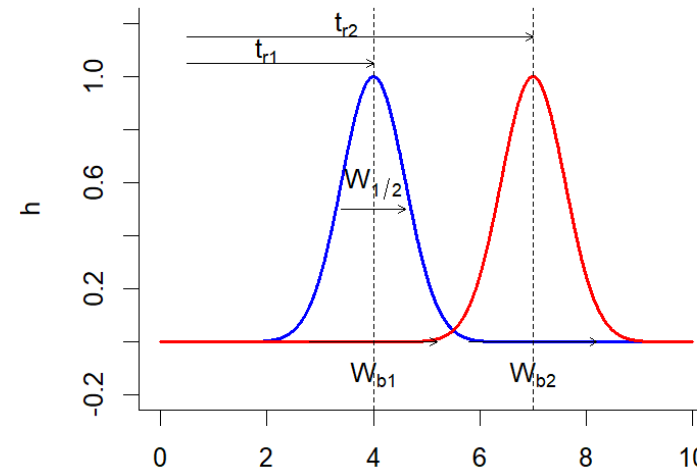
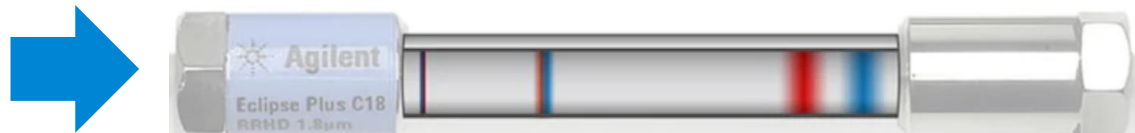
クロマトグラフィー

分離したい成分（分析種）を**分離**する手法

液体クロマトグラフィー（Liquid chromatography, LC）

ハイパフォーマンス液体クロマトグラフィー（HPLC）

分離性能を高めるために **高圧**で送液するLC



Agilent HPLC Infinity III シリーズポートフォリオ



1260 Infinity III VL LC
(耐圧 **400 bar/40 Mpa**)

水深4000mくらいの圧力！



1260 Infinity III LC
(耐圧 600 bar)



1260 Infinity III Prime LC
(耐圧 800 bar)



1290 Infinity III LC
(耐圧 **1300 bar/130 Mpa**)

[アジレントInfinityLab LC シリーズ HPLC & UHPLC 総合カタログ](#)

用語の整理

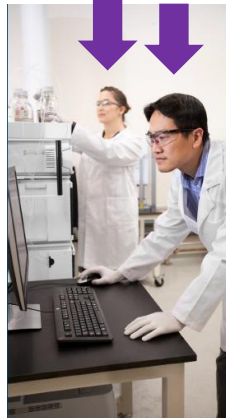
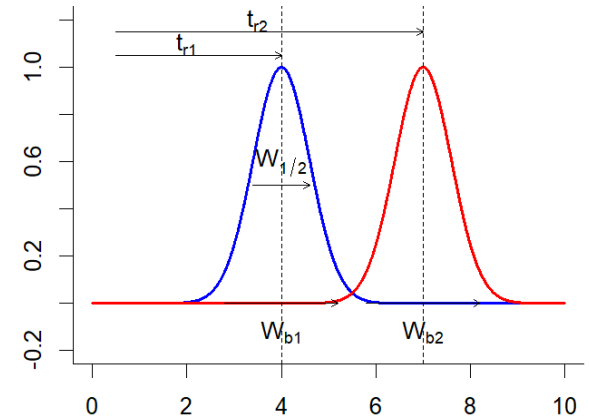
- 分離手法 : **クロマトグラフィー (Chromatography)**
- 分離装置 : **クロマトグラフ (Chromatograph)**
- 得られる結果 : **クロマトグラム (Chromatogram)**



クロマトグラフ (Chromatograph)



クロマトグラム (Chromatogram)



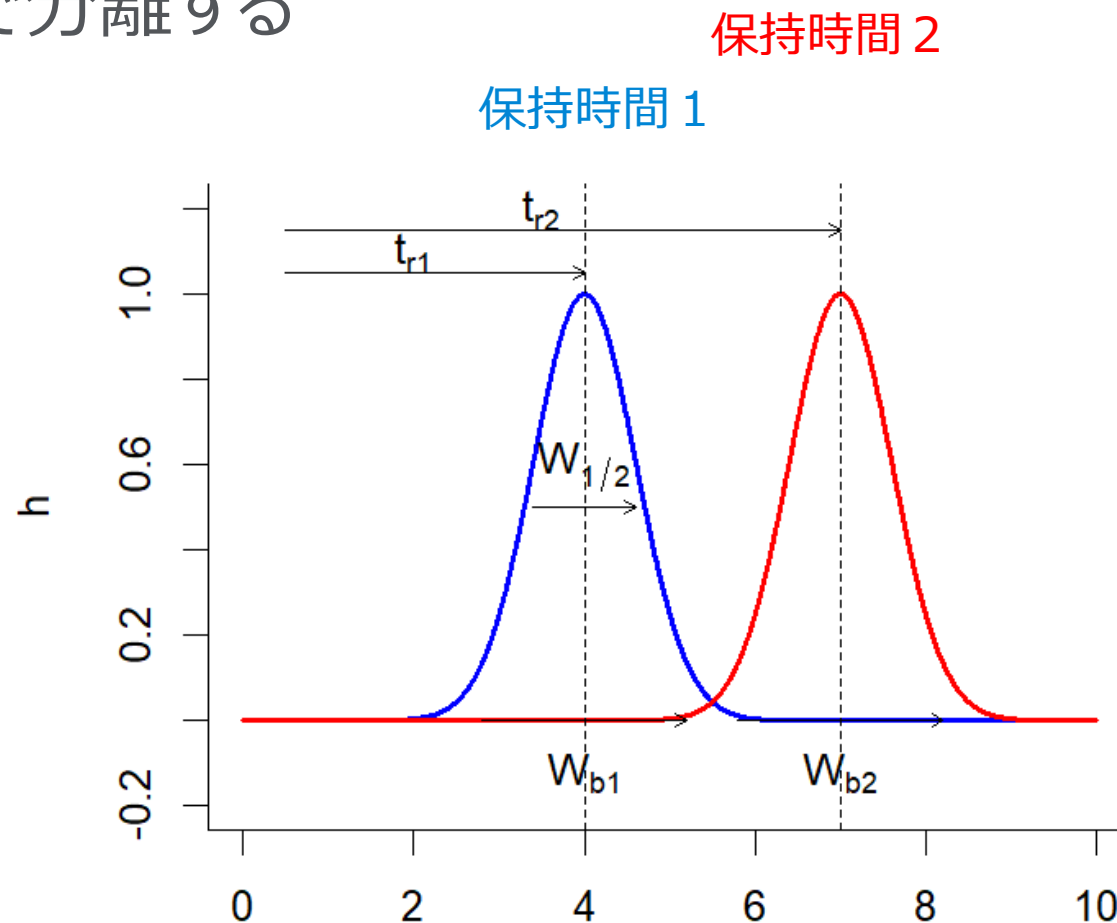
分析を行う人
クロマトグラファー (Chromatographer)

HPLCの原理

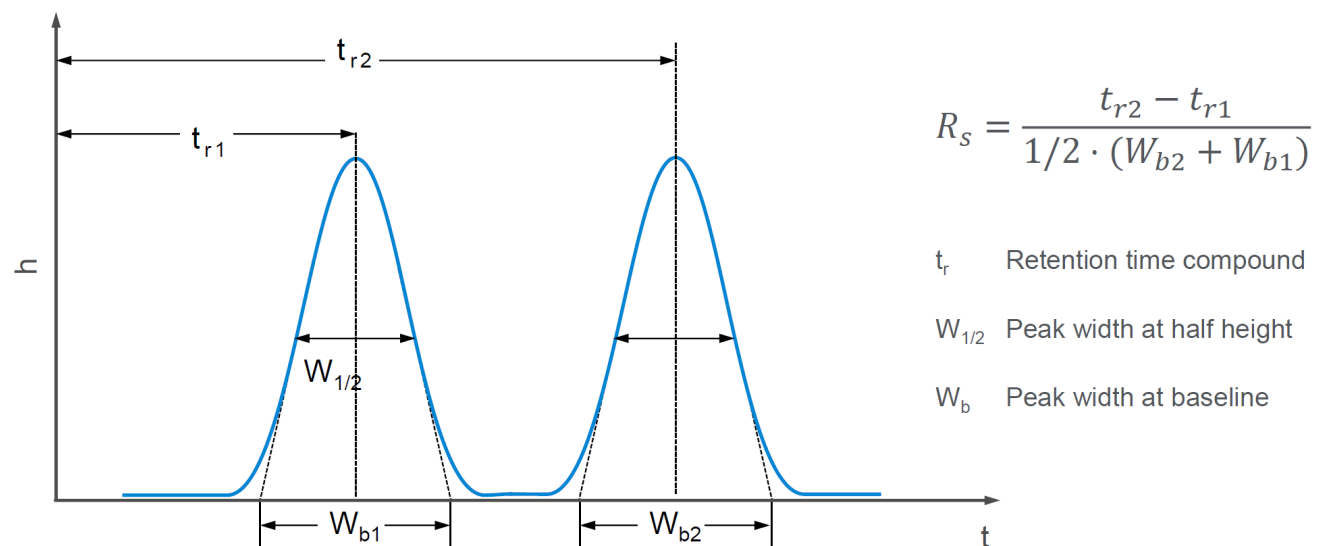
液体に溶けている分析種（分離したい成分）が、
HPLCカラムの固定相との相互作用の差で分離する



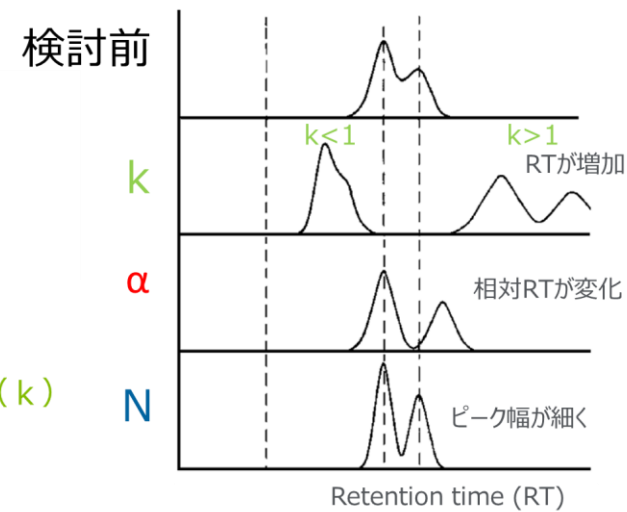
固定相との相互作用（**保持**）が弱い分析種（**青**）は先に溶出し、相互作用が強い分析種（**赤**）は遅れて溶出する



保持・分離の考え方



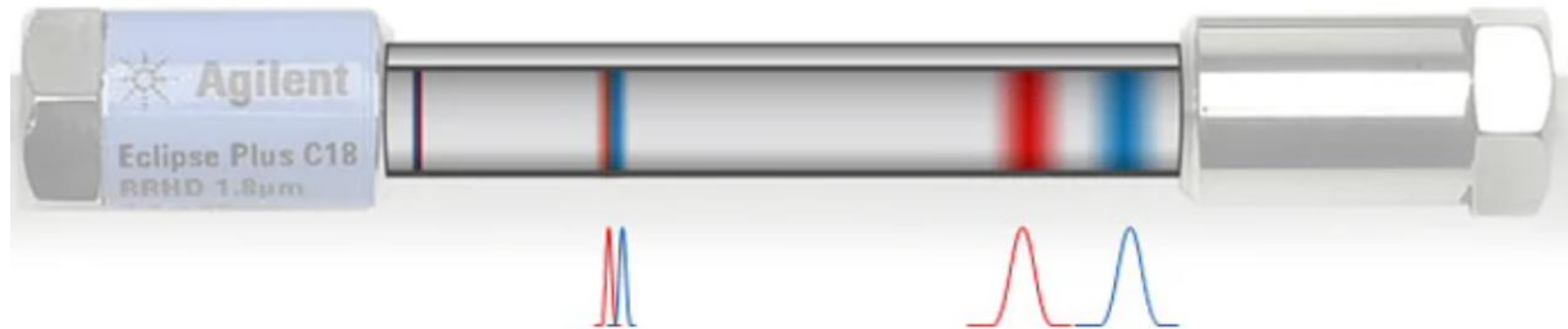
$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4}}_{\text{効率 (N)}} \cdot \underbrace{\sqrt{N}}_{\text{選択性 } (\alpha)} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k}{1+k}\right)}_{\text{保持係数 (k)}}$$



HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

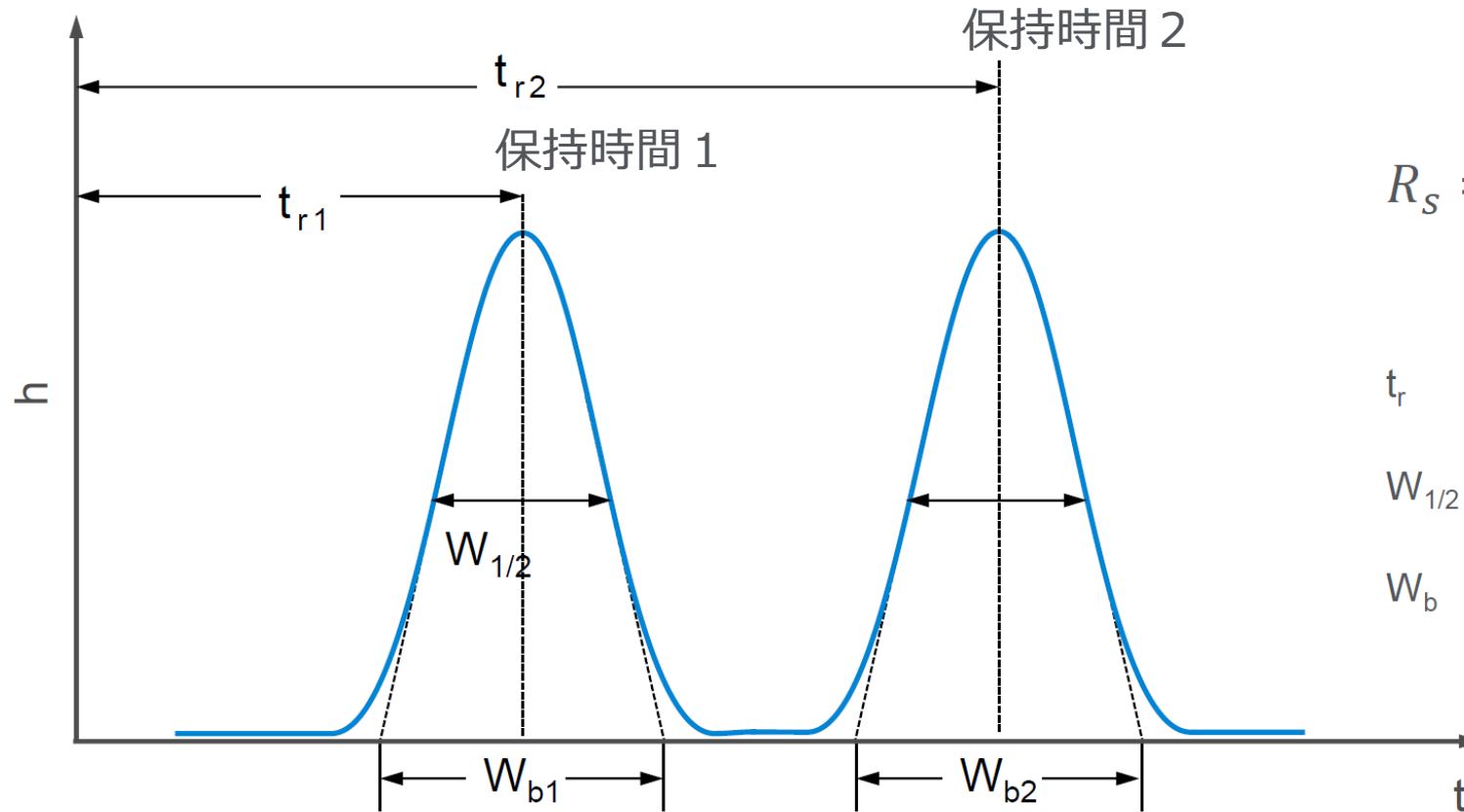
= 高圧で液体 (移動相) を流し、 カラム内で成分を分離する手法

HPLCカラムに導入された分析種は、カラム充填剤と移動相 (溶媒) との間の化学的および物理的相互作用によって分離されます。



では良好な分離とはなんのでしょうか？

分離度 (Resolution, R_s): クロマトグラムから算出される指標



$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})}$$

t_r Retention time compound

$W_{1/2}$ Peak width at half height

W_b Peak width at baseline

良好な分離 = 保持時間が離れている & ピーク幅が狭い

クロマトグラム（実測値）からの分離度の計算方法

例：クロマトデータソフト（Agilent OpenLab CDS）

表 10 OpenLab CDS の薬局方の値

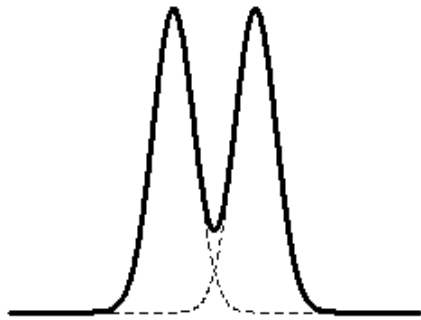
USP	EP	JP	定義	注入結果の列名	レポートで使用するフィールド
USP 2022: 分離度 分離度	分離度	分離度	$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$	分離度 USP 2022 分離度 EP 分離度 JP	ピーク_分離度_EP ピーク_分離度_JP
USP: 分離度	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t(2)} + W_{t(1)}}$	分離度 USP	ピーク_分離度_USP

USP2022 の更新に伴い、USP, EP, JP の分離度の計算方法が更新された

分離度の比較

分離度 (R_s) は、ピーク同士の分離の程度（分離の良さ）を示す指標です。。

$R_s = 1$



$R_s = 1.5$



$R_s = 2$



$R_s = 1$

$R_s \geq 1.5$

$R_s \geq 1.7$

ピークは分離し始めているが、まだ重なりがある状態

ベースライン分離が得られ、正確な定量が可能

ばらつきに強く、実務上望ましい分離度

分離度 (R_s) の理論式

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{効率 (N)}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)}_{\text{選択性 (\alpha)}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1+k}\right)}_{\text{保持係数 (k)}}$$

検討前

k

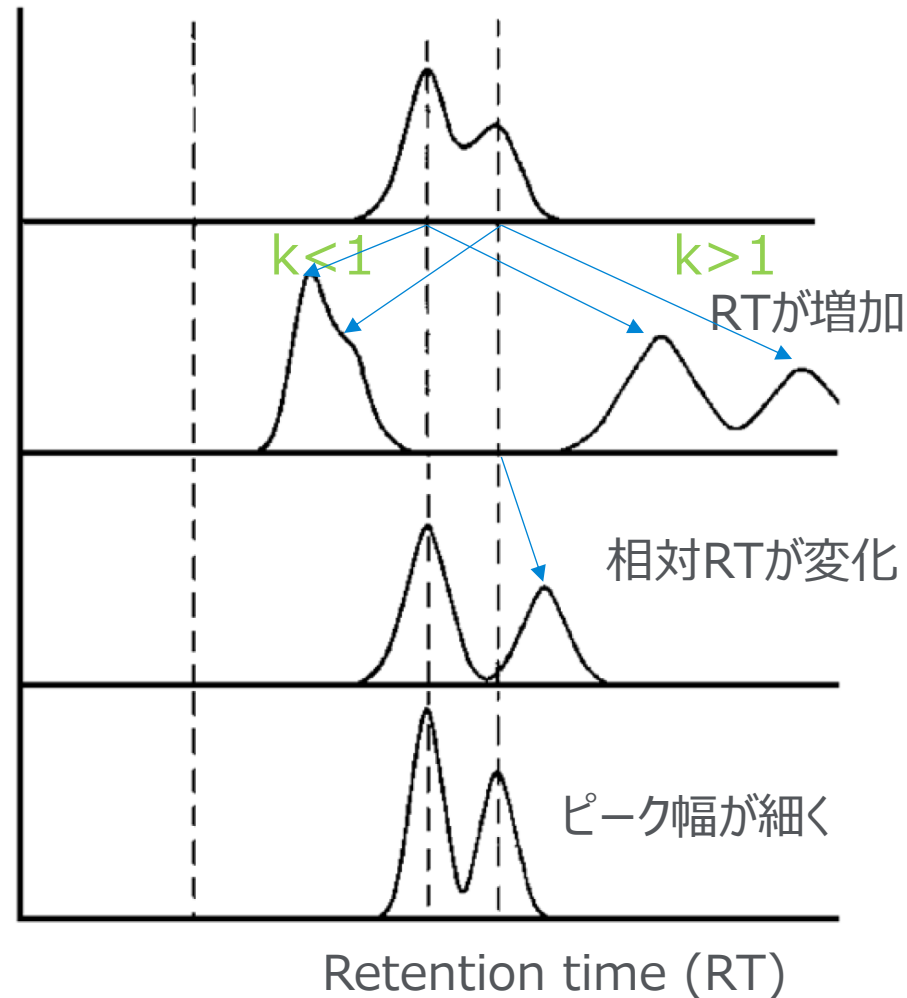
α

N

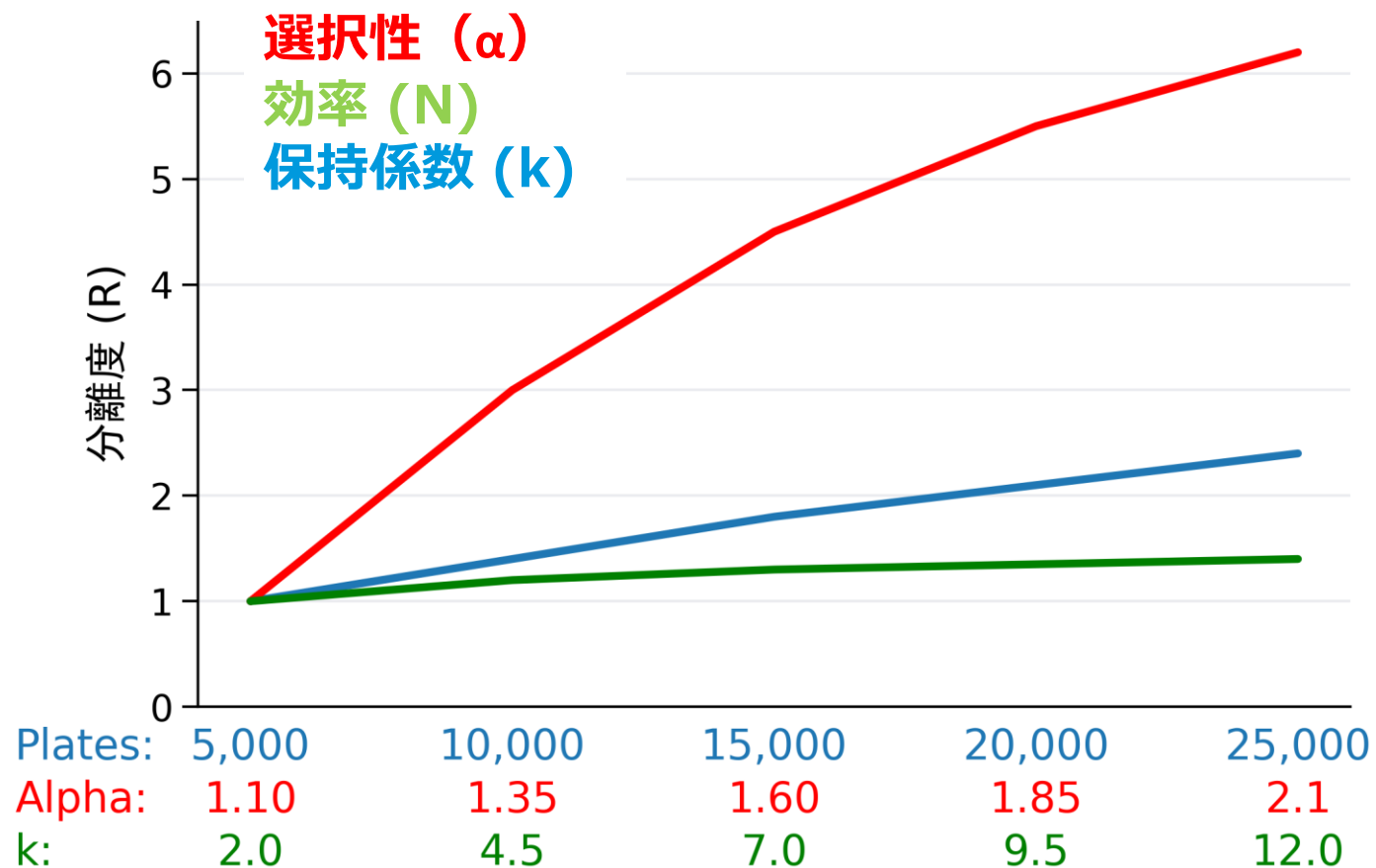
t_0 : 非保持時間 (ホールドアップタイム)

t_{R1} : 保持時間 1

t_{R2} : 保持時間 2



分離度 (R_s) に最も影響を与える因子は？

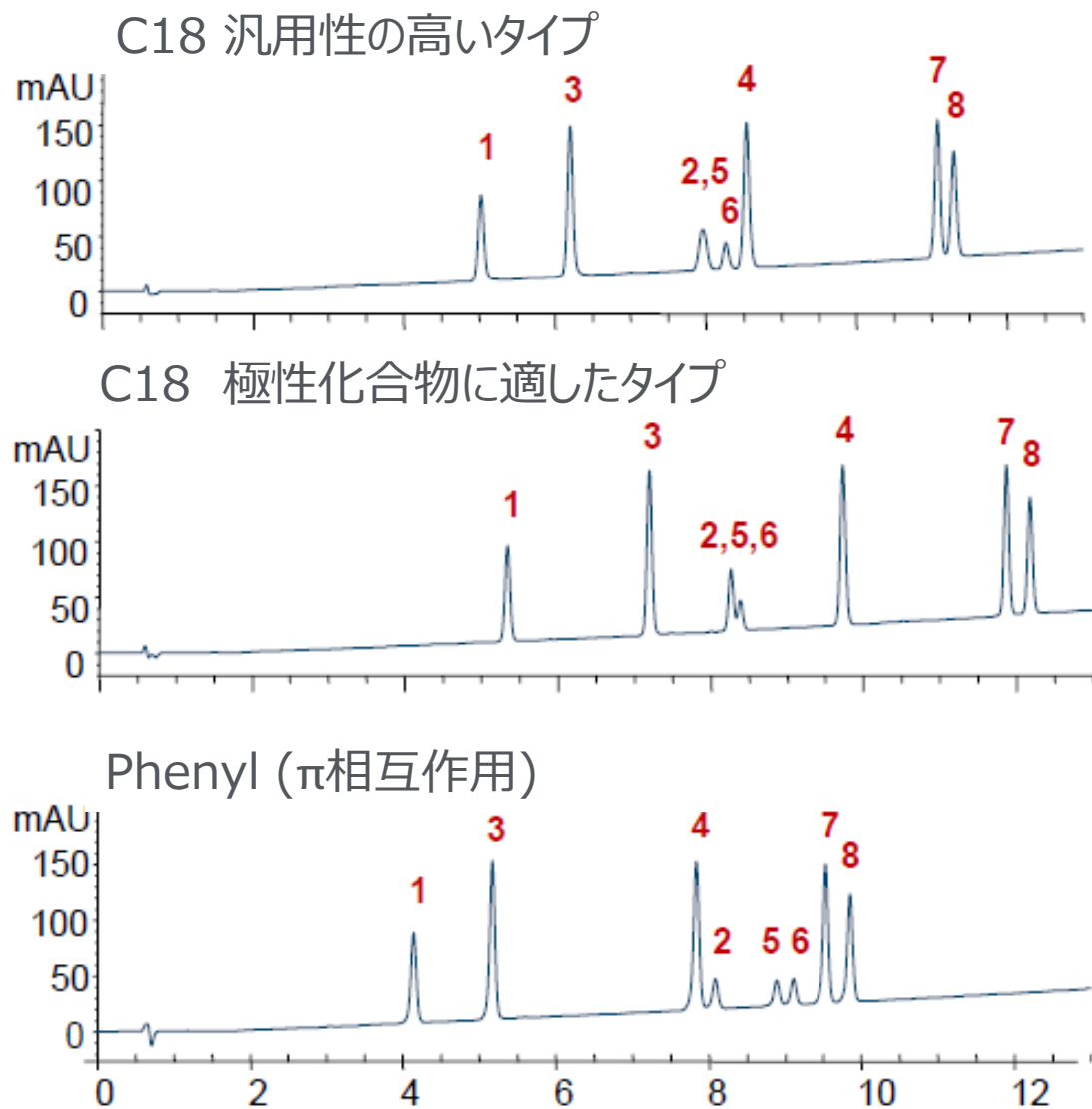


選択性 (α) は、
最も分離に影響する。

カラムによる選択性 (α) の違い

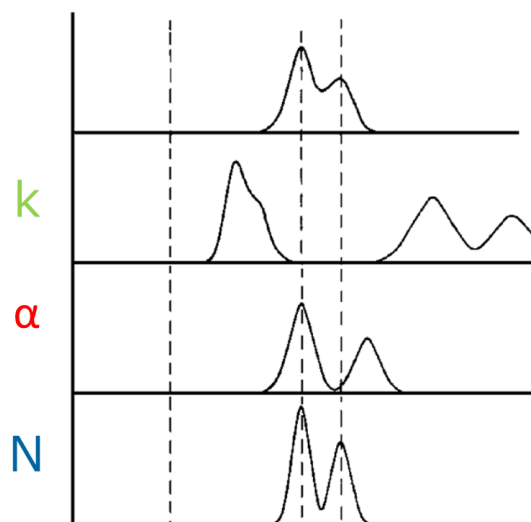
固定相の違い = 選択性の違い
⇒ 分離パターンが変わる

同じ条件でも分離パターンが変化



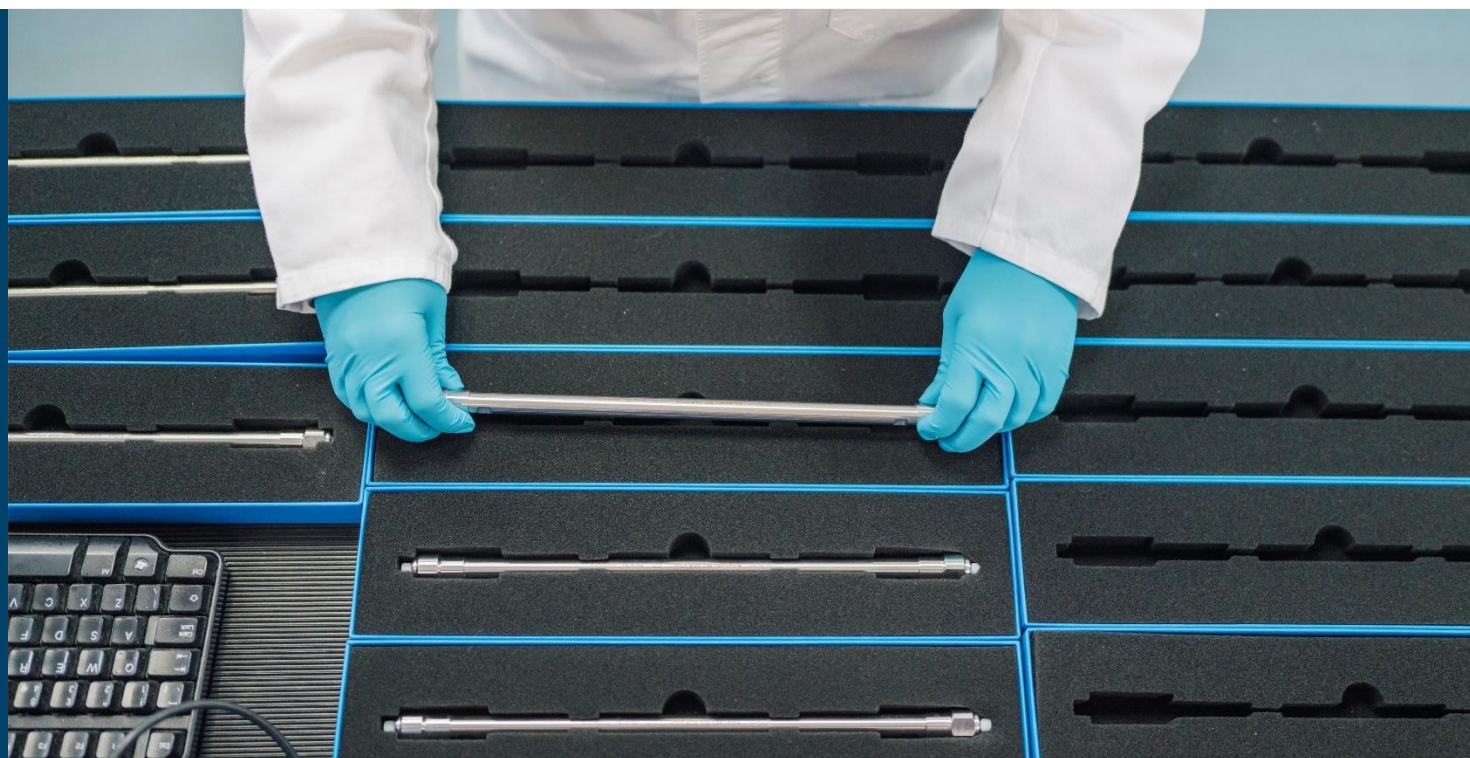
保持係数、選択性、効率のまとめ

記号	意味
● ●	主な影響
●	副次的影響
—	影響小さい
青	主要な制御に利用



条件	保持係数 (k)	選択性 (α)	効率 (N)
%B	● ●	●	—
移動相B (ACN, MeOH, etc.)	●	● ●	—
カラム温度	●	●	●
固定相 (C18, Phenyl, etc.)	●	● ●	—
移動相 pH	● ●	● ●	●
塩濃度	●	●	—
イオンペア試薬濃度	● ●	● ●	●
カラム長	NA	NA	● ●
粒子径	NA	NA	● ●
流量	NA	NA	●

メソッド開発 カラムの選択



アジレントのHPLCカラムの特徴

2001

初の表面多孔質カラム

2003

業界初の sub 2 μm カラム

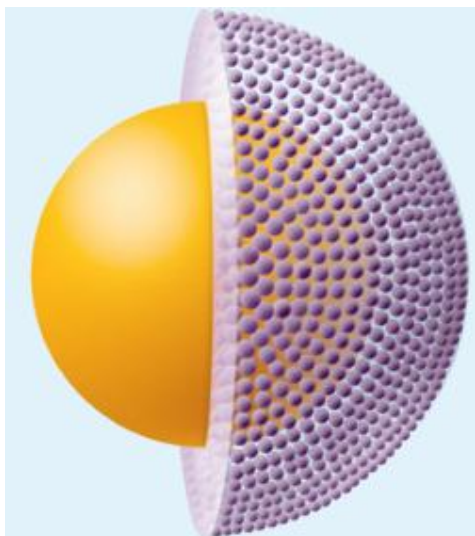
2025

ウルトライナーT HPLCカラム

比類のない優れた性能と信頼性を提供する LC カラム

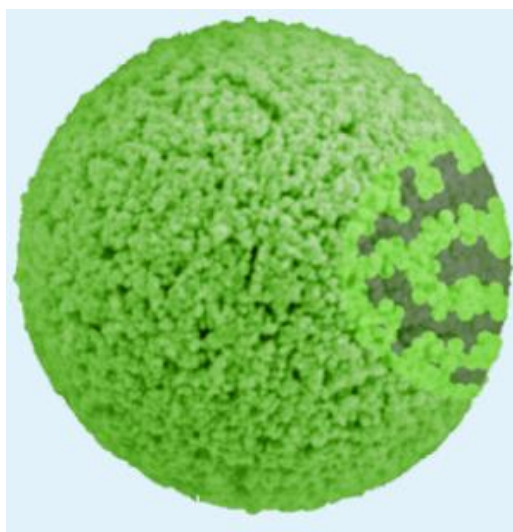
Agilent Altura HPLC カラムとウルトライナーTテクノロジー

Poroshell



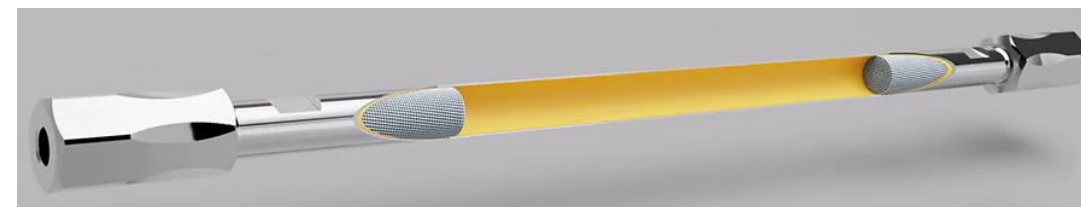
表面多孔質粒子
SPP

ZORBAX



全多孔質粒子
TPP

Altura



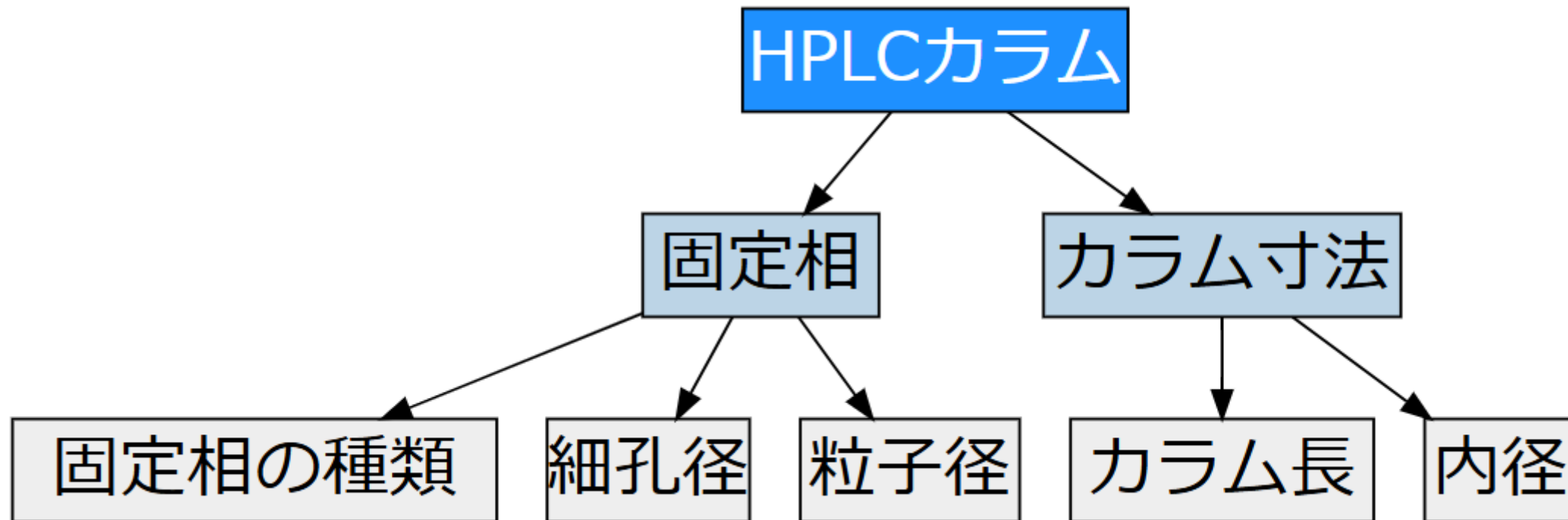
ZORBAXとPoroshellのラインナップ

主力は逆相カラム → 第一選択はC18

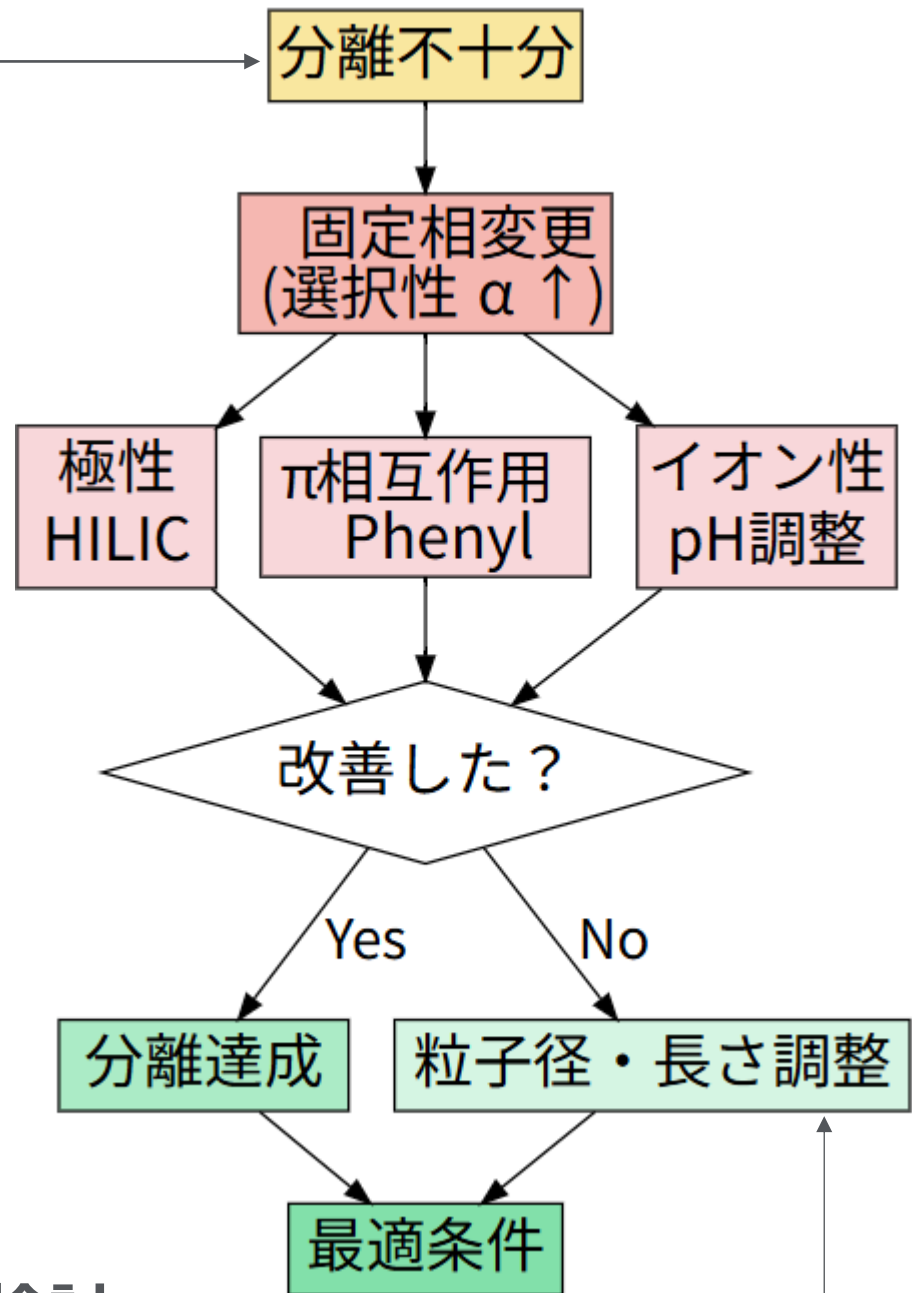
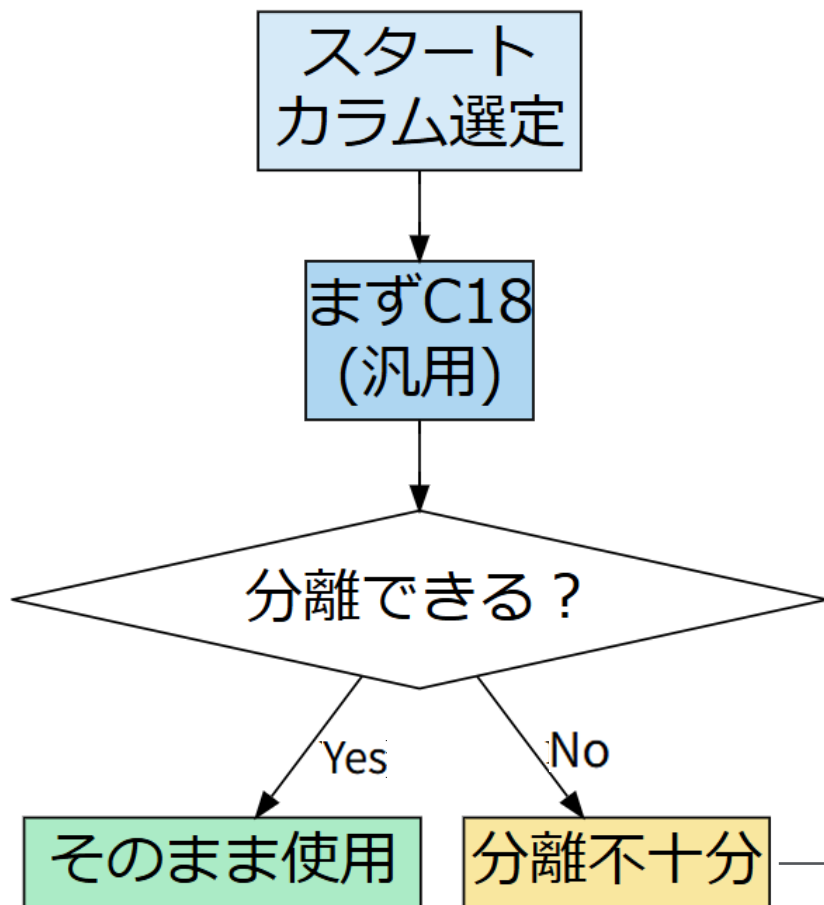
ブランド	粒子構造	分離モード	主な固定相	カラム数 固定相 x (内径、長さ、粒子径)
Poroshell 120	表面多孔質	逆相 (RP)	C18 / C8 / Phenyl / PFP / CN	320
Poroshell 120	表面多孔質	特殊選択性	Bonus-RP / Phenyl-Hexyl	110
Poroshell 120	表面多孔質	極性保持	Aq-C18 / SB-Aq	55
Poroshell 120	表面多孔質	HILIC	HILIC / Z / OH5	55
Poroshell 120	表面多孔質	キラル	Chiral-V / T / CD / CF	70
ZORBAX	全多孔質	逆相 (RP)	C18 / C8 / Phenyl / CN	350
ZORBAX	全多孔質	特殊選択性	Bonus-RP / StableBond	130
ZORBAX	全多孔質	極性保持	SB-Aq	80
ZORBAX	全多孔質	HILIC	HILIC Plus	20

[Poroshell 120リスト](#)
[ZORBAXリスト](#)

カラムの選択



カラムの選択

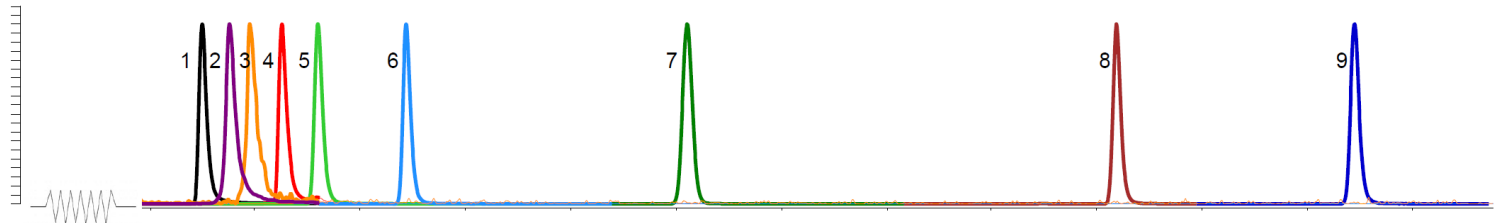


スループット・省溶媒の検討

カラムの選択 固定相の変更 (C18)

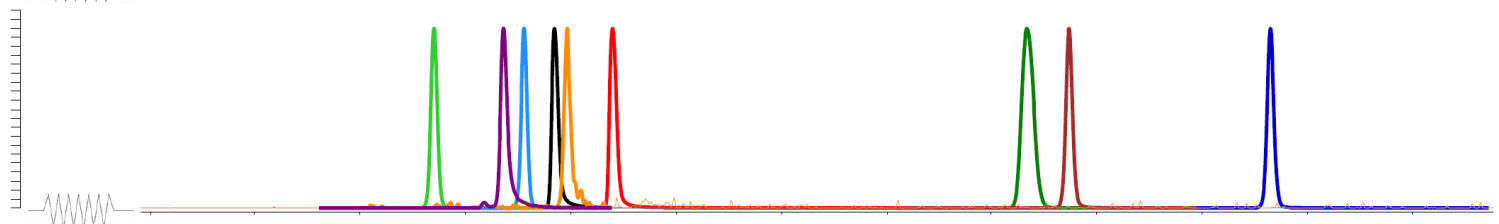
低-高pH
粒子表面が正荷電
残存シリノールの影響を抑制

CS-C18



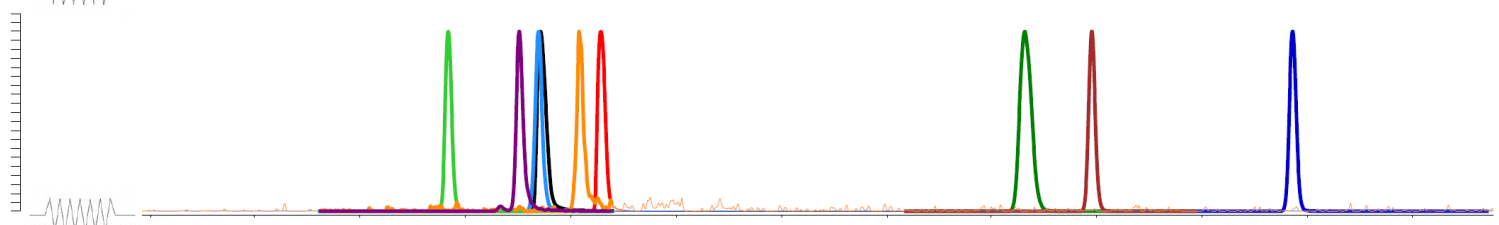
低pH

SB-C18



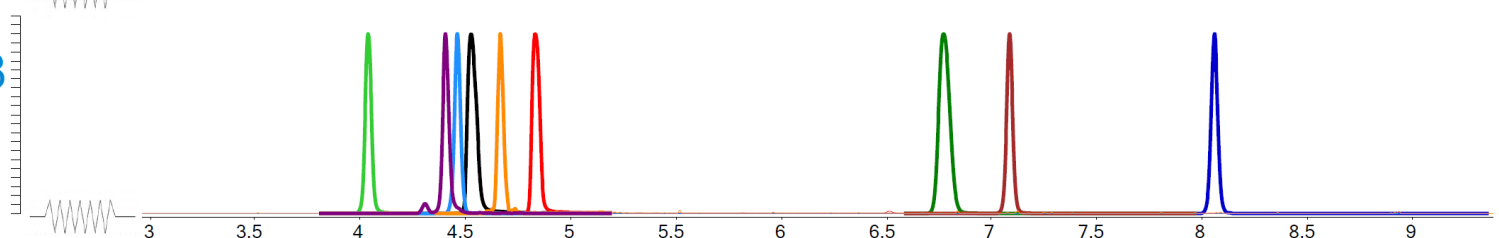
汎用・第一選択

EC-C18

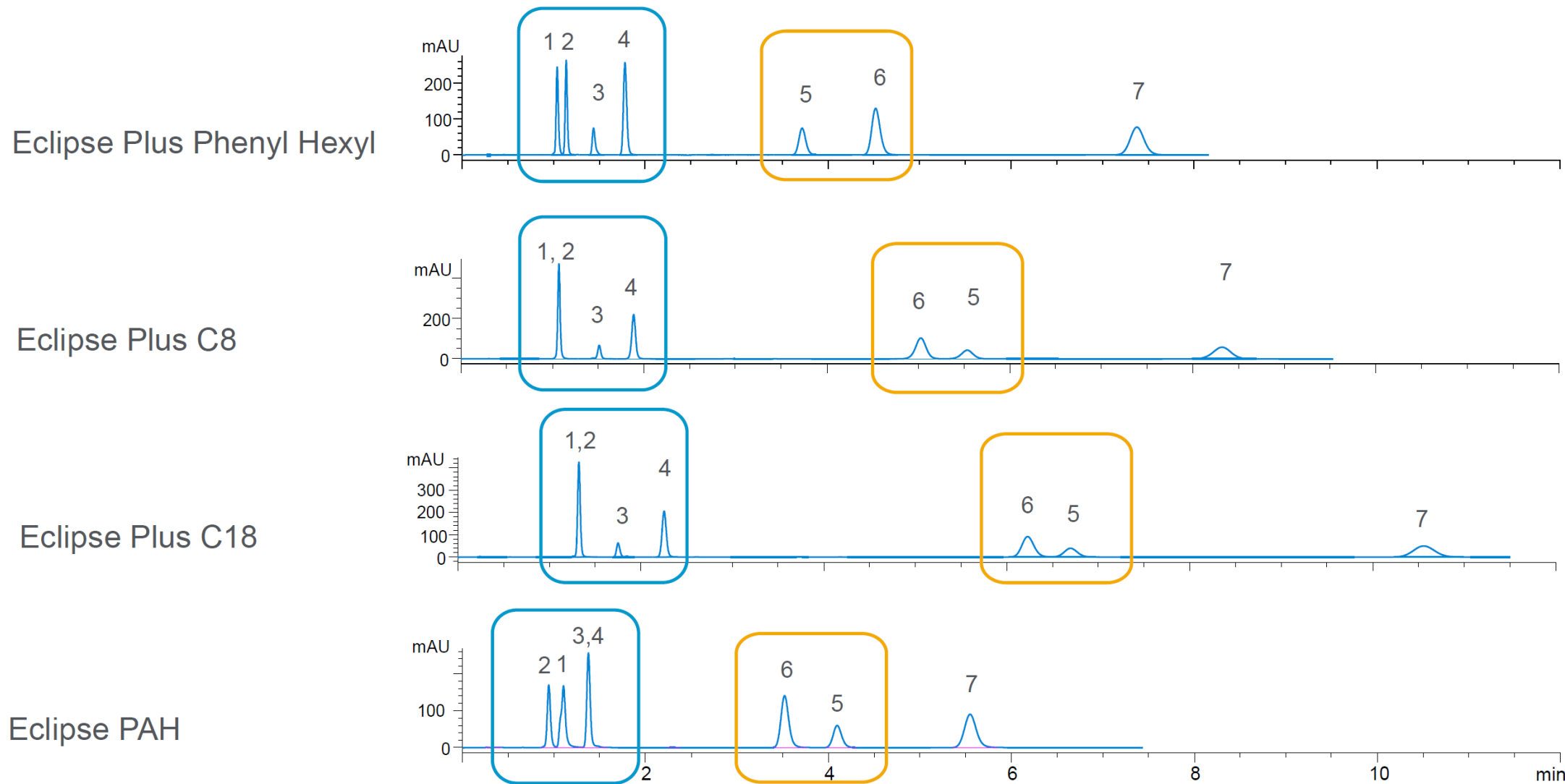


低-高pH

HPH-C18



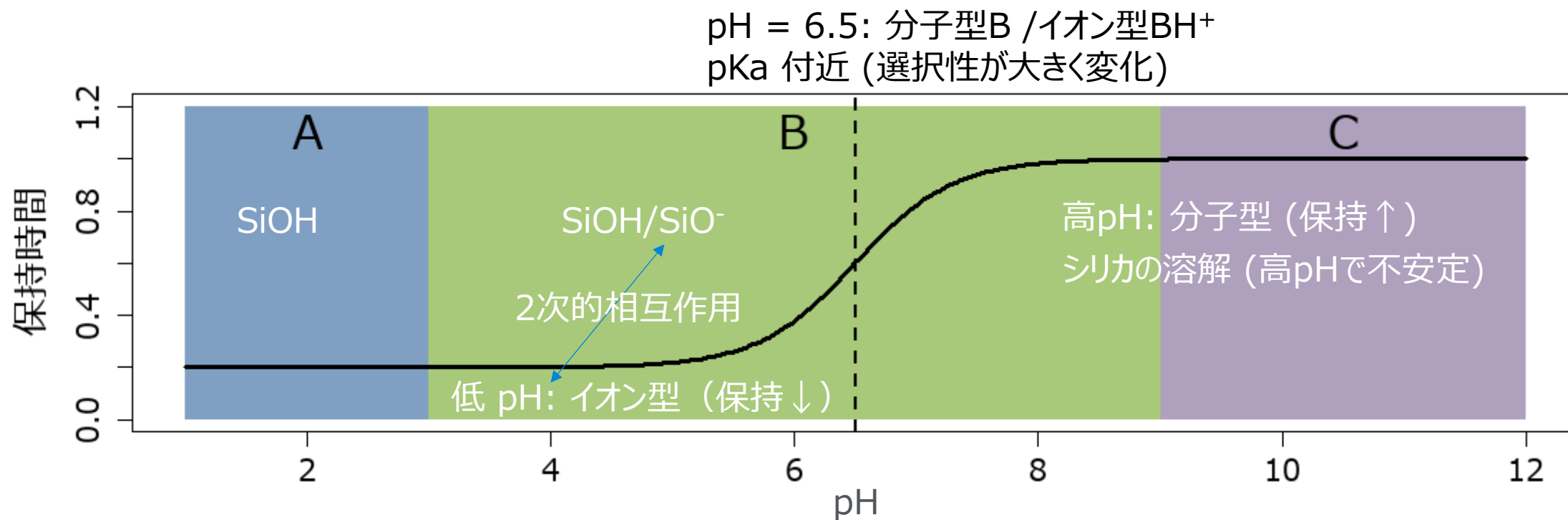
カラムの選択 固定相の変更 (逆相、特殊選択性)



カラムの選択

シリカ系逆相カラムのpHと選択性の制御

例 pKa 6.5 の塩基性化合物 B
pH 6.5 イオン型と分子型が半分 B/BH⁺
pH < 4.5 ほぼ全てイオン型 BH⁺
pH > 8.5 ほぼ全て分子型 B



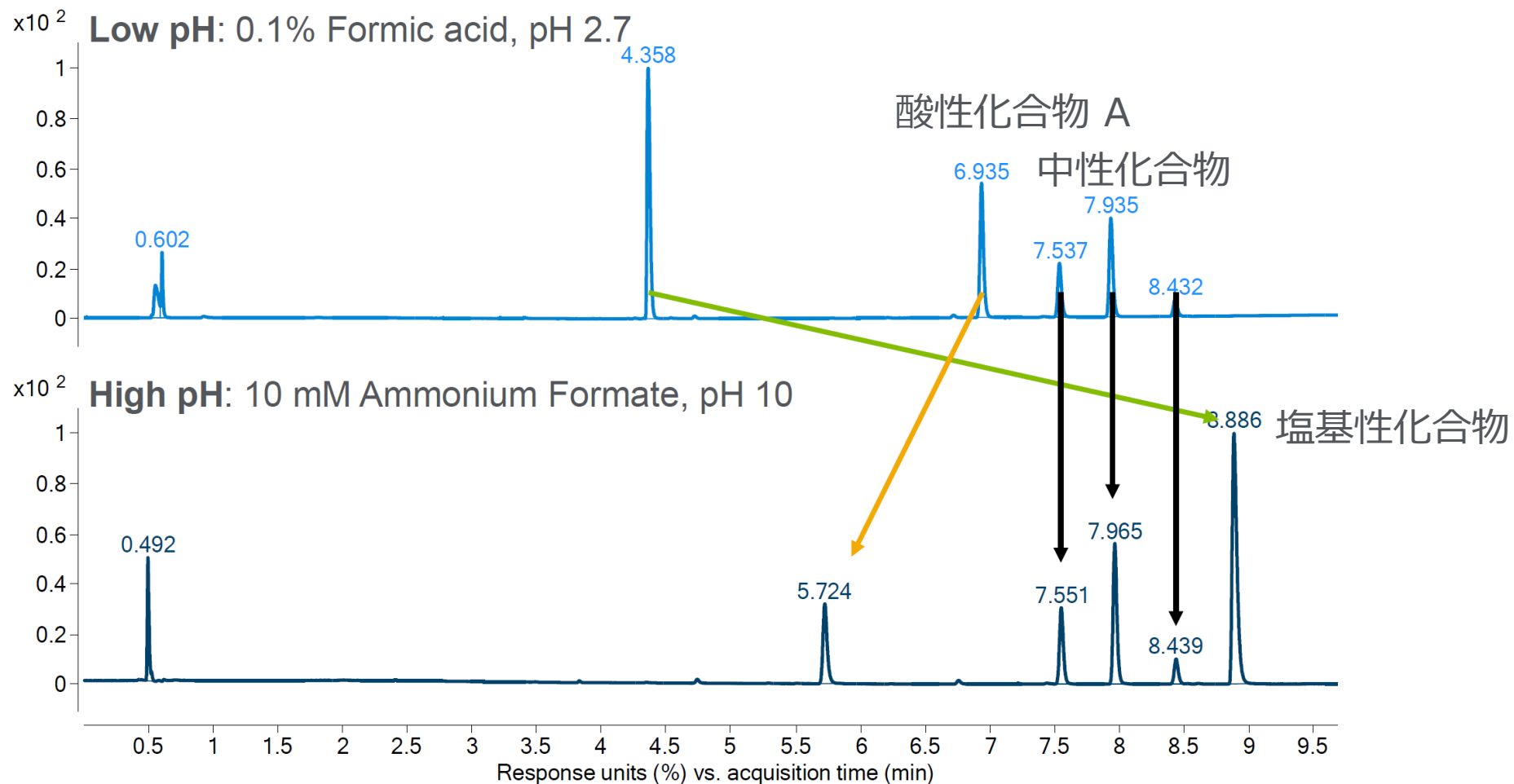
汎用性のHPLCカラム
低pH耐性のカラム

汎用性のHPLCカラム

高pH耐性のHPLCカラム

カラムの選択

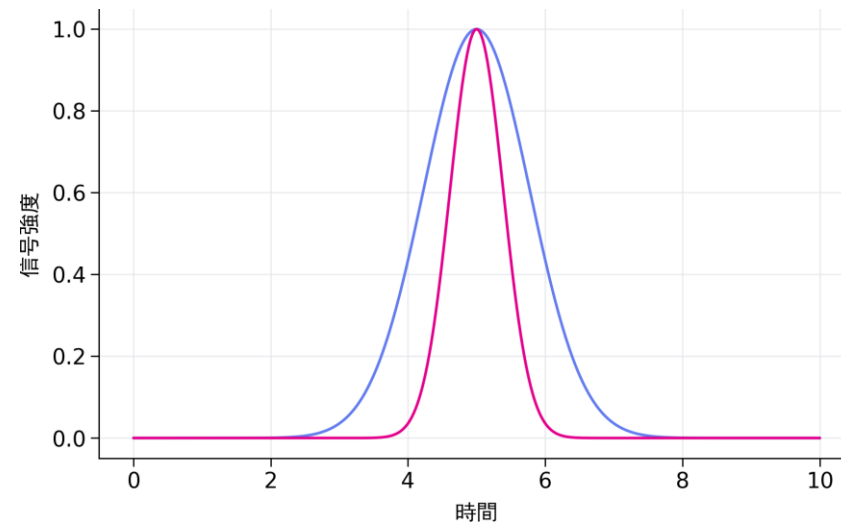
シリカ系逆相カラム (Poroshell CS-C18) のpHと選択性の制御



HPLCカラムの選択 粒子サイズ

カラム長	5 粒子径 μm カラム効率 (N)	3.5 粒子径 μm カラム効率 (N)	1.8 粒子径 μm カラム効率 (N)
150	12,500	21,000	35,000
100	8,500	14,000	23,250
75	6,000	10,500	17,500
50	4,200	7,000	12,000
30	N.A.	4,200	6,500
15	N.A.	2,100	2,500

小粒子ほどカラム効率 (N) ↑
ピークが細くなる



同等のカラム効率で
分析時間 1/3 以下
⇒スループット向上
⇒溶媒削減

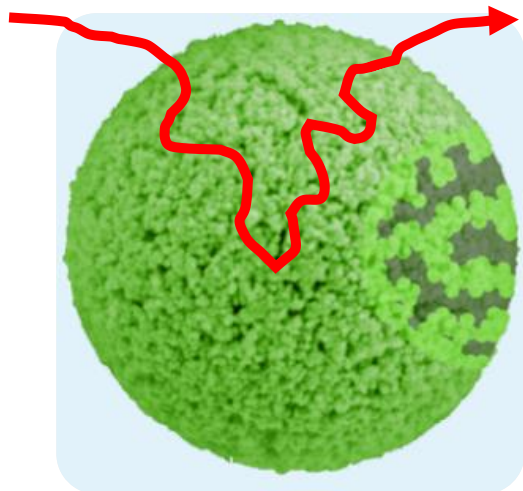
表面多孔質粒子 (SPP) の特徴

全多孔質粒子: TPP, 表面多孔質粒子: SPP

$$h = A + B/v + C \cdot v$$

充填剤内部での溶質の移動

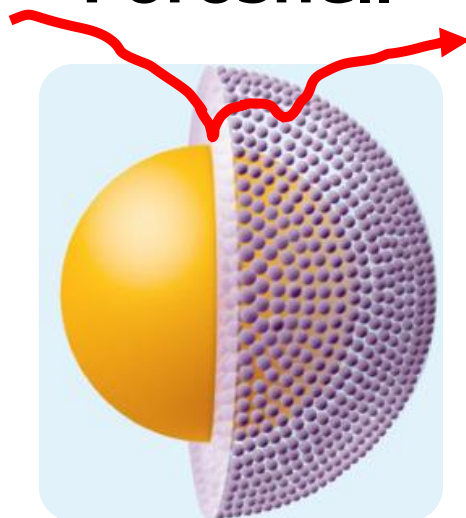
ZORBAX



TPP

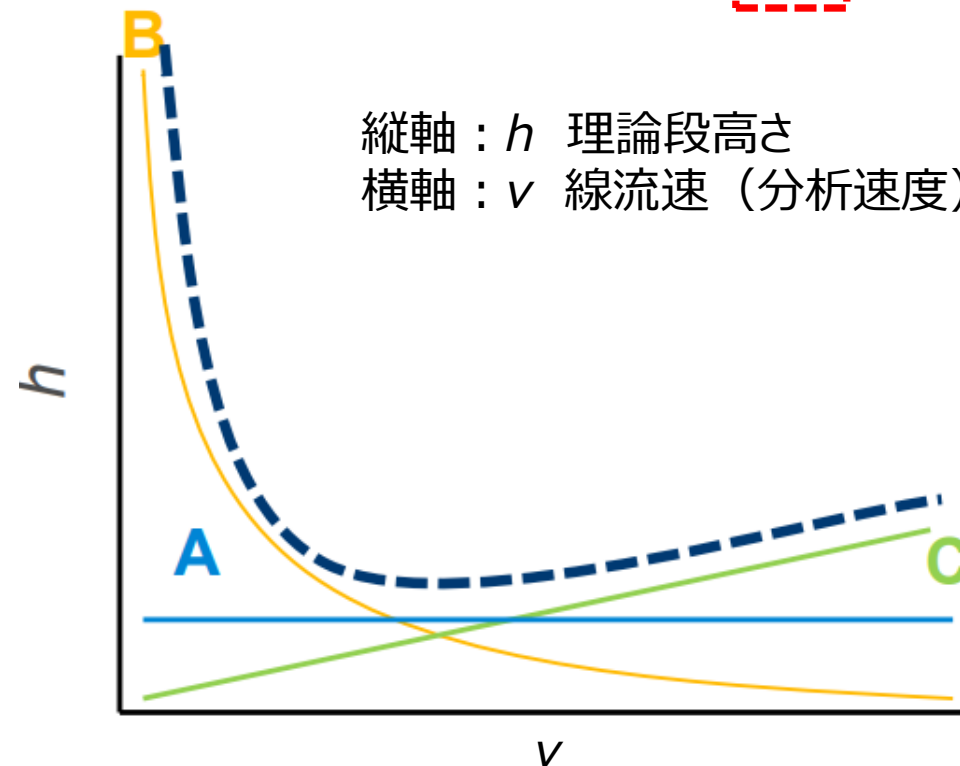
全多孔質粒子
TPP

Poroshell



SPP

表面多孔質粒子
SPP



A項 (多経路効果)

SPPが有利

B項 (縦方向拡散)

小粒子が有利

C項 (物質移動抵抗)

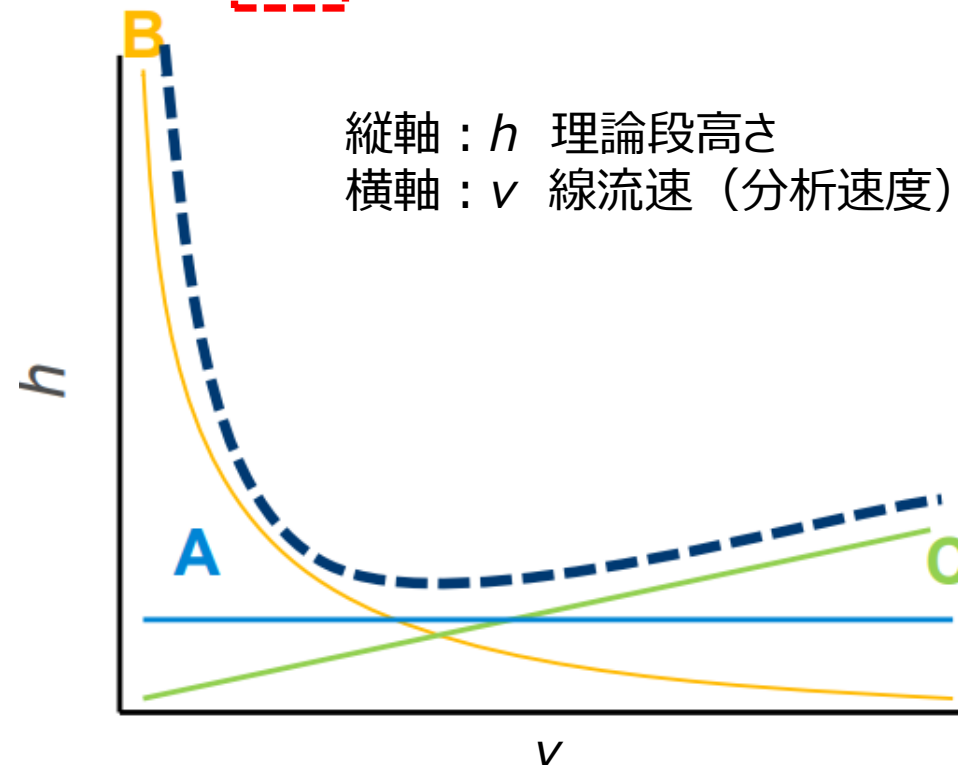
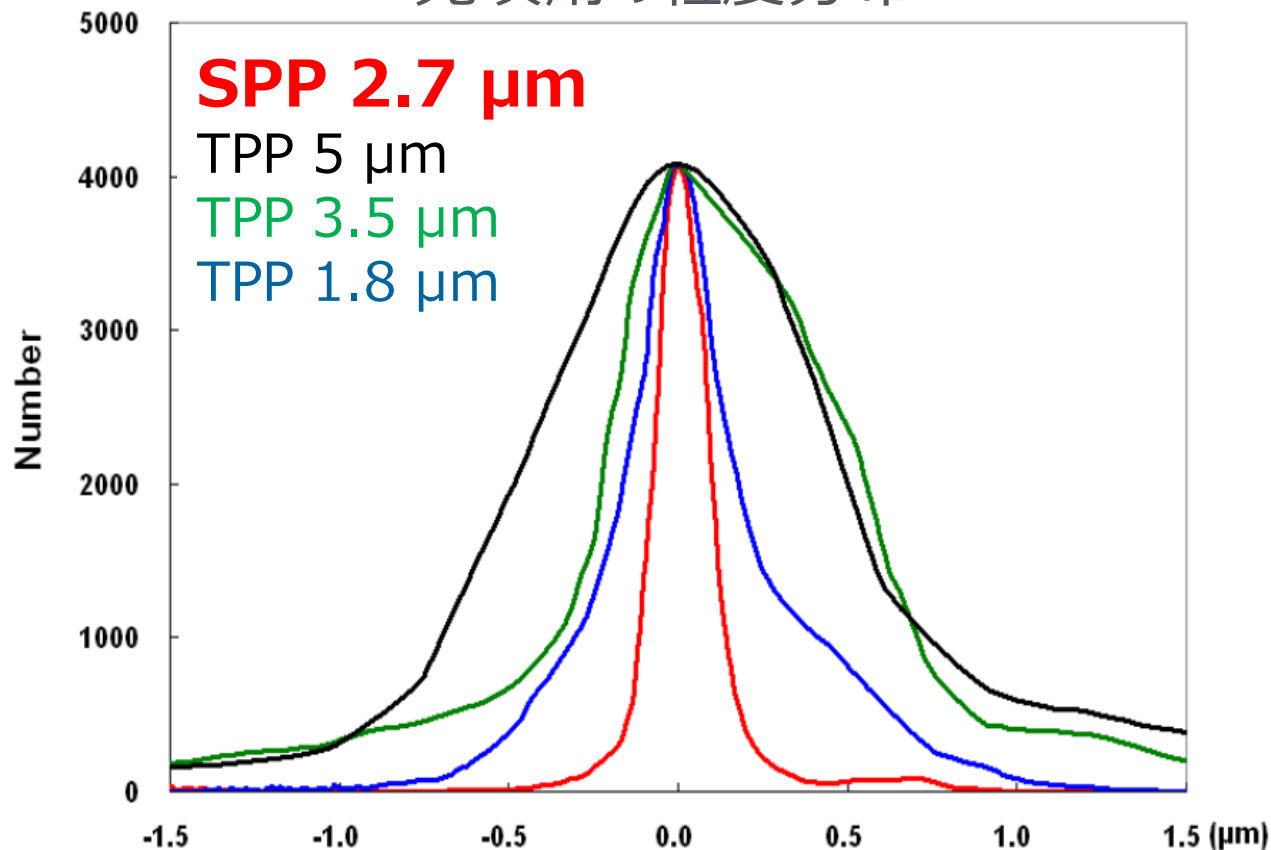
SPPが有利

表面多孔質粒子 (SPP) の特徴

全多孔質粒子: TPP, 表面多孔質粒子: SPP

$$h = A + B/v + C \cdot v$$

充填剤の粒度分布



縦軸: h 理論段高さ
横軸: v 線流速 (分析速度)

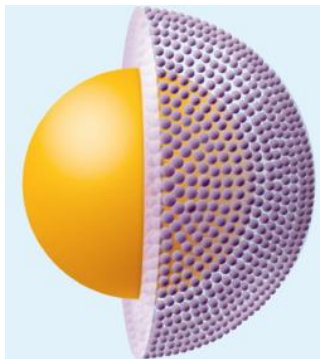
- | | |
|-------------------|---------------|
| A項 (多経路効果) | SPPが有利 |
| B項 (縦方向拡散) | 小粒子が有利 |
| C項 (物質移動抵抗) | SPPが有利 |

ZORBAX Poroshell

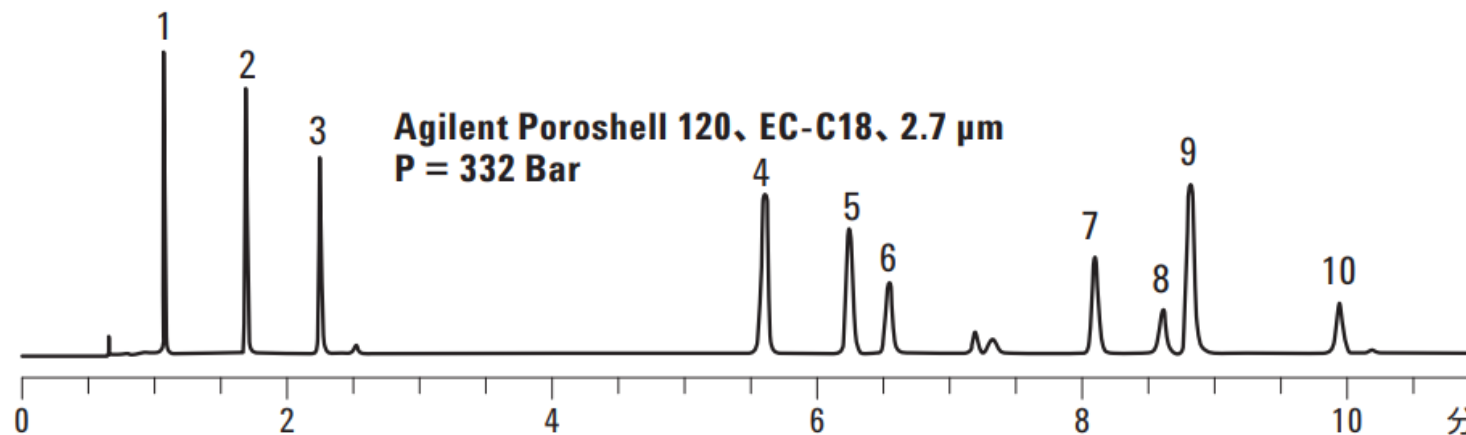
全多孔質カラム 表面多孔質カラム

全多孔質粒子: TPP, 表面多孔質粒子: SPP

SPP 充填剤 Poroshell

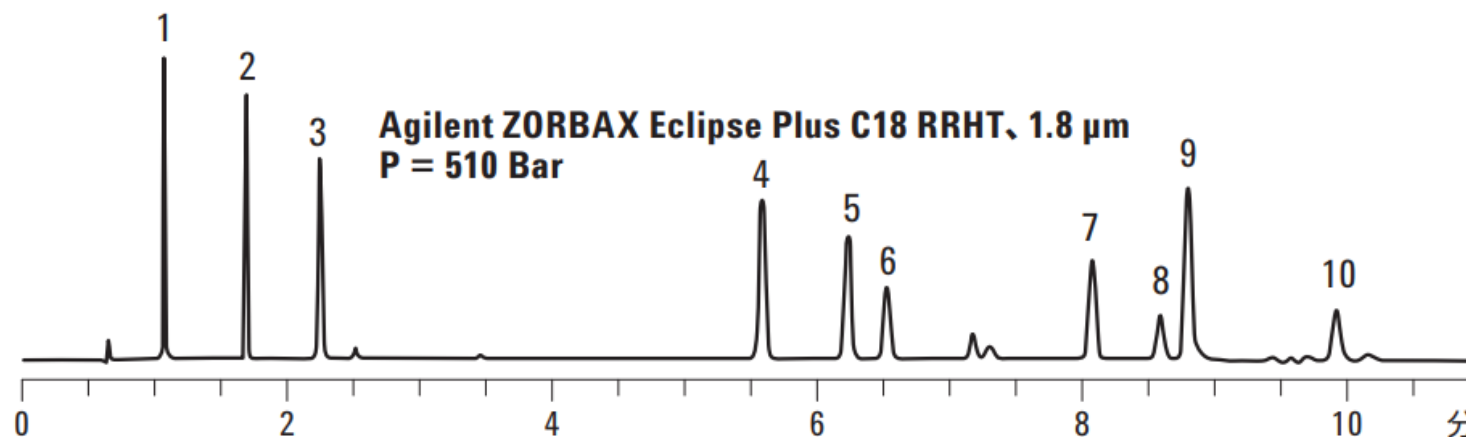
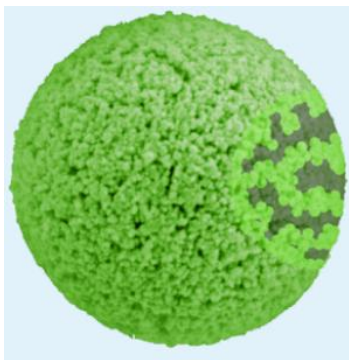


SPP はHPLC (40Mpa以下) で UHPLC と同等の分析が可能!



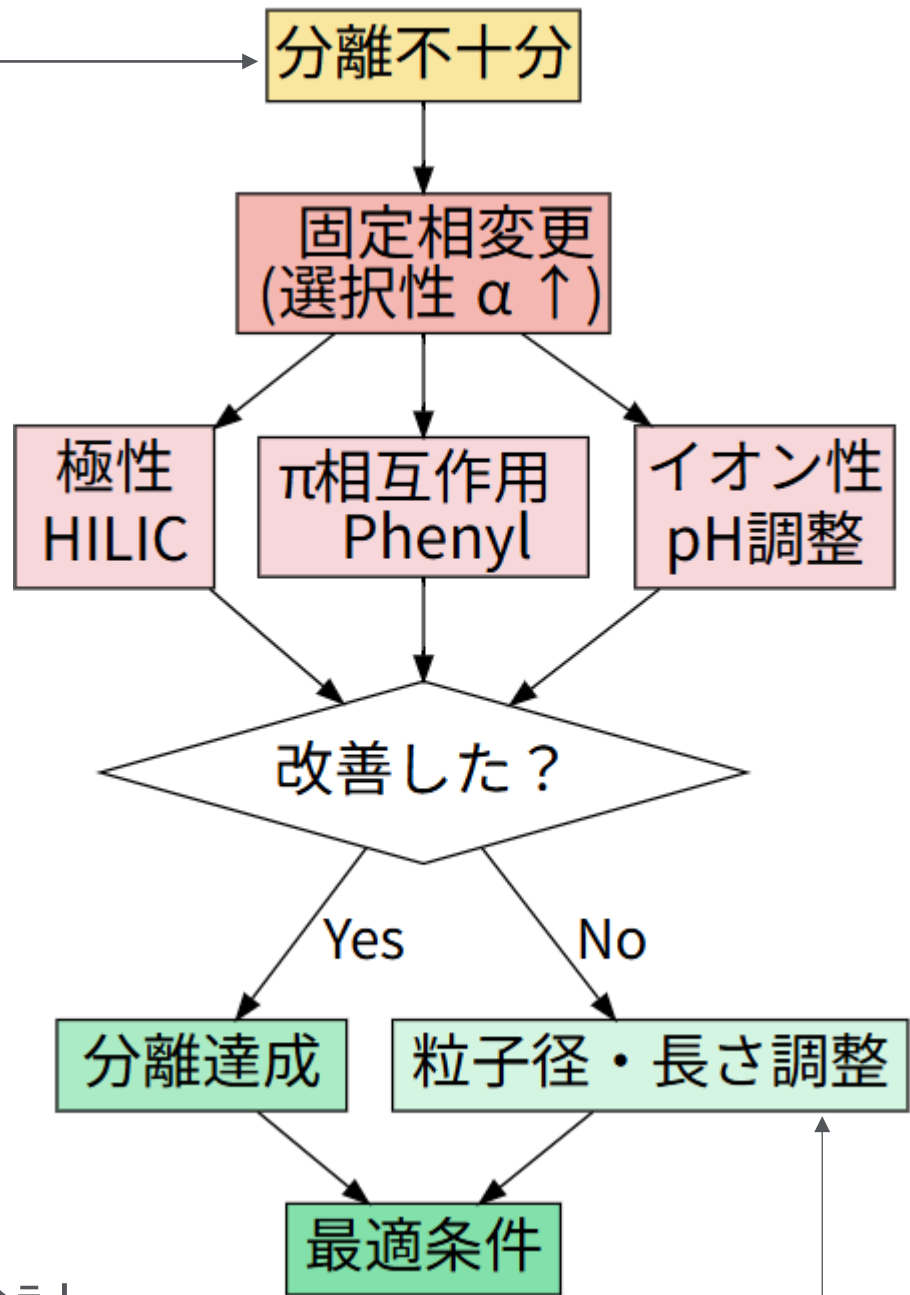
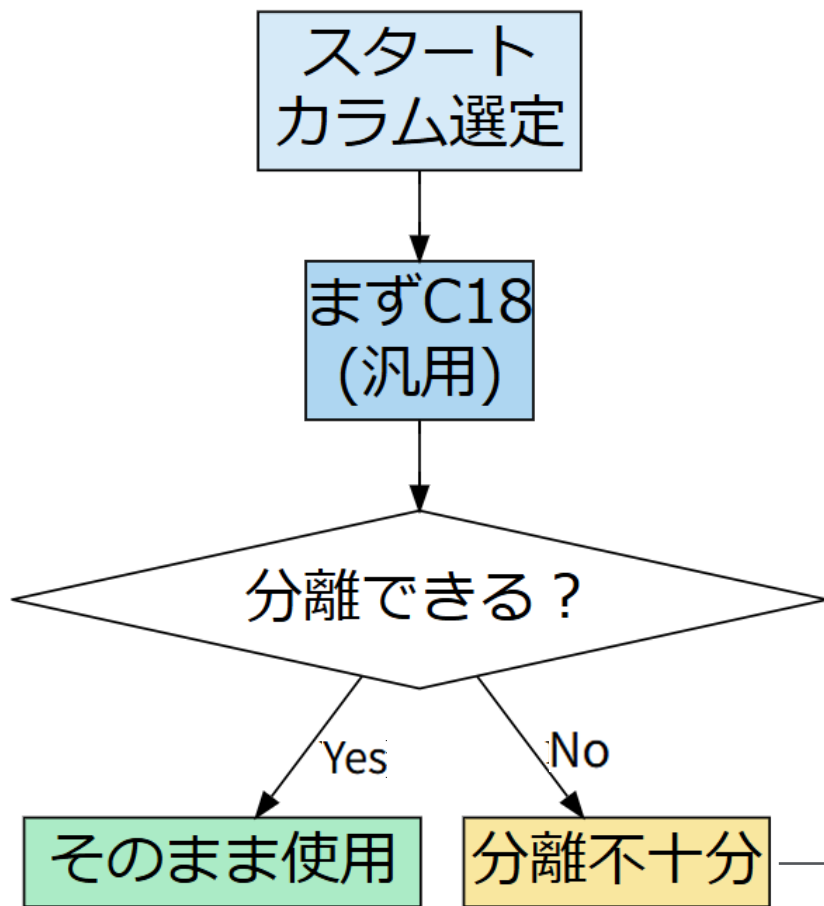
SPP 2.7 μm
33 Mpa

TPP 充填剤 ZORBAX



TPP 1.8 μm
51 Mpa

カラムの選択 まとめ



スループット・省溶媒の検討

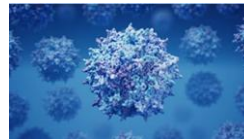
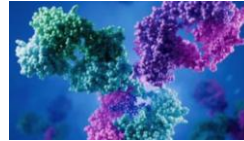
HPLCカラムのラインナップ

LCとLC/MS カラム：
低分子分析用

ZORBAX
Poroshell 120
Pursuit XRs
Polaris
Hi-Plex

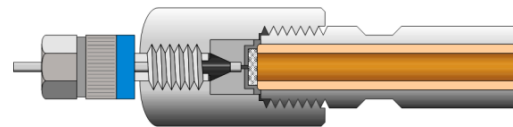
LCとLC/MS カラム：バイオ分析用

Bio/AdvanceBio カラム
糖鎖
ペプチド
オリゴヌクレオチド
アミノ酸
荷電変異
抗体
界面活性剤

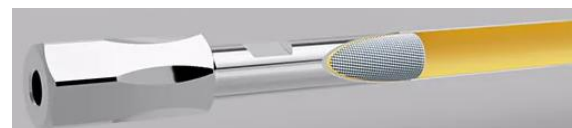


PLRP-S
PL-SAX/SCX

PEEK lined メタルフリー



Altura ウルトライナートコーティング

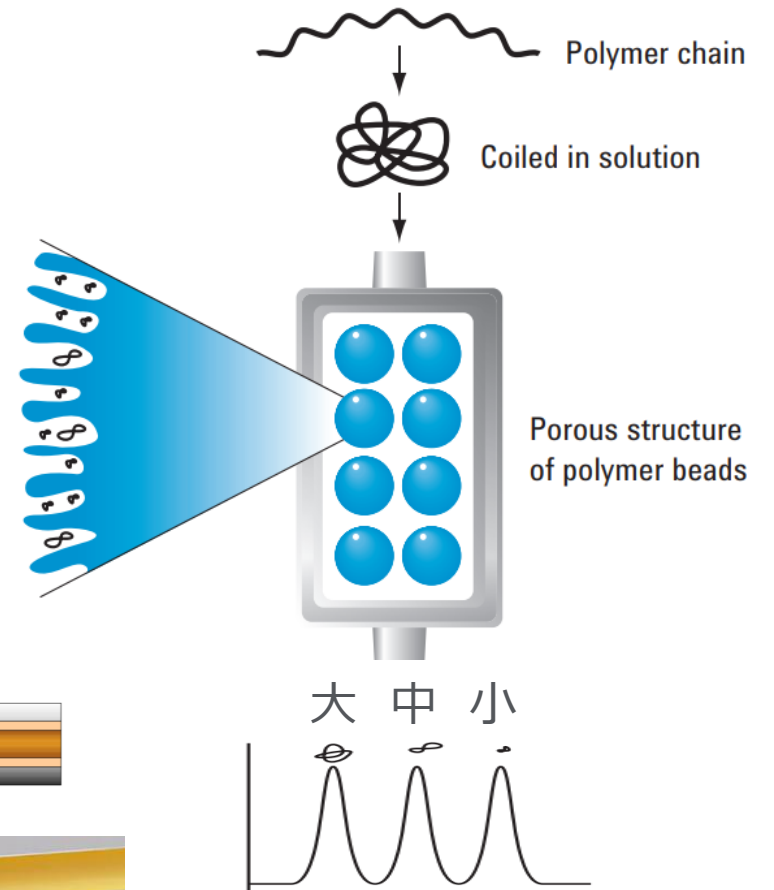


デモカラムのお問い合わせは是非アジレントへ

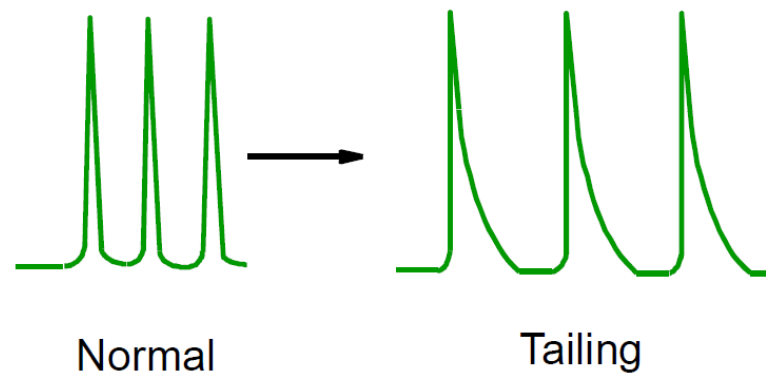
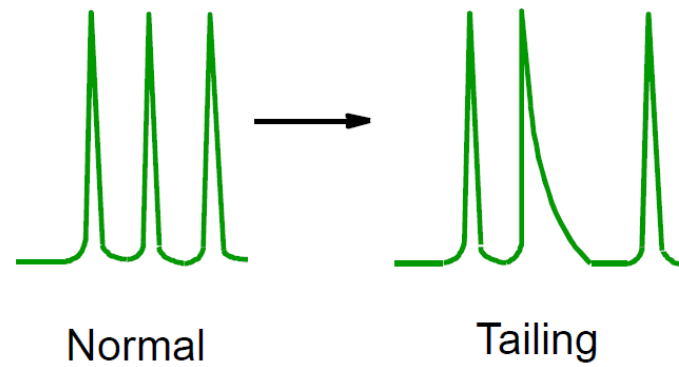
GPC カラム

有機系/水系

PL & PSS シリーズ



トラブルシューティング



HPLCカラムのトラブルシューティング

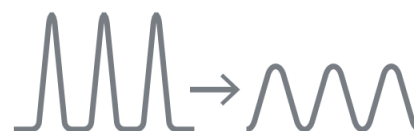
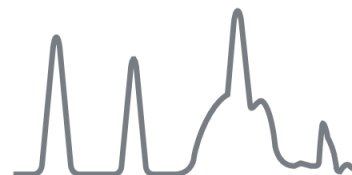
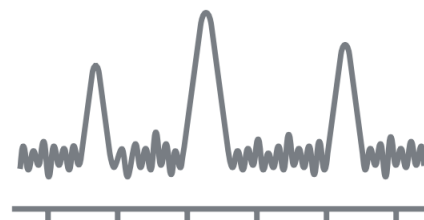
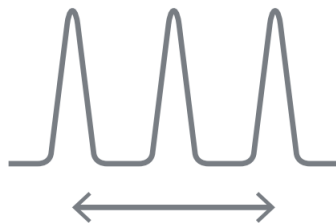
現象の確認



原因を**推定**



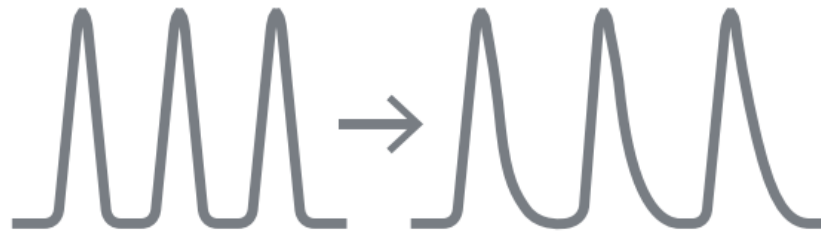
原因を取り除く



[LC Troubleshooting Guide](#)

トラブルシューティング: クロマトグラムの異常

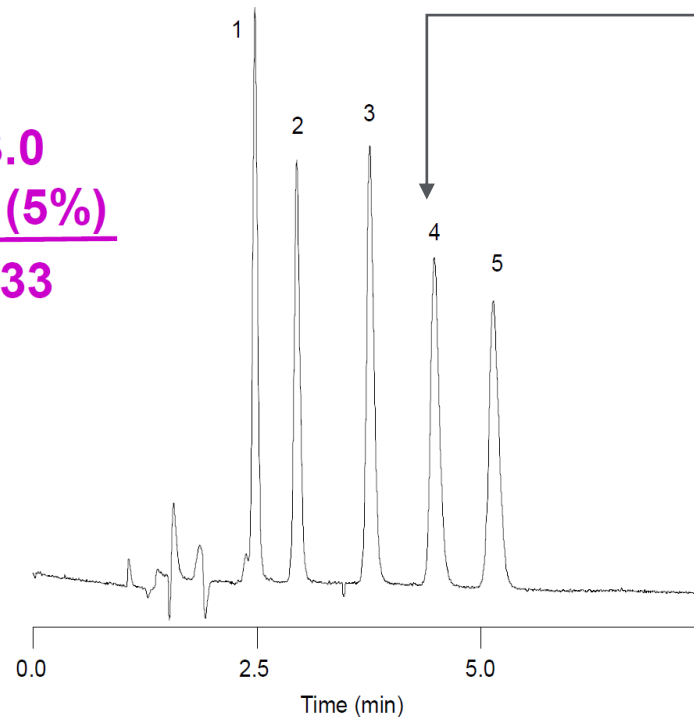
テーリング



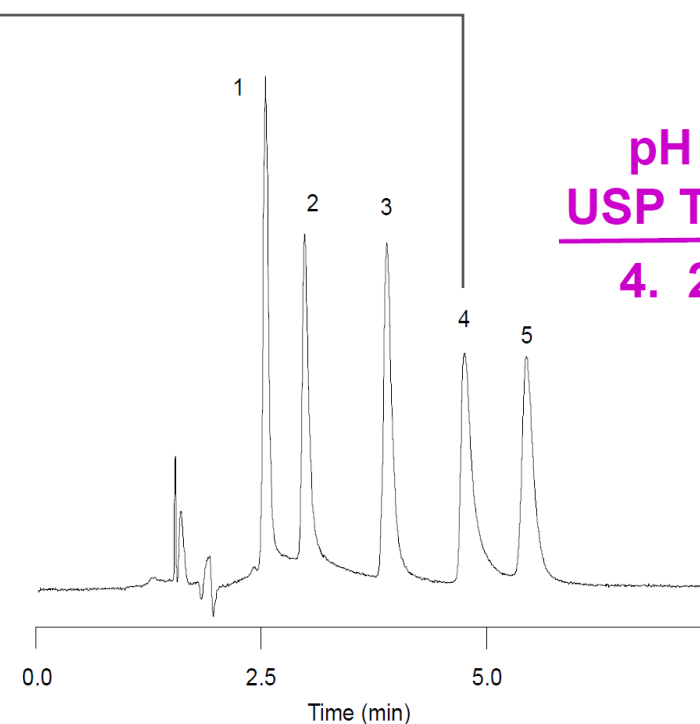
2次的な相互作用

- カラムの汚染 (サンプル、移動相)
- カラムの劣化
- サンプルの過剰負荷
- 接続不良

pH 3.0
USP T_f (5%)
4. 1.33



pH 7.0
USP T_f (5%)
4. 2.35



カラム外拡散がクロマトグラムに与える影響



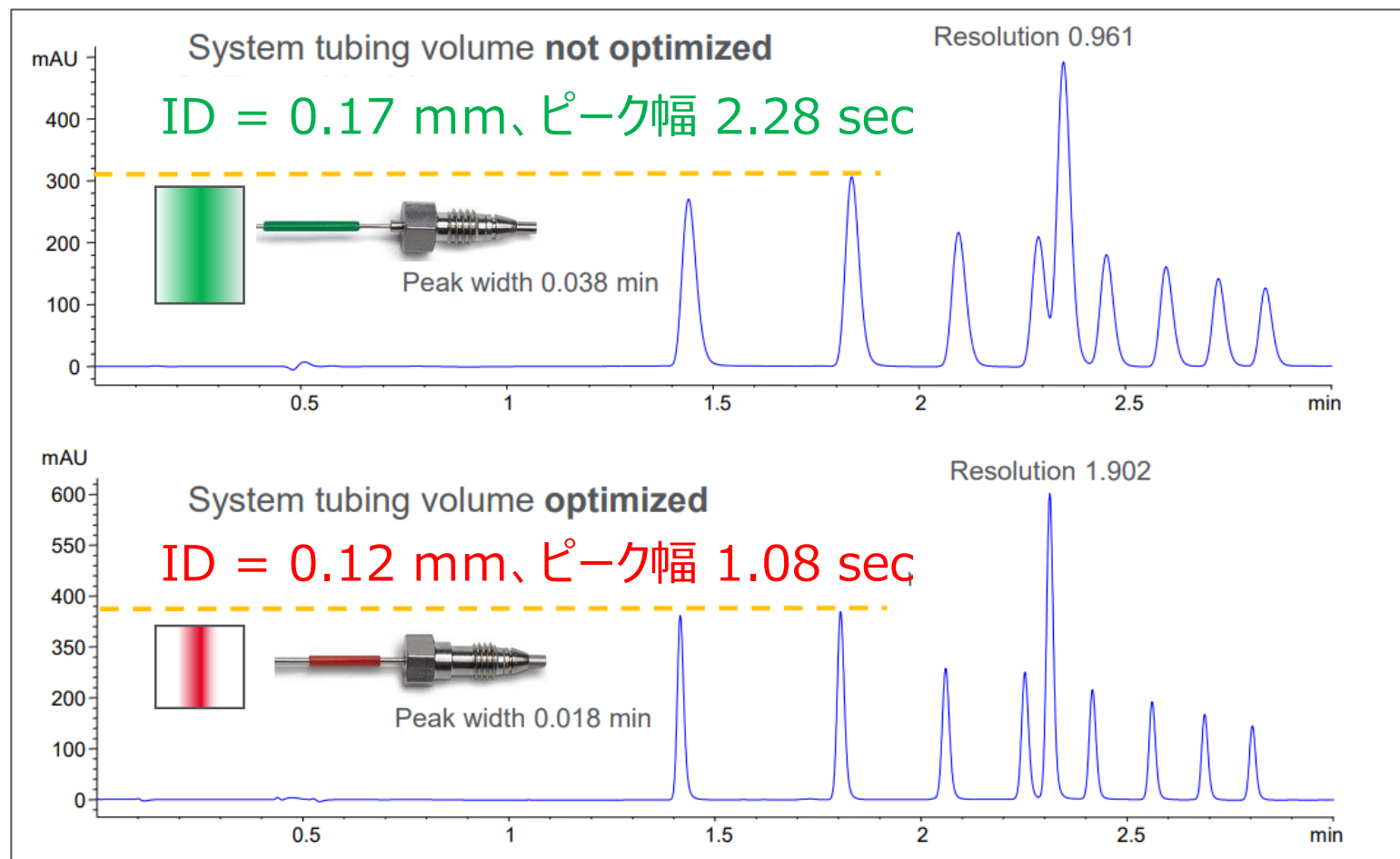
検出器

カラム

サンプラー

ポンプ

カラム外拡散



LC Capillaries and Fittings

トラブルシューティング: クロマトグラムの異常

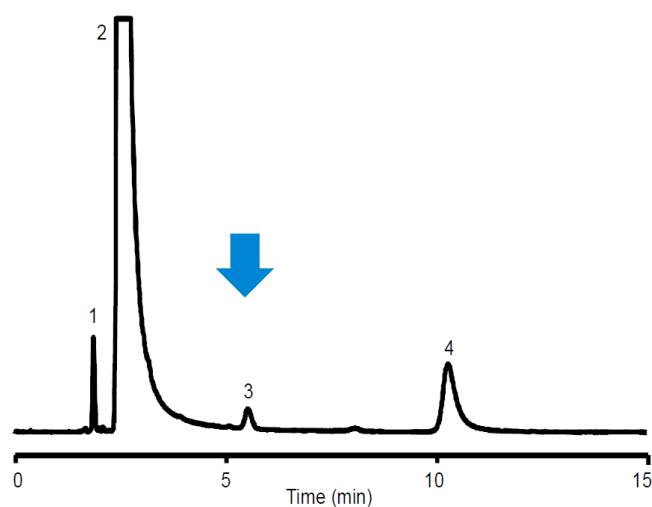
ピークのスプリット



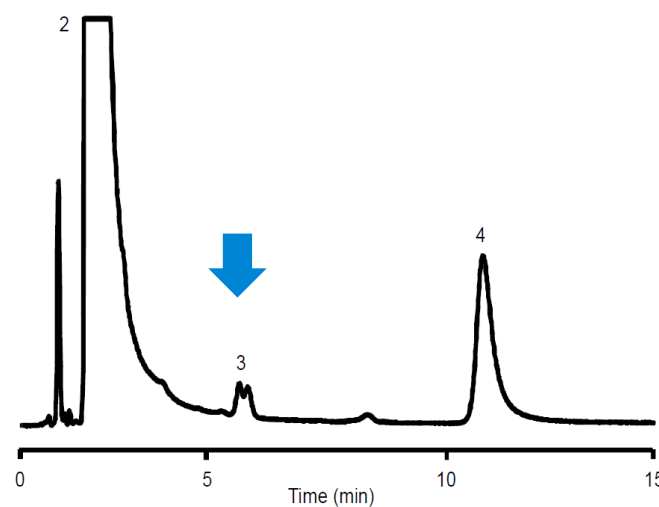
サンプル由来の汚れがカラムに蓄積
→カラムの洗浄で回復

予防：ガードカラム、サンプル前処理

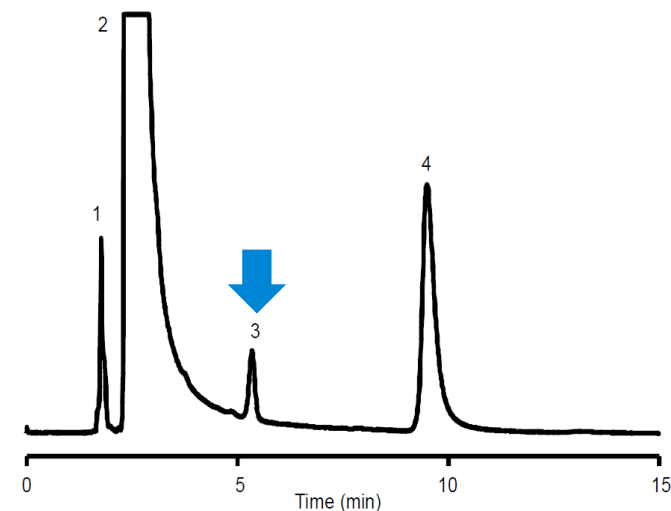
測定1回目



測定30回目



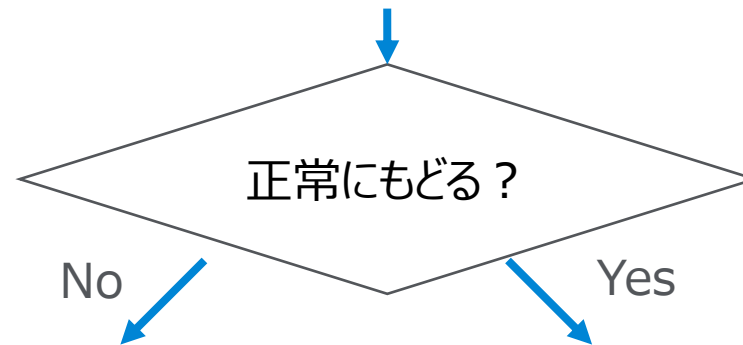
カラム洗浄後の測定1回目



トラブルシューティング: 圧力の上昇



HPLCシステムからHPLCカラムを外す



原因はシステム
異常個所を特定

原因はカラム
ガードカラム交換
インラインフィルター交換
カラム逆洗浄※

※逆洗浄前にカラムのユーザーガイドをご確認ください。

HPLCカラムのトラブルシューティング まとめ

現象の確認



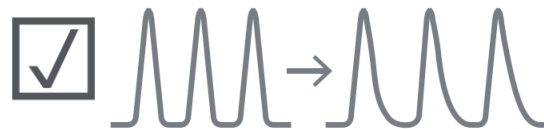
原因を**推定**



原因を取り除く



テーリング



ピークスプリット



ブロード



圧力上昇



[LC Troubleshooting Guide](#)

Q & A



Agilent

Trusted Answers