

# こんな時はどうすれば？実例から学ぶ カラムトラブル対処法

クロマニックテクノロジーズ  
塚本友康 小山隆次 長江徳和

**Email: [info@chromanik.co.jp](mailto:info@chromanik.co.jp)**

**<http://chromanik.co.jp>**





# ダブル発生！どうする？

分離が・・・ 保持が・・・ 圧力が・・・

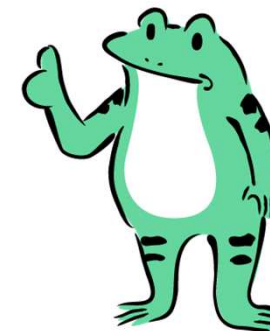
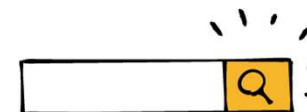


対処する場合は・・・

経験を元に対処

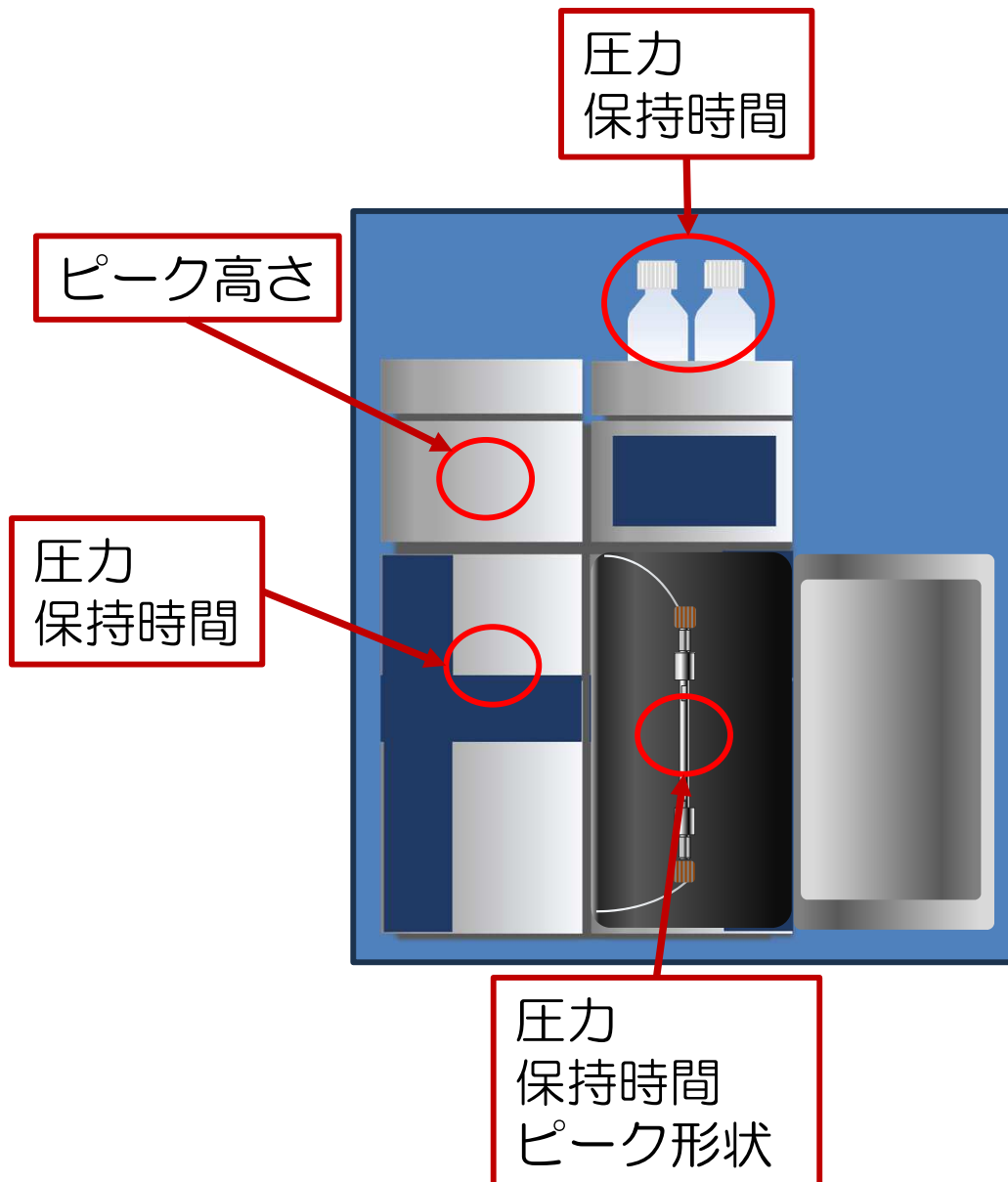
ネットで検索

メーカーに質問





# トラブルと要因



圧力や保持変化は様々な理由で起きやすいトラブル



同じ内容のトラブルでも原因がどこにあるかわかり難いことが多い

※場合によっては、ランニングプログラムが原因になることも・・・



# プログラムが原因の実例



起きたトラブル

保持時間の再現性が取れない

日内の再現性がない(分析のたびに保持時間が変化)

日間の再現性はある(同じように変化する)

原因

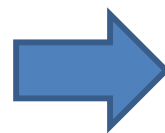
プログラムでオーブンがoffとなる  
設定になっていた



# 実際に多いのは・・・

- 再現性が取れない

- 保持時間
- 耐久性
- 分離パターン



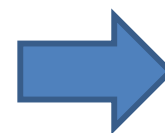
カラム交換時に  
トラブル起きやすい

充填剤バッチが変わるから？  
実際は・・・

同じバッチでも起こっている



- 圧力変化
- ピーク形状変化



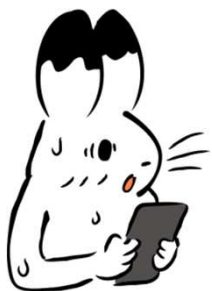
分析を繰り返した後  
起きやすい

カラムの劣化？  
数日の使用で起きている



# 実例 1

起きたトラブル



使用した次の日に圧力が上昇した

使用カラムはC18

分析回数はそこまで多くない

注入試料は、溶媒抽出した物（その他の処理はなし）

対策

有機溶媒の割合の多い移動相での逆洗浄

原因

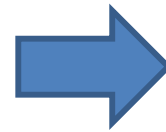
注入試料由来の吸着物質による圧力上昇





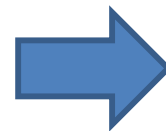
# 圧量上昇の要因

- フィルター詰まり
- 吸着物質の蓄積
- 塩の析出



サンプルや移動相  
由来の原因

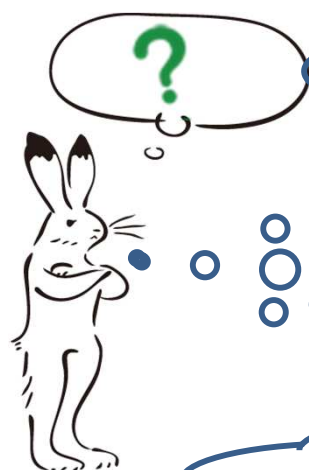
- 温度変化
- 移動相組成の変化
- カラム充填圧の違い
- 配管の内径の違い



条件変化が原因



# カラム洗浄



逆洗浄して良いの？

何を流せば良い？

グラジエントで有機溶媒100%にしてるけど・・・

## 逆洗浄

- 1, 2回したからといってすぐに劣化する可能性は低い
- 流速や圧力には注意が必要
  - 流速は使用時の半分ほどにすると圧力が高くなりすぎることはない

## 洗浄溶液

- カラムにおける溶出力の強い溶媒を選択
- ※C18カラムの場合70~80%ほどテトラヒドロフラン  
洗浄時は汚染予防のために検出器にはつながない方がよい





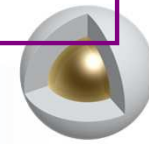
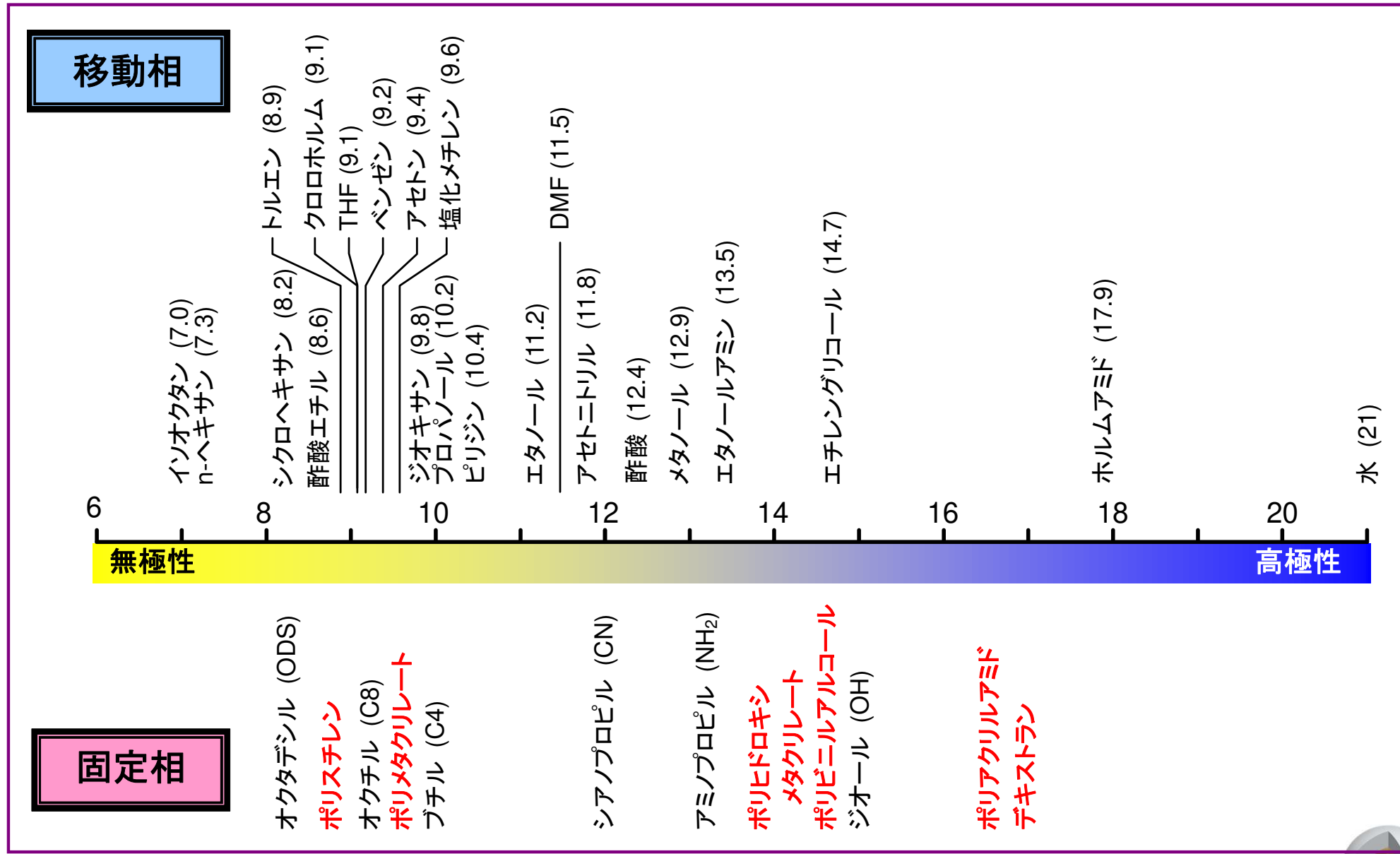
# 代表的な移動相溶媒の極性

溶 媒	極性	溶解パラメータ $\delta$	log P	粘 度 $\eta$	
n-ヘキサン	低い	7.3	3.90	0.32	
酢酸エチル		8.6		0.45	
トルエン		8.9	2.73	0.59	
テトラヒドロフラン		9.1	0.46	0.55	
アセトン		9.4	-0.24	0.36	
塩化メチレン		9.6	1.25	0.44	
エタノール		11.2	-0.31	1.20	
アセトニトリル		11.8	-0.34	0.37	
酢酸		12.4		1.26	
メタノール		12.9	-0.77	0.60	
水		高い	21.0		1.00





# 移動相の溶解パラメータ・と固定相の極性





## 実例 2



起きたトラブル

耐久性の再現性が取れない

使用カラムはC18  
分析条件はアルカリより  
1本目のカラムでは満足いく耐久性だった  
早く劣化した二本目のカラムは使用履歴があったが  
使用回数は少ない

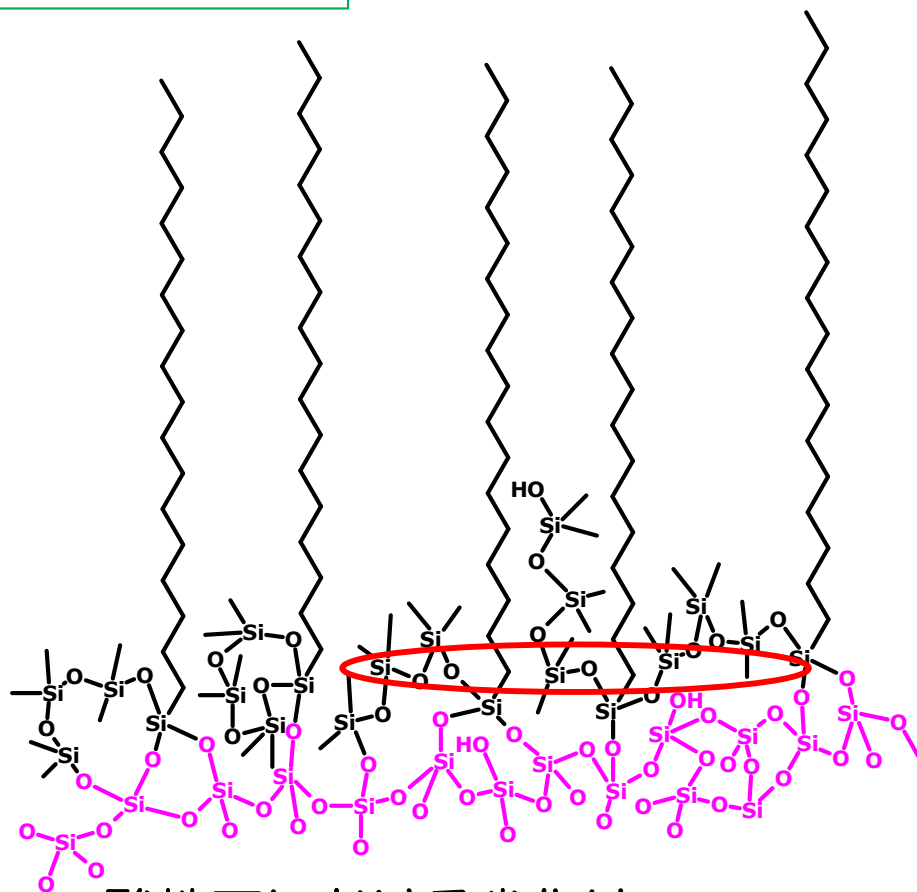
原因

酸性条件下で使用後に  
アルカリ性条件で使用した事



# 劣化の仕方の違い

## 酸での劣化

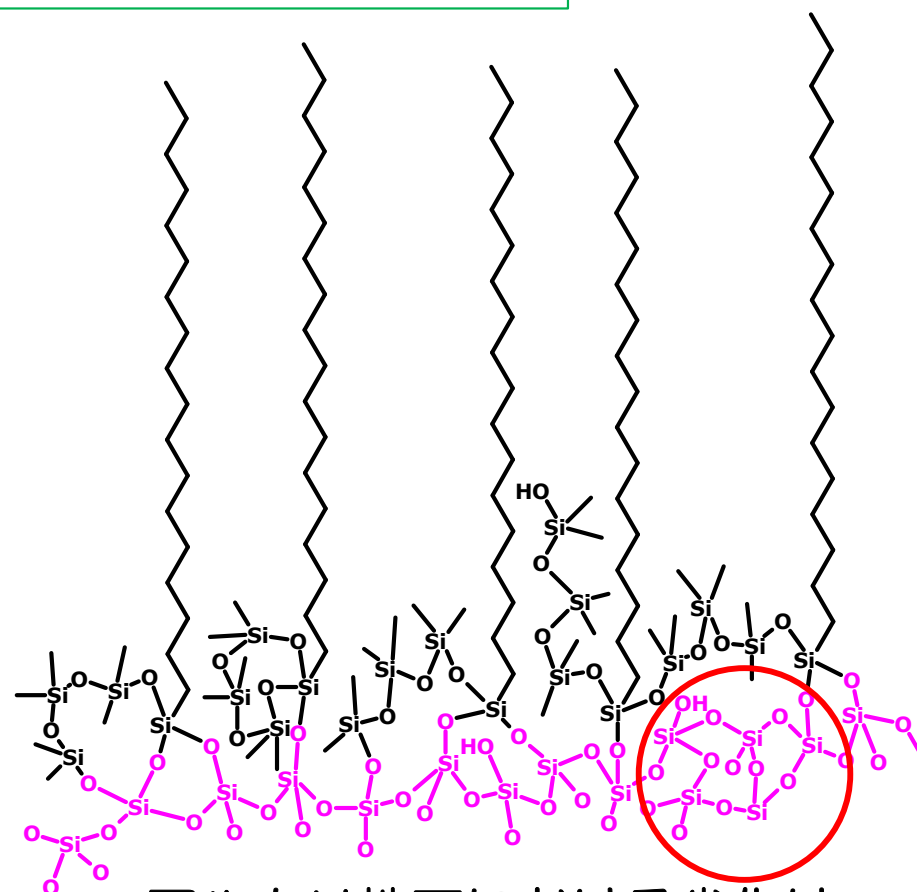


酸性下における劣化は  
C18の結合部に対する加水分解



C18基やエンドキャップの脱離

## アルカリでの劣化



アルカリ性下における劣化は  
シリカに対する加水分解



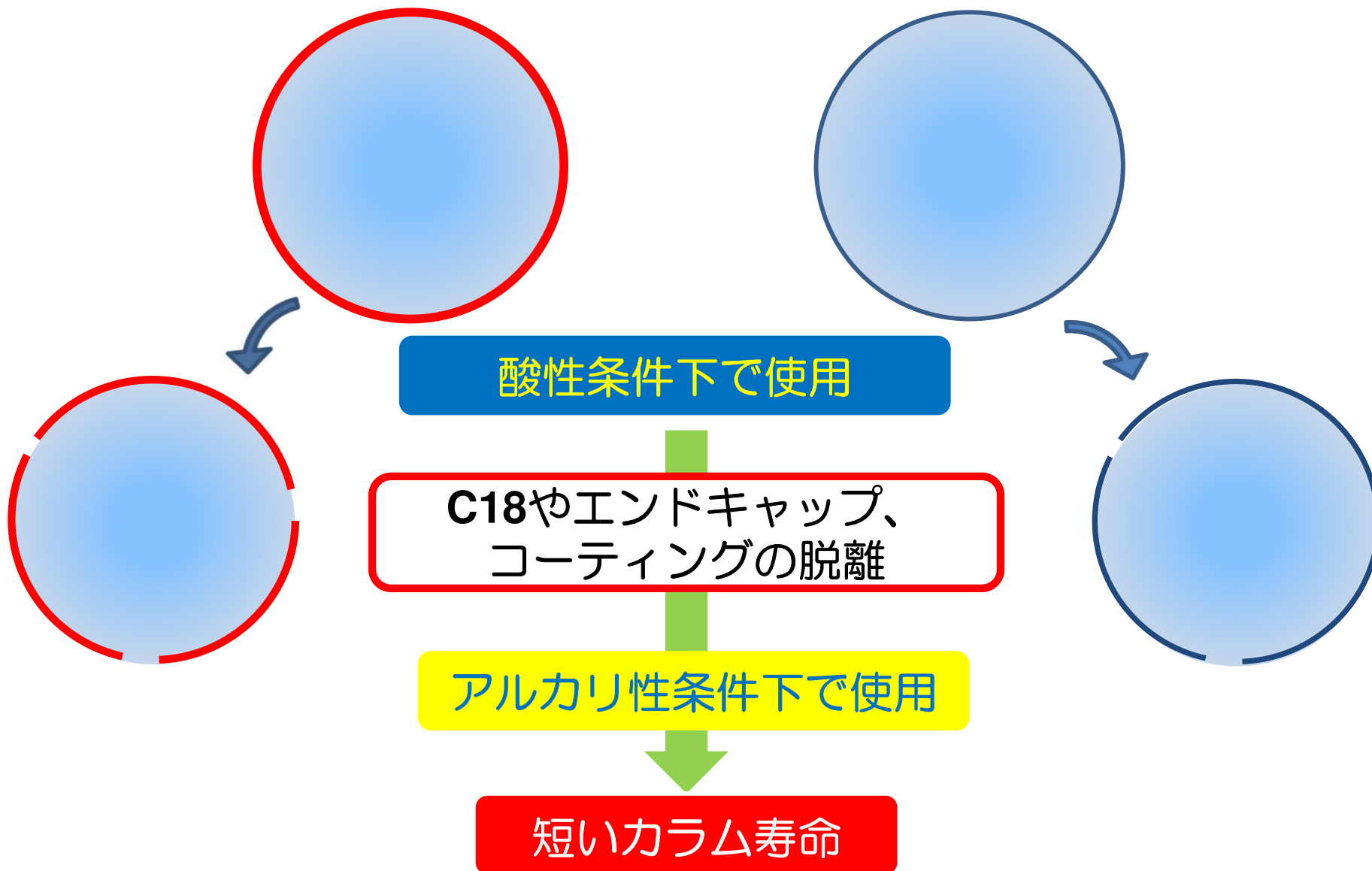
シリカの溶解



# 酸性条件からアルカリ性条件に変更すると

コーティング

エンドキャッピング





# カラムを長く使うために・・・

酸、アルカリ性移動相で使用

カラムを洗浄

毎回洗浄するのは・・・



酸、アルカリ性移動相で使用

カラムを低温で保存

※温度が下がることで溶解度が低下し、塩が析出する可能性があるため塩濃度が高い移動相では注意が必要

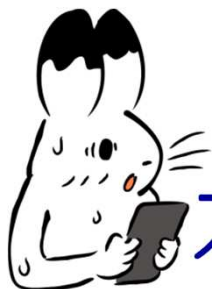
使用する塩の種類を変える

使用する塩によっても劣化の仕方が変わる。  
特にリン酸系のバッファは劣化が早いと言われている



# 実例 3

起きたトラブル



カラムの性能が期待通りにならない

使用カラムはC18

その前は別メーカーのカラムを使用

金属フェラルでカラムを接続

原因

カラム接続時に微妙な隙間が  
できてしまった事



# エンドフィッティングの違い



Ferrule Type	ネジ部の長さ	ポートの深さ	主な用途
WATERS	0.320"	0.130" (3.30mm)	送液系・カラム接続
SWAGELOK	0.225"	0.090" (2.29mm)	送液系・カラム接続
PARKER	0.210"	0.090" (2.29mm)	送液系・カラム接続

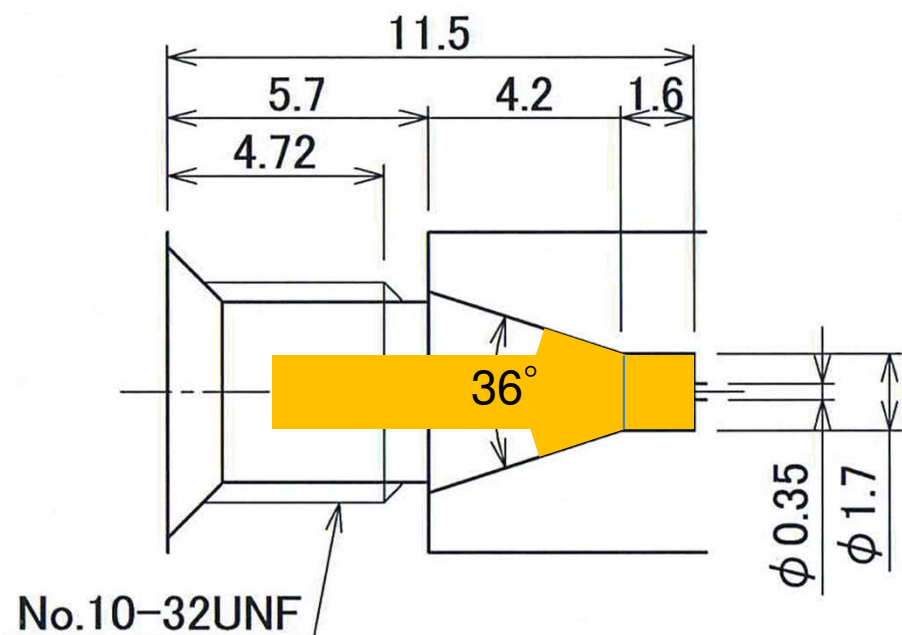
カラムの接続時には、注意が必要。  
カラムエンドの種類を確認を・・・



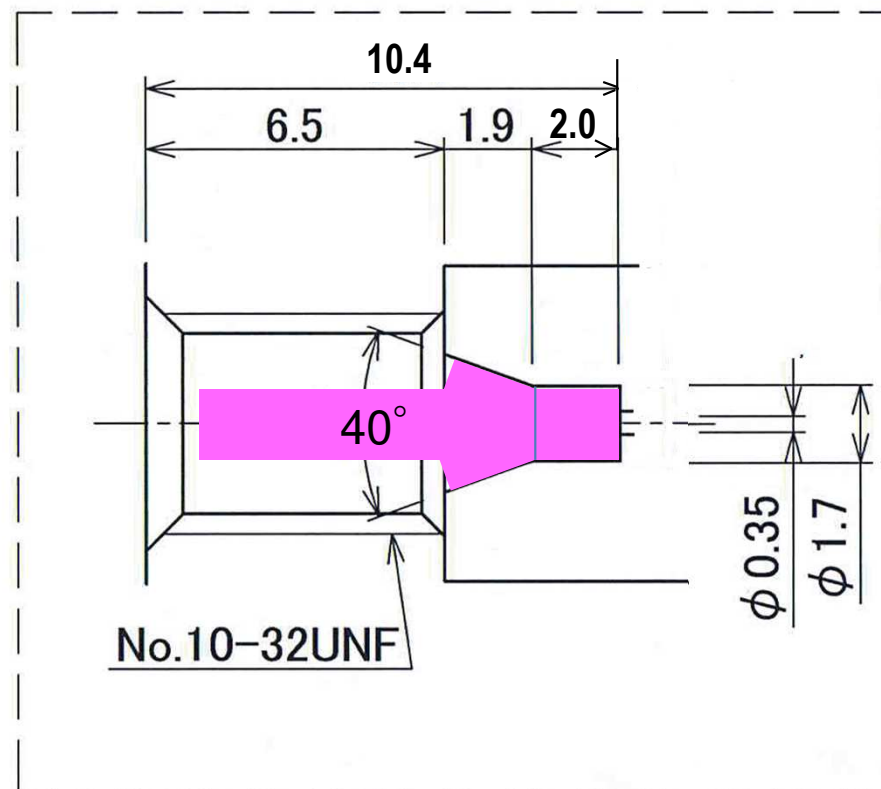


# エンドフィッティングの違い2

A社 接続部



パーカータイプ 接続部  
(IDEX社 IsoBar)



それぞれの接続に金属フェラルと  
1/16"チューブで接続した状態

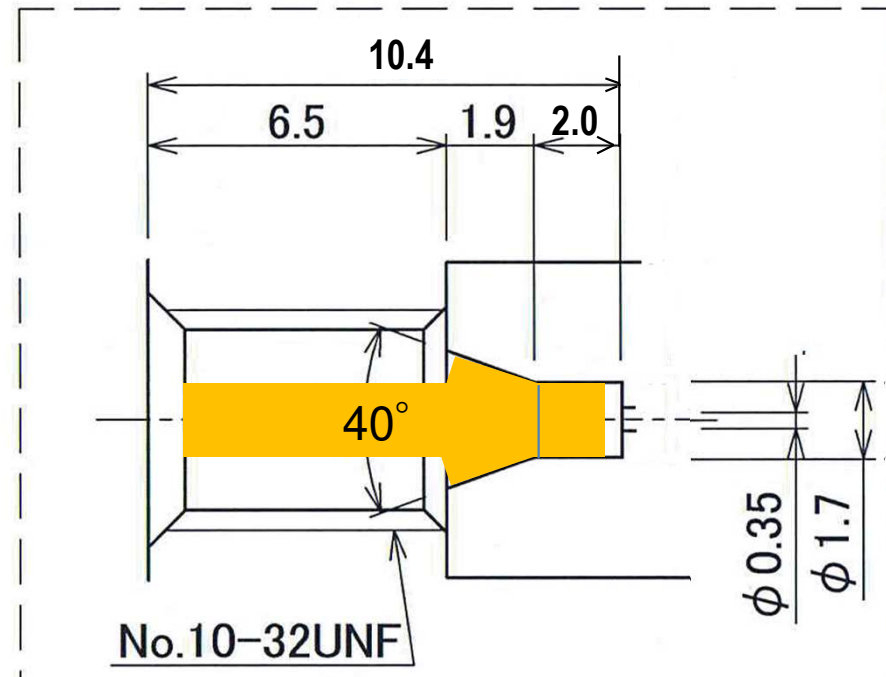
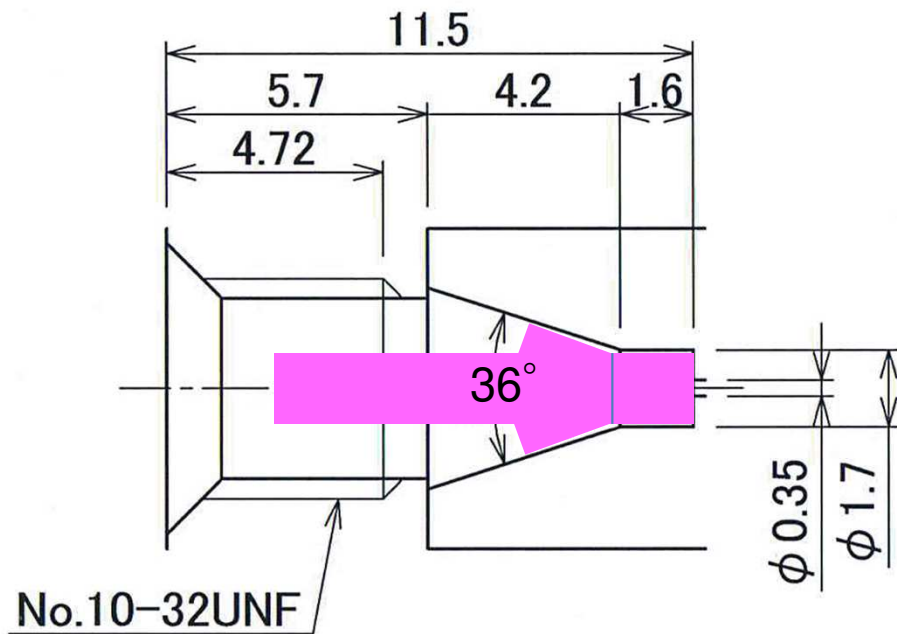


A社カラムにパーカータイプ配管を接続した場合

パーカータイプカラムにA社接続用の配管を接続した場合

### A社 接続部

### パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar)



A社カラム接続はテーパ角度が小さいため、フェラルの後部で締まり、デッドボリュームはできません。

パーカータイプカラム接続はフェラル先端で締まり、チューブ先端に隙間ができ、ピークが広がる。

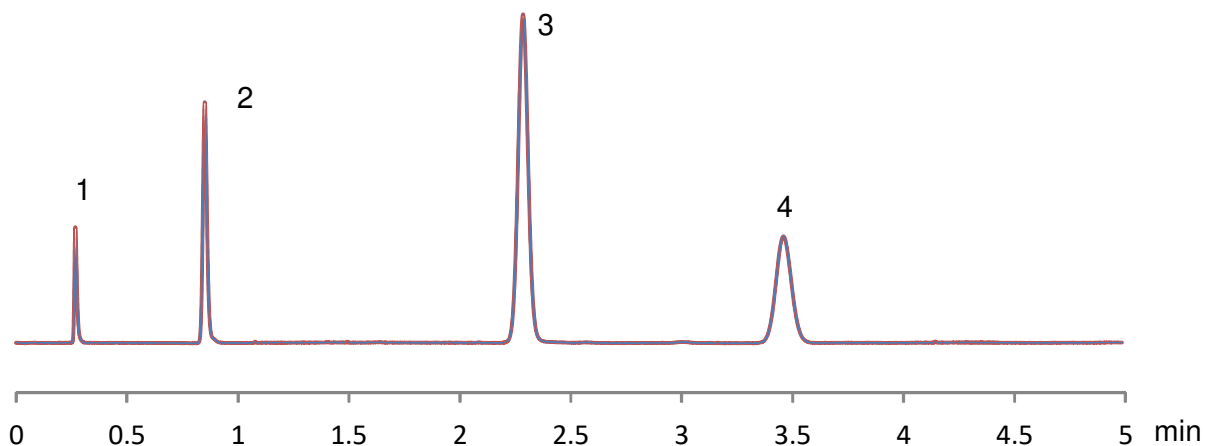


# フェラルを必要としない接続



Next Generation  
UHPLC Connection  
Technology

耐圧：130MPa  
メタルフリー対応



Connecting tube

Injector→Column: Marvel X, 0.075 mm i.d., 350 mm length

Column→Flow cell of UV: Marvel X, 0.075 mm i.d., 150 mm length

Column: SunShell C18, 2.6 μm 50 x 2.1 mm

Mobile phase: Acetonitrile/water=60/40, Flow rate:0.30 mL/min

Temperature: RT, Detection: UV@250 nm, Injection volume: 0.4 μL

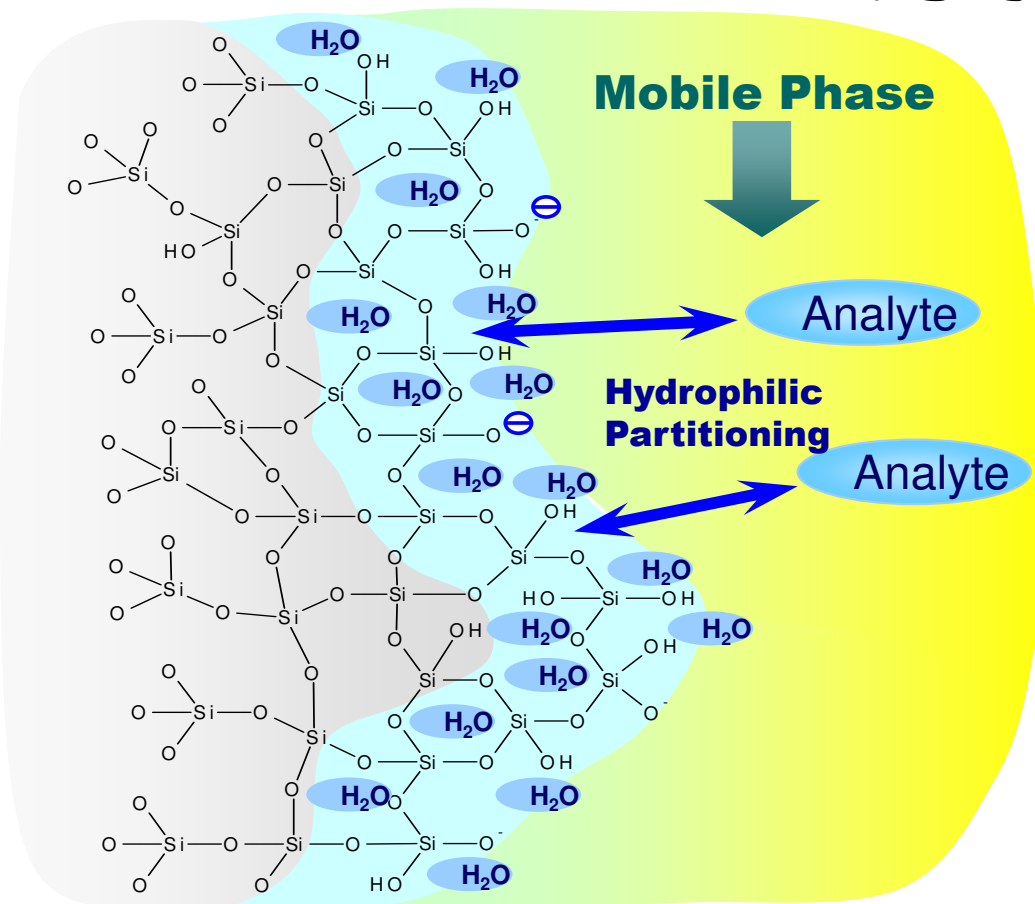
Sample: 1=Uracil, 2=Ethylbenzene, 3=Acenaphthene, 4=Butylbenzene

SunShell C18 2.6 μm, 50 x 2.1 mm

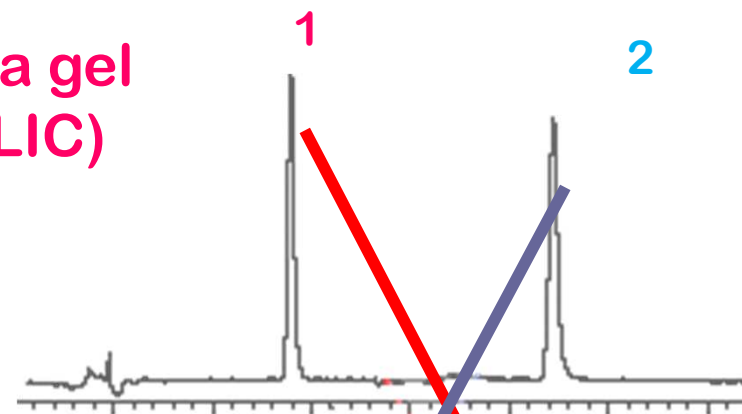
	Peak No.	SUS	Marvel X
Efficiency	1	1107	2614
	2	6852	10146
	3	10976	11907
	4	10768	11129
Tailing factor	1	0.939	0.913
	2	1.320	1.210
	3	1.057	1.037
	4	1.041	1.051
Peak width, h <sub>0.5</sub> (min)	1	0.0201	0.0124
	2	0.0246	0.0199
	3	0.0513	0.0493
	4	0.0783	0.0772



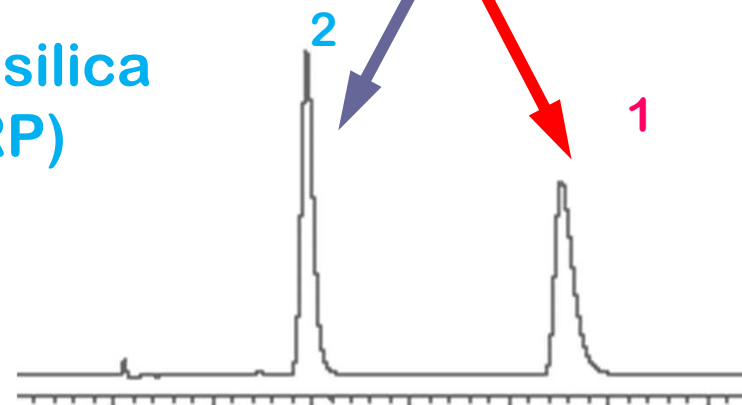
# HILICの分離メカニズム



Silica gel (HILIC)



ODS silica (RP)



## □ HILICの特徴として…

- 逆相系に用いる極性溶媒が使用可能である。
- 固定相に形成された水和層との分配によって分離が起こると言われている。
- 親水性が高い化合物ほど保持される特徴がある。



# HILICカラムをいざ使用してみると・・・

- 考えていたものより・・・

保持が短い？保持しない

保持時間の再現性が・・・

理論段数が低い気が・・・



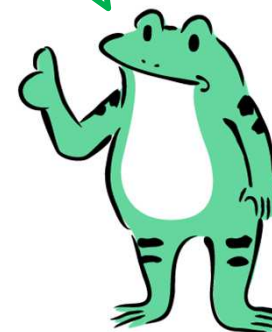
**HILIC**はどうも使いづらい



# HILICを使用するうえでの注意点

- 保持が短い・保持がない場合
  - サンプル
    - 移動相もしくは水割合が低い溶媒で調整する
  - 移動相
    - 有機溶媒の割合を増やす
    - 塩の濃度を上げる、塩の種類を変える
- 理論段数が低い場合
  - サンプル
    - 負荷量を減らす
  - 移動相
    - 流速を遅くする

試料が水に溶解しやすいため  
意外と水で調整しがち



逆相クロマトグラフィーと比べ、試料中の溶媒(水)の影響を大きく受ける傾向がある  
最適流速も逆相クロマトグラフィーより、低速になる傾向がある



# 实例4



起きたトラブル

保持時間の再現性が取れない

使用カラムはAmide  
分析するごとに保持時間がずれる  
日間での再現性はある

原因

サンプル負荷によるベースラインの乱れ



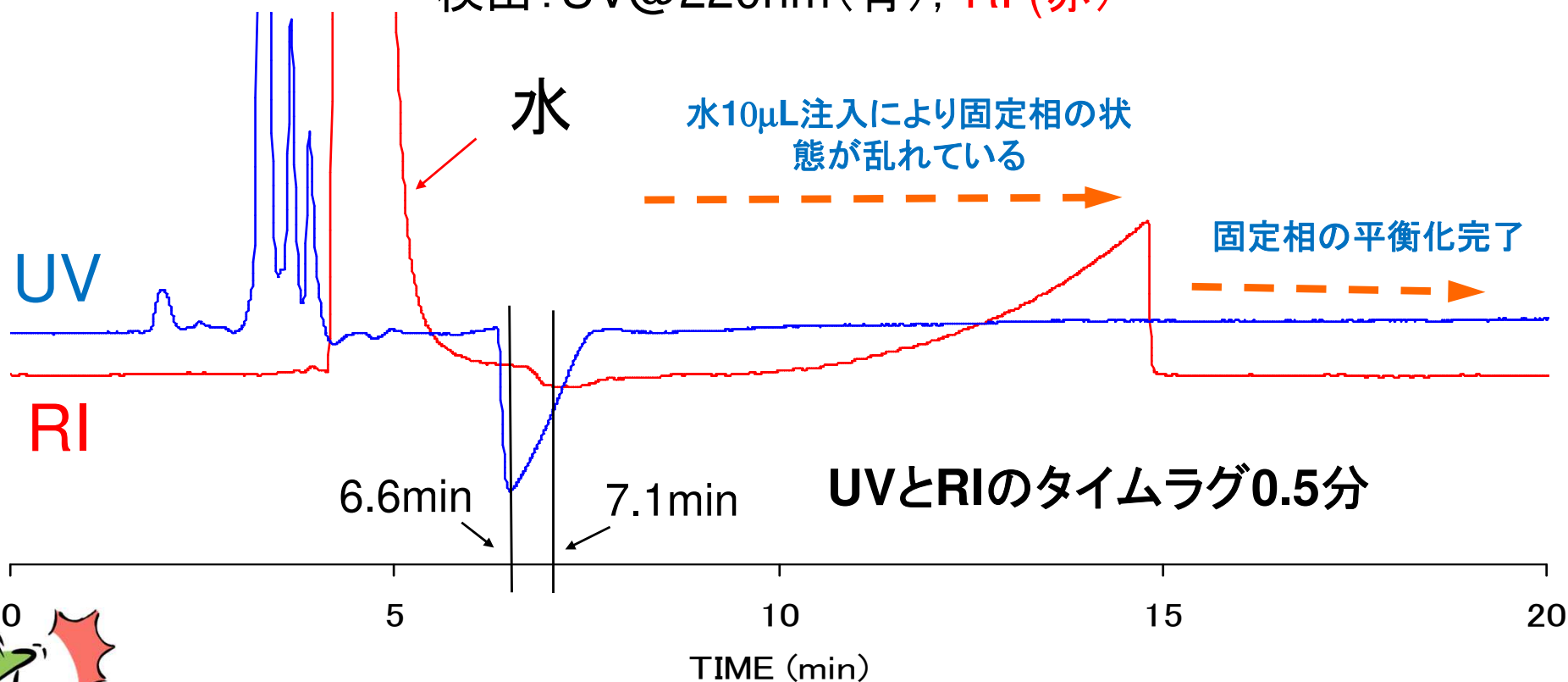
UVで見てるけどそんなことはないけど



# 水10 $\mu$ L注入時のヒリックカラムのクロマトグラム

移動相: 5mM酢酸アンモニウム/アセトニトリル(20:80)

検出: UV@220nm(青), RI(赤)



UVでは観察できないベースラインの変化が起きている!!





# 实例5



起きたトラブル

カラム間の再現性が取れない

使用カラムはアミノカラム

糖分析に使用

移動相はアセトニトリルと水の混合溶液

原因

移動相の使用履歴の違い



# 手順

**acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15**

— 平衡化

— プリン体分析

**acetonitrile : 20 mM phosphate buffer (pH6.8) =85:15**

— 平衡化

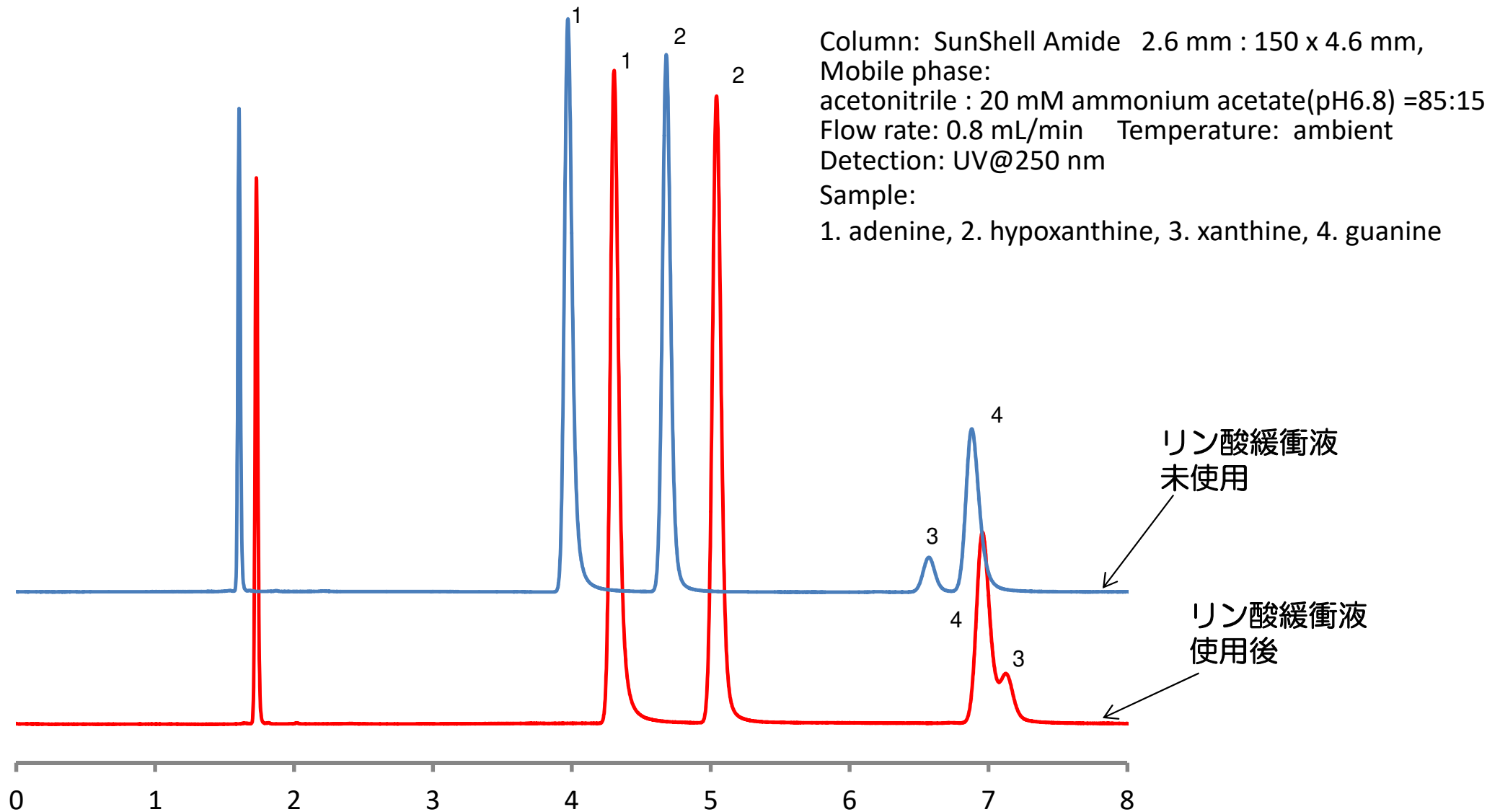
**acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15**

— 平衡化

— プリン体分析



# 移動相の使用履歴の影響



移動相の使用履歴によってはその影響が強く残り分離が変わることがある



# まとめ

- ✓ 吸着物質、フィルターの詰まり等が圧力上昇の原因である時、溶出力の強い溶媒を用いた洗浄を行うことで元に戻すことができることがある。
- ✓ カラムを長く使うためには、酸、アルカリなど条件ごとに使い分けることが必要な場合がある。
- ✓ カラム接続時には、使用するカラムの形状に注意する。場合によっては、フェラルを使用しない固定法を使うのも効果的である。
- ✓ PFPカラムはHILICモードを発言しない。
- ✓ HILICモードで連続分析を行う時、インジェクションによるベースラインの乱れを考慮する必要がある。
- ✓ カラムによっては、移動相の使用履歴により分離に変化起きる場合があるため注意が必要である。

