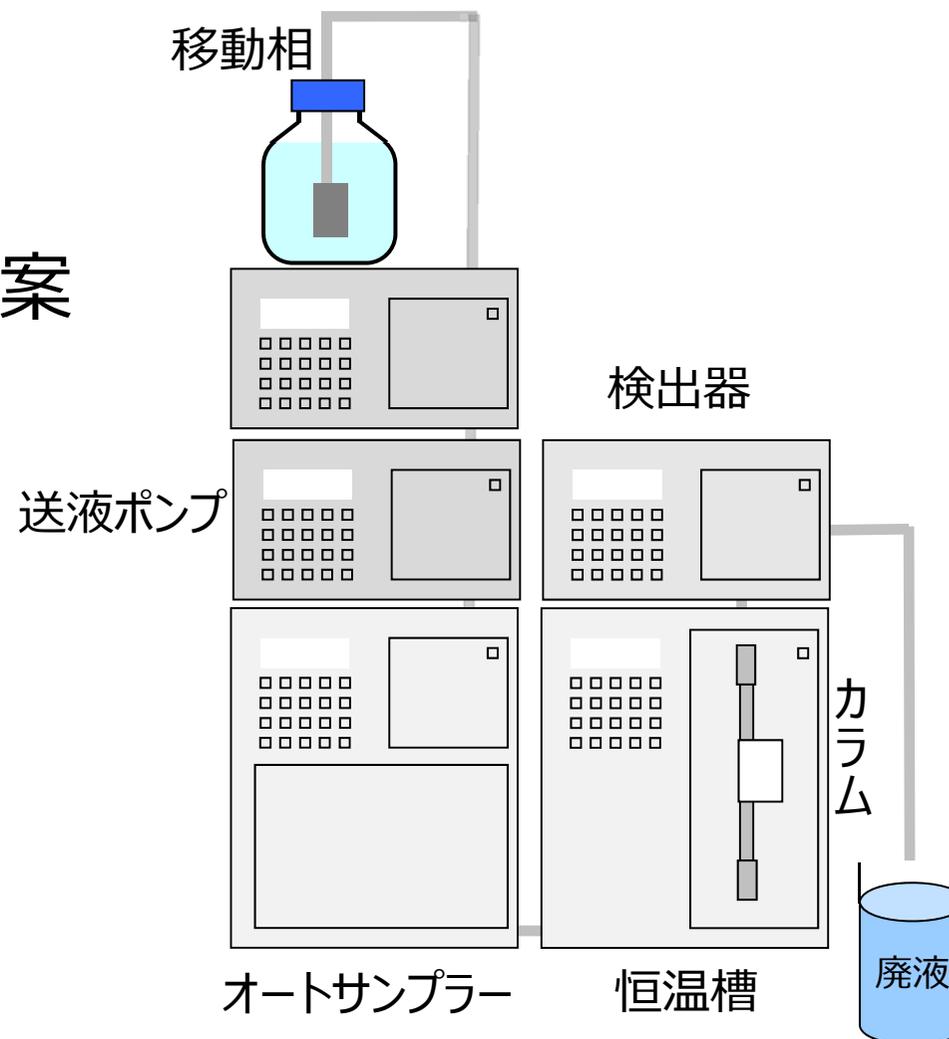


これだけは知っておきたい!
逆相HPLC・LC/MS分析を
明日から使いこなすためのノウハウと
トラブルシューティング

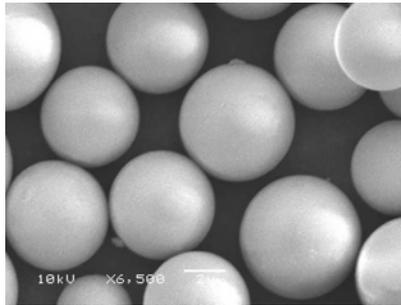
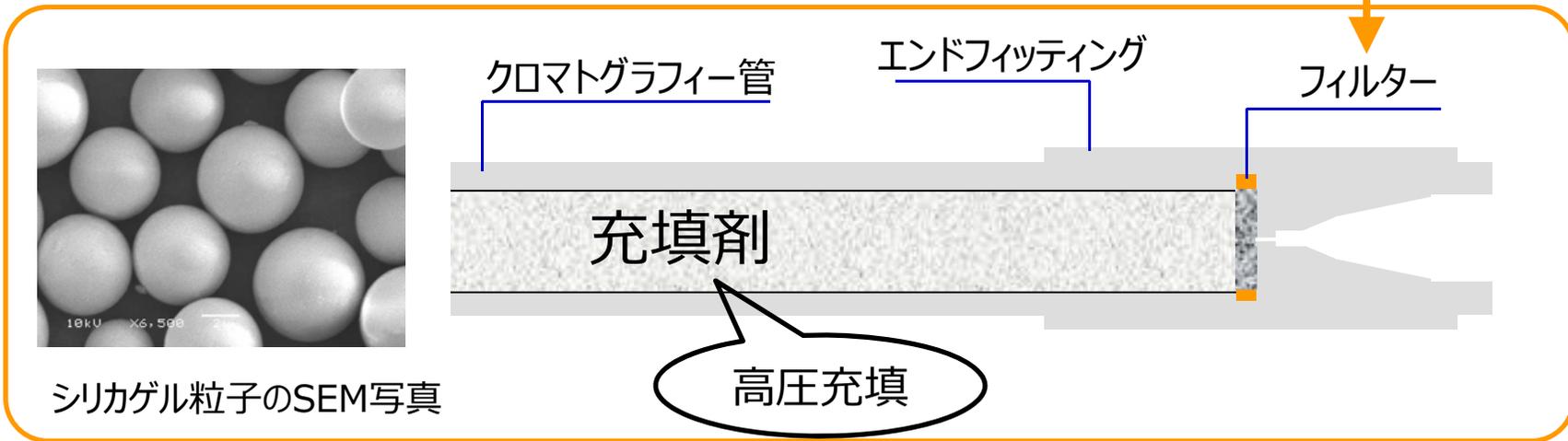
一般財団法人化学物質評価研究機構
クロマト技術部

ノウハウやトラブルシューティングのご紹介

1. カラム
2. 移動相
3. よりよい分析メソッドへの提案
4. ご案内

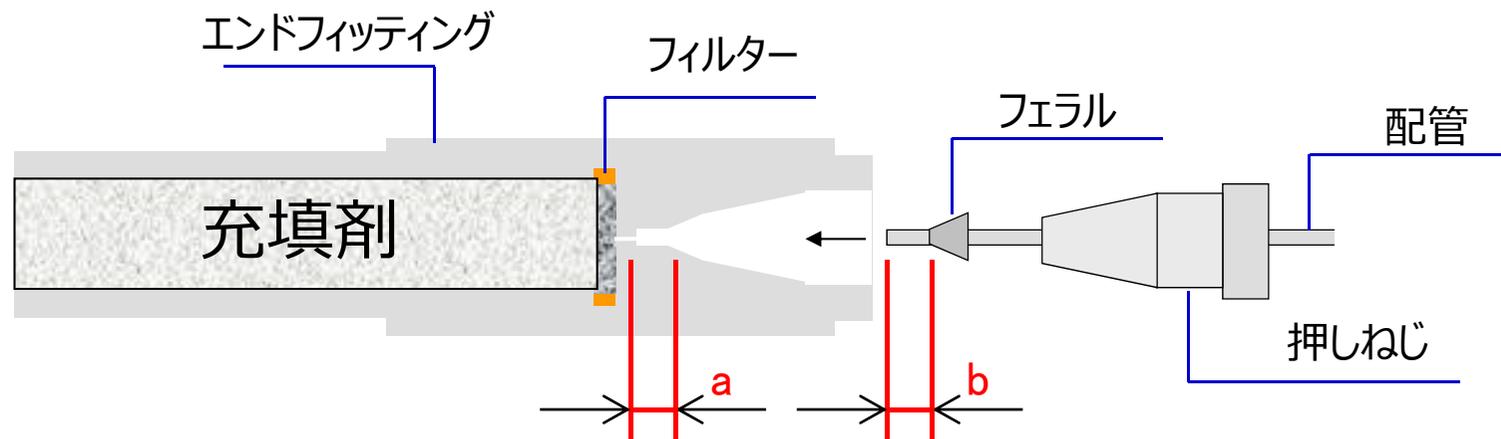


カラムの構造



シリカゲル粒子のSEM写真

- 【クロマトグラフィー管の材質】
- ステンレス
- ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)
- ガラスライニングステンレスetc

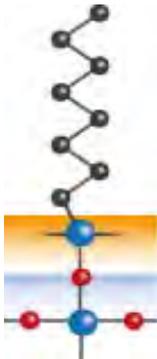


接続タイプ名※	a、b の長さ※※
Watersタイプ	3.5 mm
島津タイプ	2.3 mm

※一般的な呼称、※ ※長さは実測であり、あくまでも参考値です

- 接続タイプを合わせる、またはPEEK製などのタフコネクターを使用
- 「a」、「b」の長さが異なる→液漏れ、デッドボリュームの発生またはピーク形状の悪化

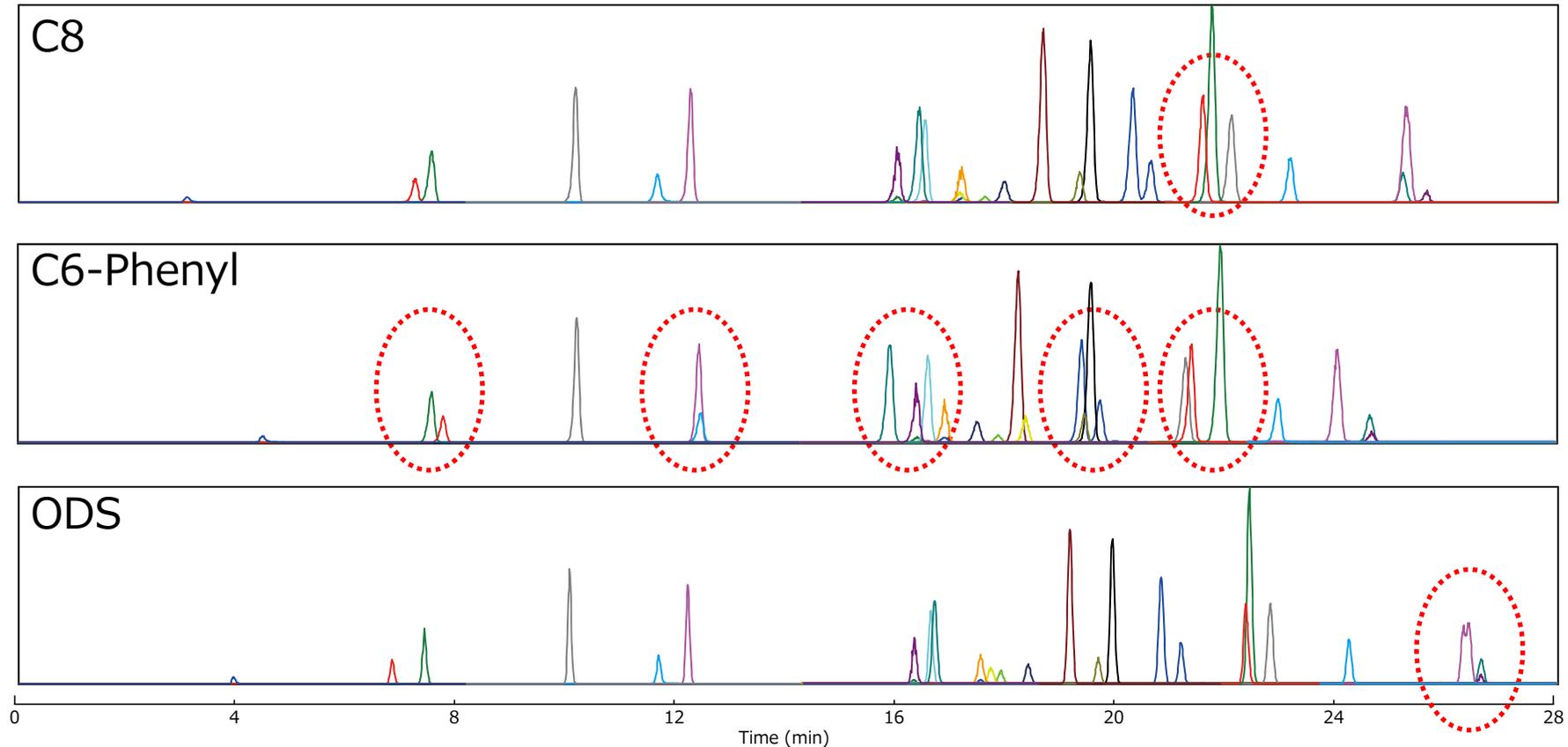
L-column シリーズのラインアップ

製品名	L-column ODS L-column2 ODS New L-column3 C18	L-column C8 L-column2 C8	L-column2 C6-Phenyl
分離機構	疎水性相互作用	疎水性相互作用	疎水性相互作用 + π - π 相互作用
修飾基	 Octadecyl (C18)基	 Octyl (C8)基	 Phenyl-Hexyl (C6-Phenyl)基
粒子径(μm)	5、3、2	5、3	5、3
比表面積	340 m^2/g 全多孔質性	340 m^2/g 全多孔質性	340 m^2/g 全多孔質性
用途	ファーストチョイス	分析時間短縮	分離の改善

充填剤の違いによる分離パターンの比較

水道水の水質管理目標設定項目

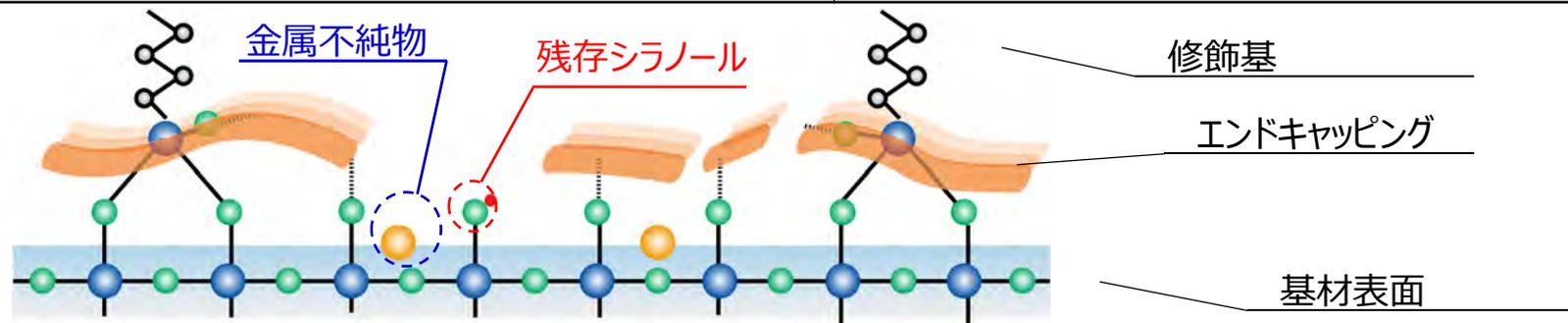
別添4（最終改正平成25年3月28日健水発0328第4号）の、別添方法18



ODSカラムやC8カラムと比べてC6-Phenylカラムの分離パターンが大きく異なる

エンドキャッピングの重要性

エンドキャッピング ✕ (残存シラノールが僅かに存在)	エンドキャッピング ◎ (残存シラノール≒0)
塩基性物質、配位性化合物が テーリング、不検出	塩基性物質、配位性化合物が シャープに検出
ロット間差が大	ロット間差が小
低耐久性	高耐久性

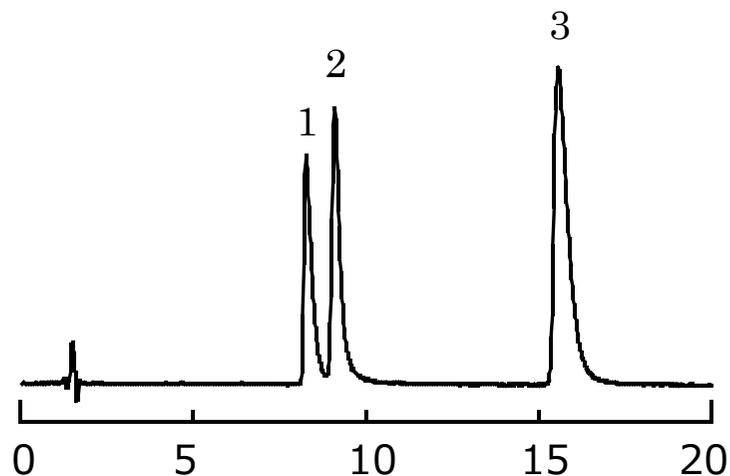
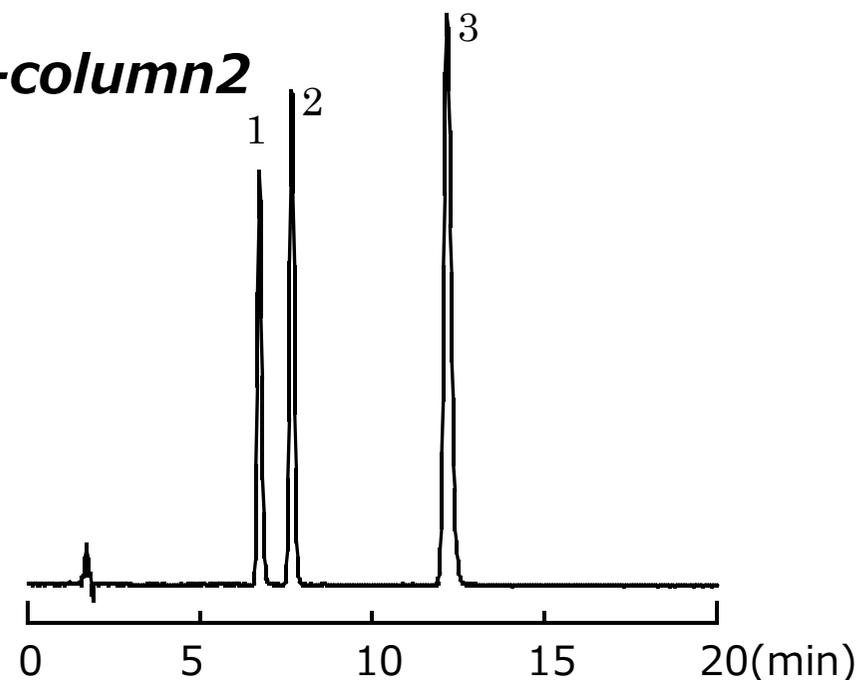


使いやすいカラムであるためには
エンドキャッピングが優れていることが基本

エンドキャッピングの差による分離・ピーク形状の違い

Application No.L2052

Brand L-1

*L-column2*

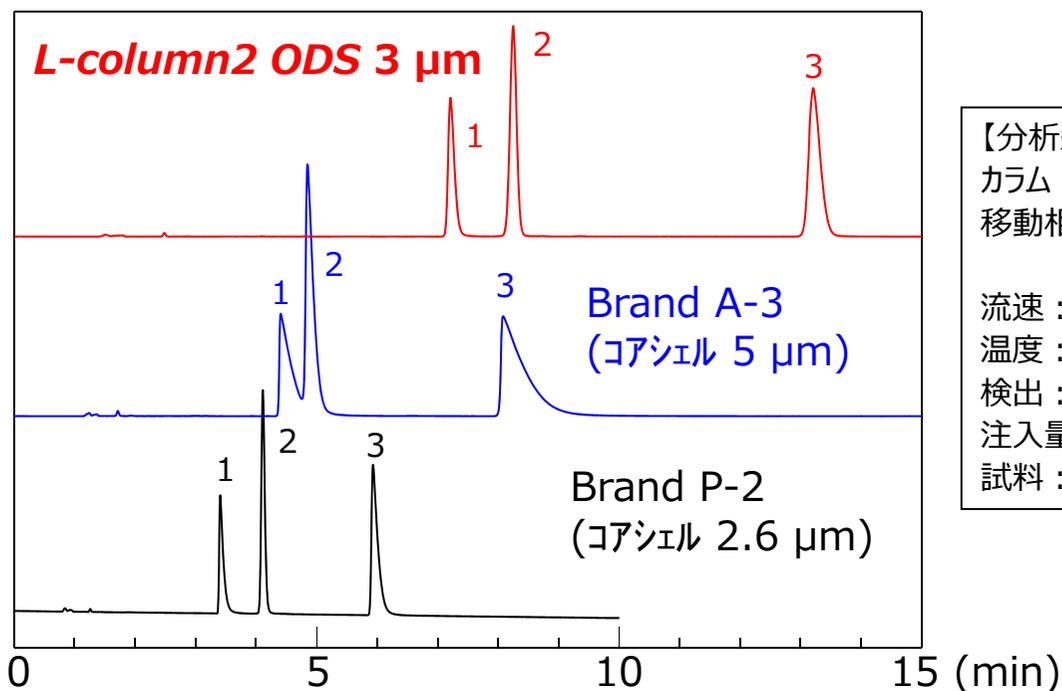
【分析条件】

カラム：C18, 5 μm , 4.6 \times 150 mm
 移動相：アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液(pH7)(35/65)
 流速：1 mL/min; 温度：40 $^{\circ}\text{C}$; 検出：UV230 nm
 注入量：2 μL
 試料：1. パロキセチン, 2. シタロプラム, 3. フルオキセチン

	$N_{(2)}$	$Rs_{(1,2)}$
Brand L-1	6400	2.05
<i>L-column2</i>	14900	3.99

エンドキャッピングが優れたカラムへ変更することで分離・テーリングが改善

L-column2 vs コアシエルカラム



【分析条件】

カラム : C18, 4.6×150 mm

移動相 : アセトニトリル

/25 mMリン酸緩衝液 (pH7) (35/65)

流速 : 1 mL/min

温度 : 40℃

検出 : UV230 nm

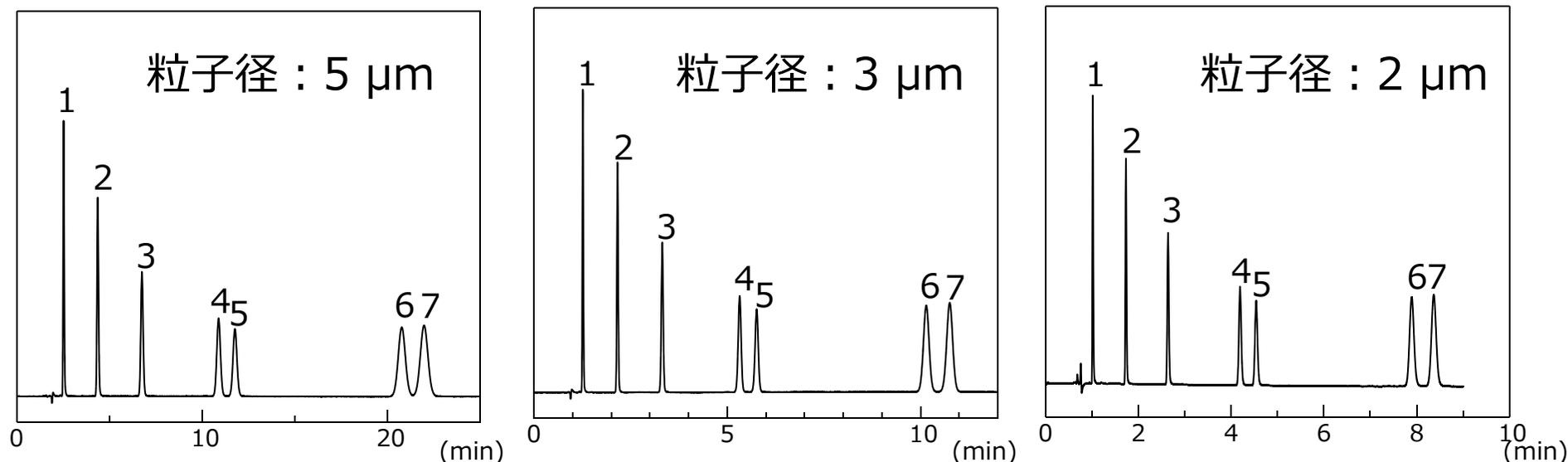
注入量 : 2 μL

試料 : 1. パロキシセチン, 2. シタロプラム, 3. フルオキシセチン

	理論段数(T.f.)		
	パロキシセチン	シタロプラム	フルオキシセチン
L-column2 ODS 3 μm	22183 (1.48)	25559 (1.03)	22141 (1.37)
Brand A-3 5 μm(コアシエル)	—	—	2154 (6.62)
Brand P-2 2.6 μm(コアシエル)	12076 (2.53)	23521 (1.24)	15254 (2.45)

コアシエルカラムでも吸着すると段数は激減⇒やはり低吸着性は重要！

充填剤の粒子径の微小化

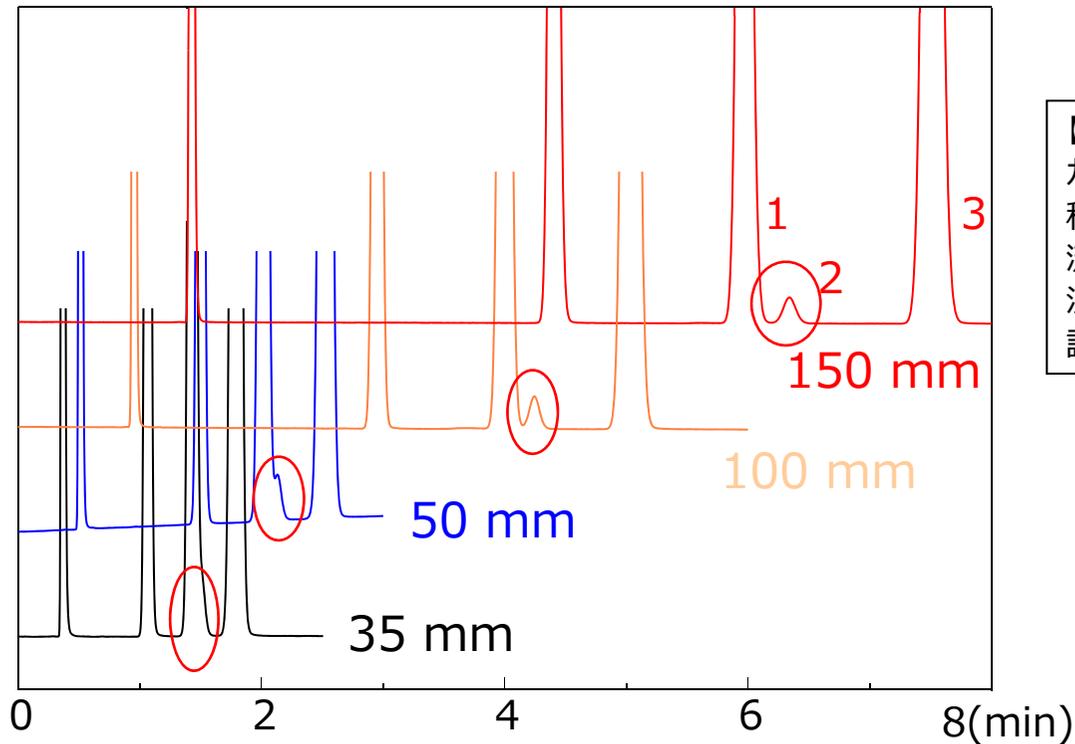


粒子径	流速(mL/min)	$t_{R(7)}$ (min)	$N_{(7)}$	$R_{S(6,7)}$	P(MPa)
5 μm	0.2	22.0	12813	1.60	4.0
3 μm	0.4	10.8	21543	2.13	23.5
2 μm	0.5	8.4	30619	2.55	54.2

【分析条件】カラム：L-column2 ODS, 2.1×150 mm; 移動相：アセトニトリル/20 mMリン酸(50/50); 温度：25℃
 検出：UV254 nm; 注入量：0.5 μL ; 試料：1. p-ヒドロキシ安息香酸, 2. p-ヒドロキシ安息香酸メチル, 3. p-ヒドロキシ安息香酸エチル
 4. p-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル, 5. p-ヒドロキシ安息香酸プロピル, 6. p-ヒドロキシ安息香酸イソブチル, 7. p-ヒドロキシ安息香酸ブチル

粒子径を小さくすると、理論段数が高くなり、分離度が向上する

カラムの長さの違いによる分離の比較



【分析条件】

カラム：L-column2 ODS 5 μm , 4.6 mm i.d.

移動相：アセトニトリル/水(60/40)

流速：1 mL/min; 温度：40°C; 検出：UV254 nm

注入量：1 μL

試料：1. トルエン, 2. 不純物, 3. ナフタレン

長さ(mm)	$R_{S(1,2)}$
35	0.47
50	0.65
100	1.69
150	1.99

カラムを長くすることで分離が改善

カラムの選択ポイント

		種類	ポイント
充填剤	修飾基	C18 C8、C4 フェニル	ファーストチョイス 分析時間の短縮 分離(π - π 相互作用)
	エンドキャッピング	TMS (多くは非公開)	塩基性物質のピーク形状
	粒子径	サブ2 μ m 3 μ m 5 μ m	高分離、スピード 汎用 汎用
サイズ	長さ	50 mm 100~150 mm 250 mm	スピード 汎用 高分離

移動相の調製

有機溶媒と水 を混合したもの

有機溶媒系	水系	添加剤
アセトニトリル メタノール テトラヒドロフラン イソプロパノール エタノール etc……	水 緩衝液※ ¹	イオン対試薬※ ² キレート防止剤※ ³

※¹ 解離性物質の分析に使用する。

※² ピーク形状が悪い、保持が弱い及び解離を抑制できない物質の分析で使用する。
イオン対を形成するアミンやスルホン酸塩などを用いる。

※³ キレート化合物の分析で使用。EDTA(エチレンジアミン四酢酸)等を用いる。

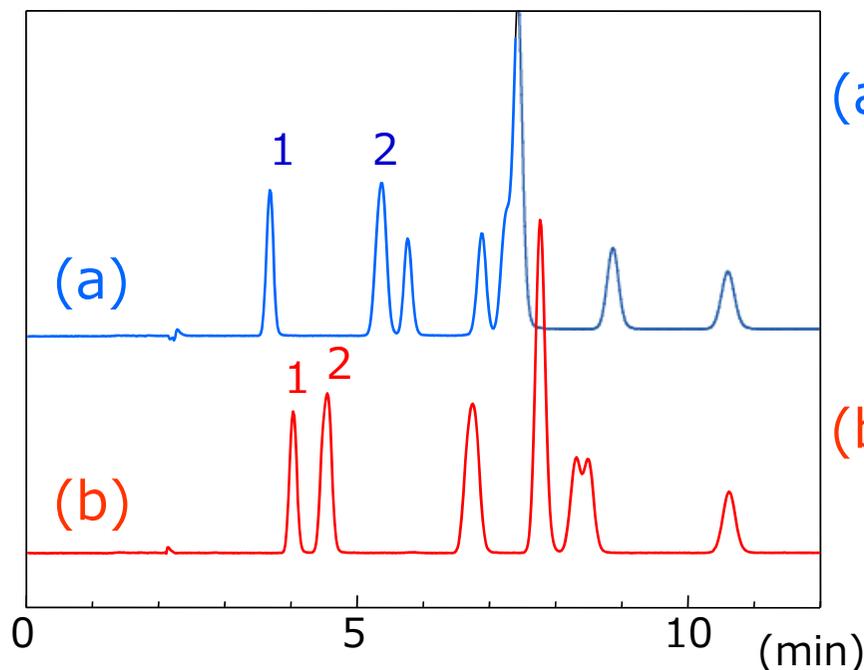
有機溶媒の選択

種類	長所	短所	備考
アセトニトリル	カラム圧が低い。 UV吸収が低い。		最も汎用 3 μm以下のカラムに最適
メタノール	安価	UV吸収がある。 カラム圧が高くなる。	UV 250 nm以上の波長で 使用する。
テトラヒドロフラン	溶出力：大	PEEKチューブを 劣化させる。	試料が溶出しないときや、 分離パターンを変えたいときに 使用する。
イソプロパノール エタノール	溶出力：大	カラム圧が高くなる。	試料が溶出しないときや、 分離パターンを変えたいときに 使用する。



HPLC用溶媒以上のグレードを使用すること
それ以外のグレードを使用する際は、
分析目的に適しているか確認する

有機溶媒の変更



(a)メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム
(15/85)

$$R_{S(1,2)}=6.58$$

(b)アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム
(10/90)

$$R_{S(1,2)}=1.90$$

【分析条件】 カラム : **L-column ODS**, 5 μm , 4.6 \times 150 mm ; 試料 : サルファ剤

移動相の溶媒を変えることで分離が改善される場合がある

緩衝液とは？

酸又は塩基を加えた時や希釈した時に
pHの変化を緩和する作用を持つ溶液

弱酸 + 共役塩基 H_3PO_4 と H_2PO_4^-
or

弱塩基 + 共役酸 NH_3 と NH_4^+

例: リン酸緩衝液(pH 1.83付近のとき)



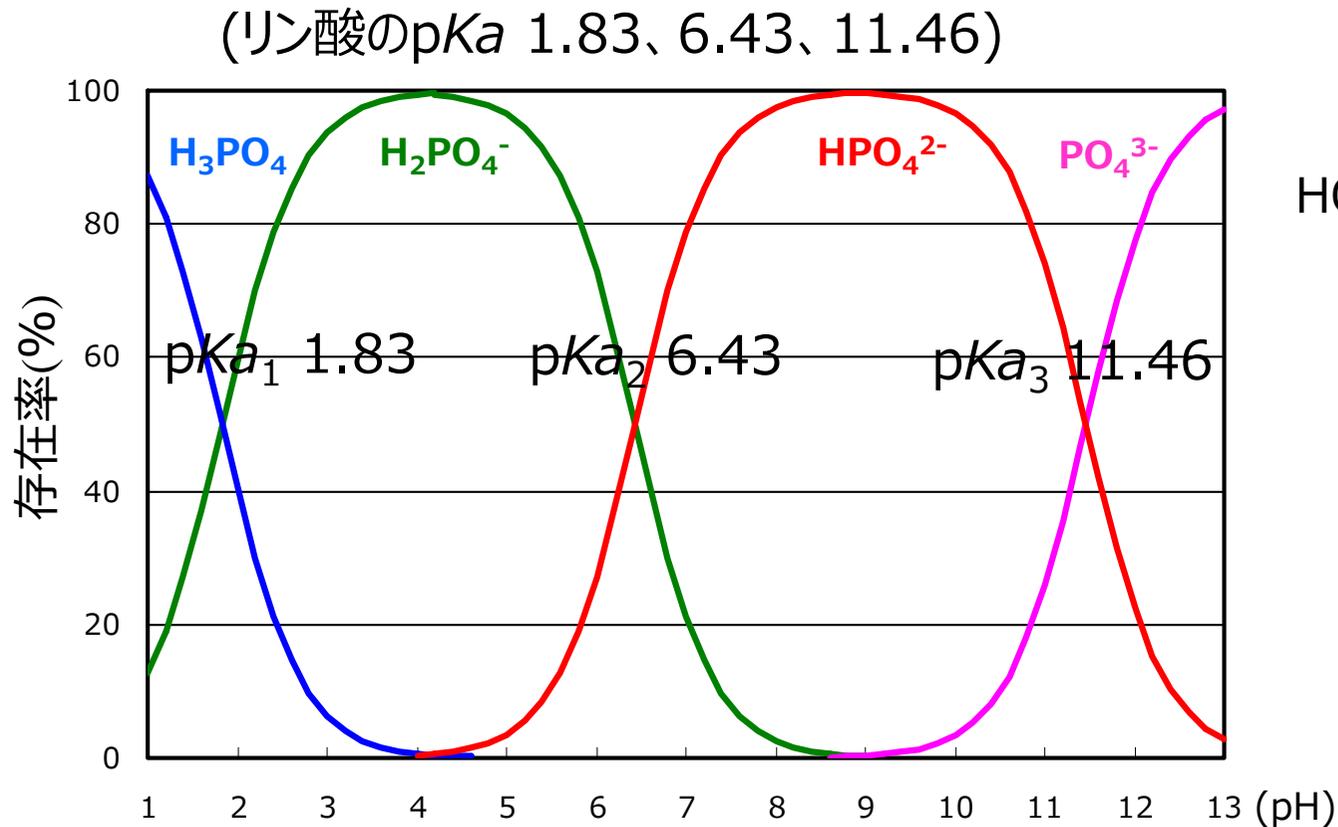
代表的な緩衝液

添加剤	M S	pKa	pHの有効緩衝範囲	推奨使用条件
ギ酸	○	3.54	2.5~4.5	0.05~0.5%
酢酸	○	4.76	3.8~5.8	0.1~1.0%
炭酸水素アンモニウム	○	9.87(HCO ₃) 9.36(NH ₄ ⁺) 6.11(CO ₃ ²⁻)	8.9~10.9 8.4~10.4 5.1~7.1	5~10 mM
アンモニア	○	9.36	8.4~10.4	<10 mM
リン酸	×	1.83 6.43 11.46	1.0~2.8 5.4~7.4 10.5~12.5	5~50 mM <10 mM
ホウ酸	×	9.24	8.2~10.2	

(液クロ文の巻及び化学便覧第5版より)

ただし、検出器に質量分析計(MS)を用いる場合は濃度10 mM(0.1%)以下を推奨

リン酸の解離、非解離状態の存在率



緩衝作用が働く条件

弱酸と共役塩基が共存(1:1のときが最大)

pH が 弱酸のpKa±約1の範囲

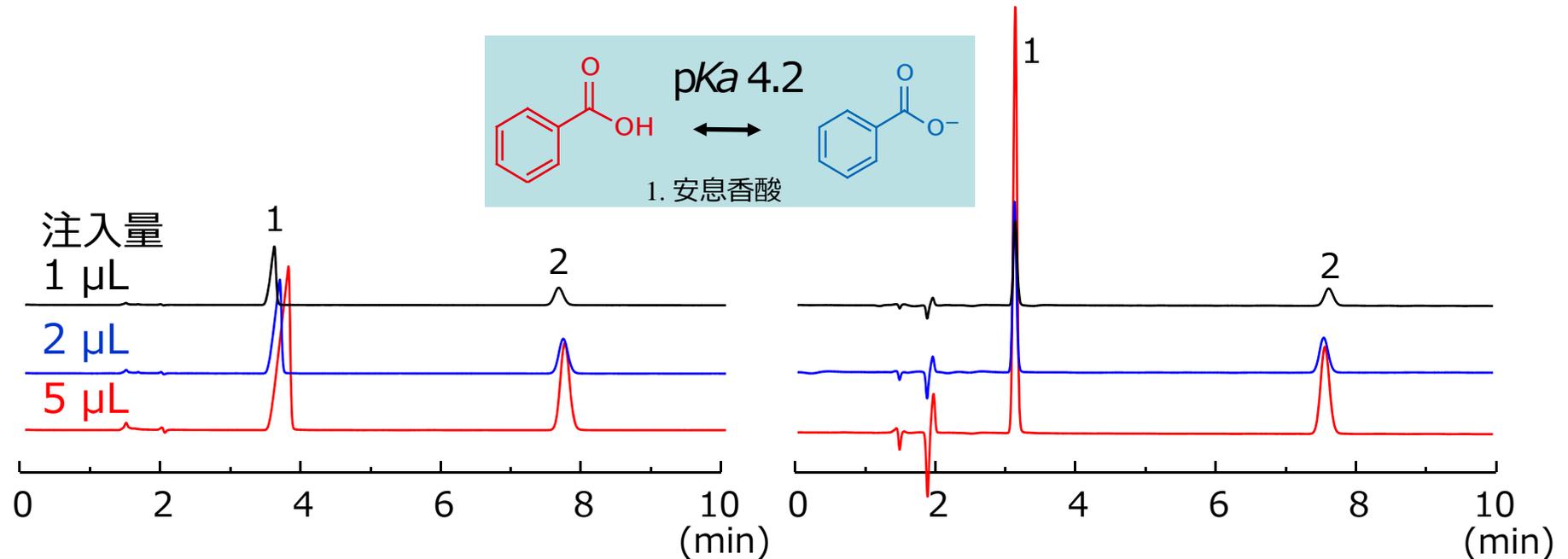
緩衝液の効果

A) 緩衝能なし

20 mM リン酸二水素カリウム(pH 4.4)
/アセトニトリル (75/25)

B) 緩衝能あり

20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.4)
/アセトニトリル (75/25)



【分析条件】 カラム : **L-column2 ODS**, 5 µm, 4.6×150 mm

試料 : 1. 安息香酸(100 mg/L), 2. メチルパラベン(100 mg/L)

- ピーク形状がシャープ
- 注入量の変化に対し保持時間が安定

緩衝液の効果

緩衝能の有無がロット間の再現性に及ぼす影響

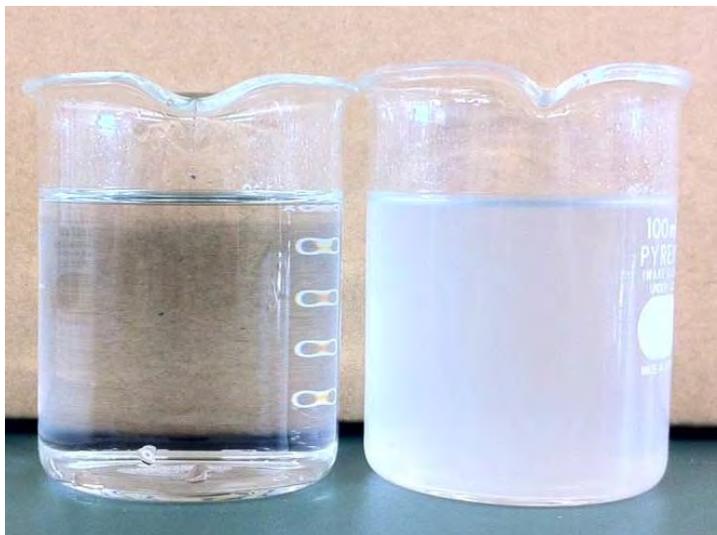
ロット番号	緩衝能なし A) 20 mM リン酸二水素カリウム		緩衝能あり B) 20 mM 酢酸緩衝液	
	安息香酸の保持時間 (min)	分離度	安息香酸の保持時間 (min)	分離度
E4311	3.73	19.52	3.12	26.55
E4312	3.54	18.79	3.06	26.38
E4313	3.64	18.75	3.12	26.40
CV (%)	2.53	2.28	1.14	0.35

【分析条件】 カラム： **L-column2 ODS**, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm
 移動相： (A)20 mMリン酸二水素カリウム溶液(pH4.4)/ アセトニトリル(75/25)
 (B)20 mM酢酸緩衝液(pH4.4)/ アセトニトリル(75/25)
 注入量： 2 μ L
 試料： 1. 安息香酸(100 mg/L), 2. メチルパラベン(100 mg/L)

解離性物質の保持時間や分離度の再現性を改善できる

緩衝液の析出

緩衝液(塩)を使用する場合、有機溶媒比率が高いと塩が析出する



アセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液pH7
左(75/25)、右(80/20)

内径4.6 mmのカラムにアセトニトリル/25 mMリン酸緩衝液pH7 (80/20)を30 mL送液するとカラム圧力が20%上昇

次のような時は注意・確認が必要

→ 有機溶媒と混合、グラジエント分析、カラム交換のとき
ポンプが送液不良のとき

酸性物質の分析のための移動相

酸性移動相

- ▶ 酸性物質を非解離の状態で行分析する
メリット: 保持、負荷量の増加
デメリット: なし

中～弱アルカリ性移動相(分離しないとき)

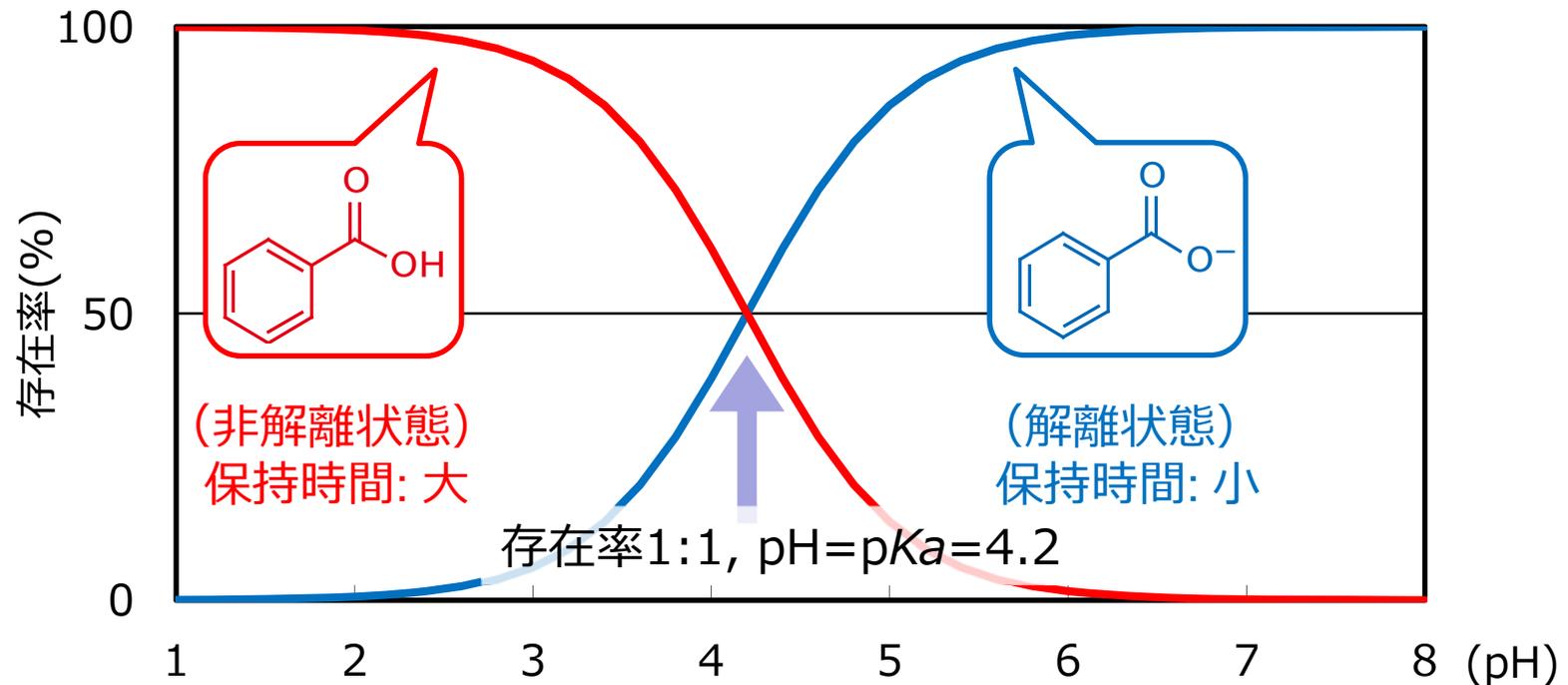
- ▶ 酸性物質を解離の状態で行分析する
メリット: 分離の改善
デメリット: カラムの劣化、保持、負荷量の減少

イオン対クロマトグラフィー(保持の弱いとき)

- ▶ 解離している酸性物質に、イオン対試薬を添加し、イオン対を形成させて固定相に保持させる
メリット: 保持の増加、ピーク形状の向上
デメリット: カラムの専用化、調製が煩雑

酸性物質の緩衝液のpH設定

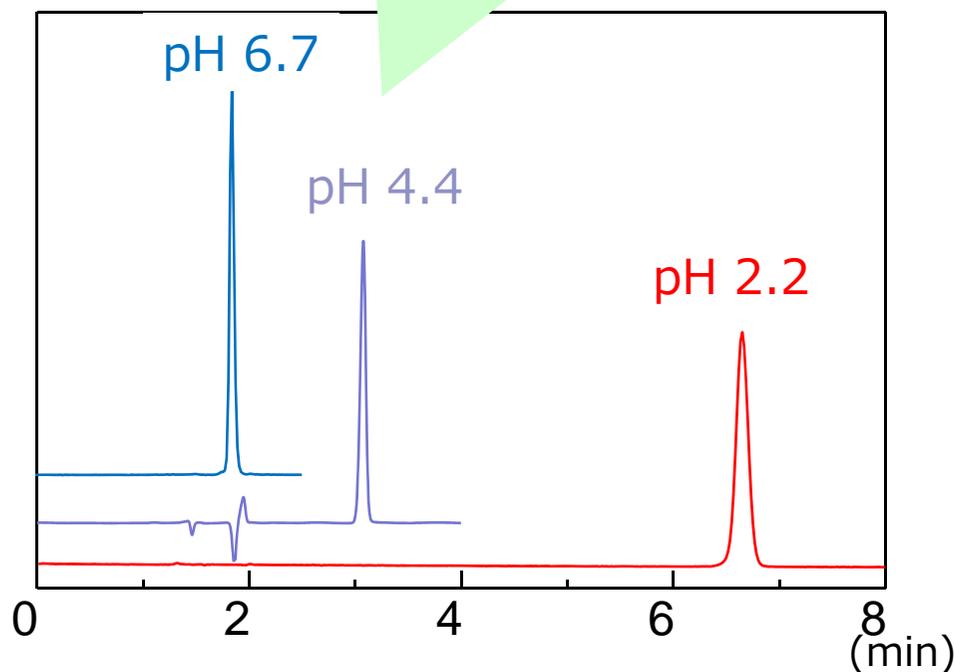
緩衝液のpHによる安息香酸の解離、非解離状態の存在率



- 酸性物質は、pHが小さいときは非解離状態で多く存在する
- 解離、非解離状態の存在率は保持時間に影響するので緩衝液のpHは化合物の pKa より2以上離れたものが望ましい

緩衝液のpHと保持時間

解離平衡が非解離側に移動すれば
保持時間は長くなる



【分析条件】

カラム：L-column ODS 5 μ m, 4.6 \times 150 mm
 移動相：アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 (25/75)
 pH4.4のときは酢酸緩衝液を使用
 流速：1 mL/min
 注入量：1 μ L
 試料：安息香酸

緩衝液のpHと保持時間

pH	保持時間	解離状態
6.7	1.85 min	99.7%
4.4	3.08 min	61.3%
2.2	6.65 min	1.0%

- 緩衝液のpHにより解離平衡が移動し、それに合わせて保持が変わる
- 酸性移動相では安息香酸が非解離の状態であるため保持が大きい

塩基性物質の分析のための移動相

酸性移動相

- ▶ 塩基性物質を解離の状態で行分析する
メリット: シラノールの影響を受けにくい
デメリット: 保持、負荷量の減少

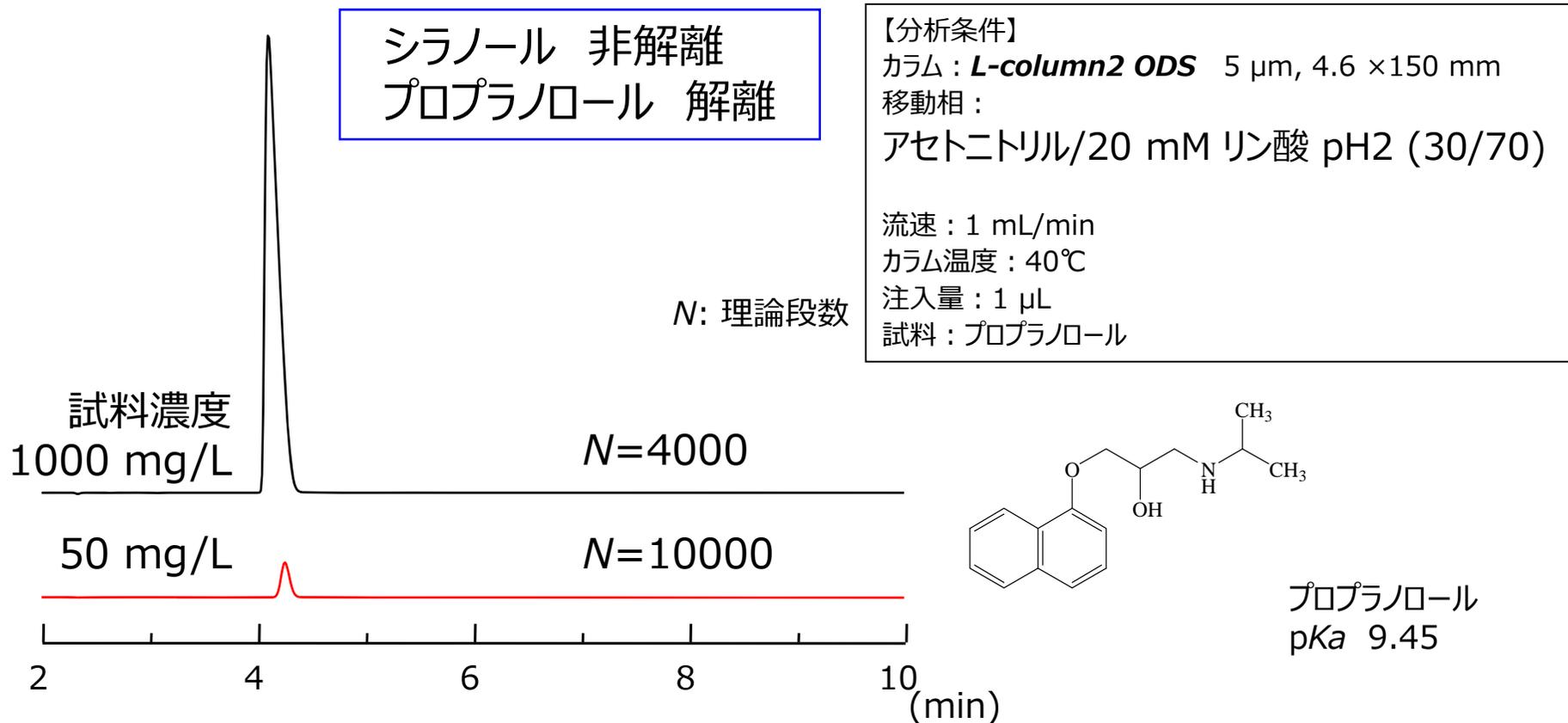
中～アルカリ性移動相

- ▶ 塩基性物質を非解離の状態で行分析する
メリット: 保持、負荷量の増加
デメリット: シラノールの影響を受けやすい、カラムの劣化

イオン対クロマトグラフィー(保持の弱いとき)

- ▶ 解離している塩基性物質に、イオン対試薬を添加し、イオン対を形成させて固定相に保持させる
メリット: 保持の増加、ピーク形状の向上
デメリット: カラムの専用化、調製が煩雑

塩基性物質の酸性移動相での分析

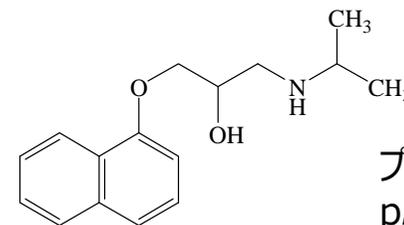
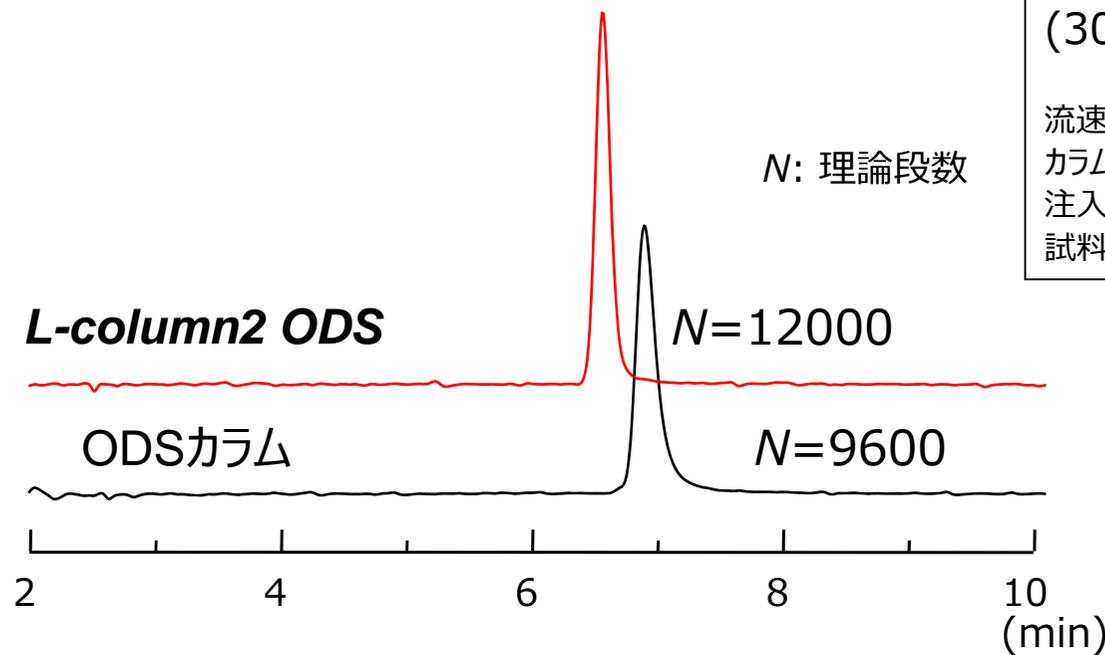


酸性移動相ではシラノール基の影響を受けなくなり、ピークがシャープになり、保持時間が短くなる。試料の濃度が高いとピーク形状が悪くなる。
→ 負荷量の低下

塩基性物質の中性移動相での分析

シラノール 解離
プロプラノロール 解離

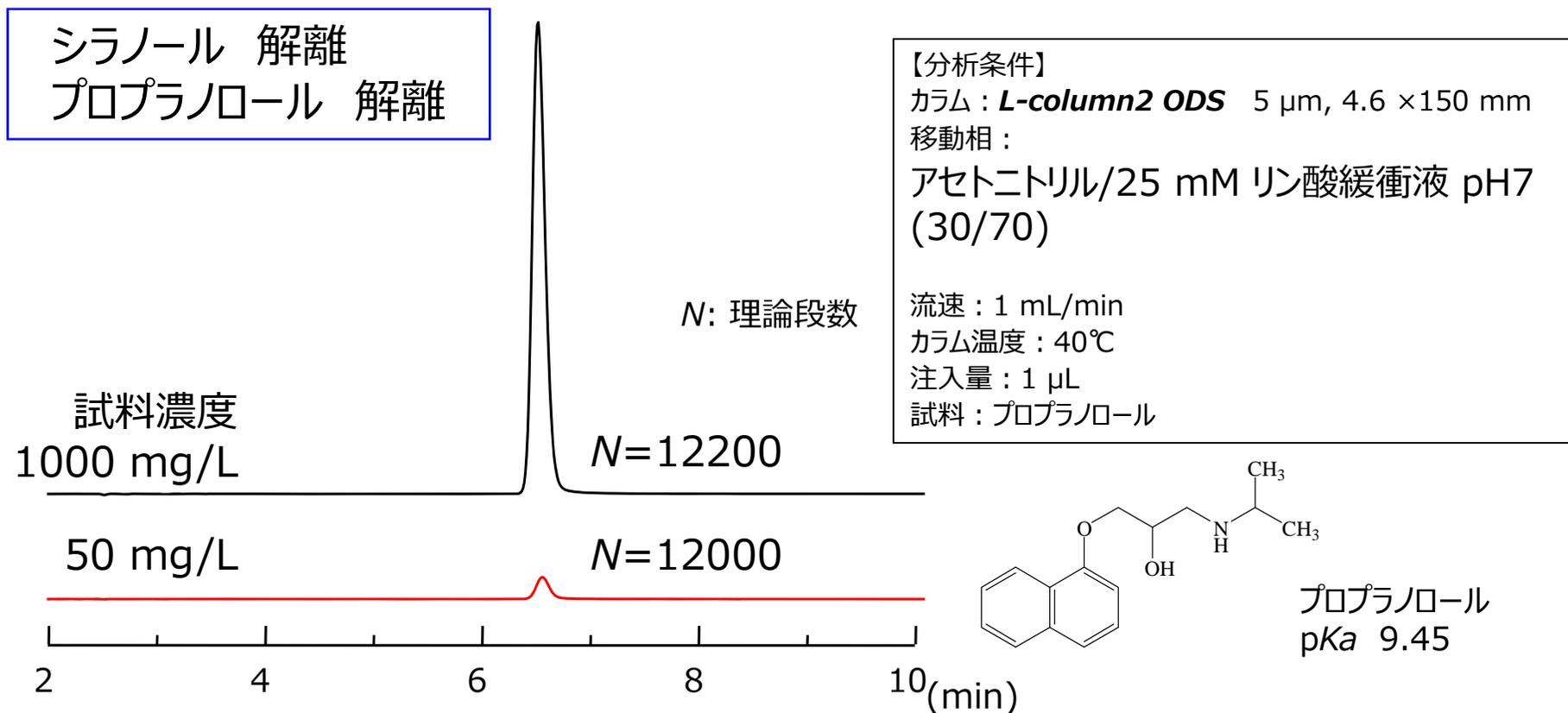
【分析条件】
 カラム：ODS(C18) 5 μm, 4.6 × 150 mm
 移動相：
 アセトニトリル/25 mM リン酸緩衝液 pH7
 (30/70)
 流速：1 mL/min
 カラム温度：40℃
 注入量：1 μL
 試料：プロプラノロール (50 mg/L)



プロプラノロール
pKa 9.45

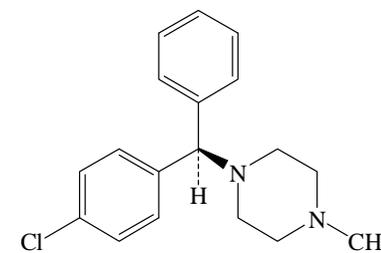
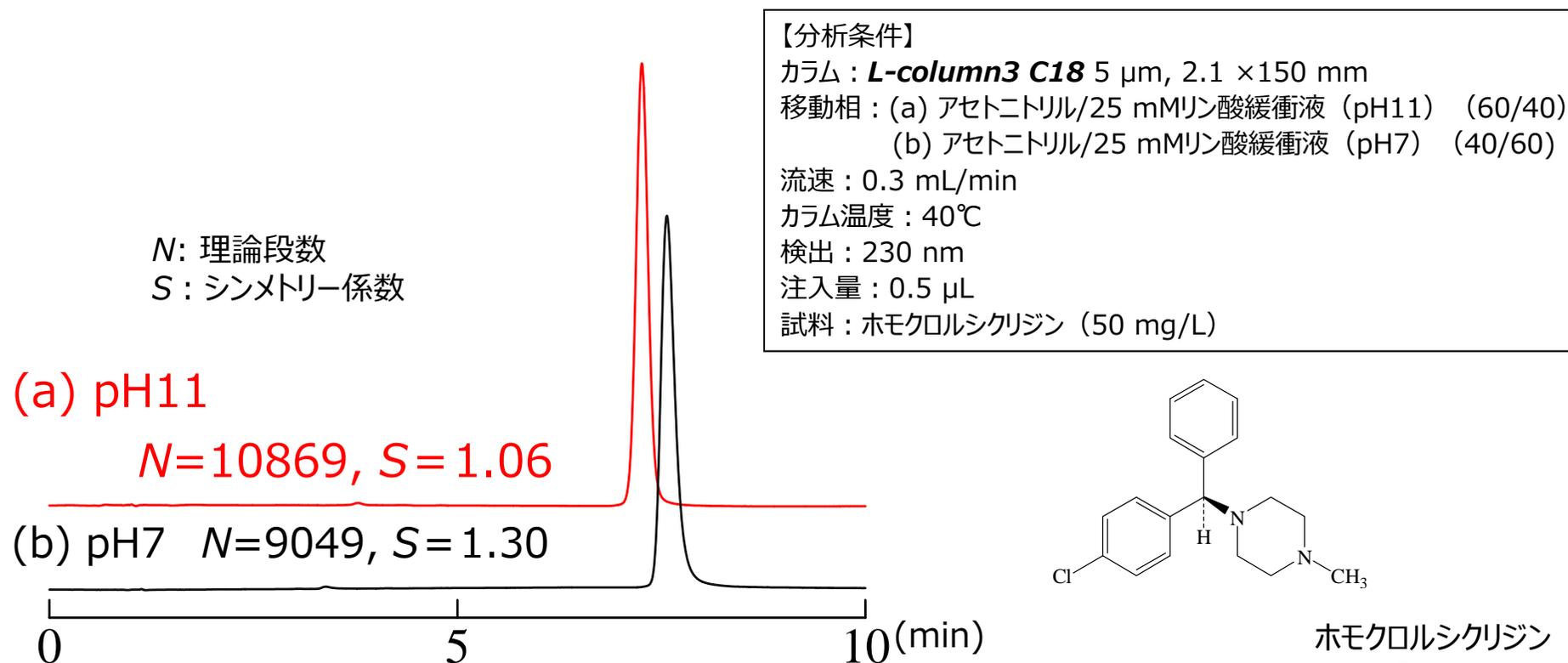
中性移動相ではシラノール基の影響を受けやすくなり、
カラムの差が生じやすい(エンドキャッピングの良し悪しがわかる)

塩基性物質の中性移動相での分析



中性移動相では試料の濃度によるピーク形状や保持時間の変化がない
→ **エンドキャッピングが完璧な場合、高い理論段数、負荷量の増加**

塩基性物質のアルカリ性移動相での分析



ホモクロルシクリジン
 pKa 9.44

塩基性物質をアルカリ性移動相で分析することで、
 解離を抑制することができ、理論段数及びピーク形状も向上

塩基性物質のテーリング防止策

1. テーリングの起こりにくいカラムを使用する
2. 残存シラノールと試料が相互作用しないようにする
 - アセトニトリルからメタノールに変更する
 - アンチテーリング剤(アミン類)を使用する
 - 温度を高くする
 - イオン対試薬を使用する

移動相にメタノールを使用

シラノール基：メタノールと水素結合
アミノプチリン：解離

【分析条件】

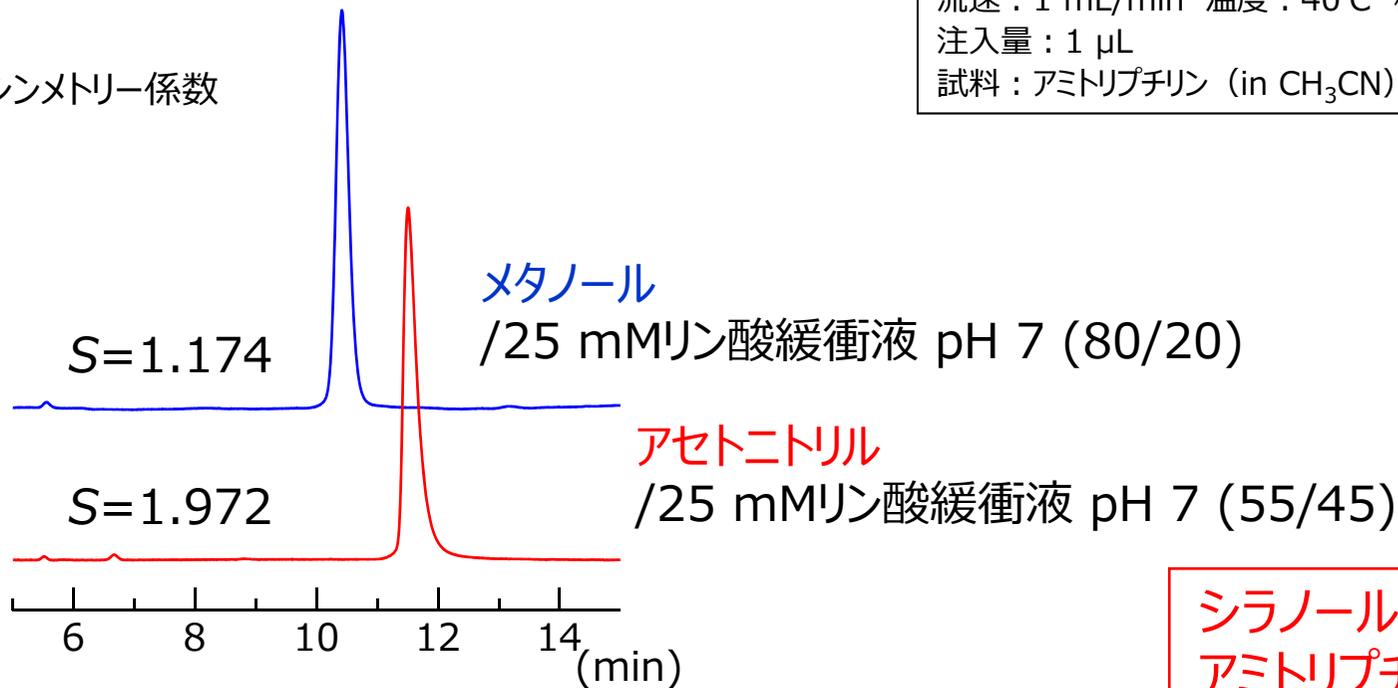
カラム：*L-column ODS* 5 μm , 4.6 \times 150 mm

流速：1 mL/min 温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 検出：UV225 nm

注入量：1 μL

試料：アミノプチリン (in CH_3CN)

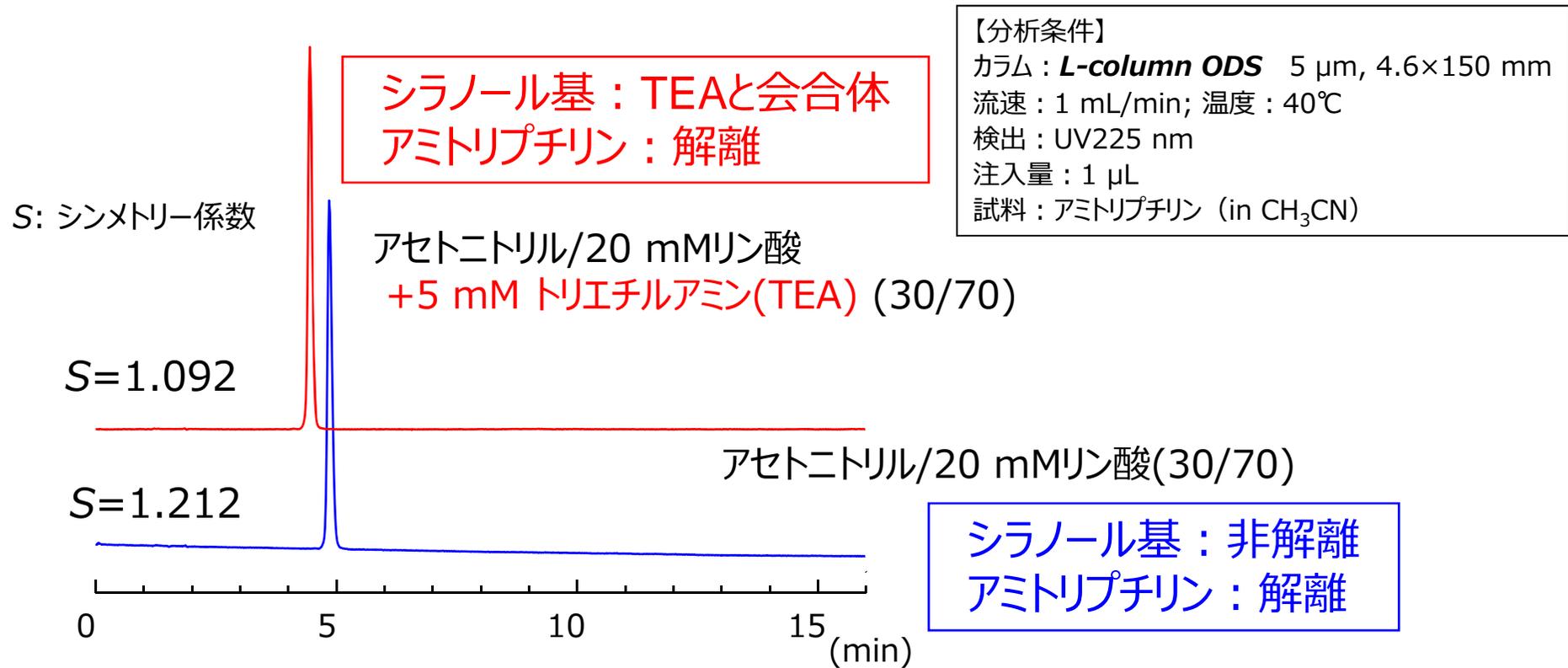
S: シンメトリー係数



シラノール基：解離
アミノプチリン：解離

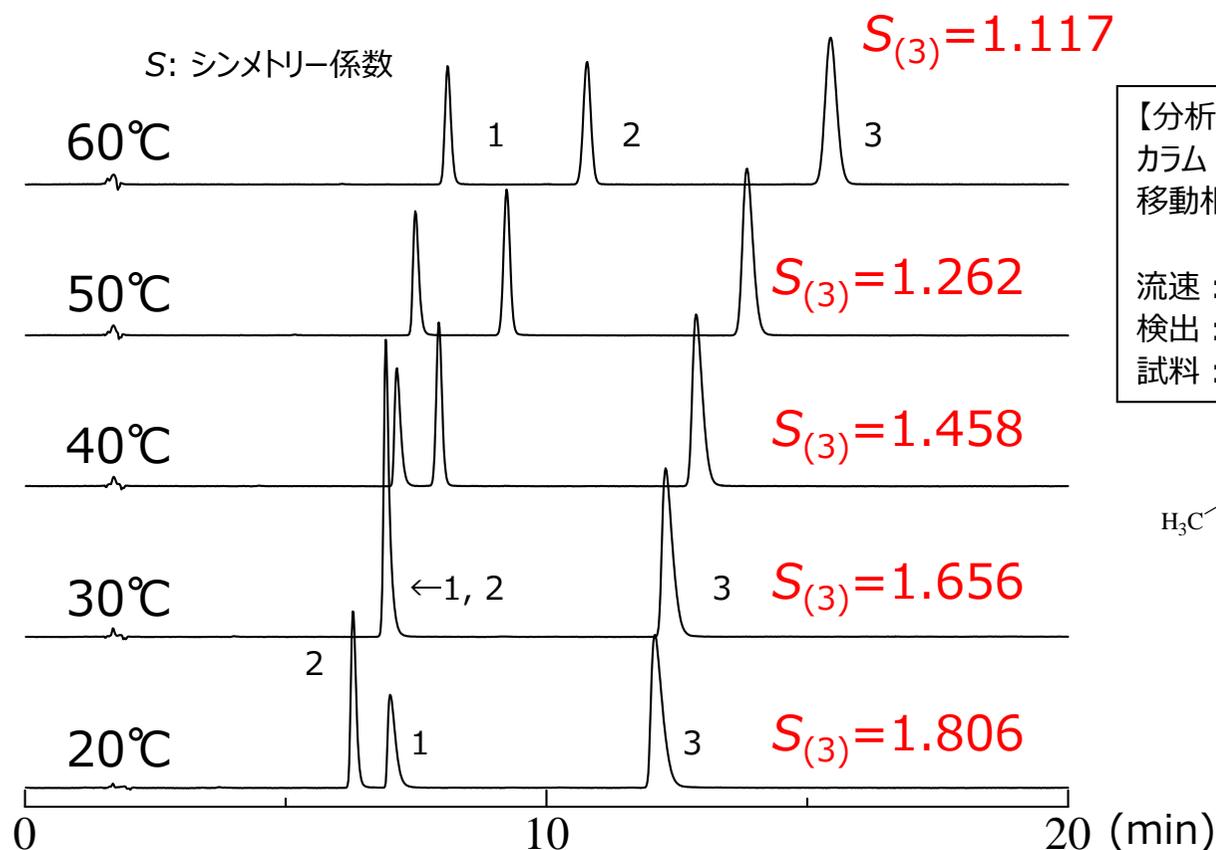
メタノールが残存シラノールと水素結合するため、塩基性物質は残存シラノールと相互作用できない。ただし、カラム圧は上昇する

アンチテーリング剤の使用



添加アミン類が残存シラノールと結合するため、塩基性物質は残存シラノールと相互作用ができない
ただし、カラムを専用化しなくてはならない。耐久性が低下する

温度を高くする



【分析条件】

カラム: **L-column ODS** 3 μm , 4.6 \times 150 mm

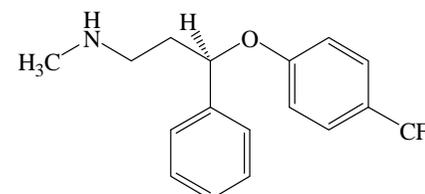
移動相: アセトニトリル

/25 mMリン酸緩衝液 (pH7) (35/65)

流速: 1 mL/min

検出: UV230 nm

試料: 1.パロキセチン、2.シタロプラム、3.フルオキセチン

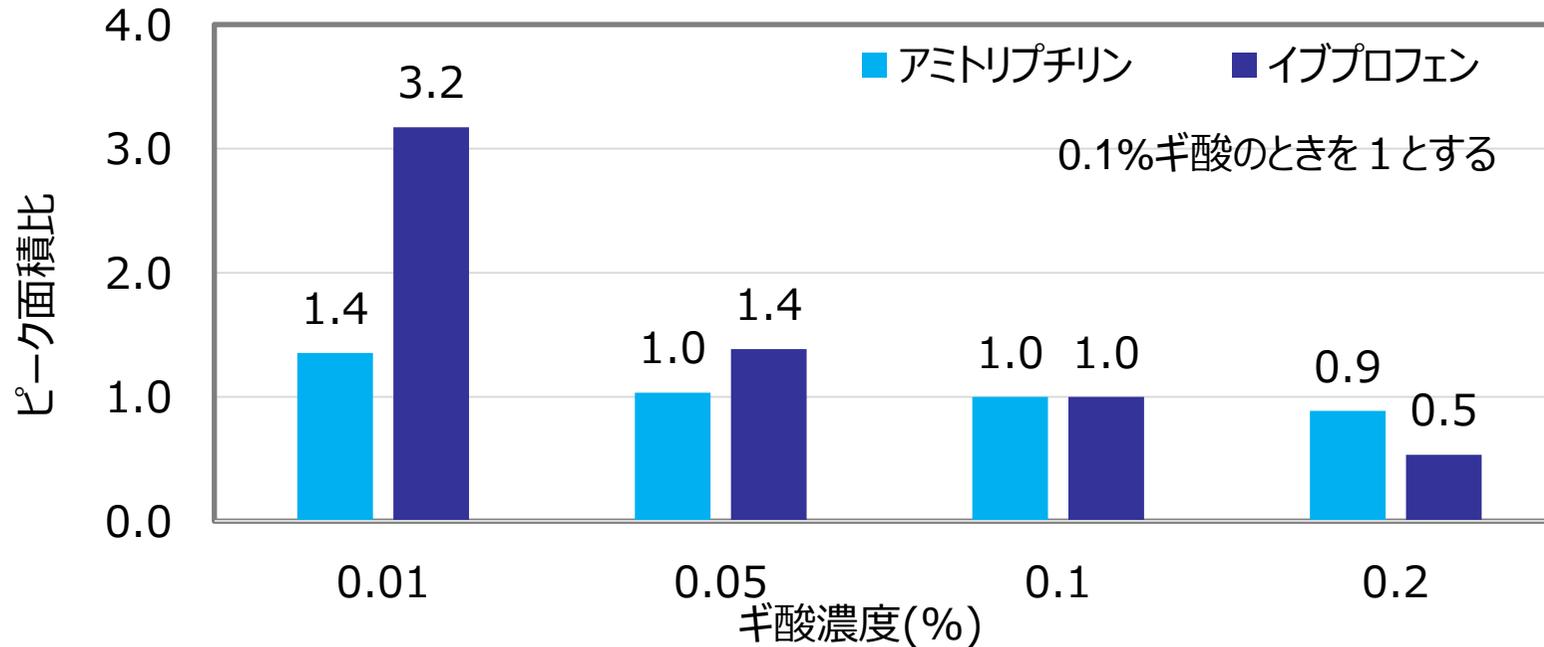


3. フルオキセチン

温度が高くなると、塩基性物質と残存シラノールとの吸脱着速度が速くなり、テーリングが改善される。ただし、カラムの耐久性は低下する

LC/MSで使用する移動相の濃度比較

移動相の種類や濃度によって感度やピーク形状が異なる
ギ酸濃度 (%) とピーク面積比の比較



【分析条件】 カラム : *L-column2 ODS* 3 μ m, 2.1 \times 50 mm; 移動相 : アセトニトリルのグラジエント分析

ギ酸濃度 : 0.01~0.2%; 流速 : 0.3 mL/min; カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C; 試料 : 1.アミトリプチリン、2.イブプロフェン; 注入量 : 5 μ L

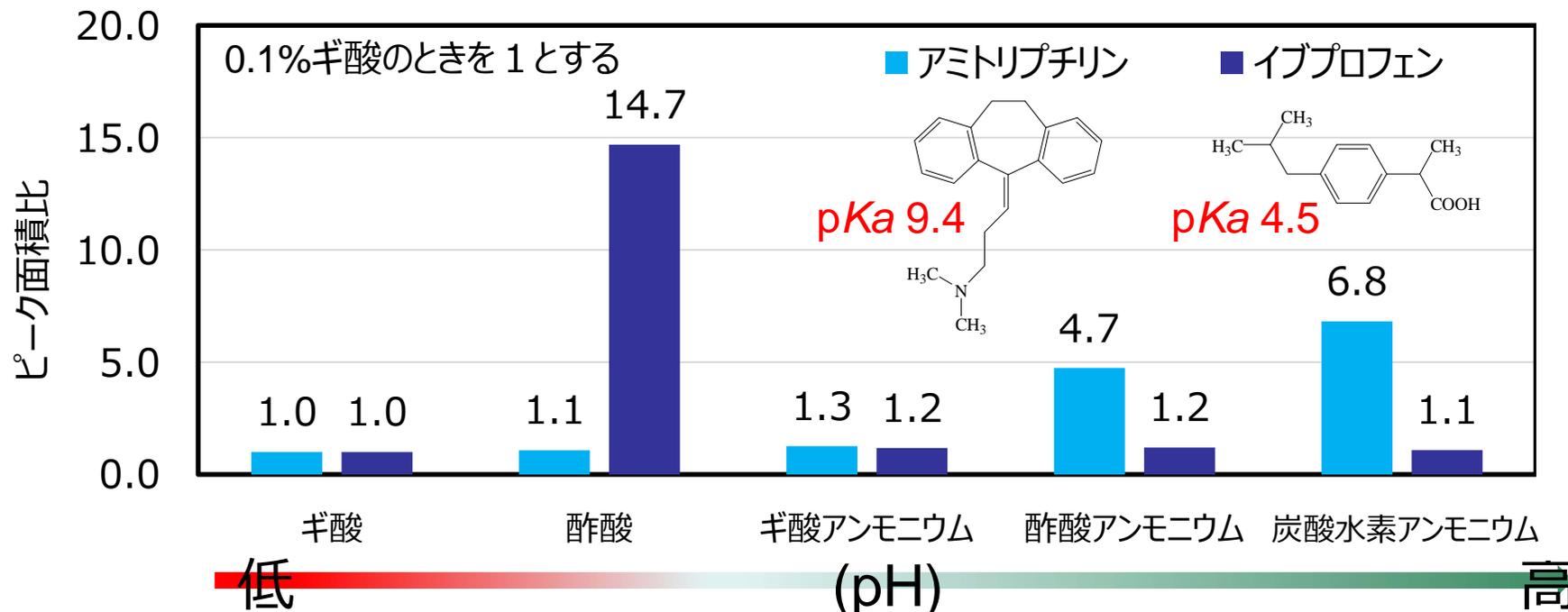
ギ酸濃度が高くなると

➤ 感度は低下する

➤ ピーク形状→アミトリプチリン: シャープ、イブプロフェン: 変化なし

LC/MSで使用する移動相の種類による比較

移動相の種類によるピーク面積比の比較



【分析条件】 カラム: *L-column2 ODS* 3 μ m, 2.1 \times 50 mm; 移動相: アセトニトリルのグラジエント分析

移動相の種類: 0.1%ギ酸、0.1%酢酸、5 mMギ酸アンモニウム、5 mM酢酸アンモニウム、5 mM炭酸水素アンモニウム

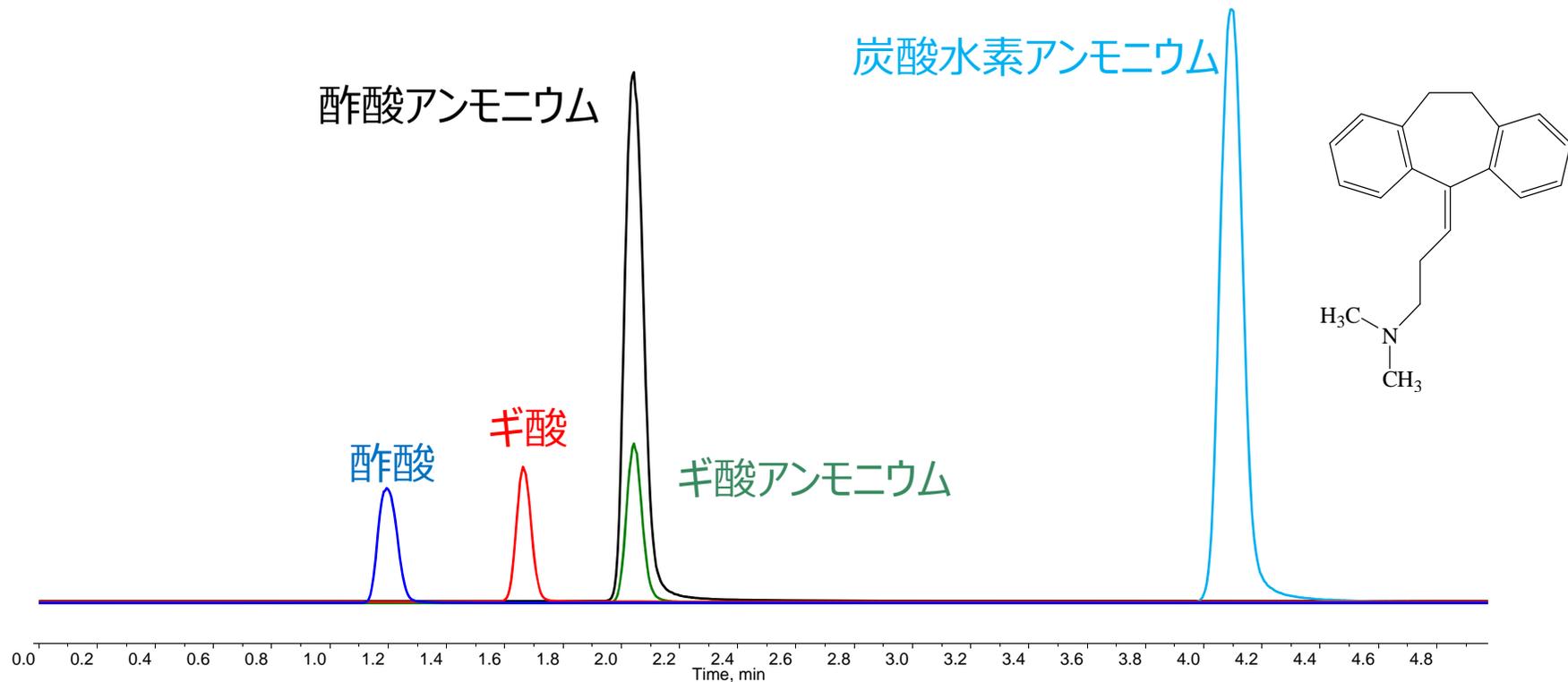
流速: 0.3 mL/min; カラム温度: 40 $^{\circ}$ C; 試料: 1.アミトリプチリン、2.イブプロフェン; 注入量: 5 μ L

pHが高くなると

- アミトリプチリン: ピーク面積増加(ピーク幅が広い)
- イブプロフェン: 酢酸緩衝液でピーク面積最大(ピーク幅が広い)

移動相の違いによるマスクロマトグラム

アミトリプチリンのマスクロマトグラム



- ギ酸とギ酸アンモニウムはピークがシャープ
- 酢酸アンモニウムは感度が高い
- 炭酸水素アンモニウムは感度が高く、保持が大きいが、ピーク幅が広い

LCシステムの配管の内径の最適化

『配管は細く・短く』が鉄則

内径4.6 mmカラム：配管の内径0.25～0.3 mm

内径2.1 mmカラム：配管の内径0.1～0.13 mm

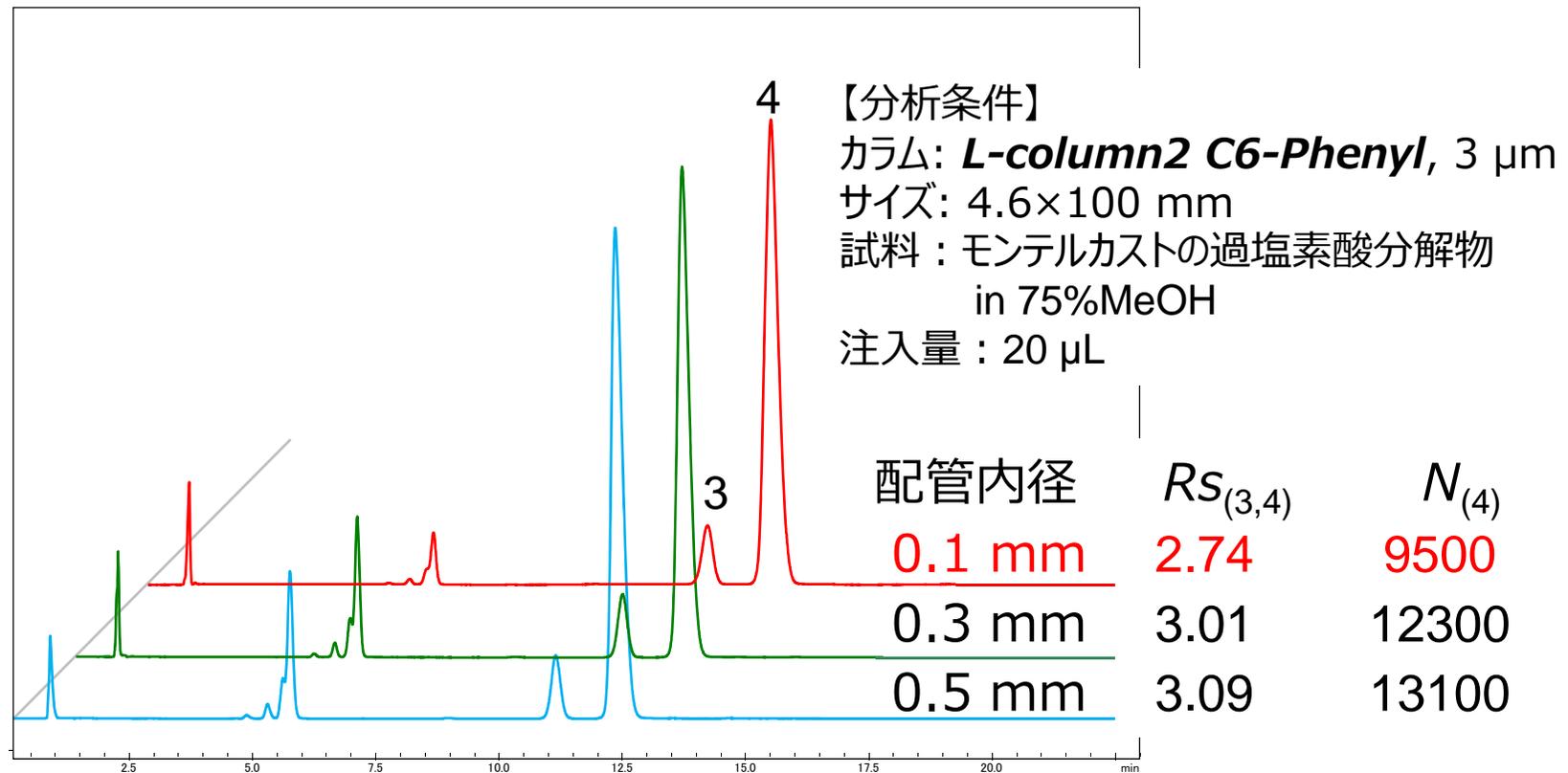
しかし、注入量を多くするとピーク形状が崩れることがある

グラジエント分析で注入量が多いときは、

カラム内径の1/10程度の配管の内径を目安に選択する

カラム入り口配管の影響(HPLC)

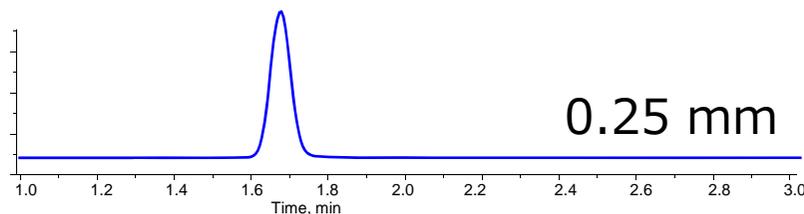
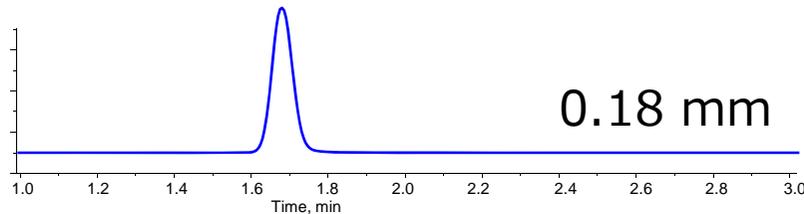
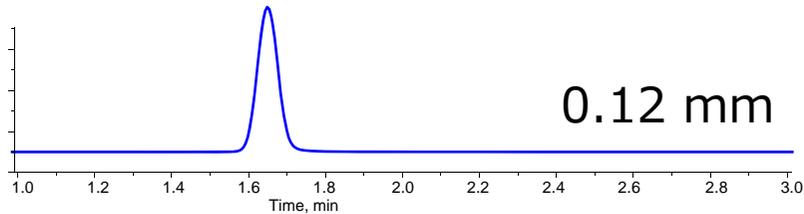
モンテルカストナトリウム錠の定量法：システム適合性(第十七改正日本薬局方)



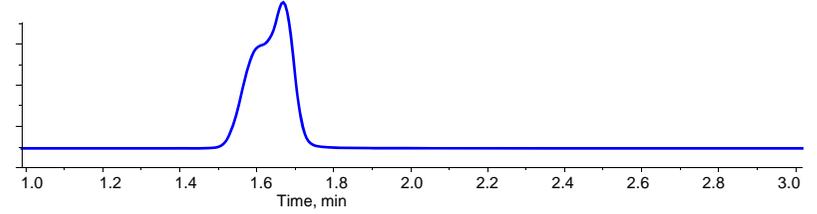
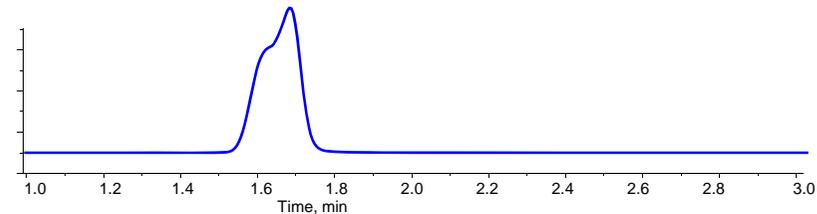
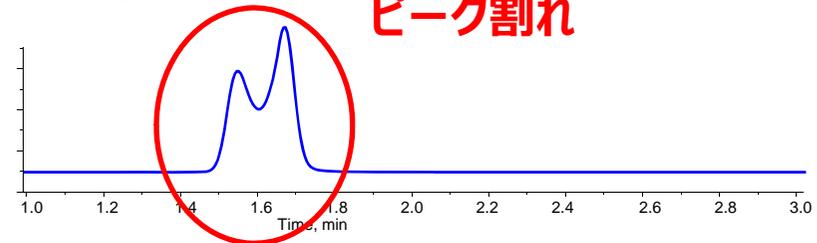
グラジエント分析のとき、カラム入り口配管の内径が小さいと、注入量(試料溶媒)の影響を受け、ピーク形状が悪化する

カラム入り口配管の影響(LC/MS/MS)

5 μ L注入



10 μ L注入



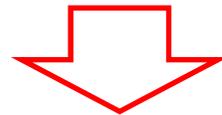
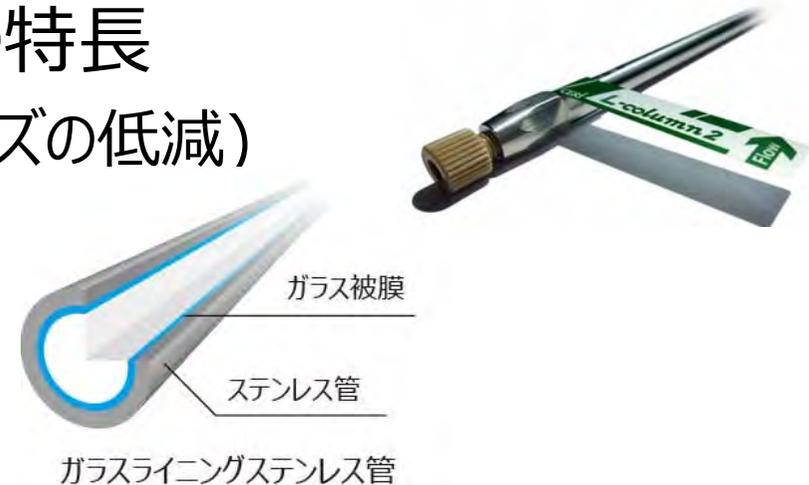
カラム : **L-column2 ODS** 3 μ m 2.1 \times 50 mm
試料: アミトリプチリン(in 50% ACN)

カラム入り口配管の内径が小さいと、注入量(試料溶媒)の影響を受け、ピーク形状が悪化する

LC/MSのメタルフリー環境への提案

L-column2 メタルフリーカラムの特長

- S/Nの向上(ピーク強度の向上とノイズの低減)
- キャリーオーバーの低減
- 定量性の向上

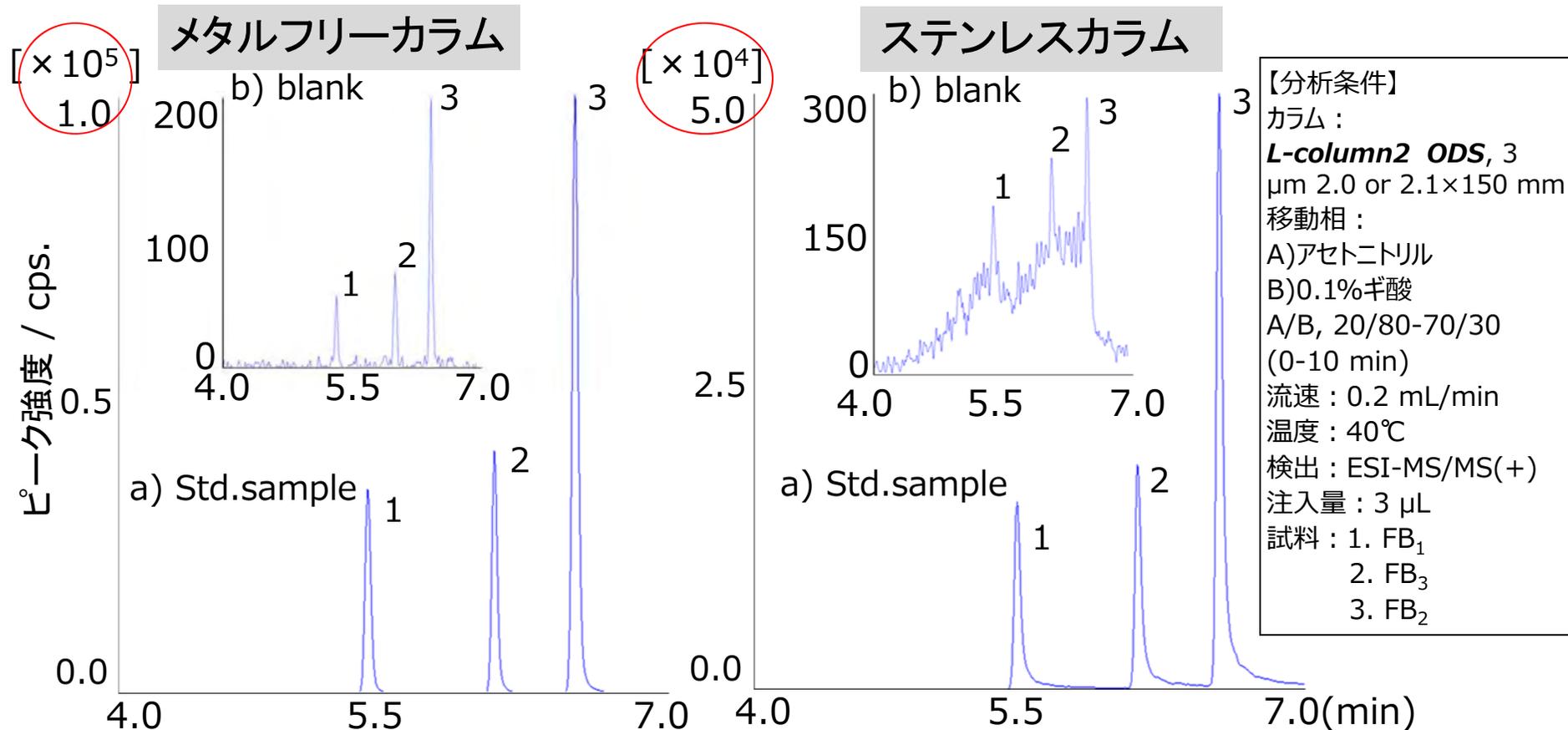


LC/MSを使用した 配位性化合物から医薬品
までの様々な分析に最適

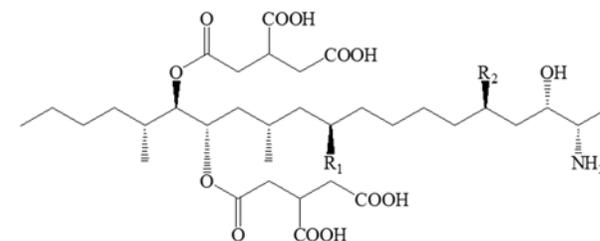
例えば・・・

- リン酸化ペプチド、核酸などの生体分子、メタボロミクス分析
- 医薬品などの薬物動態
- 自然毒、抗生物質などの食品衛生のための分析

メタルフリーカラムの効果(フモニシン)



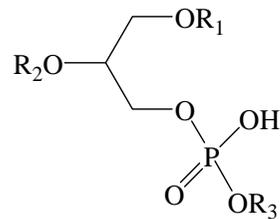
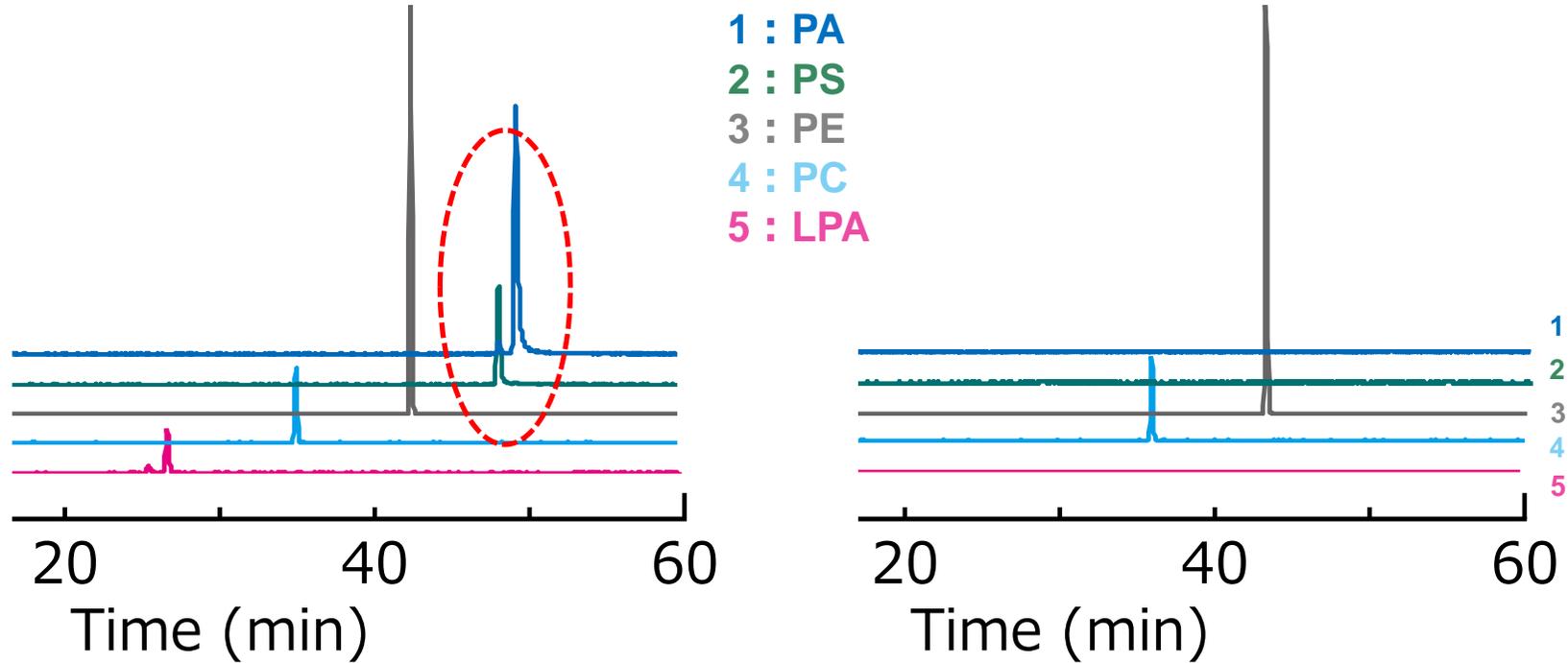
- ピーク形状の改善
- ピーク強度の上昇
- キャリーオーバーの低減



メタルフリーカラムの効果(リン脂質)

メタルフリーカラム

ステンレスカラム

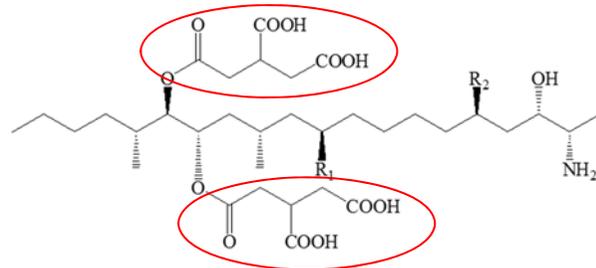


R₁ : 脂肪酸
R₂ : 脂肪酸、水素
R₃ : セリン(PS)、水素(PA)、エタノールアミン(PE)、コリン(PC)

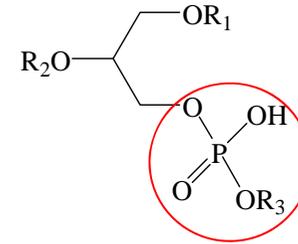
分析の難しいPSやPA(LPA)が、検出可能!!

メタルフリーカラムの性能をより引き出すために

吸着性の高い物質を分析するとき...



フモニシン



リン脂質

- LCの配管やMS部のエレクトロードに金属製の配管を使用せず、PEEK製などを使用する



- ピーク形状の改善
- ピーク強度の上昇
- キャリーオーバーの低減



分析時間短縮への提案

ハイスループット分析用ショートカラムの特長

- カラム内径2.1 mm、カラム長さ10、20、30 mmをラインナップ
- 分析時間の大幅な短縮が可能（15 min→**0.4 min**）
- 10秒の分析で2000回/日以上が可能
- 高理論段数
- 高耐久性
- 低価格



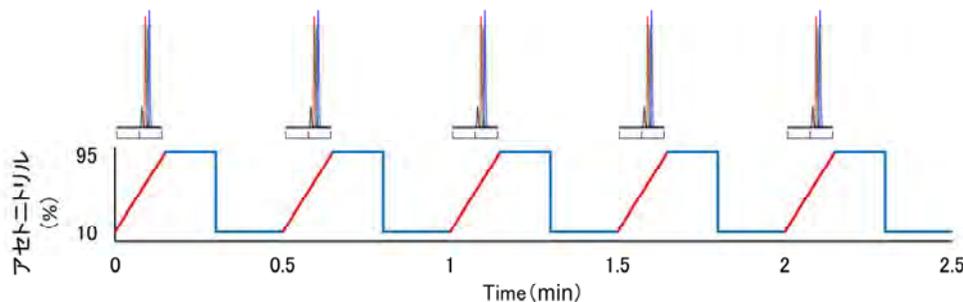
検体数が数千以上のLC/MS/MSを用いた
ハイスループット分析に最適

10 mmカラムを用いた超高速分析への挑戦

塩基性医薬品の分析再現性

Sample	CV(%)	
	保持時間	ピーク面積
1.Antipyrine	0.5	8.0
2.Ketotifen	0.4	6.0
3.Amoxapine	0.3	4.2
4.Oxatomide	0.4	5.9

n=5



1サイクル総時間30秒

(分析時間10秒+洗浄10秒+再平衡化10秒)

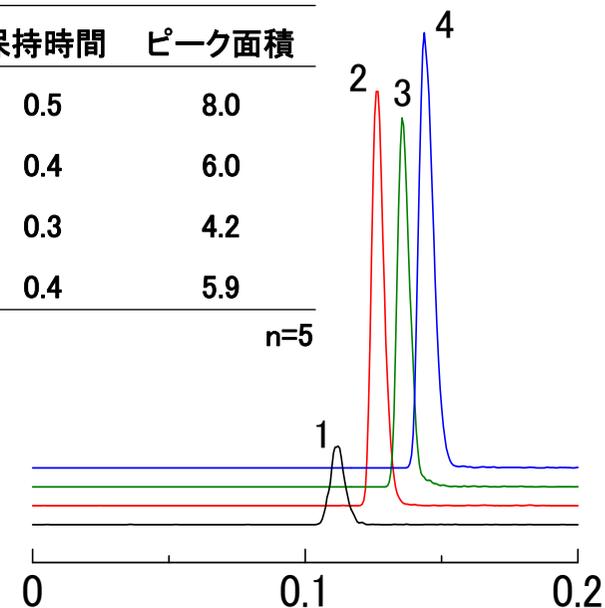
【分析条件】

カラム：L-column2 ODS 3 μm, 2.1×10 mm

移動相：アセトニトリル/0.1% ギ酸 グラジエント; 流速：1.8 mL/min; 温度：40℃

試料：1.Antipyrine、2.Ketotifen、3.Amoxapine、4.Oxatomide (500 μg/L each)

注入量：1 μL



分析時間10秒、洗浄・再平衡化を含めた1サイクル30秒の超高速分析でも良好な再現性

カラムの劣化

化学的要因

- ▶ 酸性移動相による修飾基の脱離 → シラノール基の生成
- ▶ アルカリ移動相による基材の溶解 → ボイドの発生
- ▶ 脂溶性成分などの蓄積 → 蓄積成分と試料の相互作用

物理的要因

- ▶ システム、移動相、試料由来のごみなど不溶物の詰まり → カラム圧の上昇
- ▶ 緩衝液などの塩の析出 → カラム圧の上昇
- ▶ 急激な圧力変化や圧力上限以上での送液 → ボイドの発生

カラムの劣化を防ぐには

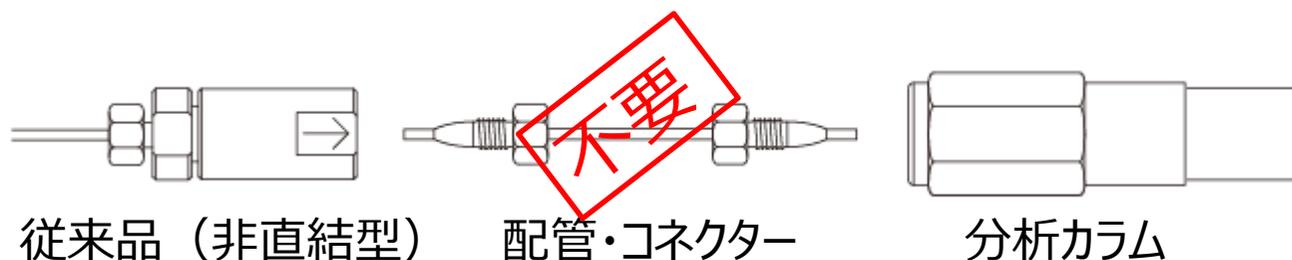
→ 移動相の条件見直し、ろ過、ガードカラム・プレカラムフィルター

カートリッジ式ガードカラムホルダー リニューアル CERI

New 分析カラムに直結できる専用ホルダー（直結型）ができました！



専用ホルダー（直結型）



配管・コネクターが不要です。

- 接続不良による液漏れの不安解消
- 簡単・正確に接続可能※
- 配管やコネクターの消耗品を削減

※ 他社製品の分析カラムに接続すると、壊れる可能性があります。

トラブルシューティング(圧力の上昇)

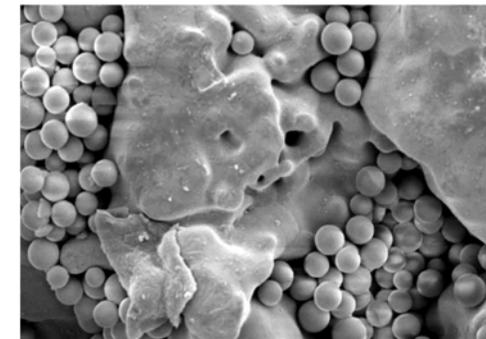
対処方法: システムが原因の場合

- ① カラムを外した状態で送液する。この時異常圧であれば、原因はシステムにあるので、下流側から確認し、異常個所を取扱説明書に従い洗浄または交換する
- ② ②で正常圧であれば、原因はカラムにあるので、カラムを洗浄する

対処方法: カラムが原因の場合

- ① 圧力が高くなった場合、通常方向と逆に送液し、洗浄を行なう
- ② 試料由来の場合は、試料が溶解する溶液で洗浄する

L-column, L-column2は、通常方向と逆に送液が可能
(内径1 mm未満のマイクロカラム以外。その他のメーカーは取扱説明書を参照)
物理的に不溶物が詰まった場合は洗浄で完全に除去できることは少ない



カラム入口側焼結フィルタ

圧力が上昇したトラブル例

[症状]

短期間でカラム圧が上昇し、ピーク割れが発生した

[使用状況]

カラム : **L-column2 ODS**, 3 μm

サイズ : 4.6 mm I.D.×150 mm L.

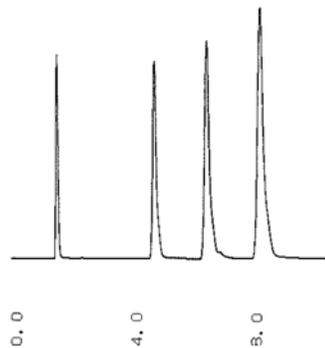
移動相 : アセトニトリル/リン酸緩衝液(pH6.5)グラジエント

試料 : 医薬品など

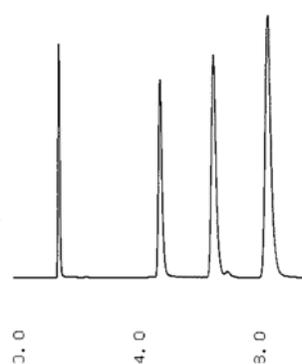
使用期間 : 2~3週間(300時間以内)

トラブルへの処置

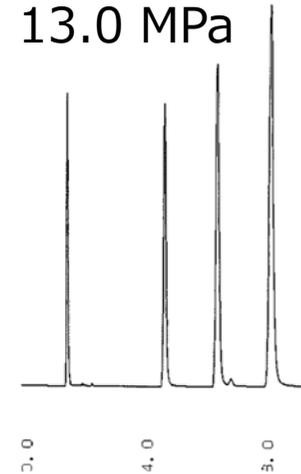
洗浄前
 $N_4 = 7000$
17.5 MPa



洗浄後
 $N_4 = 8500$
17.0 MPa



入口側のフィルターを交換※
 $N_4 = 17000$
13.0 MPa



不純物の蓄積による
充填剤の着色

[原因]

カラムの入口付近に不溶物の蓄積

その後の調査で、リン酸緩衝液の容器内で細菌が発生、それが入口側蓄積していったことが判明。容器を放置せず、調製の際は容器洗浄も怠らないことで改善

※ フィルタの交換には技術が必要です。無理に外すと性能が元に戻らないことがあります

ODSカラムの洗浄方法

実施例: 使用した移動相 メタノール/リン酸緩衝液(20/80)
カラム **L-column2 ODS**

1. 塩等を取り除いた移動相 : メタノール/水 20/80
2. 有機溶媒の濃度を上げた移動相 : メタノール/水 60/40
3. 有機溶媒100%の移動相 : メタノール 100%

- カラム容量の20倍程度の量で洗浄する
(1 mL/minなら約30分)
- 塩を析出させない
- 脂溶性の夾雑物を多く含む試料の場合、THFで洗浄する
- L-column シリーズの場合、カラムを逆向きで洗浄することも有効
(マイクロカラム以外)