

## カラムを長持ちさせるコツ

カラムの初期性能をより長く維持させることは、正確な分析結果を得るためや、コスト低減のためには必要なことです。近年では充填剤の合成方法や充填方法が進化し、「高耐久性」とうたうカラムが多くなりました。カラム寿命を最大限に延ばすには、取扱説明書の記載事項を遵守するのはもちろんですが、カラムを長持ちさせるためのコツを掴んで、必要に応じて適宜カラムのメンテナンス(洗浄)を行うことが必要です。ここでは、ODSをはじめとする逆相系カラムを長持ちさせる分析条件のポイントと、カラムの性能低下の一番の原因である不溶物や不純物のカラムへの進入を防ぐ方法として、ガードカラムやプレカラムフィルターの使い分け、更にカラムの洗浄方法を紹介します。

**Keywords** 移動相 カラム圧力 温度 不溶物 ろ過 ガードカラム プレカラムフィルター 不純物  
カラム洗浄 逆洗 保管 カラム劣化

### コツ① カラムを長持ちさせる分析条件

#### ■ 有機溶媒比率を高くする

水比率の高い移動相では、試料や移動相に溶解している疎水性物質がODSなどの修飾基に保持され、蓄積していきます。そのまま分析を続けると、蓄積物により分析結果に影響を及ぼします。グラジエント溶離法を用いて分析の都度、若しくは定期的に有機溶媒比率を高くして蓄積物を除去します。後述のガードカラムの装着も効果的です。

アルカリ性移動相では基材シリカゲルが溶解し、酸性移動相では修飾基と基材シリカゲルとの結合が加水分解します。水比率が高い移動相ではそのような移動相pHの影響を強く受け、性能低下が早くなります。そのため、水比率の高い移動相でないと保持が得られない場合でも、pH 2~7程度でイオンペア試薬等を添加して水比率の低い移動相でも保持が得られるようにして、有機溶媒比率を高くする方が、カラムにやさしい分析条件になります。

#### ■ 急激なカラム圧力変化をさせない

有機溶媒と水との混合で移動相の粘性は変化します。特にメタノールなどの高粘度の有機溶媒を用いてグラジエント溶離法を行う際は、組成変化の勾配を緩やかにして、カラムの圧力変動を抑えます。これは、後述のカラムの洗浄の際も同様です。頻繁な送液ポンプのON-OFF(送液量の急激な変動)や、カラム圧力表示がゼロになる前にカラムを配管から外すのも厳禁です。

#### ■ 適切な温度にする

温度を高くすると、カラム圧力が低くなるので、使用できる移動相組成の選択の幅が広がります。ただし温度が高くなると、性能低下が早くなります。Fig.1は25℃と40℃で比較したグラフです。L-column2 ODS では500時間送液後で約10%の性能差が出ましたが、基材シリカゲルと修飾基との結合が弱い充填剤のカラムでは、更に性能低下が早くなります。

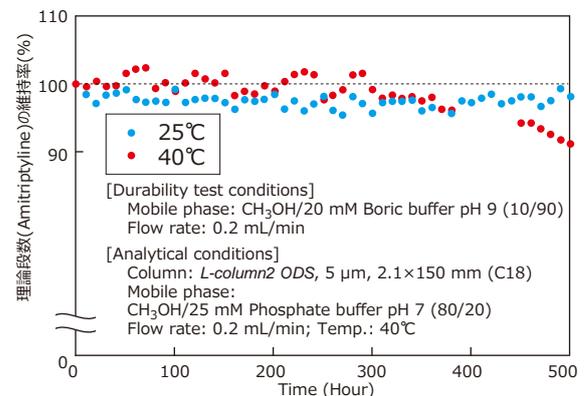


Fig.1 カラム温度の違いによる耐久性比較(pH 9)

### コツ② 分析カラムの汚染を防ぐ

試料溶液中の不溶物やカラムに悪影響を与える不純物は、孔径0.5 μm以下のメンブランフィルターでろ過したり、固相抽出、溶媒抽出などによって、あらかじめ除去します※1。

移動相の不溶物除去は通常孔径0.5 μm以下のメンブランフィルターでろ過します。粒子径3 μm以下のカラムを使用する場合は、カラム粒子径の1/10の孔径のメンブランフィルターでろ過します※2。

カラム両端には充填剤の流出を防ぐため、フィルターを装着しています(Fig.2)。フィルターに不溶物が蓄積すると、ピーク形状の悪化、カラム圧力上昇等の性能低下が起きます。フィルターの細孔に入った不溶物は除去しにくく、カラムを洗浄しても効果はほとんどありません。そこで、ガードカラムやプレカラムフィルターの装着が必須になります。

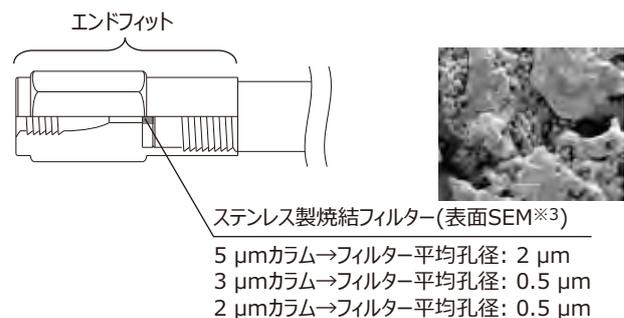


Fig.2 L-column シリーズのカラム構造

※1 JIS K 0124:2011(8.1.4.2試料溶液中妨害成分の除去)より一部引用  
 ※2 JIS K 0124:2011(8.2溶離液の準備8.2.1.1必要事項)より一部引用  
 ※3 充填したカラムからエンドフィットを外し、充填材との接面を撮影しています。丸い粒状のものは充填剤です。

ガードカラム、プレカラムフィルターは分析カラムの手前に取り付けます(Fig.3①)。

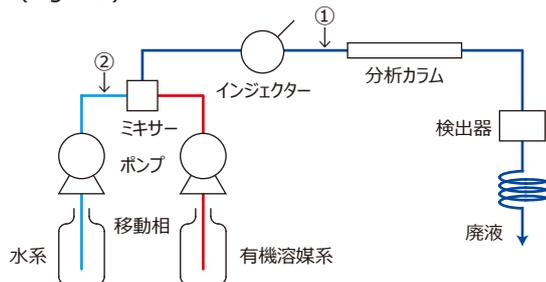


Fig.3 ガードカラム及びプレカラムフィルターの取り付け図

### ■ ガードカラムを取り付ける

ガードカラムは、中に充填剤が入っています。不溶物を捕集するのはもちろん、疎水性が強く充填剤に蓄積しやすい物質やタンパク質、高分子化合物などの不純物を分析カラム手前で捕集するために使用します。

ガードカラムは分析カラムと同じ銘柄を選択し、分析カラムと同じ内径、もしくは内径に近いサイズを使用します。

ガードカラム選択の目安(L-column シリーズ)	
分析カラム	ガードカラム(粒子径5 μm)
内径1.5~3.0 mm	→ 内径2.0 mm
内径4.0~6.0 mm	→ 内径4.0 mm or 4.6 mm
内径10, 20 mm	→ 内径10 mm

### ■ ガードカラムを水系移動相の不純物除去に使用する

水は不純物を含みます(グレードや保管状態により多少異なります)。移動相の水比率が高いと、不純物はカラムに蓄積していきます。ガードカラムを送液ポンプの後ろ、ミキサーの手前に取り付けると(Fig.3②)※4、分析カラムへの不純物の蓄積を防ぐだけでなく、水由来のゴーストピークを抑えることができます(Fig.4)。

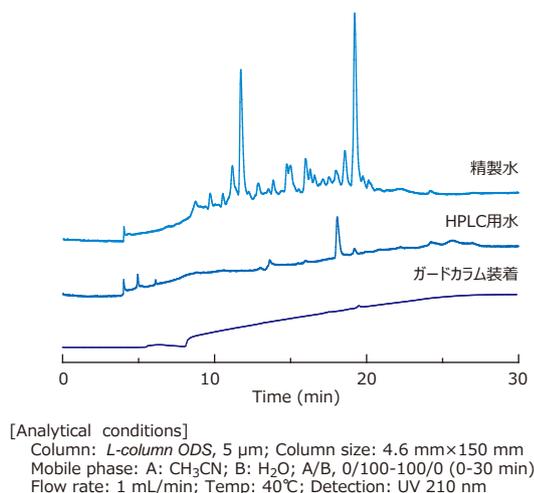


Fig.4 水中の不純物

### ■ プレカラムフィルター(プレフィルター)を取り付ける

セミマイクロカラムや、フィルター孔径が小さい粒子径3 μmや2 μmカラムは、フィルターで除去しきれなかった試料や移動相由来の不溶物や、システム由来の不溶物(プランジャーシールの磨耗による削りカスやセプタムの破片など)の蓄積が原因で性能低下が起きやすくなります。

Fig.5は、ナフタレンを連続注入したときの理論段数の維持率をプロットしたグラフです。プレカラムフィルターを装着していないと、不溶物はダイレクトにカラムに蓄積し、理論段数は急激に低下します。プレカラムフィルターを装着すると、4000回注入後でも初期性能の80%を維持、その後フィルターを交換すれば、ほぼ初期性能に戻ります。これは、L-column プレカラムフィルターが不溶物を効率的に捕集しているためです。これにより、カラムを安定した状態で長期間使用することができます。

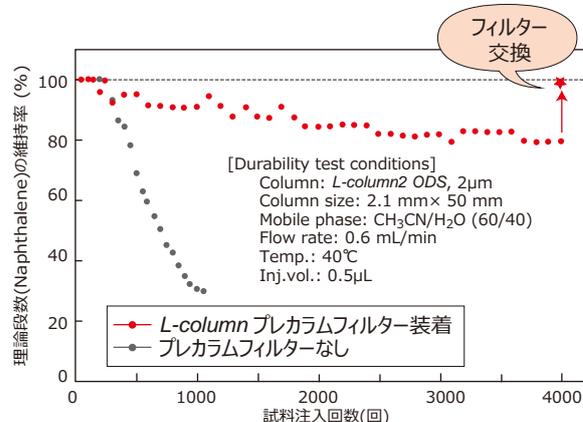


Fig.5 プレカラムフィルターの効果

L-column プレカラムフィルターは、カラムに直結した構造によりデッドボリュームを最小に抑え、試料の拡散がありません(Fig.6)。比較的きれいな試料の分析でもプレカラムフィルターを装着することを推奨します。

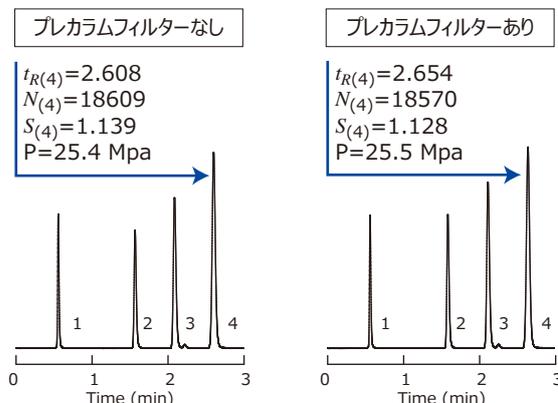
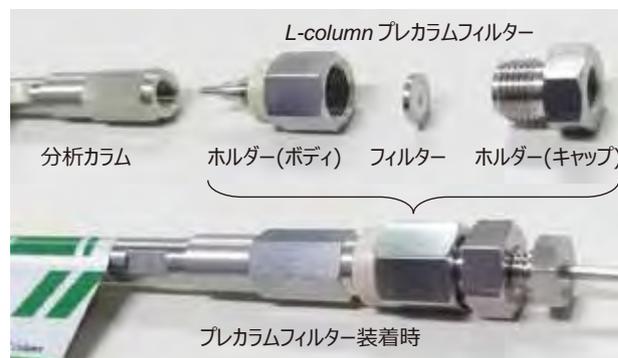


Fig.6 プレカラムフィルターの影響

※4 長さの短いカラムを用いることもあります

## コツ③ カラムは適宜洗浄する

### ■ 一般的な洗浄方法

以下のような分析条件で使用している場合の洗浄方法です。

[分析条件]

移動相: メタノール/リン酸緩衝液(50/50)

カラム: L-column2 ODS, 5  $\mu$ m

カラムサイズ: 4.6 mm I.D.×150 mm L.

①メタノール/水(50/50)、流速1 mL/min以下で約20分送液する

まず緩衝液成分を除くために比率を変えずに有機溶媒/水を送液します。塩の析出や、カラム内に残っている不純物の析出及び変性を防止するためです。

②メタノールの比率を徐々に上げて送液する

ODSをはじめとする逆相系カラムでは、疎水性相互作用<sup>※5</sup>が強い成分がカラム内に残っている場合が多いため、有機溶媒比率を上げることで、洗浄効果が上がります。

③メタノール100%、流速1 mL/min以下で約20分送液する

これで洗浄効果がみられない場合は、更に溶出力の強い溶媒を送液します。一般に使用される溶媒では溶出力が弱い順に、「メタノール<アセトニトリル<THF」となります。

### ■ 逆方向での洗浄(逆洗)

疎水性物質などの不純物は、カラム入口付近に蓄積するため、分析時とは逆に送液した方が、カラムから排出しやすい場合があります。洗浄操作は一般的な洗浄方法と同じですが、不純物が溶解しやすい有機溶媒を選択してください。

最近のカラムは充填技術が発達し、逆方向に送液しても性能が低下することはありませんが<sup>※6</sup>、頻繁に送液方向をかえることは、カラム性能維持に対して決してよいことではありません。

### ■ 洗浄するときの注意点

- 全ての段階において、カラム圧力の急激な変動に注意してください。送液組成を変えた後の初期流速は、分析時と同じか、それ以下にします
- 洗浄溶液の組成を変える際は、相溶性とカラム圧力の変動に注意してください。前段階で除去しきれなかった塩などが析出する場合があります
- 各段階における送液量は、カラム容積の約10倍程度<sup>※7</sup>を目安とします。ただし緩衝液やイオンペア試薬の濃度、カラムに蓄積している物質によって、さらに送液が必要な場合もあります
- 検出器や配管の汚染が懸念される場合は、カラム出口側の配管を必ず外してください
- ガードカラムも同様に洗浄できます。分析カラムを外してから洗浄してください。カートリッジ式ガードカラムは、ホルダーも忘れず洗浄してください
- タンパク質や高分子物質などが吸着している場合や不純物がフィルターに詰まった場合は、洗浄により除去することは難しくなります

洗浄してもピーク形状やカラム圧力に改善が見られない場合は、劣化と判断し、カラムの交換が必要です。

カラム洗浄を試みても性能回復しなかったケースを示します。

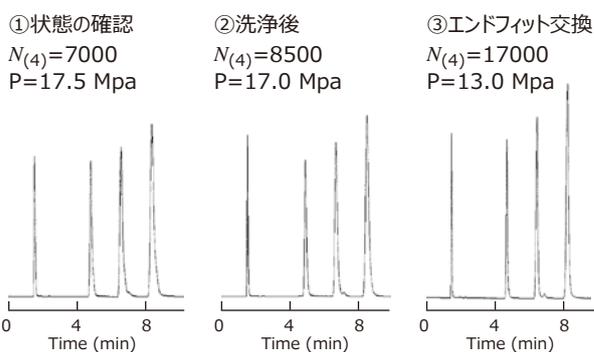
分析対象: 医薬品分析

移動相条件: アセトニトリル/中性付近のリン酸緩衝液

使用期間: 2~3週間

症状: ピークがテーリングし、カラム圧力が上昇した

まずカラムの状態を確認しました(Fig.7①)。カラム圧力が高く、何らかの不溶物の蓄積が原因とみられたので、カラム洗浄(逆洗)を行いました。性能回復しませんでした(Fig.7②)。カラムの入口側のエンドフィットを交換<sup>※8</sup>すると、ほぼ性能を回復しました(Fig.7③)。洗浄ではフィルターに詰まった不純物を完全に除去することはできなかったのです。



[Analytical conditions]

Column: L-column2 ODS, 3 $\mu$ m; Column size: 4.6×150 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>2</sub>O (60/40); Flow rate: 1 mL/min  
Temp.: R.T.; Detection: UV 254 nm; Inj.vol.: 0.5  $\mu$ L  
Sample: 1. Uracil; 2. Benzene; 3. Toluene; 4. Naphthalene

Fig. 7 ピーク形状の異常とその対処



不純物の蓄積による  
充填剤の着色  
(Fig.7のカラムではありません)

移動相や試料はろ過して使用していたため、当初、詰まりの原因は分かりませんでしたが、その後の調査で、リン酸緩衝液の保存容器内で発生した細菌<sup>※9</sup>が不溶物であることがわかりました。

### ■ カラム洗浄の頻度

ピーク形状やカラム圧力に異常がなければ、毎日洗浄する必要はありません。むしろ高頻度の洗浄はかえって性能低下を早めます。一般に2週間程度の保管期間ならば、洗浄は不要です。ただし、強酸性、強アルカリ性、高濃度の緩衝液やイオンペア試薬を使用していて、2~3日程度分析しない場合は、配管を含め洗浄してください。

※5 シラノール基が残存しているカラムでは、静電気相互作用やイオン性相互作用による吸着があります。このとき洗浄溶液に酸を添加すると洗浄効果が上がる場合があります

※6 L-column シリーズでは一部のカラムを除き、逆方向に送液ができますが、カラムメーカーにより逆方向での送液を禁止している場合があります。詳しくは取扱説明書をご覧ください

※7 カラム内を置換するには、カラム容量の約10倍の送液が必要です。例えば4.6 mm I.D.×150mm L.の場合、内容積は約2.5 mLです

※8 ここではフィルターに不純物が詰まると、洗浄効果が得にくいという実験のためエンドフィットを交換しました。エンドフィットを外すと、カラム性能が完全に失われることがあります。絶対におやめください

※9 中性付近のリン酸緩衝液は、細菌が好む環境です。使用の都度調整するか、有機溶媒と混合して保管してください

## コツ④ 保管、その他

### ■ 保管方法

長期間使用せずに保管する場合には、必ずカラム洗浄してください。コツ③の洗浄方法では、メタノール100%をカラム内に満たして終了しています。カラム添付のテストレポートの移動相組成でカラム内を満たして保管しておく、次に使用するとき、テストレポートと同条件で分析すれば、すぐ初期性能と比較でき、カラムの性能を確認することができ、便利です。

カラム内の溶媒が揮発しないように付属のプラグでしっかり密閉し、温度変化の少ない実験室などで保管してください。再度使用する際は、塩を含まない移動相を、通常の半分程度の流速で送液してください※10。

### ■ その他

カラムの初期性能をより長く維持させることは、取扱説明書をよく読み、使用pH範囲や圧力上限を守って使うのももちろんのことです。前述のとおり、頻繁な移動相の変更や、カラム圧力の変動等は、カラムに悪影響を及ぼします。

日常的にカラム圧力やベースラインなどチェックして、早めに対処(洗浄や交換)することが大切です。

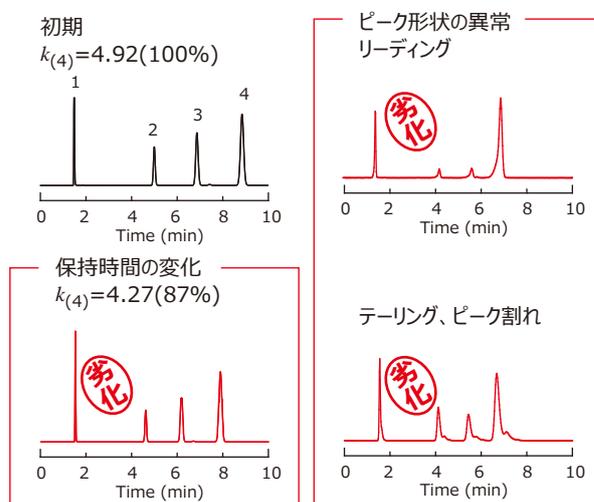
※10 カラム内部の充填剤が乾燥した場合は、有機溶媒比率の高い移動相でゆっくり送液して空気を抜けば、性能劣化することはありません

## カラム劣化の目安

大切に使用していても、性能低下を防ぐことはできません。性能低下したカラムを使って得られたデータは再現性に乏しく、正確ではありません。

L-column シリーズは、初期性能から10%性能低下した時点のカラム劣化の目安にしていますが、分析の目的や精度に応じて、個々に合った基準を設けてください。一般には、保持時間が一割以上変化したり、ピーク形状が異常になったりした場合を示します(Fig.8)。

プレカラムフィルターやガードカラムによる不溶物や不純物の捕集が負荷量を超えると、分析カラムまで汚染されることがあります。ピーク形状やカラム圧力に異常が生じたら、早めに交換してください。



[Analytical conditions]  
Column: C18, 5  $\mu$ m; Column size: 4.6 mm $\times$ 150 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60/40)  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 254 nm;  
Sample: 1. Uracil; 2. Benzene; 3. Toluene; 4. Naphthalene

Fig.8 カラム劣化の例

## L-column2 シリーズ&G-column デモカラムモニター募集

L-column2 ODS をはじめ、L-column2 C8, L-column2 C6-Phenyl のデモを承っております。  
GC分析でお困りなことはありませんか? 内径1.2 mmの大口径カラムG-column をお試しください。

リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店までご連絡ください。

**CERI** 一般財団法人 化学物質評価研究機構  
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan  
<http://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部  
e-mail [chromato@cerij.jp](mailto:chromato@cerij.jp)

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521  
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地