

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### 1) よくあるご質問・トラブルシューティング一覧

| ● よくあるご質問 |                                     | 掲載ページ |
|-----------|-------------------------------------|-------|
| Q1        | カラムの使用可能な圧力の上限は？                    | 34    |
| Q2        | 移動相の流速の上限は？                         |       |
| Q3        | カラムの使用可能なpHは？                       |       |
| Q4        | 緩衝液や塩の濃度は？                          |       |
| Q5        | 移動相の調製方法は？                          | 35    |
| Q6        | 移動相に用いる溶媒のグレードは？                    |       |
| Q7        | アセトニトリルとメタノールの違いは？                  |       |
| Q8        | LC-MSやELSD検出器で使用できる移動相は？            | 36    |
| Q9        | イオンペア試薬を使用するときの注意点は？                |       |
| Q10       | 移動相の送液方向は？                          | 37    |
| Q11       | カラムの使用可能な温度は？                       |       |
| Q12       | カラム出荷時の封入溶媒は？                       |       |
| Q13       | カラムの洗浄方法は？                          |       |
| Q14       | カラムの保管方法は？                          | 38    |
| Q15       | カラムの寿命は？                            |       |
| Q16       | 劣化したカラムに起こる症状は？                     |       |
| Q17       | カラムの劣化状態の調べ方は？                      |       |
| Q18       | セミマイクロカラムを使用するときの注意点は？              | 39    |
| Q19       | UHPLCカラムを使用するときの注意点は？               |       |
| Q20       | 分取カラムで精製できる量は？                      |       |
| Q21       | 同じ装置で逆相と順相の両方を使用するときの注意点は？          |       |
| Q22       | 水100%移動相で使用できるC <sub>18</sub> カラムは？ |       |
| Q23       | 装置とカラムとの接続は？                        |       |
| Q24       | 検出器の使い分けは？                          |       |
| Q25       | 圧力の表示単位は？                           | 40    |
| Q26       | デッドボリュームとは？                         |       |
| Q27       | サンプルの前処理方法は？                        |       |
| Q28       | 内標準物質の選定方法は？                        |       |
| Q29       | 取扱説明書の入手方法は？                        |       |

| ● トラブルシューティング |                                | 掲載ページ |
|---------------|--------------------------------|-------|
| T1            | ピーク形状が悪い                       | 41    |
| T2            | ゴーストピークが出る                     | 42    |
| T3            | ピークが出てこない                      | 43    |
| T4            | ベースラインが安定しない                   | 44    |
| T5            | 保持時間が安定しない                     | 45    |
| T6            | カラム圧力が上昇した                     |       |
| T7            | 送液ポンプの圧力が変動する                  |       |
| T8            | C <sub>18</sub> カラムでサンプルの分離が悪い | 46    |
| T9            | 逆相クロマトグラフィーで保持がほとんどない          |       |
| T10           | 逆相クロマトグラフィーで分析時間が長い            |       |
| T11           | 分離の状態が以前と変わった                  |       |
| T12           | 新品のカラムに変えると分離状態が変わった           | 47    |
| T13           | カラムからの溶出液が着色している(サンプル由来でない場合)  |       |
| T14           | カラムを枯らしてしまった(カラムを乾燥させてしまった)    |       |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### 2) よくあるご質問

#### Q1. カラムの使用可能な圧力の上限は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

| カラム                                               |                                            | カラムサイズなど                            | 圧力の上限  |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| 以下を除く COSMOSIL カラム<br>(主に逆相クロマトグラフィー用カラム)         | 粒子径 5、15 $\mu\text{m}$                     | 分析用カラム (内径 1.0 ~ 7.5 mm)            | 20 MPa |
|                                                   |                                            | 分取用カラム (内径 10 mm 以上)                | 15 MPa |
|                                                   | 粒子径 3 $\mu\text{m}$                        | —                                   | 30 MPa |
|                                                   | 粒子径 2.5 $\mu\text{m}$                      | —                                   |        |
|                                                   | 粒子径 1.8 $\mu\text{m}$                      | —                                   | 80 MPa |
| COSMOCORE カラム                                     |                                            | —                                   | 60 MPa |
| 光学異性体分離用カラム (COSMOSIL CHIRAL シリーズ)                |                                            | —                                   | 30 MPa |
| サイズ排除クロマトグラフィー用カラム<br>(COSMOSIL 5Diol-II、CNT カラム) |                                            | 5Diol-120-II、300-II は 20 MPa まで使用可能 | 15 MPa |
| RNA 分離用カラム                                        |                                            | —                                   | 15 MPa |
| SFC 用カラム                                          | カラム内径 (2.1 mm I.D.、4.6 mm I.D.、10 mm I.D.) |                                     | 30 MPa |
|                                                   | カラム内径 (20 mm I.D.)                         |                                     | 23 MPa |

※使用可能な範囲内であっても大きな圧力変動はカラムに負担をかけ、劣化につながる恐れがありますのでできるだけ避けてください。

#### Q2. 移動相の流速の上限は？

Q1. に記載の使用可能な圧力以下であれば、流速をあげることが可能です。

※できるだけ「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 に示した標準流速での使用をお薦めします。一般的にカラム圧が高くなるほどカラムの寿命は短くなります。

#### Q3. カラムの使用可能なpHは？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

| カラム                               |                                                               | 使用可能な pH      |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------|
| COSMOSIL シリーズ(全多孔性球状シリカゲル)        | COSMOSIL C <sub>18</sub> -MS-II、COSMOSIL 3C <sub>18</sub> -EB | pH 2 ~ 10*    |
|                                   | COSMOSIL C <sub>18</sub> -AR-II、COSMOSIL Protein-R            | pH 1.5 ~ 7.5* |
|                                   | COSMOSIL CHiRAL A、B、C                                         | pH 2 ~ 9*     |
|                                   | 上記以外のカラム                                                      | pH 2 ~ 7.5    |
| COSMOCORE シリーズ(Core-shell 型シリカゲル) | COSMOCORE 2.6C <sub>18</sub>                                  | pH 1.5 ~ 10*  |
|                                   | COSMOCORE シリーズ(2.6C <sub>18</sub> 以外)                         | pH 2 ~ 7.5    |
| COSMOGEL シリーズ(親水性ポリマー)            | COSMOGEL IEX シリーズ                                             | pH 2 ~ 12     |

\*シリカベースのカラムでは一般的な推奨 pH は 2 ~ 7.5 の範囲になります。推奨 pH 外での使用は可能ですが劣化を早める恐れがあります。

#### Q4. 緩衝液や塩の濃度は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

| 分離モード              | 緩衝液、塩の濃度                                                                        |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 逆相、順相、HILIC        | 緩衝液濃度範囲 (りん酸緩衝液など) : 0.005 ~ 0.1 mol/L<br>添加剤濃度 (トリフルオロ酢酸、ギ酸、酢酸など) : 0.1 ~ 1.0% |
| サイズ排除、疎水クロマト、イオン交換 | 緩衝液濃度上限 : 0.5 mol/L 以下<br>塩濃度上限 : 2 mol/L 以下                                    |
| SFC                | 酸性化合物 : 0.1 % トリフルオロ酢酸、0.1 % 酢酸、0.1% ギ酸<br>塩基性化合物 : 0.1 % ジエチルアミン               |

※

- 不溶物はカラムの劣化につながります。緩衝液や塩の溶液は必ずろ過してから使用してください。  
例えばミリカップ -HV (#44054-89) を用いると簡単にろ過することができます。
- 分析中に塩が析出するとカラムや装置の故障の原因になりますので塩が析出しない濃度でご使用ください。
- 有機溶媒と混合後に塩が析出する場合が多いので、HPLC 装置内で移動相を混合する場合には特にご注意ください。
- 装置やカラム内に有機溶媒を多く含む場合、まず塩を含まない移動相で置換した後、塩を含む移動相を送液してください。

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### Q5. 移動相の調製方法は？

「移動相の調製」p. 24、25 をご参照ください。

※

1. 有機溶媒比率、緩衝液の濃度や pH は分析結果に影響を与えるため正確に調製してください。
2. 有機溶媒と水溶液を混合した後は必ず脱気(脱気装置・超音波・アスピレーターなどで)を行ってください。  
なお、脱気装置を使用する場合は脱気する必要はありません。

### Q6. 移動相に用いる溶媒のグレードは？

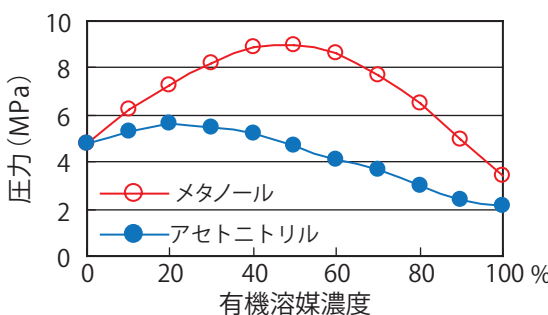
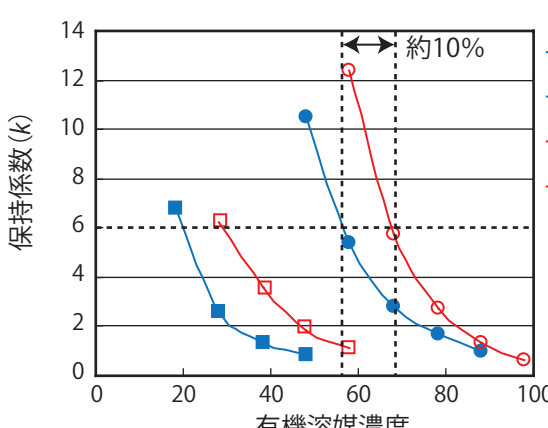
HPLC 用溶媒を使用することをお薦めします。HPLC 用溶媒については、Web ページ(<https://www.nacalai.co.jp/products/256/>)をご参照ください。

※

1. HPLC 以外のグレードの場合は、紫外吸収を持つ不純物の量が多いためグラジエント分析や微量分析には適していません。  
特に 210～220 nm など短波長で検出する場合、ベースラインの安定性や検出感度に大きな差が生じ適正な分析ができない恐れがあります。
2. 酸化防止剤含有の HPLC 以外のグレードの溶媒(テトラヒドロフラン、クロロホルムなど)を使用すると含有されている酸化防止剤がゴーストピークの原因となります。
3. トリフルオロ酢酸など変質しやすい添加剤は、HPLC 用以外のグレードを使用するとベースラインの乱れの原因となる恐れがあります。

### Q7. アセトニトリルとメタノールの違いは？

逆相クロマトグラフィーでは、有機溶媒としてアセトニトリルとメタノールがよく用いられます。  
その違いを表にまとめたので、ご参照ください。

| アセトニトリル(HPLC用)とメタノール(HPLC用)の比較 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 圧 力                            |  <p>Column: 5C<sub>18</sub>-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm<br/>Flow rate: 1.0 ml/min<br/>Temperature: 30°C</p> <p>圧力 (MPa)</p> <p>有機溶媒濃度</p> <p>メタノール<br/>アセトニトリル</p>                                                                          | <p>カラムにかかる圧力は、有機溶媒の種類や混合比によって異なります。<br/>同じ濃度の場合、アセトニトリルのほうがメタノールより圧力は低くなります。</p>                                                                                            |
| 溶出力                            |  <p>Column: 5C<sub>18</sub>-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm<br/>Flow rate: 1.0 ml/min<br/>Temperature: 30°C</p> <p>保持係数 (k)</p> <p>有機溶媒濃度</p> <p>アセトニトリル(サンプル: トルエン)<br/>アセトニトリル(サンプル: フェノール)<br/>メタノール(サンプル: トルエン)<br/>メタノール(サンプル: フェノール)</p> | <p>同じ濃度比の(アセトニトリル/水)と(メタノール/水)では溶出力は(アセトニトリル/水)の方が強くなります。有機溶媒濃度約30%～80%の範囲では、(アセトニトリル/水)の有機溶媒濃度を約10%上げた(メタノール/水)でほぼ同等の溶出力となります。(例: アセトニトリル/水 = 60/40 → メタノール/水 = 70/30)</p> |
| アセトニトリル(HPLC用)                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | メタノール(HPLC用)                                                                                                                                                                |
| 吸光度                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>・低波長(250 nm以下)でのUV吸収が小さい</li> <li>・低波長の分析に◎</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>・低波長(250 nm以下)でのUV吸収が大きい</li> <li>・低波長の分析には×</li> </ul>                                                                              |
| 移動相調製時                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>・水と混ぜると吸熱する</li> <li>・気泡が抜けにくく脱気しにくい</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>・水と混ぜると発熱する</li> <li>・気泡が抜けやすく脱気しやすい</li> </ul>                                                                                      |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### Q8. LC-MSやELSD検出器で使用できる移動相は？

液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) や蒸発光散乱検出器 (ELSD) では揮発性の移動相を使う必要があります。HPLC で汎用されるりん酸緩衝液は使用できません。なお、LC/MS において HPLC 用の溶媒が汎用されていますが、高感度分析を行う場合には LC/MS 用の溶媒を推奨します。

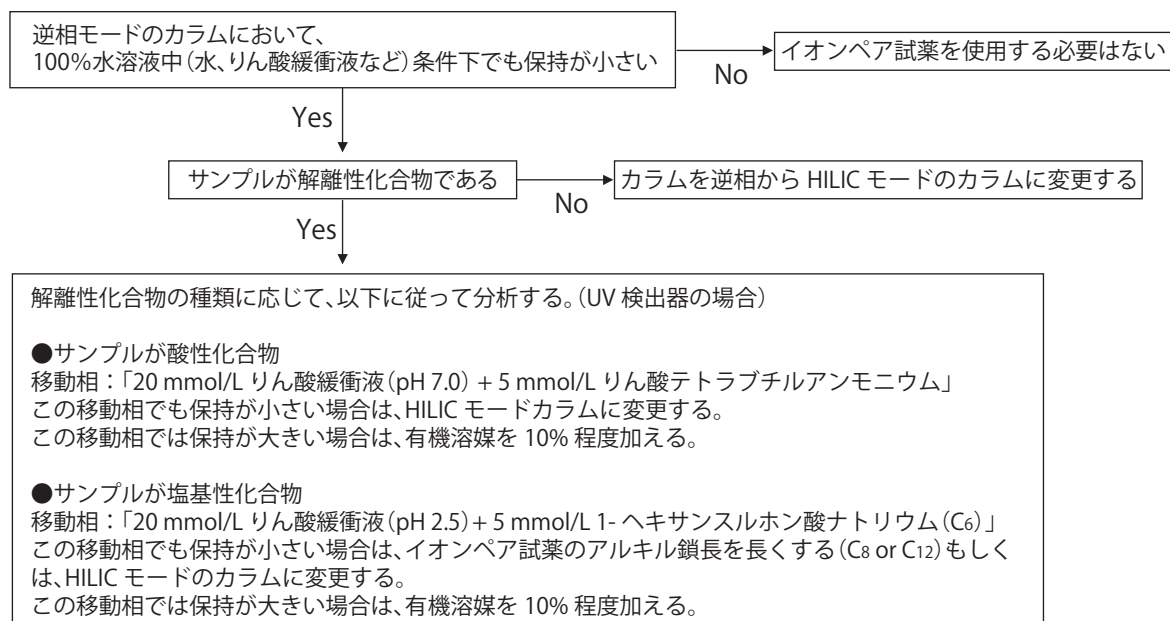
| 分類      | 使用可能な溶媒・添加剤                      |
|---------|----------------------------------|
| 溶媒      | メタノール、エタノール、アセトニトリル、水など          |
| pH 調整試薬 | 酢酸、ギ酸、アンモニア水、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムなど |
| イオンペア試薬 | ジブチルアミン、トリエチルアミンなど               |

※トリフルオロ酢酸は揮発性ですが、強酸であるためイオン化を妨害して感度低下を招くためあまり用いられていません。

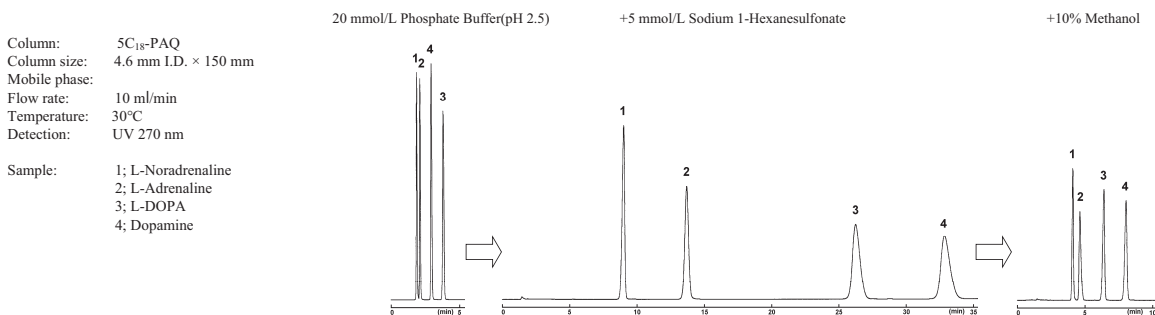
その他、DMSO (ジメチルスルホキシド)、DMF (ジメチルホルムアミド) など揮発しにくい溶媒は少量であればメタノールやアセトニトリルと混合して使用することは可能です。ただし含有量が増えると揮発性が減少し感度が低下する恐れがあります。

### Q9. イオンペア試薬を使用するときの注意点は？

- ・イオンペア試薬の濃度は通常 5 ～ 10 mmol/L 程度で行ってください。
- ・酸性イオンペア試薬の場合は pH 7 の移動相、塩基性イオンペア試薬の場合は pH 2.5 の移動相で行います。
- ・平衡化時間を十分とってください。
- ・以下に弊社が推奨するイオンペア試薬の条件設定方法を示します。



### イオンペア試薬の条件設定



※

1. イオンペア濃度が高くなるほど保持時間は長くなります。
2. 移動相の pH はサンプルが十分にイオン化する pH に設定してください。
3. イオンペア試薬を含まない移動相に比べて長い平衡化時間が必要です。
4. イオンペア試薬を用いるとカラムの洗浄を行っても完全にイオンペア試薬を除去することは難しいため、カラムをイオンペア試薬使用専用にご案内をさせていただきます。

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### Q10. 移動相の送液方向は？

カラムのラベルに記載されている方向に送液してください。

※逆方向に送液するとカラム内部の充填剤の充填状態が乱れ、理論段数の低下の原因となります。

また、カラムの入り口側の先端部分に不純物が吸着していることがあるため、検出器や配管を汚し、ノイズの原因にもなります。

### Q11. カラムの使用可能な温度は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

70℃程度まで分析可能ですが、通常は 20～50℃の一定温度で分析を行ってください。SFC 用カラムは、50℃以下でご使用ください。

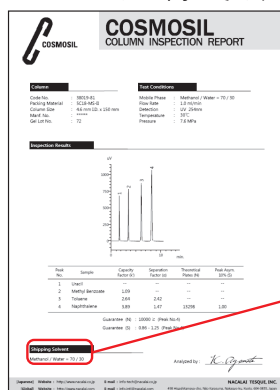
※

1. アルカリ性・酸性条件下での高温分析は、特に劣化を早める恐れがあります。
2. カラムの温度によって保持時間は変動するので分析中は一定の温度を保ってください。なお、一般的に温度が高いほどカラム圧力は低く、保持時間は短くなります。

### Q12. カラム出荷時の封入溶媒は？

カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。

コスモシールに関しては、カラムの検査成績書の下部に記載されています。



Shipping Solvent

Methanol / Water = 70 / 30

### Q13. カラムの洗浄方法は？

- ① カラム内の緩衝液、塩、酸を除去する方法

ご使用の移動相から緩衝液、塩、酸を抜いた溶媒で 10～15 分洗浄後、保管してください。

(例：メタノール / 20 mmol/L リン酸緩衝液 = 50 / 50 を使用していた場合は、メタノール / 水 = 50 / 50 で洗浄してください。)

※有機溶媒と水の比率を変えると、緩衝液の成分が析出する場合があります。

- ② カラム内の吸着物を洗浄する方法、ベースラインが安定しない場合の改善方法

サンプルをよく溶かし、かつ、溶出力の強い溶媒で洗浄してください。コスモシールに関しては以下に示します。

| 分離モード / 用途  | 使用可能な溶媒・添加剤                                                                                                                                                                         |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 逆相  p. 38 へ | (1) サンプルがタンパク質でない場合<br>メタノールやテトラヒドロフランなど<br>逆相クロマトグラフ用カラム洗浄キット (#08966-30)<br>(2) サンプルがタンパク質の場合<br>0.1% 程度トリフルオロ酢酸含有の 50～70% 程度のアセトニトリル / 水<br>※タンパク質の種類により有機溶媒濃度が高くなると析出する場合があります。 |
| 順相          | メタノール、テトラヒドロフラン、エタノールなど                                                                                                                                                             |
| キラル分離用カラム   | 使用条件(逆相、順相)によって異なります。上記をご参照ください。                                                                                                                                                    |
| HILIC       | アセトニトリル / 水 = 50 / 50<br>Sugar-D および HILIC は水 100% での洗浄も可能です。                                                                                                                       |
| サイズ排除       | (例) 蒸留水など                                                                                                                                                                           |
| 疎水クロマト      | (例) 蒸留水など                                                                                                                                                                           |
| イオン交換       | 20～50 mmol/L 緩衝液 (pH 4.5～9.5) など                                                                                                                                                    |
| フラーレン用カラム   | 1,2,4- トリクロロベンゼンなど                                                                                                                                                                  |
| SFC 用カラム    | メタノール、アセトニトリルなど                                                                                                                                                                     |

※シリカゲルを溶解するような pH 7.5 以上のアルカリ性水溶液および、固定相を剥離するような pH 1.5 以下の強酸の溶液は使用できません。シリカベースのカラムでは一般的な使用推奨 pH は 2～7.5 の範囲になります。推奨 pH 外での使用は可能ですが、劣化を早める恐れがあります。

- ③ カラムの入り口側の先端部分につまった不溶物を除去する方法

カラムの送液方法とは逆向きに、通常分析時の半分程度の流速で洗浄します。

※カラムの出口側は検出器から外した状態で行ってください。

- ④ カラム圧力が高い場合には、「4) 分析圧力上昇時の対処方法」 p. 48 をご参照ください。

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### Q14. カラムの保管方法は？

カラムによって異なるため、メーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

#### ① 短期間(数日)の保管

ご使用の移動相から緩衝液、塩、酸を抜いた溶媒で 10 ～ 15 分洗浄後、密栓して保管してください。

(例: メタノール / 20 mmol/L リン酸緩衝液 = 50 / 50 を使用していた場合は、メタノール / 水 = 50 / 50 で洗浄してください)

コスモゲル IEX(イオン交換カラム)は、20 ～ 50 mmol/L 緩衝液 (pH 4.5 ～ 9.5) で保存してください。

#### ② 長期間(1 ヶ月以上)の場合

カビの発生、カラムの乾燥、充填剤の劣化を防ぐため以下の溶媒に置換してください。

| 分離モード / 用途                                                                           | 推奨の保存溶媒                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 逆相  | メタノール / 水 = 70 / 30、アセトニトリル / 水 = 70 / 30 など              |
| 順相                                                                                   | ハロゲンや酸を含まない有機溶媒 (ヘキサン / エタノール = 90 / 10 など)               |
| キラル分離用カラム                                                                            | 【順相】<br>n-ヘキサン / 2-プロパノール = 90 / 10 など<br>【逆相】<br>エタノールなど |
| HILIC                                                                                | アセトニトリル / 水 = 90 / 10 など                                  |
| サイズ排除、疎水クロマト、イオン交換                                                                   | 0.05% アジ化ナトリウム水溶液など                                       |
| フラーレン用カラム                                                                            | トルエンなど                                                    |
| SFC 用カラム                                                                             | メタノール、エタノールなど                                             |

※いずれの場合も密栓をしっかり締め、振動のない冷暗所で保管してください。

動画はこちら！



逆相 HPLC カラムの  
洗浄・保管方法



### Q15. カラムの寿命は？

使用条件(サンプルの種類、移動相の有機溶媒濃度・塩の種類・酸の種類・pH など)によってカラムの寿命は変化するため一概には言えません。

※カラム寿命が短い場合、原因がサンプル由来であることがほとんどです。サンプルの前処理についてご検討いただくことをお勧めします。サンプルの前処理については p. 26 ～ をご参照ください。

### Q16. 劣化したカラムに起こる症状は？

カラム圧力の上昇、理論段数の低下、保持時間の減少、ピーク形状の崩れ、分離度の低下などが起こります。

※対処法については「3) トラブルシューティング」p. 41 ～ をご参照ください。

### Q17. カラムの劣化状態の調べ方は？

カラムに添付されています、「検査成績書」と同条件もしくは同等条件で測定し、カラムの劣化の程度を評価してください。評価される場合は毎回同じ装置で測定し、記録をとっておくと劣化の程度がよく分かります。

各項目についてカラム交換の基準を設け、外れている場合はカラム交換をお勧めします。

| 評価項目      | 評価内容                                             |
|-----------|--------------------------------------------------|
| 保持係数(k)   | 固定相が切断されると保持係数が小さくなります。                          |
| 理論段数(N)   | 充填剤の汚れや充填状態の変化によって低下します。                         |
| ピーク対称性(S) | 充填状態の乱れ、汚れの吸着によってピーク対称性が悪くなります。                  |
| 圧力        | カラムのフィルターの目詰まり、充填剤へのサンプルの吸着、充填剤の微細化などにより、高くなります。 |

【参考】コスモシールに関しては以下に示します。

カラム交換の基準については使用される方の状況によるため一概には言えませんが、目安として 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6 mm I.D. × 150 mm) での参考値を示します。

- 保持係数(k) : ナフタレンの k が初期値の 90% 以下
- ピーク対称性(S) : 0.86 ～ 1.25 の範囲から外れる
- 理論段数(N) : 9,000 以下
- 圧力 : 20 MPa 以上

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### Q18. セミマイクロカラムを使用するときの注意点は？

インジェクター、配管、検出器のセルをセミマイクロ用にしてください。

※移動相の流速をカラムの断面積に比例して設定してください。具体的には、「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 をご参照ください。

### Q19. UHPLCカラムを使用するときの注意点は？

- ・UHPLC 対応の装置を使用してください。
- ・一般の HPLC 装置をご使用の場合には、検出器のレスポンスを短く (例: 0.02 sec) してください。
- ・インジェクター、配管、検出器の検出セルをセミマイクロ用にしてください。
- ・カラムは、使用可能な圧力の上限值以下でご使用ください。コスモシール 2.5  $\mu\text{m}$  シリーズ (全多孔性球状シリカゲル) は 30 MPa 以下、コスモコア シリーズ (Core-Shell 型シリカゲル) は、60 MPa 以下でご使用ください。

### Q20. 分取カラムで精製できる量は？

サンプルの分離度や移動相に対する溶解性により大きく異なります。まず分析用カラムで最大負荷量を決定し、カラムの内径の断面積比から最大分取量を決定します。

※カラムの内径、流速、配管などは「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 をご参照ください。

### Q21. 同じ装置で逆相と順相の両方を使用するときの注意点は？

エタノールなど、どちらの移動相にも混じりあう溶媒で置換してから使用する移動相に切り替えてください。

※逆相系の移動相 (メタノール / 水など) と順相系の移動相 (*n*-ヘキサンなど) は混じりあわないため、直接移動相を交換すると、溶媒置換がうまくできません。

### Q22. 水100%移動相で使用できるC<sub>18</sub>カラムは？

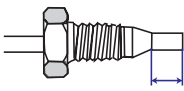
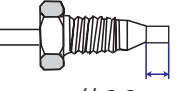
カラムによって異なるためメーカーにお問い合わせください。コスモシールに関しては以下に示します。

COSMOSIL C<sub>18</sub>-PAQ と COSMOSIL 3C<sub>18</sub>-EB が該当します。なお、C<sub>18</sub> カラム以外のカラムについては、お問い合わせください。

### Q23. 装置とカラムとの接続は？

装置側の接続パーツには、主に 2 種類の形状が存在します。下図 (左) の接続パーツ (Waters 型と呼ばれ、一般的な HPLC 装置に汎用されています) と下図 (右) の接続パーツ (UHPLC 装置に汎用されています) があり、それぞれチューブ先端の長さが異なります。また、カラム側のジョイントの形状はメーカーによって異なり、間違ったものを接続するとデットボリュームが生じたり、液漏れの原因となるため、注意してください。

弊社では、コスモシール、コスモゲルカラムは下図 (左) と接続可能であり、コスモコアカラムは下図 (右) と接続可能です。なお、可動式の接続パーツをご使用の場合には、いずれのカラムも接続することが可能です。初めて使用になられる場合には、念のため使用されている装置のメーカーに接続パーツの形状をお問い合わせください。

|                      | HPLC 装置型<br>コスモシール、コスモゲル                                                                       | UHPLC 装置型<br>コスモコア                                                                             |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 接続可能な装置の<br>接続パーツの形状 | <br>約3.3 mm | <br>約2.3 mm |

フェラル先端から出ているチューブの長さが異なります。

### Q24. 検出器の使い分けは？

検出器の選択はサンプルの性質や測定の目的に応じて選択してください。

| 検出器                       | 特長                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 紫外可視光度検出器<br>(UV/VIS 検出器) | <p>【検出方法】 サンプルの吸光度を検出</p> <p>【適用化合物】 UV 吸収がある化合物やラベル化したサンプル (高感度での分析が可能)<br/>UV 吸収がない化合物には適用不可</p> <p>【特長】 簡便であり、最も汎用されています</p>                                                      |
| 蛍光検出器<br>(FLD 検出器)        | <p>【検出方法】 光を照射して励起されたサンプルの蛍光を検出</p> <p>【適用化合物】 蛍光性を持っているサンプル</p> <p>【特長】 UV 吸収が小さい、あるいはない化合物を蛍光ラベル化したサンプルの分析や検出感度が高いため微量成分の分析にも使用します</p>                                             |
| 示差屈折率検出器<br>(RI 検出器)      | <p>【検出方法】 サンプルと移動相の屈折率の差によって検出</p> <p>【適用化合物】 全サンプル</p> <p>【特長】 UV 吸収が小さい、あるいはない化合物 (糖・アルコール類・アミノ酸など) の分析に使用されます<br/>欠点として温度・移動相組成・流量変化に非常に敏感であり取り扱いには注意が必要です<br/>グラジエント分析には適用不可</p> |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

|                        |                                                                                                                                                                   |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 電気化学検出器<br>(ECD 検出器)   | <b>【検出方法】</b> 電極表面のサンプルの酸化還元反応により流れた電流を測定し検出<br><b>【適用化合物】</b> 酸化・還元性化合物など電気化学的に活性化化合物<br><b>【特長】</b> UV より高感度に検出できるので生体マトリックス内の微量成分の分析などに使用                      |
| 蒸発光散乱検出器<br>(ELSD 検出器) | <b>【検出方法】</b> 移動相を蒸発させることにより目的化合物を微粒子化し、その散乱光を測定し検出<br><b>【適用化合物】</b> UV 吸収が小さい、あるいはない化合物（糖・アルコール類・アミノ酸など）<br><b>【特長】</b> グラジエント分析にも使用可能<br>欠点として不揮発性の移動相は使用できません |
| 質量分析検出器<br>(MS 検出器)    | <b>【検出方法】</b> サンプルをイオン化し、m/z に応じて分離・検出する<br><b>【適用化合物】</b> 液体に溶解しイオン化する化合物<br><b>【特長】</b> 分離した成分の MS スペクトルを測定することができ、定性分析に有用です<br>欠点として不揮発性の移動相は使用できません           |

### Q25. 圧力の表示単位は？

多くは SI 単位である MPa (メガパスカル) で表示されています。

※海外製や古い装置ではほかの表示も見られます。(換算式:  $1 \text{ MPa} = 10.197 \text{ kgf/cm}^2 = 145.0 \text{ psi} = 10 \text{ bar}$ )

### Q26. デッドボリウムとは？

デッドボリウムとは、インジェクターから検出器までの流路で、カラム以外の分離に関係のない容積を指します。

※

1. デッドボリウムが大きいと、サンプルの拡散が起こり、ピーク形状の異常を引き起こす恐れがあります。
2. インジェクターや検出器のセル、インジェクターから検出器までの配管は、カラム内径にあったものを選択しデッドボリウムをできるだけ減らす必要があります。

配管の内径、セルの選択については「4) 参考資料 カラム内径について」p. 21 をご参照ください。

### Q27. サンプルの前処理方法は？

「サンプルの前処理」p. 26 ～ をご参照ください。

### Q28. 内標準物質の選定方法は？

内標準物質は以下のような条件を満たせばどのような化合物でも使用可能です。

- ・目的物質とピークが重ならず、かつ近い位置にピークが現れること
- ・テーリングや吸着を起こさないこと
- ・入手が容易で安価であること
- ・化合物として安定であること

日本薬局方では、Methyl *p*-Hydroxybenzoate ～ Butyl *p*-Hydroxybenzoate が汎用されています。

### Q29. 取扱説明書の入手方法は？

弊社の場合、各製品ページ (<https://www.nacalai.co.jp/products/chromatography/>) の「関連資料」から入手ください。

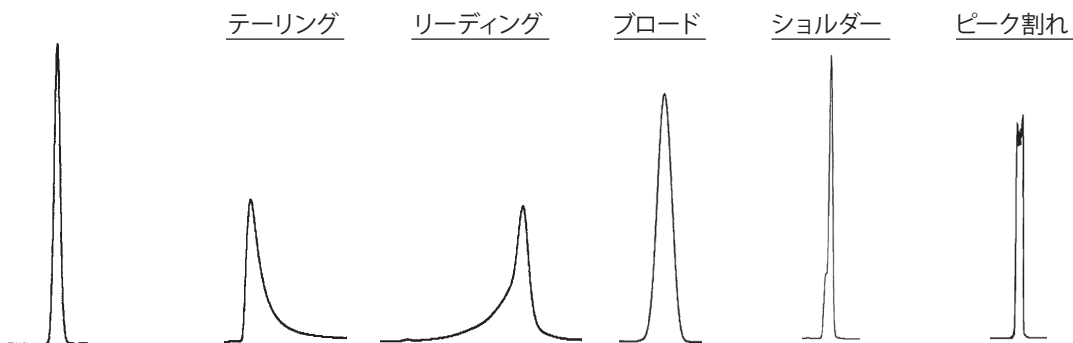
## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### 3) トラブルシューティング

#### T1. ピーク形状が悪い

正常なピーク形状

異常なピーク形状



| 症状                                                                | 原因                                                        | 対処法                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 特定のピークのみテーリングしている。                                                | 塩基性化合物と充填剤が好ましくないイオン性相互作用をしている可能性があります。                   | 残存シラノールの少ないカラムに変更してください。コスモシルでは、3C <sub>18</sub> -EB または C <sub>18</sub> -MS-II をお勧めします。あるいは、移動相に酸を 0.1 ~ 1.0% 程度添加します。                               |
|                                                                   | 金属配位性化合物と充填剤が好ましくない配位性相互作用をしている可能性があります。                  | 移動相に 5 mmol/L 程度のエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム (EDTA・2Na) を添加します。                                                                                              |
|                                                                   | サンプルと充填剤が好ましくない水素結合性相互作用をしている可能性があります。                    | 有機溶媒の種類を変更します。<br>(例: アセトニトリルからメタノールに変えるなど)                                                                                                           |
| 全てのピークがテーリングしている。                                                 | 充填剤に隙間が発生している。もしくはカラムが劣化している可能性があります。                     | カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。                                                                                                                             |
|                                                                   | カラムを交換しても改善しない場合は、カラム外でバンド拡散している可能性があります。                 | デッドボリウムを減らしてください。(デッドボリウムに関しては「Q26. デッドボリウムとは？」 p. 40 をご参照ください。                                                                                       |
| ピークがリーディングしている。                                                   | 移動相と比べて溶出力や pH の差が大きいサンプル溶媒を大量に注入したことが原因である可能性があります。      | サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒を少量用いて溶かし、移動相で希釈してください。<br>注入量を 1/2 ~ 1/10 程度に減らしてください。                                                               |
| ピークがブロードになる。<br>タンパク質などの高分子<br>(一般的な目安: 分子量 2,000<br>以上) を分析している。 | 分子サイズの大きなタンパク質が充填剤の細孔径に入れないことが原因である可能性があります。              | 大きな細孔を持つ充填剤のカラムに変更してください。コスモシルでは、細孔径が大きいタンパク質分離用逆相クロマトグラフィー用カラムである Protein-R (細孔径 30 nm) をお勧めします。                                                     |
|                                                                   | サンプルが過負荷である可能性があります。                                      | 注入量を 1/2 ~ 1/10 程度に減らしてください。                                                                                                                          |
|                                                                   | 特定のピークのみブロードになる場合、充填剤に化合物が吸着を起こしている可能性があります。              | 吸着が起こりにくいカラムに変更してください。コスモシルでは、タンパク質分離用逆相クロマトグラフィー用カラムである Protein-R をお勧めします。                                                                           |
|                                                                   | 全てのピークがブロードになる場合、カラムが劣化している可能性があります。                      | カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。                                                                                                                             |
| ピークがブロードになる。<br>低分子(分子量 2,000 以下)<br>を分析している。                     | 疎水クロマトグラフィー用カラム(HIC)において、サンプル溶液中の硫酸アンモニウム濃度が低すぎる可能性があります。 | 硫酸アンモニウム濃度を 1 mol/L 以上にして再調製してください。                                                                                                                   |
|                                                                   | サンプルが過負荷である可能性があります。                                      | 注入量を半分~ 1/10 程度に減らしてください。                                                                                                                             |
|                                                                   | 特定のピークのみブロードになる場合、充填剤に化合物が吸着を起こしている可能性があります。              | 例えば、サンプルが塩基性化合物やフェノール性化合物の場合、移動相に酸を添加して再検討してください。酸を添加しても改善しないときは、異なる充填剤のカラムへ変更してください。<br>コスモシルでは、3C <sub>18</sub> -EB、C <sub>18</sub> -MS-II をお勧めします。 |
|                                                                   | 全てのピークがブロードになる場合、カラムが劣化している可能性があります。                      | カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。                                                                                                                             |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

| 症状                         | 原因                                          | 対処法                                                                               |
|----------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 特定のピークのみショルダーやピーク割れしている。   | 2つ以上の成分が含まれており、わずかに分離している可能性があります。          | 2つ以上の成分をより分離できる分析条件を検討してください。                                                     |
|                            | 移動相とサンプル溶媒において、溶出力やサンプルの溶解性が大きく異なる可能性があります。 | サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒に溶かし移動相で希釈してください。<br>注入量を 1/2 ～ 1/10 程度に減らしてください。 |
|                            | イオン性のサンプルにおいて、解離・非解離が混在している可能性があります。        | イオン性のサンプルにおいては、移動相の pH をイオン性サンプルの $pK_a \pm 2$ 以上に設定しなおしてください。                    |
|                            | 糖の HILIC 分析の場合、アノマー分離している可能性があります。          | 糖においては、アノマー分離しにくい分析条件を検討してください。<br>コスモシールでは、Sugar-D をお勧めします。                      |
| 全てのピークがショルダーやピーク割れを起こしている。 | 移動相とサンプル溶媒において、溶出力やサンプルの溶解性が大きく異なる可能性があります。 | サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒に溶かし移動相で希釈してください。<br>注入量を 1/2 ～ 1/10 程度に減らしてください。 |
|                            | カラムが劣化している可能性があります。                         | カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。                                                         |

### T2. ゴーストピークが出る

| 該当する分離モード                                                   | 原因                                   | 対処法                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <逆相><br>グラジエント溶離法を用いている。                                    | 水に含まれる不純物ピークである可能性があります。             | 新しい HPLC 用蒸留水をご使用ください。<br>プレカラムを接続してください。<br>「5) グラジエント溶離法におけるベースラインの乱れ」p. 50 をご参照ください。        |
| <逆相><br>タンパク質の分析を行っている。                                     | 前に分析したサンプルの一部がカラムに吸着し、次の分析時に溶出しています。 | カラムを洗浄してください。洗浄方法は「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 をご参照ください。<br>コスモシールでは、吸着が起こりにくい Protein-R をお勧めします。    |
| <全ての分離モード><br>サンプル溶媒と移動相が異なっている。                            | サンプル溶媒のピークである可能性があります。               | サンプルを移動相に溶かしてください。溶けない場合は、溶解する溶媒に溶かし移動相で希釈してください。                                              |
| <全ての分離モード><br>ブランク分析として移動相を注入した時にピークが出現(分析ごとにピーク面積の減少が見られる) | インジェクターの汚染が考えられます。                   | 汚れを溶解するような溶媒(メタノールなど)をシリンジを用いて 20 mL 程度注入して洗浄してください。<br>オートインジェクターの場合は洗浄方法(溶媒、量、回数など)をご確認ください。 |
|                                                             | マイクロシリンジの汚染が考えられます。                  | 汚れを溶解するような溶媒(メタノール、クロロホルム、水など)で洗浄してください。超音波洗浄が有効です。                                            |
| 上記以外                                                        | サンプルのコンタミネーションや劣化が考えられます。            | サンプルを再調製してください。                                                                                |
|                                                             | 移動相の安定剤。                             | 安定剤を含まない HPLC 用溶媒で調製してください。                                                                    |
|                                                             | サクションフィルターが汚れている可能性があります。            | サクションフィルターを 2-プロパノールに浸し、超音波洗浄器で 5 分洗浄してください。                                                   |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### T3. ピークが出てこない

【原因特定方法】まず、 $t_0$  を分析してください。

※  $t_0$  とは、カラムに全く保持されない物質の溶出時間のことです。カラムに添付されている検査成績書の一番前のピークの物質などをご使用ください。(クロマトグラム p.5 をご参照ください)

| $t_0$ を分析した結果         | 該当する項目  |
|-----------------------|---------|
| $t_0$ の保持時間はいつもと変わらない | カラム別対処法 |
| $t_0$ の保持時間がいつもと違う    | ポンプの異常  |
| $t_0$ が検出されない         | 検出器の異常  |

#### ● カラム別対処法(※コスモシールについて記載)

| 該当するカラム                                                           | 原因                                                                  | 対処法                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 逆相クロマトグラフィー用カラム                                                   | サンプルの疎水性が高い場合は、カラム内にとどまっている可能性があります。                                | サンプルが溶出してくる程度まで、移動相の溶出力を高めてください。<br>① メタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒濃度を上げてください(最大 100% まで)。<br>② それでも溶出しない場合は、さらに溶出力の高い有機溶媒(テトラヒドロフランやクロロホルムなど)を 10 ~ 30% 程度メタノールやアセトニトリルに混ぜた移動相に変更してください(例: テトラヒドロフラン / メタノール = 30 / 70)。                                                             |
|                                                                   | 金属配位性化合物や塩基性化合物などがカラムに吸着している可能性があります。                               | 塩基性化合物の場合<br>残存シラノールの影響が考えられます。コスモシール 3C <sub>18</sub> -EB または C <sub>18</sub> -MS-II など残存シラノールの少ないカラムへ変更してください。あるいは、移動相に酸(トリフルオロ酢酸や酢酸など)を 0.1 ~ 1.0% 程度添加してください。<br><br>金属配位性化合物の場合<br>充填剤に含まれる微量の金属不純物との配位が考えられます。移動相に 5 mmol/L 程度エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム(EDTA・2Na)を添加してください。 |
| 順相クロマトグラフィー用カラム                                                   | サンプルの親水性が高い場合は、カラム内にとどまっている可能性があります。                                | サンプルが溶出してくる程度まで、移動相の溶出力を高めてください。例えば、溶出力の高い有機溶媒(エタノールなど)へ変更、もしくは含有量を高めてください。                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                   | 金属配位性化合物や塩基性化合物などがカラム内で吸着している可能性があります。                              | 移動相に酸(トリフルオロ酢酸や酢酸など)を 0.1 ~ 1.0% 程度添加してください。                                                                                                                                                                                                                                 |
| 糖分析専用カラム<br>(Sugar-D・NH <sub>2</sub> -MS)や親水性クロマトグラフィー用カラム(HILIC) | コスモシール 5NH <sub>2</sub> -MS を使用している場合は固定相のアミノ基にサンプルが吸着している可能性があります。 | 吸着を起こしにくい コスモシール Sugar-D を使用してください。                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                   | サンプルの親水性が強い場合はカラム内にとどまっている可能性があります。                                 | サンプルが溶出してくる程度まで、移動相の水の割合を増やしてください。<br>例: コスモシール Sugar-D やコスモシール HILIC の場合<br>水 100% の条件まで使用可能です。<br>例: コスモシール 5NH <sub>2</sub> -MS の場合<br>水 50% の条件(例アセトニトリル / 水 = 50 / 50)まで使用可能です。                                                                                         |
|                                                                   | HILIC カラムにおいては、りん酸基のある化合物は溶出しない可能性があります。                            | 移動相をりん酸緩衝液にしてください。                                                                                                                                                                                                                                                           |
| サイズ排除クロマトグラフィー用カラム(Diol)                                          | サンプルとシラノール基が、イオンの相互作用を起こしている可能性があります。                               | 移動相のイオン強度を高めるため、0.3 mol/L 程度塩化ナトリウムなどの塩を加えてください。<br><br>イオンの相互作用を起こさないように、移動相を pH 5.5 以下に調整してください。                                                                                                                                                                           |
|                                                                   | 疎水的吸着を起こしている可能性があります。                                               | 移動相に 10 ~ 50% 程度有機溶媒(メタノールなど)を、添加してください。                                                                                                                                                                                                                                     |
| 疎水クロマトグラフィー用カラム(HIC)                                              | サンプルの疎水性が高すぎる可能性があります。                                              | 5% 程度有機溶媒(メタノールやアセトニトリルなど)を、添加してください。                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                   | インジェクションする前に、サンプルが硫酸沈殿している可能性があります。                                 | 硫酸アンモニウム濃度を 0.5 mol/L 以下まで下げ、沈殿しないようにしてください。                                                                                                                                                                                                                                 |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### ● ポンプの異常

| 原因              | 対処法                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------|
| ポンプ内で気泡が発生している。 | 気泡を抜いてください。「T7. 送液ポンプの圧力が変動する」p. 45 をご参照ください。 |
| 液漏れしている。        | 増締めや配管の交換をしてください。                             |

### ● 検出器の異常

| 原因                        | 対処法                                                                                                                               |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 検出器が正しく接続されていない。          | 検出器付属の取扱説明書を参考に正しく接続してください。                                                                                                       |
| 検出器からレコーダーに信号が適切に送られていない。 | 信号が出ていないなど検出器自体に問題がある場合は、機器メーカーにお問い合わせください。                                                                                       |
| サンプルの UV 吸収にあう領域で分析していない。 | サンプルに対して適切な UV 吸収領域で分析してください。UV 吸収がない、もしくは UV 吸収が小さい場合は、示差屈折率 (RI) 検出器や蒸発光散乱 (ELSD) 検出器などサンプルにあった検出器を使用してください。またはサンプルをラベル化してください。 |

### T4. ベースラインが安定しない

| 原因                                                                                                                         | 対処法                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| カラム内に不純物などが蓄積されて汚れており、その汚れが溶出している可能性があります。                                                                                 | 「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 に示す溶出力の強い溶媒で洗浄を行ってください。                                                                                                                                                                 |
| コスモシル PE-MS・ $\pi$ NAP・PYE・NPE・PBr・Cholest などで固定相自体に UV 吸収があるカラムを使用している場合、微量の固定相の剥離によって (UV 吸収があるため) ベースラインが安定しない可能性があります。 | 「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 に示す溶出力の強い溶媒で洗浄を行ってください。                                                                                                                                                                 |
| ポンプの圧力が変動している場合は、ポンプに空気が混入している可能性があります。                                                                                    | 気泡を抜いてください。「T7. 送液ポンプの圧力が変動する」p. 45 をご参照ください。                                                                                                                                                                  |
| 示差屈折率検出器 (RI 検出器) を使用している場合                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                |
| 温度変化が激しいことが原因である可能性があります。                                                                                                  | カラムオープンを用いてカラムの温度を一定にするだけでなく、エアコンの風が直接 RI 検出器や配管に当たらないようにしてください。<br>※装置や配管をエアコンの風が当たらないように覆うなども有効です。                                                                                                           |
| (移動相中の) 残存ガス量が増加していることが原因である可能性があります。                                                                                      | 脱気 (脱気装置・超音波・アスピレーターなど) を必ず行ってください。                                                                                                                                                                            |
| 紫外可視光度検出器において針のようなピークが出ている場合                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                |
| カラムおよび検出器に気泡が混入している可能性があります。                                                                                               | 検出器の出口を押さえ、加圧し気泡を抜いてください。<br>※圧力をかけすぎるとセルが破損する恐れがありますので注意してください。それでも改善しない場合は、カラムを装着していない状態で粘度の高い溶媒 (2- プロパノール など) を 15 分程度流してください。                                                                             |
| カラムの温度が移動相の沸点以上になっており、カラム内に気泡が発生している可能性があります。                                                                              | 適切なカラムの温度で分析してください。通常カラムの温度は 20 ～ 50℃で行います。<br>※正確な分析を行うために、移動相の沸点より 20 ～ 50℃低い温度に設定することをお勧めします。(例: メタノール [沸点 (b.p) : 64.7℃] の場合、45℃以下で分析を行うことをお勧めします)                                                         |
| 移動相に緩衝液やイオンペア試薬を使用している場合                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                |
| カラムの平衡化不足が原因である可能性があります。                                                                                                   | 平衡化時間を長くしてください。特に、緩衝液やイオンペア試薬を使用した場合、塩を含まない移動相に比べて長い平衡化時間が必要です。                                                                                                                                                |
| 移動相中に塩などが析出している可能性があります。塩が析出している場合は、移動相貯槽が濁っている、もしくは沈殿があるなど目視で確認することができます。                                                 | (a) 緩衝液の濃度を下げる。<br>(例: 100 mmol/L から 20 mmol/L へ)<br>(b) 緩衝液の種類を変更する。<br>(例: リン酸バッファーから酢酸バッファーへ)<br>(c) 有機溶媒濃度を下げる。<br>(例: 70% アセトニトリル / 緩衝液 = 70 / 30 から 50 / 50 へ)<br>(d) 有機溶媒を変更する。<br>(例: アセトニトリルからメタノールへ) |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### T5. 保持時間が安定しない

#### ● カラムに原因

| 該当するカラム                                                              | 原因                                                                              | 対処法                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 逆相クロマトグラフィー用カラム                                                      | 移動相にイオンペア試薬を使用している場合、カラムの平衡化不足が原因である可能性があります。                                   | カラムの平衡化時間を長めにしてください。イオンペア試薬を用いるとイオンペア試薬を用いない分析に比べてカラムの平衡化時間が長くなります。                                                                                             |
|                                                                      | C <sub>18</sub> カラムで移動相を水 100% で分析している場合、C <sub>18</sub> 基の寝込みが原因ではないかといわれています。 | 水 100% の条件でも使用可能なカラムに変更してください。コスモシールでは、C <sub>18</sub> -PAQ を用いることをお勧めします。<br>※保持時間の再現性が悪くなってしまったカラムは 50% 以上の有機溶媒：水（例：メタノール / 水 = 70 / 30 など）で洗浄すると再生する場合があります。 |
| 順相クロマトグラフィー用カラム                                                      | 有機溶媒中に含まれる微量の水が保持時間に影響を与える可能性があります。                                             | 水を含まない移動相を検討してください。<br>水を含むサンプル溶媒を使用している場合は、サンプル溶媒を変更するか、もしくは注入量を減らしてください。水が入ってしまった場合は、エタノールを用いて洗浄することにより再生することが可能です。                                           |
| 糖分析用専用カラム<br>(Sugar-D・NH <sub>2</sub> -MS) や親水性クロマトグラフィー用カラム (HILIC) | 固定相の微量な剥離。                                                                      | コスモシール Sugar-D および コスモシール HILIC の場合は、水 100% で、また コスモシール NH <sub>2</sub> -MS では、アセトニトリル / 水 = 50 / 50 で 15 分程度洗浄することによって改善される可能性があります。                           |

#### ● その他

| 原因                                       | 対処法                                                                                                        |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ポンプのチェックバルブに気泡が発生しています。                  | 気泡を抜いてください。「T7. 送液ポンプの圧力が変動する」p. 45 をご参照ください。特に順相クロマトグラフィーで用いる溶媒は、沸点が低いため気泡が発生しやすく、また粘度が低いため気泡が流れ出にくくなります。 |
| ポンプが液漏れしている可能性があります。                     | 液漏れ箇所の増締めや締めなおしを行ってください。それでも改善しない場合は、部品の交換を行ってください。                                                        |
| カラムオープンを用いていない場合は、季節や時刻によってカラムの温度が変化します。 | 恒温槽やカラムオープンを用いて一定温度で分析を行ってください。<br>※恒温槽やカラムオープンは室温の影響も受けますので設定温度が室温に近い場合には室温 +5℃ 以上に設定することをお勧めします。         |

### T6. カラム圧力が上昇した

「4) 分析圧力上昇時の対処方法」p. 48 をご参照ください。

### T7. 送液ポンプの圧力が変動する

| 原因                        | 対処法                                                                                                                                                      |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ポンプのチェックバルブの部分に気泡が発生している。 | ポンプの取扱説明書に従って（ドレインバルブをあけ、送液を行うなど）、チェックバルブの気泡を抜いてください。<br>それでも改善しない場合は、チェックバルブの洗浄を行ってください。チェックバルブの洗浄方法も、ポンプの取扱説明書に従って行ってください。例えば水に浸して、超音波洗浄をするなども有効な方法です。 |

※

- 順相クロマトグラフィー用カラムにおいて、本現象が頻繁に発生する場合は、プレカラムを接続し分析圧力を上げることで気泡が流れやすくなります。
- 気泡が発生しないように、移動相は必ず脱気（脱気装置・超音波・アスピレーターなどで）を行ってください。

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### T8. C<sub>18</sub>カラムでサンプルの分離が悪い

| 対処法                              | 補足                                                                                                                      |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| カラム長を長くします。                      | ある程度分離できているが、もう少し分離したい場合に有効です。カラム長に比例して圧力が上昇します。分析時間が長くなります。                                                            |
| 移動相条件を変えます。<br>(pH、有機溶媒の種類や濃度など) | ある程度の知識や経験が必要になります。<br>複雑な条件は再現性に欠ける場合が多いので注意が必要です。                                                                     |
| 疎水性以外の相互作用を持つ充填剤を使用します。          | 分子形状やπ電子などサンプルの疎水性以外の特性を識別し分離します。<br>弊社ではさまざまな相互作用を持つ充填剤を販売しています。「COSMOSIL シリーズ / 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用」p. 64 ~をご参照ください。 |

### T9. 逆相クロマトグラフィーで保持がほとんどない

| 対処法                              | 補足                                                                           |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| イオンペア試薬を使用します。                   | 疎水性のあるイオンペア試薬とサンプルとがイオン対を形成することにより、固定相に分配されるようになり保持が生じます。非解離性のサンプルには適用できません。 |
| コスモシル PBr を使用します。                | C <sub>18</sub> カラムで保持が小さい場合に効果を発揮する逆相クロマトグラフィー用カラムです。                       |
| 親水性クロマトグラフィー (HILIC) 用カラムを使用します。 | 逆相クロマトグラフィーとは異なり、疎水性の低いサンプルほど強く保持される傾向があります。                                 |

### T10. 逆相クロマトグラフィーで分析時間が長い

| 対処法               | 補足                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| グラジエント溶離法を用います。   | 分析中に移動相の有機溶媒濃度を変化させることにより分析時間の短縮が可能になります。欠点としては、装置間差がある、ベースラインが上昇する、分析ごとに平衡化が必要などがあげられます。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| UHPLC 用カラムを使用します。 | 弊社では全多孔性球状シリカゲル充填剤を用いたコスモシル 1.8 μm シリーズ ( <a href="https://www.nacalai.co.jp/products/419/">https://www.nacalai.co.jp/products/419/</a> )、コスモシル 2.5 μm シリーズ ( <a href="https://www.nacalai.co.jp/products/298/">https://www.nacalai.co.jp/products/298/</a> )、およびコアシェル型シリカゲル充填剤を用いたコスモコア 2.6 μm シリーズ ( <a href="https://www.nacalai.co.jp/products/299/">https://www.nacalai.co.jp/products/299/</a> ) をラインアップしています。 |
| 移動相条件を検討します。      | pH、有機溶媒の種類や濃度などを検討することにより改善する可能性があります。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 疎水性の低い充填剤を使用します。  | 弊社ではコスモシル CN-MS を推奨しています。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

### T11. 分離の状態が以前と変わった

| 該当する現象         | 原因                                             | 対処法                        |
|----------------|------------------------------------------------|----------------------------|
| 理論段数の低下        | 充填状態の劣化(充填剤の乱れ・へこみ・亀裂など)やシリカゲルが溶解している可能性があります。 | カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。  |
| 保持時間の減少や分離度の低下 | 充填剤への不純物の蓄積が起こっている可能性があります。                    | カラムを洗浄することにより再生する可能性があります。 |
|                | 固定相の剥離が起こり、保持時間が低下している可能性があります。                | カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。  |

## 07 よくあるご質問・トラブルシューティング

### T12. 新品のカラムに変えると分離の状態が変わった

| 原因                               | 対処法                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|----------------------------------|----------|----------------------------------|----------|--------------------|----------|----------------|----------|
| 使用初めのカラムの平衡化不足が考えられます。           | 移動相の平衡化時間を長くしてください。標準サンプルを何度か注入してください。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
| 以前使っていたカラムの劣化が考えられます。            | カラムが劣化すると保持時間の減少、ピーク形状の変化などが起こります。その場合は、新しいカラムでの分析結果が正しい分離の状態となります。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
| カラムのロット間差の可能性があります。              | <p>カラムの名称と製造番号、現在の分離の状態などを弊社までご連絡ください。</p> <p>(a) 分析条件設定時に、3 ロットの充填剤を評価する。<br/>         弊社では、コスモシールの高い再現性を証明するために充填剤ロットの異なる 3 種類のカラムの提供を行っています。詳細はお問い合わせください。以下の 4 製品については 3 ロット 4.6 × 150 mm の 3 本セットをご用意しています。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>充填剤</th><th>製品番号</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II</td><td>09397-73</td></tr> <tr> <td>COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II</td><td>09396-83</td></tr> <tr> <td>COSMOSIL Cholester</td><td>07970-03</td></tr> <tr> <td>COSMOSIL HILIC</td><td>09385-23</td></tr> </tbody> </table> <p>(b) ロット間の影響が出にくい分析条件を設定する。</p> | 充填剤 | 製品番号 | COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II | 09397-73 | COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -AR-II | 09396-83 | COSMOSIL Cholester | 07970-03 | COSMOSIL HILIC | 09385-23 |
| 充填剤                              | 製品番号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
| COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II | 09397-73                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
| COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -AR-II | 09396-83                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
| COSMOSIL Cholester               | 07970-03                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
| COSMOSIL HILIC                   | 09385-23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |
| 移動相、流速、温度などカラム以外の要因。             | 原因箇所の特定をしてください。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |      |                                  |          |                                  |          |                    |          |                |          |

### T13. カラムからの溶出液が着色している (サンプル由来でない場合)

| 原因                                        | 対処法                                                            |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 固定相の微量な剥離物や以前の分析時にカラムに吸着していたサンプルが溶出しています。 | 溶出力(メタノールなど)の強い溶媒や逆相クロマトグラフ用カラム洗浄キット(# 08966-30)でカラムを洗浄してください。 |

※固定相の剥離においては、微量であるため保持時間にはほとんど影響ないと考えられます。

### T14. カラムを枯らしてしまった(カラムを乾燥させてしまった)

粘度の低い溶媒(メタノールなど)を分析時の半分程度の流速で 1 時間程度流した後、カラムの性能評価を行ってください。問題なければそのままご使用ください。

カラムの性能評価は「Q17. カラムの劣化状態の調べ方は？」p. 38 をご参照ください。

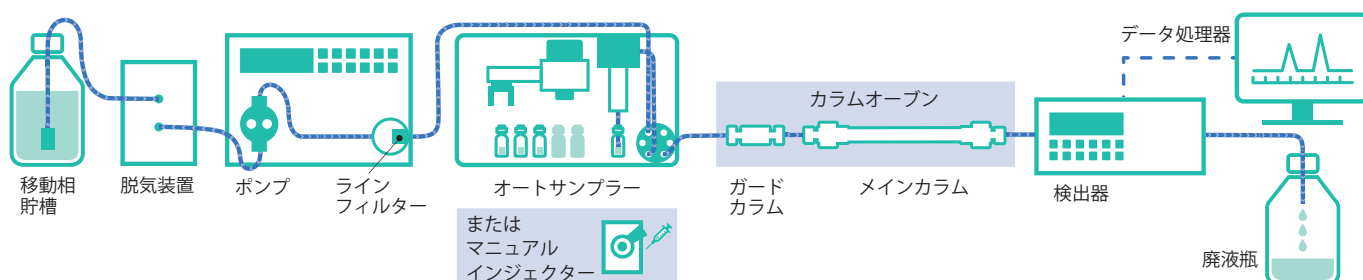
※カラムを枯らさないために、カラムは密栓をして、高温にならないところに保管してください。

## 4) 分析圧力上昇時の対処方法

分析を繰り返すことにより分析圧力が高くなる場合があります。高圧の状態での使用を続けると、カラムの劣化の促進や装置への過負荷による故障の原因になります。ここでは分析圧力が高くなった場合の対処方法を示します。

### 1. 異常箇所の探索

分析圧力が高くなった場合、カラムを含めた流路に目詰まりが起こって、圧力が高くなります。また、装置にも負荷がかかっている場合があるため、まず、目詰まりを起こしている箇所を探します。



移動相を送液しながら HPLC システムの流路の後ろ側から (検出器より) 順次、配管を外し、圧力を測定し、異常に圧力がかかっている箇所を探します。通常、装置部分には圧力はほとんどかかりません。ガードカラムと分析カラムは、使用初期の圧力と比較することにより判断します。

### 2. 装置が高圧のときの対処方法

上記異常箇所の探索に従って原因箇所を特定してください。

#### (ケース 1) 配管が高圧

原因: 塩の析出やゴミの詰まりの可能性があります。

対処: カラム・検出器を接続しない状態で配管に水を送液してください。配管を逆に接続して洗浄するのも有効です。改善しない場合は配管を交換してください。

※分析圧力上昇とは、直接関係ありませんが、配管が塩の析出やゴミの詰まりで分析圧力上昇の可能性がある場合、移動相貯槽中のサクシオンフィルターも同様に詰まっている可能性があります。サクシオンフィルターが詰まるとポンプに負担がかかりますので、水などに浸し、超音波洗浄器で 5 分洗浄してください。

#### (ケース 2) 送液ポンプが高圧

原因: ポンプのラインフィルターの汚れが考えられます。

対処: ラインフィルターを取り外して洗浄します。洗浄方法は、ラインフィルターを溶媒に浸して超音波によって洗浄してください。改善しない場合は交換してください。

#### (ケース 3) マニュアルインジェクターが高圧

原因: 汚れやゴミの詰まりの可能性があります。

対処: 汚れを溶解するような溶媒 (メタノールなど) をシリンジで 20 mL 程度注入しインジェクターを洗浄してください。その場合、LOAD と INJECT の両方の流路を洗浄してください。汚れがひどい場合には、インジェクターを分解して超音波で洗浄してください。ゴミの詰まりの場合、逆方向からの洗浄が有効です。

動画はこちら! /



圧力上昇の  
原因と対処方法



## 3. カラムが高圧のときの対処方法

(ケース 1) 移動相中に塩が析出している、または、緩衝液使用後に有機溶媒濃度が高い移動相を送液した

原因: 塩がカラム内に析出している可能性があります。

対処: 析出している塩を溶かすために、10% 程度の有機溶媒(メタノールやアセトニトリルなど)水溶液を用いて通常分析時の半分程度の流速で 30 分程度洗浄してください。改善しない場合は、水 100% で同様に洗浄してください。

予防: 緩衝液使用後に有機溶媒濃度が高い移動相を送液する場合は、使用の移動相から緩衝液や塩を抜いた溶媒で洗浄した後有機溶媒が高い移動相を送液してください。

(例) アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5) = 10 / 90 からアセトニトリル / 水 = 90 / 10 に変更する場合、まずアセトニトリル / 水 = 10 / 90 で 15 分程度洗浄した後にアセトニトリル / 水 = 90 / 10 を送液してください。

(ケース 2) サンプルが完全に溶解していない、または、サンプルをろ過していない

原因: サンプル由来の不溶物によるカラムのフィルターの詰まりの可能性があります。

対処: カラムを逆向きに装着し、分析に使用している移動相を通常分析時の半分程度の流速で 30 分程度カラムを洗浄してください。洗浄しても改善しない場合は、カラムの入り口側のエンドフィッティングの交換によって改善する場合があります。エンドフィッティングの交換は有償にてお請けしています。詳しくはお問い合わせください。

予防: サンプルのろ過を行うことをお勧めします。詳細は「サンプルの前処理 1) ろ過」p. 26 をご参照ください。

※頻繁に逆向きに装着し送液すると、充填状態が乱れ、カラムが劣化する可能性があります。

(ケース 3) 天然物やタンパク質などカラムに吸着しやすいサンプルを分析している、または、サンプルが移動相に溶けにくい

原因: サンプルが、充填剤に吸着している、もしくはカラム内に析出している可能性があります。

対処: カラムを洗浄してください。カラム別洗浄方法は、「Q13. カラムの洗浄方法は？」p. 37 をご参照ください。

予防: (a) サンプルに適した前処理を行ってください。詳細は「サンプルの前処理」p. 26 をご参照ください。  
(b) ガードカラムをご使用ください。詳細は「3) ガードカラムの選択と効果」p. 57 をご参照ください。

※

1. カラムを洗浄する際はカラムの出口側を接続せずに通液してください。

2. 長時間の洗浄はカラムの性能を低下させる恐れがあります。

3. シリカゲルベースの充填剤では、pH 7.5 以上のアルカリ性水溶液および pH 1.5 以下の強酸の溶液は使用できません。シリカベースのカラムでは、一般的な使用推奨 pH は 2 ~ 7.5 の範囲になります。推奨 pH 外での使用は可能ですが、劣化を早める恐れがあります。

4. 洗浄後は、出荷時の溶媒に置換して保管してください。

5. ケース 1 ~ 3 の対処をされても改善されない場合、カラムを交換することをお勧めします。

(ケース 4) 長期間の使用によりカラム圧力が徐々に上昇した

原因 1: 長期間の使用によりカラムに吸着物がたまっている可能性があります。

対処: (ケース 3) のようにカラムを洗浄してください。

原因 2: 長期間の使用によりカラム内のシリカゲルが割れて微細化し、圧力が上がっている可能性があります。

対処: カラムの再生は不可です。カラムを交換してください。

## 改善されない場合

ピーク形状などに変化を起こしていない、使用のカラムの耐圧を超えていない場合はそのまま使用することも可能です。しかしながら、装置への負担がかかるため、早期にカラムを交換することをお勧めします。

## 5) グラジエント溶離法におけるベースラインの乱れ

グラジエント分析を行う場合、移動相の混合不足な場合や、水に含まれる不純物によって、ベースラインが乱れることがあります。

### 1. 移動相を均一に混合するには

移動相の混合不足によるピークは、ミキサーを取り付けることによって改善できます(ベースライン 1 → 2)。

### 2. 水に含まれる不純物を除去するには

逆相クロマトグラフィー用カラムにおいてグラジエント分析を行う場合、一般に有機溶媒濃度の低い移動相を初期移動相とし、徐々に有機溶媒濃度を高めていきますが、このとき水に含まれる不純物に由来するピークが生じる場合があります。これは、水中の不純物が有機溶媒濃度の低い条件下でカラムに吸着され、有機溶媒濃度が高くなるとその吸着した不純物が溶出してくることに起因します。

このピークはプレカラムを取り付けることにより、水中の不純物をトラップできるため改善できます(ベースライン 2 → 3)。プレカラムには、C<sub>18</sub> カラムの 4.6 mm I.D. × 10 mm や 10 mm I.D. × 20 mm などを使用してください。

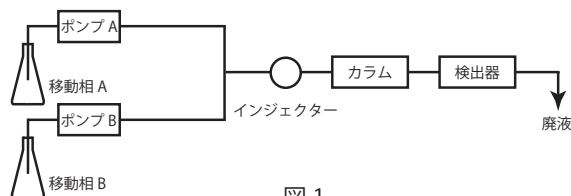
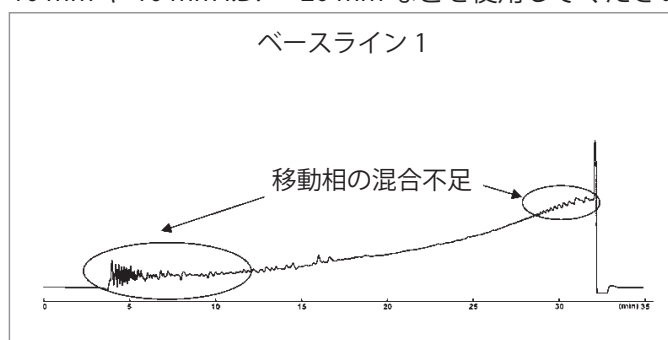


図 1.



↓ + ミキサー

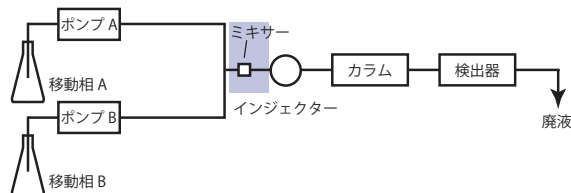
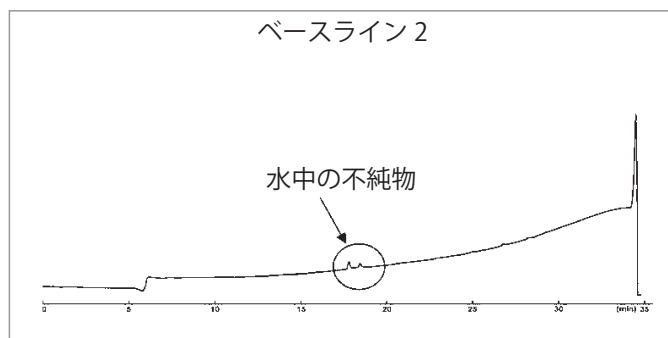


図 2.



↓ + プレカラム

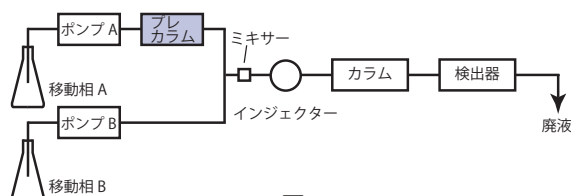
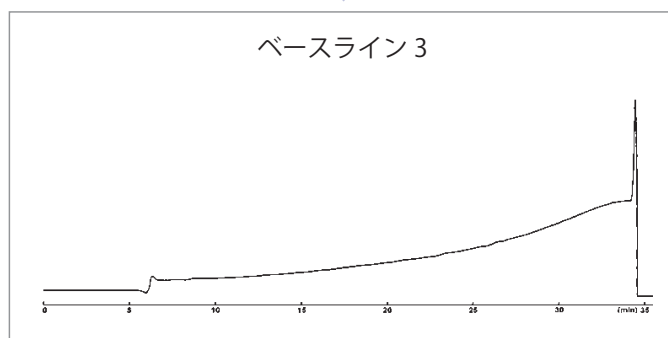


図 3.



Column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-300 4.6 mm I.D. × 150 mm      Flow rate: 1.0 mL/min  
 Pre-column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II 4.6 mm I.D. × 10 mm      Temperature: 30°C  
 Mobile phase: A; 0.1% TFA containing H<sub>2</sub>O      Detection: UV 220 nm  
                   B; 0.1% TFA containing 95% Acetonitrile  
                   B 0 → 100% 30 min Linear gradient