



【vol. 28】 逆相フラッシュカラムは何回まで再利用できますか？

February 22, 2022

Bob Bickler

逆相フラッシュクロマトグラフィーの利用は、さまざまな理由で増加し続けています。通常1回しか使用しないシリカの順相フラッシュカラムとは異なり、逆相フラッシュカラムは洗浄、保管、再利用が可能です。カラムは何回まで再利用できるのか、よく聞かれる質問です。今回は、この質問に対して、できる限りお答えしたいと思います。

逆相カラムの使用回数には、明確な答えがあるわけではありません。他の多くのクロマトグラフィーの質問と同様、逆相カラムの使用回数には、以下のような考慮すべき多くの変数があります。

- 溶媒
- 移動相に対する試料の溶解度
- 溶媒の pH
- 塩濃度
- 保存条件
- 圧力

溶媒

溶媒が汚染されていたり、有害な添加物が含まれていない限り、通常、カラムの問題は起こりません。私は通常、ACSグレードの溶媒と脱イオン水（水道水は絶対に使用しないでください）を使用しています。逆相カラムは共有結合しているため、溶媒が加水分解やその他の害をメディアに与えることはありません。

多くのメソッドでメタノールかアセトニトリルに水を加えて使用しますが、THF やアセトン、またエタノールや IPA も有機溶媒モディファイアとして使用することが可能です。しかし、有機溶媒の選択は、動作圧力に大きく影響します（図 1）。

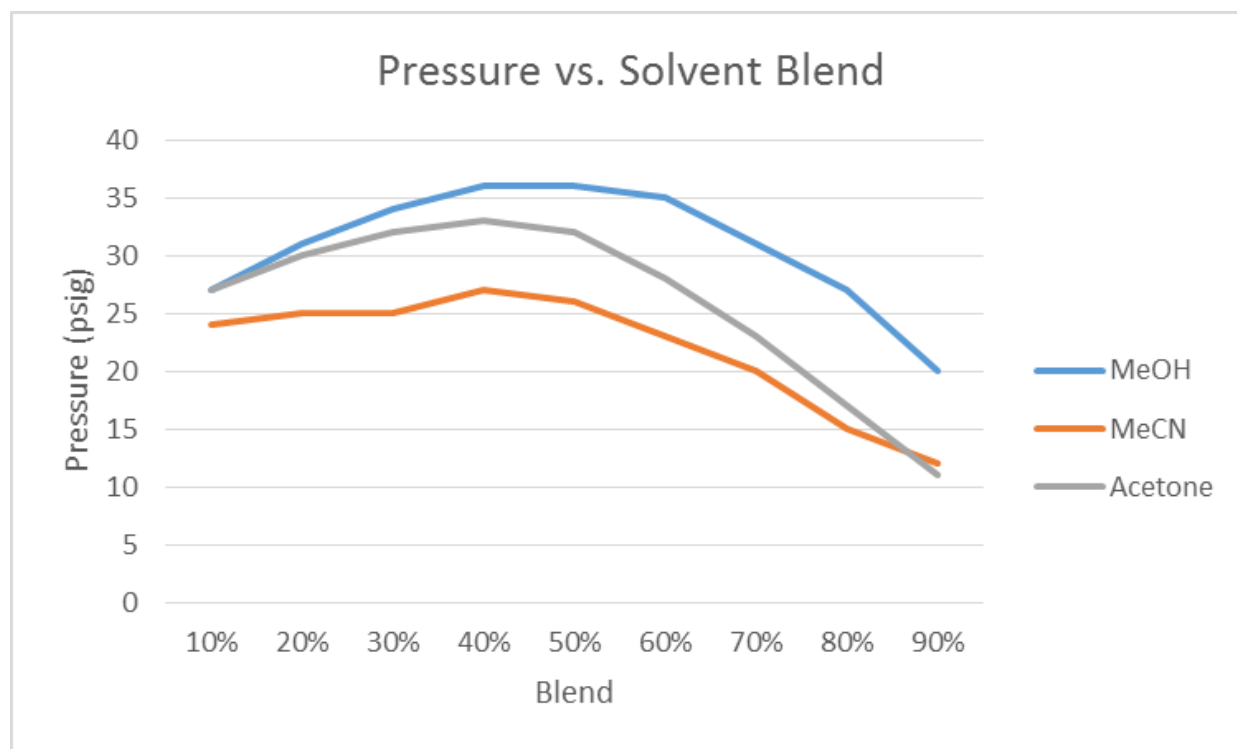


図 1. 圧力 vs. 溶媒ブレンド

試料の溶解度

フラッシュカラムのフリットの気孔率は HPLC に比べて大きいですが、サンプルをろ過することでカラム寿命を延ばすことができます。注入前のサンプルの完全溶解はカラム寿命にとって重要ですが、溶出溶媒に対する溶解度も重要です。分取クロマトグラフィーのようなフラッシュクロマトグラフィーでは、カラムメディア重量に対するサンプルロード量が多く、特にサンプルが溶液としてロードされた場合は化合物が析出する可能性が高くなります。サンプルロード時や精製時に化合物が析出する可能性を低減するために、ドライローディングの使用を強く推奨します。

沈殿が生じた場合は、水-メタノール-アセトニトリル-アセトン-ジクロロメタンと強度の高い溶媒でフラッシュカラムを穏やかに逆洗浄してから、溶媒強度を下げるすることができます。

溶媒 pH

移動相の pH はカラムを早期に破損させる最大の要因です。ほとんどの逆相カラムの pH 耐性は 2~8 ですが、Biotage® Sfär C18 のように pH10 または 11 で短時間の使用が可能なものもあります。

酸性溶媒は、サンプル成分のプロトン化が必要な場合に使用しますが、pH が 2 以下の場合、シリカとの結合相を加水分解してしまい、化合物が早く溶出し、物質移動速度論が変化して形状が崩れてしまう可能性があります。

塩基性溶媒は、サンプル成分の脱プロトン化が必要な場合に使用されます。しかし、pH >8 ではシリカ

の溶解が起こり、最終的にカラムが機能しなくなり、クロマトグラフィーの結果に大きな歪みが生じる可能性があります。

カラムの寿命を最大限に延ばすには、保管前にニート溶媒でカラムを洗浄します。

塩類含有量

アプリケーションによっては、pH やイオン強度を調整するためにバッファーを必要とする場合があります。この問題は、緩衝液の濃度が高すぎて移動相での溶解度を維持できない場合に発生し、塩の沈殿やカラムの過圧につながります。この問題のため、無機塩は使用しないでください。可能であれば、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウムなどの有機緩衝液は 500 mM を超えないようにするのが最善です。

pH モディファイアと同様に、すべてのバッファーは保存前にカラムからフラッシュする必要があります。

保存条件

逆相カラムメディアは疎水性であるため、有機溶媒で使用・保管することが望ましいです。個人的には、水の存在下で発生しうるバクテリアの繁殖を防ぐために、100%メタノールまたはアセトニトリルでカラムを保管しています。

圧力

カラムを継続的に使用すると、時間とともにカラムの背圧が上昇することがあります。これは様々な原因が考えられますが、一般的には上部フリットまたはメディアの孔を塞ぐ微粒子が原因です。バックフラッシュを行うことで、この問題を軽減できる場合があります。

長寿命化

これらの変数をすべて制御し、カラムの誤使用（固い実験室の床に落とすなど）がなければ、逆相フラッシュカラムが 25、50、あるいは 100 回使用できない理由はありません。ピーク形状、製品純度、回収率に変化が見られない限り、色落ちしたメディアでも心配はありません。私は茶色や緑色のカラムを使用していますが、現在も良好に動作しています。

逆相フラッシュクロマトグラフィーの詳細については、以下を参照してください。
日本語ホワイトペーパー「逆相フラッシュクロマトグラフィー負荷容量の決定方法」

Learn More

元の記事 ; <https://selekt.biotage.com/blog/how-many-times-can-i-reuse-my-reversed-phase-flash-column>