

実際のトラブルから学ぶ!
公開カラムトラブル解決のノウハウ
～C18からHILICまで徹底解説～

クロマニックテクノロジーズ
塚本友康 小山隆次 長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp

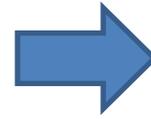
<http://chromanik.co.jp>



実際に多いのは・・・

- 再現性が取れない

- 保持時間
- 耐久性
- 分離パターン



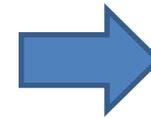
カラム交換時に
トラブル起きやすい

充填剤バッチが変わるから？
実際は・・・

同じバッチでも起こっている



- 圧力変化
- ピーク形状変化



分析を繰り返した後
起きやすい

カラムの劣化？
数日の使用で起きている

実例 1

起きたトラブル



使用した次の日に圧力が上昇した

使用カラムはC18

分析回数はそこまで多くない

注入試料は、溶媒抽出した物（その他の処理はなし）

対策

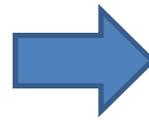
有機溶媒の割合の多い移動相での逆洗浄

原因

注入試料由来の吸着物質による圧力上昇

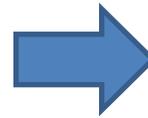
圧量上昇の要因

- フィルター詰まり
- 吸着物質の蓄積
- 塩の析出



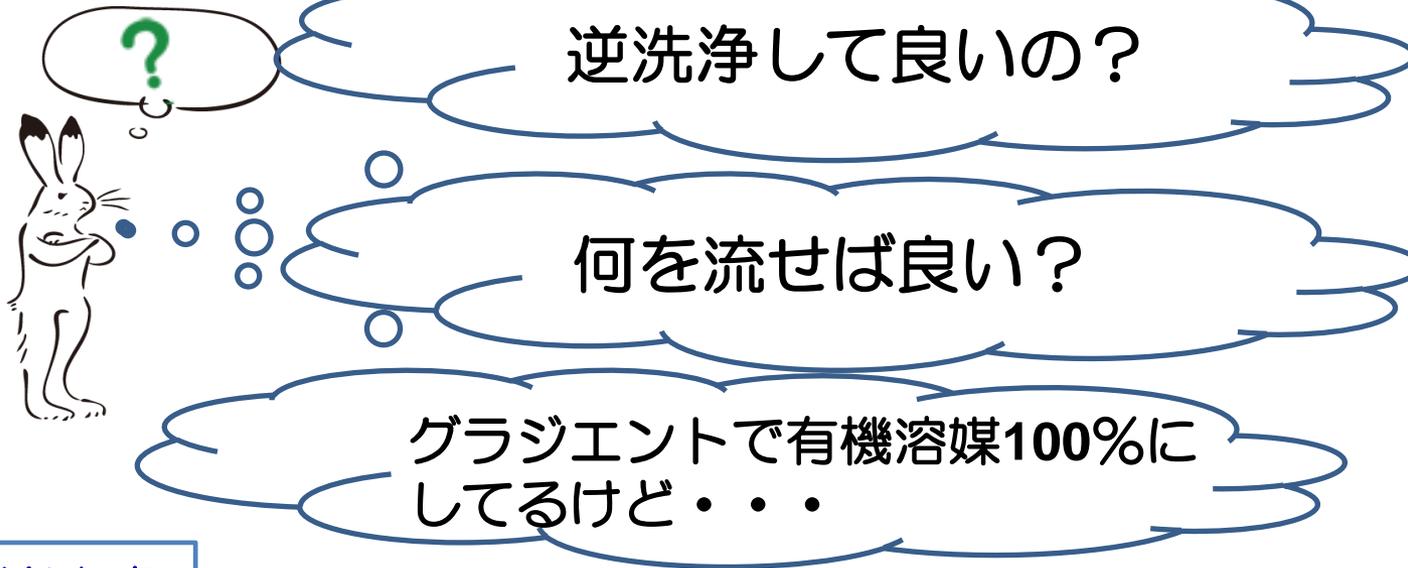
サンプルや移動相
由来の原因

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



条件変化が原因

カラム洗浄



逆洗浄

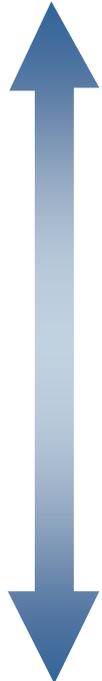
- 1, 2回したからといってすぐに劣化する可能性は低い
- 流速や圧力には注意が必要
 - ▶ 流速は使用時の半分ほどにすると圧力が高くなりすぎることはない

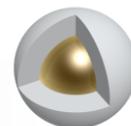
洗浄溶液

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

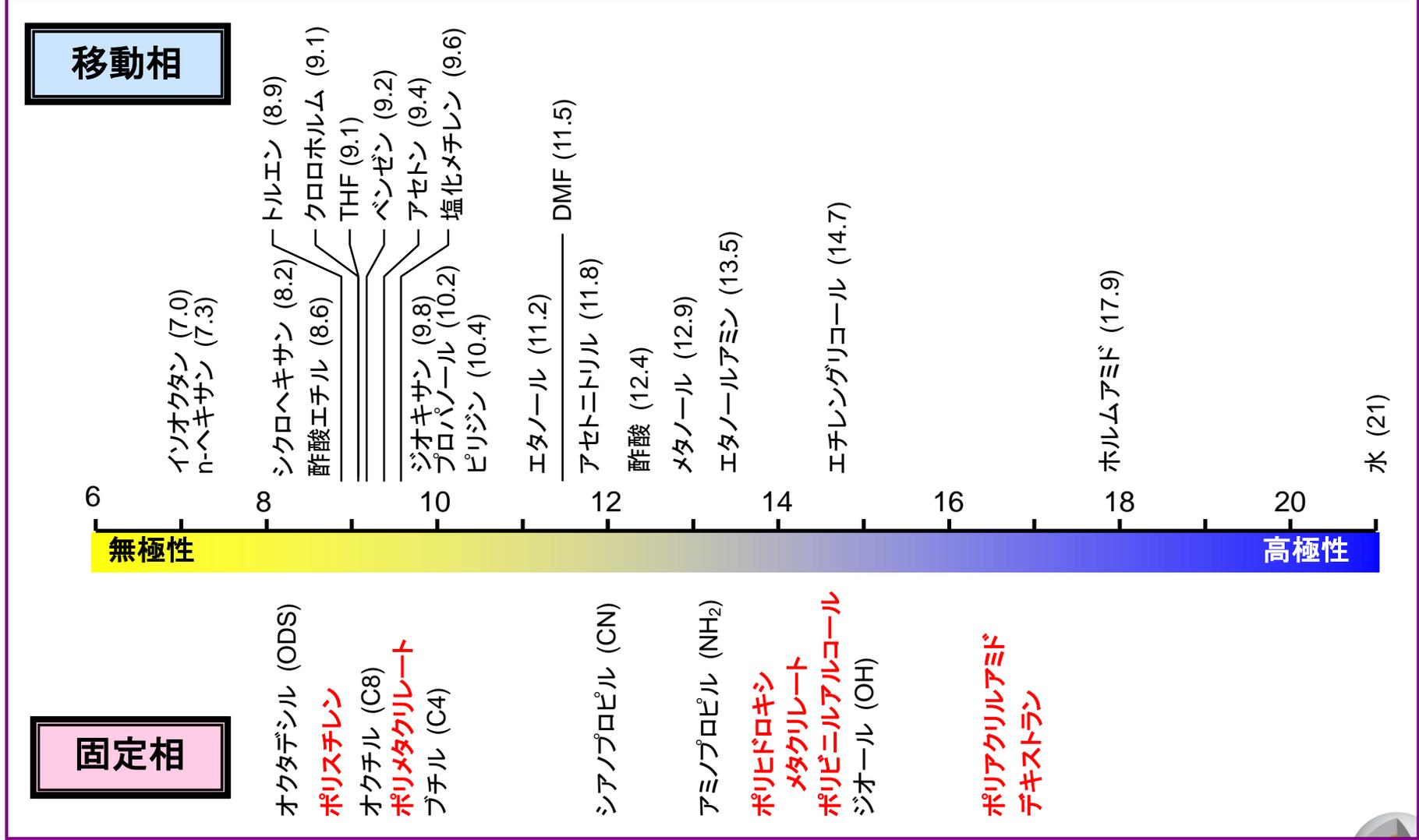


代表的な移動相溶媒の極性

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



移動相の溶解パラメータ・と固定相の極性



実例2



起きたトラブル

耐久性の再現性が取れない

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

原因

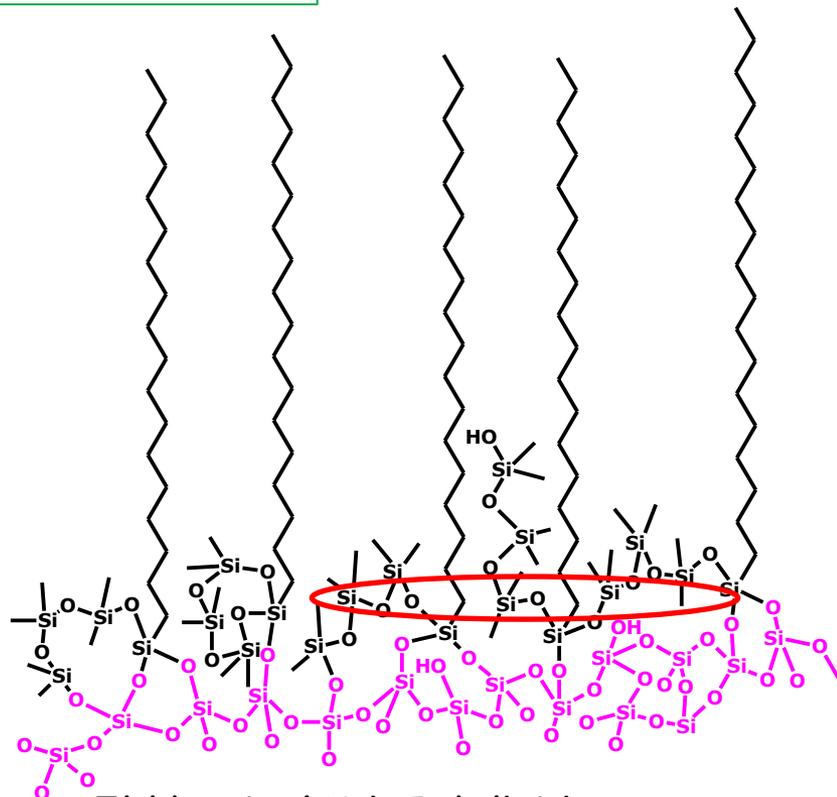
酸性条件下で使用後に
アルカリ性条件で使用した事





劣化の仕方の違い

酸での劣化

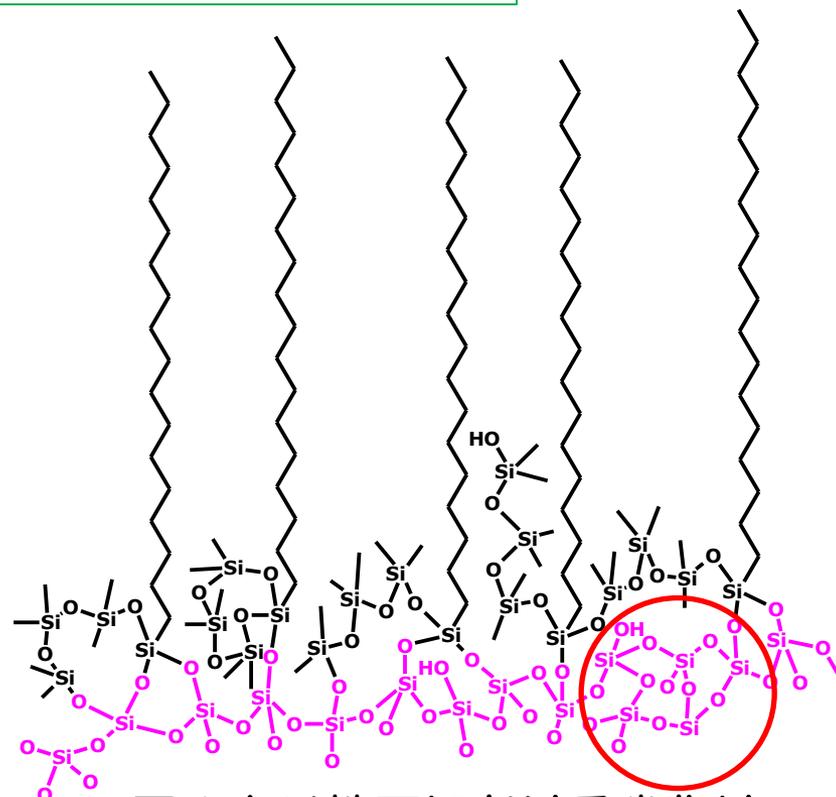


酸性下における劣化は
C18の結合部に対する加水分解



C18基やエンドキャップの脱離

アルカリでの劣化



アルカリ性下における劣化は
シリカに対する加水分解



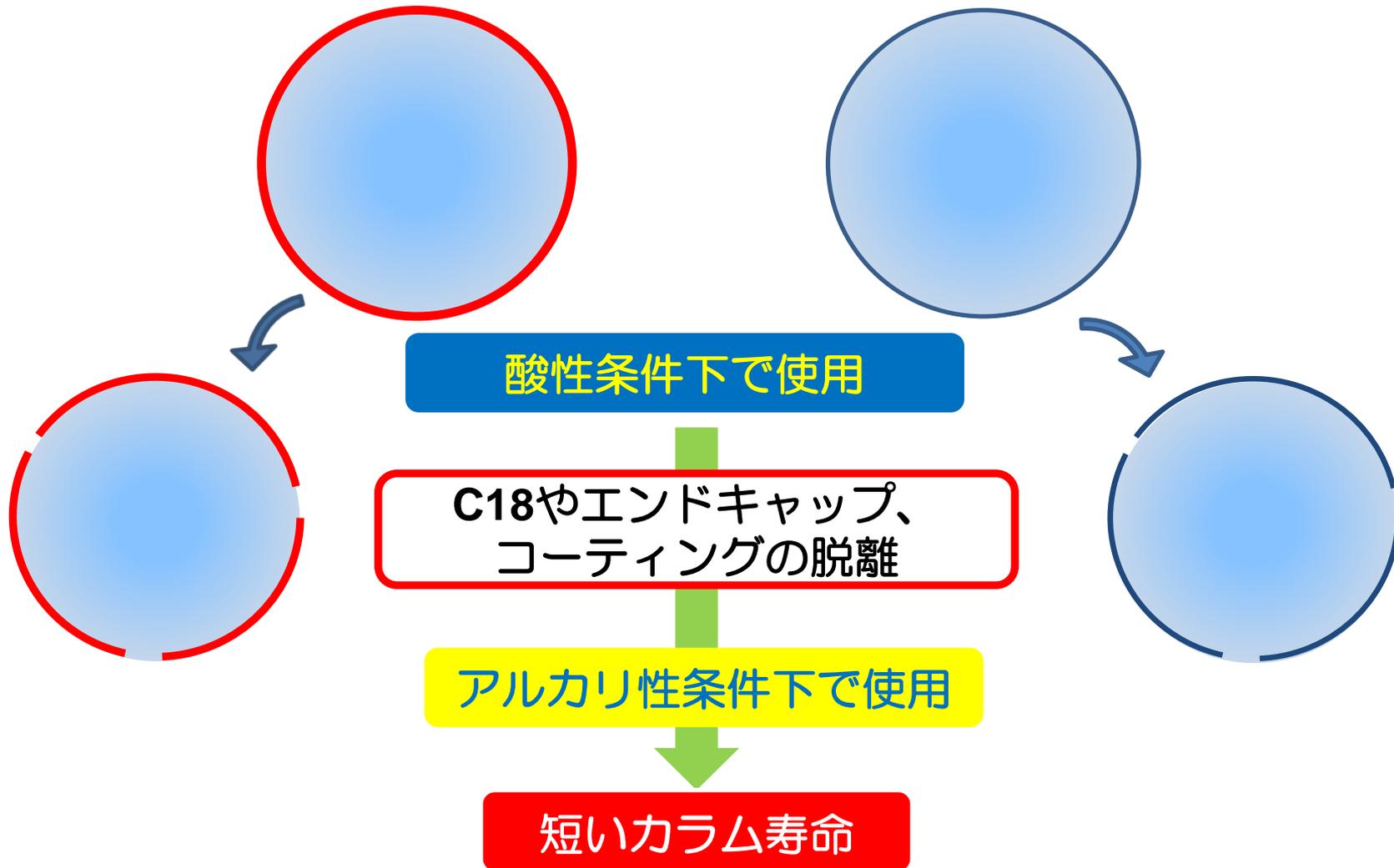
シリカの溶解



酸性条件からアルカリ性条件に変更すると

コーティング

エンドキャッピング



カラムを長く使うために・・・

酸、アルカリ性移動相で使用

カラムを洗浄

毎回洗浄するのは・・・



酸、アルカリ性移動相で使用

カラムを低温で保存

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

使用する塩の種類を変える

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

実例2

起きたトラブル



カラムの性能が期待通りにならない

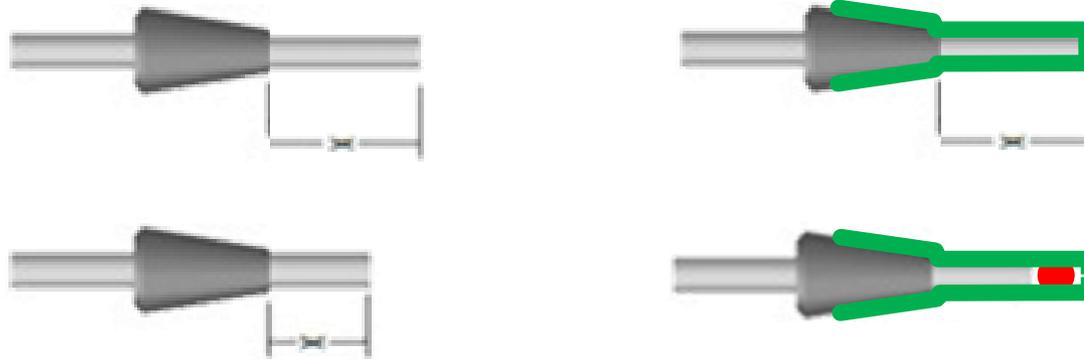
使用カラムはC18

その前は別メーカーのカラムを使用
金属フェラルでカラムを接続

原因

カラム接続時に微妙な隙間が
できてしまった事

エンドフィッティングの違い



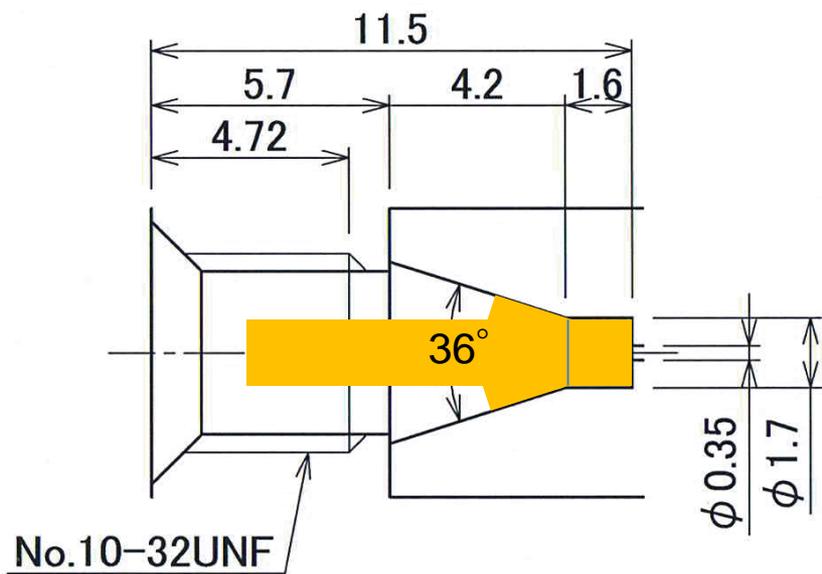
Ferrule Type	ネジ部の長さ	ポートの深さ	主な用途
WATERS	0.320"	0.130" (3.30mm)	送液系・カラム接続
SWAGELOK	0.225"	0.090" (2.29mm)	送液系・カラム接続
PARKER	0.210"	0.090" (2.29mm)	送液系・カラム接続

カラムの接続時には、注意が必要。
カラムエンドの種類を確認を・・・

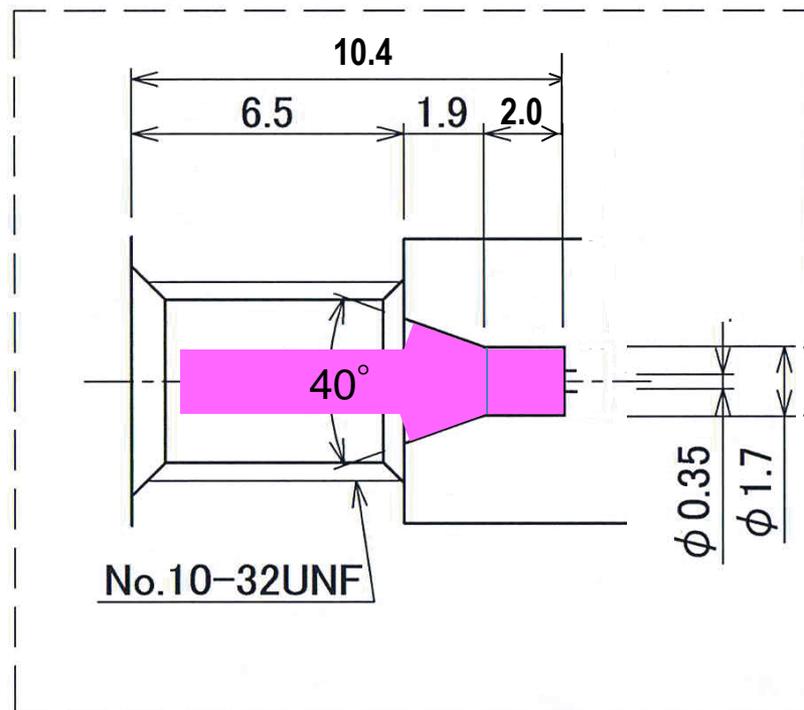


エンドフィッティングの違い2

A社 接続部



パーカータイプ 接続部
(IDEX社 IsoBar)



それぞれの接続に金属フェラルと
1/16"チューブで接続した状態

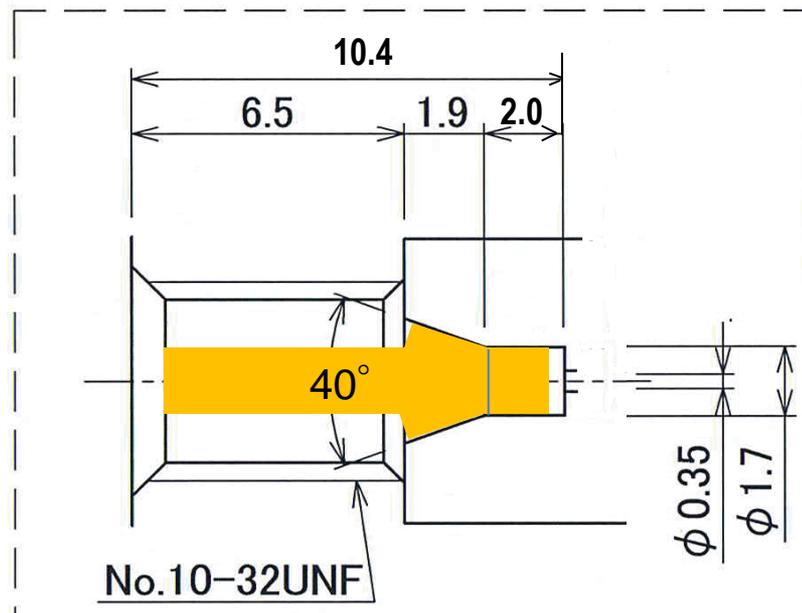
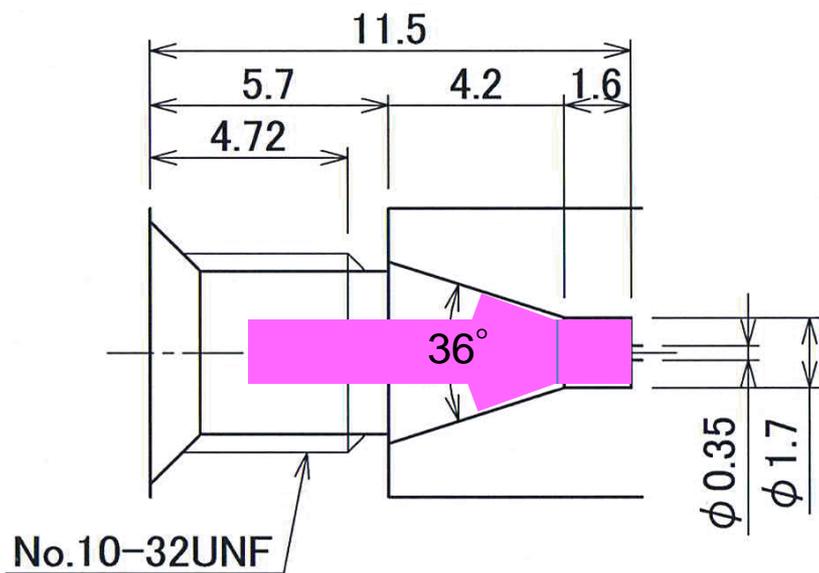


A社カラムにパーカータイプ配管を接続した場合

パーカータイプカラムにA社接続用の配管を接続した場合

A社 接続部

パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar)



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

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



フェラルを必要としない接続

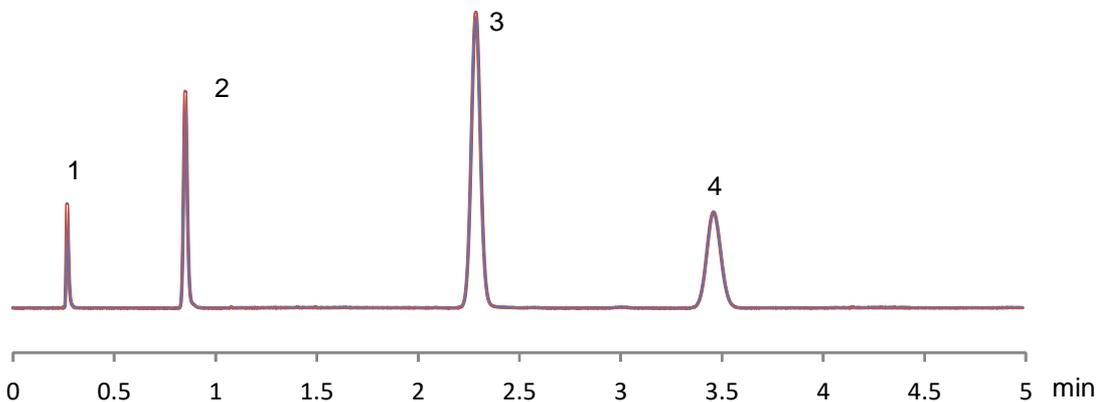
MARVEL X™

Next Generation
UHPLC Connection
Technology

耐圧：130MPa
メタルフリー対応



SunShell C18 2.6 μm, 50 x 2.1 mm



Connecting tube

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

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

Column: SunShell C18, 2.6 μm 50 x 2.1 mm

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

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

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

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



C18とPFPによる塩基性化合物の保持比較

2,3,4

SunShell C18

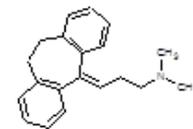
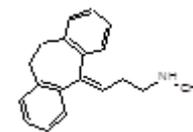
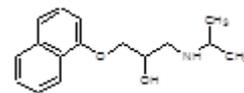
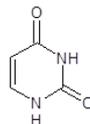
Column: SunShell C18, PFP, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/10mM Phosphate buffer pH7.0 = 80/20

Flow rate: 1.8 mL/min

Temperature: 25 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Propranolol, 3 = Nortriptyline, 4 = Amitriptyline



1

SunShell PFP

1

2

3

4

PFPカラムはHILICとして使えるんですか？



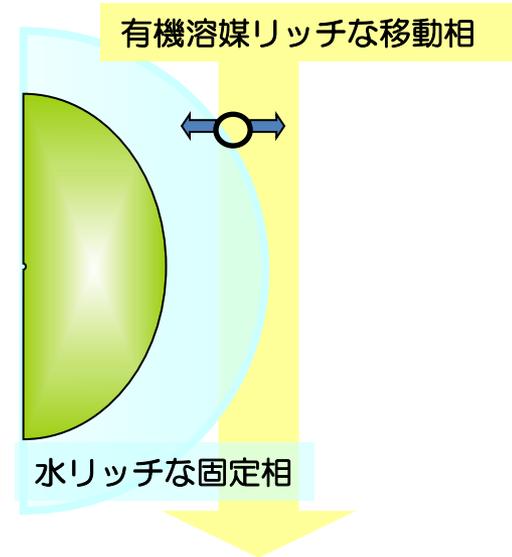
Retention time/min

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

PFPでHILIC・イオン交換？

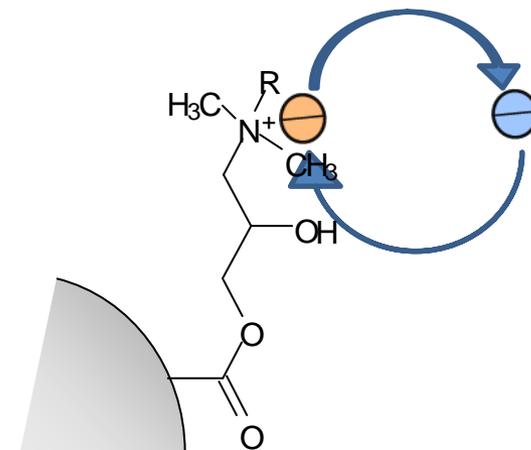
• HILICモード

- 固定相上に形成された水和層と移動相との分配
- 静電的相互作用、水素結合



• イオン交換

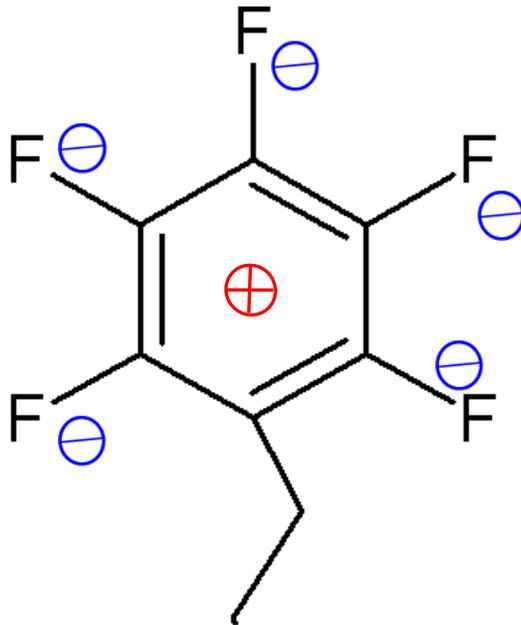
- 物質がイオン成分を取り込み、代わりに物質が持っていた他のイオン成分を放出する現象



PFPでHILIC・イオン交換

ペンタフルオロフェニル

pKa	—
分配係数(LogP)	3.54
水の溶解度 (mg/L)	50.8



- PFPの化学的特性から水を保持するとは考えにくい
- PFP基が電化を持つ構造をしていない
- フッ素の強い電気陰性度により、電子の偏りが生じている



イオン交換に似た分離機構を示す

HILICカラムをいざ使用してみると・・・

- 考えていたものより・・・

保持が短い？保持しない

保持時間の再現性が・・・

理論段数が低い気が・・・

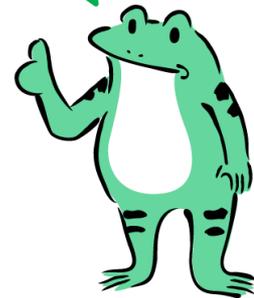
HILICはどれも使いづらい



HILICを使用するうえでの注意点

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

試料が水に溶けやすいため
意外と水で調整しがち



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

実例 3



起きたトラブル

保持時間の再現性が取れない

使用カラムはAmide
分析することにより保持時間がずれる
日間での再現性はある

原因

サンプル負荷によるベースラインの乱れ



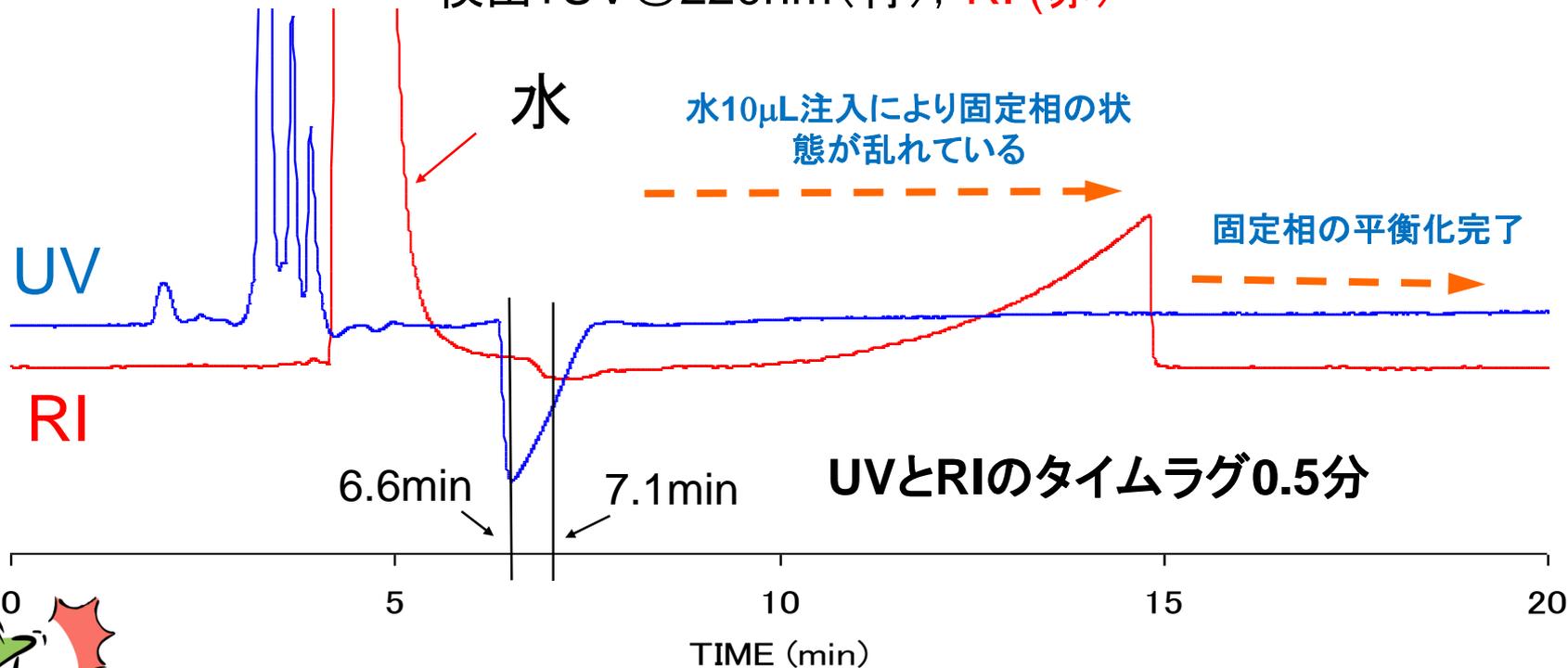
UVで見てるけどそんなことはないけど



水10 μ L注入時のヒリックカラムのクロマトグラム

移動相: 5mM酢酸アンモニウム/アセトニトリル(20:80)

検出: UV@220nm(青), RI(赤)



UVでは観察できないベースラインの変化が起きている!!

実例4



起きたトラブル

カラム間の再現性が取れない

使用カラムはアミノカラム
糖分析に使用
移動相はアセトニトリルと水の混合溶液

原因

移動相の使用履歴の違い



手順

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

- 平衡化
- プリン体分析

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

- 平衡化

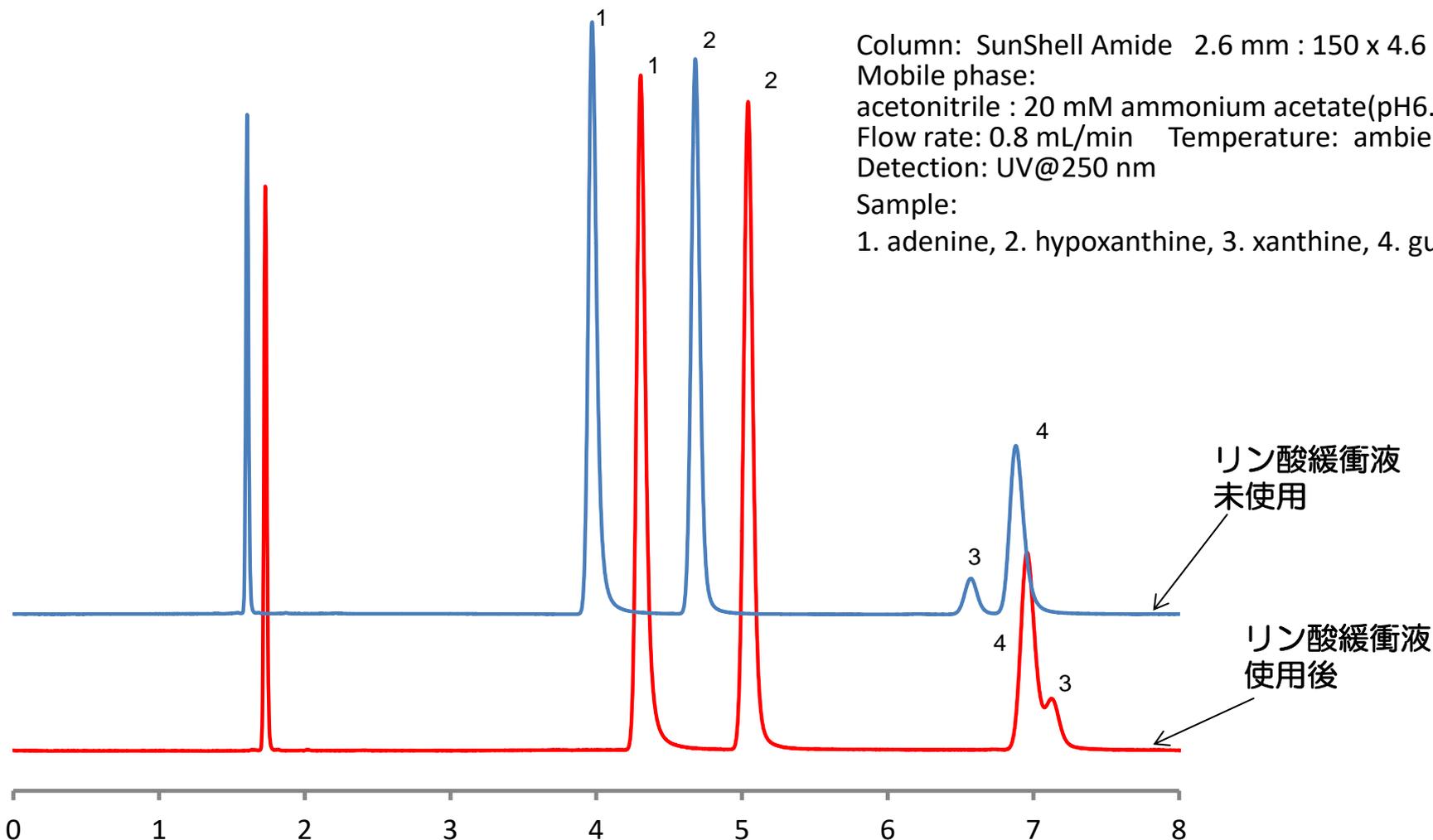
acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15

- 平衡化
- プリン体分析



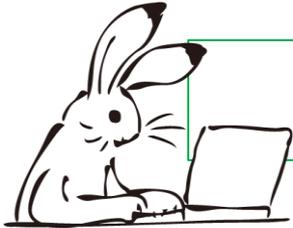
移動相の使用履歴の影響

Column: SunShell Amide 2.6 mm : 150 x 4.6 mm,
Mobile phase:
acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15
Flow rate: 0.8 mL/min Temperature: ambient
Detection: UV@250 nm
Sample:
1. adenine, 2. hypoxanthine, 3. xanthine, 4. guanine



移動相の使用履歴によってはその影響が強く残り分離が変わることがある

聞いては見たものの



.....なのですが

これは.....あれは.....
条件は？



AですBです.....

これは.....

.....

これは.....

何度もメールは面倒
メーカーにメールで問い合わせたけど
的確な（満足いく）答えが1回では
返ってこない

なんて思ったことはないですか？

上手く答えを聞くコツ

可能な範囲で良いのでできるだけ多くの
分析条件等の情報を記載する事

使用カラム

移動相条件(有機溶媒や塩の種類、pH等)

分析条件(グラジエント、流速等)

サンプルについて(特徴や誘導体化しているかなど)

分析条件の情報が少ないと仮定をしていくことになるため回答が
抽象的な内容になりがちになる



カラム選択はどのように・・・



カラムの選定の際はどのようにされているのですか

- ① 過去の分析例から性質の似た化合物の条件を使う
- ② 分子量から細孔径を選択する
- ③ 目的物質とカラムとの相互作用を考える
- ④ 手持ちのカラムで一度分析した結果から考える

カラムの持つ相互作用

疎水性相互作用

アルキル基



官能基によって相互作用が異なる

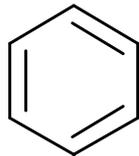
親水性相互作用

イオン交換相互作用

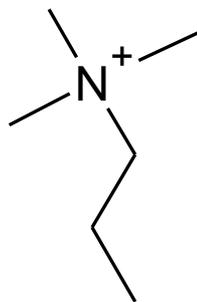
水素結合

π - π 相互作用

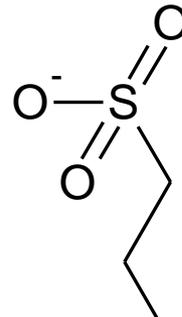
フェニル基



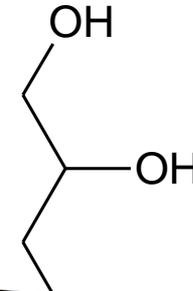
陰イオン
交換基



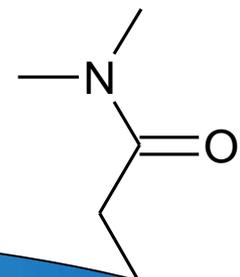
陽イオン
交換基



ジオール基



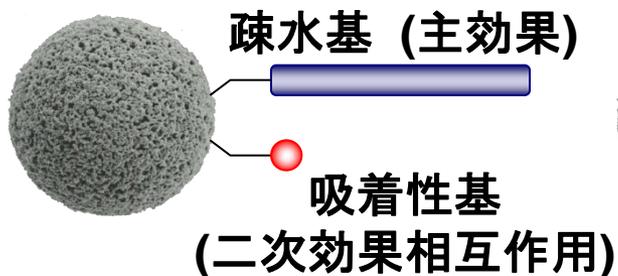
アミド基



カラム充填剤基材

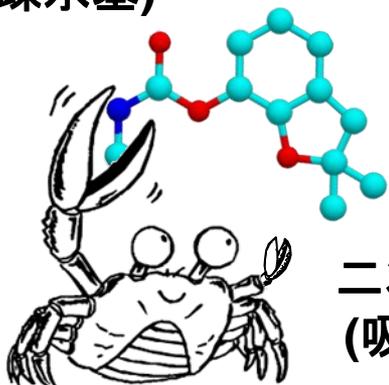


二次相互作用の働き

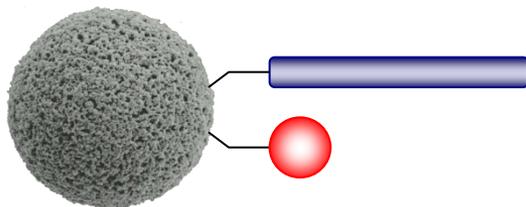


既存の分離剤

主効果
(疎水基)

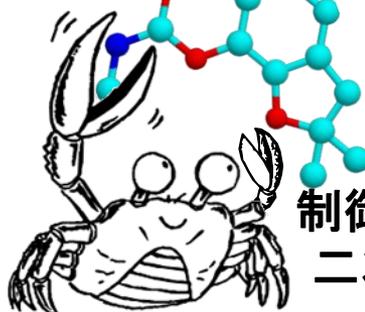


二次効果
(吸着等)

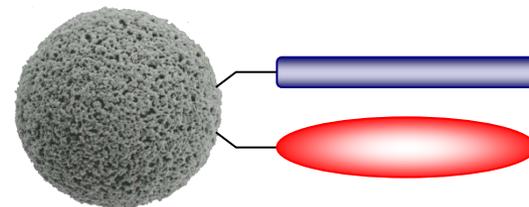


二次効果相互作用
制御型分離剤

主効果
(疎水基)

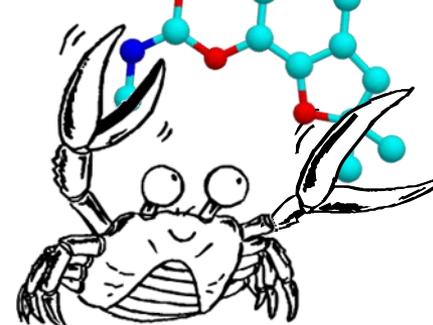


制御された
二次効果



第二主効果を持つ
二足型分離剤

主効果
(疎水基)



第二の
主効果



まとめ

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