

実例から知る！ C18・HILICカラムトラブル解決のコツ

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>



ダブル発生！どうする？

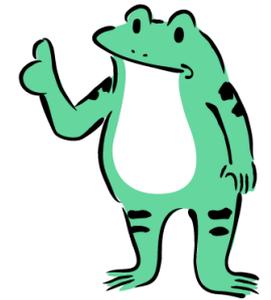
分離が・・・ 保持が・・・ 圧力が・・・

対処する場合は・・・

経験を元に対処

ネットで検索

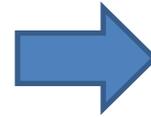
メーカーに質問



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



逆相カラム



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

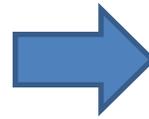
有機溶媒の割合の多い移動相での逆洗浄

原因

注入試料由来の吸着物質による圧力上昇

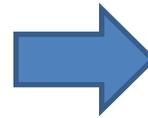
圧量上昇の要因

- フィルター詰まり
- 吸着物質の蓄積
- 塩の析出



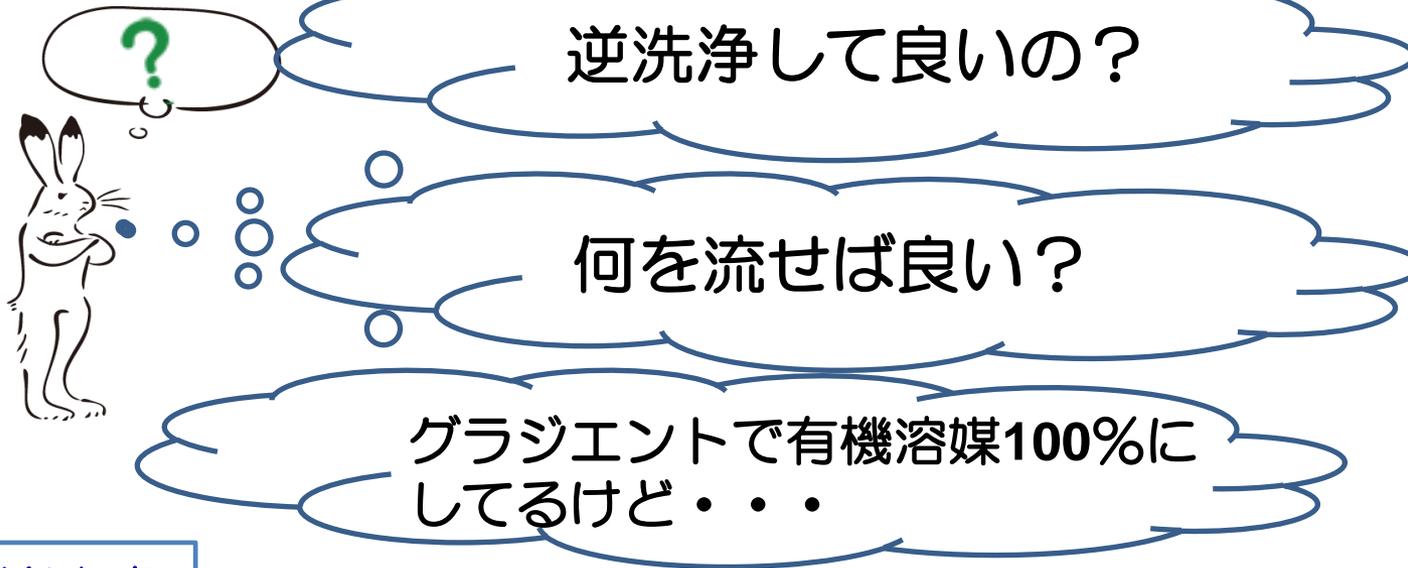
サンプルや移動相
由来の原因

- 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

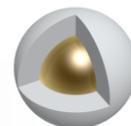
洗浄溶液

- 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

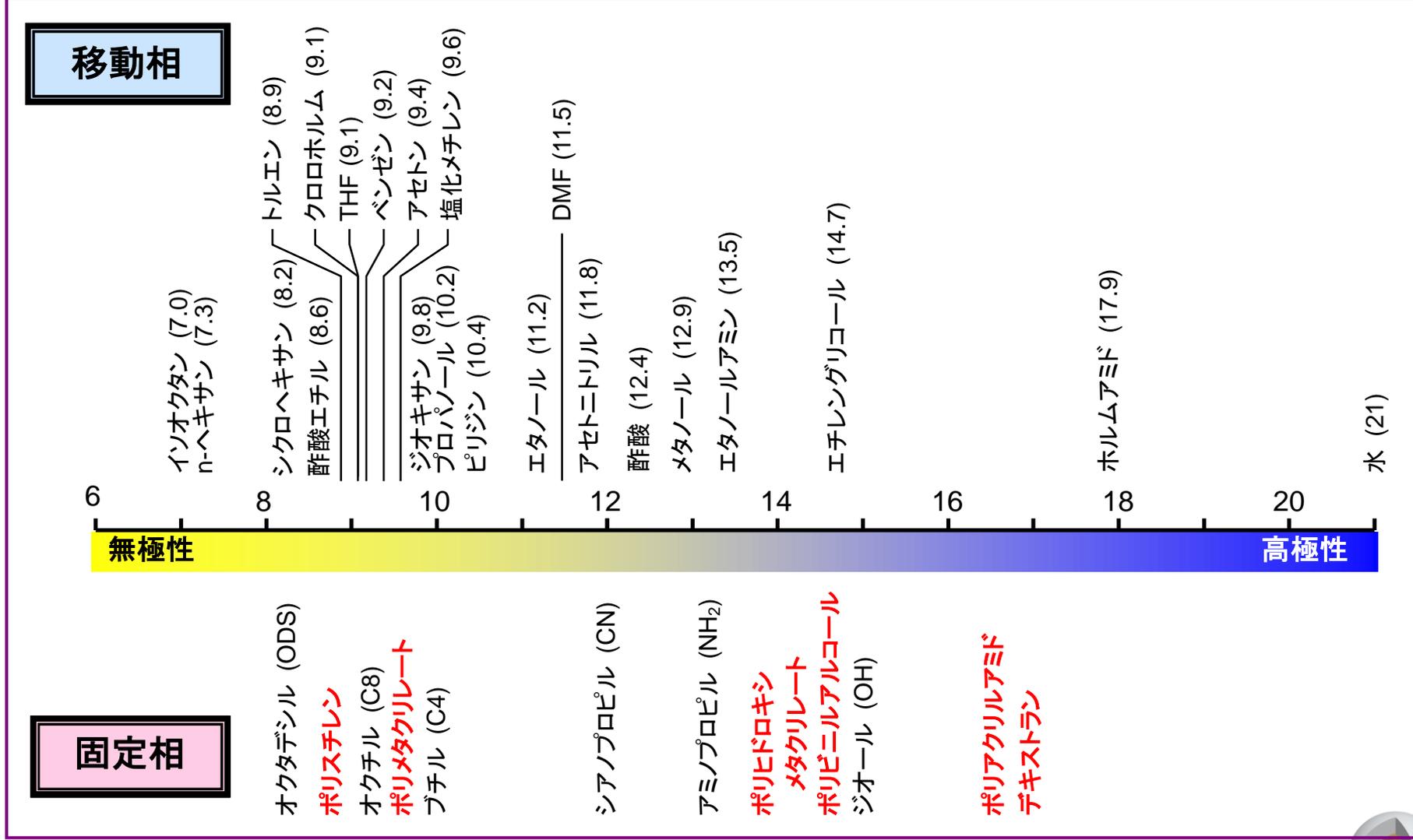


代表的な移動相溶媒の極性

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

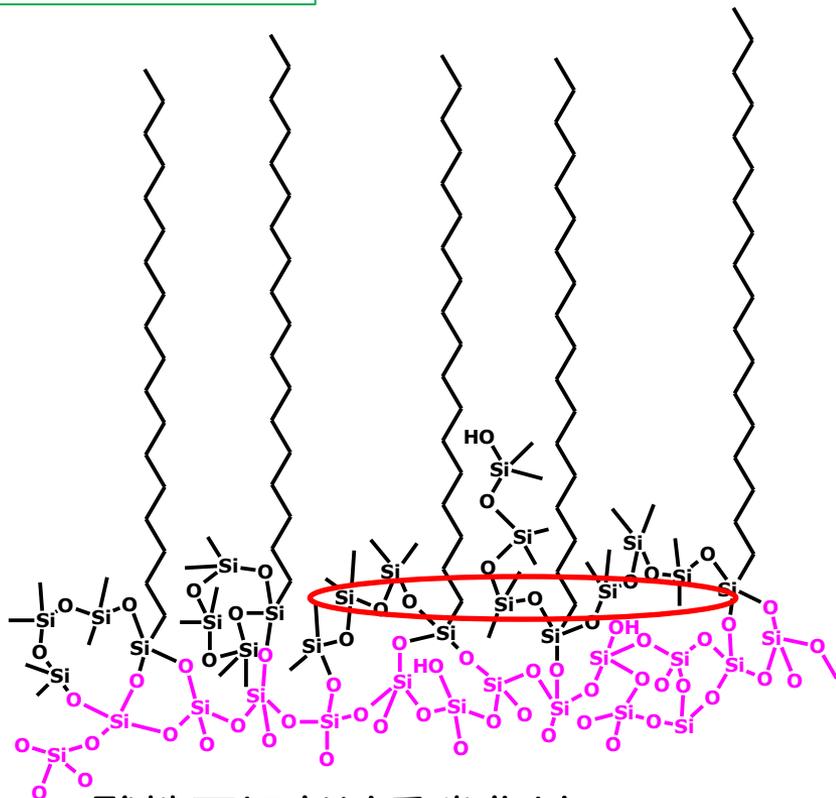
酸性条件下で使用後に
アルカリ性条件で使用した事



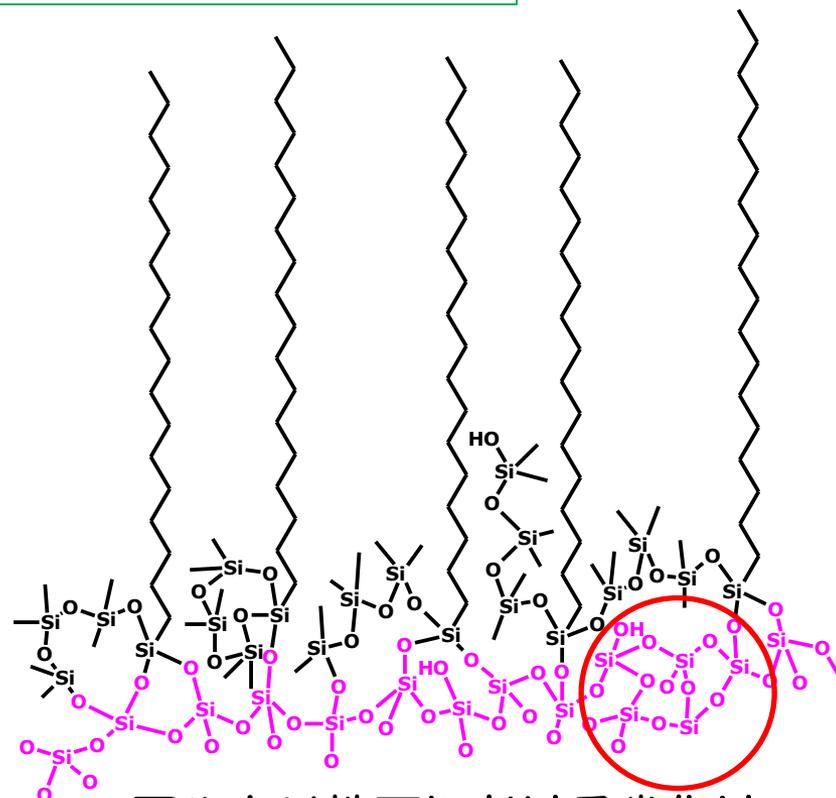
劣化の仕方の違い

酸での劣化

アルカリでの劣化



酸性下における劣化は
C18の結合部に対する加水分解



アルカリ性下における劣化は
シリカに対する加水分解

C18基やエンドキャップの脱離

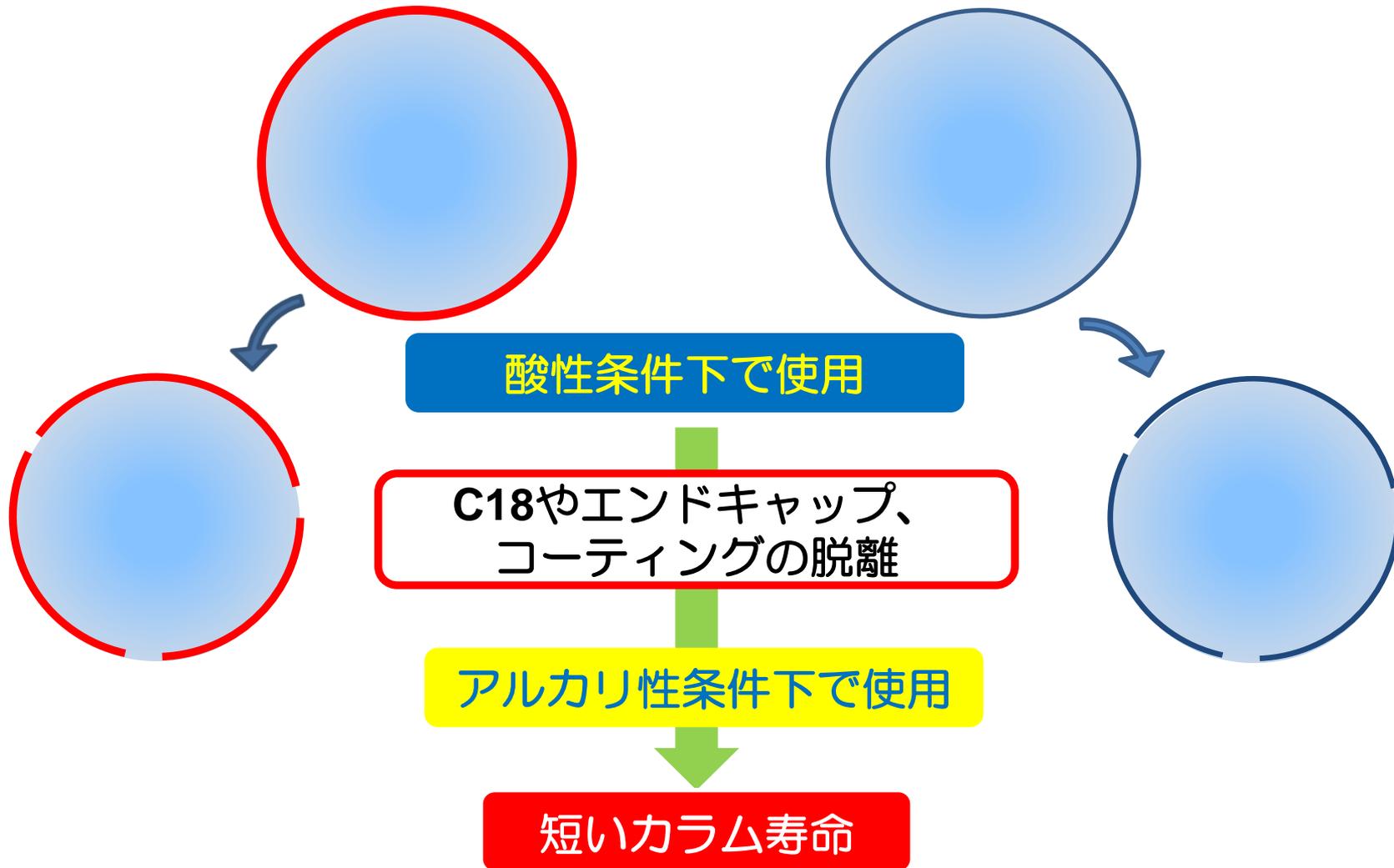
シリカの溶解



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

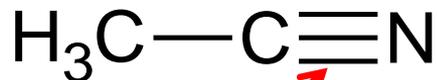
カラムと移動相の相性



Biphenylは…
Phenylhexylカラムは…



フェニル系のカラムはメタノールの方が良いんですね



π結合

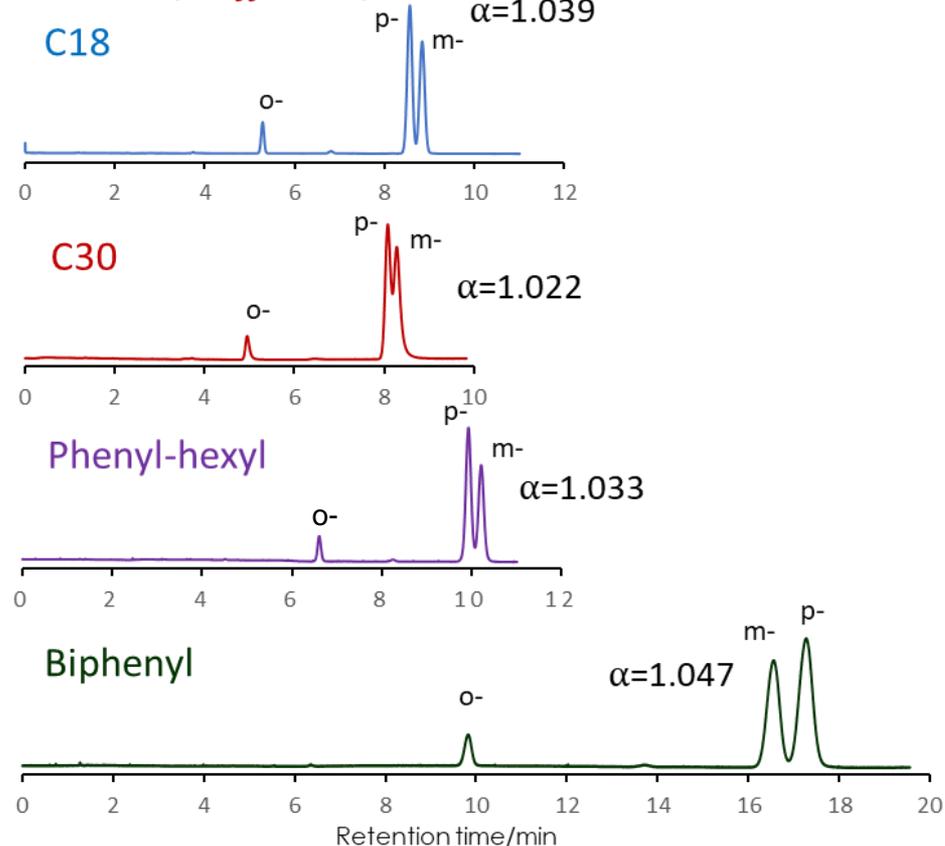
官能基のπ電子が関わる相互作用を弱める

フェニル基やビフェニル基などを導入したカラムの特性を発現させるにはアセトニトリルは不向き

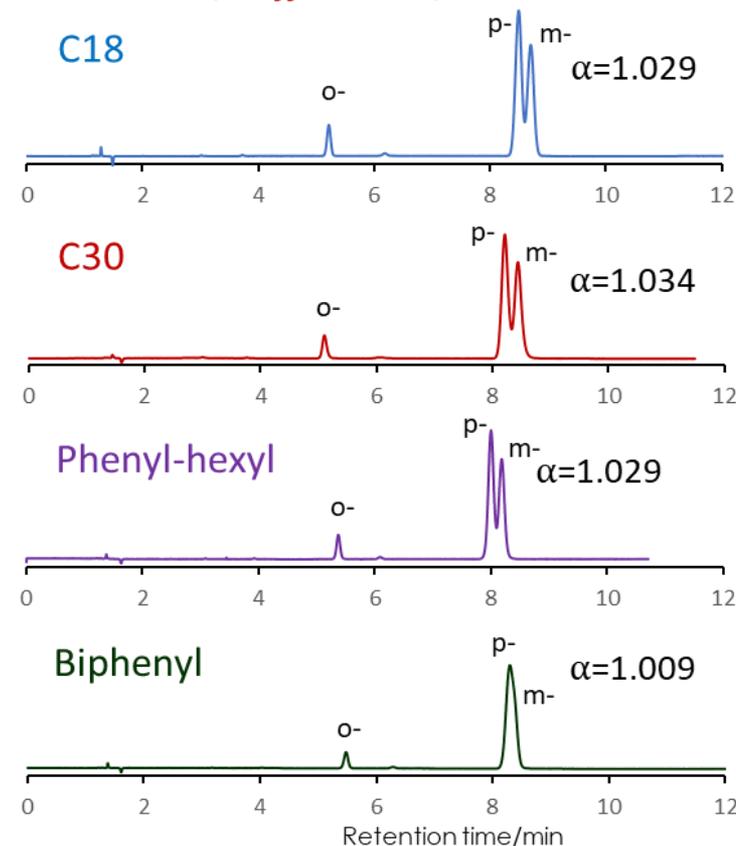


o, m, p-メチル馬尿酸の分離

Methanol/buffer=25/75



Acetonitrile/buffer=13.5/86.5

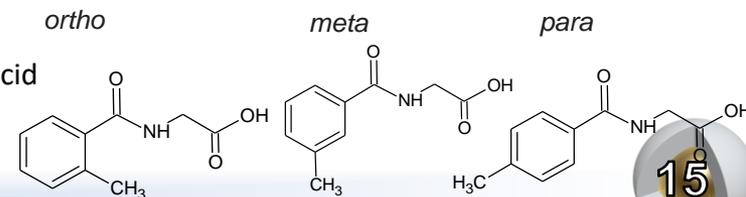


Column: SunShell C18 2.6 μ m 150 x 4.6 mm
 SunShell C30 2.6 μ m 150 x 2.1 mm
 SunShell Phenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm
 SunShell Biphenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

Temperature: 40 °C
 Detection: UV@230 nm
 Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid

Mobile phase: Organic solvent/25 mM Phosphate buffer pH 3.0

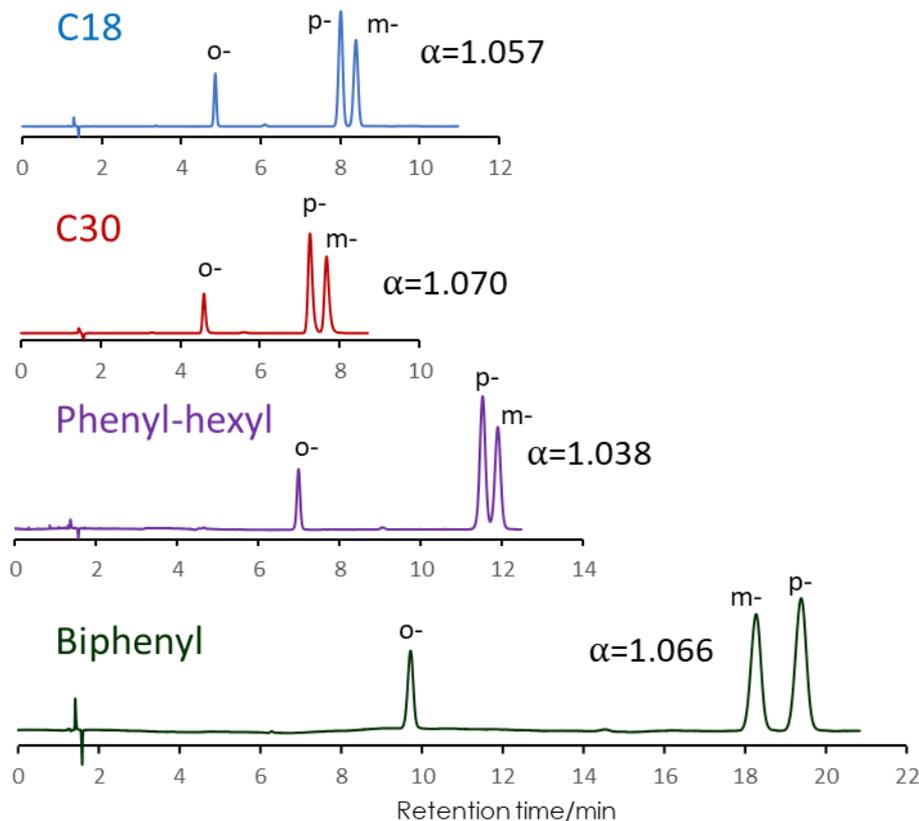
Flow rate: 1.0 mL/min, 0.2 mL/min for only C30



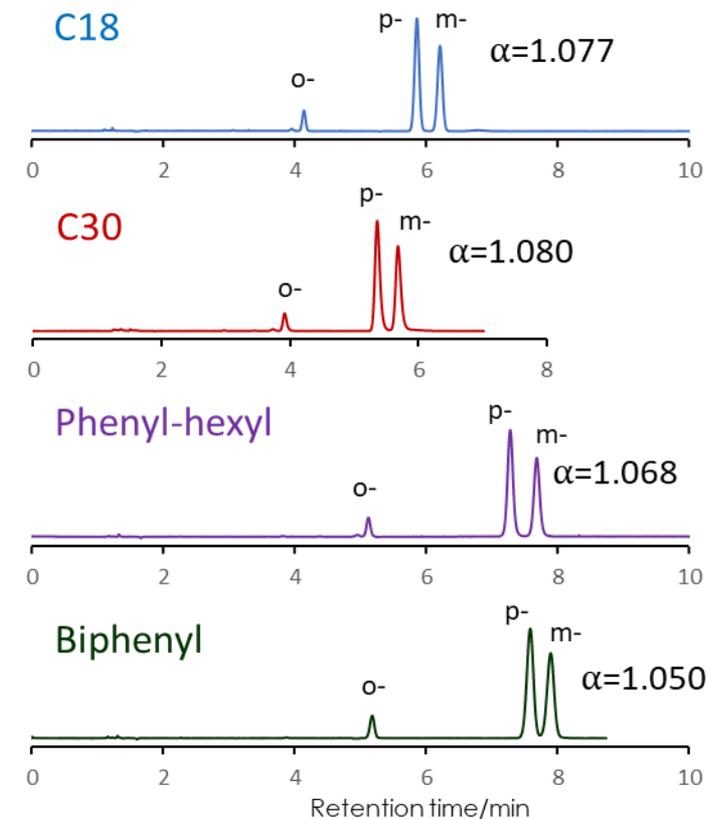


o, m, p-メチル馬尿酸の分離2

2-Propanol/buffer=7/93



Tetrahydrofuran/buffer-10/90



Column: SunShell C18 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell C30 2.6 μ m 150 x 2.1 mm

SunShell Phenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell Biphenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

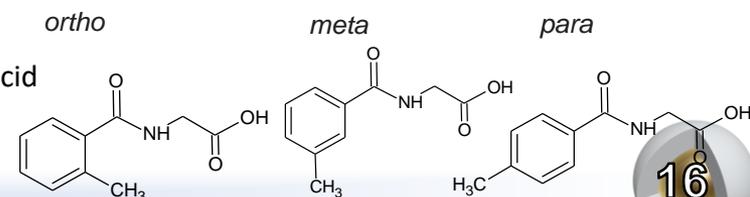
Mobile phase: Organic solvent/25 mM Phosphate buffer pH 3.0

Flow rate: 1.0 mL/min, 0.2 mL/min for only C30

Temperature: 40 °C

Detection: UV@230 nm

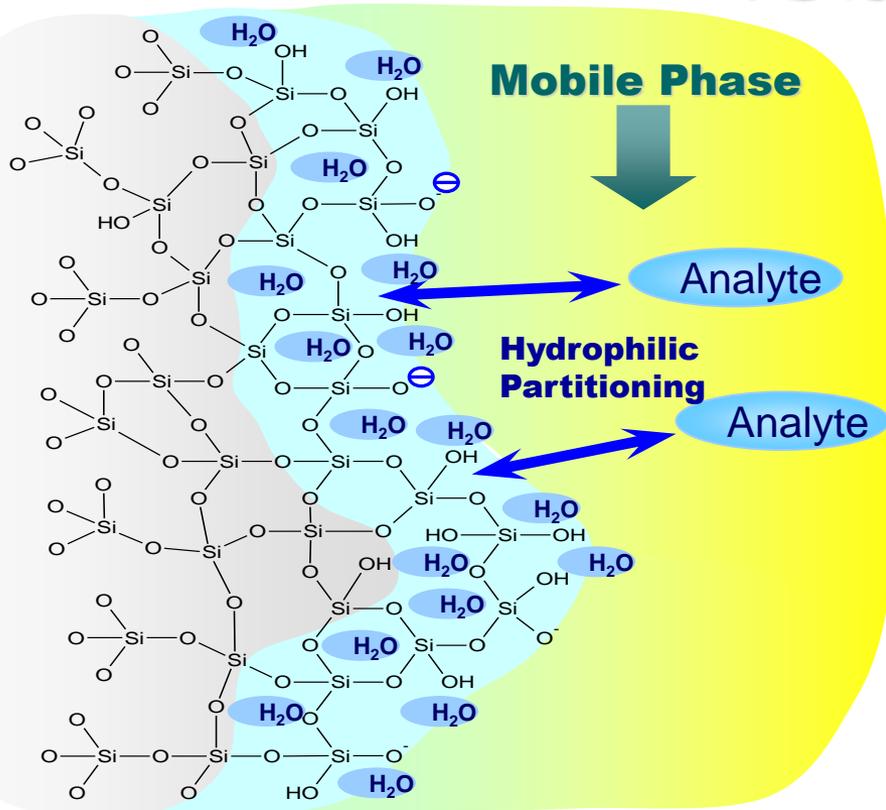
Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid



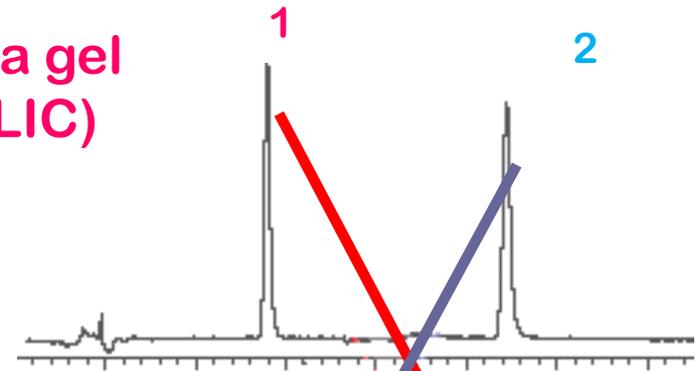


HILICカラム

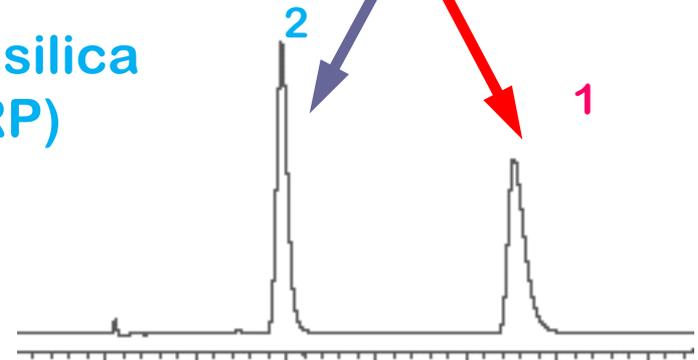
HILICの分離メカニズム



Silica gel
(HILIC)



ODS silica
(RP)



□ HILICの特徴として…

- 逆相系に用いる極性溶媒が使用可能である。
- 固定相に形成された水和層との分配によって分離が起こると言われている。
- 親水性が高い化合物ほど保持される特徴がある。

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

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



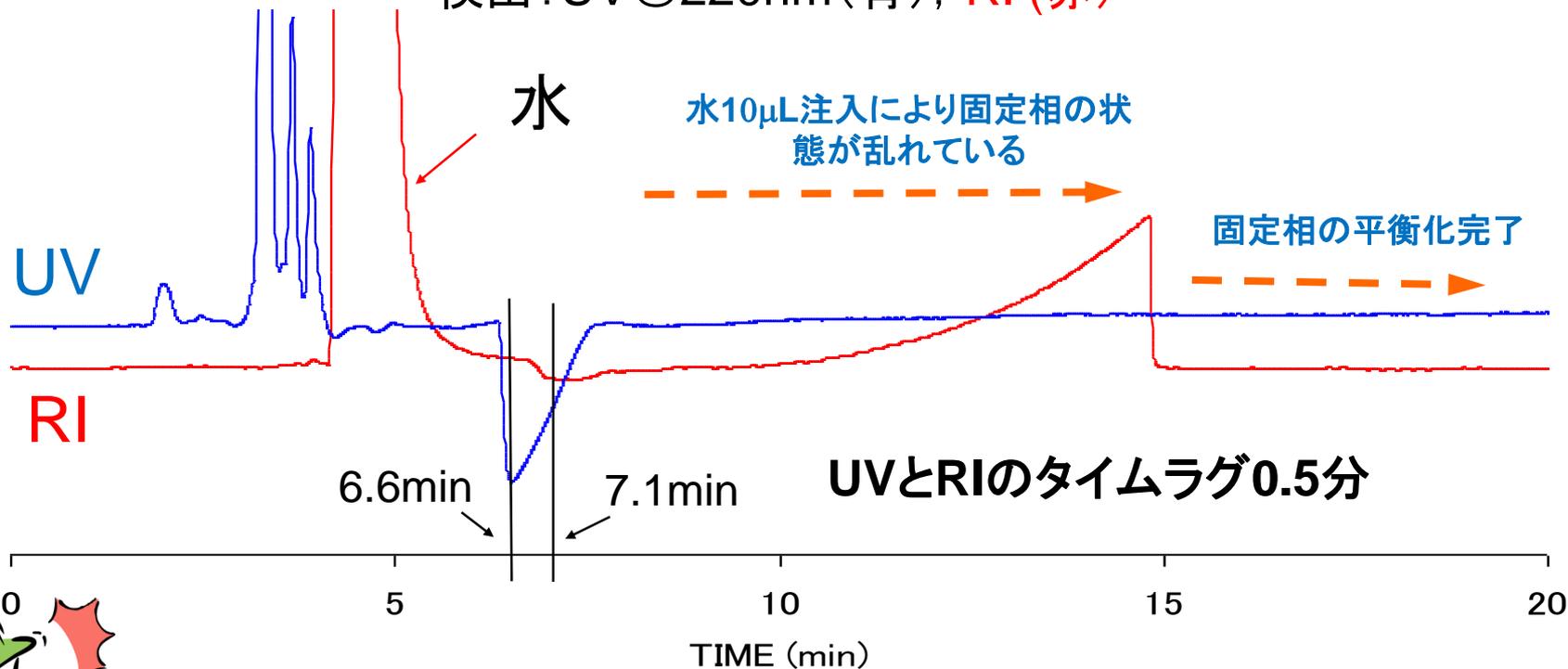
UVで見てるけどそんなことはないけど



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

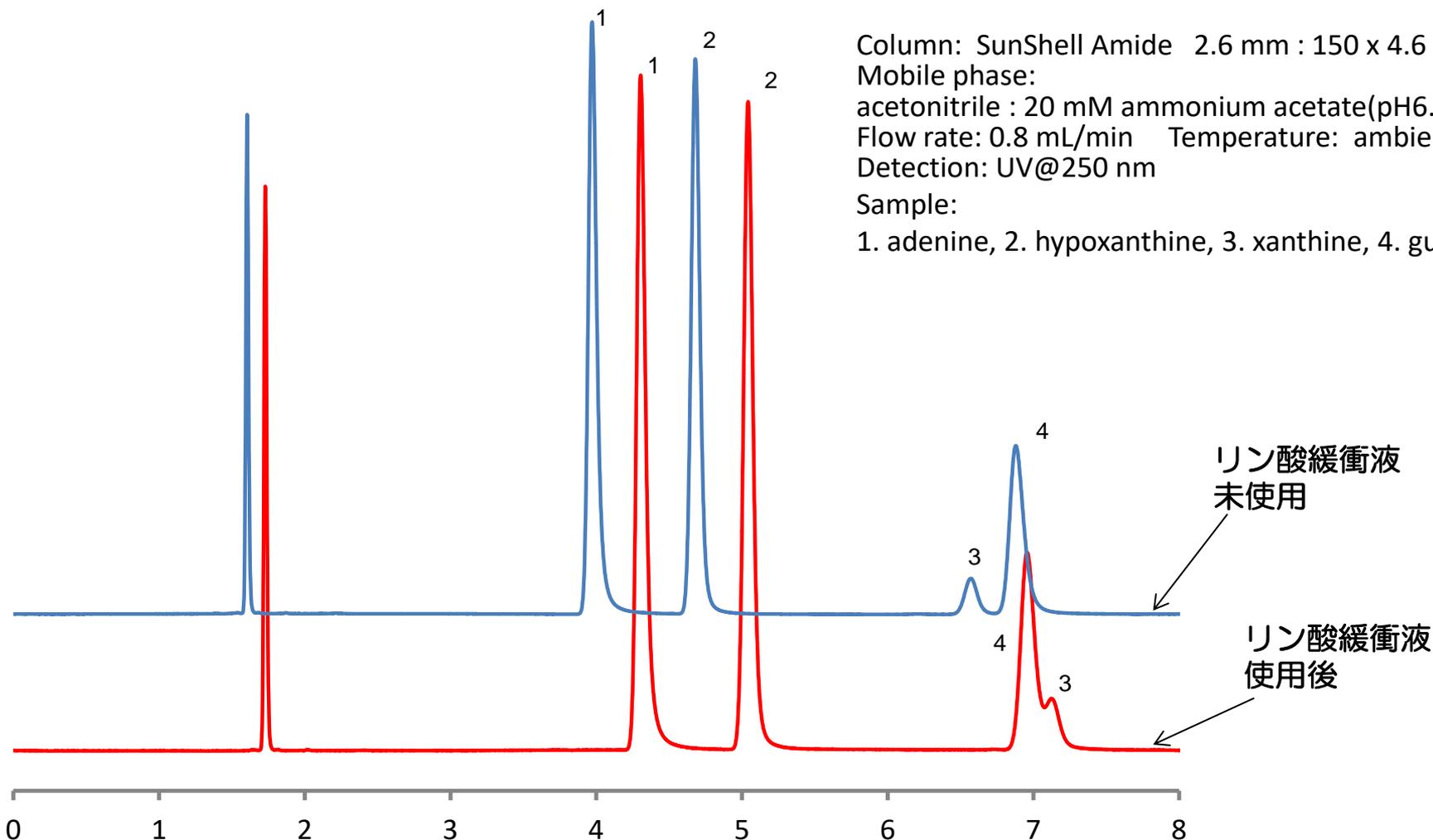
acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15

- 平衡化
- プリン体分析



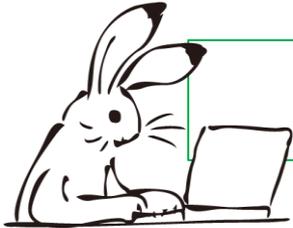
移動相の使用履歴の影響

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

もう少し情報があれば
具体的な話ができるのに

クロマトグラムだけ
見せられても・・・





カラム選択はどのように・・・



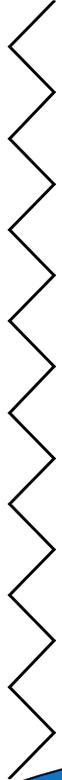
カラムの選定の際はどのようにされているのですか

- 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

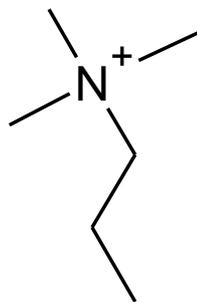


官能基によって相互作用が異なる

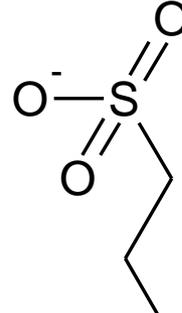
親水性相互作用

イオン交換相互作用

陰イオン
交換基



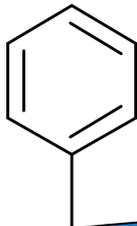
陽イオン
交換基



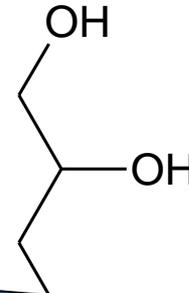
水素結合

π - π 相互作用

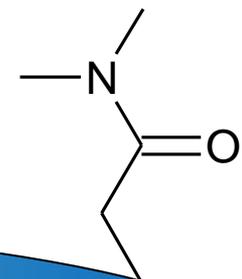
フェニル基



ジオール基



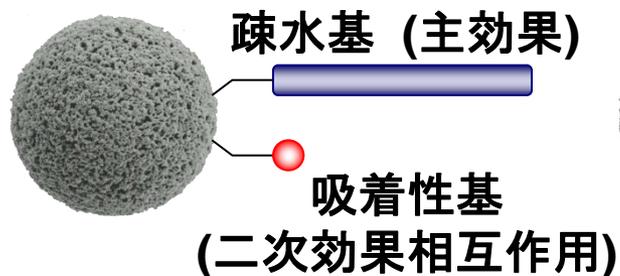
アミド基



カラム充填剤基材

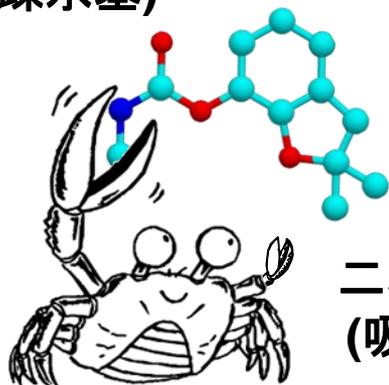


二次相互作用の働き

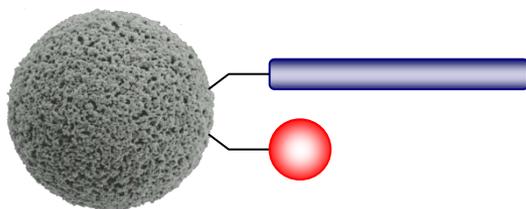


既存の分離剤

主効果
(疎水基)

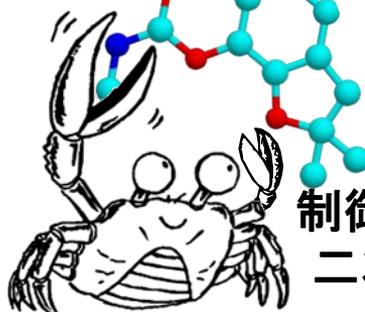


二次効果
(吸着等)

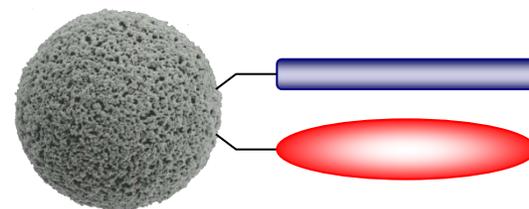


二次効果相互作用
制御型分離剤

主効果
(疎水基)

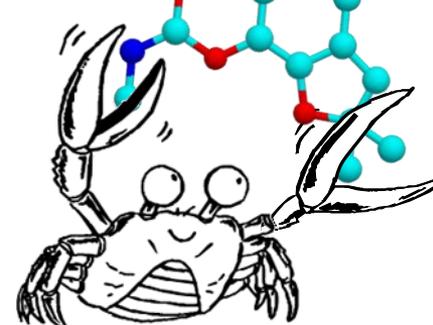


制御された
二次効果



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解消することが可能な場合がある
- ✓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
- ✓フェニル基など π 電子に基づいた相互作用を有するカラムは、アセトニトリルを用いるとその特性を発揮しにくくなる。
- ✓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