

# 水100%移動相でも使える 次世代逆相カラム： 耐久性アップ・ピーク対称性アップ

*ChromaNik*

(株) クロマニック テクノロジーズ  
長江 徳和

Email: [info@chromanik.co.jp](mailto:info@chromanik.co.jp)

<http://chromanik.co.jp>

# 通常 of 逆相カラムの水100% 移動相条件での問題点

ChromaNik

- ・ 保持の減少 ・ 再現性の低下
- ・ カラム寿命の低下

(どのpHでも有機溶媒を含まない移動相が最も劣化が早い)

# 従来のアルキル基の寝込みによる説明の元 となったと思われる論文

## The Sorption Behavior of Alkyl Bonded Phases in Reverse-Phase, High Performance Liquid Chromatography

C.H. Löchmüller\* and D.R. Wilder, Department of Chemistry, Duke University, Durham, North Carolina 27706

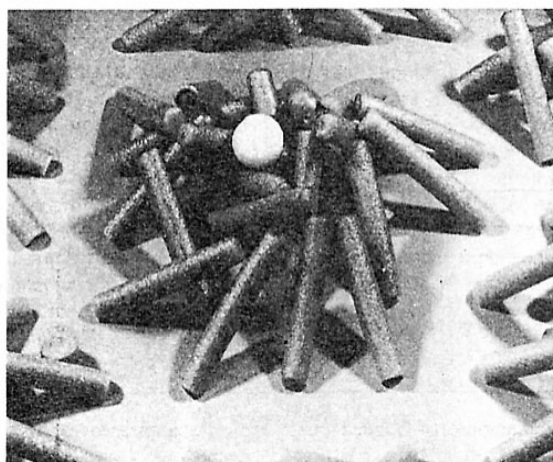


Figure 2. A scaled representation of octadecyl chains chemically bonded to the surface of silica gel showing solvophobic aggregation of the bonded ligands. Appropriate coverage data for this phase was taken from Table II. The white circle on the cluster represents a benzene sized solute molecule.

the family of larger solutes (Figure 5). It is seen that as the solutes become larger, the curves become more nearly linear, and this is consistent with the interpretation that for larger solutes even the longer bonded phases are incapable of completely utilizing the large solute surface area. Apparently, even larger or "deeper" aggregations of bonded alkyl chains would be needed to approach a liquid-like interaction.

The possibility that these effects result from an exclusion phenomena due to restricted entrance of some solutes into pores in the silica matrix seems unlikely. In Figure 5 linear changes of  $k'$  with carbon percentages with the large solutes (anthracene and chrysene) and flattened curves for the smaller solutes can be seen. The opposite trend would be expected if the larger solutes were seeing progressively less stationary phase as they were being restricted from entering the pores because of increasing blockage by the longer chain alkyl silane reagents. On the other hand, if it is maintained that benzene and naphthalene are suffering exclusion from the pores with increased carbon coverage and anthracene and chrysene never enter the smaller pores at all, then at the lesser carbon coverages benzene and naphthalene should be encountering proportionally more of the bonded stationary phase than the larger solutes. It is found, however, that the difference in  $\ln k'$  values between solutes in the linear portion of the  $k'$  vs %

1979年

アルキル基の寝込みに関する論文

C18の寝込みについて記述されている

*Journal of Chromatography*, 197 (1980) 11–20

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 12,911

## SOLUTE–SOLVENT INTERACTIONS ON THE SURFACE OF REVERSED PHASES

### I. STATIONARY PHASE INTERACTIONS AND THEIR DEPENDENCE ON BONDING CHARACTERISTICS

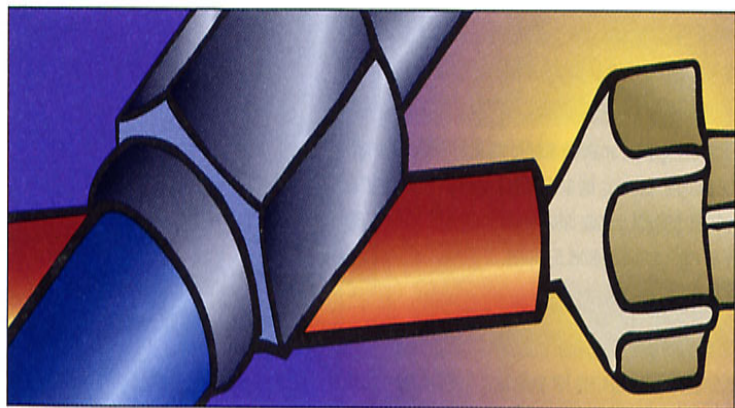
persive interactions are considered, hydrocarbon–hydrocarbon interactions will be much stronger than hydrocarbon–water interactions. It follows that the stationary phase could agglomerate and, therefore, could have a greatly reduced effective chromatographic surface area. It is possible that it will adopt a spatial arrangement where the chains are lying almost flat upon the surface. This would, in effect, reduce the effective chromatographic surface area very significantly and could account for the extensive reduction in retention capacity of the aggregated bonded phase. This

# 従来のアルキル基の寝込みによる説明

1999年アルキル基の寝込みによる保持減少の記述のある報文

316 LC-GC VOLUME 17 NUMBER 4 APRIL 1999

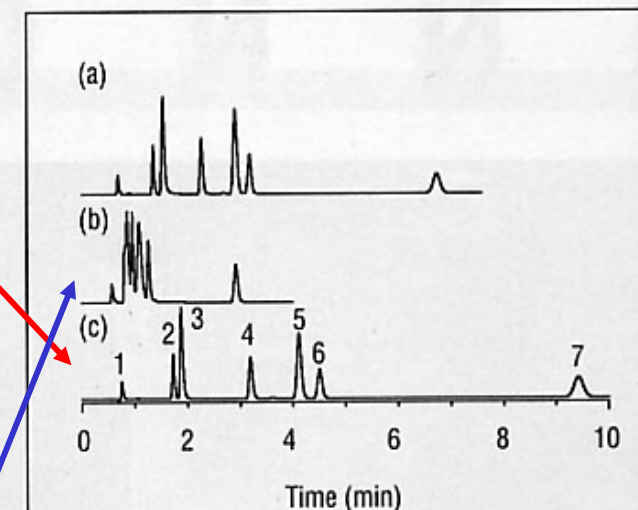
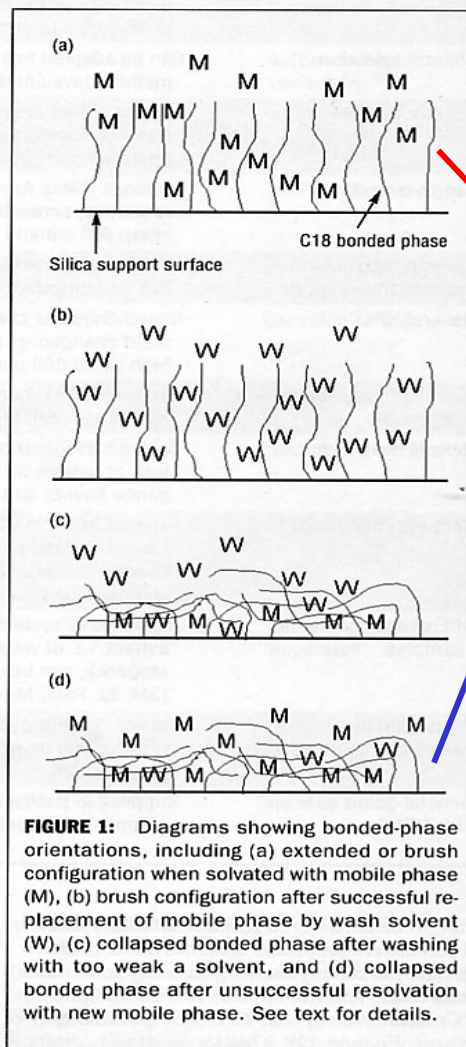
## LC Troubleshooting



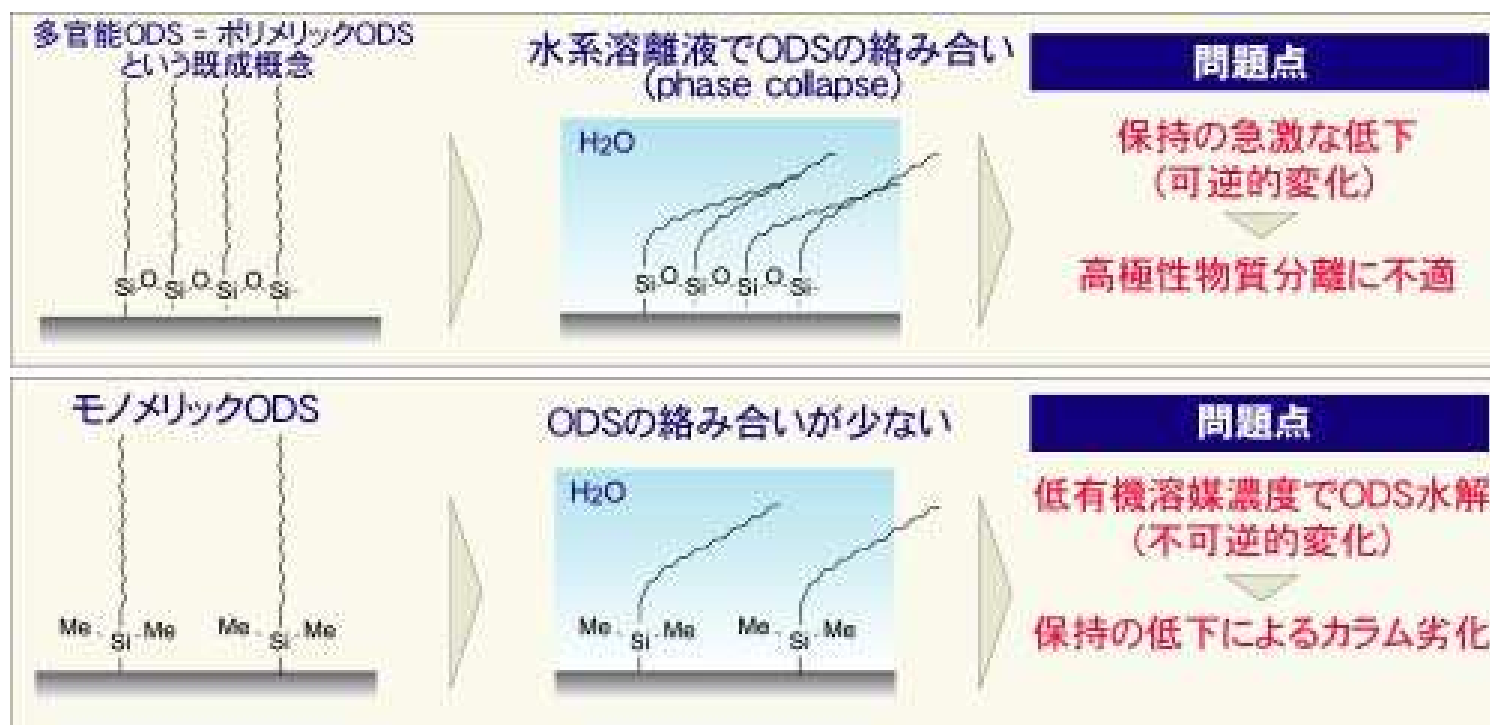
## Lessons in Column Washing

Robert G. Wolcott and John W. Dolan

Like dissolves like . . . sometimes.



# HPLCカラムメーカーのよるアルキル基の絡み合い説



ポリメリックODSはリガンド密度が高く、耐酸性はあるものの、リガンドの絡み合いや寝込み(collapse)によって、水100%系では保持の急激な低下(可逆的)が生じるとされています。これは 多官能ODS=ポリメリックODSという誤解によるものです。

Imtakt websiteより(<http://www.imtakt.com/jp/Products/Unison/Ucollapse.htm>)

# 保持の減少の本当の原因は？

ChromaNik

## 細孔からの移動相の抜け出し

BUNSEKI KAGAKU Vol. 59, No. 3, pp. 193–205 (2010)  
© 2010 The Japan Society for Analytical Chemistry

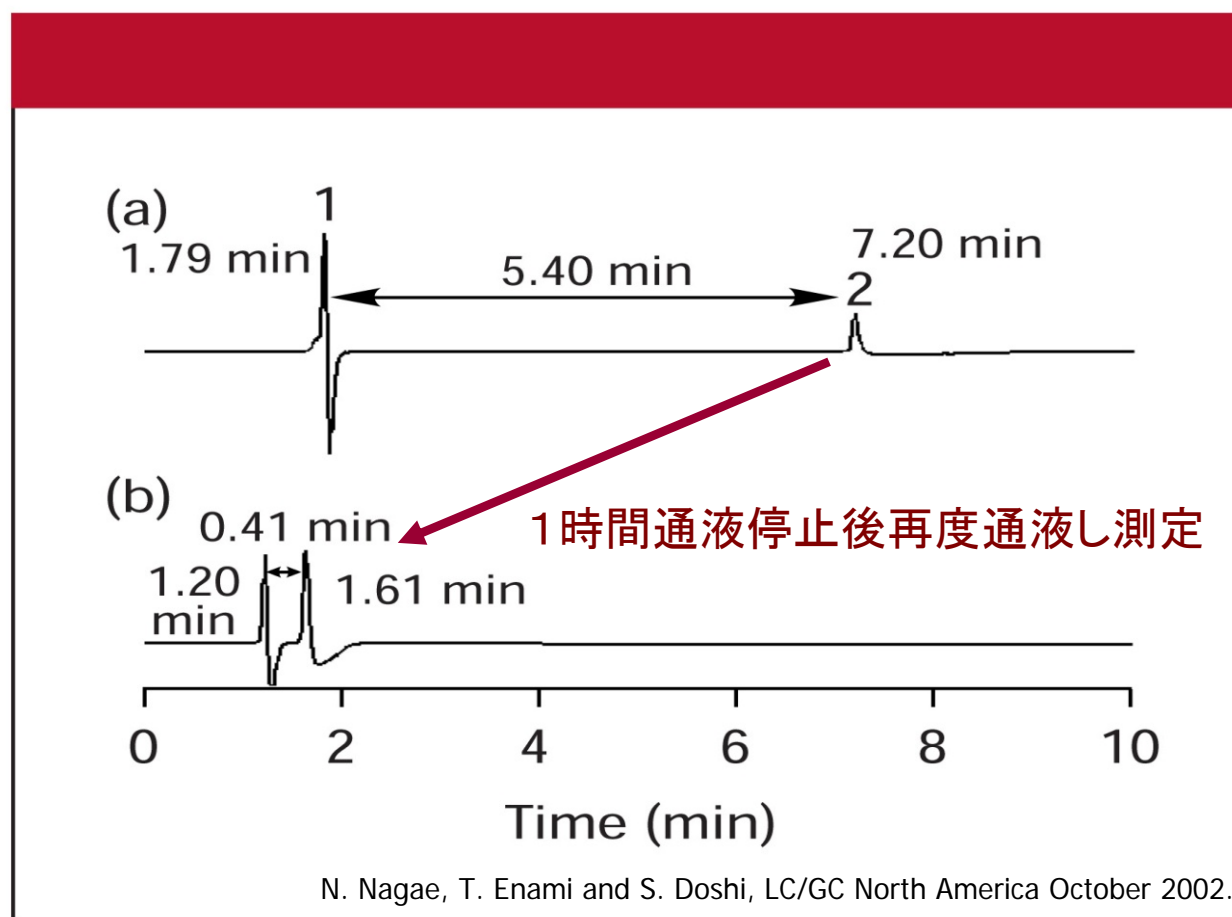
193

総合論文

水 100% 移動相を用いた高速液体クロマトグラフィー  
逆相固定相の保持挙動

長江 徳和<sup>1</sup>

# ODSカラムの保持挙動(水100%)



条件

カラム: ODS 4.6 x 150 mm

移動相: 水

カラム圧力: 6.0MPa

カラム出口以降: 1.7MPa

流速: 1.0 mL/min

温度: 40 °C

検出: RI

試料: 1. 亜硝酸ナトリウム  
2. 2-プロパノール

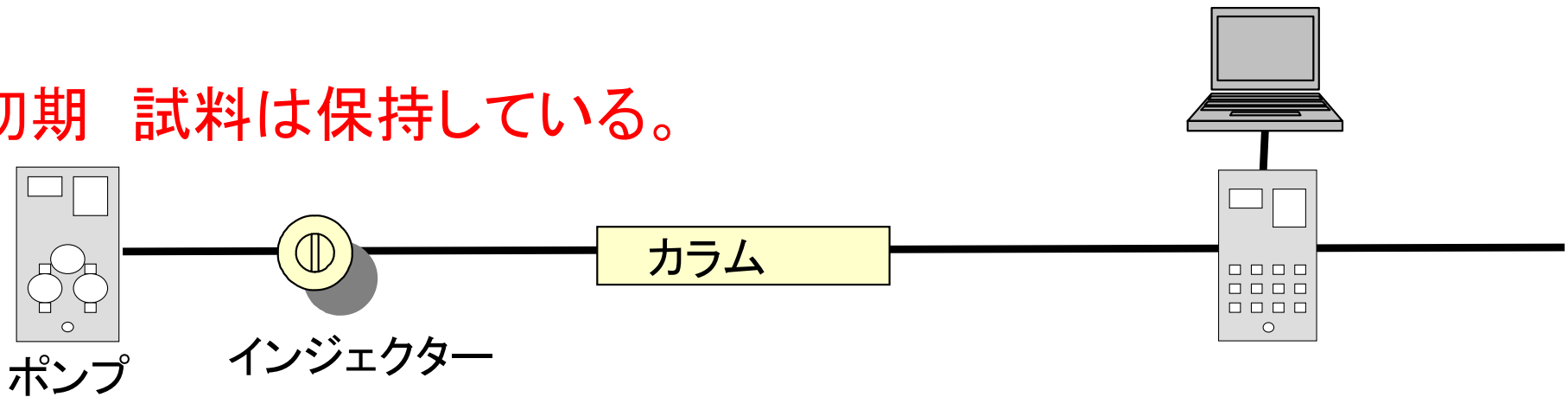
保持時間: 5.40minから0.41minに減少

→ 再現性がない

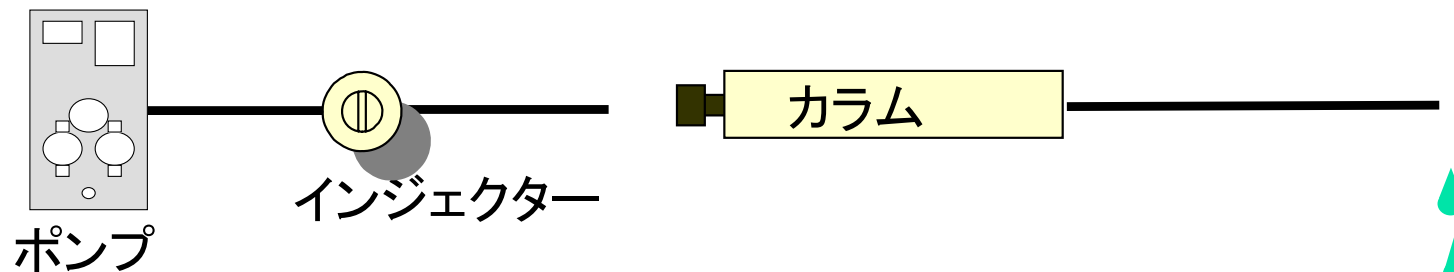


# ポンプ停止後のカラムの状態

初期 試料は保持している。



ポンプを止め圧力が0になったら、すぐにカラムIN側に密栓をする。



カラムOUT側から移動相が出てくる。(0.59mL)

その後送液開始すると保持はすでに短くなっている。

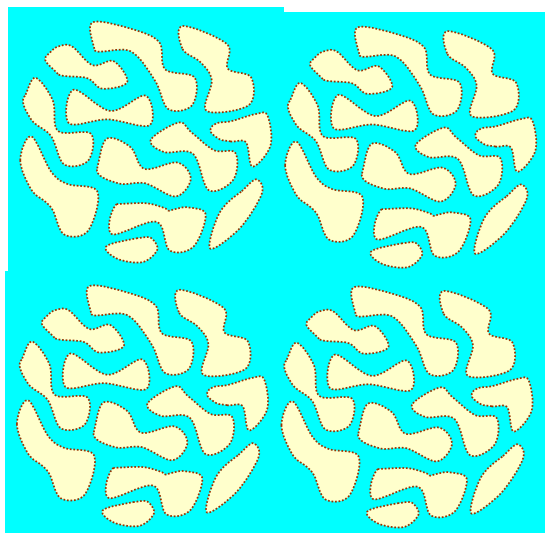
# 水100%移動相条件下で保持が減少する理由

カラム内のODS粒子

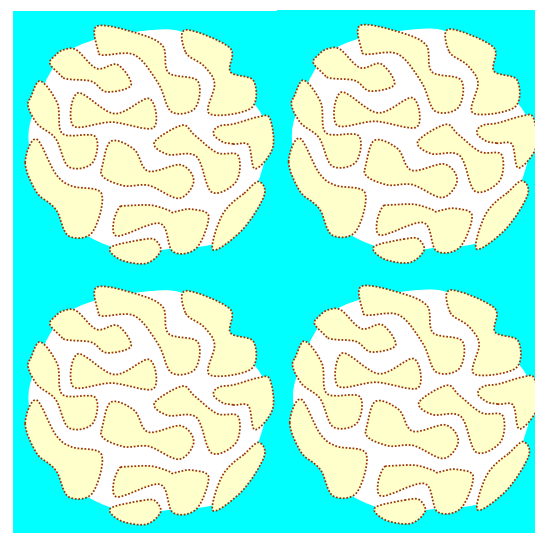
移動相：水

充填剤に圧力がかかっている場合

ポンプを停止し充填剤に圧力がなくなると



細孔内に移動相が  
満たされている状態



細孔内から移動相が  
抜け出した状態

細孔内から移動相が抜けた後、16MPa以上の圧力をかけないと戻らない。

細孔内に移動相を戻すためには有機溶媒を70%以上含む移動相に置換しなくてはならない。

細孔から移動相を抜け出させるためにどんな力が作用しているか？

*ChromaNik*

# 毛管作用

# 毛管現象とは

(岩波 理化学辞典 第5版)

液体中に細い管(毛細管)を立てると、管内において液面が管外よりも上がりまたは下がる現象。液体分子間の凝集力と液体と管壁の間の付着力との大小関係により、液体が管を濡らす(付着力が大きい)ときは液面は上昇し、濡らさないときは下降する。管の内外の液面の高さの差を $h$ 、管の半径を $r$ 、液体の密度を $\rho$ 、液体の表面張力を $\gamma$ 、接触角を $\theta$ 、重力加速度を $g$ とすれば、 $h=2\gamma\cos\theta/r\rho g$ となる。

# 毛管現象

## Capillarity, Capillary phenomenon

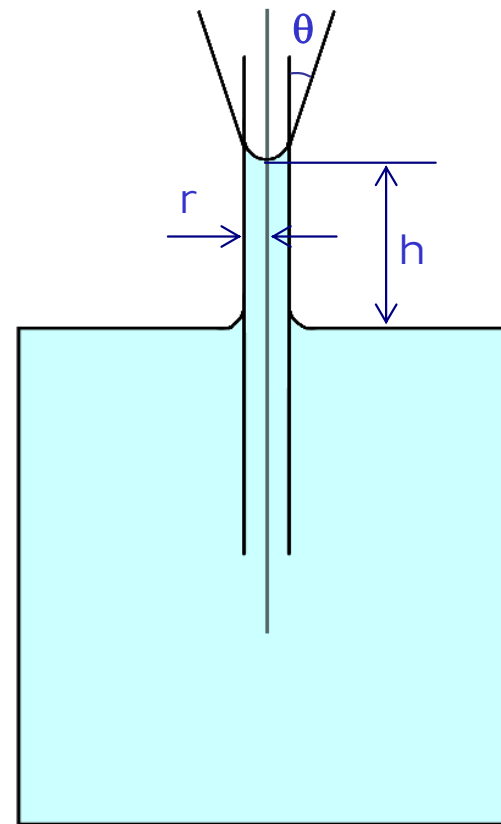
毛管現象の式:

$$h = \frac{2\gamma \cos\theta}{r\rho g}$$

$\gamma$ : 表面張力

$\rho$ : 液体の密度 (比重)

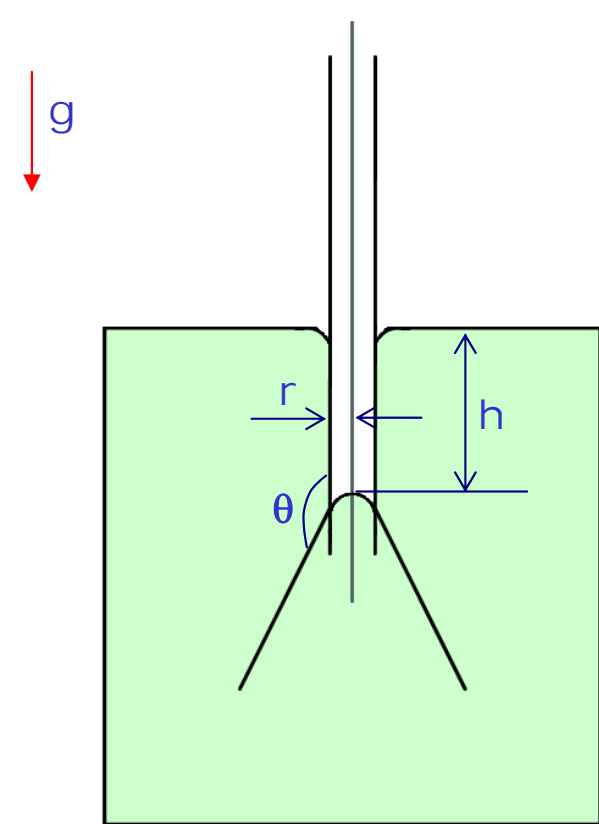
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



液体が管に濡れない場合

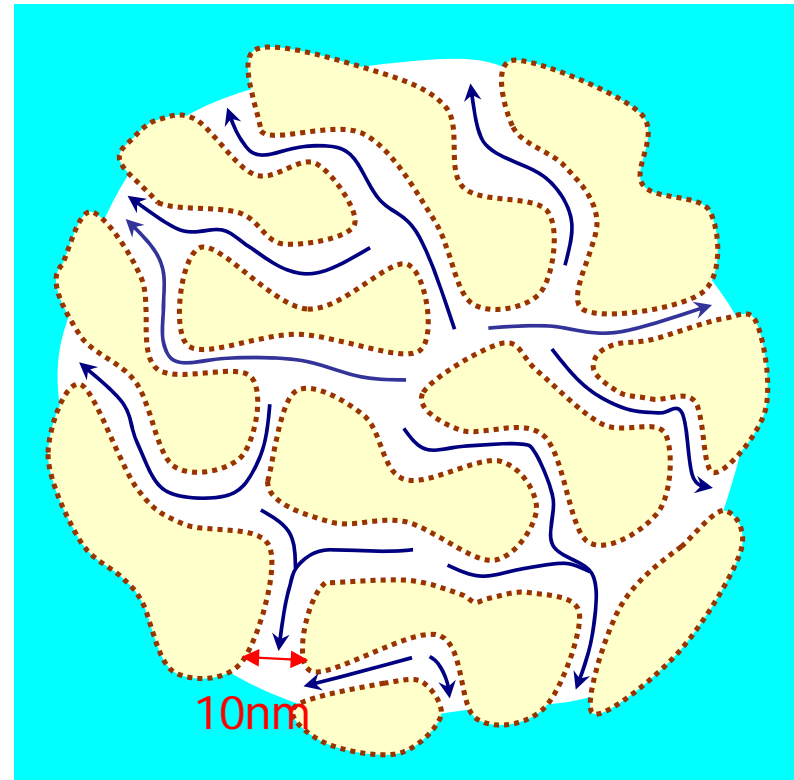
$$\theta > 90^\circ$$

# 毛管現象



内径0.5mmのガラス管

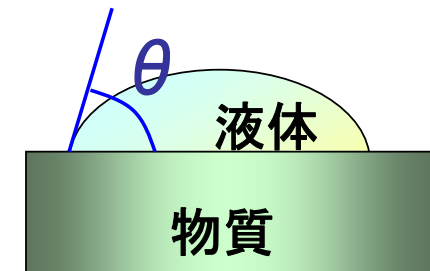
内径0.5mmのガラス管内で赤インクは6cm上昇する。この場合に作用してる圧力は0.006気圧である。内径が $1\mu\text{m}$ では30m上昇し、3気圧の圧力が作用していることになる。



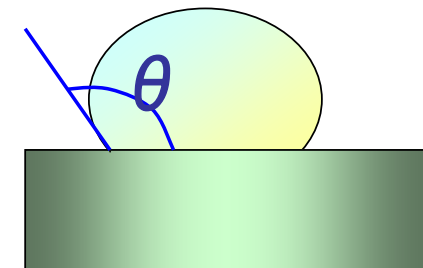
カラムを大気圧状態にして、移動相を充填剤の細孔から抜け出させるために必要な圧力は1気圧である。充填剤の細孔の大きさを考慮すると毛管現象によりこの1気圧は簡単に発生する。

# 濡れる (wetting) とは

『液体と物質の表面との接触角が90度より小さい状態である』



『液体と物質の表面との接触角が90度より大きい場合は濡れてない状態である』



『蓮の葉の上に水滴が存在する, この場合蓮の葉は水に濡れているか?』



細孔内でもODS表面に水は濡れない(接触角は90度以上)

# 水100%移動相で安定な保持を得るためには

逆相充填剤は水に濡れないー接触角は90度以上



毛管作用によって抜け出そうとする圧力が大気圧(0.1MPa)以下であればよい



C8 :水との接触角は137度→→大気圧以上→→移動相抜ける

C18 :水との接触角は126度→→大気圧以上→→移動相抜ける

C28 :水との接触角は105度→→大気圧以下→→移動相抜けない



# C18表面と30%メタノールは濡れるか？

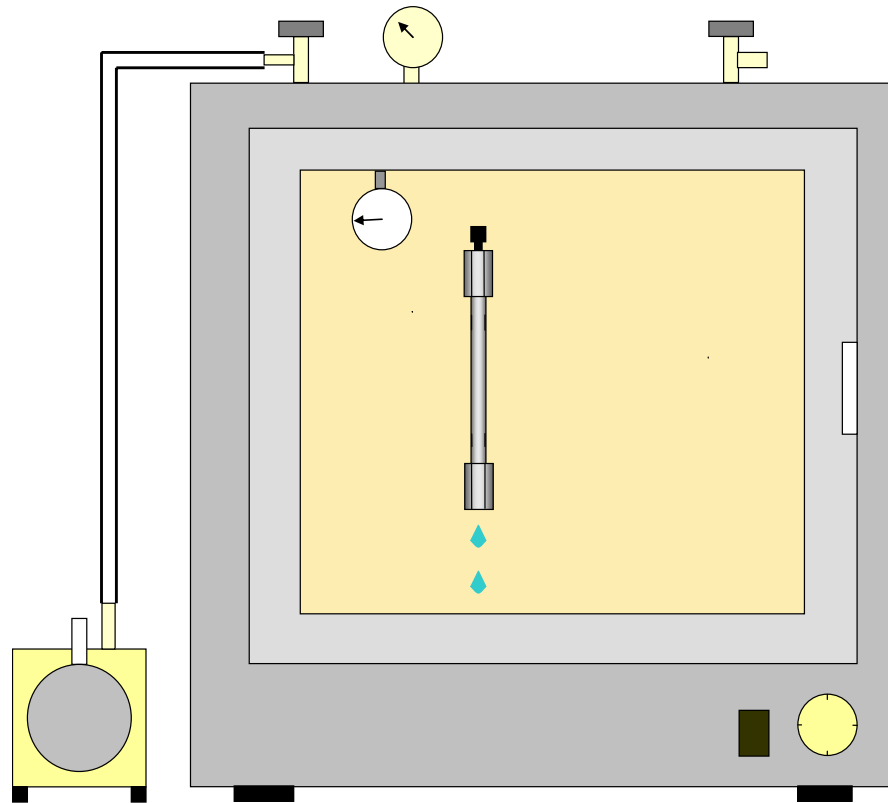


それぞれの溶液にC18充填剤を混ぜ、超音波の振動を加えながら攪拌混合した。

- ・70%メタノールでは超音波の振動を加えなくても完全にC18充填剤が分散する。分散後沈降し始める。
- ・50%メタノールでは一部分散している。(超音波振動を加えない場合は全く分散しない)
- ・30%メタノールでは全く分散していない。

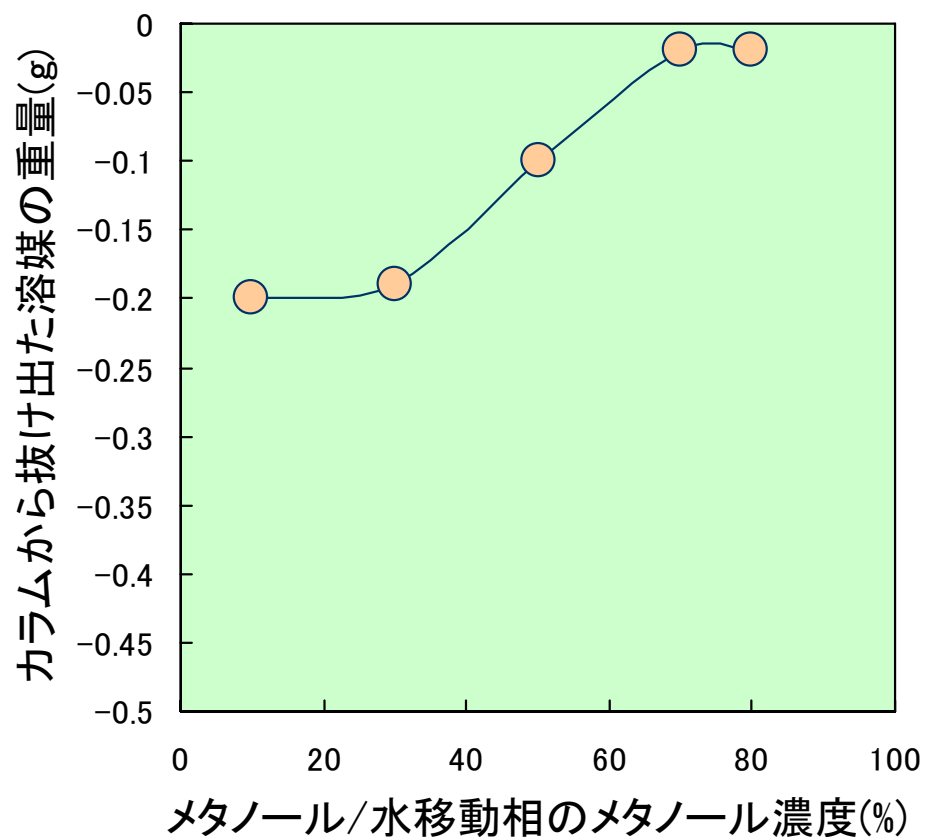
メタノール濃度が50%以下の溶液はC18表面に濡れないため、細孔内に入り込めない。しかし、圧力をかける、また100%メタノールで濡れている状態から溶液を切り替えた場合には30%メタノールでも細孔内に入り込み、その後大気圧にしても細孔から抜け出すことはない。

# 大気圧が1気圧以下であるならば



- \* 真空ポンプでカラム内の圧力を大気圧以下にし、20分間放置
- \* 充填剤細孔から移動相が抜けた場合にはカラムの重量が変化

# C18充填剤中の0.01MPaでの溶媒の状態



カラム: C18, 5  $\mu\text{m}$  - 250x4.6mm

模擬大気圧: 0.01MPa

カラム温度: 40  $^{\circ}\text{C}$

放置時間: 20分間

\* 70%以上のメタノールをカラムに通液した場合は0.01MPaでも充填剤細孔からの溶媒の抜け出しはほとんど認められず、50%以下では溶媒の抜け出ししている。

\* 70%以上のメタノールではODS充填剤が濡れるため、毛管作用により細孔内へ入り込む力が働き、充填剤細孔から溶媒は抜けでないが、50%以下では濡れないため、抜けようとする。

# 逆相固定相のアルキル基：寝込んで (絡み合っ)ているのか (Ligand Collapse) または立ち上がっているのか？

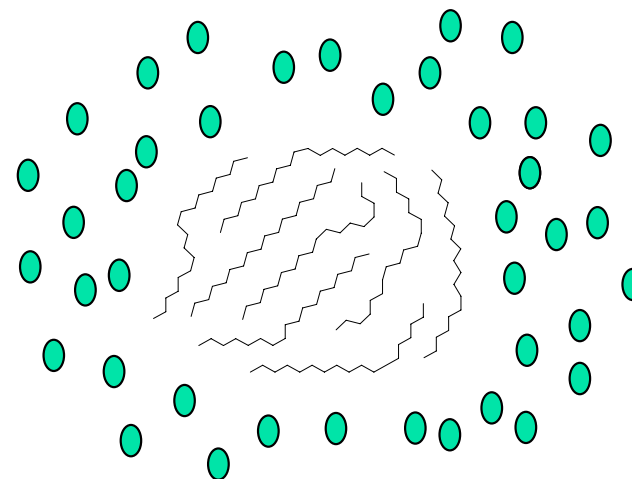
ChromaNik

一般的にはアルキル基は立ち上がっていると考えられている？

しかし視点を変えると違った見方ができる

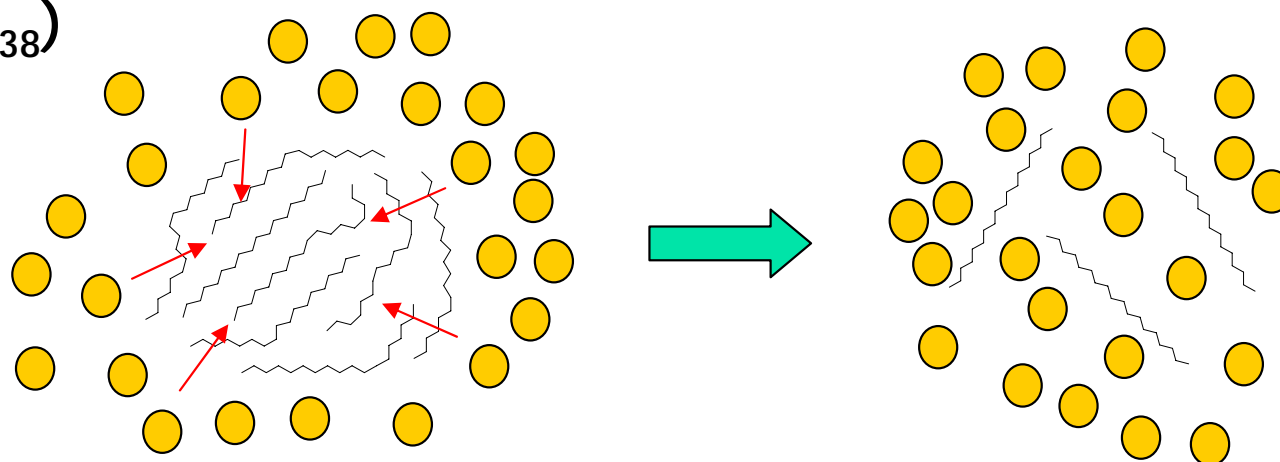
# 有機溶媒中でのオクタデカンの状態

メタノールにオクタデカン  
( $C_{18}H_{38}$ )は混ざらない  
(溶けない)



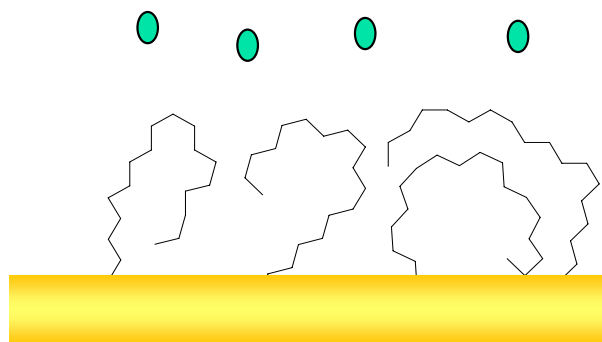
メタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとると考えられる

テトラヒドロフラン (THF)  
にオクタデカン ( $C_{18}H_{38}$ )  
は溶ける



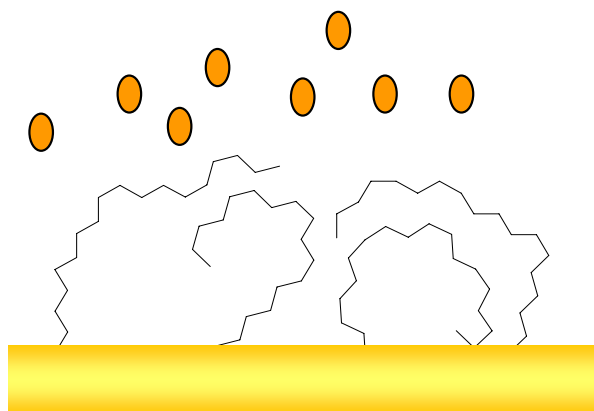
# C18表面上での溶媒和の概略図

## メタノール



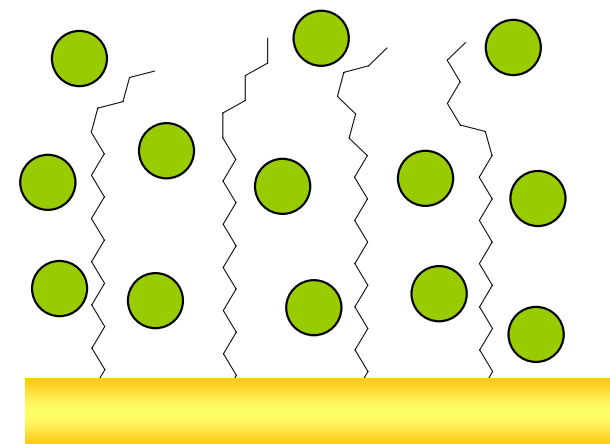
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している

## アセトニトリル



メタノールと同様に、オクタデシル基は寝込んでおり、表面にアセトニトリルが溶媒和している

## テトラヒドロフラン

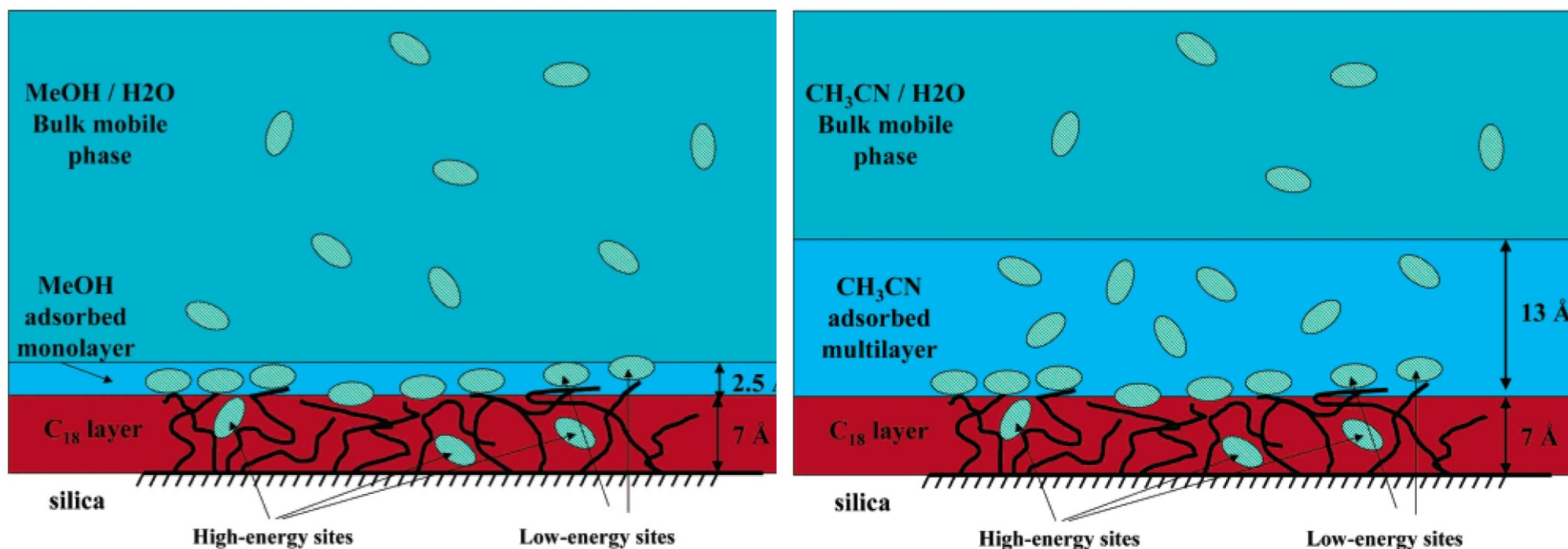


オクタデシル基は立ち上がっており、全体にテトラヒドロフランは溶媒和している

# ラマンスペクトルによる溶媒和量の測定

Adsorption Mechanism in RPLC. Effect of the Nature of the Organic Modifier

Fabrice Gritti, and Georges Guiochon, *Anal. Chem.*, 2005, 77 (13), 4257-4272



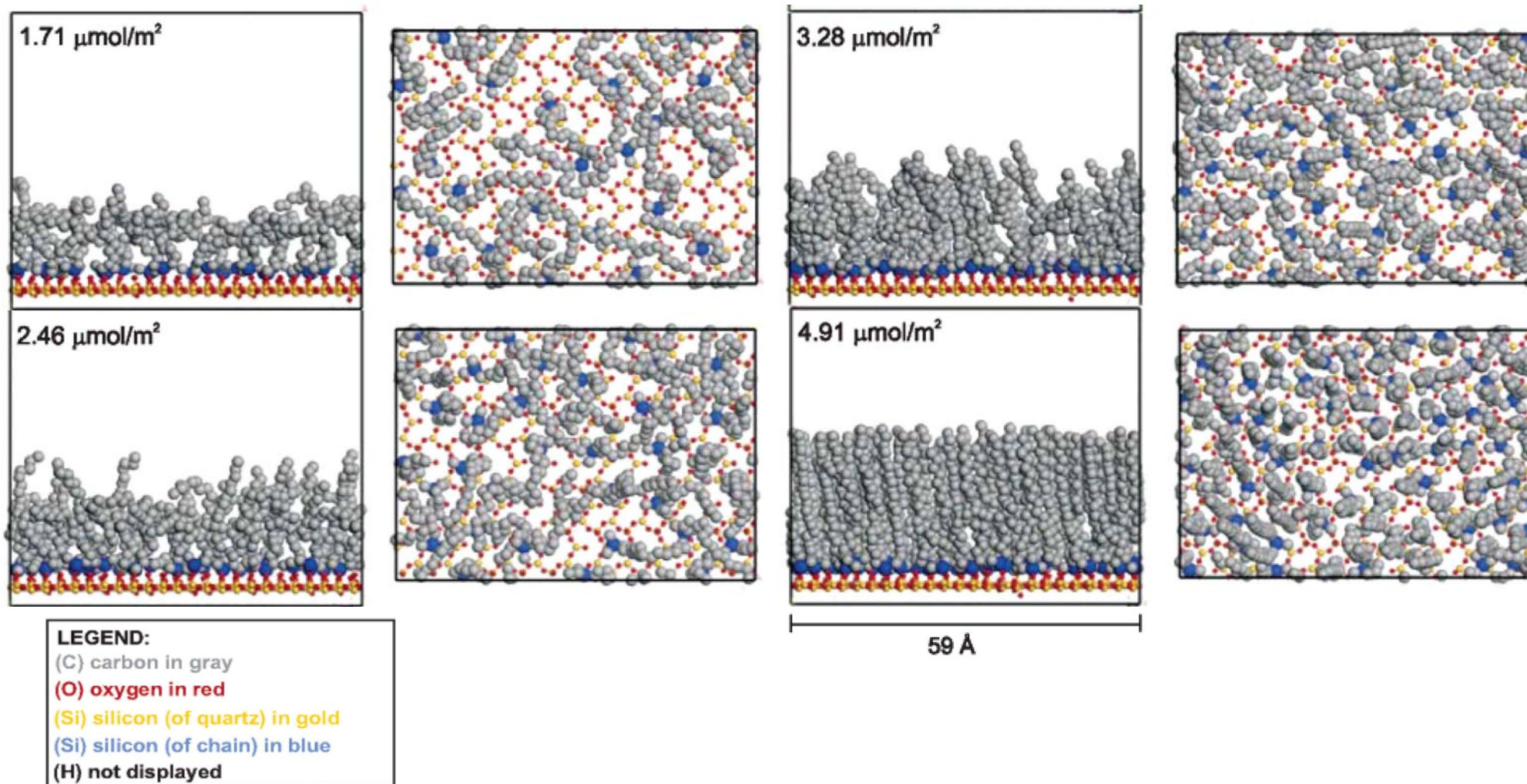
**Figure 16.** Schematic comparison of the adsorption mechanisms of a solute from aqueous solutions of methanol (A) and acetonitrile (B) onto a RPLC material. The different shadings represent the three different “phases” involved in the chromatographic system. From top to bottom, the bulk mobile phase (a water-rich solution), the adsorbed mono- or multilayer of organic modifier molecules (a phase rich in adsorbed organic modifier), and the C<sub>18</sub>-bonded phase. The analyte (phenol or caffeine) is represented by small ovals.

# Molecular Dynamics Simulations of Alkylsilane Stationary-Phase Order and Disorder. 1. Effects of Surface Coverage and Bonding Chemistry

Katrice A. Lipka, Lane C. Sander, and Raymond D. Mountain

*Anal. Chem.*, 2005, 77 (24), 7852-7861

(a) monomeric C<sub>18</sub>



**Figure 3.** Side- and top-view snapshots of simulated (a) monomeric C<sub>18</sub> and (b) polymeric C<sub>18</sub> chromatography models at various surface coverages. The atoms are color-coded according to the legend; H atoms are not displayed in the interest of clarity.



# 水100%移動相で使用可能C18

★水との接触角を90度に近づけている

- C18の結合密度を下げる
- 極性の高いエンドキャッピング
- C18に極性基を埋め込む

充填剤表面の疎水性  
が下がり, 耐久性が落  
ちる

- アルキル鎖長を長くする

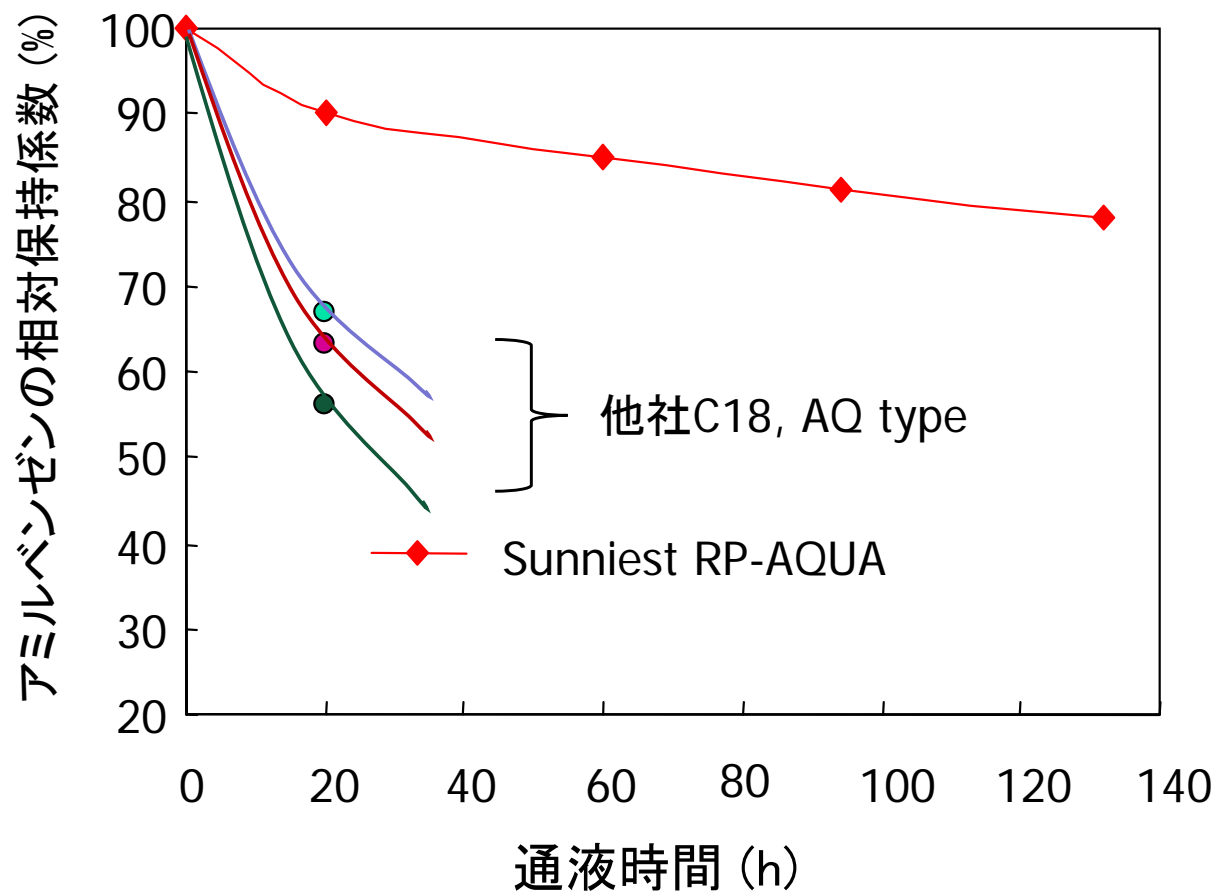
→→

充填剤表面の疎水性  
は同じで, 耐久性が落  
ちない

***Sunniest RP-AQUA***

オクタコシル基結合 (C28)

# 耐酸性加速試験 0.5%TFA, pH1.3



## 耐久性試験条件

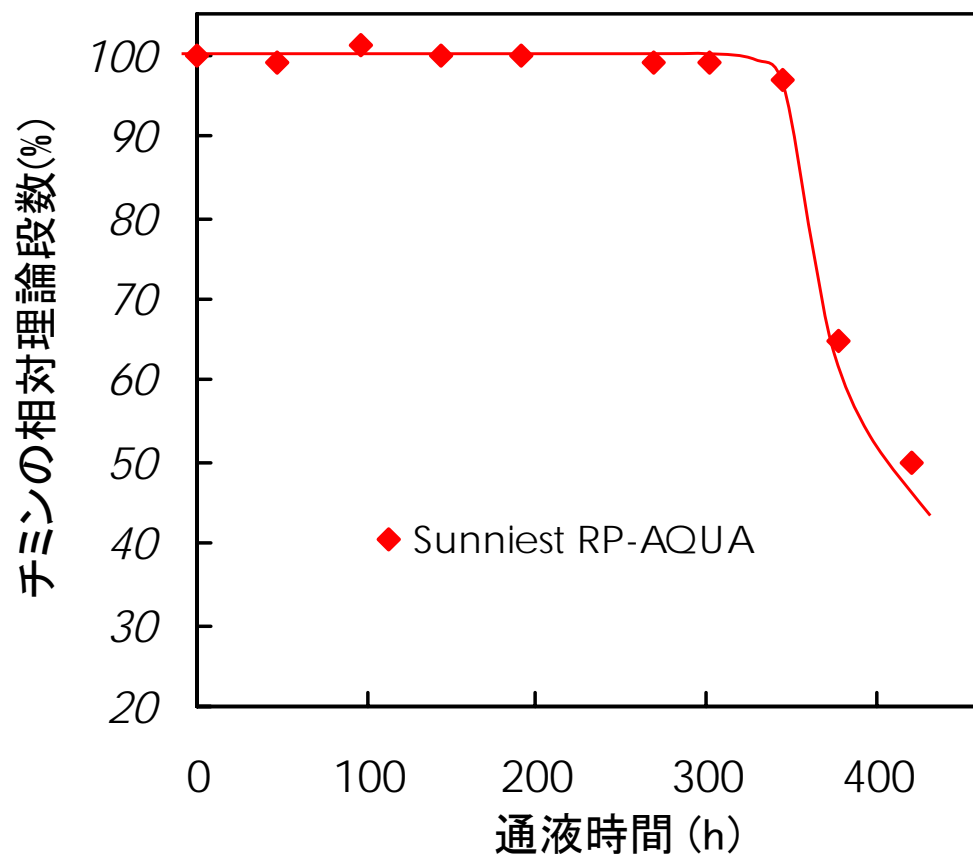
Column: Sunniest RP-AQUA,  
5 $\mu$ m 4.6x150 mm  
Mobile phase: 0.5% TFA  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 60 °C

## 保持時間測定条件

Column: Sunniest RP-AQUA,  
5 $\mu$ m 4.6x150 mm  
Mobile phase:  
CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C  
Sample: 1 = Uracil  
2 = Amylbenzene

# 耐アルカリ性試験

緩衝液のみpH8



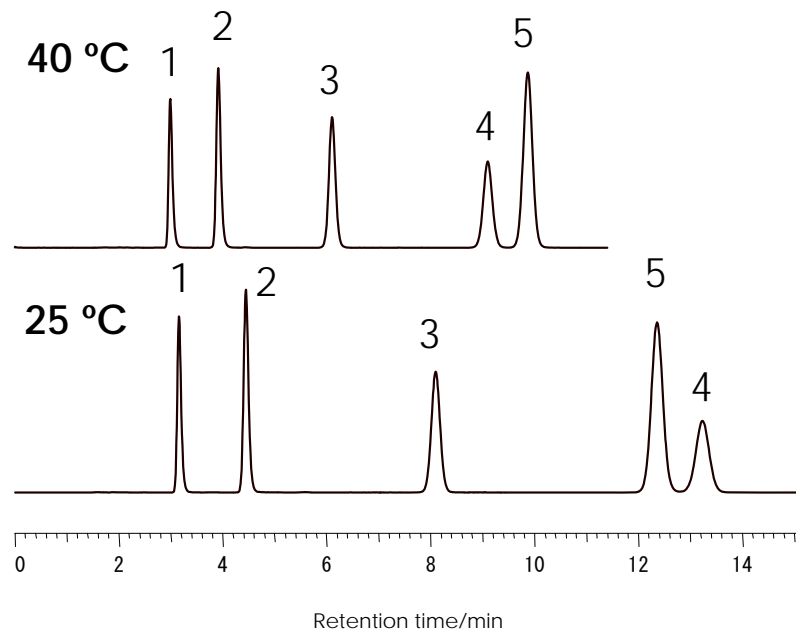
## 耐久性試験条件

Column: Sunniest RP-AQUA, 5 $\mu$ m 4.6x150 mm  
Mobile phase: 20mM Phosphate buffer pH8.0  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C

## 理論段数測定条件

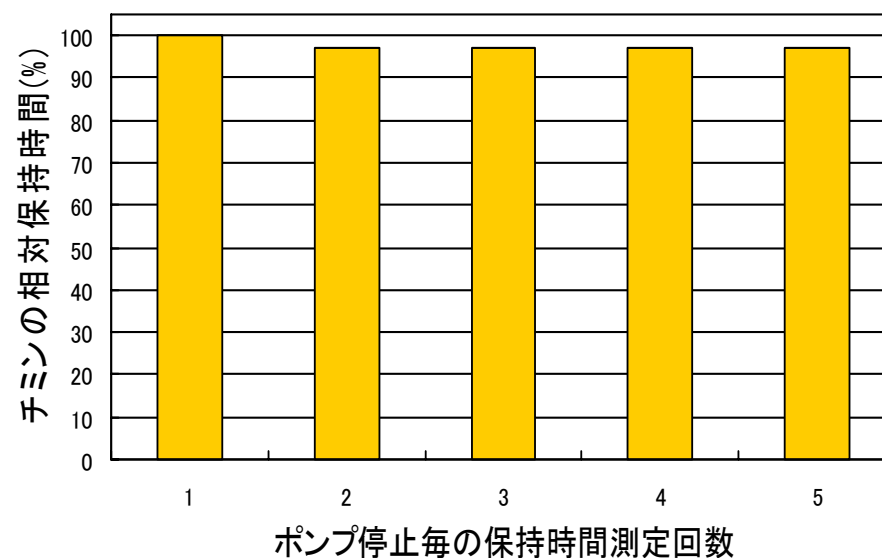
Column: Sunniest RP-AQUA, 5 $\mu$ m 4.6x150 mm  
Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C  
Sample: 1 = Thymine

# 核酸塩基の分離と再現性



Column: Sunniest RP-AQUA, 5 $\mu$ m  
4.6x150 mm  
Mobile phase: 10mM Phosphate  
buffer pH7.0  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C and 25°C  
Sample: 1 = Cytosine 2 = Uracil  
3 = Thymidine 4 = Uridine  
5 = Thymine

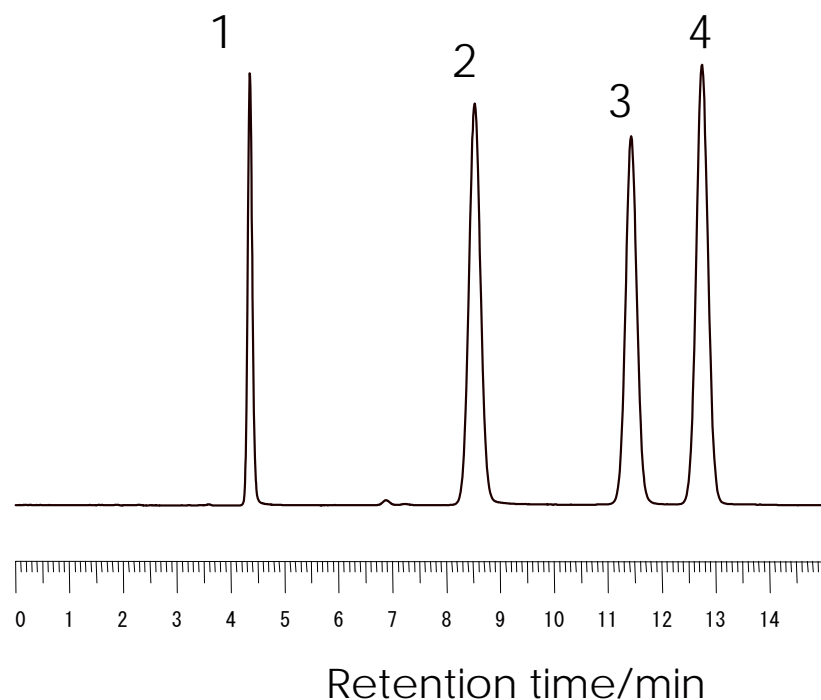
40°Cでのチミンの保持時間の変化  
(ポンプ送液1時間停止毎に測定)



緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により、ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると、通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり、保持時間は大幅に減少しますが、Sunnest RP-AQUAはほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず、97%以上の再現性を示しました。

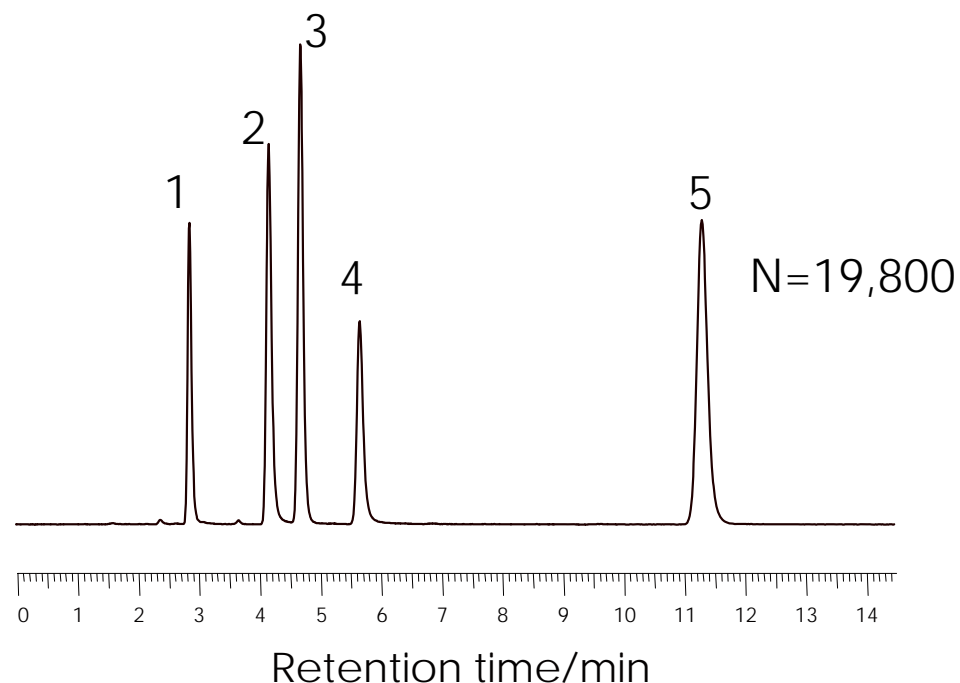
# 緩衝液のみの移動相での分離例

## ◆水溶性ビタミン



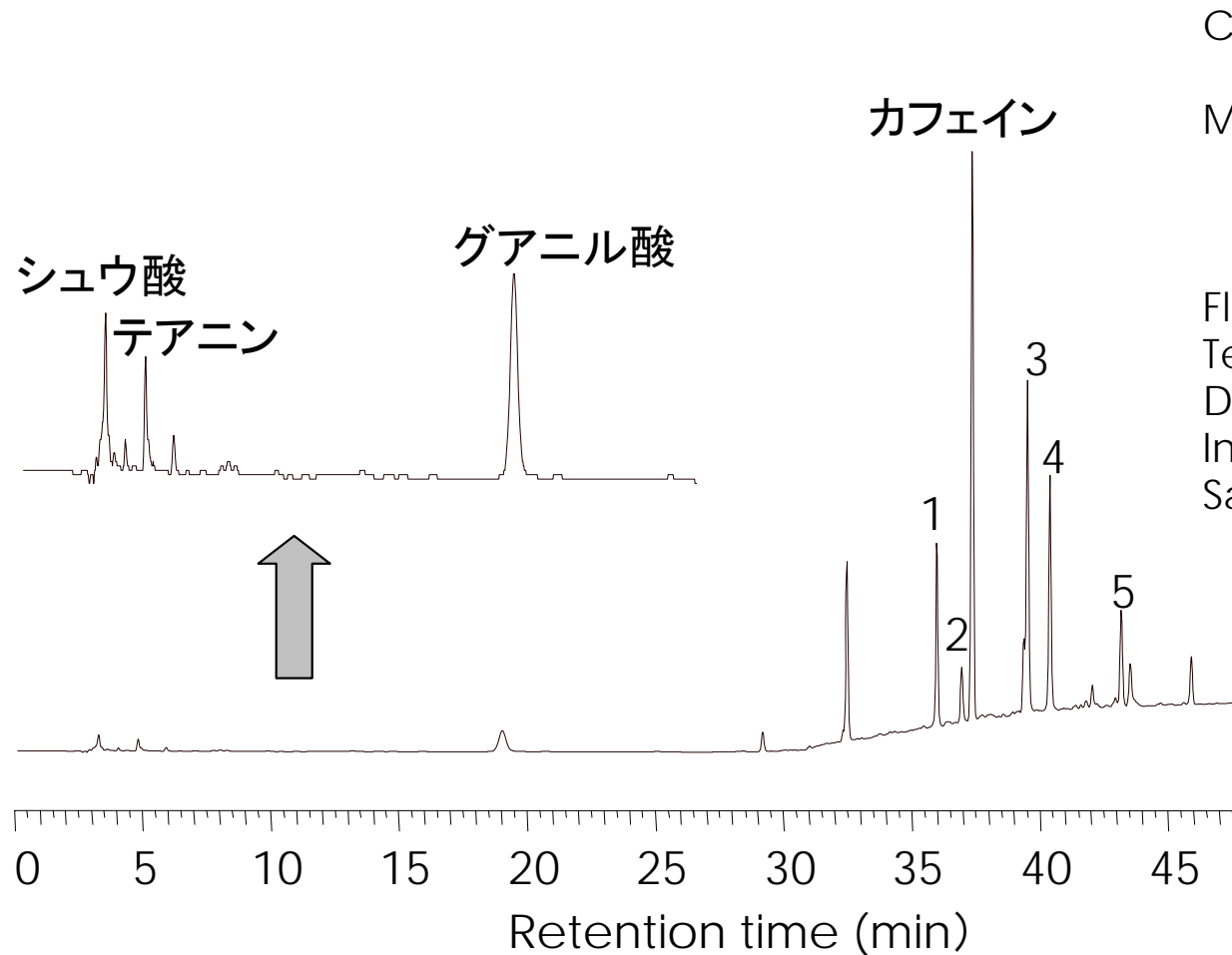
Column: Sunniest RP-AQUA, 5 $\mu$ m 4.6x150 mm  
 Mobile phase: 40mM Phosphate buffer pH6.8  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Detection: UV@250nm  
 Sample: 1 = Nicotinic acid, 2 = Pyridoxal, 3 =  
 Pyridoxine, 4 = Nicotinamide

## ◆ヌクレオチド



Column: Sunniest RP-AQUA, 3 $\mu$ m 4.6x150 mm  
 Mobile phase: 20mM Phosphate buffer pH6.0  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Detection: UV@250nm  
 Sample: 1 = 5'-GDP, 2 = 5'-GMP,  
 3 = 5'-ATP, 4 = 5'-ADP, 5 = 5'-AMP

# カテキンおよびうまみ成分の分離



Column: Sunniest RP-AQUA 5  $\mu$ m,  
250 x 4.6 mm i.d.  
Mobile phase: A) H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99.9:0.1)  
B) CH<sub>3</sub>CN  
Time (min) 0 20 60  
%B (%) 0 0 50

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@210 nm

Injection volume: 10  $\mu$ L

Sample: Oolong tea

1 = (-)-Epigallocatechin

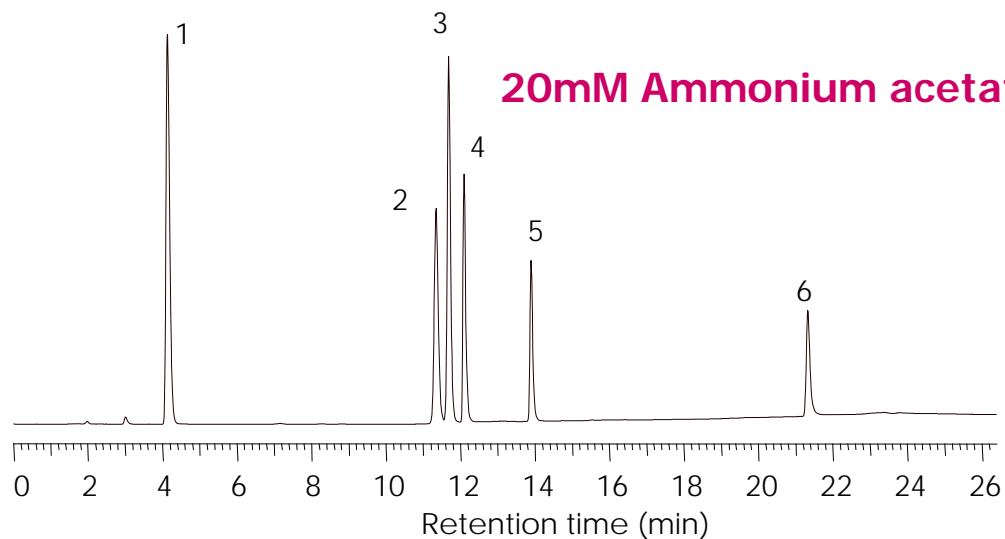
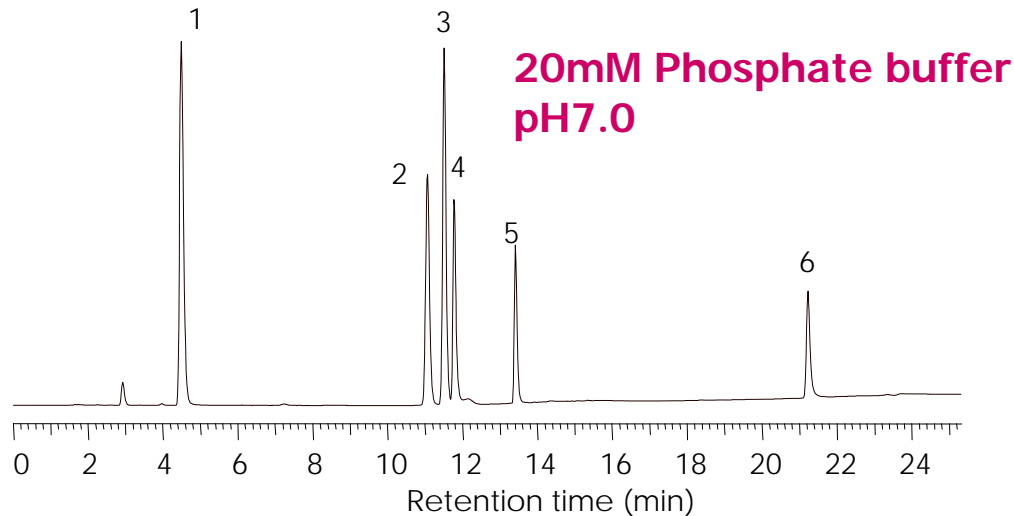
2 = (+)-Catechin

3 = (-)-Epigallocatechin gallate

4 = (-)-Epicatechin

5 = (-)-Epicatechin gallate

# 水溶性ビタミンの分離例 II



Column: Sunniest RP-AQUA 5  $\mu$ m,  
150 x 4.6 mm i.d.

Mobile phase:

A) 20mM Ammonium acetate

B) Acetonitrile/ A solution (20:80)

Time (min)	0	5	20	25
%B (%)	0	0	100	100

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: 1 = Nicotinic acid

2 = Pyridoxine HCl Vitamin B<sub>6</sub>

3 = Nicotinamide

4 = Thiamine HCl Vitamin B<sub>1</sub>

5 = Folic acid

6 = Riboflavin Vitamin B<sub>2</sub>

# まとめ

- ◆逆相カラムは水移動相が細孔から抜け出すため、保持時間が減少する
- ◆この細孔内からの水移動相の抜け出しは毛管作用により起こる
- ◆他社C18 AQ typeは疎水性を下げているので、耐久性が劣る
- ◆オクタコサン基結合Sunniest RP-AQUAは、アルキル基が長いため、水移動相でも保持の再現性が得られる
- ◆Sunniest RP-AQUAは疎水性を下げていないため、耐久性を犠牲にしていない