

目から鱗！逆相充填剤細孔から水が抜け出る – 対処方法は？

ChromaNik

(株)クロマニックテクノロジーズ
長江徳和



どんな逆相カラムでも水移動相で
再現性が出るノウハウ公開します

ChromaNik

(株)クロマニックテクノロジーズ
長江徳和

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)

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

ChromaNik

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

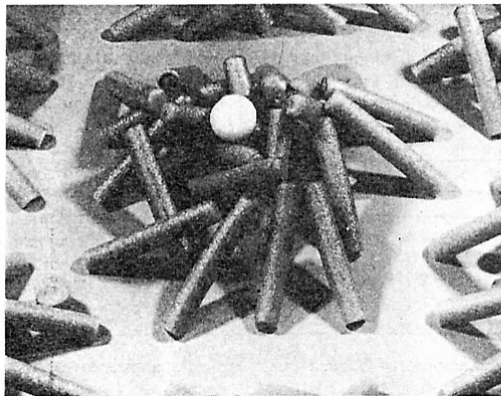


Figure 2. A scaled representation of octadecyl chains chemically bonded to the surface of silica gel showing solvophobic aggregation of the bonded ligands. Appropriate coverage data for this phase was taken from Table II. The white circle on the cluster represents a benzene sized solute molecule.

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

CHROM. 12,911

SOLUTE-SOLVENT INTERACTIONS ON THE SURFACE OF REVERSED PHASES

I. STATIONARY PHASE INTERACTIONS AND THEIR DEPENDENCE ON BONDING CHARACTERISTICS

R. P. W. SCOTT*

Chemical Research Department, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ 07110 (U.S.A.)

and

C. F. SIMPSON*

School of Molecular Sciences, Sussex University, Sussex (Great Britain)

(First received March 20th, 1980; revised manuscript received April 4th, 1980)

SUMMARY

The retention characteristics of a number of “brush”- and “bulk”-type reversed-phase column packing materials that are commercially available for high-performance liquid chromatography are examined in the situation where an abrupt change in mobile phase from pure methanol to pure water occurs. It is shown that the brush-type reversed phases are slow to come into equilibrium with pure water, and in contact with water it would appear that the hydrocarbon chains dispersively interact with themselves. This dispersive intramolecular interaction of the hydrocarbon chains results in a reduction in effective chromatographic surface area and consequently anomalously low retentive characteristics. In contact with solvent containing 10% (w/v) or more of organic solvent such as methanol, the brush-type materials exhibit normal retention characteristics. The bulk or polymeric bonded phases, however, equilibrate rapidly with water, and due to their more rigid structure do not appear to exhibit dispersive intramolecular interactions and thus exhibit normal retention characteristics. The bulk or polymeric type reversed phases, therefore, are to be preferred for examining solute-solvent/stationary phase interactions due to their more consistent chromatographic properties.

has a lower retention volume for alcohol than RP-2 and only slightly greater than RP-8. A possible explanation for this anomalous effect has been put forward by Lochmuller and Wilder³ and by Gilpin and Squires⁴, who suggest that under certain conditions the hydrocarbon chains of a brush-type reversed phase can interact more strongly with themselves than with the surrounding mobile-phase. Hydrocarbon chains can only exhibit dispersive interactions, and thus they will compete for either water or an adjacent hydrocarbon chain to interact with. Obviously, if only dispersive 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 would explain why the RP-2 bonded phase retains the solute to a greater extent than RP-18 in pure water and also explains why at higher alcohol concentrations where the hydrocarbon chains could move more freely in the mobile phase the retention characteristics are reversed and exhibit normal elution behavior. Originally in contact with wet methanol, the hydrocarbon chains would be free to move in the solvent, and the methanol between the chains would permit them to remain apart as the dispersive interactions between the hydrocarbon chains and the methanol are more nearly equivalent to the interactions between the chains themselves. However, when in contact with water, the methanol would slowly diffuse from between the hydrocarbon chain matrix, permitting the chains to interact with each other and collapse onto the surface with the resulting reduction in effective chromatographic surface area. Thus, the retention volume which is a product of the distribution coefficient and

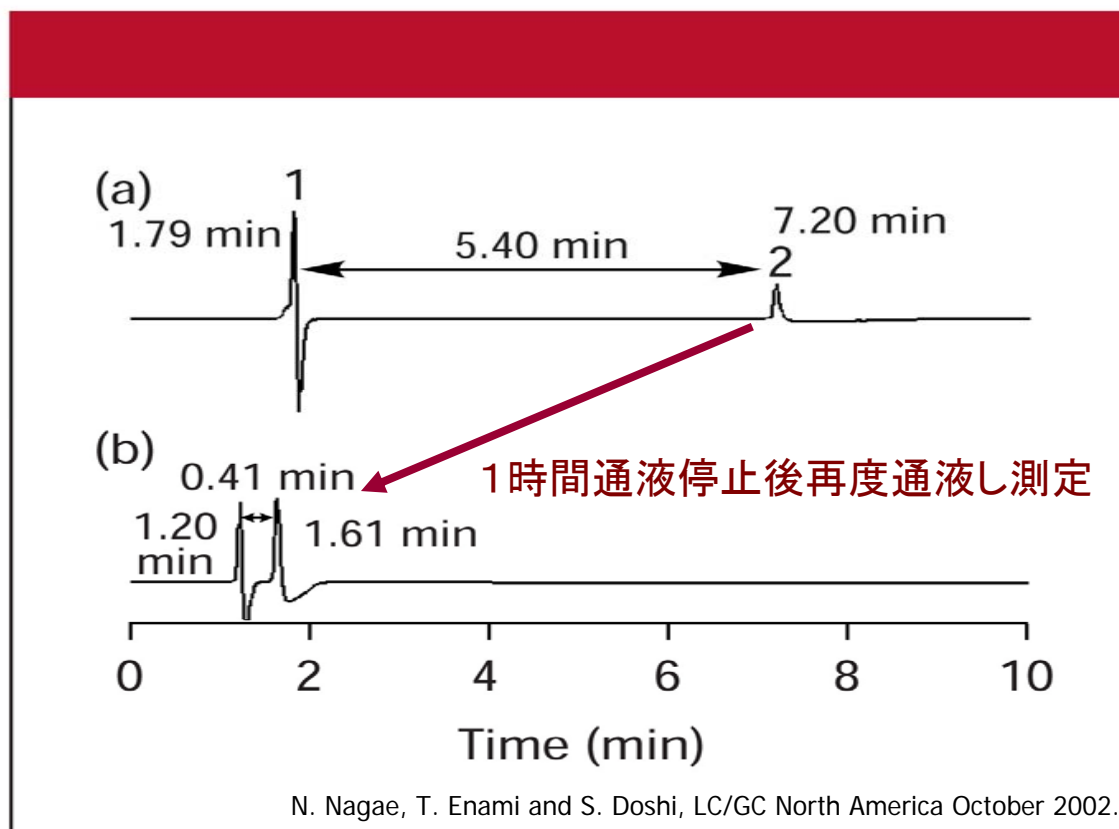
保持の減少の本当の原因は？

ChromaNik

細孔からの移動相の抜け出し

ODSカラムの保持挙動(水100%)

ChromaNik



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

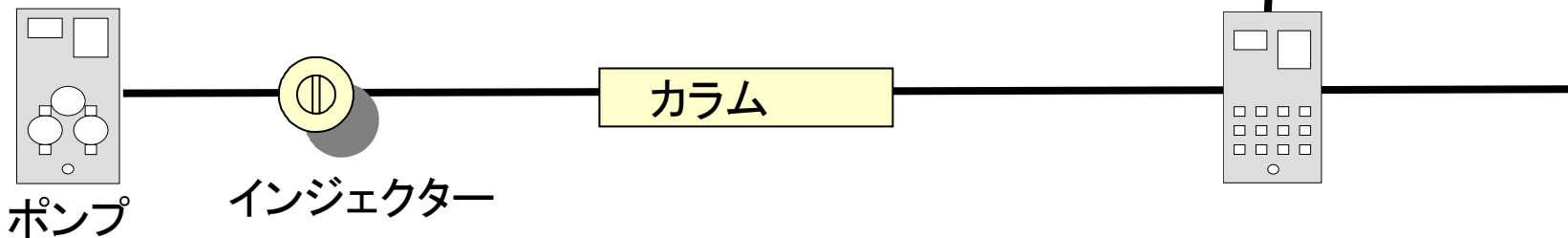
保持時間: 5.40minから0.41minに減少

→ 再現性がない

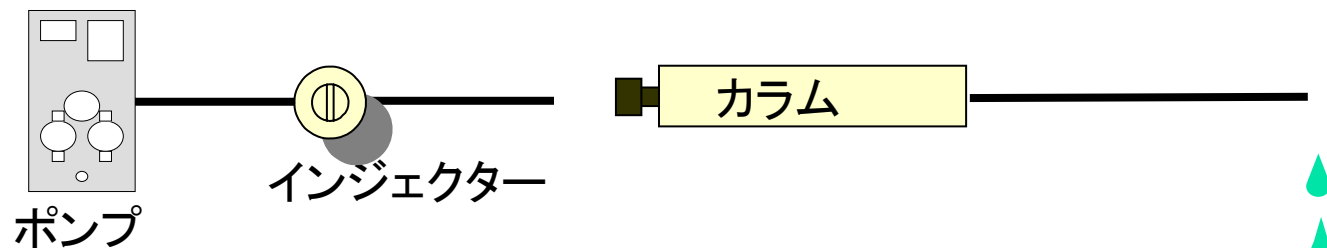
ポンプ停止後のカラムの状態

ChromaNik

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

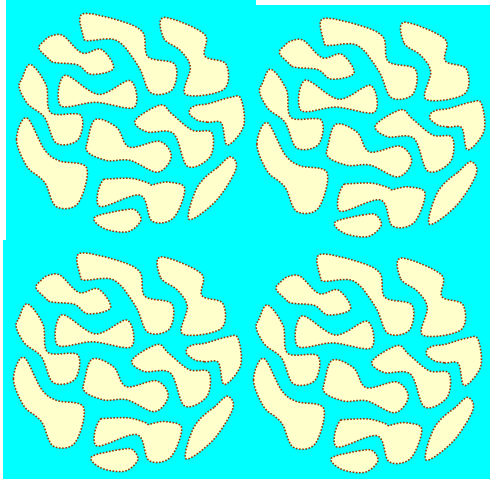
カラム内のODS粒子

ChromaNik

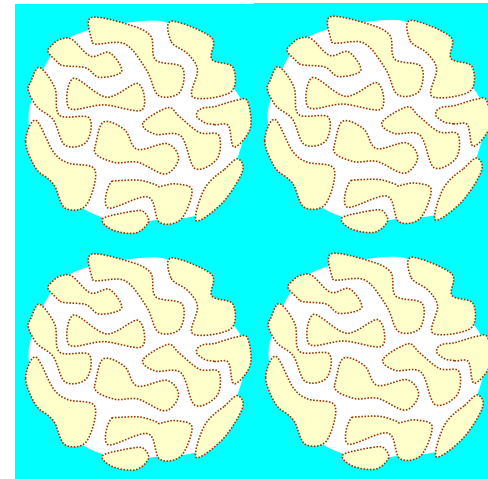
移動相:水

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)

ChromaNik

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 ρ 、液体の表面張力を γ 、接触角を θ 、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

ChromaNik

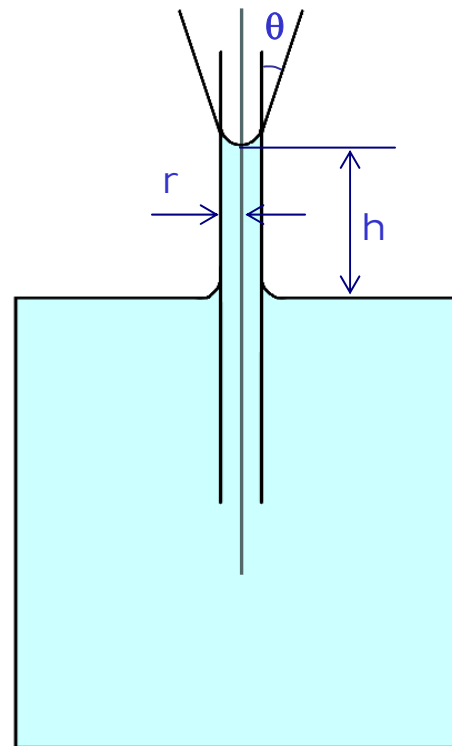
毛管現象の式:

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

γ : 表面張力

ρ : 液体の密度 (比重)

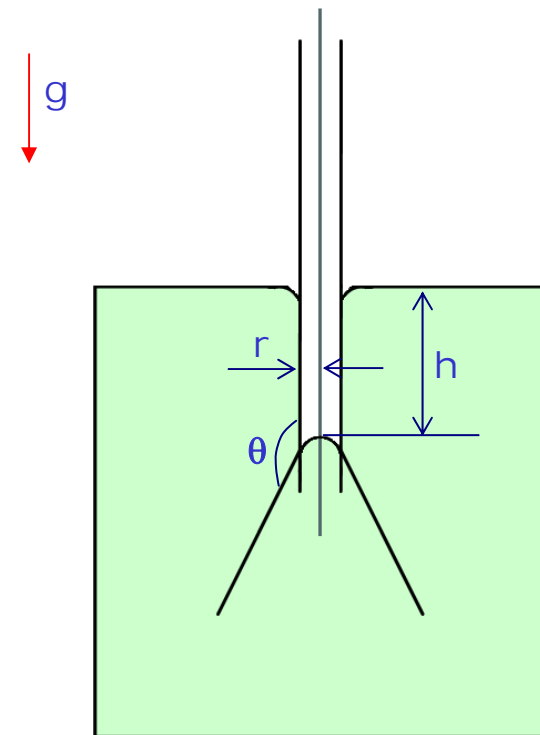
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$\theta < 90^\circ$
日本薬学会129年会

水とテフロン管の場合



液体が管に濡れない場合

$\theta > 90^\circ$

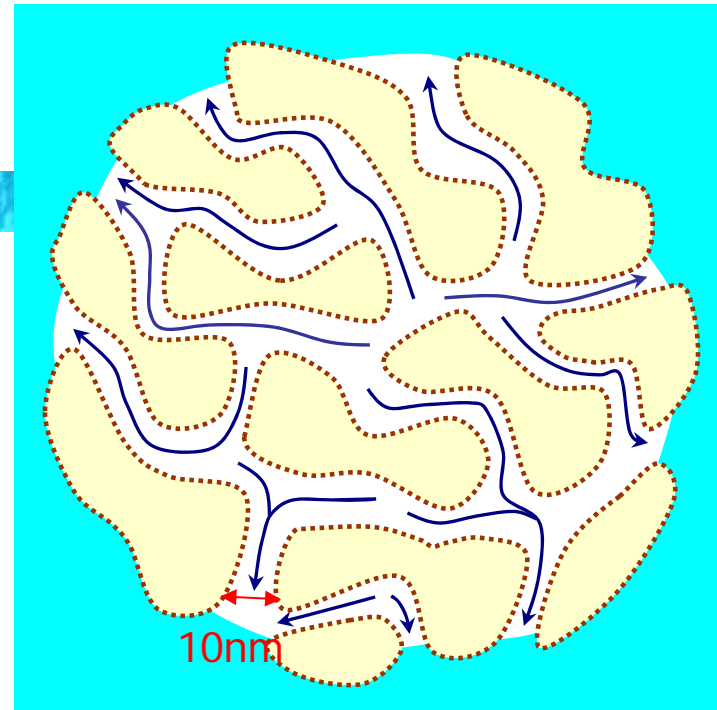
毛管現象

ChromaN



内径0.5mmのガラス管

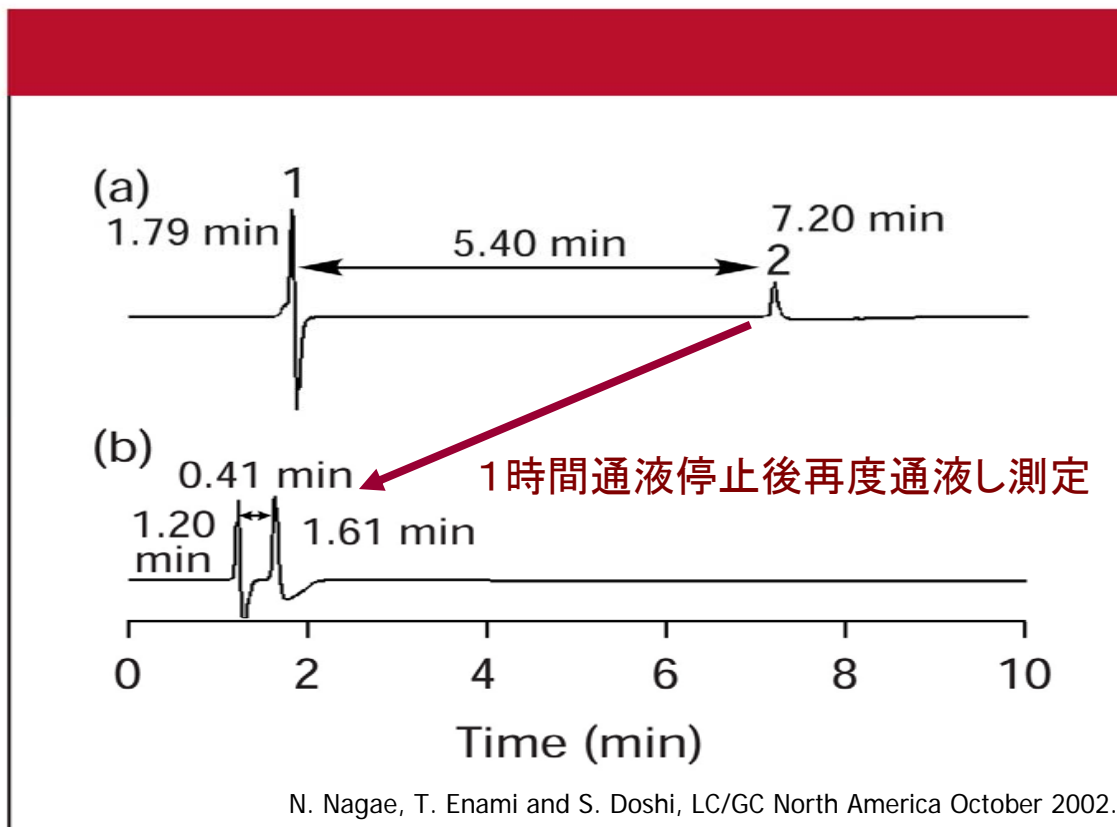
内径0.5mmのガラス管内で赤インクは6cm上昇する。この場合に作用してる圧力は0.006気圧である。内径が $1\mu\text{m}$ では30m上昇し、3気圧の圧力が作用していることになる。



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。

ポンプを停止すると保持が減少

ChromaNik



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

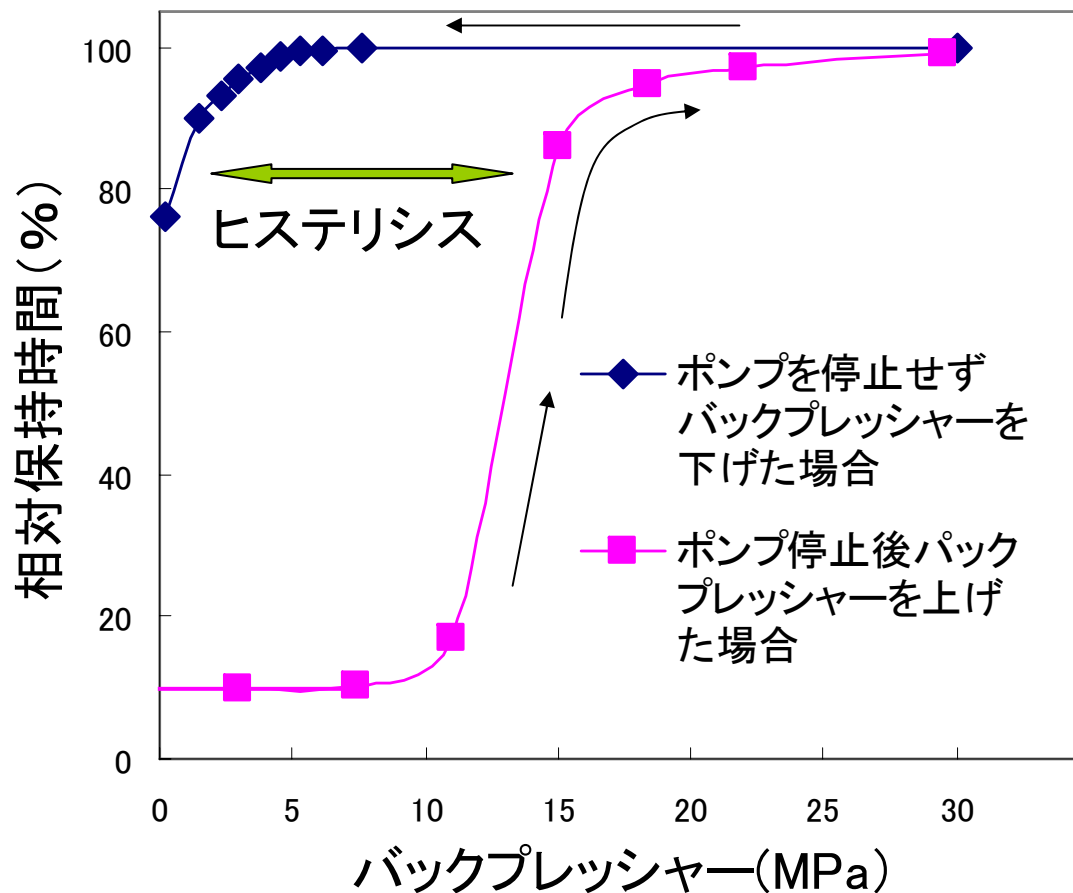
検出: RI

試料: 1. 亜硝酸ナトリウム
2. 2-プロパノール

カラム出口以降の背圧を毛管現象で作用する圧以上に上げると保持はどうなるか？

バックプレッシャーの影響

ChromaNik



カラム: ODS (細孔径10.3nm)
4.6 x 150 mm

粒子径: 5 μm

カラムのみにかかる圧力: 6 MPa

移動相: 水

流速: 1.0 mL/min

温度: 40°C

試料: 2-プロパノール

* カラムの後に内径0.13mmの配管を0.2から3m接続し、カラムのout側に圧力がかかった状態で測定

35 * ポンプ停止前の保持を100%とし、ポンプ停止後再通液時の保持の割合を縦軸としました。

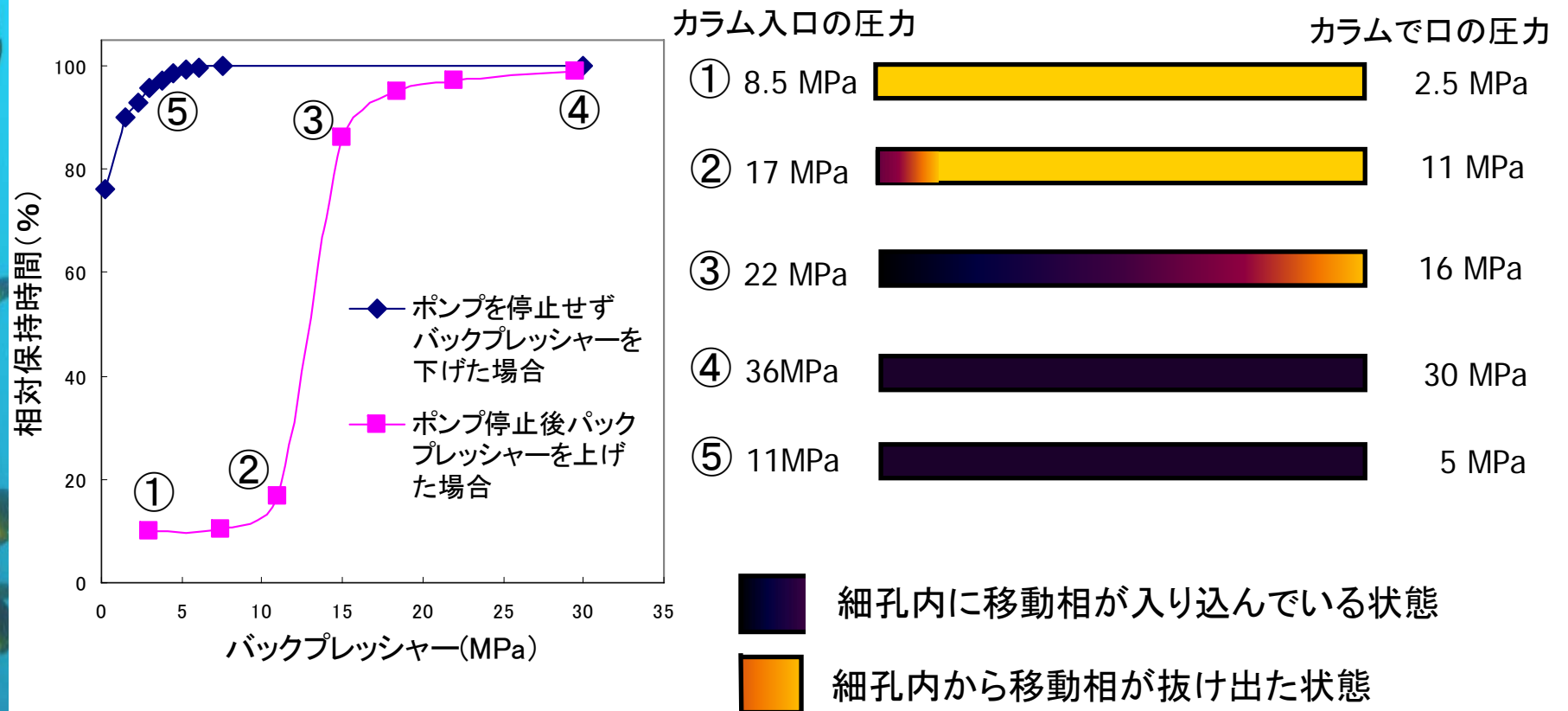
T. Enami and N. Nagae, American Laboratory October 2004.

日本薬学会129年会

カラム内充填剤の細孔内の状態

Column: ODS(10) 5 μ m 150 x 4.6mm, Mobile phase: Water,
Flow rate: 1.0mL/min, Temperature:40°C

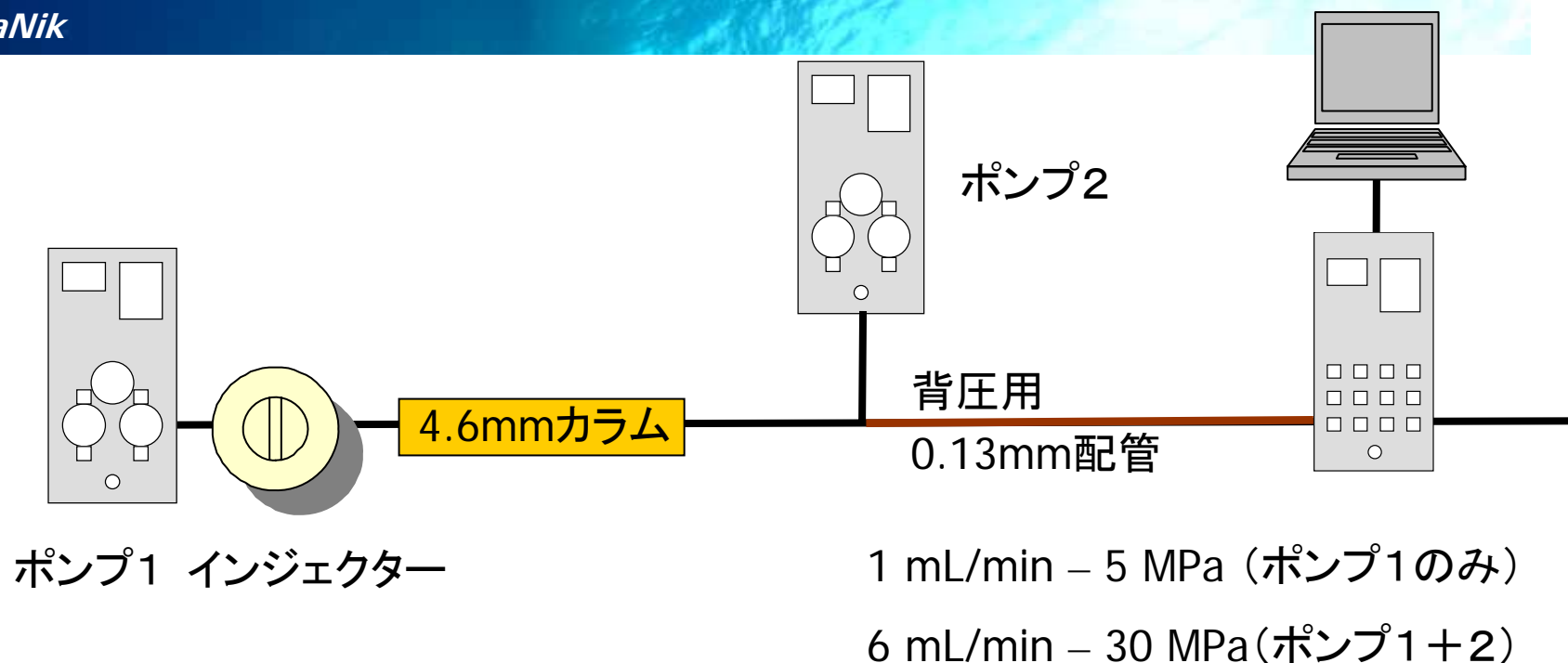
ChromaNik



T. Enami and N. Nagae, American Laboratory October 2004.

水100%移動相条件でも再現性 のけるHPLC装置

ChromaNik

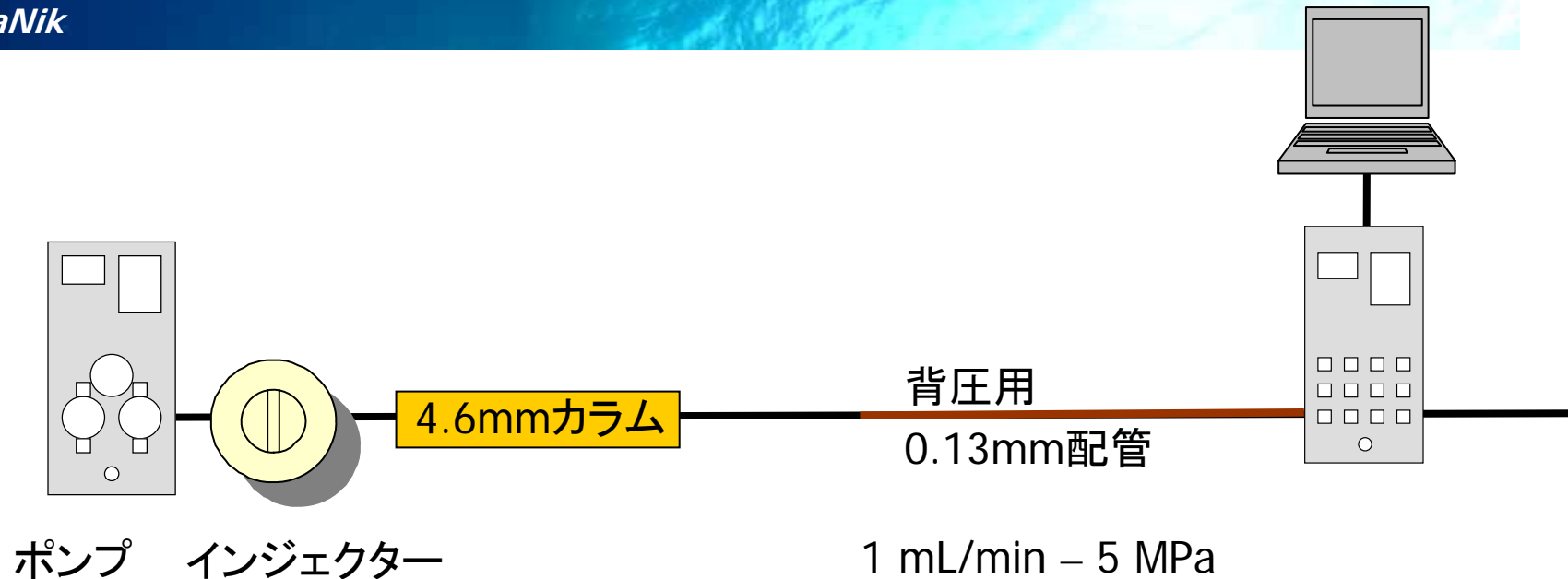


背圧用ポンプの流速を調整し、カラムout側の背圧を制御する。

特許公開2004-198136

有機溶媒を使用した水100%移動相条件でも再現性のある方法

ChromaNik

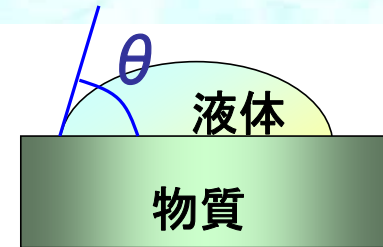


毎日分析終了後もしくは分析開始前に70%以上有機溶媒を含む移動相を5分間流すこと。5MPaの背圧をかけながら水移動相を送液し、分析開始する。分析中はポンプを停止しない。

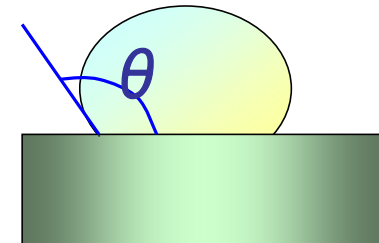
濡れる (wetting) とは

ChromaNik

『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?』



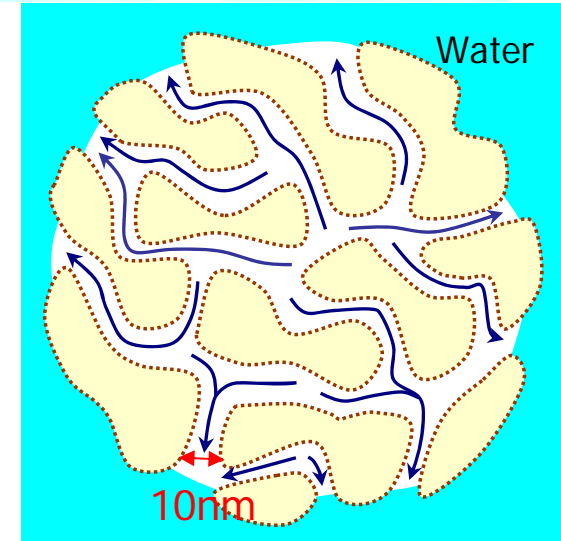
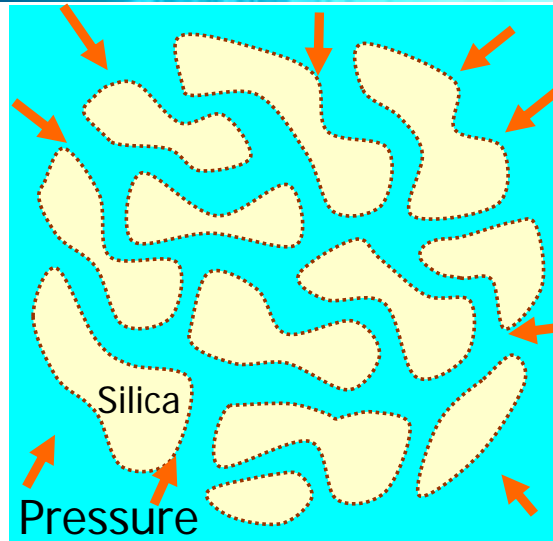
細孔内でもODS表面に水は濡れない(接触角は90度以上)

ODS表面は細孔内でも濡れない！

ChromaNik



ODS充填剤上の水



~~Wetting~~

Permeating
浸透

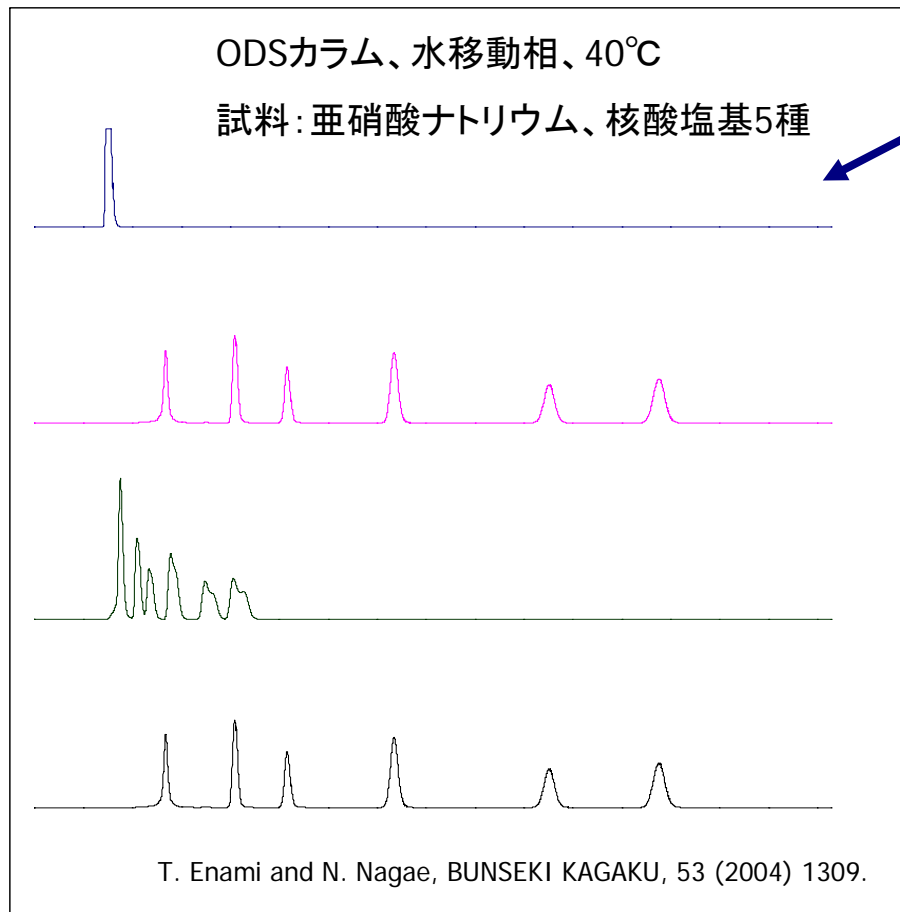
~~Dewetting~~

Expelling or
Depermeating
追い出し

この表現の方が的を射ているのでは？

ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？

ChromaNik



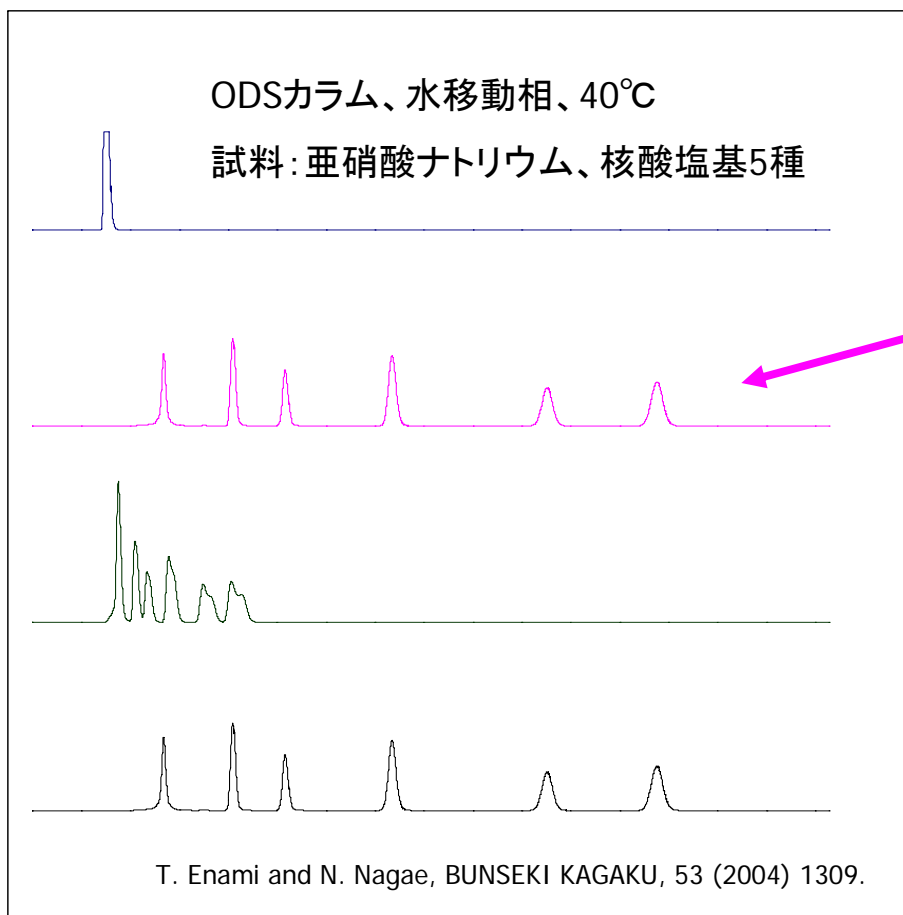
ODSカラム内をクロロホルムに置換後70°Cで24時間乾燥し、カラム温度40°Cで水移動相を流す。

- * 充填剤細孔内には空気が入っている。
- * 保持しない。
- * 細孔内には全く水が入っていない。

* 乾燥操作を行っているので、固定相のアルキル基と有機溶媒は溶媒和していない。(アルキル基は寝込んでいるCollapseしていると考えられる。)

ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？

ChromaNik

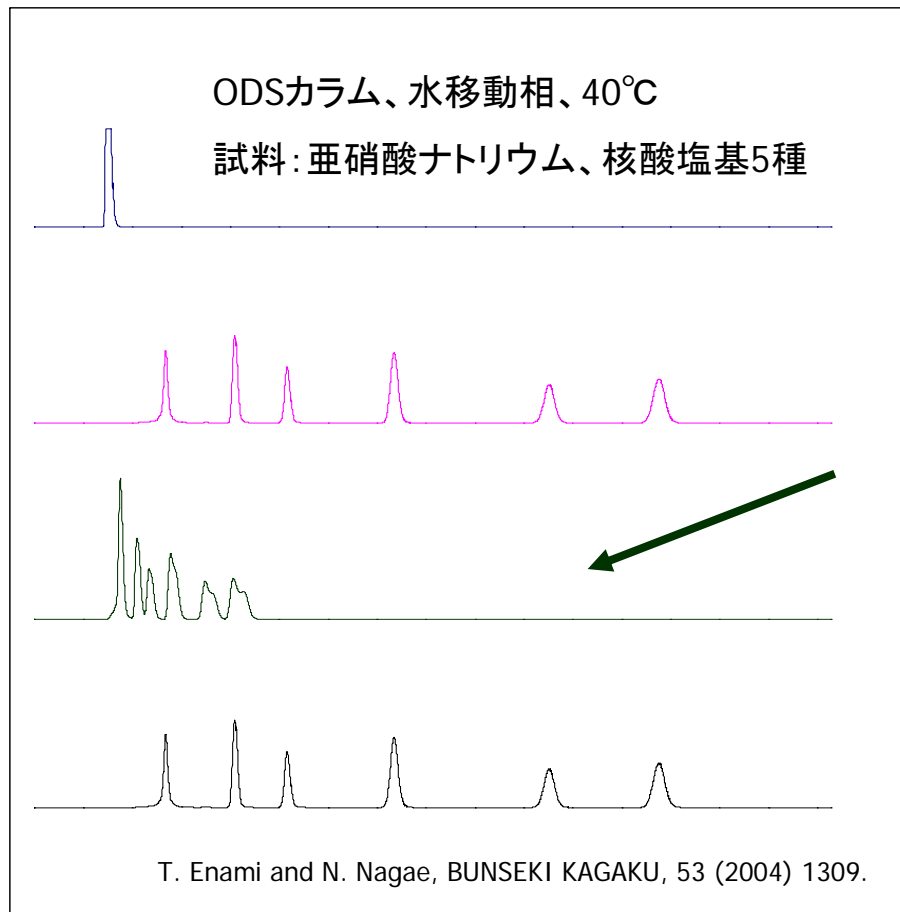


全く保持のない状態からポンプ停止しないでカラム出口以降に背圧を23MPa加えると、保持し6本のピークに分離する。

背圧を加えたただけであるので細孔内に移動相が入っており、固定相の状態は変化していないはずである。細孔内の空気の体積は0.5%以下になり通液中に移動相に溶解込むと考えられる。

ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？

ChromaNik



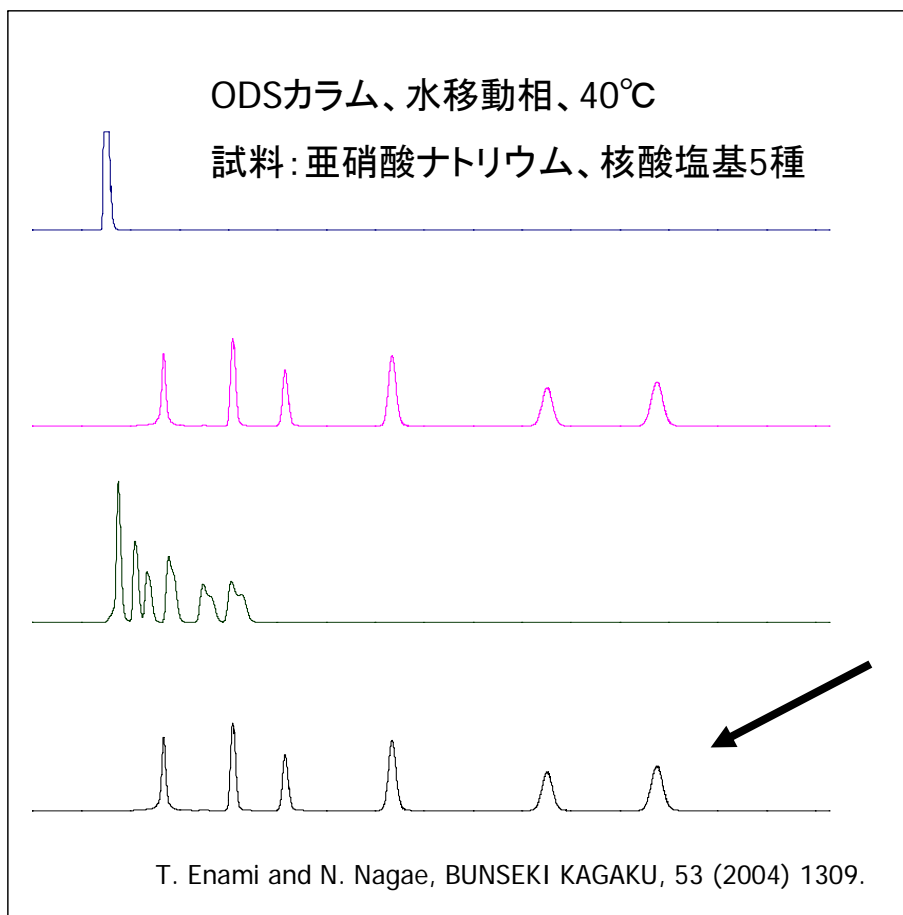
ポンプを60分間停止後、再度移動相を通液する。
* ポンプ停止時に細孔から移動相が70%以上抜け出す。

* 背圧をかけないで、再度通液しても細孔内へ移動相は戻らない。

* 保持は小さくなった。

ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのかな？

ChromaNik



通液しながらカラム出口以降の背圧を再度23MPa加えると、前回と同様に保持が増し6本のピークに分離する。全く同じ分離であり、背圧を加えることにより再現性のある分離が達成される。

ODS表面は有機溶媒で濡れた状態の履歴が無くても水移動相で分離可能、アルキル基が寝込んでいても分離に関係しない。

固定相と移動相は濡れていなくても相互作用はあるのか？

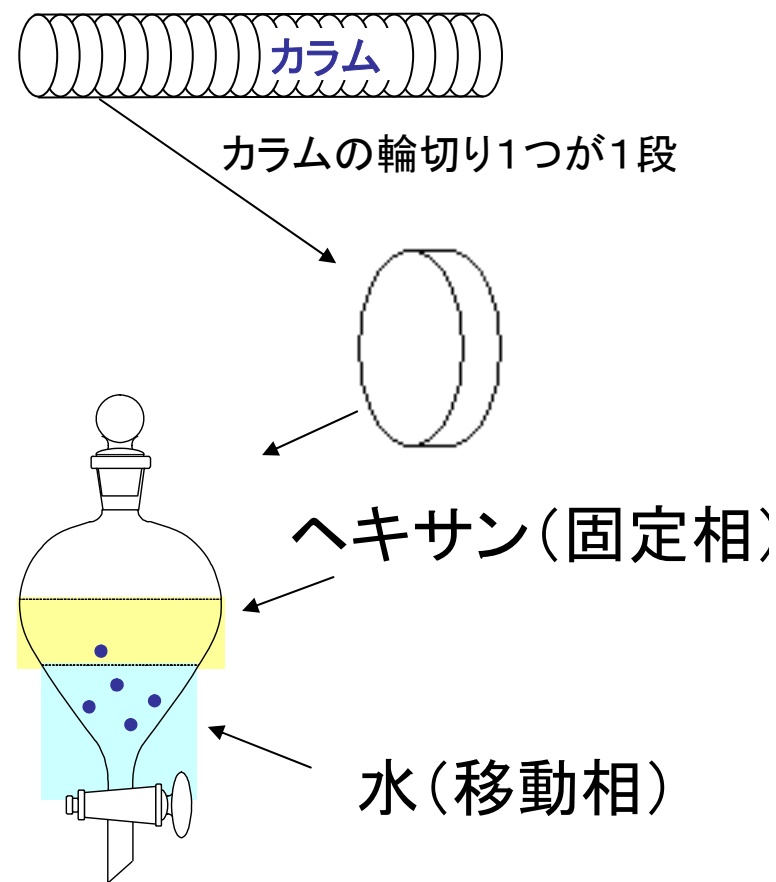
ChromaNik

段理論から分離のメカニズムを説明する場合

1段は分液ロート1個の分配に相当します。

ヘキサンと水は濡れないが溶質は両溶媒間を移動し、ある比率に分配される。

したがって固定相と移動相も同様にお互いは濡れなくても溶質の分配は起こる。



ODS表面と30%メタノールは濡れるか？

ChromaNik



それぞれの溶液にODS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ODS充填剤が分散する。分散後沈降し始める。

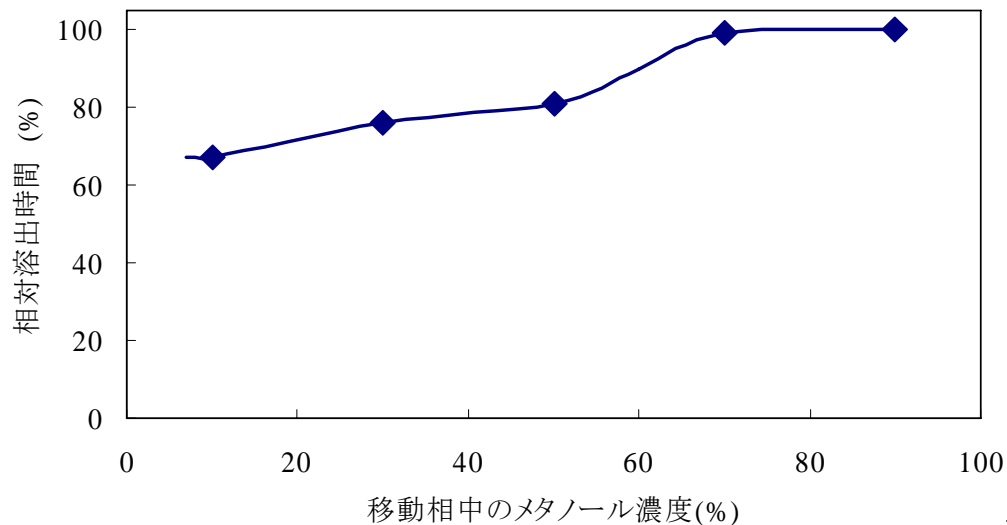
- ・50%メタノールでは一部分散している。(超音波振動を加えない場合は全く分散しない)

- ・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ODS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。

乾燥ODSとメタノールで濡れたODSを用いた場合の 亜硝酸ナトリウム・ウラシルの溶出時間(t_0)の比較

ChromaNik



カラム: ODS(10), 20 μ m - 150x 4.6 mm

移動相: メタノール/水=(10:90),
(30:70), (50:50), (70:30), (90:10)

流速: 0.2 mL/min

カラムin側の圧力: 0.1 MPa

カラムout側の圧力: 0 MPa

温度: 40 $^{\circ}$ C

試料: 亜硝酸ナトリウム(10%メタノール)

ウラシル(30%メタノール以上)

* 保持しない溶質として使用

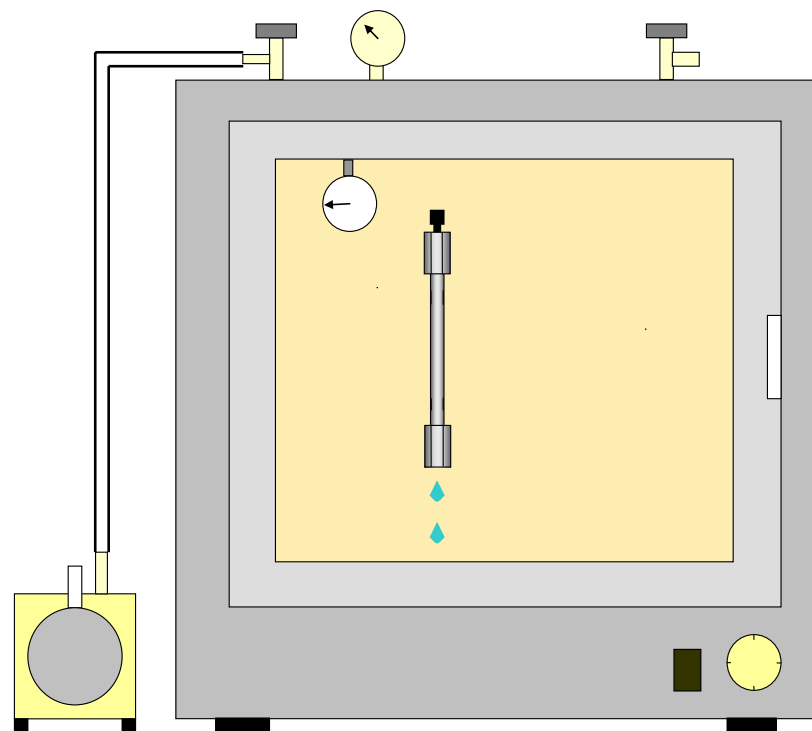
T. Enami and N. Nagae, BUNSEKI KAGAKU, 53 (2004) 1309.

一度100%メタノールをカラムに通液し、ODS充填剤をメタノールで濡らした後、それぞれの移動相を置換し測定した t_0 (亜硝酸ナトリウム・ウラシルの溶出時間)を100%とし、乾燥ODSカラムに直接それぞれの移動相を通液し測定した t_0 の相対値を移動相中のメタノール濃度に対してプロットした。

*** 相対溶出時間が100%未満の場合は細孔内全てに移動相が入り込んでいないことを意味している。**

大気圧が1気圧以下であるならば

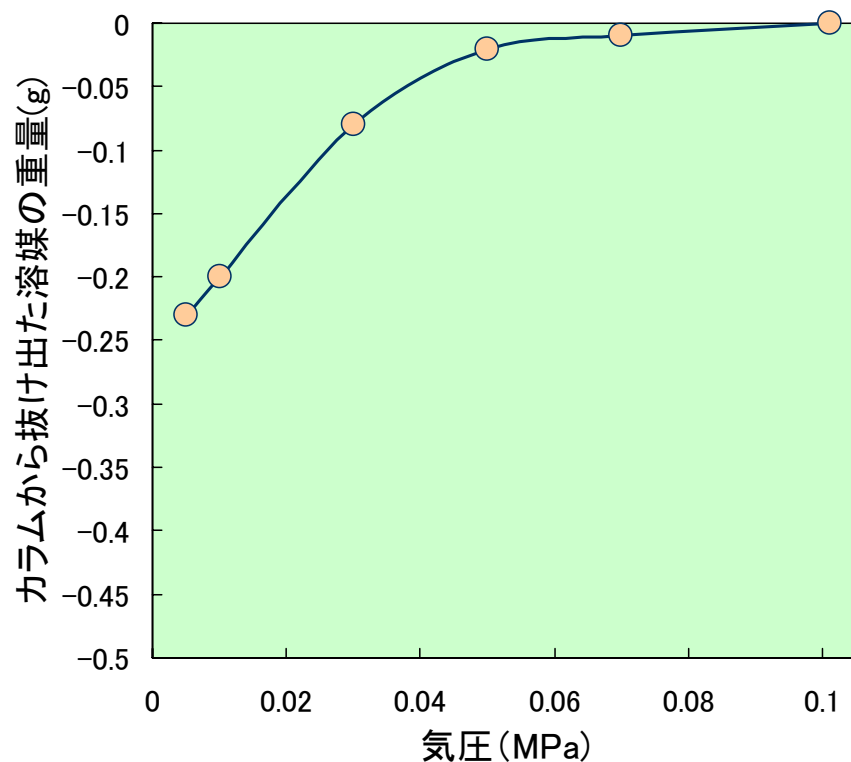
ChromaNik



- * 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

ODS充填剤中の10%メタノール溶媒の状態

ChromaNik



カラム: ODS, 5 μ m - 250x4.6mm

カラム内容媒: メタノール/水=(10:90)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

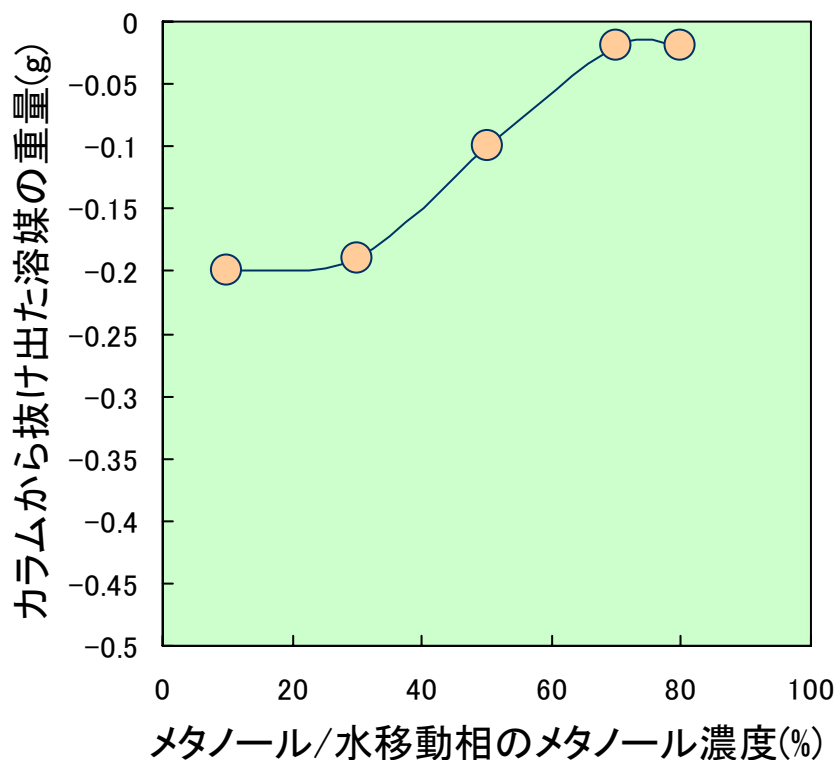
放置時間: 20分間

* 10%メタノールをカラムに通液した場合はポンプ停止後でも保持の変化は認められず、充填剤細孔から溶媒が抜けることはない。

* 模擬的に大気圧を1気圧以下にした場合、0.05MPa未満ではカラムの重量が減り、充填剤細孔内から溶媒が抜け出ている。

ODS充填剤中の0.01MPaでの溶媒の状態

ChromaNik



カラム: ODS, 5 μ m - 250x4.6mm

模擬大気圧: 0.01MPa

カラム温度: 40 $^{\circ}$ 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。

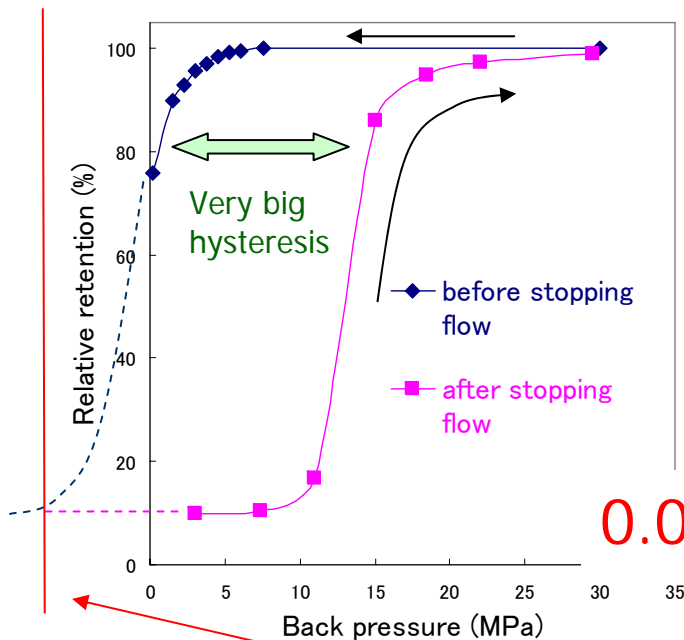
* 70%以上のメタノールではODS充填剤が濡れるため、毛管作用により細孔内へ入り込む力が働き、充填剤細孔から溶媒は抜けでないが、50%以下では濡れないため、抜けようとする。

なぜ30%メタノールはODSに濡れないのにポンプを停止しても細孔から抜け出ないのか？

ChromaNik

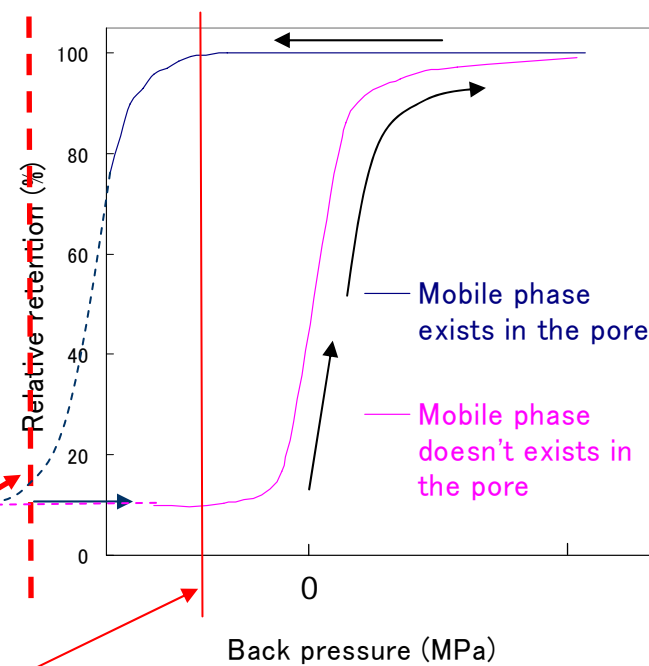
Column: ODS (5 μ m) 150x4.6mm

Mobile phase: water



Column: ODS (20 μ m) 150x4.6mm

Mobile phase: methanol/water(30:70)



0.01MPa

ポンプ停止

大気圧は30%メタノールを細孔内に押し留めておくのに十分な圧力である

Orientational Dynamics of a Hydrophobic Guest in a Chromatographic Stationary Phase: Effect of Wetting by Alcohol

Malcolm E. Montgomery, Jr., M. Anthony Green, and Mary J. Wirth*

Department of Chemistry & Biochemistry, University of Delaware, Newark, Delaware 19716

The orientational distribution of the alkyl chains of a C₁₈ chromatographic surface was sensed indirectly from the orientational distribution of a long hydrophobic probe, 1,4-bis(*o*-methylstyryl)benzene. Frequency-domain fluorescence anisotropy measurements were used to determine the orientation and reorientation of the fluorescent probe. When pure water is in contact with the C₁₈ surface, the orientational distribution of the probe is centered close to the plane of the surface. The effects of two different wetting solvents were explored: 20% methanol and 5% 1-propanol. When the C₁₈ surface is in contact with either of these, there is little change in the orientational distribution of the probe.

Wetting is important to the dynamics of chromatography. For example, Cole and Dorsey showed that the addition of only a few percent of 1-propanol to an aqueous mobile phase increases chromatographic efficiency almost 2-fold. This improved mass transfer was interpreted as owing to wetting of the chromatographic surface by the mobile phase due to significant adsorption of 1-propanol onto the hydrophobic surface. As supporting evidence cited, Simpson had measured the adsorption isotherms for a range of alcohols in water with a polymeric C₁₈ surface, and results showed that short-chain alcohols achieve high surface coverage on the chromatographic surface even at concentrations of only 5% of 1-propanol in water.¹² Higher

silanizing agents were purchased from Aldrich. The coverage of the plates was determined by FTIR spectrometry to be $60 \pm 10 \text{ \AA}^2/\text{C}_{18}$ chain ($2.8 \pm 0.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$). The amount of end-capping was not quantitated.

ChromaNik

RESULTS AND DISCUSSION

A. Contact Angle Information. The contact angle of pure water on the C_{18} surface was measured to be 93° , which indicates that water does not wet the surface. For 20% methanol in water and 5% 1-propanol, the contact angles were measured to be 65 and 69° , respectively, which indicates that the surface is partially wetted by these mobile phases. Contact

まとめ

ChromaNik

- 毛管作用によりODS細孔内からの水の抜け出しが説明でき、ODSに濡れない溶媒は細孔から抜け出ようとする力が働く
- 乾燥した溶媒和していないODSでも水移動相が細孔内に存在すれば分配が起こり分離できる
- カラム出口以降の背圧を制御することにより保持の再現性が上がる

【参考文献】

ChromaNik

- 1) N. Nagae and T. Enami, BUNSEKI KAGAKU, 49 (2000) 887.
- 2) T. Enami and N. Nagae, Chromatography, 22 (2001) 33.
- 3) N. Nagae, T. Enami and S. Doshi, LC/GC North America October 2002.
- 4) N. Nagae, T. Enami and S. Doshi, LC/GC North America June 2003.
- 5) N. Nagae, T. Enami and S. Doshi, LC/GC Europe Volume 16 Number 7
July 2003.
- 6) T. Enami and N. Nagae, American Laboratory October 2004.
- 7) T. Enami and N. Nagae, BUNSEKI KAGAKU, 53 (2004) 1309.