

# これって本当？知って驚く カラムの常識・非常識

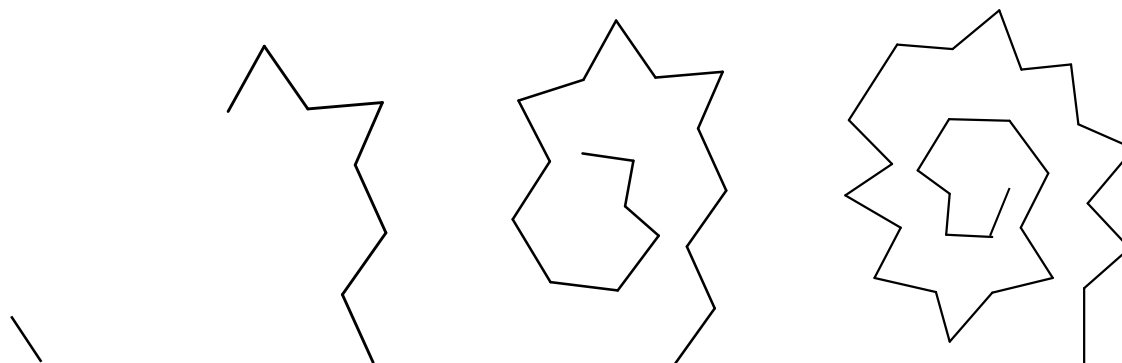
## LCの常識は正しいの？

- ✓ 疎水性の高い固定相は保持が大きい？
- ✓ 逆相アルキル基は立ち上がっている，寝込んでいる？
- ✓ 逆相固定相は濡れている，濡れていない(non-wetting)？

(クロマニックテクノロジーズ)

長江 徳和

# 疎水性



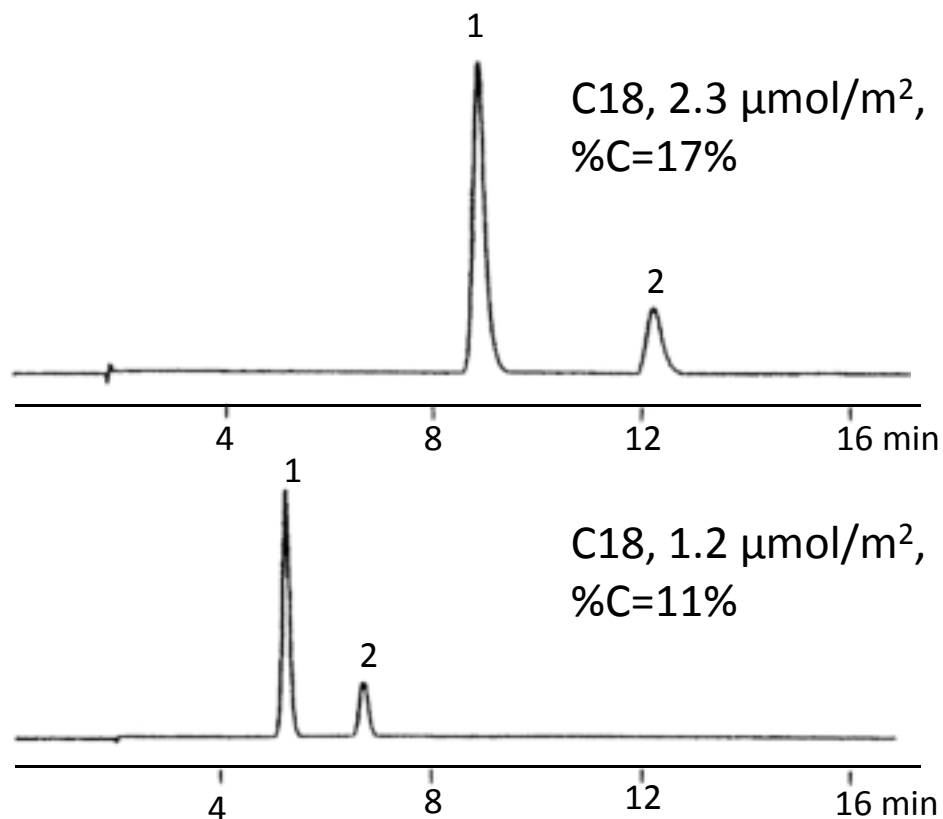
	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
分配係数(LogP)	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	22.6	0.66	0.006	$8.84 \times 10^{-10}$

疎水性(LogP)はn-オクタノールと水への分配比率により定義される

C30は最も疎水性が高いが、これは水への溶解度が低いことが大きく影響する。

化合物の保持予測として用いられる化合物は、一般的にLogPが1から6の間のものである。

# C18固定相の保持



Column size: 4.6x150 mm

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=(98:2)

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

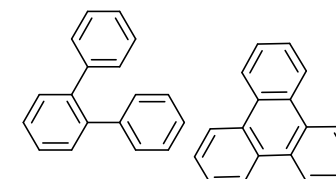
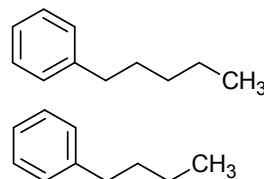
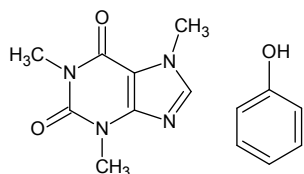
Detection: UV @450nm

Sample: 1= Tocopherol

2= Tocopherol acetate

固定相の体積(結合密度)が半分になると保持もおおよそ半分になる。

# 逆相固定相の選択性および保持



固定相	炭素含有量	水素結合性 α(カフェイン/フェノール)	疎水性 α(アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	疎水性 アミルベンゼンの保持係数	立体選択性 α(o-ターフェニル/トリフェニレン)
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

★固定相:シリカ基材の細孔径, 12nm, 一官能性試薬+エンドキャッピング, 移動相:メタノール/水=70/30, 温度:30°C

C8固定相はC18固定相に比べ固定相体積(炭素含有量)は約半分であり、アミルベンゼンの保持も同様に約半分である。

固定相の体積(結合密度)が半分になると保持もおおよそ半分になる.



C8固定相はC18固定相に比べ体積は半分であり, アミルベンゼンの保持も半分である.



C8固定相(%C=11%)は  
C18固定相(1.2  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , %C=11%)と  
体積(炭素含有)も,  
保持も同じである.

# 保持係数(k)と分配濃度比(Kd)

$$k = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M}$$

$$K_d = \frac{S_D}{M_D}$$

S: 固定相中の溶質の存在量

M: 移動相中の溶質の存在量

S<sub>D</sub>: 固定相中の溶質の分配濃度

M<sub>D</sub>: 移動相中の要旨値の分配濃度

V<sub>S</sub>: 固定相の体積(容積)

V<sub>M</sub>: 移動相の容積

C8固定相(%C=11%)とC18固定相(1.2 μmol/m<sup>2</sup>, %C=11%)は固定相体積(V<sub>S</sub>)が同じで保持係数(k)も同じであるので、分配濃度比(K<sub>d</sub>)も同じ値になる。

# 固定相の体積が2倍異なるC18固定相の保持係数(k)と分配濃度比(Kd)

固定相	炭素含有量	結合密度	固定相体積	移動相体積
C18 (A)	17%	2.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.4 mL	1.6 mL
C18 (B)	11%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL

4.6x150mmカラムを使用

C18 (A, B)は同じ固定相なので、分配濃度比(Kd)は同じだと仮定する。  $K_d = \frac{S_D}{M_D}$

C18 (A) の場合  $k_A = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.4}{M_D \times 1.6} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.25 = 0.25 K_d$

C18 (B) の場合  $k_B = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_d$

C18(A)はC18(B)の約2倍の保持係数になる。

# 固定相の体積が同じC18とC8固定相の保持係数(k)と分配濃度比(Kd)

固定相	炭素含有量	結合密度	固定相体積	移動相体積
C18 (A)	17%	2.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.4 mL	1.6 mL
C18 (B)	11%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL
C8	11%	2.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL

4.6x150mmカラムを使用

C18とC8固定相分配濃度比(Kd)は $Kd_{C18}$ ,  $Kd_{C8}$

$$Kd = \frac{S_D}{M_D}$$

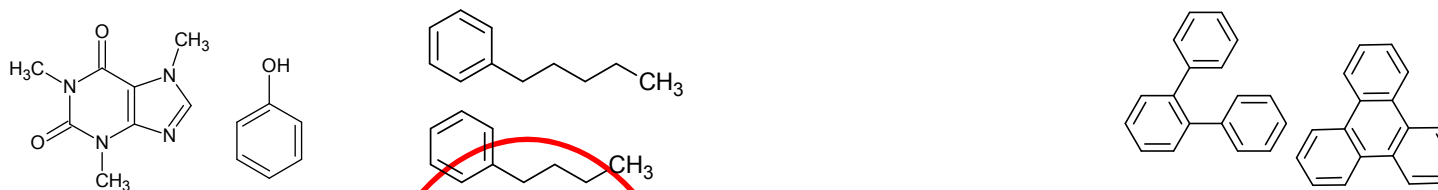
C18 (B) の場合  $k_{C18B} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 Kd_{C18}$

C8 の場合  $k_{C8} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 Kd_{C8}$

C18(B)とC8の保持係数は同じであるため、 $Kd_{C18}$ と $Kd_{C8}$ も同じである。



# 逆相固定相の選択性および保持



固定相	炭素含有量	水素結合性 α(カフェイン/フェノール)	疎水性 α(アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	疎水性 アミルベンゼンの保持係数	立体選択性 α(o-ターフェニル/トリフェニレン)
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

★固定相:一官能性試薬+エンドキャッピング, 移動相:メタモール/水=70/30, 温度:30°C

- ・炭素一個の差(アミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数)はアルキル鎖長と相関があるように見える。
- ・しかし保持時間が大きく異なる分離での比較である。

# 炭素一個の差の分離係数

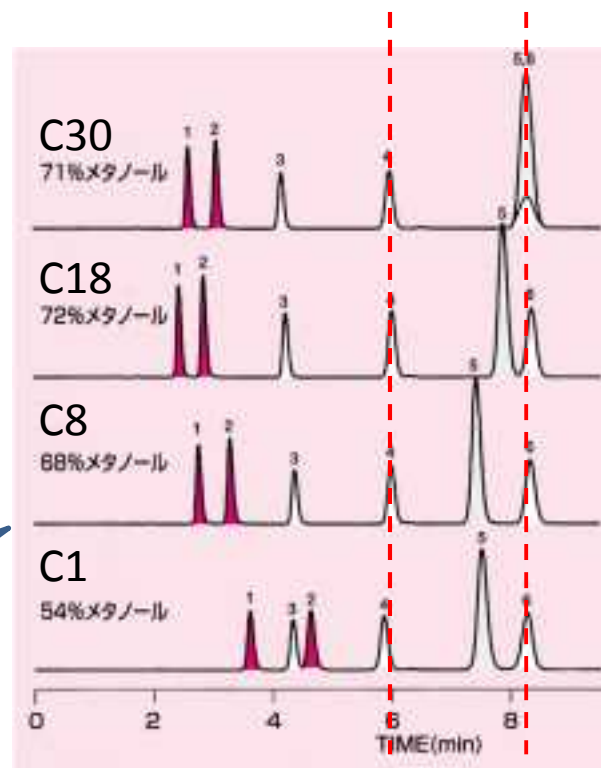
固定相	炭素含有量	水素結合性 [メチルパラベン/トルエン]	疎水性 [メチルパラベン/ベンゼン]	疎水性 [エチルベンゼン/トルエン]	立体選択性 [メチルパラベン/エチルベンゼン]
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

★固定相 一言転性試薬+エンドキャッピング 移動相 メタノール/水=70/30 温度 30℃

アルキル鎖長が長いほど分離係数( $\alpha$ )は大きい。

しかし

保持時間を一緒にすると炭素が一個異なる成分(トルエン, エチルベンゼン)の分離係数( $\alpha$ )は同じである。

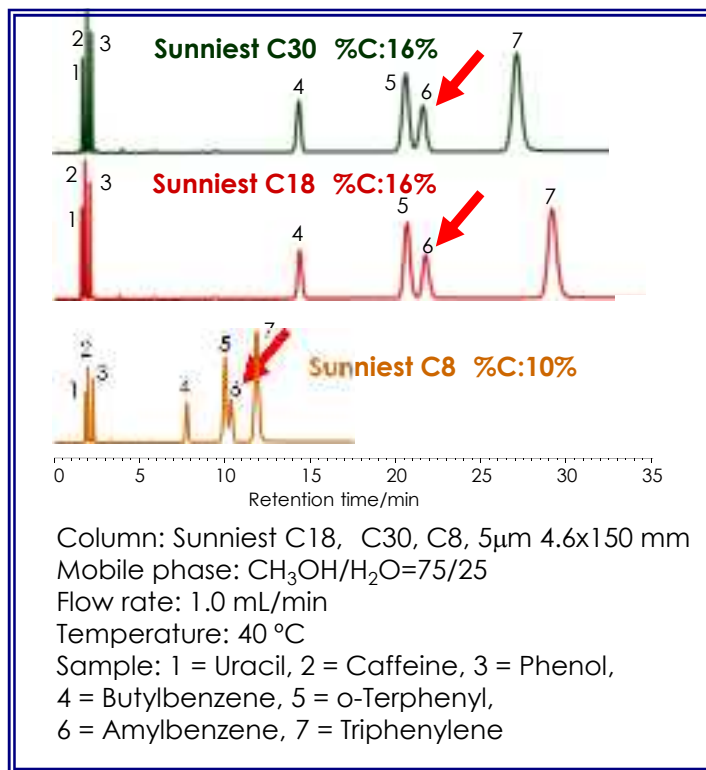


カラムサイズ: 4.6 × 150mm  
 移動相: メタノール/水、有機溶媒濃度は図中に表示  
 流速: 1.0 mL/min, 温度: 30℃,  
 試料: 1=メチルパラベン, 2=エチルパラベン,  
 3=ベンゼン, 4=トルエン, 5=ナフタレン, 6=エチルベンゼン

保持が同じ場合の炭素一個の差の成分の分離係数を固定相の疎水性と定義すれば、アルキル鎖長の差は疎水性に関係しない。

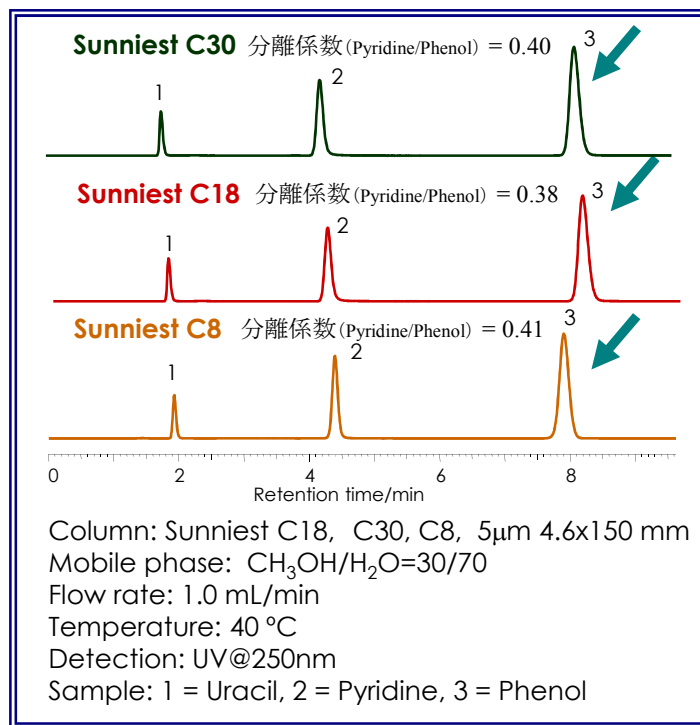
# メタノール・水移動相におけるアミルベンゼンとフェノールの保持

## ◆標準試料の分離例



C30固定相もC18固定相おなじ炭素含有量であれば保持は同じである。

## ◆ピリジンとフェノールの分離



フェノールはどの固定相でも保持はほぼ同じである。これはフェノールが固定相表面でのみ相互作用するため、実際に作用する固定相の体積が同じになるためである。<sup>11</sup>

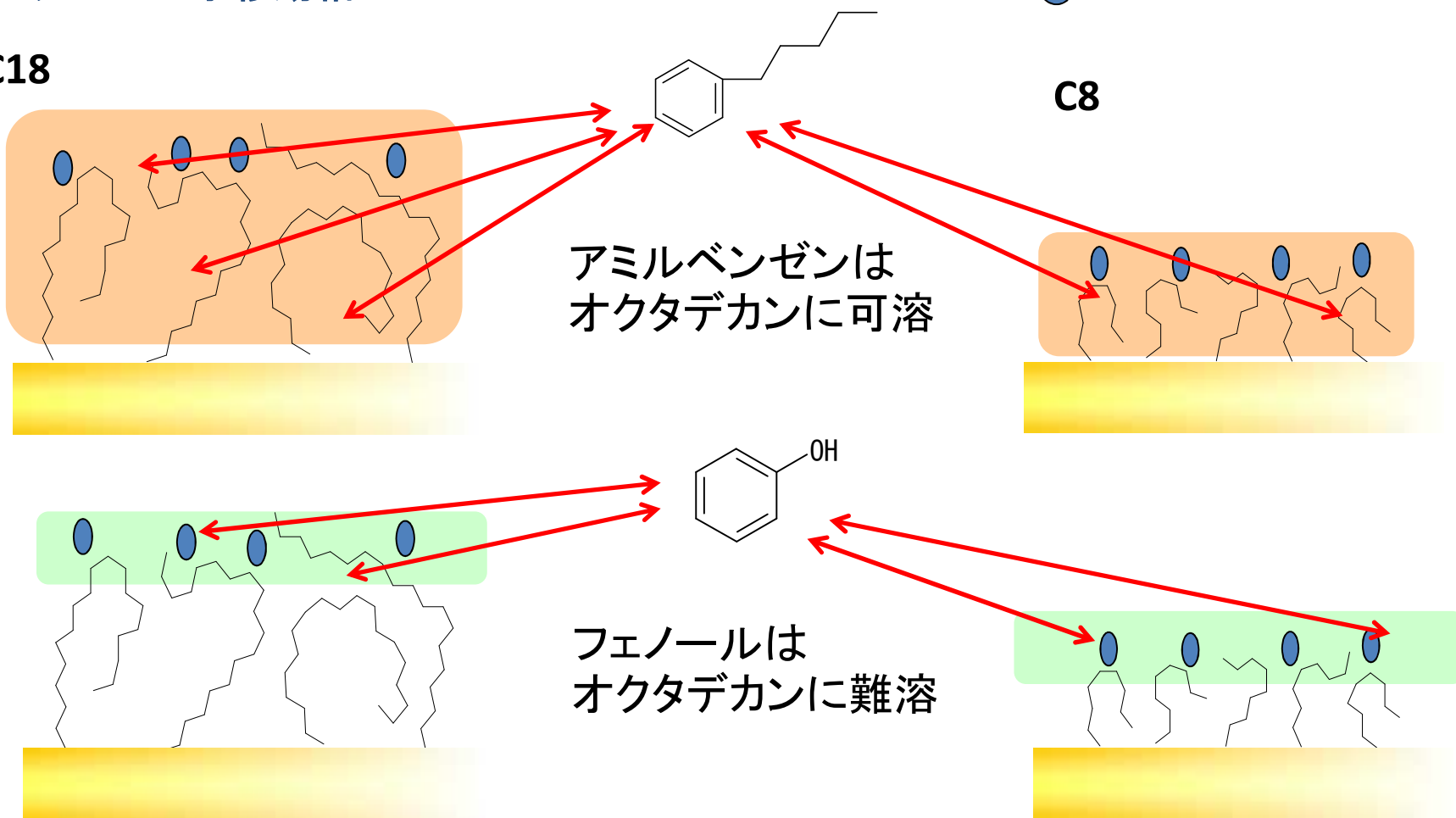
# 試料とC18固定相の相互作用場

メタノール・水移動相

● : メタノール

C18

C8



# まとめ

1. C30, C18およびC8の固定相自身の疎水性は大きく異なる.
2. しかし固定相と移動相に分配する溶質から論じた場合, この溶質の分配(濃度)比はどの固定相でもほぼ同じである.
3. つまり, 固定相体積と固定相への溶質の分配量(分配濃度が同じであるため)はほぼ比例し, 保持も同様に比例する.
4. 保持係数( $k$ )は固定相と移動相の分配(濃度)比( $K_d$ )で決まるわけではなく, 分配濃度に固定相・移動相の体積・容積を乗じた固定相中と移動相中に存在する溶質の量により決まる.
5. もちろんアルキル鎖長の違いにより, 選択性は異なる.
6. フェノールのような極性の高い成分は固定相の表面とのみ相互作用するため, 固定相の体積は関係なくなり, 表面積が保持係数に関わってくる.

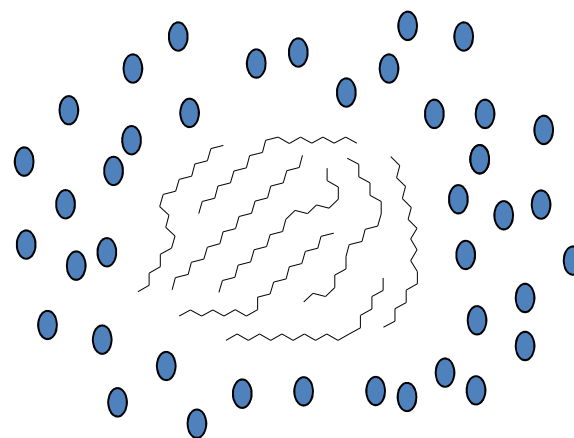
逆相固定相のアルキル基：寝込んで  
(絡み合っ)ているのか (Ligand Collapse)  
または立ち上がっているのか？

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

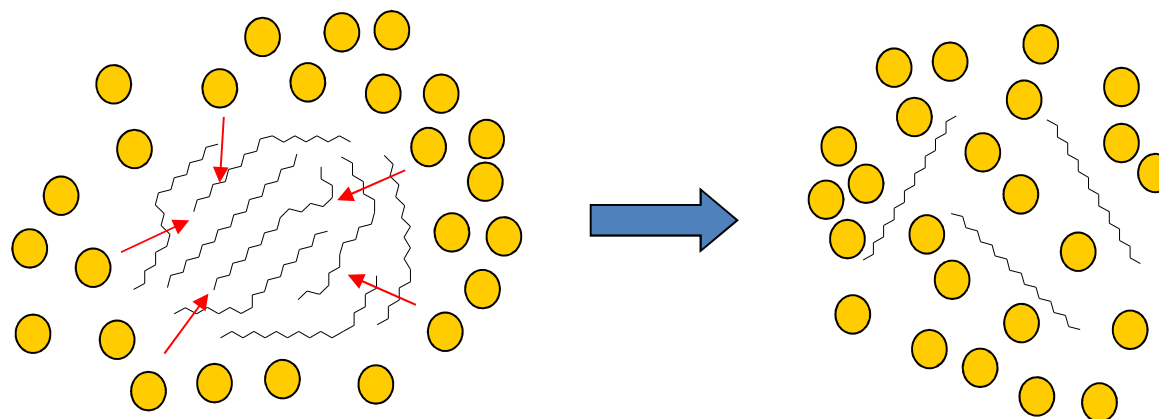
# 有機溶媒中でのオクタデカンの状態

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)



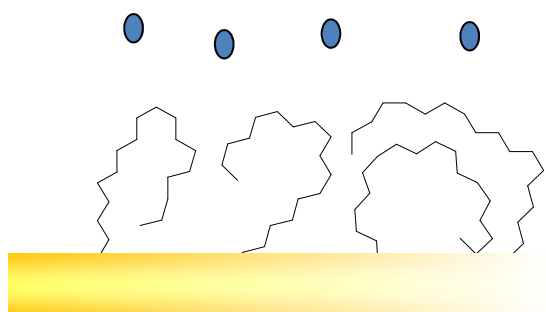
メタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとると考えられる。

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。



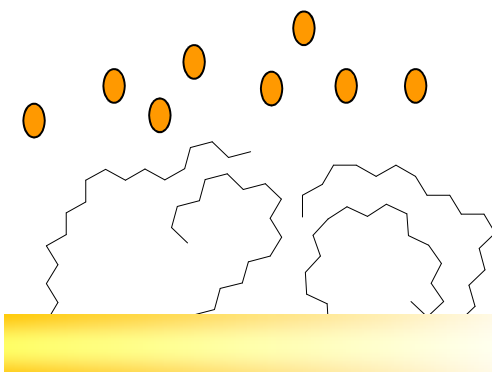
# C18表面上での溶媒和の概略図

## メタノール



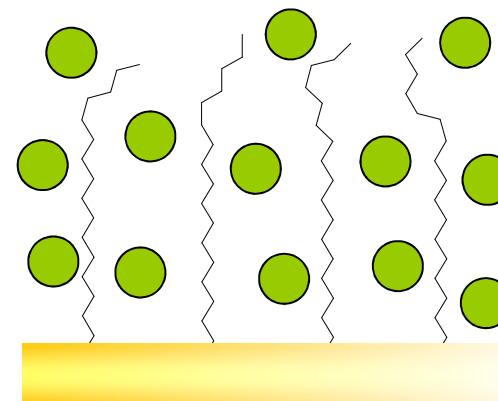
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している。

## 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

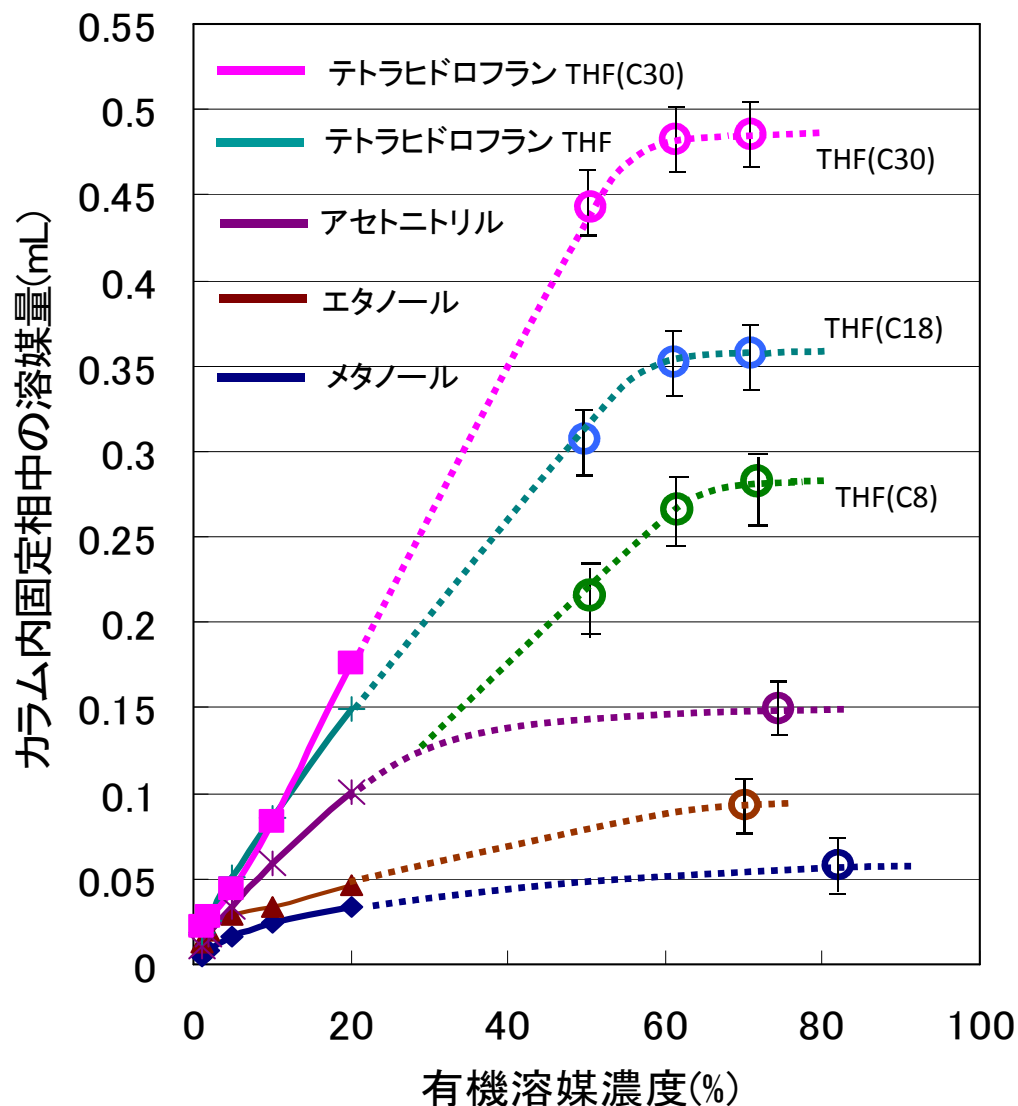


オクタデシル基は立ち上がっており、全体にテトラヒドロフランは溶媒和している。

ほとんど(80%以上)固まった状態であると推測される



# C18固定相への分配量(溶媒和量)



カラム : C18, C30, C8

4.6x150mm

1) 4.6x150mmカラムにC18充填剤は約1.5g入っている。

2) C18の炭素含有量16%

C30の炭素含有量16%

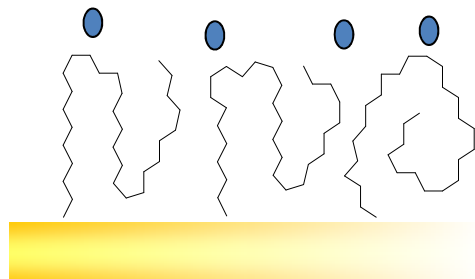
カラム内のアルキル基の容量は約0.35mLと計算される。

有機溶媒濃度20%でメタノールは約0.04mL, アセトニトリルは約0.1mL, テトラヒドロフランは約0.15mL溶媒和している。

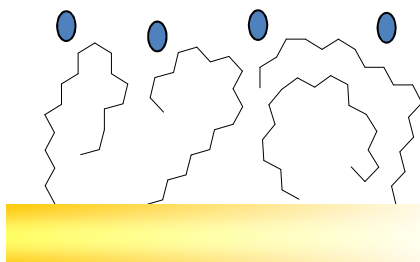
82%メタノールの溶媒和量を0.06mLと仮定すると, ウラシルの溶出量から74%アセトニトリルと50%THFの溶媒和量はそれぞれ0.15mLと0.31mLとなる。

# C30,C18,C8固定相の状態

**C30 %C 16%**

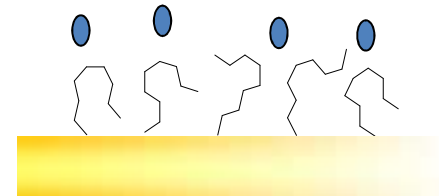


**C18 %C 16%**

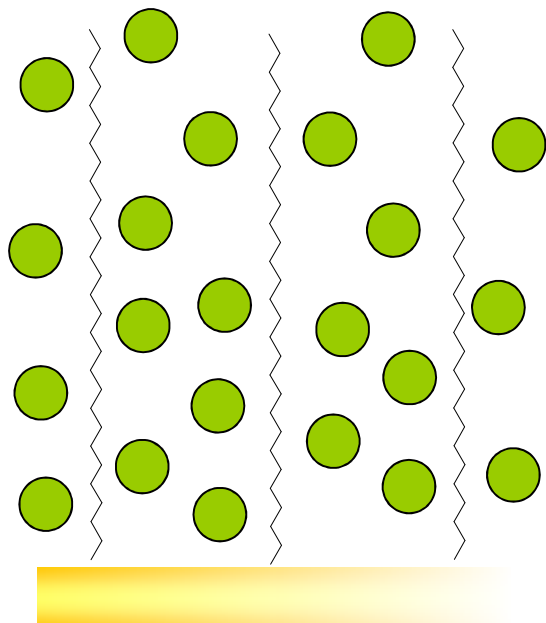


**CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25**

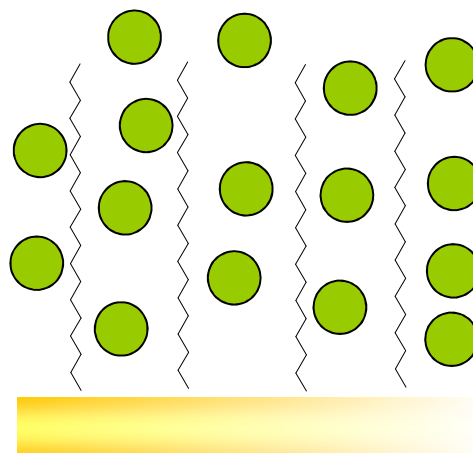
**C8 %C 10%**



**C30**

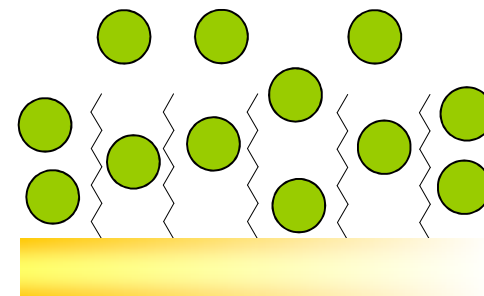


**C18**



**THF/H<sub>2</sub>O=50/50**

**C8**

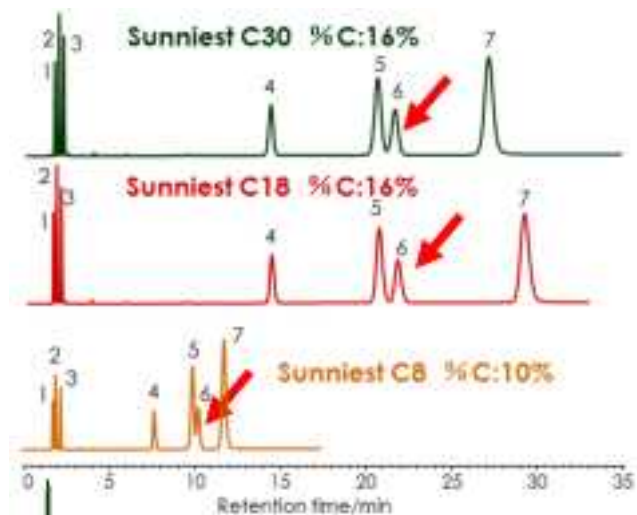


● : メタノール

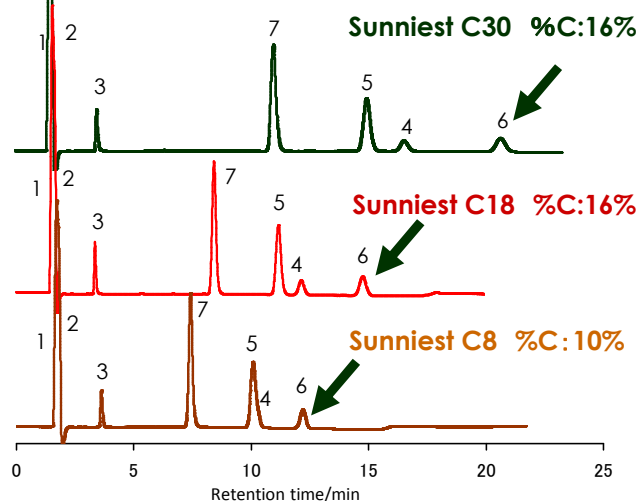
● : THF

# メタノールとテトラヒドロフラン (THF) の差

メタノール



THF



Column: Sunniest C30, C18, C8, 5 $\mu$ m  
4.6x150 mm

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

THF/H<sub>2</sub>O=50/50

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil,

2 = Caffeine,

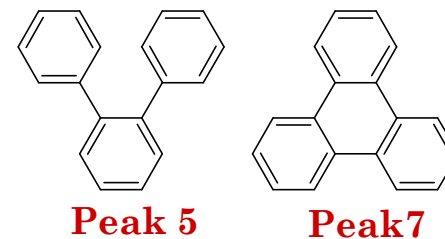
3 = Phenol,

4 = Butylbenzene,

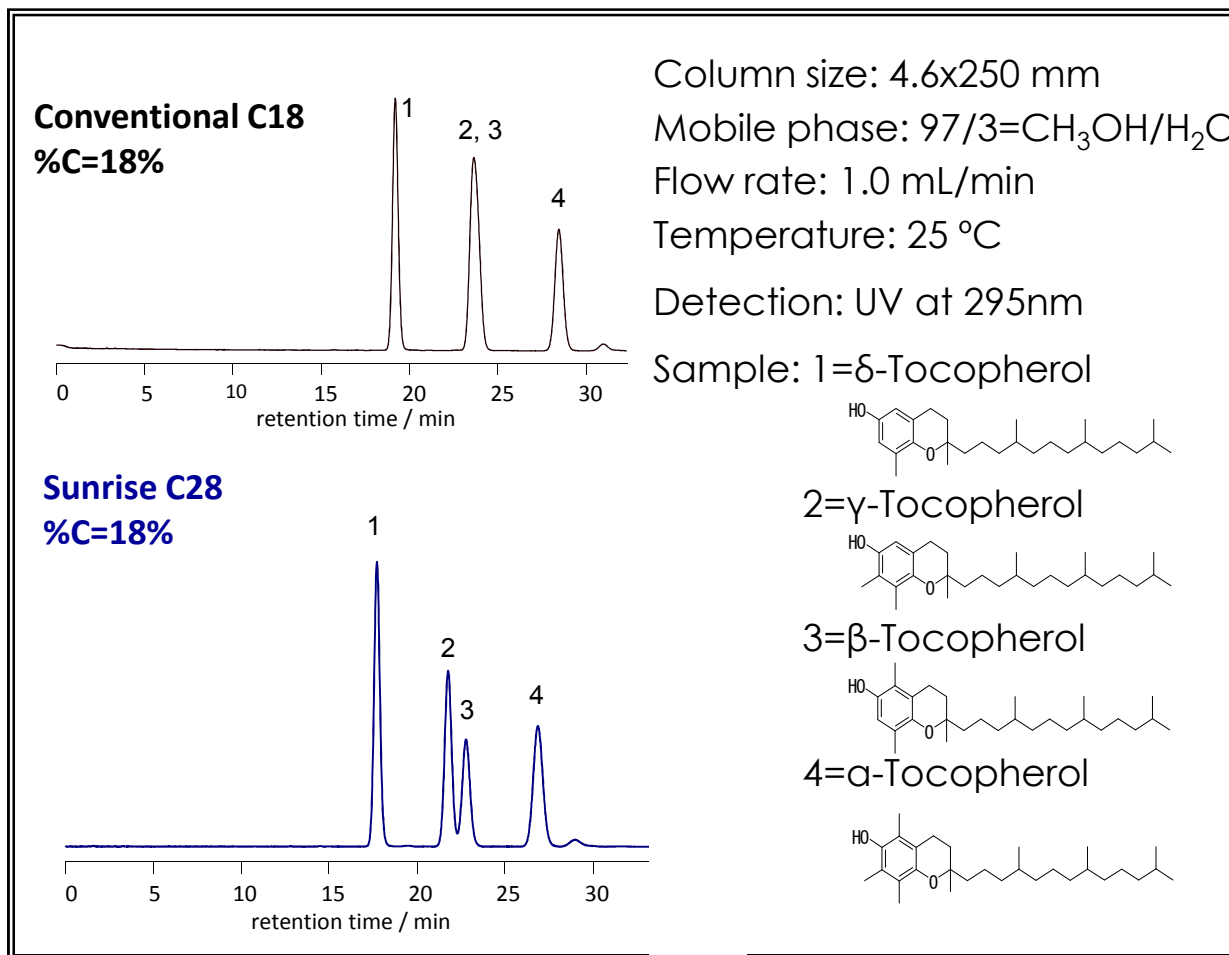
5 = o-Terphenyl,

6 = Amylbenzene,

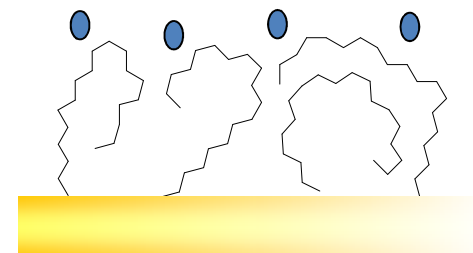
7 = Triphenylene



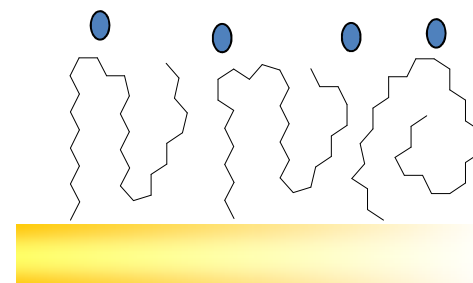
# C18とC28(C30)の保持比較1



**C18**

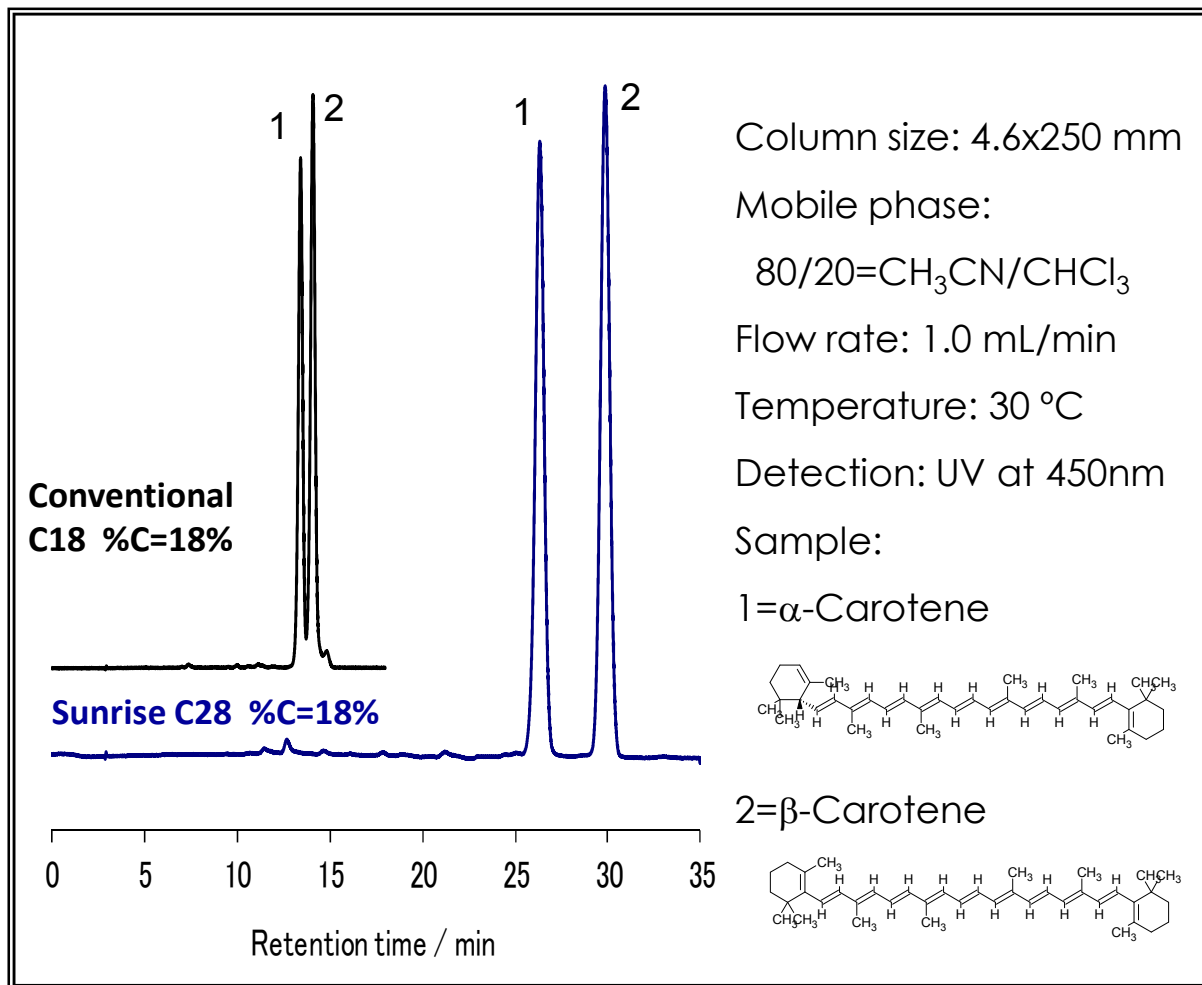


**C28**



固定相容量は同じ

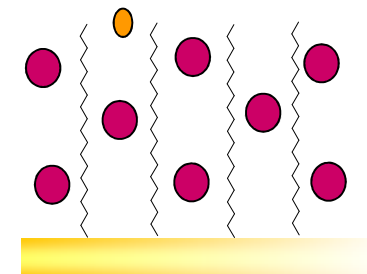
# C18とC28(C30)の保持比較2



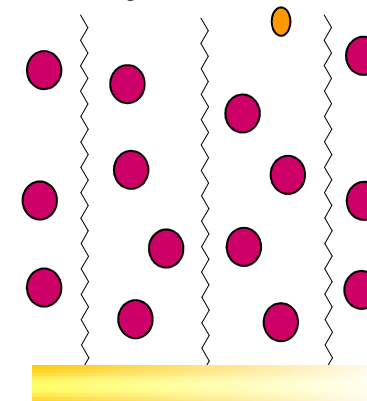
● : アセトニトリル

● : クロロホルム

**C18**



**C28**

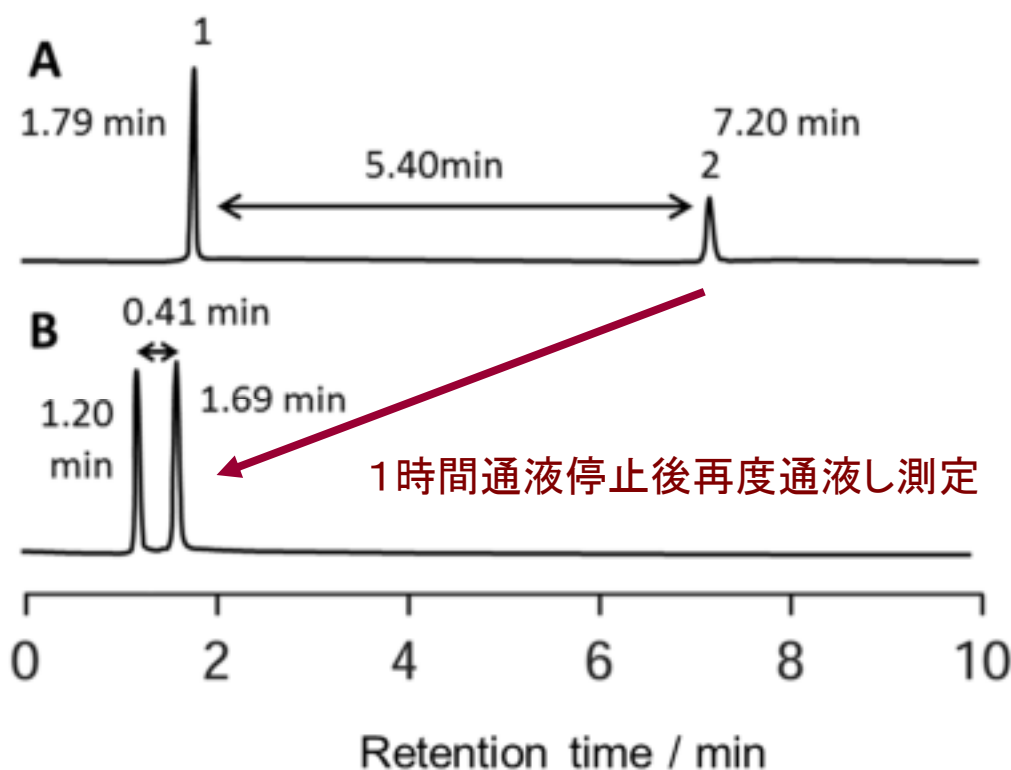


固定相容量は2倍

逆相アルキル基は  
濡れている, 濡れていない(non-wetting) ?

逆相HPLCにおける水または緩衝液のみの移動相を  
用いた分析の問題点

# 水移動相ではODSカラムの保持が減少する 特にポンプを停止した後は大きく減少



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

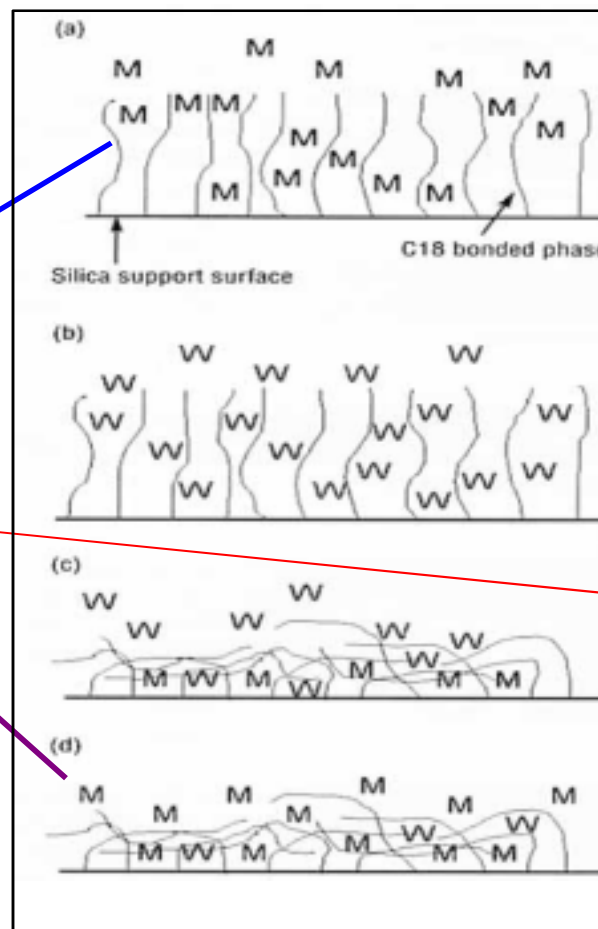
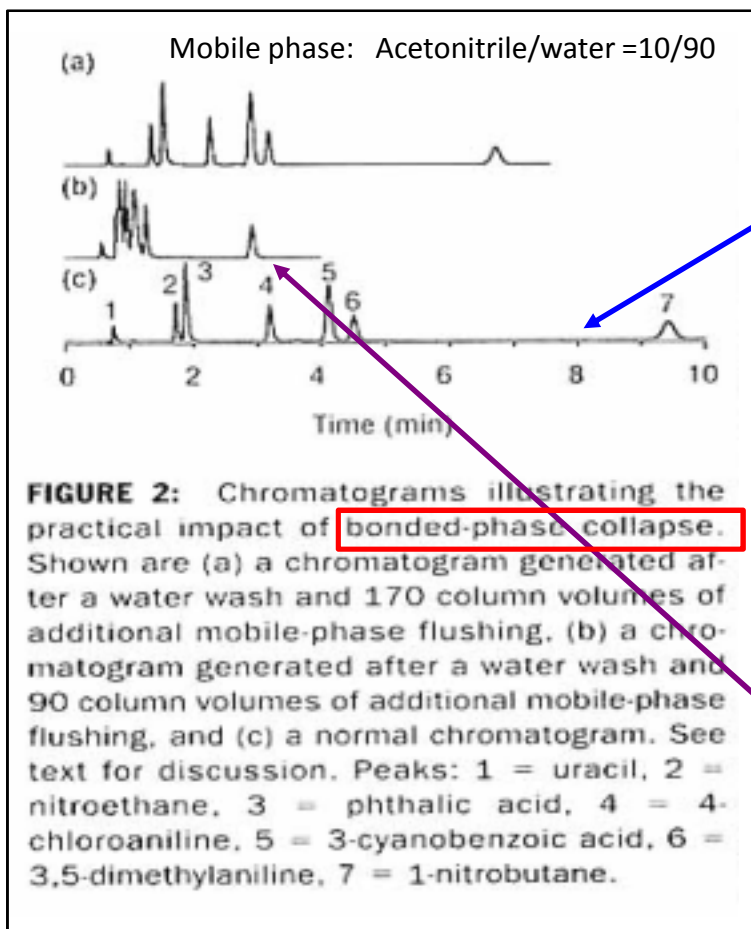
検出: RI

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

# 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



固定相は移動相で濡れている。  
アルキル基は立ち上がっている。

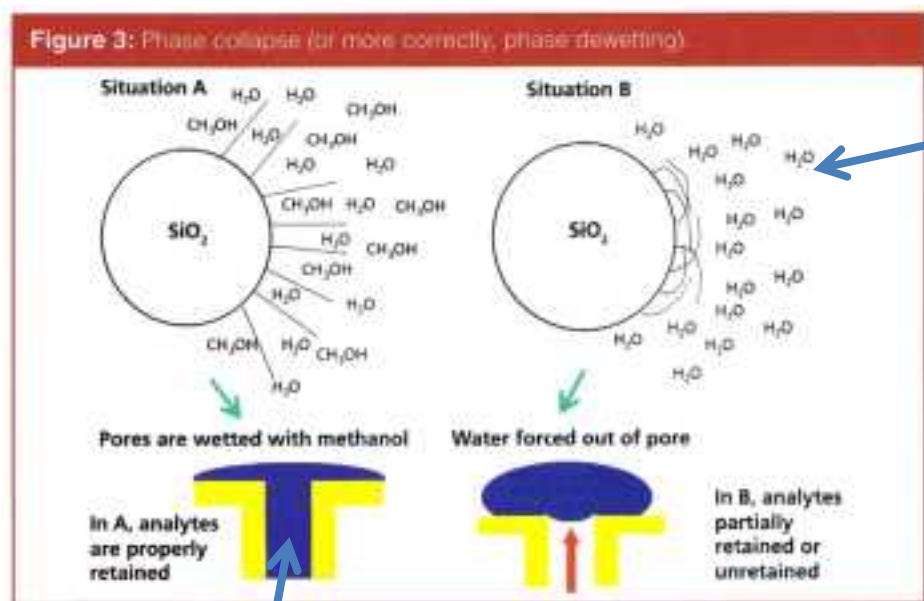
水でカラムを洗浄すると、アルキル基は寝込んでしまう。  
これをBonded-phase collapseと表現している。

再び移動相を流しても寝込みのため、保持は小さくなっている。



# 現在の移動相の細孔からの抜け出しによる説明

2013年, アルキル基の寝込みによるDewettingの結果, 移動相は抜け出る



RONALD E. MAJORS, LCGC North America, Jul 1, 2013

アルキル基は立ち上がっており, 固定相は移動相で濡れている. 移動相は細孔から抜け出さない.

水移動相ではアルキル基は寝込んでしまい, Phase collapseがおこる。Phase collapse状態になると移動相と濡れなくなり, 移動相は細孔から抜け出す。

Dewetting とは

- 1) アルキル基が立ち上がっている状態がWetting
- 2) アルキル基が寝込んだ状態になるとnon-wetting

1の状態から2の状態に変化する事をDewettingと表現している！ or？

## 充填剤の細孔から移動相が抜け出すとこと記述した論文

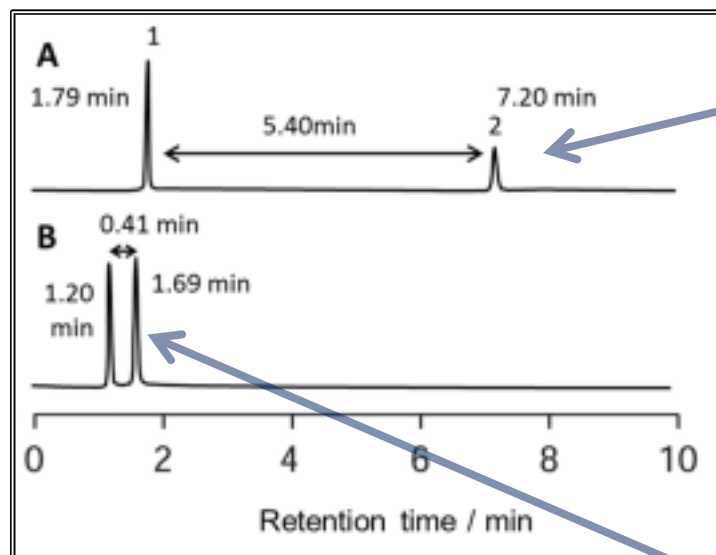
- 1) “Retention behavior of reversed phase for HPLC using a 100% aqueous mobile phase”,  
N. Nagae and T. Enami, Bunseki Kagaku, 49, 887 (2000).
- 2) “Retention behavior of reversed phase for HPLC using 100% aqueous mobile phase (2)”,  
N. Nagae and T. Enami, Chromatography, 22, 33 (2001).
- 3) “The Retention Behavior of Reversed-Phase HPLC Columns with 100% Aqueous Mobile Phase”  
N. Nagae, T. Enami and S. Doshi, LCGC North America Volume 20 Number 10 October (2002).
- 4) "Retention Behavior of Reversed-Phase HPLC Columns with 100% Aqueous Mobile Phase “  
T. Enami and N.Nagae, American Laboratory October (2004).
- 5) “Wetting property and capillarity of stationary phase for reversed phase liquid chromatography”,  
T. Emani and N. Nagae, Bunseki Kagaku, 53, 1309 (2004).

### 総合論文

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

## 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

# 疑問その1



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

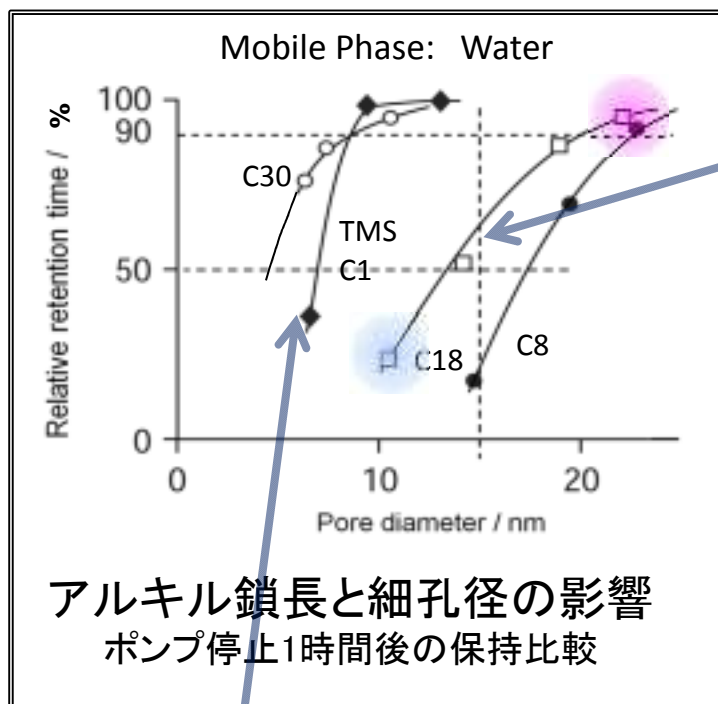
水移動相でポンプを止めなければ, 2-プロパノールは保持している。C18アルキル基は濡れているのか? 寝込んでいるのか(Phase collapse), そうでないのか?

発表者の回答: C18アルキル基は最初から寝込んでいる。Phase collapseしている。C18アルキル基は水に濡れることはない。最初からNon-wettingであり, 毛管作用により細孔から抜け出そうとする力が作用するが, 充填剤周りにかかる圧力の方が高いため, 抜け出さない。

ポンプを1時間停止後, 再通液すると保持は減少している。ポンプを停止すると, または充填剤に圧力がかからなくなると, C18アルキル基は寝込むのか? この状態では移動相は充填剤細孔内から抜け出ている。

発表者の回答: 最初から移動相に濡れていないのであり, C18アルキル基は最初から寝込んでいる。Phase collapseしている。ポンプを止め, カラム圧が大気圧まで下がると, 毛管作用により働く抜け出そうとする圧力の方が勝り, 水移動相は抜け出てしまう。その後ポンプを動かし, 圧力をかけても, 大きなヒステリシスの存在で, 水移動相は細孔に入り込むことができず, 保持は回復しない。20MPa以上の圧をかければ, 細孔内に水移動相は入り込み, 保持は回復する。

# 疑問その2



N. Nagae, Chromatography, 22, 33 (2001)

細孔径10nmのC1(TMS)はポンプ停止後も保持時間の減少はないが、細孔径が小さくなると保持時間は減少する。C1は寝込みやPhase collapseが物理的に起こりえないが、なぜ保持時間の減少が起こるのか？

細孔径10nmのC18はポンプ停止後80%程度保持時間が減少しているに対し、22nmのC18はほとんど保持時間の減少がない。

10nmではC18アルキル基が寝込み、水に濡れていないが、22nmでは固定相は水に濡れていて、C18アルキル基は寝込んでないのか？

発表者の回答: 細孔径が10nmでも22nmでもC18アルキル基の状態は同じである。両者ともC18アルキル基は寝込んでおり、水移動相に濡れていない。毛管作用で水移動相は細孔から抜け出る。この毛管作用力は細孔径に反比例する。細孔径の大きな22nmではこの毛管作用力は大気圧に勝てないため、水移動相は細孔から抜け出ず、保持時間は減少しない。

発表者の回答: そもそも水移動相を流し、保持をしているときには常に固定相に移動相が濡れている訳ではない。濡れていなくても溶質は固定相と移動相に分配し、保持する。ヘキサンと水を用い分液ロートで溶質を分配させるように、0.2-0.3nmの隙間の存在下の界面で接している2液間でも溶質は分配する。つまり固定相と移動相が0.3nmの隙間があっても接していれば分配し、保持する。分離において固定相は移動相で濡れる必要はない。

アルキル基の寝込みPhase collapseにより濡れなくなると言うことではない。

## 疑問その3 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.

(濡れるため、細孔内に溶液が入り込み分散する)

- ・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)  
(濡れないため、細孔内に溶液は入り込めない)

- ・30%メタノールでは全く分散していない.  
(濡れないため、細孔内に溶液は入り込めない)

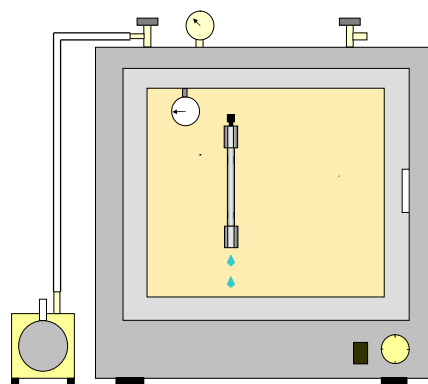
T. Enami and N. Nagae, BUNSEKI KAGAKU, 53 (2004) 1309.

発表者の回答: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。

濡れ性は固定相の寝込み(Phase collapse)で決まるのではなく、移動相(溶液)により決まる。

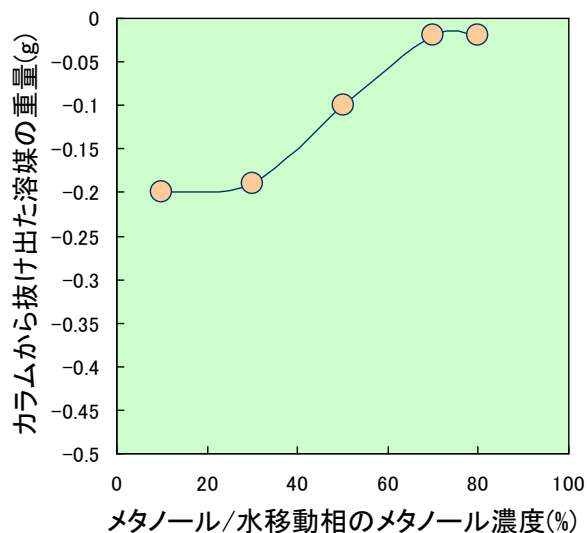


# 疑問その4 大気圧が低ければC18カラムから移動相は抜け出すか？



カラム: C18 250x4.6mm  
 模擬大気圧: 0.01MPa  
 カラム温度: 40 °C

- \* 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



\* 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移動相溶液の抜け出しはほとんど認められず、50%以下では移動相溶液は抜け出している。

\* 70%以上のメタノールではC18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、充填剤細孔から溶液は抜け出さないが、50%以下では濡れないため、抜け出そうとする。

発表者の回答: 毛管作用とは、濡れる(接触角が90度未満)場合には毛細管内に入り込む力が働き、逆に濡れない(接触角が90度より大きい)場合には毛細管から抜け出す力が働くことである。

メタノール濃度50%以下の濃度ではC18充填剤の細孔内から移動相を抜き出す力が働く。その力が0.01MPaより大きいため左図に示されているようにカラムから移動相溶液が抜け出す。

通常10%以上のメタノール濃度の移動相を用いれば、保持の減少は起こらない。これはC18充填剤細孔内から移動相溶液を抜け出させる圧力が大気圧(1気圧)より低いためである。

## 疑問その5 Dewetting は起こっているのか？

C18固定相, メタノール:水(70:30)移動相



固定相は移動相で濡れている  
Wetting 保持の変化はない

C18固定相, メタノール:水(50:50)移動相  
C18固定相, メタノール:水(30:70)移動相



固定相は移動相で濡れていない  
Non-wetting 保持の変化はない

C18固定相, 水移動相



固定相は移動相で濡れていない  
Non-wetting 保持は変化する

発表者の回答: 固定相が濡れている(Wetting)と濡れていない(Non-wetting)は、固定相の状態が変わると言うよりも、移動相溶液が異なることにより、濡れている状態と濡れていない状態になることである。メタノール:水(70:30)移動相溶液はC18固定相に濡れるが、メタノール:水(30:70)移動相溶液や水はC18固定相に濡れない。したがって、Wetting 状態からNon-wetting 状態への変化は溶液の組成比の変化で起こっており、C18固定相の状態が変化しWetting 状態からNon-wetting状態に変わっているのではない。

移動相溶液の組成の変化でWetting からNon-wetting なることをDewetting と言うのであればDewetting は起こっている。しかし通常は溶液組成を変えることにより、濡れ性が変化することをあえてDewetting と言わないと思われる。また固定相の状態の変化で、初めは水に濡れており、試料は保持するが、その後時間の経過とともに水には濡れなくなり、試料の保持が減少するのであれば、Dewetting は起こっている。しかし実際には後者のような現象は起こっていない。

# まとめ

- ◆ 逆相固定相に移動相溶媒が濡れない場合，毛管作用で移動相溶媒は充填剤細孔から抜け出す力が働く。
- ◆ その力（圧力）が大気圧より大きい場合に細孔内から移動相溶媒は抜け出る。
- ◆ Dewetting の意味の定義をしっかりと定める必要があると思われる。Wetting とNon-wetting状態は確認できるが，移動相溶液が変わらなければ，Wetting からNon-wetting状態への変化は起こらない。

---

株式会社 クロマニックテクノロジーズ  
552-0001 大阪府大阪市港区波除6-3-1  
TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890  
E-mail: info@chromanik.co.jp  
URL: <http://chromanik.co.jp>