

C18,C8で保持や分離は何が決めて？ 前代未聞のカラムの知識

- ① 疎水性の高い固定相は保持が大きい？
- ② 濡れている, 濡れていない(non-wetting)？

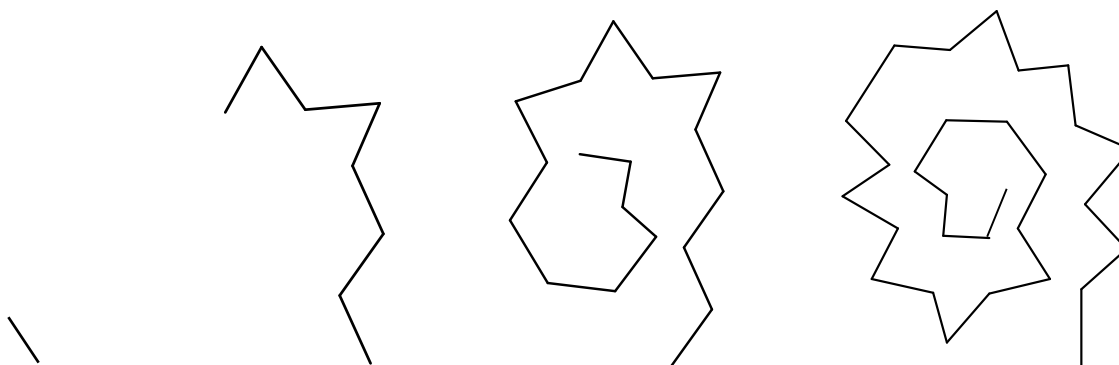
おまけ, エンドフィッティングの差異

『こんなことがあるのか！』

(クロマニックテクノロジーズ)

長江 徳和

疎水性



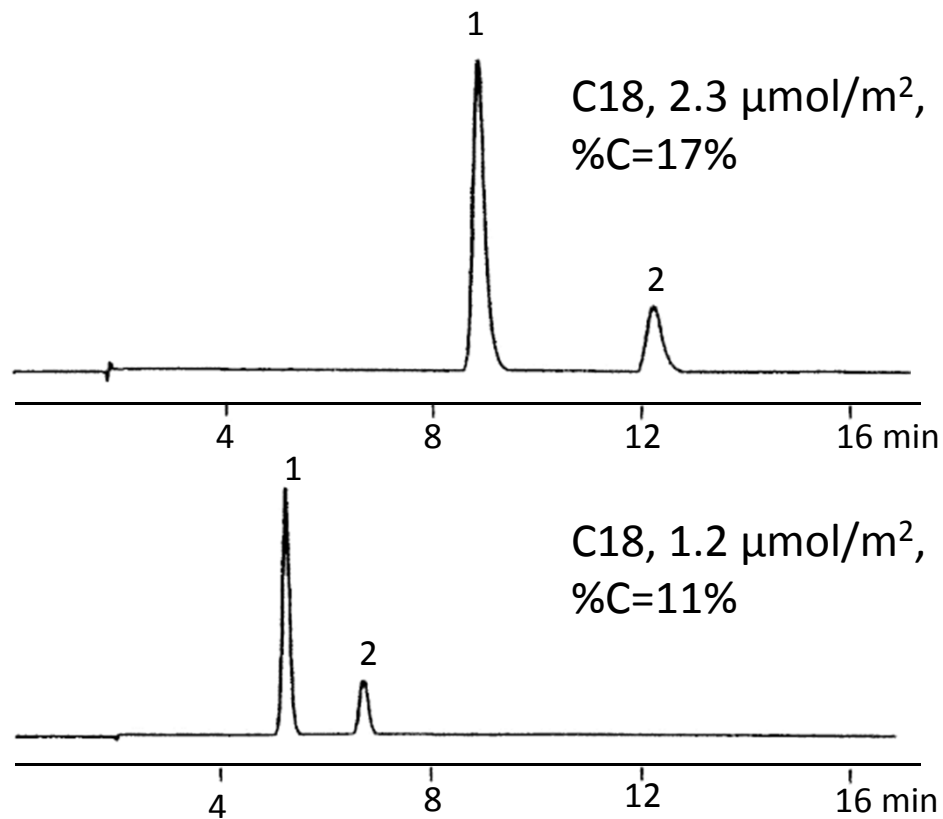
	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
分配係数(LogP)	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	22.6	0.66	0.006	8.84×10^{-10}

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:

CH₃OH/H₂O=(98:2)

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

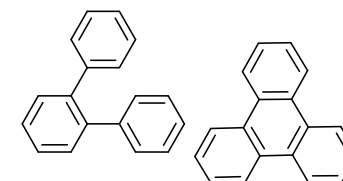
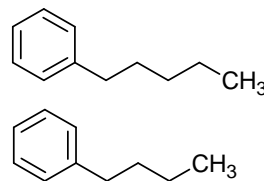
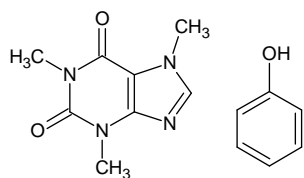
Detection: UV @450nm

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)と分配比(Kd)

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

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

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_D: 固定相中の溶質の分配濃度

M_D: 移動相中の要旨値の分配濃度

V_S: 固定相の体積(容積)

V_M: 移動相の容積

C8固定相(%C=11%)とC18固定相(1.2 μmol/m², %C=11%)は固定相体積(V_S)が同じで保持係数(k)も同じであるので、分配比(Kd)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 $k_A = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.4}{M_D \times 1.6} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.25 = 0.25 K_d$

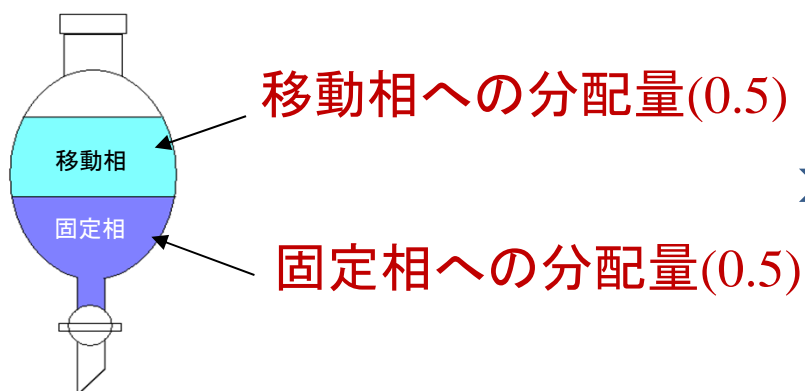
C18 (B) の場合 $k_B = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_d$

C18(A)はC18(B)の約2倍の保持係数になる。

固定相の体積が異なる場合

<<同じ固定相では分配濃度比が同じと仮定する(固定相/移動相=1)>>

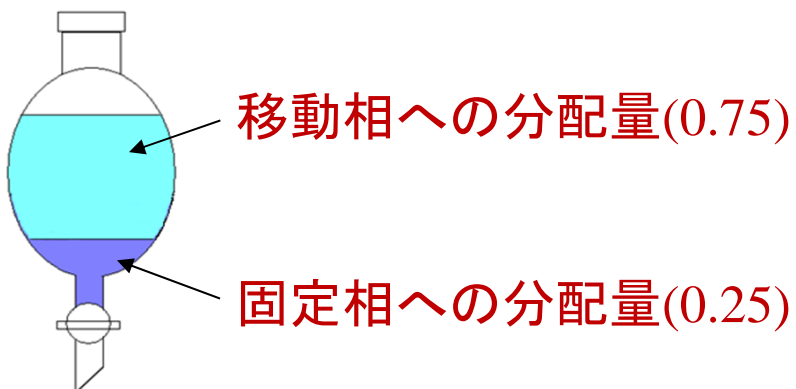
例えばC18(%C=18%)



移動相と固定相への分配濃度比は同じであるため、分配量の比(k)は体積比となる。

$$k=0.5/0.5=1 \quad k = \frac{S}{M}$$

固定相の体積が半分のC18(%C=9%)



$$k=0.25/0.75=0.33$$

固定相の体積が同じC18とC8固定相の保持係数(k)と分配比(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固定相分配比(Kd)は Kd_{C18} , Kd_{C8}

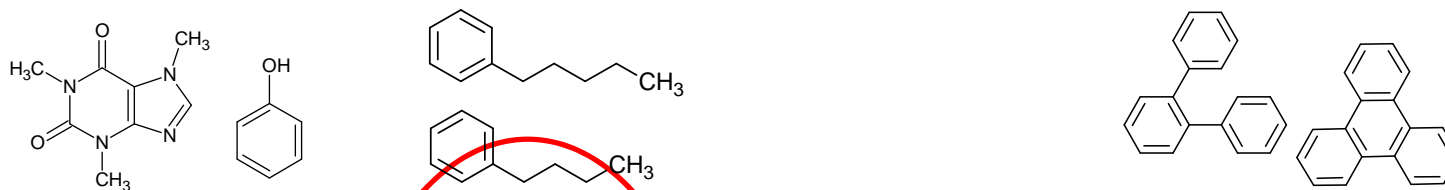
$$Kd = \frac{S_D}{M_D}$$

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

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

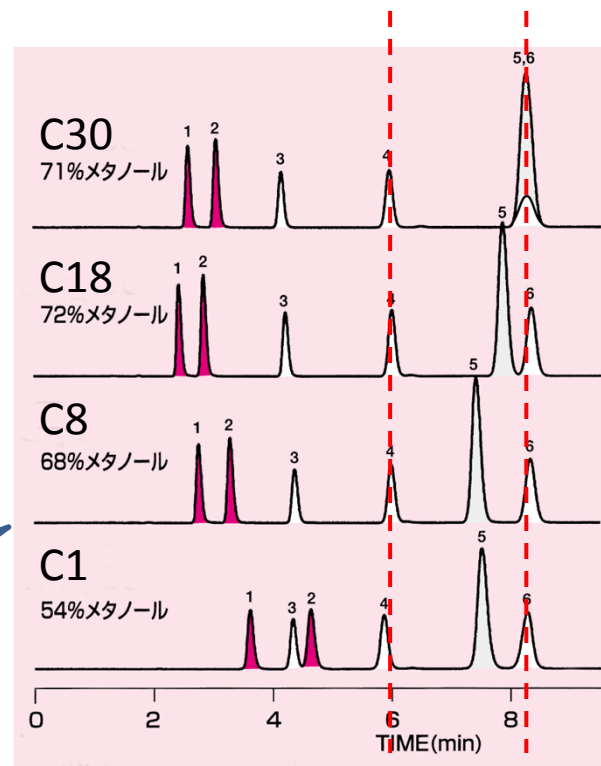
固定相	炭素含有量	水素結合性 α(カフェイン/フェノール)	疎水性 α(アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	疎水性 アミルベンゼンの保持係数	立体選択性 α(o-ターフェニル/トリフェニル)
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

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

アルキル鎖長が長いほど分離係数(α)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(α)は同じである。

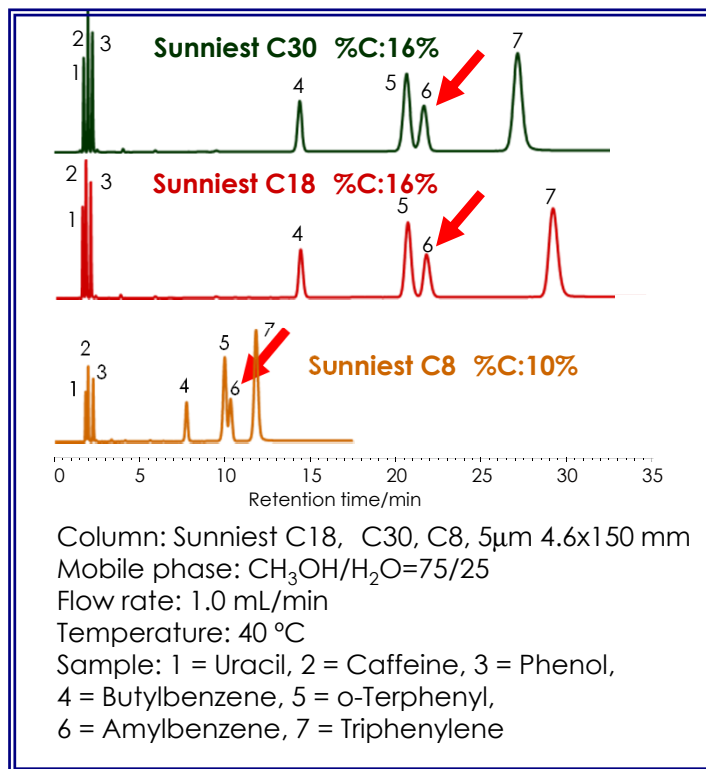


カラムサイズ: 4.6 × 150mm
 移動相: メタノール/水、有機溶媒濃度は図中に表示
 流速: 1.0 mL/min, 温度: 30°C,
 試料: 1=メチルパラベン, 2=エチルパラベン,
 3=ベンゼン, 4=トルエン, 5=ナフタレン, 6=エチルベンゼン

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。

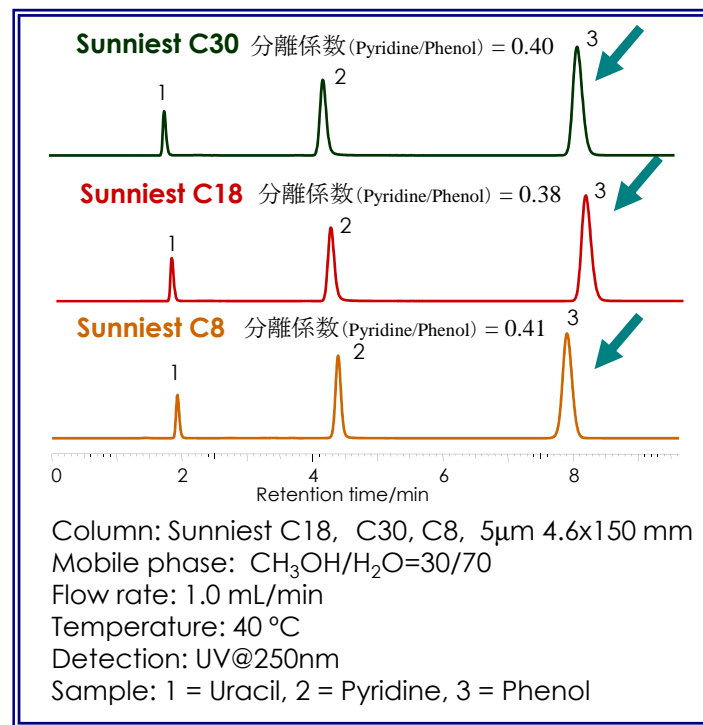
メタノール・水移動相におけるアミルベンゼンとフェノールの保持

◆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。¹²

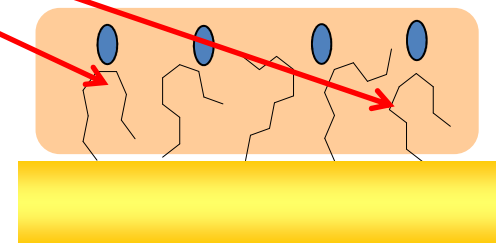
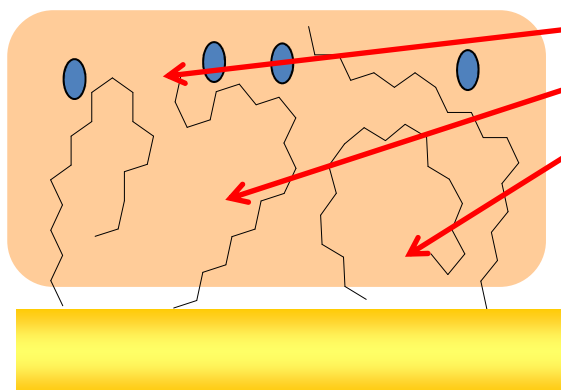
試料とC18固定相の相互作用場

メタノール・水移動相

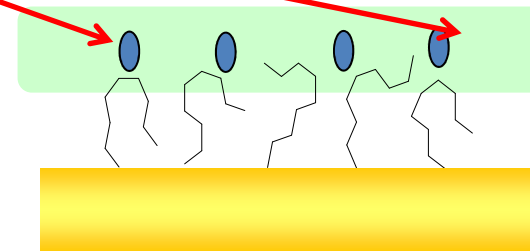
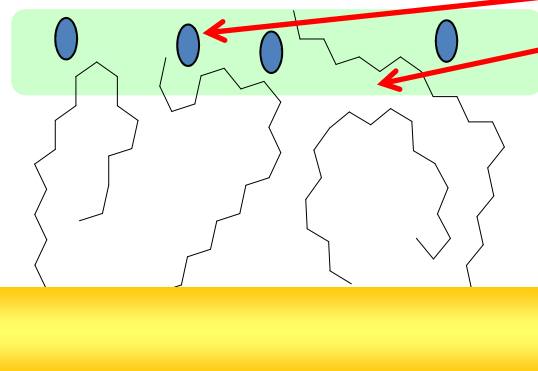
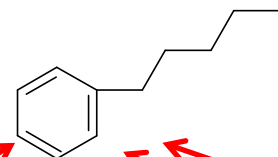
● : メタノール

C18

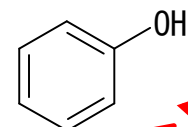
C8



アミルベンゼンは
オクタデカンに可溶



フェノールは
オクタデカンに難溶



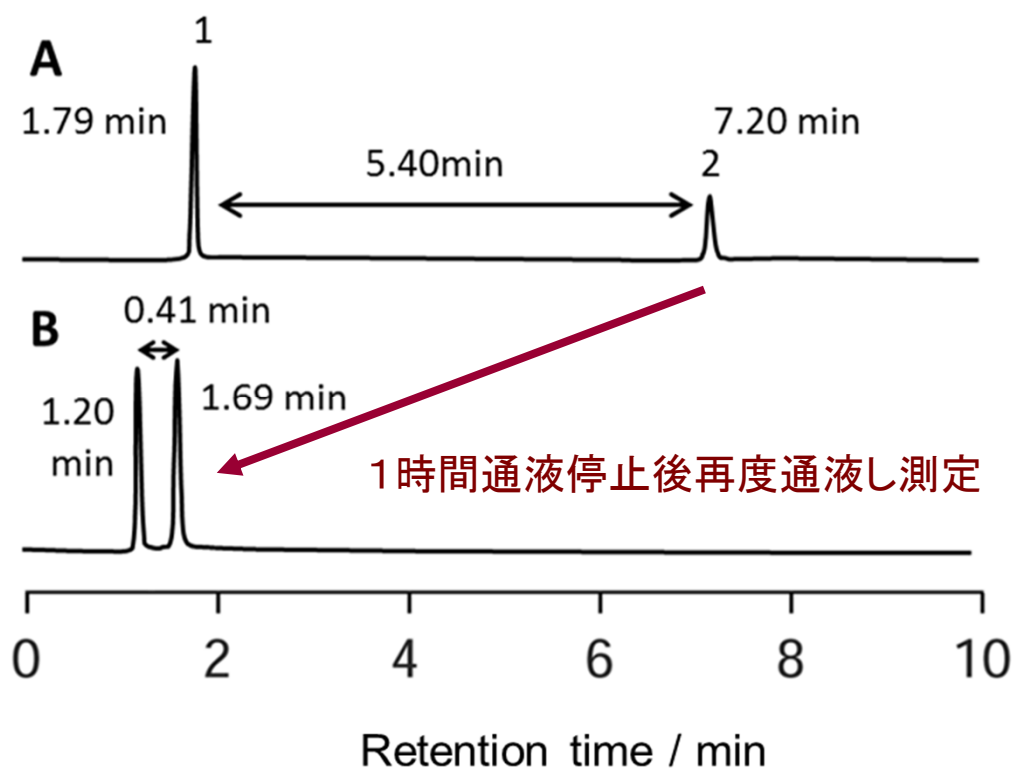
まとめ

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.

逆相アルキル基は
立ち上がっている, 寝込んでいる?
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には大きく減少



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

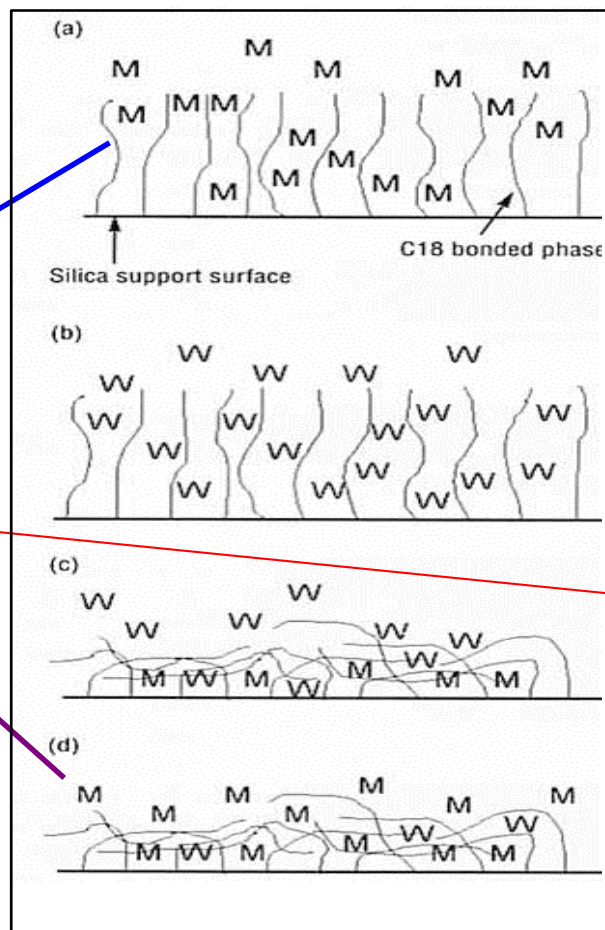
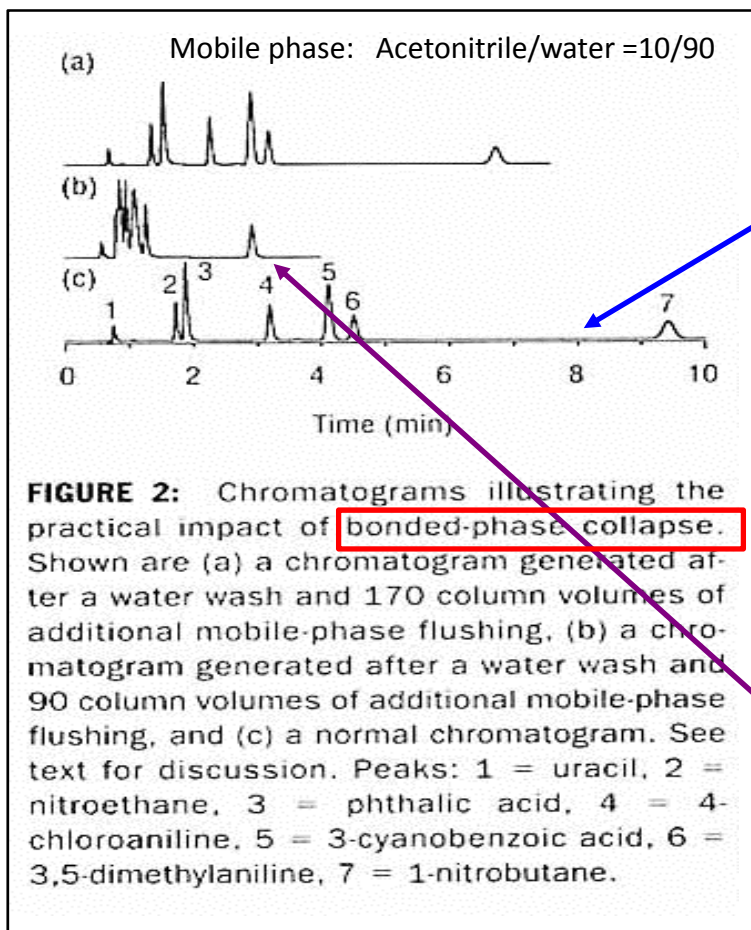
検出: RI

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



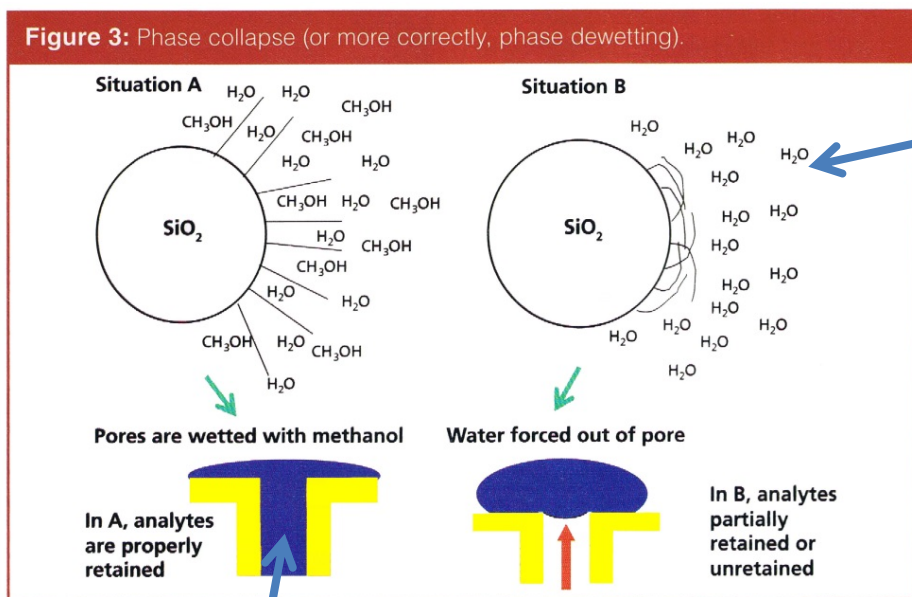
固定相は移動相で濡れている。アルキル基は立ち上がっている。

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

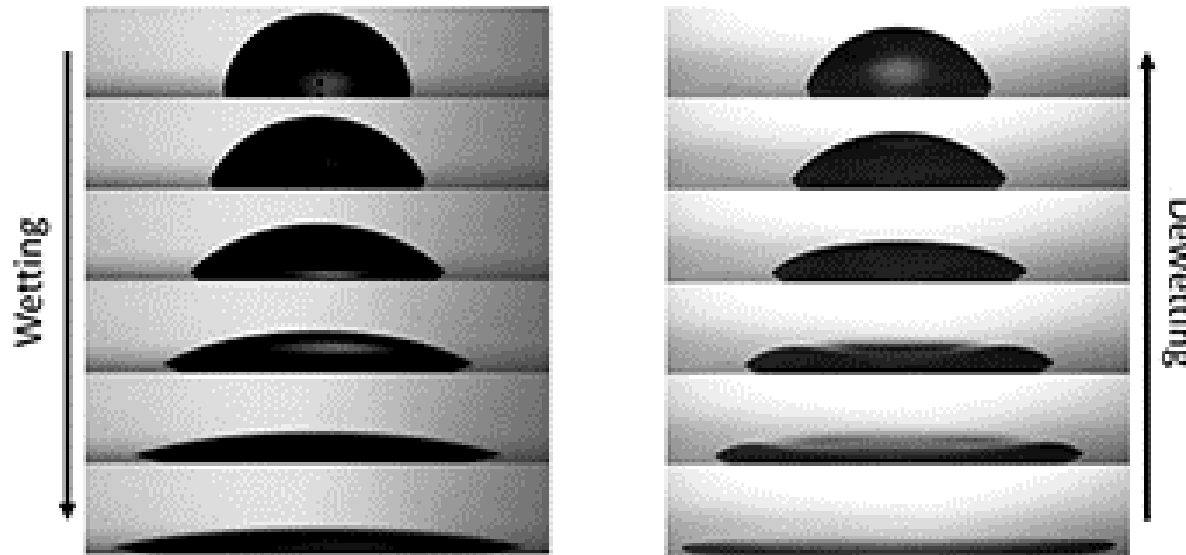
アルキル基は立ち上がっており, 固定相は移動相で濡れている. 移動相は細孔から抜け出さない.

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？

Dewettingとは？



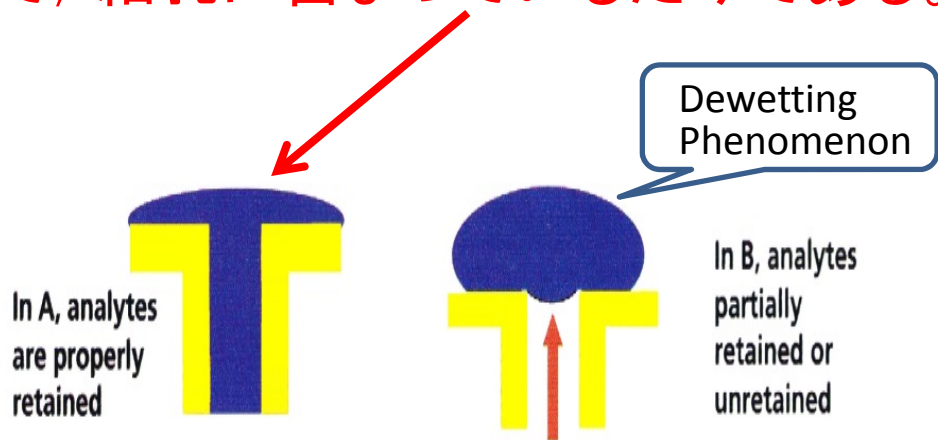
<http://www.mynewsdesk.com/uk/northumbria-university/pressreleases/its-delightful-its-dynamic-its-dewetting-1582445>

**Dewetting とは接触角が大きくなること！！
細孔から液体が抜けることではない！！**

実は移動相を換えない限り、逆相固定相表面と移動相の接触角は変化しない！！

他社のDewettingの説明

実は固定相表面は移動相で濡れていない。
毛管作用で抜け出そうとする圧力以上の圧がかかっている
ので、細孔に留まっているだけである。



移動相送液中で細孔が加圧されている状態

水系移動相の場合、背圧が低い状態やポンプを止めて再開した直後は、細孔内から移動相が排除され、化合物が保持されない現象が起こります。

毛管作用で抜け出そうとする圧力以下の圧まで下がると、細孔から抜け出る。

これは毛管現象である。

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 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、 $h=2\gamma\cos\theta/\rho g$ となる。

毛管現象

Capillarity, Capillary phenomenon

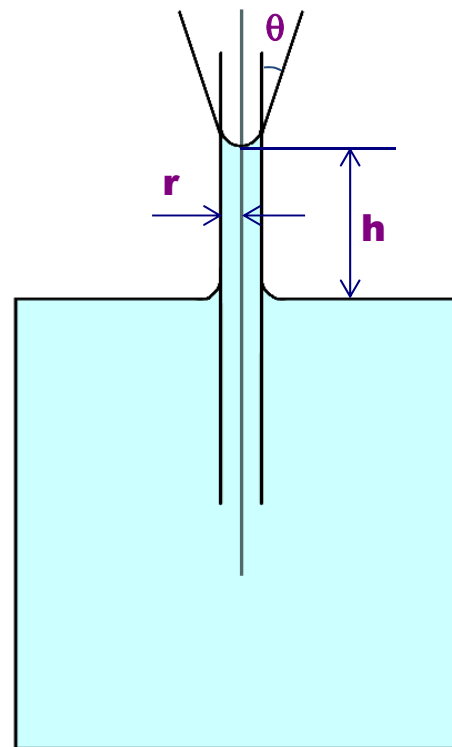
毛管現象の式:

$$h = 2\gamma \cos\theta / (r\rho g)$$

γ : 表面張力

ρ : 液体の密度(比重)

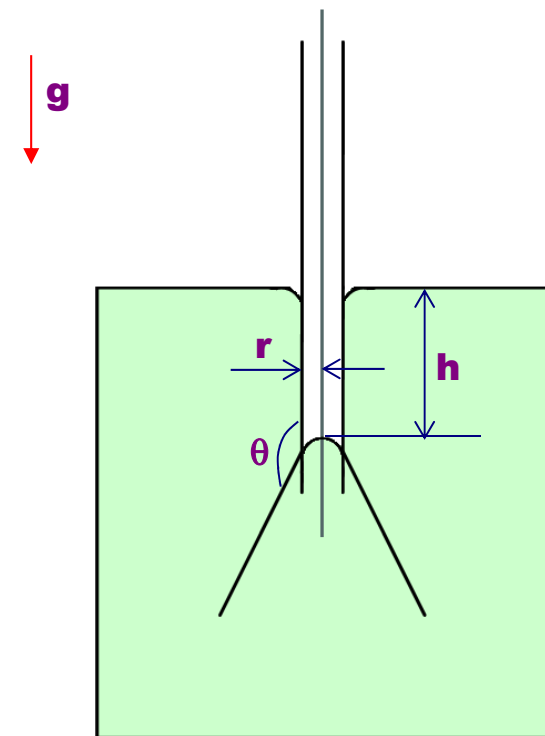
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



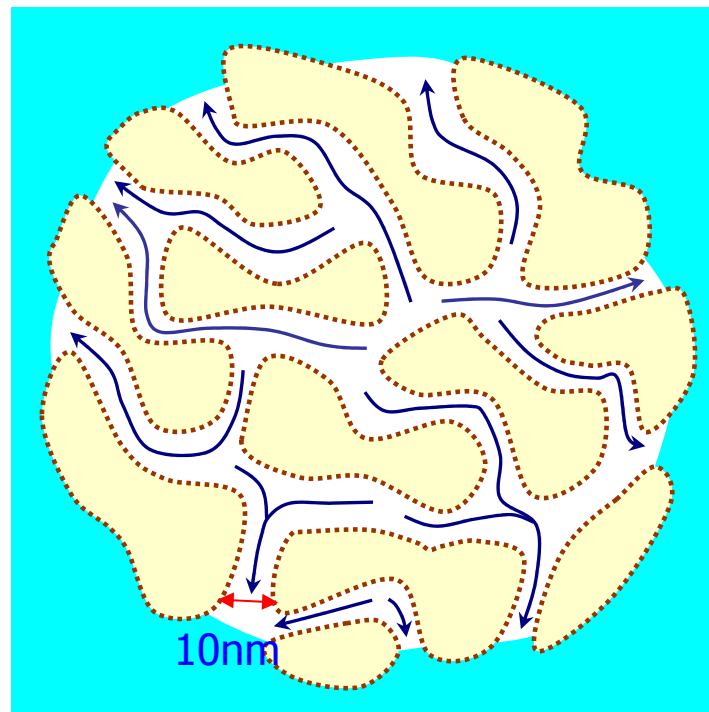
液体が管に濡れない場合

$$\theta > 90^\circ$$

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。

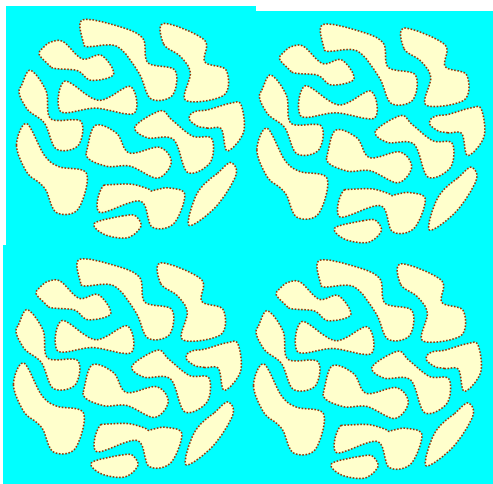
水100%移動相条件下で保持が減少する理由

カラム内のC18充填剤粒子

移動相: 水

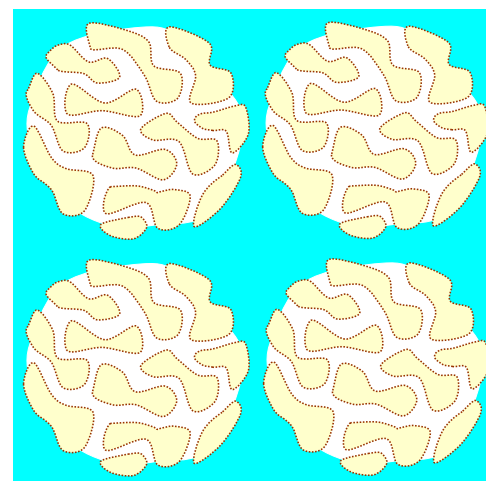
充填剤に圧力がかかっている場合

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
浸透している状態

Permeating



細孔内から移動相が
抜け出した状態

**Expelling
Depermeating**

疑問その5 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)

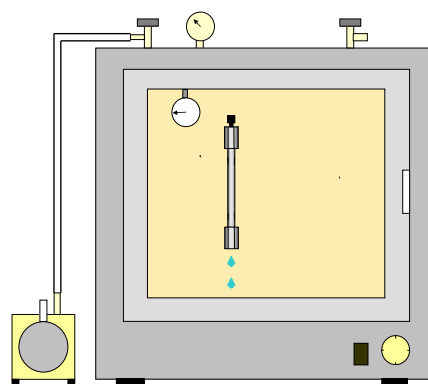
- ・30%メタノールでは全く分散していない.
(濡れないため、細孔内に溶液は入り込めない)

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。

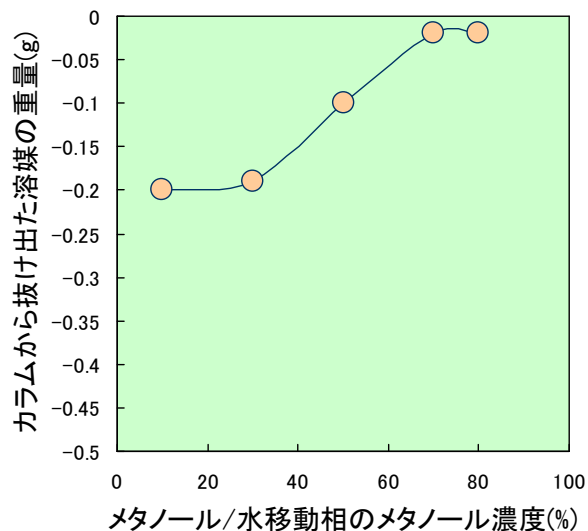
濡れ性は固定相の寝込み(Phase collapse)で決まるのではなく、移動相(溶液)により決まる。

疑問その6 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8 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。
- ◆ 水移動相を用いた場合の逆相カラムのさまざまな現象については下記の総合論文に詳しく記載されている。

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

193

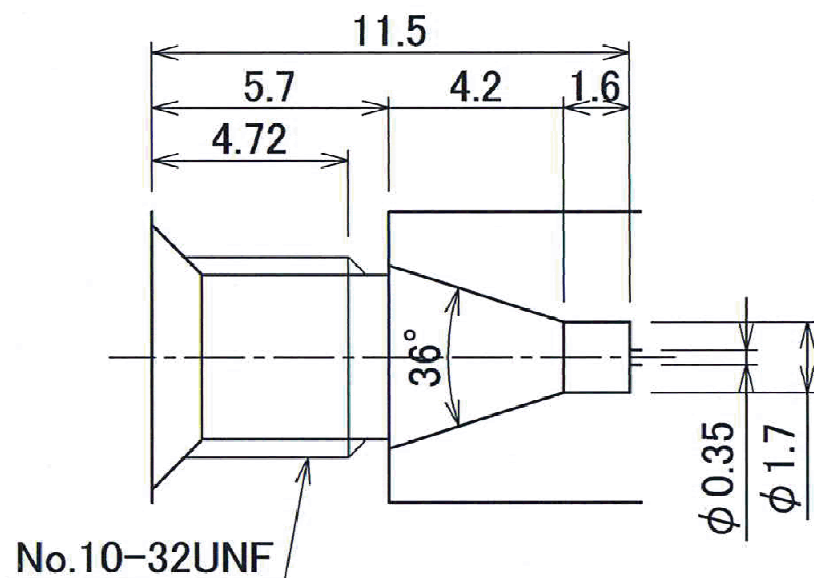
総合論文

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

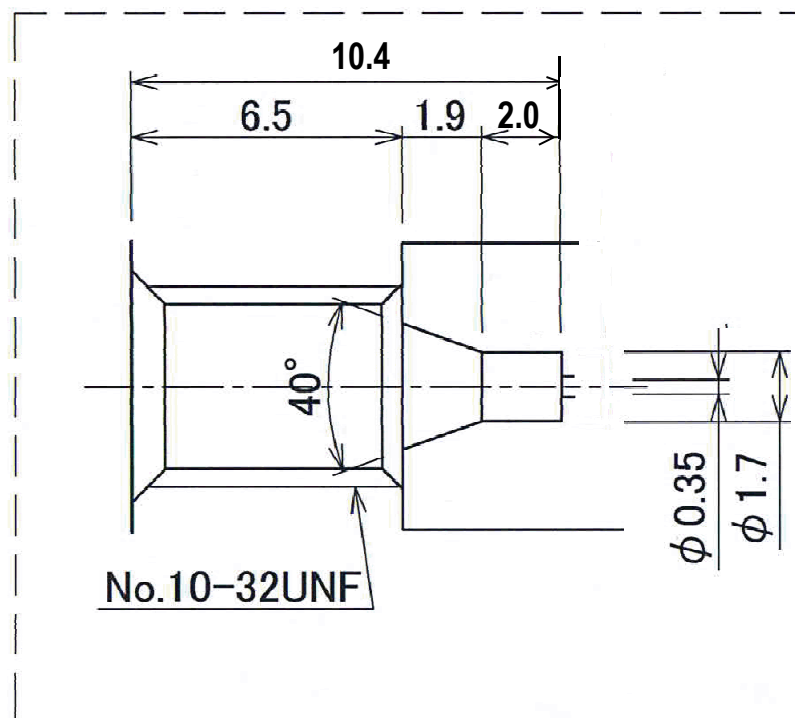
長江 徳和¹

エンドフィッティングの違い

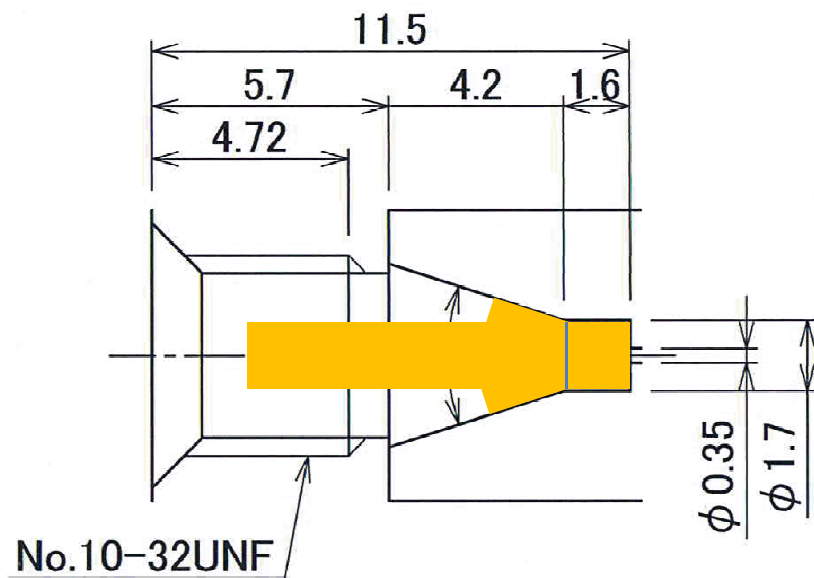
A社 接続部



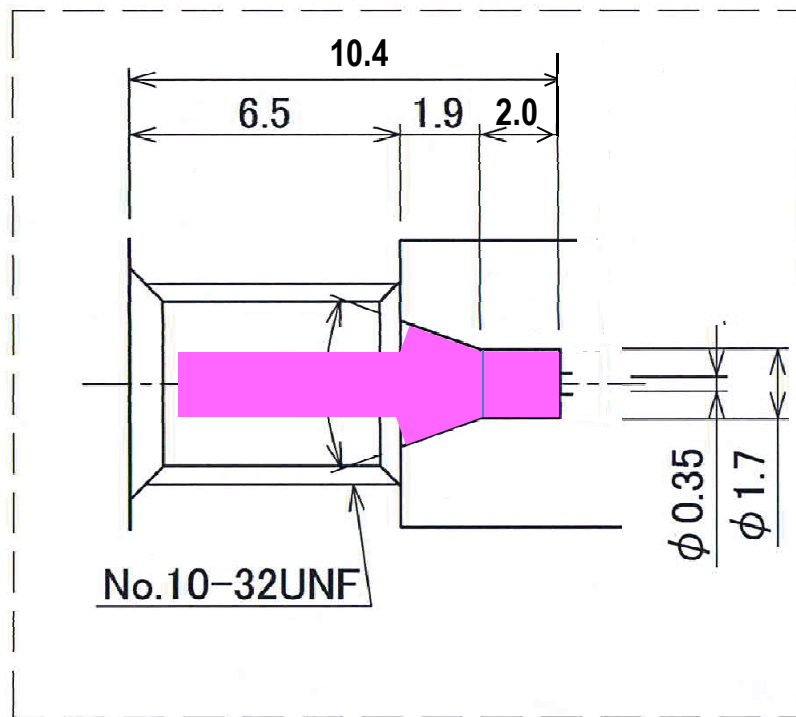
パーカータイプ 接続部
(IDEX社 IsoBar hardware)



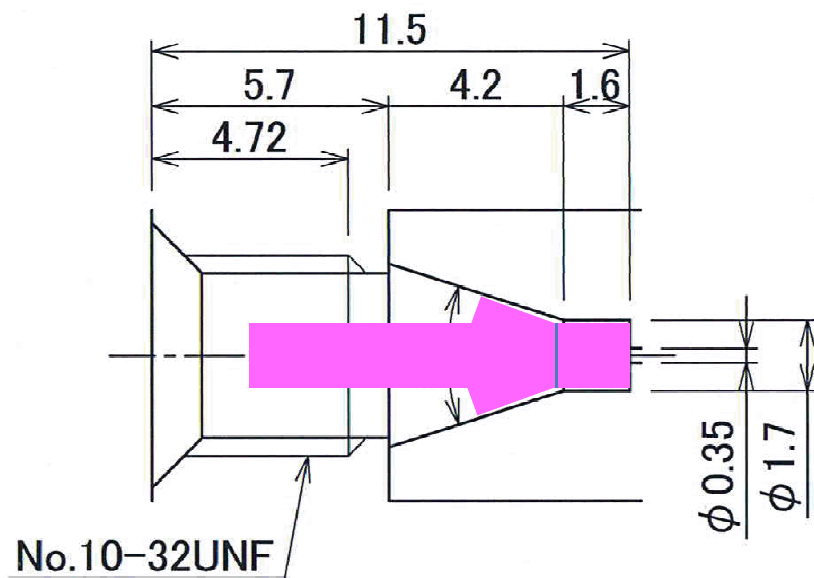
A社 接続部



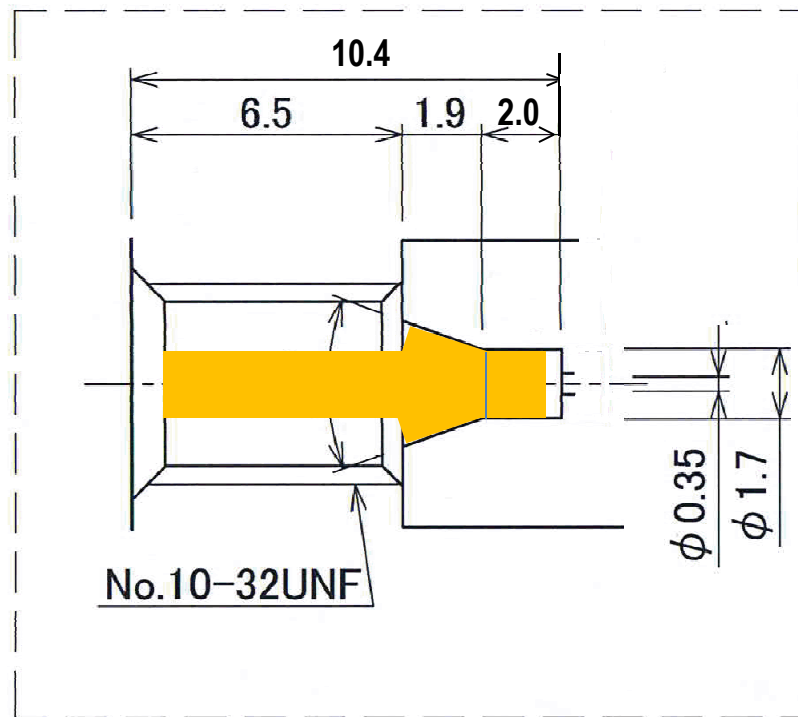
パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar hardware)



A社 接続部



パーカータイプ 接続部
(IDEX社 IsoBar hardware)



IDEX社IsoBarと同じ接続のカラム



SunShell, Halo, PoroShell,
Ascentis Express, Perkin Elmer SPP,
Kinetex, CosmoCore, ClassicShell,
MeteoricCore, UltraCore, OpalShell,
Capcell Core

ご静聴ありがとうございました



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>