

C18からHILICもよくある失敗から学ぶ LCカラムの基礎

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>



実際に多いのは・・・

カラムのケア関連

カラム洗浄

カラムの保管

劣化しているかどうか

カラムの性能関連

保持時間

分離パターン

耐久性

圧力変化

ピーク形状変化

分析を繰り返した後 or カラム交換時に
問題が起こりやすい

※同じ症状でも原因が違うことも・・・



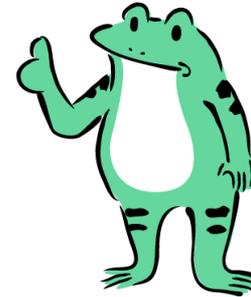
ドラブル発生！どうする？

対処する場合は・・・

経験を元に対処



ネットで検索

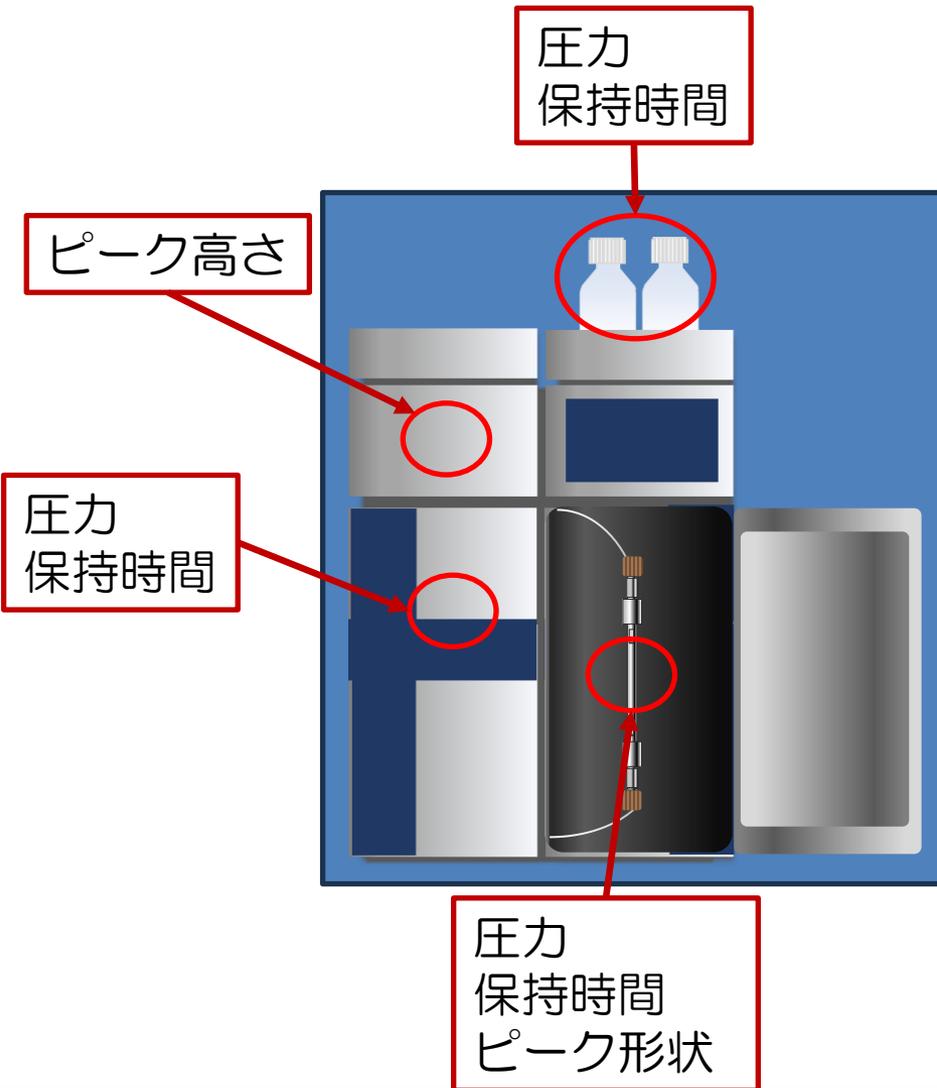


メーカーに質問



どの対処法でも良し悪しが存在

トラブルと要因



圧力や保持変化は様々な理由で起きやすいトラブル



同じ内容のトラブルでも原因がどこにあるかわかり難いことが多い

- ※見落とししがちな原因も中には・・・
- ・ランニングプログラムが原因になることも・・・

プログラムが原因の実例



起きたトラブル

保持時間の再現性が取れない

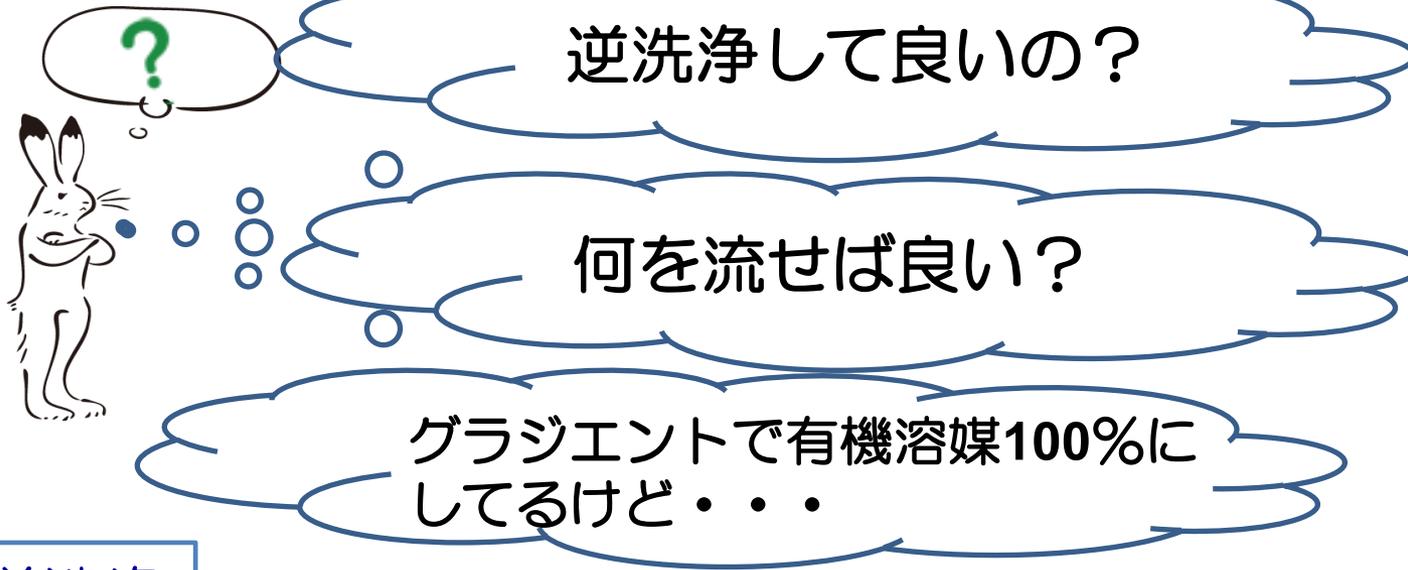
日内の再現性がない(分析のたびに保持時間が変化)

日間の再現性はある(同じように変化する)

原因

プログラムでオーブンがoffとなる
設定になっていた

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

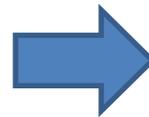
洗浄溶液

- 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

どんな時に有効か

圧力上昇
 ピーク形状が崩れた
 保持時間が変わった

吸着物質の蓄積
 塩の析出
 フィルター詰まりなど

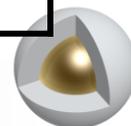


サンプルや移動相
 由来のモノが原因

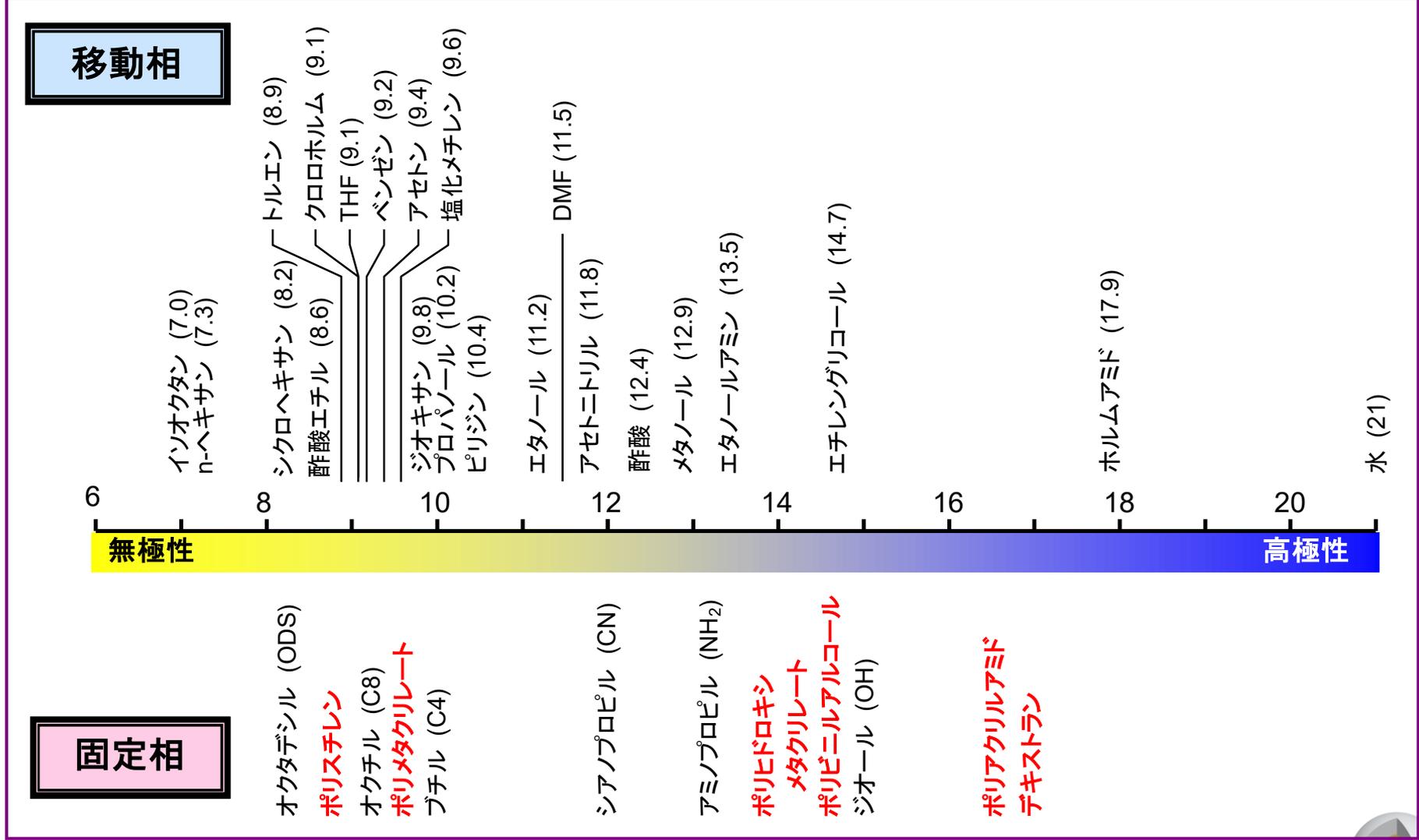


代表的な移動相溶媒の極性

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 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

こんなお声も・・・



カラムが劣化しているかどうか確認したい

テストレポート(カラムに同封されている成績表)の条件で分析し比較する



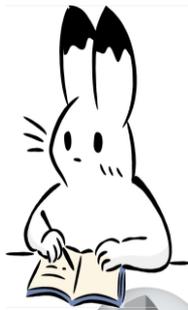
カラムの保管方法はどうかしらしい？

テストレポート(カラムに同封されている成績表)に記載されている封入溶媒or50%以上の有機溶媒を含む溶液で満たして保管

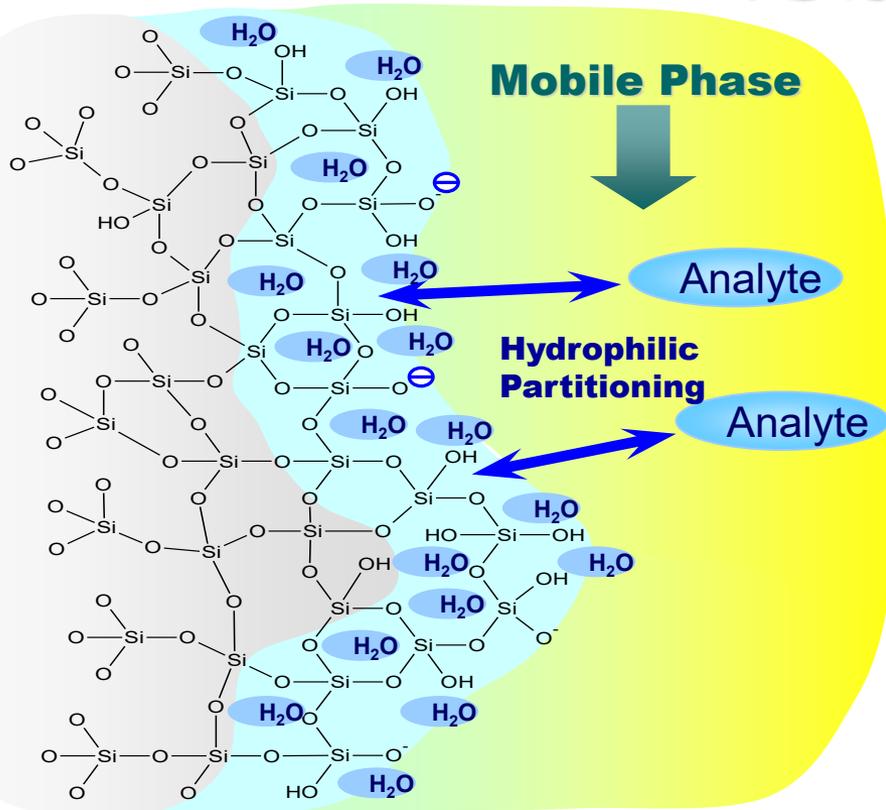


カラムの交換の目安は？

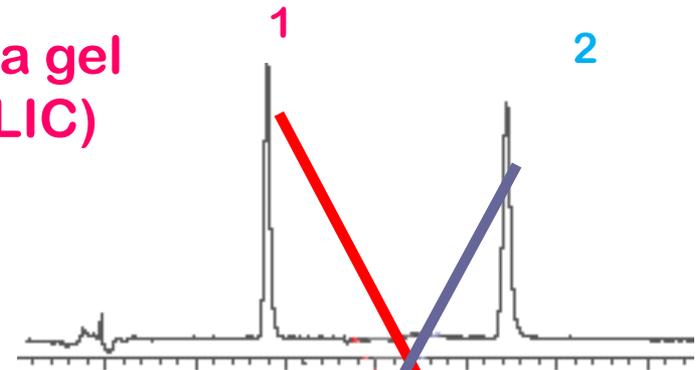
測定結果に求められる精度に依存する。精密分析であれば早めに交換を



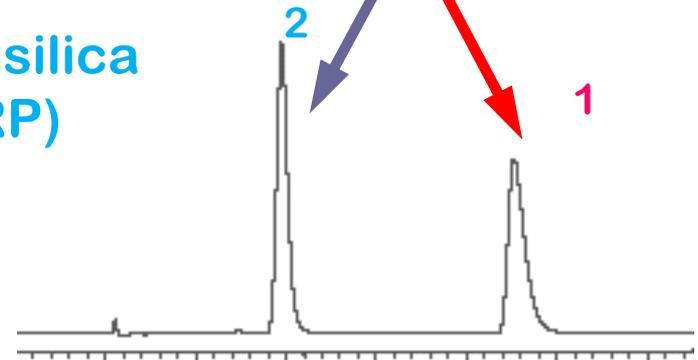
HILICの分離メカニズム



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

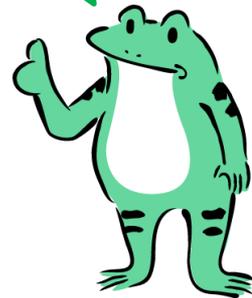
- 特に多いのが・・・
- 保持ができない・再現性が取れない
というご相談



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

試料が水に溶けやすいため
意外と水で調整しがち



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



HILICでの再現性

保持時間の再現性が取れない多くの原因は・・・

サンプル負荷後の平衡化不足

もしくは

カラムの使用履歴の違い

- HILICモードでは
 - インジェクション後に逆相系より長い時間ベースライン変化が起きている
 - 流した移動相の影響が強く残ることがある



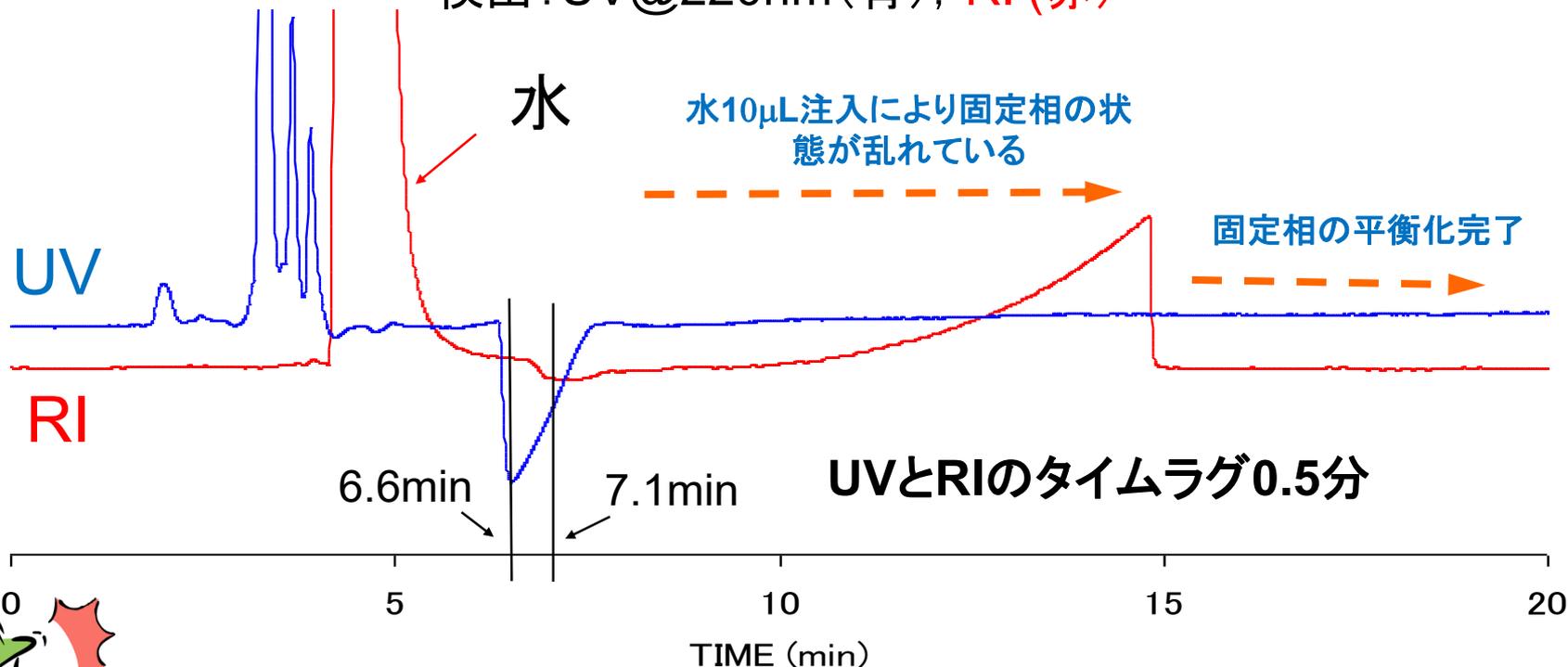
UVで見てるけどそんなことはないけど



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!!



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

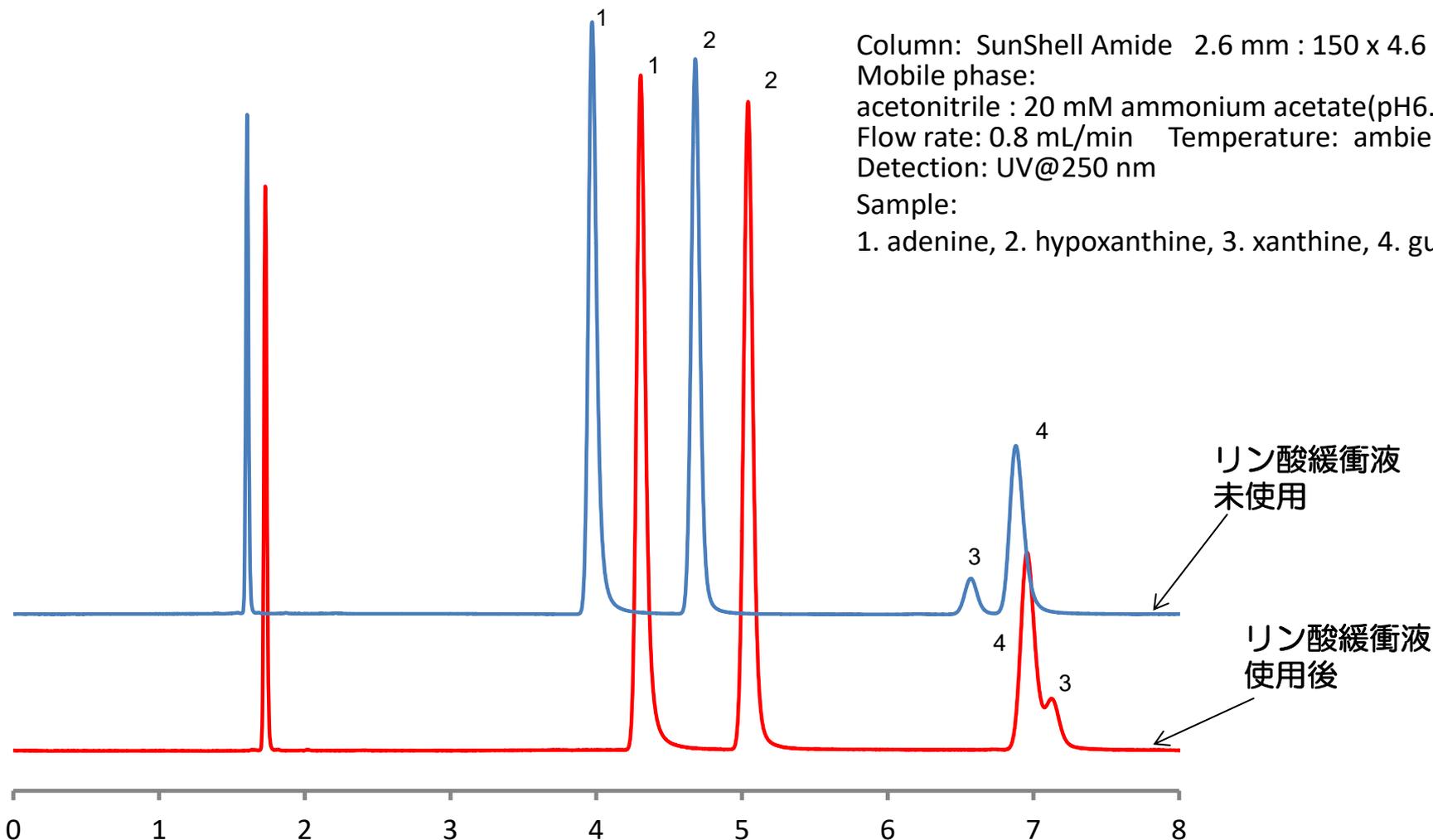
acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15

- 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

実例2



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

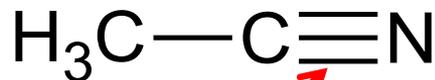
カラムと移動相の相性



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

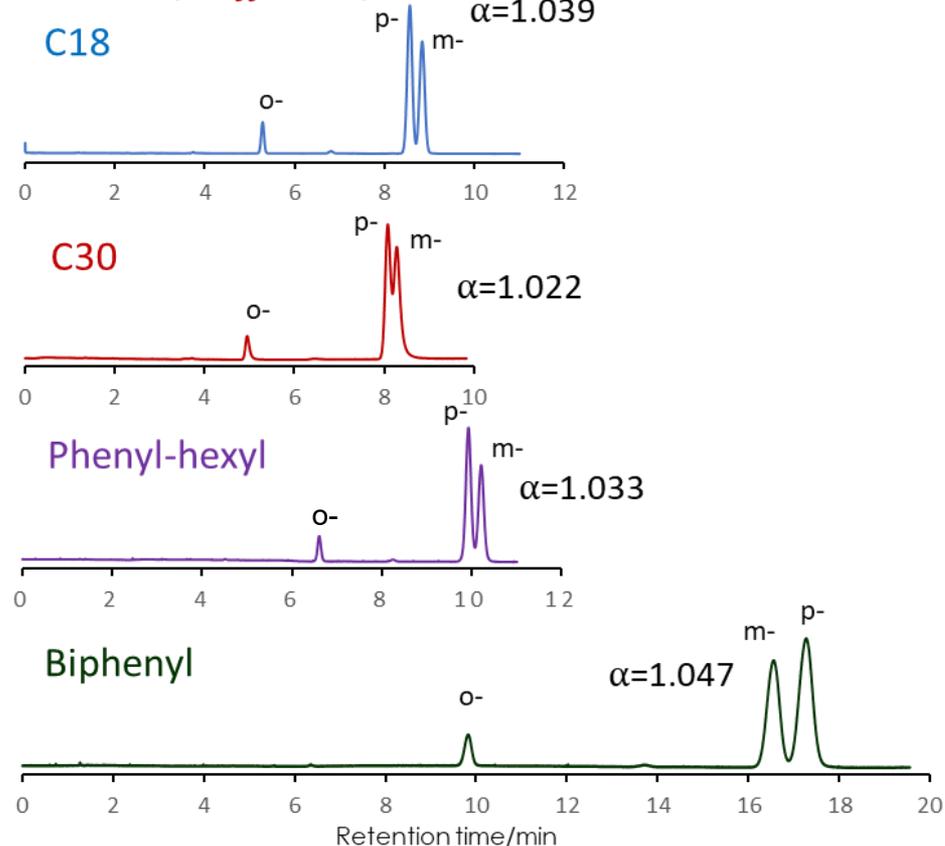
官能基のπ電子が関わる相互作用を弱める

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

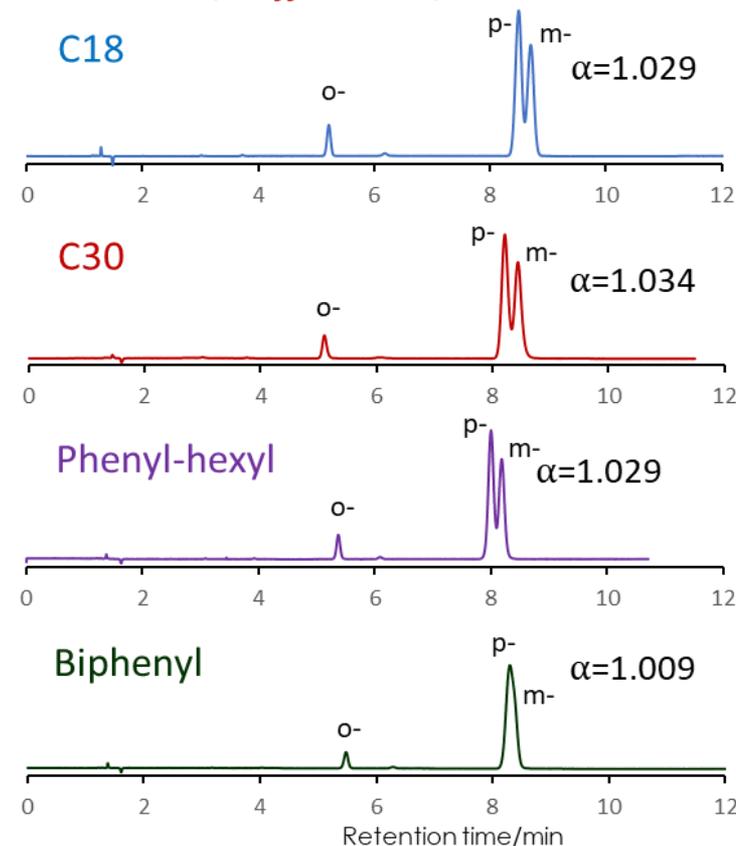


o, m, p-メチル馬尿酸の分離

Methanol/buffer=25/75



Acetonitrile/buffer=13.5/86.5

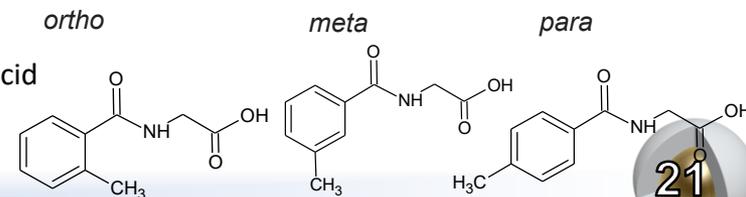


Column: SunShell C18 2.6 μ m 150 x 4.6 mm
 SunShell C30 2.6 μ m 150 x 2.1 mm
 SunShell Phenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm
 SunShell Biphenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

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

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

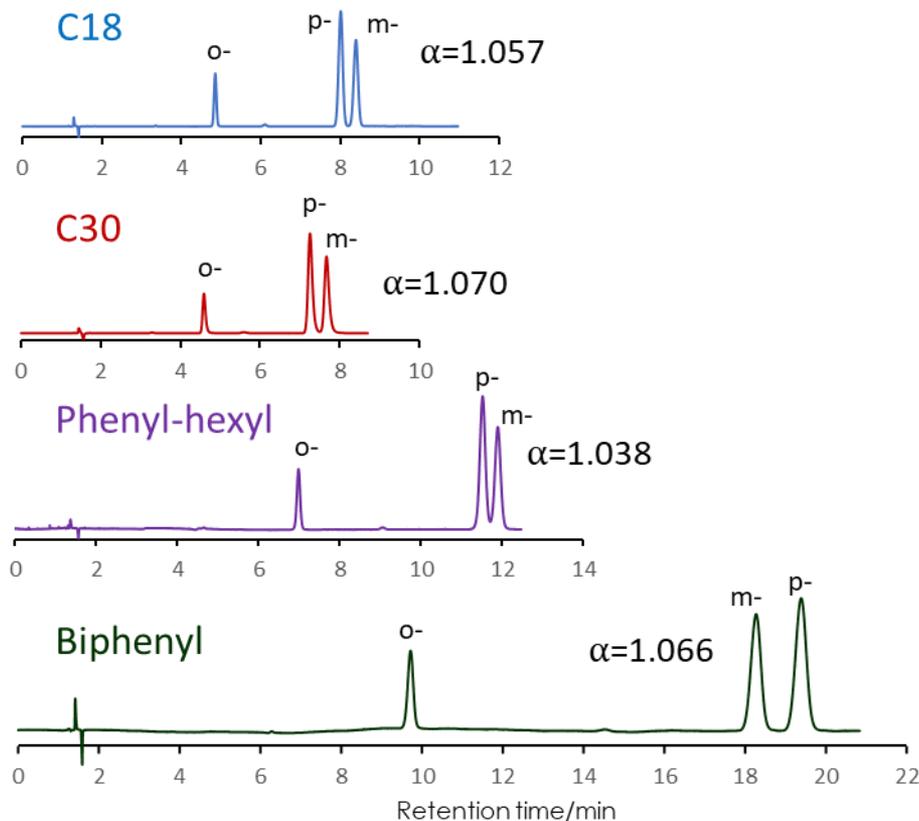
Flow rate: 1.0 mL/min, 0.2 mL/min for only C30



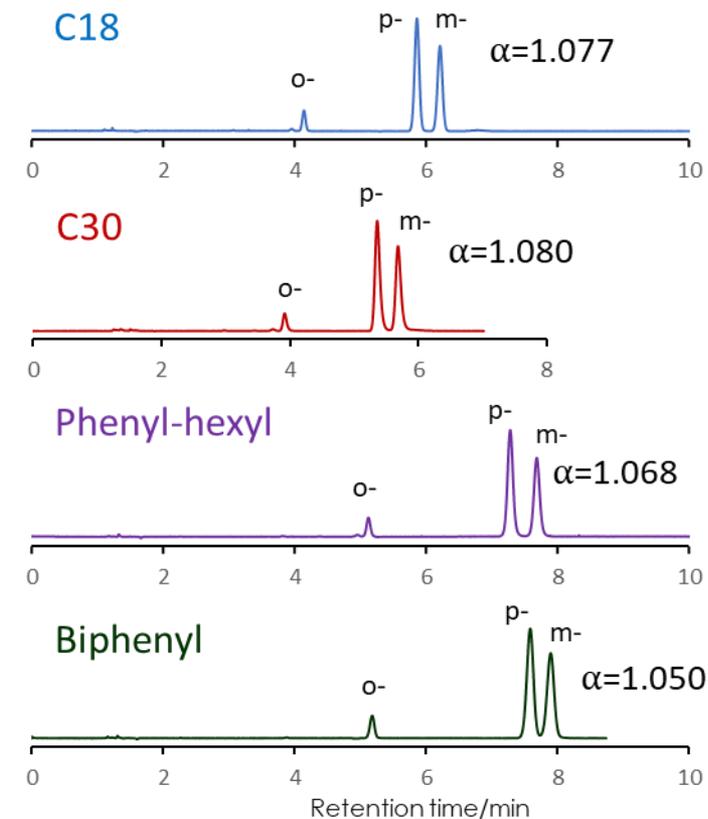


o, m, p-メチル馬尿酸の分離2

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

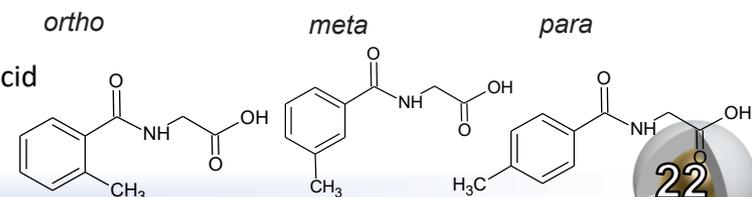
Mobile phase: Organic solvent/25 mM Phosphate buffer pH 3.0

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

Temperature: 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV@230 nm

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



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

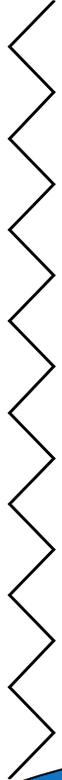
- ① 過去の分析例から性質の似た化合物の条件を使う
- ② 目的物質とカラムとの相互作用を考える
- ③ 分子量から細孔径を選択する
- ④ 手持ちのカラムで一度分析した結果から考える



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

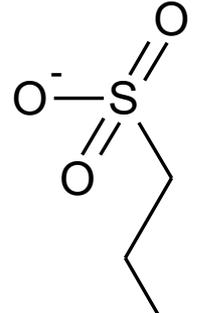
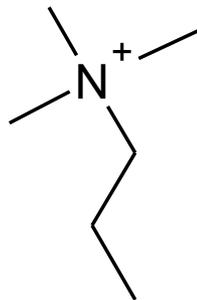
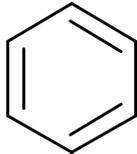
陰イオン
交換基

陽イオン
交換基

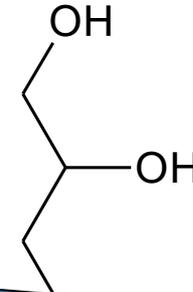
水素結合

π - π 相互作用

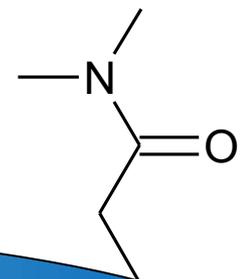
フェニル基



ジオール基



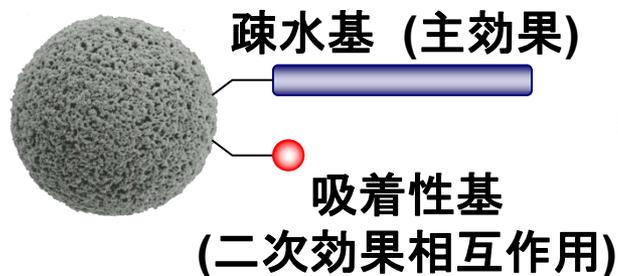
アミド基



カラム充填剤基材

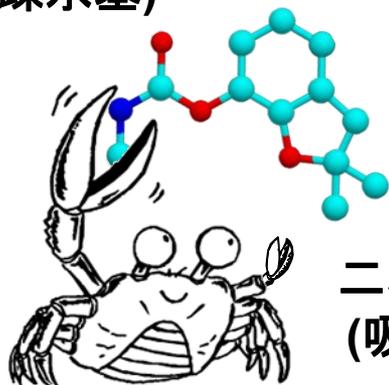


二次相互作用の働き

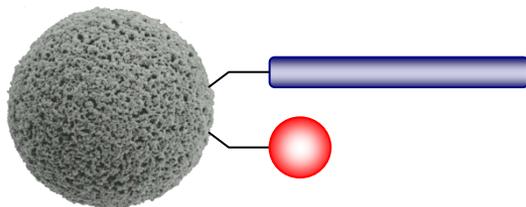


既存の分離剤

主効果
(疎水基)

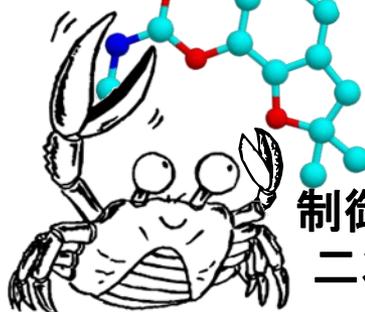


二次効果
(吸着等)

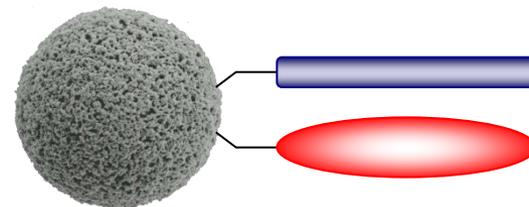


二次効果相互作用 制御型分離剤

主効果
(疎水基)

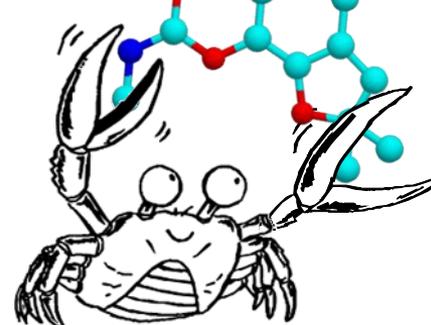


制御された
二次効果



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

実例3



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

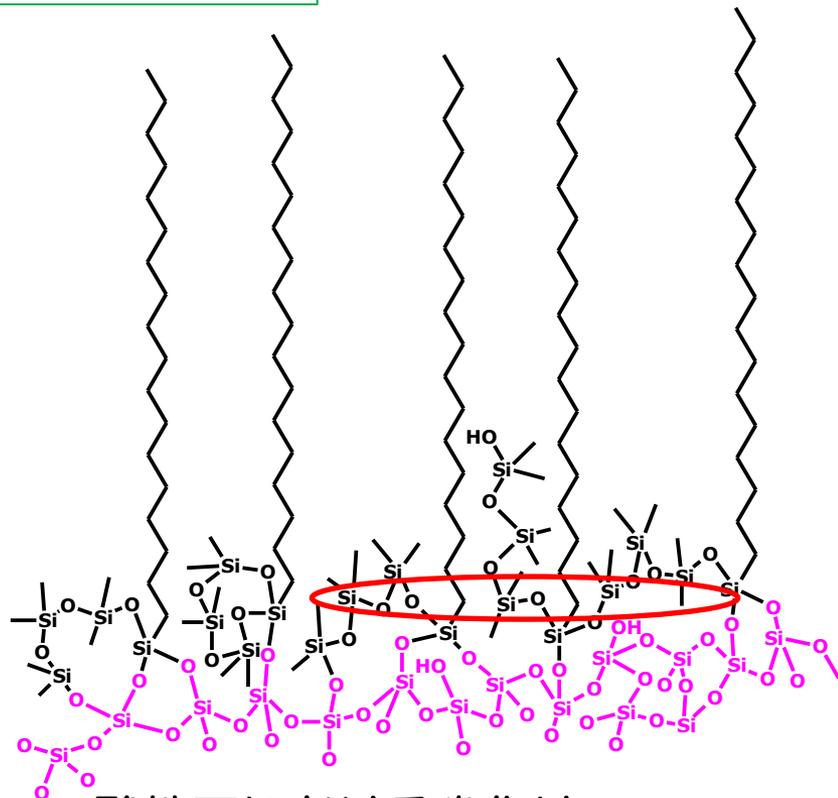
原因

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



酸性下における劣化は
C18の結合部に対する加水分解



C18基やエンドキャップの脱離

アルカリでの劣化



アルカリ性下における劣化は
シリカに対する加水分解



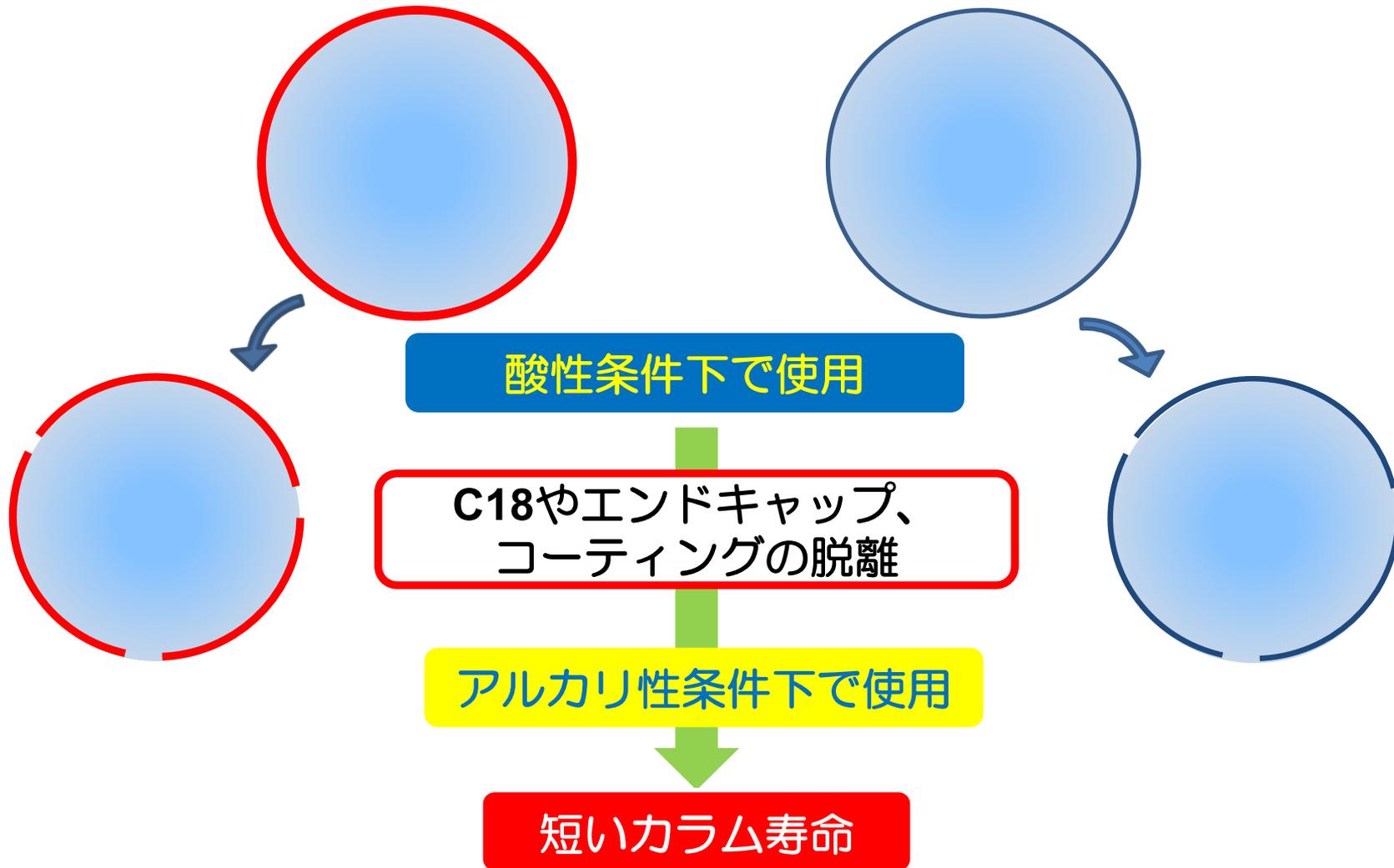
シリカの溶解



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

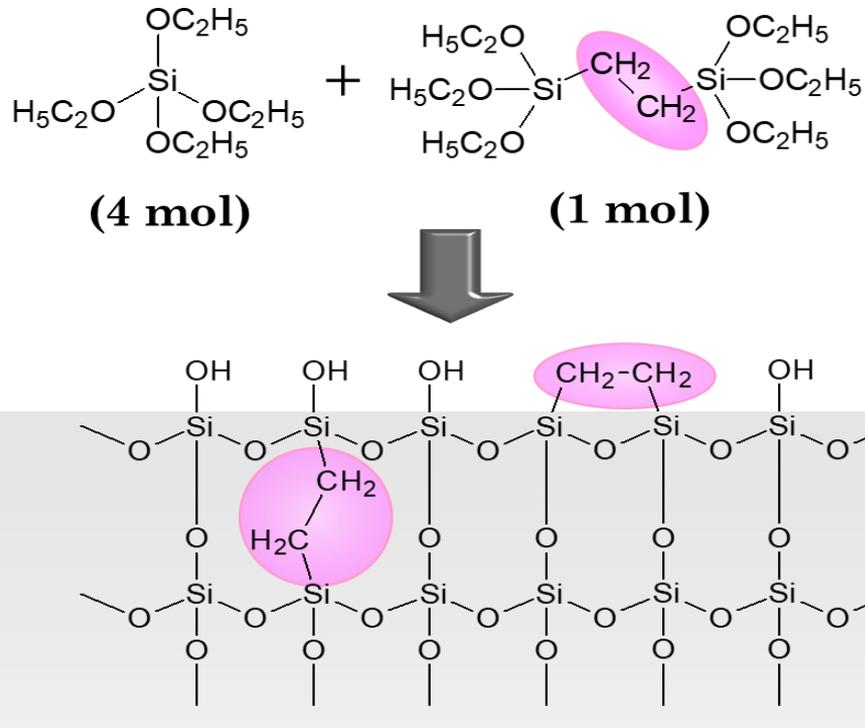
使用する塩の種類を変える

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

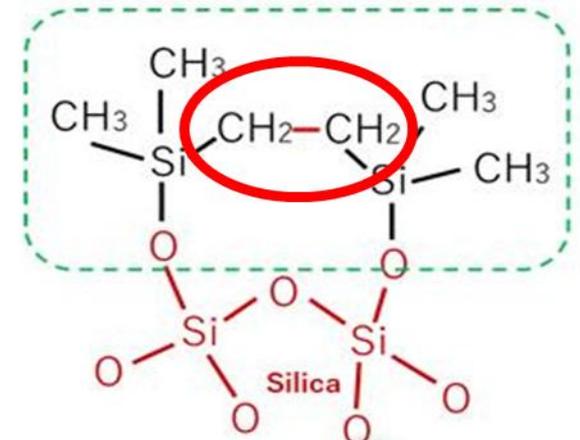
カラムを長く使うための選択肢

ハイブリッドシリカカラム

シリカゲル骨格内にエチレン鎖導入



タンデムTMS エンドキャッピング



+

両方を組み合わせた
ウルトラハイブリッドシリカカラム

SunBridge





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元に戻すことができることがある。
- ✓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。
- ✓フェニル系のカラムを使用する場合、メタノール等のアルコール系の有機溶媒を用いるほうが、特有の選択性を発現できる。
- ✓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。

HPLC column

ChromaNyk
ChromaNik Technologies Inc.

SunBridge

発売開始キャンペーン
内径4.6 mm以下の分析カラム

40% OFF

セール期間: 2025年2月1日~2025年7月31日ご注文分迄



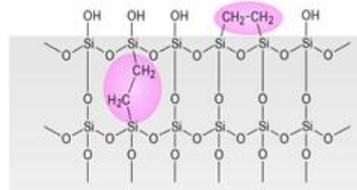
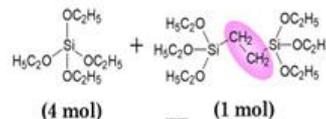
クロマニクテクノロジーズ

ChromaNyk
ChromaNik Technologies Inc.

ULTRA HYBRID C18

SunBridge C18

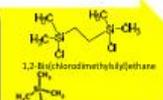
エチレン架橋シリカゲル



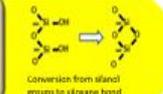
テトラエトキシランとビス(トリエトキシシリル)エタンを4:1の割合で混合しシリカゲルを合成
粒子径: 5 μm, 細孔容積: 0.8 mL/g, 比表面積: 190 m²/g,
細孔径: 15 nm

三官能性C18を結合

ダブルエンド
キャッピング

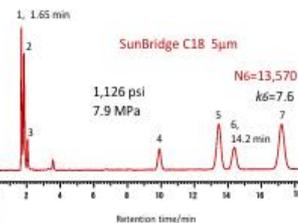
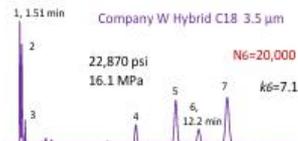


高温反応



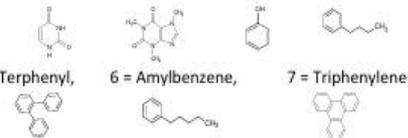
Hybrid silica gel + special end-capping

水素結合性、疎水性、立体選択性および保持時間の評価



比較対象として、シリカ骨格にエチレン鎖を組み込んだエチレン架橋シリカゲルC18であるW社製ハイブリッドC18を使用しました。

Column: Company W Hybrid C18 3.5 μm, 5 μm,
SunBridge C18 5 μm,
Column dimensions: 150 x 4.6 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine, 3 = Phenol, 4 = Butylbenzene,



	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)	比表面積 (m ² /g)	実質含有率
W社 Hybrid C18 3.5 μm	0.38	1.54	1.33	185	17.4%
W社 Hybrid C18 5 μm	0.39	1.52	1.33	188	18.0%
SunBridge C18 5 μm	0.42	1.54	1.32	190	16.1%