

いまさら聞けないカラムの疑問？C18もHILIC
もHPLCカラムのあるあるはこれで解決！
HPLCカラムのノウハウとトラブル対処

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>



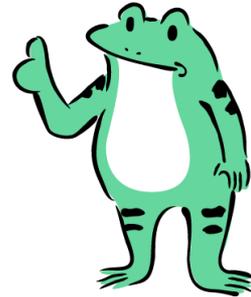
ドラブル発生！どうする？

対処する場合は・・・

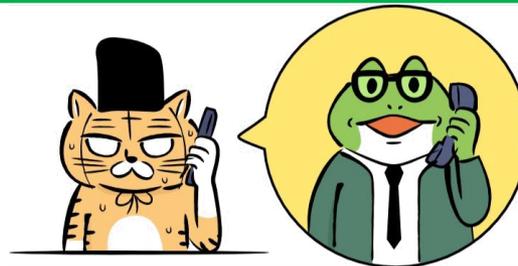
経験を元に対処



ネットで検索

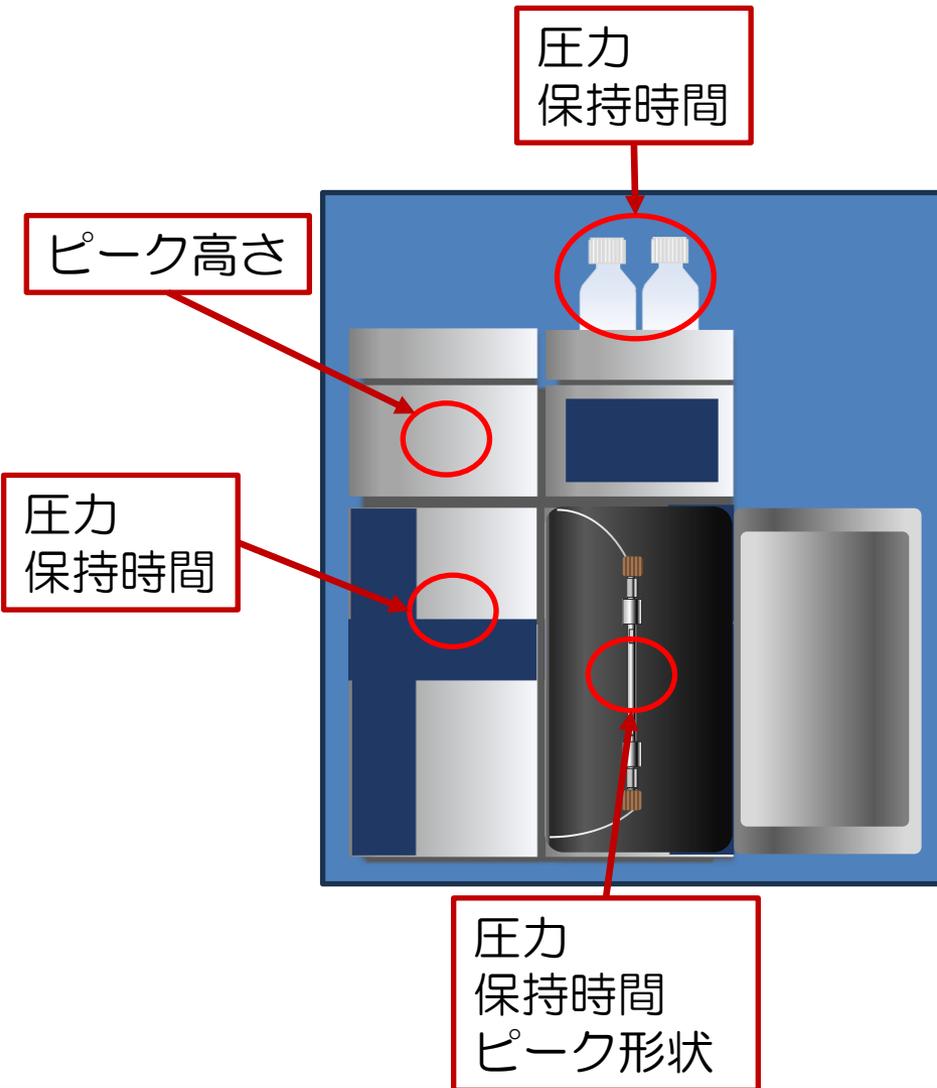


メーカーに質問



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

※場合によっては、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のオフとなる
設定になっていた



ピーク形状が...

原因

残存シラノールによるテーリング
金属配位等によるテーリング
サンプルの過負荷
拡散によるピーク幅の広がり(ピークが太い)
カラムの劣化
吸着物質の影響

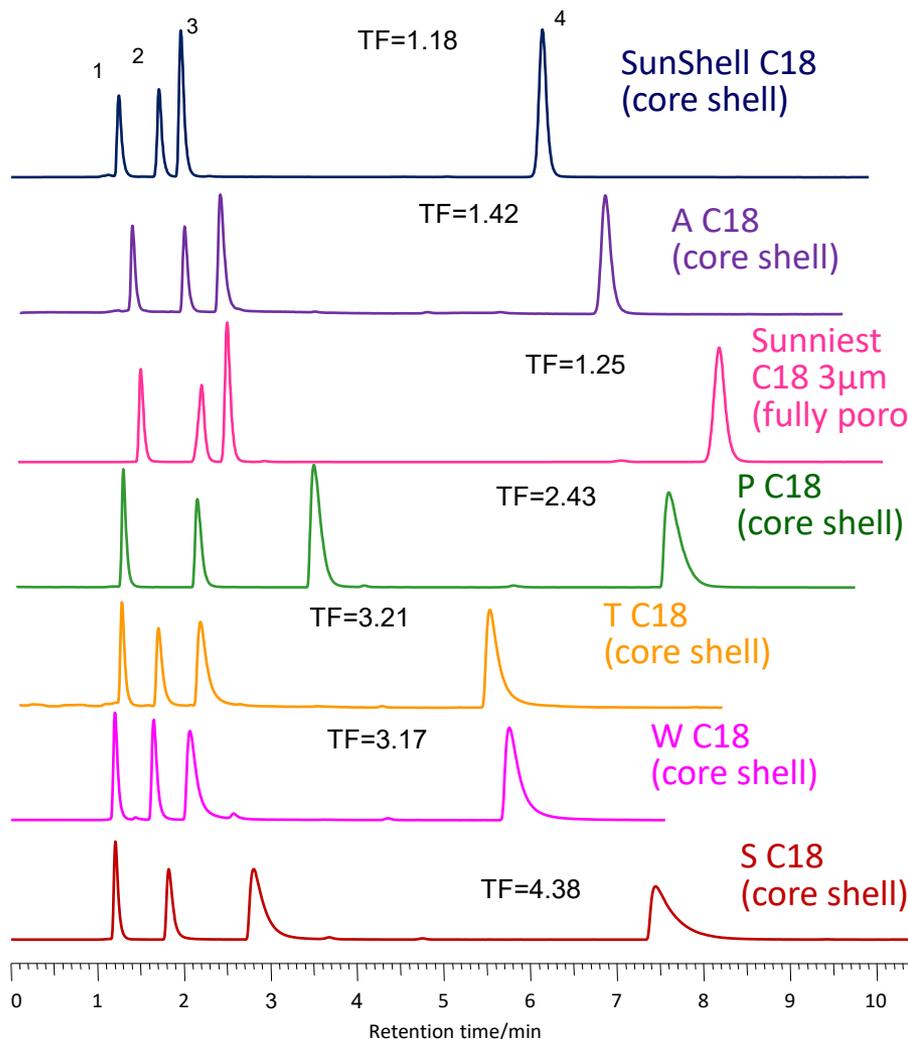
原因によって対処法は様々



原因の特定が重要



残存シラノールの影響



Sample: 1=Uracil, 2=Propranolol, 3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline

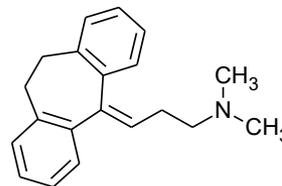
Mobile phase: Acetonitrile/**20mM phosphate buffer pH7.0**=(60:40)

Column dimension: 150 x 4.6 mm, Flow rate: 1.0 mL/min, Temp.: 40°C

- 主に塩基性化合物のテーリングの原因
- メーカーによって差がある

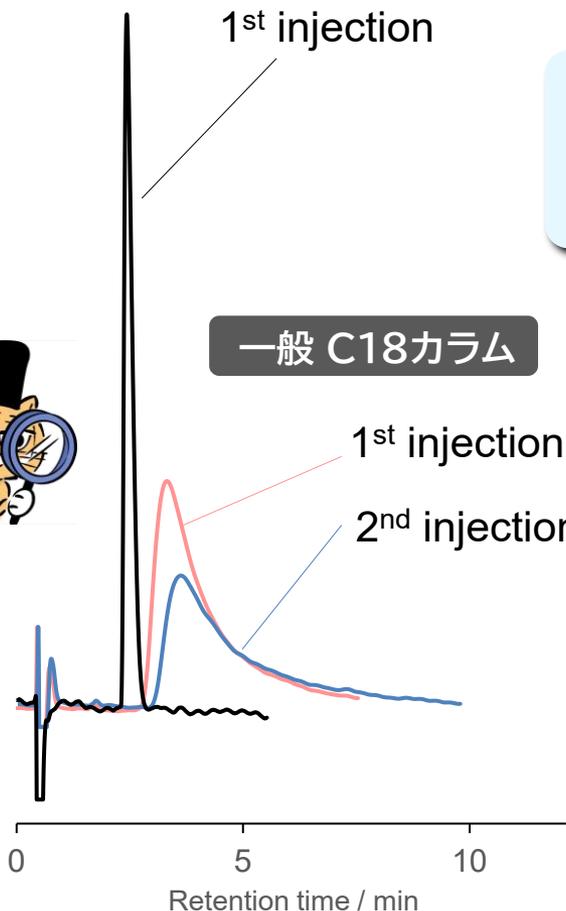


- メーカーの違うカラムに変える
- メタノールを使う



金属配位の影響

不活性化 C18

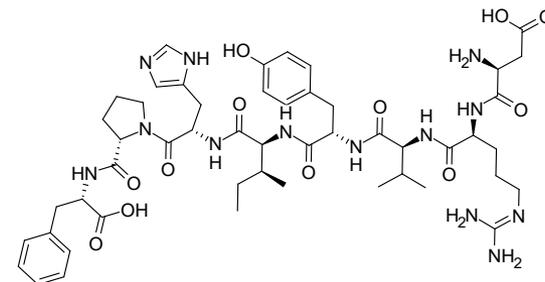


イオンペア効果を有するTFAを添加すればペプチドピークは改善するが、LC/MSにて**イオン化抑制**が生じるなどの問題がある。

Column: SunShell Peptide C18 , general C18
 Column dimension: 2.1 x 50 mm, 2.6 μm
 Mobile phase: Acetonitrile/**0.1% formic acid in water**=15/85
 Flow rate: 0.3 mL/min,
 Temperature: 40 °C, Detection: UV@210 nm
 Sample: Angiotensin II

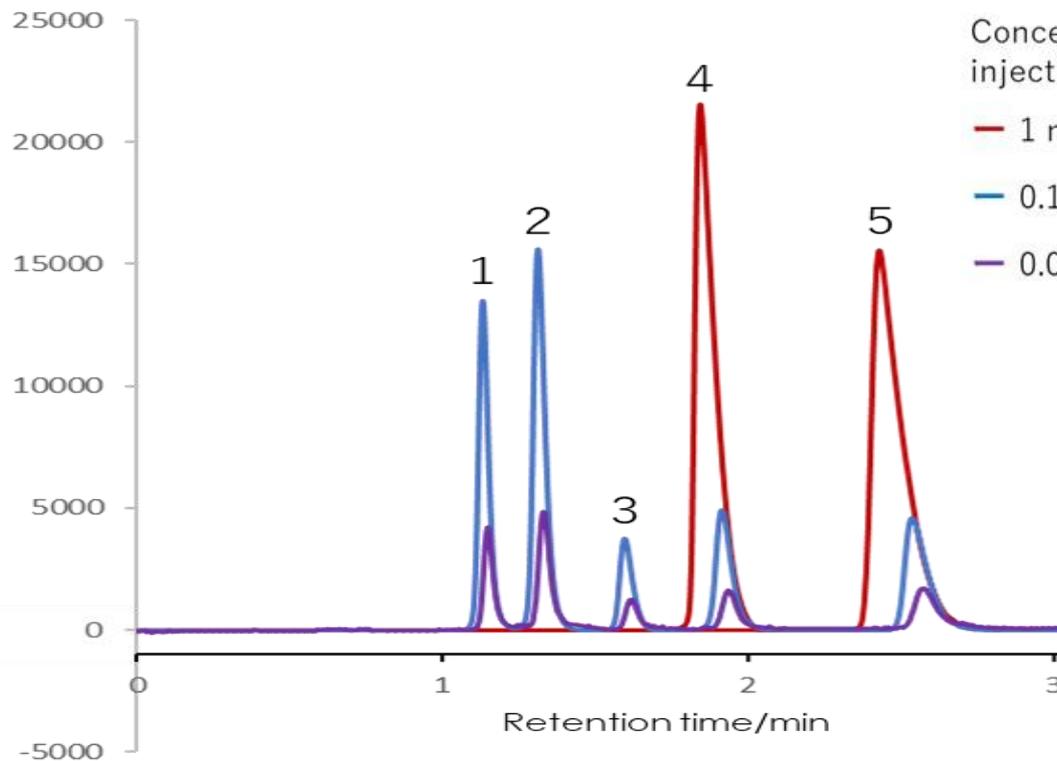
一般 C18カラム

一般C18カラムの場合、**ギ酸条件下**でペプチドピーク形状が崩れやすく安定化にも時間を要する。



金属配位対策されたカラムハードウェアをしようすることで改善

負荷量によるピーク形状の変化



Concentration and injection volume

— 1 mg/mL, 1.0 μ L

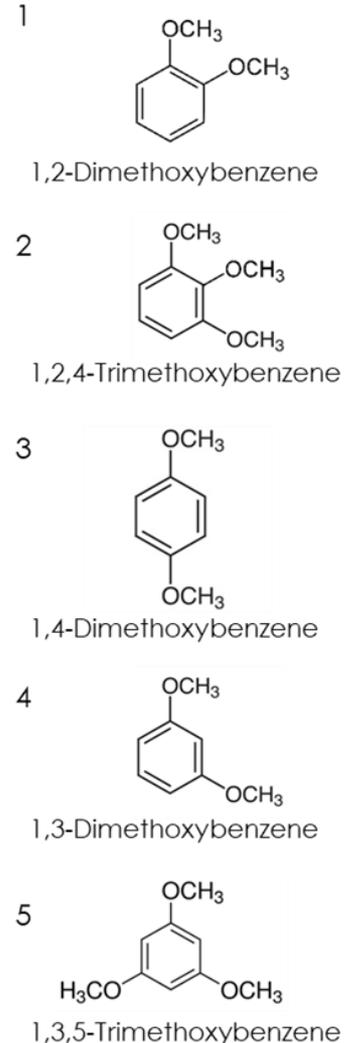
— 0.1 mg/mL, 1.0 μ L

— 0.03 mg/mL, 1.0 μ L

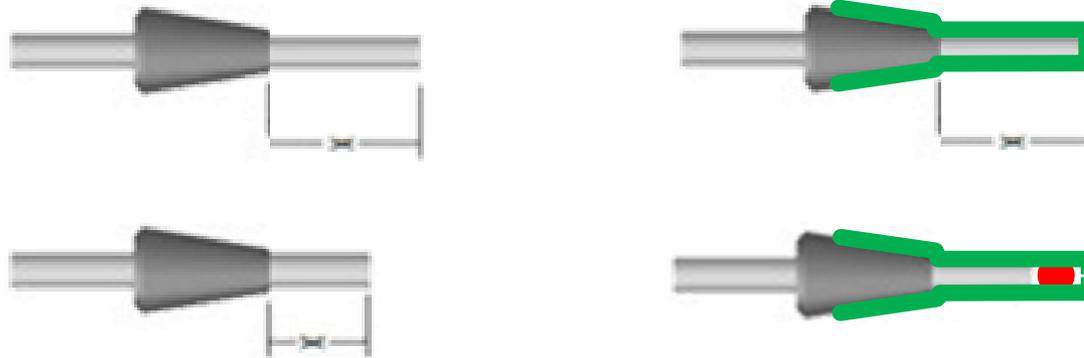
リーディングが特徴

固定相、サンプルによって差がある

負荷量を減らすことでピーク形状が改善



エンドフィッティングの違い



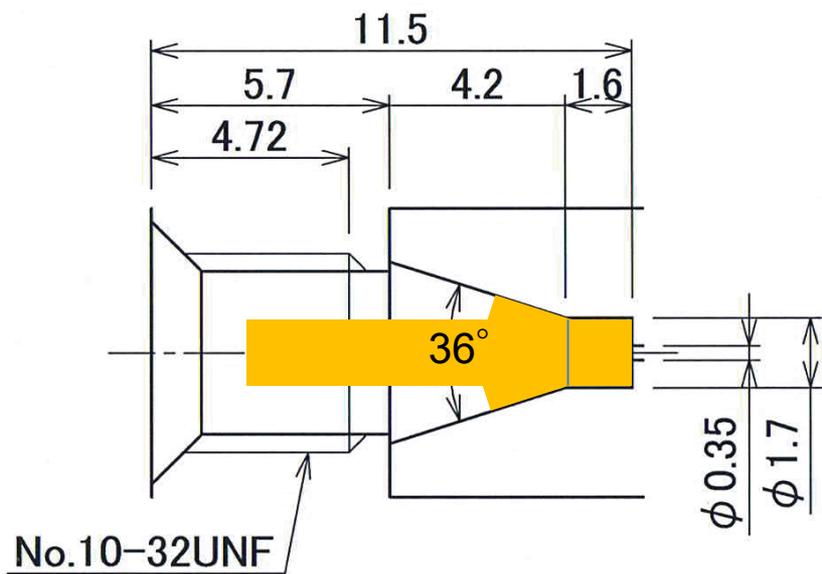
Ferrule Type	ネジ部の長さ	ポートの深さ	主な用途
WATERS	0.320"	0.130" (3.30mm)	送液系・カラム接続
SWAGELOK	0.225"	0.090" (2.29mm)	送液系・カラム接続
PARKER	0.210"	0.090" (2.29mm)	送液系・カラム接続

カラムの接続時には、注意が必要。
カラムエンドの種類を確認を・・・

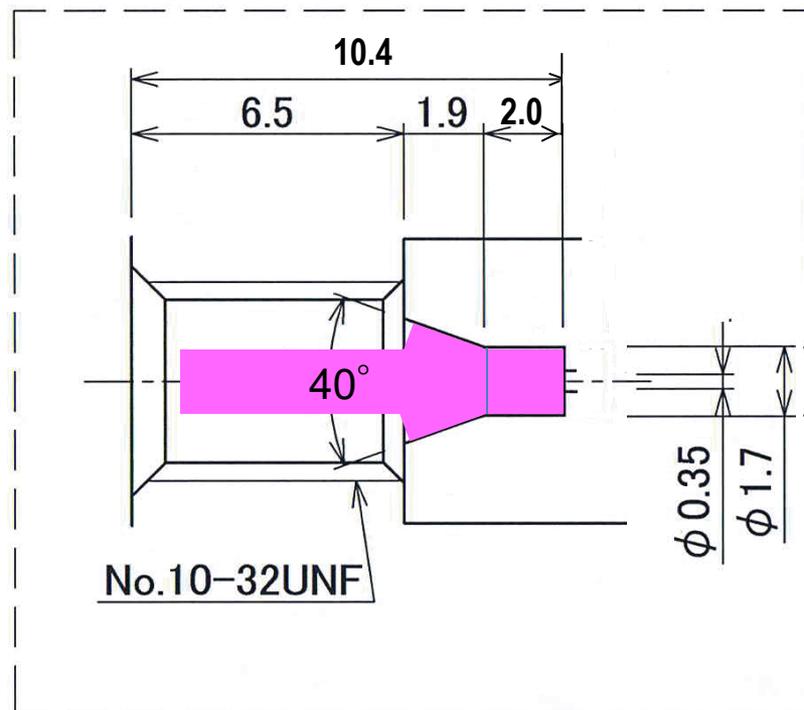


エンドフィッティングの違い2

A社 接続部



パーカータイプ 接続部
(IDEX社 IsoBar)



それぞれの接続に金属フェラルと
1/16"チューブで接続した状態

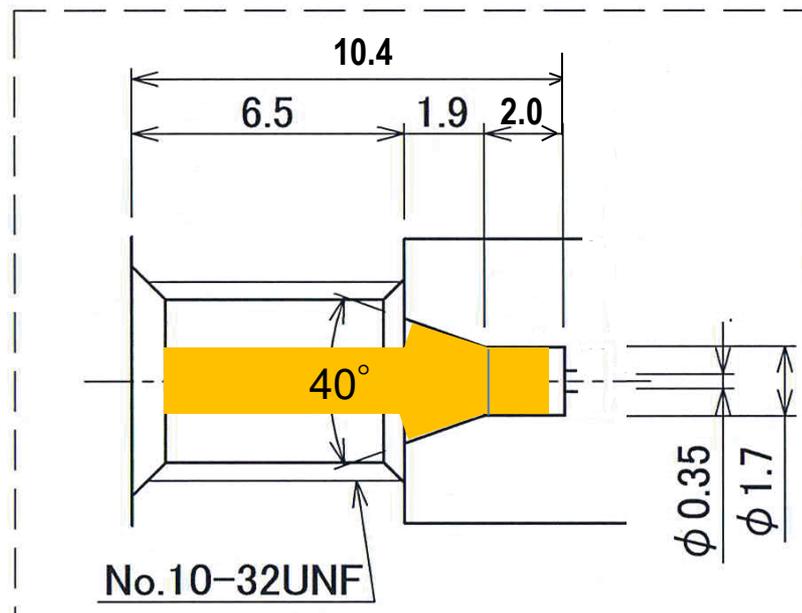
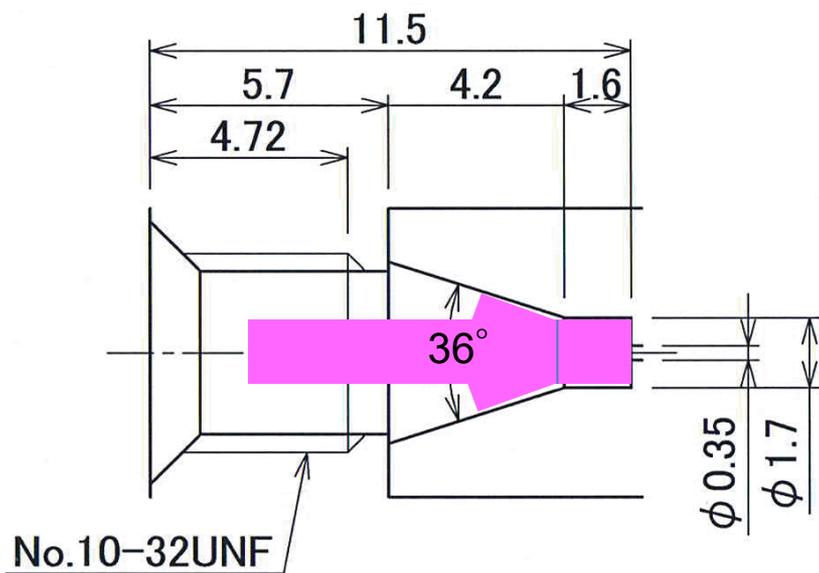


A社カラムにパーカータイプ配管を接続した場合

パーカータイプカラムにA社接続用の配管を接続した場合

A社 接続部

パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar)



A社カラム接続はテーパ角度が小さいため、フェラルの後部で締まり、デッドボリュームはできません。

パーカータイプカラム接続はフェラル先端で締まり、チューブ先端に隙間ができ、ピークが広がる。



フェラルを必要としない接続

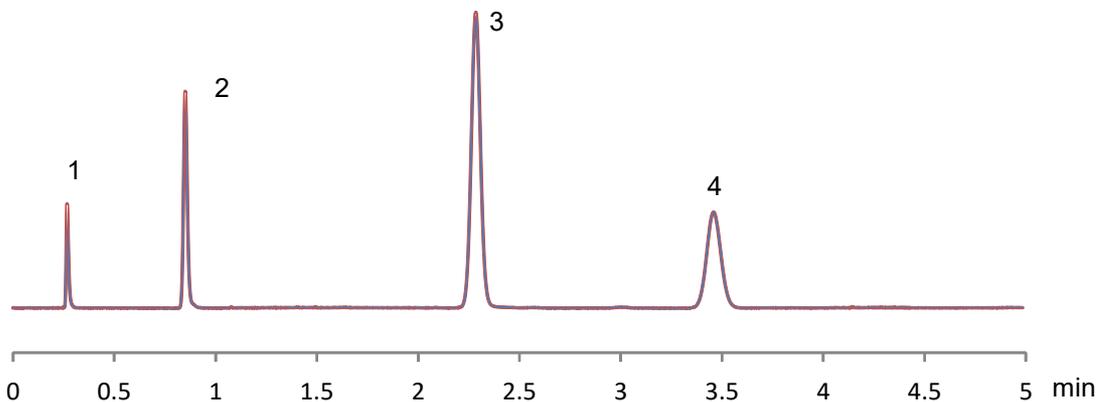
MARVEL X™

Next Generation
UHPLC Connection
Technology

耐圧：130MPa
メタルフリー対応



SunShell C18 2.6 μm, 50 x 2.1 mm



Connecting tube

Injector→Column: Marvel X, 0.075 mm i.d., 350 mm length

Column→Flow cell of UV: Marvel X, 0.075 mm i.d., 150 mm length

Column: SunShell C18, 2.6 μm 50 x 2.1 mm

Mobile phase: Acetonitrile/water=60/40, Flow rate:0.30 mL/min

Temperature: RT, Detection: UV@250 nm, Injection volume: 0.4 μL

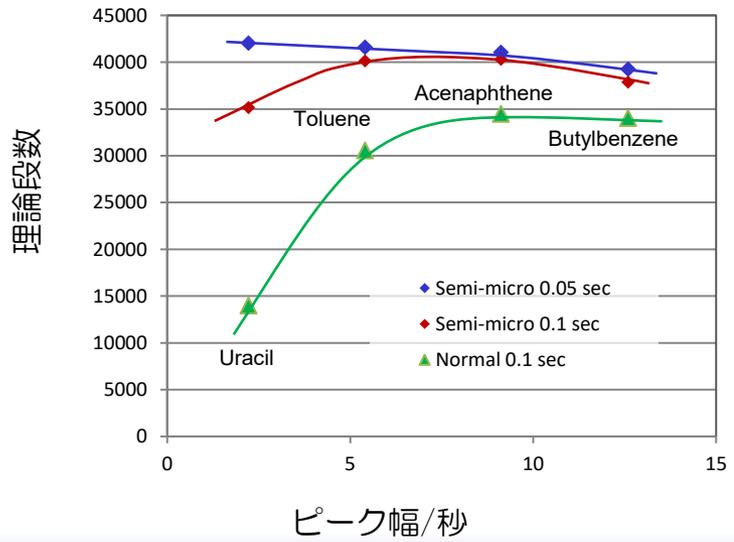
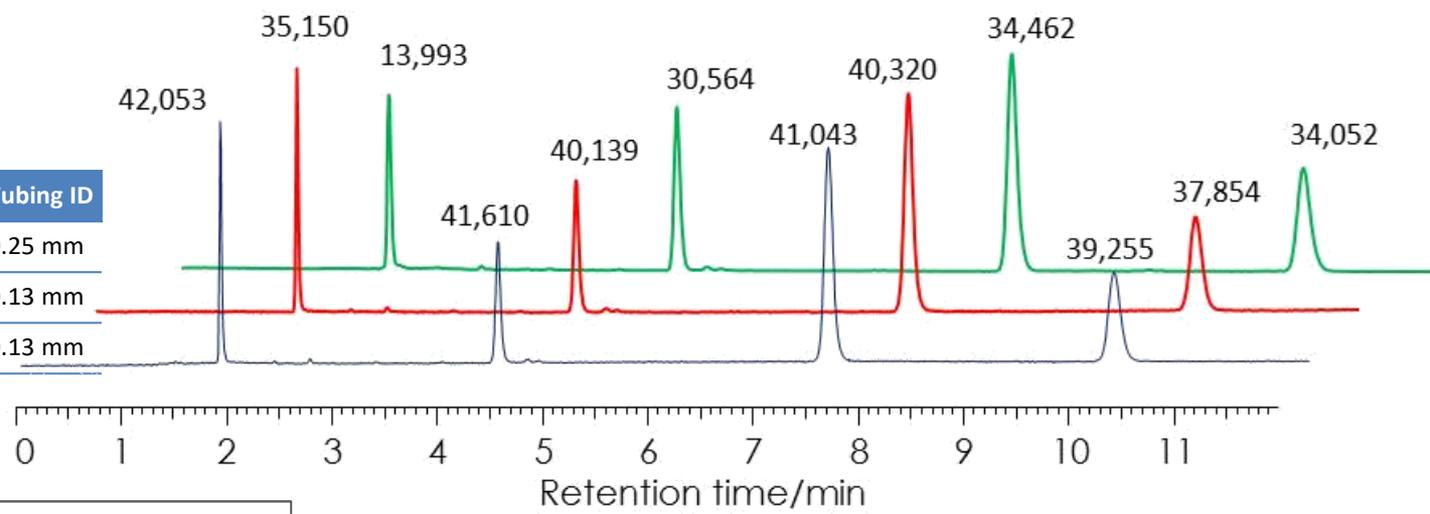
Sample: 1=Uracil, 2=Ethylbenzene, 3=Acenaphthene, 4=Butylbenzene

	Peak No.	SUS	Marvel X
Efficiency	1	1107	2614
	2	6852	10146
	3	10976	11907
	4	10768	11129
Tailing factor	1	0.939	0.913
	2	1.320	1.210
	3	1.057	1.037
	4	1.041	1.051
Peak width, h _{0.5} (min)	1	0.0201	0.0124
	2	0.0246	0.0199
	3	0.0513	0.0493
	4	0.0783	0.0772



通常仕様とセミマイクロ仕様のHPLCの比較

Flow cell	Response	Sampling	Tubing ID
Normal 13 μ L	0.1 sec	0.4 sec	0.25 mm
Semi-micro 3.2 μ L	0.1 sec	0.4 sec	0.13 mm
Semi-micro 3.2 μ L	0.05 sec	0.05 sec	0.13 mm



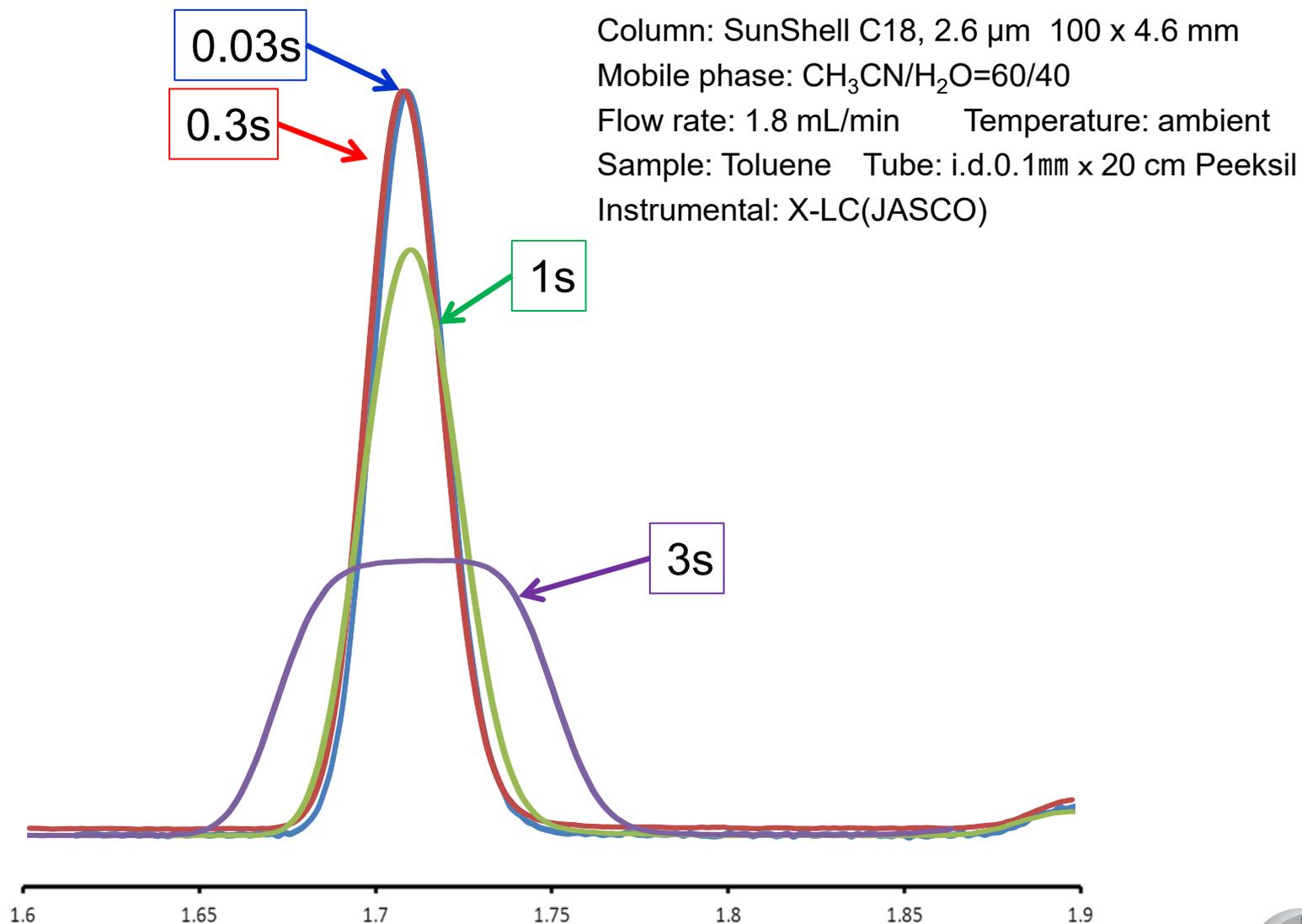
Column: SunShell C18, 5 μ m 250 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O= 70/30
 Flow rate: 1.0 mL/min,
 Temperature: 40 °C
 Pressure: 6.7 MPa
 Detection: UV@250 nm
 Sample: 1 = Uracil
 2 = Toluene
 3 = Acenaphthene
 4 = Butylbenzene



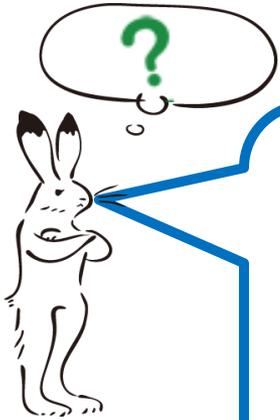
HPLC: Hitachi LaChrom ELITE



検出器レスポンスタイムの影響



カラム洗浄



逆洗浄して良いの？

何を流せば良い？

グラジエントで有機溶媒100%にしてるけど・・・

などなど

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

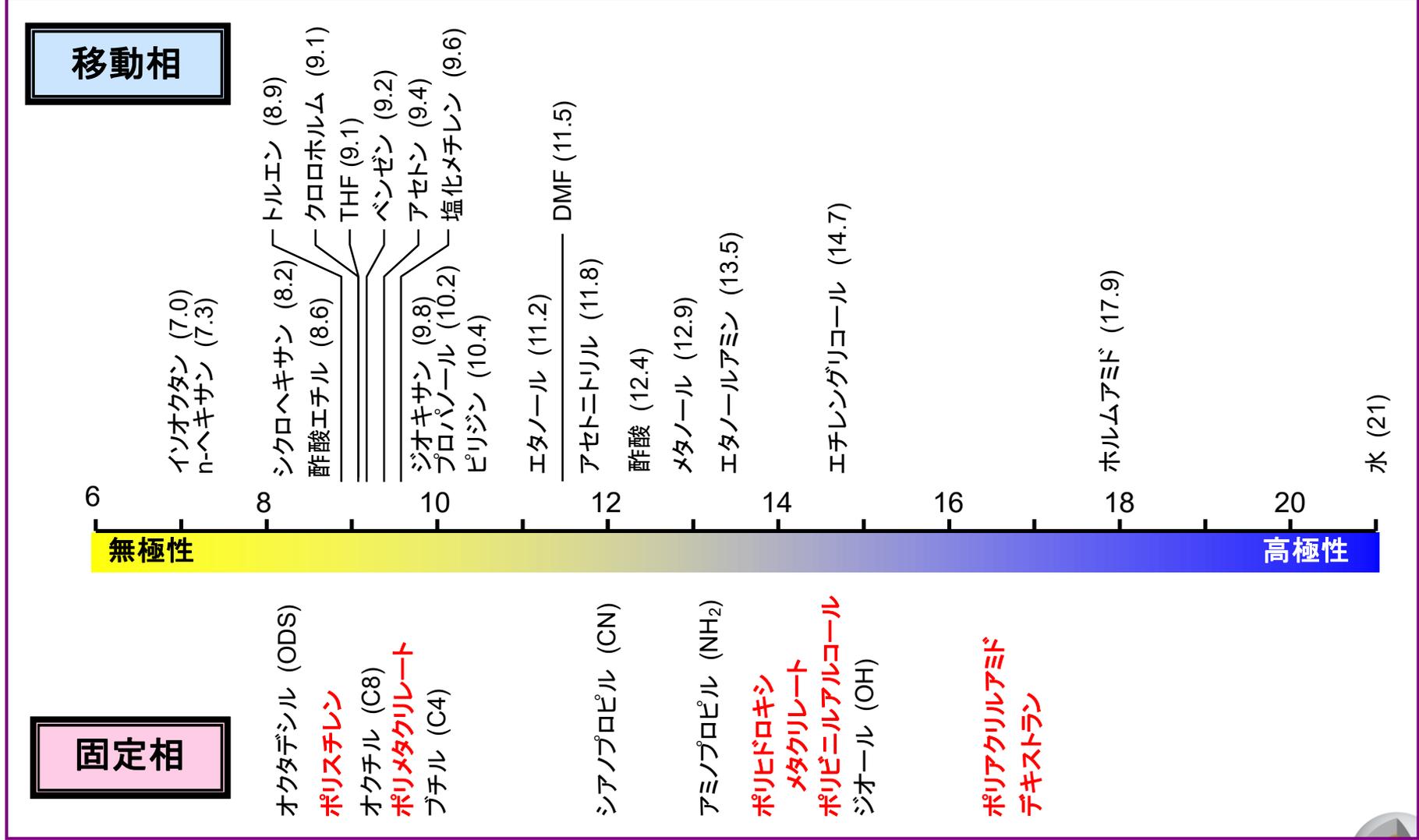
- カラムにおける溶出力の強い溶媒を選択
- ※C18カラムの場合70~80%ほどテトラヒドロフラン
- 洗浄時は汚染予防のために検出器にはつながない方がよい



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



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



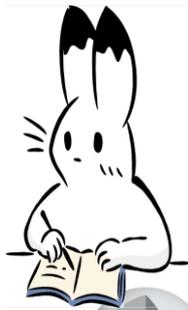
カラムの保管方法はどうかしらしい？

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

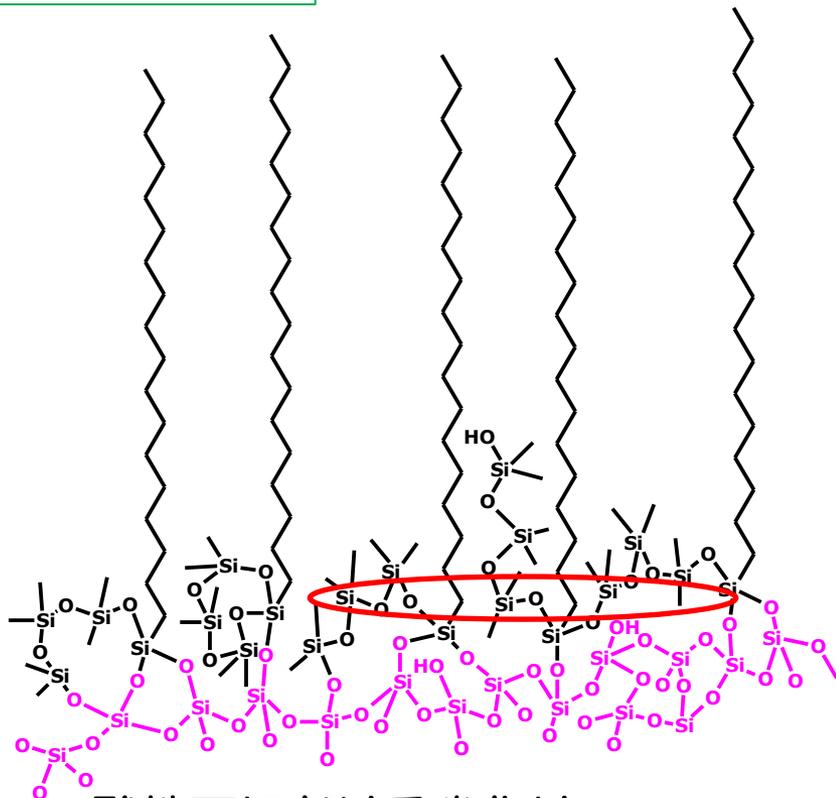




劣化の仕方の違い

酸での劣化

アルカリでの劣化



酸性下における劣化は
C18の結合部に対する加水分解

アルカリ性下における劣化は
シリカに対する加水分解



C18基やエンドキャップの脱離

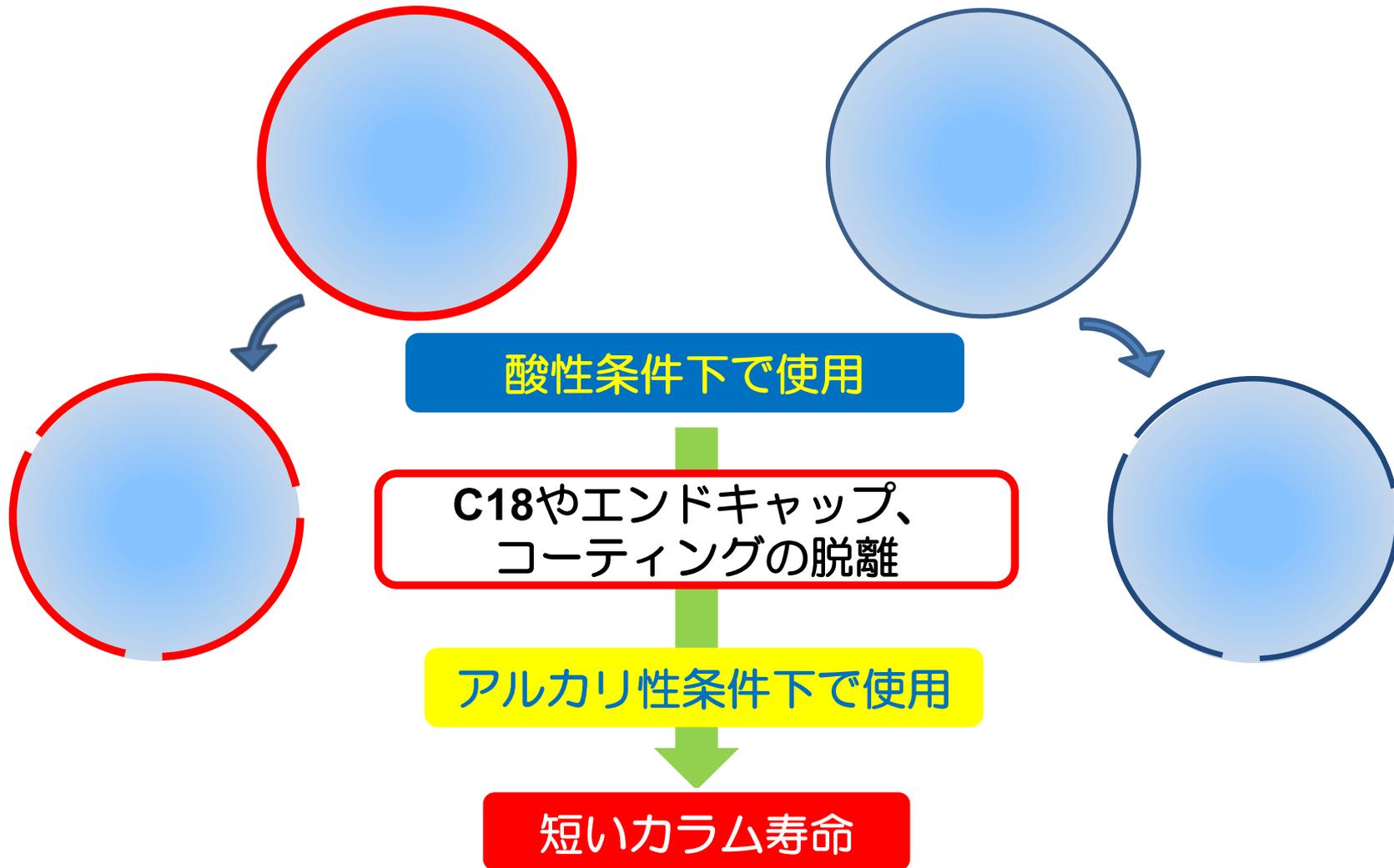
シリカの溶解



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

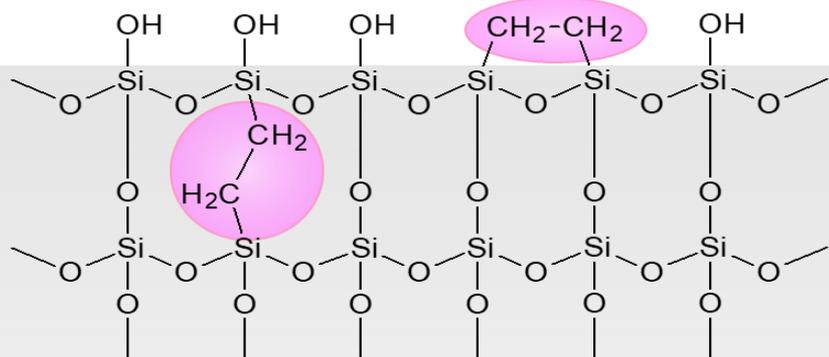
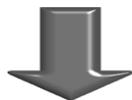
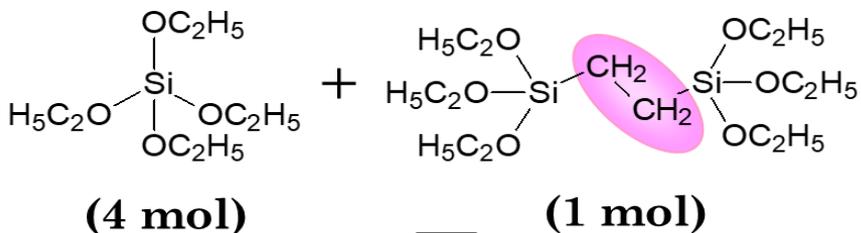
使用する塩によっても劣化の仕方が変わる。
特にリン酸系のバッファは劣化が早いと言われている



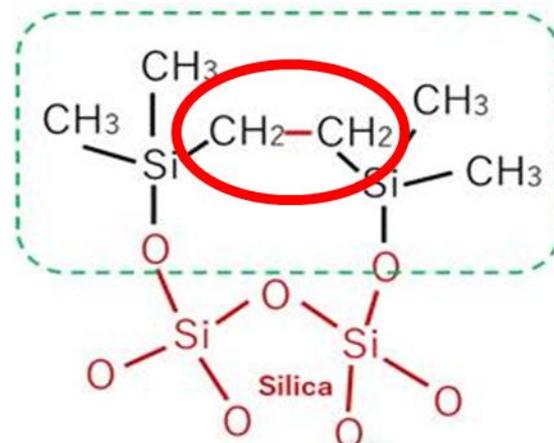
カラムを長く使うための選択肢

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



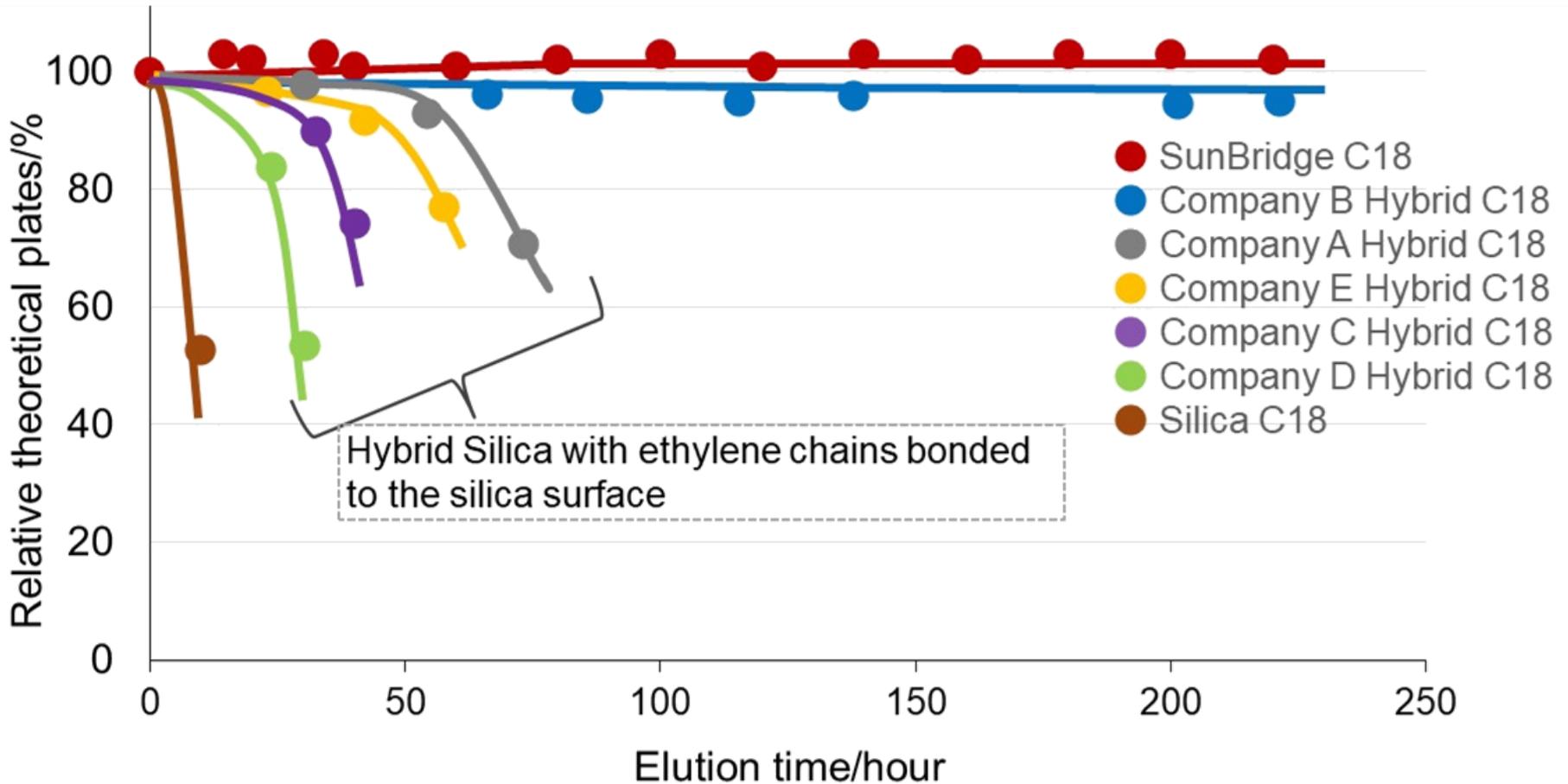
+

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



アルカリ条件下での耐久性



耐久性試験条件 (pH 11.5)

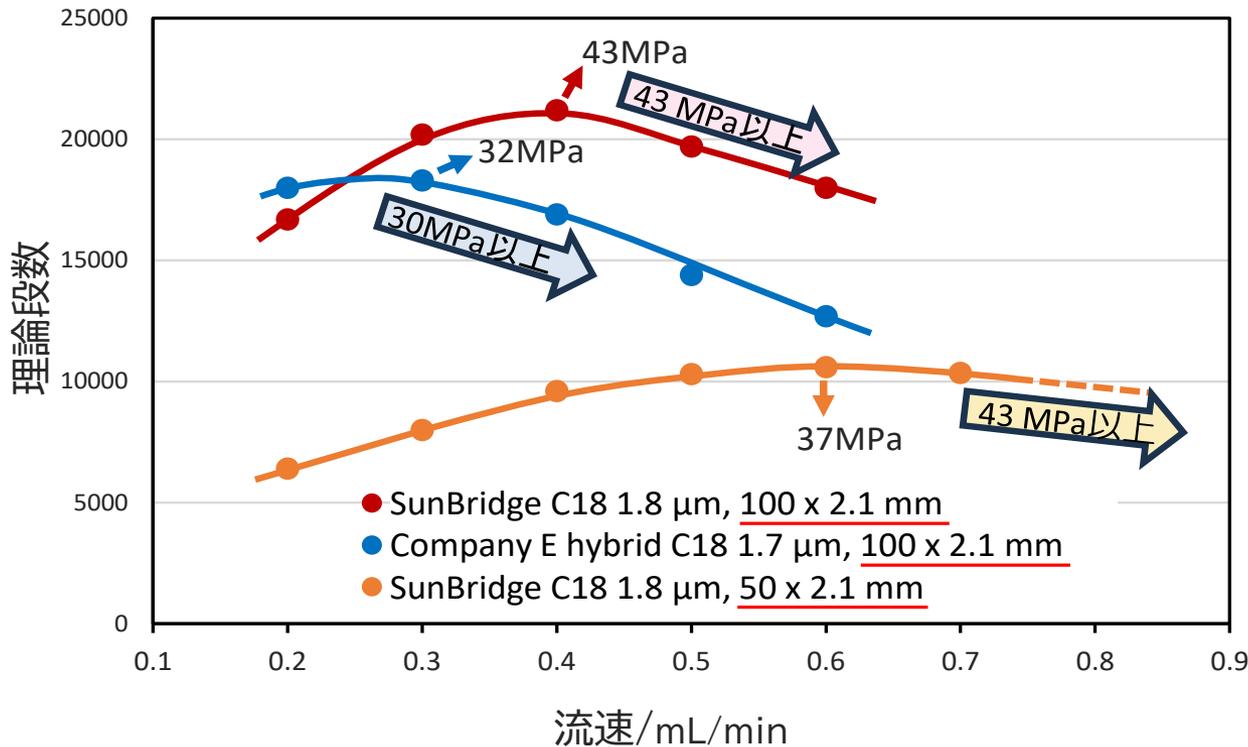
Column dimension: 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Methanol/50 mM potassium phosphate pH 11.5=10/90

Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C



高流速・高圧力条件下での摩擦熱の影響



Column: SunBridge C18 1.8 μm
Company E hybrid C18 1.7 μm
Column dimension: 100 x 2.1 mm and
50 x 2.1 mm
Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40
Temperature: 40 °C
Sample: Acenaphthene for 100 mm length,
Butylbenzene for 50 mm length



一定以上の圧力に達すると理論通りの
段数にならない

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・・・ などなど



HILICはどれも使いづらい

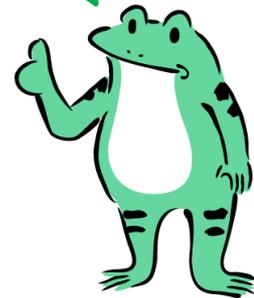
実際・・・

**逆相系と比べるとHILICは扱いが難しい
 (注意点が多い)**

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



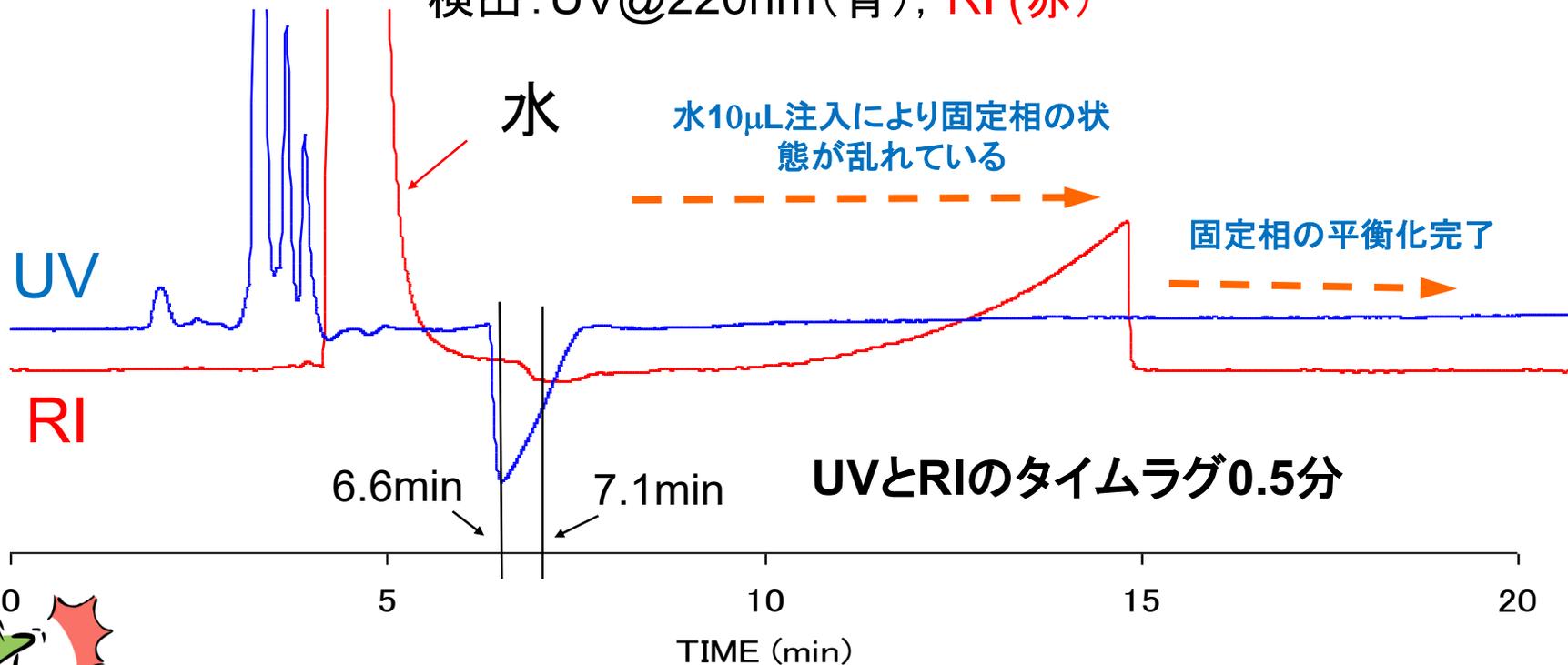
UVで見てるけどそんなことはないけど



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

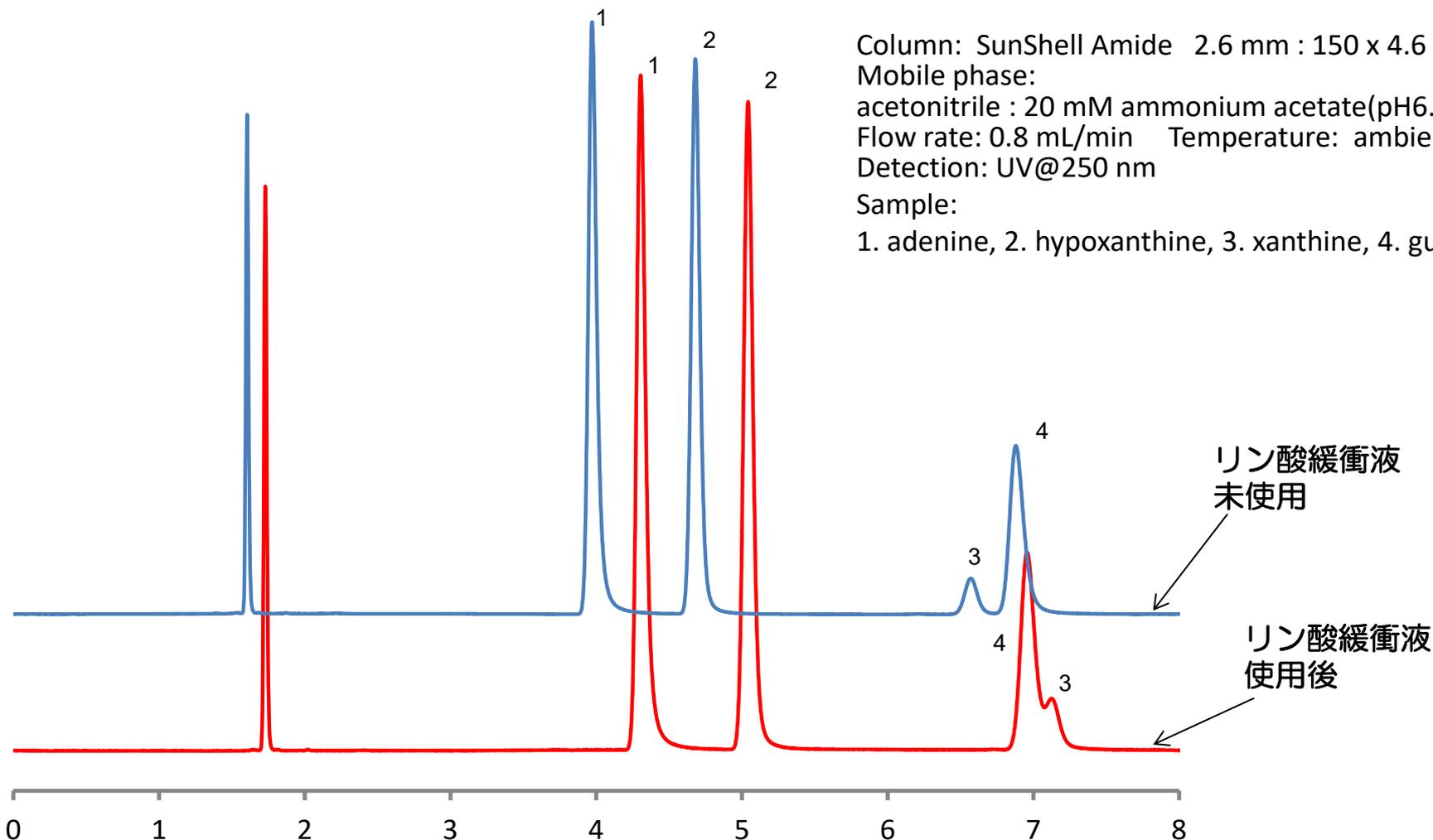
acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15

- 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

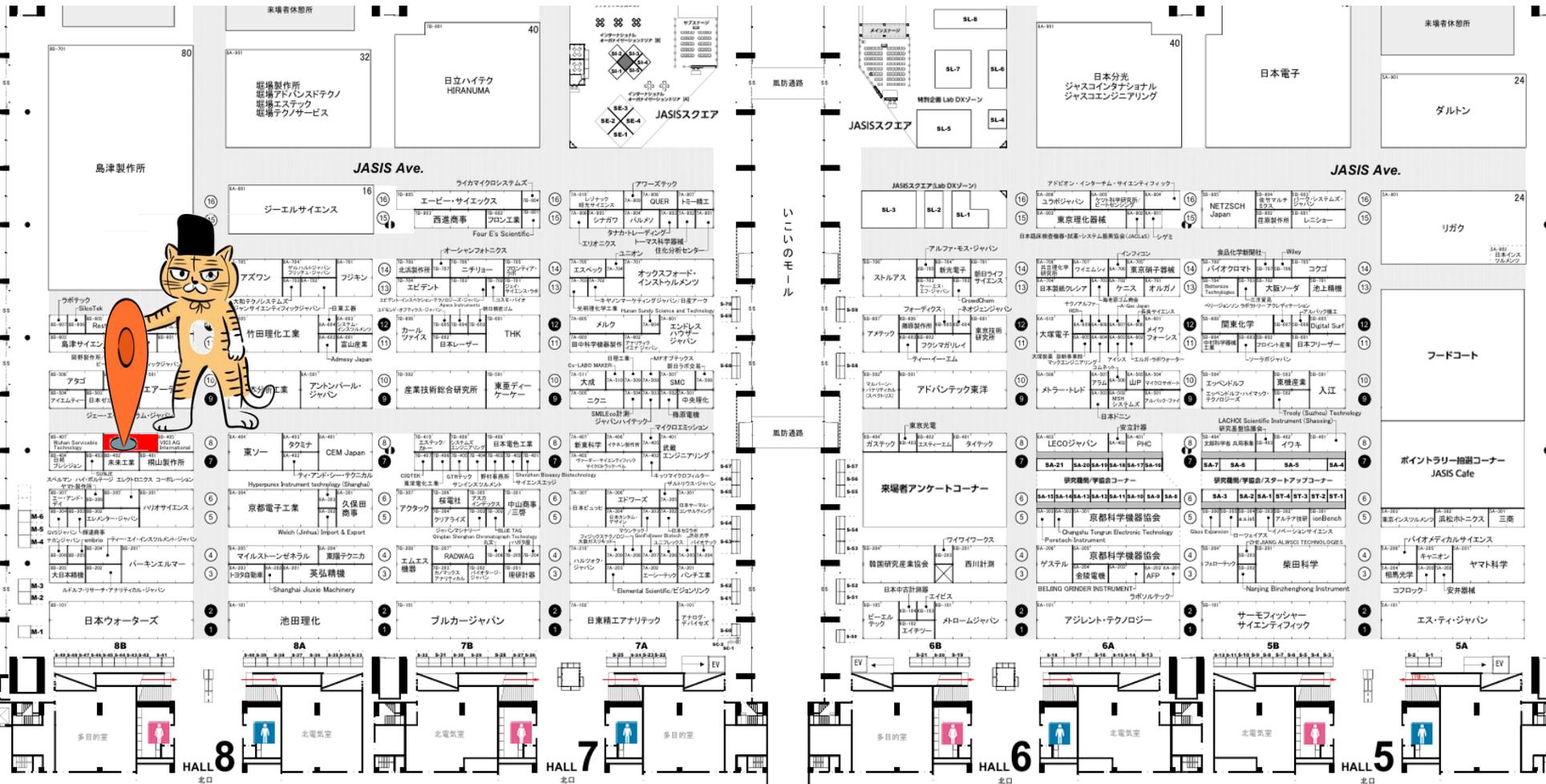


移動相の使用履歴によってはその影響が強く残り分離が変わることがある



まとめ

- ✓ピーク形状が変化する要因は多々あり、その原因を見極め、その原因に沿った対応が必要となる
- ✓カラム接続時は、使用するカラムの形状に注意する。場合によっては、フェラルを使用しない固定法を使うのも効果的である。
- ✓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。
- ✓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。



8ホールにブース(8B-406)があります
 ご興味がありましたらぜひお越しください
 カラムに関するご相談等もお申し付けください