

第21回クロマトグラフィーシンポジウム P-26

C18充填剤の水移動相条件下での細孔からの移動相の抜け出しについての評価

(クロマニックテクノロジーズ)

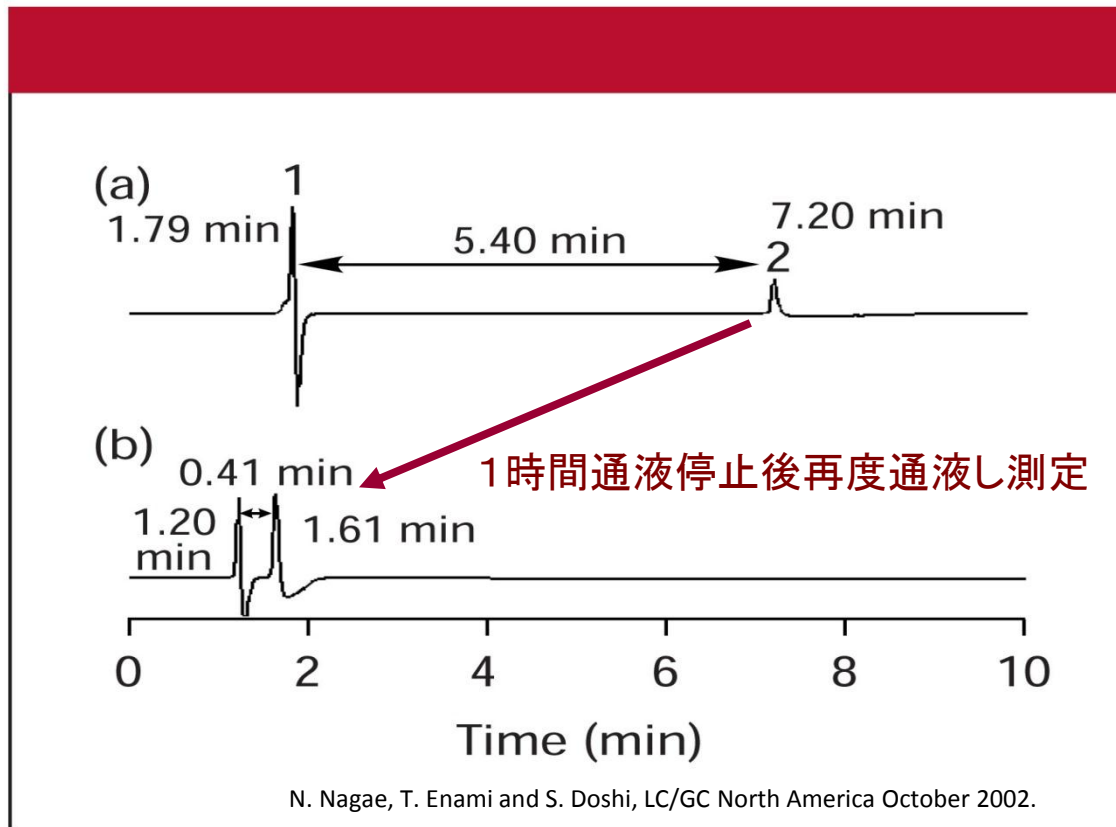
○長江徳和、塚本友康

TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>

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

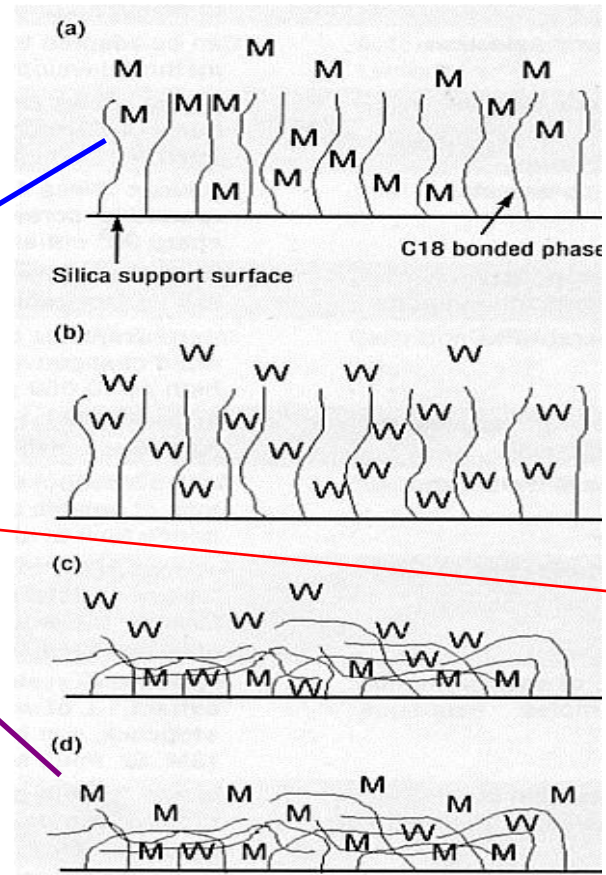
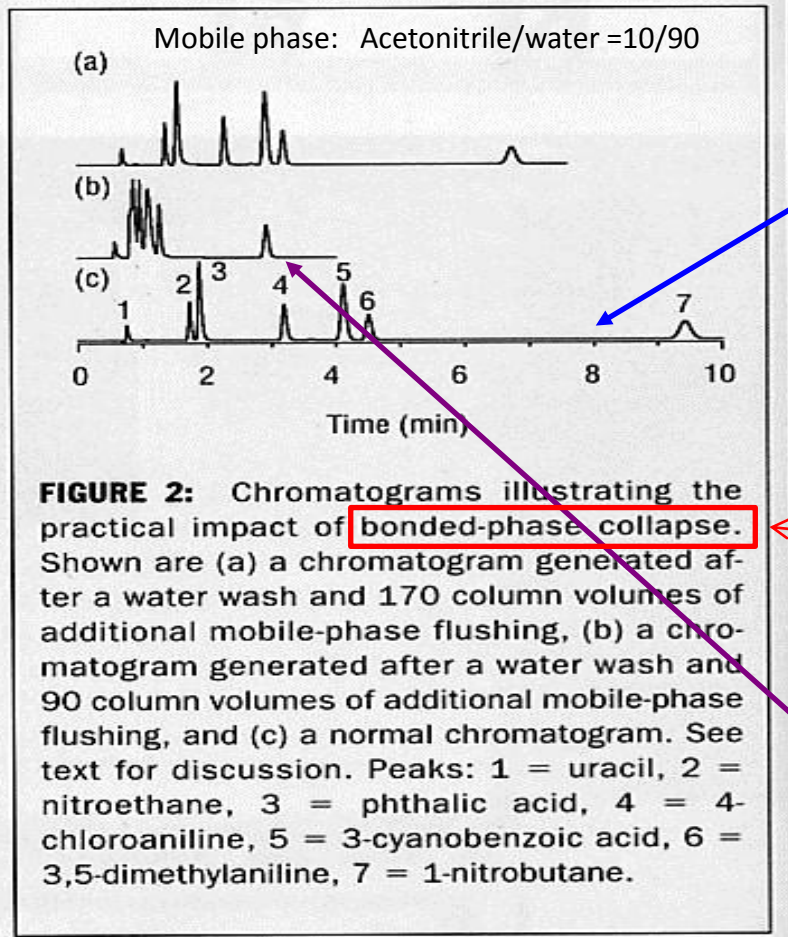
試料: 1. 亜硝酸ナトリウム
2. 2-プロパノール

保持時間: 5.40minから0.41minに減少 → 再現性がない

以前のアルキル基の寝込みによる説明

真実とは程遠い! ?

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。

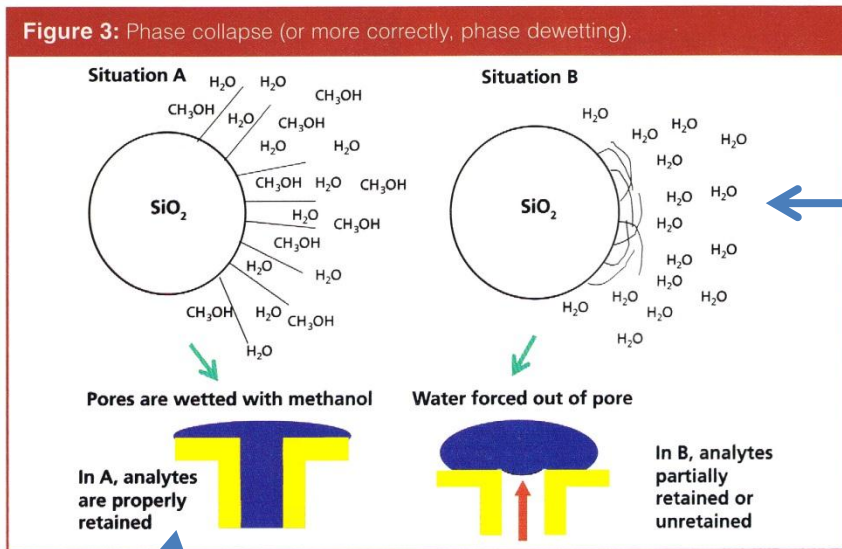
水でカラムを洗浄すると, アルキル基は寝込んでしまう。これをBonded-phase collapseと表現している。

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

Figure 3. Phase collapse (or more correctly, phase dewetting)



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。

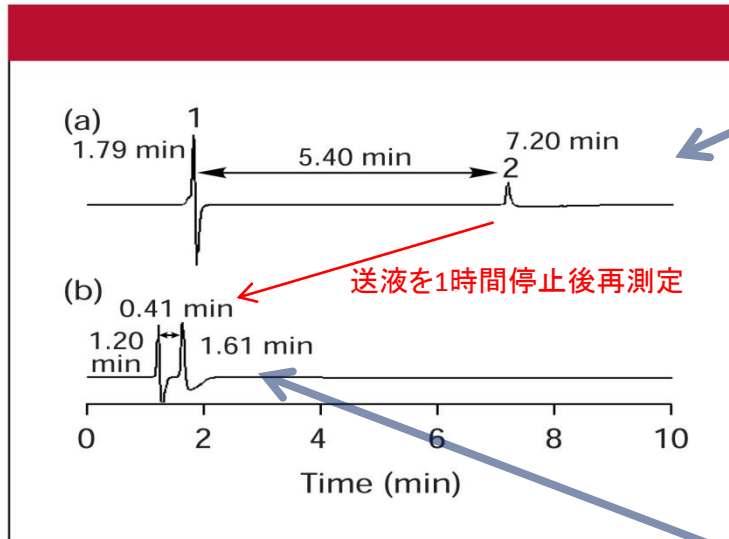
Doubtful description!?

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?

疑問その1



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。

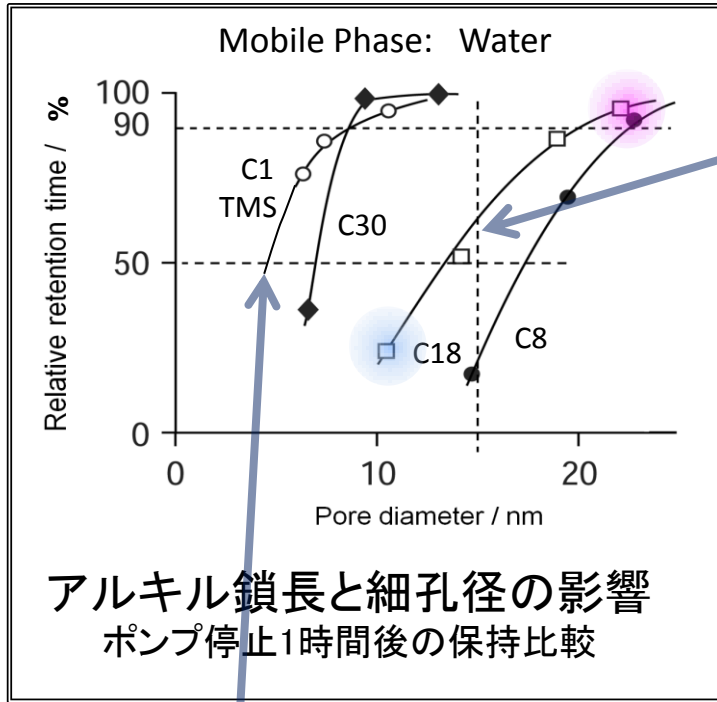
ポンプを1時間停止後、再通液すると保持は減少している。ポンプを停止すると、または充填剤に圧力がかからなくなると、C18アルキル基は寝込むのか？ この状態では移動相は充填剤細孔内から抜け出ている。

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細孔内から抜け出そうとする圧力の方が勝り、水移動相は抜け出してしまう。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なく、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。

N. Nagae, T. Enami and S. Doshi, LC/GC North America October 2002

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

疑問その2



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

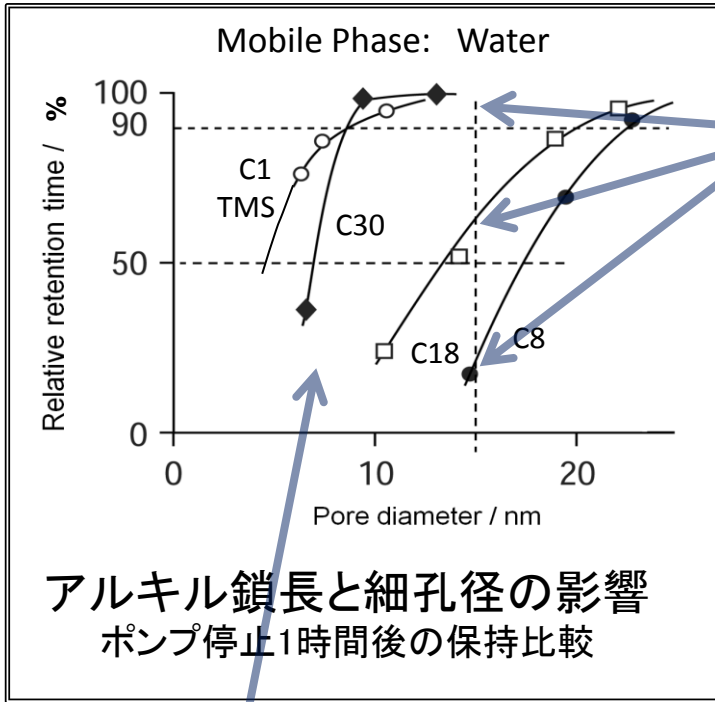
細孔径10nmのC1(TMS)はポンプ停止後も保持時間の減少はないが、細孔径が小さくなると保持時間は減少する。C1は寝込みやPhase collapseが物理的に起こりえないが、なぜ保持時間の減少が起こるのか？

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。C1固定相の結果からも、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



アルキル鎖長と細孔径の影響
ポンプ停止1時間後の保持比較

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

全ての固定相で細孔径が小さいほど保持時間の減少度合いが大きいのはなぜか？

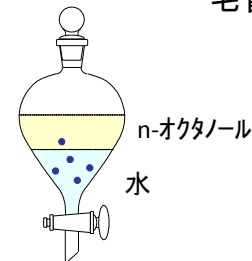
発表者の回答: 細孔径が小さいとアルキル基が寝込みやすくなることはない, そもそも水移動相では最初から寝込んでいると考えられる。保持時間の減少は毛管作用による水移動相の細孔からの抜け出しであるため, 細孔径が小さいほど, 毛細管内径が小さいほど大きな力が働き, 抜け出しやすくなる。

同じ細孔径でC8はもっとも保持時間の減少が大きくC30が最も保持時間の減少が少ない。またC18はその中間であるのはなぜか？

発表者の回答: 細孔から水移動相が抜け出す力は表面と水との接触角のコサイン値で決まる。つまり水との接触角はC8で約140度, C18で126度, C30では108度で, C8が最も大きな接触角ですので, 最も大きな毛管作用力が働く。

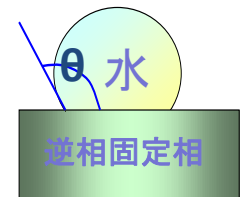
疎水性の高い固定相の方が接触角が大きく, 濡れないのでは？

発表者の回答: 疎水性はn-オクタノールと水との間の分配比のパラメーターであるのに対し, 濡れ性は接触角のパラメーターである。両パラメーターは定義が異なるため, 同一視することはできない。疎水性が高いからと言って濡れ性(撥水性)が高いとは限らない。



疎水性

毛管作用の式 $h=2\gamma\cos\theta/r\rho g$



濡れ性・撥水性

最新のC18固定相のシミュレーション

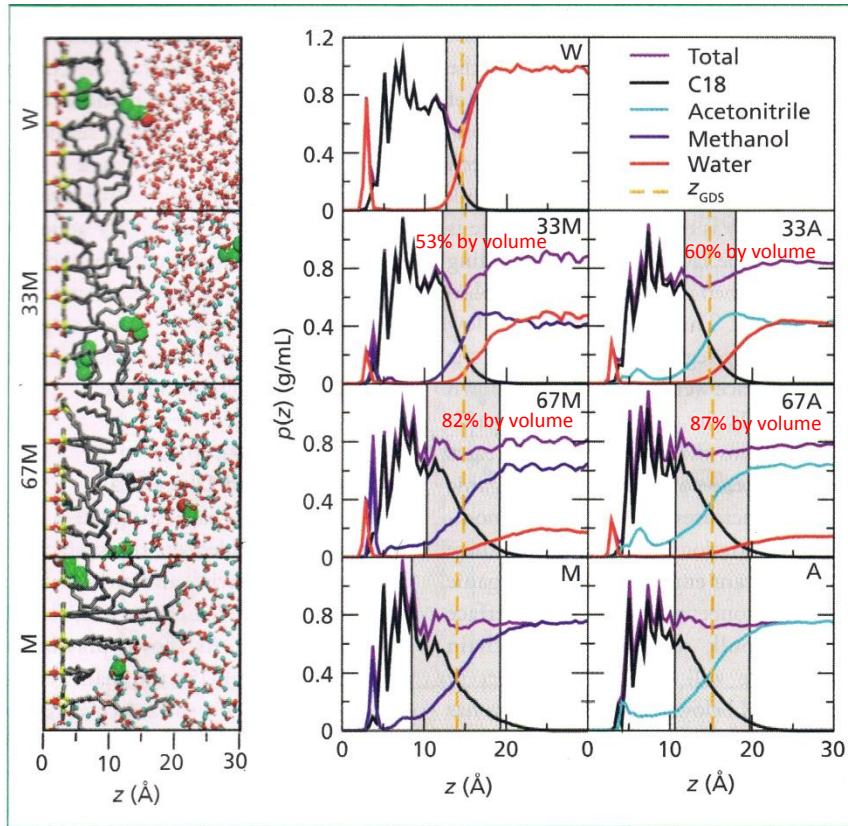
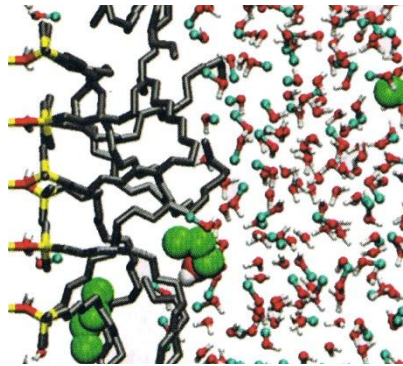


Figure 1: Left: Snapshots from simulations in different solvents, C₁₈ chains (gray), and alkane and alcohol solutes (large spheres with green, red, and white indicating CH_x, hydroxyl oxygen, and hydrogen, respectively). Middle and right: Density profiles of C₁₈ chains, methanol, water, and acetonitrile for pure water (W), pure methanol (M), pure acetonitrile (A), and solvent mixtures given as mole percent. T = 323 K, grafting density of 2.9 μmol/m². Adapted, in part, from references 4 and 14.

左図から有機溶媒0%から53%までC18アルキル基はほとんど寝込んだ状態である。有機溶媒が増えることにより、固定相との溶媒和が起こり、固定相表面に溶媒和相が形成される。しかし有機溶媒は固定相内部まで入り込むことはなく、有機溶媒100%でも10Å程度のC18の塊が存在する。オクタデカン(C₁₈H₃₈)がメタノールと混ざり合わないことから、メタノールのみの移動相であってもC18アルキル基が立ち上がり、メタノール分子が固定相内部に深く入り込むことはない。

メタノール：水(53:47)移動相



疑問その4

30%メタノール移動相を用いた場合、通常保持の変化は認められない。Phase collapseしていないのか？してても濡れているのか？

発表者の回答：30%メタノール移動相でもC18固定相には濡れてない。70%メタノールはC18固定相には濡れる。両条件でもC18アルキル基は寝込み固まっている状態である。つまり寝込み(Phase collapse)と濡れ性は無関係である。

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)

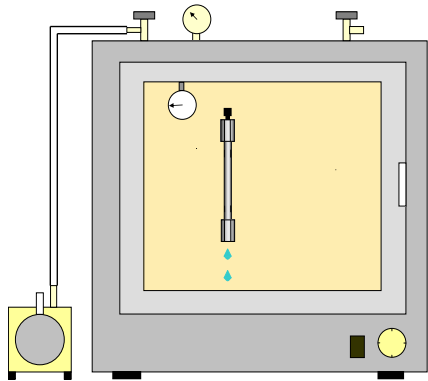
- ・30%メタノールでは全く分散していない。
(濡れないため、細孔内に溶液は入り込めない)

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。

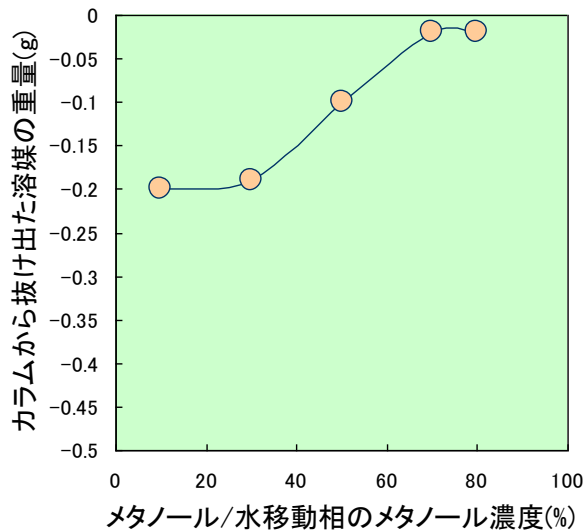
濡れ性は固定相の寝込み(Phase collapse)で決まるのではなく、移動相(溶液)により決まる。

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

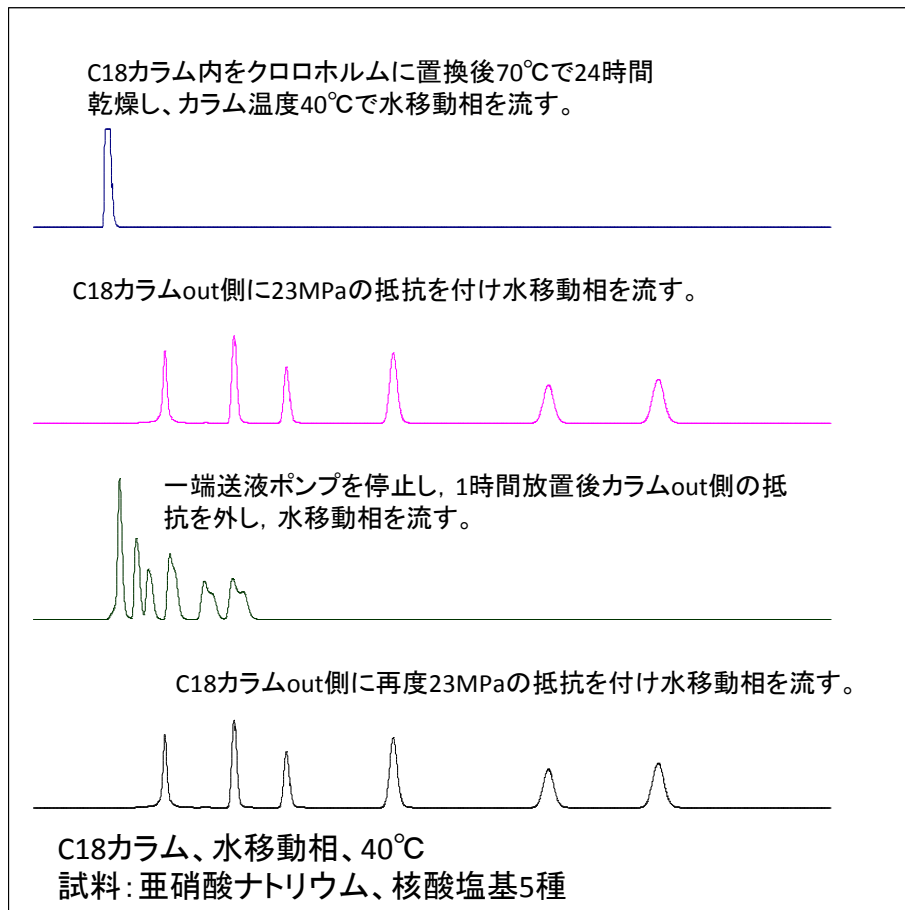


* 70%以上のメタノールをカラムに通液した場合は0.01MPaでも充填剤細孔内からの移動相溶液の抜け出しはほとんど認められず、50%以下では移動相溶液は抜け出している。

* 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、充填剤細孔内から溶液は抜け出ないが、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)場合には毛細管内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7 C18表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？



発表者の回答: 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。) 充填剤細孔内には移動相は入り込むことなく試料は保持も分離もされない。

カラムout側に、毛管作用で働く圧力を超える23MPaの背圧を加えると、水移動相は充填剤細孔内に入り込み、試料は保持し、分離される。

送液ポンプを停止し、充填剤周りの圧を大気圧まで下げると、毛管作用により水移動相は充填剤細孔内から抜け出す。カラムout側の背圧をかけない状態で再通液すると保持は減少し、分離は悪くなっている。

再度23MPaの背圧を加えると、水移動相は再び充填剤細孔内に入り込み、試料は保持し、分離される。

左図の全ての分離で、水移動相はC18固定相に濡れていない。固定相と移動相は濡れれなくても、ある界面で接していれば溶質は分配し、保持し分離できる。

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
それで, 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
しかし, 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
それで, 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

移動相	濡れ性 Wettability on C18	固定相の状態 Structure of the Bonded-Phase Chains ^a	移動相の状態1 State of mobile phase under 0.01MPa pressure	移動相の状態2 State of mobile phase under 0.1MPa pressure	移動相の状態3 State of mobile phase under 23MPa pressure	毛管作用として働く圧力 Force brought by capillarity (expelling force)
Methanol:water (70:30)	Wetting	Almost collapsed state	Keep in the pore	Keep in the pore	Keep in the pore	---
Methanol:water (50:50)	Non-wetting	Collapsed state	Expelled out of the pore	Keep in the pore	Keep in the pore	More than 0.01MPa, less than 0.1MPa
Methanol:water (30:70)	Non-wetting	Collapsed state	Expelled out of the pore	Keep in the pore	Keep in the pore	More than 0.01MPa, less than 0.1MPa
Water	Non-wetting	Collapsed state	Expelled out of the pore	Expelled out of the pore	Keep in the pore	More than 0.1MPa, less than 23MPa

a: Reported in Mark R. Schure, et al. LCGC North America 630 Volume 31 Number 8 August 2013

- ✓ 高密度 ($3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) のC18でエンドキャッピングを施した充填剤はメタノール濃度50%以下のメタノール・水移動相には濡れない。
- ✓ 濡れない場合には毛管作用により充填剤細孔内から移動相を抜け出させる力が働く。
- ✓ その時の圧力(力)が大気圧以下の場合には充填剤が移動相で濡れてなくても充填剤細孔内から移動相は抜け出さない。
- ✓ Dewetting とは『濡れてない状態になると、充填剤細孔内から移動相が抜け出すこと』であるならば、上記記述と矛盾する。背圧を23MPaかけると水移動相でも抜け出さない。
- ✓ 逆相固定相は移動相が同じ場合には、濡れている状態から濡れない状態に変化することではなく、移動相の水の比率が高くなり、移動相自身が代わることにより、初めて変化する。
- ✓ つまり、Major氏の主張しているDewettingは、科学的には的確な言葉の用法でないと考えられる。