

1) HILICカラムの上手な使い方

HILIC カラムは、普段逆相カラムを使用している方にとっては、分析条件設定が、難しく感じられることがあります。また、HILIC で使用される固定相も多種多様であることから、カラムによって使い方も異なります。ここでは、コスモシル HILIC カラムの上手な使い方を説明します。コスモシル HILIC カラムは、固定相であるトリアゾール由来の親水性相互作用(主に水素結合による)と陰イオン交換能によって、保持と分離を行います。以下をご覧ください。適切な移動相条件を選択してください。

1. 有機溶媒の種類と濃度の効果

- ・通常は、アセトニトリル / 水系の移動相を使用します。
- ・アセトニトリル濃度を高くすると保持は大きくなり、低くすると保持は小さくなります(図1)。
- ・アセトニトリル濃度は 0 ~ 95% (通常 50 ~ 95%) の範囲でご使用ください。
- ・メタノール / 水系は保持が小さくなります(図2)。
- ・有機溶媒および水は、必ず HPLC 用をご使用ください。

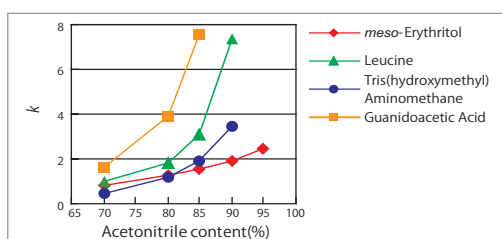


図 1. アセトニトリル濃度と保持との関係

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Acetonitrile / 10 mmol/L CH₃COONH₄

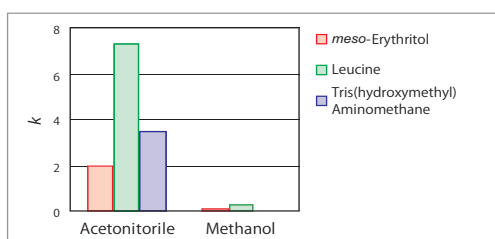


図 2. アセトニトリルとメタノールの保持力の違い

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Organic solvent / 10 mmol/L CH₃COONH₄ = 90 / 10

2. pH の効果

- ・移動相の pH は 2 ~ 7.5 の範囲でご使用ください。
- ・中性付近の pH で使用すると保持は大きくなります(図3)。

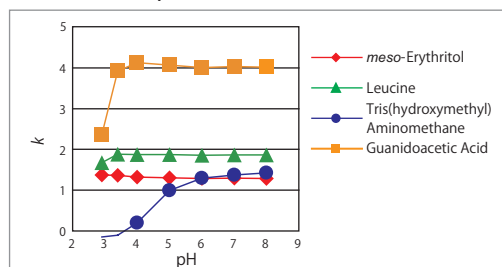


図 3. pH と保持との関係

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Acetonitrile / 10 mmol/L Buffer = 90 / 10

3. 緩衝液の種類と濃度の効果

- ・解離性のサンプルを分析する場合は、移動相に塩や緩衝液を添加する必要があります。
- ・HILIC では高濃度のアセトニトリルを移動相としますが、アセトニトリルは塩に対する溶解性が低いので注意が必要です。逆相クロマトグラフィーで汎用されるりん酸塩は溶解性が低いために HILIC で使用される場合には、アセトニトリル濃度を 70% 以下にしてください。また、使用前に移動相に塩が析出していないか、必ず確認してください。
- ・緩衝液の種類は、高濃度のアセトニトリル中でも溶解性の高い、酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムを推奨します。
- ・緩衝液の濃度は、5 ~ 100 mmol/L の範囲でご使用ください。また、アセトニトリルと混合後、塩の析出がないか確認してください。
- ・塩濃度を高くすると、イオン交換能が抑制され、保持が小さくなります(図4)。
- ・移動相に緩衝液を使用する場合は、使用前に必ず 0.45 μm 以下のフィルターでろ過してください。

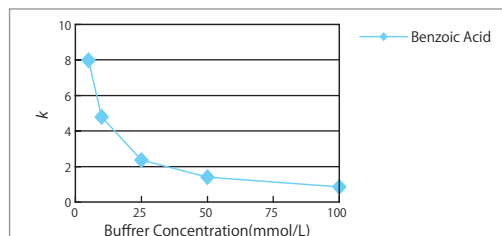


図 4. 塩濃度と保持との関係

Column : COSMOSIL HILIC
Mobile phase : Acetonitrile / CH₃COONH₄ = 50 / 50

4. 移動相選択フロー

ここでは、化合物の特性から、第一選択の移動相を提示します。保持時間の増減は主にアセトニトリル濃度で調整してください。

- ・中性化合物 → Acetonitrile / Water = 90 / 10
- ・塩基性化合物 → Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 90 / 10
- ・両性化合物 → Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 70 / 30
- ・酸性化合物 → Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 50 / 50 → 溶出しえない場合は、Acetonitrile / 10 mmol/L Phosphate Buffer(pH 7.0) = 50 / 50

5. 相互作用の使い分け

コスモシル HILIC カラムは、2つの相互作用(親水性相互作用と陰イオン交換)によって、保持と分離を行います。移動相を選択することにより、相互作用を使い分けることができます。

陰イオン交換能は塩濃度によって調整できます。塩濃度を上げることにより陰イオン交換能を抑制することが可能です。一方、親水性相互作用は、アセトニトリル濃度によって調整できます。アセトニトリル濃度を上げることにより親水性相互作用を強めることができます。

下図では、酸性化合物であるアスコルビン酸とイソアスコルビン酸の分離について示しています。4. の項で推奨している移動相(Acetonitrile / 10 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ = 50 / 50)では、陰イオン交換能が強く働き保持が生じていますが、2つの化合物間での陰イオン性の差が少ないため、分離が不十分です。そのため、塩濃度を高めて陰イオン交換能を抑え、さらに親水性相互作用を強めるためにアセトニトリル濃度を上げました。その結果、親水性相互作用によって十分な分離が達成できました。

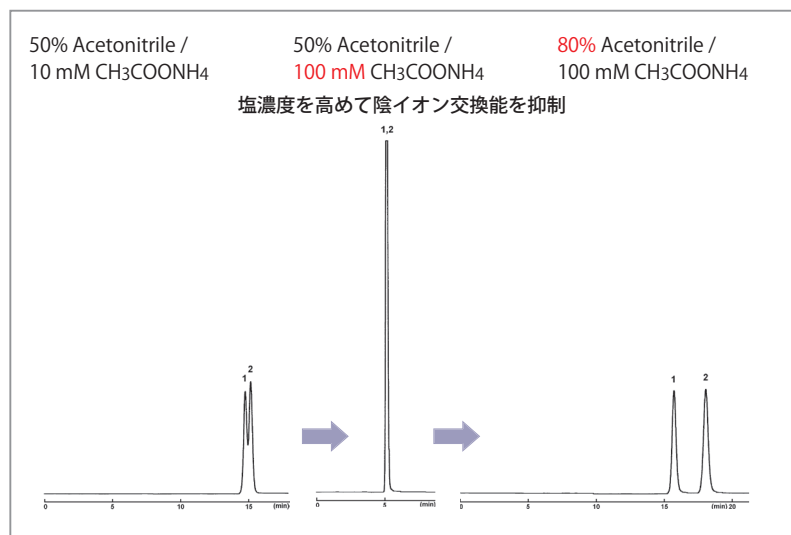


図 5. 親水性相互作用による分離

Column : COSMOSIL HILIC 4.6 mm I.D. × 250 mm
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 30°C
Detection : UV 245 nm
Sample : 1; Isoascorbic Acid (0.5 mg/mL)
2; Ascorbic Acid (0.5 mg/mL)
Inj.Vol. : 2.0 µL

6. テーリング時の対処方法

ピークがテーリングする場合には、以下の移動相を試してください。ピーク形状が改善する場合があります。

- ・移動相に 5 mmol/L の EDTA を添加する。
- ・くえん酸緩衝液にする。〔例 10 mmol/L Citrate Buffer(pH 7.0)〕

以下では 5 mmol/L EDTA を添加した例を示します。

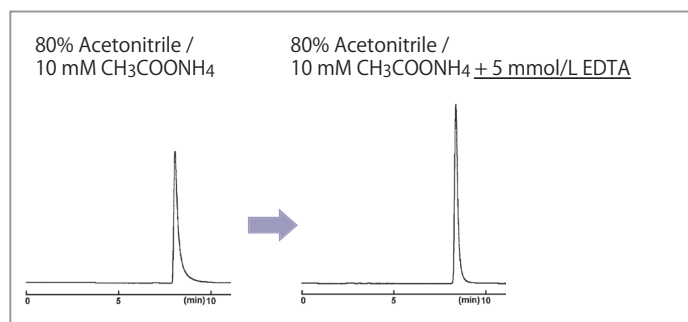


図 6. ピーク形状の改善

Column : COSMOSIL HILIC 4.6 mm I.D. × 250 mm
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 30°C
Detection : UV 254 nm
Sample : Tryptophan (1 ng)

7. カラムの洗浄

ベースラインが乱れる場合には、50% アセトニトリルを 30 分程度送液して洗浄してください。

2) SFC用カラムの上手な使い方

超臨界流体を移動相として使用する超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) は、液体クロマトグラフィー (LC) よりも有機溶媒の使用量が極めて少ないこと、分取精製後の溶媒留去が容易であること、LC とは異なる分離挙動を示すことなどから、注目されている分離技術です。SFC 用カラムは、LC 用カラムとは分析条件の影響が異なります。SFC 用カラムをご使用いただく上で、分析条件の影響を紹介します。

1. SFC

● 超臨界流体

物質には固体、液体、気体の状態があります。温度、圧力を加えても液体と気体の区別がつかなくなる終点があり、これを臨界点といい、臨界点の温度 (T_c) および圧力 (P_c) を超えた状態にある流体を超臨界流体といいます (図 1)。超臨界流体は、気体の粘度と拡散性、液体の溶解性を併せ持ちます (表 1)。比較的簡単な条件 (臨界温度 31°C 、臨界圧力 7.38 MPa) で超臨界流体にすることができる二酸化炭素が SFC の移動相として汎用されています。

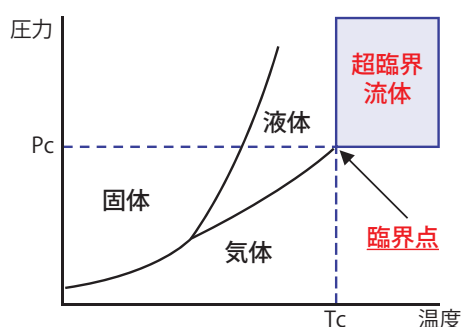


図 1. 物質の状態図

	密度 (g/cm^3)	粘度 ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)	拡散係数 (cm^2/s)
気体	$(0.6 \sim 2.0) \times 10^{-3}$	$(1 \sim 3) \times 10^{-5}$	$0.1 \sim 0.4$
超臨界流体	$0.2 \sim 0.9$	$(1 \sim 9) \times 10^{-5}$	$(0.2 \sim 2.0) \times 10^{-3}$
液体	$0.6 \sim 1.6$	$(0.2 \sim 3.0) \times 10^{-3}$	$(0.2 \sim 2.0) \times 10^{-5}$

表 1. 気体、液体、超臨界流体の物性値の比較*

* 参考文献: 村田 誠四郎 (2004) 化学便覧 基礎編 改訂 5 版 丸善株式会社

2. 超臨界流体クロマトグラフと液体クロマトグラフとの主な違い

超臨界流体クロマトグラフの基本的な流路図を図 7 に示します。液体クロマトグラフとの主な違いは、 CO_2 ポンプと背圧制御弁 (BPR: Back Pressure Regulator) が必要です。

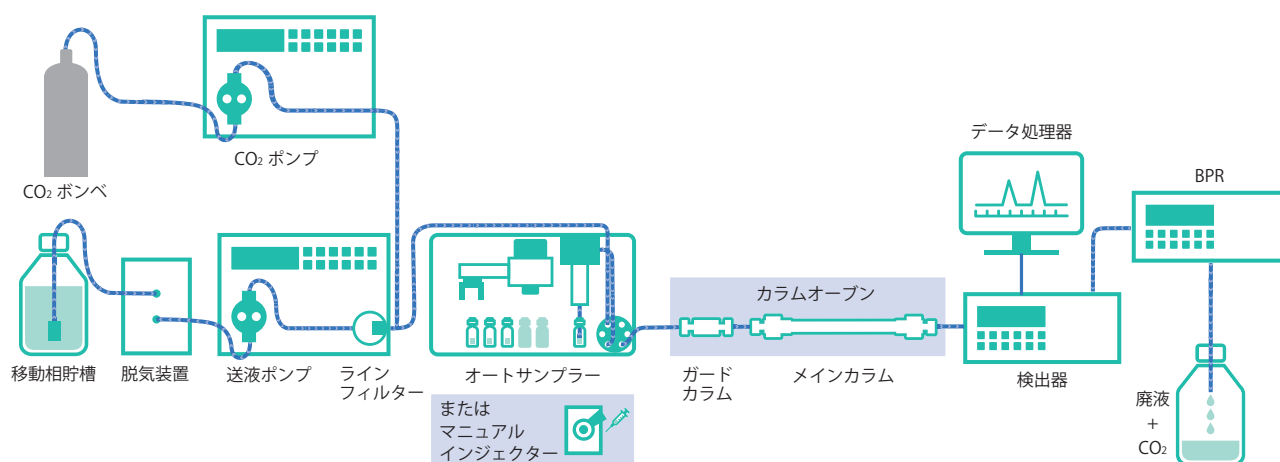


図 7. 超臨界流体クロマトグラフの基本的な流路

3. 分析条件の影響

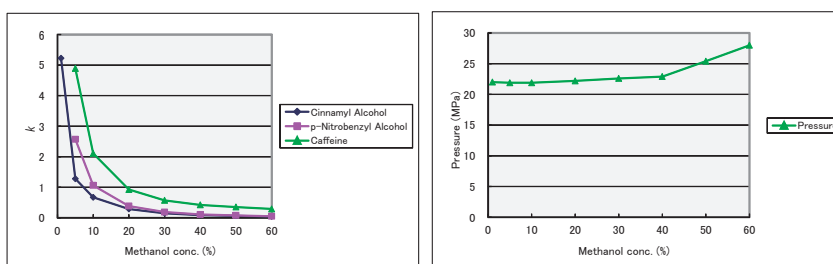
分析条件の設定方法はLCと異なります。安定した分析をするためには、適切な分析条件を設定する必要があります。それぞれの分析条件の影響について評価しました。SFCは、順相HPLCと同様の挙動を示す傾向があることが知られています。今回、順相HPLCで汎用されているシリカゲルカラムを用いて分析条件の影響を評価しました。弊社ラインアップのSFC用コスモシルカラムにおいて、分析条件の影響は同様の傾向を示します。

● 移動相の有機溶媒濃度の影響

SFCの移動相は、二酸化炭素にモディファイア（移動相の性質を変化させる添加剤）としてメタノールなどの有機溶媒を添加します。有機溶媒濃度を増加すると保持は小さくなる傾向を示します。有機溶媒濃度を増減することで保持時間を調整することができます。ただし、有機溶媒濃度が高い条件下では超臨界状態ではなくなるので、圧力の変化や保持挙動に注意が必要です。

移動相の有機溶媒濃度の影響

Column: COSMOSIL 5SL-II
Column size: 4.6mm I.D.-250mm
Mobile phase: A: CO₂
B: Methanol
B conc. **%
Flow rate: 3.0 ml/min
BPR: 10 MPa
Temperature: 40 °C
Detection: UV254nm
Sample: Cinnamyl Alcohol
p-Nitrobenzyl Alcohol
Caffeine

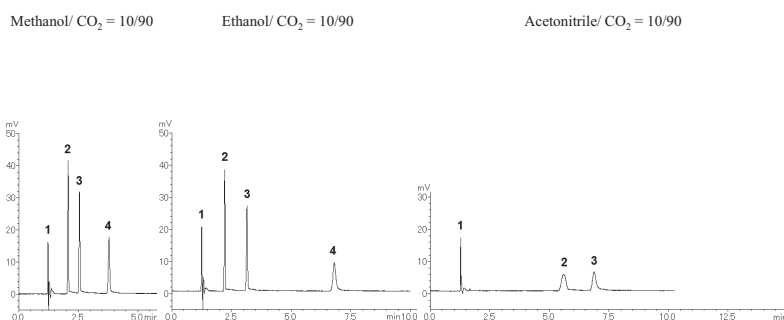


● 移動相の溶媒種の影響

モディファイアはメタノール、エタノール、アセトニトリルなどが汎用されています。モディファイアの有機溶媒はサンプルの移動相への溶解性やカラムの特性を考慮し選択してください。モディファイアとして水を使用することは推奨していません。

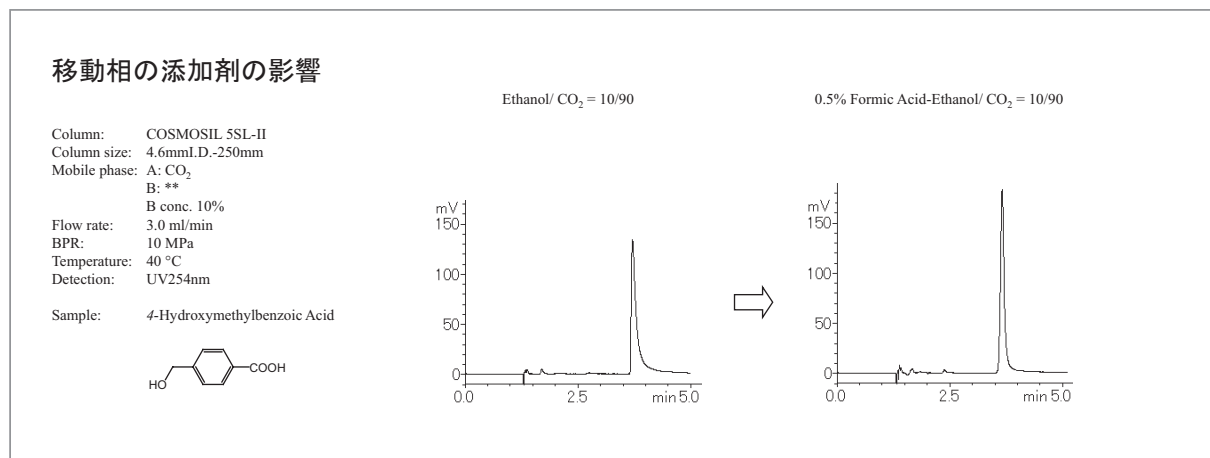
移動相の溶媒種の影響

Column: COSMOSIL 5SL-II
Column size: 4.6mm I.D.-250mm
Mobile phase: A: CO₂
B: **
B conc. 10%
Flow rate: 3.0 ml/min
BPR: 10 MPa
Temperature: 40 °C
Detection: UV254nm
Sample: 1: p-Xylene
2: Cinnamyl Alcohol
3: p-Nitrobenzyl Alcohol
4: Caffeine



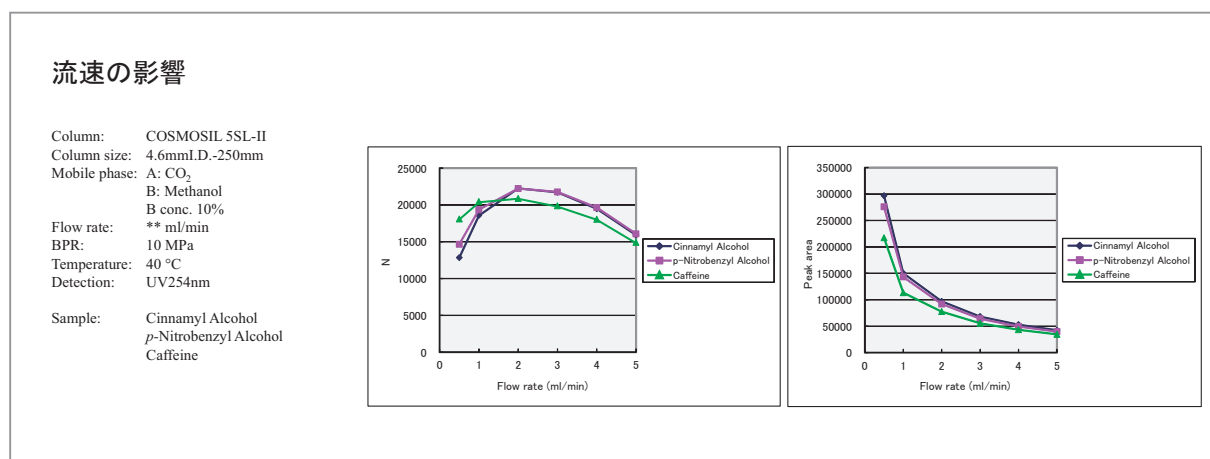
● 移動相の添加剤の影響

解離性化合物を分析する場合、モディファイアに添加剤を加えないと吸着やテーリングを起こすことがあります。添加剤として、ギ酸や酢酸アンモニウムが汎用されます。



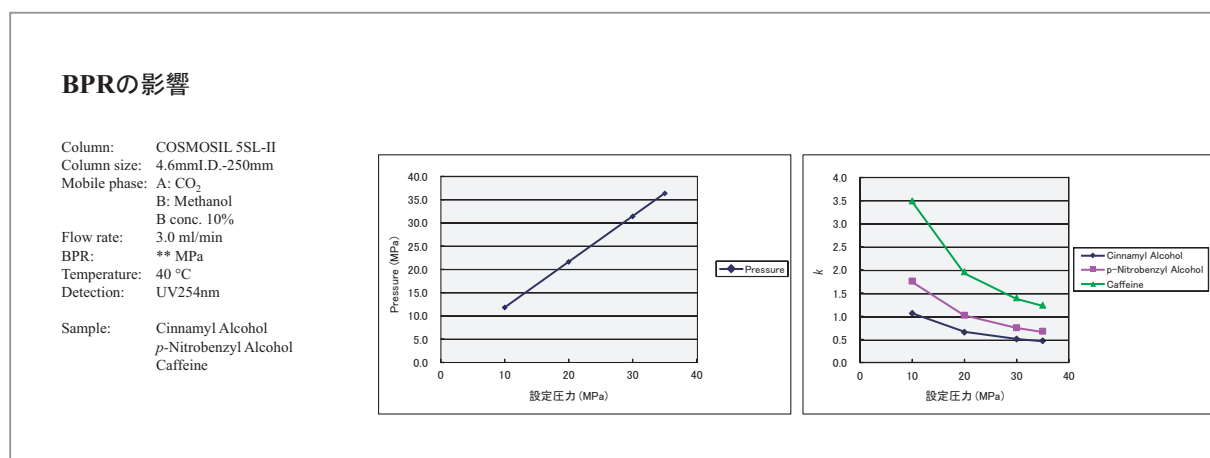
● 流速の影響

内径 4.6 mm カラムの流速は、3 mL/min を推奨します。流速を速くすると UV の検出感度は低下します。



● BPR の影響

装置内を超臨界状態に保つため、検出器の出口側に BPR を接続します。BPR の設定圧力を変えると保持時間は変化します。安定した分析をするために BPR は一定条件に設定することが必要です。通常は 10 MPa に設定してください。

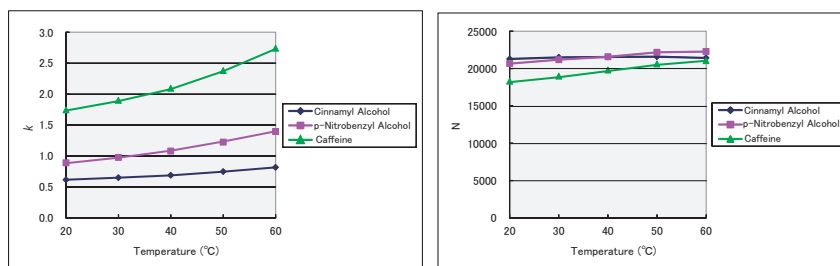


● カラム温度の影響

カラム温度が高いと保持時間が大きくなる傾向を示します。理論段数(N)はカラム温度が高いとやや高くなります。温度が低くなると超臨界状態を保つことが難しくなるので、通常は 40℃ 以上に設定してください。

カラム温度の影響

Column: COSMOSIL 5SL-II
 Column size: 4.6mm I.D.-250mm
 Mobile phase: A: CO₂
 B: Methanol
 B conc. 10%
 Flow rate: 3.0 ml/min
 BPR: 10 MPa
 Temperature: ** °C
 Detection: UV254nm
 Sample: Cinnamyl Alcohol
 p-Nitrobenzyl Alcohol
 Caffeine

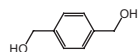


● サンプル負荷量の影響

サンプルの移動相への溶解性が低い場合、サンプル負荷量が増加するとピークはリーディングする傾向があります。有機溶媒濃度や有機溶媒の種類を変更し、移動相へのサンプル溶解性を高めることでピーク形状を改善することができます。

サンプル負荷量の影響

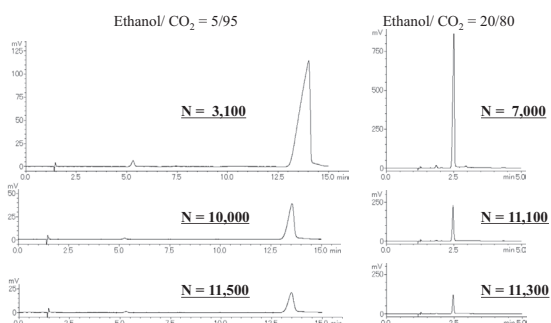
Column: COSMOSIL 5SL-II
 Column size: 4.6mm I.D.-250mm
 Mobile phase: A: CO₂
 B: Ethanol
 B conc. **%
 Flow rate: 3.0 ml/min
 BPR: 10 MPa
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV254nm
 Sample: 1,4-Benzenedimethanol (**mg/ml)
 Inj. Vol.: 5.0 µl



50 mg/ml (250 µg)

10 mg/ml (50 µg)

5 mg/ml (25 µg)



3) ガードカラムの選択と効果

カラムのフィルターの詰まりや充填剤へのサンプルの吸着によりカラムは劣化しますが、そのほとんどがカラムの入り口側のみで生じています。そのため、分析および分取カラム(メインカラム)の前にガードカラムを接続することにより、メインカラムの劣化を防ぐことができます。

1. ガードカラムの選択

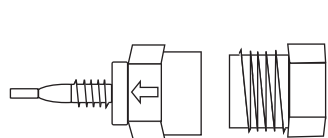
ガードカラムの充填剤には、メインカラムと同じ充填剤を選択してください。カラムサイズについて、内径はメインカラムと同じか、あるいは細く、長さは短いカラム(10 ~ 50 mm)を選択してください。なお、コスモシールカラムの製品番号や価格は、各製品ページ(<https://www.nacalai.co.jp/products/chromatography/>)の「価格表」をご覧ください。

(例) メインカラム 5C18-MS-II (20 mm I.D. × 250 mm) → ガードカラム 5C18-MS-II (10 mm I.D. × 20 mm)

2. ガードカートリッジについて

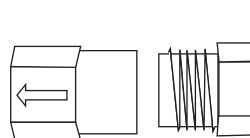
通常ガードカラムに加え、汎用サイズ(4.6 mm I.D. × 10 mm、2.0 mm I.D. × 10 mm)については、安価なカートリッジタイプも用意しています。コスモシールガードカートリッジは、ガードカートリッジホルダーにセットして使用します。ガードカートリッジホルダーは以下の2種類があります。① ダイレクトカートリッジホルダー(内径 4.6 mm 用) ② ガードカートリッジホルダー(内径 2.0 mm 用)を用意しています。なお、ホルダーは繰り返し使用できます。

① ダイレクトカートリッジホルダー(内径 4.6 mm 用)



分析カラムに直接接続します。

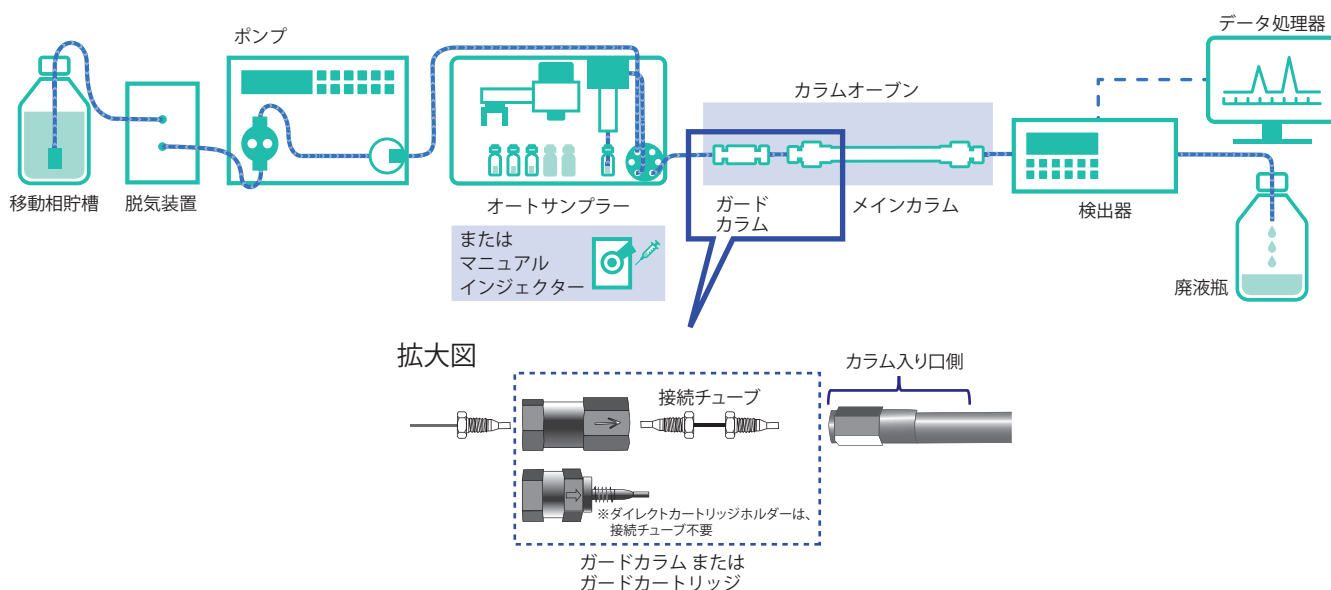
② ガードカートリッジホルダー(内径 2.0 mm 用)



カラム用接続チューブ(別売り)を用いて分析カラムと接続します。

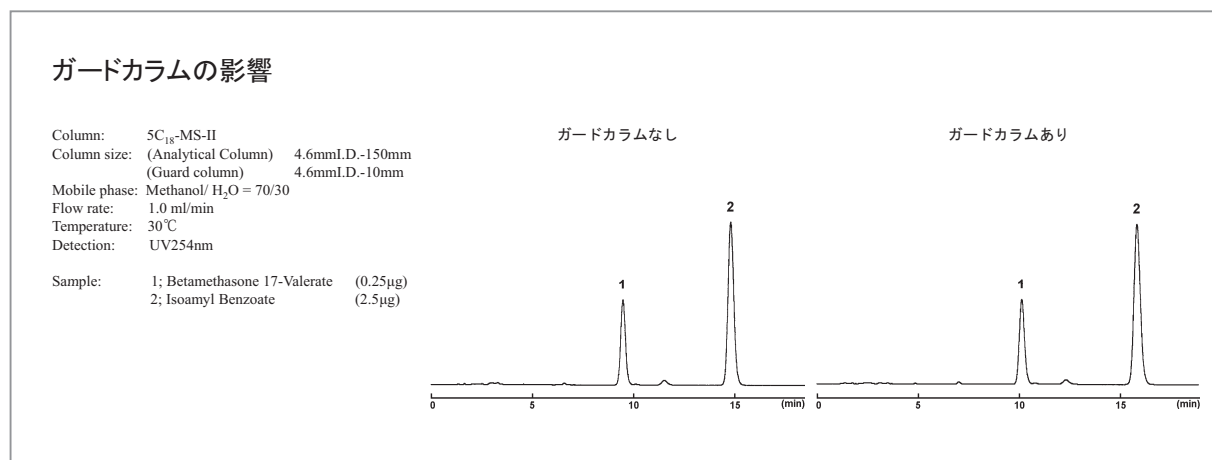
3. ガードカラムの接続

ガードカラムおよびガードカートリッジの接続には接続チューブを使用してください。接続チューブは、内径 0.1 mm と 0.25 mm の2種類を用意しています。内径 0.1 mm (#12570-41)は内径 3 mm 以下のメインカラム、内径 0.25 mm (#37843-69)は内径 4.6 mm ~ 10 mm のメインカラムとの接続に適しています。



4. 使用例

コスモシールのガードカラムシリーズは、分析用、分取用カラムと同一の高性能充填剤を高圧充填しているため、メインカラムの性能を落とすことなく保護します。



5. ガードカラムの交換

下図の分析例は、ガードカラムの劣化後、交換によってピーク形状が回復した例を示しています。それ以外にも、分析中に分析圧の上昇、ゴーストピークの出現、ベースラインの上昇など、不具合が生じたときには速やかに新しいガードカラムと交換してください。劣化したガードカラムを使用し続けると、メインカラムまで劣化してしまいます。

