



新技術説明会

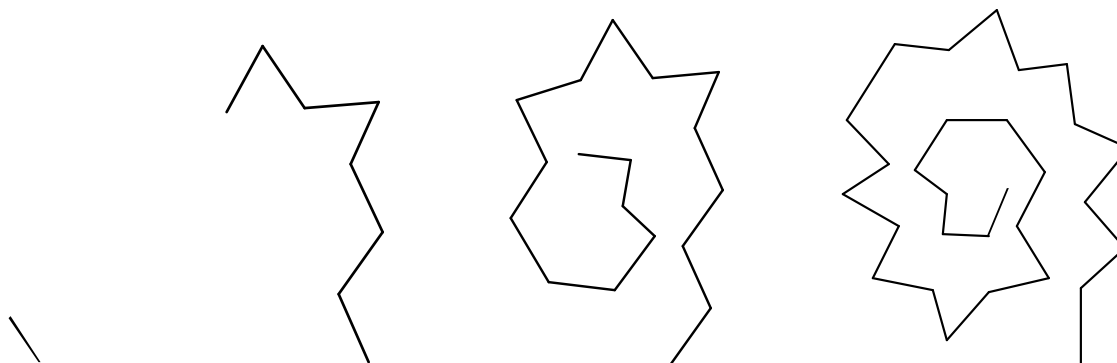
# ここでしか聞けないカラムの 初耳学(真実): 同じカラムで保持が違うその理由

- ① C18はC8より疎水性が高いので、C18はC8より保持が大きい?
- ② Dewettingと表現することがある。これは正しい表現なのか?
- ③ アルキル基は立ち上がっているか?
- ④ 新規エンドキャッピング

(クロマニックテクノロジーズ)

長江 徳和

# 疎水性



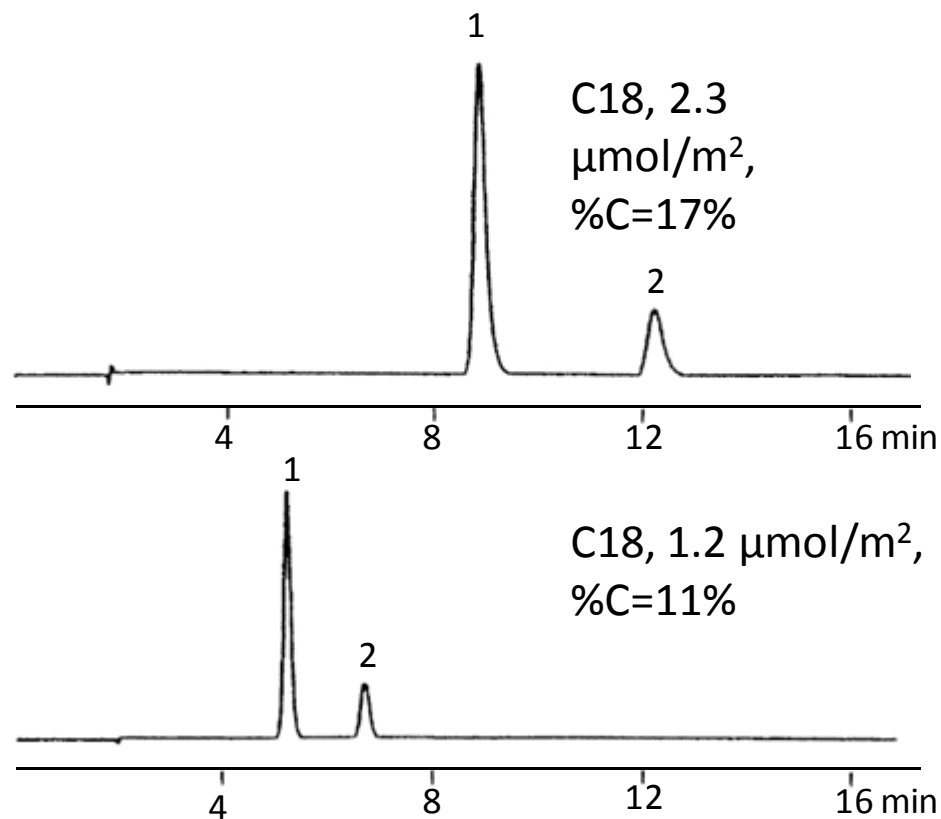
	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
分配係数(LogP)	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	22.6	0.66	0.006	$8.84 \times 10^{-10}$

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:

$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=(98:2)$

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

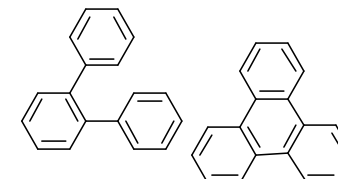
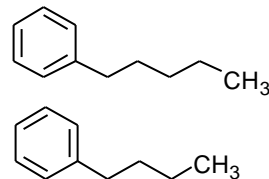
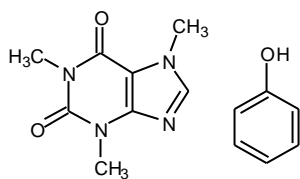
Detection: UV @450nm

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<sub>D</sub>: 固定相中の溶質の分配濃度

M<sub>D</sub>: 移動相中の要旨値の分配濃度

V<sub>S</sub>: 固定相の体積(容積)

V<sub>M</sub>: 移動相の容積

C8固定相(%C=11%)とC18固定相(1.2 μmol/m<sup>2</sup>, %C=11%)は固定相体積(V<sub>S</sub>)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  $k_A = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.4}{M_D \times 1.6} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.25 = 0.25 K_d$

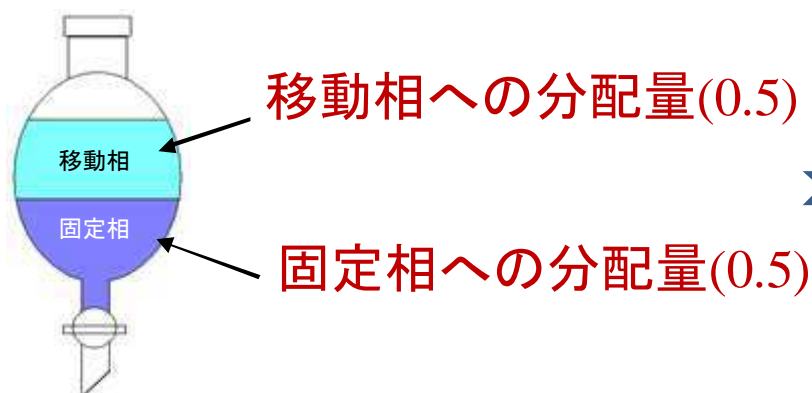
C18 (B) の場合  $k_B = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_d$

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%)

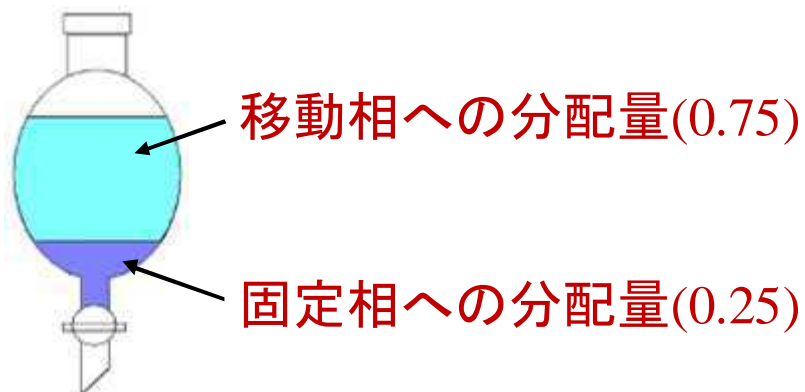


移動相と固定相への分配濃度比は同じであるため、分配量の比(k)は体積比となる。

$$k=0.5/0.5=1$$

$$k = \frac{S}{M}$$

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 $Kd_{C18}$ ,  $Kd_{C8}$

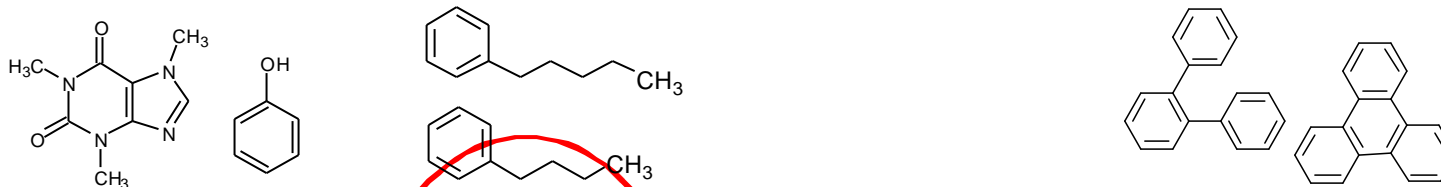
$$Kd = \frac{S_D}{M_D}$$

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

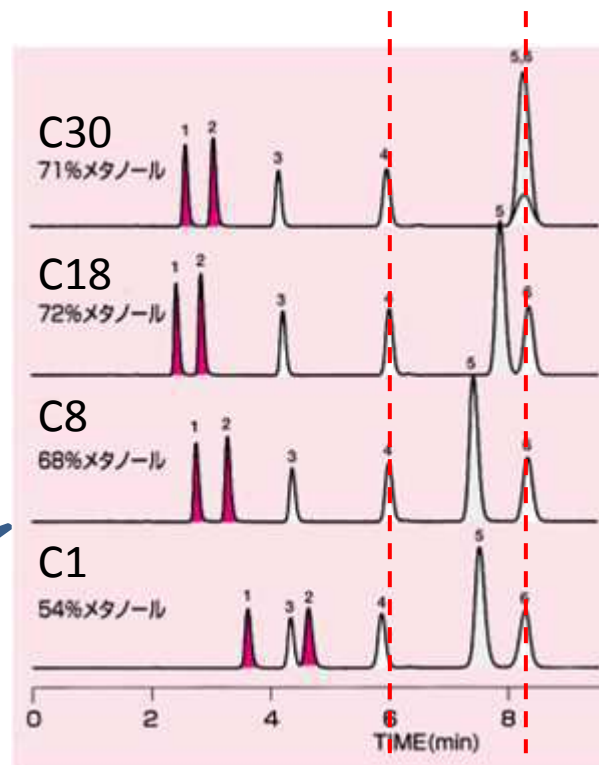
固定相	炭素含有量	水素結合性 $\alpha$ (7-メチルパラベン)	疎水性 $\alpha$ (1-メチルベンゼン/1-メチルナフタレン)	疎水性 1-メチルベンゼンの保持体数	立体選択性 $\alpha$ (2-フェニルエチルアミン)
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

★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( $\alpha$ )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( $\alpha$ )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。

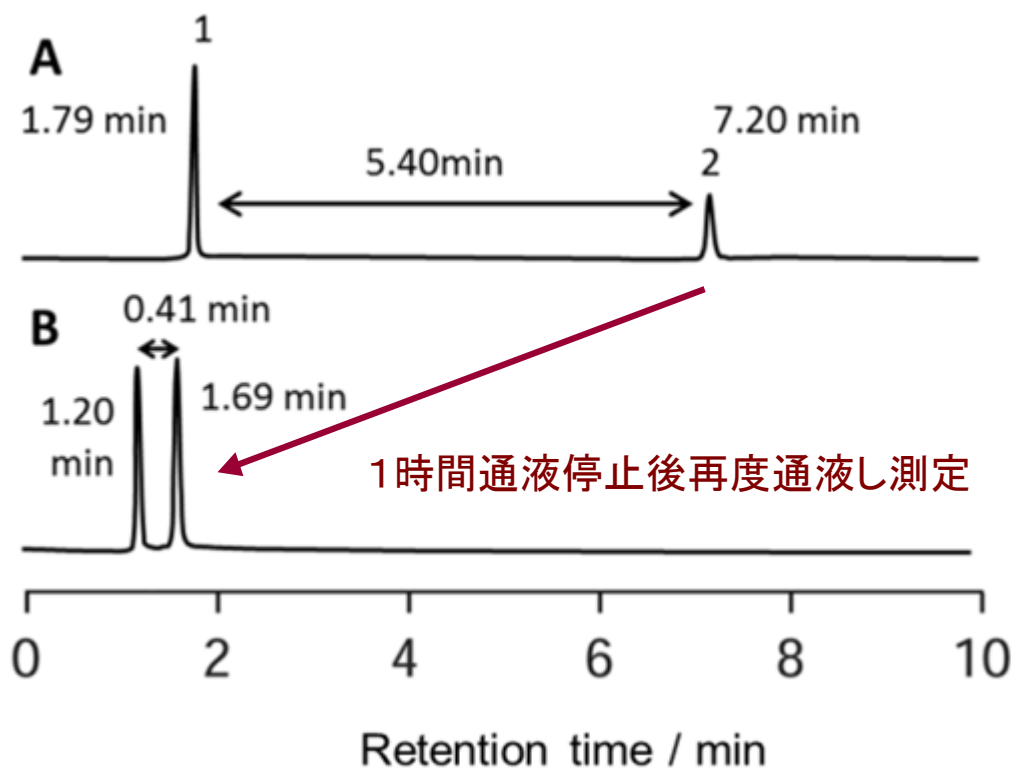
# まとめ

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の元となったと思われる論文

## The Sorption Behavior of Alkyl Bonded Phases in Reverse-Phase, High Performance Liquid Chromatography

C.H. Löchmuller\* and D.R. Wilder, Department of Chemistry, Duke University, Durham, North Carolina 27706

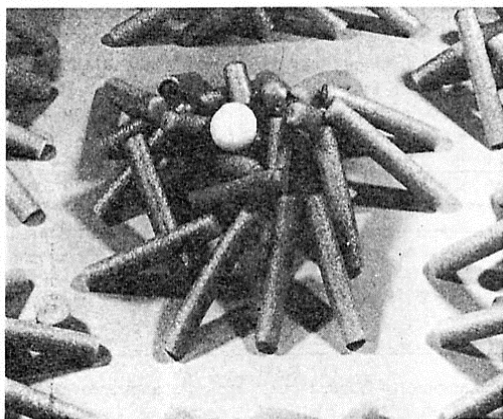


Figure 2. A scaled representation of octadecyl chains chemically bonded to the surface of silica gel showing solvophobic aggregation of the bonded ligands. Appropriate coverage data for this phase was taken from Table II. The white circle on the cluster represents a benzene sized solute molecule.

the family of larger solutes (Figure 5). It is seen that as the solutes become larger, the curves become more nearly linear, and this is consistent with the interpretation that for larger solutes even the longer bonded phases are incapable of completely utilizing the large solute surface area. Apparently, even larger or "deeper" aggregations of bonded alkyl chains would be needed to approach a liquid-like interaction.

The possibility that these effects result from an exclusion phenomena due to restricted entrance of some solutes into pores in the silica matrix seems unlikely. In Figure 5 linear changes of  $k'$  with carbon percentages with the large solutes (anthracene and chrysene) and flattened curves for the smaller solutes can be seen. The opposite trend would be expected if the larger solutes were seeing progressively less stationary phase as they were being restricted from entering the pores because of increasing blockage by the longer chain alkyl silane reagents. On the other hand, if it is maintained that benzene and naphthalene are suffering exclusion from the pores with increased carbon coverage and anthracene and chrysene never enter the smaller pores at all, then at the lesser carbon coverages benzene and naphthalene should be encountering proportionally more of the bonded stationary phase than the larger solutes. It is found, however, that the difference in  $\ln k'$  values between solutes in the linear portion of the  $k'$  vs %

1979年

アルキル基の寝込みに関する論文

C18の寝込みについて記述されている

*Journal of Chromatography*, 197 (1980) 11–20

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 12,911

## SOLUTE-SOLVENT INTERACTIONS ON THE SURFACE OF REVERSED PHASES

### I. STATIONARY PHASE INTERACTIONS AND THEIR DEPENDENCE ON BONDING CHARACTERISTICS

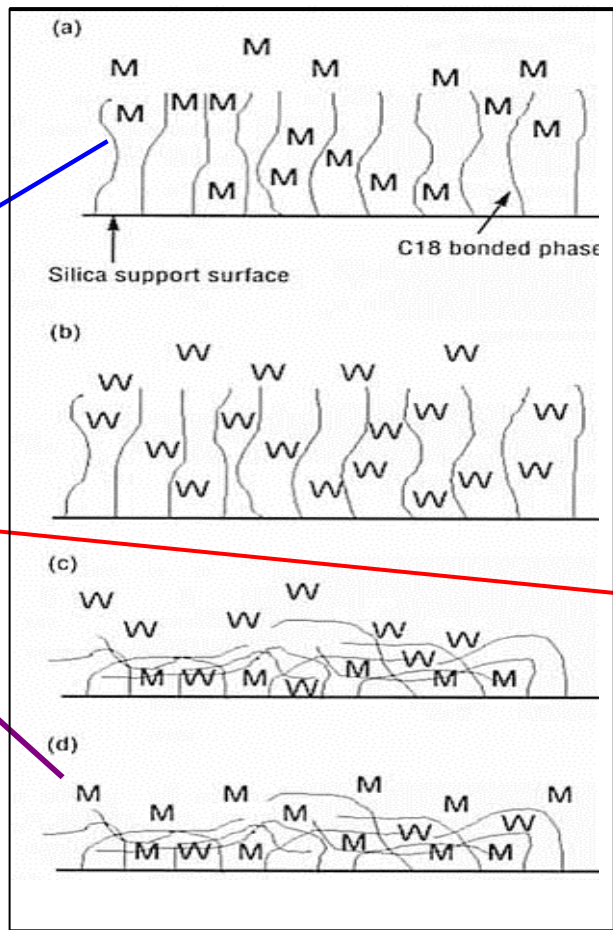
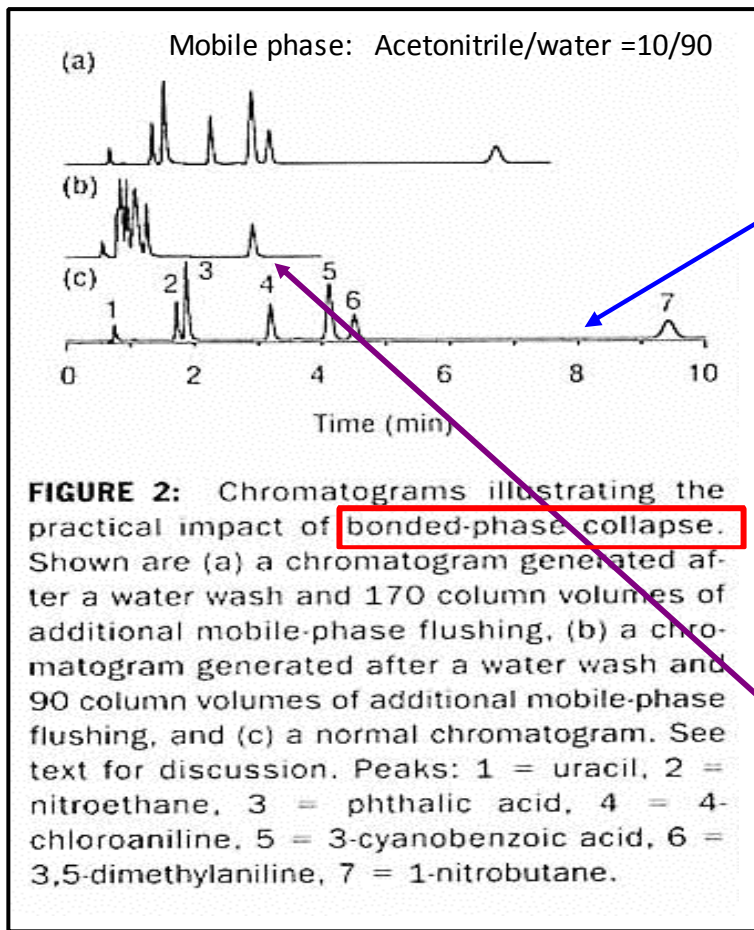
persive interactions are considered, hydrocarbon–hydrocarbon interactions will be much stronger than hydrocarbon–water interactions. It follows that the stationary phase could agglomerate and, therefore, could have a greatly reduced effective chromatographic surface area. It is possible that it will adopt a spatial arrangement where the chains are lying almost flat upon the surface. This would, in effect, reduce the effective chromatographic surface area very significantly and could account for the extensive reduction in retention capacity of the aggregated bonded phase. This

1980年 有機溶媒を含まない水系移動相を用いた場合の保持の減少をアルキル基の寝込みと主張した論文



# 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



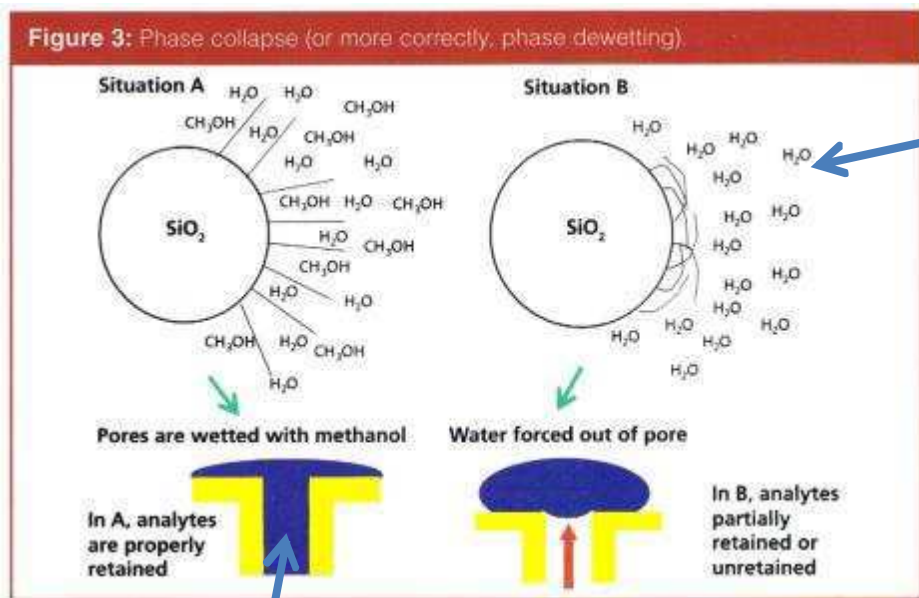
固定相は移動相で濡れている。アルキル基は立ち上がっている。

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.

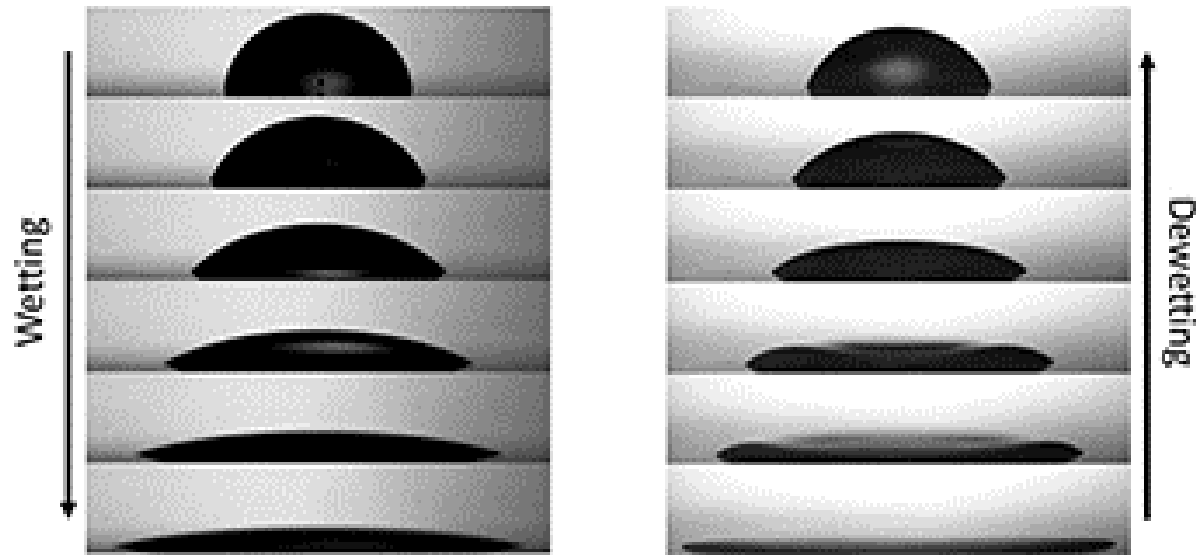
水移動相ではアルキル基は寝込んでしまい, Phase collapseが起こる。Phase collapse状態になると移動相と濡れなくなり, 移動相は細孔から抜け出す.

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？



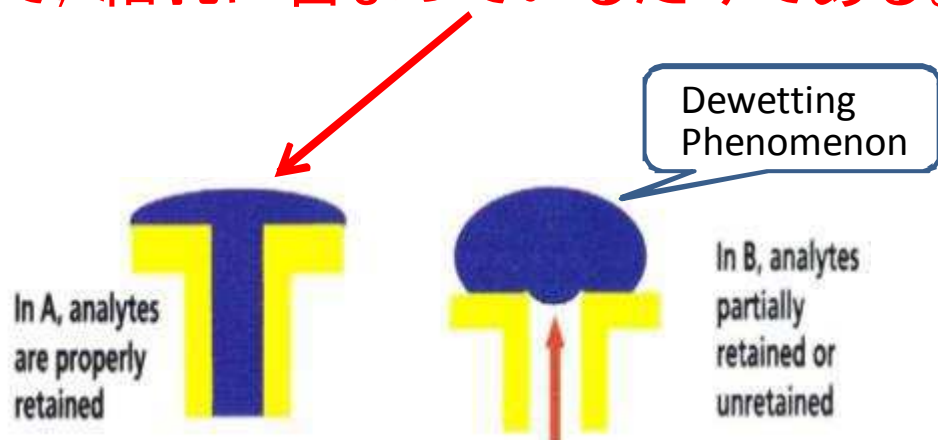
<http://www.mynewsdesk.com/uk/northumbria-university/pressreleases/its-delightful-its-dynamic-its-dewetting-1582445>

**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 $\rho$ 、液体の表面張力を $\gamma$ 、接触角を $\theta$ 、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

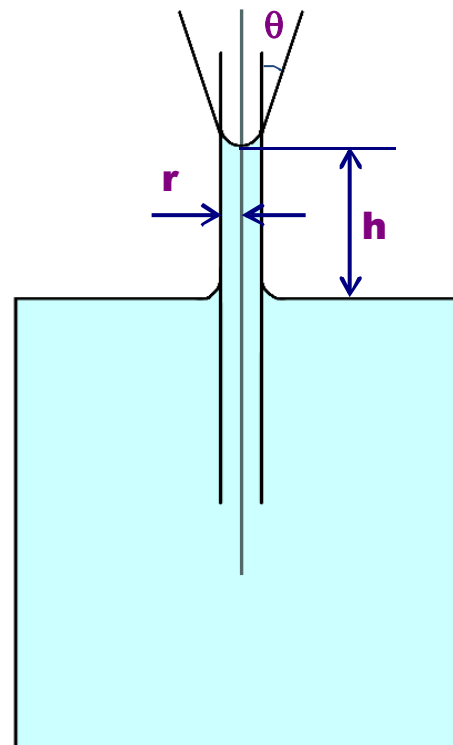
毛管現象の式:

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

$\gamma$ : 表面張力

$\rho$ : 液体の密度(比重)

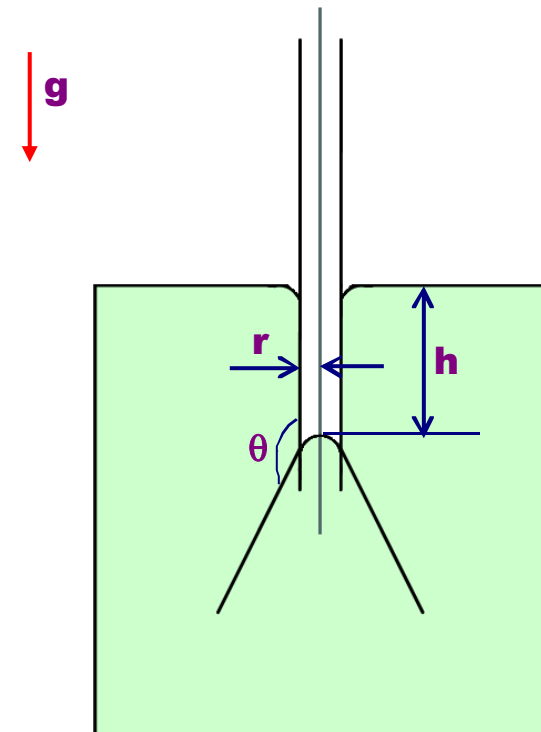
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



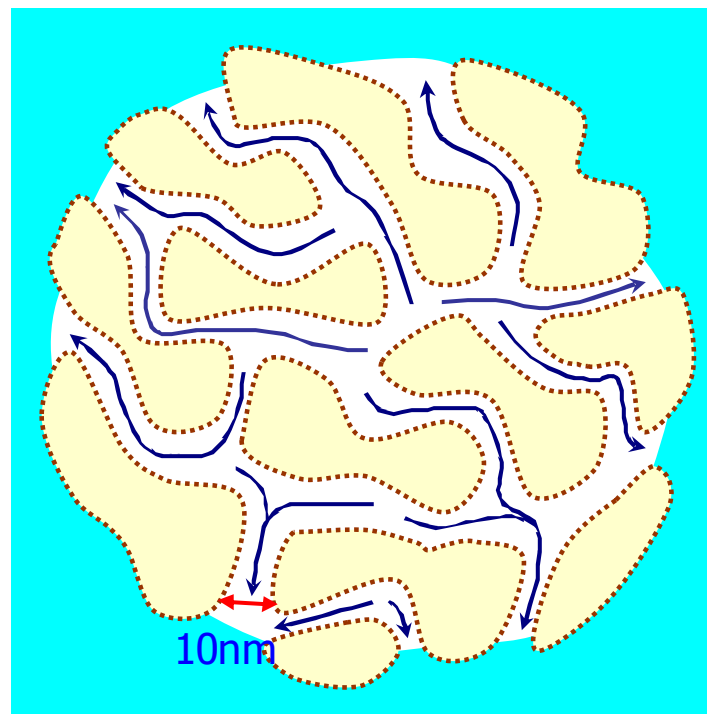
液体が管に濡れない場合

$$\theta > 90^\circ$$

# 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 $\mu$ 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。

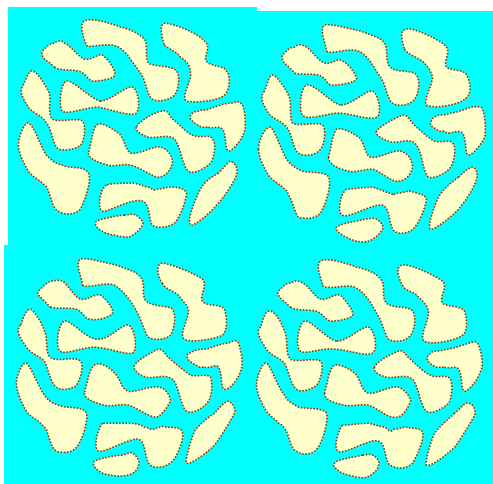
# 水100%移動相条件下で保持が減少する理由

カラム内のC18充填剤粒子

移動相: 水

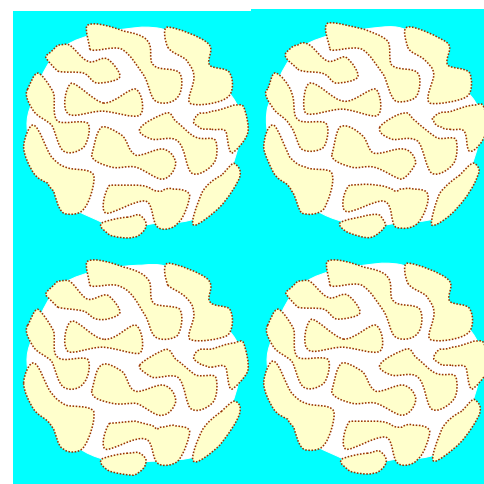
充填剤に圧力がかかっている場合

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)

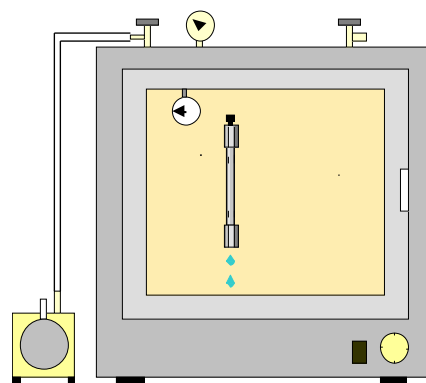
・30%メタノールでは全く分散していない。  
(濡れないため、細孔内に溶液は入り込めない)

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。

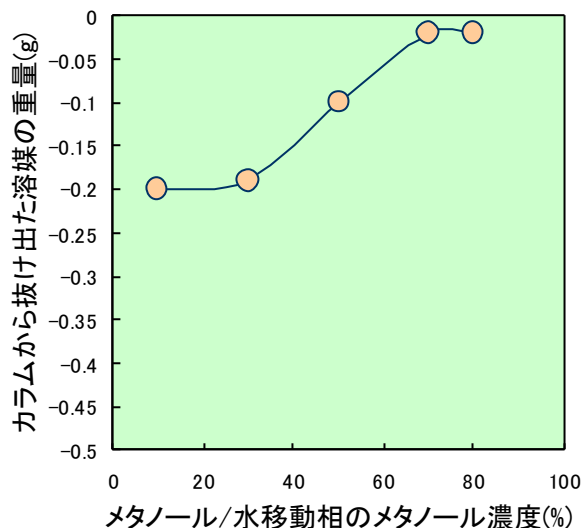
濡れ性は固定相の寝込み(Phase collapse)で決まるのではなく、移動相(溶液)により決まる。

# 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)

193

© 2010 The Japan Society for Analytical Chemistry

## 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<sup>1</sup>

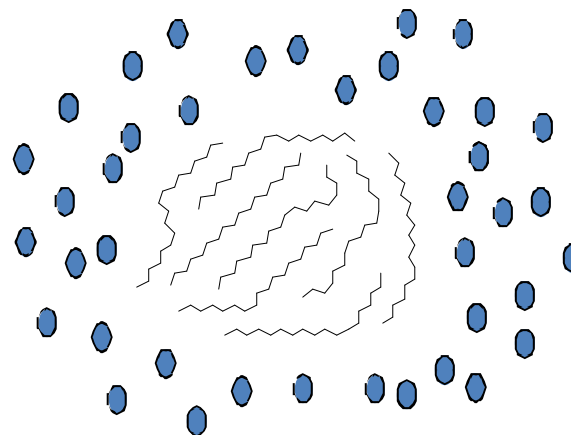
逆相固定相のアルキル基：寝込んで  
(絡み合っ)ているのか (Ligand Collapse)  
または立ち上がっているのか？

一般的にはアルキル基は立ち上がって  
いると考えられている？

しかし視点を変えると違った見方ができる

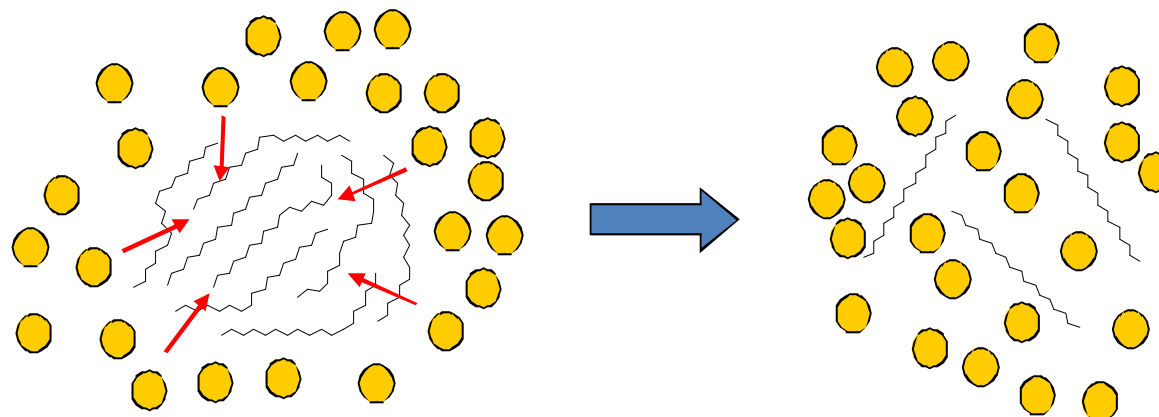
# 有機溶媒中でのオクタデカンの状態

メタノールにオクタデカン  
( $C_{18}H_{38}$ )は混ざらない。  
(溶けない)



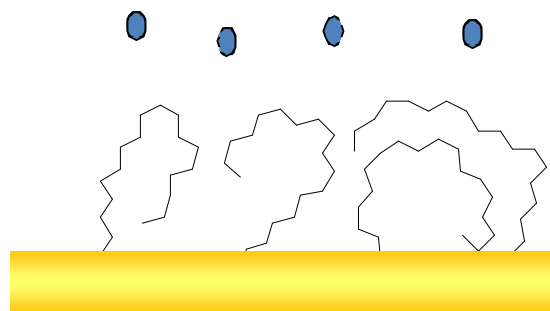
メタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとると考えられる。

テトラヒドロフラン(THF)  
にオクタデカン  
( $C_{18}H_{38}$ )は溶ける。



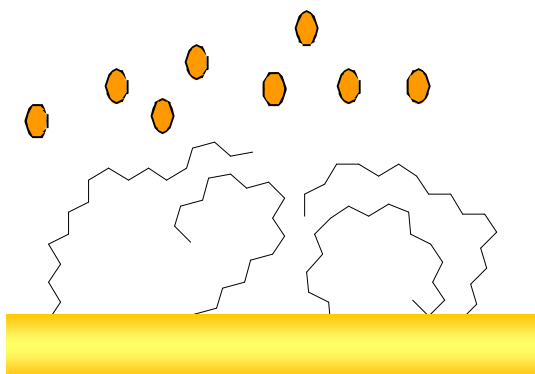
# C18表面上での溶媒和の概略図

## メタノール



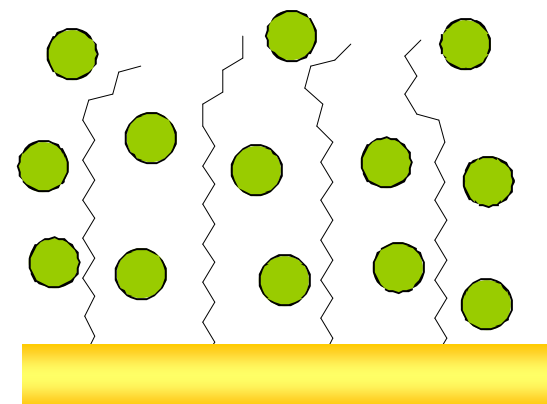
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している。

## アセトニトリル



メタノールと同様に、オクタデシル基は寝込んでおり、表面にアセトニトリルが溶媒和している。

## テトラヒドロフラン



オクタデシル基は立ち上がっており、全体にテトラヒドロフランは溶媒和している。

ほとんど(80%以上)固まった状態であると推測される

# 最新のC18固定相のシミュレーション

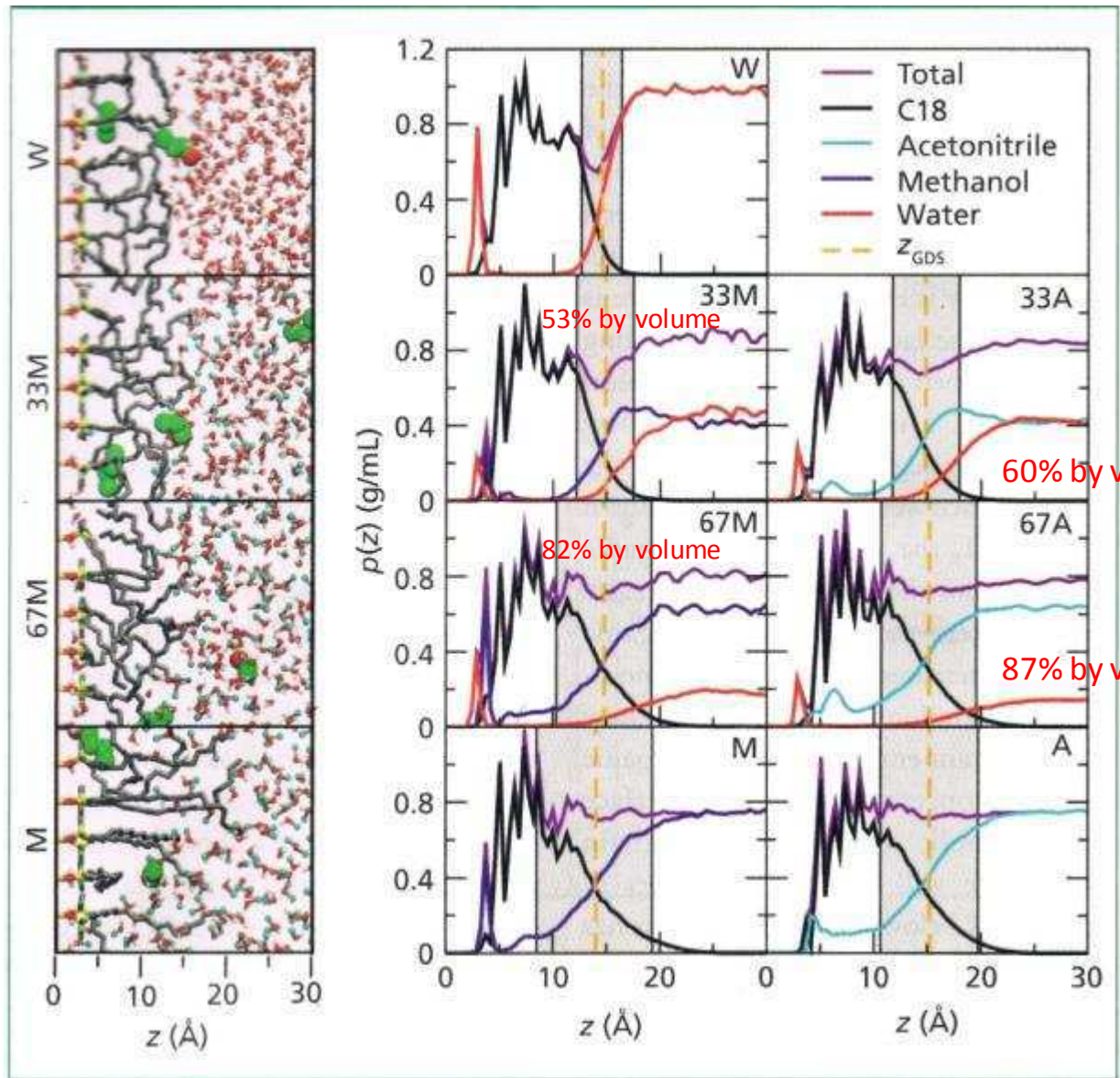


Figure 1: Left: Snapshots from simulations in different solvents, C<sub>18</sub> chains (gray), and alkane and alcohol solutes (large spheres with green, red, and white indicating CH<sub>x</sub>, hydroxyl oxygen, and hydrogen, respectively). Middle and right: Density profiles of C<sub>18</sub> chains, 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/m<sup>2</sup>. Adapted, in part, from references 4 and 14.



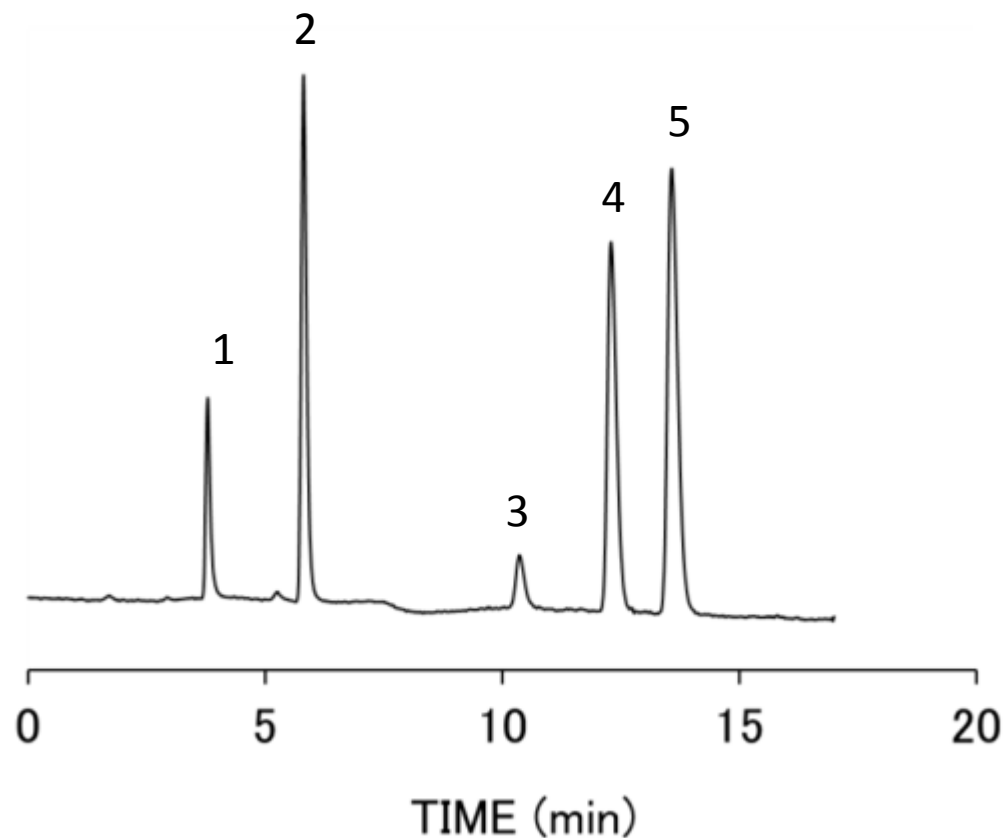
# 移動相中の有機溶媒の固定相への溶媒和の測定

有機溶媒の保持係数から  
移動相と固定相の分配量を計算



**有機溶媒の固定相への  
分配量を溶媒和量と仮定**

# アルコール類の分離



カラム: ODS 250 x 4.6 mm

移動相: 水

流速: 1.0 mL/min

温度: 40 C

検出: RI

試料: 1. メタノール

2. エタノール

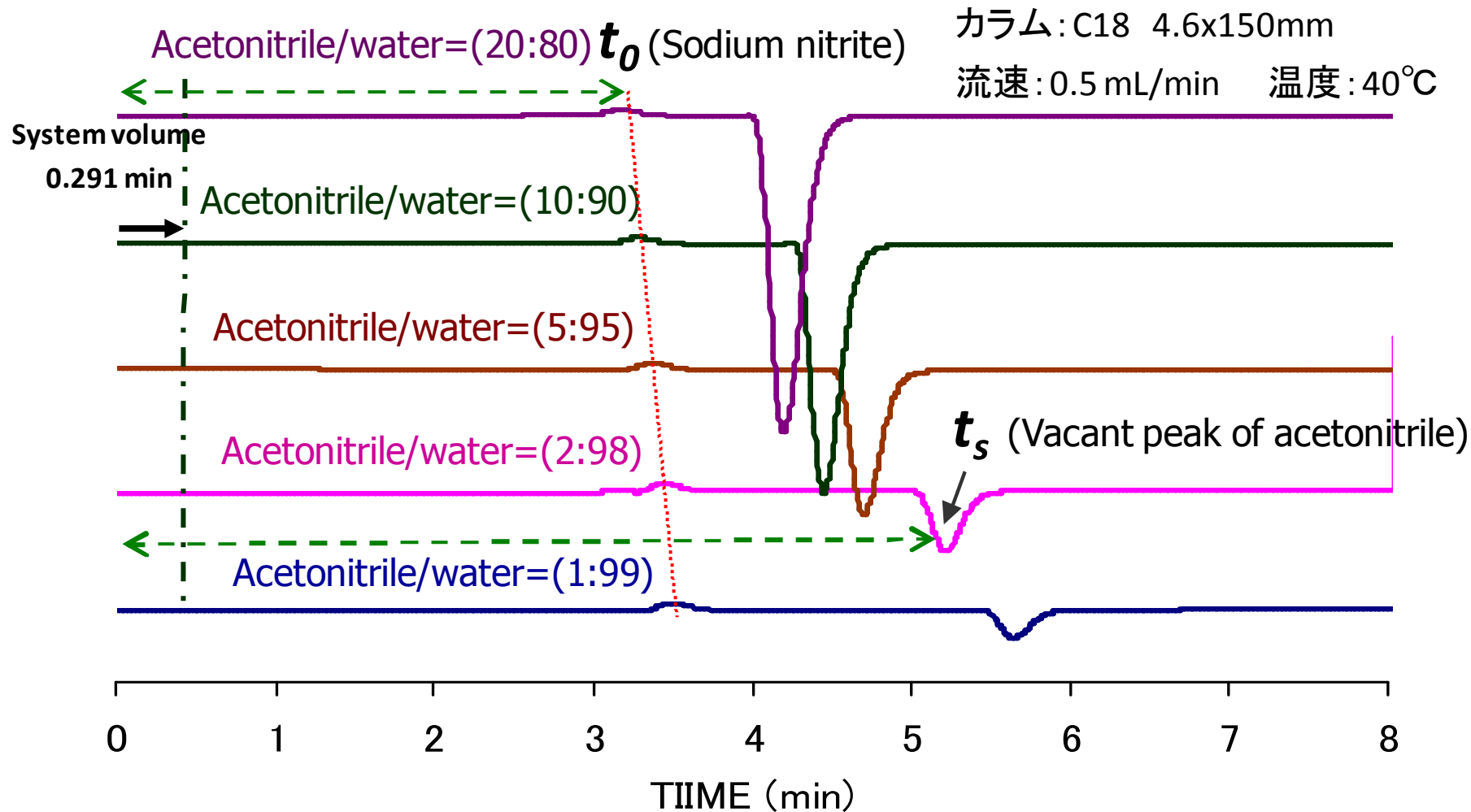
3. アセトニトリル

4. 1-プロパノール

5. 2-プロパノール

逆相LCの移動相で用いられる有機溶媒も保持し, 分離できる.

# アセトニトリル・水移動相を用いた $t_0$ (亜硝酸ナトリウム) とアセトニトリル (ベイカントピーク) のクロマトグラム



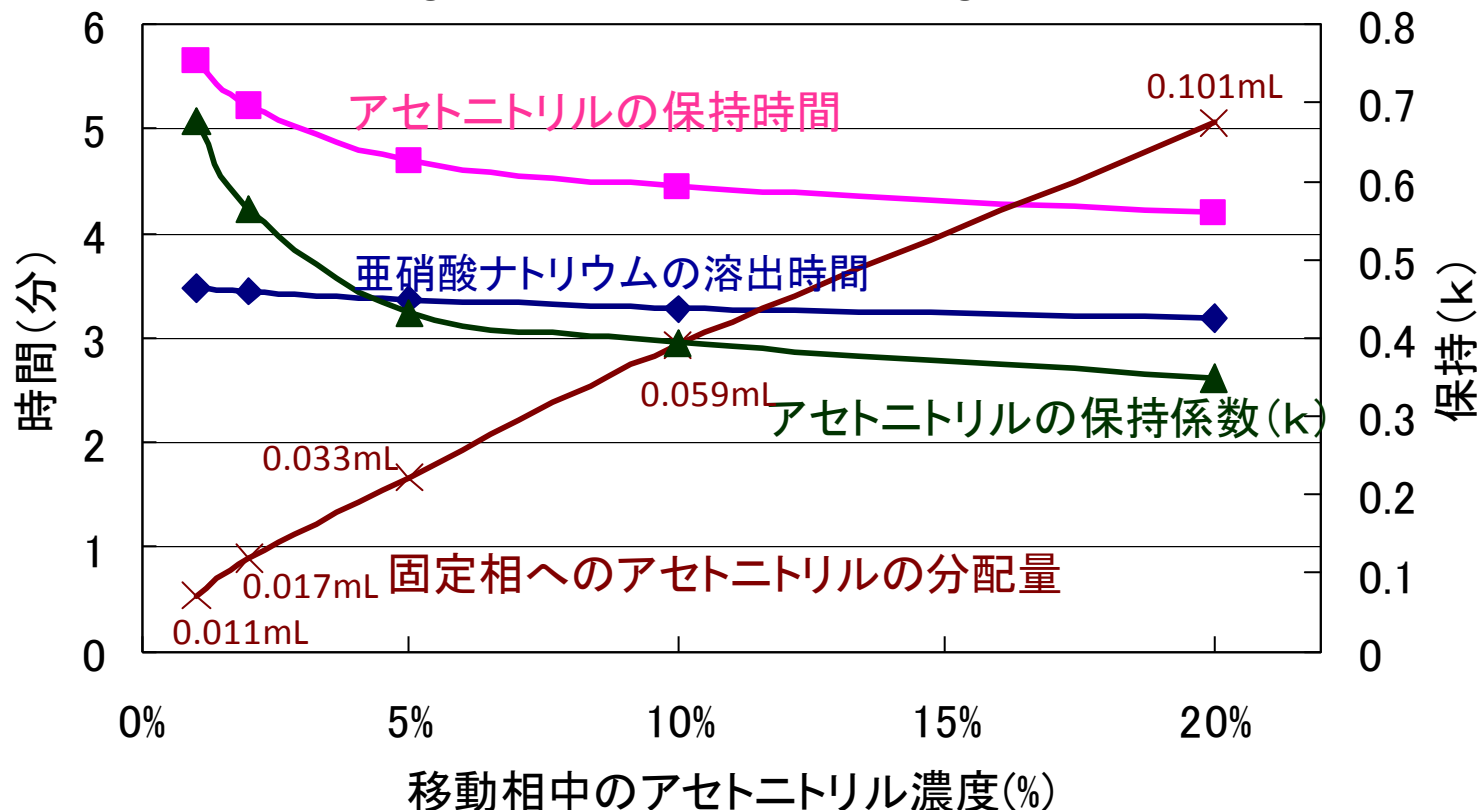
アセトニトリルは保持しており, 固定相中に分配する. この分配量を溶媒和量とする.

## アセトニトリル・水移動相を用いた場合の保持時間, 保持および固定相へのアセトニトリルの分配量

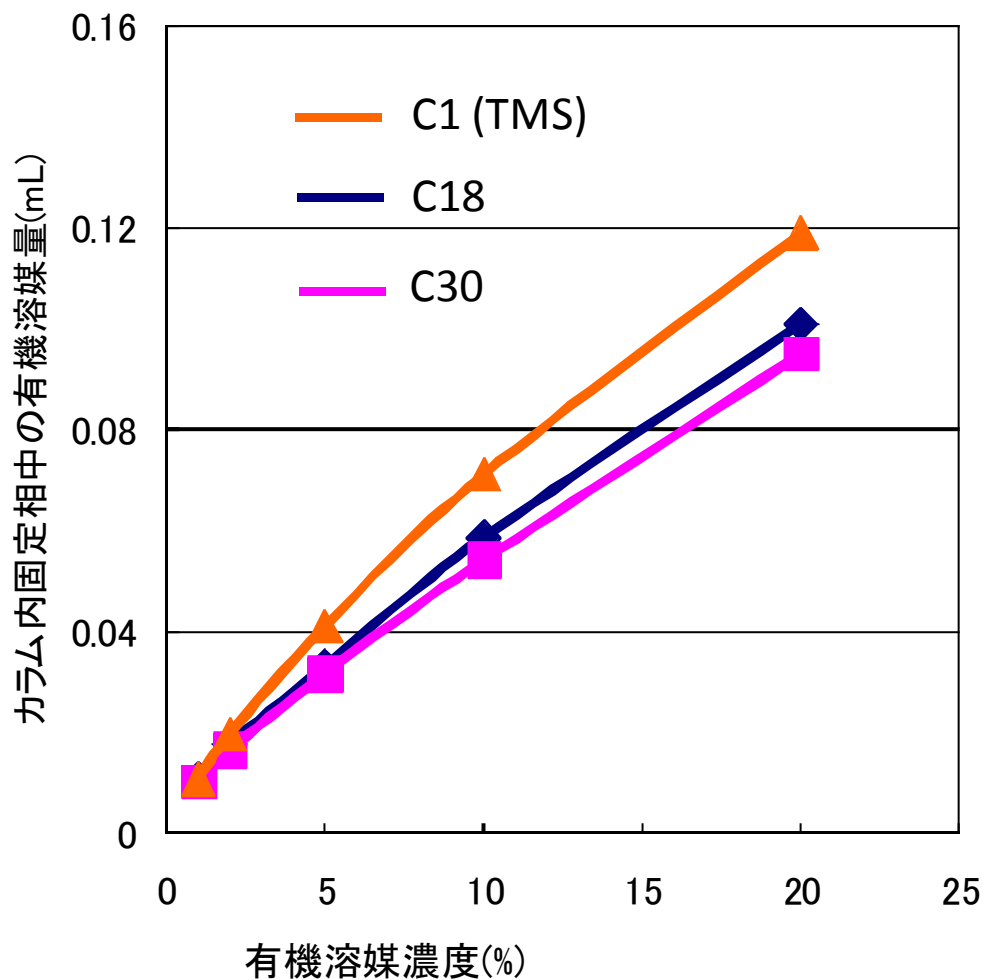
$$k = (t_s - t_0) / (t_0 - \text{system volume}) \quad k = S / M \quad S = k \times M$$

カラム: ODS 4.6x150mm,

カラム中の充填剤は約1.5gであり, この充填剤の約0.3g(0.35mL)がC18固定相に相当する.



# C1, C18およびC30固定相 へのアセトニトリルの分 配量(溶媒和量)



カラム: C1 (TMS, %C: 5%)

C18 (%C: 16%)

C30 (%C: 16%)

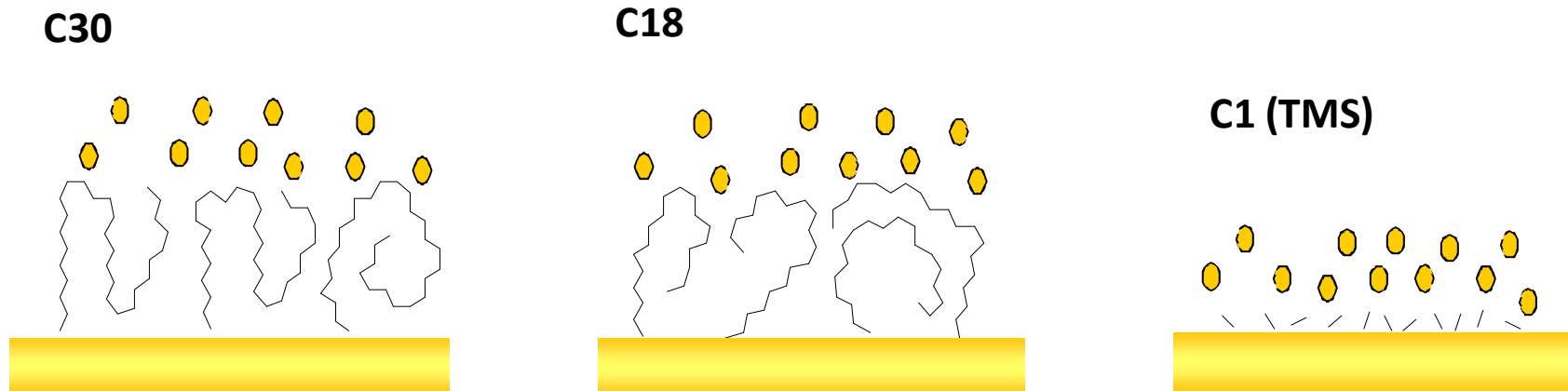
4.6x150mm

アルキル鎖長が長くなっても溶  
媒和量は大差ない。

# C1, C18およびC30固定相の状態

移動相:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$

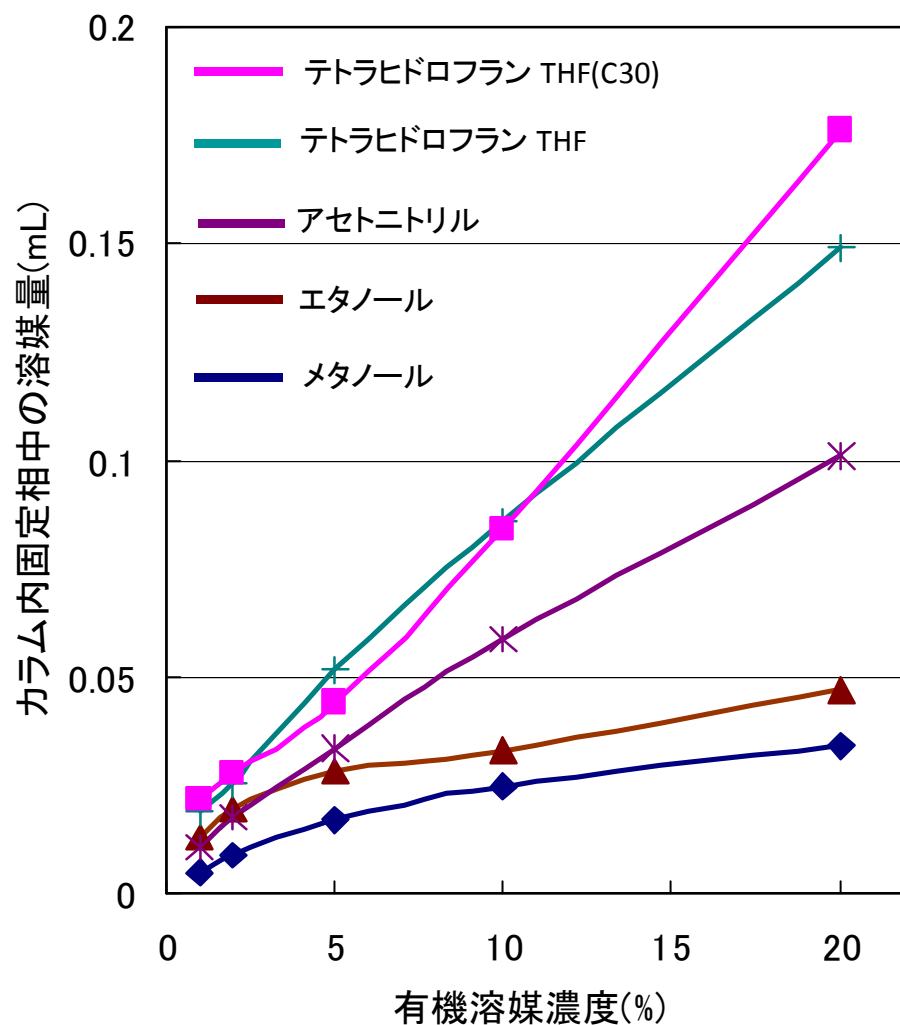
● : Acetonitrile



固定相表面上に溶媒和するため、アルキル鎖長が異なってもアセトニトリルの溶媒和量はほとんど同じである。

またラマンスペクトルを用いてアセトニトリルの溶媒和量を測定した報告もあるが、同様にC1, C8, C18固定相への溶媒和量は同じであると結論づけている。

# C18固定相への分配量(溶媒和量)



カラム: C18, (一部C30)  
4.6x150mm

1) 4.6x150mmカラムにC18充填剤は約1.5g入っている。

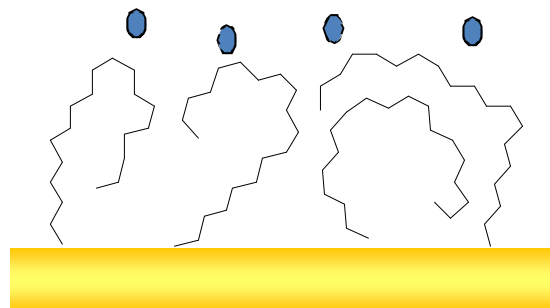
2) C18の炭素含有量16%  
C30の炭素含有量16%

カラム内のオクタデシル基の容量は約0.35mLと計算される。

有機溶媒濃度20%でメタノールは約0.04mL, アセトニトリルは約0.1mL, テトラヒドロフランは約0.15mL溶媒和している。

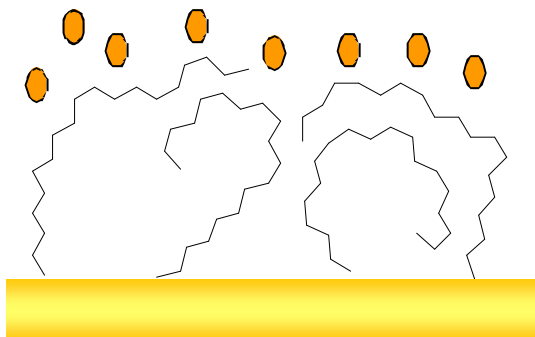
# C18表面上での溶媒和の概略図

メタノール



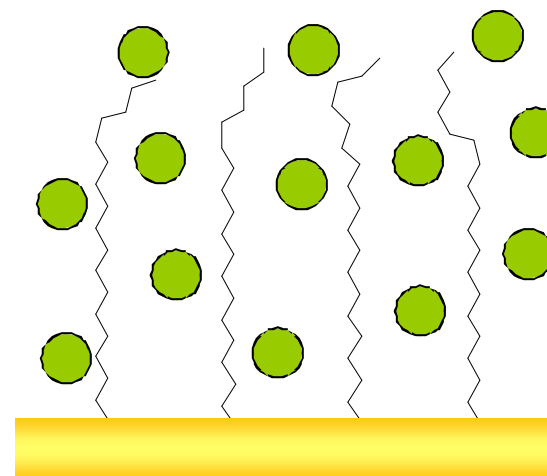
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している。

アセトニトリル



オクタデシル基は寝込んでおり、表面にアセトニトリルが溶媒和している。

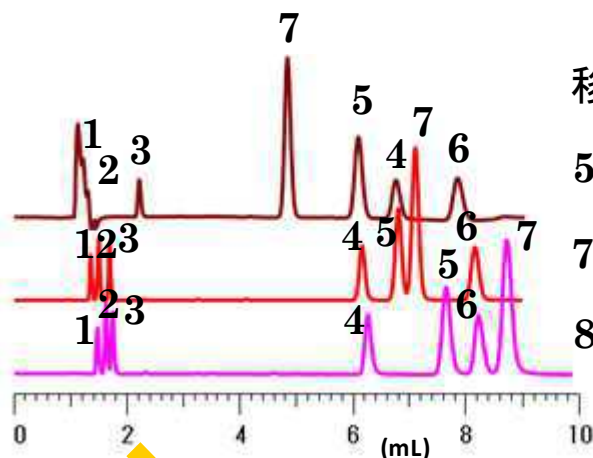
テトラヒドロフラン



オクタデシル基は立ち上がっており、全体にテトラヒドロフランは溶媒和している。



# 有機溶媒による $t_0$ の変化



移動相:  
 50% THF  
 74% アセトニトリル  
 82% メタノール

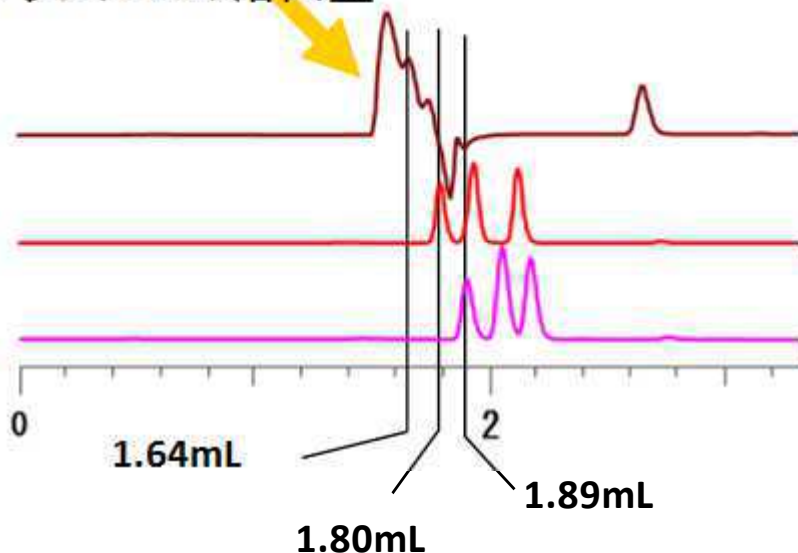
カラム: C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm.

アミルベンゼンの溶出量が約8mLになるように有機溶媒と水との混合比を決定

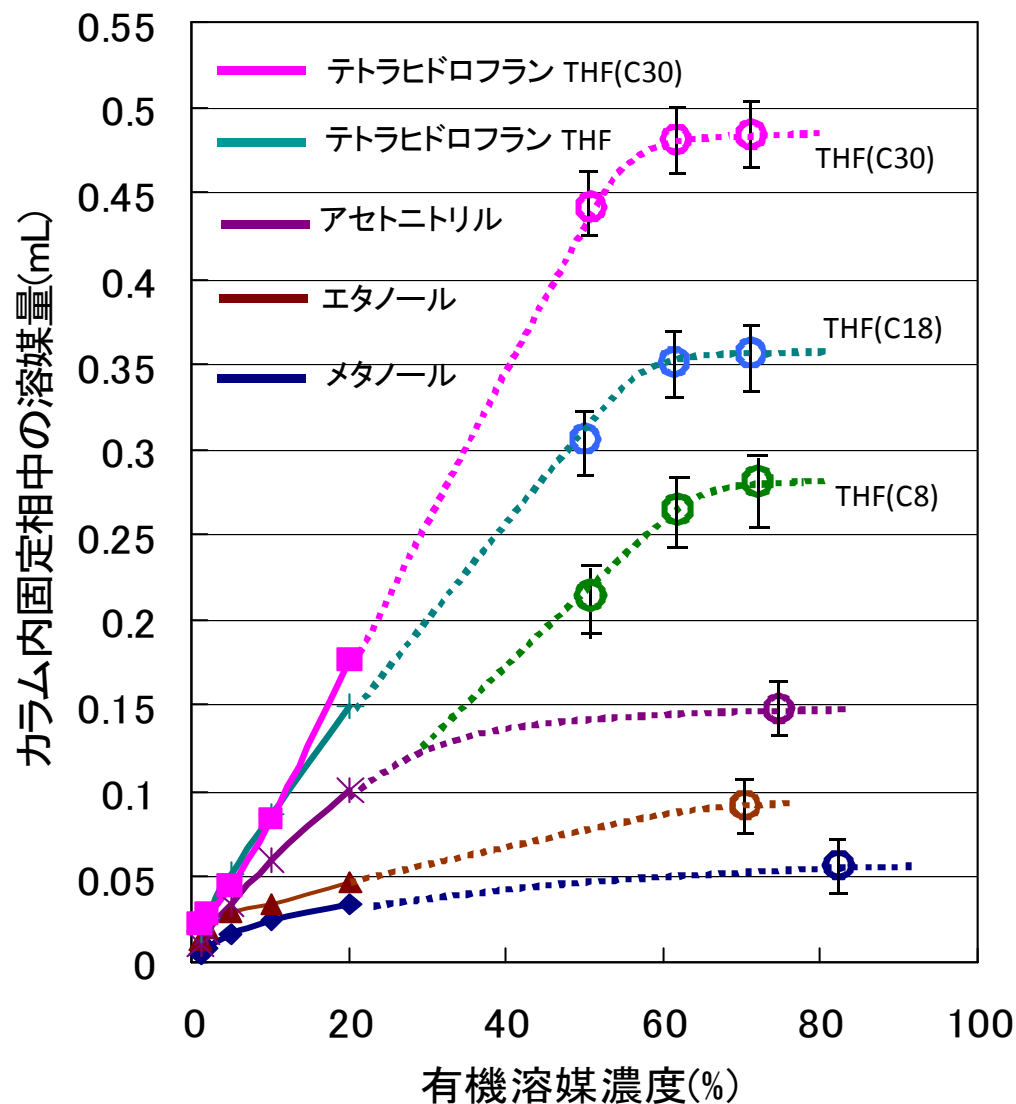
- 1. ウラシル, 2. カフェイン, 3. フェノール,
- 4. ブチルベンゼン, 5. o-ターフェニル,
- 6. **アミルベンゼン**, 7. トリフェニレン

ウラシル $t_0$ の溶出量



- 1) 溶媒和した有機溶媒とアルキル基の両方が固定相として働く.
- 2) 溶媒和量の多い場合に $t_0$ は小さくなる.
- 3) THFはメタノールに比べ, 0.25mL (=1.89-1.64) 多くアルキル基に溶媒和していることになる.

# C18固定相への分配量(溶媒和量)



カラム : C18, C30, C8

4.6x150mm

1) 4.6x150mmカラムにC18充填剤は約1.5g入っている.

2) C18の炭素含有量16%

C30の炭素含有量16%

カラム内のアルキル基の容量は約0.35mLと計算される.

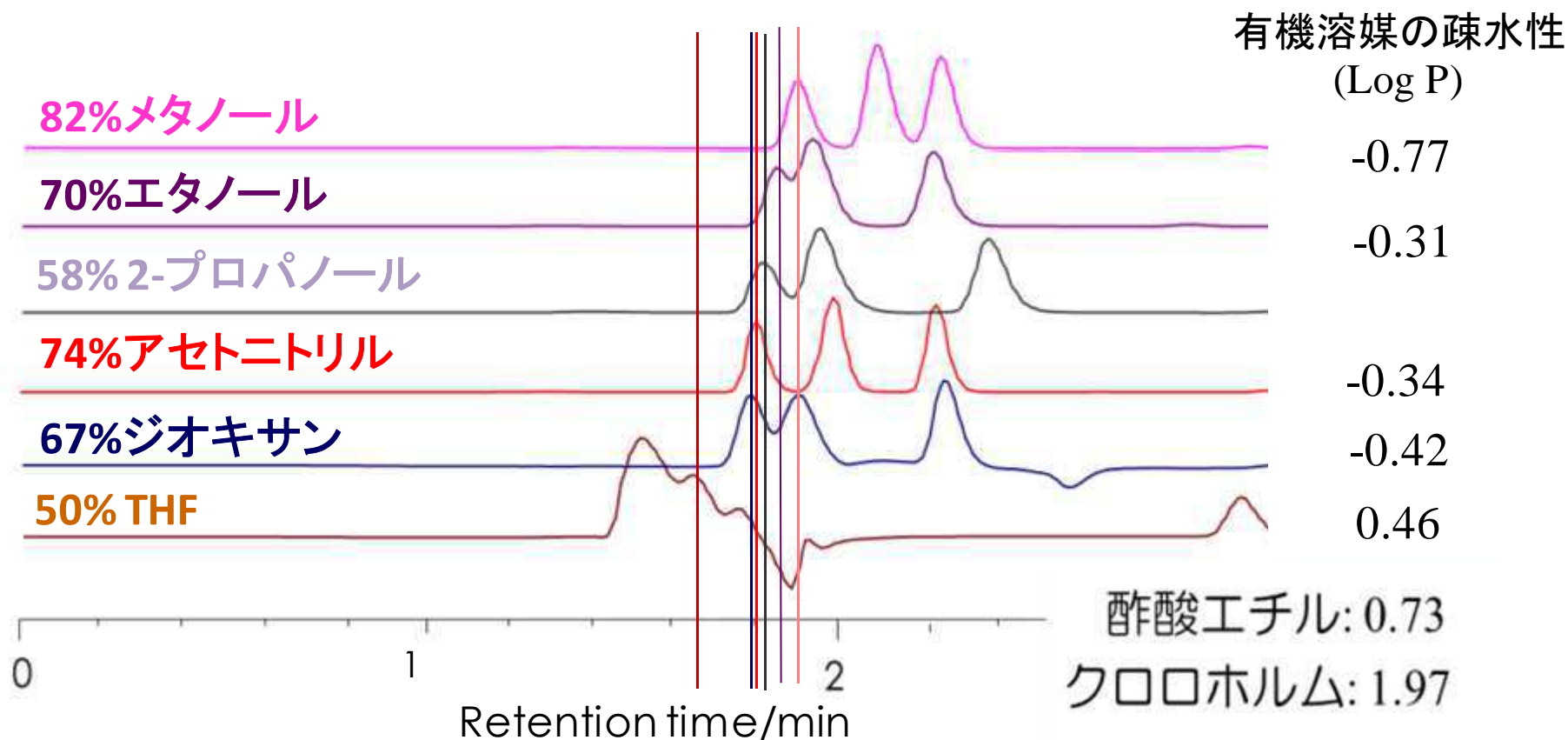
有機溶媒濃度20%でメタノールは約0.04mL, アセトニトリルは約0.1mL, テトラヒドロフランは約0.15mL溶媒和している.

82%メタノールの溶媒和量を0.06mLと仮定すると, ウラシルの溶出量から74%アセトニトリルと50%THFの溶媒和量はそれぞれ0.15mLと0.31mLとなる.

# to(ウラシル)の溶出時間の比較

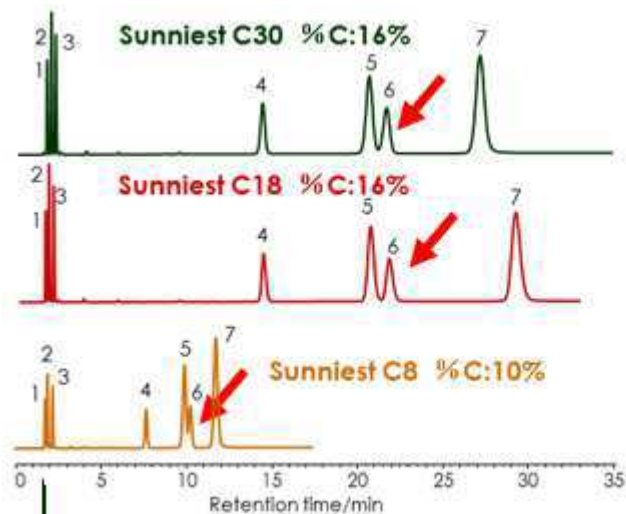
カラム: C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm. 試料: 1. ウラシル, 2. カフェイン, 3. フェノール  
アミルベンゼンの溶出量が約8mLになるように有機溶媒と水との混合比を決定

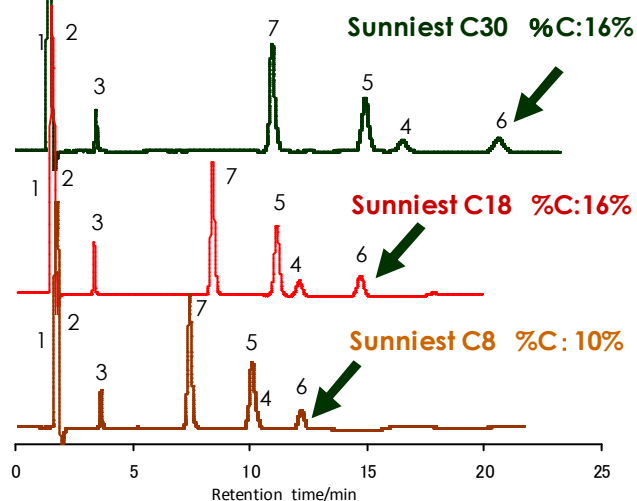


# メタノールとテトラヒドロフラン (THF) の差

メタノール



THF



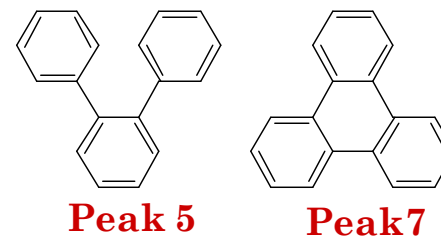
Column: Sunniest C30, C18, C8, 5 $\mu$ m  
4.6x150 mm

Mobile phase:  
CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25  
THF/H<sub>2</sub>O=50/50

Flow rate: 1.0 mL/min

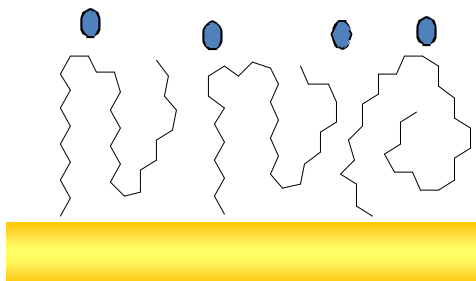
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil,  
2 = Caffeine,  
3 = Phenol,  
4 = Butylbenzene,  
5 = o-Terphenyl,  
6 = Amylbenzene,  
7 = Triphenylene

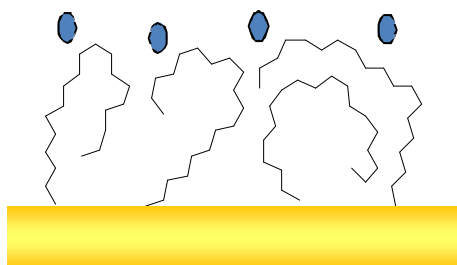


# C30,C18,C8固定相の状態

C30 %C 16%

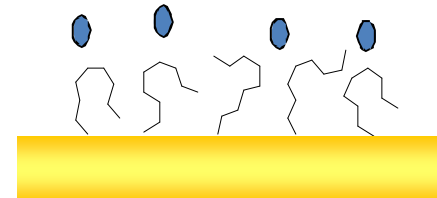


C18 %C 16%

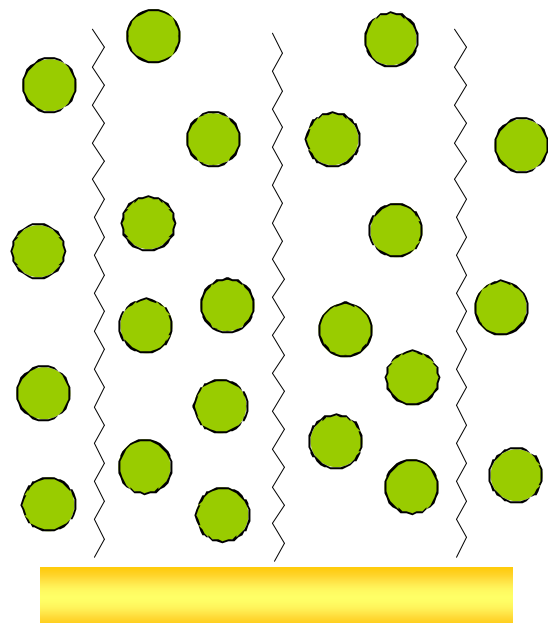


CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

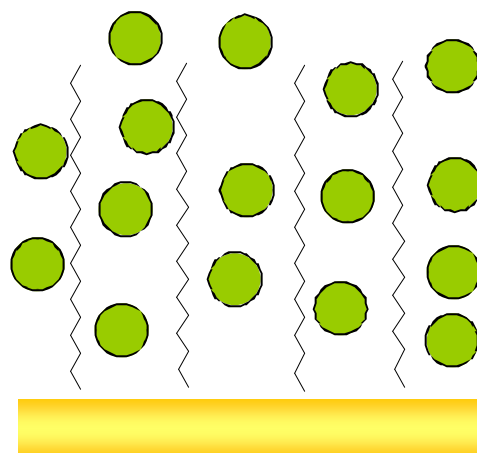
C8 %C 10%



C30

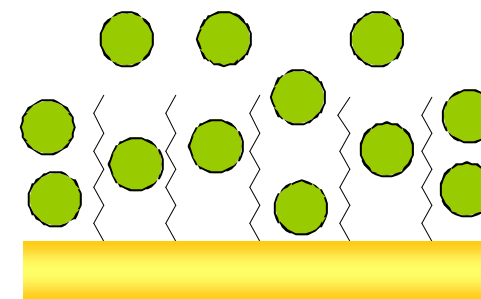


C18



THF/H<sub>2</sub>O=50/50

C8

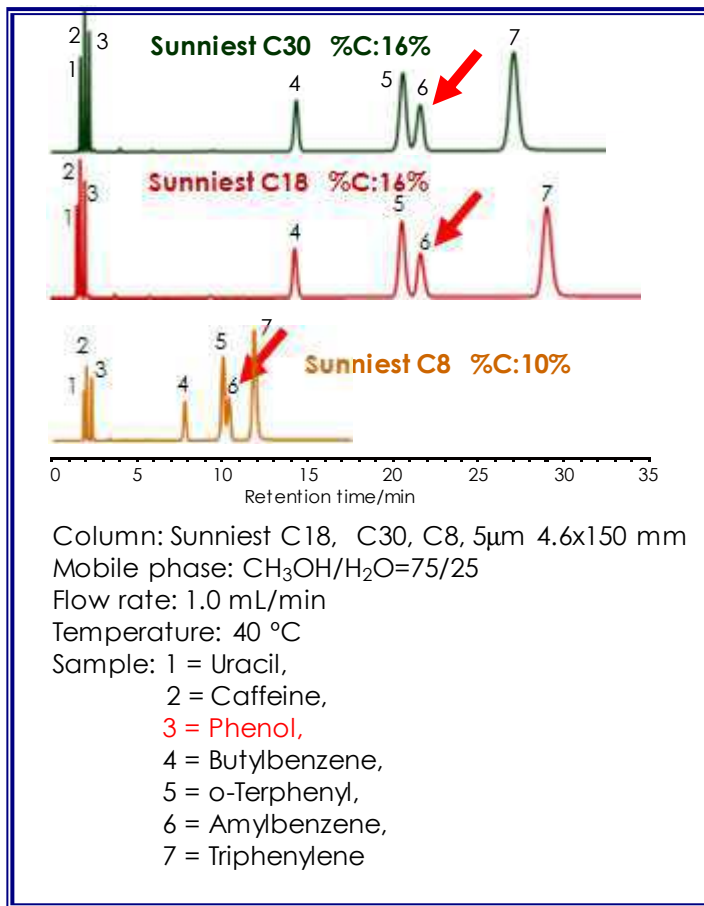


● : メタノール

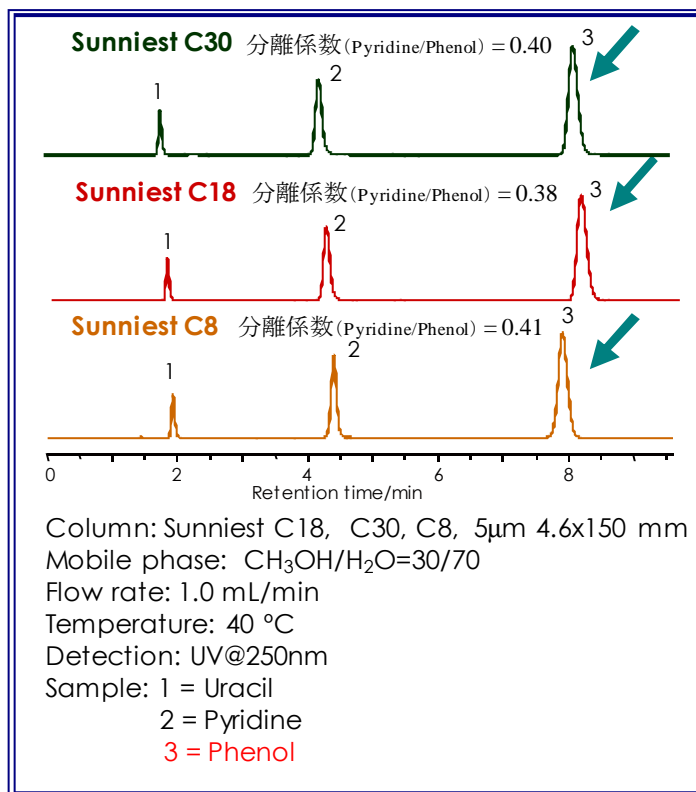
● : THF

# 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



## ◆ピリジンとフェノールの分離



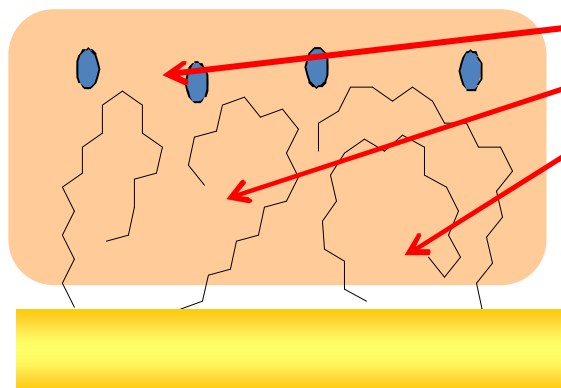
C8はC18とC30に比べ、アミルベンゼンの保持は半分であるが、フェノールの保持はほぼ同じである。

# 試料とC18固定相の相互作用場

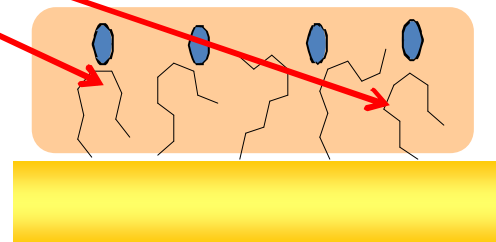
メタノール・水移動相

● : メタノール

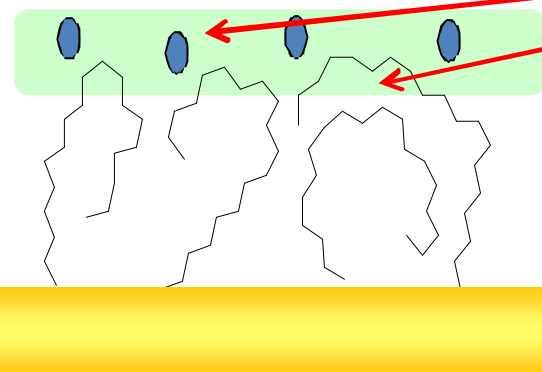
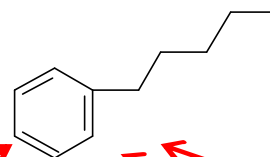
C18



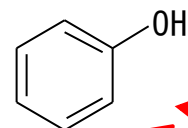
C8



アミルベンゼンは  
オクタデカンに可溶



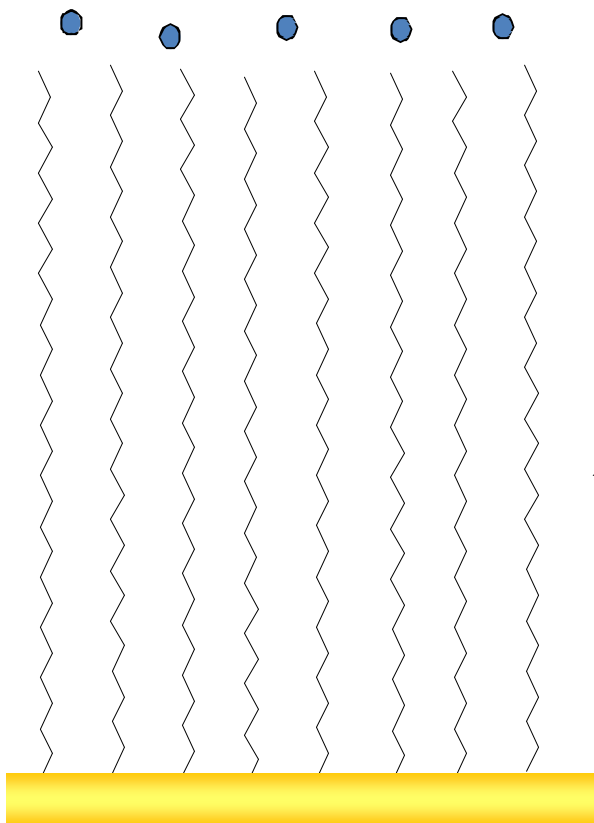
フェノールは  
オクタデカンに難溶



# 層の厚い固定相 (C30) と 層の薄い固定相 (C18) の比較

ノンポーラスシリカにポリメリックC30とモノメリックC18を結合

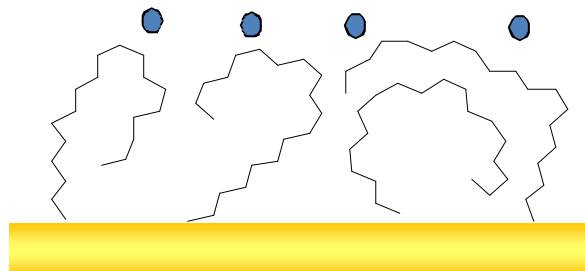
NP-C30, %C: 0.23%



炭素含有量は約1/4で層の厚みも約1/4



NP-C18, %C: 0.06%





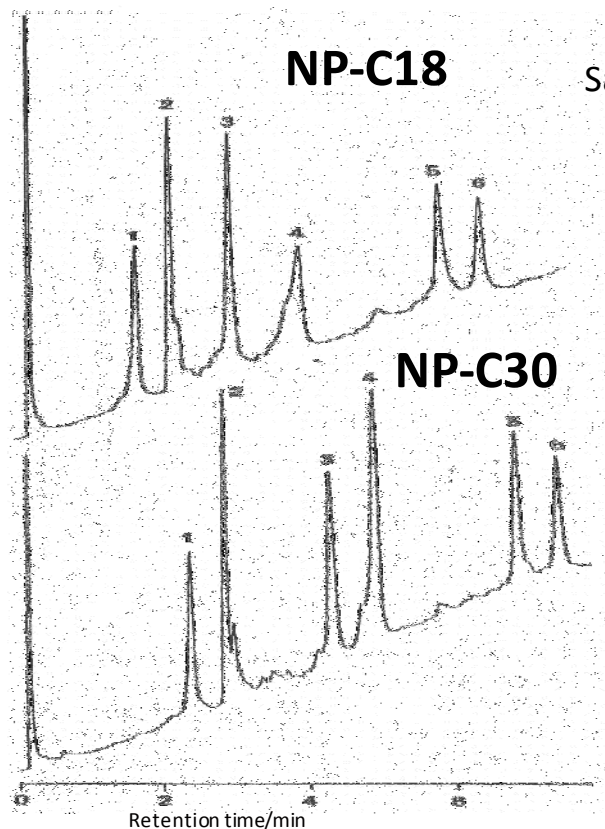
# NP-C30とNP-C18の比較 タンパク質の分離

4.6x30mm

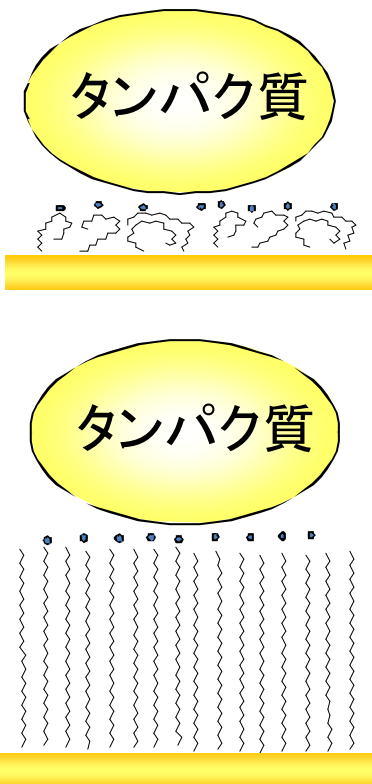
A) 0.1%TFA,

B) CH<sub>3</sub>CN

グラジエント溶離



Sample: 1 = Ribonuclease,  
2 = Insulin,  
3 = Cytochrom C,  
4 = Lysozyme,  
5 = Myoglobin,  
6 = Carbonic anhydrase



タンパク質は固定相表面のみと相互作用していると考えられる  
C18とC30はほぼ同じ分離を示す.

# NP-C30とNP-C18の比較 多環芳香族炭化水素の分離

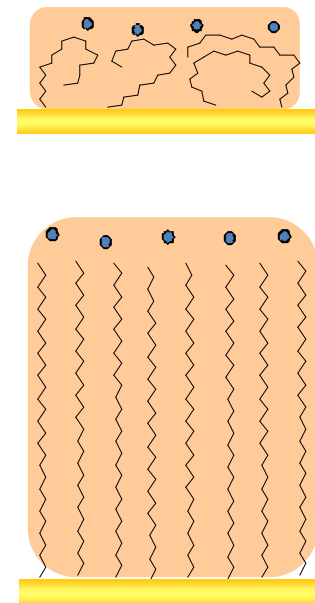
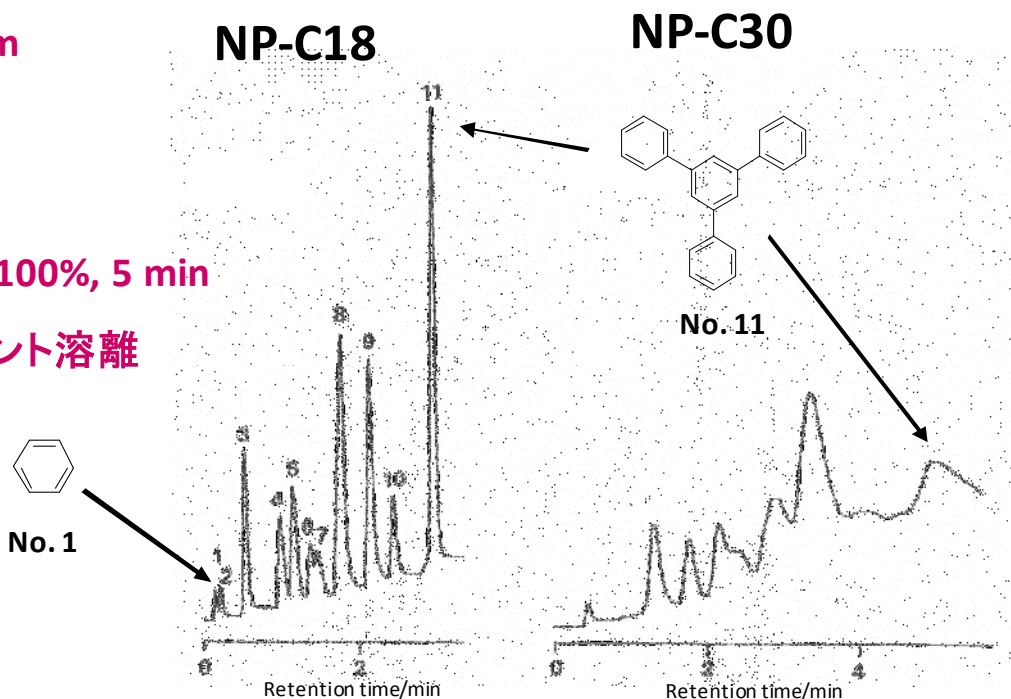
4.6x30mm

A) H<sub>2</sub>O

B) CH<sub>3</sub>OH

%B: 20%-100%, 5 min

グラジエント溶離



多環芳香族炭化水素は極性が低いため、アルキル基全体と相互作用し、NP-C30は固定相が厚く、NP-C18に比べ溶質の固定相内への出入りに時間がかかるため、ピークがブロードになると考えられる。

# NP-C30とNP-C18の比較

## ナギのメタノール抽出成分の分離

4.6x30mm

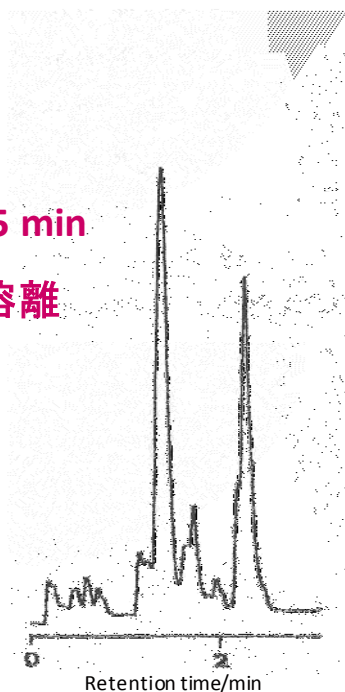
A) H<sub>2</sub>O

B) CH<sub>3</sub>OH

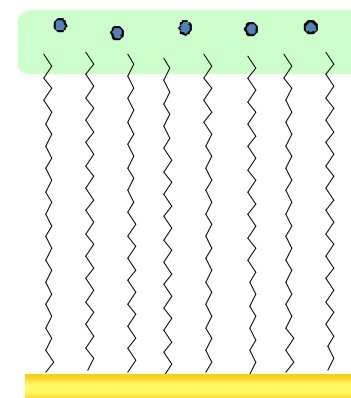
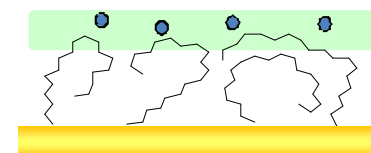
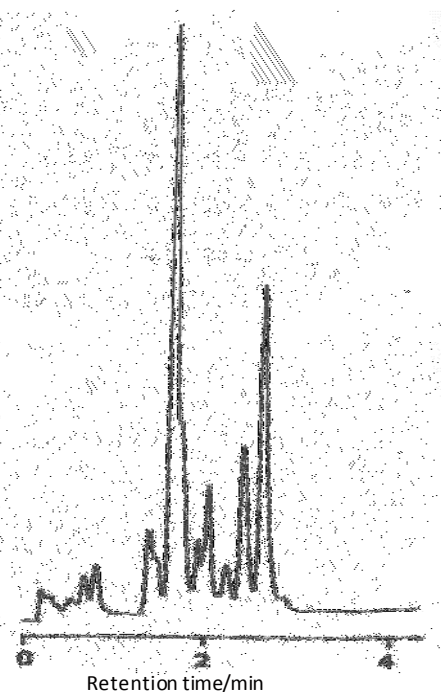
%B: 0%-30%, 5 min

グラジエント分離

NP-C18



NP-C30



ナギの極性成分も固定相表面のみと相互作用していると考えられる  
C18とC30はほぼ同じ分離を示す。

# まとめ

- ・水移動相を用いた場合には逆相アルキル基は寝込んでしまうと言われていたが、メタノール移動相でもアルキル基はほとんど寝込んでいると推察される。
- ・THF・水移動相ではアルキル基はTHFの溶媒和により立ち上がるようになり、寝込んでいると推察されるメタノール・水移動相とは異なる分離が可能である。
- ・試料の疎水性・極性の度合いにより、固定相の作用場が異なり、極性の高い試料の保持はアルキル鎖に大きく影響されない。

# 1. エンドキャッピング技術・最新の手法

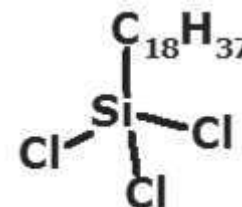
## Sunniest (SunShell) Bonding Technology

熱処理によりシラノール基をシロキサン結合に変換

# Sunniest (SunShell) Bonding Technology

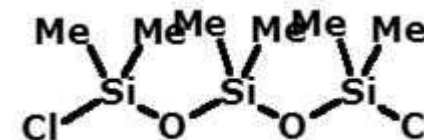
✓ Trifunctional silyl-reagent,

(Octadecyltrichlorosilane)



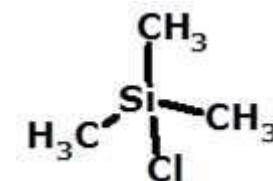
✓ Difunctional silyl-endcapping reagent

(Hexamethyldichlorotrisiloxane)



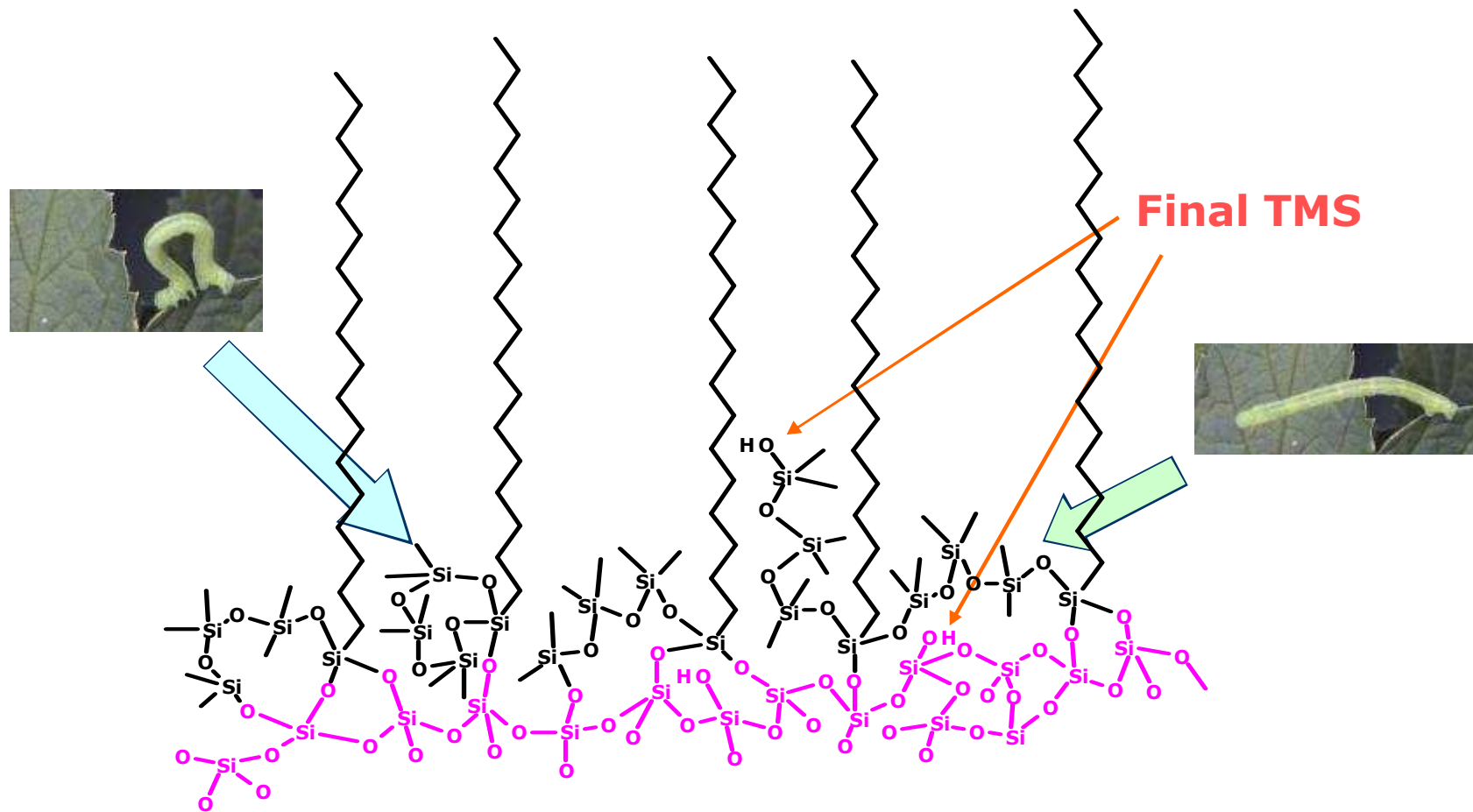
✓ Second silyl-endcapping reagent

(above + Trimethylchlorosilane(TMS))



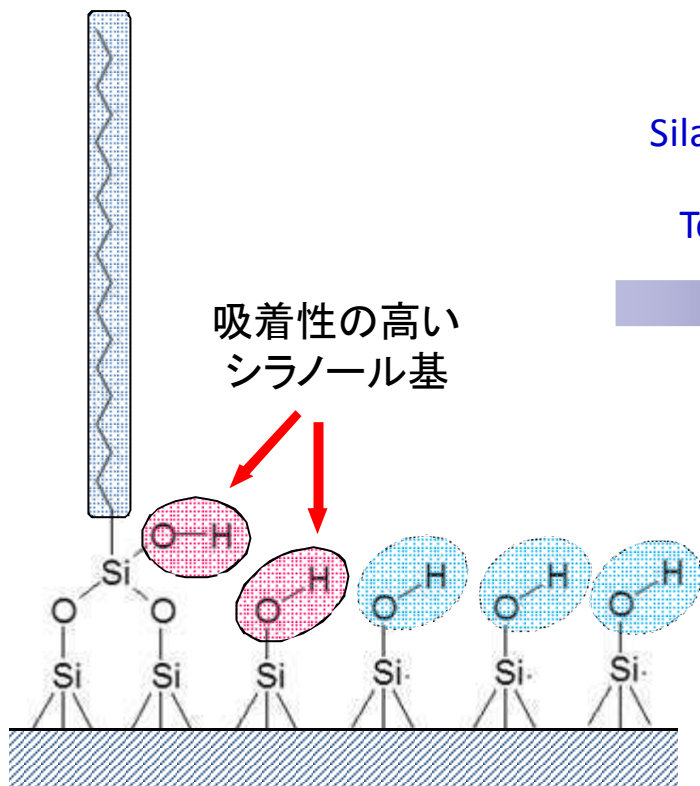
✓ High reaction temperature for endcapping

# Bonding state on silica



# Silanol Activity Control

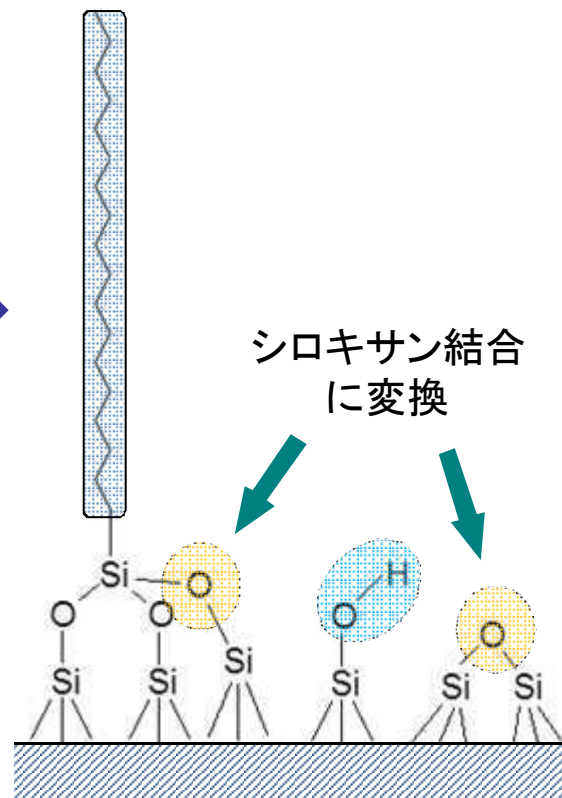
Typical no endcapping C18




Silanol Activity Control Technology



Sunrise C18-SAC



 有機溶媒と水からなる移動相中では疎水基(C18)の影響で水和しにくいシラノール基

 疎水基(C18)の影響が少なく、十分水和できるシラノール基



# 残存シラノール基の割合

シリカ表面上のシラノール基量は  $8 \sim 9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$

C18結合後2/3のシラノール基は残っている.

C18の結合密度  $\sim 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$

C18およびエンドキャッピング (TMSなど) 後

1980年代 1/2

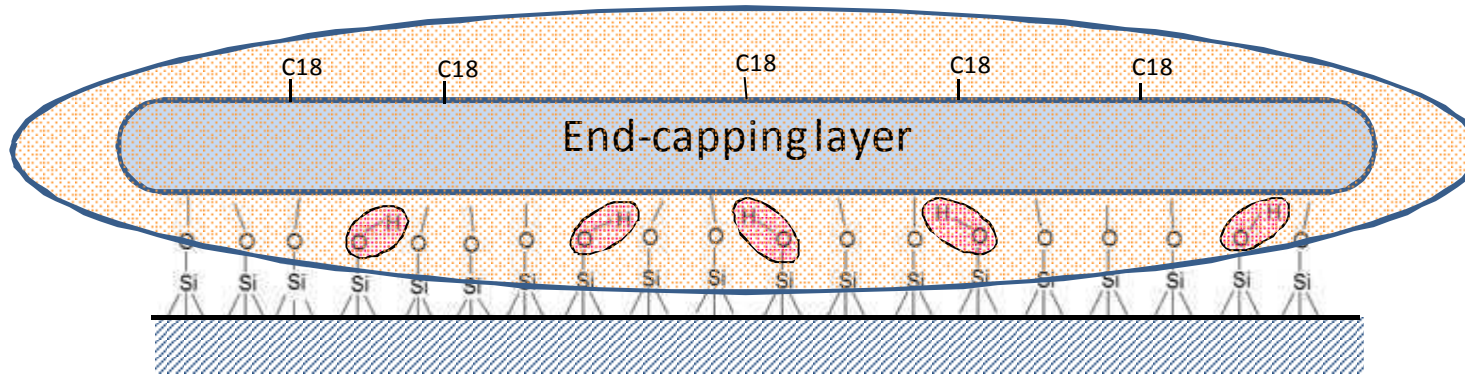
1990年代 2/5

2000年代 1/3 のシラノール基は残っている.

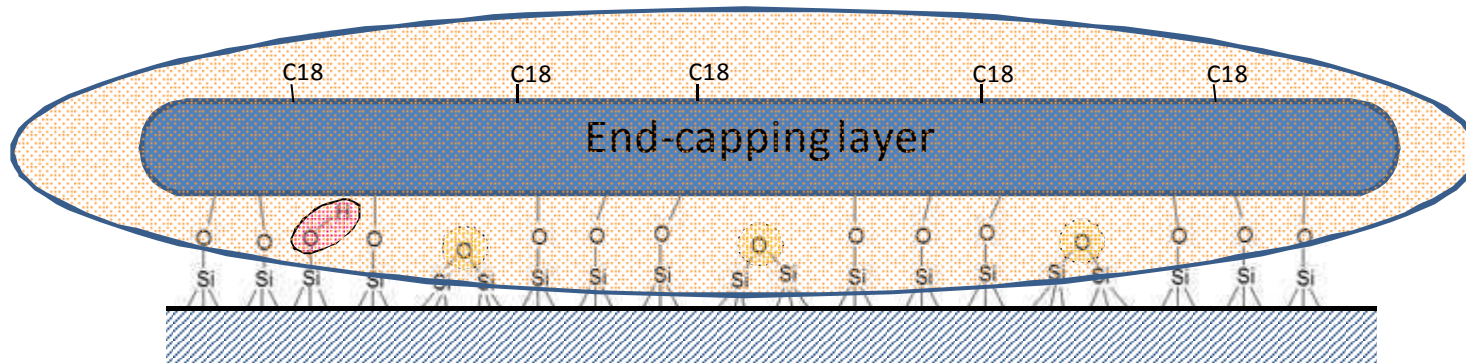
1/3の残存シラノール基の影響はエンドキャッピング剤によりほぼ封鎖される.

# 疎水性の比較

Conventional end-capping



Both Sunniest end-capping and Silanol Activity Control



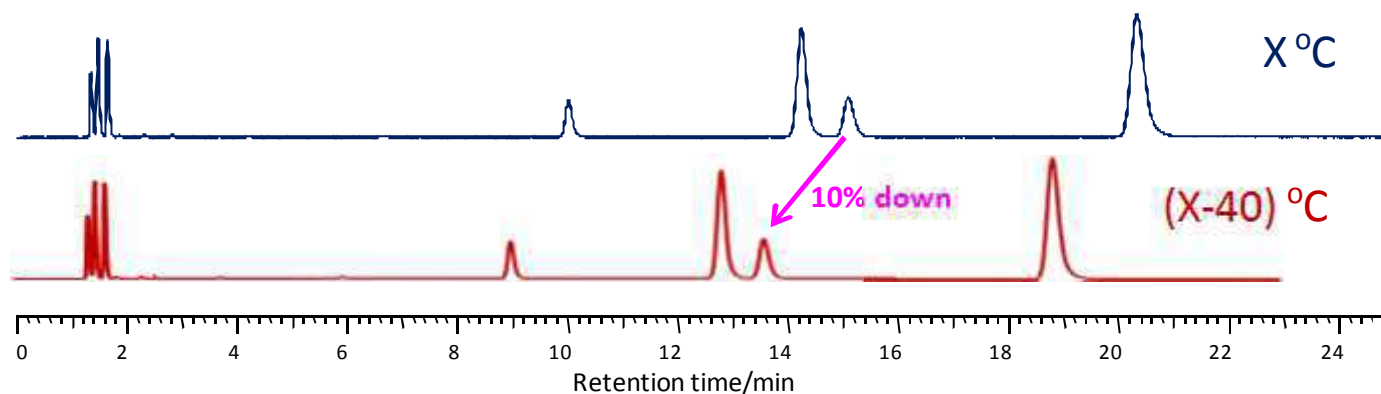
More  
Hydrophobic

# 炭素含有量と保持時間

(2種類の異なる反応温度)

エンドキャッピングの反応温度: X °C (200 °C 以上)      シリカ基材: コアシェル(150m<sup>2</sup>/g)

エンドキャッピングの 反応温度	X °C	(X-40) °C
C18結合後の炭素含有量	7.0%	7.0%
エンドキャッピング後の 炭素含有量	7.3% (熱によりC18が一部切断)	7.7% (熱によるC18の切断はない)
Silanol Activity Control	Yes(シロキサン結合変換)	No
塩基性化合物のテーリング度合い	良好	良好(X °Cと同じ)
Retention factor (k)	10.4	9.5



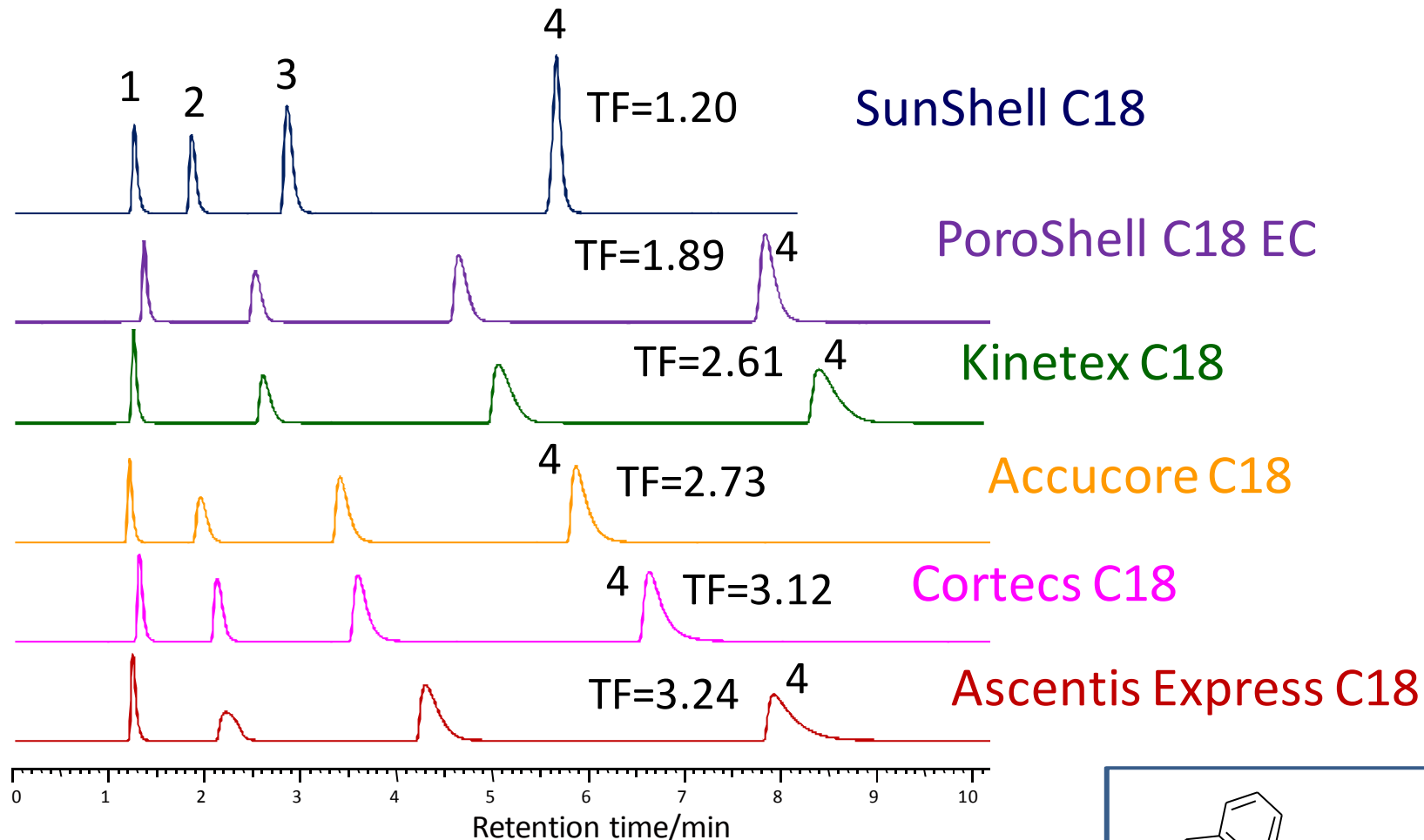
# 保持と炭素含有量との関係

	Retention factor	Carbon loading (%)	Specific surface area <sup>b</sup> (m <sup>2</sup> /g)
SunShell C18, 2.6 μm	10.4	7.3	125
Ascentis Express C18, 2.7 μm	9.7	8.0	133
PoroShell C18 EC, 2.7 μm	9.0	8.5	135
Cortecs C18, 2.7 μm	7.7	7.3	113
Accucore C18, 2.7 μm	7.4	8.8	130
Kinetex C18, 2.6 μm	5.4	4.9	102

- a. Retention factor of amylbenzene, Mobile phase; methanol:water=75:25, 40 °C,  
b. Measured using C18 materials sintered at 600 degree Celsius for 8 hours.

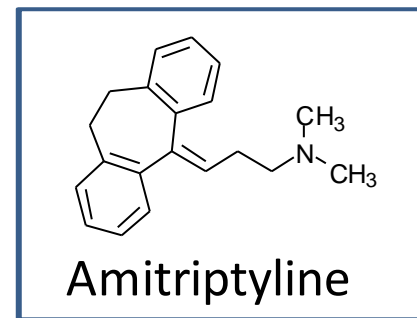
Both Sunniest end-capping and Silanol Activity Control

# Comparison of amitriptyline peak

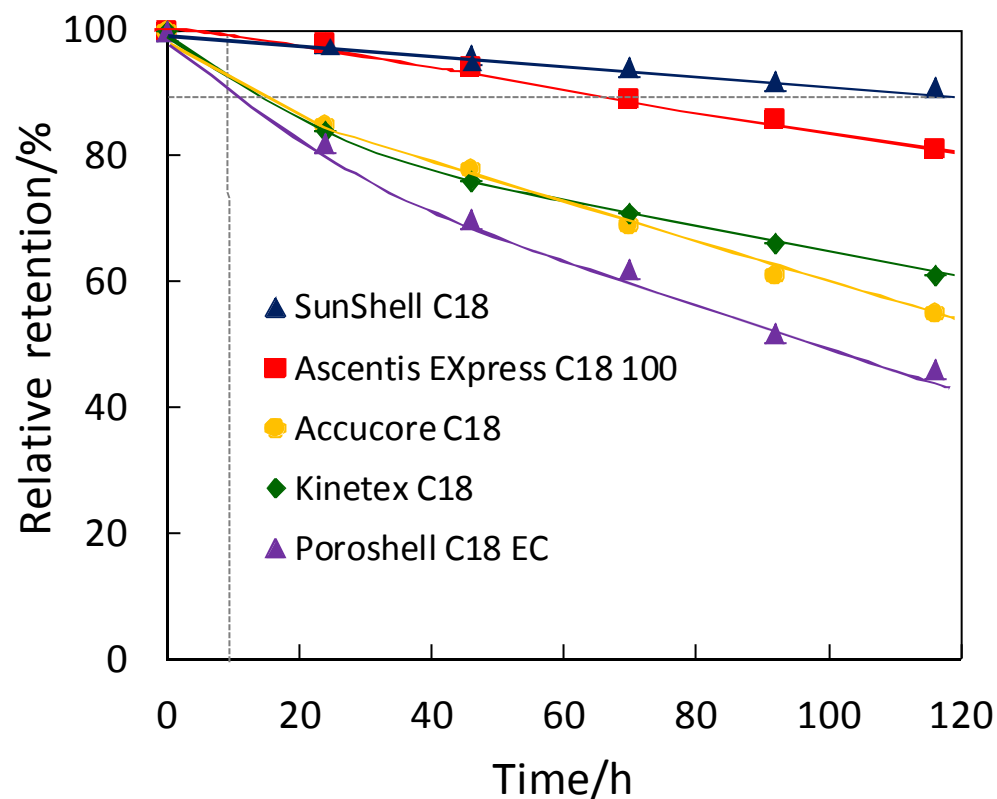


Mobile phase: Acetonitrile/10mM ammonium acetate pH6.8=(40:60)  
 Column dimension: 150 x 4.6 mm, Flow rate: 1.0 mL/min, Temp.: 40°C

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



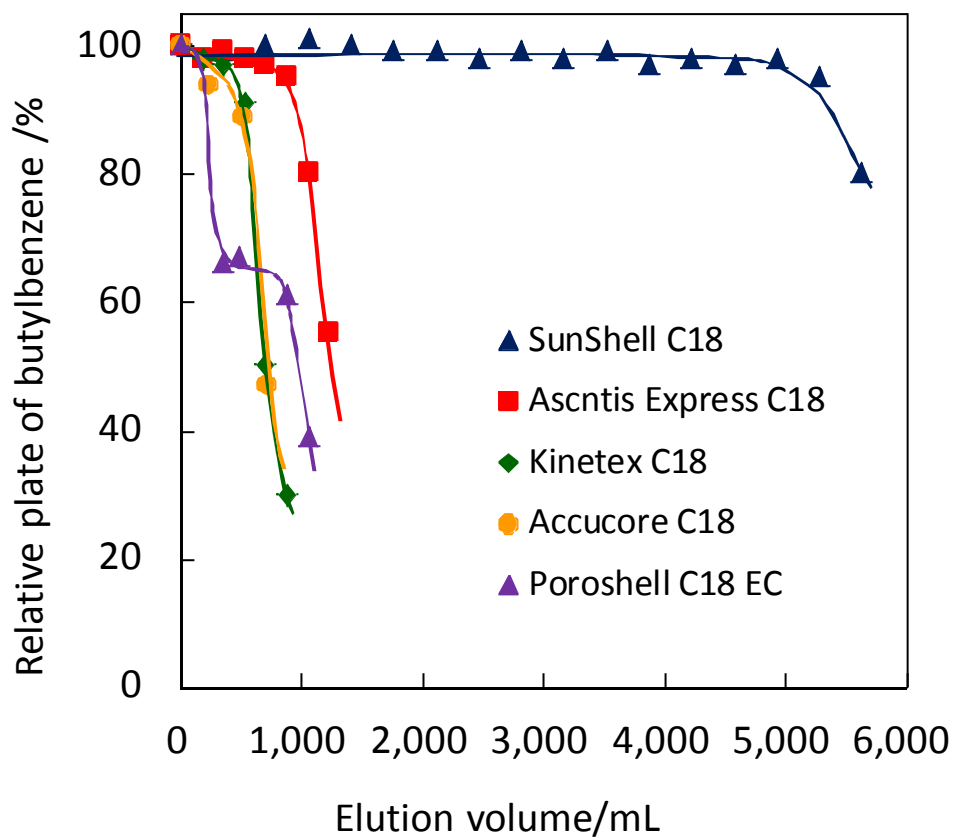
# 酸性条件での耐久性



Durable test condition  
Column size: 50 x 2.1 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/1.0% TFA, pH1=10/90  
Flow rate: 0.4 mL/min  
Temperature: 80 °C

Measurement condition  
Column size: 50 x 2.1 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40  
Flow rate: 0.4 mL/min  
Temperature: 40 °C  
Sample: 1 = Uracil  
2 = Butylbenzene

# アルカリ性条件での耐久性



Durable test condition

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>OH/20mM Sodium borate/  
10mM NaOH=30/21/49 (pH10)

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 50 °C

Measurement condition

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=70/30

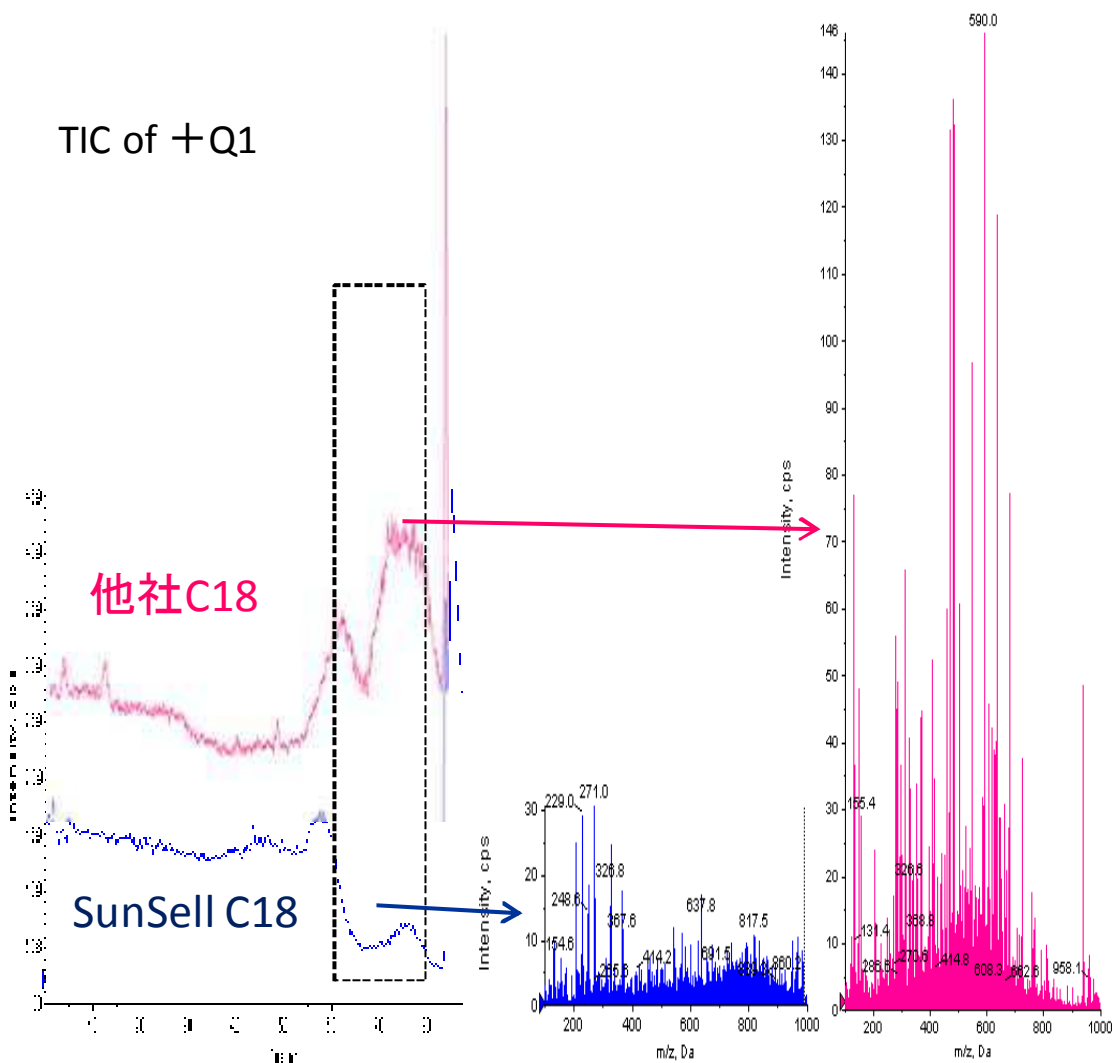
Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Butylbenzene

# Bleeding test using LC/MS

+Q1: 5.997 min to 7.999 min of Sample



Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

A) 0.1% acetic acid

B) CH<sub>3</sub>CN

Gradient:

Time: 0min 1min 5min 7min

%B: 5% 5% 100% 100%

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 40 °C

MS: ABI API-4000

Ionization:

Turboionspray (cation)

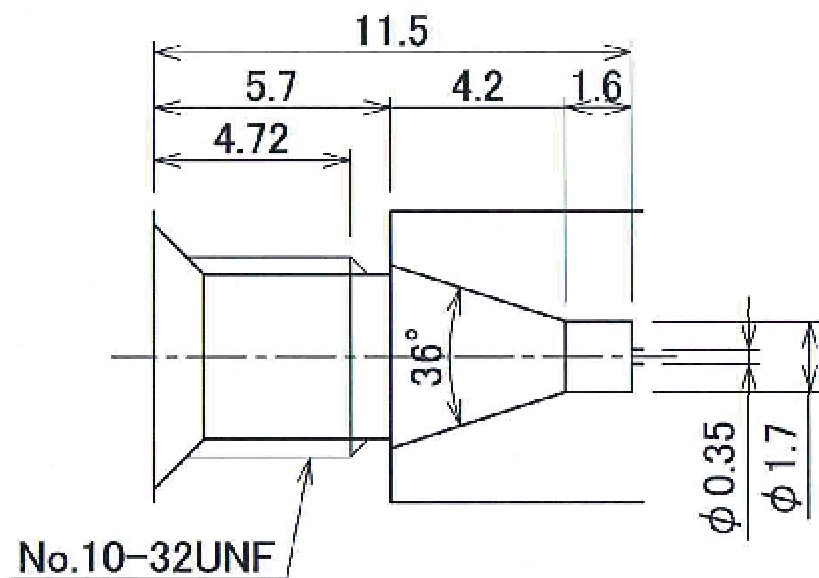
Measurement mode:

Q1 Scan m/z 100-1000

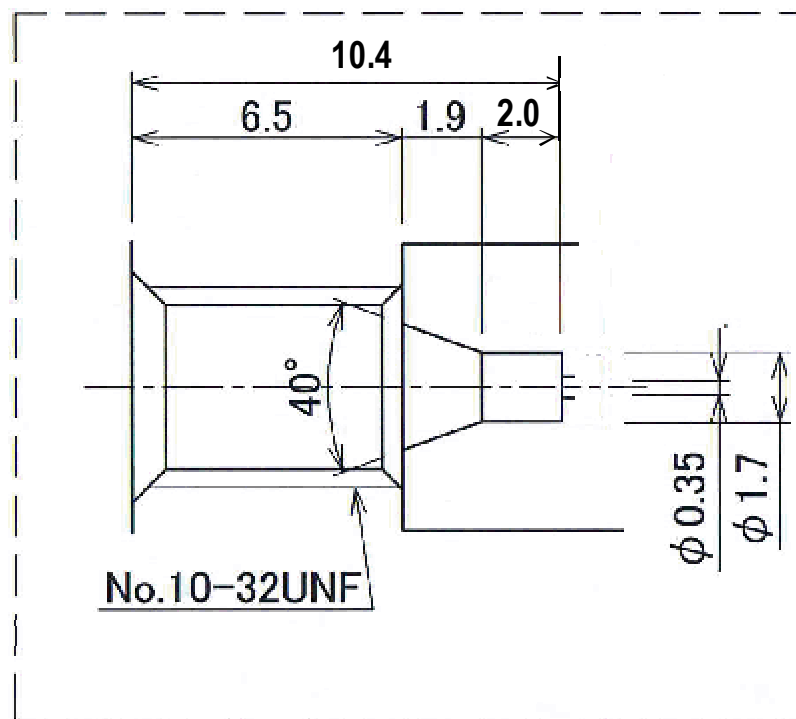


# エンドフィッティングの違い

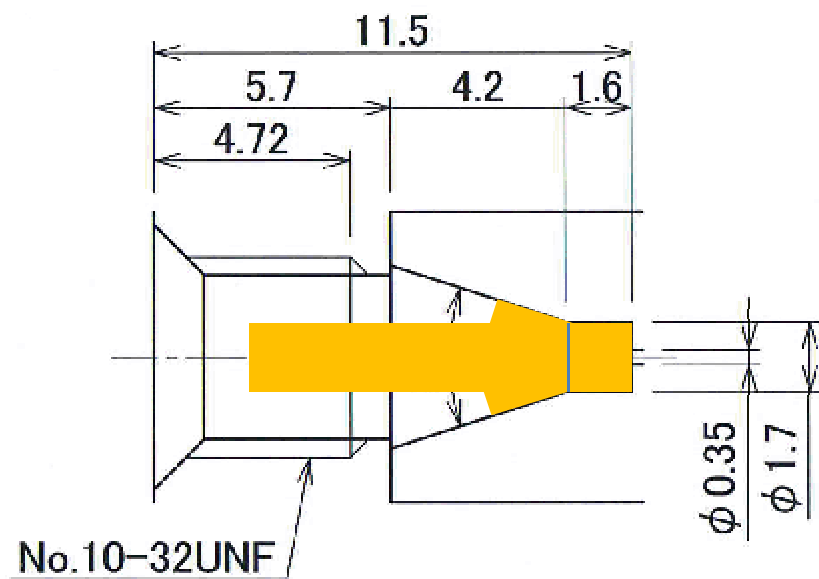
A社 接続部



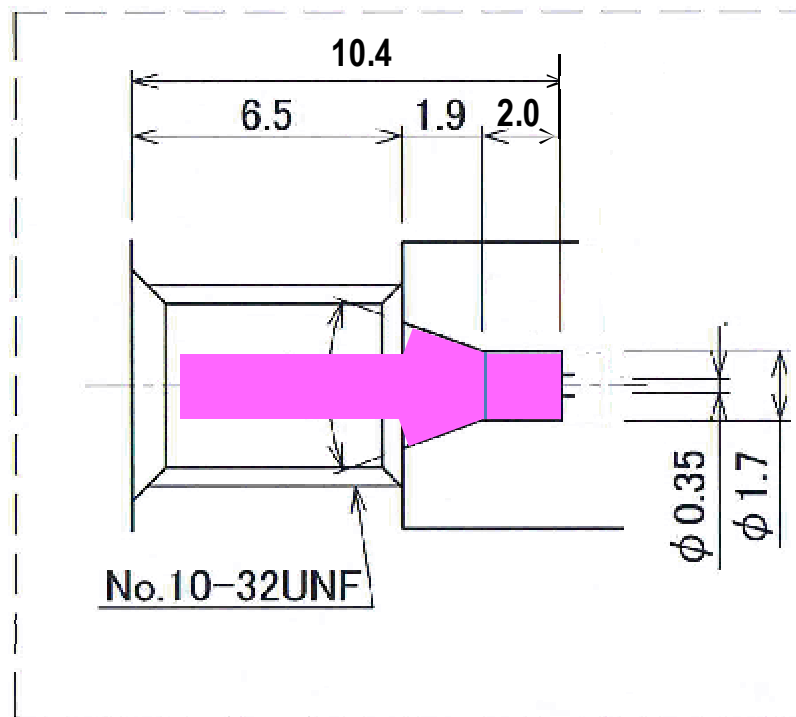
パーカータイプ 接続部  
(IDEX社 IsoBar hardware)



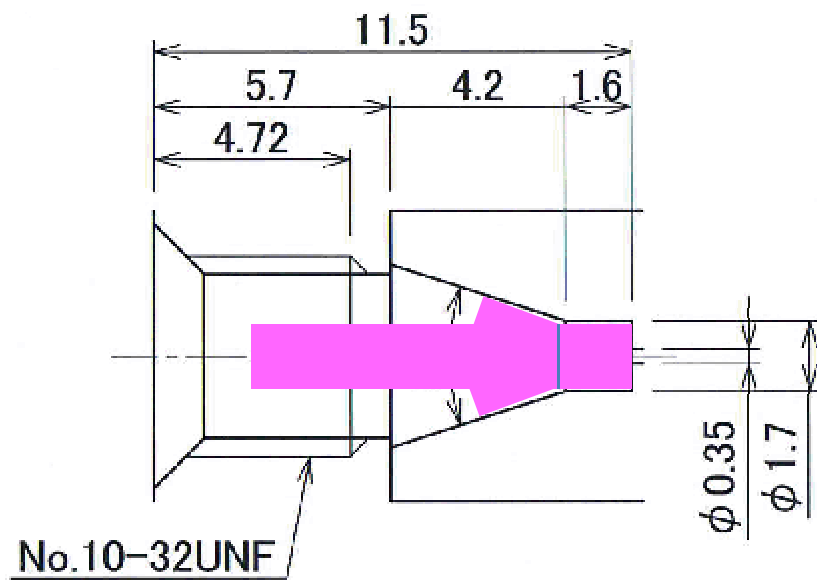
A社 接続部



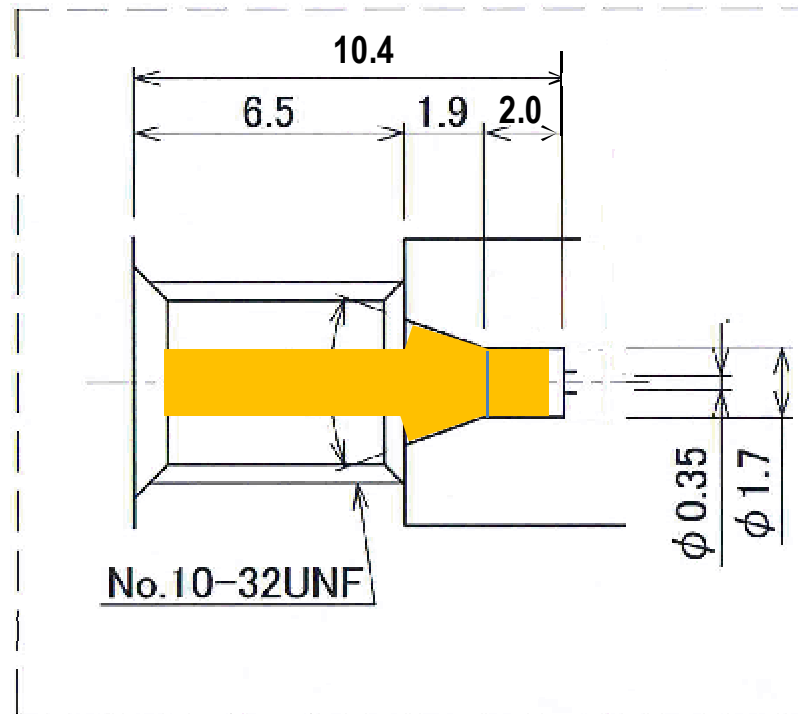
パーカータイプ 接続部  
(IDEX社 IsoBar hardware)



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](mailto:info@chromanik.co.jp)  
URL: <http://chromanik.co.jp>