



C18とは分離が変わる！ シラノールを活かしたC18と 新たな固定相PFP&18

クロマニックテクノロジーズ
塚本友康 長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>



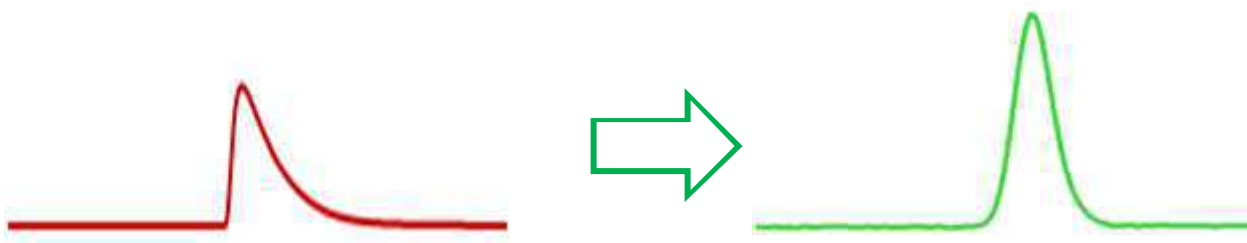


シラノール

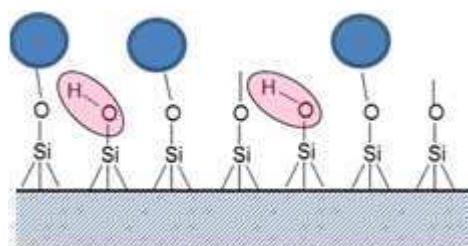
と

エンドキャップ

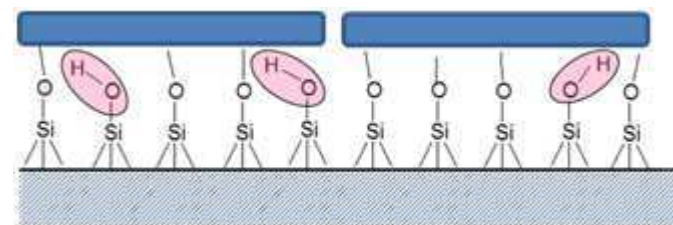
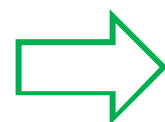
エンドキャッピング



塩基性化合物のピーク形状の改善



ピンポイントな
エンドキャッピング



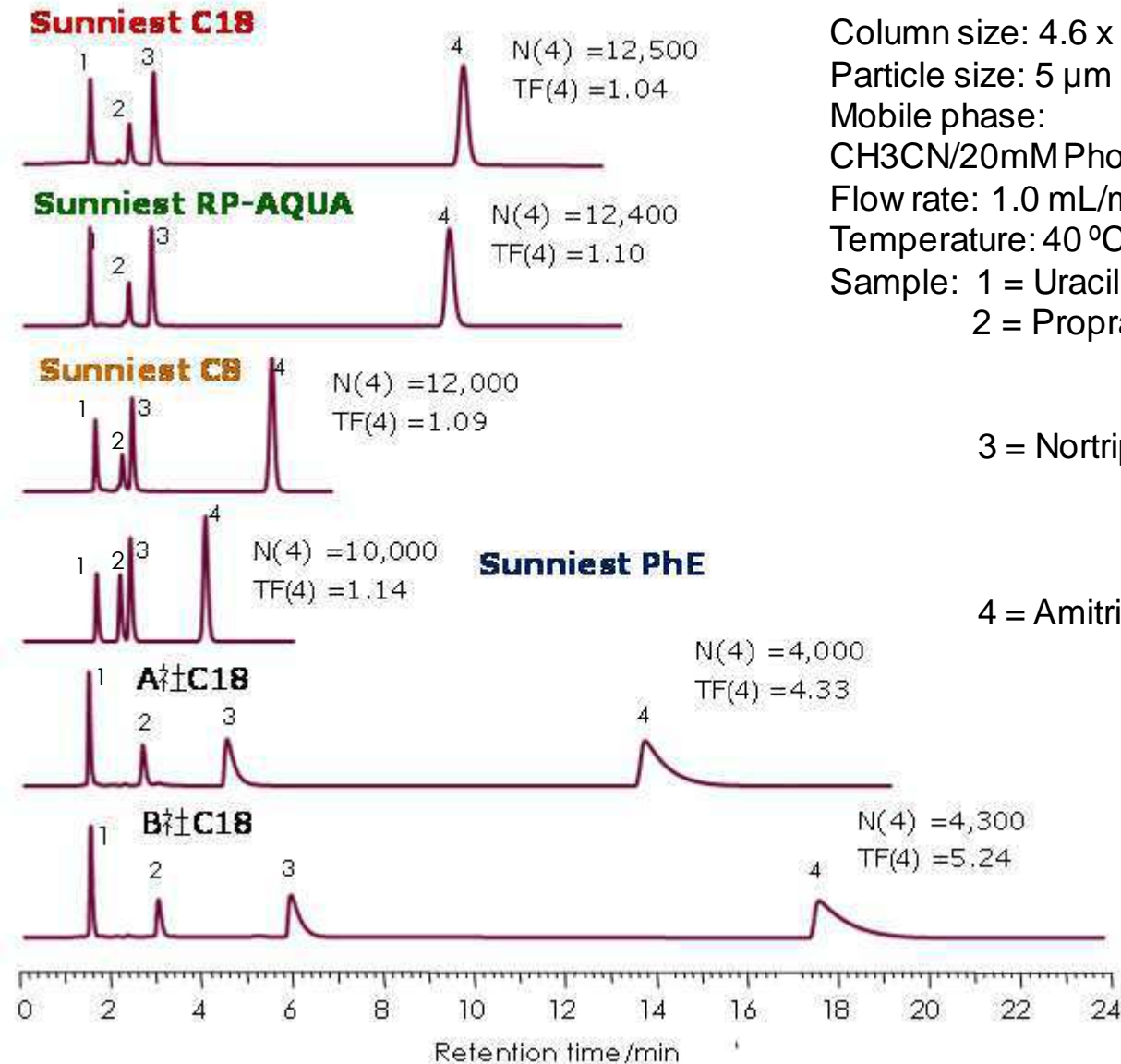
表面を覆うような
エンドキャッピング

手法

TMS化、マルチステージタイプ、
ポリメリックエンドキャッピング
高温気相エンドキャッピング
Sunniest エンドキャッピング
シラノールアクティビティコントロール



Sunniestインドキャッピングの効果



Column size: 4.6 x 150 mm

Particle size: 5 μ m

Mobile phase:

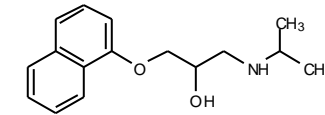
CH₃CN/20mM Phosphate buffer pH7.0 = 60/40

Flow rate: 1.0 mL/min

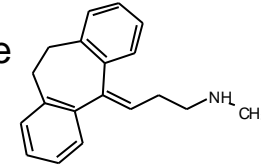
Temperature: 40 °C or 22 °C

Sample: 1 = Uracil

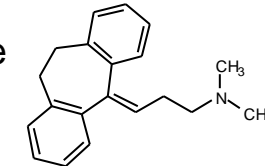
2 = Propranolol



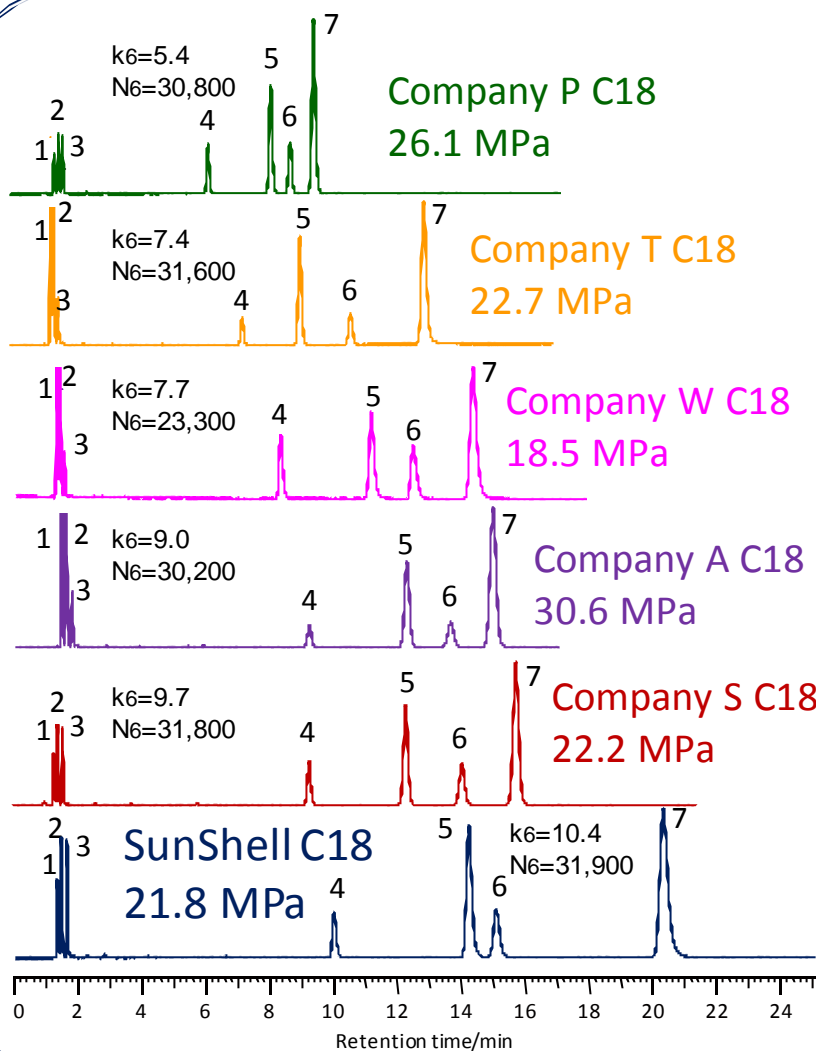
3 = Nortriptyline



4 = Amitriptyline



標準試料の分離比較



Column:

Company P C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (26.1 Mpa, 30,800 plate)
 Company T C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (22.7 Mpa, 31,600 plate)
 Company W C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (18.5 Mpa, 23,300 plate)
 Company A C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (30.6 Mpa, 30,200 plate)
 Company S C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (22.2 Mpa, 31,800 plate)
 SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (21.8 Mpa, 31,900 plate)

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=75/25$

Flow rate: 1.0 mL/min

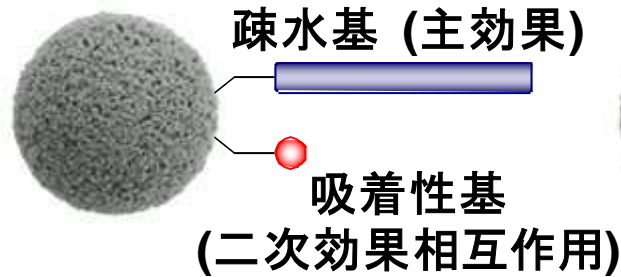
Temperature: 40 $^\circ\text{C}$

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

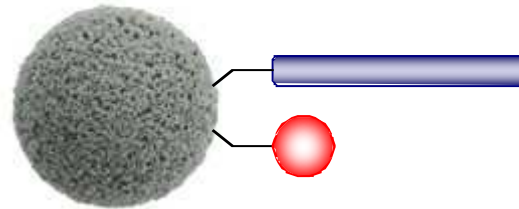
	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/o-Terphenylene)
Company P C18	0.48	1.54	1.20
Company T C18	0.35	1.56	1.50
Company W C18	0.38	1.59	1.32
Company A C18	0.42	1.57	1.25
Company S C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.39	1.60	1.46



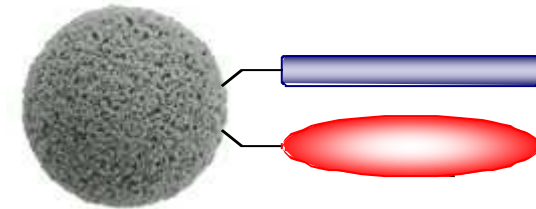
同じ官能基で差がでるのは？



既存の分離剤

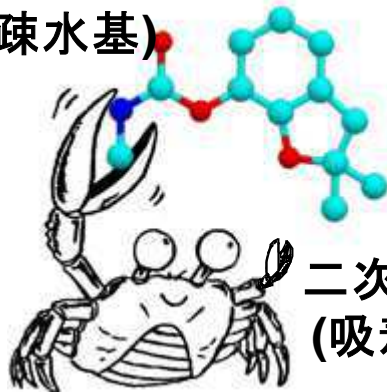


二次効果相互作用
制御型分離剤



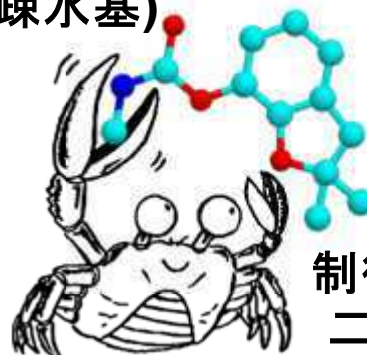
第二主効果を持つ
二足型分離剤

主効果
(疎水基)



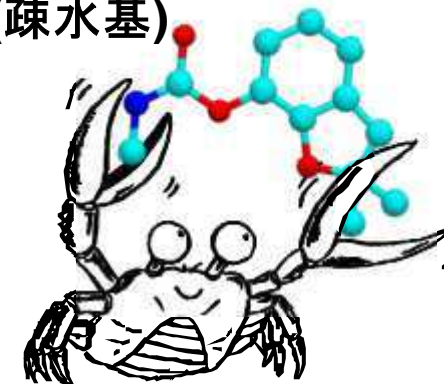
二次効果
(吸着等)

主効果
(疎水基)



制御された
二次効果

主効果
(疎水基)



第二の
主効果



シリノール



カラム、分離にとっては

良くない

シラノール基の相互作用

- | | |
|----------|-------------------|
| 1. 吸着 | Si-OH |
| 2. イオン交換 | Si-O ⁻ |
| 3. 水素結合 | Si-OH |

- | |
|---|
| <p>1) 吸着・順相クロマトグラフィーで用いられる未修飾シリカ中のシラノール基</p> <p>2) シリカ系逆相充填剤の残存シラノール基</p> |
|---|



シラノール基のイオン交換性!?



塩基性化合物のテーリング

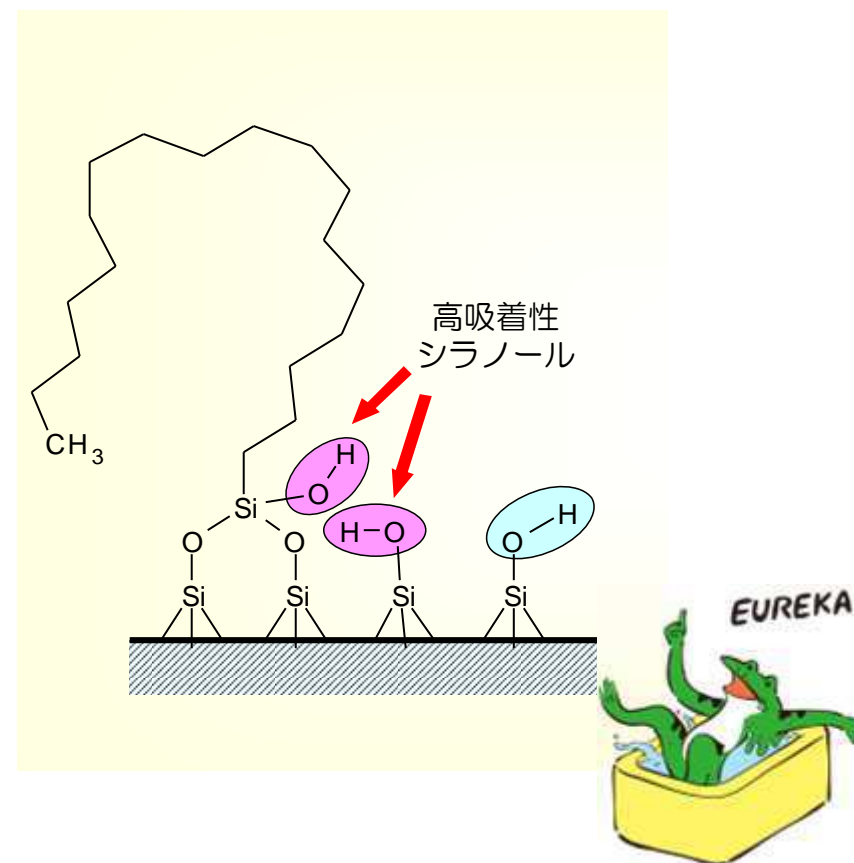


シラノールのイオン交換性

イオン交換クロマトグラフィにおいて
すべての塩基性物質が
テーリングするわけではない



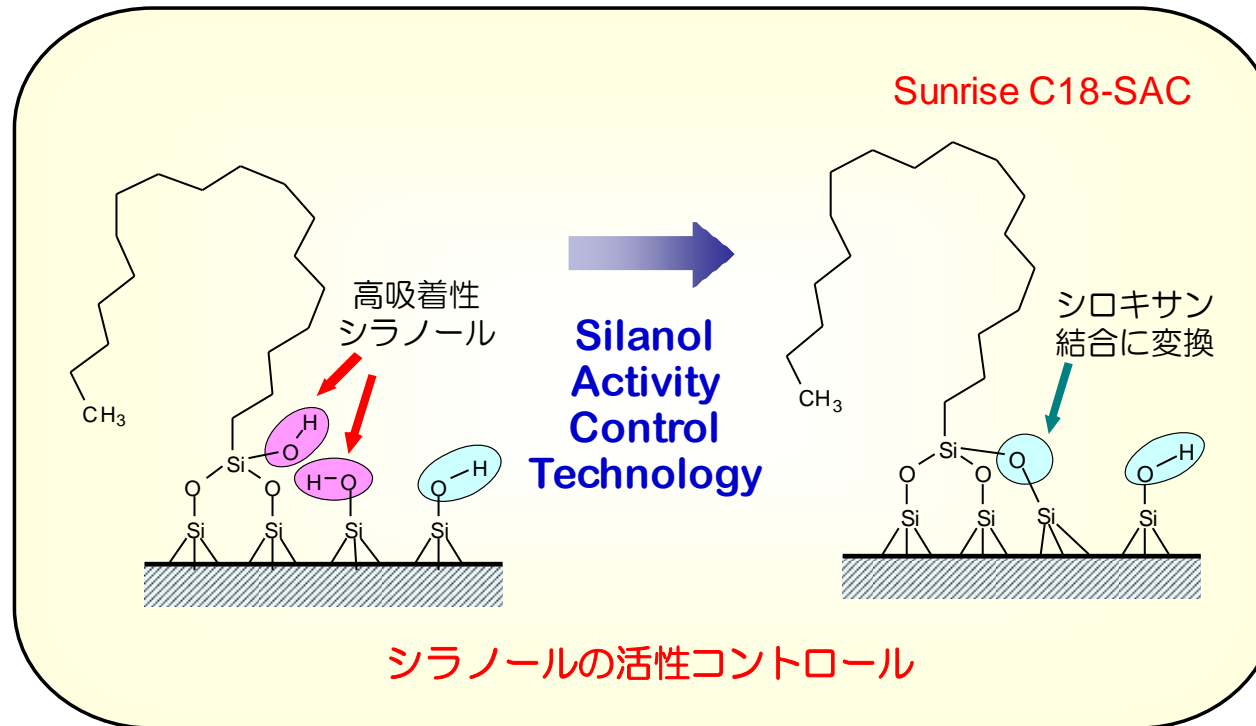
C18カラム充填剤上に、塩基性物質を
テーリングさせる要因があるのでは



C18基近くの疎水場に存在する
シラノール基が水和しようとし
塩基性物質を強く引き付けるのでは?



シラノールアクティビティコントロール



シリカは結晶構造ではなくアモルファス



条件次第では原子を動かすことができる

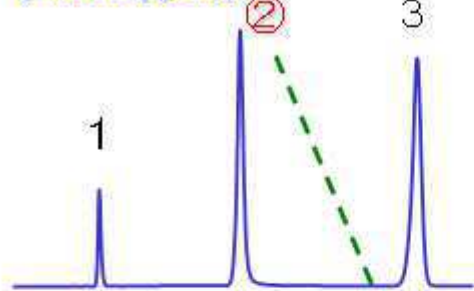


シラノール基による分離の変化

■ ピリジンの溶出順とピーク形状の比較

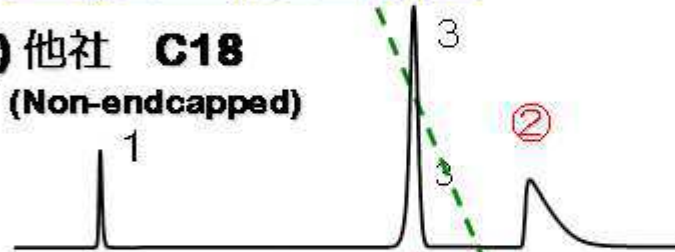
A) Sunrise C18

(Endcapped)

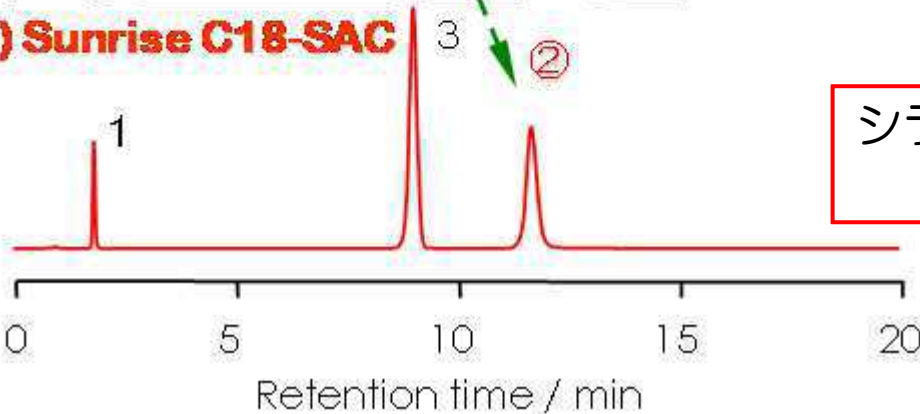


B) 他社 C18

(Non-endcapped)



C) Sunrise C18-SAC



Column size: 4.6 X 150mm

Mobile phase: CH₃OH/H₂O = 30:70

Sample: 1 = Uracil, ② = Pyridine, 3 = Phenol

シラノール基の影響でピリジンが移動するが
テーリング

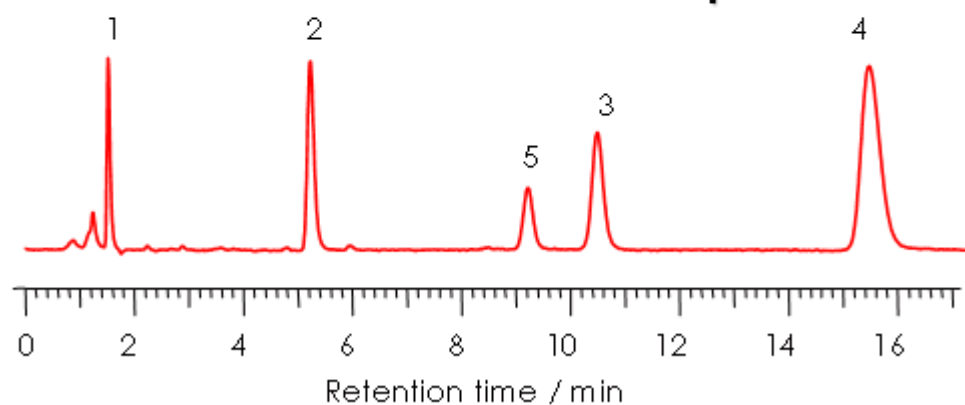
シラノール基の影響でピリジンが移動するが
テーリング無し

塩基性化合物の選択性の比較

A) Sunrise C18



B) Sunrise C18-SAC



Column size: 4.6x150 mm

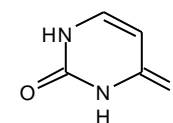
Mobile phase:

CH₃CN/20mM Phosphate buffer pH3.0 or pH4.5 = 50:50

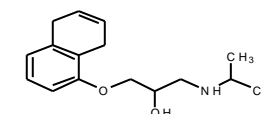
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

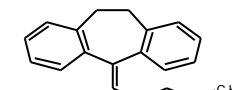
Sample: 1 = Uracil



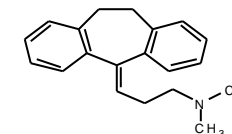
2 = Propranolol



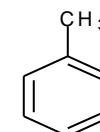
3 = Nortriptyline



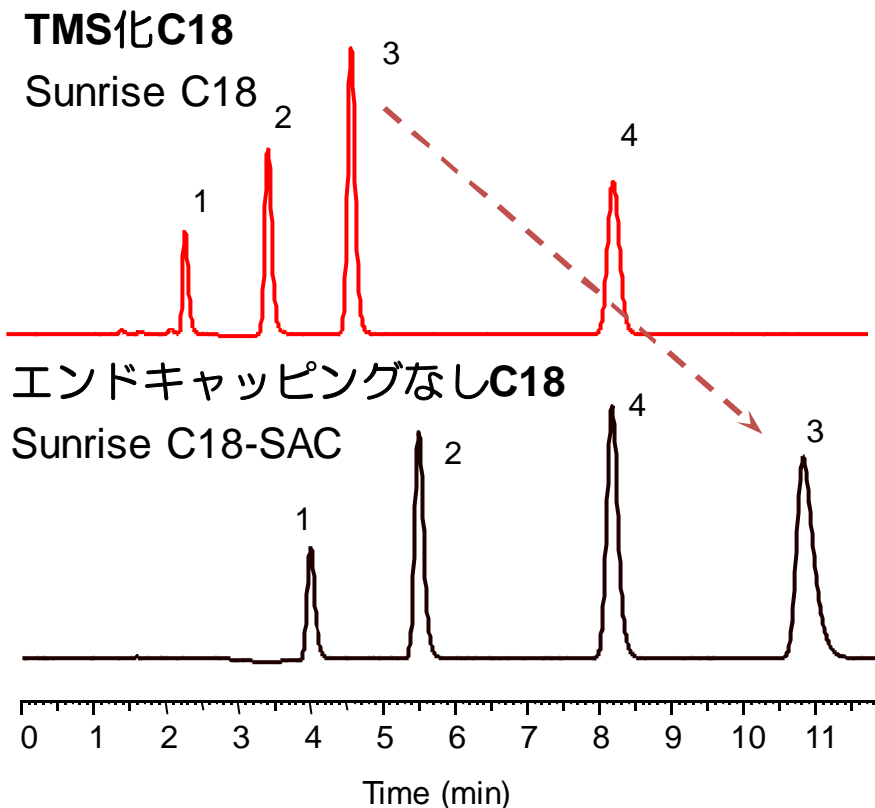
4 = Amitriptyline



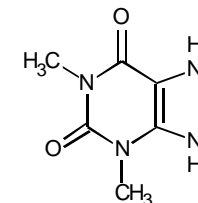
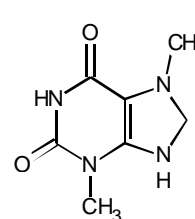
5 = Toluene



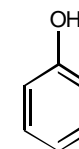
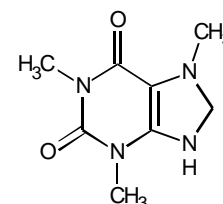
水素結合性 (キサンチン類の分離)



1=テオブロミン 2=テオフィリン



3=カフェイン 4=フェノール



カラムサイズ：4.6 x 150 mm

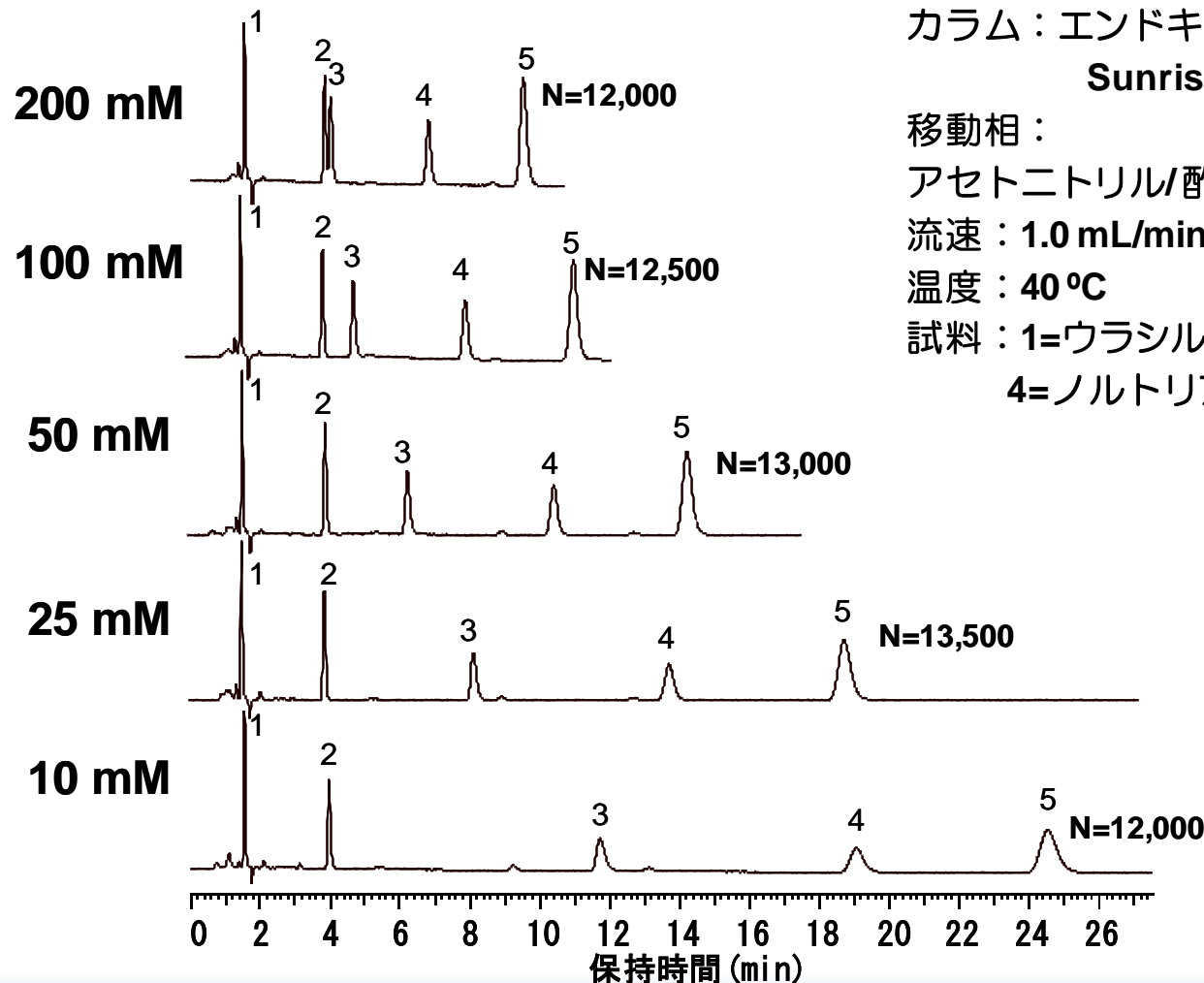
移動相：メタノール/20mMリン酸二水素カリウム pH4.5 (30:70)

流速：1.0 mL/min

温度：40 °C



イオン交換 塩濃度の影響



カラム：エンドキャッピングなしC18,
Sunrise C18-SAC 4.6 x 150 mm

移動相：

アセトニトリル/酢酸アンモニウム pH 4.1 (70:30)

流速：1.0 mL/min

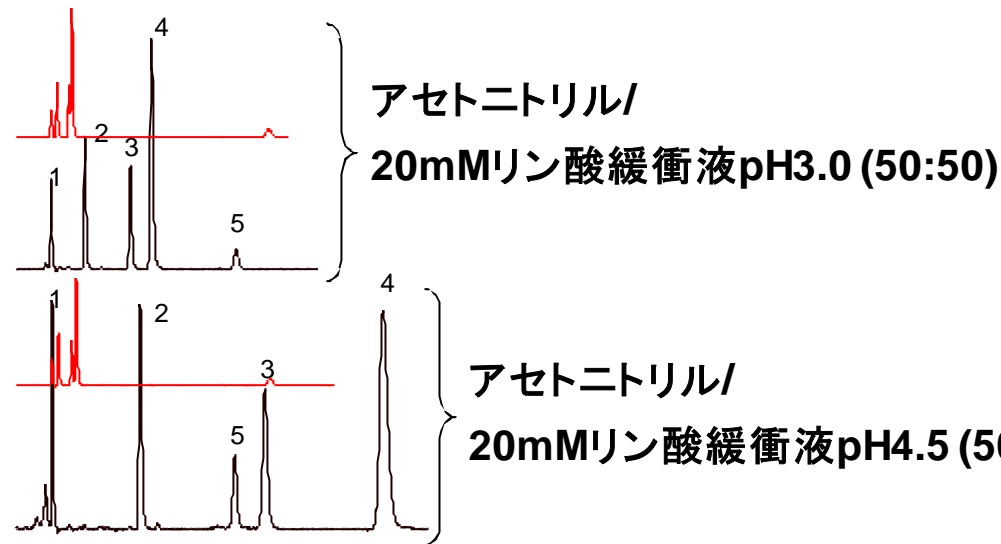
温度：40 °C

試料：1=ウラシル, 2=トルエン, 3=プロプラノロール,
4=ノルトリプチリン, 5=アミトリプチリン

塩濃度を上げると保持が
小さくなる, つまり
イオン交換が働いている



イオン交換 エンドキャップC18との保持比較



カラム: **TMS化C18, Sunrise C18**

4.6 x 150 mm

エンドキャップなし

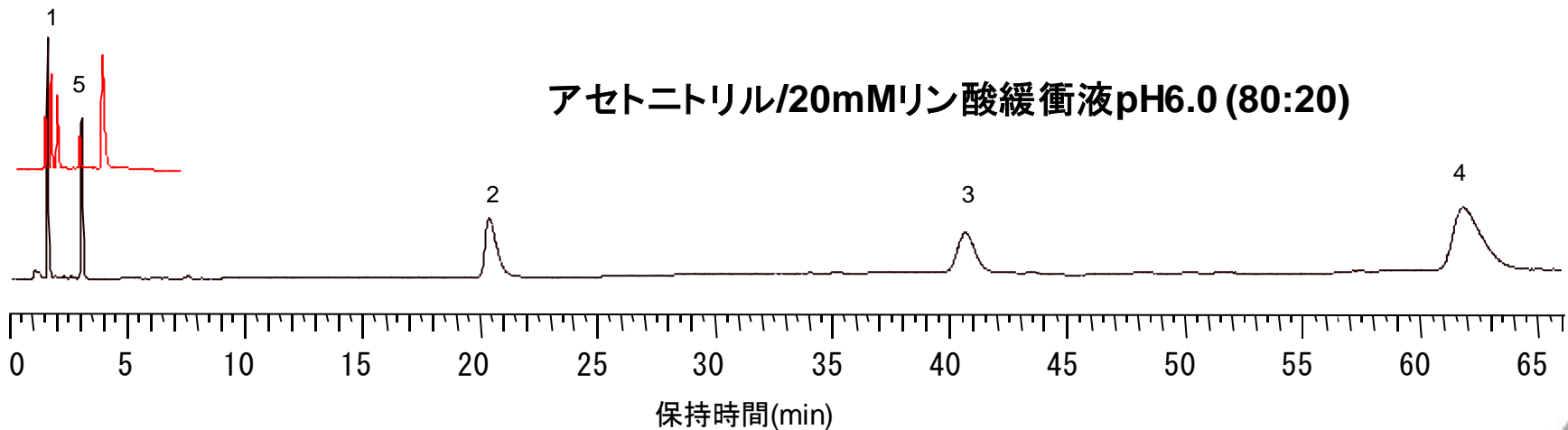
C18, Sunrise C18-SAC

4.6 x 150 mm

流速: 1.0 mL/min

温度: 40 °C

試料: 1=ウラシル, 2=プロプラノロール,
3=ノルトリプチリン,
4=アミトリプチリン, 5=トルエン

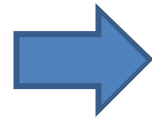




実際の使用例

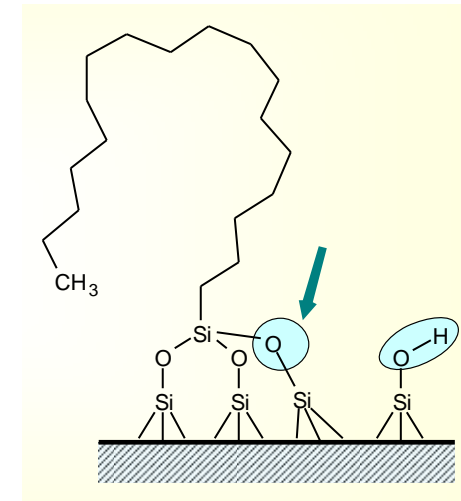
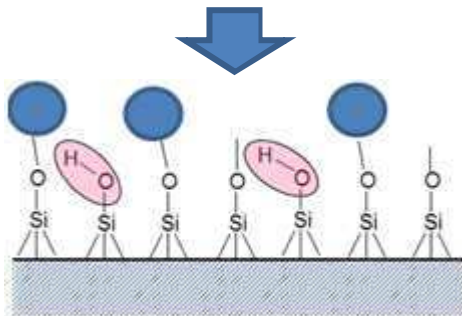
カラムの製造終了

同じメーカーの
最新カラムに変更後
分離が変わる



- シラノール基の残存量の違い
- 基材シリカの違い
- C18 試薬の違い
- エンドキャッピング方法・試薬の違い

製造終了となる
カラムの多くは・・・



過去数十年前に作られたメソッドは
シラノール基の相互作用を自然と利用
していた可能性がある

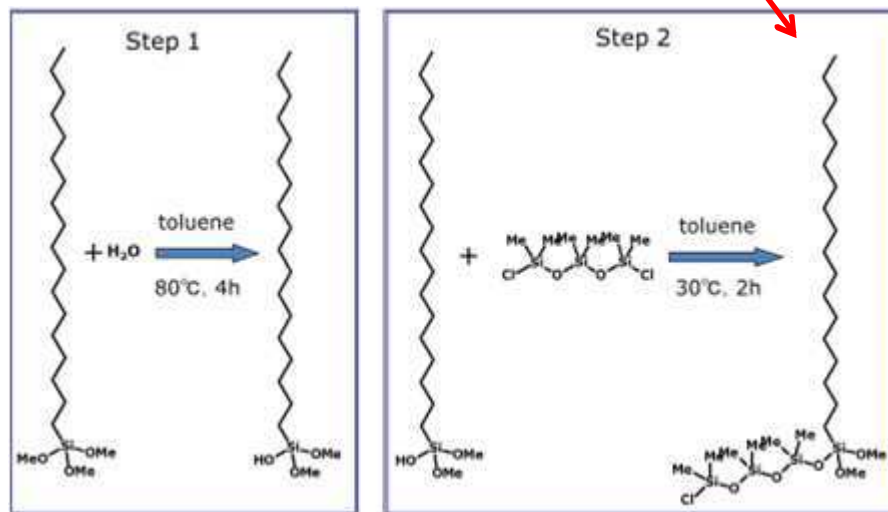
シラノール基の相互作用を活かせる
カラムが有効



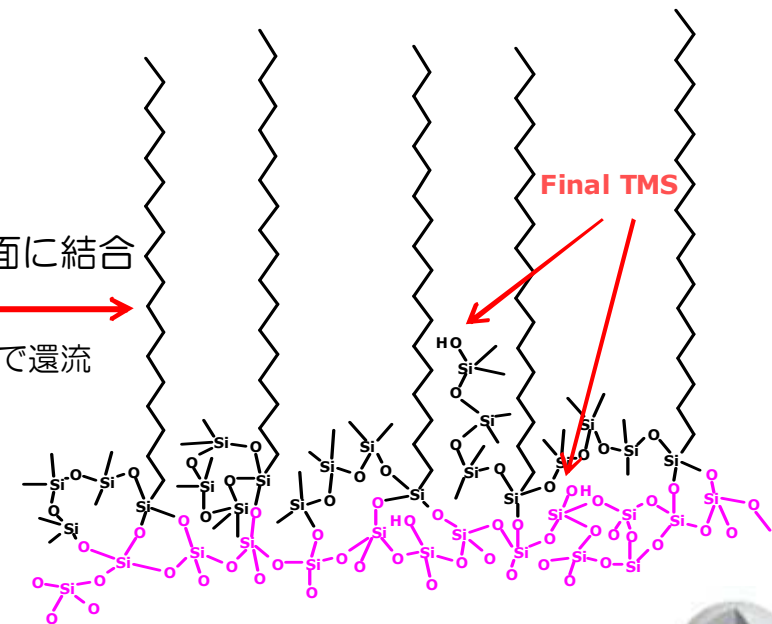
弊社の技術

サニエスト結合（エンドキャッピング）技術

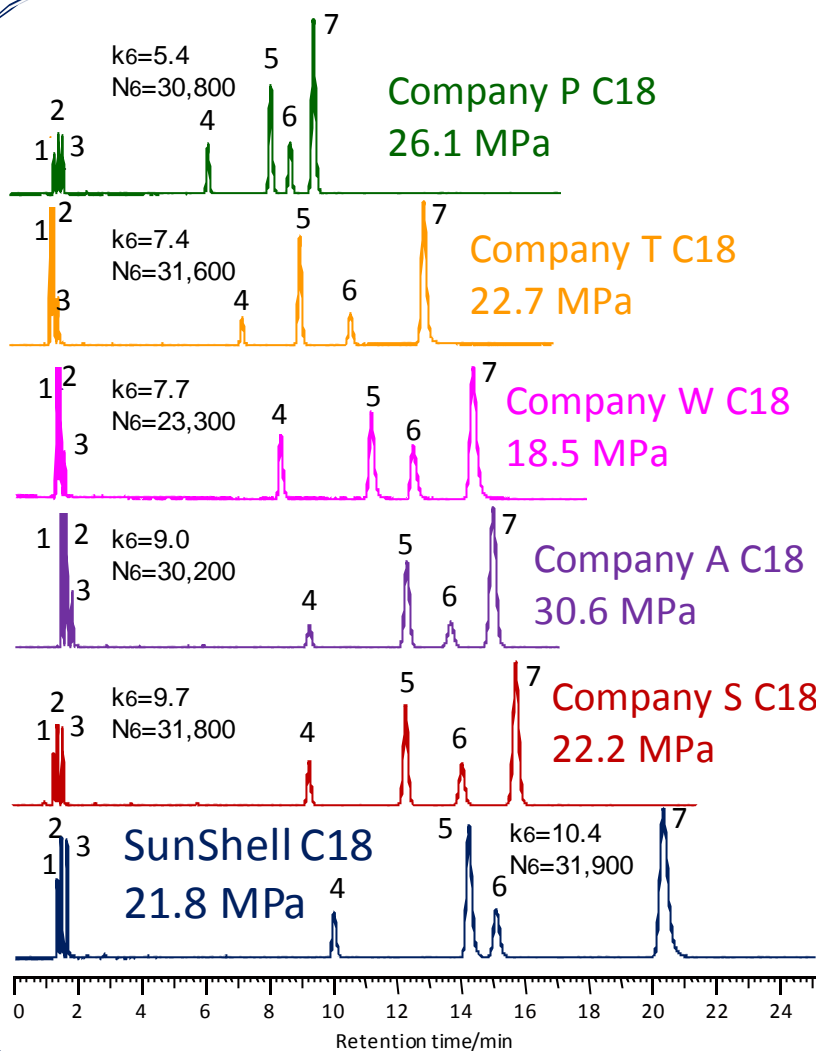
Hexamethyloctadecyltetrasilane (C18 reagent A)の合成



シリカ表面に結合
トルエン中で還流



標準試料の分離比較



Column:

Company P C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (26.1 Mpa, 30,800 plate)
 Company T C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (22.7 Mpa, 31,600 plate)
 Company W C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (18.5 Mpa, 23,300 plate)
 Company A C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (30.6 Mpa, 30,200 plate)
 Company S C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (22.2 Mpa, 31,800 plate)
 SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (21.8 Mpa, 31,900 plate)

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=75/25$

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 $^\circ\text{C}$

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

	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/o-Terphenylene)
Company P C18	0.48	1.54	1.20
Company T C18	0.35	1.56	1.50
Company W C18	0.38	1.59	1.32
Company A C18	0.42	1.57	1.25
Company S C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.39	1.60	1.46

物性値

	炭素含有量 Carbon loading (%)	比表面積 Specific surface area ^a (m ² /g)	細孔容積 Pore volume ^a (mL)	細孔径 Pore diameter ^a (nm)
SunShell C18	7.3	125	0.261	8.34
Company S C18	8.0	133	0.278	8.20
Company A C18	8.5	135	0.414	12.3
Company T C18	8.8	130	0.273	8.39
Company W C18	7.3	113	0.264	9.32
Company P C18	4.9	102	0.237	9.25

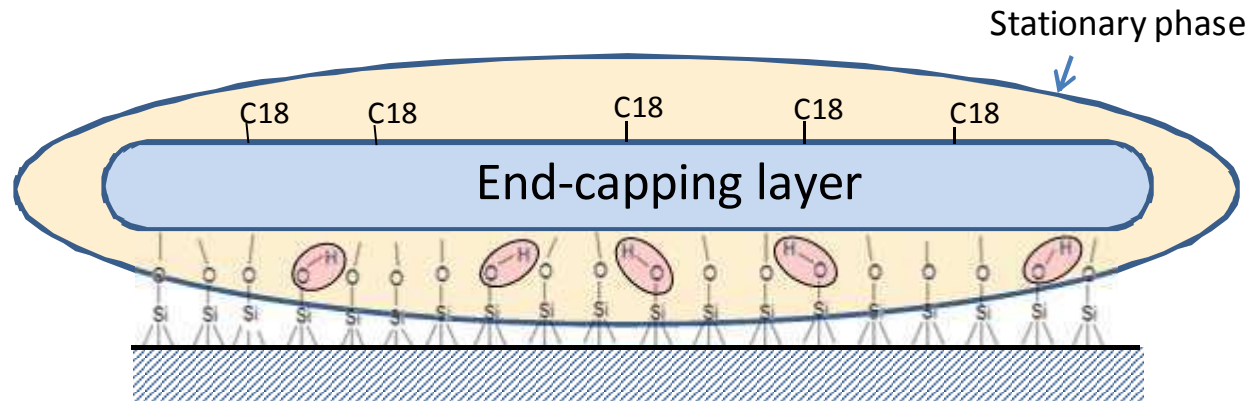
a. C18充填剤を600°Cで8時間焼成し、アルキル基を焼き飛ばした後のコアシェル粒子を測定しました。この測定値はオリジナルのコアシェル粒子の値より小さくなります。

*全ての測定はクロマニックテクノロジーズ社内で行いました。

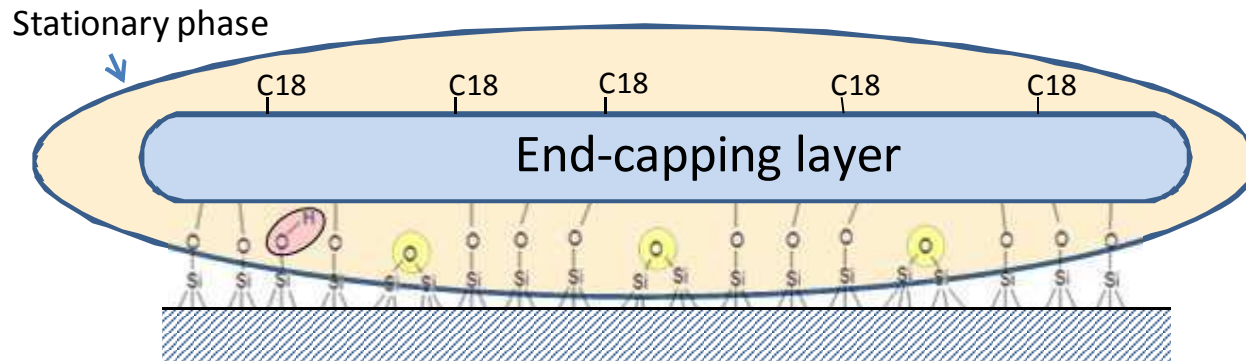


シリカ表面の疎水性

既存のエンドキャッピング



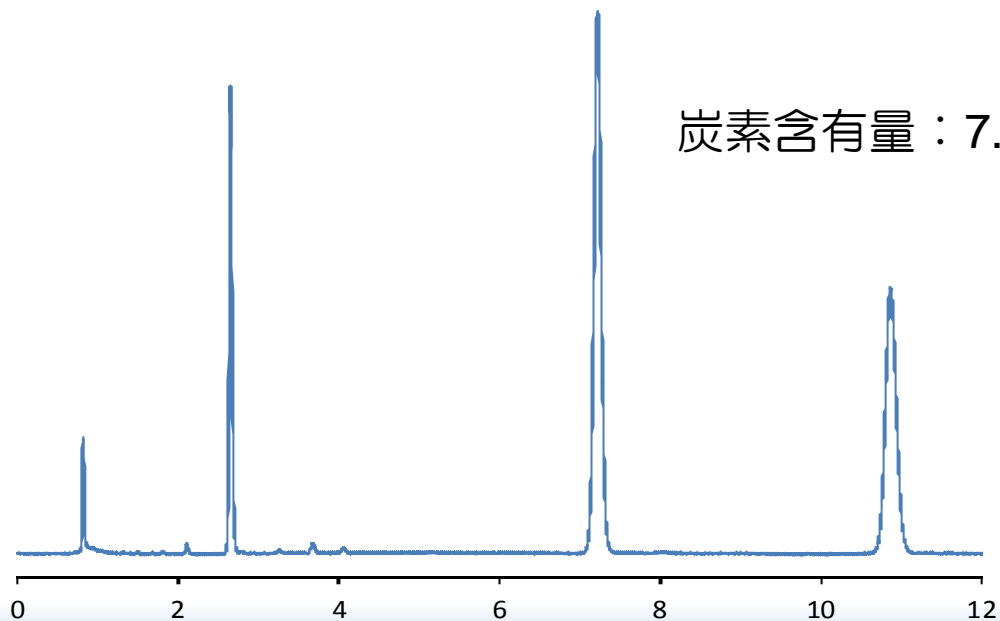
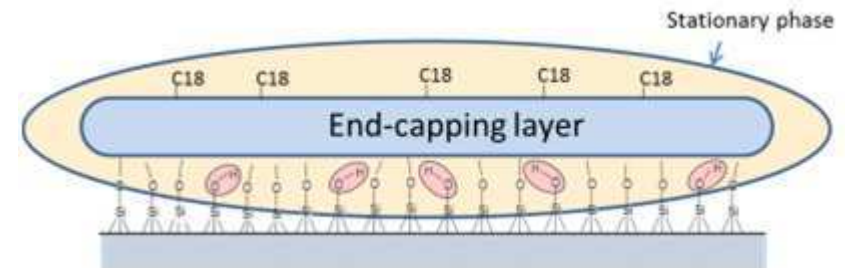
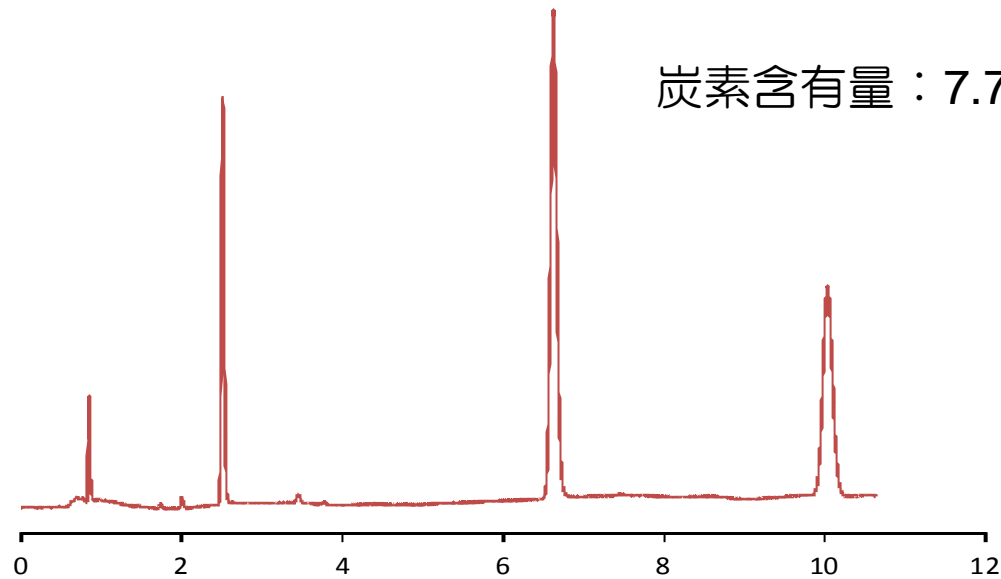
Sunniest エンドキャッピング



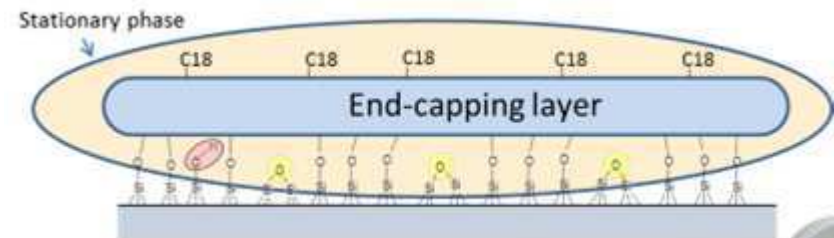
低
疎水性
高



保持の比較

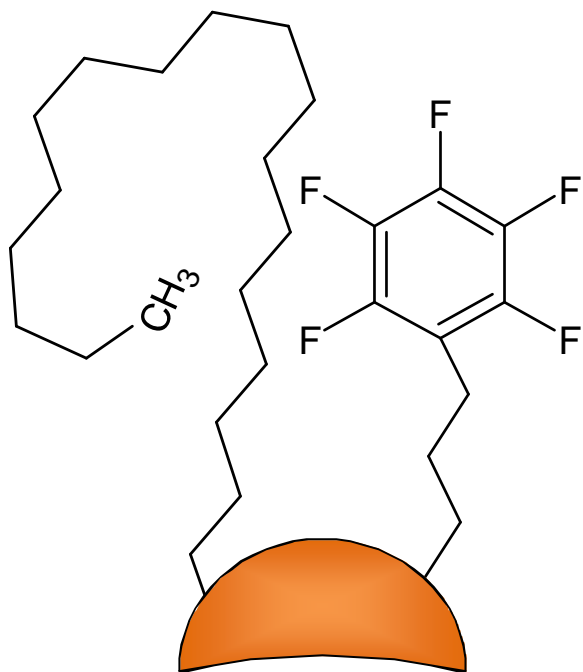


炭素含有量は少ないが
シラノール基減少の影響により
保持が増加



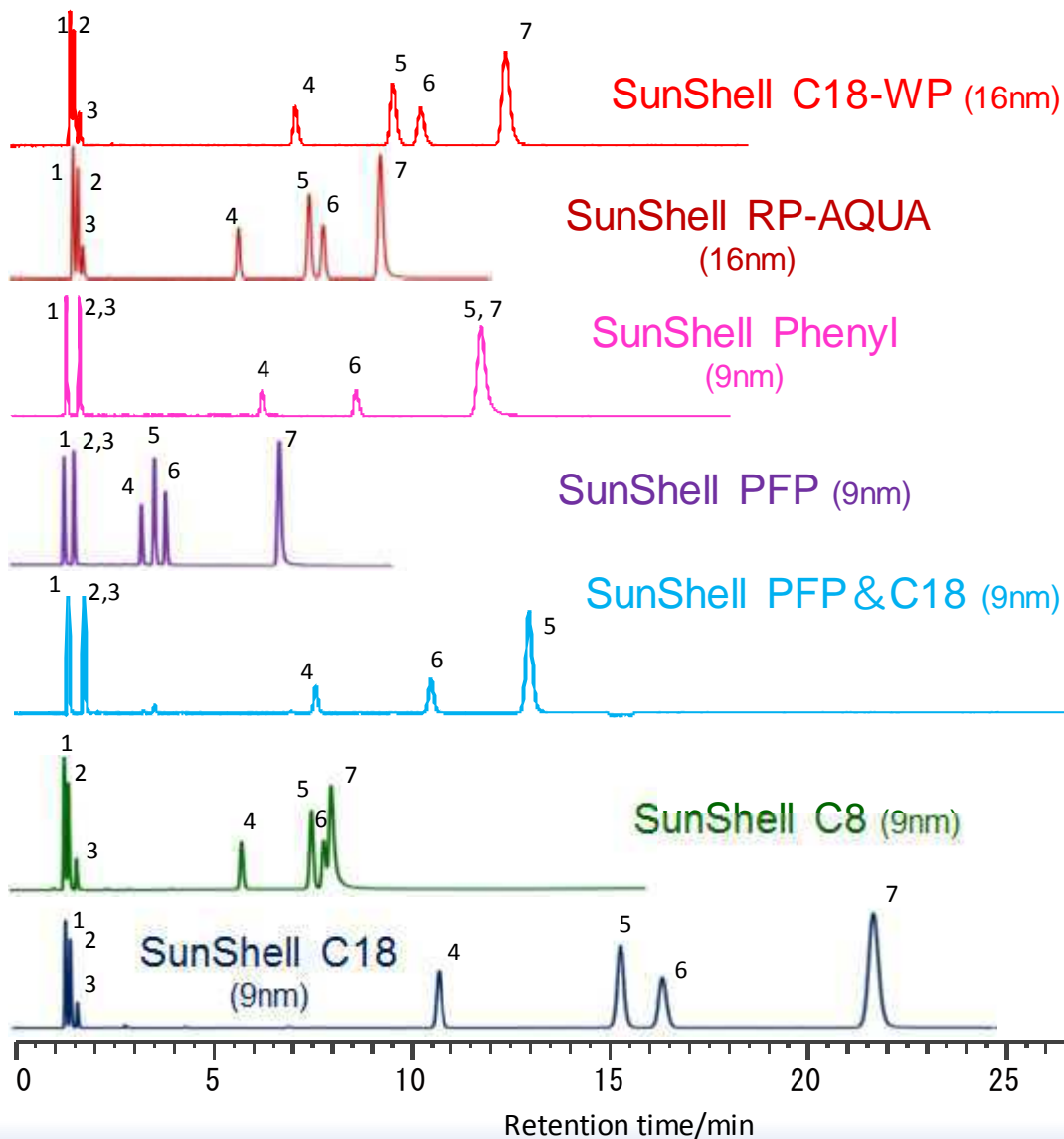
PFP & C18

- 疎水性相互作用
- 水素結合性
- 双極子相互作用
- π - π 相互作用
- 静電的相互作用



- 立体選択性に優れている
- PFPカラムと比べると疎水性相互作用が強い

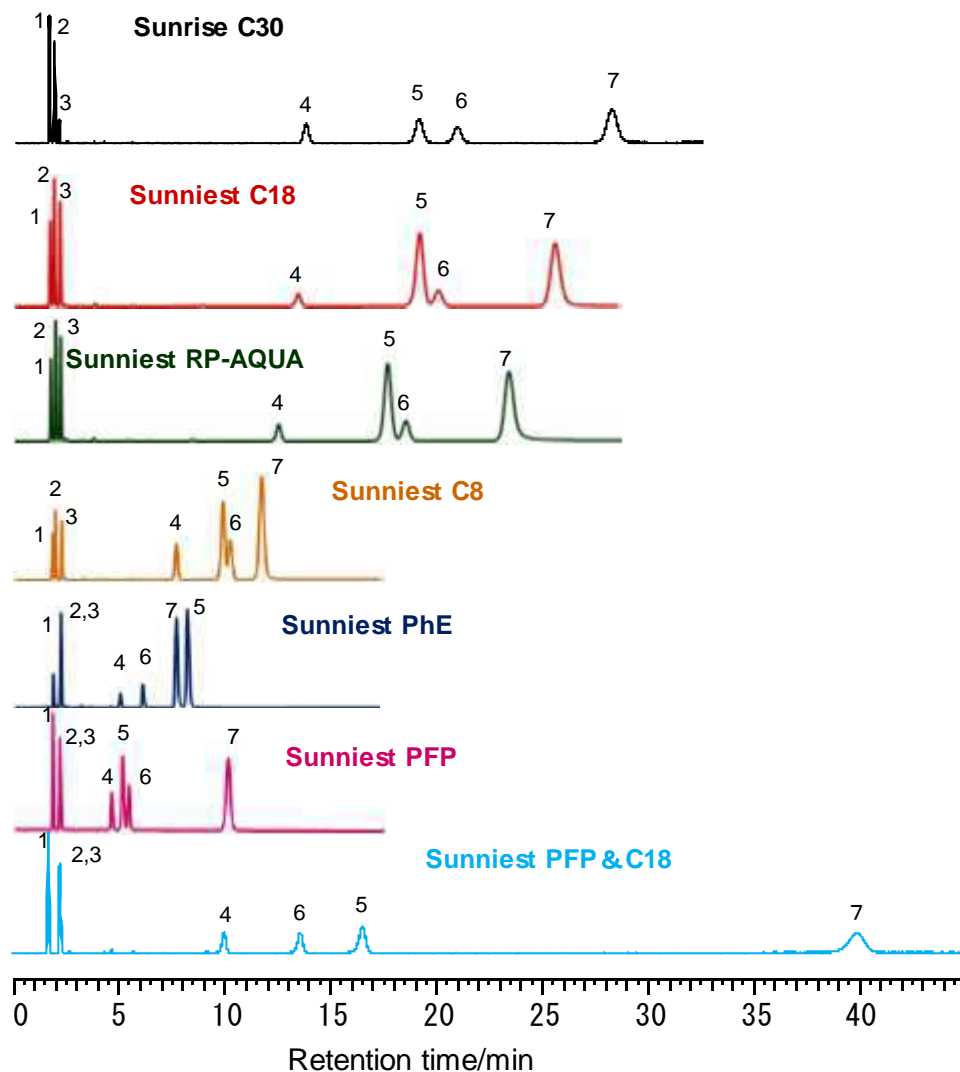
標準試料の分離例 (コアシェル)



	水素結合性 (Caffeine/ Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C18-WP	0.40	1.55	1.35
RP-AQUA	0.52	1.52	1.30
Phenyl	1.00	1.48	1.01
PFP	1.00	1.31	2.38
PFP&C18	1.00	1.47	2.64
C8	0.32	1.46	1.08
C18	0.39	1.60	1.46

Column dimension: 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
 5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene,
 7 = Triphenylene

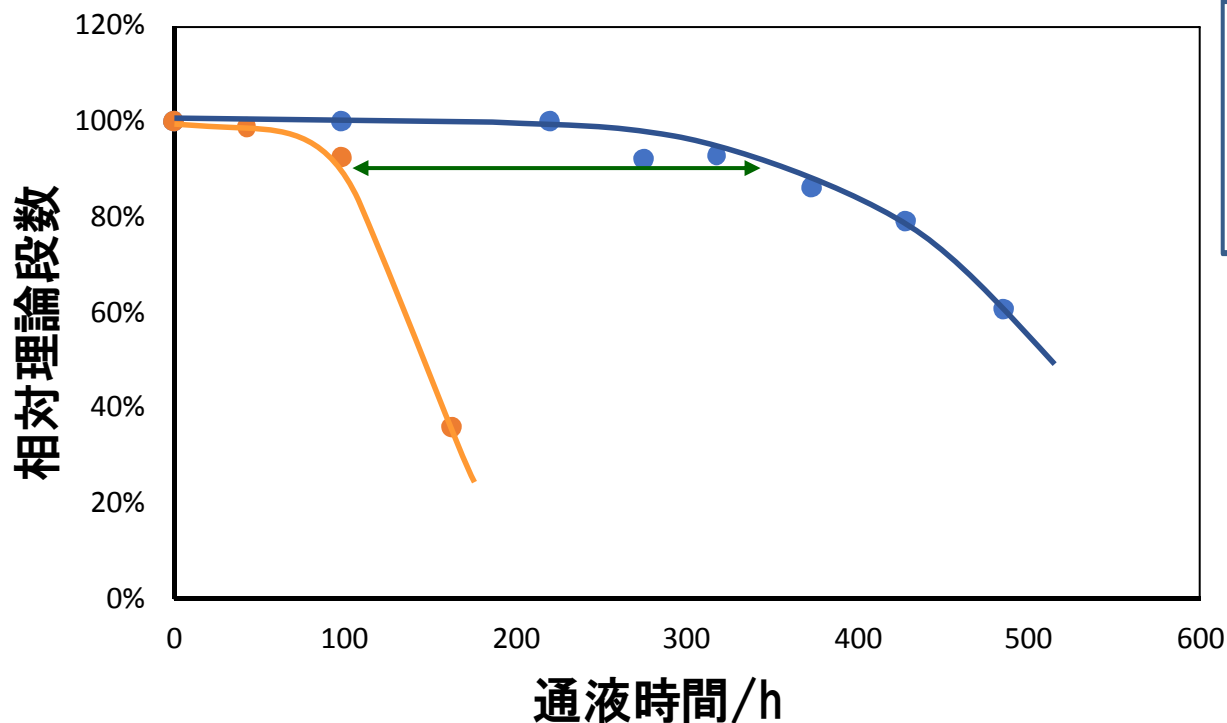
標準試料の分離例 (全多孔性)



Column: SunriseC30,
Sunniest C18, RP-AQUA, 5C8, PhE, PFP,
PFP&C18
5 μ m 4.6x150 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Pressure: 5.4 MPa
Sample: 1 = Uracil,
2 = Caffeine,
3 = Phenol,
4 = Butylbenzene,
5 = o-Terphenyl,
6 = Amylbenzene,
7 = Triphenylene,

	水素結合性 (Caffeine/ Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C30	0.51	1.59	1.52
C18	0.43	1.56	1.37
RP-QUA	0.49	1.56	1.37
C8	0.33	1.43	1.23
PhE	1.00	1.34	0.92
PFP	1.00	1.29	2.51
PFP&C18	1.00	1.43	2.66

耐久性比較



Test conditions
 Column: PFP&C18 5um 2.1x150 mm
 PFP 5um 2.1x150 mm
 Mobil phase: CH₃OH/20mM PB pH7.0=70/30
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Temperature: 40 °C

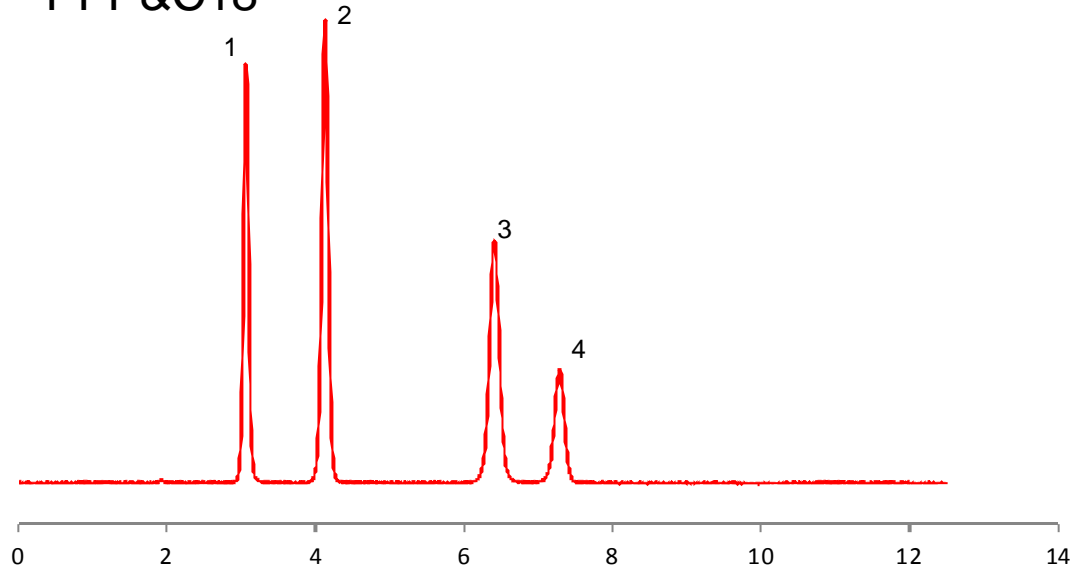
Measurement condition
 Column: PFP&C18 5um 2.1x150 mm
 PFP 5um 2.1x150 mm
 Mobil phase: Acetonitrile/water=70/30
 Acetonitrile/water=60/40
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample: Acenaphthene

一般的なPFPカラムの3倍の耐久性を実現



PFPカラムとの比較

PFP&C18



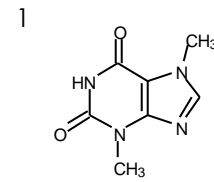
Column: Sunniest PFP&C18, PFP 5 μm, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃OH/water =30/70

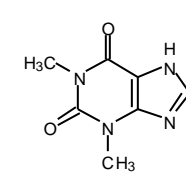
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

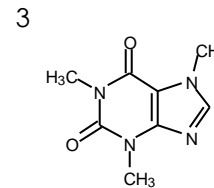
Detection: UV@250nm



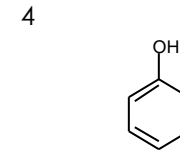
Theobromine



Theophylline

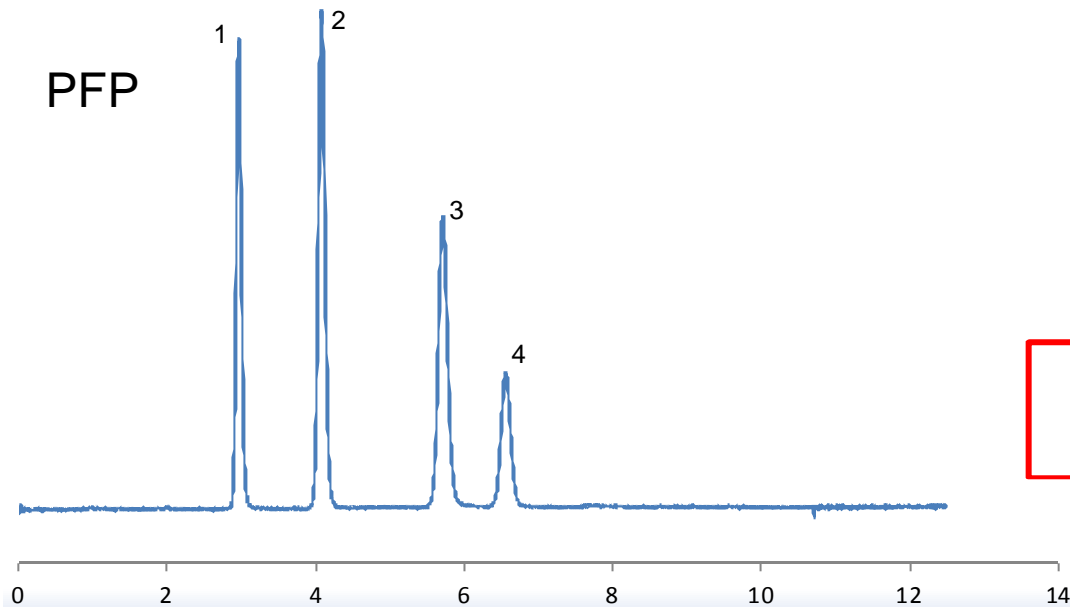


Caffeine



Phenol

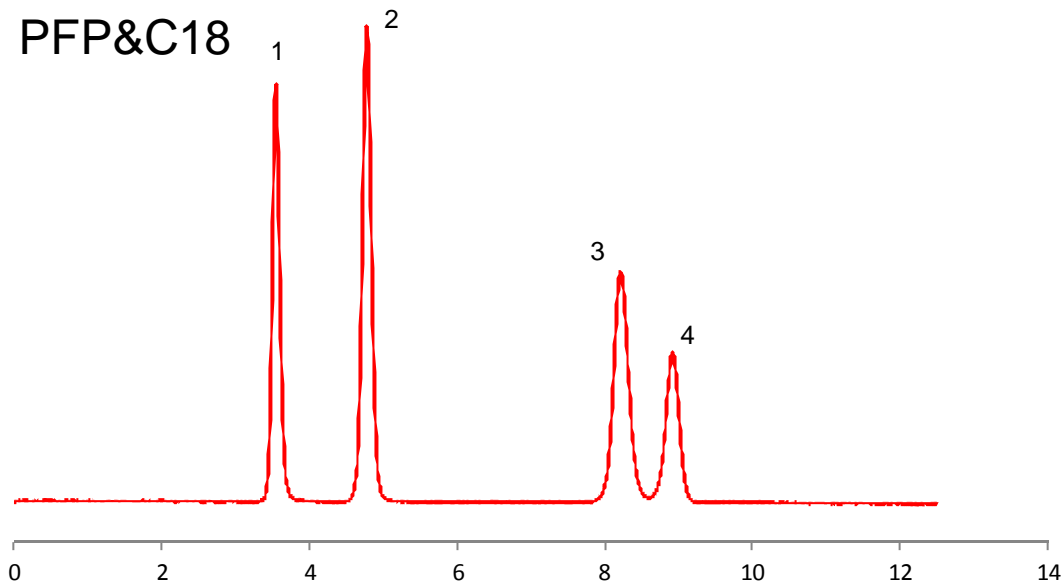
PFP



保持時間は異なるが
似たような分離

PFPカラムとの比較2

PFP&C18



Column: Sunniest PFP&C18, PFP 5 μ m, 150 x 4.6 mm

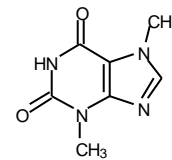
Mobile phase: CH₃OH/50 mM phosphate buffer=30/70

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 25 °C

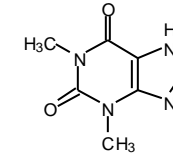
Detection: UV@250nm

1



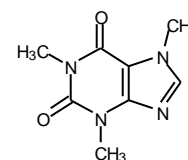
Theobromine

2



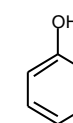
Theophylline

3



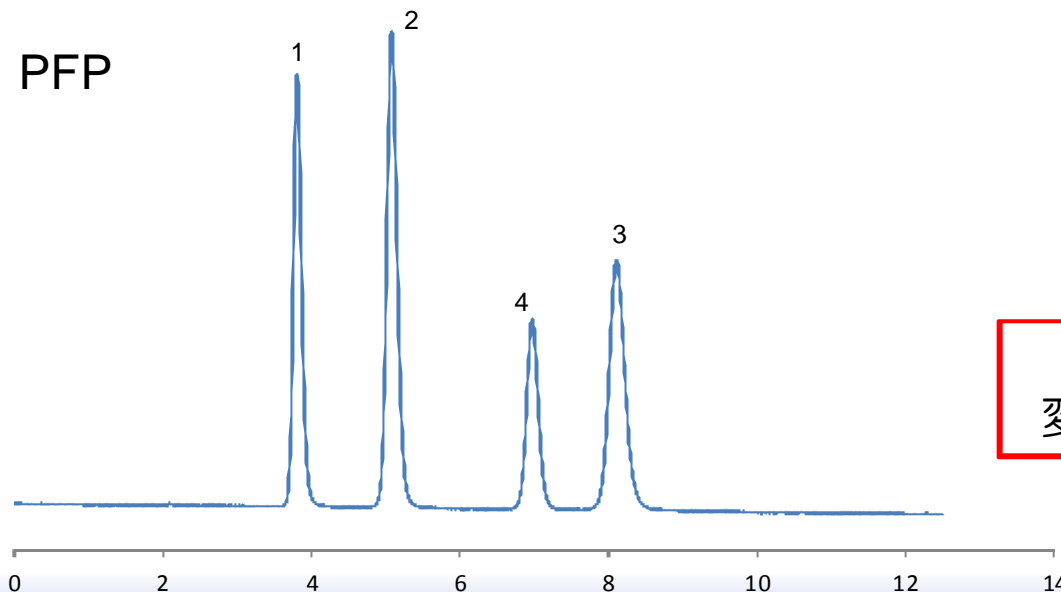
Caffeine

4



Phenol

PFP



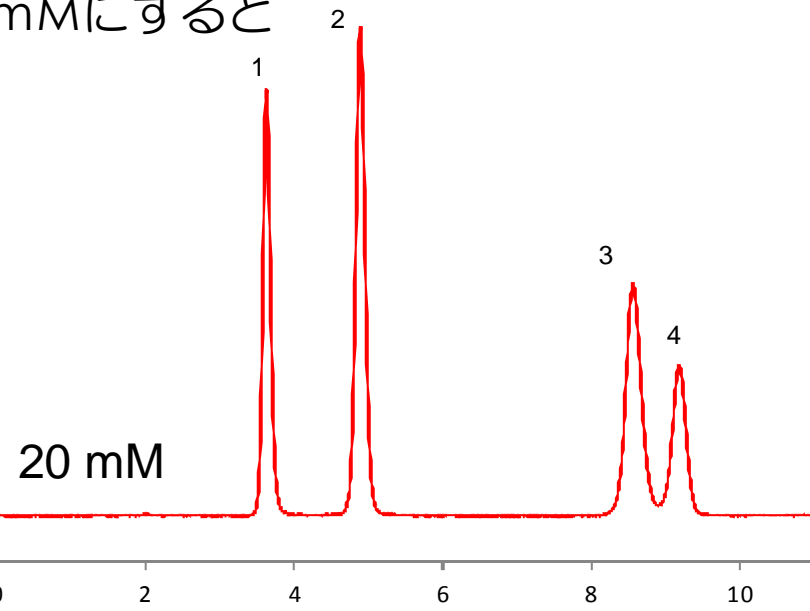
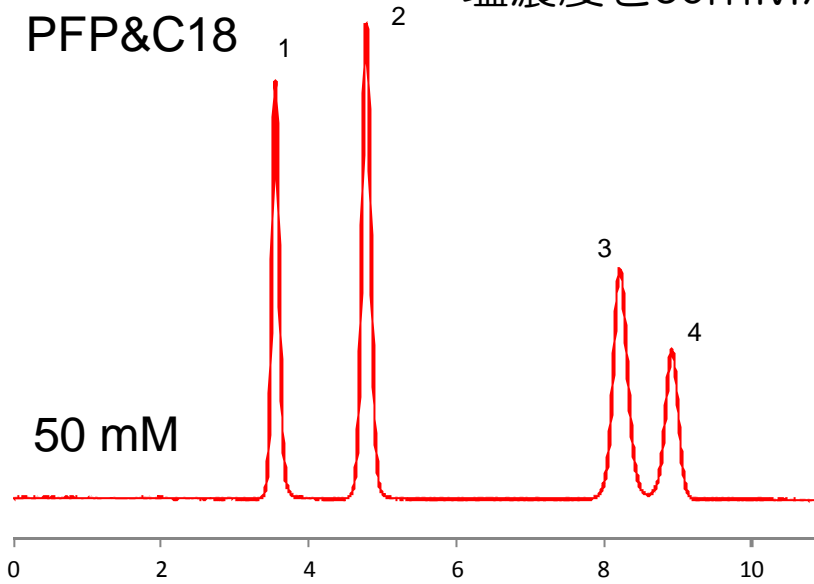
移動相に塩を加えると溶出時間が
変化するがPFPの方が変化が大きい



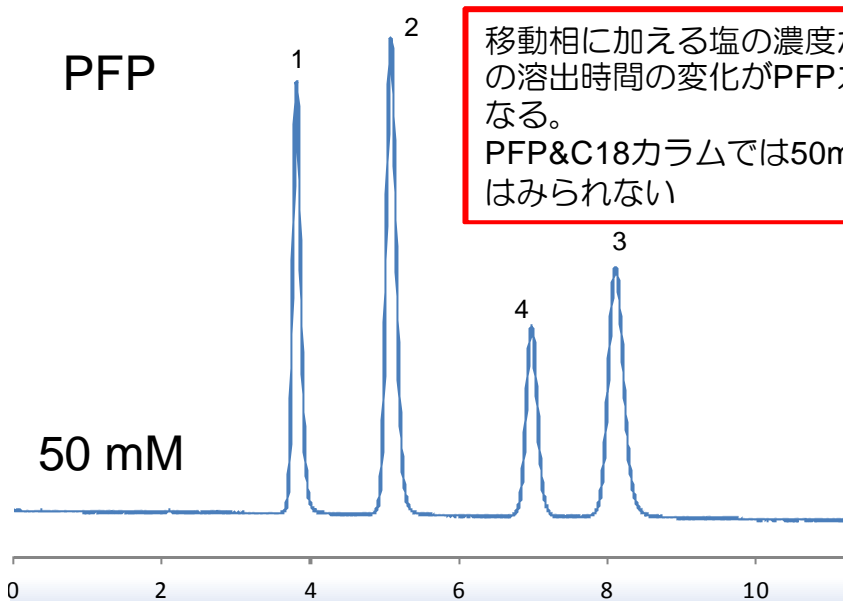
塩濃度の影響

塩濃度を50mMから20 mMにすると

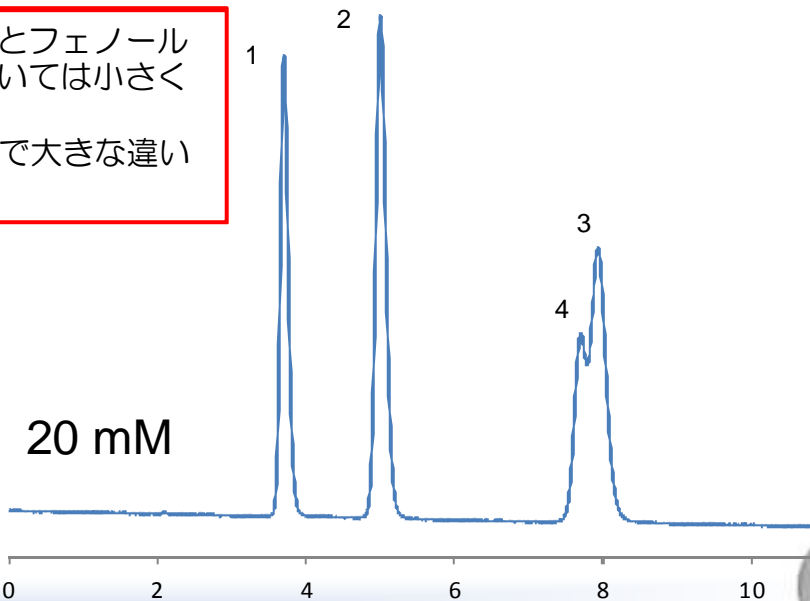
PFP&C18



PFP



移動相に加える塩の濃度が薄くなるとフェノールの溶出時間の変化がPFPカラムにおいては小さくなる。
PFP&C18カラムでは50mMと20mMで大きな違いはみられない

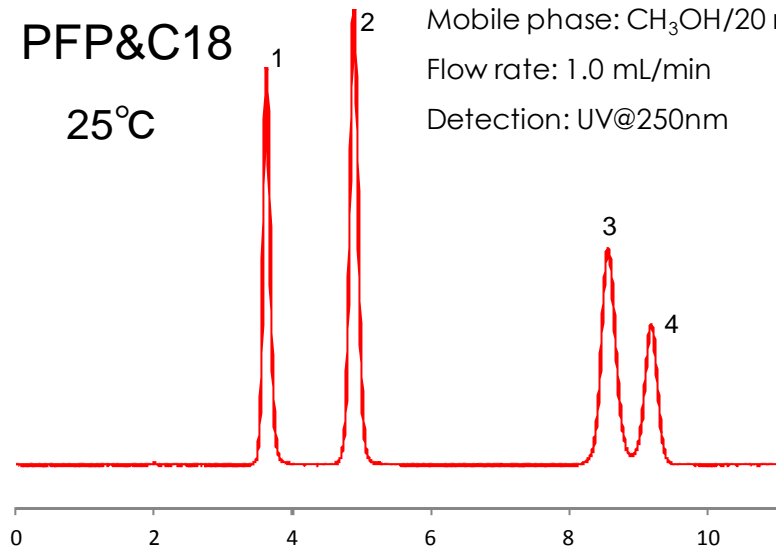




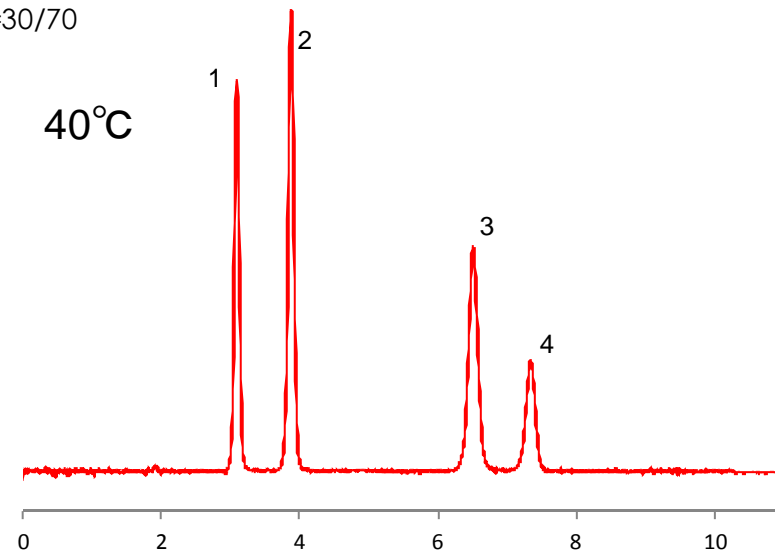
温度の影響

PFP&C18

25°C



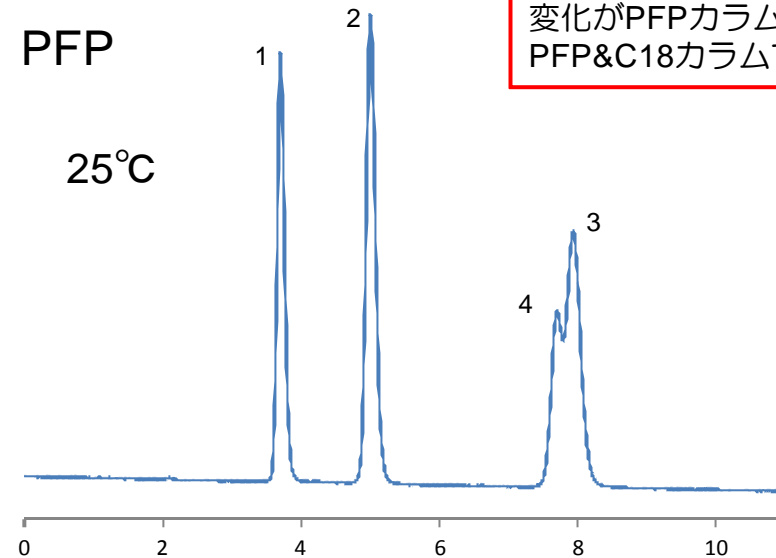
40°C



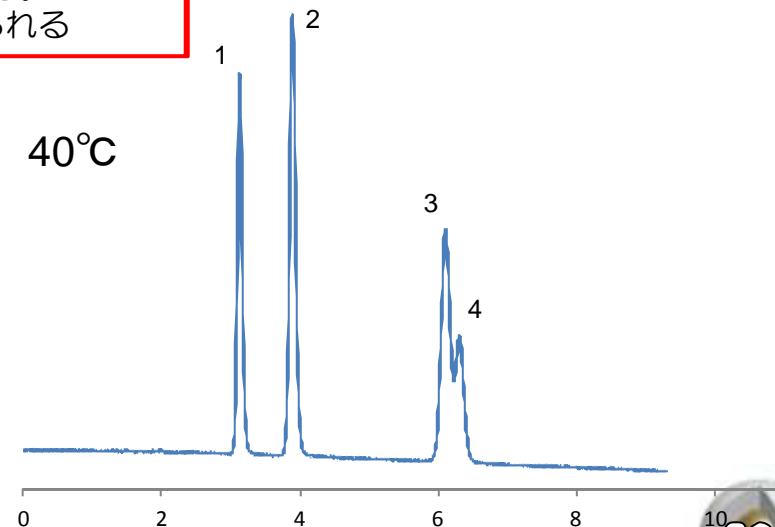
25°Cから40°Cに変わるとフェノールの溶出時間の
変化がPFPカラムにおいては小さくなる。
PFP&C18カラムでも同様の傾向が見られる

PFP

25°C



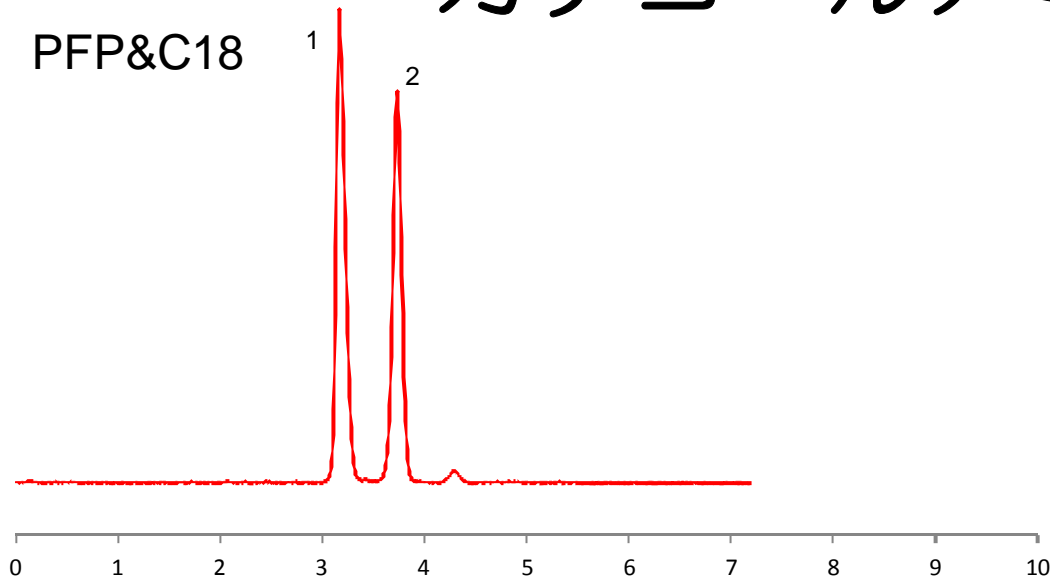
40°C



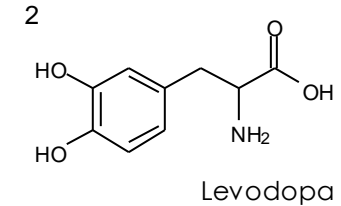
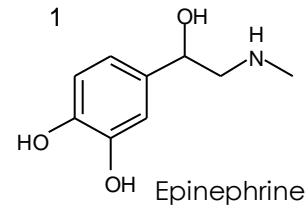


カテコールアミンの分離

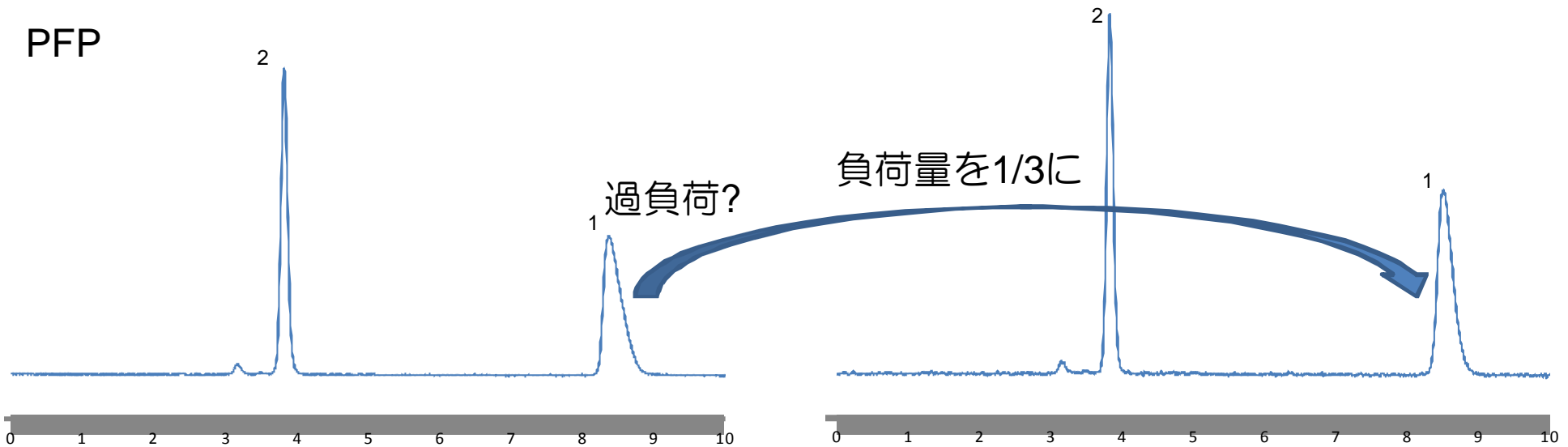
PFP&C18



Column: Sunniest PFP&C18, PFP 5 μ m, 150 x 4.6 mm
Mobile phase: 12.5 mM Ammonium Formate(pH3)
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 25 $^{\circ}$ C
Detection: UV@260nm



PFP



エピネフリンに対してはPFPとPFP&C18では相互作用が大きく異なる

まとめ

- アモルファスであるシリカゲルは一定条件下においてシラノール基を、シロキサン結合に変えることが可能であった
- シラノール基を効果的に残すことで一般的なエンドキャッピングを施したC18カラムとは異なった分離が可能であった
- エンドキャッピングと同時にシロキサン結合変換により作成されたC18カラムは、一般的なエンドキャッピングで作成されたC18カラムより保持が増大した。
- PFP&C18カラムはPFPと比較した場合、疎水性化合物の保持時間が長い。
- 酸性条件下において、PFP&C18カラムはPFPの三倍の耐久性を示した。
- PFP&C18カラムはPFPカラムと似た分離挙動を示すがC18基による疎水性相互作用も発現する