

# Jasis 2012新技術説明会

逆相固定相どうなっているの？  
これを知れば見方・使い方が変わる  
移動相で分離が変わる訳

逆相固定相のアルキル基の状態および試料との  
相互作用についての考察

クロマニックテクノロジーズ

長江徳和

E-mail: [nagae@chromanik.co.jp](mailto:nagae@chromanik.co.jp)

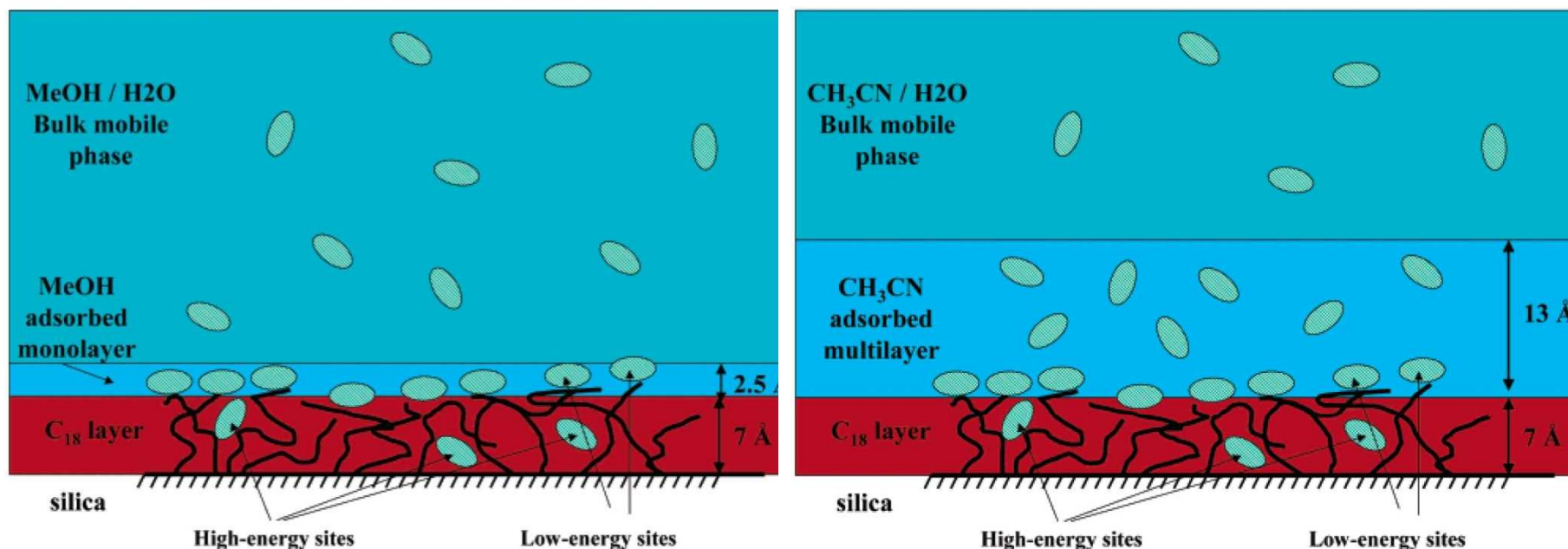
# RPLCの保持機構

- アルキル基が集積する充填剤表面に吸着する  
疎溶媒和相互作用 (solvophobic interaction):  
Horvath
- 結合層内部への分配が起こる分配理論:  
Dill, Dorsey
- アルキル結合層表面には移動相中の有機溶  
媒成分が溶媒和し, それがもう一つの固定相  
として機能すると考える分配モデル:  
Kazakevich , Guiochon

# ラマンスペクトルによる溶媒和量の測定

Adsorption Mechanism in RPLC. Effect of the Nature of the Organic Modifier

Fabrice Gritti, and Georges Guiochon, *Anal. Chem.*, 2005, 77 (13), 4257-4272



**Figure 16.** Schematic comparison of the adsorption mechanisms of a solute from aqueous solutions of methanol (A) and acetonitrile (B) onto a RPLC material. The different shadings represent the three different “phases” involved in the chromatographic system. From top to bottom, the bulk mobile phase (a water-rich solution), the adsorbed mono- or multilayer of organic modifier molecules (a phase rich in adsorbed organic modifier), and the C<sub>18</sub>-bonded phase. The analyte (phenol or caffeine) is represented by small ovals.

# Molecular Dynamics Simulations of Alkylsilane Stationary-Phase Order and Disorder. 1. Effects of Surface Coverage and Bonding Chemistry

Katrice A. Lippa, Lane C. Sander, and Raymond D. Mountain

*Anal. Chem.*, 2005, 77 (24), 7852-7861

**Table 1. Structural Details of Simulated C<sub>18</sub> Alkylsilane Chromatographic Phase Models**

ligand type	chain density ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	average chain spacing <sup>a,b</sup> (Å)	average end-to-end chain length <sup>b,c</sup> (Å)	average phase thickness <sup>b,d</sup> (Å)	average tilt angle <sup>b,e</sup> ( $\theta$ )	average % of gauche dihedrals	phase selectivity $\alpha_{\text{TBN/BaP}}^f$ and category <sup>g</sup>
Monomeric							
monofunctional C <sub>18</sub>	1.71	9.5 ± 1.4	14.9 ± 2.3	9.0 ± 4.6	50.3 ± 22.4	38.2	
monofunctional C <sub>18</sub>	2.46	7.6 ± 0.6	15.4 ± 3.0	12.5 ± 3.9	34.8 ± 15.1	39.1	
monofunctional C <sub>18</sub>	3.28	7.2 ± 0.7	16.8 ± 2.9	15.7 ± 3.3	19.7 ± 10.3	38.4	1.72 (L)
monofunctional C <sub>18</sub>	3.28 <sup>h</sup>	5.3 ± 1.0	19.6 ± 2.6	19.0 ± 3.1	13.4 ± 9.7	26.3	
monofunctional C <sub>18</sub>	4.91	5.2 ± 0.8	21.5 ± 1.2	21.3 ± 1.3	7.8 ± 3.9	16.0	
monofunctional C <sub>18</sub>	4.91 <sup>h</sup>	4.1 ± 0.4	21.9 ± 1.8	21.6 ± 2.1	8.5 ± 5.1	13.0	
Polymeric							
trifunctional, tri-C <sub>18</sub>	1.64	3.1 ± 0.2	14.0 ± 3.6	9.7 ± 4.2	44.6 ± 18.4	34.2	
trifunctional, tri-C <sub>18</sub>	2.46	3.1 ± 0.1	17.1 ± 3.5	14.3 ± 5.0	30.5 ± 18.4	32.4	
trifunctional, tri-C <sub>18</sub>	3.28	3.1 ± 0.1	20.9 ± 1.6	19.4 ± 2.3	19.7 ± 10.2	20.4	
difunctional, tri-C <sub>18</sub>	3.89	3.1 ± 0.1	21.2 ± 1.9	20.2 ± 5.0	13.7 ± 20.4	18.7	1.61 (I)
trifunctional, tri-C <sub>18</sub>	4.09	3.1 ± 0.2	21.4 ± 1.4	21.1 ± 1.6	8.7 ± 4.3	19.6	
trifunctional, tri-C <sub>18</sub>	4.30	3.1 ± 0.2	21.3 ± 1.9	21.1 ± 2.5	9.3 ± 7.4	18.2	1.11 (I)
difunctional, tri-C <sub>18</sub>	4.91	3.1 ± 0.2	21.9 ± 0.9	21.7 ± 1.1	7.6 ± 4.2	14.1	
trifunctional, tri-C <sub>18</sub>	4.91	3.1 ± 0.1	21.3 ± 1.3	20.9 ± 1.6	8.5 ± 5.0	19.2	0.71 (H)
trifunctional, branched12-mer-C <sub>18</sub>	4.91	3.1 ± 0.2	21.6 ± 1.2	21.1 ± 1.5	8.8 ± 5.8	15.7	
trifunctional, cyclic 12-mer-C <sub>18</sub>	4.91	3.1 ± 0.2	22.1 ± 1.1	21.8 ± 1.2	9.9 ± 4.7	12.6	
trifunctional, tri-C <sub>18</sub>	5.94	3.0 ± 0.2	22.2 ± 0.9	22.1 ± 1.0	6.1 ± 2.7	10.4	0.49 (H)

<sup>a</sup> Distance between Si atoms of the alkylsilane chains. <sup>b</sup> Uncertainty represents standard deviation of 100 measurements. <sup>c</sup> Distance between Si atom and end C atom of the alkylsilane chain. <sup>d</sup> Magnitude of the distance vector between Si and end C of the alkylsilane chain perpendicular to the quartz surface. <sup>e</sup> Relative to the axis perpendicular to the quartz surface. <sup>f</sup> Experimentally determined selectivity coefficients for C<sub>18</sub> RPLC phases at room temperature that are represented by simulation models (see ref 33 for more details). <sup>g</sup> Shape selectivity of stationary phases categorized as high (H;  $\alpha_{\text{TBN/BaP}} < 1$ ), intermediate (I;  $1 < \alpha_{\text{TBN/BaP}} < 1.7$ ), and low (L;  $\alpha_{\text{TBN/BaP}} > 1.7$ ). <sup>h</sup> Ligands placed in a clustered formations to minimize interchain spacing.

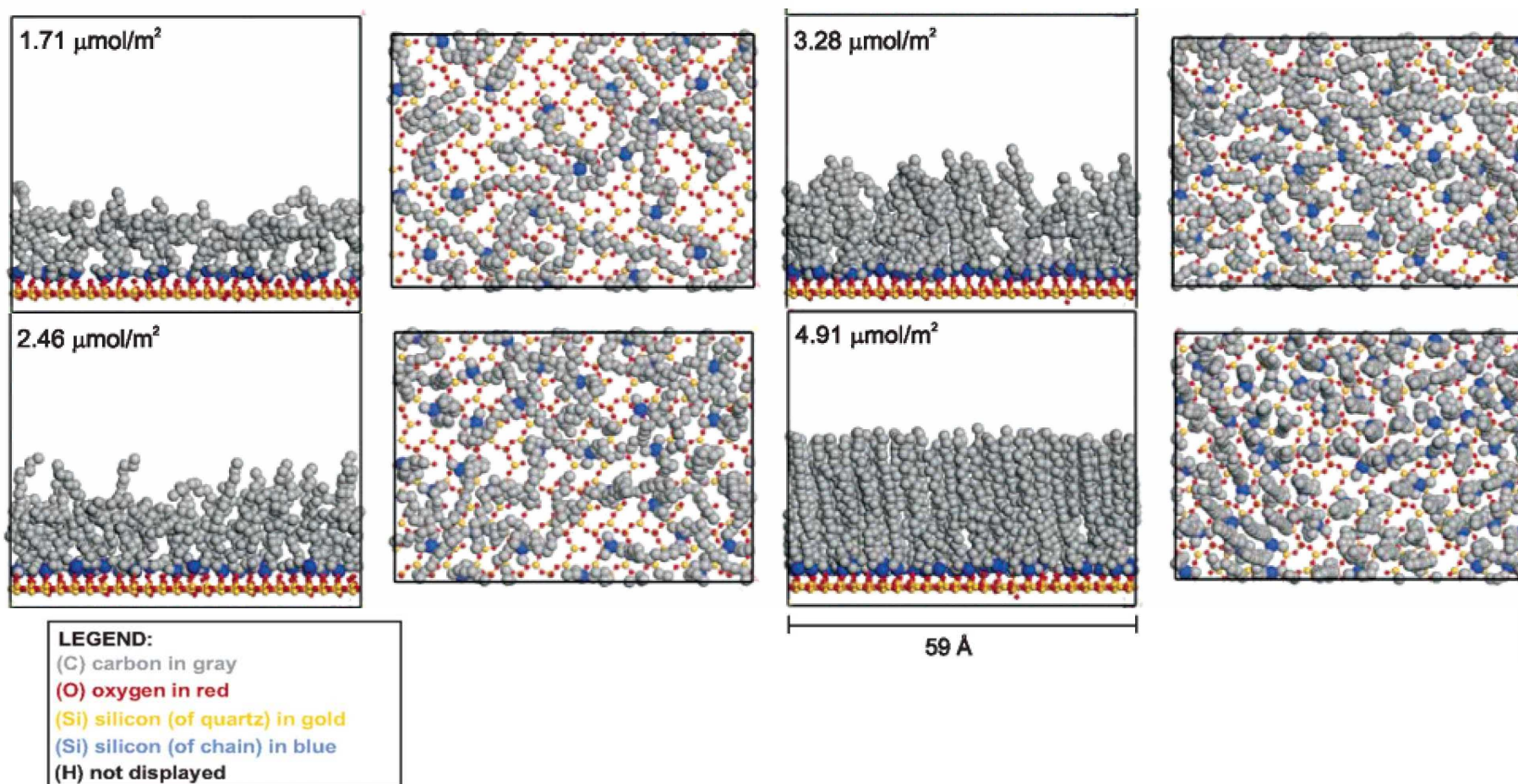


# Molecular Dynamics Simulations of Alkylsilane Stationary-Phase Order and Disorder. 1. Effects of Surface Coverage and Bonding Chemistry

Katrice A. Lipka, Lane C. Sander, and Raymond D. Mountain

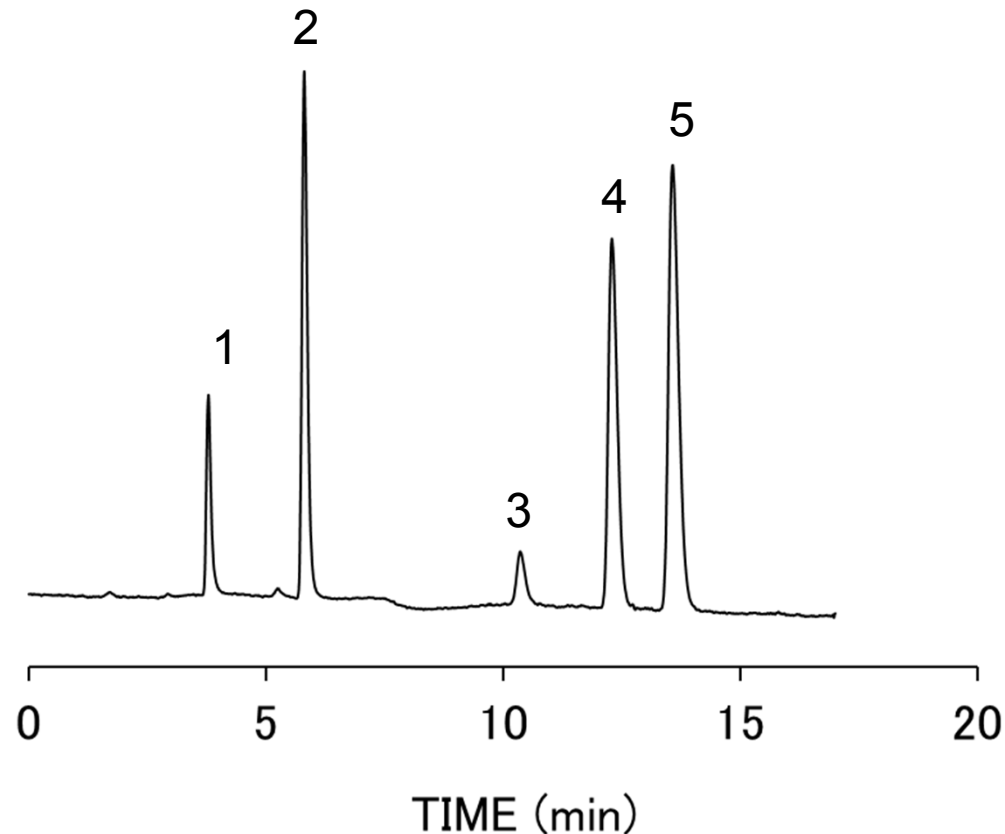
*Anal. Chem.*, 2005, 77 (24), 7852-7861

(a) monomeric C<sub>18</sub>



**Figure 3.** Side- and top-view snapshots of simulated (a) monomeric C<sub>18</sub> and (b) polymeric C<sub>18</sub> chromatography models at various surface coverages. The atoms are color-coded according to the legend; H atoms are not displayed in the interest of clarity.

# 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

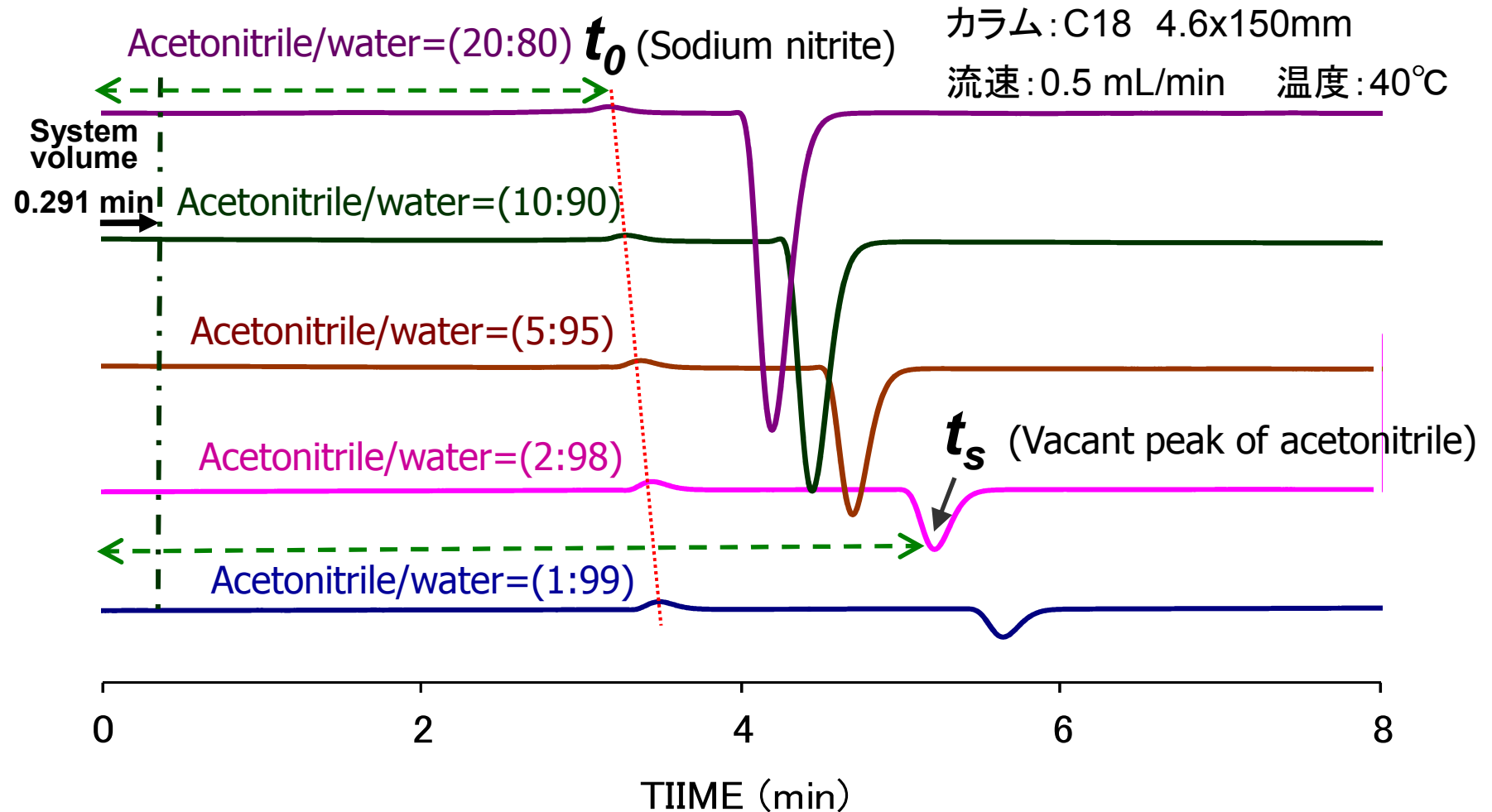
3. アセトニトリル

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



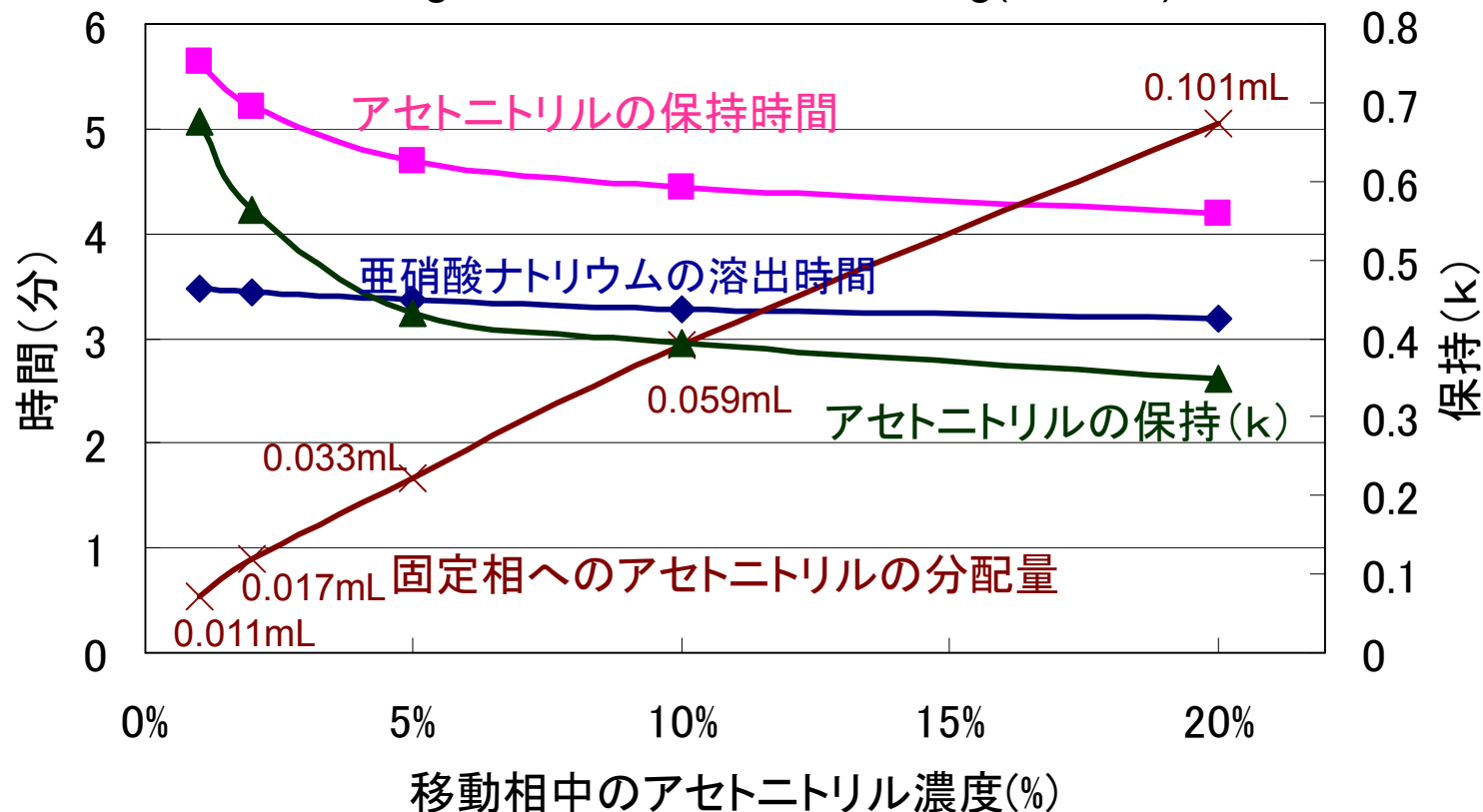
アセトニトリルは保持しており、固定相中に分配する。この分配量を溶媒和量とする

# 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

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

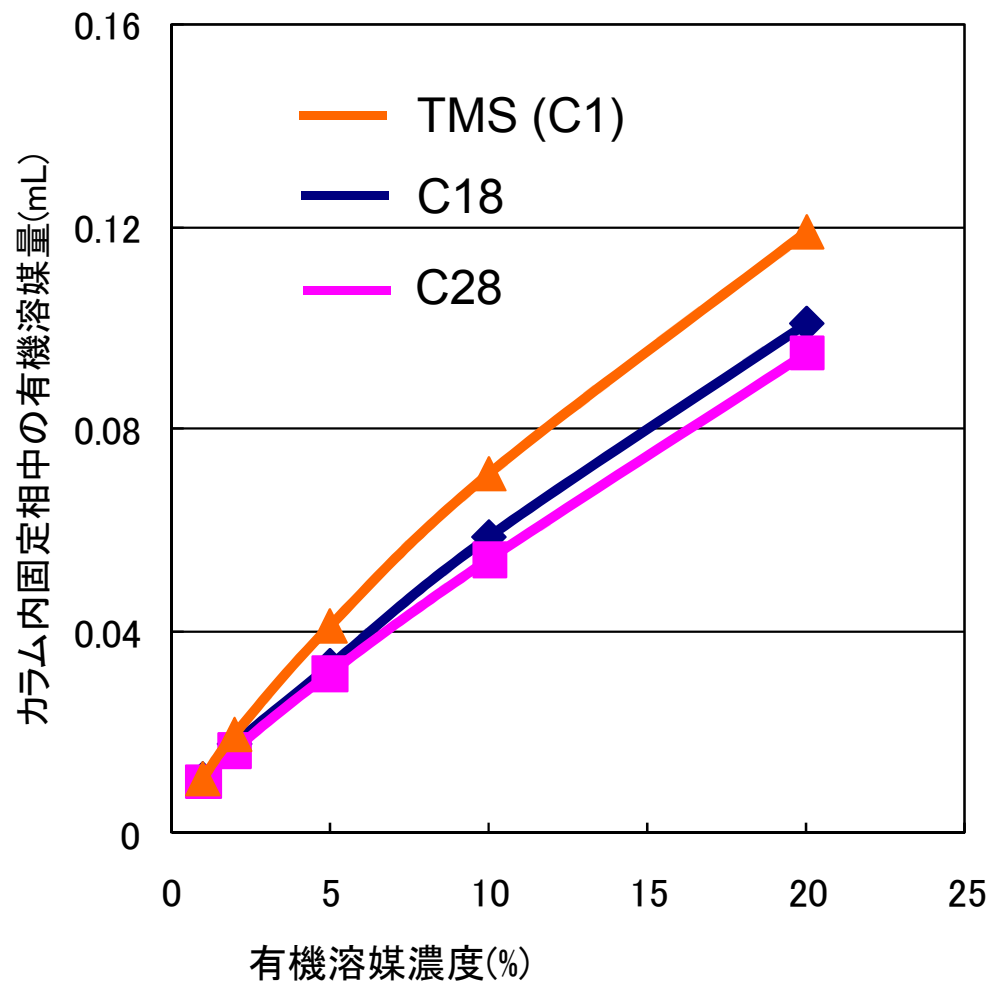
カラム: ODS 4.6x150mm,

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C28固定相 へのアセトニトリルの 分配量(溶媒和量)



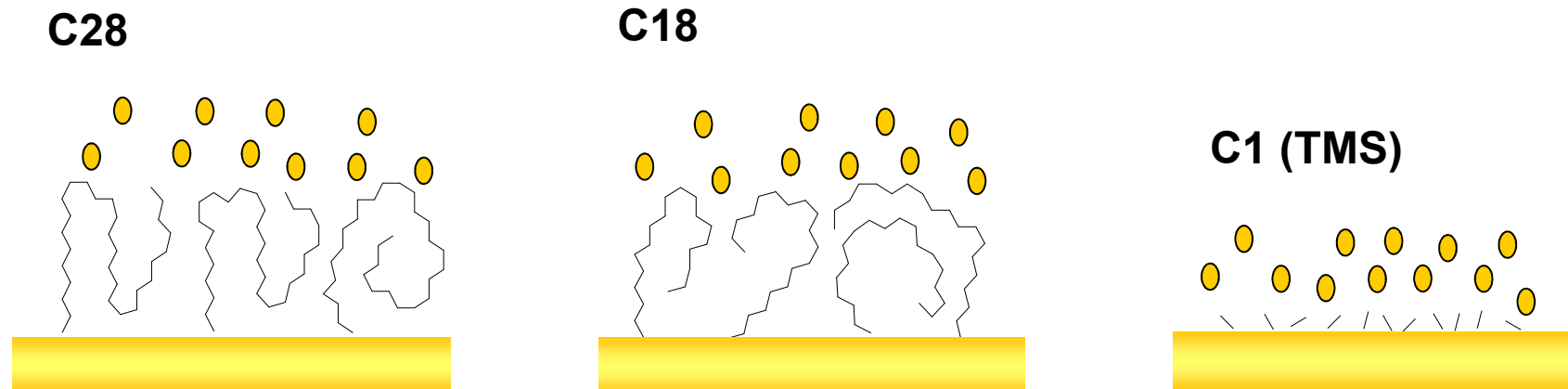
カラム: TMS (C1, %C: 5%)  
C18 (%C: 16%)  
C28 (%C: 16%)  
4.6x150mm

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C28固定相の状態

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

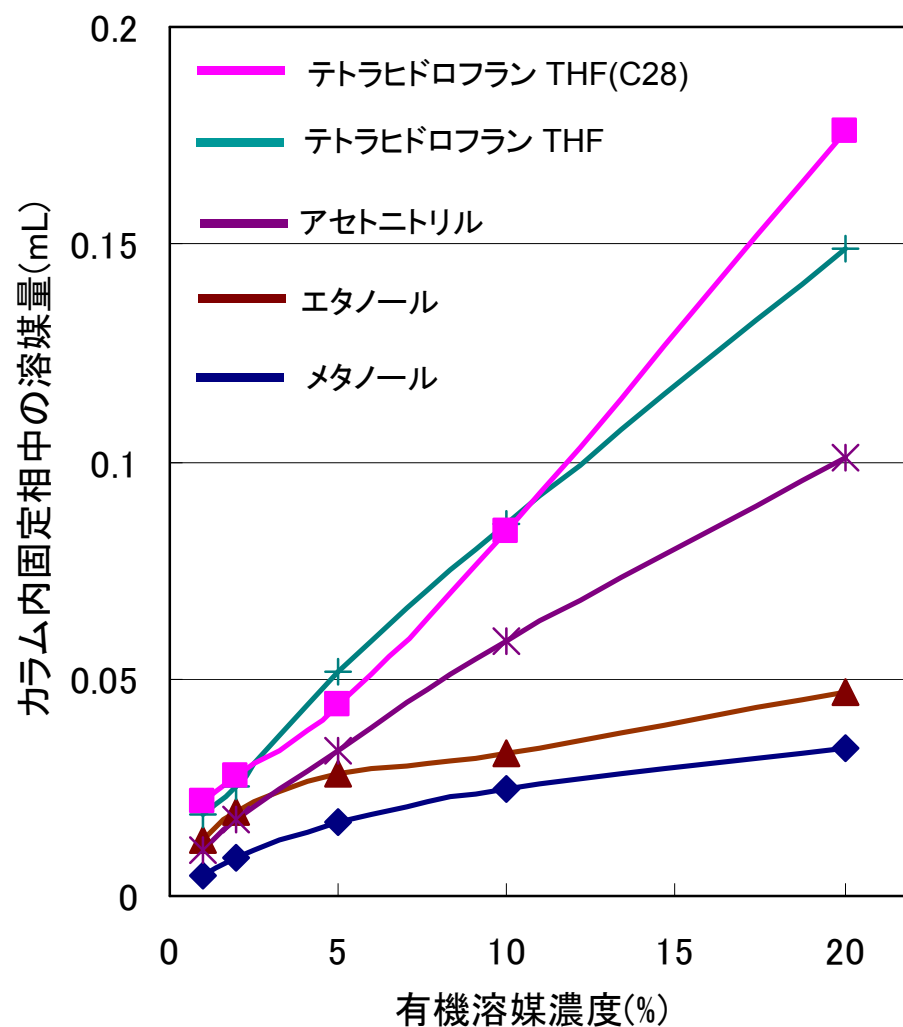
● : Acetonitrile



疎水性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C28)  
4.6x150mm

1) 4.6x150mmカラムにC18充填剤は約1.5g入っている

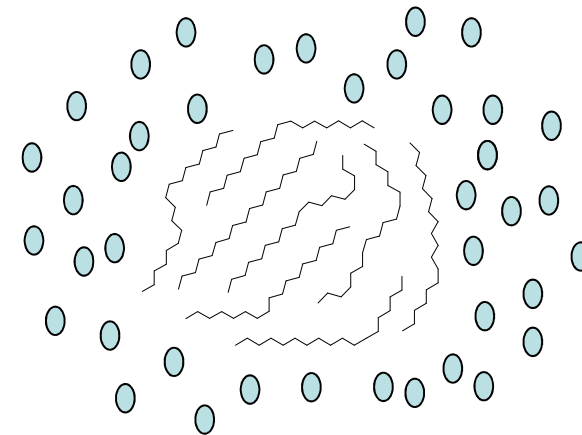
2) C18の炭素含有量16%  
C28の炭素含有量16%

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。

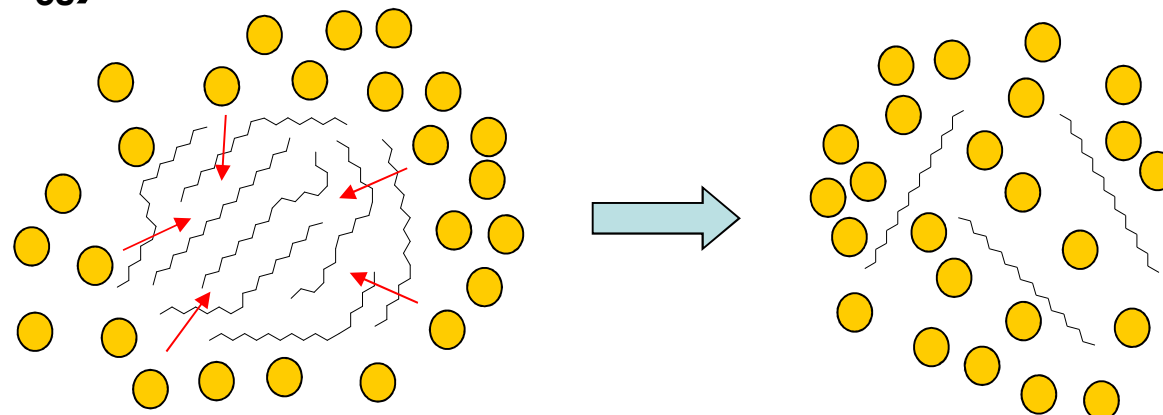
# 有機溶媒中でのオクタデカンの状態

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)



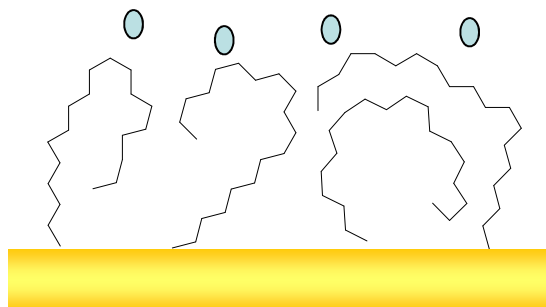
メタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとると考えられる

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



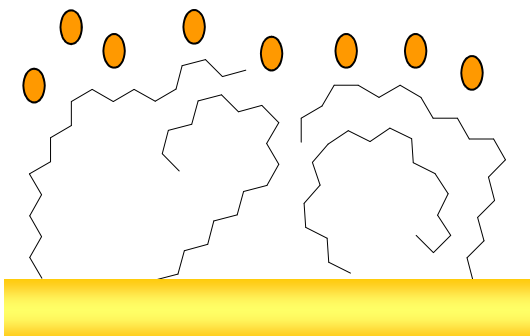
# C18表面上での溶媒和の概略図

メタノール



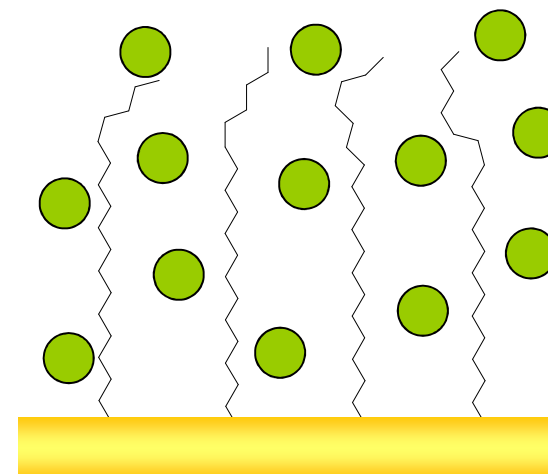
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している

アセトニトリル



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

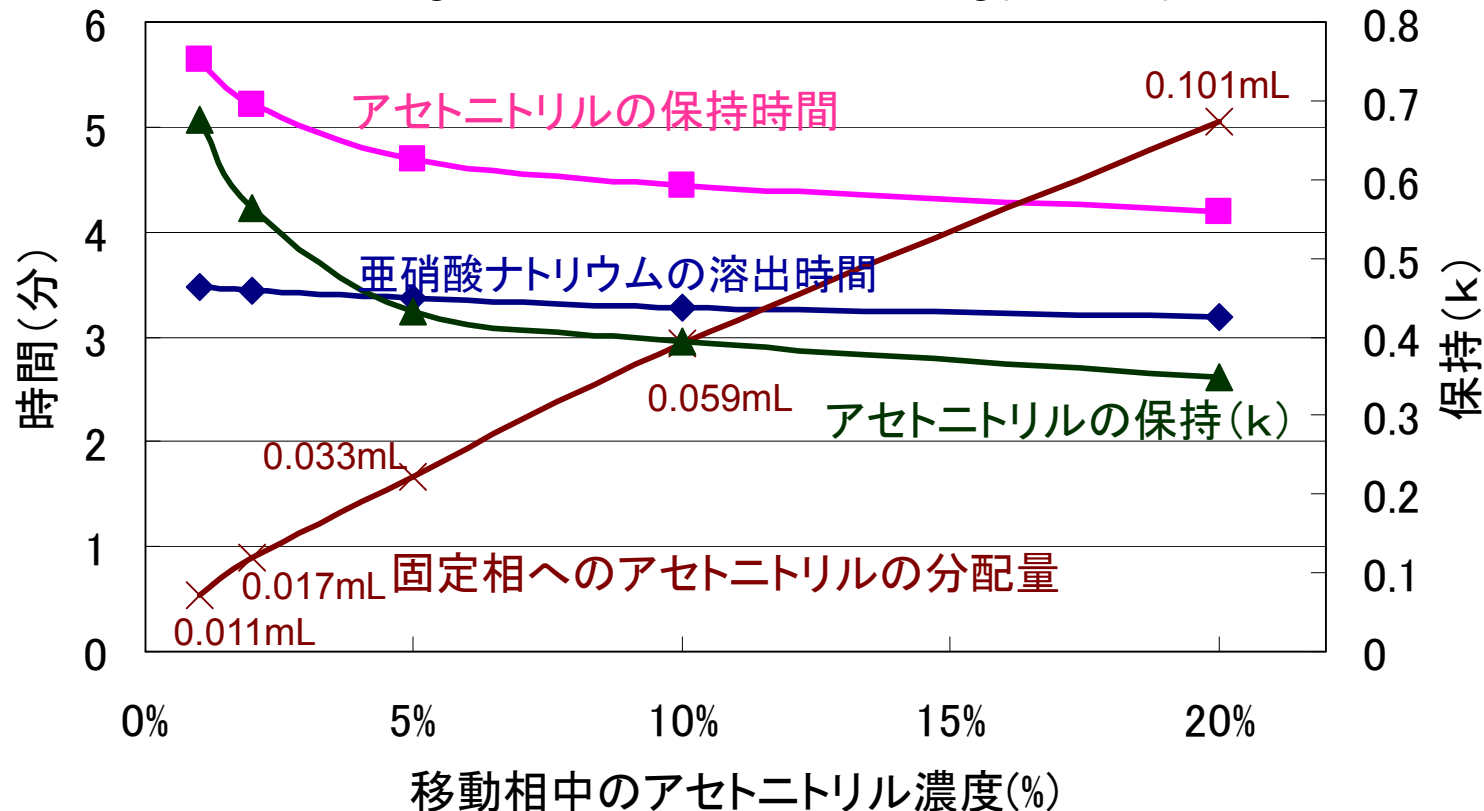


# アセトニトリル・水移動相を用いた場合の保持時間, 保持および固定相へのアセトニトリルの分配量

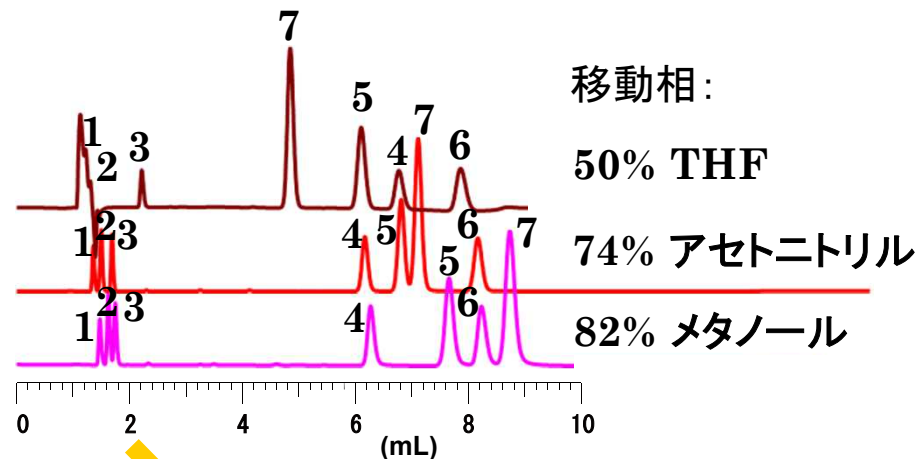
$$k = (t_s - t_0) / (t_0 - \text{system volume}) \quad k = S / M \quad S = k \times M$$

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



# 有機溶媒による $t_0$ の変化



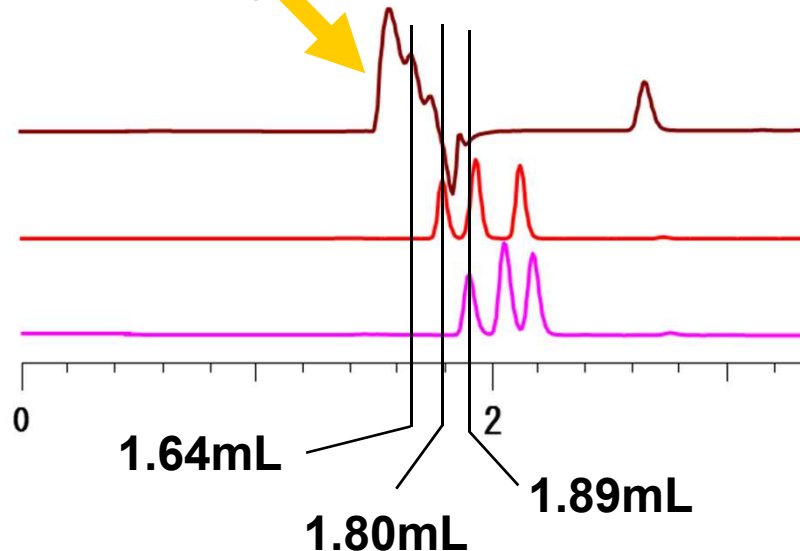
カラム: C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

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

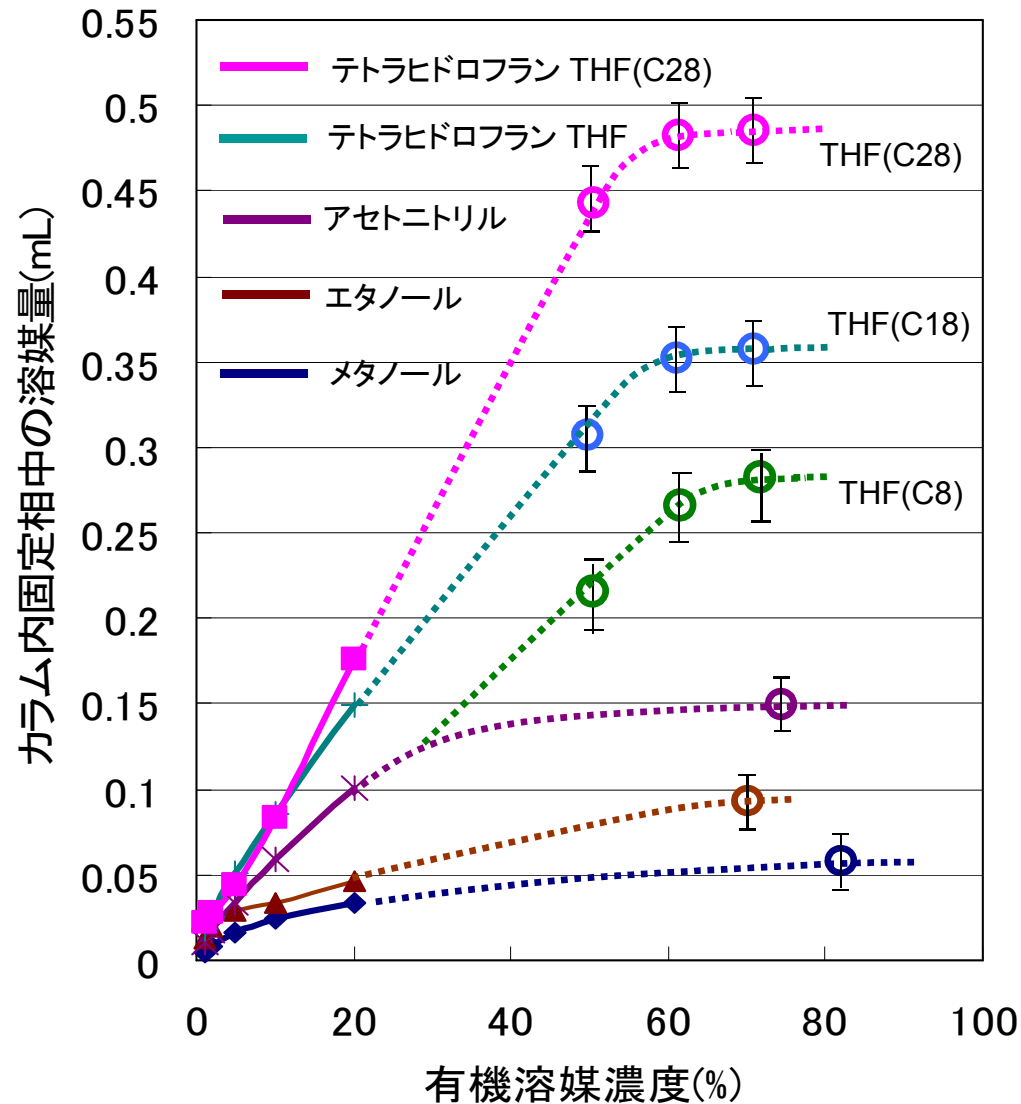


1) 溶媒和した有機溶媒とアルキル基の両方が固定相として働く。

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, (一部C28)

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%

C28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。

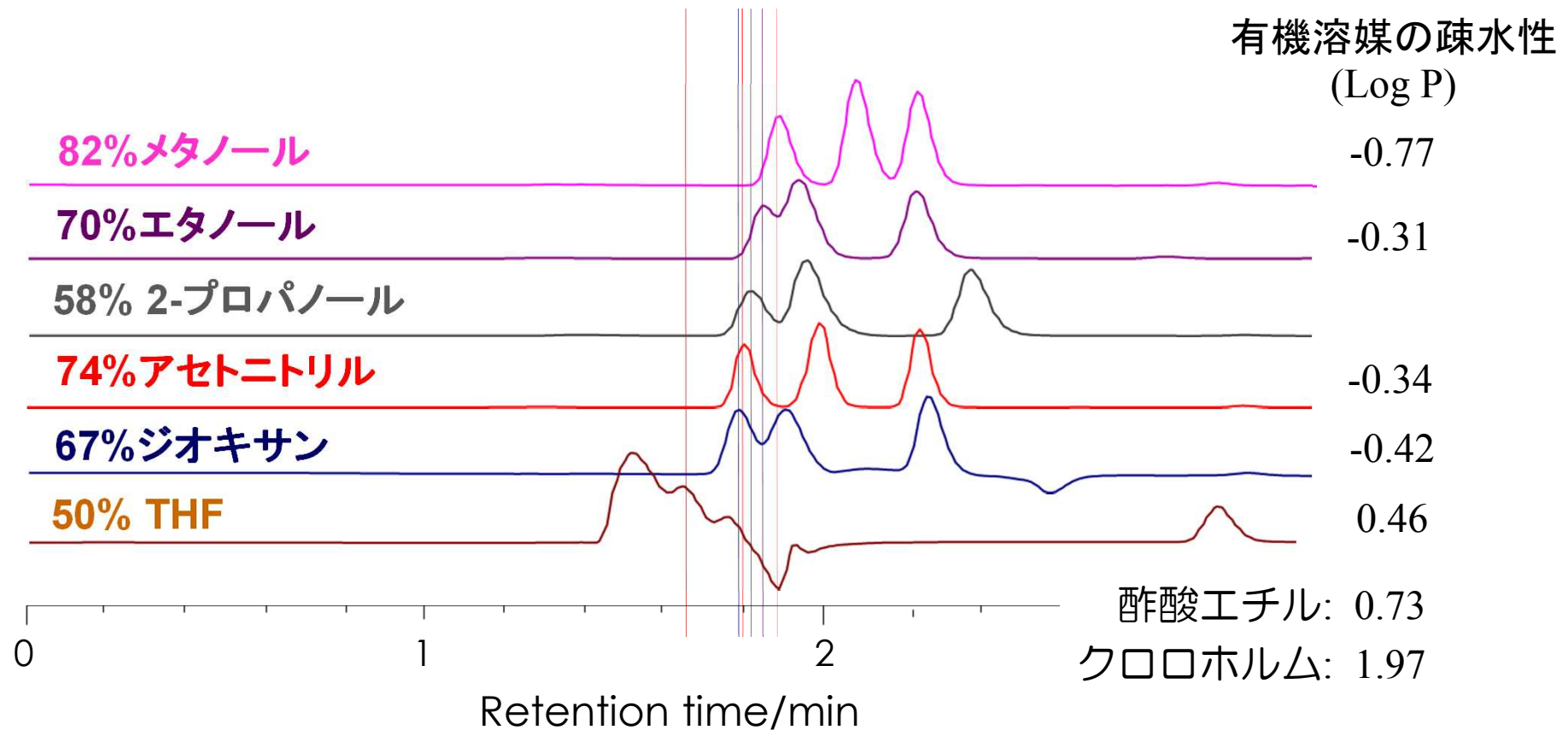
**82%メタノールの溶媒和量を0.06mLと仮定すると, ウラシルの溶出量から74%アセトニトリルと50%THFの溶媒和量はそれぞれ0.15mLと0.31mLとなる**

# 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

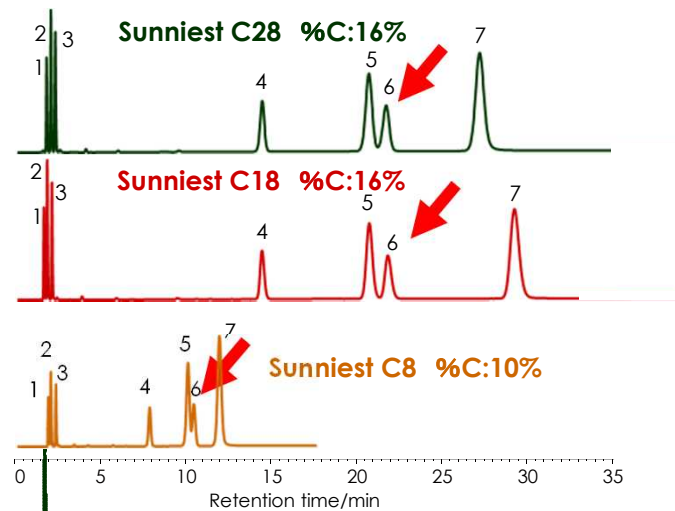
カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm. 試料: 1. ウラシル, 2. カフェイン, 3. フェノール

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

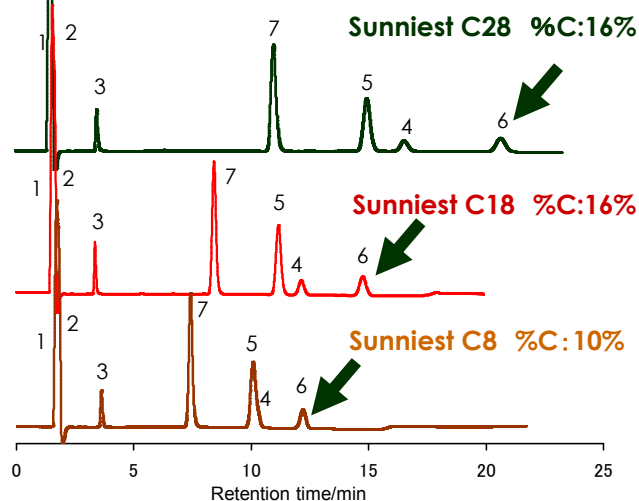


# メタノールとテトラヒドロフラン (THF) の差

メタノール



THF



Column: Sunniest C28, 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,

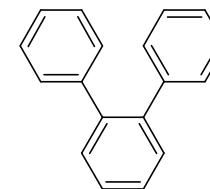
3 = Phenol,

4 = Butylbenzene,

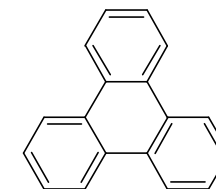
5 = o-Terphenyl,

6 = Amylbenzene,

7 = Triphenylene



Peak 5

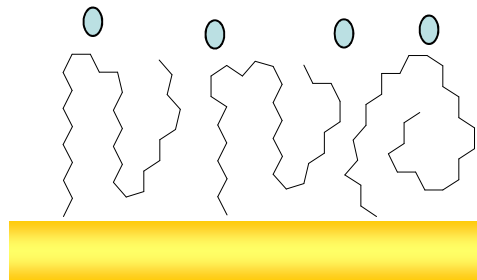


Peak 7

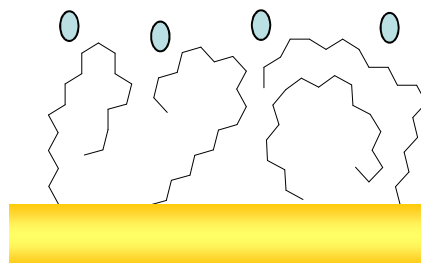


# C28, C18, C8固定相の状態

C28 %C 16%

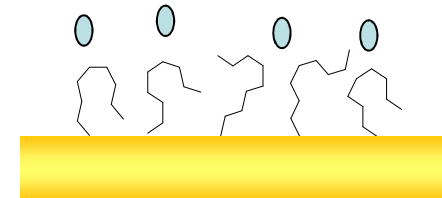


C18 %C 16%

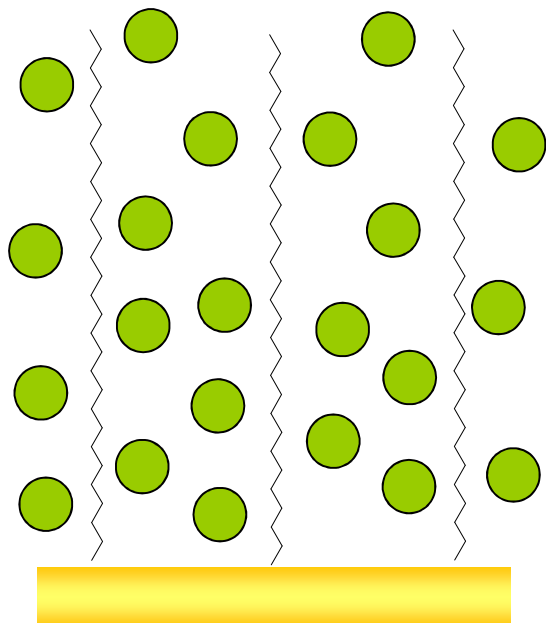


C8 %C 10%

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

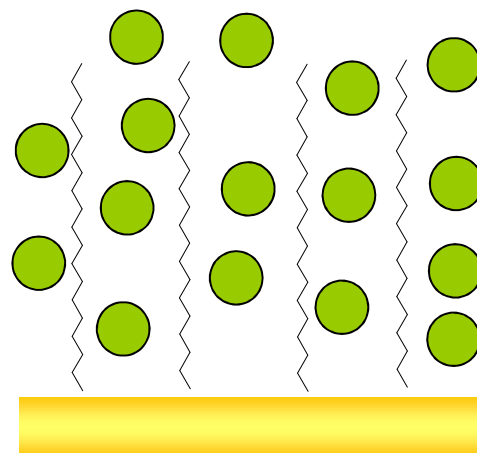


C28



C18

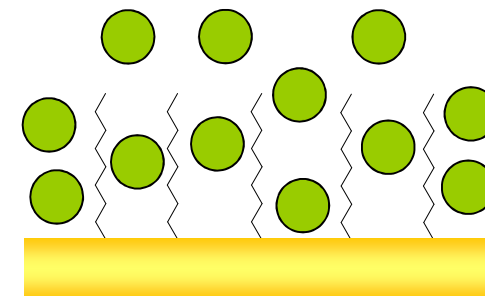
THF/H<sub>2</sub>O=50/50



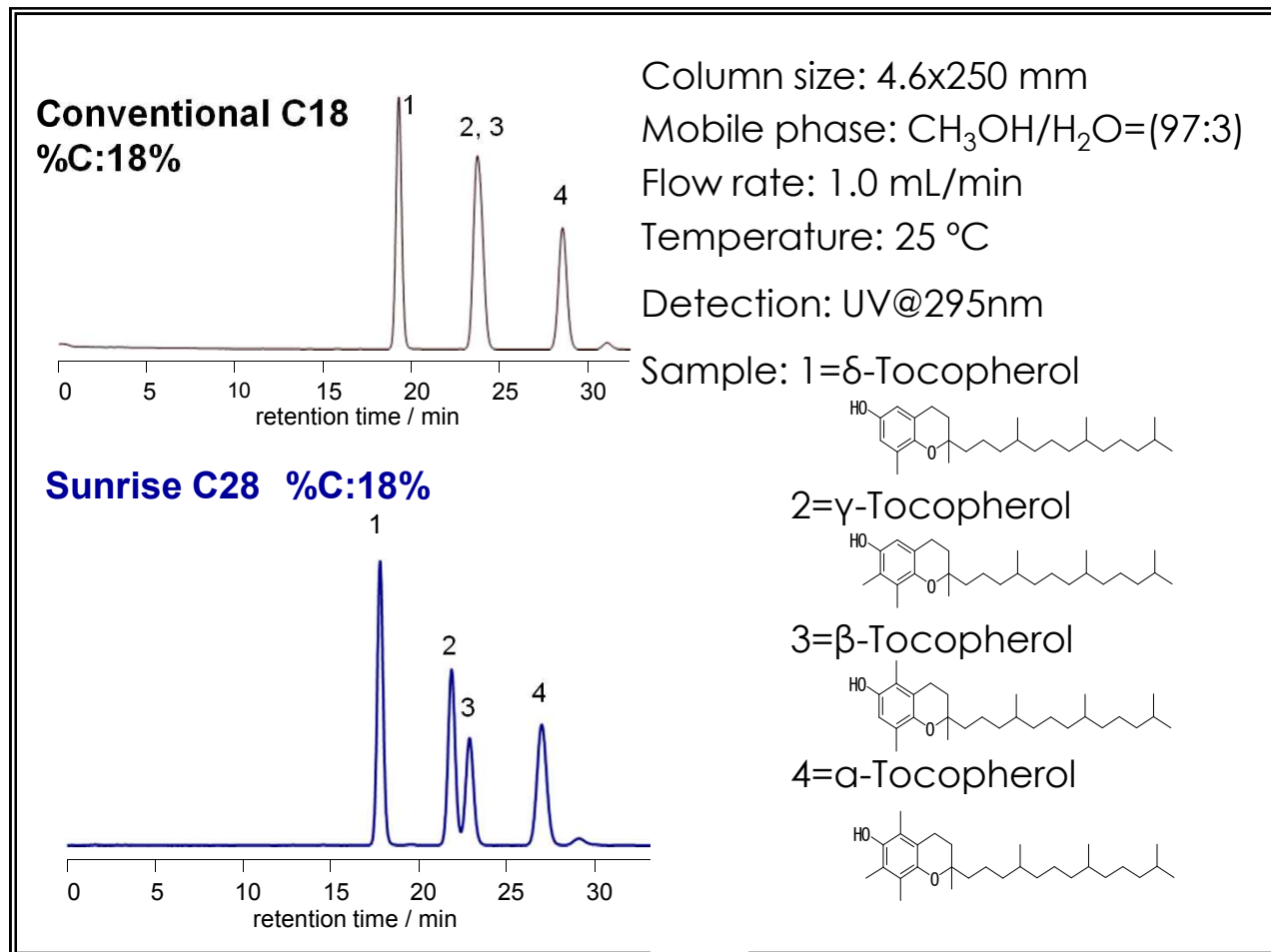
C8

○ : メタノール

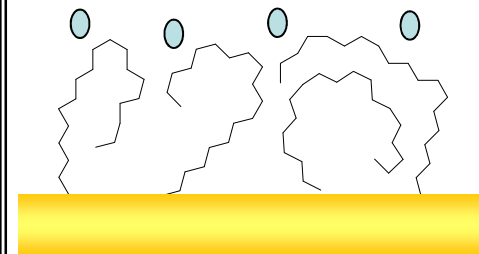
● : THF



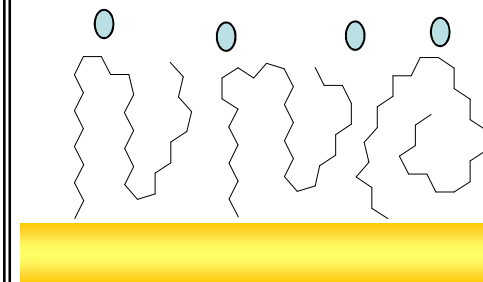
# 炭素含有量の同じC28とC18はメタノール・水移動相条件下では保持は同じ



**C18**

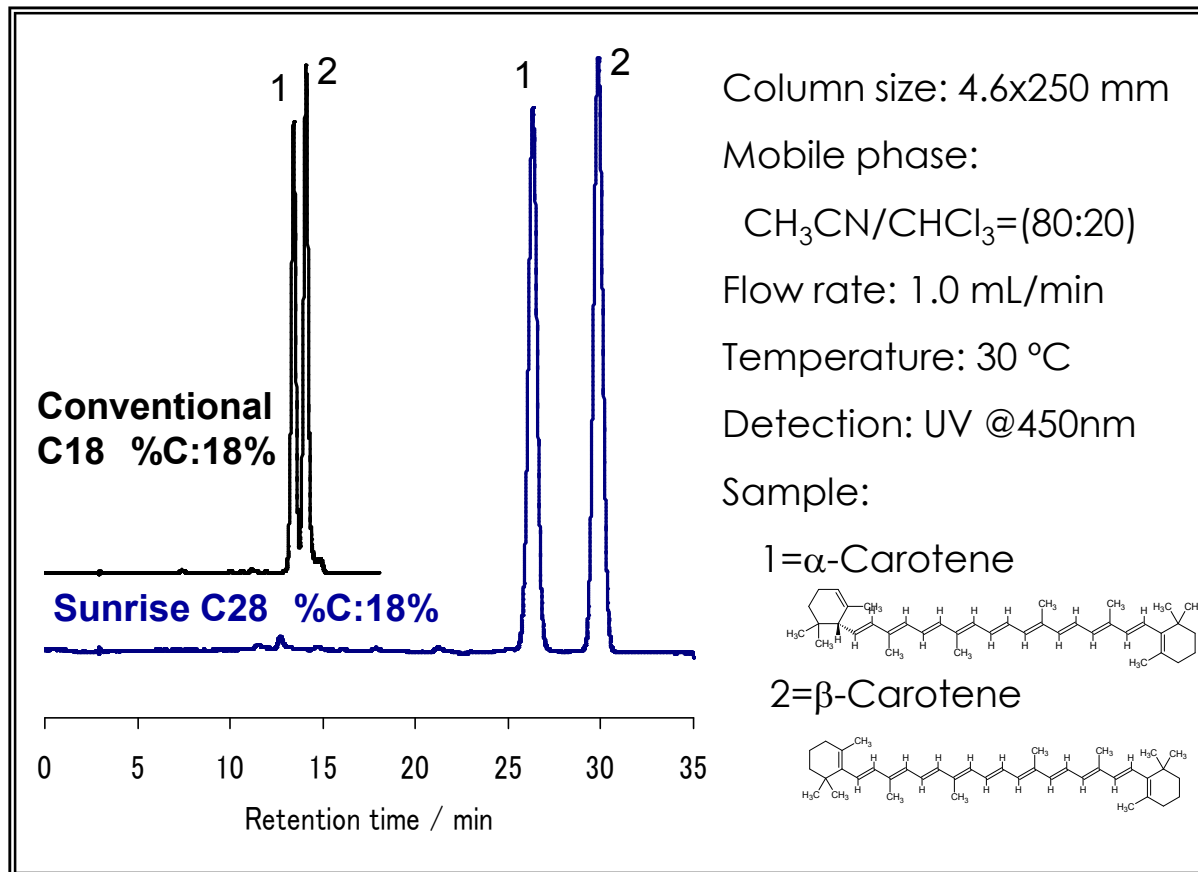


**C28**

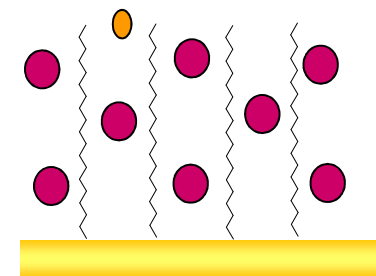


固定相容量は同じ

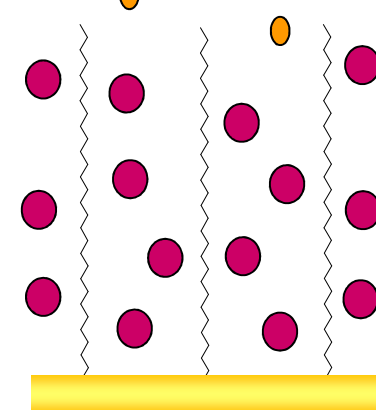
# 炭素含有量の同じC28とC18でもアセトニトリル・クロロホルム移動相条件下では保持は変わる



C18



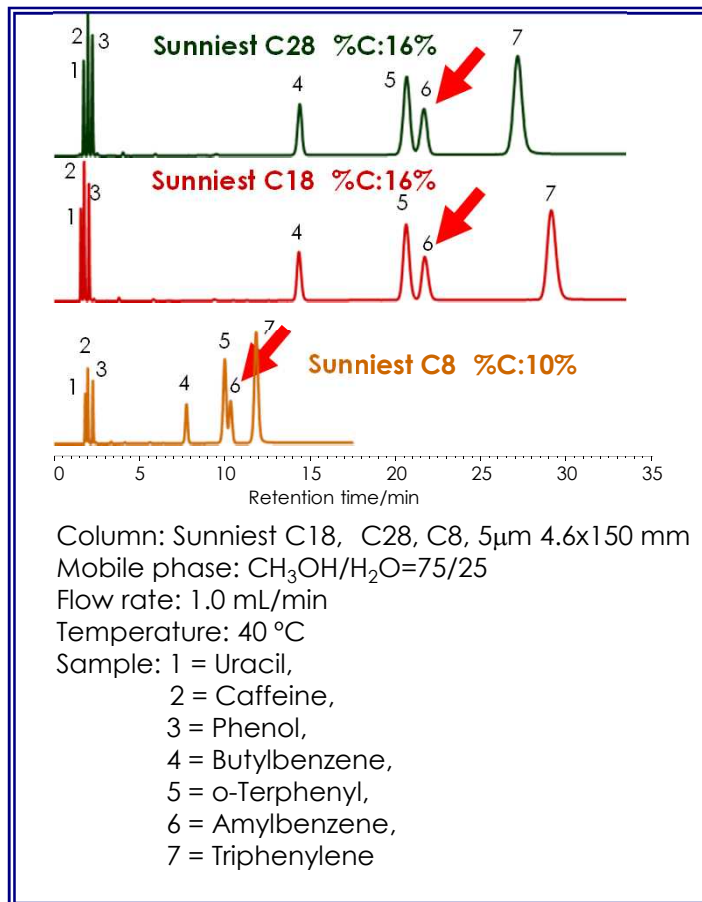
C28



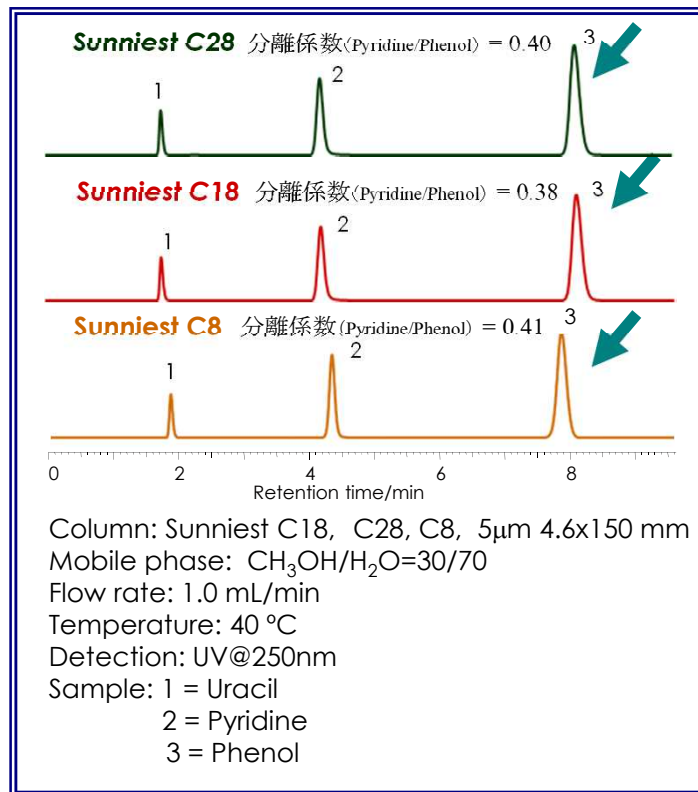
固定相容量は2倍

# 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



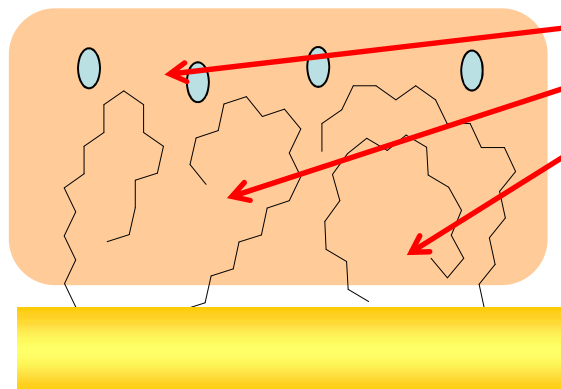
C8はC18とC28に比べ、アミルベンゼンの保持は半分であるが、フェノールの保持はほぼ同じである。

# 試料とC18固定相の相互作用場

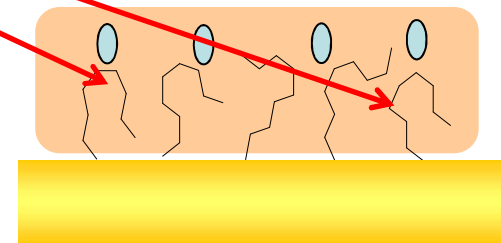
メタノール・水移動相

● : メタノール

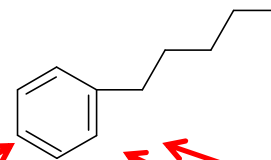
C18



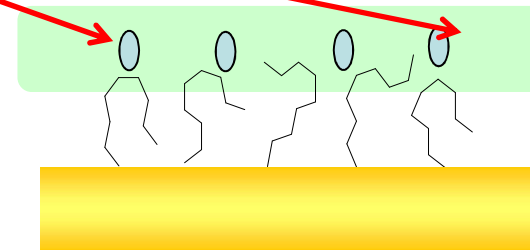
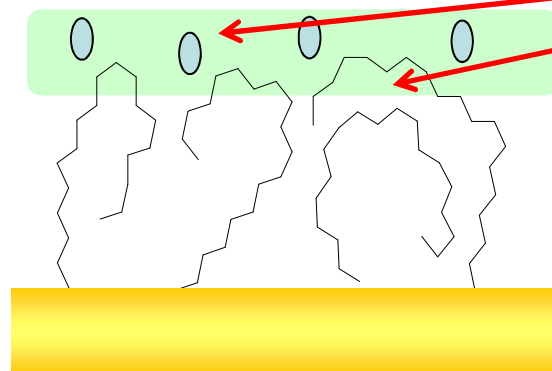
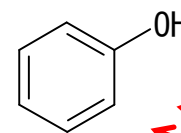
C8



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

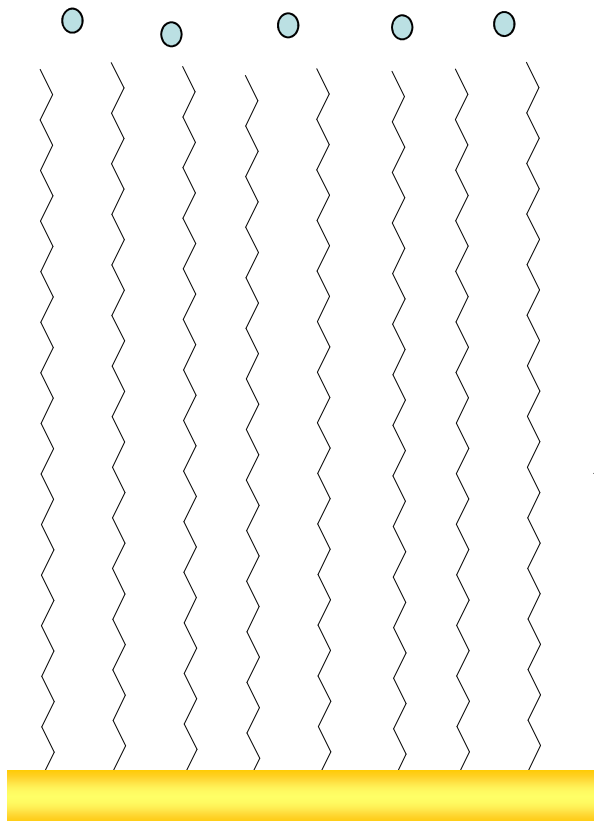




# 層の厚い固定相 (C30)と 層の薄い固定相 (C18)の比較

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

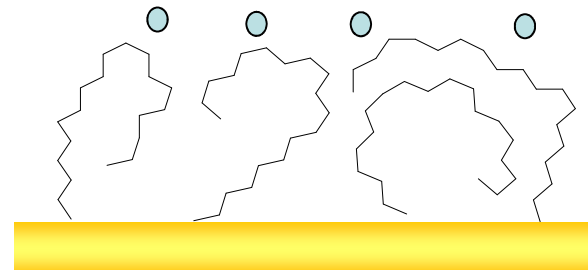
NP-C30, %C:0.23%



炭素含有量は約1/4で層の厚みも約1/4



NP-C18, %C:0.06%



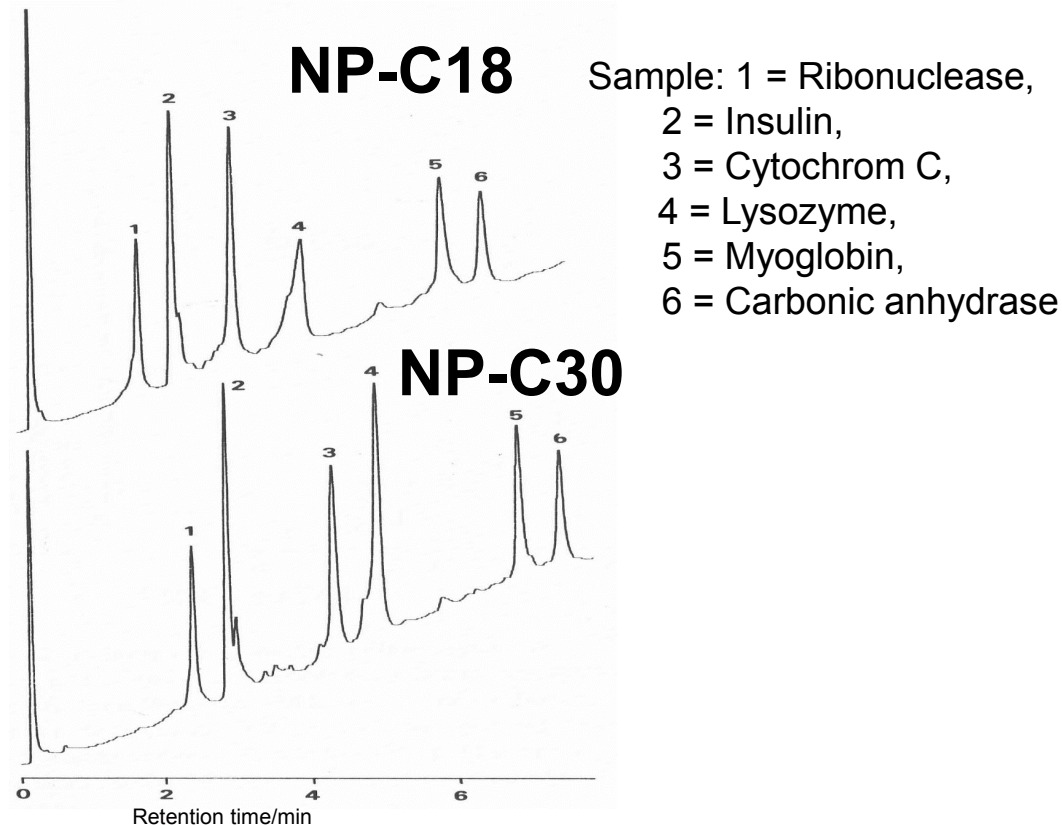
# NP-C30とNP-C18の比較 タンパク質の分離

4.6x30mm

A) 0.1%TFA,

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

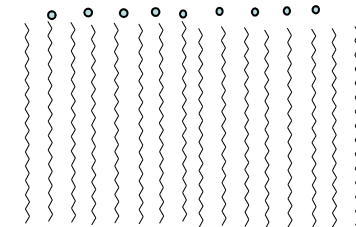
グラジエント溶離



タンパク質



タンパク質



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

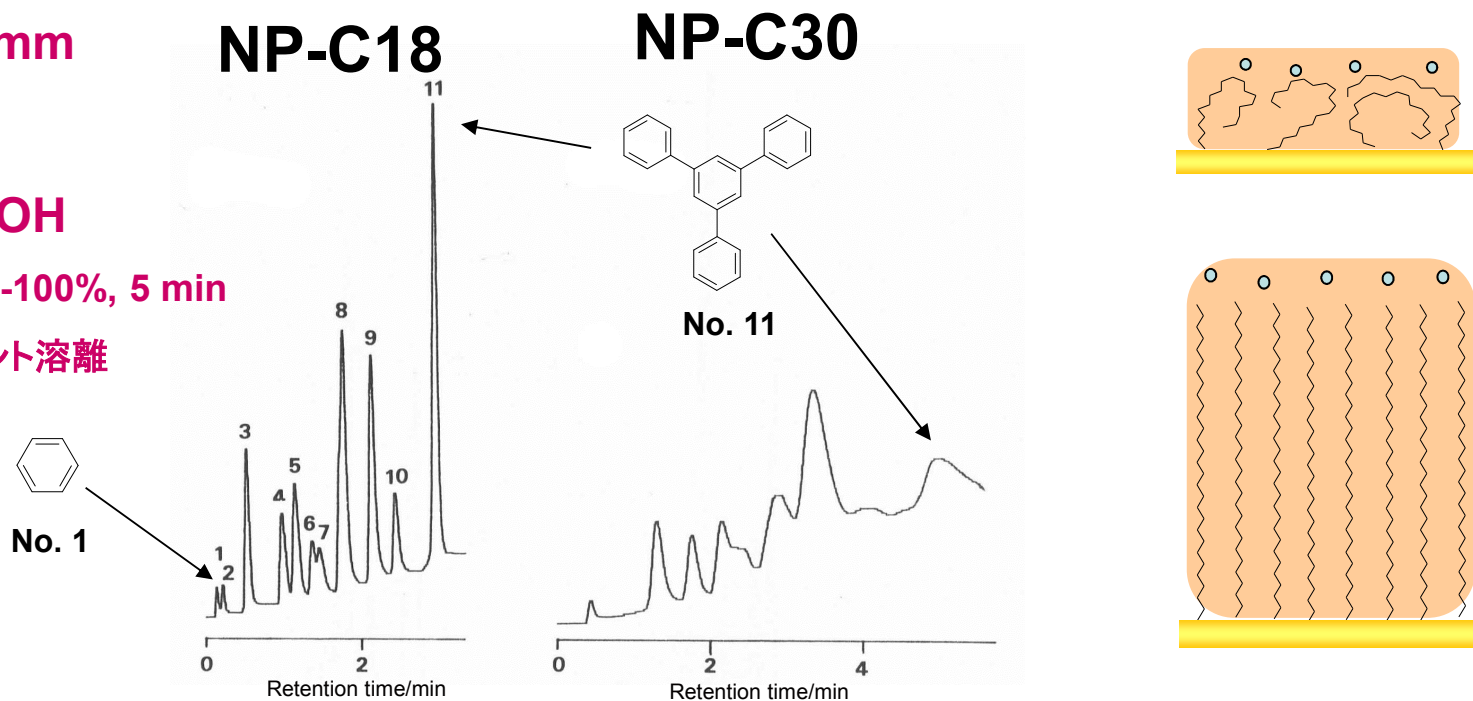
4.6x30mm

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

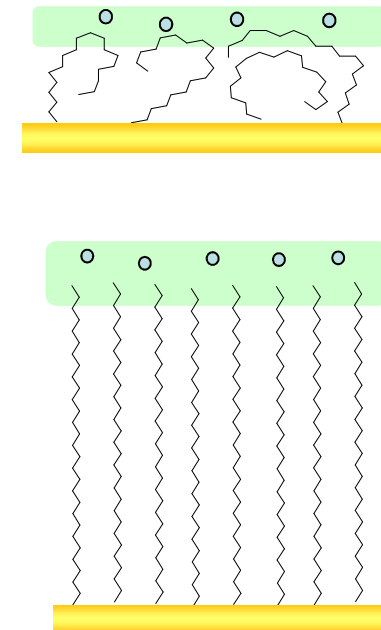
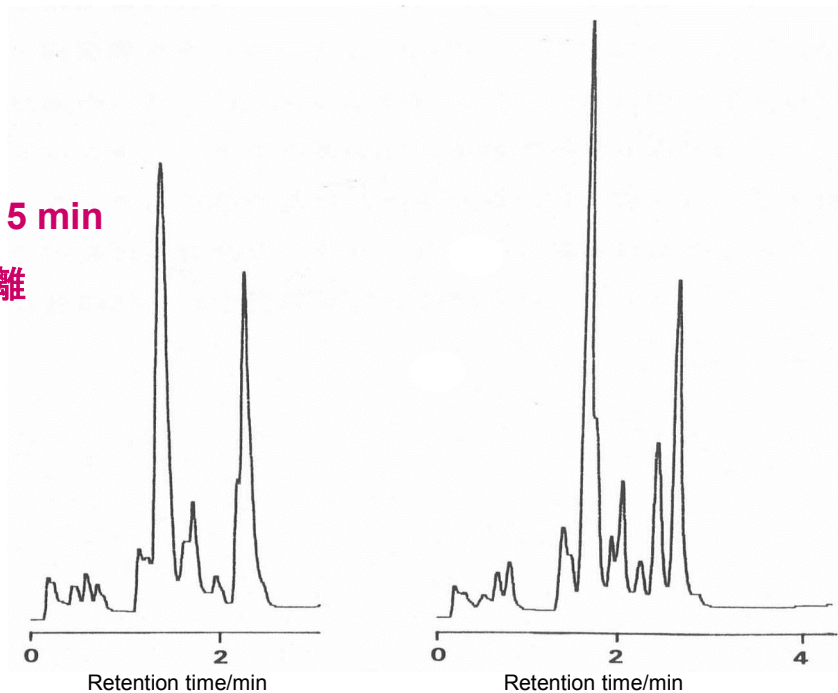
4.6x30mm NP-C18 NP-C30

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

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

%B: 0%-30%, 5 min

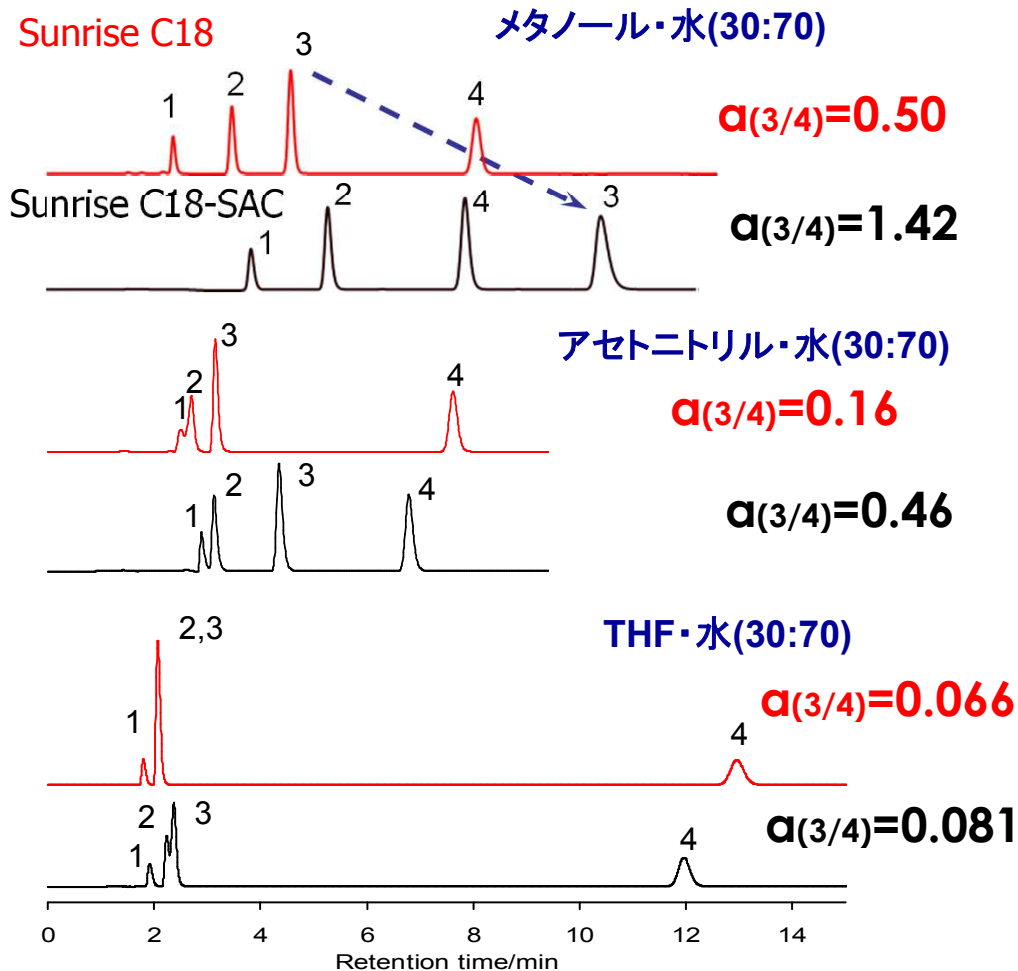
グラジエント溶離



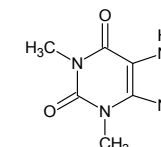
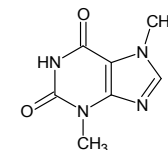
ナギの極性成分も固定相表面のみと相互作用していると考えられる  
C18とC30はほぼ同じ分離を示す

# 水素結合性の比較

## キサンチン類の分離

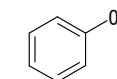
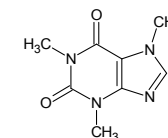


1=Theobromine    2=Theophylline



3=Caffeine

4=Phenol



Column:

Sunrise C18, End-capped (%C:15)

Sunrise C18-SAC, Not end-capped (%C:14%)

5 $\mu$ m, 4.6x150 mm

Mobile phase:

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

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=30/70

THF/H<sub>2</sub>O=30/70

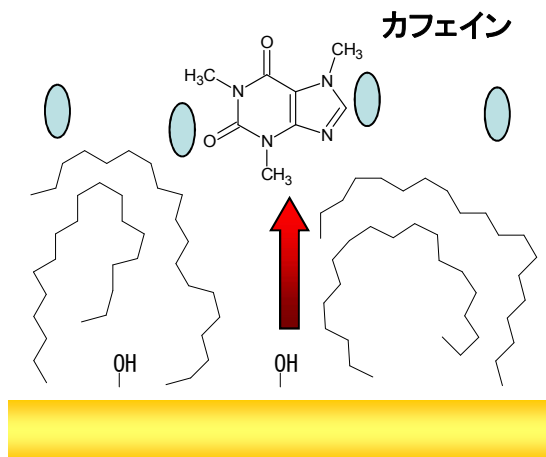
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

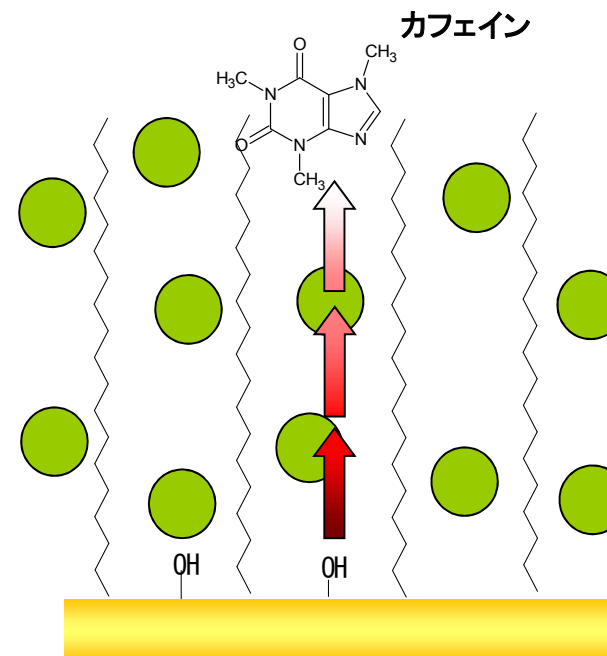
カフェインは水素結合性が高く、シラノール基の存在により保持が大きくなるが、THFを用いるとシラノール基の影響が少なくなる

# 水素結合性の比較 固定相の状態

メタノール・水



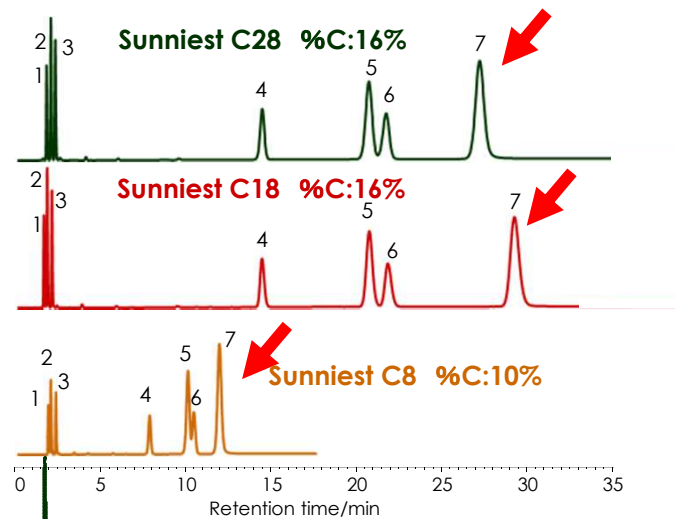
THF・水



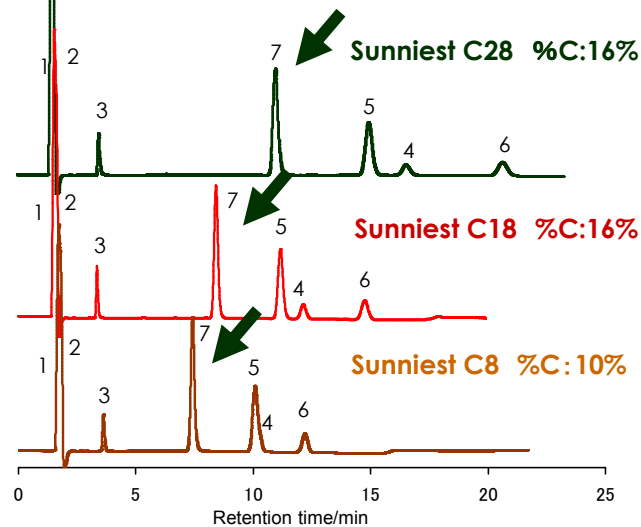
THF・水移動相を用いた場合には、極性の高いTHFが固定相内に存在することにより、溶質に対するシラノール基の影響を弱ませる。

# 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 C28, 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,

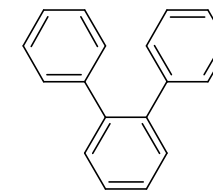
3 = Phenol,

4 = Butylbenzene,

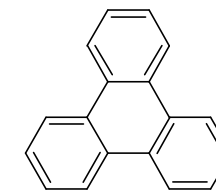
5 = o-Terphenyl,

6 = Amylbenzene,

7 = Triphenylene



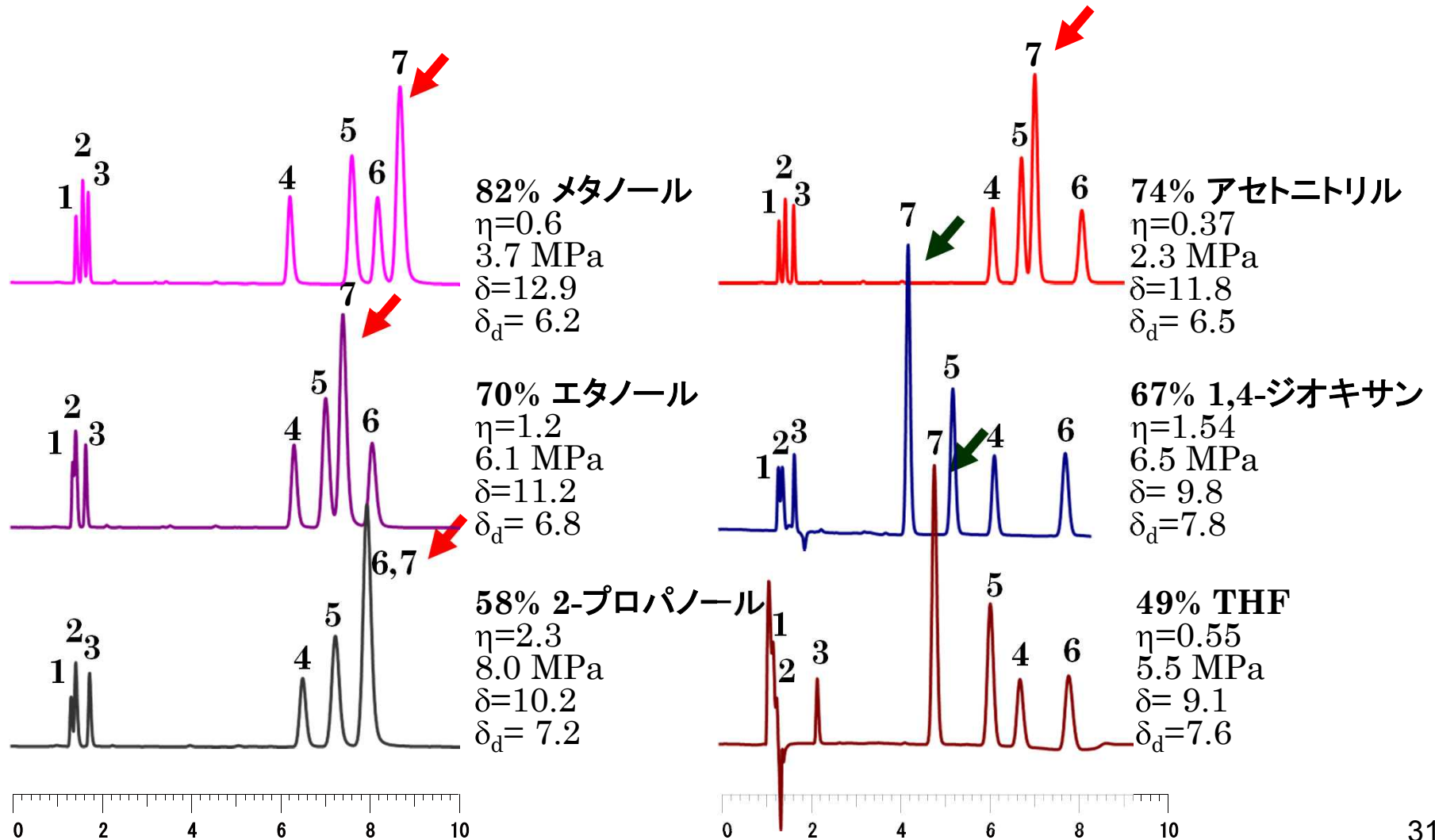
Peak 5



Peak 7



# 高粘性溶媒の使用ー 選択性のコントロール I





# まとめ

- C18アルキル基は、メタノール・水移動相では固まっております。表面にのみメタノールは溶媒和していると考えられる
- THF・水移動相ではTHF濃度の上昇に伴い、固定相内部にTHFは溶媒和し、アルキル基は立ち上がり始めると考えられる
- 固定相に溶媒和した有機溶媒は固定相として働き、メタノールとTHFでは分離は大きくことなる
- 試料の極性により固定相としてのアルキル基の相互作用場が異なると考えられる