

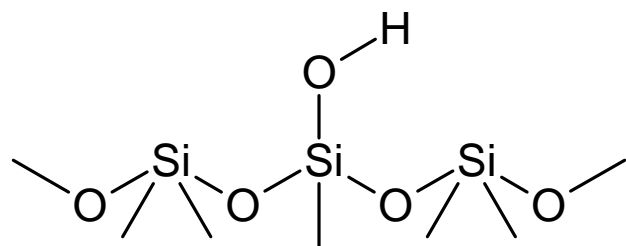
# シラノール基は塩基性化合物のテーリングの原因 - いや違う！

(株) クロマニック テクノロジーズ  
長江 徳和

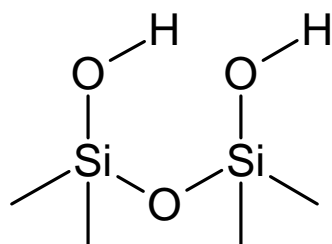
## 【緒言】

- 逆相型固定相中の残存シラノール基は，吸着やピークテーリング等の原因であるとされている
- 残存シラノール基に基づく主な相互作用は，吸着，イオン交換，水素結合である
- これらの二次効果相互作用を積極的に利用することで，極性化合物に対して特異的な保持を示す新規な逆相固定相の創出が可能であると思われる
- 二次効果相互作用の制御方法として熱処理を行ったC18固定相を用いた塩基性化合物と金属配位性化合物の分離を行った

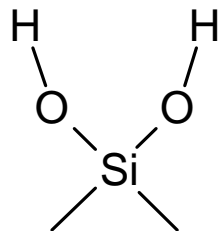
# シラノールの形態とピリジンのピーク



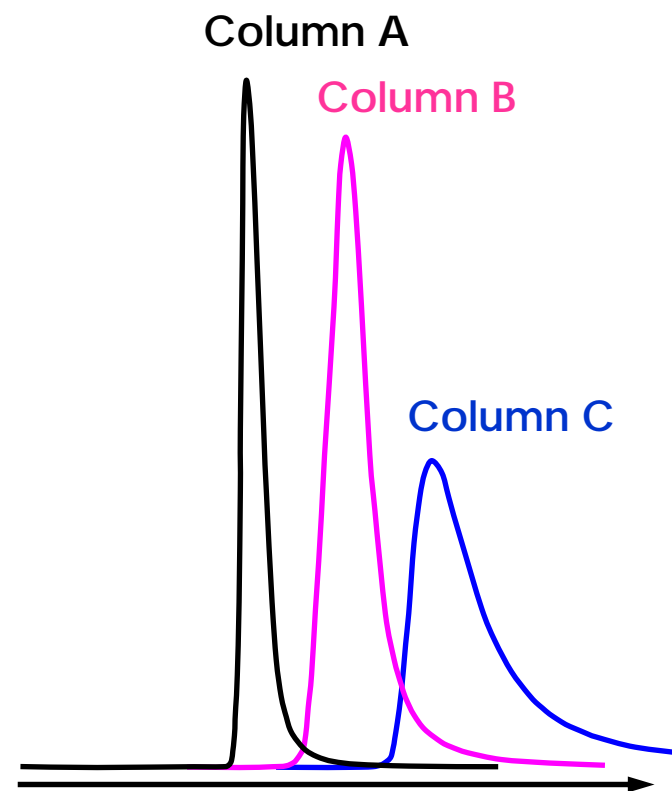
Isolated Silanol



Vicinal Silanol



Geminal Silanol



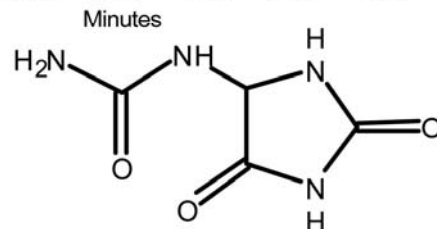
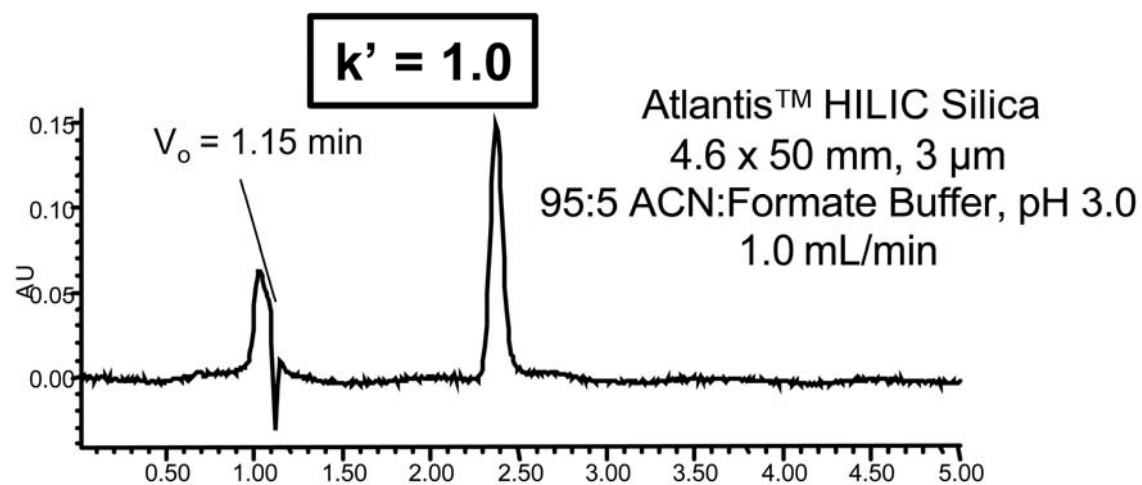
C18カラムを用いた場合の  
ピリジンのピーク形状

60% CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O

# 疑問

- シラノール基は塩基性化合物のテーリングの原因か？
- シリカゲルを用いた，逆相と同じ移動相で分離するヒリックモードでは，塩基性化合物はテーリングしない！
- 従って，シリカゲル表面に存在するシラノール基は塩基性化合物のテーリングの原因ではない
- しかし，残存シラノール基を含むC18固定相では塩基性化合物はテーリングする
- なぜか？

# シリカゲルによるヒリックモードの 塩基性化合物の分離

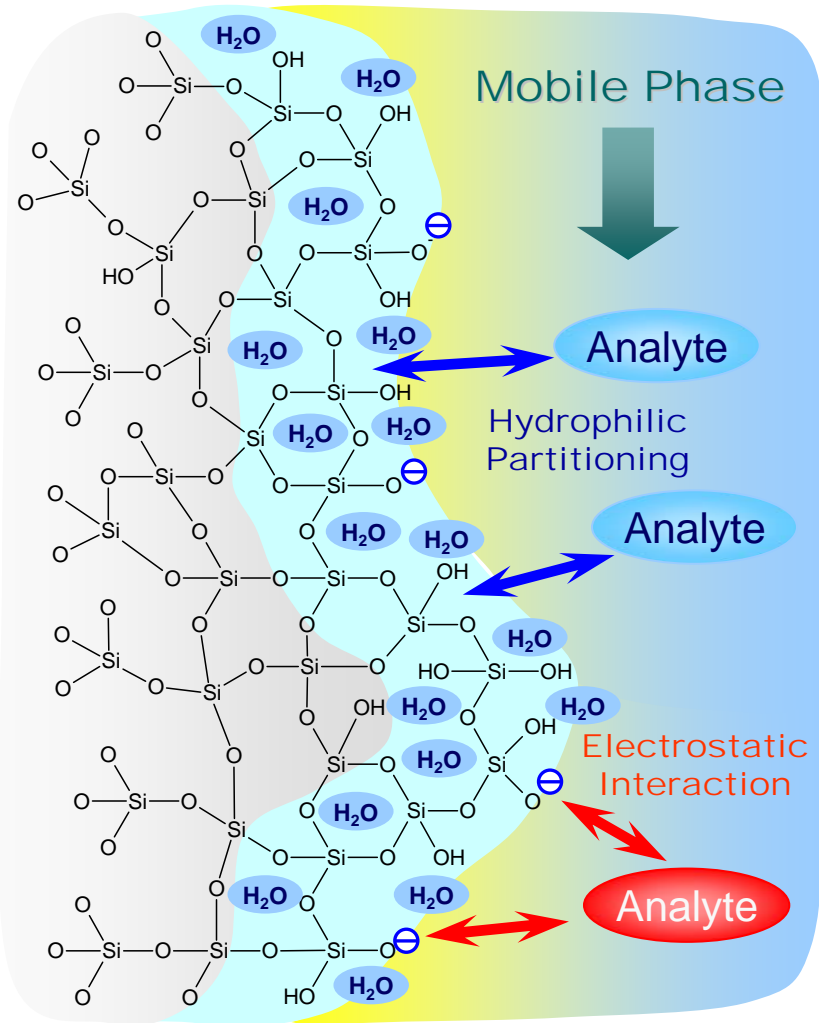


**Allantoin**

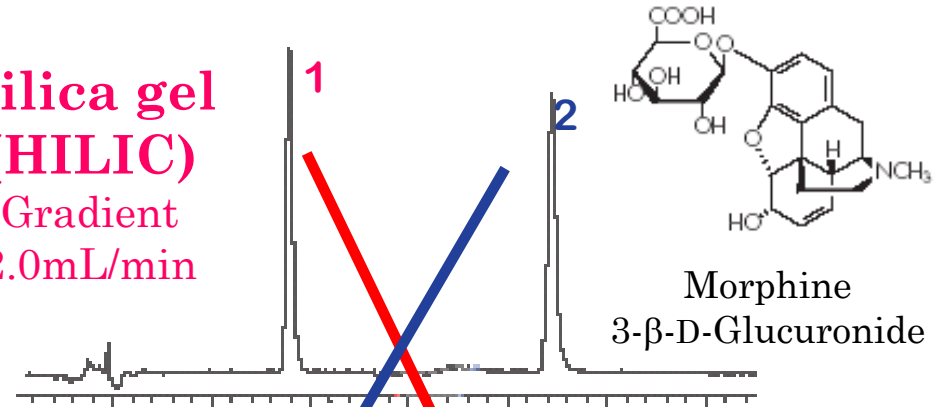
Waters技術資料より

塩基性化合物は有機溶媒と緩衝液の移動相でテーリングすることなく溶出する

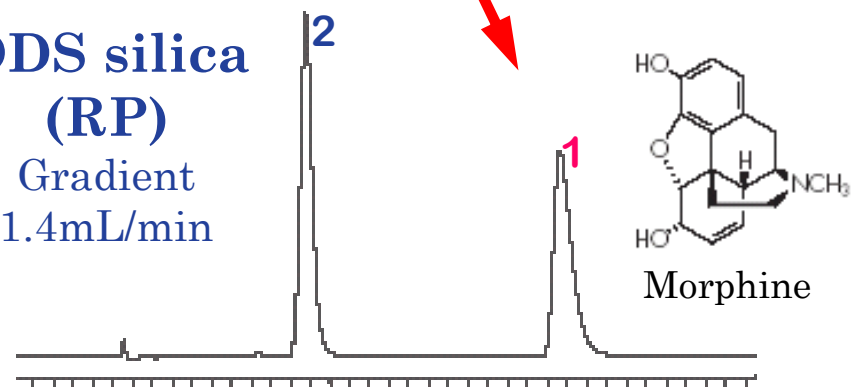
# シリカゲルのヒリックモードにおける保持機構



Silica gel  
(HILIC)  
Gradient  
2.0mL/min



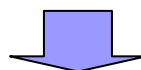
ODS silica  
(RP)  
Gradient  
1.4mL/min



※日本ウォーターズ(株)資料を基に作成

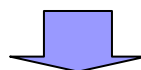
# 逆相での塩基性化合物のテーリングの原因は？

シリカゲルを用いるヒリックモードでは塩基性化合物良好



シラノール基が安定に水和している状態では塩基性化合物はテーリングしない

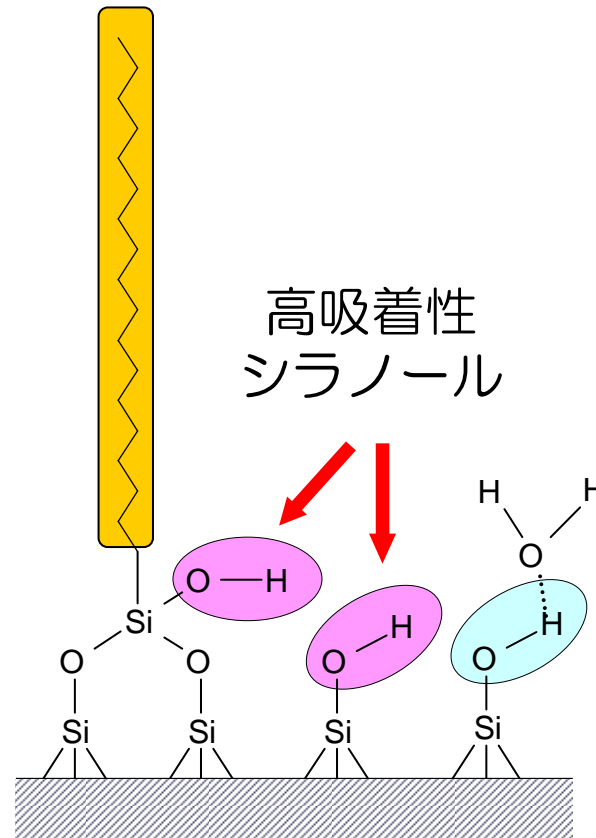
もし不完全な水和状態のシラノール基が存在すれば



イオン交換的吸着により塩基性化合物はテーリングする

疎水場の近くに存在するシラノール基は、疎水場の影響により  
水和が妨害され、不完全な水和状態である

# C18固定相の残存シラノール基の状態





# 塩基性化合物をテーリングさせなくする方法

水和の不十分な、または水和していないシラノール基をなくす

TMS化などのエンドキャッピング



エンドキャップにより、さらに疎水場が増え、全てのシラノール基をエンドキャップすることになる



塩基性化合物はテーリングしないが、疎水性が増し、保持は減少する

一般的なエンドキャップ型C18

シラノール基のシロキサン化



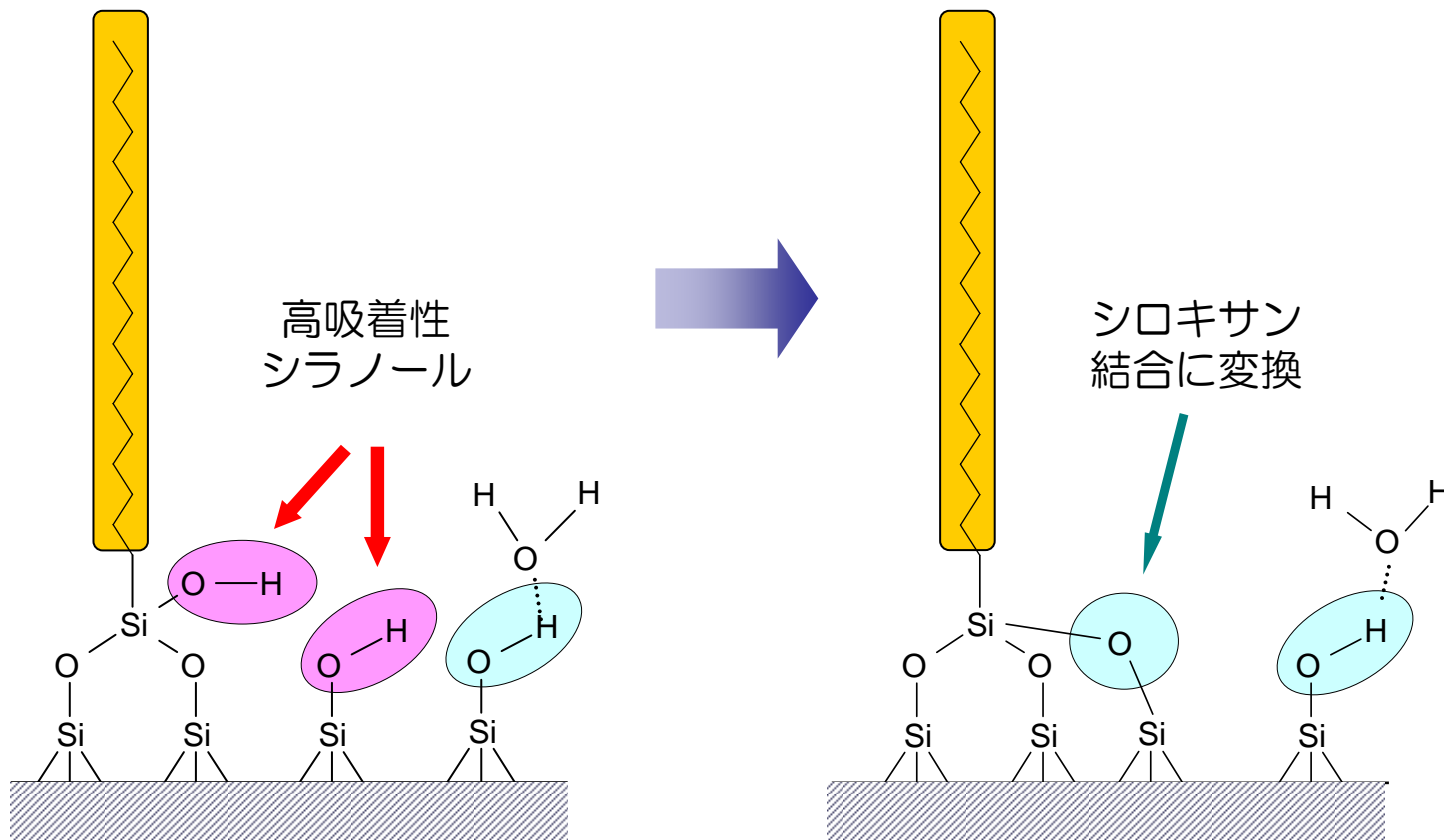
疎水場近くのシラノール基のみシロキサン化、疎水場から離れた水和しているシラノール基はそのまま



塩基性化合物はテーリングせず、イオン交換相互作用で、保持増加

新規なノンエンドキャップ型C18

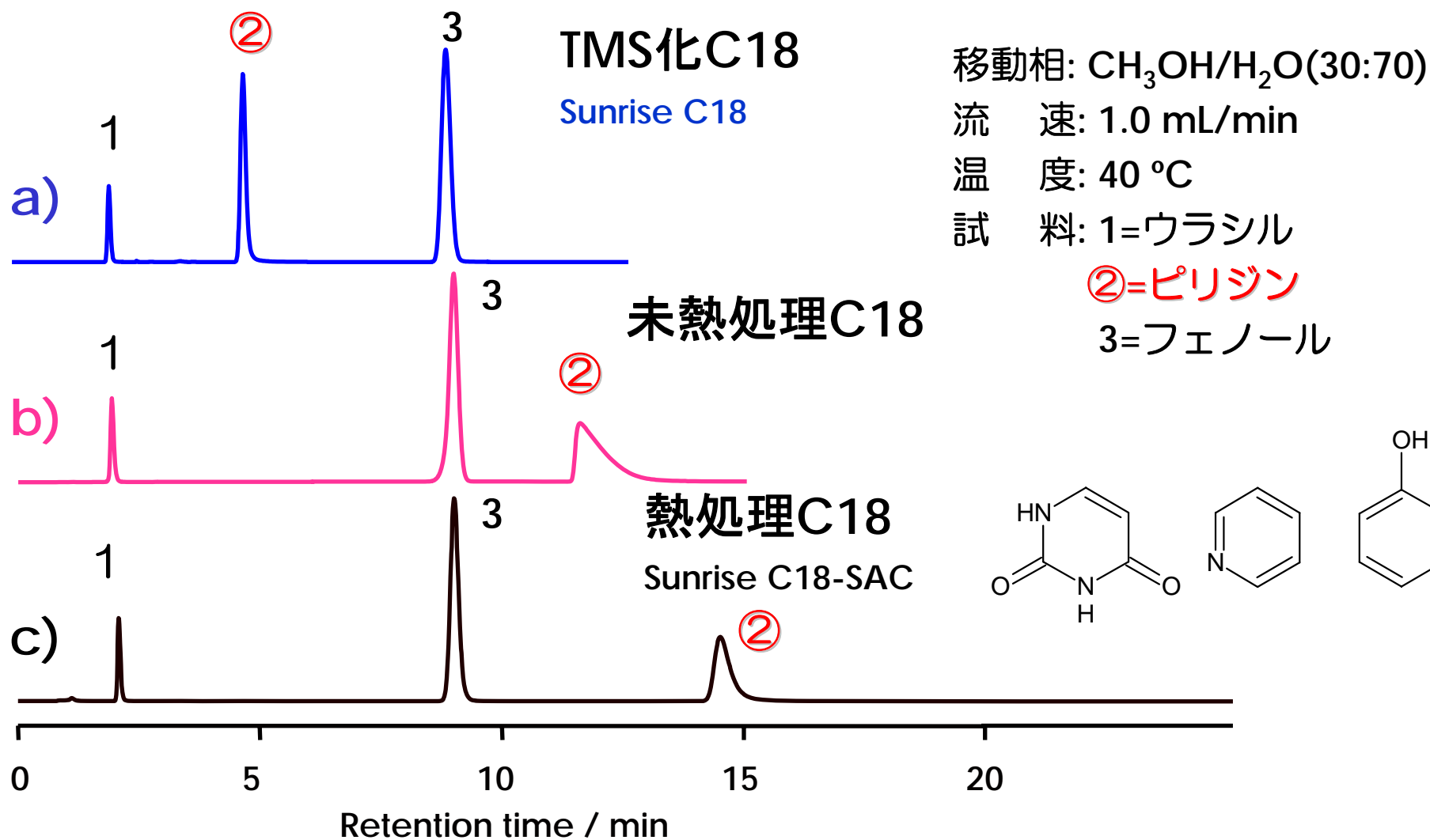
# C18固定相の残存シラノール基の状態



## 【実験】

- 基材シリカゲル
  - 細孔径：12 nm，比表面積：340 m<sup>2</sup>/g，粒子径：5 μm
- オクタデシルトリクロロシランの導入
  - 炭素含量：14%
  - 比較対象として，TMS化固定相も調製
- 熱処理（真空乾燥機中で熱処理，シロキサン化）
  - 処理温度：200 °C，処理時間：48時間
  - 有機溶媒/緩衝液で水和出来る部位の再シラノール化
  - 比較対照として，未熱処理固定相も調製
- 評価
  - カラム：内径4.6 mm，長さ150 mm
  - 移動相：メタノールまたはアセトニトリル/水または緩衝液

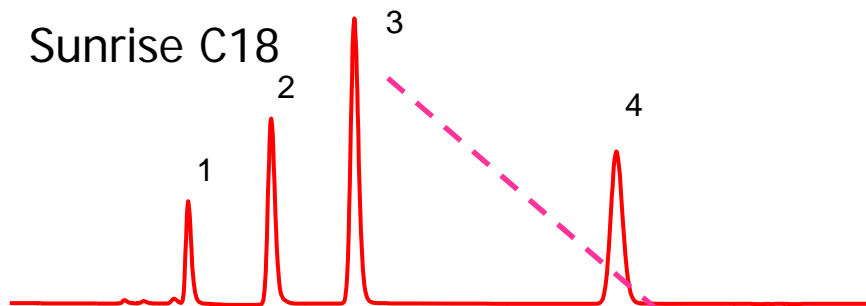
# ピリジンのピーク形状比較



# キサンチン類の分離

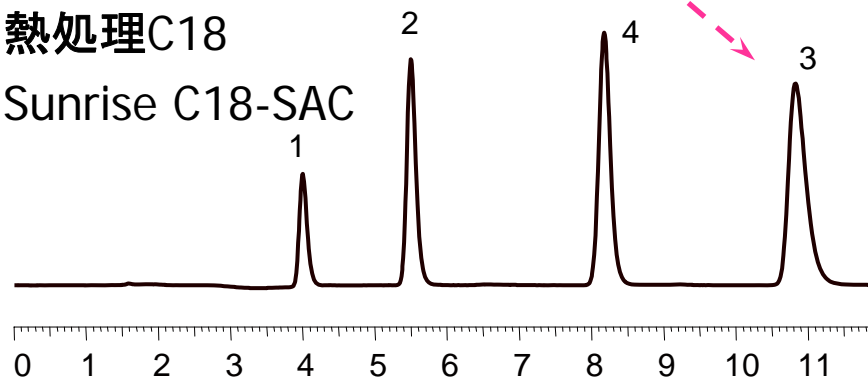
TMS化C18

Sunrise C18



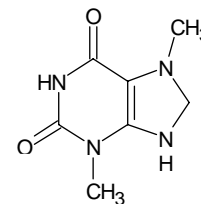
熱処理C18

Sunrise C18-SAC

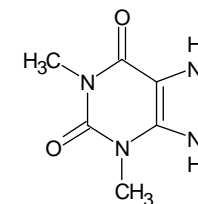


Time (min)

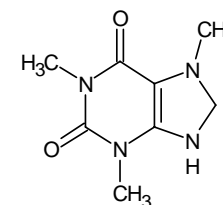
1= テオブロミン



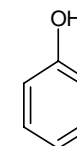
2= テオフィリン



3= カフェイン



4= フェノール



カラムサイズ：4.6 x 150 mm

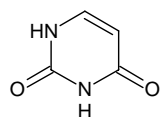
移動相：メタノール/20mMリン酸二水素カリウム pH4.5 (30:70)

流速：1.0 mL/min

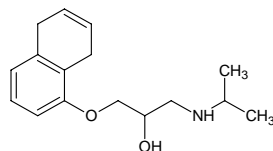
温度：40 °C

# 三環系抗うつ剤の分離

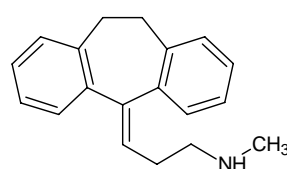
1=ウラシル



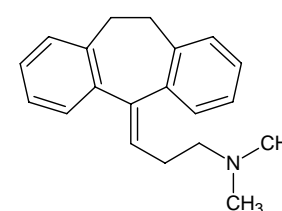
2=プロプラノロール



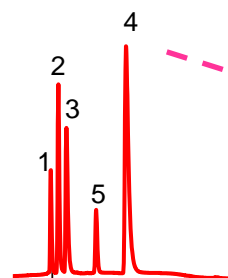
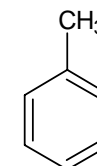
3=ノルトリプチリン



4=アミトリプチリン



5=トルエン

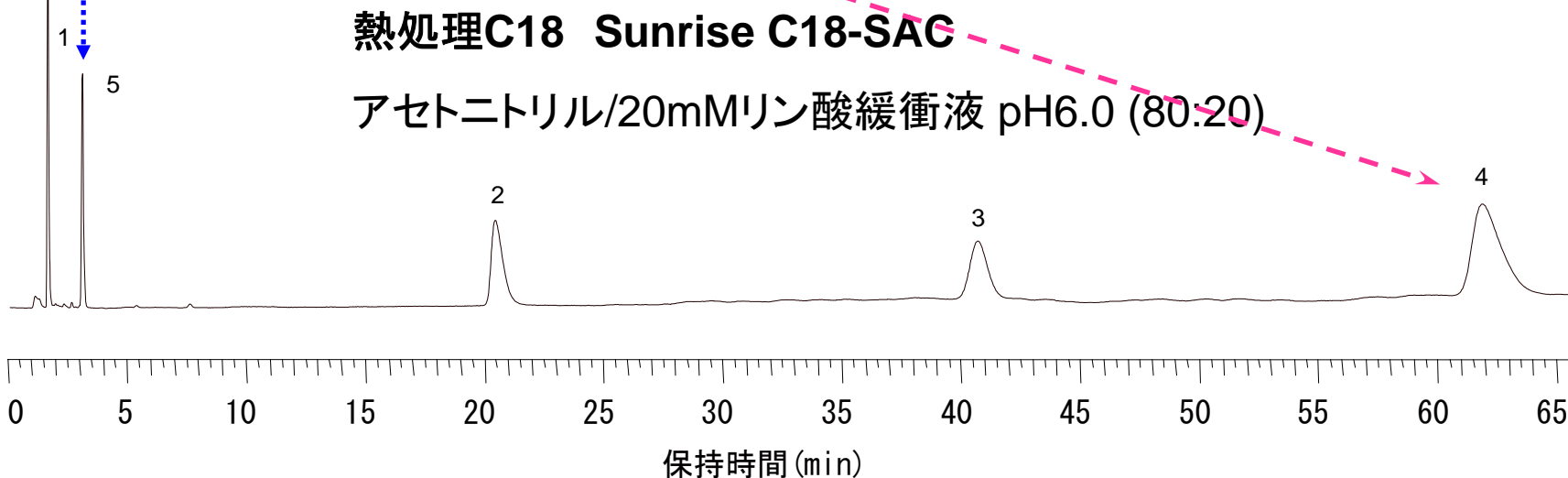


**TMS化 C18 Sunrise C18**

アセトニトリル/20mMリン酸緩衝液 pH6.0 (80:20)

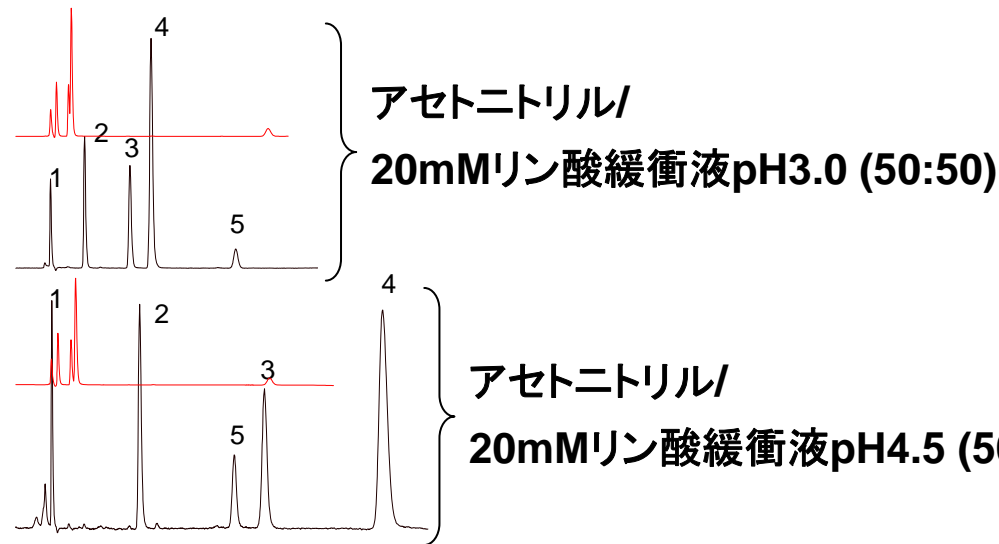
**熱処理C18 Sunrise C18-SAC**

アセトニトリル/20mMリン酸緩衝液 pH6.0 (80:20)



# 移動相pHによる保持時間の制御

イオン交換相互作用の保持機構が働く成分は移動相pHにより保持を大きく変化させることが可能



カラム: **TMS化C18, Sunrise C18**

**4.6 x 150 mm**

熱処理C18, Sunrise C18-SAC

4.6 x 150 mm

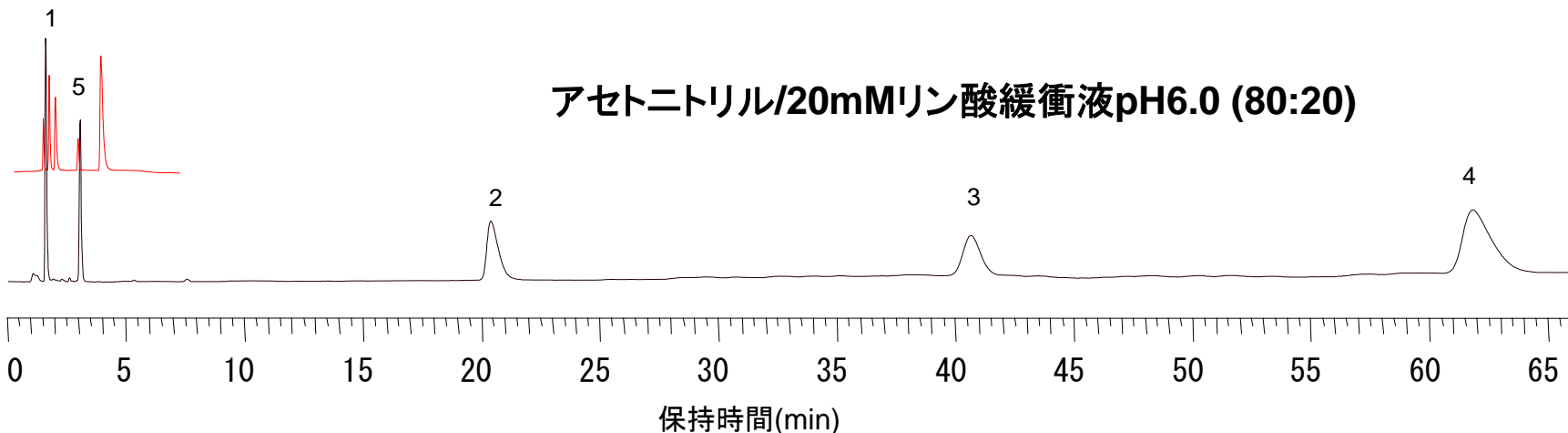
流速: 1.0 mL/min

温度: 40 °C

試料: 1=ウラシル, 2=プロプラノロール,

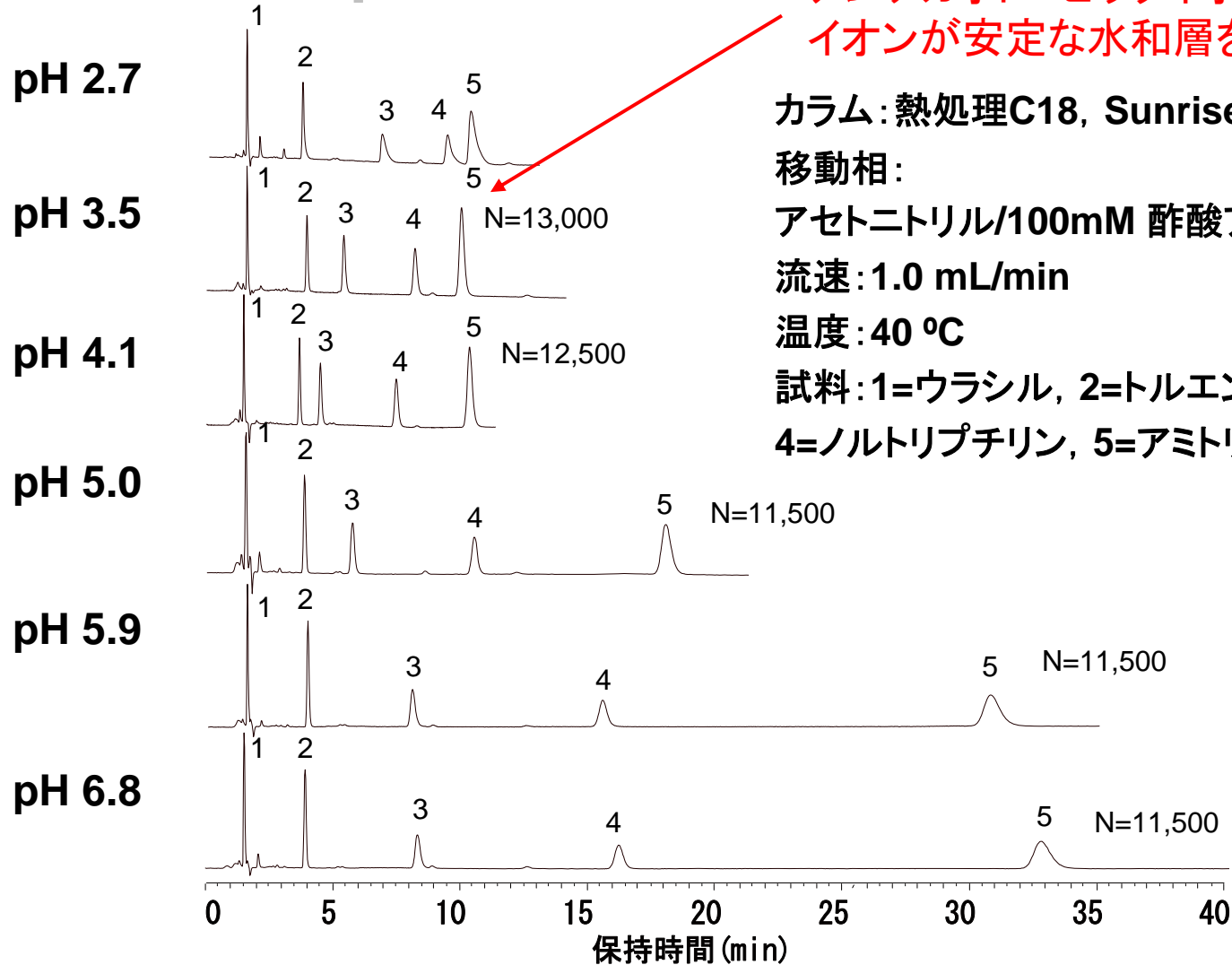
3=ノルトリプチリン,

4=アミトリプチリン, 5=トルエン



# 酢酸アンモニウムを用いた塩基性化合物の 分離：pHの影響

アンチカオトロピックイオンであるアンモニウムイオンが安定な水和層を形成



カラム: 熱処理C18, Sunrise C18-SAC 4.6 x 150 mm

移動相:

アセトニトリル/100mM 酢酸アンモニウム (70:30)

流速: 1.0 mL/min

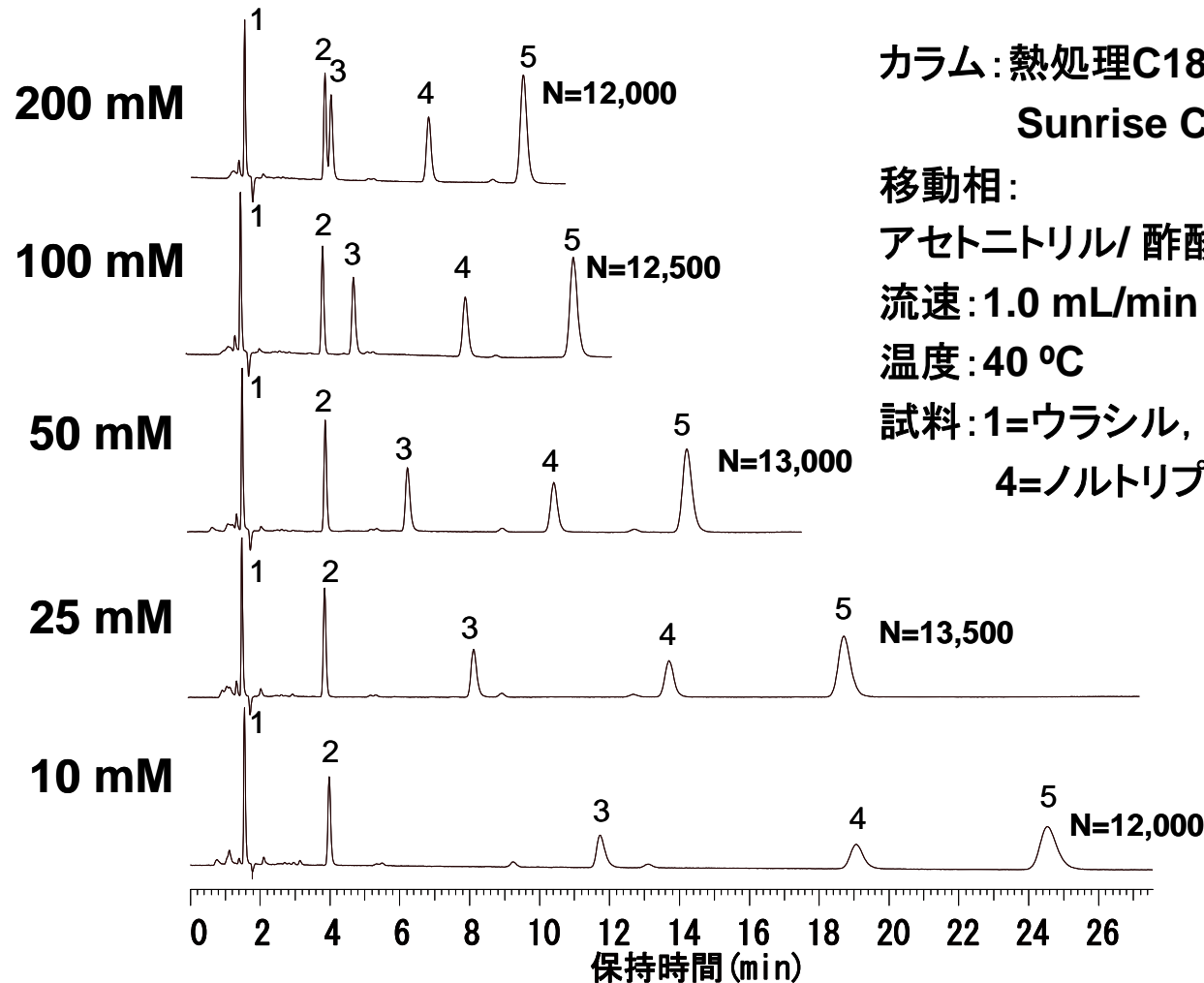
温度: 40 °C

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



# 酢酸アンモニウムを用いた塩基性化合物の 分離：塩濃度の影響



カラム: 熱処理C18,

Sunrise C18-SAC 4.6 x 150 mm

移動相:

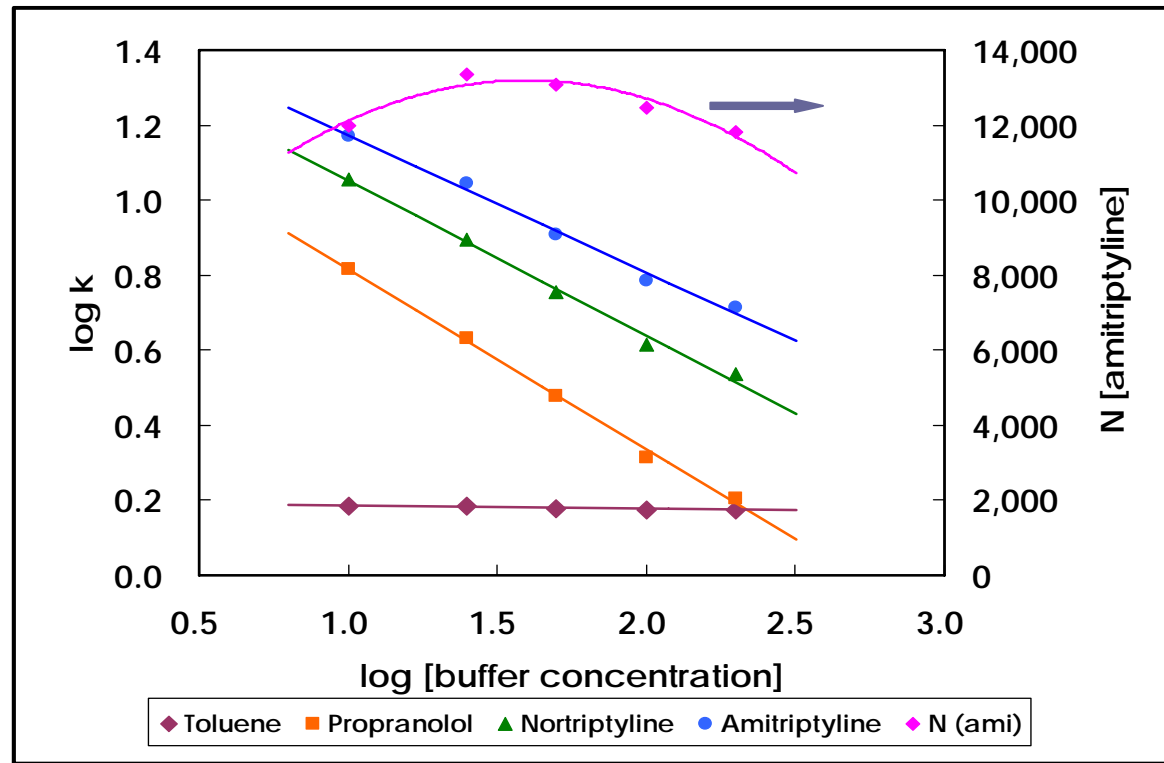
アセトニトリル/ 酢酸アンモニウム pH 4.1 (70:30)

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

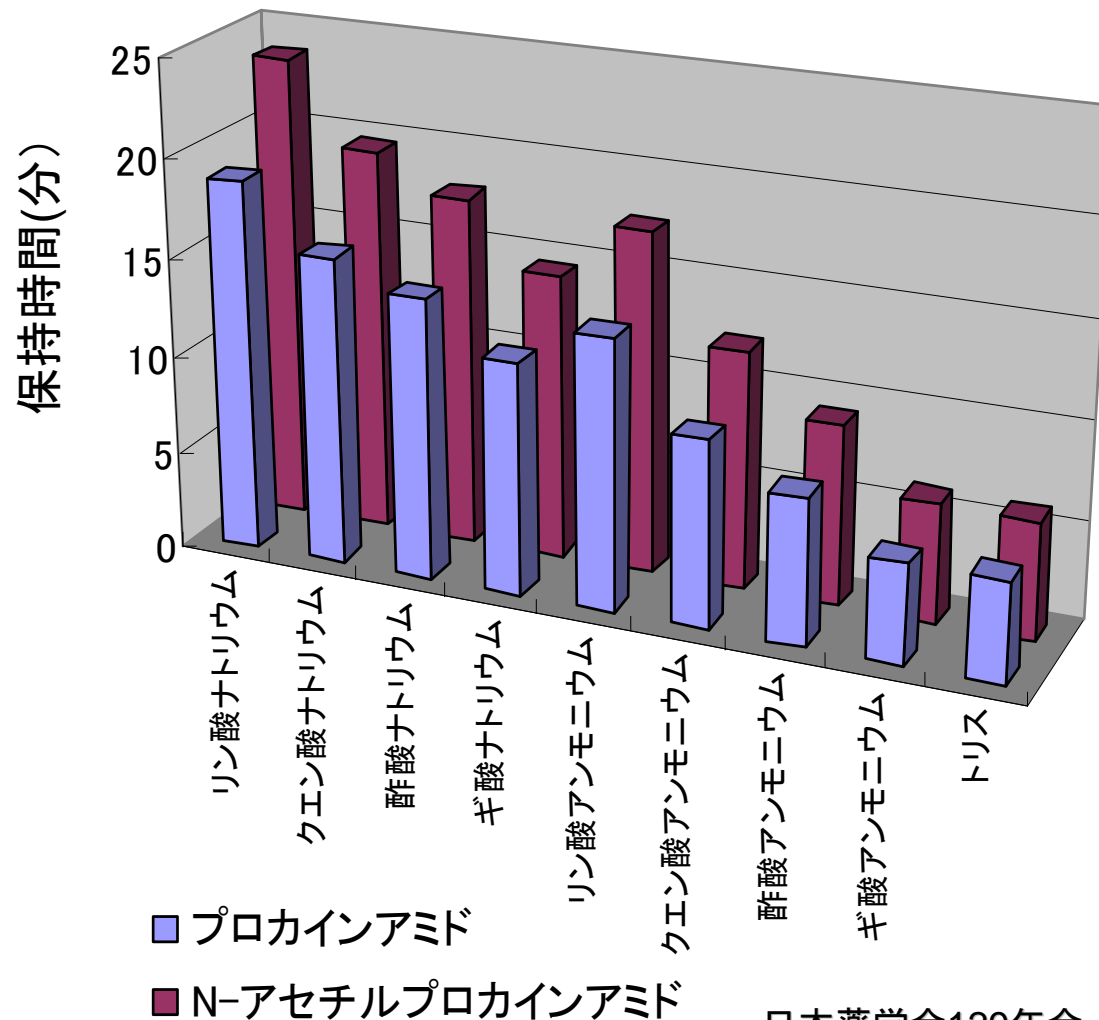
# 緩衝液濃度と保持指数との関係



$$\log k = -\frac{z_B}{z_A} \log[A] + \frac{z_B}{z_A} \log[\bar{A}] + \log \frac{V_r}{V_m} + \frac{1}{z_A} \log K_A^B$$

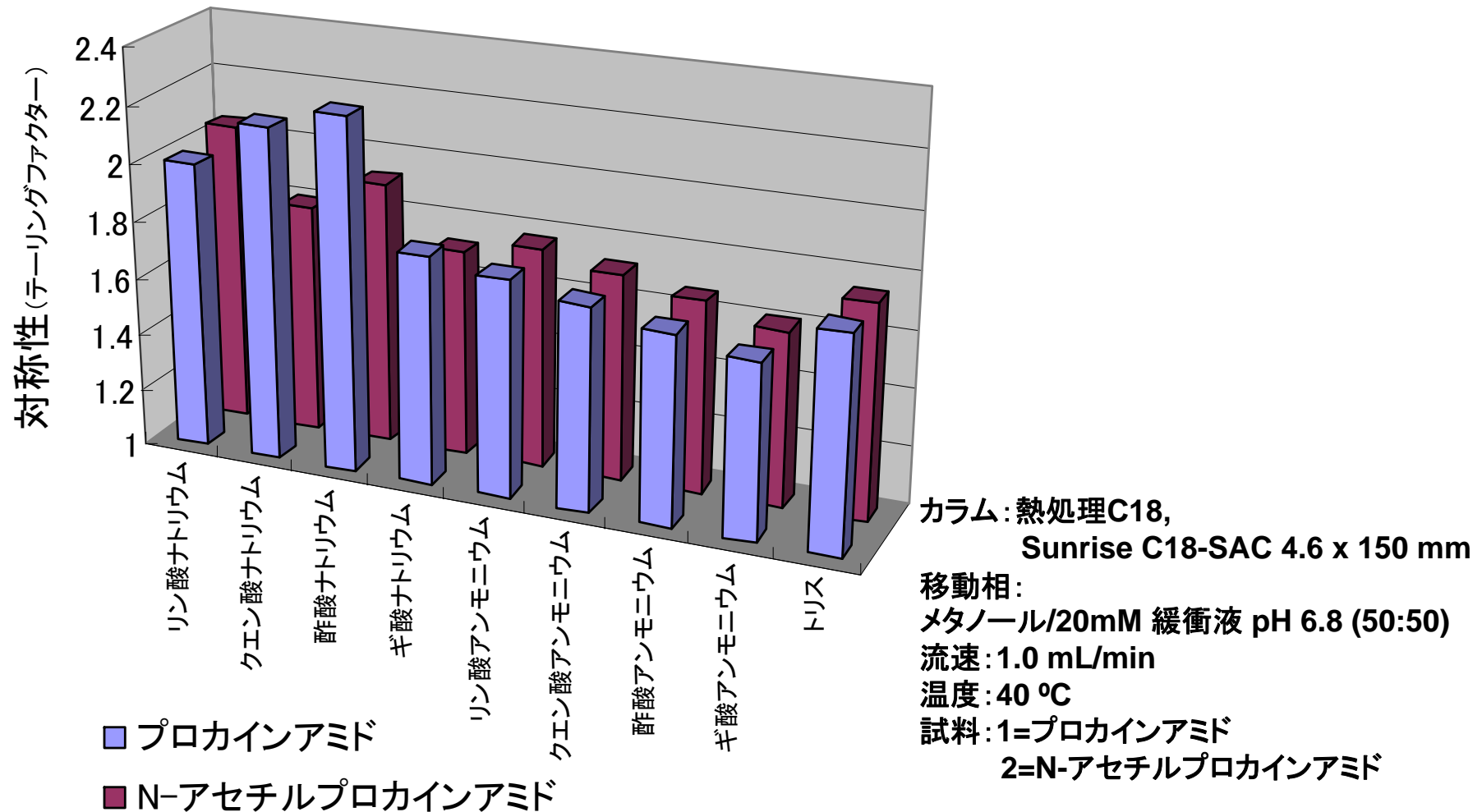
A: 溶離剤イオン, B: 測定イオン, k: Bの保持指数, K: 選択係数  
 $z_A, z_B$ : 各イオンの電荷,  $V_r, V_m$ : カラム内の樹脂体積と移動相体積

# 緩衝液の塩の保持時間への影響

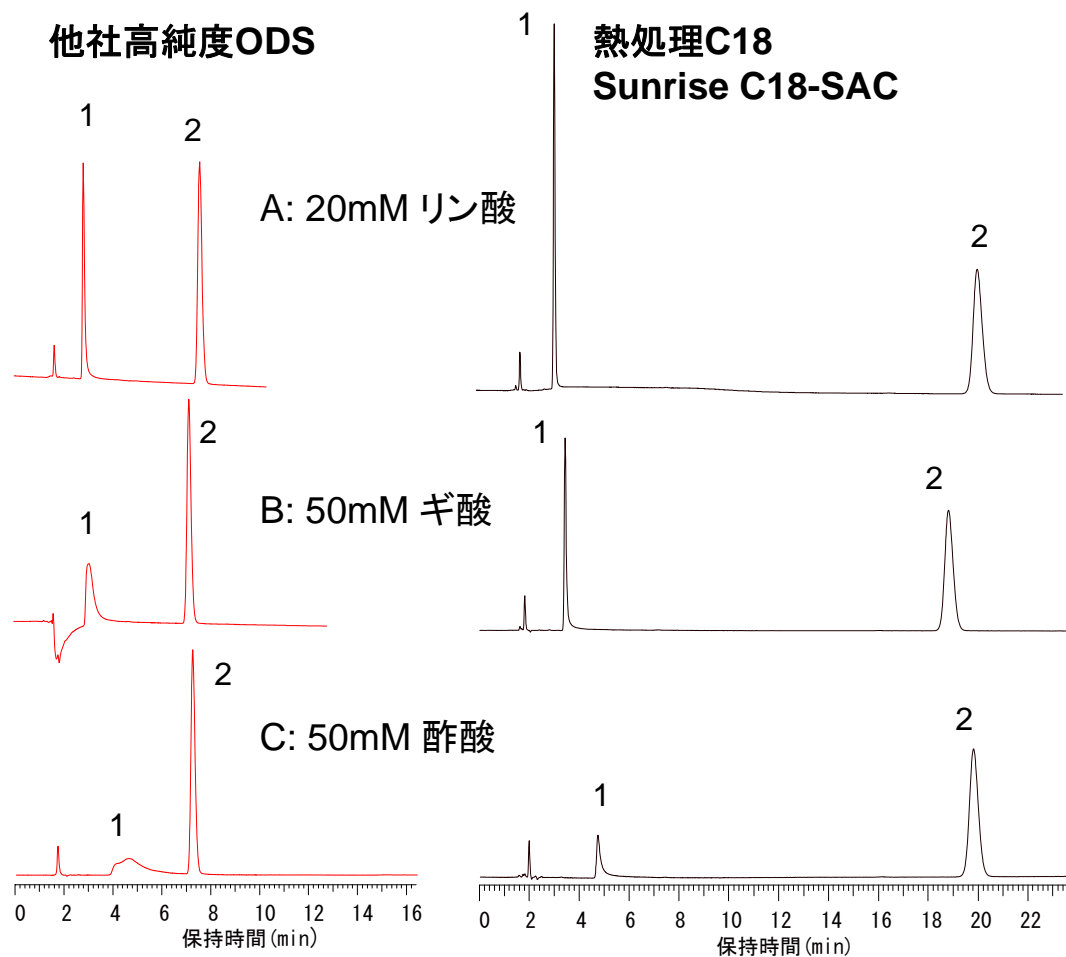


カラム: 熱処理C18,  
Sunrise C18-SAC 4.6 x 150 mm  
移動相:  
メタノール/20mM 緩衝液 pH 6.8 (50:50)  
流速: 1.0 mL/min  
温度: 40 °C  
試料: 1=プロカインアミド  
2=N-アセチルプロカインアミド

# 緩衝液の塩のピーク対称性への影響



# 金属配位性化合物の分離



カラム: 他社高純度ODS 5 $\mu$ m, 4.6x150 mm

熱処理C18, Sunrise C18-SAC

4.6x150 mm

移動相: A)アセトニトリル/20mMリン酸 (10:90)

B)アセトニトリル/50mMギ酸 (10:90)

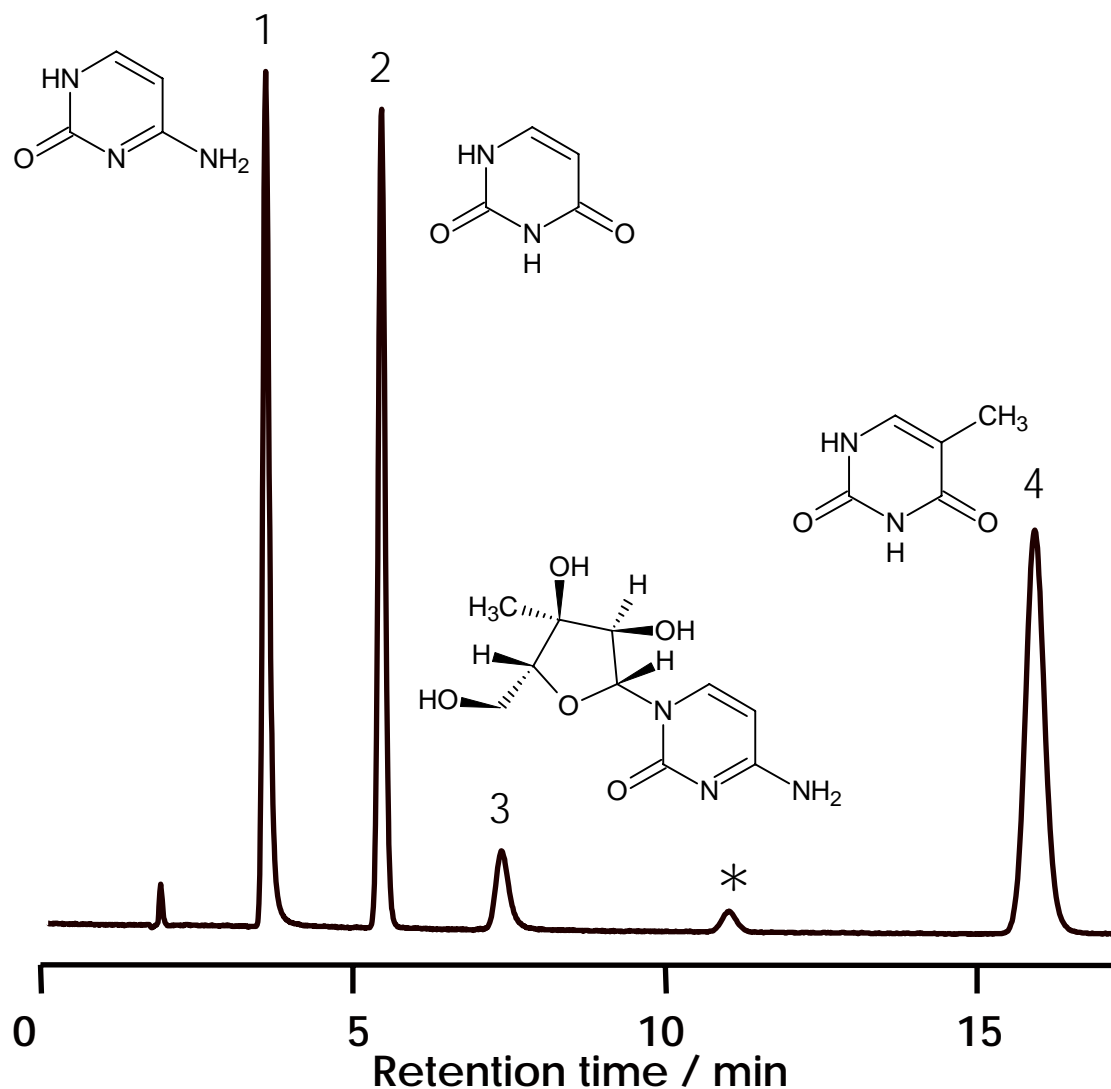
C)アセトニトリル/50mM酢酸 (10:90)

流速: 1.0 mL/min

温度: 40 °C

試料: 1=8-キノリノール, 2=カフェイン

# 核酸塩基類の分離例



カラム：熱処理C18,  
Sunrise C18-SAC, 5  $\mu$ m  
4.6 x 150 mm

移動相：20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH4.5

流速：1.0 mL/min

温度：25  $^\circ\text{C}$

試料：1=シトシン

2=ウラシル

3=シチジン

4=チミン

\*=不純物

## 【まとめ】

- C18固定相中にシラノール基を高度に残存させることにより，極性化合物，特に塩基性化合物の保持を増加させることが可能であった
- 熱処理により調節されたシラノール基は塩基性化合物をテーリングさせなかった
- さらに，シラノール基によるイオン効果相互作用が認められ，塩基性化合物の保持を移動相のpHや塩濃度により調整可能であった
- 金属配位性化合物の分離に有効であり，詳細は未解明であるが，シラノール基の水和状態や特性の変化が金属不純物の影響の抑制に寄与していると推定された