

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

ChromaNik

長江 徳和

(株) クロマニック テクノロジーズ

TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>

日本薬科機器協会ラークショップ2013

A)水の多い移動相を用いた場合の
保持の変化と逆相充填剤の状態

B)通常 of 移動相中での逆相固定相
のアルキル基の状態は？
また分離場として働く固定相とは？

通常 of 逆相カラムの水100% 移動相条件での保持の減少

ChromaNik

原因は: アルキル基の寝込み

Phase collapse

Ligand collapse

多くの論文で発表されていた

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. Löchmüller* and D.R. Wilder, Department of Chemistry, Duke University, Durham, North Carolina 27706

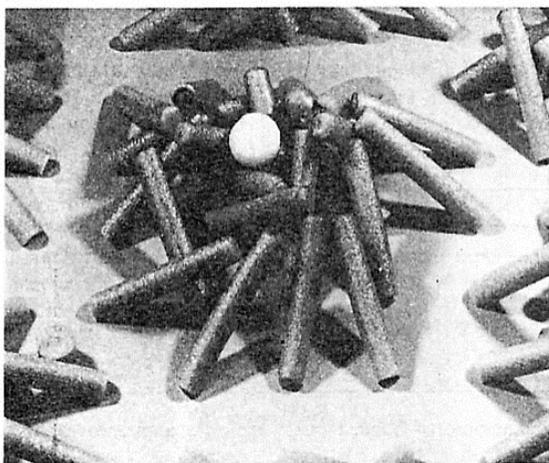


Figure 2. A scaled representation of octadecyl chains chemically bonded to the surface of silica gel showing solvophobic aggregation of the bonded ligands. Appropriate coverage data for this phase was taken from Table II. The white circle on the cluster represents a benzene sized solute molecule.

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

従来の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のある報文

316 LC-GC VOLUME 17 NUMBER 4 APRIL 1999

LC Troubleshooting



Lessons in Column Washing

Robert G. Wolcott and John W. Dolan

Like dissolves like . . . sometimes.

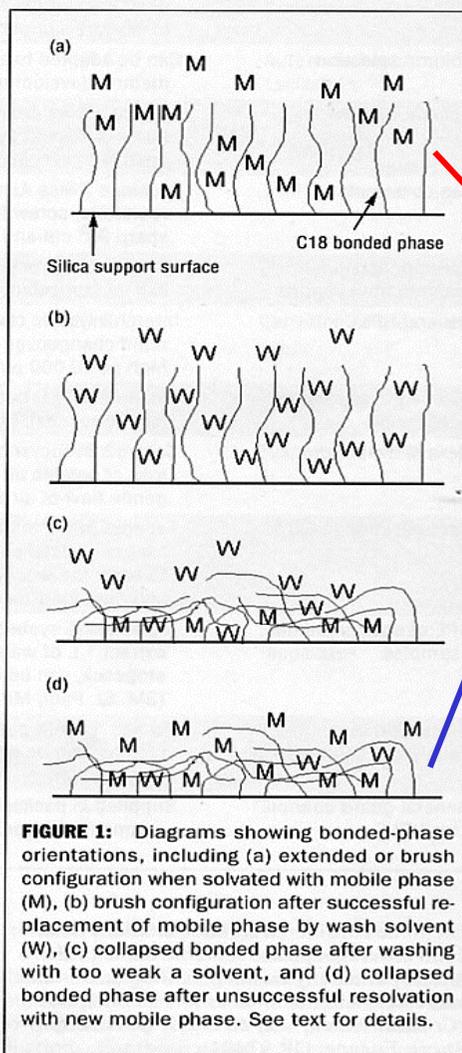


FIGURE 1: Diagrams showing bonded-phase orientations, including (a) extended or brush configuration when solvated with mobile phase (M), (b) brush configuration after successful replacement of mobile phase by wash solvent (W), (c) collapsed bonded phase after washing with too weak a solvent, and (d) collapsed bonded phase after unsuccessful resolution with new mobile phase. See text for details.

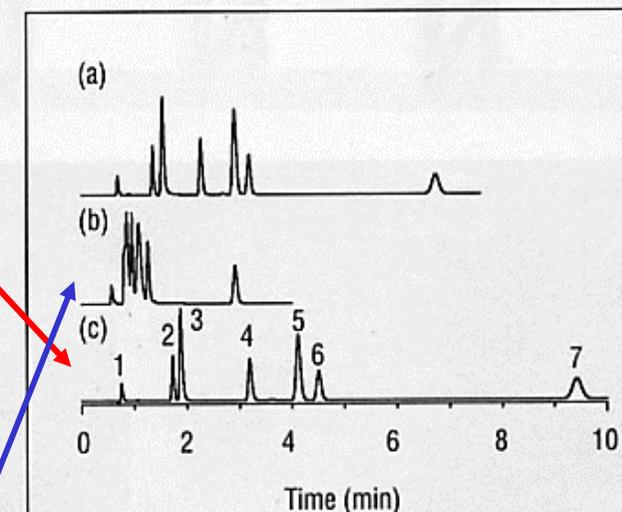
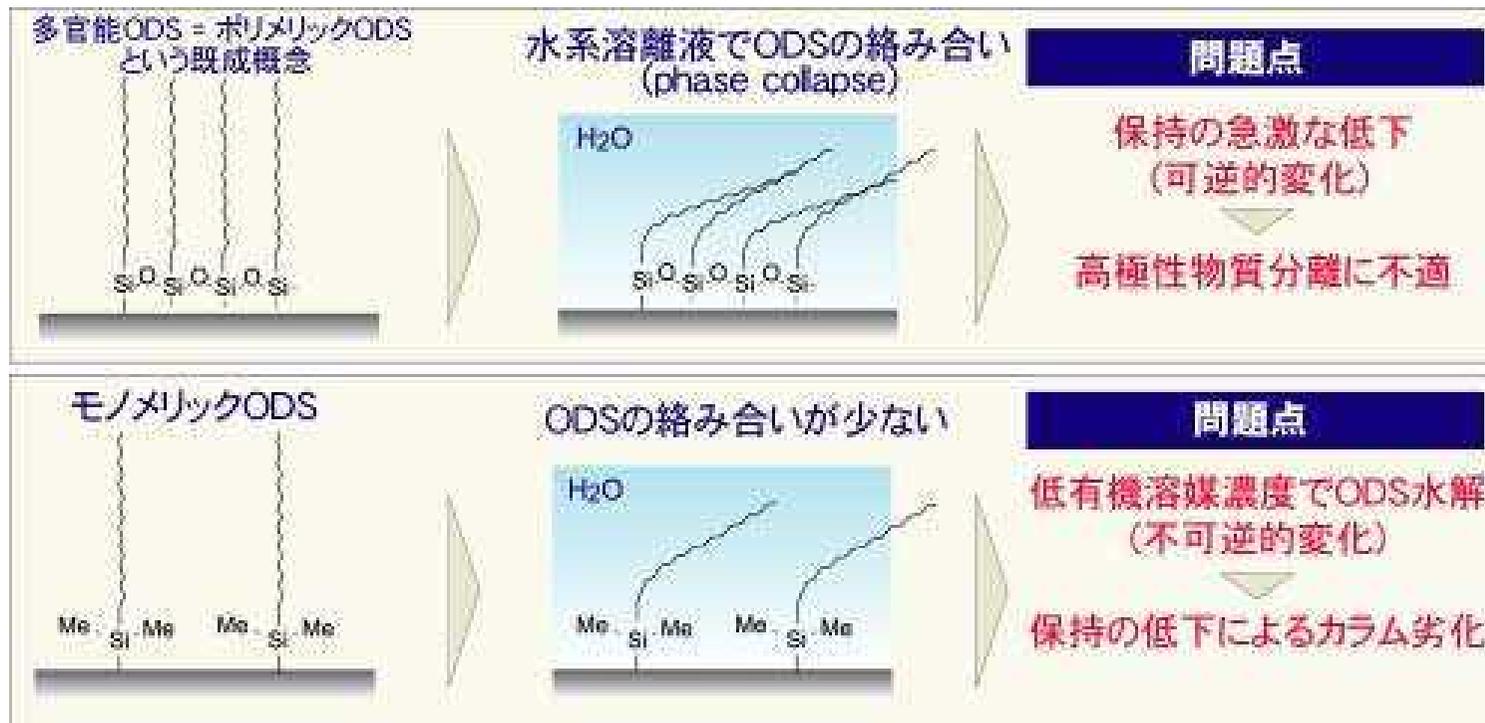


FIGURE 2: Chromatograms illustrating the practical impact of bonded-phase collapse. Shown are (a) a chromatogram generated after a water wash and 170 column volumes of additional mobile-phase flushing, (b) a chromatogram generated after a water wash and 90 column volumes of additional mobile-phase flushing, and (c) a normal chromatogram. See text for discussion. Peaks: 1 = uracil, 2 = nitroethane, 3 = phthalic acid, 4 = 4-chloroaniline, 5 = 3-cyanobenzoic acid, 6 = 3,5-dimethylaniline, 7 = 1-nitrobutane.

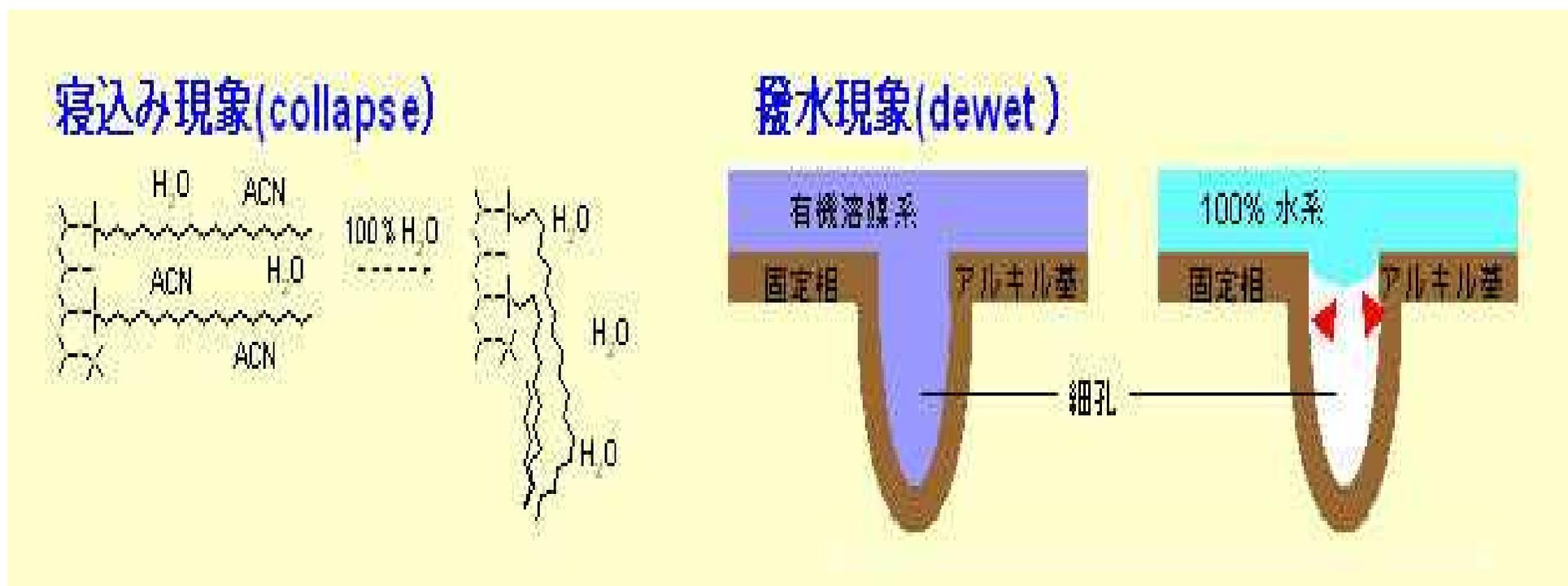
HPLCカラムメーカーのよるアルキル基の絡み合い説



ポリメリックODSはリガンド密度が高く、耐酸性はあるものの、リガンドの絡み合いや寝込み(collapse)によって、水100%系では保持の急激な低下(可逆的)が生じるとされています。これは 多官能ODS=ポリメリックODSという誤解によるものです。

Imtakt websiteより (<http://www.imtakt.com/jp/Products/Unison/Ucollapse.htm>)

HPLCカラムメーカーのよるアルキル基の寝込み説と撥水説



Sigma Aldrich website より

(<http://www.sigmaaldrich.com/japan/analytical-chromatography/hplc/ascentis.html>)

保持の減少の本当の原因は？

ChromaNik

細孔からの移動相の抜け出し

BUNSEKI KAGAKU Vol. 59, No. 3, pp. 193–205 (2010)
© 2010 The Japan Society for Analytical Chemistry

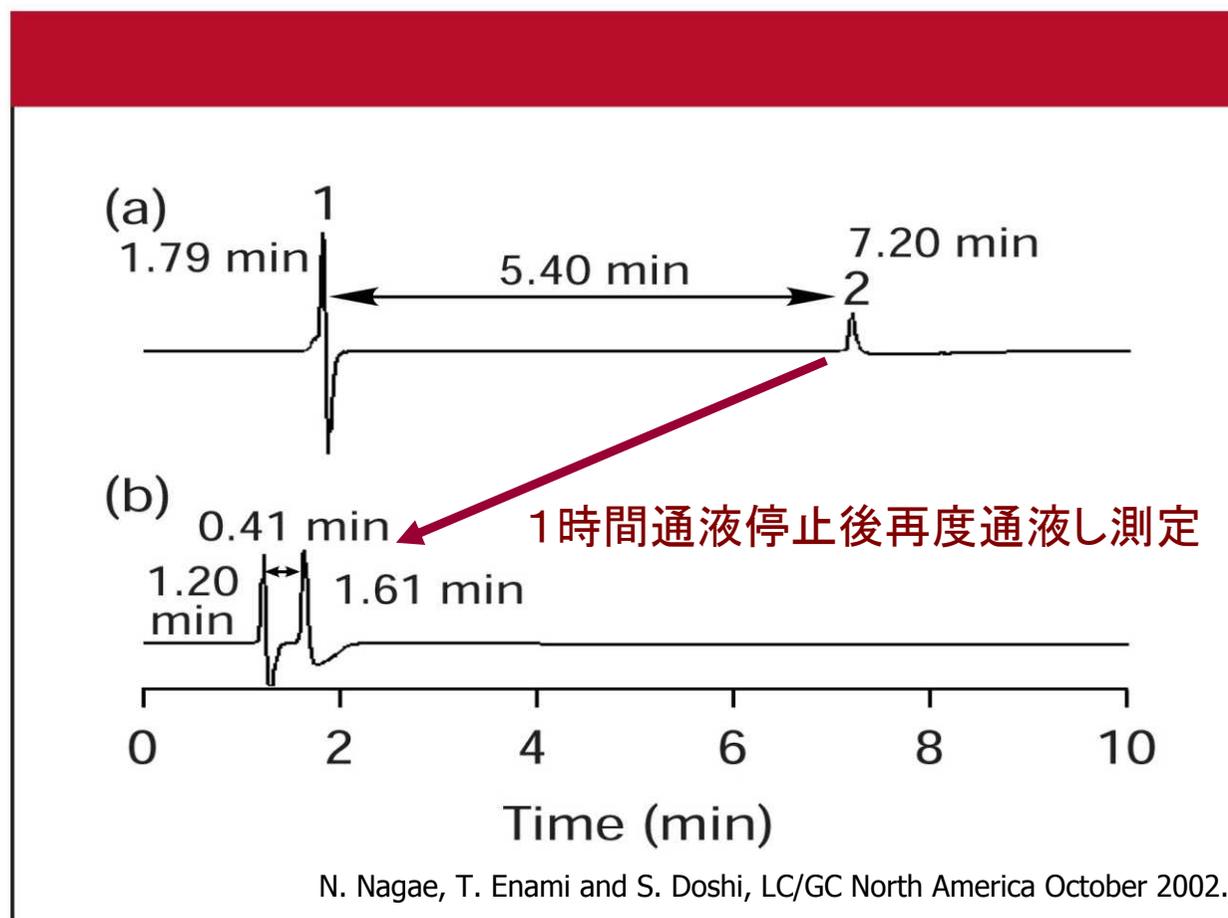
193

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¹

ODSカラムの保持挙動(水100%)



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

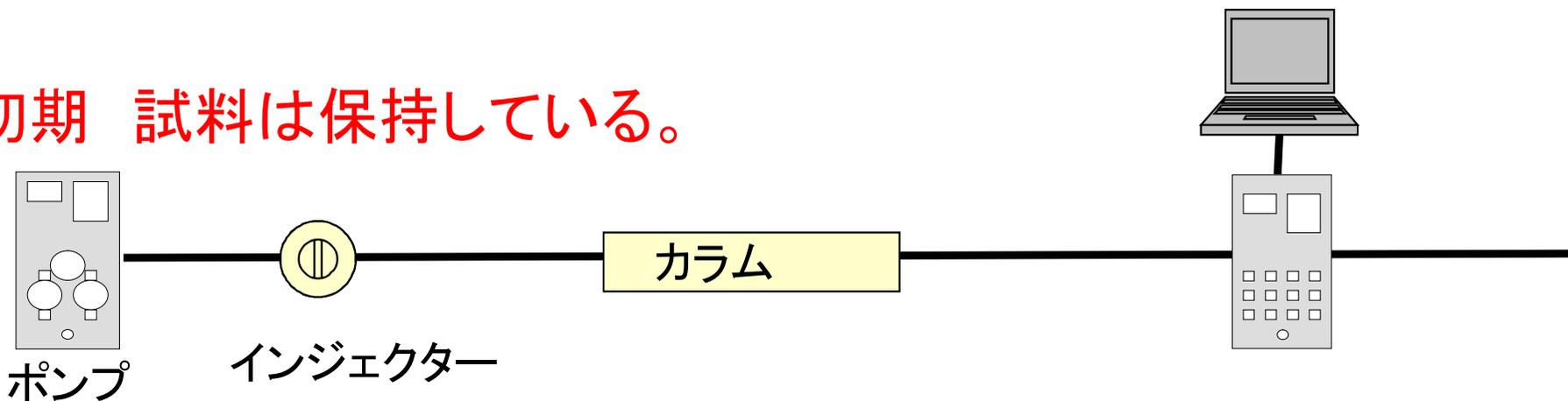
2. 2-プロパノール

保持時間: 5.40minから0.41minに減少

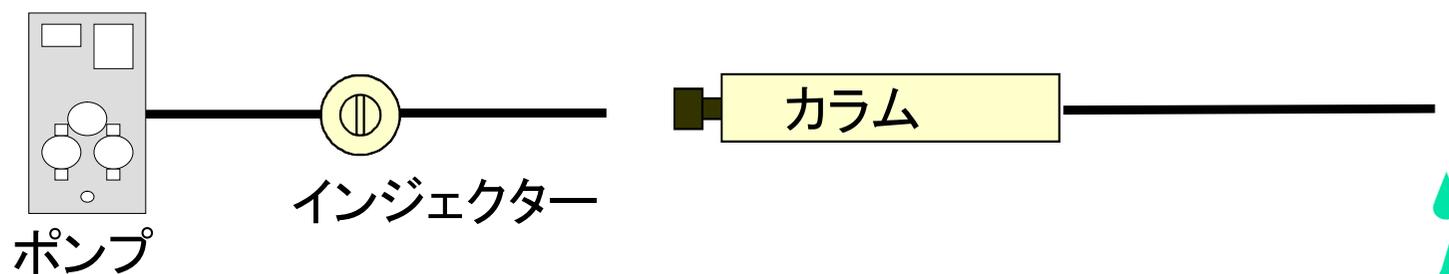
→ 再現性がない

ポンプ停止後のカラムの状態

初期 試料は保持している。



ポンプを止め圧力が0になったら、すぐにカラムIN側に密栓をする。



カラムOUT側から移動相が出てくる。(0.59mL)

その後送液開始すると保持はすでに短くなっている。

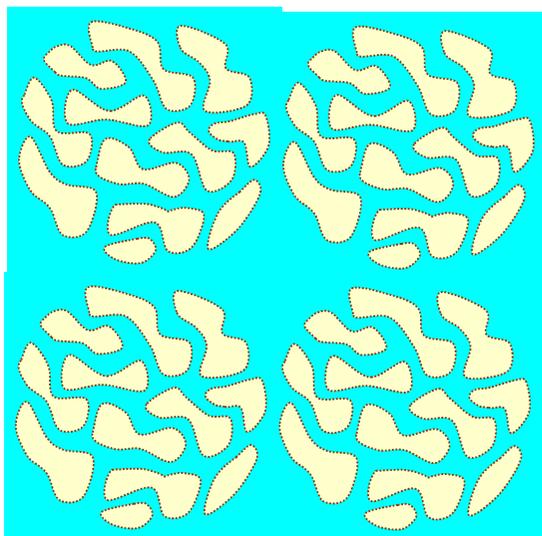
水100%移動相条件下で保持が減少する理由

カラム内のODS粒子

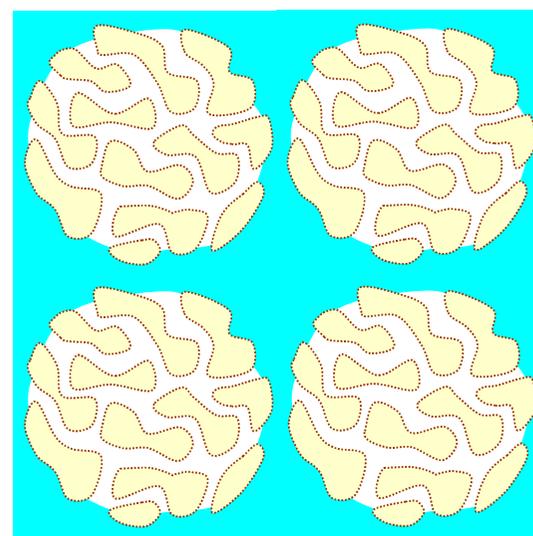
移動相：水

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
満たされている状態



細孔内から移動相が
抜け出した状態

細孔内から移動相が抜けた後、16MPa以上の圧力をかけないと戻らない。

細孔内に移動相を戻すためには有機溶媒を70%以上含む移動相に置換しなくてはならない。

細孔から移動相を抜け出させるためにどんな力が作用しているか？

ChromaNik

毛管作用

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 ρ 、液体の表面張力を γ 、接触角を θ 、重力加速度を g とすれば、 $h=2\gamma\cos\theta/r\rho g$ となる。

毛管現象

Capillarity, Capillary phenomenon

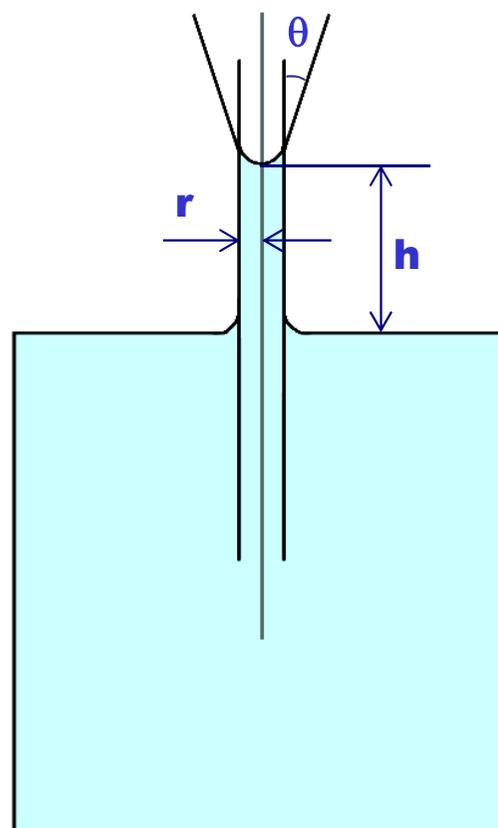
毛管現象の式:

$$h = \frac{2\gamma \cos\theta}{r\rho g}$$

γ : 表面張力

ρ : 液体の密度 (比重)

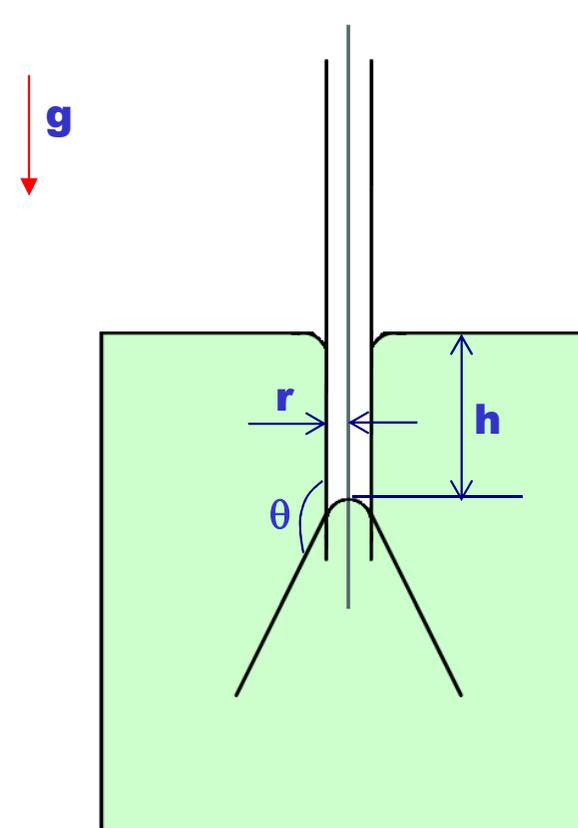
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



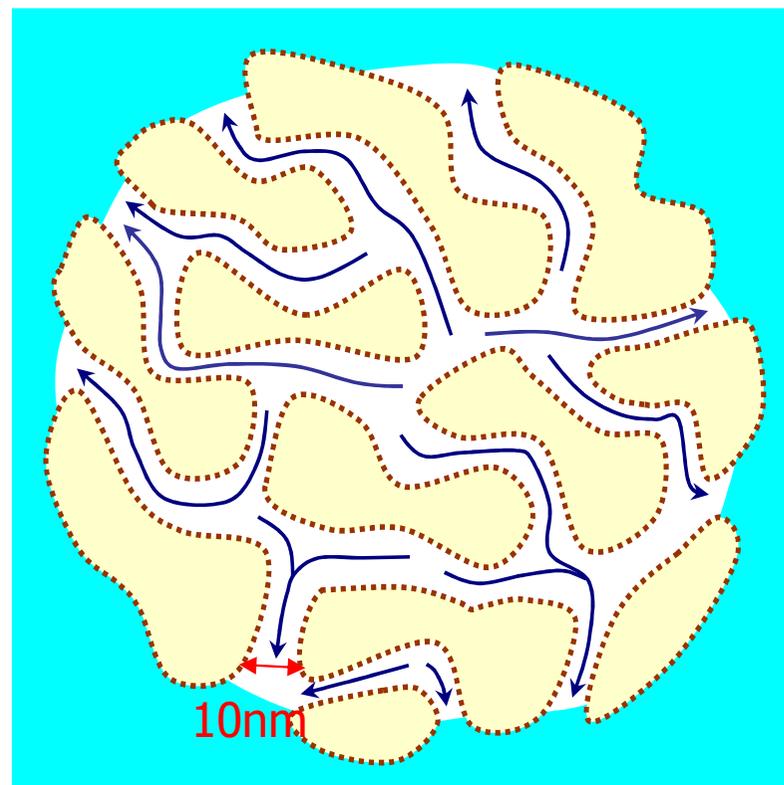
液体が管に濡れない場合

$$\theta > 90^\circ$$

毛管現象



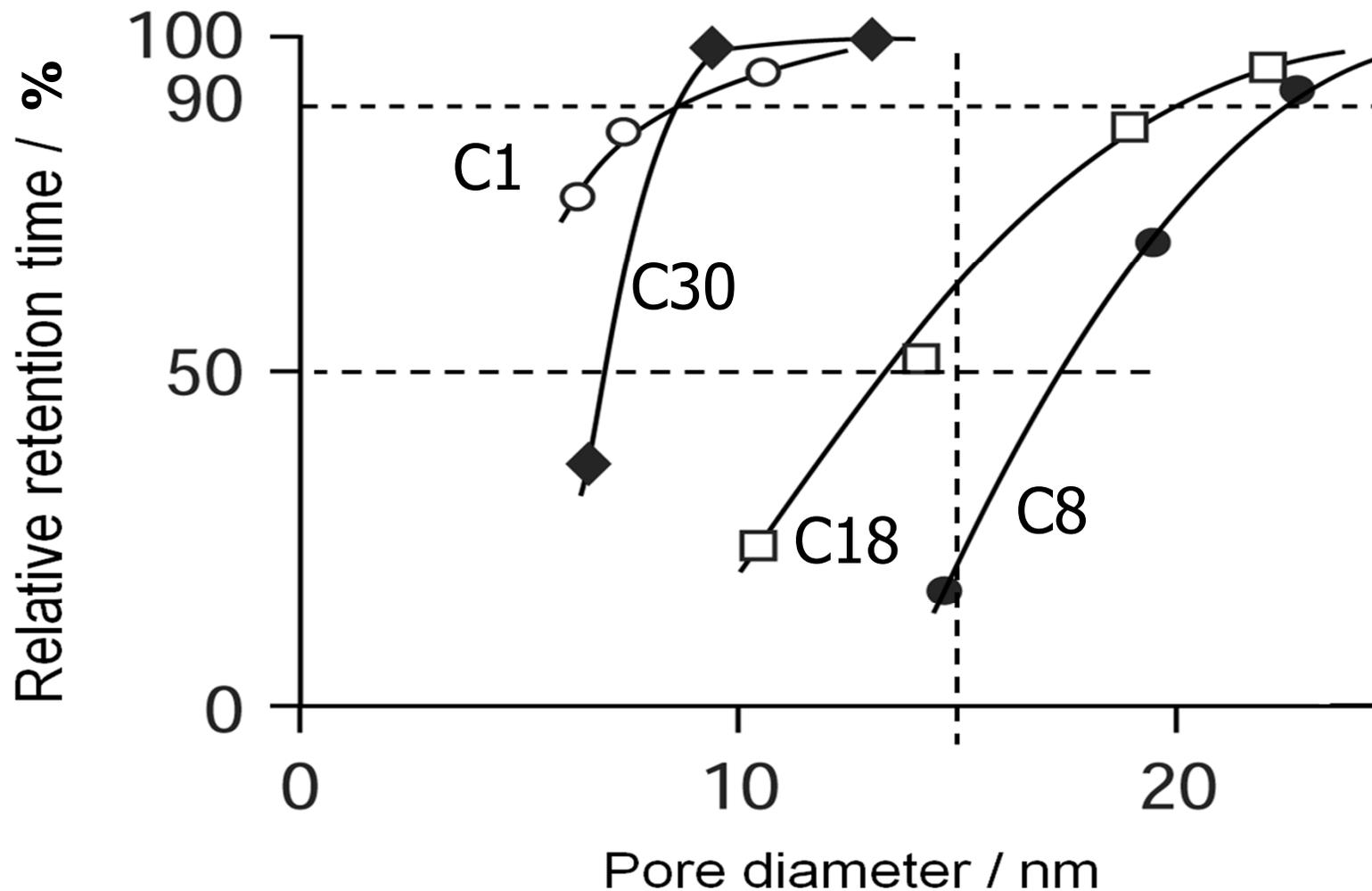
内径0.5mmのガラス管内で赤インクは6cm上昇する。この場合に作用してる圧力は0.006気圧である。内径が $1\mu\text{m}$ では30m上昇し、3気圧の圧力が作用していることになる。



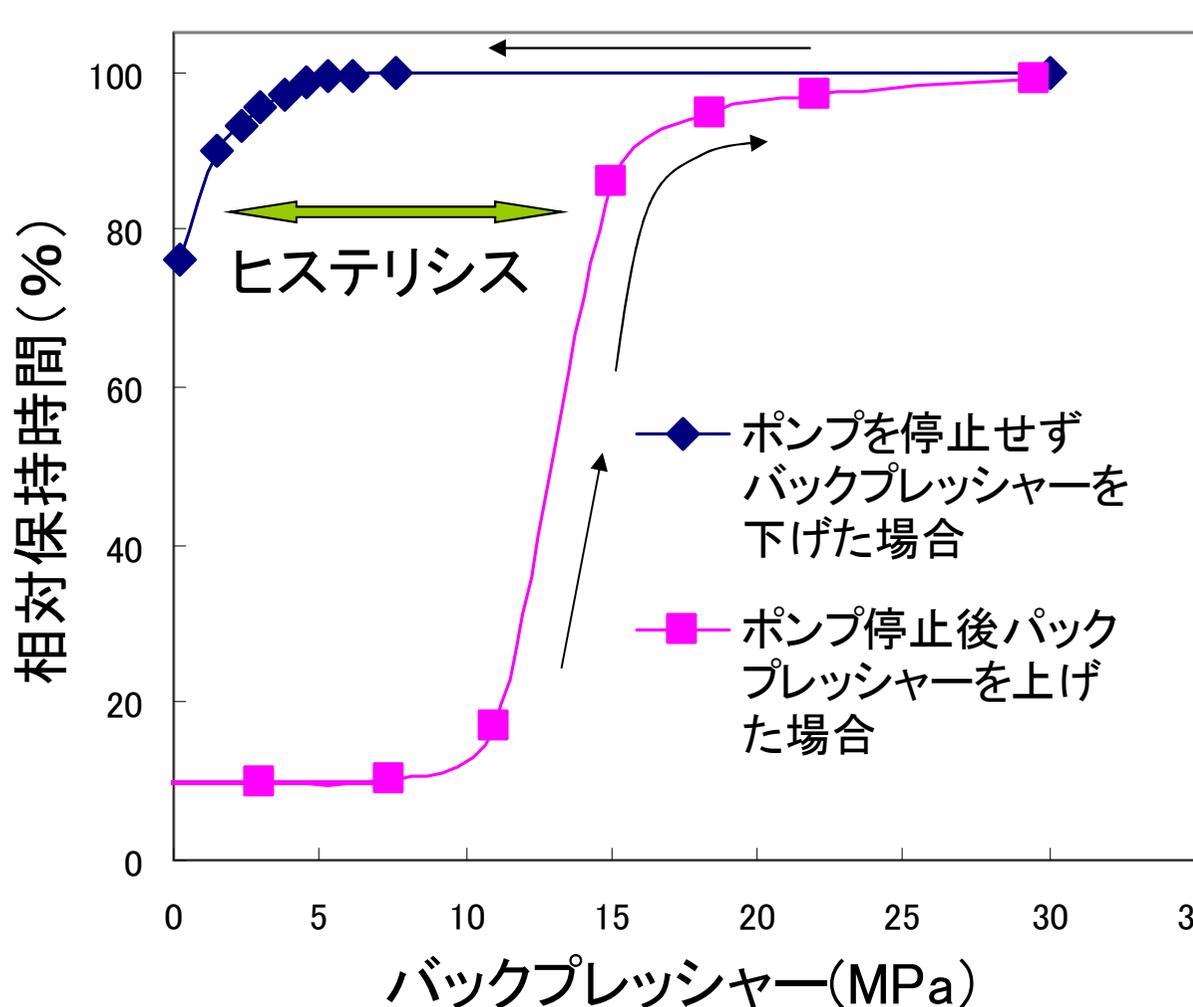
カラムを大気圧状態にして、移動相を逆相充填剤の細孔から抜け出させるために必要な圧力は1気圧である。充填剤の細孔の大きさを考慮すると毛管現象によりこの1気圧は簡単に発生する。

アルキル鎖長と細孔径の影響

ポンプ停止1時間後の保持比較



バックプレッシャーの影響



カラム: C18 (10.3nm)

4.6 x 150 mm

粒子径: 5 μm

カラムのみにかかる圧力: 6 MPa

移動相: 水

流速: 1.0 mL/min

温度: 40°C

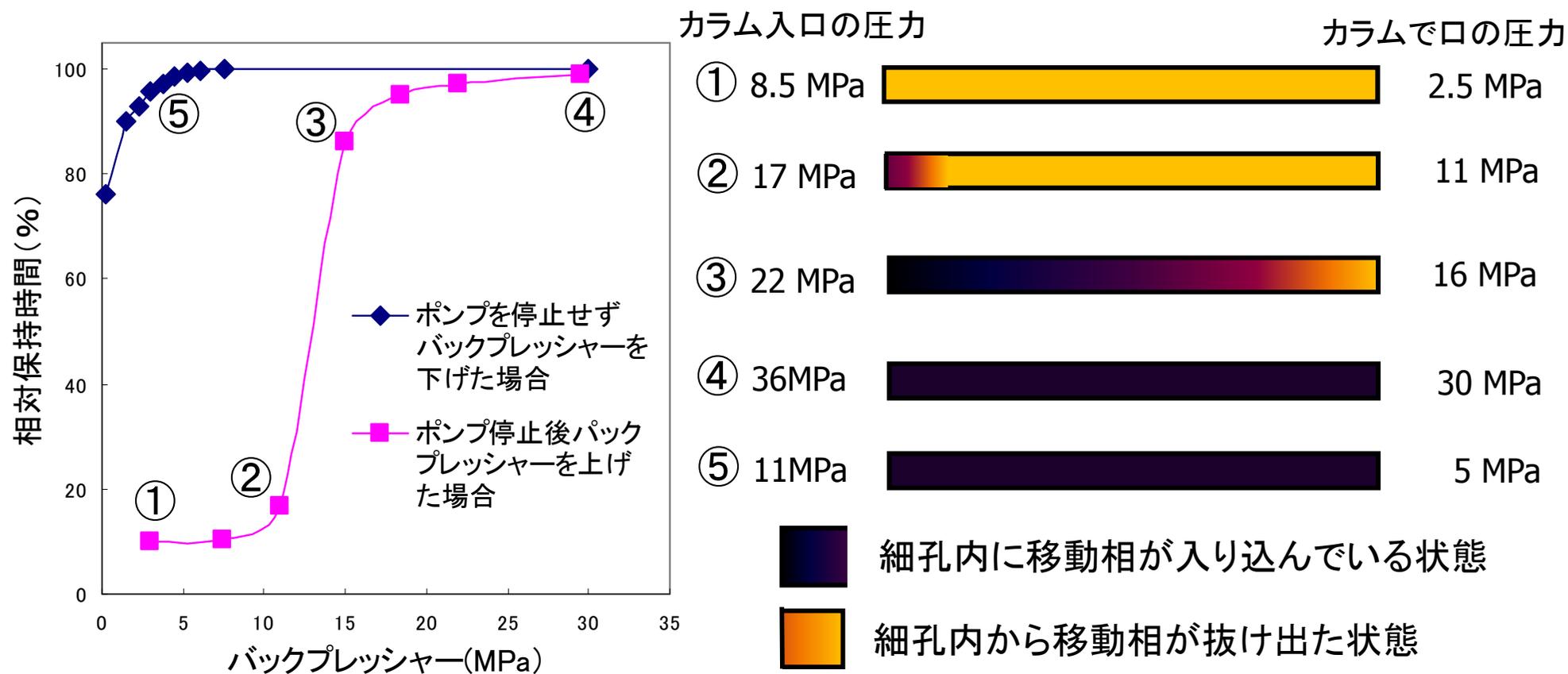
試料: 2-プロパノール

* カラムの後に内径0.13mmの配管を0.2から3m接続し、カラムのout側に圧力がかかった状態で測定

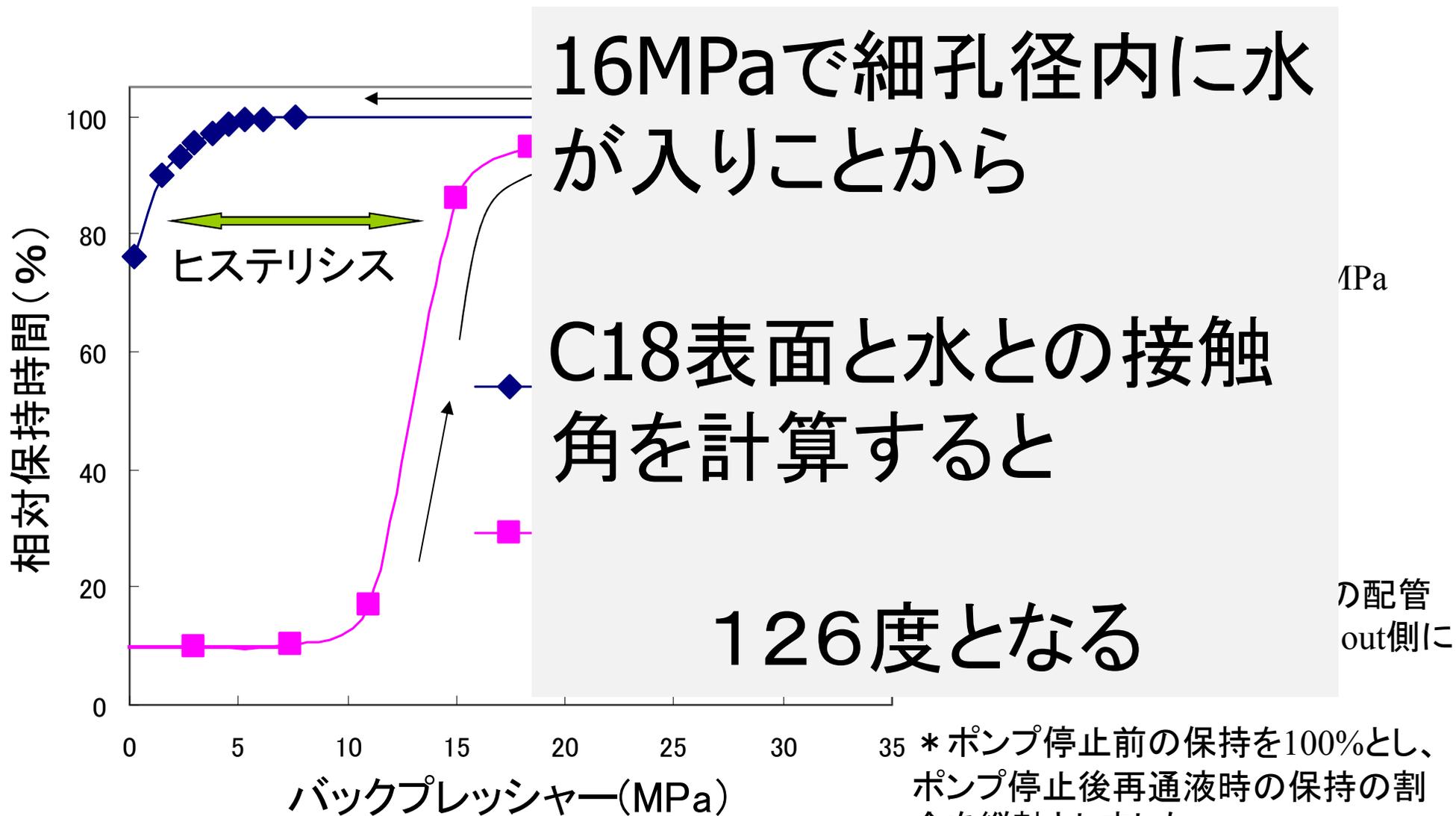
35 * ポンプ停止前の保持を100%とし、ポンプ停止後再通液時の保持の割合を縦軸としました。

カラム内充填剤の細孔内の状態

Column: C18 (10) 5 μm 150 x 4.6mm, Mobile phase: Water,
Flow rate: 1.0mL/min, Temperature: 40°C



バックプレッシャーの影響



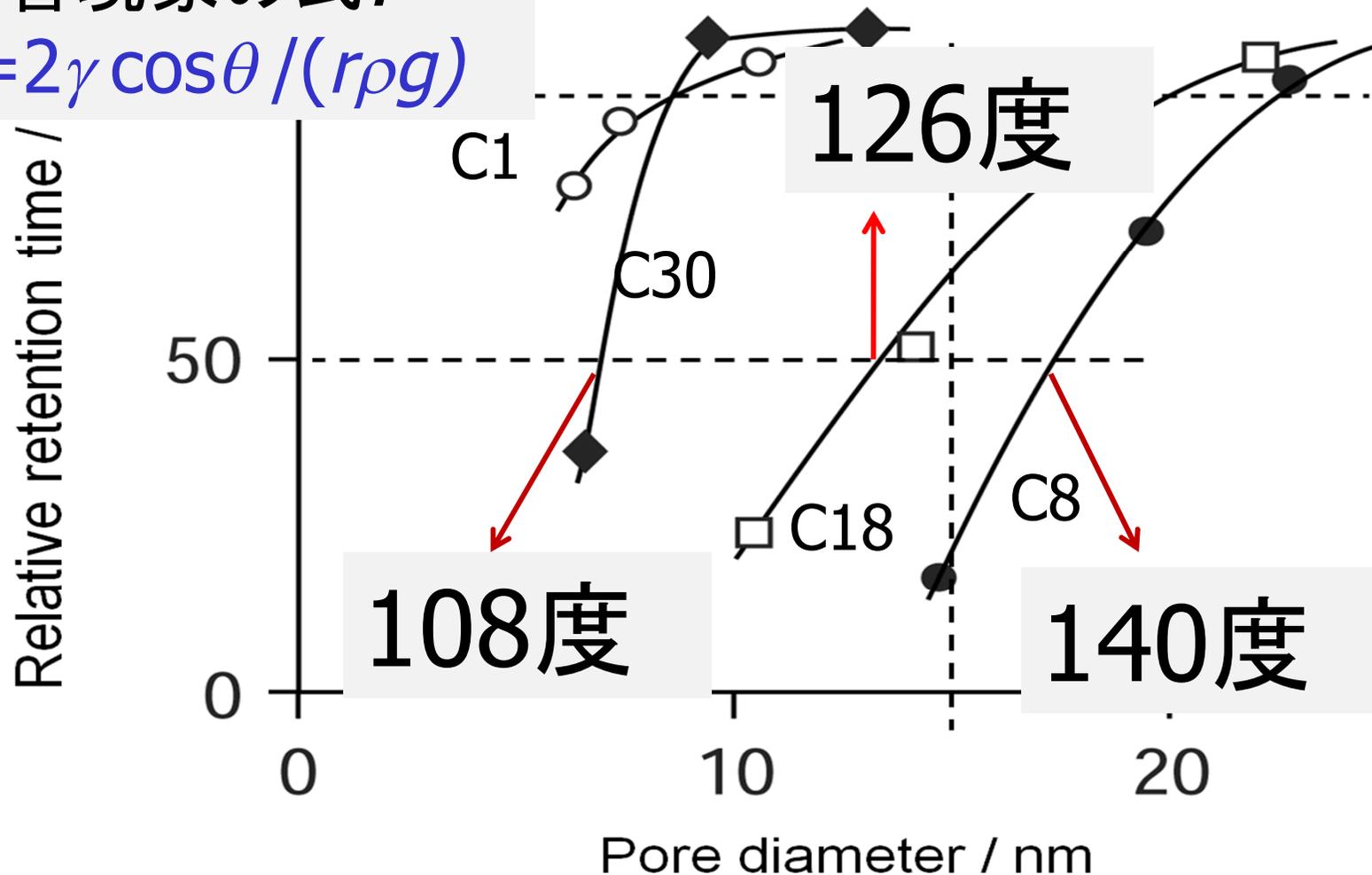
* ポンプ停止前の保持を100%とし、
ポンプ停止後再通液時の保持の割合を縦軸としました。

アルキル鎖長と細孔径の影響

ポンプ停止1時間後の保持比較

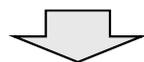
毛管現象の式:

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

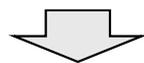


水100%移動相で安定な保持を得るためには

逆相充填剤は水に濡れないー接触角は90度以上



毛管作用によって抜け出そうとする圧力が大気圧(0.1MPa)以下であればよい



細孔径が10nmの充填剤の場合

C8 :水との接触角は140度→→大気圧以上→→移動相抜ける

C18 :水との接触角は126度→→大気圧以上→→移動相抜ける

C30 :水との接触角は108度→→大気圧以下→→移動相抜けない

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。

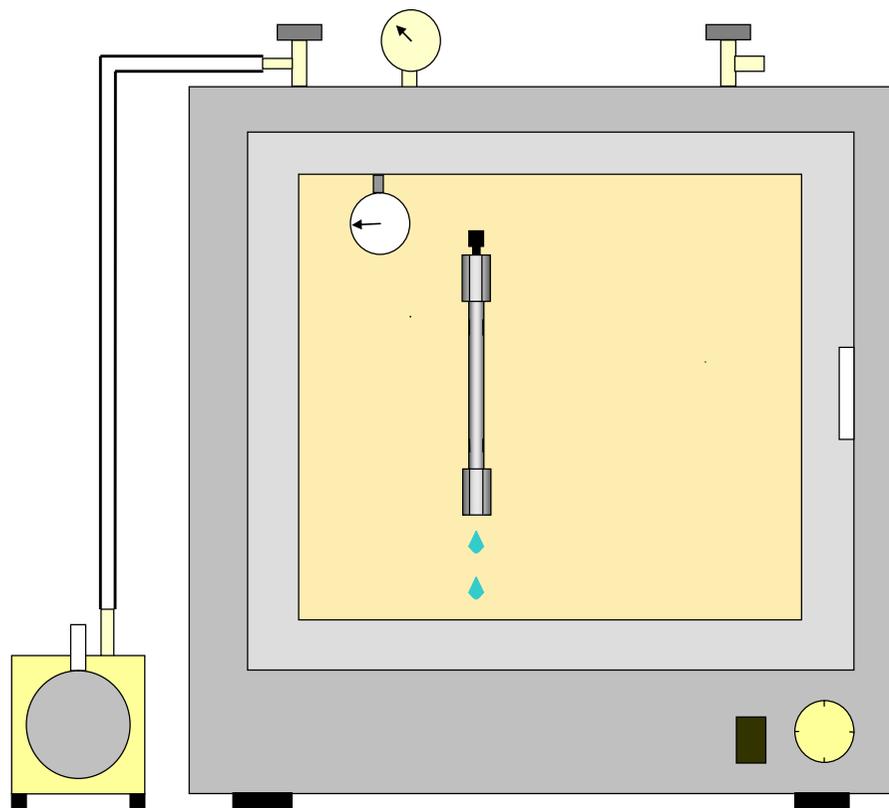
- ・70%メタノールでは超音波の振動を加えなくても完全にC18充填剤が分散する。分散後沈降し始める。

- ・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)

- ・30%メタノールでは全く分散していない。

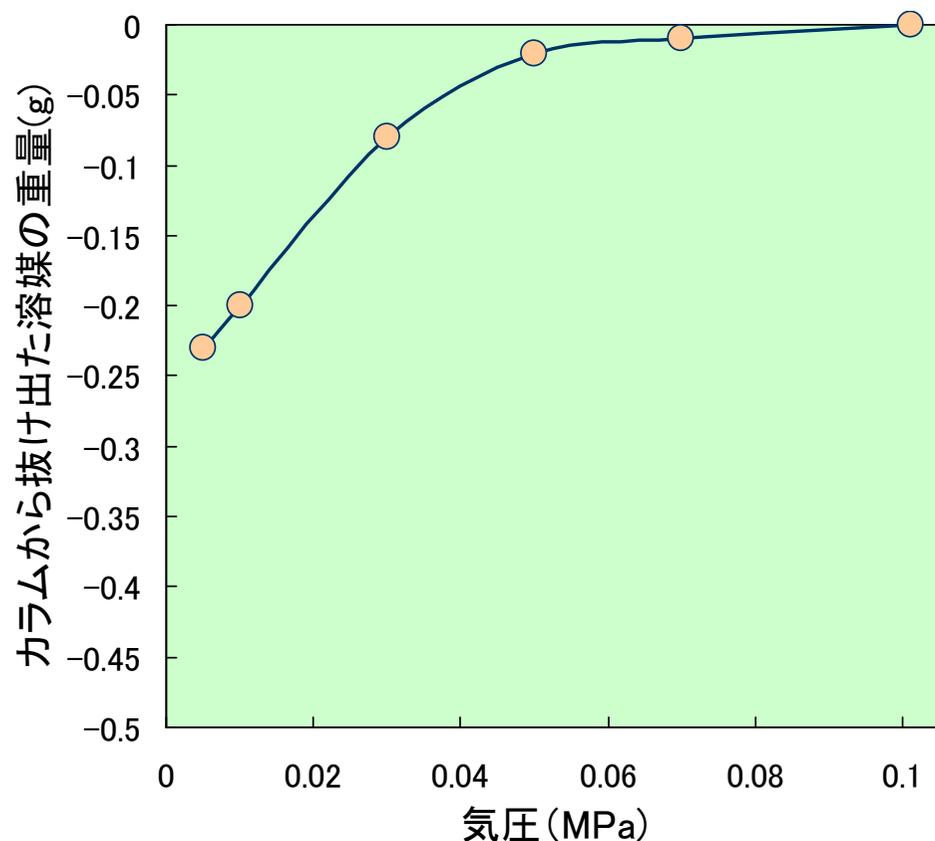
メタノール濃度が50%以下の溶液はC18表面に濡れないため、細孔内に入り込めない。しかし、圧力をかける、また100%メタノールで濡れている状態から溶液を切り替えた場合には30%メタノールでも細孔内に入り込み、その後大気圧にしても細孔から抜け出すことはない。

大気圧が1気圧以下であるならば



- * 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

ODS充填剤中の10%メタノール溶媒の状態



カラム: C18, 5 μ m - 250x4.6mm

カラム内容媒: メタノール/水=(10:90)

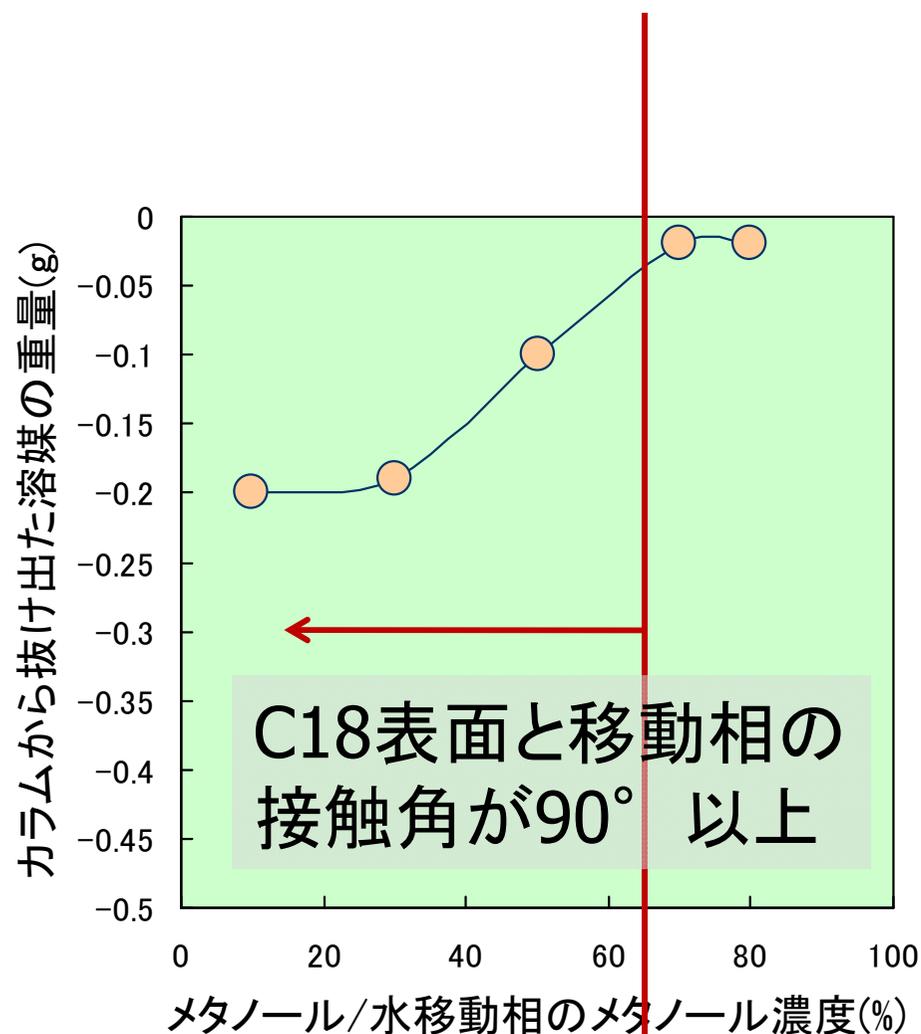
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

放置時間: 20分間

* 10%メタノールをカラムに通液した場合はポンプ停止後でも保持の変化は認められず、充填剤細孔から溶媒が抜けることはない。

* 模擬的に大気圧を1気圧以下にした場合、0.05MPa未満ではカラムの重量が減り、充填剤細孔内から溶媒が抜け出ている。

C18充填剤中の0.01MPaでの溶媒の状態



カラム: C18, 5 μm - 250x4.6mm

模擬大気圧: 0.01MPa

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

放置時間: 20分間

* 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溶媒の抜け出しはほとんど認められず、50%以下では溶媒の抜け出ししている。

* 70%以上のメタノールではODS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、充填剤細孔から溶媒は抜けでないが、50%以下では濡れないため、抜けようとする。

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？

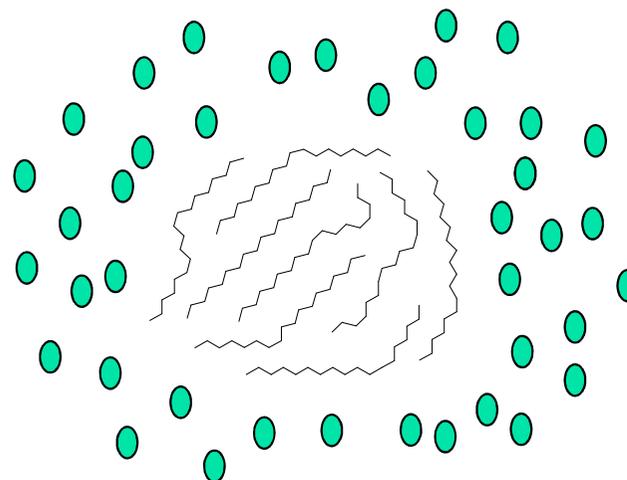
ChromaNik

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

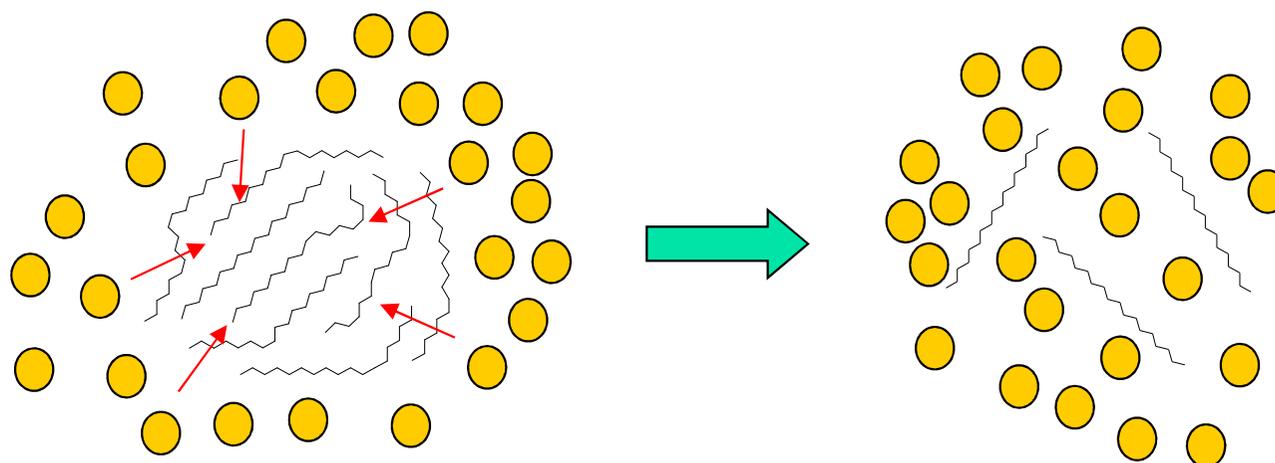
有機溶媒中でのオクタデカンの状態

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)



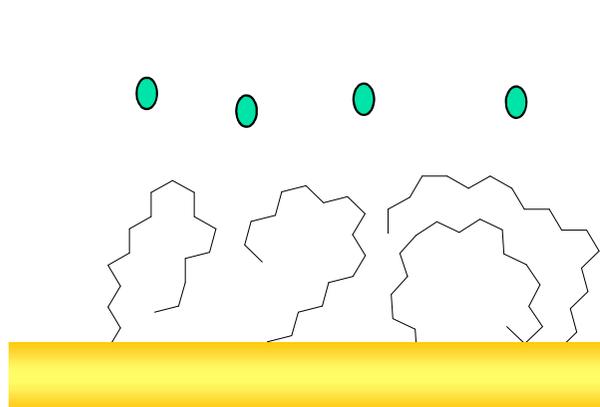
メタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとると考えられる

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



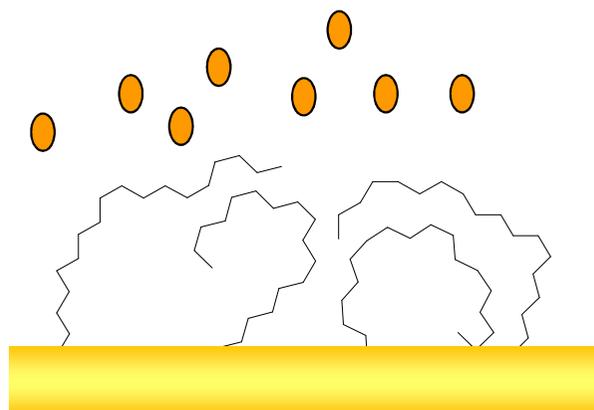
C18表面上での溶媒和の概略図

メタノール



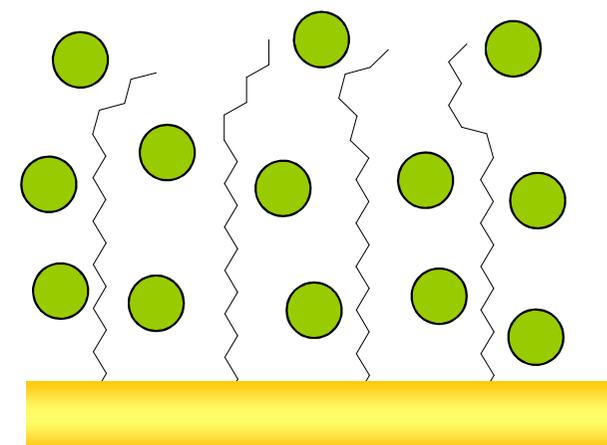
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している

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(95%以上)固まった状態であると推測される

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

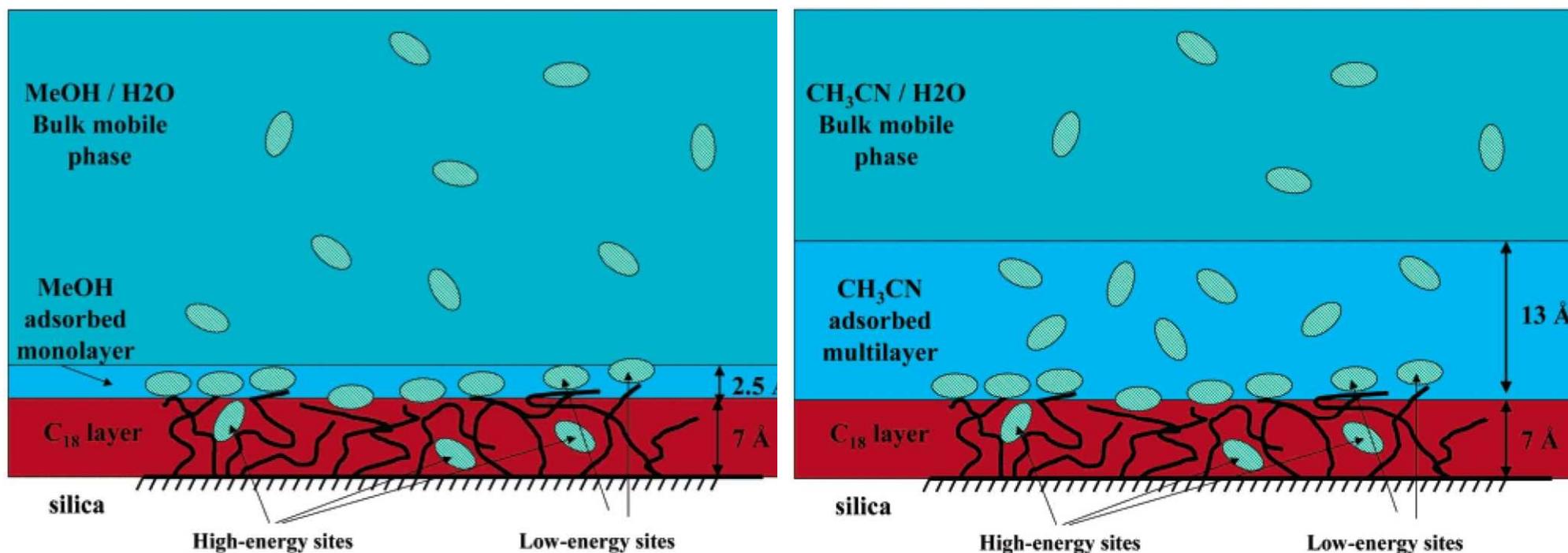


Figure 16. Schematic comparison of the adsorption mechanisms of a solute from aqueous solutions of methanol (A) and acetonitrile (B) onto a RPLC material. The different shadings represent the three different “phases” involved in the chromatographic system. From top to bottom, the bulk mobile phase (a water-rich solution), the adsorbed mono- or multilayer of organic modifier molecules (a phase rich in adsorbed organic modifier), and the C₁₈-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 C₁₈ Alkylsilane Chromatographic Phase Models

ligand type	chain density ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	average chain spacing ^{a,b} (Å)	average end-to-end chain length ^{b,c} (Å)	average phase thickness ^{b,d} (Å)	average tilt angle ^{b,e} (θ)	average % of gauche dihedrals	phase selectivity $\alpha_{\text{TBN}/\text{BaP}}^f$ and category ^g
Monomeric							
monofunctional C ₁₈	1.71	9.5 ± 1.4	14.9 ± 2.3	9.0 ± 4.6	50.3 ± 22.4	38.2	
monofunctional C ₁₈	2.46	7.6 ± 0.6	15.4 ± 3.0	12.5 ± 3.9	34.8 ± 15.1	39.1	
monofunctional C ₁₈	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 ₁₈	3.28 ^h	5.3 ± 1.0	19.6 ± 2.6	19.0 ± 3.1	13.4 ± 9.7	26.3	
monofunctional C ₁₈	4.91	5.2 ± 0.8	21.5 ± 1.2	21.3 ± 1.3	7.8 ± 3.9	16.0	
monofunctional C ₁₈	4.91 ^h	4.1 ± 0.4	21.9 ± 1.8	21.6 ± 2.1	8.5 ± 5.1	13.0	
Polymeric							
trifunctional, tri-C ₁₈	1.64	3.1 ± 0.2	14.0 ± 3.6	9.7 ± 4.2	44.6 ± 18.4	34.2	
trifunctional, tri-C ₁₈	2.46	3.1 ± 0.1	17.1 ± 3.5	14.3 ± 5.0	30.5 ± 18.4	32.4	
trifunctional, tri-C ₁₈	3.28	3.1 ± 0.1	20.9 ± 1.6	19.4 ± 2.3	19.7 ± 10.2	20.4	
difunctional, tri-C ₁₈	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 ₁₈	4.09	3.1 ± 0.2	21.4 ± 1.4	21.1 ± 1.6	8.7 ± 4.3	19.6	
trifunctional, tri-C ₁₈	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 ₁₈	4.91	3.1 ± 0.2	21.9 ± 0.9	21.7 ± 1.1	7.6 ± 4.2	14.1	
trifunctional, tri-C ₁₈	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 ₁₈	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 ₁₈	4.91	3.1 ± 0.2	22.1 ± 1.1	21.8 ± 1.2	9.9 ± 4.7	12.6	
trifunctional, tri-C ₁₈	5.94	3.0 ± 0.2	22.2 ± 0.9	22.1 ± 1.0	6.1 ± 2.7	10.4	0.49 (H)

^a Distance between Si atoms of the alkylsilane chains. ^b Uncertainty represents standard deviation of 100 measurements. ^c Distance between Si atom and end C atom of the alkylsilane chain. ^d Magnitude of the distance vector between Si and end C of the alkylsilane chain perpendicular to the quartz surface. ^e Relative to the axis perpendicular to the quartz surface. ^f Experimentally determined selectivity coefficients for C₁₈ RPLC phases at room temperature that are represented by simulation models (see ref 33 for more details). ^g Shape selectivity of stationary phases categorized as high (H; $\alpha_{\text{TBN}/\text{BaP}} < 1$), intermediate (I; $1 < \alpha_{\text{TBN}/\text{BaP}} < 1.7$), and low (L; $\alpha_{\text{TBN}/\text{BaP}} > 1.7$). ^h 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 C₁₈

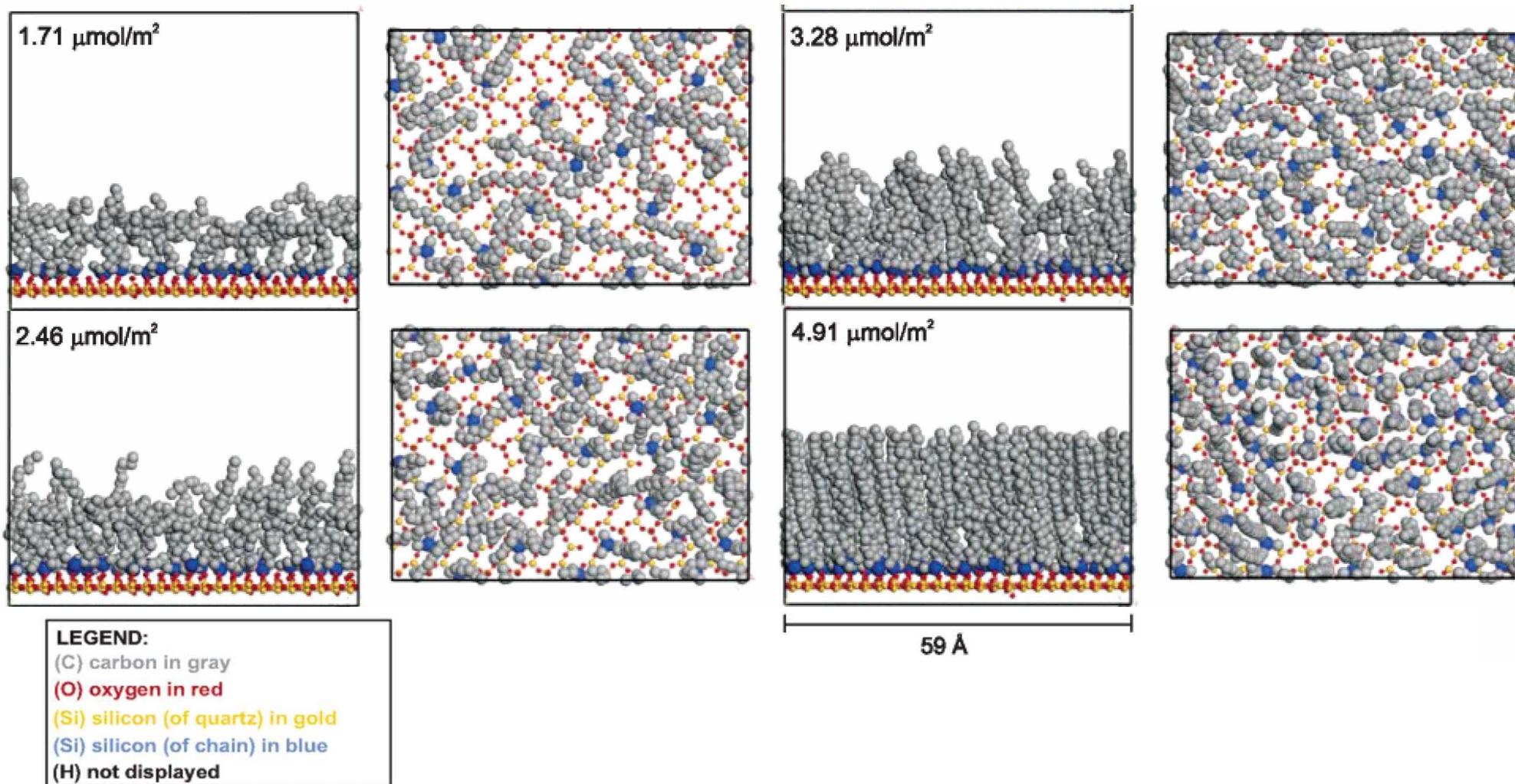


Figure 3. Side- and top-view snapshots of simulated (a) monomeric C₁₈ and (b) polymeric C₁₈ chromatography models at various surface coverages. The atoms are color-coded according to the legend; H atoms are not displayed in the interest of clarity.

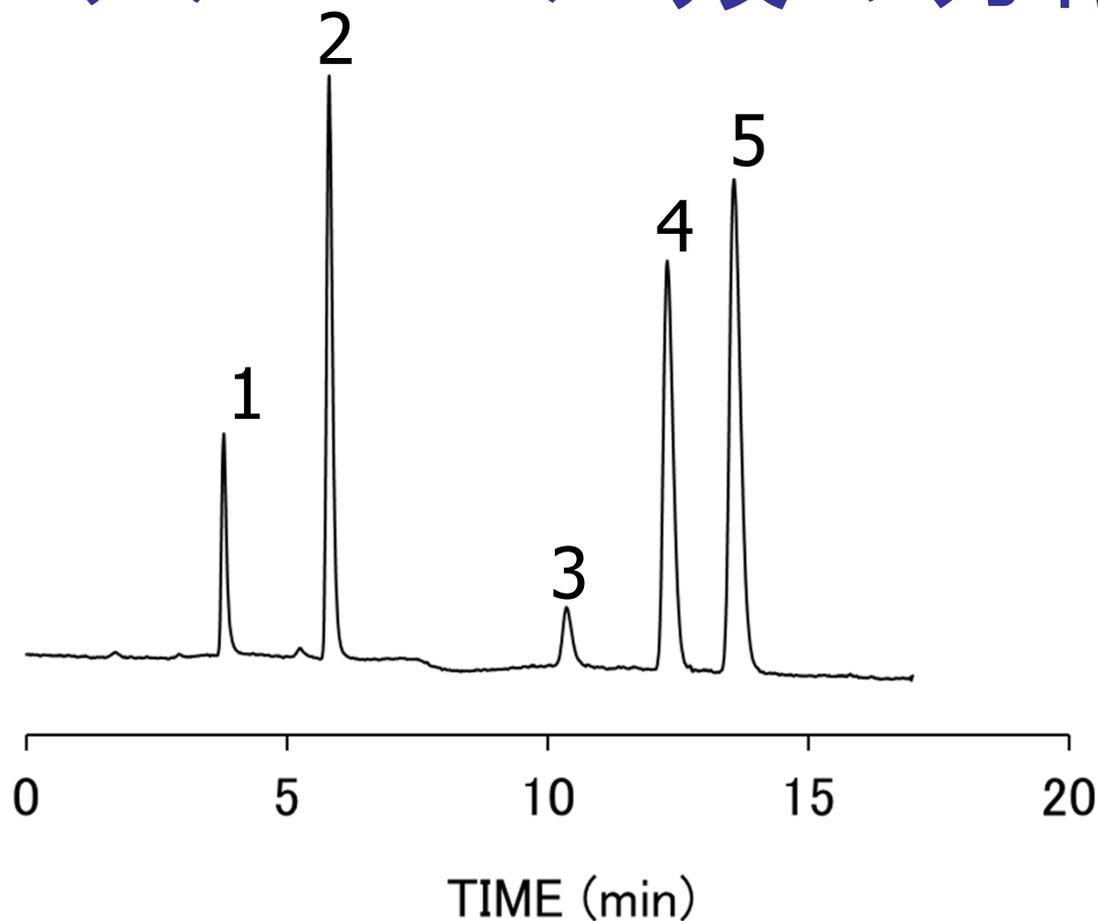
移動相中の有機溶媒の固定相への溶媒和の測定

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

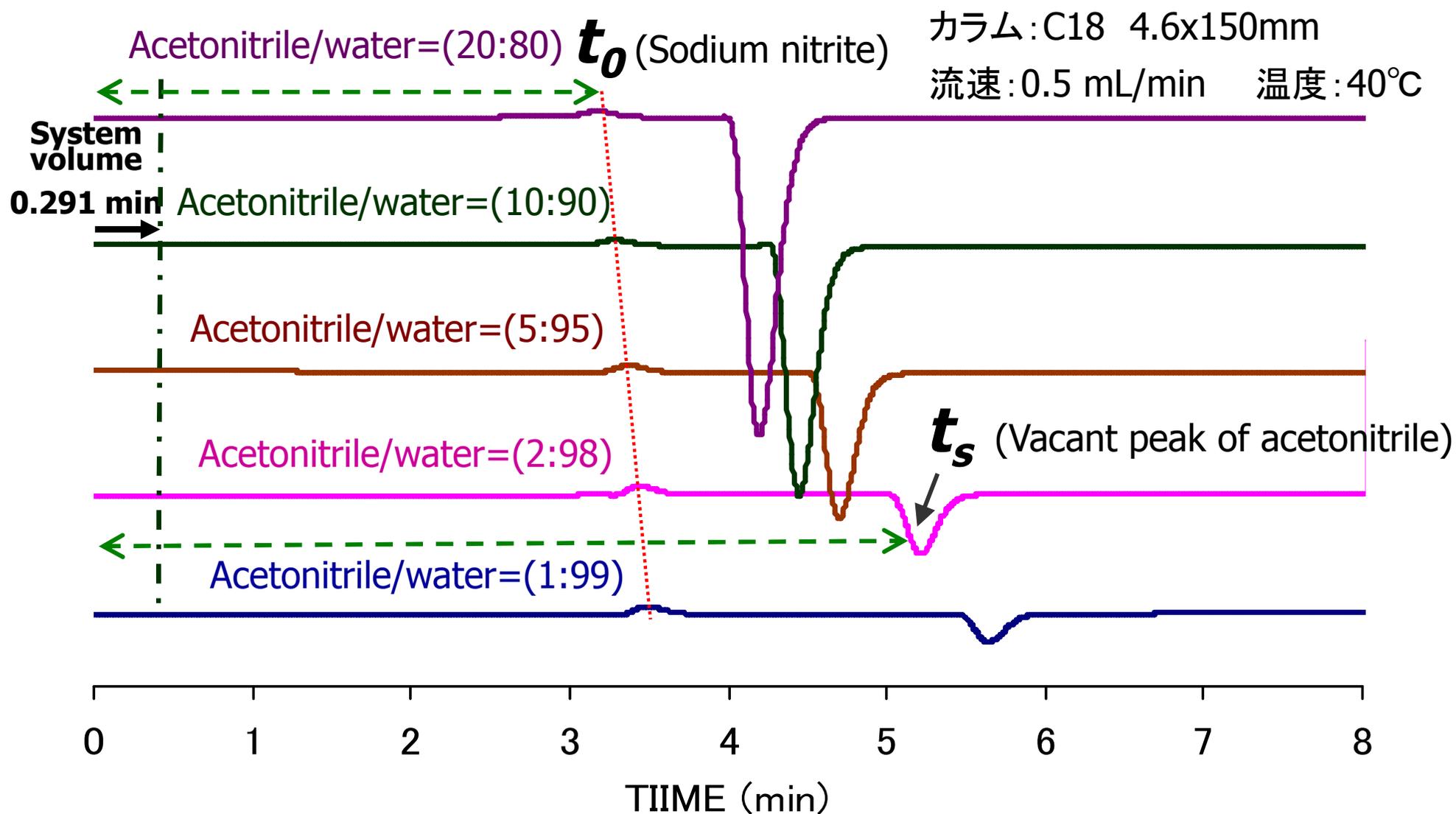
3. アセトニトリル

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



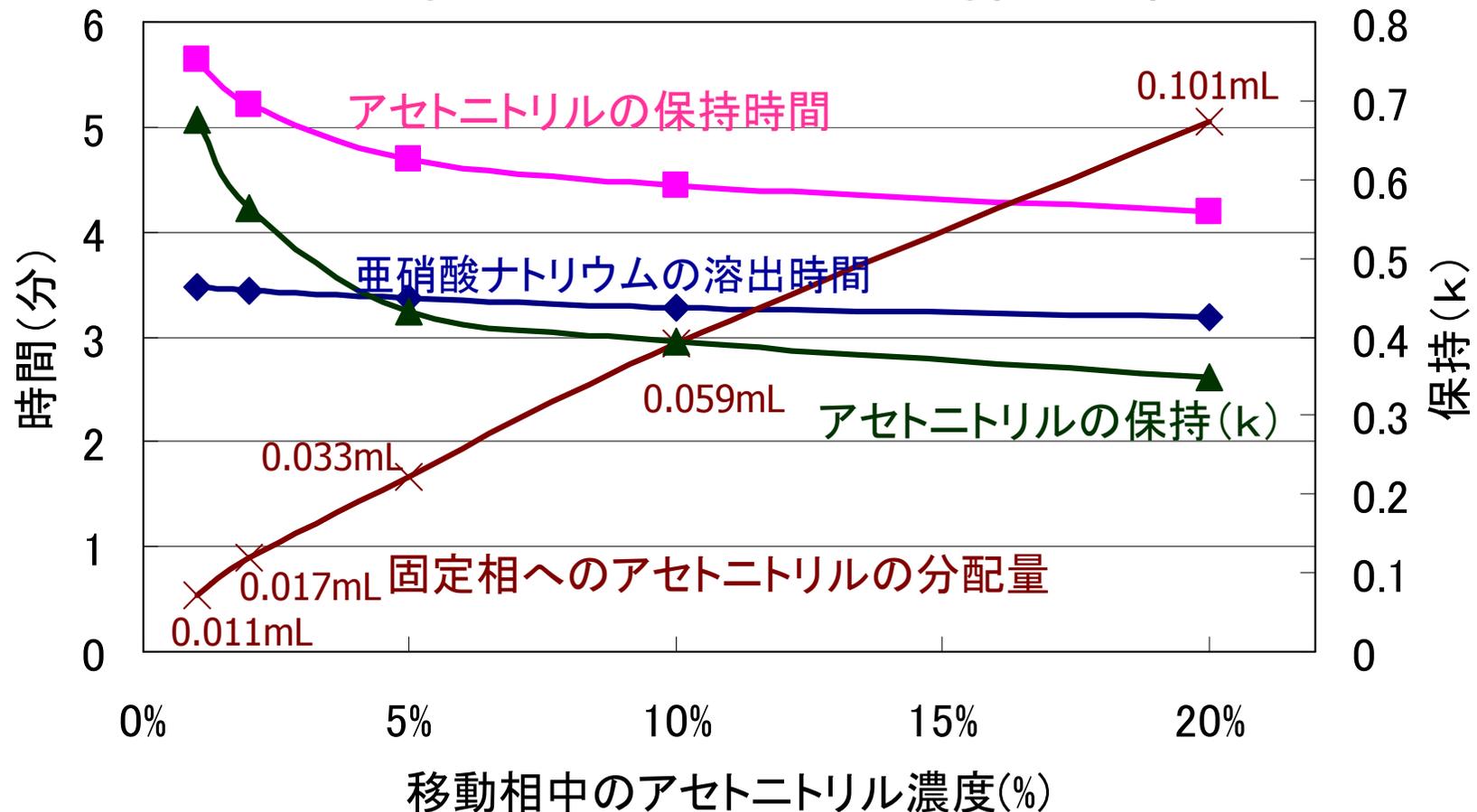
アセトニトリルは保持しており，固定相中に分配する。この分配量を溶媒和量とする

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

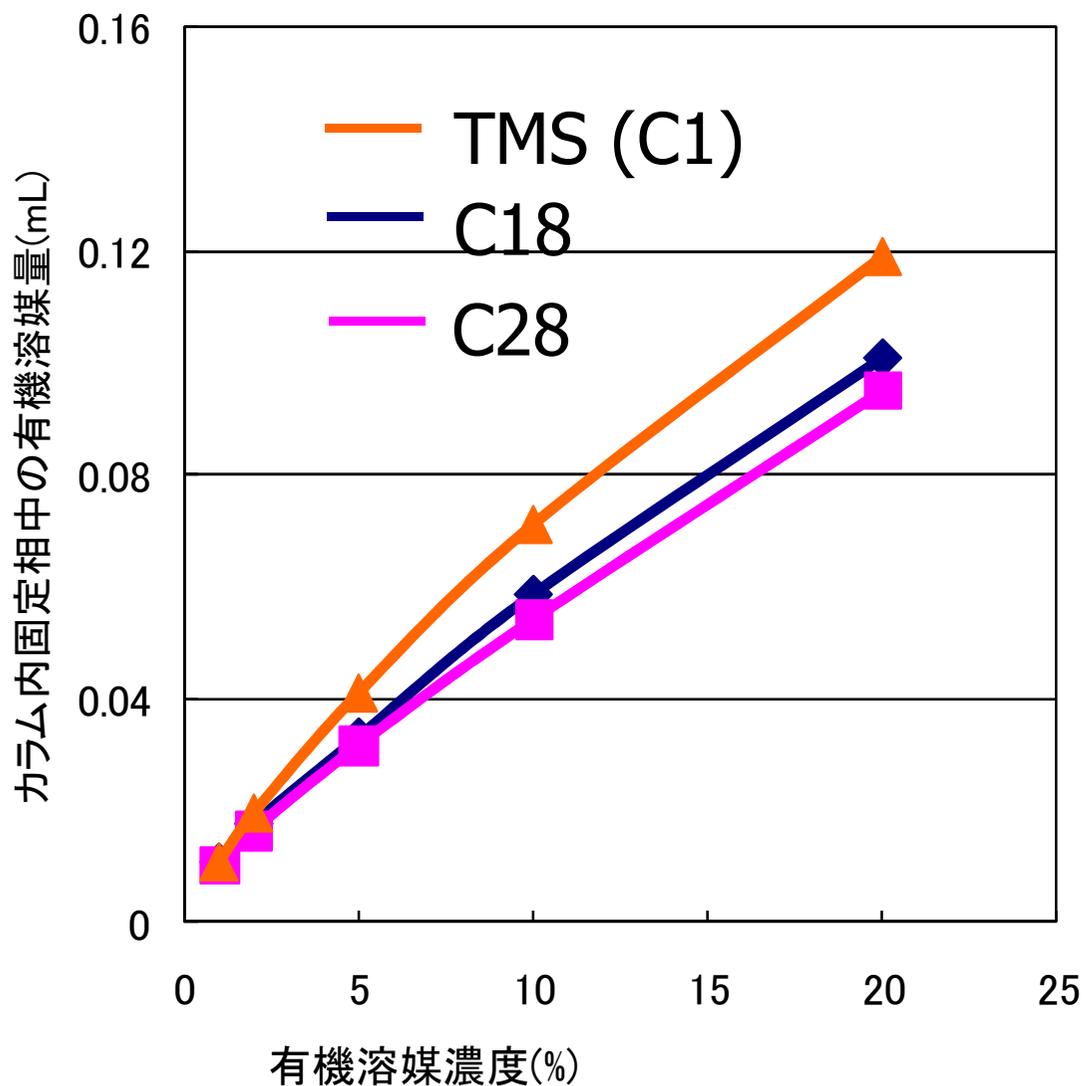
$$k = (t_s - t_0) / (t_0 - \text{system volume}) \quad k = S / M \quad S = k \times M$$

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)



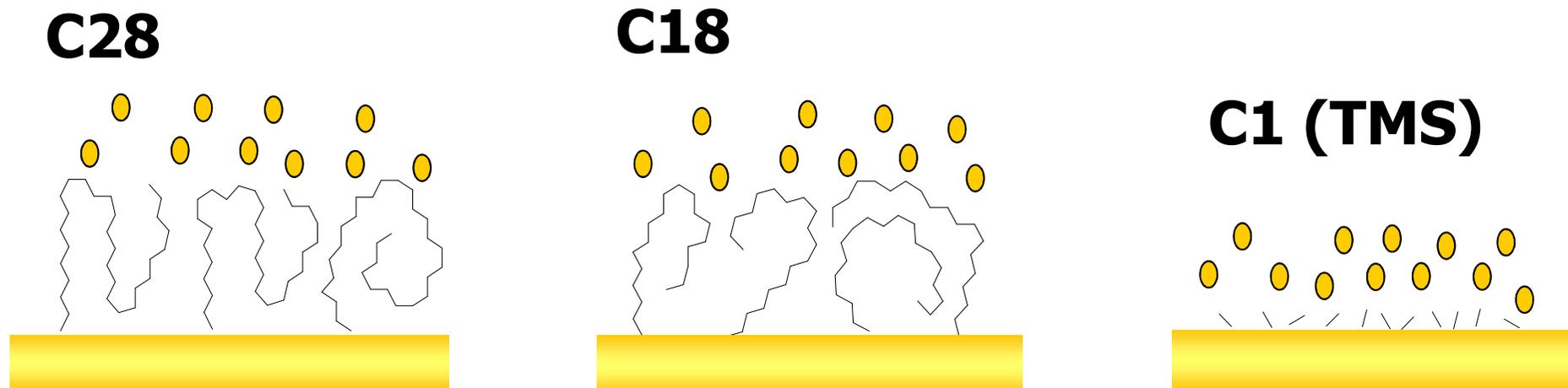
カラム: TMS (C1, %C: 5%)
C18 (%C: 16%)
C28 (%C: 16%)
4.6x150mm

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

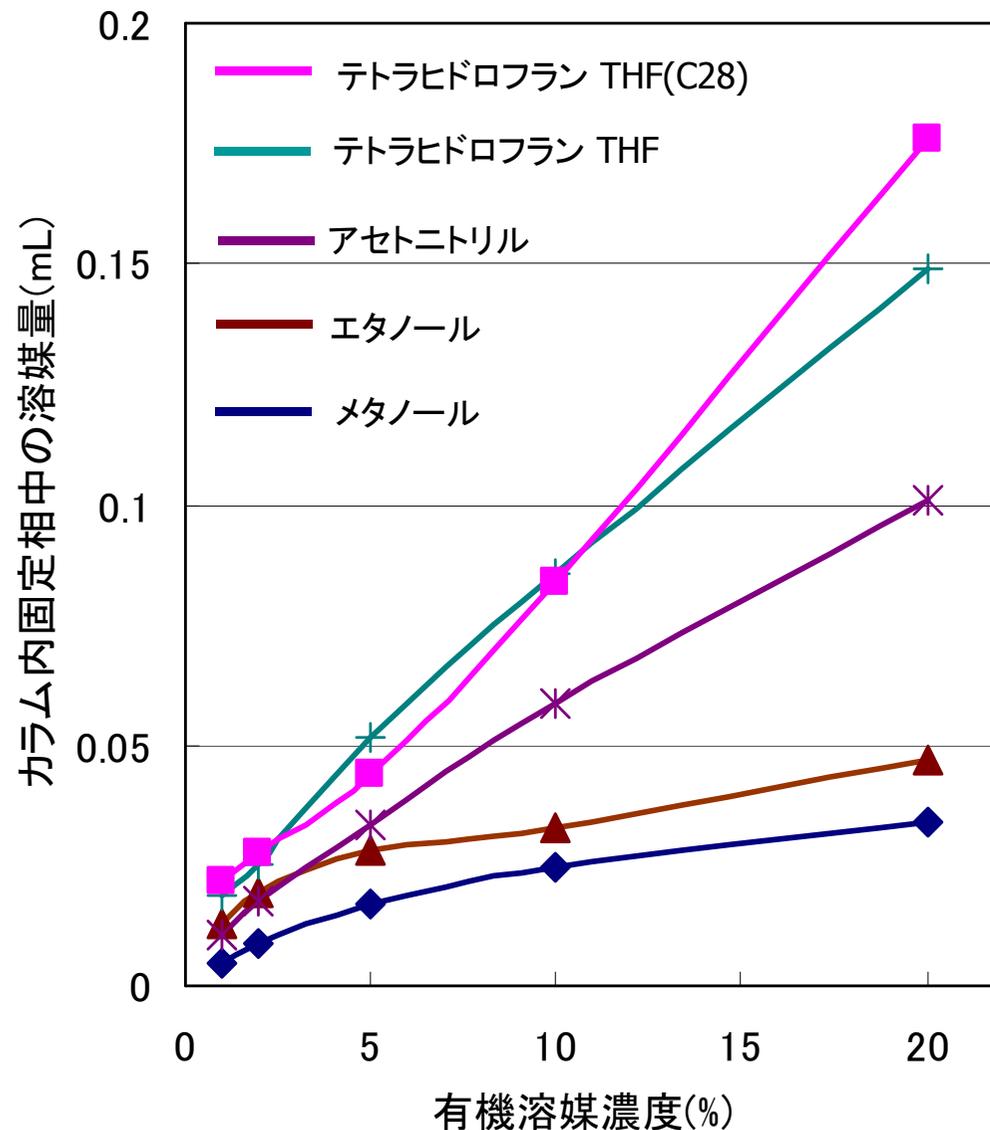
● : Acetonitrile



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

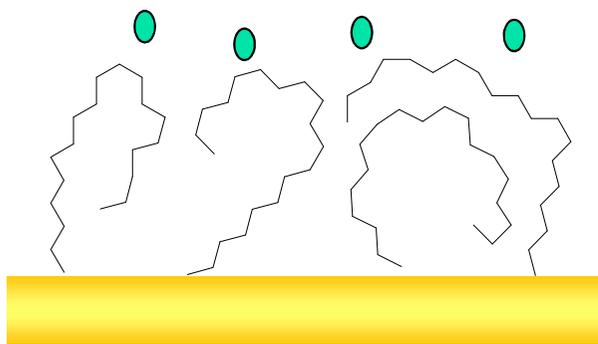
2) C18の炭素含有量16%
C28の炭素含有量16%

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。

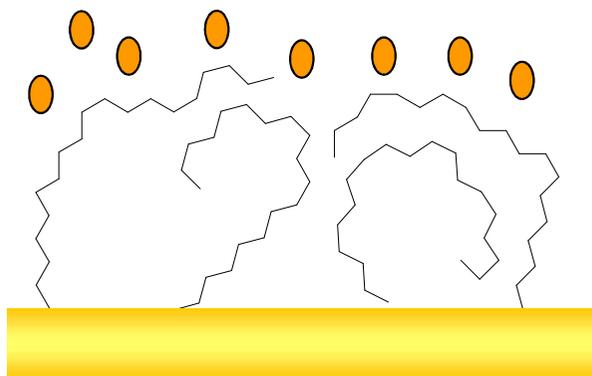
C18表面上での溶媒和の概略図

メタノール



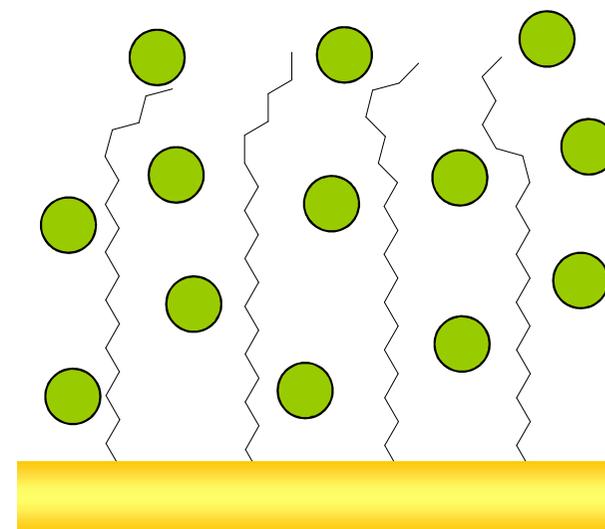
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している

アセトニトリル



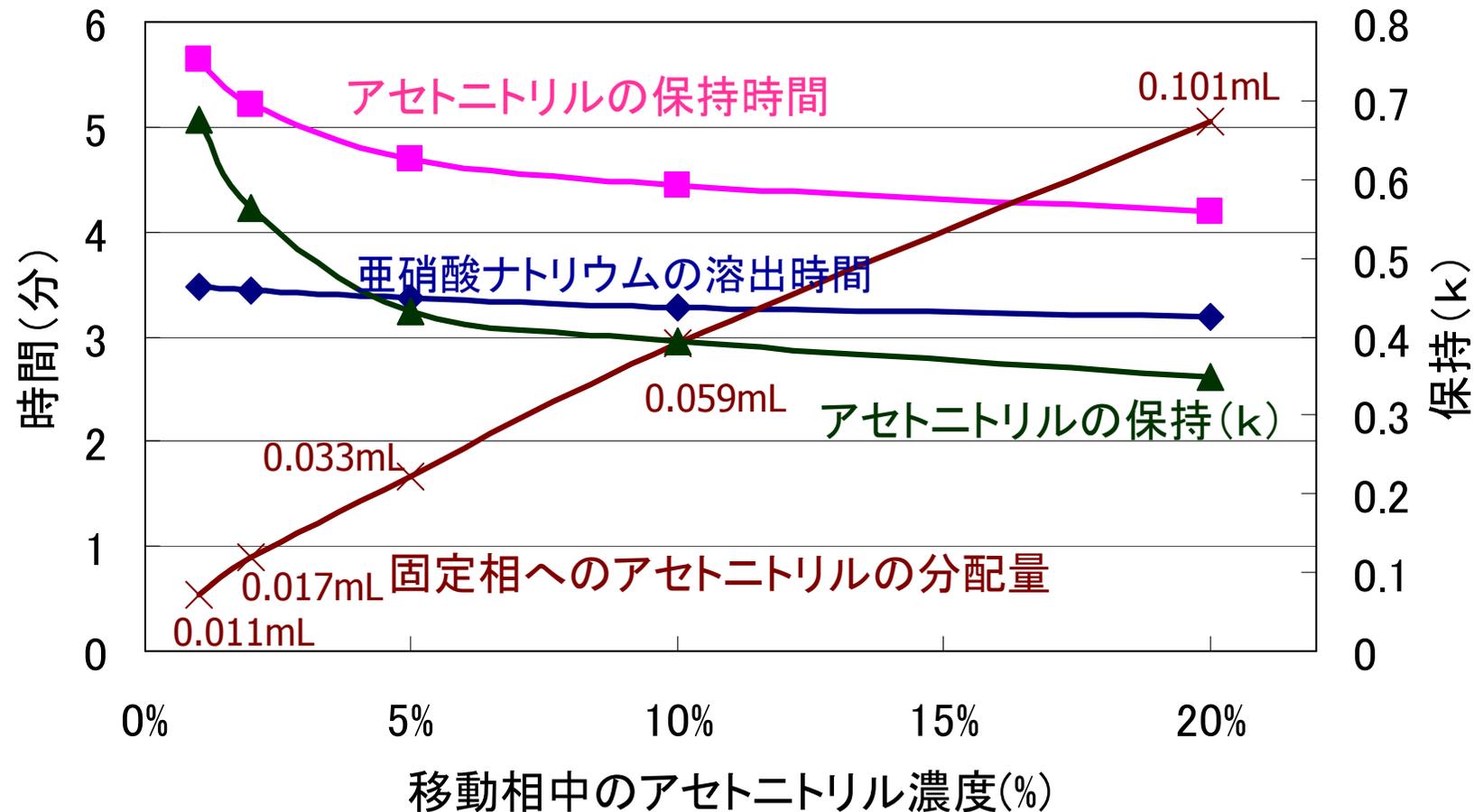
オクタデシル基は寝込んでおり、表面にアセトニトリルが溶媒和している

テトラヒドロフラン



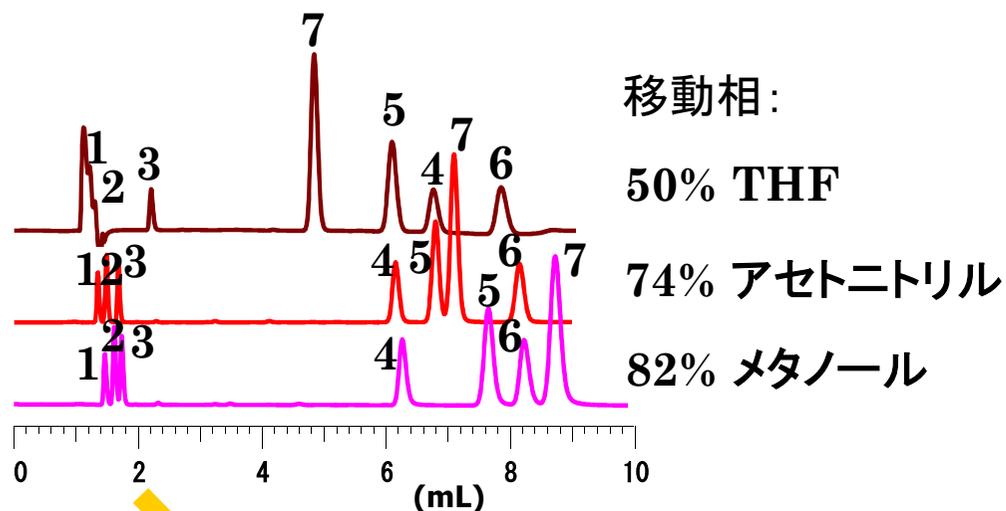
オクタデシル基は立ち上がっており、全体にテトラヒドロフランは溶媒和している

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



亜硝酸ナトリウムの溶出時間 (t_0) の減少量と固定相へのアセトニトリルの分配量の増加量が一致する

有機溶媒による t_0 の変化



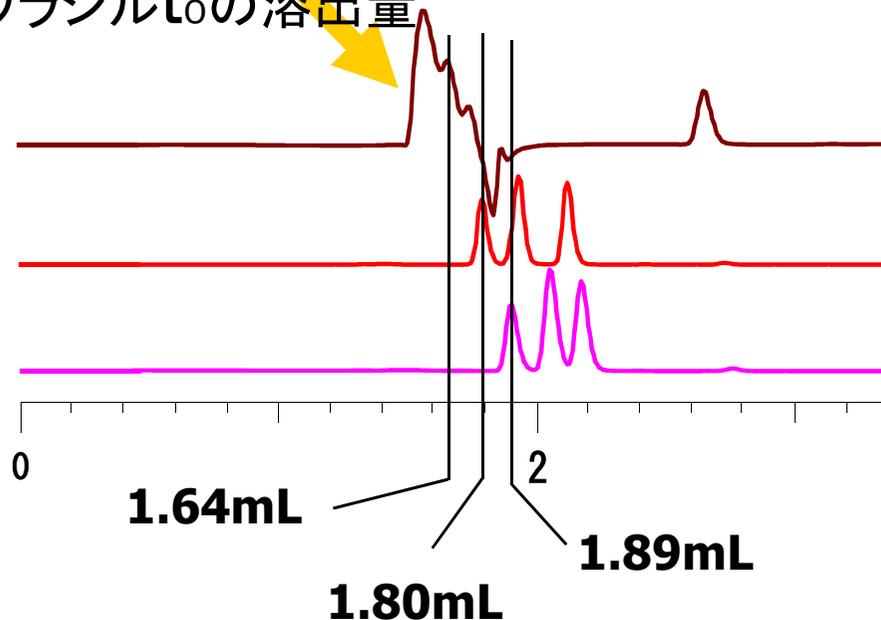
カラム: C18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm

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

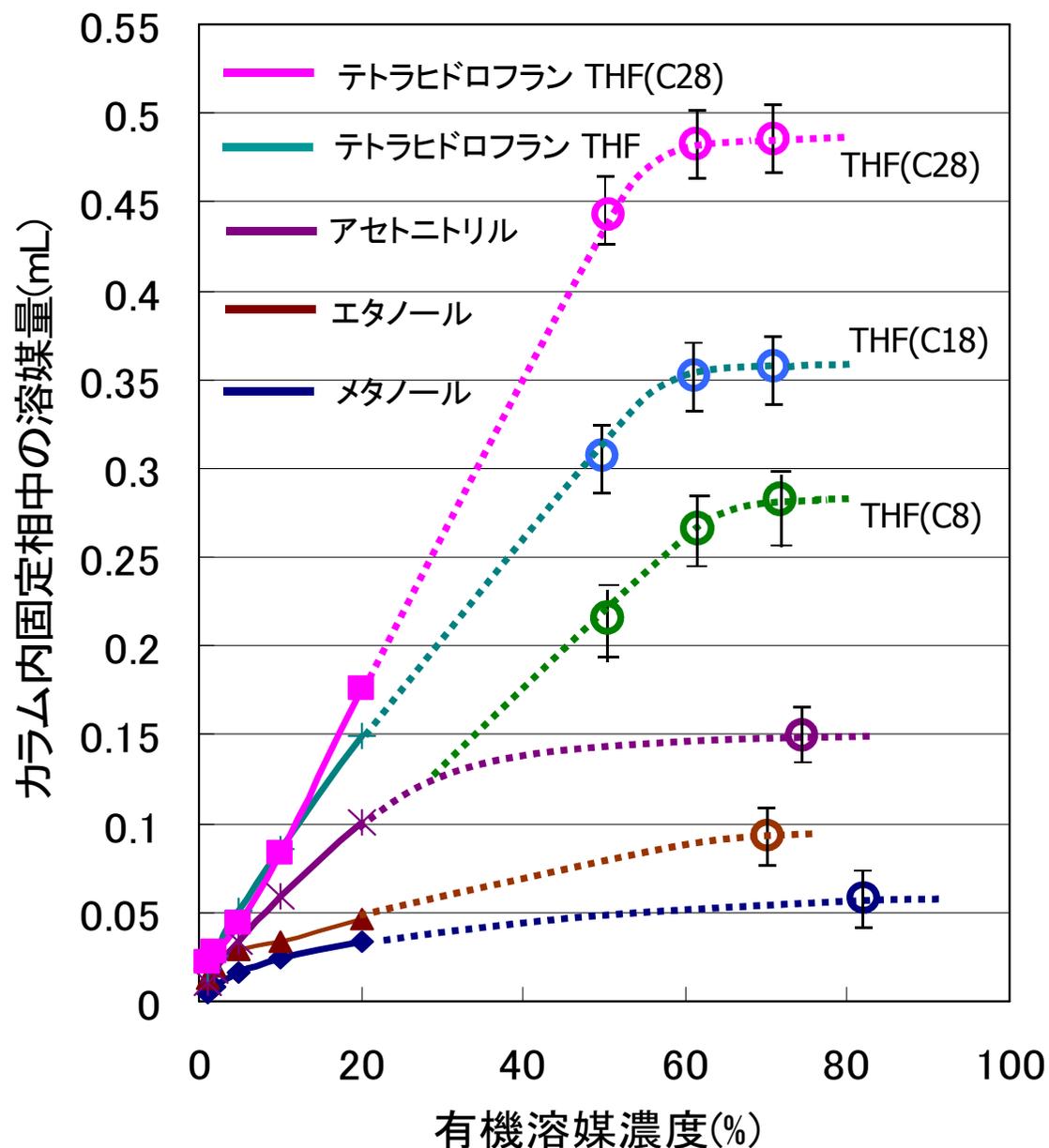


1) 溶媒和した有機溶媒とアルキル基の両方が固定相として働く。

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, C28, 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%

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

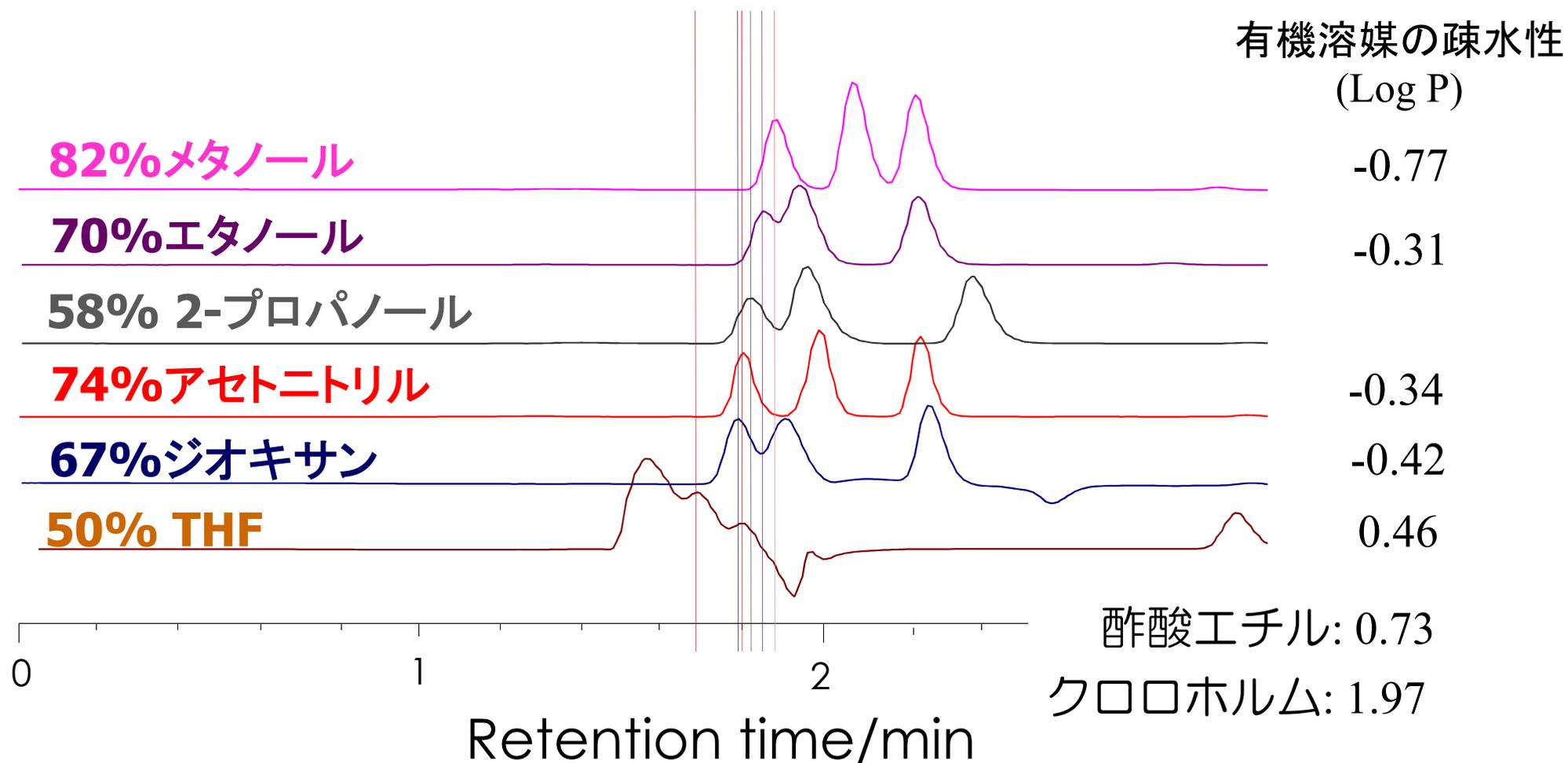
有機溶媒濃度20%でメタノールは約0.04mL, アセトニトリルは約0.1mL, テトラヒドロフランは約0.15mL溶媒和している。

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

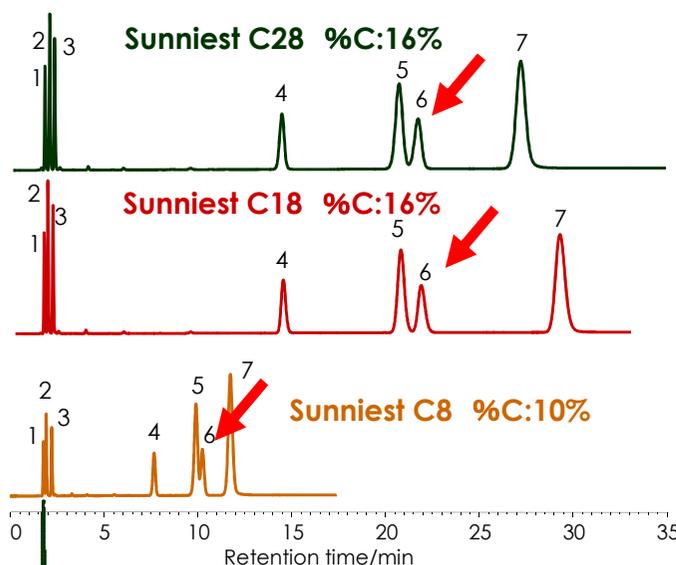
カラム: C18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm

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

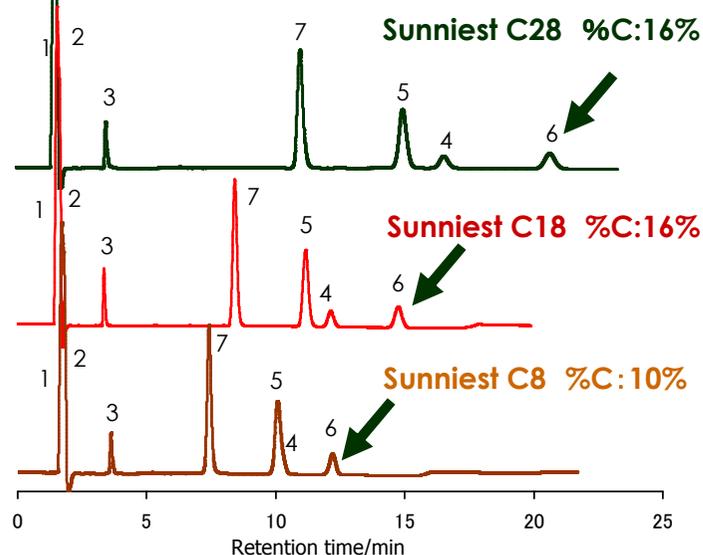


メタノールとテトラヒドロフラン (THF) の差

メタノール



THF

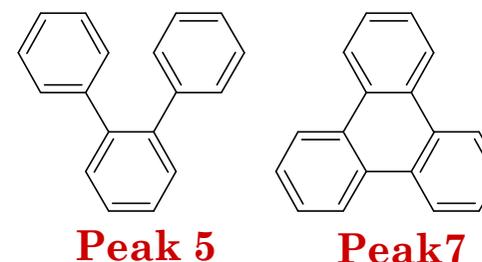


Column: Sunniest C28, C18, C8, 5 μ m
4.6x150 mm

Mobile phase:
CH₃OH/H₂O=75/25
THF/H₂O=50/50

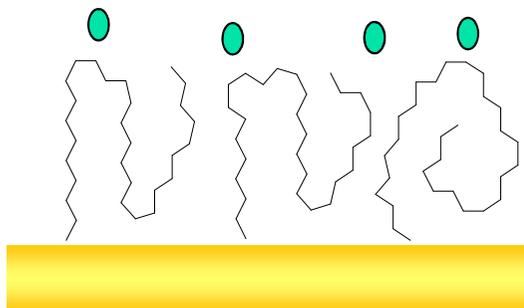
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C

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

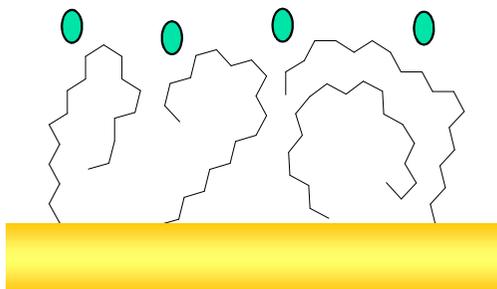


C28,C18,C8固定相の状態

C28 %C 16%

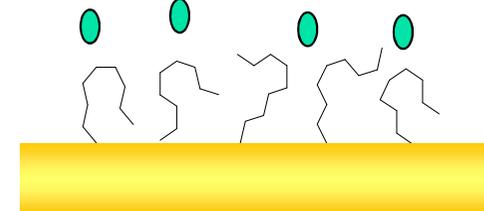


C18 %C 16%

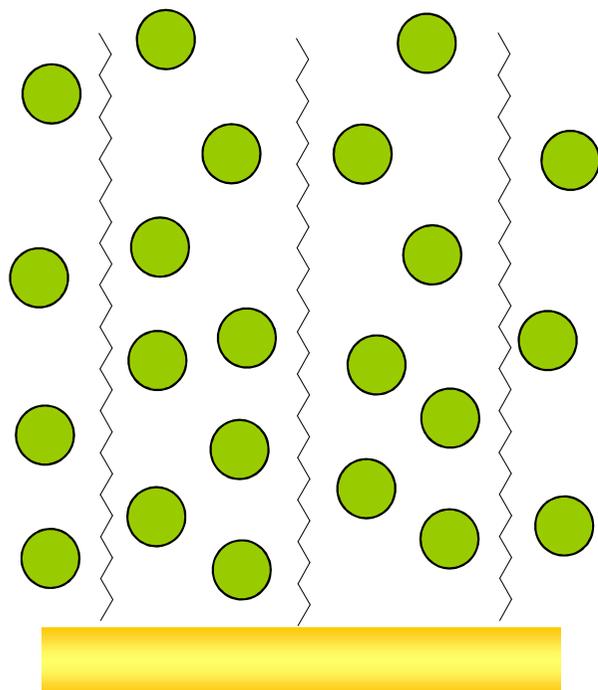


CH₃OH/H₂O=75/25

C8 %C 10%



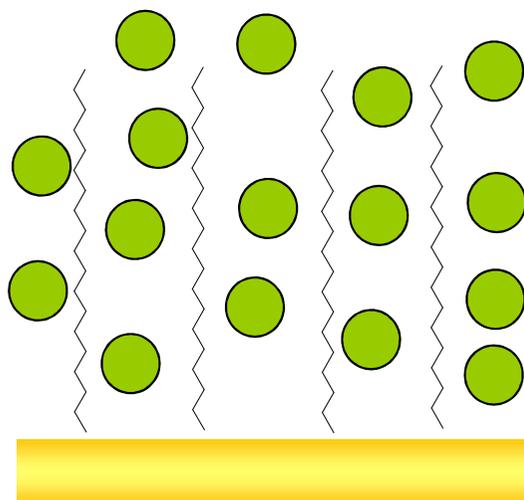
C28



● : メタノール

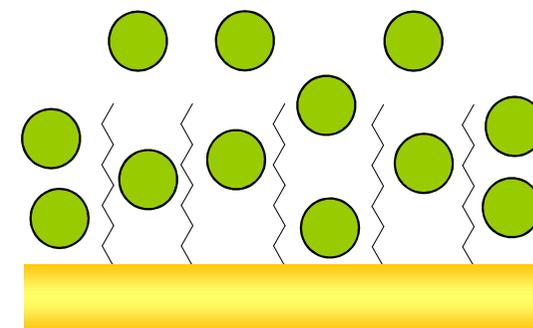
● : THF

C18



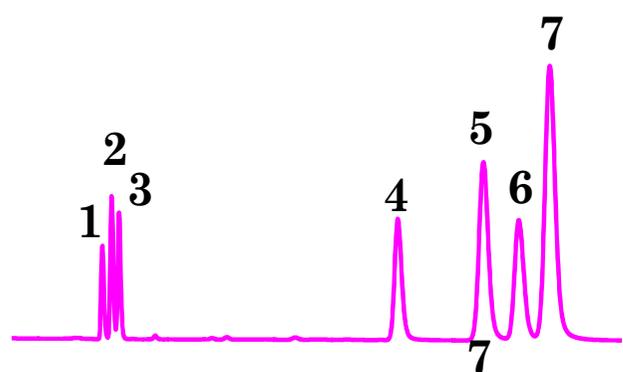
THF/H₂O=50/50

C8

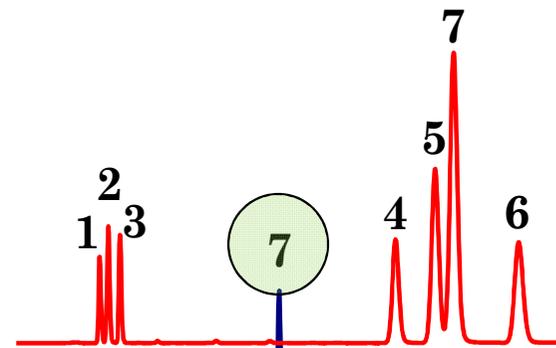


移動相有機溶媒の選択性

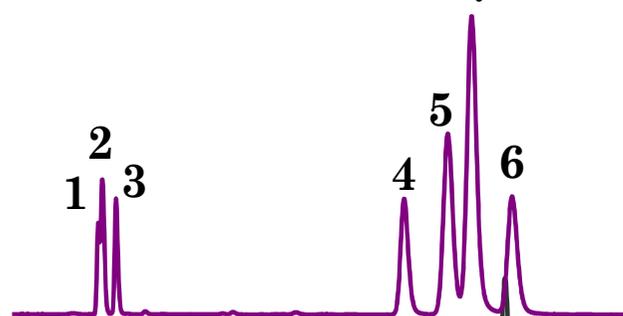
5=o-terphenylと7=triphenyleneの溶出順序



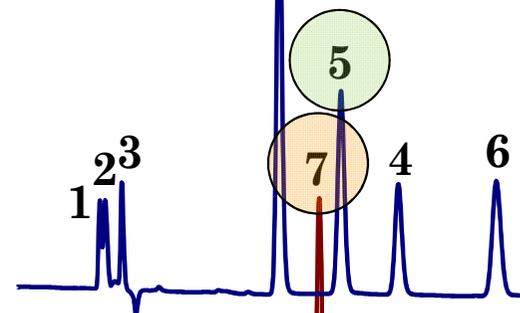
82% メタノール
 $\eta=0.6$
 3.7 MPa
 $\delta=12.9$
 $\delta_d=6.2$



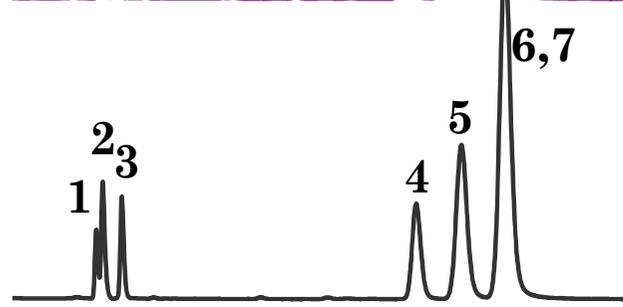
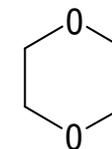
74% アセトニトリル
 $\eta=0.37$
 2.3 MPa
 $\delta=11.8$
 $\delta_d=6.5$



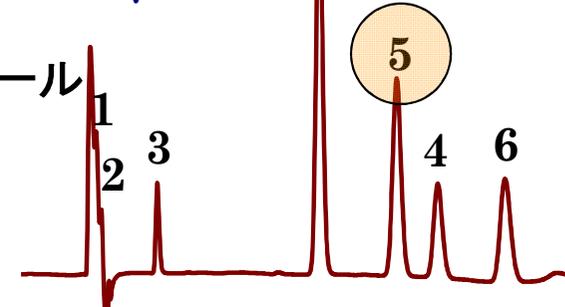
70% エタノール
 $\eta=1.2$
 6.1 MPa
 $\delta=11.2$
 $\delta_d=6.8$



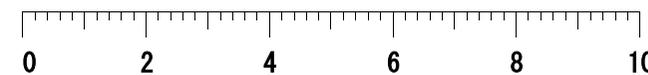
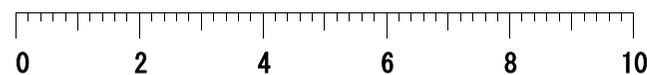
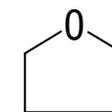
67% 1,4-ジオキサン
 $\eta=1.54$
 6.5 MPa
 $\delta=9.8$
 $\delta_d=7.8$



58% 2-プロパノール
 $\eta=2.3$
 8.0 MPa
 $\delta=10.2$
 $\delta_d=7.2$

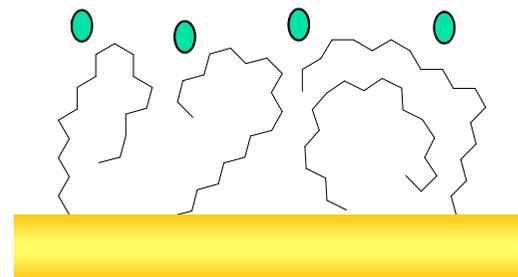


49% THF
 $\eta=0.55$
 5.5 MPa
 $\delta=9.1$
 $\delta_d=7.6$

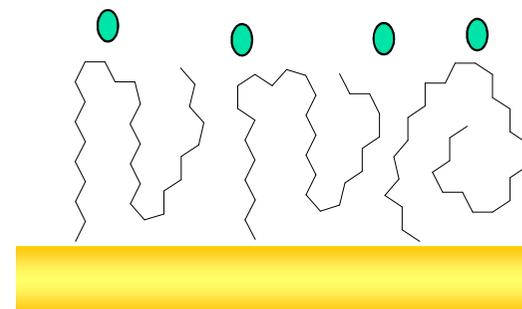


炭素含有量の同じC28とC18はメタノール・水移動相条件下では保持は同じ

C18

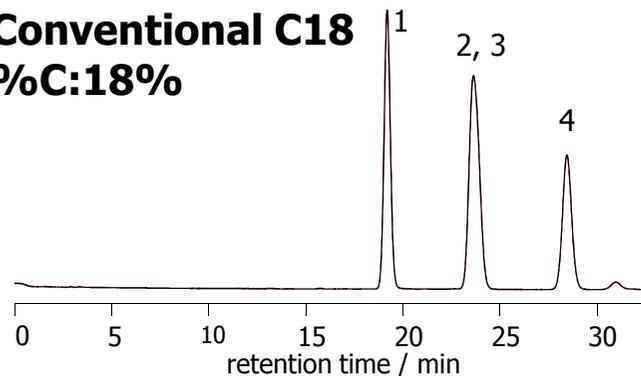


C28

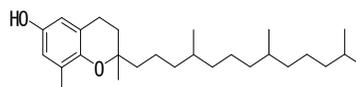


固定相容量は同じ

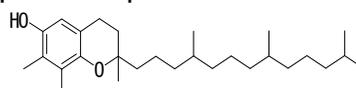
Conventional C18 %C:18%



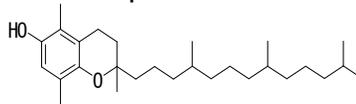
Column size: 4.6x250 mm
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=(97:3)
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 25 °C
 Detection: UV@295nm
 Sample: 1=δ-Tocopherol



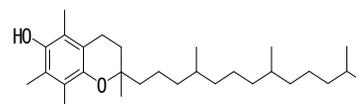
2=γ-Tocopherol



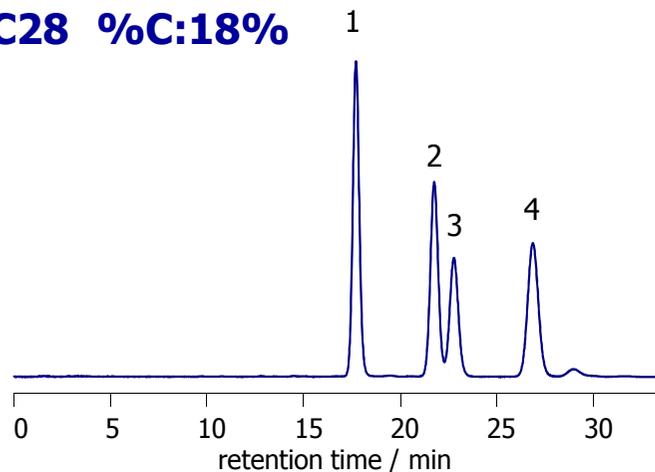
3=β-Tocopherol



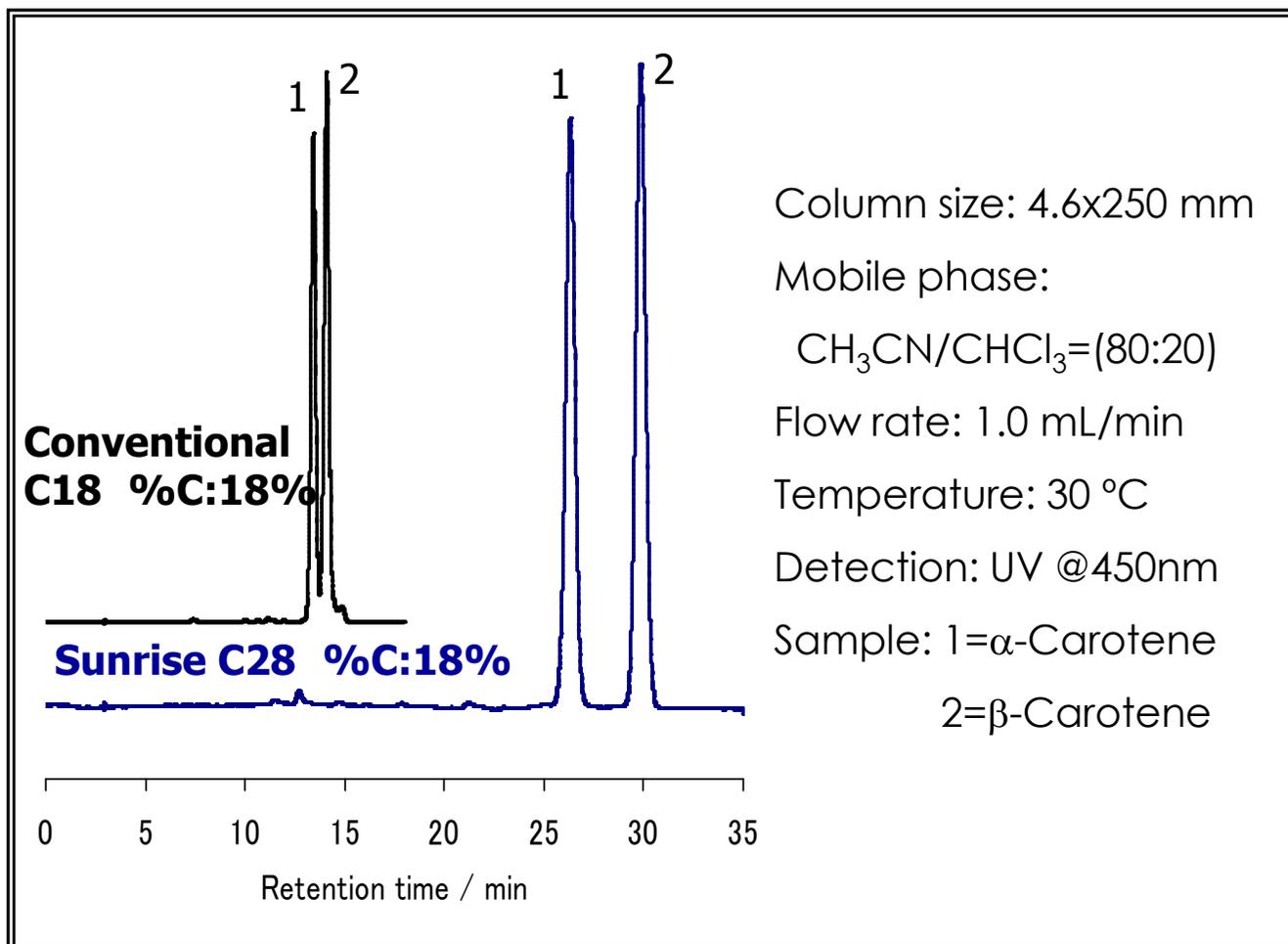
4=α-Tocopherol



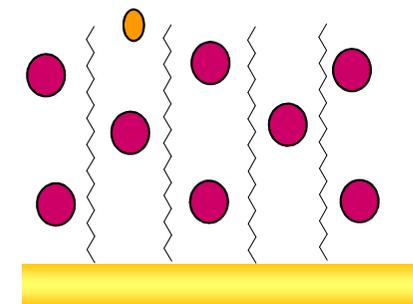
Sunrise C28 %C:18%



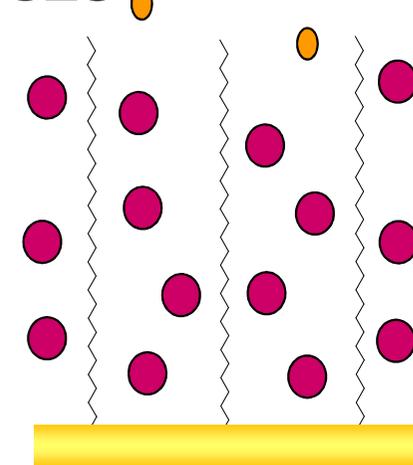
炭素含有量の同じC28とC18でもアセトニトリル・クロロホルム移動相条件では保持は変わる



C18



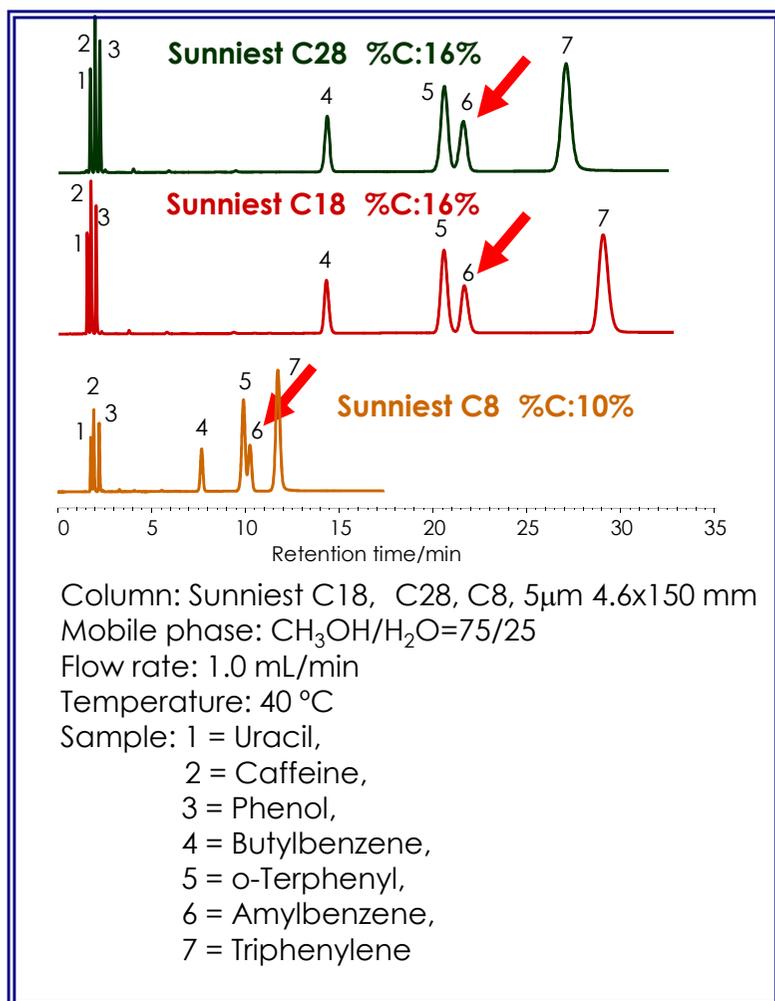
C28



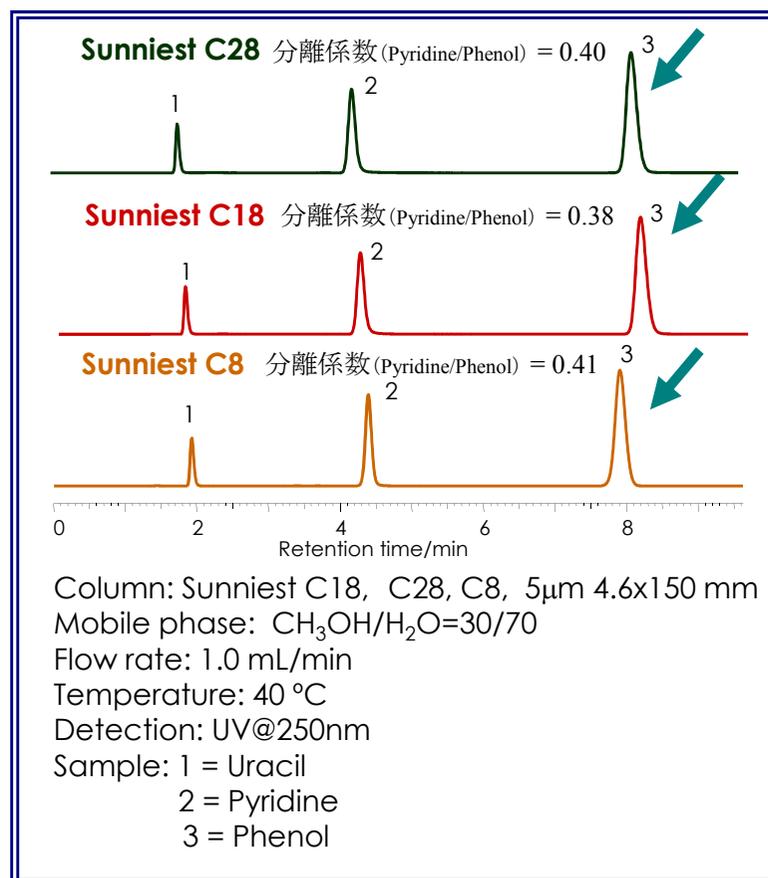
固定相容量は2倍

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

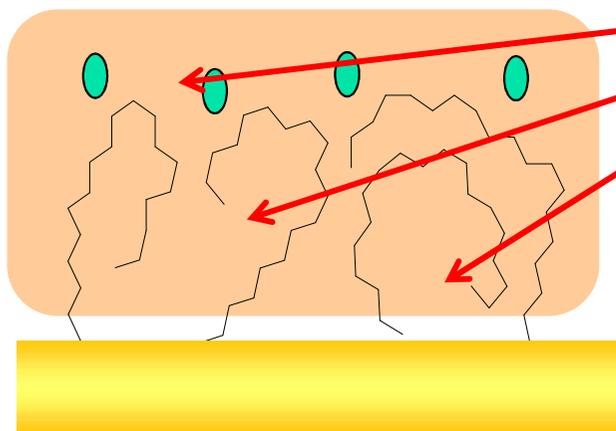


C8はC18とC28に比べ、アミルベンゼンの保持は半分であるが、フェノールの保持はほぼ同じである。

試料とC18固定相の相互作用場

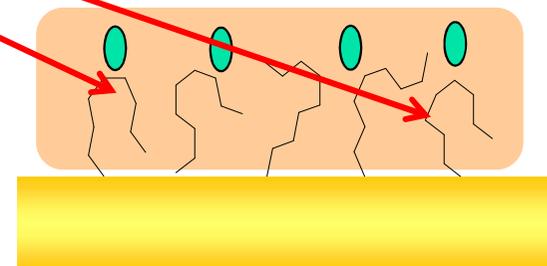
メタノール・水移動相

C18

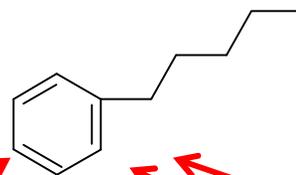


● : メタノール

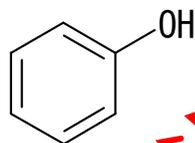
C8



アミルベンゼンは
オクタデカンに可溶



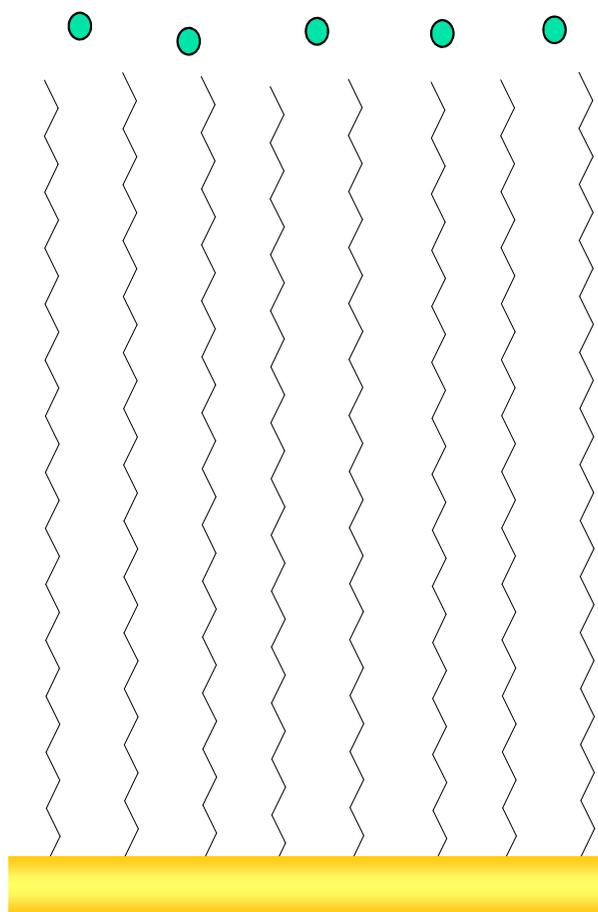
フェノールは
オクタデカンに難溶



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

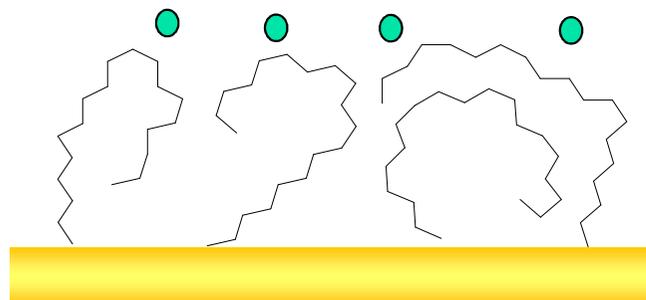
NP-C30, %C:0.23%



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

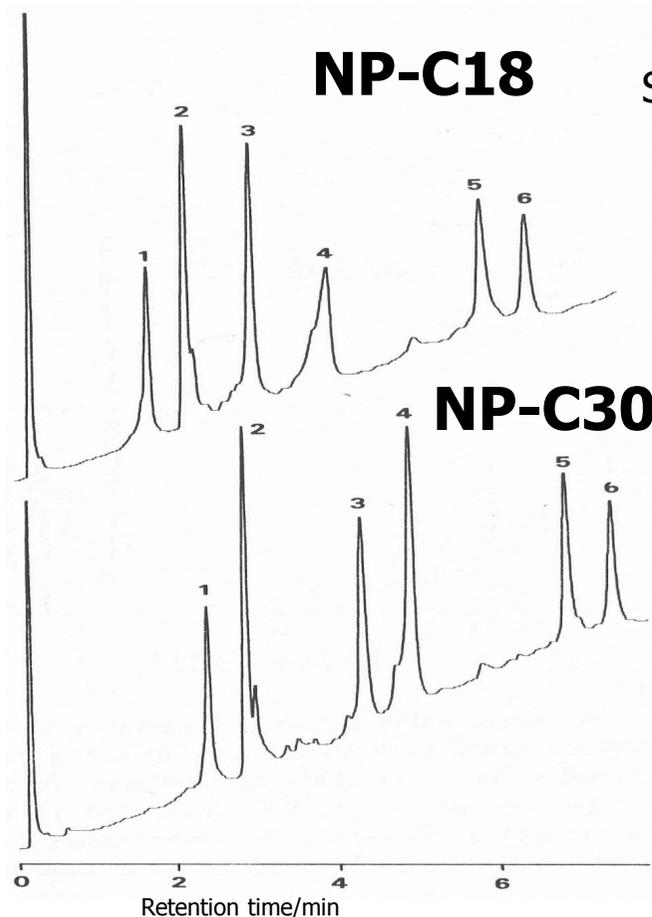
タンパク質の分離

4.6x30mm

A) 0.1%TFA,

B) CH₃CN

グラジエント溶離

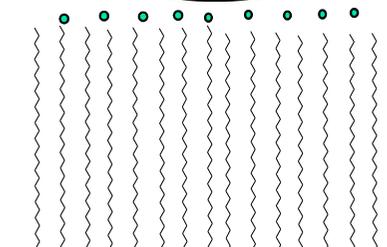


Sample: 1 = Ribonuclease,
2 = Insulin,
3 = Cytochrom C,
4 = Lysozyme,
5 = Myoglobin,
6 = Carbonic anhydrase

タンパク質



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

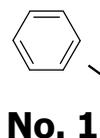
4.6x30mm

A) H₂O

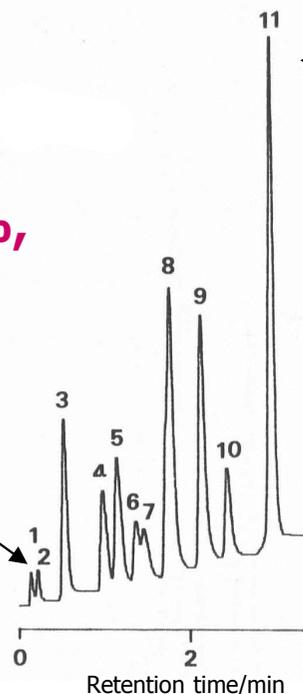
B) CH₃OH

%B: 20%-100%,
5 min

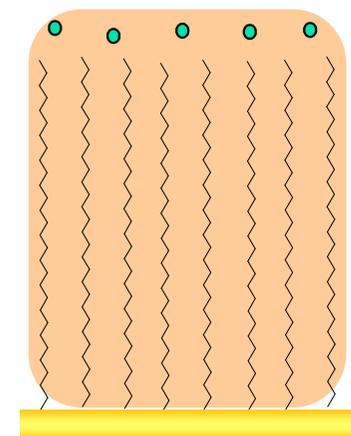
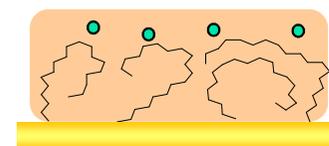
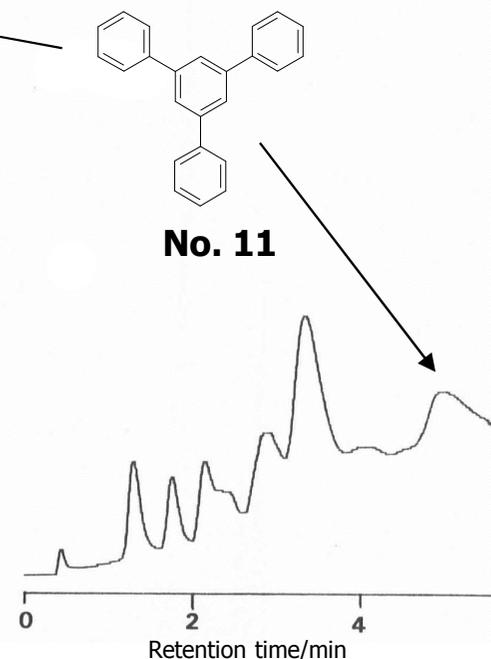
グラジエント溶離



NP-C18



NP-C30



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

NP-C18

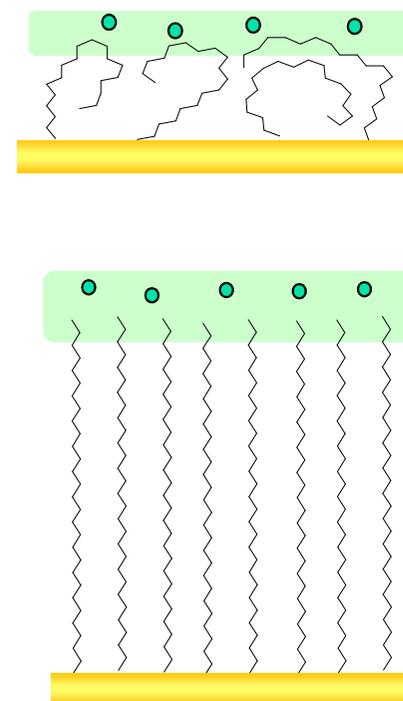
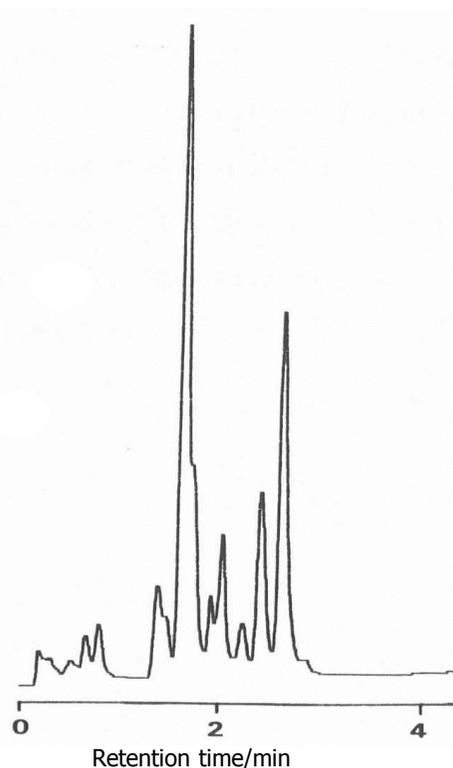
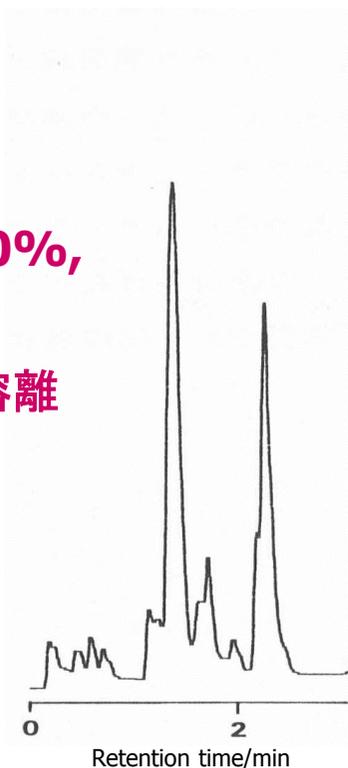
NP-C30

A) H₂O

B) CH₃OH

%B: 0%-30%,
5 min

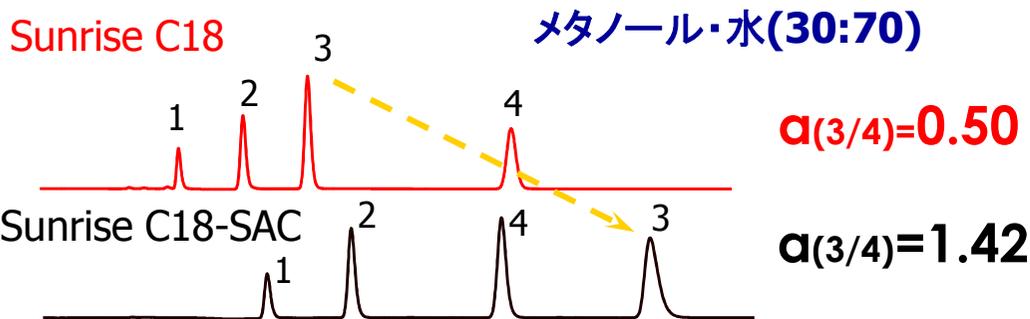
グラジエント溶離



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

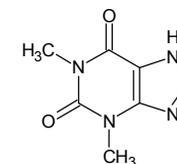
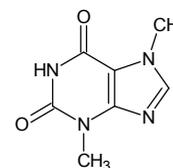
水素結合性の比較

キサンチン類の分離



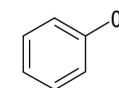
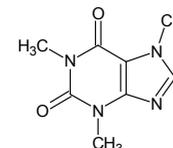
1=Theobromine

2=Theophylline



3=Caffeine

4=Phenol

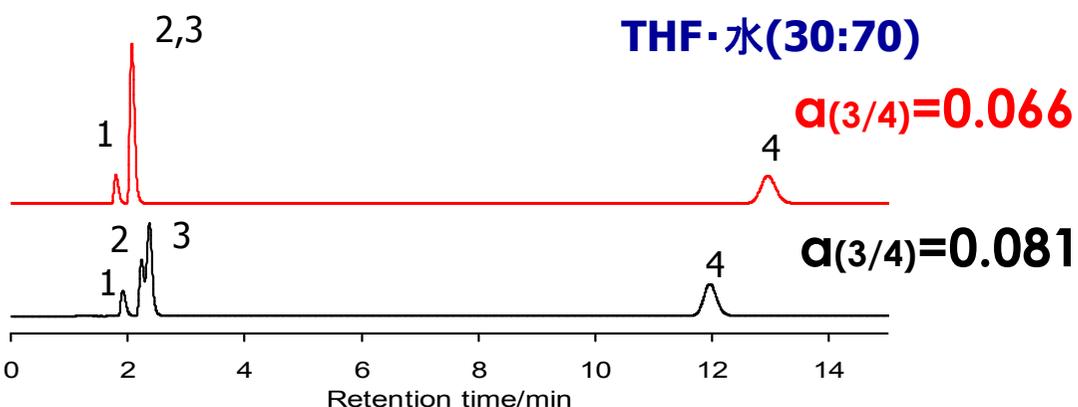
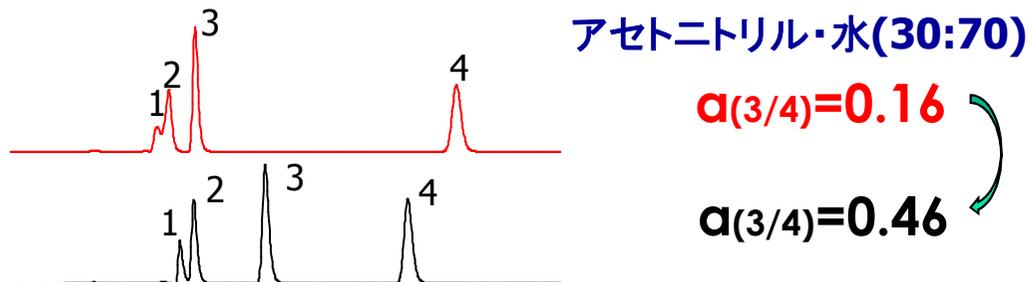


2.84倍

2.88倍

mn:

Sunrise C18, End-capped (%C:15)
Sunrise C18-SAC, Not end-capped (%C:14%)



5 μ m, 4.6x150 mm

Mobile phase:

1.22倍 /H₂O=30/70

CH₃CN/H₂O=30/70

THF/H₂O=30/70

Flow rate: 1.0 mL/min

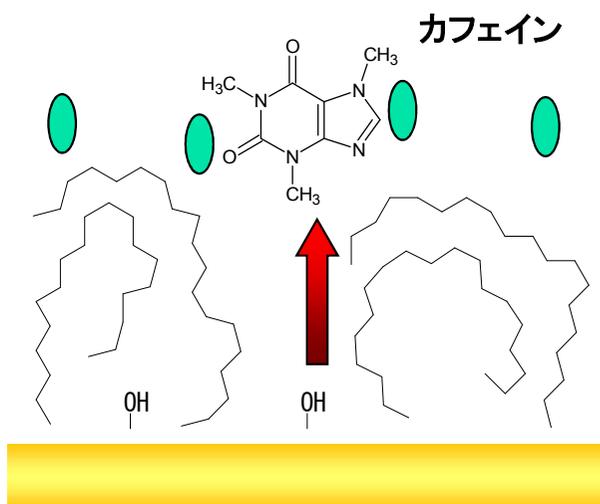
Temperature: 40 °C

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

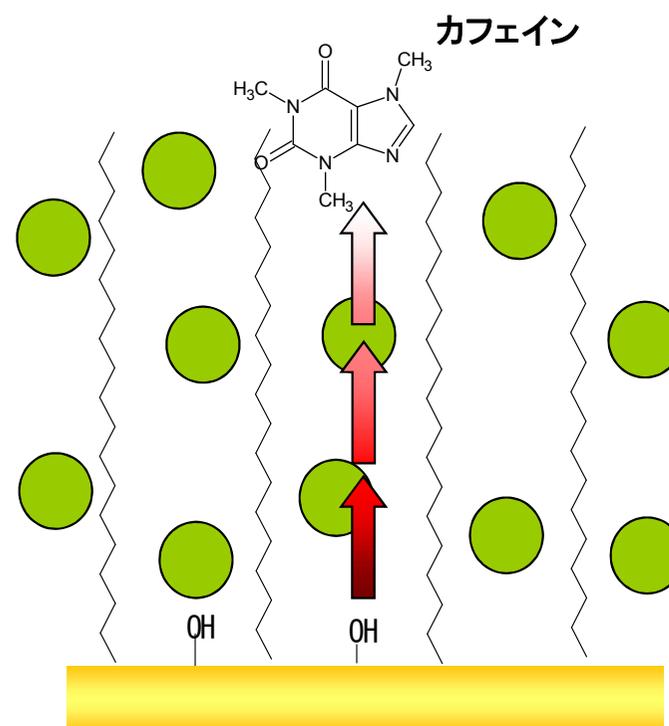
水素結合性の比較

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、溶質に対するシリカ表面のシラノール基の影響を弱めさせる。

まとめ

- ・水移動相と用いた場合には逆相アルキル基は寝込んでしまうとと言われていたが、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。
- ・水移動相での逆相カラムの保持の減少はアルキル基の寝込みや絡み合いではなく、毛管作用による充填剤細孔内からの移動相の抜け出しである。
- ・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。