

# C18の固定相概念を覆す！ 業務に必ず役立つ目から鱗のカラムの 常識・非常識



- ①疎水性の高い固定相は保持が大きい？
- ②逆相アルキル基は濡れている，濡れていない(non-wetting)？  
立ち上がっている，寝込んでいる？
- (おまけ)シリカ系逆相充填剤のエンドキャッピングの新しい考え方

(クロマニックテクノロジーズ)

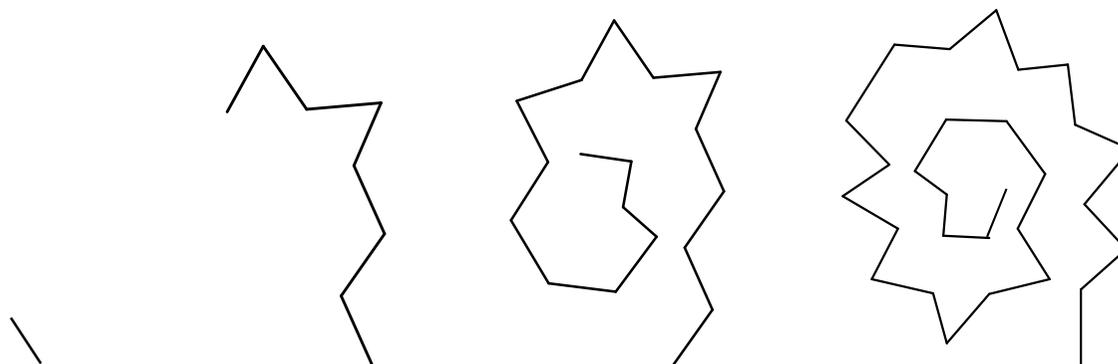
長江 徳和

一般的に

「C18はC8より疎水性が高いため  
保持時間が長くなる」  
と言われているが????

固定相と移動相への溶質の  
分配量と分配濃度を考慮すると  
違った見方ができる

# 疎水性



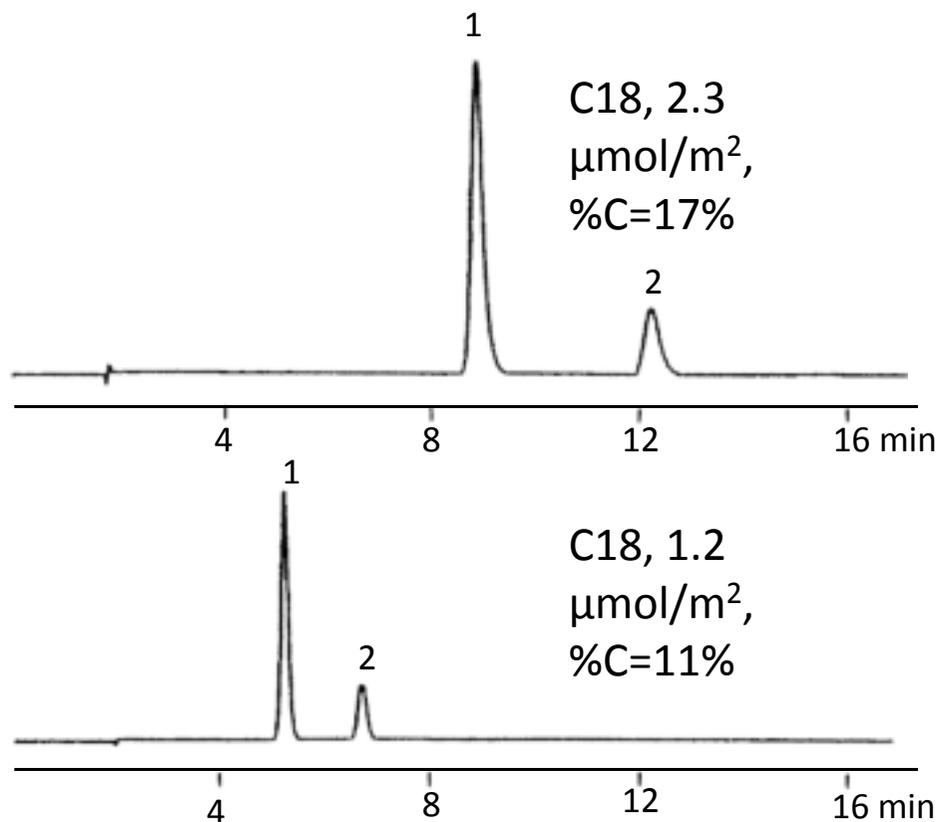
	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
分配係数(LogP)	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	22.6	0.66	0.006	$8.84 \times 10^{-10}$

疎水性(LogP)はn-オクタノールと水への分配比率により定義される

C30は最も疎水性が高いが、これは水への溶解度が低いことが大きく影響する。

化合物の保持予測として用いられる化合物は、一般的にLogPが1から6の間のものである。

# C18固定相の保持



Column size: 4.6x150 mm

Mobile phase:

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

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

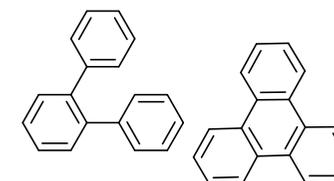
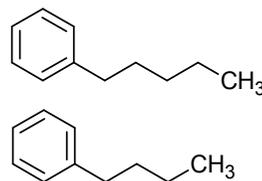
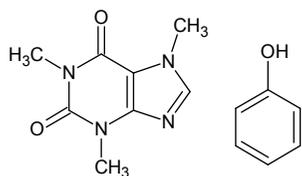
Detection: UV @450nm

Sample: 1= Tocopherol

2= Tocopherol acetate

固定相の体積(結合密度)が半分になると保持もおおよそ半分になる。

# 逆相固定相の選択性および保持



固定相	炭素含有量	水素結合性 α(カフェイン/フェノール)	疎水性 α(アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	疎水性 アミルベンゼンの保持係数	立体選択性 α(o-ターフェニル/トリフェニレン)
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

★固定相:シリカ基材の細孔径, 12nm, 一官能性試薬+エンドキャッピング, 移動相:メタノール/水=70/30, 温度:30°C

C8固定相はC18固定相に比べ固定相体積(炭素含有量)は約半分であり、アミルベンゼンの保持も同様に約半分である。

固定相の体積(結合密度)が半分になると保持もおおよそ半分になる.



C8固定相はC18固定相に比べ体積は半分であり, アミルベンゼンの保持も半分である.



C8固定相(%C=11%)は  
C18固定相(1.2  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , %C=11%)と  
体積(炭素含有)も,  
保持も同じである.

## 保持係数(k)と分配比(Kd)

$$k = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M}$$

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

S: 固定相中の溶質の存在量

M: 移動相中の溶質の存在量

S<sub>D</sub>: 固定相中の溶質の分配濃度

M<sub>D</sub>: 移動相中の要旨値の分配濃度

V<sub>S</sub>: 固定相の体積(容積)

V<sub>M</sub>: 移動相の容積

C8固定相(%C=11%)とC18固定相(1.2 μmol/m<sup>2</sup>, %C=11%)は固定相体積(V<sub>S</sub>)が同じで保持係数(k)も同じであるので、分配比(Kd)も同じ値になる。

# 固定相の体積が2倍異なるC18固定相の保持係数(k)と分配比(Kd)

固定相	炭素含有量	結合密度	固定相体積	移動相体積
C18 (A)	17%	2.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.4 mL	1.6 mL
C18 (B)	11%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL

4.6x150mmカラムを使用

C18 (A, B)は同じ固定相なので、分配比(Kd)は同じだと仮定する。  $K_d = \frac{S_D}{M_D}$

C18 (A) の場合  $k_A = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.4}{M_D \times 1.6} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.25 = 0.25 K_d$

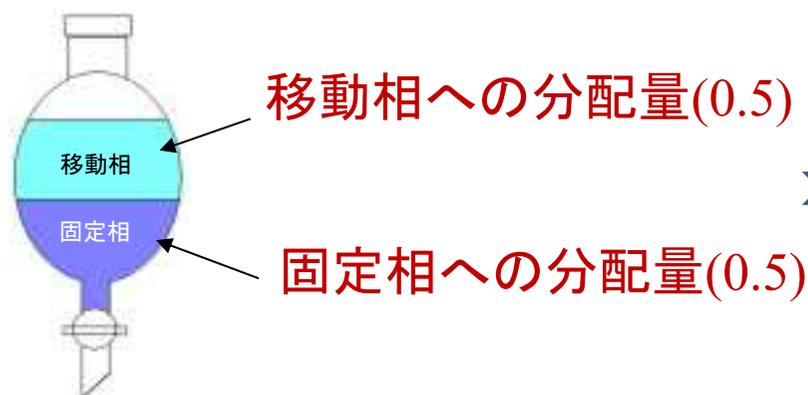
C18 (B) の場合  $k_B = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_d$

C18(A)はC18(B)の約2倍の保持係数になる。

# 固定相の体積が異なる場合

<<同じ固定相では分配濃度比が同じと仮定する(固定相/移動相=1)>>

例えばC18(%C=18%)

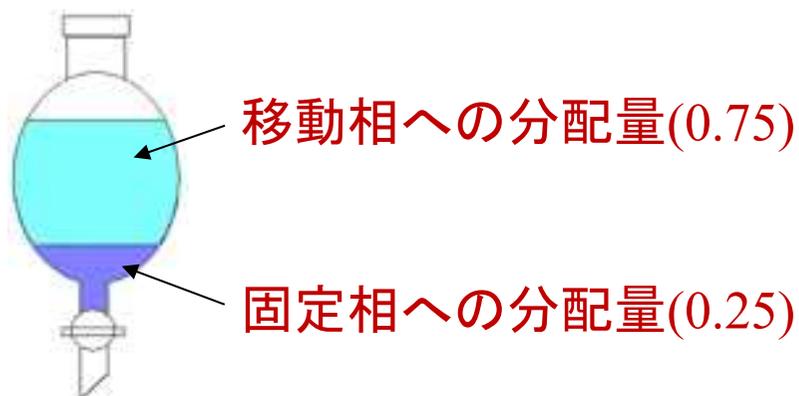


移動相と固定相への分配濃度比は同じであるため、分配量の比(k)は体積比となる。

$$k=0.5/0.5=1$$

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

固定相の体積が半分のC18(%C=9%)



$$k=0.25/0.75=0.33$$

# 固定相の体積が同じC18とC8固定相の保持係数(k)と分配比(Kd)

固定相	炭素含有量	結合密度	固定相体積	移動相体積
C18 (A)	17%	2.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.4 mL	1.6 mL
C18 (B)	11%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL
C8	11%	2.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL

4.6x150mmカラムを使用

C18とC8固定相分配比(Kd)は $Kd_{C18}$ ,  $Kd_{C8}$

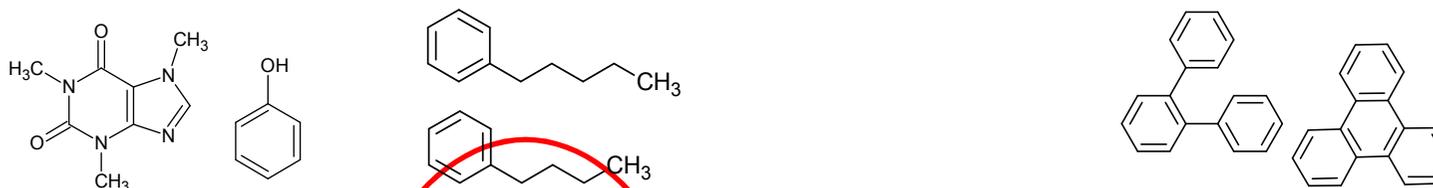
$$Kd = \frac{S_D}{M_D}$$

C18 (B) の場合  $k_{C18} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 Kd_{C18}$

C8 の場合  $k_{C8} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 Kd_{C8}$

C18(B)とC8の保持係数は同じであるため、 $Kd_{C18}$ と $Kd_{C8}$ も同じである。

# 逆相固定相の選択性および保持



固定相	炭素含有量	水素結合性 α(カフェイン/フェノール)	疎水性 α(アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	疎水性 アミルベンゼンの保持係数	立体選択性 α(o-ターフェニル/トリフェニレン)
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

★固定相:一官能性試薬+エンドキャッピング, 移動相:メタモール/水=70/30, 温度:30°C

- ・炭素一個の差(アミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数)はアルキル鎖長と相関があるように見える。
- ・しかし保持時間が大きく異なる分離での比較である。

# 炭素一個の差の分離係数

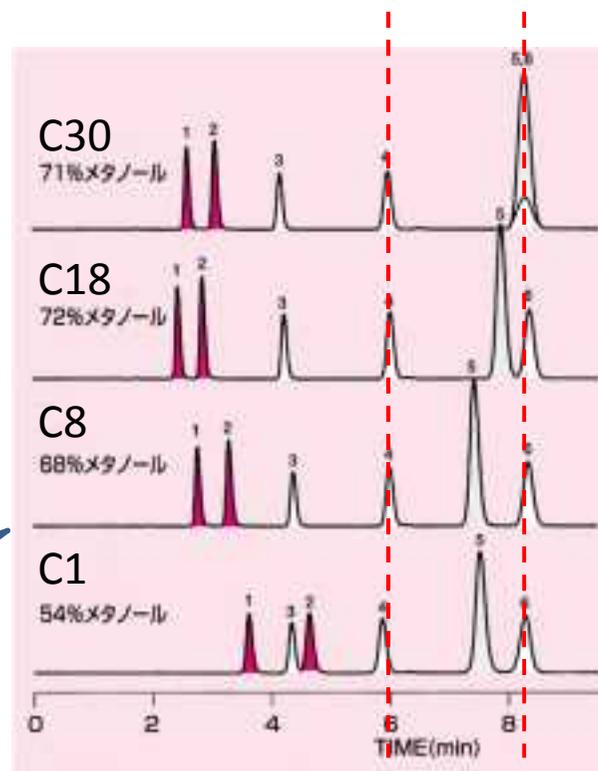
固定相	炭素含有量	水素結合性 [H <sub>2</sub> O/メタノール]	疎水性 [メタノール/メタノール]	疎水性 [メタノール/メタノール]	立体選択性
C30	18%	0.50	1.72	18.9	1.73
C18	18%	0.34	1.68	19.7	1.44
C8	11%	0.29	1.55	9.4	0.89
C1	4.5%	0.51	1.43	2.3	0.99
Phenyl	8%	0.69	1.38	2.5	0.87
Cyano	7%	0.48	1.16	0.4	1.97

★固定相 一言性試験+エンドキャッピング 移動相: メタノール/水=70/30 温度: 30°C

アルキル鎖長が長いほど分離係数( $\alpha$ )は大きい。

しかし

保持時間を一緒にすると炭素が一個異なる成分(トルエン, エチルベンゼン)の分離係数( $\alpha$ )は同じである。



カラムサイズ: 4.6 × 150mm  
 移動相: メタノール/水、有機溶媒濃度は図中に表示  
 流速: 1.0 mL/min, 温度: 30°C,  
 試料: 1=メチルパラベン, 2=エチルパラベン,  
 3=ベンゼン, 4=トルエン, 5=ナフタレン, 6=エチルベンゼン

保持が同じ場合の炭素一個の差の成分の分離係数を固定相の疎水性と定義すれば、アルキル鎖長の差は疎水性に関係しない。

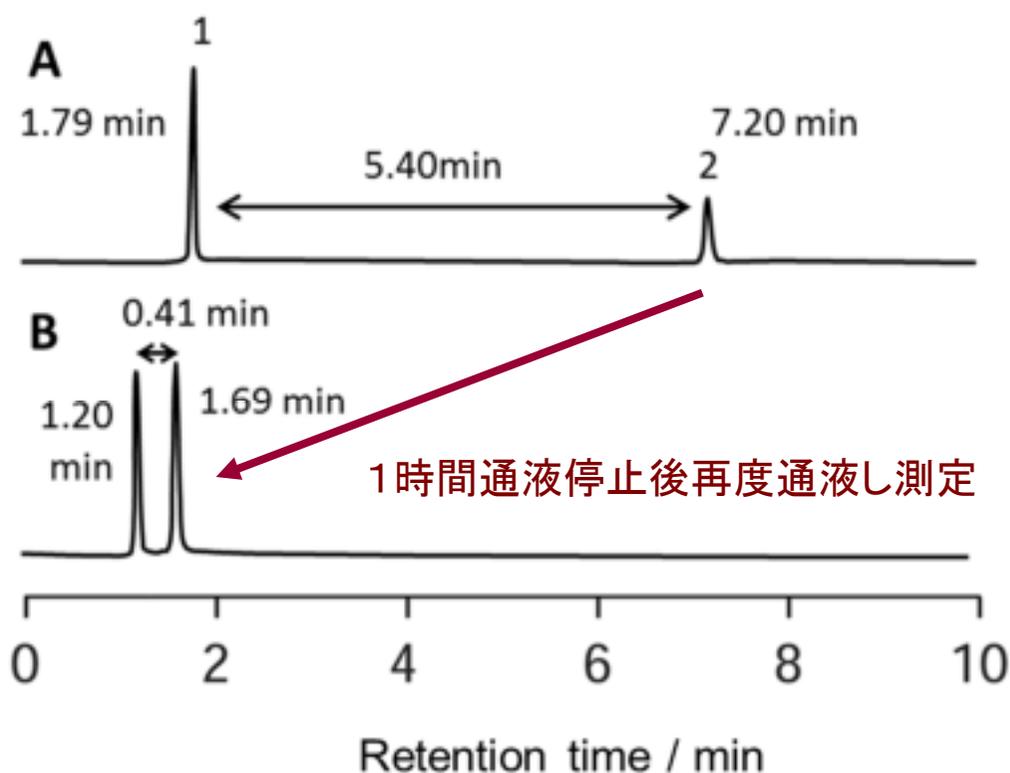
# まとめ

1. C30, C18およびC8の固定相自身の疎水性は大きく異なる.
2. しかし固定相と移動相に分配する溶質から論じた場合, この溶質の分配(濃度)比はどの固定相でもほぼ同じである.
3. つまり, 固定相体積と固定相への溶質の分配量(分配濃度が同じであるため)はほぼ比例し, 保持も同様に比例する.
4. 保持係数( $k$ )は固定相と移動相の分配(濃度)比( $K_d$ )で決まるわけではなく, 分配濃度に固定相・移動相の体積・容積を乗じた固定相中と移動相中に存在する溶質の量により決まる.
5. もちろんアルキル鎖長の違いにより, 選択性は異なる.

逆相アルキル基は  
濡れている, 濡れていない(non-wetting)?  
立ち上がっている, 寝込んでいる?

逆相HPLCにおける水または緩衝液のみの移動相を  
用いた分析の問題点

# 水移動相ではC18カラムの保持が減少する 特にポンプを停止した後は大きく減少



条件

カラム: C18 4.6 x 150 mm

移動相: 水

カラム圧力: 6.0MPa

カラム出口以降: 1.7MPa

流速: 1.0 mL/min

温度: 40 °C

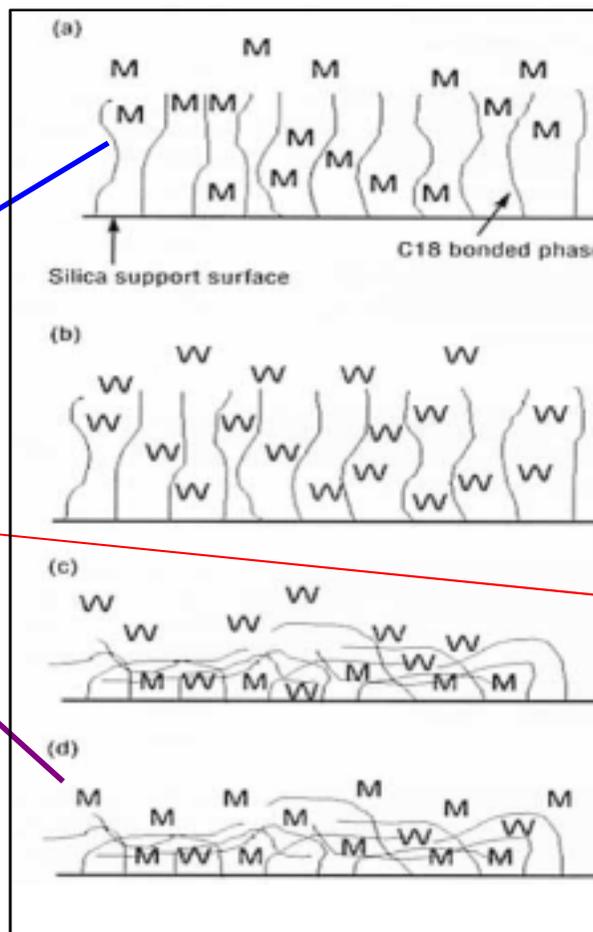
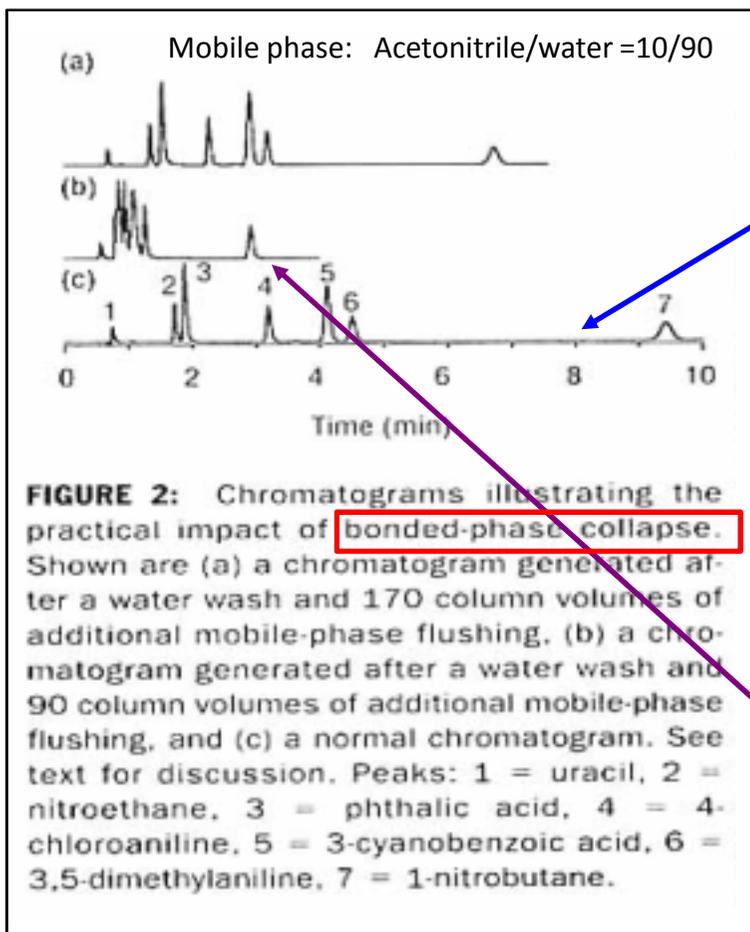
検出: RI

試料: 1. 亜硝酸ナトリウム  
2. 2-プロパノール

保持時間: 5.40minから0.41minに減少 → 再現性がない

# アルキル基の寝込みによる説明

1999年, アルキル基の寝込みによる保持減少の記述



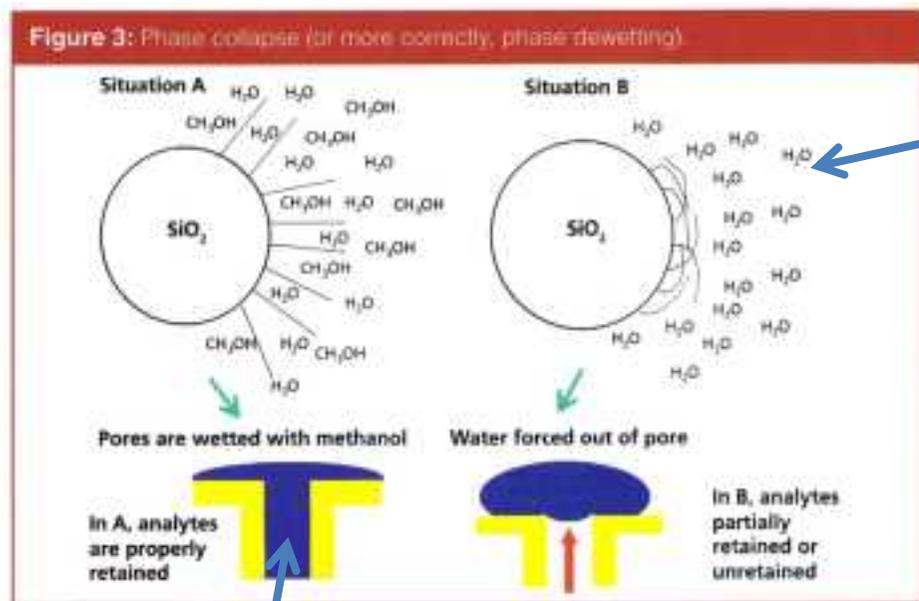
固定相は移動相で濡れている。  
アルキル基は立ち上がっている。

水でカラムを洗浄すると、アルキル基は寝込んでしまう。  
これをBonded-phase collapseと表現している。

再び移動相を流しても寝込みのため、保持は小さくなっている。

# 現在の移動相の細孔からの抜け出しによる説明

2013年, アルキル基の寝込みによるDewettingの結果, 移動相は抜け出る



RONALD E. MAJORS, LCGC North America, Jul 1, 2013

アルキル基は立ち上がっており, 固定相は移動相で濡れている. 移動相は細孔から抜け出さない.

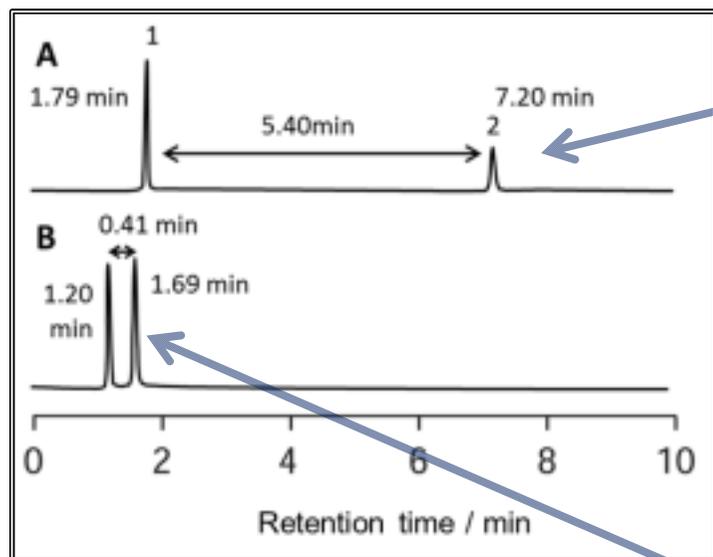
水移動相ではアルキル基は寝込んでしまい, Phase collapseがおこる。Phase collapse状態になると移動相と濡れなくなり, 移動相は細孔から抜け出す。

Dewetting とは

- 1) アルキル基が立ち上がっている状態がWetting
- 2) アルキル基が寝込んだ状態になるとnon-wetting

1の状態から2の状態に変化する事をDewettingと表現している！ or？

# 疑問その1



条件  
 カラム: C18 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

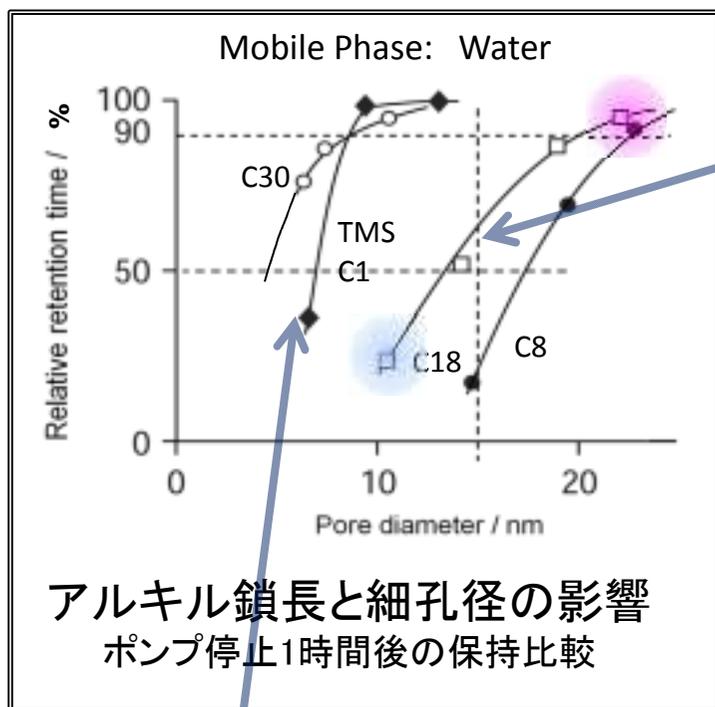
水移動相でポンプを止めなければ、2-プロパノールは保持している。C18アルキル基は濡れているのか？ 寝込んでいるのか (Phase collapse), そうでないのか？

発表者の回答: C18アルキル基は最初から寝込んでいる。Phase collapseしている。C18アルキル基は水に濡れることはない。最初からNon-wettingであり、毛管作用により細孔から抜け出そうとする力が作用するが、充填剤周りにかかる圧力の方が高いため、抜け出さない。

ポンプを1時間停止後、再通液すると保持は減少している。ポンプを停止すると、または充填剤に圧力がかからなくなると、C18アルキル基は寝込むのか？ この状態では移動相は充填剤細孔内から抜け出ている。

発表者の回答: 最初から移動相に濡れていないのであり、C18アルキル基は最初から寝込んでいる。Phase collapseしている。ポンプを止め、カラム圧が大気圧まで下がると、毛管作用により働く抜け出そうとする圧力の方が勝り、水移動相は抜け出てしまう。その後ポンプを動かし、圧力をかけても、大きなヒステリシスの存在で、水移動相は細孔に入り込むことができず、保持は回復しない。20MPa以上の圧をかければ、細孔内に水移動相は入り込み、保持は回復する。

# 疑問その2



N. Nagae, Chromatography, 22, 33 (2001)

細孔径10nmのC1(TMS)はポンプ停止後も保持時間の減少はないが、細孔径が小さくなると保持時間は減少する。C1は寝込みやPhase collapseが物理的に起こりえないが、なぜ保持時間の減少が起こるのか？

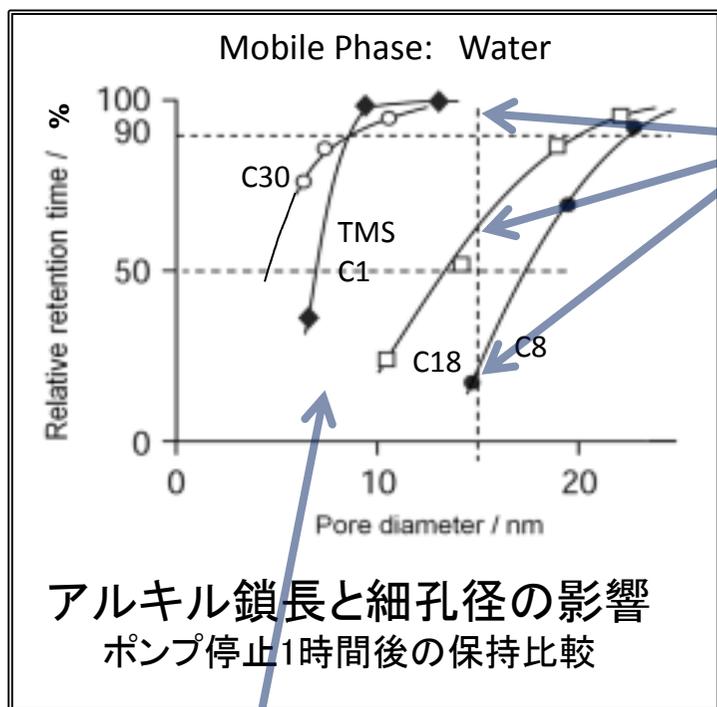
細孔径10nmのC18はポンプ停止後80%程度保持時間が減少しているに対し、22nmのC18はほとんど保持時間の減少がない。

10nmではC18アルキル基が寝込み、水に濡れていないが、22nmでは固定相は水に濡れていて、C18アルキル基は寝込んでないのか？

発表者の回答: 細孔径が10nmでも22nmでもC18アルキル基の状態は同じである。両者ともC18アルキル基は寝込んでおり、水移動相に濡れていない。毛管作用で水移動相は細孔から抜け出る。この毛管作用力は細孔径に反比例する。細孔径の大きな22nmではこの毛管作用力は大気圧に勝てないため、水移動相は細孔から抜け出ず、保持時間は減少しない。

発表者の回答: そもそも水移動相を流し、保持をしているときには常に固定相に移動相が濡れている訳ではない。濡れていなくても溶質は固定相と移動相に分配し、保持する。ヘキサンと水を用い分液ロートで溶質を分配させるように、0.2-0.3nmの隙間の存在下の界面で接している2液間でも溶質は分配する。つまり固定相と移動相が0.3nmの隙間があっても接していれば分配し、保持する。分離において固定相は移動相で濡れる必要はない。アルキル基の寝込みPhase collapseにより濡れなくなると言うことではない。

# 疑問その3



N. Nagae, Chromatography, 22, 33 (2001)

同じ細孔径でC8はもっとも保持時間の減少が大きくC30が最も保持時間の減少が少ない。またC18はその中間であるのはなぜか？

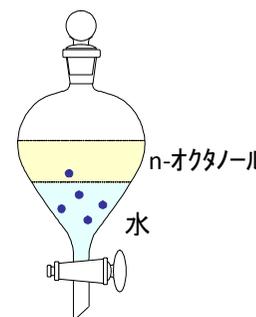
発表者の回答: 細孔から水移動相が抜け出す力は表面と水との接触角のコサイン値で決まる。つまり水との接触角はC8で約140度, C18で126度, C30では104度で, C8が最も大きな接触角であるので, 最も大きな毛管作用力が働く。

疎水性の高い固定相の方が接触角が大きく, 濡れないのでは？

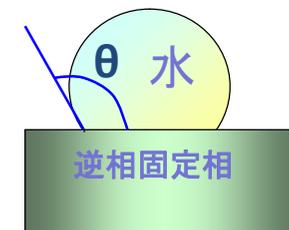
発表者の回答: 疎水性はn-オクタノールと水との間の分配比で表されるパラメーターであるのに対し, 濡れ性は接触角のパラメーターである。両パラメーターは定義が異なるため, 同一視することはできない。疎水性が高いからと言って濡れ性(撥水性)が高いとは限らない。

全ての固定相で細孔径が小さいほど保持時間の減少度合いが大きいのはなぜか？

発表者の回答: 細孔径が小さいとアルキル基が寝込みやすくなることはない, そもそも水移動相では最初から寝込んでいると考えられる。保持時間の減少は毛管作用による水移動相の細孔からの抜け出しであるため, 細孔径が小さいほど, 毛細管内径が小さいほど大きな力が働き, 抜け出しやすくなる。



疎水性



濡れ性・撥水性

# 最新のC18固定相のシミュレーション

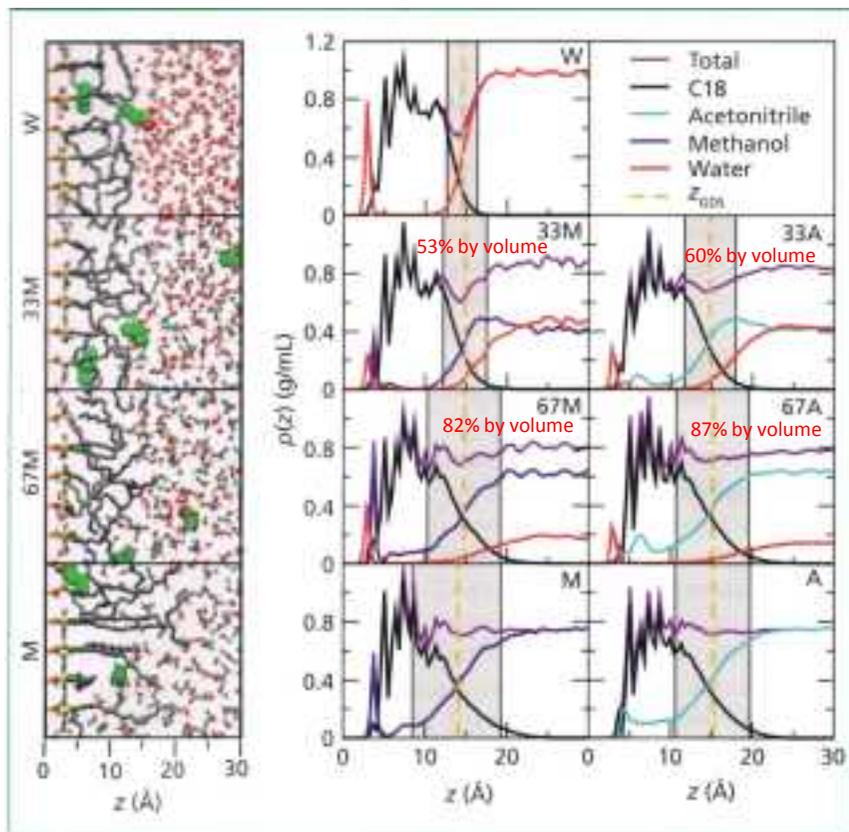
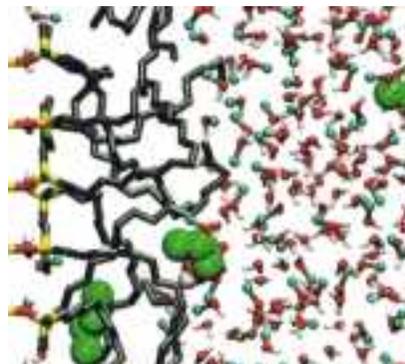


Figure 1: Left: Snapshots from simulations in different solvents, C<sub>18</sub> chains (gray), and alkane and alcohol solutes (large spheres with green, red, and white indicating CH<sub>2</sub>, hydroxyl oxygen, and hydrogen, respectively). Middle and right: Density profiles of C<sub>18</sub> chains, methanol, water, and acetonitrile for pure water (W), pure methanol (M), pure acetonitrile (A), and solvent mixtures given as mole percent. T = 323 K, grafting density of 2.9 μmol/m<sup>2</sup>. Adapted, in part, from references 4 and 14.

左図から有機溶媒0%から53%までC18アルキル基はほとんど寝込んだ状態である。有機溶媒が増えることにより、固定相との溶媒和が起こり、固定相表面に溶媒和相が形成される。しかし有機溶媒は固定相内部まで入り込むことはなく、有機溶媒100%でも10Å程度のC18の塊が存在する。オクタデカン(C18H38)がメタノールと混ざり合わないことから、メタノールだけの移動相であってもC18アルキル基が立ち上がり、メタノール分子が固定相内部に深く入り込むことはない。

メタノール:水(53:47)移動相



## 疑問その4

30%メタノール移動相を用いた場合、通常保持の変化は認められない。Phase collapseしていないのか？してても濡れているのか？

発表者の回答: 30%メタノール移動相でもC18固定相には濡れてない。70%メタノールはC18固定相には濡れる。両条件でもC18アルキル基は寝込み固まっている状態である。つまり寝込み(Phase collapse)と濡れ性は無関係である。

## 疑問その5 C18表面と30%メタノールは濡れるか？



それぞれの溶液にC18充填剤を混ぜ、超音波の振動を加えながら攪拌混合した。

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

(濡れるため、細孔内に溶液が入り込み分散する)

- ・50%メタノールでは一部分散している.  
(超音波振動を加えない場合は全く分散しない)  
(濡れないため、細孔内に溶液は入り込めない)

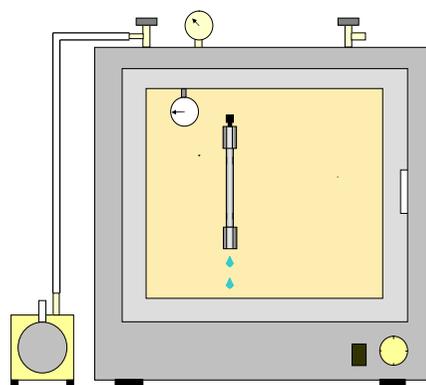
- ・30%メタノールでは全く分散していない.  
(濡れないため、細孔内に溶液は入り込めない)

T. Enami and N. Nagae, BUNSEKI KAGAKU, 53 (2004) 1309.

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

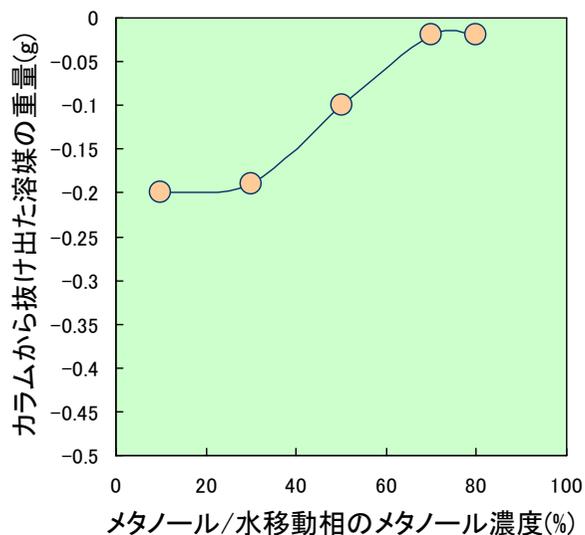
濡れ性は固定相の寝込み(Phase collapse)で決まるのではなく、移動相(溶液)により決まる。

# 疑問その6 大気圧が低ければC18カラムから移動相は抜け出すか？



カラム: C18 250x4.6mm  
 模擬大気圧: 0.01MPa  
 カラム温度: 40 °C

- \* 真空ポンプでカラム内の圧力を大気圧以下にし、20分間放置
- \* 充填剤細孔から移動相が抜けた場合にはカラムの重量が変化



\* 70%以上のメタノールをカラムに通液した場合は0.01MPaでも充填剤細孔からの移動相溶液の抜け出しはほとんど認められず、50%以下では移動相溶液は抜け出している。

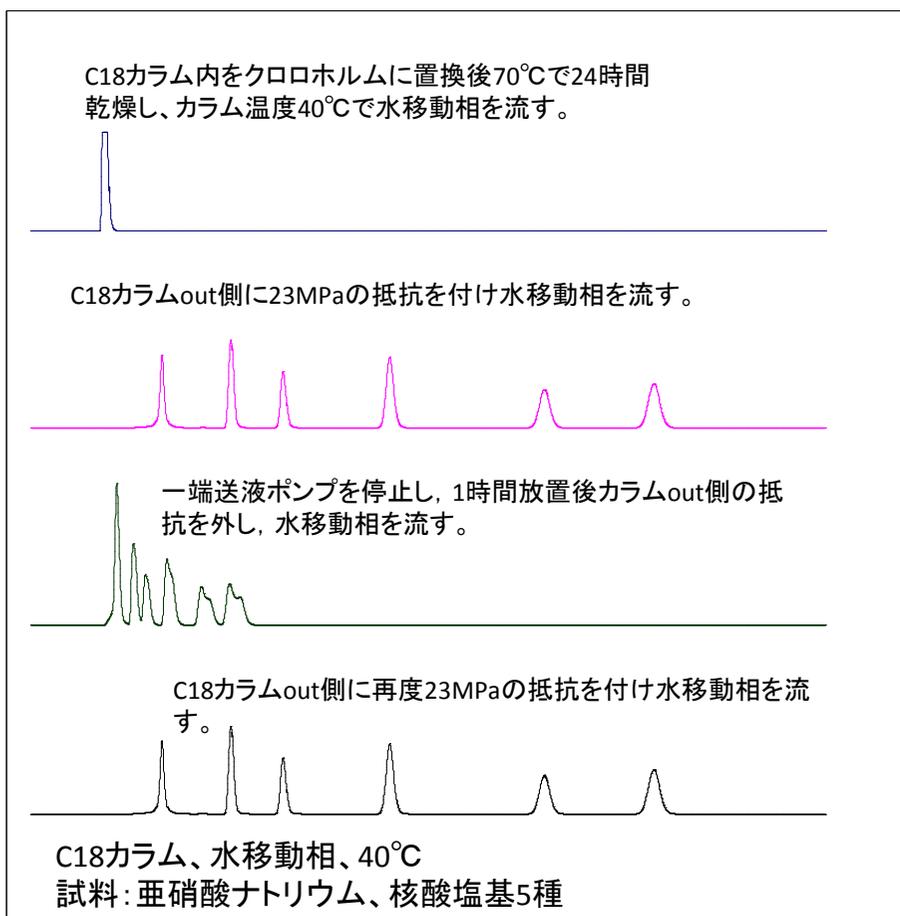
\* 70%以上のメタノールではC18充填剤が濡れるため、毛管作用により細孔内へ入り込む力が働き、充填剤細孔から溶液は抜け出さないが、50%以下では濡れないため、抜け出そうとする。

発表者の回答: 毛管作用とは、濡れる(接触角が90度未満)場合には毛細管内に入り込む力が働き、逆に濡れない(接触角が90度より大きい)場合には毛細管から抜け出す力が働くことである。

メタノール濃度50%以下の濃度ではC18充填剤の細孔内から移動相を抜き出す力が働く。その力が0.01MPaより大きいため左図に示されているようにカラムから移動相溶液が抜け出す。

通常10%以上のメタノール濃度の移動相を用いれば、保持の減少は起こらない。これはC18充填剤細孔内から移動相溶液を抜け出させる圧力が大気圧(1気圧)より低いためである。

# 疑問その7 C18表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？



T. Enami and N. Nagae, BUNSEKI KAGAKU, 53 (2004) 1309.

発表者の回答: 乾燥操作を行っているので、固定相のアルキル基と有機溶媒は溶媒和していない。(アルキル基は寝込んでいるCollapseしていると考えられる。) 充填剤細孔内には移動相は入り込むことなく試料は保持も分離もされない。

カラムout側に、毛管作用で働く圧力を超える23MPaの背圧を加えると、水移動相は充填剤細孔内に入り込み、試料は保持し、分離される。

送液ポンプを停止し、充填剤周りの圧を大気圧まで下げると、毛管作用により水移動相は充填剤細孔内から抜け出す。カラムout側の背圧をかけない状態で再通液すると保持は減少し、分離は悪くなっている。

再度23MPaの背圧を加えると、水移動相は再び充填剤細孔内に入り込み、試料は保持し、分離される。

左図の全ての分離で、水移動相はC18固定相に濡れていない。固定相と移動相は濡れれなくても、ある界面で接していれば溶質は分配し、保持し分離できる。

## 疑問その8 Dewetting は起こっているのか？

C18固定相, メタノール:水(70:30)移動相



固定相は移動相で濡れている  
Wetting 保持の変化はない

C18固定相, メタノール:水(50:50)移動相  
C18固定相, メタノール:水(30:70)移動相



固定相は移動相で濡れていない  
Non-wetting 保持の変化はない

C18固定相, 水移動相



固定相は移動相で濡れていない  
Non-wetting 保持は変化する

発表者の回答: 固定相が濡れている(Wetting)と濡れていない(Non-wetting)は、固定相の状態が変わると言うよりも、移動相溶液が異なることにより、濡れている状態と濡れていない状態になることである。メタノール:水(70:30)移動相溶液はC18固定相に濡れるが、メタノール:水(30:70)移動相溶液や水はC18固定相に濡れない。したがって、Wetting 状態からNon-wetting 状態への変化は溶液の組成比の変化で起こっており、C18固定相の状態が変化しWetting 状態からNon-wetting状態に変わっているのではない。

移動相溶液の組成の変化でWetting からNon-wetting なることをDewetting と言うのであればDewetting は起こっている。しかし通常は溶液組成を変えることにより、濡れ性が変化することをあえてDewetting と言わないと思われる。また固定相の状態の変化で、初めは水に濡れており、試料は保持するが、その後時間の経過とともに水には濡れなくなり、試料の保持が減少するのであれば、Dewetting は起こっている。しかし実際には後者のような現象は起こっていない。

# まとめ

- ◆ 逆相固定相に移動相溶媒が濡れない場合，毛管作用で移動相溶媒は充填剤細孔から抜け出す力が働く。
- ◆ その力(圧力)が大気圧より大きい場合に細孔内から移動相溶媒は抜け出る。
- ◆ Dewetting の意味の定義をしっかりと定める必要があると思われる。Wetting と Non-wetting状態は確認できるが，移動相溶液が変わらなければ，Wetting から Non-wetting状態への変化は起こらない。
- ◆ 水移動相を用いた場合の逆相カラムのさまざまな現象については下記の総合論文に詳しく記載されている。

BUNSEKI KAGAKU Vol. 59, No. 3, pp. 193-205 (2010)  
© 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<sup>1</sup>

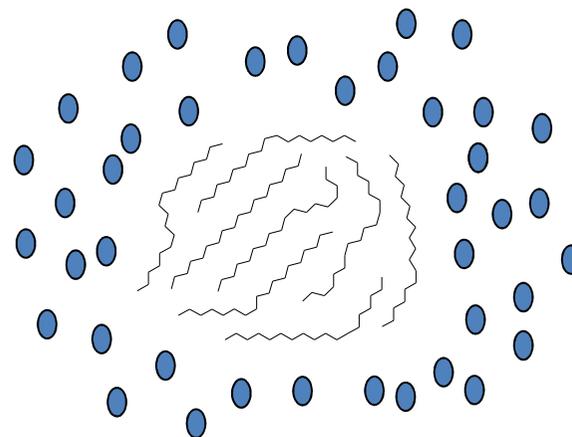
逆相固定相のアルキル基：寝込んで  
(絡み合っ)ているのか (Ligand Collapse)  
または立ち上がっているのか？

一般的にはアルキル基は立ち上がって  
いると考えられている？

しかし視点を変えると違った見方ができる

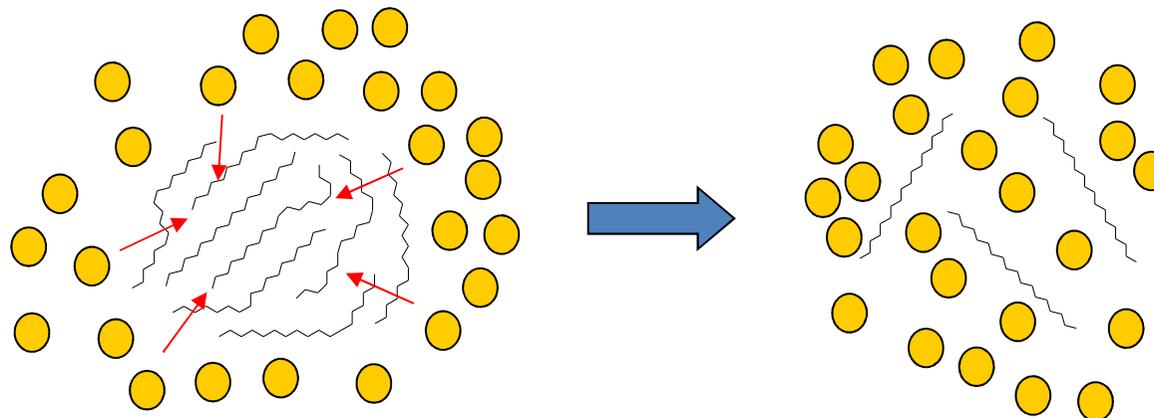
# 有機溶媒中でのオクタデカンの状態

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



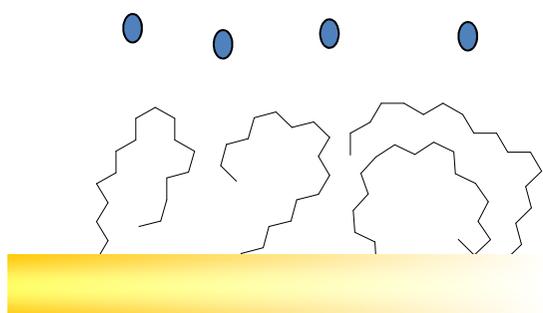
メタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとると考えられる。

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



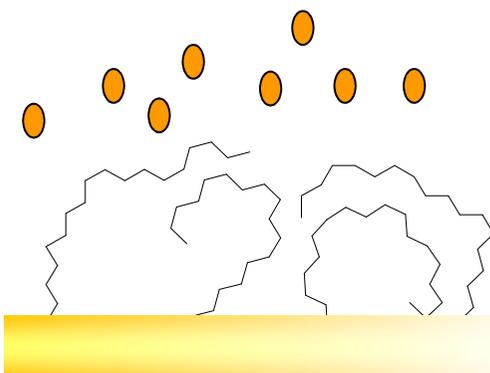
# C18表面上での溶媒和の概略図

## メタノール



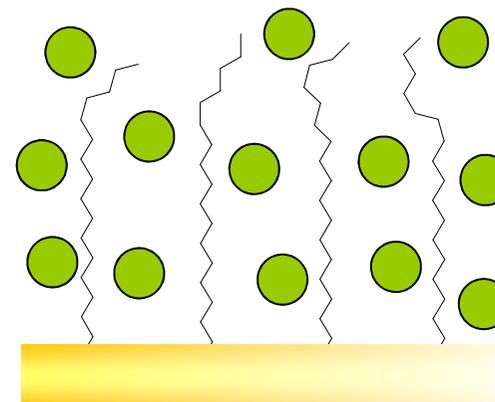
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している。

## アセトニトリル



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

## テトラヒドロフラン



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

ほとんど(80%以上)固まった状態であると推測される

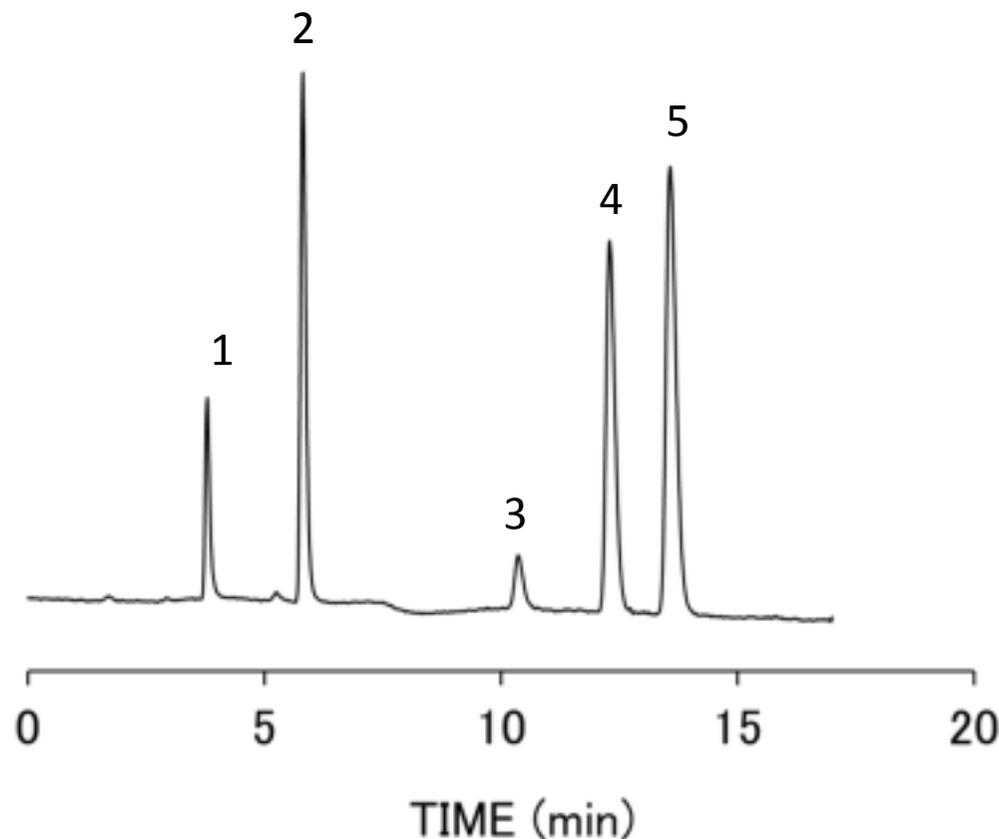
# 移動相中の有機溶媒の固定相への溶媒和の測定

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: C18 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

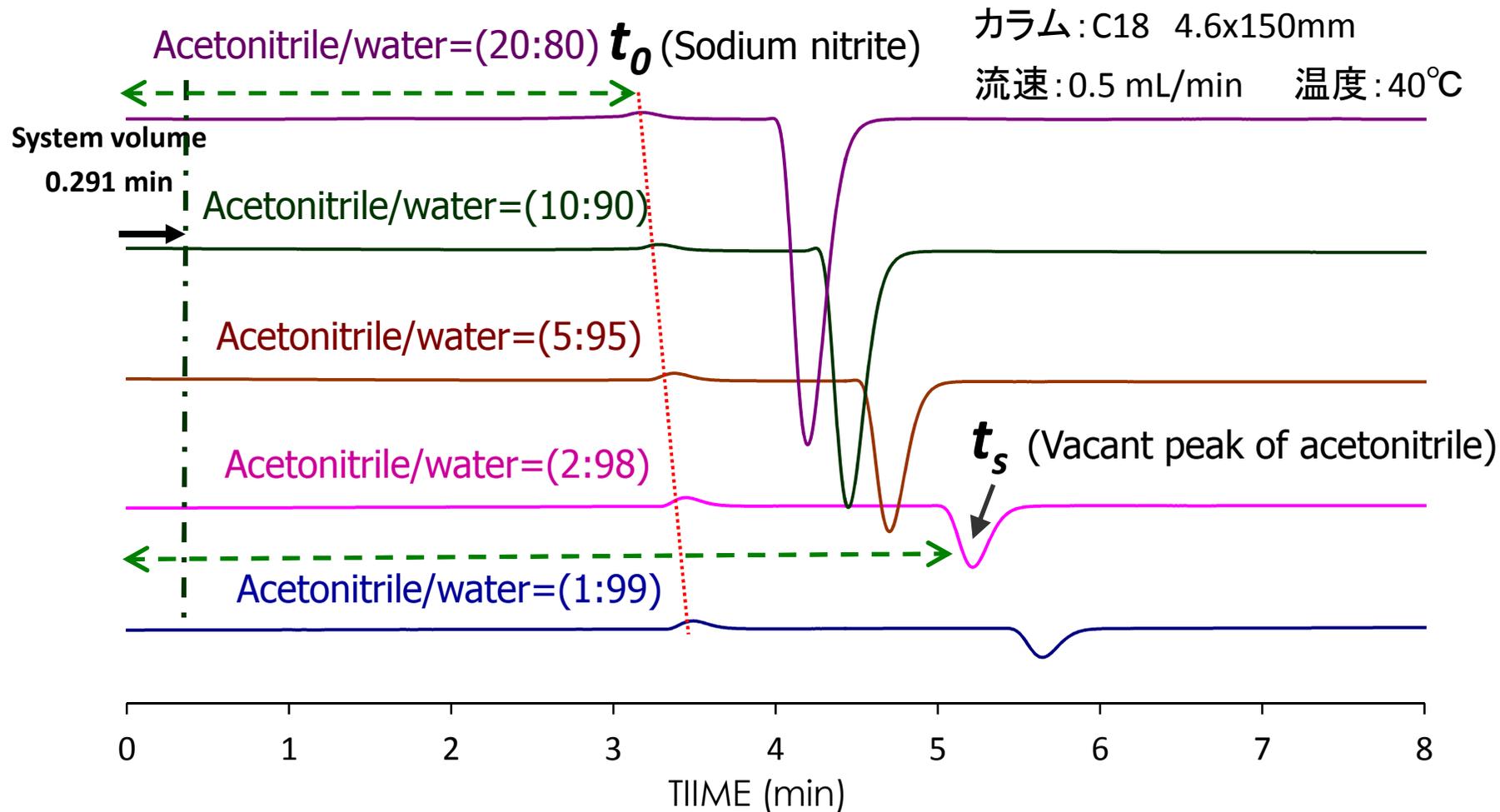
3. アセトニトリル

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



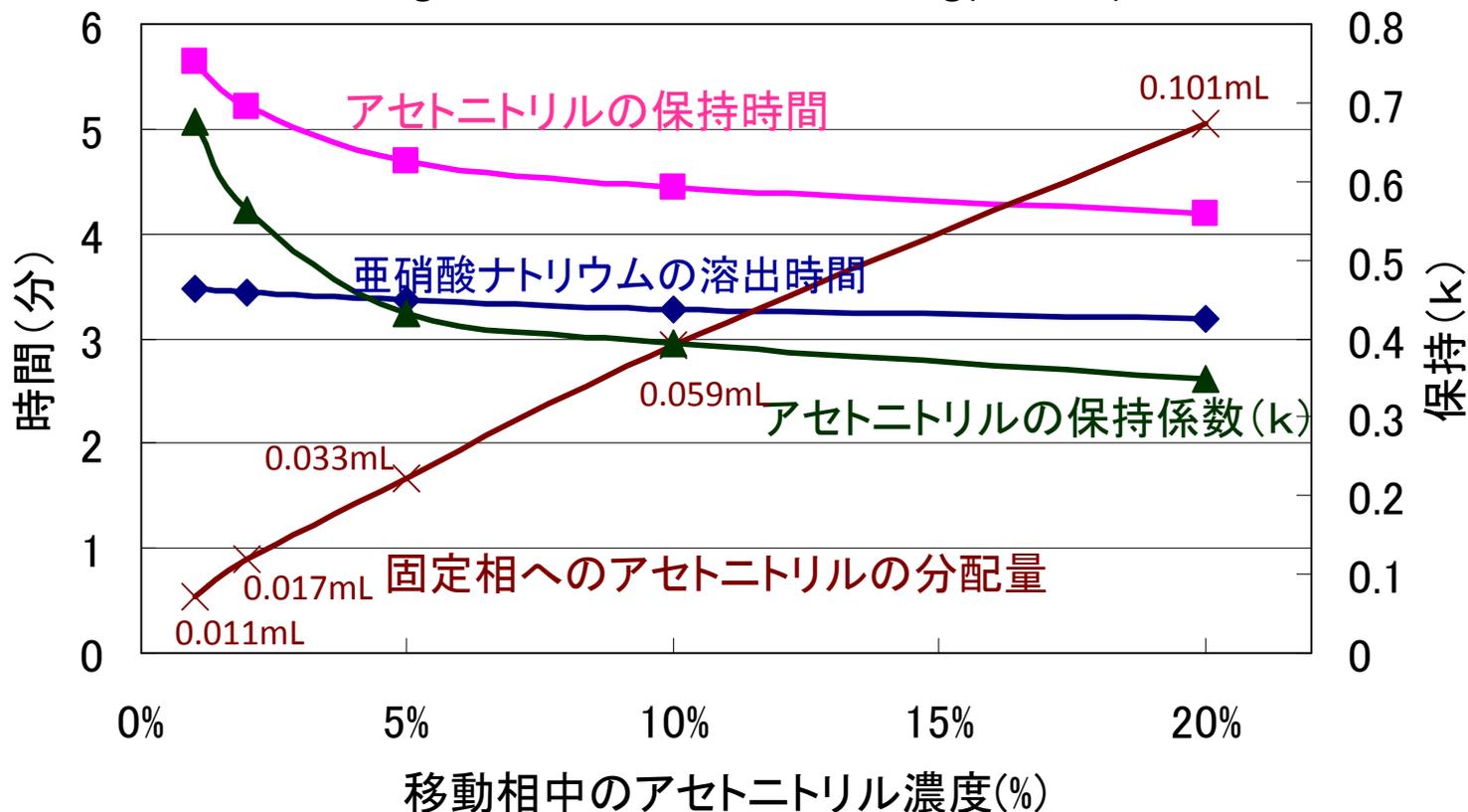
アセトニトリルは保持しており、固定相中に分配する。この分配量を溶媒和量とする。

# 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

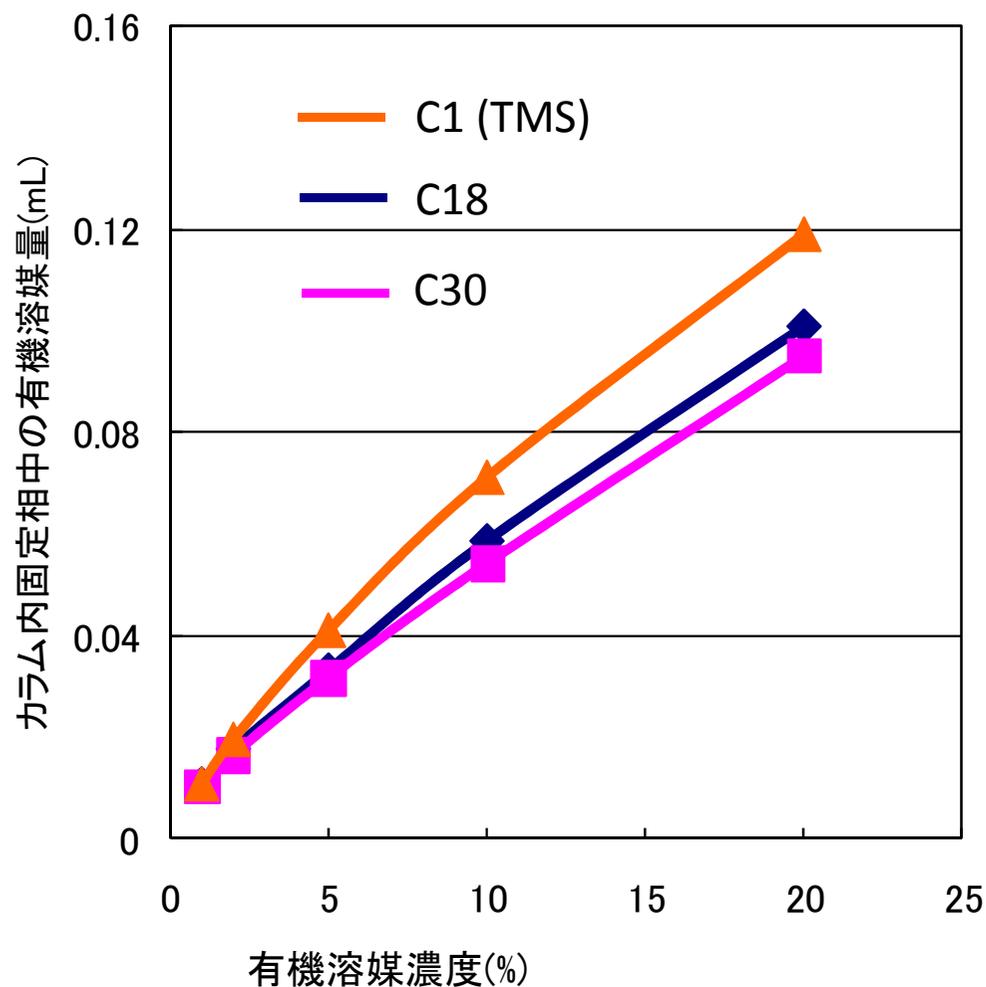
$$k = (t_s - t_0) / (t_0 - \text{system volume}) \quad k = S / M \quad S = k \times M$$

カラム: C18 4.6x150mm, 流速: 0.5 mL/min

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



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



カラム: C1 (TMS, %C: 5%)

C18 (%C: 16%)

C30 (%C: 16%)

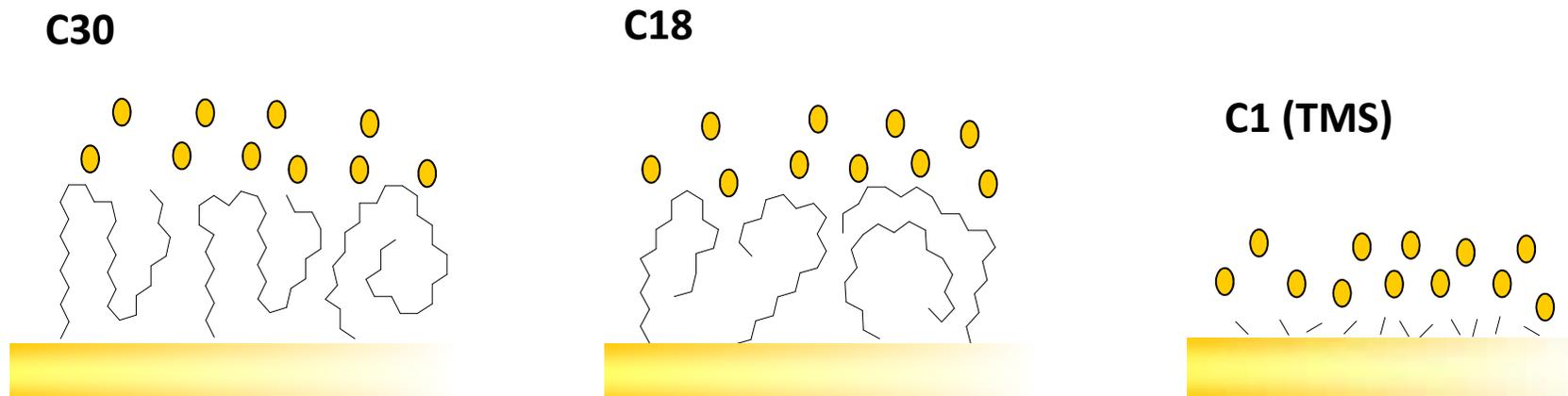
4.6x150mm

アルキル鎖長が長くなっても溶  
媒和量は大差ない。

# C1, C18およびC30固定相の状態

移動相: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O

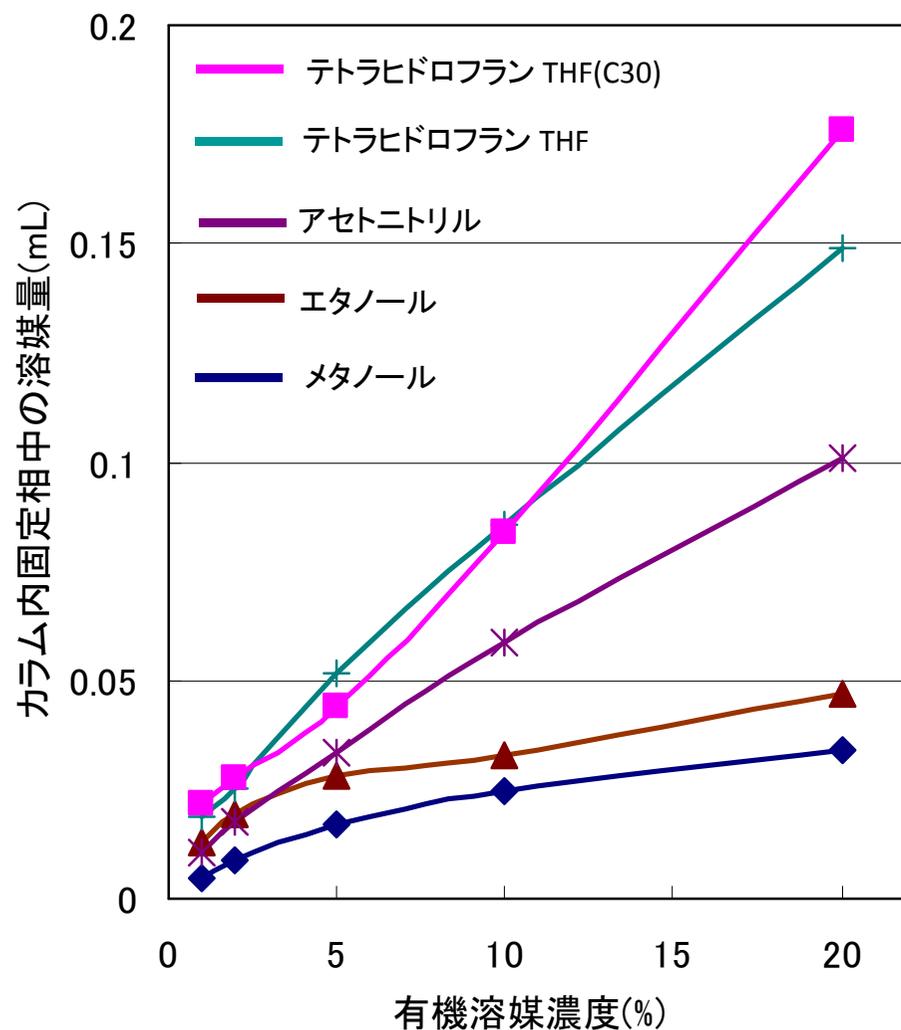
● : Acetonitrile



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C30)  
4.6x150mm

1) 4.6x150mmカラムにC18充填剤は約1.5g入っている.

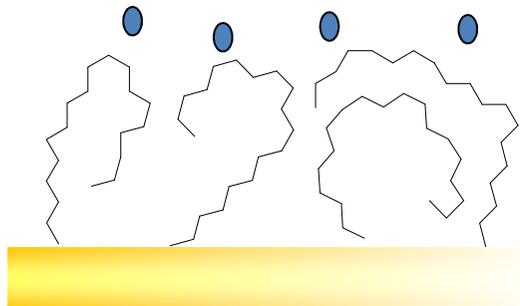
2) C18の炭素含有量16%  
C30の炭素含有量16%

カラム内のオクタデシル基の容量は約0.35mLと計算される.

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

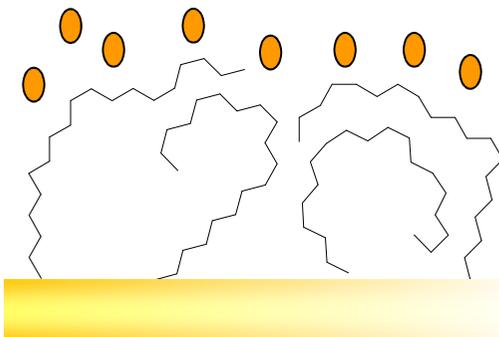
# C18表面上での溶媒和の概略図

## メタノール



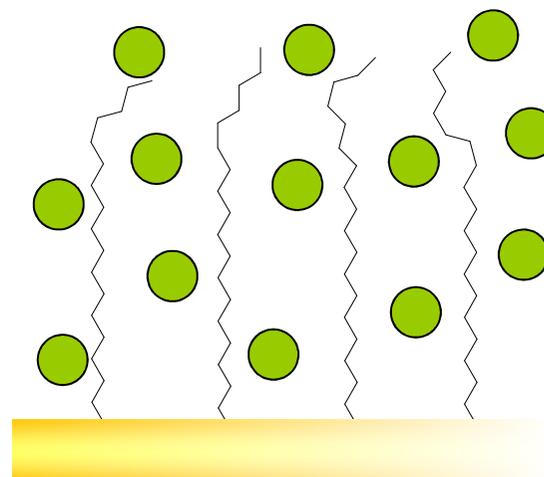
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している。

## アセトニトリル



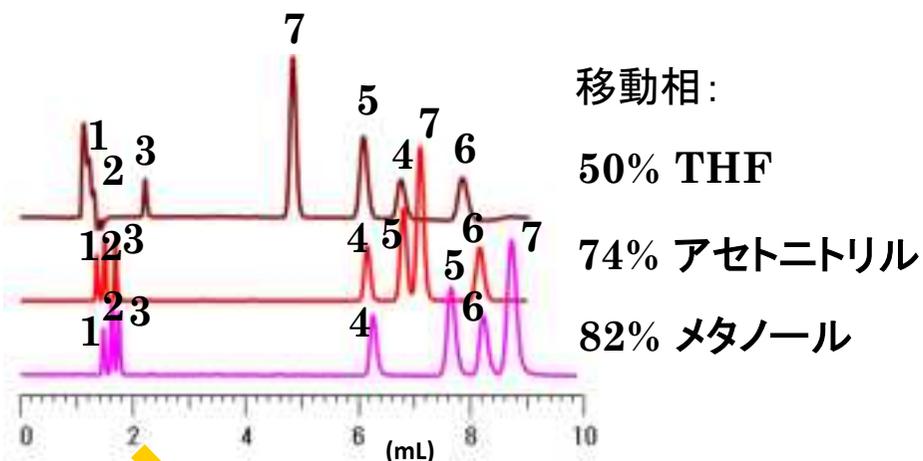
オクタデシル基は寝込んでおり、表面にアセトニトリルが溶媒和している。

## テトラヒドロフラン



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

# 有機溶媒による $t_0$ の変化



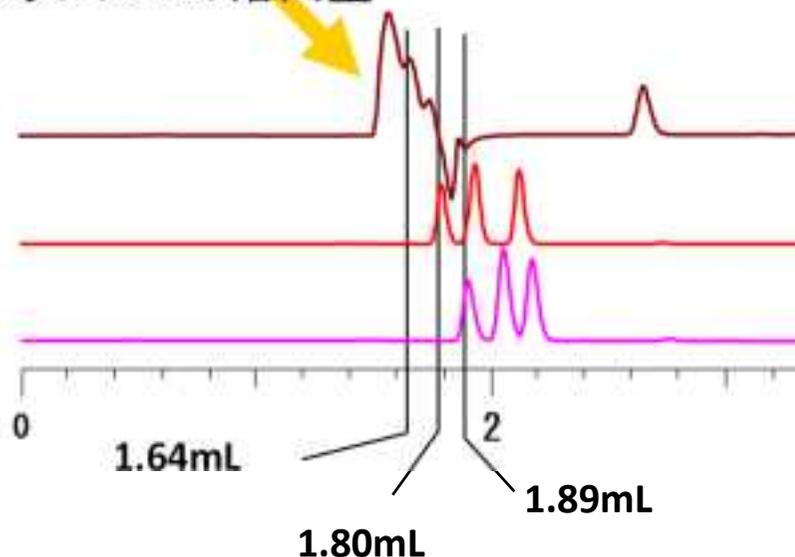
カラム: C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm.

アミルベンゼンの溶出量が約8mLになるように有機溶媒と水との混合比を決定

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

ウラシル $t_0$ の溶出量

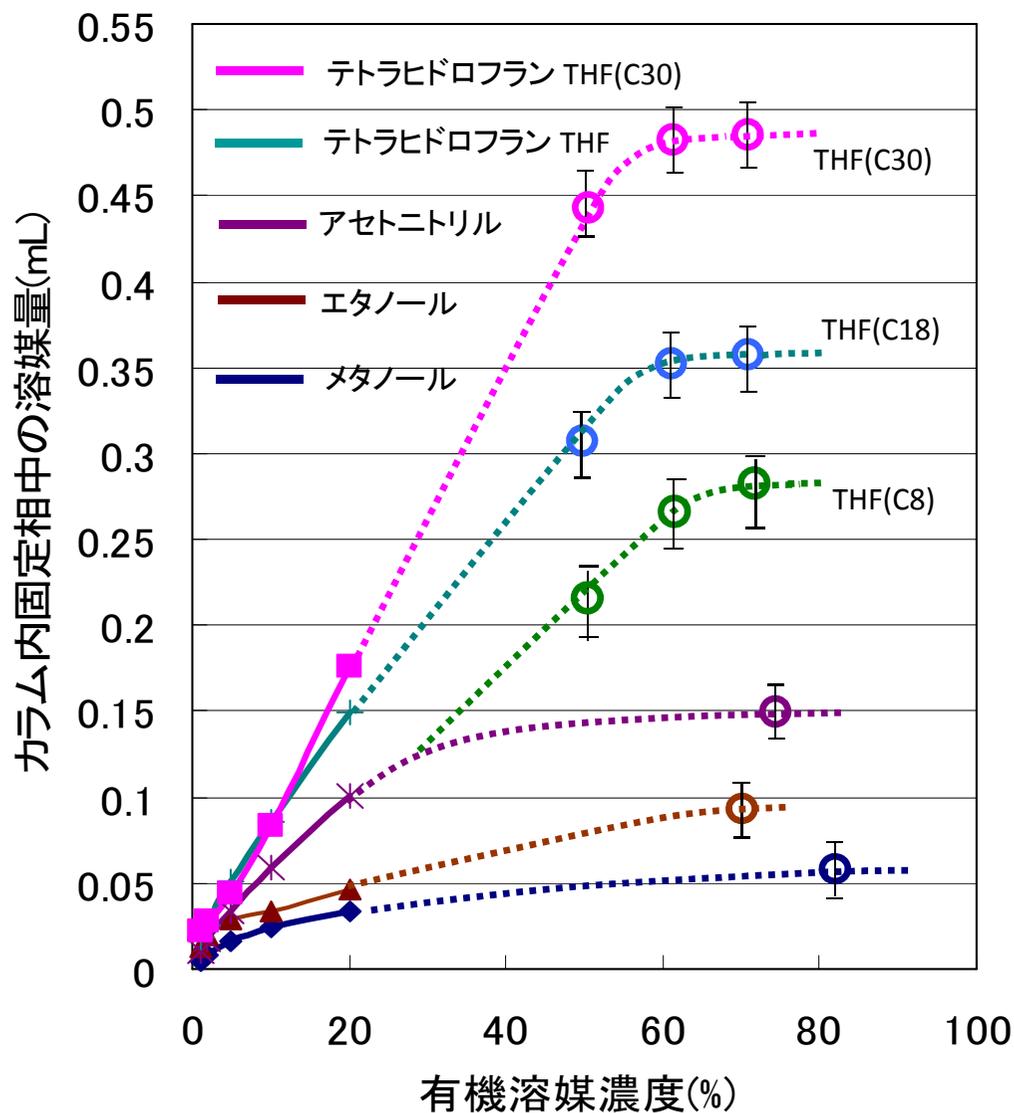


1) 溶媒和した有機溶媒とアルキル基の両方が固定相として働く。

2) 溶媒和量の多い場合に $t_0$ は小さくなる。

3) THFはメタノールに比べ, 0.25mL (=1.89-1.64) 多くアルキル基に溶媒和していることになる。

# C18固定相への分配量(溶媒和量)



カラム : C18, C30, C8

4.6x150mm

1) 4.6x150mmカラムにC18充填剤は約1.5g入っている。

2) C18の炭素含有量16%

C30の炭素含有量16%

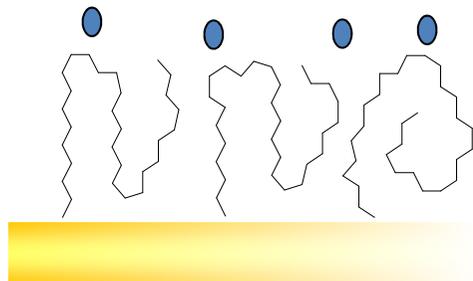
カラム内のアルキル基の容量は約0.35mLと計算される。

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

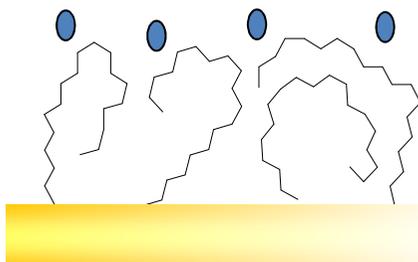
82%メタノールの溶媒和量を0.06mLと仮定すると, ウラシルの溶出量から74%アセトニトリルと50%THFの溶媒和量はそれぞれ0.15mLと0.31mLとなる。

# C30,C18,C8固定相の状態

**C30 %C 16%**

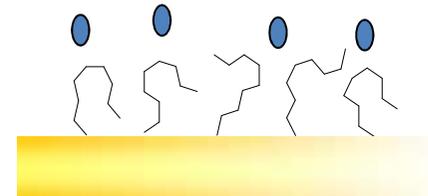


**C18 %C 16%**

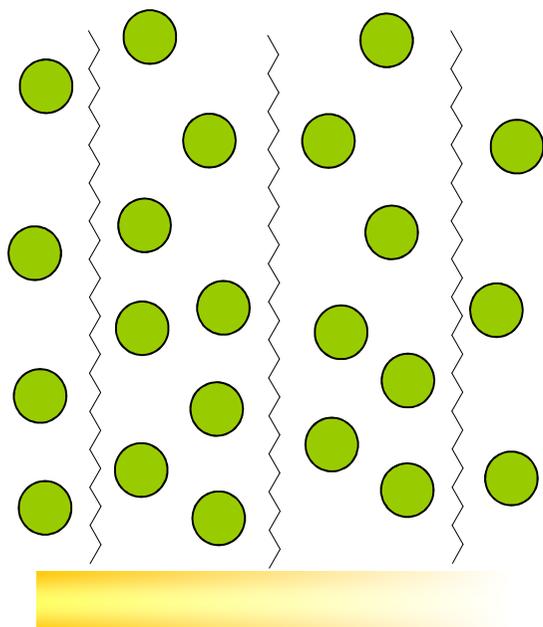


**CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25**

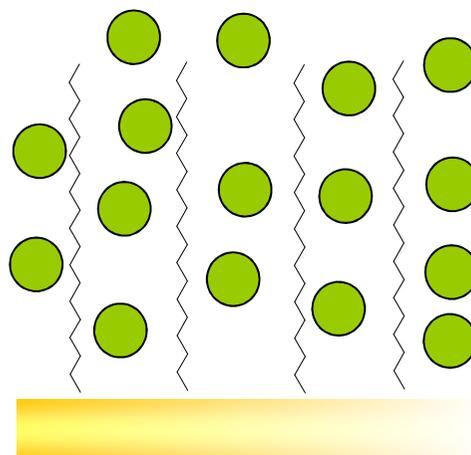
**C8 %C 10%**



**C30**

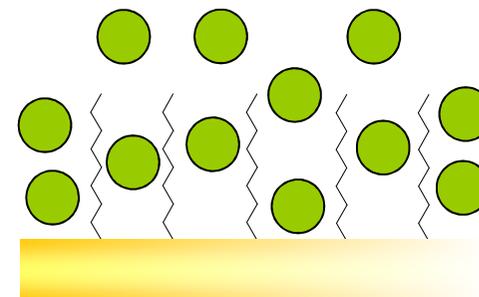


**C18**



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

**C8**

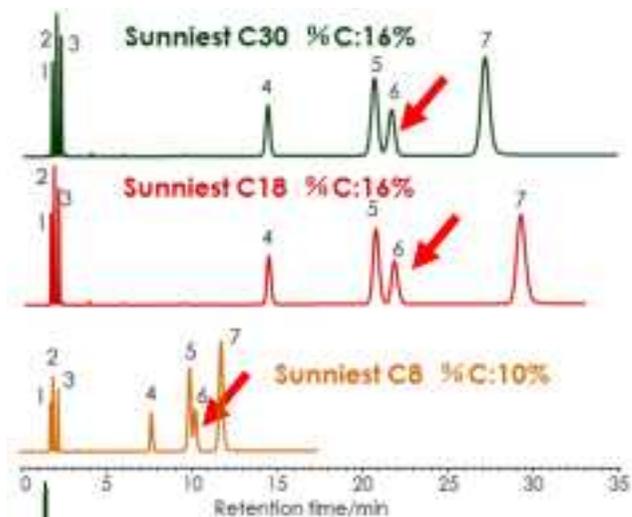


● : メタノール

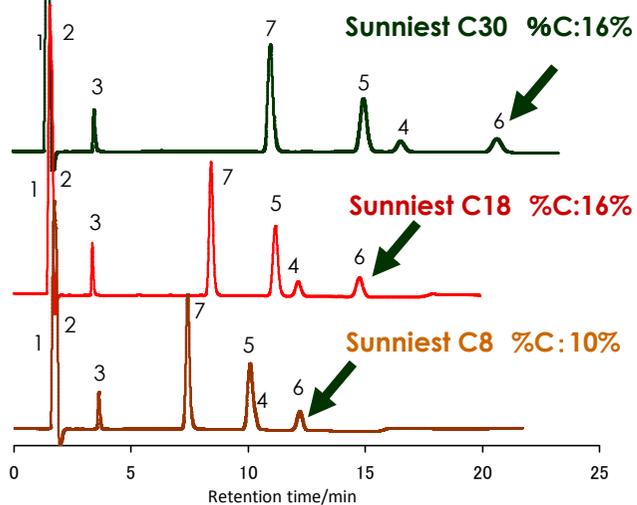
● : THF

# メタノールとテトラヒドロフラン (THF) の差

メタノール



THF



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

Mobile phase:

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

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

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil,

2 = Caffeine,

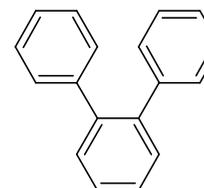
3 = Phenol,

4 = Butylbenzene,

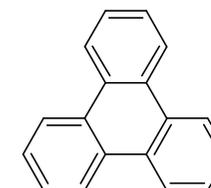
5 = o-Terphenyl,

6 = Amylbenzene,

7 = Triphenylene



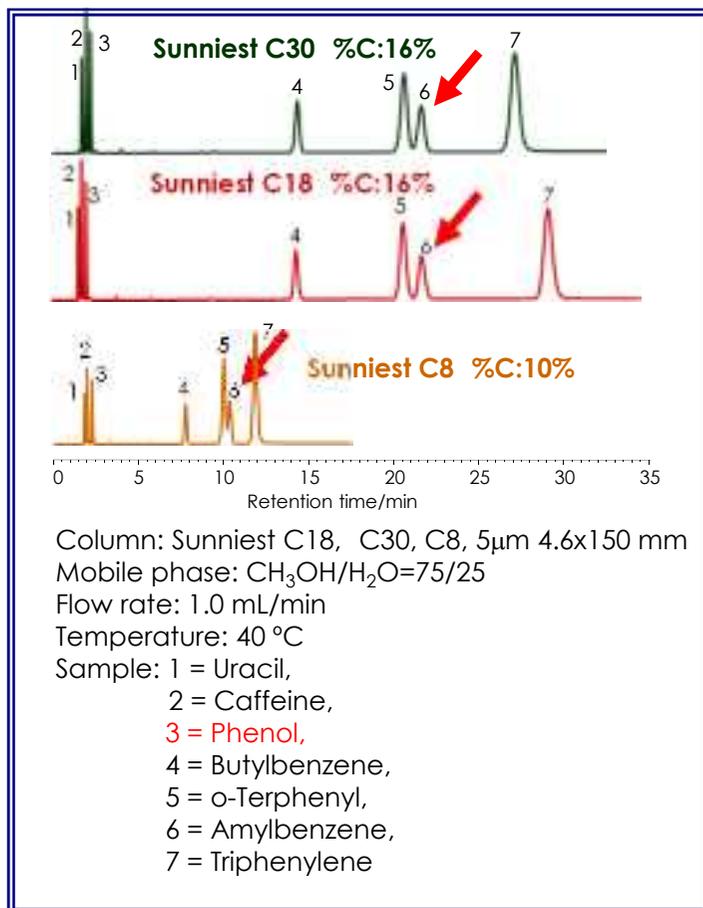
Peak 5



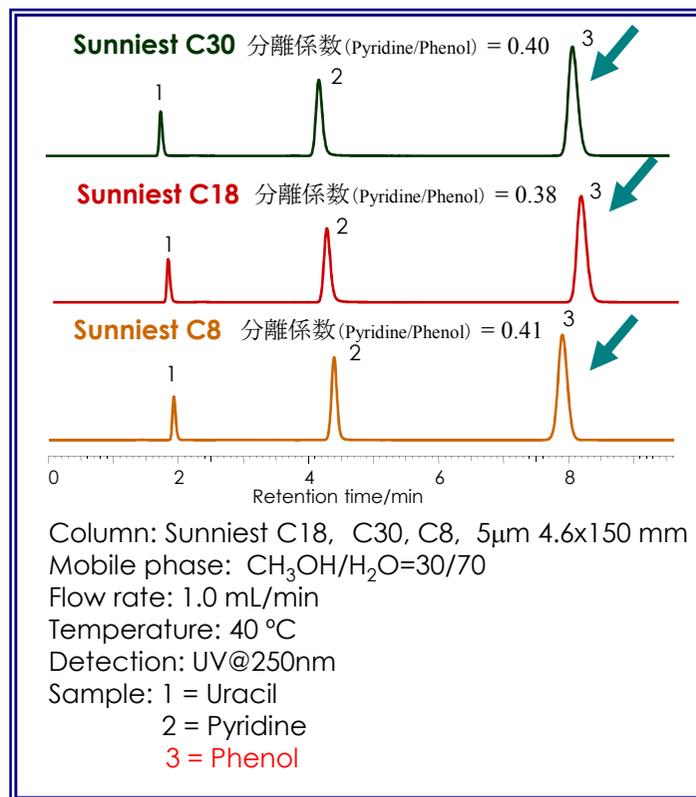
Peak 7

# メタノール・水移動相における アミルベンゼンとフェノールの保持

## ◆標準試料の分離例



## ◆ピリジンとフェノールの分離



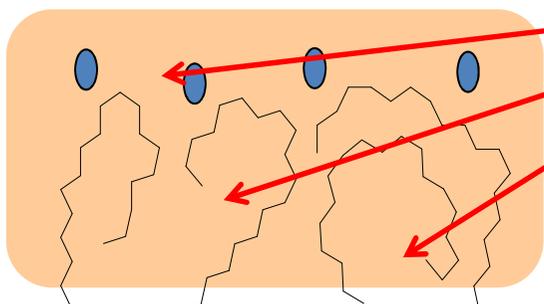
C8はC18とC30に比べ、アミルベンゼンの保持は半分であるが、フェノールの保持はほぼ同じである。

# 試料とC18固定相の相互作用場

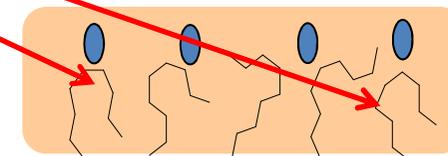
メタノール・水移動相

● : メタノール

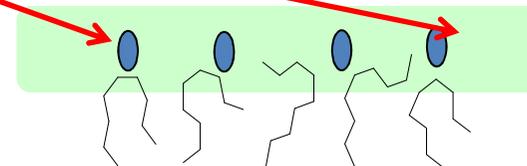
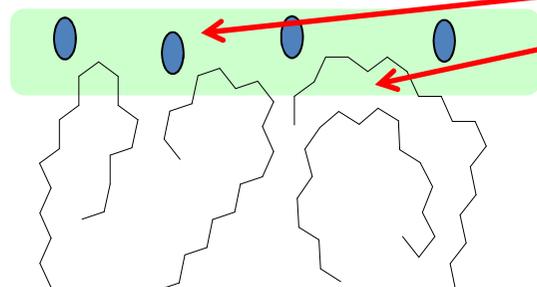
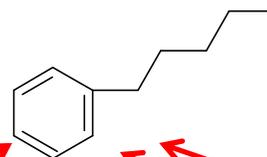
C18



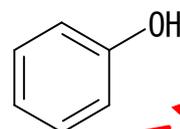
C8



アミルベンゼンは  
オクタデカンに可溶



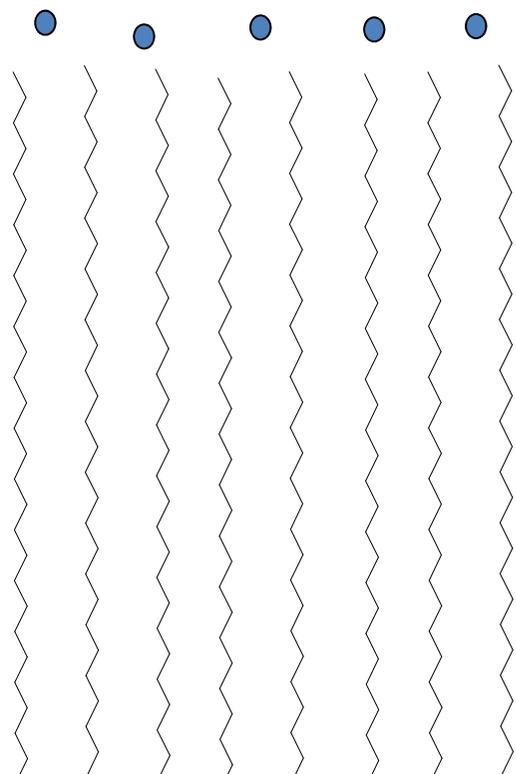
フェノールは  
オクタデカンに難溶



# 層の厚い固定相 (C30)と 層の薄い固定相 (C18)の比較

ノンポーラスシリカにポリメリックC30とモノメリックC18を結合

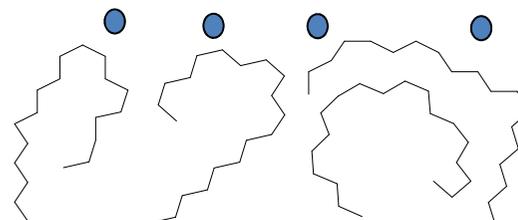
NP-C30, %C:0.23%



炭素含有量は約1/4で層の厚みも約1/4



NP-C18, %C:0.06%



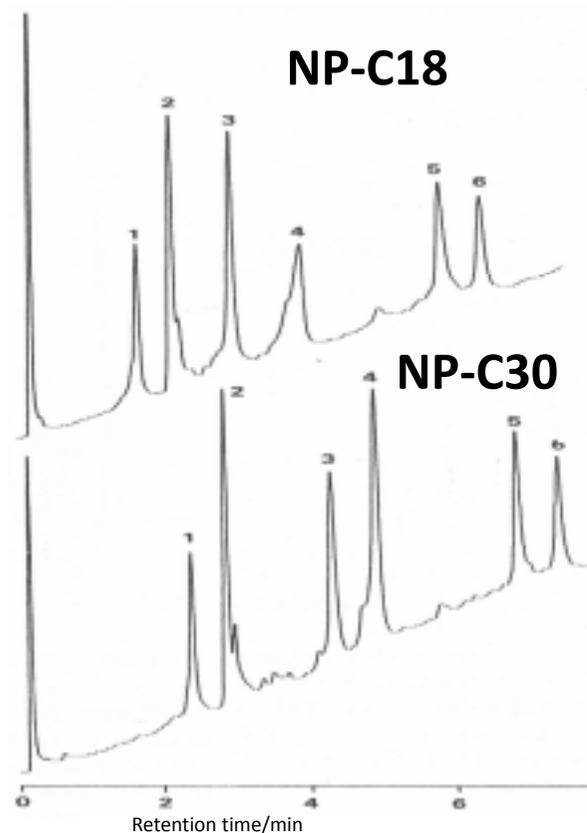
# NP-C30とNP-C18の比較 タンパク質の分離

4.6x30mm

A) 0.1%TFA,

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

グラジエント溶離

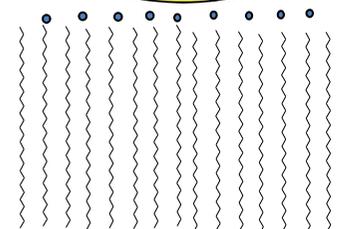


Sample: 1 = Ribonuclease,  
2 = Insulin,  
3 = Cytochrom C,  
4 = Lysozyme,  
5 = Myoglobin,  
6 = Carbonic anhydrase

タンパク質



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

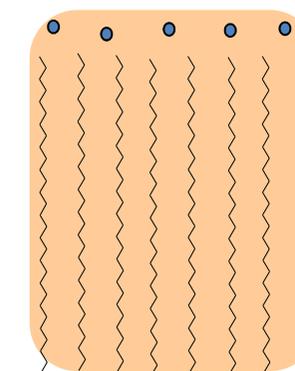
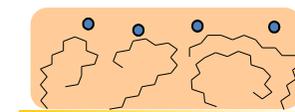
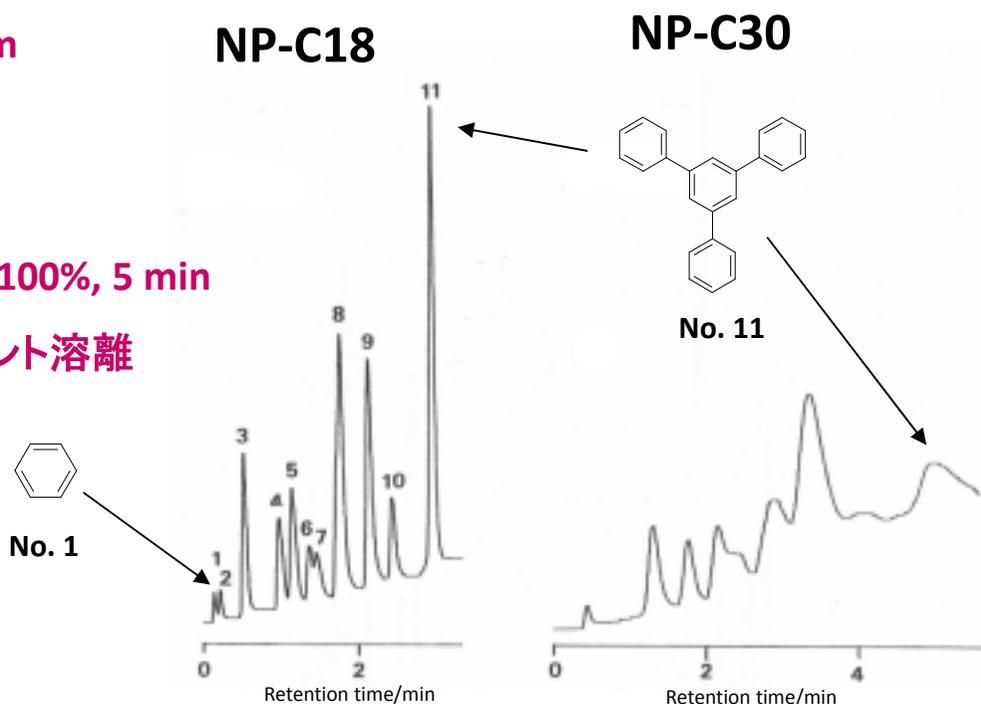
4.6x30mm

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



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

# NP-C30とNP-C18の比較

## ナギのメタノール抽出成分の分離

4.6x30mm

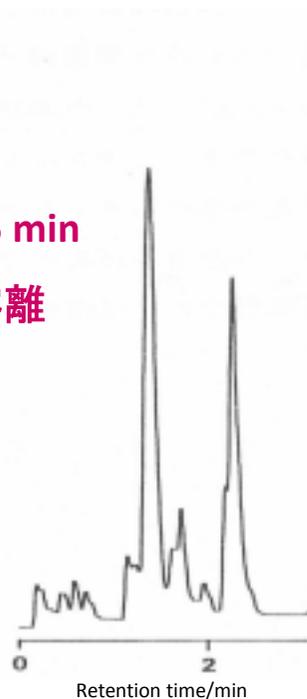
A) H<sub>2</sub>O

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

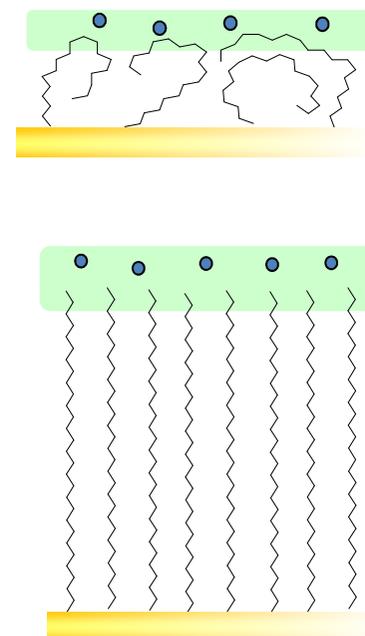
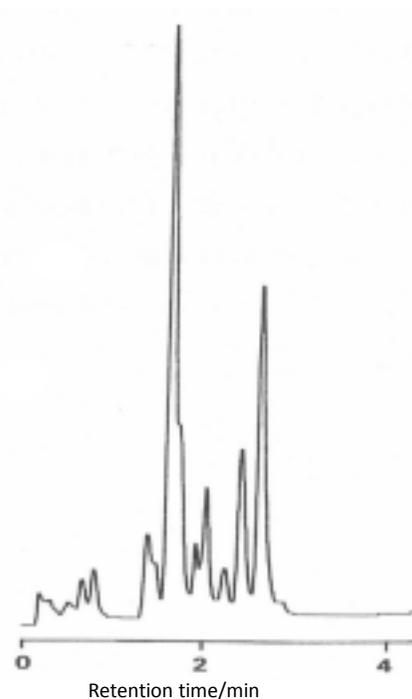
%B: 0%-30%, 5 min

グラジエント溶離

NP-C18



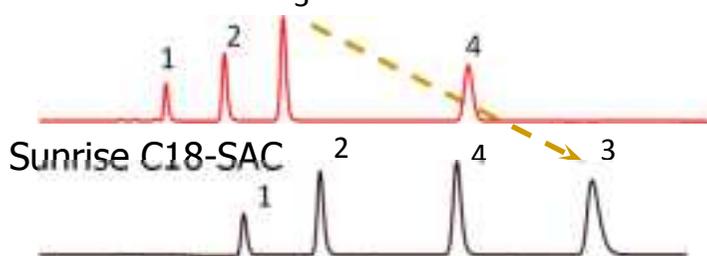
NP-C30



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

# 水素結合性の比較 キサンチン類の分離

Sunrise C18 メタノール・水(30:70)

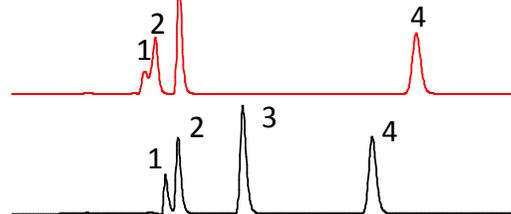


$\alpha(3/4)=0.50$

$\alpha(3/4)=1.42$

2.84倍

アセトニトリル・水(30:70)

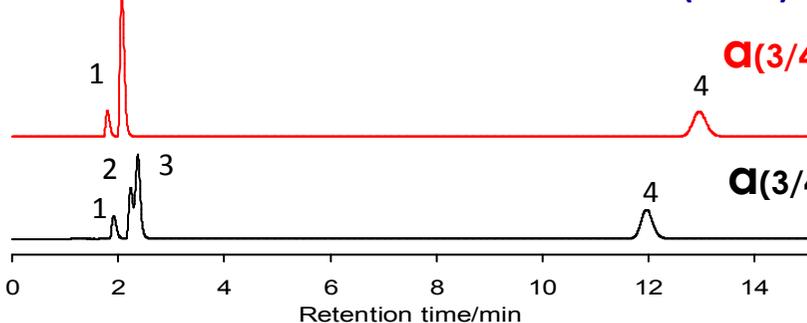


$\alpha(3/4)=0.16$

$\alpha(3/4)=0.46$

2.88倍

THF・水(30:70)

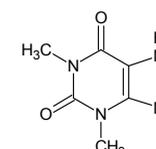
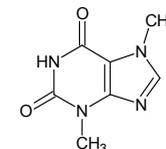


$\alpha(3/4)=0.066$

$\alpha(3/4)=0.081$

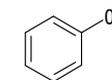
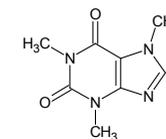
1=Theobromine

2=Theophylline



3=Caffeine

4=Phenol



mn:

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

Sunrise C18-SAC, Not end-capped

(%C:14%)

5 $\mu$ m, 4.6x150 mm

Mobile phase:

1.22倍 /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

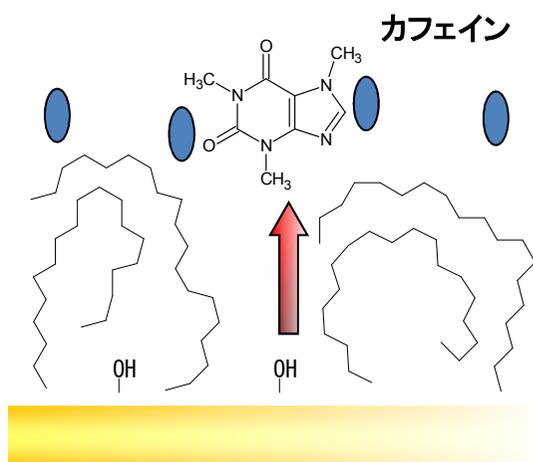
Temperature: 40 °C

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。

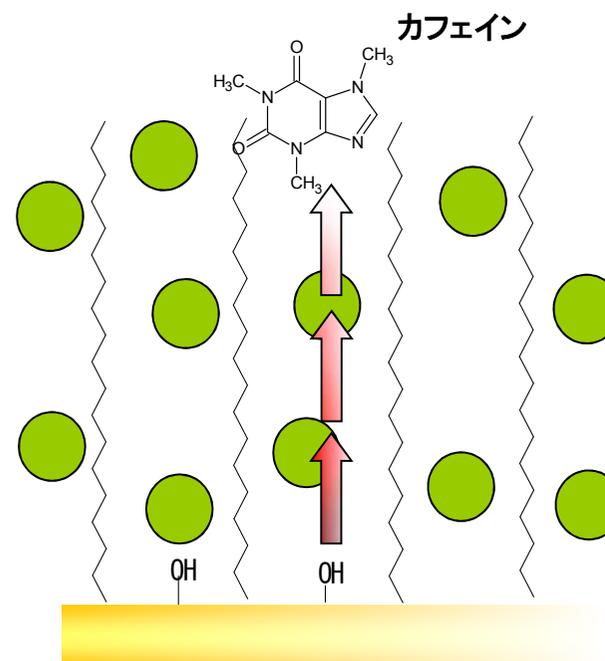
# 水素結合性の比較

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。

# まとめ

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

# 1. エンドキャッピング技術・最新の手法

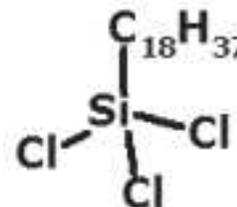
## Sunniest (SunShell) Bonding Technology

熱処理によりシラノール基をシロキサン結合に変換

# Sunniest (SunShell) Bonding Technology

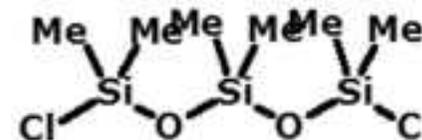
- ✓ Trifunctional silyl-reagent,

(Octadecyltrichlorosilane)



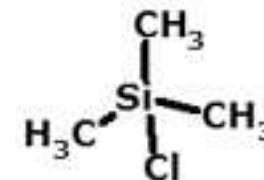
- ✓ Difunctional silyl-endcapping reagent

(Hexamethyldichlorotrisiloxane)



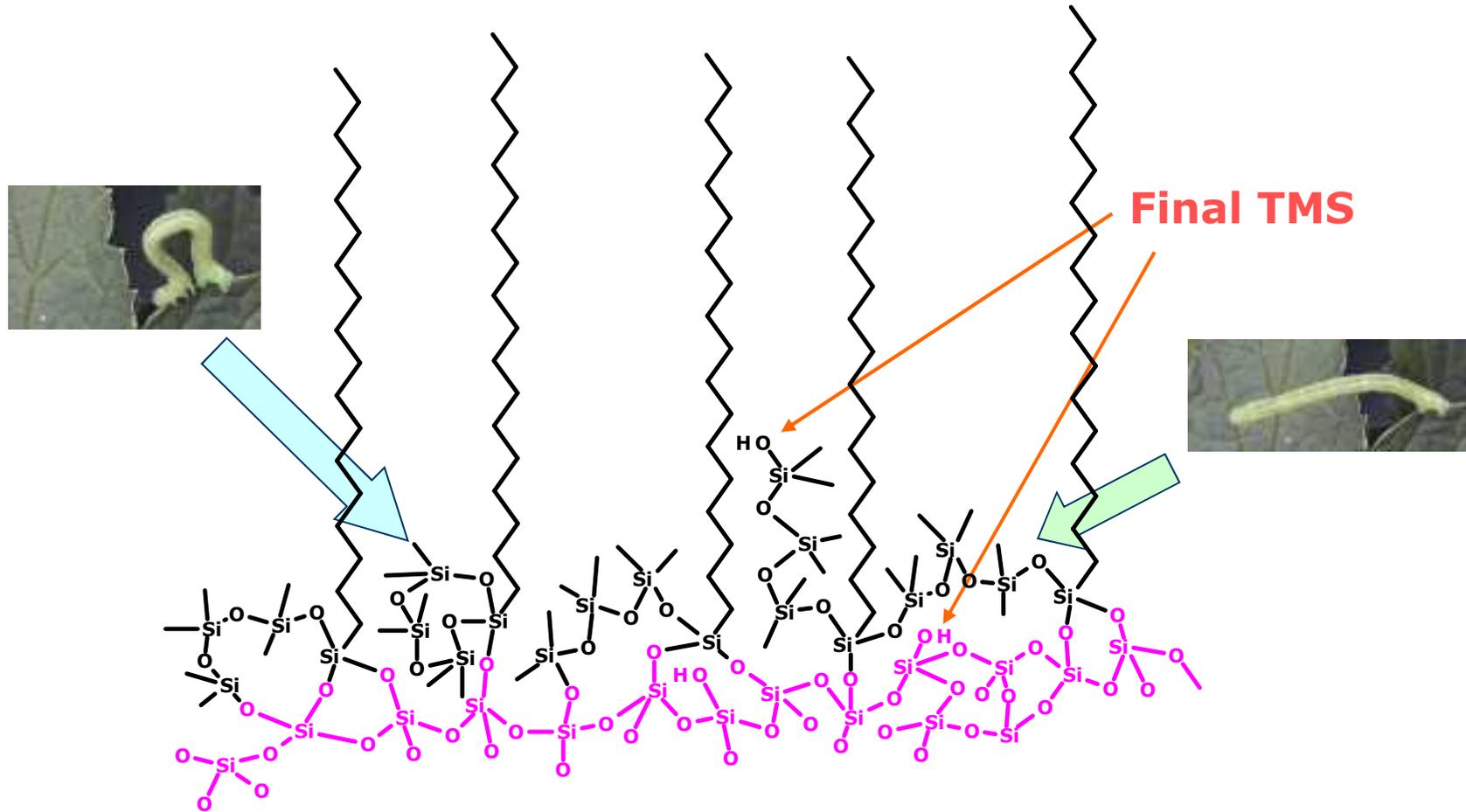
- ✓ Second silyl-endcapping reagent

(above + Trimethylchlorosilane(TMS))



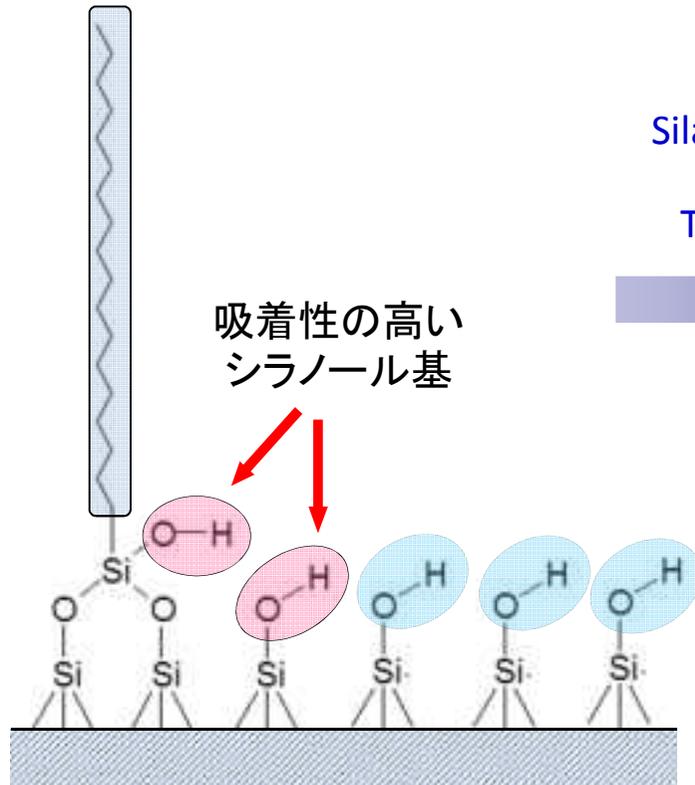
- ✓ High reaction temperature for endcapping

# Bonding state on silica



# Silanol Activity Control

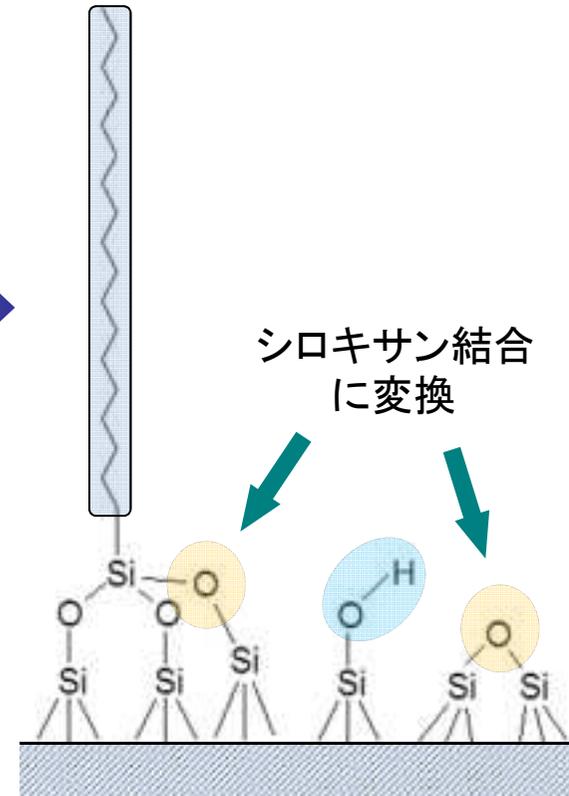
Typical no endcapping C18

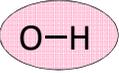
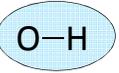


Silanol Activity  
Control  
Technology

Heat

Sunrise C18-SAC



-  有機溶媒と水からなる移動相中では疎水基 (C18) の影響で水和しにくいシラノール基
-  疎水基 (C18) の影響が少なく, 十分水和できるシラノール基

# 残存シラノール基の割合

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

C18結合後2/3のシラノール基は残っている.

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

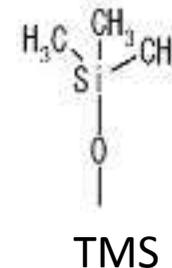
C18およびエンドキャッピング (TMSなど) 後

1980年代 1/2

1990年代 2/5

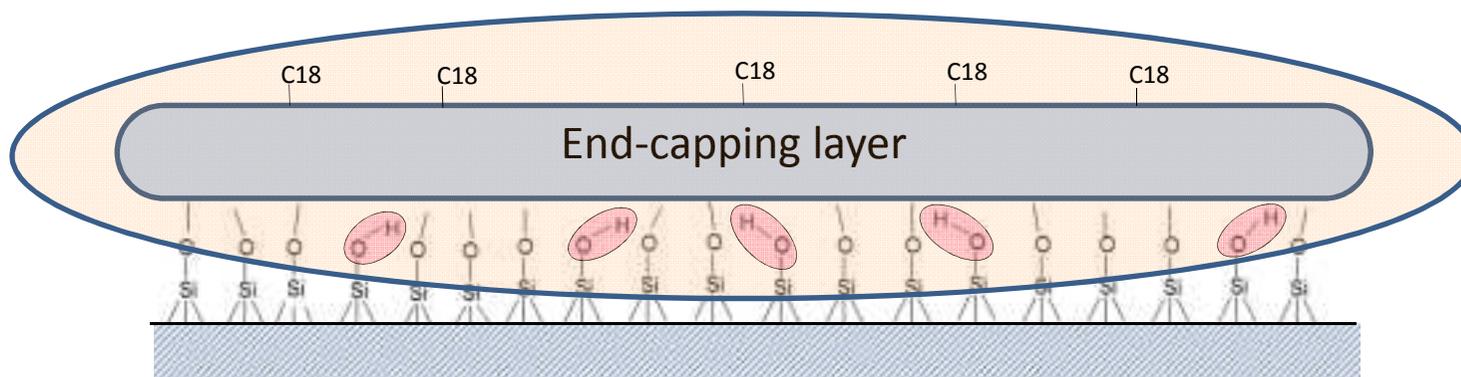
2000年代 1/3 のシラノール基は残っている.

1/3の残存シラノール基の影響はエンドキャッピング剤によりほぼ封鎖される.

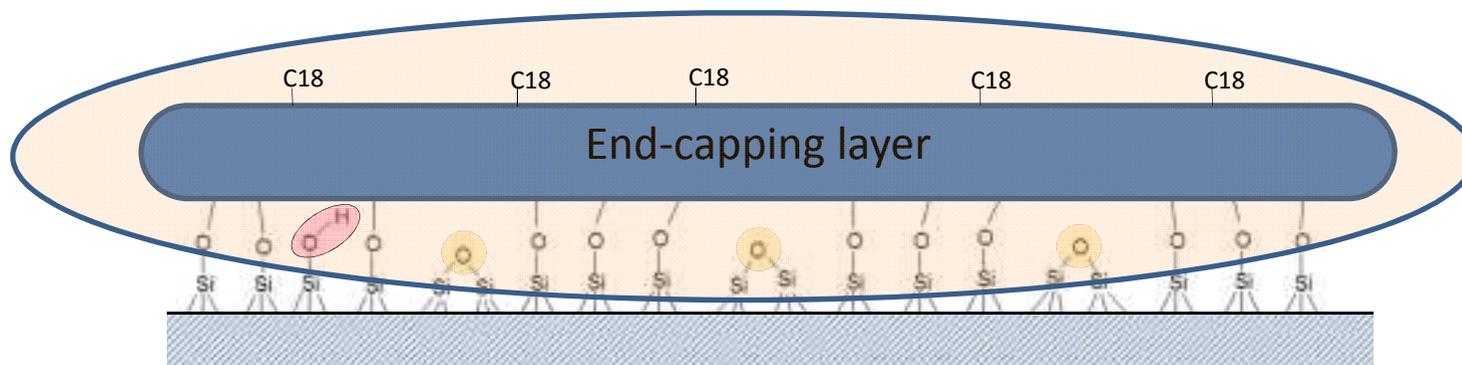


# 疎水性の比較

Conventional end-capping



Both Sunniest end-capping and Silanol Activity Control



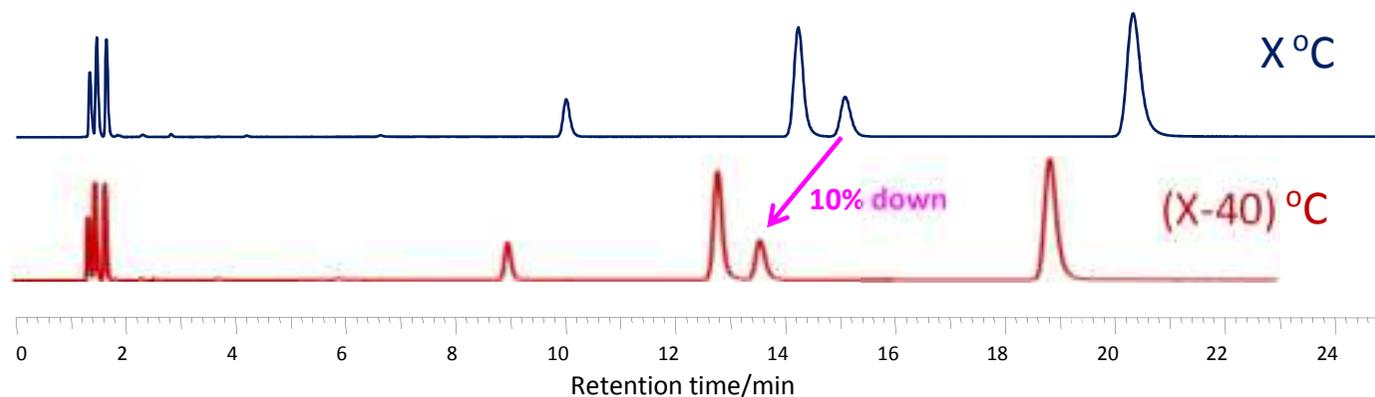
More  
Hydrophobic

# 炭素含有量と保持時間

(2種類の異なる反応温度)

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

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



# 保持と炭素含有量との関係

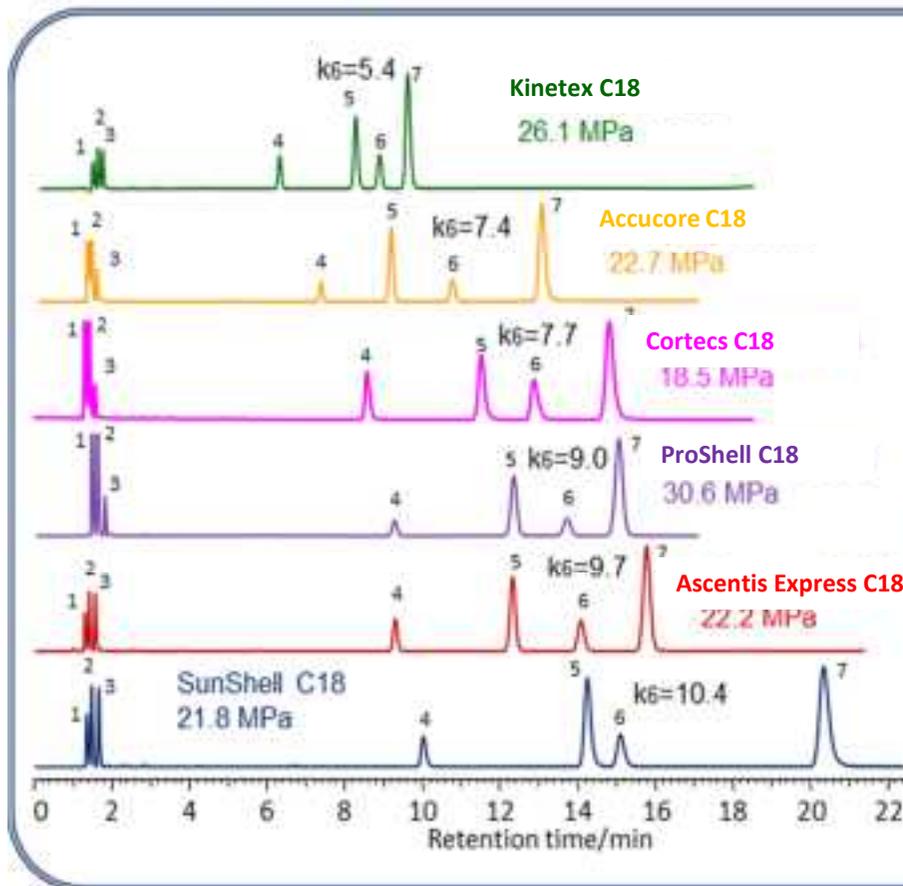
	Retention factor	Carbon loading (%)	Specific surface area <sup>b</sup> (m <sup>2</sup> /g)
SunShell C18, 2.6 μm	10.4	7.3	125
Ascentis Express C18, 2.7 μm	9.7	8.0	133
PoroShell C18 EC, 2.7 μm	9.0	8.5	135
Cortecs C18, 2.7 μm	7.7	7.3	113
Accucore C18, 2.7 μm	7.4	8.8	130
Kinetex C18, 2.6 μm	5.4	4.9	102

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

Both Sunniest end-capping and Silanol Activity Control

# 標準試料の分離・保持時間

標準試料の分離



Column: Company A C18, 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm (26.1 MPa, 30,800 plate)  
 Company B C18, 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm (22.7 MPa, 31,600 plate)  
 Company E C18, 2.7  $\mu$ m 150 x 4.6 mm (18.5 MPa, 23,300 plate)  
 Company C C18, 2.7  $\mu$ m 150 x 4.6 mm (30.6 MPa, 30,200 plate)  
 Company D C18, 2.7  $\mu$ m 150 x 4.6 mm (22.2 MPa, 31,800 plate)  
 SunShell C18, 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm (21.8 MPa, 31,900 plate)

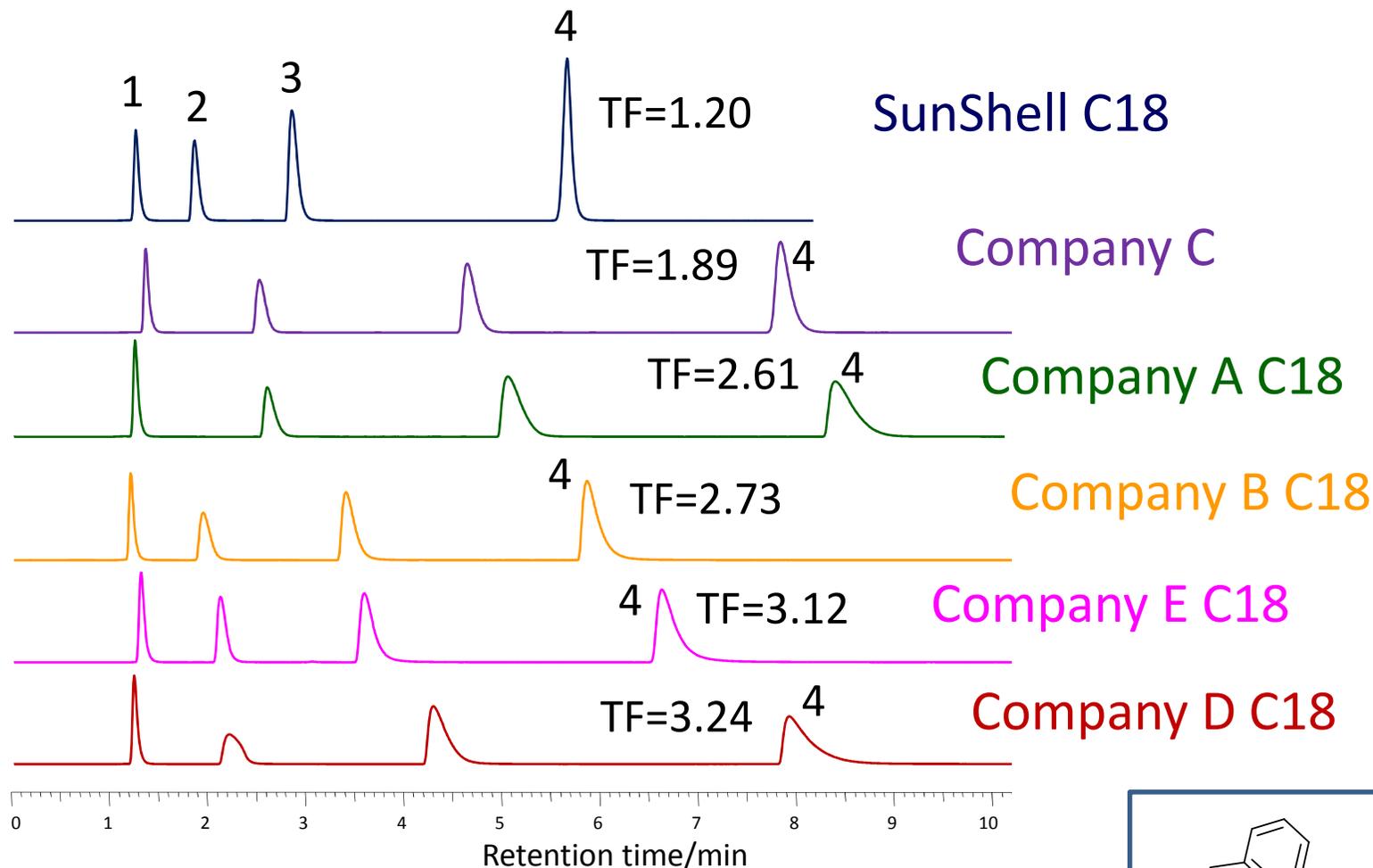
Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

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

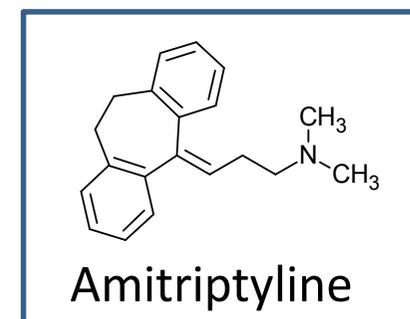
	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/o-Terphenyl)
Company A C18	0.48	1.54	1.20
Company B C18	0.35	1.56	1.50
Company E C18	0.38	1.59	1.32
Company C C18	0.42	1.57	1.25
Company D C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.39	1.60	1.46

# アミトリプチリンのピーク形状比較

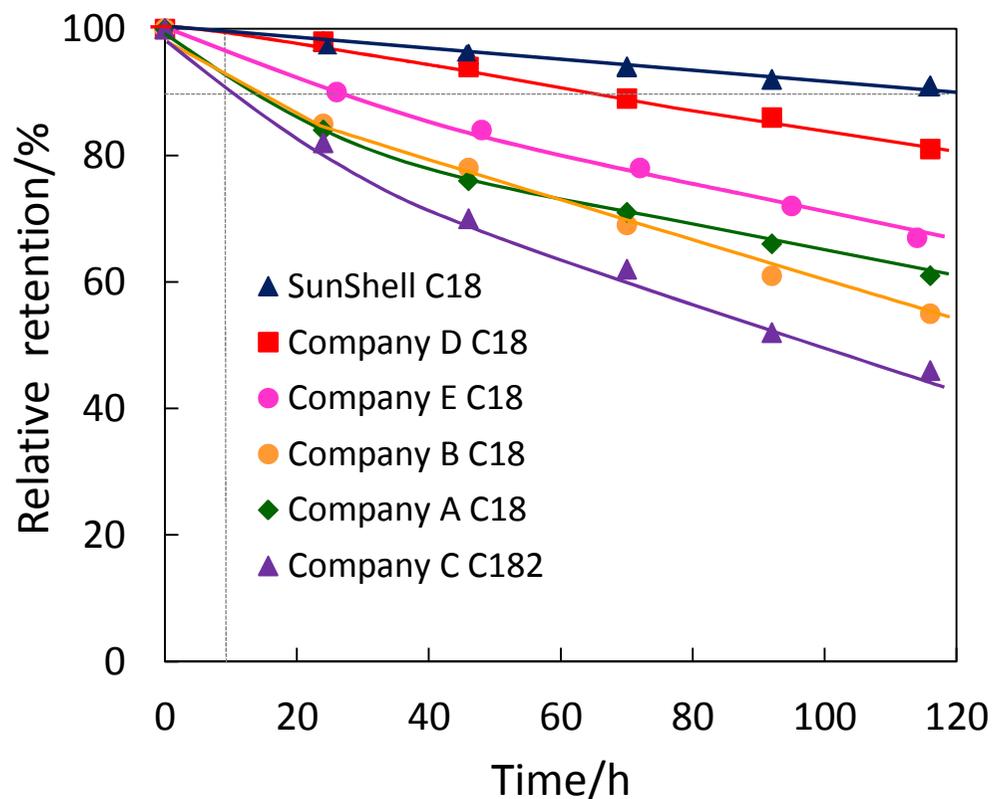


Mobile phase: Acetonitrile/10mM ammonium acetate pH6.8=(40:60)  
 Column dimension: 150 x 4.6 mm, Flow rate: 1.0 mL/min, Temp.: 40°C

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



# 酸性条件での耐久性 (加速試験)

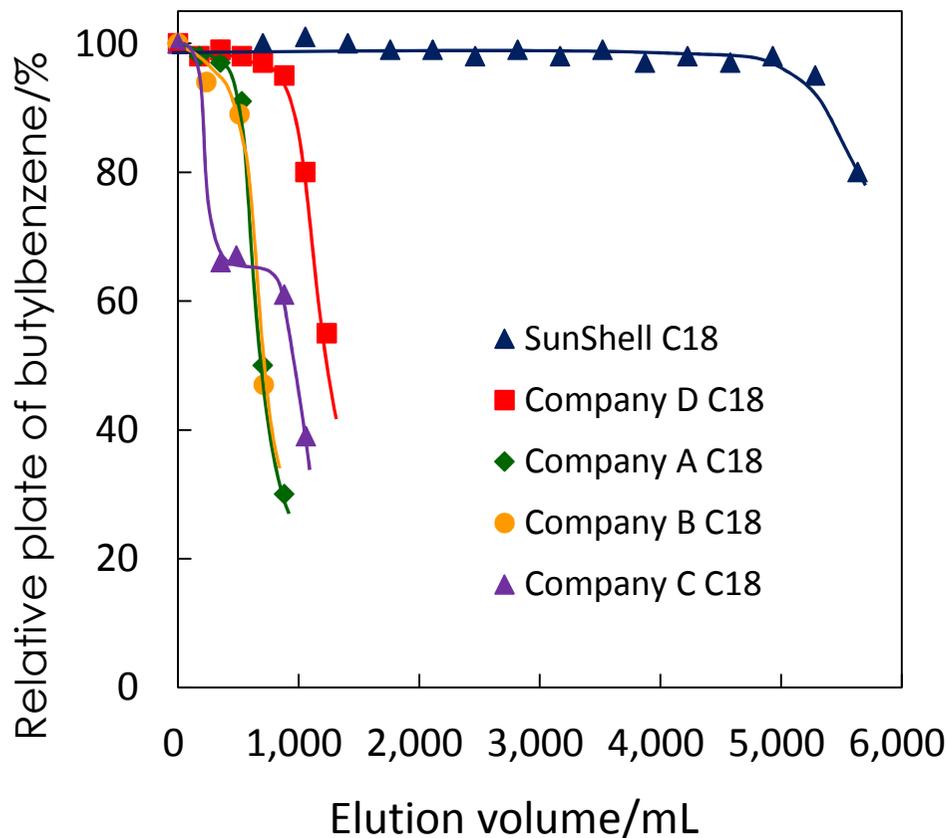


Durable test condition  
 Column size: 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/1.0% TFA,  
 pH1=10/90  
 Flow rate: 0.4 mL/min  
 Temperature: 80 °C

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

加速試験としてpH1で80°Cの条件を用いました。疎水性試料のブチルベンゼンの保持が90%に減少することは、酸によりアルキル基が10%脱離することを意味しています。この10%のアルキル基の脱離でカラム劣化を判断しますとSunShell C18は他社のC18に比べ、2倍から10倍の耐久性を示しました。

# アルカリ性条件での耐久性



Durable test condition

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>OH/20mM Sodium borate/10mM

NaOH=30/21/49 (pH10)

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 50 °C

Measurement condition

Column size: 50 x 2.1 mm

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

Flow rate: 0.4 mL/min

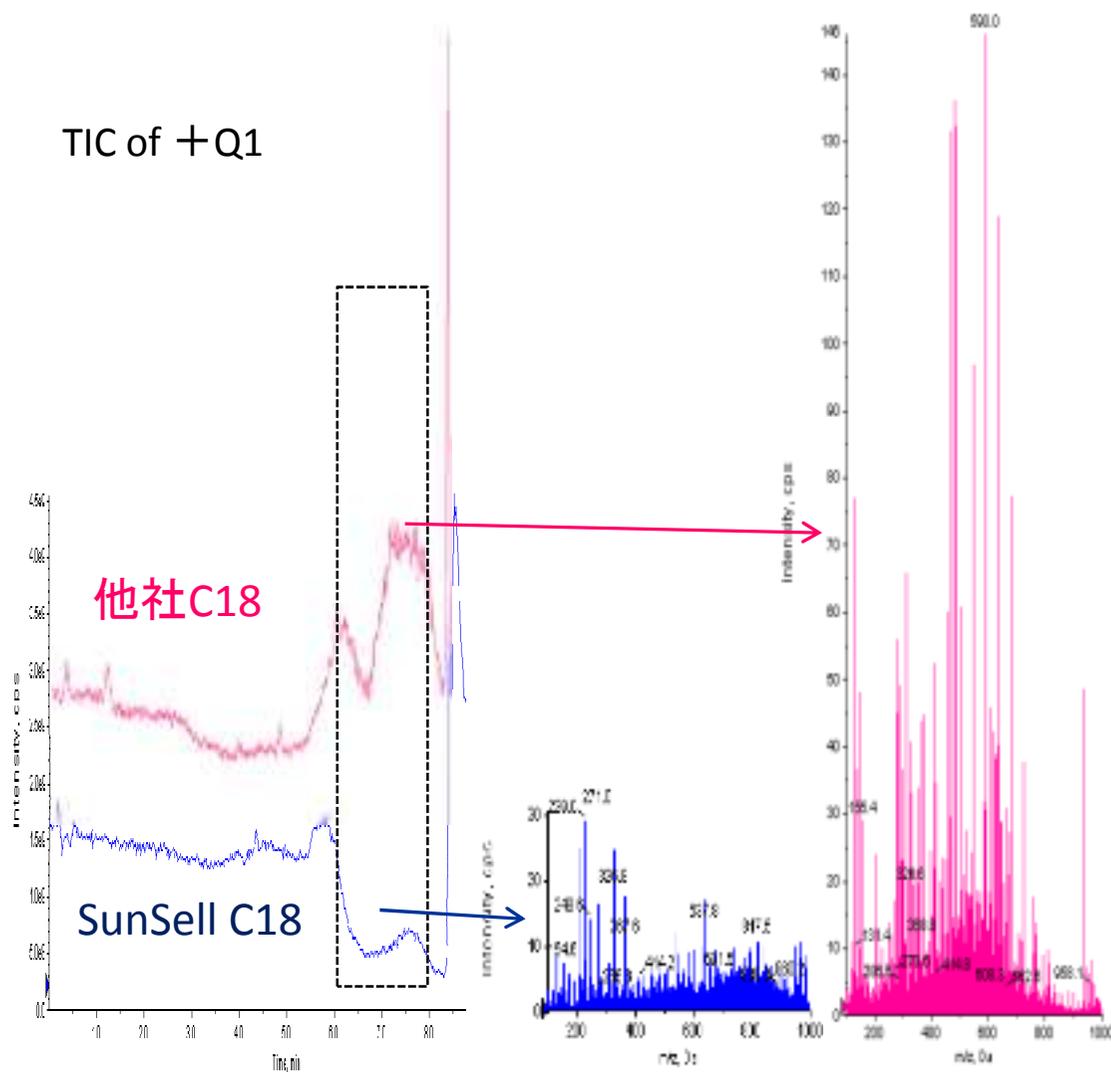
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Butylbenzene

有機溶媒の濃度が30%と比較的低く、pH 10で50°Cのアルカリ性条件での耐久性を比較しました。アルカリ性条件下ではシリカが溶け出すため、カラムの入口側がへこみ、段数が低下します。SunShell C18は他社C18の5倍から10倍の耐久性を示しました。

# Bleeding test using LC/MS

+Q1: 5.997 min to 7.999 min of Sample



Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

A) 0.1% acetic acid

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

Gradient:

Time: 0min 1min 5min 7min

%B: 5% 5% 100% 100%

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 40 °C

MS: ABI API-4000

Ionization:

Turboionspray (cation)

Measurement mode:

Q1 Scan m/z 100-1000



ご静聴ありがとうございました

株式会社 クロマニックテクノロジーズ  
552-0001 大阪府大阪市港区波除6-3-1  
TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890  
E-mail: [info@chromanik.co.jp](mailto:info@chromanik.co.jp)  
URL: <http://chromanik.co.jp>