

# インハウスセミナー

- ・逆相カラムの水移動相使用時の注意点
- ・逆相固定相のアルキル基の状態について
- ・クロマニック逆相カラムの紹介

Sunniest and SunShell

株式会社クロマニックテクノロジーズ  
長江徳和

# 逆相固定相のアルキル基の状態について: 水移動相での分離挙動からテトラヒ ドロフラン移動相を用いた場合の考察

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](mailto:info@chromanik.co.jp)

<http://chromanik.co.jp>

# 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

# 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. Löchmuller\* 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

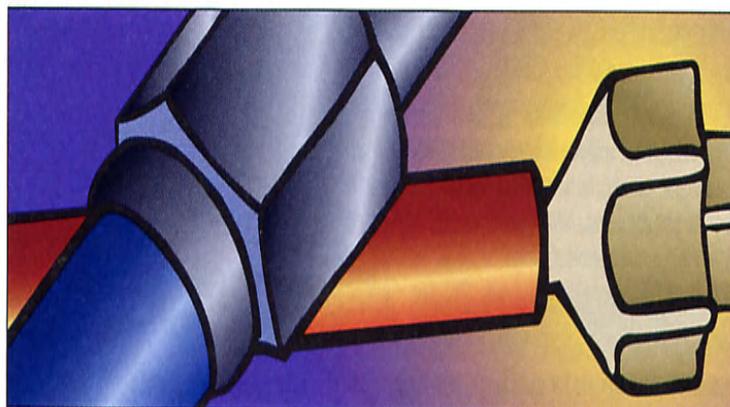
persive interactions are considered, hydrocarbon–hydrocarbon interactions will be much stronger than hydrocarbon–water interactions. It follows that the stationary phase could agglomerate and, therefore, could have a greatly reduced effective chromatographic surface area. It is possible that it will 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

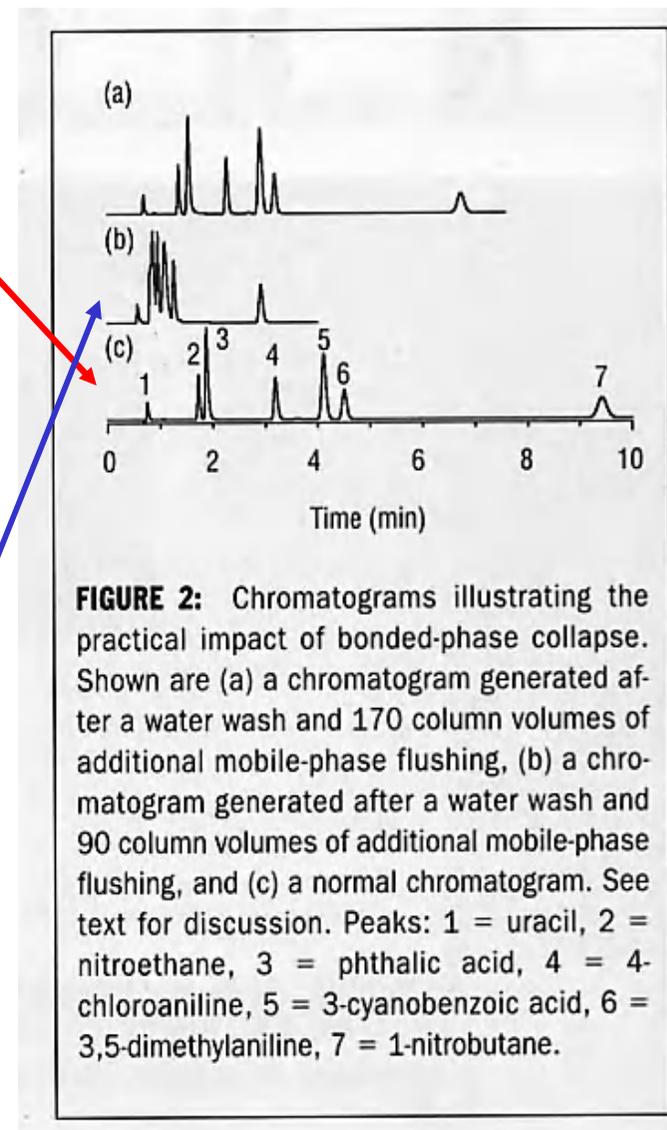
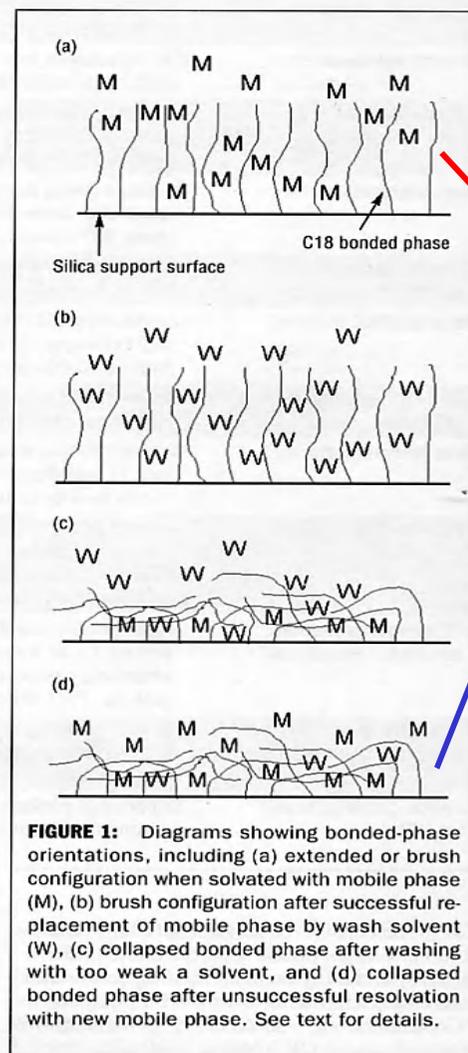
## LC Troubleshooting



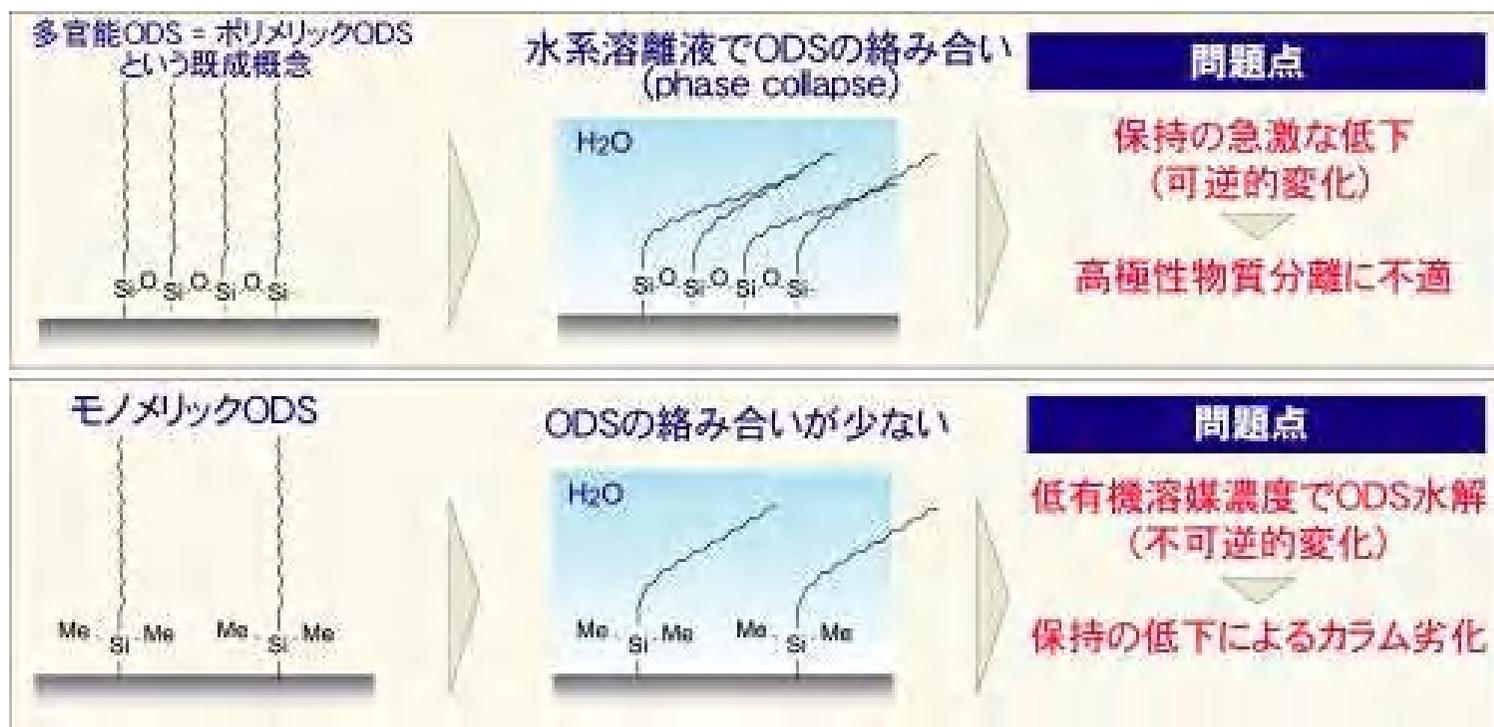
## Lessons in Column Washing

Robert G. Wolcott and John W. Dolan

Like dissolves like . . . sometimes.



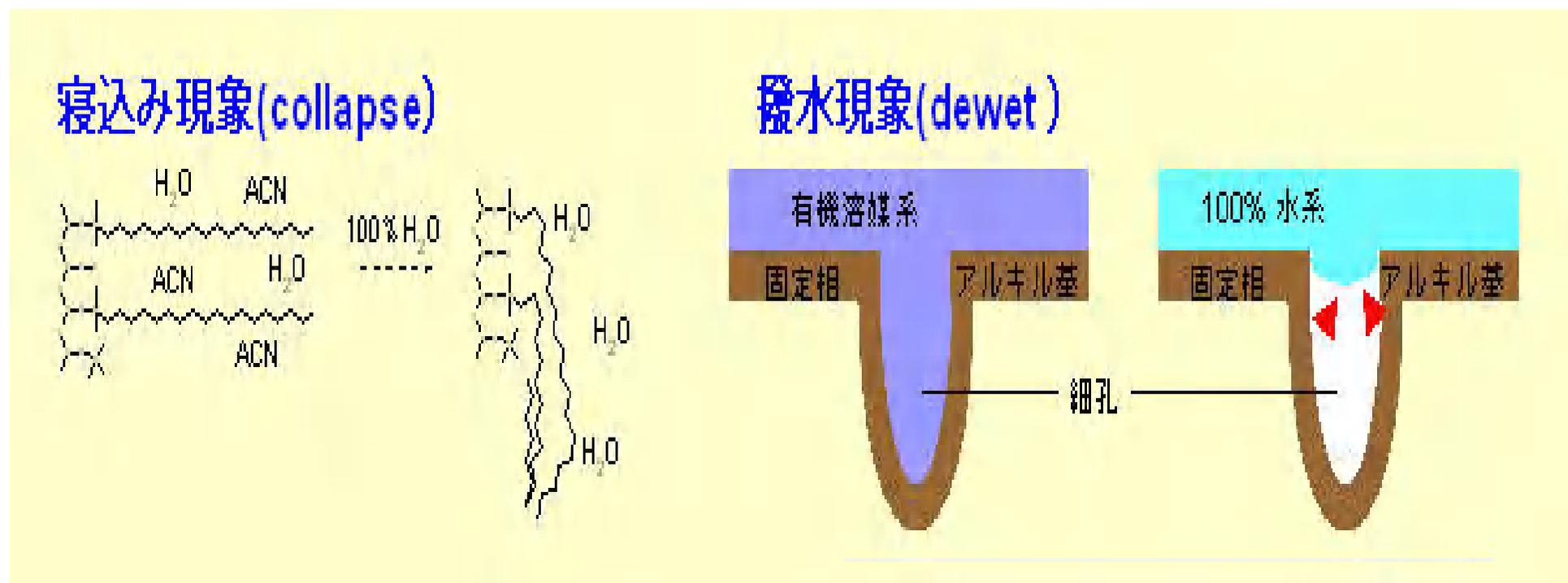
# HPLCカラムメーカーのよるアルキル基の絡み合い説



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

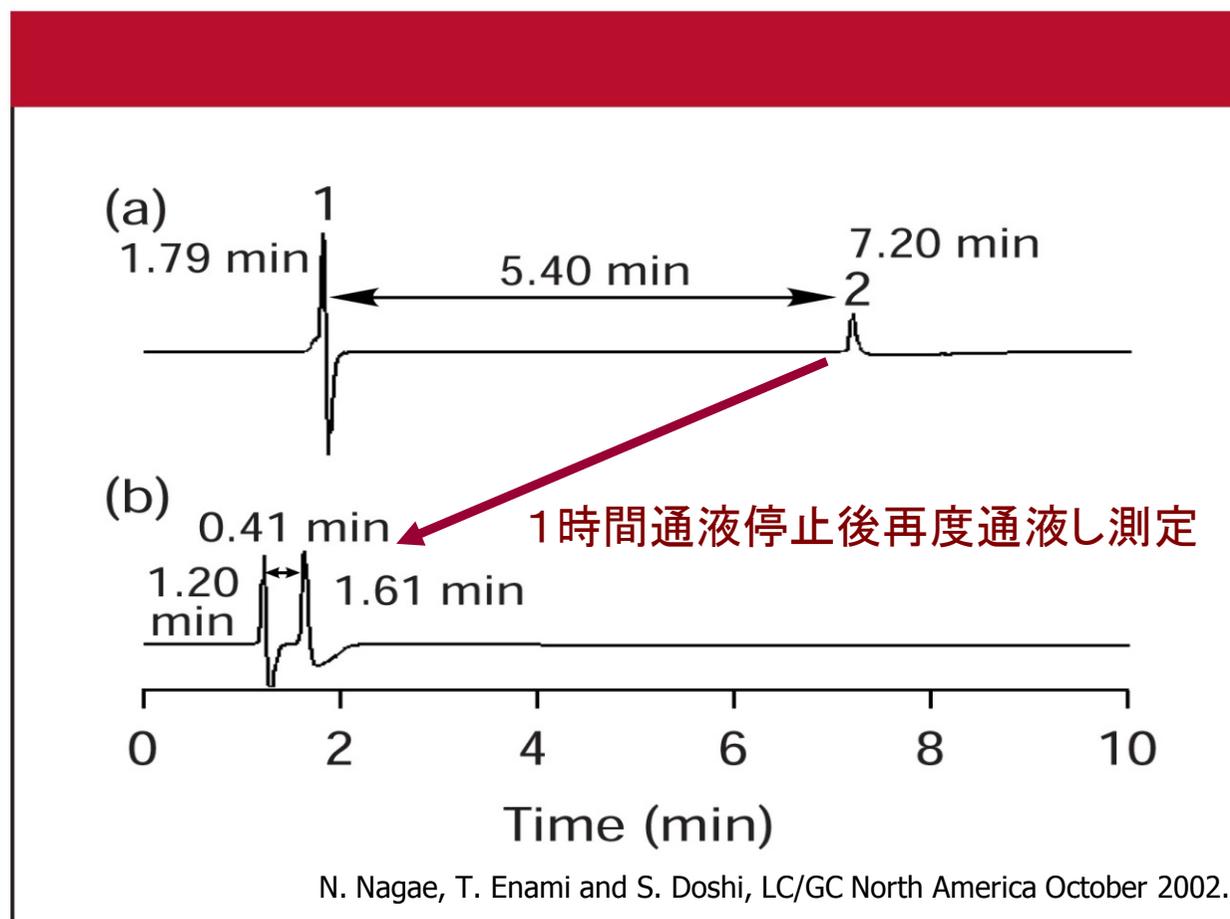
193

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<sup>1</sup>

# 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

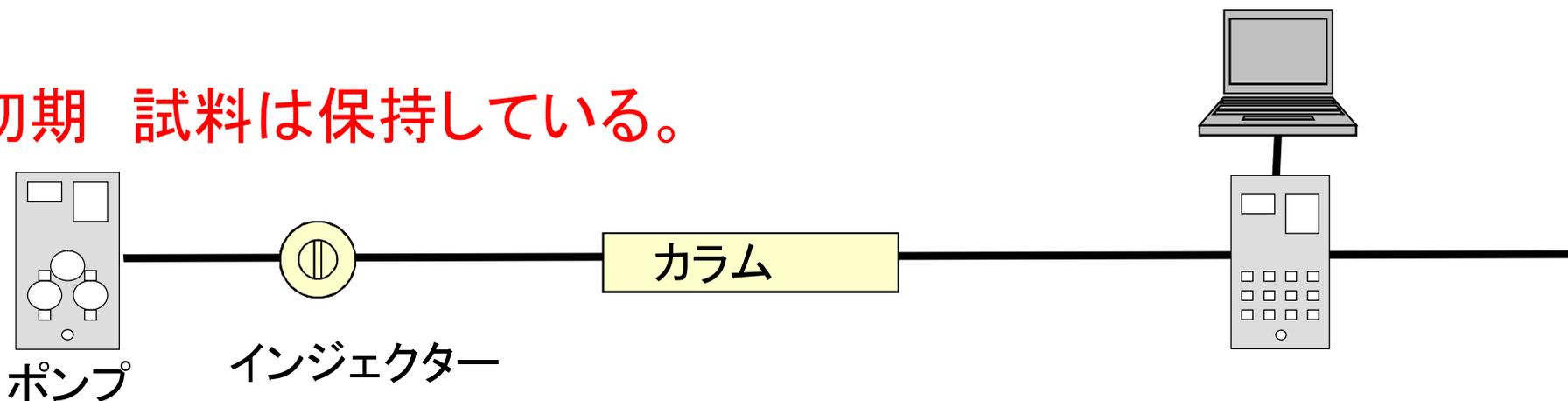
2. 2-プロパノール

保持時間: 5.40minから0.41minに減少

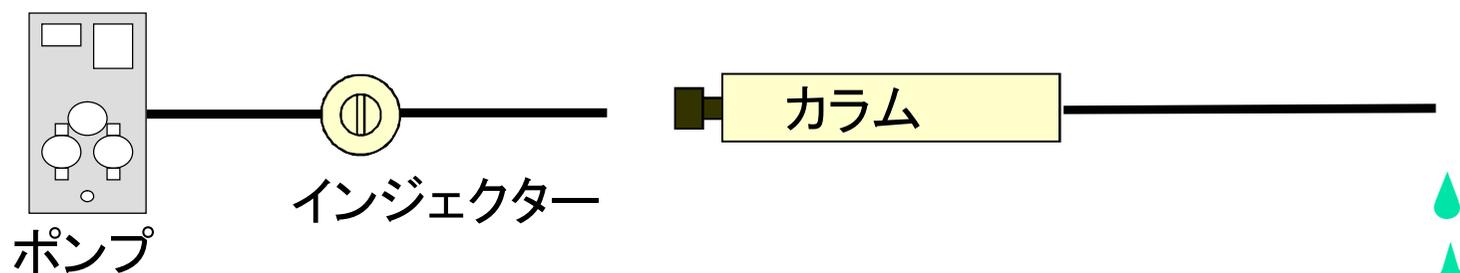
→ 再現性がない

# 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。

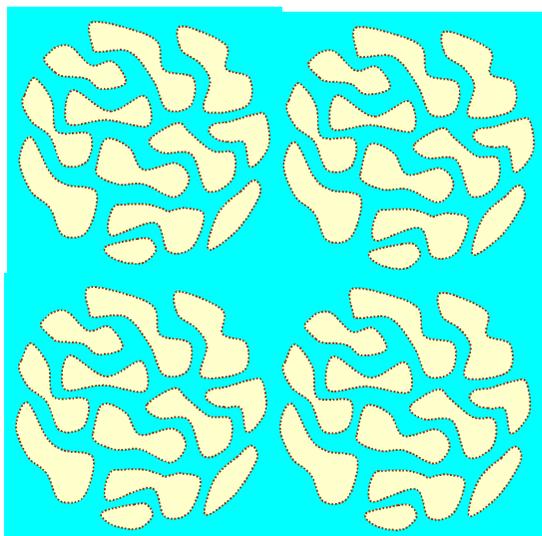
# 水100%移動相条件下で保持が減少する理由

カラム内のODS粒子

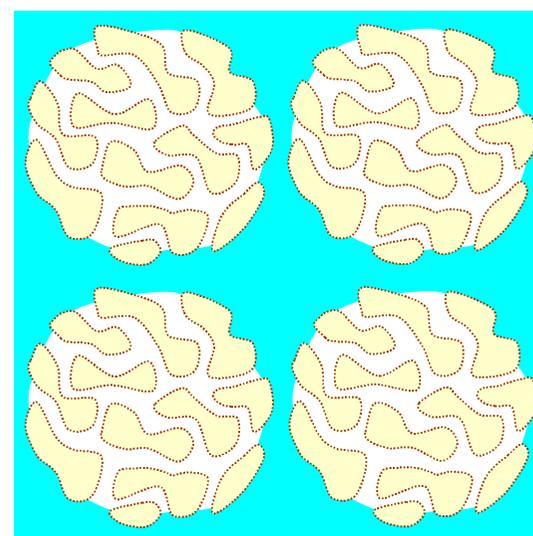
移動相: 水

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。

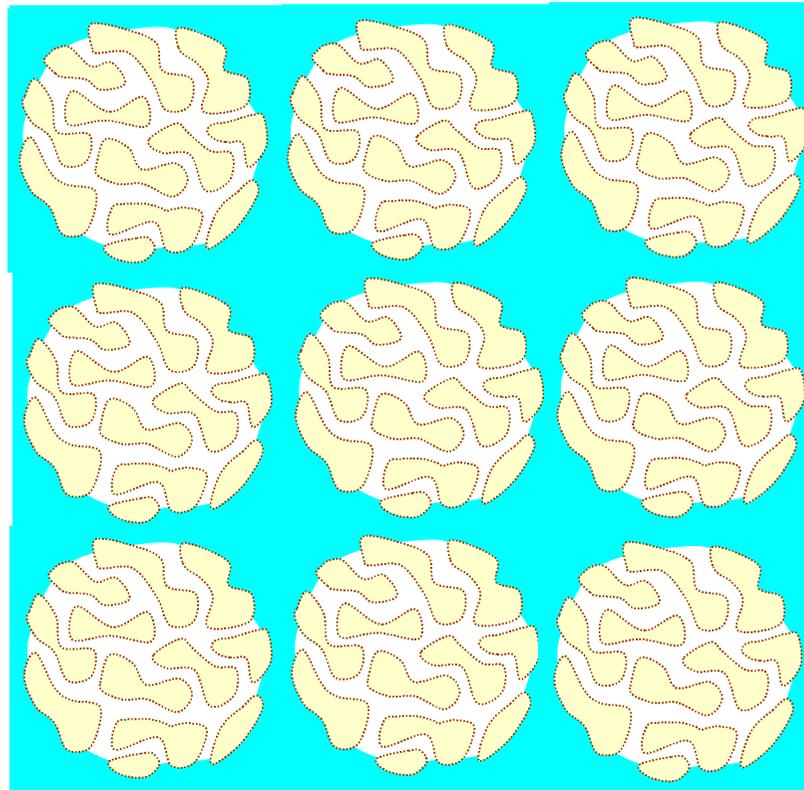
細孔内に移動相を戻すためには有機溶媒を70%以上含む移動相に置換しなくてはならない。

# 水100%移動相条件下で保持が減少する理由

ポンプを停止し充填剤に圧力がからなくなると

移動相:水

カラム内のODS粒子



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 $\rho$ 、液体の表面張力を $\gamma$ 、接触角を $\theta$ 、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

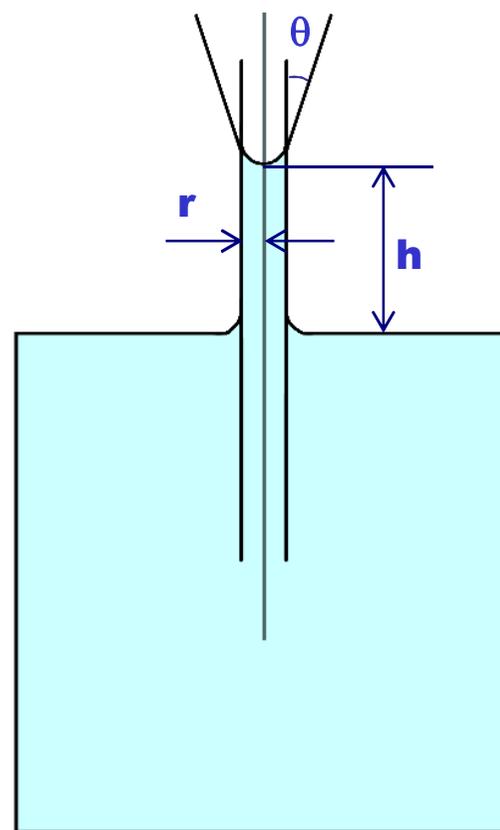
毛管現象の式:

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

$\gamma$ : 表面張力

$\rho$ : 液体の密度 (比重)

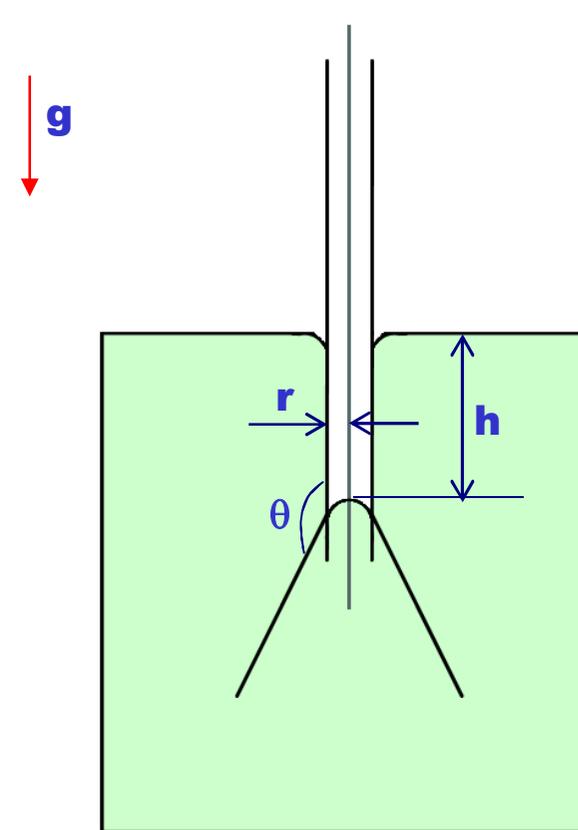
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



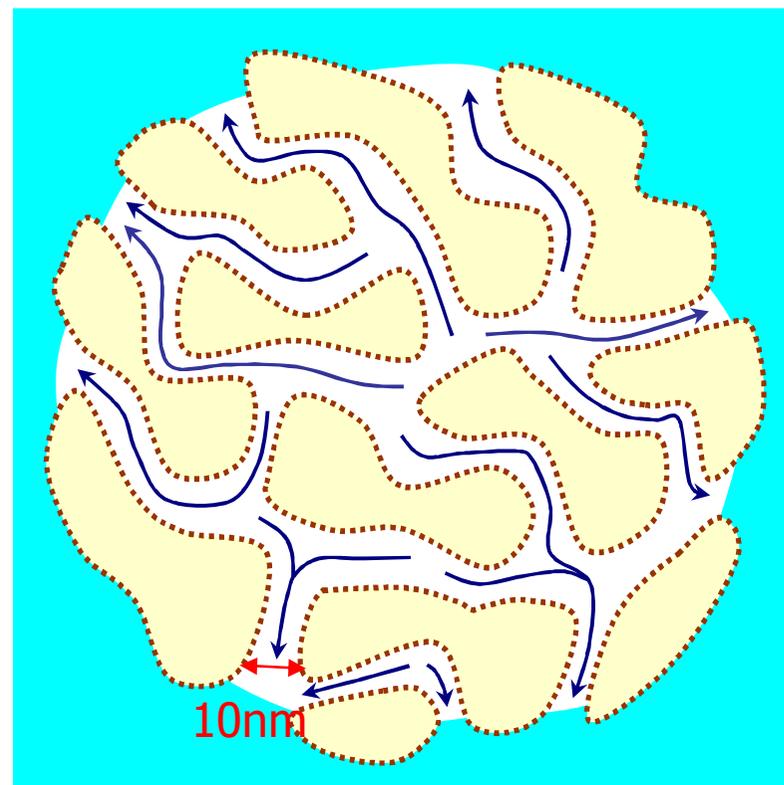
液体が管に濡れない場合

$$\theta > 90^\circ$$

# 毛管現象



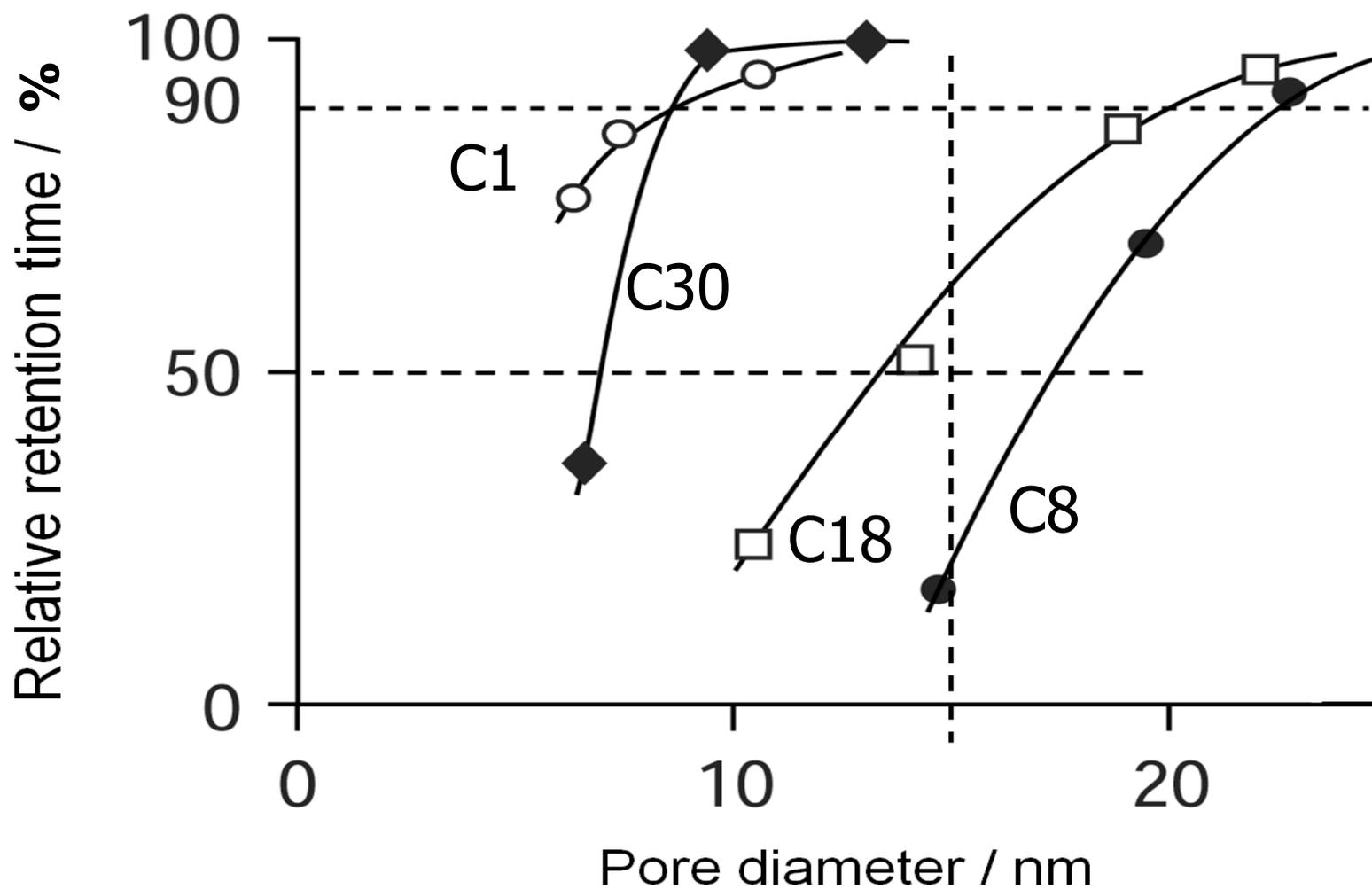
内径0.5mmのガラス管内で赤インクは6cm上昇する。この場合に作用してる圧力は0.006気圧である。内径が $1\mu\text{m}$ では30m上昇し、3気圧の圧力が作用していることになる。



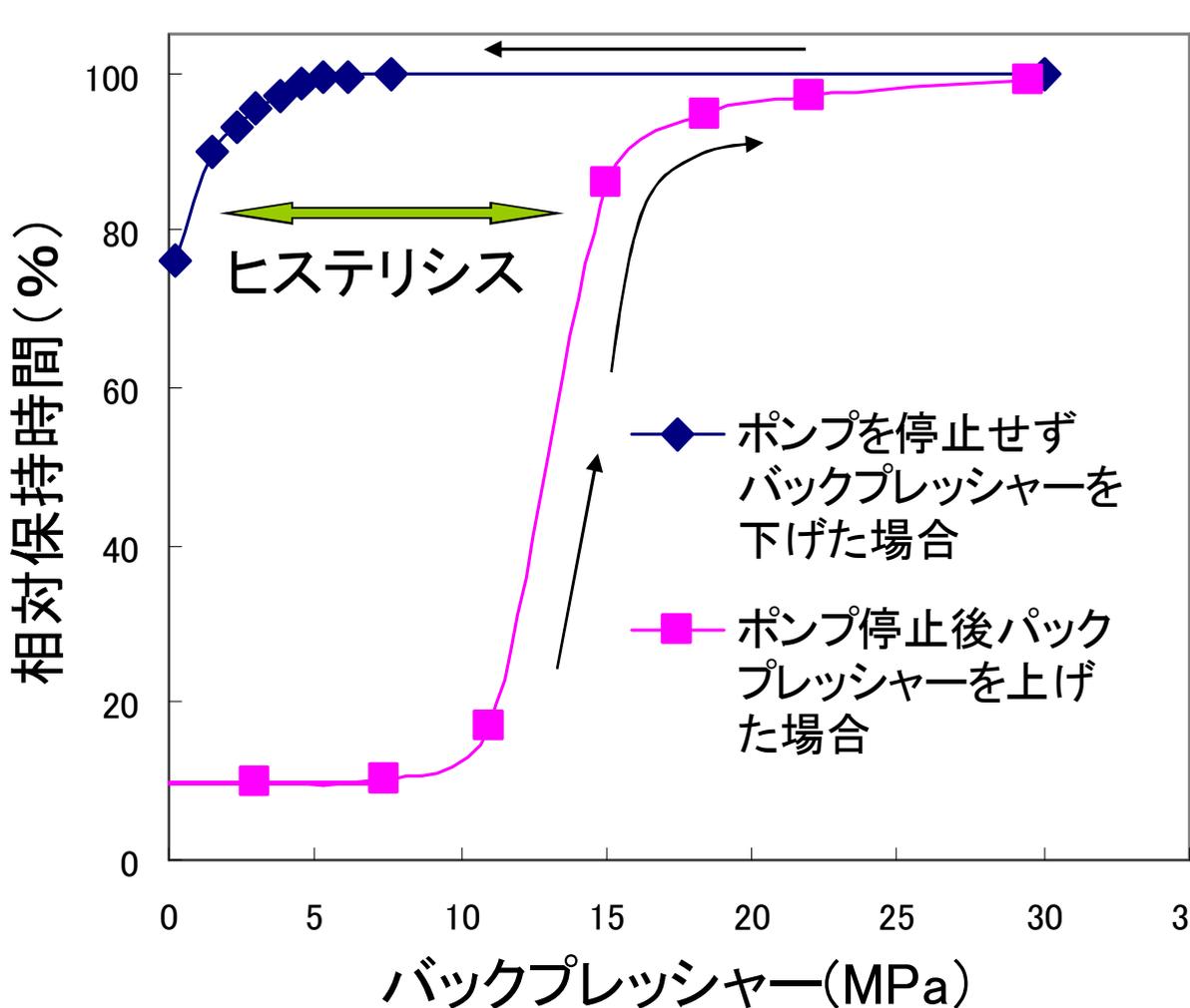
カラムを大気圧状態にして、移動相を充填剤の細孔から抜け出させるために必要な圧力は1気圧である。充填剤の細孔の大きさを考慮すると毛管現象によりこの1気圧は簡単に発生する。

# 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  $\mu\text{m}$

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

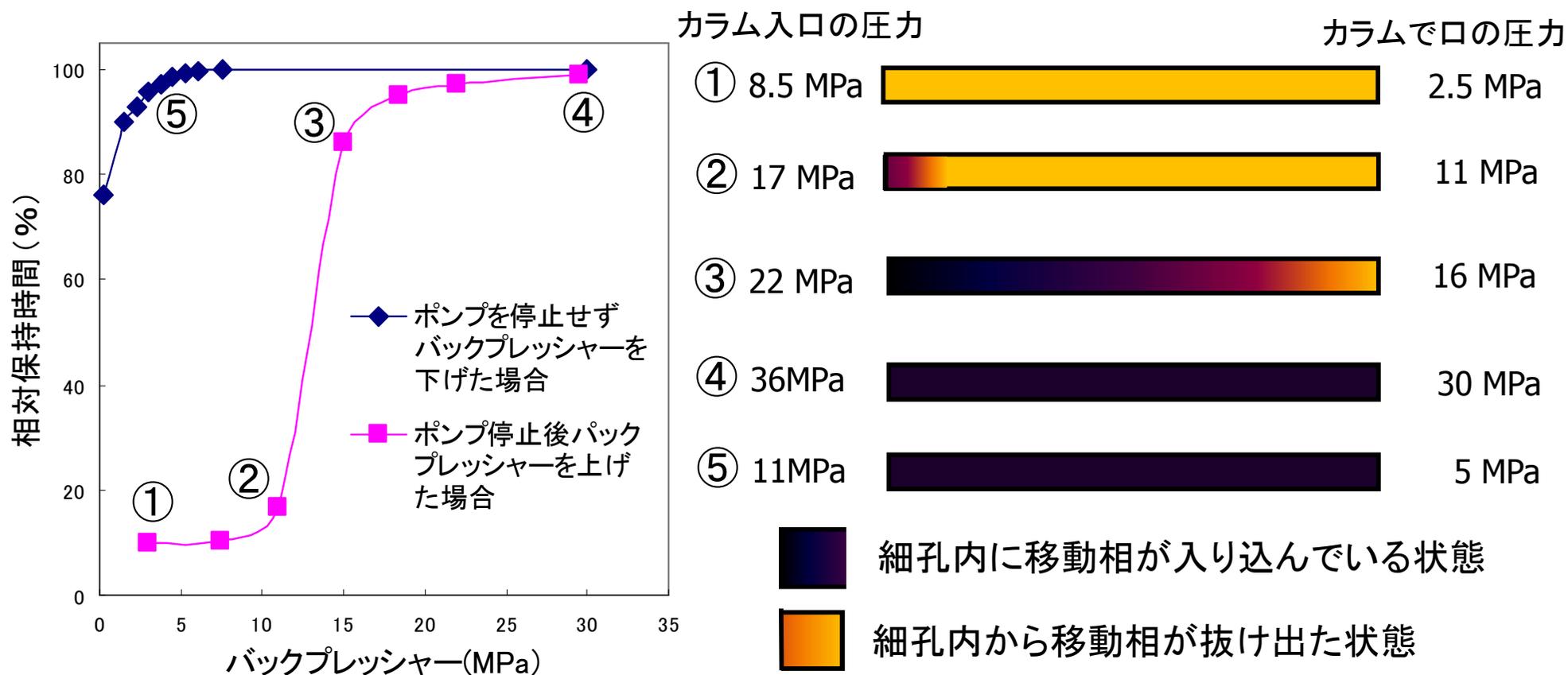
試料: 2-プロパノール

\* 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  $\mu\text{m}$  150 x 4.6mm, Mobile phase: Water,  
Flow rate: 1.0mL/min, Temperature: 40°C



# カラム内充填剤の細孔内の状態

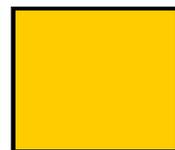
ODS (10nm, 5 $\mu$ m)カラム、水移動相



## 再度ポンプ通液

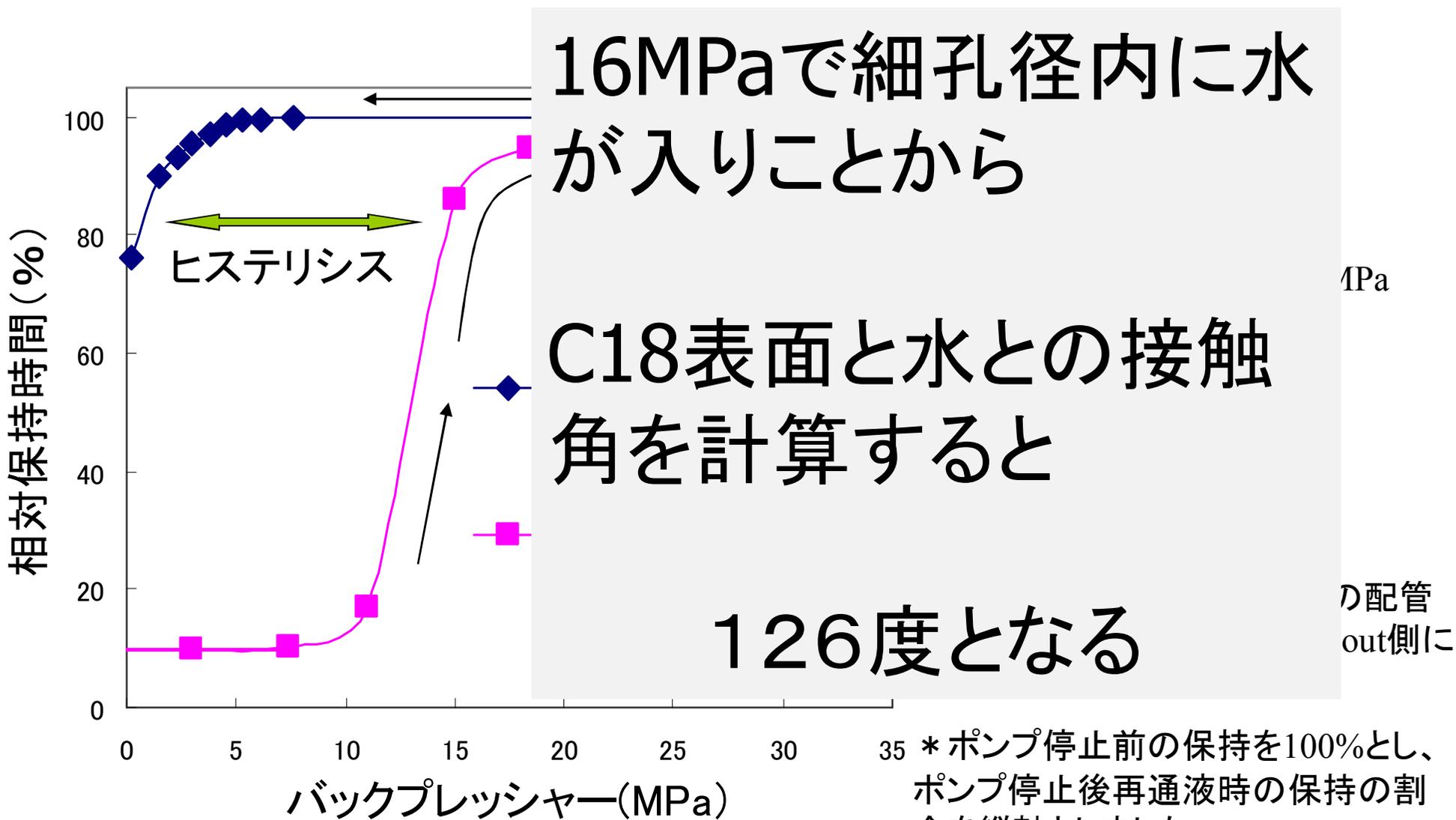


細孔内に移動相が入っている状態



細孔内から移動相が抜け出ている状態

# バックプレッシャーの影響

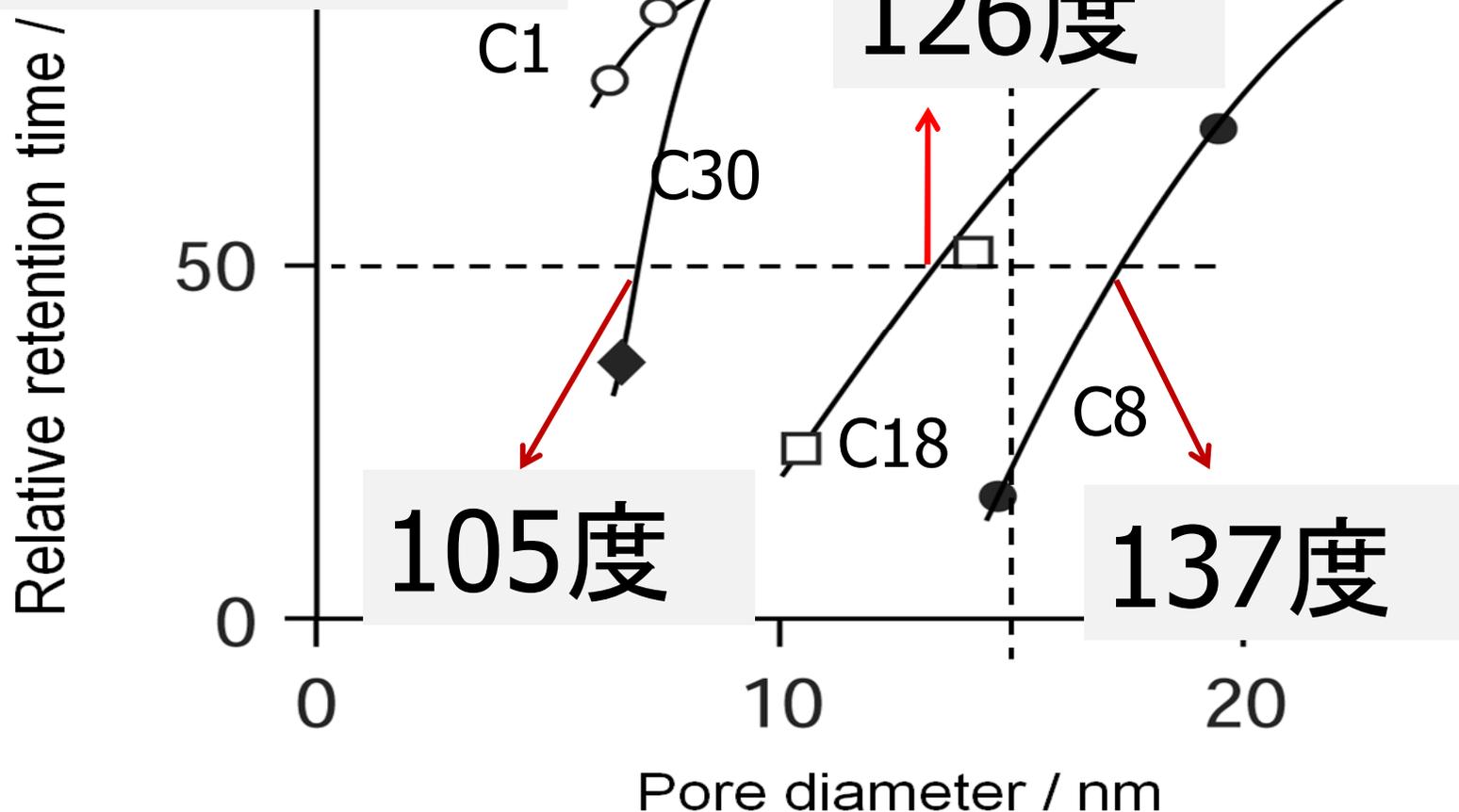


# アルキル鎖長と細孔径の影響

## ポンプ停止1時間後の保持比較

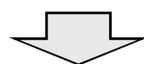
毛管現象の式:

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

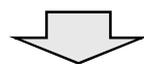


# 水100%移動相で安定な保持を得るためには

逆相充填剤は水に濡れない—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

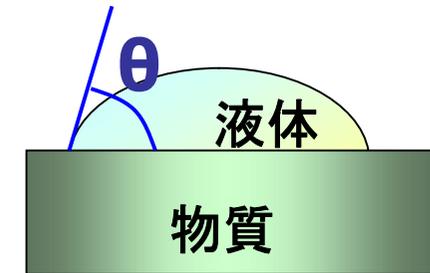
C8 :水との接触角は137度→→大気圧以上→→移動相抜ける

C18 :水との接触角は126度→→大気圧以上→→移動相抜ける

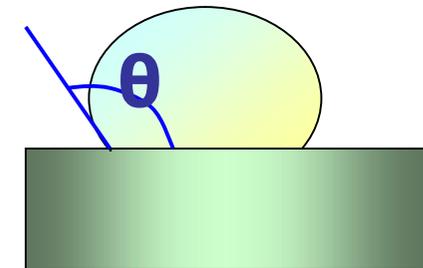
C30 :水との接触角は105度→→大気圧以下→→移動相抜けない

# 濡れる (wetting) とは

『液体と物質の表面との接触角が90度より小さい状態である』



『液体と物質の表面との接触角が90度より大きい場合は濡れてない状態である』



『蓮の葉の上に水滴が存在する, この場合蓮の葉は水に濡れているか?』

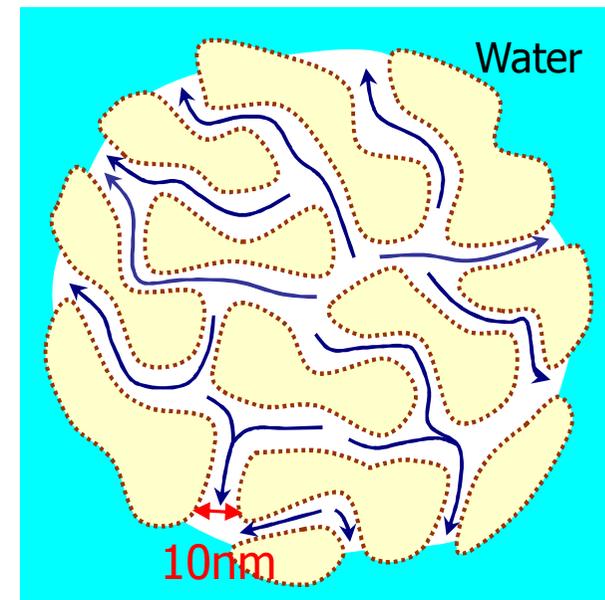
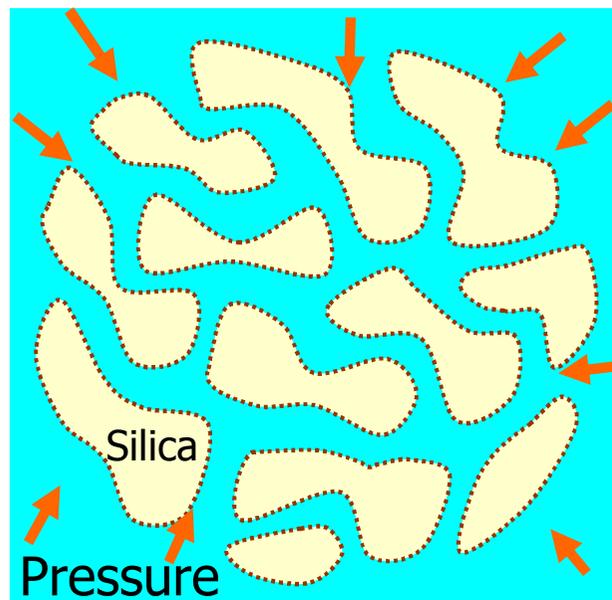


細孔内でもODS表面に水は濡れない(接触角は90度以上)

# ODS表面は細孔内でも濡れない！



ODS充填剤上の水



~~Wetting~~

Permeating

浸透

~~Dewetting~~

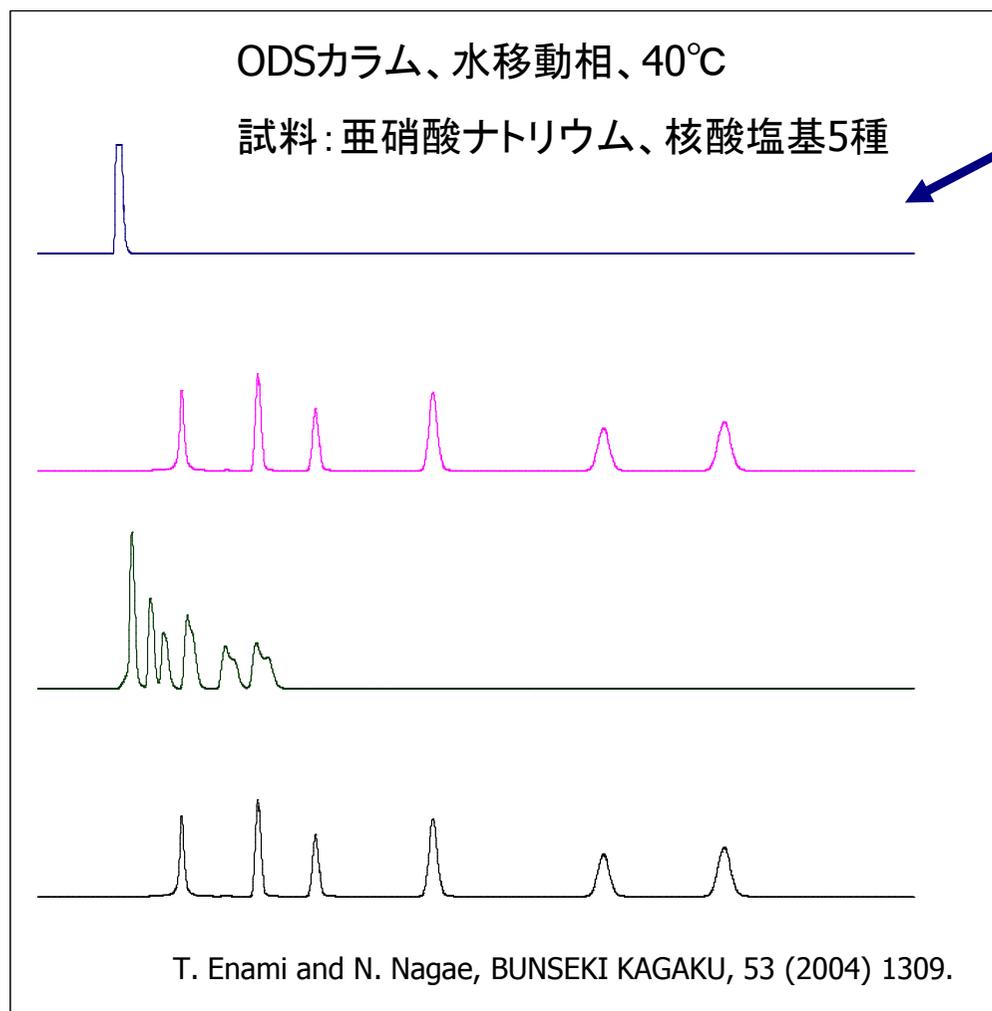
Expelling or

Depermeating

追い出し

この表現の方が的を射ているのでは？

# ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？

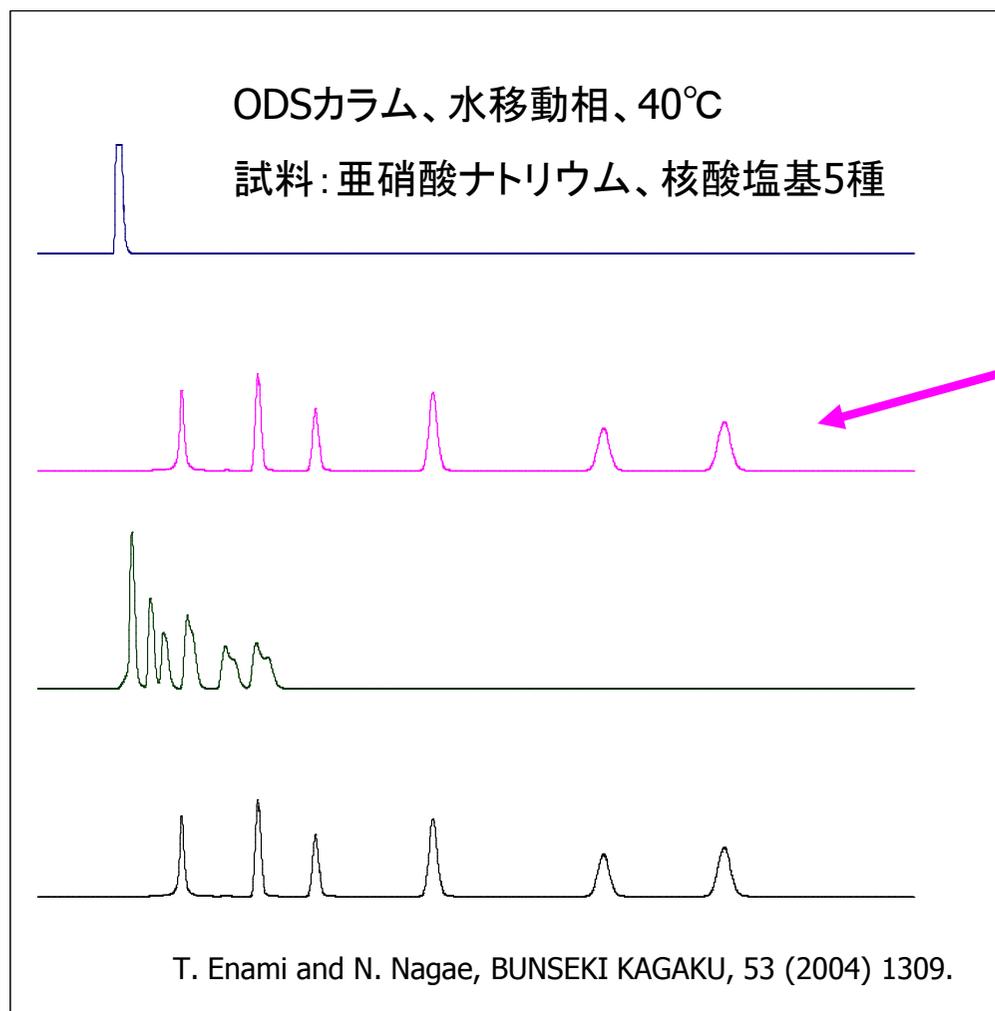


ODSカラム内をクロロホルムに置換後70°Cで24時間乾燥し、カラム温度40°Cで水移動相を流す。

- \* 充填剤細孔内には空気が入っている。
- \* 保持しない。
- \* 細孔内には全く水が入っていない。

\* 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。)

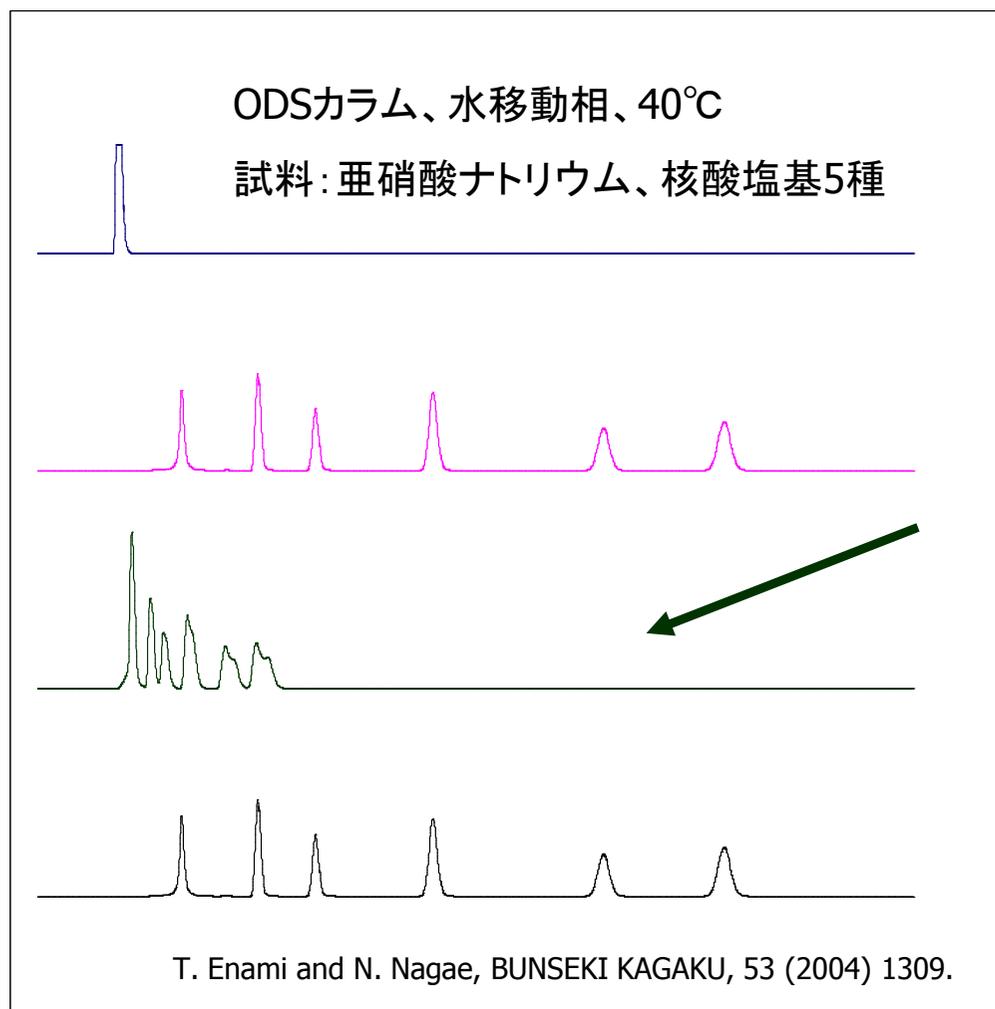
# ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？



全く保持のない状態からポンプ停止しないでカラム出口以降に背圧を23MPa加えると、保持し6本のピークに分離する。

背圧を加えたただけであるので細孔内に移動相が入っており、固定相の状態は変化していないはずである。細孔内の空気の体積は0.5%以下になり通液中に移動相に溶け込むと考えられる。

# ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのか？

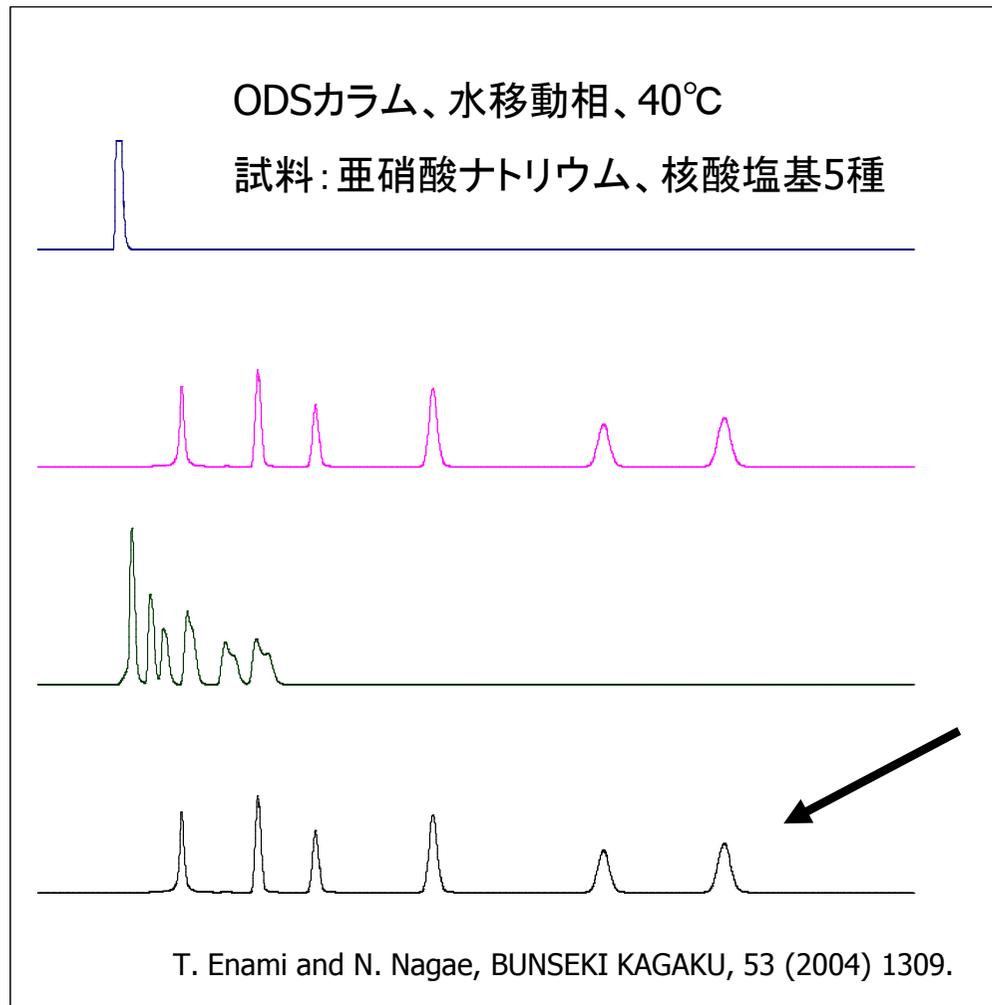


ポンプを60分間停止後、再度移動相を通液する。  
\* ポンプ停止時に細孔から移動相が70%以上抜け出す。

\* 背圧をかけないで、再度通液しても細孔内へ移動相は戻らない。

\* 保持は小さくなった。

# ODS表面と移動相(水)が濡れていなくても保持するのかな？



通液しながらカラム出口以降の背圧を再度23MPa加えると、前回と同様に保持が増し6本のピークに分離する。全く同じ分離であり、背圧を加えることにより再現性のある分離が達成される。

**ODS表面は有機溶媒で濡れた状態の履歴が無くても水移動相で分離可能、アルキル基が寝込んでいても分離に関係しない。**

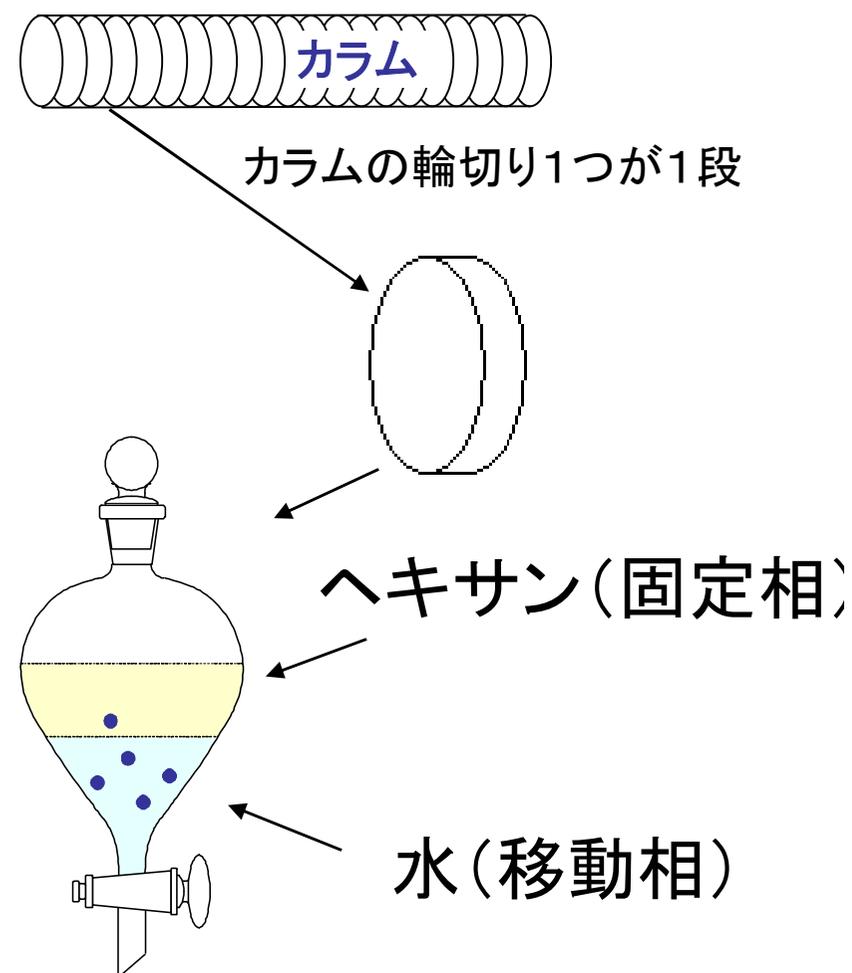
# 固定相と移動相は濡れていなくても 相互作用はあるのか？

段理論から分離のメカニズムを説明  
する場合

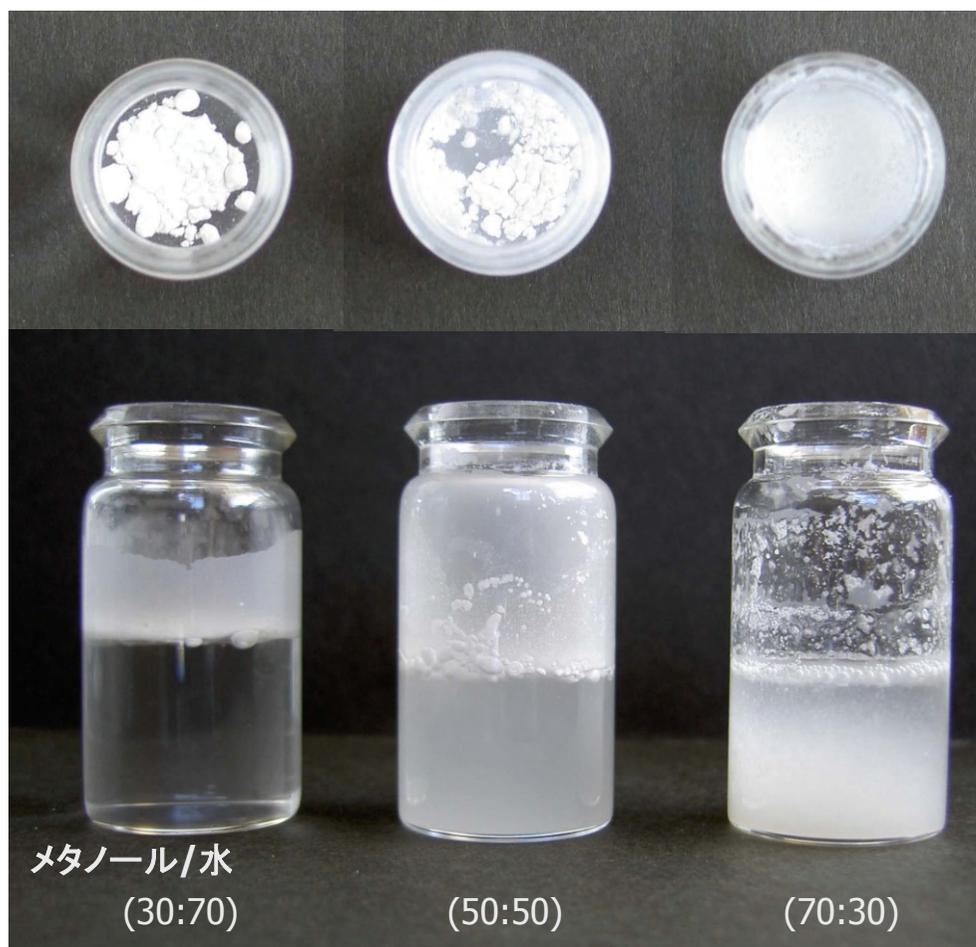
1段は分液ロート1個の分配に相当し  
ます。

ヘキサンと水は濡れないが  
溶質は両溶媒間を移動し、  
ある比率に分配される。

したがって固定相と移動相も  
同様にお互いは濡れなくても  
溶質の分配は起こる。



# 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。

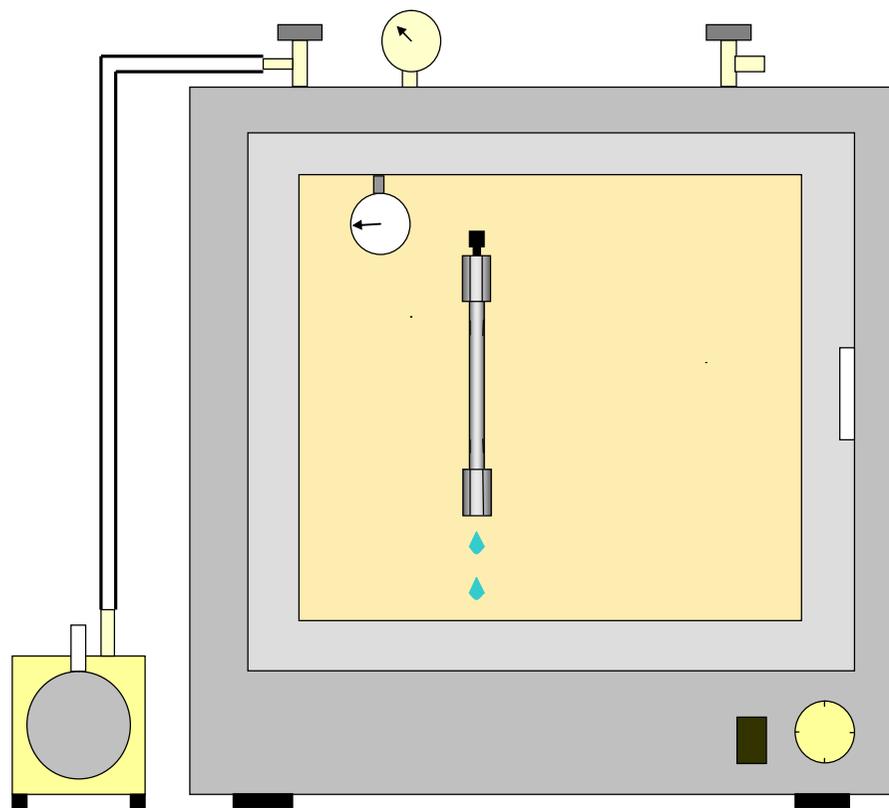
- ・70%メタノールでは超音波の振動を加えなくても完全にC18充填剤が分散する。分散後沈降し始める。

- ・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。

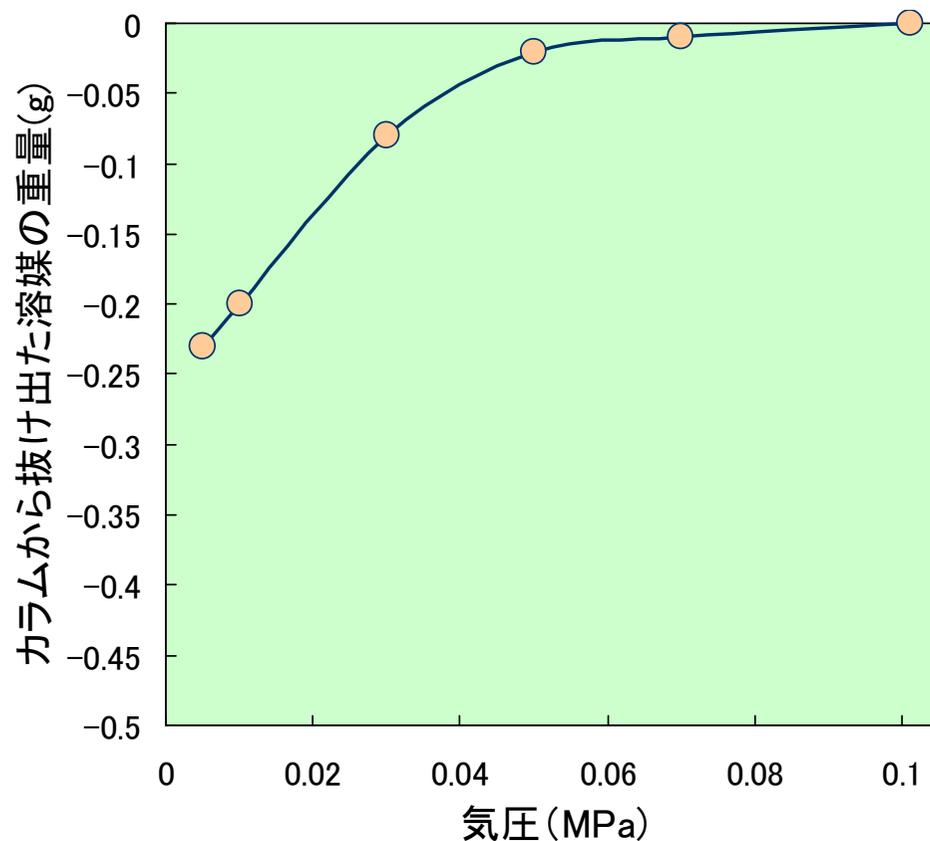
メタノール濃度が50%以下の溶液はC18表面に濡れないため、細孔内に入り込めない。しかし、圧力をかける、また100%メタノールで濡れている状態から溶液を切り替えた場合には30%メタノールでも細孔内に入り込み、その後大気圧にしても細孔から抜け出すことはない。

# 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  $\mu\text{m}$  - 250x4.6mm

カラム内容媒: メタノール/水=(10:90)

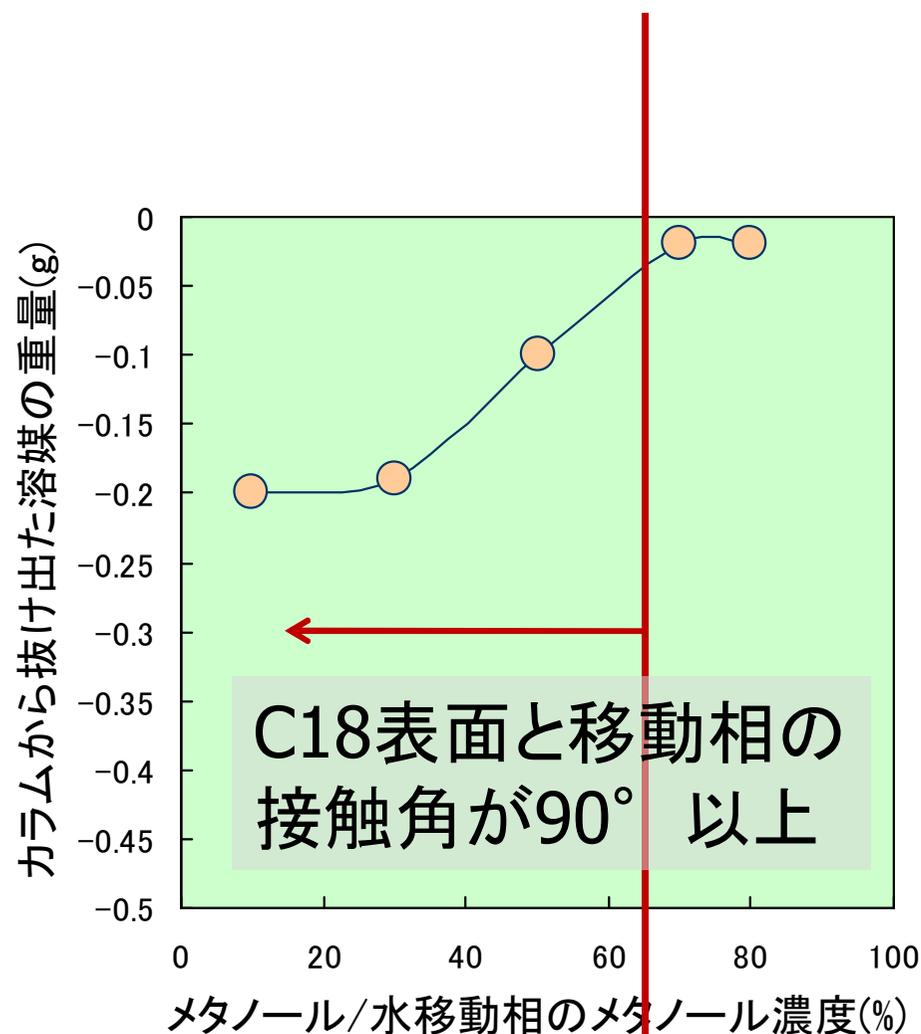
カラム温度: 40  $^{\circ}\text{C}$

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  $\mu\text{m}$  - 250x4.6mm

模擬大気圧: 0.01MPa

カラム温度: 40  $^{\circ}\text{C}$

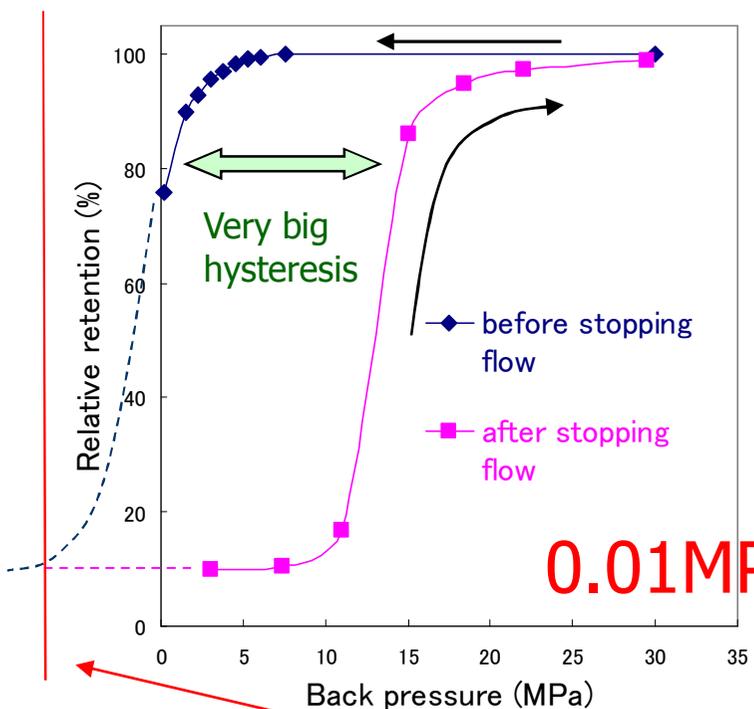
放置時間: 20分間

\* 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。

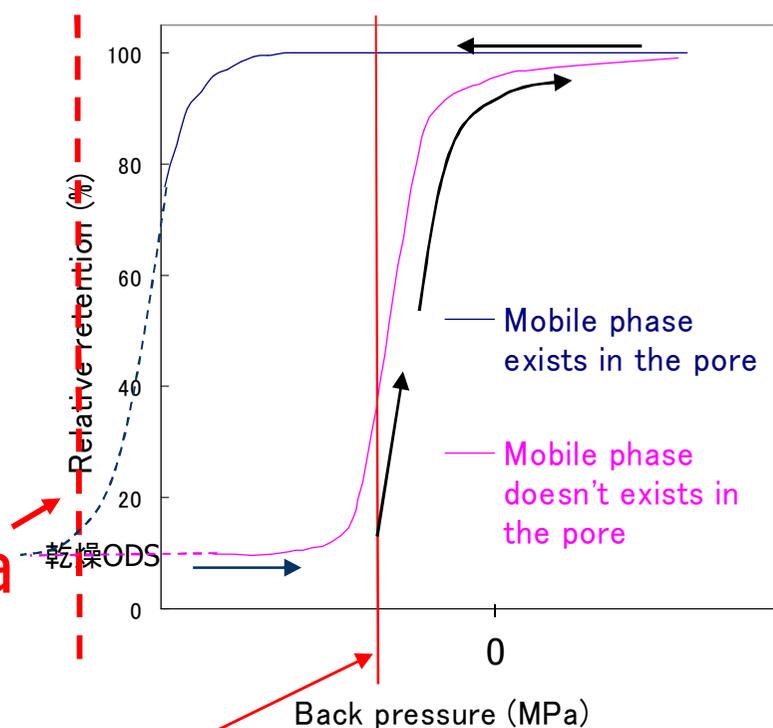
\* 70%以上のメタノールではODS充填剤が濡れるため、毛管作用により細孔内へ入り込む力が働き、充填剤細孔から溶媒は抜けでないが、50%以下では濡れないため、抜けようとする。

# なぜ30%メタノールはODSに濡れないのにポンプを停止しても細孔から抜け出さないのか？

Column: ODS (5 $\mu$ m) 150x4.6mm  
Mobile phase: water



Column: ODS (20 $\mu$ m) 150x4.6mm  
Mobile phase: methanol/water(30:70)



ポンプ停止

大気圧は30%メタノールを細孔内に押し留めておくのに十分な圧力である

# Orientational Dynamics of a Hydrophobic Guest in a Chromatographic Stationary Phase: Effect of Wetting by Alcohol

Malcolm E. Montgomery, Jr., M. Anthony Green, and Mary J. Wirth\*

*Department of Chemistry & Biochemistry, University of Delaware, Newark, Delaware 19716*

The orientational distribution of the alkyl chains of a  $C_{18}$  chromatographic surface was sensed indirectly from the orientational distribution of a long hydrophobic probe, 1,4-bis(*o*-methylstyryl)benzene. Frequency-domain fluorescence anisotropy measurements were used to determine the orientation and reorientation of the fluorescent probe. When pure water is in contact with the  $C_{18}$  surface, the orientational distribution of the probe is centered close to the plane of the surface. The effects of two different wetting solvents were explored: 20% methanol and 5% 1-propanol. When the  $C_{18}$  surface is in contact with either of these, there is little change in the orientational distribution of the probe.

Wetting is important to the dynamics of chroma. For example, Cole and Dorsey showed that the addition of only a few percent of 1-propanol to an aqueous mobile phase increases chromatographic efficiency almost 2-fold. Improved mass transfer was interpreted as owing to wetting of the chromatographic surface by the mobile phase due to significant adsorption of 1-propanol onto the hydrophobic surface. As supporting evidence cited, Simpson had measured the adsorption isotherms for a range of alcohols in water with a polymeric  $C_{18}$  surface, and results showed that short-chain alcohols achieve significant coverage on the chromatographic surface even at concentrations of only 5% of 1-propanol in water.<sup>12</sup> Higher

silanizing agents were purchased from Aldrich. The coverage of the plates was determined by FTIR spectrometry to be  $60 \pm 10 \text{ \AA}^2/\text{C}_{18}$  chain ( $2.8 \pm 0.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ). The amount of end-capping was not quantitated.

## RESULTS AND DISCUSSION

**A. Contact Angle Information.** The contact angle of pure water on the  $\text{C}_{18}$  surface was measured to be  $93^\circ$ , which indicates that water does not wet the surface. For 20% methanol in water and 5% 1-propanol, the contact angles were measured to be  $65$  and  $69^\circ$ , respectively, which indicates that the surface is partially wetted by these mobile phases. Contact

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？

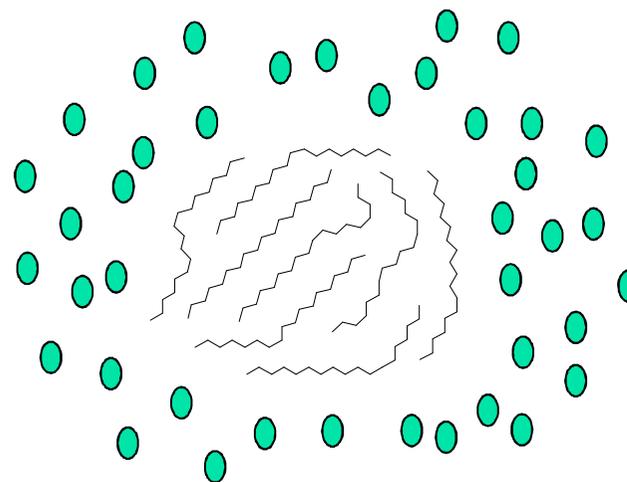
ChromaNik

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

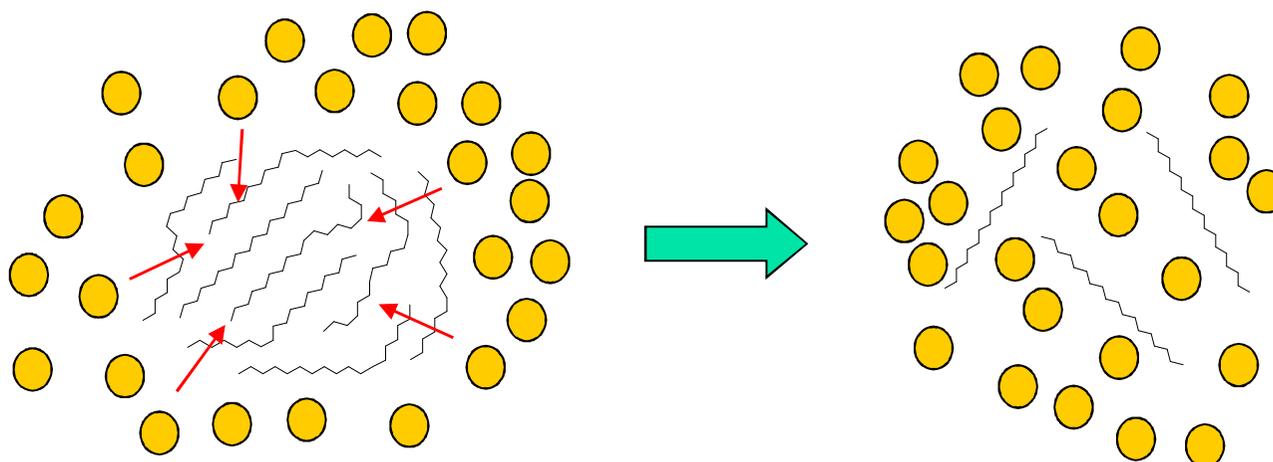
# 有機溶媒中でのオクタデカンの状態

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)



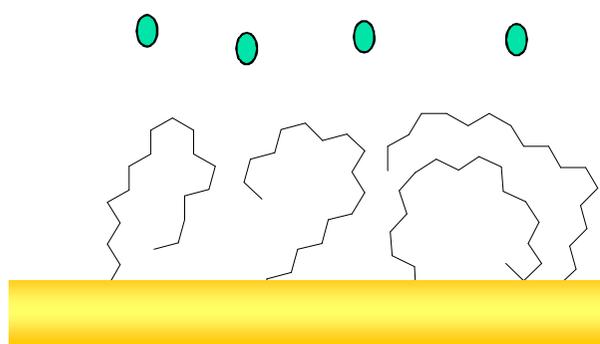
メタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとると考えられる

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



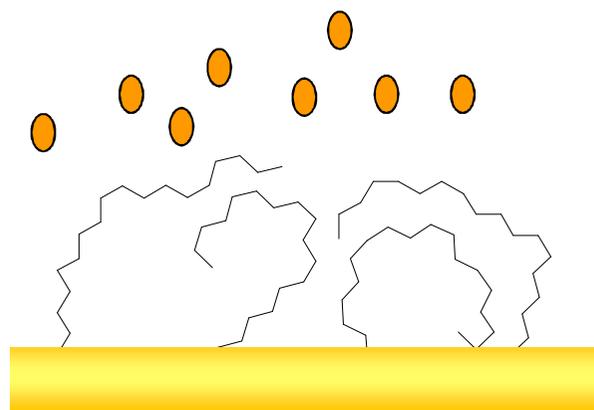
# C18表面上での溶媒和の概略図

## メタノール



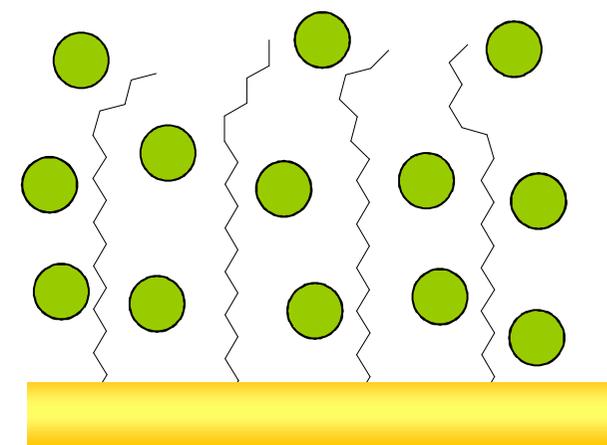
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している

## 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



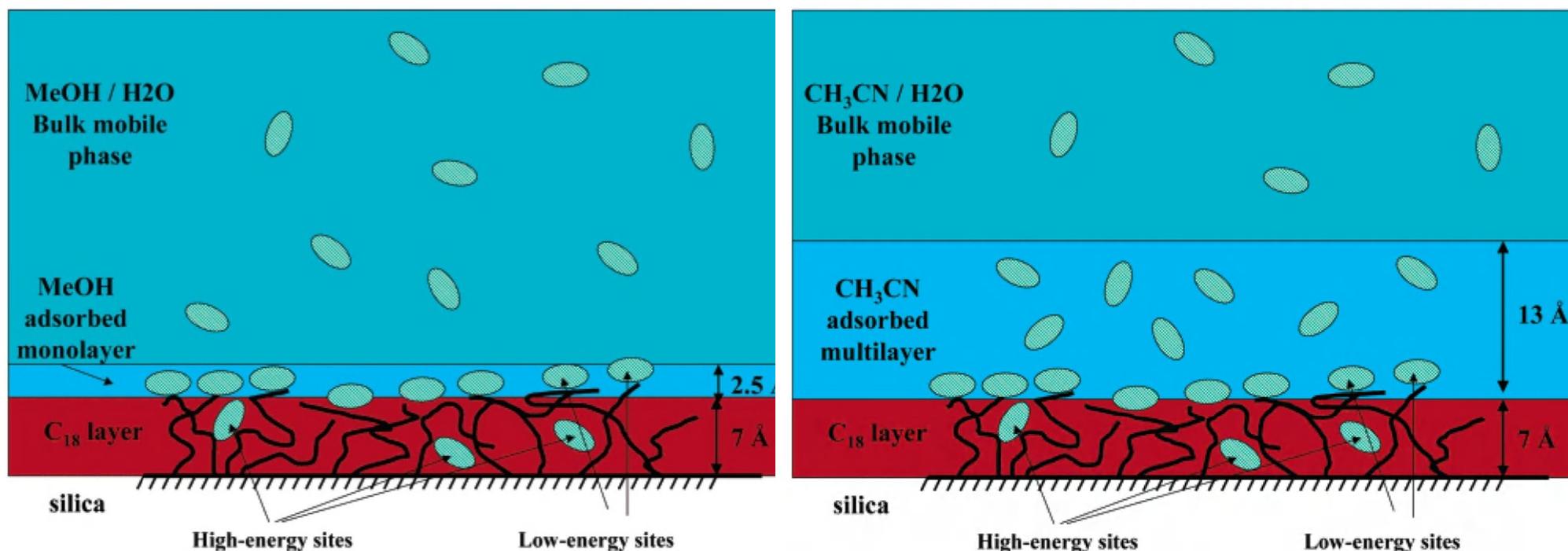
オクタデシル基は立ち上がっており、全体にテトラヒドロフランは溶媒和している

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 C<sub>18</sub>-bonded phase. The analyte (phenol or caffeine) is represented by small ovals.

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

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

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

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

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

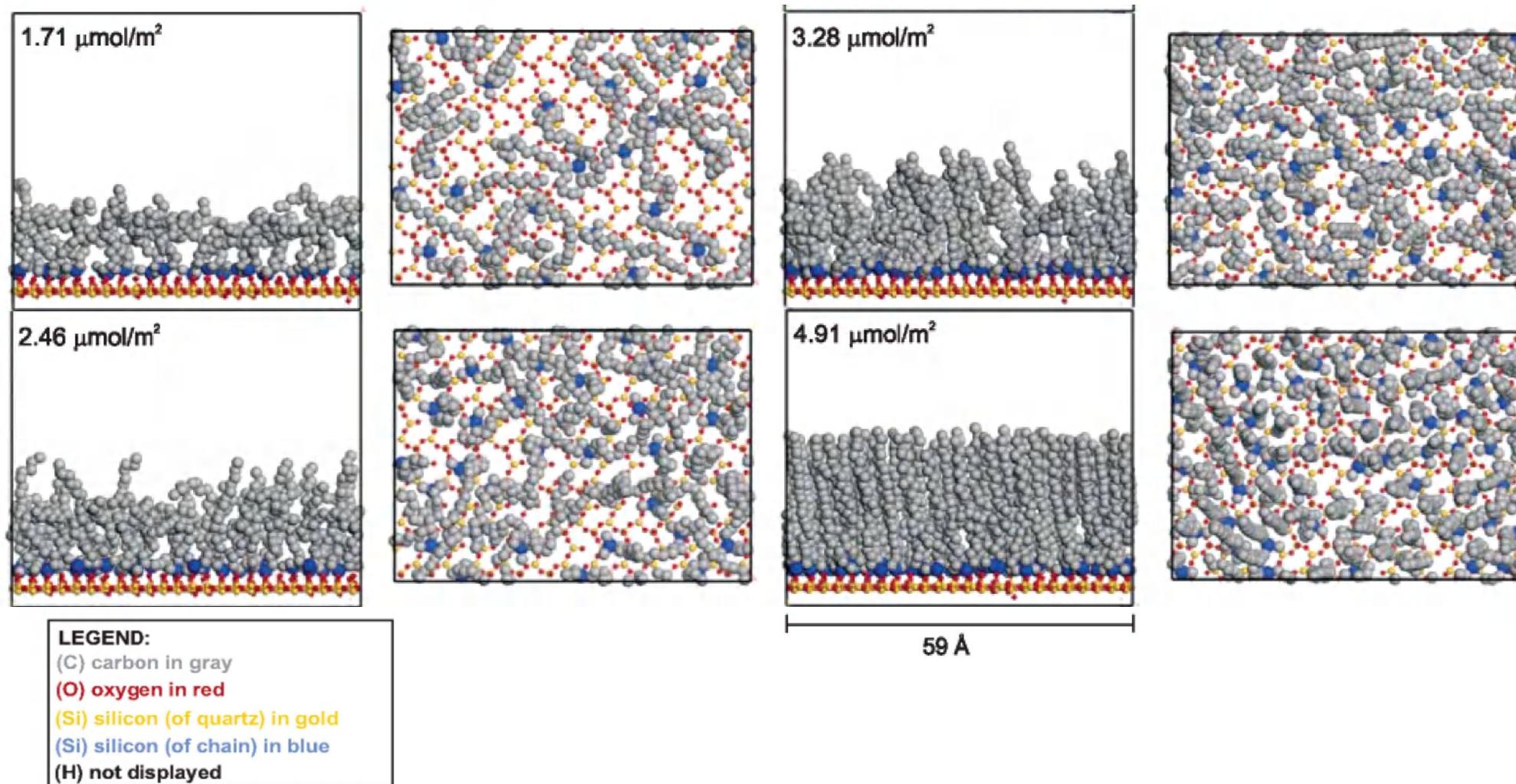
<sup>a</sup> Distance between Si atoms of the alkylsilane chains. <sup>b</sup> Uncertainty represents standard deviation of 100 measurements. <sup>c</sup> Distance between Si atom and end C atom of the alkylsilane chain. <sup>d</sup> Magnitude of the distance vector between Si and end C of the alkylsilane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

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

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

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

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



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

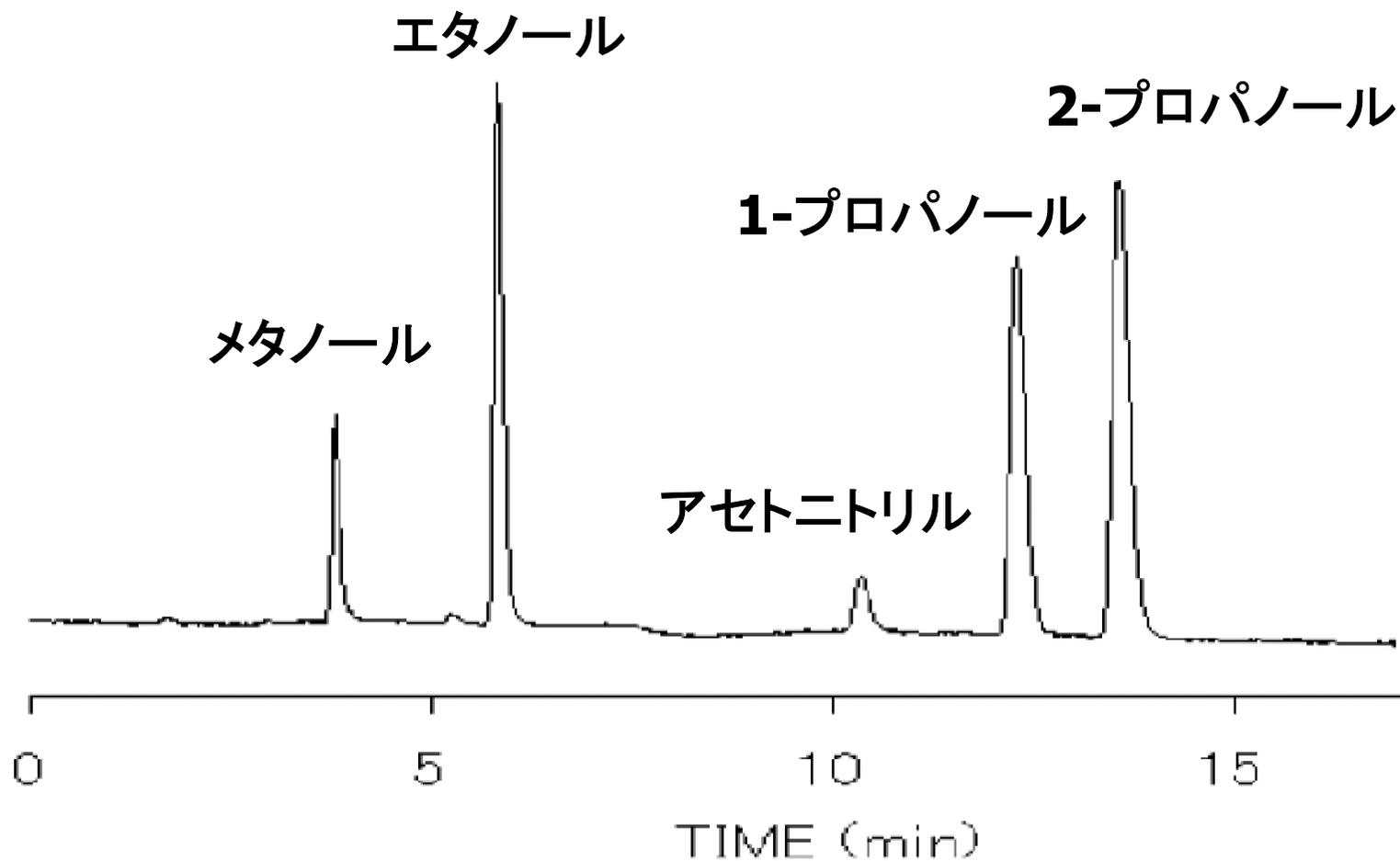
# 移動相中の有機溶媒の固定相への溶媒和の測定

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



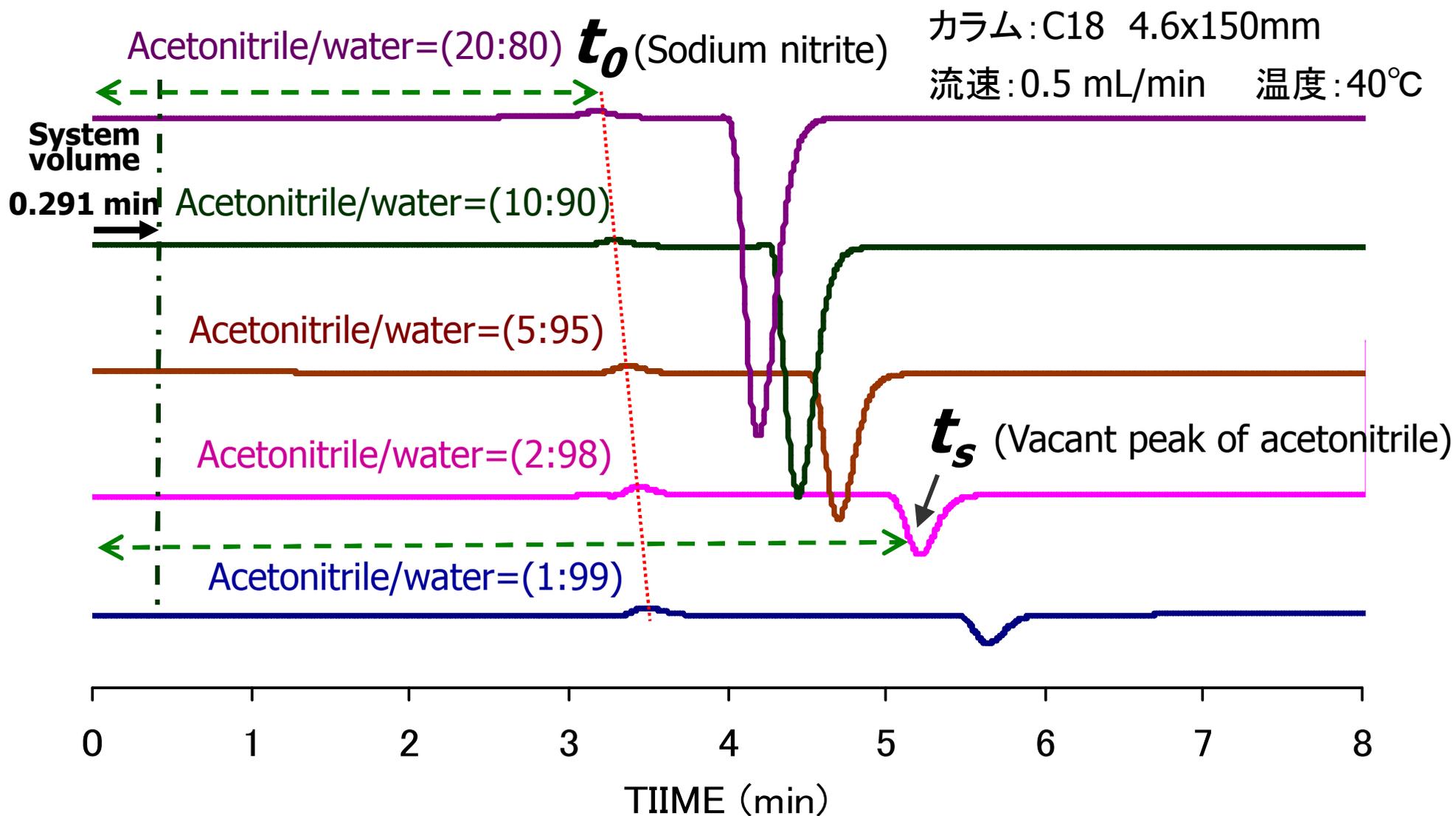
有機溶媒の固定相への  
分配量を溶媒和量と仮定

# 逆相カラムは有機溶媒を保持分離する



カラム: 逆相C18 4.6x250mm 移動相: 水

# 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



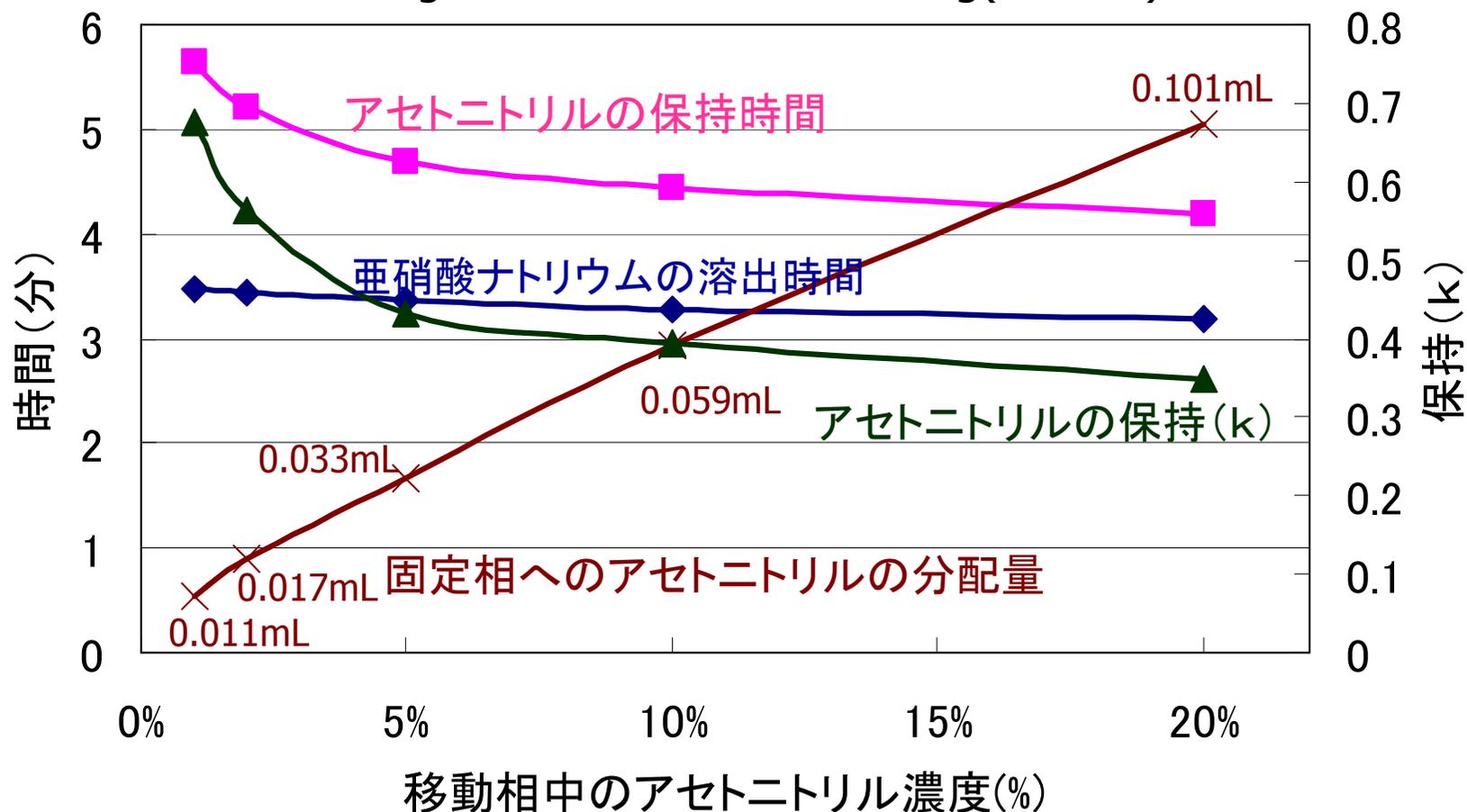
アセトニトリルは保持しており、固定相中に分配する。この分配量を溶媒和量とする

# 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

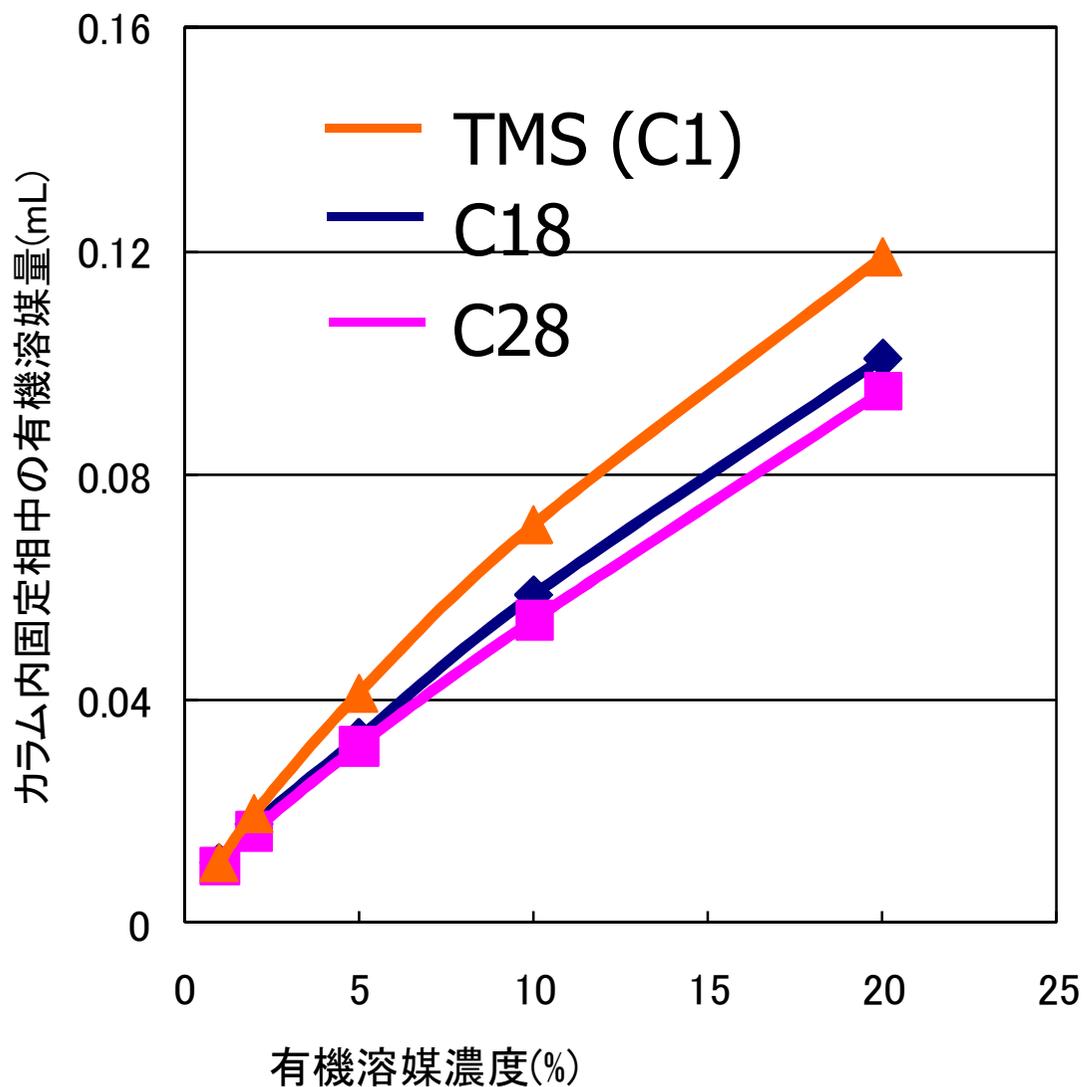
$$k = (t_s - t_0) / (t_0 - \text{system volume}) \quad k = S / M \quad S = k \times M$$

カラム: 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)



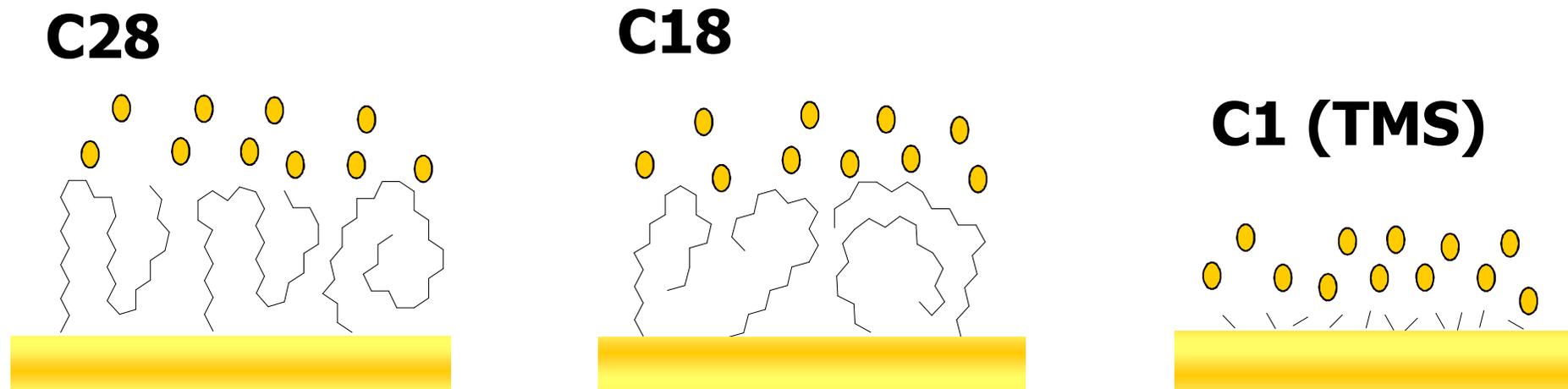
カラム: TMS (C1, %C: 5%)  
C18 (%C: 16%)  
C28 (%C: 16%)  
4.6x150mm

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

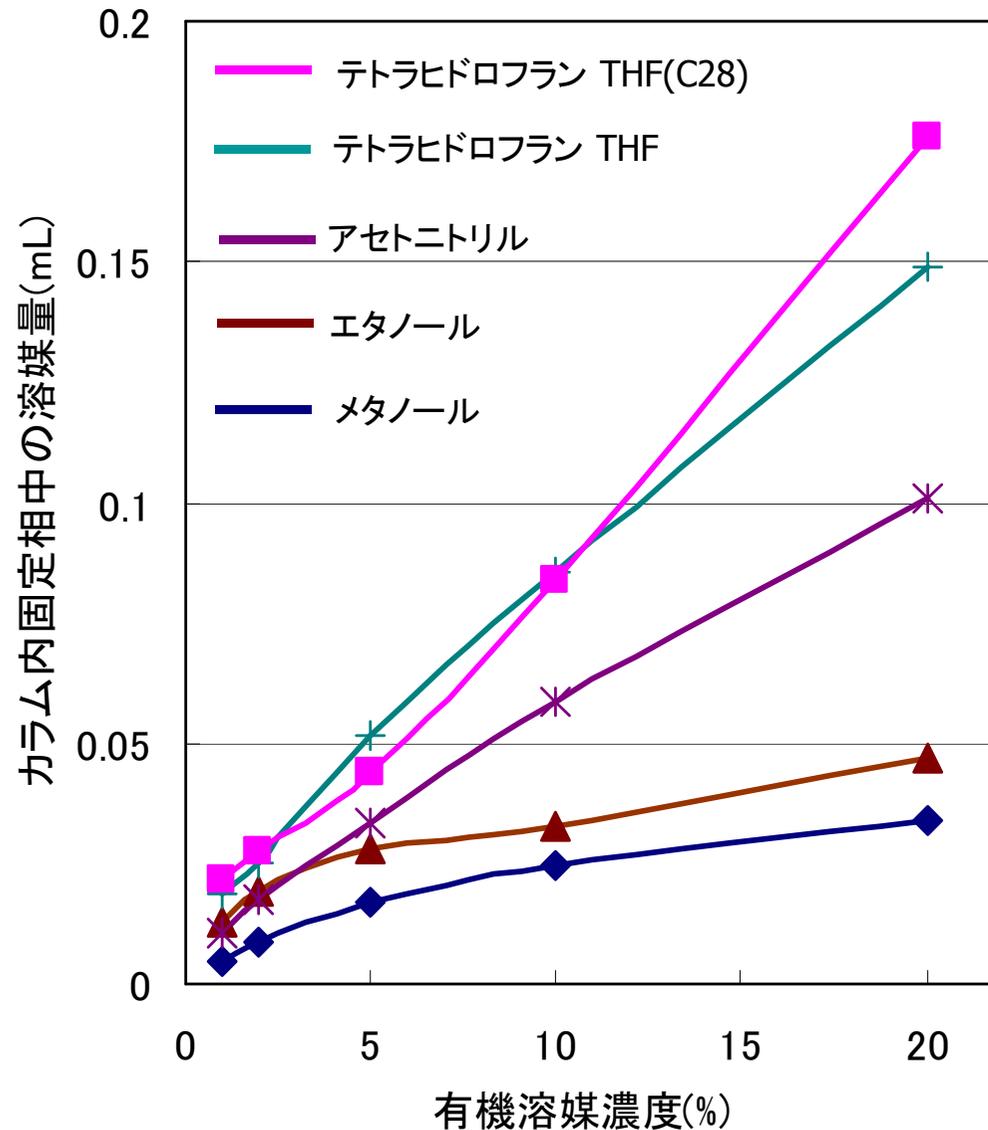
● : Acetonitrile



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

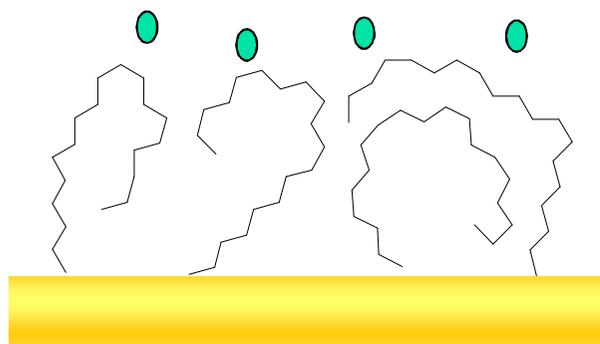
2)C18の炭素含有量16%  
C28の炭素含有量16%

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。

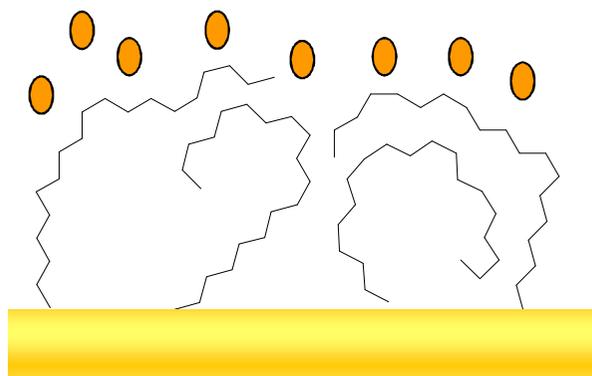
# C18表面上での溶媒和の概略図

## メタノール



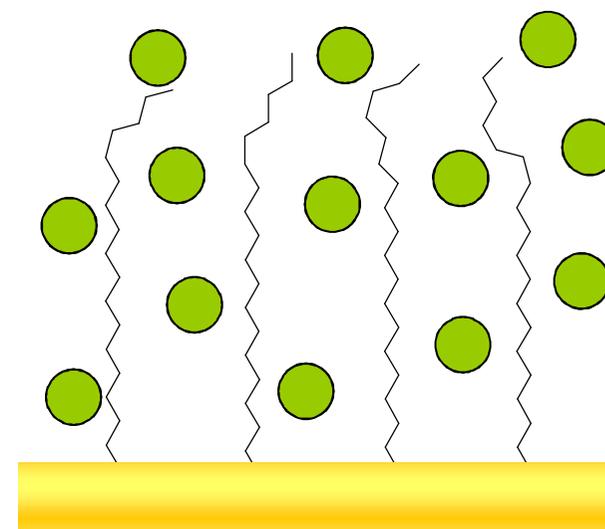
オクタデシル基は寝込み、表面に少量のメタノールが溶媒和している

## アセトニトリル



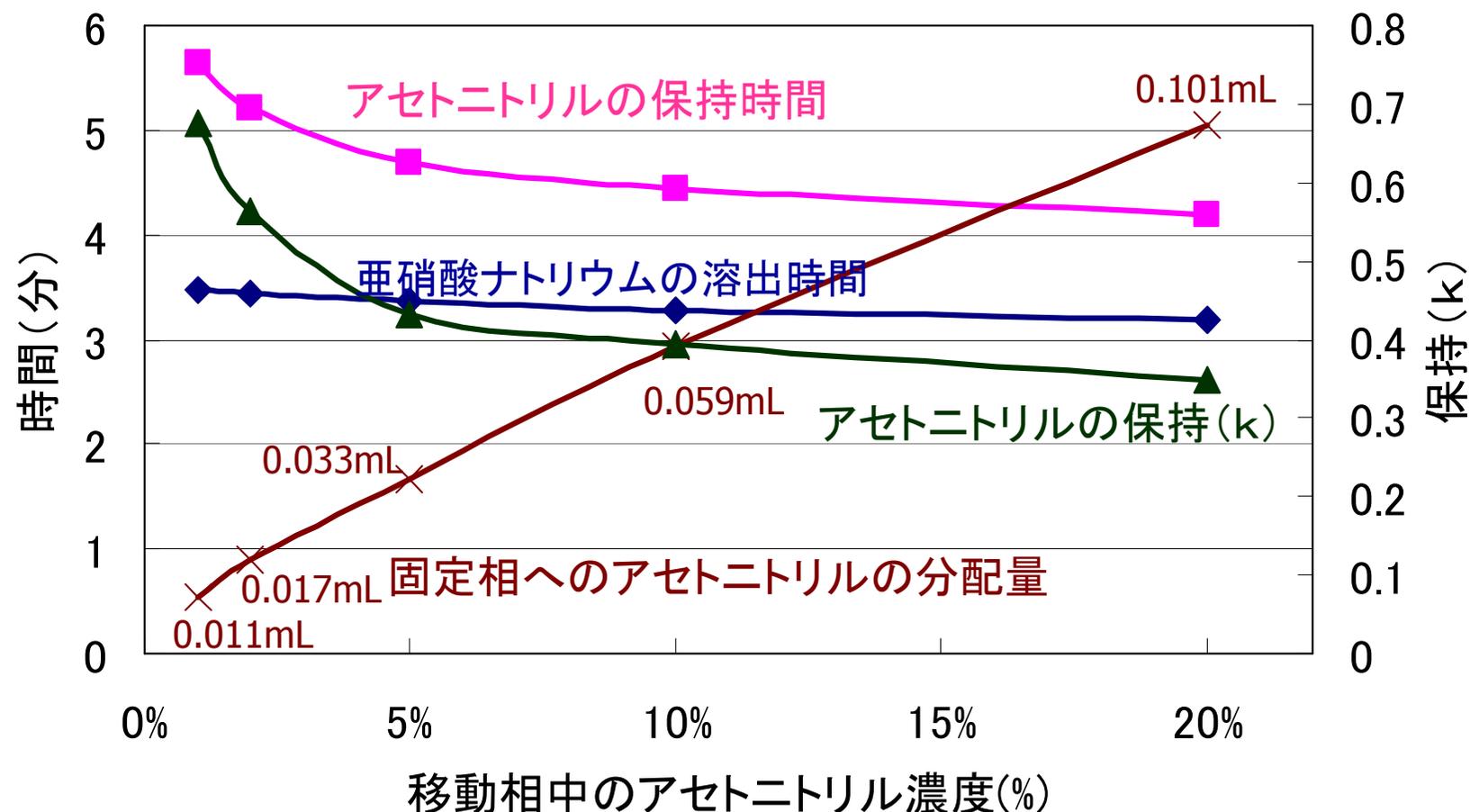
オクタデシル基は寝込んでおり、表面にアセトニトリルが溶媒和している

## テトラヒドロフラン



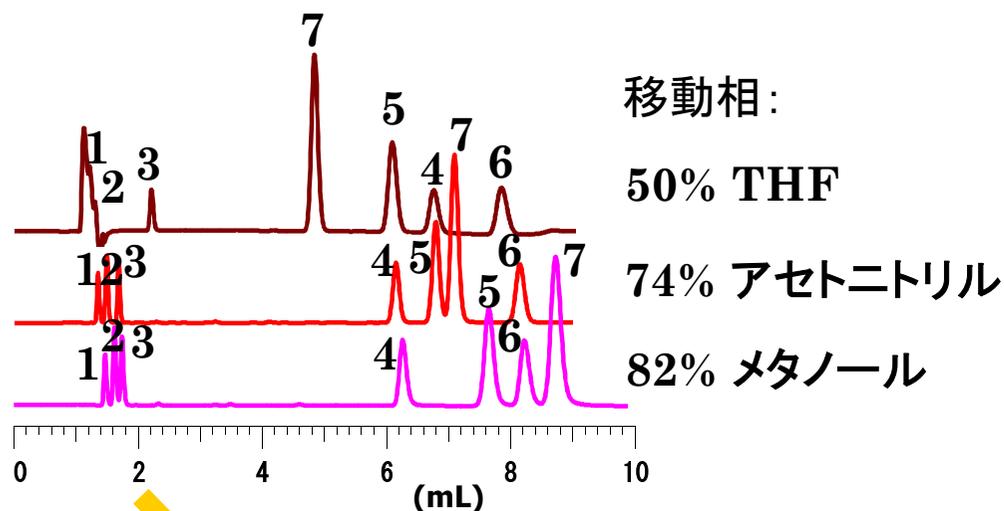
オクタデシル基は立ち上がっており、全体にテトラヒドロフランは溶媒和している

# 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



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



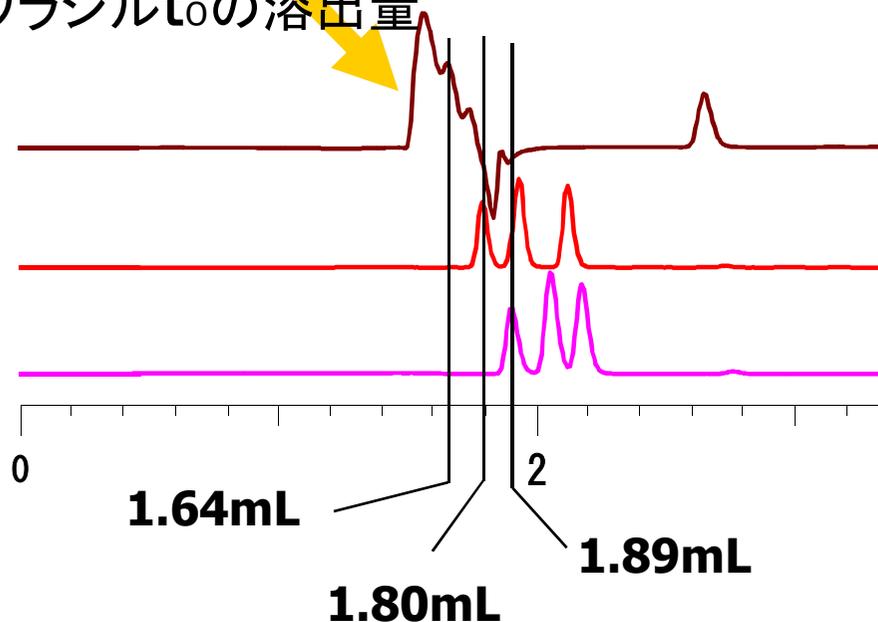
カラム: C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm.

アミルベンゼンの溶出量が約8mLになるように有機溶媒と水との混合比を決定

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

ウラシル $t_0$ の溶出量

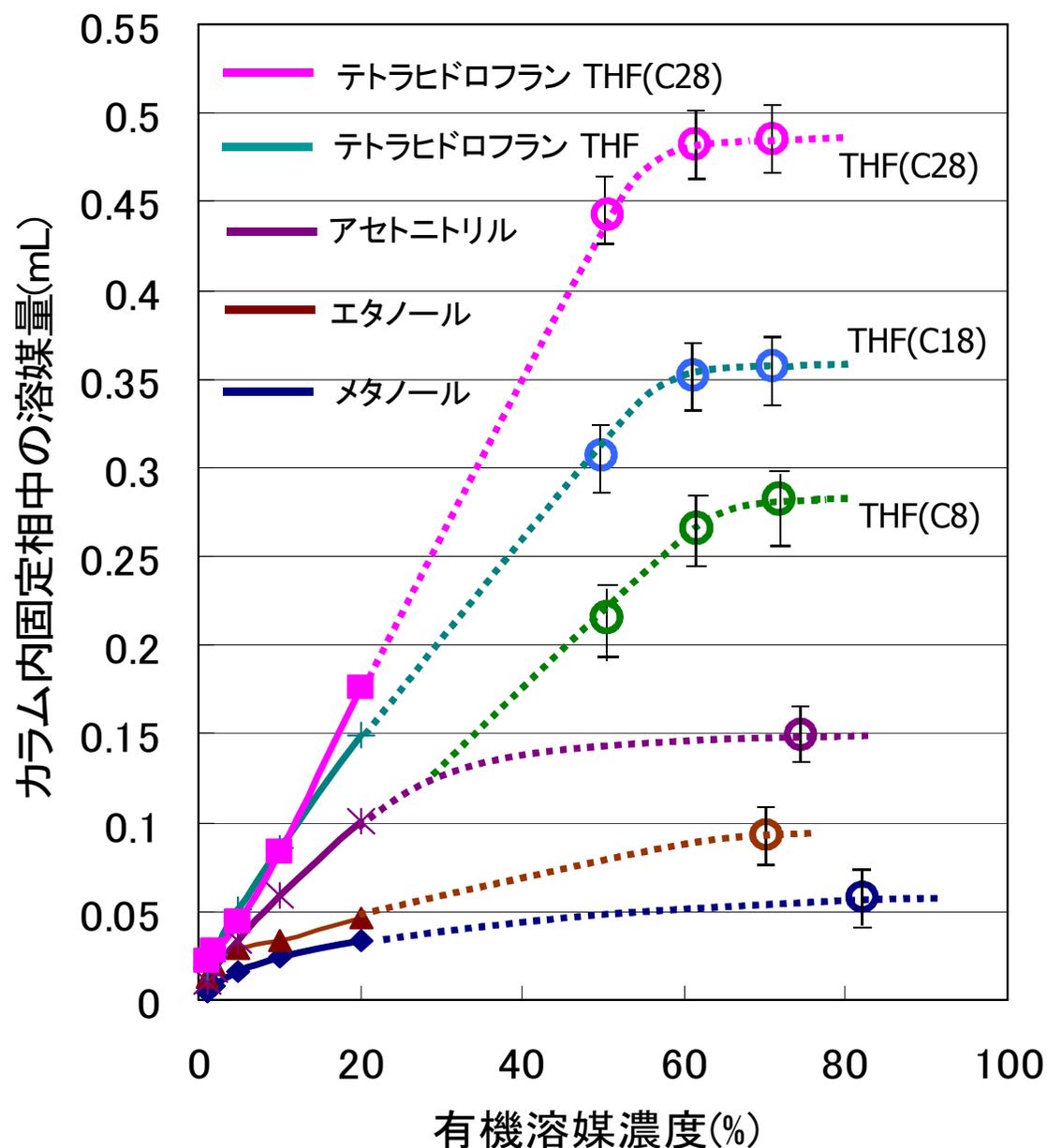


1) 溶媒和した有機溶媒とアルキル基の両方が固定相として働く。

2) 溶媒和量の多い場合に $t_0$ は小さくなる

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

# C18固定相への分配量(溶媒和量)



カラム: C18, (一部C28)  
4.6x150mm

1) 4.6x150mmカラムにC18充填剤は約1.5g入っている

2) C18の炭素含有量16%  
C28の炭素含有量16%

カラム内のアルキル基の容量は約**0.35mL**と計算される

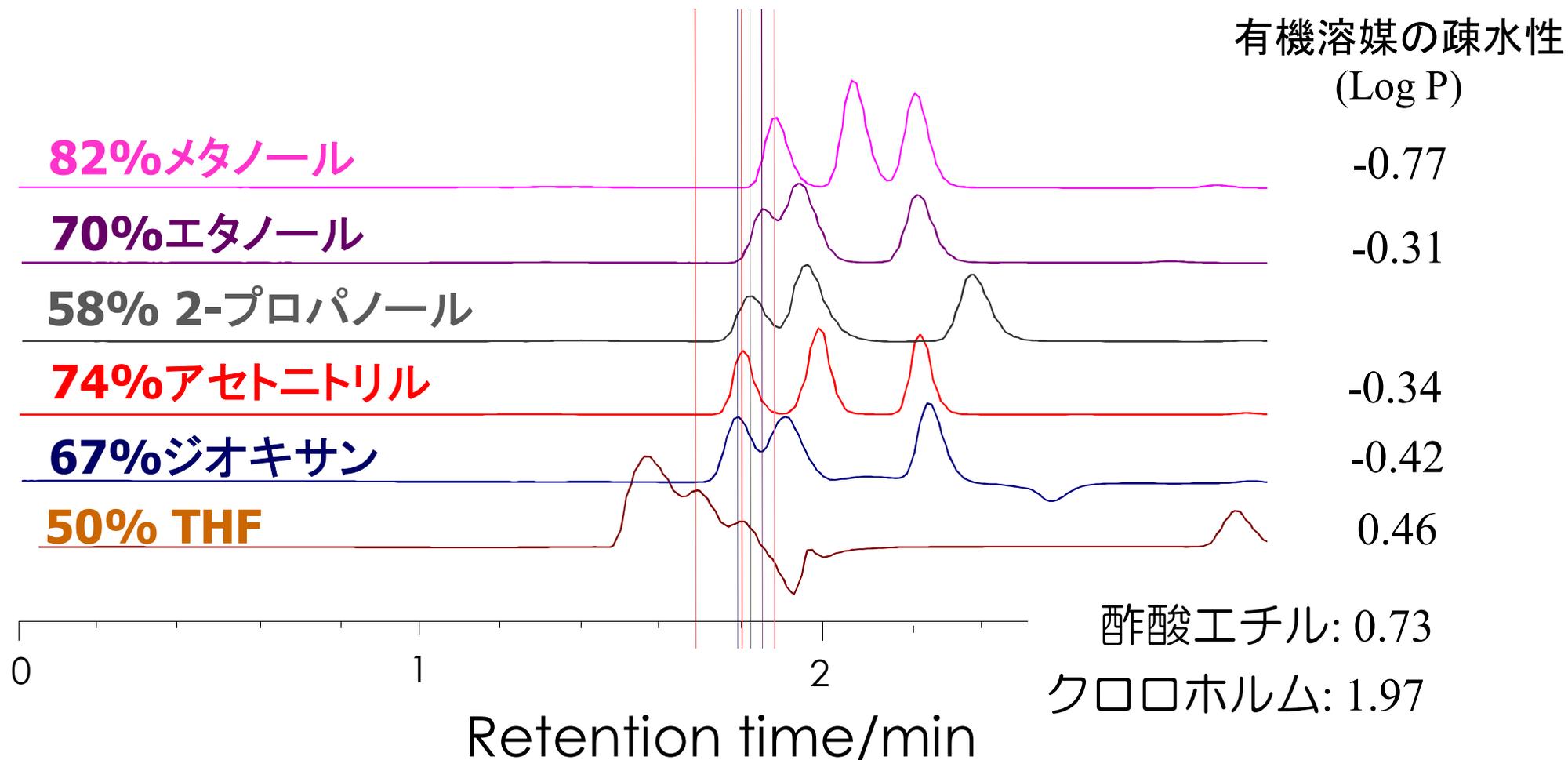
有機溶媒濃度20%でメタノールは約0.04mL, アセトニトリルは約0.1mL, テトラヒドロフランは約0.15mL溶媒和している。

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

# to(ウラシル)の溶出時間の比較

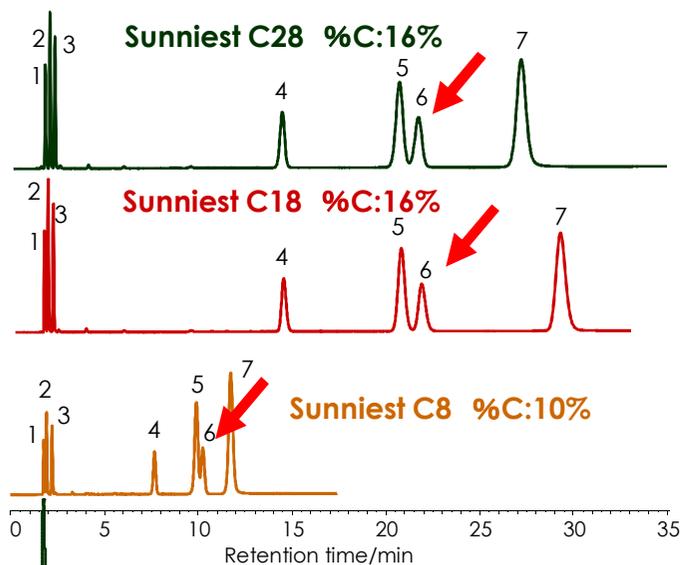
カラム: C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm. 試料: 1. ウラシル, 2. カフェイン, 3. フェノール  
アミルベンゼンの溶出量が約8mLになるように有機溶媒と水との混合比を決定

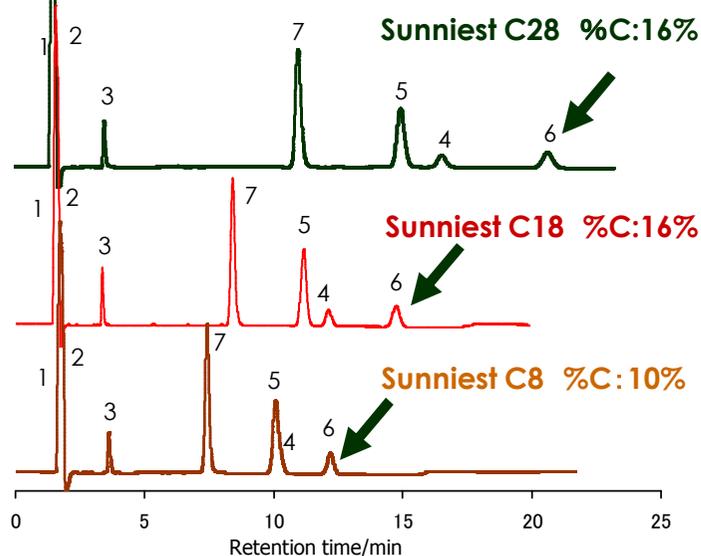


# メタノールとテトラヒドロフラン (THF) の差

メタノール



THF



Column: Sunniest C28, C18, C8, 5 $\mu$ m  
4.6x150 mm

Mobile phase:

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

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

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil,

2 = Caffeine,

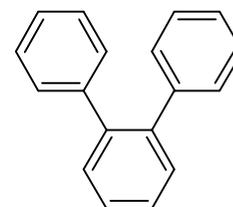
3 = Phenol,

4 = Butylbenzene,

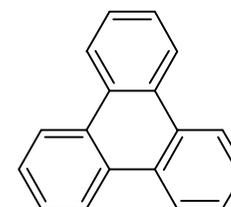
5 = o-Terphenyl,

6 = Amylbenzene,

7 = Triphenylene



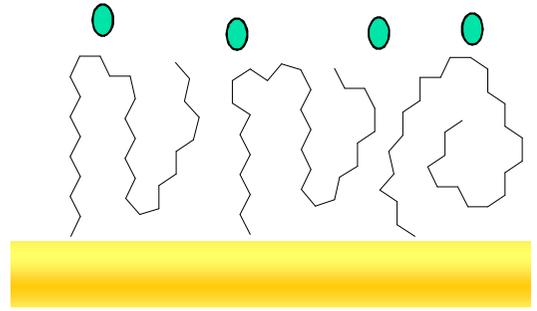
Peak 5



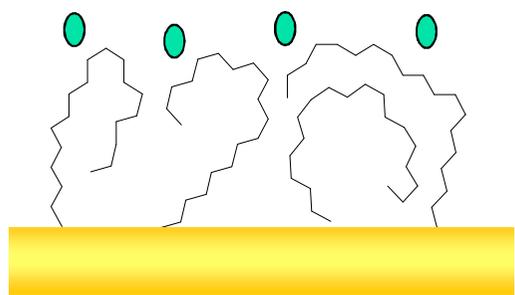
Peak 7

# C28,C18,C8固定相の状態

**C28** %C 16%

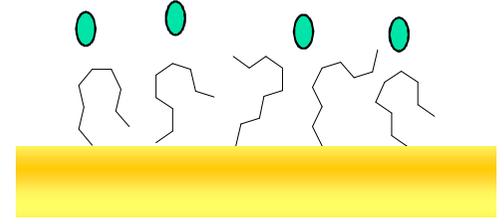


**C18** %C 16%



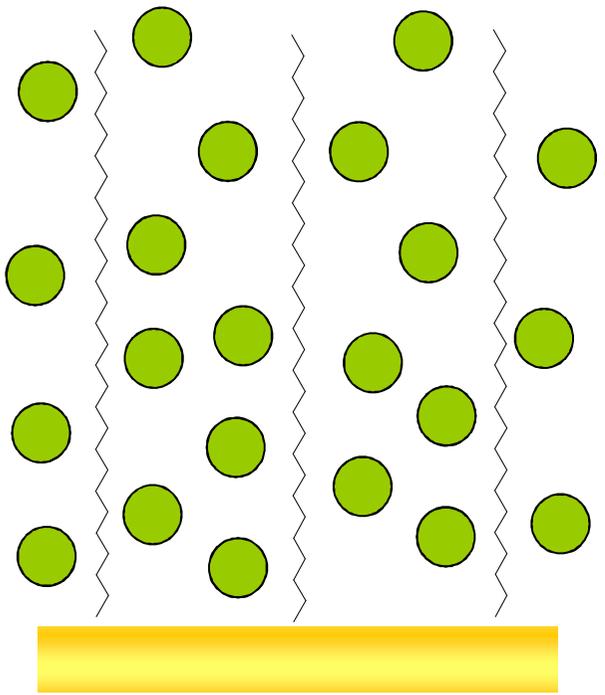
**CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25**

**C8** %C 10%

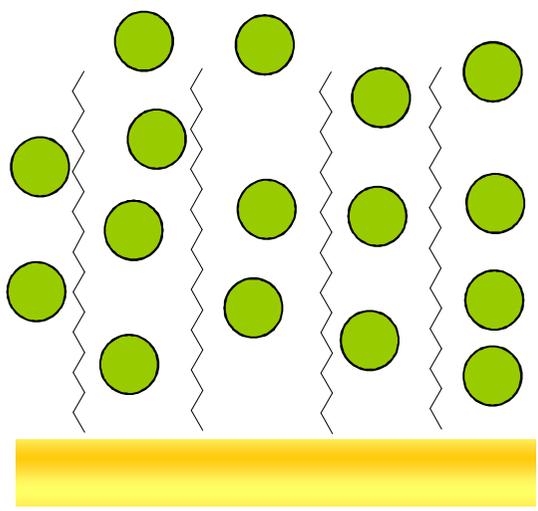


● : メタノール

**C28**



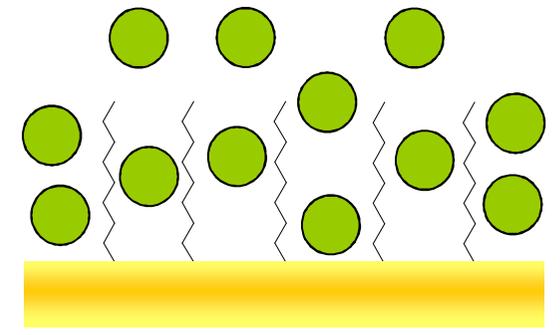
**C18**



● : THF

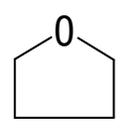
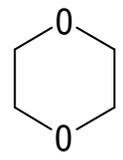
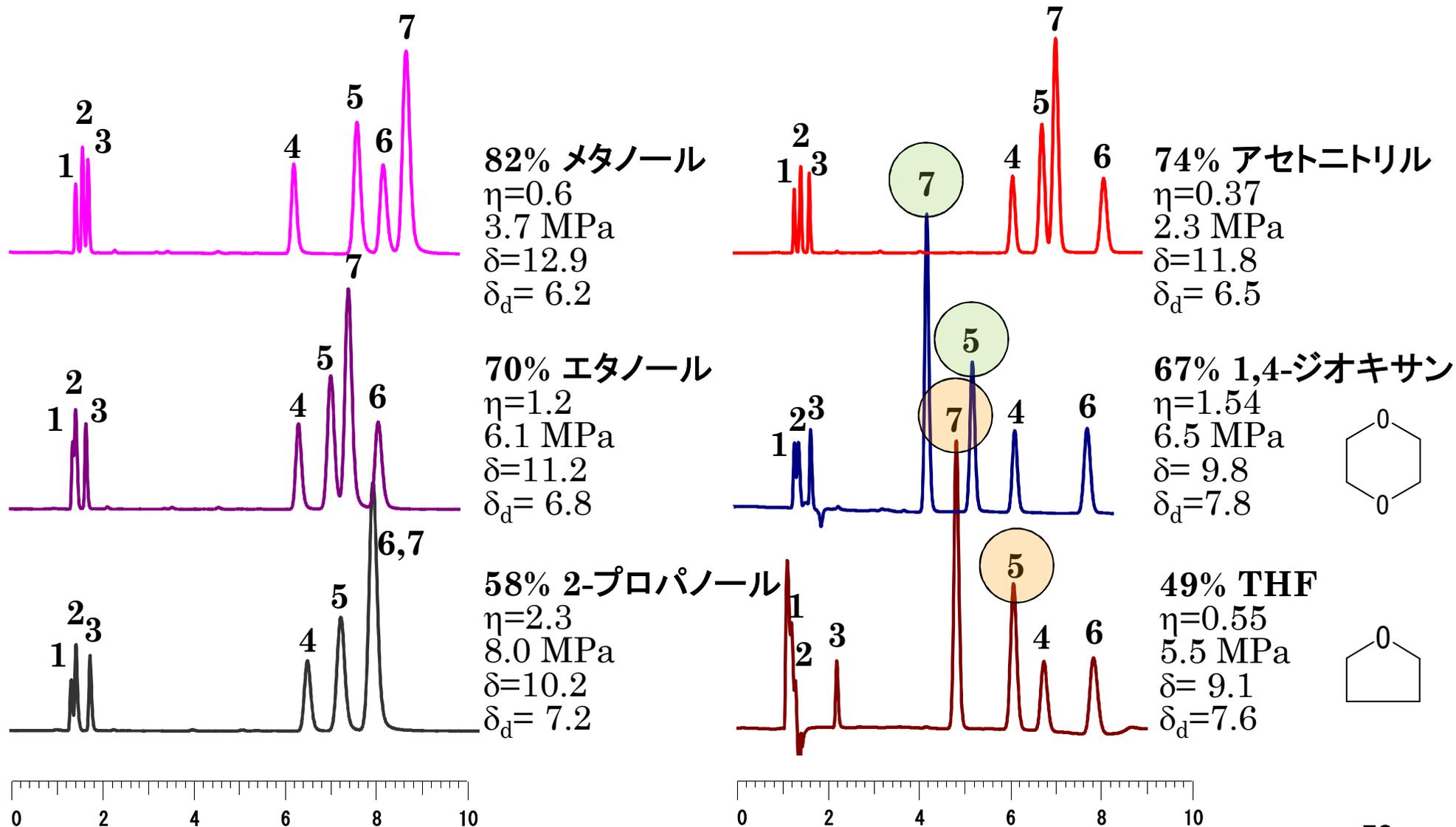
**THF/H<sub>2</sub>O=50/50**

**C8**



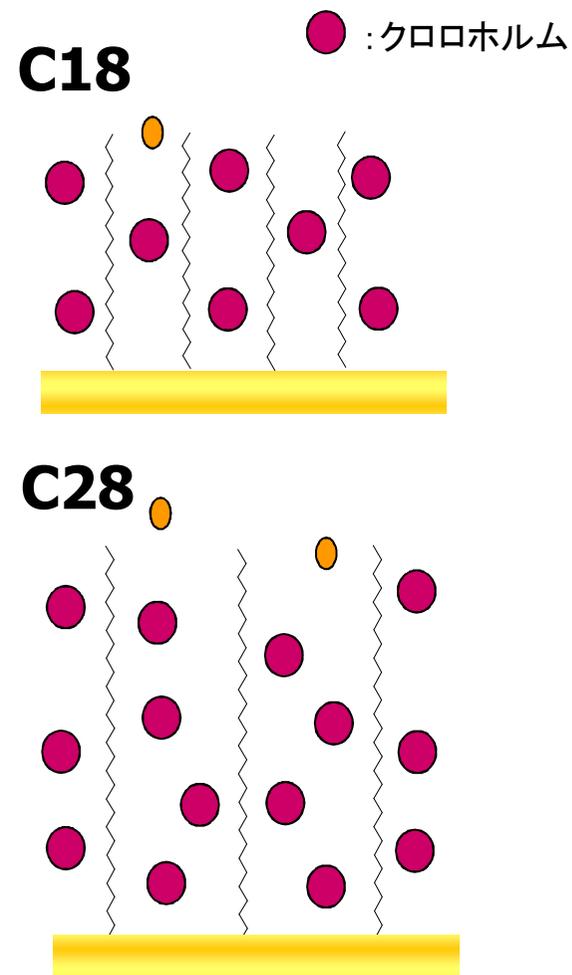
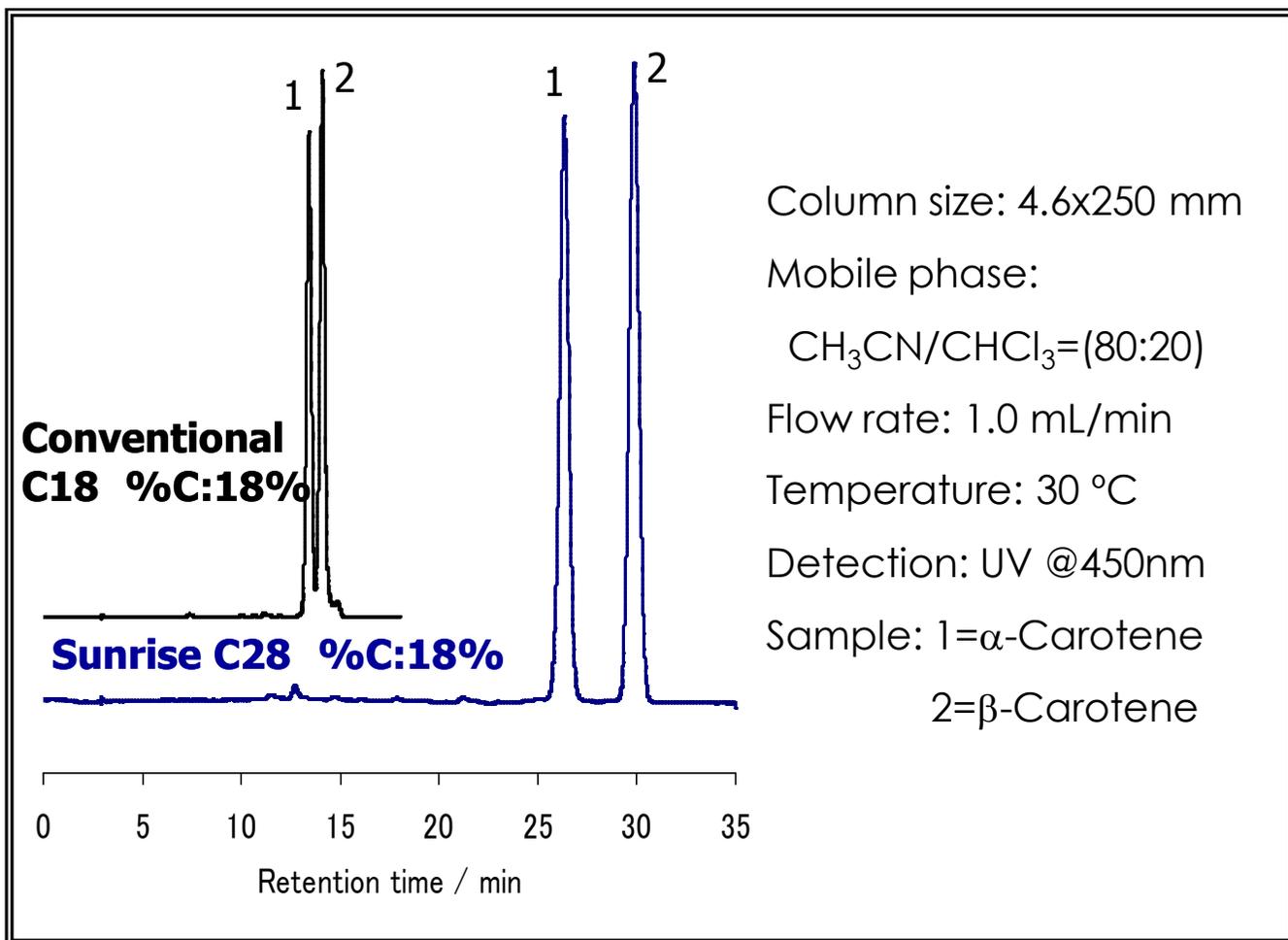
# 移動相有機溶媒の選択性

## 5=o-terphenylと7=triphenyleneの溶出順序





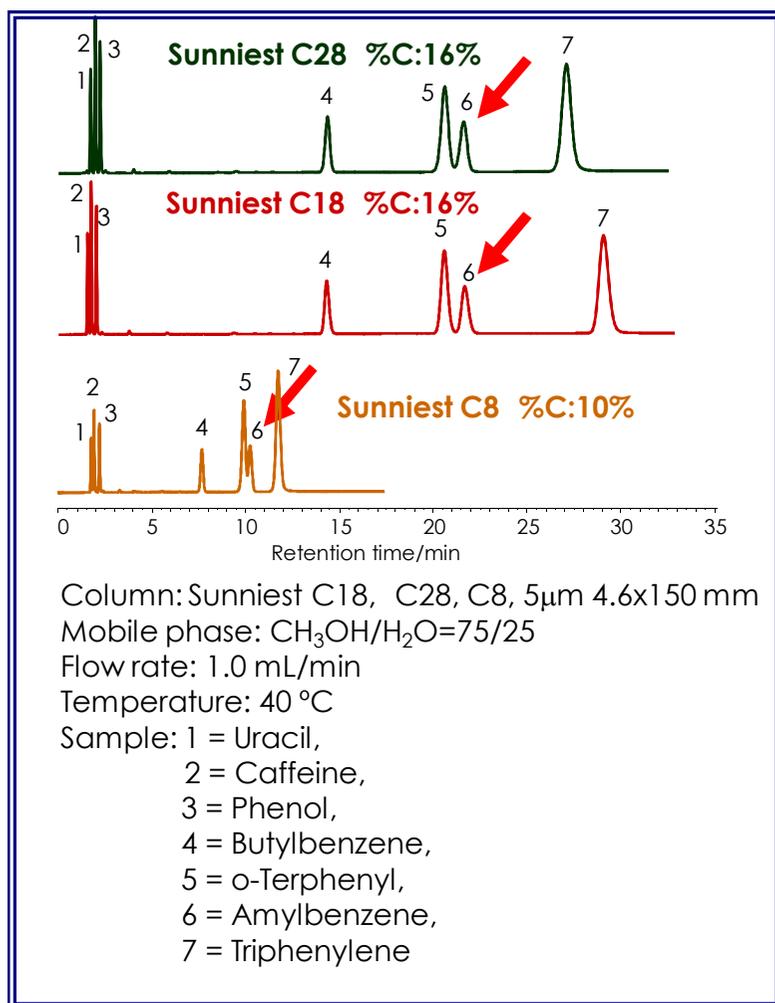
# 炭素含有量の同じC28とC18でもアセトニトリル・クロロホルム移動相条件では保持は変わる



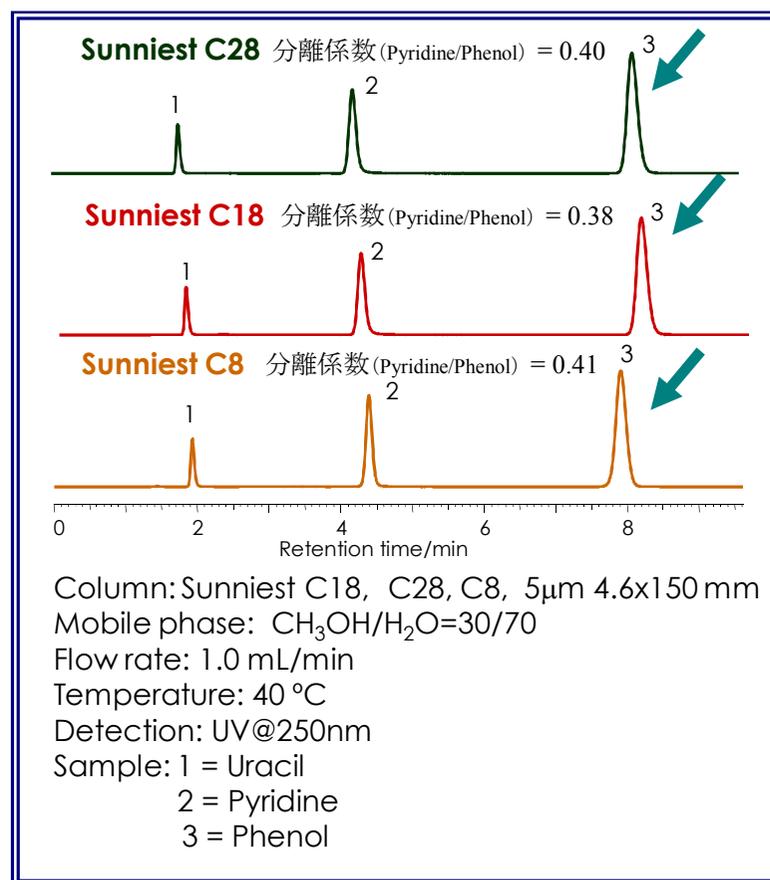
固定相容量は2倍

# 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

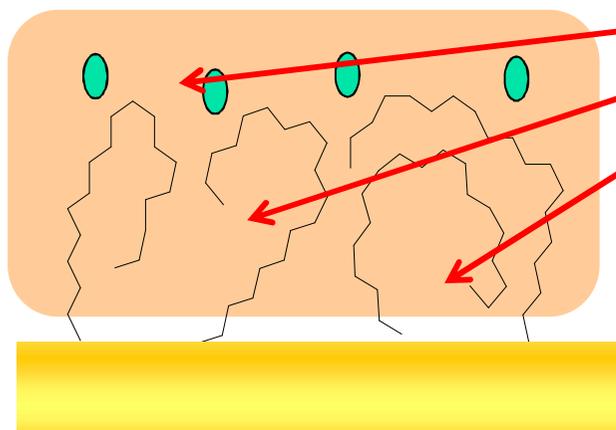


C8はC18とC28に比べ、アミルベンゼンの保持は半分であるが、フェノールの保持はほぼ同じである。

# 試料とC18固定相の相互作用場

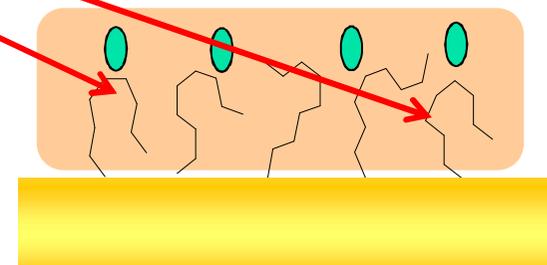
## メタノール・水移動相

C18

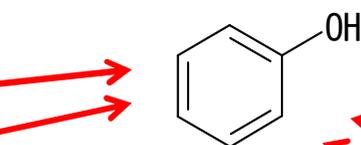
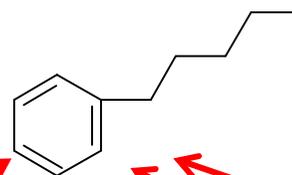


● : メタノール

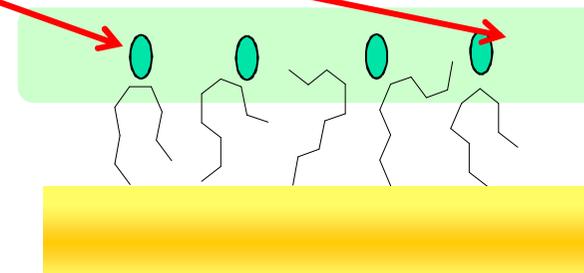
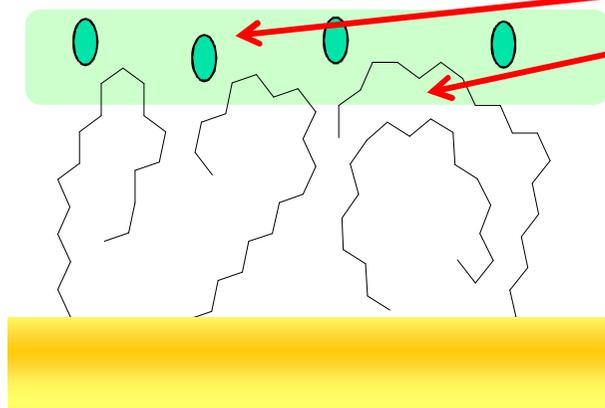
C8



アミルベンゼンは  
オクタデカンに可溶



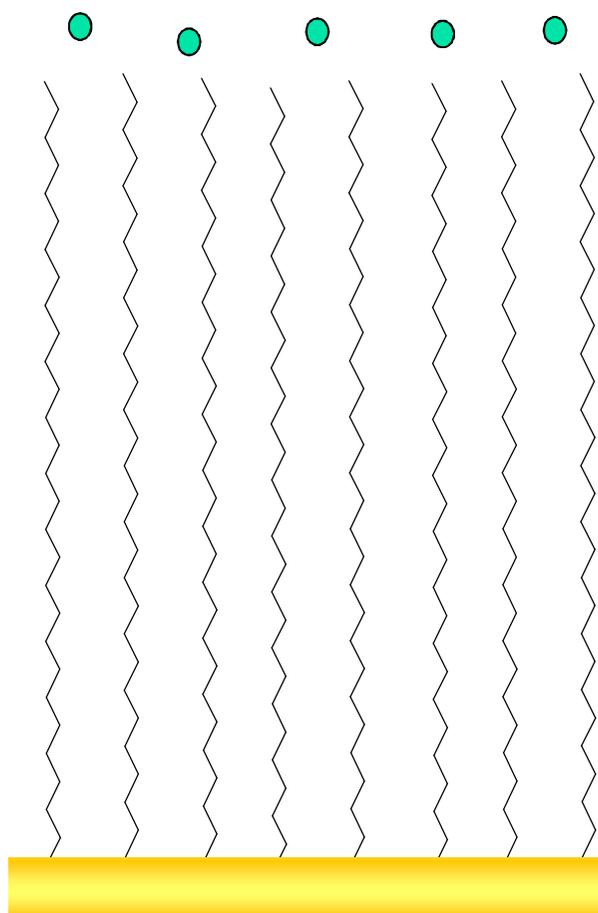
フェノールは  
オクタデカンに難溶



# 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

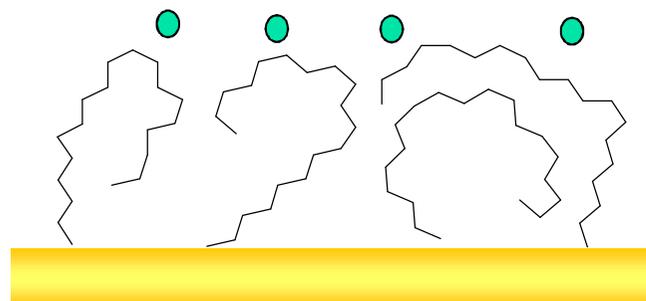
**NP-C30, %C:0.23%**



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

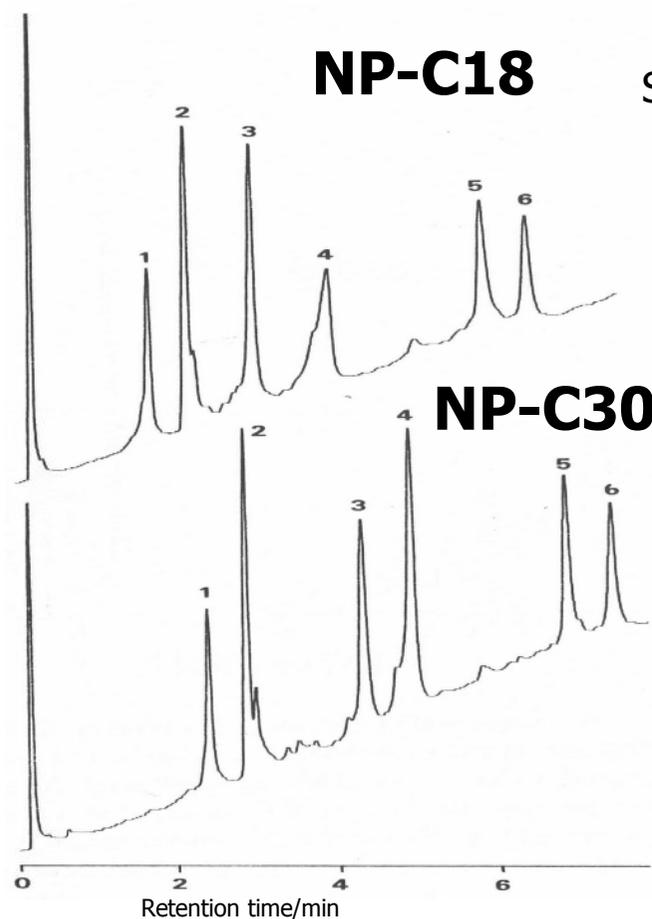
## タンパク質の分離

4.6x30mm

A) 0.1%TFA,

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

グラジエント溶離

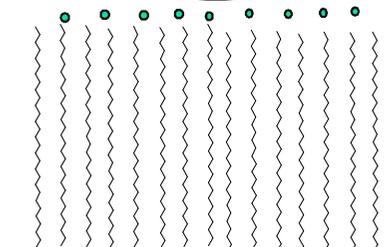


Sample: 1 = Ribonuclease,  
2 = Insulin,  
3 = Cytochrom C,  
4 = Lysozyme,  
5 = Myoglobin,  
6 = Carbonic anhydrase

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

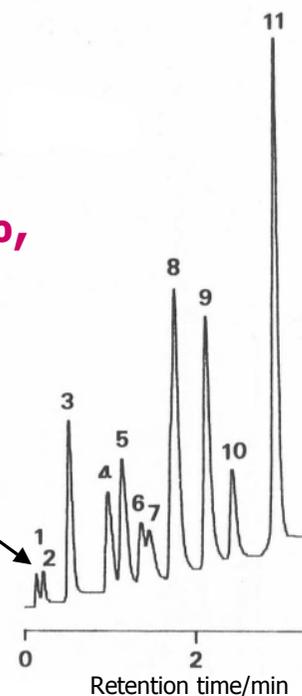
%B: 20%-100%,  
5 min

グラジエント溶離

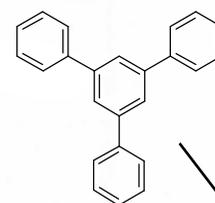


No. 1

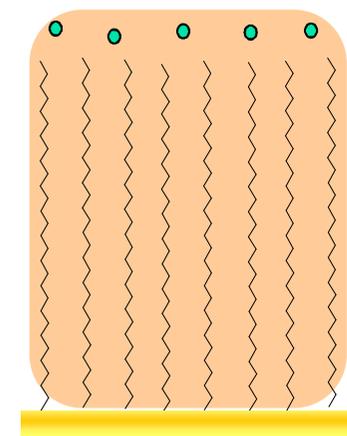
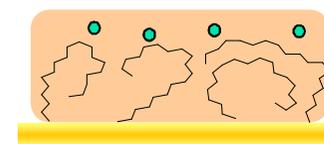
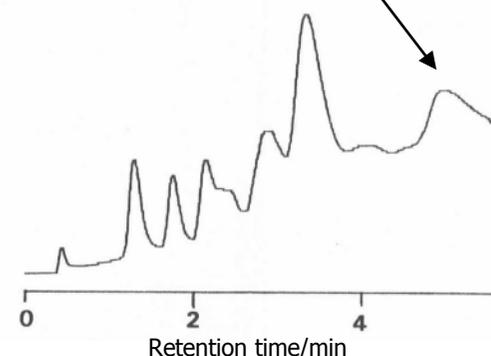
NP-C18



NP-C30



No. 11



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

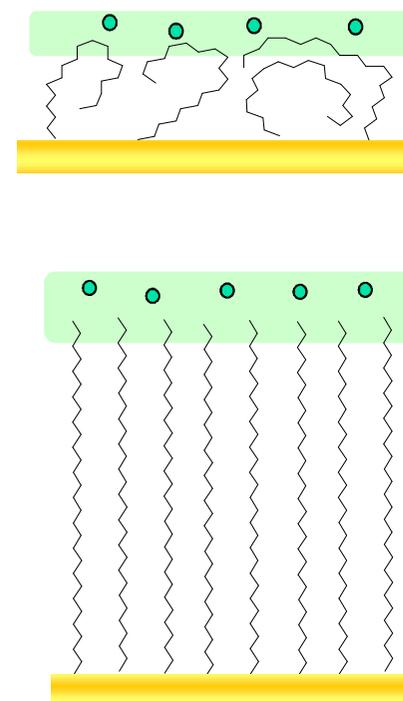
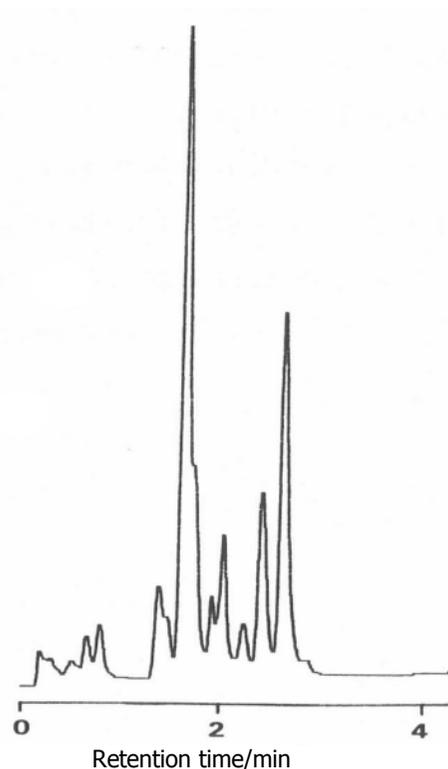
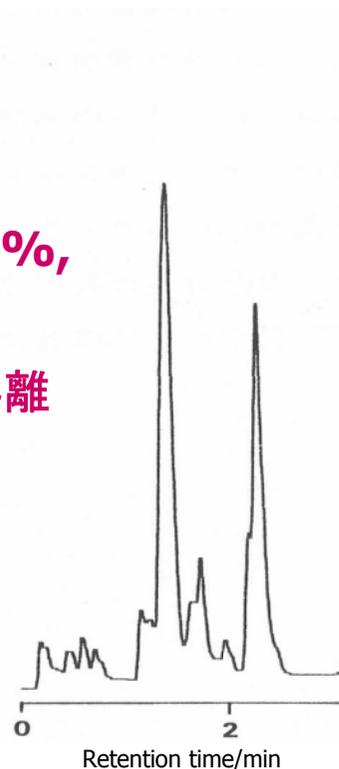
NP-C30

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

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

%B: 0%-30%,  
5 min

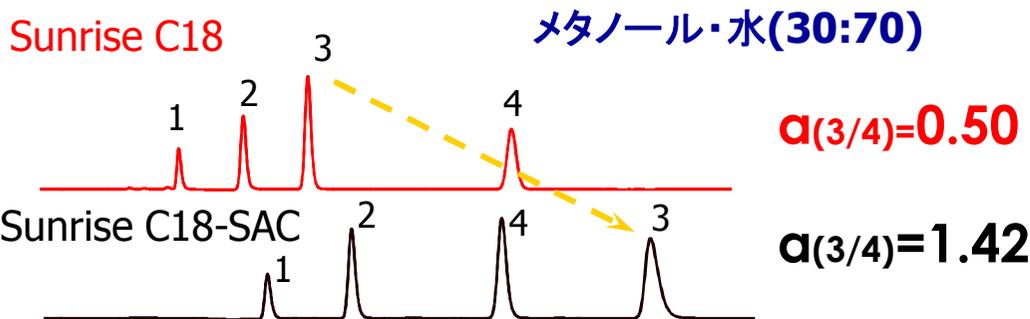
グラジエント溶離



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

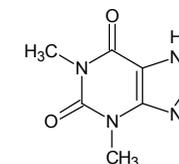
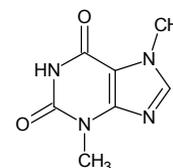
# 水素結合性の比較

## キサンチン類の分離



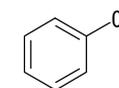
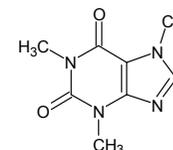
**1=Theobromine**

**2=Theophylline**



**3=Caffeine**

**4=Phenol**



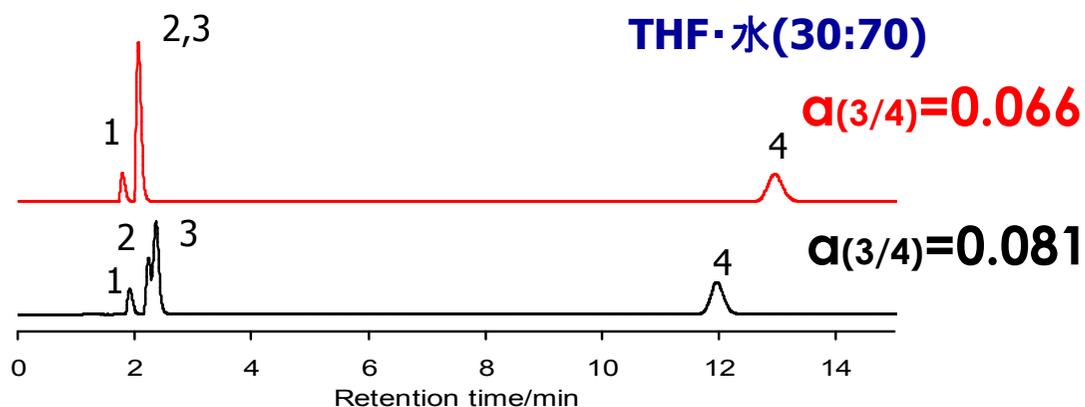
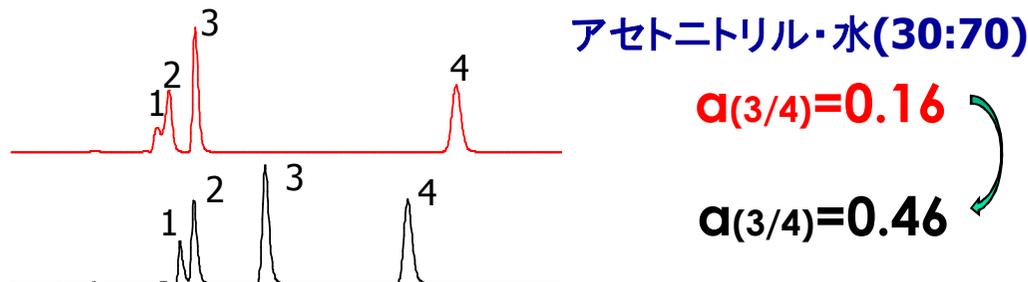
2.84倍

2.88倍

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

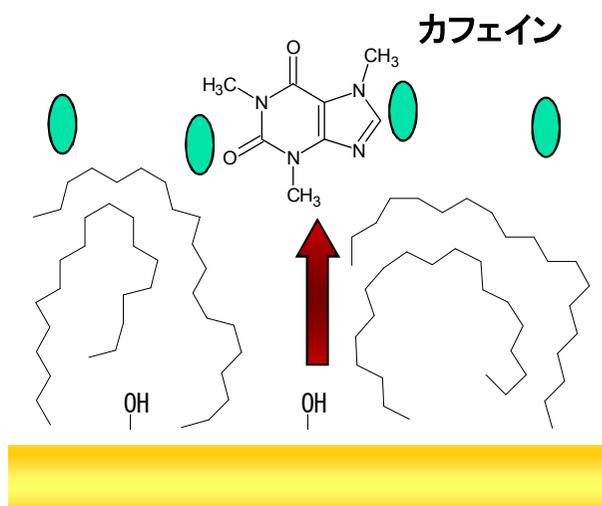
Temperature: 40 °C

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

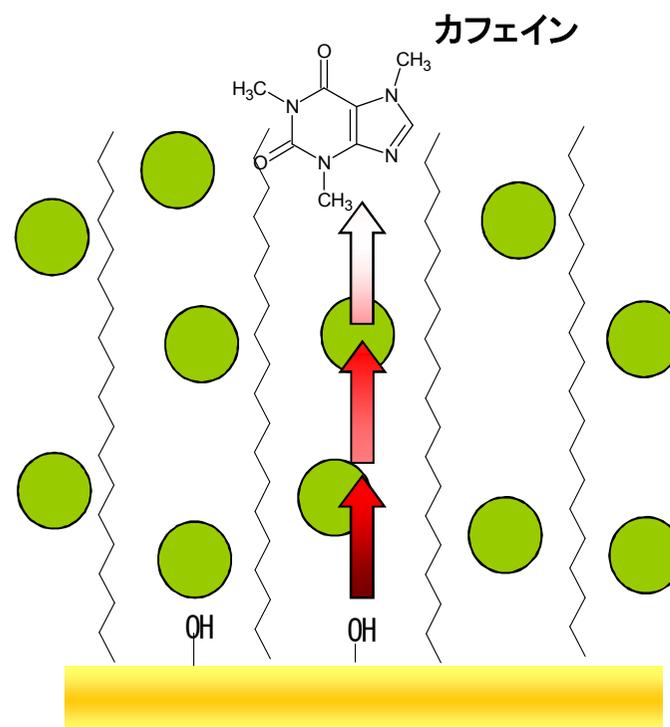
# 水素結合性の比較

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

- ・水移動相と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。
- ・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。

# ハイブリッド型C18に並ぶ耐アルカリ性Sunniest C18カラムの紹介 : 2.6 $\mu$ mコアシェル 粒子への応用

**ChromaNik**

クロマニック テクノロジーズ

○長江 徳和

**Norikazu Nagae** Email:  
**info@chromanik.co.jp**

***http://chromanik.co.jp***



## 【緒言】

- カークランドによりHPLCが発明されて以来40年近く経過するが、この間充填剤は日々改良が進められてきた。
- またシリカ系逆相充填剤はシラノール基の影響を防ぐため、様々なエンドキャッピング技法が開発されてきた。
- 演者らは従来のエンドキャッピング方法の概念を変え、エンドキャッピング試薬をあらかじめオクタデシルシリル化試薬に結合させたシリル化試薬を開発した。
- 5 $\mu\text{m}$ および2 $\mu\text{m}$ の全多孔性シリカおよび2.6 $\mu\text{m}$ のコア-シェル型シリカに新規試薬を結合し、評価した。
- アミトリプチリンのピーク形状を比較することにより、この試薬で調製した充填剤の残存シラノール基の評価を行った。



# HMODTS結合に用いたシリカ基材

全多孔性シリカ,

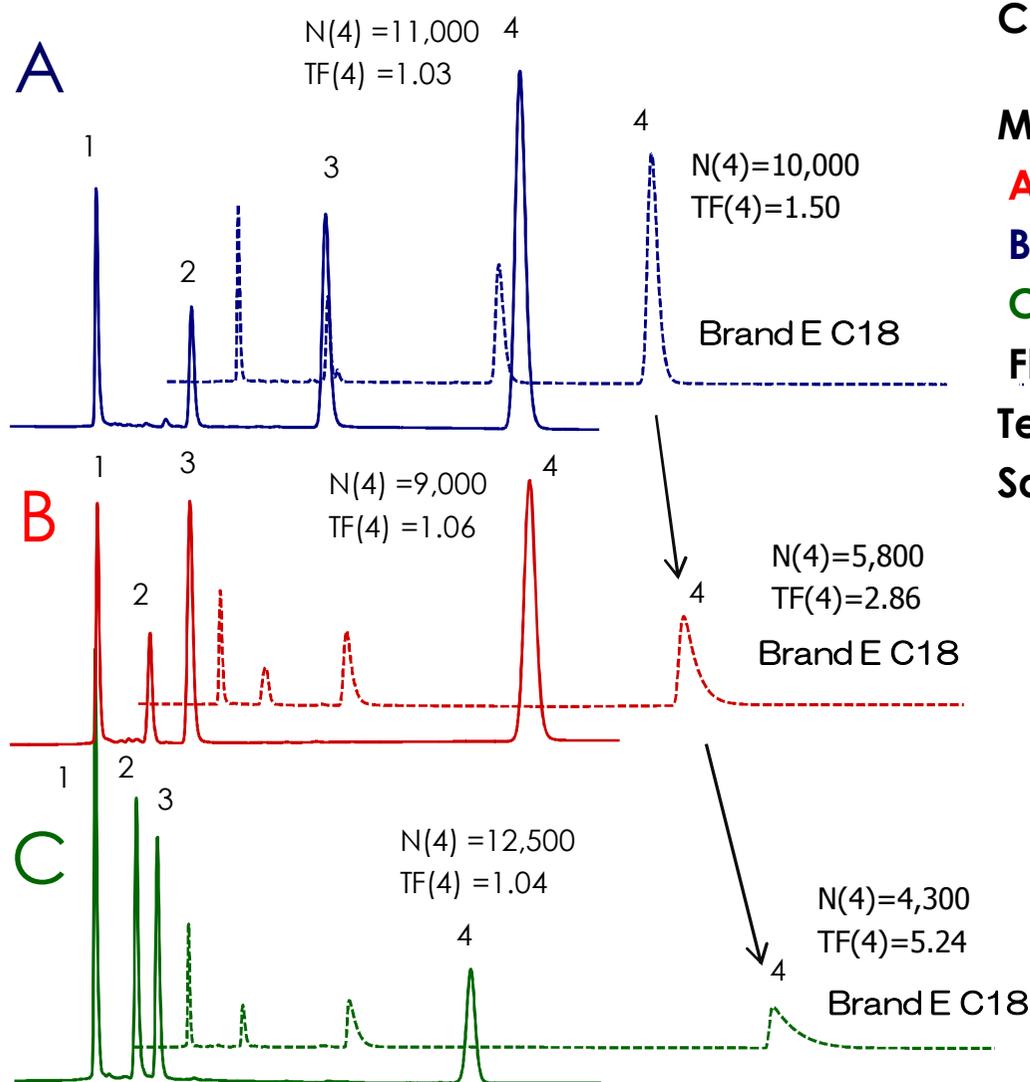
**1) 細孔径: 12nm, 比表面積: 340 m<sup>2</sup>/g, 粒子径: 5 μm**

**2) 細孔径: 10nm, 比表面積: 340 m<sup>2</sup>/g, 粒子径: 2 μm**

コアシェル型シリカ,

**1) 細孔径: 9nm, 比表面積: 150 m<sup>2</sup>/g, 粒子径: 2.6 μm**

# アミトリプチリンのピーク比較 I



Column: Sunniest C18(HMODTS), 5  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
 Re: Brand E C18, 5  $\mu$ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase:

**A)** CH<sub>3</sub>OH/20mM Phosphate buffer pH7.5 = 80/20

**B)** CH<sub>3</sub>OH/20mM Phosphate buffer pH6.0 = 80/20

**C)** CH<sub>3</sub>CN/20mM Phosphate buffer pH7.0 = 60/40

Flow rate: 1.0 mL/min

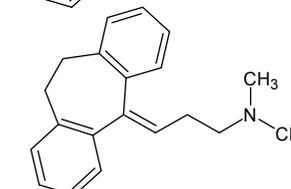
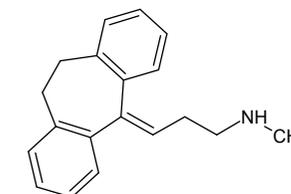
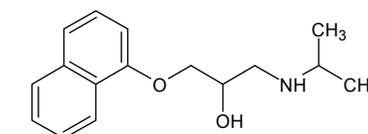
Temperature: 40 °C for **A**, **C** and **D**, 22 °C for **B**

Sample: 1 = Uracil,

2 = Propranolol,

3 = Nortriptyline,

4 = Amitriptyline,

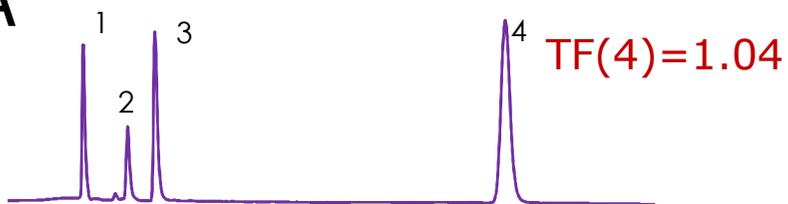


TF: USP tailing factor

# アミトリプチリンのピーク比較 II -A

アセトニトリル CH<sub>3</sub>CN, pH7.0, 40 °C

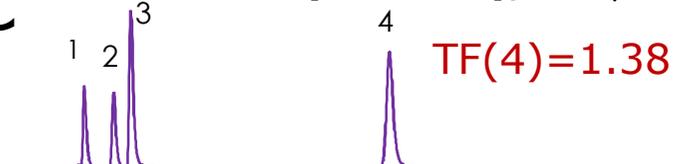
**A** Sunniest C18 (HMODTS), 5 μm



**B** Sunniest C18-HT(HMODTS), 2 μm



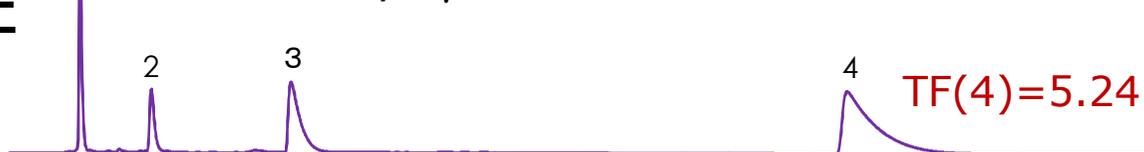
**C** SunShell C18(HMODTS), 2.6 μm **core shell type**



**D** Brand D C18, 2.6 μm **core shell type**



**E** Brand E C18, 5 μm



Column size: 150 x 4.6 mm for A, D and E

100 x 2.1 mm for B and C

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>CN/20mM Phosphate buffer pH7.0=60/40

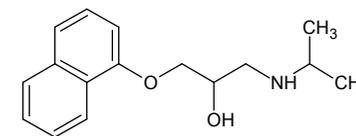
Flow rate: 1.0 mL/min for A, D, and E

0.4 mL/min for B and C

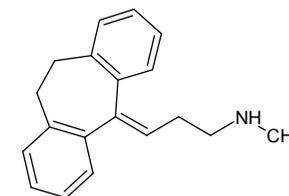
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

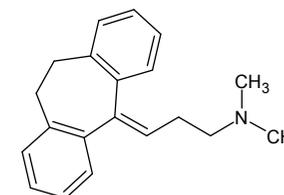
2 = Propranolol



3 = Nortriptyline



4 = Amitriptyline



TF: USP tailing factor

# アミトリプチリンのピーク比較 II -B

Column	TF	N
Sunniest C18(HMODTS)	1.04	12,500
Sunniest RP-AQUA	1.24	13,800
D1	5.19	3,300
D2	2.19	14,200
AT	3.25	5,300
S1	1.74	8,300
W1	1.97	10,600
WS2	1.59	10,100
W3	1.33	10,000
Japanese company A1 C18	3.07	8,500
Japanese company A2 C18	2.52	9,200
Japanese company B1 C18	2.23	50
Japanese company B2 C18	2.01	10,900
Japanese company B3 C18	7.75	3,600

Column	TF	N
Japanese company C1 C18	2.14	8,700
P1	1.09	9,500
M1	2.01	11,200
Japanese company D1 C18	1.30	12,000
Japanese company D2 C18	2.92	8,000
Japanese company D3 C18	2.70	6,100
Japanese company E1 C18	1.56	10,400
Japanese company F1 C18	3.44	6,700
Japanese company G1 C18	1.71	10,000
Japanese company G2 C18	2.15	11,500
Japanese company H1 C18	11.1	2,100
Japanese company I1 C18	3.77	7,400
A1	3.28	5,900

**Column size: 150 X 4.6 mm**

**Particle size: 5 μm**

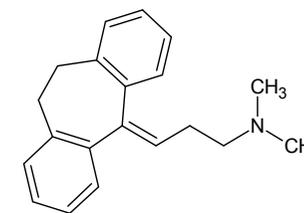
**Mobile phase:**

**CH<sub>3</sub>CN/20mM Phosphate  
buffer pH7.0=60/40**

**Flow rate: 1.0 mL/min**

**Temperature: 40 °C**

**Sample: Amitriptyline**



# アミトリプチリンのピーク比較 II -B

Column	TF	N
Sunniest C18(HMODTS)	1.04	12,500
Sunniest RP-AQUA	1.24	13,800
Acclaim PolarAdvantage II	5.19	3,300
Acclaim 120 C18	2.19	14,200
ACE C18	3.25	5,300
Ascentis C18	1.74	8,300
Atlantis T3 C18	1.97	10,600
SunFire C18	1.59	10,100
X-Bridge C18	1.33	10,000
Cadenza 5CD-C18	3.07	8,500
Unison US-C18	2.52	9,200
CAPCELLPAK C18 MG	2.23	50
CAPCELLPAK C18 MG II	2.01	10,900
CAPCELLPAK C18 MG III	7.75	3,600

Column	TF	N
Develosil ODS-UG-5	2.14	8,700
Gemini-NX C18	1.09	9,500
Hiber Purospher STAR RP-18e	2.01	11,200
Inertsil ODS-4	1.30	12,000
Inertsil ODS-SP	2.92	8,000
Inertsil ODS-3	2.70	6,100
L-column ODS	1.56	10,400
Shim-pack VP-ODS	3.44	6,700
TSKgel ODS-100V	1.71	10,000
TSKgel ODS-100Z	2.15	11,500
Wakopak Navi C18-5	11.1	2,100
YMC-Pack Pro C18	3.77	7,400
ZORBAX Eelipse Plus C18	3.28	5,900

**Column size: 150 X 4.6 mm**

**Particle size: 5 μm**

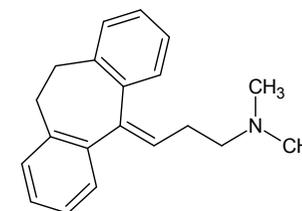
**Mobile phase:**

**CH<sub>3</sub>CN/20mM Phosphate  
buffer pH7.0=60/40**

**Flow rate: 1.0 mL/min**

**Temperature: 40 °C**

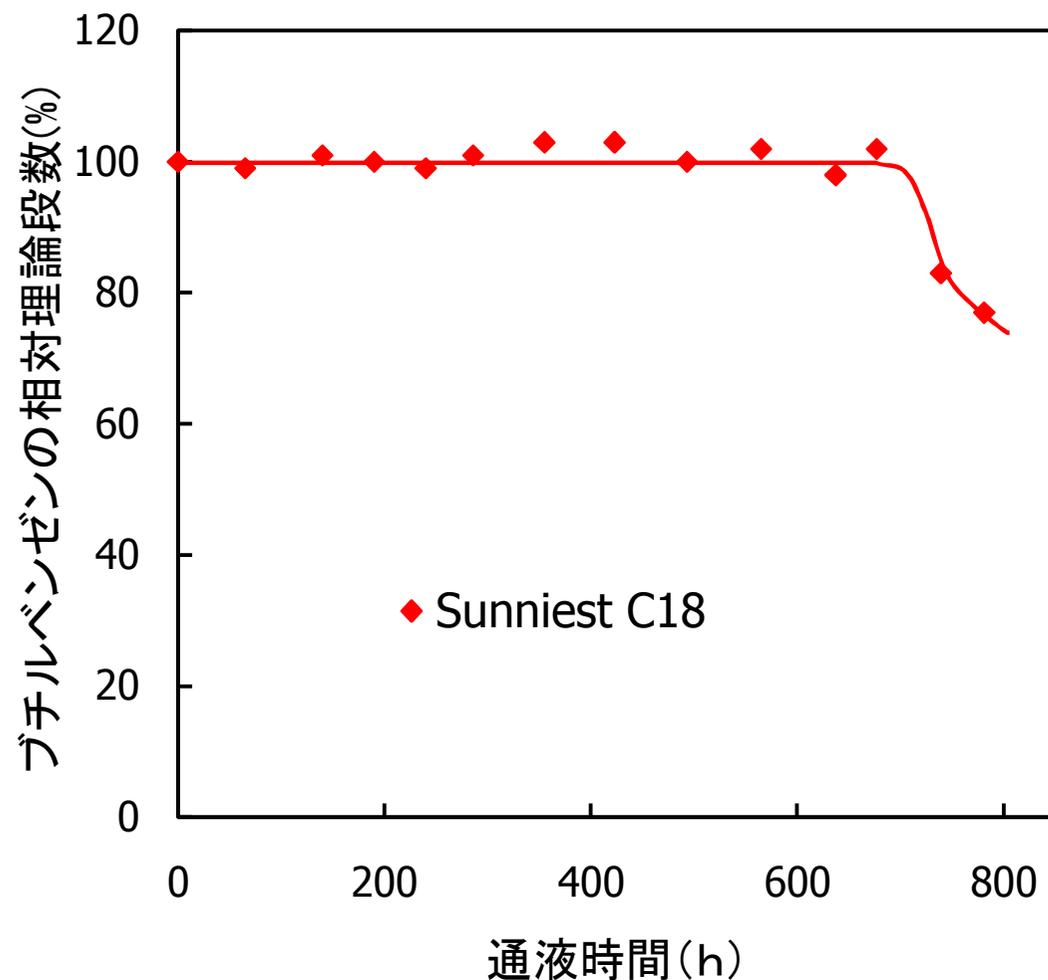
**Sample: Amitriptyline**



# 耐久性の評価

## アルカリ性試験

Sunniest C18(HMODTS)はpH10, 50°Cの条件で700時間の耐久性



### 耐久性試験条件

**Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 $\mu$ m**

**150 x 4.6 mm**

**Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/20mM**

**Sodium borate /10mM**

**NaOH=30/21/49 (pH10)**

**Flow rate: 1.0 mL/min**

**Temperature: 50 °C**

### 理論段数測定条件

**Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 $\mu$ m**

**150 x 4.6 mm**

**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 = Butylbenzene**

# Azithromycinの純度評価

## USP 32 Protocol Related Substances Test

カラム C18 4.6x250mm

移動相 : A)50リン酸緩衝液pH8.95

B)アセトニトリル/メタノール(25/75)

90分のクラジエント溶離

流速:1.0 mL/min

カラム温度:60°C

pH9のアルカリ性で  
しかもカラム温度60°C  
非常に過酷な条件

他社ハイブリッドカラムXB-C18

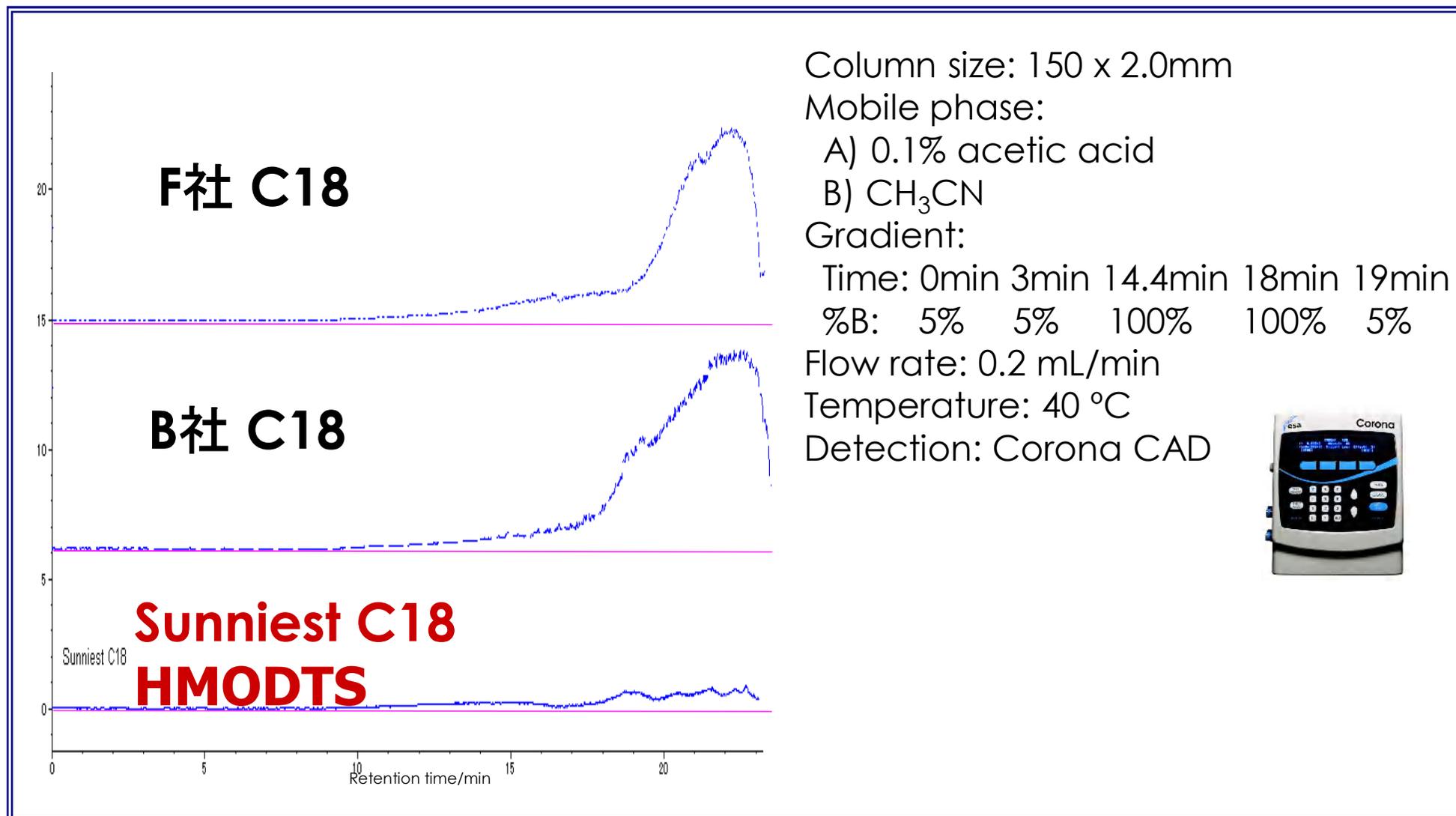
→ 30回測定でカラム劣化

Sunniest C18(通常のシリカ)

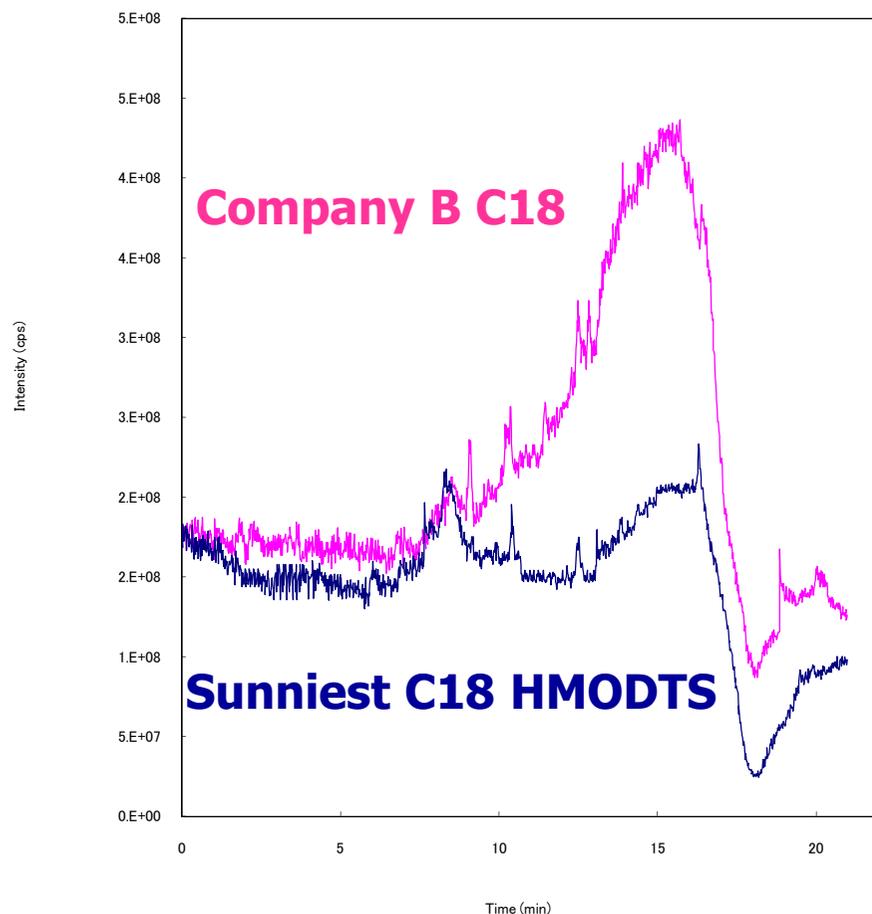
→ 25回測定でカラム劣化

} 大差なし

# カラムからの溶出物の比較(ブリード現象)



# MSを用いたブリードの比較



Column size: 150 x 2.0 mm

Mobile phase:

A) 0.1% acetic acid

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

Gradient:

Time: 0min 3min 14.4min 18min 19min

%B: 5% 5% 100% 100% 5%

Flow rate: 0.2 mL/min

Temperature: 40 °C

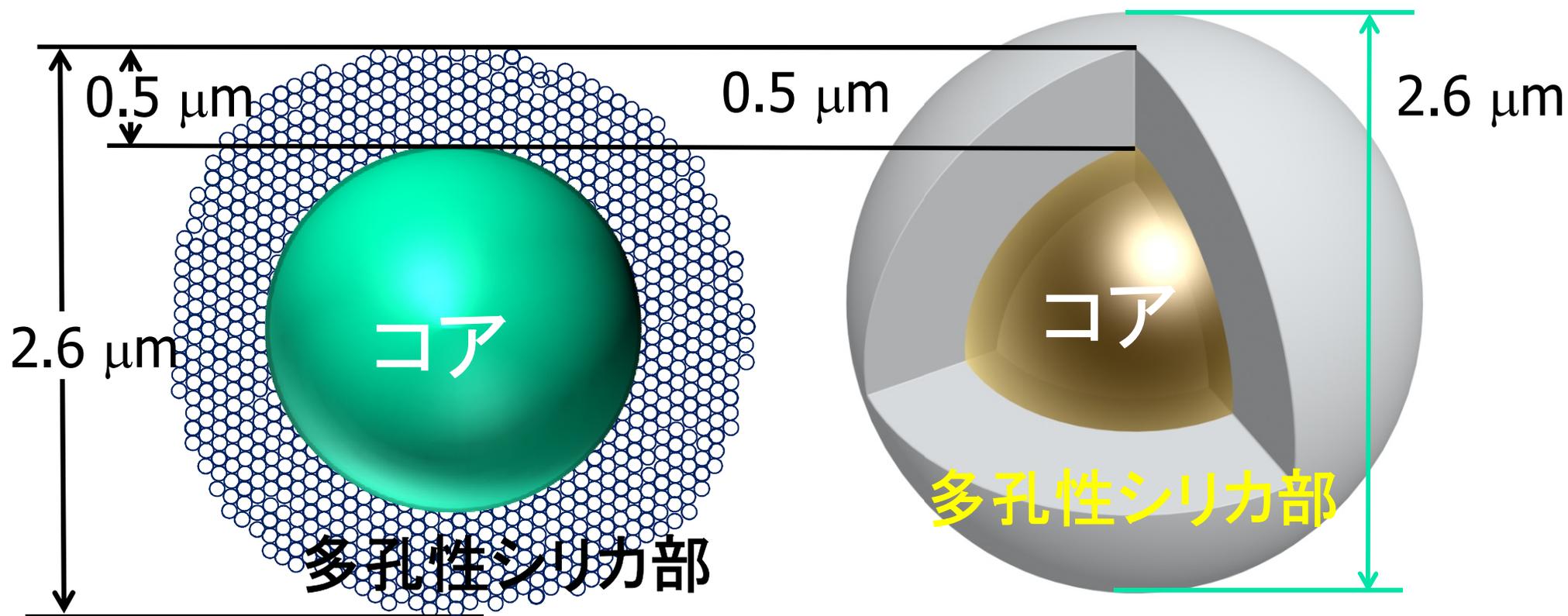
MS: ABI API-4000

Ionization: Turboionspray (cation)

Measurement mode:

Q1 Scan m/z 100-1000

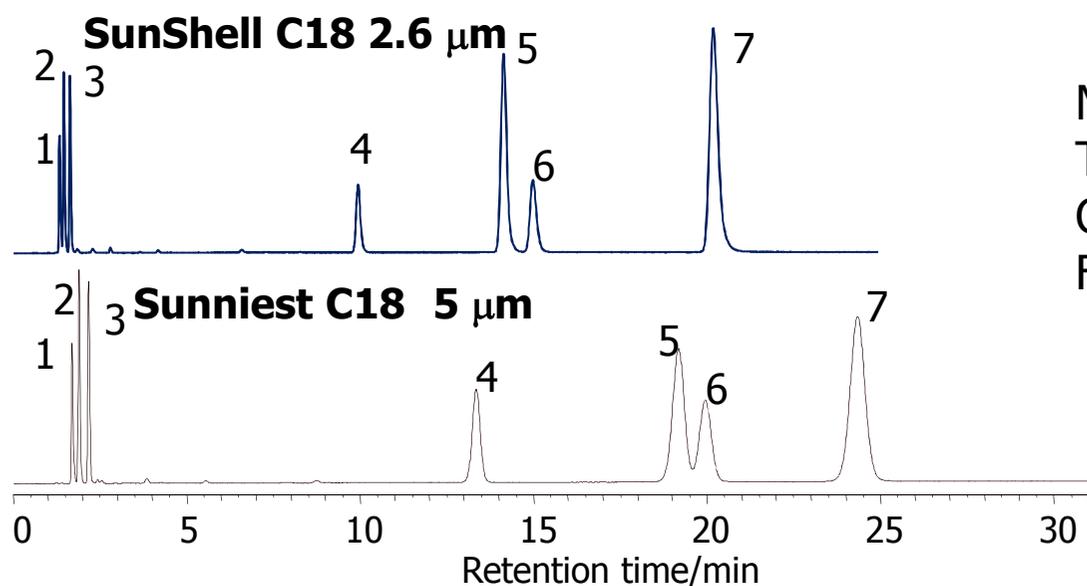
# コアシェル構造の概略図



粒子径: 2.6  $\mu\text{m}$ , コア径: 1.6  $\mu\text{m}$ , 多孔質層の厚さ: 0.5  $\mu\text{m}$   
細孔容積: 0.34 mL/g, 比表面積: 150  $\text{m}^2/\text{g}$ , 細孔径: 9 nm  
多孔性シリカの体積の割合: 77%

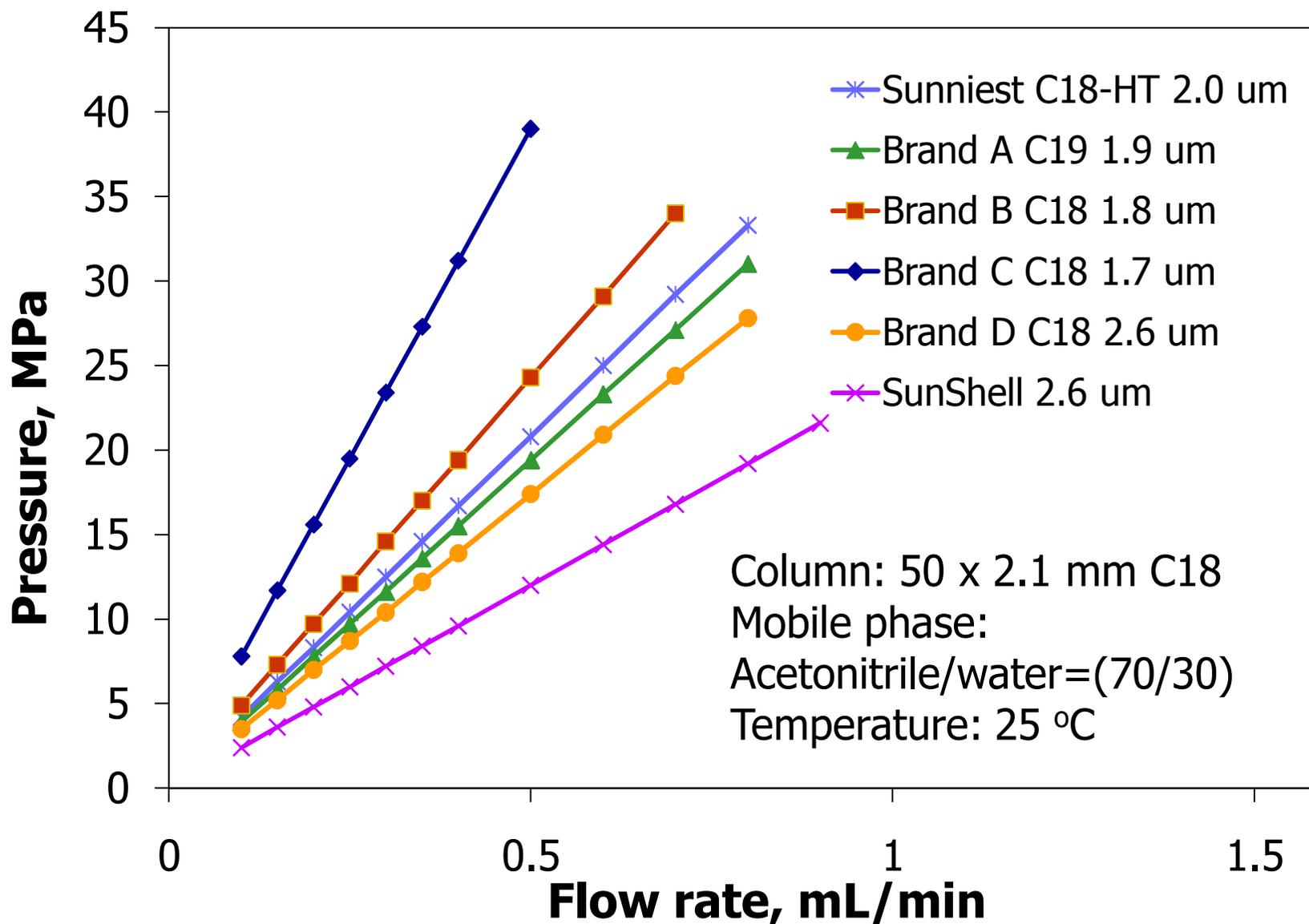
# 全多孔性シリカとコアシェル型シリカの 標準試料の保持比較

	全多孔性シリカ <sup>a)</sup> Sunniest C18, 5 $\mu\text{m}$		コアシェル型シリカ <sup>b)</sup> SunShell C18, 2.6 $\mu\text{m}$		コアシェル型シリカ <sup>a)</sup> Brand D C18, 2.6 $\mu\text{m}$	
	保持時間( $t_R$ )	保持指数(k)	保持時間( $t_R$ )	保持指数(k)	保持時間( $t_R$ )	保持指数(k)
1) ウラシル	1.70	0	0.48	0	1.36	0
2) カフェイン	1.90	0.12	0.53	0.10	1.49	0.10
3) フェノール	2.17	0.28	0.59	0.23	1.61	0.18
4) ブチルベンゼン	13.35	6.85	3.68	6.67	6.19	3.55
5) o-ターフェニル	19.19	10.29	5.46	10.38	8.15	4.99
6) アミルベンゼン	19.96	10.74	5.57	10.60	8.75	5.43
7) トリフェニレン	24.35	13.32	6.87	13.31	9.44	5.94

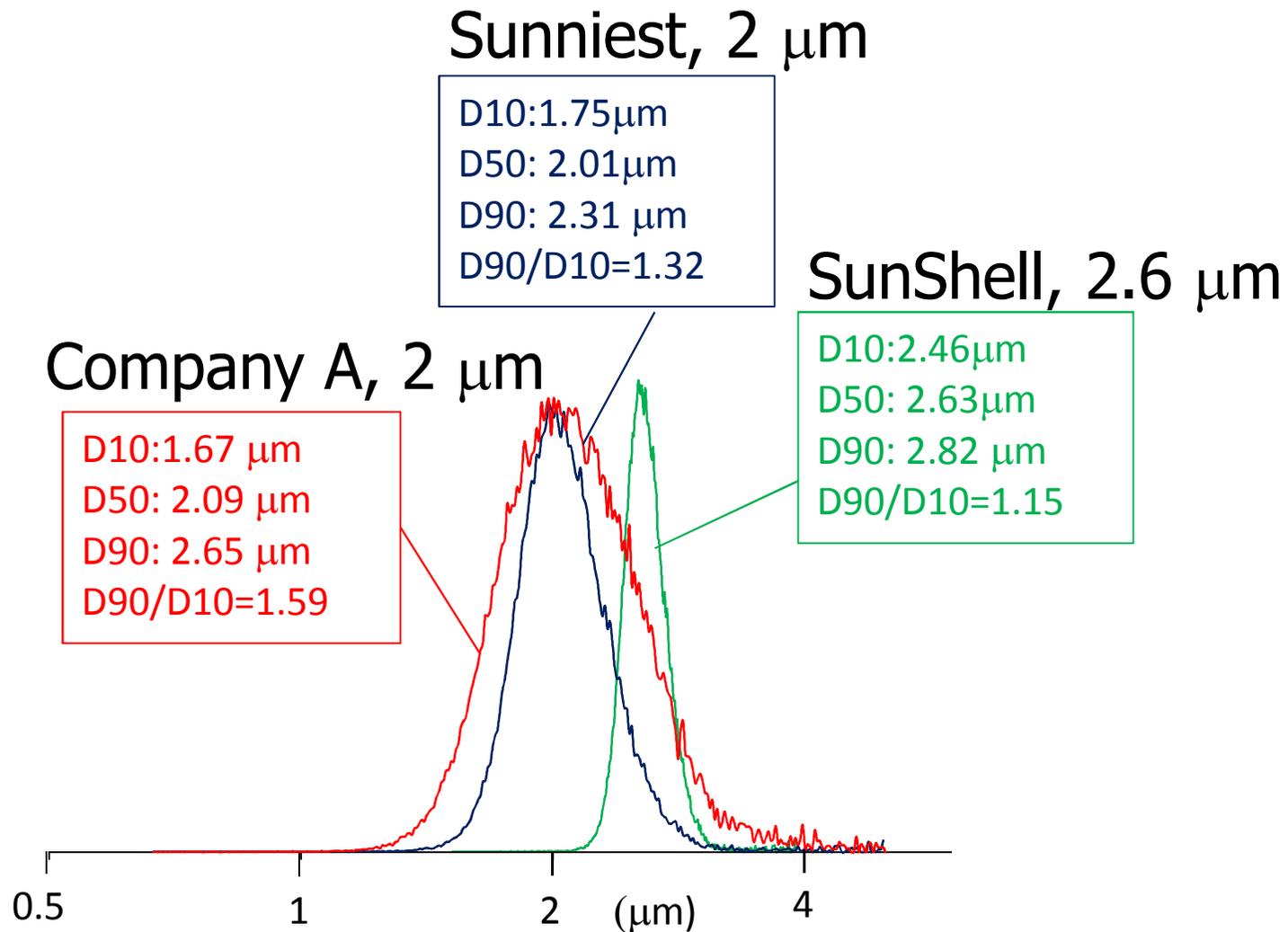


Mobile phase: Methanol/water(75:25)  
 Temperature: 40°C  
 Column dimension: 150 x 4.6 mm  
 Flow rate: 1.0 mL/min

# ハイスルーブットSub2 $\mu$ mカラムとコアシェル型カラムとの圧力比較

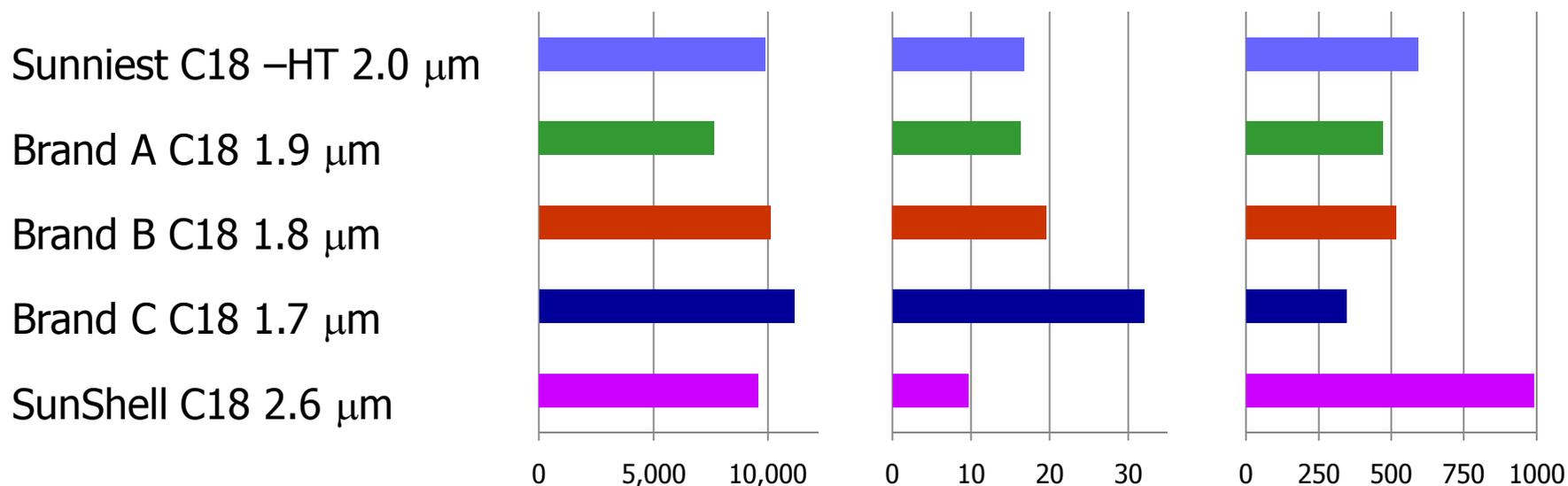


# 粒度分布の比較



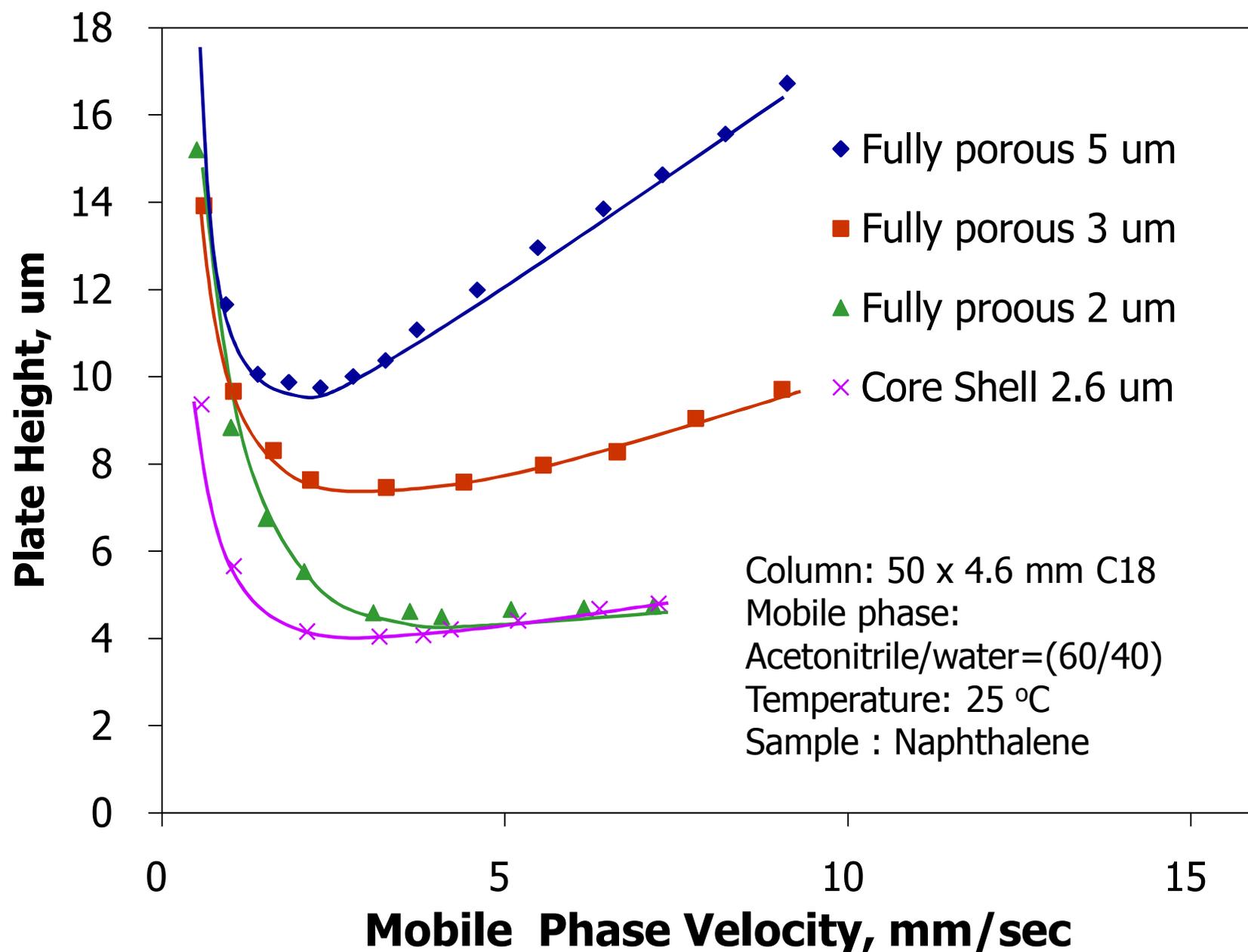
# 単位圧力あたりの段数比較

	Plates	Pressure(MPa)	Plates/pressure
Sunniest C18 –HT 2.0 μm	9,900	16.7	593
Brand A C18 1.9 μm	7,660	16.3	470
Brand B C18 1.8 μm	10,100	19.6	515
Brand C C18 1.7 μm	11,140	32.0	348
SunShell C18 2.6 μm	9,600	9.7	990

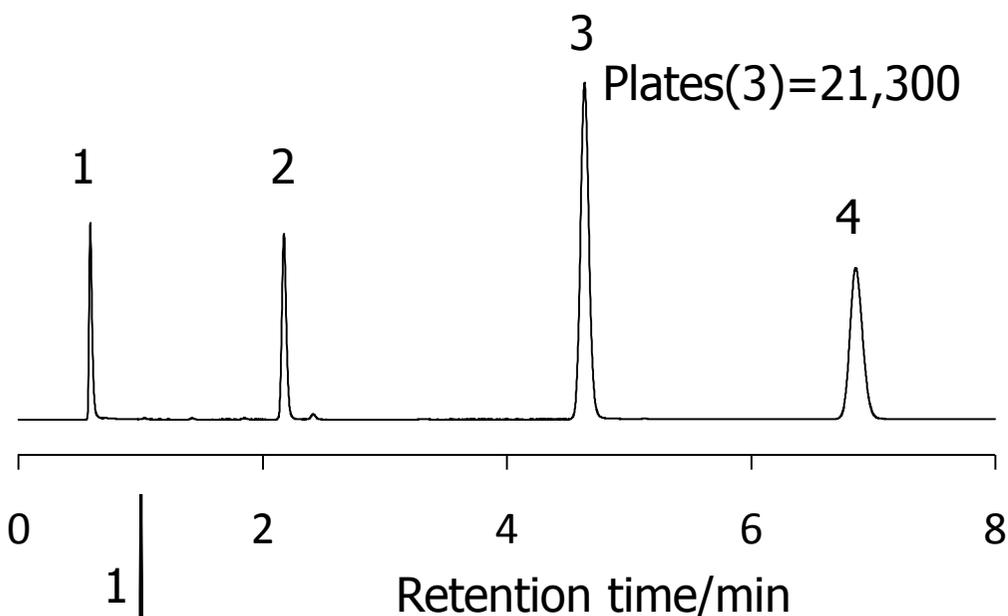


Column: 50 x 2.1 mm C18, Mobile phase: Acetonitrile/water=(70/30), Temperature: 25 °C

# 全多孔性とコアシェル型の理論段高さの比較

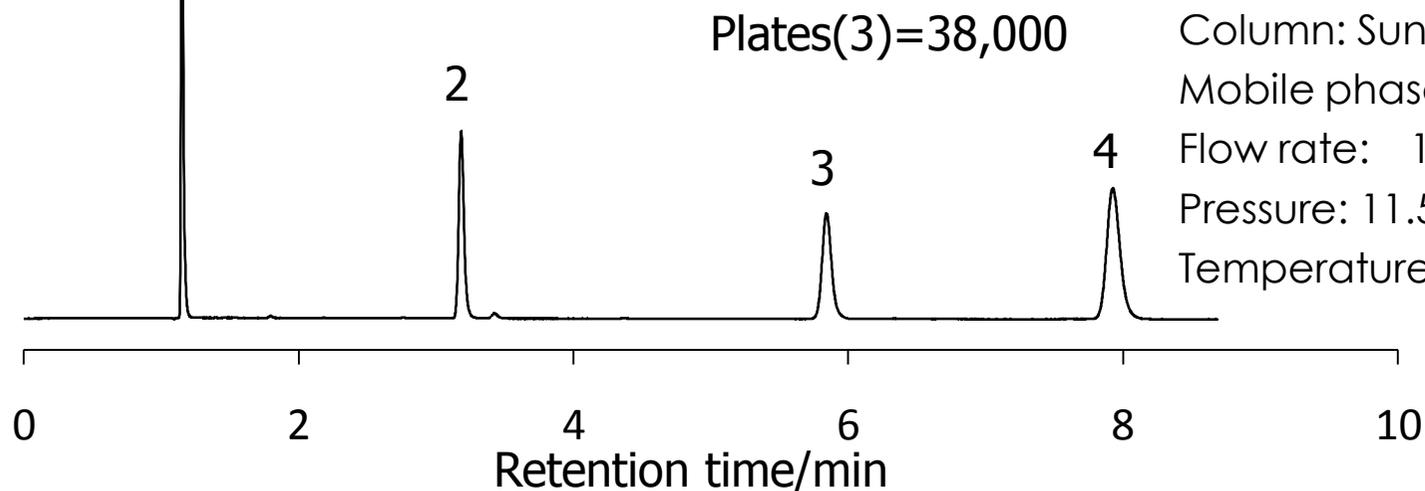


# コアシェルC18の標準試料の理論段数



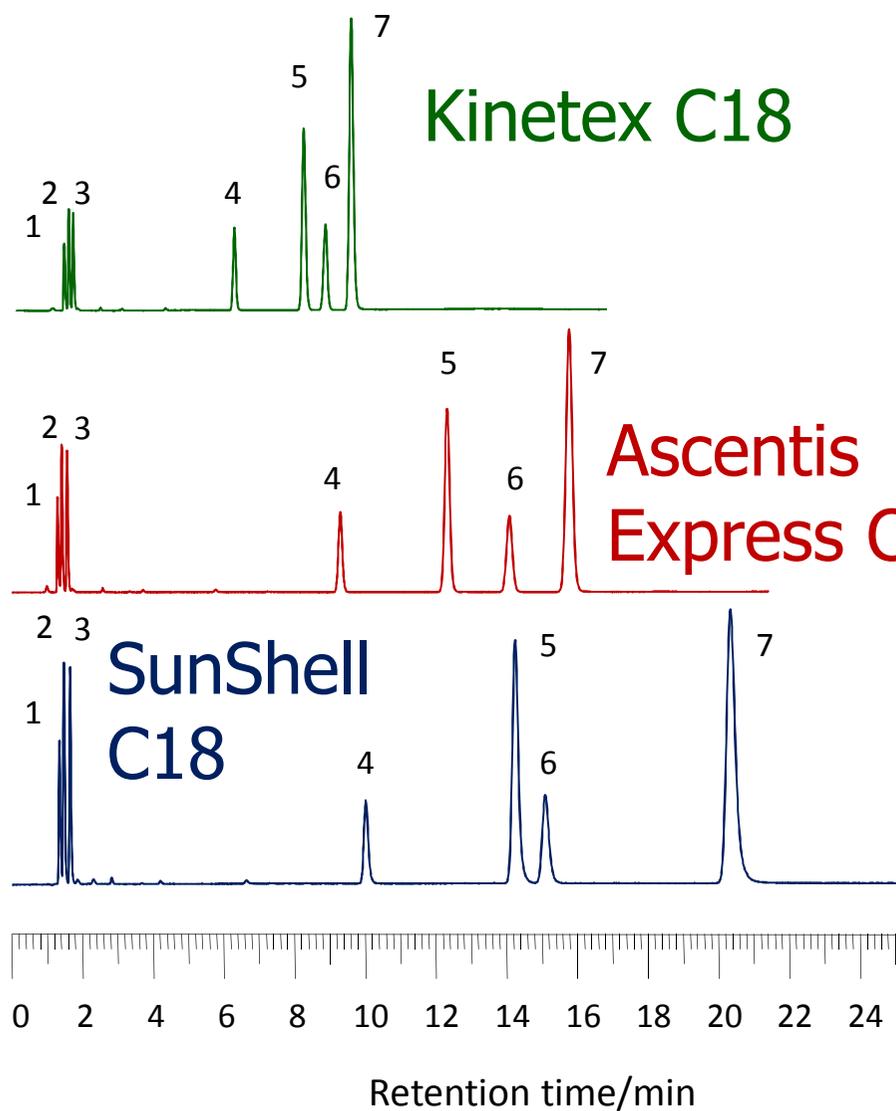
Column: SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  100 x 2.1 mm  
Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=60/40$   
Flow rate: 0.3 mL/min  
Pressure: 12.5 MPa  
Temperature: 25  $^\circ\text{C}$

Sample: 1 = Uracil  
2 = Toluene  
3 = Acenaphthene  
4 = BUtylbenzene



Column: SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm  
Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=70/30$   
Flow rate: 1.0 mL/min  
Pressure: 11.5 MPa  
Temperature: 25  $^\circ\text{C}$

# 標準試料の比較



Column:

Kinetex C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

Ascentis Express C18, 2.7  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

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

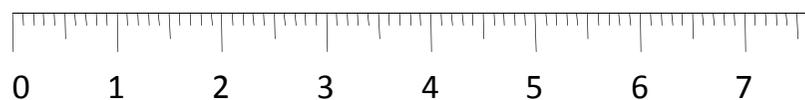
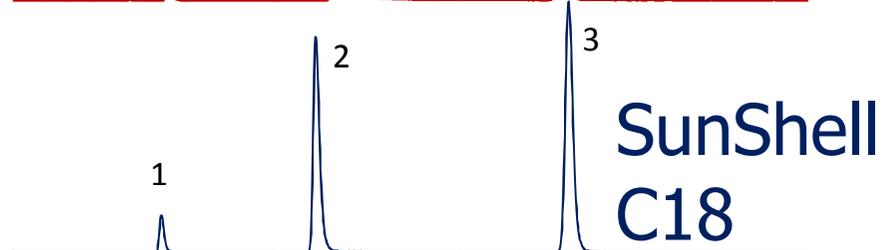
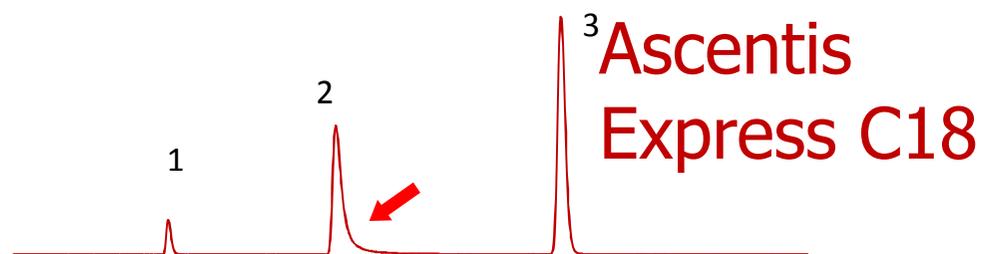
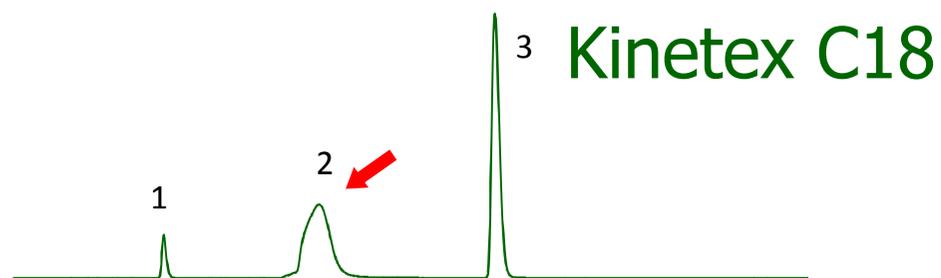
Flow rate: 1.0 mL/min

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

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

	Hydrogen bond (Caffeine/Phenol)	Hydrophobicity (Amylbenzene/Butylbenzene)	Steric selectivity (Triphenylene/o-Terphenyl)
Kinetex C18	0.48	1.54	1.20
Ascentis Express C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.40	1.59	1.47

# ピリジンの比較



Retention time/min

Column:

Kinetex C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

Ascentis Express C18, 2.7  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=30/70$

Flow rate: 1.0 mL/min

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

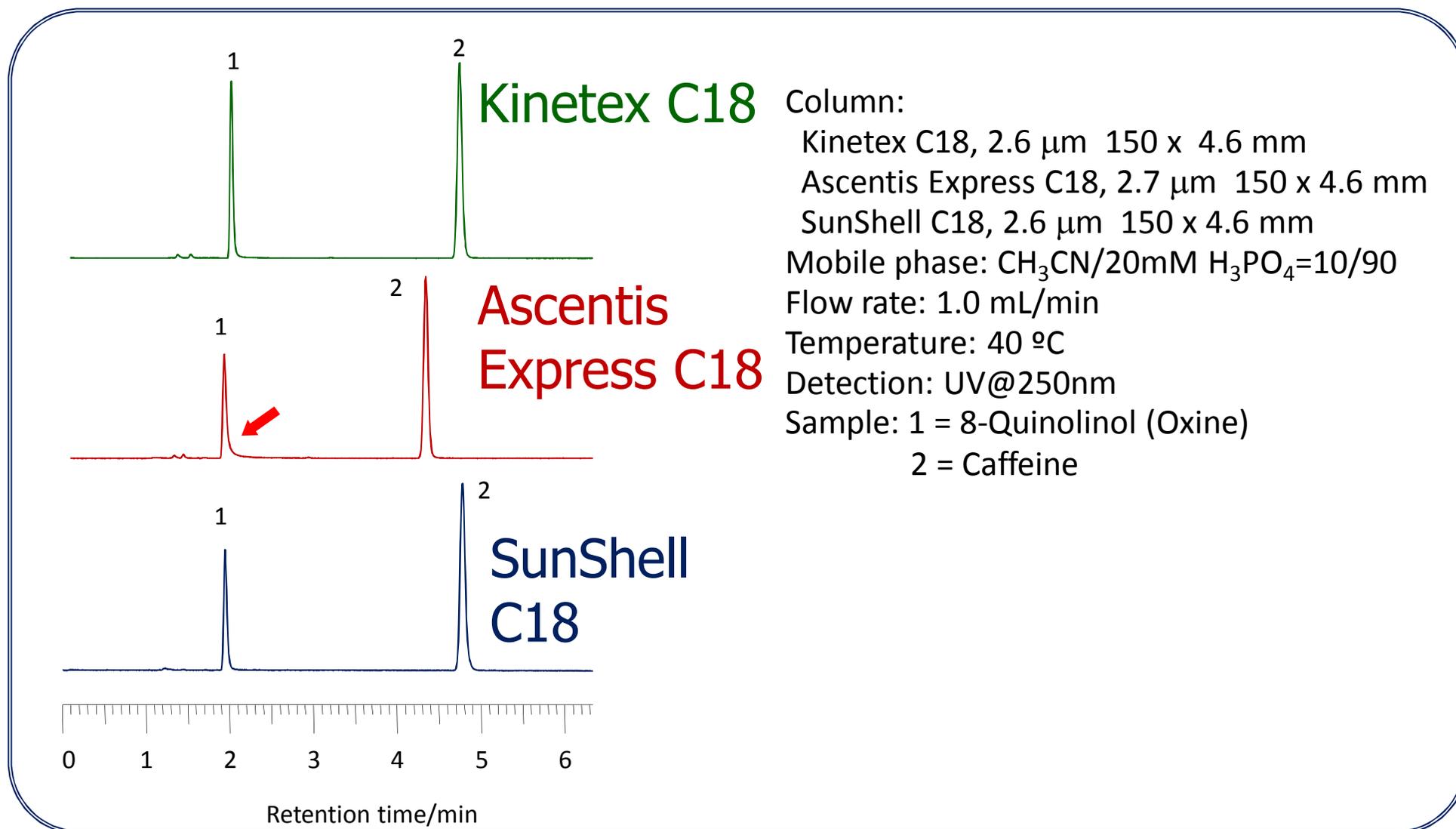
Detection: UV@250nm

Sample: 1 = Uracil

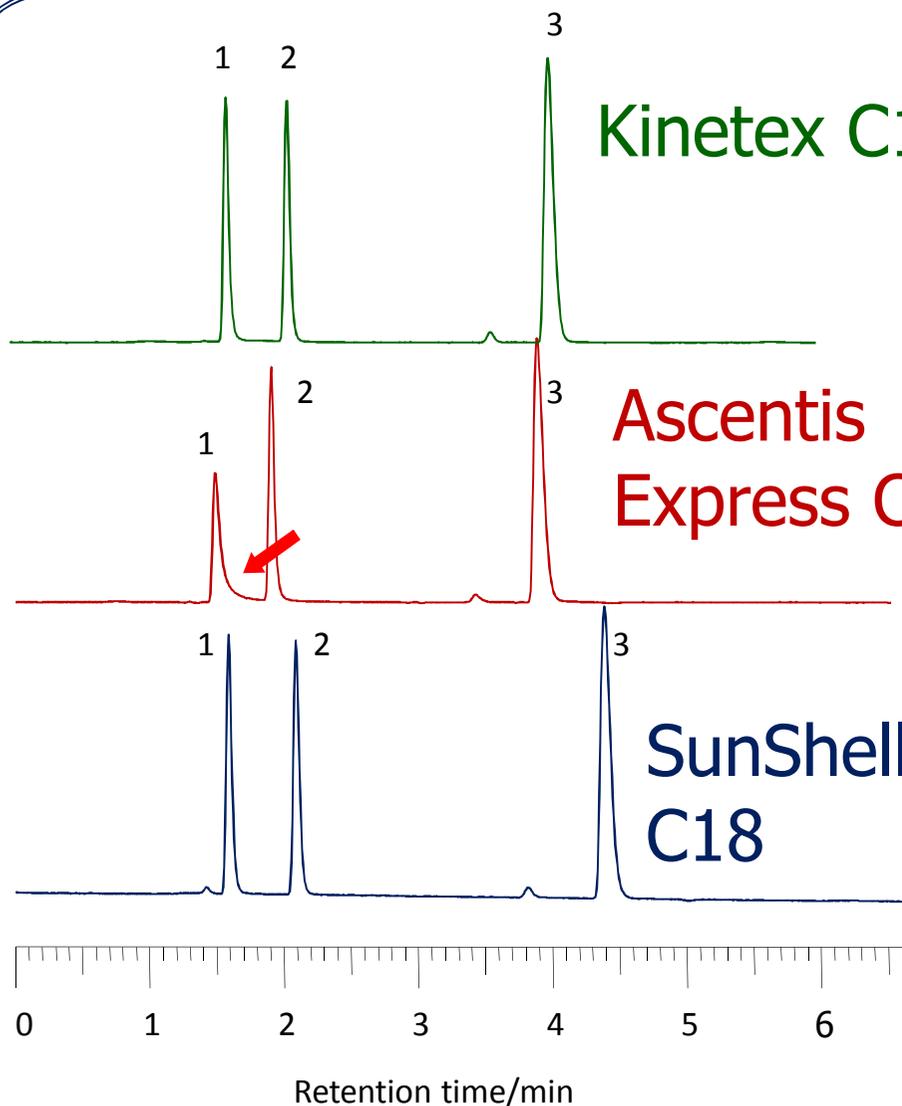
2 = Pyridine

3 = Phenol

# 金属配位性化合物オキシンの比較



# ギ酸の比較



**Kinetex C18**

Column:

Kinetex C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

Ascentis Express C18, 2.7  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4=2/98$

Flow rate: 1.0 mL/min

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

Detection: UV@210nm

Sample: 1 = Formic acid

2 = Acetic acid

3 = Propionic Acid

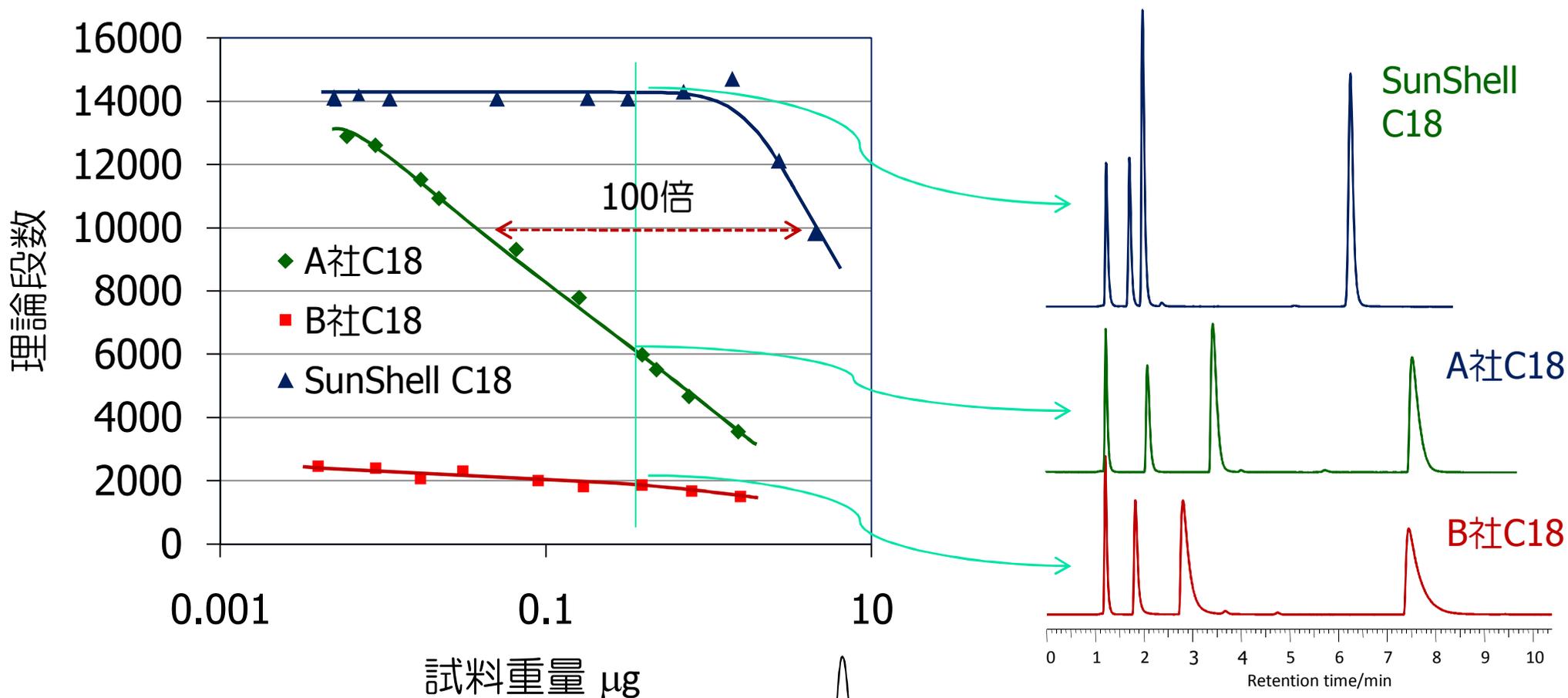
**Ascentis  
Express C18**

**SunShell  
C18**

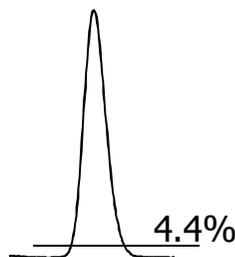
Retention time/min

# アミノリプチリンの試料負荷量 I

移動相: アセトニトリル/20mMリン酸緩衝液pH7.0=(60:40)  
 カラムサイズ: 150 x 4.6 mm, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C



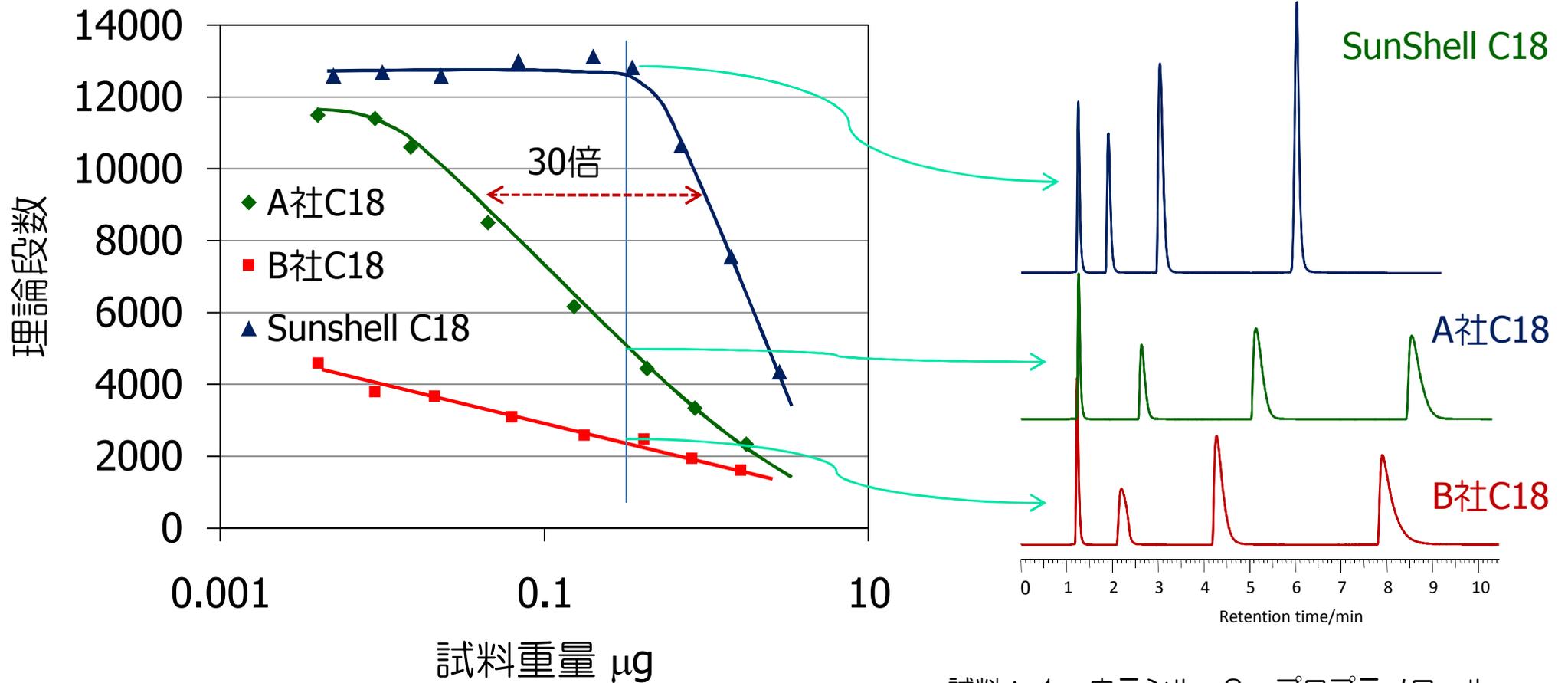
理論段数はピークの高さの4.4%の位置でのピーク幅を用いて計算 (5σ法)



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 = アミノリプチリン

# アミトリプチリンの試料負荷量 II

移動相: アセトニトリル/10mM酢酸アンモニウムpH6.8=(40:60)  
 カラムサイズ: 150 x 4.6 mm, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C

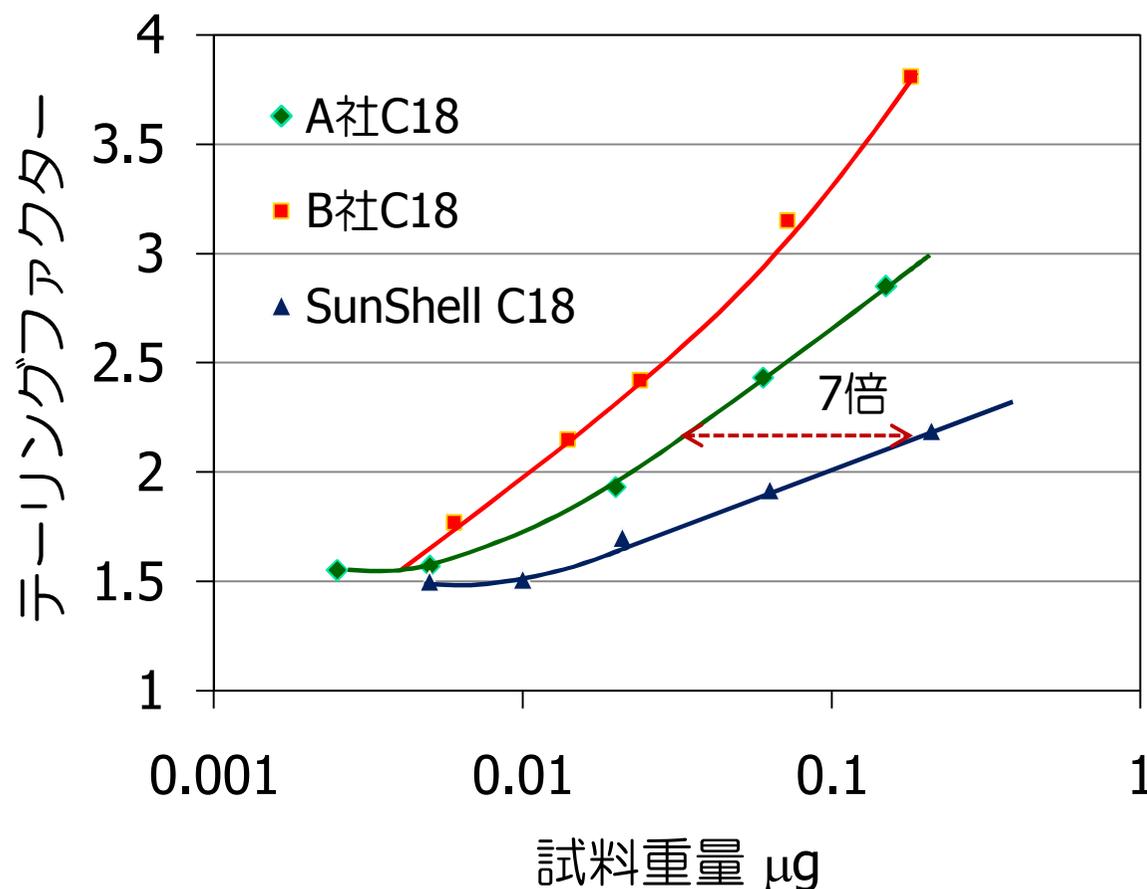


試料: 1 = ウラシル, 2 = プロプラノロール,  
 3 = ノルトリプチリン, 4 = アミトリプチリン

# アミトリプチリンの試料負荷量Ⅲ

移動相: アセトニトリル/0.1%ギ酸=(30:70)

カラムサイズ: 150 x 4.6 mm, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C



テーリングファクター

3.6

2.9

2.4

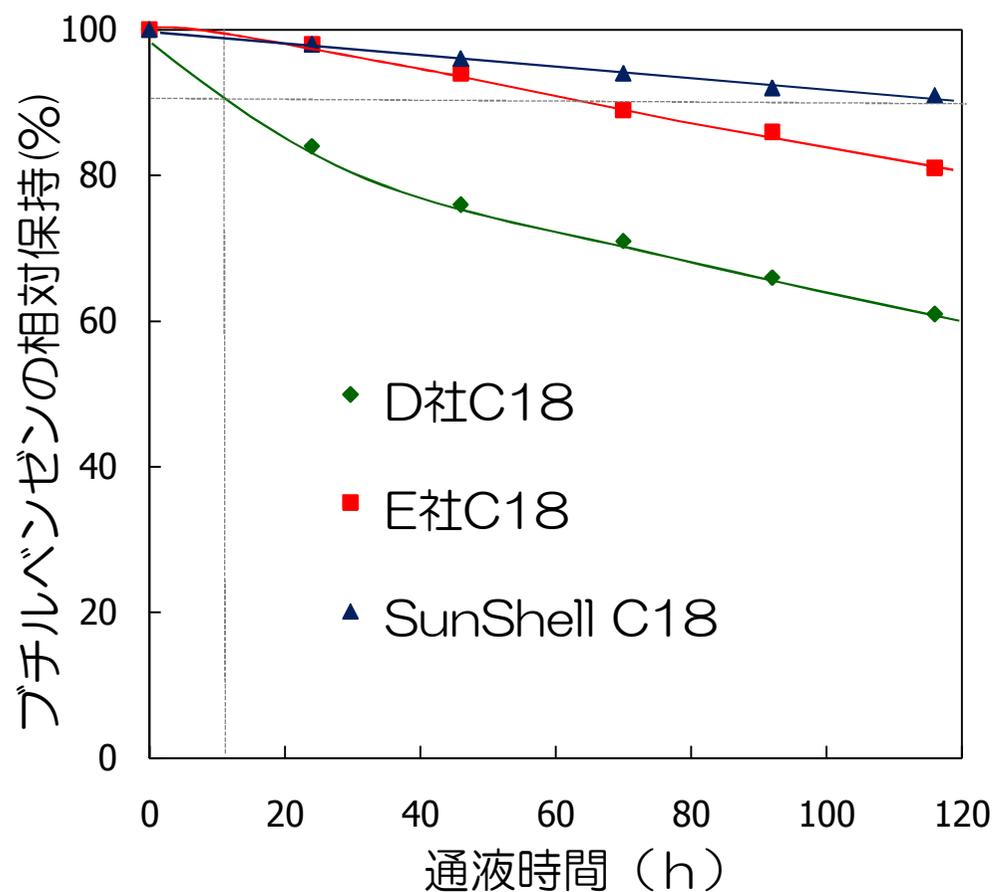
1.8

1.3

5 min

アセトニトリル/0.1%ギ酸移動相を用いた場合には試料過負荷になりやすく、試料過負荷時にはピークは前にずれ、テーリングが増します。

# 耐酸性加速試験



## 耐久性試験条件

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/1.0% TFA, pH1=10/90

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 80 °C

## 保持時間測定条件

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: H<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Butylbenzene

# 段理論1

移動相1	移動相2	移動相3	移動相4
固定相1	固定相2	固定相3	固定相4

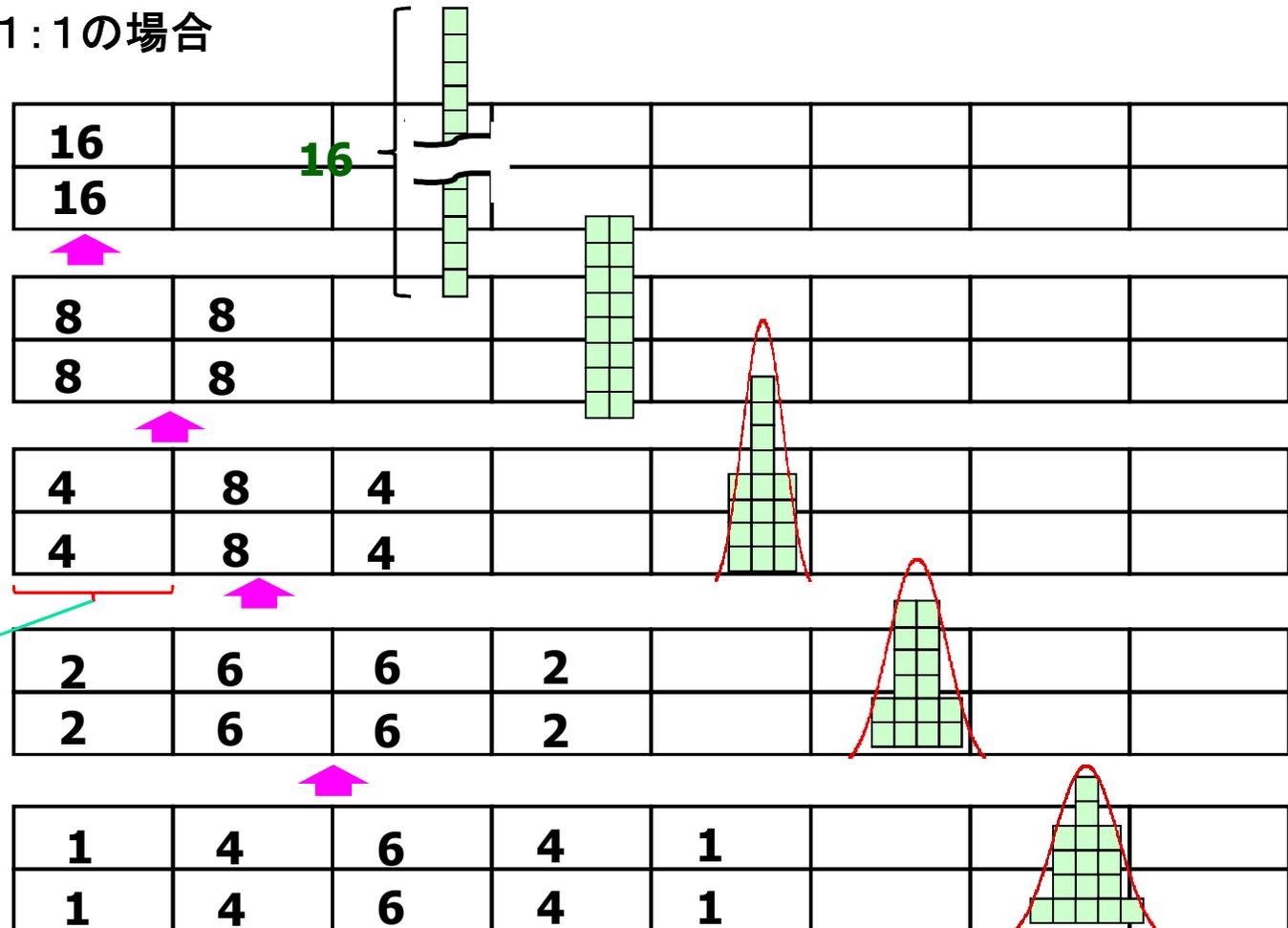


移動相	移動相1	移動相2	移動相3
固定相1	固定相2	固定相3	固定相4

移動相のみが動いて行く

移動相と固定相への分配比が1:1の場合

試料を 32  $\mu$ g 注入すると



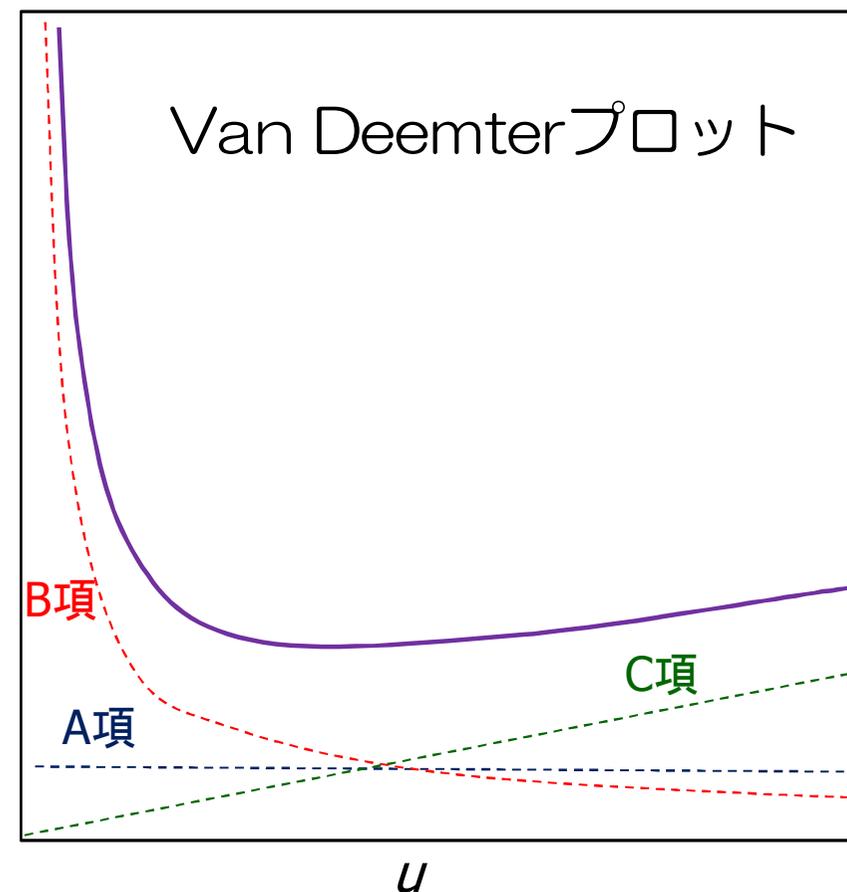
理論段高さ  
Height equivalent  
to a theoretical  
plate (HETP)

# Van Deemterの式

$$H = Ad_p + B \frac{D_m}{u} + C \frac{d_p^2}{D_m} u$$

$H$

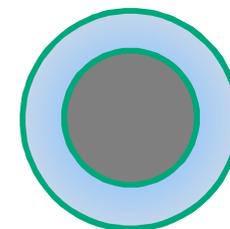
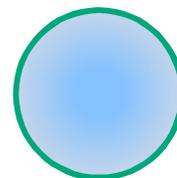
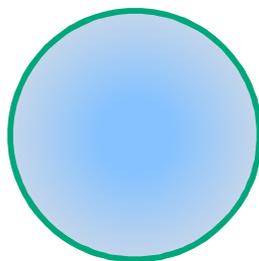
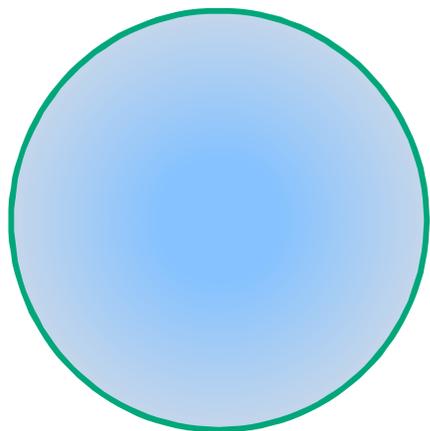
- A項 : 多流路拡散、渦巻き拡散  
粒径を $d_p$
- B項 : カラム軸方向への拡散、  
アナライトの移動相中の  
拡散係数を $D_m$
- C項 : 物質移動の項：固定相-移動相で  
の物質移動、粒子内での拡散  
による物質移動に依存



# 理論段数を上げるために

理論段高さ(HETP)を低くする

$$\text{HETP} \div 2.2 \times \text{粒子径}$$



粒子径

5 μm

3 μm

2 μm

2.6 μm

理論段高さ

11.0 μm

6.6 μm

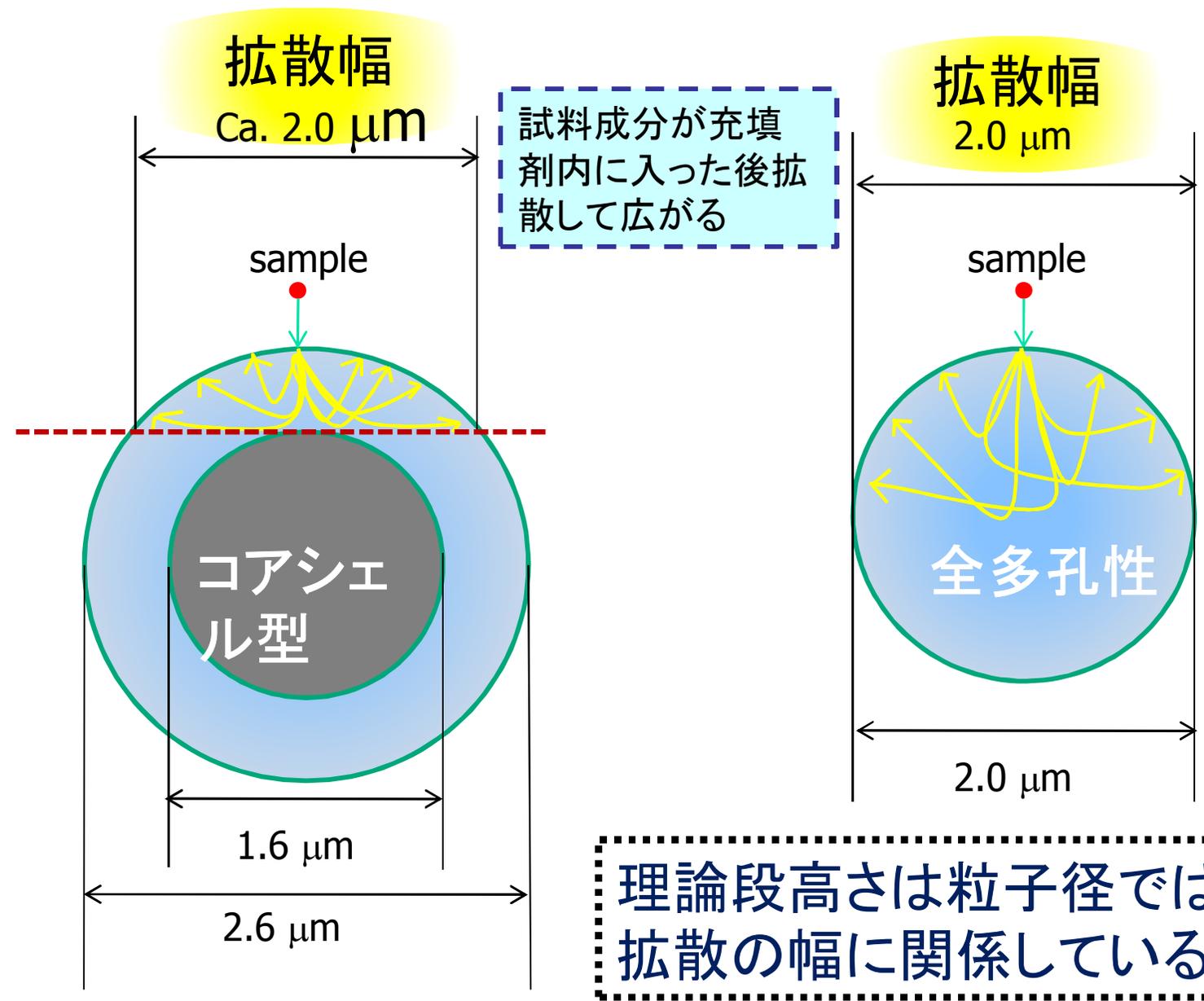
4.4 μm

4.4 μm

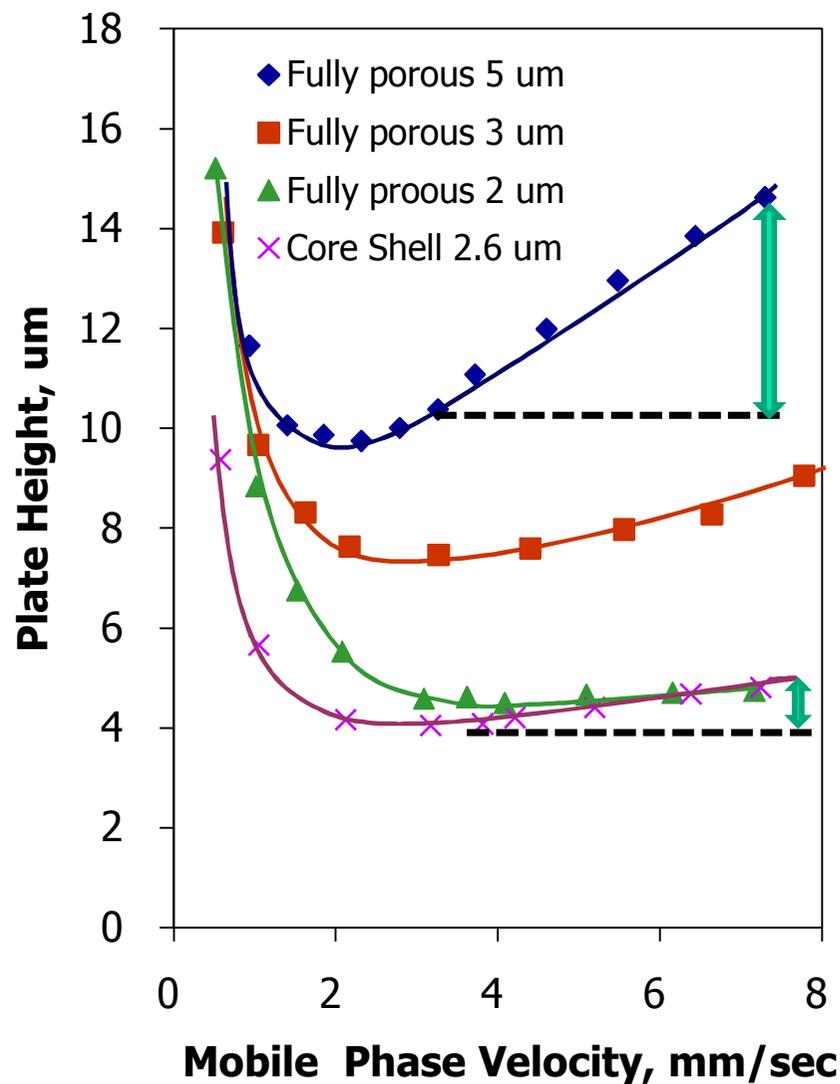
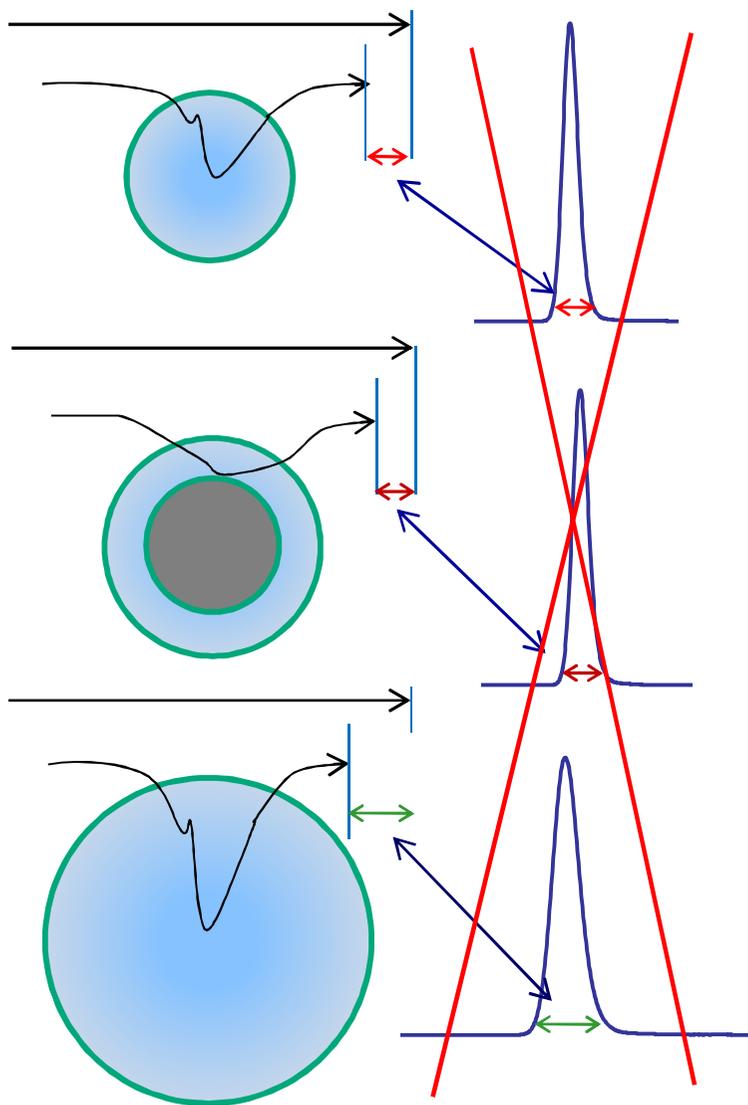
粒子径が小さいほど理論段高さは低くなる



# コアシェル型と全多孔性充填剤の比較



# 『拡散による物質移動(の遅れ)』はC項に関係している



## 【まとめ】

- エンドキャッピング試薬として用いられるヘキサメチルトリシロキサンをODSに結合させた新規C18試薬(HMODTS)を開発した
- HMODTSの官能基はシリカ表面の様々な位置のシラノール基と結合可能
- 残存シラノール基を非常に少なくすることが可能, その結果耐久性が向上 - pH10使用可能
- 2.6 $\mu$ mのコアシェル型粒子を用いることによりサブ2 $\mu$ mカラムの半分の圧力で, 同等な段数が得られた
- コアシェル型C18は, 超高压LC装置が不要で, 汎用HPLC装置でサブ2 $\mu$ mと同等な高速分離が達成可能である