

残存シラノール基が分離に及ぼす影響

シリカゲルのシラノール基と金属不純物

シリカゲルの化学的性質は、シラノール基によって決まります。そのシラノール基には主に3種類あり、それぞれ性質が異なります。

孤立シラノールの多いシリカゲルから合成された充填剤は塩基性化合物に対する吸着が強いと言われ、その割合はシリカゲルの合成条件によって異なります ※1。

シリカゲルに含まれる金属不純物はシラノール基の酸性度を高くし、活性を高めます ※4。また充填剤表面に残った金属不純物は吸着点となり ※5、配位性化合物の分析に支障をきたします。

シラノール基の種類

孤立シラノール	会合したシラノール ※3	ジェミナルシラノール
IR 3750 cm ⁻¹ ※3	IR 3750 cm ⁻¹ ※3	29 Si NMR ※2

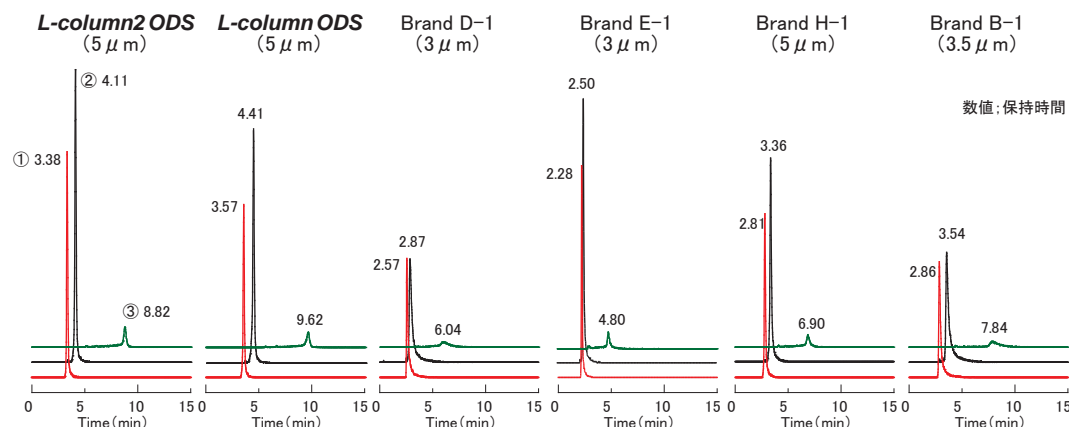
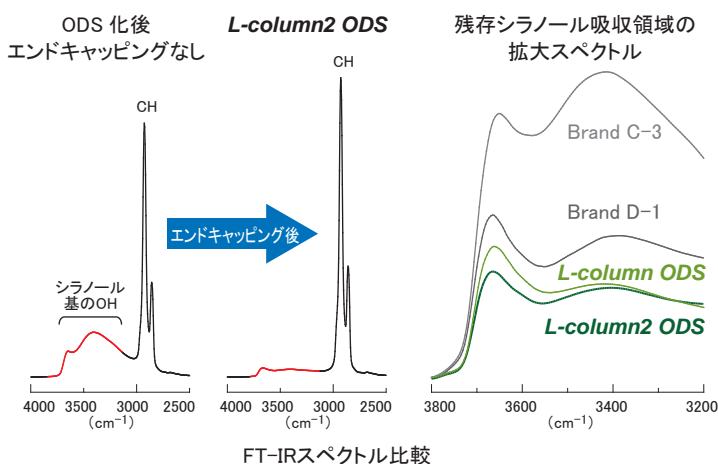
※1 J.J.Kirkland etc., J. Chromatogr., 352 (1986) 275. ※2 M.L.Miller etc., J. Chromatogr., 319 (1985) 9.
※3 K.K. Unger, Porous Silica, Elsevier, Amsterdam, 1979.
※4 P.C. Sadek, etc., J. Chromatogr. Sci., 25 (1987) 489. ※5 B.Buszewski, Chromatographia, 34 (1992) 573.

エンドキャッピングの効果

C18には、金属不純物の影響を避けるために高純度のシリカゲルを用いますが、シリカゲル中の金属不純物は完全に除去することができません。

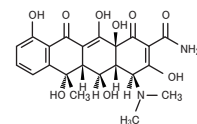
しかし、エンドキャッピングによりシリカゲル表面を完全に被覆すると、溶質は表面金属と接触できなくなりますが、従来のエンドキャッピング法では不可能でした。

テトラサイクリン類は金属に配位しやすく定量が難しい物質です。シリカゲル基材表面に残っている金属によりピークはテーリングして、定量性に欠けてしまいます。**L-column2 ODS** は基材に高度に品質管理した高純度シリカゲルを使用し、且つ新規エンドキャッピング法により、ほぼ完全にシリカゲル表面を被覆することで、シャープなピークが得られます。



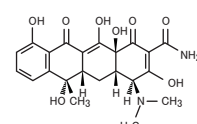
[Analytical conditions]
Column: 2.1 × 150 mm L or 2.0 × 150 mm (C18)
Mobile phase: 0.1% HCOOH in CH₃CN/0.1% HCOOH in H₂O (15/85)
Flow rate: 0.2 mL/min Temp.: 40°C Detection: ESI-MS (+) OTC (461→426) TC (445→410) CTC (479→444)
Inj. vol.: 10 μL (50 ppb in H₂O)

① オキシテトラサイクリン (OTC)

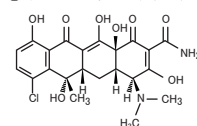


数値: 保持時間

② テトラサイクリン (TC)



③ クロルテトラサイクリン (CT)

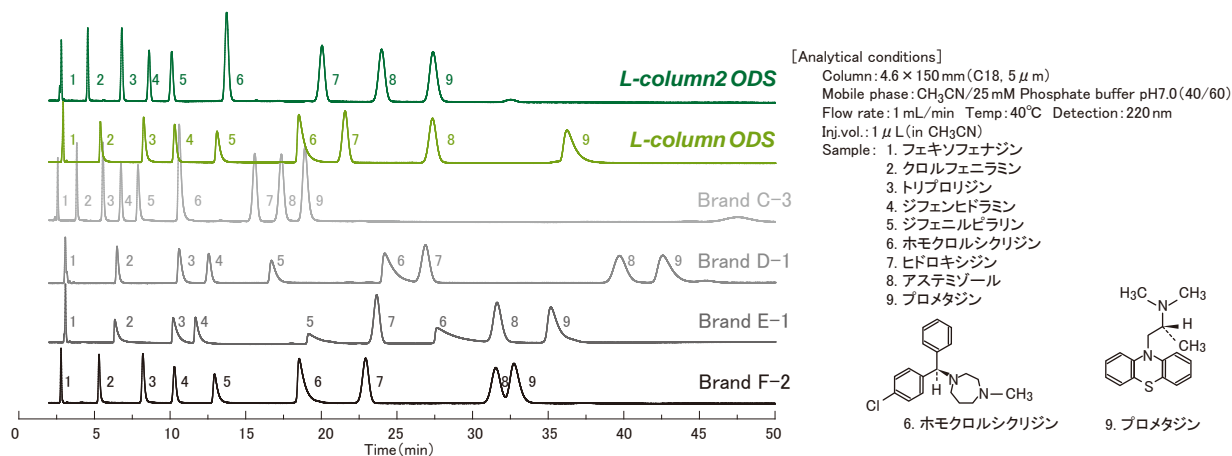


テトラサイクリン類の分析

シラノールの完全不活性化による効果

■ ピーク形状の向上

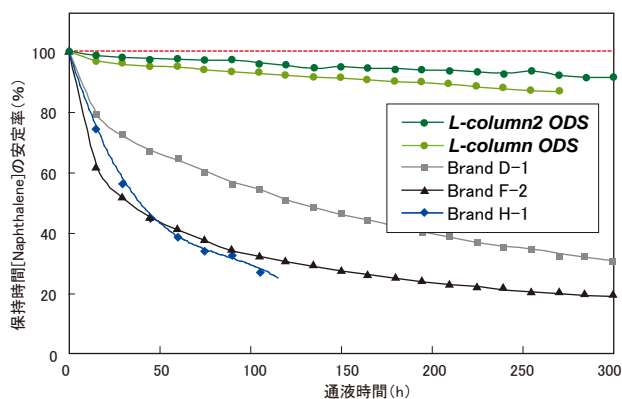
塩基性化合物は残存シラノール基に吸着することによりピークがテーリングします。完全にエンドキャッピングすると残存シラノール基との相互作用がなくなり、C18の持つ本来の保持挙動により、ピークはシャープに、再現性の良いデータが得られます。



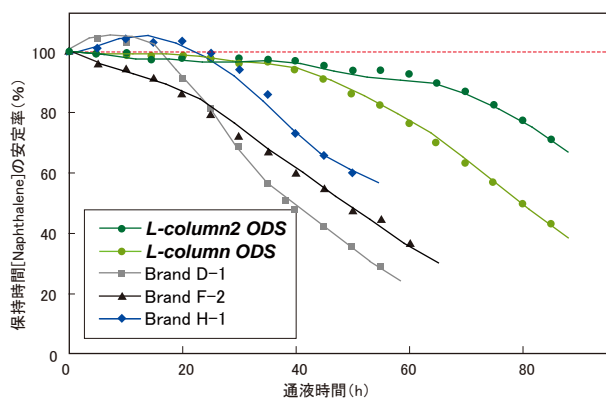
塩基性医薬品(抗アレルギー剤)の分析

■ 耐久性の向上

耐久性はエンドキャッピングの密度により影響されます。エンドキャッピングが不十分だと修飾部分が加水分解されやすく、保持時間が早くなり、またシラノール基が増加することにより、塩基性化合物のピーク形状が悪くなってしまいます。カラム温度を高くしてカラム劣化を加速した試験結果では、**L-column2 ODS** はかなり長期間安定していることになり、H-1より20倍以上耐久性があると推察されます。シリカゲルベースのカラムでも表面の被覆をほぼ完全にすることで、シリカゲル表面に移動相が触れることを防ぐことができるので、**L-column2 ODS** はアルカリ移動相下でも高耐久性を示します。



加速耐久性試験 (pH1 以下)



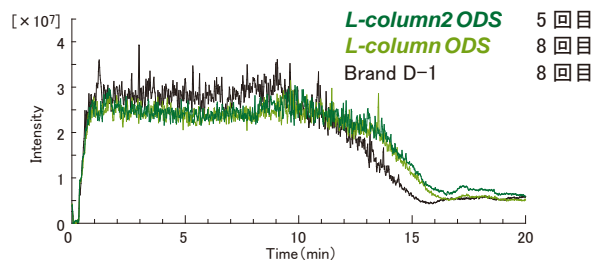
加速耐久性試験 (pH10)

■ ブリーディングの減少

シリカゲル表面が完全に被覆されていなかったり、修飾基との結合が弱いと、充填剤基材由来のノイズが発生します。GC用カラムの液相からのブリーディング(ブリード)が成分の検出や定量に影響を及ぼすのと同様、HPLCでも微量成分分析のLC/MS/MSで特に問題になります。

シラノール基を完全不活性化することで、ベースラインのノイズを抑えることができます。どのようなカラムも長時間使用していれば、ベースラインは落ち着いてきますが、限界があります。右は繰り返し使用した後のベースラインです。

L-column 及び Brand D-1 はグラジエント条件を8回繰り返した状態ですが、**L-column2 ODS** は、5回目のベースラインでノイズが少なくなっているのがわかります。

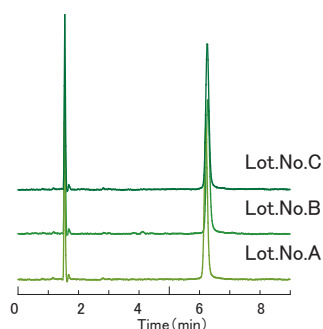


[Analytical conditions]
 Column: 2.1 × 150 mm (C18, 5 μm)
 Mobile phase: A) 0.1% HCOOH in CH₃CN B) 0.1% HCOOH in H₂O
 A/B, 5/95 → 100/0 → 100/0 (0 → 10 → 20 min)
 Flow rate: 0.2 mL/min Temp: 40°C

LC/MSにおけるノイズ

■ 再現性

シラノールを完全にエンドキャッピングすると、残存シラノール基に起因するロット間のばらつきが抑えられ、分析の再現性が良くなります。特に低濃度でエンドキャッピングの差は顕著に現れ、定量性に影響します。

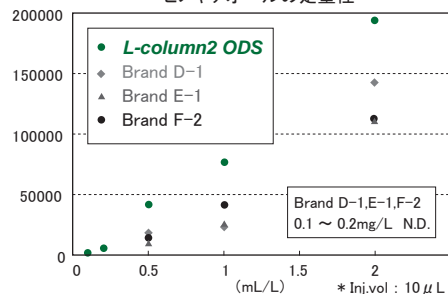


[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** 4.6 × 150 mm (5 μm, 12 nm)
 Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (40/60)
 Flow rate: 1 mL/min Temp: 40°C
 Sample: 1. Urasil 2. Hinokitiol (10 mg/L)
 Inj.vol.: 1 μL

充填剤ロット	Rt	N	T.F.※
Lot.No.A	6.227	14483	1.104
Lot.No.B	6.294	12519	1.201
Lot.No.C	6.274	13752	1.099

※USPテーリングファクター

ヒノキチオールの定量性

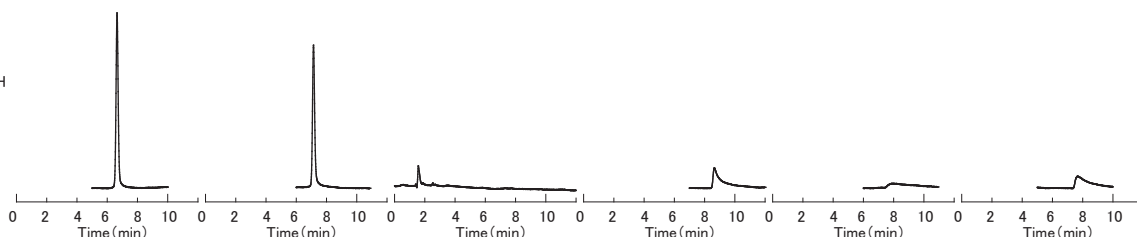
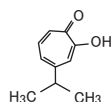


カラム比較

一言で「C18(ODS)」と言ってもメーカーや銘柄によって様々な特徴があります。使い慣れたカラムを選択するという方法もありますが、汎用性が高く分析メソッドを作成しやすいカラムを選択する方が効率的です。酸性化合物から塩基性化合物まで簡単なメソッドでテーリングなくシャープなピークが得られるカラムが、どのような分析にも対応できるファーストチョイスカラムであるといえます。

L-column2 ODS	L-column ODS	Brand C-3	Brand D-1	Brand E-1	Brand F-2
---------------	--------------	-----------	-----------	-----------	-----------

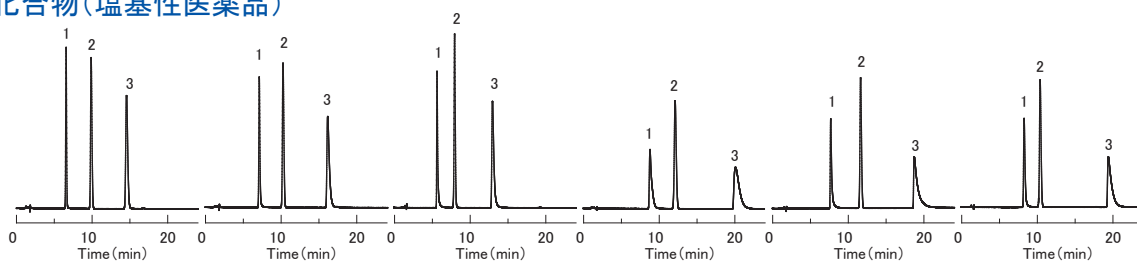
■ 配位化合物(ヒノキチオール)



	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※
ヒノキチオール	6.640	9858	1.158	7.167	10497	1.277	N.D.	N.D.	N.D.	8.647	2150	6.638	7.910	287	3.229	7.686	511	3.661

※USPテーリングファクター

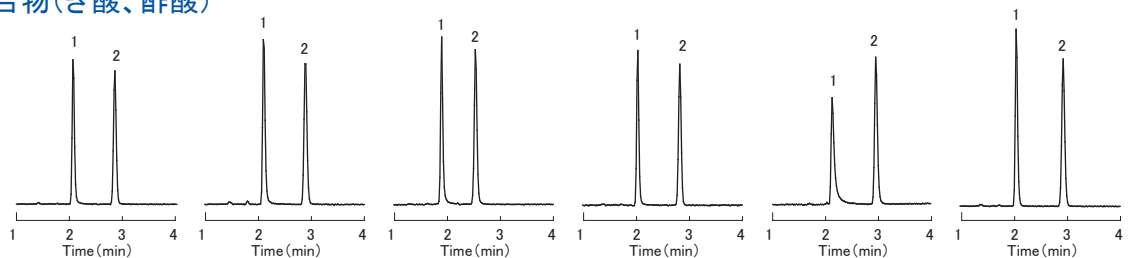
■ 塩基性化合物(塩基性医薬品)



	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※
1. プロプラノール	6.605	14753	1.094	7.191	12719	1.383	5.763	11404	2.168	8.868	5.374	2.464	7.763	10593	2.265	8.419	9821	1.162
2. ベナゼプリル	9.935	13015	1.230	10.35	12982	1.230	8.100	12262	1.175	12.23	10020	1.168	11.737	12549	1.124	10.549	11816	1.185
3. マプロチリン	14.643	14207	1.304	16.294	12597	1.930	13.142	12093	1.962	20.258	4010	2.558	18.882	12300	5.735	19.624	10152	3.563

※USPテーリングファクター

■ 酸性化合物(ぎ酸、酢酸)



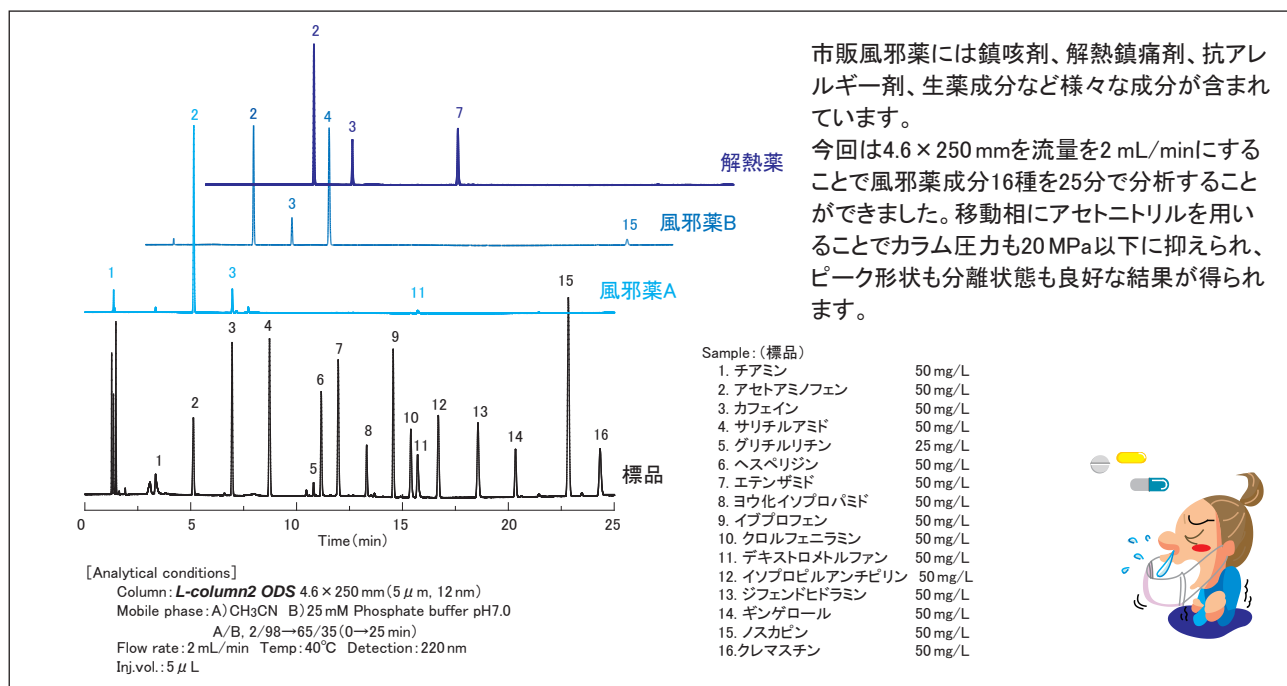
	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※	Rt	N	T.F.※
1. ぎ酸	2.047	11647	1.098	2.107	9950	1.249	1.900	9450	1.205	2.149	8273	1.364	2.137	5285	2.034	2.054	10768	1.164
2. 酢酸	2.813	15087	1.061	2.892	1298	1.134	2.537	11693	1.098	3.169	12320	1.091	2.970	13621	1.239	2.932	12855	1.091

※USPテーリングファクター

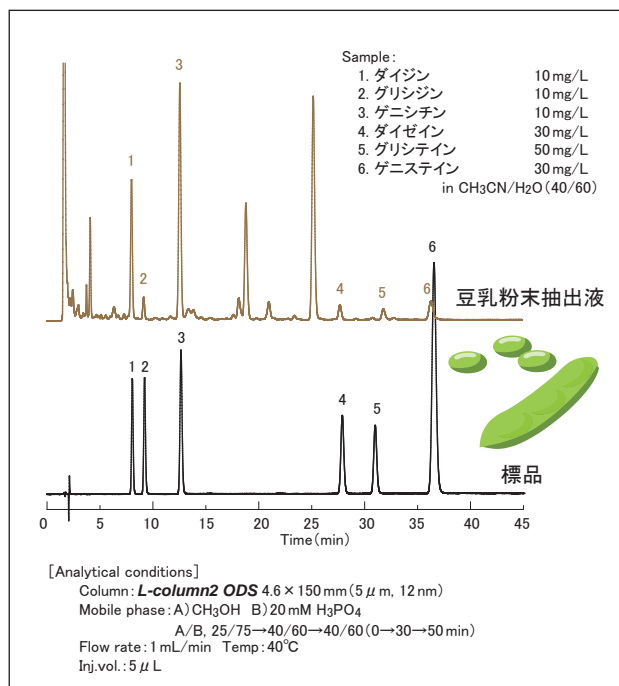
[Analytical conditions] Column: 4.6 × 150 mm (C18, 5 μm) Flow rate: 1 mL/min Temp: 40°C

★配位化合物 Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (40/60) Detection: UV 254 nm Sample: ヒノキチオール (0.5 mg/L) 注入量: 10 μL
 ★塩基性化合物 Mobile phase: CH₃CN/25 mM Phosphate buffer pH 7.0 (30/70) Detection: UV 220 nm
 Sample: 1. プロプラノール (50 mg/L) 2. ベナゼプリル (400 mg/L) 3. マプロチリン (500 mg/L) 注入量: 1 μL
 ★酸性化合物 Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄ (2/98) Detection: UV 210 nm Sample: 1. ぎ酸 (0.5%) 2. 酢酸 (1%) 注入量: 1 μL

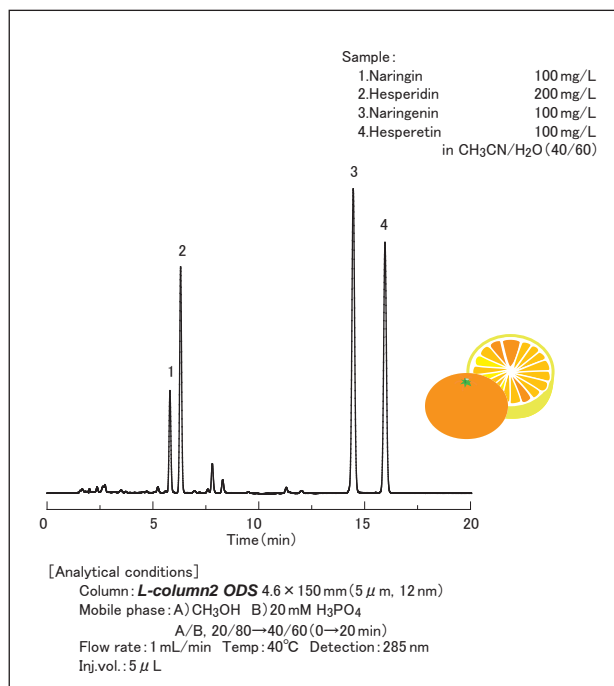
Application



市販風邪薬の分析 (Application No.L2031)



大豆イソフラボンの分析 (Application No.L2028)



ポリフェノール類(かんきつ類薄皮成分)の分析 (Application No.L2029)

リーフレット内容に関してのお問合せは、最寄の代理店又は東京事業所クロマト技術部までご連絡ください

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構
 Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
<http://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部
 e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521
 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地