

エンドキャッピングを備えたシリル試薬によるC18固定相の開発： 2 μ m粒子への応用

クロマニック テクノロジーズ

○長江 徳和, 山本 孝治, 門田 千明

Norikazu Nagae, Kouji Yamamoto and Chiaki Kadota

Email: info@chromanik.co.jp

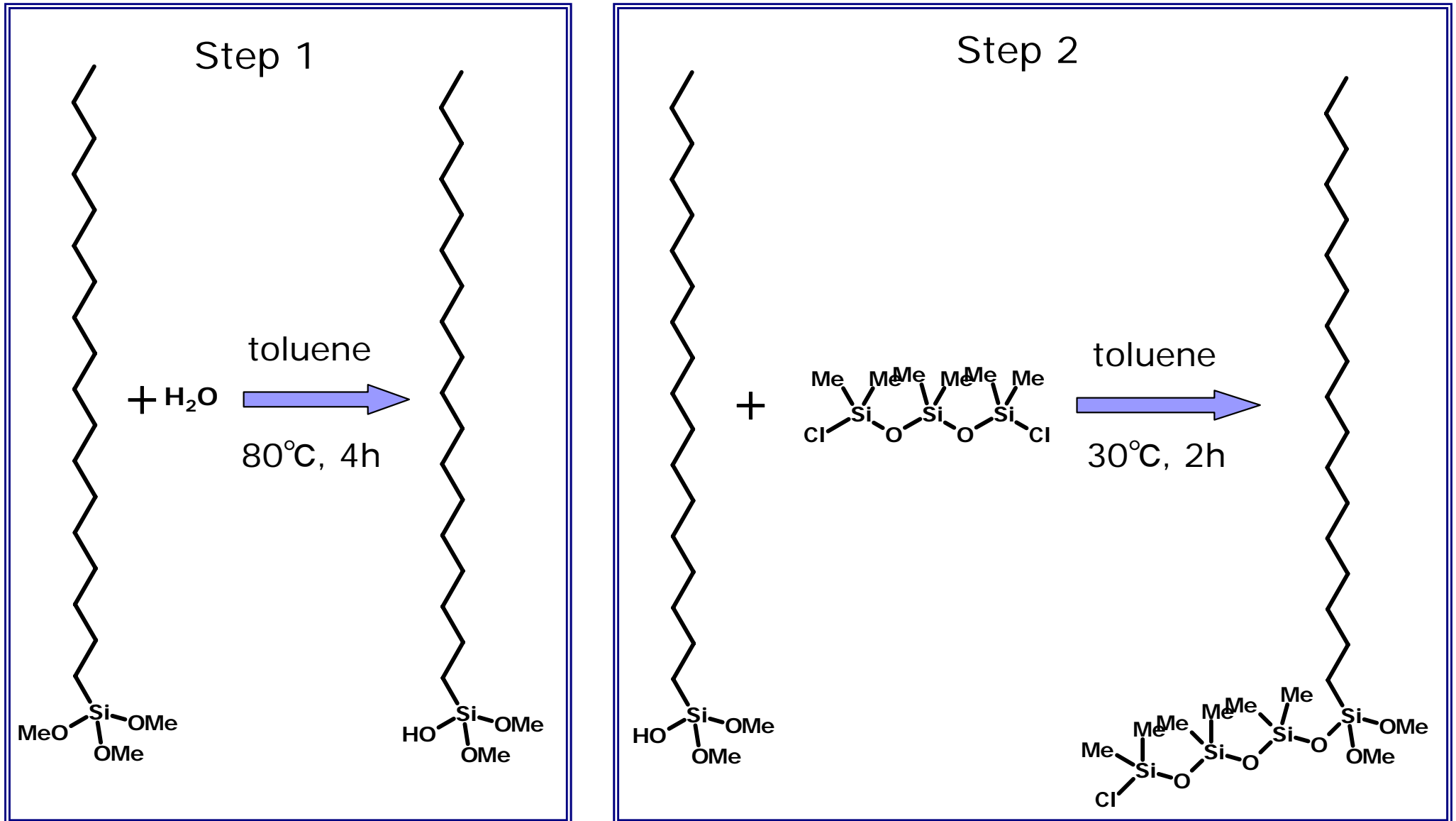
<http://chromanik.co.jp>

【緒言】

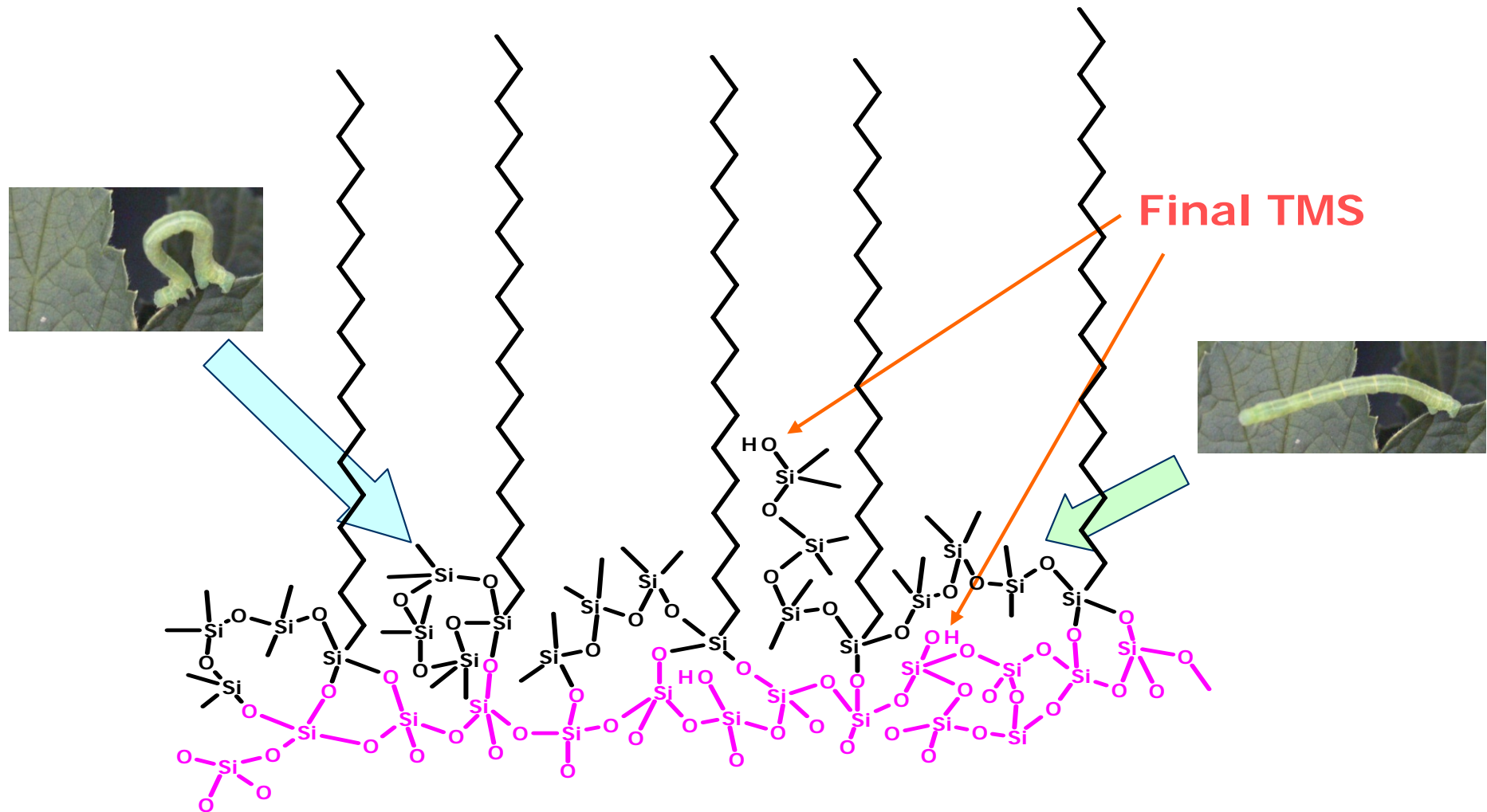
- カークランドによりHPLCが発明されて以来40年近く経過するが、この間充填剤は日々改良が進められてきた。
- 表面多孔性（ペリキュラー）充填剤から全多孔性に、さらに近年再び粒子径を $3\mu\text{m}$ 以下にした表面多孔性へと、シリカ系充填基材も変化している。
- またシリカ系逆相充填剤はシラノール基の影響を防ぐため、様々なエンドキャッピング技法が開発されてきた。
- 演者らは従来のエンドキャッピング方法の概念を変え、エンドキャッピング試薬をあらかじめオクタデシルシリル化試薬に結合させたシリル化試薬を開発した。
- アミトリプチリンのピーク形状を比較することにより、この試薬で調製した充填剤の残存シラノール基の評価を行った。

新規C18試薬A (HMODTS) 特許出願中

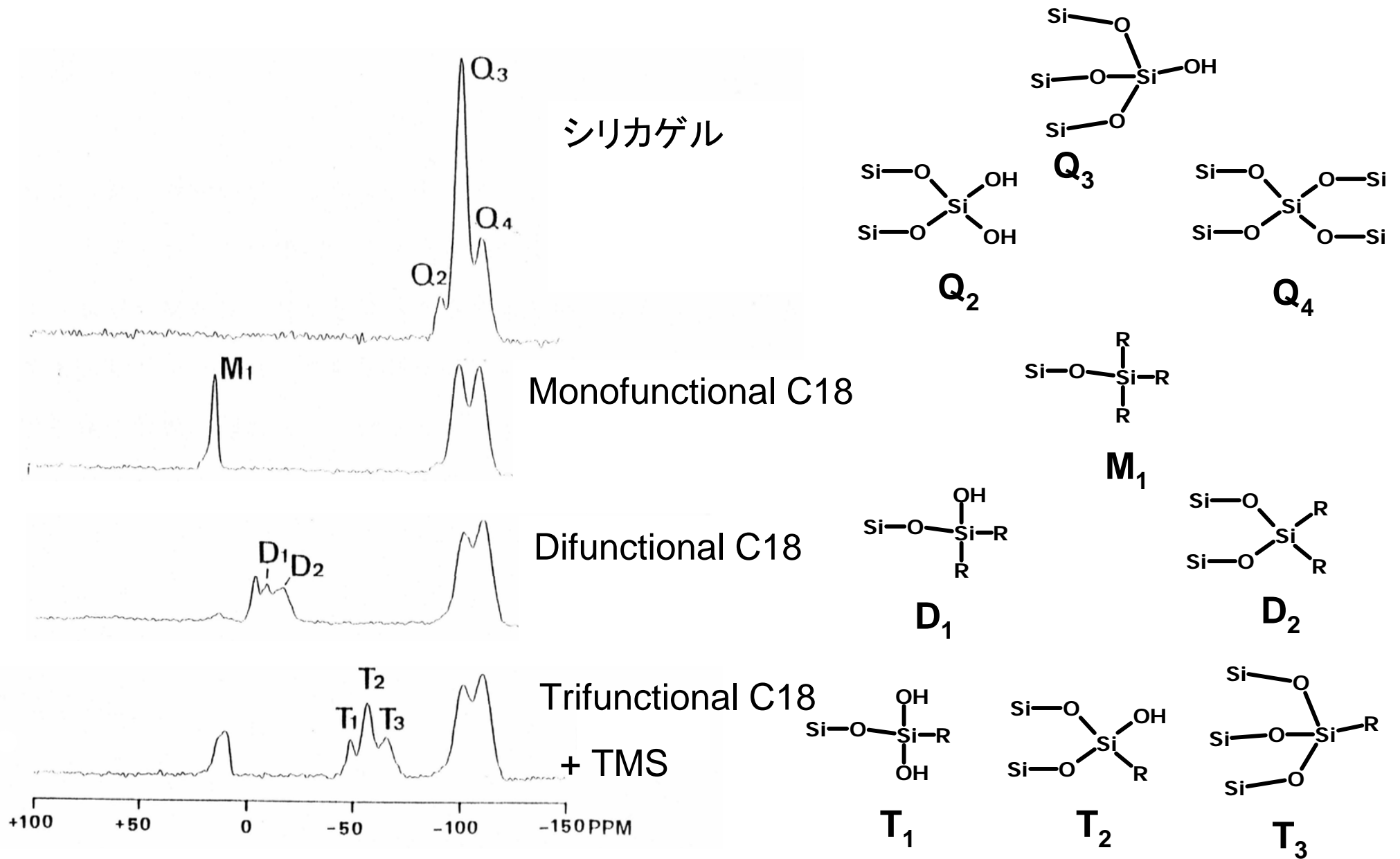
ヘキサメチルオクタデシルテトラシラン



推定されるシリカ表面での結合状態 (Sunniest C18 HMODTS)



^{29}Si CP-MAS NMR



Sunniest C18 HMODTS 充填剤の物性

用いたシリカゲル: 12nm, 340 m²/g, 5 μm

C18 試薬結合後の炭素含有量: 16.1%

最終エンドキャッピング後の炭素含有量: 16.3%

アミトリプチリンのピーク比較 I

メタノール CH₃OH, pH7.5, 40 °C

Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5µm

Mobile phase:

CH₃OH/20mM Phosphate buffer pH7.5=80/20

Flow rate: 1.0 mL/min

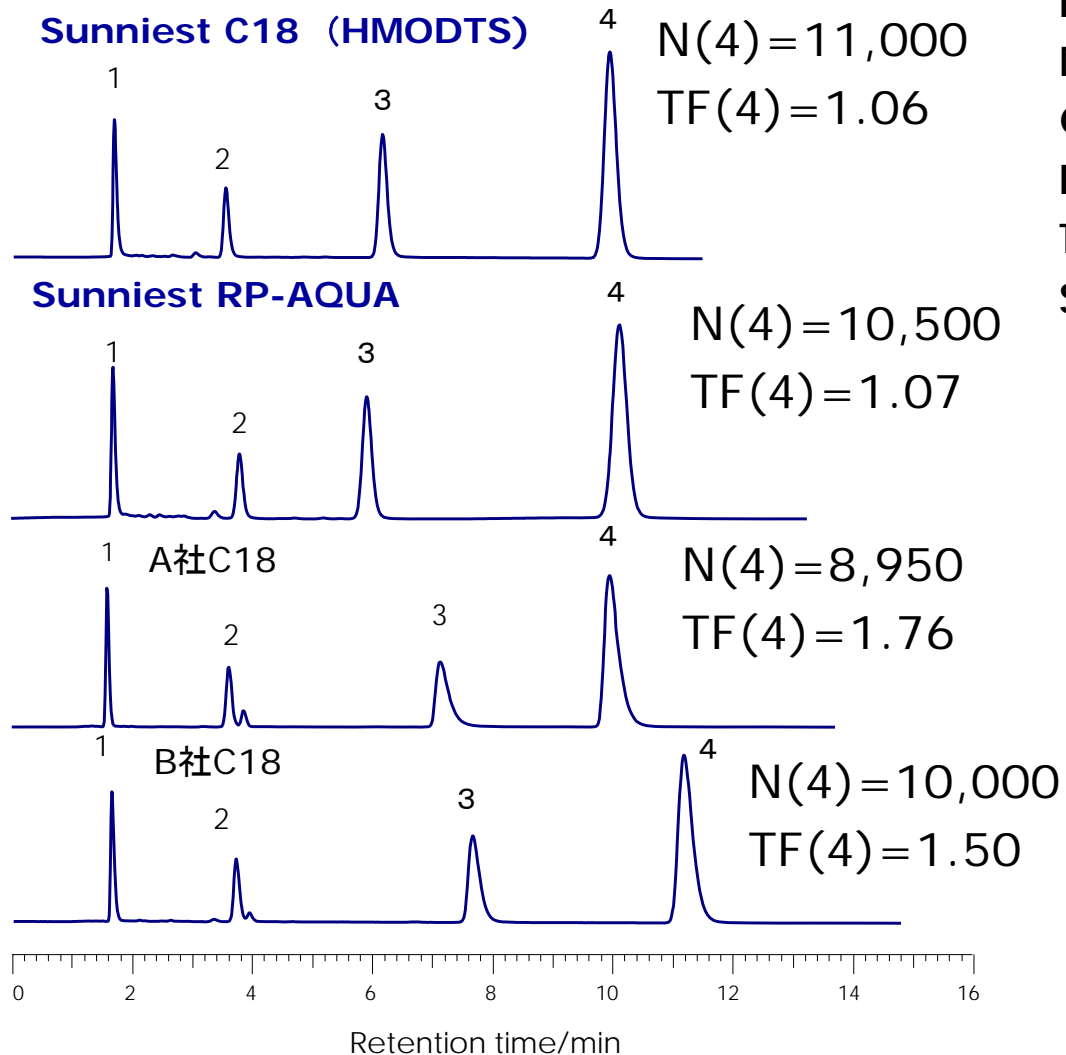
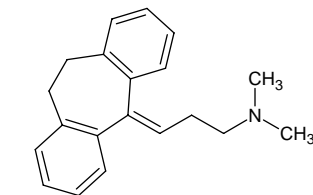
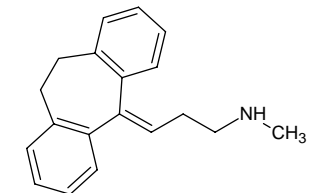
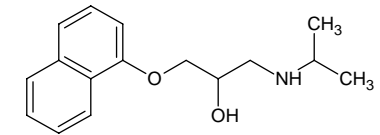
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Propranolol

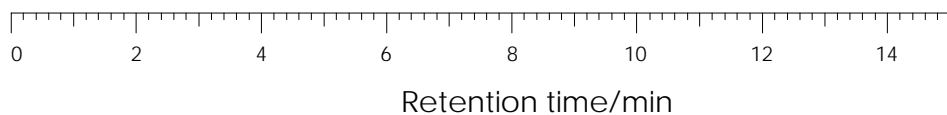
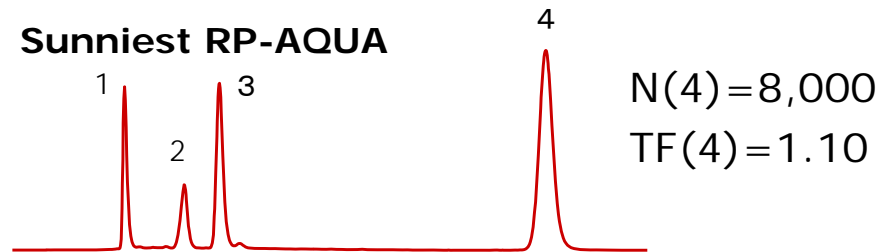
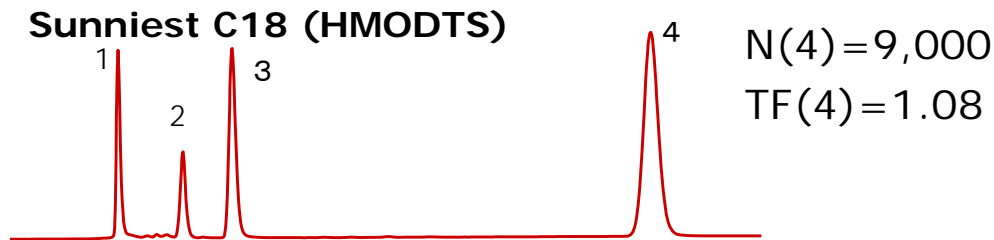
3 = Nortriptyline

4 = Amitriptyline



アミトリプチリンのピーク比較Ⅱ

メタノール CH₃OH, pH6.0, 22 °C



Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5µm

Mobile phase:

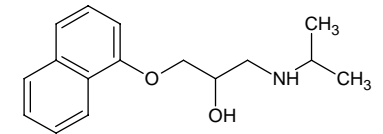
CH₃OH/20mM Phosphate buffer pH6.0=80/20

Flow rate: 1.0 mL/min

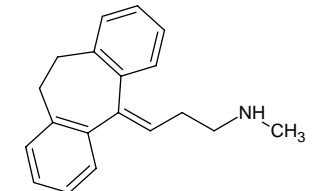
Temperature: 22 °C

Sample: 1 = Uracil

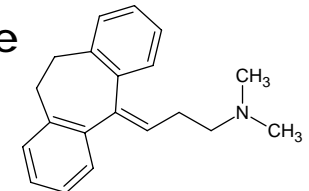
2 = Propranolol



3 = Nortriptyline



4 = Amitriptyline



アミトリプチリンのピーク比較Ⅲ-A

アセトニトリル CH₃CN, pH7.0, 40 °C

Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5μm

Mobile phase:

CH₃CN/20mM Phosphate buffer pH7.0=60/40

Flow rate: 1.0 mL/min

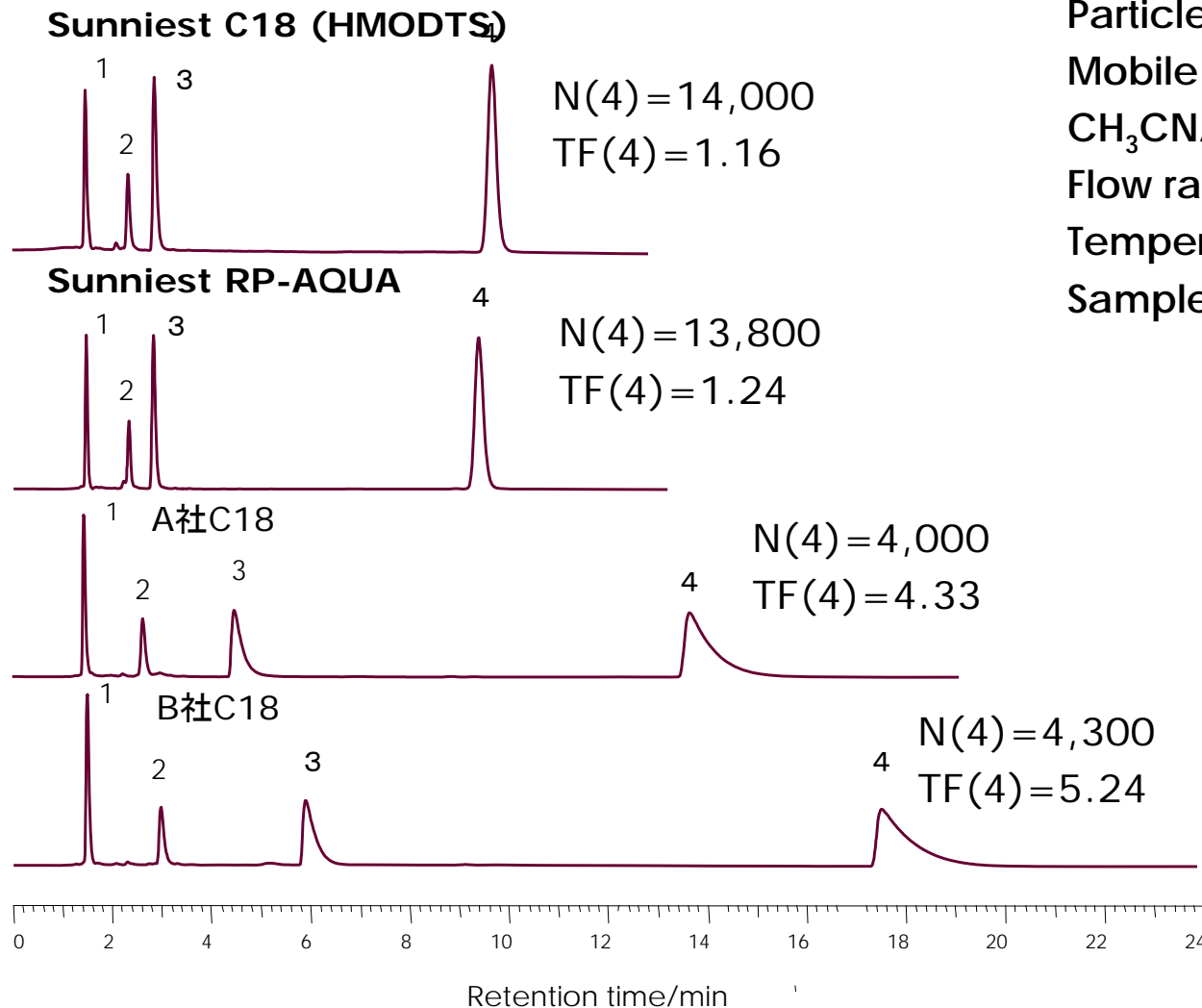
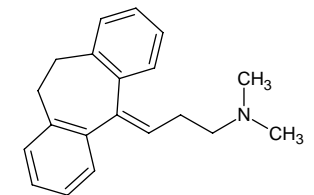
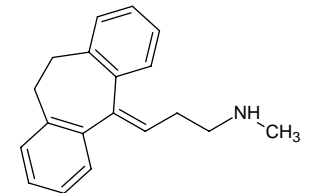
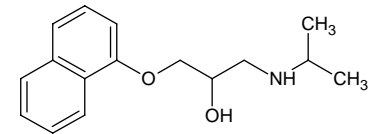
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Propranolol

3 = Nortriptyline

4 = Amitriptyline

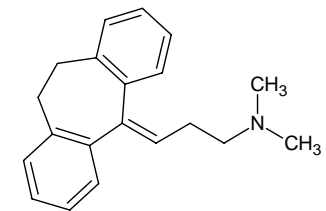


アミトリプチリンのピーク比較Ⅲ-B

Column	TF	N
Sunniest C18(HMODTS)	1.16	14,000
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

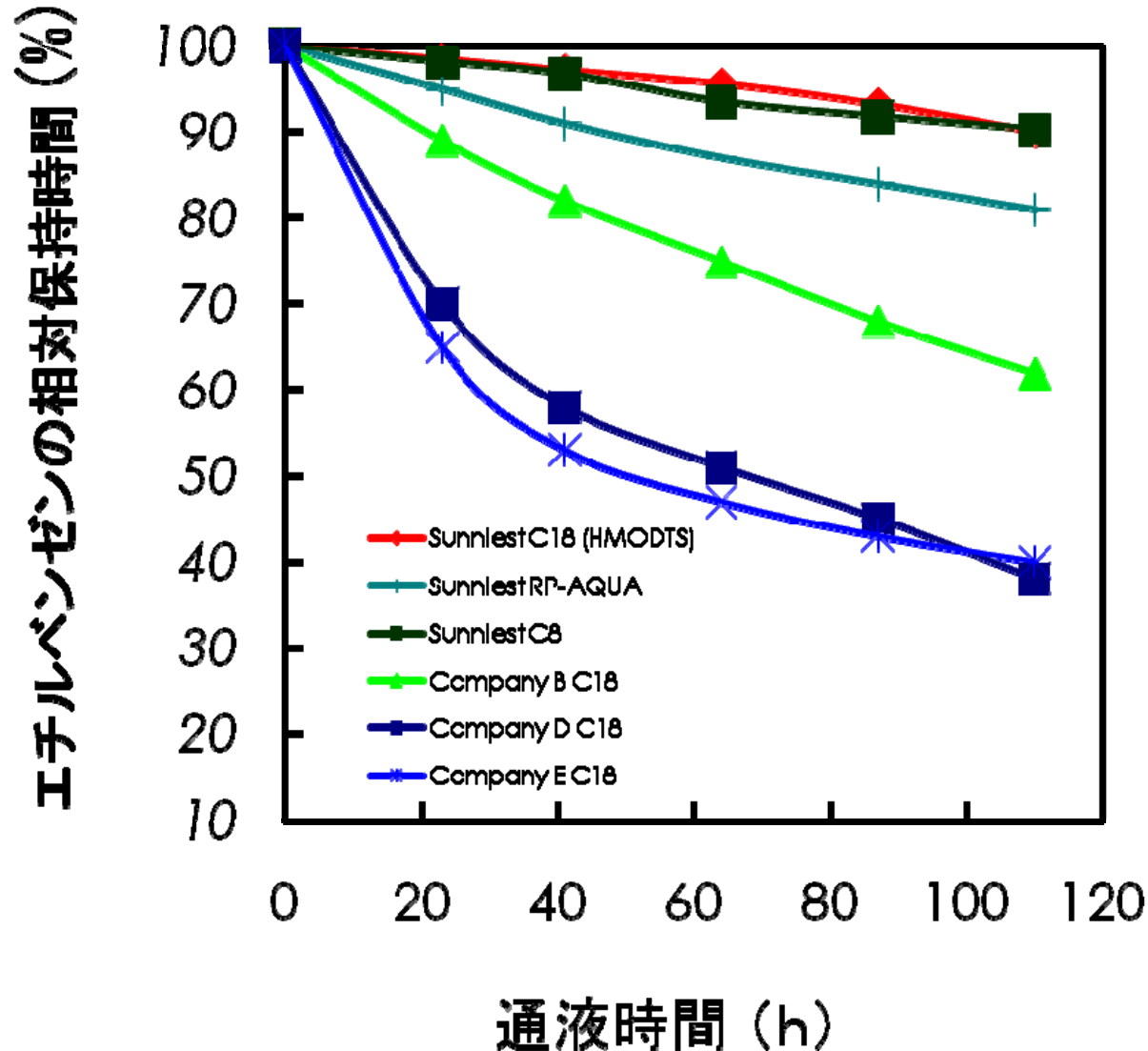
Column	TF	N
Japanese company C1 C18	2.14	8,700
P1	1.09	9,500
M1	2.01	11,200
Japanese company D1 C18	1.30	12,000
Japanese company D2 C18	2.92	8,000
Japanese company D3 C18	2.70	6,100
Japanese company E1 C18	0.99	11,400
Japanese company F1 C18	3.44	6,700
Japanese company G1 C18	1.71	10,000
Japanese company 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:
 CH₃CN/20mM Phosphate
 buffer pH7.0=60/40
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample: Amitriptyline



耐久性の評価

耐酸性加速試験



耐久性試験条件

Column size: 4.6x150 mm
 Mobile phase: CH₃CN/1.0% TFA, pH1=10/90
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 80 °C

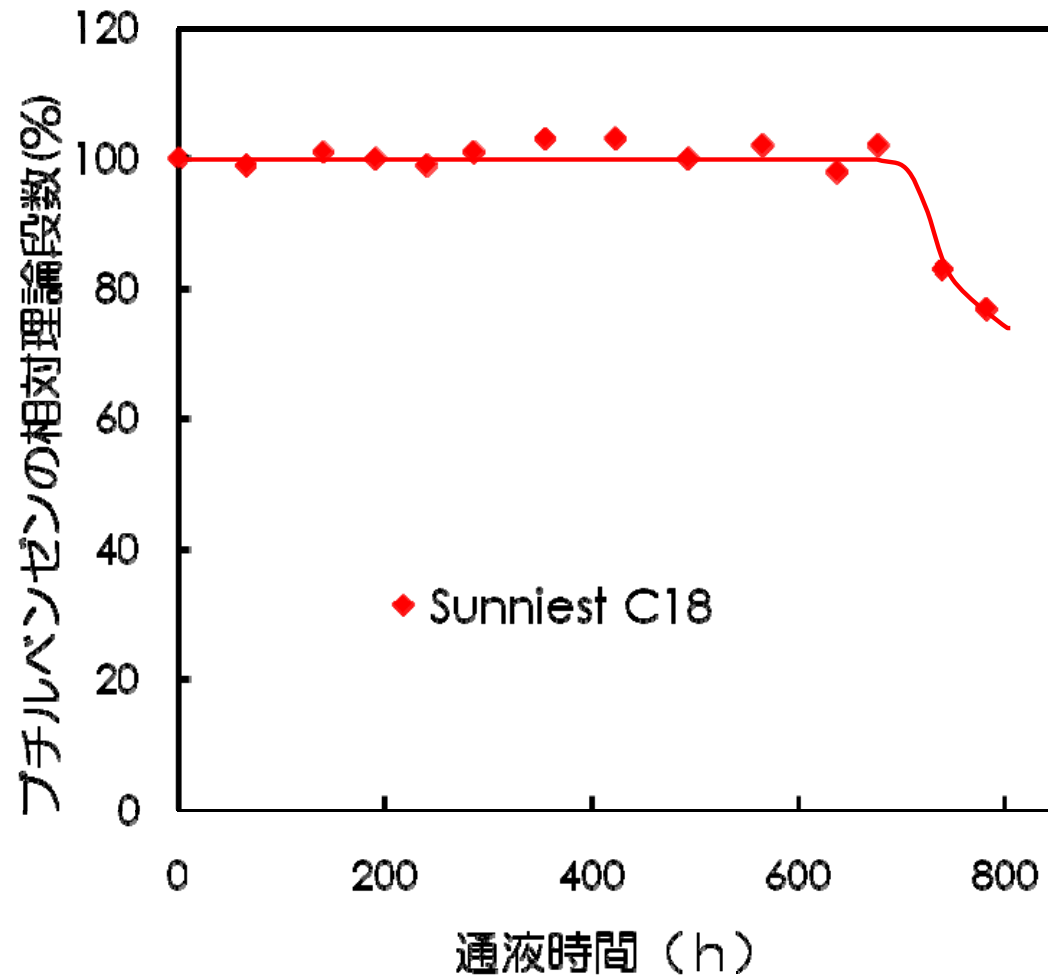
保持時間測定条件

Column size: 4.6x150 mm
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample: 1 = Uracil
 2 = Ethylbenzene

耐久性の評価

アルカリ性試験

Sunniest C18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 μ m
4.6x150 mm
Mobile phase: CH₃OH/20mM Sodium borate /10mM NaOH=30/21/49 (pH10)
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 50 °C

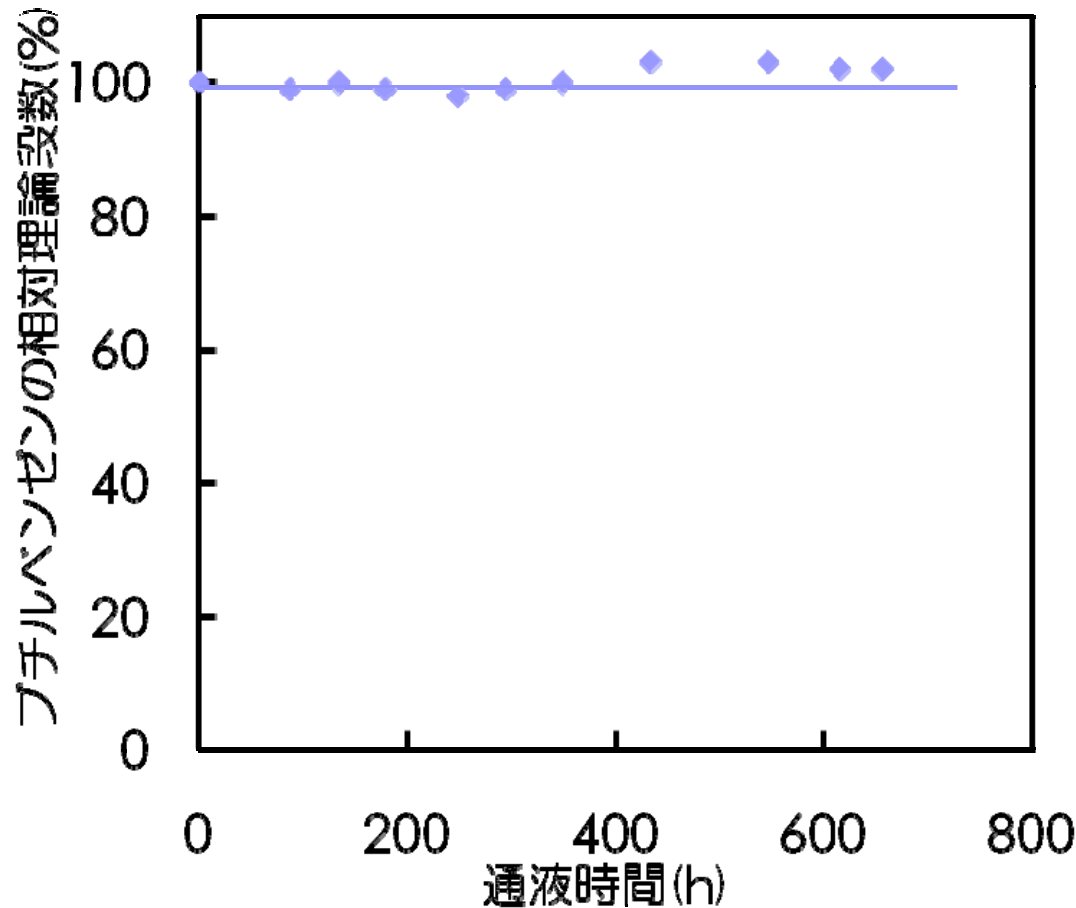
理論段数測定条件

Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 μ m
4.6x150 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Sample: 1 = Butylbenzene

耐久性の評価

アルカリ性試験

Sunniest C8はpH9.2, 40°Cの条件で600時間の耐久性



耐久性試験条件

Column: Sunniest C8, 5 μ m
4.6x150 mm

Mobile phase: CH₃OH/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 C8, 5mm
4.6x150 mm

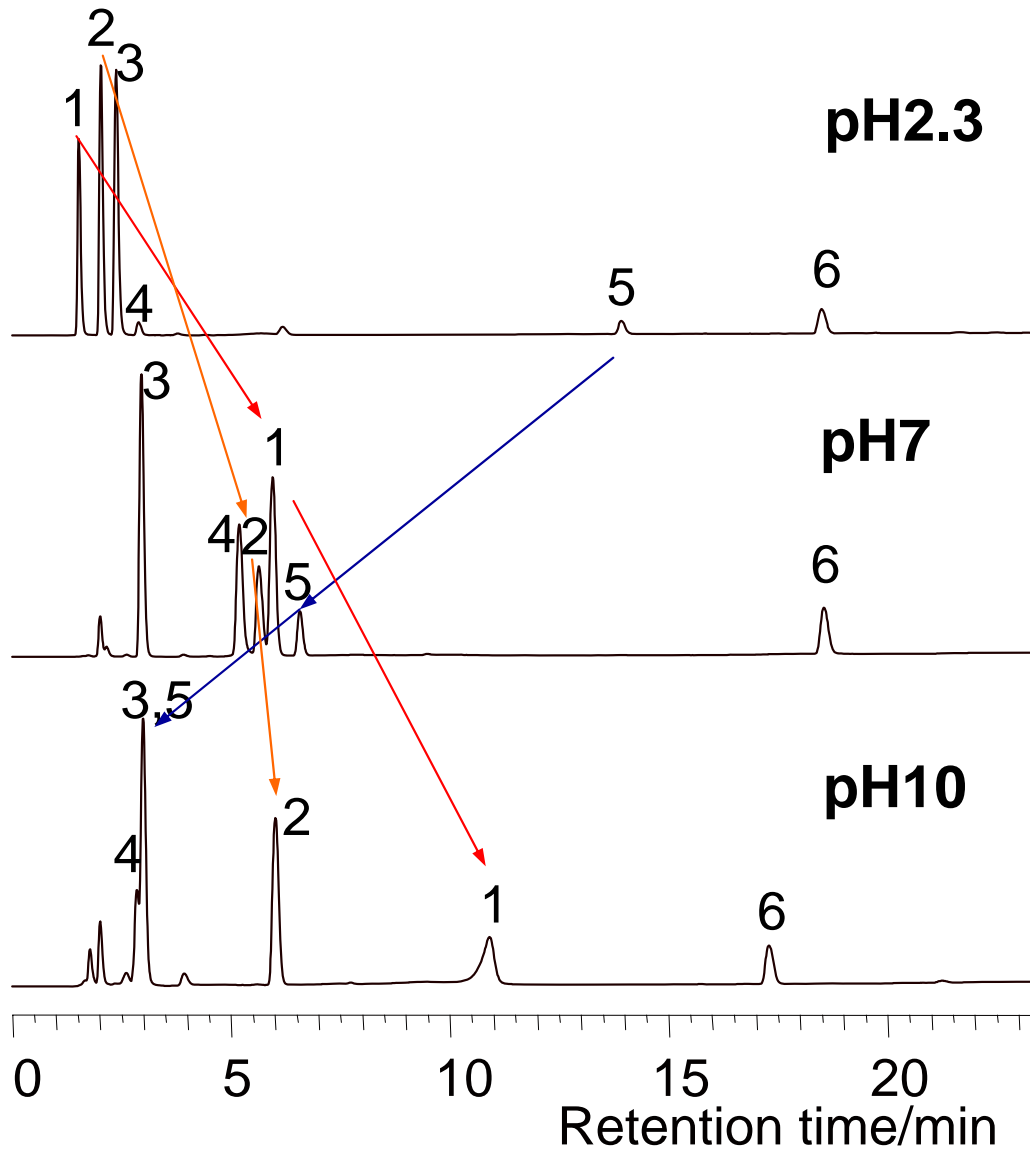
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Butylbenzene

リン酸緩衝液によるpH選択性



Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 μ m,
4.6 x 150 mm

Mobile phase:

A1) 20mM Phosphoric acid pH2.3

A2) 20mM Phosphate buffer pH7

A3) 20mM Phosphate buffer pH10

B) Acetonitrile

Time (min)	0	30
%B (%)	2	26

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: 1= Thiamine HCl Vitamin B₁

2 = Nicotinamide

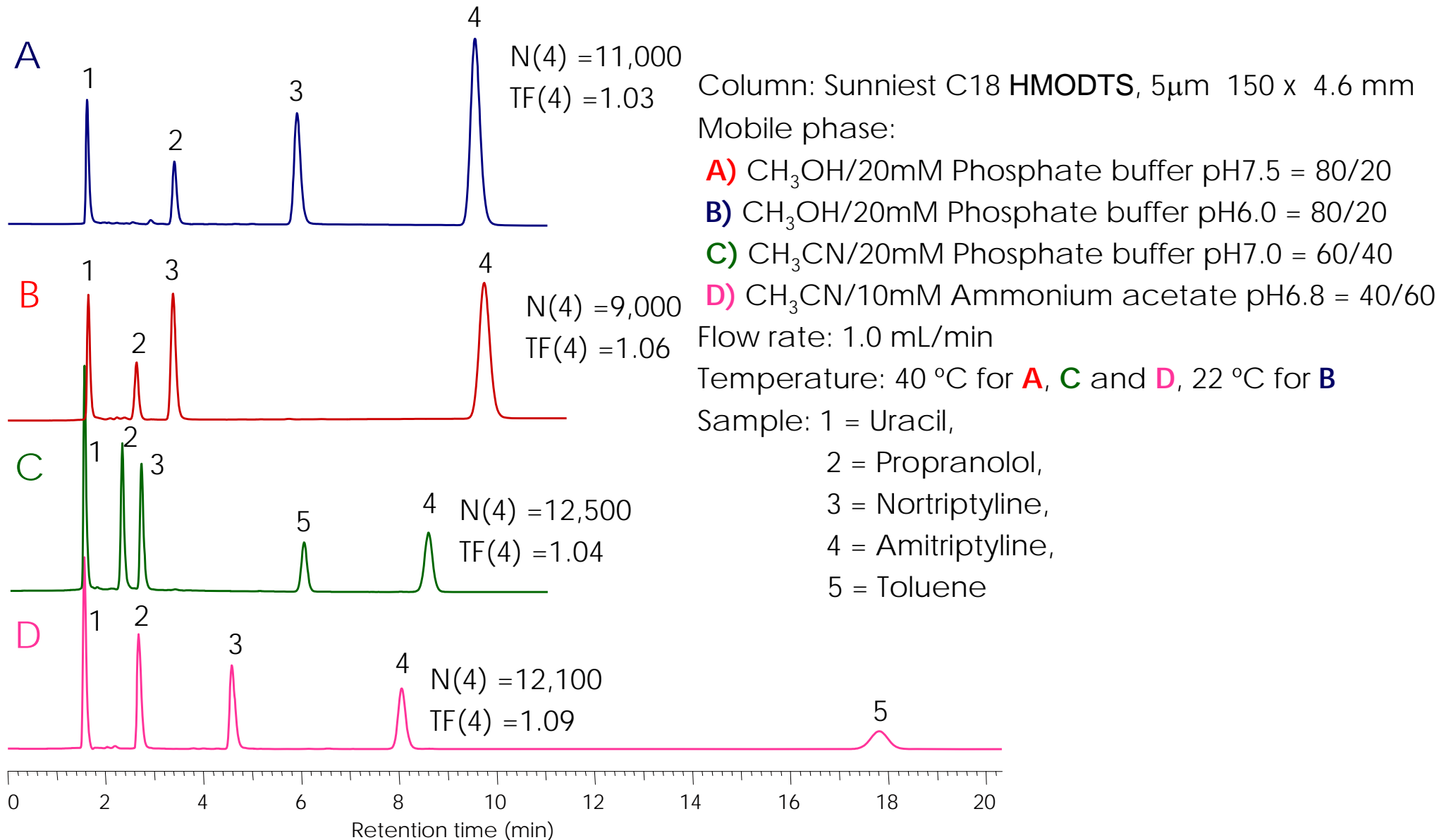
3 = Nicotinic acid

4 = Pyridoxine HCl Vitamin B₆

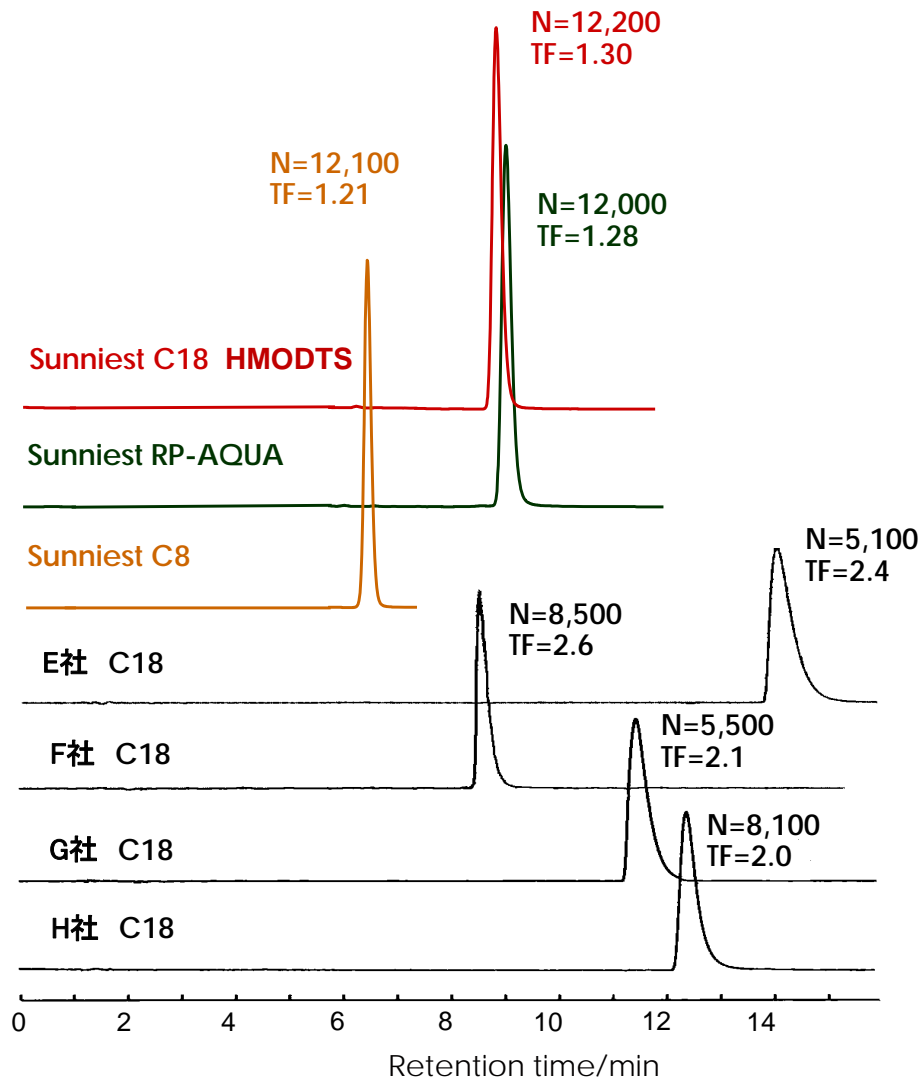
5 = Folic acid

6 = Riboflavin Vitamin B₂

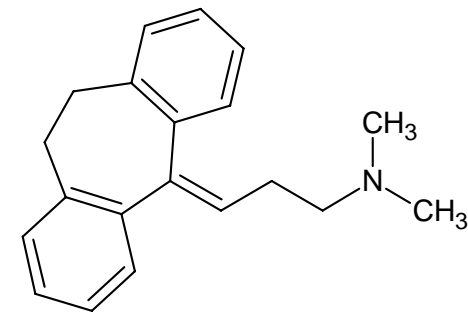
移動相の異なる条件でのアミトリプチリンのピーク比較



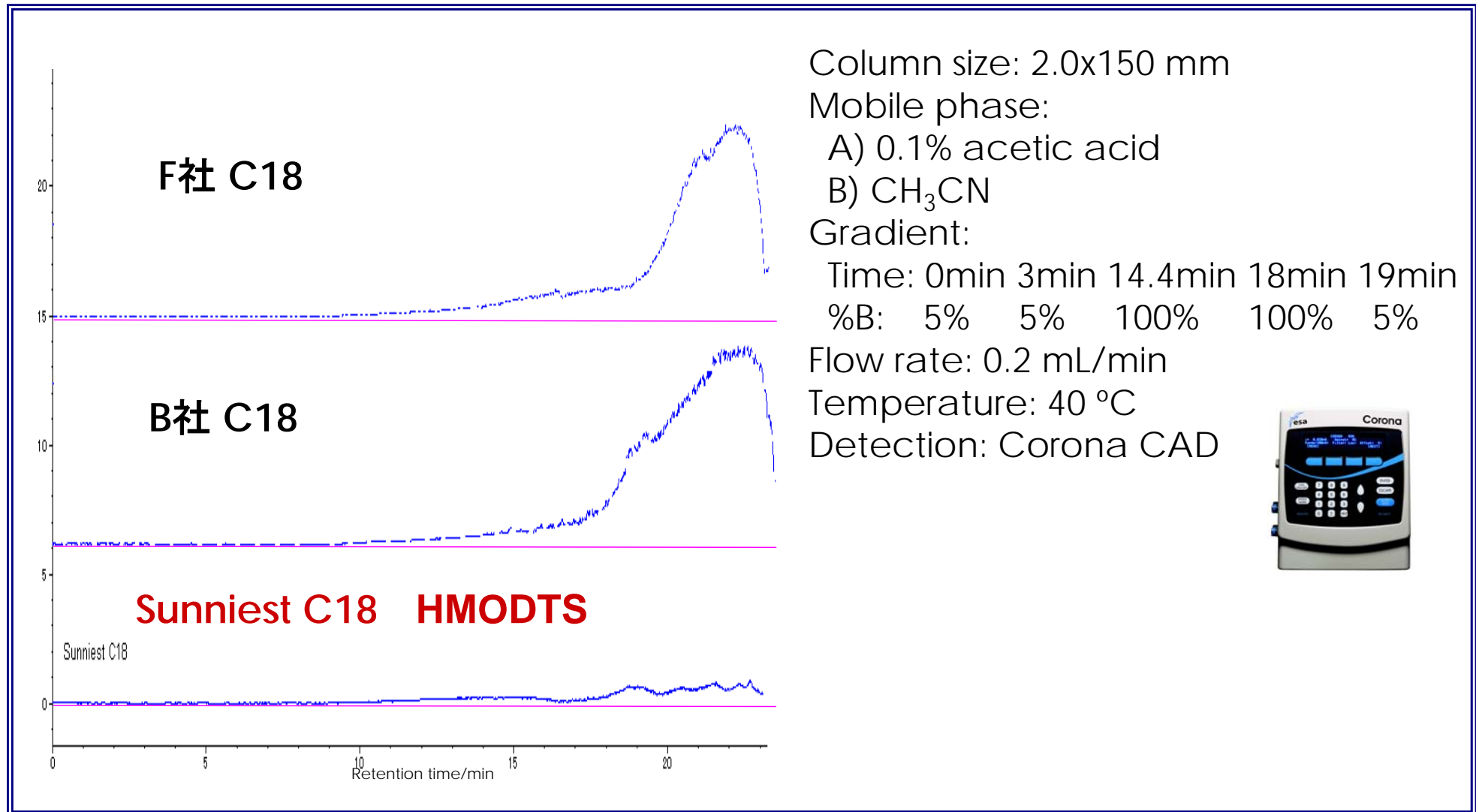
他社との比較



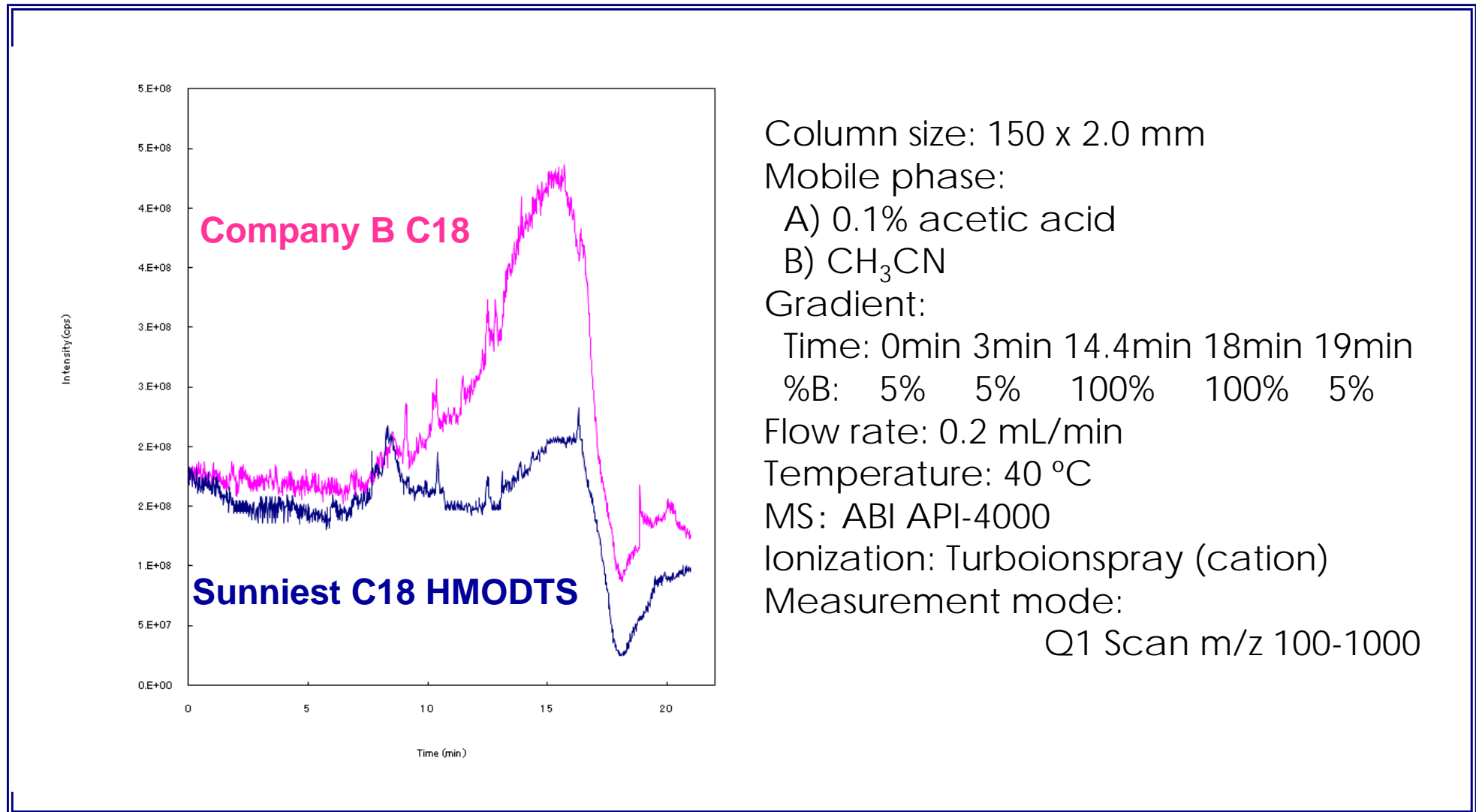
Column size: 4.6x150 mm
 Particle size: 5 μ m
 Mobile phase: CH₃CN/10mM Ammonium acetate
 pH6.8=40/60
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample: Amitriptyline



カラムからの溶出物の比較（ブリード現象）

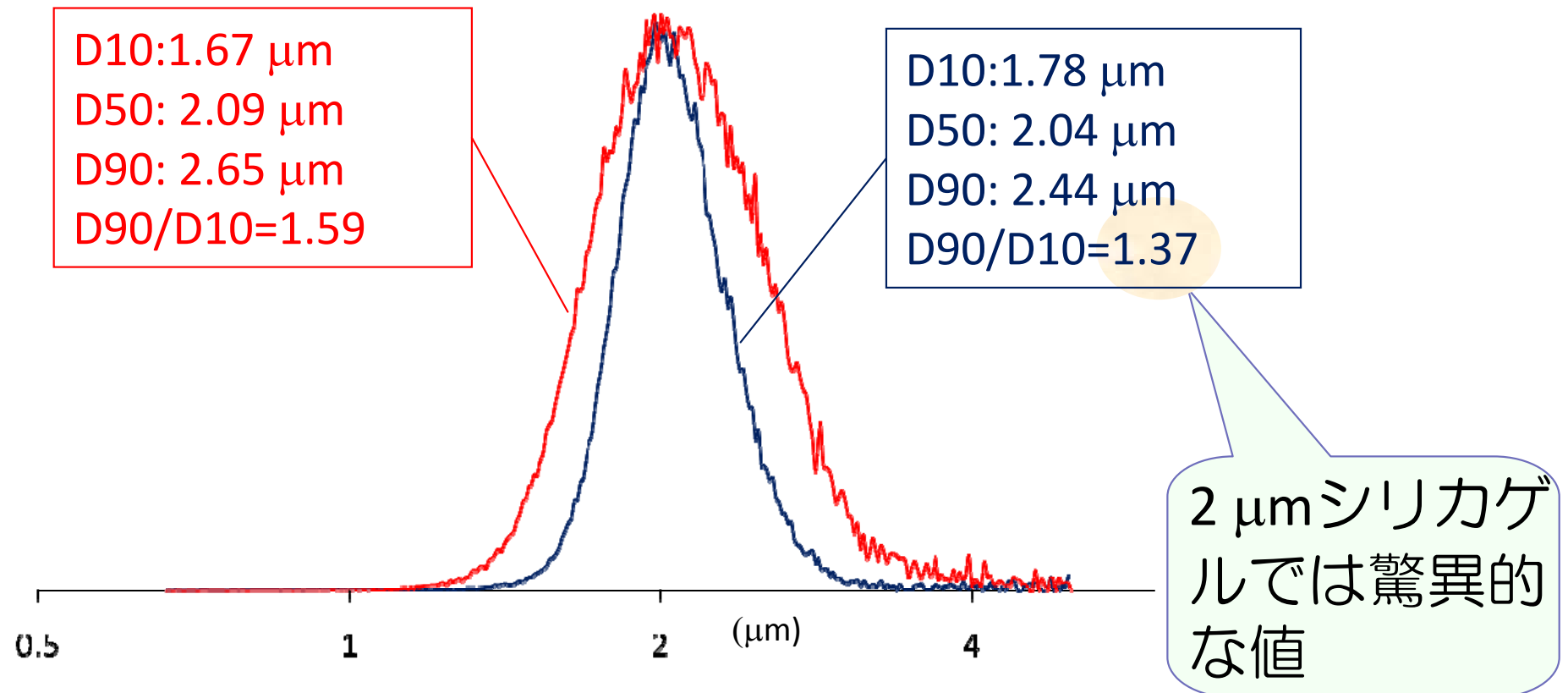


MSを用いたブリードの比較

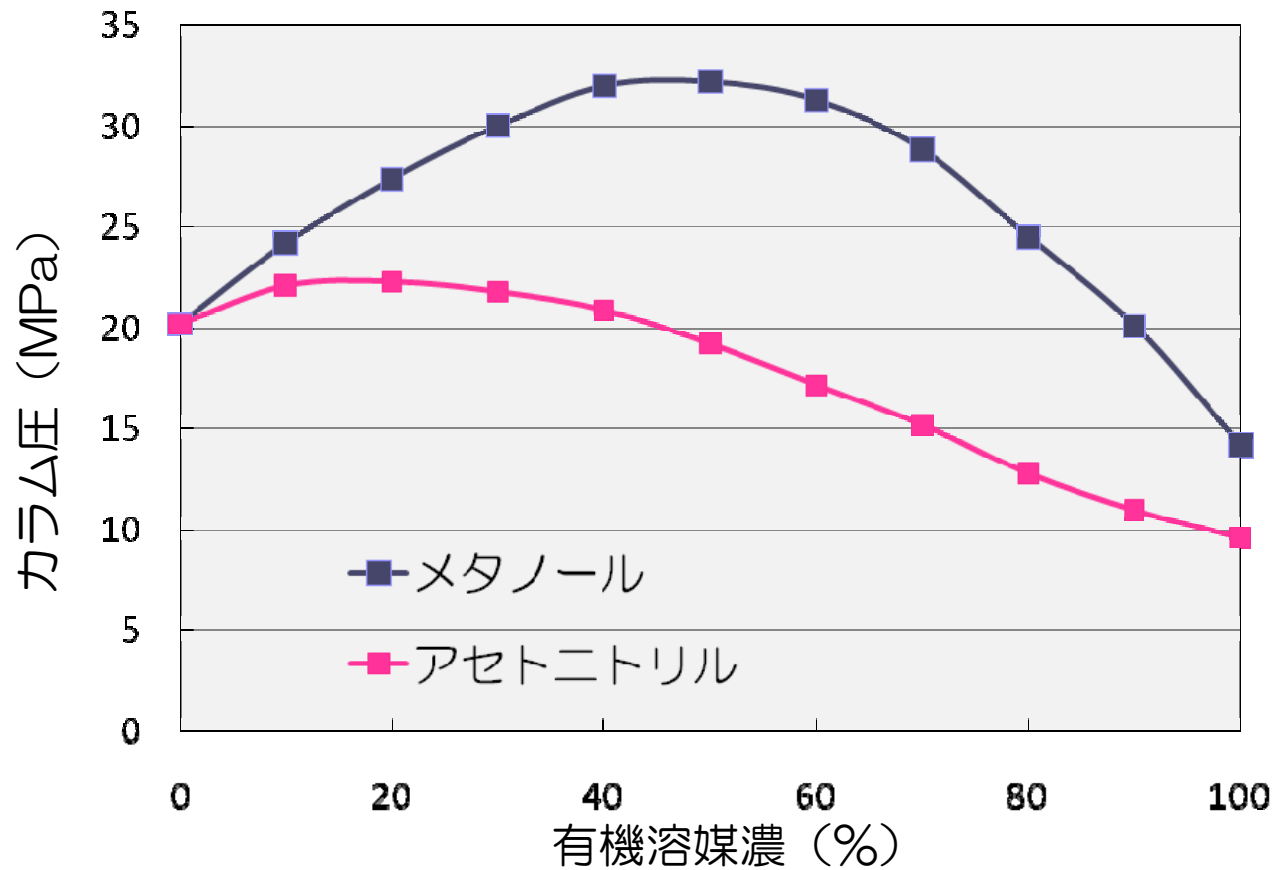


2 μ m粒子 精密分級による狭い粒度分布

コールターカウンター方式による粒度分布



有機溶媒と水移動相を用いたカラム圧



Column: Sunniest C18, 2 μ m (Prototype) 50 x 2.0 mm

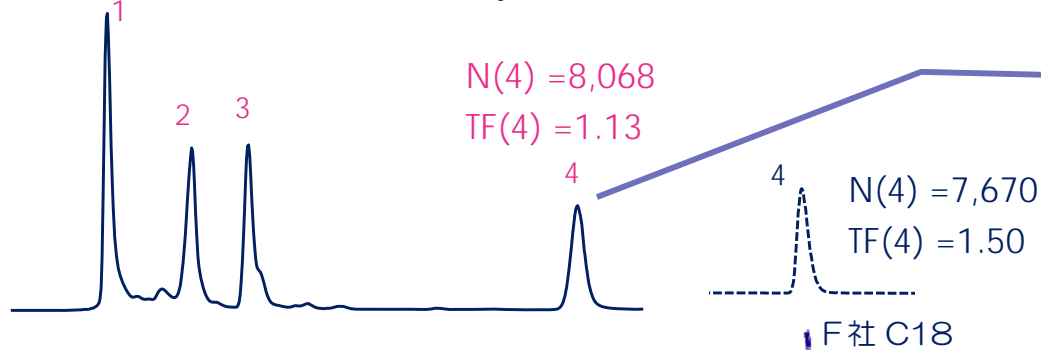
Mobile phase: CH₃OH/H₂O, CH₃CN/H₂O

Flow rate: 0.5 mL/min

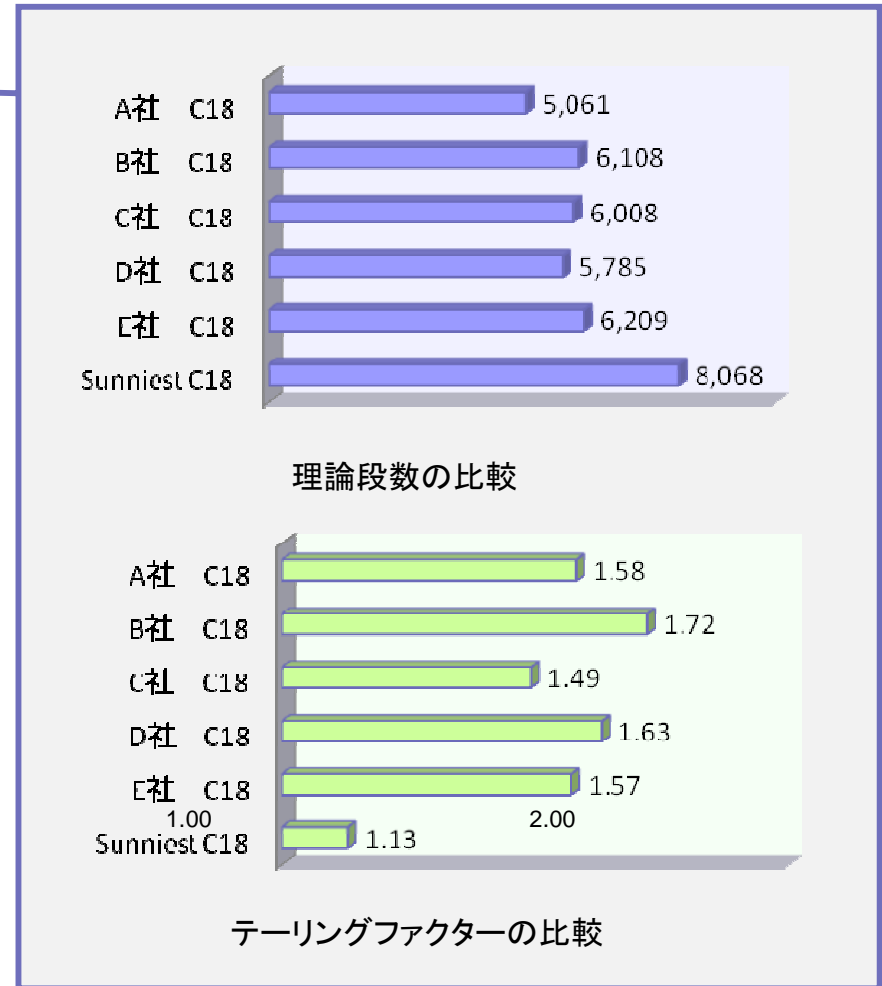
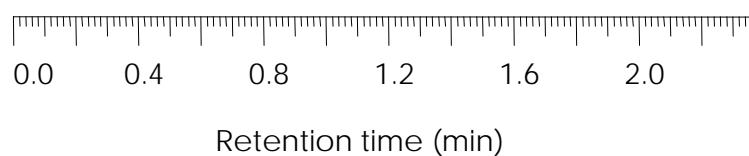
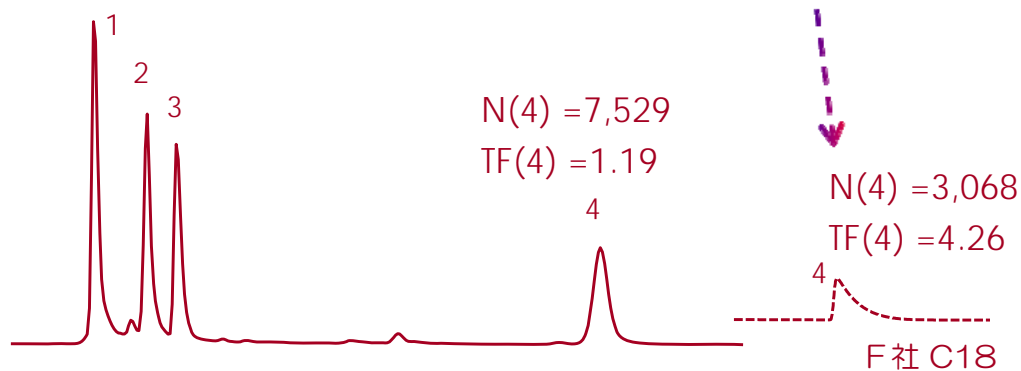
Temperature: 40 °C

2 μm充填剤も同様な表面処理

A メタノール/20mMリン酸緩衝液 pH7.5 =(80:20)



B アセトニトリル/20mMリン酸緩衝液 pH7.0 =(60:40)



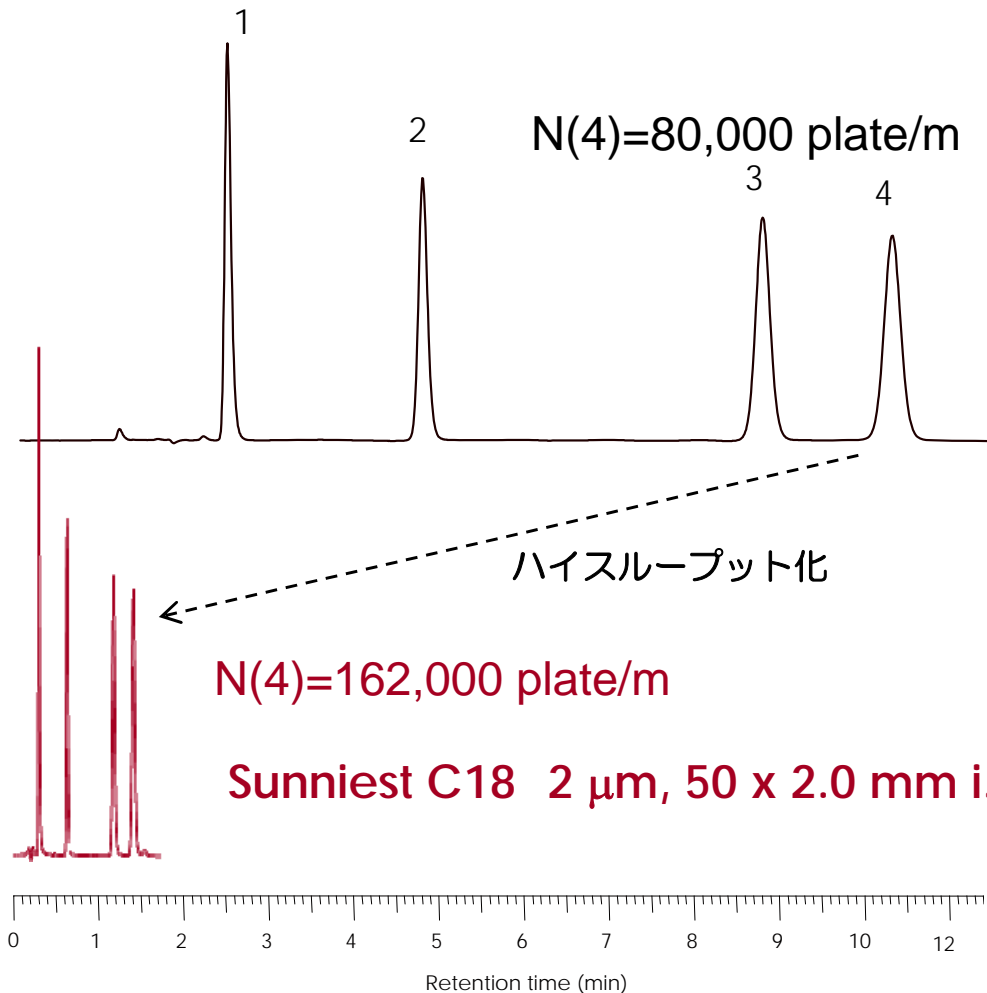
Column: Sunniest C18 HMODTS, 2 μm 2.0 x 50 mm, Temperature: 40 °C

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

ハイスループット化

解熱鎮痛剤の分離 Analgesics

Sunniest C18 5 μm, 150 x 4.6 mm i.d.



Mobile phase:

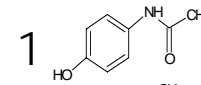
CH₃CN/0.1% Formic acid = 20/80

Flow rate: 1.0 mL/min for 150 x 4.6 mm i.d.,

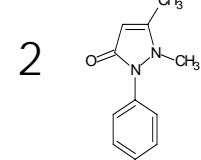
0.6 mL/min for 50 x 2.0 mm i.d.

Temperature: 40 °C

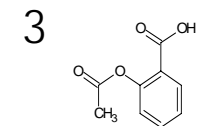
Detection: UV@230 nm



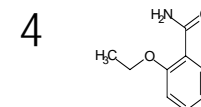
Acetaminophen



Antipyrine



Aspirin



Ethenzamide

【まとめ】 Sunniest C18, RP-AUQA

- 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
- 移動相中の有機溶媒や緩衝液などの制限を受けることなく, 塩基性化合物のテーリグを少なくできる
- 2 μ m粒子を用いることにより高速分析が達成された