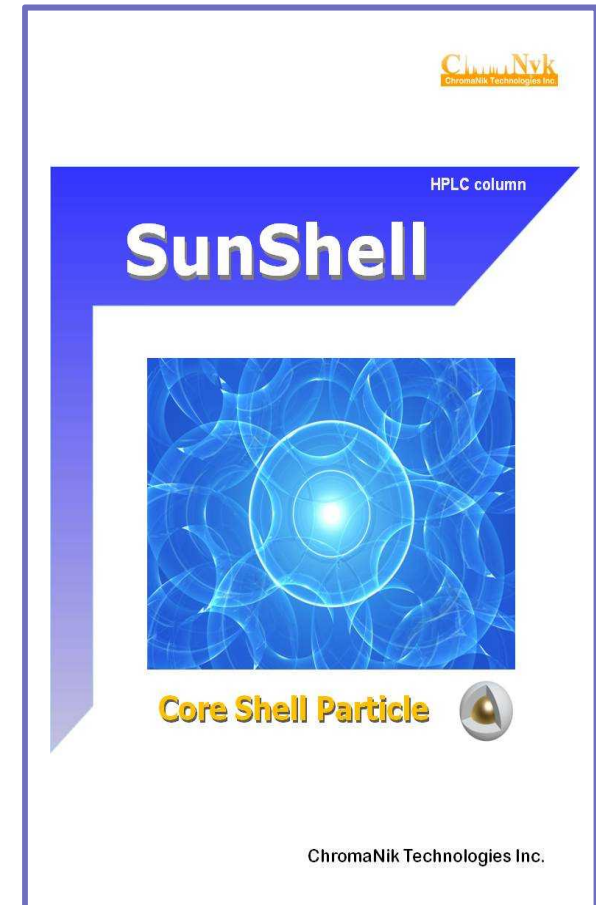


ハイブリッド型に並ぶ耐アルカリ性: Sunniest / SunShell C18の紹介

クロマニック テクノロジーズ

○長江 徳和

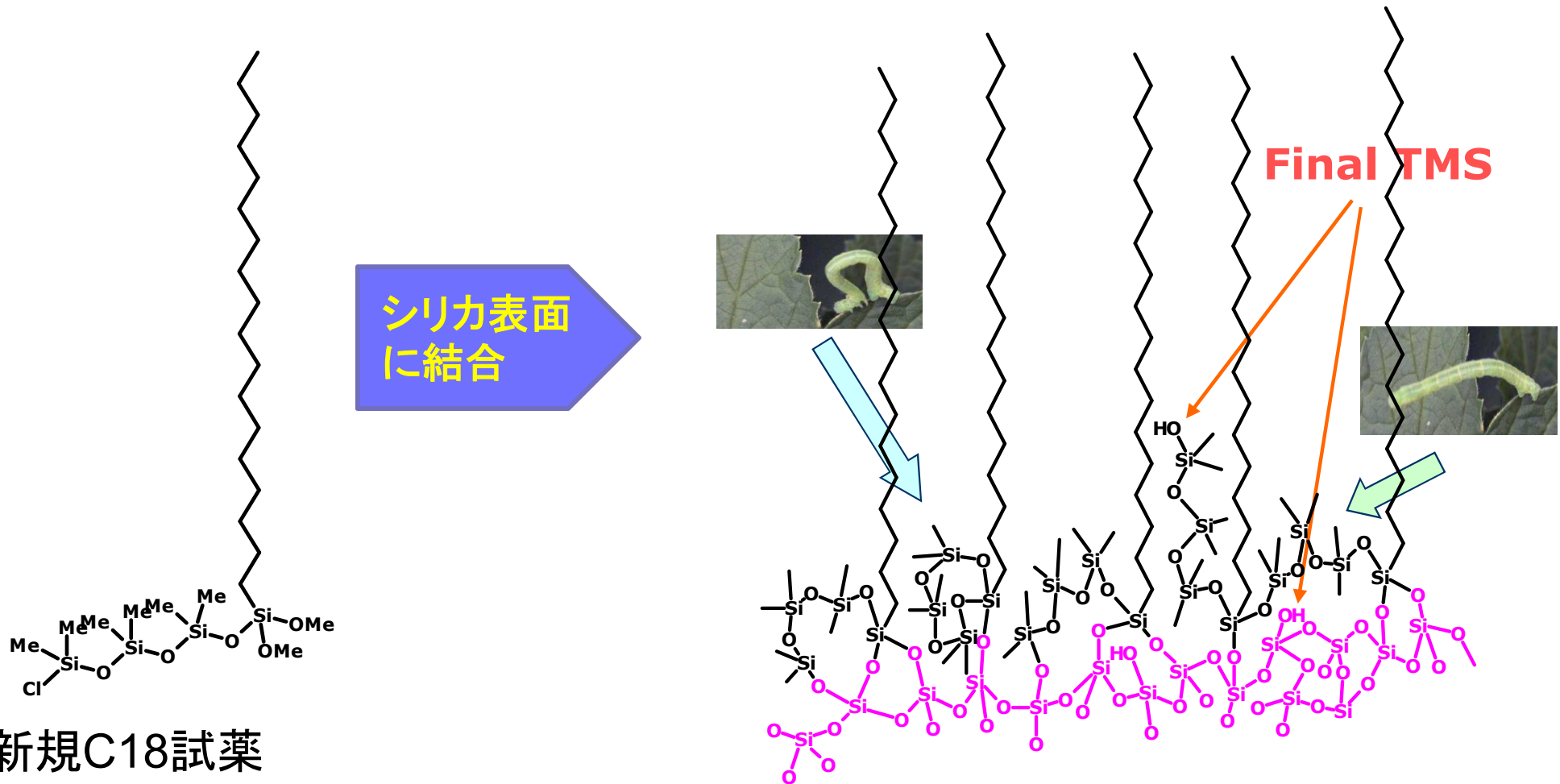
Norikazu Nagae
Email:
info@chromanik.co.jp
<http://chromanik.co.jp>



【緒言】

- 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 μm および2 μm の全多孔性シリカおよび2.6 μm 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。
- アルカリ性条件での耐久性をハイブリッド型C18と比較した。

Sunniest C18 およびSunShell C18固定相の 推定されるシリカ表面での結合状態



新規C18試薬
ヘキサメチルオクタデシルテトラシラン
(HMODTS)

HMODTS結合に用いたシリカ基材

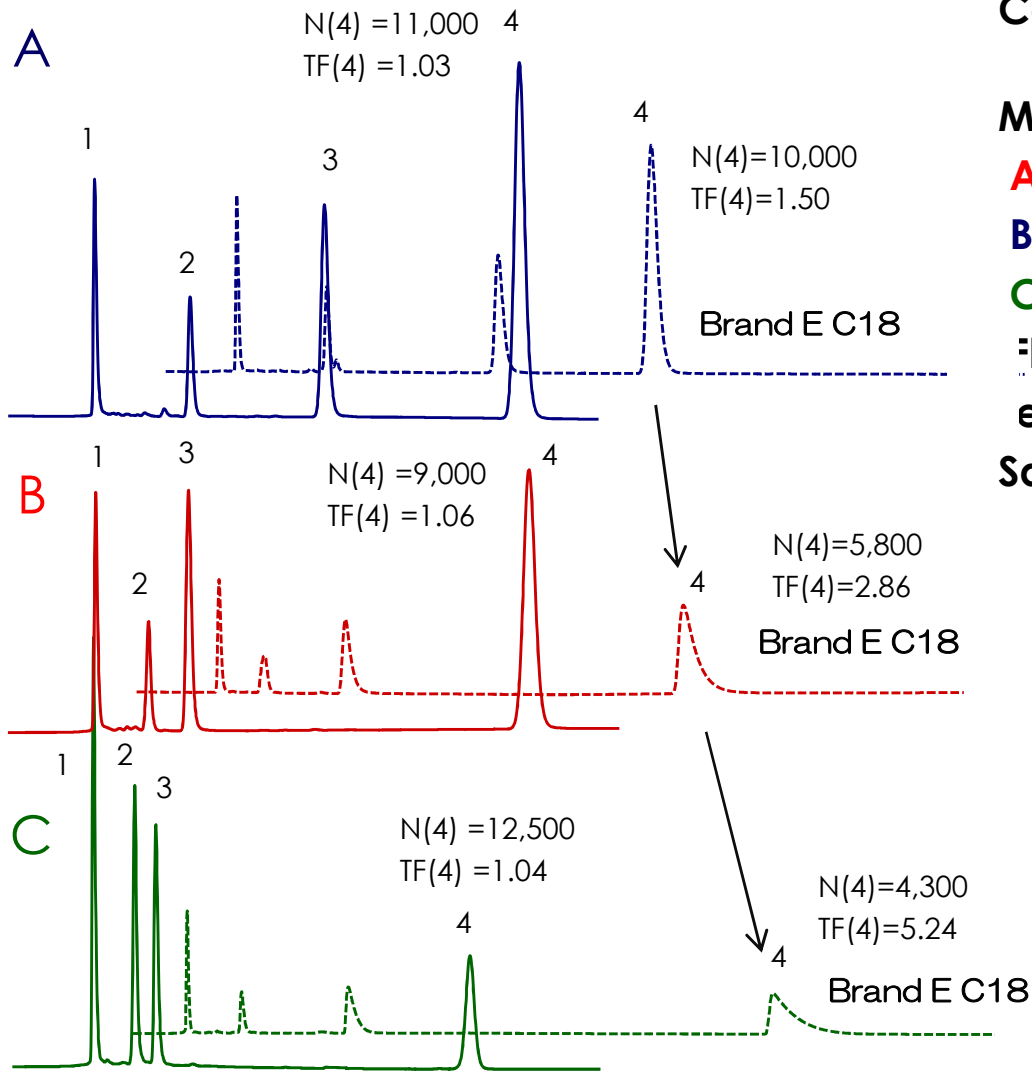
全多孔性シリカ (Sunniest C18)

- 1) 細孔径: 12nm, 比表面積: 340 m²/g, 粒子径: 5 μm
- 2) 細孔径: 10nm, 比表面積: 340 m²/g, 粒子径: 2 μm
- 3) 炭素含有量: 16%

コアシェル型シリカ (SunShell C18)

- 1) 細孔径: 9nm, 比表面積: 150 m²/g, 粒子径: 2.6 μm
- 2) 炭素含有量: 7%

アミトリプチリンのピーク比較 I



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

Mobile phase:

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

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

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

Flow rate: 1.0 mL/min

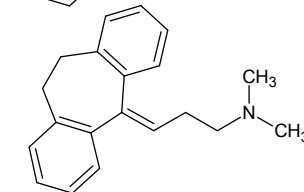
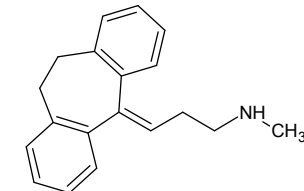
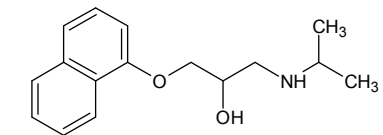
Temperature: 40 °C for **A**, **C** and **D**, 22 °C for **B**

Sample: 1 = Uracil,

2 = Propranolol,

3 = Nortriptyline,

4 = Amitriptyline,



TF: USP tailing factor

通常のC18 : C移動相でアミトリプチリン(4)はひどくテーリング

アミトリプチリンのピーク比較 II - A

アセトニトリル CH₃CN, pH7.0, 40 °C

Column size: 150 x 4.6 mm for A, D and E
100 x 2.1 mm for B and C

Mobile phase:
CH₃CN/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

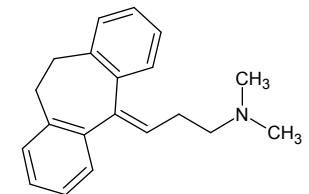
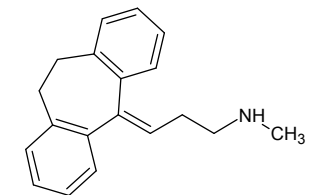
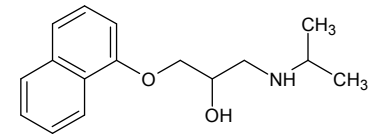
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Propranolol

3 = Nortriptyline

4 = Amitriptyline



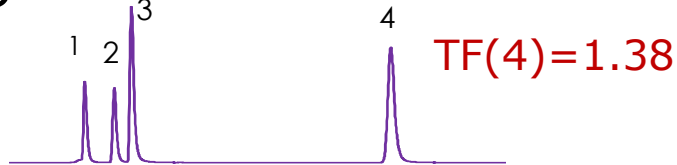
A Sunniest C18 (HMODTS), 5 μm



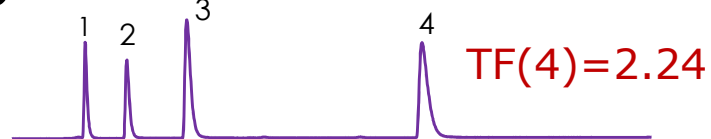
B Sunniest C18-HT(HMODTS), 2 μm



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



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

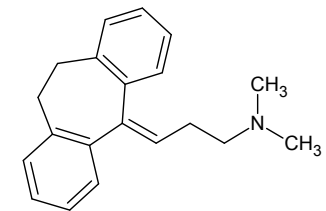
Mobile phase:

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

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

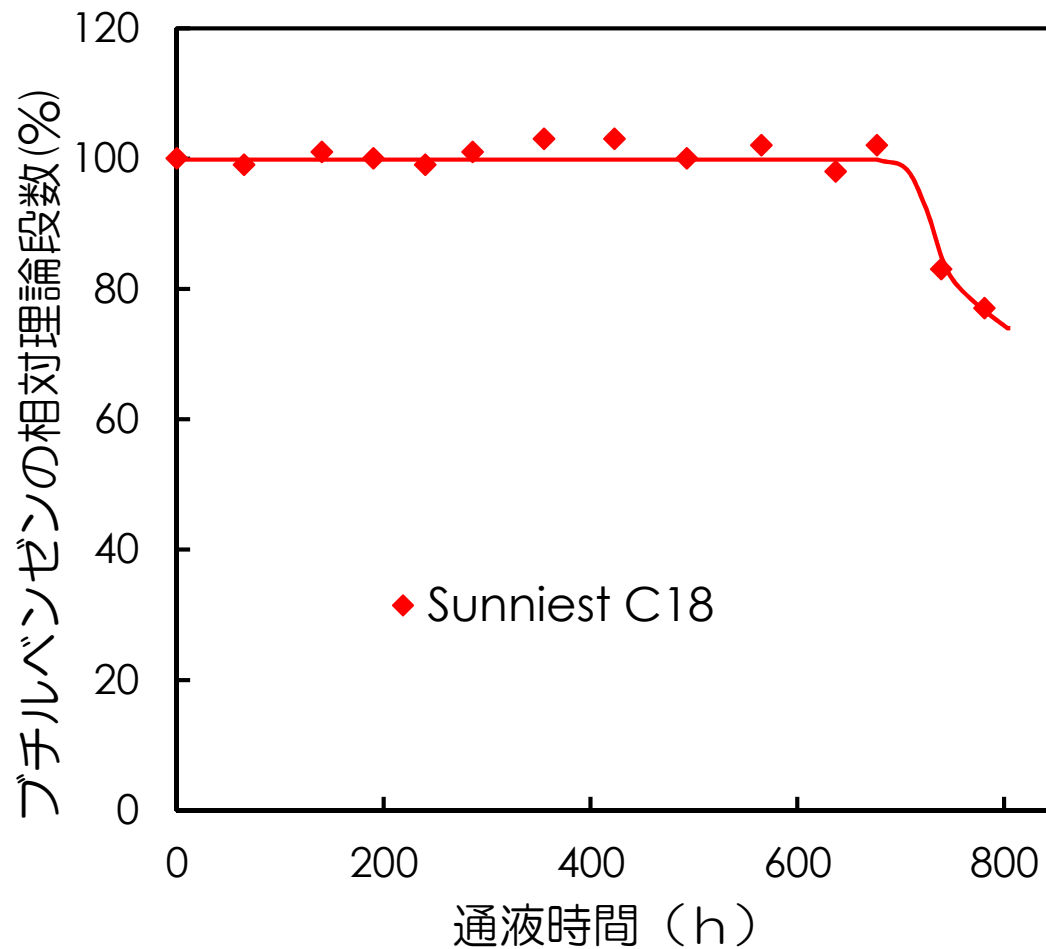
Sample: Amitriptyline



耐久性の評価

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

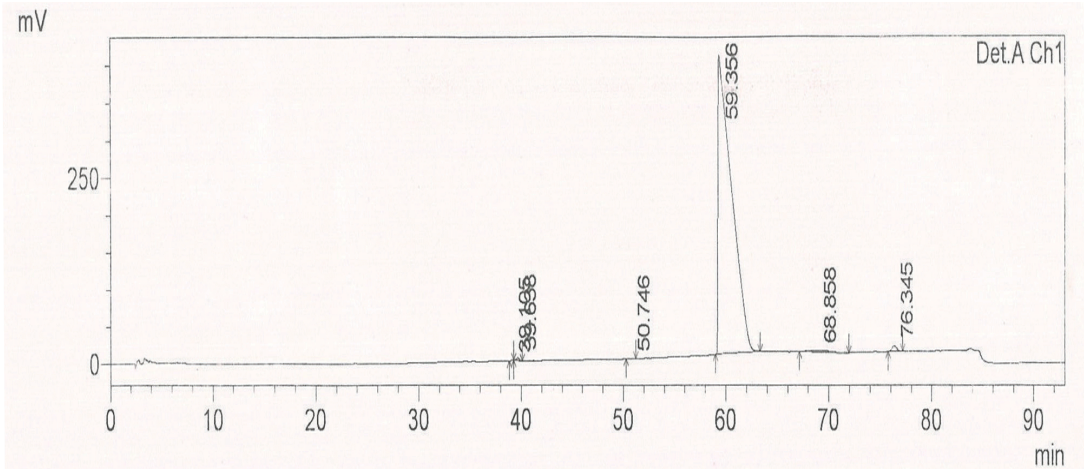
Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 μ m
 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃OH/20mM Sodium borate /10mM NaOH=30/21/49 (pH10)
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 50 °C

理論段数測定条件

Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 μ m
 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=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



<Peak table>

Detector A Ch1 210nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	39.10	4872	307	0.01
2	39.64	78939	3790	0.21
3	50.75	18790	658	0.05
4	59.36	36862590	402103	98.17
5	68.86	340280	2395	0.91
6	76.35	242975	7705	0.65
Total		37548447	416958	100.00

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

Azithromycin

Related Substances test

- Indian Pharmacopeia Column Recommended Waters X-Bridge 250X4.6, 5 um
- Column used **Sunshell Column 100X4.6, 2.6 um**
- M.Phase A: 0.18 % anhydrous Na₂HPO₄ pH 8.9
- M.Phase B :25 volumes MeOH and 75 volumes AcN .
- Gradient table, Flow rate and relevant method details given in slide Number 11
- Temperature **60 Deg C.**
- Sample concentration **8000 ppm**
- Injection volume used **50 ul** for 250X 4.6, 5 um X-Bridge C18 column
- Injection volume used **20 ul** for 100X 4.6, 5 um Sunshell C18 column
- UV 210 nm
- System suitability requirements: RRT between **Azithromycin** Principal peak and **3-deoxyazithromycin** shall be about **1.33**

Azithromycin Related Substances Test

Reference Indian Pharmacopeia 2010 pg 857-858

Gradient Method Transfer

Enter your dimensions / particle class in the green boxes below.

Existing Method				New Method			
Parameter	Value	Unit		Parameter	Value	Unit	Adjusted Flow Rate
Column geometry	Particle Size	5	µm	Column geometry	Particle Size	2.6	µm
	Column Length	250	mm		Column Length	100	mm
	Column ID	4.6	mm		Column ID	4.6	mm
Method conditions	Flow Rate	1	ml/min	Method conditions	Flow Rate	1.92	ml/min
	Injection Volume	50	µl		Injection Volume	20	µl
	Pressure	54	bar		Pressure	154	bar

System dead volume	1.2	ml	System dead volume	0.07	ml	0.07	ml
--------------------	-----	----	--------------------	------	----	------	----

Gradient	Use 3 steps	Time	%A	%B	Time	%A	%B	Time	%A	%B
Initial Conditions		0	50	50	0	50	50	0	50	50
Step 2 (Initial hold)		20	45	55	5.3	45	55	4.58	45	55
Step 3		30	40	60	6.34	40	60	6	40	60
Step 4		80	25	75	16.64	25	75	16	25	75
Step 5		90	50	50	19.24	50	50	19.5	50	50

Equilibration time	30	min	Equilibration time	8	min	8	min
--------------------	----	-----	--------------------	---	-----	---	-----

Comparisons

Existing Method New Column Dimensions Adjusted Flow Rate

Existing Method vs. New Column

Analysis Time (2x faster)

Pressure (2x higher)

Existing Method vs. Variable Flow

Analysis Time (2x faster)

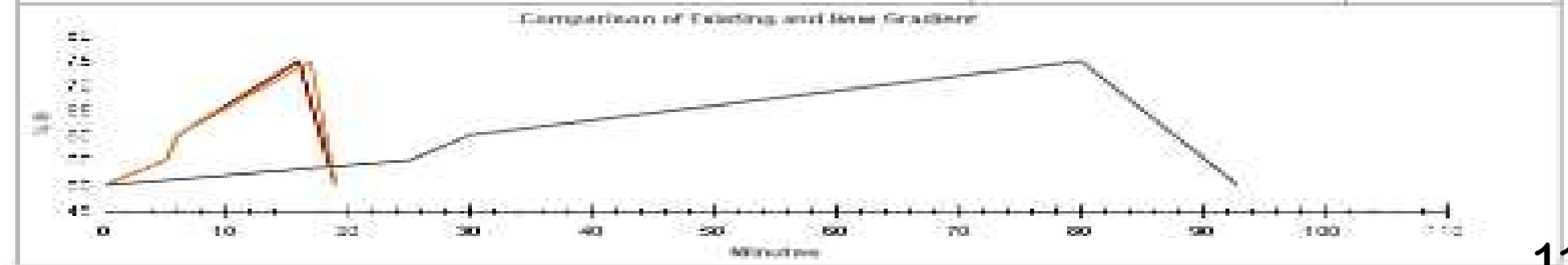
Pressure (2x higher)

Time Saved

73.7 min (New Column Dimensions) vs **74.4 min** (Adjusted Flow Rate)

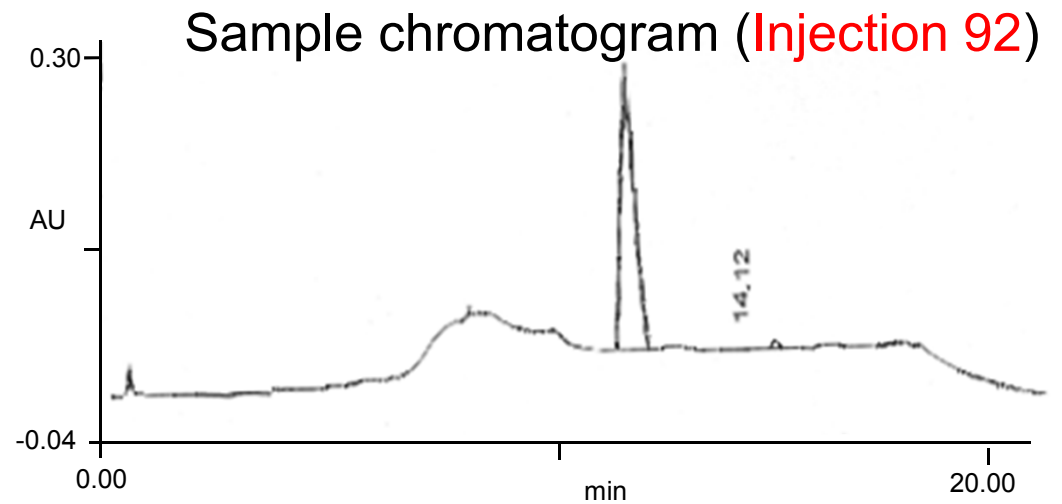
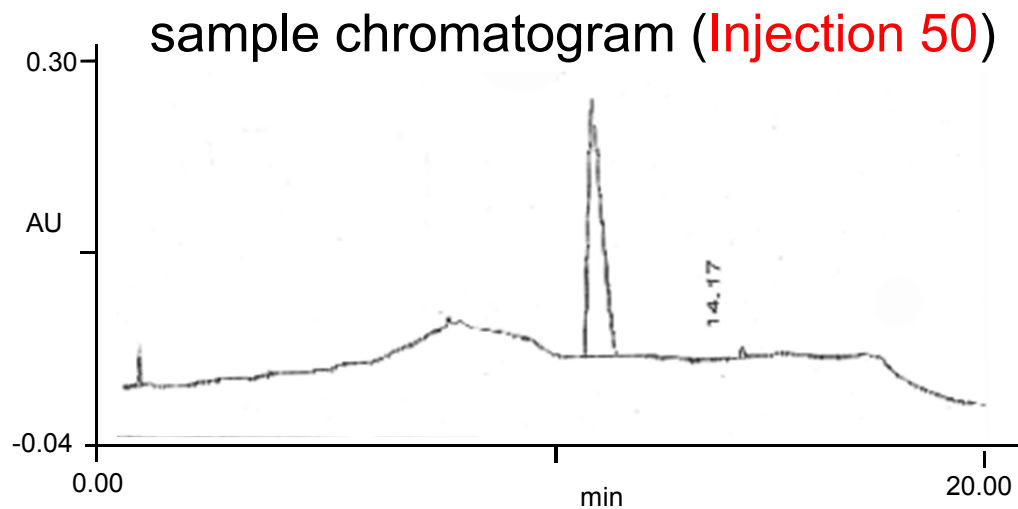
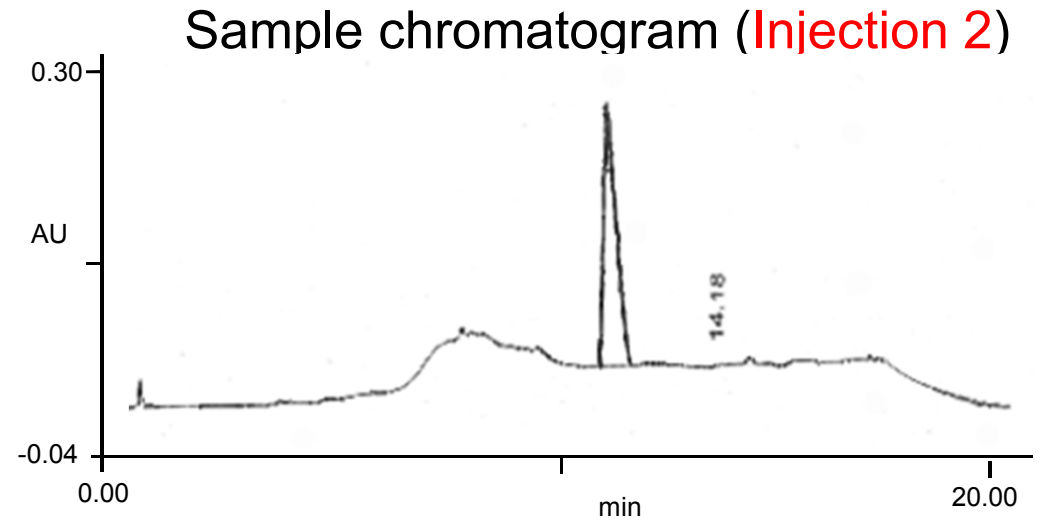
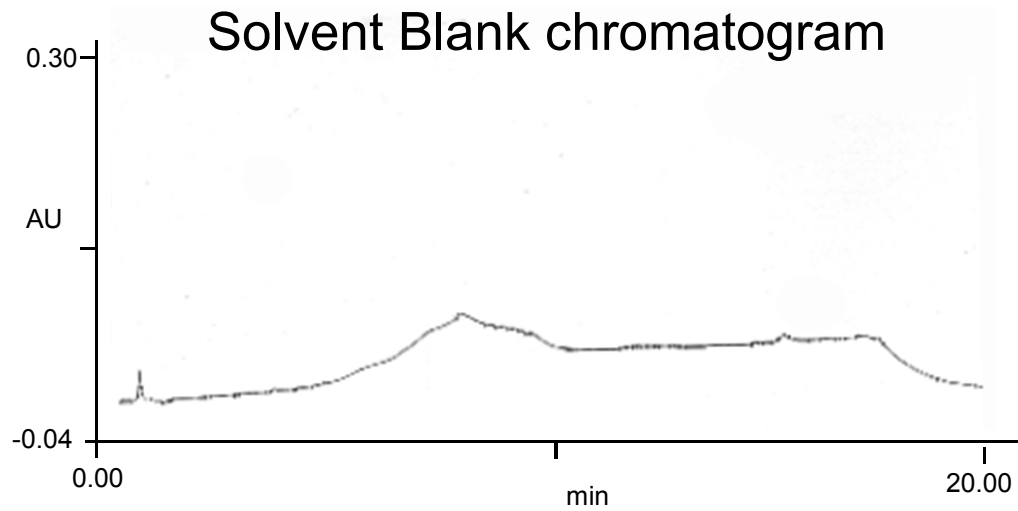
Solvent Saved

55.8 ml (New Column Dimensions)

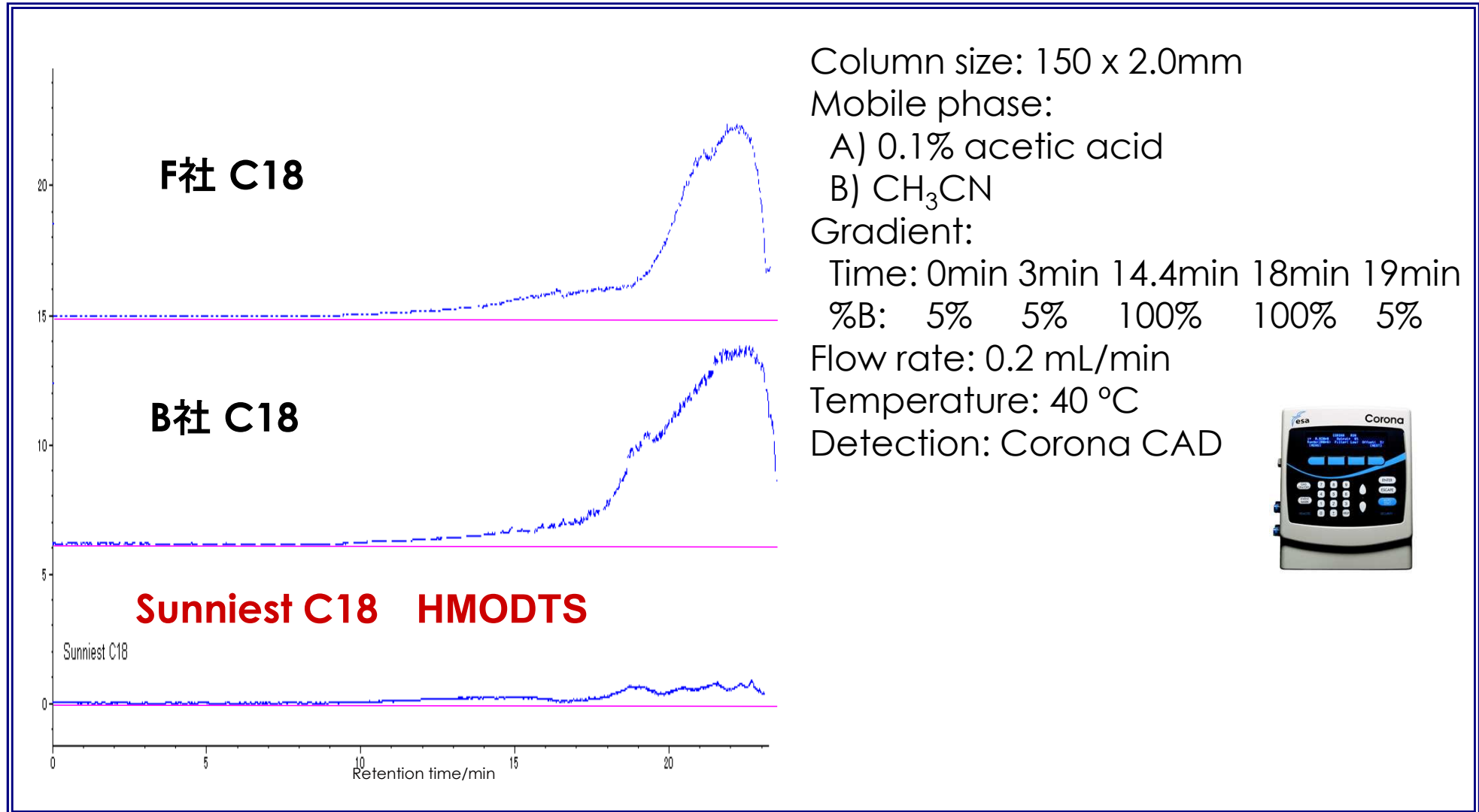


Azithromycin

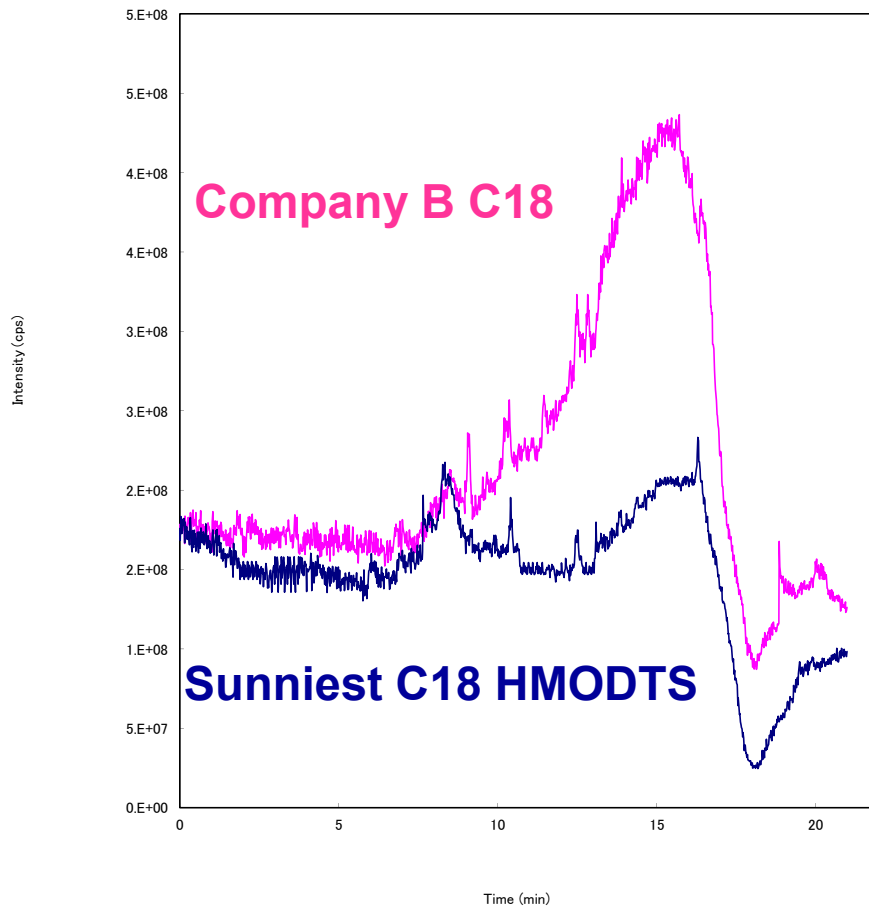
Related Substances test Chromatograms



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) CH₃CN

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

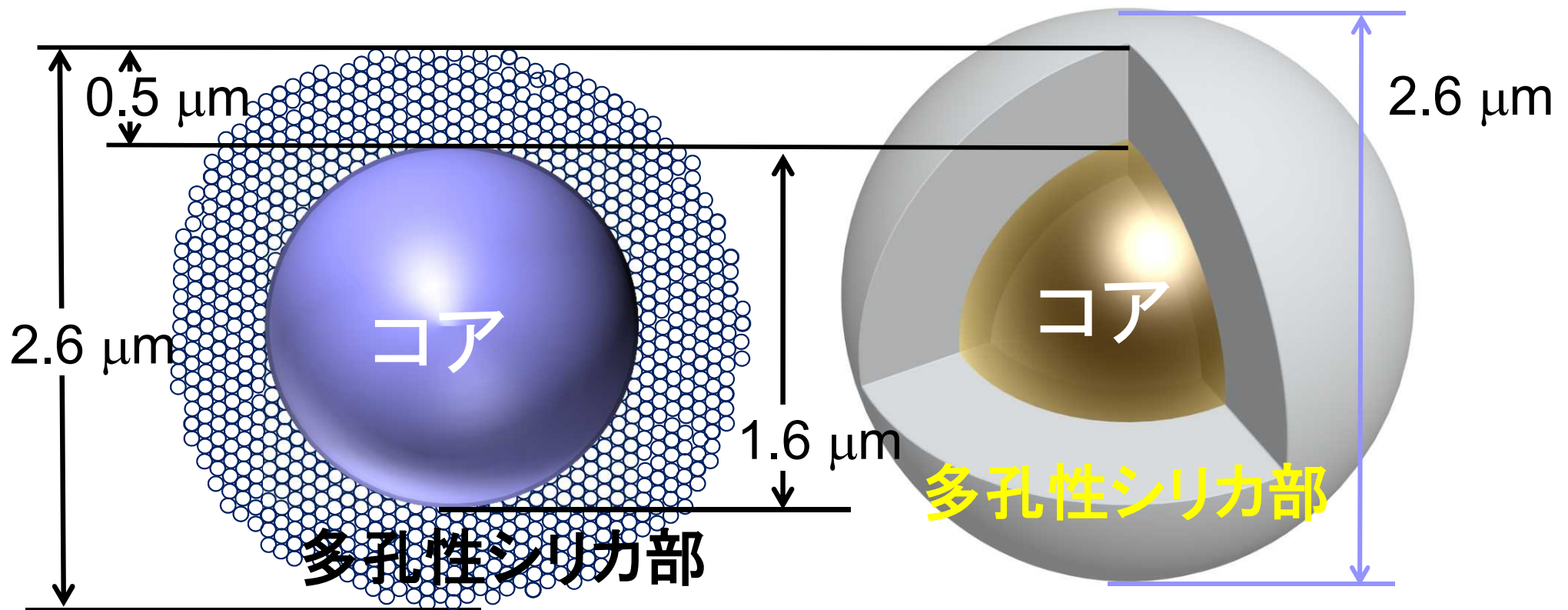
Ionization: Turboionspray (cation)

Measurement mode:

Q1 Scan m/z 100-1000

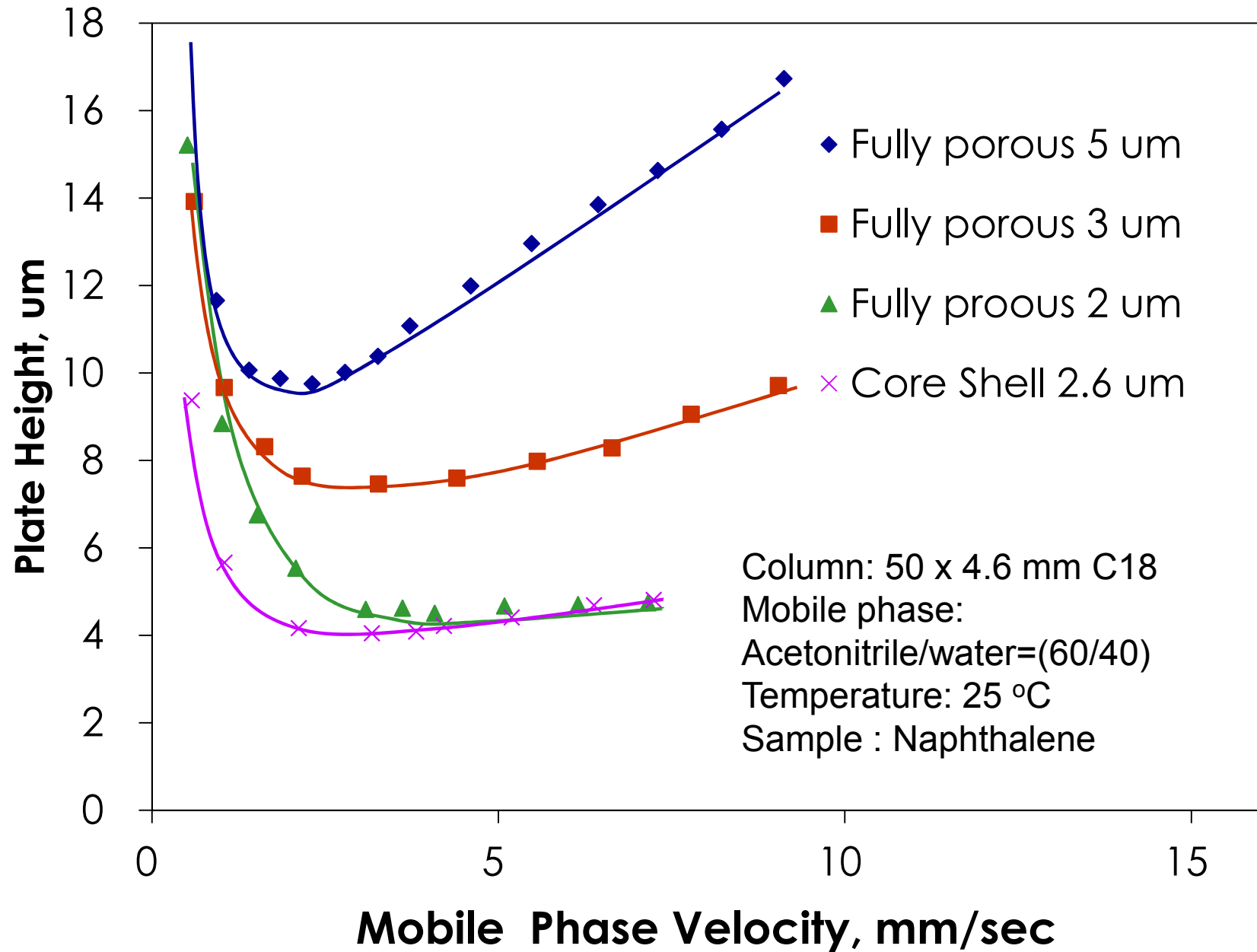
SunShell

コアシェル構造の概略図

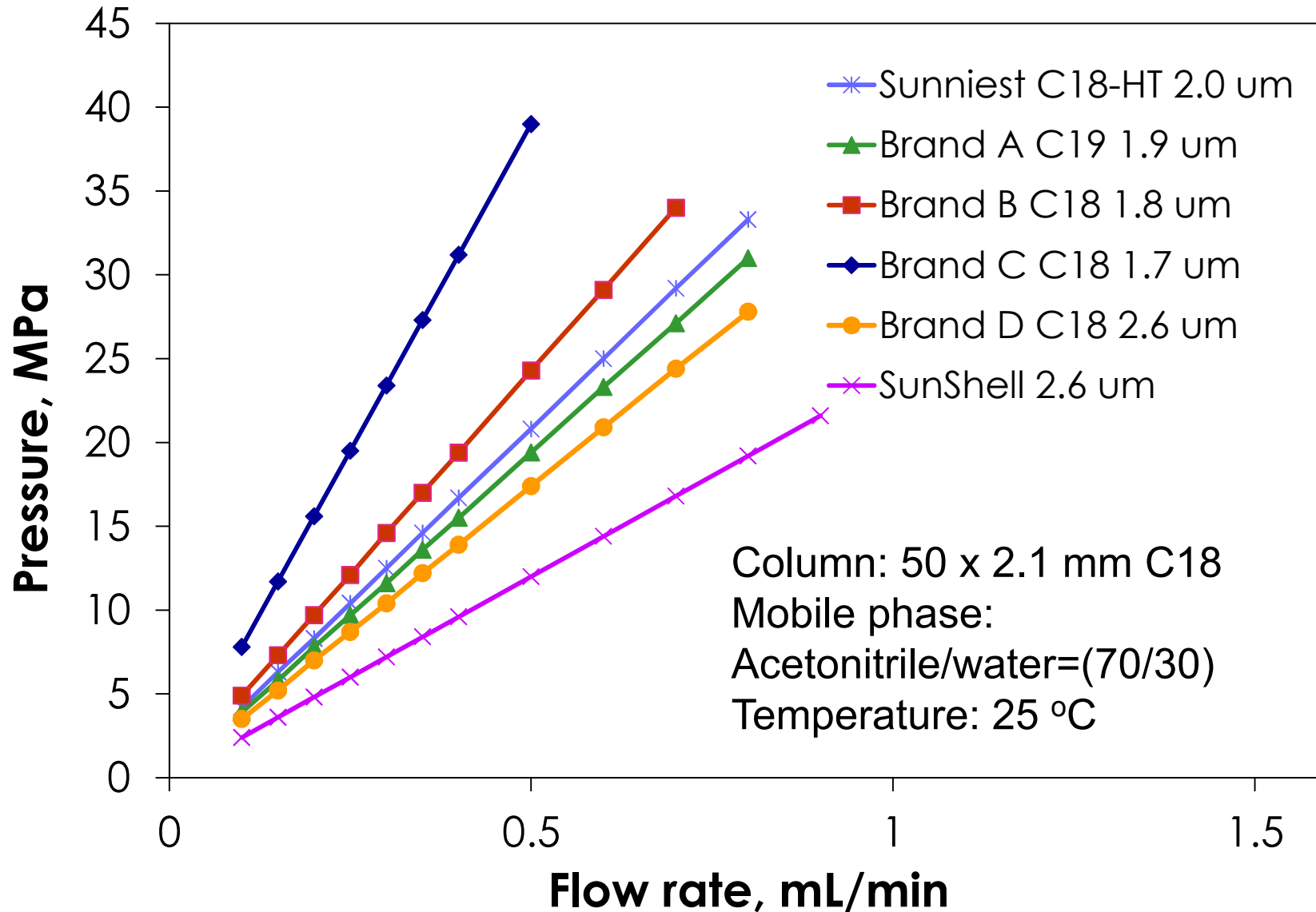


粒子径: $2.6 \mu\text{m}$, コア径: $1.6 \mu\text{m}$, 多孔質層の厚さ: $0.5 \mu\text{m}$
 細孔容積: 0.34 mL/g , 比表面積: $150 \text{ m}^2/\text{g}$, 細孔径: 9 nm
 多孔性シリカの体積の割合: 77%

全多孔性とコアシェル型の理論段高さの比較

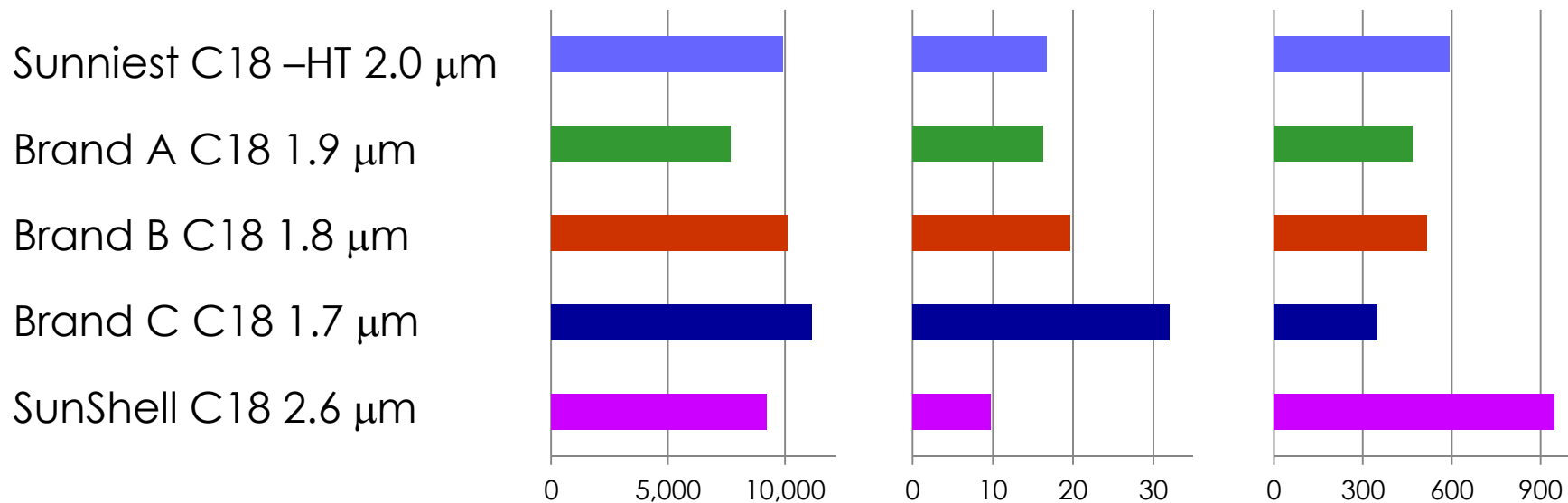


ハイスルーブットSub2 μ mカラムとコアシェル型カラムとの圧力比較



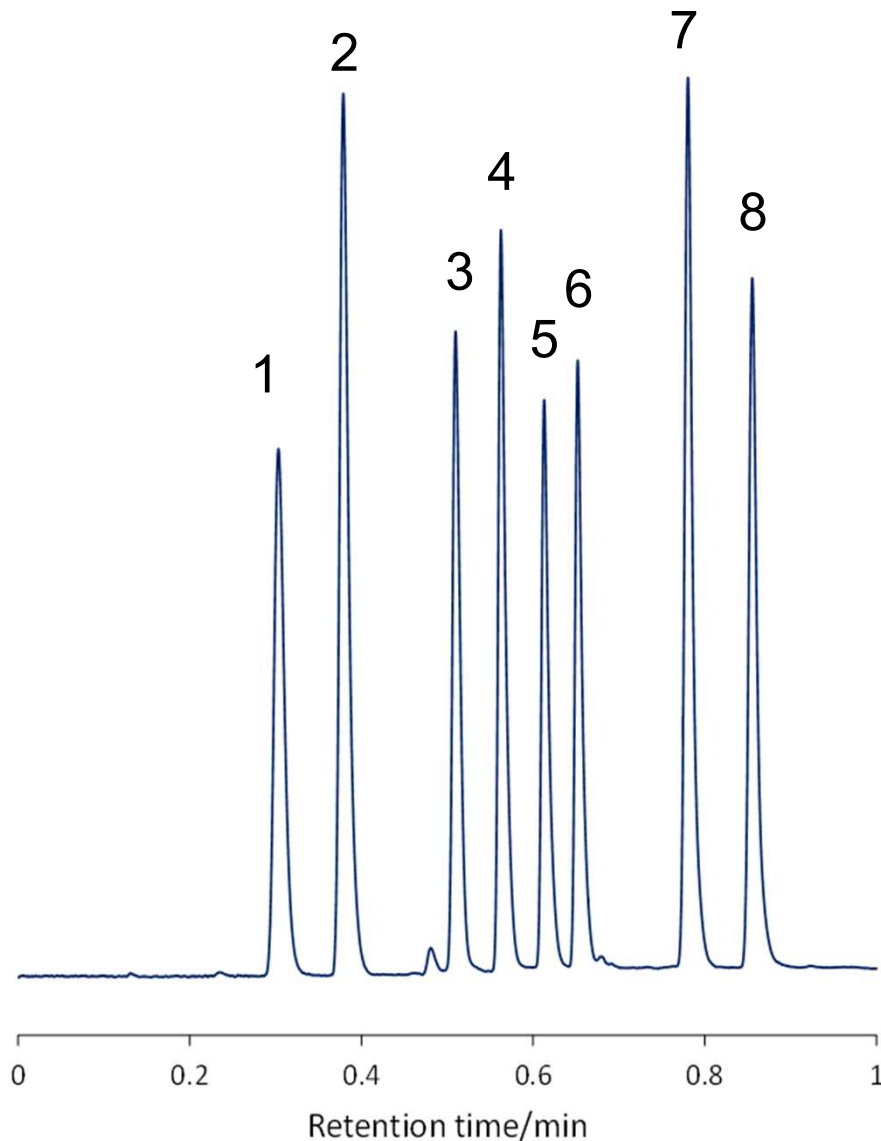
単位圧力あたりの段数比較

	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	9,200	9.7	948



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

高速分離例



Column: SunShell C18 2.6 μm , 30 x 3.0 mm.
 Mobile phase: A) Water, B) Acetonitrile; Gradient (Acetonitrile %), 0.00 min - 35%, 0.40 min - 100%, 0.80 min - 100%, 0.85 min - 35%, 1 cycle; 1.8 min, (High-pressure gradient).

Flow rate: 1.0 mL/min.

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

Injection Volume: 1 μL .

Wavelength: 200 - 500nm, CH-9, 215 - 500nm (Max Abs.).

Sample: Mixture of ultraviolet absorbers,

1 = 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone,

2 = Ethyl *p*-aminobenzoate,

3 = 2, 4-Dihydroxybenzophenone,

4 = 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone,

5 = 2,2'-Dihydroxy-4,4'-

dimethoxybenzophenone,

6 = 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone,

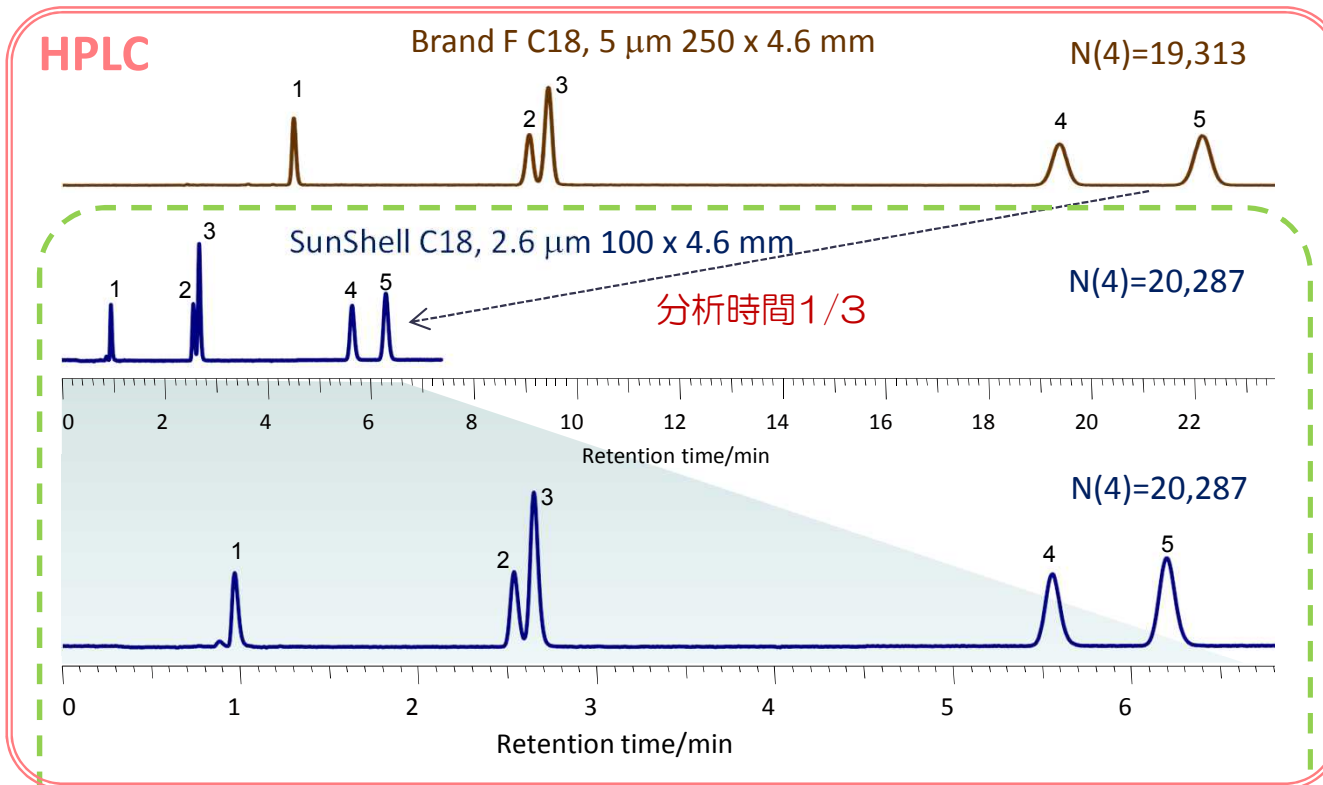
7 = 2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole,

8 = 4-tert-Butylphenyl salicylate.

Courtesy of Jasco.

イソクラチック溶離例

5 μ m C18からの移行



Column:

Brand F C18, 5 μ m 250 x 4.6 mm
SunShell C18, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm

Mobile phase:

CH₃CN/20mM Phosphoric acid = 45/55

Flow rate: 1.0 mL/min,

1.8 mL/min at the lowest chromatogram

Temperature: 25 °C

Pressure: 9.5 MPa for Brand F C18 5 μ m

13.4 MPa for SunShell C18 2.6 μ m

Detection: UV@230 nm

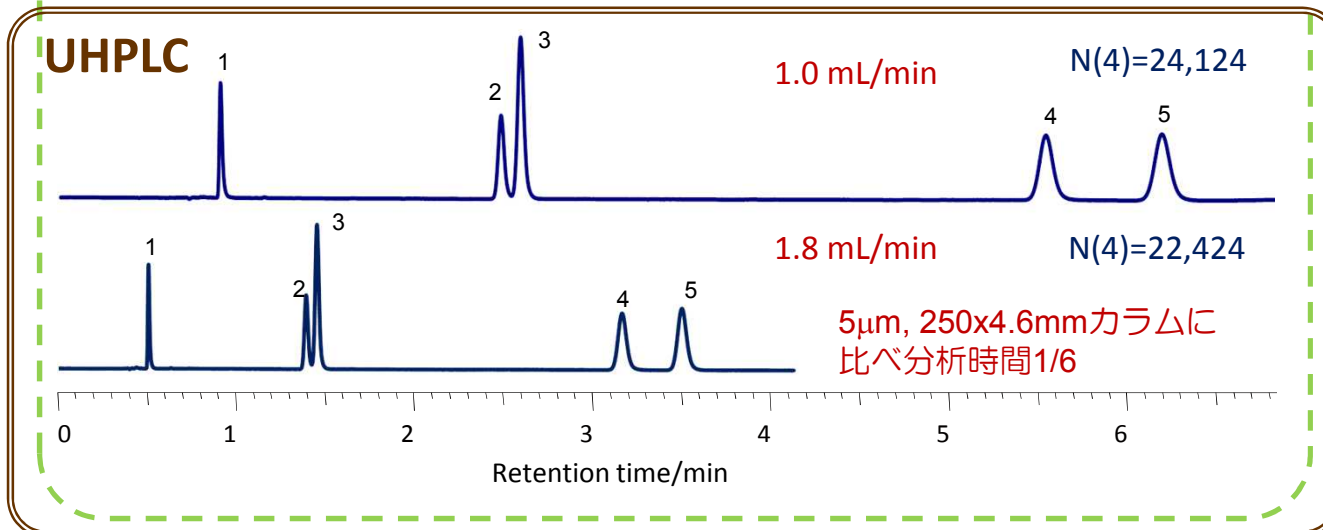
Sample: 1 = Benzydamine

2 = Ketoprofen

3 = Naproxen

4 = Indomethacin

5 = Ibuprofen



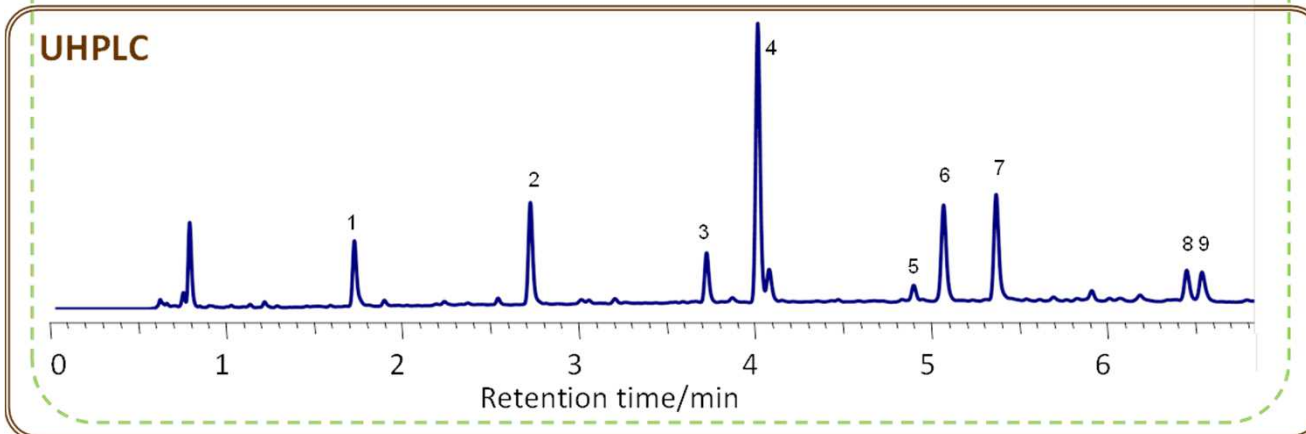
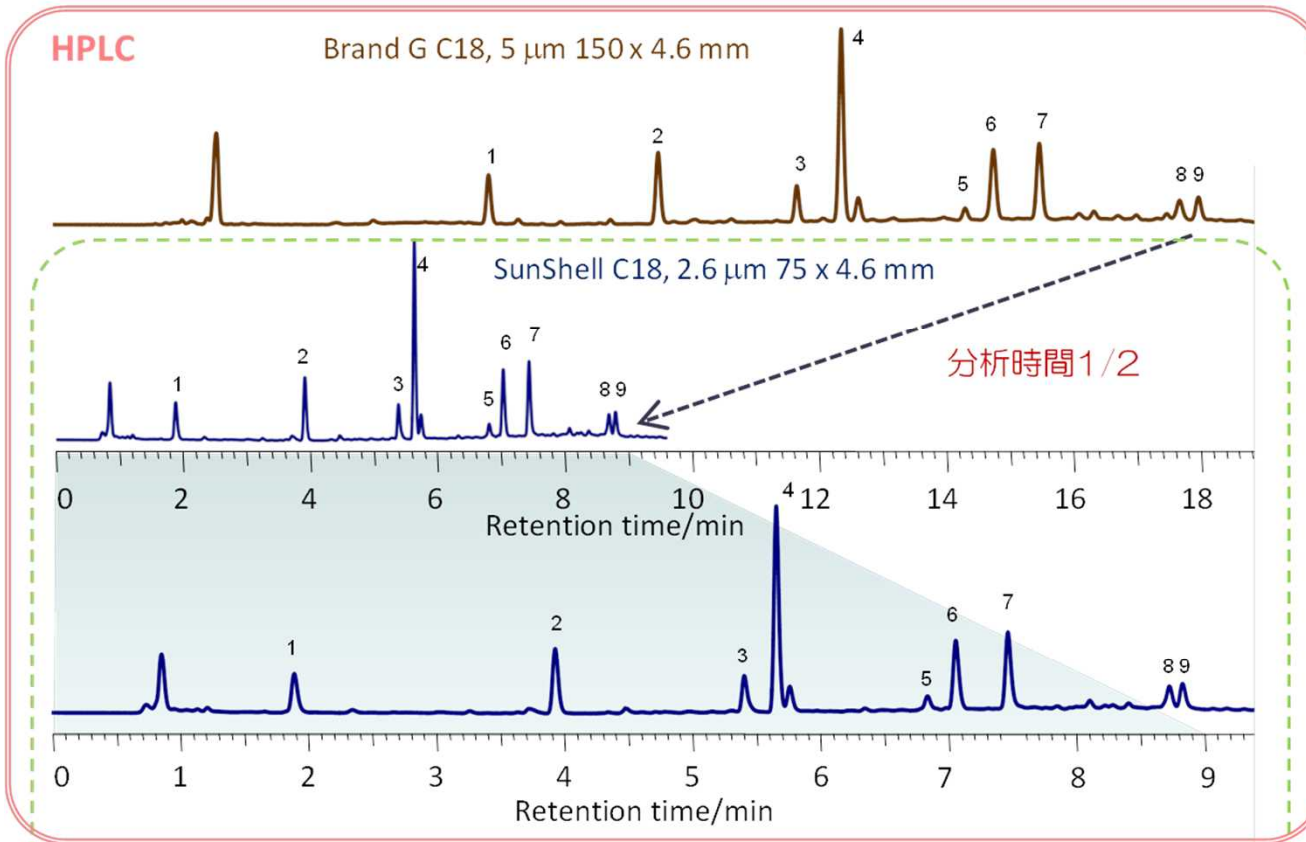
HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(内径0.25mmの配管仕様)

UHPLC: Jasco X-LC

グラジエント溶離例

5 μ m C18からの移行



Column:

Brand G C18, 5 μ m 150 x 4.6 mm
SunShell C18, 2.6 μ m 75 x 4.6 mm

Mobile phase:

A) 0.1% Phosphoric acid
B) CH₃CN

Gradient program for Brand G C18

Time	0 min	15 min	20 min
%B	2%	25%	25%

for SunShell C18

Time	0 min	7.5 min	10 min
%B	2%	25%	25%

Flow rate: 1.0 mL/min,

Temperature: 25 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: Oolong tea

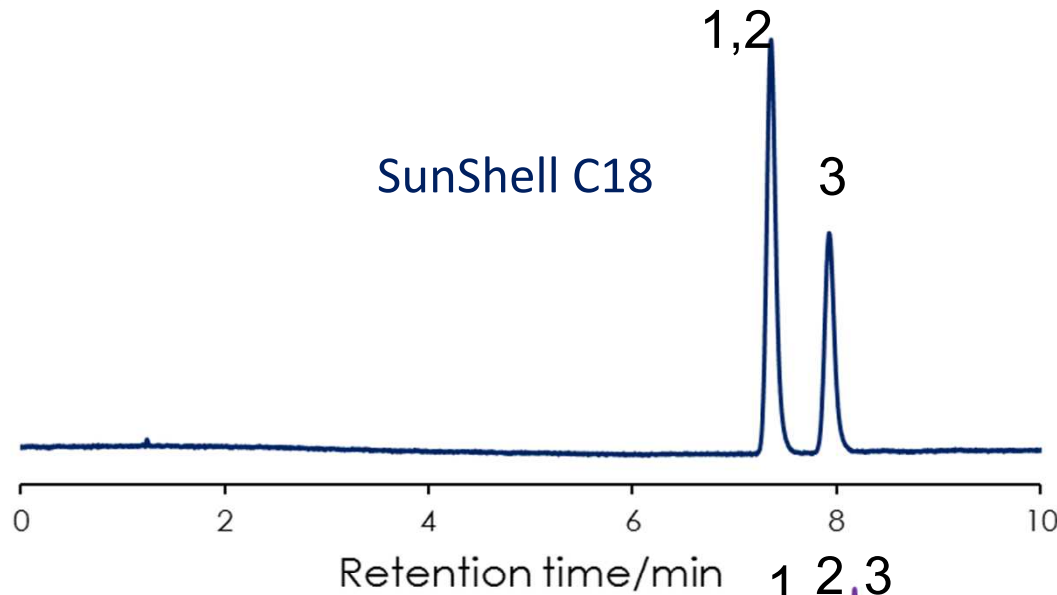
1 = Gallic acid, 2 = Epigallocatechin, 3 = Catechin, 4 = Caffeine, 5 = Epicatechin, 6 = Epigallocatechin gallate, 7 = Gallic acid gallate, 8 = Epicatechin gallate, 9 = Catechin gallate

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(内径0.25mmの配管仕様)

UHPLC: Jasco X-LC

クレゾールの異性体の分離



Column:

SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm

SunShell PFP, 2.7 μm 150 x 4.6 mm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=40/60$

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 25 $^\circ\text{C}$

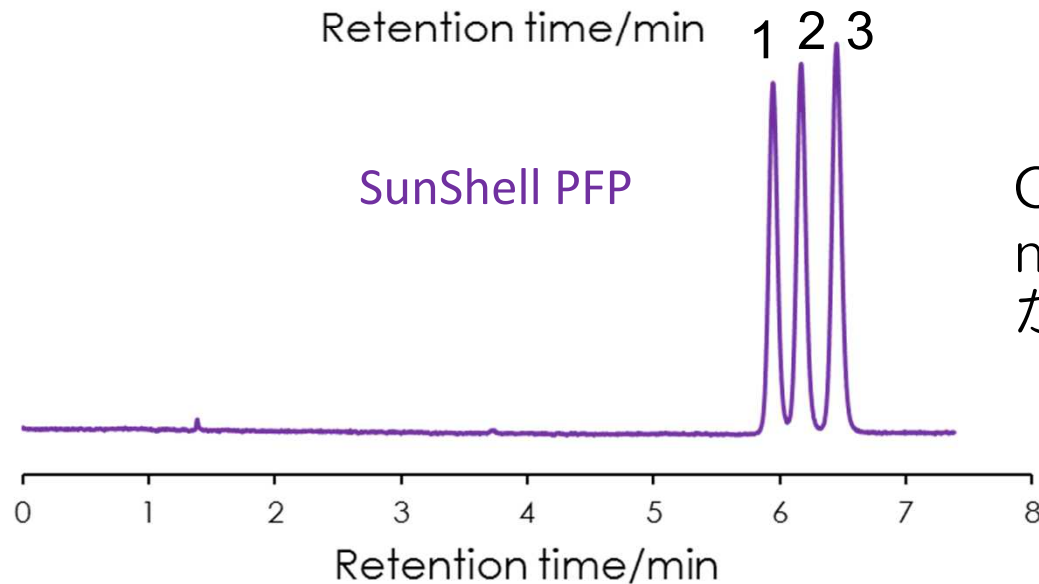
Sample:

1 = p-Cresol

2 = m-Cresol

3 = o-Cresol

SunShell PFP



C18カラムではp-クレゾールとm-クレゾールは分離不可能ですが、PFP は分離可能です。

SunShell RP ガードフィルター

(C18結合カートリッジフィルター)



- ☆均一な細孔径を持つモノリス型ガラスフィルター（直径4mm,厚さ4mm）にC18を結合
- ☆夾雑物の捕捉によるカラム圧の上昇防止やC18結合相による吸着物の除去など、種々の逆相カラムのガードカラムとして利用可能
- ☆カートリッジ式で交換が容易
- ☆ホルダーを含めローテッドボリュウム仕様（2.1x50mmカラムで5%の段数低下、4.6x150mmカラムで1%の段数低下）
- ☆内径2.1mm~4.6mmカラムに使用可能
- ☆SunShell RP Guard Filterの圧力損失は1 mL/minで約0.1MPa、またGuard Filter 本体の耐圧は60MPa
- ☆SunShell以外の逆相カラムにも汎用的に使用可能
- ☆アミトリプチリンのような塩基性化合物もテーリングのないシャープなピーク形状

【まとめ】

- シリカ表面の様々な位置のシラノール基と結合可能な新規C18試薬 (HMODTS)を開発した
- 残存シラノール基を非常に少なくすることができ、その結果耐久性が向上 - pH10使用可能・ハイブリッド型と同等な耐久性
- 2.6 μ mのコアシェル型粒子を用いることによりサブ2 μ 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 μ mと同等な高速分離が達成可能である
- さらにコアシェル型C18は分析時間が短縮されるため、アルカリ性移動相条件下での分析数が大幅に増やすことが可能