

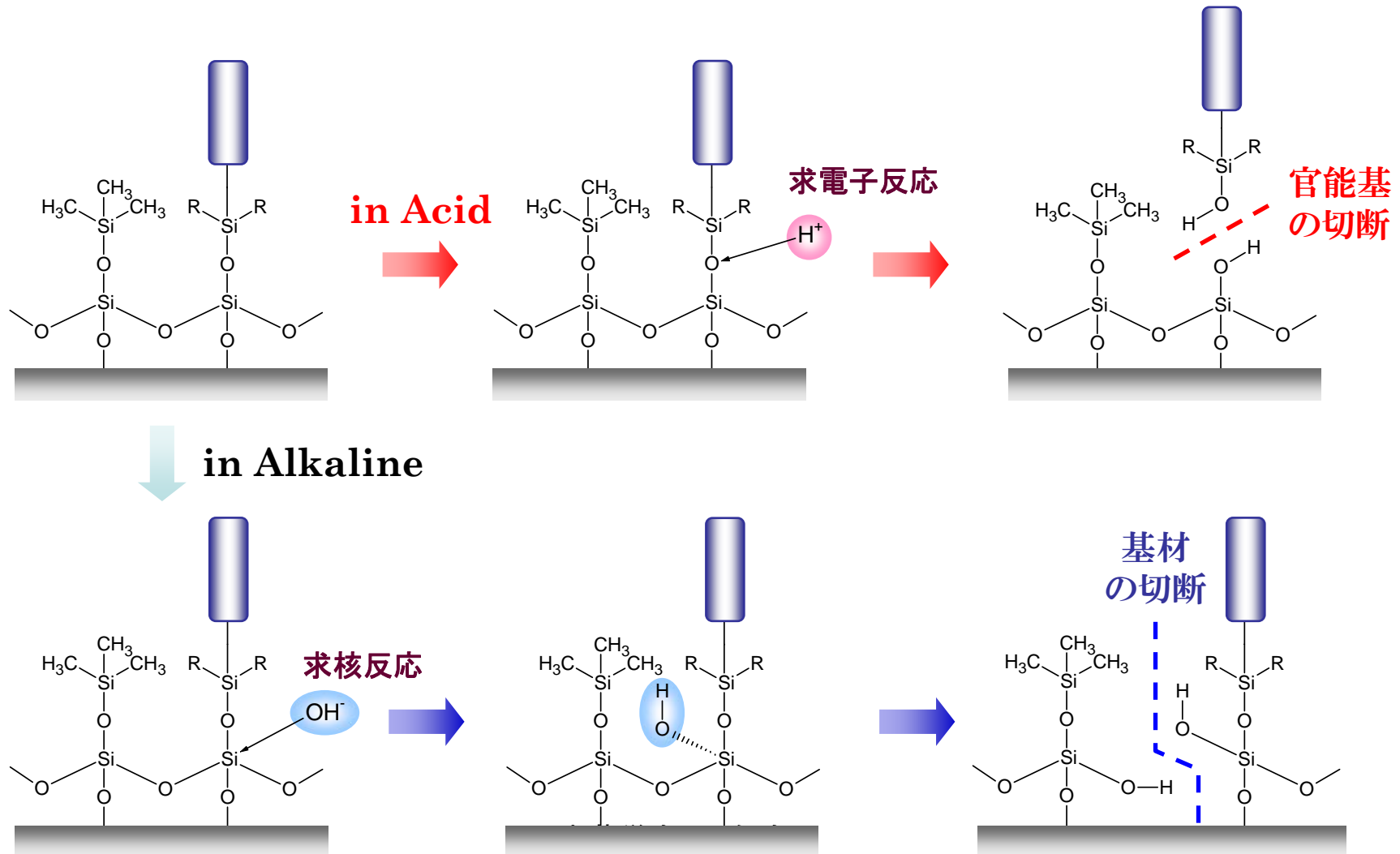
分離選択の大幅な改善：高温/長鎖 アルキル基の知られざる能力

(株) クロマニック テクノロジーズ
長江 徳和

高耐熱性SUNARMOR C18の開発

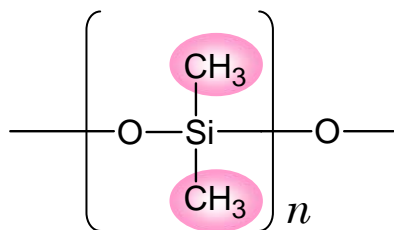
- 近年、2 μ m以下の微小粒子径充填剤を充填した超高速HPLCカラムが市販されはじめている
- 微粒子化は高性能化の有効な手段ではあるが、装置側のリスクが大きく、また、汎用HPLCではその能力を十分に引き出すことはできない
- 高温下で使用することができれば拡散係数を大きくでき、高分解能を得ることができるが、一般的なシリカ系逆相固定相は50°C以上での長期使用は不可能である
- クロマニックテクノロジーズは、シリカ系逆相固定相の耐熱性向上を目的として、エチレン基をC18シリル化試薬に結合した新規試薬を開発し、60°Cで十分に使用可能なC18カラムであるSunArmor C18を開発した

酸性/アルカリ性下でのシリカゲルの分解

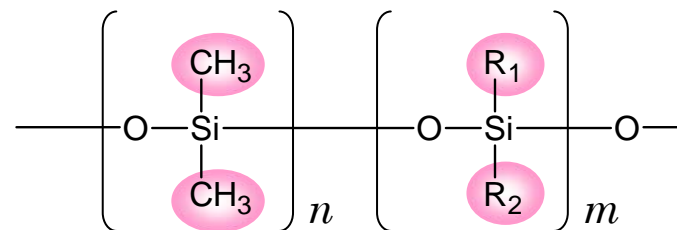


耐熱性シラン化合物

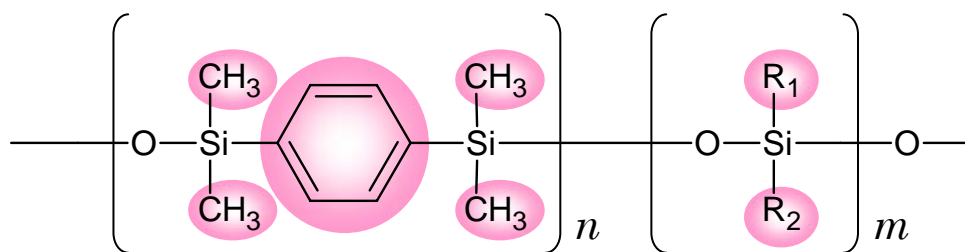
GC用固定相に用いられている



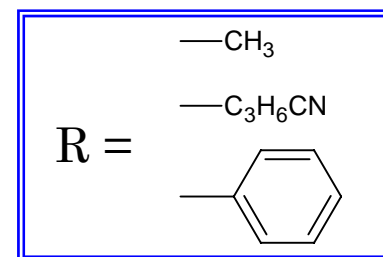
Poly[dimethylsiloxane]
(OV-1, SE30...)



Poly[alkylsiloxane]/[dimethylsiloxane]
(phenyl:OV-5, OV-17, cyano/phenyl:V-225, OV-1701...)

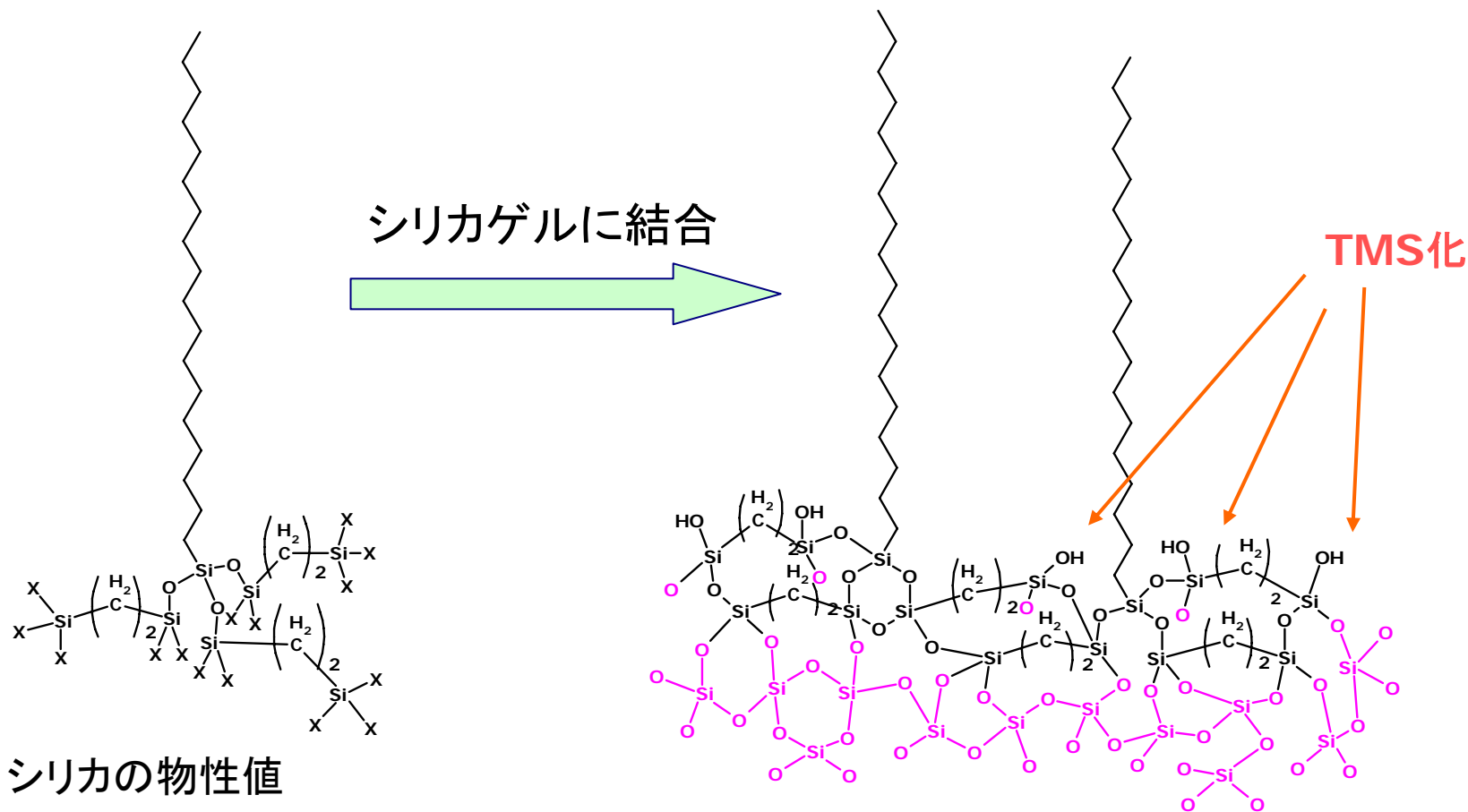


Silarylene (silphenylene) type



アルキル・アルキレン基の導入で耐熱性・化学的安定性が向上する?!

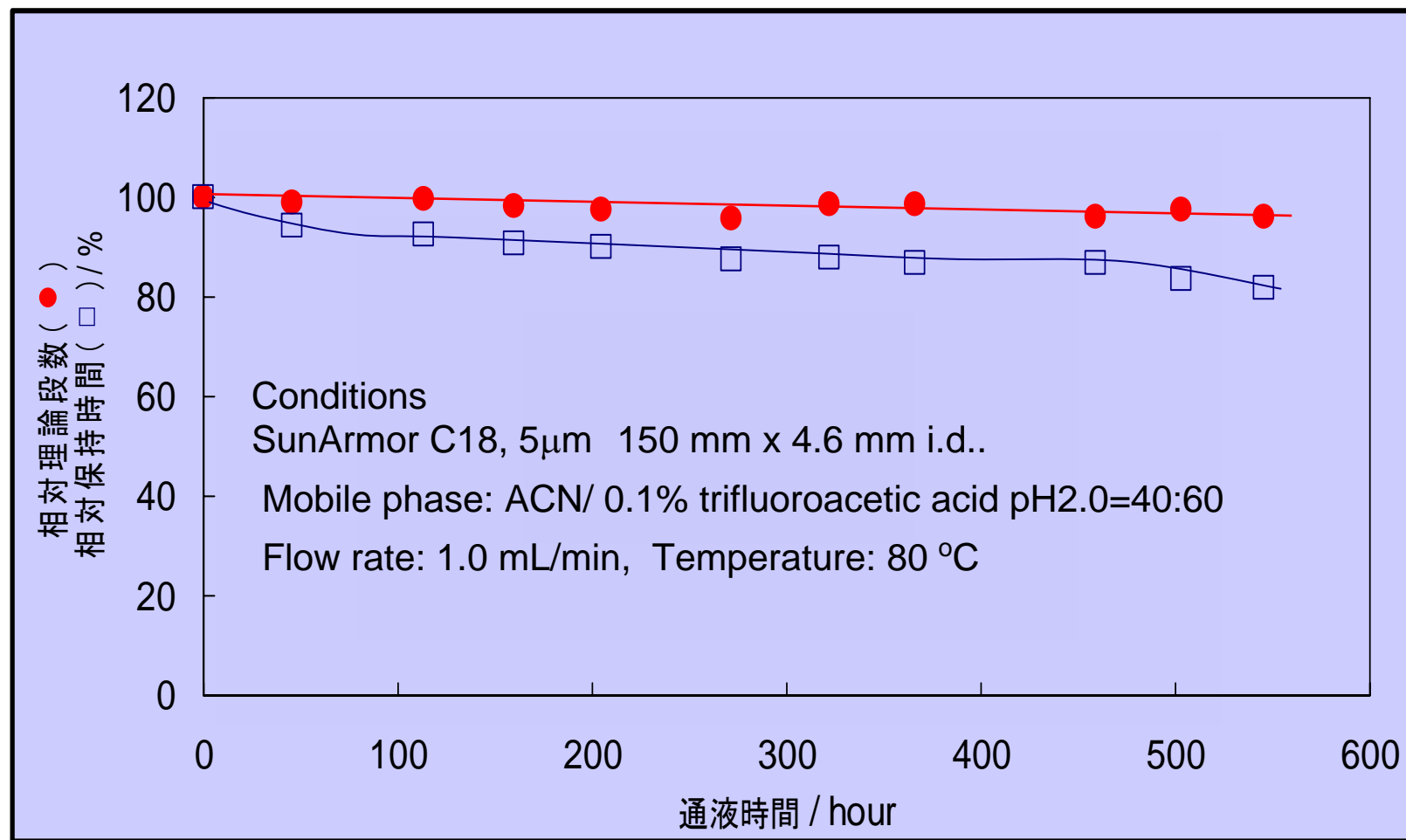
新規開発C18試薬 特許出願中 (SunArmor C18)



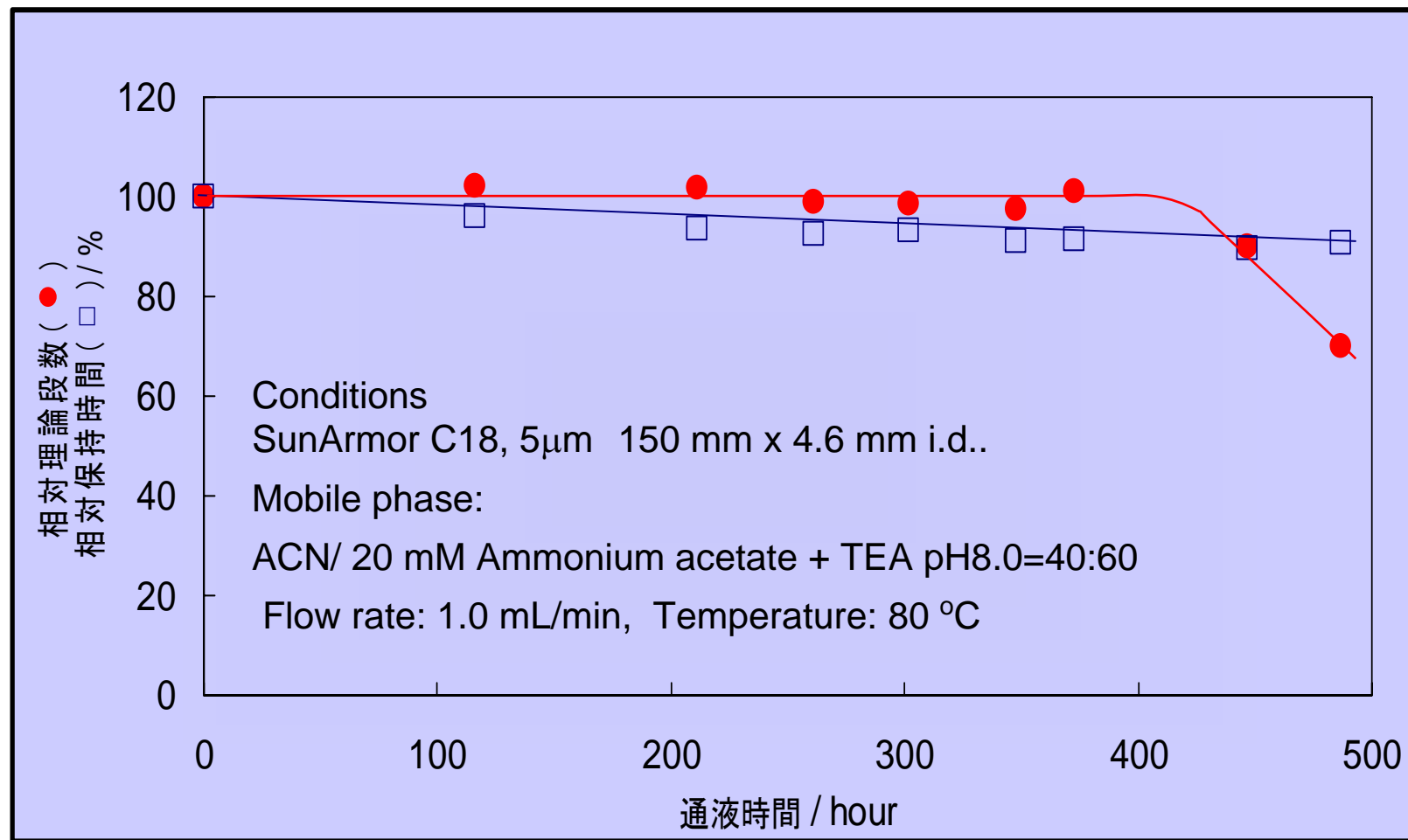
比表面積: 340m²/g, 細孔容積: 1.0mL/g, 細孔径: 12nm

日本薬学会129年会

80°C-pH 2.0における理論段数と保持時間の变化



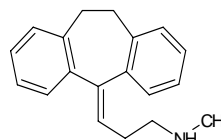
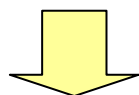
80°C-pH 8.0における理論段数と保持時間の变化



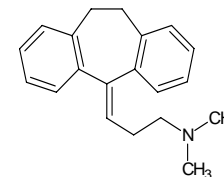
カラム温度を上げるとどうなるか？

- ★溶質の拡散係数が上がる
- ★吸脱着速度が速くなる
- ★移動相の粘度が下がる

三環系抗うつ剤のような比較的分子量の大きく
拡散係数の低い試料は



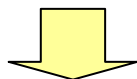
ノルトリプチリン



アミトリプチリン

理論段数が上昇，更に対称性も向上

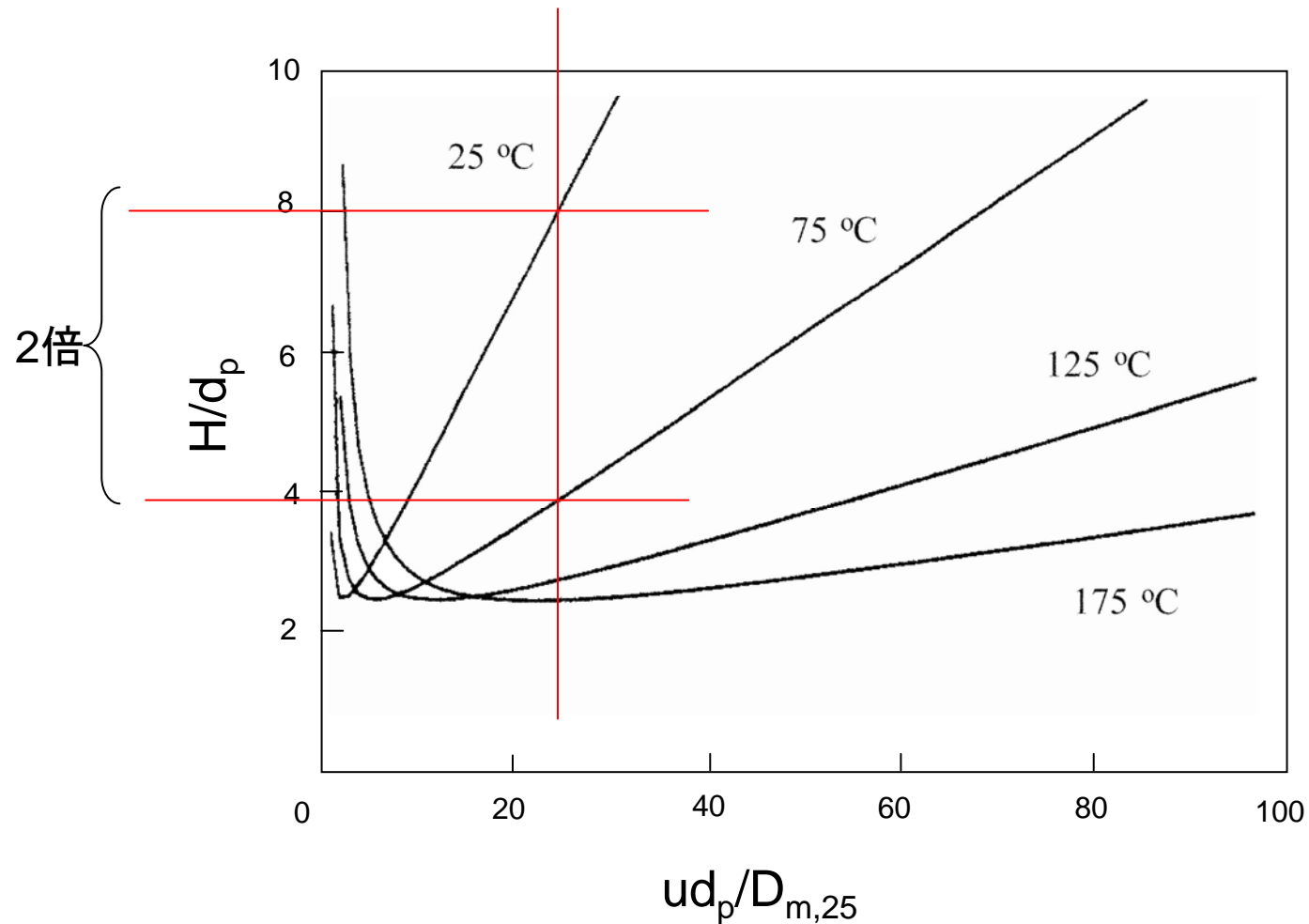
高粘度有機溶媒も10MPa以下の低圧で使用可能になる



溶出順序が逆転することもあり，分離が改善



各温度における線流速と理論段高との関係



F.D.Antia and C. Horvath, J. Chromatogr., 436, 1-15 (1988).

温度と粘度および拡散係数との関係

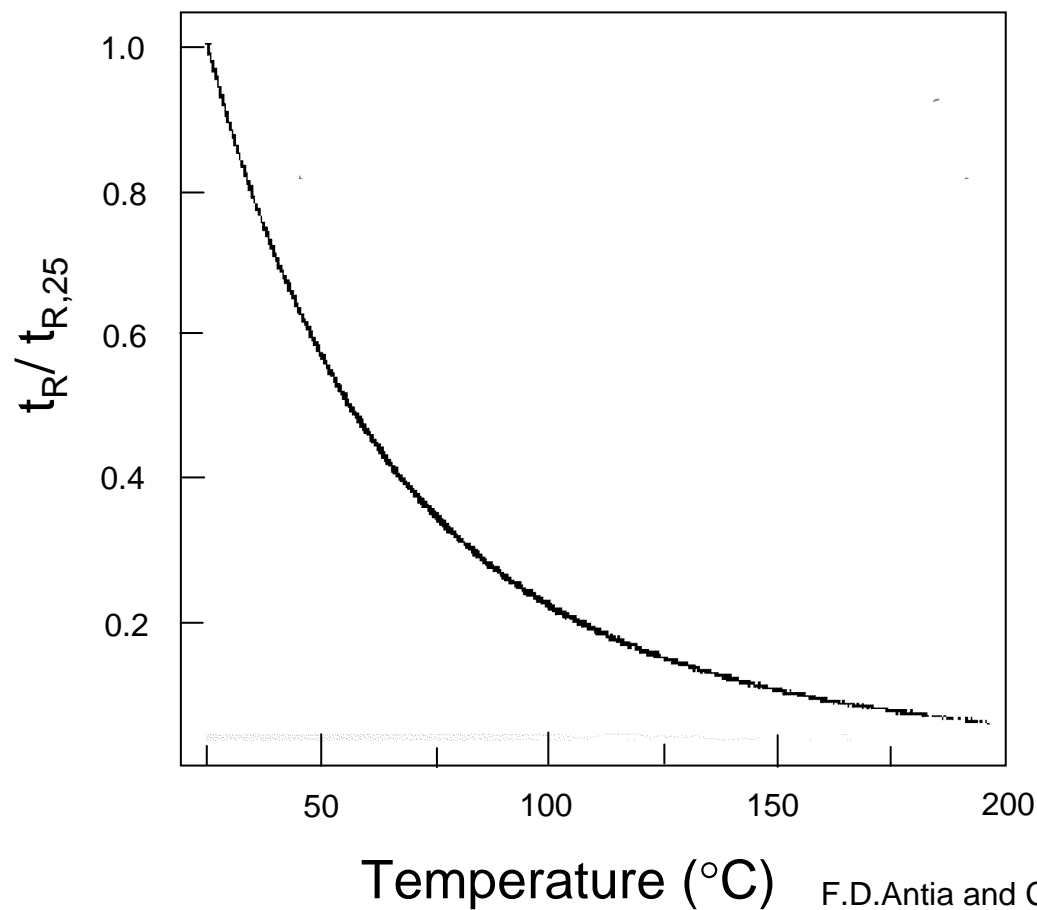
$$\eta = \alpha \exp(\beta/T)$$

$$D_m = D_{m,25} \frac{T}{298} \cdot \frac{\eta_{25}}{\eta}$$

η : 粘度, T : 絶対温度, D : 拡散係数

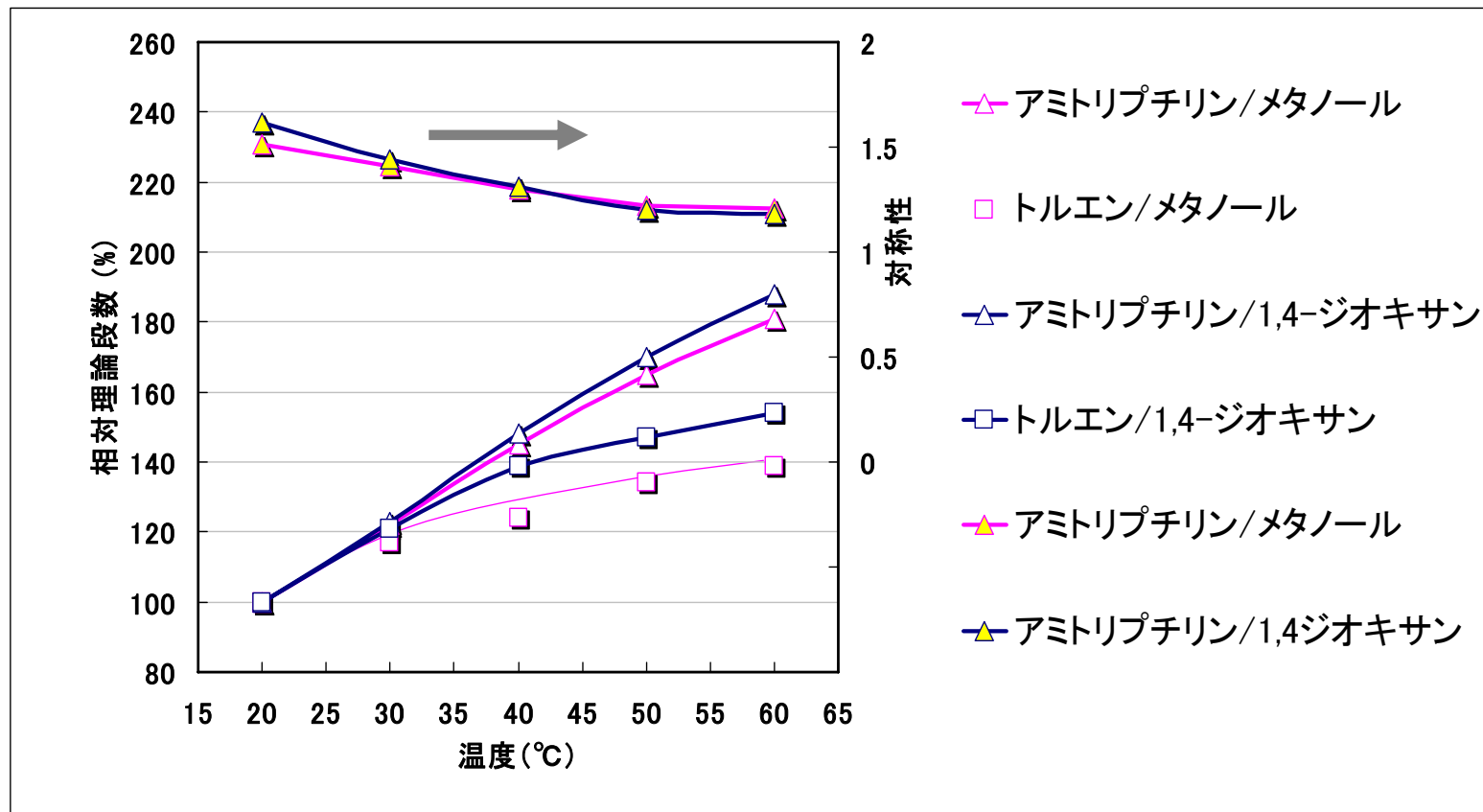
温度と分析時間の関係

カラム圧, 段数を一定となる条件



F.D.Antia and C. Horvath, J. Chromatogr., 436, 1-15 (1988).

カラム温度による理論段数と対称性の変化



カラム: SunArmor C18, 5 μ m 4.6x150 mm

移動相:メタノール/20mM リン酸緩衝液pH7.5 (80:20)

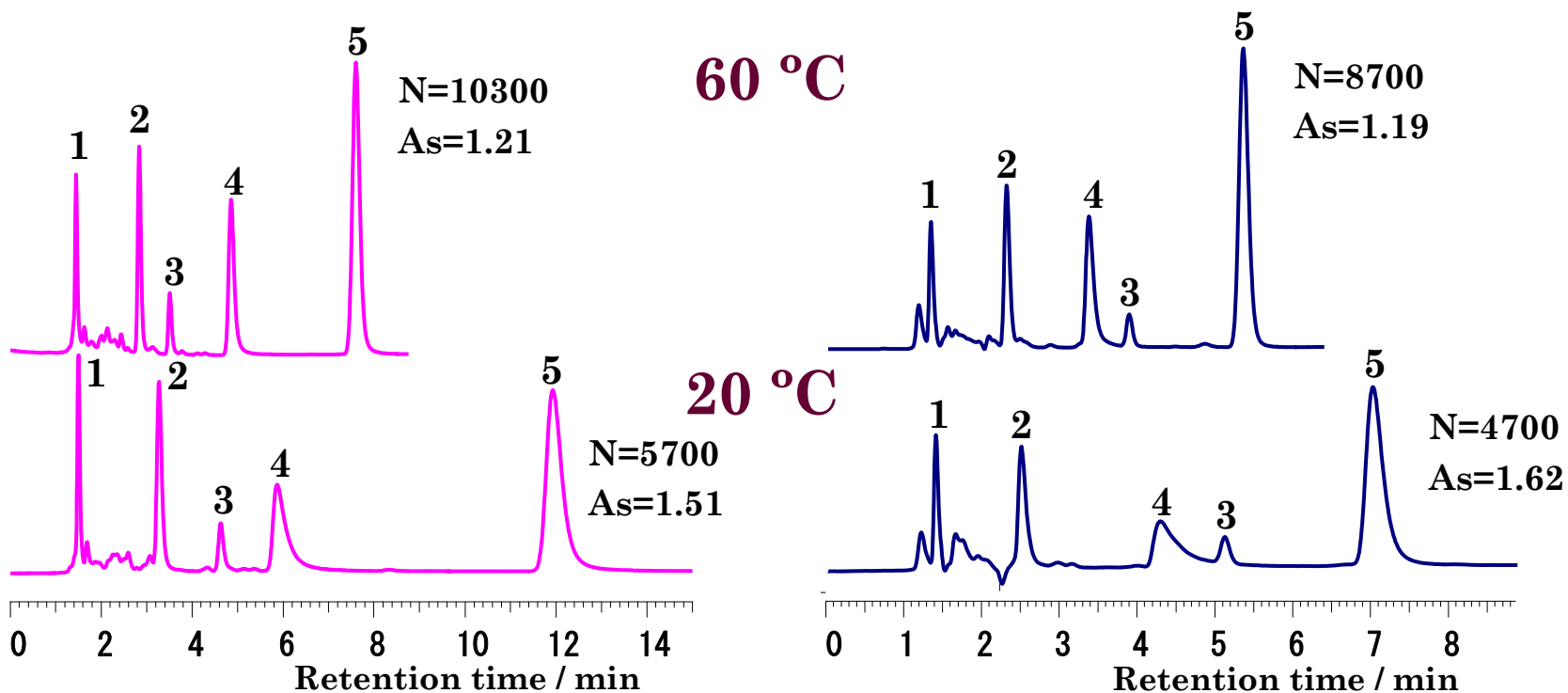
1,4-ジオキサン/5mM リン酸緩衝液pH7.5 (65:35)

流速:1.0 mL/min

60 °Cと20 °Cでのクロマトグラム

メタノール/20mM リン酸緩衝液 pH7.5(80:20)

1,4-ジオキサン/5mM リン酸緩衝液 pH7.5(65:35)

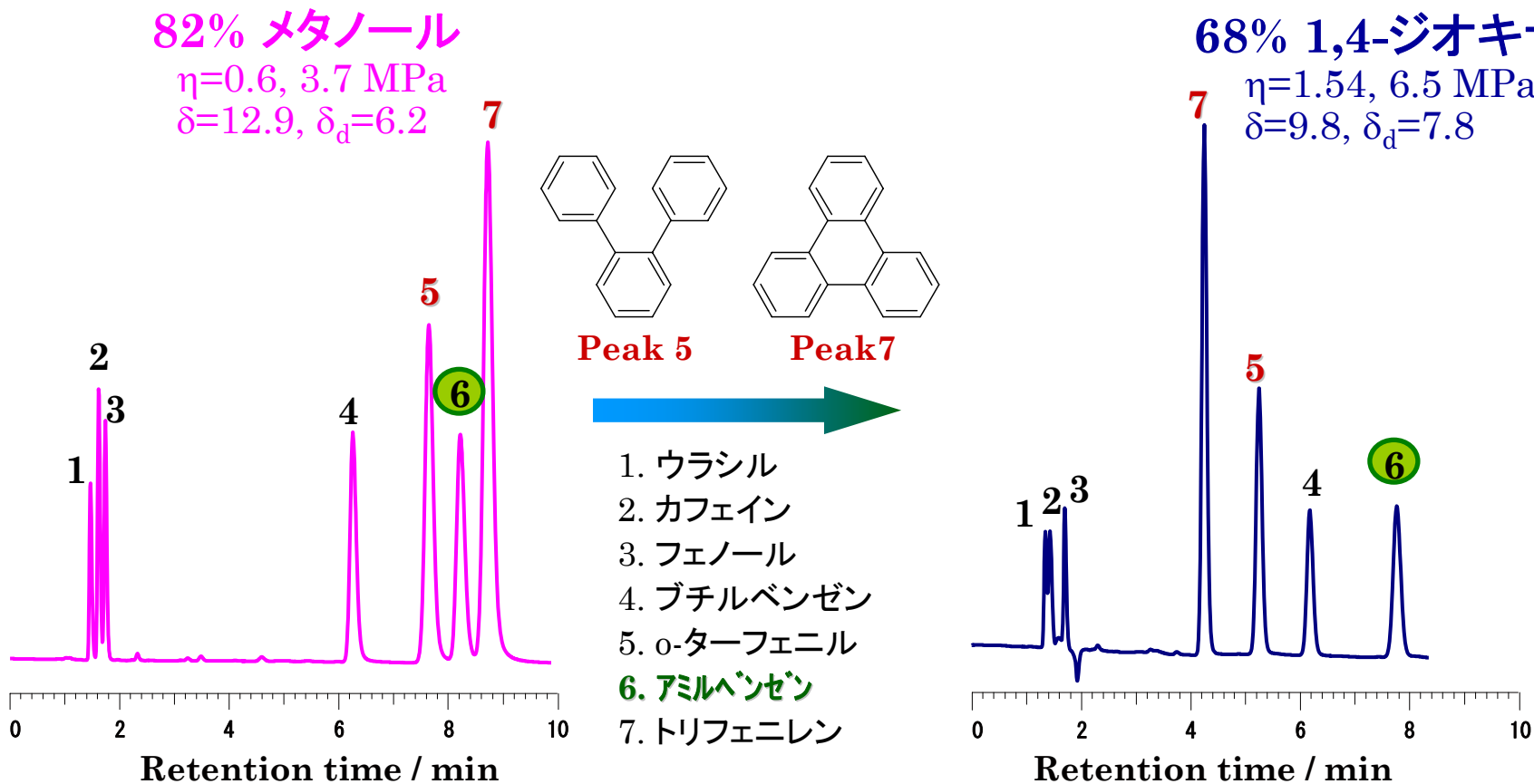


カラム: C18, 5 μ m, 4.6 x150 mm.

カラム温度: 60 °C, 20 °C 検出: UV @ 250 nm.

試料: 1=ウラシル, 2=プロプラノロール, 3=トルエン, 4=ノルトリプチリン, 5=アミトリプチリン

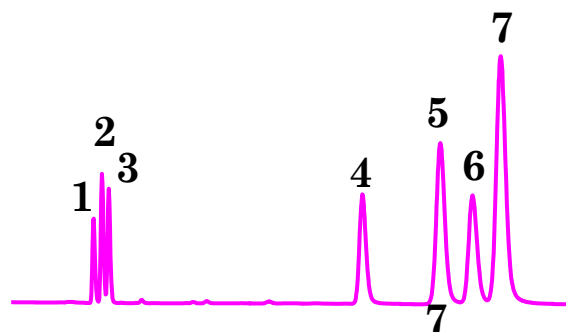
高粘性溶媒による選択性の変化



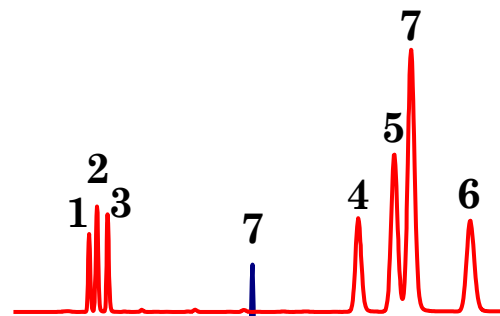
カラム: C18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm

カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm.

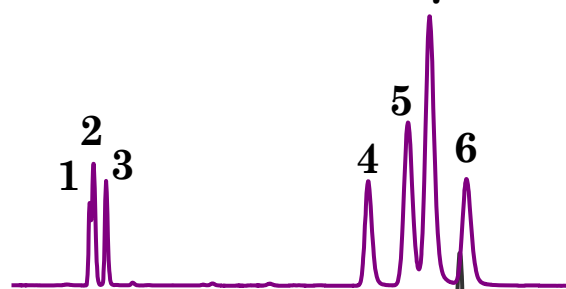
高粘性溶媒の使用－選択性のコントロール I



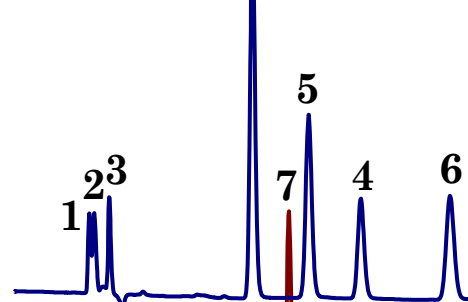
82% メタノール
 $\eta=0.6$
 3.7 MPa
 $\delta=12.9$
 $\delta_d=6.2$



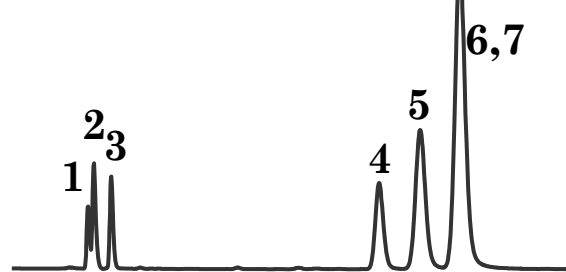
74% アセトニトリル
 $\eta=0.37$
 2.3 MPa
 $\delta=11.8$
 $\delta_d=6.5$



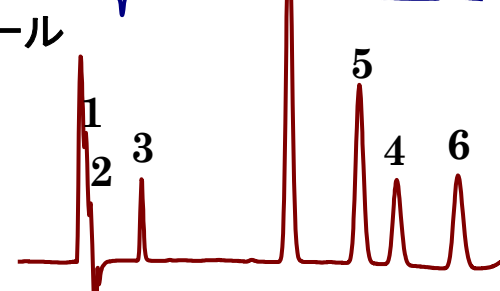
70% エタノール
 $\eta=1.2$
 6.1 MPa
 $\delta=11.2$
 $\delta_d=6.8$



67% 1,4-ジオキサン
 $\eta=1.54$
 6.5 MPa
 $\delta=9.8$
 $\delta_d=7.8$



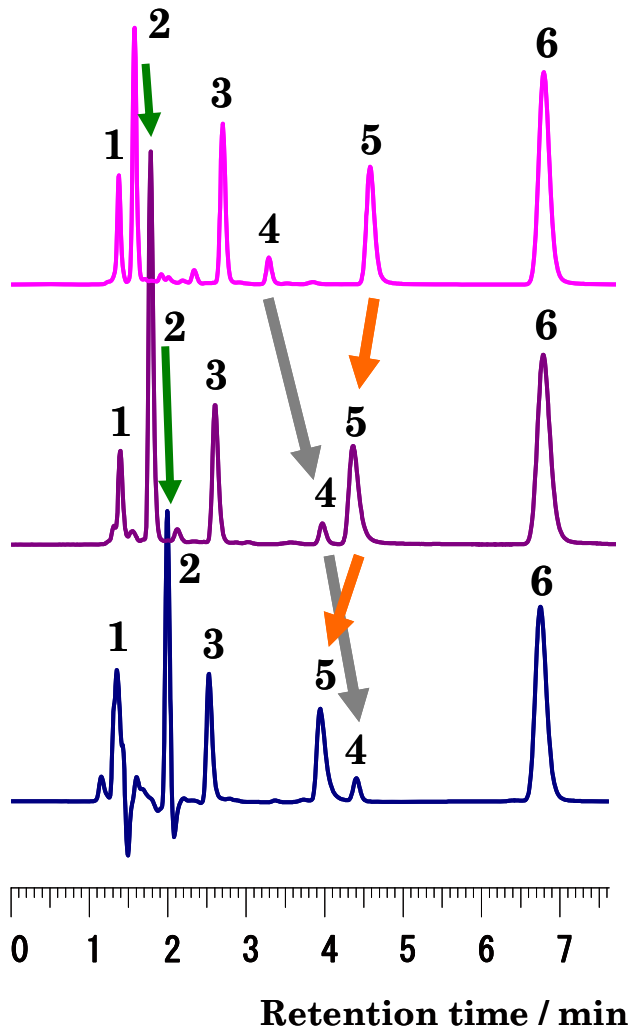
58% 2-プロパノール
 $\eta=2.3$
 8.0 MPa
 $\delta=10.2$
 $\delta_d=7.2$



49% THF
 $\eta=0.55$
 5.5 MPa
 $\delta=9.1$
 $\delta_d=7.6$



選択性のコントロール II



メタノール/20mM リン酸緩衝液 pH7.5(81:19)

エタノール/20mM リン酸緩衝液 pH7.5(66:34)

1,4-ジオキサン/5mM リン酸緩衝液 pH7.5(63:37)

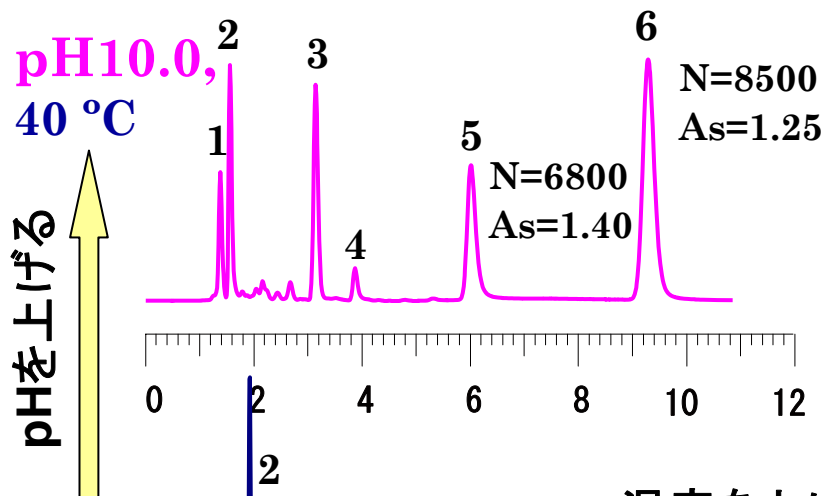
カラム: C18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm

カラム温度: 60 °C

検出: UV @ 250 nm.

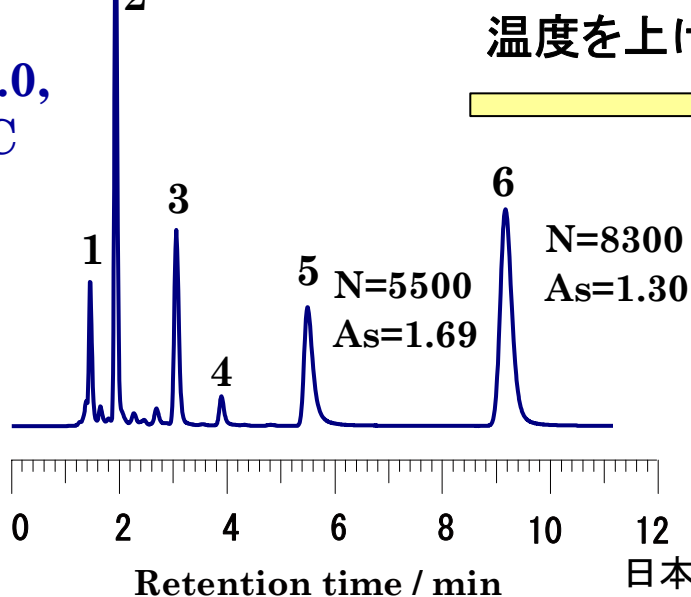
試料: 1=ウラシル, 2=プロピルパラベン,
3=プロプラノロール, 4=トルエン, 5=ノルトリプチリン,
6=アミトリプチリン

温度, pHの効果

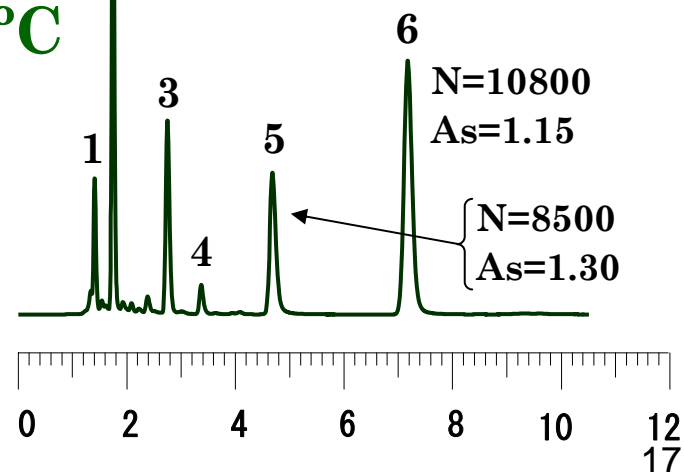


カラム: C18, 5 μ m, 4.6 x 150mm
 移動相: メタノール/20mMリン酸緩衝液. (80:20)
 検出: UV @ 250 nm.
 試料: 1=ウラシル, 2=プロピルパラベン,
 3=プロプラノロール, 4=トルエン, 5=ノルトリプチリン,
 6=アミトリプチリン

pH7.0, 40 °C



pH7.0, 60 °C



長鎖アルキル基固定相

炭素数28のオクタコシル基C28

★Sunrise C28: 炭素含有量18%

異性体の分離

★Sunniest RP-AQUA: 炭素含有量16%

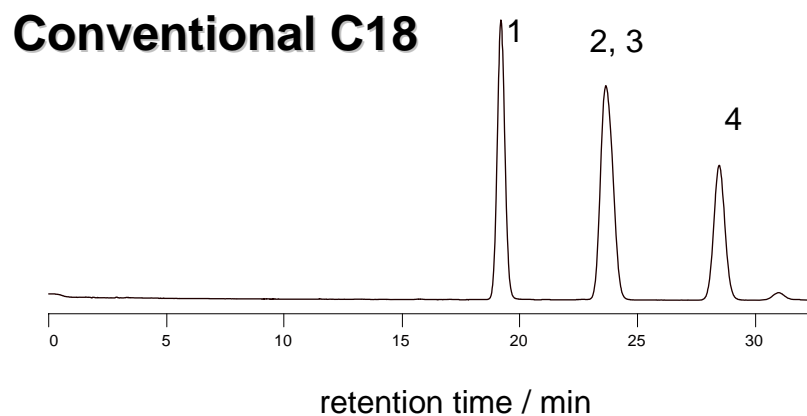
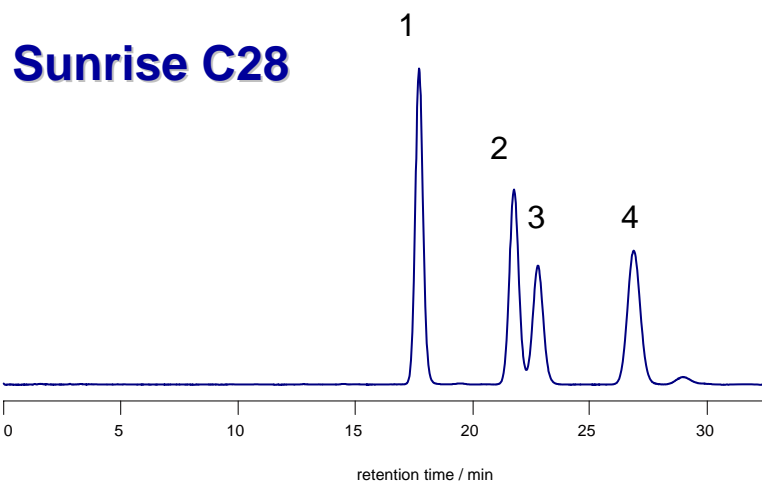
水リッチな移動相で安定 しかも

残存シラノール基の影響ほとんどない

(シリカ基材: 340m²/g, 12nm)

ビタミンEの分離比較

C18では不可能な構造異性体の分離達成



Column size: 4.6x250 mm

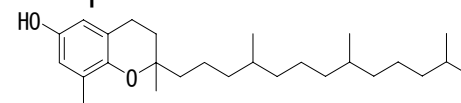
Mobile phase: 97/3=CH₃OH/H₂O

Flow rate: 1.0 mL/min

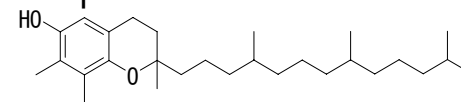
Temperature: 25 °C

Detection: UV at 295nm

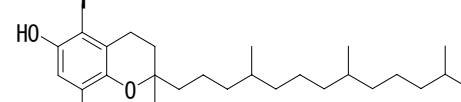
Sample: 1= δ -tocopherol



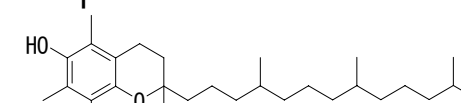
2= γ -tocopherol



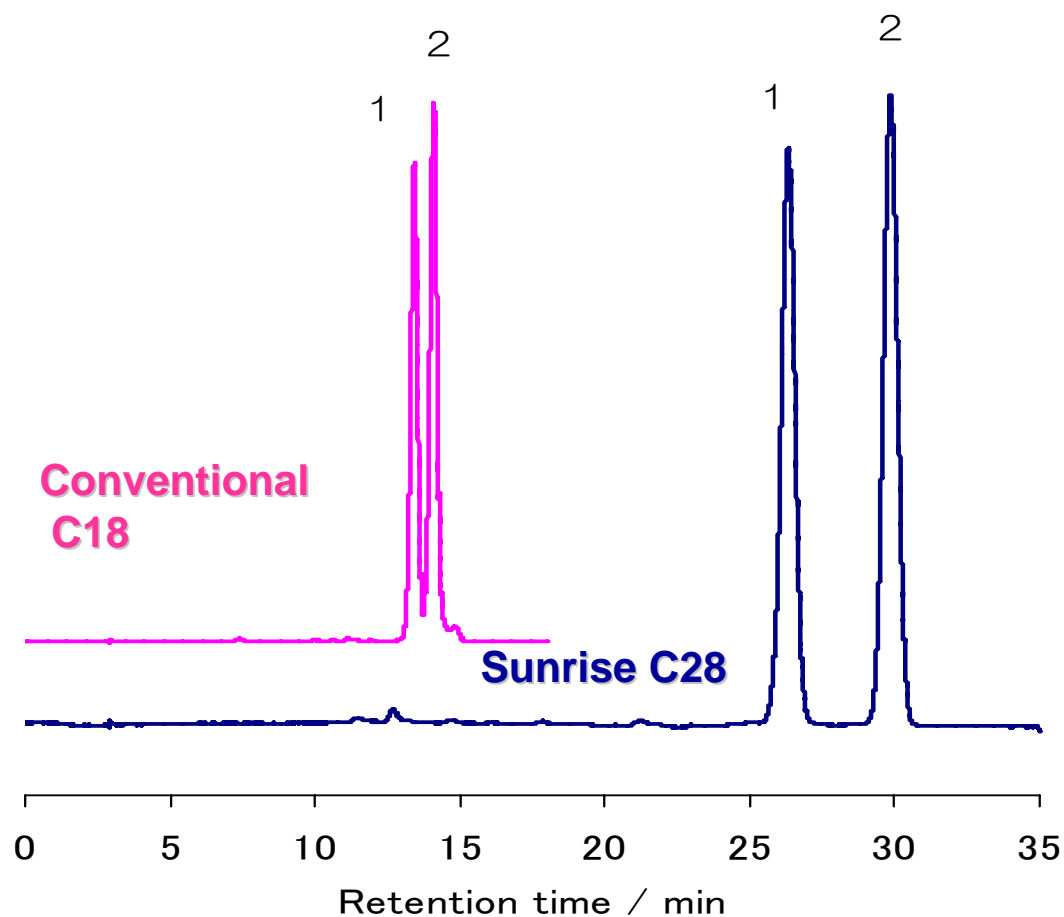
3= β -tocopherol



4= α -tocopherol



α , β -カロテンの分離比較



Column size: 4.6x250 mm

Mobile phase:

80/20=CH₃CN/CHCl₃

Flow rate: 1.0 mL/min

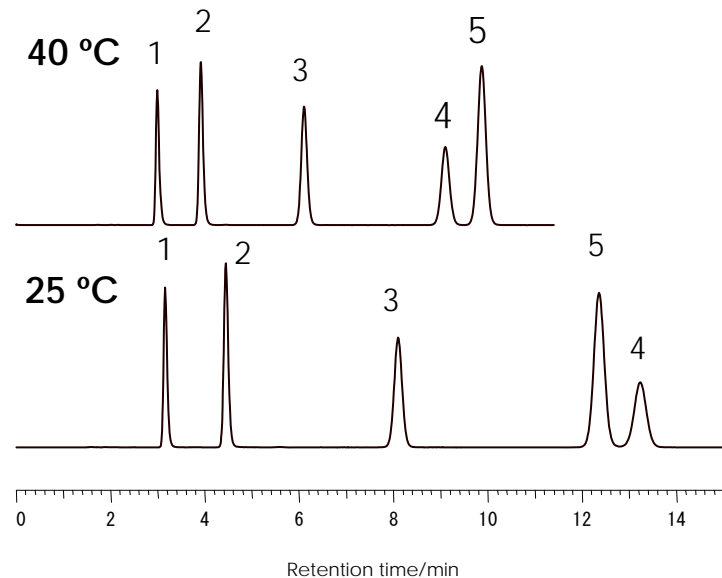
Temperature: 30 °C

Detection: UV at 450nm

Sample: 1= α -carotene

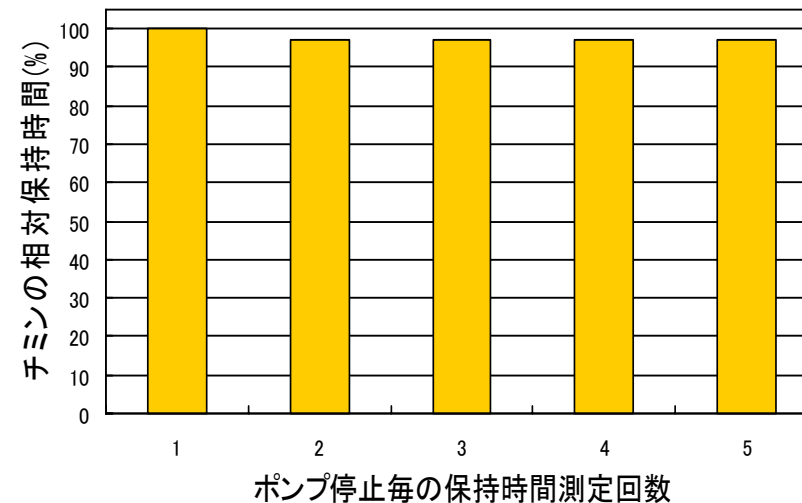
2= β -carotene

核酸塩基の分離



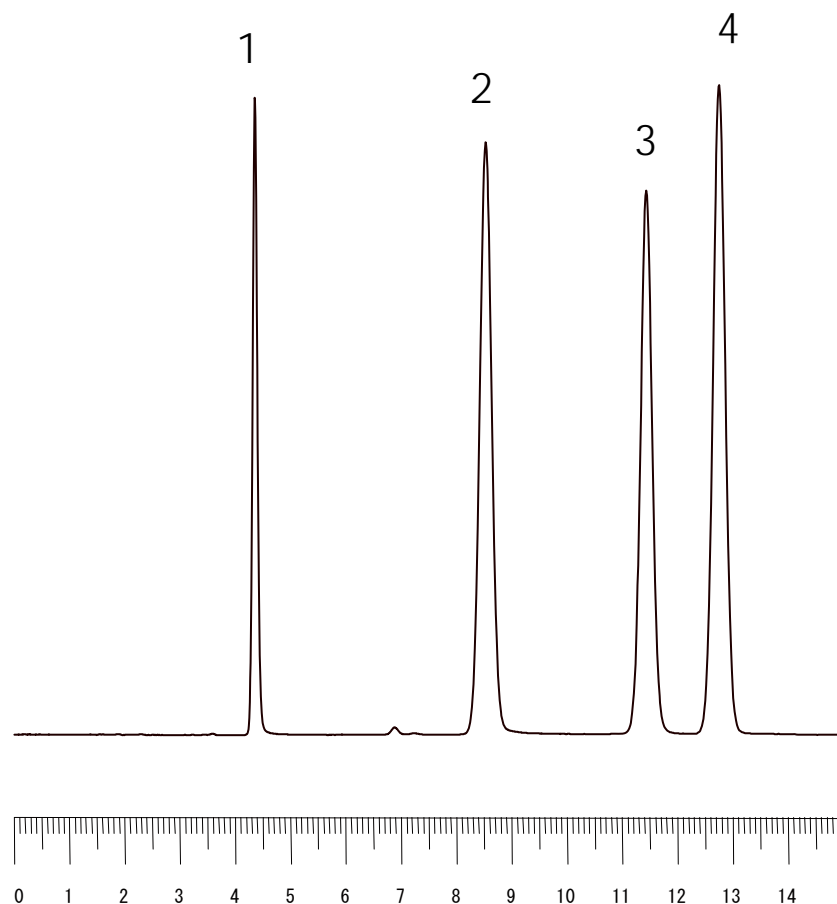
Column: Sunniest RP-AQUA, 5 μ m
4.6x150 mm
Mobile phase: 10mM Phosphate
buffer pH7.0
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C and 25°C
Sample: 1 = Cytosine 2 = Uracil
3 = Thymidine 4 = Uridine
5 = Thymine

40°Cでのチミンの保持時間の変化
(ポンプ送液1時間停止毎に測定)



緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により、ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると、通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり、保持時間は大幅に減少しますが、Sunnest RP-AQUAはほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず、97%以上の再現性を示しました。

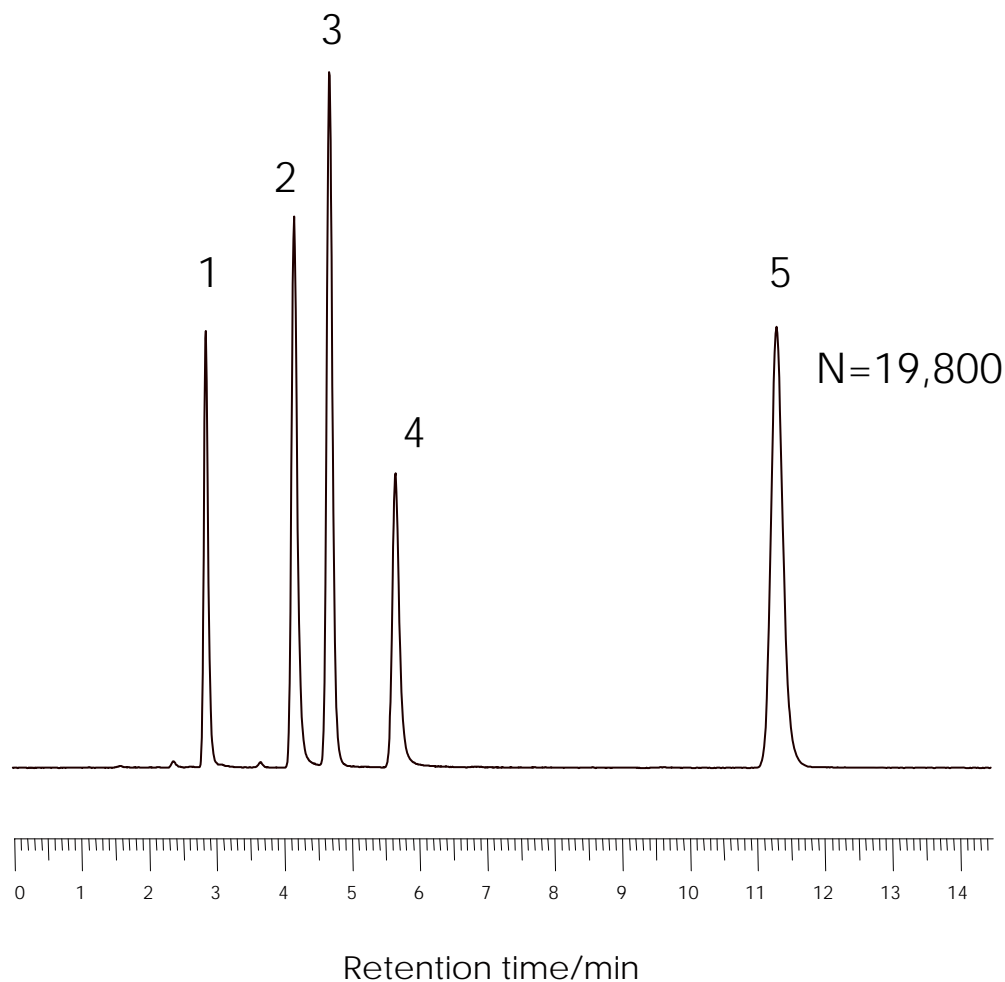
水溶性ビタミンの分離例



Retention time/min

Column: Sunniest RP-AQUA, 5 μ m
4.6x150 mm
Mobile phase: 40mM Phosphate buffer
pH6.8
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@250nm
Sample: 1 = Nicotinic acid, 2 = Pyridoxal,
3 = Pyridoxine, 4 = Nicotinamide

ヌクレオチドの分離



Column: Sunniest RP-AQUA, 3 μ m
4.6x150 mm

Mobile phase: 20mM Phosphate
buffer pH6.0

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250nm

Sample: 1 = 5'-GDP, 2 = 5'-GMP,
3 = 5'-ATP, 4 = 5'-ADP, 5 = 5'-AMP

まとめ

- カラム温度を60°Cに設定するだけで、理論段数が上がり、対称性が向上する
- さらに、高粘度有機溶媒をカラム圧力を気にすることなく使用でき、選択性を大きく変化させることが可能となる
- C28オクタコシル基は異性体の分離や水の多い条件で分離を可能とする