

# 常識を超えた新規C18充填剤・ すべてのピークをシャープに！： 2 $\mu$ mカラムへの挑戦

クロマニック テクノロジーズ

長江 徳和

Norikazu Nagae

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

<http://chromanik.co.jp>

分析展2010新技術説明会9月3日

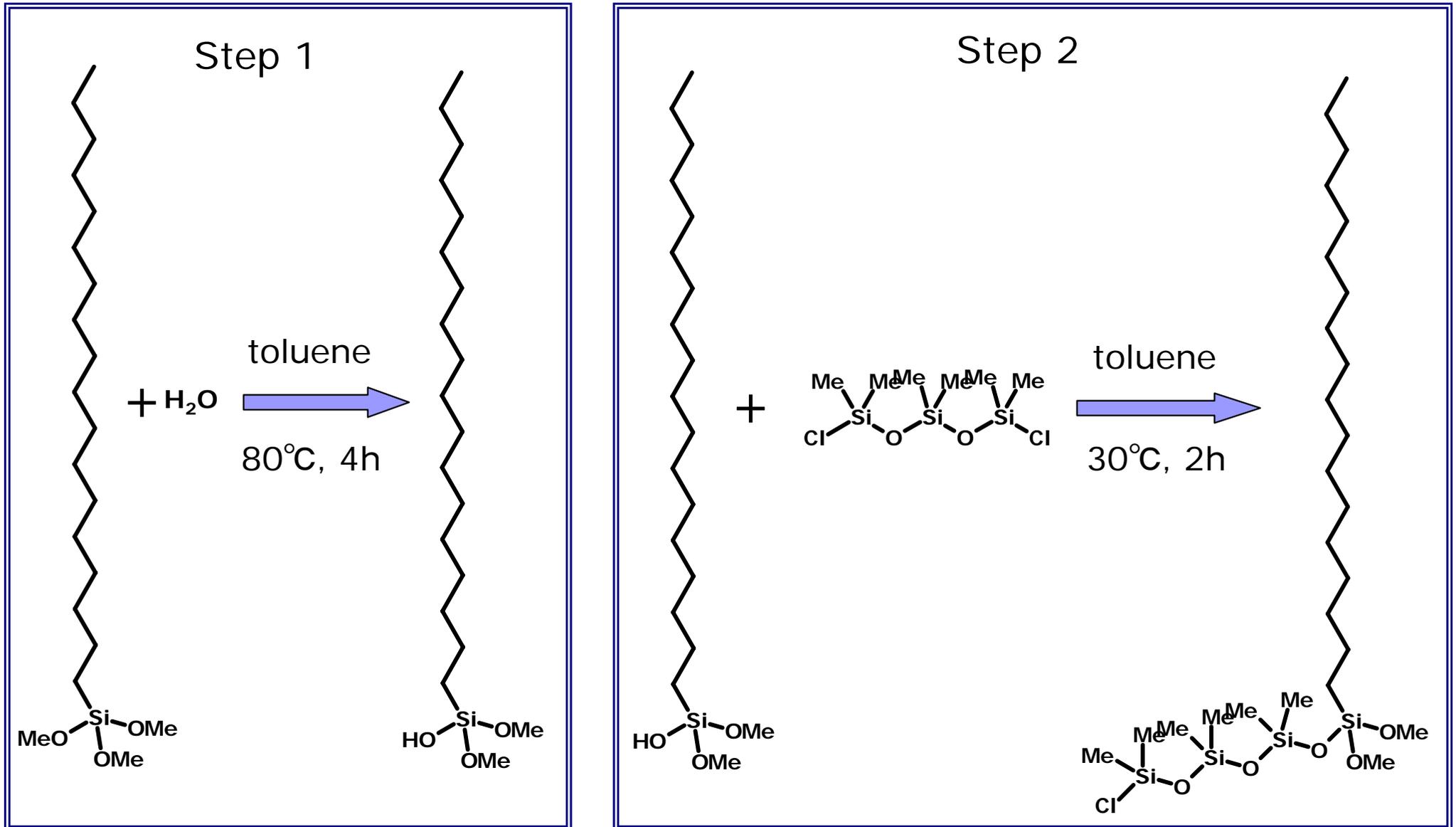
## 【緒言】

- 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。

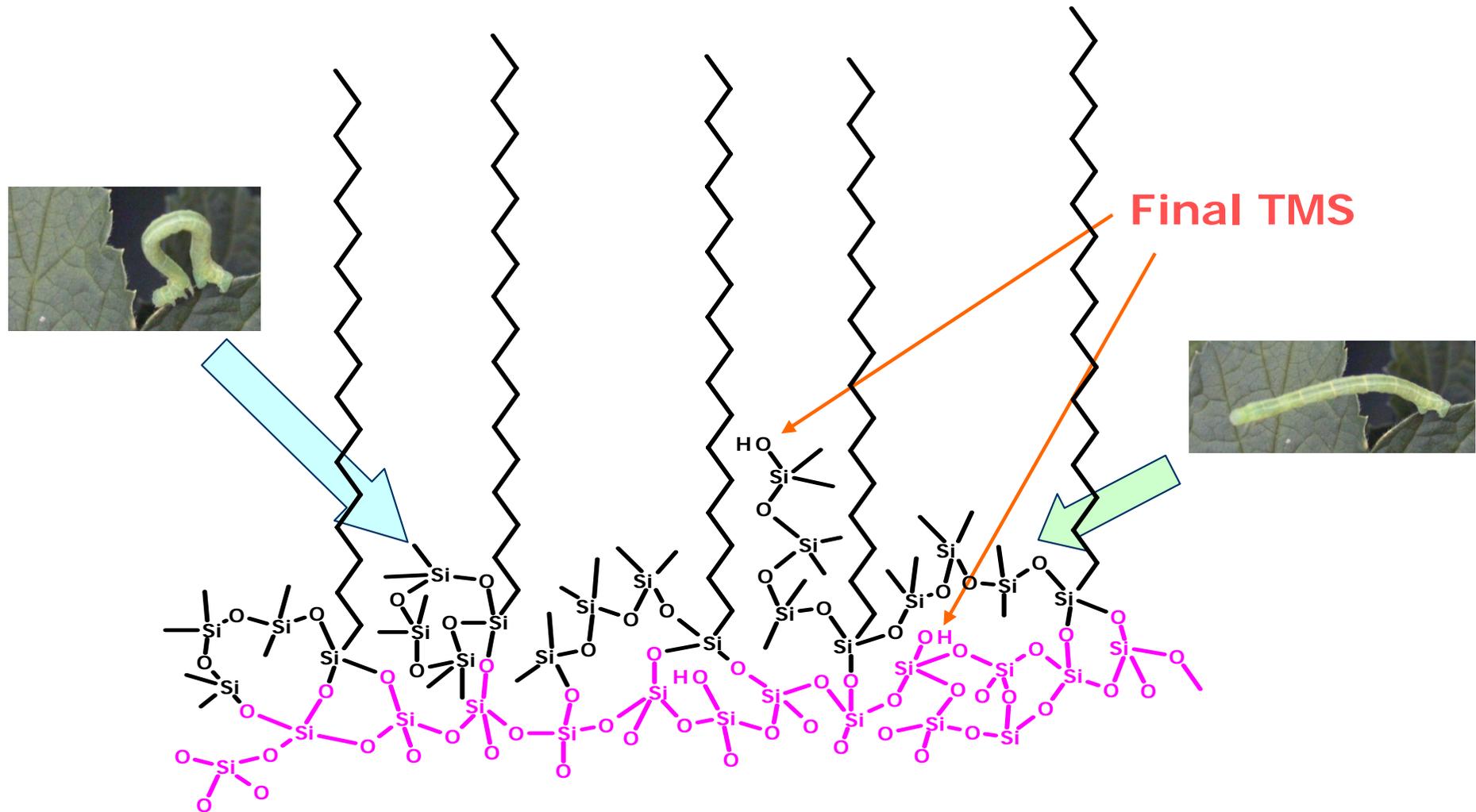
# 新規C18試薬A (HMODTS)

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)



# Sunniest C18 HMODTS 充填剤の物性

用いたシリカゲル: 12nm, 340 m<sup>2</sup>/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 CH<sub>3</sub>OH, pH7.5, 40 °C

Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5µm

Mobile phase:

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

Flow rate: 1.0 mL/min

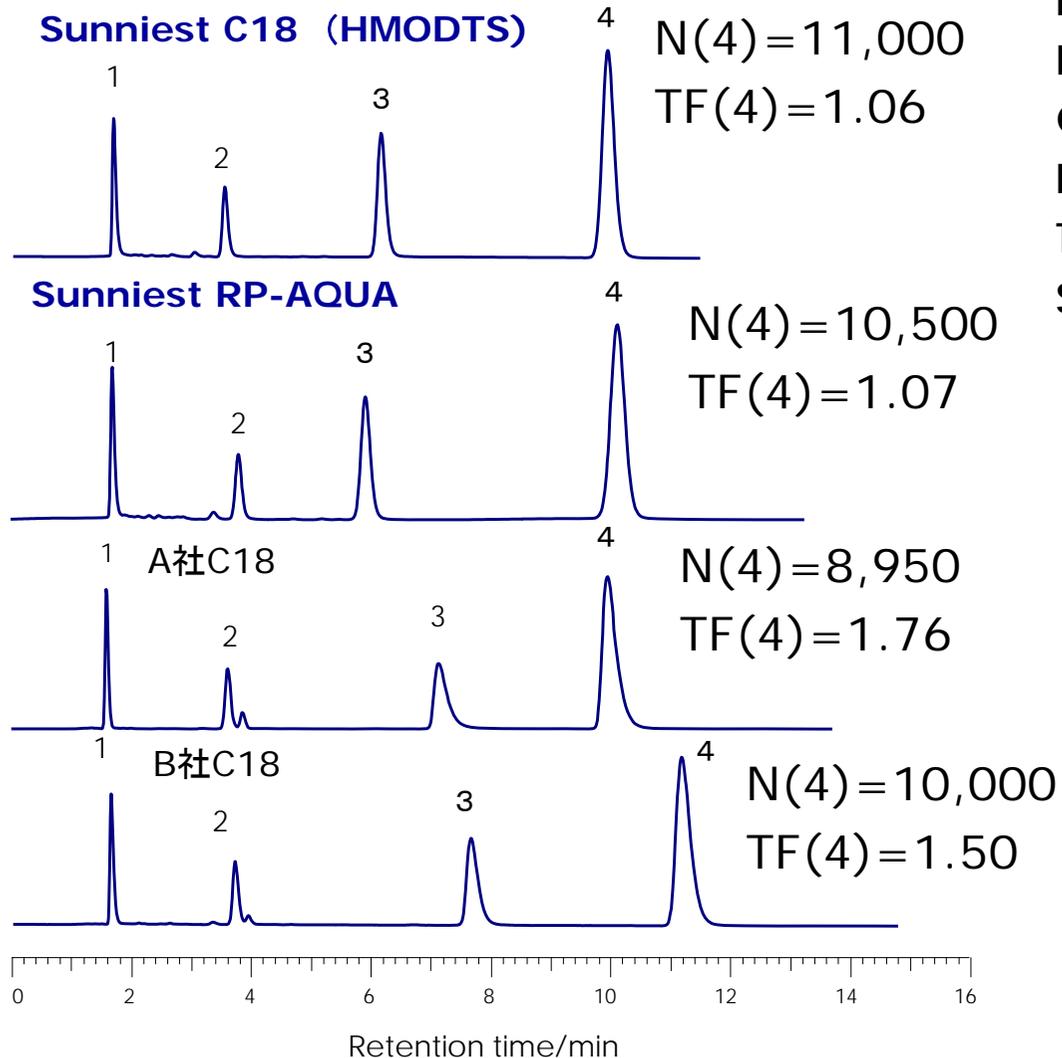
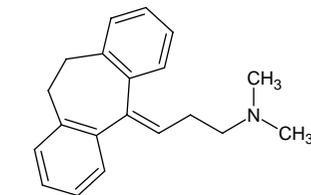
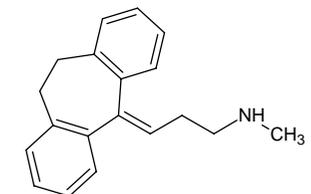
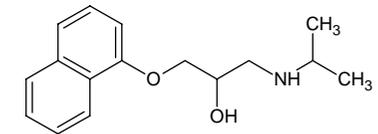
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Propranolol

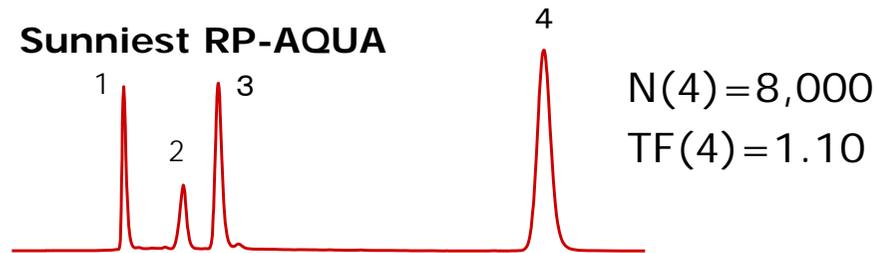
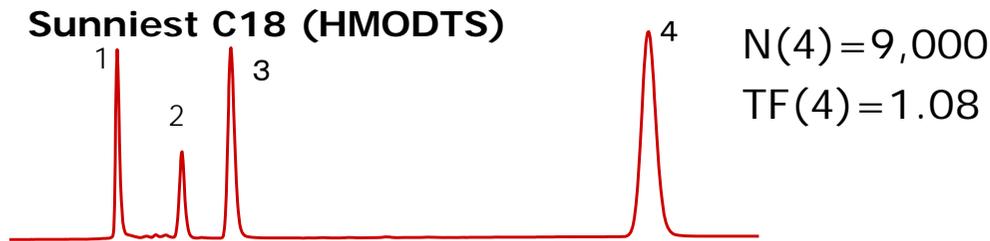
3 = Nortriptyline

4 = Amitriptyline



# アミトリプチリンのピーク比較Ⅱ

メタノール CH<sub>3</sub>OH, pH6.0, 22 °C



Retention time/min

Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5µm

Mobile phase:

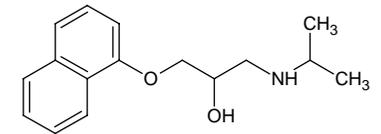
CH<sub>3</sub>OH/20mM Phosphate buffer pH6.0=80/20

Flow rate: 1.0 mL/min

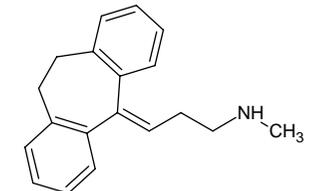
Temperature: 22 °C

Sample: 1 = Uracil

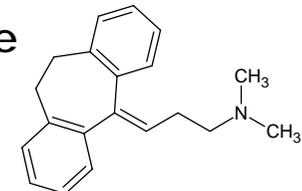
2 = Propranolol



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 CH<sub>3</sub>CN, pH7.0, 40 °C

Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5μm

Mobile phase:

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

Flow rate: 1.0 mL/min

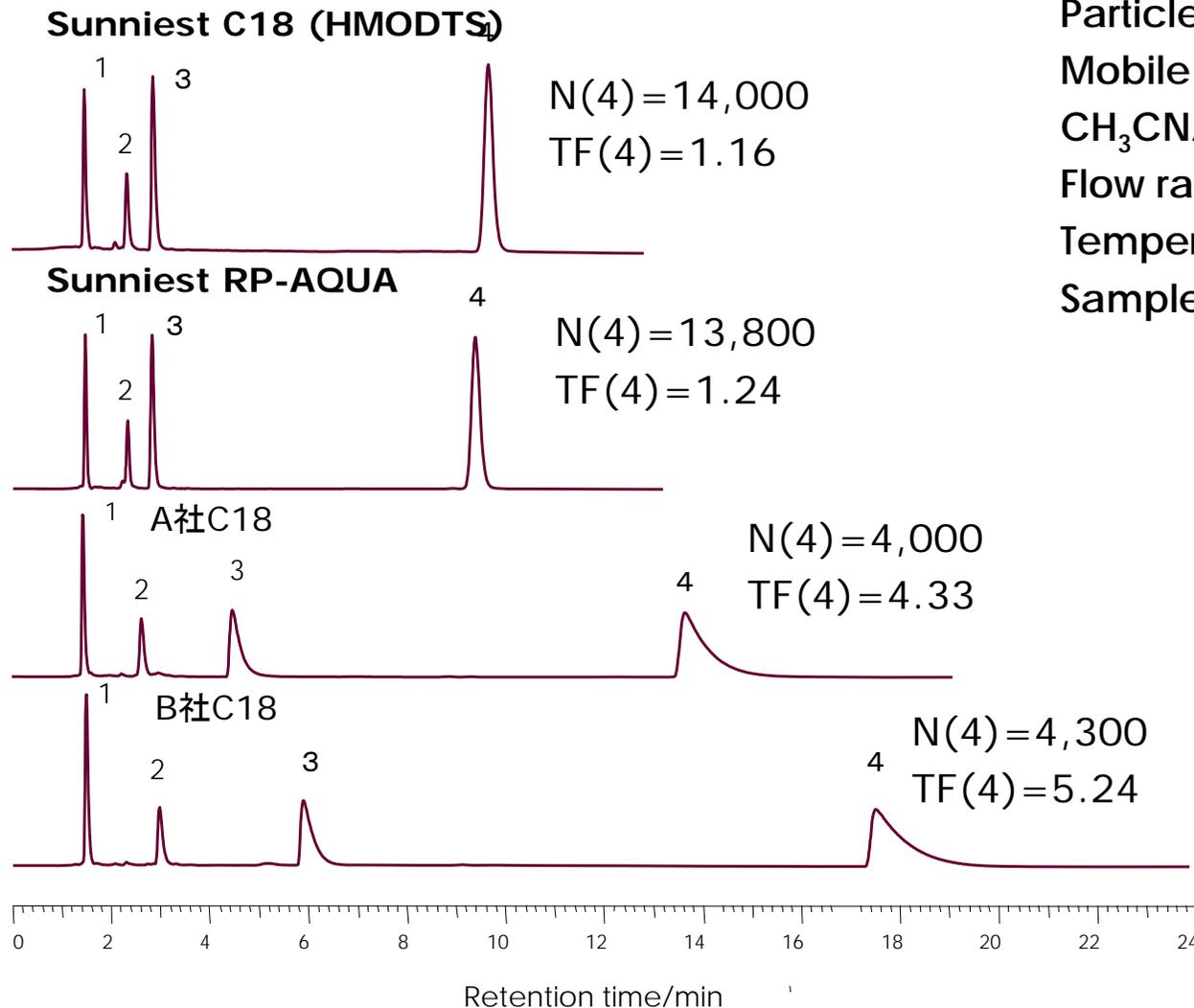
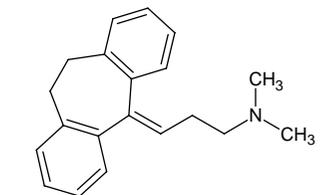
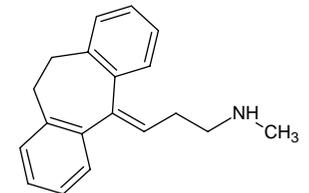
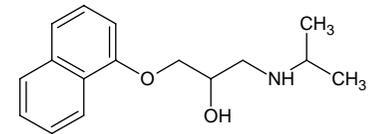
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Propranolol

3 = Nortriptyline

4 = Amitriptyline

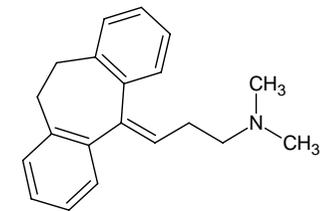


# アミトリプチリンのピーク比較Ⅲ-B

Column	TF	N
Sunniest C18(HMODTS)	1.04	12,500
Sunniest RP-AQUA	1.12	12,800
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

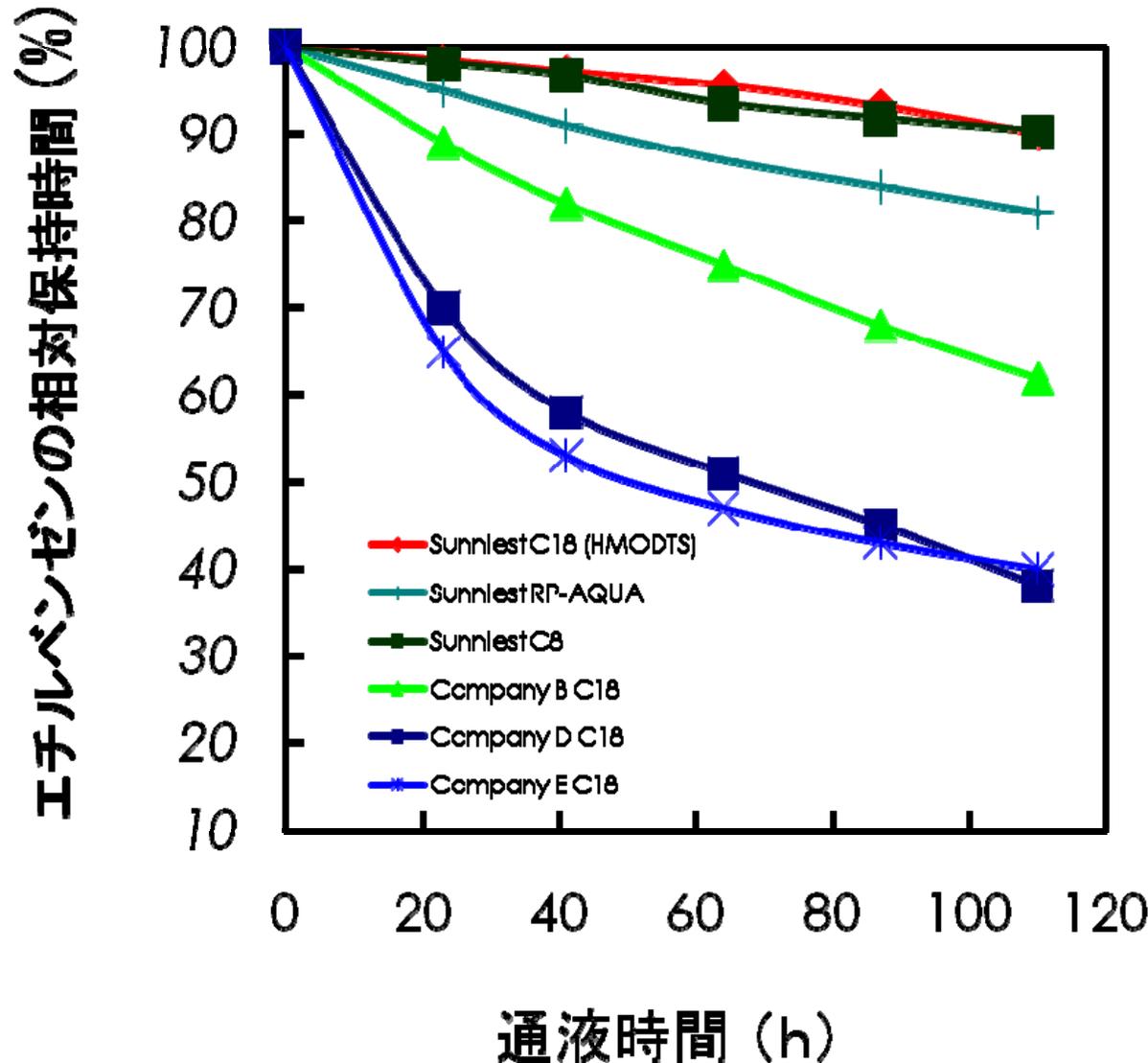
Column	TF	N
Japanese company C1 C18	2.14	8,700
P1	1.09	9,500
M1	2.01	11,200
Japanese company D1 C18	1.30	12,000
Japanese company D2 C18	2.92	8,000
Japanese company D3 C18	2.70	6,100
Japanese company E1 C18	1.56	11,400
Japanese company F1 C18	3.44	6,700
Japanese company G1 C18	1.71	10,000
Japanese company 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:**  
 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

## 耐酸性加速試験



### 耐久性試験条件

Column size: 4.6x150 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/1.0% TFA, pH1=10/90  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 80 °C

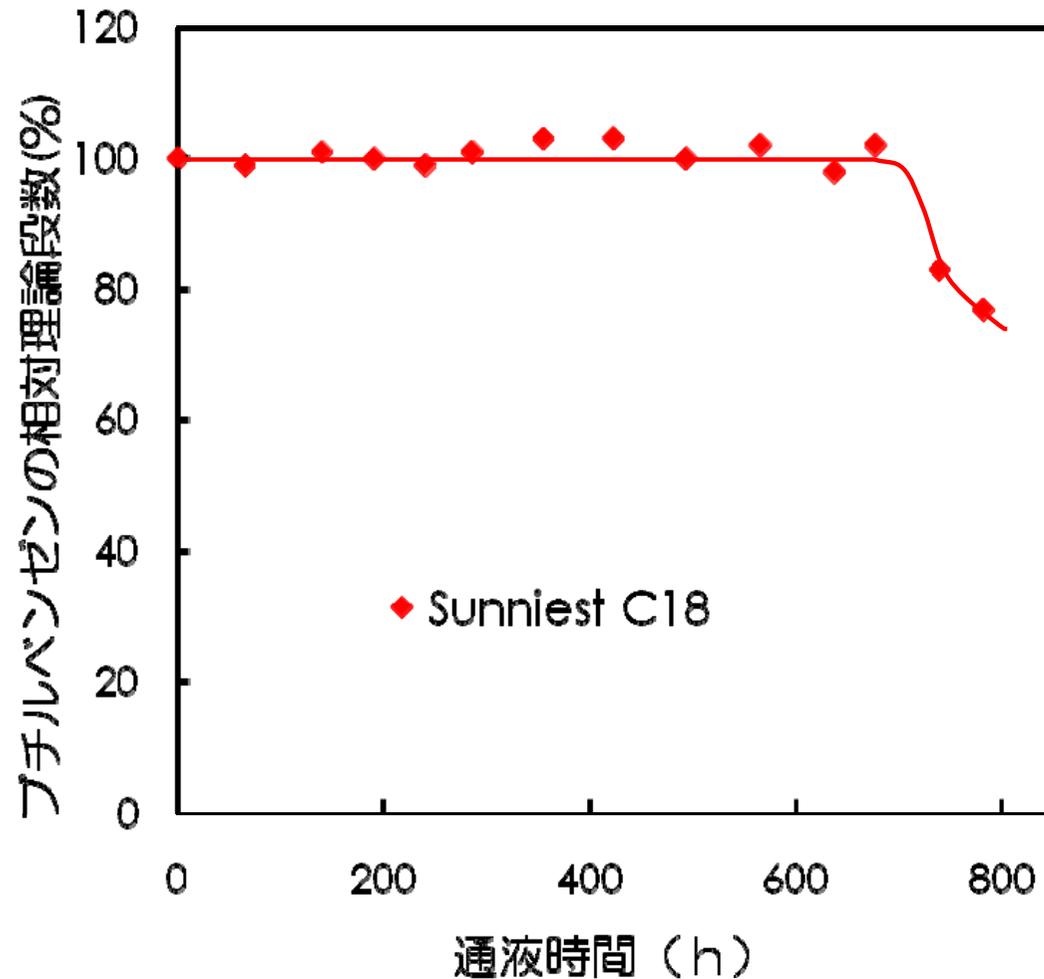
### 保持時間測定条件

Column size: 4.6x150 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=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 $\mu$ m  
4.6x150 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

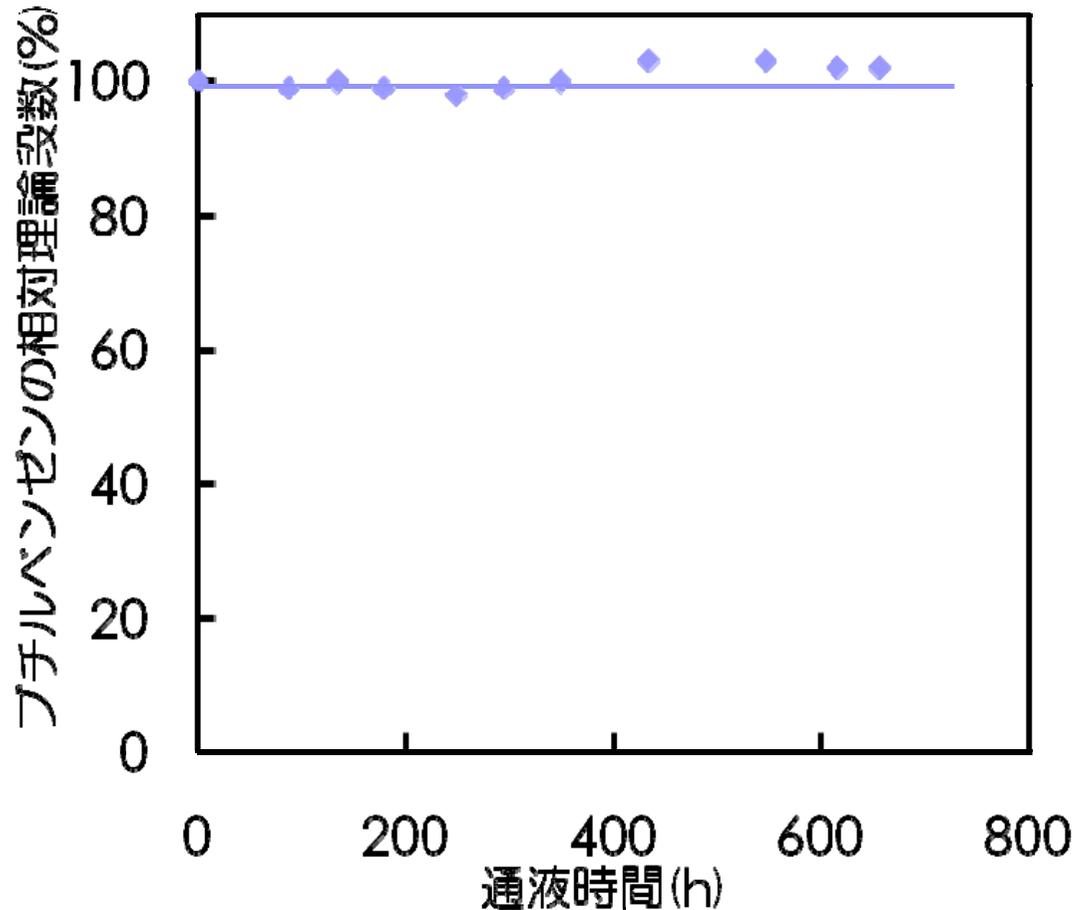
### 理論段数測定条件

Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 $\mu$ m  
4.6x150 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

# 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 $\mu$ m  
4.6x150 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 C8, 5mm  
4.6x150 mm

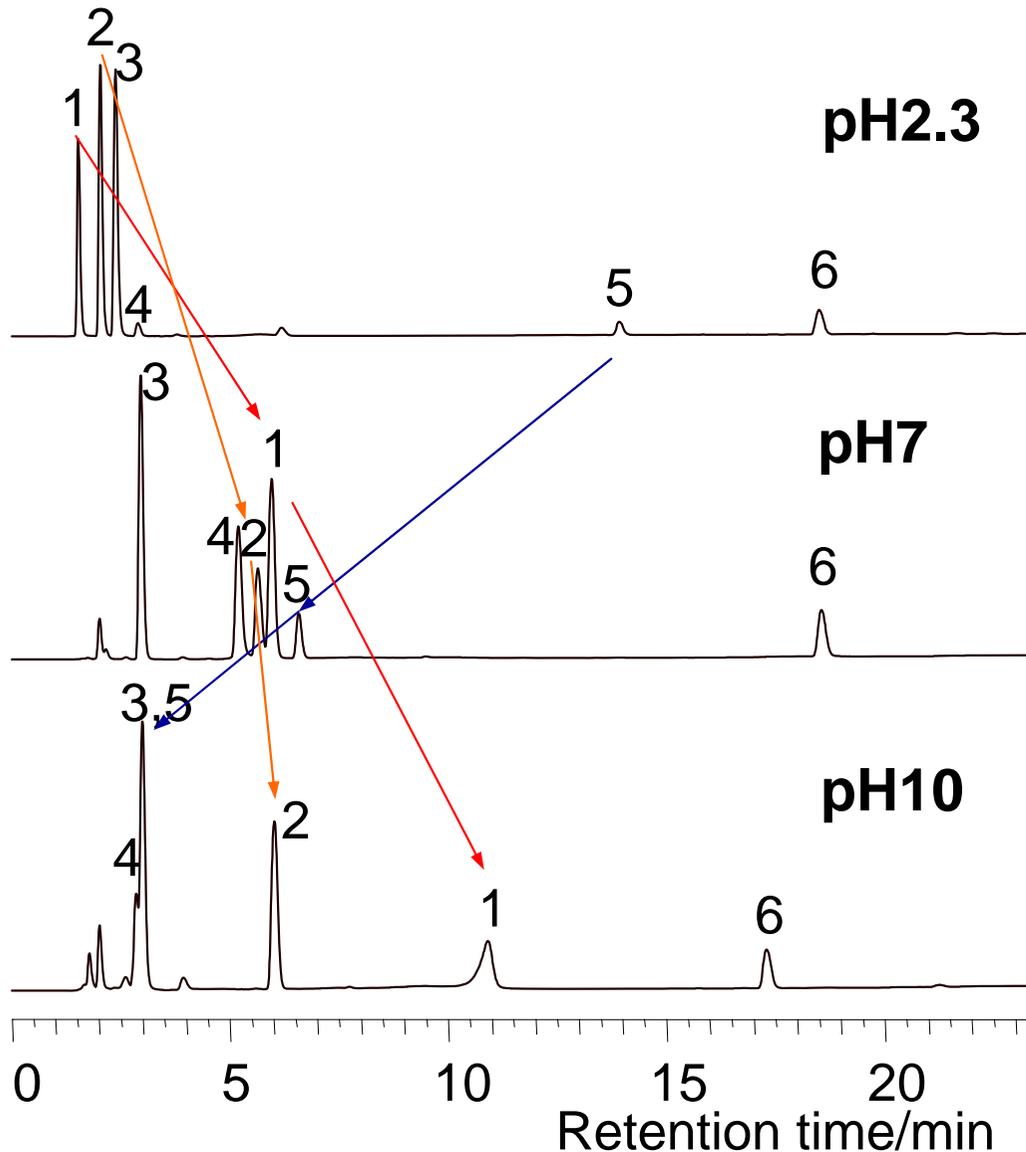
Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Butylbenzene

# リン酸緩衝液によるpH選択性



Column: Sunniest C18 HMODTS, 5  $\mu$ 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 B<sub>1</sub>

2 = Nicotinamide

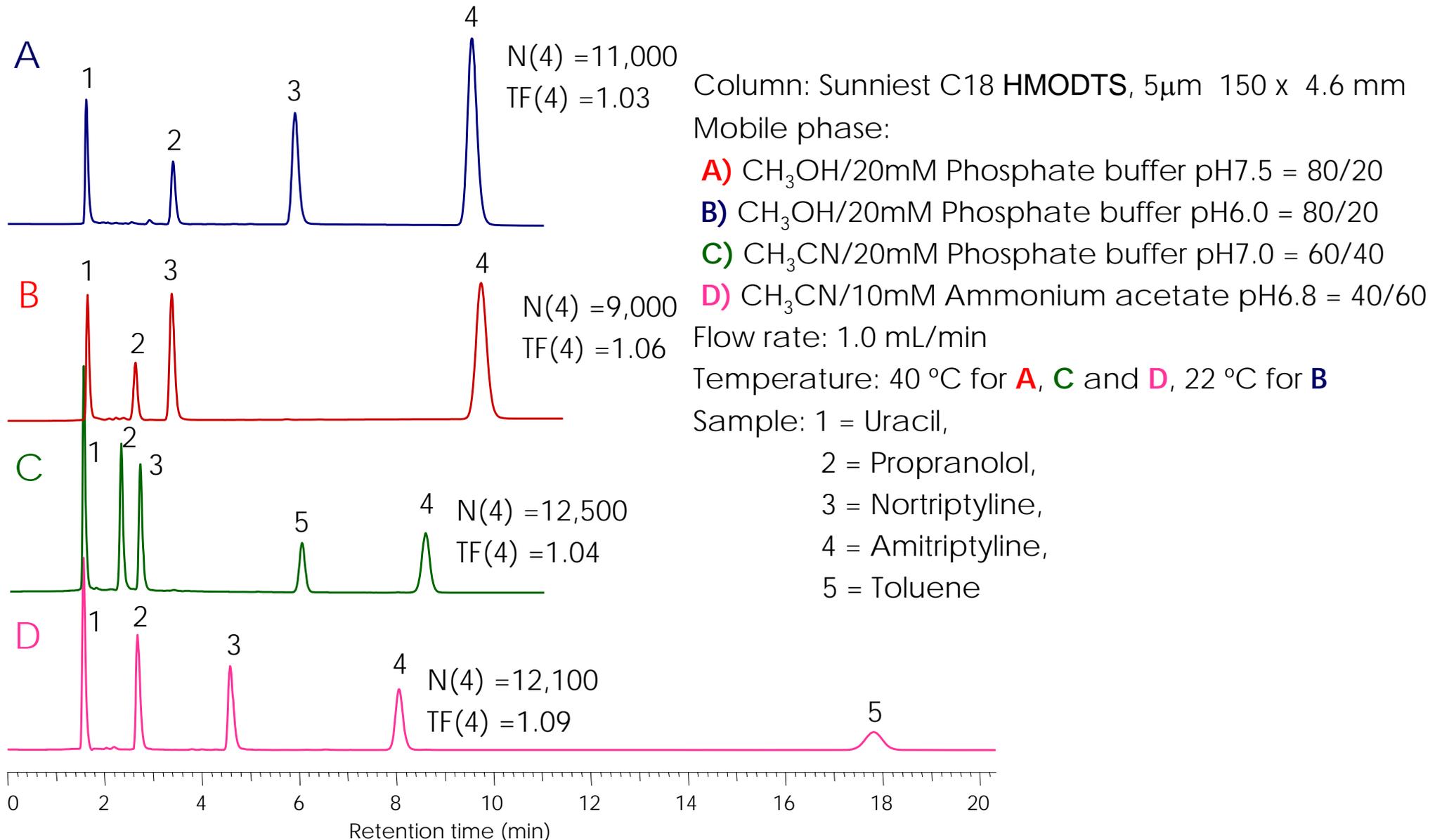
3 = Nicotinic acid

4 = Pyridoxine HCl Vitamin B<sub>6</sub>

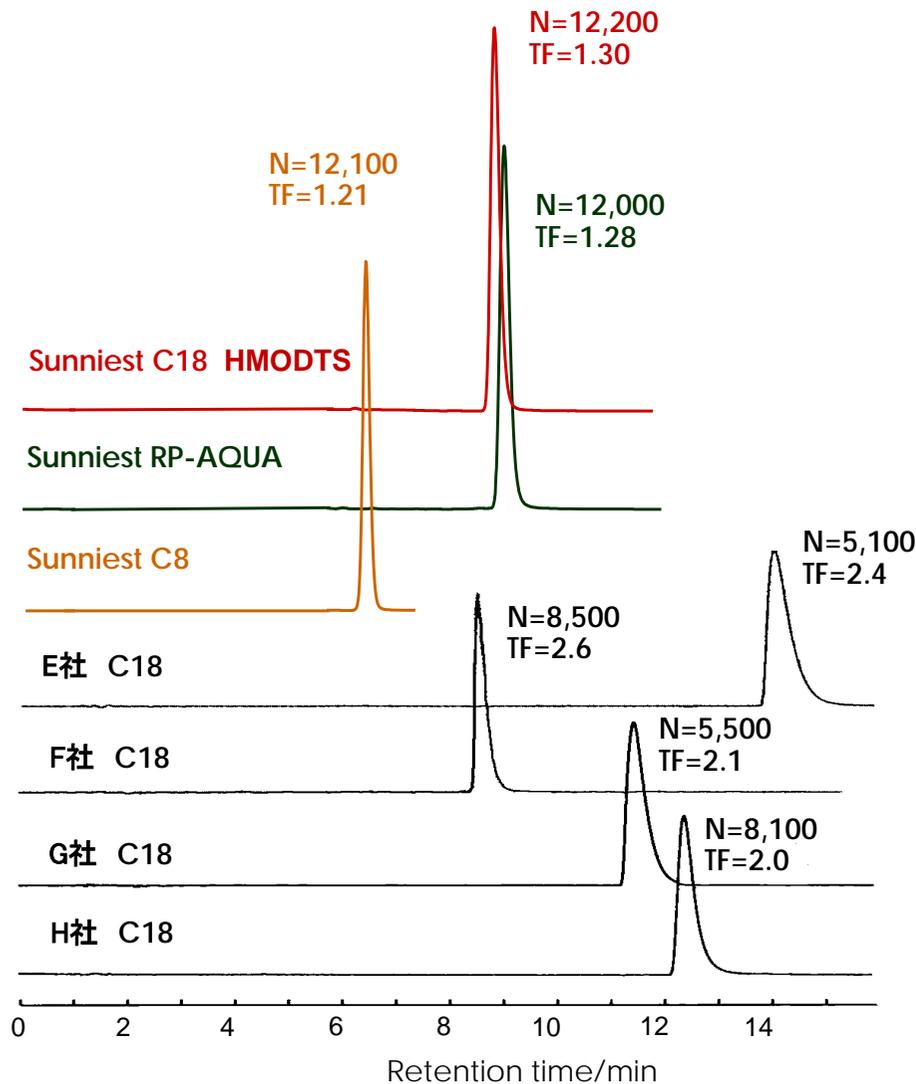
5 = Folic acid

6 = Riboflavin Vitamin B<sub>2</sub>

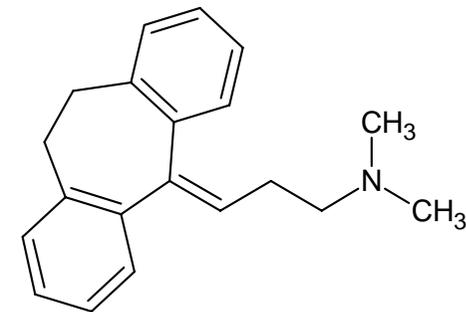
# 移動相の異なる条件でのアミトリプチリンのピーク比較



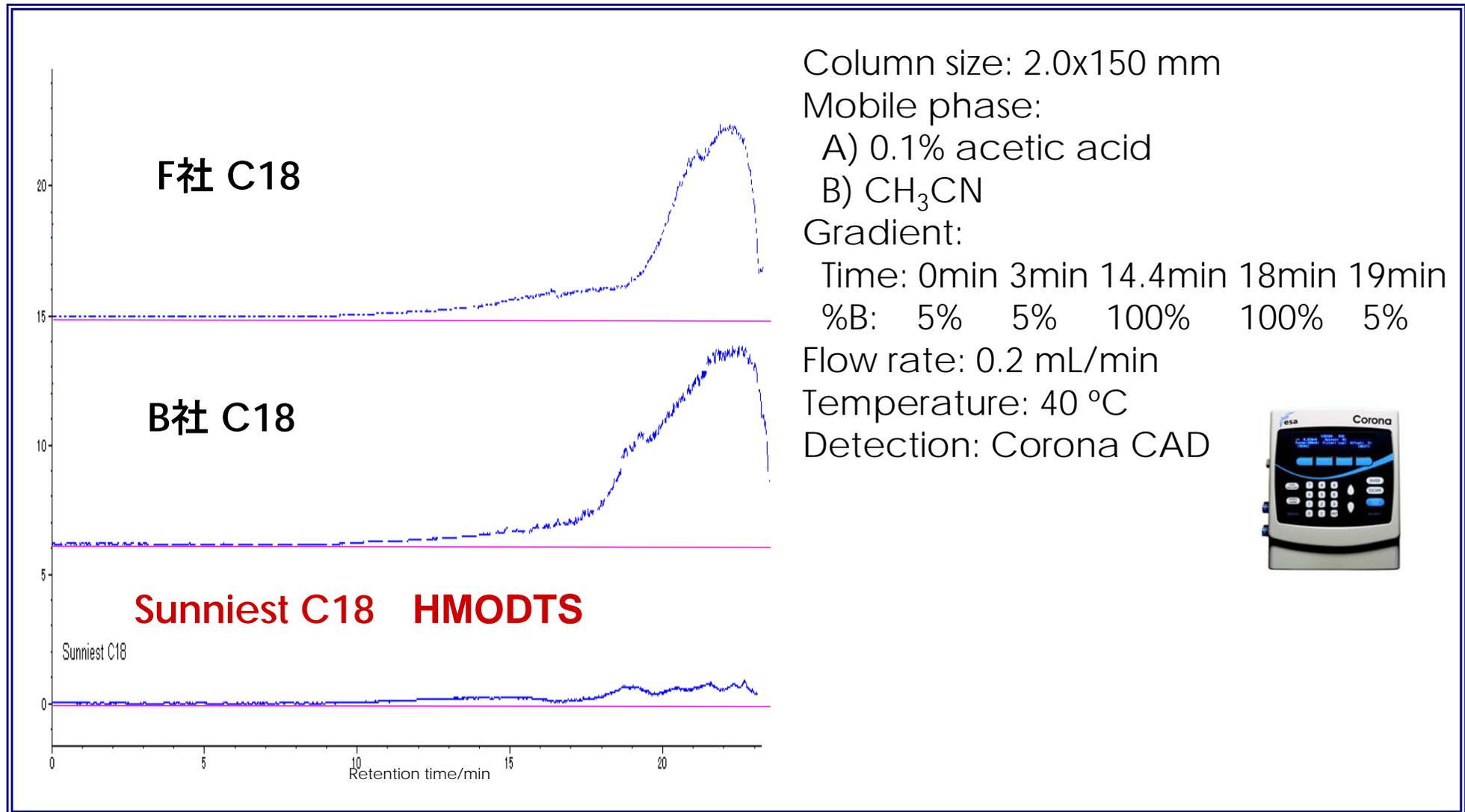
# 他社との比較



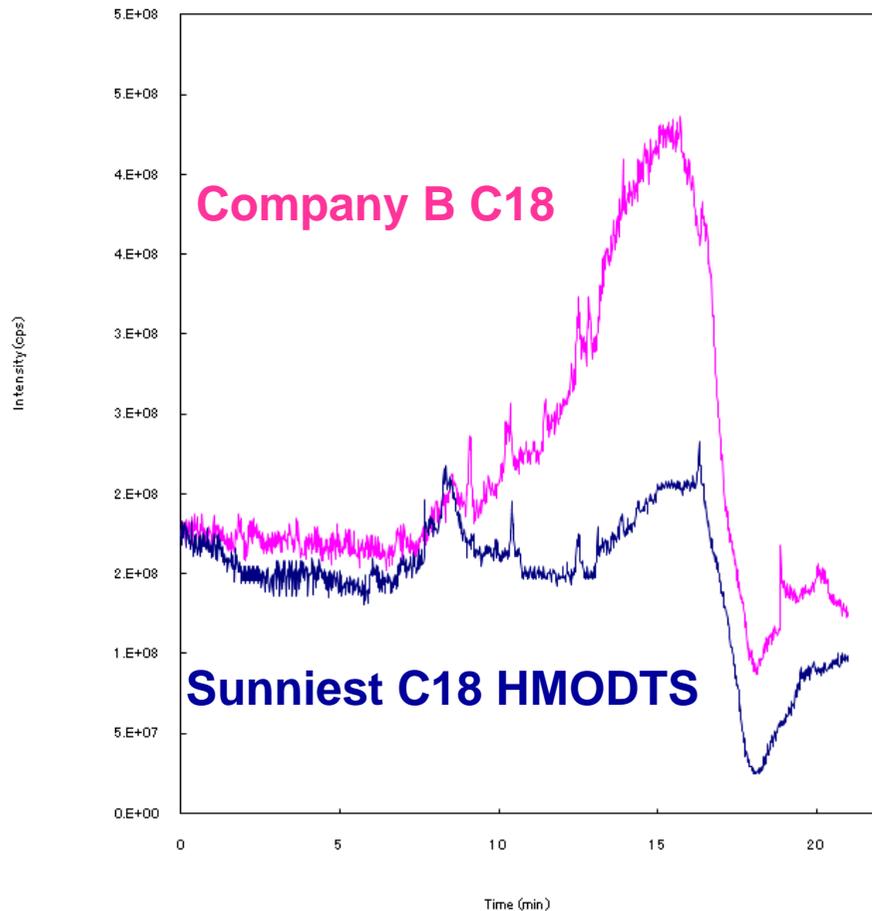
Column size: 4.6x150 mm  
 Particle size: 5 $\mu$ m  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/10mM Ammonium acetate  
 pH6.8=40/60  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Sample: Amitriptyline



# 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



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)

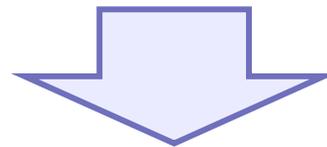
Measurement mode:

Q1 Scan m/z 100-1000

# 0.1% ギ酸移動相での平衡化

## 問題点

- ・イオン強度の低い酸性条件(LC/MS用の移動相)において、一般のC18固定相は塩基性化合物の保持時間は数時間かけて、徐々に減少し、**安定するまでに時間がかかる**
- ・C18固定相内に微量に残存しているシラノール基は、C18アルキル基の疎水場の中に存在するため、シラノール基が平衡状態になるまでに**数時間から十数時間**かかる また試料過負荷時に分配比の移動相へのずれが大きく、**ピーク形状は直角三角形**に近い形状になり、早く溶出するようになる



## 解決方法

- ・固定相内部に存在するシラノール基を極力減らすことにより、シラノール基そのものの影響を排除する

**Sunniest C18**

- ・粒子表面のイオン化を高め、疎水場の中にシラノール基が存在していても、シラノール基の周りのイオン化表面により、シラノール基の状態の平衡化を速くさせる充填剤も提案されている

# Problems in acidic, low-ionic strength condition from poster (P-631) by Waters at HPLC 2010

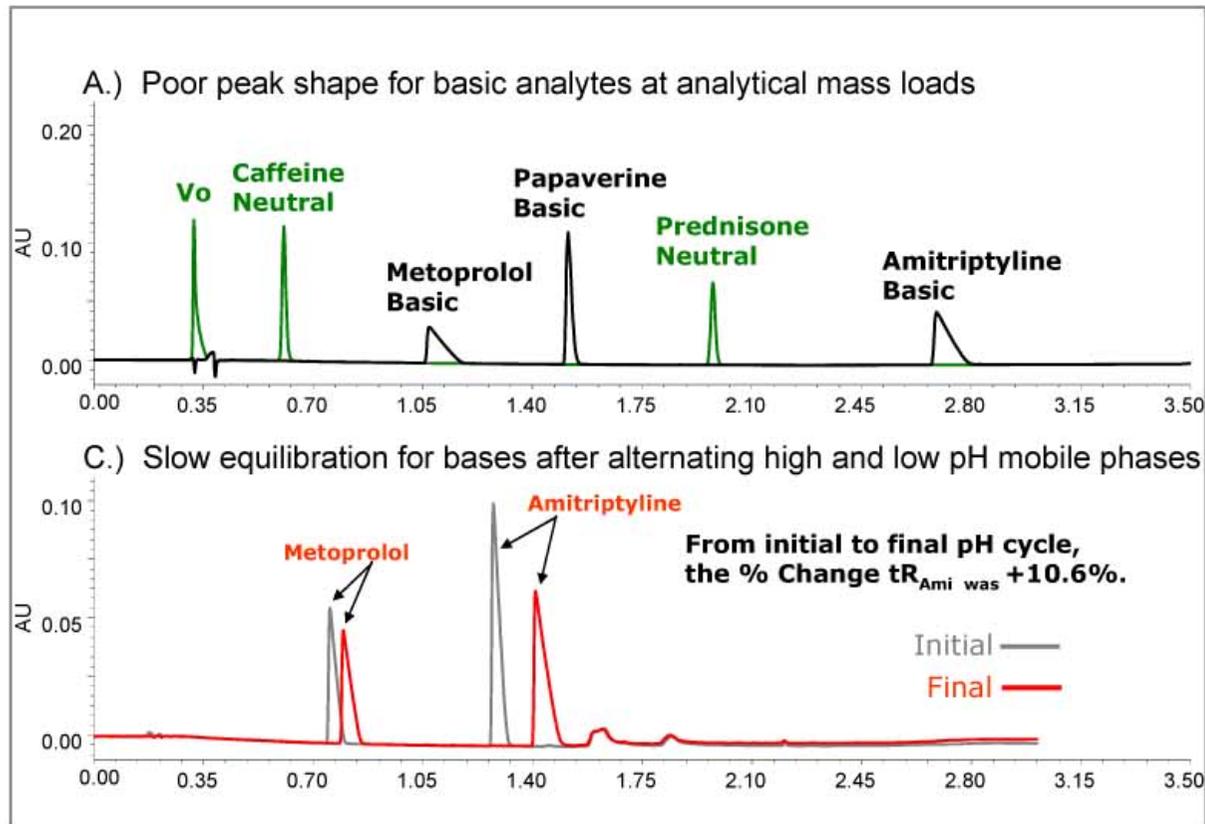


Figure 1. Performance issues observed on high purity supports using low ionic strength acidic mobile phase systems.

A.) Peak Capacity Conditions, C.) High & Low pH Mobile Phase Conditions

1. McCalley, D. V. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1075*, 57.

2. (a) Gilroy, J. J.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 757. (b) Marchand, D.H., Williams, L.A., Dolan, J.W., L.R. Snyder, L.R. *J. Chromatogr. A*, **2003**, *1015*, 53.

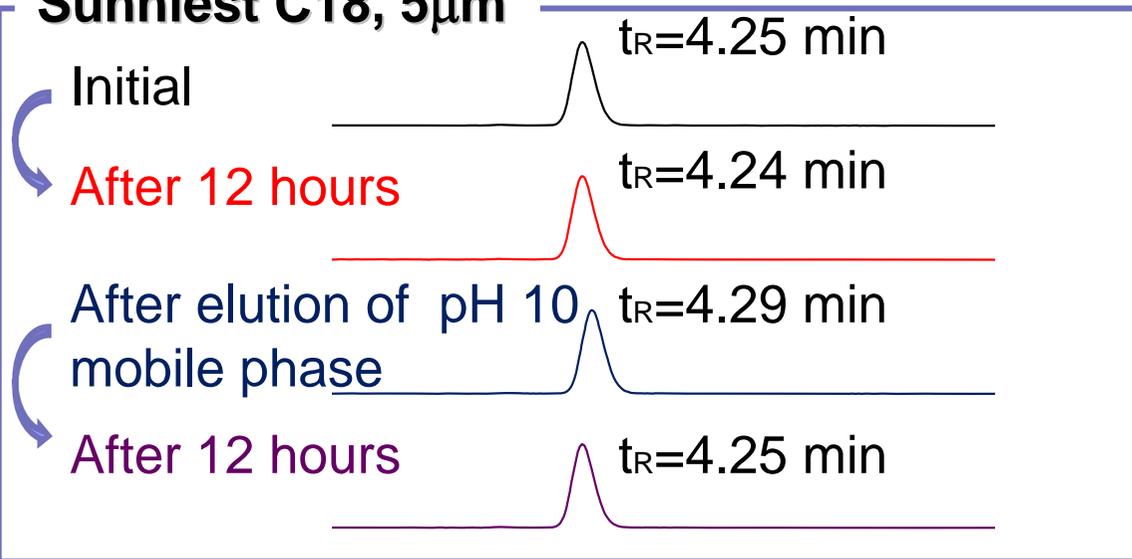
Two of the performance issues for high purity silica and hybrid supports that are most evident in acidic, low-ionic-strength mobile phases, are poor peak shape<sup>1</sup> for analytical mass loads of basic analytes, and slow equilibration for basic analytes when materials are exposed to alternating high and low pH mobile phases.<sup>2</sup> (Figure 1)

It was hypothesized that the absence of a controlling surface charge at low pH on high purity supports was the cause of the unexpected column performance.

For high purity hybrid and silica-based reversed phase materials, the surface charge of the particle is near zero at about pH 3. Near this pH, even small changes in surface charge have a large impact on the peak shape and retention of ionized compounds.

# 0.1%ギ酸酸性条件での 塩基性化合物の保持の安定性

## Sunniest C18, 5 $\mu$ m



Condition

Column size: 4.6x 150 mm

Mobile phase: Acetonitrile/0.1% formic acid (30:70)

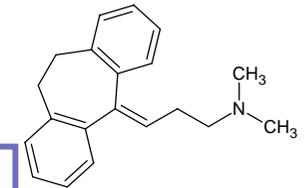
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

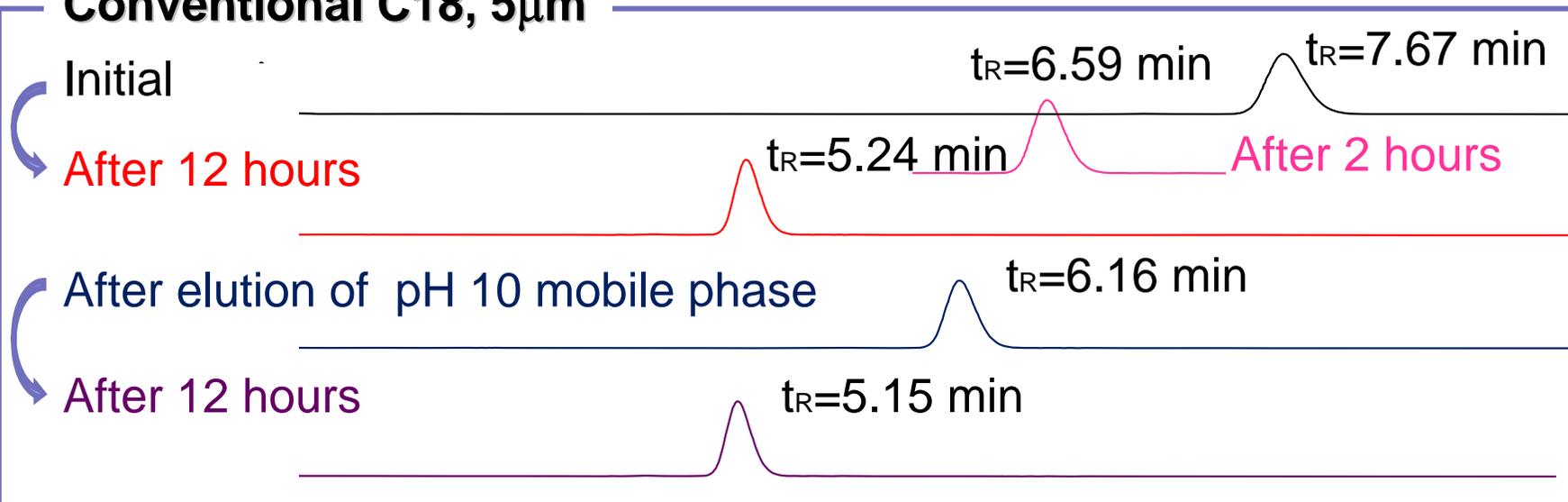
Detection: UV@250nm

Sample: Amitriptyline (0.27mg/mL)

Injection Volume: 0.2  $\mu$ L

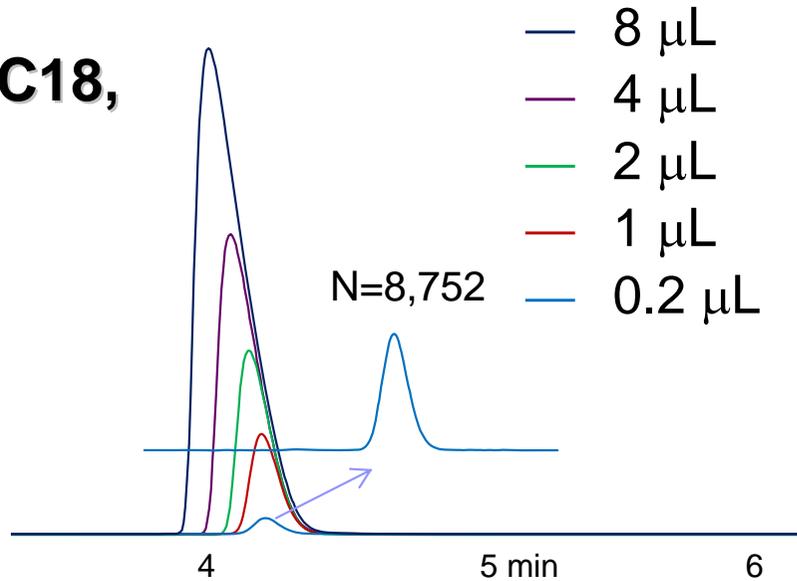


## Conventional C18, 5 $\mu$ m



# 0.1%ギ酸酸性条件での アミトリプチリンの負荷量

**Sunniest C18,  
5 $\mu$ m**



Condition

Column size: 4.6x 150 mm

Mobile phase: Acetonitrile/0.1%  
formic acid (30:70)

Flow rate: 1.0 mL/min

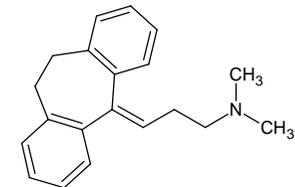
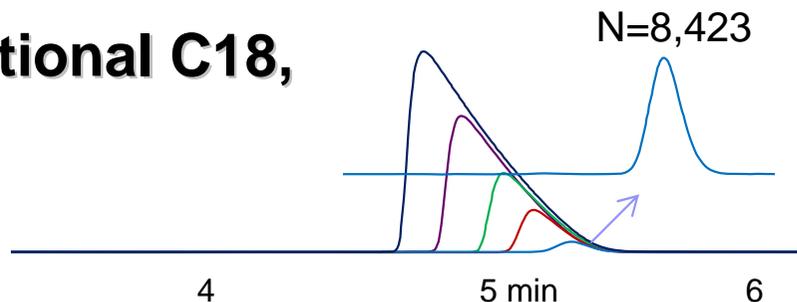
Temperature: 40 °C

Detection: UV@250nm

Sample: Amitriptyline (0.27mg/mL)

Injection Volume: 0.2, 1, 2, 4 and 8  $\mu$ L

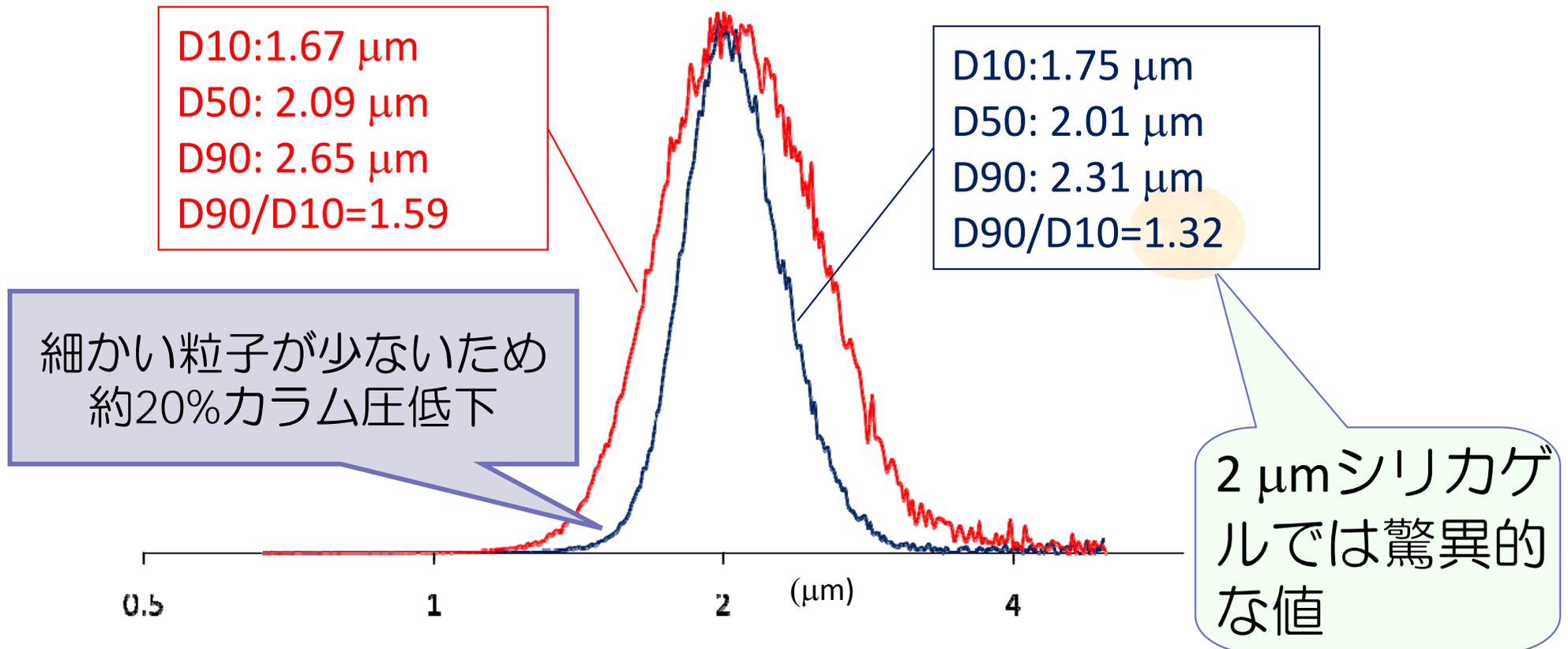
**Conventional C18,  
5 $\mu$ m**



イオン強度の低い酸性条件ではアミトリプチリンの様な塩基性化合物は0.5 $\mu$ g程度の注入であれば十分な段数が得られます. 過負荷になった状態では, 残存シラノール基の影響がほとんどないSunniest C18は一般C18に比べてテーリングも少なく, ピークがシャープになります.

# 2 $\mu$ 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



# カラム耐圧

一般の5, 3 $\mu$ mと同じ物性の2 $\mu$ mシリカ

↳ カラム長さ30mmから50mmでの耐圧は50MPa程度

55MPaの充填圧では2.1x50mmには約100mg充填される

Sunniest C18-HT 2 $\mu$ mは、骨格の太い高耐圧シリカゲルを採用

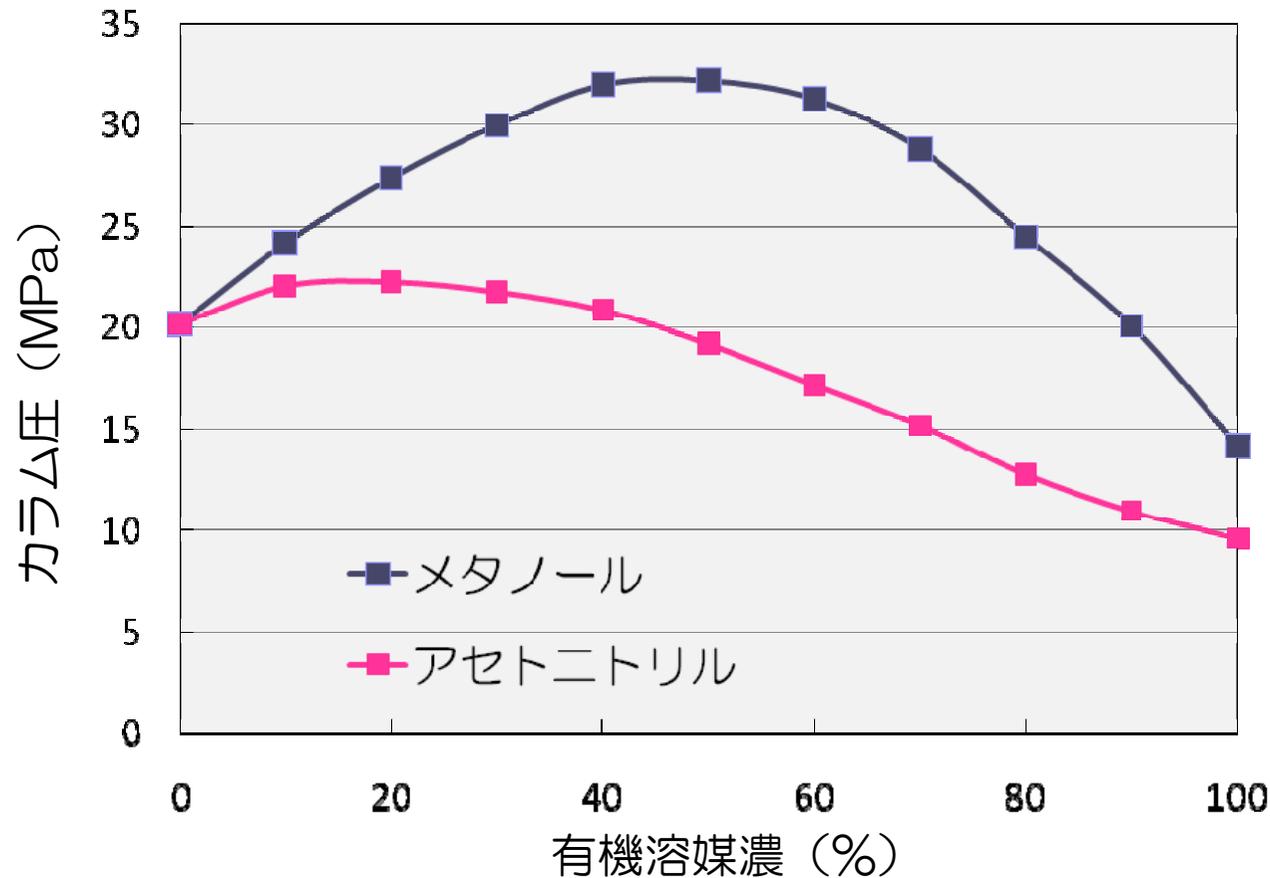
↳ 耐圧は70MPa以上になる

75MPaの充填圧では2.1x50mmには約104mg充填される

4%分凹みやすい

カラム圧20%上昇

# 有機溶媒と水移動相を用いたカラム圧



他社2 $\mu$ mカラム  
と同等

Column: Sunniest C18, 2 $\mu$ m (Prototype) 50 x 2.0 mm

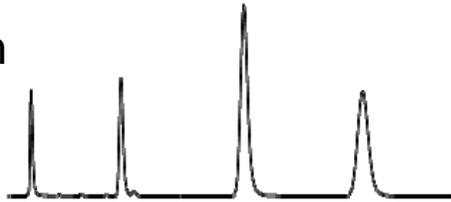
Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O

Flow rate: 0.5 mL/min

Temperature: 40 °C

# 2 μmカラムの理論段数比較

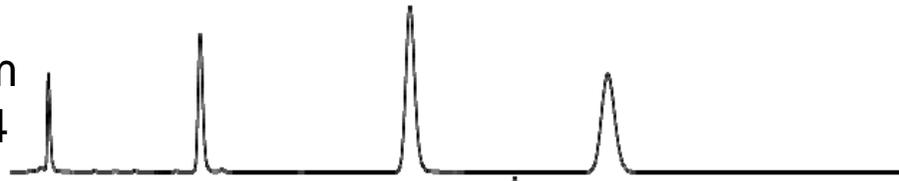
2.1 x 30 mm  
N(3)= 5,375



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

Flow rate: 0.6 mL/min for 2.1 x 30 mm  
and 2.1 x 50 mm

2.1 x 50 mm  
N(3)= 9,294

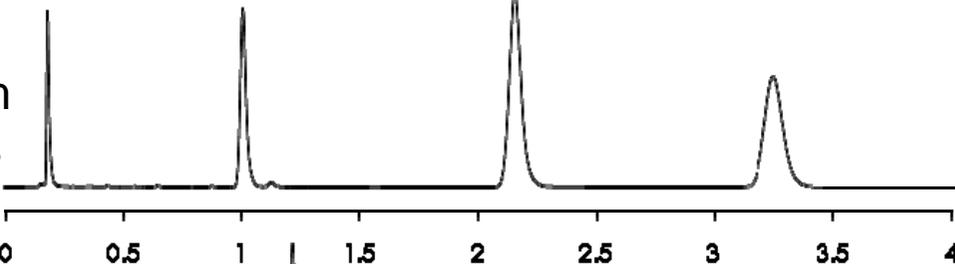


1.0 mL/min for 3.0 x 50 mm

0.4 mL/min for 2.1 x 75 mm

and 2.1 x 100 mm

3.0 x 50 mm  
N(3)= 9,303



Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

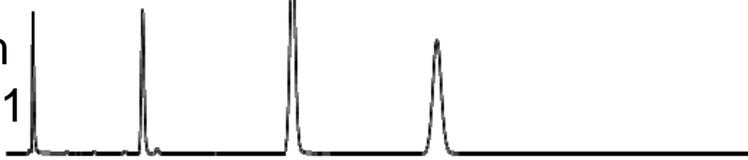
Sample: 1=Uracil,

2=Toluene,

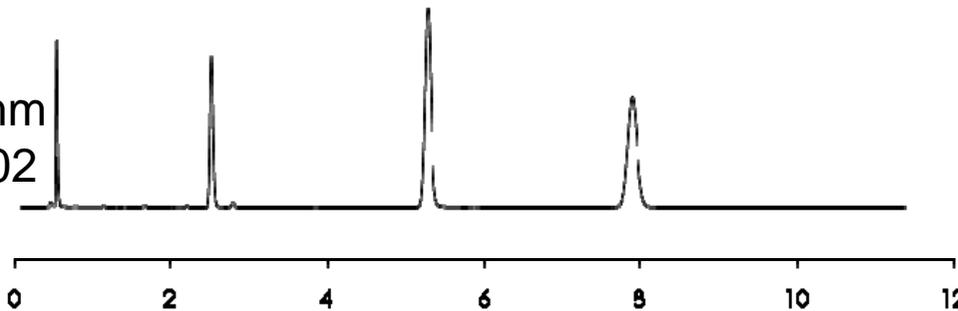
3=Acenaphthene,

4=Butylbenzene

2.1 x 75 mm  
N(3)= 14,021

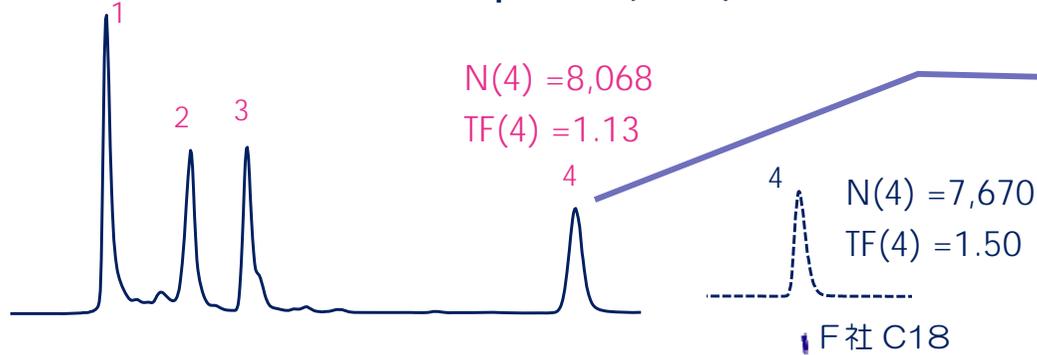


2.1 x 100 mm  
N(3)= 19,802

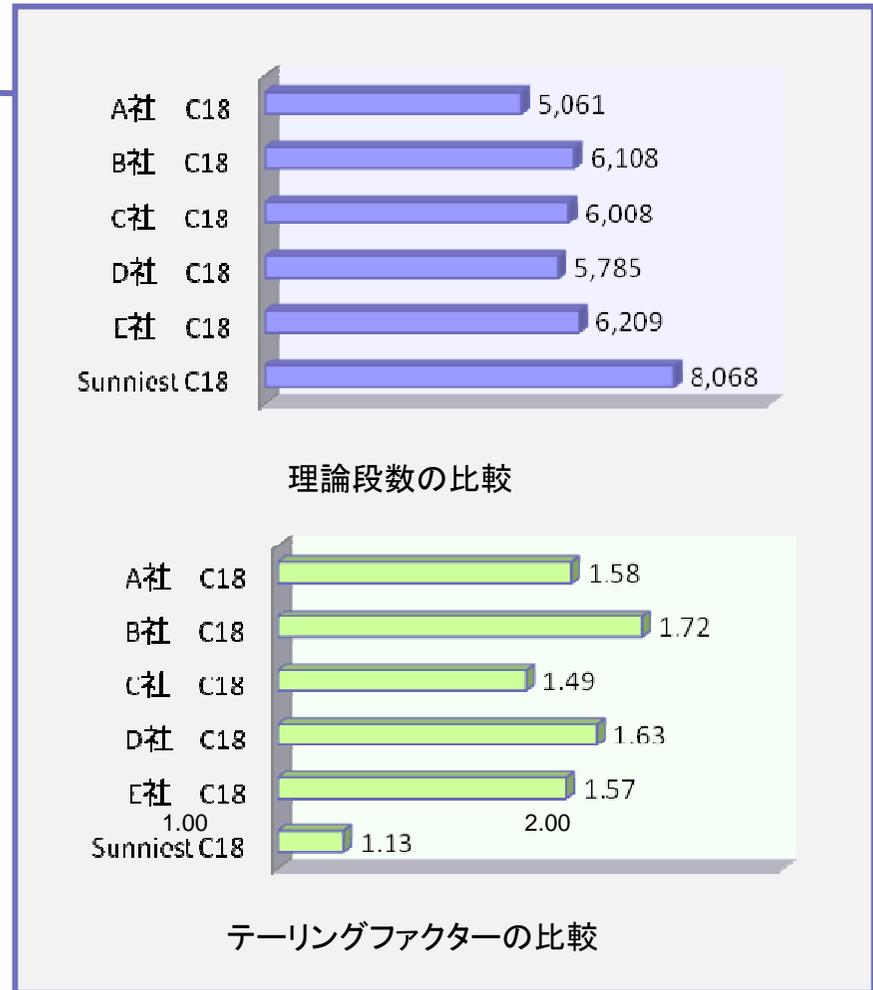
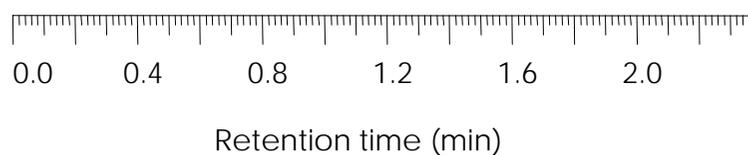
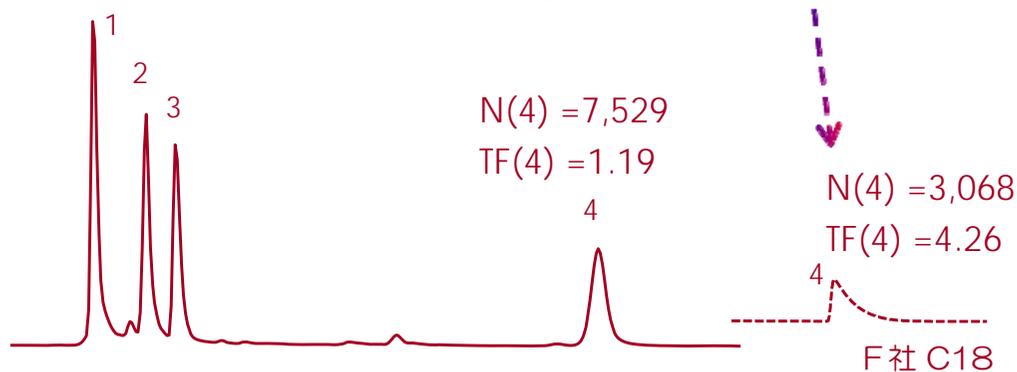


# 2 μm 充填剤も同様な表面処理

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)



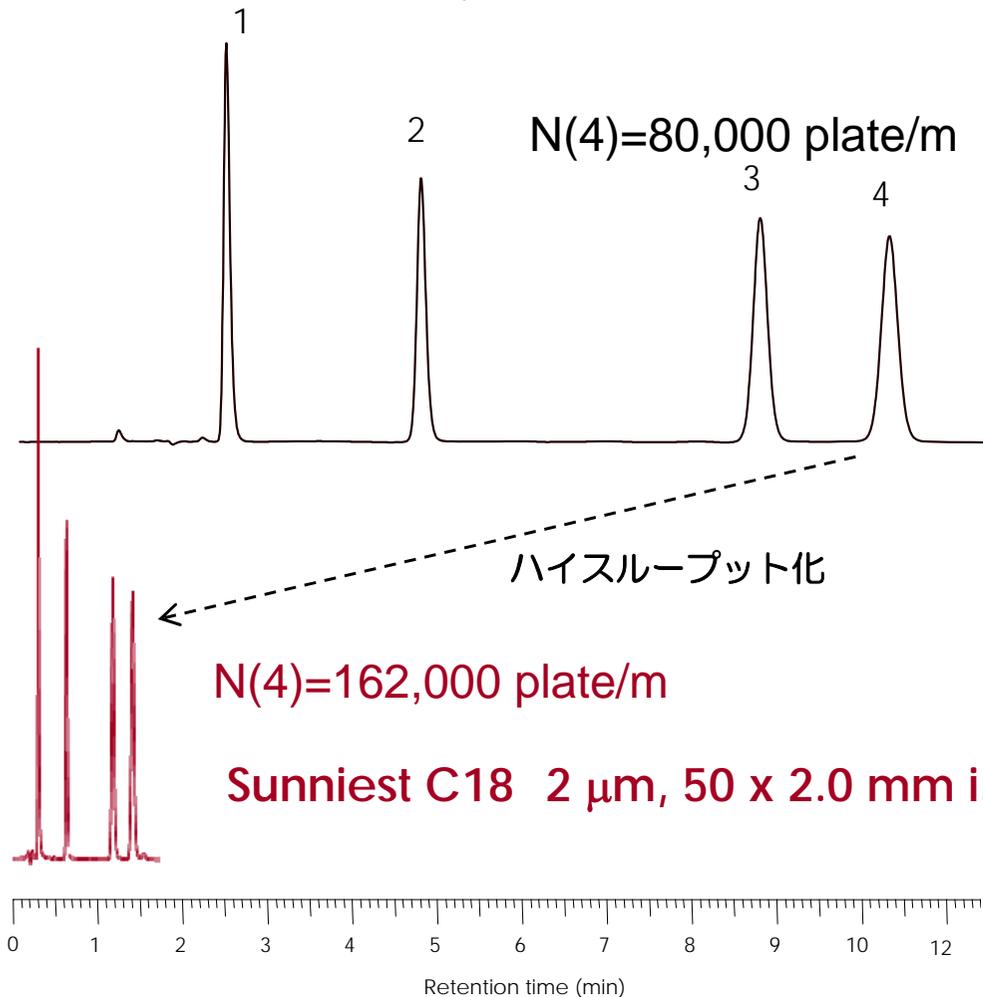
Column: Sunniest C18 HMODTS, 2 μm 2.0 x 50 mm, Temperature: 40 °C

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:

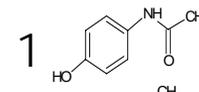
CH<sub>3</sub>CN/0.1% Formic acid = 20/80

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

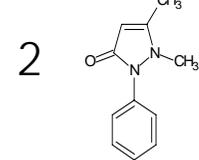
**0.6 mL/min for 50 x 2.0 mm i.d.**

Temperature: 40 °C

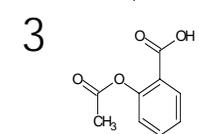
Detection: UV@230 nm



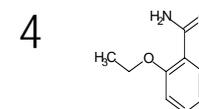
Acetaminophen



Antipyrine



Aspirin



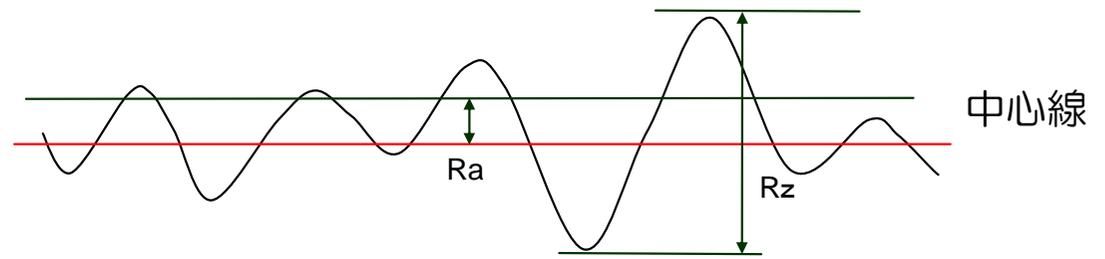
Ethenzamide

# カラム本体内面の表面粗さ

表面粗さを表すパラメータ

Ra: 中心線平均粗さ

Rz: 十点平均粗さ（断面曲線から基準長さだけを抜き取った部分において、最高から5番目までの山頂の標高の平均値と、最深から5番目までの谷底の標高の平均値との差の値）

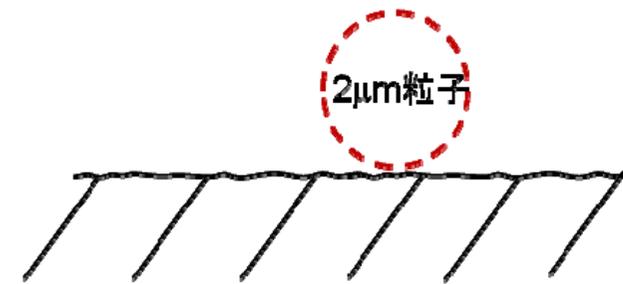


表面粗さを示す概略図

	A社	B社	C社	D社	E社	クロマニック テクノロジーズ
Ra	0.34 $\mu\text{m}$	0.32 $\mu\text{m}$	0.37 $\mu\text{m}$	0.03 $\mu\text{m}$	0.20 $\mu\text{m}$	0.01 $\mu\text{m}$
Rz	1.88 $\mu\text{m}$	1.62 $\mu\text{m}$	1.91 $\mu\text{m}$	0.19 $\mu\text{m}$	0.90 $\mu\text{m}$	0.10 $\mu\text{m}$



A, B, C社のカラム内面



クロマニックテクノロジーズのカラム内面

# ★Sunniest C18-HT 2 μmの価格

長さ(mm)	30		50		75		100		
内径(mm)	型番	価格(円)	型番	価格(円)	型番	価格(円)	型番	価格(円)	
2.1	EB1931	<del>68,000</del>	EB1941	<del>68,000</del>	EB1951	<del>68,000</del>	EB1961	<del>68,000</del>	
2.1	EB1931	<b>47,600</b>	EB1941	<b>47,600</b>	EB1951	<b>47,600</b>	EB1961	<b>47,600</b>	キャンペーン価格
3.0	EB1331	<del>68,000</del>	EB1341	<del>68,000</del>	EB1351	<del>68,000</del>	EB1361	<del>68,000</del>	
3.0	EB1331	<b>47,600</b>	EB1341	<b>47,600</b>	EB1351	<b>47,600</b>	EB1361	<b>47,600</b>	キャンペーン価格

※ 上表以外のサイズに関しても製造可能です。詳細は(株)クロマニックテクノロジーズまでお問合せ下さい。上記価格に消費税は含まれておりません。

**発売記念キャンペーンセール**

期間：2010年4月1日～2011年3月31日

**30% off**



# 【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た
- CSH技術を用いなくても酸性低イオン強度条件下で塩基性化合物の分離を改善させることができた
- 2 $\mu$ m粒子を用いることにより高速分析が達成された