

エチレン鎖をシリカ骨格内に導入した ハイブリッド型シリカ基材を用いた新規C18カラム

○長江 徳和, 小山 隆次, 塚本 友康
(クロマニックテクノロジーズ)

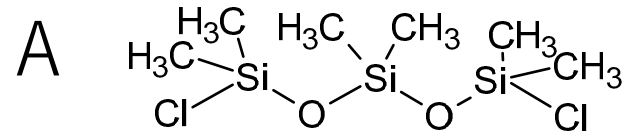
3種類のシリカゲル基材と二種類の エンドキャッピングでC18カラムの耐久性を比較

シリカゲル基材

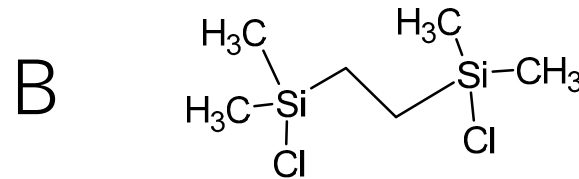
1. ハイブリッドシリカ①
2. ハイブリッドシリカ②
3. シリカゲル

X

エンドキャッピング



Hexamethyldichlorotrisiloxane

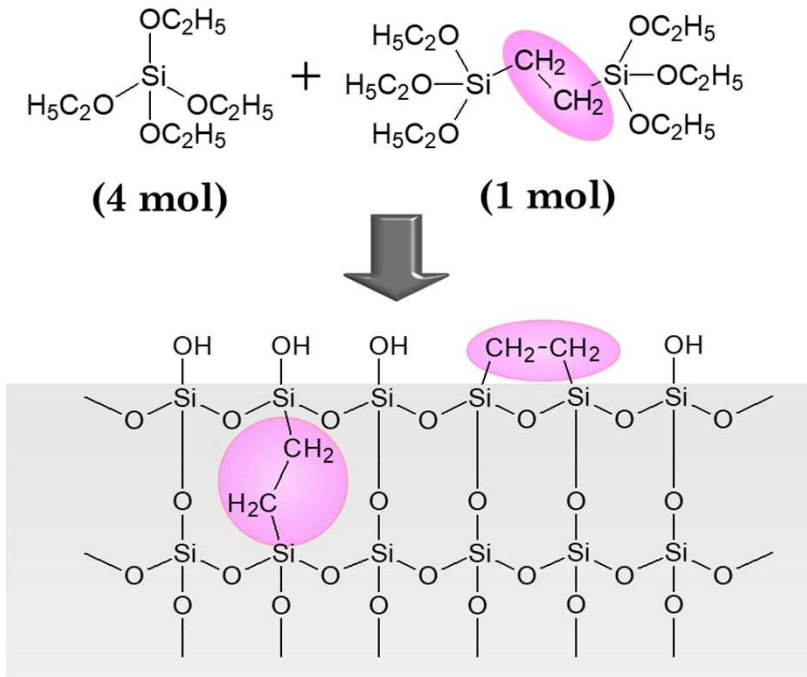


1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethane

※ 6種類のC18充填剤を試作し、評価した。

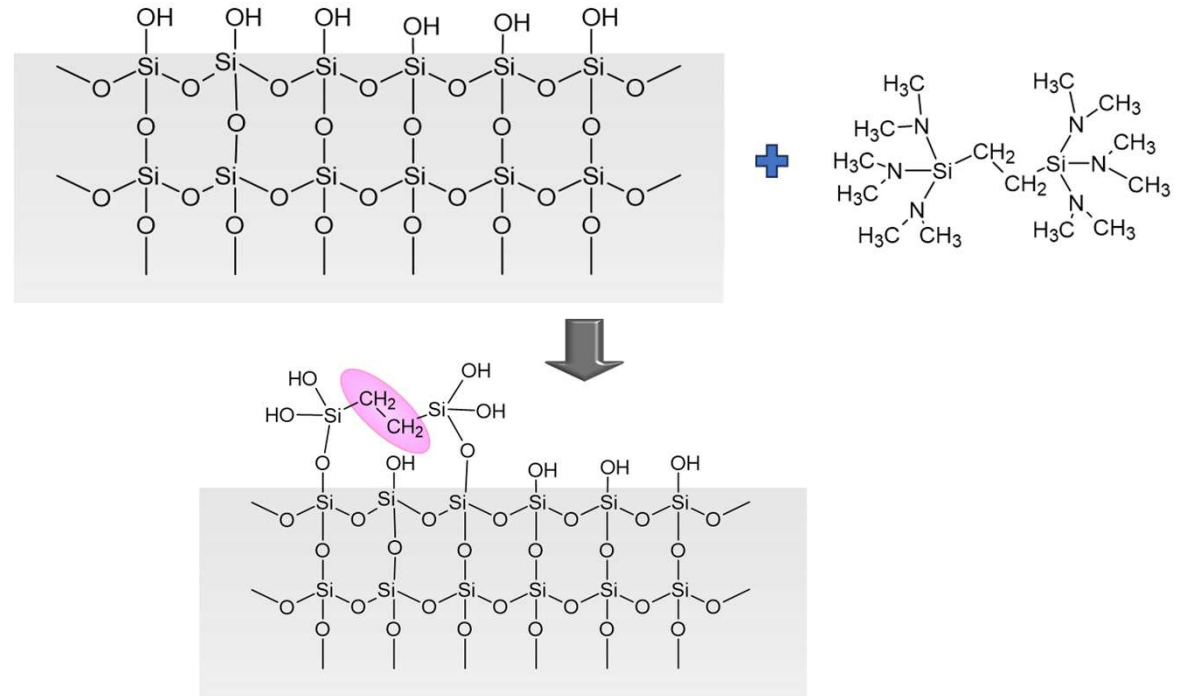
1. ハイブリッド①

シリカゲル骨格内にエチレン鎖導入



2. ハイブリッド②

シリカゲル表面にエチレン鎖結合



1) ゼルゲル法で有機シリカゲルを形成

2) シリカ表層に有機シリケート層を形成

【発明の名称】 クロマトグラフィー分離のための多孔質有機・無機ハイブリッド粒子、及びそれらの製造法

【出願日】 平成14年8月7日(2002・8・7)

【出願人】 【氏名又は名称】 ウォーターズ・インヴェストメンツ・リミテッド

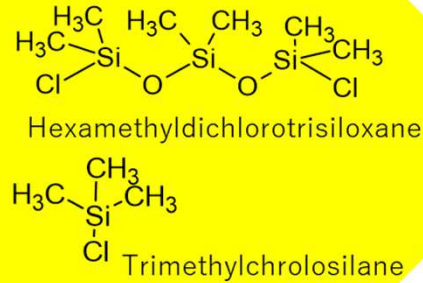
【発明の名称】 テンプレートッド多層有機/無機グラフィティングを用いたpH安定クロマトグラフィー媒体

【出願日】 平成17年9月31日(2005・9・30) 特許出願のみで成立していない

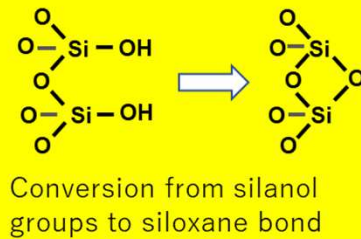
【出願人】 【氏名又は名称】 フェノメネックス インコーポレイテッド

2種類のエンドキャッピングシリル化試薬

ダブルエンド
キャッピング
Double
end-capping



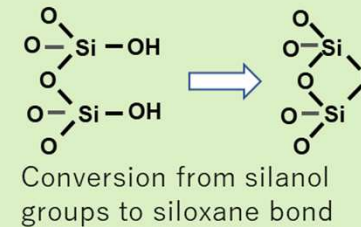
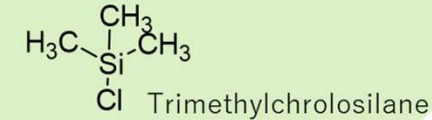
高温反応
Elevated
temperature
end-capping



A-type endcapping

Hexamethyldichlorotrisiloxane

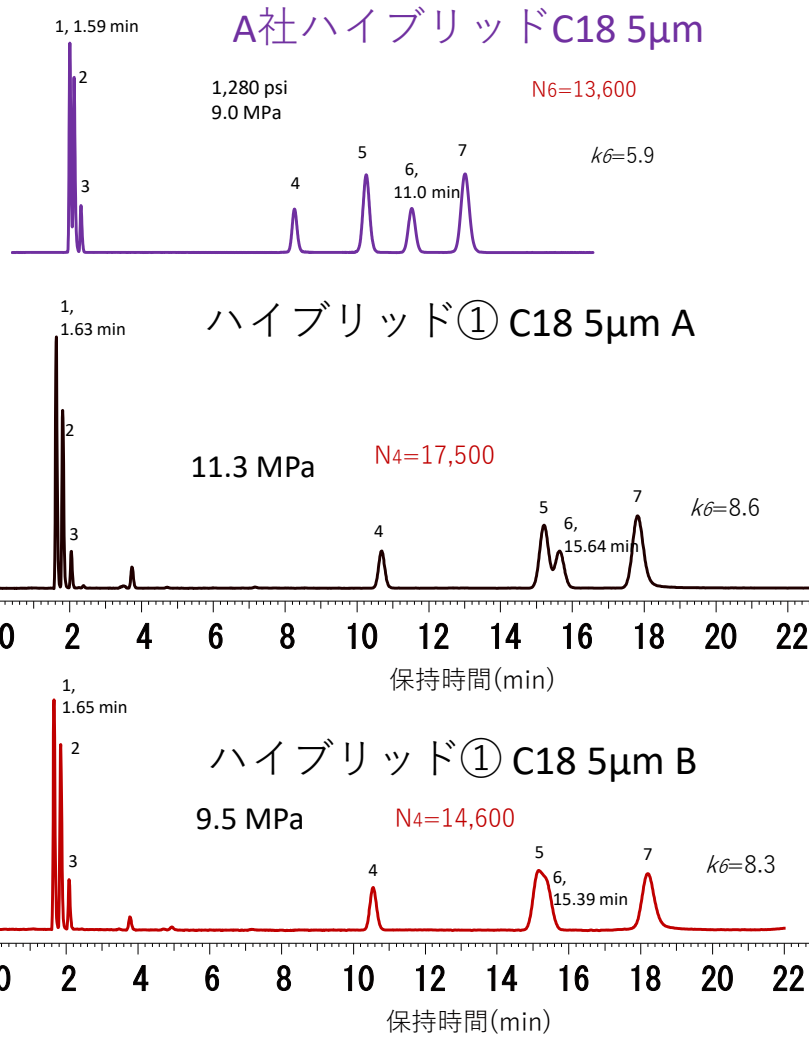
1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethane



B-type endcapping

1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethane

6種類のC18の比表面積と炭素含有量および標準試料での分離比較

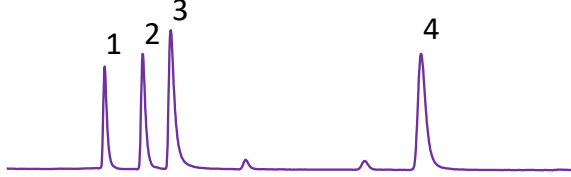


Column dimension: 150 x 4.6 mm:
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample: 1 = Uracil
 2 = Caffeine
 3 = Phenol
 4 = Butylbenzene
 5 = o-Terphenyl
 6 = Amylbenzene
 7 = Triphenylene

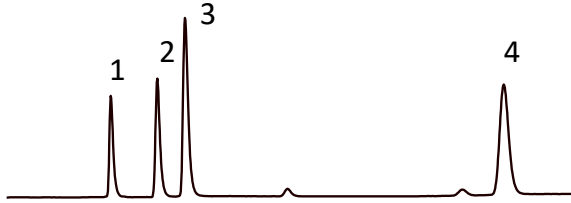
	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)	比表面積 (m ² /g)	炭素含有量
A社ハイブリッドC18 5 μ m	0.39	1.52	1.33	188	18.0%
ハイブリッド① C18 5 μ m A	0.43	1.55	1.19	209	15.9%
ハイブリッド① C18 5 μ m B	0.43	1.55	1.23	209	16.0%
ハイブリッド② C18 5 μ m A	0.40	1.54	1.35	332	17.0%
ハイブリッド② C18 5 μ m B	0.40	1.56	1.39	332	17.2%
シリカゲルC18 5 μ m A	0.42	1.58	1.41	330	15.3%
シリカゲルC18 5 μ m B	0.43	1.60	1.29	330	15.9%

アミトリプチリンピークの比較 (リン酸緩衝液)

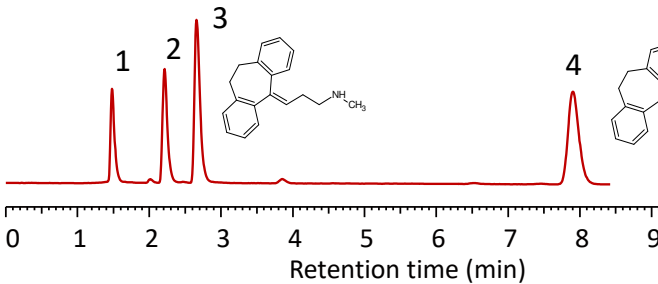
A社ハイブリッドC18 5 μ m



ハイブリッド① C18 5 μ m A

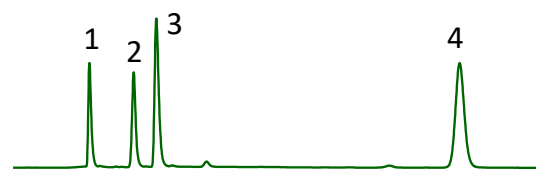


ハイブリッド① C18 5 μ m B

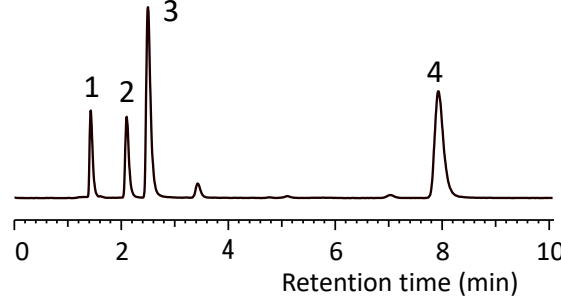


3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline

ハイブリッド② C18 5 μ m A



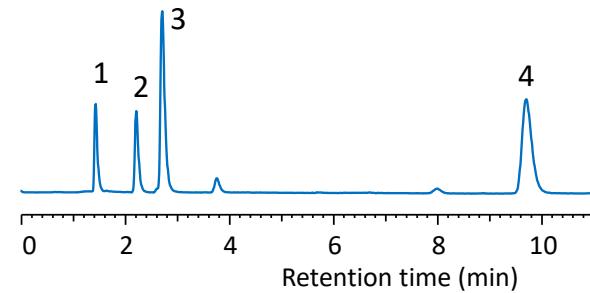
ハイブリッド② C18 5 μ m B



シリカゲル C18 5 μ m A



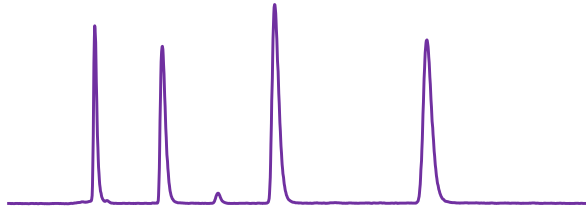
シリカゲルC18 5 μ m B



	Nortriptyline N	Nortriptyline TF	Amitriptyline N	Amitriptyline TF
A社ハイブリッドC18 5 μ m	4,138	2.25	13,097	1.60
ハイブリッド① C18 5 μ m A	5,992	1.59	14,032	1.22
ハイブリッド① C18 5 μ m B	5,865	1.55	12,350	1.23
ハイブリッド② C18 5 μ m A	5,376	1.50	12,164	1.15
ハイブリッド② C18 5 μ m B	4,818	1.63	11,343	1.43
シリカゲル C18 5 μ m A	6,323	1.51	12,922	1.14
シリカゲル C18 5 μ m B	5,451	1.54	12,724	1.34

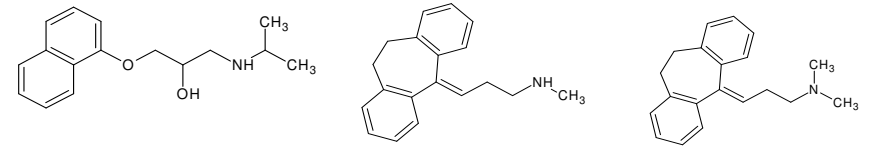
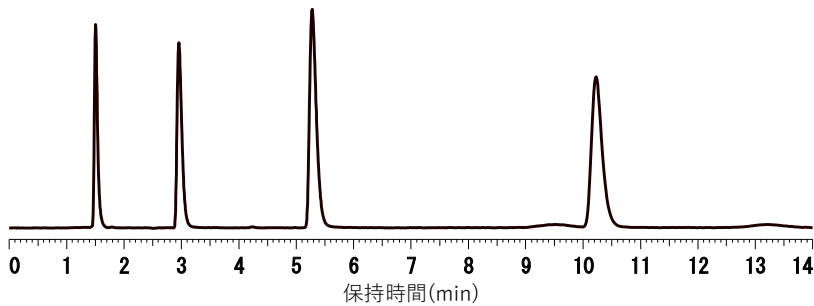
アミトリプチリンピークの比較（酢アン緩衝液）

A社ハイブリッドC18 5 μ m

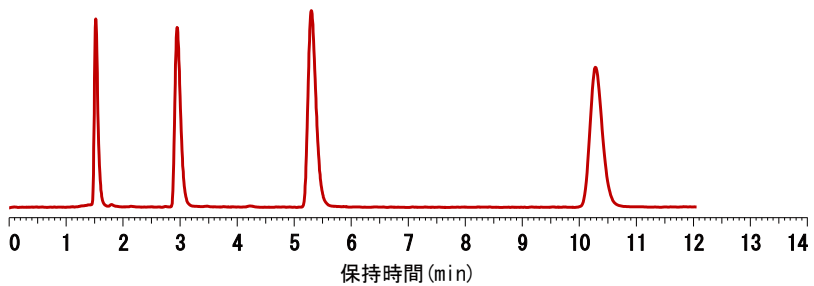


Column dimension: 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: Acetonitrile/10 mM ammonium acetate pH6.8=40/60
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@250 nm
 Sample: 1=Uracil, 2=Propranolol, 3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline

ハイブリッド① C18 5 μ m A



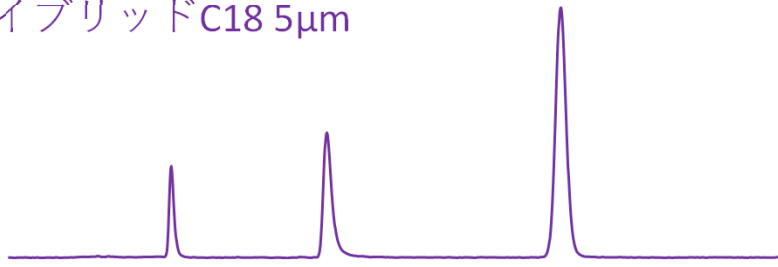
ハイブリッド① C18 5 μ m B



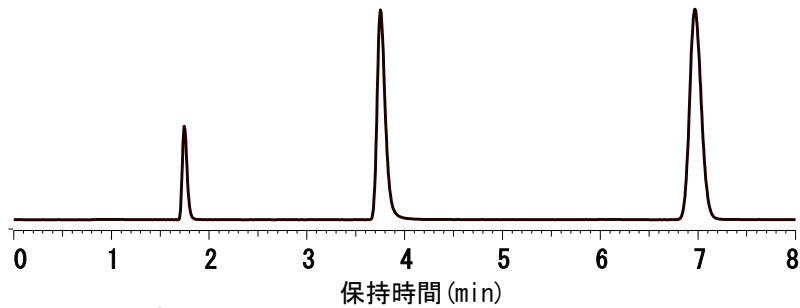
	Nortriptyline, N	Nortriptyline, TF	Amitriptyline, N	Amitriptyline, TF
A社ハイブリッドC18 5 μ m	6,916	1.68	10,694	1.48
ハイブリッド① C18 5 μ m A	9,512	1.57	14,389	1.36
ハイブリッド① C18 5 μ m B	6,688	1.40	10,471	1.24

ピリジンピークの比較

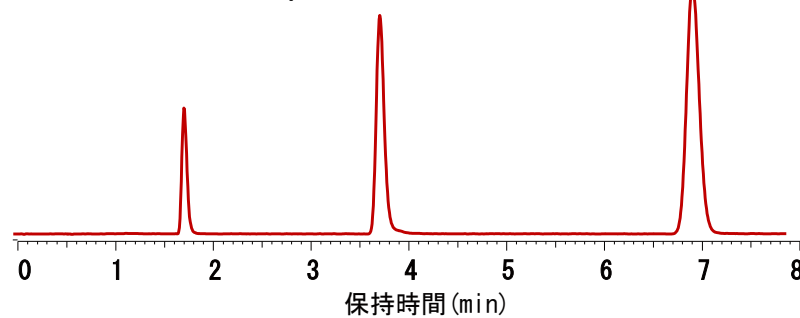
A社ハイブリッドC18 5 μ m



ハイブリッド① C18 5 μ m A



ハイブリッド① C18 5 μ m B

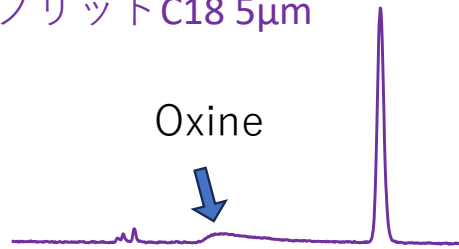


Column dimension: 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=30/70
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@250 nm
 Sample: 1 = Uracil
 2 = Pyridine
 3 = Phenol

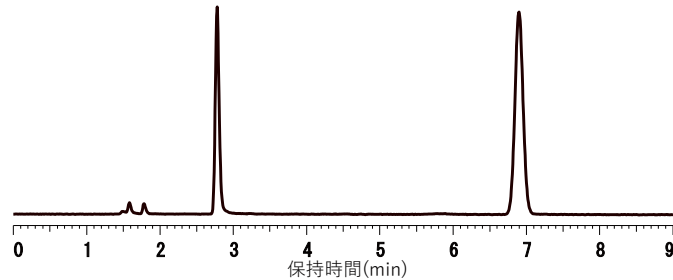
	Pyridine, N	Pyridine, TF	Phenol, N	Phenol, TF	Pyridine /Phenol N	Pyridine /Phenol TF
A社ハイブリッドC18 5 μ m	6,791	1.63	14,101	1.21	0.48	1.35
ハイブリッド① C18 5 μ m A	9,871	1.41	15,947	1.18	0.62	1.19
ハイブリッド① C18 5 μ m B	10,064	1.26	13,328	1.14	0.76	1.11

金属配位性化合物オキシンの比較

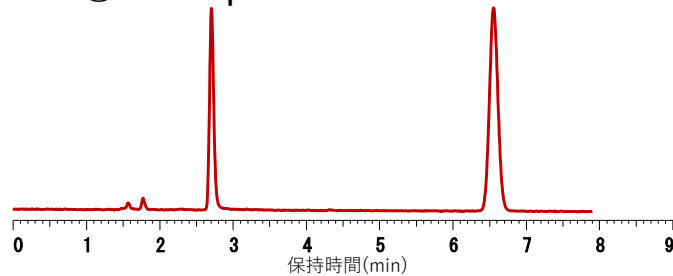
A社ハイブリッドC18 5 μ m



ハイブリッド① C18 5 μ m A



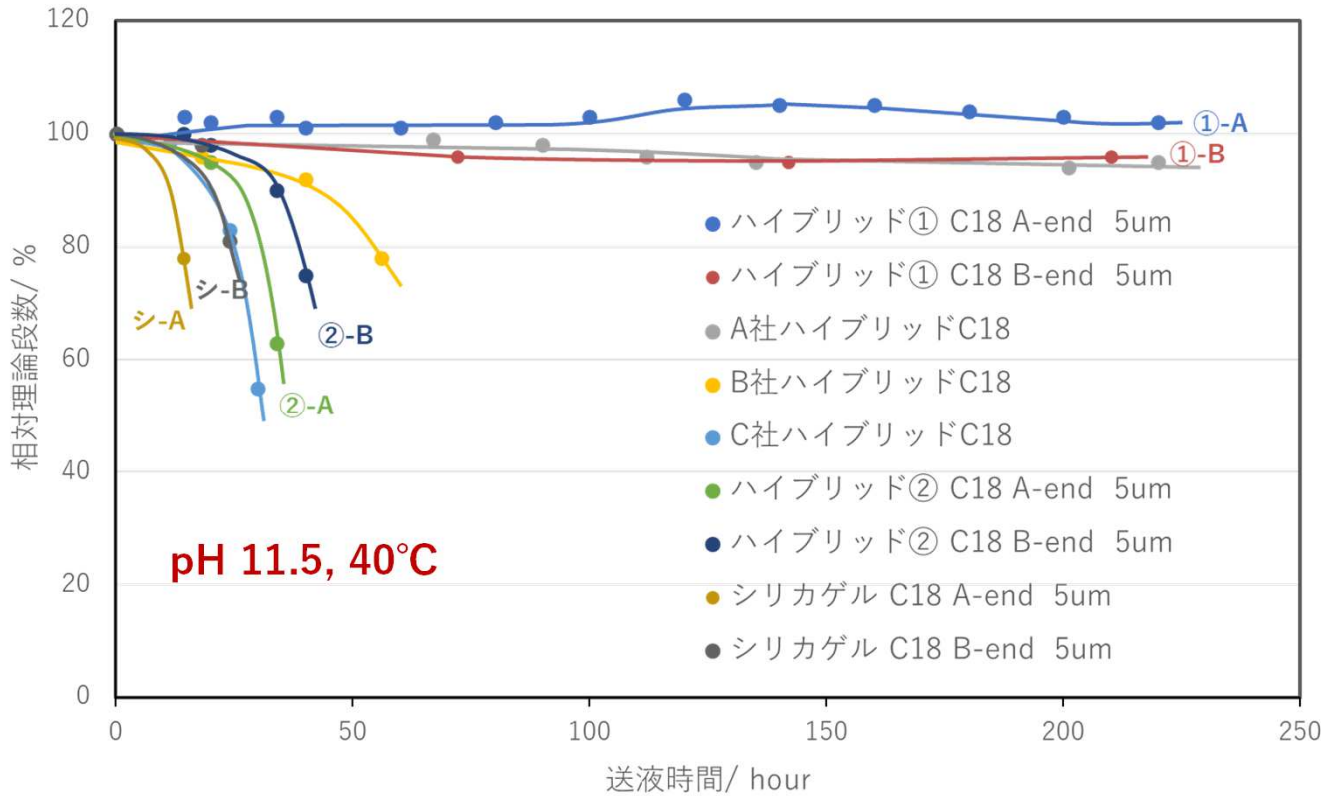
ハイブリッド① C18 5 μ m B



Column dimension: 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄=10/90
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@250 nm
 Sample: 1 = 8-Quinolinol (Oxine)
 2 = Caffeine

	Oxine, N	Oxine, TF
A社ハイブリッドC18 5 μ m	64	4.6
ハイブリッド① C18 5 μ m A	12,722	1.20
ハイブリッド① C18 5 μ m B	10,556	1.21

耐アルカリ性比較 (理論段数の減少)



耐アルカリ性試験条件

Column size: 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Methanol/50 mM potassium phosphate pH 11.5=10/90

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

段数測定用の条件

Mobile phase: Acetonitrile/water=70/30

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Butylbenzene

- ★比較のため、A社・B社・C社のハイブリッドC18とP社のC18の試験結果も示す。
- ★①-A, ①-BとW社のアルカリ性条件での理論段数の変化はほぼ同じであった。

By Norikazu Nagae and Daido Ishii

20 : MARCH 1995

Stability and separation characteristics of alkyl-bonded silica gels for reversed-phase liquid chromatography under acidic and basic pH conditions

THE USE of silica-based stationary phases for reversed-phase liquid chromatography (RPLC) is well-established. Recent advances in synthesis of *n*-alkyl-bonded silica stationary phases

ica or including aluminum salts.¹⁶ The authors' previous paper¹⁷ described a silica-based C18 stationary phase densely endcapped with trimethylsilane that was stable under acidic and basic conditions. Re-

and *n*-triacontyltrichlorosilane were purchased from Chisso (Tokyo, Japan). A silicon standard solution for atomic absorption spectrometry was obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

溶け出したシリカの濃度 (対数)

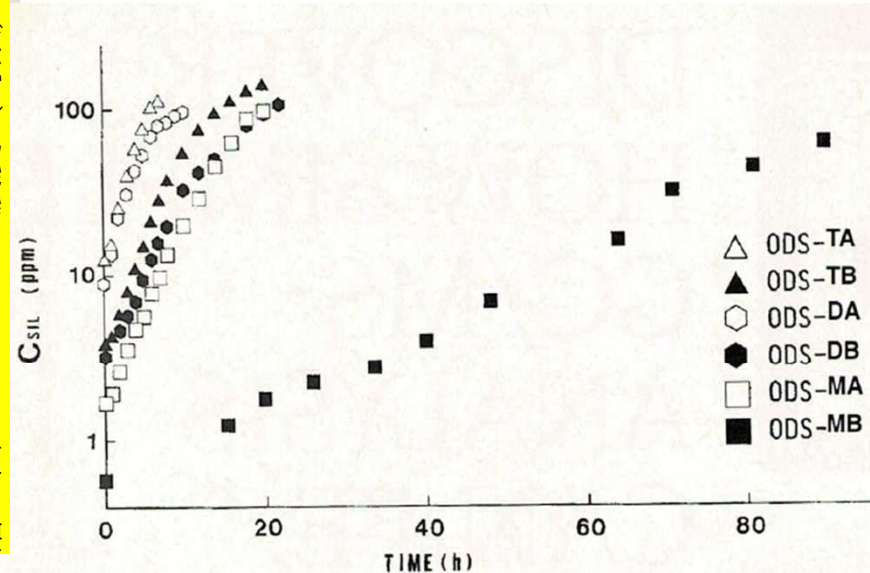
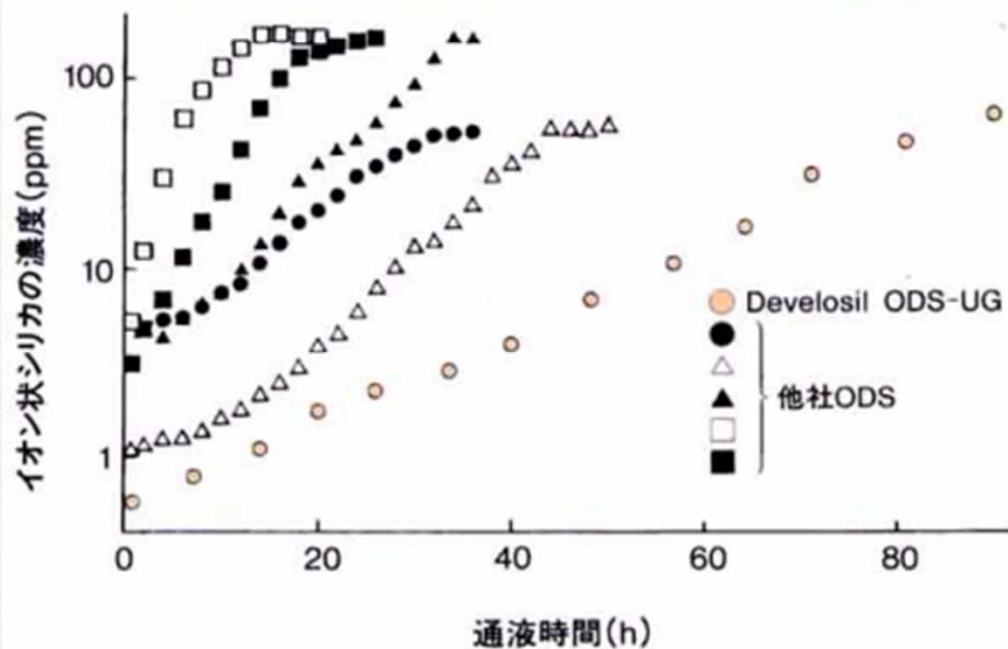


Figure 5 Relationships between elution time and $\log C_{SiL}$. Eluant: 0.1 M glycine + 0.1 M sodium chloride/0.1 M sodium hydroxide (49:51), pH 11.1; other conditions as in Figure 4.

Figure 4 Relationships between pH of the eluant and the logarithm of the concentration of silicic acid in the effluent ($\log C_{SiL}$). Column: 150 × 4.6 mm i.d.; eluant, Sorensen's buffer solution: 0.1 M glycine + 0.1 M sodium chloride/0.1 M sodium hydroxide; flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 30 °C. The average concentration of silicic acid in the effluent eluted between 5 and 15 min from the beginning of the elution was measured using the molybdenum yellow method. The data were obtained from changing the pH of the eluant from low pH to high pH on the same column.

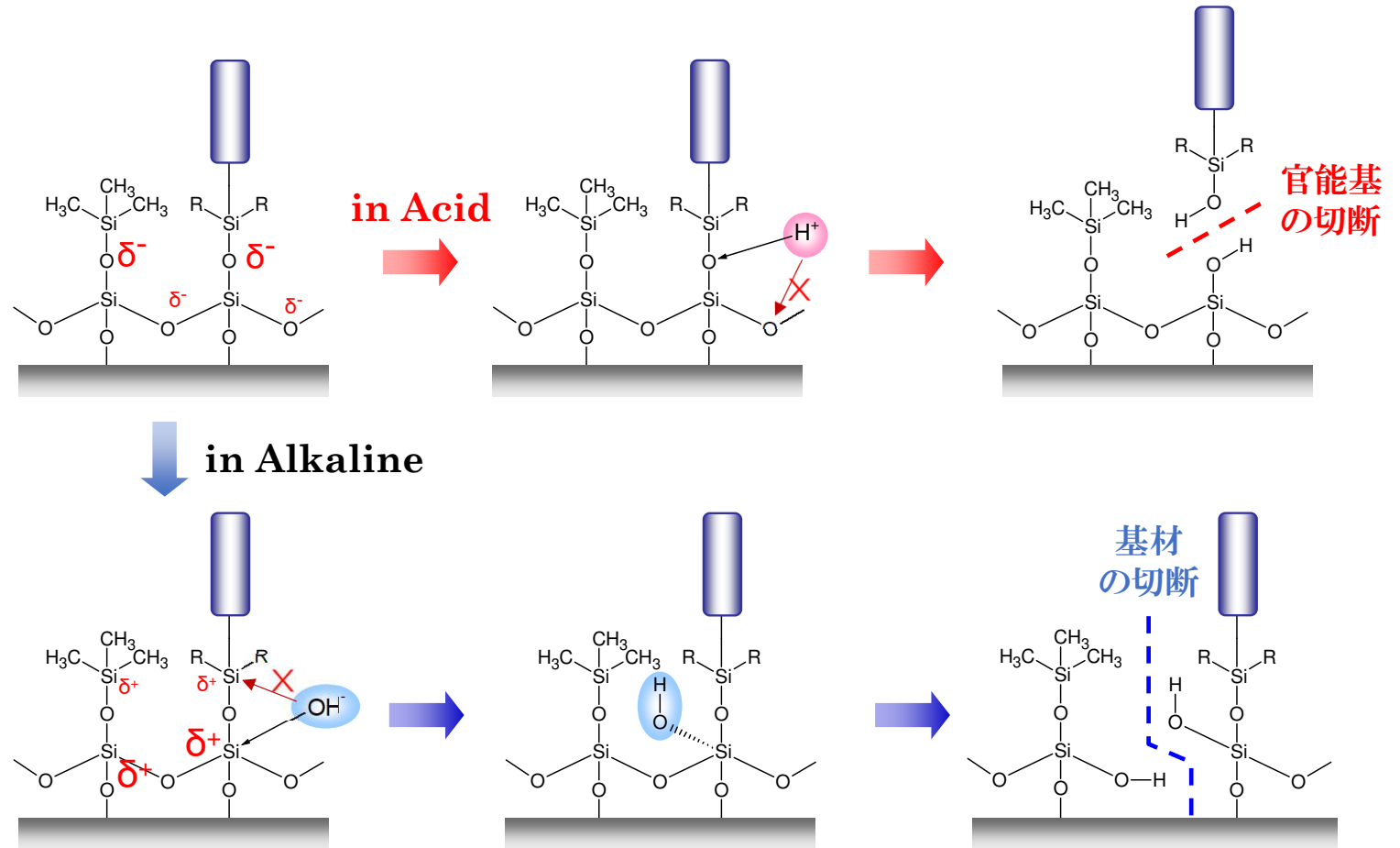
酸性/アルカリ性下でのシリカゲルの分解

O原子の電子密度が高いほど酸による求電子反応が強くなる。その結果加水分解によりアルキルシリル基が脱離する。

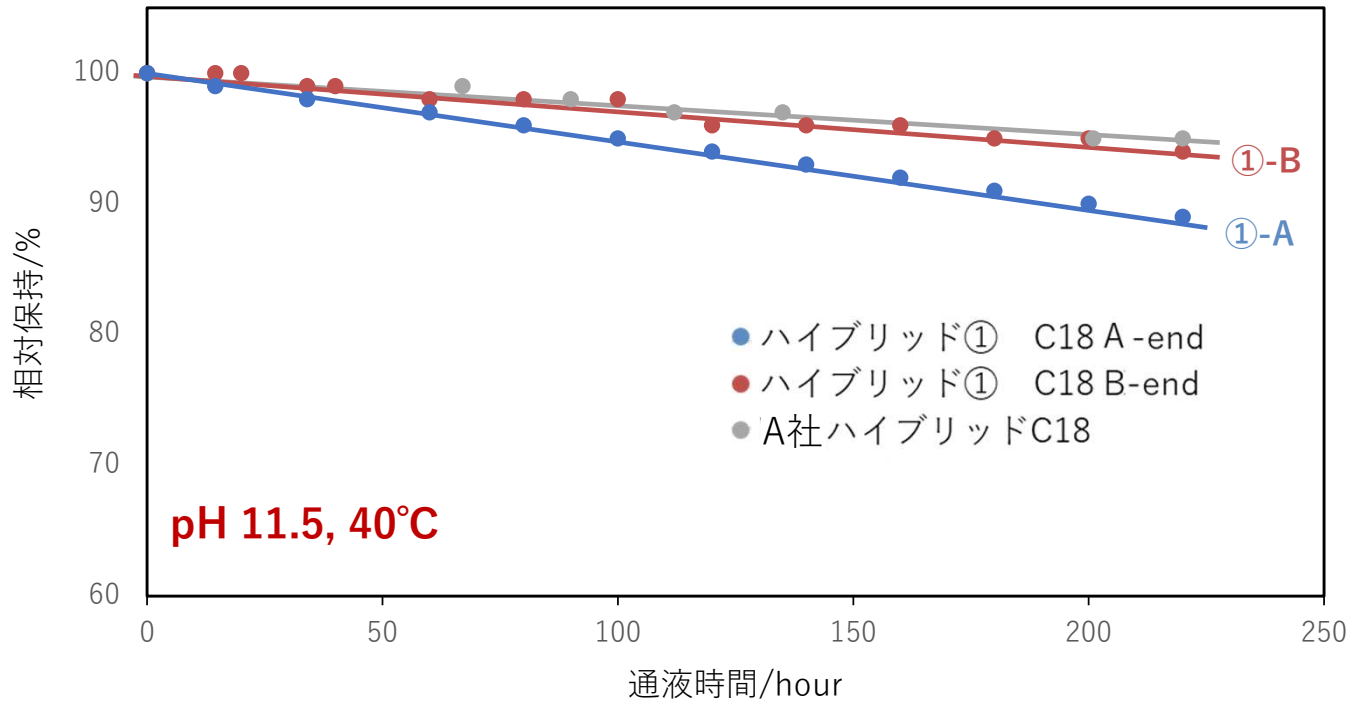
シリカゲルの最も安定なpHは？

↓
1.7

Si原子の電子密度が低いほどアルカリによる求核反応が強くなる。その結果加水分解によりシリカが溶け出す。



耐アルカリ性比較 (保持の減少)



耐アルカリ性試験条件

Column size: 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: Methanol/50 mM potassium phosphate pH 11.5=10/90
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C

保持測定用の条件

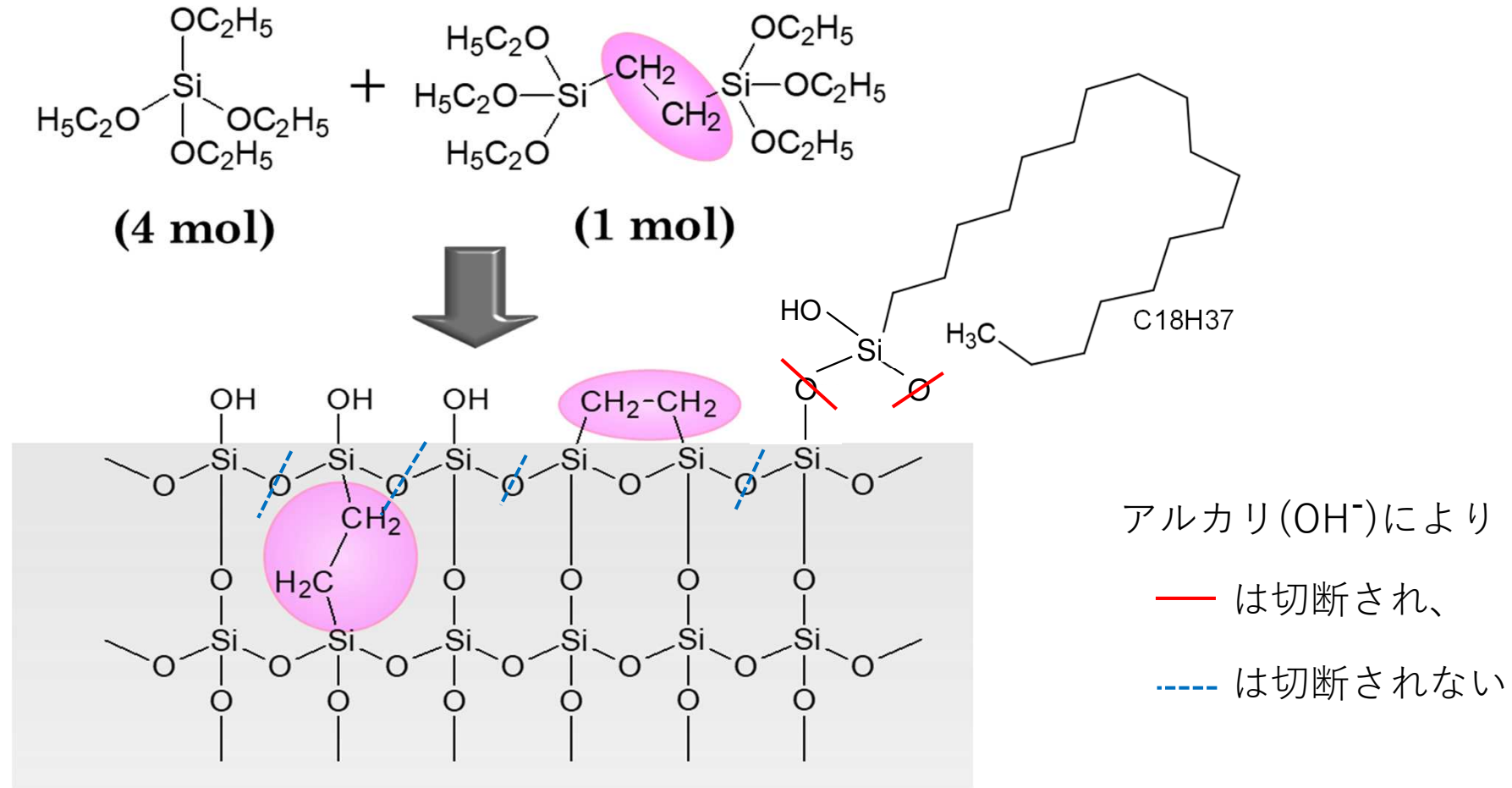
Column size: 50 x 2.1 mm
 Mobile phase: Acetonitrile/water =60/40
 Flow rate: 0.4 mL/min,
 Temperature: 40 °C
 Sample: 1 = Uracil (t_0), 2 = Butylbenzene

★アルカリ性条件下での保持の変化は、220時間経過後①-BとA社の5%程度であったが、①-Aは10%以上であった。

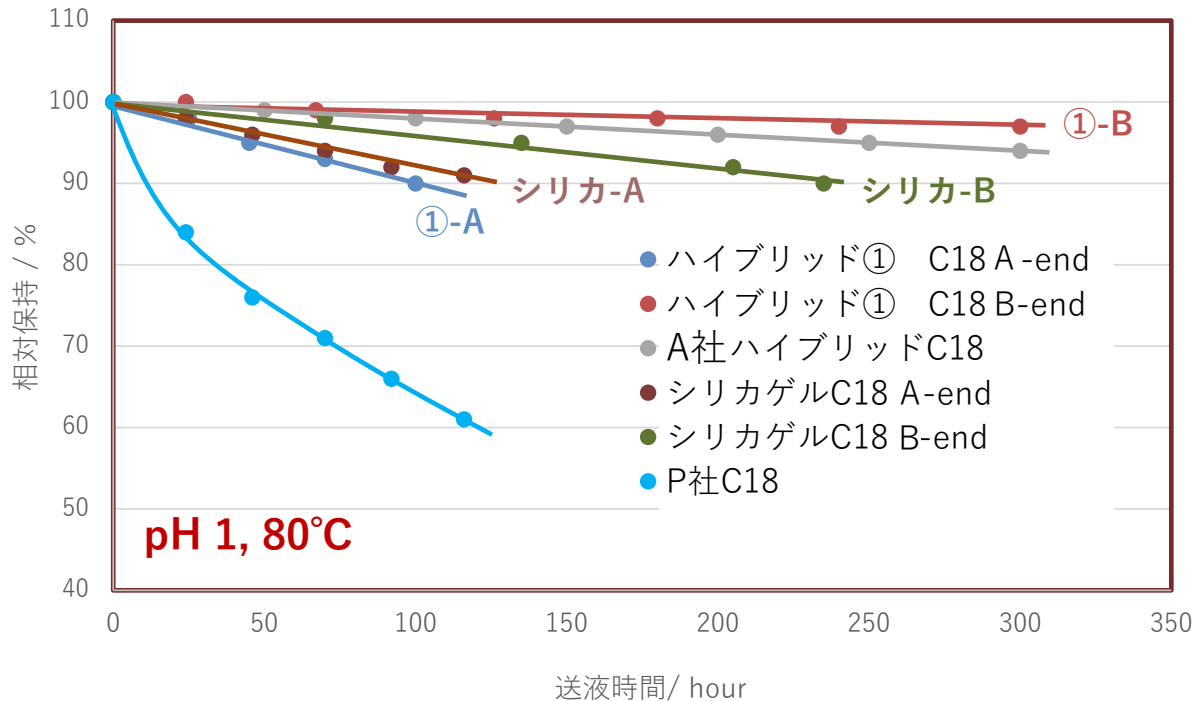
★pH 11.5の条件でもハイブリッド①シリカは溶けることなく、理論段数変化はないが、アルキル基が脱離し保持が減少する。

1. ハイブリッド①

シリカゲル骨格内にエチレン鎖導入



耐酸性比較



耐酸性試験条件

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

Acetonitrile/1.0% TFA, (pH 1)=10/90

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 80 °C

保持測定用の条件

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: Acetonitrile/water =60/40

Flow rate: 0.4 mL/min,

Temperature: 40 °C

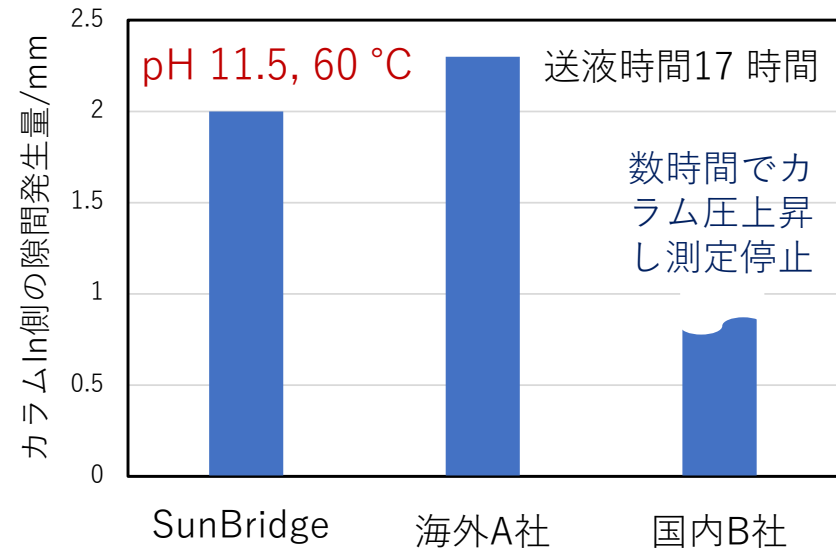
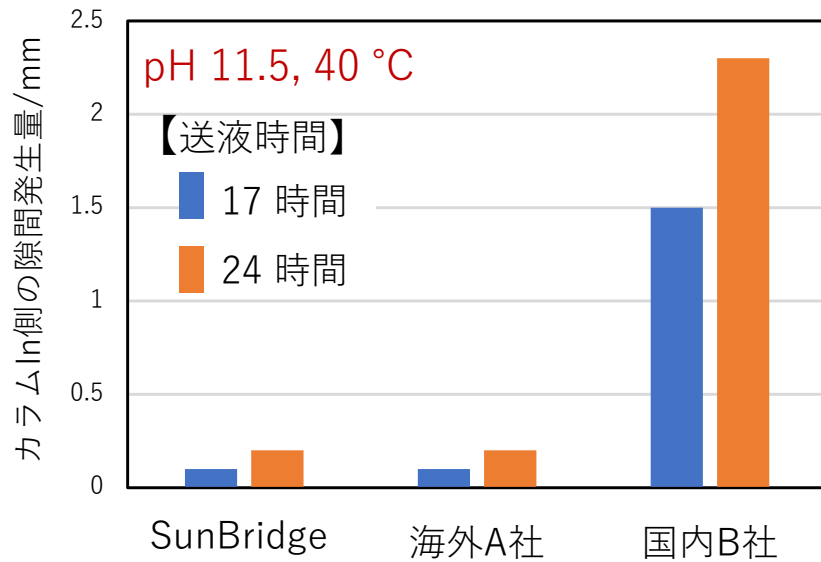
Sample: 1 = Uracil (t_0), 2 = Butylbenzene

★AタイプのエンドキャッピングよりもBタイプのエンドキャッピングの方が耐酸性は高い。

★pH 1, 80°Cの条件でも①-BのC18は300時間経過後も保持係数の減少は2%程度であった。

シリカゲルの最も安定なpHは？ ➡ 1.7 pH 1~2では、シリカゲルは安定で溶け出すことはない。

ハイブリッドシリカゲルのアルカリ性条件での耐久性比較 (カラムの凹みで評価)



アルカリ性耐久試験条件(pH 11.5)

Column dimension: 100 x 2.1 mm

Mobile phase: 50mM potassium phosphate pH 11.5

Flow rate: 0.1 mL/min

Temperature: 40 °C, 60 °C

Elution time: 17 h, 24 h

小括

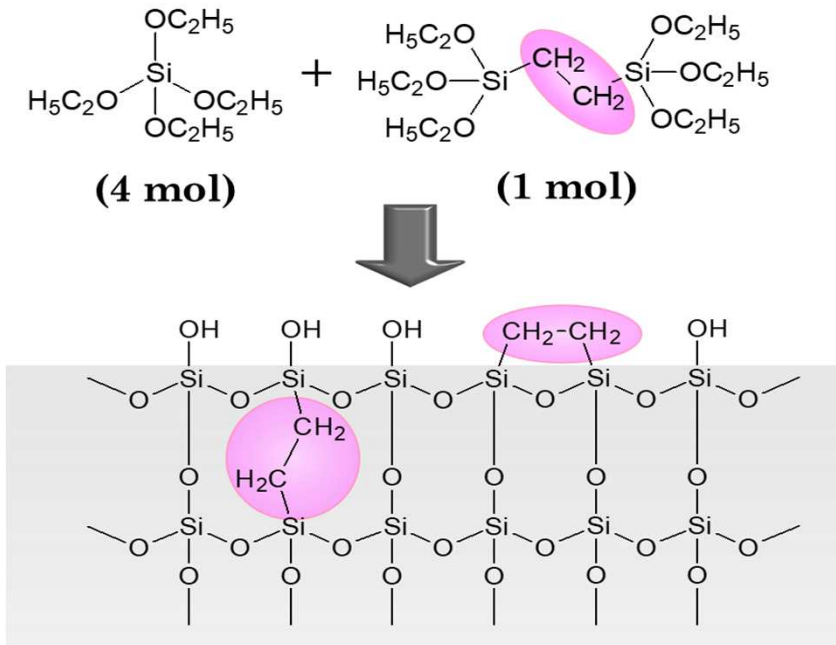
- ◆エチレン鎖をシリカに導入したハイブリッドシリカにC18結合とエンドキャッピングを施したハイブリッドC18充填剤は、通常のシリカゲルに同様に処理したC18充填剤より高い耐久性を示した。
- ◆このハイブリッドC18充填剤は耐アルカリ性のみならず、耐酸性も向上した。
- ◆2種類のエンドキャッピング試薬の差はピーク形状には認められず、金属配位性や塩基性化合物はテーリングの少ないピークが得られたが、耐久性では差があり、1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethaneの方がHexamethyldichlorotrisiloxaneより耐酸性も耐アルカリ性も高かった。
- ◆ハイブリッドシリカへのエチレン鎖の導入方法でも差が生じ、シリカ表面のみに導入したもの（ハイブリッドシリカ②）より、シリカ骨格内にも導入した（ハイブリッドシリカ①）の方が10倍以上の耐アルカリ性を示した。

従来のハイブリッドC18を超える
ULTRA HYBRID C18

SunBridge C18

1. ハイブリッドシリカゲル①

シリカゲル骨格内にエチレン鎖導入



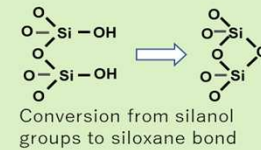
テトラエトキシシランとビス(トリエトキシシリル)エタンを4:1の割合で混合しシリカゲルを合成
粒子径: 5 μm, 細孔容積: 0.8 mL/g, 比表面積: 190 m²/g, 細孔径: 15 nm

三官能性C18を結合

ダブルエンド
キャッピング
Double
end-capping



高温反応
Elevated
temperature
end-capping



B-type endcapping

1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethane

A社ハイブリッドC18との比較

ピリジンピーク

Column dimension:

150 x 4.6 mm for 3.5 and 5 μm

100 x 2.1 mm for 1.7 μm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=30/70$

Flow rate: 1.0 mL/min for 3.5 and 5 μm

0.2 mL/min for 1.7 μm

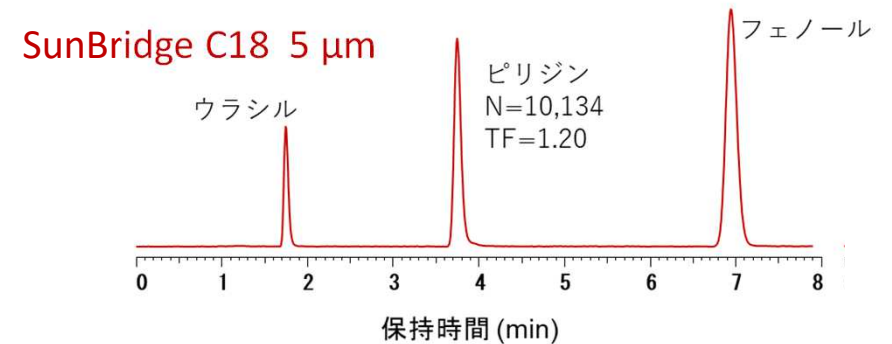
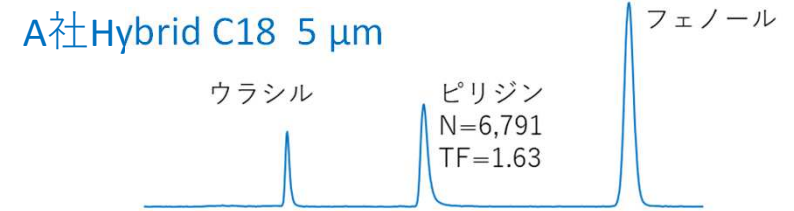
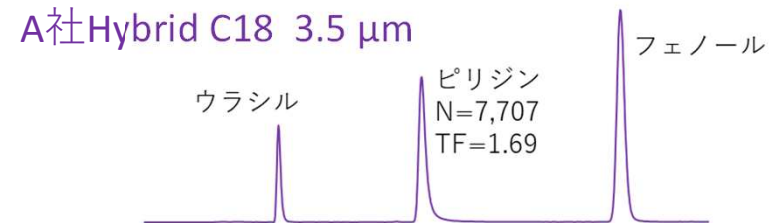
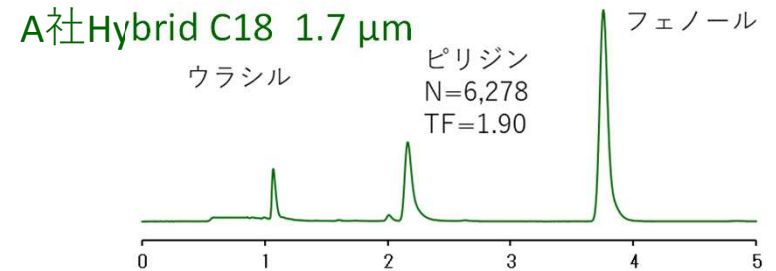
Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@250 nm

Sample: 1 = Uracil

2 = Pyridine

3 = Phenol



A社ハイブリッドC18との比較

オキシソピーク (金属配位性化合物)

Column dimension:

150 x 4.6 mm for 3.5 and 5 μ m

100 x 2.1 mm for 1.7 μ m

Mobile phase: CH₃CN/20 mM H₃PO₄=10/90

Flow rate: 1.0 mL/min for 3.5 and 5 μ m

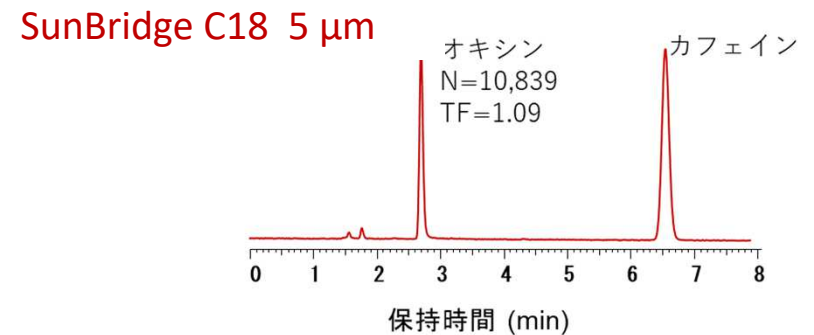
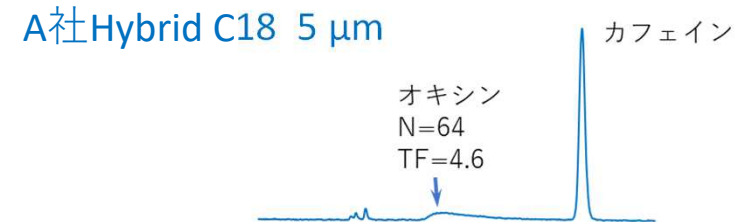
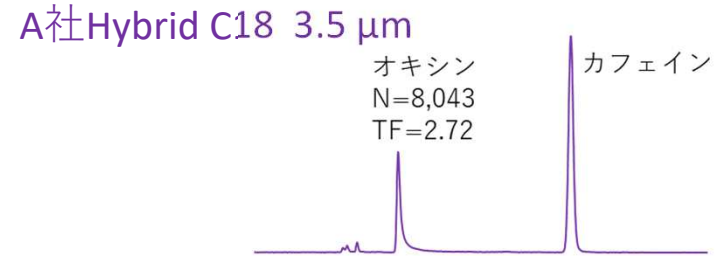
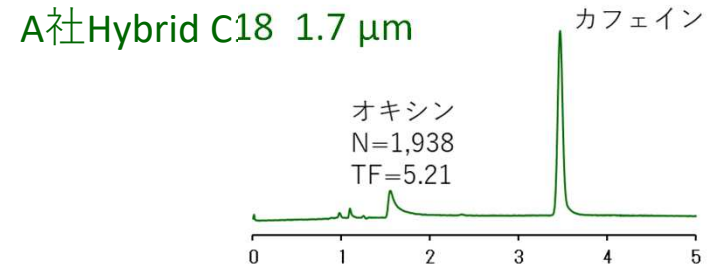
0.2 mL/min for 1.7 μ m

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: 1 = 8-Quinolinol (Oxine)

2 = Caffeine



A社ハイブリッドC18との比較

アミトリプチリンピーク (塩基性化合物)

Column dimension:

150 x 4.6 mm for 3.5 and 5 μ m

100 x 2.1 mm for 1.7 μ m

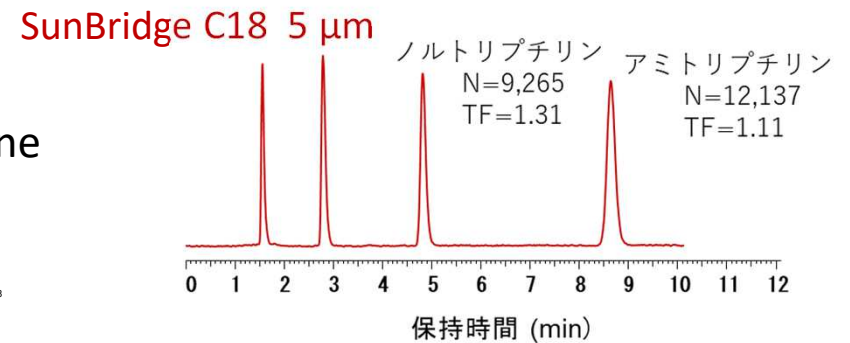
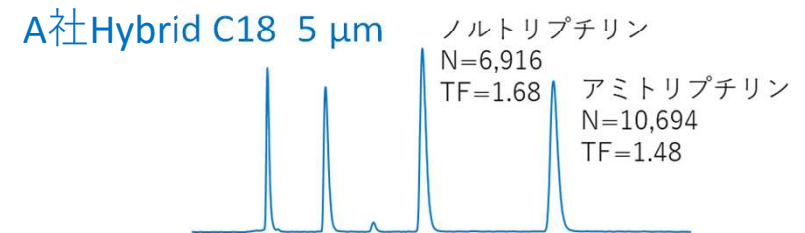
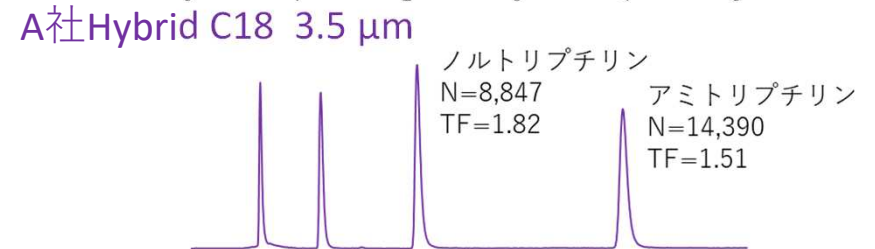
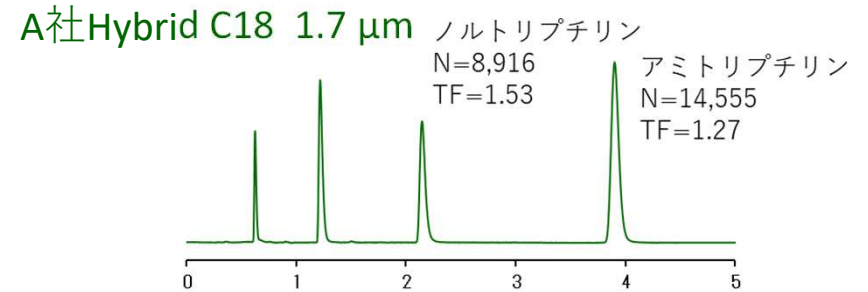
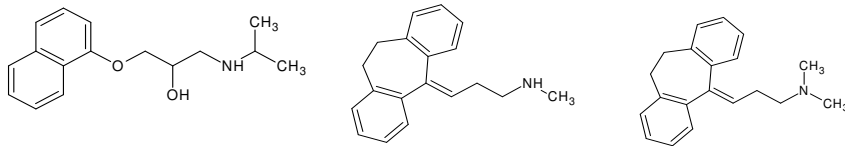
Mobile phase: Acetonitrile/10 mM ammonium acetate pH 6.8
=40/60

Flow rate: 1.0 mL/min for 3.5 and 5 μ m
0.3 mL/min for 1.7 μ m

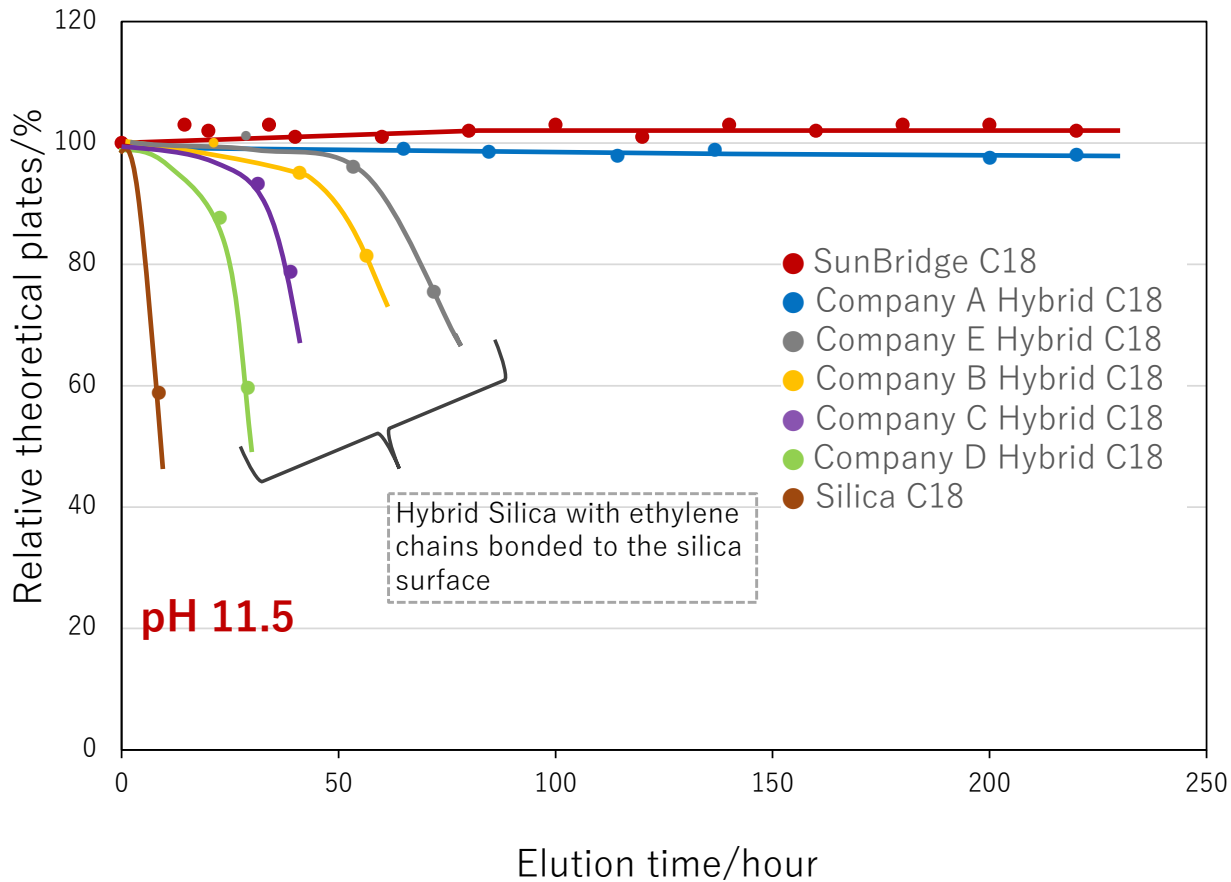
Temperature: 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV@250 nm

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



pH 11.5条件での耐久性比較



耐久性試験条件(pH 11.5)

Column dimension: 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Methanol/50mM

potassium phosphate pH 11.5=10/90

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

測定条件

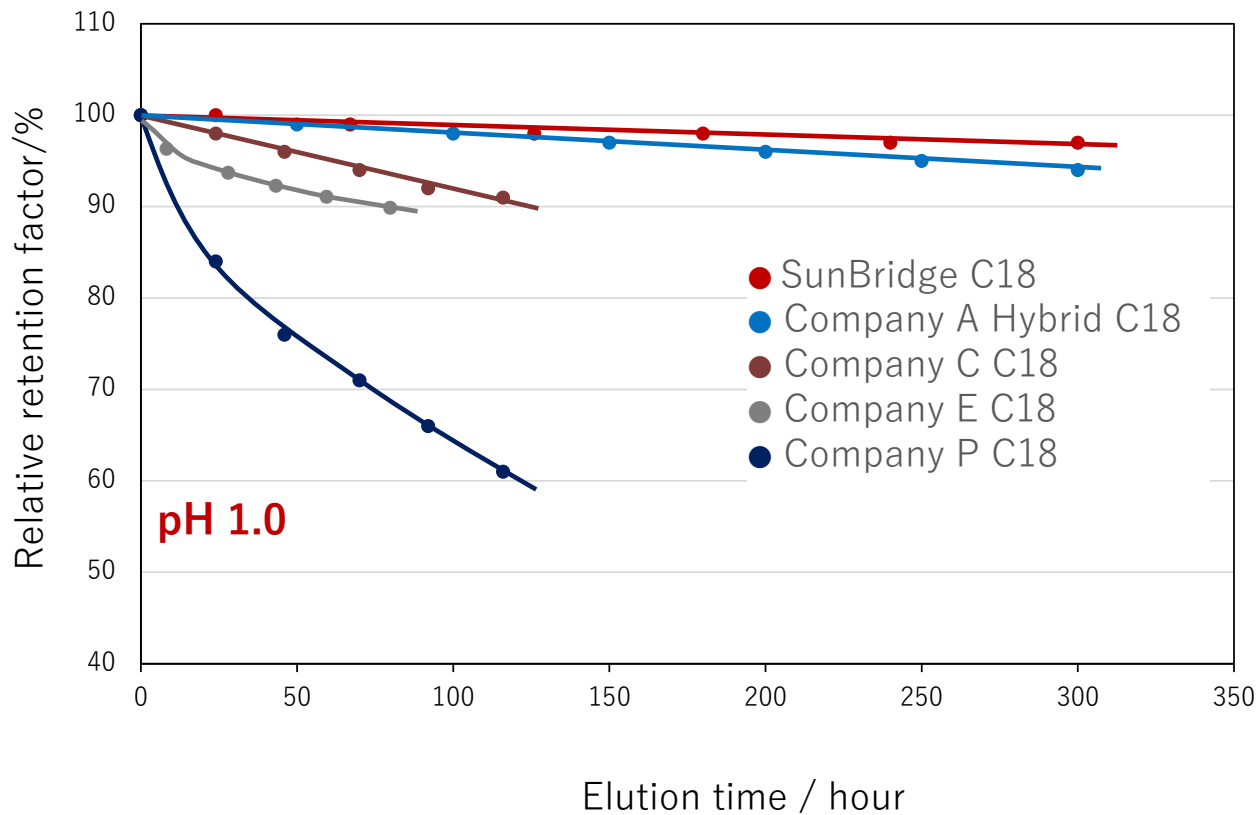
Mobile phase: Acetonitrile/water=70/30

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Butylbenzene

pH 1.0の条件での耐久性比較



耐久性試験条件 (pH 1.0)

Column dimension: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: Acetonitrile/1.0% TFA pH1=10/90

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 80 °C

測定条件

Mobile phase: Acetonitrile/water=70/30

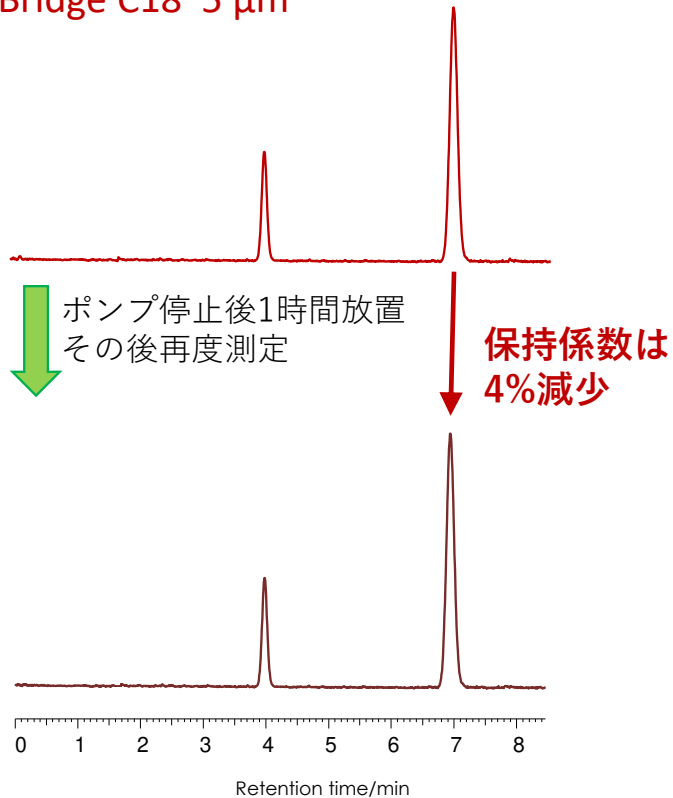
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

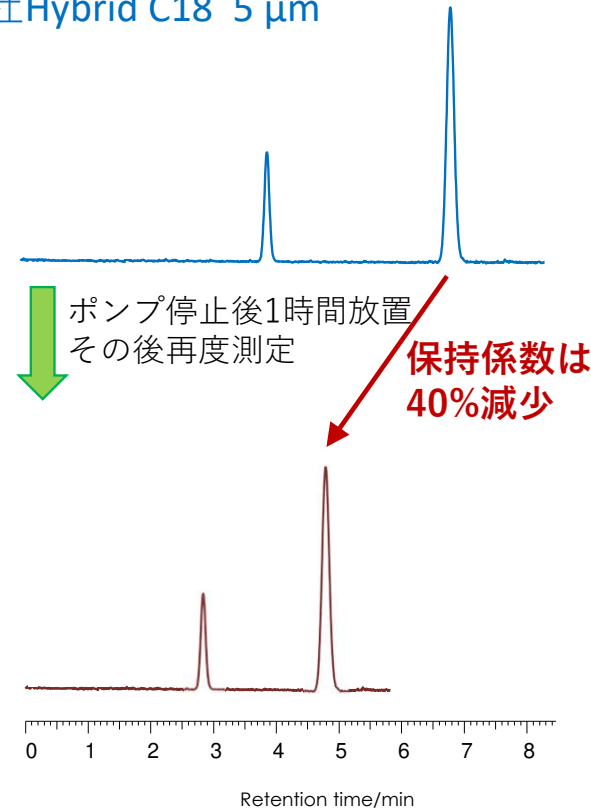
Sample: 1 = Uracil, 2 = Butylbenzene

100%水系移動相での保持の変化

SunBridge C18 5 μm



A社Hybrid C18 5 μm



Column dimension: 150 x 4.6 mm

Mobile phase:

10 mM phosphate buffer pH 7.0

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

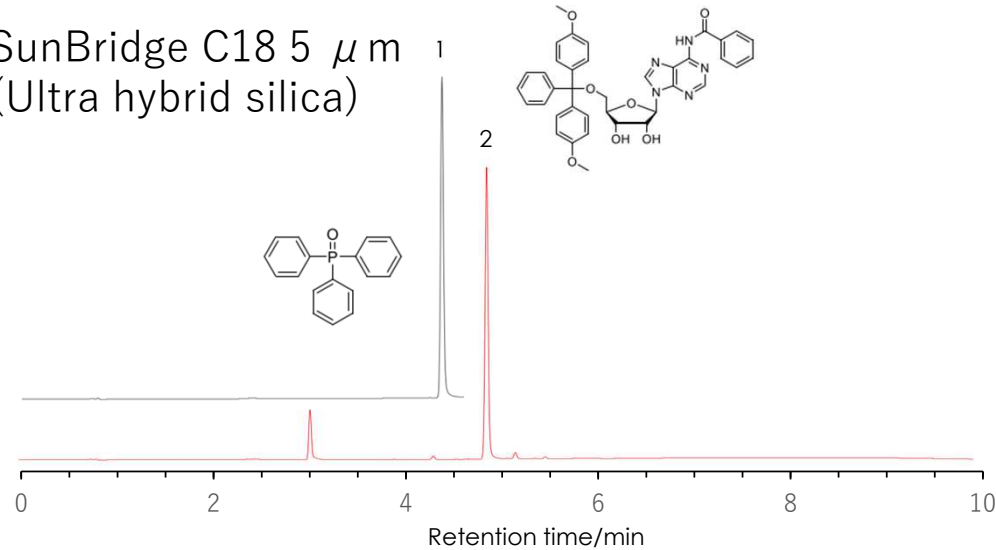
Detection: UV@250 nm

Sample: 1=Uridine, 2=Adenine

SunBridge C18 は100%水系移動相条件でも保持の減少はほとんどなく、問題なく使用可能

核酸合成関連化合物の分離

SunBridge C18 5 μ m
(Ultra hybrid silica)



Column:

SunBridge (U-Hybrid silica) C18 5 μ m

Company A (Hybrid silica) C18 2.5 μ m Column

dimension: 3.0 x 100 mm

Temperature: 40 °C

Flow rate: 0.85 mL/min

Detection: UV@254 nm

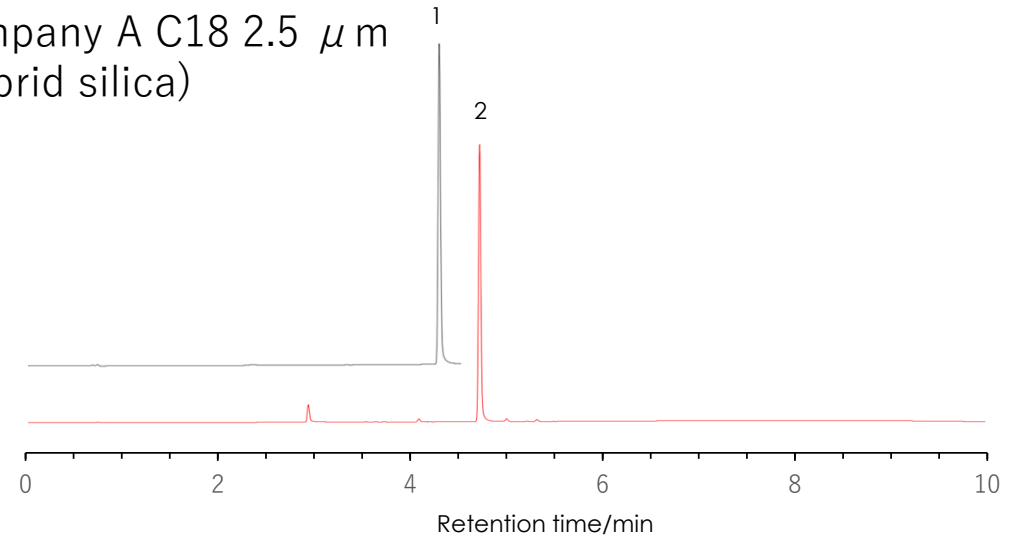
Mobile phase:

- [A] Water
- [B] 2% Formic acid in water
- [C] Acetonitrile

Gradient program:

Time (min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	95	5	0
0.60	95	5	0
4.50	0	5	95
7.50	0	5	95
9.50	0	0	100
10.00	0	0	100

Company A C18 2.5 μ m
(Hybrid silica)



Sample solution: Acetonitrile

Injection Volume: 5 μ L

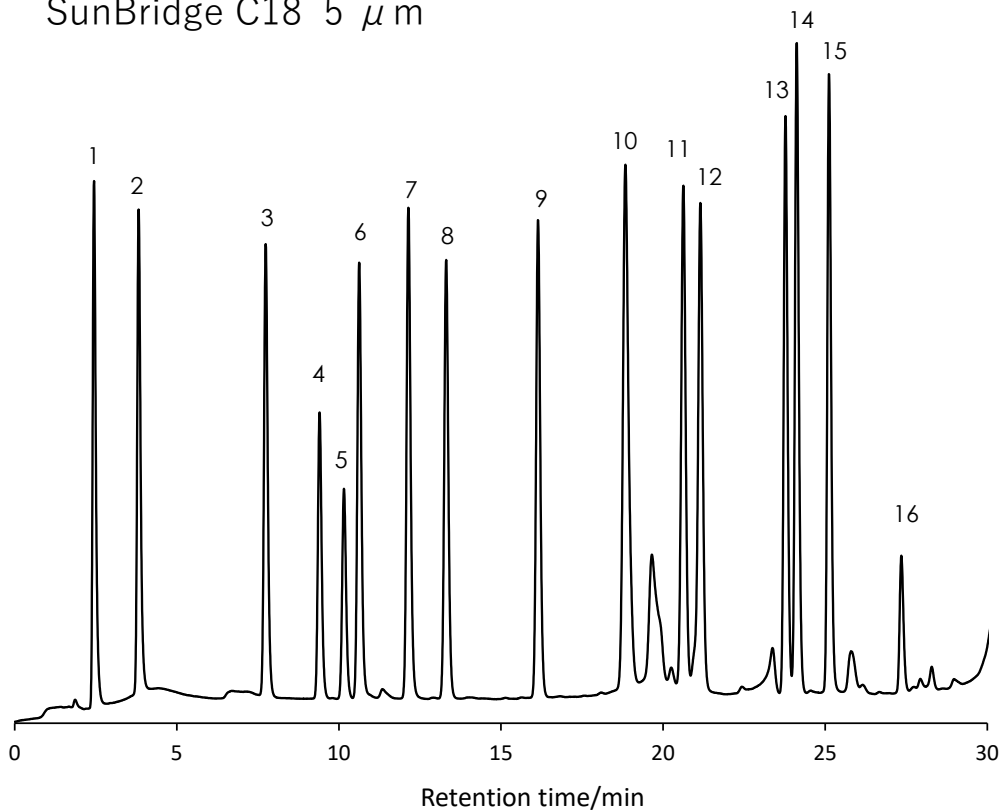
Sample:

1 = Triphenylphosphine Oxide

2 = 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N6-benzoyladenosine

OPA誘導体化アミノ酸の分離

SunBridge C18 5 μ m



Column: SunBridge (Ultra hybrid silica) C18 5 μ m, Company A (Partial hybrid silica) C18 3 μ m

Column dimension: 100 x 3.0 mm

Mobile phase: A) 10 mM Na_2HPO_4 with 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 8.2

B) Acetonitrile / Methanol / Water = 45 / 45 / 2

Gradient program: shown right

Flow rate: 0.55 mL/min, Temperature: 40 $^\circ\text{C}$

Detection(Fluorescent): Ex. at 350 nm, Em. at 450 nm

Labeling method: In autosampler *

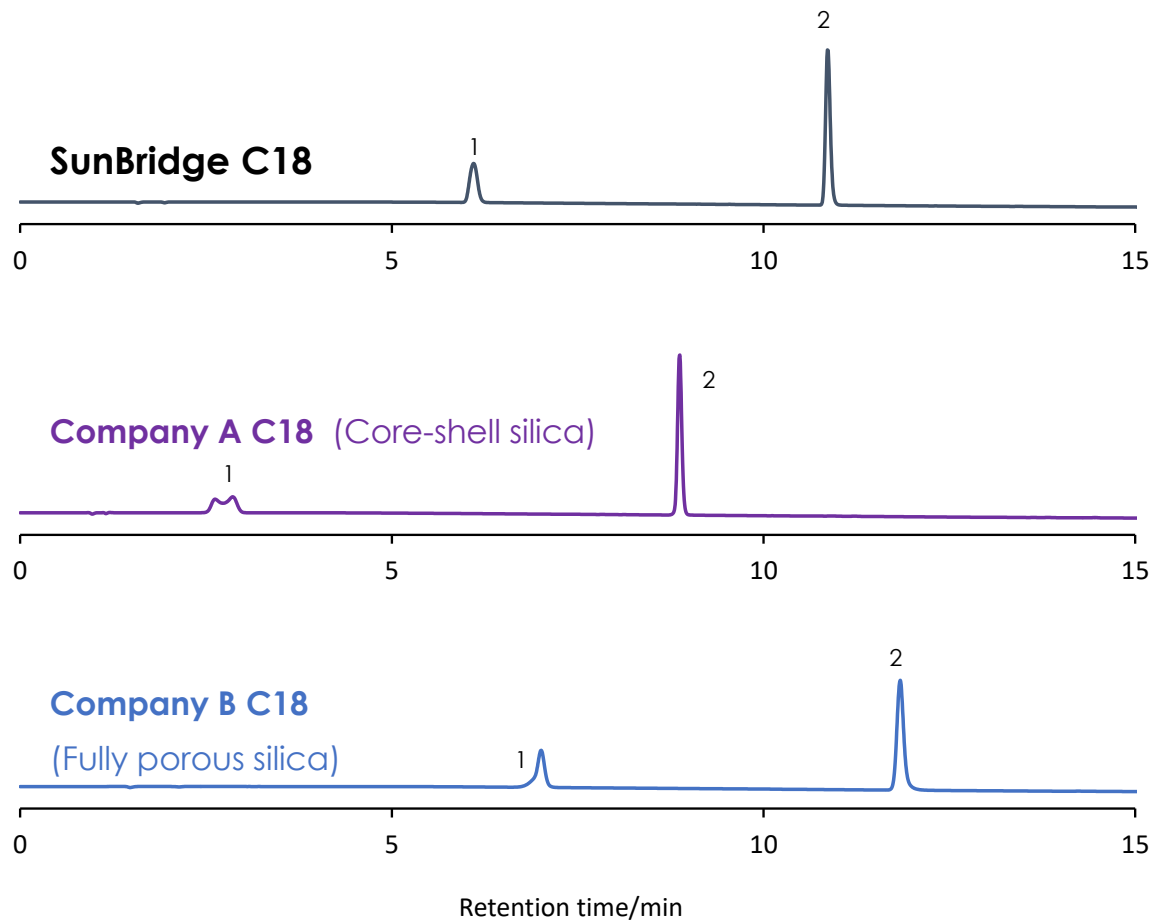
Instrument: Nexera LC-40 (Shimadzu)

Time (min)	A(%)	B(%)
0	98	2
20	70	30
28.5	45	55
29.5	0	100
38	0	100
39	98	2

Sample: 1 = Aspartate, 2 = Glutamate, 3 = Serine, 4 = Histidine, 5 = Glycine, 6 = Threonine, 7 = Arginine, 8 = Alanine, 9 = Thyrosine, 10 = Cystine, 11 = Valine, 12 = Methionine, 13 = Phenylalanine, 14 = Isoleucine, 15 = Leucine, 16 = Lysine (Wako Amino Acids Mixture Standard Solution, Type H, 50 μM /sample)

*0.1 M Boric acid buffer (pH 9.8) with 3-mercaptoethanol, aspiration/dispensing
 0.1 M Boric acid buffer (pH 9.8) with o-phthalaldehyde, aspiration/dispensing/mixing
 Measurement samples, aspiration/dispensing/mixing
 Fmoc-HCl in acetonitrile, aspiration/dispensing/mixing
 Diluent (0.5% phosphoric acid), aspiration/dispensing/mixing

ビスフェノールA, グルクロン酸抱合体の分離



Column: SunBridge C18 5 μ m, 150 x 4.6 mm

Company A(Core-shell silica) 5 μ m, 100 x 4.6 mm

Company B (Fully porous silica) 5 μ m, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: A) 10 mM Ammonium acetate aq.

B) Acetonitrile

Gradient program: shown right

Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40 $^{\circ}$ C,

Detection: UV@230 nm (PDA)

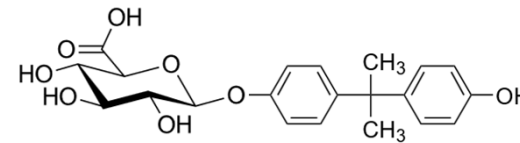
Sample: 1 = Bisphenol A Glucuronide (BPA-Glc),

2 = Bisphenol A (BPA)

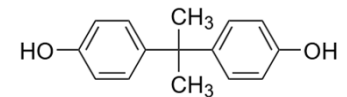
(each 50 μ M dissolved in 50% Acetonitrile)

Instrument: Shimadzu Prominence system

1. BPA-Glc



2. BPA



まとめ

- ◆ SunBridge に採用したエチレン鎖をシリカ内に導入したハイブリッドシリカは耐久性が高く、ハイブリッドシリカカラムへ pH 11.5 のリン酸緩衝液を通液した時の凹み状態の比較において、A社ハイブリッドシリカは同等な凹み度合いであったが、B社ハイブリッドシリカは10倍程度凹みが深くなり、10倍程度の耐久性の差が示された。
- ◆ A社ハイブリッドC18は金属配位性化合物であるオキシソルホンがひどくテーリーングしたが、SunBridge C18ではオキシソルホンピークはシャープであり、金属配位性化合物に対し不活性であることが示された。
- ◆ 耐アルカリ性比較において、A社以外のハイブリッドシリカC18はエチレン鎖をシリカ表面に導入したハイブリッドC18と同等であり、シリカ内部にエチレン鎖を導入していないか、導入したとしても非常に少ないと考えられる。
- ◆ SunBridge C18は100%水系移動相での保持の変化が少なく、有機溶媒の入っていない移動相条件でも再現性の高い保持時間を示した。