

常識を超えた新規C18カラム： すべてのピークをシャープに！

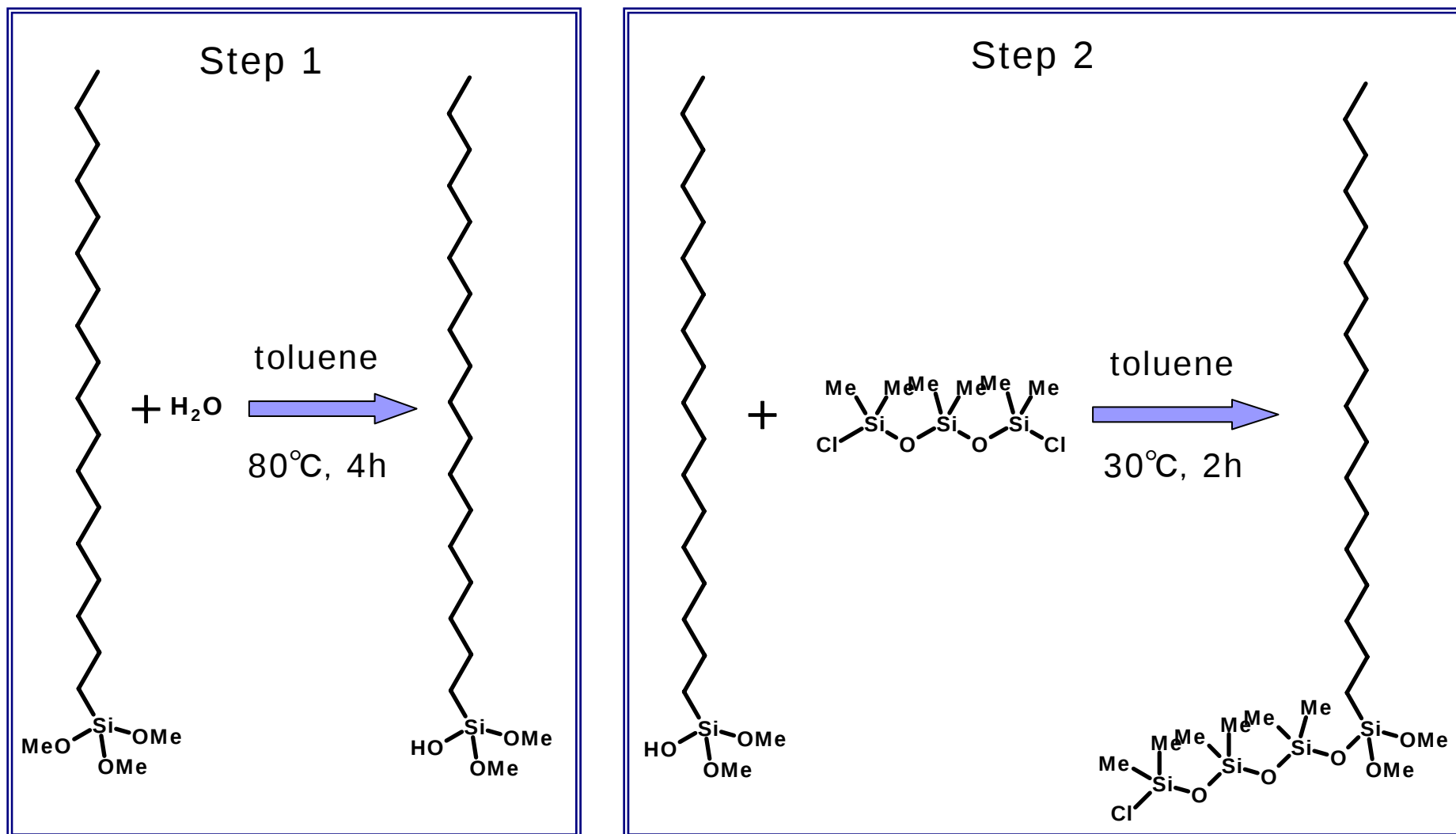
クロマニック テクノロジーズ
長江徳和

【緒言】

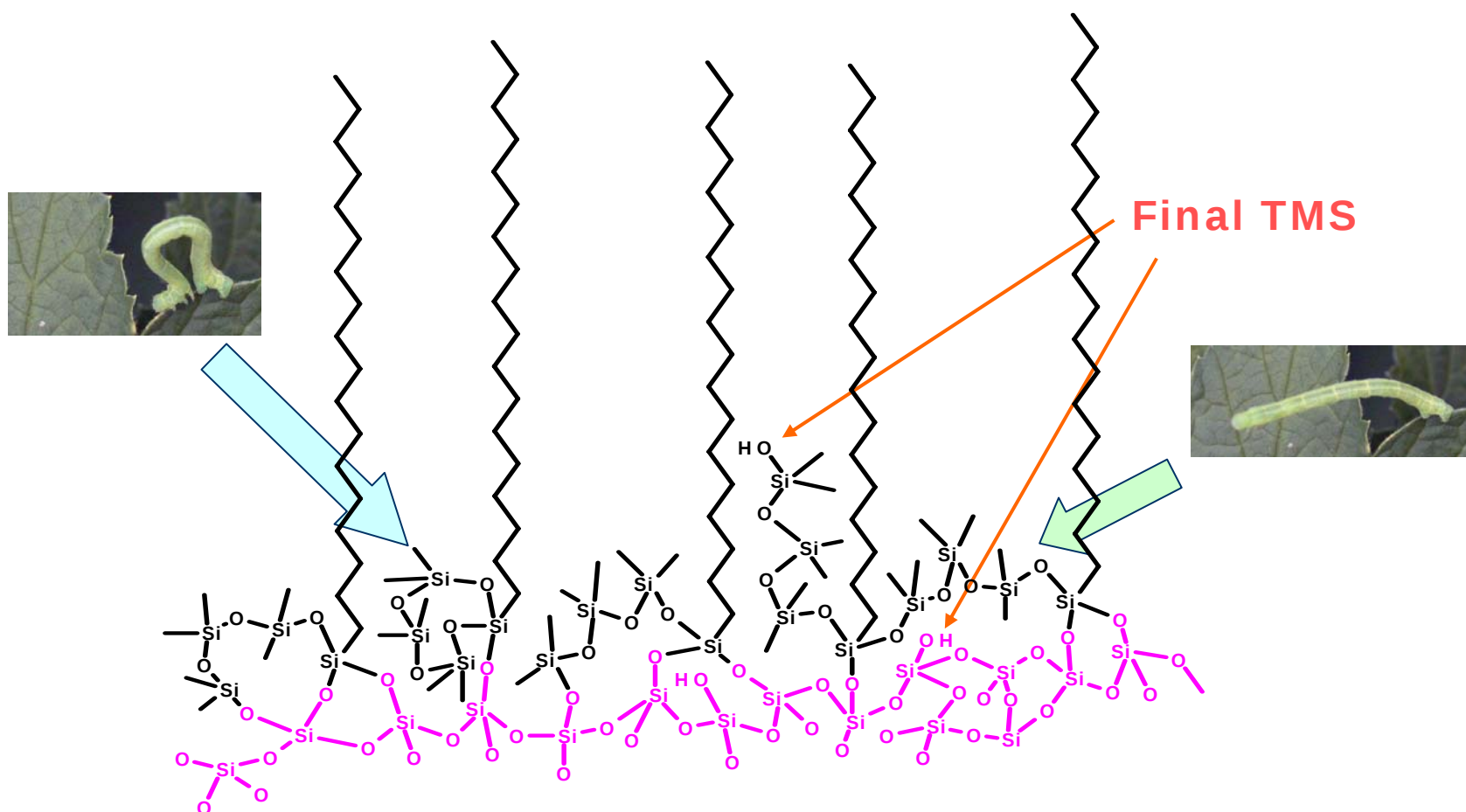
- カークランドによりHPLCが発明されて以来40年近く経過するが、この間充填剤は日々改良が進められてきた。
- 表面多孔性（ペリキュラー）充填剤から全多孔性に、さらに近年再び粒子径を $3\mu\text{m}$ 以下にした表面多孔性へと、シリカ系充填基材も変化している。
- またシリカ系逆相充填剤はシラノール基の影響を防ぐため、様々なエンドキャッピング技法が開発されてきた。
- 演者らは従来のエンドキャッピング方法の概念を変え、エンドキャッピング試薬をあらかじめオクタデシルシリル化試薬に結合させたシリル化試薬を開発した。
- アミトリプチリンのピーク形状を比較することにより、この試薬で調製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

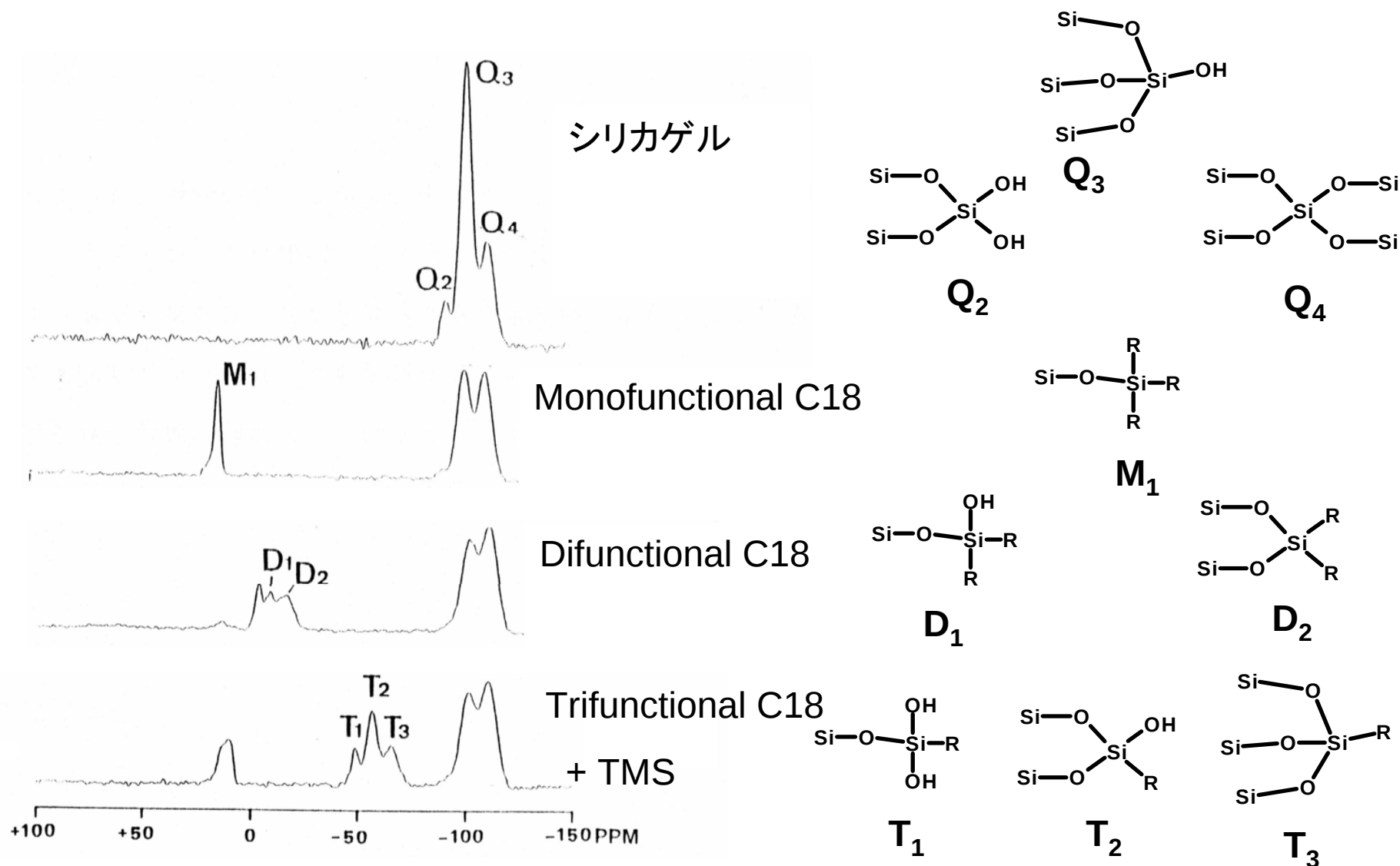
ヘキサメチルオクタデシルテトラシラン



推定されるシリカ表面での結合状態 (Sunniest C18)



^{29}Si CP-MAS NMR



Sunniest C18充填剤の物性

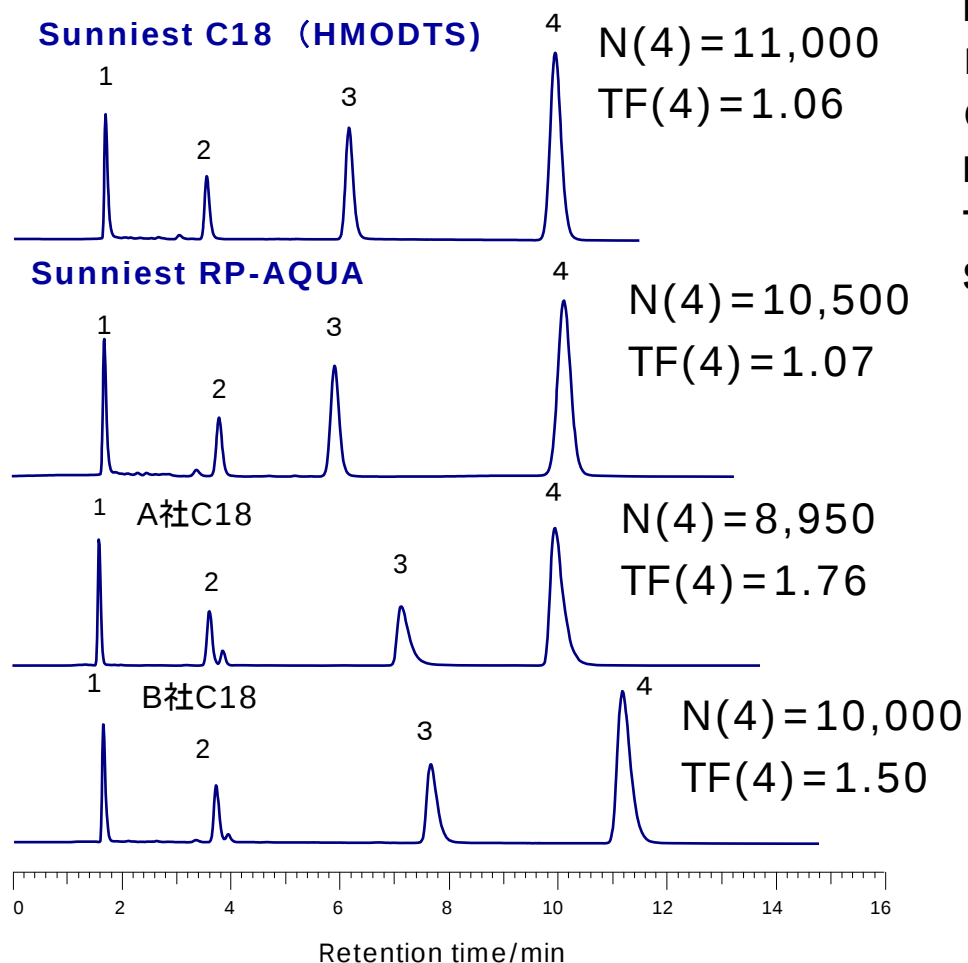
用いたシリカゲル: 12nm, 340 m²/g, 5 μm

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

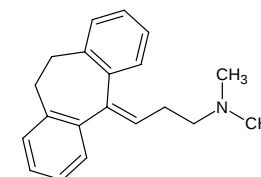
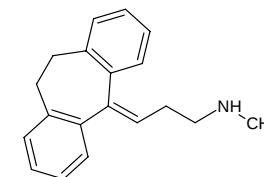
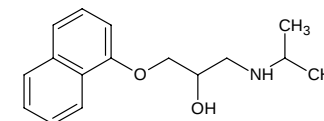
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Propranolol

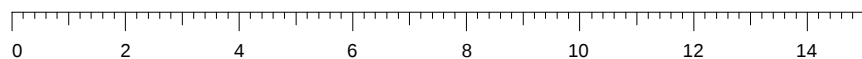
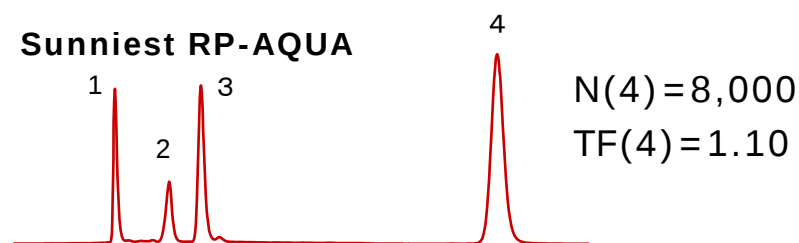
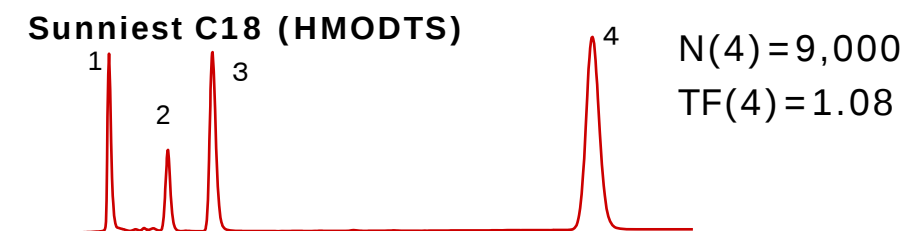
3 = Nortriptyline

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



Retention time/min

Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5μm

Mobile phase:

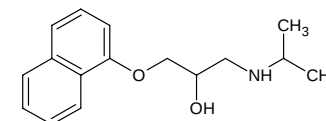
CH₃OH/20mM Phosphate buffer pH6.0=80/20

Flow rate: 1.0 mL/min

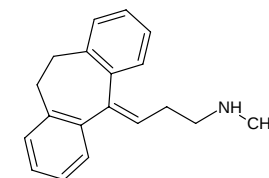
Temperature: 22 °C

Sample: 1 = Uracil

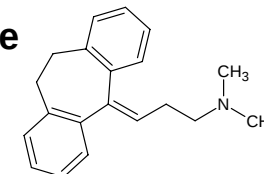
2 = Propranolol



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 CH_3CN , pH7.0, 40 °C

Column size: 4.6x150 mm

Particle size: 5 μm

Mobile phase:

$\text{CH}_3\text{CN}/20\text{mM}$ Phosphate buffer pH7.0=60/40

Flow rate: 1.0 mL/min

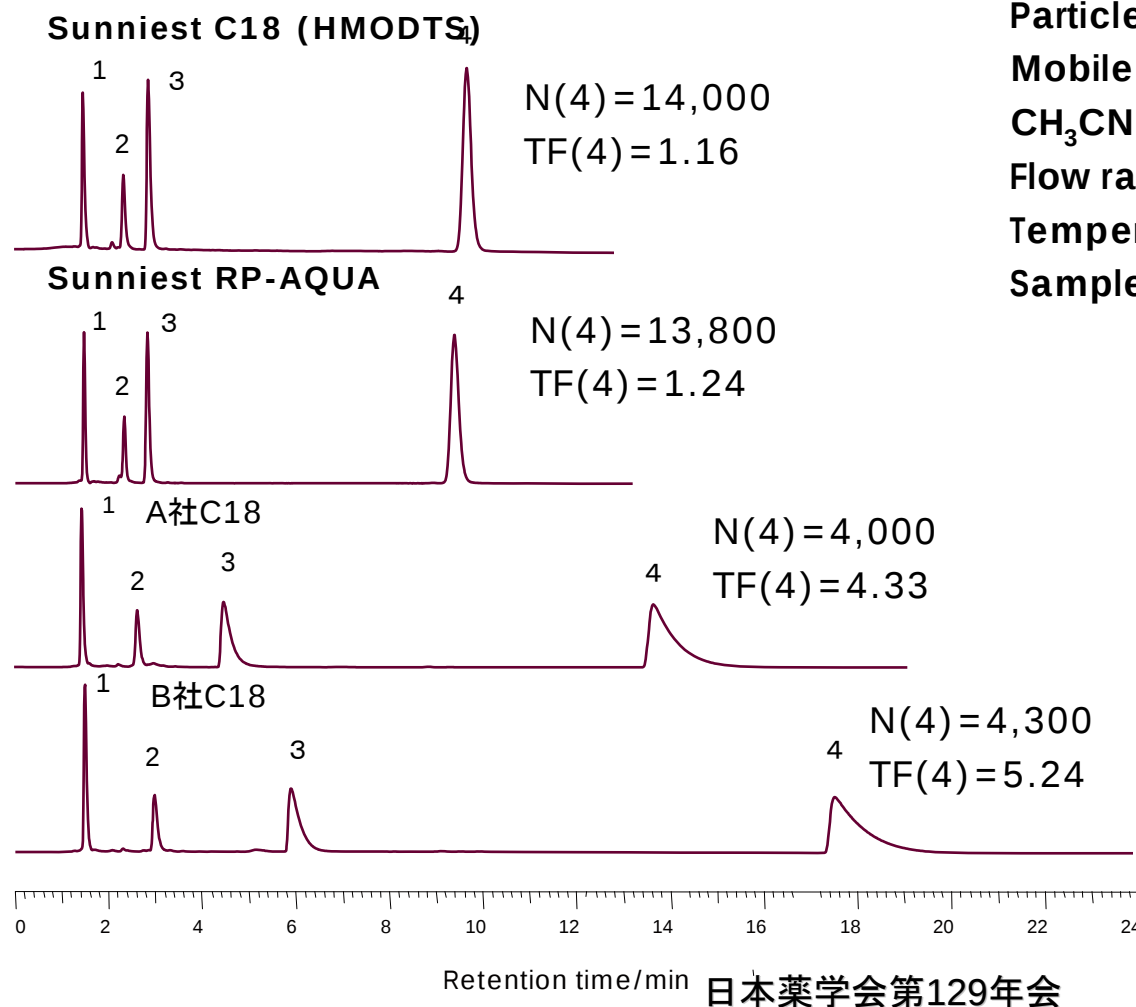
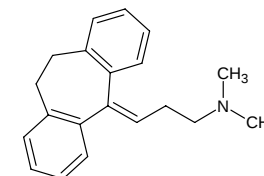
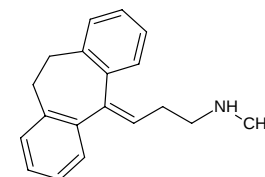
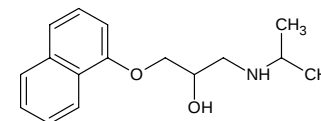
Temperature: 40 °C

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

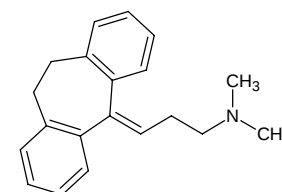
Mobile phase:

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

Flow rate: 1.0 mL/min

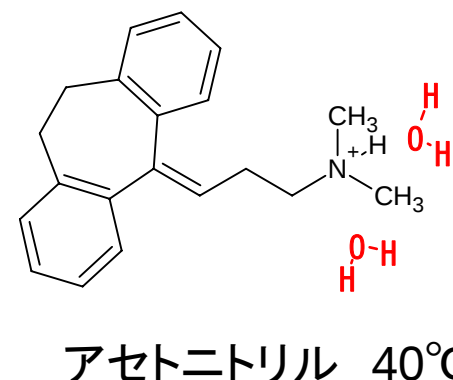
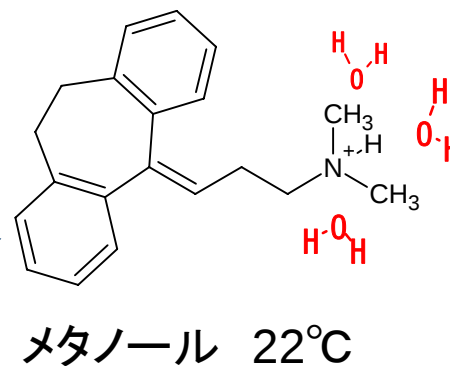
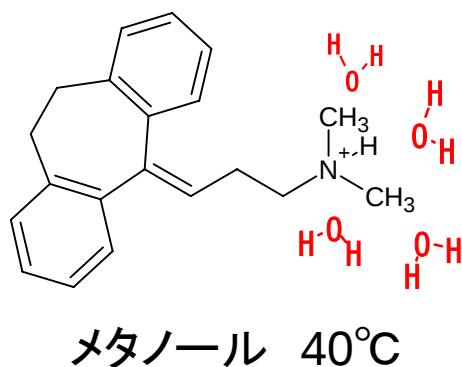
Temperature: 40 °C

Sample: Amitriptyline



溶質の水和状態の変化

塩基性化合物のカチオンの周りの水和量は
カラム温度が下がるほど下がり、
メタノールよりもアセトニトリルの方が下がる

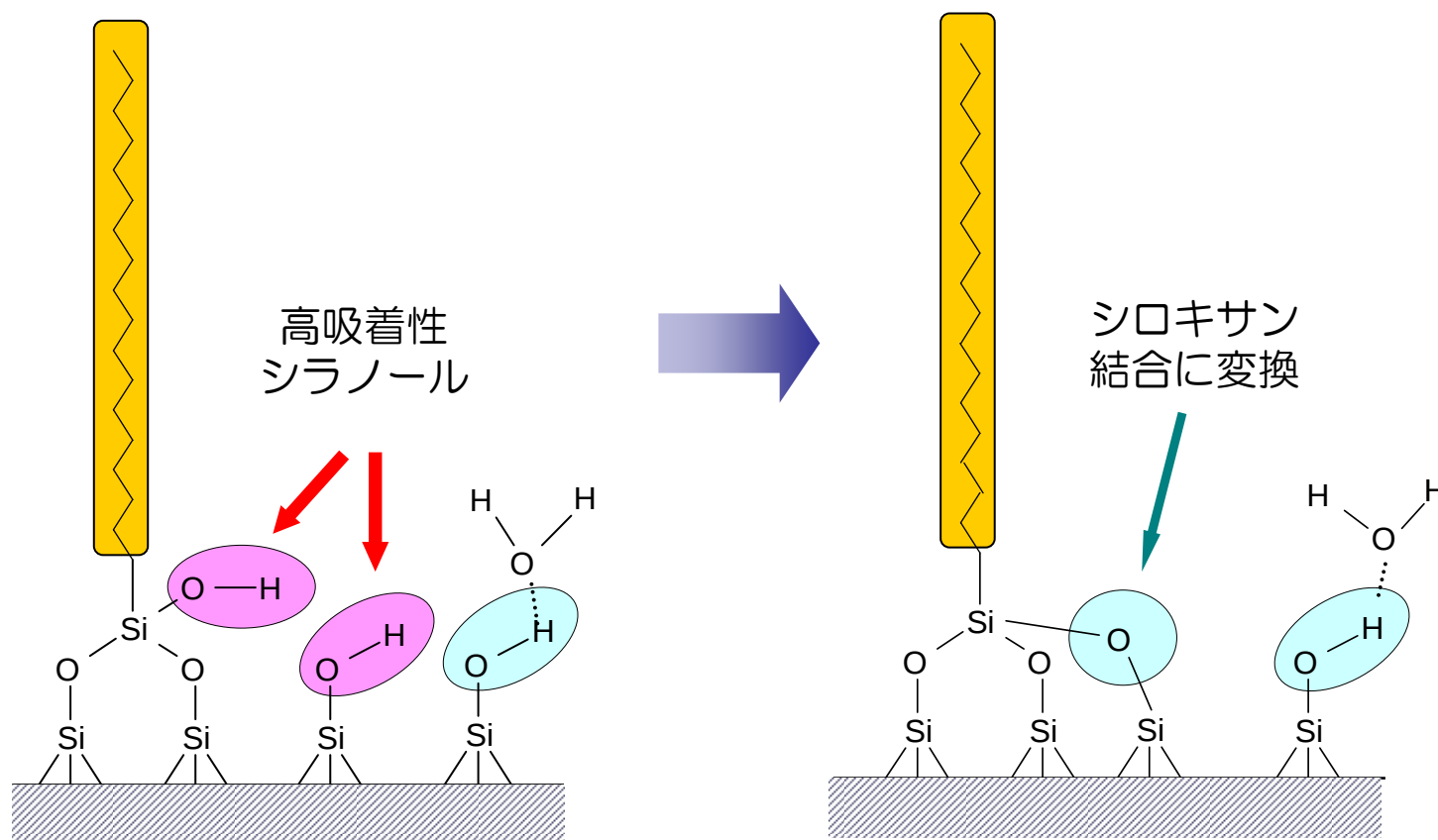


塩基性化合物のカチオンの周りの水和量が少ない

シラノール基とのイオン交換吸着相互作用が強く働く

テーリング

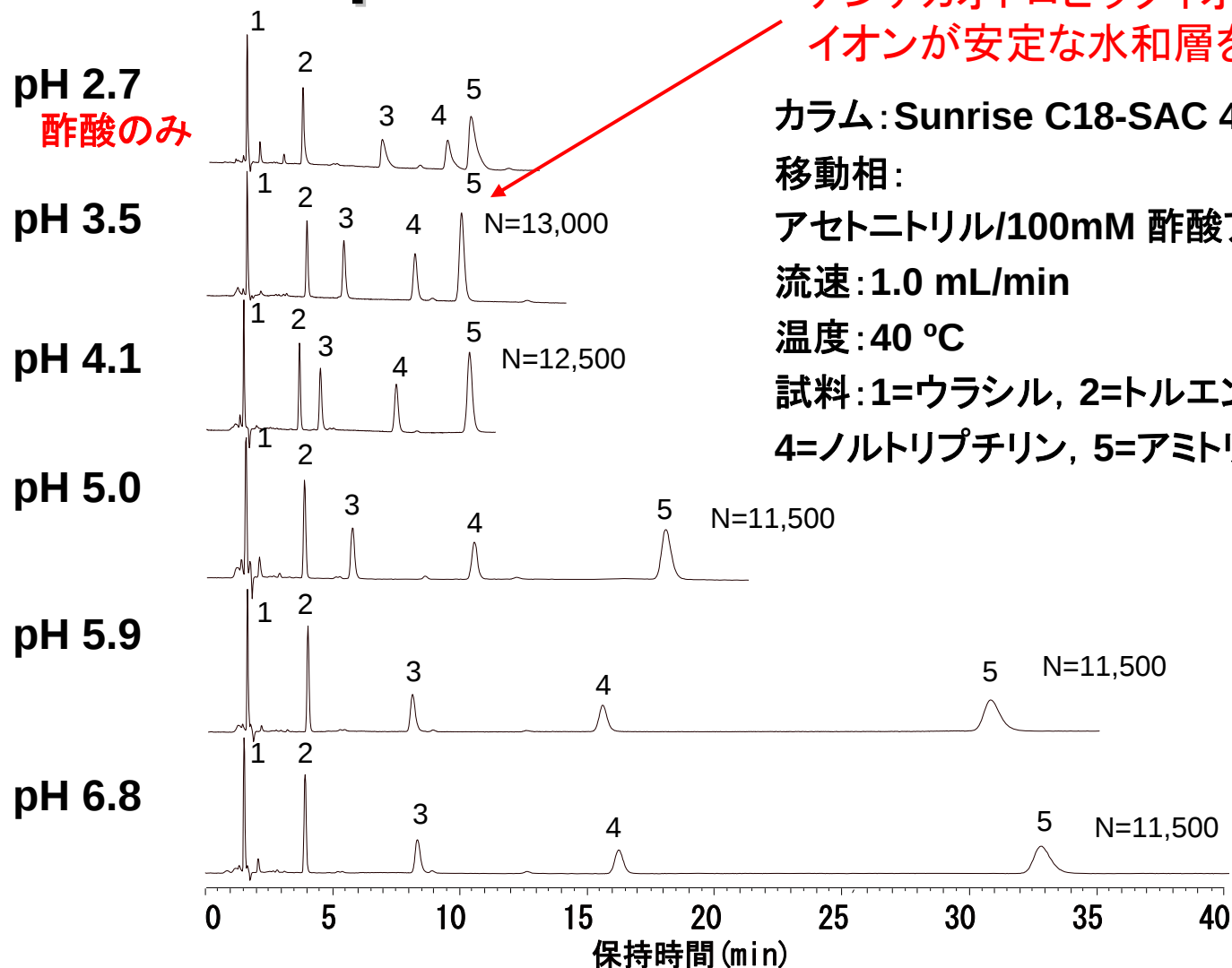
シラノール基を残したC18固定相 Sunrise C18-SAC



水和したシラノール基はアミトリプチリン(塩基性)をイオン交換相互作用で保持増大させるが、アミトリプチリンをテーリングさせない。

酢酸アンモニウムを用いた塩基性化合物の 分離：pHの影響

アンチカオトロピックイオンであるアンモニウム
イオンが安定な水和層を形成



カラム: Sunrise C18-SAC 4.6 x 150 mm

移動相:

アセトニトリル/100mM 酢酸アンモニウム (70:30)

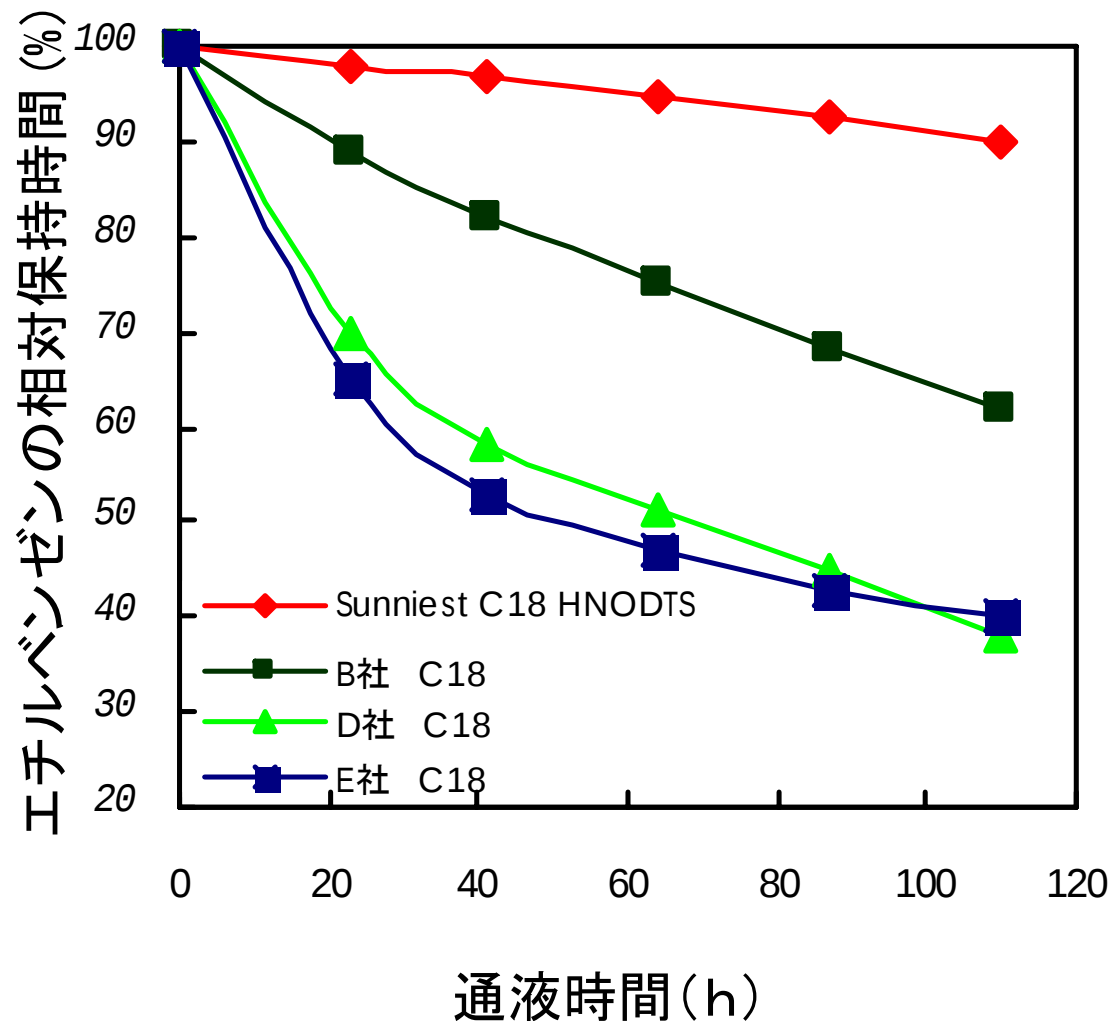
流速: 1.0 mL/min

温度: 40 °C

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

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

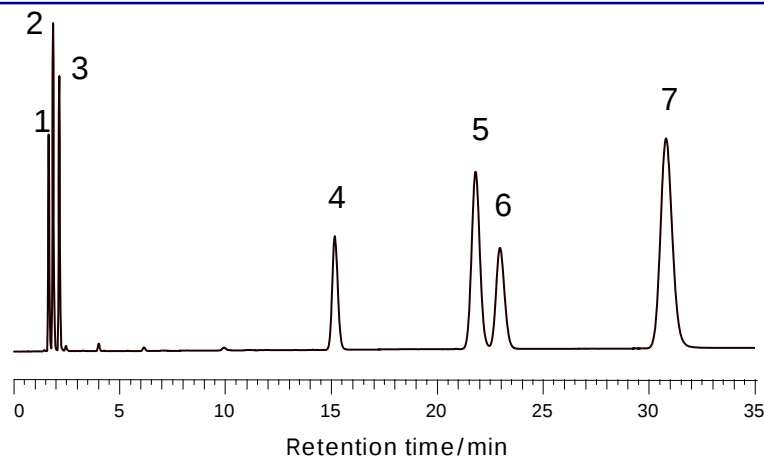
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Ethylbenzene

分離特性 I

標準試料の分離例



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

Pressure: 5.4 MPa

Sample: 1 = Uracil,

2 = Caffeine,

3 = Phenol,

4 = Butylbenzene

5 = o-Terphenyl

6 = Amylbenzene

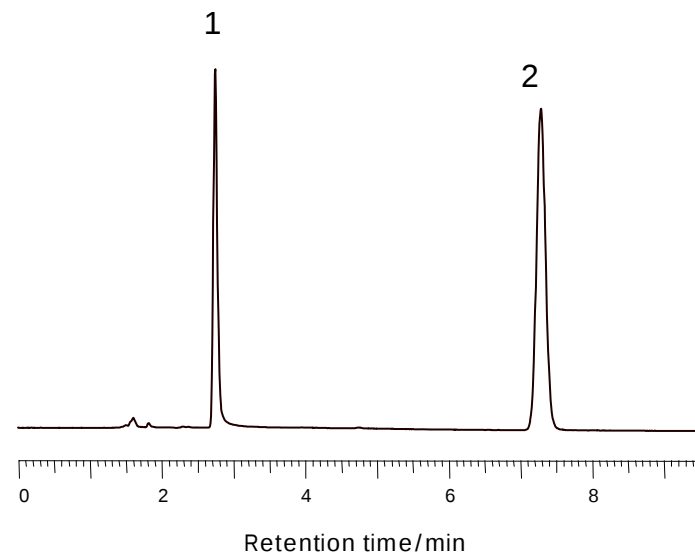
7 = Triphenylene

疎水性: 分離係数 (Amylbenzene/Butylbenzene) = 1.58

水素結合性: 分離係数 (Caffeine/Phenol) = 0.41

立体選択性: 分離係数 (Triphenylene/o-Terphenyl) = 1.43

金属配位性化合物の分離



Column: Sunniest C18

HMODTS, 5 μ m 4.6x150 mm

Mobile phase:

CH₃CN/20mM H₃PO₄=10/90

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

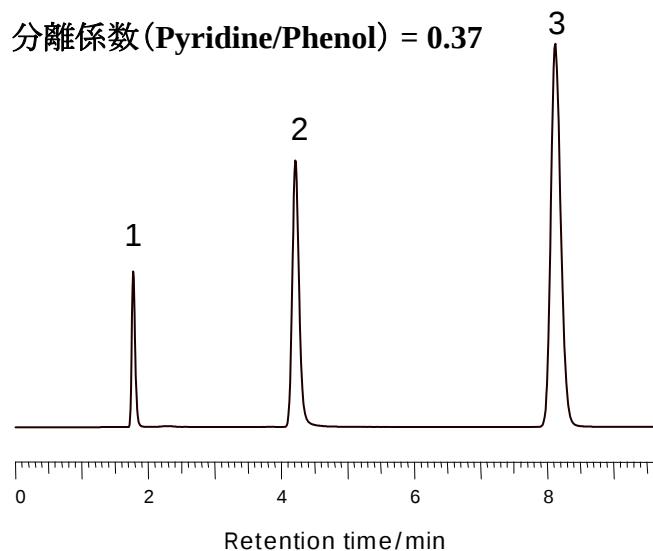
Detection: UV@250nm

Sample: 1 = 8-Quinolinol

2 = Caffeine

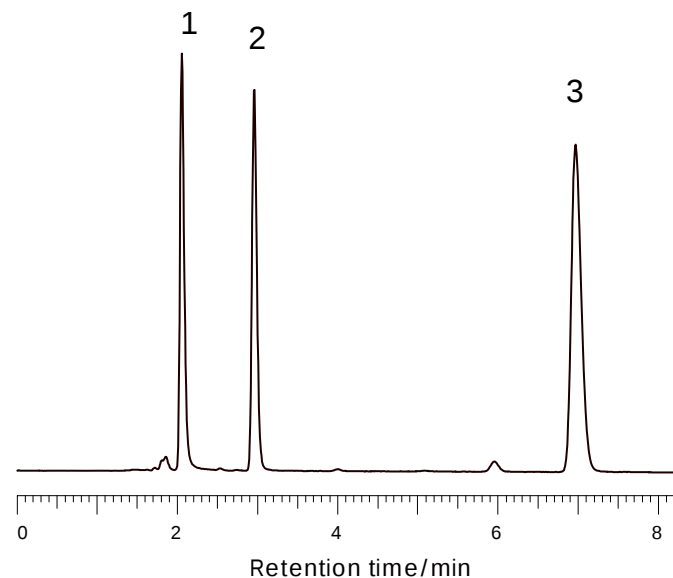
分離特性 II

ピリジンとフェノールの分離



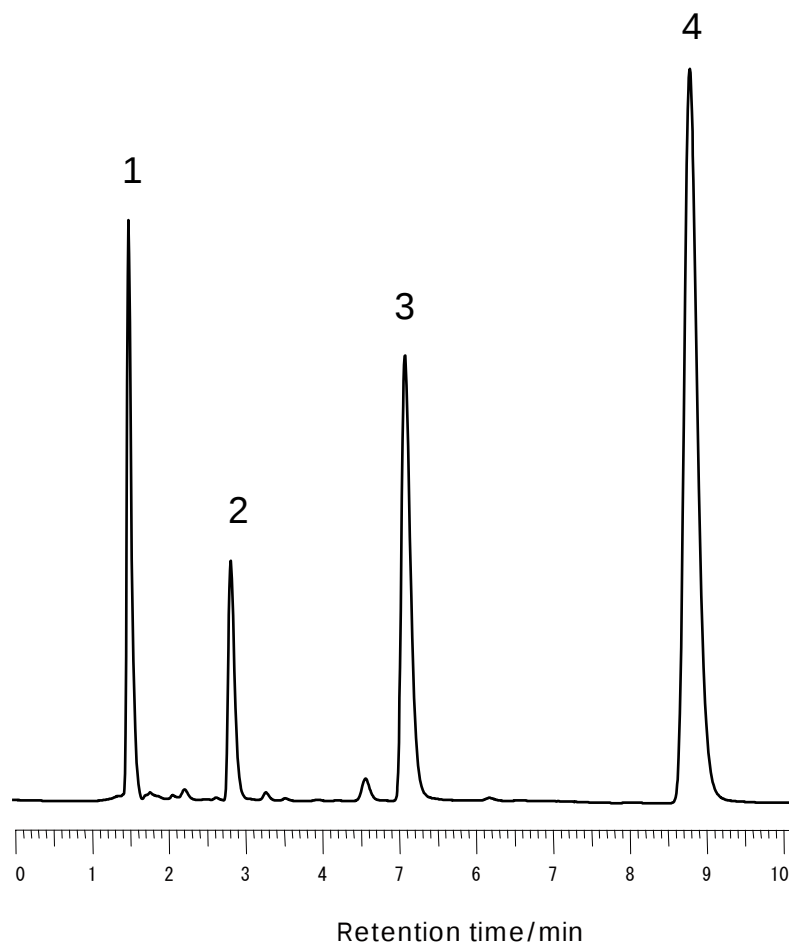
Column: Sunniest C18
HMODTS, 5 μ m 4.6x150 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=30/70
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@250nm
Sample: 1 = Uracil
2 = Pyridine
3 = Phenol

酸性化合物の分離



Column: Sunniest C18
HMODTS, 5 μ m 4.6x150 mm
Mobile phase: CH₃CN/0.1% H₃PO₄=2/98
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@210nm
Sample: 1 = Formic acid
2 = Acetic acid
3 = Propionic Acid

アセトニトリルと酢酸アンモニウムを用いた アミトリプチリンの分離例



Column: Sunniest C18 HMODTS, 5 μ m 4.6x150 mm

Mobile phase:

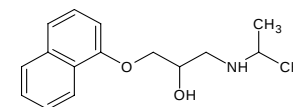
CH₃CN/10mM Ammonium acetate pH6.8=40/60

Flow rate: 1.0 mL/min

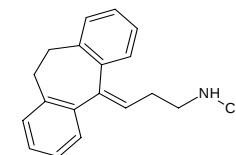
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil,

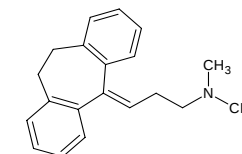
2 = Propranolol,



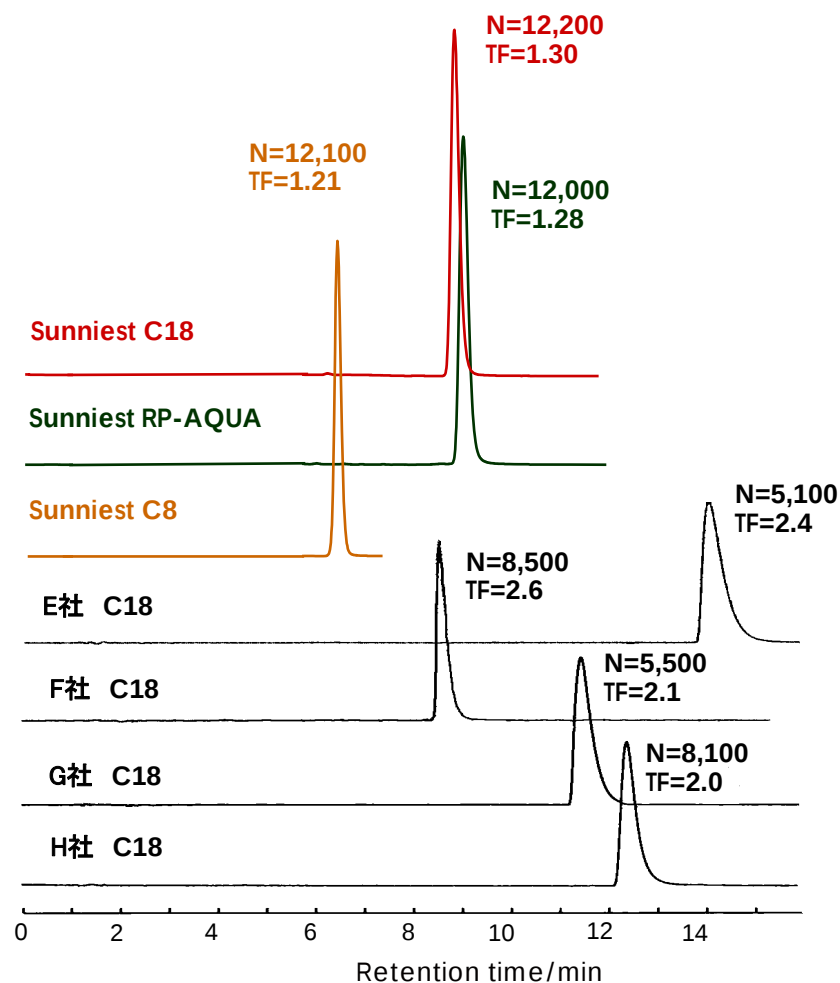
3 = Nortriptyline,



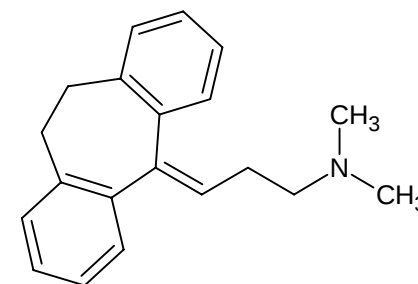
4 = Amitriptyline



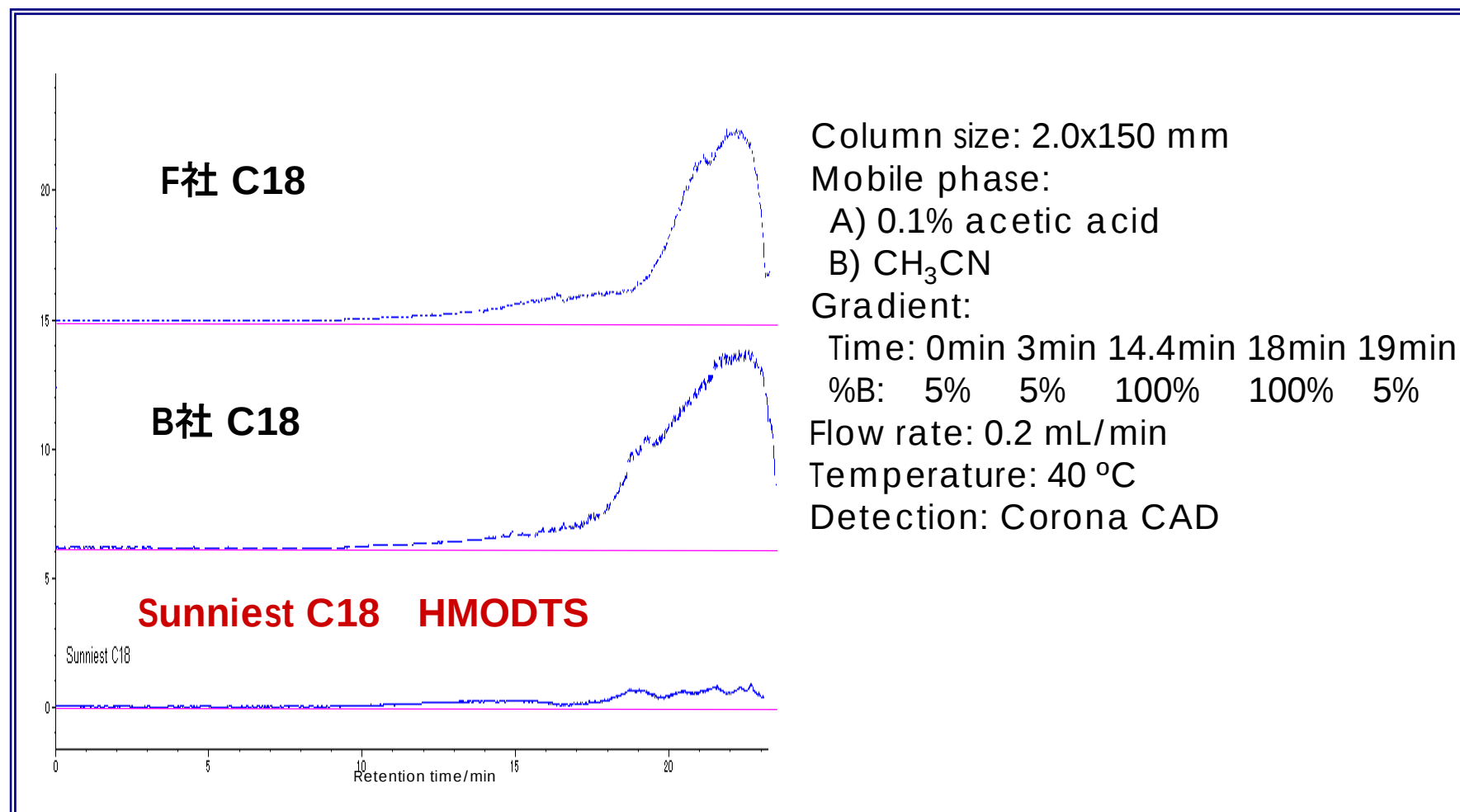
他社との比較



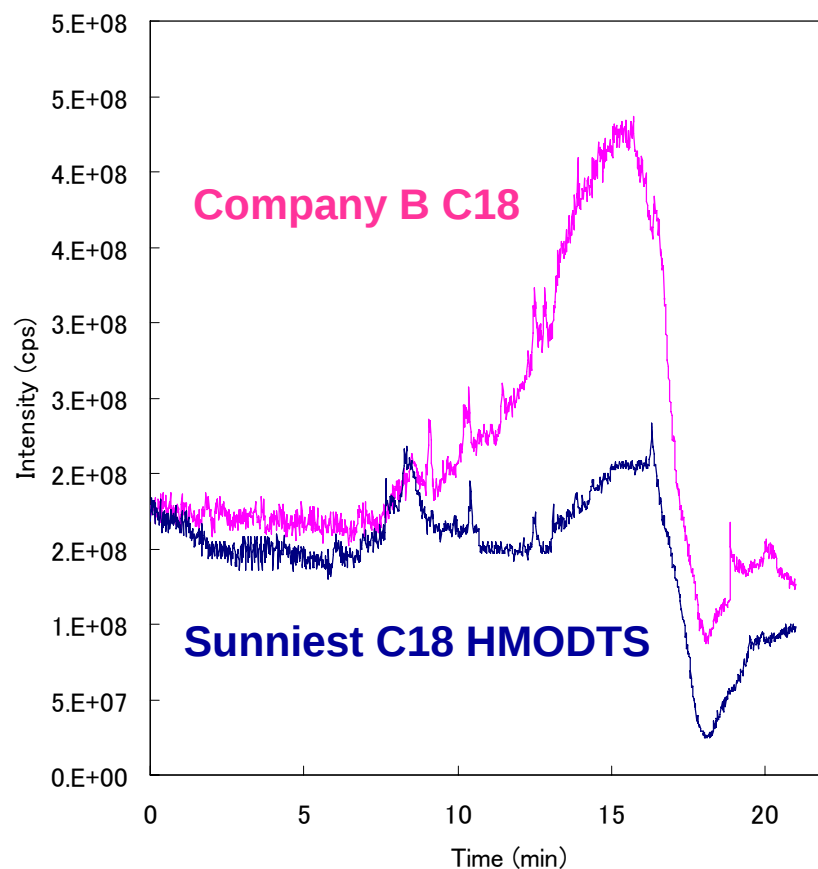
Column size: 4.6x150 mm
 Particle size: 5 μ m
 Mobile phase: CH₃CN/10mM
 Ammonium acetate
 pH6.8=40/60
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample: Amitriptyline



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



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

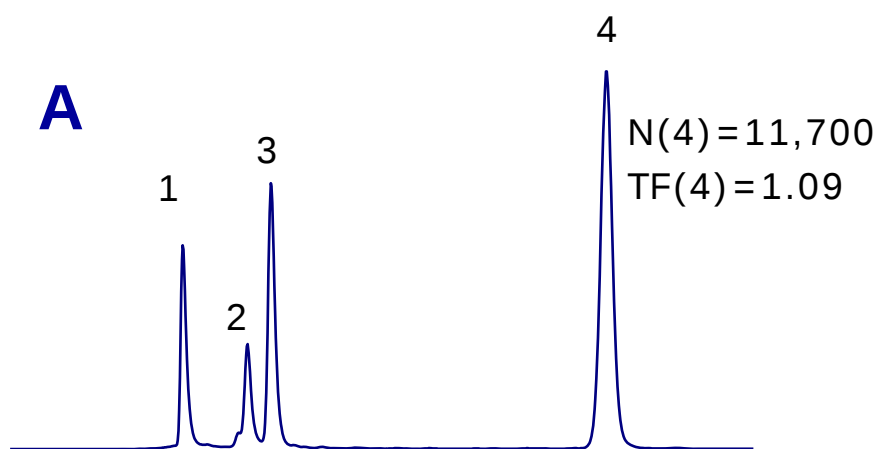
MS: ABI API-4000

Ionization: Turboionspray (cation)

Measurement mode:

Q1 Scan m/z 100-1000

オクチル基(C8,HMOTS)でも同様に合成 アミトリプチリンのピーク形状



Column: Sunniest C8 HMOTS, 5 μ m 4.6x150 mm

Mobile phase:

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

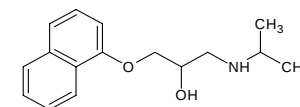
B) CH₃CN/10mM Ammonium acetate pH6.8=40/60

Flow rate: 1.0 mL/min

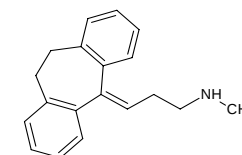
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil,

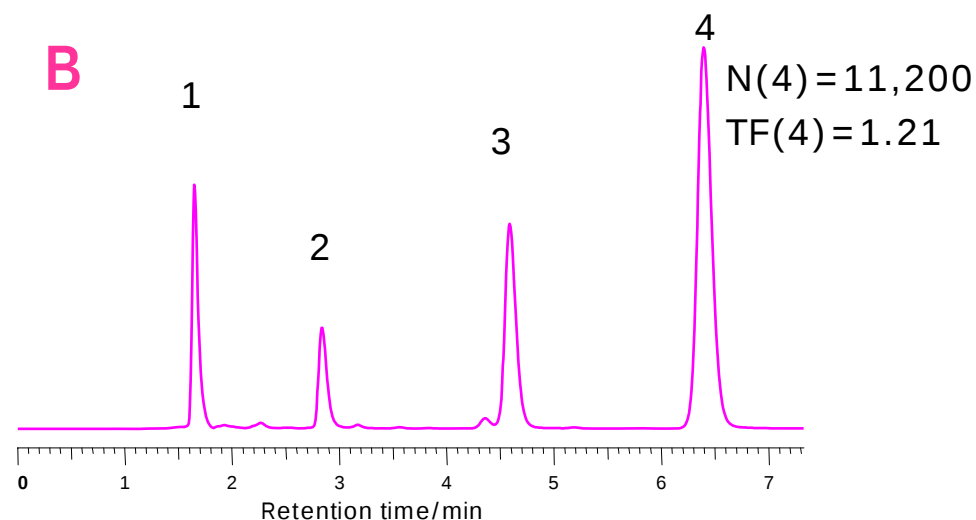
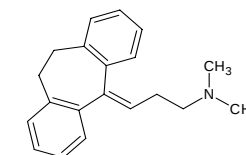
2 = Propranolol,



3 = Nortriptyline,



4 = Amitriptyline



【まとめ】 Sunniest C18, RP-AUQA, C8

- 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スロキサンを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
- 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