

# 分離選択の大幅な改善：高温・有機 溶媒が有する知られざる能力

(株) クロマニック テクノロジーズ  
長江 徳和

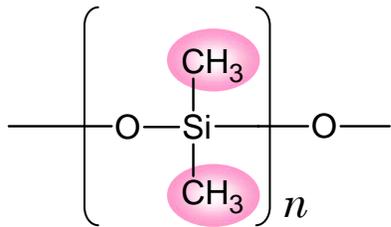
# 高耐熱性POST-X<sup>2</sup> C18の開発

- 近年, 2 $\mu$ 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ます
- 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, 有機シリケートグラフトによる基材シリカゲルの改質を行い, 60°Cで十分に使用可能なC18カラムであるPost-X<sup>2</sup> C18を開発した

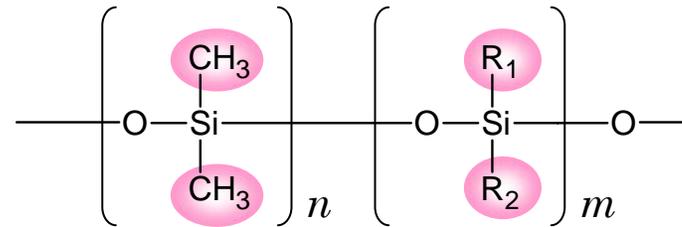


# 耐熱性シラン化合物

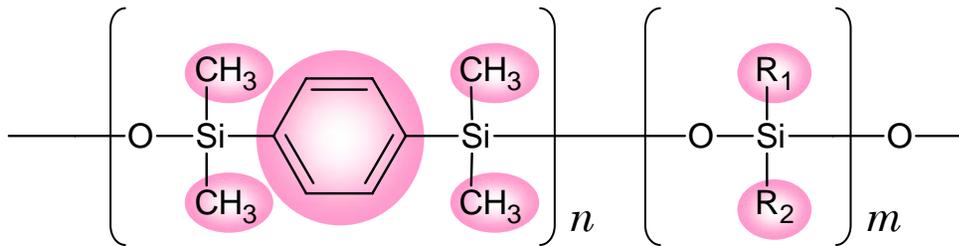
## GC用固定相に用いられている



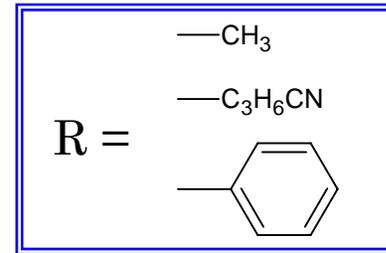
Poly[dimethylsiloxane]  
(OV-1, SE30...)



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

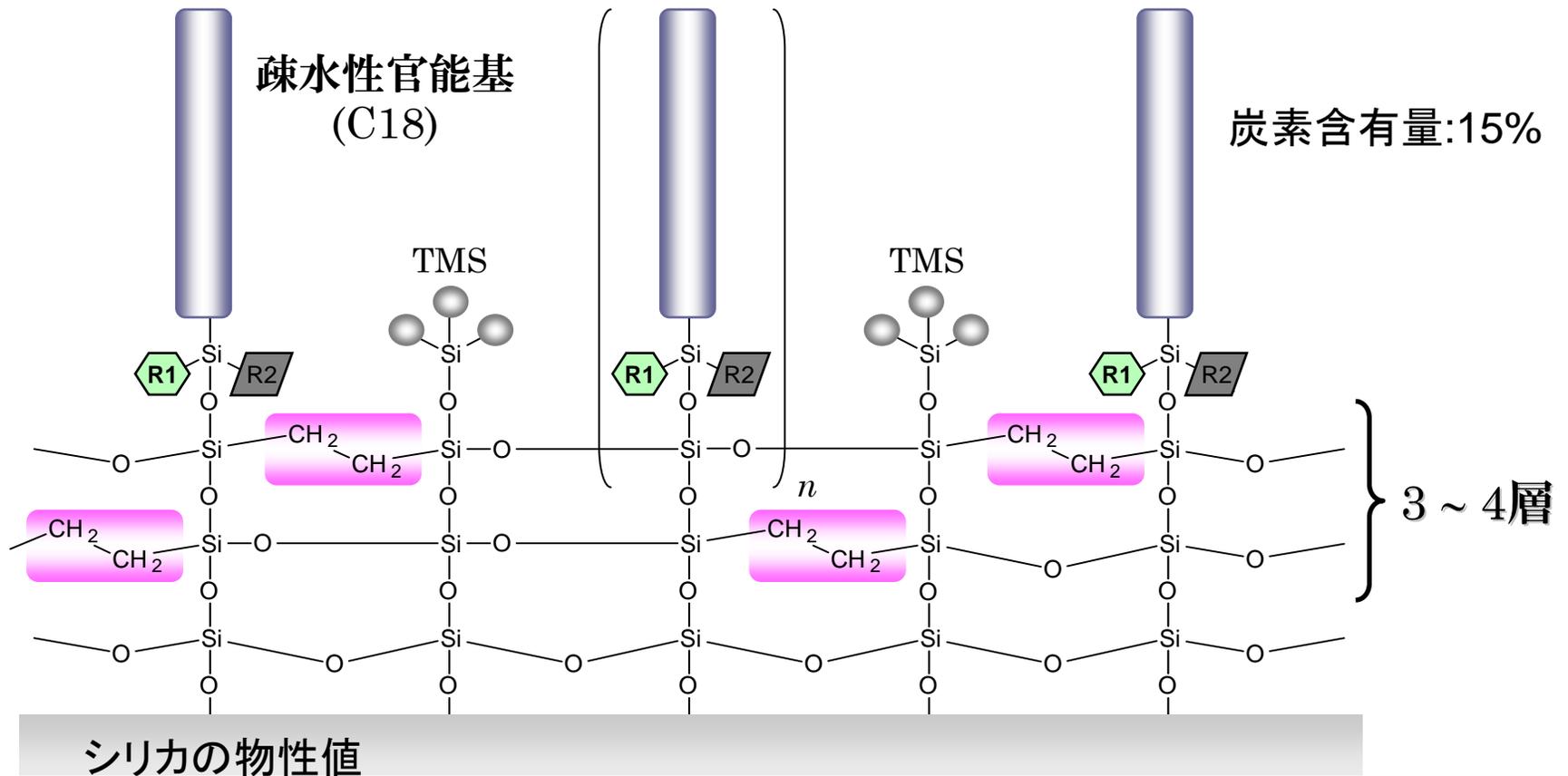


Silarylene (silphenylene) type



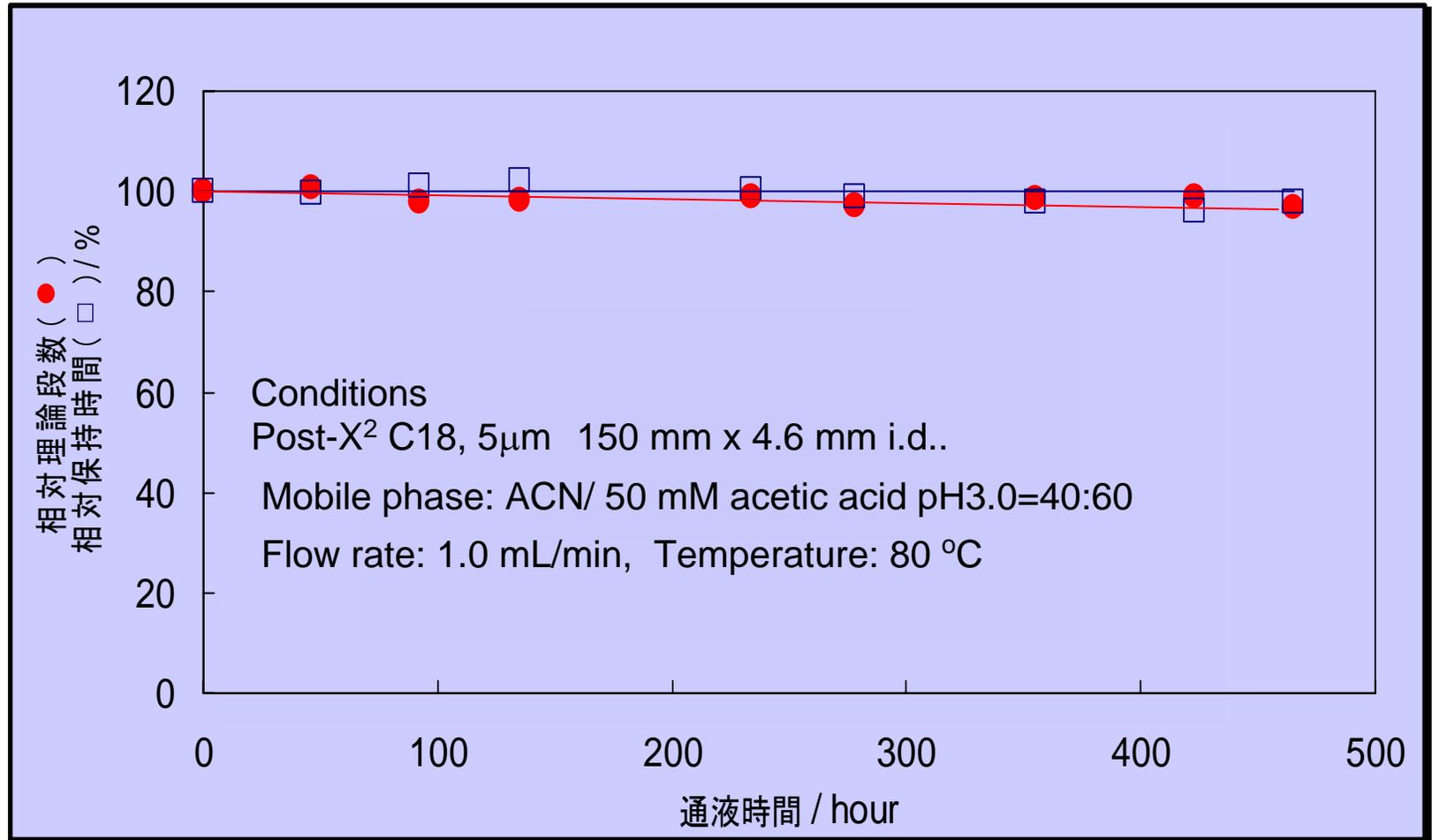
アルキル・アルキレン基の導入で耐熱性・化学的安定性が向上する?!

# 有機シリケートグラフト型固定相 (Post-X<sup>2</sup> C18)の推定構造

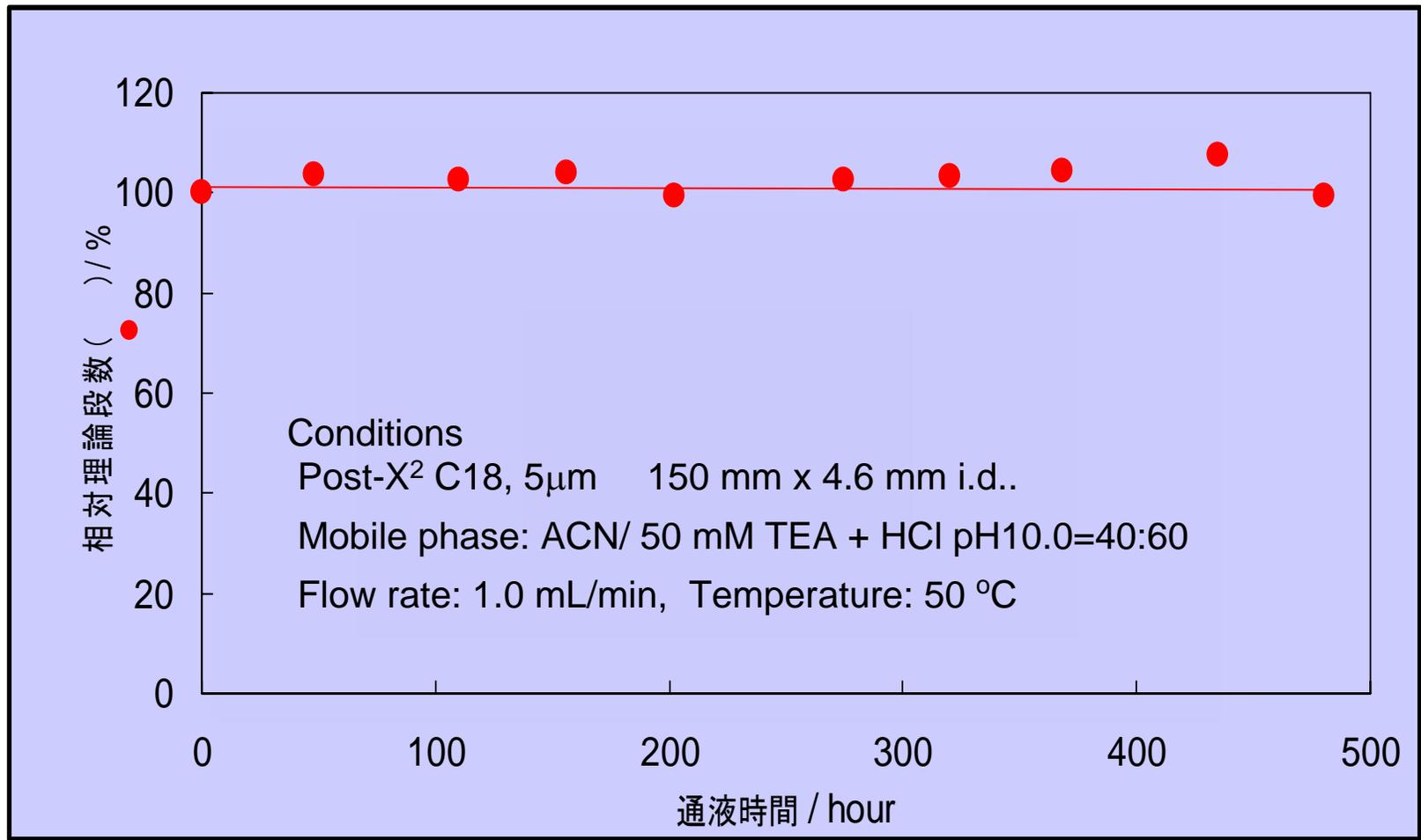


比表面積: 340m<sup>2</sup>/g, 細孔容積: 1.0mL/g, 細孔径: 12nm

# 80°C-pH 3.0における理論段数と保持時間の変化



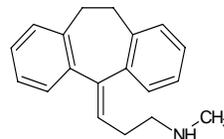
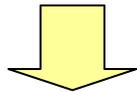
# 50°C-pH 10における理論段数の変化



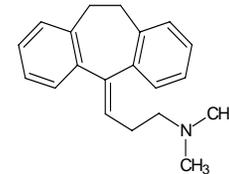
# カラム温度を上げるとどうなるか？

- ★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



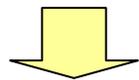
ノルトリプチリン



アミトリプチリン

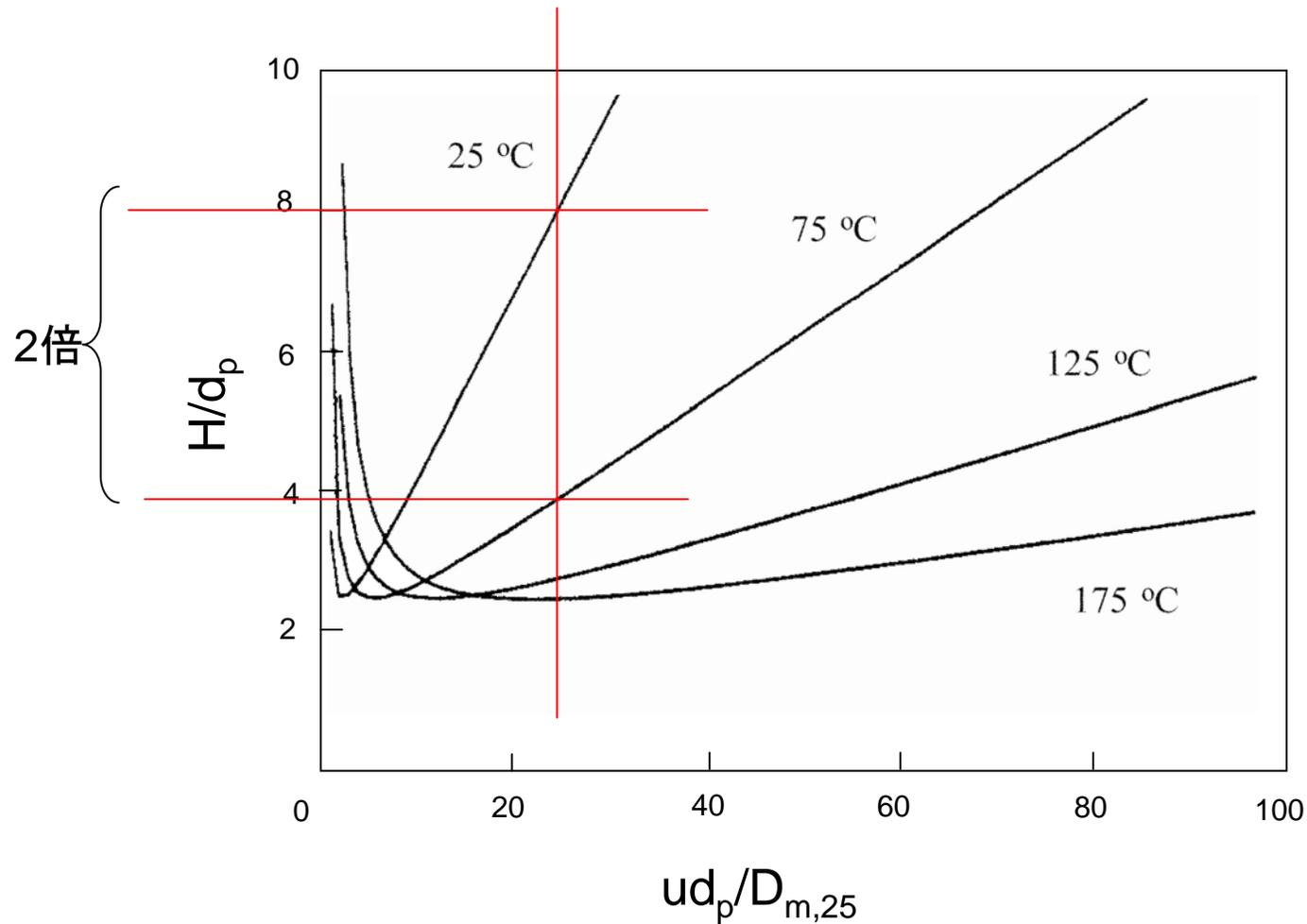
理論段数が上昇，更に対称性も向上

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



# 温度と粘度および拡散係数との関係

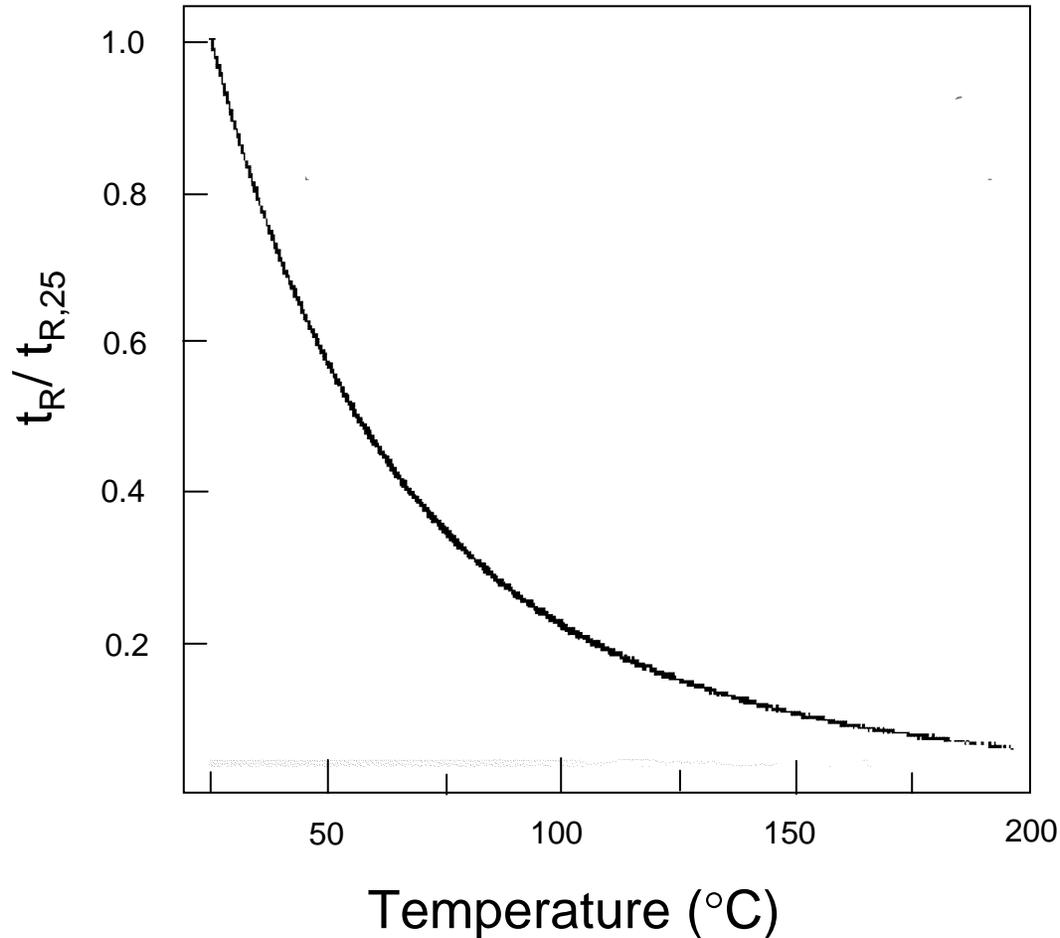
$$\eta = \alpha \exp(\beta/T)$$

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

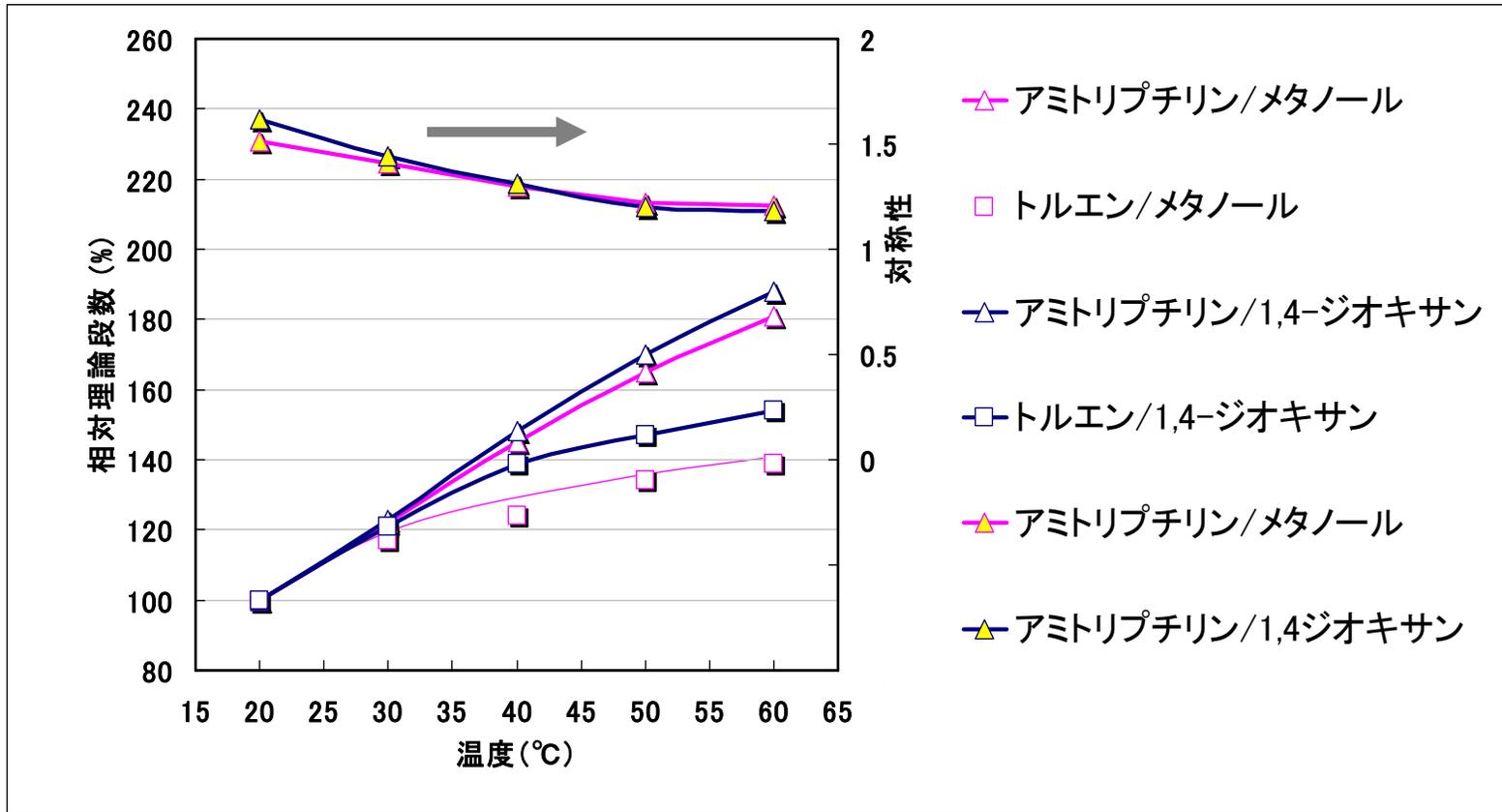
$\eta$ : 粘度,  $T$ : 絶対温度,  $D$ : 拡散係数

# 温度と分析時間の関係

カラム圧, 段数を一定となる条件



# カラム温度による理論段数と対称性の変化



カラム: Post-X<sup>2</sup> C18, 5 $\mu$ m 4.6x150 mm

移動相: メタノール/20mM リン酸緩衝液pH7.5 (80:20)

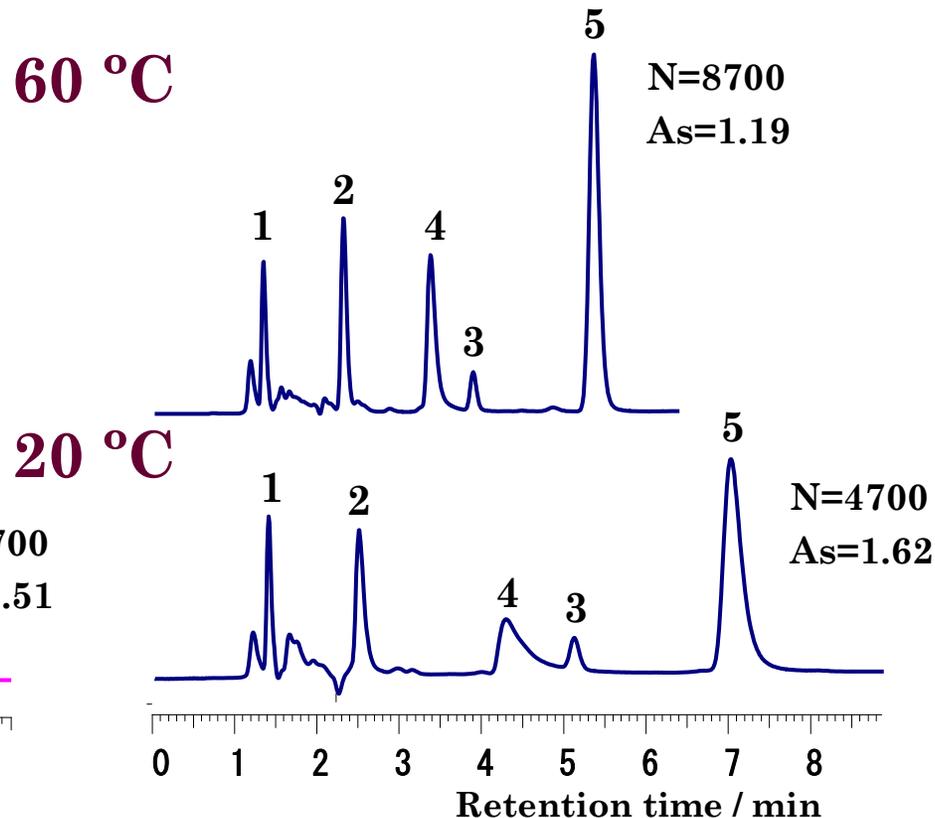
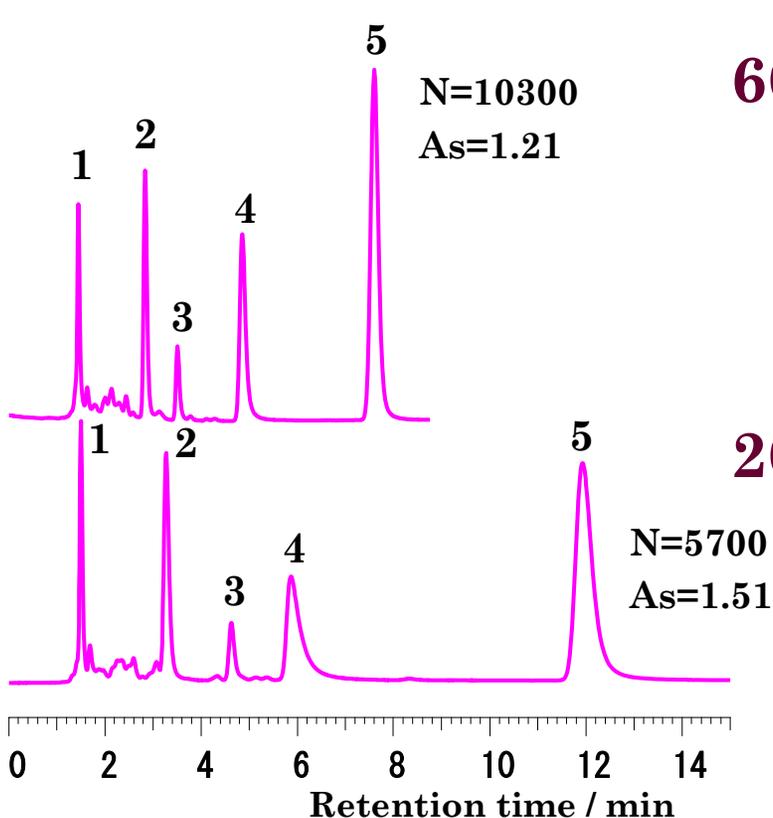
1,4-ジオキサン/5mM リン酸緩衝液pH7.5 (65:35)

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: Post-X<sup>2</sup> C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x150 mm.

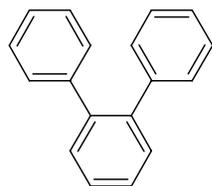
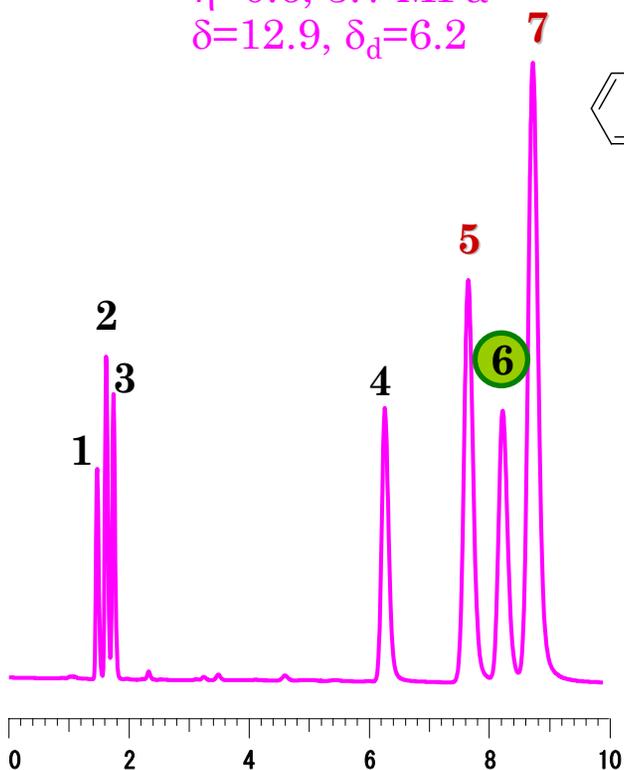
カラム温度: 60 °C, 20 °C 検出: UV @ 250 nm.

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<sup>13</sup>

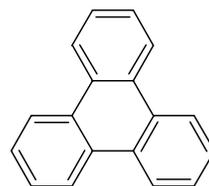
# 高粘性溶媒による選択性の変化

82% メタノール

$\eta=0.6, 3.7 \text{ MPa}$   
 $\delta=12.9, \delta_d=6.2$



Peak 5



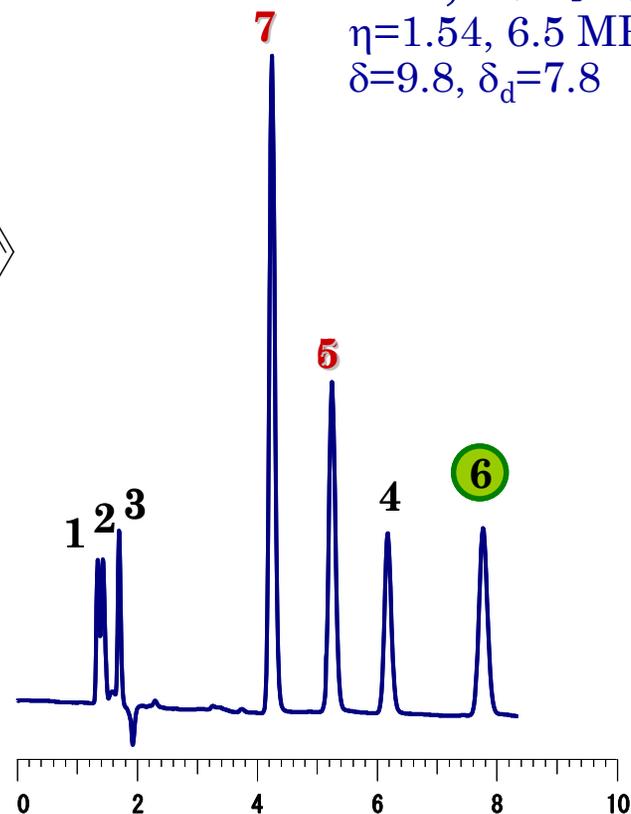
Peak 7



1. ウラシル
2. カフェイン
3. フェノール
4. ブチルベンゼン
5. o-ターフェニル
6. アミルベンゼン
7. トリフェニレン

68% 1,4-ジオキサン

$\eta=1.54, 6.5 \text{ MPa}$   
 $\delta=9.8, \delta_d=7.8$



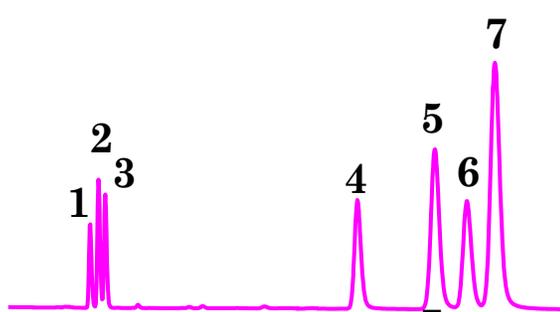
Retention time / min

カラム: Post-X<sup>2</sup> C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

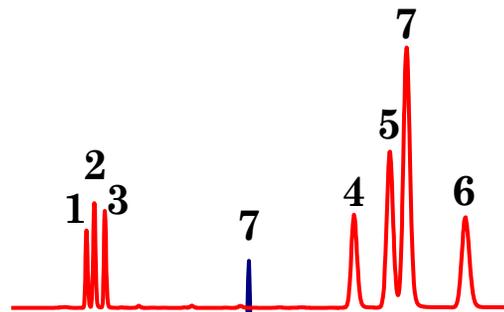
カラム温度: 60 °C, 検出: UV @ 250 nm.

Retention time / min

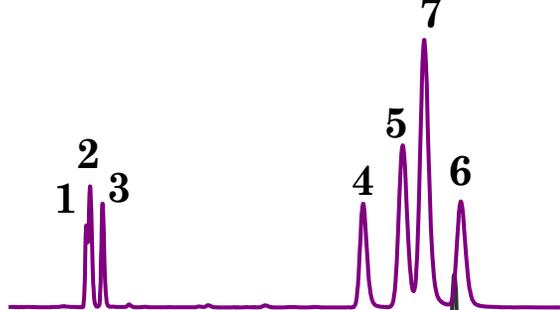
# 高粘性溶媒の使用－ 選択性のコントロール I



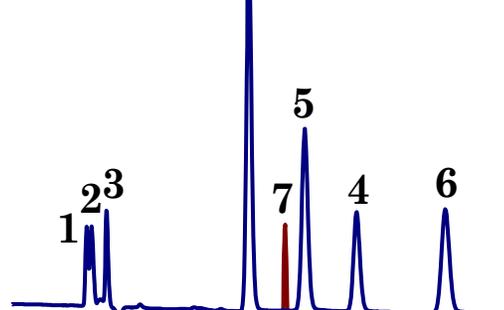
**82% メタノール**  
 $\eta=0.6$   
 3.7 MPa  
 $\delta=12.9$   
 $\delta_d=6.2$



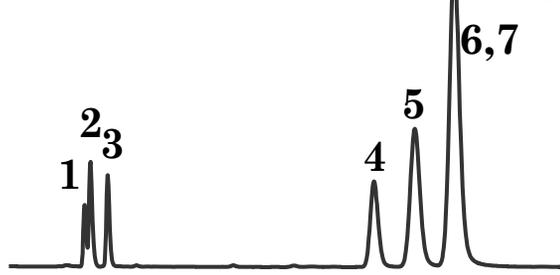
**74% アセトニトリル**  
 $\eta=0.37$   
 2.3 MPa  
 $\delta=11.8$   
 $\delta_d=6.5$



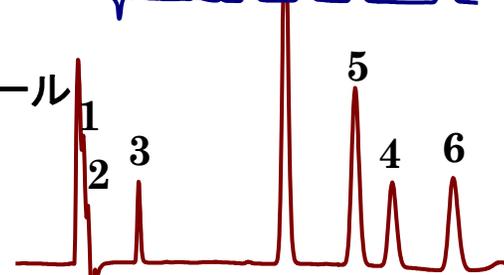
**70% エタノール**  
 $\eta=1.2$   
 6.1 MPa  
 $\delta=11.2$   
 $\delta_d=6.8$



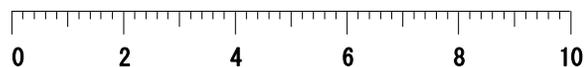
**67% 1,4-ジオキサン**  
 $\eta=1.54$   
 6.5 MPa  
 $\delta=9.8$   
 $\delta_d=7.8$



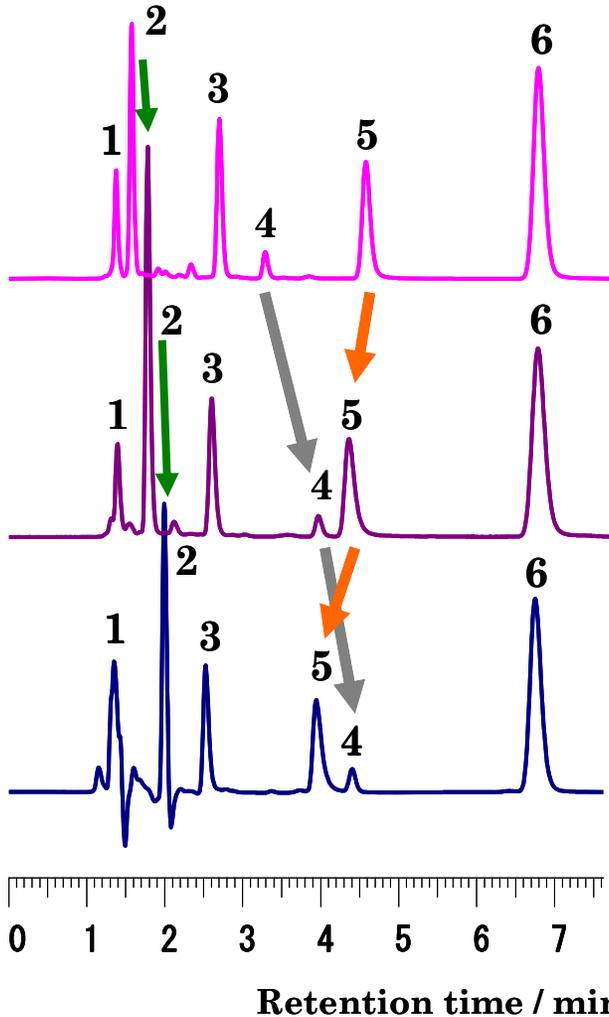
**58% 2-プロパノール**  
 $\eta=2.3$   
 8.0 MPa  
 $\delta=10.2$   
 $\delta_d=7.2$



**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)

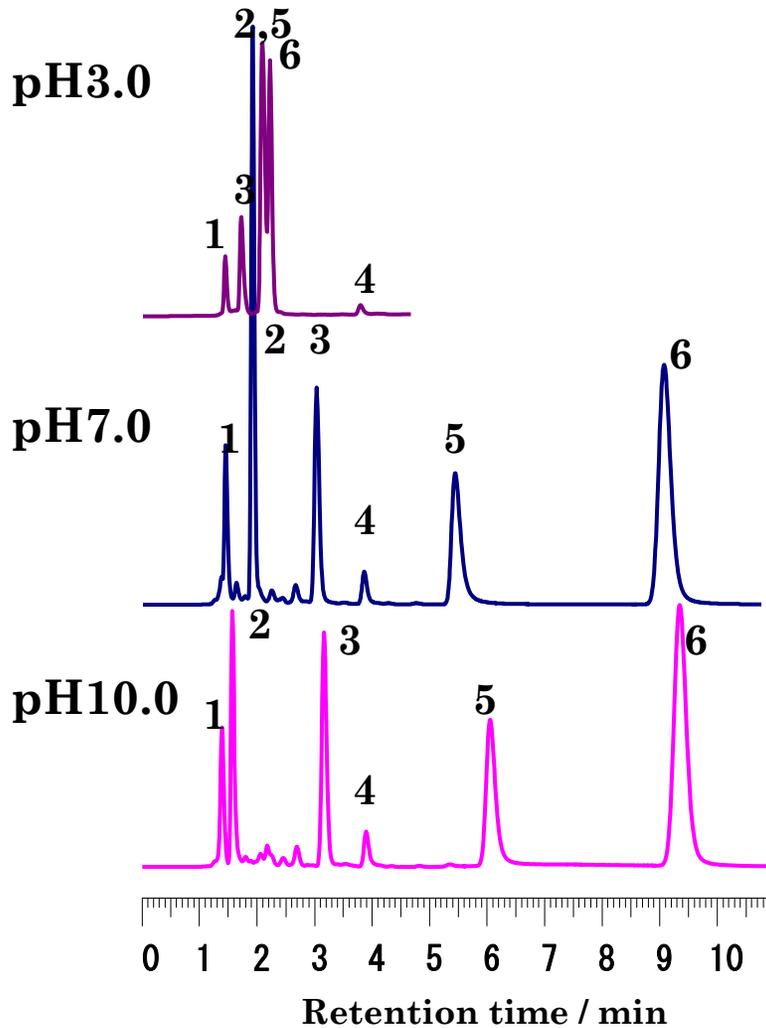
カラム: Post-X<sup>2</sup> C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150 mm

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

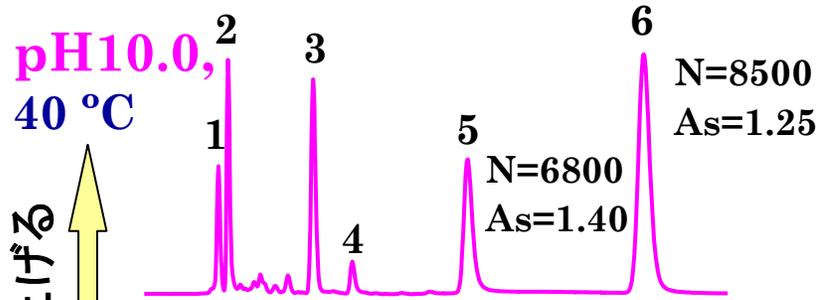
# pHによる保持の変化



pHの上昇に伴い、  
 プロピルパラベン保持減少  
 ノルトリプチリン、アミトリプチリンの保持増加

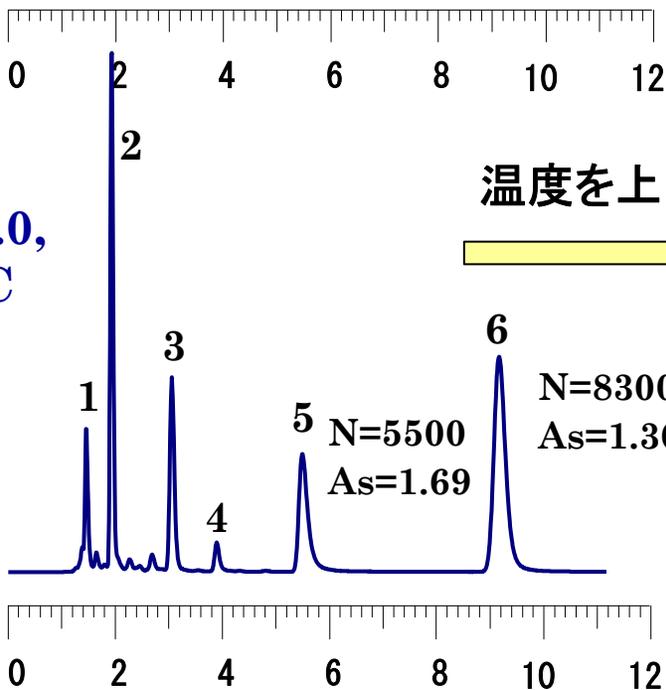
カラム: Post-X<sup>2</sup> C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 150mm  
 移動相: メタノール/20mMリン酸緩衝液. (80:20)  
 カラム温度: 40 °C  
 検出: UV @ 250 nm.  
 試料: 1=ウラシル, 2=プロピルパラベン,  
 3=プロプラノロール, 4=トルエン, 5=ノルトリプチリン,  
 6=アミトリプチリン

# 温度, pHの効果



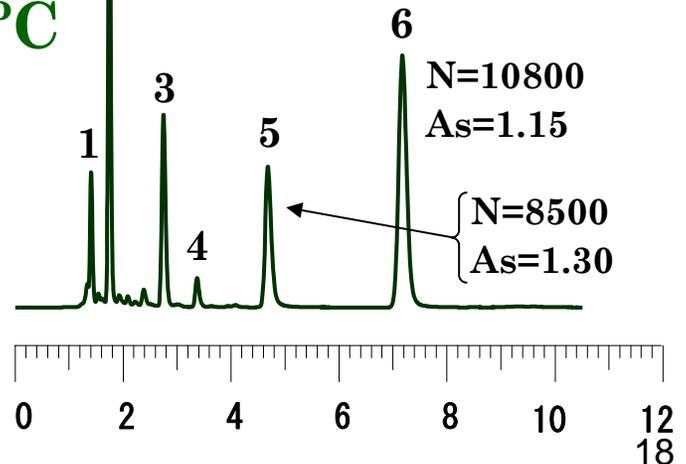
pHを上げる ↑

**pH7.0, 40 °C**



温度を上げる →

**pH7.0, 60 °C**



ピーク形状への効果  
**pH < 温度**

カラム: Post-X<sup>2</sup> C18, 5mm, 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

Retention time / min

# 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
- つまり一本のカラムで性能向上させ，しかも選択性を大きく変え，最適な分離条件を簡単に導き出せる