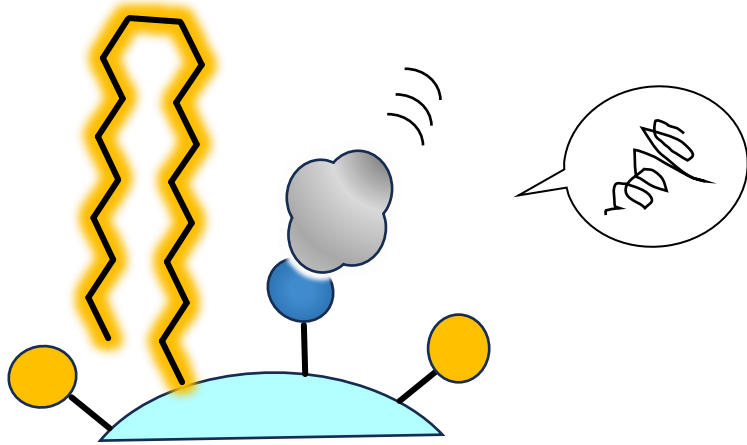


C18(ODS)で困った時の

HPLCカラム選択：高吸着化合物編



ChromaNik



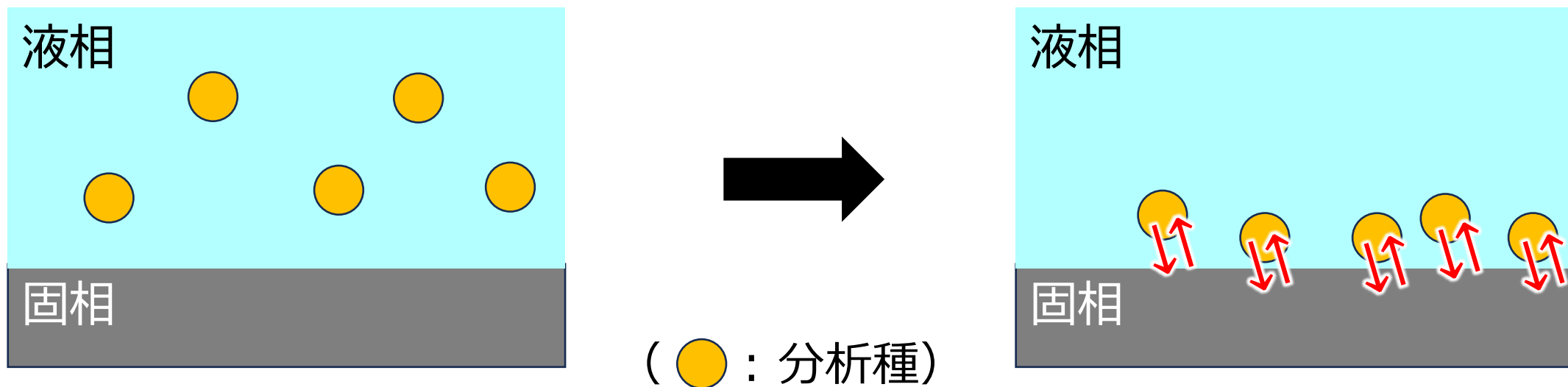
株式会社クロマニック テクノロジーズ

カラムコンシェルジュ 小山 隆次

koyama@chromanik.co.jp

吸着って、ナンダ？

吸着：二相が接する界面上で、特定の成分濃度が上昇する現象



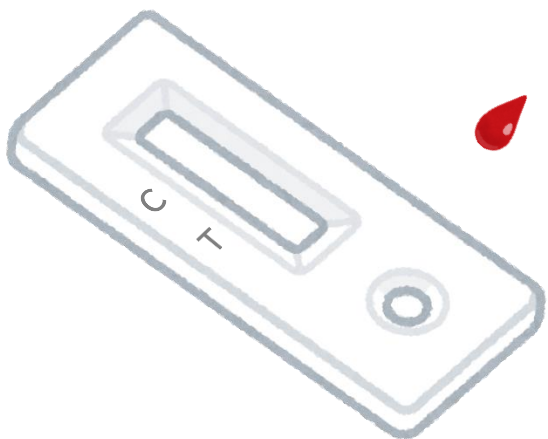
↕ : ファンデルワールスカ、イオン交換作用など

吸着&脱離のメカニズムを利用の例

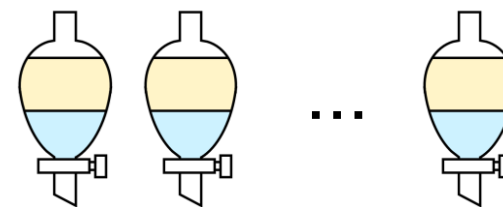
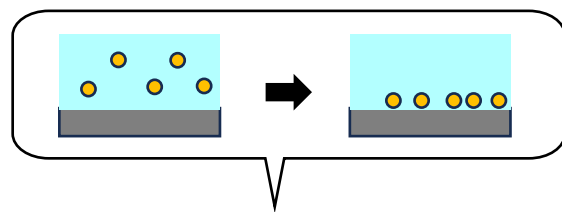
シリカゲル等を吸着剤に用いた、吸着クロマトグラフィー

吸着と分配

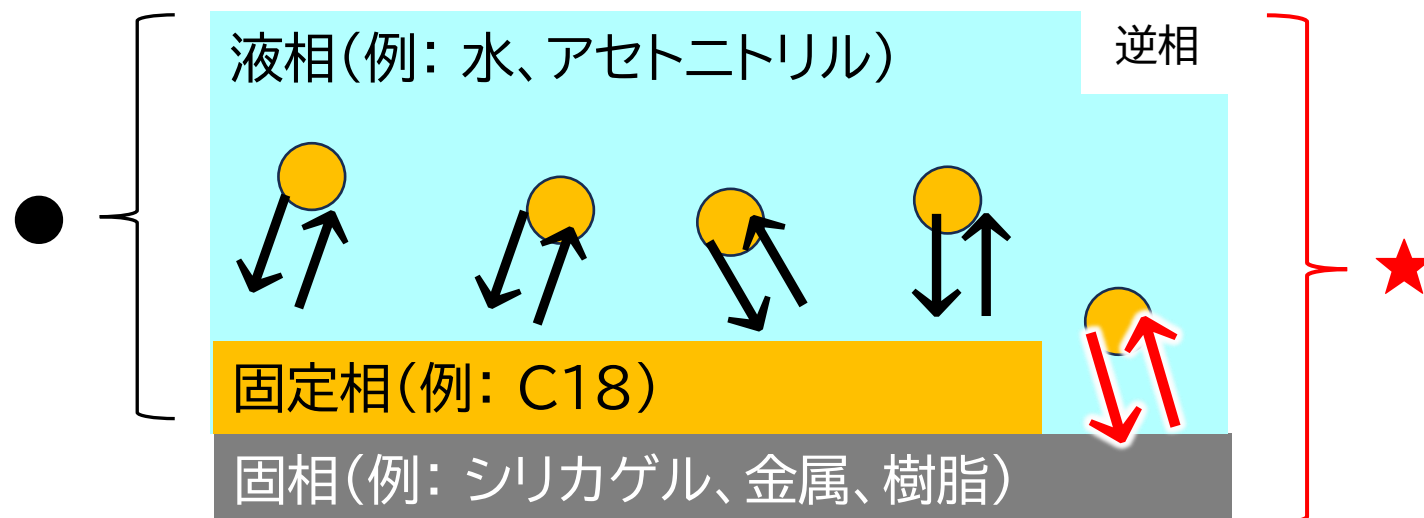
特異的な吸着を利用



抗原・抗体検査キットにおける
免疫クロマトグラフィー



吸着 ⇔ 分配クロマトグラフィー
(逆相HPLCでの利用など)

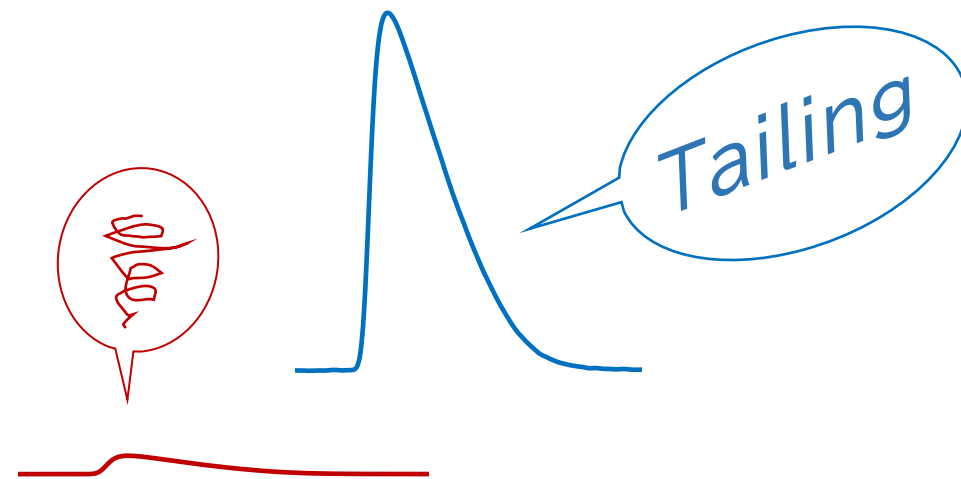
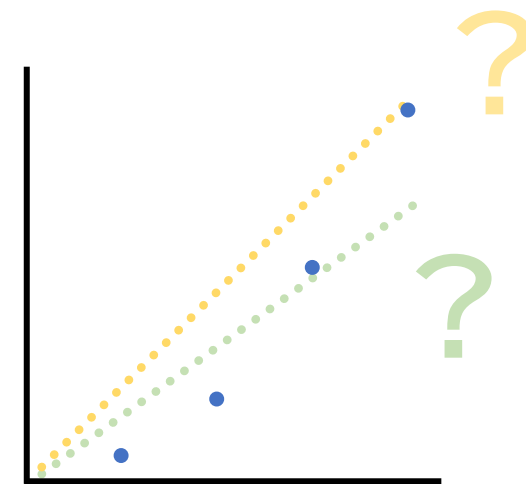


● : 理想的な相互作用系 ★ : 実際の相互作用系

良質な検査・分析のために重要 : (非特異的な) **吸着の排除**

吸着で生じ得る、HPLC分析への影響

- ピーク形状の劣化
- 検量線の直線性が崩れる。
- ピークの消失
- 打つたびに、面積値が変動
- キャリーオーバー



吸着箇所も色々

- **バイアル、前処理**

経時的な容器内壁への吸着

- **サンプラーニードル**

ピーク消失、面積値の変動

- **システム配管系(SS)**

ピーク消失、面積値の変動、キャリーオーバー

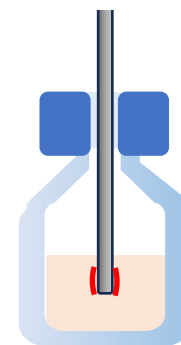
- **カラム**

ピーク形状の劣化・消失、値の変動...

0 min



90 min



カラム内の吸着箇所

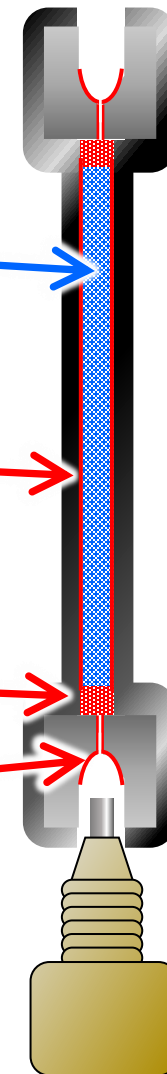


① 充填剤

② カラム管(内壁)

③ フリット(焼結フィルター)

④ カラム接続部



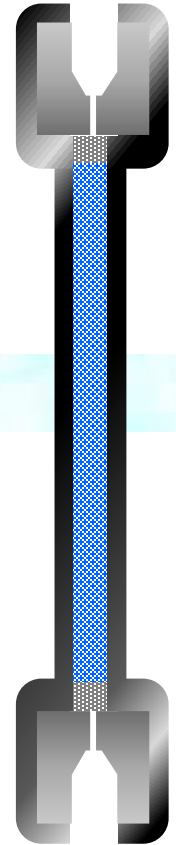
シリカゲル基材由来

金属部(SS)由来

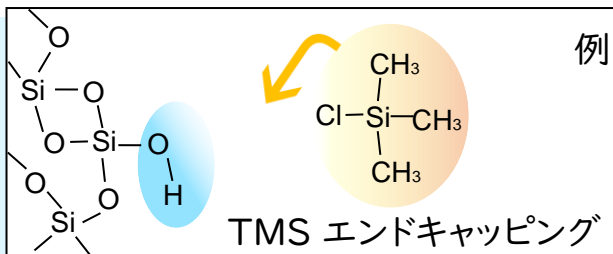
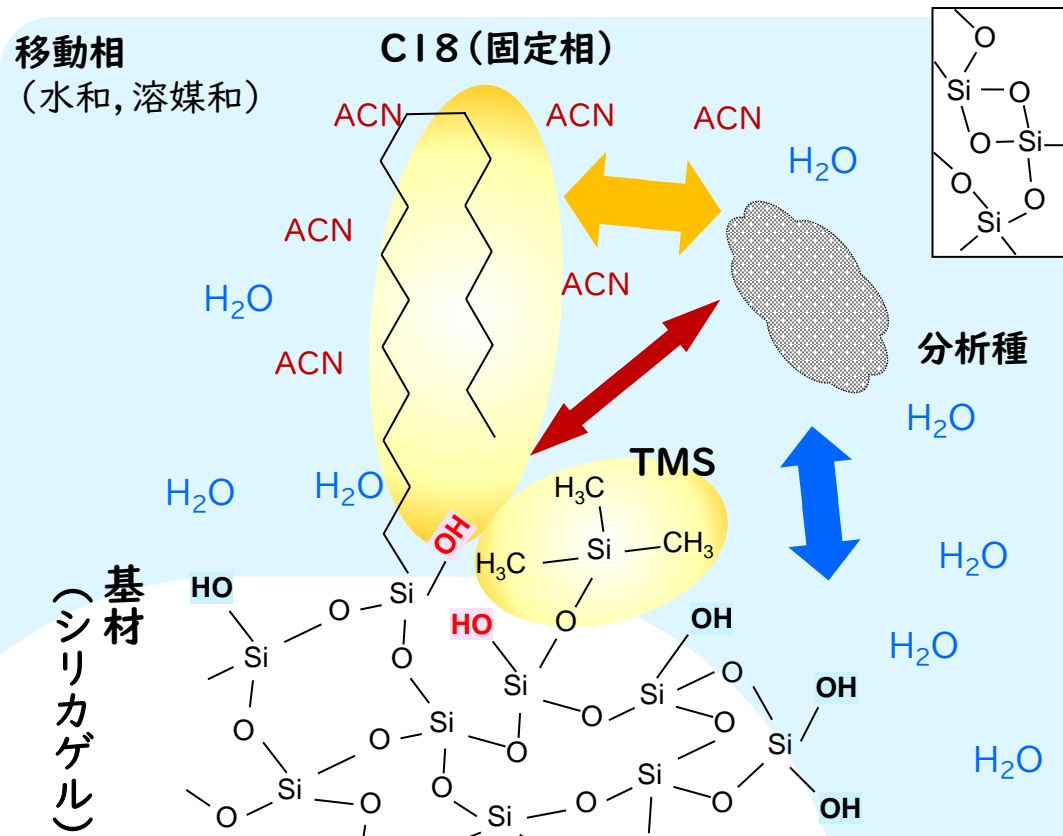
シリカゲル基材

ChromaNik

シラノールとend-capping

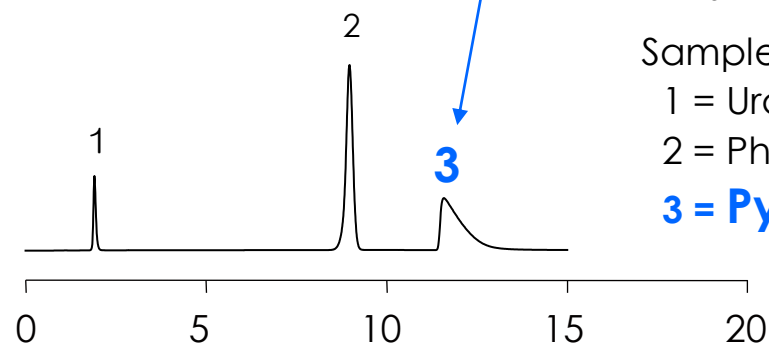


シリカゲル基材の表面状態 (シラノール基の存在)



塩基性化合物の過度な
テーリング

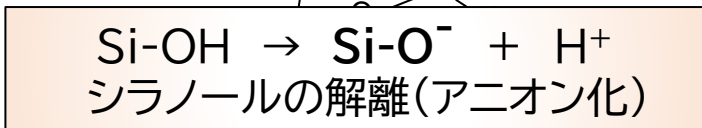
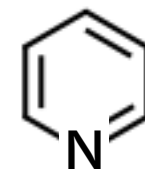
<例>
エンドキャッピング処理を行っていない他社製C18



Column size:
4.6 X 150mm

Mobile phase:
CH₃OH/H₂O = 30:70

Sample:
1 = Uracil
2 = Phenol
3 = Pyridine



Si-OH: 水和を供するシラノール基
Si-OH: 水和を供さないシラノール基

▶ 塩基性化合物のテーリング：不均一な相互作用が原因

シラノール基の吸着性と、コントロール

塩基性化合物の良好な

対称性

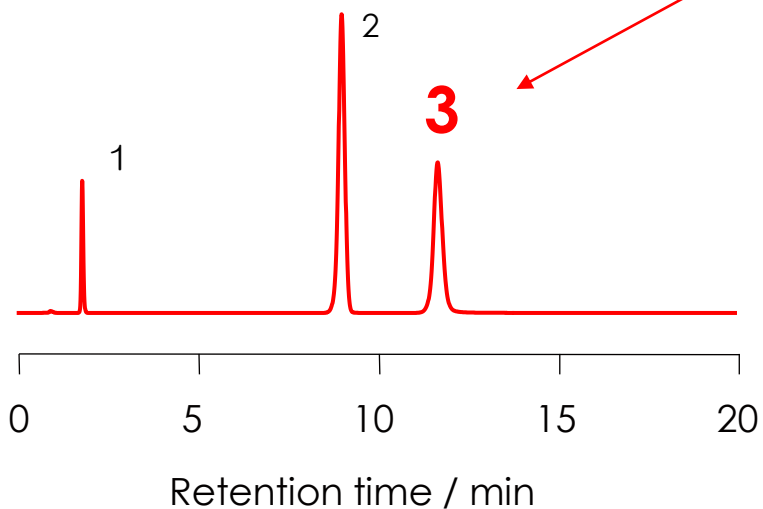


塩基性化合物の過度な

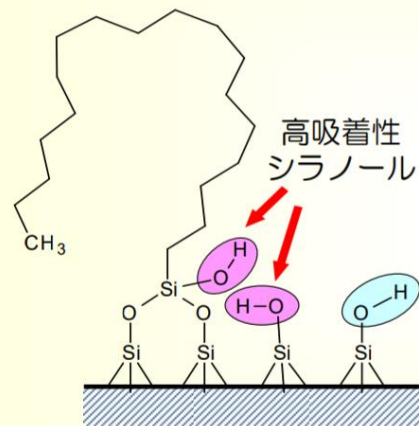
テーリング

クロマニック製 Sunrise C18-SAC

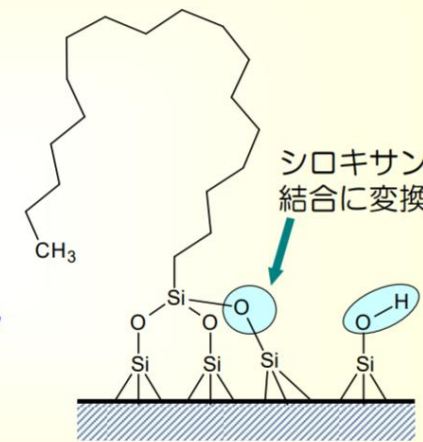
(エンドキャッピングを行っていない* C18)



「選択的な不活性化」



Silanol Activity Control Technology



シラノールの活性コントロール

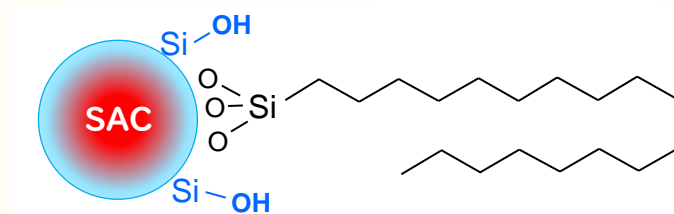
*SAC(Silanol Acitivity Control)技術による、選択的シラノール処理は実施済

▶ SAC技術で、シリカ表面の吸着性はコントロール可能

シラノール活性コントロール技術 (SAC)

- 不均一化した表面が、テーリングを引き起こす。
➔ 適切な処理を行えば、シラノールは保持に活かせる。

Sunrise
C18-SAC



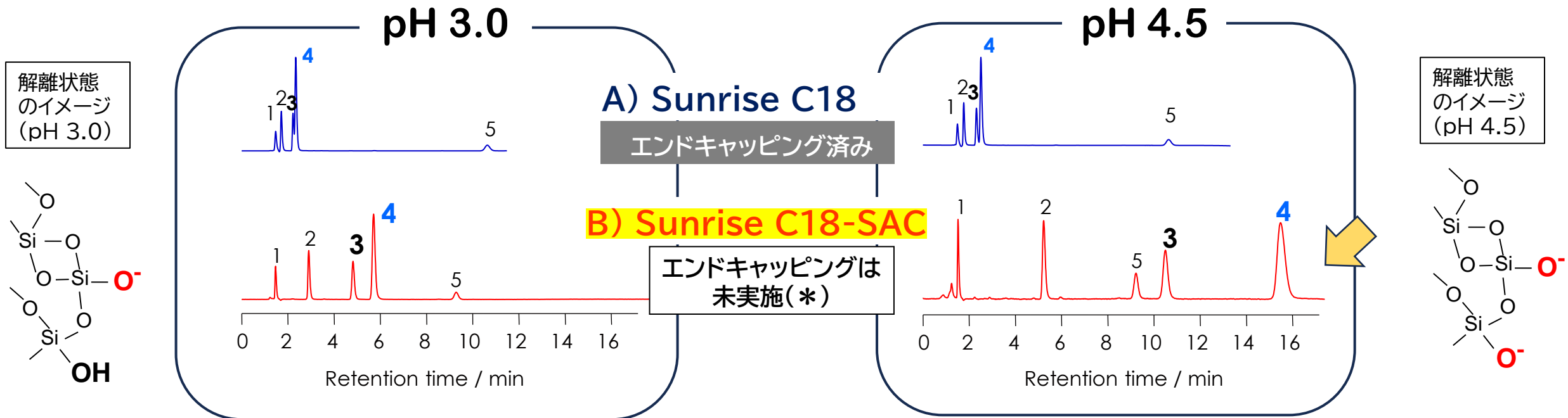
シラノール
活性コントロール型C18

エンドキャッピングは未実施 (SAC:Silanol Acitivity Control)

詳細: <http://chromanik.co.jp/product/Sunrise C18sac.html>

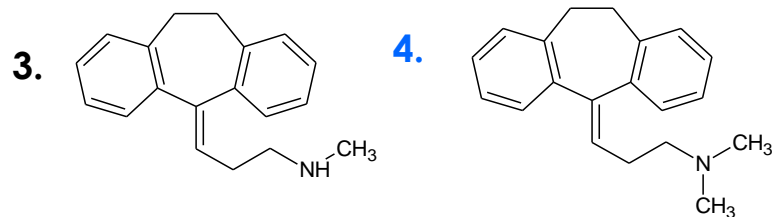


シラノール基の相互作用（カチオン交換）



*SAC(Silanol Activity Control)技術による、選択的シラノール処理は実施済

塩基性化合物

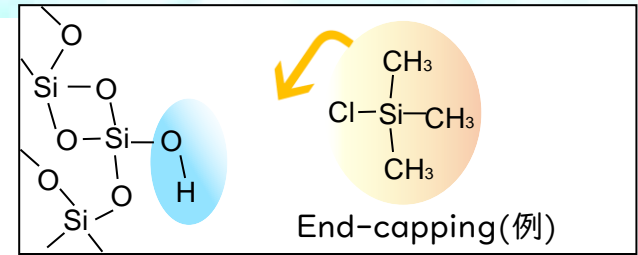


Column size: 4.6x150 mm
 Mobile phase: CH₃CN/20mM Phosphate (pH3.0 or pH4.5) = 50/50
 Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40 °C

Sample:
 1 = Uracil
 2 = Propranolol
 3 = Nortriptyline
 4 = Amitriptyline
 5 = Toluene

▶ 塩基性化合物を(良好なピーク形状のまま)、強く保持

シリカ基材とエンドキャッピング



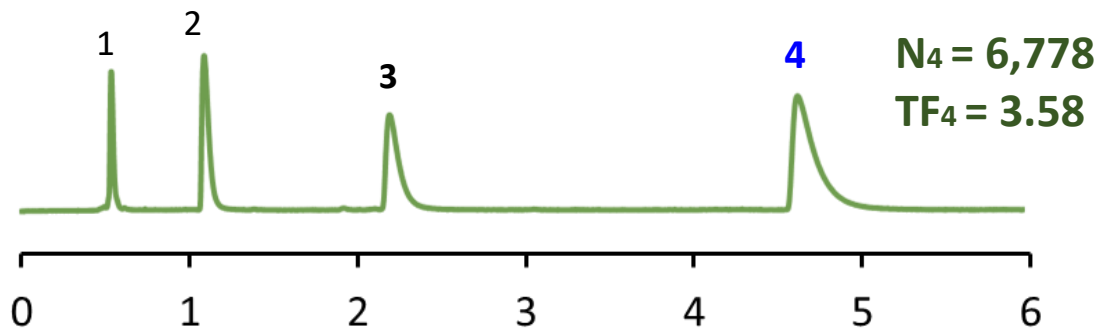
- 逆相では、**エンドキャッピング**したカラムが一般的
但し、カラムの種類によって、その吸着性は大きく異なる。

逆相カラムの例

SunShell C18



Company A C18



Retention time / min

Column dimension: 100 x 2.1 mm 2 μ m (Core-Shell)

Mobile phase:

CH₃CN/10 mM ammonium acetate pH 6.8 = 40/60

Flow rate: 0.3 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

Sample:

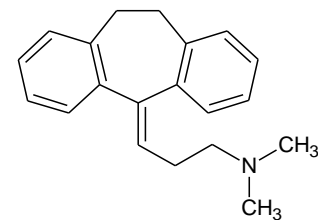
1 = Uracil

2 = Propranolol

3 = Nortriptyline

4 = Amitriptyline

4.



塩基性
化合物

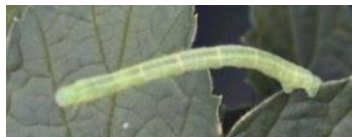
(N:理論段数、TF:シンメトリー係数)

クロマニック基盤技術：高度不活性処理

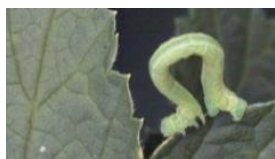
サニエスト

Sunniest end-capping
(2008年～)

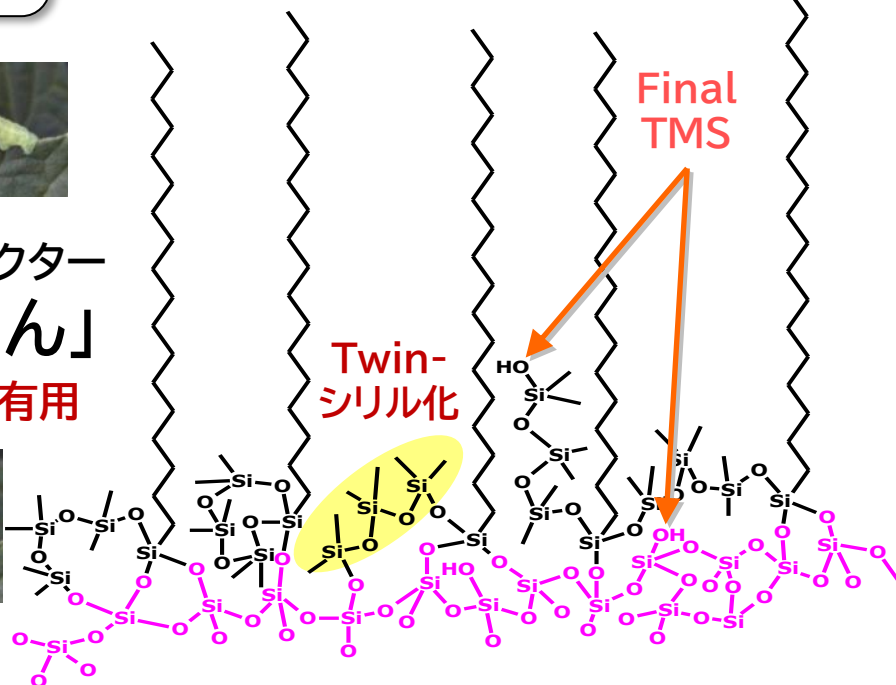
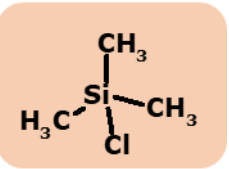
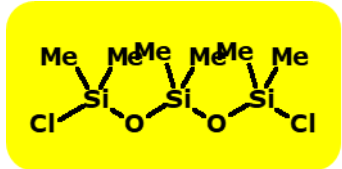
概要



イメージキャラクター
「尺取虫くん」
高密度修飾に有用



ダブルエンド
キャッピング

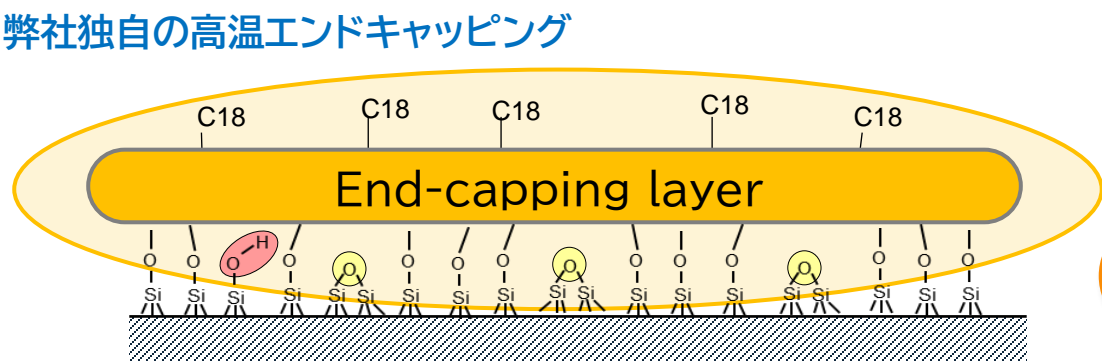
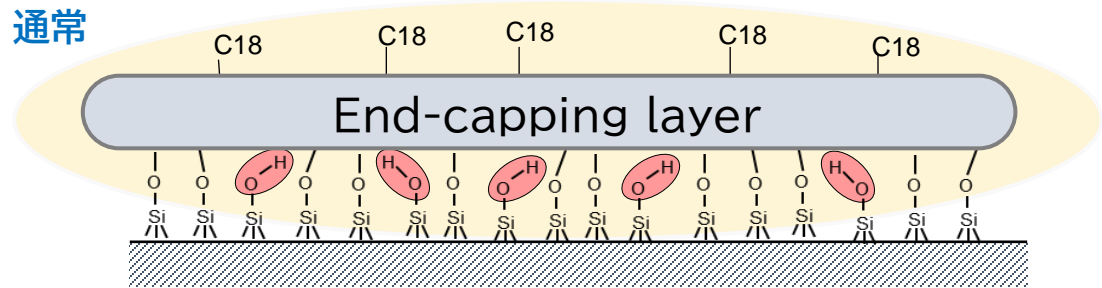
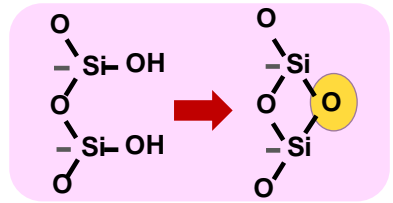


①広範・緻密なEnd-capping層

②シリカゲル表面のSiloxane化

多層的な不活性化

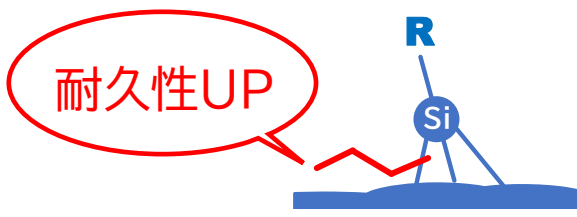
高温反応



疎水性
大

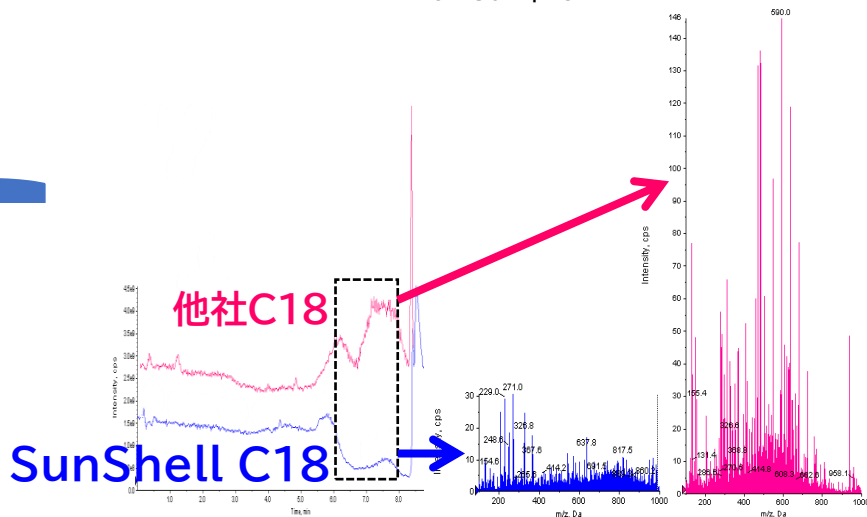
高度不活性処理による安定化

表面多孔性(コアシェル)粒子にも、高度不活性処理を適用

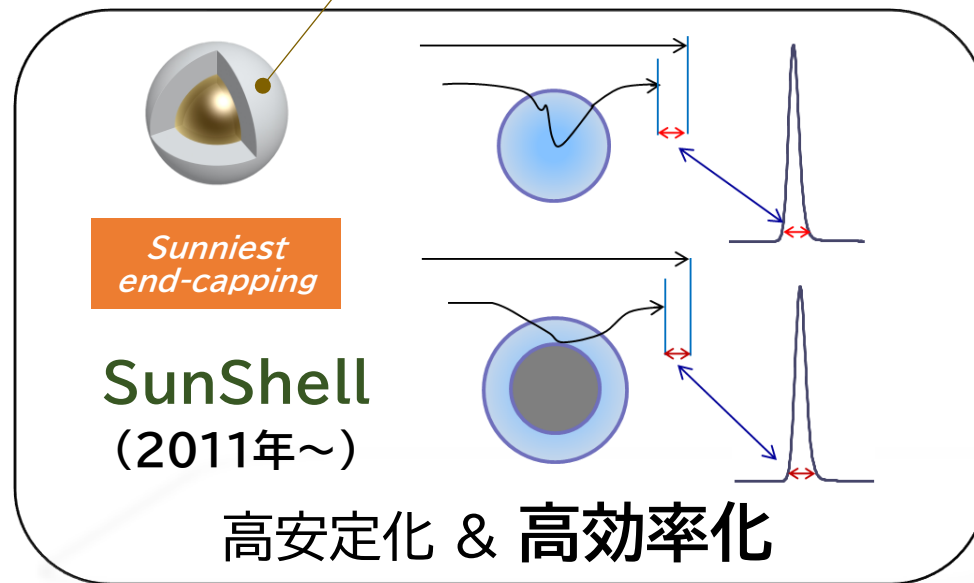


TIC of +Q1

+Q1: 5.997 min to 7.999 min of Sample

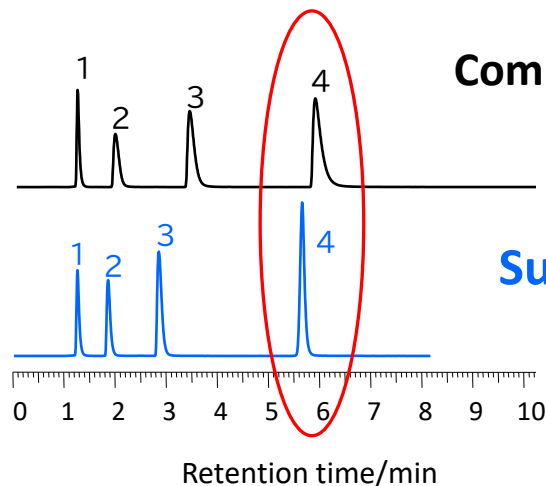


➔ ブリード低減



➔ テーリング抑制

塩基性化合物



Company E C18

TF₄=2.73

SunShell C18

TF₄=1.20

Column size: CoreShell 2.6 μm or 2.7 μm, 150 x 4.6 mm

Mobile phase:

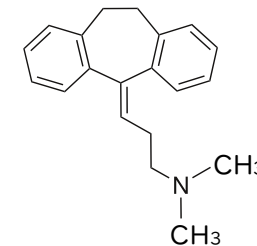
Acetonitrile/10mM ammonium acetate pH6.8=(40:60)

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40°C

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

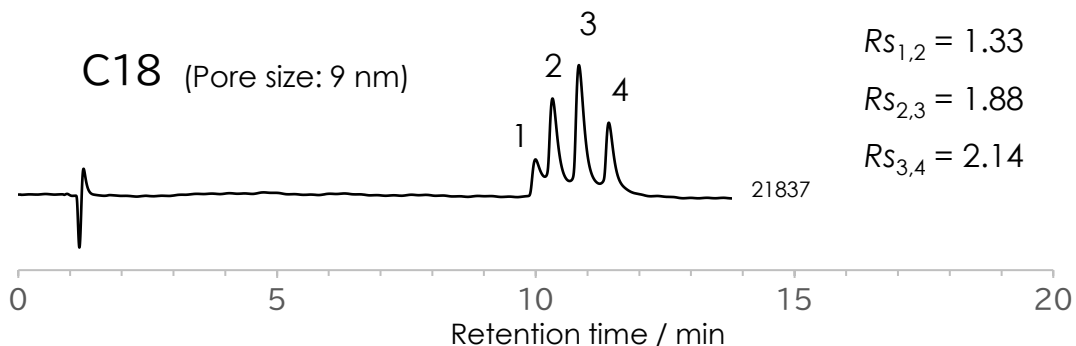
4. Amitriptyline



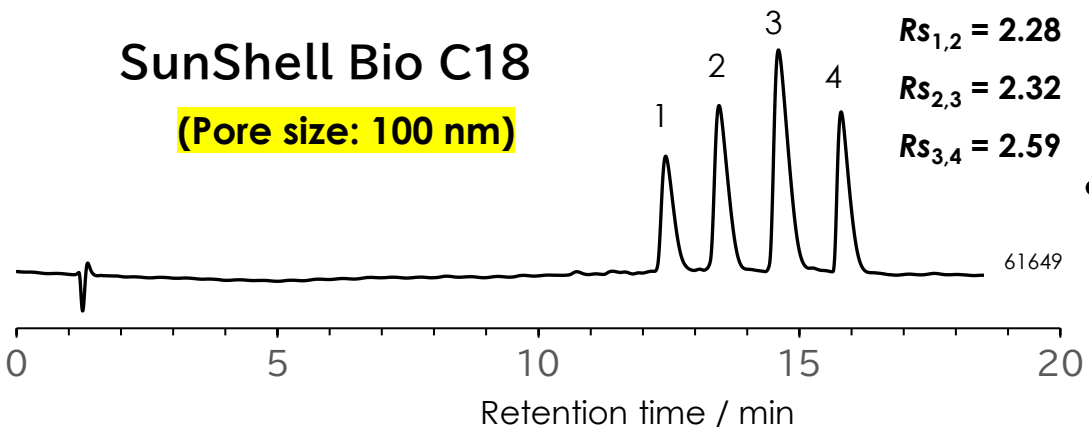
(TF: シンメトリー係数)

塩基性ポリペプチドの分離

塩基性化合物



Column: Core-shell C18
 2.6 μ m 150 x 2.1 mm
 Flow: 0.3 ml/min



Column: SunShell Bio C18
 2.6 μ m 100 x 2.1 mm
 Flow: 0.2 ml/min

Protamine : アミノ酸一次配列
 塩基性アミノ酸 (R: アルギニン) を多く含む、類縁のペプチド群で構成される。

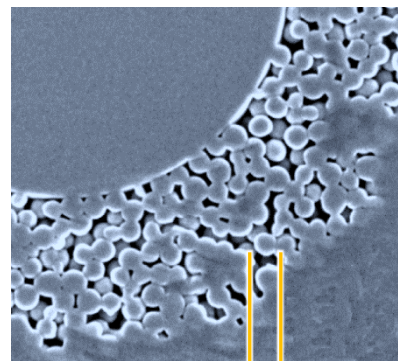
- I : PRRRRSSSRPIRRRRRPRASRRRRR-GGRRRR
- II : PRRRR-SSRRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR
- III : PRRRR-SSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR
- IV : PRRRR-ASRR-IRRRRRPRVSRRRRR-GGRRRR

(Rs :分離度)

タンデムTMS法

Tandem-TMS end-capping

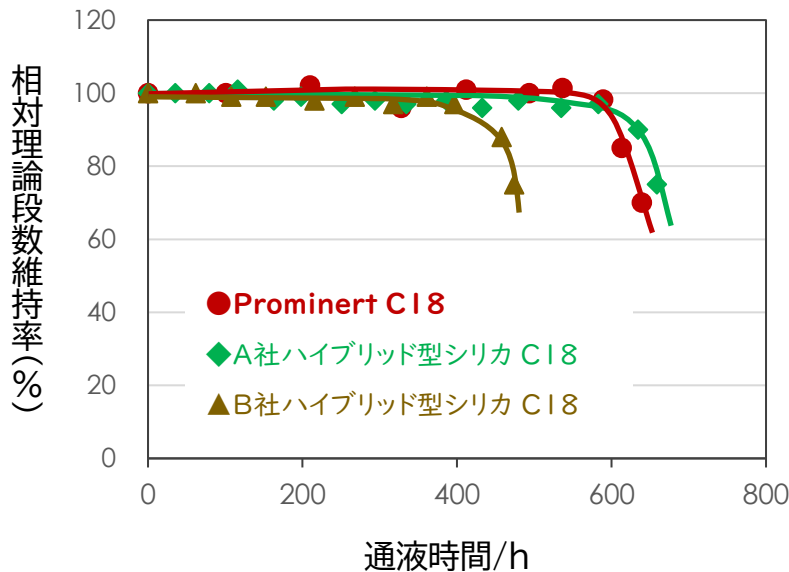
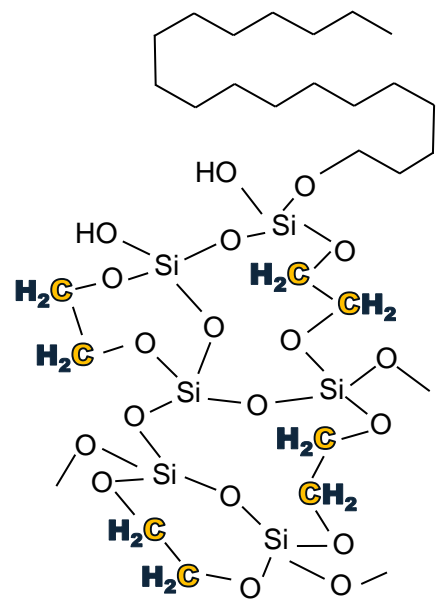
(2022年~)
 適用品



Pore size
 100 nm (1000 Å)

Temperature: 40°C
 Detection: UV@220 nm
 Injection volume: 1.0 μ l
 Mobile phase: A)0.1% TFA in Water, B)Acetonitrile
 Gradient program:10% B (0 min)→20% B (20 min)
 Sample: Protamine Sulfate from Salmon in Mobile phase A

Tandem TMS : アルカリ耐久性の比較



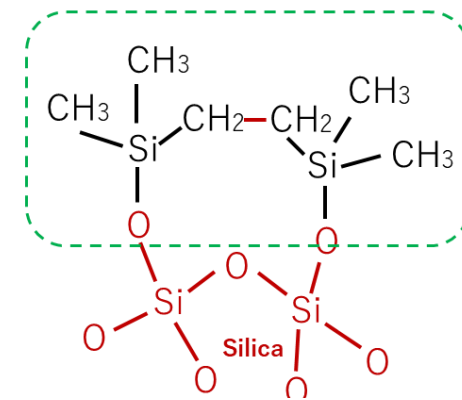
low high

アルカリ性移動相通液条件

カラムサイズ: 50 x 2.1 mm
 移動相: メタノール/10 mM 重炭酸アンモニウム (pH 10.5, アンモニア水で調整) = 30/70
 流速: 0.8 mL/min, カラム温度: 60 °C

理論段数測定条件

カラムサイズ: 50 x 2.1 mm
 移動相: アセトニトリル/水 = 60/40
 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40 °C
 試料: プチルベンゼン



ハイブリッド型シリカ

V.S.

最新技術によるエンドキャッピング

Tandem-TMS
end-capping

耐久性試験の結果は、ほぼ同等

<適用カラム>

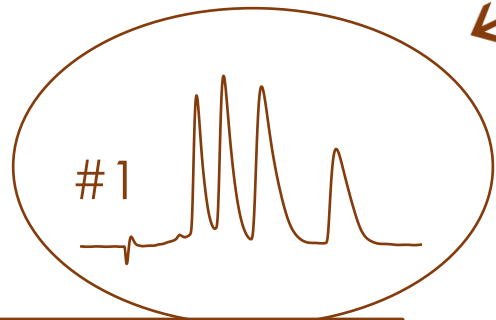
Prominertシリーズ, SunShell Bio C18(NEW) 他

推奨使用pH範囲: 1~12(C18の場合)

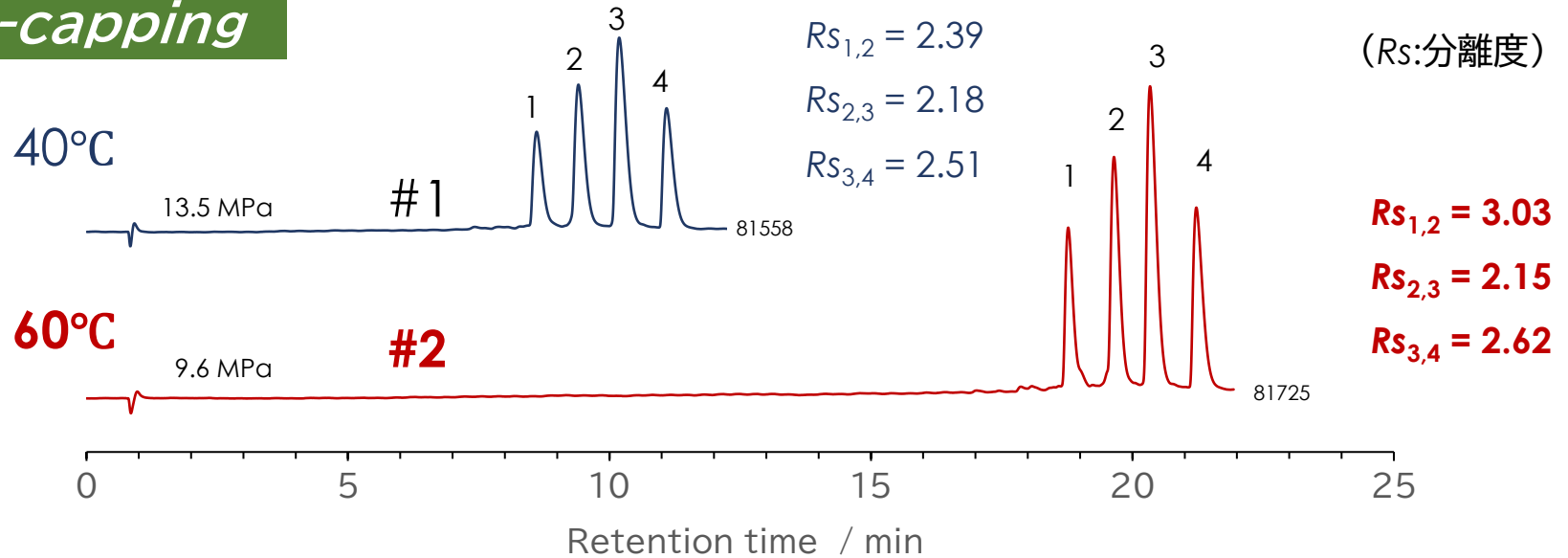
▶ 過酷条件で高安定: オリゴ核酸 / ペプチド分析に有用

バイオ向け新製品: SunShell Bio C18

Tandem-TMS end-capping



移動相条件#1で
温度60°Cの場合



Column: SunShell Bio C18 2.6 μ m 100 x 2.1 mm
Flow: 0.3 ml/min, Temperature: 40°C, 60 °C
Detection: UV@220 nm, Injection volume: 0.5 μ L
Mobile phase: A)0.1% TFA in Water, B)Acetonitrile

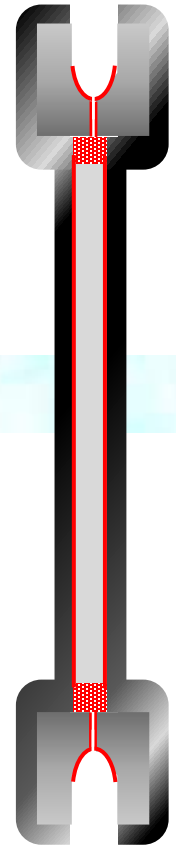
Sample: Protamine Sulfate from Salmon in Mobile phase A
Gradient Program :
#1 10% B (0 min)→15% B (15 min)
#2 5% B (0 min)→15% B (30 min)

▶ 中～高分子試料の保持性と、高温での溶出性を両立

金属部(SUS)

ChromaNik

吸着抑制とメタルフリー

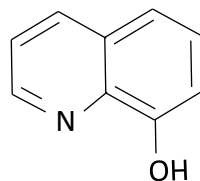


金属部への吸着性の高い化合物の例

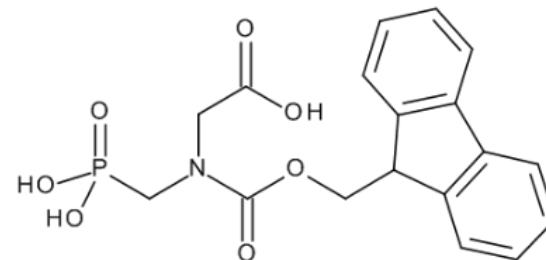
- オキシン
- EDTA
- クエン酸
- ATP,ADP,AMP
- グリホサート(農薬)

金属配位性化合物

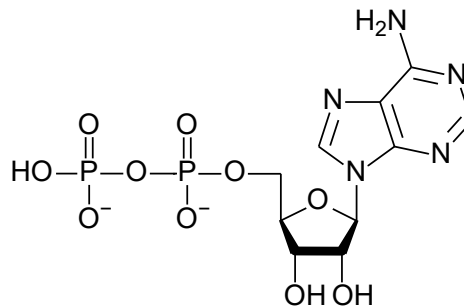
Oxine



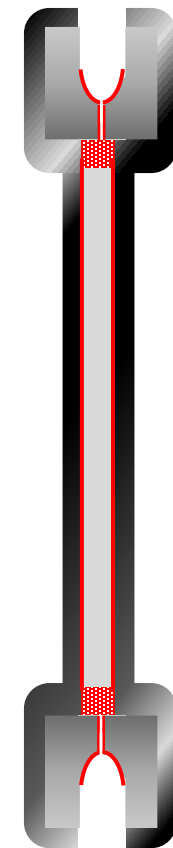
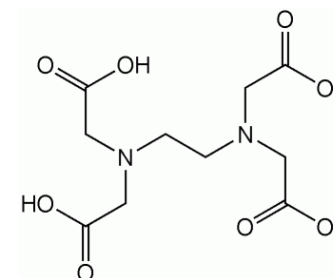
Glyphosate - FMOC



ADP



EDTA

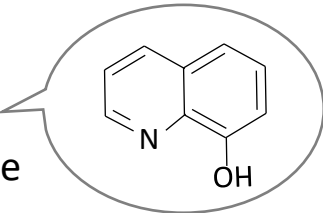


リン酸マスクと、充填剤の金属不純物試験

Metal chelating test

Column: Biphenyl 2.6 μm or 2.7 μm 150 x 4.6 mm
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@250 nm
 Mobile phase: CH₃CN/
 20mM H₃PO₄=10/90

Sample:
 1 = Oxine
 2 = Caffeine



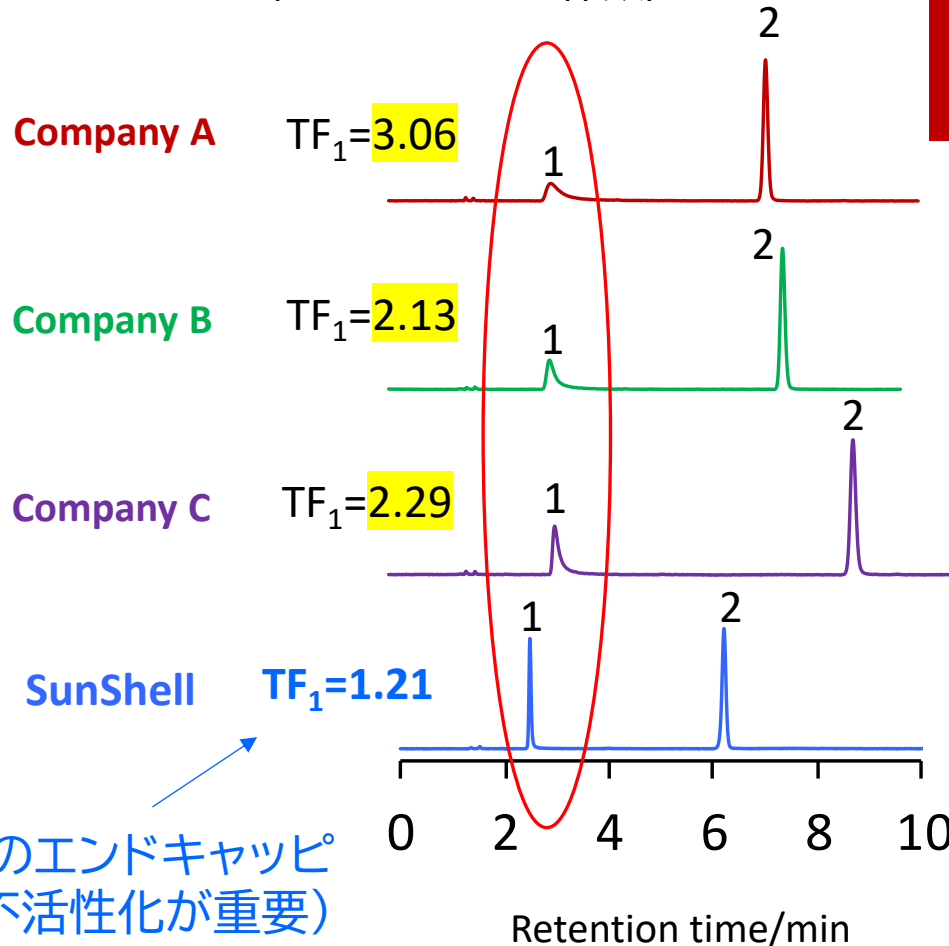
▶ 移動相にリン酸等を流す事で金属活性点をマスクし、試料の吸着を低減できる。但し、

充填剤内の金属不純物影響

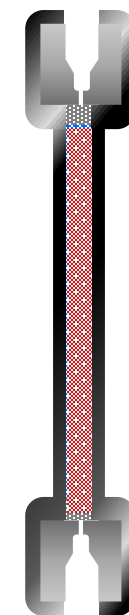
までは、十分に排除できない。

充填剤の、金属吸着性比較

(TF:シンメトリー係数)



金属配位性化合物

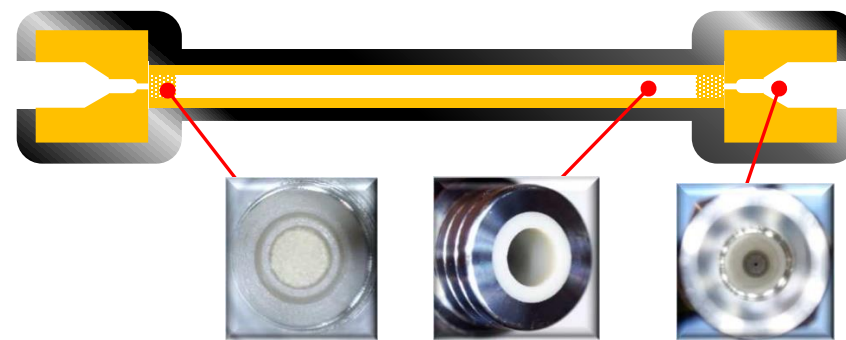
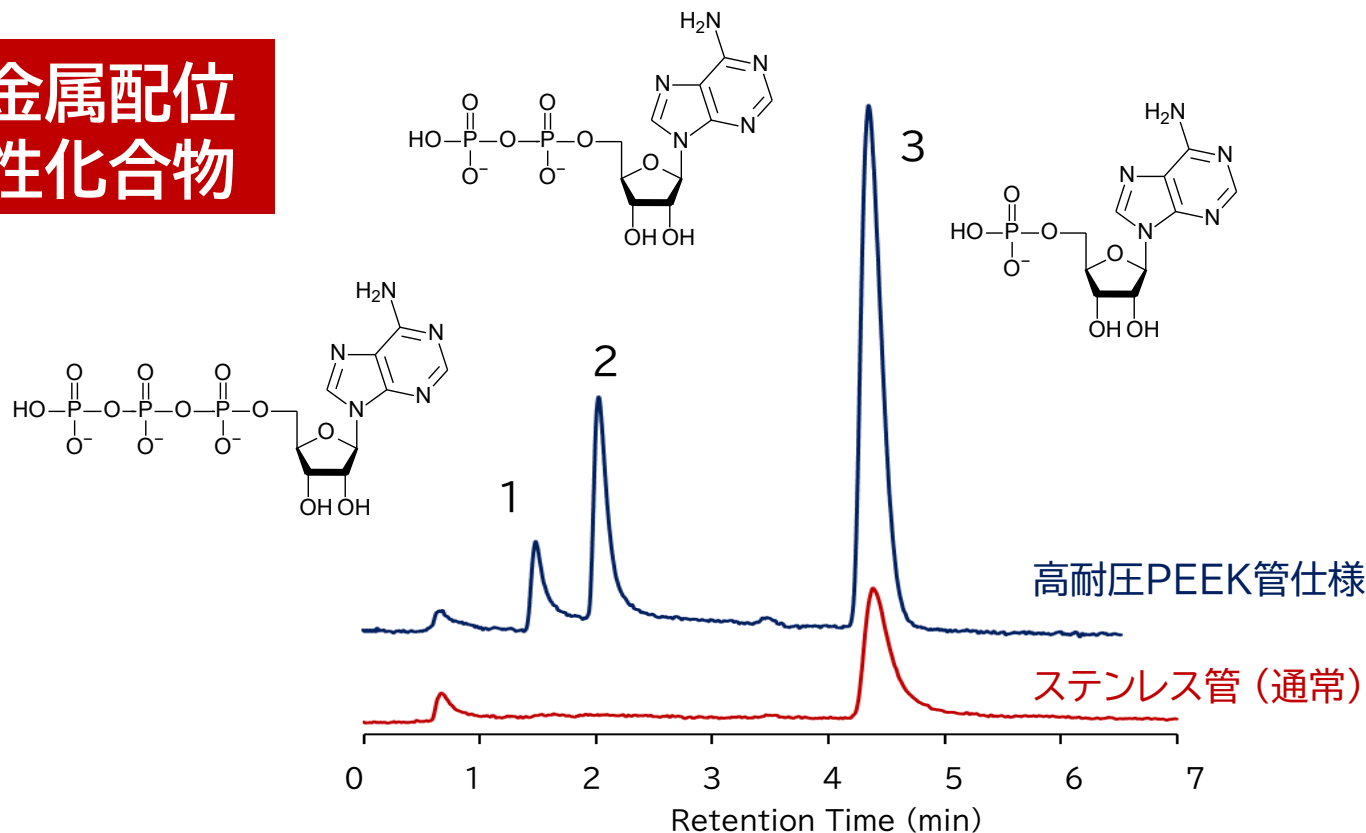


(充填剤のエンドキャッピング=不活性化が重要)

メタルフリーカラムの活用 for LC/MS

- ▶ 移動相にリン酸・EDTA等を流せない環境下(LC/MS)では、高耐圧PEEK管仕様のメタルフリーカラムが重用される。

金属配位
性化合物



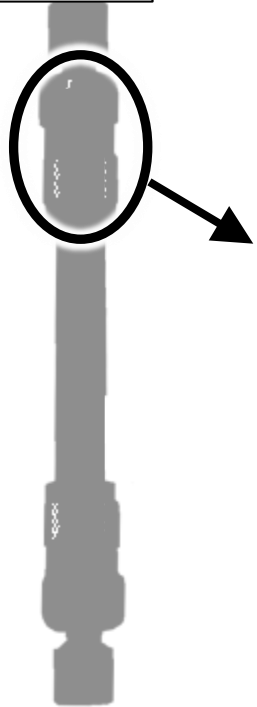
Column: **Sunniest RP-AQUA**
 3 μm, 50 X 2.1 mm I.D.
 Mobile phase: 10 mM HCOONH₄
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Temperature: 25 °C
 Detection: UV at 250 nm
 Sample: 1. ATP 2. ADP 3. AMP
 Injection: 1 μL (各成分濃度25 μg/mL)



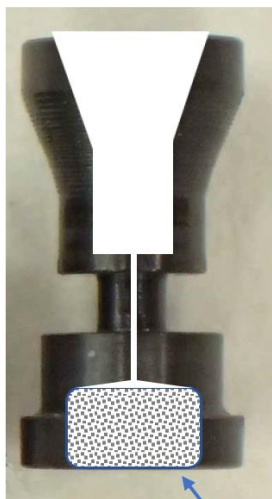
装置環境：接液部イナート化HPLC

メタルフリーカラム接続時の留意点(一部)

一部メタルフリーカラムの内部構造

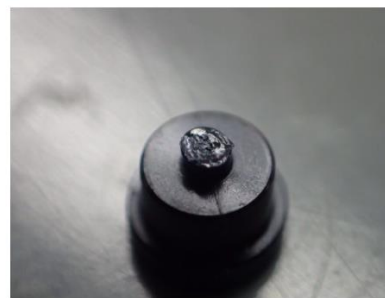


内径2.1mmカラム管の配管接続部

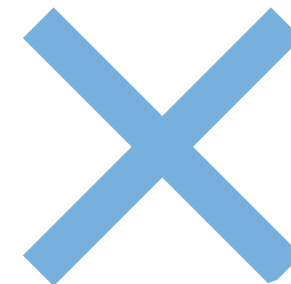
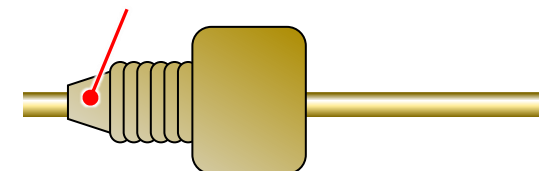


フィルター

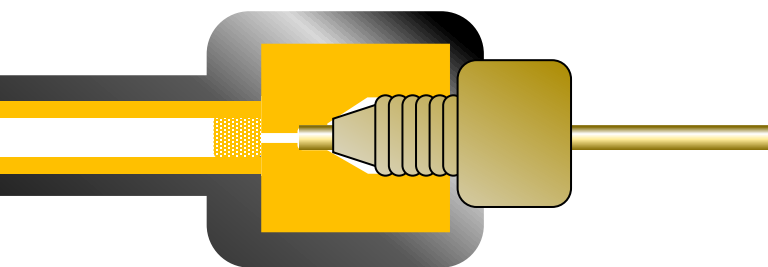
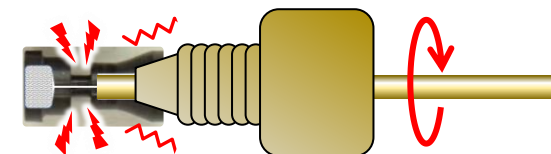
細すぎる



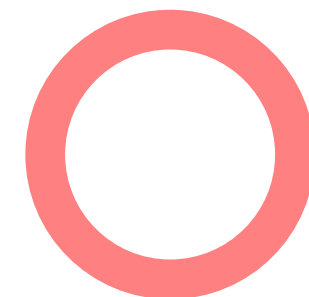
ワンピースナット(フェラル部一体型)



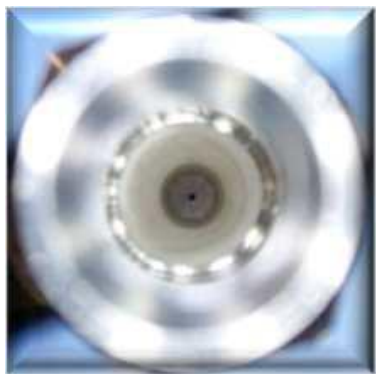
フェラルがフィッティングに圧着されると、ネジと一緒に回転し、簡単にねじ切れる。



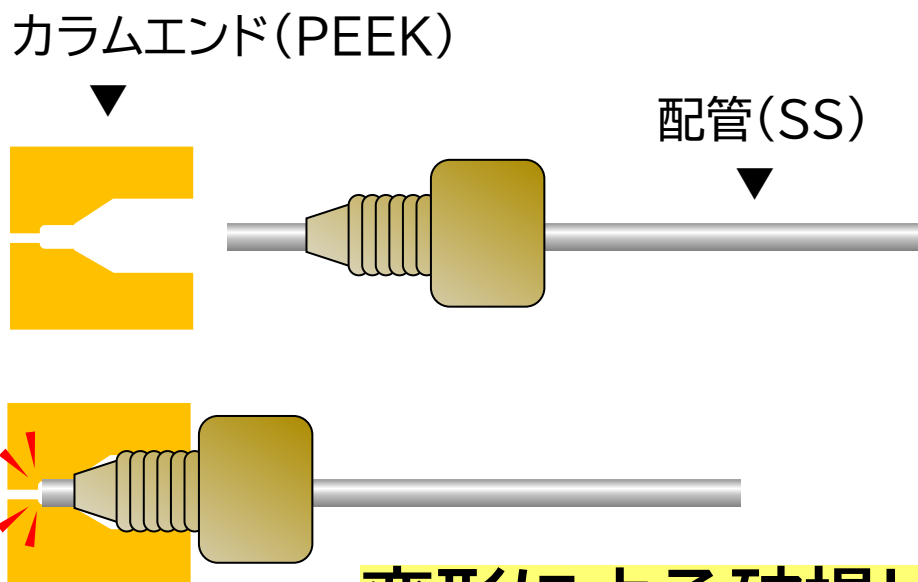
※当社取り扱いのメタルフリーカラム2種
(巴製作所、IDEX社)は対策済みにつき、
内部破損の恐れはありません。



メタルフリーカラム接続時の留意点



▲
カラムエンド接続面



▼
カラムエンド(PEEK)

▼
配管(SS)

メタルフリーカラムは
イナートHPLC環境*
での使用を原則推奨

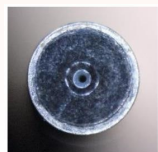


SS配管がPEEK面
(強度がSSより弱い)
に、**直接押しあたる。**



変形による破損リスク

汎用HPLC (SS配管)



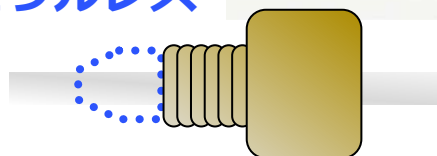
*変形対策を兼ねた、イナートHPLC環境構築の例
Marvel-X PLS (PEEK lined Stainless Steel)
配管先端部：PEEKチップ



Marvel-X 配管システムの特徴



フェラルレス



SS / 接液部:SS,PEEK



or

PLS / 接液部:PEEK



デッドボリウムを極小化

手締めで高耐圧 (~130MPa)

「HPLC/UHPLCカラムのエンドフィッティング接続の留意点」 URL: <https://bunseki.jsac.jp/tech>

HPLC/UHPLC装置は吐出ポンプ, オートサンプラー, インジェクター, カラム, 検出器間を1/16インチのステンレススチール配管などで接続されており, 配管の容量や, 接続部で発生するカラム外容積はカラムの性能に大きく影響する事が知られている。本稿ではカラムのエンドフィッティング接続での間違いやトラブル回避方法やエンドフィッティング規格に関わらず接続可能な配管の評価などを紹介する。… (日本分析化学会機関紙「ぶんせき」技術紹介より) **キーワード: HPLC, Fitting, Ferrule** S1017 (2022)



簡易メタルフリー化 / Marvel-X “PLS”



PLS (PEEK lined stainless steel)

MarvelX kit 価格表 (チューブ, ネジ 2 個) ☆チューブのみの販売もしております。

材質	内径	長さ	品番	詳細	価格
PLS	75 μ m	70 mm	UPFP-6075070	MarvelX PLS 75 μ m x 70 mm Kit	¥30,100
PLS	75 μ m	150 mm	UPFP-6075150	MarvelX PLS 75 μ m x 150 mm Kit	¥30,600
PLS	75 μ m	250 mm	UPFP-6075250	MarvelX PLS 75 μ m x 250 mm Kit	¥30,800
PLS	75 μ m	350 mm	UPFP-6075350	MarvelX PLS 75 μ m x 350 mm Kit	¥31,300
PLS	75 μ m	500 mm	UPFP-6075500	MarvelX PLS 75 μ m x 500 mm Kit	¥31,400
PLS	75 μ m	600 mm	UPFP-6075600	MarvelX PLS 75 μ m x 600 mm Kit	¥31,900
PLS	100 μ m	70 mm	UPFP-6100070	MarvelX PLS 100 μ m x 70 mm Kit	¥30,100
PLS	100 μ m	150 mm	UPFP-6100150	MarvelX PLS 100 μ m x 150 mm Kit	¥30,600
PLS	100 μ m	250 mm	UPFP-6100250	MarvelX PLS 100 μ m x 250 mm Kit	¥30,800
PLS	100 μ m	350 mm	UPFP-6100350	MarvelX PLS 100 μ m x 350 mm Kit	¥31,300
PLS	100 μ m	500 mm	UPFP-6100500	MarvelX PLS 100 μ m x 500 mm Kit	¥31,400
PLS	100 μ m	600 mm	UPFP-6100600	MarvelX PLS 100 μ m x 600 mm Kit	¥31,900

輸入検査(当社独自)

目視検査(マイクロスコープ)および通液試験にて、成型不良品の入荷を防ぐ受け入れ態勢



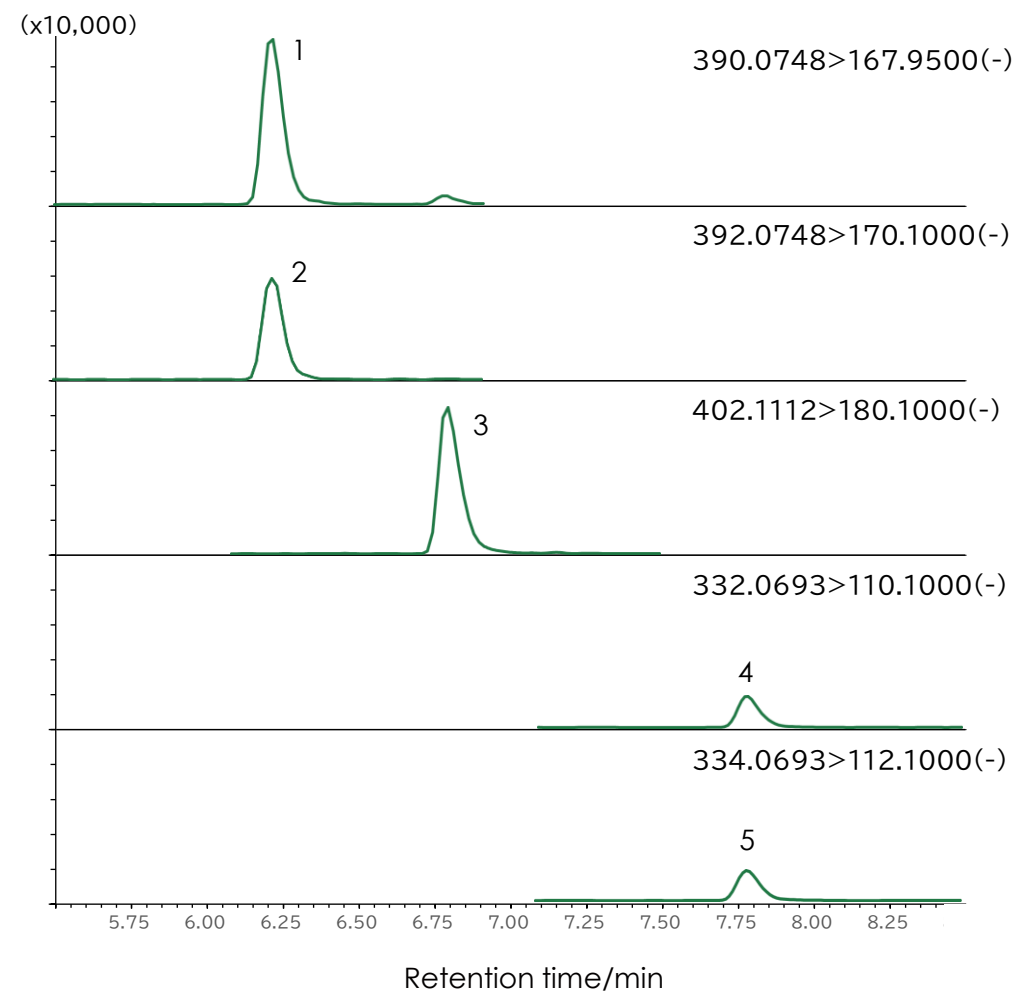
真上からの画像



斜め上からの画像

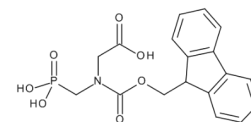
グリホサート類(農薬)の LC/MS分析例

金属配位性化合物

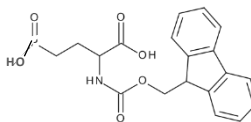


(AMPA: Aminomethyl phosphonic acid)

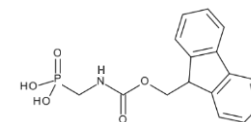
1,2
Glyphosate - FMOC



3
Glufosinate - FMOC



4,5
AMPA - FMOC



[HPLC Condition]

Column:

Prominert C18 3.5 μm, 150 x 2.1 mm i.d. MTF (Metal free)

Mobile phase:

A) 5 mM Ammonium acetate in Water

B) Acetonitrile

Gradient Program: see right

Flow rate: 0.25 mL/min

Column Temperature: 35 °C

Injection Volume: 10 μL

Instrument: LCMS-8050 (Shimadzu)*

*Tubing: PLS (PEEK lined stainless steel)

Sample:

1 = Glyphosate - FMOC

2 = [¹³C,¹⁵N] Glyphosate - FMOC

3 = Glufosinate - FMOC

4 = AMPA - FMOC

5 = [¹³C,¹⁵N] AMPA - FMOC

Time (min)	B.Conc(%)
0 - 1.01	5
1.01 - 9.50	5 → 63
9.50 - 11.0	63 → 95
11.0 - 13.0	95
13.0 - 18.0	5

[MS Condition]

Interface: ESI

Nebulizing gas flow: 2 L/min

Drying gas flow: 10 L/min

Heating gas flow: 10 L/min

DL temp.: 150 °C

Heat Block Temp.: 400 °C

Interface Temp.: 300 °C

CID-gas: 210 kPa

Interface voltage: -3 kV



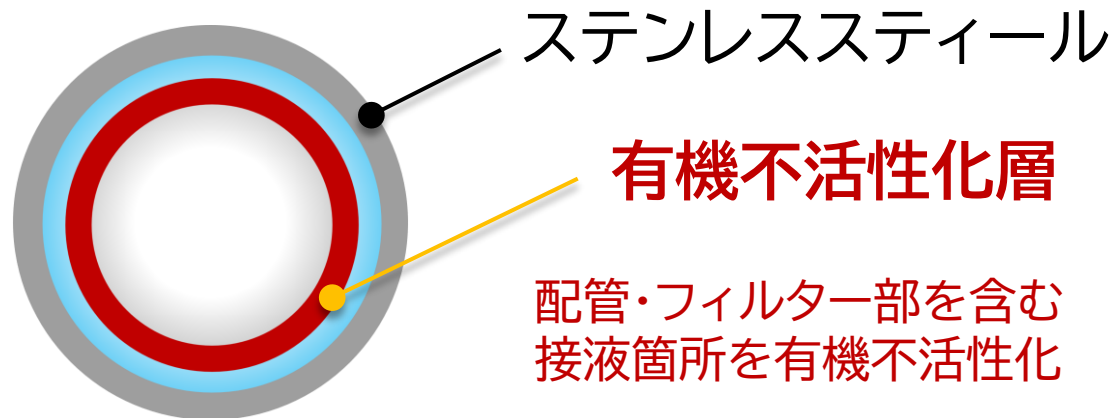
(データ提供：一般社団法人 農民連食品分析センター)

新製品 PS inert 「有機不活性」カラム

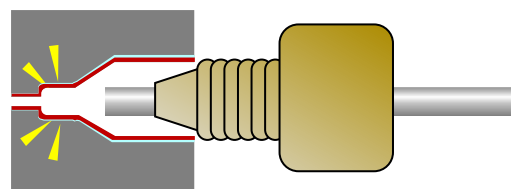
— あらゆるHPLCで **低吸着を** —



PS inertカラム、有機不活性処理のイメージ



SS管での接続も、問題なし



2022年発売カラム
Prominert
(プロミナート)

新開発した不活性化法で
充填剤の内部を低吸着化

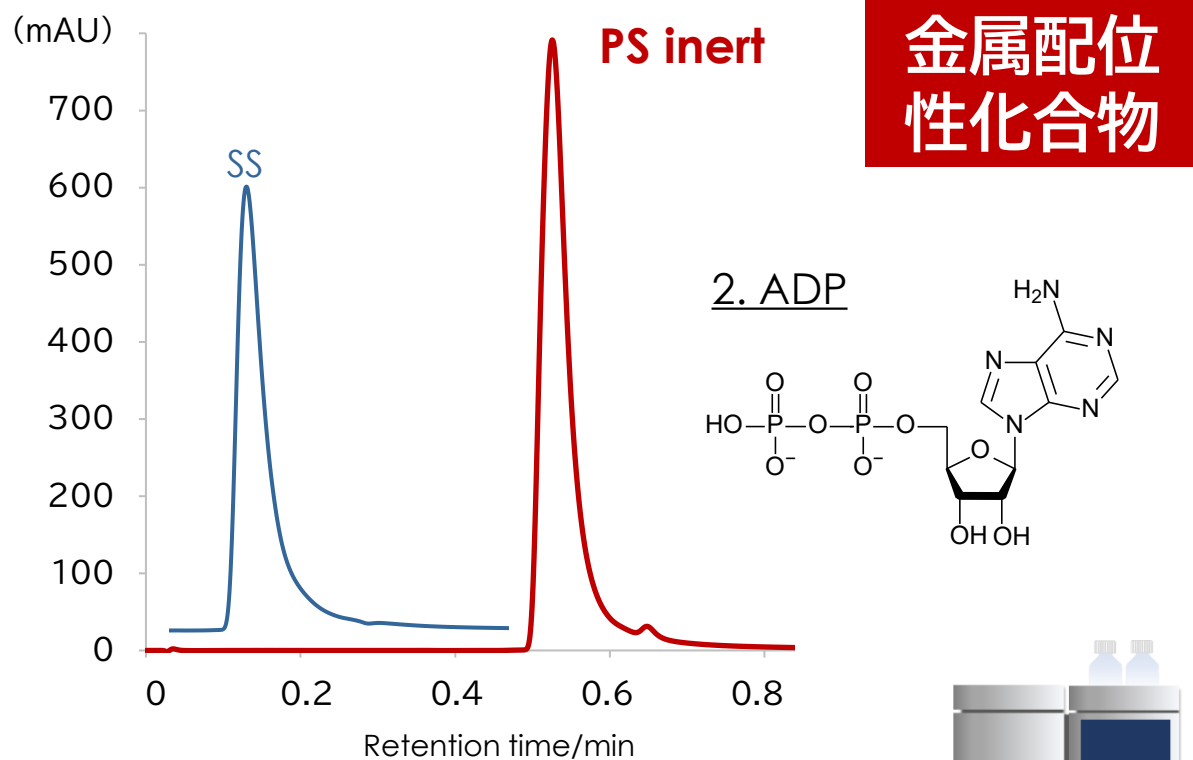
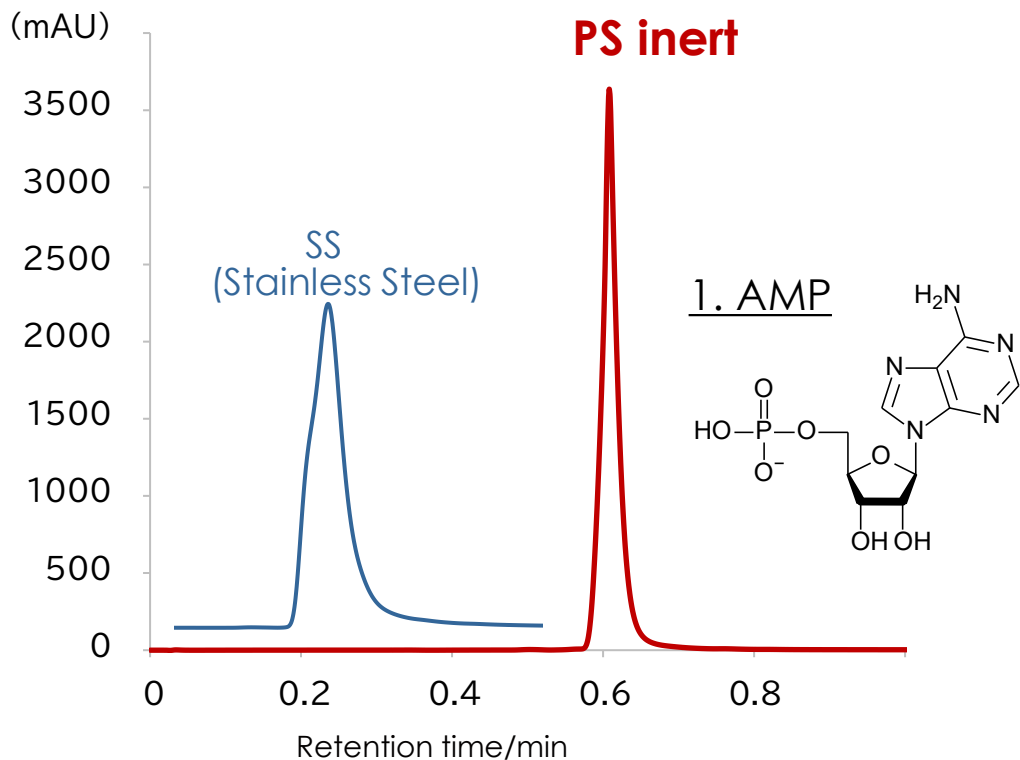


▶ Prominertのコンセプトを継承し、**Prominert Surface**=有機不活性表面処理を施したカラム管

↳ **有機不活性管 PS inert**

(option)

PS inert : 有機不活性カラムの低吸着性



Column:
SunShell C18 2.6 μm, 100 x 2.1 mm i.d. SS / PS inert

Mobile phase:
Acetonitrile : 0.1% formic acid in Water = 1 : 99

Detection: UV@254 nm
Flow rate: 0.45 mL/min

Column Temperature: 40 °C
Injection Volume: 2 μL
Sample: 1=AMP, 2=ADP

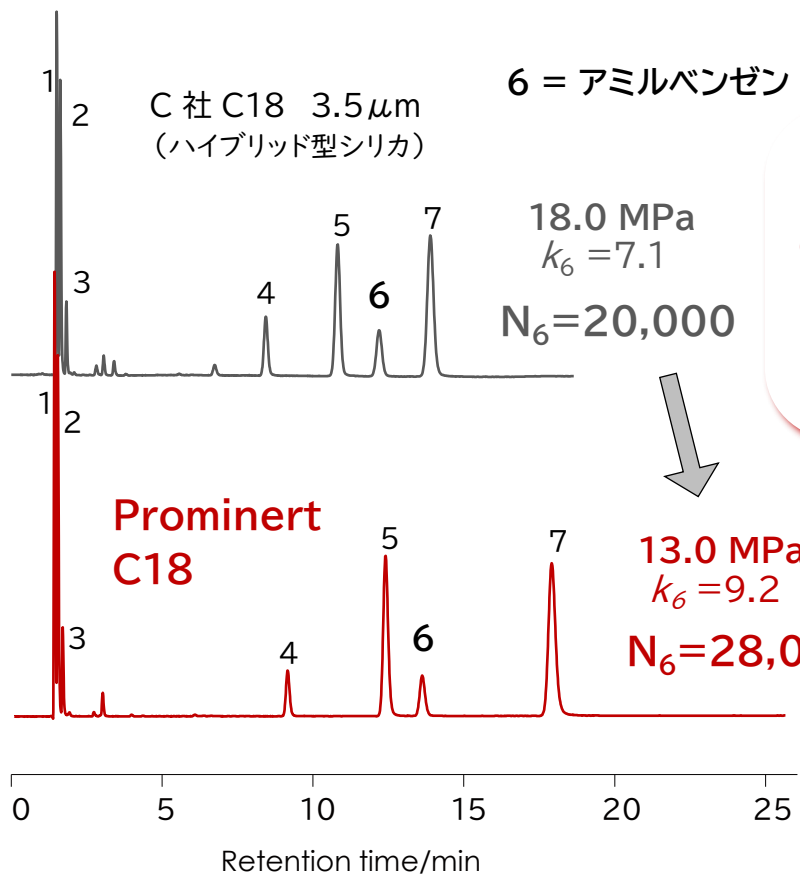
PS inertは、「Prominert」以外の充填剤にも適用可能です。



▶ 良好なピーク形状と、汎用性の両立

装置環境：汎用HPLC (SS配管)

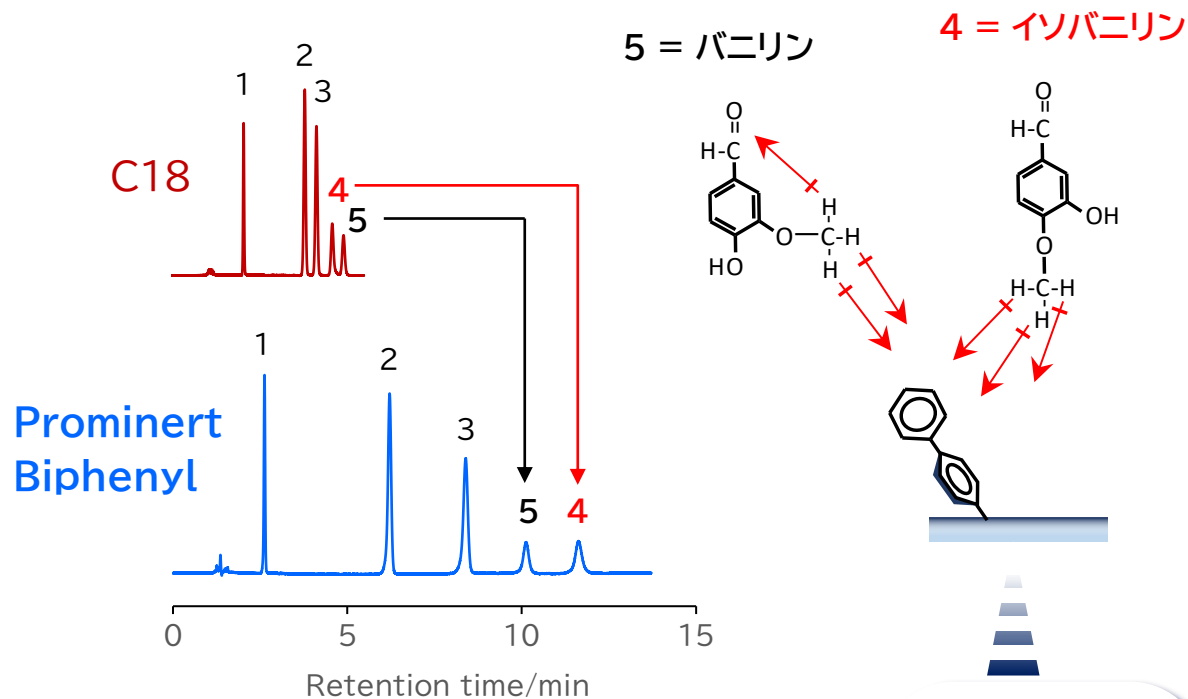
Prominert(充填剤)の高効率性 & 選択性



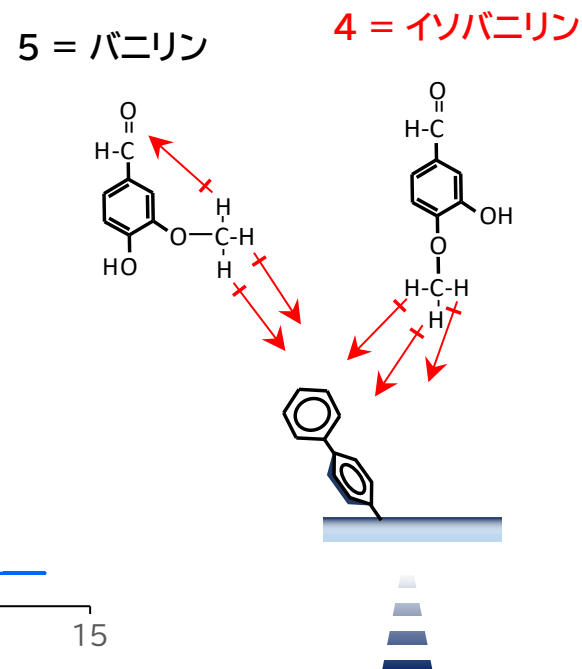
カラム効率
 (理論段数÷圧力)

2倍

(k :保持係数、 N :理論段数)

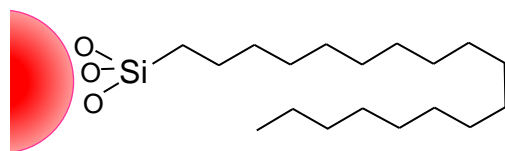


(分析条件詳細: Prominert専用カタログに記載)

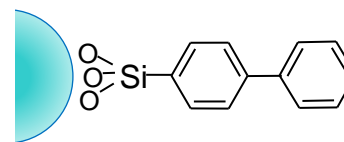


プロミナート
ProMinert

- 3.5 μ m 粒子
- 2種の固定相 →
- **最高度不活性化**



C18 使用pH範囲:1~12



Biphenyl 使用pH範囲:1~10

充填剤／カラム管を、ともに高不活性化

— あらゆるHPLCで高分離を —

プロミナート

Prominert / 卓越した不活性さ

汎用HPLC(20MPa以下)でも高分離



①充填剤の不活性化

Tandem-TMS end-capping

▶ 高密度エンドキャッピング処理による、不活性化法

②充填剤の選別

3.5 μ m / C18, Biphenyl

▶ 低圧&高分離を実現すべく厳選した2種の充填剤

③イナート管対応 (option)

有機不活性管 *PS inert*

▶ 有機不活性化処理イナート管

SS配管系でも、低吸着

特殊イナート管のバリエーション

NEW

**特殊イナート管
種類**

(PS inertは、近日発売
予定品です。)

メタルフリーカラム

IDEX 社 高耐圧PEEKカラム



巴製作所 高耐圧PEEKカラム
(MTF)

Made in Japan



有機不活性カラム

「PS inert」



カラムサイズ
(内径x長さ)

4.6 x 150 mm, 4.6 x 250mm,
2.1 x 50 mm, 2.1 x 150 mm

2.1 x 150 mm, 2.1 x 250mm,
2.1 x 50 mm, 2.1 x 100 mm

2.1 x 150 mm, 2.1 x 50 mm,
2.1 x 100 mm (予定品)

耐圧
*カラムハードウェアとして

100 MPa*

130 MPa*

(カラム耐圧に準拠)

価格
(税抜)

標準品カラム価格
+ 30,000円

標準品カラム価格
+ 20,000円

標準品カラム価格
+ _____,000円

型番
(標準品型番:CB6941の場合)

□□□□□M
(例 CB694M)

□□□□□MTF
(例 CB694MTF)

□□□□□PS
(例 CB694PS)

まとめと留意点: HPLCでの吸着と対策

- シラノールは、必ずしも「吸着」の原因ではない。
- 充填剤の高度不活性化は、低吸着化において重要
- メタルフリーカラム(PEEK)は、取り扱いに注意
- Marvel-X(PLS)活用で、簡易イナート環境を構築
- PS inertは、汎用HPLC(SS)で吸着を低減できる。

対象化合物の吸着特性によっても、最善手段は異なる。