HPLCカラム最前線!!

~ 高極性化合物からオリゴ核酸まで適用可能な、 異次元品質のウルトラハイブリッドC18(ODS)カラム

ChromaNik



(株)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





株式会社クロマニックテクノロジーズ



本日のセミナーの流れ

- 1. ハイブリッドカラムの特徴
- 2. シリカ表面の高度不活性処理

3. Ultra Hybrid Technology



HPLCカラムの歴史と当社創業

年 出来事 1960年代後半 HPLCの基礎技術が相次いで発明 (スラリー充填法による微粒子カラム製造、他) 1970年代 HPLC産業の勃興(10 µmの全多孔性粒子) 5 μm の全多孔性粒子カラム が市場に浸透 1980年代後半 3 µm の全多孔性粒子カラム が市場に浸透 1990~2000年 1.7-1.8 µm の全多孔性粒子カラム が市販 2003年以降

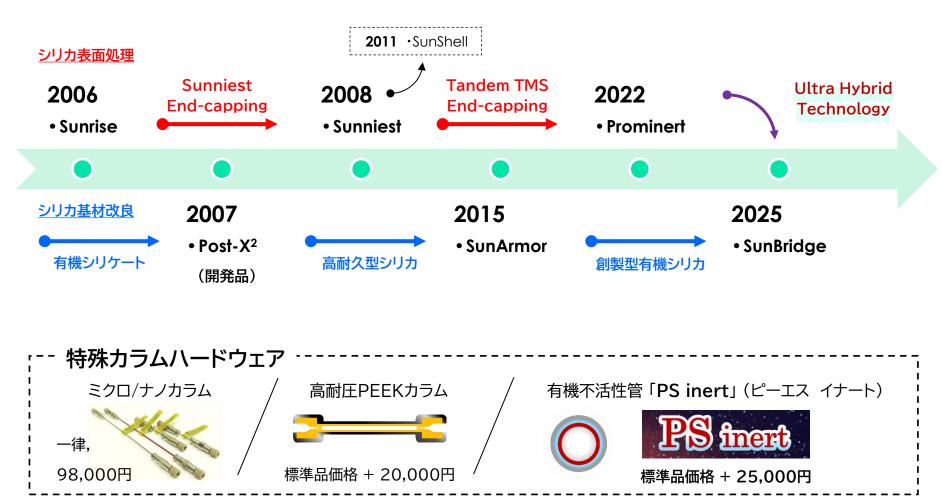


2005年 (株)クロマニックテクノロジーズ 創業

シリカ基材

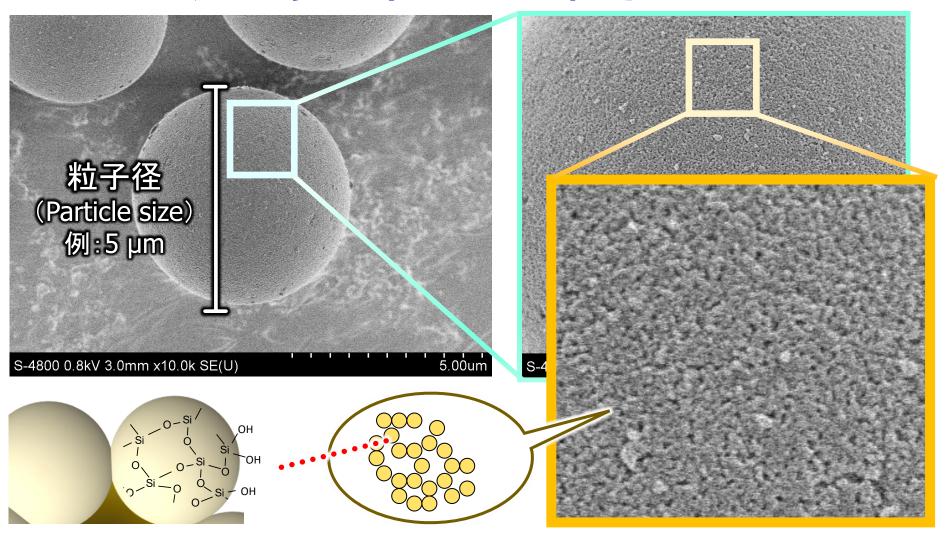
(球状)

クロマニック製カラムと技術開発の歩み



▶ 不活性処理、有機シリカ(ハイブリッド)を長年研究

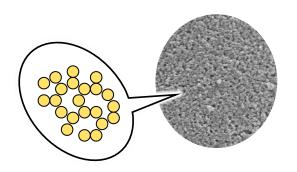
HPLC用の多孔性シリカ粒子について



▶無孔性シリカ(一次粒子)の凝集体 = シリカゲル

シリカと有機シリカ(ハイブリッド)の違い

■ シリカ基材



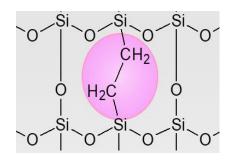
OH

<共通>

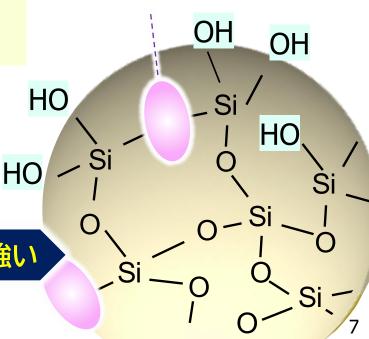
- ・多孔性粒子
- ・微粒子化に対応
- ・比表面積が広い
- ・官能基導入が容易

• 酸性酸化物

■ 有機シリカ基材



エチレン架橋



O HO OH

OH

アルカリに弱い

 OH

アルカリに強い

シリカ基材C18カラムの仕様(例)

基材(シリカゲル)

 SiO_2 純度: >99.99%,粒子径: 5 μ m,細孔容積: 0.8 mL/g,比表面積: 190 m²/g,細孔径: 15 nm

修飾 修飾基: オクタデシルシリル基,結合密度: 3.0 μ mol/m² <mark>炭素含有量</mark>: 17% エンドキャッピング: TMS 固定相官能基の修飾 ② エンドキャッピング OH などの不活性処理 炭素含有量を反映する有機官

能基は全て表面処理に由来

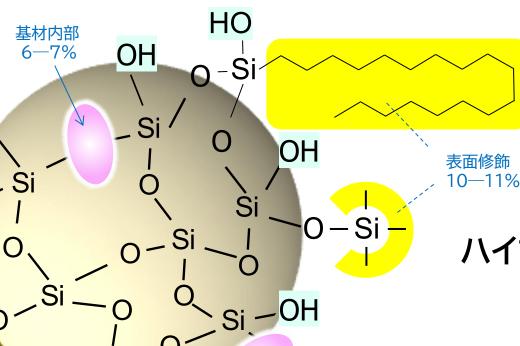
8

ハイブリッド基材C18カラム

ハイブリッドカラム:

エチレン架橋型シリカゲルを基材に 用いたカラム(有機シリカカラム)

※カラム仕様記載の炭素含有量(例: **17%**)は 基材内部と表面修飾相当分の合算値となる。



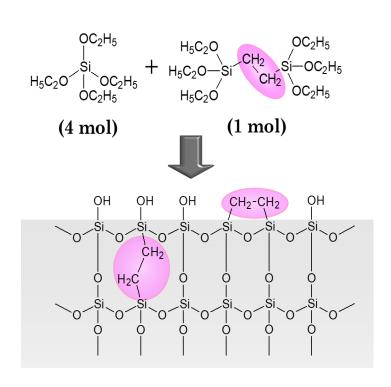


図. ハイブリッド基材の形成イメージ

ハイブリッド基材(無機+有機)

+ 表面修飾(有機)

ハイブリッドカラム(~2007年,2015年)

Post-X²(開発品), **SunArmor**

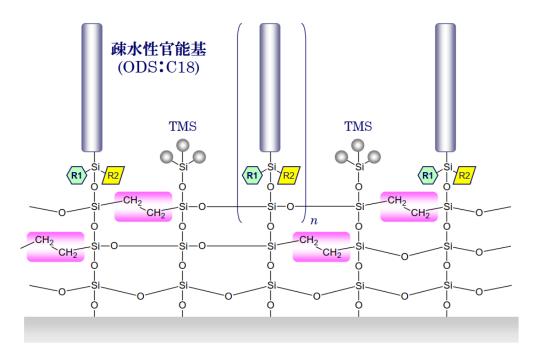
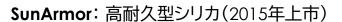


図. ハイブリッドシリカ表面(グラフト型)

日本薬学会127回年会(2007年3月28日) **有機シリケートグラフト型**高耐熱性C18カラムの開発

ポリマーテクノロジーとの融合による
シリカベースのグラフト型逆相固定相を開発
ポリマーに匹敵する高耐熱・高アルカリ性を実現!





▶ シリカゲル表面を改質して、有機シリカ層を形成

ハイブリッド基材の効果(SunArmor)

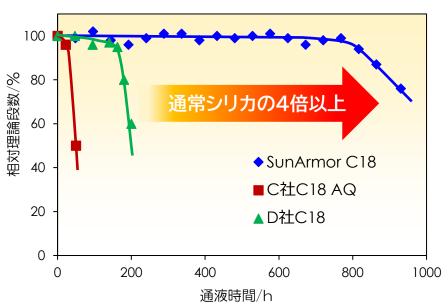
高温耐久性

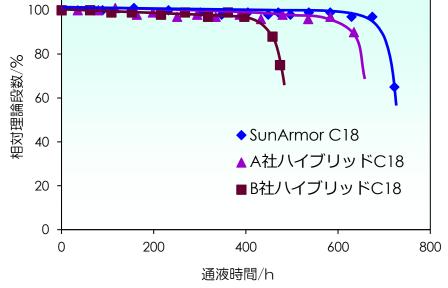
(pH 6.8, 80°C)



アルカリ耐久性

(pH 10.5, 60°C)





中性性移動相通液条件

カラムサイズ: 50 x 2.1 mm 移動相: メタノール/10 mM 酢酸 アンモニウム(pH 6.8) = 30/70

流速: 0.2 mL/min カラム温度: 80 ℃

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 ℃ 試料: ブチルベンゼン

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 ℃

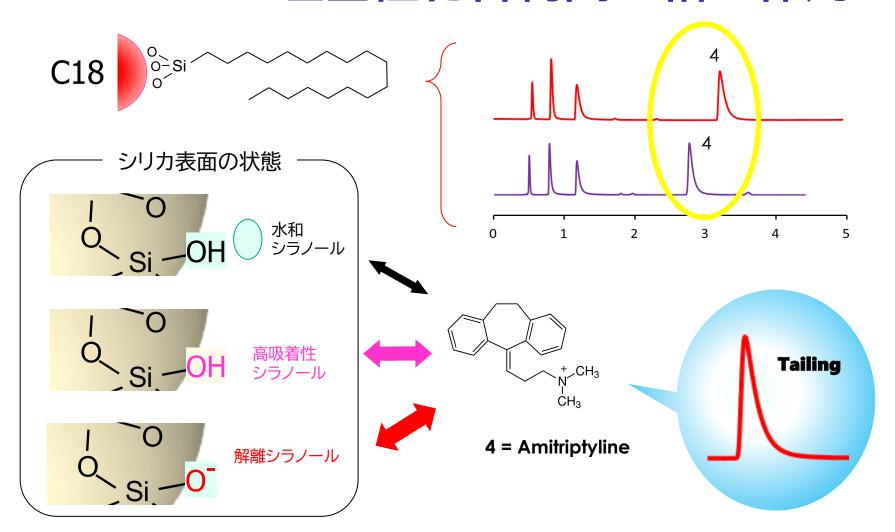
理論段数測定条件

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: ブチルベンゼン

▶ 表面改質型ハイブリッドカラムは安定性が高い。

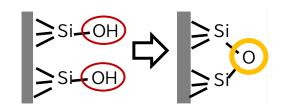
シラノール・塩基性化合物間の相互作用

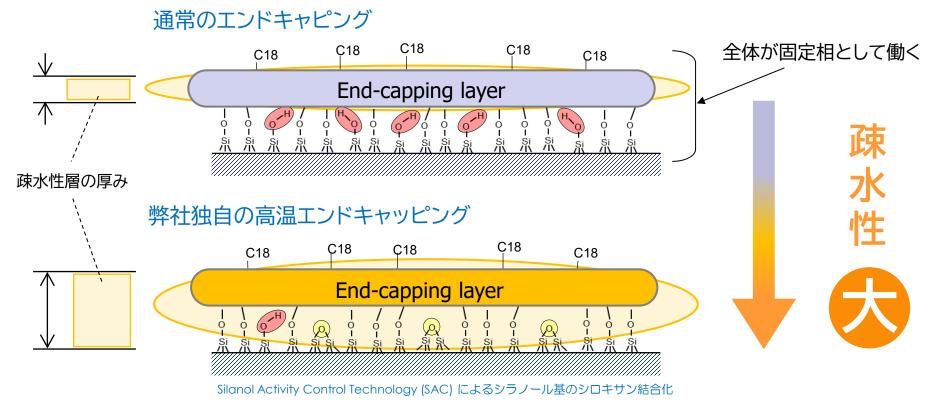


▶ 残存シラノール基が 不均一な相互作用を与える。

処理法 A 高温エンドキャッピング法

高温条件でエンドキャッピングを実施(脱水シロキサン結合化)



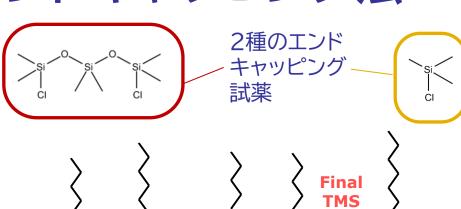


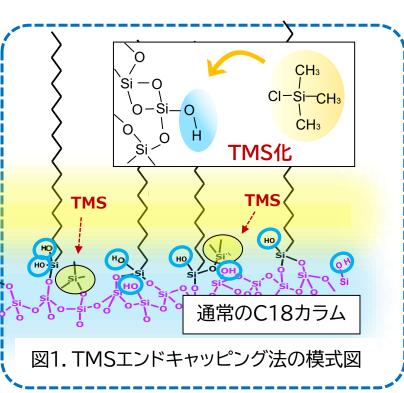
▶ エンドキャッピング層の下部(シリカ表層)を疎水化

処理法 B ダブルエンドキャッピング法



二座式シリル化法と, TMS化の重ね合せ





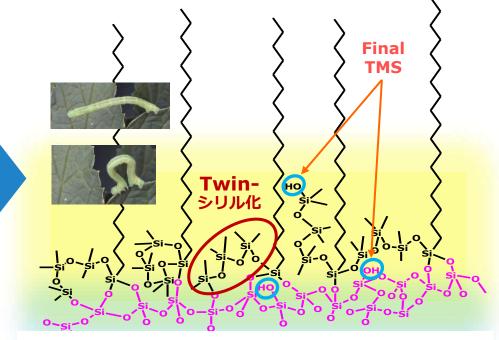
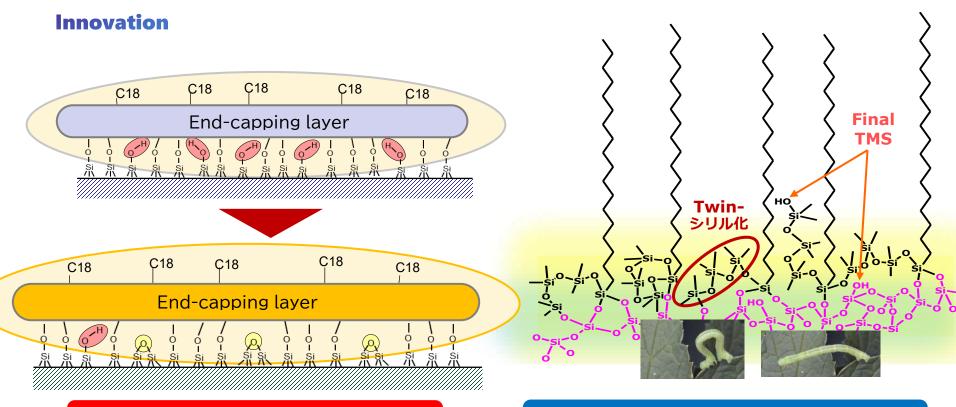


図2. ダブルエンドキャッピング実施過程の模式図

▶ 2種の試薬で 広範なエンドキャッピング層を形成



シリカ高度不活性化法の確立



高温エンドキャッピング

ダブルエンドキャッピング



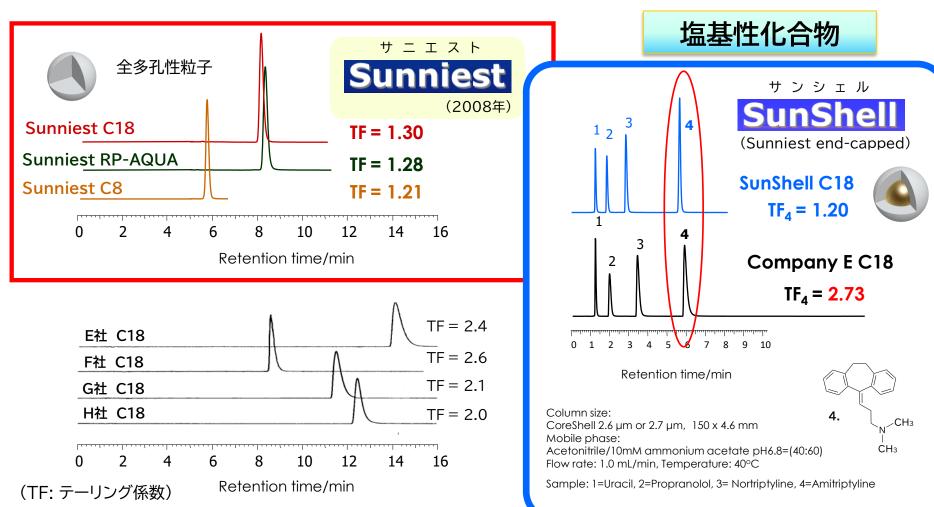
サニエスト 基盤技術: **Sunniest end-capping**

(2008年)



▶ 重層的な不活性化で 残存シラノール影響を最小化

高度不活性化の効果: ピーク形状の改善



▶ 塩基性化合物ピーク形状を改善(コアシェルカラムも)

高度不活性化の効果: ピーク形状の改善

金属配位性化合物

基材に内在する金属の影響を抑制

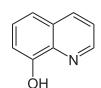
金属吸着性試験条件

Column size: 4.6x150 mm

Mobrile phase:

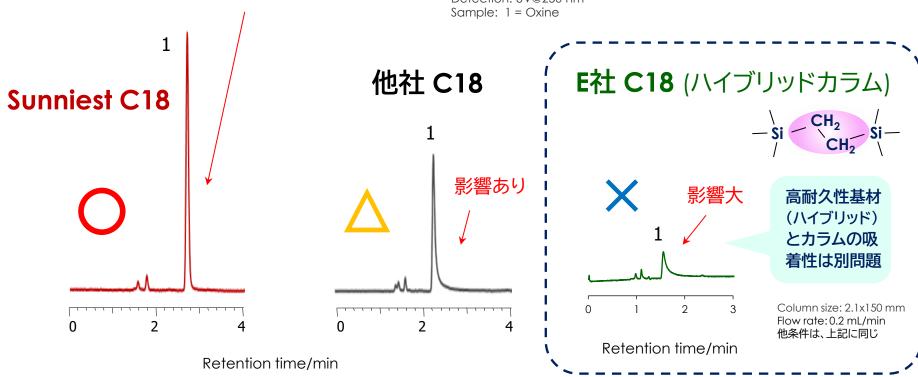
MeOH/20 mM H₃PO₄=10/90 Flow rate: 1.0 ml/min

Temperature: 40°C
Detection: UV@250 nm
Sample: 1 = Oxine



1. Oxine

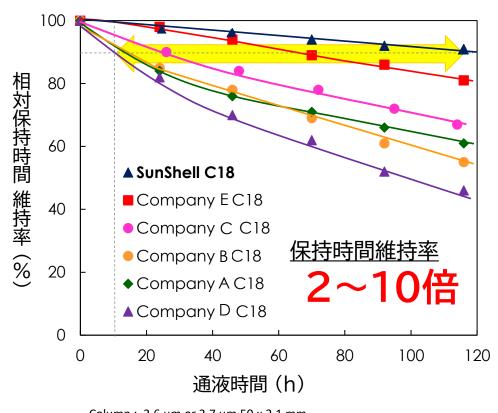
吸着性指標 化合物



▶ 適切な表面処理(エンドキャッピング)が改善に重要

高度不活性化の効果: 耐酸性

pH 1



Column : 2.6 μm or 2.7 μm 50 x 2.1 mm

酸耐久性試験条件

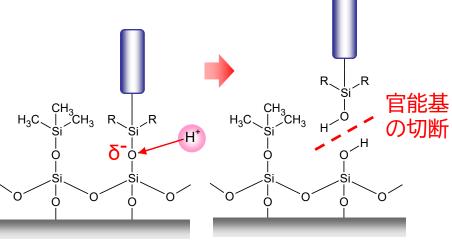
Mobile phase: CH₃CN/1.0% TFA (pH1) = 10/90 Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 80 °C

保持時間測定条件

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 40 $^{\circ}$ C Sample: 1 = Uracil 2 = Butylbenzene

	比較カラム	pH 範囲 (カタログ記載)
	SunShell C18	1.5 – 10
	Company E C18	2 – 9
	Company C C18	2 – 8
•	Company A C18	1.5 – 10
	Company B C18	1 – 11
	Company D C18	2 – 9

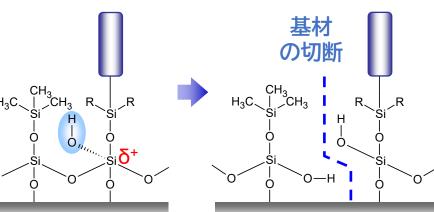


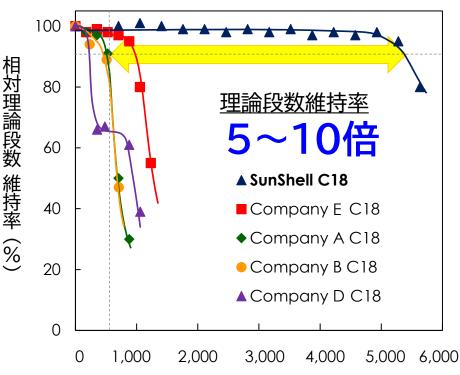
劣化の特徴

酸加水分解によって保持力が減少

高度不活性化の効果: 耐アルカリ性 pH 10

比較カラム pH 範囲 (カタログ記載) ▲ SunShell C18 1.5 - 10 Company E C18 2 - 9 Company A C18 1.5 - 10 Company B C18 1 - 11 Company D C18 2 - 9





溶出容量(mL)

Column: 2.6 μm or 2.7 μm 50 x 2.1 mm

塩基耐久性試験条件

Mobile phase: CH₃OH/20mM Sodium borate/

10mM NaOH = 30/21/49 (pH10)

Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 50 °C

劣化の特徴

42/15

Mobile phase: CH₃OH/H₂O=70/30

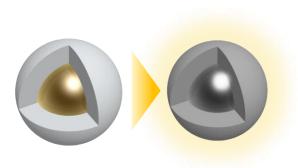
Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Butylbenzene

理論段数測定条件

アルカリ溶解(凹み)に伴い理論段数が減少

高度不活性化法のさらなる進化 (2022-)



<u>適用カラム</u>



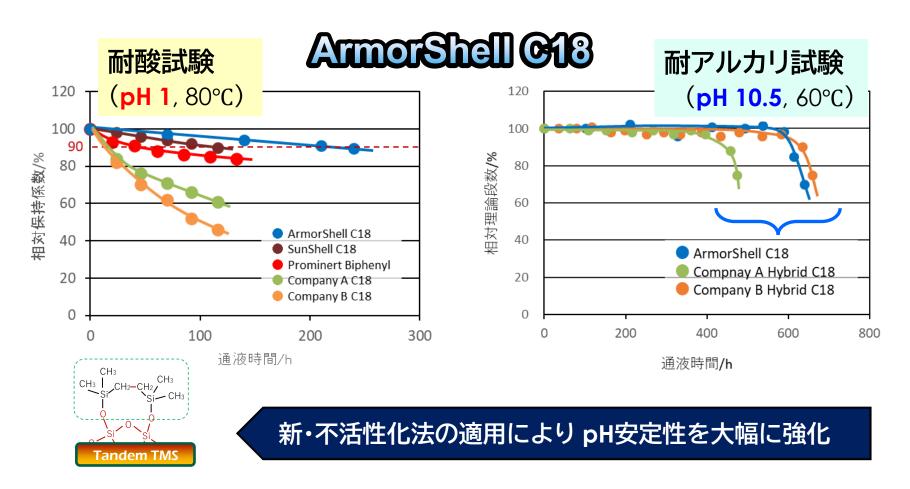
— 汎用HPLCの可能性を拡げる3.5 μm粒子カラム

— コアシェルSunShell C18の耐久性を2倍に向上

SunShell Blo C18

— 100 nmワイドポア設計の中分子専用カラム

2倍の耐久性、高密度エンドキャッピング



▶ コアシェルの高効率性 + ハイブリッドの高耐久性 (表面改質型)

エンドキャッピングか、ハイブリッドか?





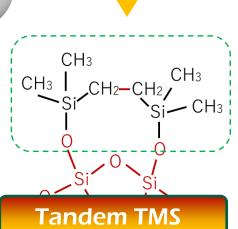
高密度シリカ表面処理

ArmorShell Prominert 他

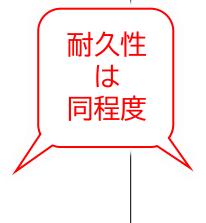
パーシャルハイブリッド

(Post-X²) **SunArmor**

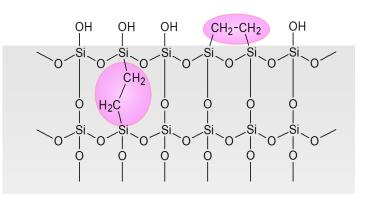




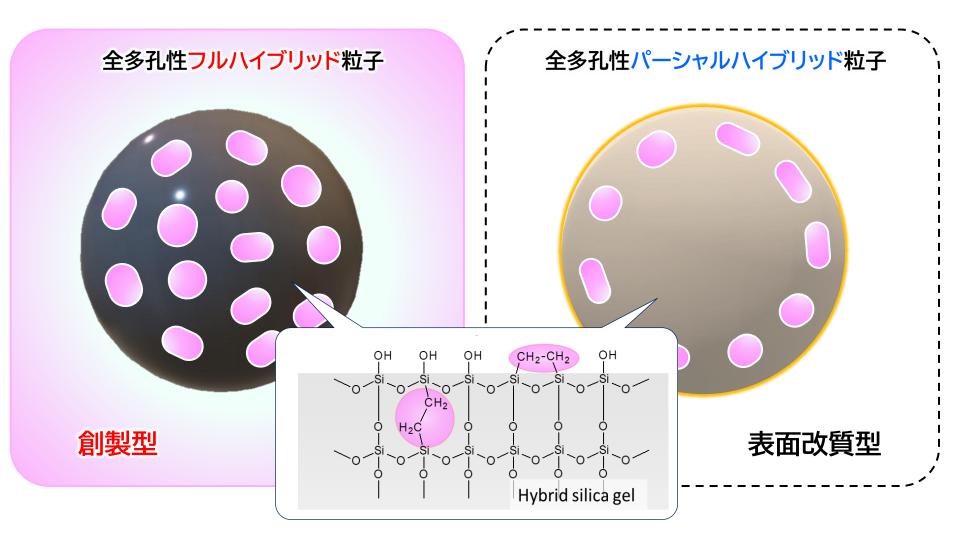
シリカ表面の改質処理





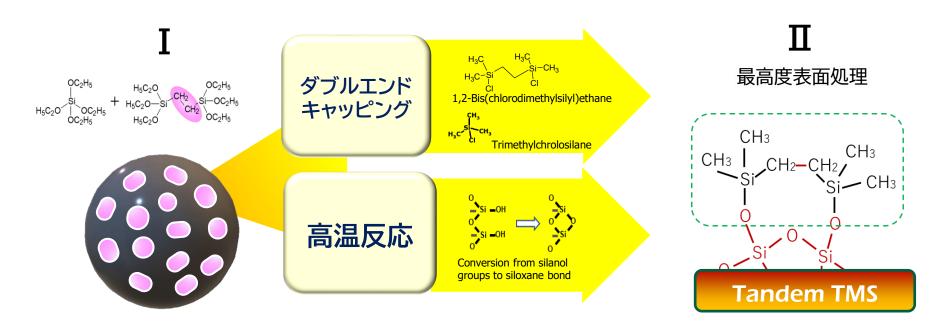


全多孔性ハイブリッドカラムの2系統



▶ 多くの市販ハイブリッドカラムは表面改質型(右)

新型ハイブリッドカラム開発コンセプト



- I. フルハイブリッド基材(創製型の有機シリカ)
- II. 最新エンドキャッピング法 (Tandem TMS)
- ▶ ウルトラハイブリッド な 新時代C18カラムを開発

SunBridge C18 5 µm 【2025年2月発売】

サンブリッジ



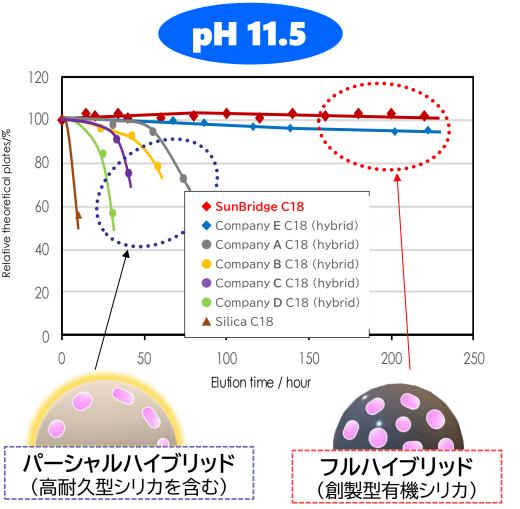
Ultra Hybrid Technology

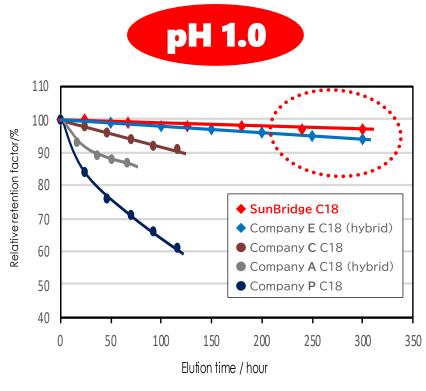
- 高耐久 ― 異次元の耐久性能
- 低吸着 ― 良好なピーク形状
- 高安定 ― 迅速な平衡化



SunBridge C18 5 µm

—— 高耐久 —





SunBridgeは高pH, 低pH条件ともに最高の耐久性を示した。

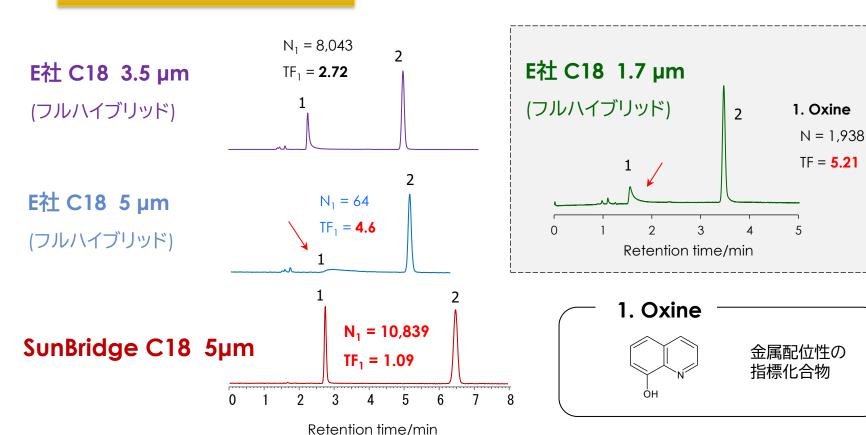
*詳細条件はカタログを参照下さい。

▶ フルハイブリッドはアルカリ耐久性が極めて高い。

SunBridge C18 5 µm — 低吸着 —

金属配位性化合物

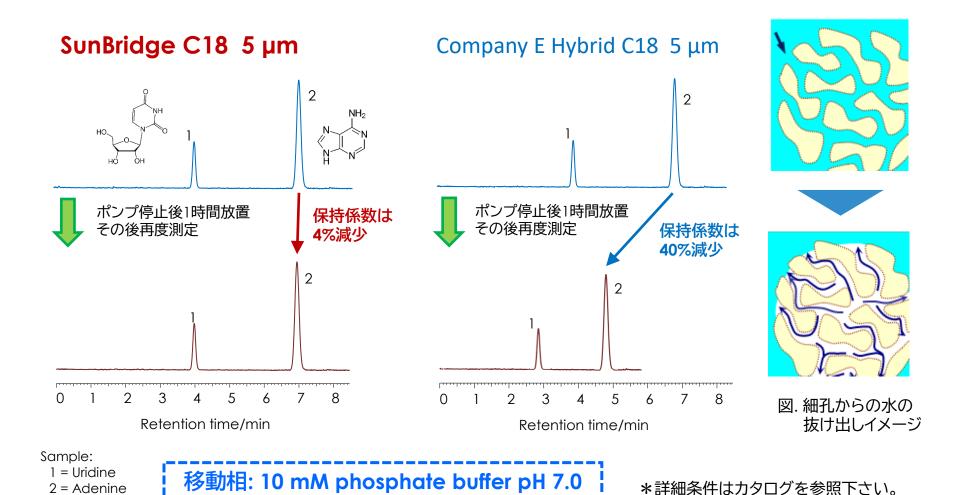
(N: 理論段数, TF: テーリング係数、シンメトリー係数)



*詳細条件はカタログを参照下さい。

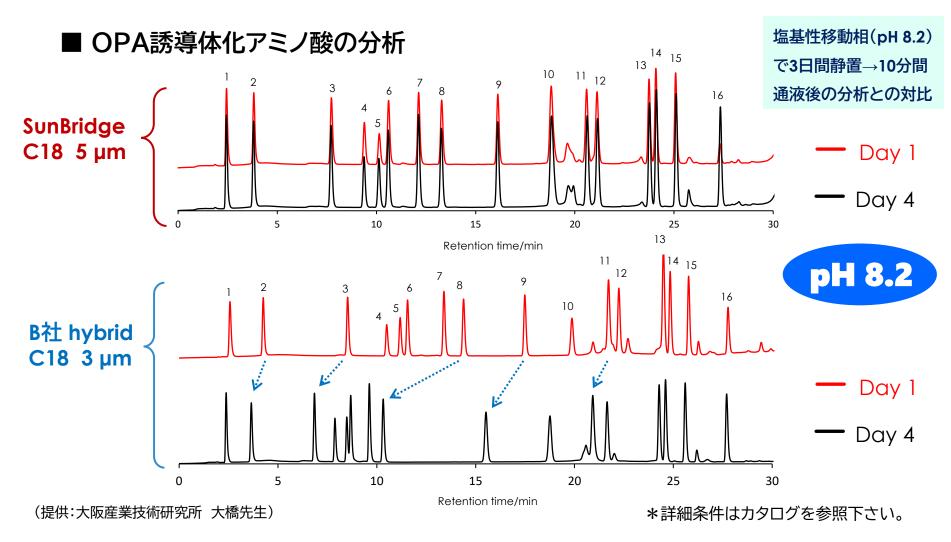
▶ E社(フルハイブリッド)が抱える吸着課題を解消

SunBridge C18 5 µm — 高安定 —



▶ 水系100%条件の使用時にも保持再現性が良好

SunBridge C18 5 µm 分析例: アミノ酸

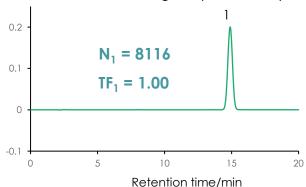


▶ 負荷のかかる塩基性条件下でも、平衡化が迅速

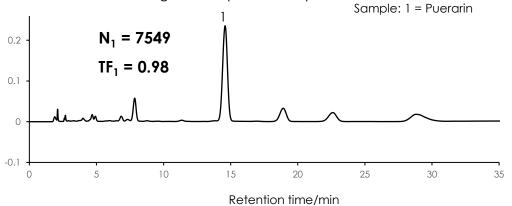
SunBridge C18 5 µm 分析例: 生薬

■ 生薬の分析(日本薬局方カッコン)

○ 標準溶液: プエラリン 0.1 mg/mL (50% MeOH)



● 試料溶液: 日局カッコン 0.3 g/100 mL (50% MeOH)



(N: 理論段数, TF: エーリング係数、シンメトリー係数)

【日本薬局方(JP18)規定】 N ≥ 3000, TF ≤ 2.0

<第18改正日本薬局方に基づく試験条件>

Column: SunBridge C18 $\,$ 5 μm , $\,$ 150 x $\,$ 4.6 mm

Mobile phase:

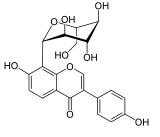
50 mM Sodium Dihydrogen Phosphate aq. / Acetonitrile = 9 / 1

Flow rate: 0.885 mL/min (プエラリンの保持時間: 約15分)

Injection volume: 10 µL, Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm (PDA)

Instrument: Waters Acquity UPLC H-Class



1. Puerarin

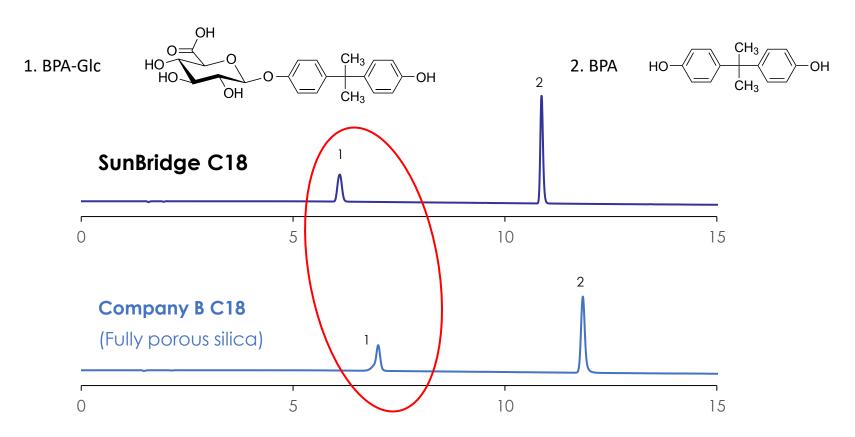
(提供: イスクラ産業株式会社)

*詳細条件はカタログを参照下さい。

▶ 配糖体ピークの対称性が良好 & 高理論段数

SunBridge C18 5 µm 分析例: 抱合体

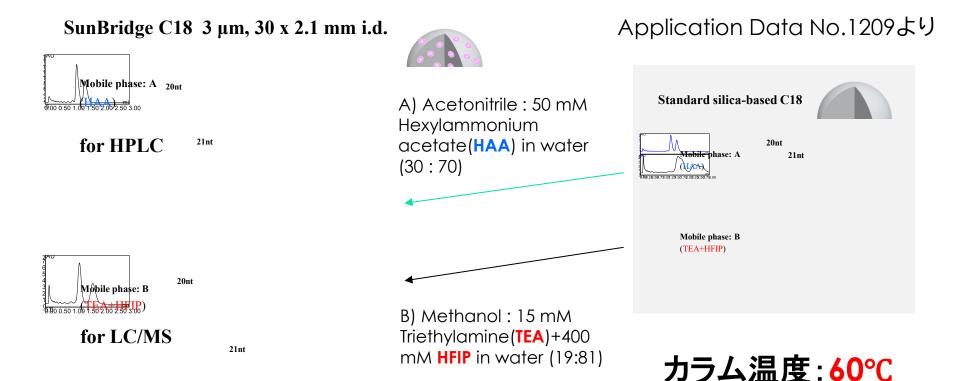
■ビスフェノールAとグルクロン酸抱合体の分離



*詳細条件はアプリケーションデータ集ver.5、又は当社ホームページより App. No.1179をご閲覧下さい。

▶ SunBridgeは極性化合物のピーク形状が良好

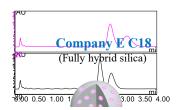
SunBridge C18 3 µm 分析例:オリゴ核酸



▶ SunBridgeはオリゴ核酸のピーク改善に有用

SunBridge C18 3 µm 分析例:オリゴ核酸

21nt



(5 mM TEA+ 50 mM HFIP)

Α

Application Data No.1209より

Gradient: 9-11 % B

20nt

(5 mM TEA+ 50 mM HFIP)

SunBridge C18

(Fully hybrid silica with Tandem TMS end-capping)



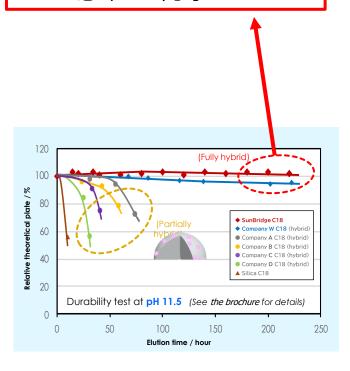
21nt

20nt

Gradient: 10.5-12.5 % B

▶ Company E C18 は弱いイオンペア 試薬でも良好に機能したものの、僅か なテーリングが発生。対してSunBridge C18は、より優れた分離性能を示した。 SunBridge C18 ≥ Company E

C18 は、完全に架橋された pH 安定型ハイブリッドシリカカラム という意味では同等のスペック



シリーズ新製品のご案内

SunBridge PFP-R (3 µm)



25'9月発売

SunBridge C18 (1.8 µm)



25'10月発売予定

キャンペーン・特別企画も実施中です。