

エチレン架橋型ハイブリッドシリカ C18 カラム

SunBridge C18 の特性



クロマニックテクノロジーズ 長江徳和, 小山隆次, 塚本友康

1 はじめに

HPLC 逆相充填剤の基剤としてシリカゲルは 1970 年代から使用されているが、シリカゲル自身のアルカリ性条件での耐久性の低さから、疎水性が高い C18 を結合した充填剤でも移動相の pH は 8 までは限界と長らく言われてきた。エンドキャッピング技術の向上により、残存シラノール基は減少し、シリカ表面の疎水性が上がることで、逆相充填剤の耐アルカリ性は向上してきたが、pH 10 が限界であった。2000 年以降エチレン鎖をシリカ基材に組み入れ、無機のシリカと有機のエチレンを組み合わせたハイブリッドシリカ基材が開発され、耐アルカリ性は飛躍的に向上し、pH 12 まで使用できるような充填剤（カラム）が利用できるようになった。現在ハイブリッドシリカ C18 と呼ばれる充填剤（カラム）は大きく分けて 2 種類のものがある。シリカゲルへのエチレン鎖の導入方法が異なり、エチレン鎖がシリカゲル骨格内に導入されている Ethylene cross-linked Silica gel (Fully hybrid silica gel) とシリカゲル表面にエチレン鎖を導入した Silica gel with ethylene bonded to silica surface (Partially hybrid silica gel) が代表的な 2 種類のハイブリッドシリカゲル基材である。前者は後者に比べアルカリ性条件下での耐久性が高く、温度が高い、塩濃度が高いなど過酷な移動相条件下でも適用可能である。本稿では前者のエチレン鎖をシリカゲル骨格に導入したエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルに C18 を結合後、二座結合型エンドキャッピング試薬である 1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethane を高温で反応させたハイブリッドシリカ C18 カラムの分離性能ならびに耐アルカリ性の評価を行った。

また 2004 年以降 HPLC 装置の耐圧性能が 100 MPa 以上に向上した UHPLC が市販されるようになり、粒子径が 2 μm 未満の sub-2 μm 充填剤が利用できるようになった。この sub-2 μm 粒子を充填した内径 2.1mm、長さ 100mm のカラムは、50 MPa 以上のカラム背圧がかかるようになり、移動相が高圧でカラム内を移動するときに発生する摩擦熱の悪影響が無視できなくなった。ハイブリッドシリカ C18 に対するこの摩擦熱の影響について考察を行った。

2 ハイブリッドシリカ C18 の作製

2.1 ハイブリッドシリカゲル

エチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルは図 1 に示す様に、テトラエトキシシランとビス(トリエトキシシリル)エタンをモル比で 4:1 の割合で混合してシリカゲルを合成し、物性値が細孔容積: 0.8 mL/g、比表面積: 190 m²/g、細孔径: 15 nm になるように調整した。分級により平均粒子径が 1.8 μm ・3 μm ・5 μm の粒子を得た。エチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルの製造方法は 2004 年時点でウォーターズ・

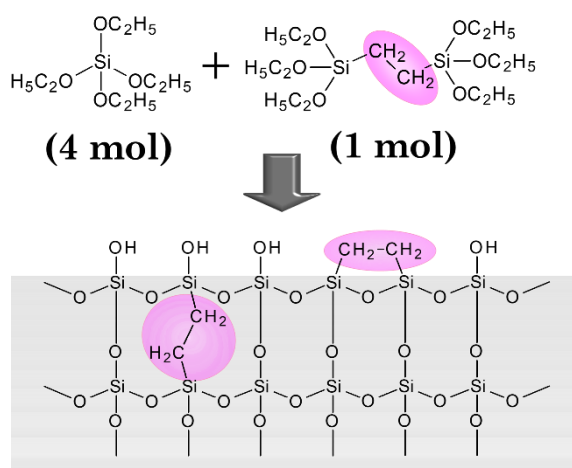


図1 エチレン架橋型有機シリカゲル

インヴェストメンツ・リミテッドの特許¹⁾として成立している。20年以上経過後の2024年にこの特許は失効しており、現在は公知の技術となっている。図2のAに示されている様にエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルはエチレン鎖がシリカ骨格内に均一に分布しており、比表面積などの物性値からシリカゲルの骨格の太さは平均値として12.5 nmと計算された。一方通常の比表面積340 m²/gのシリカゲル表面にエチレン鎖を導入したハイブリッドシリカゲルを図2のBに示す。比表面積340 m²/gのシリカゲルの骨格の太さは平均値として6.6 nmと計算される。エチレン鎖が骨格全体に分布している前者はフルハイブリッドシリカゲル、シリカ骨格表面

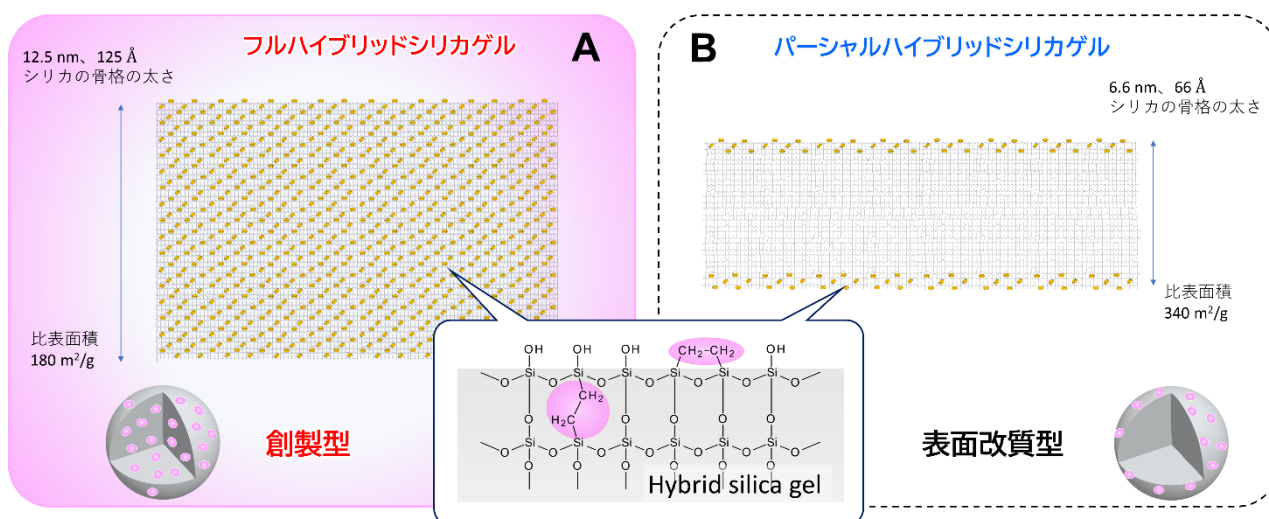


図2 フルハイブリッドシリカゲルとパーシャルハイブリッドシリカゲル

にのみエチレン鎖が存在している後者はパーシャルハイブリッドシリカゲルとも呼ばれている。

2.2 C18 表面処理とエンドキャッピング

常法により、エチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルにトリクロロオクタデシルシランをトルエン中で還流させ、オクタデシル基 (C18) を結合した。エンドキャッピングは初めに二座型シリル化剤である 1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethane を反応させ、次に Trimethylchlorosilane を用い二回目の反応を行った。このエンドキャッピング反応はシラノール基が脱水しシロキサン結合に変換される 200 °C以上の温度で行った。通常のシリル化試薬のみで行うエンドキャッピングに比べ、この高温でのシラノール基のシロキサン結合への変換を含むエンドキャッピング²⁾は、最終的に残存シラノール基が少なくなるだけでなく、残存シラノール基が減ることにより固定相全体の疎水性が上がる。その結果、炭素含有量が低くても大きな保持を示すようになり、さらに基材表面の疎水性が上がるため水分子がシリカ基材表面に近付きにくくなることで、加水分解による劣化が遅くなる。

今まで述べてきたエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルにエンドキャッピングを含めた C18 表面処理を

行った充填剤はクロマニックテクノロジー社製の SunBridge C18 カラムとして市販されている。

2.3 ハイブリッドシリカ C18 の不活性度

今まで述べてきたエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルにエンドキャッピングを含めた C18 表面処理を行った充填剤であるクロマニックテクノロジー社製の SunBridge C18 の不活性度を評価した。図 3 に示されている様に、オキシシンならびにアミトリプチリンのピーク形状から金属配位性化合物と塩基性化合物への不活性度を評価した。比較として同様にエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルを用いた H 社ハイブリッド C18 も評価した。SunBridge C18 は金属配位性化合物オキシシンと塩基性化合物アミトリプチリンの両化合物ともピーク形状は良好でテーリングも少なく、H 社ハイブリッド C18 よりも不活性であることが示された。移動相中の有機溶媒に水素結合性を有するメタノールを使用すると、シラノール基の活性度が抑えられ、塩基性化合物のテーリングは少なくなるが、水素結合性を有さないアセトニトリルを使用すると、塩基性化合物のテーリングは大きくなる。今回使用した移動相はアセトニトリルを有機溶媒として用いており、テーリングの起こりやすい移動相での比較を行った。

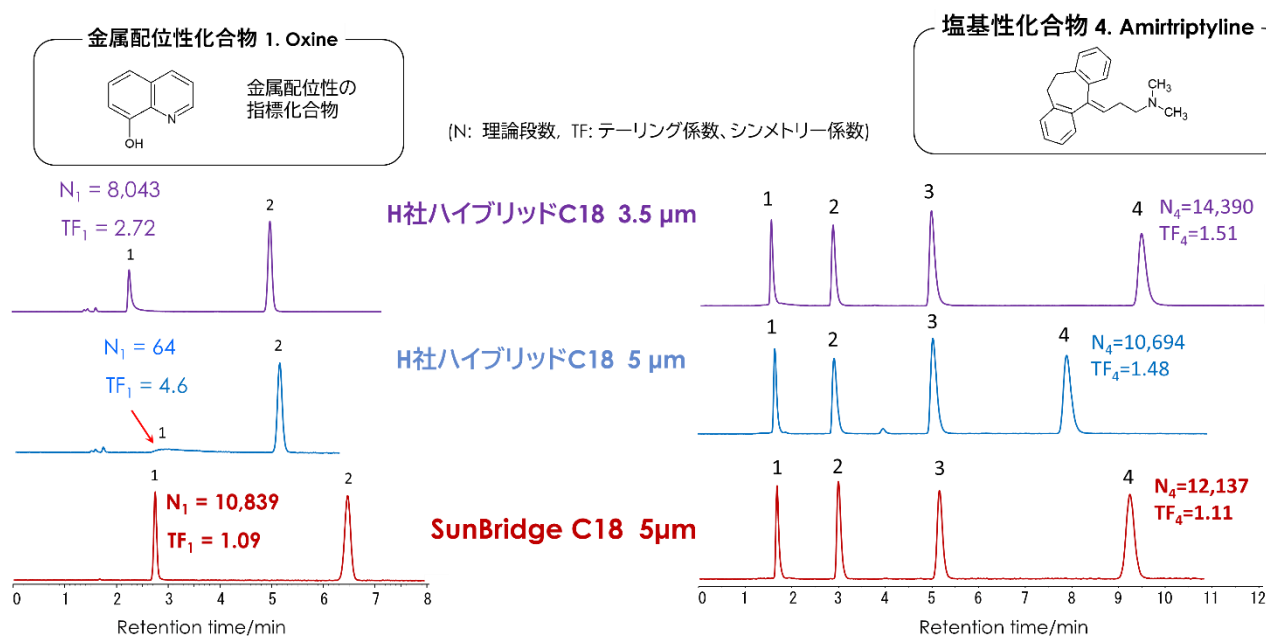


図 3 金属配位性化合物と塩基性化合物への不活性度を評価

【オキシシン分離条件】

Column dimension: 150 x 4.6 mm for 3.5 and 5 μm
Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/20\text{mM H}_3\text{PO}_4=10/90$
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@250 nm
Sample: 1 = 8-Quinolinol (Oxine)
2 = Caffeine

【アミトリプチリン分離条件】

Column dimension: 150 x 4.6 mm
Mobile phase: Acetonitrile/10mM 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=Amirtriptyline

3 耐久性の評価

エチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルに C18 結合及びエンドキャッピングを施した SunBridge C18 の耐久性を他社のフルハイブリッド C18 やパーシャルハイブリッドまたはそう思われる C18 と比較した。図 4 の A に pH 11.5 の移動相を通液した時の理論段数の変化を示す。シリカ C18 カラムはアルカリ性移動相を通液するとシリカが移動相に溶け、シリカ基材の体積が減少し、カラム管 IN 側に隙間ができる。その結果理論段

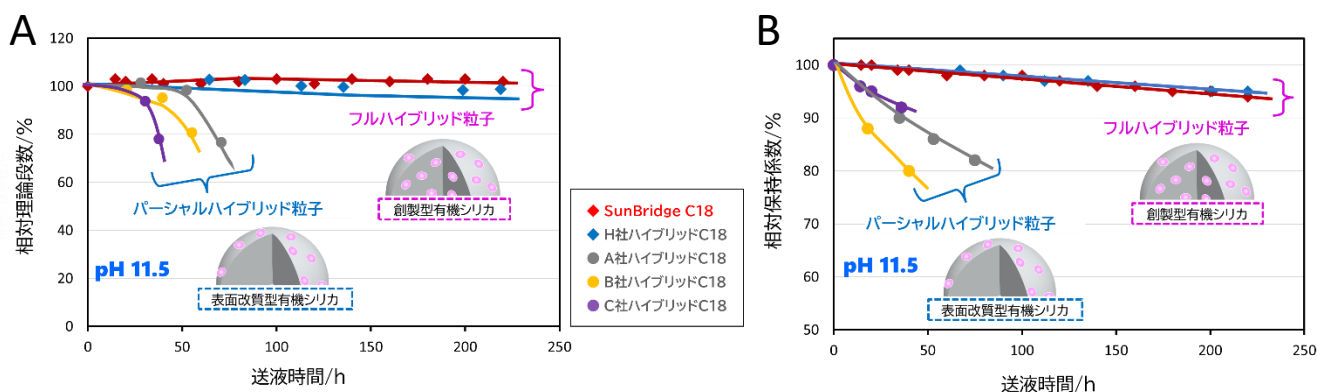


図4 アルカリ性移動相条件下における耐久性：理論段数と保持係数で評価

【耐久性試験条件】 (pH 11.5)

Column dimension: 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

【理論段数・保持係数測定条件】

Mobile phase: Acetonitrile/water=70/30

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Butylbenzene

数が減少する。溶け出すシリカの濃度をモリブデン黄吸光光度法で測定すると時間とともに指数関数的に濃度が上がることが知られている³⁾。したがって、ある時間で急激に理論段数が減少するのは、アルカリ性条件下でシリカは指数関数的な速さで溶け出しているためである。フルハイブリッドシリカ C18であるSunBridge C18とH社ハイブリッド C18は200時間以上の通液でも理論段数はほぼ変わらず、シリカ基材はほとんど溶け出していないことが示された。一方パーシャルハイブリッドシリカ C18やパーシャルハイブリッドシリカ C18であると推測されるA社、B社、C社ハイブリッド C18は通液開始後30時間から60時間で理論段数は下がり始め、フルハイブリッドシリカ C18とパーシャルハイブリッドシリカ C18は4倍以上の耐アルカリ性の差が認められた。通常のシリカ C18は10時間未満で、理論段数は50%にまで下がり、ほとんど使用不可能であった。また図4のBは保持係数の変化を示しているが、フルハイブリッドシリカ C18でも200時間通液後で保持係数は約5%減少し、若干の固定相(C18)が脱離している。しかしパーシャルハイブリッド C18は10時間から20時間で、保持係数は5%以上減少しており、保持係数で比較するとこのpH 11.5の条件ではフルハイブリッドシリカ C18はパーシャルハイブリッドシリカ C18の10倍以上の耐久性があることが示された。

4 摩擦熱の影響による理論段数の変化

4.1 充填剤基材が受ける摩擦熱による理論段数低下

sub-2 μm 粒子径の充填剤が充填されたカラムは背圧が高くなり、30 MPa 以上になると、摩擦熱の理論段数に与える影響が大きくなる。移動相がカラム内に流れることによる摩擦熱の発生によりカラム入口から出口に向けてカラム温度が徐々に上昇する。カラムオープンは一一定の温度に保たれているため、カラム自身の温度が摩擦熱により上昇すると、カラム断面の中心部と外側で温度差ができる。移動相の粘度は温度が高いほど低くなるため、温度の高いカラム断面中心部の移動相の方がカラム断面外側の移動相より粘度は低くなり、移動速度が速くなる。カラム内の移動相の移動速度に差ができ一定でないためピークは広がる。

図5にコアシェル C18 (SunShell C18) 2 μm カラム、全多孔性シリカ C18 1.8 μm カラムおよびエチレン架

橋型ハイブリッドシリカゲル C18 (H 社ハイブリッド C18) 1.7 μm カラムの流速と理論段数の関係を示す。カラムサイズは内径 2.1 mm で長さ 100 mm であり、アセトニトリル/水=60/40 の移動相をカラム温度 40 $^{\circ}\text{C}$ で通液してアセナフテンの理論段数を測定した。コアシェルカラムは流速 0.5 mL/min で、全多孔性シリカ C18 カラムは流速 0.4 mL/min で、エチレン架橋型ハイブリッドシリカゲル C18 カラムは 0.25 mL/min で理論段数の極大値を示した。これらのカラムの背圧は流速が 0.5 mL/min の時に 48 MPa から 54 MPa であり、大きな差はないため、これらのカラム間では摩擦熱の発生に大きな差はないと考えられる。しかしながら理論段数の極大値が得られる流速に大きな差があるのは、カラム断面での中心部から外側への温度勾配が異なり、コアシェル C18 はエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲル C18 に比べ温度勾配が小さく、中心部と外側の温度差が小さいためだと考えられる。Gritti⁴⁾らはコアシェルシリカとエチレン架橋型ハイブリッドシリカの熱伝導率を比較し、前者は後者の 3 倍高い熱伝導率を有していると報告している。上記 3 種の充填剤基材を比較すると、コアシェルシリカは粒子の内部に無効性のシリカが存在し、細孔容積が 0.25 mL/g 程度であり、カラム内に占めるシリカ (SiO_2) の体積が、細孔容積が 1.0~0.8 mL/g の一般的な全多孔性シリカよりも大きい。このことがコアシェルシリカの熱伝導率が大きくなる要因である。また、全多孔性であるエチレン架橋型ハイブリッドシリカはシリカ骨格にエチレン鎖が内在しており、無機のシリカより炭素の方が熱伝導率は低いため、エチレン架橋型ハイブリッドシリカが最も熱伝導率は低くなる。このように熱伝導率の高い基材を用いたカラムは、摩擦熱による温度上昇時のカラム断面の温度勾配が小さくなるため、カラム背圧が高くなる高流速でも摩擦熱の影響が少なくなり理論段数は低下しにくくなる。

4.2 カラム長さ・温度が与える摩擦熱による理論段数低下への影響

図 6 にはカラム長さの異なるクロマチックテ

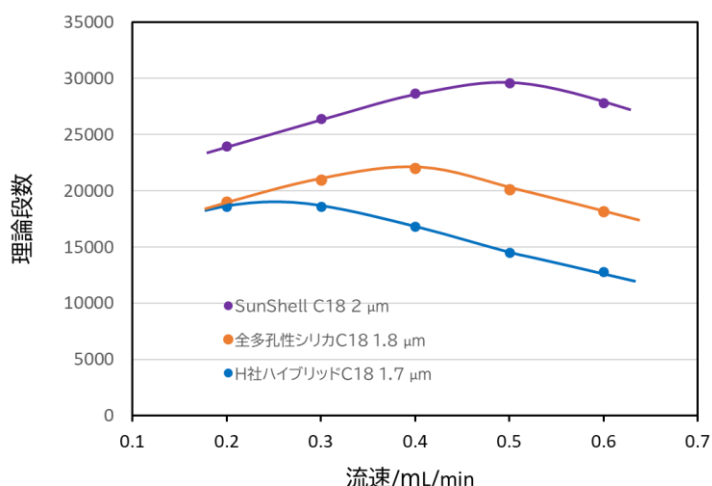


図 5 カラムの流速と理論段数の関係 I：シリカ基材の比較

Column: SunShell (core shell) C18, 2 μm , 全多孔性 C18, 1.8 μm , H 社ハイブリッド C18, 1.7 μm
 Column dimension: 100 mm x 2.1 mm
 Mobile phase: Acetonitrile/water=60/40
 Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$
 Sample: Acenaphthene

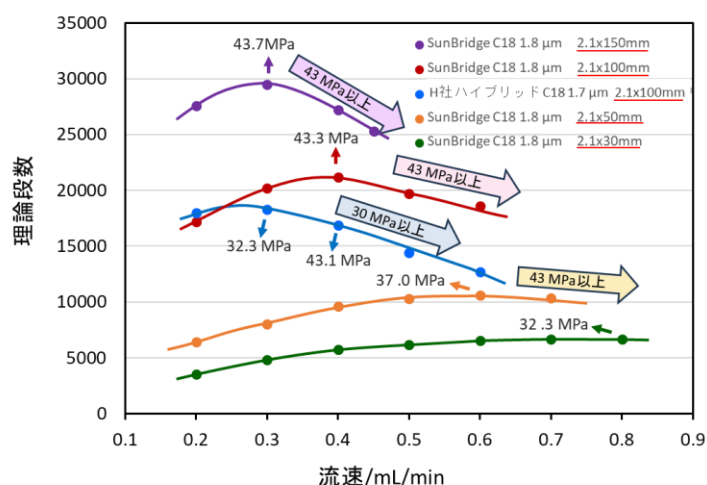


図 6 カラムの流速と理論段数の関係 II：カラム長さの比較

Column: SunBridge C18, 1.8 μm , H 社ハイブリッド C18, 1.7 μm ,
 Column dimension: 30, 50, 100 and 150 mm x 2.1 mm
 Mobile phase: Acetonitrile/water=60/40
 Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$
 Sample: Acenaphthene

クノロジーズ社製エチレン架橋型ハイブリッドシリカ SunBridge C18 1.8 μm カラムの流速と理論段数の関係を示す。内径 2.1 mm, カラム長 30 mm, 50 mm, 100 mm および 150 mm のカラムを用いた。他社カラムとの比較として、内径 2.1 mm, 長さ 100 mm のシリカ基材が同じエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲル C18 である H 社ハイブリッド C18 1.7 μm カラムも加えた。SunBridge C18 1.8 μm のカラム長さ 30 mm のカラムは長さが短いため、流速が 0.8 mL/min でもカラム背圧は 30 MPa 程度であり、摩擦熱による理論段数の低下はほぼ起こっていないと考えられる。しかしカラム長が長くなれば、長さに比例してカラム背圧が高くなり、摩擦熱による理論段数低下が認められるようになる。SunBridge C18 1.8 μm カラムはカラム長さに関係なく、理論段数低下は約 43 MPa のカラム背圧がかかる流速で始まっている。つまり、SunBridge C18 1.8 μm カラムの基材は、43 MPa 以上のカラム背圧で発生する摩擦熱で、カラム中心部と外側の温度差が理論段数を低下させる程度に大きくなることを示している。また理論段数の低下率はカラム長が長いほど大きく、カラムが長い分摩擦熱によるカラム温度上昇が大きくなるためであると考えられる。H 社ハイブリッド C18 1.7 μm カラムは長さ 100 mm のものだけの測定データではあるが、カラム背圧が 30 MPa 以上で理論段数が低下した。摩擦熱発生量は充填剤に関係なくカラム背圧のみでほぼ決まると考えられ、充填剤基材の熱伝導率は H 社ハイブリッド C18 1.7 μm の方が SunBridge C18 1.8 μm よりも低いために、低カラム背圧で理論段数が低下し始めたと考えられる。両カラムは同じエチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルを用いているが、H 社ハイブリッドシリカゲルの方が骨格内のエチレン鎖量が多いため、熱伝導率が低いと推察される。両エチレン架橋型ハイブリッドシリカ C18 は基材の物性値はほぼ同じで、C18 の結合密度の指標となる C18 カラムでの α -ターフェニルとトリフェニレンの分離係数もほぼ同じである。つまり両充填剤の C18 の結合密度もほぼ同じであると考えられるにも関わらず、炭素含有量は H 社ハイブリッド C18 の方が 1 割程度高いことから、H 社ハイブリッド基材内のエチレン鎖量が多いと考えられる。SunBridge C18 1.8 μm カラムは図 5 の全多孔性シリカ C18 1.8 μm カラムと同様に、流速が 0.4 mL/min で理論段数が極大値となっており、H 社のエチレン架橋型ハイブリッドシリカ基材の熱伝導率が低くなる欠点を改善していると言える。

図 7 はカラム温度を変えた時のカラム長 150 mm のカラムの流速と理論段数の関係を示す。25 $^{\circ}\text{C}$ の場合、流速が 0.25 mL/min で理論段数は極大値となり、しかも流速を上げた時の理論段数の低下度合いも大きく、高速・高理論段数での分離は難しい結果となった。しかしカラム温度を上げると徐々に理論段数は上がり、理論段数の極大値はより高流速で達成されるようになり、さらに流速の増大に伴う理論段数の低下率もカラム温度が高いほど低くなった。カラム温度が高い場合には摩擦熱の理論段数に与える影響が少なくなることが示された。カラム長 150 mm のカラムでもカラム温度 60 $^{\circ}\text{C}$ で操作すれば、高速・高理論段数分離が可能であることが示された。

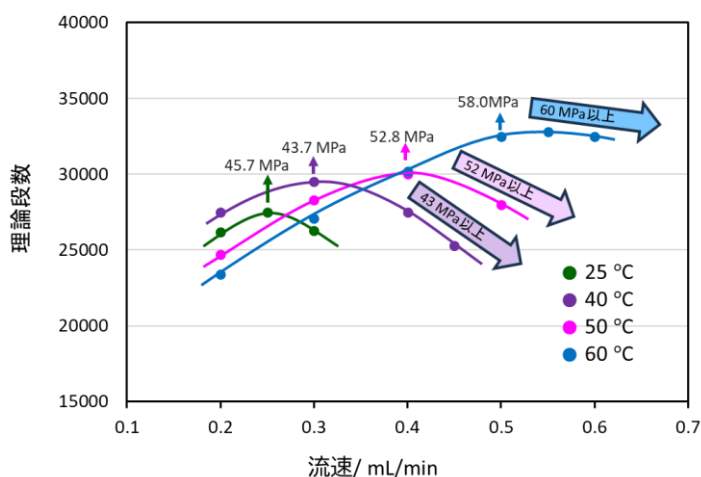


図 7 カラムの流速と理論段数の関係 III : カラム温度の比較

Column: SunBridge C18, 1.8 μm , 150 mm x 2.1 mm
 Mobile phase: Acetonitrile/water=60/40
 Temperature: 25, 40, 50 and 60 $^{\circ}\text{C}$
 Sample: Acenaphthene

5 分離例

図 8 には塩化ベンザルコニウムの SunBridge C18 5 μm カラムと H 社ハイブリッド C18 3.5 μm カラムの分離を示す。塩化ベンザルコニウム(R = C16)のテーリングファクター(TF)と保持時間を比較すると、両値とも H 社ハイブリッド C18 3.5 μm は SunBridge C18 5 μm の 2 倍以上であった。これは残存シラノール基の影響によるものと推測される。さらに粒子径を補正して理論段数を比較すると、SunBridge C18 5 μm は H 社ハイブリッド C18 3.5 μm の約 2 倍の理論段数を示した。

図 9 にはリゾチームの分離を示す。比較として細孔径の異なる C18 カラムを用いた。細孔径は図中に表示している。リゾチームは分子量が 10,000 以上のタンパク

質であるため、細孔径が 10 nm では十分な大きさではなく、リゾチームピークはブロードになったと考えられる。SunBridge C18 は細孔径が 15 nm であるため、分子量 20,000 程度のタンパク質にとって十分大きい細孔径であるため、非常にシャープなリゾチームピークが得られた。

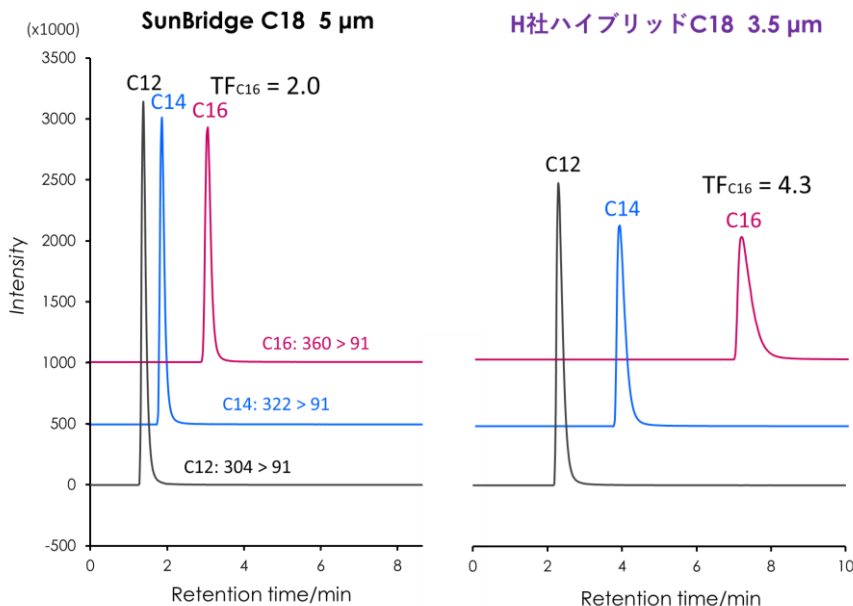
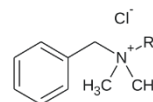


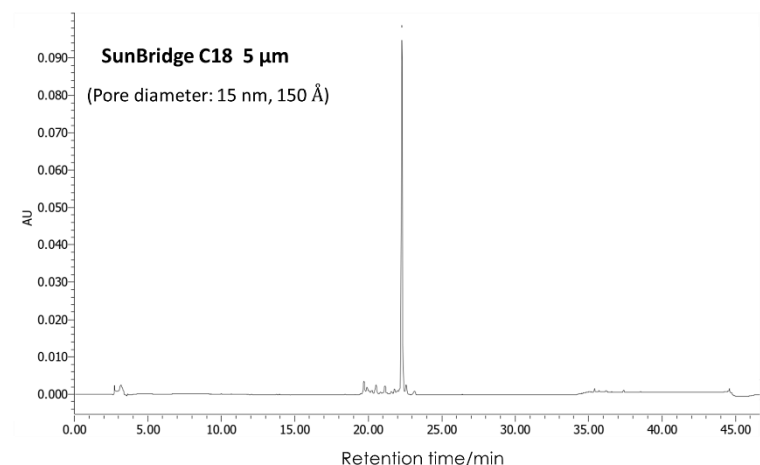
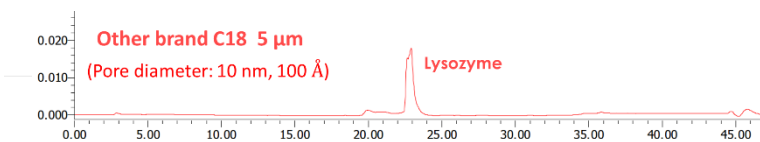
図 8 塩化ベンザルコニウムの分離

Column: SunBridge C18 5 μm , Company E (hybrid) C18 3.5 μm
 Column dimension: 100 x 2.1 mm
 Mobile phase: Acetonitrile/10 mM ammonium formate in water=75/25
 Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$
 Flow rate: 0.4 mL/min
 Sample: Benzalkonium chloride (each 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
 Detection: MS
 MRM C12: 304 > 91, C14: 332 > 91, C16: 360 > 91



C12: R = $(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$
 C14: R = $(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 C16: R = $(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$

提供：地方独立行政法人大阪産業技術研究所 佐藤先生



Column: SunBridge C18 5 μm , Other brand C18
 Column dimension: 250 x 4.6 mm
 Mobile phase:

[A] 0.1% Trifluoroacetic acid in water
 [B] 0.1% Trifluoroacetic acid in acetonitrile

Gradient program:

Time (min)	B.Conc (%)
0 – 30	0 $\rightarrow$ 60
30 – 40	100
40 – 50	0

Temperature: 65 $^{\circ}\text{C}$,
 Detection: UV@280 nm
 Flow rate: 1.0 mL/min,
 Injection Volume: 500 μL
 Sample: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lysozyme (M.W. 14.3 kDa)
 Sample solution: Phosphate-buffered Saline (pH7.4)

図 9 リゾチームの分離

6 まとめ

エチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルおよびこのハイブリッドシリカゲルに C18 結合し、二座型のエンドキャッピングを施したハイブリッドシリカ C18 カラムについて述べた。アルカリ性条件下での耐久性はエチレン架橋型ハイブリッドシリカ C18 では劇的に向上し、シリカ表面にエチレン鎖を導入した C18 よりも 10 倍程度高かった。二座型のエンドキャッピングは残存シラノール基の影響を非常に少なくし、塩基性化合物のテーリングを抑えるとともに、耐久性向上にも寄与していると考えられる。sub-2 μm 粒子を充填したカラムはカラム背圧が高くなり、摩擦熱の影響で理論段数が低下する。エチレン架橋型ハイブリッドシリカゲルはシリカ骨格内にエチレン鎖が存在し、このエチレン鎖により熱伝導率が低くなるため理論段数の低下が起こりやすいが、エチレン鎖の量が少なくなるように調整された SunBridge C18 1.8 μm カラムは全多孔性シリカ C18 1.8 μm カラムと同様な理論段数の低下であり、他社のエチレン架橋型ハイブリッドシリ C18 1.7 μm の欠点を克服している。

文献

- 1) Waters Investments Limited : Z. Jiang, R. P. Fisk, J. O'Gara, T. H. Walter, K. D. Wyndham, US6686035, "Porous inorganic/organic hybrid particles for chromatographic separations and process for their preparation" (2004. 2. 3).
- 2) 長江徳和, LC と LC/MS の知恵 (*Wisdom for LC and LC/MS*), 第 7 号, 14-22 (2023).
- 3) N. Nagae and D. Ishii, *American Laboratory*, 27, 20 (1995).
- 4) F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 1217 5069 (2010).



株式会社 クロマニック テクノロジーズ
552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1
TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890
E-mail: info@chromanik.co.jp
Website: <http://chromanik.co.jp>

202510