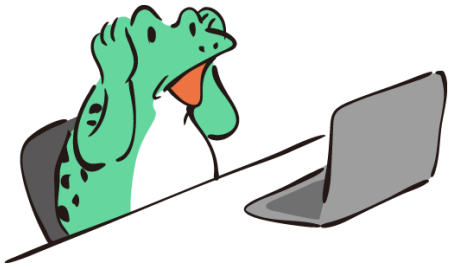
C18とは違う分離を！
2本目にするならどのカラム？

クロマニックテクノロジーズ
塚本友康　長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp

http://chromanik.co.jp

C18カラムでは分離できない

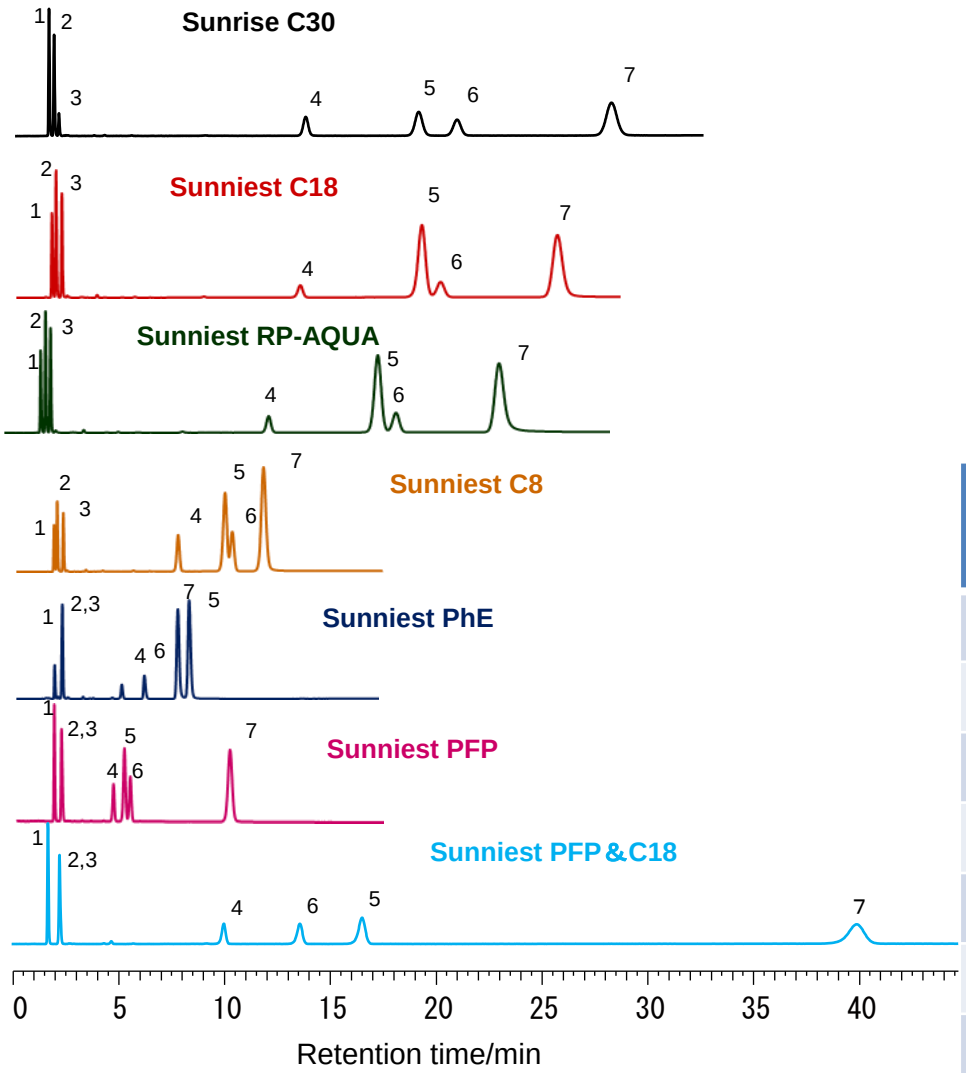


異性体　親水性化合物
構造等の類縁物質

カラムを変える

移動相を変える

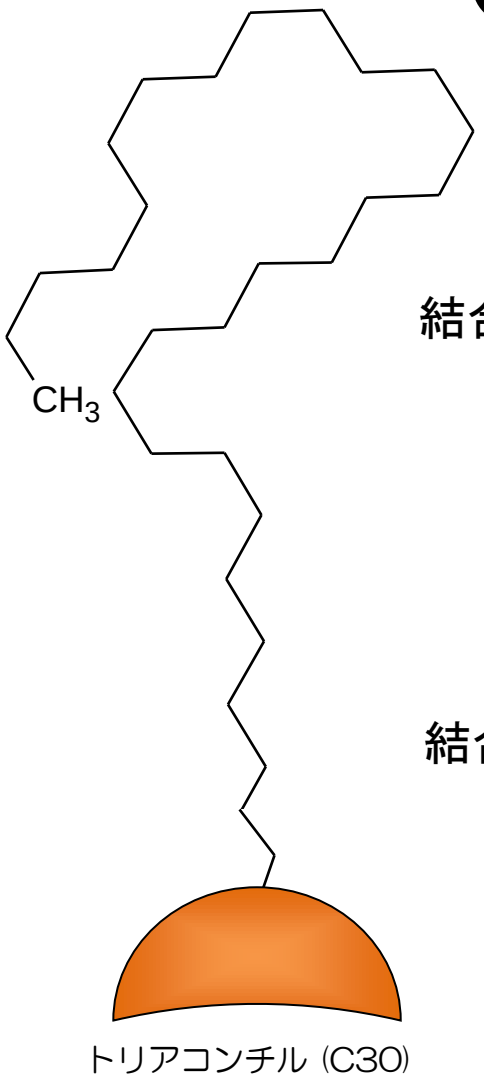
標準試料の分離例（全多孔性）



Column: SunriseC30,
Sunniest C18, RP-AQUA, 5C8, PhE, PFP, PFP&C18
5 µm 4.6x150 mm
Mobile phase: CH_3OH/H_2O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 ºC
Pressure: 5.4 MPa
Sample: 1 = Uracil,
2 = Caffeine,
3 = Phenol,
4 = Butylbenzene,
5 = o-Terphenyl,
6 = Amylbenzene,
7 = Triphenylene,

	水素結合性 (Caffeine/ Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C30	0.51	1.59	1.52
C18	0.43	1.56	1.37
RP-QUA	0.49	1.56	1.37
C8	0.33	1.43	1.23
PhE	1.00	1.34	0.92
PFP	1.00	1.29	2.51
PFP&C18	1.00	1.43	2.66

C30 C28カラム



- 疎水性相互作用が主な相互作用

結合密度が高い場合

- 疎水性の高い化合物分離に有用
- 構造異性体分離に有用

結合密度が低い場合 (RP-AQUA)

- 水系の移動相での安定性が高い
- 極性基導入型C18より、耐久性が高い
- 親水性化合物の分離の使用可能

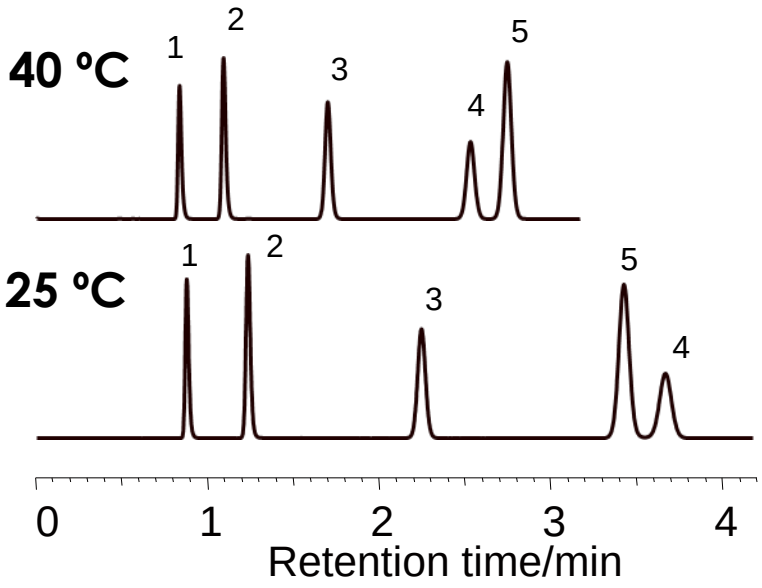
RP-AQUAとの違い

	SunShell C30	SunShell RP-AQUA
結合密度	1.9 μmol/m^2	1.4 μmol/m^2
エンドキャッピング	TMS	Sunniest エンドキャップ
細孔径	12 nm	16 nm
pH範囲	2-8	2-8 (2-10)
対象化合物	異性体 低極性化合物	極性化合物

大きな違いは官能基の結合密度

SunShell RP-Aqua の40 ºCでの保持

核酸塩基の分離



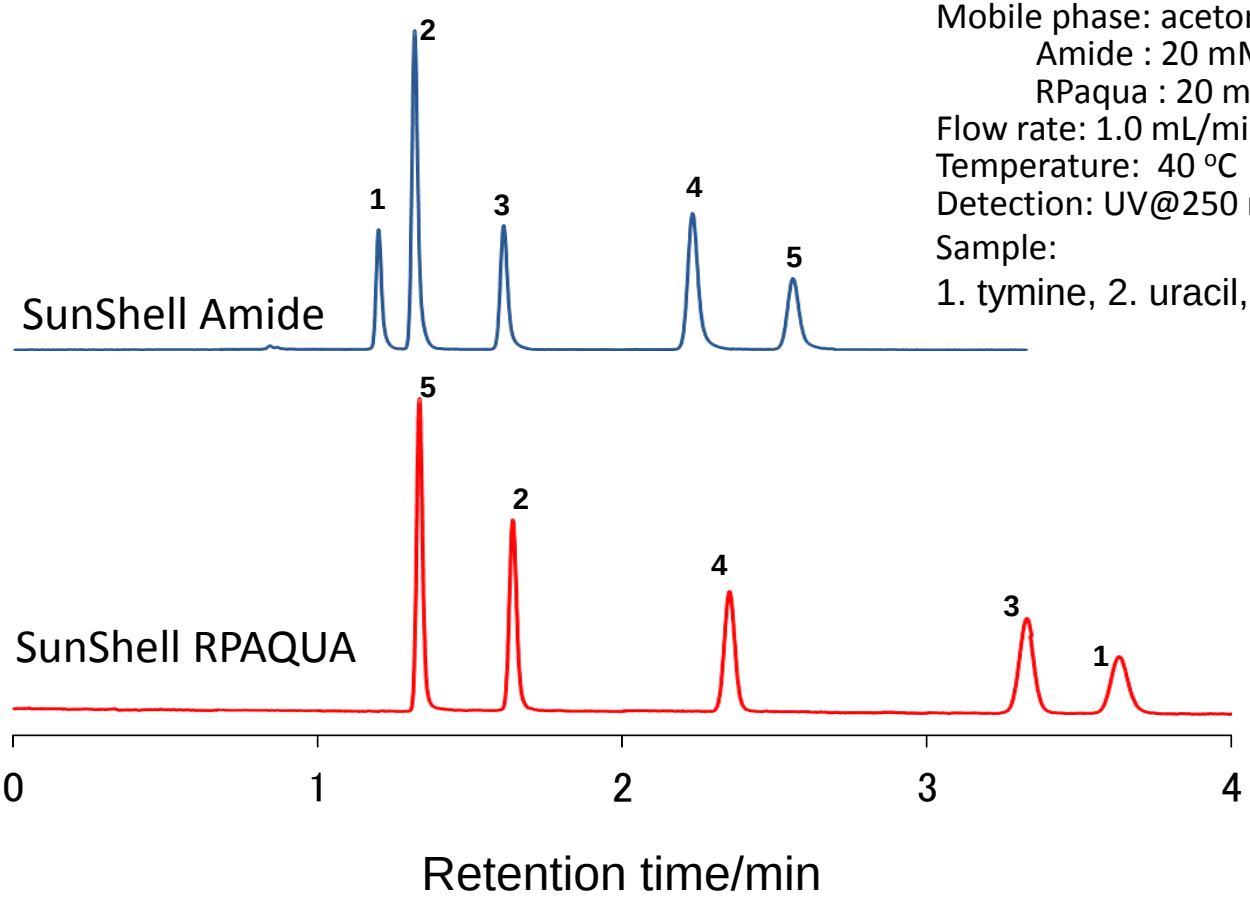
Column: SunShell RP-Aqua, 2.6 µm 75 x 4.6 mm
Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 ºC and 25 ºC
Sample: 1 = Cytosine, 2 = Uracil, 3 = Thymidine, 4 = Uridine, 5 = Thymine

40℃でのチミンの保持時間の変化

（ポンプ送液1時間停止毎に測定）

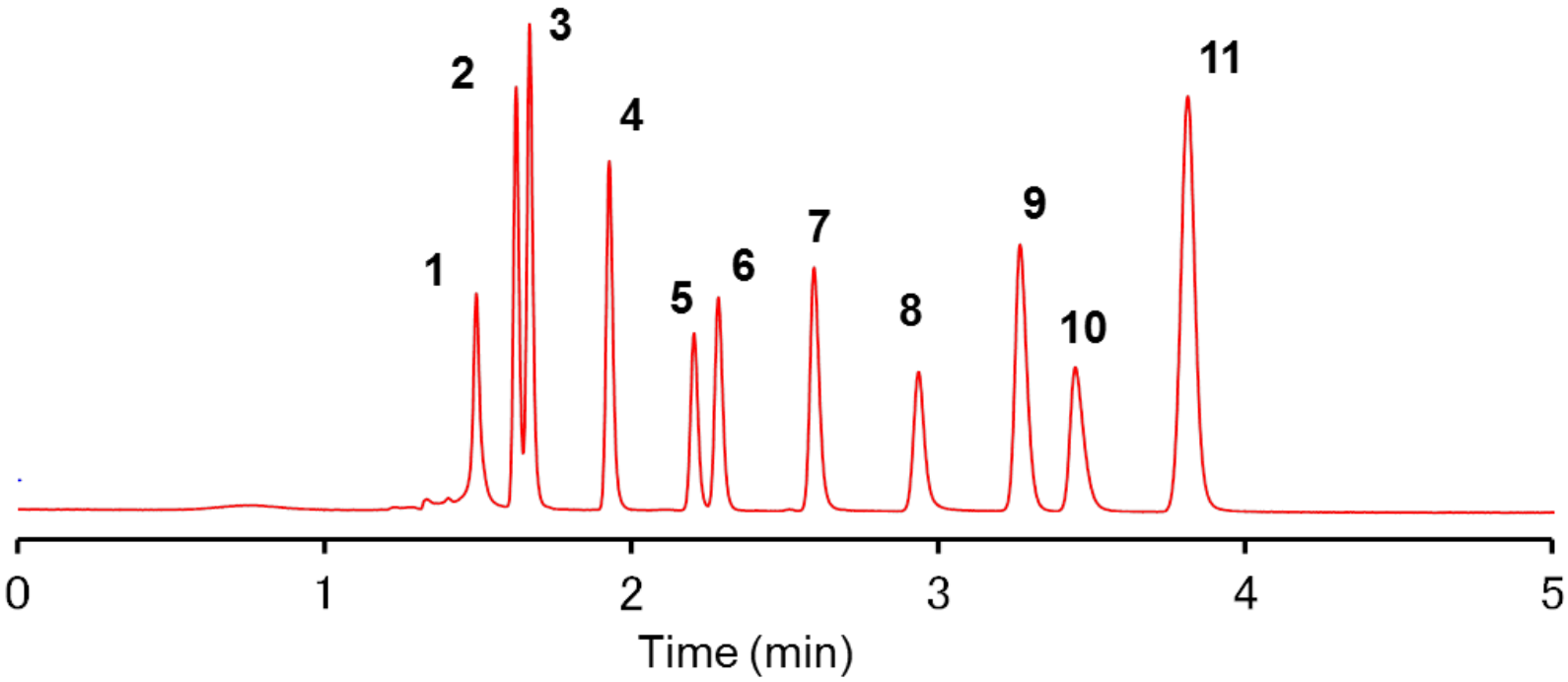
緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により，ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると，通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり，保持時間は大幅に減少しますが，SunShell RP-Aquaほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず，94%以上の再現性を示しました。

HILICと逆相クロマトグラフィーの比較



Column:
SunShell Amide 2.6 μm : 100 x 4.6 mm
SunShell RPAqua 2.6 μm : 100 x 4.6 mm
Mobile phase: acetonitrile :
Amide : 20 mM ammonium acetate(pH4.7) =8:2
RPaqua : 20 mM phosphate buffer(pH7.0)
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@250 nm
Sample:
1. tymine, 2. uracil, 3. uridine, 4. cytosine, 5. cytidine

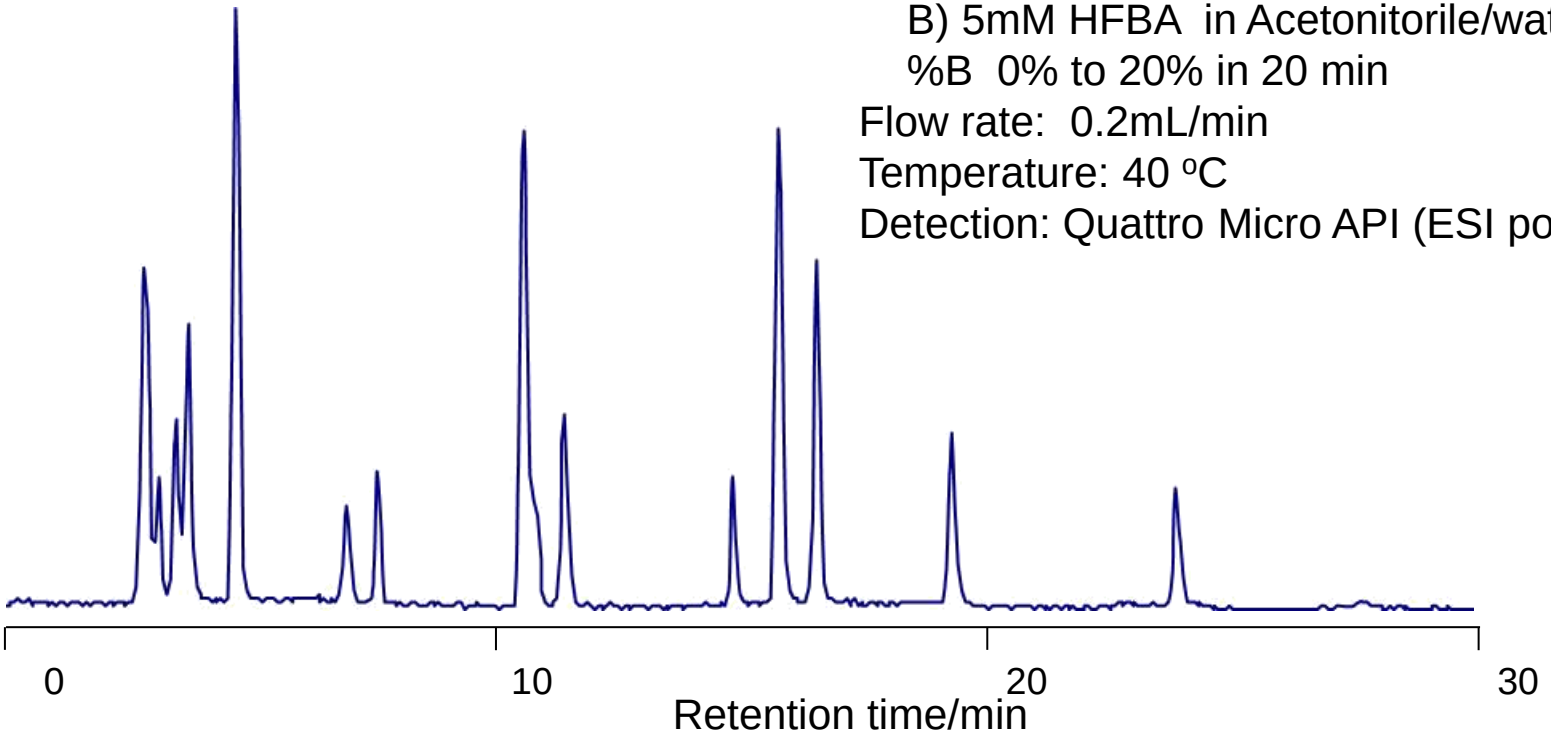
有機酸の分離



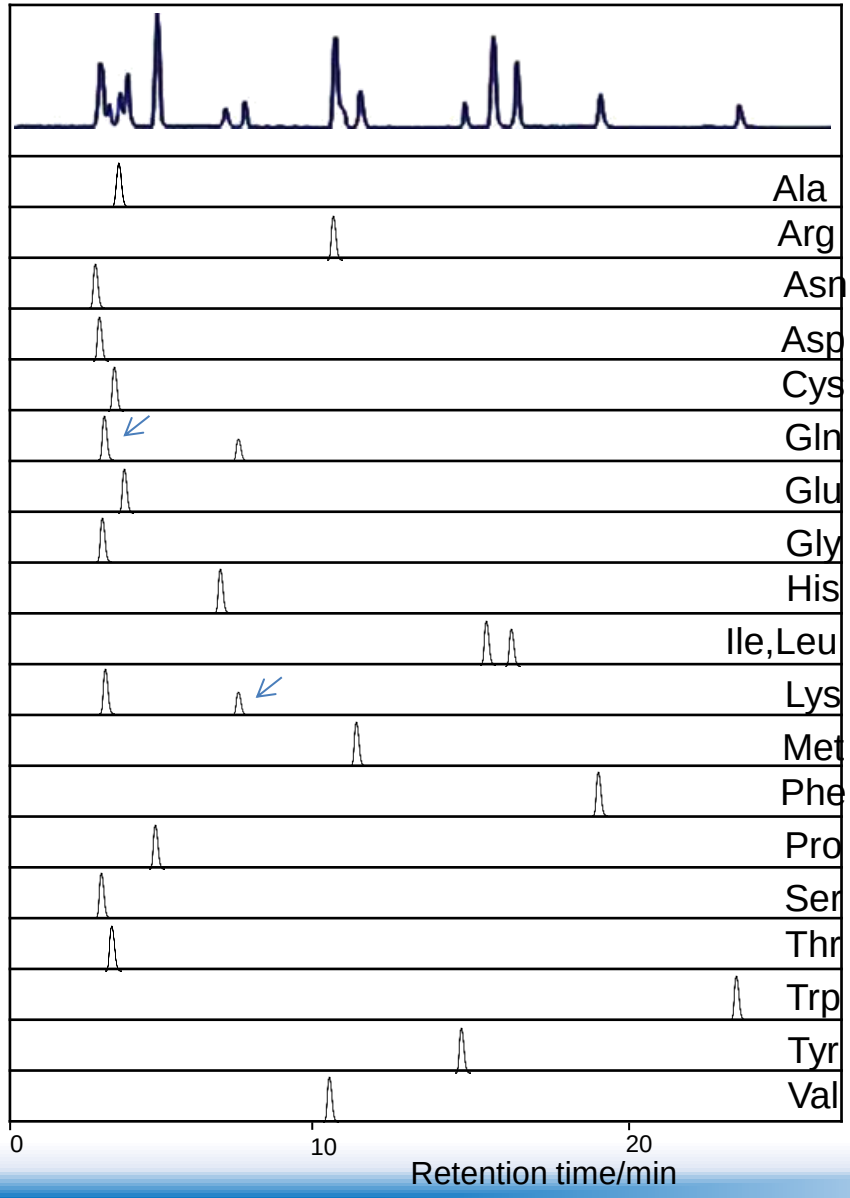
Column: SunShell RP-AQUA 2.6 µm, 150 x 4.6 mm, Mobile phase: 0.025 M KH2PO4, pH2.5
Flow rate: 1.0 mL/min, Column pressure: 32 MPa for 1.5mL/min, Temperature: 40 ºC
Detection: UV@210nm, Injection volume: 2 µL
Sample: 1 = Oxalic acid (60 ppm), 2 = Tartaric acid (500 ppm), 3 = Formic acid (1000 ppm),
4 = Malic acid (1000 ppm), 5 = Lactic acid (1000 ppm), 6 = Acetic acid (1000 ppm),
7 = Diglycolic acid (1000 ppm), 8 = Maleic acid (100 ppm), 9 = Citric acid (1000 ppm),
10 = Succinic acid (1000 ppm), 11 = Fumaric acid (10 ppm).

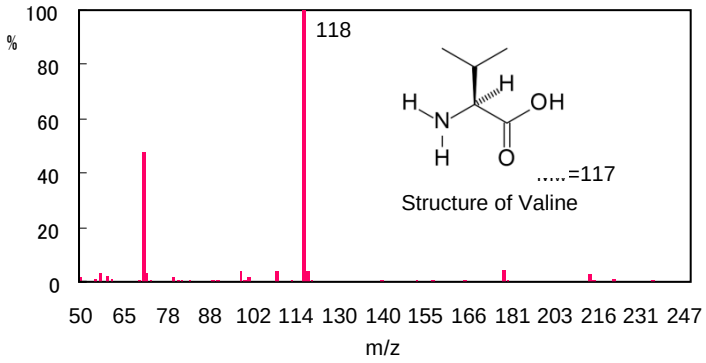
アミノ酸の分離

Column: Sunniest RP-AQUA 5μm, 2.0x 150mm
Mobile phase:
A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)
B) 5mM HFBA in Acetonitorile/water(9/1)
%B 0% to 20% in 20 min
Flow rate: 0.2mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM



アミノ酸のLC/MS

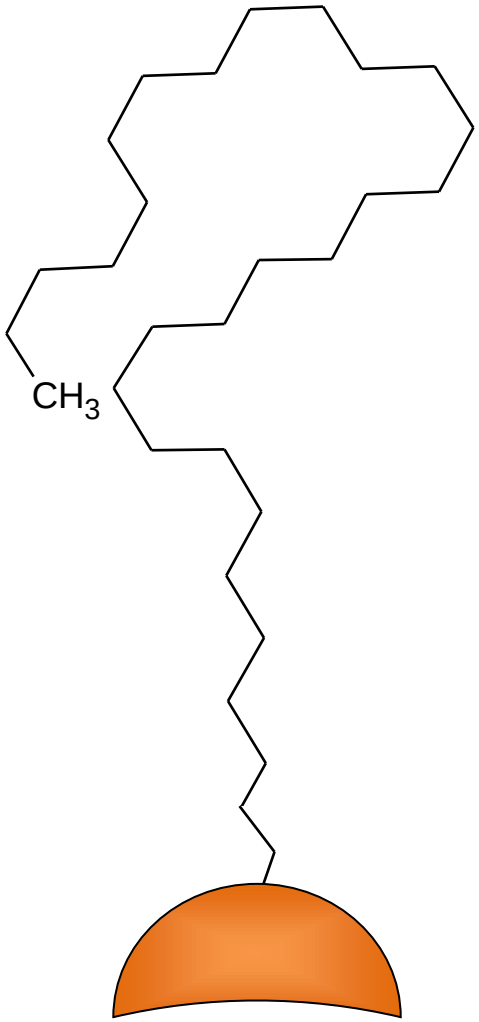




Mass spectrum of Valine

Column: Sunniest RP-AQUA 5μm, 2.0x 150mm
Mobile phase:
A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)
B) 5mM HFBA in Acetonitorile/water(9/1)
%B 0% to 20% in 20 min
Flow rate: 0.2mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

C30カラムの注意点



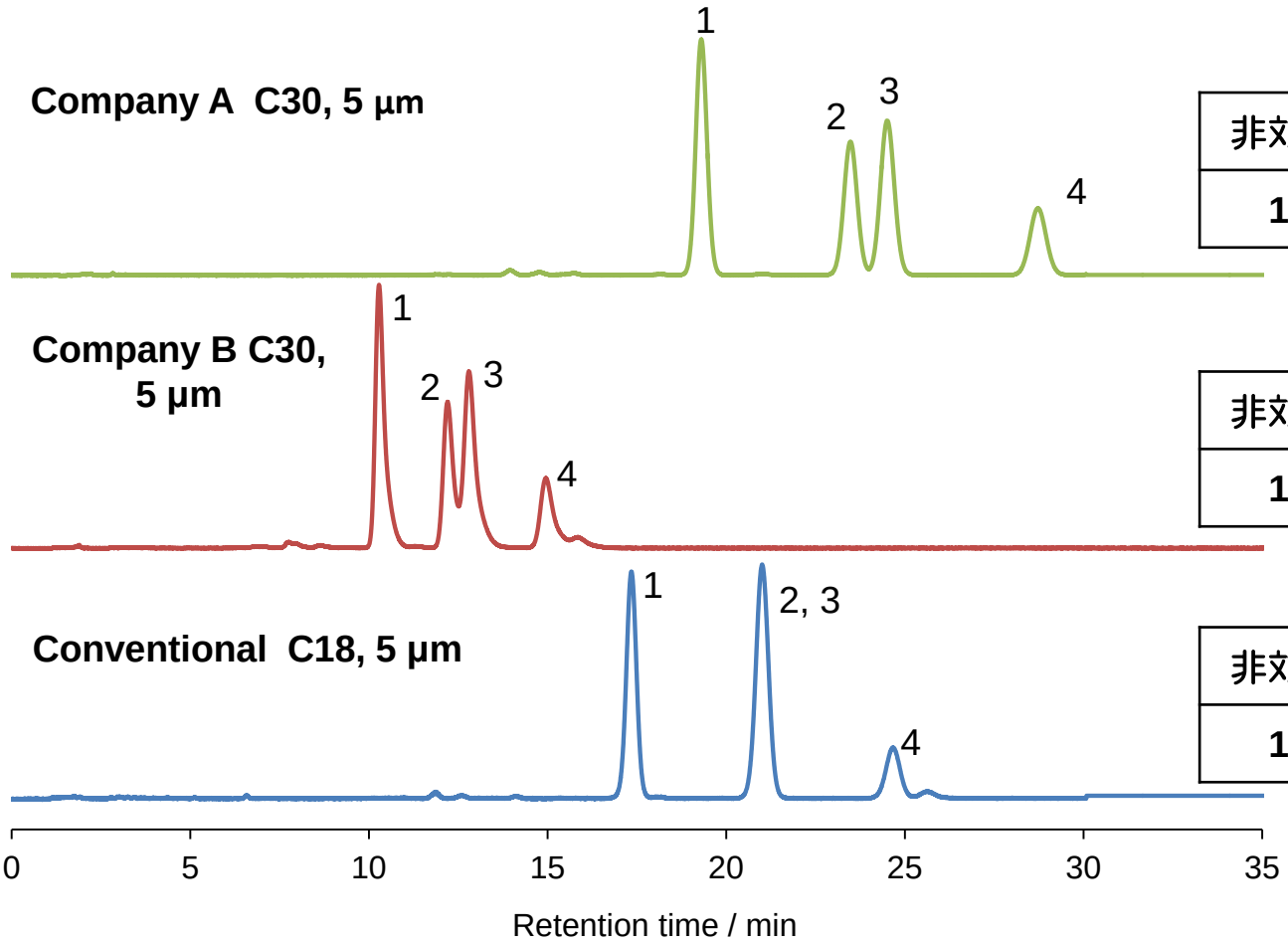
トリアコンチル（C30）

結合密度が高いほど
異性体分離に優れる

結合密度が高すぎると
ピークがテーリングする

結合密度が低いと
分離が不十分になる

結合密度の影響



非対称性	結合密度	細孔径
1.02	1.9 µmol/m²	13 nm

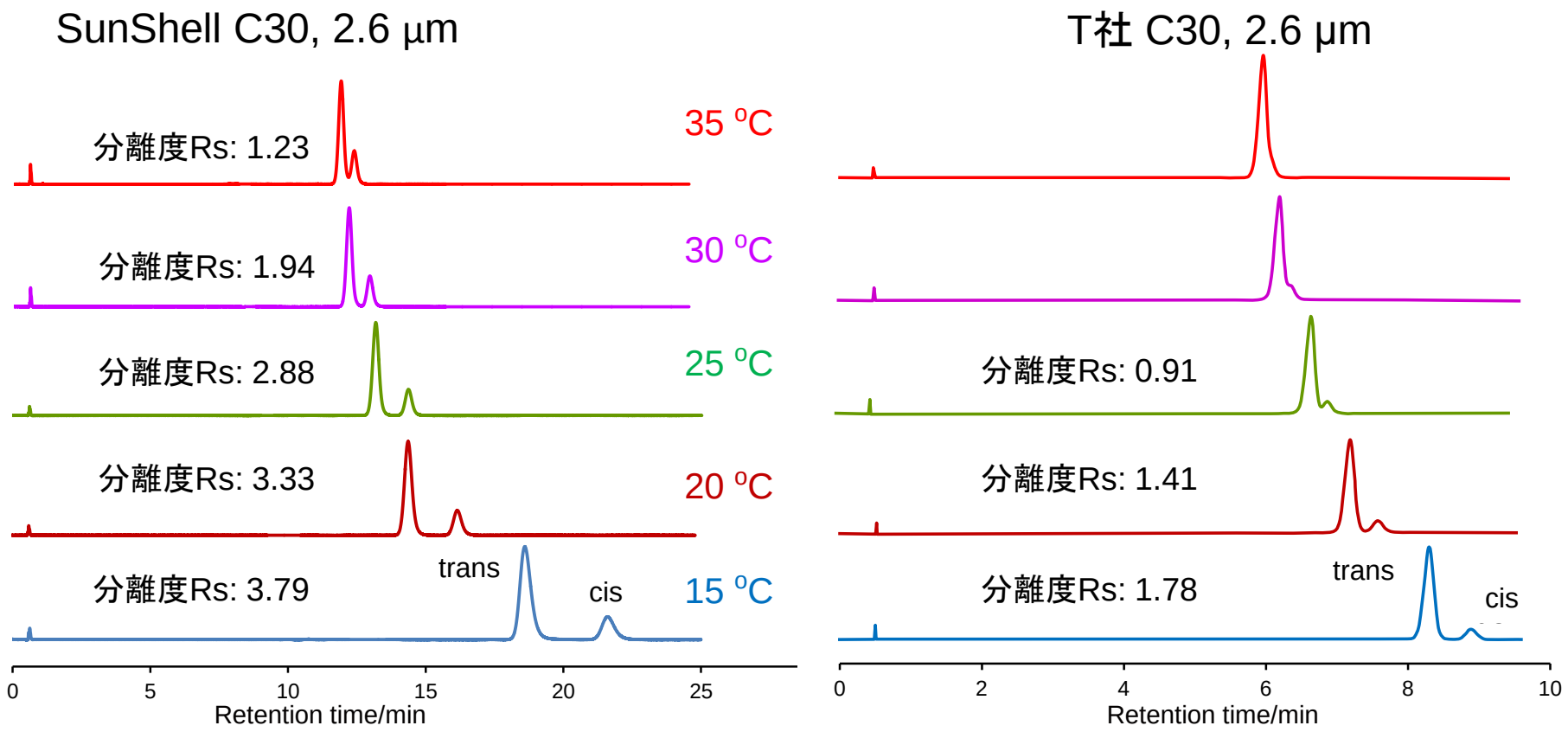
非対称性	結合密度	細孔径
1.63	3.7 µmol/m²	20 nm

非対称性	結合密度	細孔径
1.04	3.0 µmol/m²	13 nm

Column dimension, 250 x 4.6 mm;
mobile phase, methanol/water = 97/3;
flow rate, 1.0 mL/min;
temperature, 30 °C;
detection, UV295 nm;

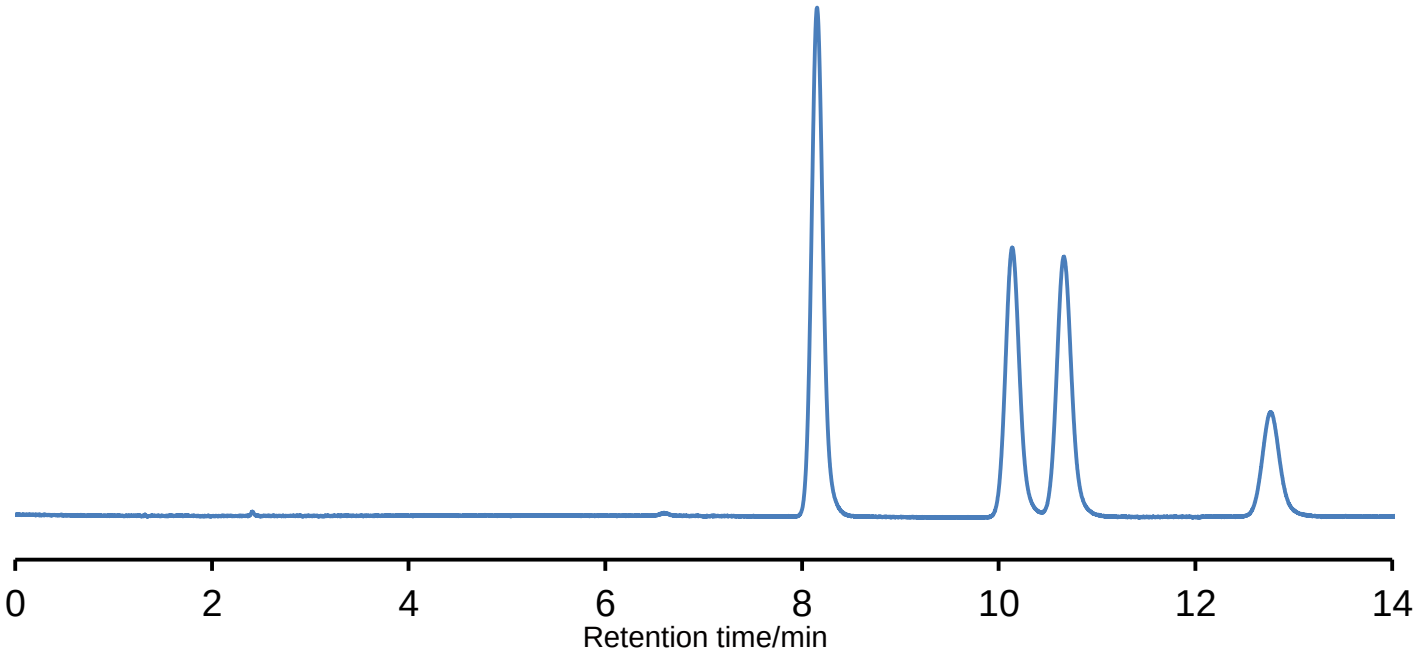
sample,
1 = δ-tocopherol, 2 = γ-tocopherol,
3 = β-tocopherol, 4 = α-tocopherol

ビタミンK１異性体の分離比較



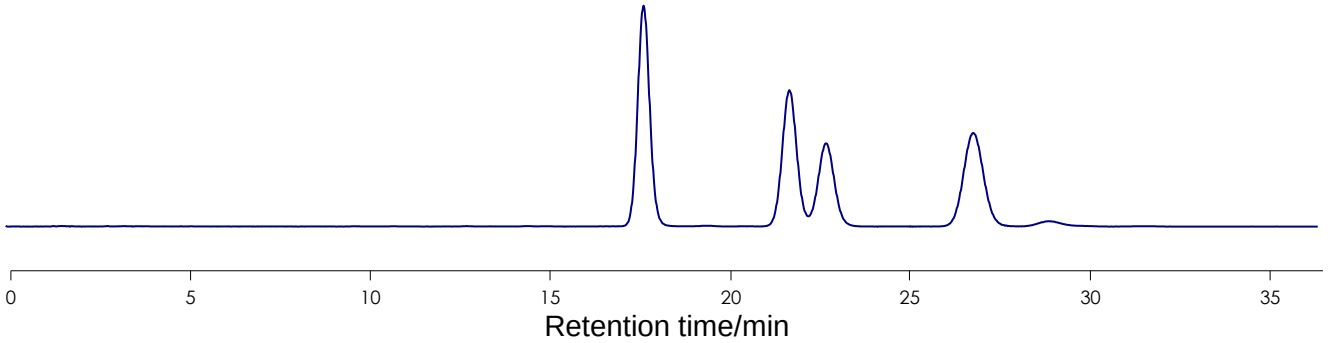
Column: SunShell C30, 2.6 µm 100 x 2.1 mm
T社 C30, 2.6 µm 100 x 2.1 mm
Mobile phase: CH_3OH/H_2O= 96/4
Flow rate: 0.35 mL/min,

ビタミンEの分離比較



Column: SunShell C30, 2.6 μm 150 x 3.0 mm

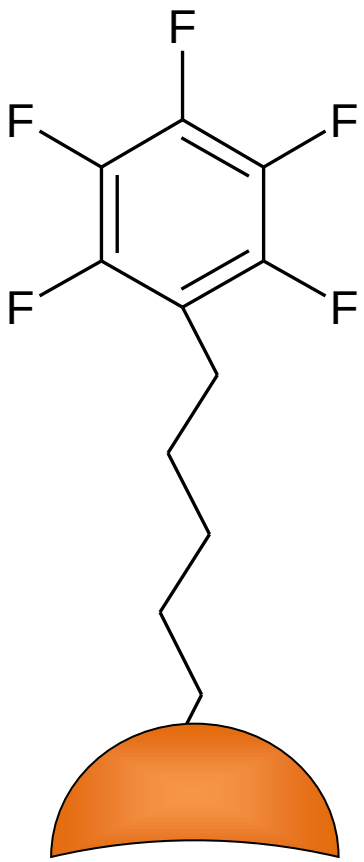
Mobile phase: CH_3OH/H_2O= 97/3 Flow rate: 0.43 mL/min, Temperature: 25 °C, Pressure: 15.5 MPa



Column: Sunrise C28, 5 μm 250 x 4.6 mm

Mobile phase: CH_3OH/H_2O= 97/3 Flow rate: 1 mL/min, Temperature: 25 °C

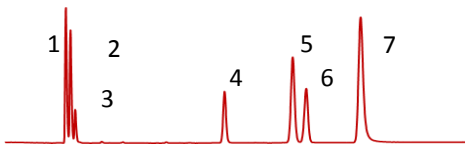
ペンタフルオロフェニル（PFP）



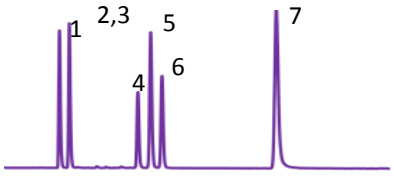
- 疎水性相互作用
- 水素結合性
- 双極子相互作用
- π-π相互作用
- 静電的相互作用

- 極性化合物の保持が可能
- 立体選択性に優れている
- ハロゲン化合物の分離に有効

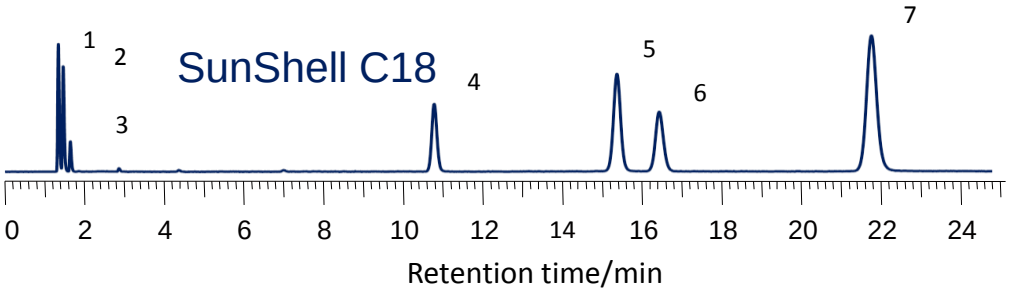
標準試料の分離



SunShell RP-Aqua



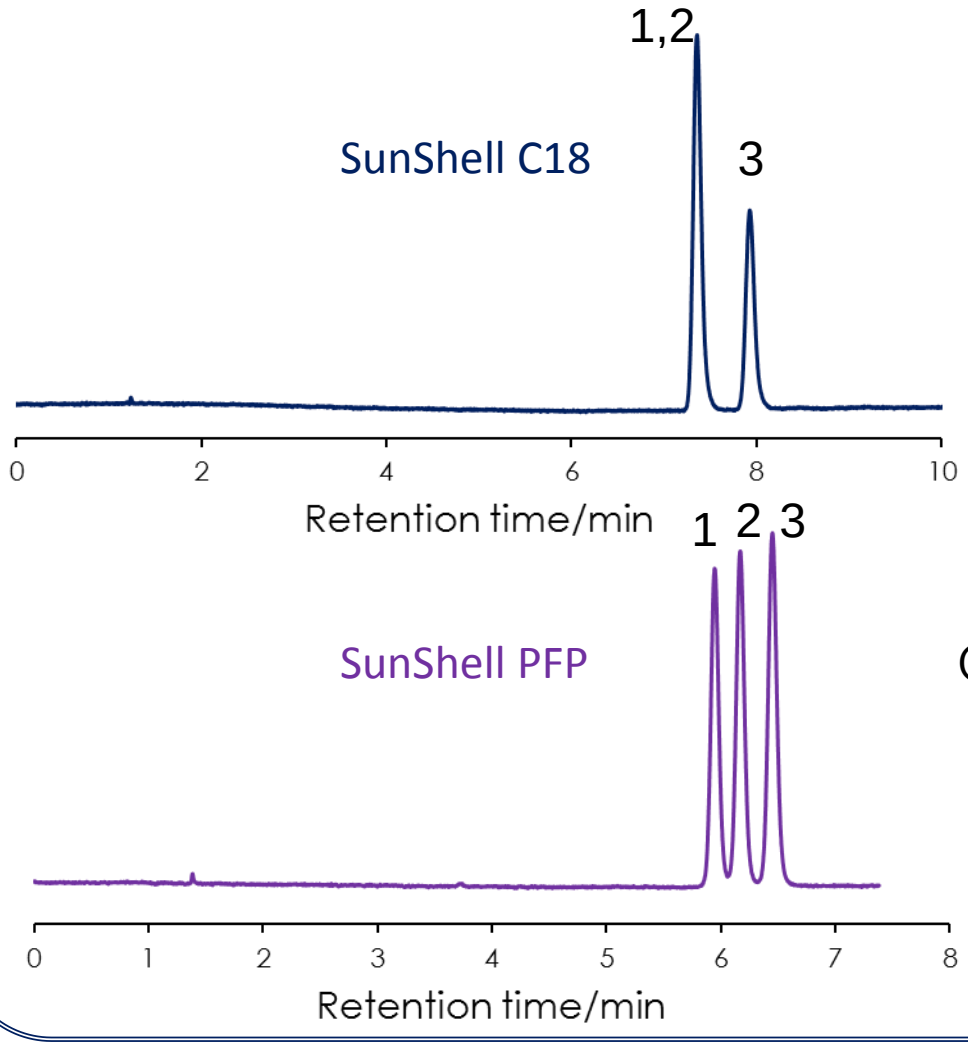
SunShell PFP



Column dimension: 150 x 4.6 mm
Mobile phase: CH_3OH/H_2O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine,
3 = Phenol, 4 = Butylbenzene
5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene,
7 = Triphenylene

	Hydrogen bonding (Caffeine/ Phenol)	Hydrophobicity (Amylbenzene/ Butylbenzene)	Steric selectivity (Triphenylene/ o-Terphenyl)
RP-Aqua	0.52	1.52	1.30
PFP	1.00	1.31	2.38
C18	0.39	1.60	1.46

クレゾール異性体の分離

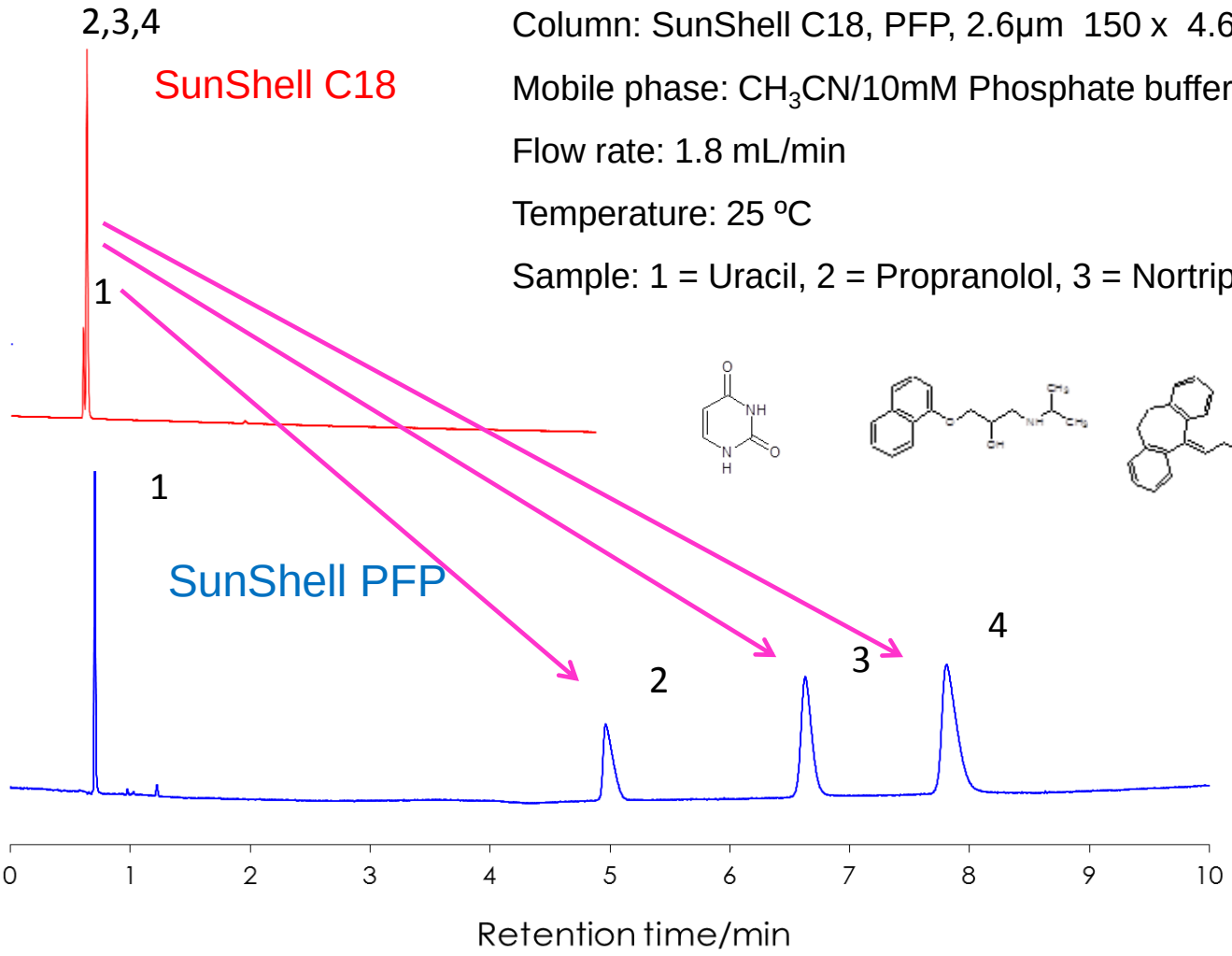


Column:
SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
SunShell PFP, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
Mobile phase: CH_3OH/H_2O=40/60
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 25 °C
Sample: 1 = p-Cresol
2 = m-Cresol
3 = o-Cresol

C18カラムではp-クレゾールとm-クレゾールは分離不可能

PFP は分離可能

C18とPFPによる塩基性化合物の保持比較



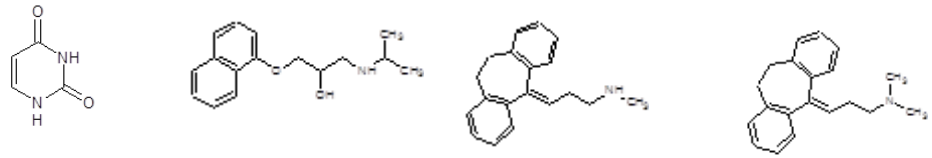
Column: SunShell C18, PFP, 2.6μm 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH_3CN/10mM Phosphate buffer pH7.0 = 80/20

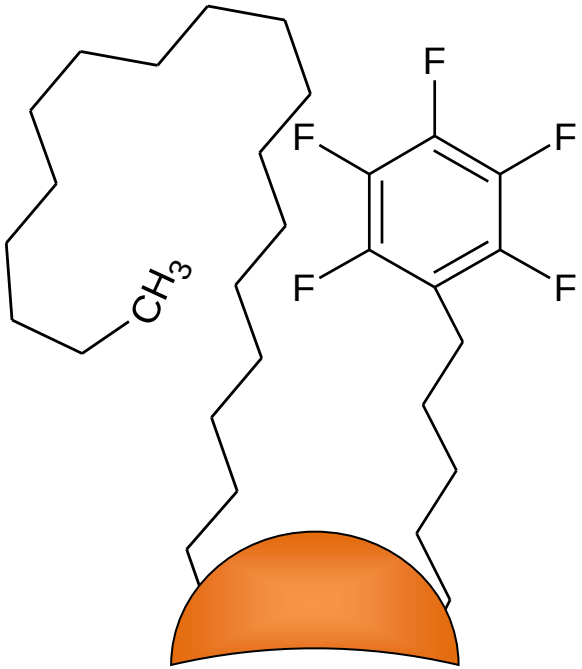
Flow rate: 1.8 mL/min

Temperature: 25 ºC

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



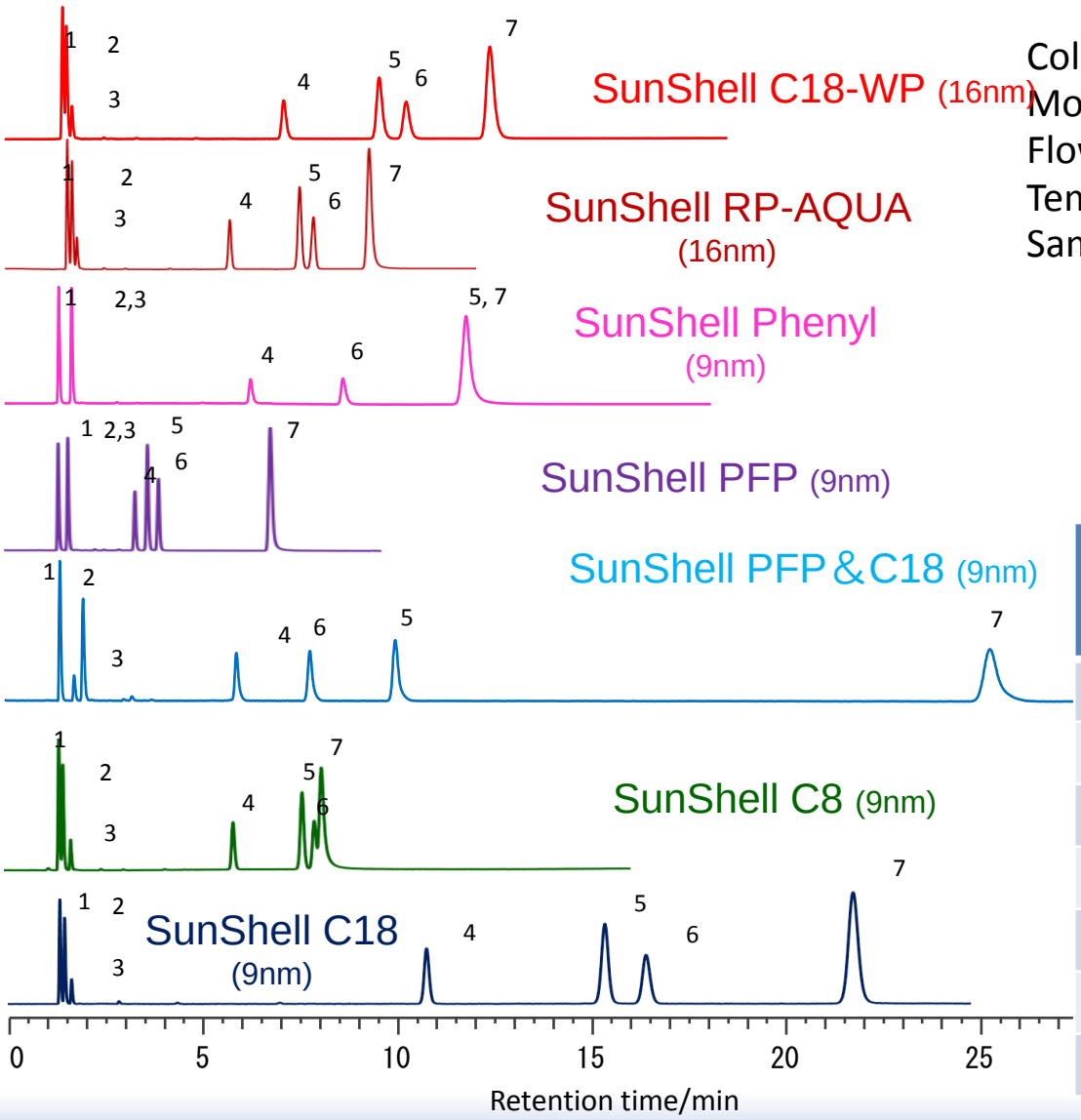
PFP&C18



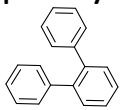
- 疎水性相互作用
- 水素結合性
- 双極子相互作用
- π-π相互作用
- 静電的相互作用

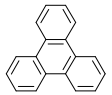
- 立体選択性に優れている
- PFPカラムと比べると疎水性相互作用が強い

標準試料の分離例（コアシェル）



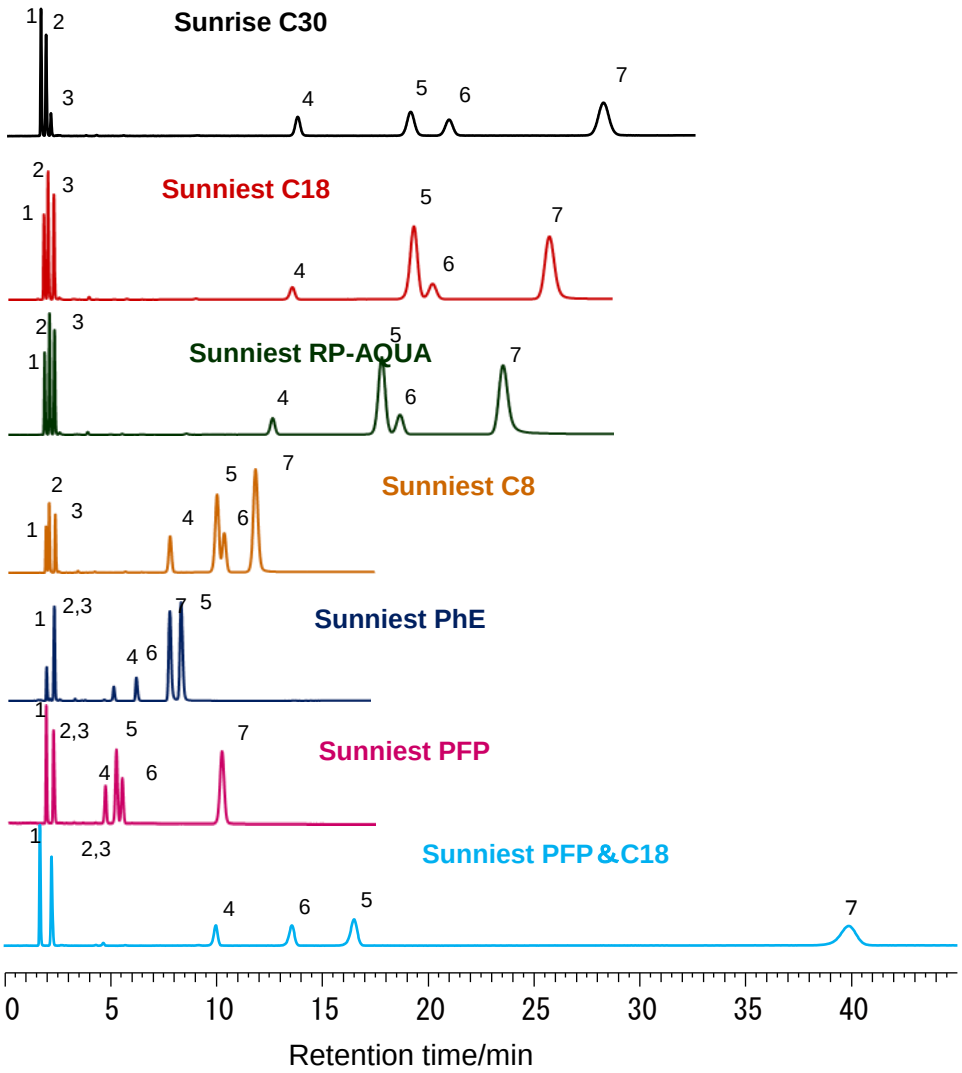
Column dimension: 150 x 4.6 mm
Mobile phase: CH_3OH/H_2O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine,
3 = Phenol, 4 = Butylbenzene
5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene,
7 = Triphenylene

5 

7 

	水素結合性 (Caffeine/ Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C18-WP	0.40	1.55	1.35
RP-AQUA	0.52	1.52	1.30
Phenyl	1.00	1.48	1.01
PFP	1.00	1.31	2.38
PFP&C18	1.64	1.41	2.77
C8	0.32	1.46	1.08
C18	0.39	1.60	1.46

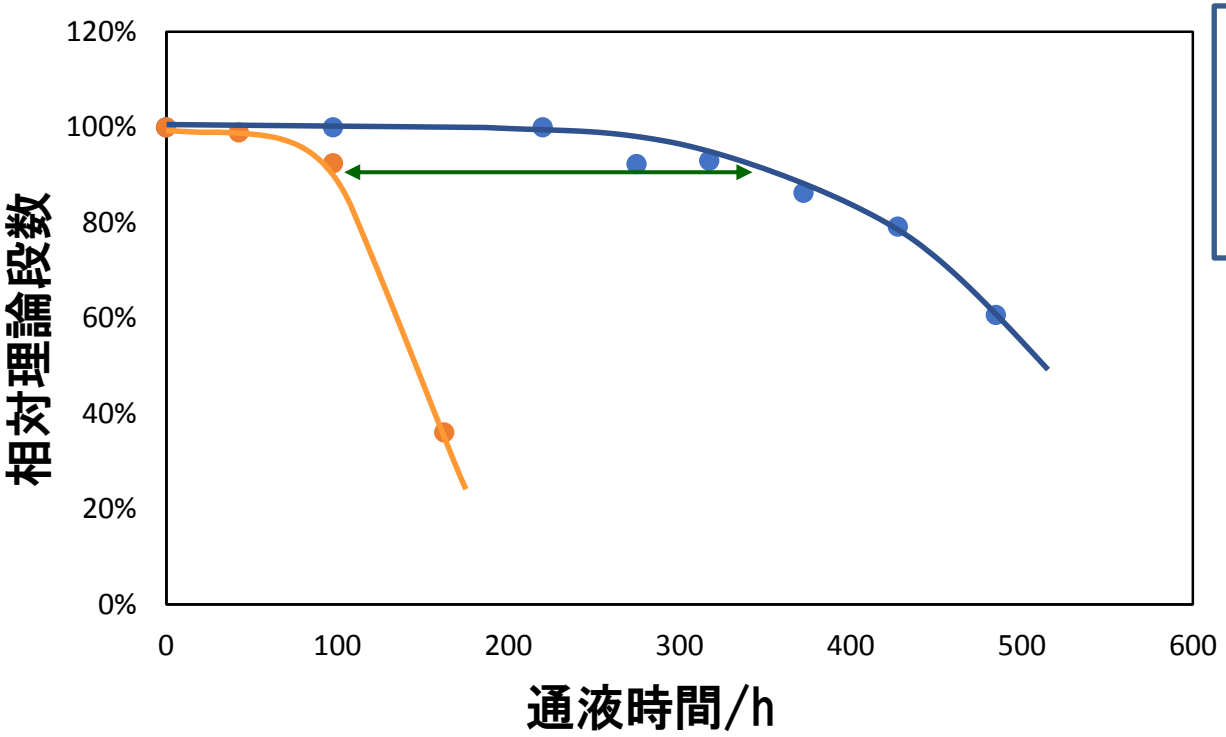
標準試料の分離例（全多孔性）



Column: SunriseC30,
Sunniest C18, RP-AQUA, 5C8, PhE, PFP, PFP&C18
5 µm 4.6x150 mm
Mobile phase: CH_3OH/H_2O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 ºC
Pressure: 5.4 MPa
Sample: 1 = Uracil,
2 = Caffeine,
3 = Phenol,
4 = Butylbenzene,
5 = o-Terphenyl,
6 = Amylbenzene,
7 = Triphenylene,

	水素結合性 (Caffeine/ Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C30	0.51	1.59	1.52
C18	0.43	1.56	1.37
RP-QUA	0.49	1.56	1.37
C8	0.33	1.43	1.23
PhE	1.00	1.34	0.92
PFP	1.00	1.29	2.51
PFP&C18	1.00	1.43	2.66

耐久性比較



Test conditions
Column: PFP&C18 5um 2.1x150 mm
PFP 5um 2.1x150 mm
Mobil phase: CH_3OH/20mM PB pH7.0=70/30
Flow rate: 0.2 mL/min
Temperature: 40 ºC

Measurement condition
Column: PFP&C18 5um 2.1x150 mm
PFP 5um 2.1x150 mm
Mobil phase: Acetonitrile/water=70/30
Acetonitrile/water=60/40
Flow rate: 0.2 mL/min
Temperature: 40 ºC
Sample: Acenaphthene

一般的なPFPカラムの3倍の耐久性を実現

iHILIC-Fusion column by HILICON

- ✓ SeQuent社でZIC-HILIC充填剤の合成を担当していたWen JiangさんがHILICON社をUMEÅで2014年に設立
- ✓ 両性イオンとアミドの長所を取り入れた
- ✓ HILIC-Fusion を開発

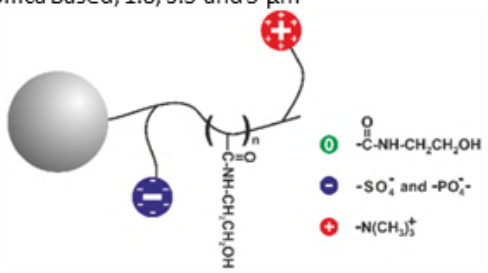
Wen Jiang

iHILIC®-Fusion

advances HILIC separations in HPLC and UHPLC

Available in both PEEK and Stainless Steel

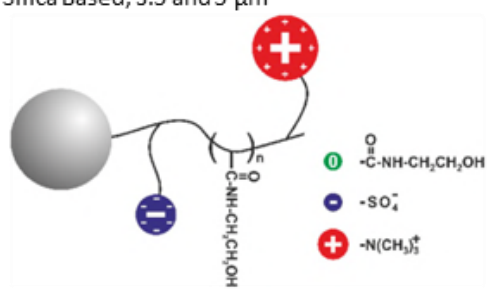
Silica Based, 1.8, 3.5 and 5 µm



iHILIC®-Fusion

Available in both PEEK and Stainless Steel

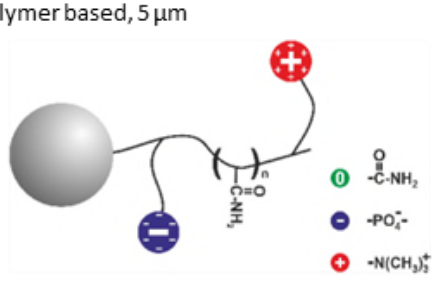
Silica Based, 3.5 and 5 µm



iHILIC®-Fusion(+)

Available in PEEK

Polymer based, 5 µm



iHILIC®-Fusion(P)

HILICカラムを設計するうえで・・

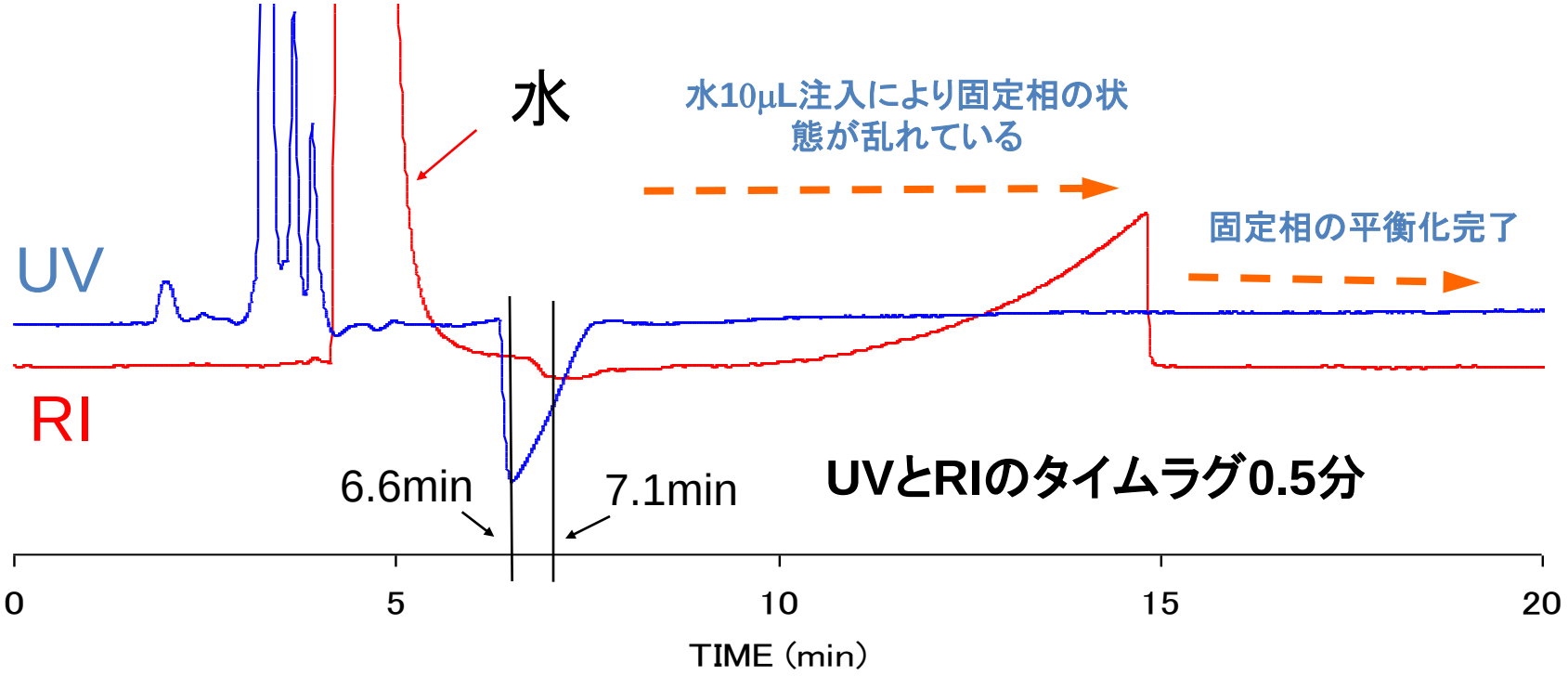
1. 基材自身の親水性が高い
   - 基材のみでもHILICで使用可能なシリカを選択
   - コアシェルを使用することで高分離が可能

2. 導入されている官能基の構造
   - 官能基が高い水和性を有し，高い密度で導入可能である
   - 静電的な相互作用が極力低い
   - 官能基の結合部位の疎水性が低いこと

水10μL注入時のヒリックカラムのクロマトグラム

移動相：5mM酢酸アンモニウム/アセトニトリル(20:8

検出：UV@220nm（青），RI (赤）



安定な水和層形成のためのイオンとは

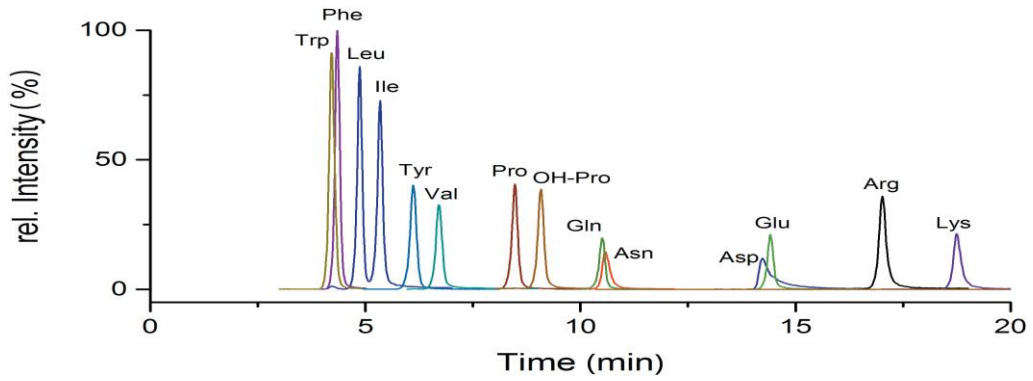
ホフマイスターシリーズ *(Hofmeister series* リオトロピック系列と同意) とは、水を構造化させる能力の順にイオンを配列したものである。(水和を安定させるイオン)

アニオンでは
SO4(2-)＞HPO4(2-)＞CH3COO(-)～citrate(3-)＞tartrate(2-)
＞HCO3(-)＞CrO4(2-)＞Cl(-)＞NO3(-)＞ClO3(-)

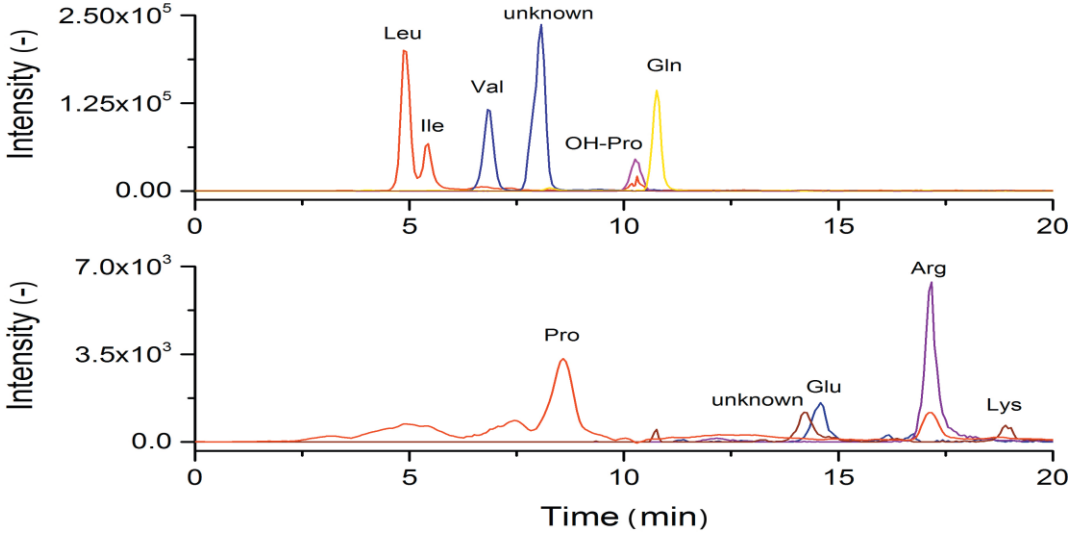
カチオンでは
(CH3)4N+>NH4+ > K+ > Na+ > Li+ > Mg2+ > Ca2+

アミノ酸のHILIC-ESI-MS

標準品



ダイエットサプリ



LC–MS System: Agilent 1100er LC system and Thermo Fisher LTQ™ equipped with a HESI source, operated in positive ionization mode for analysis of standards. For the dietary supplement, an Orbitrap™ Exactive classic equipped with a HESI source and operated in positive ionization mode.

Column: 150 × 2.1 mm, 3.5-μm iHILIC-Fusion(+)

Gradient Elution: A) acetonitrile–water–1 M ammonium acetate, pH 5.75 (90:5:5); B) water–acetonitrile–1 M ammonium acetate, pH 5.75 (90:5:5); 0–0.5 min (90:10) A–B; 0.5 to 25 min, gradient elution from (90:10) A–B to (60:40) A–B.

Flow Rate: 0.3 mL/min

Column Temperature: 40 ° C

Injection Volume: 5 μL

Amino Acids: Arginine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glutamine, hydroxyl–proline, isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, proline, tryptophan, tyrosine, and valine. 50 μM of each amino acid was dissolved in water–acetonitrile (25:75) solution.

リン脂質のiHILIC-Fusionカラムによる分離

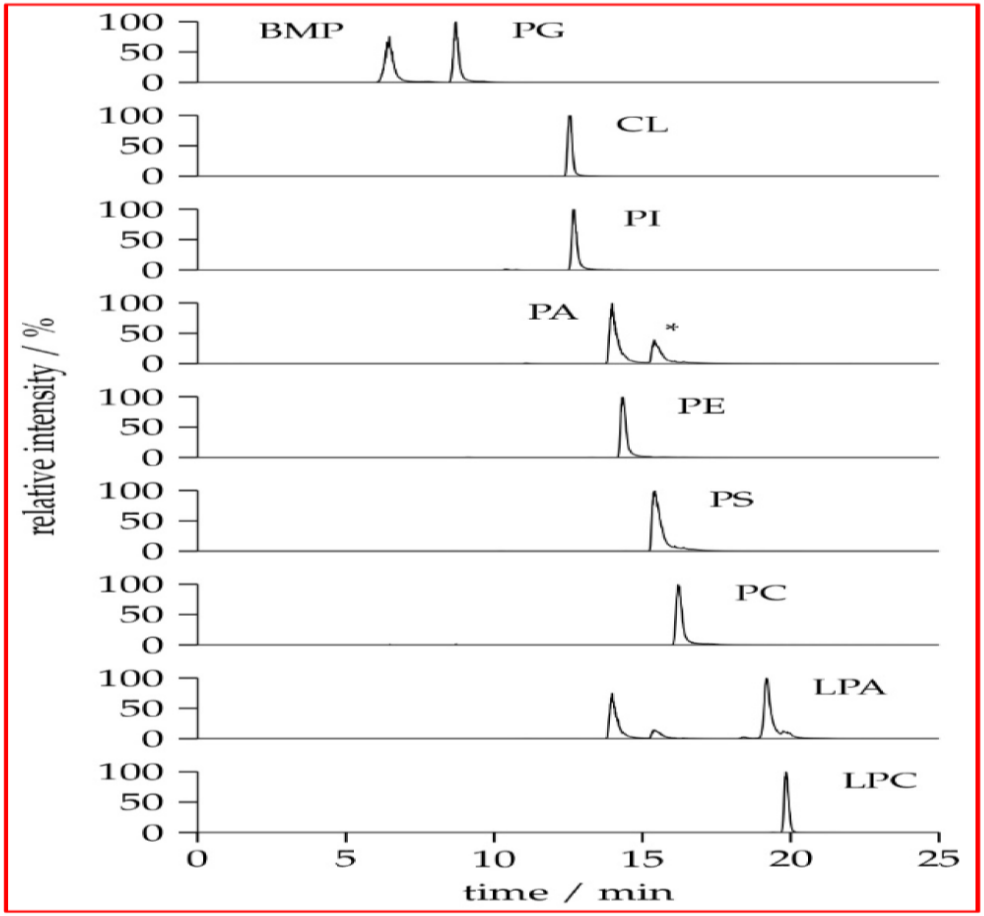


Figure 2: Separation of PL standards in ascending retention order with iHILIC®-Fusion. * Double peak of PA is caused by in-source fragmentation of the PS head group resulting in corresponding PA species.

LC–MS system: Thermo Scientifi c Ultimate 3000 HPLC system coupled to a Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole–Orbitrap™ mass spectrometer, which is equipped with a HESI II source and operated in negative ionization mode (ESI–).

Column: 150 × 2.1 mm, 3.5 μm 100 Å iHILIC®-Fusion.

Eluent:

A) ammonium acetate solution (35 mM, pH 5.75) and acetonitrile (95:5, *v/v*);

B) acetonitrile.

Gradient elution: 0–0.5 min, 97% B; 0.5–26.5 min, from 97% to 75% B; 27–33 min, 60% B; 35–45 min 97% B.

Flow rate: 0.3 mL/min

Column temperature: 40 ° C

Injection volume: 10 μL