



# HILIC？逆相？ 2本目に選ぶなら どのカラム？ C18とは分離を変えたいそんな時

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](mailto:info@chromanik.co.jp)

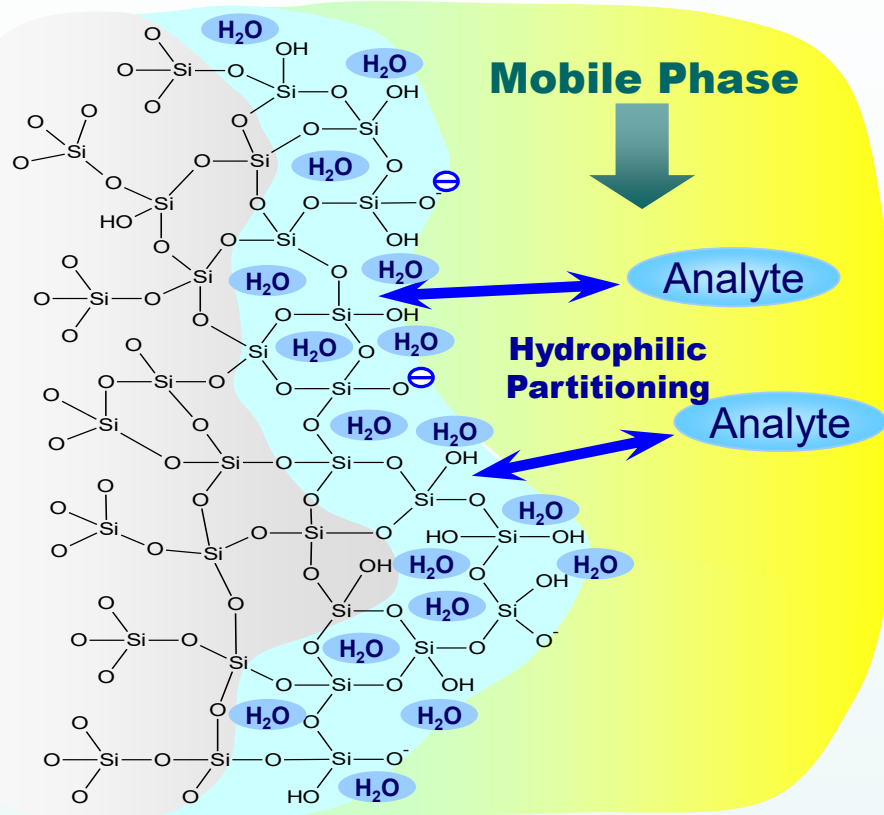
<http://chromanik.co.jp>



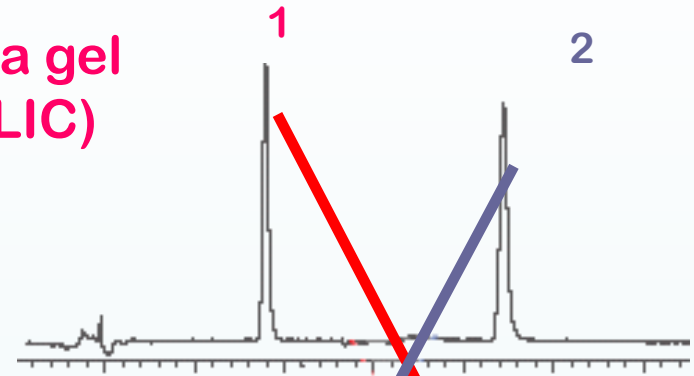
# HILIC

## 親水性相互作用 クロマトグラフィ

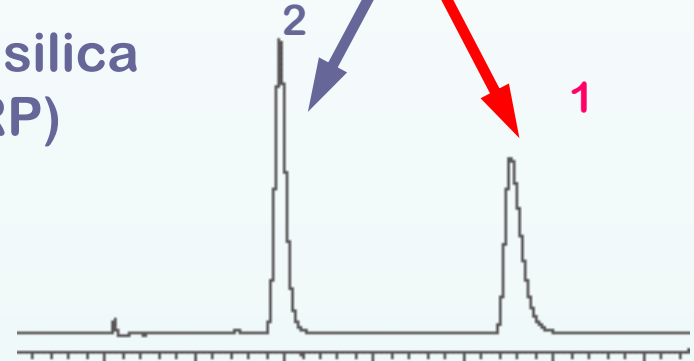
# HILICの分離メカニズム



Silica gel  
(HILIC)



ODS silica  
(RP)



## □ HILICの特徴として…

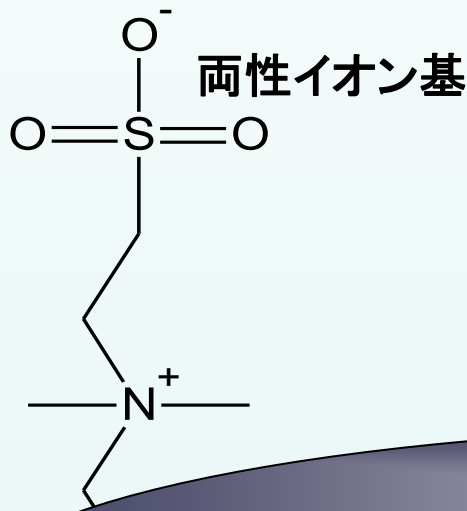
- 逆相系に用いる極性溶媒が使用可能である。
- 固定相に形成された水和層との分配によって分離が起こると言われている。
- 親水性が高い化合物ほど保持される特徴がある。

# HILICカラムに使用される官能器

- 未修飾シリカ
- アミドシリカ
- ジオール結合型シリカ
- 両性イオン結合型シリカ
- トリアゾール結合型シリカ
- アミノシリカ
- スクシンイミド誘導体結合型シリカ

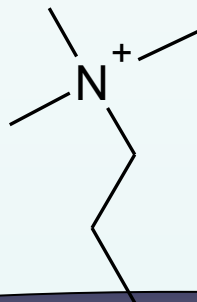
## 親水性相互作用

### 静電的相互作用

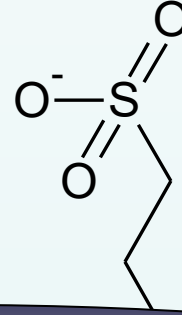


### イオン交換相互作用

陰イオン  
交換基

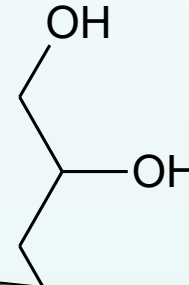


陽イオン  
交換基

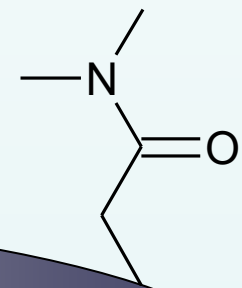


### 水素結合

ジオール基



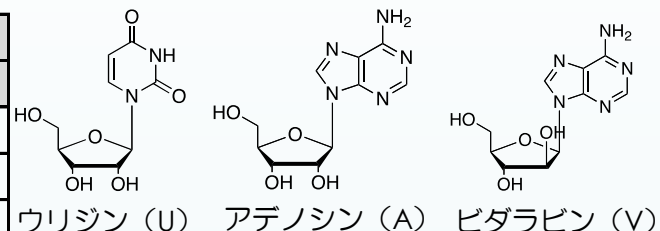
アミド基



# 親水性の比較

データ提供: 池上亨先生

分析条件: Mobile phase: Acetonitrile/ammonium acetate buffer (20 mM, pH = 4.76) = 90:10 [v/v]  
 Linear velocity; 1.0 mm/s, UV detection wave length; 254 nm, Column oven temperature; 30 °C



| Column                        | U     |  | A     | V     |
|-------------------------------|-------|--|-------|-------|
|                               | k (U) |  | k (A) | k (V) |
| ZIC-HILIC (5 μm)              | 2.11  |  | 1.55  | 2.32  |
| ZIC-HILIC (3.5 μm)            | 2.10  |  | 1.51  | 2.28  |
| Nucleodur HILIC (3 μm)        | 2.20  |  | 2.33  | 3.40  |
| Amide-80 (5 μm)               | 3.30  |  | 3.80  | 4.90  |
| XBridge Amide (3.5 μm)        | 2.55  |  | 2.81  | 3.64  |
| PolySULFOETHYL (3 μm)         | 1.58  |  | 1.15  | 1.39  |
| PolyHYDROXYETHYL (3 μm)       | 3.92  |  | 3.75  | 4.93  |
| CYCLOBOND I (5 μm)            | 0.70  |  | 1.36  | 1.68  |
| LiChrospher Diol (5 μm)       | 1.50  |  | 2.50  | 3.30  |
| Chromolith Si                 | 0.31  |  | 0.73  | 0.85  |
| HALO HILIC (2.7 μm)           | 0.64  |  | 1.59  | 1.87  |
| COSMOSIL HILIC (5 μm)         | 1.60  |  | 2.20  | 3.00  |
| Sugar-D (5 μm)                | 1.58  |  | 1.88  | 2.72  |
| NH <sub>2</sub> -MS (5 μm)    | 2.44  |  | 2.13  | 2.90  |
| SunShell HILIC-Amide (2.6 μm) | 2.93  |  | 3.55  | 4.84  |

ウリジンの保持から充填剤の親水性を評価

↓

保持が大きいほど充填剤の親水性が高い

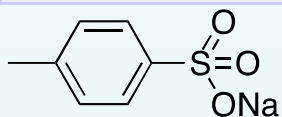
同じHILICカラムであっても、親水性の違いが大きい

↓

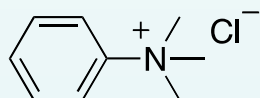
逆相カラムのように使い分ける必要がある

# イオン交換性の比較

| Column                        | U<br>k (U)<br>20 mM | SPTS<br>k (SPTS) | a(SPTS/U) | U<br>k (U)<br>20 mM | TMPAC<br>k (TMPAC) | a(TMPAC/U) |
|-------------------------------|---------------------|------------------|-----------|---------------------|--------------------|------------|
| ZIC-HILIC (5 mm)              | 2.11                | 0.69             | 0.33      | 2.11                | 3.32               | 1.57       |
| ZIC-HILIC (3.5 mm)            | 2.10                | 0.56             | 0.27      | 2.10                | 3.45               | 1.64       |
| Nucleodur HILIC (3 mm)        | 2.20                | 1.13             | 0.51      | 2.20                | 3.14               | 1.43       |
| Amide-80 (5 mm)               | 3.30                | 0.89             | 0.27      | 3.30                | 4.57               | 1.38       |
| XBridge Amide (3.5 mm)        | 2.55                | 0.74             | 0.29      | 2.55                | 1.89               | 0.74       |
| PolySULFOETHYL (3 mm)         | 1.58                | 0.25             | 0.16      | 1.58                | 1.38               | 0.87       |
| PolyHYDROXYETHYL (3 mm)       | 3.92                | 0.87             | 0.22      | 3.92                | 3.34               | 0.85       |
| CYCLOBOND I (5 mm)            | 0.70                | 3.32             | 4.73      | 0.70                | 0.45               | 0.63       |
| LiChrospher Diol (5 mm)       | 1.50                | 0.95             | 0.63      | 1.50                | 1.73               | 1.16       |
| Chromolith Si                 | 0.31                | 0.06             | 0.19      | 0.31                | 5.25               | 16.94      |
| HALO HILIC (2.7 mm)           | 0.64                | 0.20             | 0.31      | 0.64                | 9.03               | 14.11      |
| COSMOSIL HILIC (5 mm)         | 1.60                | 1.28             | 0.80      | 1.60                | 0.78               | 0.49       |
| Sugar-D (5 mm)                | 1.58                | 3.00             | 1.90      | 1.58                | 0.39               | 0.25       |
| NH <sub>2</sub> -MS (5 mm)    | 2.44                | 2.01             | 0.82      | 2.44                | 0.69               | 0.28       |
| SunShell HILIC-Amide (2.6 mm) | 2.93                | 1.29             | 0.48      | 2.93                | 1.18               | 0.44       |



Sodium p-toluenesulfonate (SPTS)



Trimethylphenylammonium chloride (TMPAC)

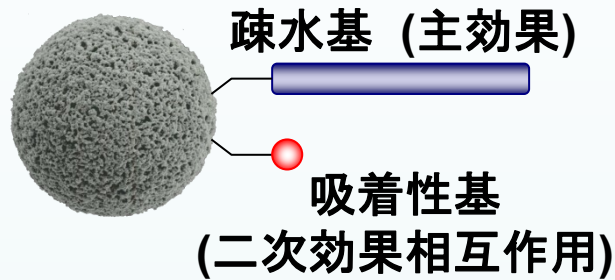
aの値により充填剤の  
イオン交換性が評価できる



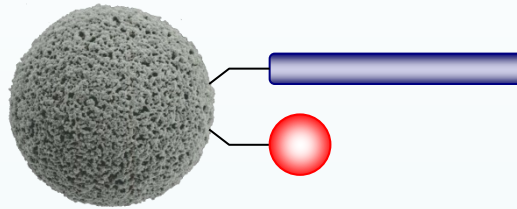
値が小さいほどイオン交換  
性が低い

Amide等電荷がない官能基の  
aの値は低くアニオン、カチオン  
交換ともに小さくなる

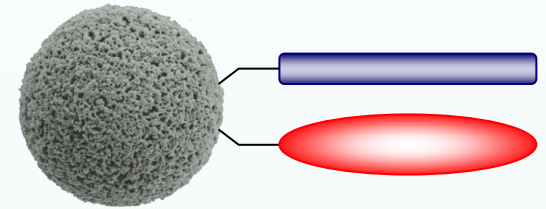
# 二次相互作用の働き



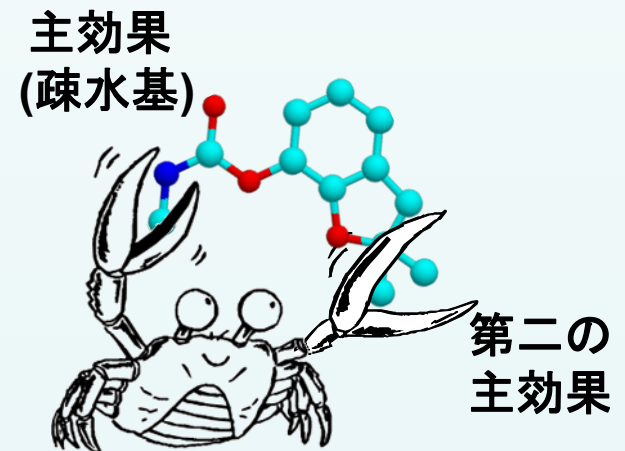
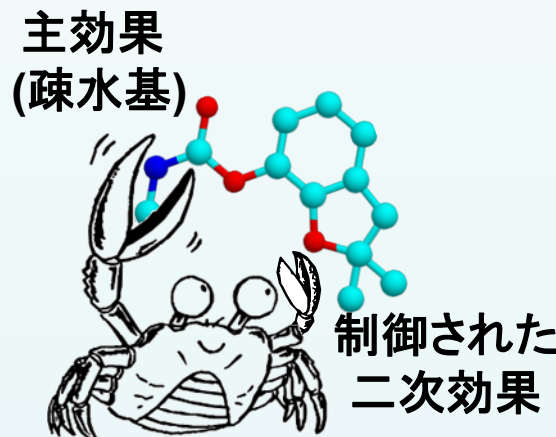
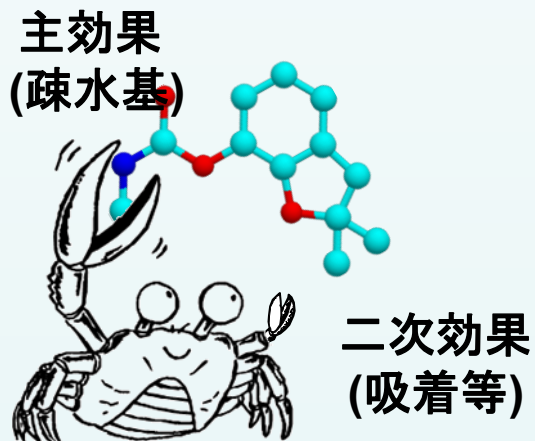
既存の分離剤



二次効果相互作用  
制御型分離剤



第二主効果を持つ  
二足型分離剤



# いざ使用してみると……

## ■ 考えていたものより……

保持が短い？ 保持しない

保持時間の再現性が……

理論段数が低い気が……

HILICはどうも使いづらい







# HILICを使用するうえでの注意点

## ■ 保持が短い・保持がない場合

### ● サンプル

- 移動相もしくは水割合が低い溶媒で調整する

### ● 移動相

- 有機溶媒の割合を増やす
- 塩の濃度を上げる、塩の種類を変える

## ■ 理論段数が低い場合

### ● サンプル

- 負荷量を減らす

### ● 移動相

- 流速を遅くする

逆相クロマトグラフィと比べ、試料中の溶媒(水)の影響を大きく受ける傾向がある

最適流速も逆相クロマトグラフィより、低速になる傾向がある

いざ使用してみると……



保持時間の再現性が……



インジェクションによるベースラインの乱れ



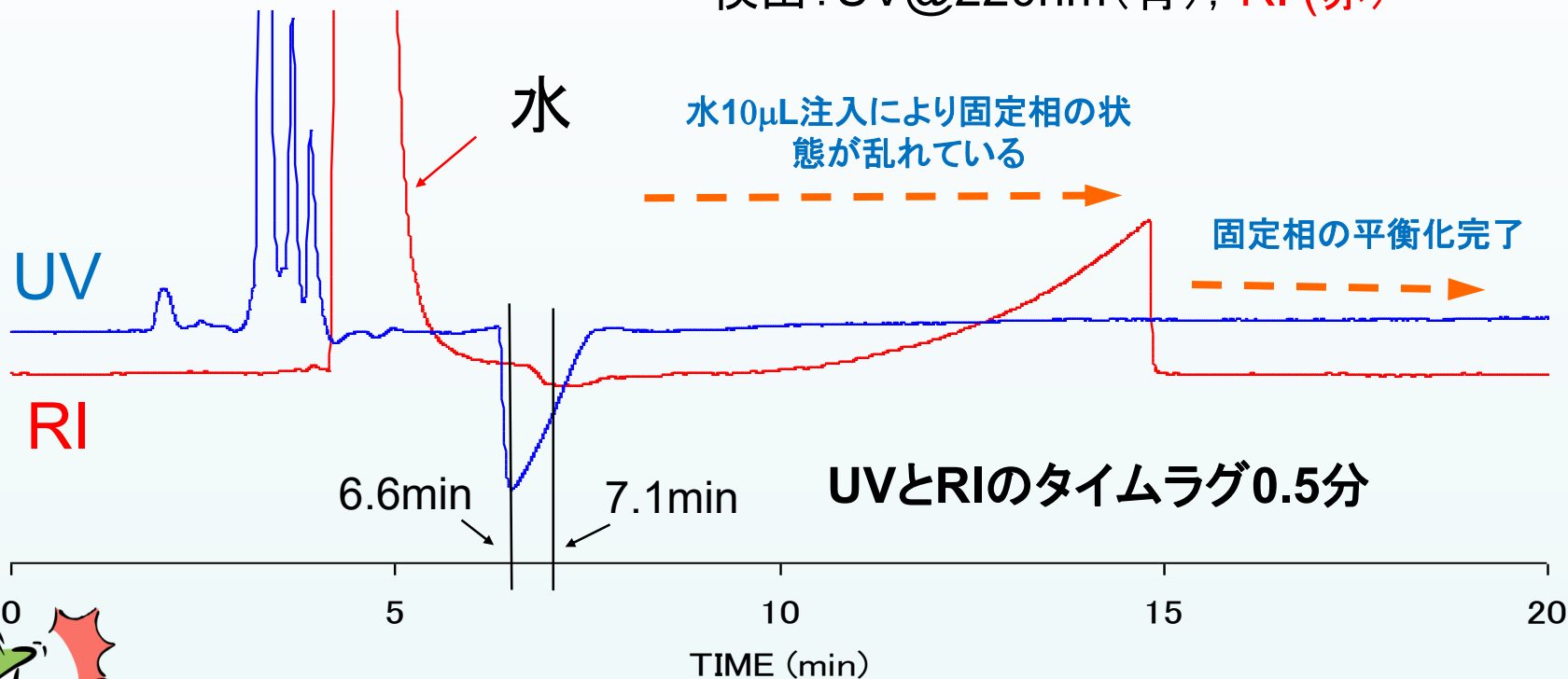
UVで見てるけどそんなことはないけど



# 水10 $\mu$ L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(20:80)

検出: UV@220nm(青), RI(赤)



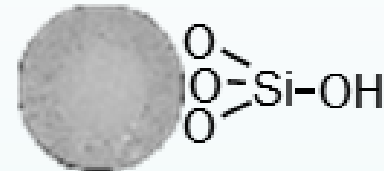
UVでは観察できないベースラインの変化が起きている!!

# HILICカラムのラインナップ

SunShell HILIC-Amide



SunShell HILIC-S



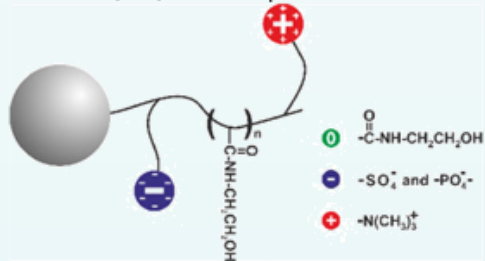
## iHILIC<sup>®</sup> -Fusion

advances HILIC separations in HPLC and UHPLC



Available in both PEEK and Stainless Steel

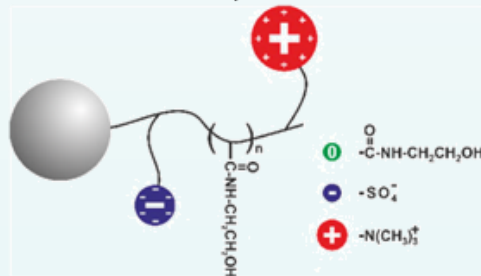
Silica Based, 1.8, 3.5 and 5 μm



iHILIC<sup>®</sup> -Fusion

Available in both PEEK and Stainless Steel

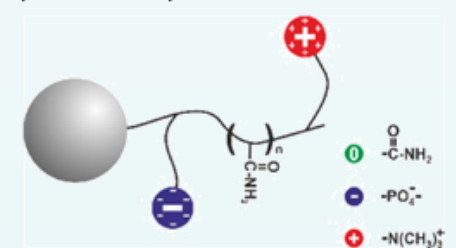
Silica Based, 3.5 and 5 μm



iHILIC<sup>®</sup> -Fusion(+)

Available in PEEK

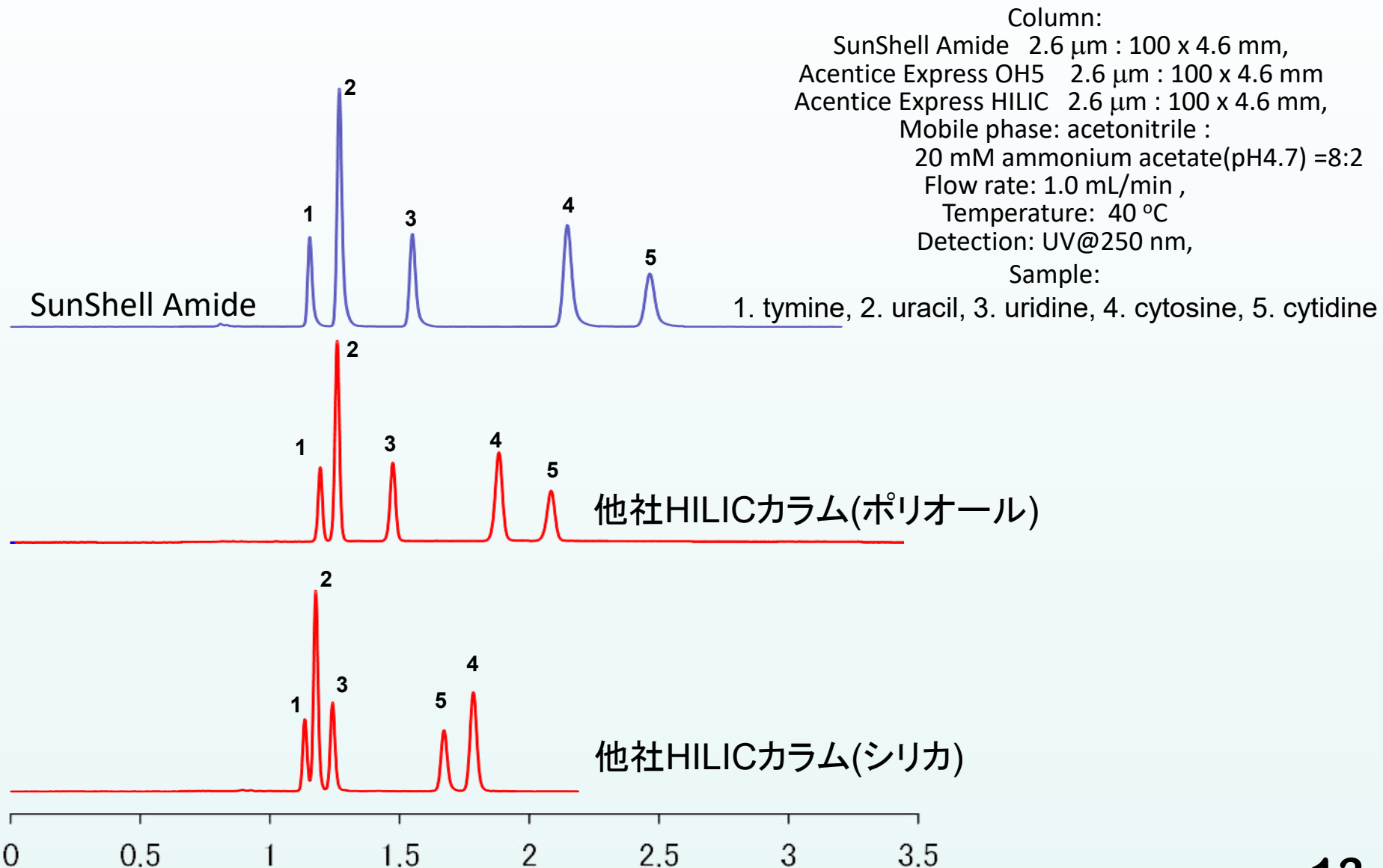
Polymer based, 5 μm



iHILIC<sup>®</sup> -Fusion(P)

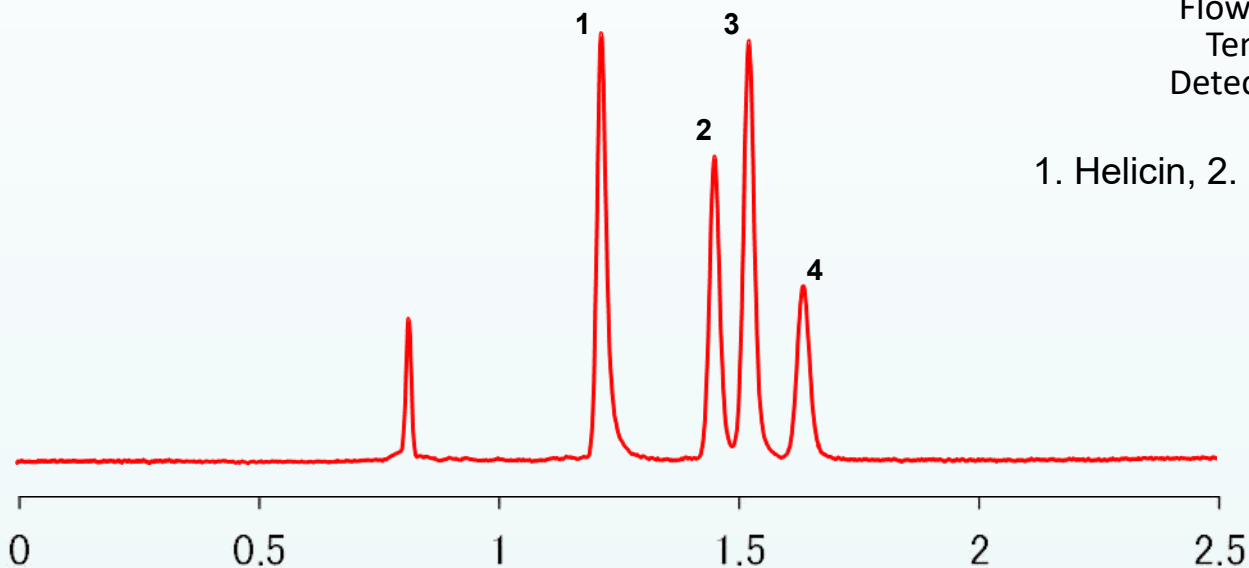


# 核酸塩基の分離



# 配糖体の分離

Column:  
 SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,  
 Mobile phase: acetonitrile :  
 25 mM phosphate Ammonium (pH4.9) =8:2  
 Flow rate: 1.0 mL/min ,  
 Temperature: 室温  
 Detection: UV@215 nm,  
 Sample:  
 1. Helicin, 2. Salicin, 3. Arbutin 4. Rutin

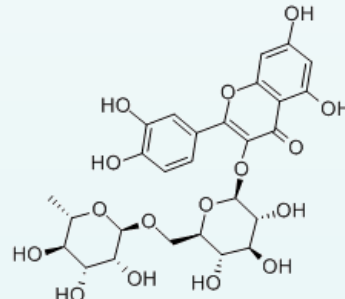
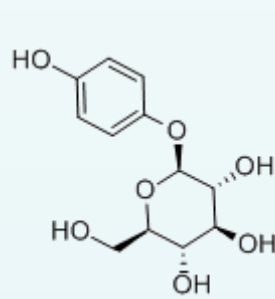
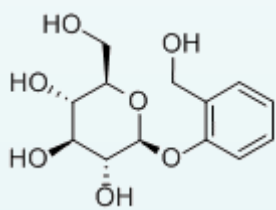
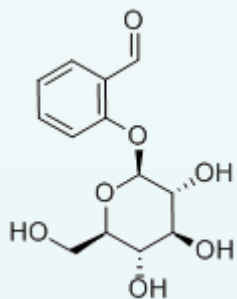


1. Helicin,

2. Salicin,

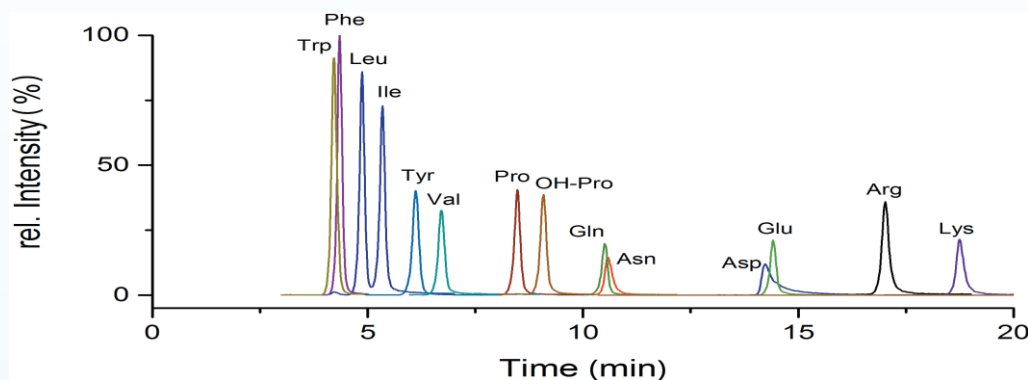
3. Arbutin

4. Rutin

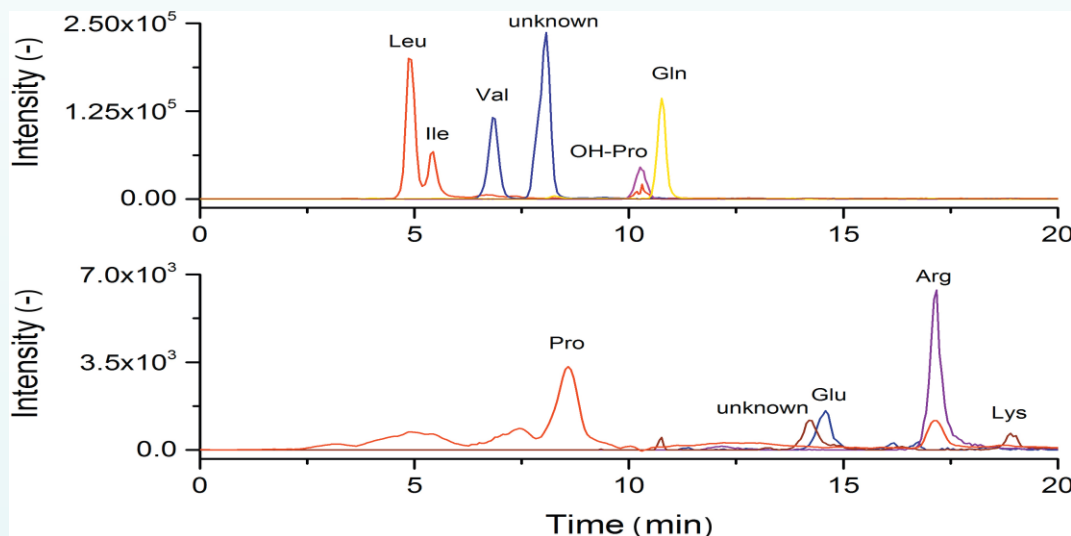


# アミノ酸のHILIC-ESI-MS

## 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- $\mu$ m 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

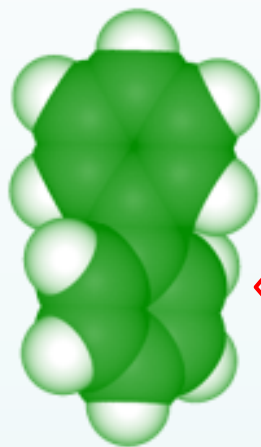
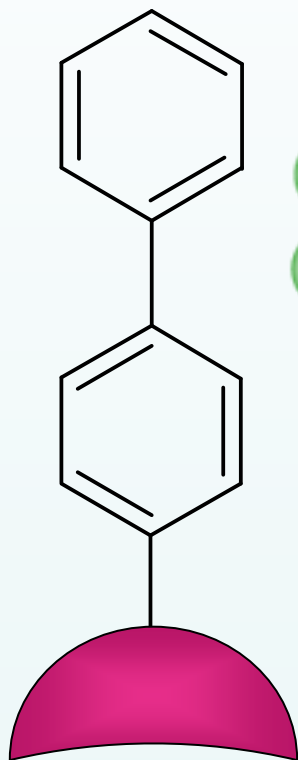
**Column Temperature:** 40 °C

**Injection Volume:** 5  $\mu$ L

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



# Biphenyl



- 疎水性相互作用
- 水素結合性
- $\pi$ - $\pi$ 相互作用

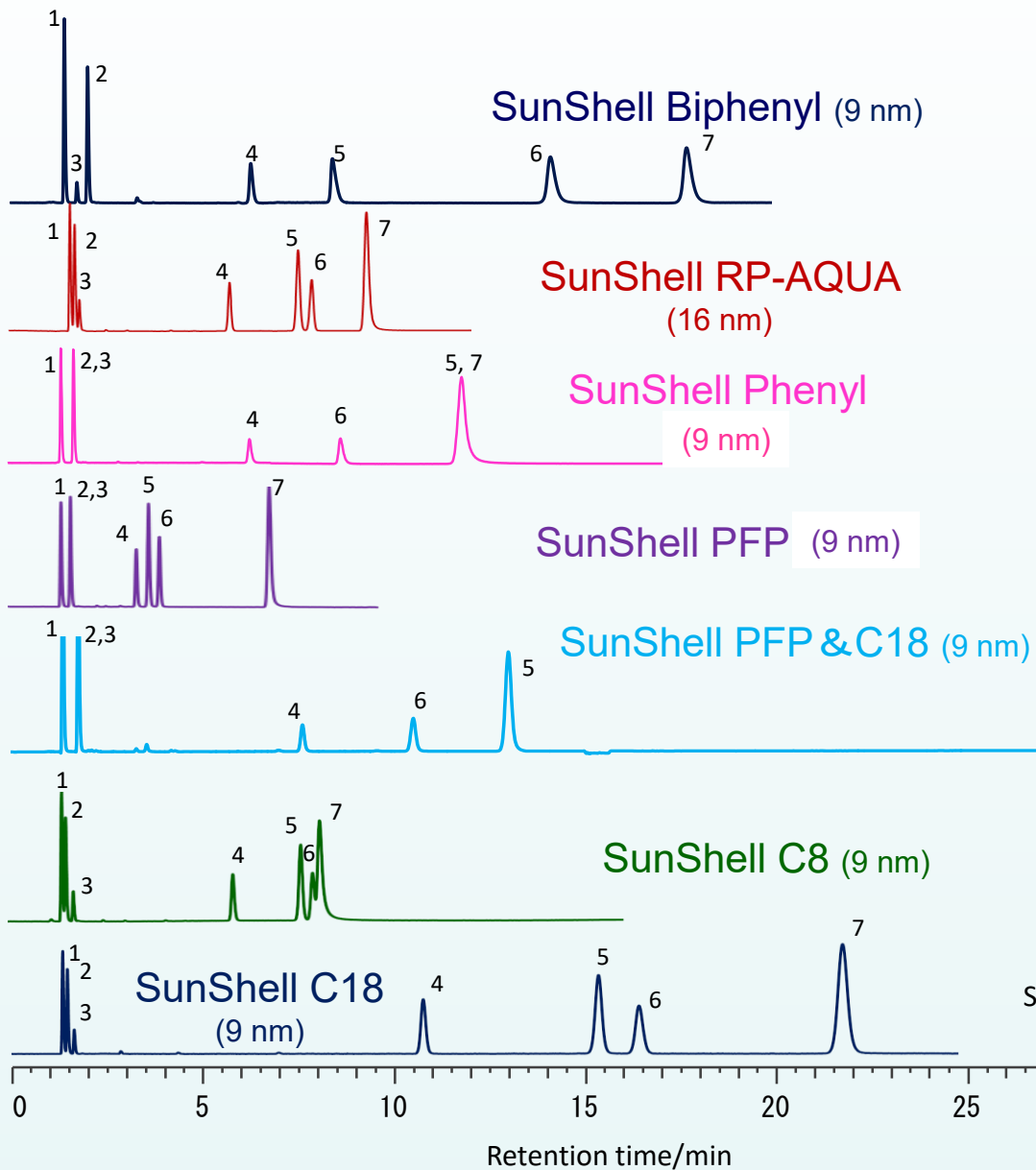
45度ねじれていることでPhenyl基とは異なった分離特性を示す

一般的な逆相カラムと比べると水素結合性が強い

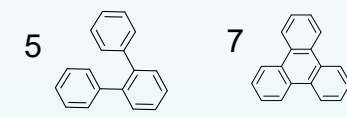




# 標準試料の分離例 (コアシェル)



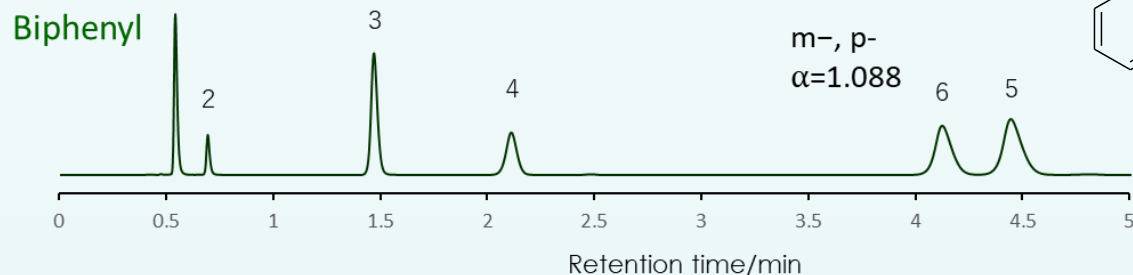
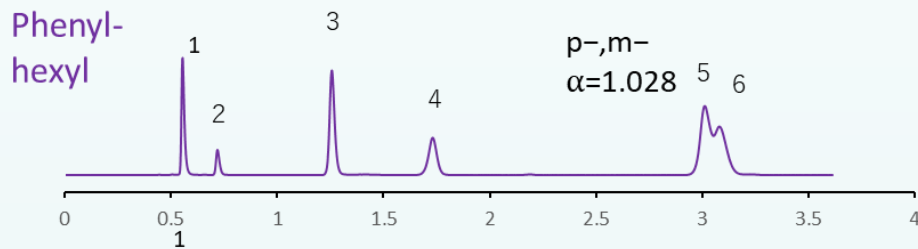
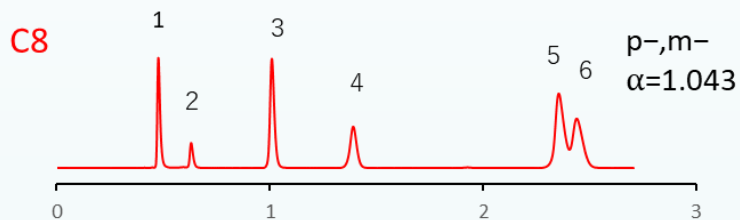
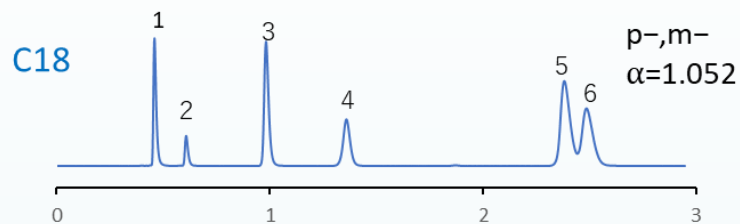
|           | 水素結合性<br>(Caffeine/<br>Phenol) | 疎水性<br>(Amylbenzene/<br>Butylbenzene) | 立体選択性<br>(Triphenylene/<br>o-Terphenyl) |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------------|---|
| Biphennyl | 1.82                           | 1.44                                  | 1.28                                    |
| RP-AQUA   | 0.52                           | 1.52                                  | 1.30                                    |
| Phenyl    | 1.00                           | 1.48                                  | 1.01                                    |
| PFP       | 1.00                           | 1.31                                  | 2.38                                    |
| PFP&C18   | 1.00                           | 1.47                                  | 2.64                                    |
| C8        | 0.32                           | 1.46                                  | 1.08                                    |
| C18       | 0.39                           | 1.60                                  | 1.46                                    |



Column dimension: 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=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



# その他の逆相カラムとの分離比較



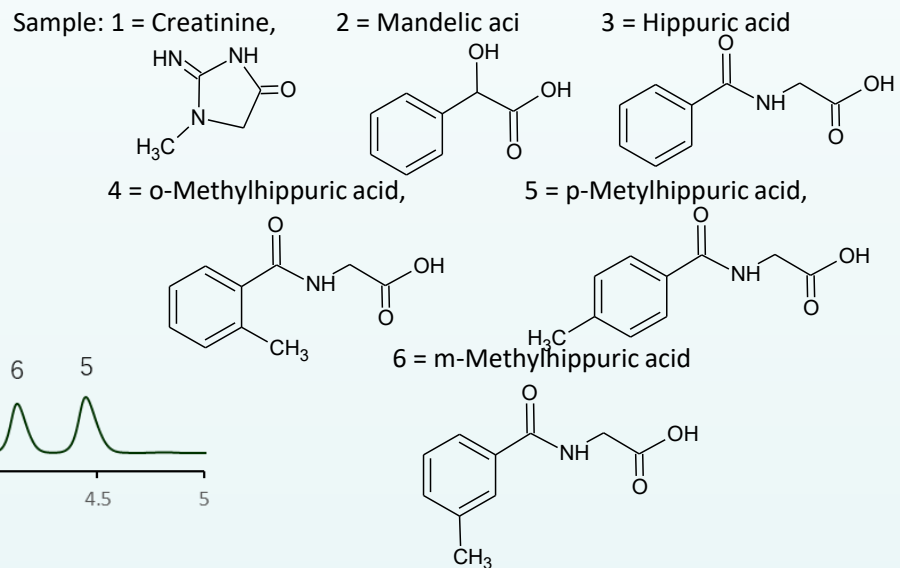
Column: SunShell C18 2.6  $\mu$ m 100 x 2.1 mm  
 SunShell C8 2.6  $\mu$ m 100 x 2.1 mm  
 SunShell Phenyl 2.6  $\mu$ m 100 x 2.1 mm  
 SunShell Biphenyl 2.6  $\mu$ m 100 x 2.1 mm

Mobile phase: 2-Propanol/20 mM Ammonium acetate pH6.8=3/97

Flow rate: 0.4 mL/min

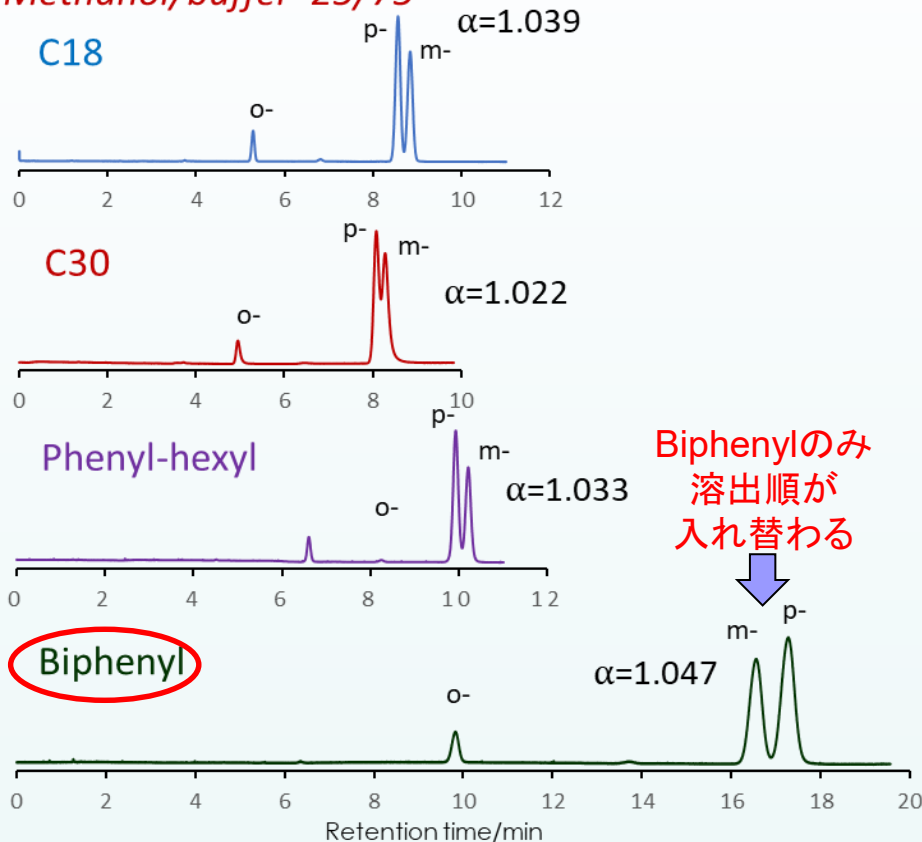
Temperature: 40 °C

Detection: UV@230 nm

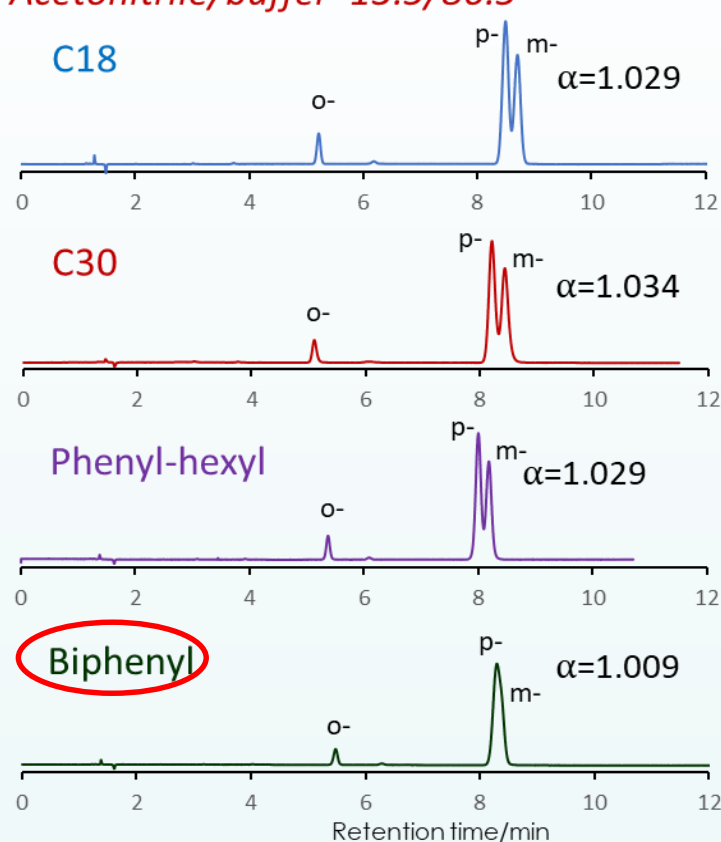


# 有機溶媒による分離の変化

Methanol/buffer=25/75



Acetonitrile/buffer=13.5/86.5

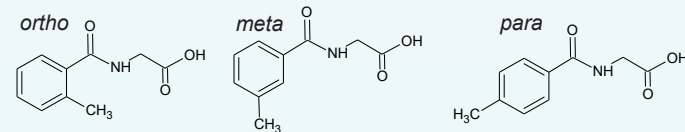


Biphenylのみ  
溶出順が  
入れ替わる



Column: SunShell C18 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
SunShell C30 2.6  $\mu$ m 150 x 2.1 mm  
SunShell Phenyl 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
SunShell Biphenyl 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm

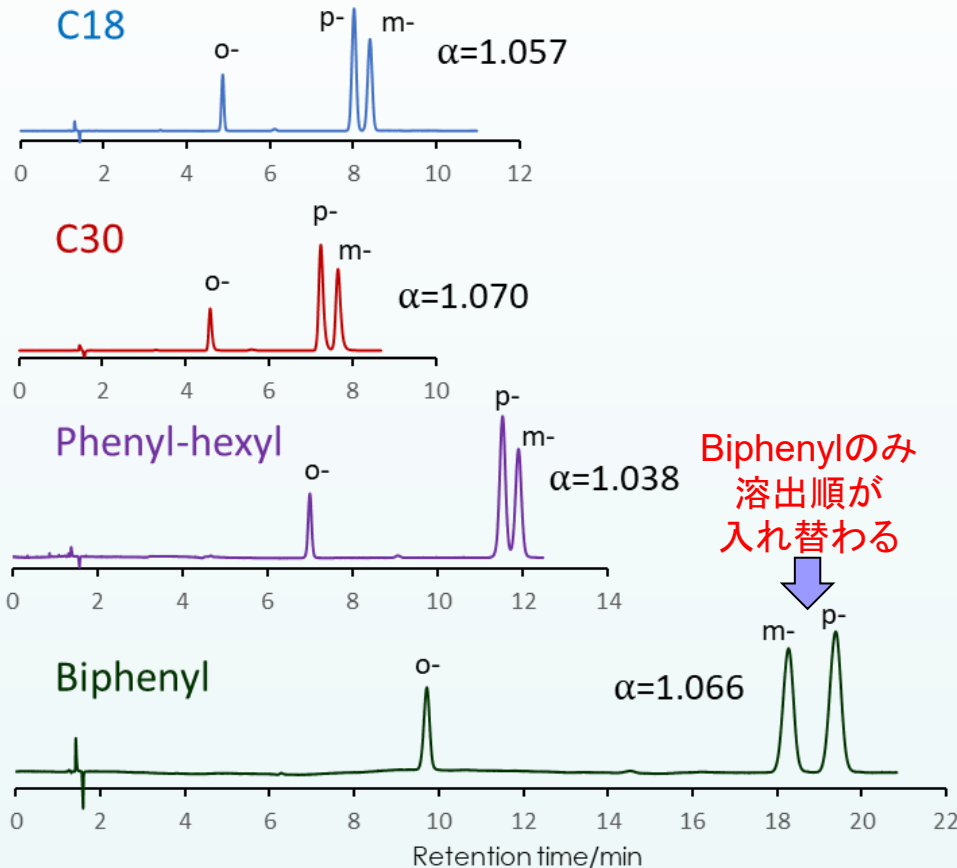
Mobile phase: Organic solvent/25 mM phosphate buffer pH3.0  
Flow rate: 1.0 mL/min, 0.2 mL/min for only C30  
Temperature: 40 oC  
Detection: UV@230 nm  
Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid



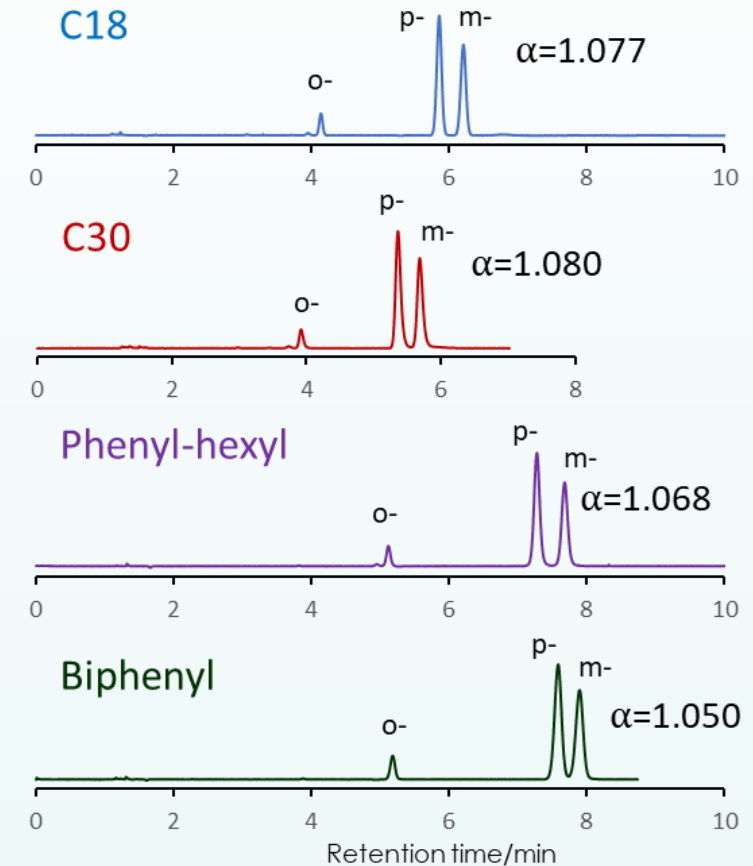
**Biphenylカラムはアセトニトリルとメタノールで分離  
が大きく変化する**

# 有機溶媒による分離の変化2

2-Propanol/buffer=7/93



Tetrahydrofuran/buffer-10/90



Biphenylのみ  
溶出順が  
入れ替わる

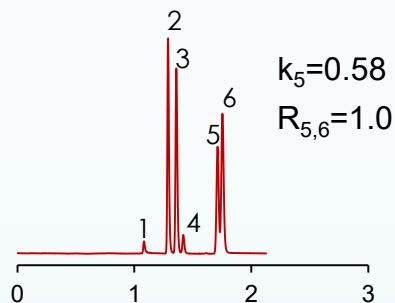


**THFでは多くの逆相カラムで  
分離が改善される**

Column: SunShell C18 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
 SunShell C30 2.6  $\mu$ m 150 x 2.1 mm  
 SunShell Phenyl 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
 SunShell Biphenyl 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: Organic solvent/25 mM phosphate buffer pH3.0  
 Flow rate: 1.0 mL/min, 0.2 mL/min for only C30  
 Temperature: 40 oC  
 Detection: UV@230 nm  
 Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid

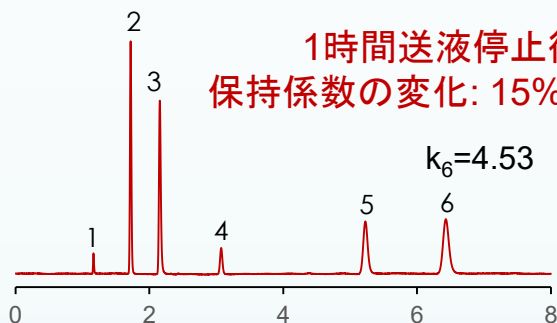
# 核酸塩基の分離比較

A) Methanol/10 mM ammonium acetate pH6.8=20/80

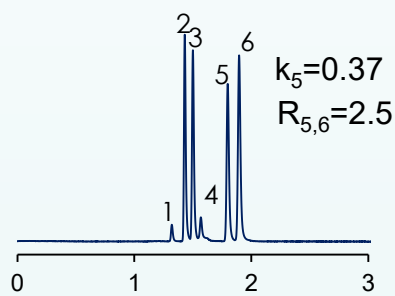
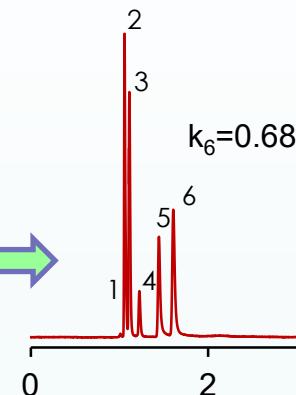


**C18**

B) 10 mM ammonium acetate pH6.8

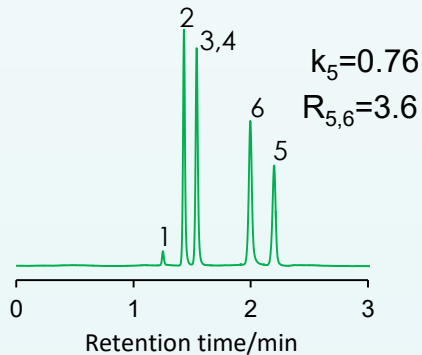
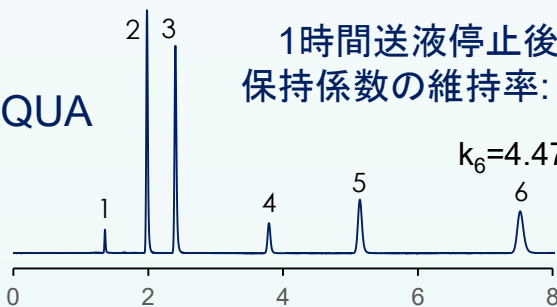


1時間送液停止後の  
保持係数の変化: 15% まで減少



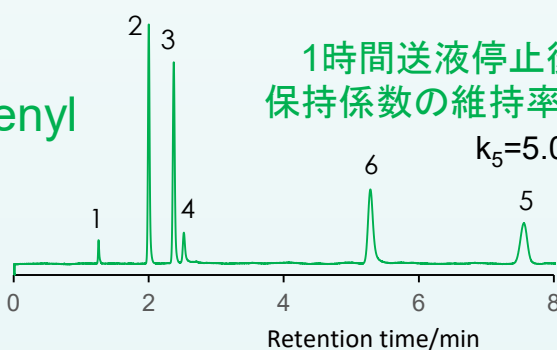
**RP-AQUA**

1時間送液停止後の  
保持係数の維持率: 99%



**Biphenyl**

1時間送液停止後の  
保持係数の維持率: 96%



Column:

SunShell C18 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm

SunShell RP-AQUA 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm

SunShell Biphenyl 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6

Flow rate: 1.0 mL / min,

Temperature: 40 °C

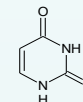
Detection: UV@250 nm

1. NaNO<sub>2</sub>

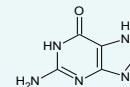
2. Cytosine



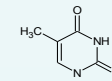
3. Uracil



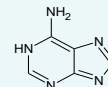
4. Guanine



5. Thymine

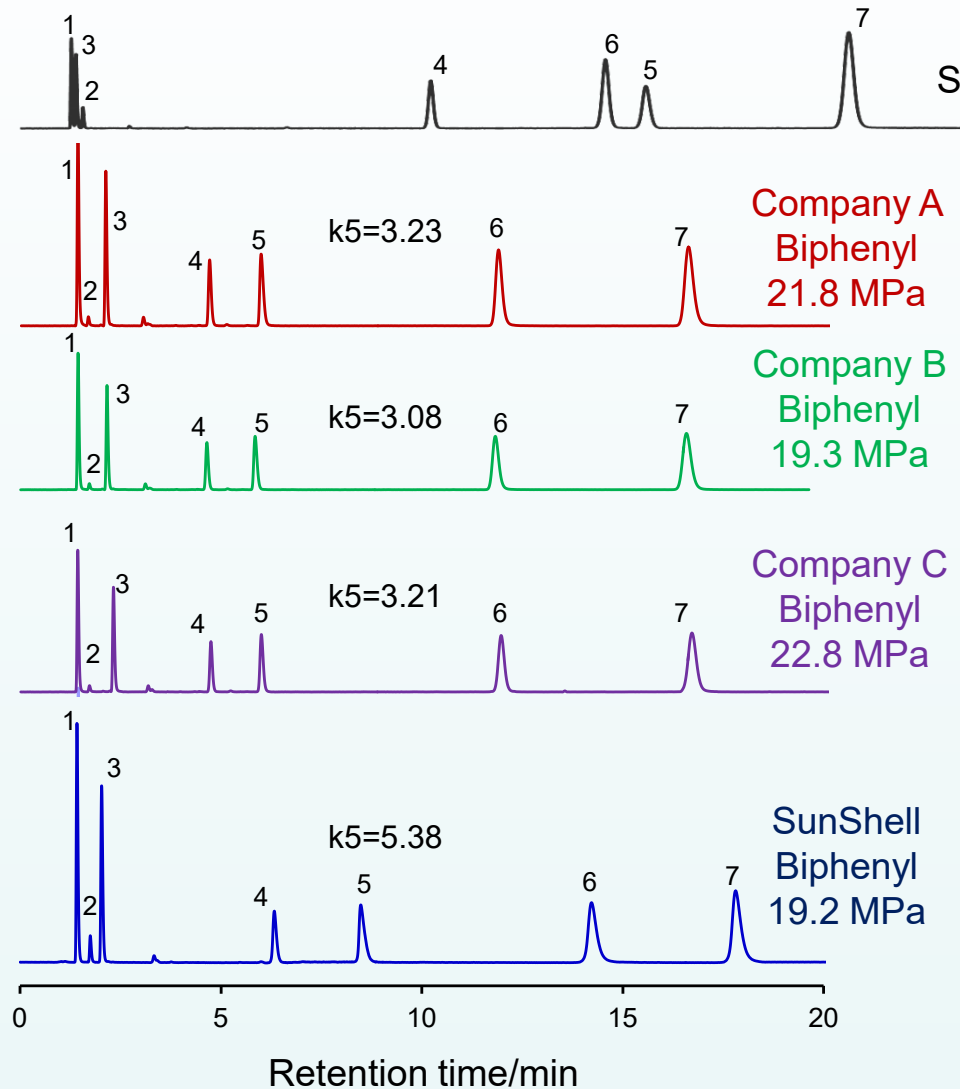


6. Adenine



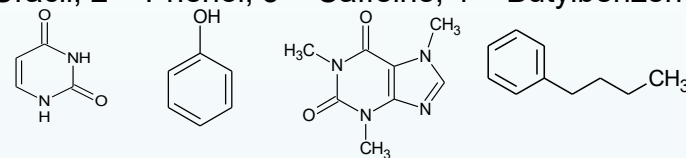
# 他社カラムとの分離比較

- 比較に用いたカラム
1. Kinetex Biphenyl, 2.6 μm
  2. Halo Biphenyl, 2.7 μm
  3. Raptor Biphenyl, 2.7 μm
  4. SunShell Biphenyl, 2.6 μm

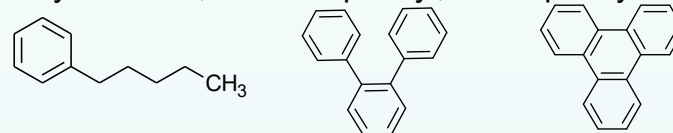


Column: Company A Biphenyl, 2.6 μm 150 x 4.6 mm  
 Company B Biphenyl, 2.7 μm 150 x 4.6 mm  
 Company C Biphenyl, 2.7 μm 150 x 4.6 mm  
 SunShell Biphenyl, 2.6 μm 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40 °C  
 Sample: 1 = Uracil, 2 = Phenol, 3 = Caffeine, 4 = Butylbenzene



5 = Amylbenzene, 6 = o-Terphenyl, 7 = Triphenylene



|                       | 水素結合性<br>α(Caffeine/<br>Phenol) | 疎水性<br>α(Amylbenzene/<br>Butylbenzene) | 立体選択性<br>α(Triphenylene<br>/o-Terphenyl) |
|-----------------------|---------------------------------|--|--|
| SunShell C18          | 0.39                            | 1.60                                   | 1.46                                     |
| Company A<br>Biphenyl | 2.69                            | 1.39                                   | 1.45                                     |
| Company B<br>Biphenyl | 2.52                            | 1.37                                   | 1.46                                     |
| Company C<br>Biphenyl | 3.07                            | 1.38                                   | 1.45                                     |
| SunShell<br>Biphenyl  | 1.82                            | 1.44                                   | 1.28                                     |



# オキシンのピーク比較

Column dimension: 150 x 4.6 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/20mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>=10/90  
Flow rate: 1.0 mL/min,  
Temperature: 40 °C,  
Detection: UV@250nm  
Sample: 1 = 8-Quinololinol (Oxine), 2 = Caffeine

Company A  
Biphenyl



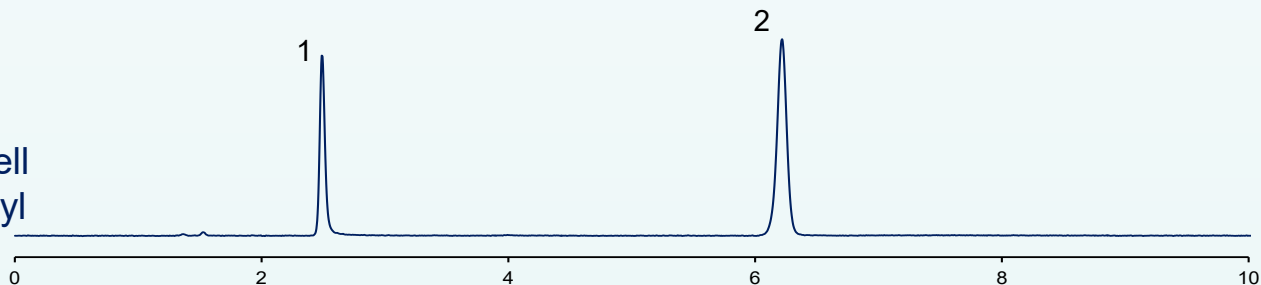
Company B  
Biphenyl



Company C  
Biphenyl



SunShell  
Biphenyl

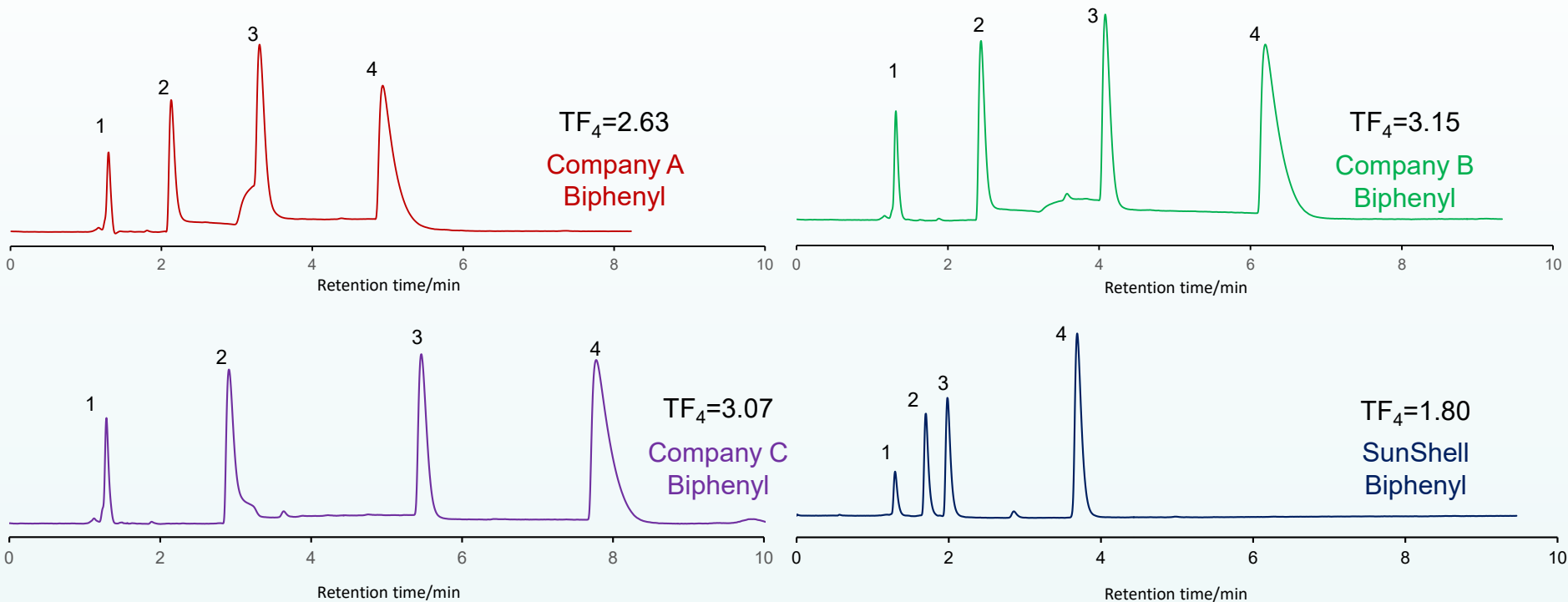


他社Biphenylカラムと比べ金属配位性のある  
化合物のピーク形状が良い



# アミトリプチリンのピーク比較

- 比較に用いたカラム
1. Kinetex Biphenyl, 2.6  $\mu\text{m}$
  2. Halo Biphenyl, 2.7  $\mu\text{m}$
  3. Raptor Biphenyl, 2.7  $\mu\text{m}$
  4. SunShell Biphenyl, 2.6  $\mu\text{m}$



Column dimension: 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/20 \text{ mM Phosphate buffer pH } 7.0=60/40$   
 Flow rate: 1.0 mL/min    Temperature: 40 °C  
 Detection: UV@250 nm  
 Sample: 1 = Uracil, 2 = Propranolol, 3 = Nortriptyline, 4 = Amitriptyline

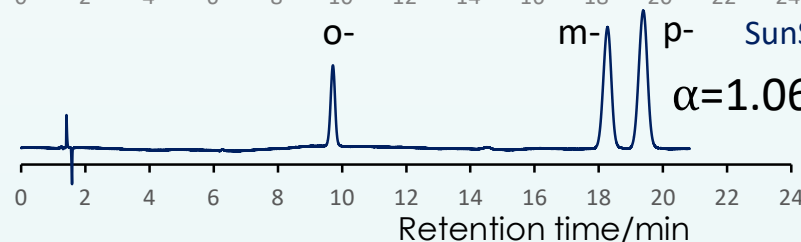
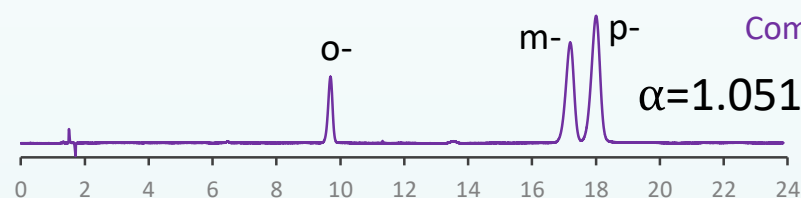
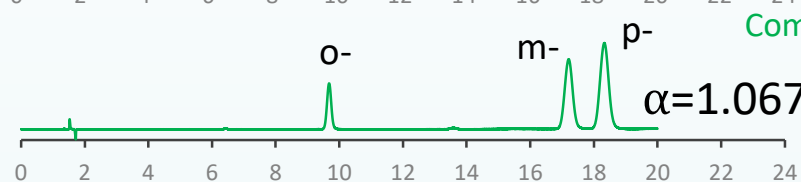
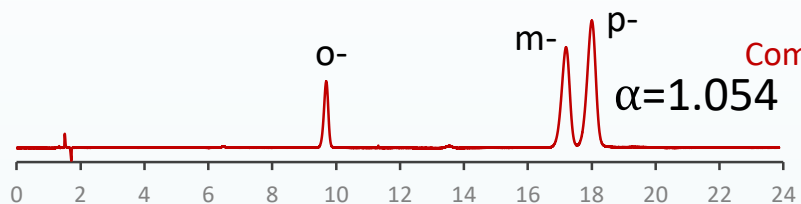
**他社Biphenylカラムと比べ塩基性化合物の  
 ピーク形状が良い**



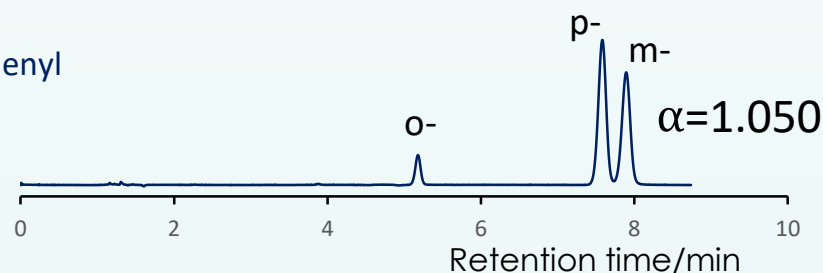
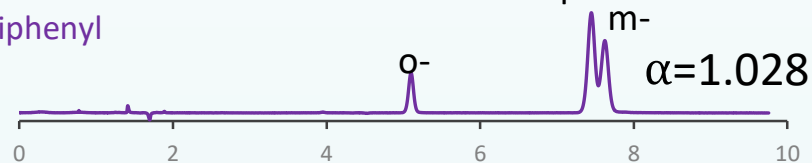
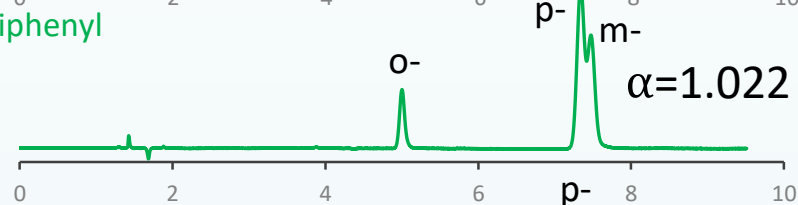
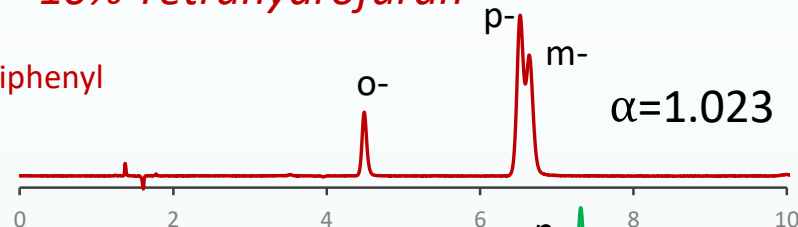


# メチル馬尿酸の異性体の分離比較

7% 2-Propanol

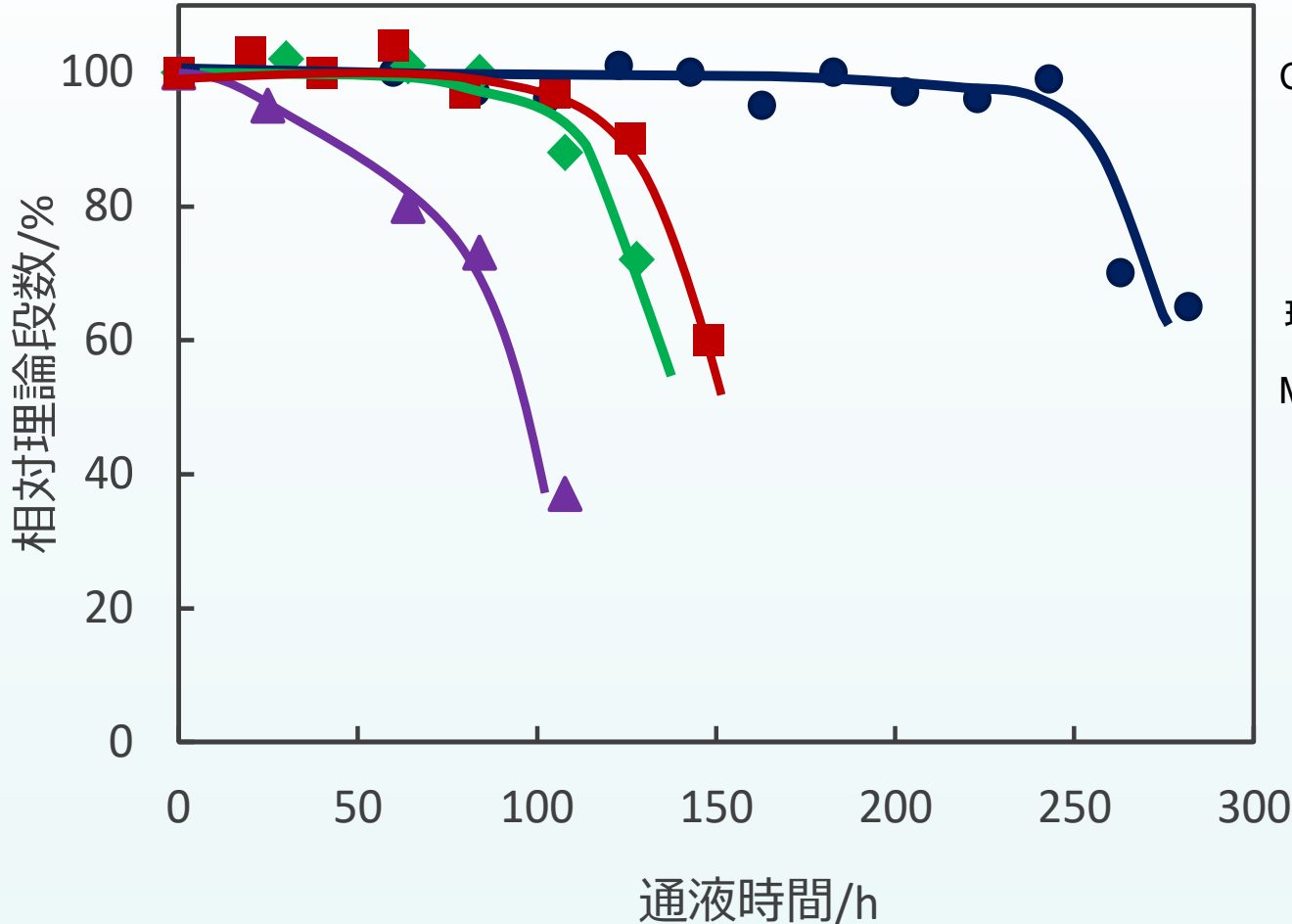


10% Tetrahydrofuran



**SunShell Biphenylカラムは移動相の有機溶媒を変えても分離が維持できる**

# 塩基性条件下の耐久性



耐久性試験条件

Column dimension: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: 20 mM Sodium phosphate pH 8.0

Flow rate: 0.2 mL/min

Temperature: 40 °C

理論段数測定条件

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=50/50

Flow rate: 0.2 mL/min

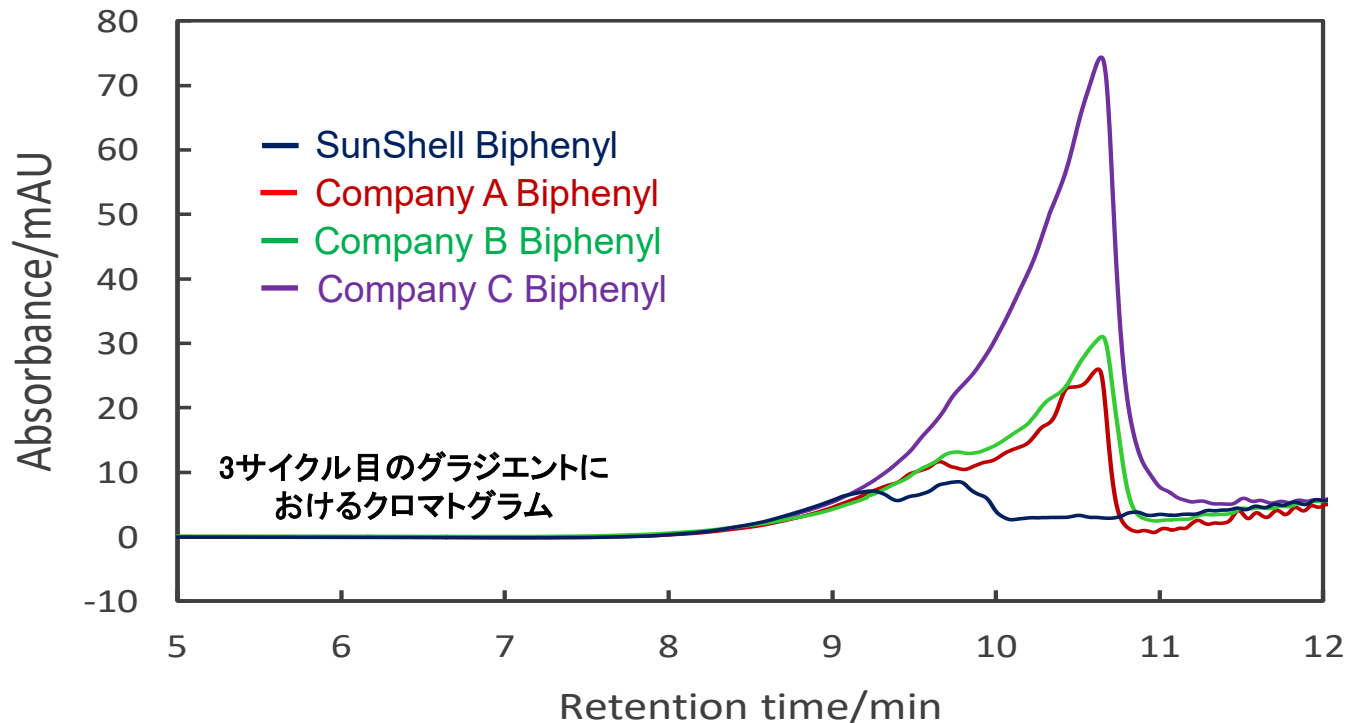
Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: Butylbenzene

**SunShell Biphenylカラムは高い耐塩基性を有している**

# 酸性条件におけるブリード



## ブリード試験条件

Column dimension: 50 x 2.1 mm

Flow rate: 0.3 mL/min

Mobile phase: A) 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 1.2)

Temperature: 40 °C

B) Acetonitrile

Detection: UV@250 nm

Gradient program

| Time (min) | 0  | 5  | 10 | 17 | 18 | 35 |
|------------|----|----|----|----|----|----|
| %B         | 10 | 10 | 90 | 90 | 10 | 10 |

**SunShell Biphenylカラムは  
他社と比較して高い耐酸性**



## まとめ

- HILICカラムは逆相カラムと同様に、官能基によってその特性が異なる
- HILICモードで分析を行う場合、一般的な逆相モードより、サンプルの調整等、注意が必要な点が多い
- HILICモードで連続分析を行う場合、インジェクションによるベースラインの乱れを考慮する必要がある
- Biphenylカラムは、逆相カラムの中でも水素結合性が強く発現する
- BiphenylカラムやPhenylカラムは、移動相にアセトニトリルを用いるとパイ電子に基づく相互作用が機能しなくなる
- Biphenylカラムは水系移動相のみでも安定して使用可能である

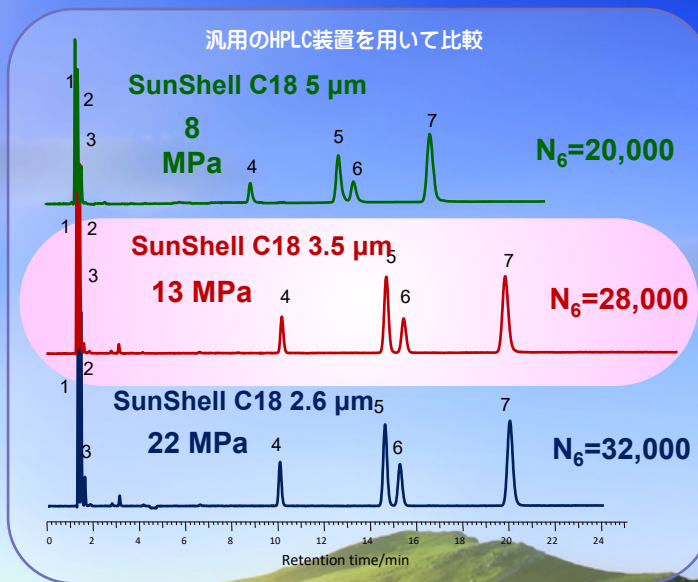


# Memo

キャンペーンセール期間:  
2020/11/16~2021/3/31

C18, 3.5  $\mu\text{m}$ およびBiphenyl  
キャンペーンセール

40% Off

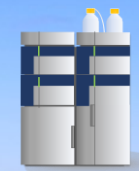


Column size: 150 x 4.6 mm  
Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=75/25$   
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil  
2 = Caffeine  
3 = Phenol

4 = Butylbenzene  
5 = o-Terphenyl  
6 = Amylbenzene  
7 = Triphenylene

HPLC: 汎用コンベンショナル装置  
(内径 0.25 mm の配管を使用)

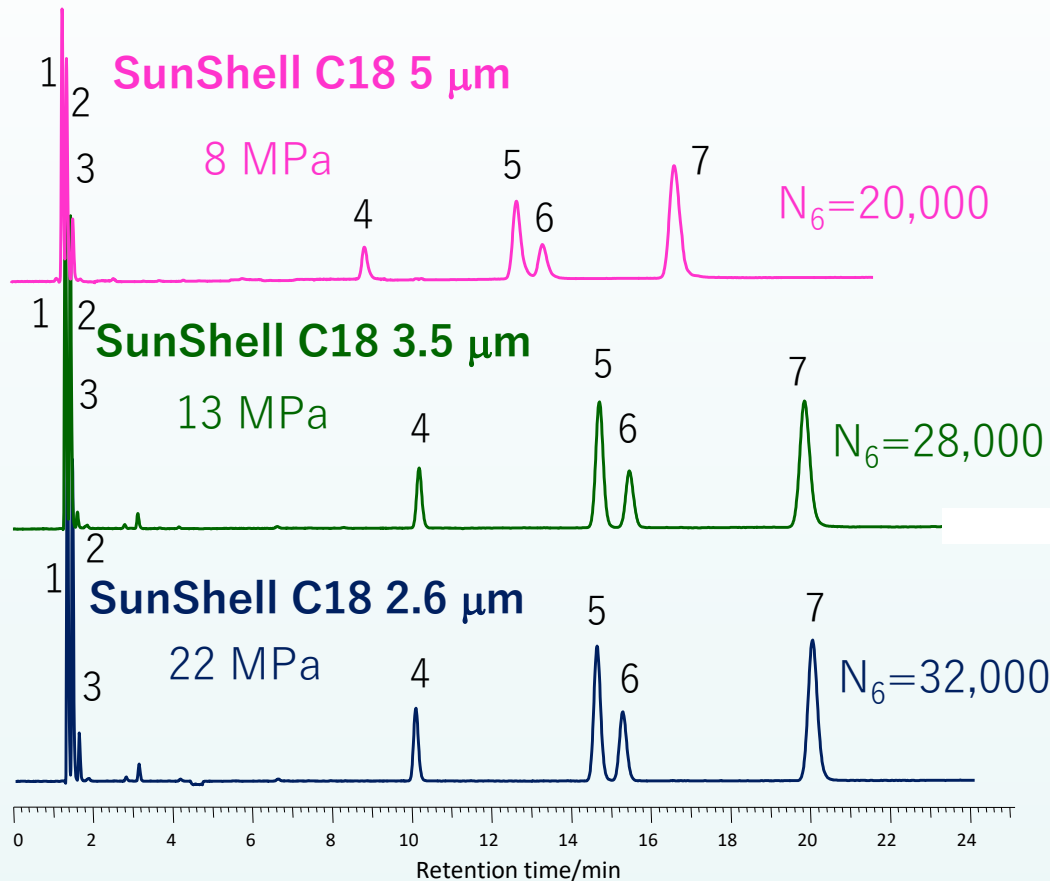


# SunShell C18, 3.5 $\mu\text{m}$ カラム新発売

全多孔性 3  $\mu\text{m}$  カラムより低圧で, HPLCでも十分な性能発揮!!

SunShell Biphenyl, 2.6  $\mu\text{m}$  カラム新発売 裏面参照!

# 粒子径の異なるコアシェルカラムの比較



Column size: 150 x 4.6 mm

Mobile phase:

$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=75/25$

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

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(Tubing, 0.25 mm i.d.)



汎用HPLCでも使用しやすい20MPa以下で使用可能な粒子径3.5 $\mu\text{m}$ を新発売



---

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](mailto:info@chromanik.co.jp)  
URL: <http://chromanik.co.jp>