

C18以外のHPLCカラム、 どう選ぶ？どう使う？

逆相セカンドカラムの決定版
から、HILICの活用まで

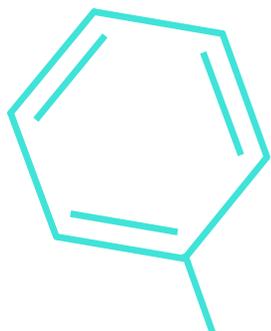


液クロ玉手箱

ChromaNik

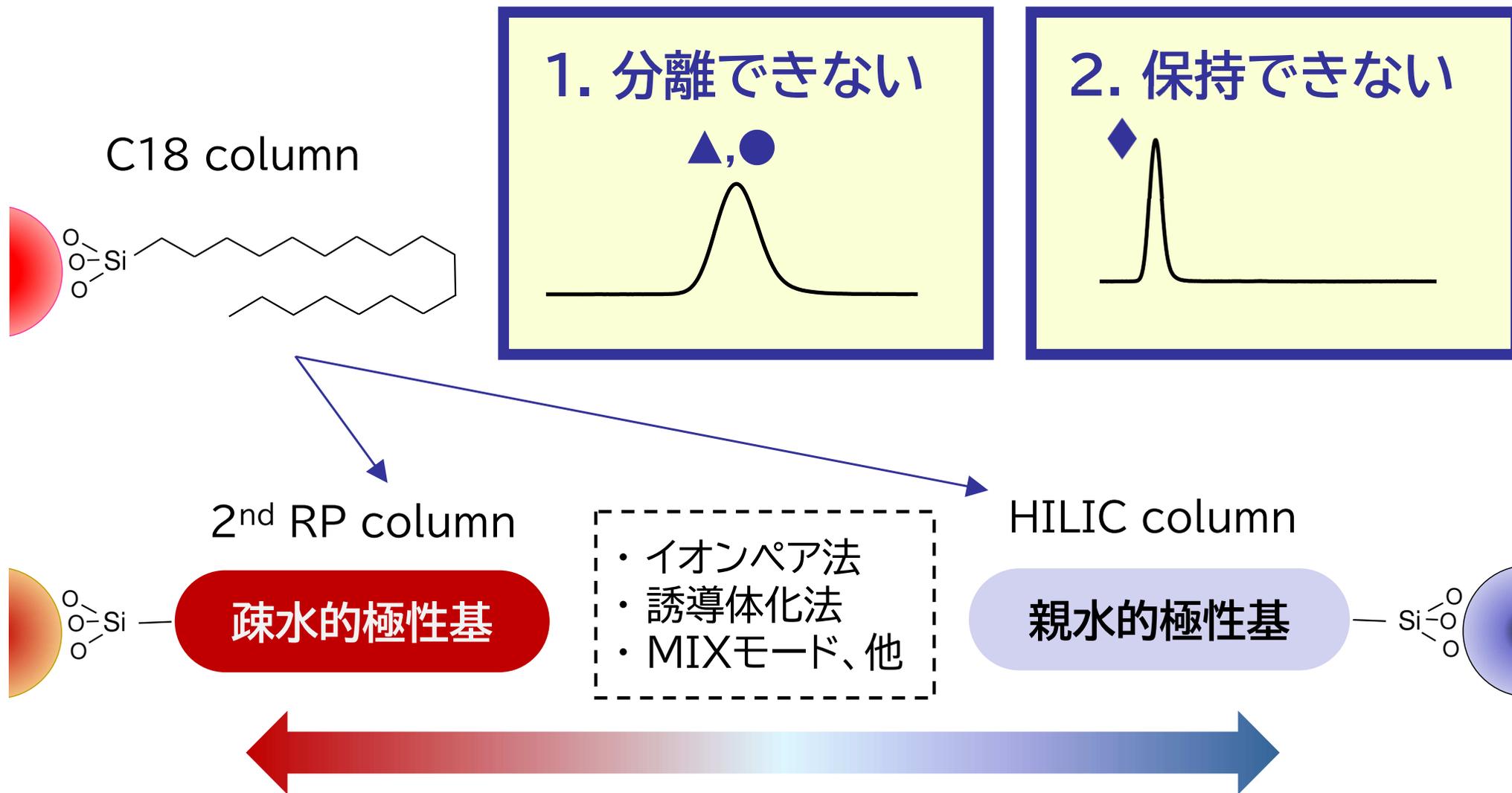


(株)クロマニックテクノロジーズ
カラムコンシェルジュ
小山 隆次
koyama@chromanik.co.jp



ChromaNyk
ChromaNik Technologies Inc.

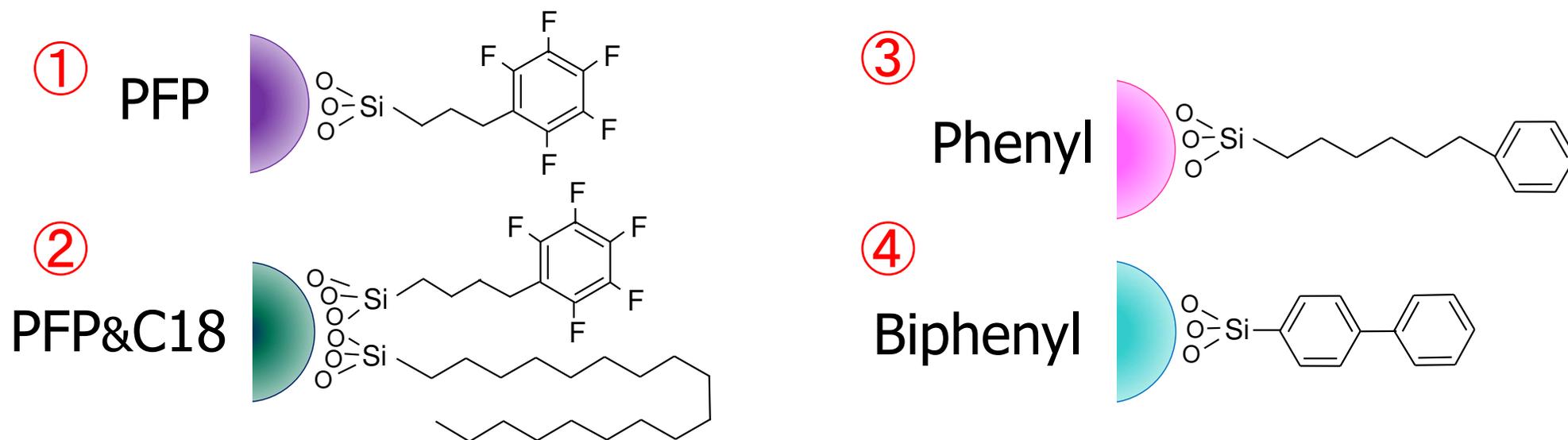
C18で“困った時”の 別種カラムの選択



▶ 異なる逆相カラム 又はHILICカラムの選択など

本日はご紹介するテーマ

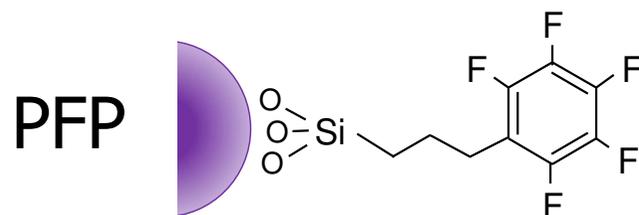
1. セカンド逆相カラムと 活用のコツ



2. HILICカラムと 活用のコツ



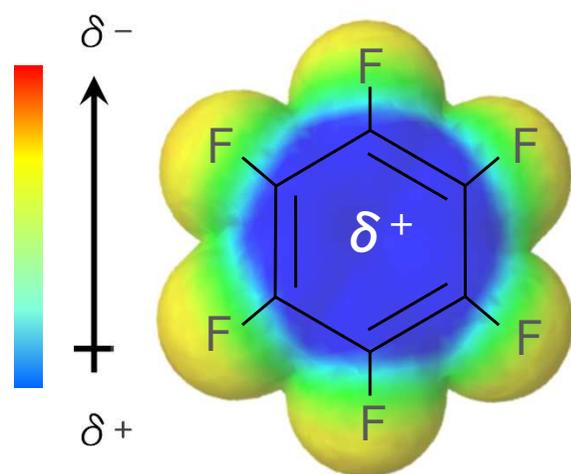
①PFP: ユニークな保持・分離機構



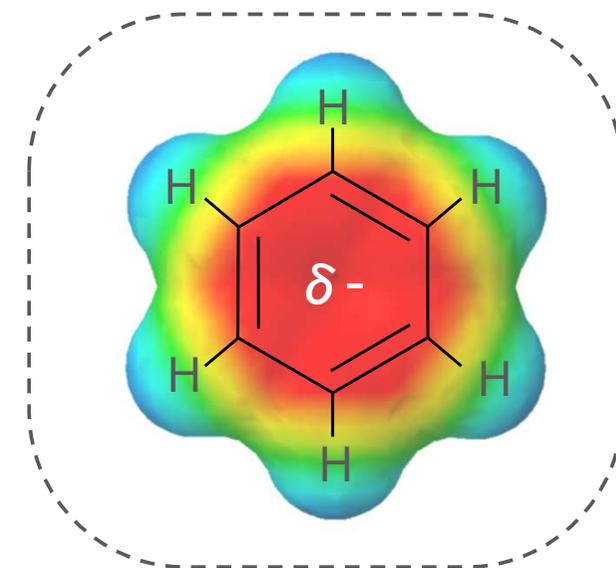
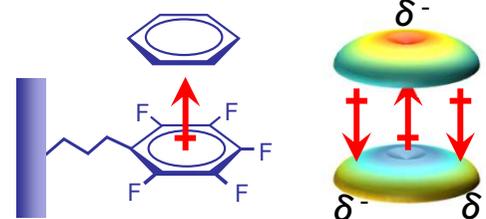
結合基: Pentafluorophenylpropyl

(カラム名称: PFPP, F5, Fluorophenylなど)

- フッ素の電子吸引性に基づく双極子間相互作用
- 「フェニル」とは、真逆の静電ポテンシャル配置

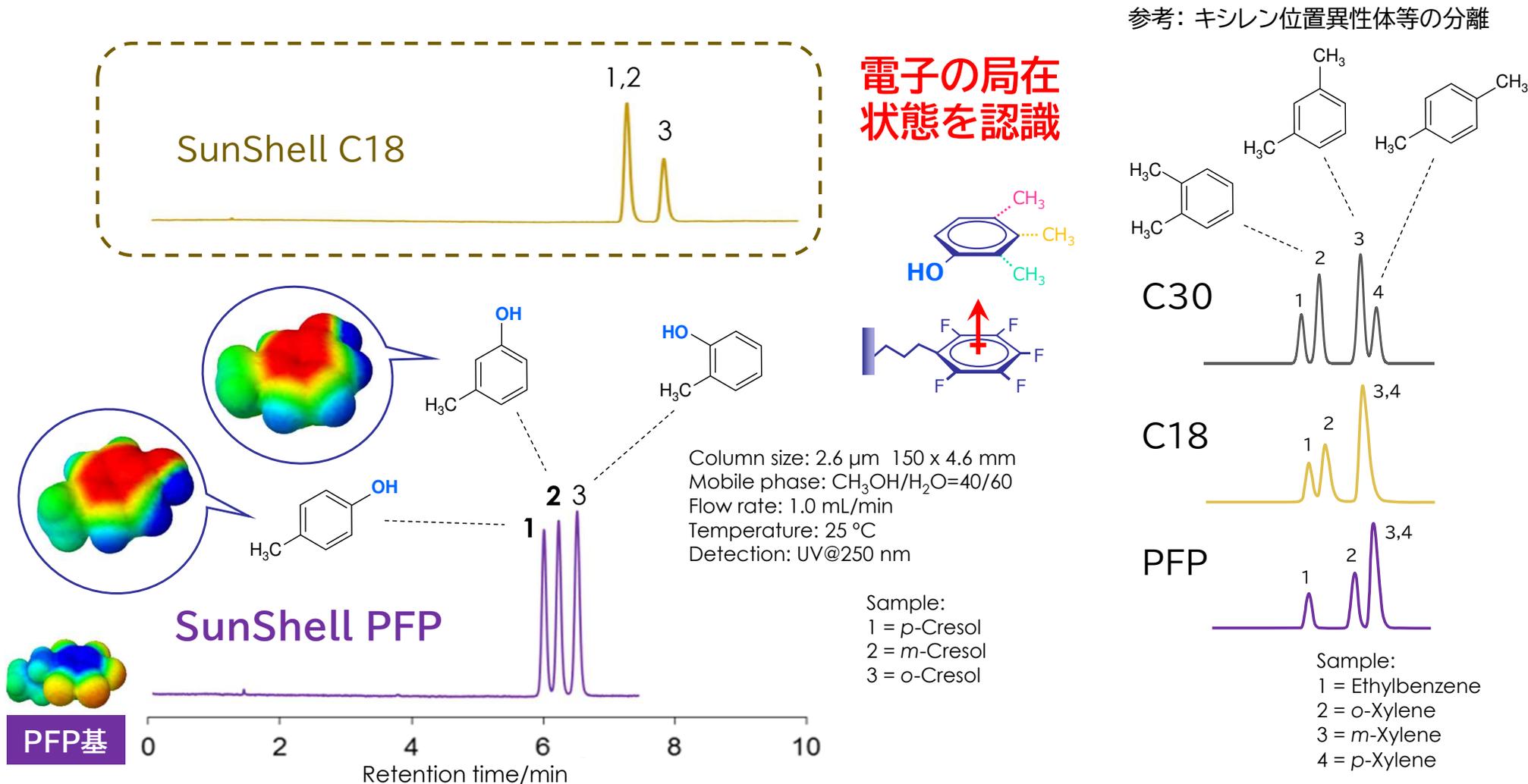


パーフルオロベンゼンの静電ポテンシャルマップ (左図) と、ベンゼンの静電ポテンシャルマップ (右図)



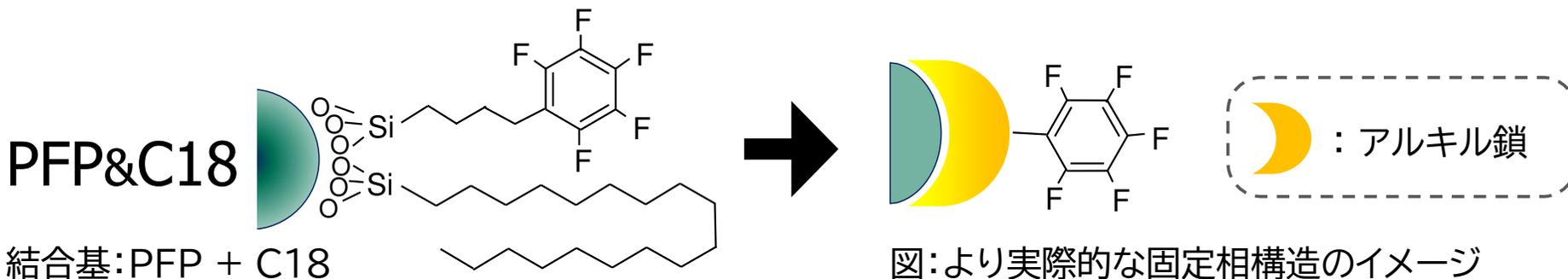
▶ 芳香環に対する特異な親和性が 類縁分離を生む。

①PFP: クレゾール位置異性体の分離



▶ PFPでは「**極性基**」の位置異性体の分離が良好

② PFP&C18: PFPの選択性 + 疎水性



- PFPの選択性を活かしつつ、疎水性保持を強化
- 疎水性付与に伴う安定化で、耐久性は3倍に向上

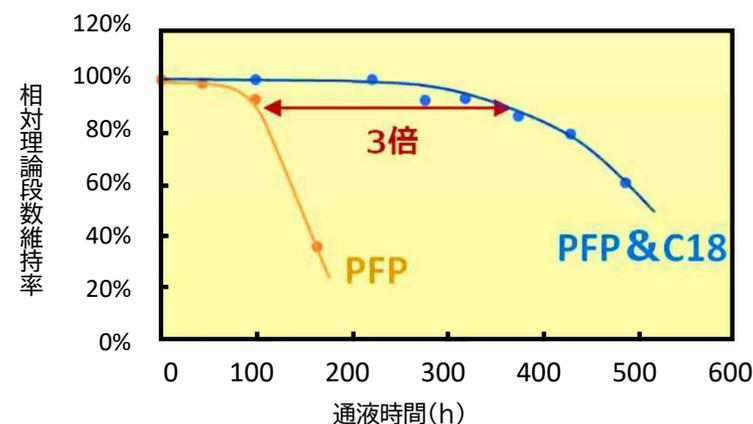
- C18をエンドキャッピングの一環で導入
- 高い疎水性保持力 + **安定性強化型 PFP**

耐久性テスト条件

Column: Sunniest 5 μm , 2.1m x 150mm
 Mobile phase: CH₃OH/20mM Phosphate buffer (pH 7.0) = 70/30
 Flow rate: 0.2 mL/min Temperature: 40 °C

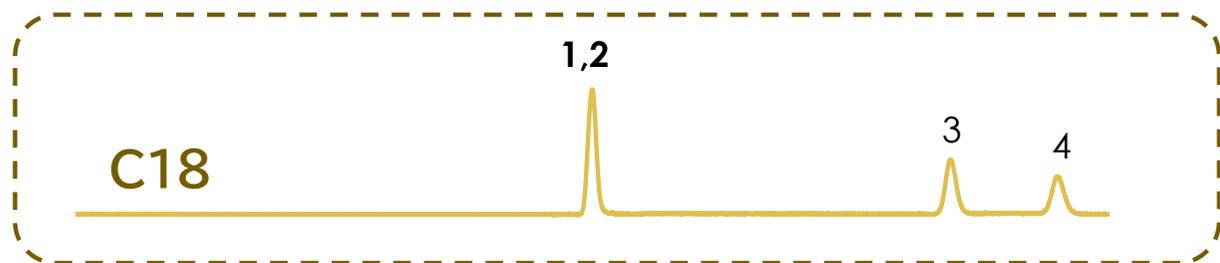
理論段数 測定条件 (結果は右図)

Mobile phase: CH₃OH/H₂O=70/30 (PFP&C18)
 CH₃OH/H₂O=60/40 (PFP)
 Flow rate: 0.2 mL/min Temperature: 40 °C
 Sample: Acenaphthene

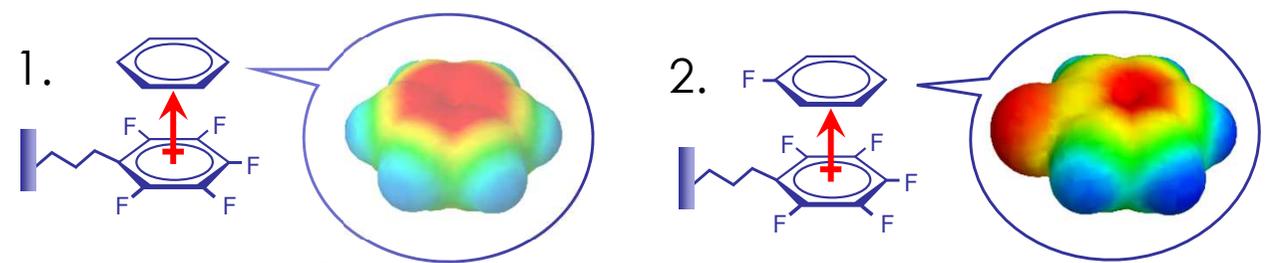


▶ 逆相HPLCでの汎用性を重視 C18ライクなPFP

②PFP&C18: フルオロベンゼンの分離

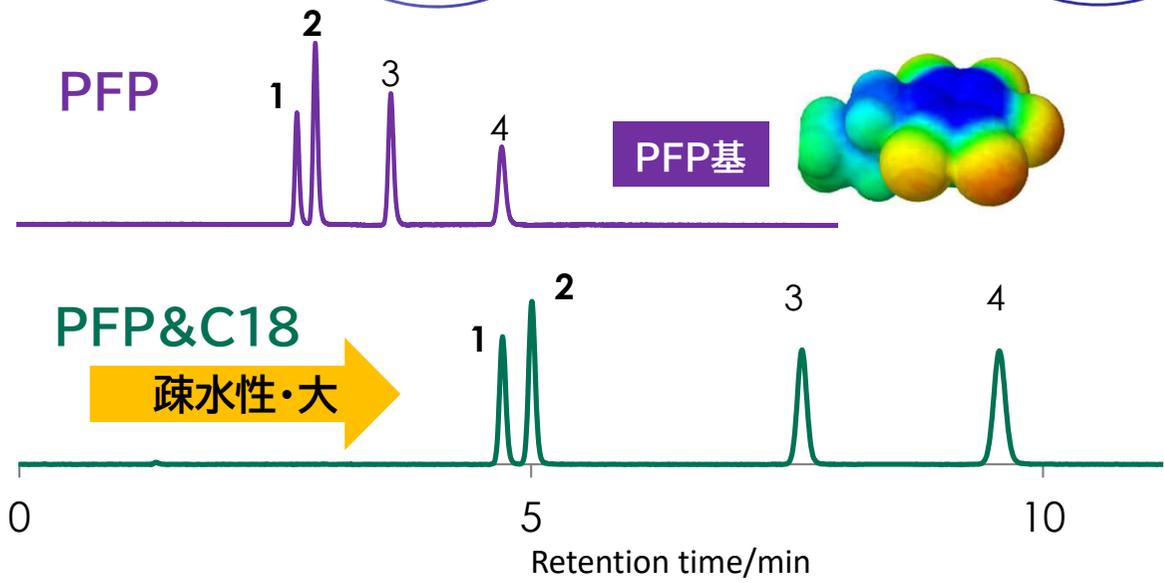


Column:
SunShell 2.6 μm , 4.6 x 150 mm
Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=60/40$
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 $^\circ\text{C}$
Detection: UV@250 nm



Sample:

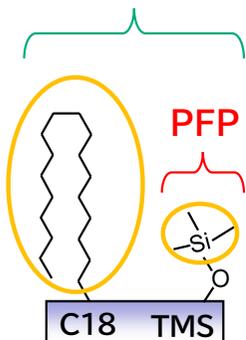
- 1. Benzene
- 2. Fluorobenzene
- 3. Toluene
- 4. a,a,a-Trifluorotoluene



▶ PFPの選択性はそのままに 疎水性保持力を強化

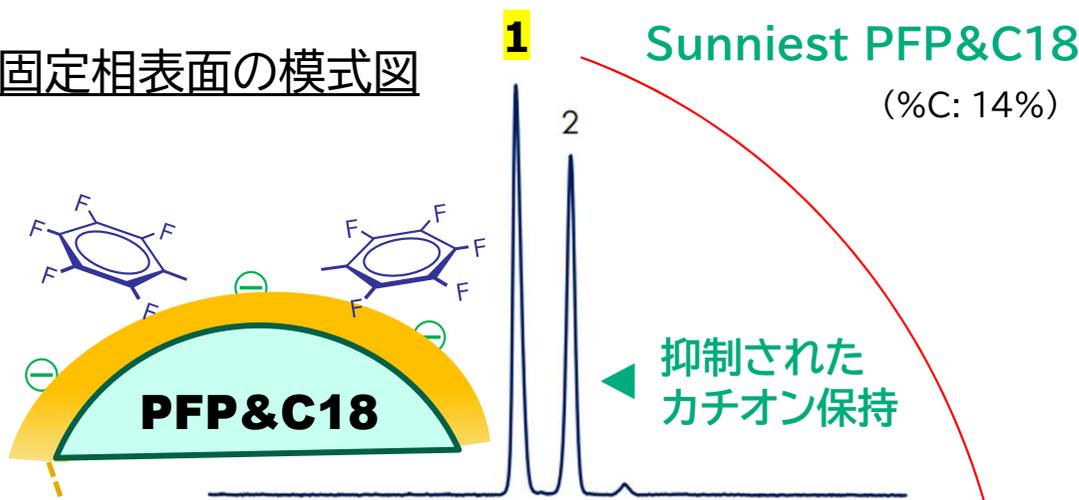
■ PFP系固定相の相違点: カチオン保持

PFP&C18



2次反応工程の差

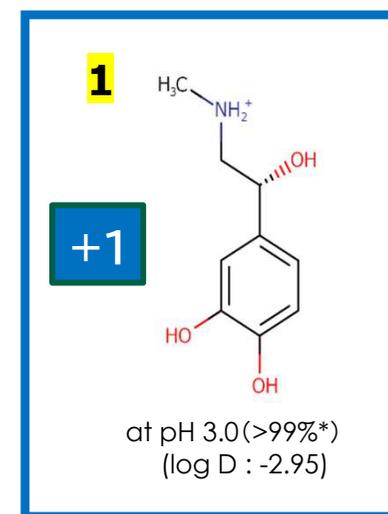
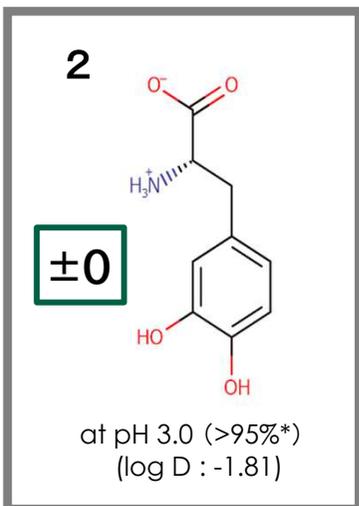
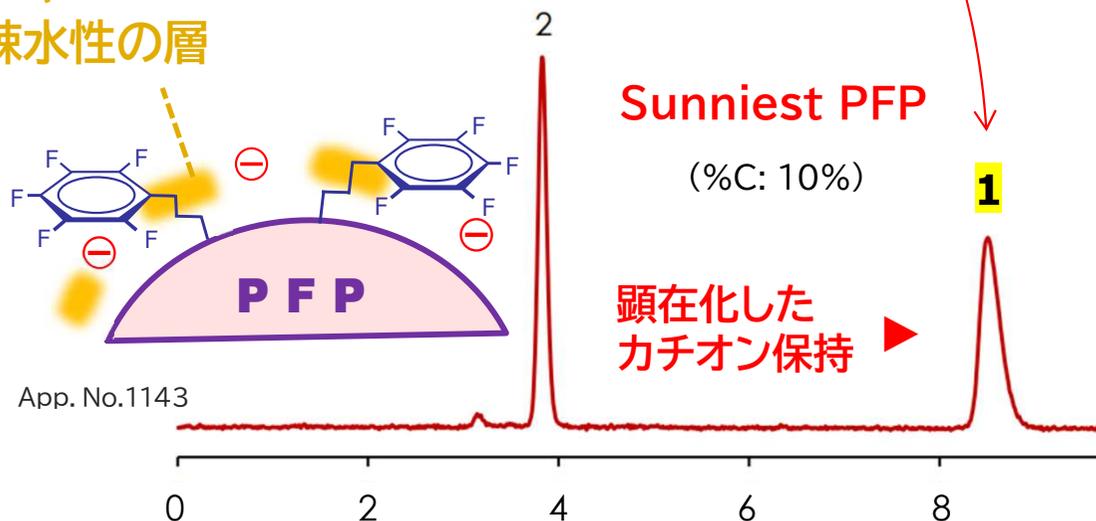
固定相表面の模式図



Column: 5 μ m, 150 x 4.6 mm
Mobile phase: 12.5 mM
Ammonium Formate (pH3)

Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 25 $^{\circ}$ C
Detection: UV@260 nm
Sample:
1 = Epinephrine
2 = Levodopa

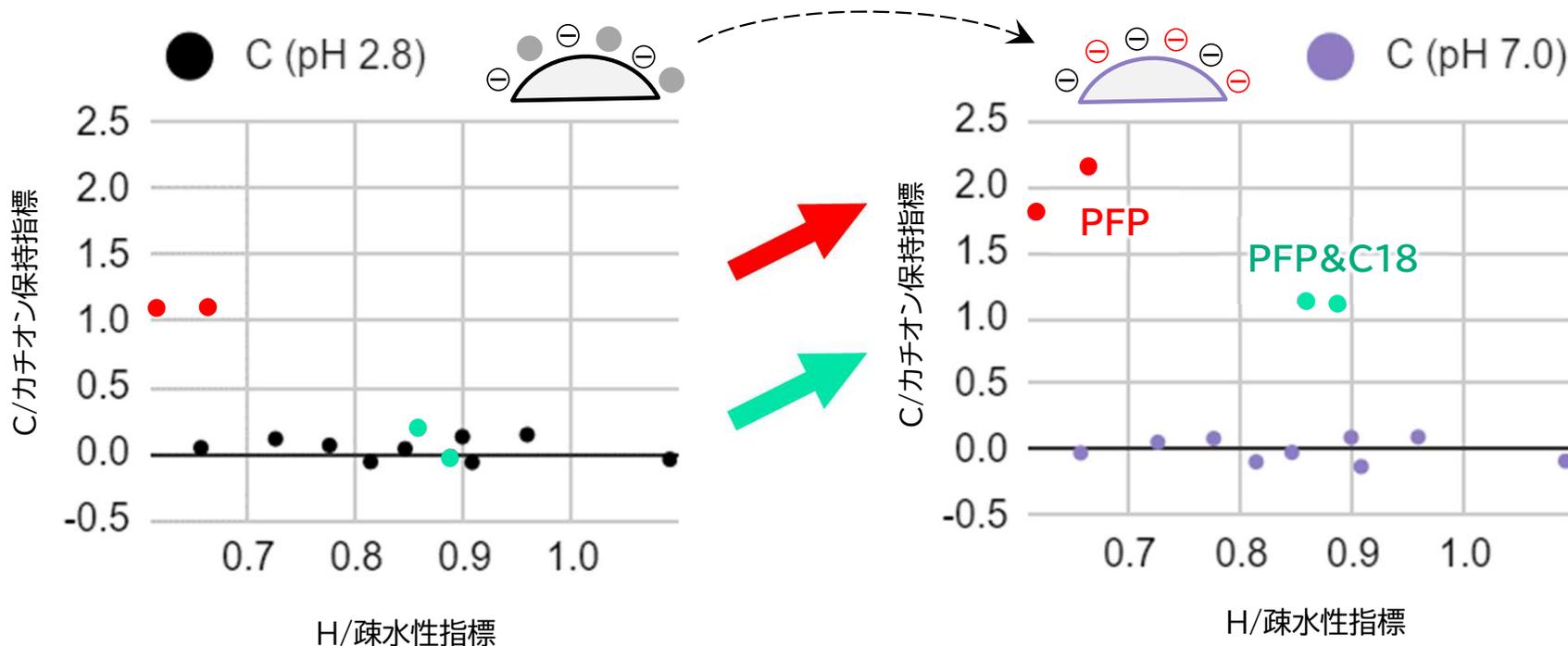
疎水性の層



▶ PFPは (PFP&C18より) カチオン保持が強い。

■ 逆相固定相13種の比較

C/カチオン保持指標
pH 2.8 → pH 7.0



- PFP系固定相4種
- Sunniest PFP
 - SunShell PFP
 - Sunniest PFP&C18
 - SunShell PFP&C18

- その他固定相9種
- Sunniest PhE
 - Sunniest Biphenyl
 - Sunniest C8
 - Sunniest RP-AQUA
 - SunShell Biphenyl
 - SunShell Phenyl
 - SunShell C8
 - SunShell RP-AQUA
 - SunShell C18
- Chemical reaction diagram: Si-OH + OH- -> Si-O- + H2O

----- エンドキャッピング様式の違い -----

PFP系: TMS end-capping ▶ 一般的な不活性化法

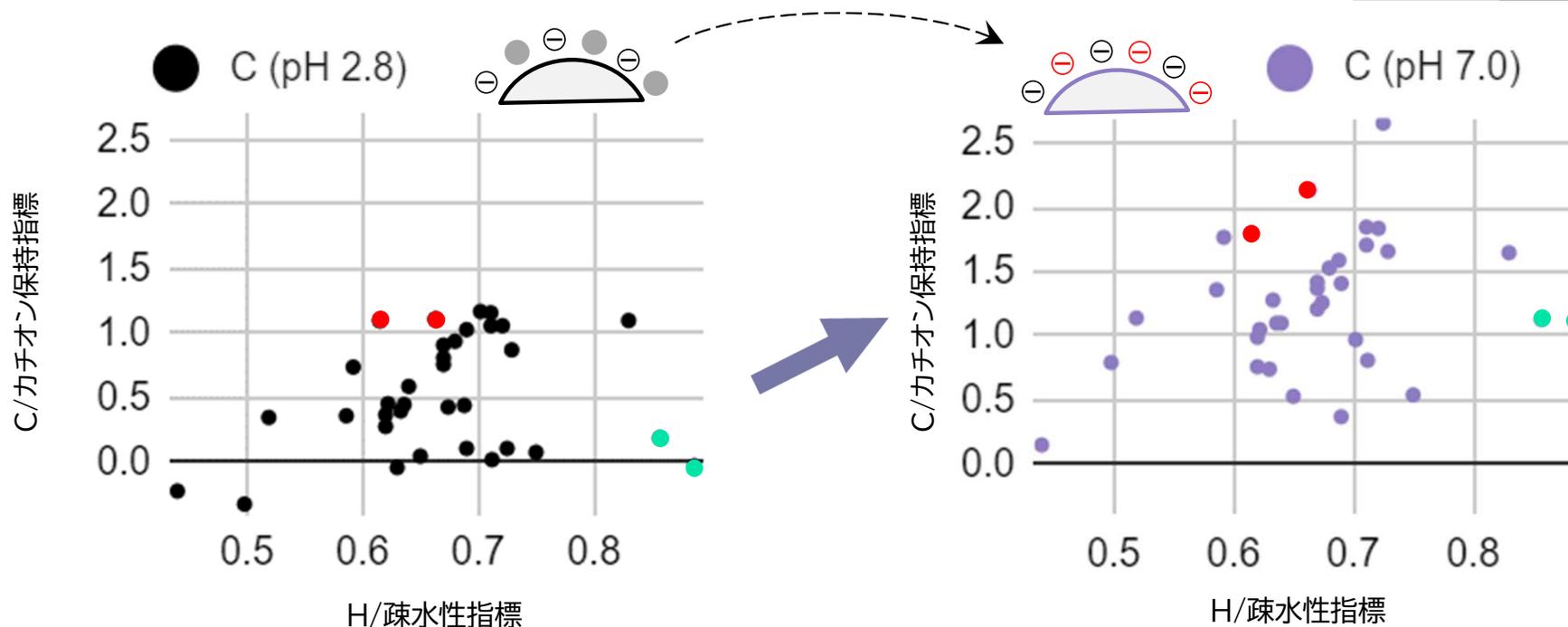
他: Sunniest end-capping ▶ 高温 & 高度不活性化法

固定相の性質上、高度不活性化法の適用が困難

▶ PFP&C18も 中性条件ではカチオン保持が働く。

■ PFP系固定相34種の比較

C/カチオン保持指標
pH 2.8 → pH 7.0



<PFP(F5)系カラム34種> (左列より、H値に基づき昇順に整理)

Ultra PFP
XSelect CSH Fluoro-Phenyl
Venusil PFP
YMC-Triart PFP
Xselect HSS PFP
Sunniest PFP
Viva PFP Propyl
Hypersil GOLD PFP

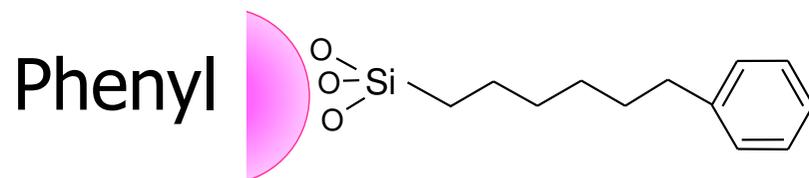
Ultra PFP Propyl
Poroshell 120 PFP
Svea PFP
Ultimate PFP
Pinnacle DB PFP Propyl
Pursuit PFP
SunShell PFP
Ultra II PFP Propyl

Fluophase PFP
Discovery HS F5
Selectra PFPP
Kinetex PFP 100A
Shim-pack Velox PFPP
Curosil-PFP
Fluophase RP
HALO PFP
Halo 5 PFP

Ascentis Express 5 F5
Nucleodur PFP
Ascentis Express F5
Kinetex F5
Accucore PFP
Luna PFP(2)
Allure PFP Propyl
Sunniest PFP&C18
SunShell PFP&C18

▶ 2次相互作用(カチオン保持)差異が PFPの多様性

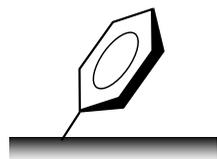
③Phenyl: 多様なPhenyl系固定相



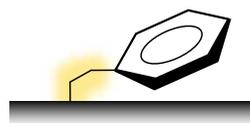
結合基: Phenylhexyl(一例)

- C18とは異なる選択性(π 相互作用が働く)
- 多種多様なPhenyl系固定相のバリエーション

USP L11登録固定相(Phenyl)の一例



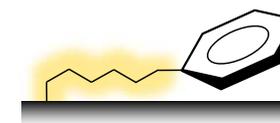
Phenyl



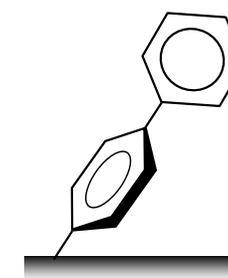
Phenylethyl



Phenylpropyl



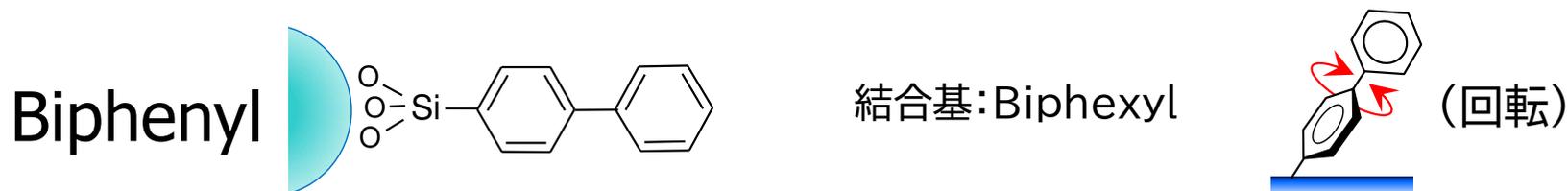
Phenylhexyl



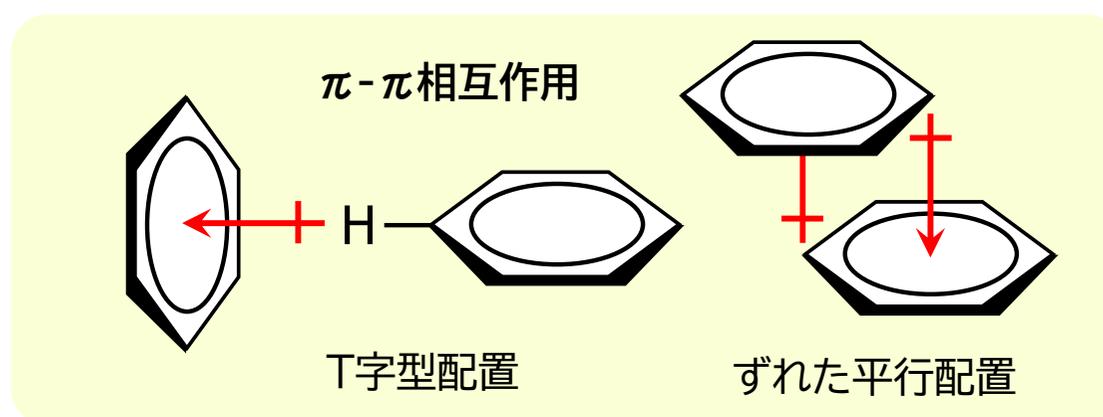
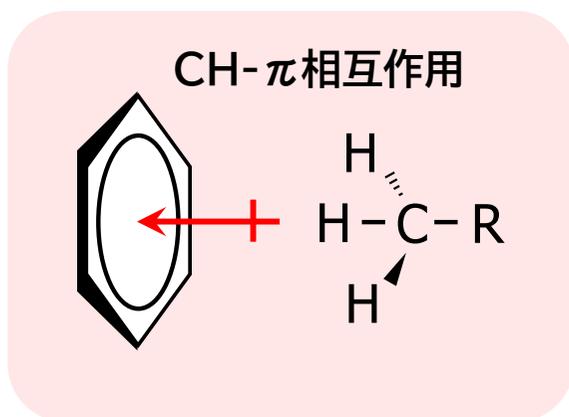
Bihenyl

▶ 主にアルキル鎖長とフェニル基のバランスの違い。

④Biphenyl: π 相互作用を最大化



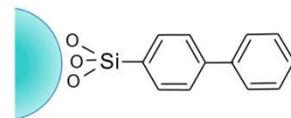
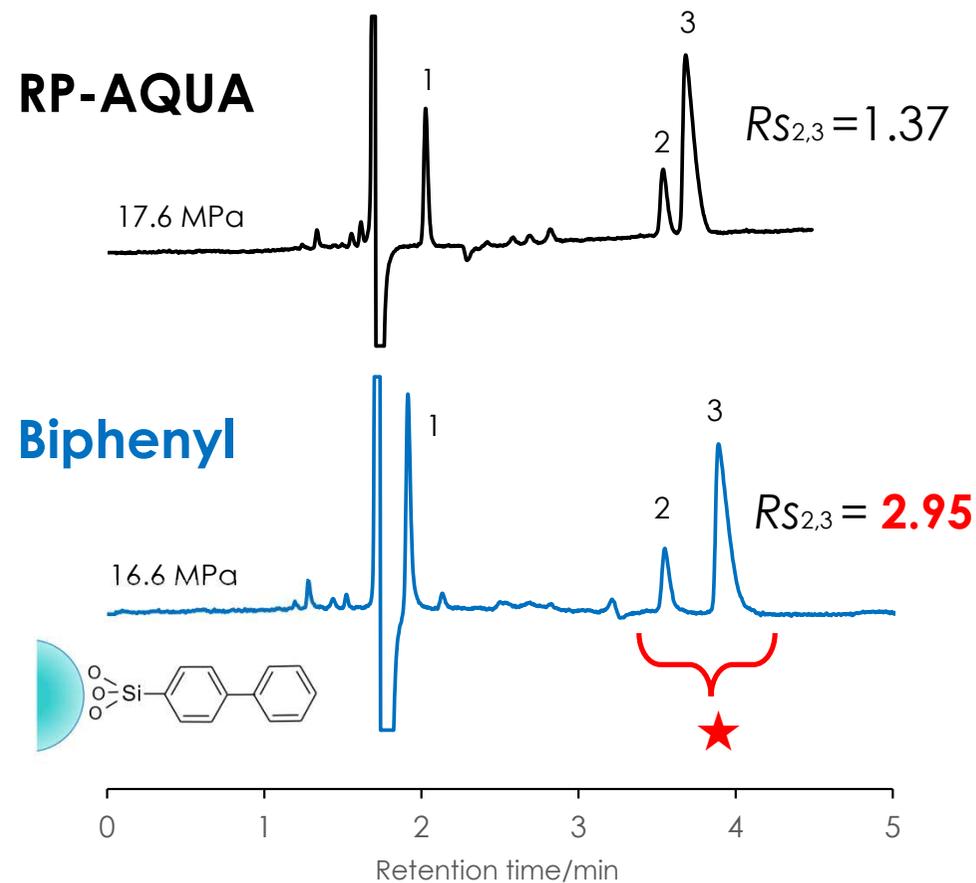
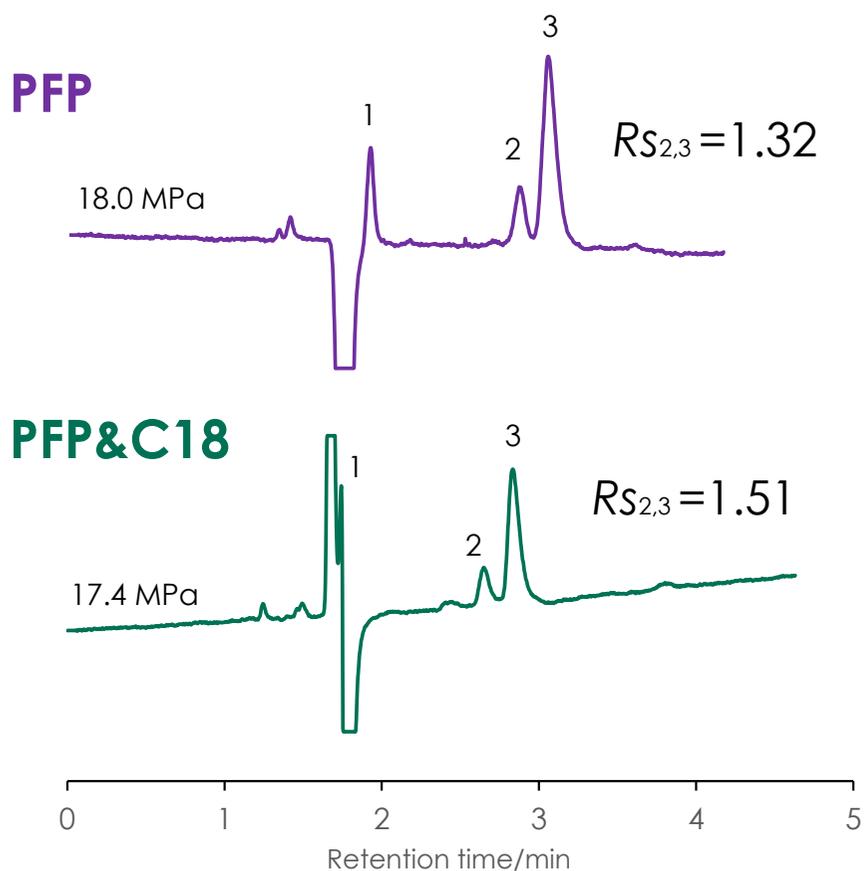
- アルキル鎖を介さない 二連のPhenyl基固定相
- ユニークな分離特性 π 相互作用に基づく選択性



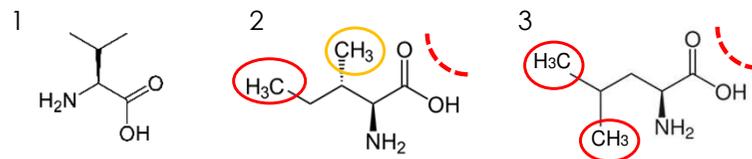
他の π 相互作用 カチオン- π 相互作用, ハロゲン- π 相互作用, π 水素結合(NH- π 相互作用, OH- π 相互作用)等

▶ 特に CH/ π 相互作用に基づく選択性が際立つ

④Biphenyl: イソロイシン、ロイシン分離

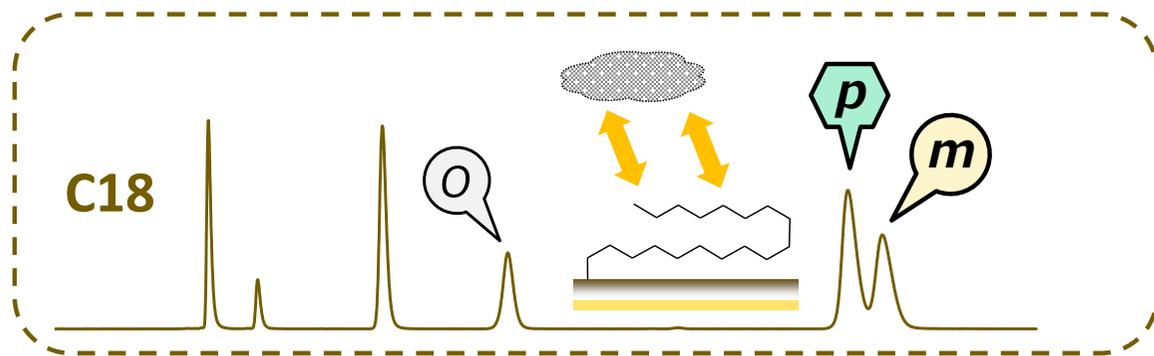


Column: SunShell RP-AQUA , PFP , PFP&C18 , Biphenyl 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: 0.1% formic acid Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C
 Detection: UV@205nm Sample: 1 = L-Valine 2 = L-Isoleucine 3 = L-Leucine



▶ 分岐位置の異なる構造異性体同士を 良好に分離

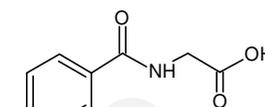
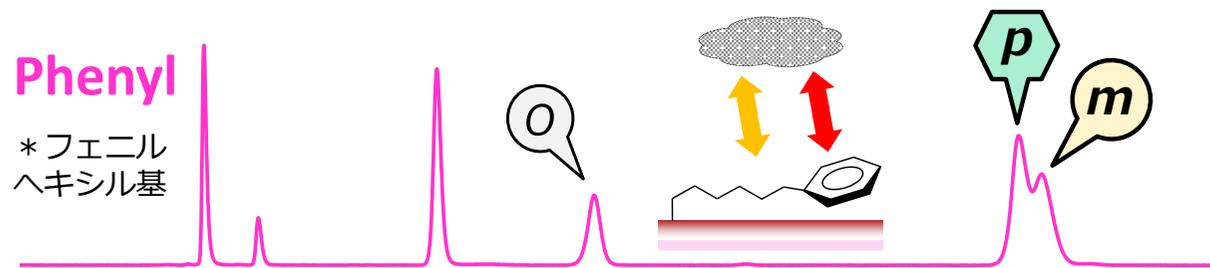
●Phenyl系固定相の選択性の違い



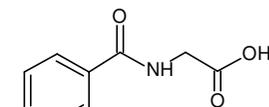
Column: SunShell 2.6 μ m 100 x 2.1mm
 Mobile phase: 2-Propanol / 20 mM
 Ammonium acetate (pH 6.8) = 3/97
 Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 40 °C
 Detection: UV@230 nm
 Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid

Phenyl

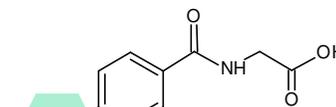
*フェニル
ヘキシル基



o-メチル馬尿酸

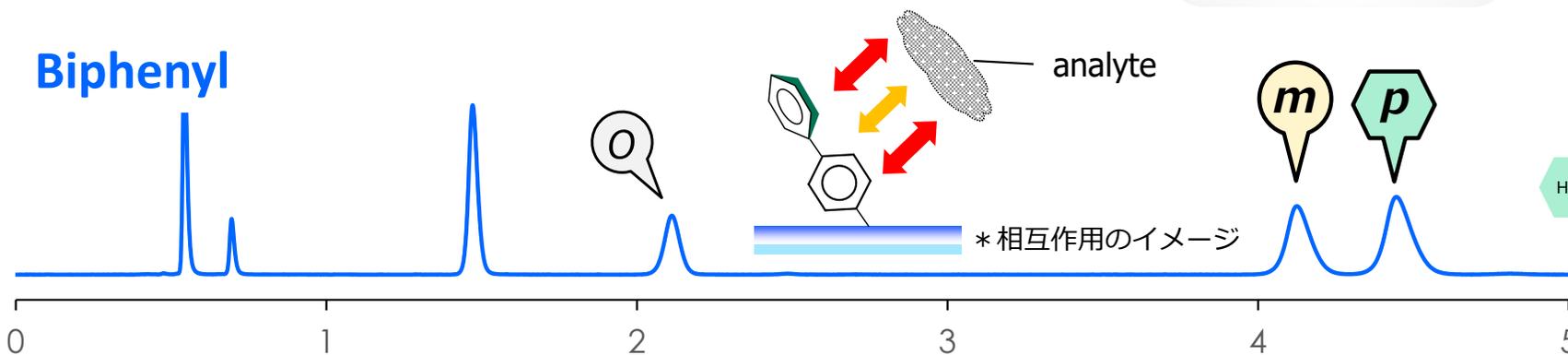


m-メチル馬尿酸



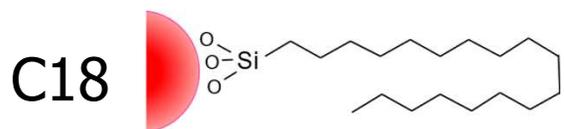
p-メチル馬尿酸

Biphenyl

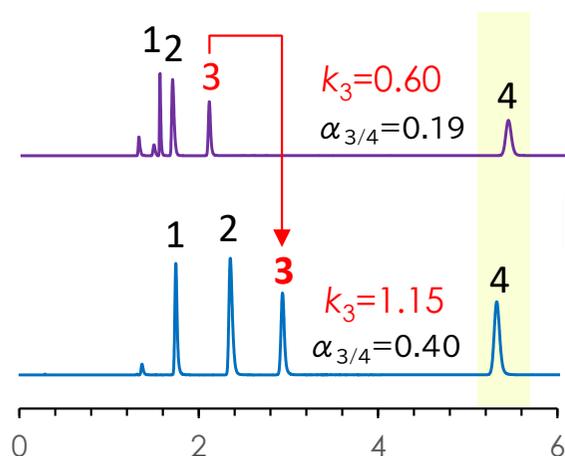


▶ 疎水基とフェニル基のバランスが 選択性を生む。

●Biphenyl: CH₃基に対する強い認識



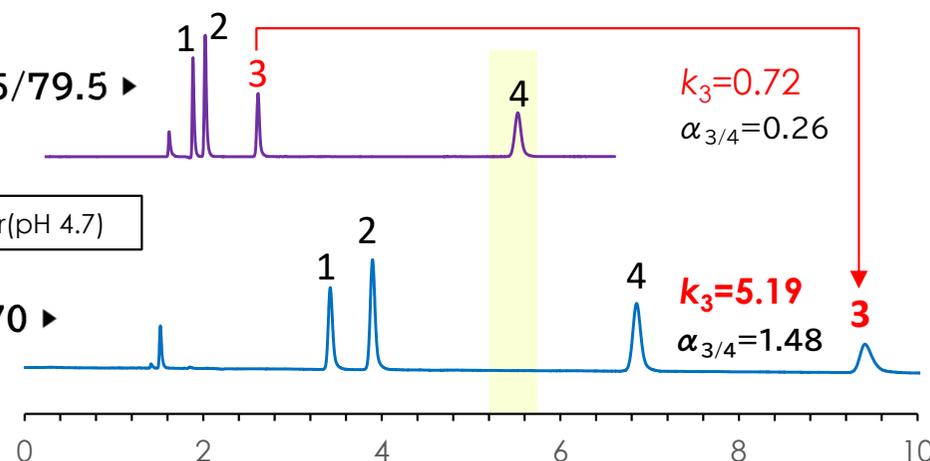
Column:
SunShell 2.6 μm150 x 4.6 mm
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@250 nm
Mobile phase: shown below
Sample: shown below



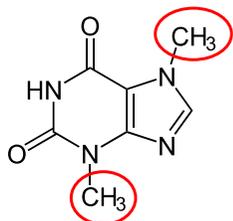
◀ Acetonitrile/Buffer* = 20.5/79.5 ▶

* 20 mM Ammonium Acetate Buffer (pH 4.7)

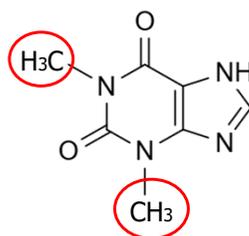
◀ Methanol/Buffer* = 30/70 ▶



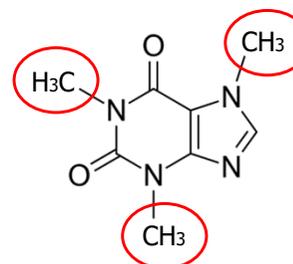
1. Theobromine



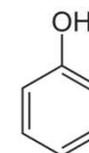
2. Theophylline



3. Caffeine



4. Phenol



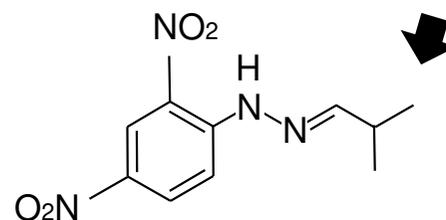
▶ メタノール移動相下で 各種π相互作用が強まる。

●Biphenyl: CH₃基の結合状態を認識

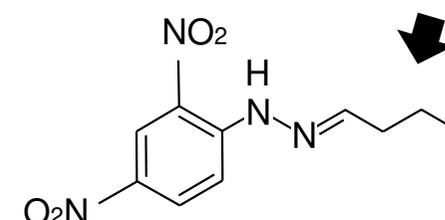
Column: SunShell 2.6 μm, 150 x 4.6 mm
 Mobile phase:
2-propanol : **Methanol** : Water = 25:40:35

Temperature: 40 °C
 Detection: UV@360 nm

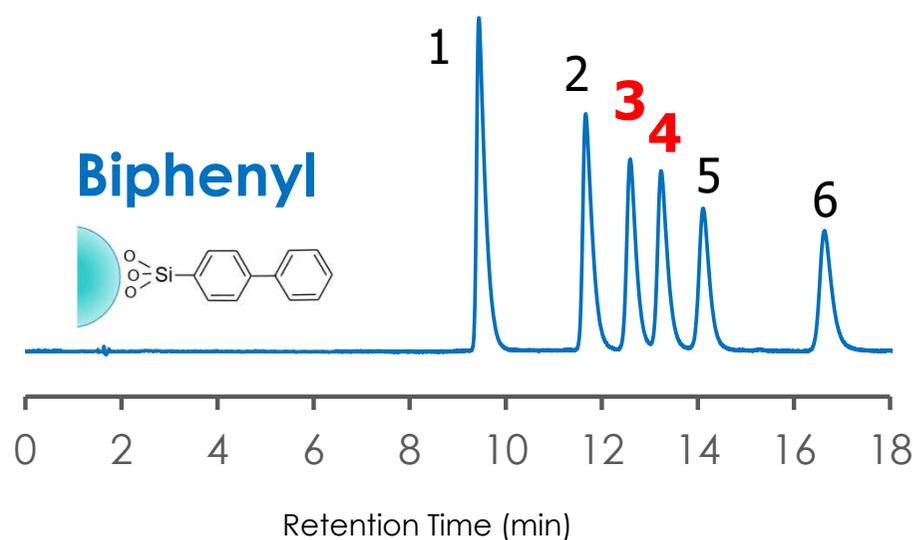
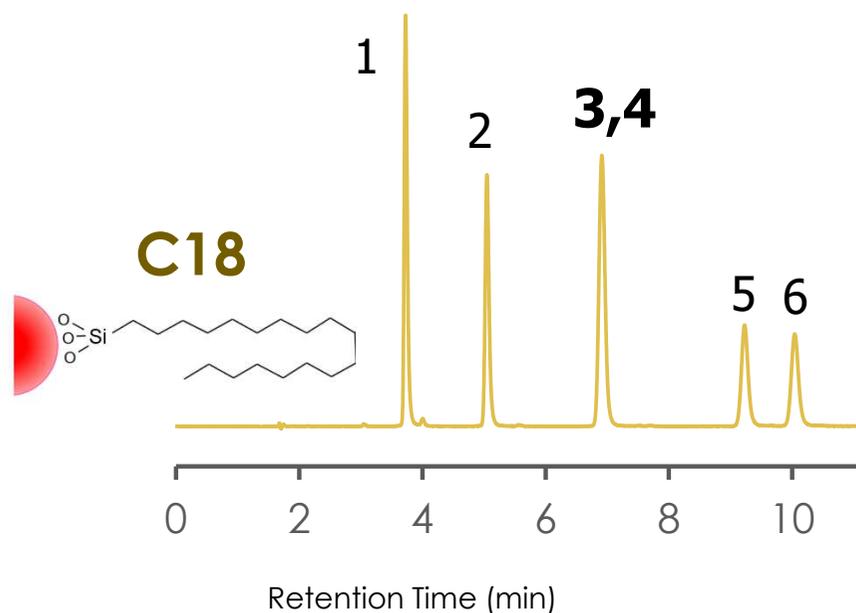
- Sample:
1. Acetaldehyde-DNPH
 2. Propionaldehyde-DNPH
 3. iso-Butyraldehyde-DNPH
 4. n-Butyraldehyde-DNPH
 5. iso-Valeraldehyde-DNPH
 6. n-Valeraldehyde-DNPH



3. iso-Butyraldehyde-DNPH

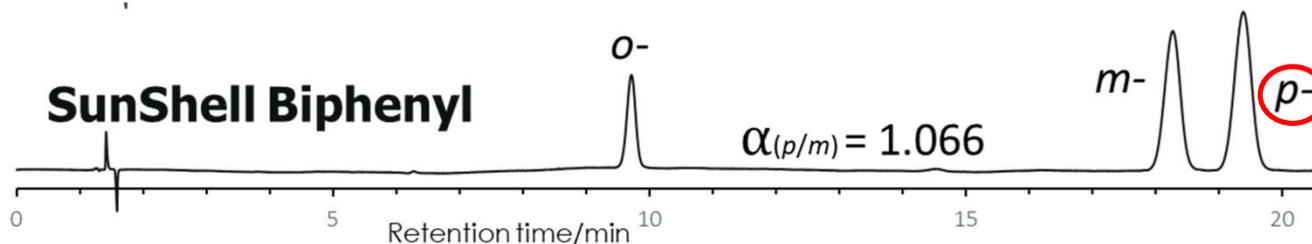
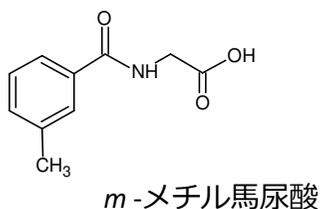
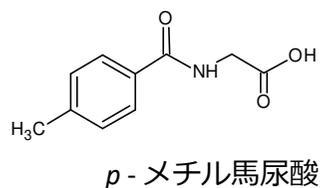
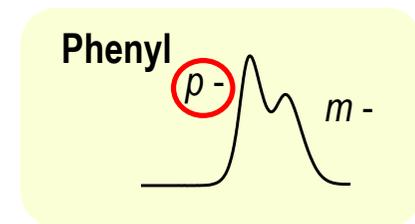
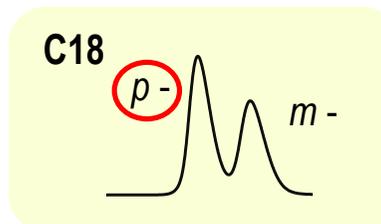


4. n-Butyraldehyde-DNPH

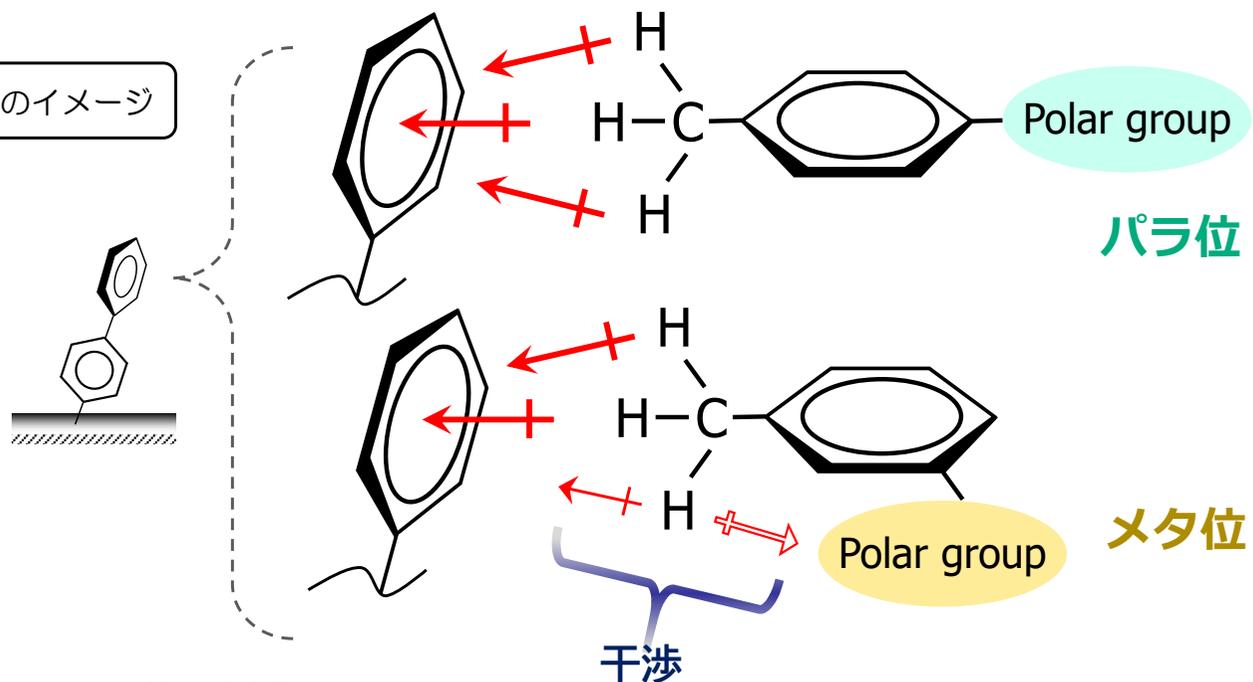


▶ 分岐鎖・直鎖構造異性体を分離 (MeOH+IPA)

● CH/π 選択性モデル



相互作用のイメージ



Column:
 2.6 μm (Core-Shell) 150 x 4.6 mm
 Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C
 Mobile phase:
 2-Propanol/25 mM Phosphate buffer (pH 3.0)
 Detection: UV@230 nm
 Sample: *o*-, *m*-, *p*-Methylhippuric acid

Biphenylの (←+)

分析種の (+⇔)

▶ CH/π相互作用と 分子内相互作用との綱引き

●Biphenyl 4種比較：塩基性化合物

シラノール高度不活性法の適用によって、
水素結合性が減少し、
疎水性保持が増大

α (C/P)

水素結合性 = α (Caffeine/Phenol)

疎水性保持
= k_A

疎水選択
= α (A/B)

形状認識 = α (T/o)

A Biphenyl
B Biphenyl
C Biphenyl

SunShell
Biphenyl

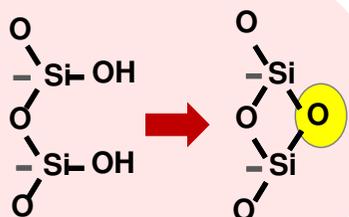
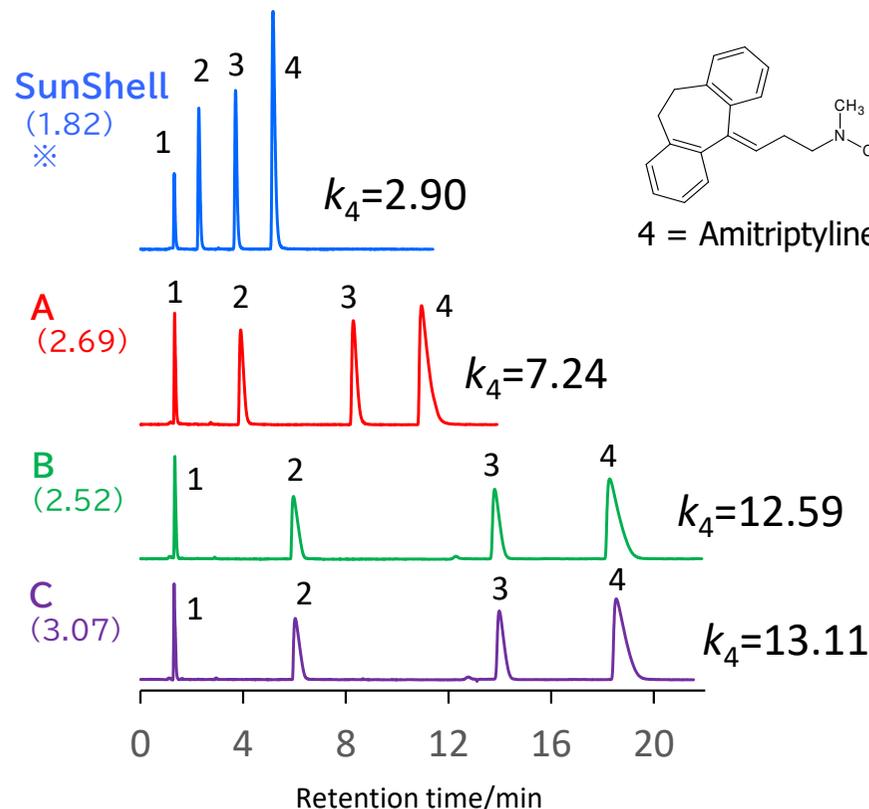


図. Biphenyl固定相4種(SunShell, A, B, C)の選択性比較

各種パラメータの最高値を100%とした場合の相対比較チャート

塩基性化合物の吸着性試験 ※()内は、 α (C/P)



Column: Biphenyl 2.6 μ m or 2.7 μ m Mobile phase:
150 x 4.6 mm CH₃CN/10 mM Ammonium
Flow rate: 1.0 mL/min, acetate pH 6.8 = 40/60
Temperature: 40 °C Detection: UV@250 nm
Sample: 1=Uracil, 2=Propranolol, 3=Nortriptyline, 4=Amitriptyline

▶ 高度不活性処理で 塩基性化合物の吸着を抑制

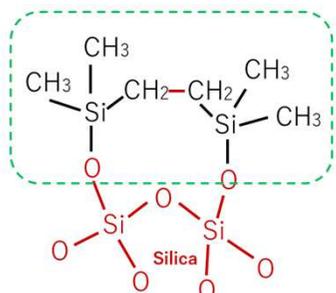
汎用HPLC向け 決定版カラム & カラム管



(2022年)



(2023年)



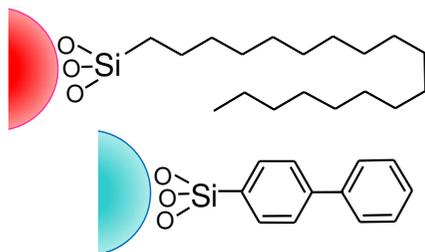
Prominer推奨pH範囲
 1 - 12(C18)
 1 - 10(Biphenyl)

Tandem TMS

高耐久型エンドキャッピング法

ワイドなpHレンジ

 **3.5 μm**
 高効率粒子



更なる分離向上に

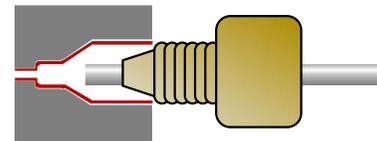
実質
メタル
フリー

有機不活性化層

焼結フィルター

カラム内壁

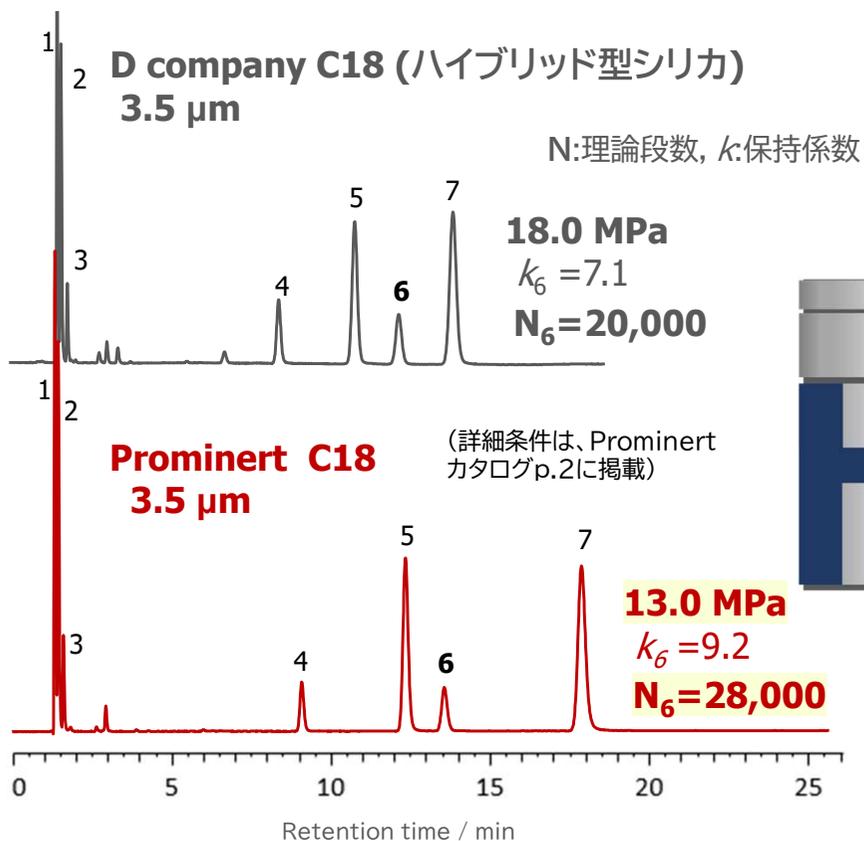
Stainless Steel



接続良好

高吸着性化合物に

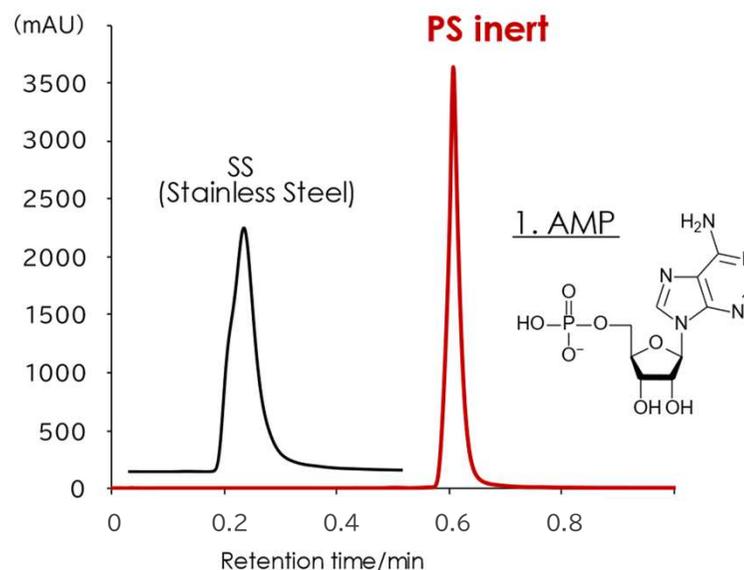
充填剤 ◀汎用HPLCの可能性を拡張▶ 素管



▶ 低圧力で高理論段数



セミオーダー対応(通常品価格+25,000円)



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

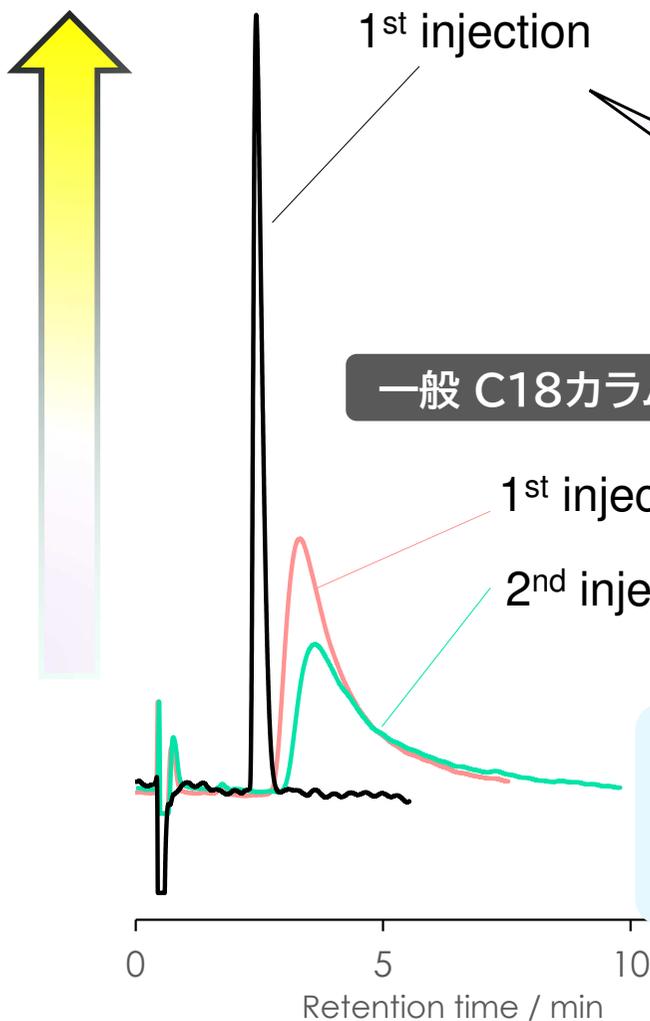
Detection: UV@254 nm Column Temperature: 40 °C
Flow rate: 0.45 mL/min Instrument: LC2060C MT(Shimadzu)

▶ 吸着抑制にて強度向上

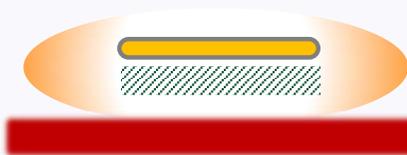
【新製品】 SunShell Peptide C18

(2024年)

SunShell Peptide C18



低吸着・不活性技術



Wide poreコアシェル粒子

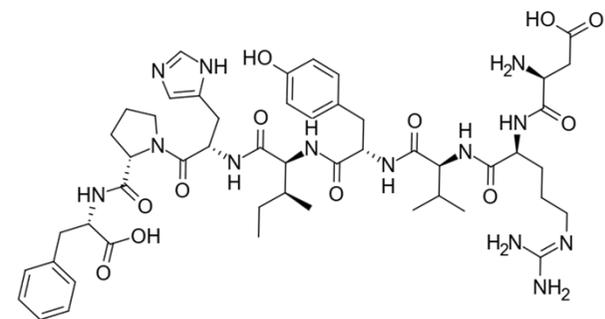


一般 C18カラム

一般C18カラムの場合、**ギ酸条件下**でペプチドピーク形状が崩れやすく安定化にも時間を要する。

イオンペア効果を有するTFAを添加すればペプチドピークは改善するが、LC/MSにて**イオン化抑制**が生じるなどの問題がある。

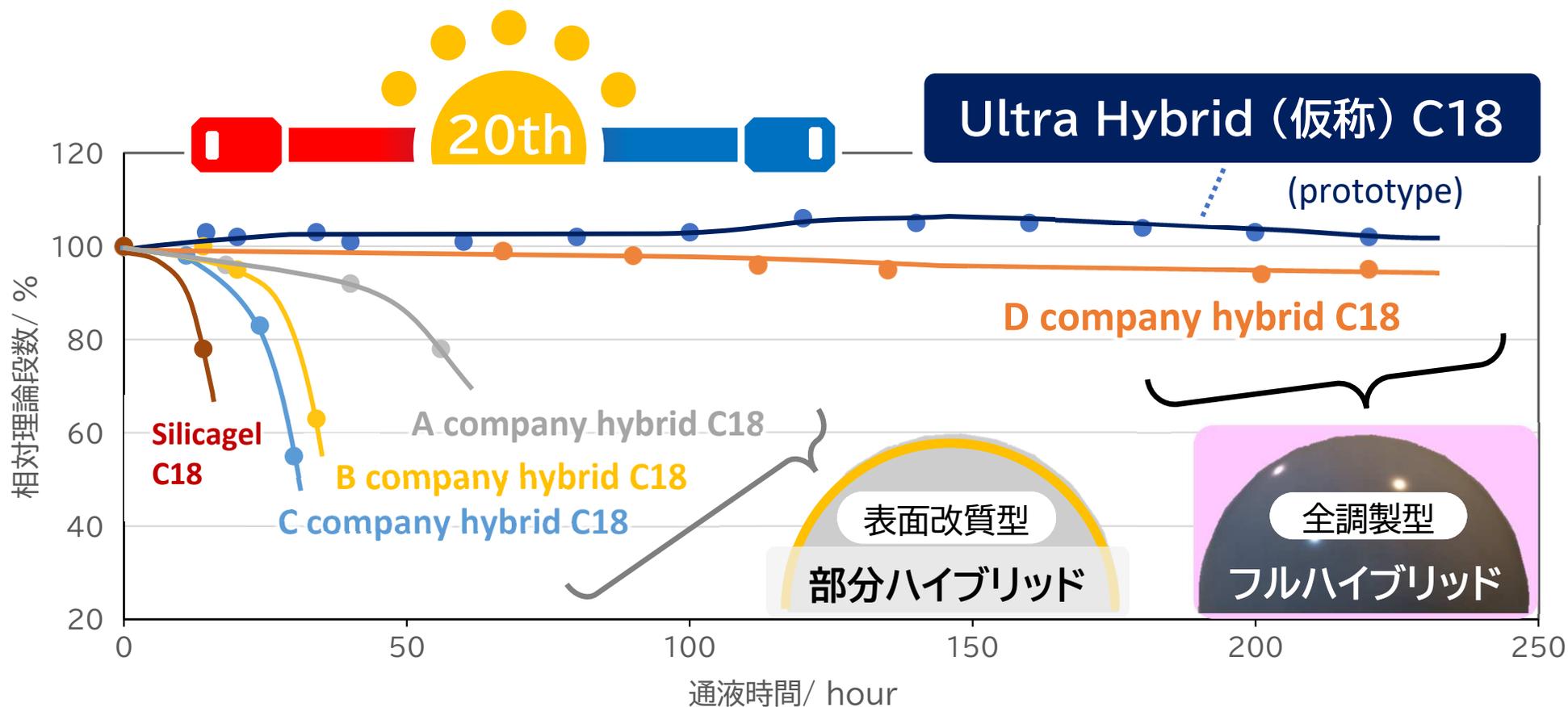
Column: SunShell Peptide C18 , general C18
 Column dimension: 2.1 x 50 mm, 2.6 μm
 Mobile phase: Acetonitrile/**0.1% formic acid in water**=15/85
 Flow rate: 0.3 mL/min,
 Temperature: 40 °C, Detection: UV@210 nm
 Sample: Angiotensin II



▶ **ギ酸条件下で 優れたピーク強度**

LC/MSに最適

【予告】ウルトラハイブリッドカラム (2025年)



耐久性試験条件

Column: Ultra Hybrid(仮) C18, D company hybrid C18, A company hybrid C18, B company hybrid C18, C company hybrid C18, 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: Methanol/50mM potassium phosphate pH 11.5 = 10/90
 Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40 °C

測定試験条件

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=70/30
 Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C
 Sample: 1 = Butylbenzene

▶ 当社史上最安定 異次元の耐久性を有した充填剤

◆逆相LCで、そもそも保持できない場合

(例)

- 糖

高極性化合物

水溶性が極めて高く 疎水性相互作用が殆ど働かない。

- アミノ酸

酸・塩基の双性イオンを持つため pHを一方に振っても極性は高いままとなり、疎水性相互作用が殆ど働かない。



C18 (ODS)

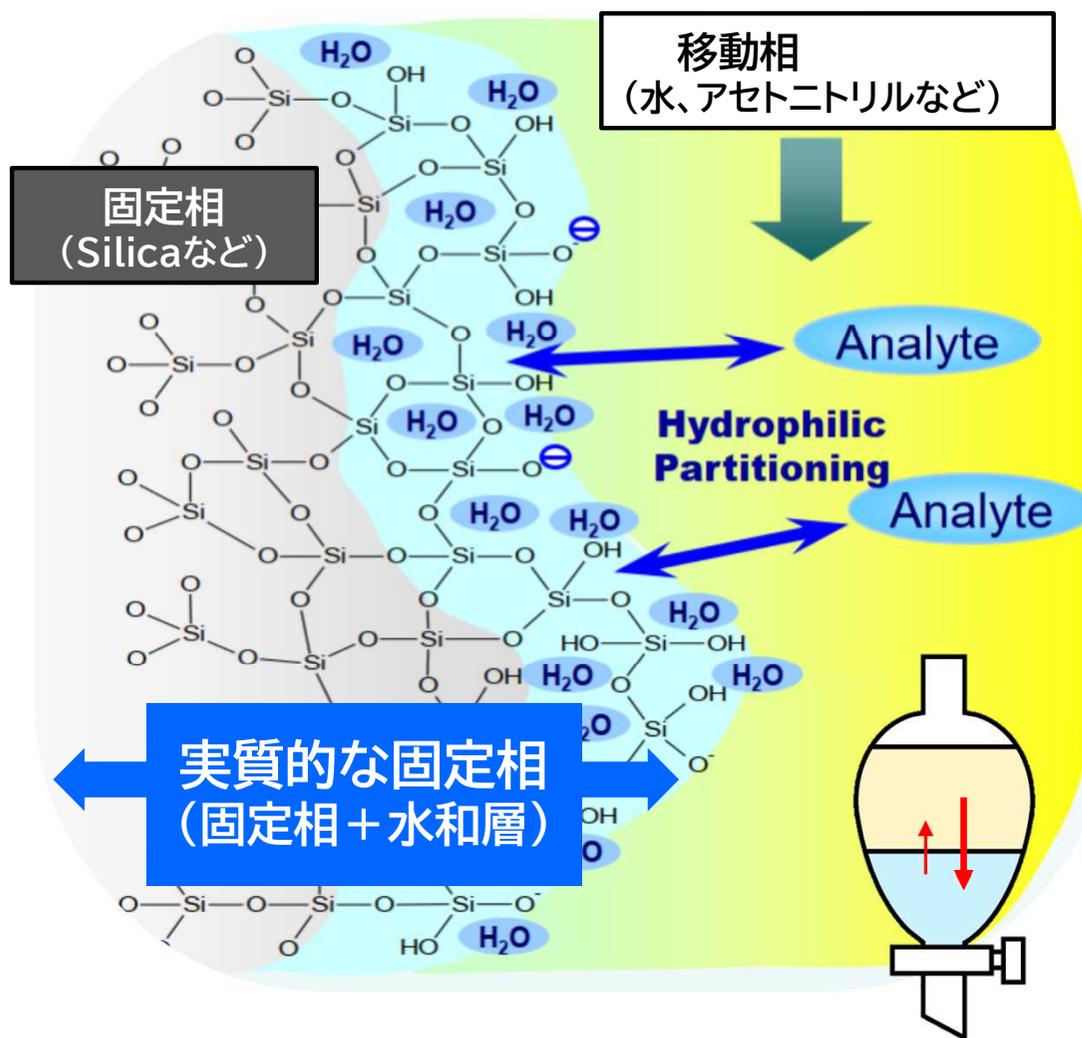
対策:

配位子交換(糖・糖アルコール)、イオン交換(アミノ酸)、誘導体化逆相分析、又はイオン対クロマトグラフィー等

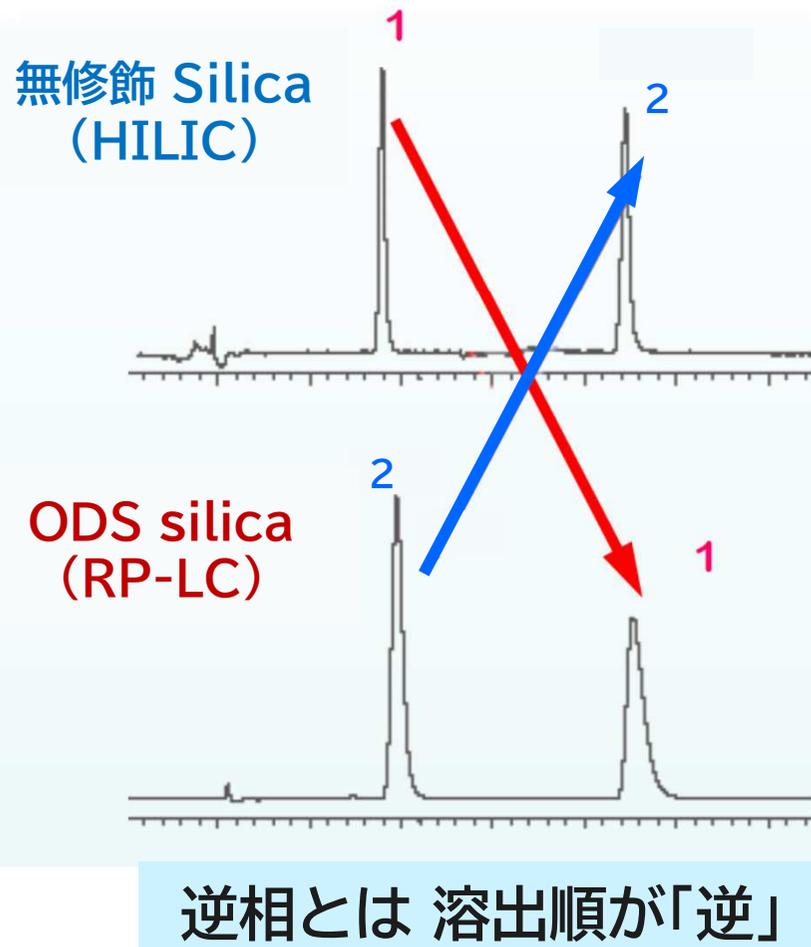
▶ 親水性化合物を狙って保持する分析モードの活用

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)

シリカゲル固定相表面の、親水性相互作用のイメージ

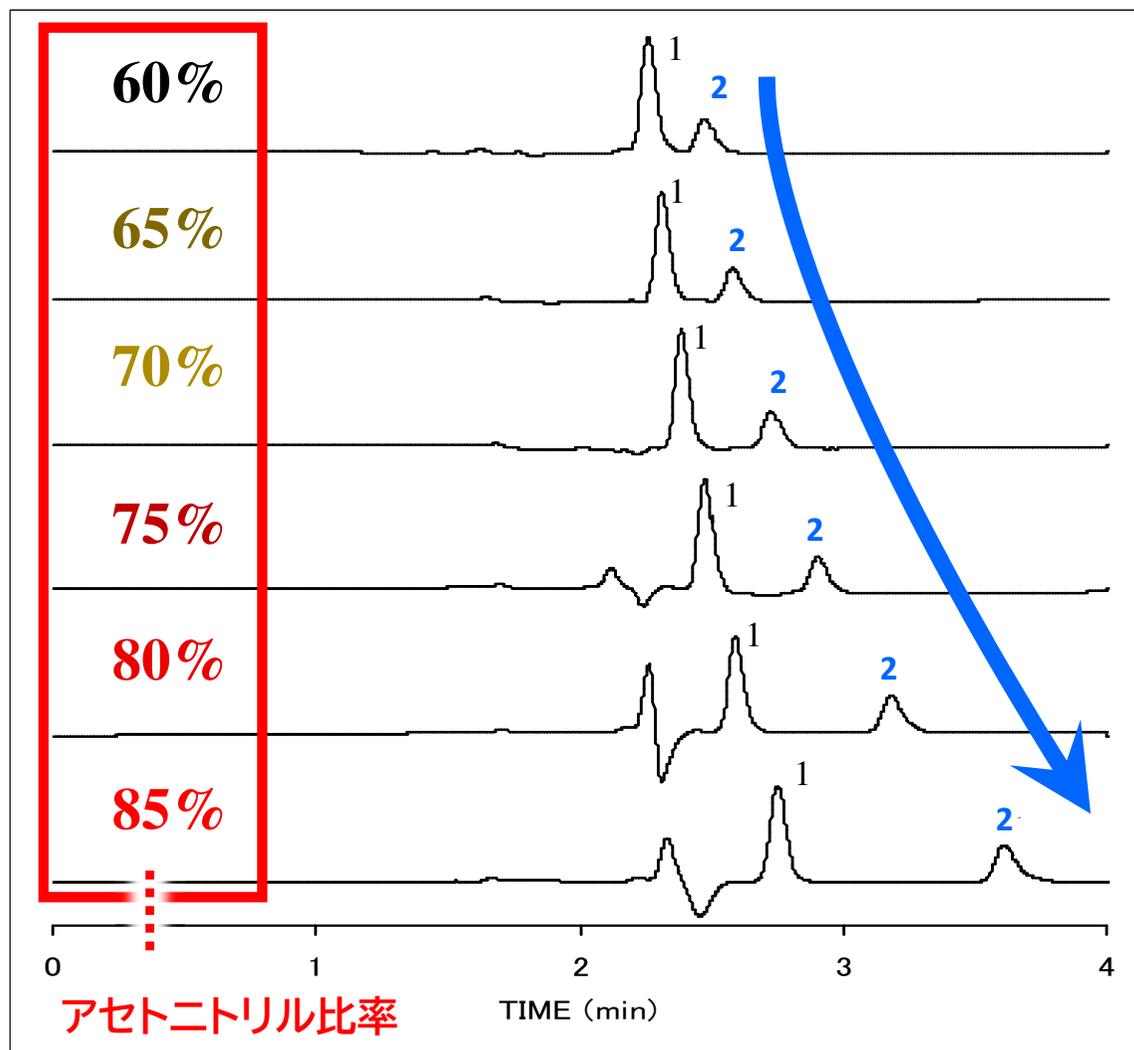


1 = 疎水性化合物 2 = 極性化合物



▶ 固定相の担持した水和層が 分配固定相として機能

◆親水性保持と、有機溶媒比率との関係



Column: Silica 1, 4.6x150mm

Mobile phase: Acetonitrile/10mM phosphate (pH4.5) = (60:40), (65:35), (70:30), (75:25), (80:20), (85:15)

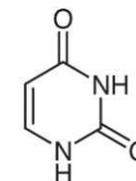
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

Detection: UV@220nm

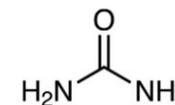
Sample: 1 = Uracil

logP = -1.07



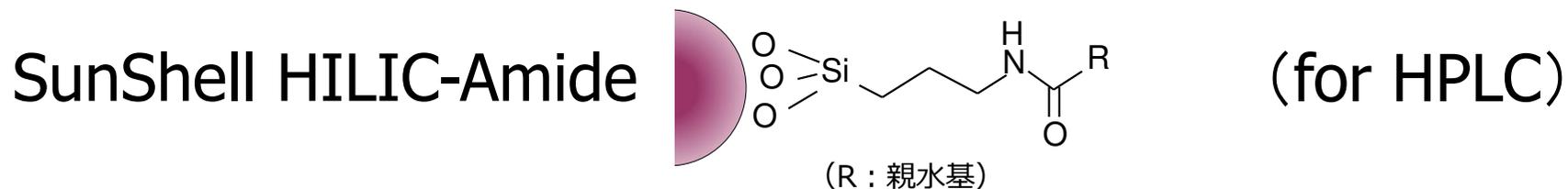
2 = Urea

logP = -2.11

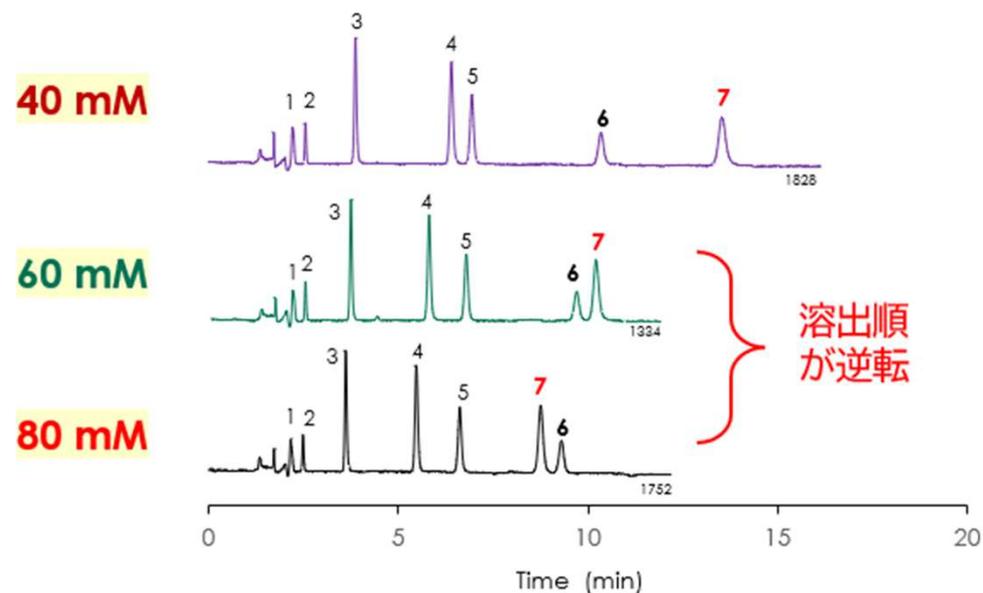
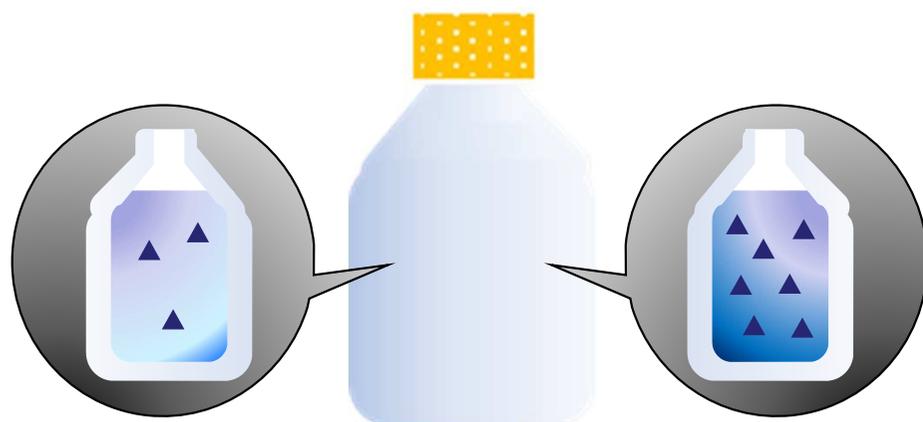


▶ 有機溶媒の比率が高いほど 親水性保持力も向上

⑤ HILIC Amide : 高活性型HILIC固定相



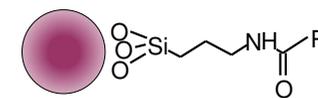
- アミド系親水基の活性による高い親水性保持力
- 塩濃度のコントロール等で 選択性が一部変化



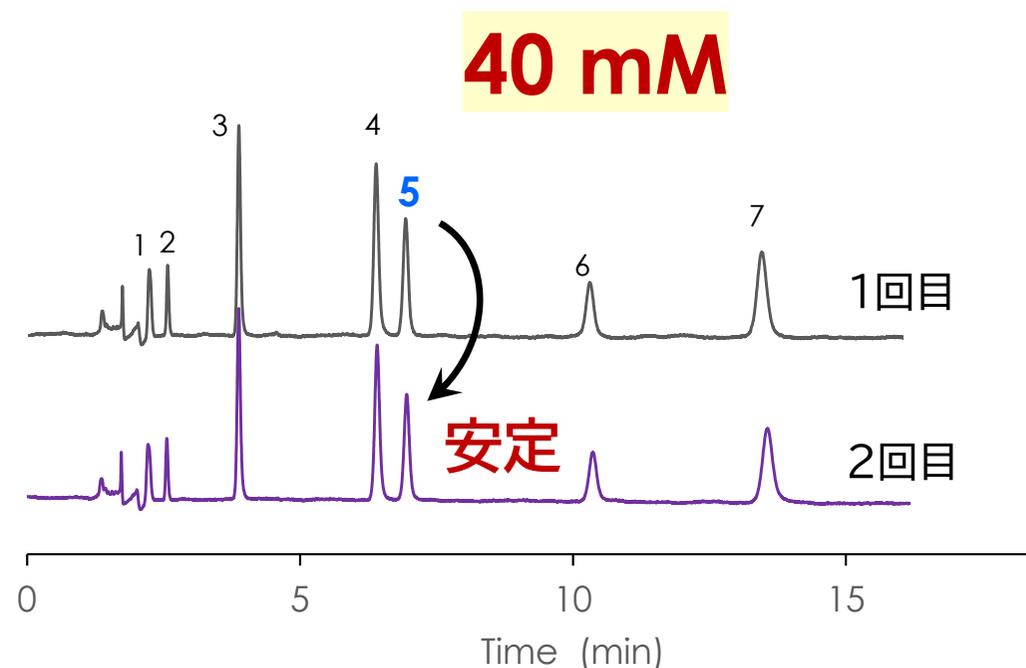
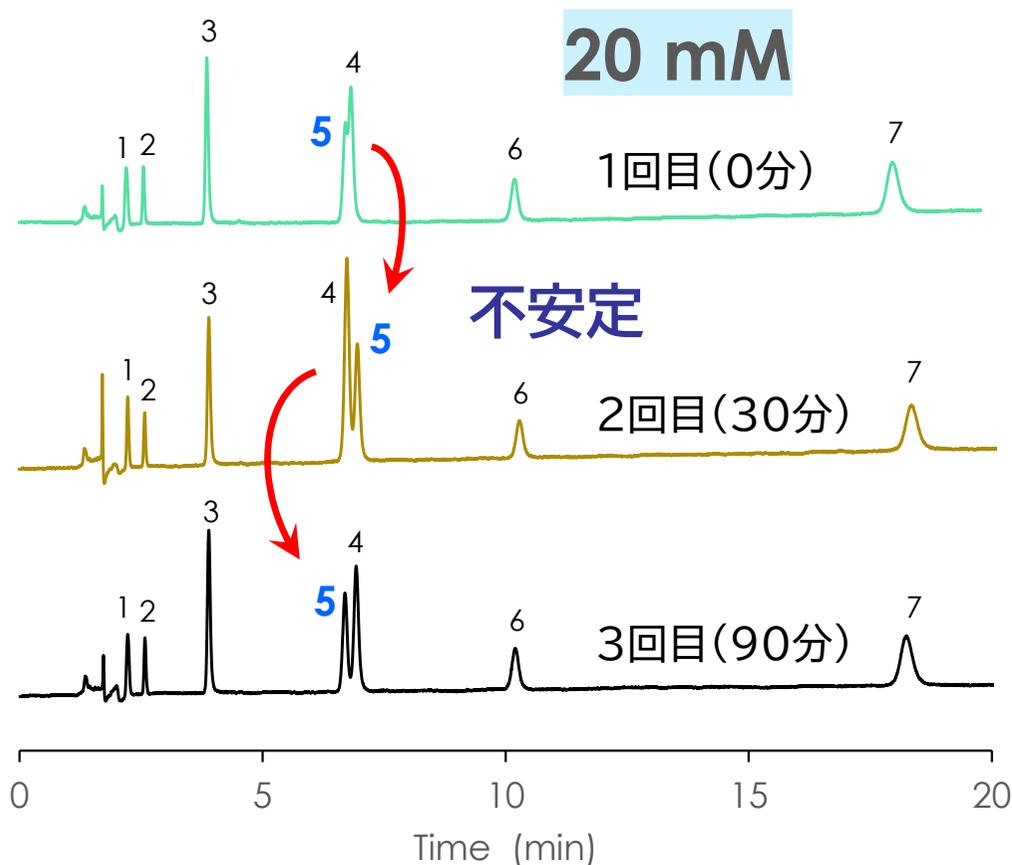
▶ 塩の種類・濃度制御が HILIC-Amide活用のコツ

◆平衡化時間と、保持挙動

SunShell HILIC Amide



Nucleobases

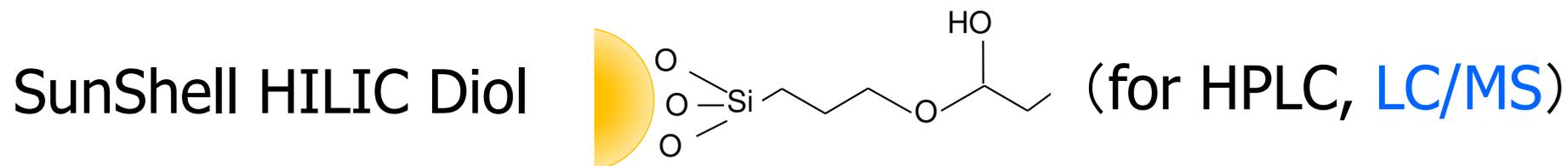


HILICモードは 塩濃度が重要因子

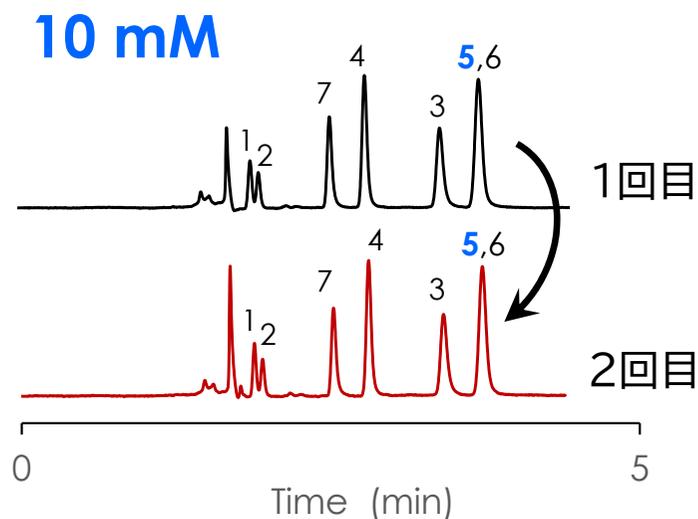
Column: SunShell HILIC-Amide 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm, Mobile phase: CH₃CN/X mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7)=90/10, Flow rate:1.0 mL/min, Temperature: 40 °C, Detection: UV@250nm, Sample: 1.Thymine, 2.Uracil, 3.Adenine, 4.Hypoxanthine, 5.Cytosine, 6.Guanine, 7.Xanthine

▶ 早期の平衡化には「塩濃度高め」での調製が有効

⑥ HILIC Diol : 高安定型HILIC固定相



- ジオール基による シンプルな親水性相互作用
- 平衡化が迅速。低塩濃度で 安定な分析が可能



保持力が弱い一方 安定化も早い。

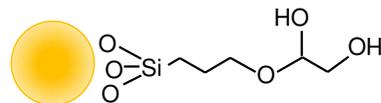
Column: SunShell HILIC Diol 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃CN/10 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7) = 90/10
 Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40 °C, Detection: UV@250nm
 Sample: 1.Thymine, 2.Uracil, 3.Adenine, 4.Hypoxanthine, 5.Cytosine,
 6.Guanine, 7.Xanthine

▶ 低い塩濃度で扱える事から LC/MSと相性が良い。

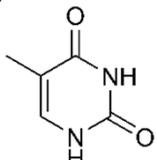
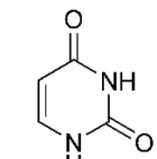
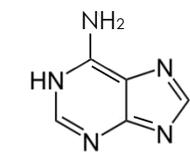
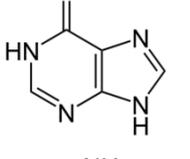
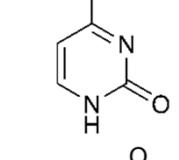
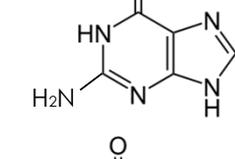
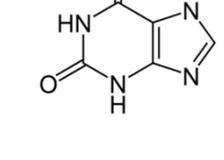
塩濃度を変化させた場合の挙動

Nucleobases

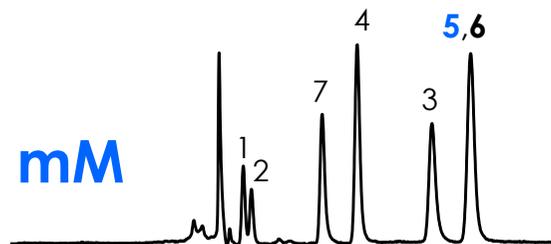
SunShell HILIC Diol



Sample:

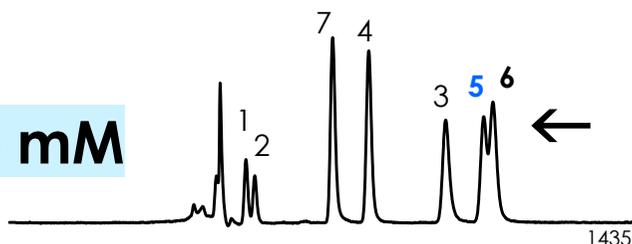
- 1  Thymine
- 2  Uracil
- 3  Adenine
- 4  Hypoxanthine
- 5  **Cytosine**
- 6  **Guanine**
- 7  Xanthine

10 mM



Column: SunShell HILIC Diol 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: A)CH₃CN / B) **X mM** Ammonium acetate buffer(pH 4.7), A/B = 90/10, Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40 °C, Detection: UV@250nm

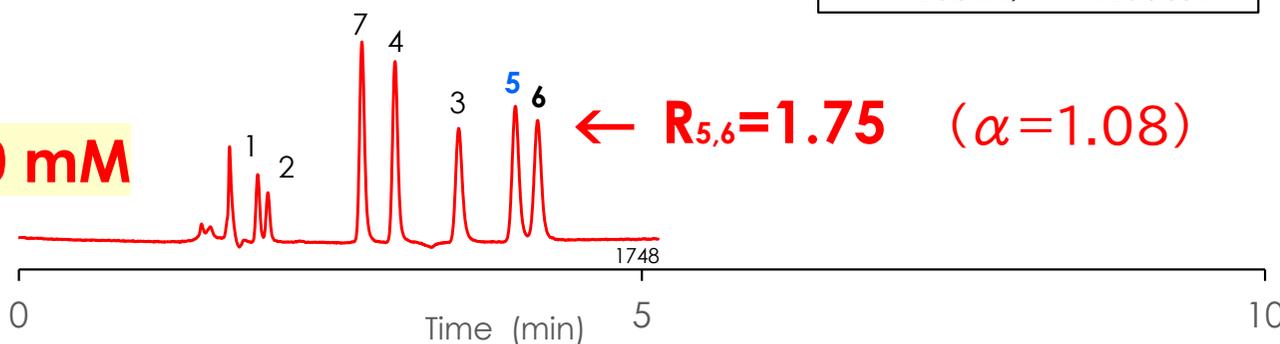
20 mM



$R_{5,6} = 1.04$ ($\alpha = 1.04$)

R: 分離度, α : 分離係数

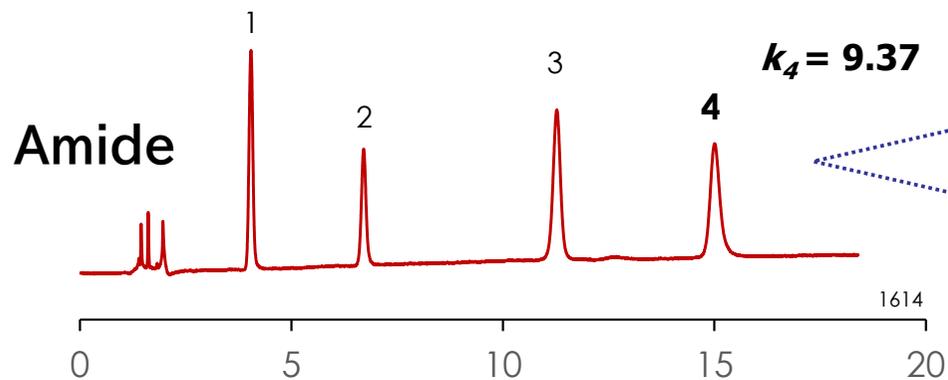
80 mM



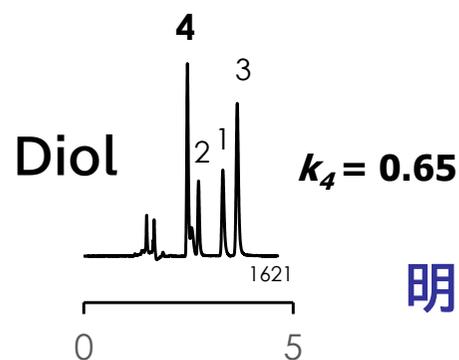
$R_{5,6} = 1.75$ ($\alpha = 1.08$)

▶ 塩濃度を上げることで 選択性が一部変化する。

◆両HILIC固定相の親水性保持力の対比

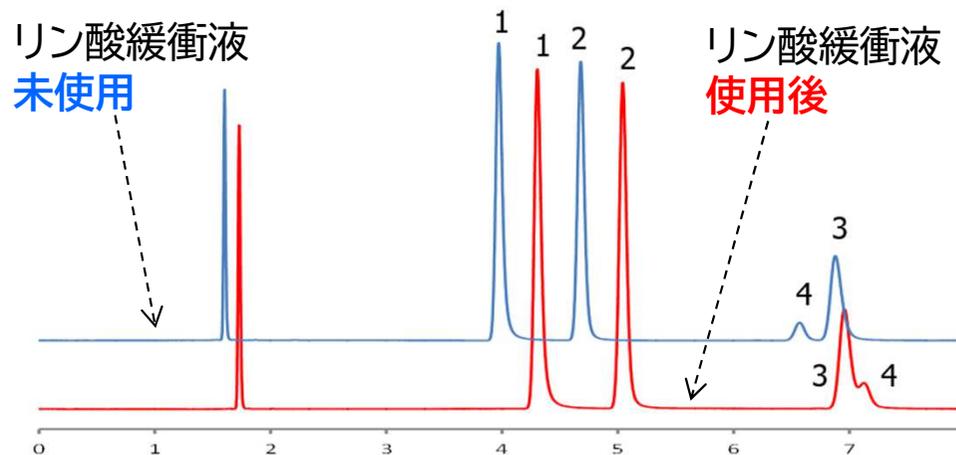


Column: SunShell HILIC Diol or HILIC-Amide 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm
 Mobile phase:
 Acetonitrile: **20 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7)** = 90:10
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C , Detection: UV@250nm, Sample: shown below

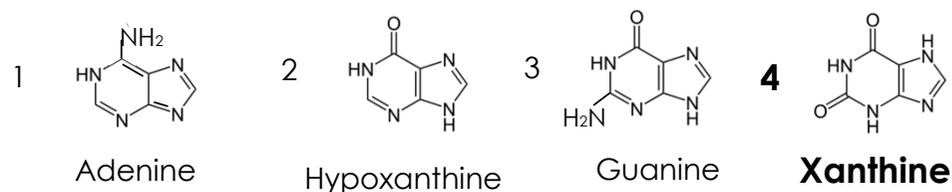


明白な保持・選択性の差

移動相使用履歴の影響(メモリー効果)



Column: SunShell HILIC- Amide 2.6 mm : 150 x 4.6 mm,
 Mobile phase:
 Acetonitrile : **20 mM Ammonium acetate(pH6.8)** = 85:15
 Flow rate: 0.8 mL/min Temperature: ambient
 Detection: UV@250 nm , Sample: shown below



▶ Amide: 保持が強い反面 メモリー効果にも注意

まとめ（ご聴講ありがとうございました。）

1. セカンド逆相カラム

- PFPは 極性置換基を有した芳香族化合物の分離が得意
- PFP&C18は 疎水基の安定性を付与したPFP系固定相
- Phenylは C18とは異なる保持機構(π 相互作用)が働く
- Biphenylでは π 相互作用が最大化。類縁体分離に有用
- **SunShell Peptide**は、ギ酸系でペプチドを良好に検出

2. HILICカラム

- Amideは 高活性が特徴。塩濃度コントロールの重要性大
- Diolは 低塩濃度での高安定性が特徴。LC/MSにも最適