

# 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

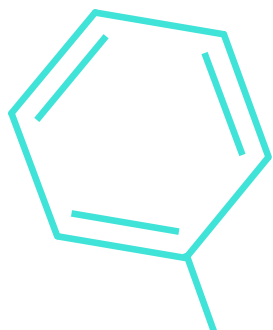


液クロ玉手箱

ChromaNik

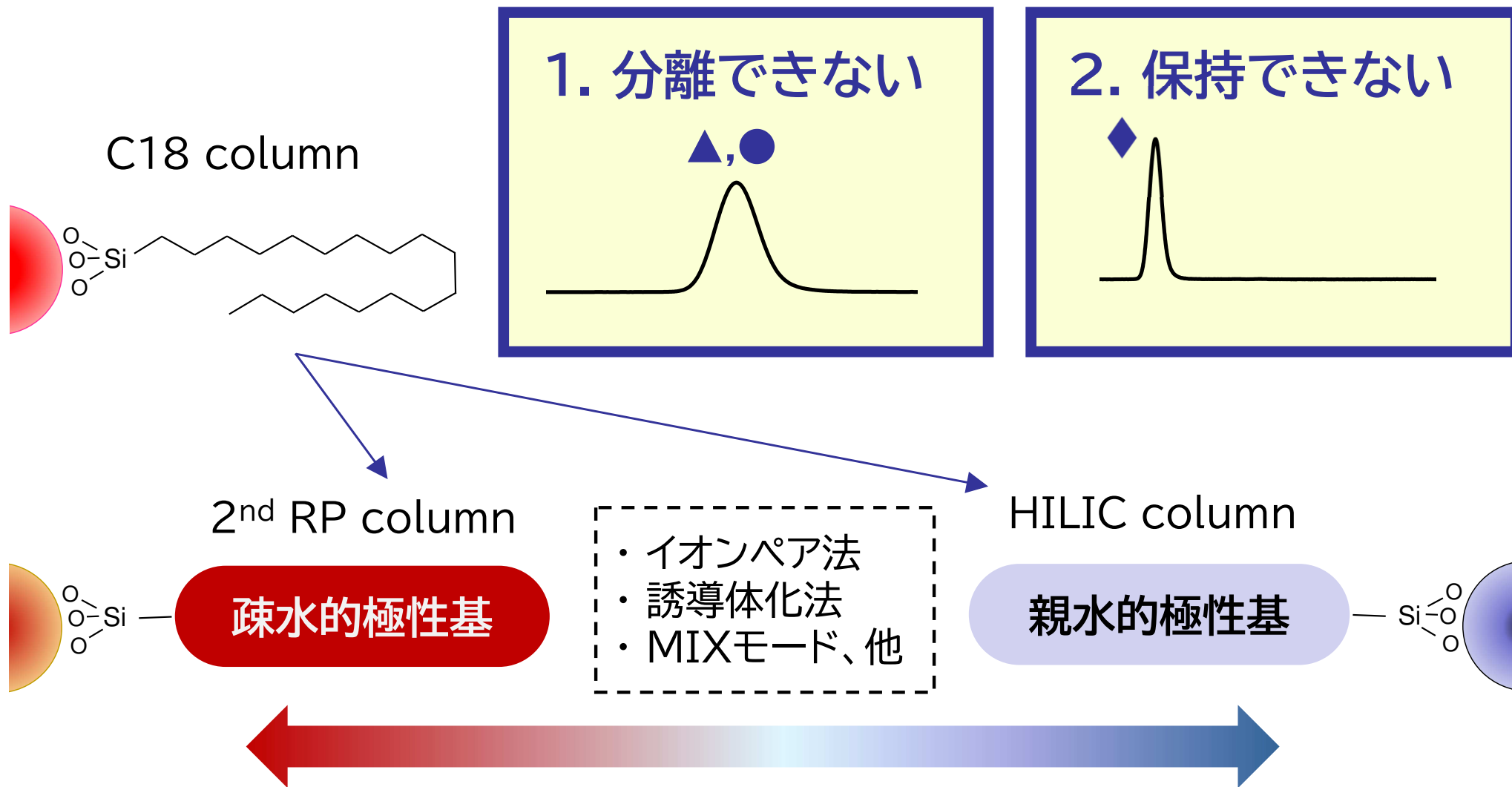


(株)クロマニックテクノロジーズ  
カラムコンシェルジュ  
小山 隆次  
koyama@chromanik.co.jp



ChromaNyk  
ChromaNik Technologies Inc.

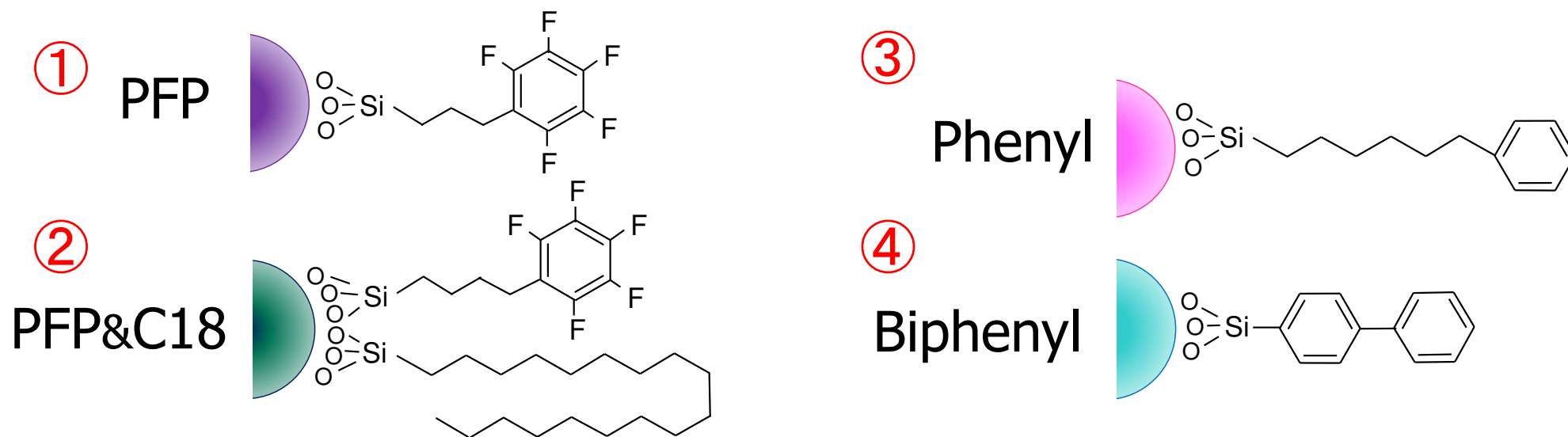
# C18で“困った時”の 別種カラムの選択



▶ 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

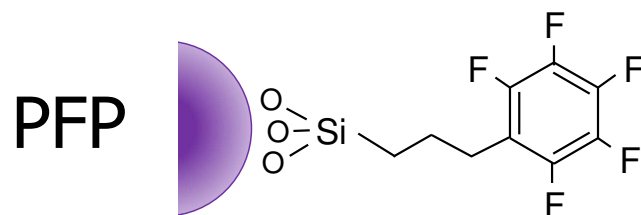
## 1. セカンド逆相カラムと 活用のコツ



## 2. HILICカラムと 活用のコツ



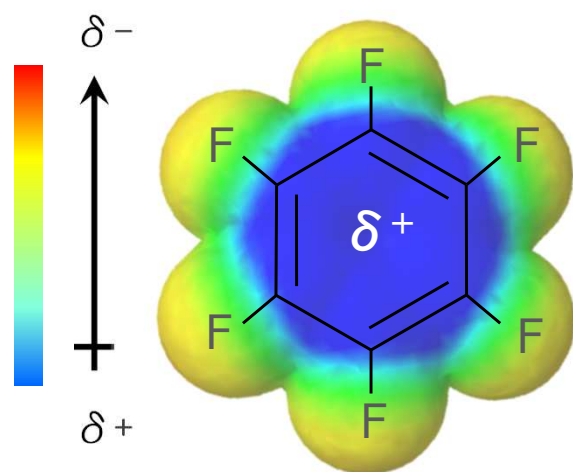
# ①PFP: ユニークな保持・分離機構



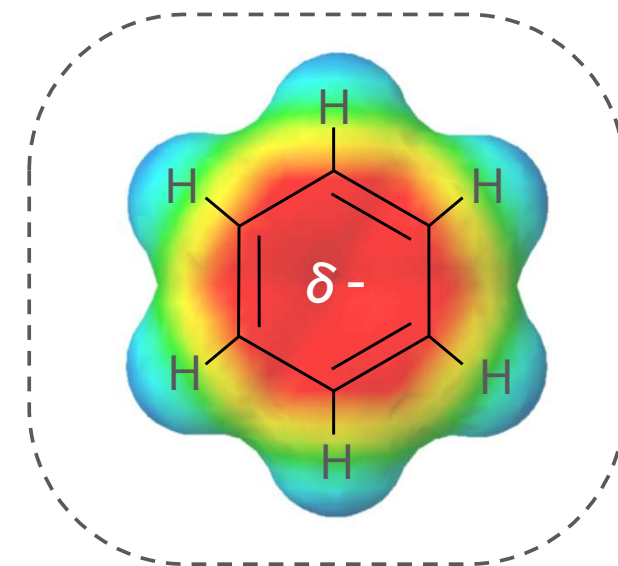
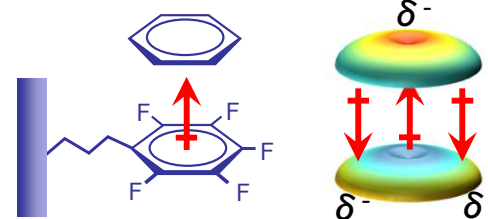
結合基: Pentafluorophenylpropyl

(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

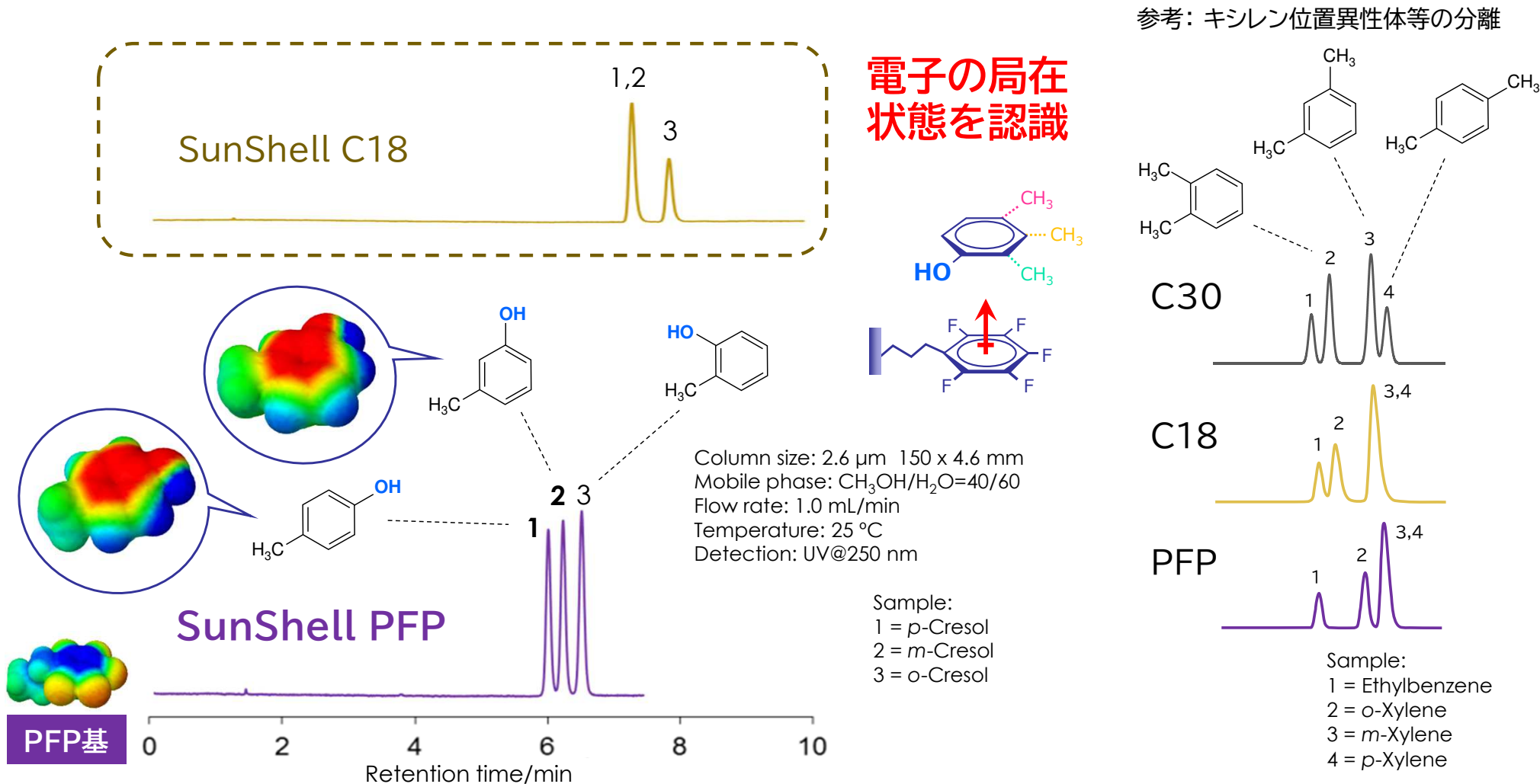


パーフルオロベンゼンの静電ポテンシャルマップ (左図) と、ベンゼンの静電ポテンシャルマップ (右図)



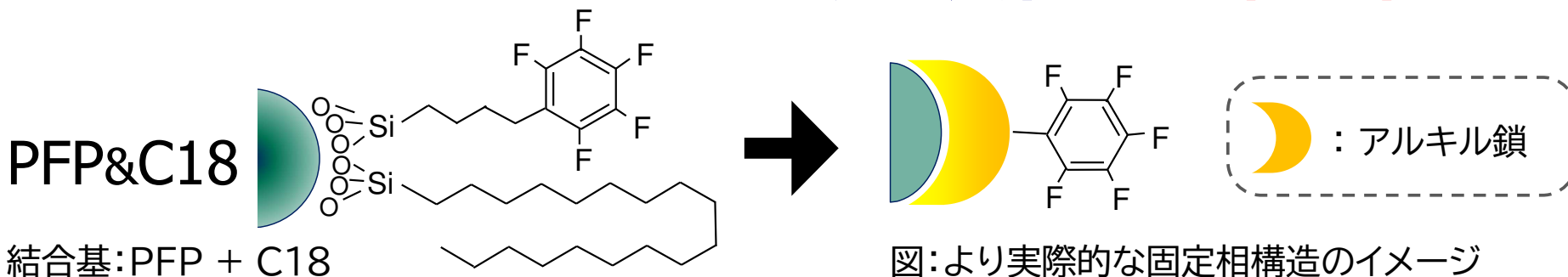
▶ 芳香環に対する特異な親和性が 類縁分離を生む。

# 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

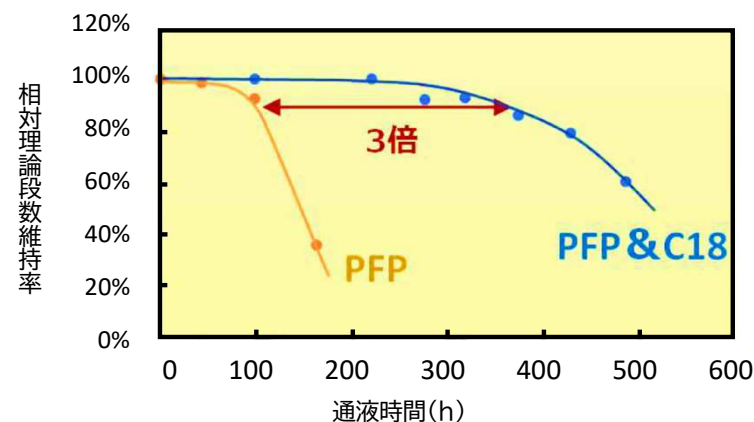
- C18をエンドキャッピングの一環で導入
- 高い疎水性保持力 + **安定性強化型 PFP**

**耐久性テスト条件**

Column: Sunniest 5  $\mu\text{m}$ , 2.1m x 150mm  
 Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{OH}/20\text{mM}$  Phosphate buffer (pH 7.0) = 70/30  
 Flow rate: 0.2 mL/min Temperature: 40  $^\circ\text{C}$

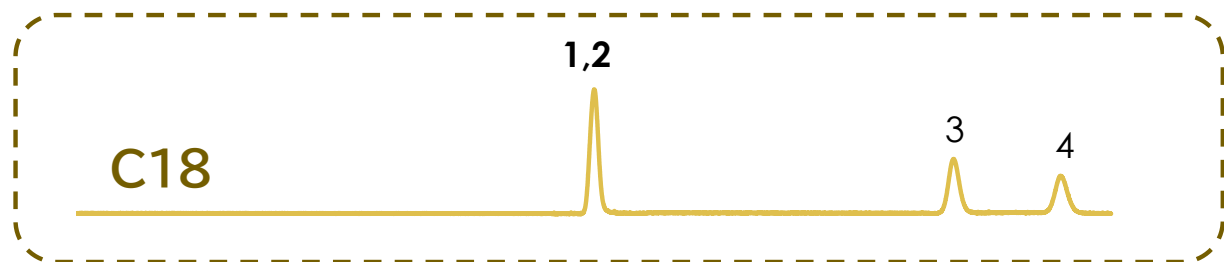
**理論段数 測定条件 (結果は右図)**

Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=70/30$  (PFP&C18)  
 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=60/40$  (PFP)  
 Flow rate: 0.2 mL/min Temperature: 40  $^\circ\text{C}$   
 Sample: Acenaphthene

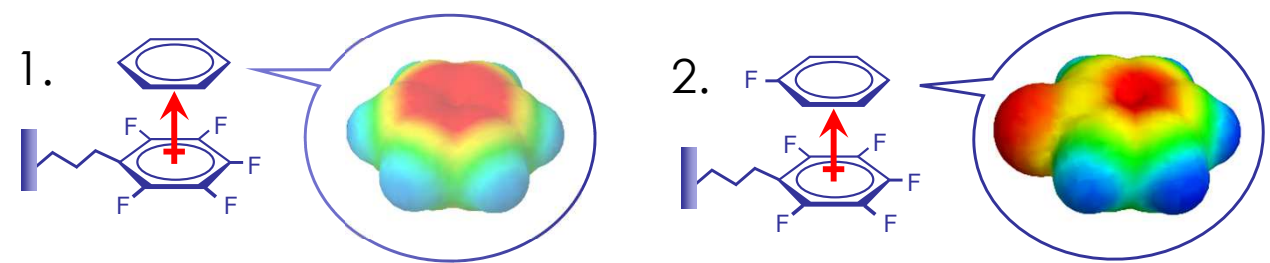


▶ 逆相HPLCでの汎用性を重視 C18ライクなPFP

# ②PFP&C18: フルオロベンゼンの分離

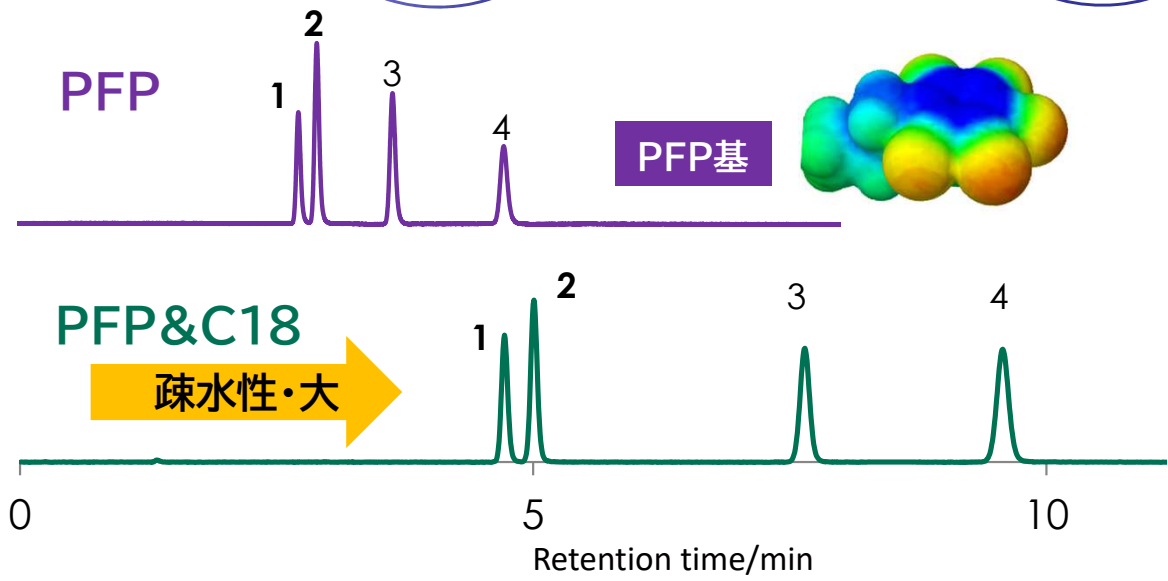


Column:  
SunShell 2.6 μm, 4.6 x 150 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=60/40  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C  
Detection: UV@250 nm



Sample:

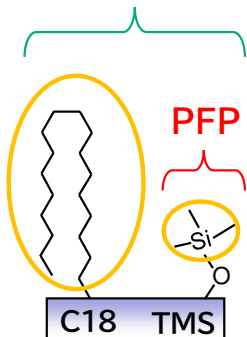
- 1. Benzene
- 2. Fluorobenzene
- 3. Toluene
- 4. a,a,a-Trifluorotoluene



▶ PFPの選択性はそのままに 疎水性保持力を強化

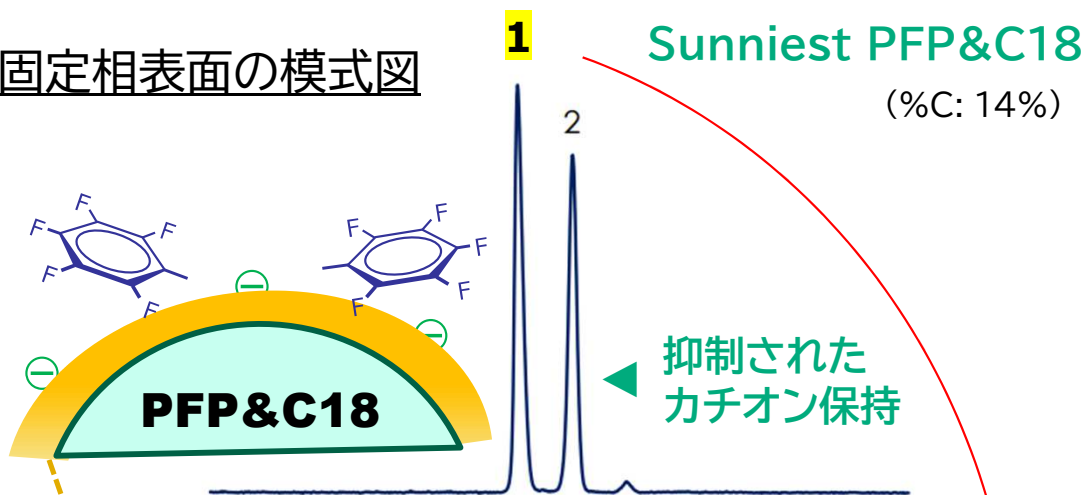
# ■ PFP系固定相の相違点: カチオン保持

PFP&C18



2次反応工程の差

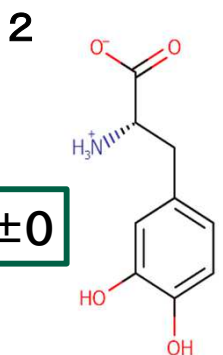
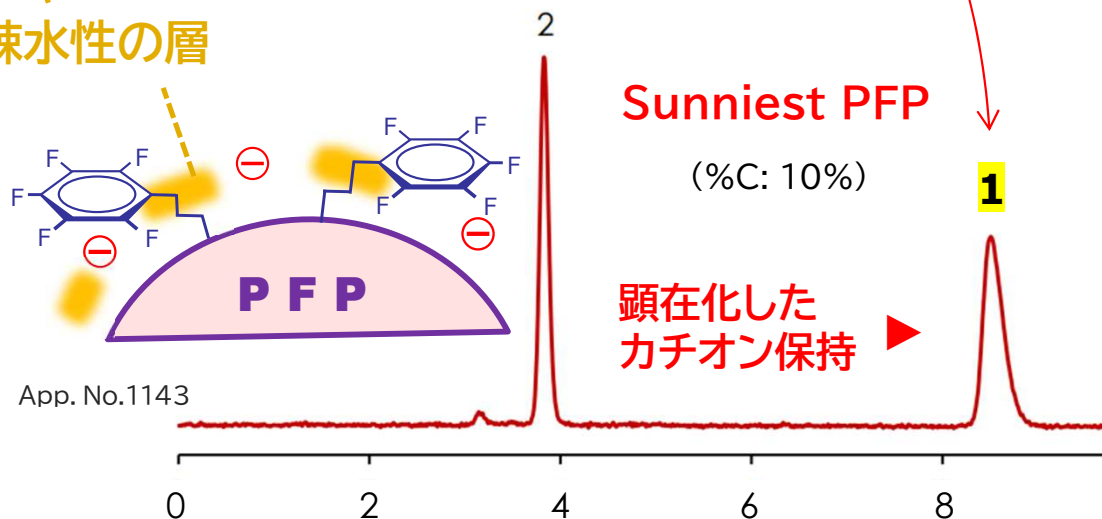
固定相表面の模式図



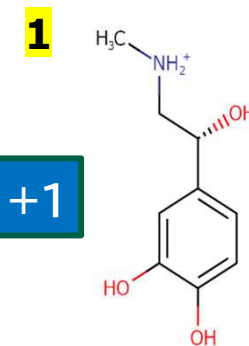
Column: 5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm  
Mobile phase: 12.5 mM  
Ammonium Formate (pH3)

Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 25 °C  
Detection: UV@260 nm  
Sample:  
**1 = Epinephrine**  
2 = Levodopa

疎水性の層



at pH 3.0 (>95%\*)  
(log D : -1.81)



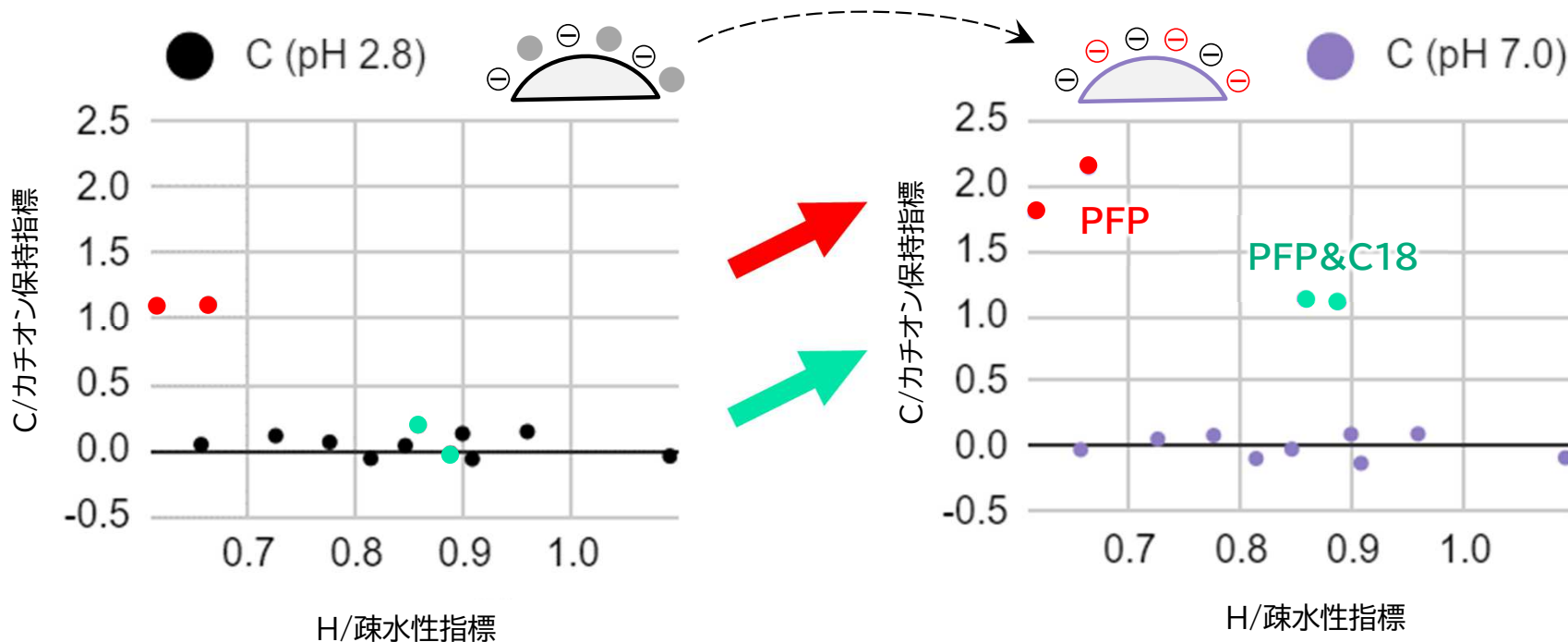
at pH 3.0 (>99%\*)  
(log D : -2.95)

▶ PFPは (PFP&C18より) カチオン保持が強い。



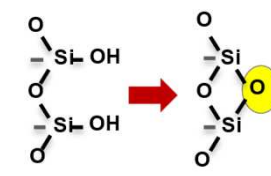
# ■ 逆相固定相13種の比較

C/カチオン保持指標  
pH 2.8 → pH 7.0



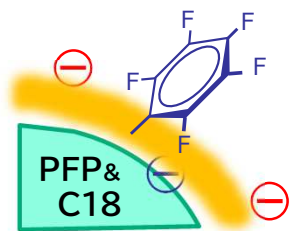
- PFP系固定相4種
- Sunniest PFP
  - SunShell PFP
  - Sunniest PFP&C18
  - SunShell PFP&C18

- 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



固定相の性質上、高度不活性化法の適用が困難

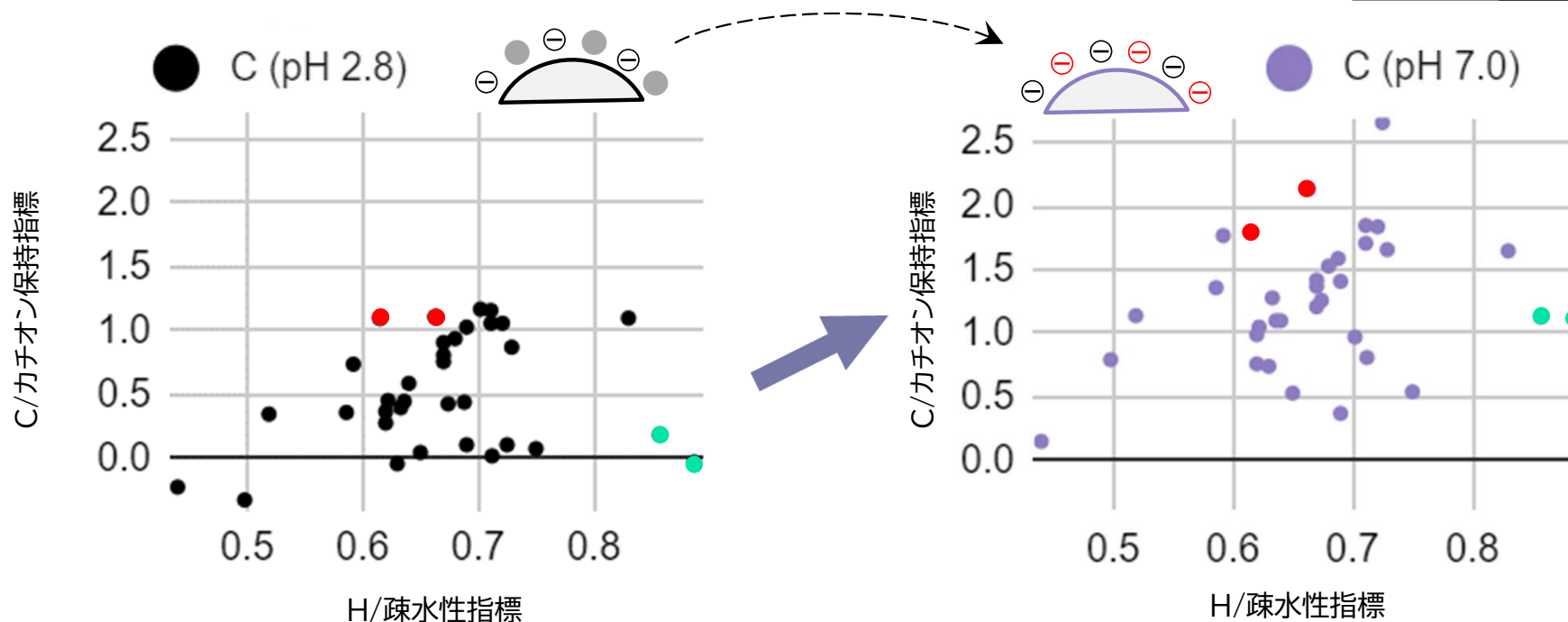
- エンドキャッピング様式の違い ---
- PFP系: TMS end-capping** ▶ 一般的な不活性化法
- 他: Sunniest end-capping** ▶ 高温 & 高度不活性化法



▶ 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

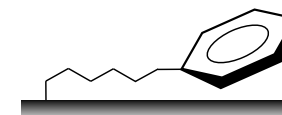
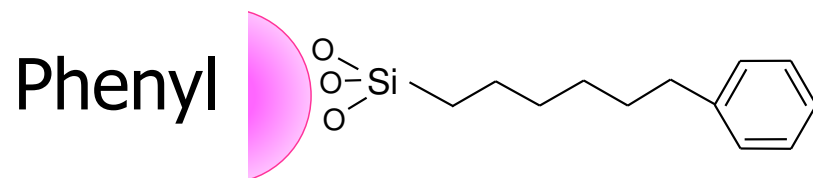
Ultra PFP Propyl  
Poroshell 120 PFP  
Svea PFP  
Ultimate PFP  
Pinnacle DB PFP Propyl  
Pursuit PFP  
**SunShell PFP**  
Ultra II PFP Propyl

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

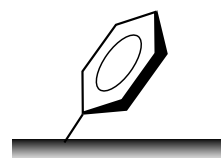
### ③Phenyl: 多様なPhenyl系固定相



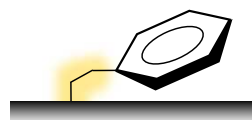
結合基: Phenylhexyl(一例)

- C18とは異なる選択性( $\pi$ 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

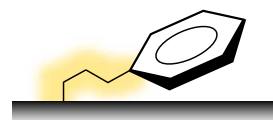
USP L11登録固定相(Phenyl)の一例



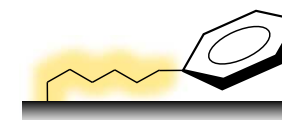
Phenyl



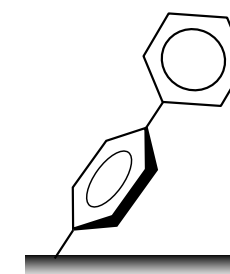
Phenyethyl



Phenylpropyl



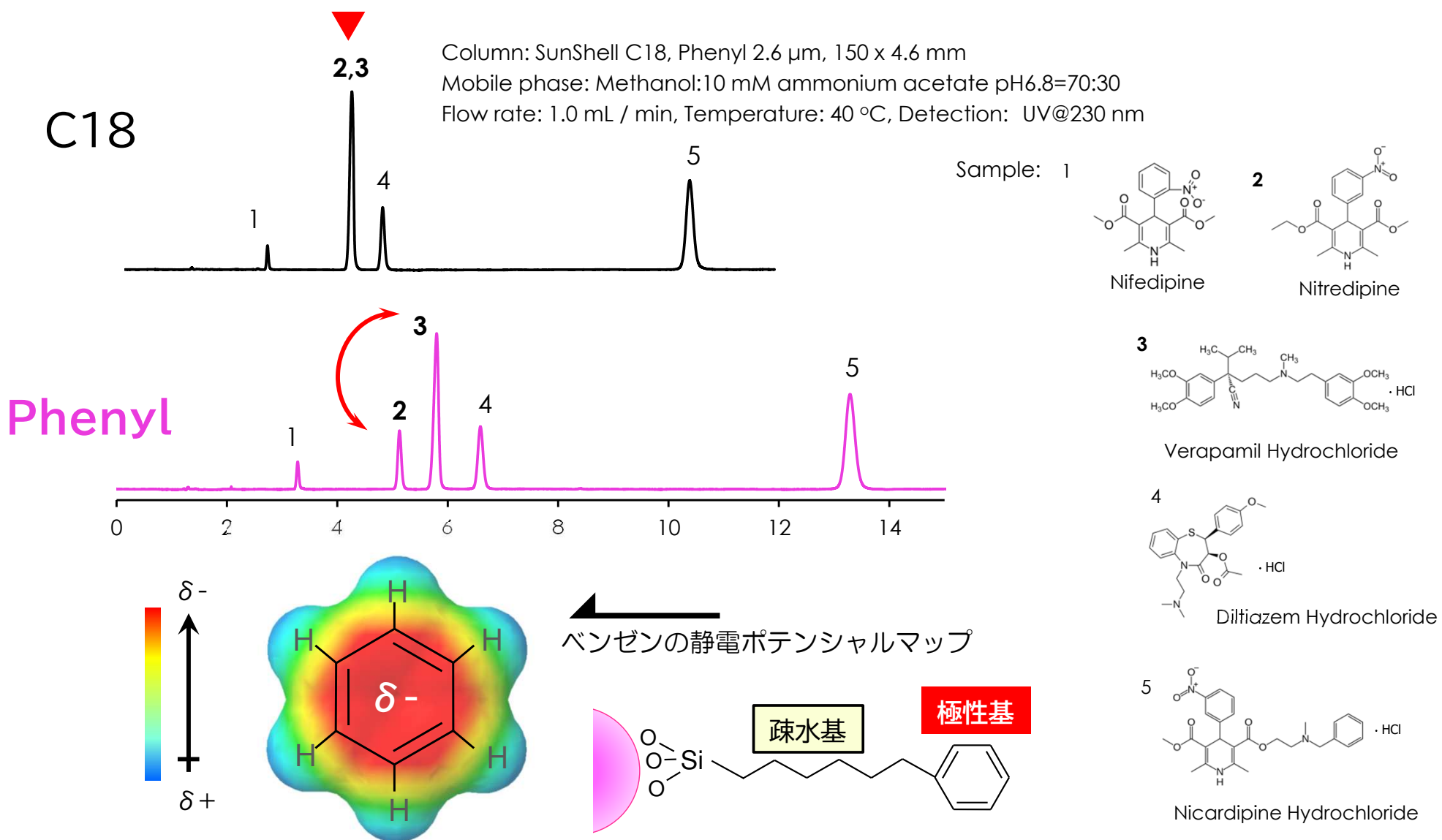
Phenylhexyl



Bihenyl

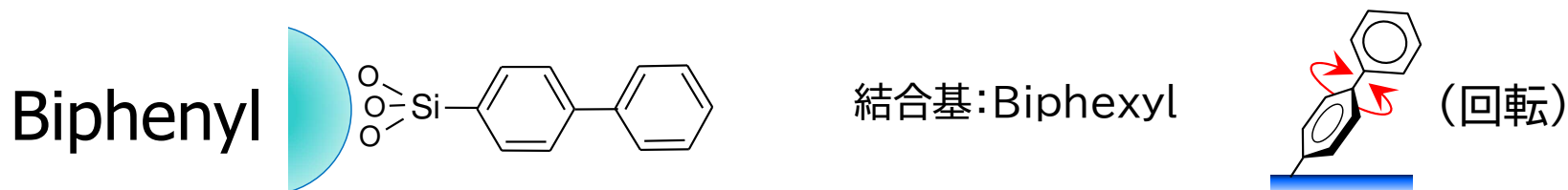
▶ 主にアルキル鎖長とフェニル基のバランスの違い。

# ③Phenyl: Ca拮抗剤の分離

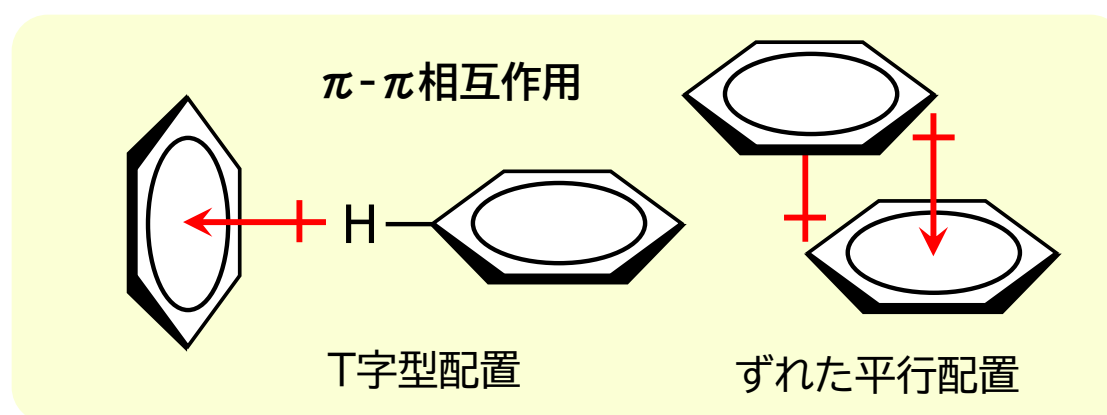
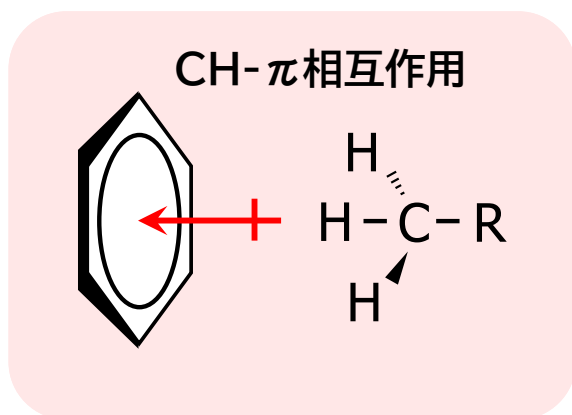


▶ 疎水性相互作用の他に  $\pi$  電子的相互作用が働く。

# ④Biphenyl: $\pi$ 相互作用を最大化



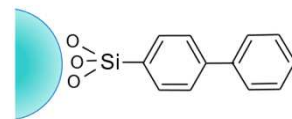
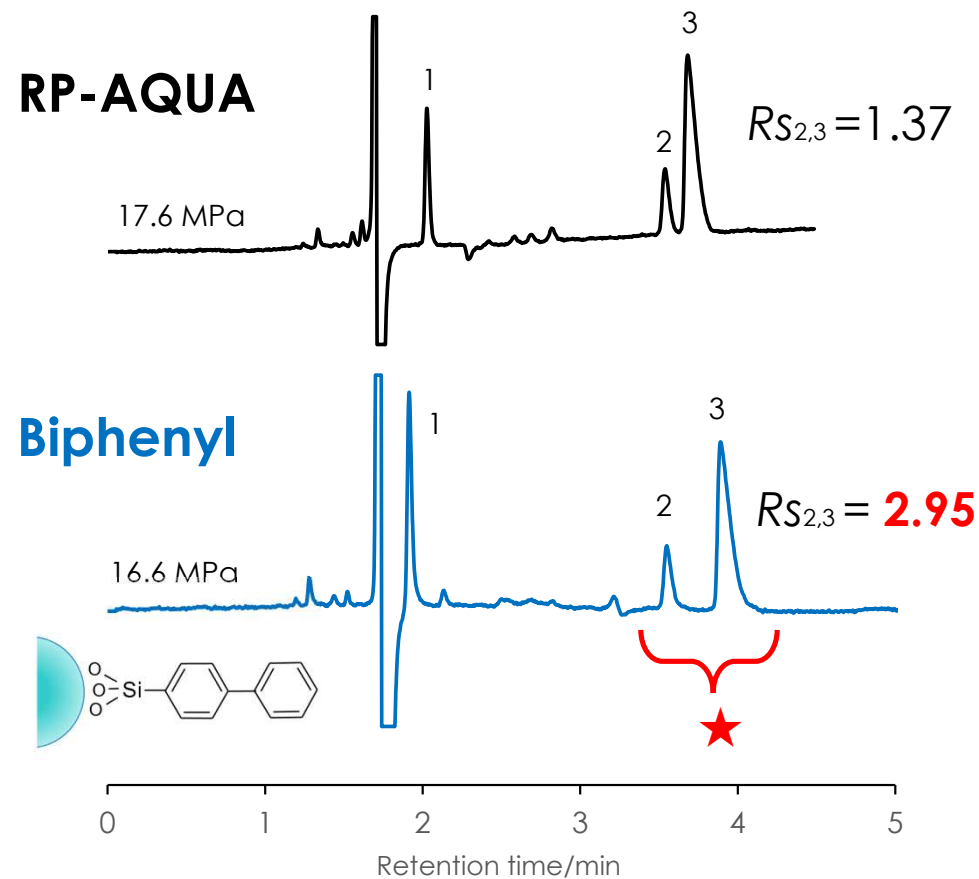
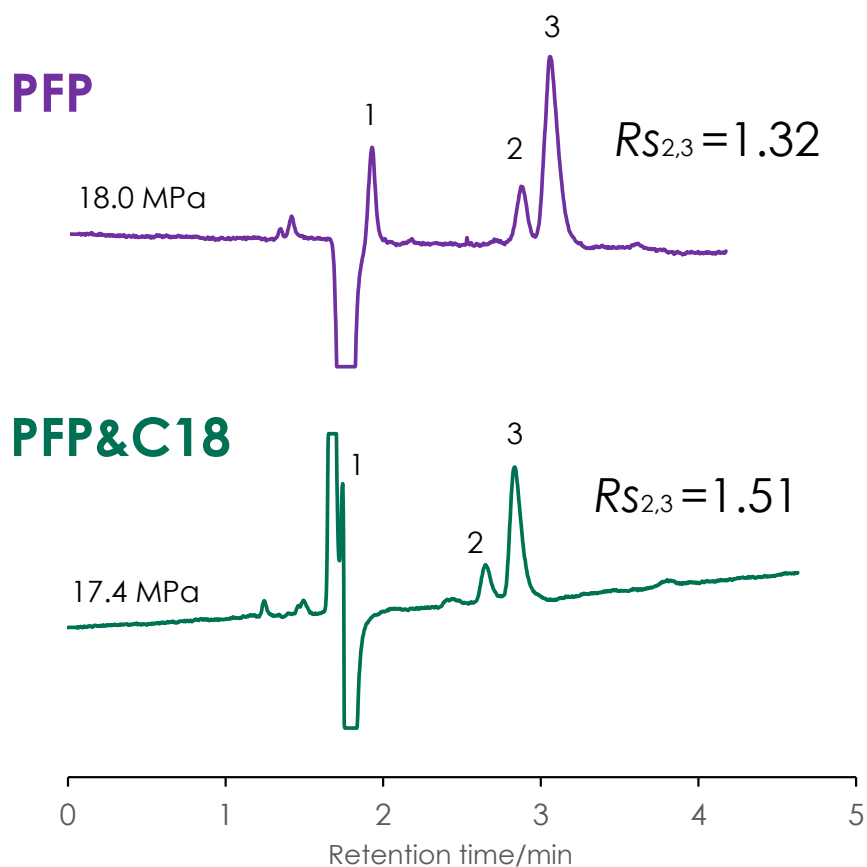
- アルキル鎖を介さない 二連のPhenyl基固定相
- ユニークな分離特性  $\pi$ 相互作用に基づく選択性



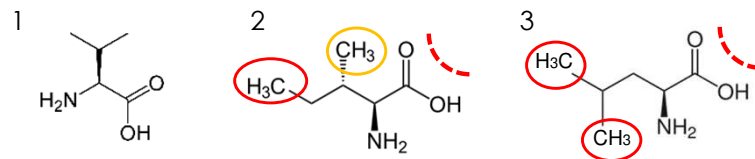
他の $\pi$ 相互作用 カチオン- $\pi$ 相互作用, ハロゲン- $\pi$ 相互作用,  $\pi$ 水素結合 (NH- $\pi$ 相互作用, OH- $\pi$ 相互作用) 等

▶ 特に CH/ $\pi$ 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

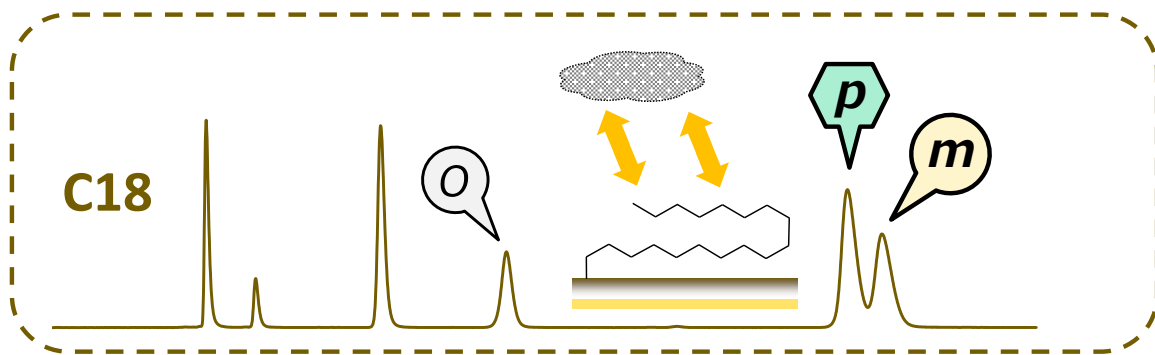


Column: SunShell RP-AQUA , PFP , PFP&C18 , Biphenyl 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: 0.1% formic acid Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C  
 Detection: UV@205nm Sample: 1 = L-Valine 2 = L-Isoleucine 3 = L-Leucine



▶ 分岐位置の異なる構造異性体同士を 良好に分離

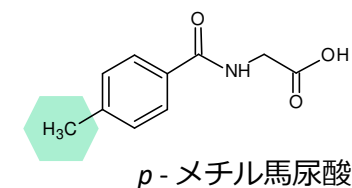
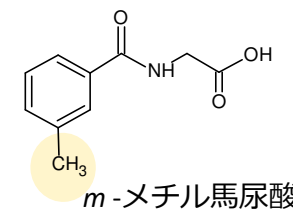
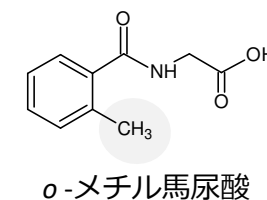
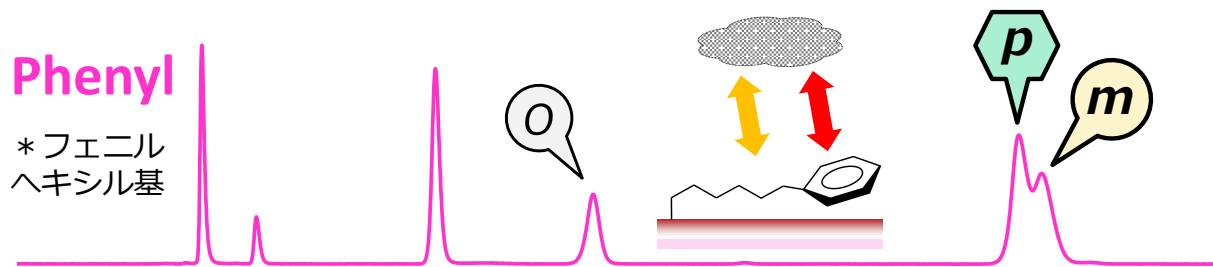
# ● Phenyl系固定相の選択性の違い



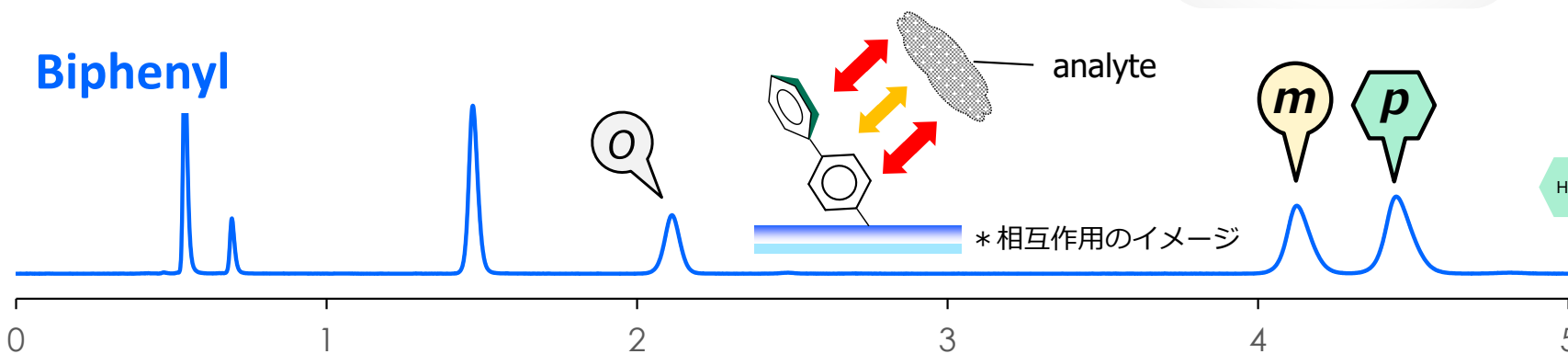
Column: SunShell 2.6 $\mu$ m 100 x 2.1mm  
 Mobile phase: 2-Propanol / 20 mM  
 Ammonium acetate (pH 6.8) = 3/97  
 Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 40 °C  
 Detection: UV@230 nm  
 Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid

**Phenyl**

\*フェニル  
ヘキシル基

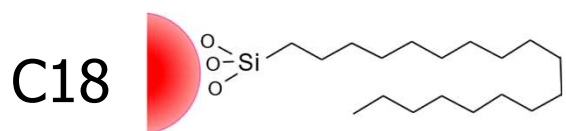


**Biphenyl**

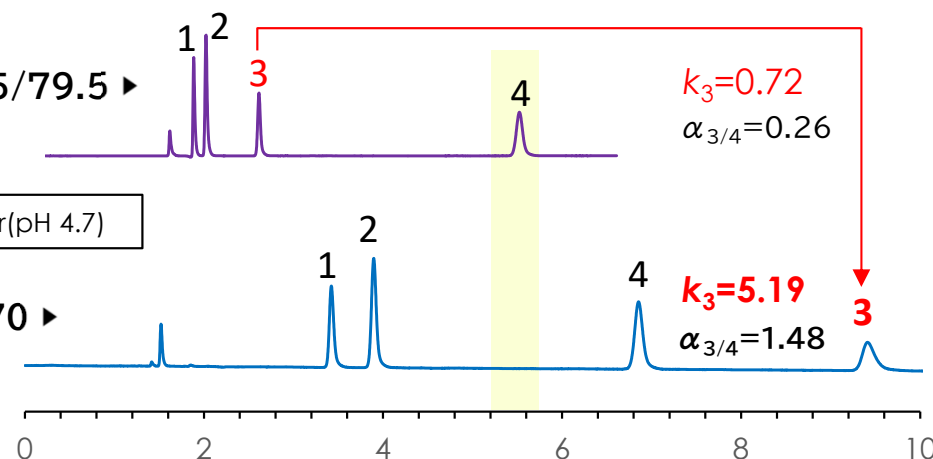
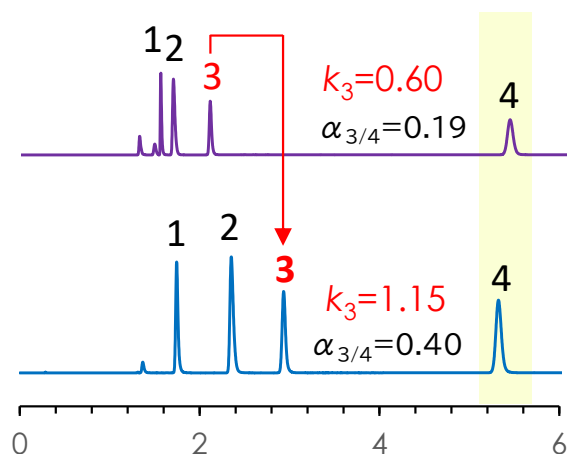


▶ 疎水基とフェニル基のバランスが 選択性を生む。

# ●Biphenyl: CH<sub>3</sub>基に対する強い認識

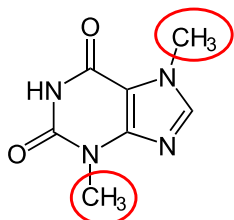


Column:  
SunShell 2.6 μm 150 x 4.6 mm  
Flow rate : 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C  
Detection: UV@250 nm  
Mobile phase: shown below  
Sample: shown below

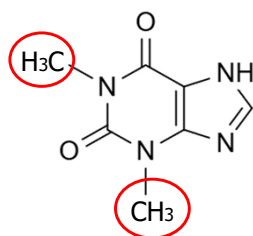


\* 20 mM Ammonium Acetate Buffer (pH 4.7)

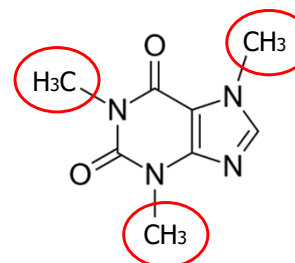
1. Theobromine



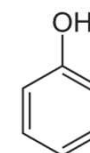
2. Theophylline



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。

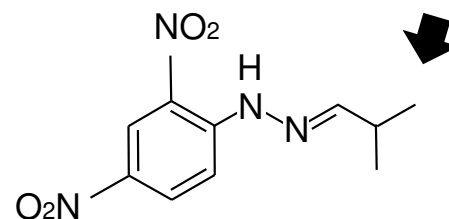


# ●Biphenyl: CH<sub>3</sub>基の結合状態を認識

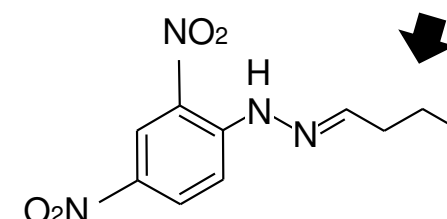
Column: SunShell 2.6 μm, 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase:  
**2-propanol** : **Methanol** : Water = 25:40:35

Temperature: 40 °C  
 Detection: UV@360 nm

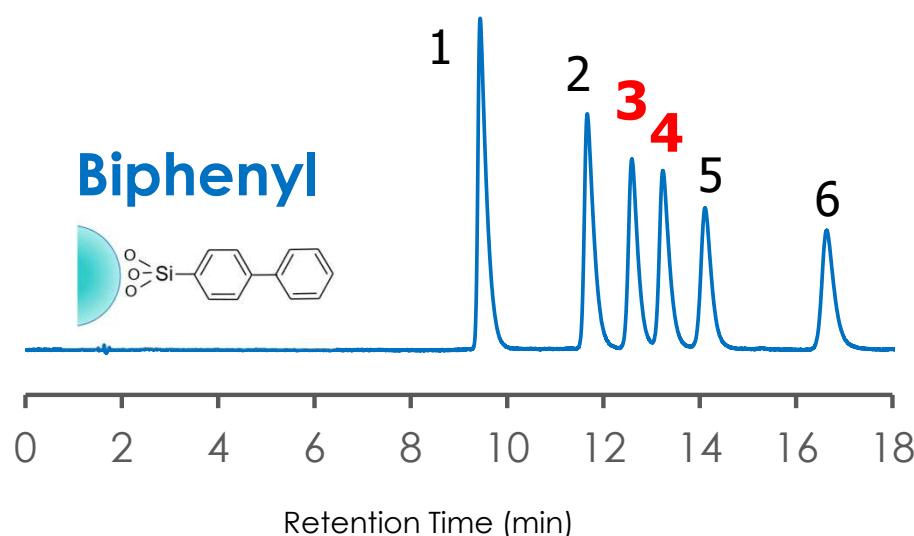
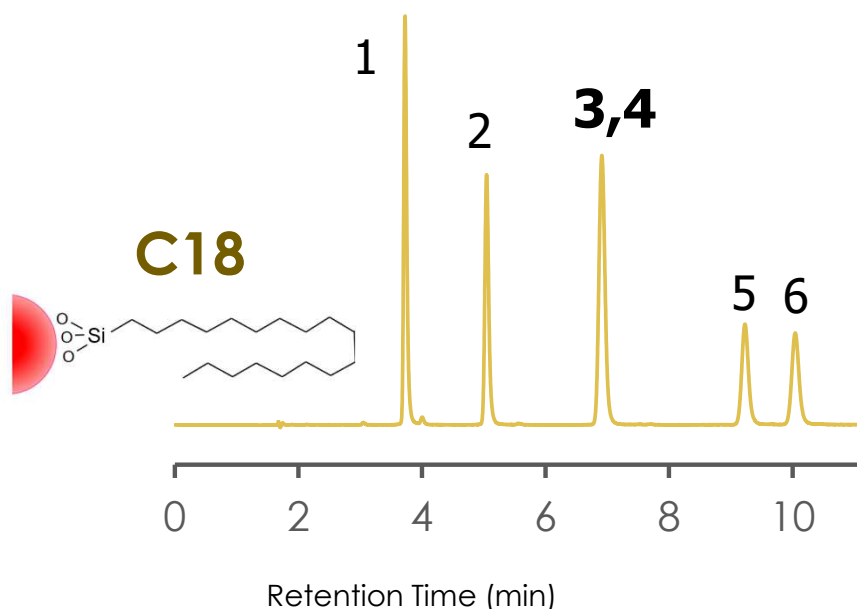
- Sample:
1. Acetaldehyde-DNPH
  2. Propionaldehyde-DNPH
  3. iso-Butyraldehyde-DNPH
  4. n-Butyraldehyde-DNPH
  5. iso-Valeraldehyde-DNPH
  6. n-Valeraldehyde-DNPH



3. iso-Butyraldehyde-DNPH

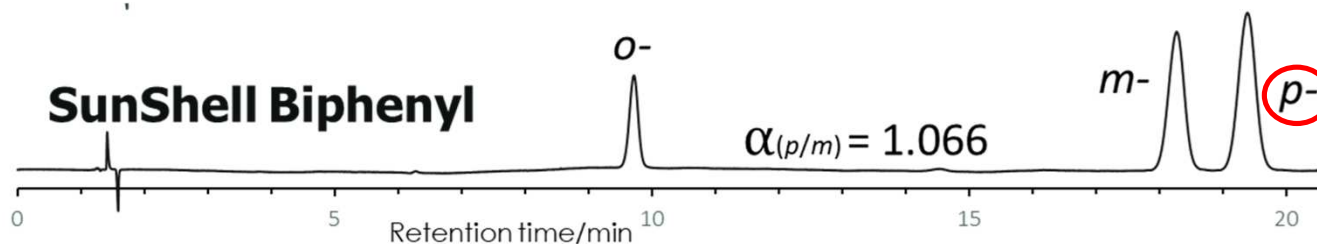
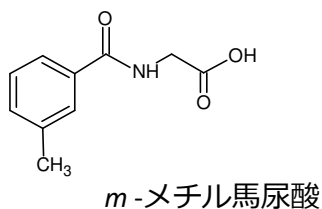
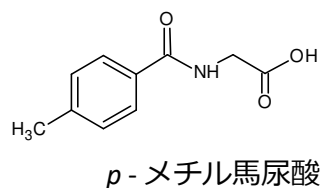
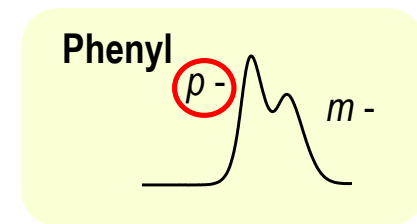
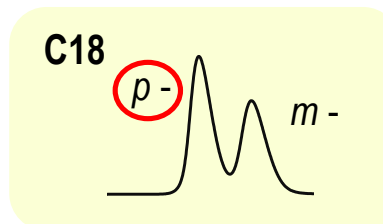


4. n-Butyraldehyde-DNPH



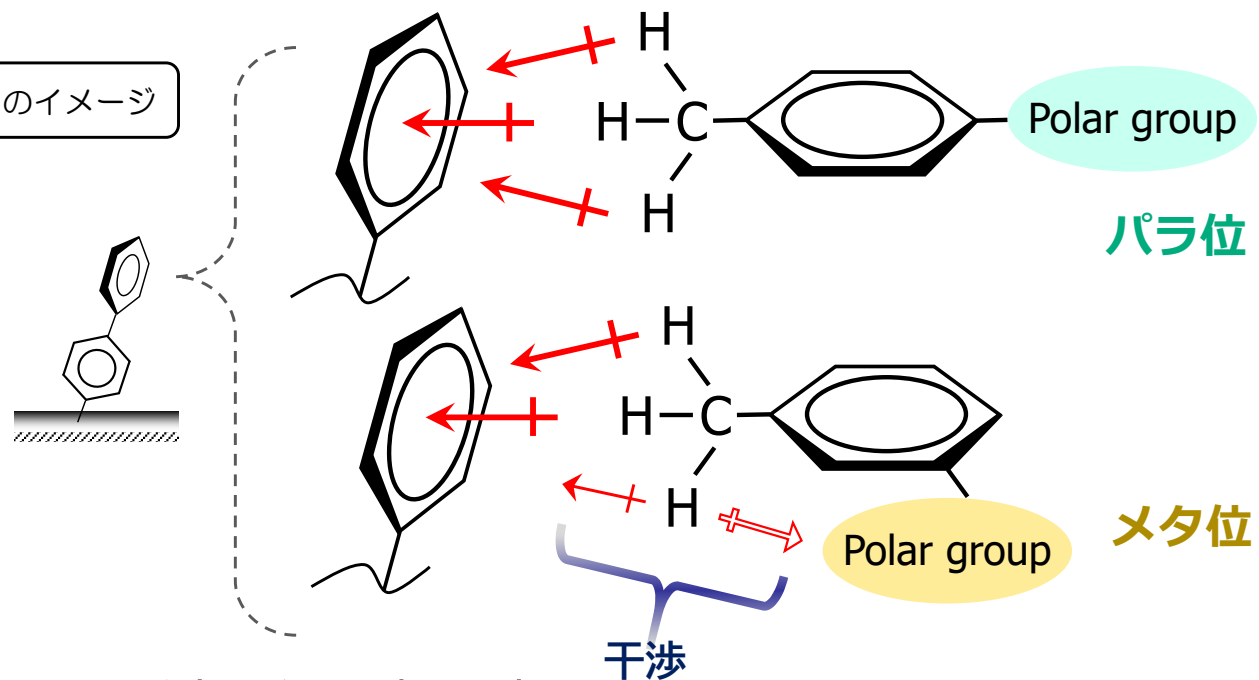
▶ 分岐鎖・直鎖構造異性体を分離 (MeOH+IPA)

# ● CH/π 選択性モデル



Column:  
 2.6  $\mu\text{m}$  (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

相互作用のイメージ



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

$\alpha$  (C/P)

水素結合性 =  $\alpha$  (Caffeine/Phenol)

疎水性保持  
=  $k_A$

疎水選択  
=  $\alpha$  (A/B)

形状認識 =  $\alpha$  (T/o)

A Biphenyl  
B Biphenyl  
C Biphenyl

SunShell  
Biphenyl

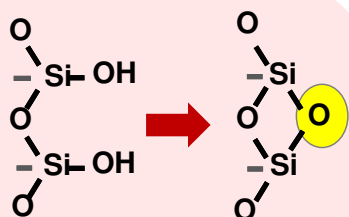
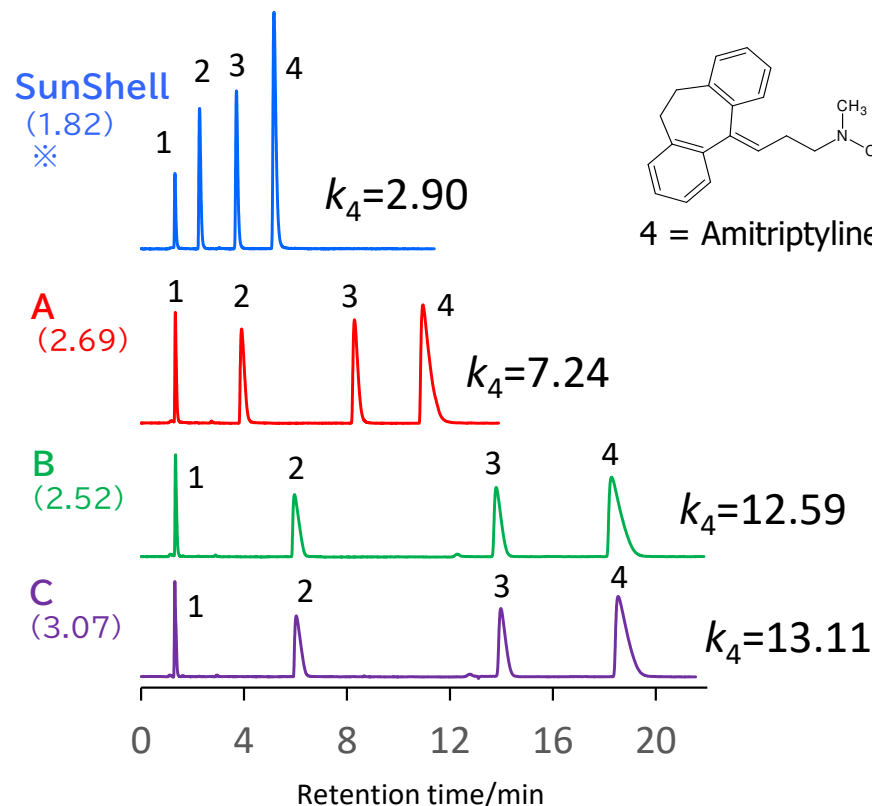


図. Biphenyl固定相4種(SunShell, A, B, C)の選択性比較

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、 $\alpha$  (C/P)



Column: Biphenyl 2.6  $\mu$ m or 2.7  $\mu$ m      Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/10 mM Ammonium acetate pH 6.8 = 40/60  
 150 x 4.6 mm  
 Flow rate: 1.0 mL/min,      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

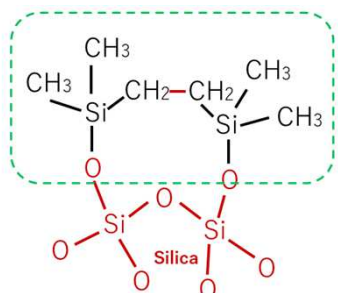
# 汎用HPLC向け 決定版カラム & カラム管



(2022年)



(2023年)



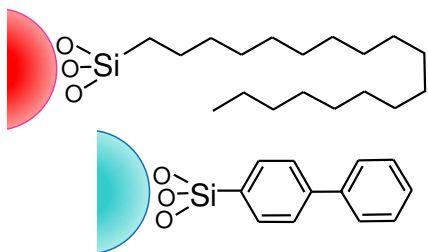
Prominer推奨pH範囲  
 1 - 12(C18)  
 1 - 10(Biphenyl)

Tandem TMS

高耐久型エンド  
キャッピング法

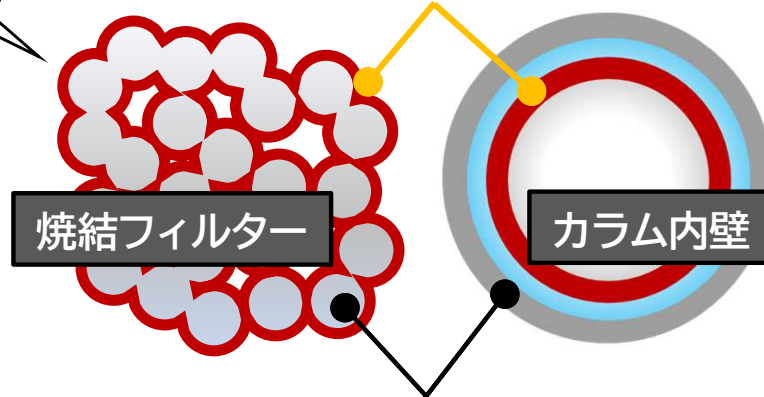
ワイドな  
pHレンジ

3.5 μm  
高効率粒子

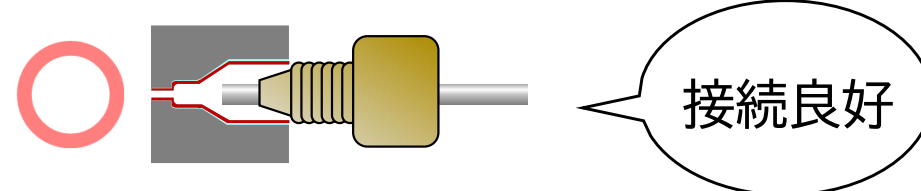


実質  
メタル  
フリー

有機不活性化層



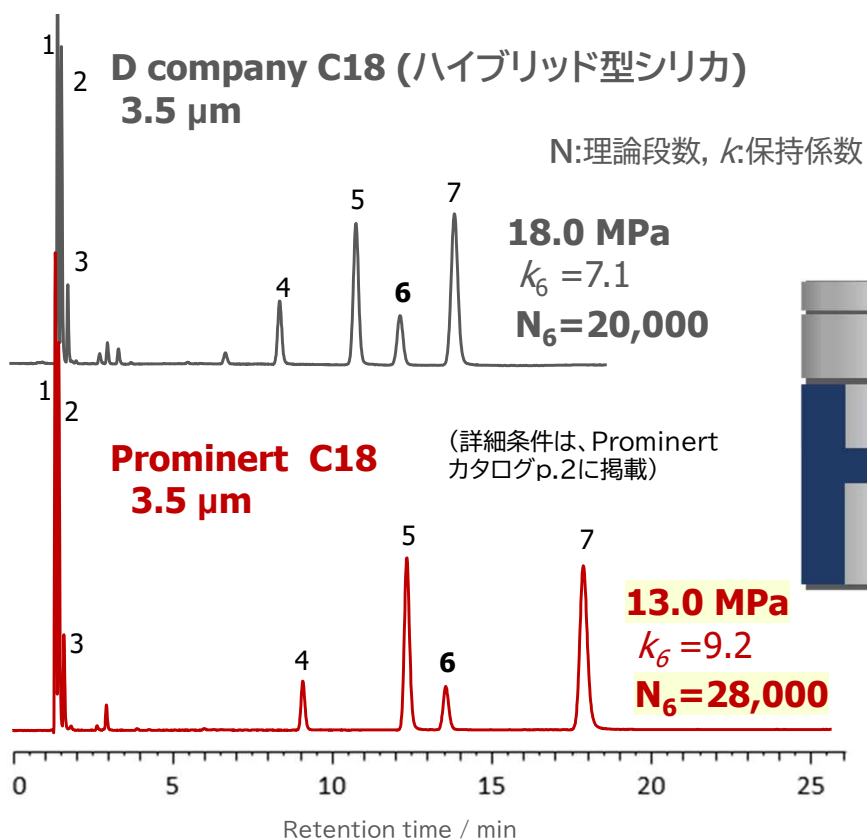
Stainless Steel



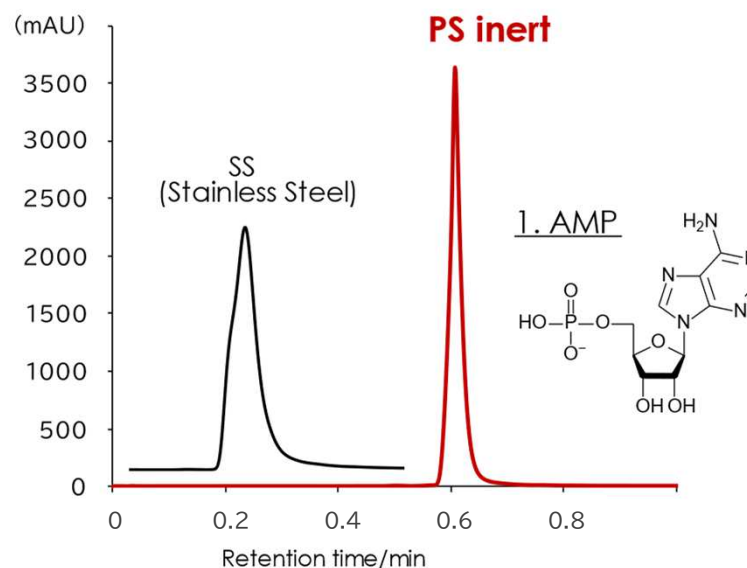
更なる分離向上に

高吸着性化合物に

# 充填剤 ◀汎用HPLCの可能性を拡張▶ 素管



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)

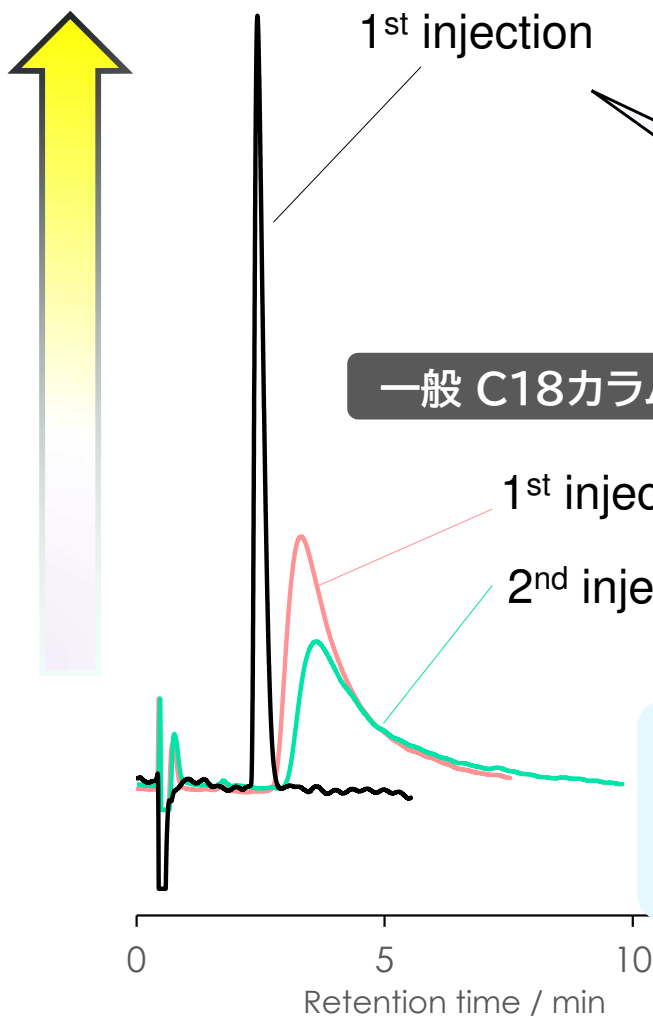
▶ 低圧力で高理論段数

▶ 吸着抑制にて強度向上

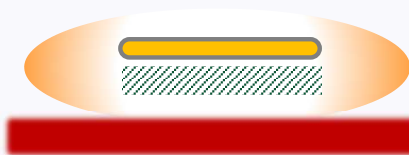
# 【新製品】 SunShell Peptide C18

(2024年)

## SunShell Peptide C18



低吸着・不活性技術



Wide poreコアシェル粒子

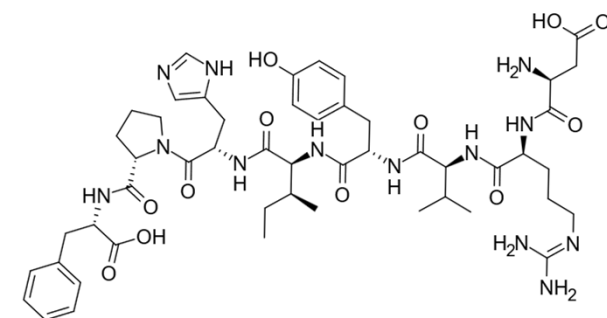


一般 C18カラム

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。

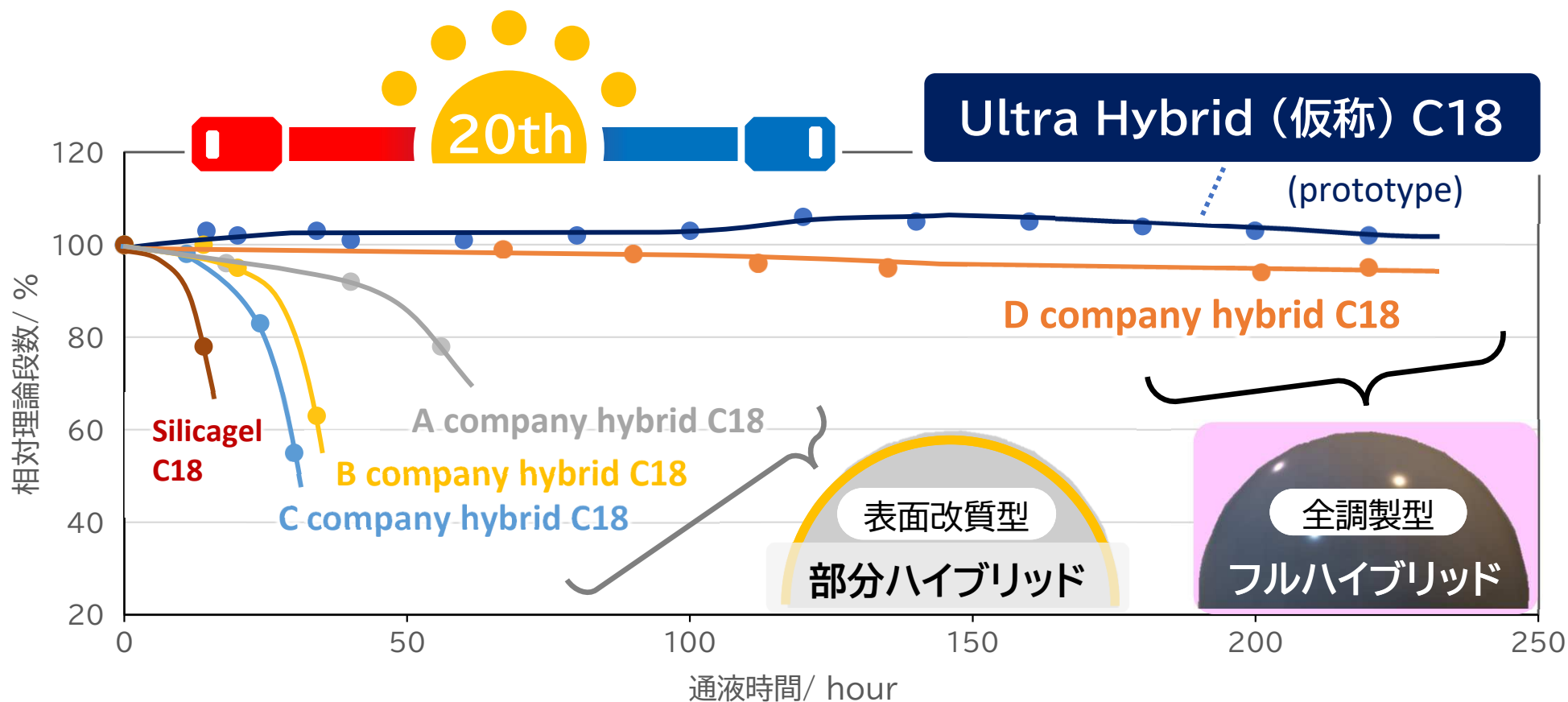
Column: SunShell Peptide C18 , general C18  
 Column dimension: 2.1 x 50 mm, 2.6 μm  
 Mobile phase: Acetonitrile/**0.1% formic acid in water**=15/85  
 Flow rate: 0.3 mL/min,  
 Temperature: 40 °C, Detection: UV@210 nm  
 Sample: Angiotensin II



▶ **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:

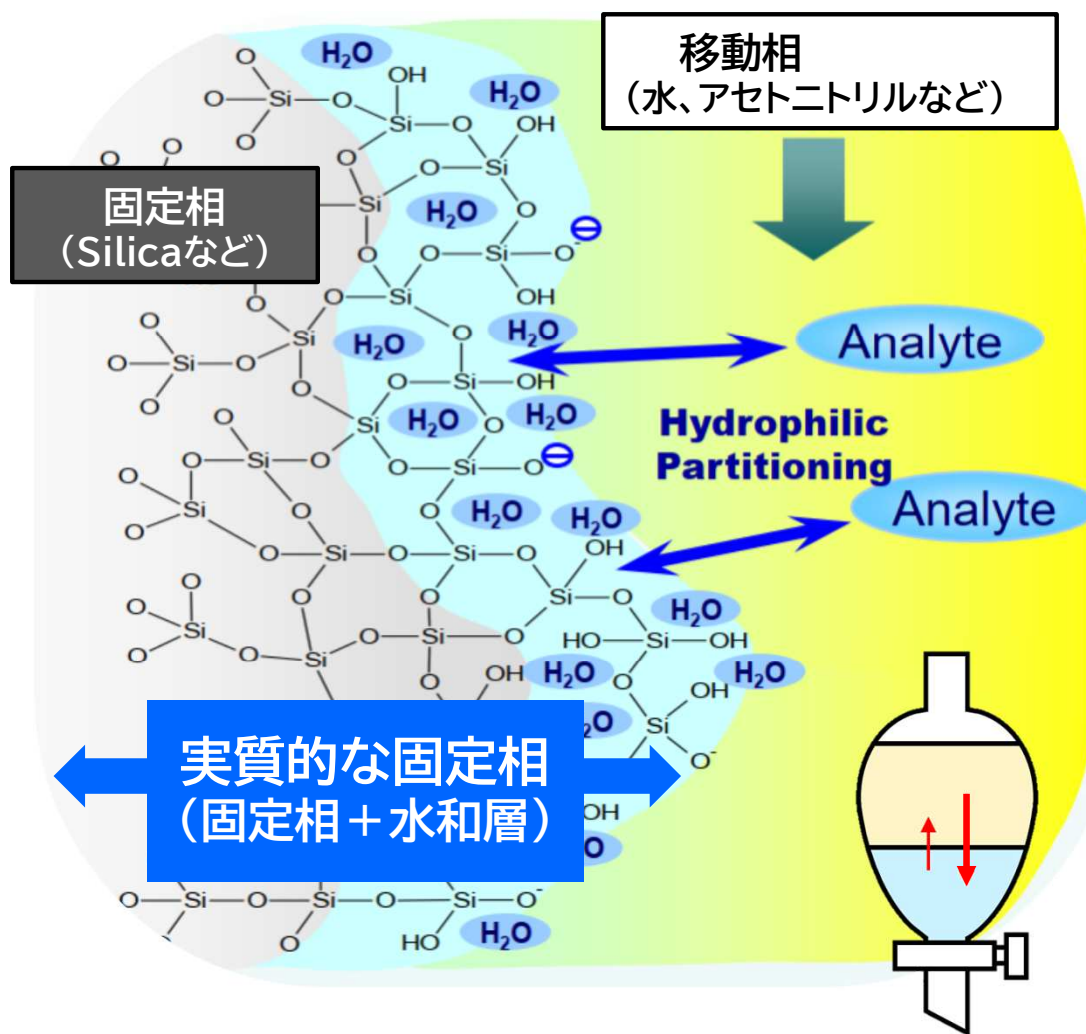
配位子交換(糖・糖アルコール)、イオン交換(アミノ酸)、誘導体化逆相分析、又はイオン対クロマトグラフィー等

▶ 親水性化合物を狙って保持する分析モードの活用

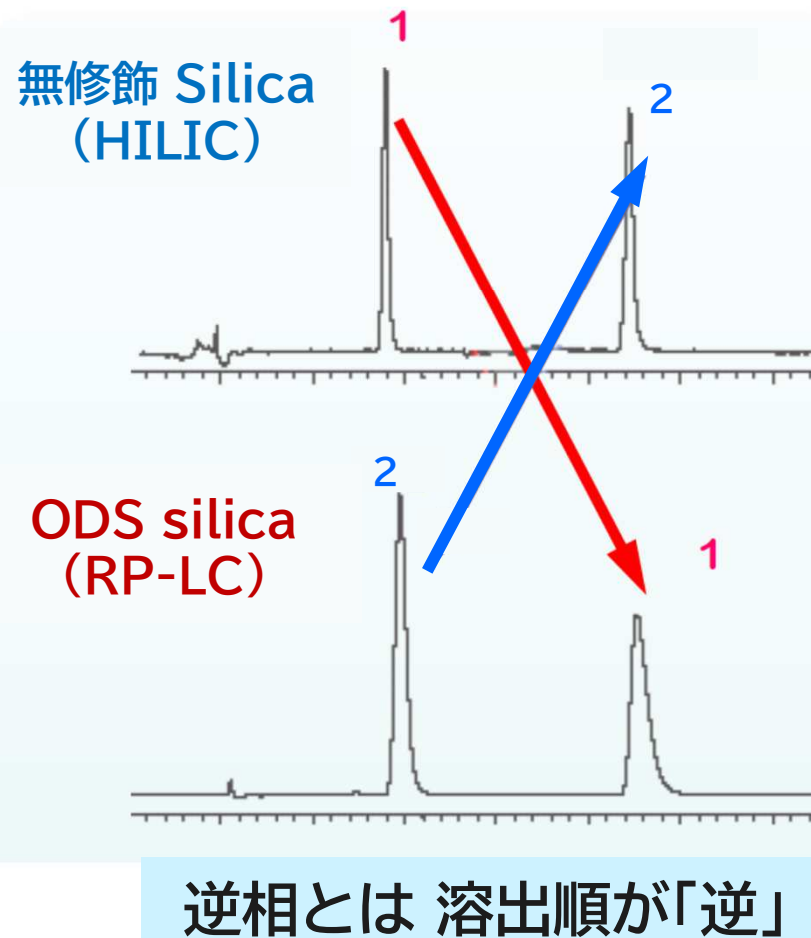


# 親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)

シリカゲル固定相表面の、親水性相互作用のイメージ

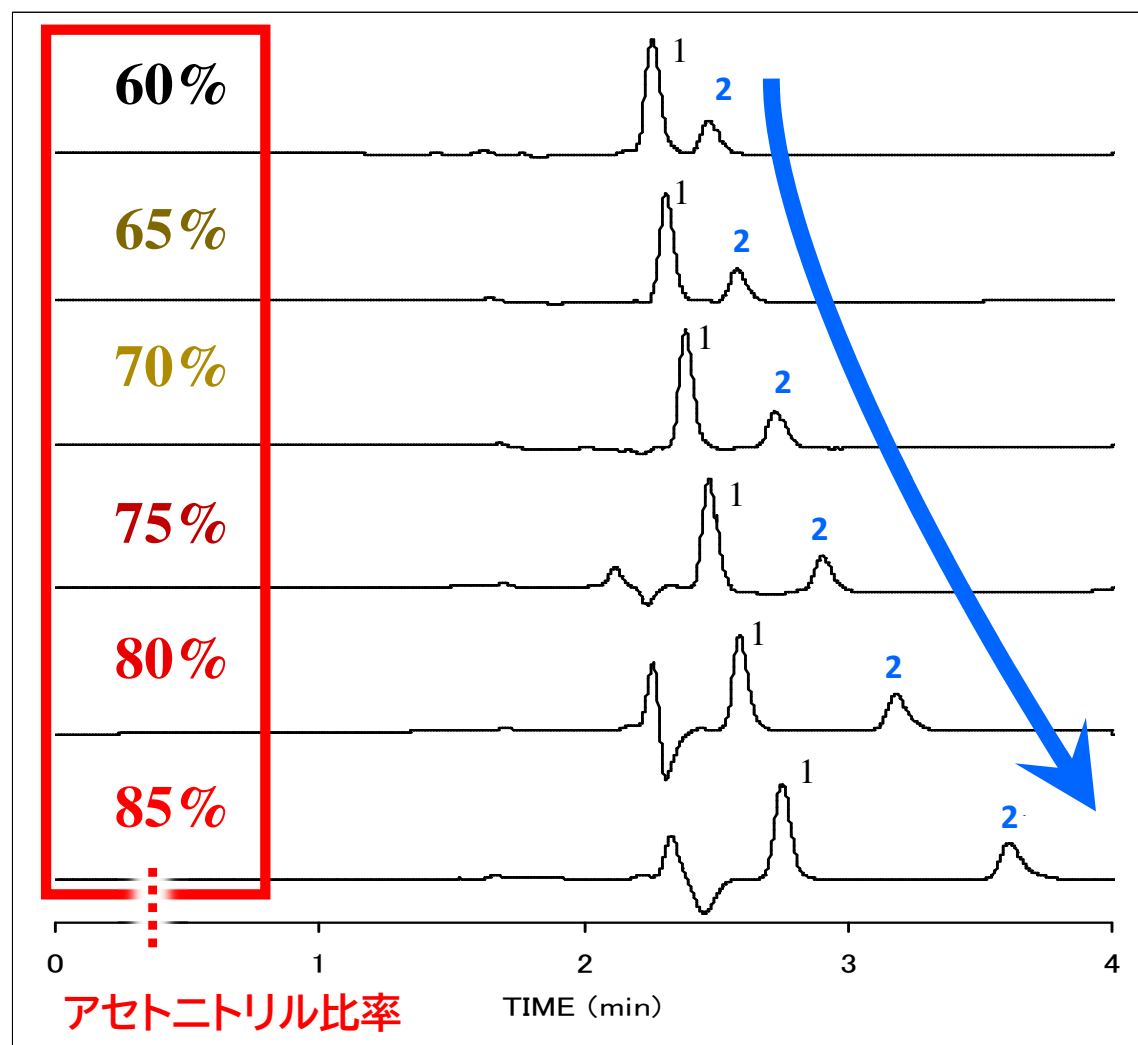


1 = 疎水性化合物 2 = 極性化合物



▶ 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)

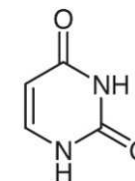
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

Detection: UV@220nm

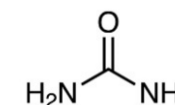
Sample: 1 = Uracil

logP = -1.07



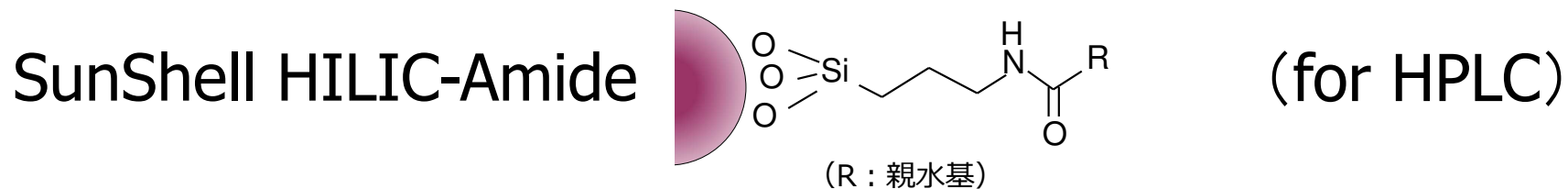
2 = Urea

logP = -2.11

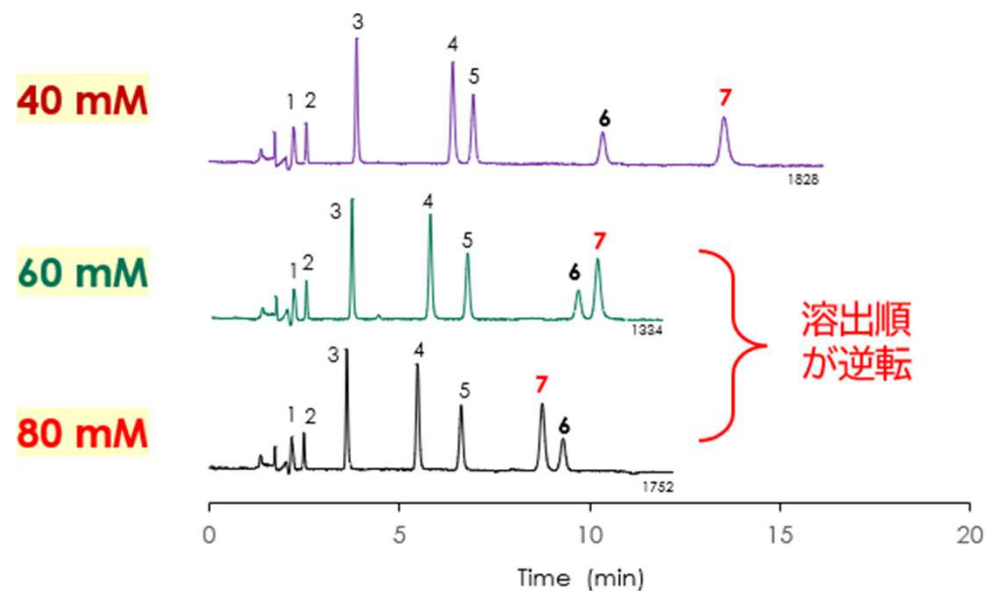
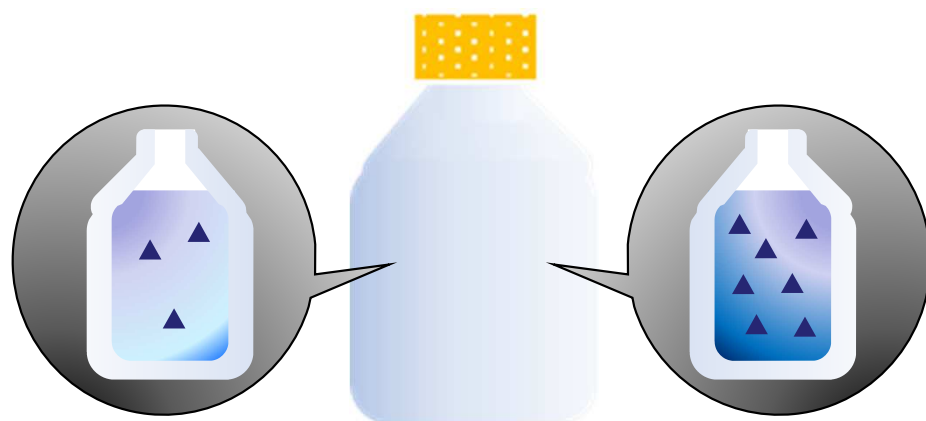


▶ 有機溶媒の比率が高いほど 親水性保持力も向上

# ⑤ HILIC Amide : 高活性型HILIC固定相



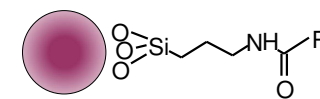
- アミド系親水基の活性による高い親水性保持力
- 塩濃度のコントロール等で 選択性が一部変化



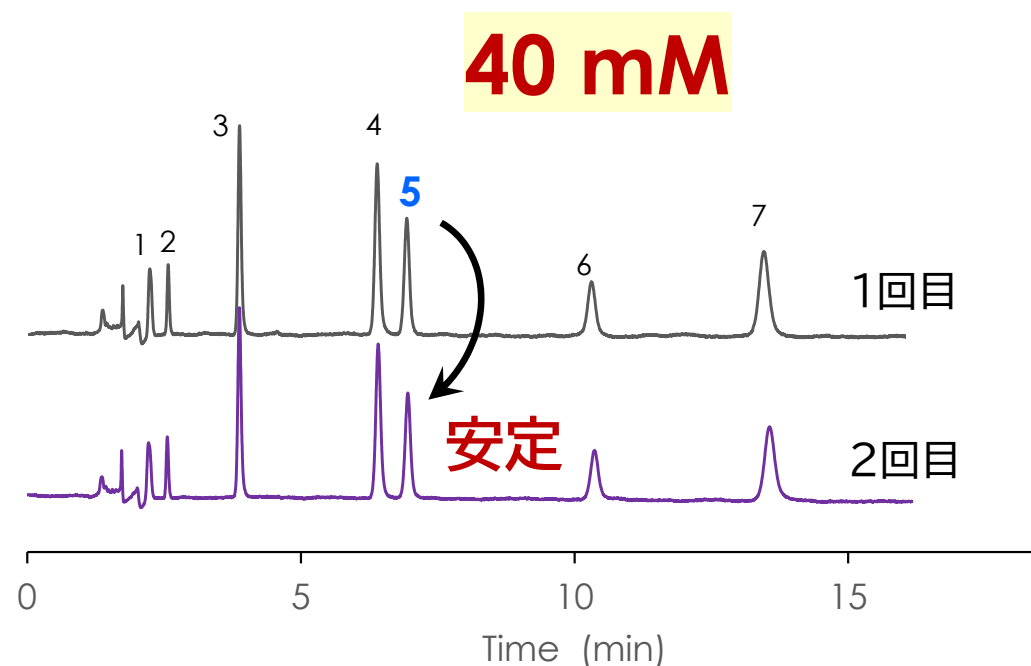
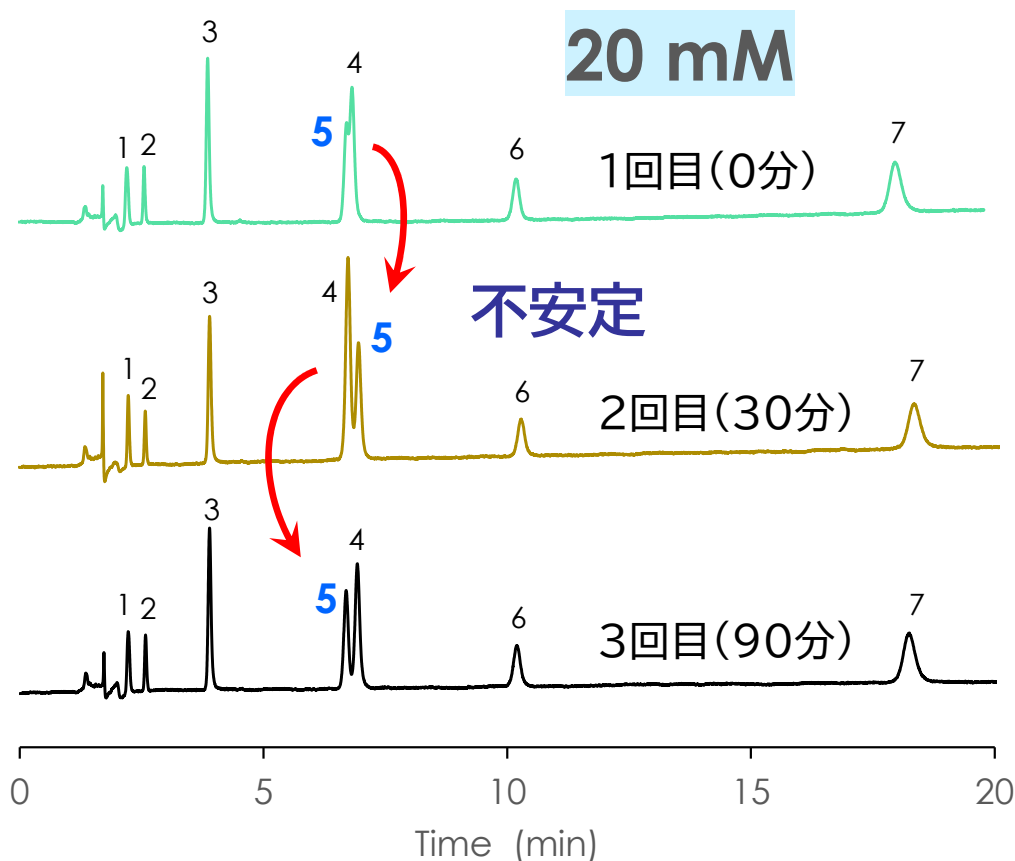
▶ 塩の種類・濃度制御が HILIC-Amide活用のコツ

# ◆平衡化時間と、保持挙動

SunShell HILIC Amide



Nucleobases

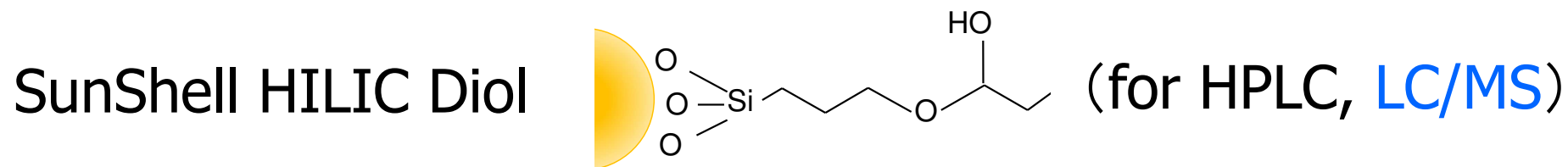


HILICモードは 塩濃度が重要因子

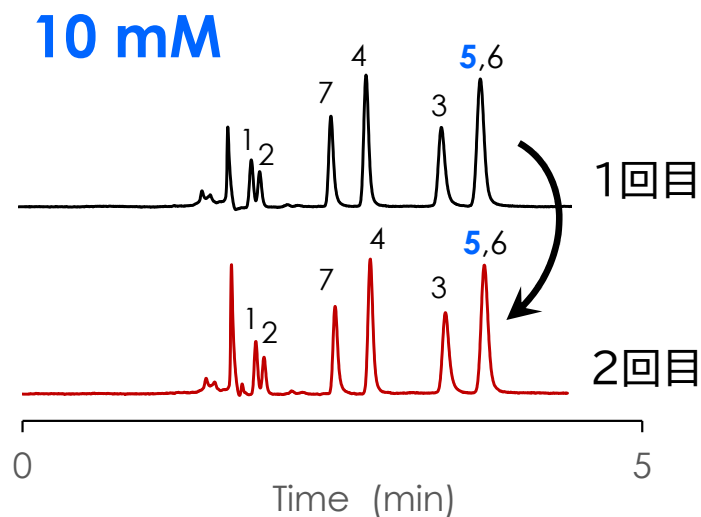
Column: SunShell HILIC-Amide 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm, Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/X mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7)=90/10, Flow rate:1.0 mL/min, Temperature: 40 °C, Detection: UV@250nm, Sample: 1.Thymine, 2.Uracil, 3.Adenine, 4.Hypoxanthine, 5.Cytosine, 6.Guanine, 7.Xanthine

▶ 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。

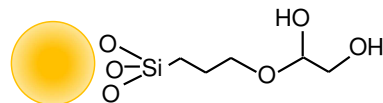
Column: SunShell HILIC Diol 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/10 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7) = 90/10  
 Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40 °C, Detection: UV@250nm  
 Sample: 1.Thymine, 2.Uracil, 3.Adenine, 4.Hypoxanthine, 5.Cytosine,  
 6.Guanine, 7.Xanthine

▶ 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

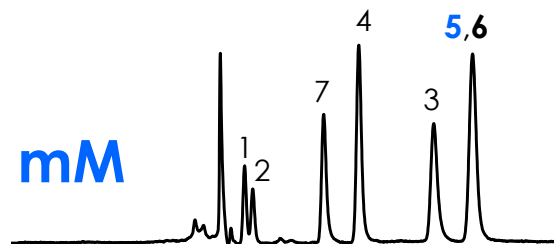
SunShell HILIC Diol



Sample:

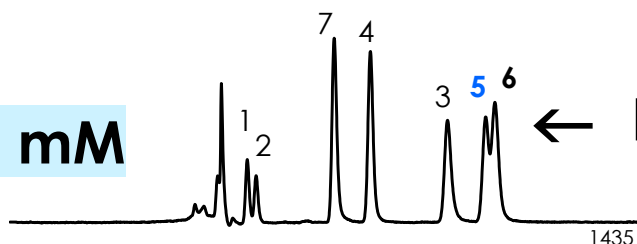
- 1 CC1=CNC(=O)NC1=O Thymine
- 2 O=C1NC=CC(=O)N1 Uracil
- 3 NC1=NC=NC2=C1N=CN2 Adenine
- 4 O=C1NC2=C(N1)N=CN=C2 Hypoxanthine
- 5 NC1=NC(=O)NC=C1 Cytosine
- 6 NC1=NC2=C(N=CN2)C(=O)N1 Guanine
- 7 O=C1NC2=C(N=CN=C2)C(=O)N1 Xanthine

10 mM



Column: SunShell HILIC Diol 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: A)CH<sub>3</sub>CN / 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

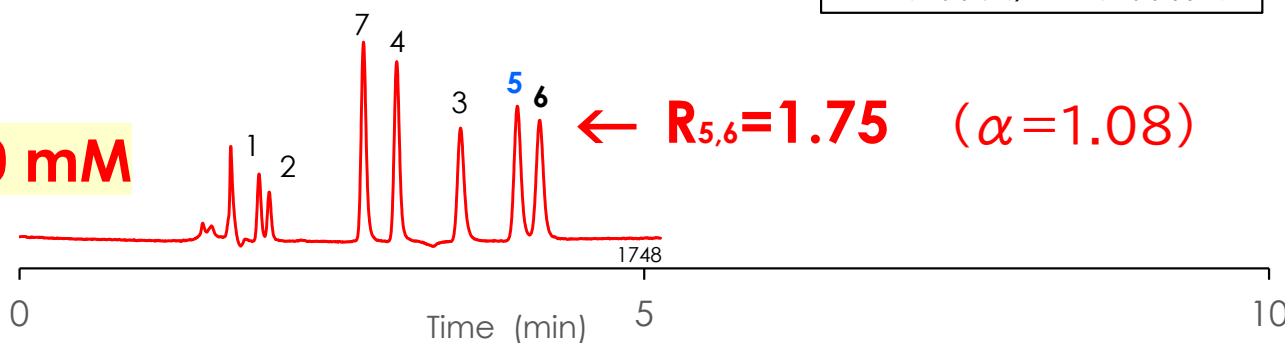
20 mM



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

R: 分離度,  $\alpha$ : 分離係数

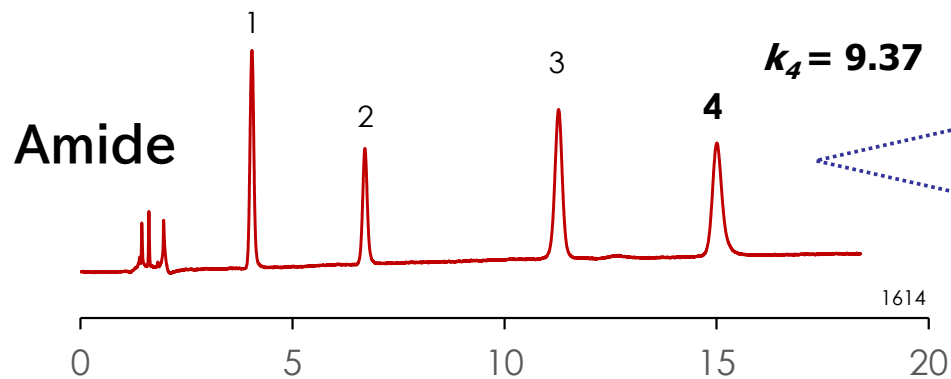
80 mM



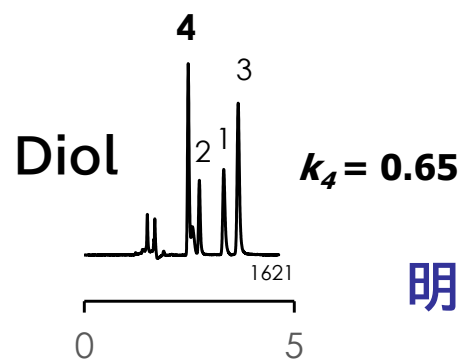
$R_{5,6}=1.75$  ( $\alpha=1.08$ )

▶ 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

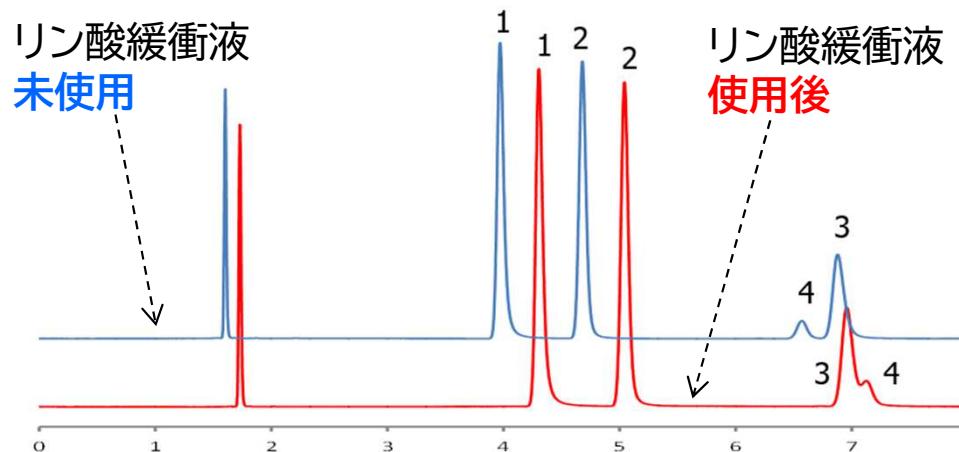


Column: SunShell HILIC Diol or HILIC-Amide 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase:  
 Acetonitrile: **20 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7)** = 90:10  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C , Detection: UV@250nm, Sample: shown below

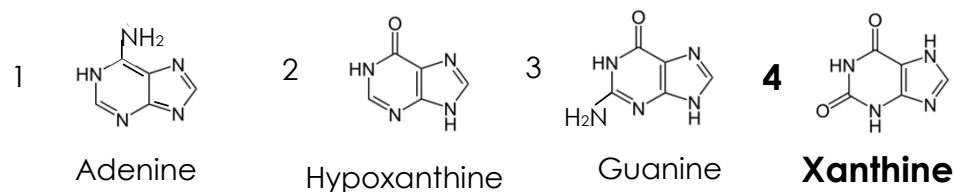


明白な保持・選択性の差

## 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( $\pi$ 相互作用)が働く
- Biphenylでは  $\pi$ 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