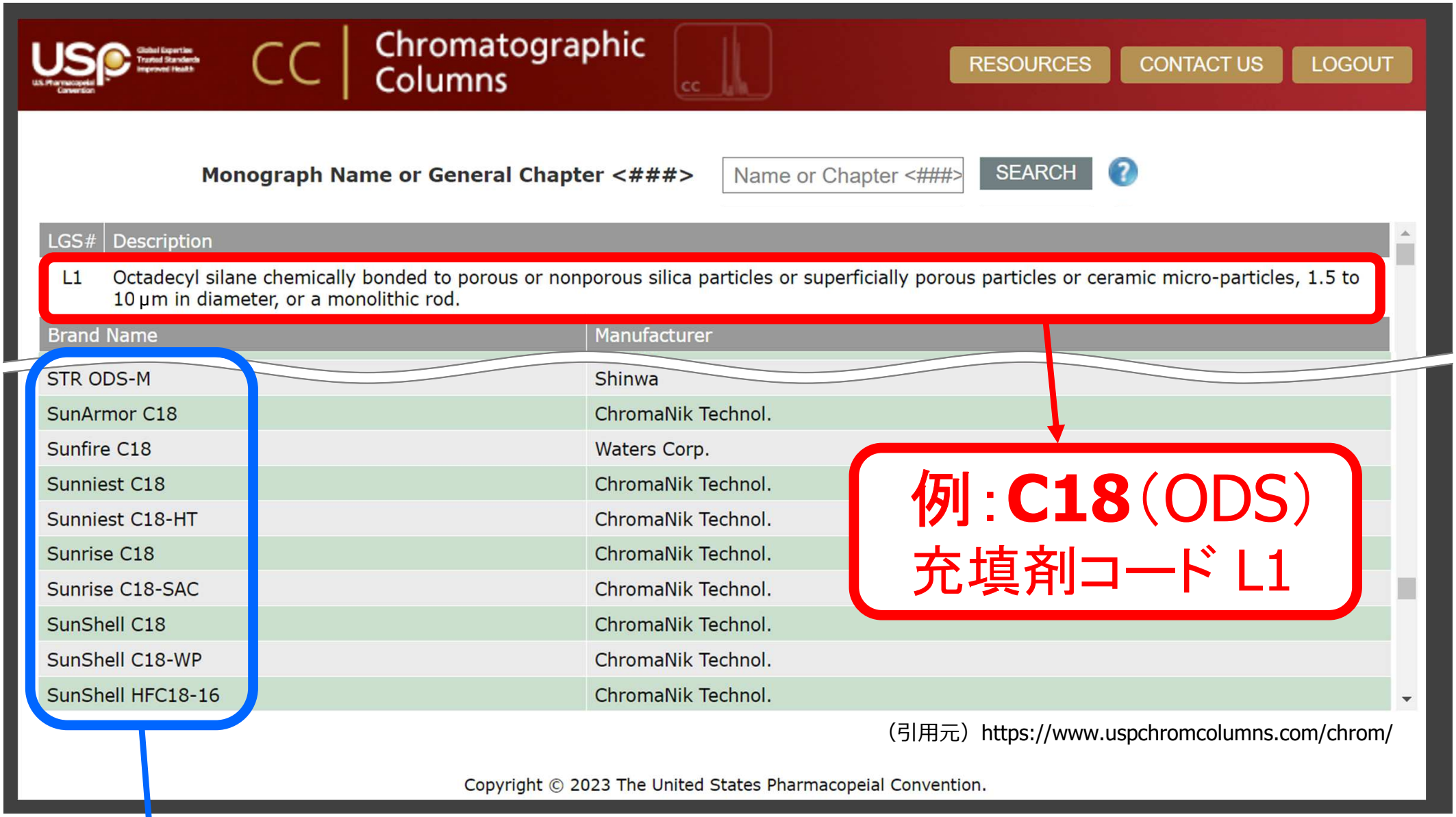
HPLCカラム充填剤も色々（USPを例に）

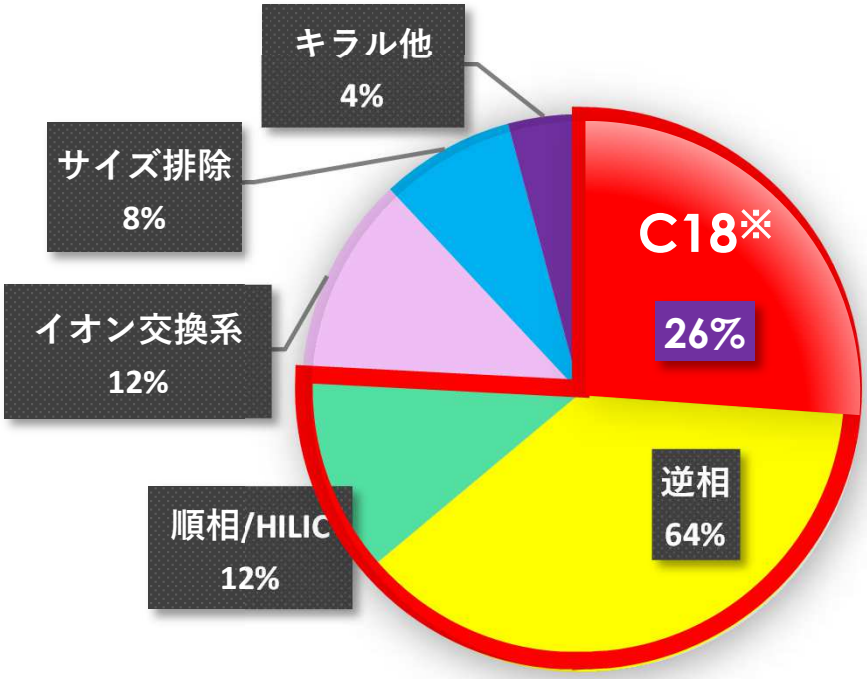


例：USP Lx登録済みカラム充填剤の名称

HPLCカラムも色々

参考:米国薬局方(US Pharmacopeia;USP)

USP CC Chromatographic Columns



HPLC充填剤USPコード、登録ブランド数上位６

USP Code	分離モード	充填剤	登録数
L1	逆相	C18	1049
L7	逆相	C8	442
L11	逆相	Phenyl	268
L3	順相／HILIC	Silica	245
L10	逆相*	Cyano	191
L8	順相／HILIC	NH2	155

＊USP登録情報より、2023年1月調査時点での集計。
（逆相には、逆相系MIXモードやCyano等も含む）

USPに登録されている

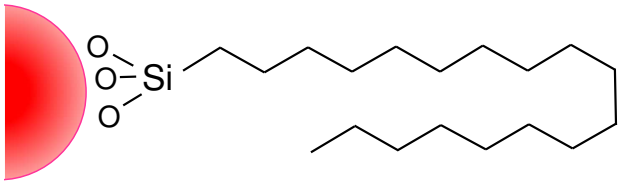
HPLCカラム充填剤の総数：4014

「逆相カラム」の数：2566

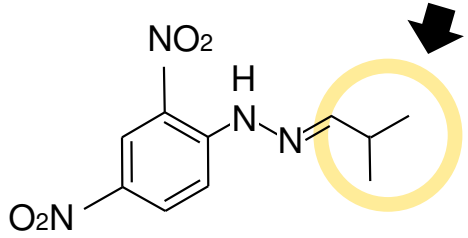
「C18カラム」の数：1049

41%

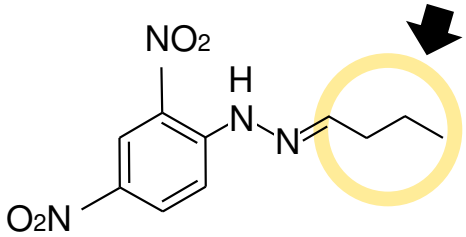
C18以外の逆相カラムを必要とする場面



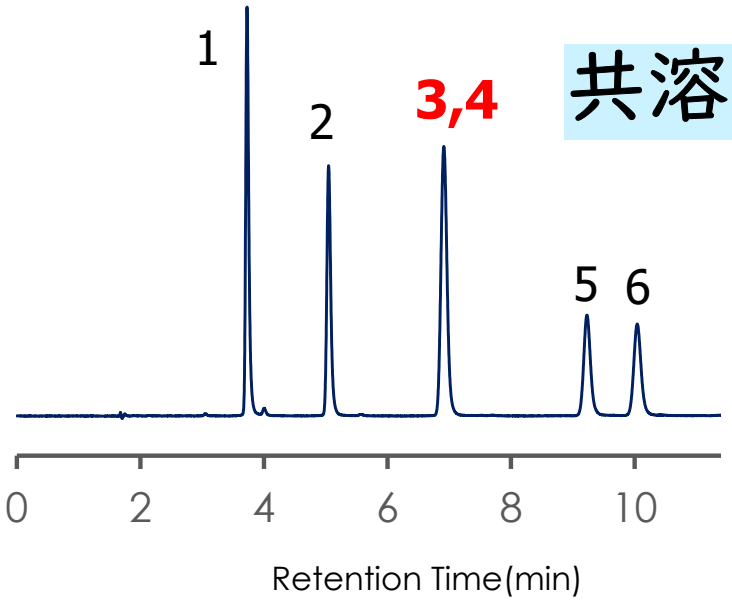
C18(ODS)



3. iso-Butyraldehyde-DNPH



4. n-Butyraldehyde-DNPH



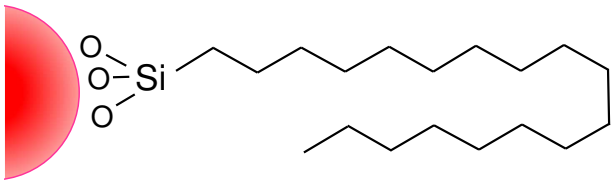
共溶出

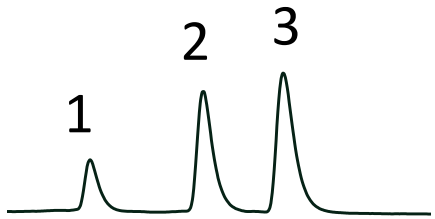
Column: SunShell 2.6 µm, 150 x 4.6 mm
Mobile phase: IPA:MeOH:H2O=25:40:35
Temperature: 40 °C
Detection: UV@360 nm

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

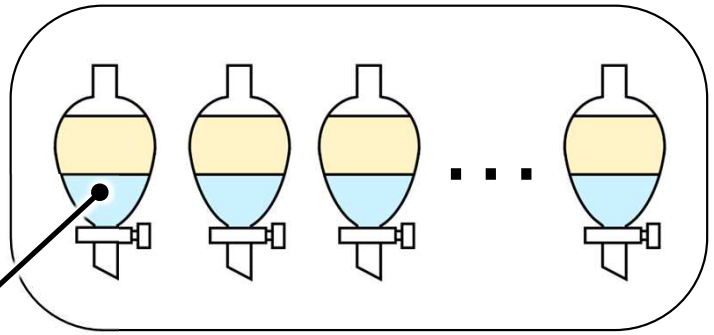
“疎水性”だけでは分離困難な**類縁化合物**

逆相分離の基本（C18カラム）





疎水基との分配に
基づいた保持・分離



移動相
（水、アセトニトリルなど）

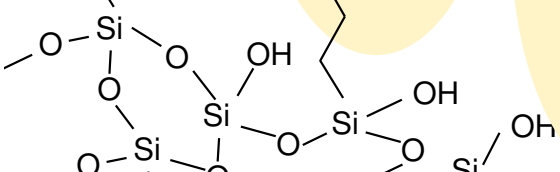
分析種3

分析種2

分析種1

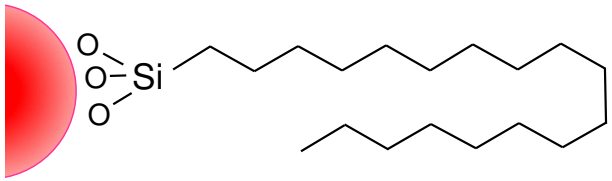
疎水性
相互作用

固定相
（C18など）

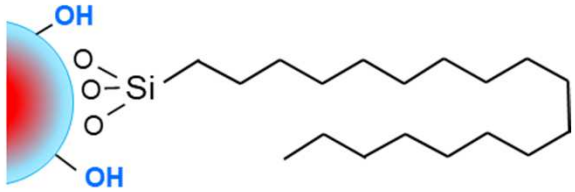


「C18」も色々、逆相カラムも色々

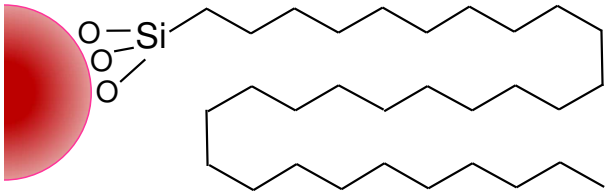
L1 C18



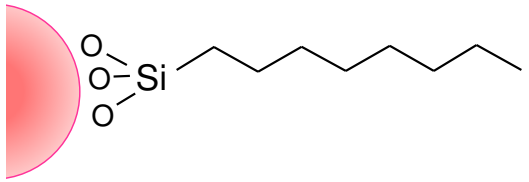
C18-SAC



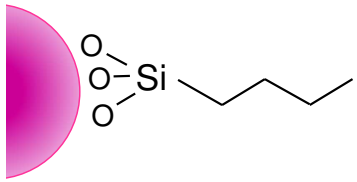
RP-AQUA C30



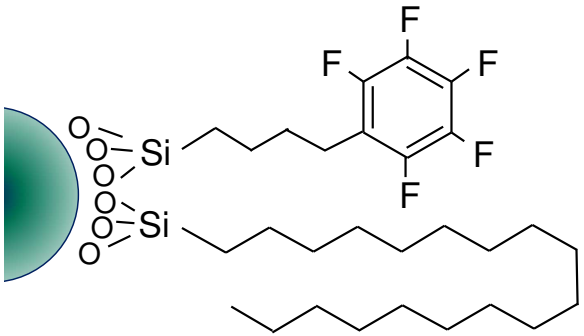
C8



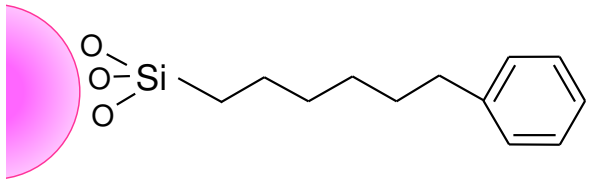
C4



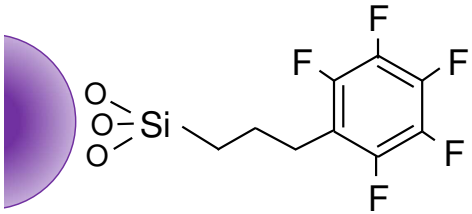
PFP& C18



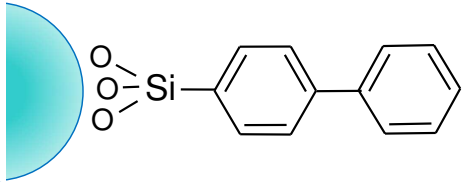
Phenyl



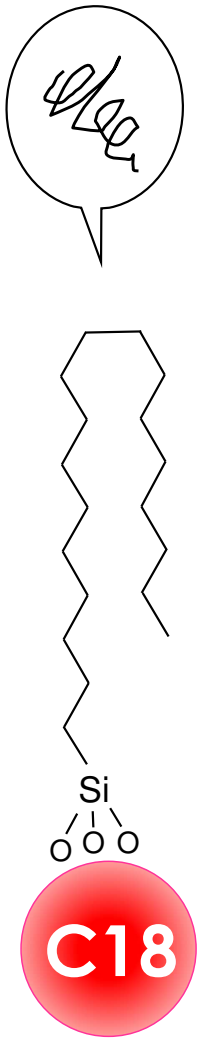
PFP



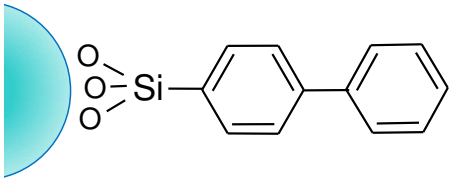
Biphenyl



「疎水性以外」の選択性を上手く活用

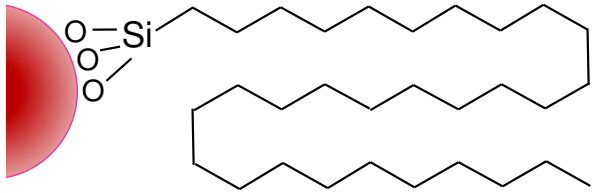


Biphenyl



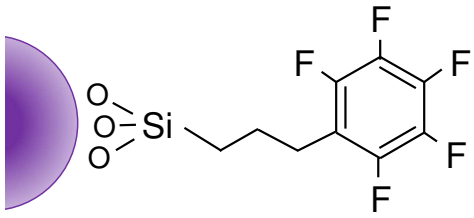
CH-π選択性

C30

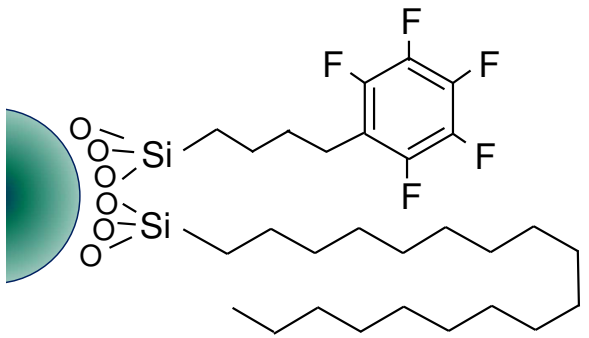


形状認識

PFP系



双極性間相互作用



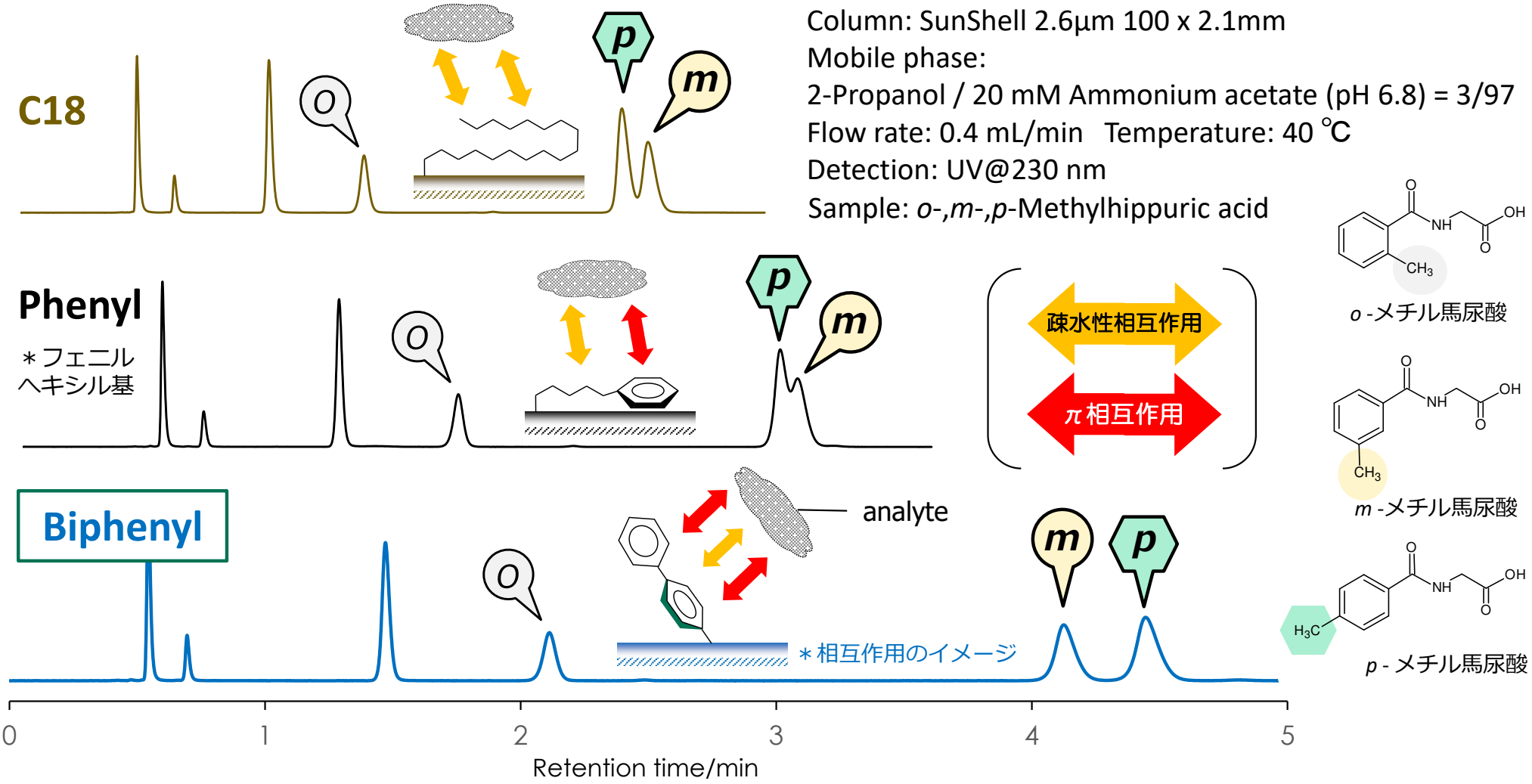
Biphenyl

ChromaNik

CH-π選択性

Biphenyl：o,m,p-メチル馬尿酸の分離

Biphenylの特徴：C18と選択性が変わる（異なる順序で溶出）



Column: SunShell 2.6µm 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 ℃
Detection: UV@230 nm
Sample: *o*-,*m*-,*p*-Methylhippuric acid

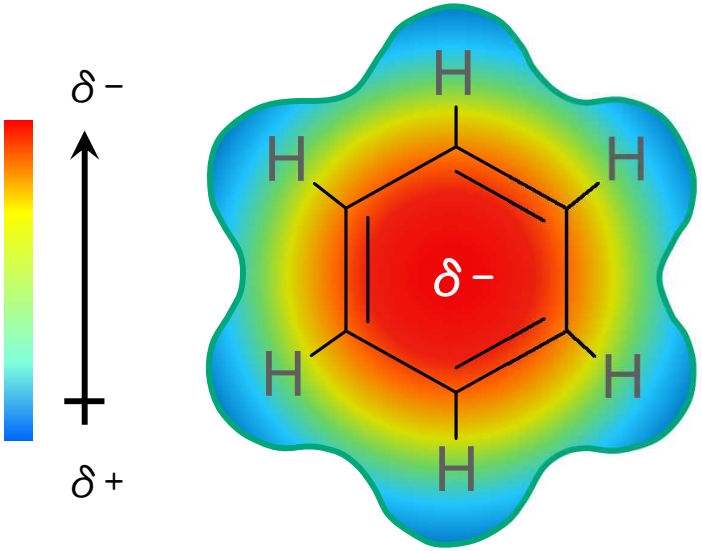
o -メチル馬尿酸

m -メチル馬尿酸

p - メチル馬尿酸

フェニルより強固に、**π電子に基づく相互作用** が働く

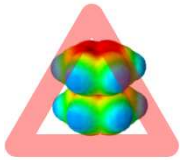
π－π相互作用の誤解

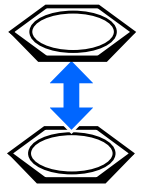


ベンゼンの静電ポテンシャルマップ（イメージ）

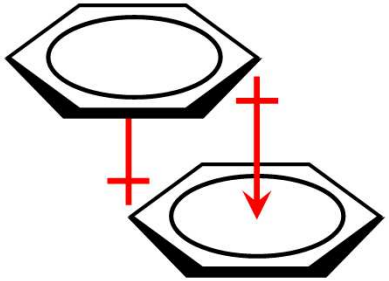
＊分子としては無極性でも、相互作用に着目するとフェニルは「**極性基**」。電気陰性度の大きい分子(C他)と結合した**H**を引き付ける。

重なり配置

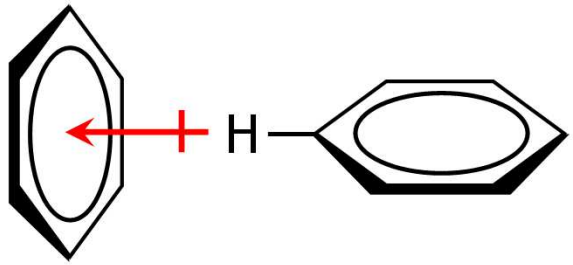


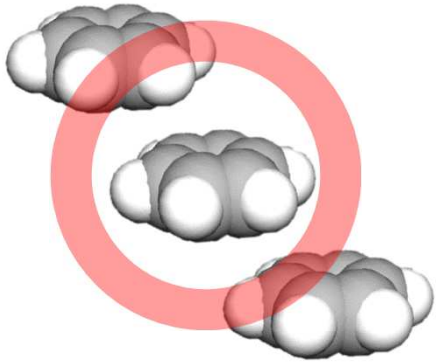


斥力

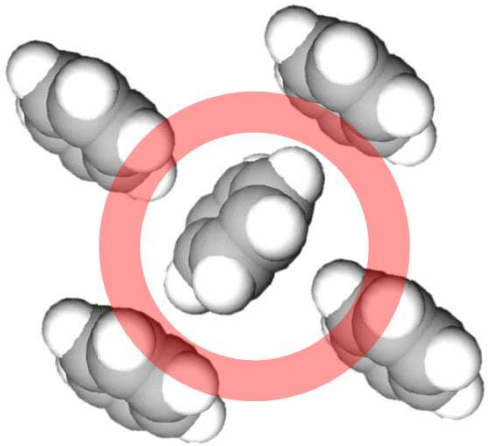


ずれた平行配置





π－π相互作用



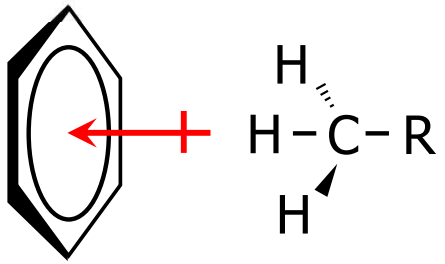
より安定

T字型配置

π－π相互作用：フェニルカラムの特徴と言われるが、共役系（芳香環・多重結合）化合物を **保持するとは限らない。**

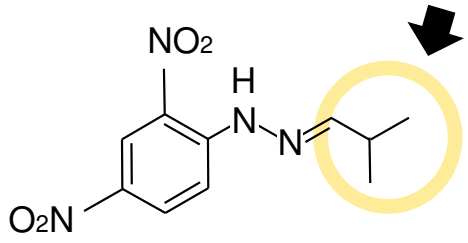
多様なπ相互作用：カチオン-π、ハロゲン-π相互作用、π水素結合（NH-π相互作用、OH-π相互作用）．．．

逆相条件下で注目： **CH-π相互作用**

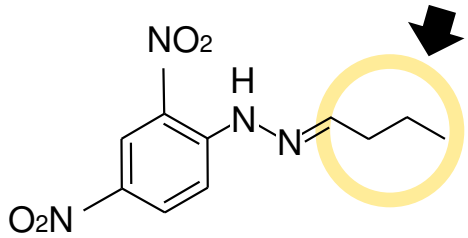


CH-π相互作用を活かした分離の効果

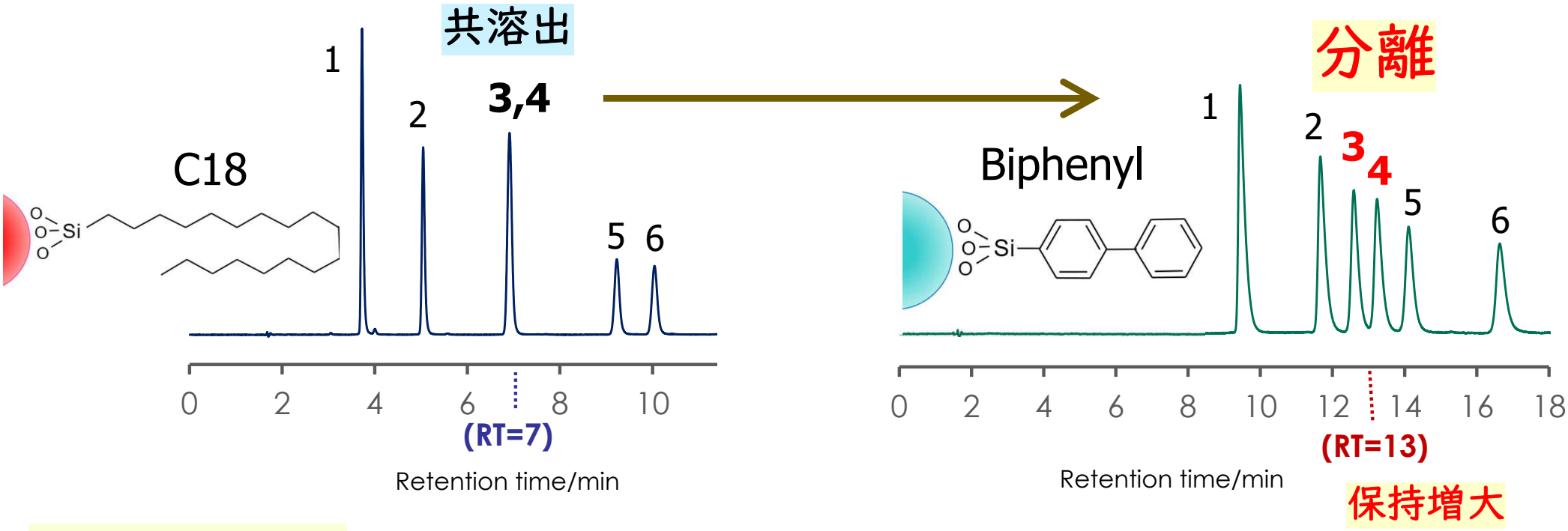
BiphenylのCH-π相互作用によって、類縁化合物を分離



3. iso-Butyraldehyde-DNPH



4. n-Butyraldehyde-DNPH



移動相有機溶媒選択もポイント

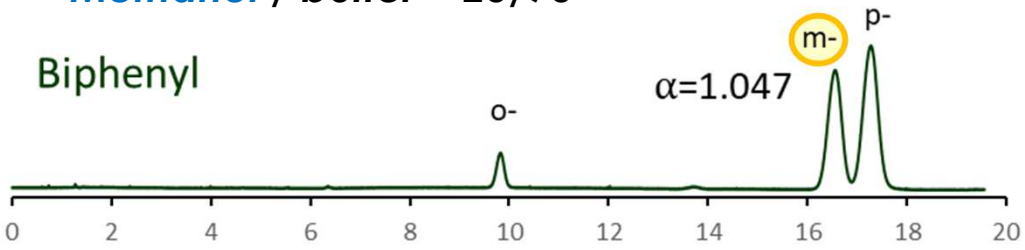
Column: SunShell 2.6 µm, 150 x 4.6 mm
Mobile phase: IPA:MeOH:H2O=25:40:35
Temperature: 40 °C
Detection: UV@360 nm

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

Biphenylカラム：有機溶媒選択のコツ

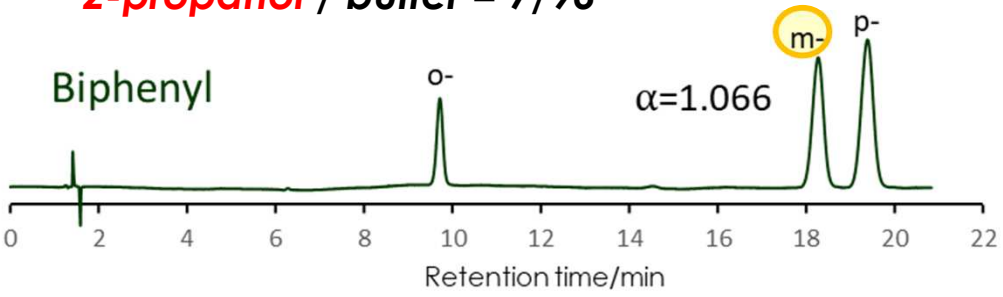
有機溶媒種による分離影響

Methanol / buffer = 25/75



メタノール、2-プロパノールを移動相に用いると、π電子に基づく保持選択性が最大限に発揮される。

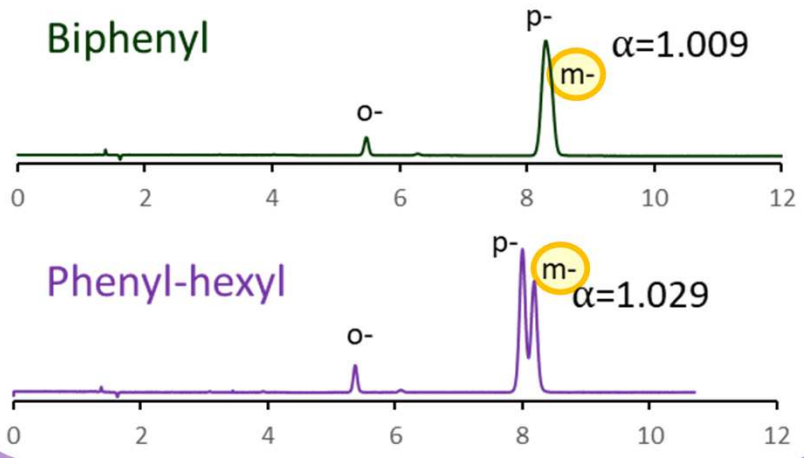
2-propanol / buffer = 7/93



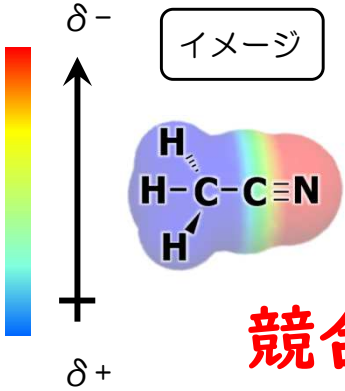
Column: SunShell Biphenyl 2.6 µm 150 x 4.6 mm
Mobile phase: Organic solvent/25 mM Phosphate buffer pH 3.0
Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C Detection: UV@230 nm
Sample: *o*-, *m*-, *p*-Methylhippuric acid

π相互作用が抑制される

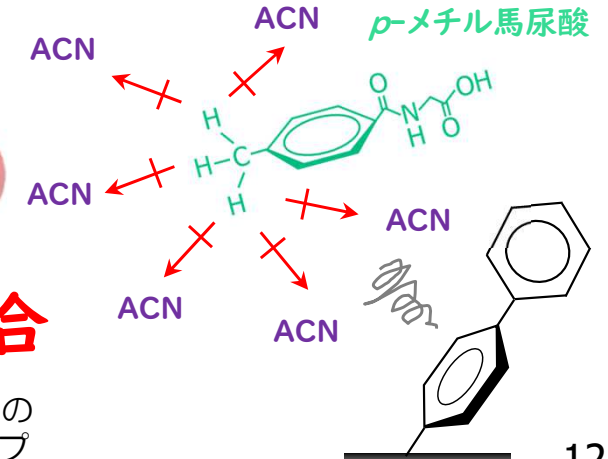
Acetonitrile / buffer = 13.5/86.5



アセトニトリルの三重結合（π電子）の影響



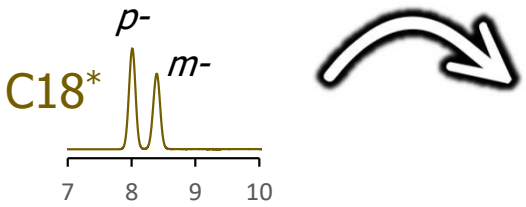
競合



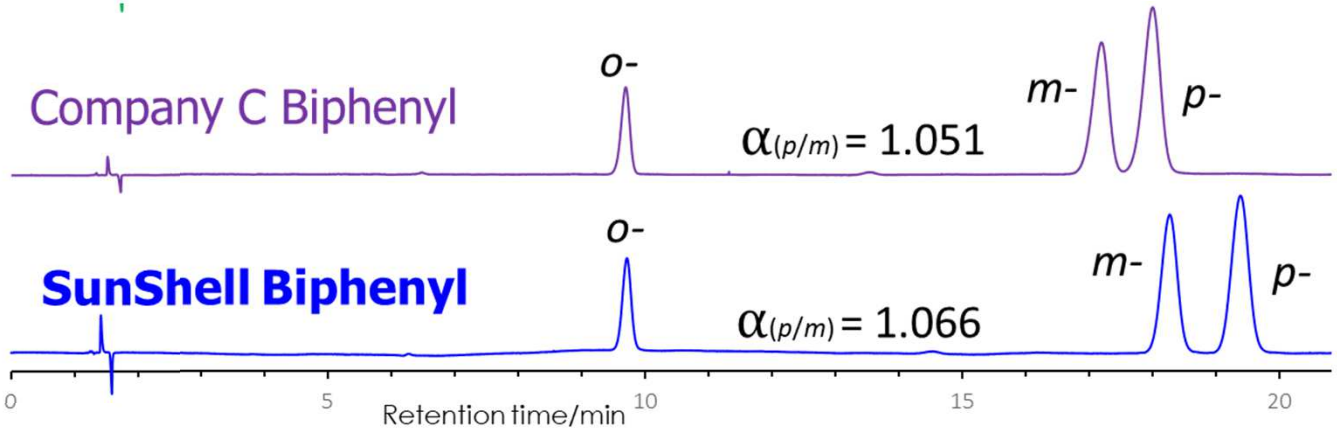
アセトニトリル(ACN)の
静電ポテンシャルマップ

Biphenylカラムと、「CH−π 選択性」

CH−π相互作用：Biphenylと分子内相互作用との綱引き

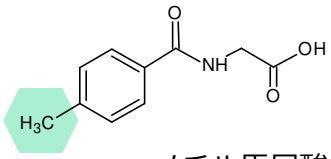


＊ SunShell
（同条件）

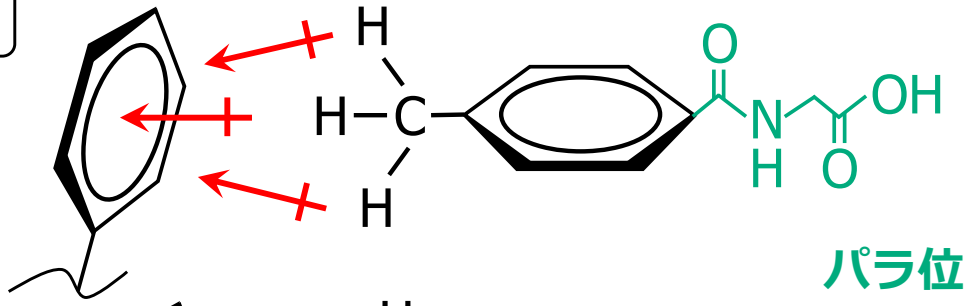


C18、Phenylカラムでの
保持はBiphenylより弱く、
溶出順序は共に「p−,m−」

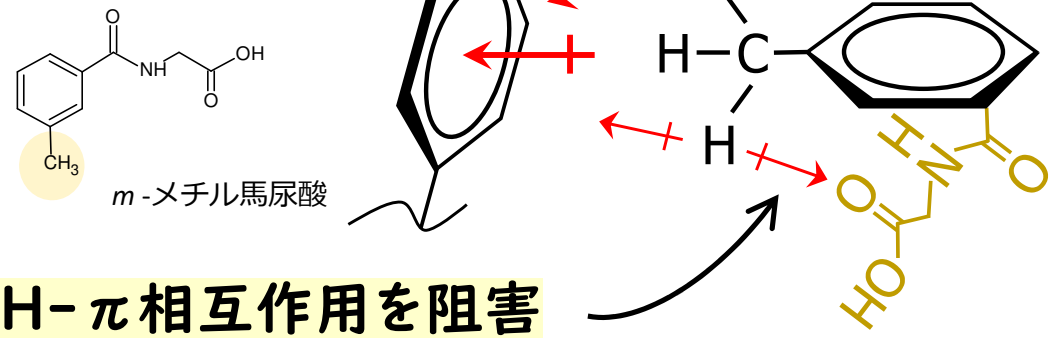
相互作用のイメージ



p - メチル馬尿酸



パラ位



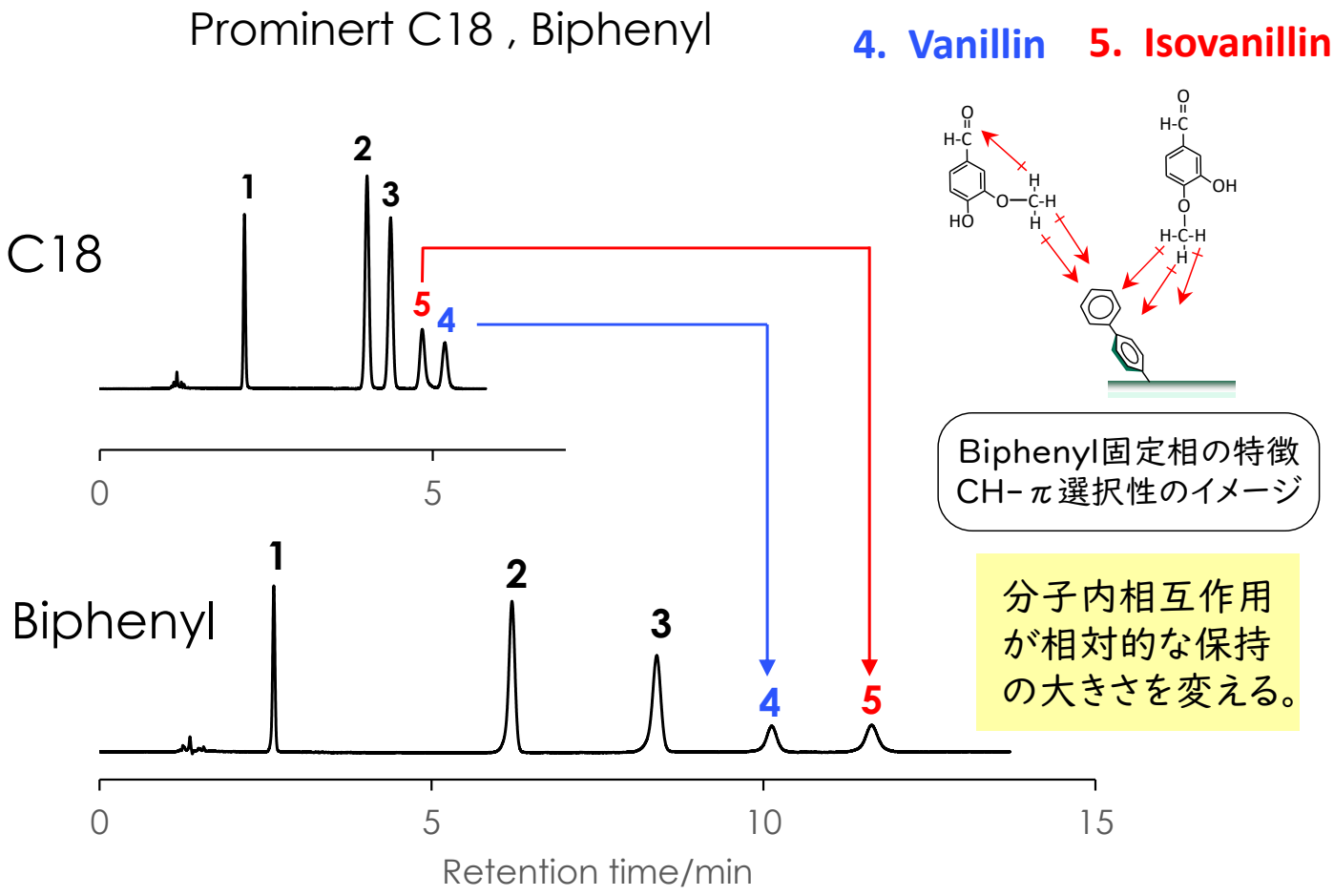
m -メチル馬尿酸

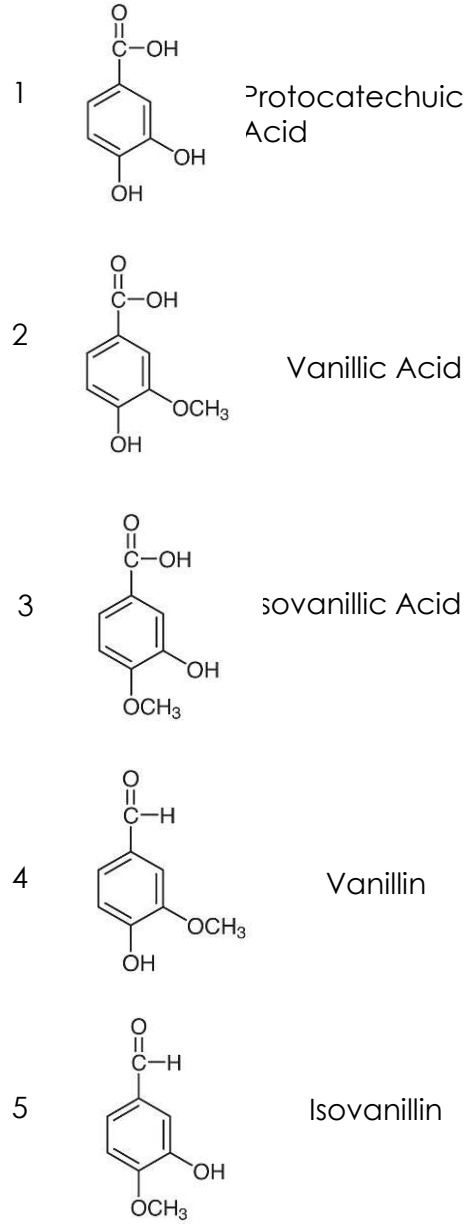
メタ位

Column:
2.6 µm or 2.7 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

分子内の相互作用が、**CH−π相互作用を阻害**

Biphenylアプリケーション：バニリン類





Column: Prominert C18 , Biphenyl 3.5 µm, 150 x 4.6 mm

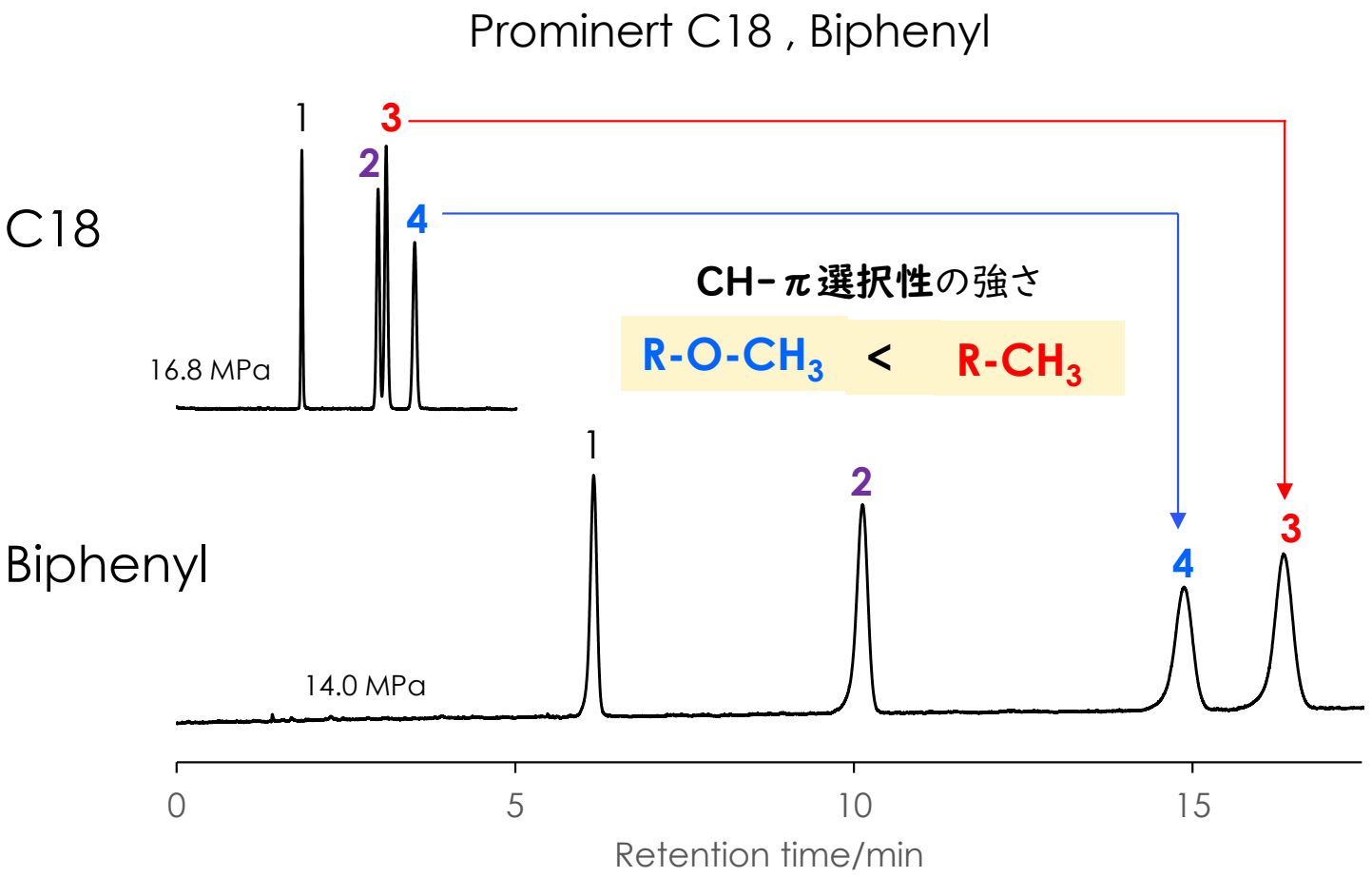
Mobile phase: Methanol / 0.1% Phosphoric acid = 25 / 75

Flow rate: 1.0 mL/min Sample: 1 = Protocatechuic Acid

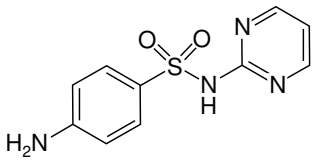
Temperature: 40 °C 2 = Vanillic Acid , 3 = Isovanillic Acid

Detection: UV@250nm 4 = Vanillin , 5 = Isovanillin

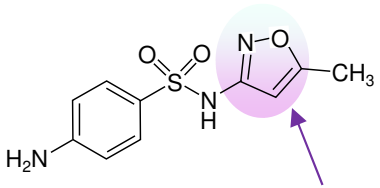
Biphenylアプリケーション：サルファ剤



1 Sulfadiazine

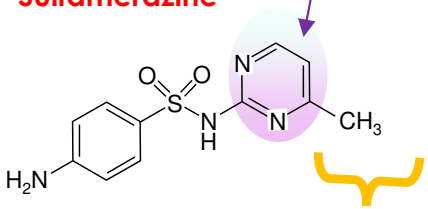


2 Sulfamethoxazole

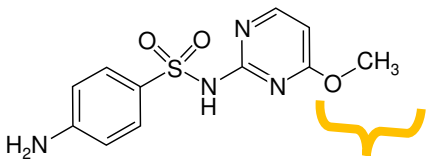


複素環の違い

3 Sulfamerazine



4 Sulfamonomethoxine



Column: Prominert C18 or Biphenyl 3.5 µm, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Methanol / 50mM Ammonium Acetate = 20 / 80

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C Sample: 1 = Sulfadiazine 3= Sulfamerazine

Detection: UV@265nm 2 = Sulfamethoxazole 4 = Sulfamonomethoxine

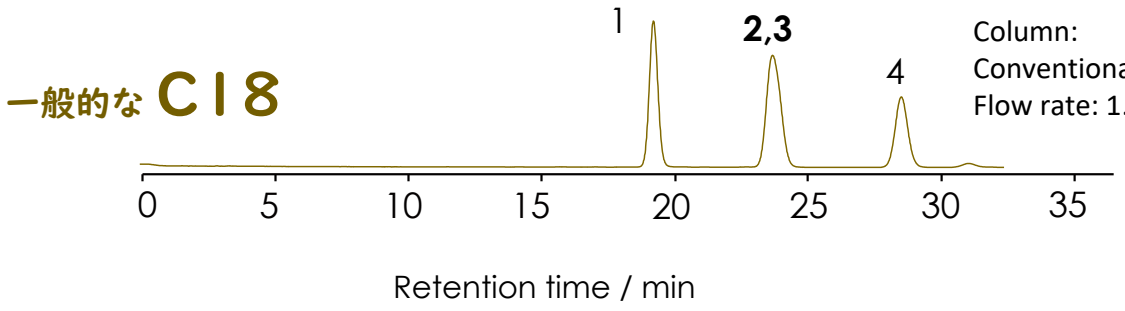
C30、PFP系

ChromaNik

形状認識
双極子間相互作用

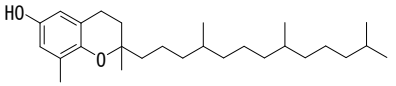
C30：α,β,δ,γトコフェロールの分離

C30の特徴：**C18より、類縁化合物の分離に優れる。**

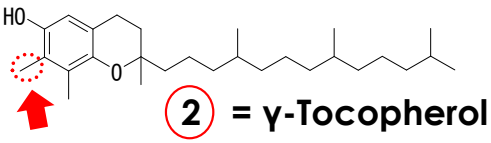


Column:
Conventional C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm
Flow rate: 1.0 mL/min

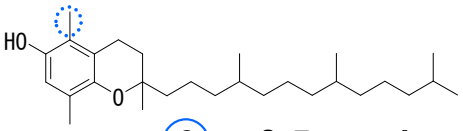
<共通条件>
Mobile phase:
Methanol/water = 97/3
Temperature: 25 °C
Detection: UV@295nm
Sample: α,β,δ,γ-Tocopherol



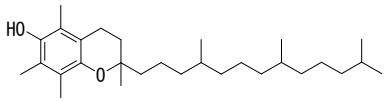
1 = δ-Tocopherol



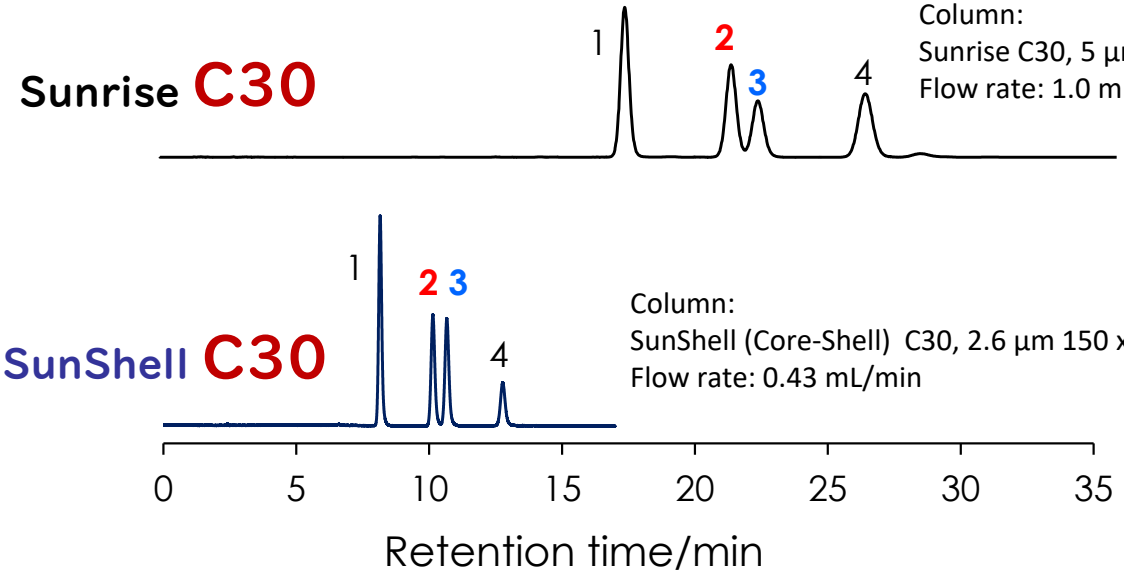
2 = γ-Tocopherol



3 = β-Tocopherol



4 = α-Tocopherol



Column:
Sunrise C30, 5 µm 250 x 4.6 mm
Flow rate: 1.0 mL/min

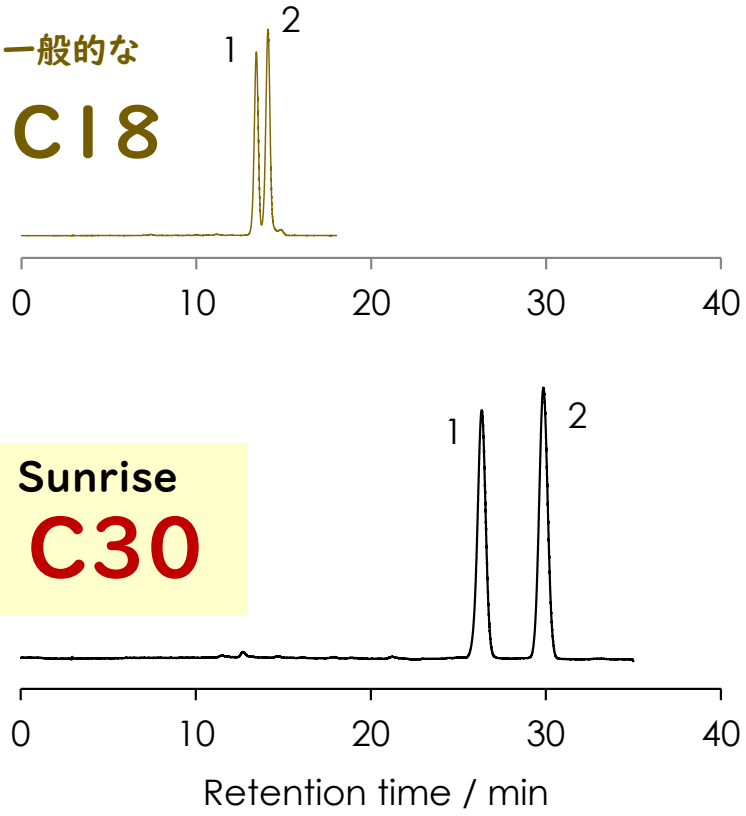
Column:
SunShell (Core-Shell) C30, 2.6 µm 150 x 3.0 mm
Flow rate: 0.43 mL/min

低極性の構造異性体分離に有効（疎水性メイン）

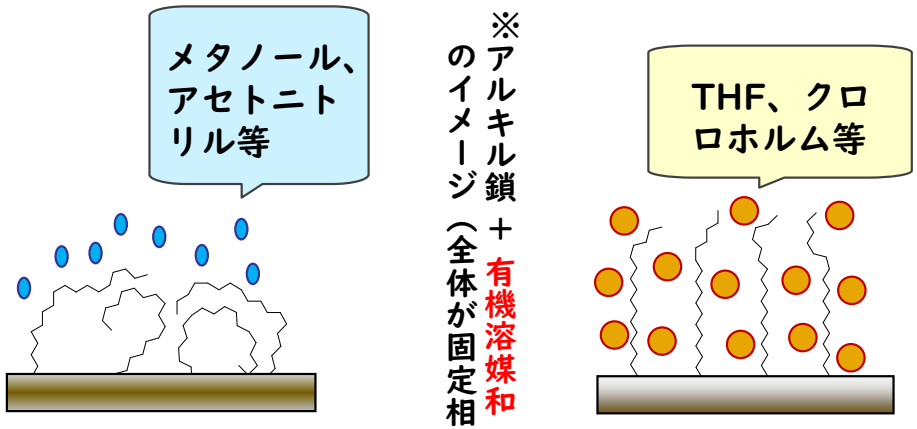
C30カラム：有機溶媒選択のコツ

α, β-カロテン の分離比較（高溶媒和移動相条件）

1. α-Carotene
2. β-Carotene



溶解力の高いクロロホルムやTHFを移動相に用いると、**アルキル鎖の溶媒和量が増大**する。



＜共通条件＞

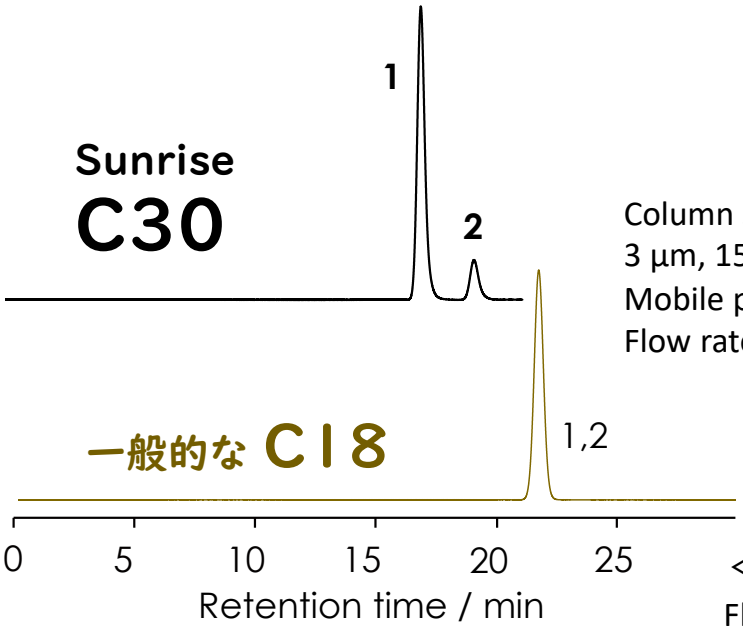
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 30 °C
Detection: UV at 450 nm
Sample: α, β-Carotene

Column size:
5 µm, 250 x 4.6 mm
Mobile phase:
$CH_3CN/CHCl_3$ = 80:20

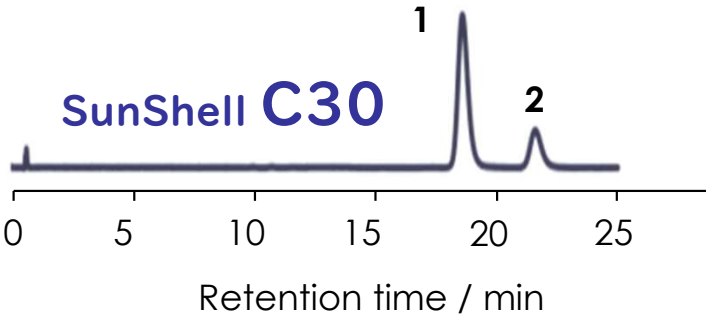
C30は、**疎水性のキャパシティー**がC18より大きい。

C30アプリケーション：ビタミンK1

ビタミンK1異性体の分離比較



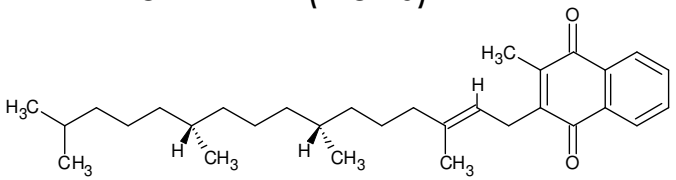
Column size:
3 µm, 150 x 4.6 mm
Mobile phase: Methanol
Flow rate: 1.0 mL/min



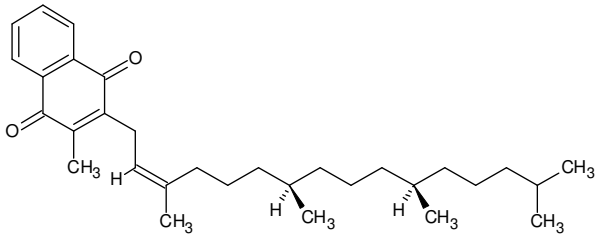
<共通条件>
Flow rate: 1.0 mL/min
Detection: UV@250 nm
Temperature: 15 °C
Sample:
Vitamin K1 isomers

Column:
SunShell C30, 2.6 µm 100 x 2.1 mm
Mobile phase: methanol/water = 96/4
Flow rate: 0.35 mL/min

1 =Vitamin K1 (trans)



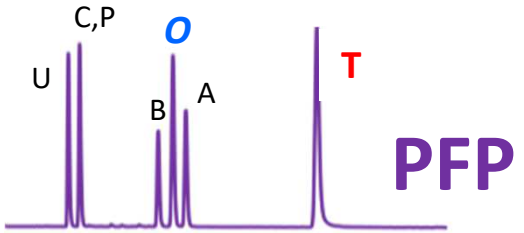
2 = Vitamin K1 (cis)

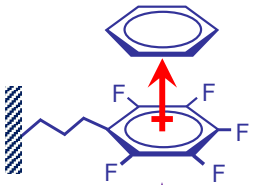


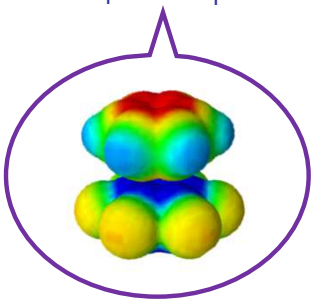
温度もカギ
（低温ほど高分離）

PFP：o-ターフェニル、トリフェニレン

PFPの特徴：**形状認識能（立体・平面選択性）に優れる。**



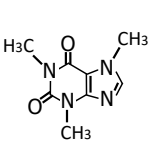




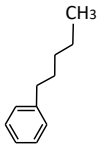
芳香環を認識

Sample
(for Batch test)

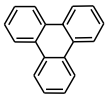
Uracil (t_0)



Caffeine

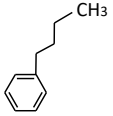


Amylbenzene



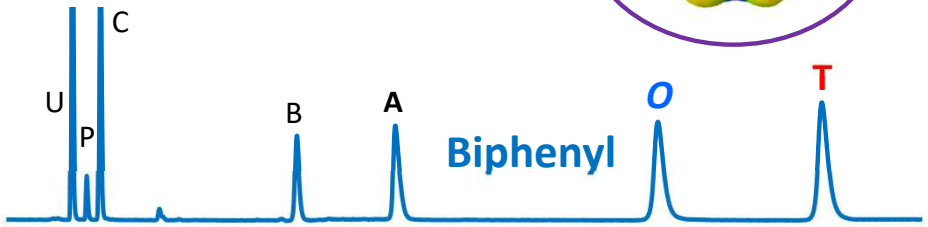
Triphenylene

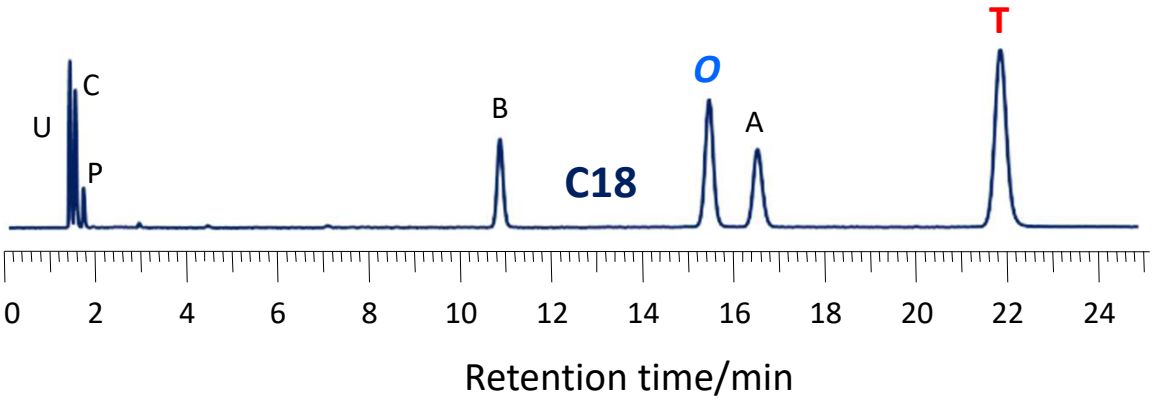
Phenol



Butylbenzene

O-terphenyl





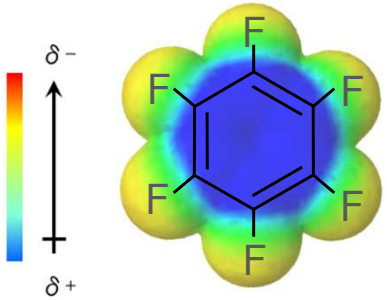
Column： SunShell 2.6μm, 150 x 4.6 mm　Flow rate: 1.0 mL/min
Mobile phase: CH_3OH/H_2O=75/25　Temperature: 40 °C

分離特性	水素結合性	疎水性	立体選択性
分離係数 (k/k)	α (C/P)	α (A/B)	α (T/*o*)
PFP	1.00	1.31	**2.38**
Biphenyl	1.82	1.44	**1.28**
C18	0.39	1.60	**1.46**

PFPアプリケーション：クレゾール異性体

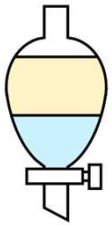
⇆ 双極子間相互作用

極性基を含む類縁化合物
（置換位置の違い）の認識。



パーフルオロベンゼンの
静電ポテンシャルマップ

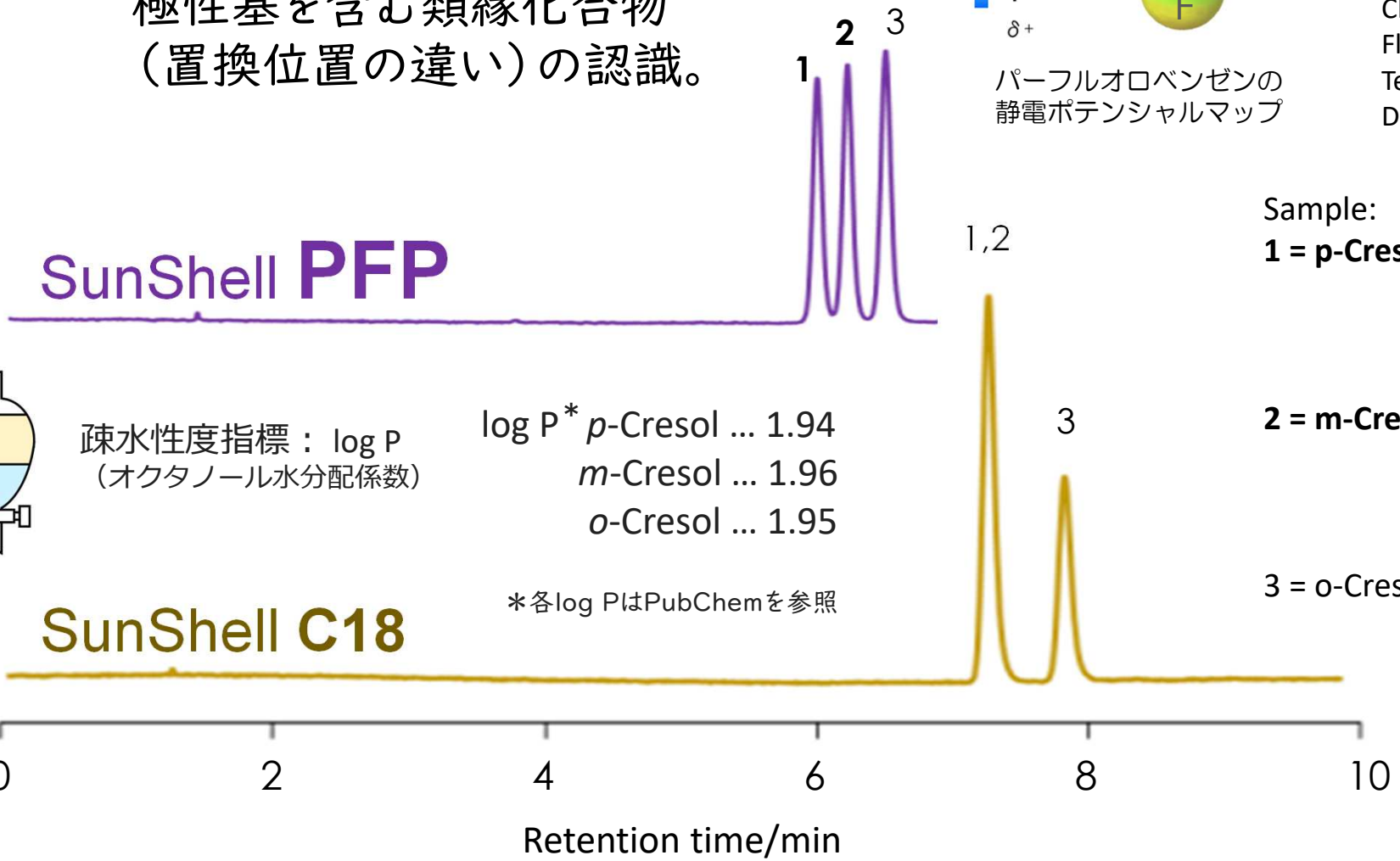
Column size:
2.6 µm 150 x 4.6 mm
Mobile phase:
CH_3OH/H_2O=40/60
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 25 ºC
Detection: UV@250 nm



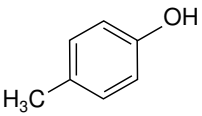
疎水性度指標： log P
（オクタノール水分配係数）

log P* *p*-Cresol … 1.94
m-Cresol … 1.96
o-Cresol … 1.95

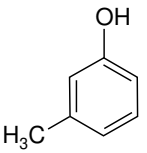
＊各log PはPubChemを参照



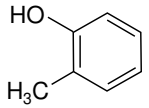
Sample:
1 = p-Cresol



2 = m-Cresol

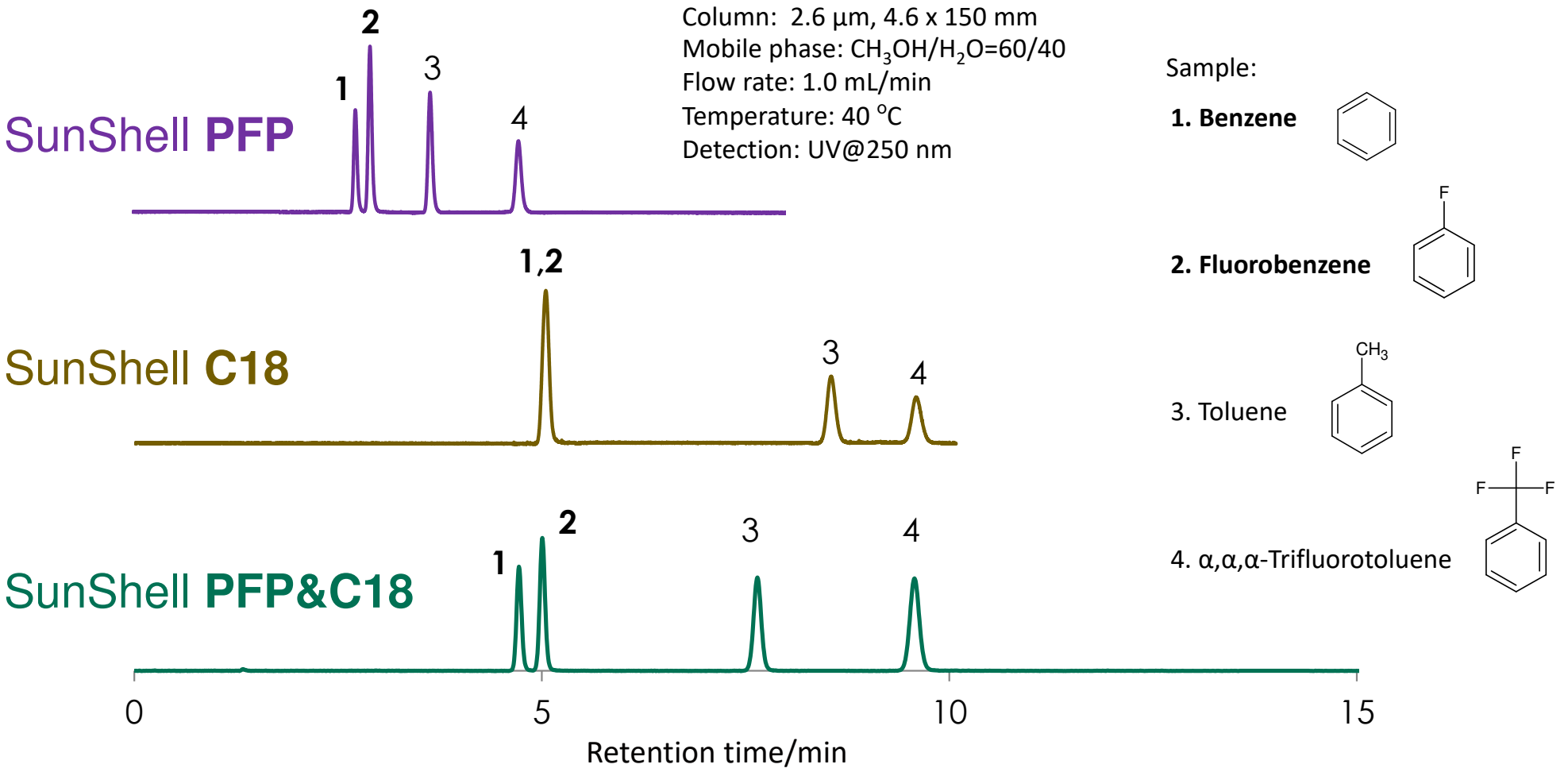


3 = o-Cresol



ハロゲン選択性と、PFP&C18融合固定相

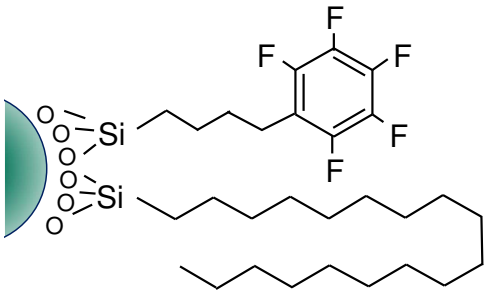
「PFP&C18」の特徴：**PFPの選択性と、C18の保持性**



PFP,及び**PFP&C18**は、極性置換基の認識能が高い。

「PFP&C18」の特性　～ PFPとの違い ～

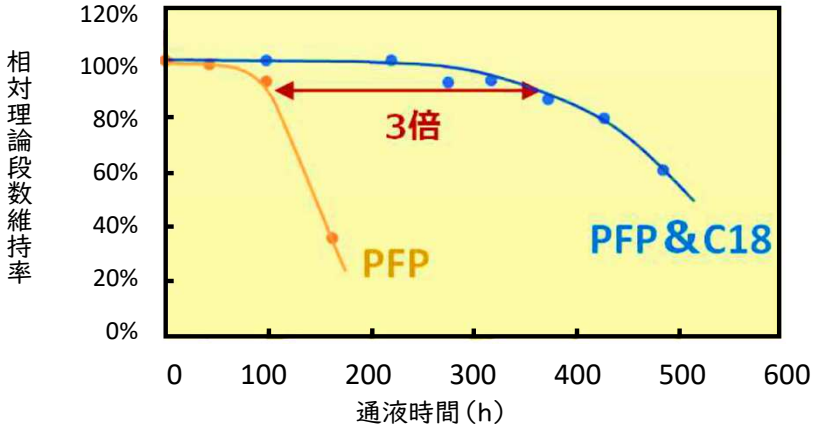
PFP&C18は、疎水性を付与と共に**安定性を向上**（約３倍）

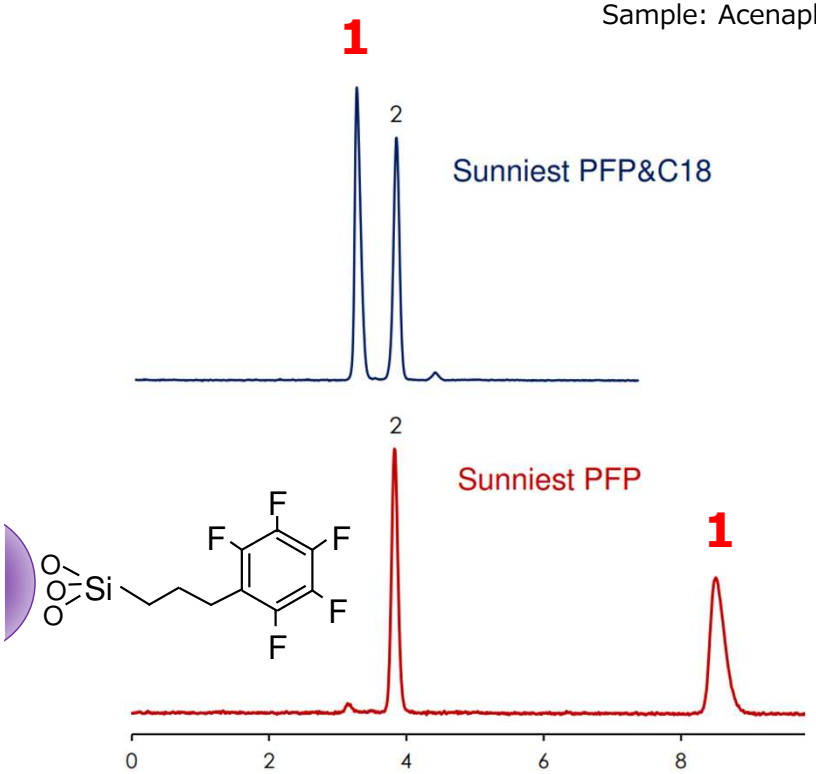


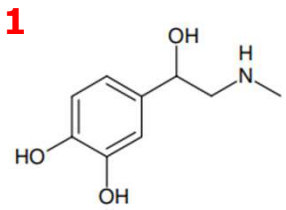
Column: Sunniest 5 µm , 2.1m x 150mm

耐久性テスト条件
Mobile phase: CH_3OH/20mM Phosphate buffer (pH 7.0) = 70/30
Flow rate: 0.2 mL/min Temperature: 40 ºC

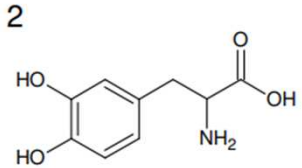
理論段数測定条件（右図）
Mobile phase: CH_3OH/H_2O=70/30（PFP&C18）
CH_3OH/H_2O=60/40（PFP）
Flow rate: 0.2 mL/min　Temperature: 40 ºC
Sample: Acenaphthene







Epinephrine



Levodopa

Column:　5 µm, 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

PFPとは、分離選択性が一部異なる。

類縁化合物向け、カラム選択（まとめ）

Biphenyl　CH-π選択性（π電子に基づく保持特性）

- CH基の位置/分子内相互作用の差を認識

C30　形状認識（アルキル基の相互作用を拡張）

- 低極性の構造異性体(cis,trans等)を認識

PFP，PFP&C18　双極子間相互作用（&ハロゲン選択性）

- 極性置換基の有無・位置の違いを認識