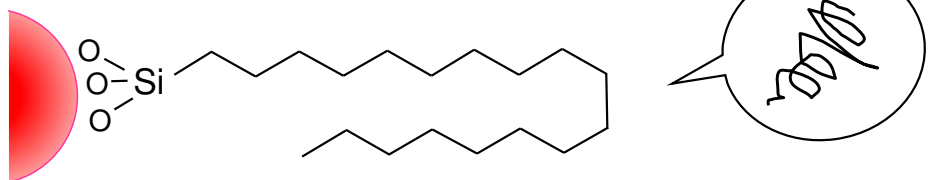




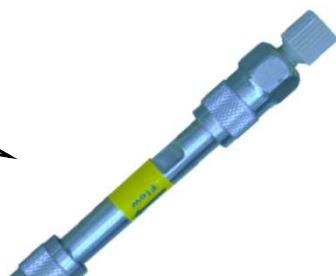
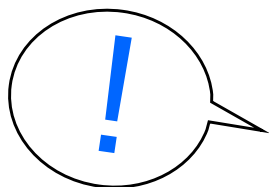
C18(ODS)で困った時の

HPLCカラム選択：極性化合物編

ChromaNik

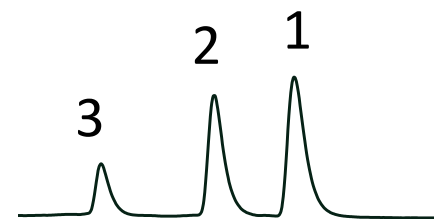
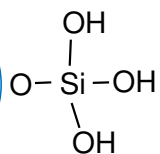


株式会社クロマニック テクノロジーズ
カラムコンシェルジュ
小山 隆次



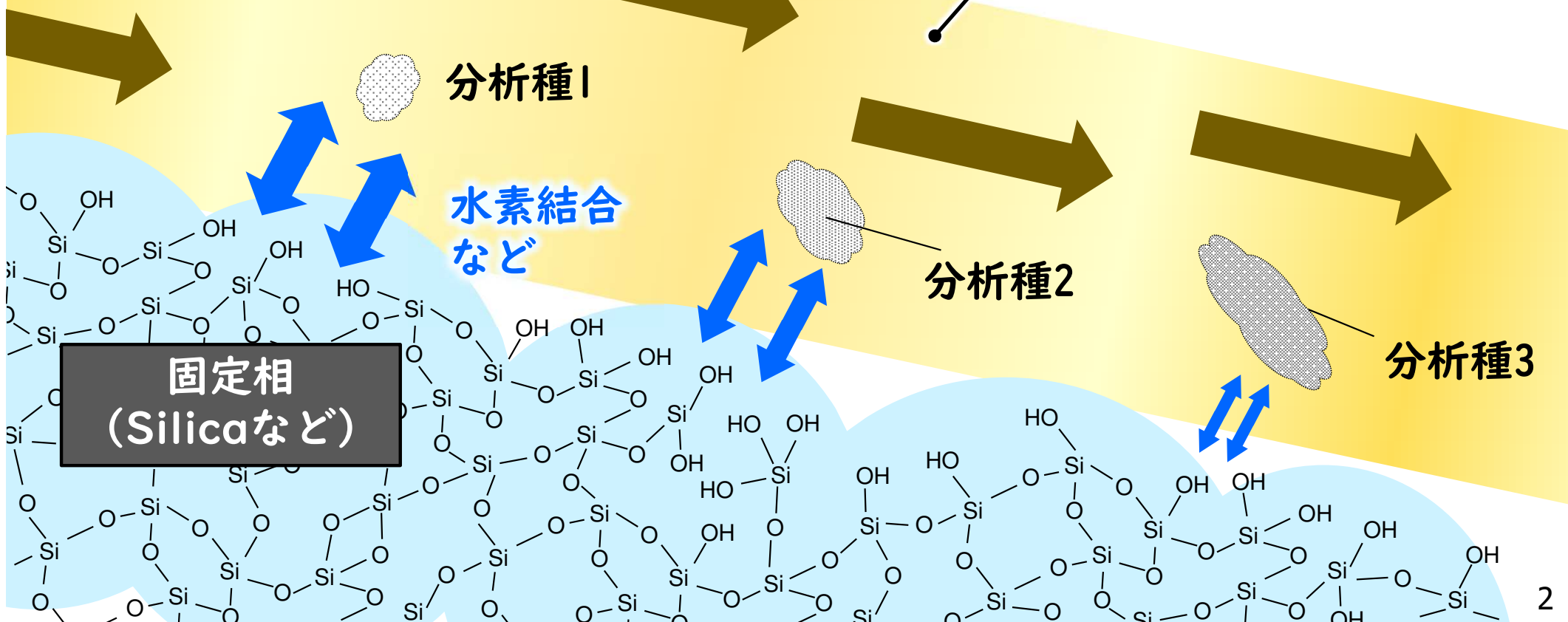
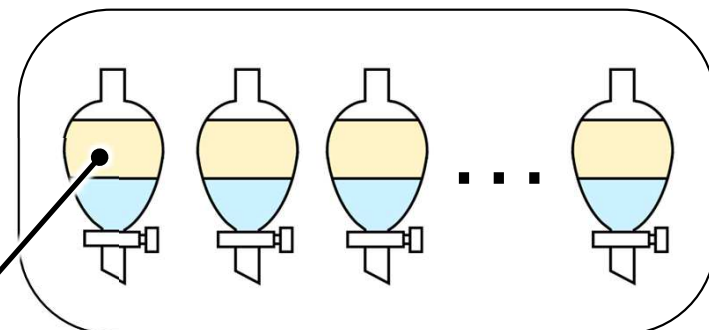
ChromaNik
ChromaNik Technologies Inc.

順相分離の基本 (Silicaカラム)



移動相
(酢酸エチル、
ヘキサンなど)

極性基への吸着に
基づいた保持・分離



分析種1

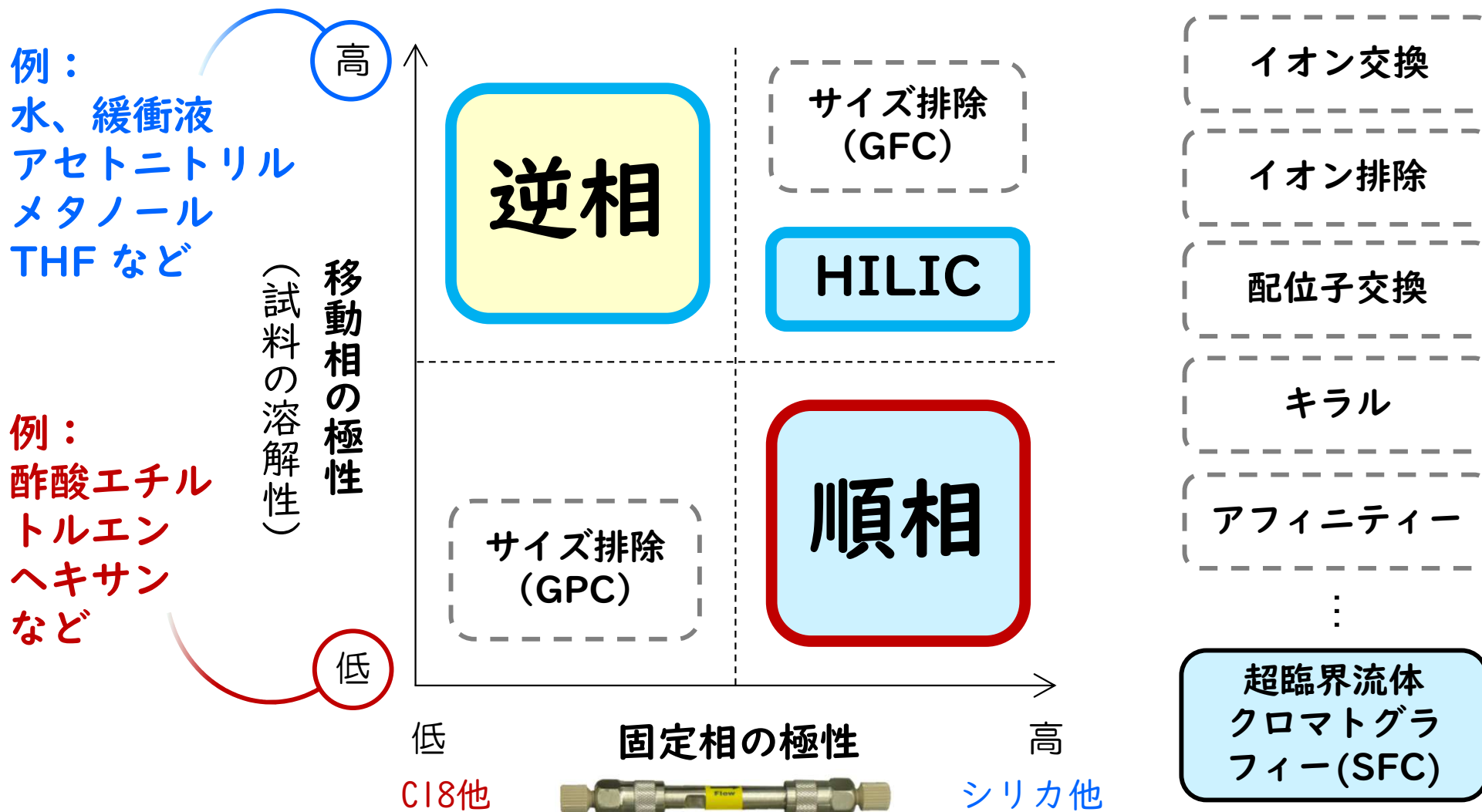
水素結合
など

分析種2

分析種3

固定相
(Silicaなど)

液クロ (HPLC) の分離モードも、色々



逆相クロマトグラフィーが、HPLC分析の主流

逆相条件で **保持しない**、分析種

- **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を一方に振っても疎水性が上がらない。逆相条件下で保持を得にくい。

○ ○ ○

対策：

配位子交換(糖・糖アルコール)、イオン交換(アミノ酸)
誘導体化法・又はイオン対試薬を用いた形で逆相分析。

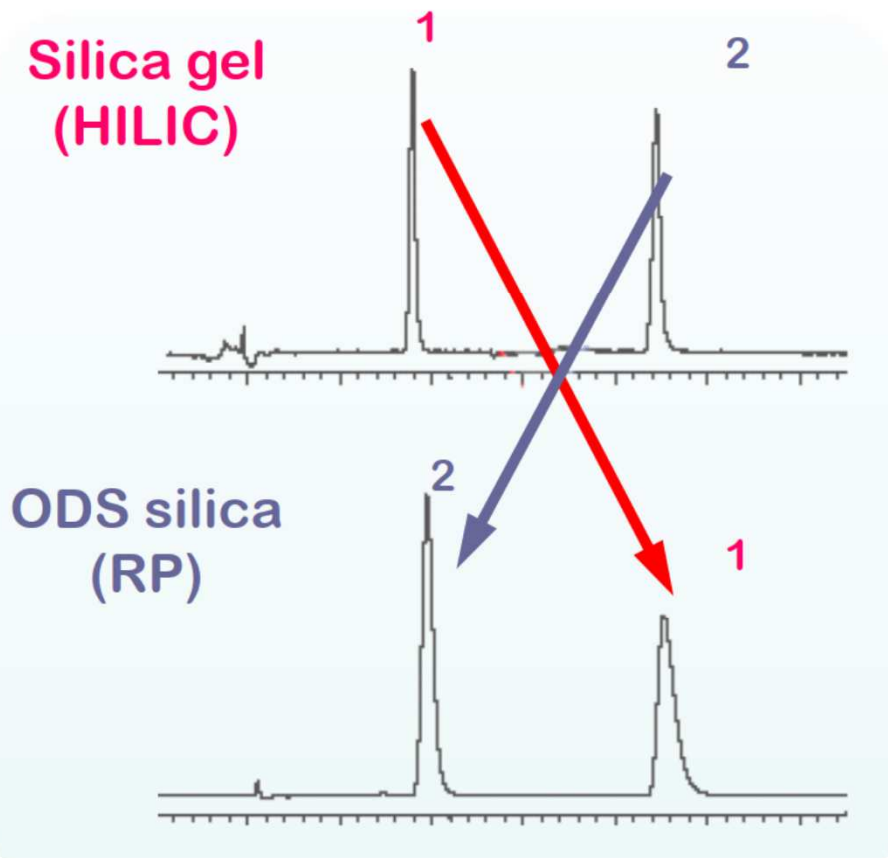
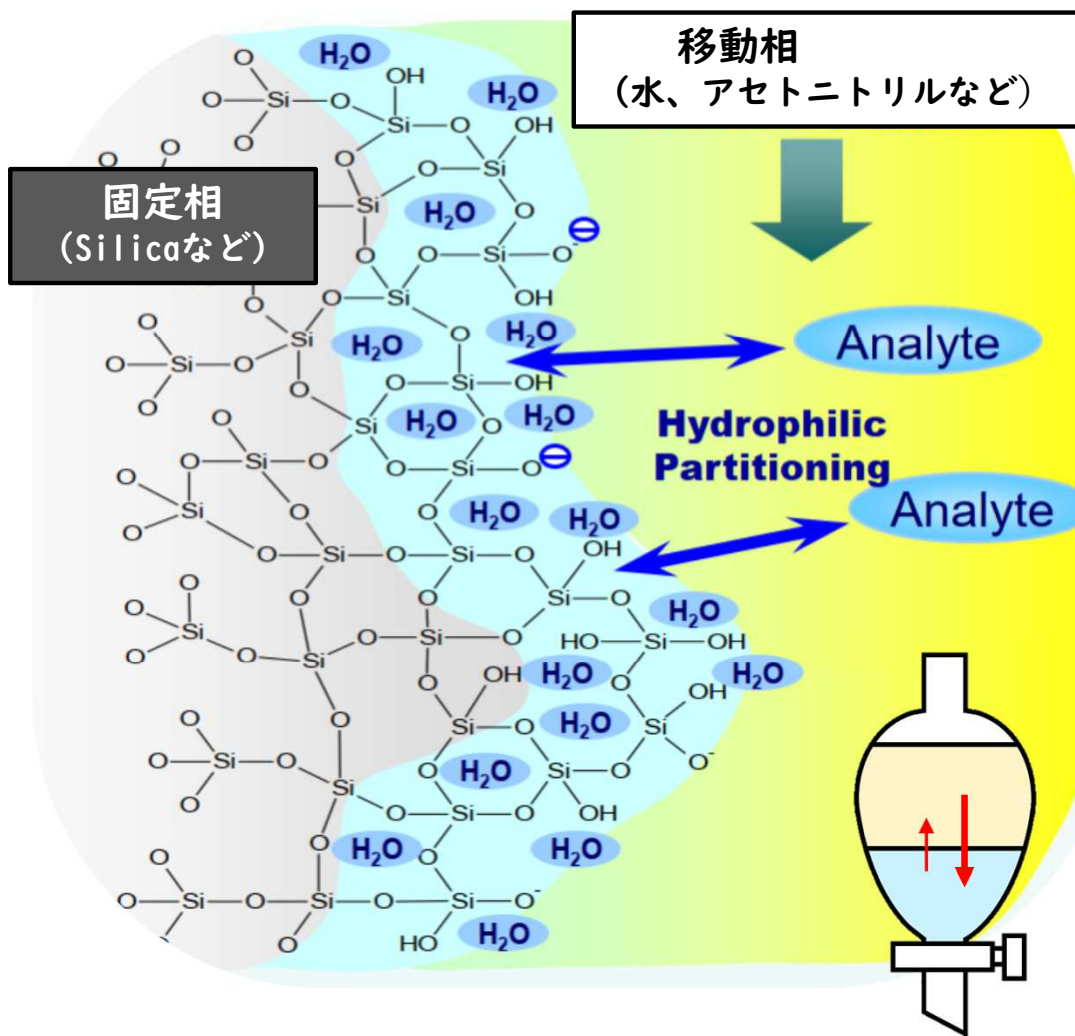
専用化、コスト、装置・カラムへの負荷、煩雑性



親水性相互作用クロマトグラフィー

Hydrophilic **I**nteraction **L**iquid **C**hromatography

順相の
一形態

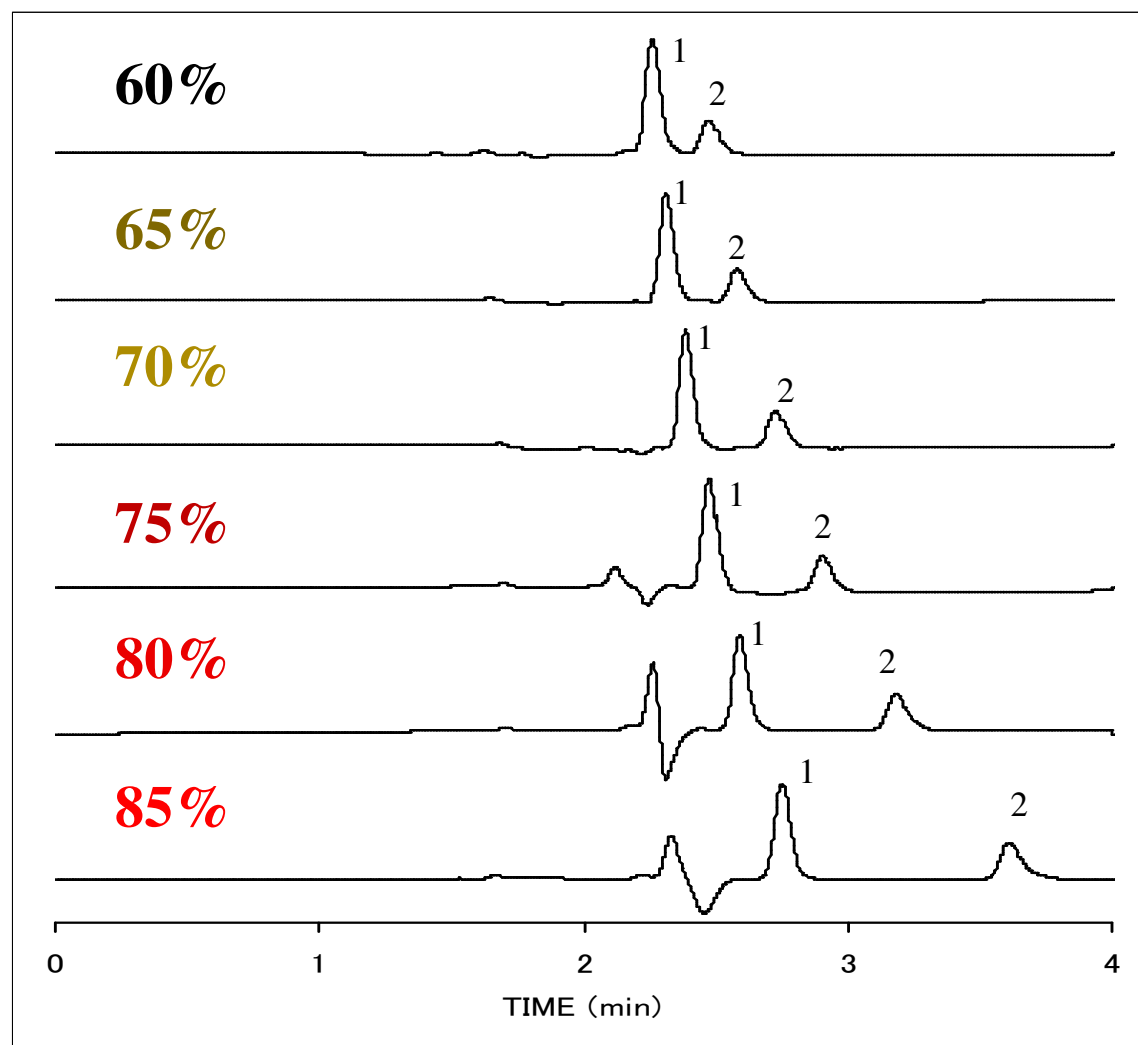


主な対象は、 $\log P < 0$ の化合物

- 逆相と同種の移動相

- 高極性化合物を保持

HILICの保持性と、Acetonitrileの割合



Column: Silica 1 4.6x150mm

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

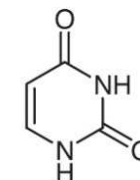
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

Detection: UV@220nm

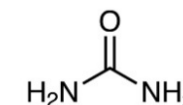
Sample: 1=Uracil

logP= -1.07



2=Urea

logP= -2.11



有機溶媒割合が高い程、**極性化合物**を保持

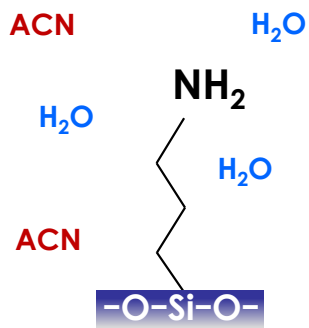
HILICカラムの源流

ChromaNik

NH2

HILIC固定相の源流の一つ：NH₂カラム

アミノプロピル固定相

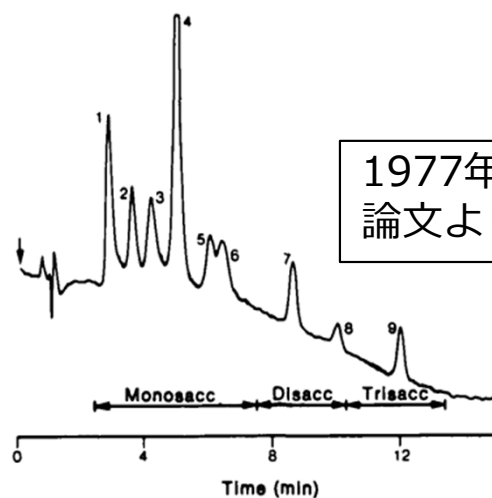


—— HILICの提唱（1990年の論文） ——

Journal of Chromatography A
Volume 499, 19 January 1990, Pages 177-196

Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds

Andrew J. Alpert



1977年の
論文より*

NH₂, Aminoカラムとアセトニトリル/水移動相で水溶性化合物を分析する手法は、1970年代から糖分析に用いられていた。（実質的には、HILICモードそのもの）

アミノ基（弱イオン交換基）は、中性の糖を保持する上で**水和層を形成するための支持体**として機能

Figure 3. Gradient elution separation of saccharides (312). Column: MicroPak NH₂. Mobile Phase: Gradient 10% to 40% H₂O in CH₃CN at 2% increase per minute. Flow Rate: 60 ml/hr. Detector: Varichrom (Varian, variable wavelength), λ = 192nm. Sample: 5 μl solution of 100 μg of each solute. Solutes: 1. Ribose, 2. Xylose, 3. Arabinose, 4. Fructose, 5. Glucose, 6. Galactose, 7. Sucrose, 8. Trehalose, 9. Raffinose. (Reprinted by permission of Varian Associates).

* 図引用元：

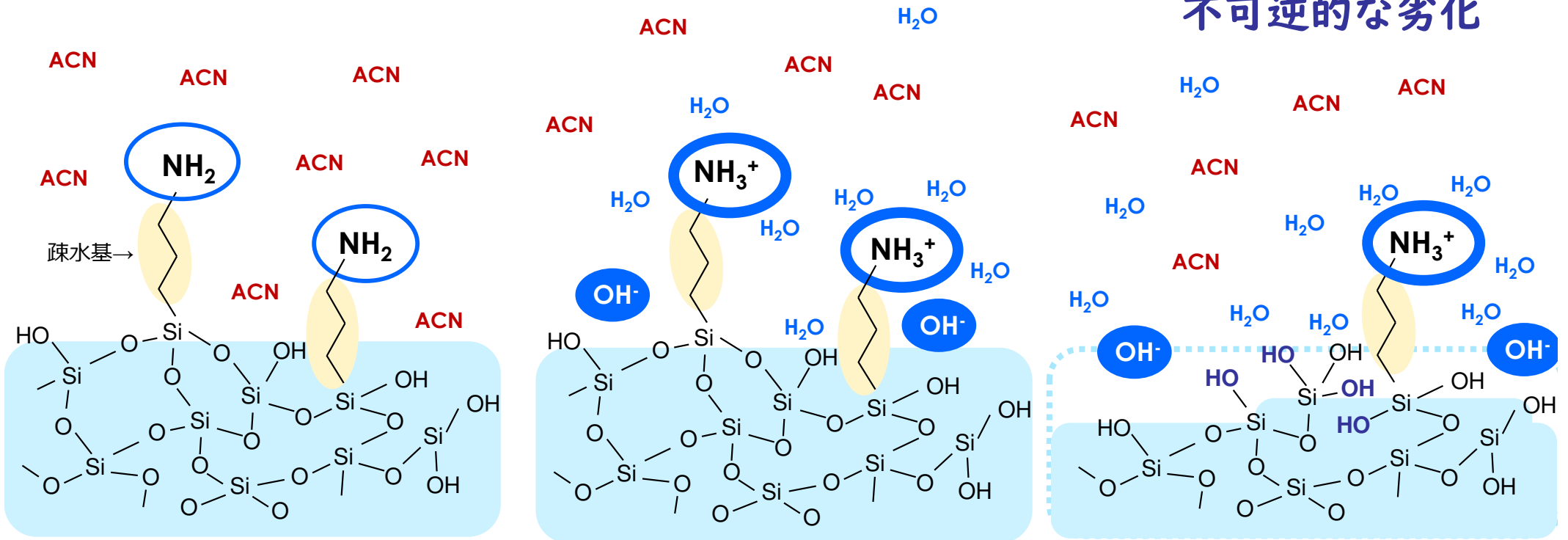
Ronald E. Majors, Recent Advances in High Performance Liquid Chromatography Packings and Columns, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 15, Issue 9, September 1977, Pages 334-351,

NH₂カラム (シリカ基材) の問題点

分析前 (封入溶媒)

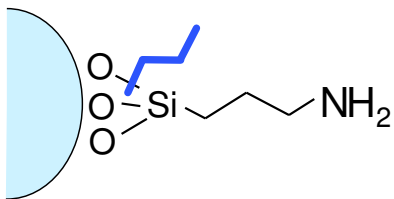
分析中

長期保管後



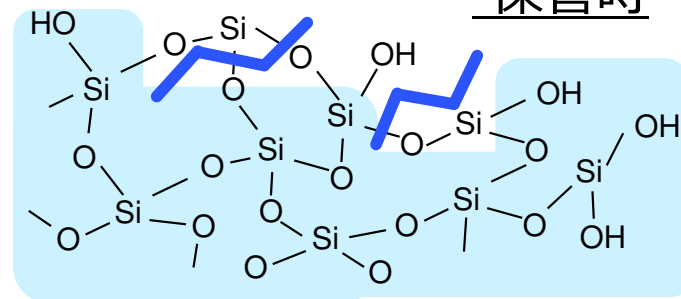
不可逆的な劣化

塩基性雰囲気中ではSiO₂のネットワークが切断される



溶解

保管時



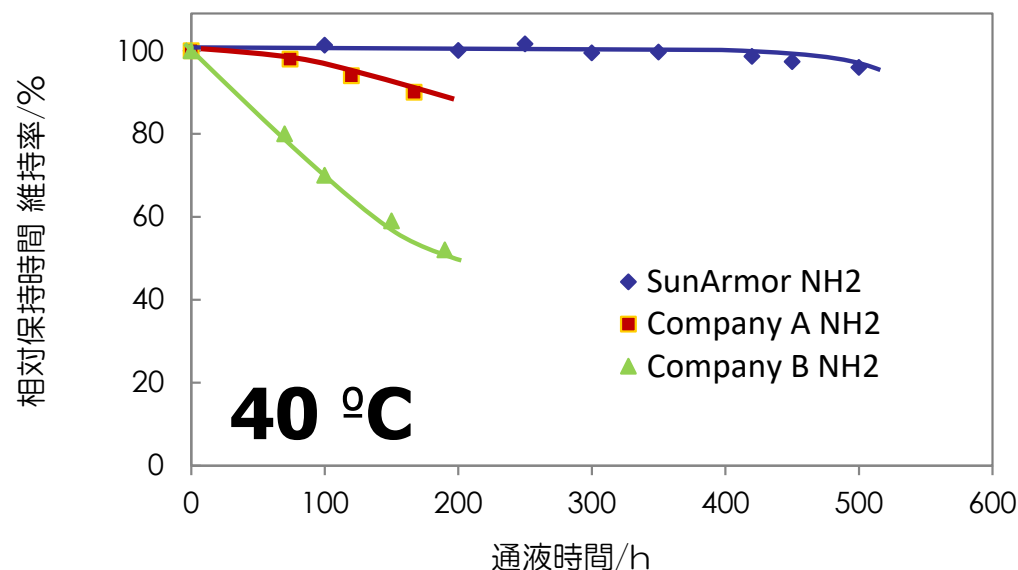
一般的なNH₂カラムの耐久性と留意点

通常試験を想定した、40℃での水混液移動相での連続送液耐久性試験

ポイント

一般的なシリカ型NH₂カラムは、「アセトニトリル/水」移動相の連続通液だけで劣化しやすい。

(200時間通液するだけで10%~50%ほど劣化 ※右図A,B)



耐久性試験 通液条件

カラム: SunArmor NH₂ 5 μm, 250 x 4.6 mm

移動相: アセトニトリル/水 = 75/25

流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40℃ 又は 60℃

保持時間測定条件 (共通)

移動相: アセトニトリル/水 = 75/25

流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40℃

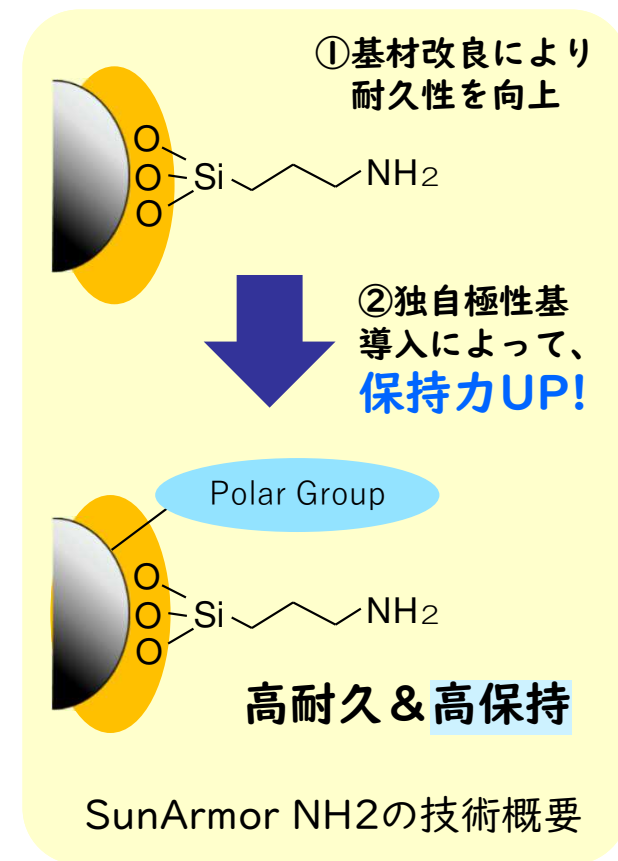
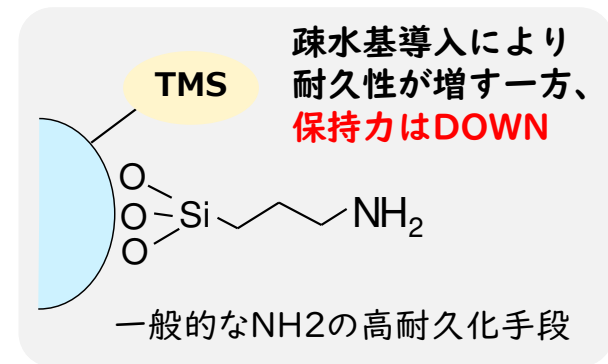
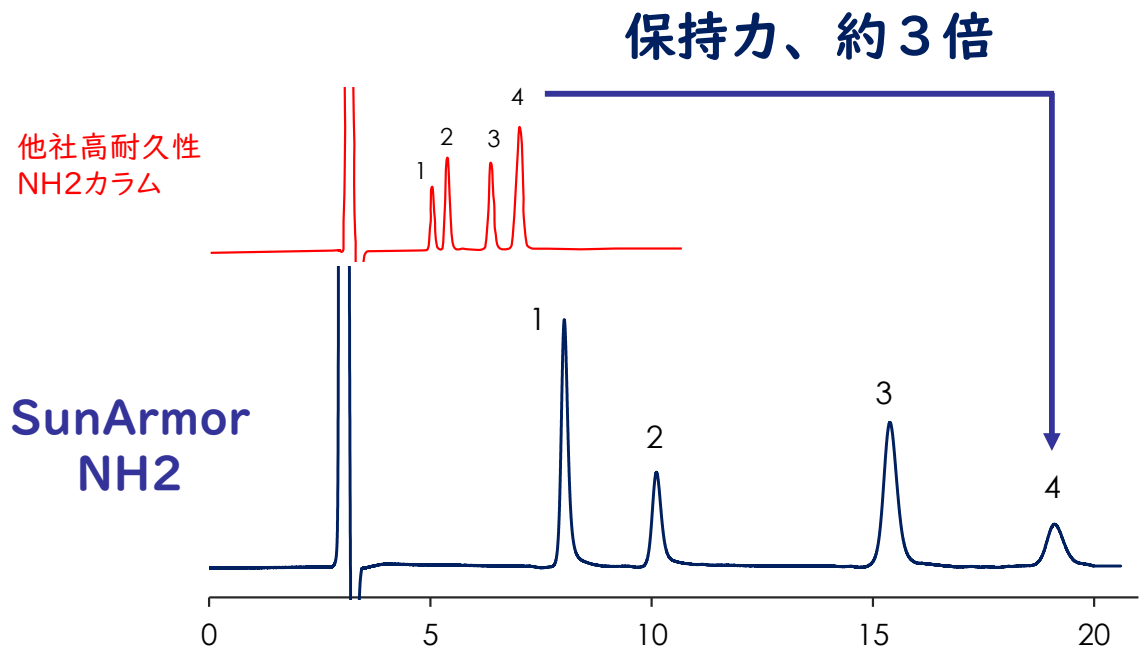
検出: RI, 試料: スクロース

対策

有機溶媒100%に置換して保管を推奨。カラムにはポリマー基材、又は**高耐久シリカ型**のNH₂を推奨

SunArmor NH2 : 親水性化合物の保持力

糖の保持時間の比較

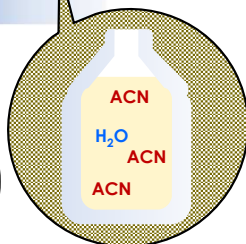
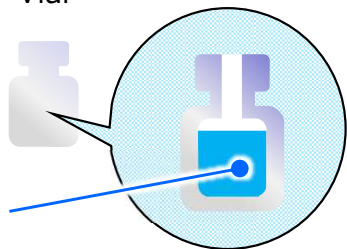


カラム: 他社高耐久性NH2 5 μm, 250 x 4.6 mm
SunArmor NH2 5 μm, 250 x 4.6 mm
移動相: アセトニトリル/水 = 75/25
流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C
検出: RI

試料溶媒の溶出力が移動相より強い(強溶媒)場合、ピーク形状劣化や再現性低下を招く恐れ。

- 試料: 1 = Fructose
2 = Glucose
3 = Sucrose
4 = Maltose

Vial



注入時拡散抑制に

「保持力」
が重要

※水が「強溶媒」

HILICカラムもいろいろ

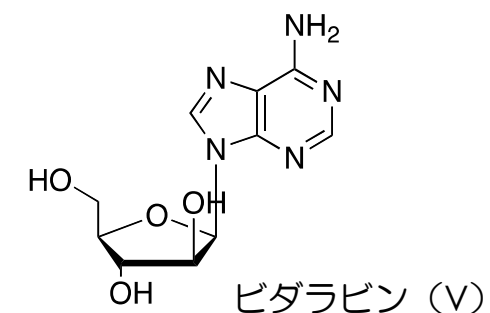
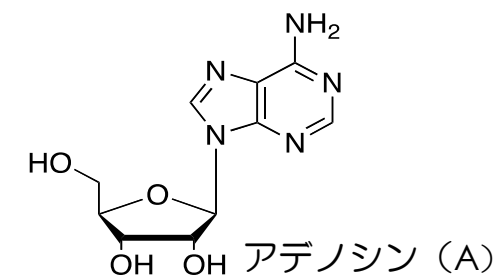
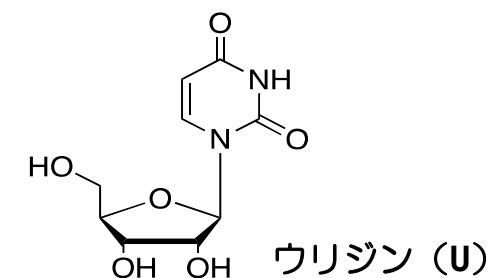
ChromaNik

双性イオン型
アミド
ジオール

HILICカラムの保持比較

データ提供：京都工芸繊維大学 池上亨先生

Column	U <i>k</i> (U)	A <i>k</i> (A)	V <i>k</i> (V)
ZIC-HILIC (5 μm) ⑦	2.11	1.55	2.32
ZIC-HILIC (3.5 μm) ⑧	2.10	1.51	2.28
Nucleodur HILIC (3 μm) ⑥	2.20	2.33	3.40
TSKgel Amide-80 (5 μm) ②	3.30	3.80	4.90
XBridge Amide (3.5 μm) ④	2.55	2.81	3.64
PolySULFOETHYL (3 μm) ⑪	1.58	1.15	1.39
PolyHYDROXYETHYL (3 μm) ①	3.92	3.75	4.93
CYCLOBOND I (5 μm) ⑬	0.70	1.36	1.68
LiChrospher Diol (5 μm) ⑫	1.50	2.50	3.30
Chromolith Si ⑮	0.31	0.73	0.85
HALO HILIC (2.7 μm) ⑭	0.64	1.59	1.87
COSMOSIL HILIC (5 μm) ⑨	1.60	2.20	3.00
Sugar-D (5 μm) ⑩	1.58	1.88	2.72
NH ₂ -MS (5 μm) ⑤	2.44	2.13	2.90
SunShell HILIC-Amide (2.6 μm) ③	2.93	3.55	4.84



ウリジン *k*(U) を基準に、親水保持性を比較 (○内の数字は順位)

固定相も、いろいろ

分析条件：

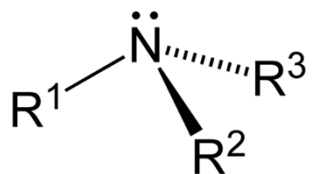
Mobile phase: Acetonitrile/ammonium acetate
buffer (20 mM, pH = 4.76) = 90:10 [v/v]

Linear velocity; 1.0 mm/s, UV detection wave length; 254 nm,
Column oven temperature; 30 °C

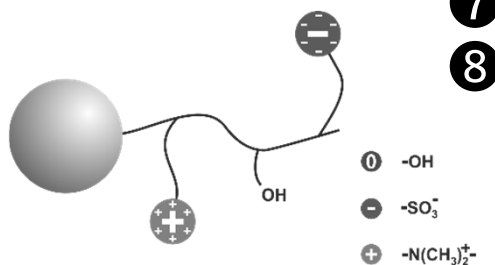
HILIC固定相保持力の傾向

* HILIC固定相の一例。当てはまらないものは「その他」に分類

アミン ⑤,⑩
アミノプロピル

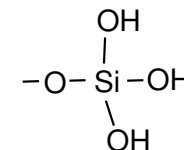


双性イオン型 ⑥

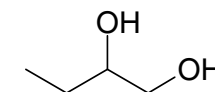


その他 ①,⑪

シリカ ⑭⑮

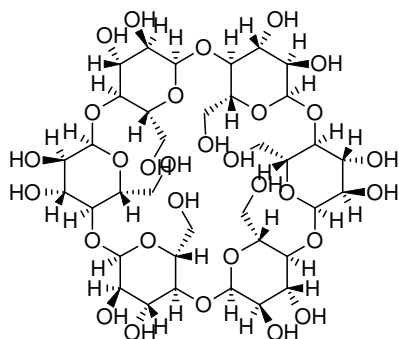


ジオール ⑫
ポリオール



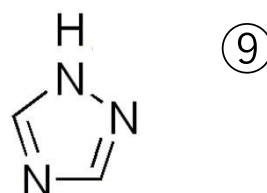
シクロデキストリン

⑬

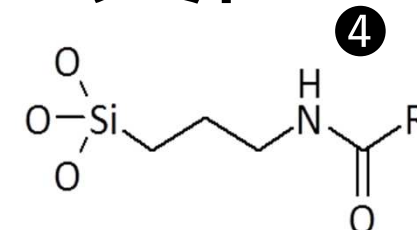


市販されている
HILIC固定相の一部

トリアゾール



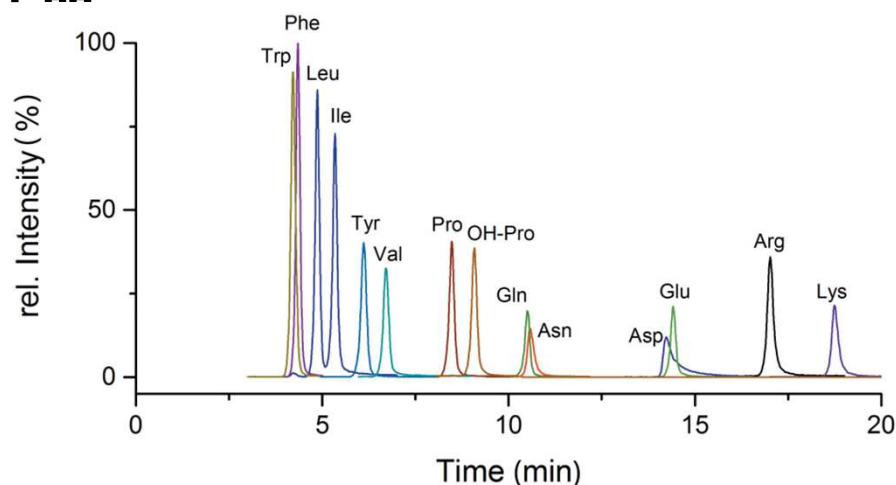
アミド ②,③



比較的、「アミド」「双性イオン型」の保持が強い傾向

双性イオン型カラムのアミノ酸分離例

標準品



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 x 2.1 mm, 3.5 μm iHILIC-Fusion(+)

Gradient Elution:

A) acetonitrile–water–1 M ammonium acetate, pH 5.75 (90:5:5)

B) water–acetonitrile–1 M ammonium acetate, pH 5.75 (90:5:5)

0–0.5 min (90:10) A–B; 0.5 to 25 min, gradient elution from (90:10) A–B to (60:40) A–B.

Flow Rate: 0.3 mL/min

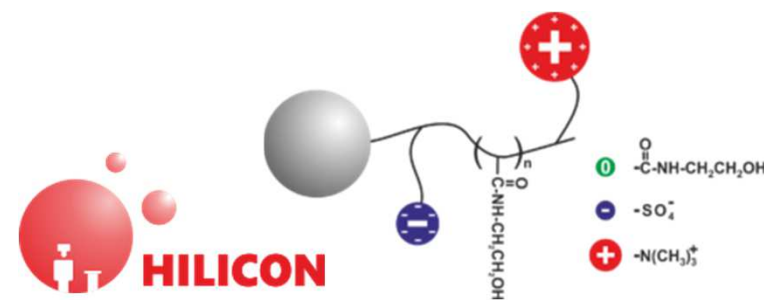
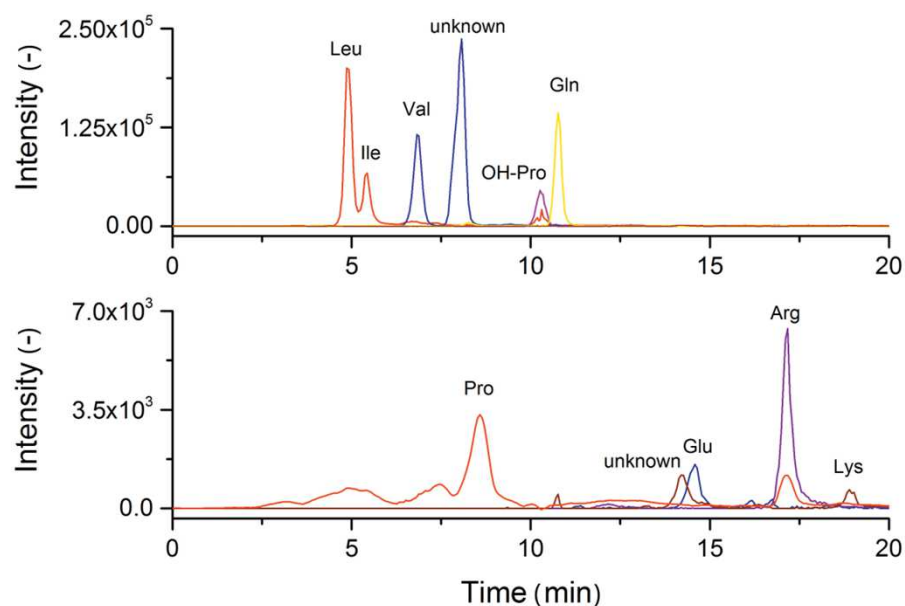
Column Temperature: 40 °C

Injection Volume: 5 μL

Amino Acids:

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

ダイエットサプリ



双性イオン型カラムもいろいろ



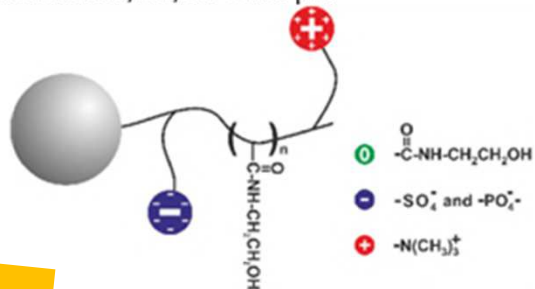
iHILIC® -Fusion

<日本国内総代理店>
 株式会社クロマニクテクノロジーズ

advances HILIC separations in HPLC and UHPLC

Available in both PEEK and Stainless Steel

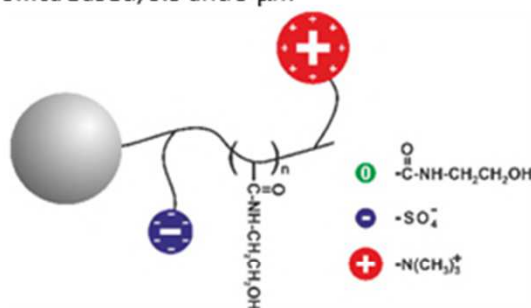
Silica Based, 1.8, 3.5 and 5 μm



iHILIC® -Fusion

Available in both PEEK and Stainless Steel

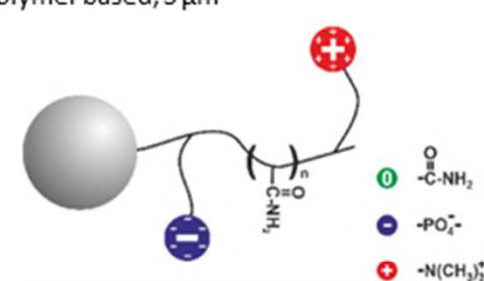
Silica Based, 3.5 and 5 μm



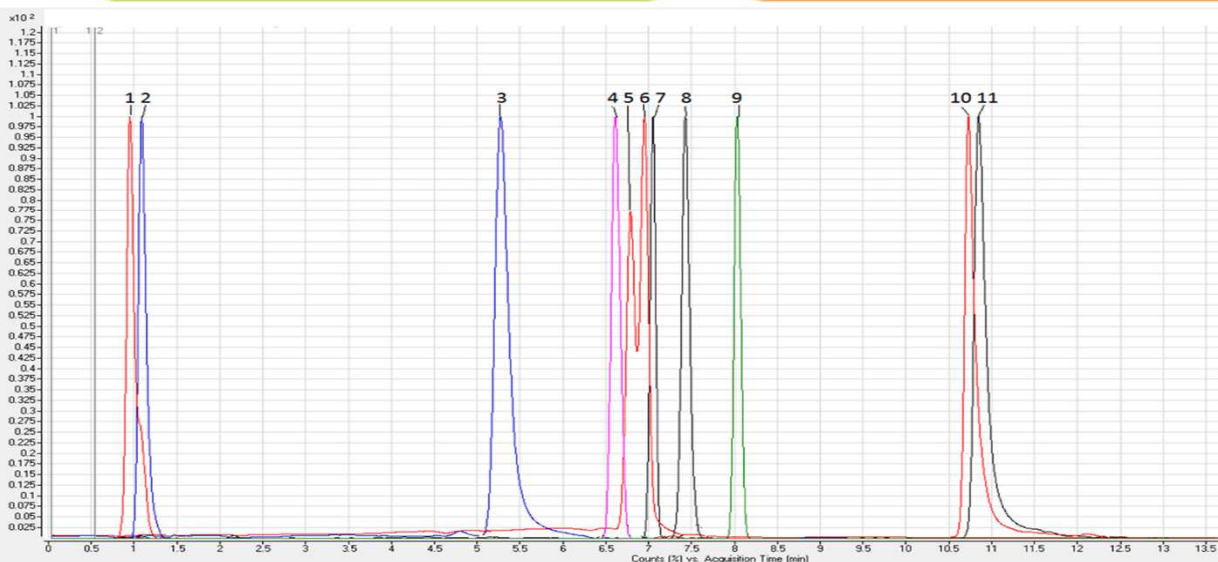
iHILIC® -Fusion(+)

Available in PEEK

Polymer based, 5 μm



iHILIC® -Fusion(P)



Column:

100 x 2.1 mm, 1.8 μm, 100 Å, iHILIC-Fusion at 30 °C

Gradient elution:

A) acetonitrile/methanol (98/2, v/v);

B) 10 mM ammonium formate with 0.1% (v/v) formic acid (pH 3.15) in ultra-pure (Milli-Q) Water

TIME	0	2	8	13	15	17	23
%A	95	95	65	25	25	95	95

Flow rate: 0.3 mL/min; **Injection volume:** 2 μL

- 1) Misoprostol, 2) Caffeine, 3) Adenine, 4) Phenylalanine, 5) Leucine, 6) Isoleucine, 7) Serine, 8) Tyrosine, 9) Folic acid, 10) Lysine, 11) Ornithine.

「コアシェル型」 HILICカラム

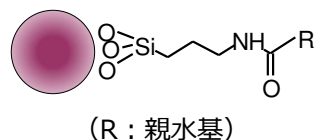


2.6 μm

SunShell HILIC-Amide

(固定相：アミド系)

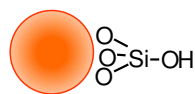
for HPLC



SunShell HILIC-S

(固定相：シリカ)

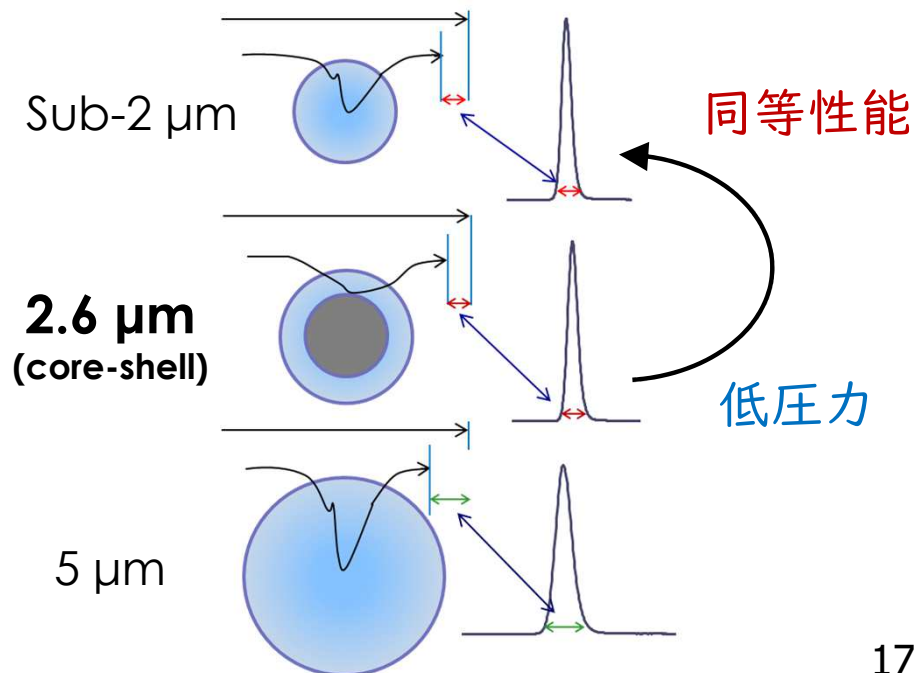
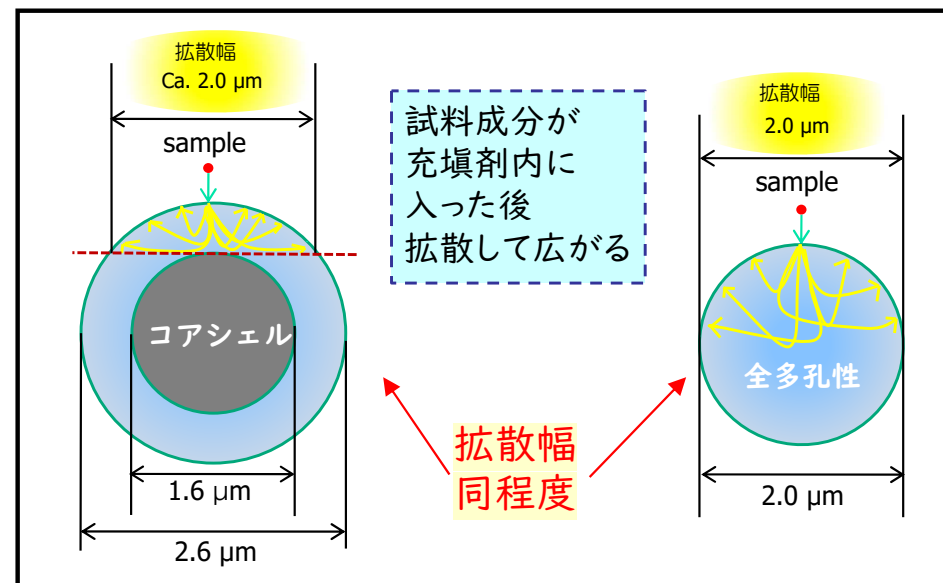
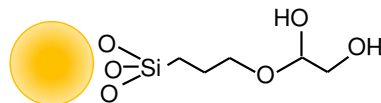
for HPLC, LC/MS



SunShell HILIC Diol **NEW**

(固定相：ジオール)

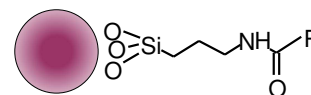
for HPLC, LC/MS



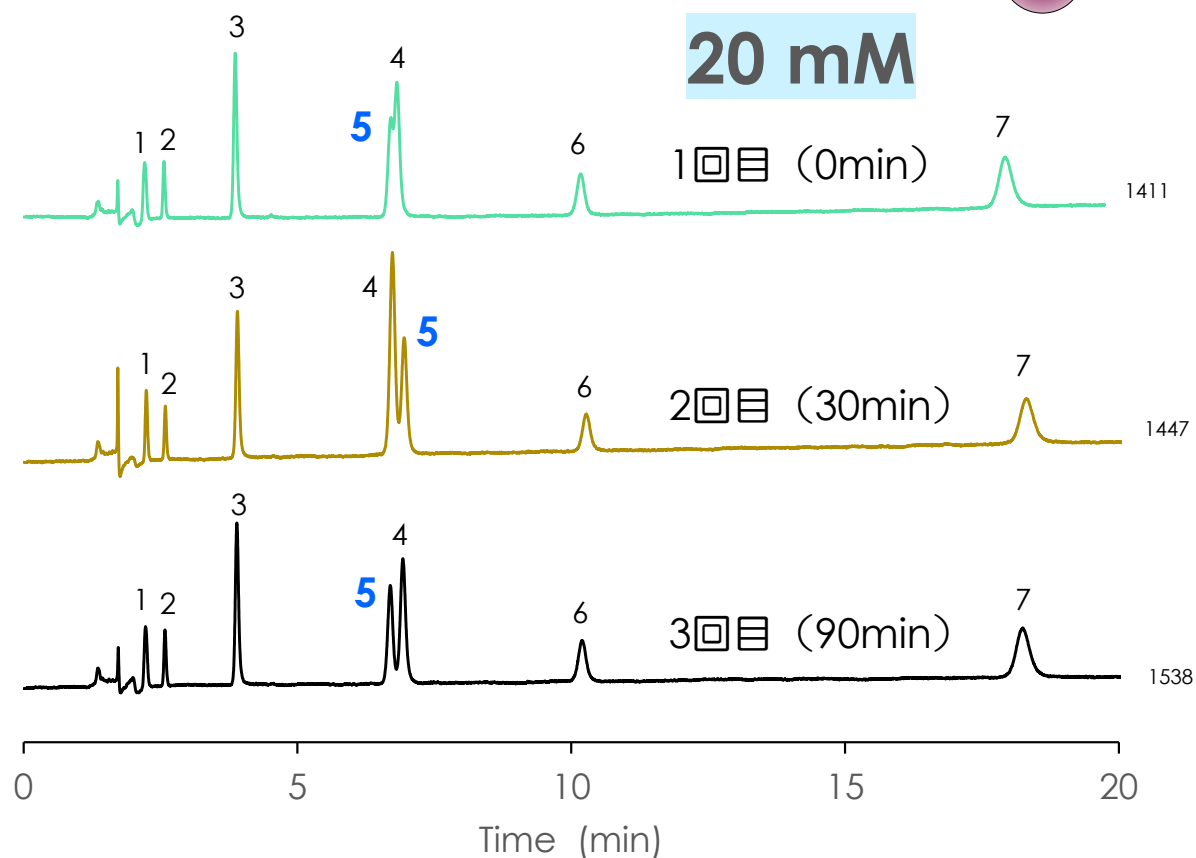
HILIC-Amide : 塩濃度と平衡化時間①

Nucleobases

SunShell HILIC Amide



20 mM



Column: SunShell HILIC-Amide 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/20 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7) = 90/10

Flow rate: 1.0 mL/min

Sample: 1 = Thymine, 2 = Uracil 3 = Adenine ,

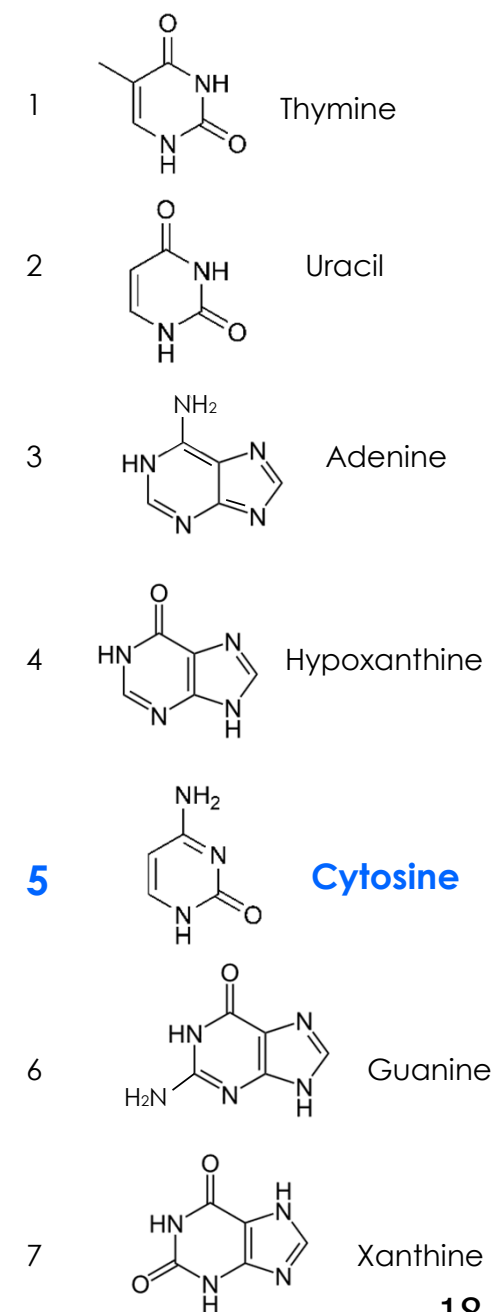
Temperature: 40 $^{\circ}$ C

4 = Hypoxanthine , 5 = Cytosine ,

Detection: UV@250nm

6 = Guanine, 7 = Xanthine

平衡化不足?

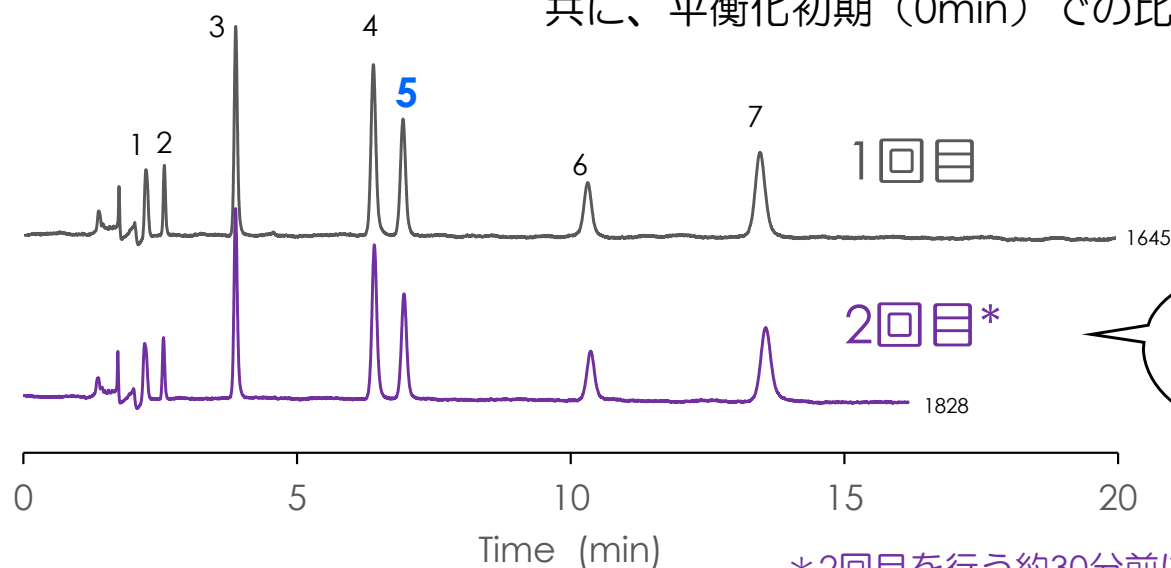


HILIC-Amide : 塩濃度と平衡化時間②

Nucleobases

40 mM

共に、平衡化初期 (0min) での比較。



*2回目を行う約30分前に、違う溶離液を流し、環境をリセット

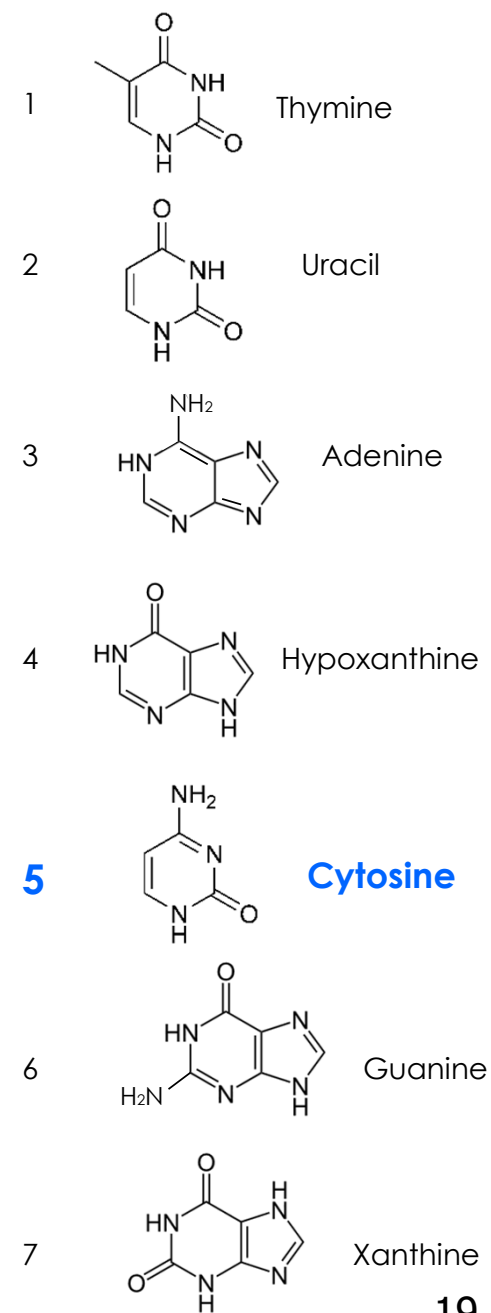
Column: SunShell HILIC-Amide 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/40 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7) = 90/10

Flow rate: 1.0 mL/min Sample: 1 = Thymine, 2 = Uracil 3 = Adenine ,

Temperature: 40 °C 4 = Hypoxanthine , 5 = Cytosine ,

Detection: UV@250nm 6 = Guanine, 7 = Xanthine



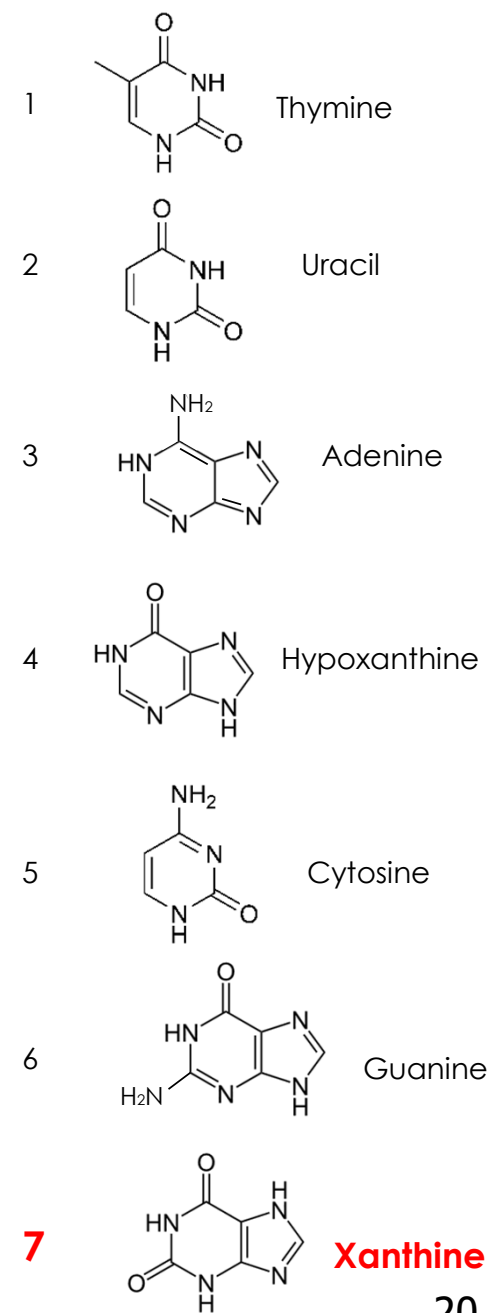
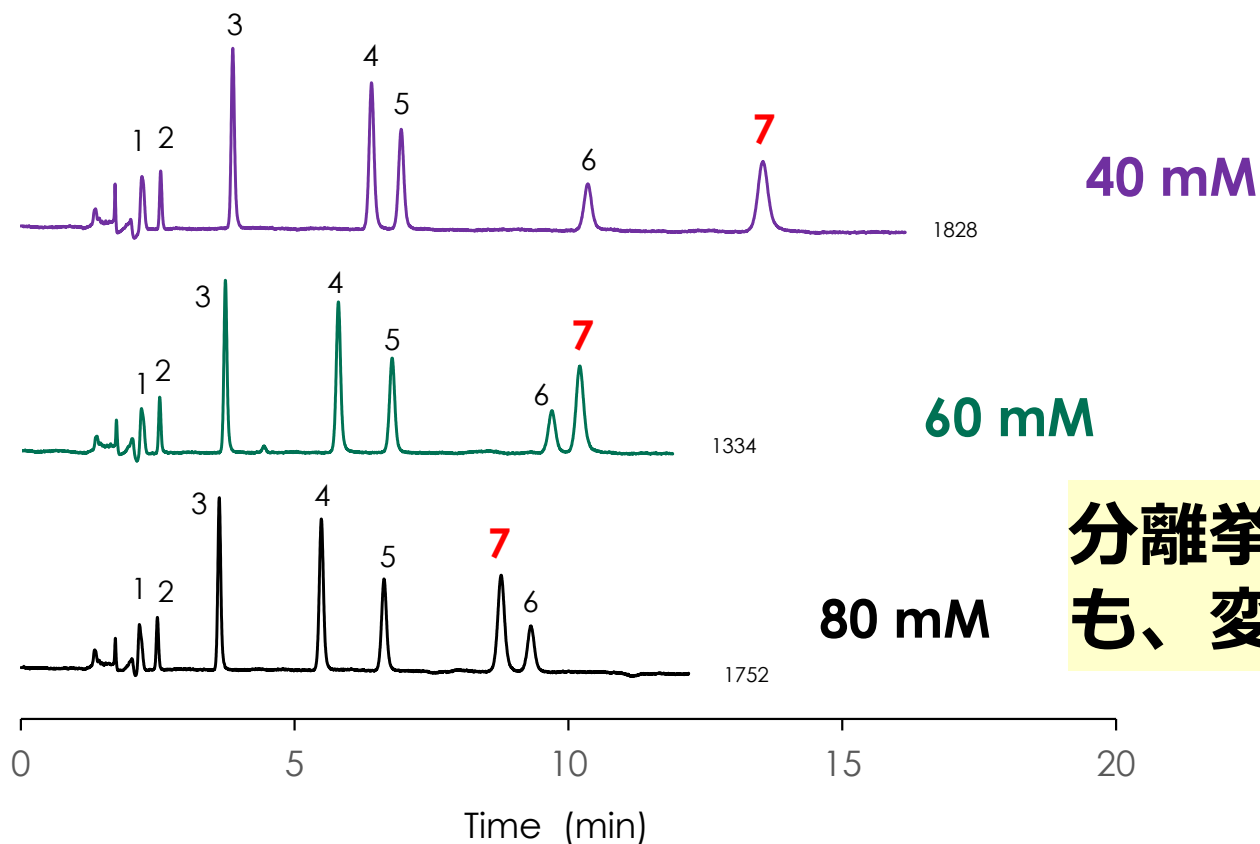
ポイント

平衡化時間以前に「適切な塩濃度」が重要

HILIC-Amide : 塩濃度と保持・分離挙動

Nucleobases

SunShell HILIC Amide



Column: SunShell HILIC-Amide 2.6 μm, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/40 mM, 60 mM, 80 mM Ammonium acetate buffer (pH 4.7) = 90/10

Flow rate: 1.0 mL/min Sample: 1 = Thymine, 2 = Uracil 3 = Adenine ,

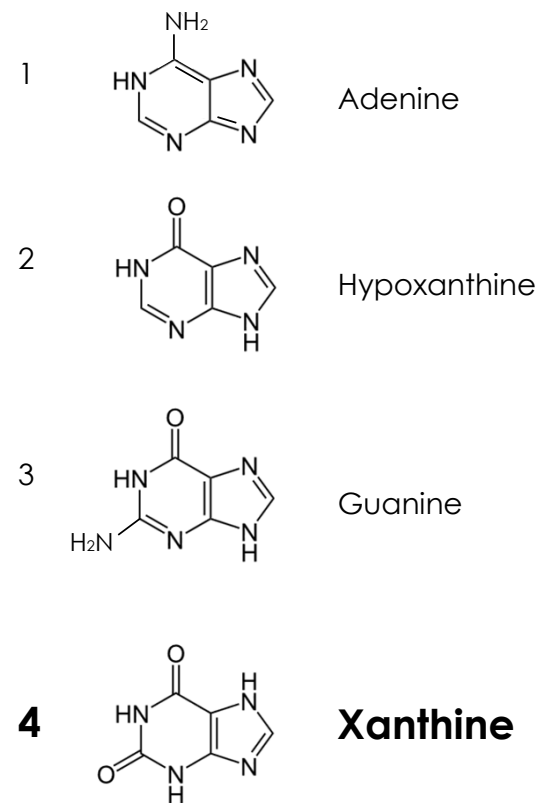
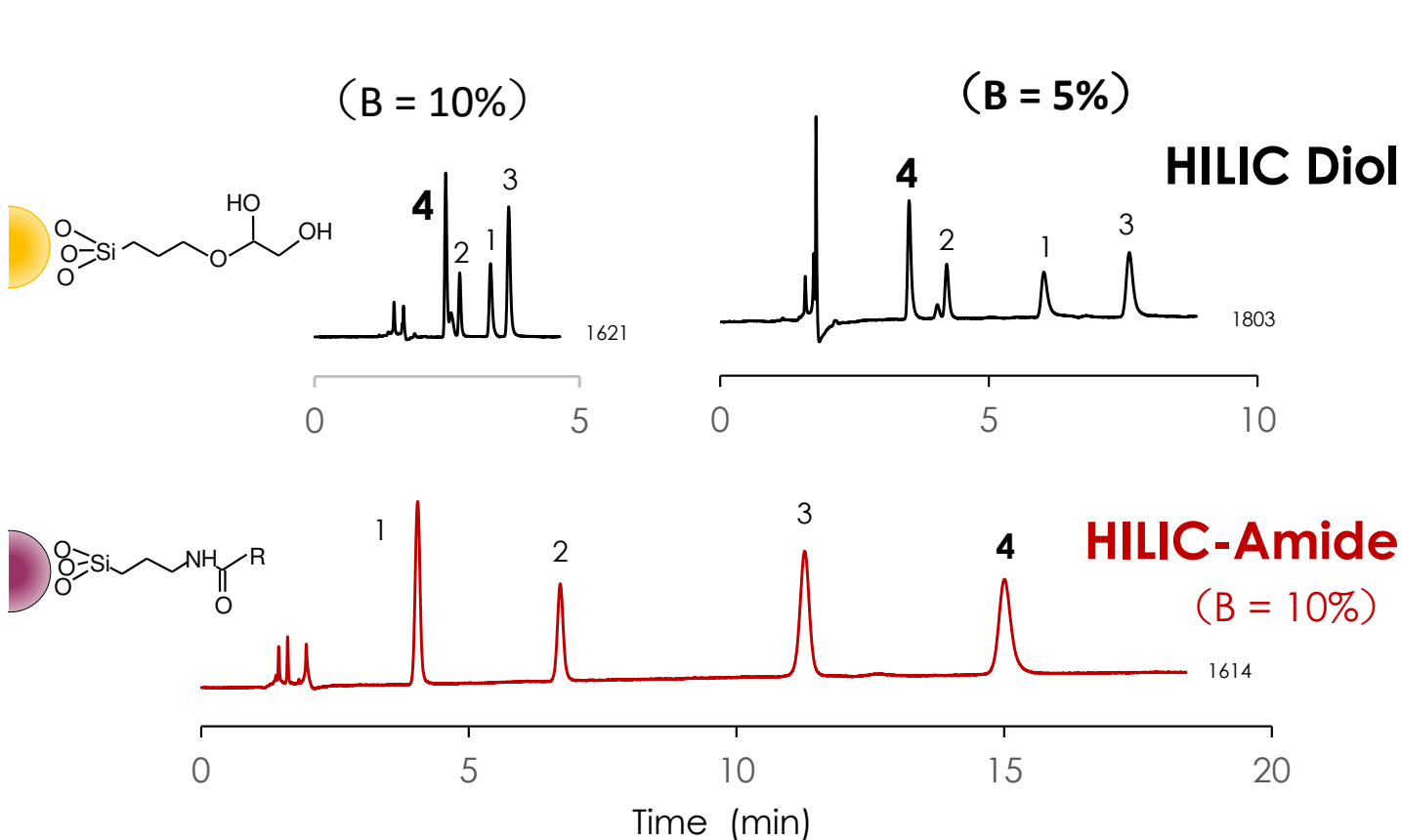
Temperature: 40 °C 4 = Hypoxanthine , 5 = Cytosine ,

Detection: UV@250nm 6 = Guanine, 7 = Xanthine

HILIC-Amide & Diol : 保持と分離挙動

Purine bases

SunShell HILIC シリーズ



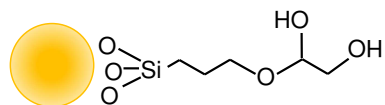
Column: SunShell HILIC Diol or HILIC-Amide 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: A) CH₃CN B) 20 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7) ,
 A/B = 90/10, A/B = 95/5 , Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C Sample: 1 = Adenine, 2 = Hypoxanthine
 Detection: UV@250nm 3 = Guanine, 4 = Xanthine

ポイント

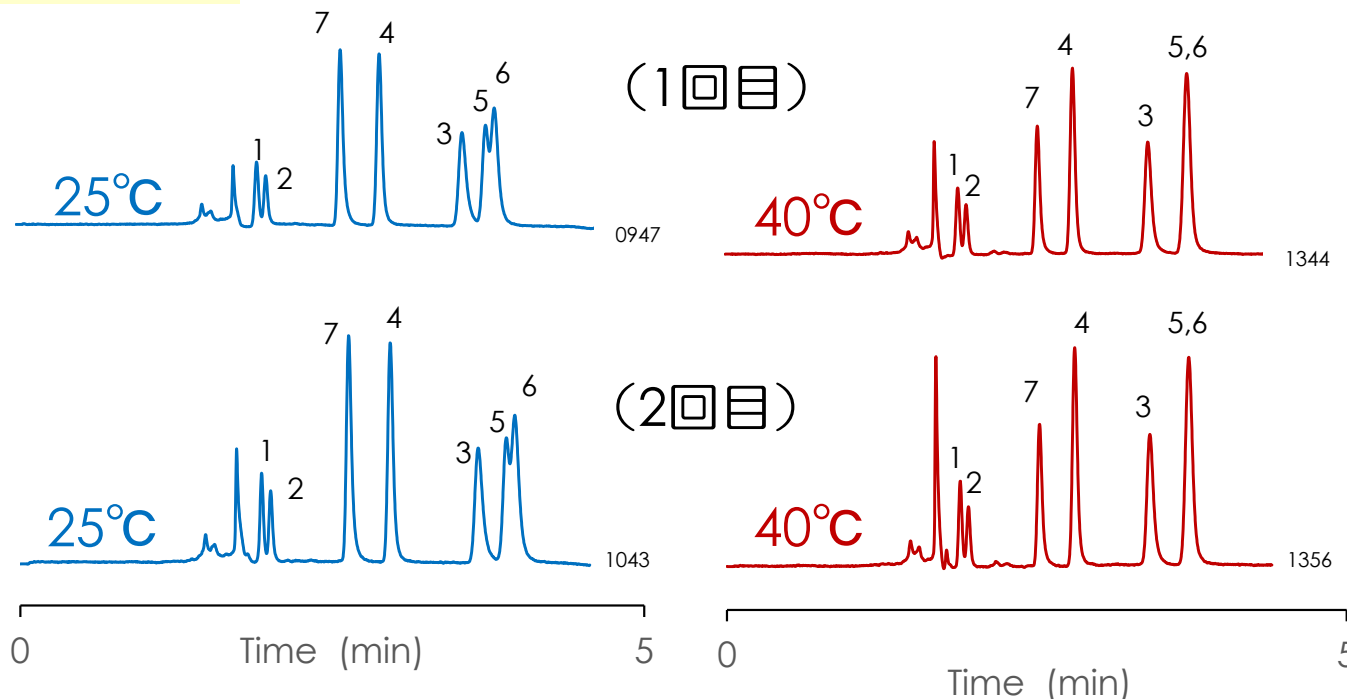
2次的相互作用の違い
 = HILICカラムの**個性**

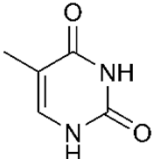
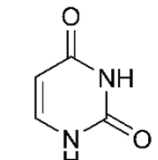
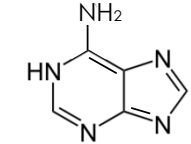
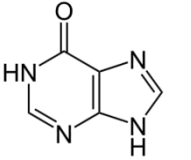
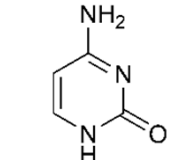
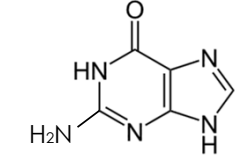
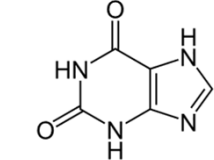
HILIC Diol : 塩濃度・温度と保持挙動

10 mM



SunShell HILIC Diol



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

安定

Column: SunShell HILIC Diol 2.6 μm, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/10 mM Ammonium acetate buffer(pH 4.7) = 90/10

Flow rate: 1.0 mL/min

Sample: 1 = Thymine, 2 = Uracil 3 = Adenine ,

Temperature: 25 or 40 °C

4 = Hypoxanthine , 5 = Cytosine ,

Detection: UV@250nm

6 = Guanine, 7 = Xanthine

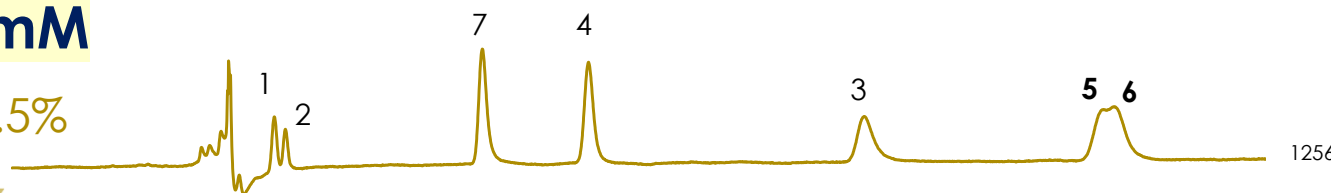
ポイント

保持力が弱い一方、平衡化は迅速&高安定

HILIC Diol : 移動相調整と分離度の対比

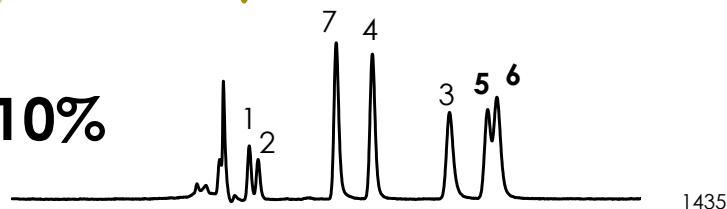
20 mM

B=4.5%



$R_{5,6}=1.01$ ($\alpha=1.02$)

B=10%

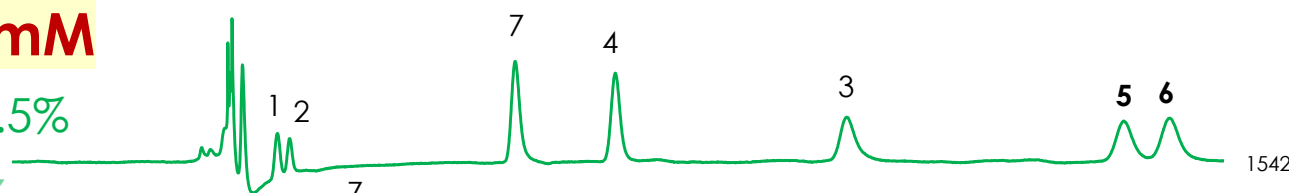


$R_{5,6}=1.04$ ($\alpha=1.04$)

R : 分離度, α : 分離係数

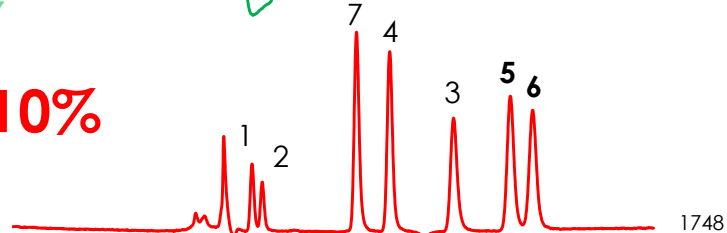
80 mM

B=4.5%



$R_{5,6}=1.53$ ($\alpha=1.05$)

B=10%



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

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 = 95.5/4.5, **A/B = 90/10**
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@250nm

Sample: 1 = Thymine

2 = Uracil

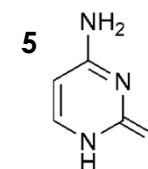
3 = Adenine

4 = Hypoxanthine

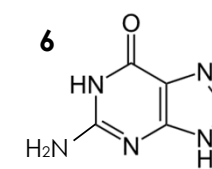
5 = Cytosine

6 = Guanine

7 = Xanthine



Cytosine



Guanine

ポイント

分離コントロールする上で、**塩濃度** と溶媒比率が重要

極性化合物向け、カラム選択（まとめ）

SunArmor NH2 高耐久型シリカおよび、極性基導入機構

- 糖分析用、高耐久 & 高保持なアミノカラム

SunShell HILIC-Amide 高効率性と、高い親水性保持力

- HPLC用、高分離のための**応用HILIC**カラム

SunShell HILIC Diol 低い塩濃度でも安定利用可能

- LC-MSに適合、高安定な**入門HILIC**カラム

化合物によっては、水系100%条件で使用可能な、逆相カラム（Biphenyl他）の選択も有効