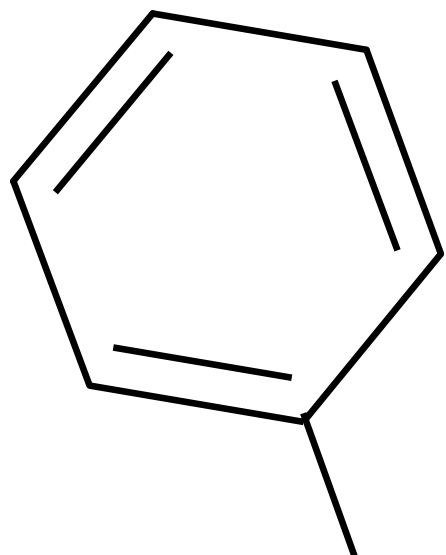
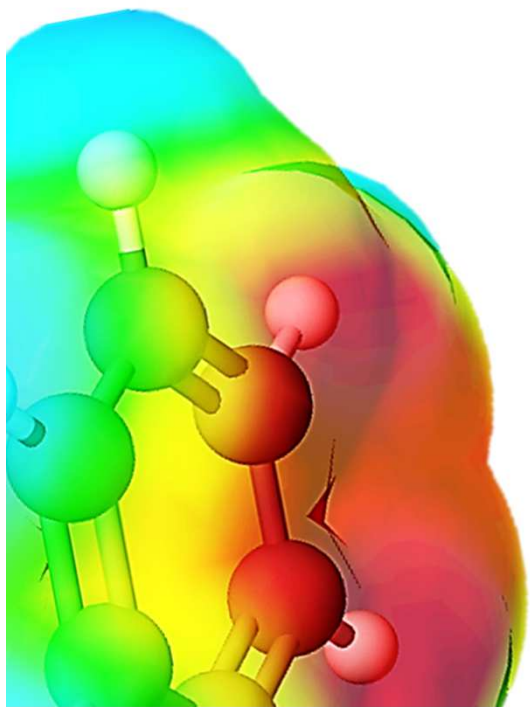


# 液クロ玉手箱

C18で困った時の、  
Phenylカラムの活用法



ChromaNik

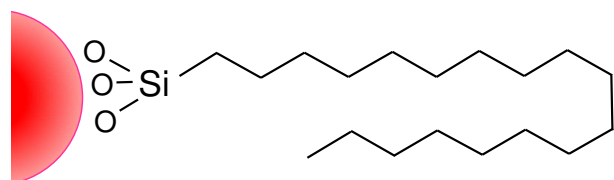


(株)クロマニックテクノロジーズ  
カラムコンシェルジュ  
小山 隆次  
koyama@chromanik.co.jp

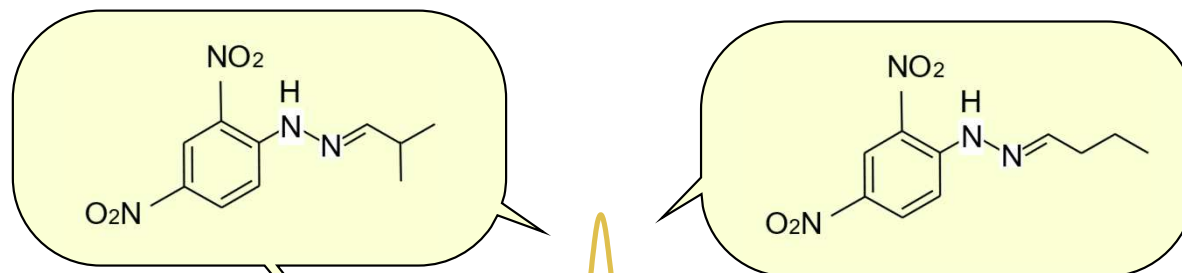
**ChromaNyk**  
ChromaNik Technologies Inc.

# C18で困った時の、セカンドカラムは？

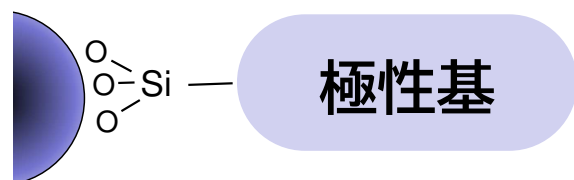
1<sup>st</sup> column: C18



〈例〉とある類縁化合物(構造異性体)



2<sup>nd</sup> column: ??

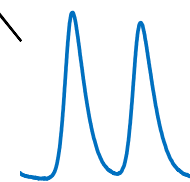


C18と異なる、

選択性

C18と同様の、

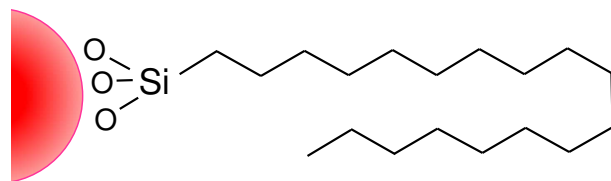
安定性



▶ 逆相セカンドカラムの選定に重要な「2つの視点」

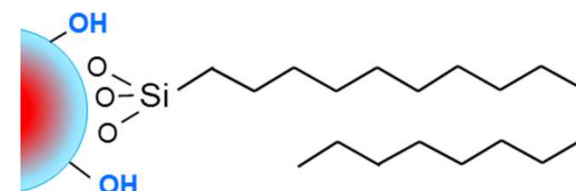
# 逆相LC固定相一覽

C18  
(ODS)

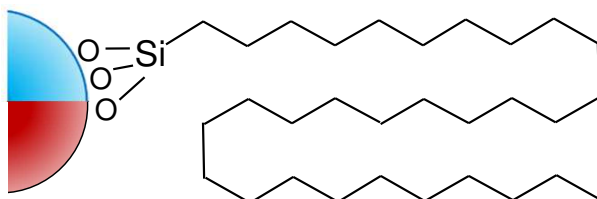


シラノール活性コントロール型

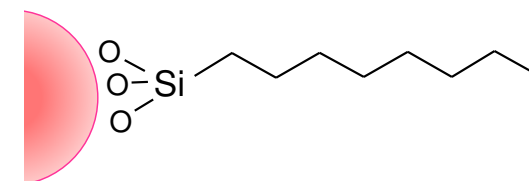
C18-SAC



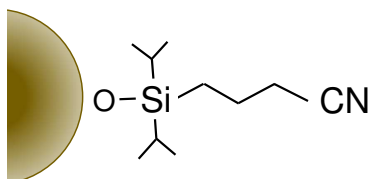
RP-AQUA  
C30



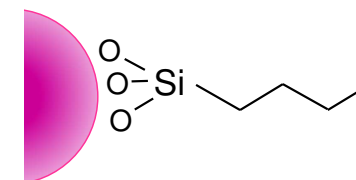
C8



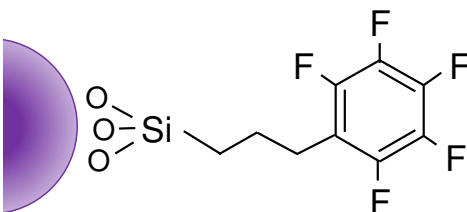
Cyano



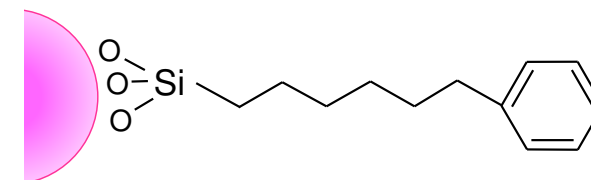
C4



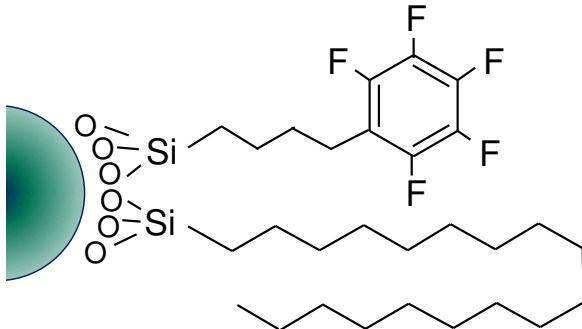
PFP



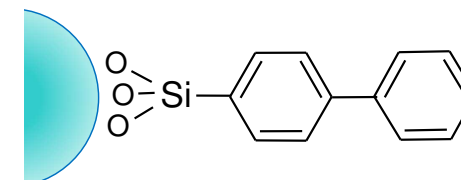
Phenyl  
(Phenylhexyl)



PFP&C18

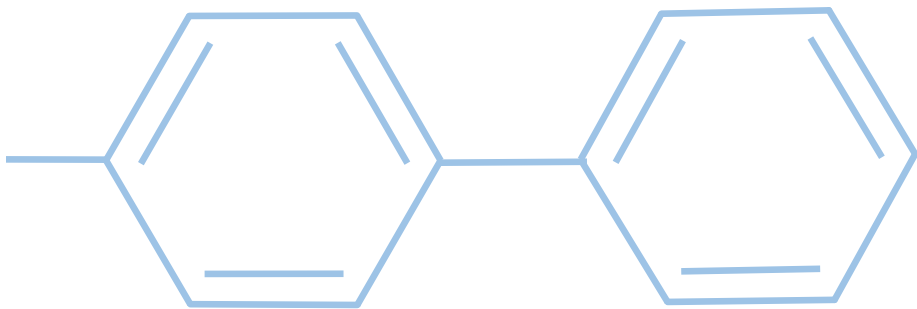


Biphenyl



# Phenyl系固定相の特徴

*ChromaNik*

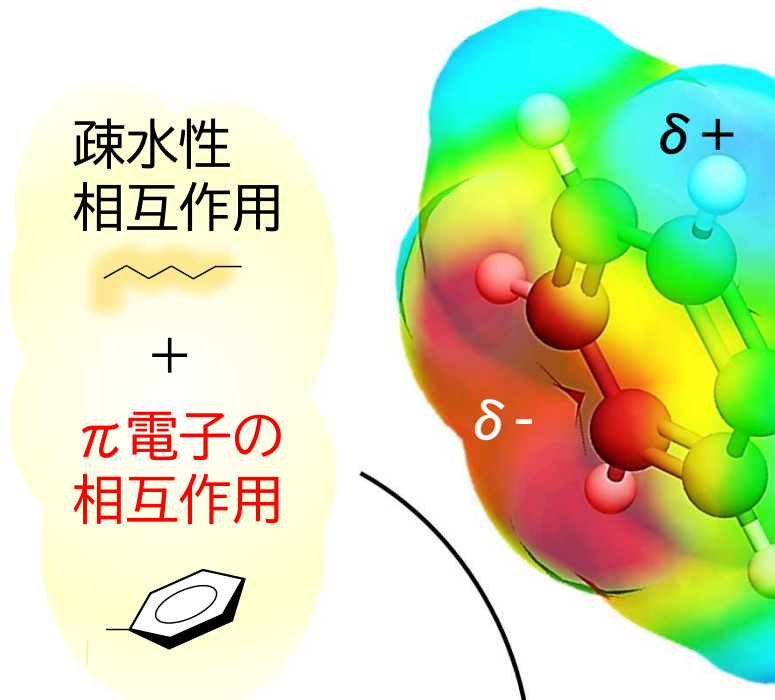


# 主な、Phenyl系カラム

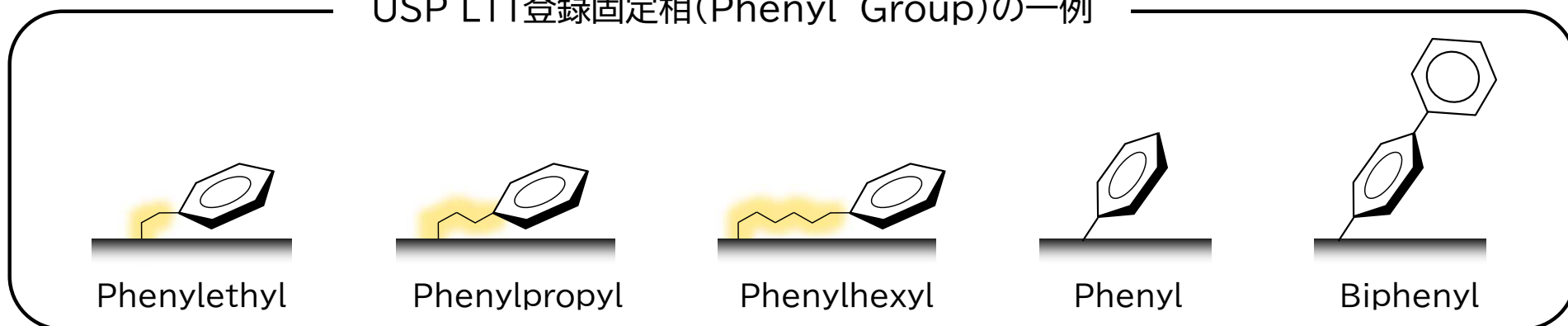
米国薬局方(USP)LC分類コード別、登録カラム数<sup>1)</sup>

登録数順位	USP Code	充填剤	登録数
1	L1	C18	1049
2	L7	C8	442
<b>3</b>	<b>L11</b>	<b>Phenyl</b>	<b>268</b>
4	L3	Silica	245
5	L10	Cyano	191
6	L8	NH2	155

1) US Pharmacopeia(USP), Chromatographic Columns, <https://www.uspchromcolumns.com/chrom/> (閲覧日: 2023-01-13)  
登録数のカウント・順位の記載は発表者による。



USP L11登録固定相(Phenyl Group)の一例



▶ 疎水基とπ電子のバランス ⇒ **フェニルの多様性**

# Biphenylカラム (L11登録品)

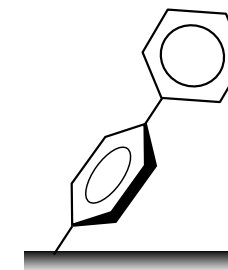


表1. USP L11(Phenyl group) に登録済みのBiphenyl 固定相一覧<sup>1)</sup>

Bland name	Manufacturer	Bland name	Manufacturer
① HALO Biphenyl	Advanced Materials Tech.	⑭ Epic Biphenyl	PerkinElmer
② Sunniest Biphenyl	ChromaNik Technol.	⑮ MacroSep BIO-Gold Biphenyl	PerkinElmer
③ SunShell Biphenyl	ChromaNik Technol.	⑯ Quasar Biphenyl	PerkinElmer
④ EIROSHELL BIO BiPhenyl	Glantreo	⑰ Quasar SPP Biphenyl	PerkinElmer
⑤ EIROSHELL RP BiPhenyl	Glantreo	⑱ Kinetex Biphenyl	Phenomenex
⑥ SOLAS BIO BiPhenyl	Glantreo	⑲ Force Biphenyl	Restek Corp.
⑦ SOLAS RP BiPhenyl	Glantreo	⑳ Pinnacle DB Biphenyl	Restek Corp.
⑧ Chromasol ONYX Biphenyl	Intek Chromasol	㉑ Pinnacle II Biphenyl	Restek Corp.
⑨ XCORE Biphenyl	ISERA	㉒ Raptor Biphenyl	Restek Corp.
⑩ XELA Biphenyl	ISERA	㉓ Ultra Biphenyl	Restek Corp.
⑪ NUCLEOSHELL Biphenyl	Macherey-Nagel	㉔ Viva Biphenyl	Restek Corp.
⑫ ChromCore Biphenyl	NanoChrom Technology	㉕ Shim-pack Velox Biphenyl	Shimadzu
⑬ Chromegabond WR Biphenyl	PerkinElmer	㉖ Accucore Biphenyl	Thermo Scientific

1) US Pharmacopeia, <https://www.uspchromcolumns.com/chrom/>, (閲覧日:2023/1/13) [注] Bland name, Manufacturerは掲載情報に基づく。

現在、上記と **Prominert Biphenyl**(ChromaNik新製品)を含めた27種のBiphenylが少なくとも市販されている。

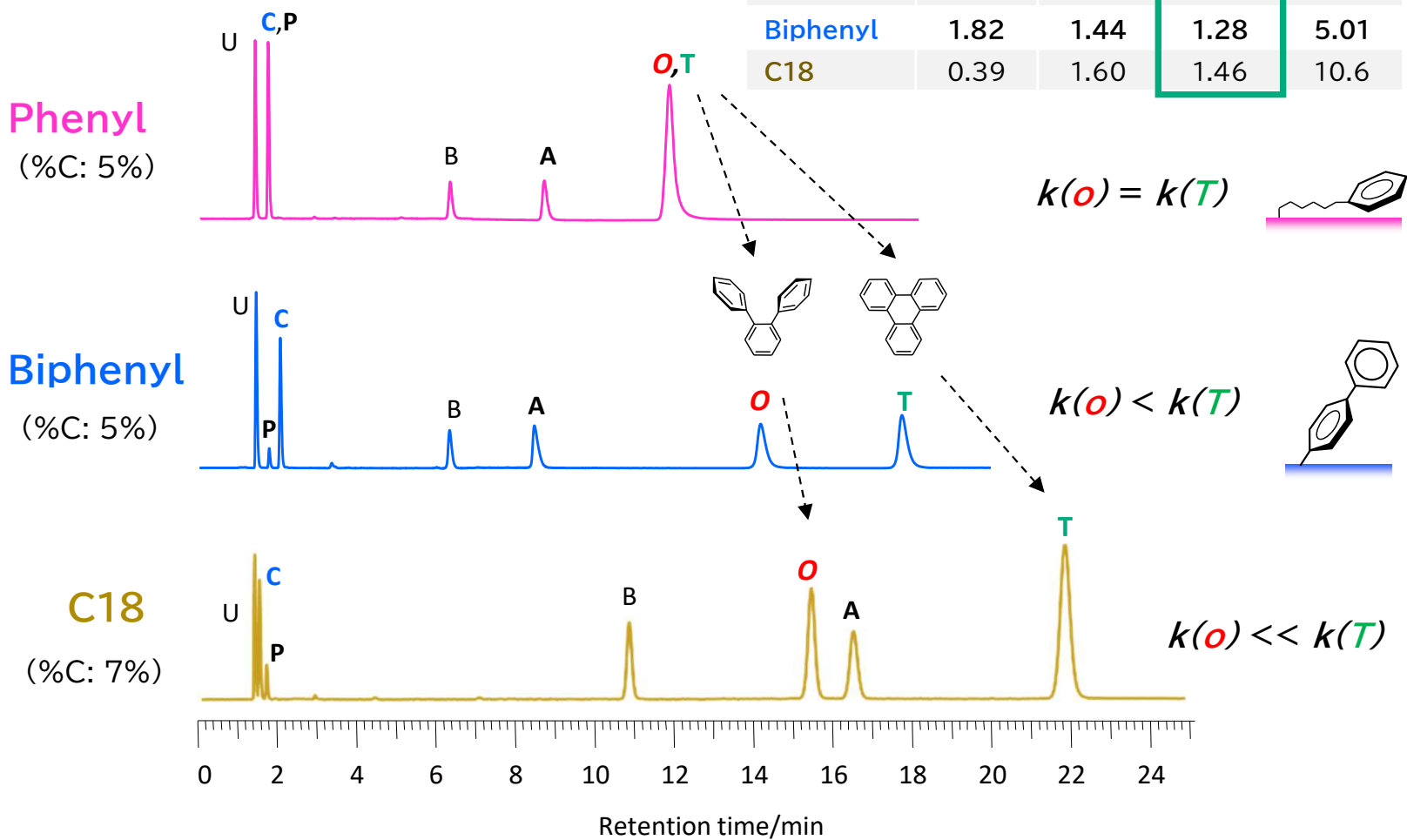
▶ Phenylカラム全体の、約1割がBiphenylタイプ

# Phenyl系固定相：保持・選択性の対比

%C…炭素含有率(Carbon load; wt%)

選択性* (分離係数 $\alpha$ )	水素結合性 (C/P)	疎水性 (A/B)	形状認識 (T/o)	疎水性保持 指標 (kA)
Phenyl	1.00	1.48	1.01	5.23
Biphenyl	1.82	1.44	1.28	5.01
C18	0.39	1.60	1.46	10.6

\*選択性試験は、田中テスト<sup>2)</sup>を基準として、自社の充填剤バッチ試験用に一部修正



Column: SunShell  
2.6 $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
Mobile phase:  
Methanol/水 = 75/25  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C  
Sample(for Batch test):  
U = Uracil (t0)  
C = Caffeine  
P = Phenol  
B = Butylbenzene  
O = o-terphenyl  
A = Amylbenzene  
T = Triphenylene

▶ Biphenylは、通常のPhenylより選択性が広い。

2) K.Kimata, K.Iwaguchi, S.Onishi, K.Jinno, R.Eksteen, K.Hosoya, MAraki and N.Tanaka, ; J. Chromatogr. Sci., Vol. 27 (1989)



# Phenyl系固定相：保持・選択性の対比

— Phenyl — Biphenyl — C18

選択性 (分離係数 $\alpha$ )	水素結合性 (C/P)	疎水選択性 (A/B)	形状認識 (T/o)	疎水性保持 指標 ( $k_A$ )
Phenyl	1.00	1.48	1.01	5.23
Biphenyl	1.82	1.44	1.28	5.01
C18	0.39	1.60	1.46	10.6

Column: SunShell  
2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
Mobile phase:  
Methanol/水 = 75/25  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C

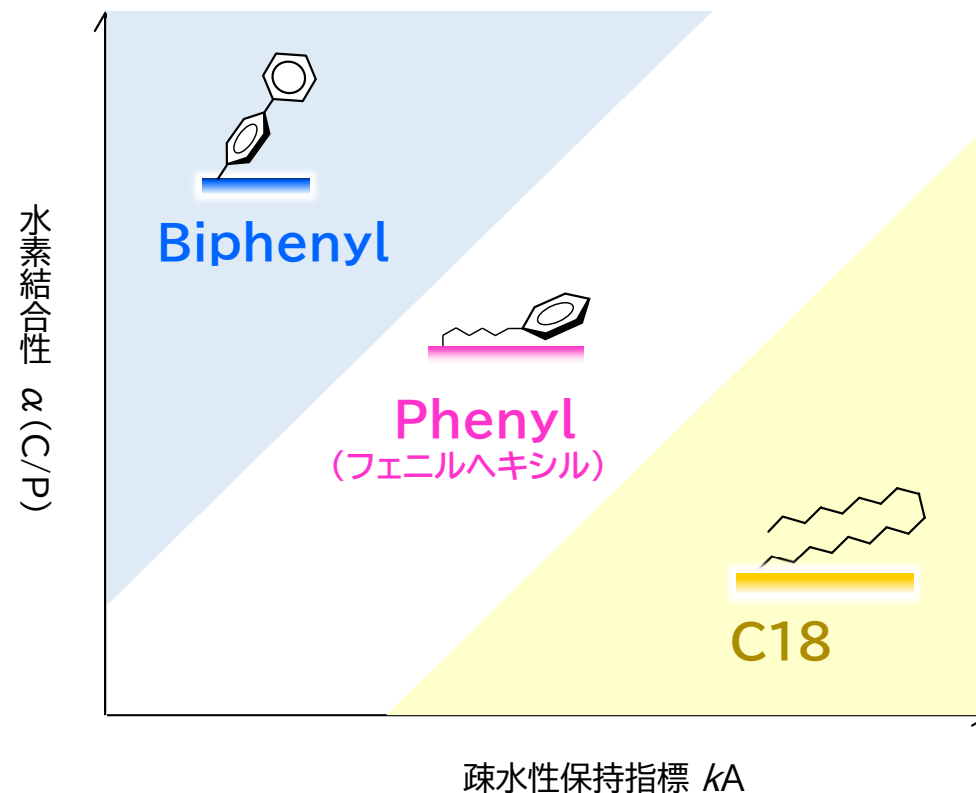
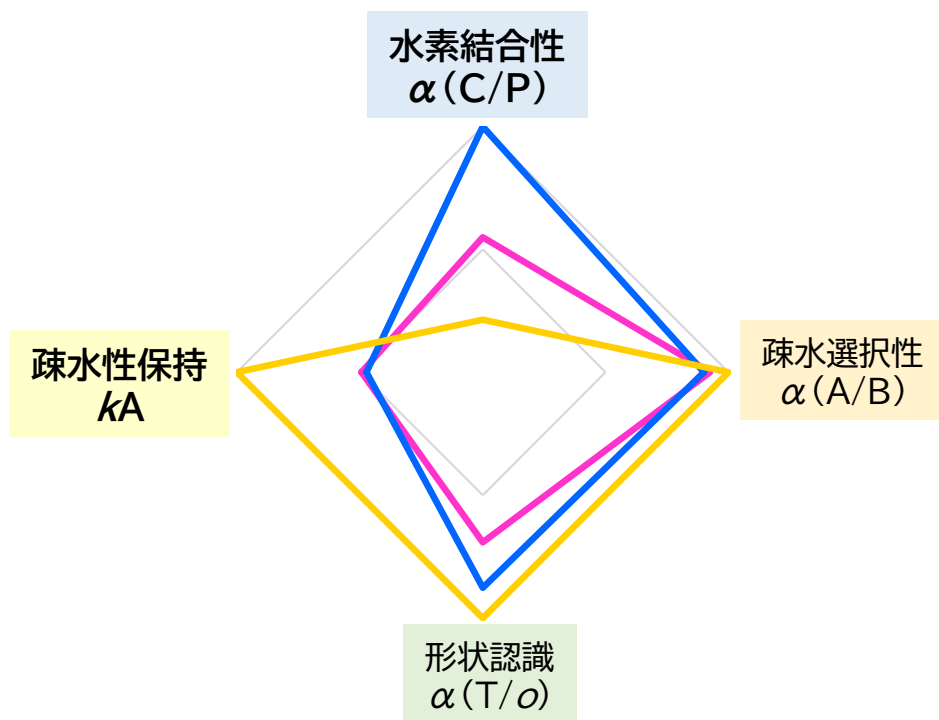


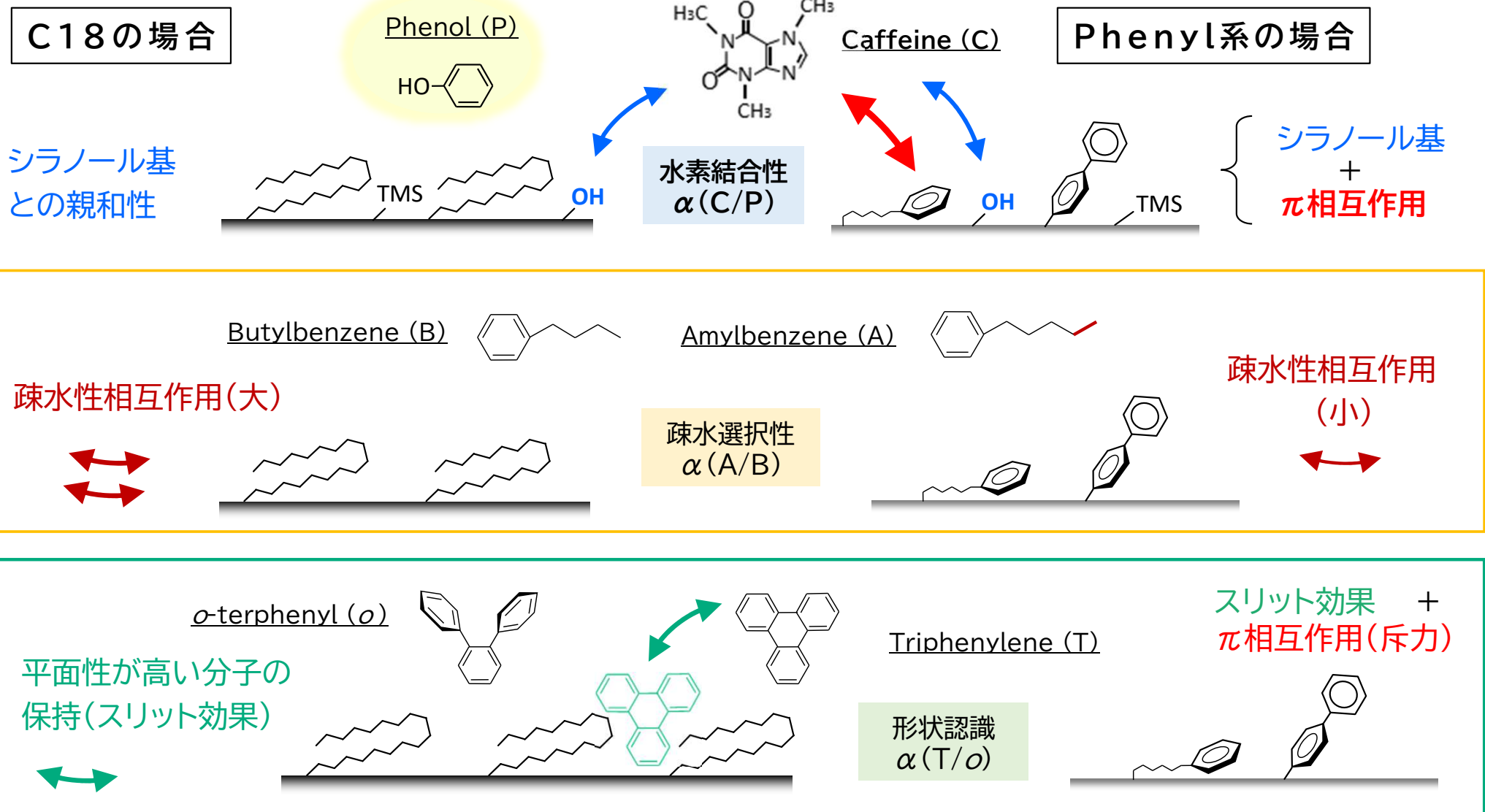
図. Phenyl系固定相とC18の選択性比較

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

▶ C18と比較し、Phenyl系は **水素結合性** が高い

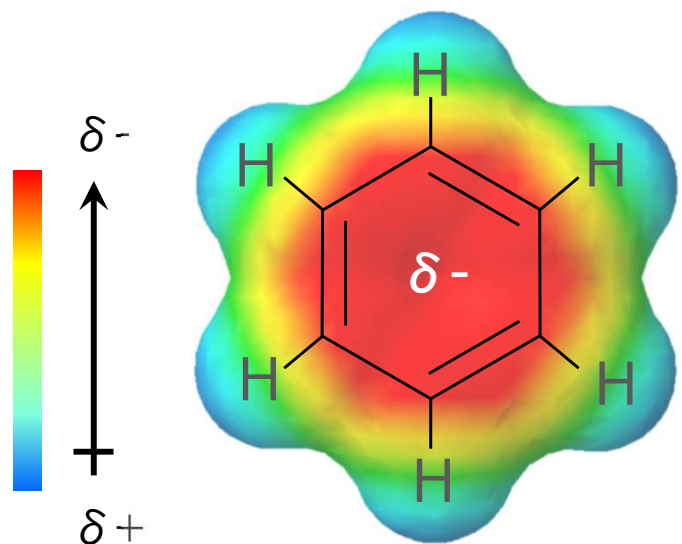


# (参考) 各種選択性指標の意味するところ

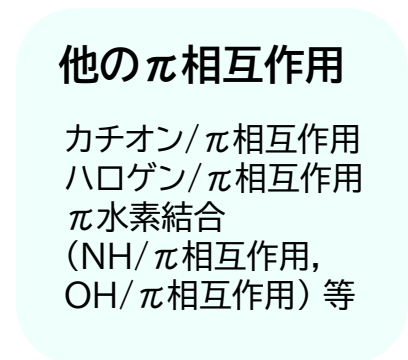
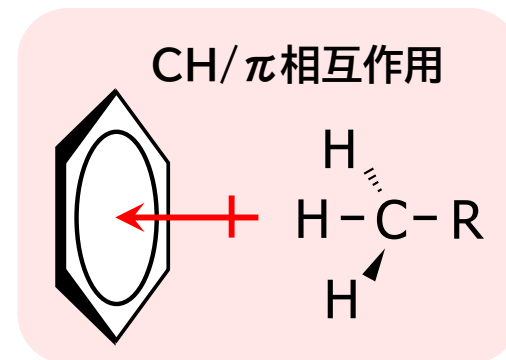
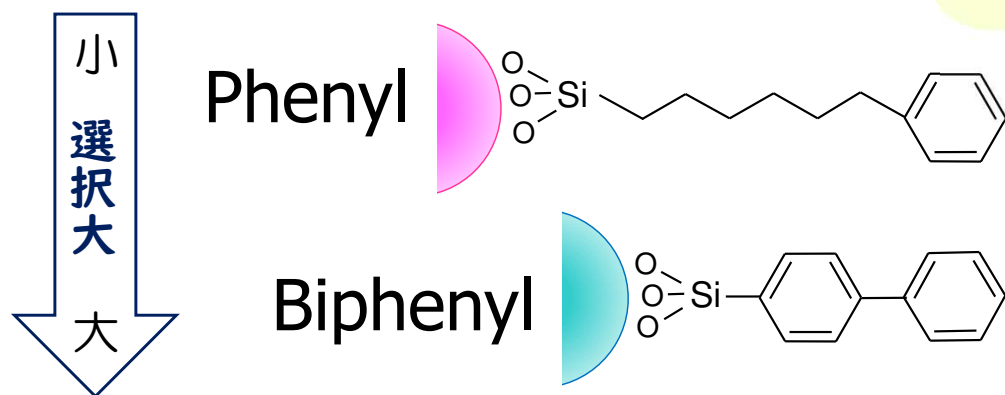
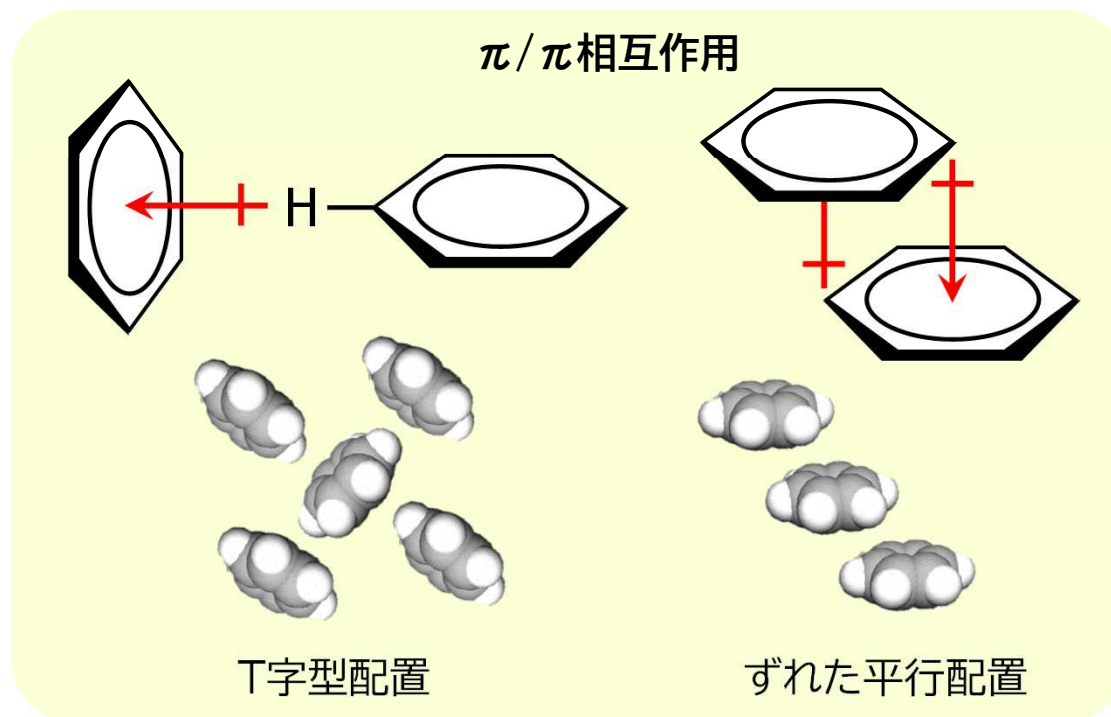


▶ C18とPhenyl系では、選択性の意味が異なる。

# Phenyl系固定相と、 $\pi$ 相互作用

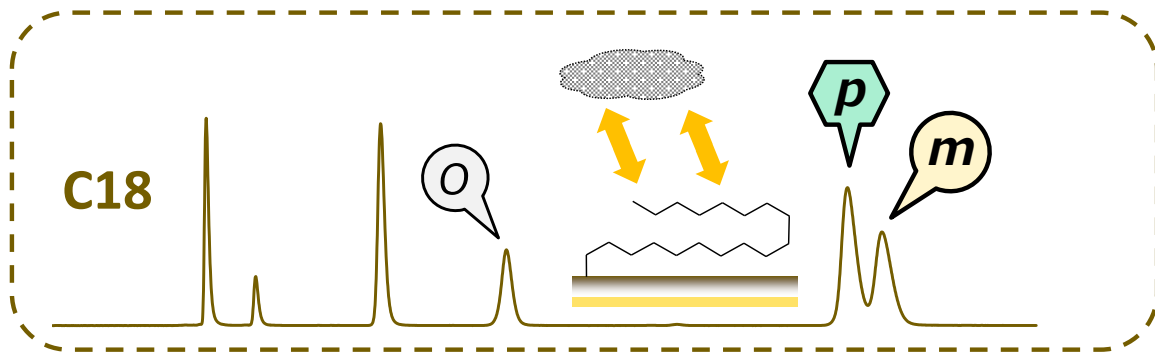


ベンゼンの静電ポテンシャルマップ



▶  $\pi$ 電子に基づく相互作用が、特異な選択性を示す。

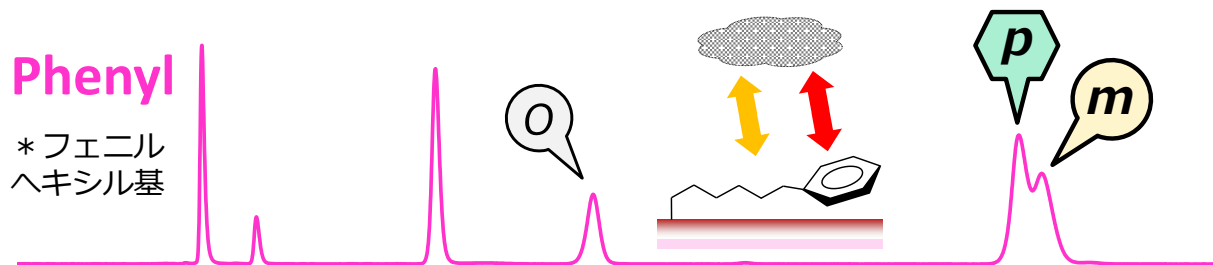
# Phenyl系固定相の違い：メチル馬尿酸



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

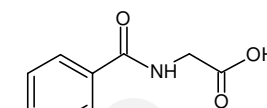
## Phenyl

\*フェニル  
ヘキシル基

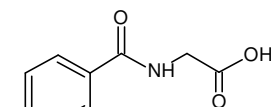


疎水性相互作用

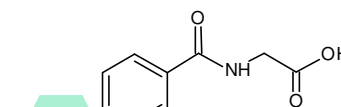
$\pi$ 相互作用



*o*-メチル馬尿酸

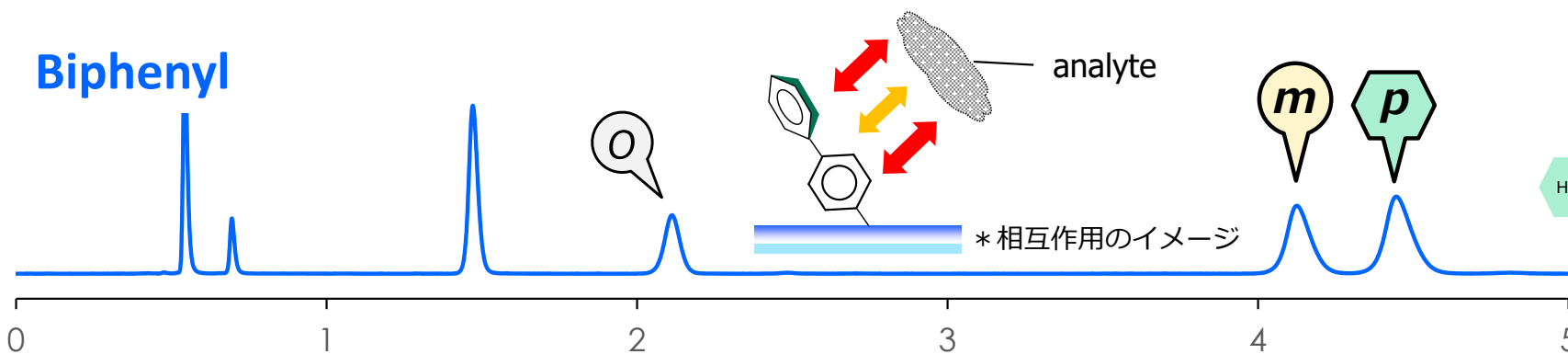


*m*-メチル馬尿酸



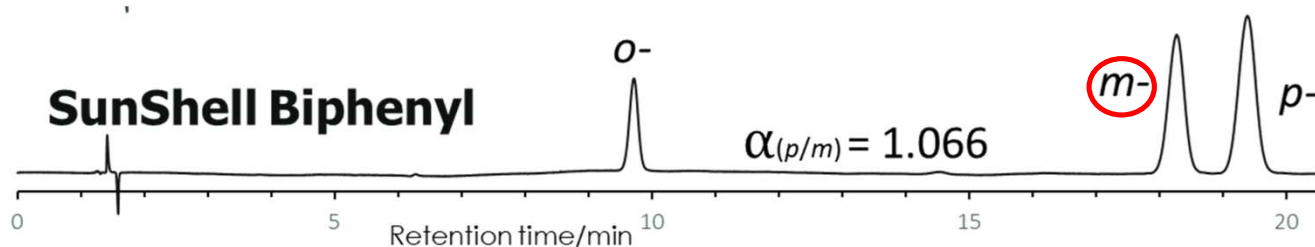
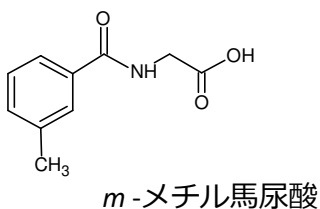
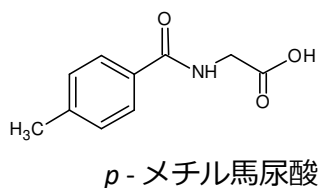
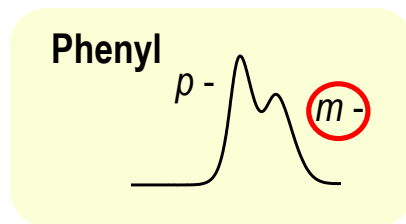
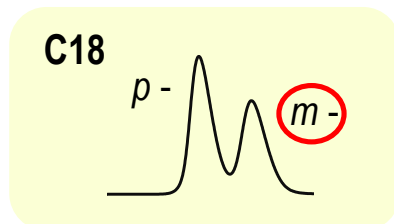
*p*-メチル馬尿酸

## Biphenyl

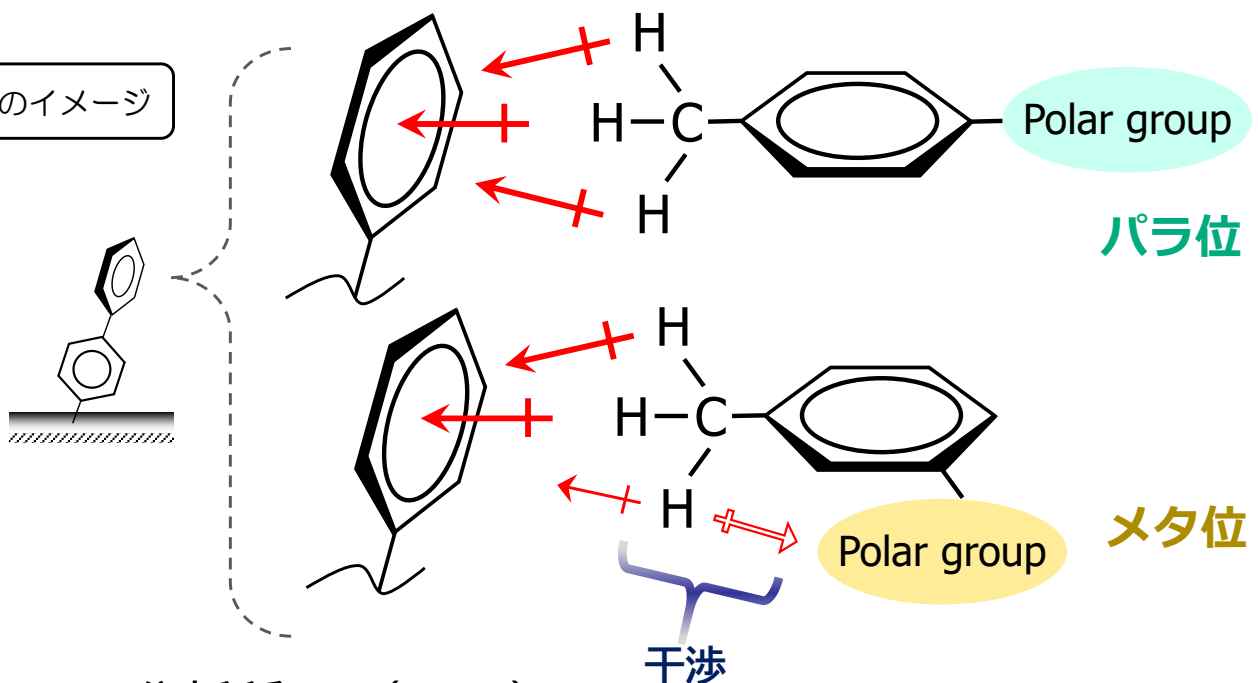


▶ アルキル鎖/フェニル基のバランスが、分離に反映

# 「CH/ $\pi$ 選択性モデル」



相互作用のイメージ



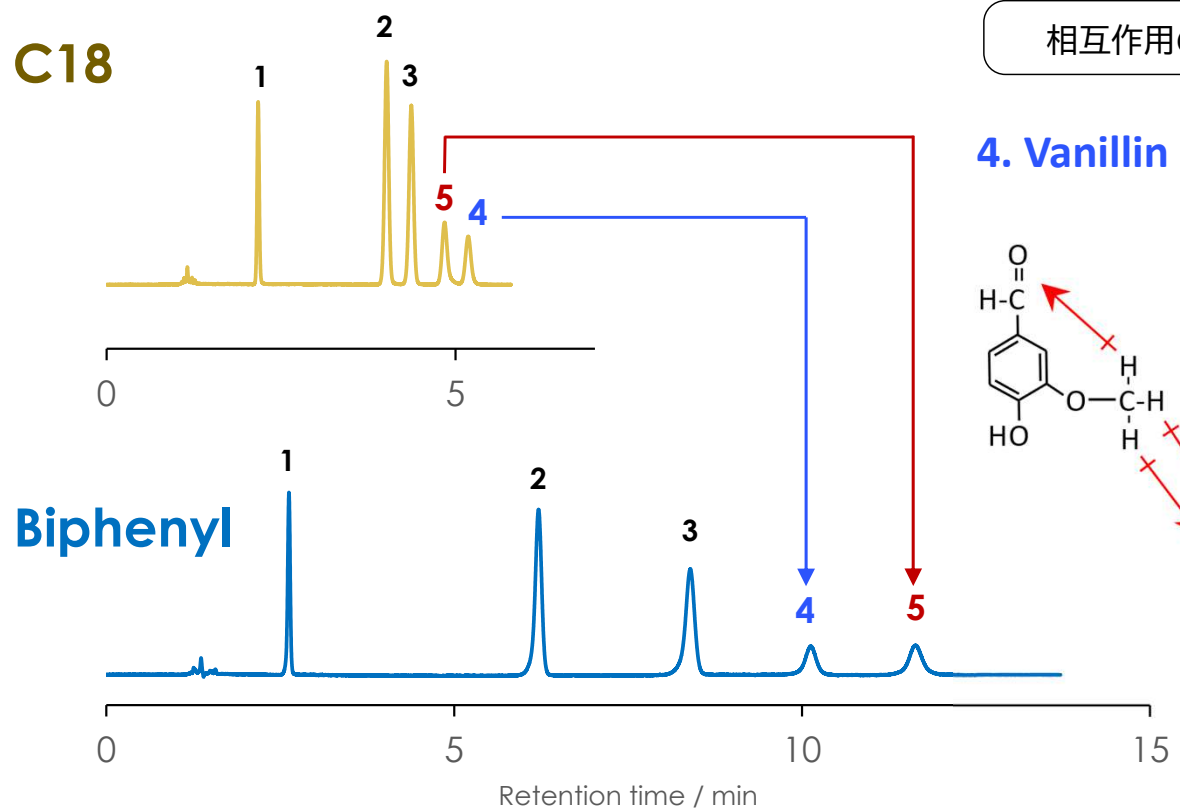
Column:  
2.6  $\mu\text{m}$  or 2.7  $\mu\text{m}$  (Core-Shell) 150 x 4.6 mm  
Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C  
Mobile phase:  
2-Propanol/25 mM Phosphate buffer (pH 3.0)  
Detection: UV@230 nm  
Sample: *o*-, *m*-, *p*-Methylhippuric acid

Biphenylの (  $\leftarrow+$  )

分析種の (  $\rightarrow+$  )

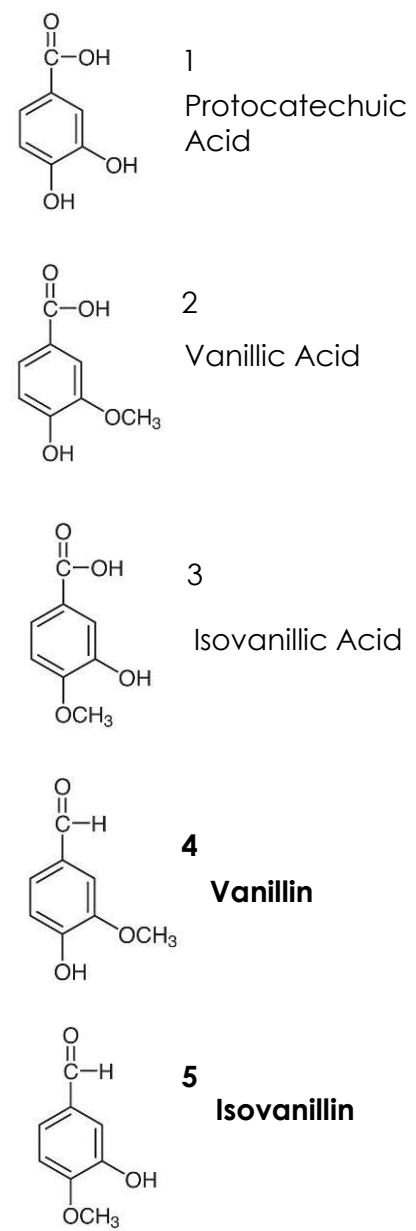
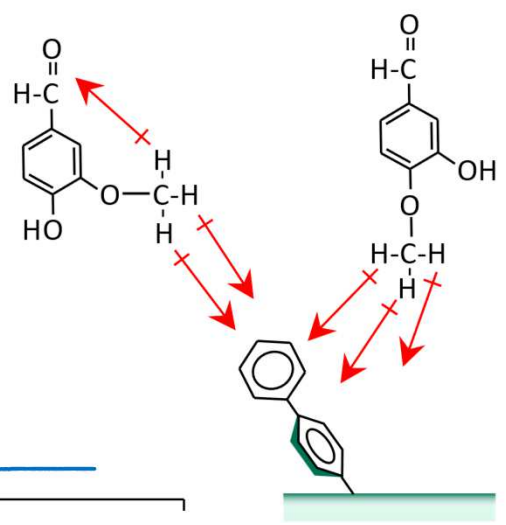
▶ CH/ $\pi$ 相互作用と、分子内相互作用との綱引き

# バニリン類とCH/ $\pi$ 選択性



相互作用のイメージ

4. Vanillin 5. Isovanillin

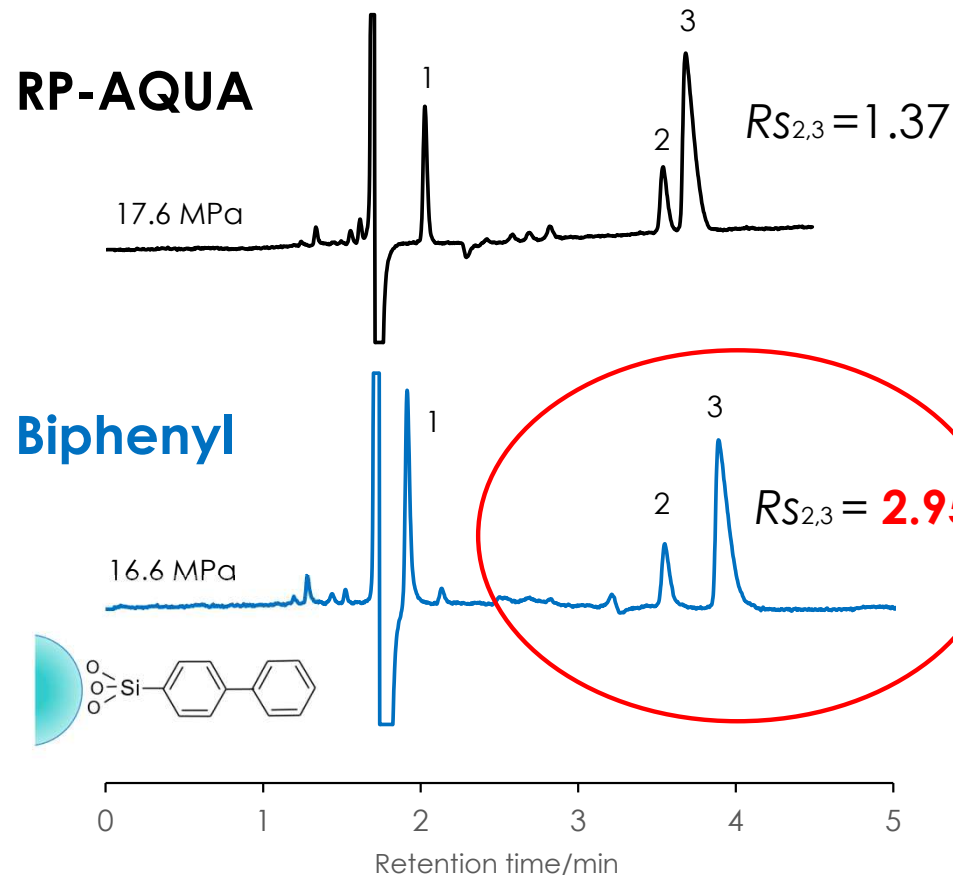
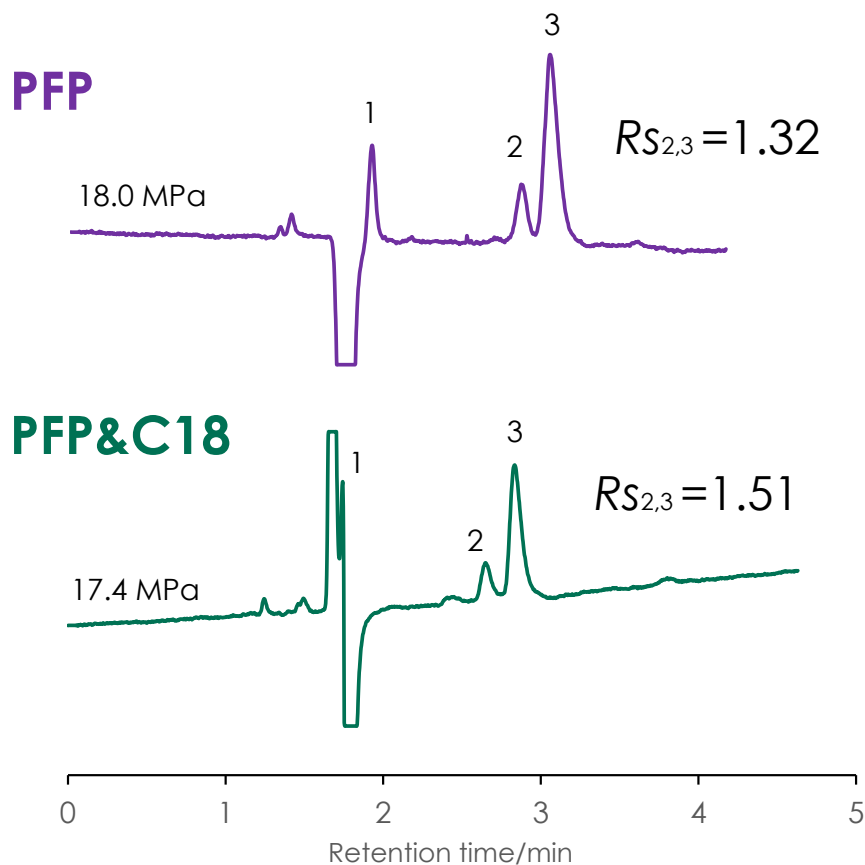


Column: Prominert C18, Biphenyl 3.5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: Methanol / 0.1% Phosphoric acid = 25 / 75  
 Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40  $^{\circ}$ C Detection: UV@250nm

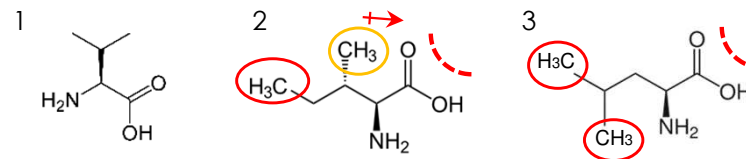
Sample: 1 = Protocatechuic Acid  
 2 = Vanillic Acid, 3 = Isovanillic Acid  
 4 = Vanillin, 5 = Isovanillin

▶ メトキシ基の位置異性体間でも、同様の分離傾向

# 分岐鎖アミノ酸とCH/ $\pi$ 選択性 水系100%



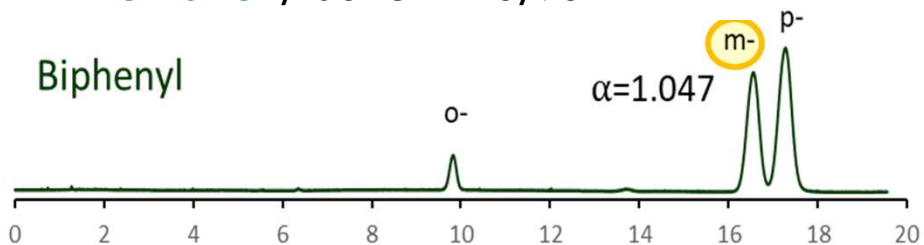
Column: SunShell RP-AQUA , PFP , PFP&C18 , Biphenyl 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: 0.1% formic acid Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C  
 Detection: UV@205nm Sample: 1 = L-Valine 2 = L-Isoleucine 3 = L-Leucine



▶ 構造異性体の分岐鎖アミノ酸同士を良好に分離

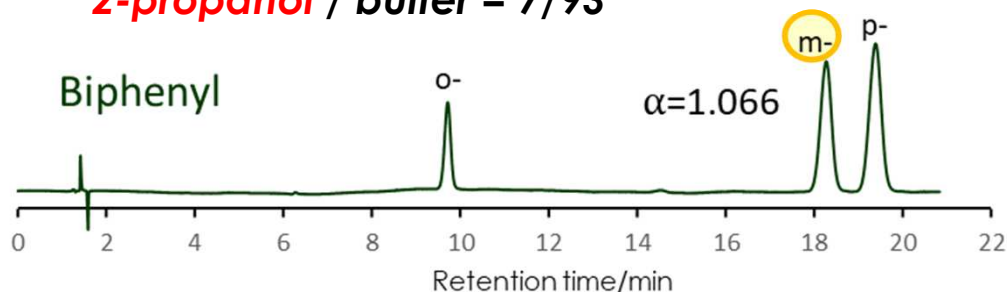
# 有機溶媒種と分離への影響(メチル馬尿酸)

Methanol / buffer = 25/75



メタノール、又は2-プロパノールを使用時にCH/ $\pi$ 選択性が引き立つ

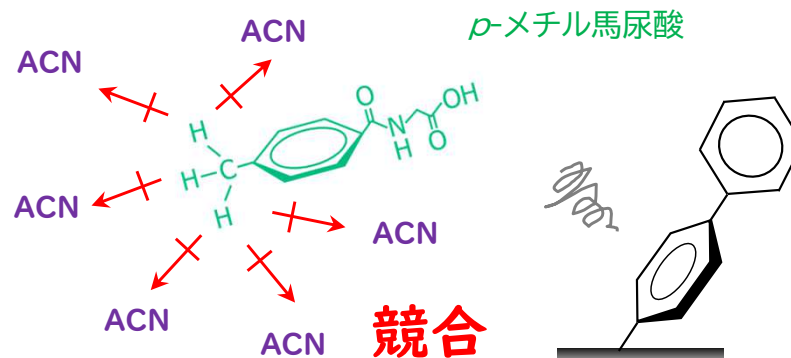
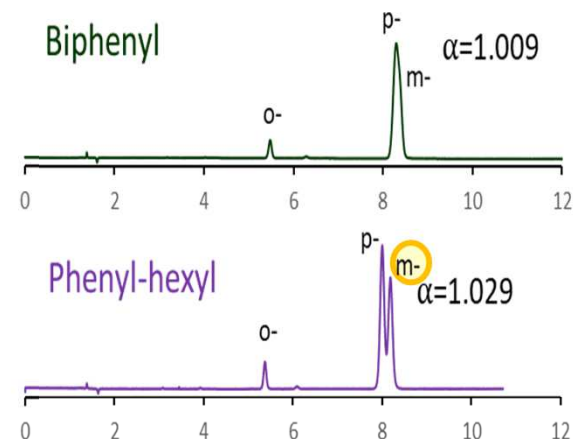
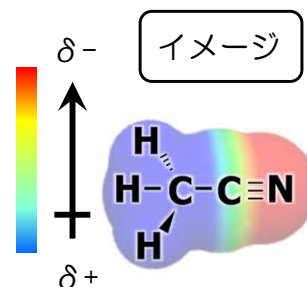
2-propanol / buffer = 7/93



Column: SunShell Biphenyl, Phenyl 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: Organic solvent/25 mM Phosphate buffer pH 3.0  
 Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$  Detection: UV@230 nm Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid

Acetonitrile / buffer = 13.5/86.5

共溶出



▶ アセトニトリル移動相は、 $\pi$ 相互作用を抑制する。



# 分岐鎖・直鎖構造異性体と、移動相最適化

Column: SunShell 2.6 μm, 150 x 4.6 mm

Mobile phase:

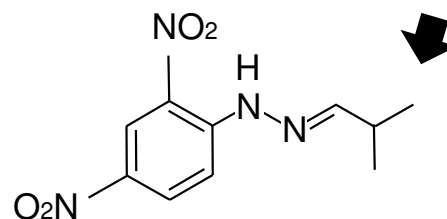
**2-propanol (IPA)** : **Methanol** : Water = 25:40:35

Temperature: 40 °C

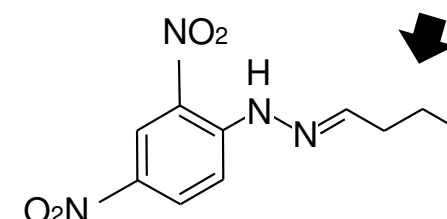
Detection: UV@360 nm

Sample:

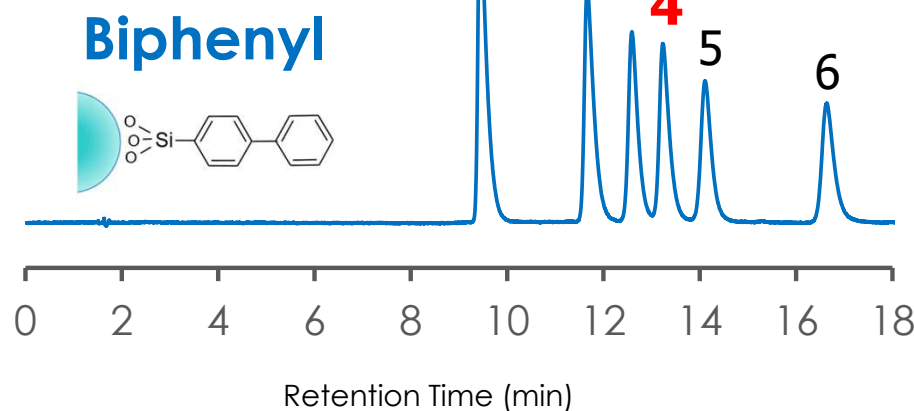
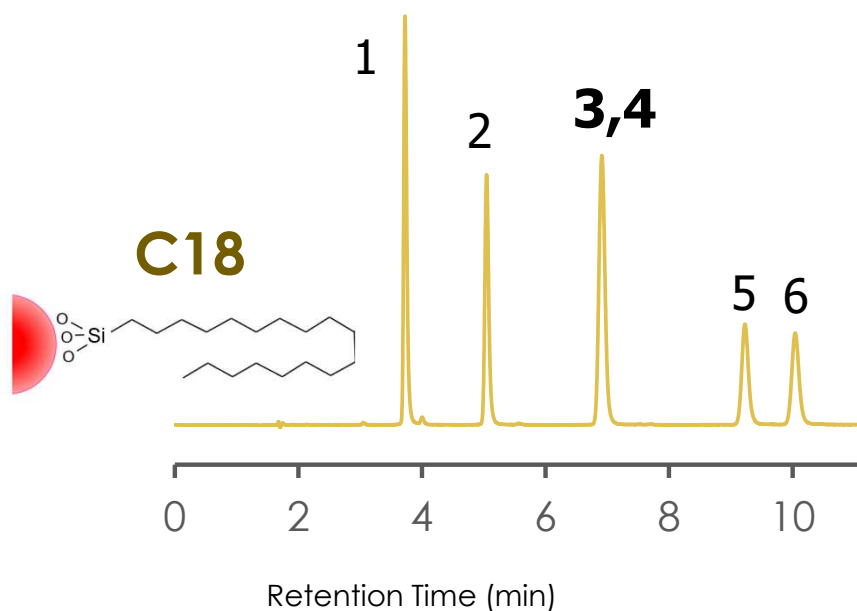
1. Acetaldehyde-DNPH
2. Propionaldehyde-DNPH
3. iso-Butyraldehyde-DNPH
4. n-Butyraldehyde-DNPH
5. iso-Valeraldehyde-DNPH
6. n-Valeraldehyde-DNPH



3. iso-Butyraldehyde-DNPH



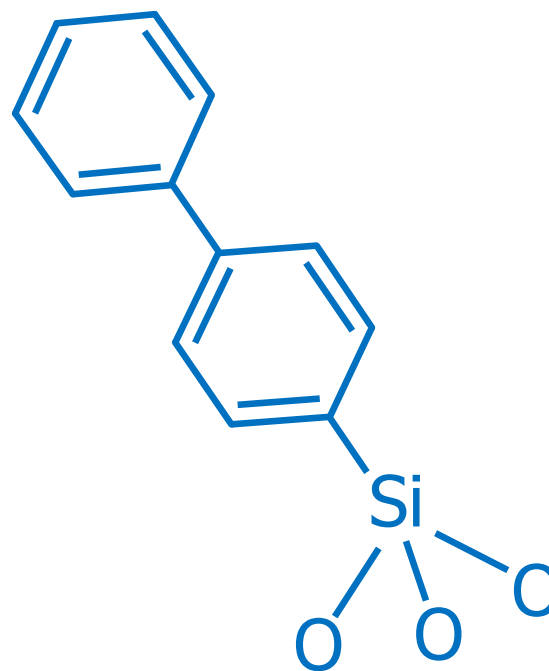
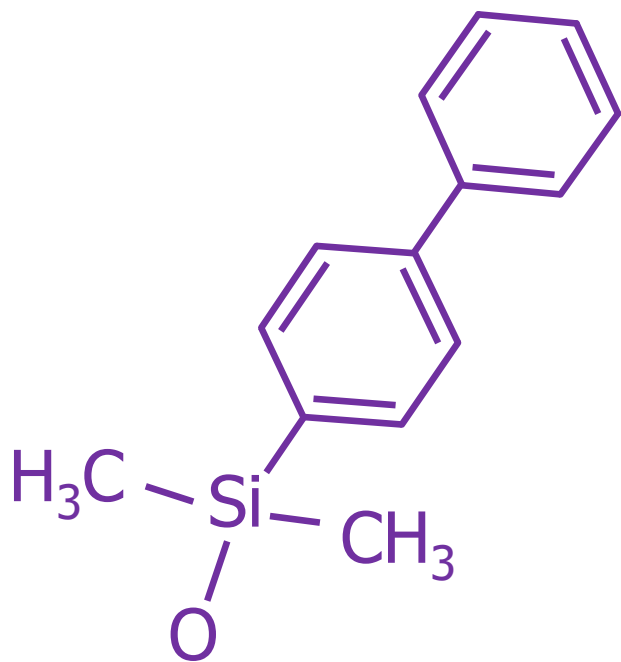
4. n-Butyraldehyde-DNPH



▶ IPAを含む有機溶媒が、時に、選択性を拡張する。

# Biphenylカラム間の比較 に見る Phenyl の留意点

ChromaNik



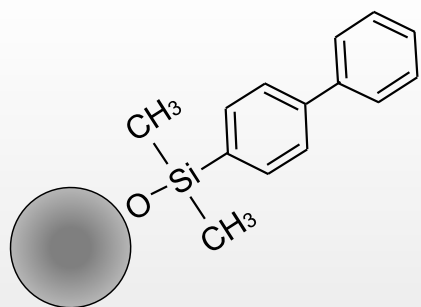
# Biphenyl 4種の比較

共通: SPP(surface porous particle)、いわゆるコアシェル型シリカ粒子、粒子径2.6 $\mu$ mまたは、2.7 $\mu$ mで比較

カラム	粒子径 ( $\mu$ m)	Particle type	Pore size (nm)	比表面積(m <sup>2</sup> /g)	炭素含有率 (%)	結合基	End-capping	pH range
Company A Biphenyl	2.6	SPP	10	200(eff.)*	11(eff.)*	Biphenyl	TMS	1.5 - 8.5
Company B Biphenyl	2.7	SPP	9	135	7	Biphenyldimethylsilane	Yes	1.5 - 8.0
Company C Biphenyl	2.7	SPP	9	130	7	Biphenyldimethylsilane	Yes	1.5 - 8.0
SunShell Biphenyl	2.6	SPP	9	150	5	三官能性Biphenyl	Sunniest end-capping	1.5 - 9
SunShell Phenyl	2.6	SPP	9	150	5	三官能性Phenyl-hexyl	Sunniest end-capping	1.5 - 9
SunShell C18	2.6	SPP	9	150	7	三官能性C18	Sunniest end-capping	1.5 - 10

\*eff(effective): 換算値

\*\*Sunniest end-capping: 三官能性試薬に対応した、シリカ高度不活性化法

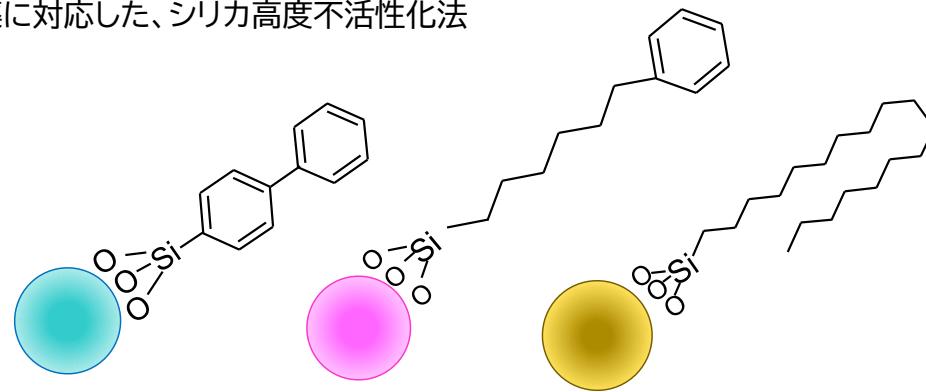


(A Biphenyl)

B Biphenyl

C Biphenyl

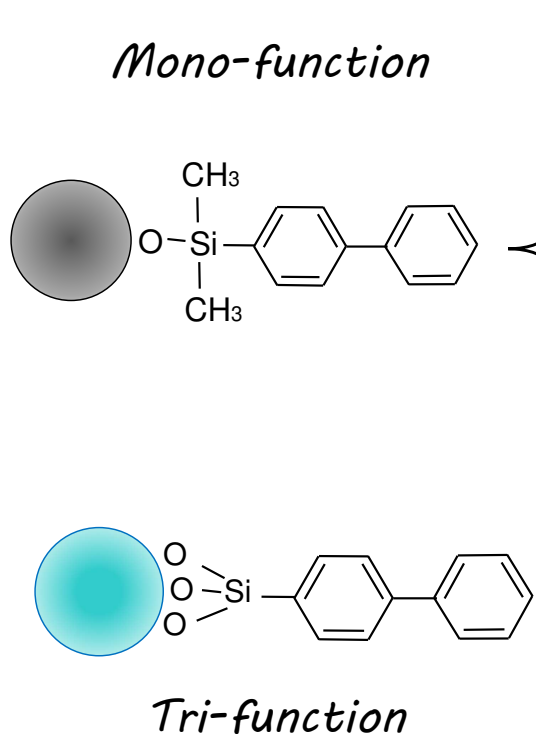
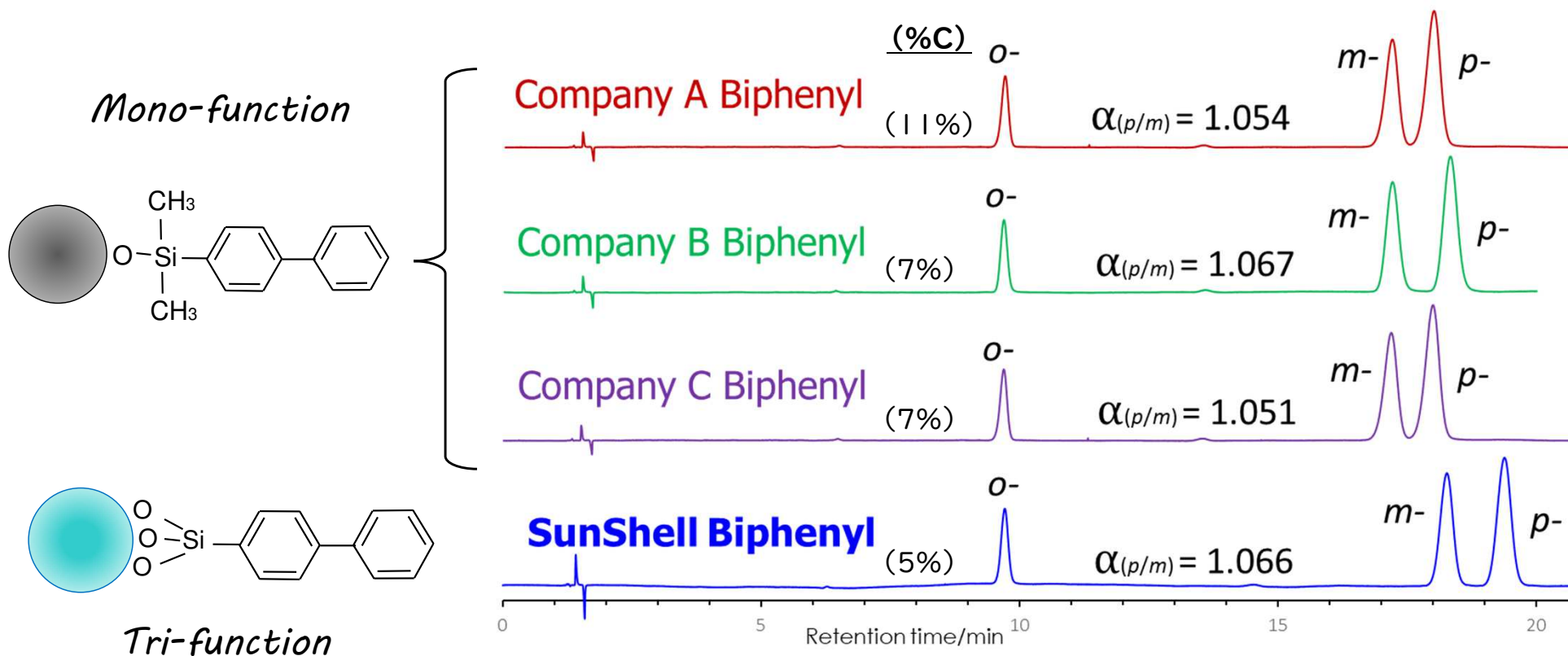
一官能性



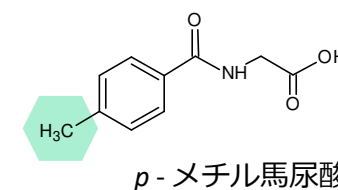
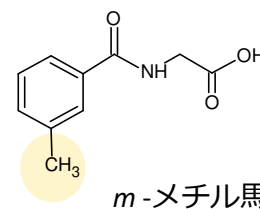
三官能性

SunShell各種

# Biphenyl 4種の比較：メチル馬尿酸

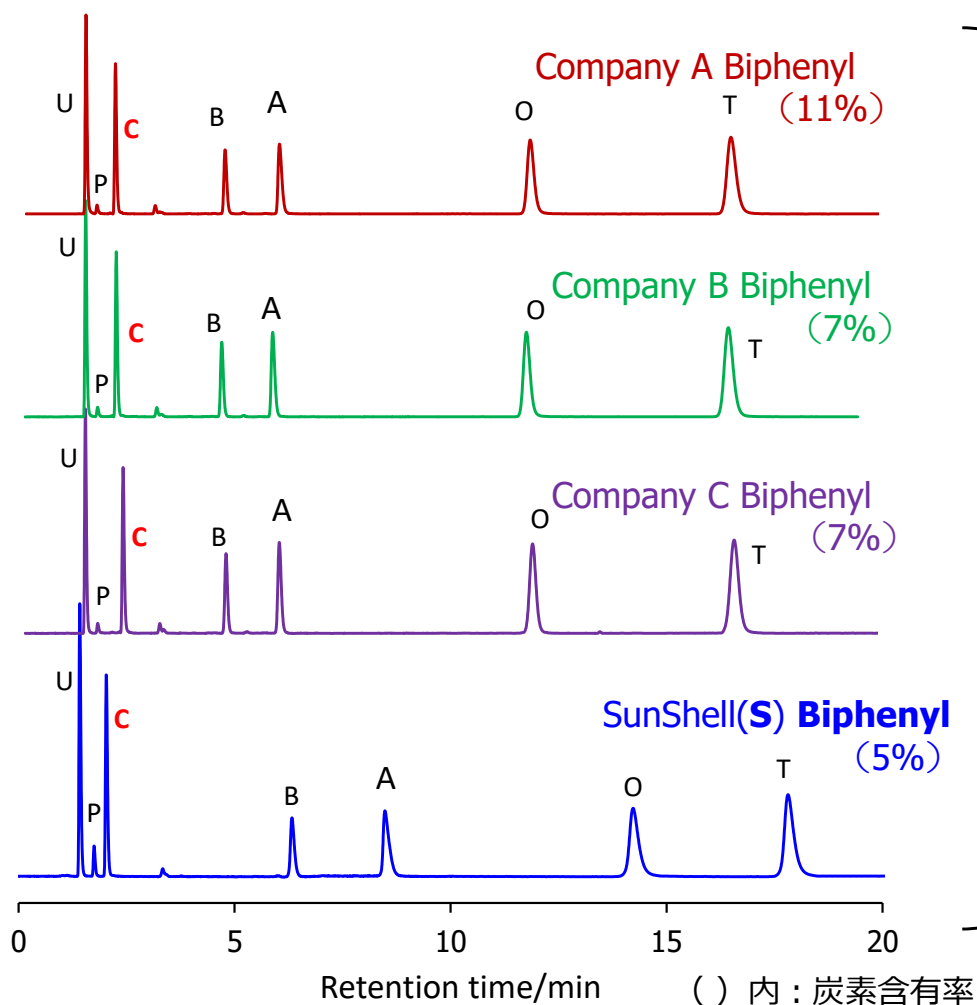


Column: 2.6  $\mu\text{m}$  or 2.7  $\mu\text{m}$  (Core-Shell) 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: 2-Propanol/25 mM Phosphate buffer ( pH 3.0 )  
 Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$  Detection:UV@230 nm  
 Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid



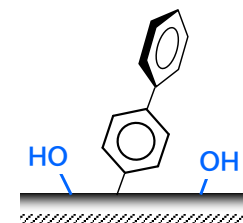
▶ CH/ $\pi$ 選択性は、Biphenyl固定相に共通の特徴

# Biphenyl 4種の比較：選択性の相違点



選択性 (分離係数 $\alpha$ )	水素結合性 (C/P)	疎水性 (A/B)	形状認識 (T/o)	疎水性保持 指標 (kA)
A Biphenyl	<b>2.69</b>	1.39	1.45	3.23
B Biphenyl	<b>2.52</b>	1.37	1.46	3.08
C Biphenyl	<b>3.07</b>	1.38	1.45	3.21
S Biphenyl	<b>1.82</b>	1.44	1.28	5.38
SunShell C18	0.39	1.60	1.46	10.6

溶出順は変わらないものの、  
A,B,C Biphenylの3種は  
「水素結合性」が特異に高い。



Column: 2.6  $\mu$ m or 2.7  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: Methanol/水 = 75/25  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Sample(for Batch test):  
 U = Uracil (t0)  
 C = Caffeine  
 P = Phenol  
 B = Butylbenzene  
 O = o-terphenyl  
 A = Amylbenzene  
 T = Triphenylene

▶ 残存シラノール基が、「水素結合性」を嵩増しする。

# Biphenyl 4種の比較：残存シラノール

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  
=  $k_A$

SunShell  
Biphenyl

疎水選択  
=  $\alpha$  (A/B)

形状認識 =  $\alpha$  (T/o)

A Biphenyl

B Biphenyl

C Biphenyl

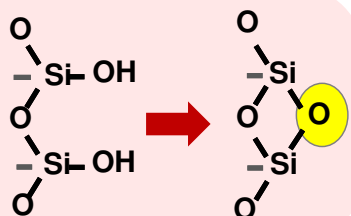
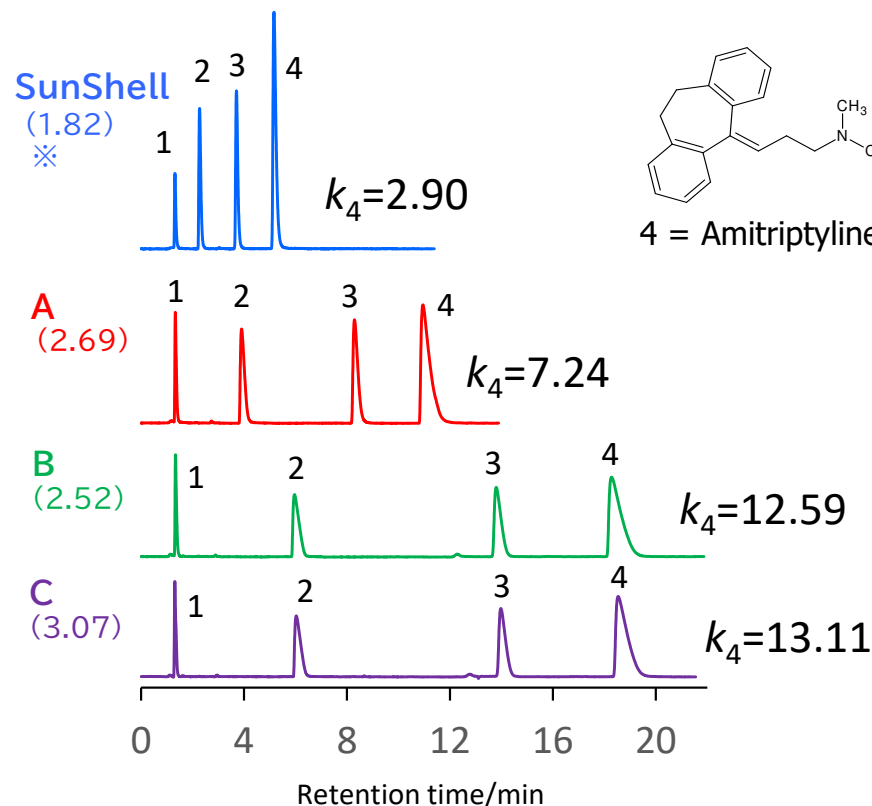


図. Biphenyl固定相4種(SunShell, A, B, C)の選択性比較

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

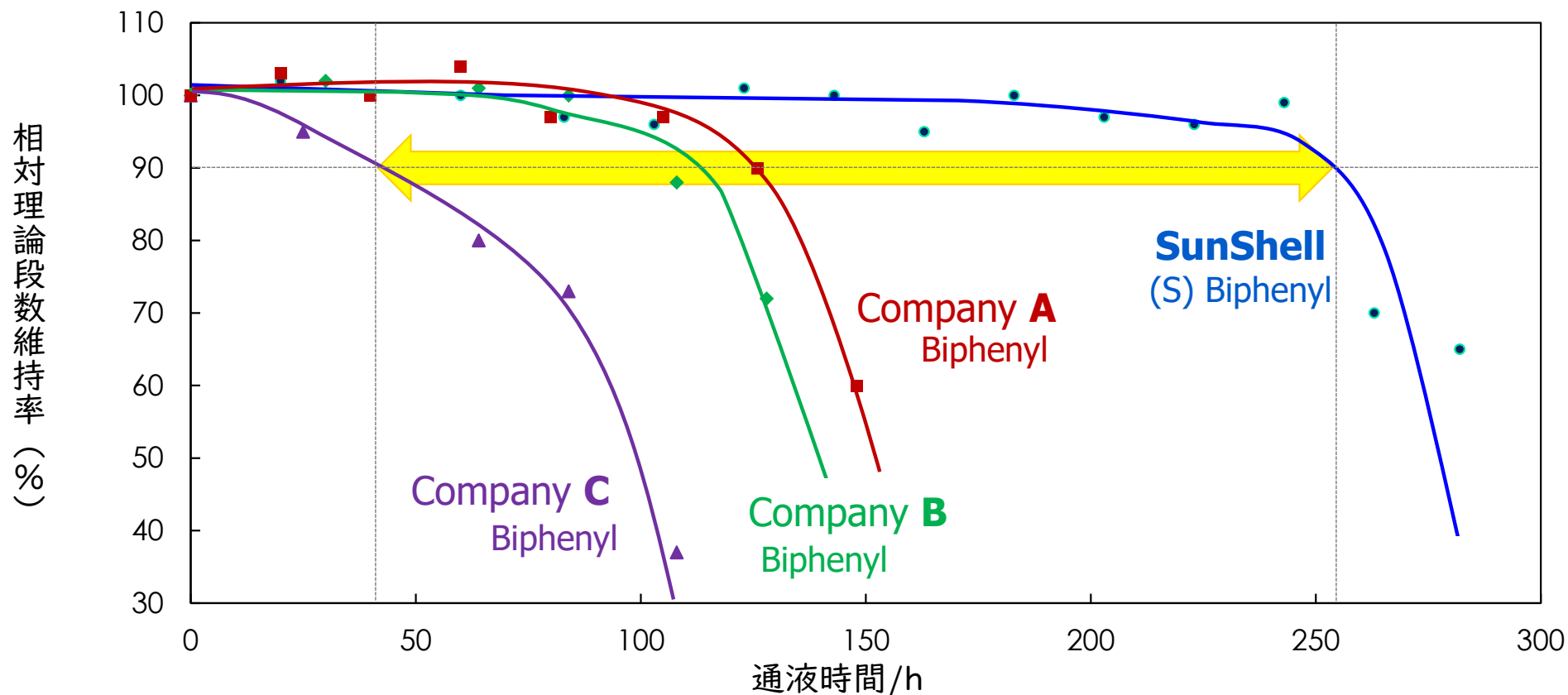
※( )内は、 $\alpha$  (C/P)



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

▶ 二次相互作用による、塩基性化合物の過度な吸着

# 耐久性試験の比較：弱アルカリ性移動相



耐久性試験条件

Column dimension: 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase:  
**20 mM Sodium phosphate (pH 8.0)**

共通条件

Column dimension: 50 x 2.1 mm  
 Temperature: 40 °C  
 Flow rate: 0.2 mL/min

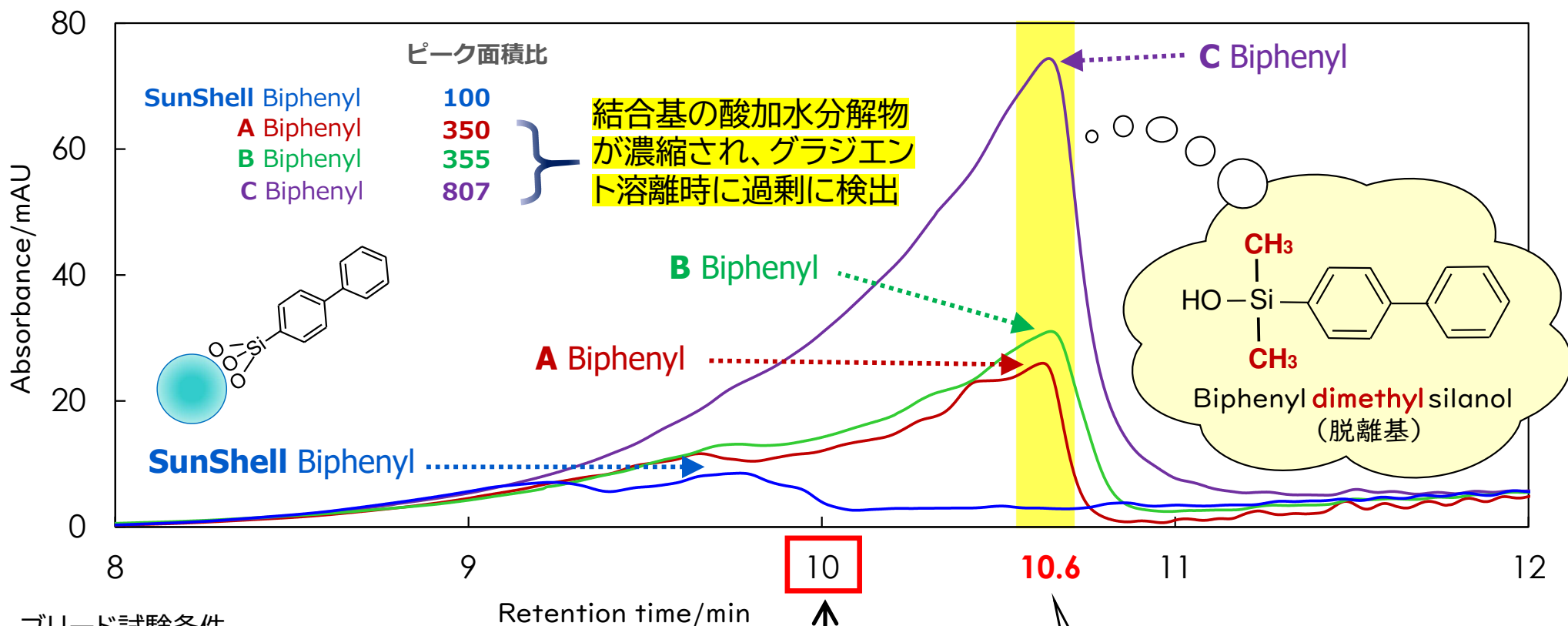
理論段数測定条件

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=50/50  
 Detection: UV@250 nm  
 Sample: Butylbenzene

▶ 残存シラノール基の最小化が、耐久性向上に直結



# ブリード試験の比較：酸性移動相



## ブリード試験条件

Column dimension: 50 x 2.1 mm

Flow rate: 0.3 mL/min

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

Temperature: 40 °C

B) Acetonitrile

Detection: UV@250 nm

## Gradient program

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

グラジエント終点  
(17分までhold)

Chromatogram of a base line at the third gradient cycle

▶ グラジエント溶離時の、ベースラインの変動に注意

# まとめ

- Phenylカラムは、ダイレクトフェニルからアルキル型フェニル、ビフェニルなどを含む、多様性ある固定相群である。
- フェニル基および疎水基のバランスが、選択性を変える。
- フェニル系固定相は、その性質上ブリードノイズが過大になりやすく、安定性向上のための不活性化処理が重要である。
- クロマトックテクノロジーズのPhenyl系カラムは、いずれも高度不活性化を適用済みで、**選択性と安定性**の二刀流でもって、堅牢性ある分析法開発への貢献が期待できる。

