

HPLC カラムの 選び方

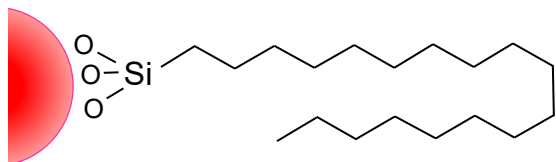


～Biphenyl、PFPなど
C18(ODS) 以外の逆相
固定相に焦点を当てて～

(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

C18で“困った時”のセカンドカラム問題

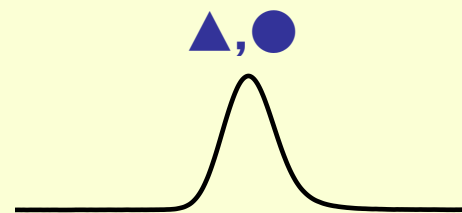
C18 (1st 逆相カラム)



どうしようか…?



分離できない！



C18以外の結合相

- ・ イオンペア法
- ・ 誘導体化法
- ・ HILIC
- ・ MIXモード

C18

他のモード

▶ を使う？他のモードを検討？それとも…？

分離度 R_s 向上に関わる因子と、その効果

(例) $N = 12000$, $k = 3.0$, $\alpha = 1.10$

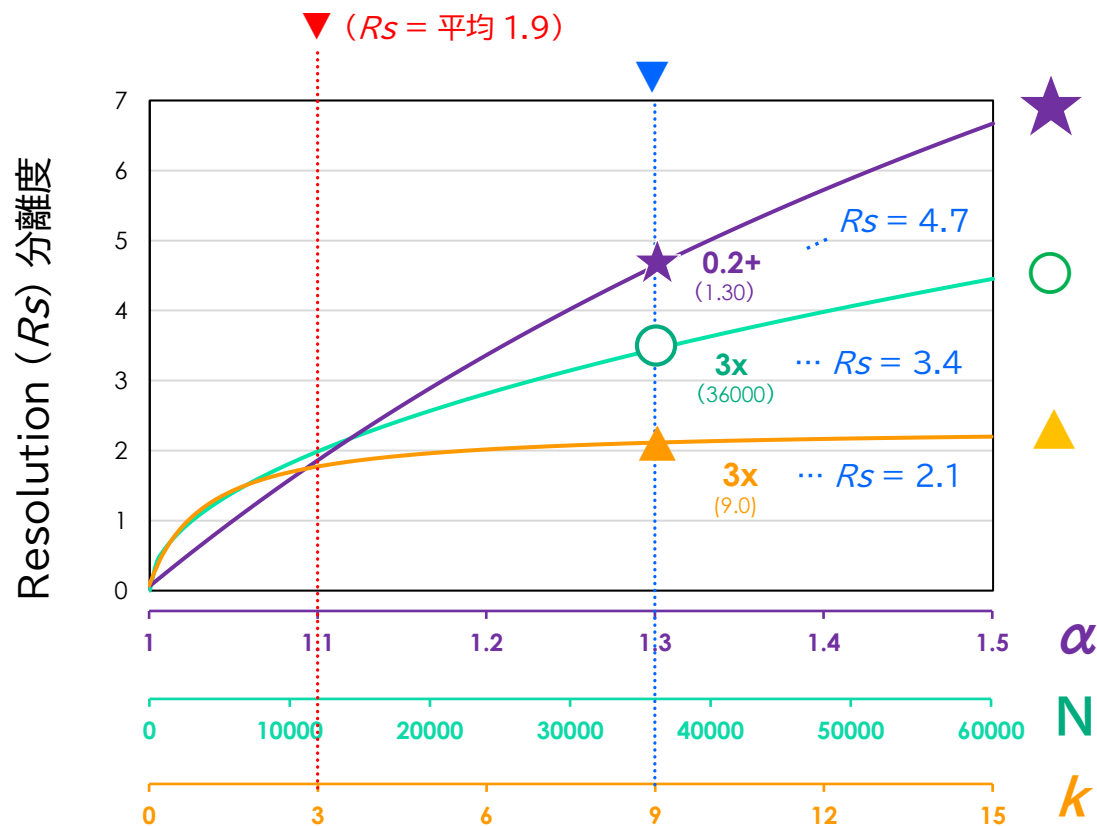


図: ある2成分ピークの分離度に与える、各パラメータの効果

指標

関連する主要要素

Selectivity (α)
分離係数

選択性 (固定相)

Efficiency (N)
理論段数

効率 (粒子径・表面
多孔性、カラム長さ)

Retention (k)
保持係数

保持 (移動相の有
機溶媒比率を調整)

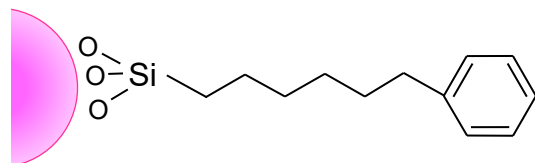
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

最重要因子は **分離係数**

▶ **保持** < **効率** << **選択性** …「相互作用の差異を認識」

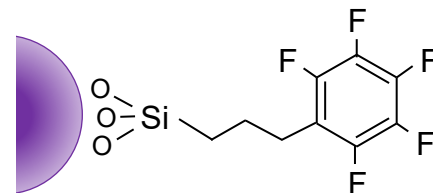
HPLCカラムの選び方と、活用のコツ

Phenyl



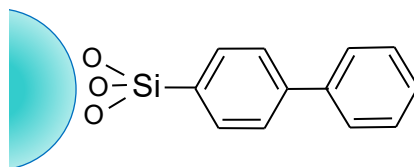
②

PFP

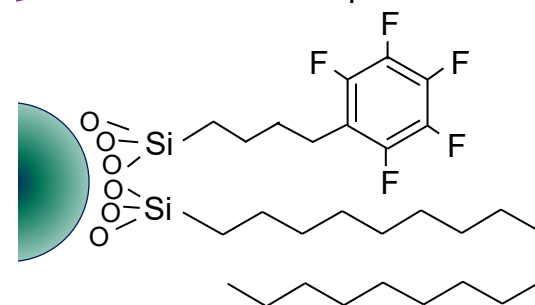


①

Biphenyl

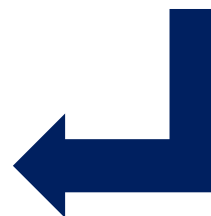
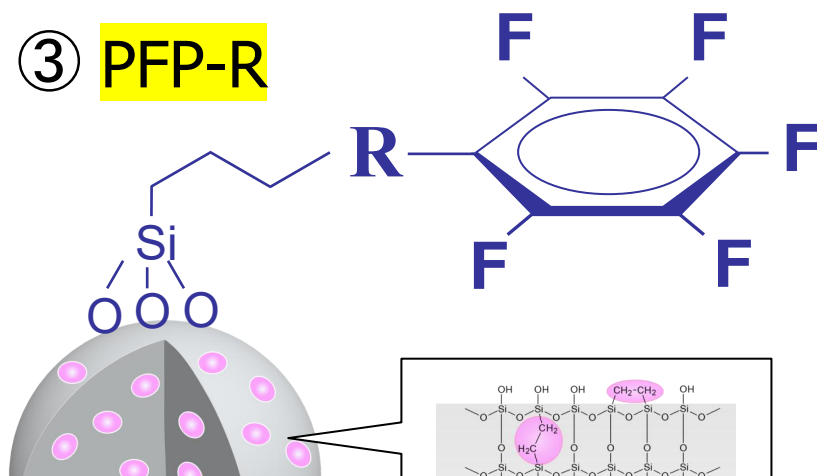


PFP&C18



③

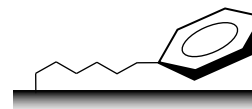
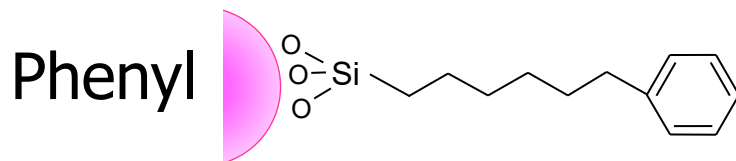
PFP-R



SunBridge PFP-R

~2025年9月発売~

代表的なセカンドカラム：フェニルも色々



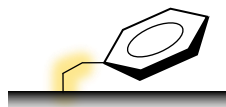
結合基：Phenylhexyl (C6-Phenyl)

- C18とは異なる、 π 相互作用を含めた選択性
- 多様なPhenyl結合相のバリエーション(下図)

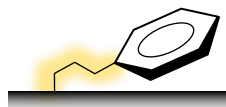
USP L11登録固定相(Phenyl)の一例



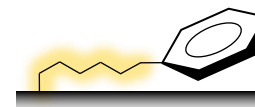
Phenyl



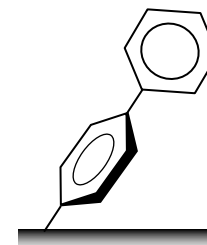
Phenyethyl



Phenylpropyl



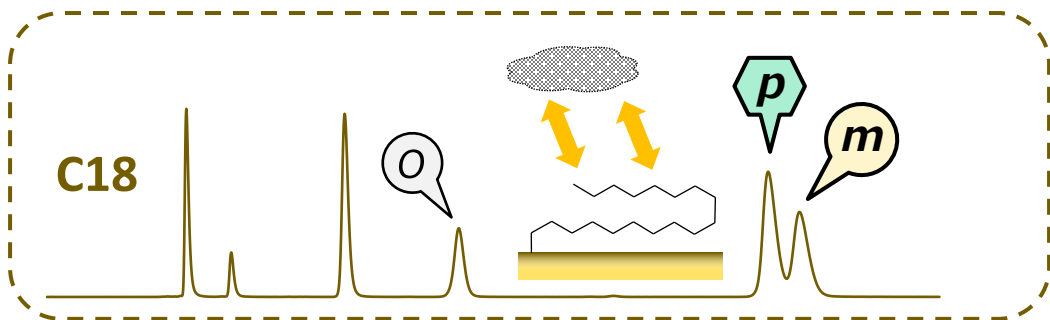
Phenylhexyl



Bihenyl

▶ 主にアルキル鎖長とフェニル基のバランスの違い

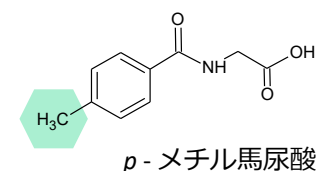
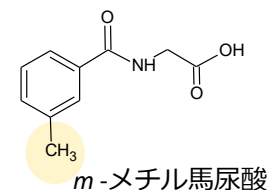
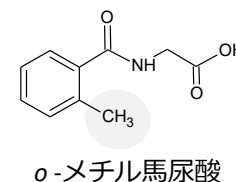
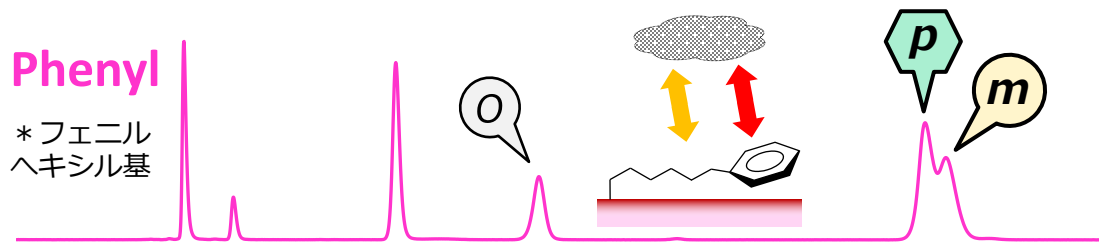
PhenylとBiphenylの選択性のちがい



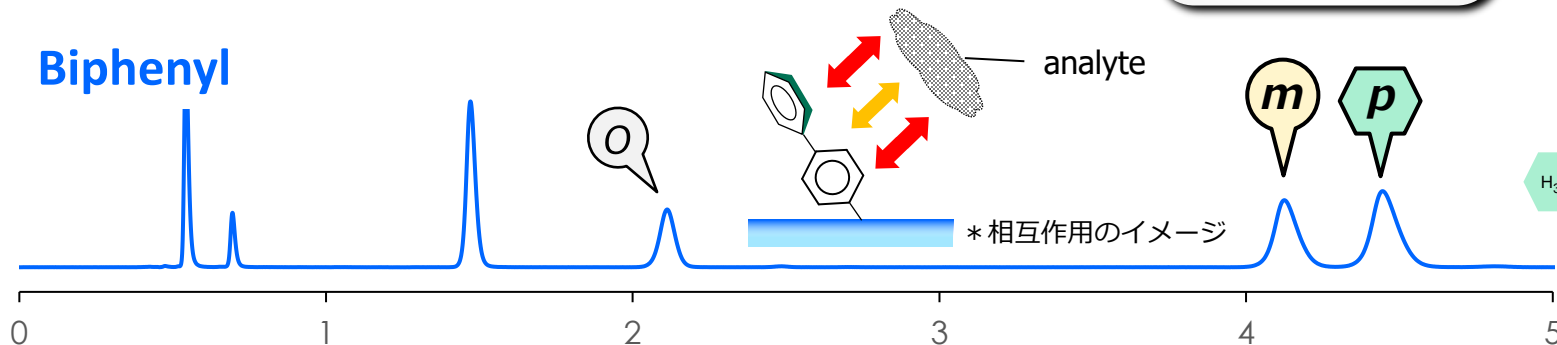
Column: SunShell 2.6 μ m 100 x 2.1mm
 Mobile phase: 2-Propanol / 20 mM
 Ammonium acetate (pH 6.8) = 3/97
 Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 40 °C
 Detection: UV@230 nm
 Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid

Phenyl

*フェニル
ヘキシル基

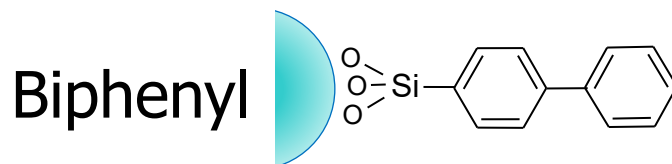


Biphenyl

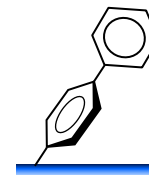


▶ 疎水基とフェニル基のバランスが 選択性を生む。

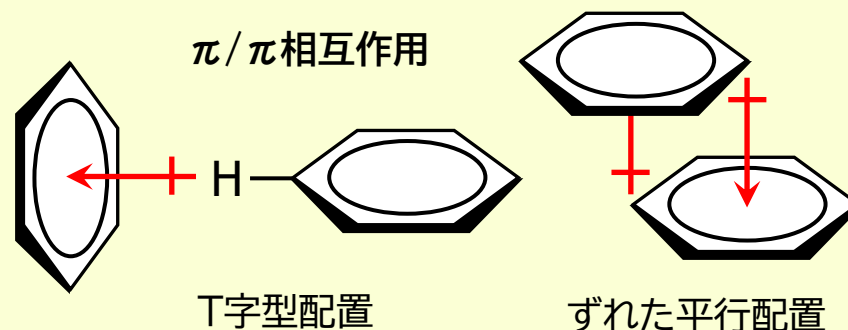
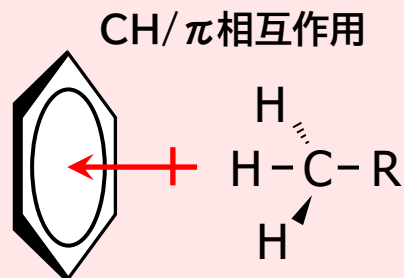
①Biphenyl: π 相互作用を最大化



結合相:Biphenyl
(スペーサーなし)



- アルキル鎖を介さない二連のPhenyl基による π 電子性
- π/π スタッキング相互作用、CH/ π 相互作用など

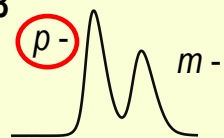


他の π 相互作用 カチオン/ π 相互作用, ハロゲン/ π 相互作用, π 水素結合(NH/ π 相互作用, OH/ π 相互作用) 等

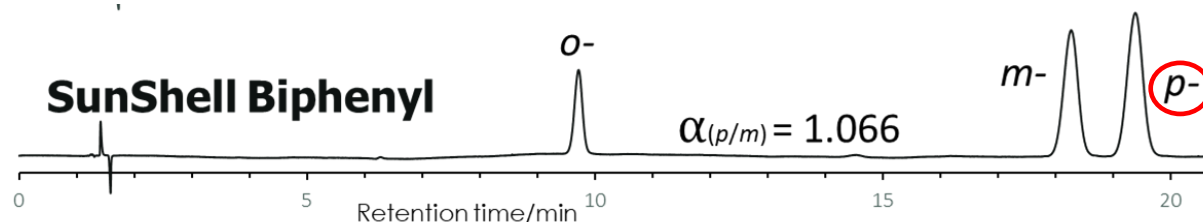
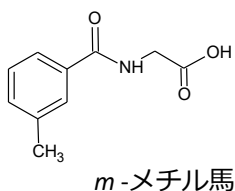
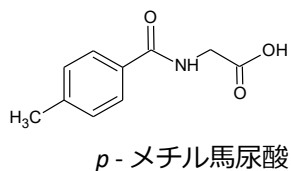
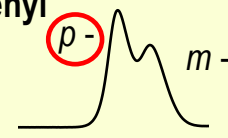
▶ 特に CH/ π 相互作用に基づく選択性が際立つ

CH/ π 選択性モデル

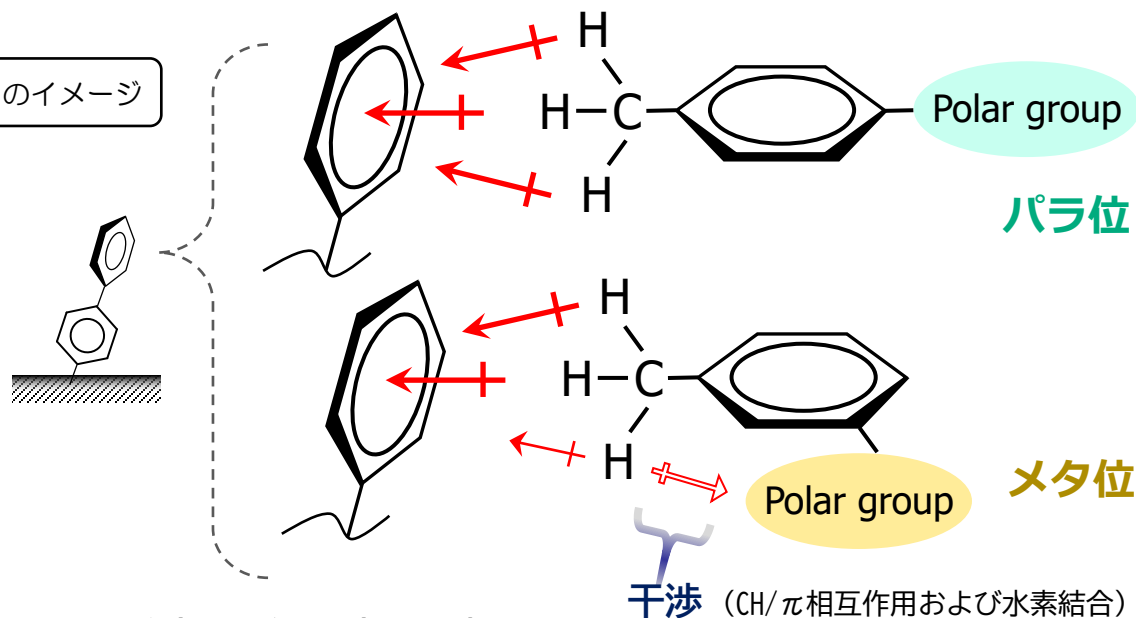
C18



Phenyl



相互作用のイメージ

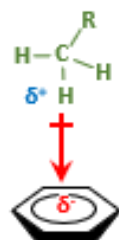


Column:
2.6 μ m (Core-Shell) 150 x 4.6 mm
Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 40 °C
Mobile phase:
2-Propanol/25 mM Phosphate buffer (pH 3.0)
Detection: UV@230 nm
Sample: o-, m-, p-Methylhippuric acid

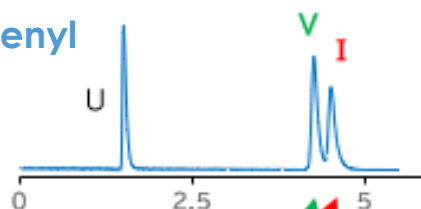
Biphenyl側 ($\leftarrow +$)分析種側 ($+ \rightarrow$)

▶ CH/ π 相互作用と 分子内相互作用との綱引き

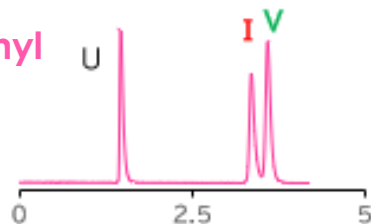
バニリン異性体の分離とCH/ π 選択性

CH/ π 相互作用

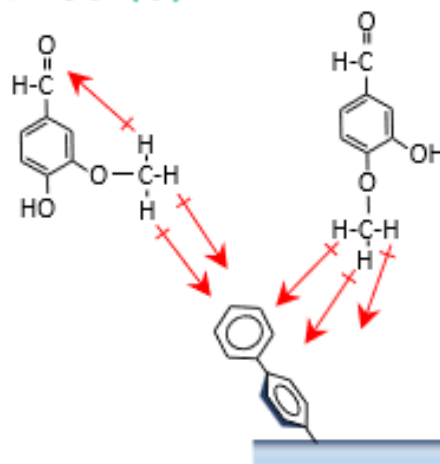
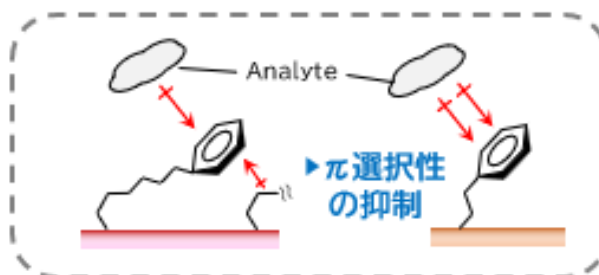
Biphenyl



Phenyl



バニリン(V) イソバニリン(I)

CH/ π 選択性モデル

Column:

[Biphenyl] SunShell Biphenyl

[Phenyl] SunShell Phenyl (C6-phenyl)

Column dimension: 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm

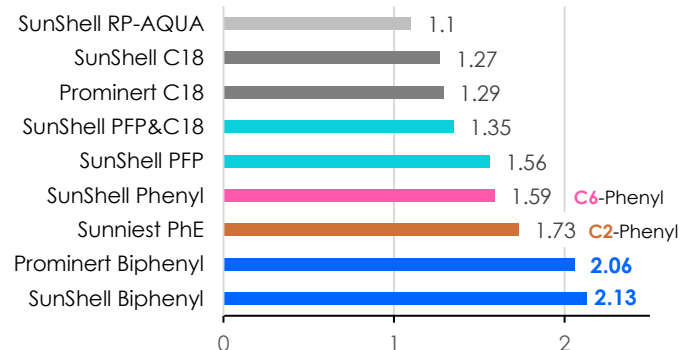
Mobile phase:

Methanol : 0.1% Phosphoric acid in water = 40:60

Temperature: 40 °C

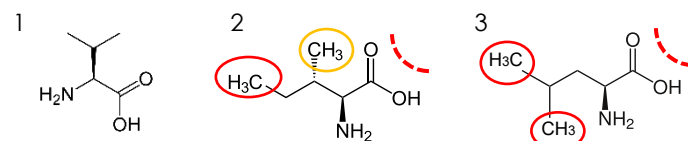
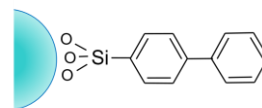
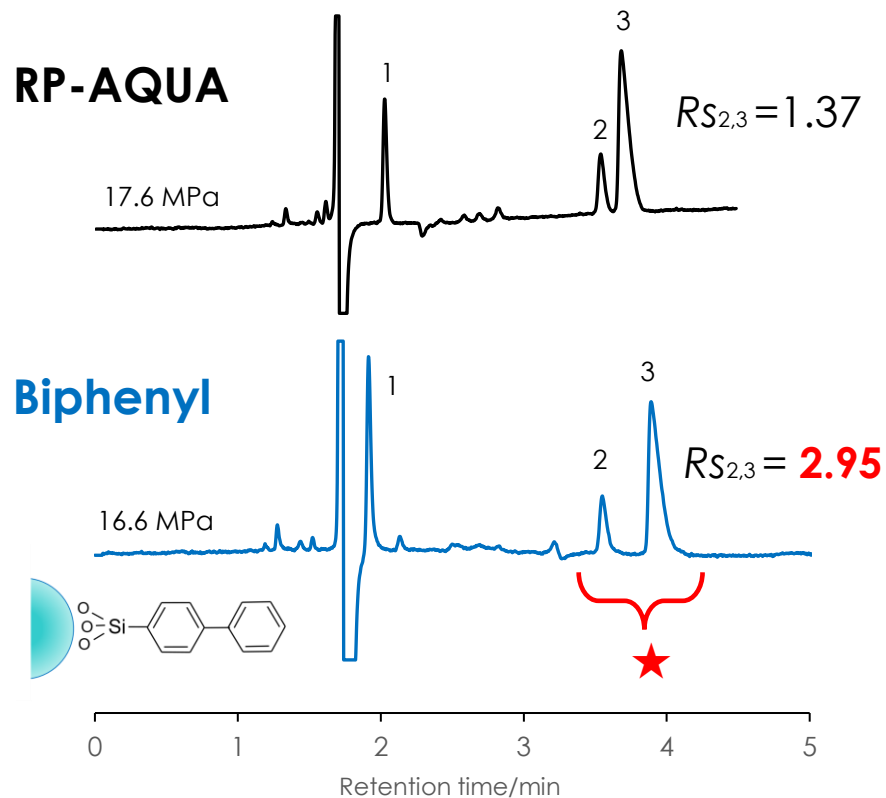
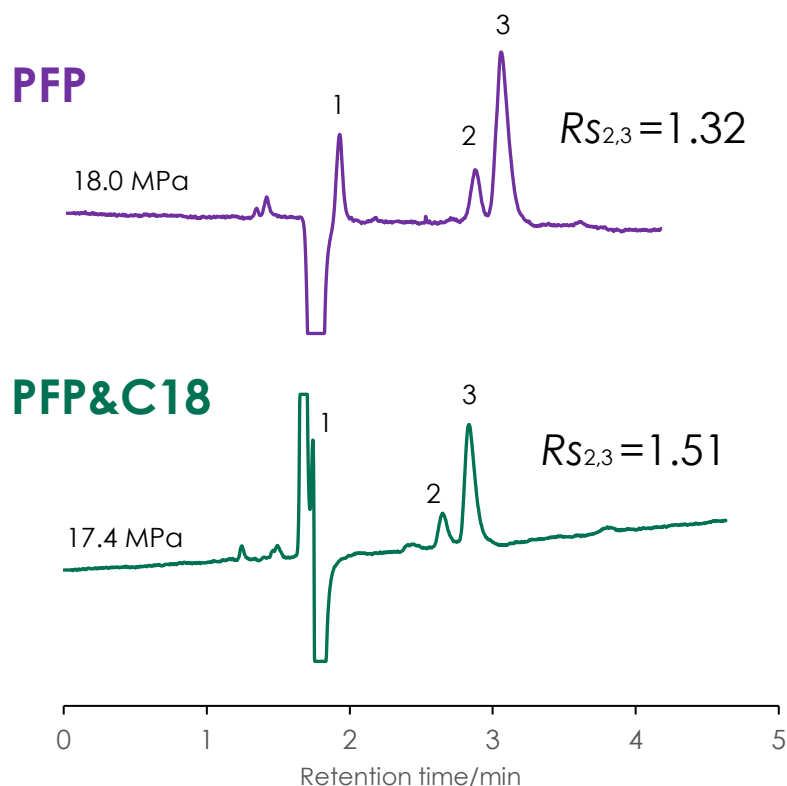
Detection: UV@250 nm

Sample: U=Uracil, V=Vanillin, I=Isovanillin

図. 各固定相のCH/ π 選択性 (Phenylカラムテスト法)

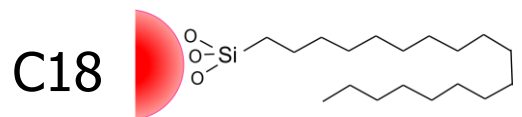
▶ Biphenylの最大の特徴: CH/ π 選択性の強さ

イソロイシン、ロイシンの分離（非誘導体）

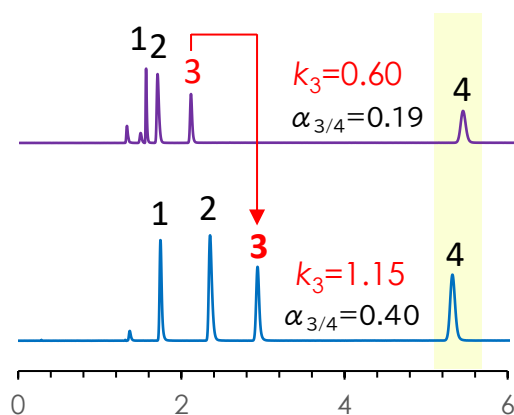


▶ 分岐位置の異なる構造異性体同士を 良好に分離

CH/ π 選択性と移動相有機溶媒の影響



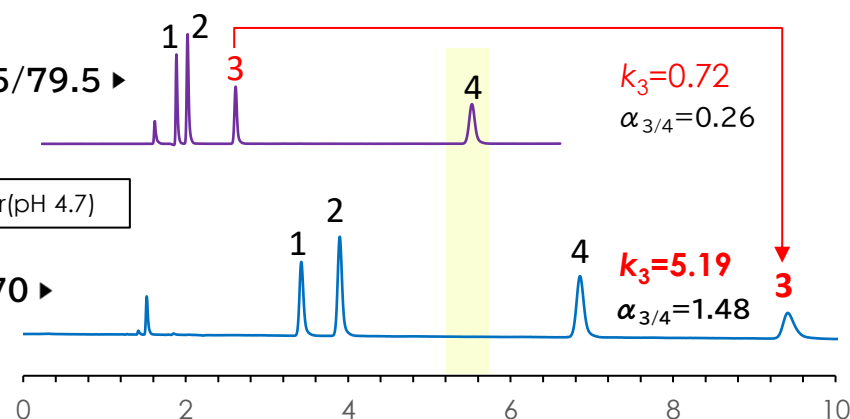
Column:
SunShell 2.6 μm 150 x 4.6 mm
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$
Detection: UV@250 nm
Mobile phase: shown below
Sample: shown below



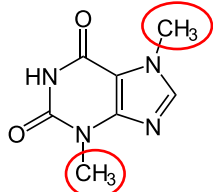
◀ Acetonitrile/Buffer* = 20.5/79.5 ▶

* 20 mM Ammonium Acetate Buffer (pH 4.7)

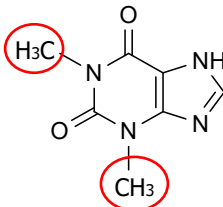
◀ Methanol/Buffer* = 30/70 ▶



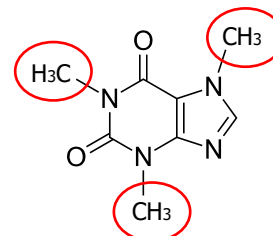
1. Theobromine



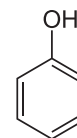
2. Theophylline



3. Caffeine



4. Phenol



▶ メタノールで選択性が向上、アセトニトリルで抑制

分岐鎖・直鎖構造異性体の分離

Column: SunShell 2.6 μ m, 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

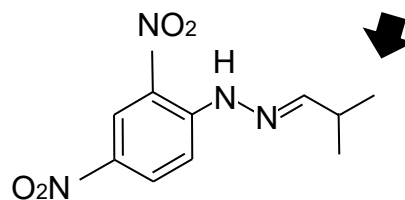
2. Propionaldehyde-DNPH

3. iso-Butyraldehyde-DNPH

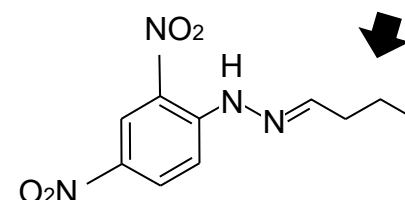
4. n-Butyraldehyde-DNPH

5. iso-Valeraldehyde-DNPH

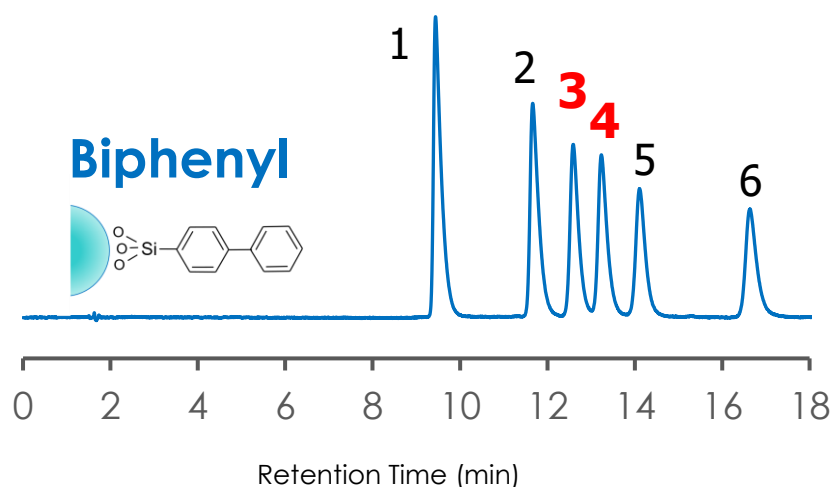
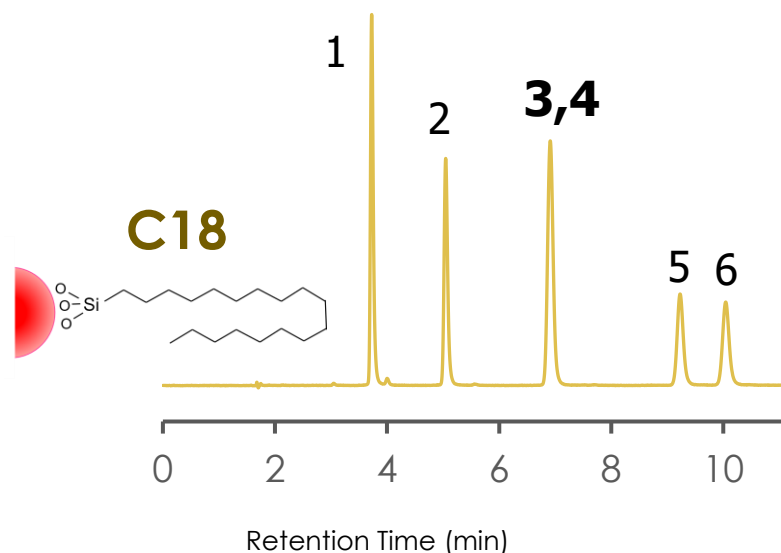
6. n-Valeraldehyde-DNPH



3. iso-Butyraldehyde-DNPH



4. n-Butyraldehyde-DNPH



▶ IPAを加えた混合有機溶媒系で選択性が一部向上

高度不活性処理で 2次相互作用を低減

SunShell Biphenyl: 高度エンドキャッピング済み

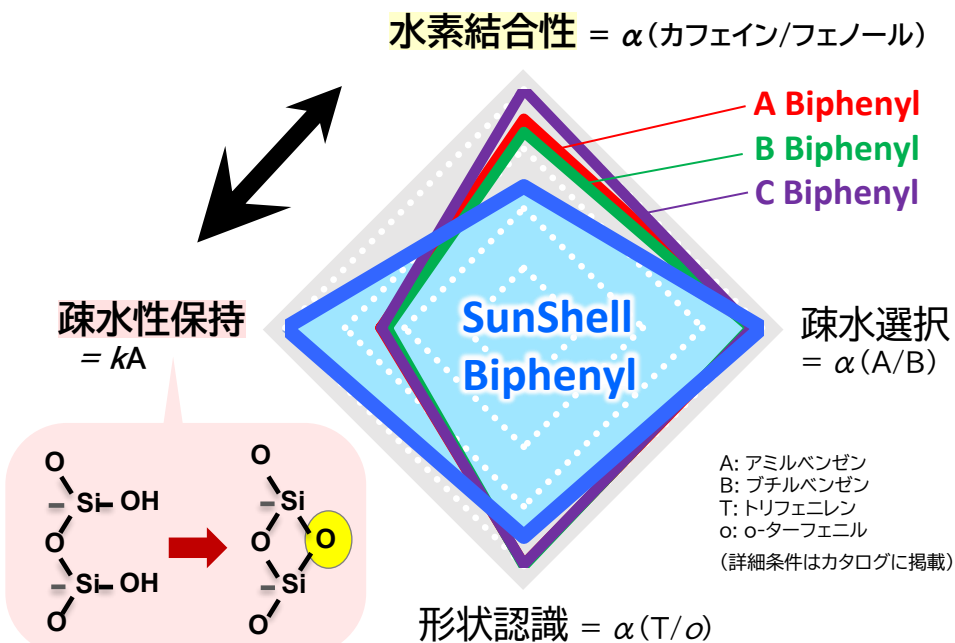
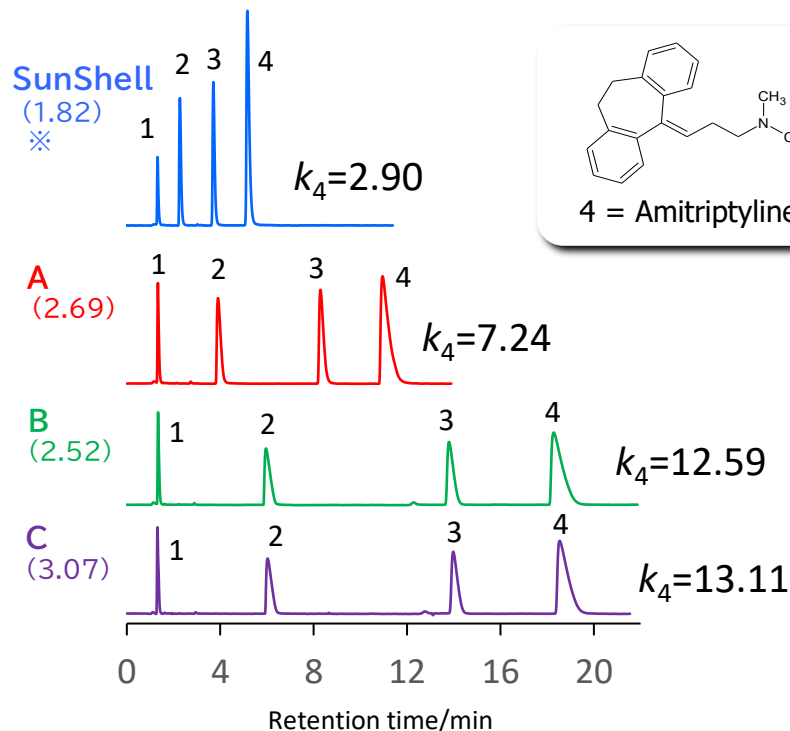


図. Biphenyl固定相4種(SunShell, A, B, C)の選択性比較

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

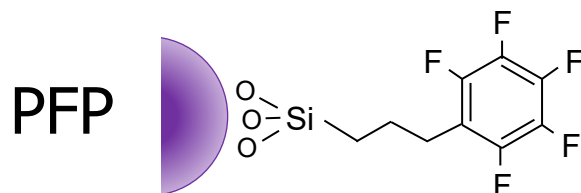
塩基性化合物

※()内は、左記 α (カフェイン/フェノール)の値



▶ 他社Biphenylと比較し、シラノール影響が少ない

②PFP(ペンタフルオロフェニル)固定相



結合相: Pentafluorophenyl(PFP)+propyl

(他の名称: PFPP, F5, Fluorophenylなど)

- フッ素の強い電子吸引性に基づく双極子/双極子相互作用
- π/π ドナー・アクセプター相互作用(芳香環の強い認識)
- 特異的なカチオン保持性を示す場合がある。(※ 後述)

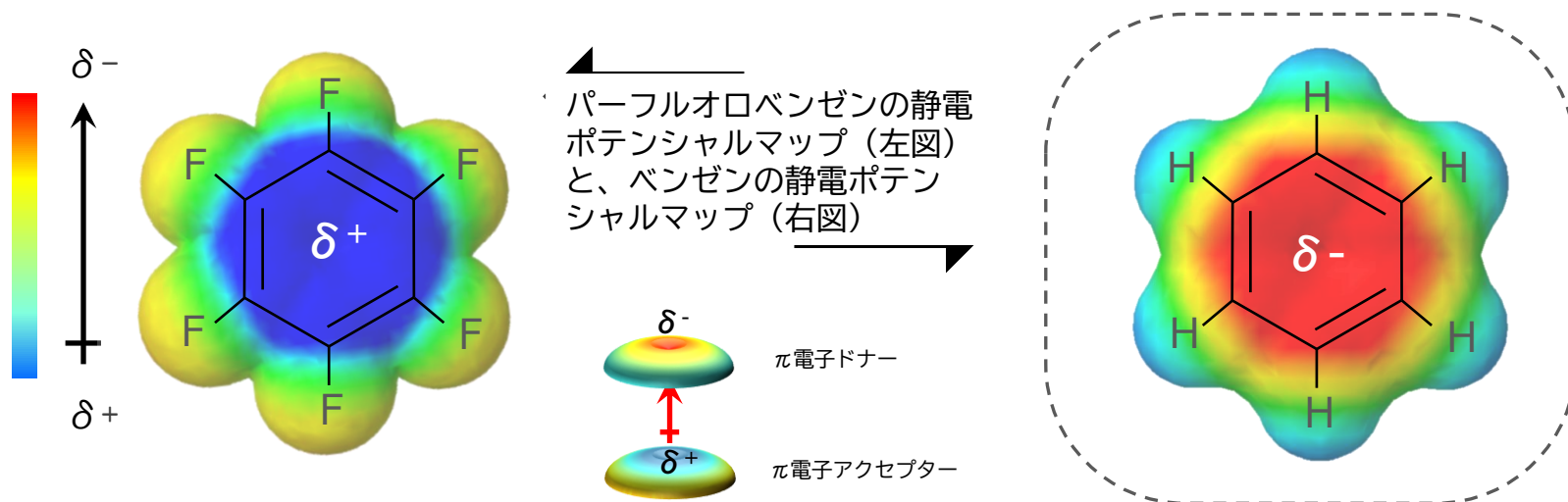
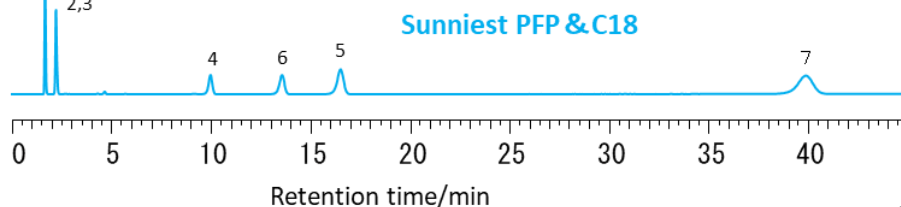
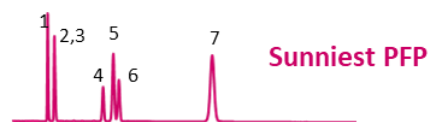
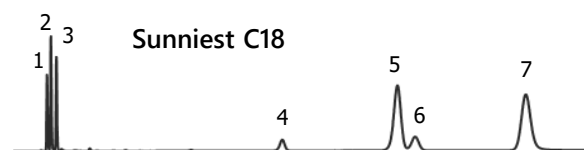


図. π/π ドナー・アクセプター相互作用のイメージ

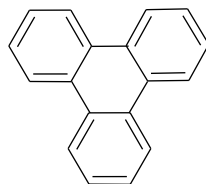
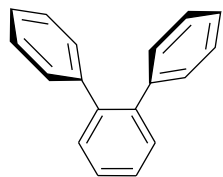
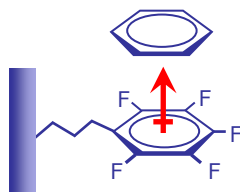
PFPの大きな特性の一つ: π 電子認識

- 芳香環(π 電子雲)に対する強い保持と選択性

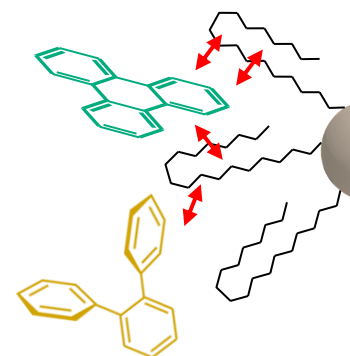


選択性指標	水素結合性	疎水性	立体選択性
分離係数 α	$\alpha(2/3)$	$\alpha(6/4)$	$\alpha(7/5)$
Sunniest C18	0.43	1.56	1.37
Sunniest PFP	1.00	1.29	2.51
Sunniest PFP&C18	1.00	1.43	2.66

サンプル
 1 = ウラシル(t_0)
 2 = カフェイン
 3 = フェノール
 4 = ブチルベンゼン
 5 = *o*-ターフェニル
 6 = アミルベンゼン
 7 = トリフェニレン



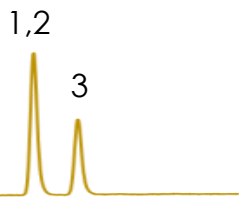
<通常C18の場合>
(スリット効果のみ)



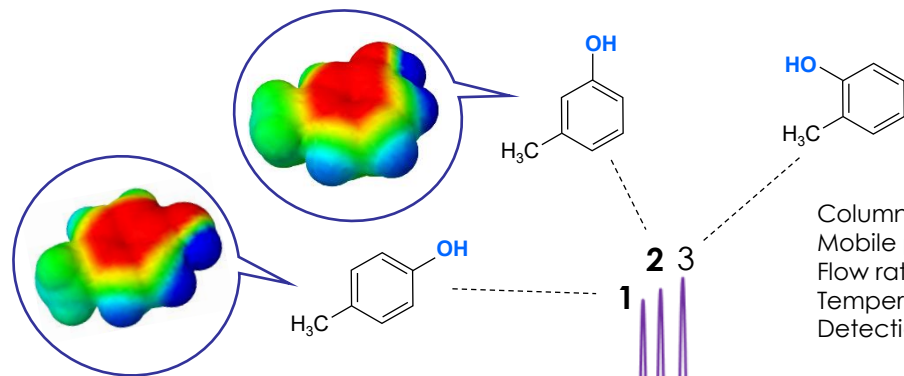
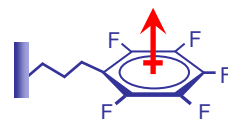
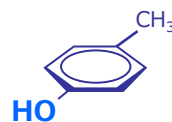
▶ 形状だけでなく、 π 電子への配向が選択性を増幅

クレゾール位置異性体(-OH基) の分離

SunShell C18



1. *p*-Cresol



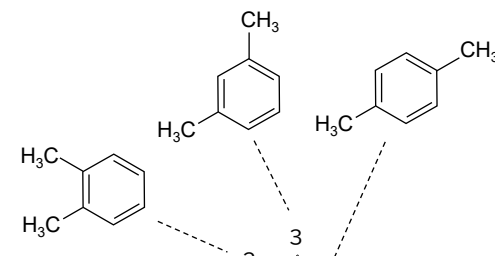
SunShell PFP

Column size: 2.6 μ m 150 x 4.6 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=40/60
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 25 °C
Detection: UV@250 nm

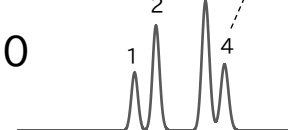
Sample:
1 = *p*-Cresol
2 = *m*-Cresol
3 = *o*-Cresol



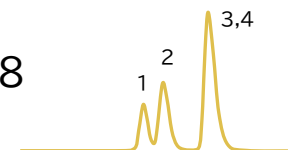
参考: キシレン位置異性体等の分離



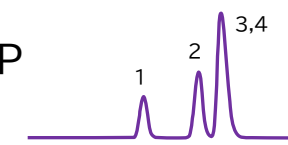
C30



C18



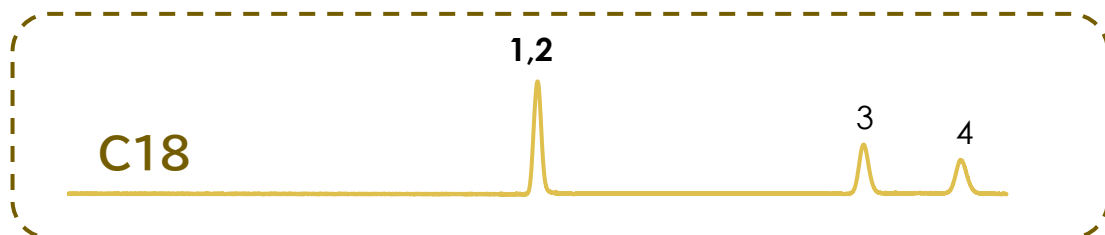
PFP



Sample:
1 = Ethylbenzene
2 = *o*-Xylene
3 = *m*-Xylene
4 = *p*-Xylene

▶ PFPは **電子の局在**に基づいた分離認識を示す。

ベンゼン、フルオロベンゼンの分離



Column:

SunShell 2.6 μm , 4.6 x 150 mm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=60/40$

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

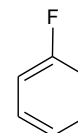
Detection: UV@250 nm

Sample:

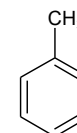
1. Benzene



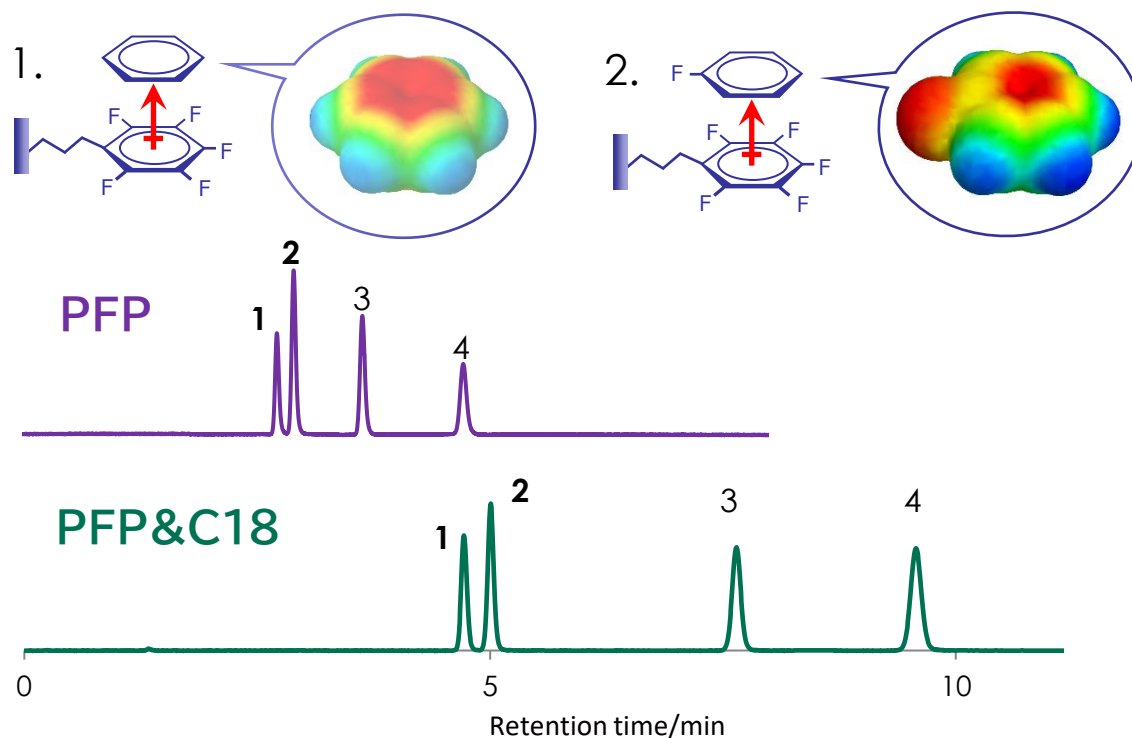
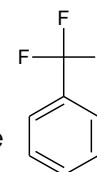
2. Fluorobenzene



3. Toluene

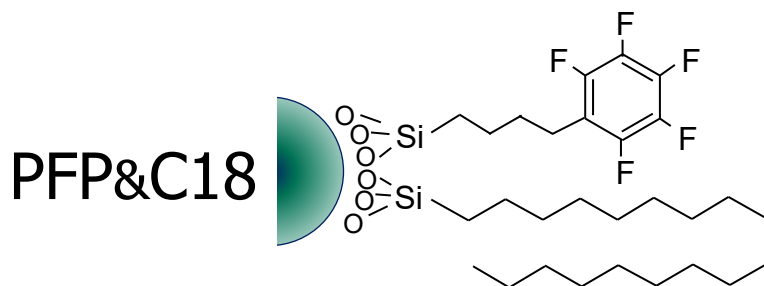


4. α,α,α -Trifluorotoluene



▶ 有機フッ素化合物に対する特異な保持・分離認識

派生型PFP固定相の一種：PFP&C18



結合相：PFP & C18

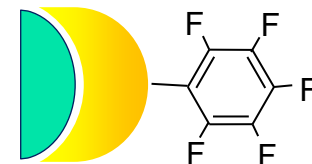
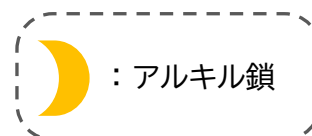


図. 結合相のイメージ

- PFPと同様の相互作用 + 強化された疎水性相互作用
- 基材のシラノール影響を抑制
- 従来PFPより耐久性を向上

(よく受ける質問:ミックスモードですか?)

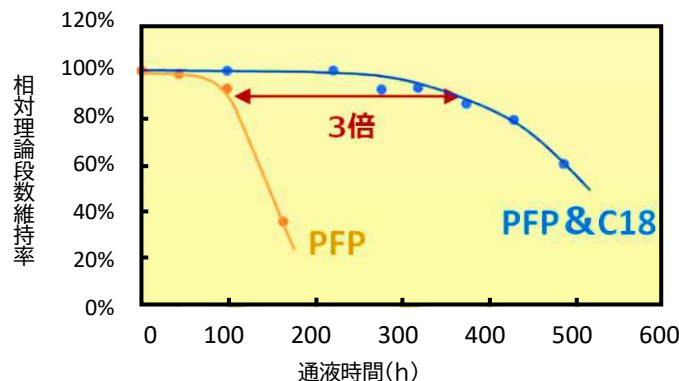
回答「ちがいます。逆相です。」

耐久性テスト条件

Column: Sunniet 5 μm , 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 $^{\circ}\text{C}$

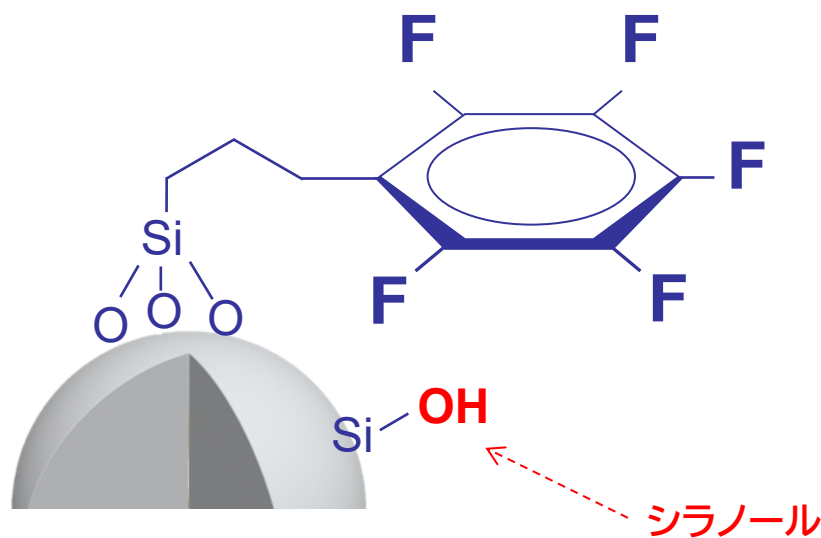
理論段数 測定条件 (結果は右図)

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



PFPの誤解:「PFPでもHILICになる？」

- かつてPFPはHILIC(順相)挙動を示すと言われていた。
実際には、PFPではなく **シラノール基** の影響が大きい。¹⁾



(エンドキャッピングでも封鎖できない活性)

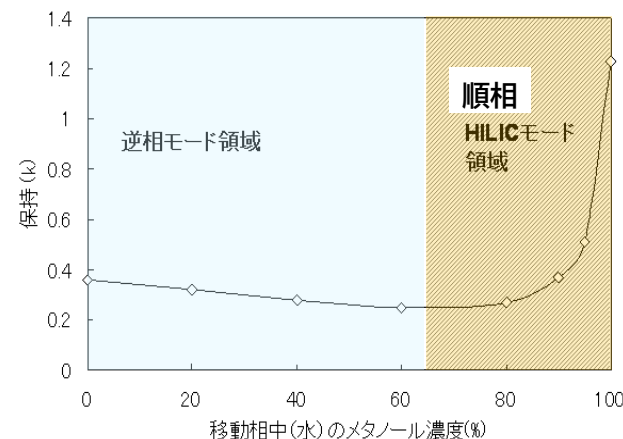


図. 逆相から順相への変換を意味するU字カーブの参考図

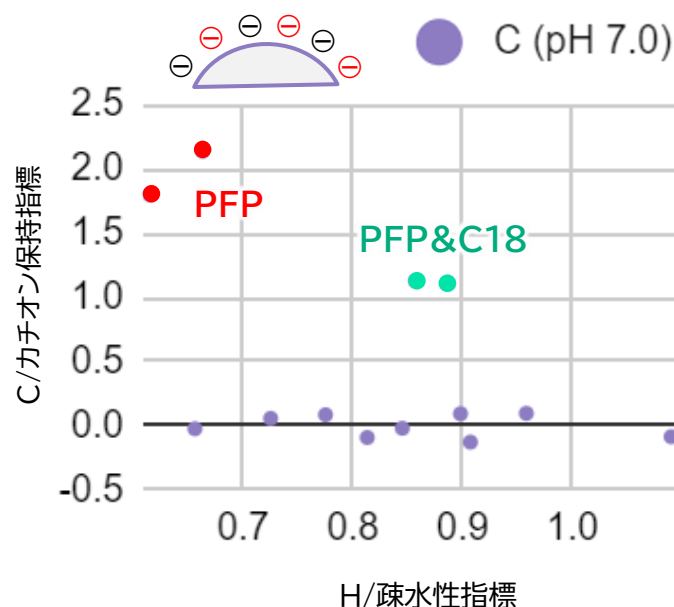
PFP(一部)では塩基性化合物に対してのみ上記挙動が生じる

▶ 過剰な**カチオン保持**をもたらす原因は シラノール

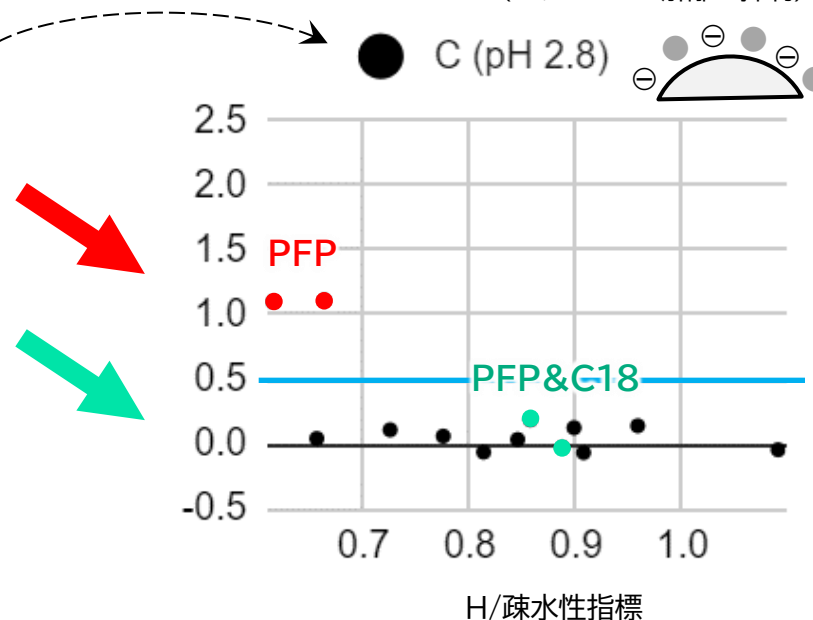
逆相固定相のカチオン保持傾向

C: カチオン保持指標

シラノールの解離状態



(シラノールの解離を抑制)

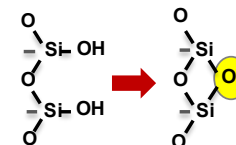


PFP系固定相4種

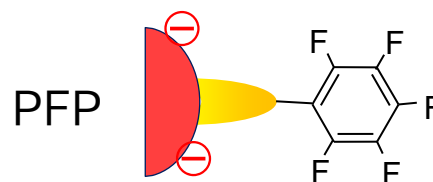
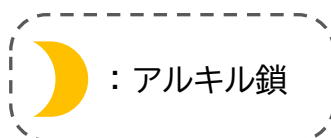
Sunniest PFP
SunShell PFP
Sunniest PFP&C18
SunShell PFP&C18

その他固定相9種

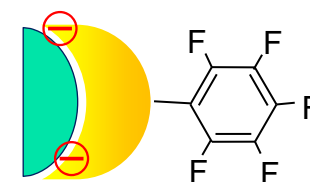
Sunniest PhE
Sunniest Biphenyl
Sunniest C8
Sunniest RP-AQUA
SunShell Biphenyl
SunShell Phenyl
SunShell C8
SunShell RP-AQUA
SunShell C18



固定相設計とシラノールの潜在的影響



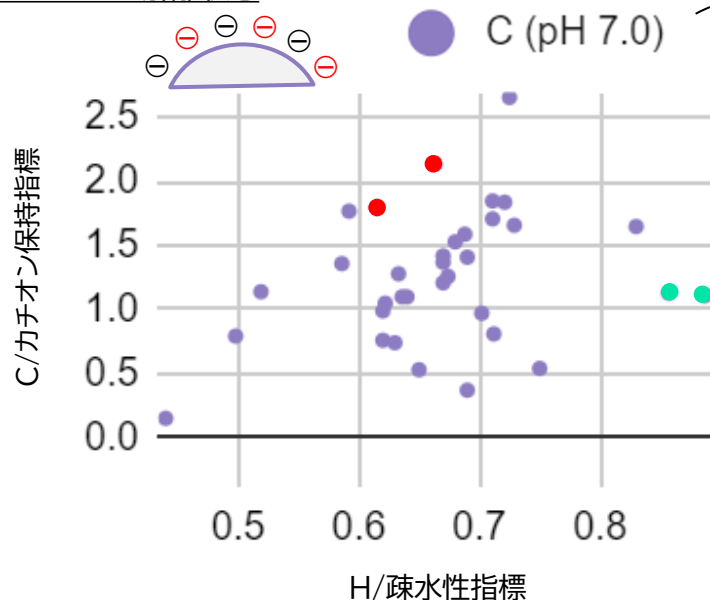
PFP
&C18



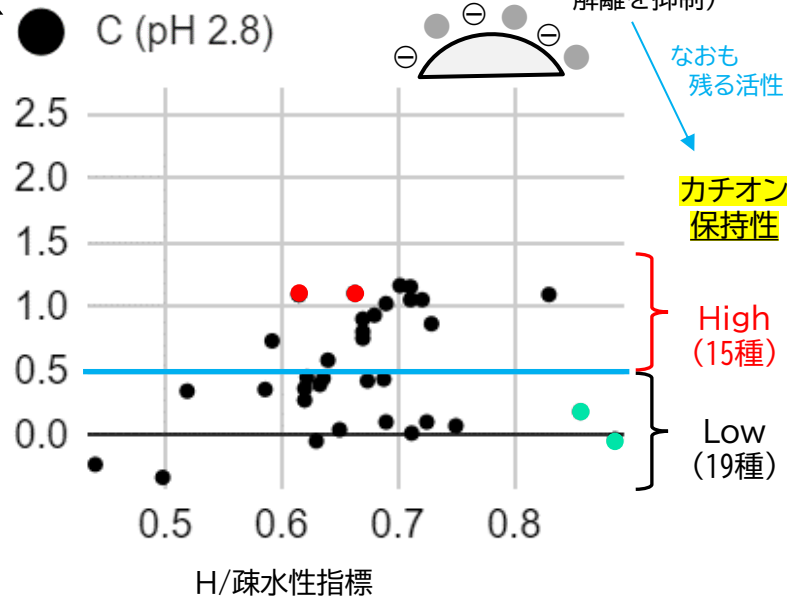
▶ 酸性移動相条件で **カチオン保持** を一部抑制可能

PFP系(34種)のカチオン保持傾向

シラノールの解離状態



(シラノールの解離を抑制)



PFP(F5)系カラム34種 (左列よりHに基づき昇順に整列, 赤字:High)

Ultra PFP
XSelect CSH Fluoro-Phenyl
Venusil PFP
YMC-Triart PFP
Xselect HSS PFP
Sunnest 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
Sunnest PFP&C18
SunShell PFP&C18

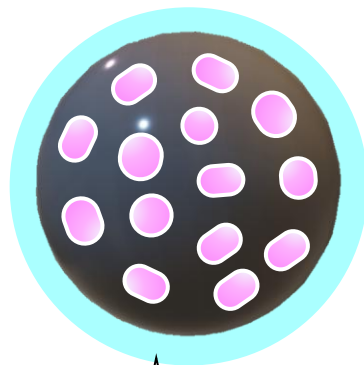
▶ シラノール処理など 充填剤設計の違いを反映

全多孔性ウルトラハイブリッド逆相カラム

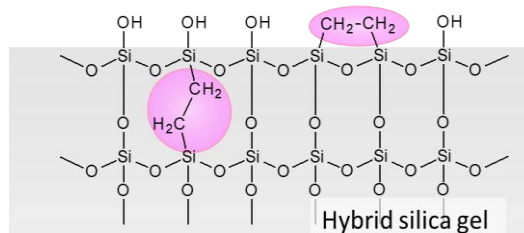
(2025年～)



表面改質型有機シリカ粒子
(パーシャルハイブリッド)



創製型有機シリカ粒子
(**フルハイブリッド**)
を基材とする固定相



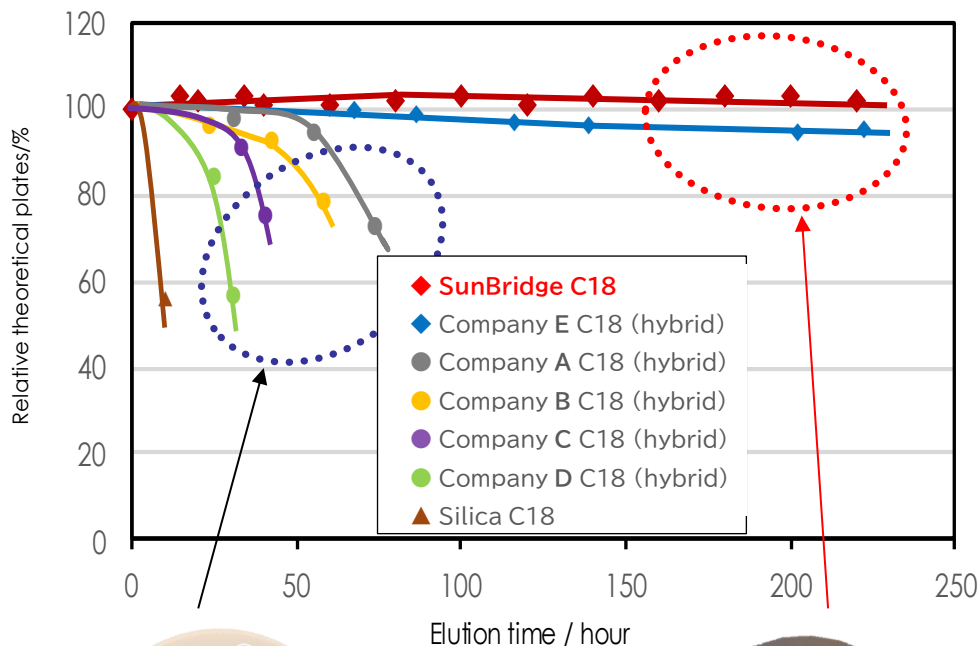
- C18 3 μm , 5 μm (発売中)
- C18 1.8 μm (近日発売)



*SunBridgeカラム
イメージキャラクター

SunBridge C18カラムとpH安定性

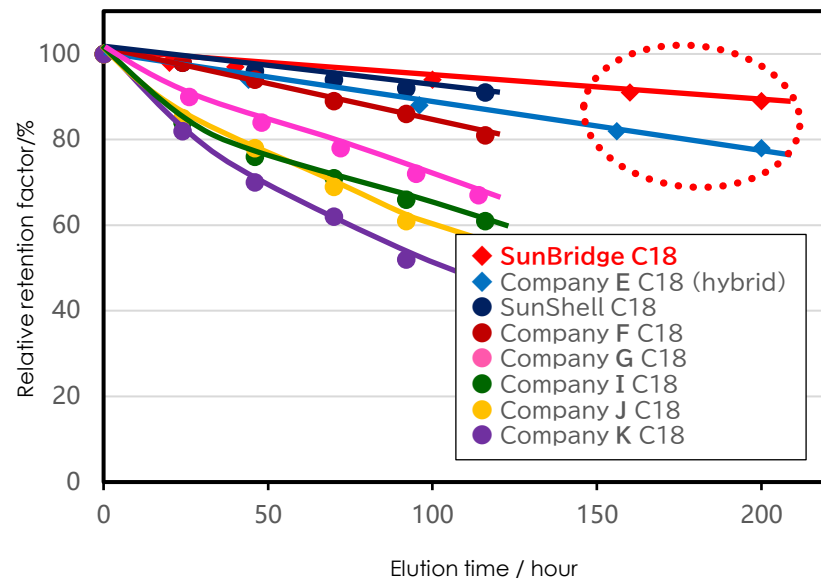
pH 11.5



パーシャルハイブリッド
(表面改質型有機シリカ)

フルハイブリッド
(創製型有機シリカ)

pH 1.0

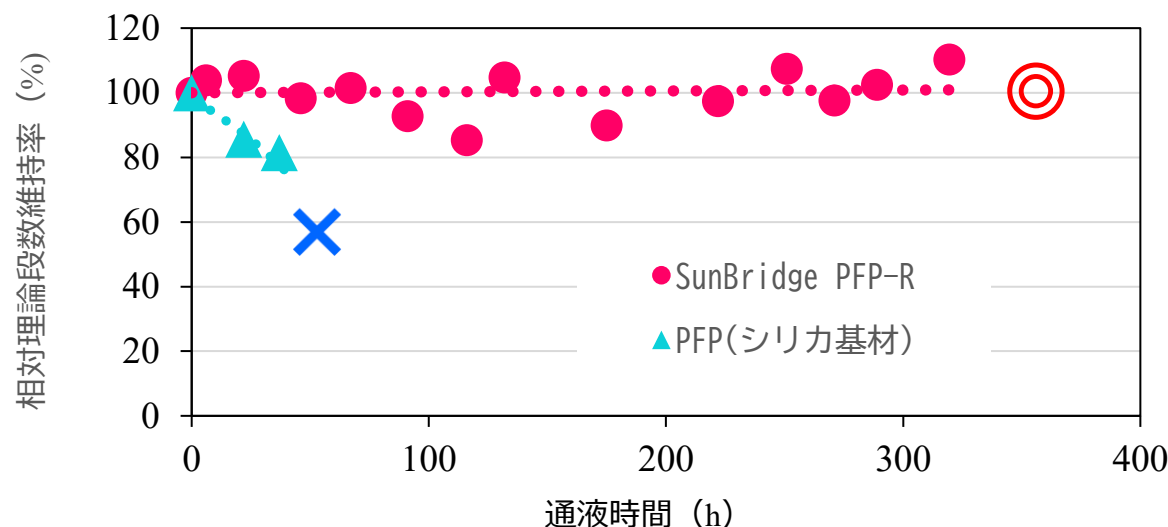


SunBridge C18は酸/塩基の
両方の条件で**最高の耐久性**

* 詳細条件はカタログを参照下さい。

▶ 高温 および幅広い移動相pHレンジで極めて安定

SunBridge PFP-Rのアルカリ耐久性



<耐久性試験条件>

移動相: 20 mMリン酸緩衝液(pH 8.0)

<理論段数の測定条件>

移動相: メタノール / 水 (50 : 50)

検出: UV@250 nm, 試料: Butylbenzene

<共通条件>

流速: 0.2 ml/min, 温度: 40 °C

カラム: SunBridge PFP-R 3 μ m, 2.1x50 mm

PFP(シリカ基材) 5 μ m, 2.0x50 mm

図. SunBridge PFP-Rと従来型PFP(シリカ基材)のアルカリ耐久性比較

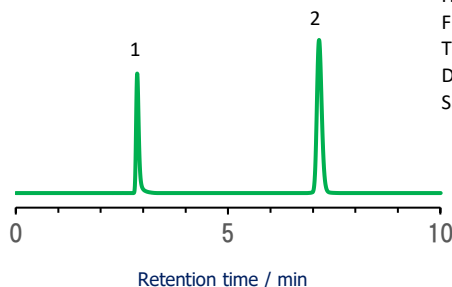
× 従来型PFP(シリカ基材)は、48時間経過前に圧力オーバーで試験継続が困難となった。
◎ SunBridge PFP-Rは、300時間の通液後も理論段数の低下がほとんど生じなかった。※

※ 基材安定性確認のための加速試験です。理論段数は低下しませんが保持時間の短縮は生じます。他のPFPと同様にシリノール活性を抑える事が望ましいため **酸性条件**での利用を推奨します。

▶ PFP-Rは PFPの耐久性に関わる諸問題を解消

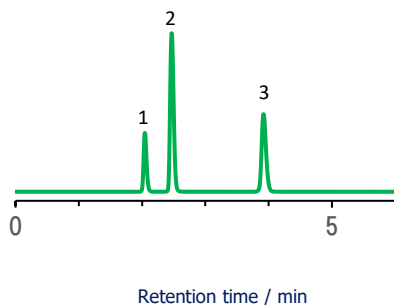
SunBridge PFP-Rの基本性能の評価

金属配位性テスト



Column dimension: 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃CN/20mM H₃PO₄=10/90
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@250nm
 Sample: 1 = 8-Quinolinol (Oxine)
 2 = Caffeine

ギ酸テスト



Column dimension: 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃CN/0.1% H₃PO₄=2/98
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@210nm
 Sample: 1 = Formic acid
 2 = Acetic acid
 3 = Propionic Acid

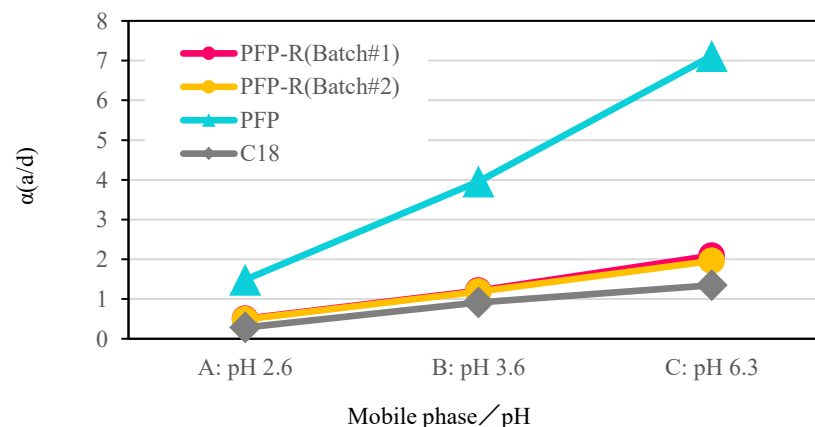
- 強い吸着とピークテーリングを示す傾向があるギ酸とオキシシンに対し、良好なピーク形状が認められた。

カチオン保持性テスト

Column :
 SunBridge PFP-R 3 μm Batch#1
 SunBridge PFP-R 3 μm Batch#2
 Sunniest PFP 5 μm
 SunBridge C18 3 μm
 Column dimension: 150 x 4.6 mm

Mobile phase: (A) 0.2% formic acid (pH 2.6)
 (B) 100 mM Ammonium formate buffer (pH 3.6)
 (C) 100 mM 100 mM Ammonium formate (pH 6.3)
 Flow rate: 1.0 ml/min, Temperature: 25 °C,
 Detection: UV@260 nm
 Sample: (a)=L-Adrenaline, (d)=L-DOPA
 Cation Retention indicator: α(a/d)

＜注＞スライド番号20-21で示したカチオン保持指標(C)とは評価条件が異なる。

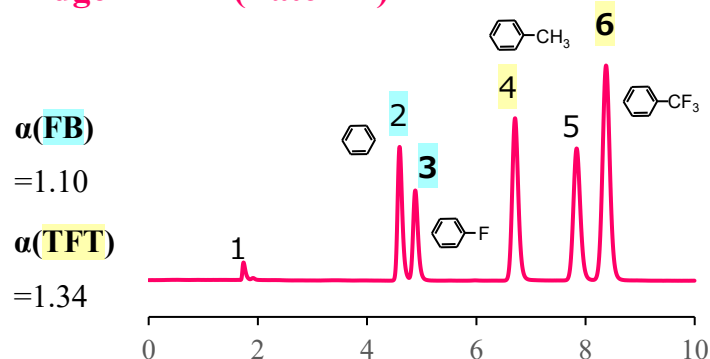


- カチオン保持性α(a/d)は従来型PFPと比較して明らかに小さく、バッチ間差も僅かであった。

▶ PFP-Rの低吸着性は 不活性型C18カラムに匹敵

PFP-R vs PFP 「有機フッ素選択性」

SunBridge PFP-R (Batch#1)



有機フッ素選択性テスト

Column :

SunBridge PFP-R 3 μm Batch#1

SunBridge PFP-R 3 μm Batch#2

Sunniest PFP 5 μm

SunBridge C18 3 μm

Column dimension: 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Methanol/Water(60 : 40)

Flow rate: 1.0 ml/min, Temperature: 40 °C,

Detection: UV@250 nm

Sample: 1=Uracyl(t0), 2=Benzene,

3=Fluorobenzene (FB),

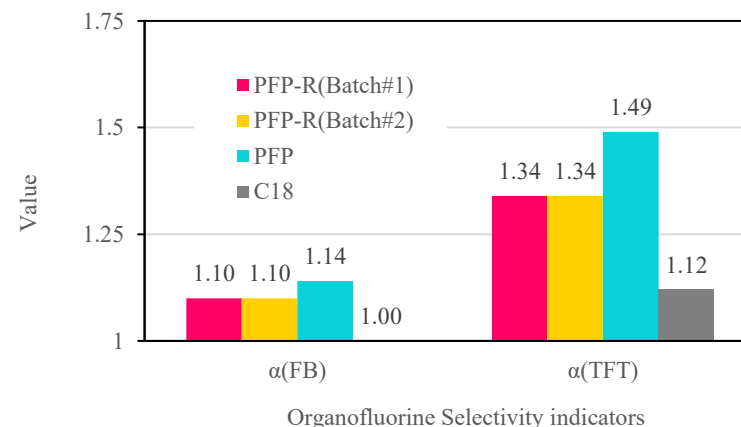
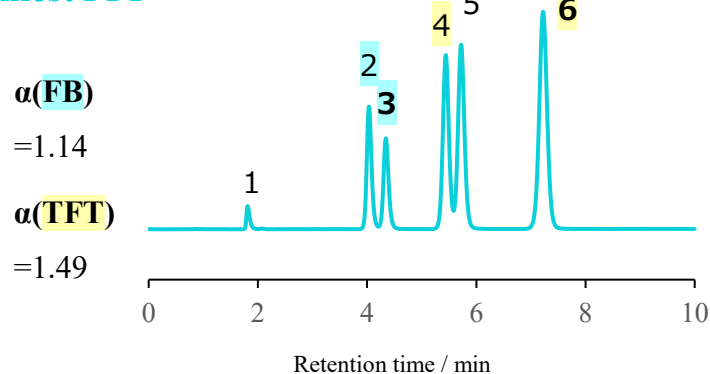
4=Toluene, 5=Bromobenzene,

6= α,α,α -Trifluorotoluene (TFT)

Organofluorine Selectivity Indicator-1 : $\alpha(3/2)$ as $\alpha(\text{FB})$

Organofluorine Selectivity indicator-2: $\alpha(6/4)$ as $\alpha(\text{TFT})$

Sunniest PFP



➤ PFP-Rの有機フッ素選択性 $\alpha(\text{FB})$, $\alpha(\text{TFT})$ はPFP同様に高く、バッチ間の差も殆ど見られなかった。

▶ PFP-Rは保持が強く 有機フッ素選択性も高い。

PFAS(短鎖～長鎖) 一斉分析への応用

● PFAS分析における課題： <ポスター引用※>

“短鎖 PFAS (C4, C5)：ピーク幅が広く、水含有移動相でイオン化効率が低下するため **感度が不足**”

魚介類：夾雑成分が多く、**マトリックス由来ピークのオーバーラップが一般的に発生する。**

分析条件

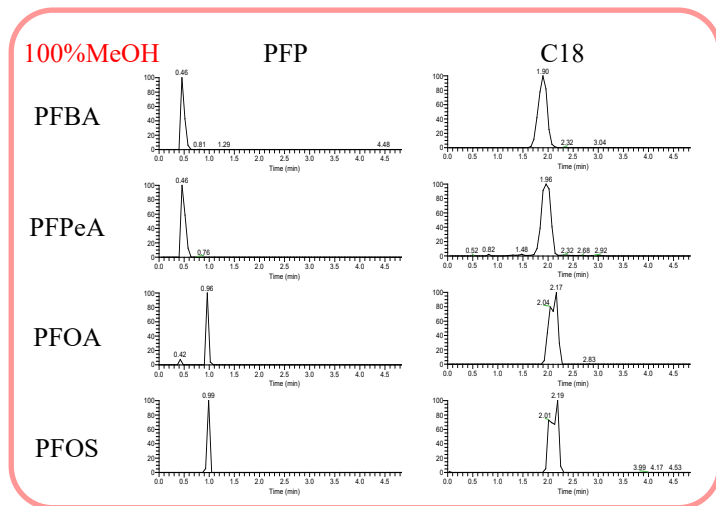
LC-MS：Ultimate 3000, Q Exactive Focus (いずれもThermo Fisher Scientific)

分析カラム：SunBridge PFP-R (3 μ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm) (クロマニクテクノロジーズ)

移動相：A液 メタノール, B液 2 mMギ酸水溶液, グラジエント溶離

流量：0.30 mL/min 注入量：4 μ L , カラム温度：スクリーニング 15/20/30/40/50/60/70 $^{\circ}$ C

試料前処理：水試料 U.S. EPA Method 533/537.1準拠, 食品 U.S. EPA Method 1633A準拠



➡ 一斉分析ではPFPとメタノールの組み合わせが最適

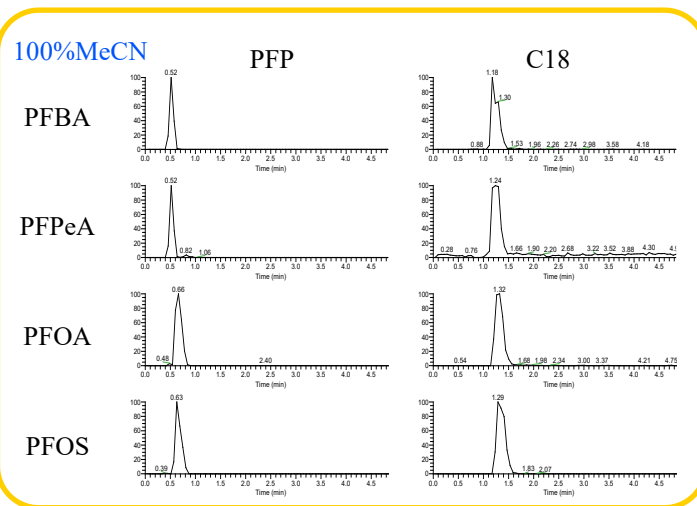


図 40 $^{\circ}$ C条件におけるPFPカラム / C18カラムで測定したPFBA、PFPeA、PFOA、PFOS（移動相：メタノール又はアセトニトリル）のクロマトグラム

▶ カラム先端濃縮効果によって、ピーク形状を維持

PFAS分析: 夾雑成分の干渉回避法(1)

● PFP-Rの高安定性を活かした分離テクニック

<引用>

“カラム温度のスクリーニング: 15℃から70℃まで温度を段階的に変化させた結果、妨害ピークの直鎖PFOSを基準とする相対保持時間から、55℃にすることでPFOS溶出領域への牡蠣妨害ピークの干渉を排除できることが判明した。”

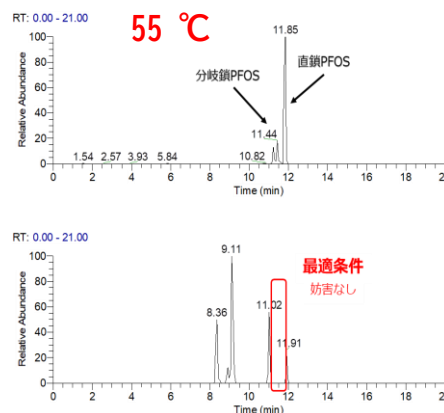
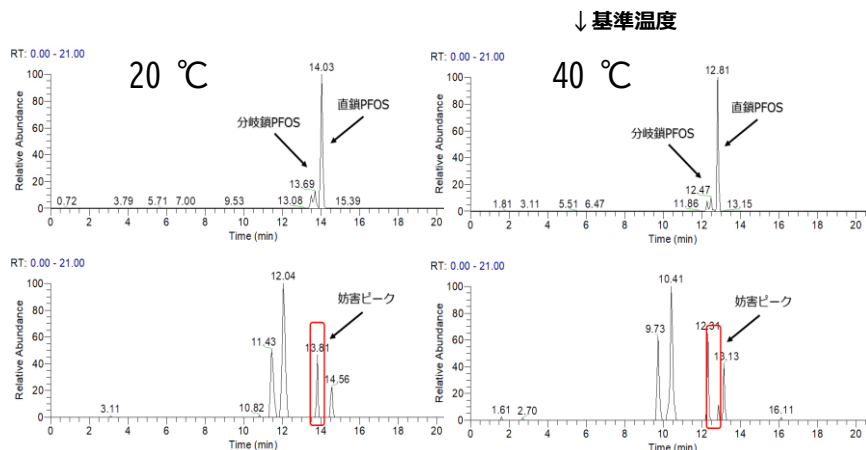
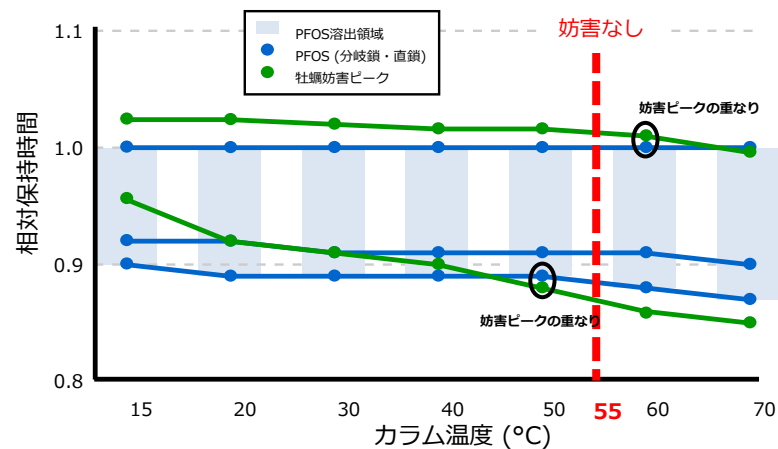
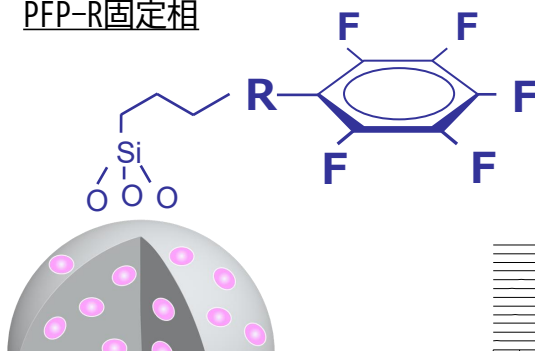


図. カラム温度スクリーニングによるPFOSへの牡蠣妨害ピークの干渉回避

▶ 温度コントロールで夾雑成分の溶出位置をスライド

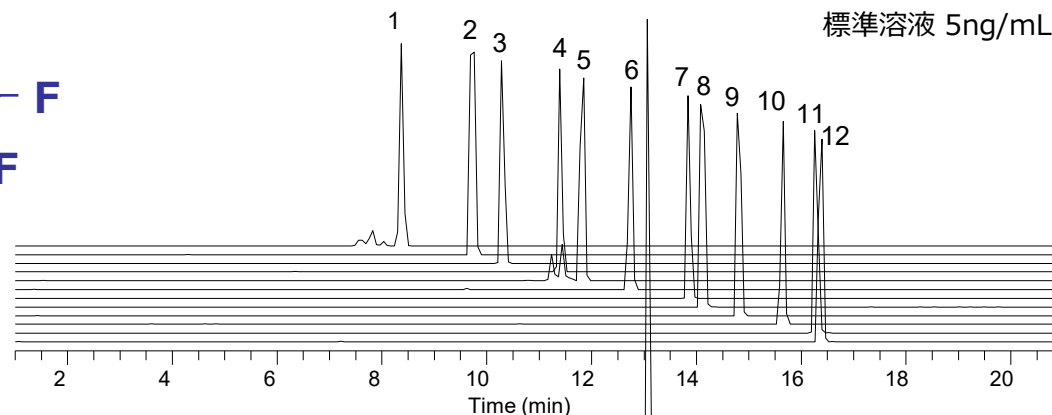
PFAS分析: 夾雑成分の干渉回避法(2)

PFP-R固定相



<引用>

“分離確認と検出限界：55 °Cで測定した結果、PFOSへの牡蠣妨害ピークの干渉がみられないことが確認された。牡蠣試料では全分析対象PFASについてLOD ≤ 0.05 μg/kgを達成した。”



- 1 PFHxS
- 2 PFOA
- 3 PFHpS
- 4 PFNA
- 5 PFOS
- 6 PFDA
- 7 PFUdA
- 8 PFDS
- 9 PFDoA
- 10 PFTTrDA
- 11 FOSA
- 12 PFTeDA

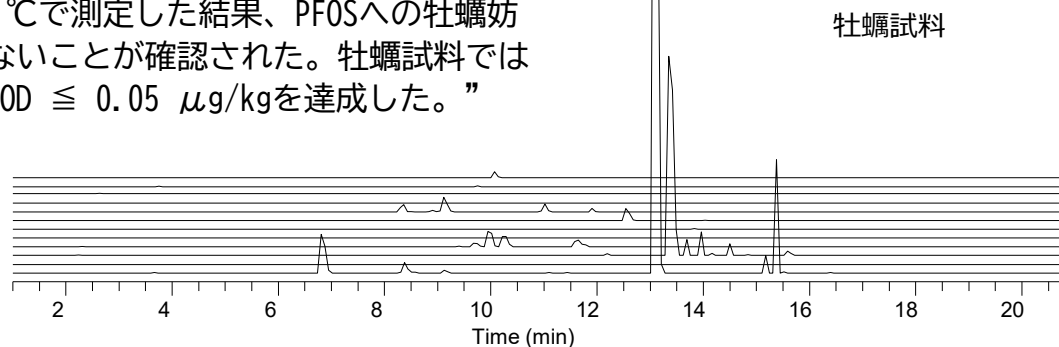
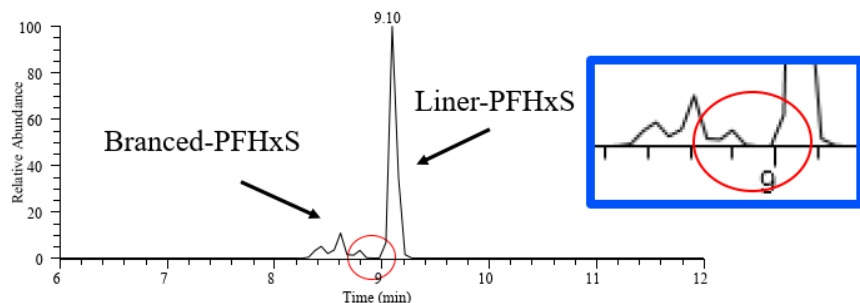


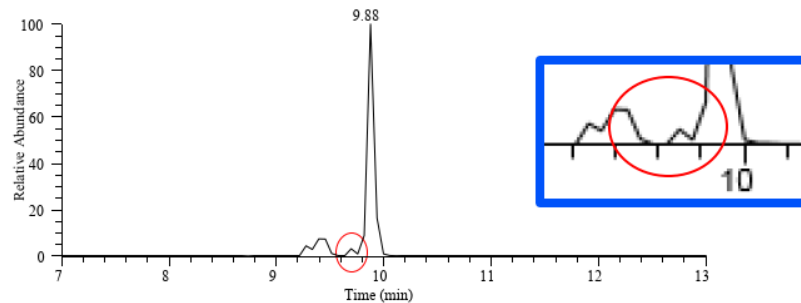
図. PFP-Rカラム / 55 °C / メタノール及び2 mMギ酸水溶液グラジエント分離条件で測定した標準溶液及び牡蠣試料のクロマトグラム

▶ 夾雑の影響を回避し 堅牢性の高い分析法を構築

PFAS分析: 分岐鎖体／直鎖体の分離



PFP-R



C18

図. PFP-RカラムとC18カラムを用いて分析したPFHxSのクロマトグラム

<引用> “C18カラムでは、一部のBranched-PFHxSが分離不十分
→ PFP-Rカラムでは、Branched-PFHxSとLinear-PFHxSを**明確に分離**できた。”

PFP-Rは、一般財団法人日本食品検査様との共同研究により開発されたPFAS分析用カラムです。

☑ PFAS分析関連の各種発表ポスターに関する詳しい情報をご希望の方は、当社までお問合せ下さい。

▶ SunBridge PFP-Rは**PFAS分析を改善**します

まとめ

HPLCカラムの選び方

- **Biphenyl** + メタノール(or IPA)で π 相互作用が向上
- **Biphenyl**は、 $-\text{CH}_3$ 位置異性体を認識(CH/ π 選択性)
- **PFP**は、芳香環への配向性と電子局在の識別能が高い。
- **PFP**のカチオン保持の強さは、シラノールに大きく依存
- **PFP-R**はハイブリッド基材 & 独自設計によって高安定化
- **PFP-R**の優れた有機フッ素選択性はPFAS分析にも有用



ご清聴ありがとうございました。

