

# 通常の方法に + $\alpha$ !

## 固相抽出・ヒリック・ジルコニアの使い方!

極性化合物のために特別に設計された固相抽出剤,  
親水性化合物の分離に最適なヒリックカラム,  
高温・耐アルカリ性に優れたジルコニアカラム。  
充填剤の特性を最大限に引き出す上手な使い方を!

**株式会社 クロマニック テクノロジーズ**

TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890

E-mail: [info@chromanik.co.jp](mailto:info@chromanik.co.jp) URL: [www.chromanik.co.jp](http://www.chromanik.co.jp)

ChromNik

# HPLC分析における [ Second Choice ]

分離ができない！ さあ困った！  
さあ~て、次の手は？

2007/03/28      日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー      1

ChromNik

## 主要なHPLC分離モードの使用比率

分配モード (約70%)

分配モードの内、約70%が逆相分配モード  
C18/C8カラムがFirst Choice!!

2007/03/28      日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー      2

ChromNik

## First Choice (極性化合物の場合)

- カラム
  - C18, 5 μm, 150 x 4.6 mm, 一官能型, エンドキャップ
- 移動相
  - 各メーカーの技術資料から類似化合物の条件検索
  - H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH溶解度試験：析出点より 5%溶解する組成
  - グラジエント可能ならば、有機溶媒 20% ⇒ 80% 20 min
  - イオン性化合物の場合は 25 mMリン酸緩衝液を添加
    - 酸：pH4.5 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 塩基：pH 6.8 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=1/1)
- 試料
  - 移動相で溶解、あるいは移動相で希釈
  - 0.45 μmのメンブランフィルタでろ過後、5 ~ 10 μL注入

2007/03/28      日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー      3

ChromNik

## 分離の改善, 定量精度の向上

2007/03/28      日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー      4

## Second Choice ①

逆相モードのまま選択性を大幅改善  
**ZirChrom® HPLC Column**

## もっと過激な条件が使えるとしたら...

- 強酸性/強塩基性移動相が使用できたら...
  - 酸性物質の解離 (イオン化) が抑制される
  - 塩基性物質の解離 (イオン化) が抑制される
  - 非イオン性物質として取り扱い可能になる
- 高温で使用できたら...
  - 拡散係数が大きくなり、理論段数が向上する
  - 分離平衡が早くなり、分析時間も短縮される
  - 高粘性溶媒も使用でき、選択性改善の幅が拡大する

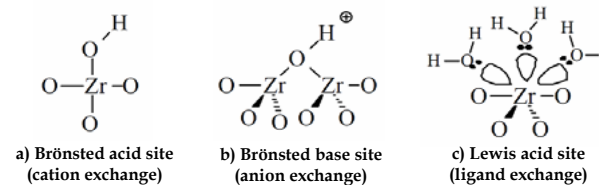
高耐酸/耐塩基性, 高耐熱性 シルコニア基材逆相HPLCカラム

**ZirChrom® HPLC Column**

## シリコニア系HPLC固定相 **ZirChrom®**

- シルコニアの主な長所
  - 化学的安定性が高い (pH 1 ~ 14)
  - 熱的安定性が高い (~ 200 °C)
  - 機械的安定性が高く、膨潤/収縮しない
- 高化学的安定性の利点
  - 測定対象に最も適した条件で分離可能
  - 高イオン性物質を単純なイオン抑制法で分離可能
  - イオンペア剤が不要なためシンプルな条件設定が可能
- 高熱的安定性の利点
  - 分離平衡が速やかになり、シャープなピークが得られる
  - 保持容量が小さくなり、ハイスループット分離が可能

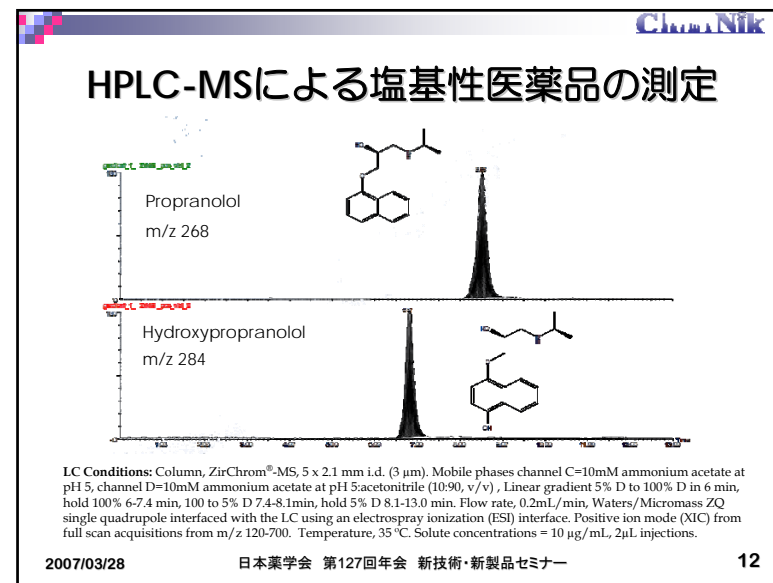
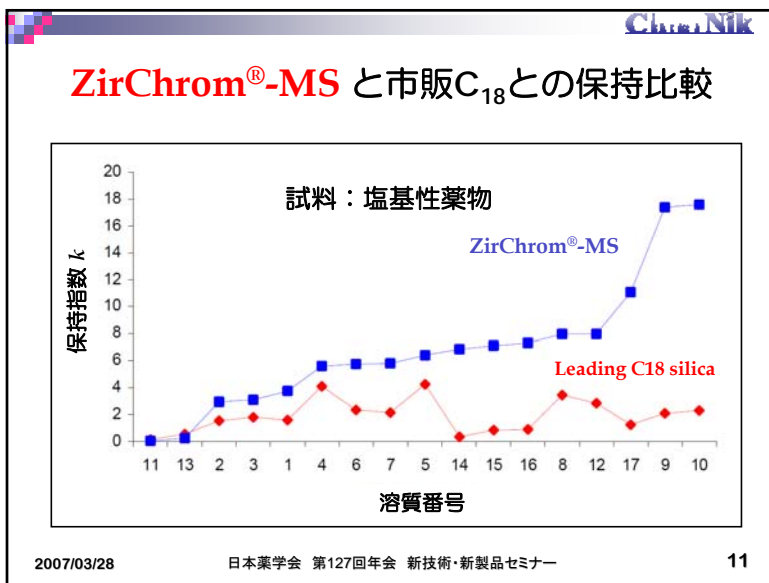
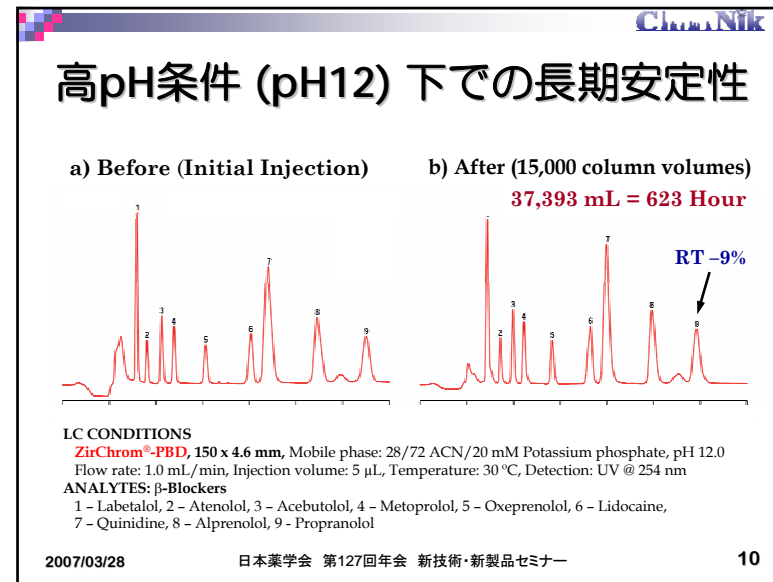
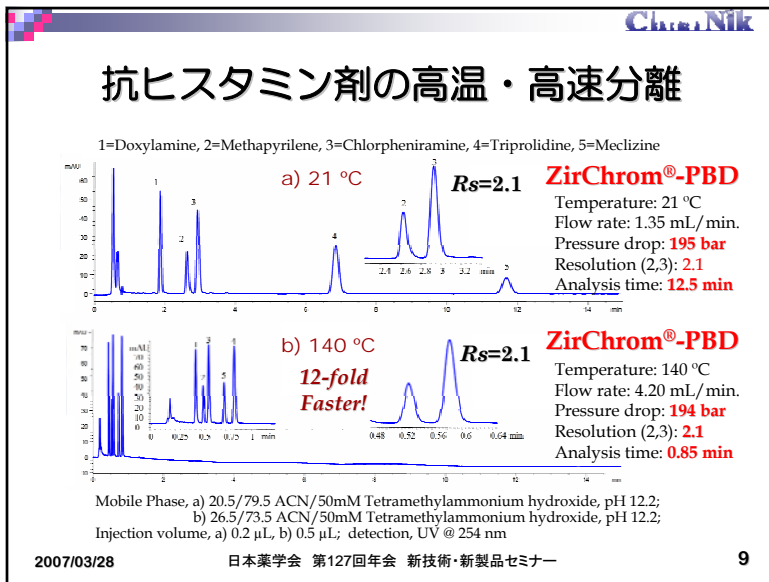
## シリコニアの表面化学と不活性化



Brønsted acidとBrønsted baseは、『イオン交換作用』を生み出します。  
 Lewis acidは、表面に多量に存在し、『配位子交換作用』を生み出します。

### ZirChrom® の不活性化技術

- ・ ポリマーコートによるBrønsted acid/baseの不活性化
- ・ Lewis Base (EDTPA) によるLewis Acidの不活性化



## Second Choice ②

### C18で保持の小さい成分の分離の改善 ZIC®-HILIC HPLC Column

2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

13

## 親水性化合物だけを保持できたら...

- 逆相モードと溶出順序が逆転できたら...
  - C18には保持し難い親水性化合物の分離が可能になる
  - 疎水性化合物の残存による性能劣化が防げる
- それも、単純な分配モードで分離できたら...
  - 水-有機溶媒系で親水性化合物の分離が可能になる
  - イオン抑制法のような強酸/強塩基を使用しないでよい
  - イオンペア剤を用いないのでLC-MSと結合し易くなる
  - イオン交換のような煩雑な緩衝液調整から開放される

親水性化合物分析用親水性相互作用クロマトグラフィーカラム

### ZIC®-HILIC HPLC Column

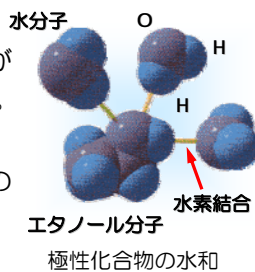
2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

14

## 親水性固定相における順相分配

親水性官能基の周りには水分子が多数集まり、水素結合によって、繋がって水層(水和層)を形成します。水に溶け易い化合物ほど、この水和層に取り込まれます。この水和層への取込まれ易さ(分配)の差を利用して親水性化合物を分離します。



### 親水性相互作用クロマトグラフィー: HILIC

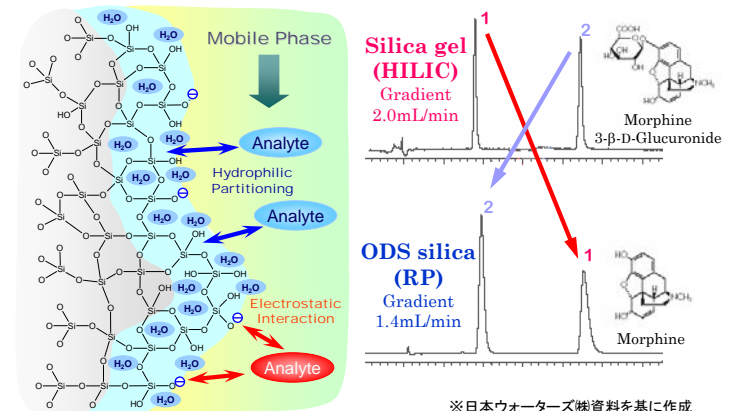
Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

15

## Silica-HILICにおける保持機構



※日本ウォーターズ株式会社資料を基に作成

2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

16

Chrom.Nik

## 極性基 (親水基) を持つ固定相

荷電型

シリカゲル

中性型 (無電荷型)

シリカゲル

アミノ型シリカゲル

アミノ型メタクリレートゲル

ジオール型シリカゲル

ヒドロキシメタクリレートゲル

**カオトロピックイオン (Chaotropic ions)**

Anion:  $\text{Br}_3\text{CCOO}^- > \text{Cl}_3\text{CCOO}^- > \text{SCN}^-$ , guanidinium  $> \text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^- > \text{Cl}_2\text{CHCOO}^- > \text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{F}^- > \text{SO}_4^{2-}$

Cation:  $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > (\text{CH}_3)_4\text{N}^+$

2007/03/28 日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー 17

Chrom.Nik

## ZIC®-HILIC/pHILICの保持機構

CH<sub>3</sub>  
CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
CH<sub>3</sub>

**ZIC®-HILICの官能基構造**  
*Chaotropic*理論に基づき設計された強い水層を形成できるスルホベタイン型Zwitter ion官能基

2007/03/28 日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー 18

Chrom.Nik

## HILICシリカとの保持比較- ペプチド分離

**a) ZIC®-HILIC**  
10 μm, 20 nm

**b) Silica HILIC**  
10 μm, 20 nm

イオン交換相互作用に基づいて保持される。イオン強度を高くしないと良好なピークとならない。

カラム: ZIC®-HILIC, 100 x 4.6 mm, 10 μm  
 溶離液: 50/50 = ACN/50 mM AcONH<sub>4</sub>, pH 6.7  
 流速: 0.5 mL/min  
 検出: UV @ 214 nm

2007/03/28 日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー 19

Chrom.Nik

## 移動相の有機溶媒濃度と保持指数

**HILICにおける溶媒強度**

THF < acetone < ACN  
< IPA < ethanol < water

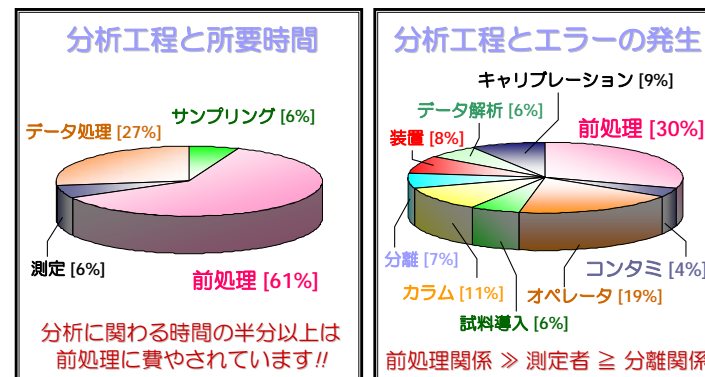
Column: ZIC®-HILIC 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: 10 mM formic acid  
 Legend: (circles) cytosine (triangles) adenine

2007/03/28 日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー 20

# Second Choice ③

やっぱり前処理?! 極性化合物の回収率向上  
**ZIC®-HILIC HPLC Column**

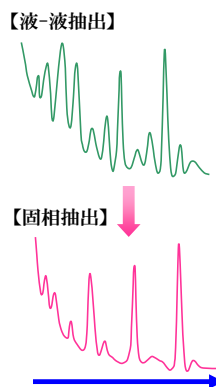
## 前処理は本当に必要か？



※『環境測定 絵とき基本用語』, YAN環境測定技術委員会編, オーム社, 2000年, p.45から引用, 一部加筆

## 固相抽出 (SPE) 法を利用すると...

- 高回収率, 高精度, 迅速, 簡便, 安全性, 低コスト
- 溶媒低減可能, 自動化が容易, フィールドサンプリングが可能
- 溶媒制限が少なく適用範囲が広い
  - 液-液抽出は水溶性溶媒が使用不可
- 選択性を変化させることが容易
  - 異なるモードの組み合わせが可能



## 逆相モードでクリーンアップできない...

- 固相抽出剤の変更
  - 疎水基の種類, 基材の変更
- 複合モードの利用
  - 逆相 + イオン交換 (イオン性官能基を持つ化合物)
- HILICモードの利用
  - 親水性相互作用 (逆相モードで保持されない化合物)
- イオン交換モードの利用
  - 明確なイオン性を示す化合物
- その他
  - 配位子交換, 錯形成, アフィニティ等のモードを検討

## 固相抽出におけるHILICモード...

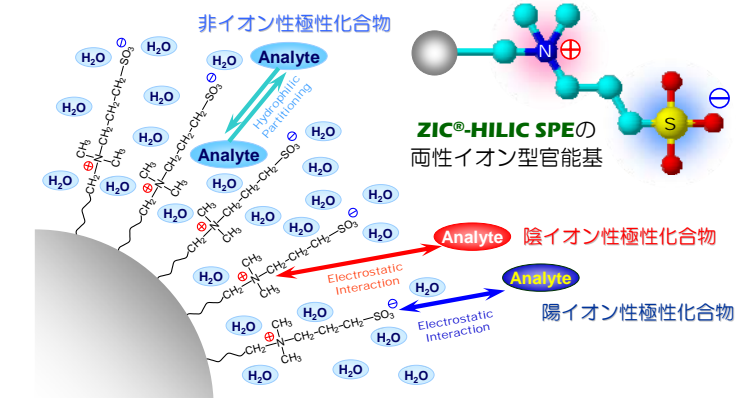
- HILICモードは、逆相モードと異なる選択性
  - 逆相モードとは反対の捕捉特性を示しますので、極性化合物の前処理に有用です
  - 水を溶離液に用いますので、RP-HPLCを用いる場合に、良好な分離と感度を得られます
  - 逆相型SPEの溶出液の精製や液性調整にも利用可能です
- ZIC®-HILICの高水和性両性イオン型官能基
  - Chaotropic理論に基づく官能基が導入されています
  - "Anti-Chaotropic" なスルホベタイン型官能基は、非常に安定した強い水和層を形成します
  - ZIC®-HILIC SPEの親水性相互作用は、マトリックスの影響を受け難いため、極性化合物の前処理に最適です

2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

25

## ZIC®-HILIC SPEにおける保持機構

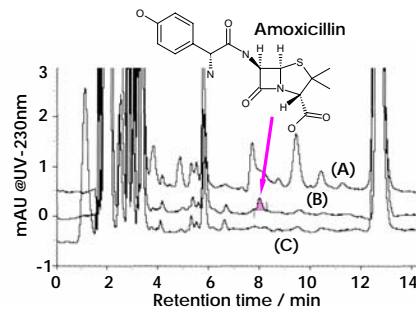


2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

26

## 血漿中の抗生物質Amoxicillinの測定



(A) Acetonitrile precipitated blank plasma  
 (B) ZIC®-HILIC extracted acetonitrile precipitated spiked plasma  
 (C) ZIC®-HILIC extracted acetonitrile precipitated blank plasma

### 抽出手順

アセトニトリルで血漿沈殿  
 遠心分離  
 上澄1 mLを負荷  
 アセトニトリルで洗浄  
 水(400 µL)で溶出  
 逆相カラムで分離  
 移動相: 0.1 M PBS/ACN

### 固相抽出カートリッジ

100 mg ZIC®-HILIC SPE

### コンディショニング

水 2mL  
 アセトニトリル 2 mL

2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

27

## Second Choice 分離の改善

- First Choice は、C18カラム
  - First Trial Conditionでの結果を見て、分離を改善する
- Second Choice ① 高安定性固定相の使用
  - 測定対象に最も合った条件で分離を改善
  - 塩基性薬物の分離改善には — ZirChrom® column
- Second Choice ② HILICモードの使用
  - C18に保持され難い高極性化合物の分離を改善
  - 極性化合物の分離改善には — ZIC®-HILIC column
- Second Choice ③ HILIC固相抽出剤の使用
  - 逆相で捕捉性の低い極性化合物を高度に捕捉
  - 極性化合物の回収率向上には — ZIC®-HILIC SPE

2007/03/28

日本薬学会 第127回年会 新技術・新製品セミナー

28