



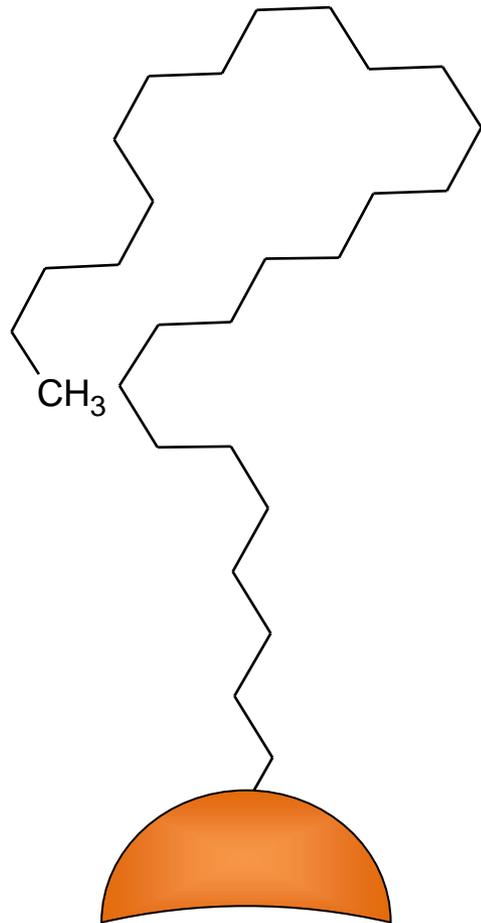
# HILICおよび逆相コアシェル (ソリッドコア)カラムを用いた 高極性化合物の分析

クロマニックテクノロジーズ  
塚本友康 長江徳和

**Email: [info@chromanik.co.jp](mailto:info@chromanik.co.jp)**  
***<http://chromanik.co.jp>***



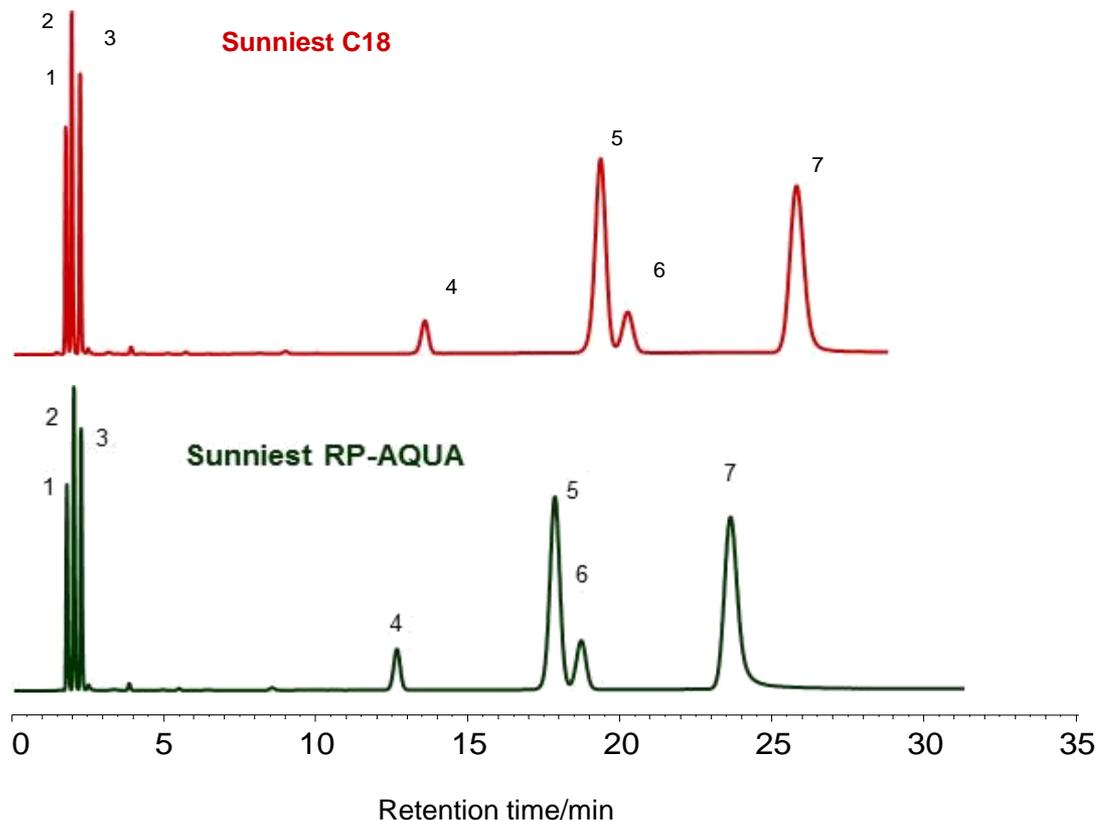
# オクタコシル(C28)



- 疎水性相互作用が主な相互作用
- 水系の移動相での安定性が高い
- 立体選択性が高い
- 極性基導入型C18より、耐久性が高い



# C18とC28の標準試料の分離



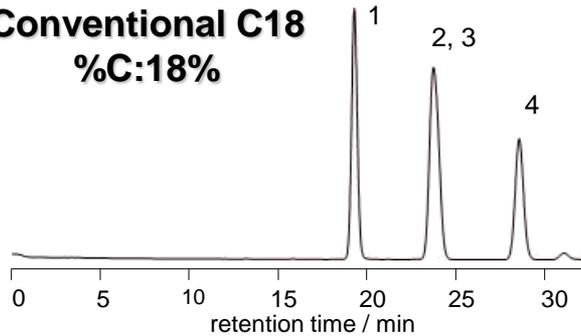
Column: Sunniest C18, 5 $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
Sunniest RP-AQUA, 5 $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
Sunniest C18, 5 $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C  
Pressure: 5.4 MPa

Sample: 1 = Uracil,  
2 = Caffeine,  
3 = Phenol,  
4 = Butylbenzene, (N=15,700)  
5 = o-Terphenyl, (N=15,000)  
6 = Amylbenzene, (N=15,300)  
7 = Triphenylene, (N=14,500)

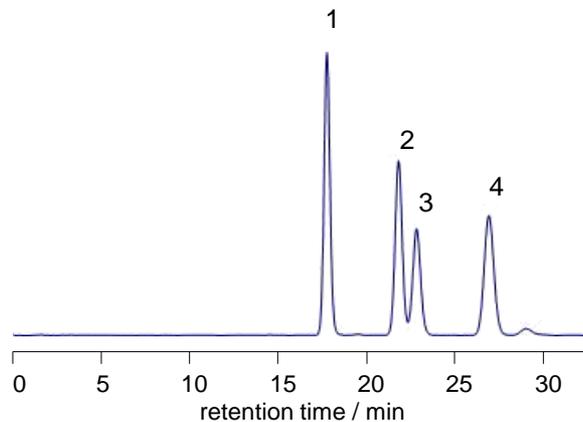


# C18との比較1

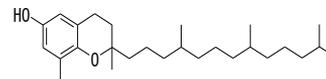
**Conventional C18**  
%C:18%



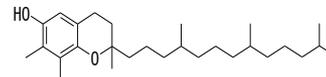
**Sunrise C28** %C:18%



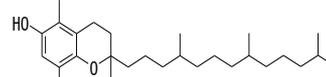
Column size: 4.6x250 mm  
 Mobile phase: 97/3=CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 25 °C  
 Detection: UV at 295nm  
 Sample: 1=δ-Tocopherol



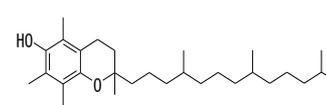
2=γ-Tocopherol



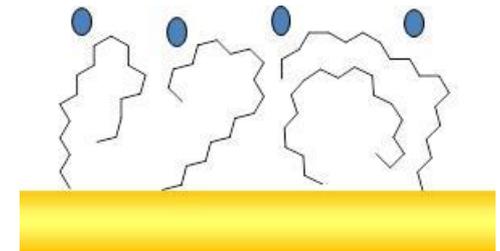
3=β-Tocopherol



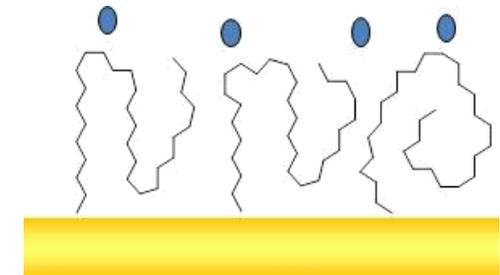
4=α-Tocopherol



**C18**



**C28**

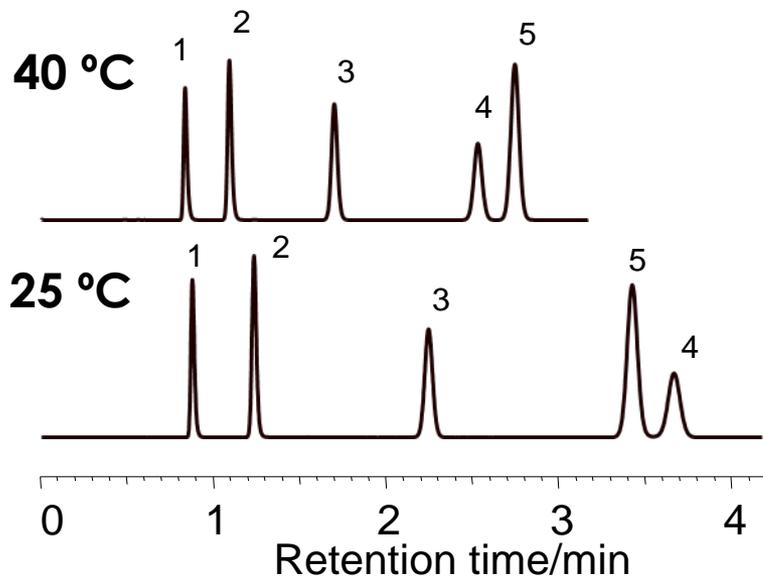


固定相容量は同じ



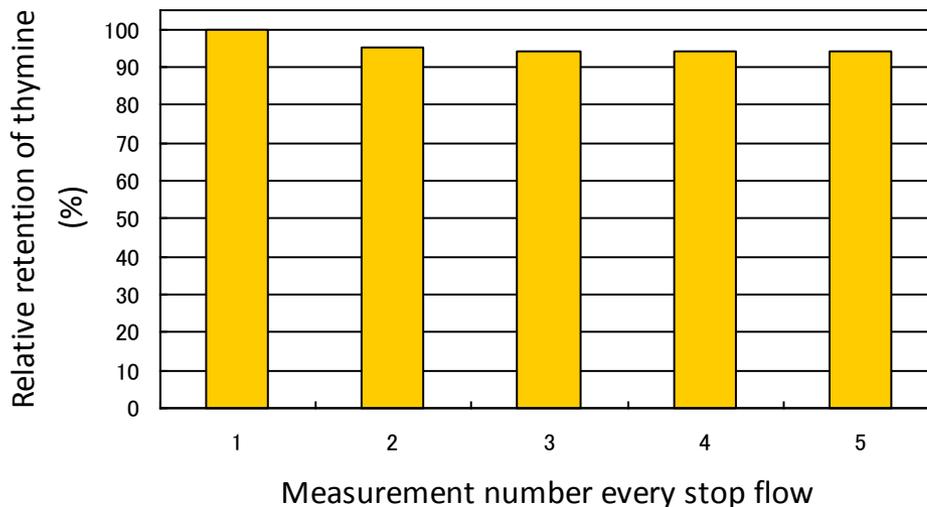
# SunShell RP-Aqua の40 °Cでの保持

## 核酸塩基の分離



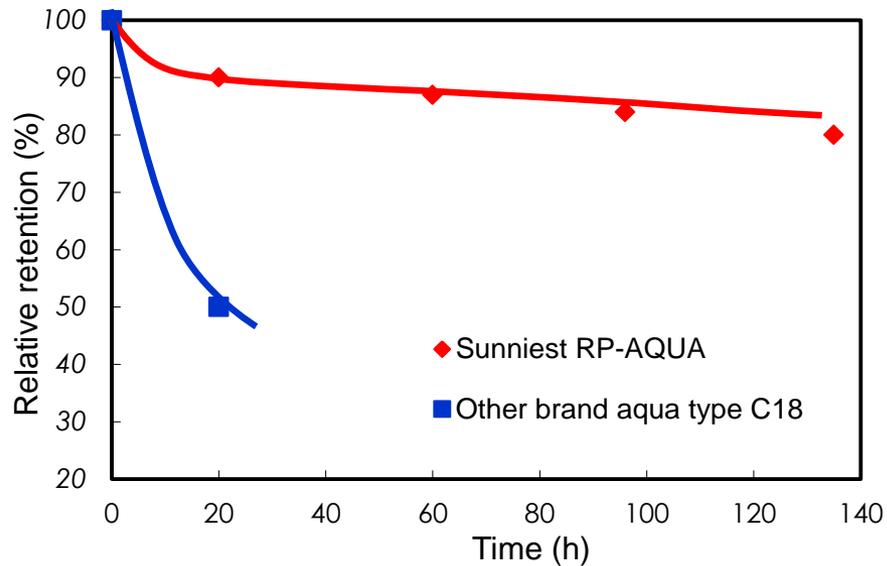
Column: SunShell RP-Aqua, 2.6  $\mu\text{m}$  75 x 4.6 mm  
Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 40 °C and 25 °C  
Sample: 1 = Cytosine, 2 = Uracil, 3 = Thymidine,  
4 = Uridine, 5 = Thymine

## 40°Cでのチミンの保持時間の変化 (ポンプ送液1時間停止毎に測定)

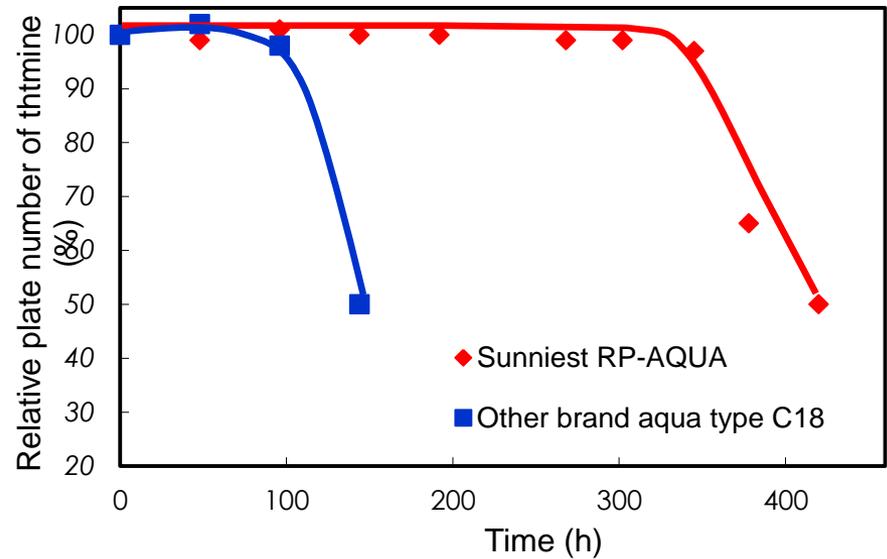


緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により、ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると、通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり、保持時間は大幅に減少しますが、SunShell RP-Aquaほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず、94%以上の再現性を示しました。

# 酸性、塩基性条件下の耐久性



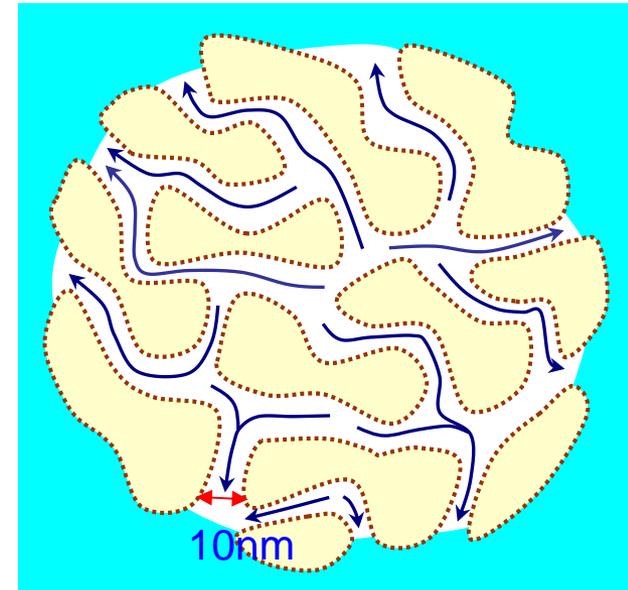
Test conditions  
 Mobile phase: 0.5% TFA  
 Temperature: 60 °C



Test conditions  
 Mobile phase:  
 20 mM phosphate buffer (pH 8.0)  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C

# 細孔からの移動相の抜け出し

内径0.5mmのガラス管



内径0.5mmのガラス管内で赤インクは6cm上昇する。この場合に作用してる圧力は0.006気圧である

内径が1 $\mu$ mでは30m上昇し、3気圧の圧力が作用していることになる

カラムを大気圧状態にして、移動相を充填剤の細孔から抜け出させるために必要な圧力は1気圧である

充填剤の細孔の大きさを考慮すると毛管現象によりこの1気圧は簡単に発生する

# 毛細管現象

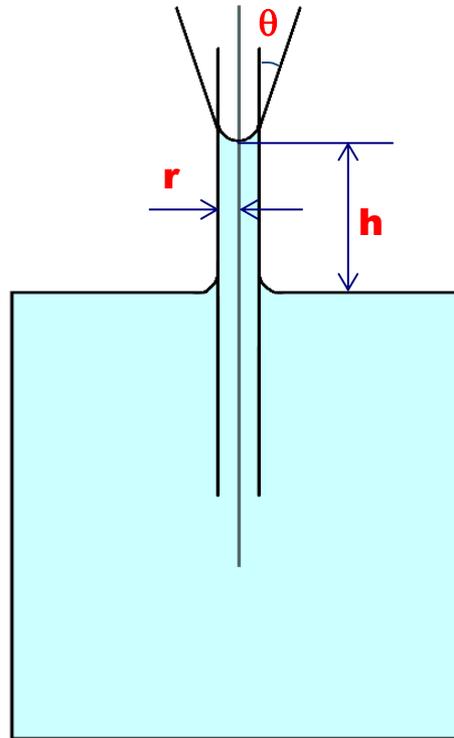
水とガラス管の場合    水とテフロン管の場合

毛管現象の式:

$$h = \frac{2\gamma \cos \theta}{r\rho g}$$

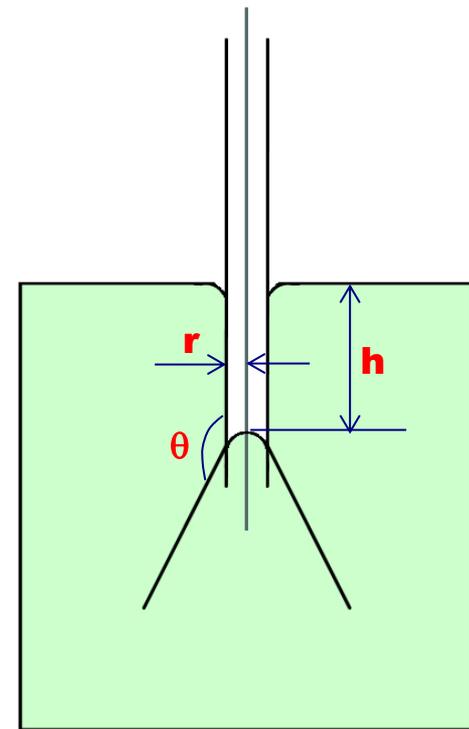
$\gamma$ : 表面張力

$\rho$ : 液体の密度(比重)



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$



液体が管に濡れない場合

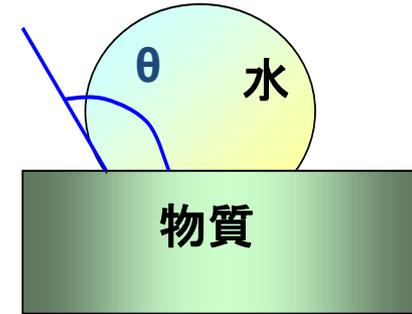
$$\theta > 90^\circ$$



# 疎水性と撥水性

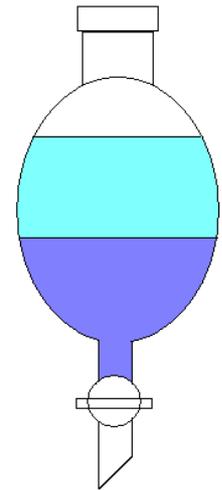
**撥水性** → 水をはじく性質

『液体と物質の表面との接触角が90度より大きくその角度が大きいほど撥水性が強い』



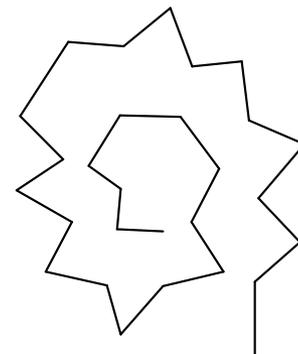
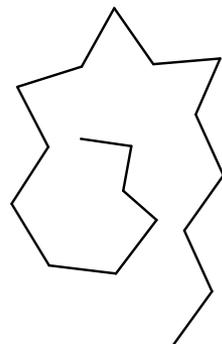
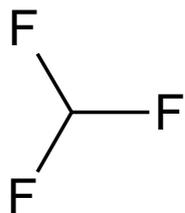
**疎水性** → 水と混ざりにくい性質

物質を水とn-オクタノールに溶解して水と混ぜ合わせ、平衡に達したときの双方での濃度の比、分配係数によって表される。分配係数はしばしば常用対数を用いてLogPと表される。





# 撥水と疎水違う？同じ？



	Trifluoromethane	Octadecane	Octane	Octacosane
接触角( $\theta$ )	120°	126°	140°	108°
分配係数(LogP)	0.64	9.18	5.18	14.09
水の溶解度 (mg/L)	4090	0.006	0.66	$8.84 \times 10^{-10}$

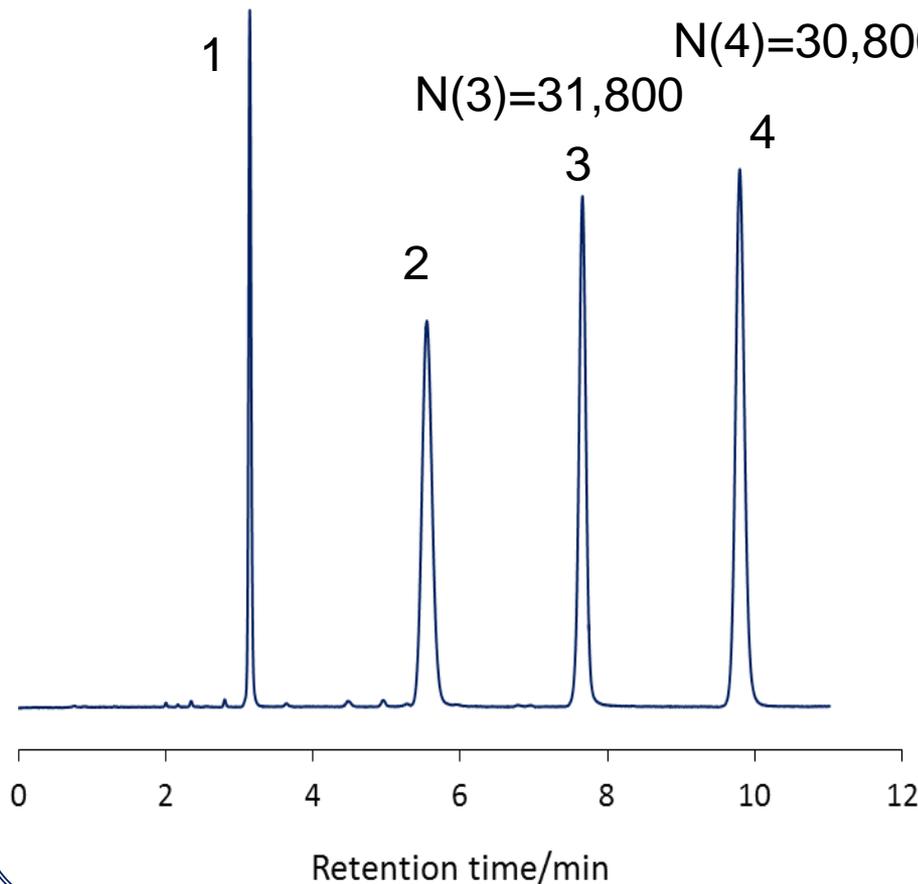
分析化学 Vol.59 No. 3, P193-205(2010)

疎水性(logP)が高いから撥水性(接触角)が高いわけではない

**疎水性の高さ ≠ 撥水性の強さ**

# 水溶性ビタミンの分離

SunShell RP-AQUA



Column:

SunShell RP-AQUA, 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase:

40mM Phosphate buffer pH6.8

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250nm

Sample: 1 = Nicotinic acid,

2 = Pyridoxal,

3 = Pyridoxine,

4 = Nicotinamide



# アミノ酸の分離

Column: Sunniest RP-AQUA 5 $\mu$ m, 2.0x 150mm

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

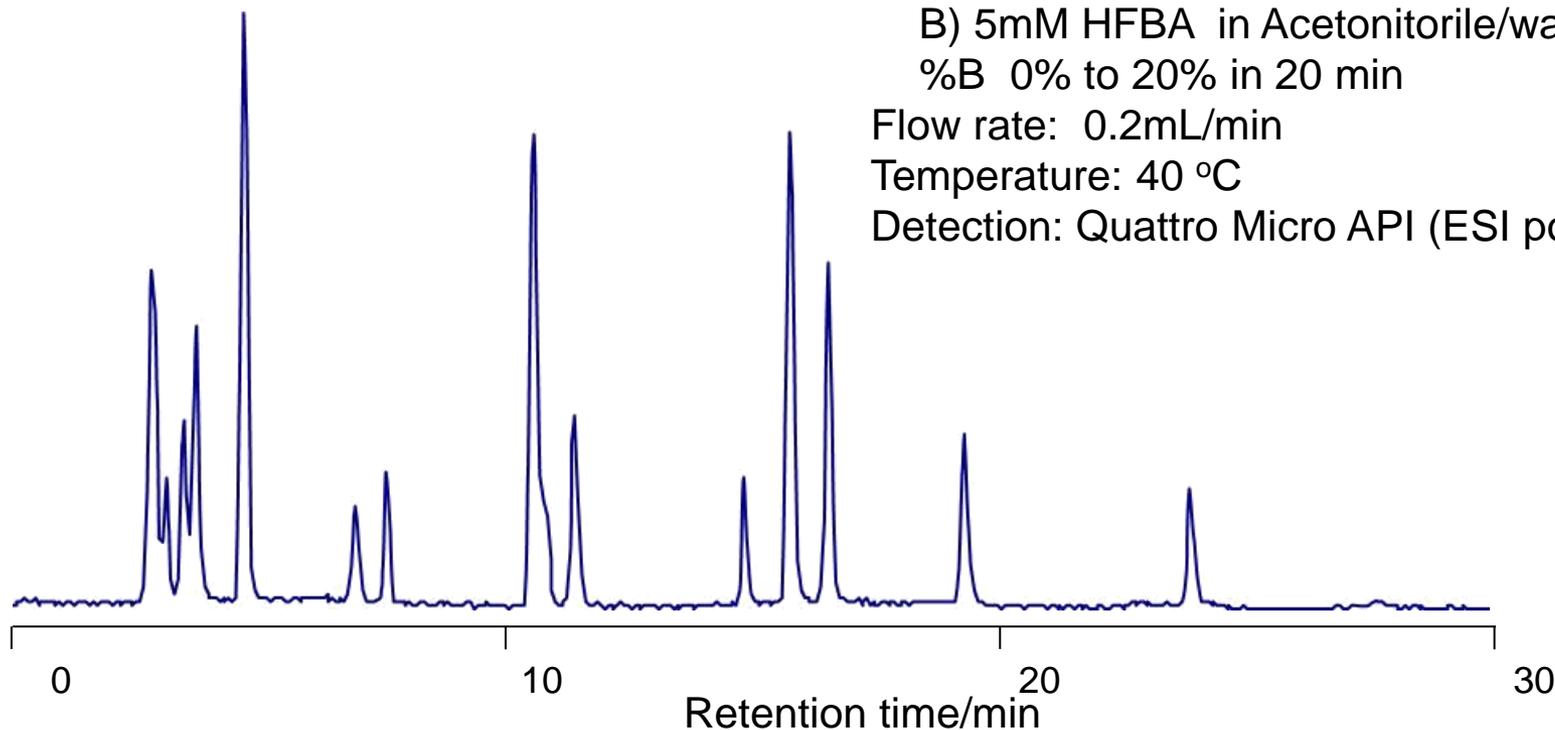
B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)

%B 0% to 20% in 20 min

Flow rate: 0.2mL/min

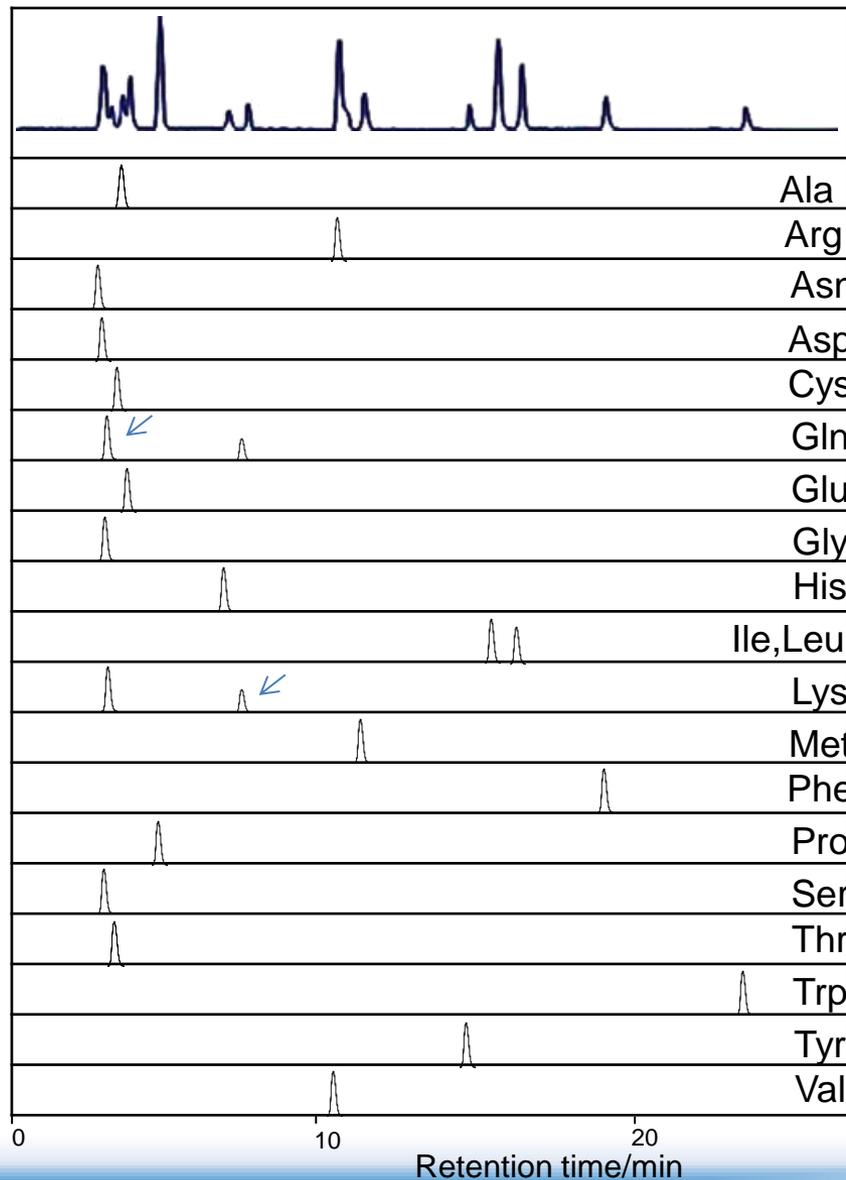
Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM



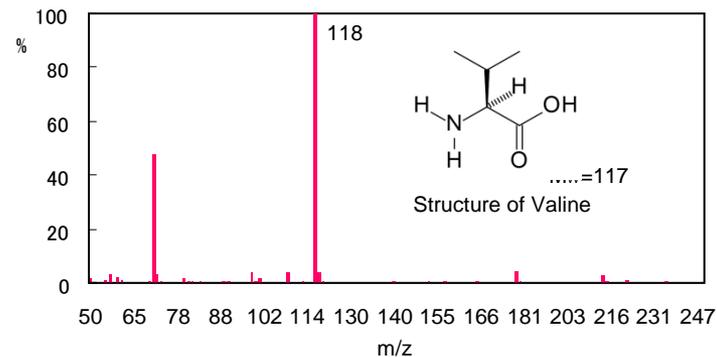


# アミノ酸のLC/MS



m/z

- 90 Ala
- 175 Arg
- 133 Asn
- 134 Asp
- 122 Cys
- 147 Gln
- 148 Glu
- 76 Gly
- 156 His
- 132 Ile,Leu
- 147 Lys
- 150 Met
- 166 Phe
- 116 Pro
- 106 Ser
- 120 Thr
- 205 Trp
- 182 Tyr
- 118 Val

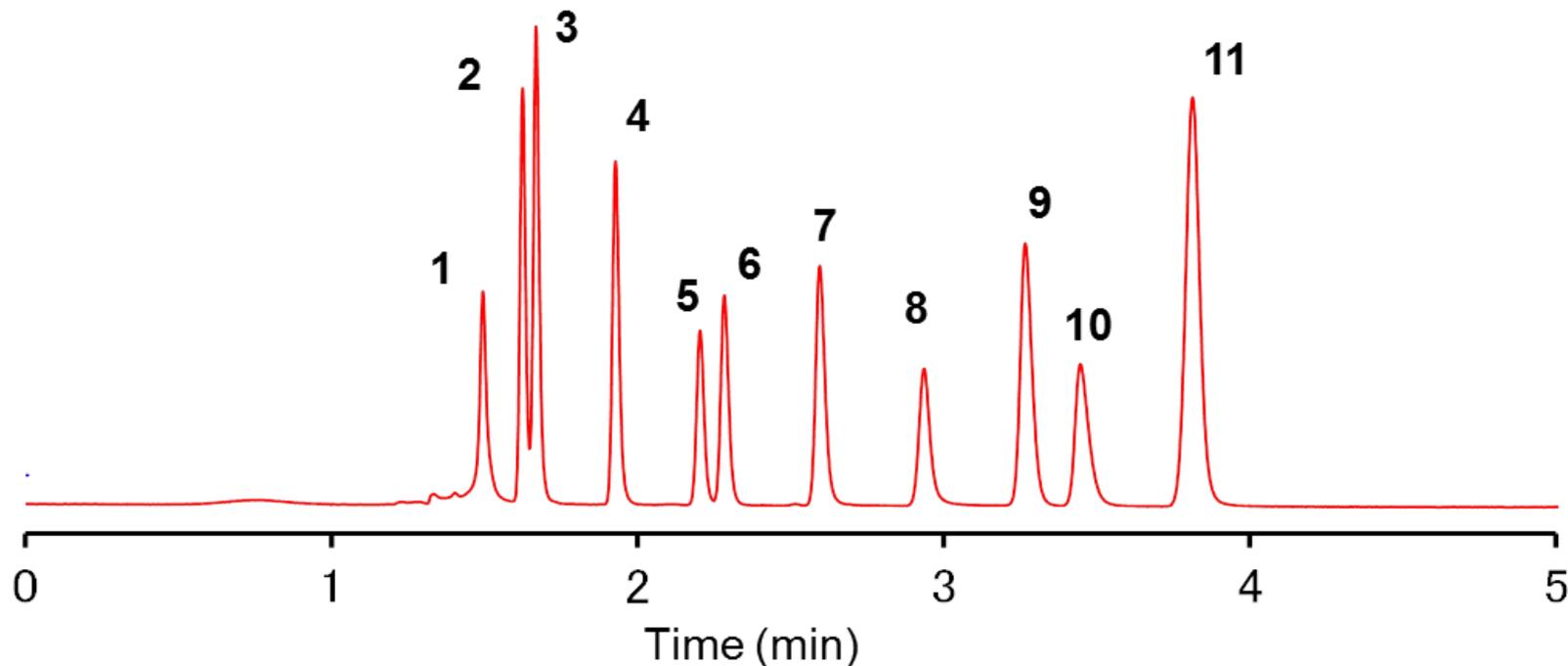


Mass spectrum of Valine

Column: Sunniest RP-AQUA 5 $\mu$ m, 2.0x 150mm  
 Mobile phase:  
 A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)  
 B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)  
 %B 0% to 20% in 20 min  
 Flow rate: 0.2mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM



# 有機酸の分離



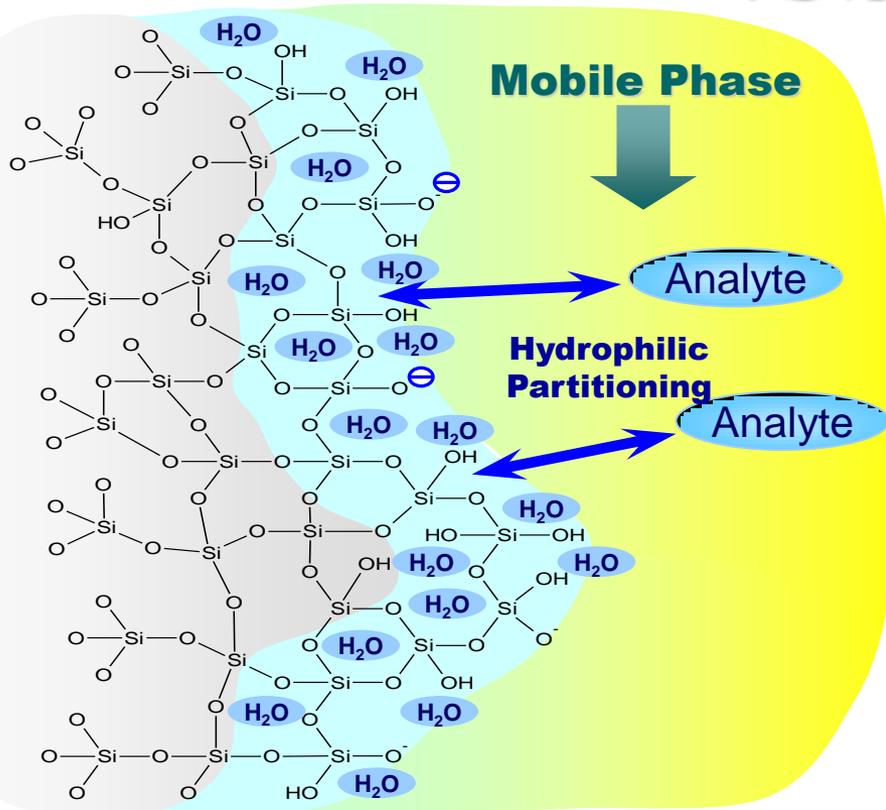
Column: SunShell RP-AQUA 2.6  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm, Mobile phase: 0.025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH2.5

Flow rate: 1.0 mL/min, Column pressure: 32 MPa for 1.5mL/min, Temperature: 40  $^\circ\text{C}$

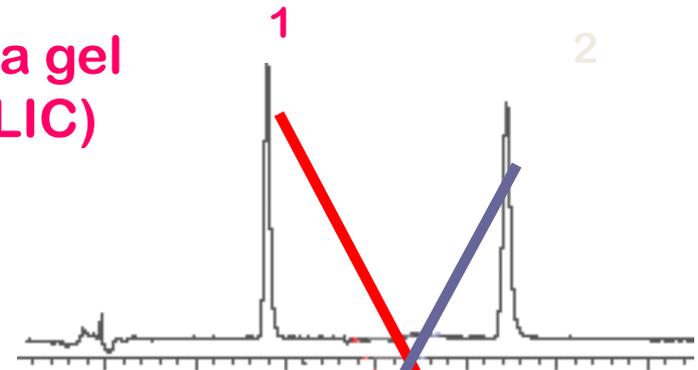
Detection: UV@210nm, Injection volume: 2  $\mu\text{L}$

Sample: 1 = Oxalic acid (60 ppm), 2 = Tartaric acid (500 ppm), 3 = Formic acid (1000 ppm),  
4 = Malic acid (1000 ppm), 5 = Lactic acid (1000 ppm), 6 = Acetic acid (1000 ppm),  
7 = Diglycolic acid (1000 ppm), 8 = Maleic acid (100 ppm), 9 = Citric acid (1000 ppm),  
10 = Succinic acid (1000 ppm), 11 = Fumaric acid (10 ppm).

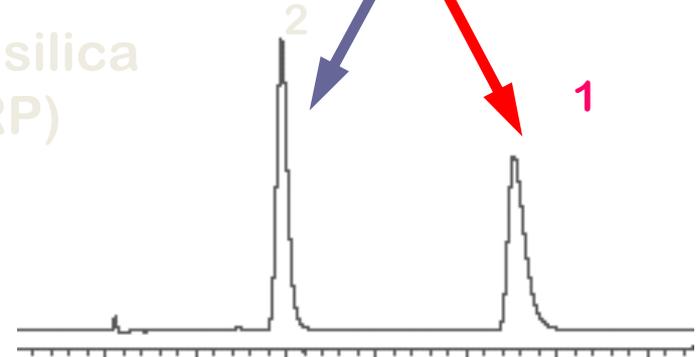
# HILICの分離メカニズム



Silica gel  
(HILIC)



ODS silica  
(RP)



## □ HILICの特徴として...

- 逆相系に用いる極性溶媒が使用可能である
- 固定相に形成された水和層との分配によって分離が起こると言われている
- 親水性が高い化合物ほど保持される特徴がある



# HILICを使用するうえでの注意点

- 保持が短い・保持がない場合
  - サンプル
    - 移動相もしくは水割合が低い溶媒で調整する
  - 移動相
    - 有機溶媒の割合を増やす
    - 塩の濃度を上げる、塩の種類を変える
- 理論段数が低い場合
  - サンプル
    - 負荷量を減らす
  - 移動相
    - 流速を遅くする

逆相クロマトグラフィと比べ、試料中の溶媒(水)の影響を大きく受ける傾向がある

最適流速も逆相クロマトグラフィより、低速になる傾向がある

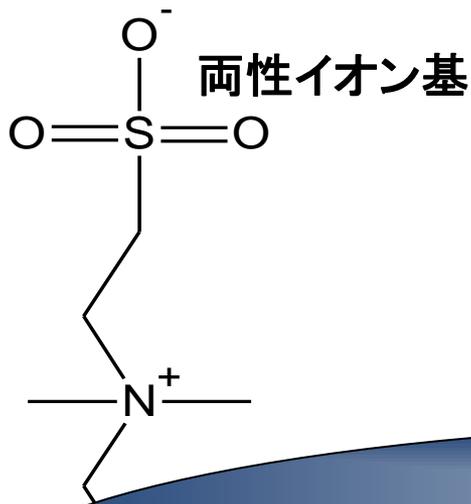
# HILICカラムに使用される官能器

## □ 逆相カラムと違い・・・

- 親水的な分配が主な分離機構だが二次相互作用も比較的強く働く
- 二次的な相互作用を抑えることはほとんどされていない
- 電荷を有する官能基が多い。

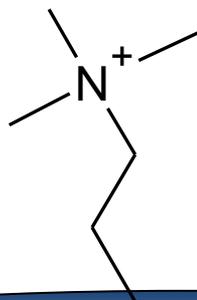
### 親水性相互作用

#### 静電的相互作用

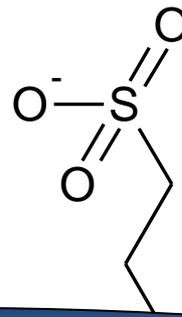


#### イオン交換相互作用

陰イオン  
交換基

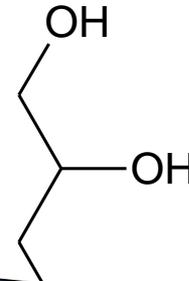


陽イオン  
交換基

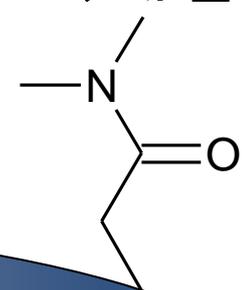


#### 水素結合

ジオール基

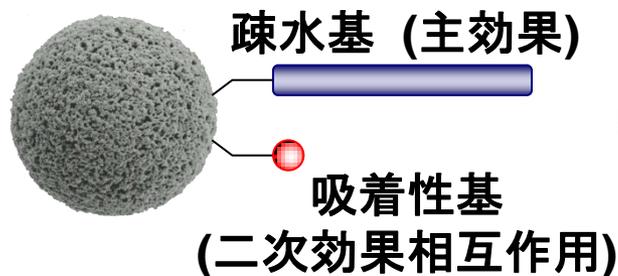


アミド基

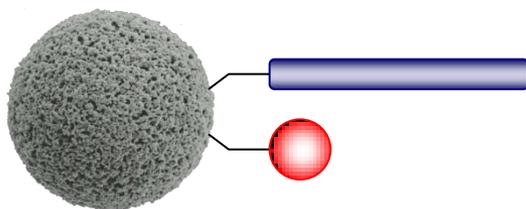




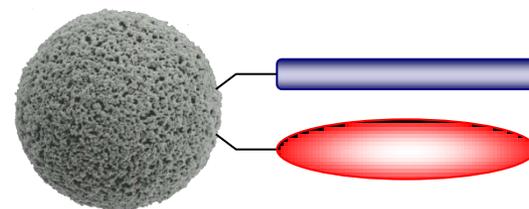
# 二次相互作用の働き



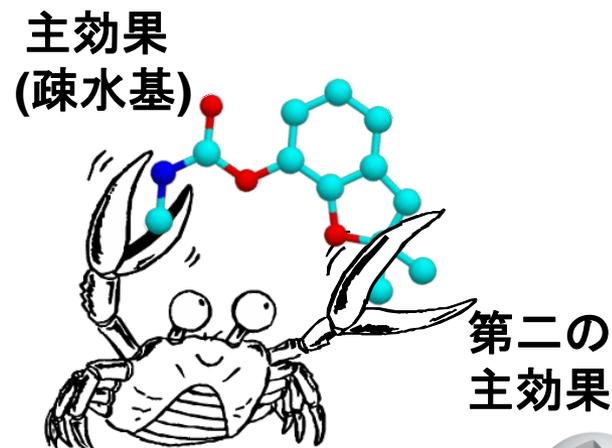
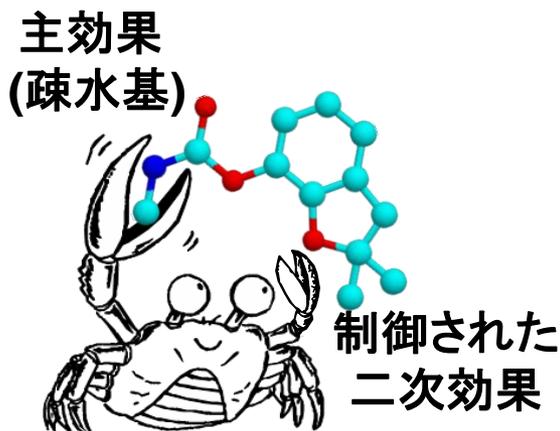
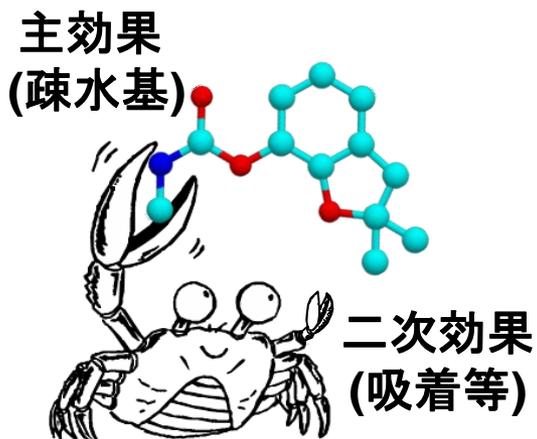
既存の分離剤



二次効果相互作用  
制御型分離剤



第二主効果を持つ  
二足型分離剤



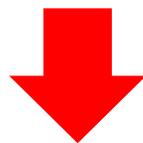
# HILICカラムを設計するうえで・・・

## 1. 基材自身の親水性が高い

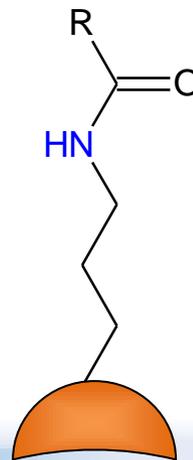
- 基材のみでもHILICで使用可能なシリカを選択
- コアシェルを使用することで高分離が可能

## 2. 導入されている官能基の構造

- 官能基が高い水和性を有し、高い密度で導入可能である
- 静電的な相互作用が極力低い
- 官能基の結合部位の疎水性が低いこと



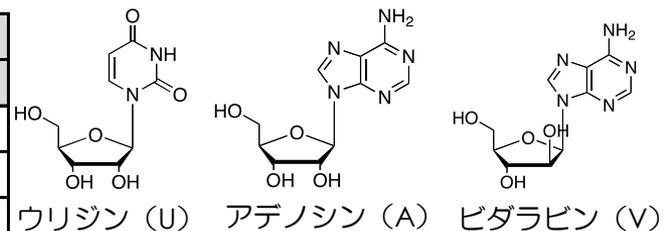
アミド基を選択





# 親水性の比較

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



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

ウリジンの保持から充填剤の親水性を評価



保持が大きいほど充填剤の親水性が高い

同じHILICカラムであっても、親水性の違いが大きい



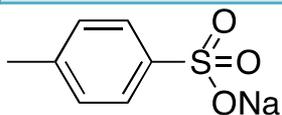
逆相カラムのように使い分ける必要がある

合成したSunShell HILIC-Amideは他の官能基を導入したHILICカラムの中でも大きな親水性を有していた

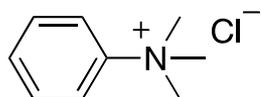


# イオン交換性の比較

Column	U	S□□□	a(SPTS/U)	U	TMPAC	a(TMPAC/U)
	k(□) 20 mM	k(S□□□)		k(□) 20 mM	k(TMPAC)	
ZIC-HILIC (5 mm)	2.11	0.69	0.33	2.11	3.32	1.57
ZIC-HILIC (3.5 mm)	2.10	0.56	0.27	2.10	3.45	1.64
Nucleodur HILIC (3 mm)	2.20	1.13	0.51	2.20	3.14	1.43
Amide-80 (5 mm)	3.30	0.89	0.27	3.30	4.57	1.38
XBridge Amide (3.5 mm)	2.55	0.74	0.29	2.55	1.89	0.74
PolySULFOETHYL (3 mm)	1.58	0.25	0.16	1.58	1.38	0.87
PolyHYDROXYETHYL (3 mm)	3.92	0.87	0.22	3.92	3.34	0.85
CYCLOBOND I (5 mm)	0.70	3.32	4.73	0.70	0.45	0.63
LiChrospher Diol (5 mm)	1.50	0.95	0.63	1.50	1.73	1.16
Chromolith Si	0.31	0.06	0.19	0.31	5.25	16.94
HALO HILIC (2.7 mm)	0.64	0.20	0.31	0.64	9.03	14.11
COSMOSIL HILIC (5 mm)	1.60	1.28	0.80	1.60	0.78	0.49
Sugar-D (5 mm)	1.58	3.00	1.90	1.58	0.39	0.25
NH <sub>2</sub> -MS (5 mm)	2.44	2.01	0.82	2.44	0.69	0.28
SunShell HILIC-Amide (2.6 mm)	2.93	1.29	0.48	2.93	1.18	0.44



Sodium p-toluenesulfonate (SPTS)



Trimethylphenylammonium chloride (TMPAC)

aの値により充填剤の  
イオン交換性が評価できる



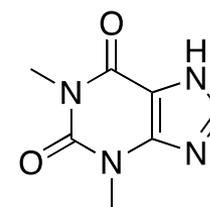
値が小さいほどイオン交換性  
が低い

合成したSunShell HILIC-  
Amideは aの値が低くアニオン、  
カチオン交換ともに小さいこと  
が判明した

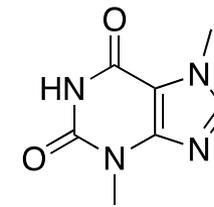


# 充填剤表面の比較

Column	Tb k (Tb)	Tp k (Tp)	$\alpha(Tb/Tp)$
ZIC-HILIC (5 mm)	0.36	0.30	1.18
ZIC-HILIC (3.5 mm)	0.34	0.28	1.20
Nucleodur HILIC (3 mm)	0.52	0.52	1.00
Amide-80 (5 mm)	1.06	0.76	1.39
Amide-80 (3 mm)	1.43	1.08	1.32
XBridge Amide (3.5 mm)	0.71	0.52	1.38
PolySULFOETHYL (3 mm)	0.23	0.23	1.00
PolyHYDROXYETHYL (3 mm)	0.75	0.66	1.14
CYCLOBOND I (5 mm)	0.44	0.43	1.01
LiChrospher Diol (5 mm)	0.57	0.55	1.04
Chromolith Si	0.31	0.26	1.22
HALO HILIC (2.7 mm)	0.64	0.50	1.26
COSMOSIL HILIC (5 mm)	0.49	0.55	0.89
Sugar-D (5 mm)	0.31	0.59	0.52
NH <sub>2</sub> -MS (5 mm)	0.43	0.80	0.54
SunShell HILIC-Amide (2.6 mm)	0.60	0.67	0.90



theophylline (Tp)



theobromine (Tb)

$\alpha(Tb/Tp) > 1$  酸性  
 $\alpha(Tb/Tp) = 1$  中性  
 $\alpha(Tb/Tp) < 1$  塩基性

$\alpha$ の値によって充填剤表面の性質が評価される

合成したSunShell HILIC-Amideは  $\alpha = 0.9$  であり、弱い塩基性を示した。



# 核酸塩基の分離

Column:

SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,

Acentice Express OH5 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm

Acentice Express HILIC 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,

Mobile phase: acetonitrile :

20 mM ammonium acetate(pH4.7) =8:2

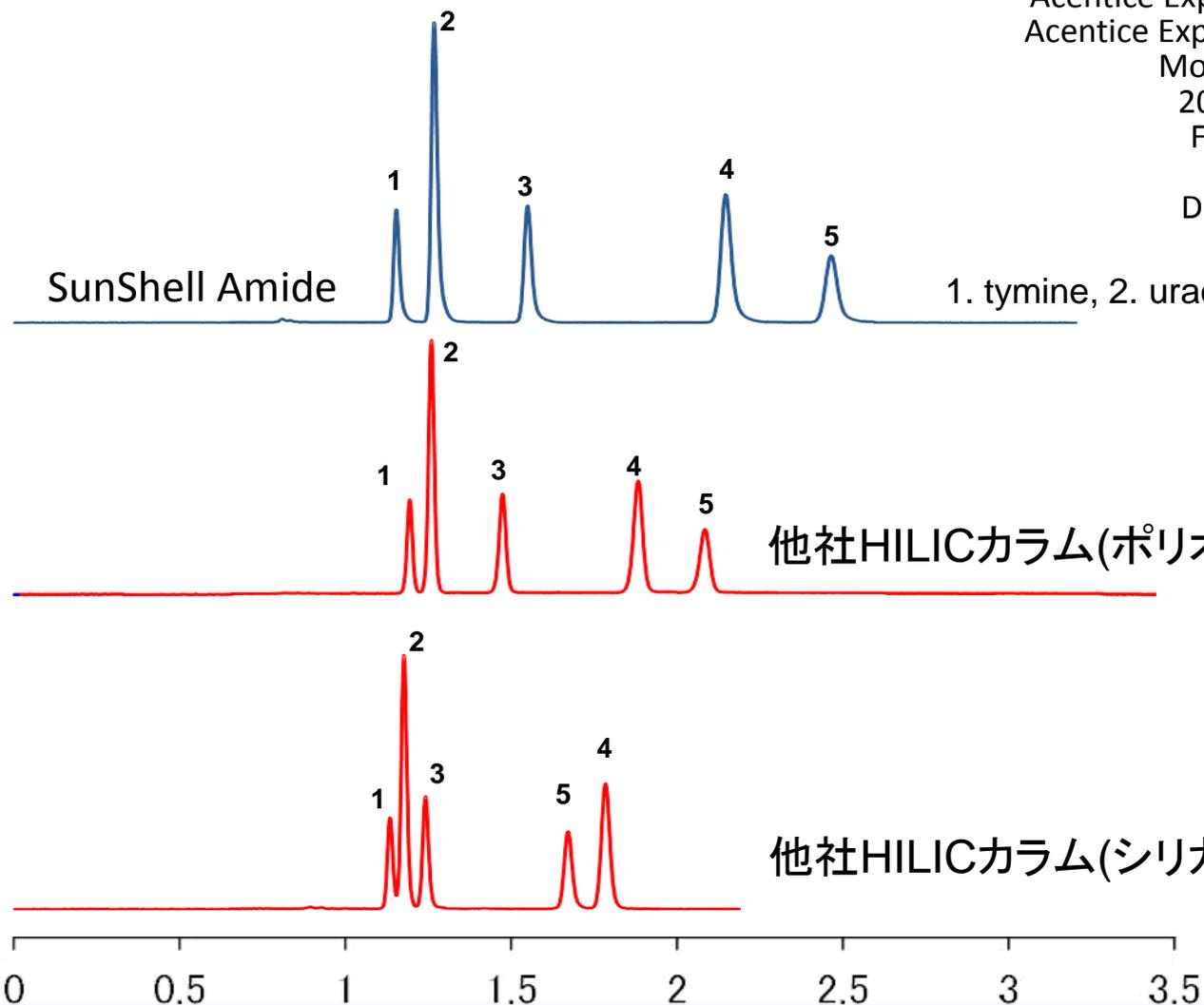
Flow rate: 1.0 mL/min ,

Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@250 nm,

Sample:

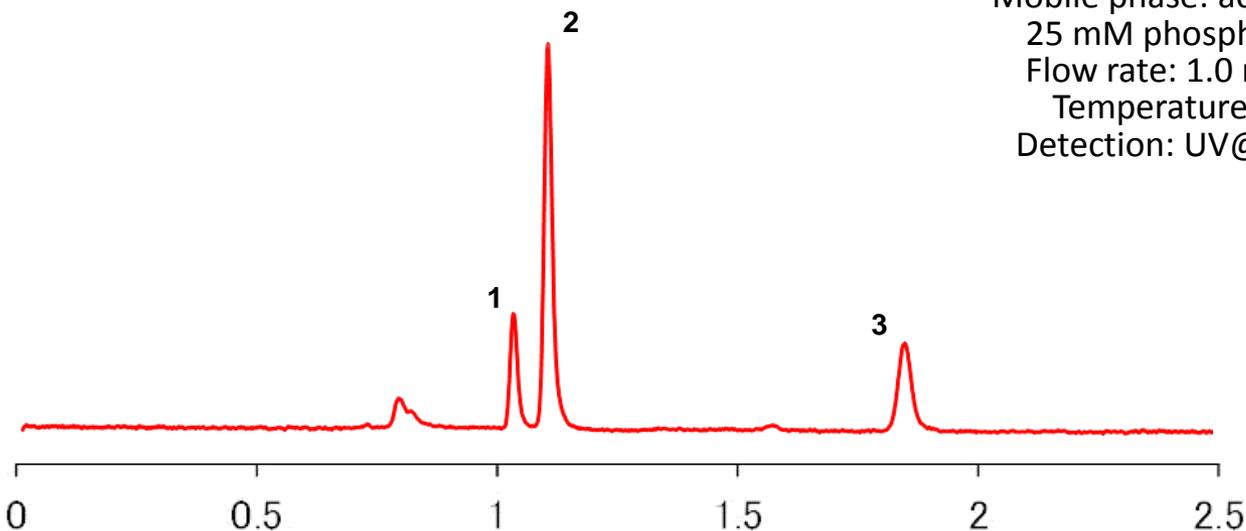
1. thymine, 2. uracil, 3. uridine, 4. cytosine, 5. cytidine



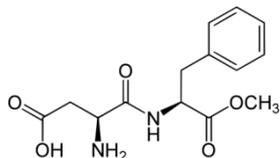


# 合成甘味料の分離

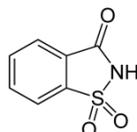
Column:  
SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,  
Mobile phase: acetonitrile :  
25 mM phosphate buffer (pH2.5) =8:2  
Flow rate: 1.0 mL/min ,  
Temperature: 室温  
Detection: UV@215 nm,



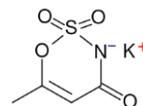
1. Aspartame



2. Saccharin,



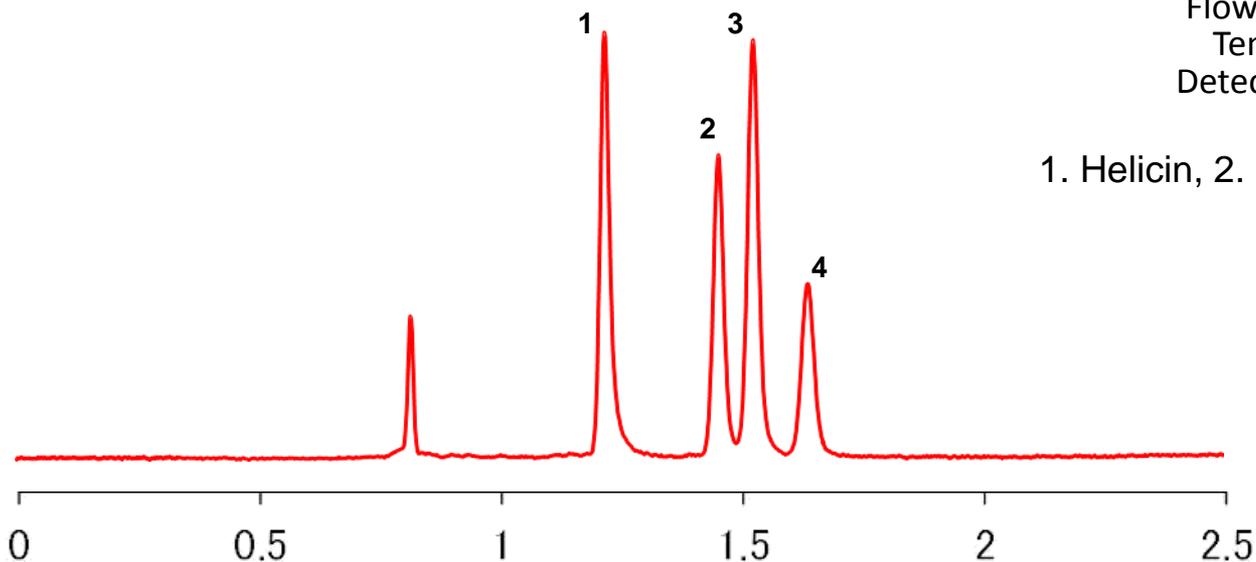
3. Acesulfame K,





# 配糖体の分離

Column:  
SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,  
Mobile phase: acetonitrile :  
25 mM phosphate Ammonium (pH4.9) =8:2  
Flow rate: 1.0 mL/min ,  
Temperature: 室温  
Detection: UV@215 nm,  
Sample:  
1. Helicin, 2. Salicin, 3. Arbutin 4. Rutin

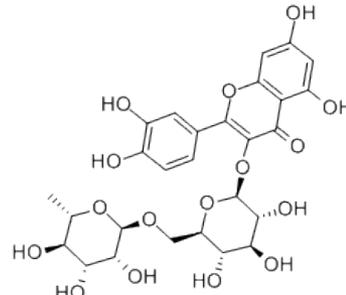
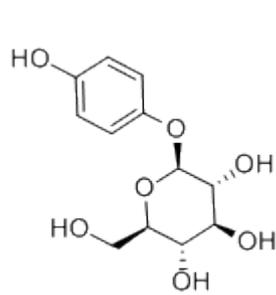
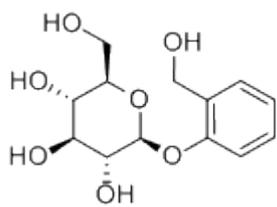
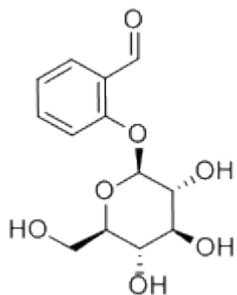


1. Helicin,

2. Salicin,

3. Arbutin

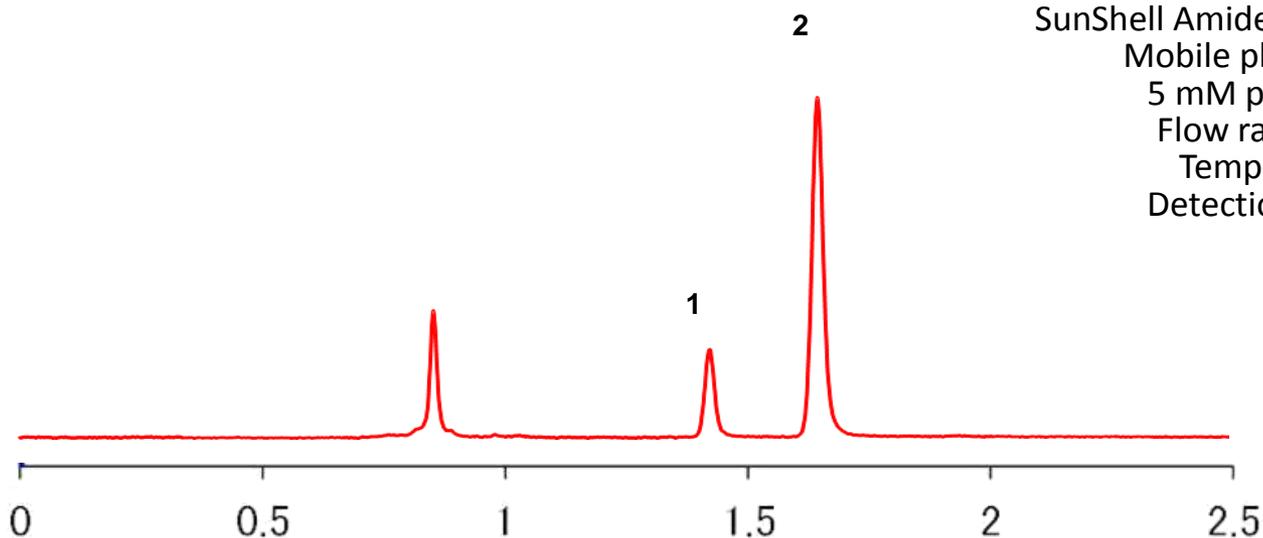
4. Rutin



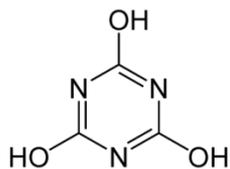


# メラミンの分離

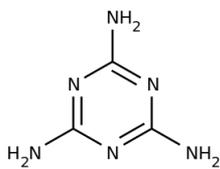
Column:  
SunShell Amide 2.6  $\mu$ m : 100 x 4.6 mm,  
Mobile phase: acetonitrile :  
5 mM phosphate Buffer (pH6.9) =75:25  
Flow rate: 1.0 mL/min ,  
Temperature: 40  $^{\circ}$ C  
Detection: UV@220 nm,



1. Cyanuric acid,



2. Melamine,





# HILICと逆相クロマトグラフィの比較

Column:

SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm

SunShell RPAqua 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm

Mobile phase: acetonitrile :

Amide : 20 mM ammonium acetate(pH4.7) =8:2

RPaqua : 20 mM phosphate buffer(pH7.0)

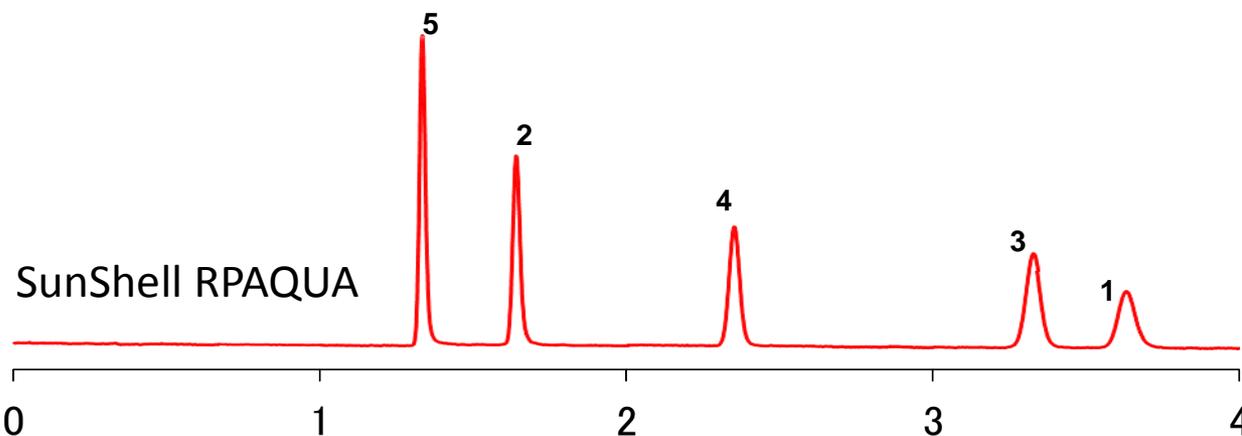
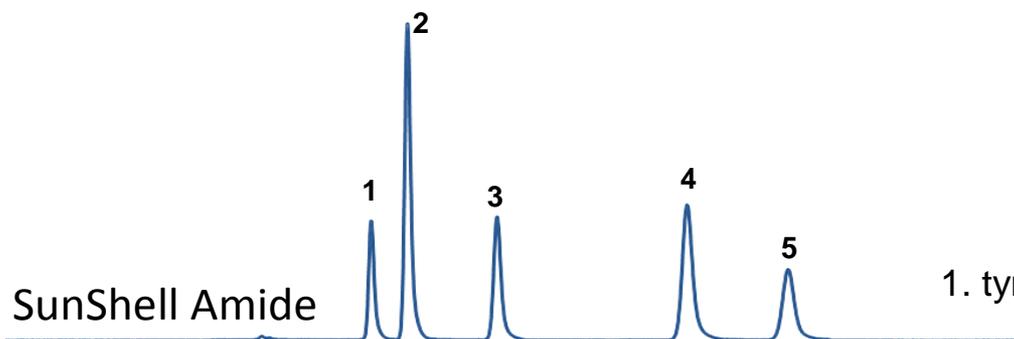
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@250 nm

Sample:

1. thymine, 2. uracil, 3. uridine, 4. cytosine, 5. cytidine





# まとめ

- C28カラムは、水系移動相のみでも保持時間が安定しており、極性化合物の分離に有用であった
- 作成したSunShell HILIC-Amideは、他のHILICカラムと比較した場合、高い親水性を示し、イオン交換性も低かった
- SunShell HILIC-Amideは、他社コアシェル型HILICカラムより長い保持を示した
- C28カラムとAmideカラムを核酸塩基を用いて比較した場合、その溶出順は概ね逆となった