

# 極性化合物の分離に！ HILIC, C18-SACの 基礎と上手な使い方！

一般のC18では分離が難しい極性化合物に適した  
HILICとSilanol Activity Controlled C18の  
活用法について説明いたします

2007/8/30 15:10-15:35 A-4会場  
於：アパホテル&リゾート 東京ベイ幕張 ホール

**ChromaNik** (株)クロマニックテクノロジーズ

# 極性化合物分析のための [ Second Choice ]

分離ができない！  
さあ困った！次の手は？

## First Choice (測定対象：極性化合物)

- カラム
  - C18 (ODS), 5 $\mu$ m, 150 x 4.6 mm i.d.
    - モノファンクション型, フルエンドキャッピング
- 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%溶解し易い組成
  - グラジエントができれば有機溶媒 20%⇒80%, 20min
  - イオン性化合物の場合は 25mMリン酸緩衝液を添加
    - 酸：pH4.5 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 塩基：pH6.8 (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 $\mu$ mのメンブランフィルタでろ過後, 5~10 $\mu$ L注入

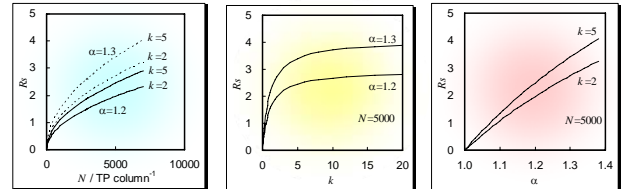
とりあえず、分析を試してみたけど...

- 分離ができな〜い!!
    - 分離度が足りない
    - カラムに保持されない
    - 共存成分と重なっている
  - 検出ができな〜い!!
    - 共存成分が重なっている
    - 検出器に反応しない (ここでは省略)
- ⇒ **分離の改善**

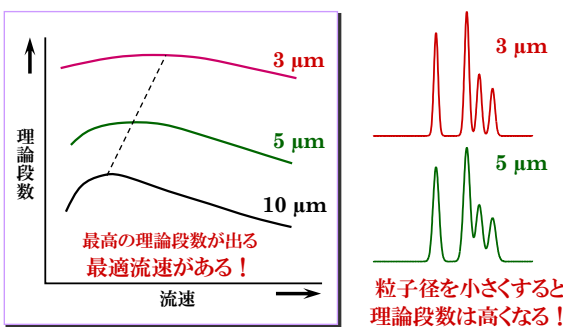
## 分離の改善の概念

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

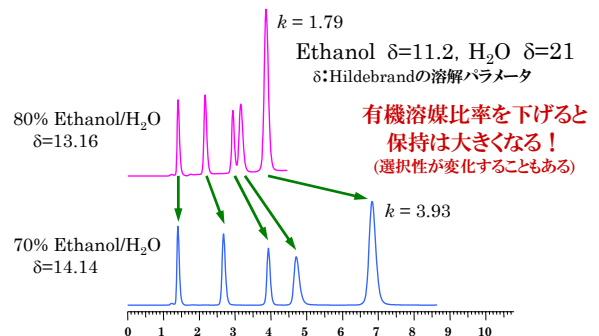
$N$ : 理論段数,  $\alpha$ : 分離係数 [ $\alpha = k_2/k_1$ ],  $k$ : 保持指数 [ $k = (T - T_0)/T_0$ ]

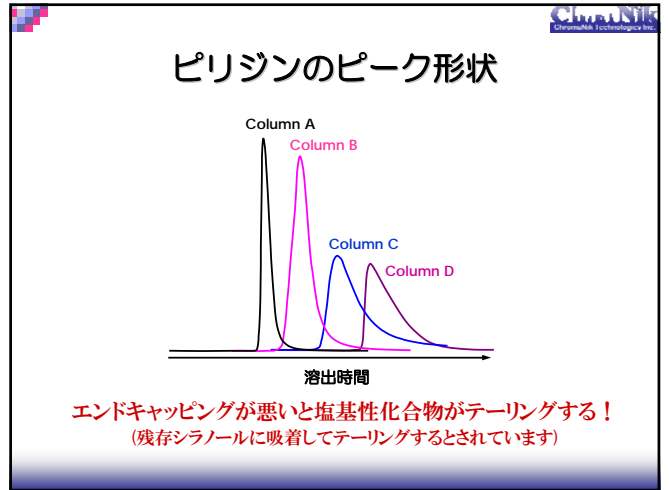
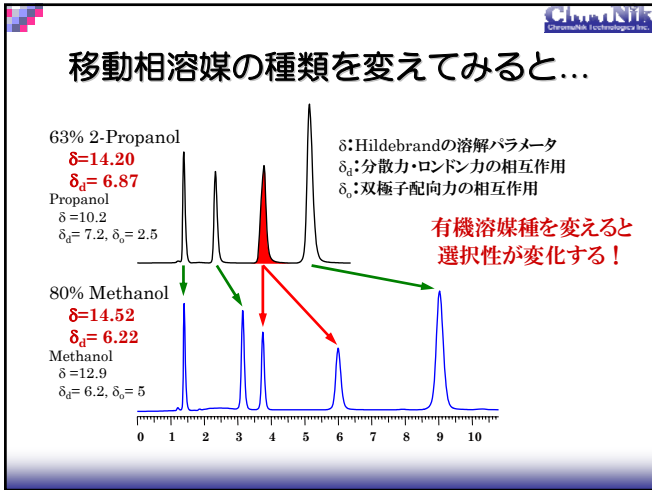


粒子径, 移動相流速を変えてみると...



有機溶媒濃度を変えてみると...

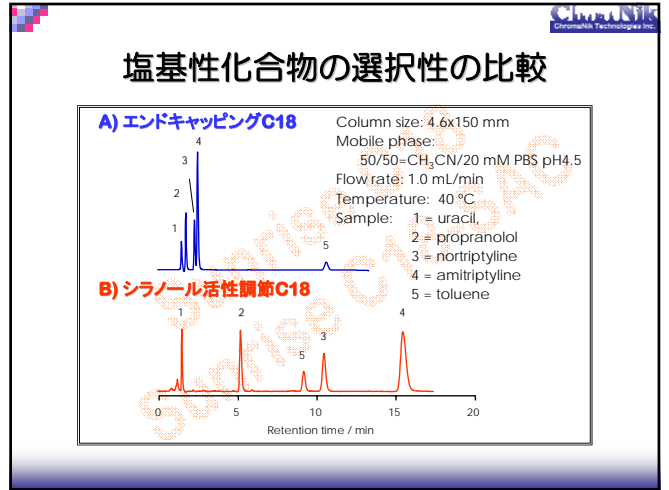
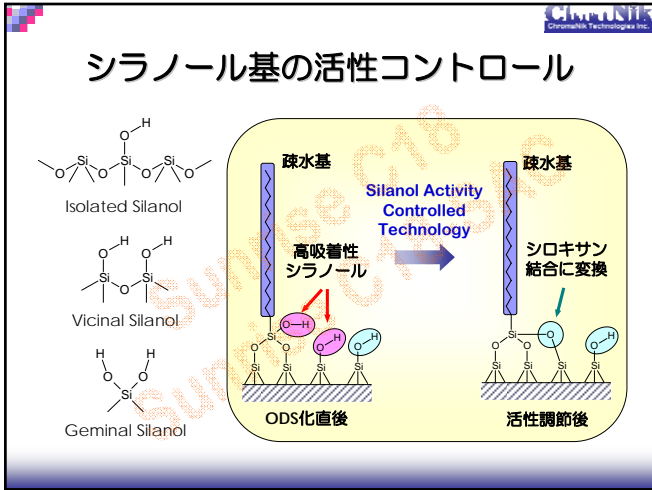
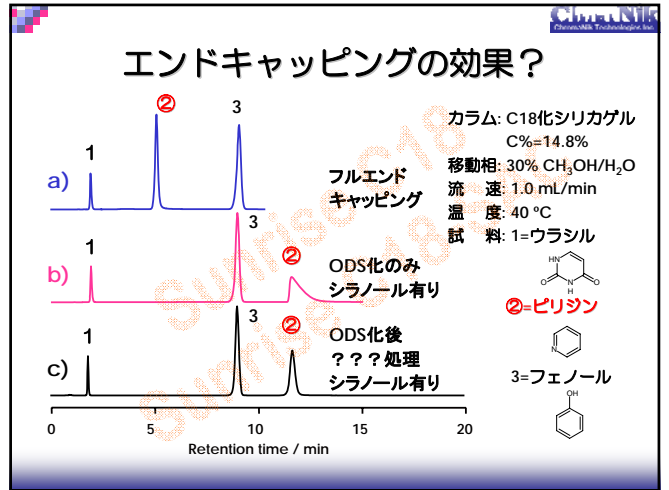




## Second Choice

① 逆相モードのままで選択性を大幅改善  
**ChromaNik Sunrise C18-SAC**

② 保持の小さい成分の分離の改善  
**ZIC®-HILIC HPLC Column**



## シラノール活性の調節技術の効果

- ChromaNikでは、吸着活性の高いシラノールを選択的に低減させ、有効なシラノールのみを残存させる技術を開発しました
- この技術の導入により高密度エンドキャッピングが可能となり、塩基性化合物のピーク形状を大幅に改善させることができました **— Sunrise C18**
- また、活性調節後の高水和性シラノールをエンドキャッピングすることなく、固定相中に残存させたことにより、水素結合性/イオン性相互作用がプラスされた今までにない逆相分離モードを創出することができました **— Sunrise C18-SAC**

## ChromaNik Sunrise C18-SAC

- 高純度シリカゲルにオクタデシルシランを結合後、シラノール活性調節処理を行い、エンドキャッピング処理を行わずにシラノールを残存させました
  - 細孔径：12nm，比表面積：340m<sup>2</sup>/g，炭素量：14%
- シラノール基に基づく相互作用（水素結合/イオン交換等）が加味されて分離が行われます
- 酸性条件下ではイオン交換相互作用が強く働きますので、緩衝液/塩濃度で分離の調節が可能です

## イオン交換クロマトグラフィにおける保持

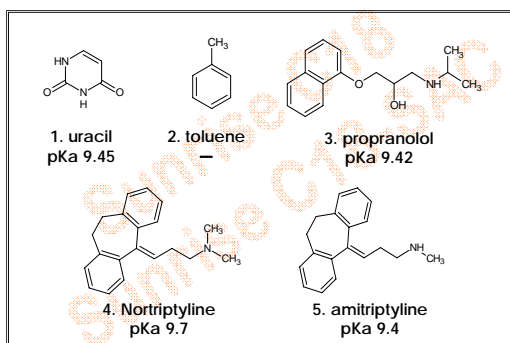
- カラムと溶離液の種類が決定されると、 $\log k$ （保持指数の対数）と $\log [A]$ （溶離剤イオン濃度の対数）間に直線関係があり、その傾きは、 $-z_A/z_B$ です

$$\log k = -\frac{z_B}{z_A} \log [A] + \frac{z_B}{z_A} \log [\bar{A}] + \log \frac{V_r}{V_m} + \frac{1}{z_A} \log K_A^B$$

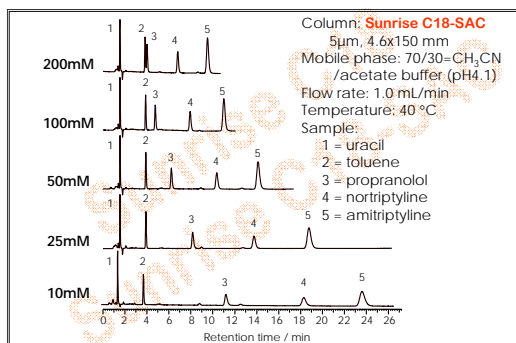
- $A$ ：溶離剤イオン， $B$ ：測定イオン， $k$ ： $B$ の保持指数，
- $z_A, z_B$ ：各イオンの電荷， $V_r, V_m$ ：カラム内の樹脂体積と移動相体積，
- $K_A^B$ ：選択係数

※上式は広濃度域で成立しないとされますが、実用使用濃度範囲は1桁以内ですので直線関係は成立します

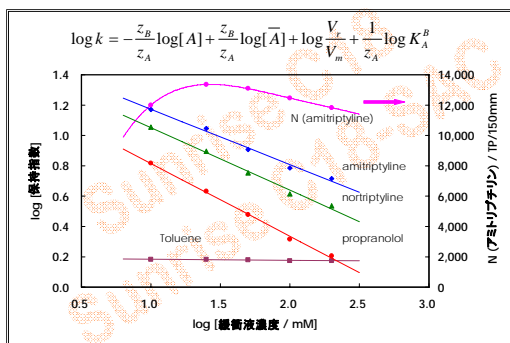
## 評価用化合物の化学構造と酸解離指数



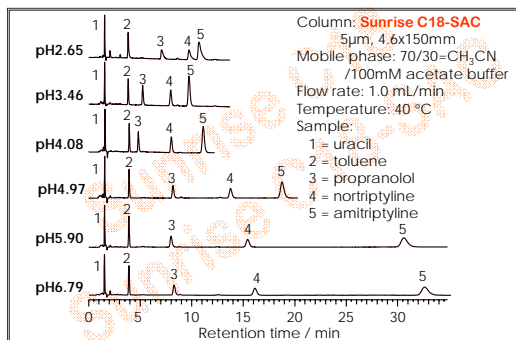
## 異なる緩衝液濃度でのクロマトグラム



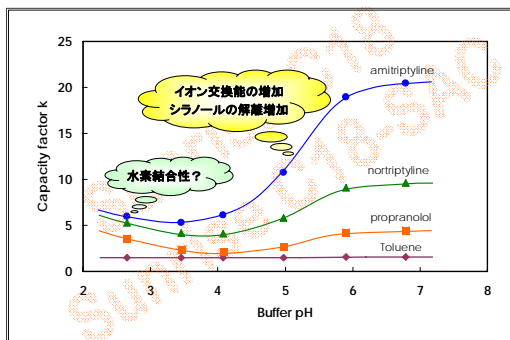
## 緩衝液濃度と保持指数との関係



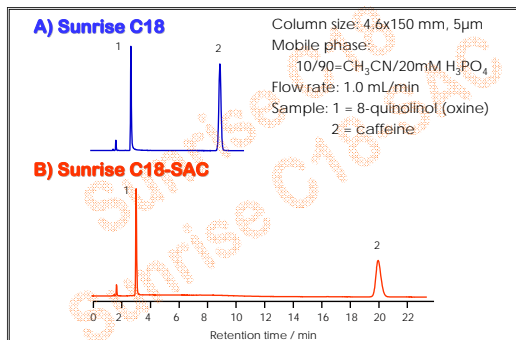
## 異なる緩衝液pHにおける分離



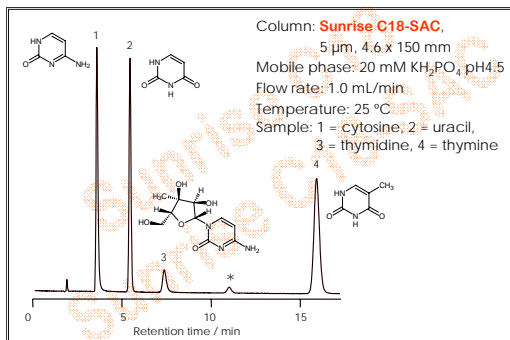
## 緩衝液pHと保持指数との関係



## 8-キノリノール/カフェインの分離例



## 核酸塩基類の分離例



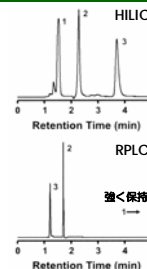
## 極性/親水性化合物だけを保持できたら...

- 逆相モードと溶出順序が逆転できたら...
  - C18に保持し難い親水性化合物の分離が可能に!
  - 疎水性化合物の残存による性能が劣化がなくなる!
- それも、単純な分配モードで分離ができたら...
  - 水-有機溶媒系で親水性化合物の分離が可能に!
  - イオン抑制のために強酸/強塩基を使用しないでよい!
  - イオンペア剤を使用しないのでLC-MSと結合可能に!
  - イオン交換のような煩雑な緩衝液調整から開放される!

## 親水性相互作用クロマトグラフィー

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography : HILIC

- 対象成分/親水性固定相間の親水性相互作用に基づいて分離されます
- HILICモードでは、親水性の高い化合物ほど強く保持されます
- 多くの場合、溶出順序は逆相モードとは逆になります
- 逆相型カラムでは保持され難く、ポイドボリューム近くに溶出する成分の分離にHILICは最適です
- 安定した水和特性を持ち、保水性の高い充填剤が必要となります



HILICとRPLCによるペプチドの分離  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/10 mM AcONH<sub>4</sub> (pH 7)  
 (HILIC) 65/40 = CH<sub>3</sub>CN/10 mM AcONH<sub>4</sub> (pH 7)  
 (RPLC) 95 = CH<sub>3</sub>CN/10 mM AcONH<sub>4</sub> (pH 7)  
 Sample: 1 = Phe-Gly-Gly-Phe, 2 = Leu-Gly-Gly, 3 = Gly-Gly-Gly

## ZIC®-HILIC/pHILICの官能基構造

CCCC[N+](C)(C)CCCS(=O)(=O)[O-]

スルホベタイン型官能基

両性イオン “荷電しかも中性”

- 安定で強い水和相を形成
- 静電的相互作用が低い

分子内塩を形成

★ Chaotropic order  
 Anion: TCA > ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > CH<sub>3</sub>acetate > F<sup>-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>  
 Cation: Ca<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > Li<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>

## 塩基性ペプチドの保持

Column: ZIC®-HILIC, bare silica column, 100 × 4.6 mm i.d.  
 Mobile phase: 40 % acetonitrile in CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (50 mM, pH 6.5)  
 Sample: bradykinin (pI 12)

zwitterionic column      bare silica column

陽イオン変換相互作用が加味される

Retention Time (min)

## HILICにおける溶媒強度

Retention factor k

Concentration of organic solvent / %

acetonitrile

methanol

CH<sub>3</sub>CNのほうが強く保持

HILICにおける溶媒強度

THF < acetone  
 < acetonitrile < IPA  
 < ethanol < water

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

## 芳香族有機酸の分離例

Column: ZIC®-pHILIC, 100 x 4.6 mm i.d.  
 Mobile phase: (left) 75:25 = acetonitrile/CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (17 mM, pH 6.8)  
 (right) 75:25 = acetonitrile/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (17 mM, pH 9.6)  
 Sample: 1 = gentisic acid, 2 = protocatechuic acid, 3 = isoprotic acid

イオン化を高めると保持も分離も改善

Retention Time (min)

## 核酸塩基の分離例

Column: ZIC®-HILIC 150 x 2.1 mm, 5 μm  
 Eluent: 80% acetonitrile/20% 25 mM CH<sub>3</sub>COOH, 2.5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>  
 Flow rate: 0.1 mL/min, Detection: UV at 254 nm  
 Sample: 1 = thymine, 2 = uracil, 3 = adenine, 4 = guanine, 5 = cytosine

Retention Time (min)

## 極性化合物のための Second Choice

- **First Choice** はフルエンドキャップ型C18カラム
  - First Trial Conditionでの分離結果を見て、分離を改善
  - まず、**ChromaNik Sunrise C18**でトライして下さい！
- **Second Choice ①** 選択性の異なる固定相の使用
  - 水素結合性/イオン性相互作用による分離の改善
  - 特に塩基性薬物の分離改善には - **Sunrise C18-SAC !!**
- **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 !!**