

極性化合物分析にも利用できる逆相系 カラムC28・C30・PFPの特徴

クロマニックテクノロジーズ
長江徳和 塚本友康

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>

分離を変えるには・・・

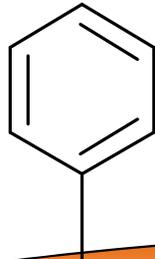
疎水性相互作用

アルキル基



π - π 相互作用

フェニル基

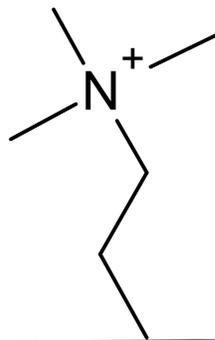


相互作用の異なるカラムに交換する

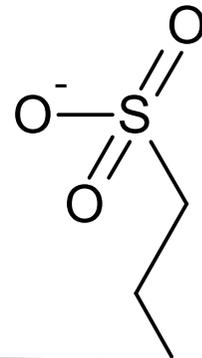
親水性相互作用

イオン交換相互作用

陰イオン
交換基

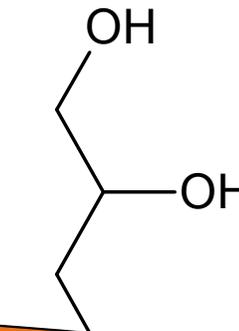


陽イオン
交換基

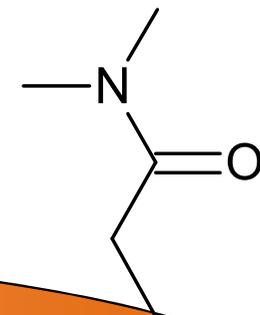


水素結合

ジオール基

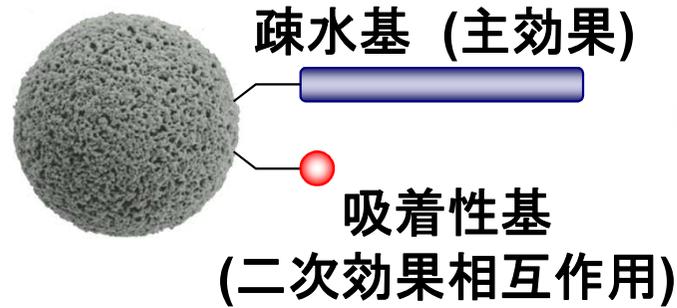


アミド基

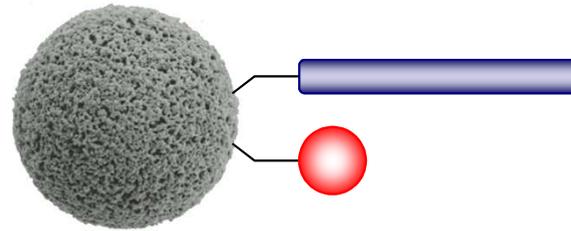
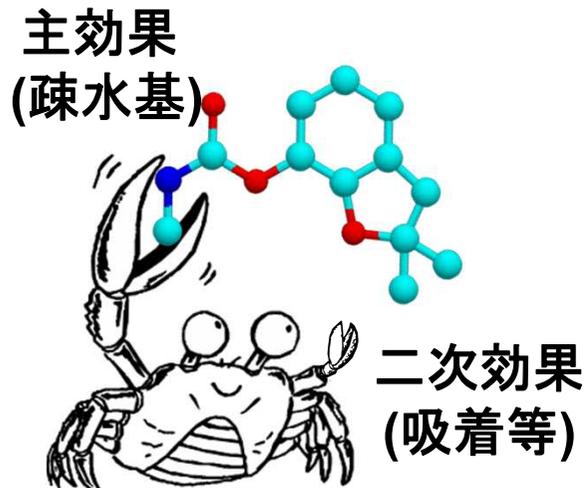


カラム充填剤基材

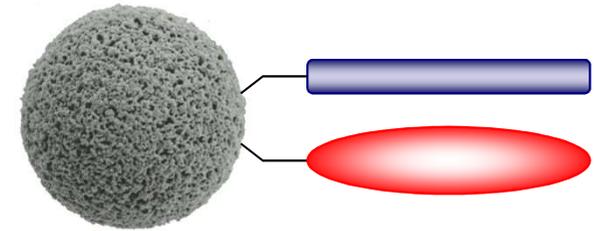
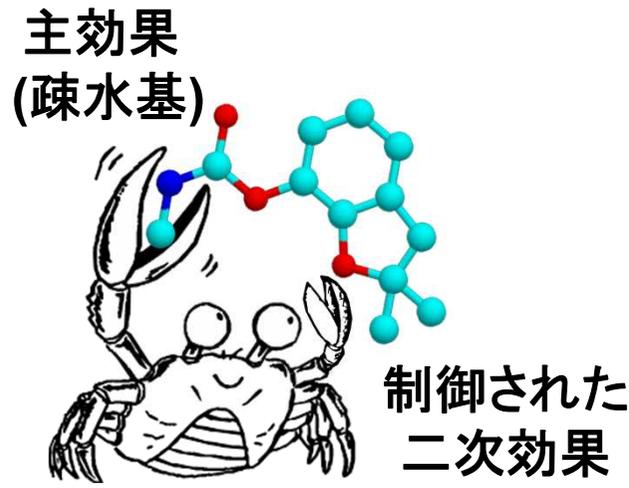
分離を変えるには・・・2



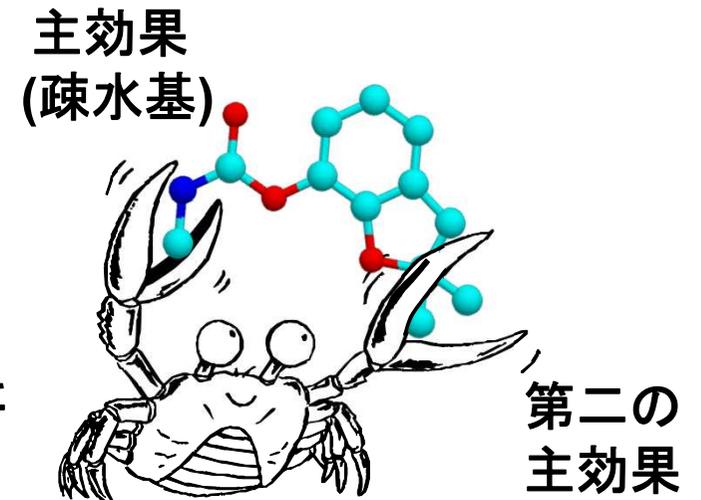
既存の分離剤



二次効果相互作用
制御型分離剤



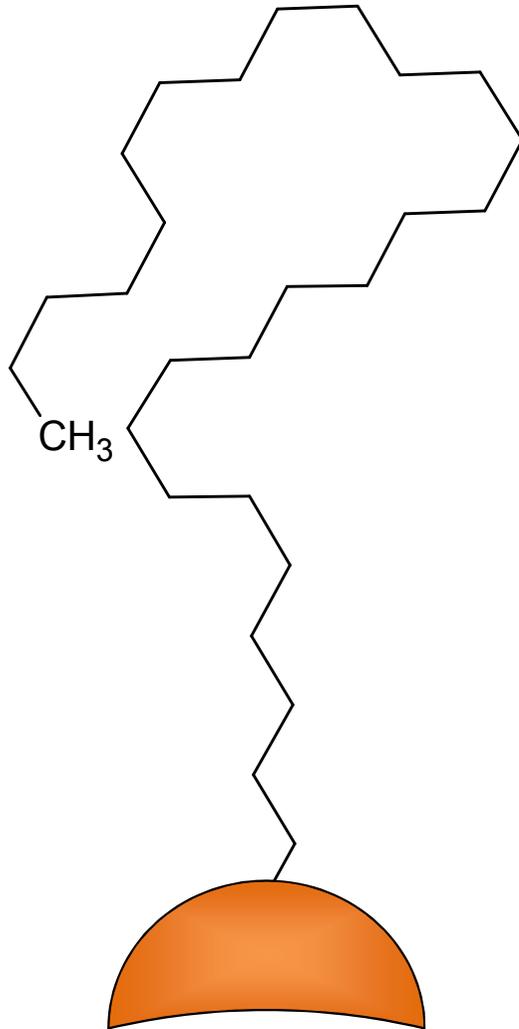
第二主効果を持つ
二足型分離剤



本日の内容

- C28カラムの紹介(C30)
 - 100%水系移動相で使用出来る理由
 - 親水性化合物の分離への適用
- PFPカラムの紹介(ペンタフルオロフェニル)
 - PFPカラムの分離の特長
 - PFPカラムでHILIC? イオン交換?

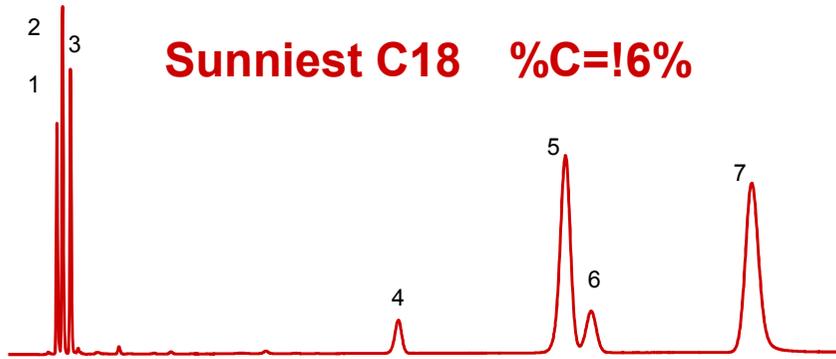
オクタコシル(C28)



- 疎水性相互作用が主な相互作用

- 水系の移動相での保持の安定性が高い
- 立体選択性が高い
- 極性基導入型ODSより、耐久性が高い

C18とC28の標準試料の分離



Column: Sunniest C18, 5 μ m 150 x 4.6 mm
 Sunniest RP-AQUA, 5 μ m 150 x 4.6 mm
 Sunniest C18, 5 μ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Pressure: 5.4 MPa

Sample: 1 = Uracil,

2 = Caffeine,

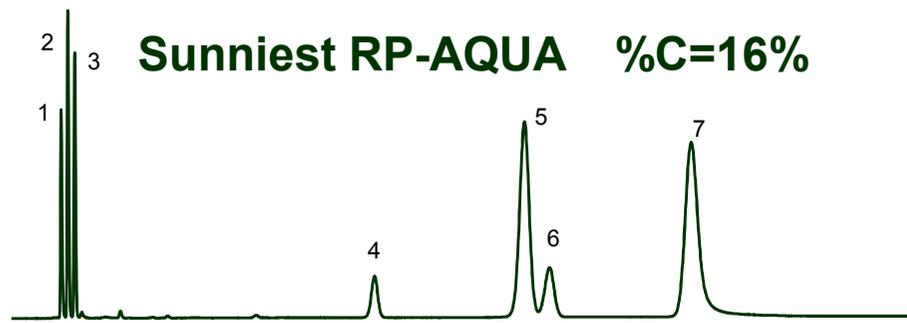
3 = Phenol,

4 = Butylbenzene, (N=15,700)

5 = o-Terphenyl, (N=15,000)

6 = Amylbenzene, (N=15,300)

7 = Triphenylene, (N=14,500)

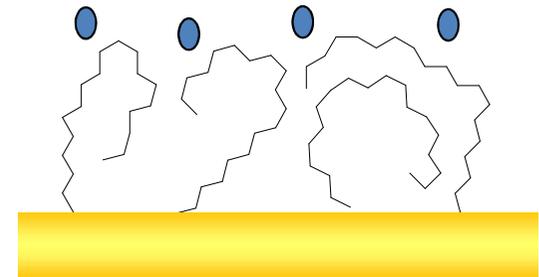


0 5 10 15 20 25 30 35

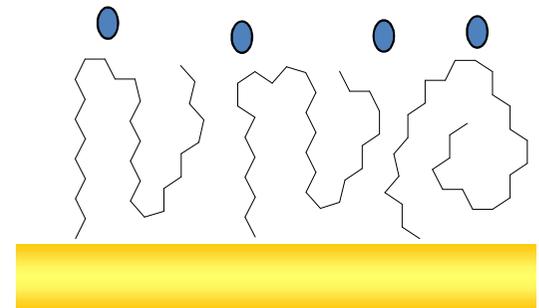
Retention time/min

ODSとの比較1

C18

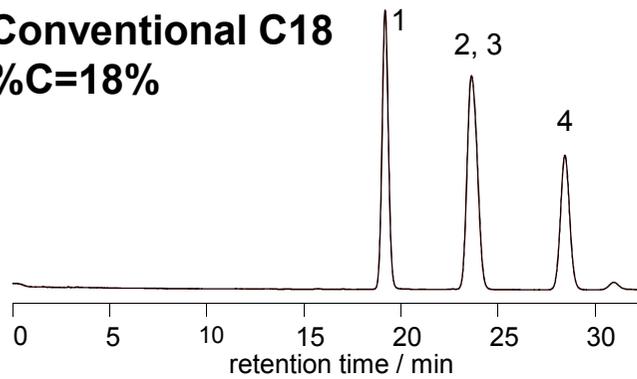


C28

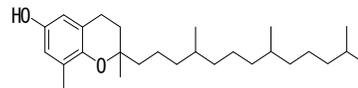


固定相容量は同じ

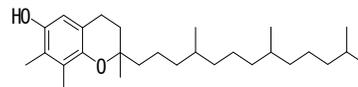
Conventional C18 %C=18%



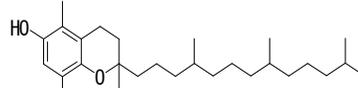
Column size: 4.6x250 mm
Mobile phase: 97/3=CH₃OH/H₂O
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 25 °C
Detection: UV at 295nm
Sample: 1=δ-Tocopherol



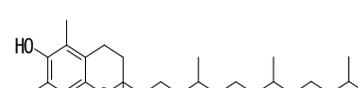
2=γ-Tocopherol



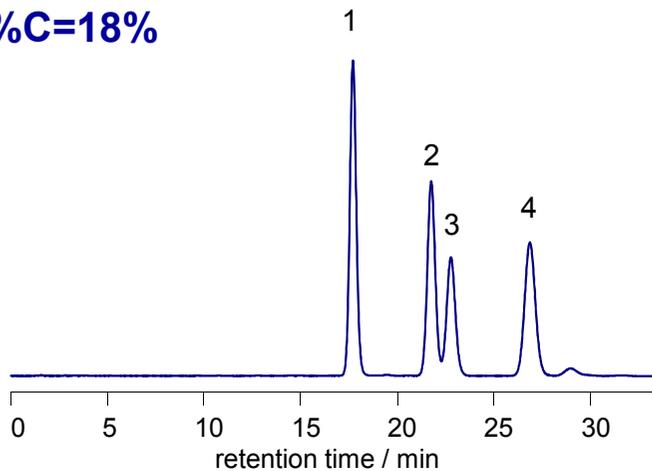
3=β-Tocopherol



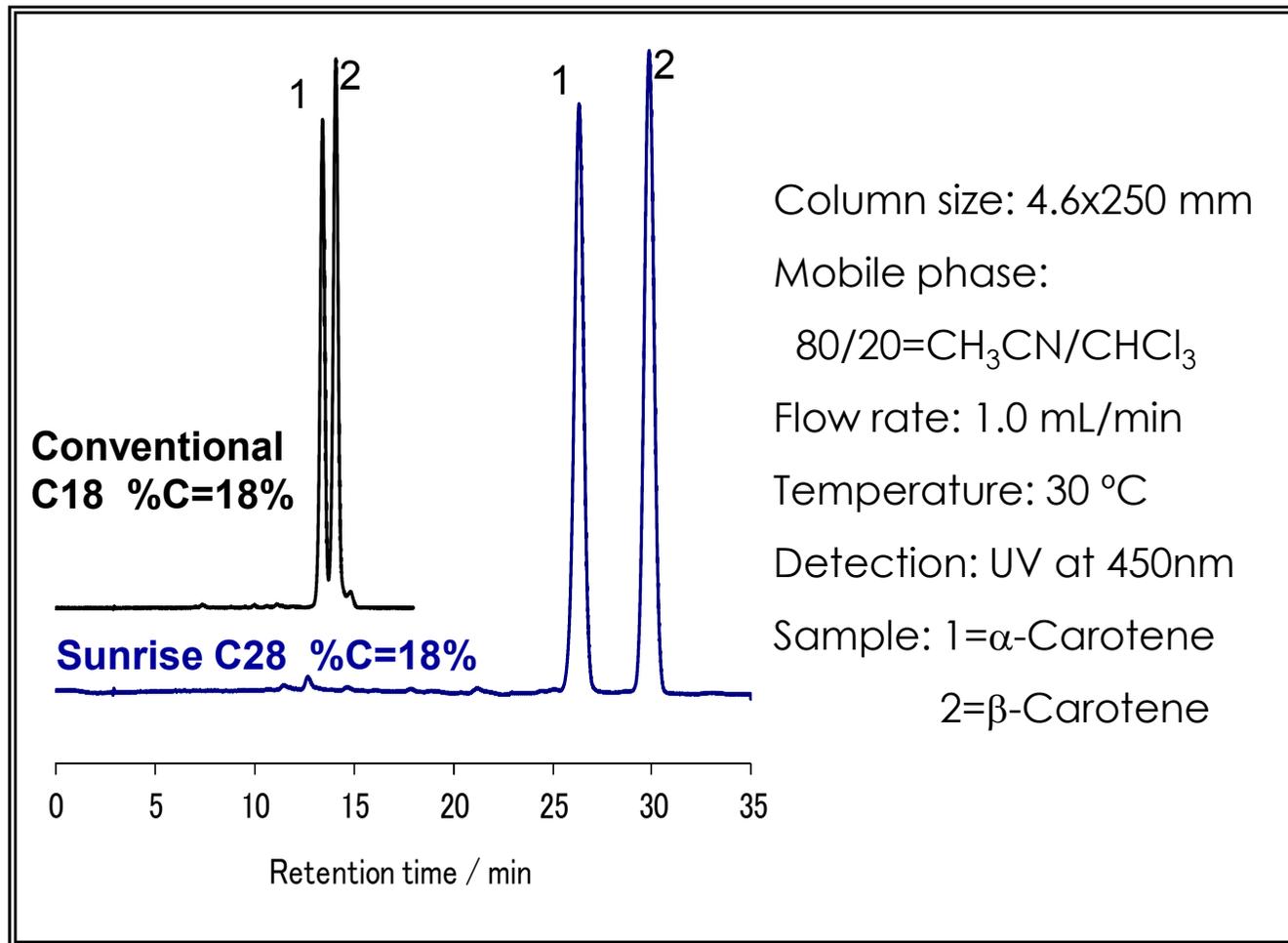
4=α-Tocopherol



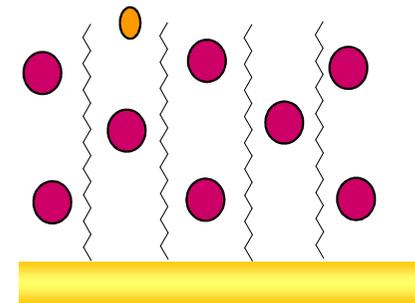
Sunrise C28 %C=18%



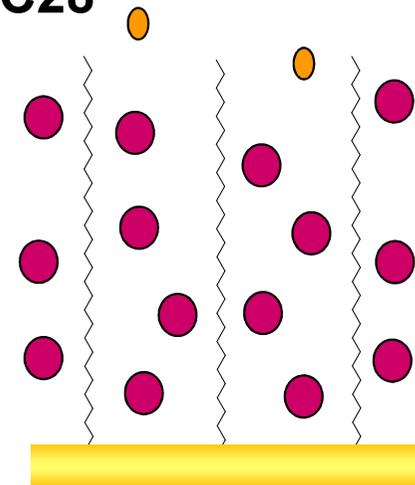
ODSとの比較2



C18

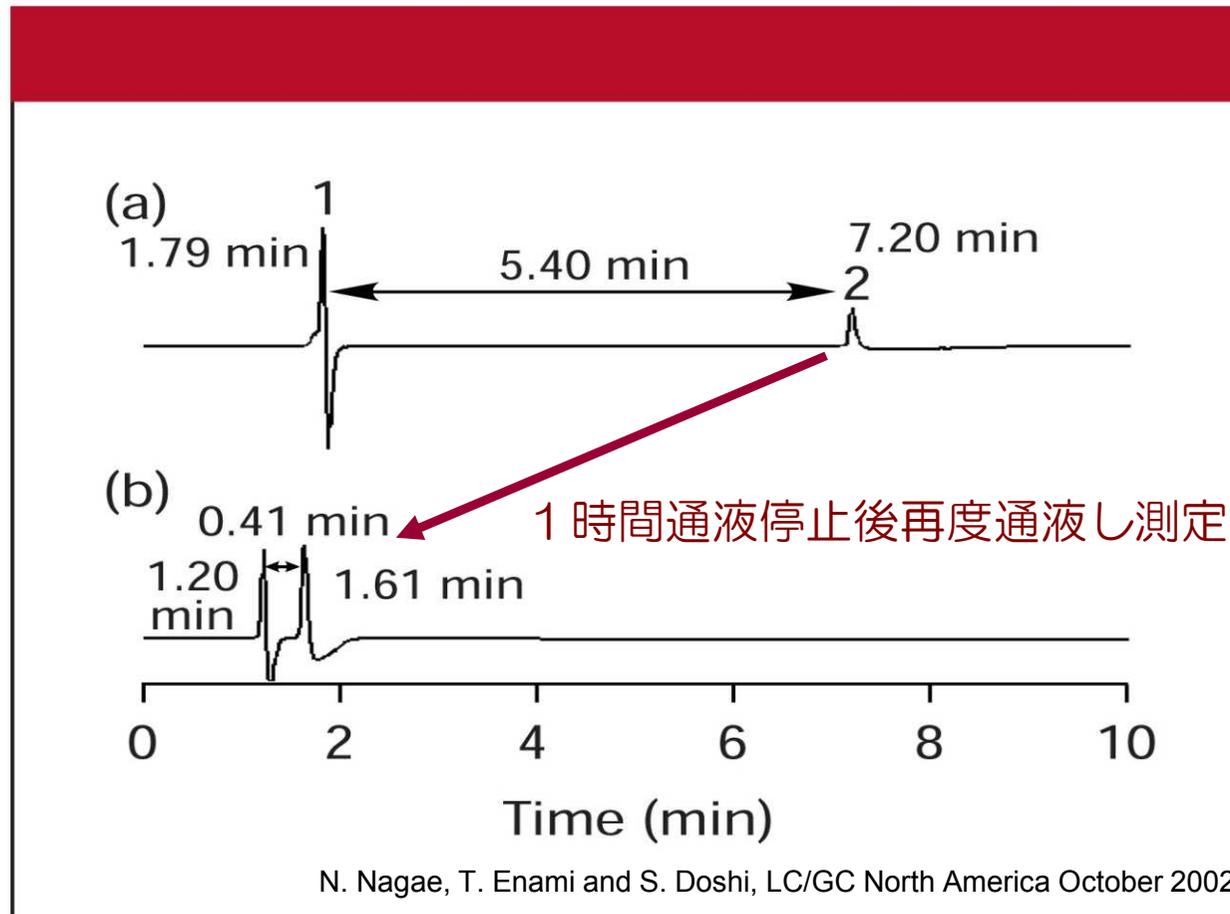


C28



固定相容量は2倍

ODSカラムの保持挙動（水100%）



条件

カラム：ODS 4.6 x 150 mm

移動相：水

カラム圧力：6.0MPa

カラム出口以降：1.7MPa

流速：1.0 mL/min

温度：40 °C

検出：RI

試料：1. 亜硝酸ナトリウム
2. 2-プロパノール

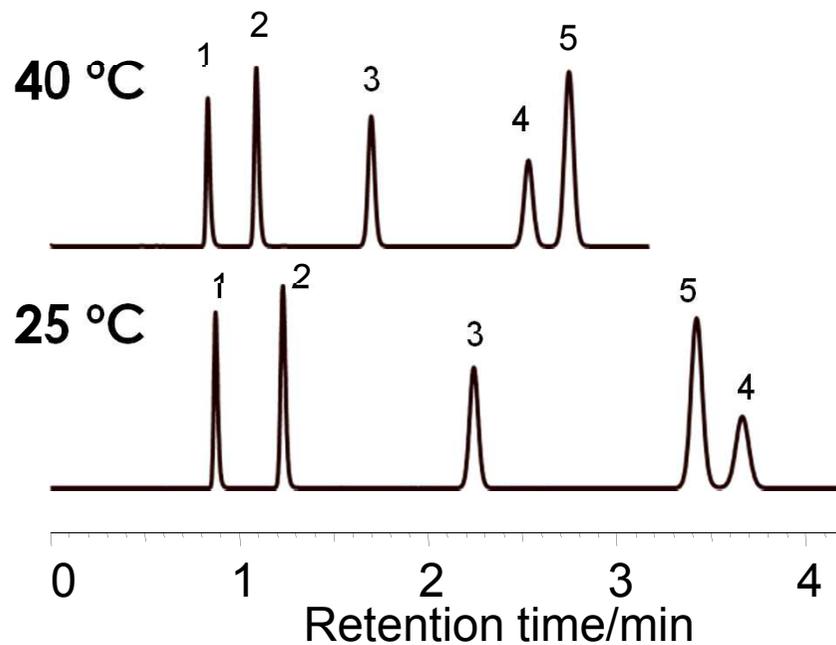
保持時間：5.40minから0.41minに減少



再現性がない

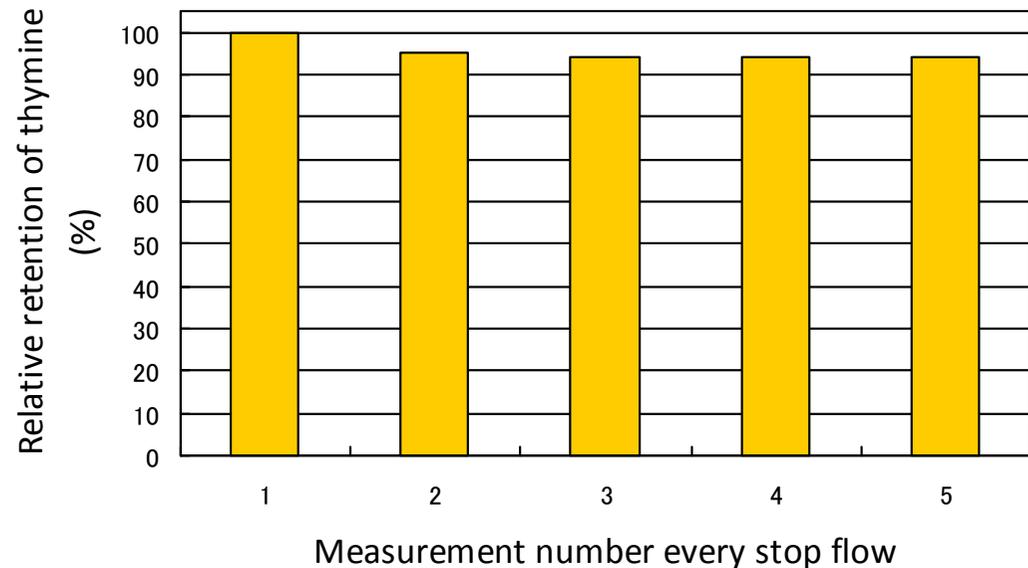
SunShell RP-Aqua(C28) の40 °Cでの保持

核酸塩基の分離



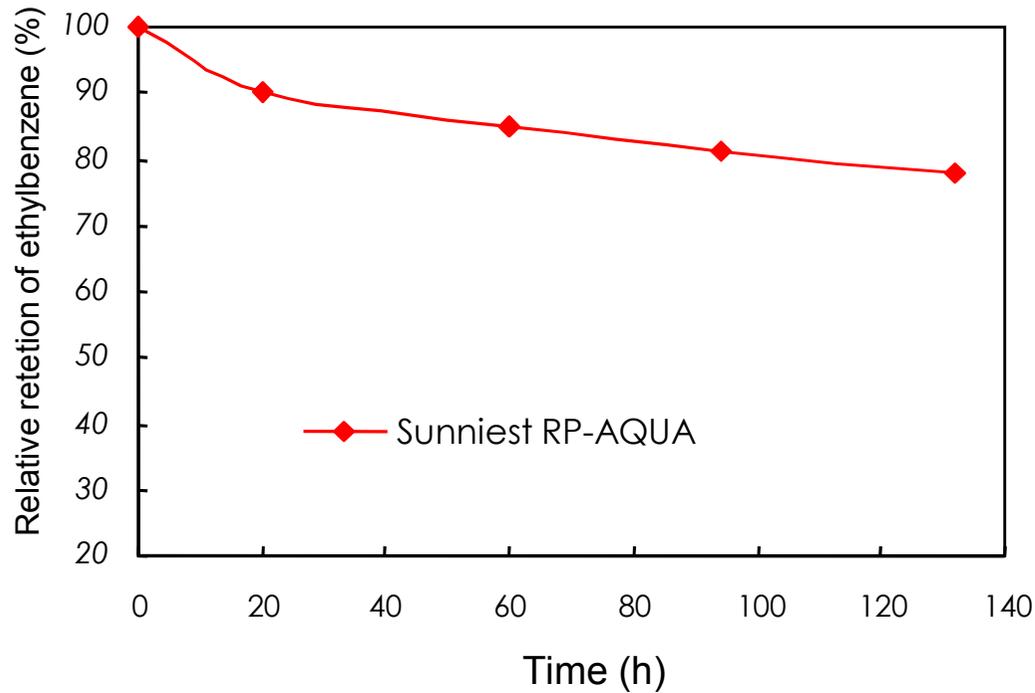
Column: SunShell RP-Aqua, 2.6 μm 75 x 4.6 mm
 Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C and 25 °C
 Sample: 1 = Cytosine, 2 = Uracil, 3 = Thymidine,
 4 = Uridine, 5 = Thymine

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)



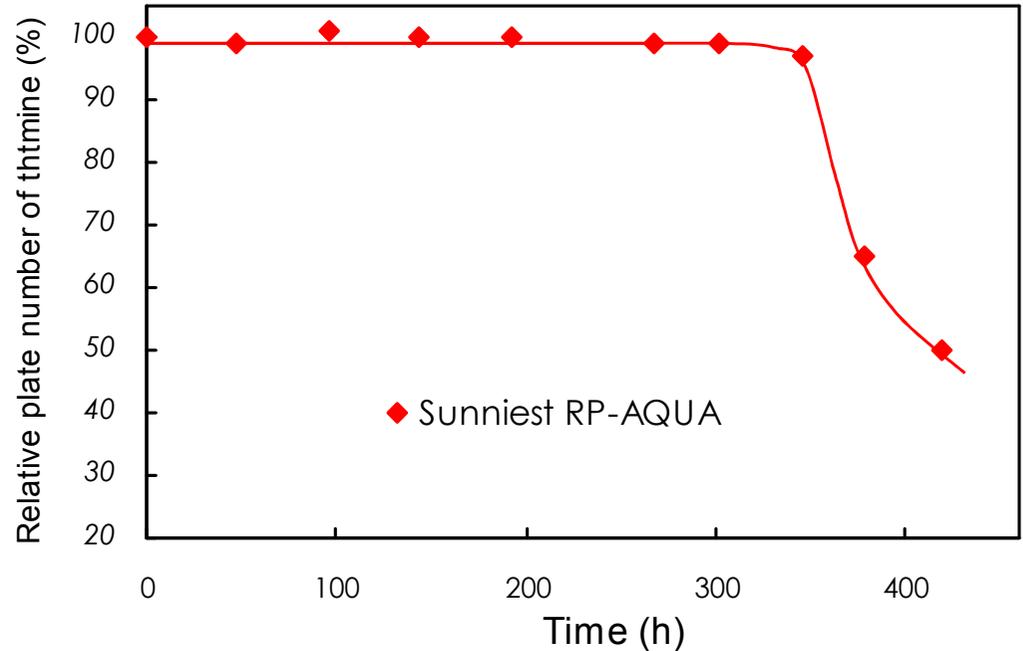
緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により、ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると、通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり、保持時間は大幅に減少しますが、SunShell RP-Aquaほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず、94%以上の再現性を示しました。

C28の酸性、塩基性条件下の耐久性



Durable test conditions

Column: Sunniest RP-AQUA, 5 μ m 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: 0.5% TFA
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 60 °C



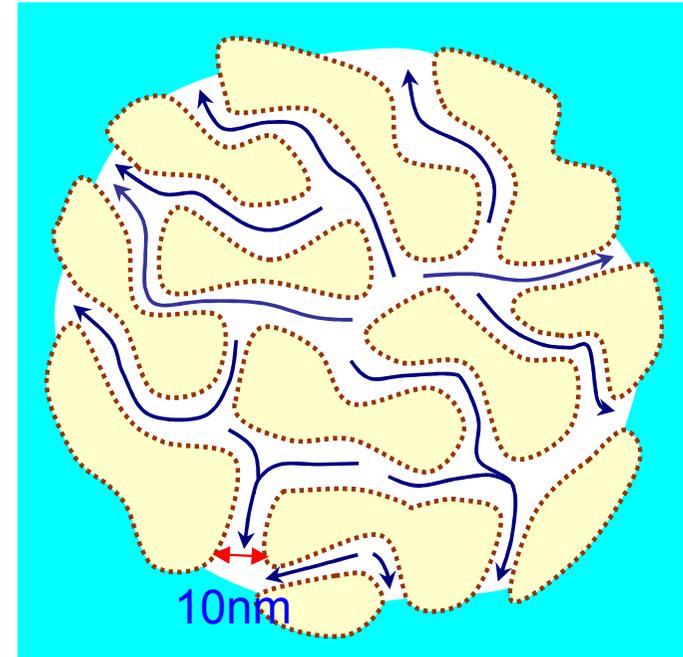
Durable test conditions

Column: Sunniest RP-AQUA, 5 μ m 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: 20mM Phosphate buffer pH8.0
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C

保持の減少は細孔からの移動相の抜け出し



内径0.5mmのガラス管内で赤インクは6cm上昇する。6cm上昇時に作用してる圧力は0.006気圧である。内径が $1\mu\text{m}$ では30m上昇し、3気圧の圧力が作用していることになる。



実際の充填剤の細孔径は約10nmであり、 $1\mu\text{m}$ の1/100である。毛管作用で発生する圧力は100気圧以上となる。

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

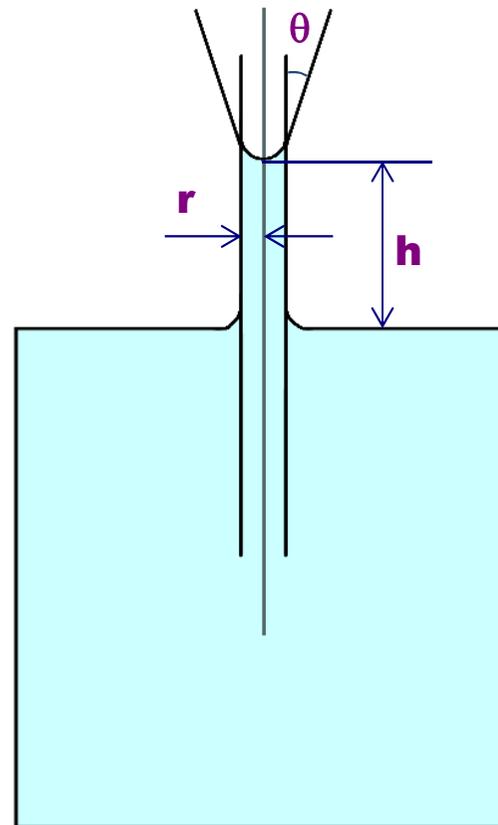
毛管現象の式:

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

γ : 表面張力

ρ : 液体の密度 (比重)

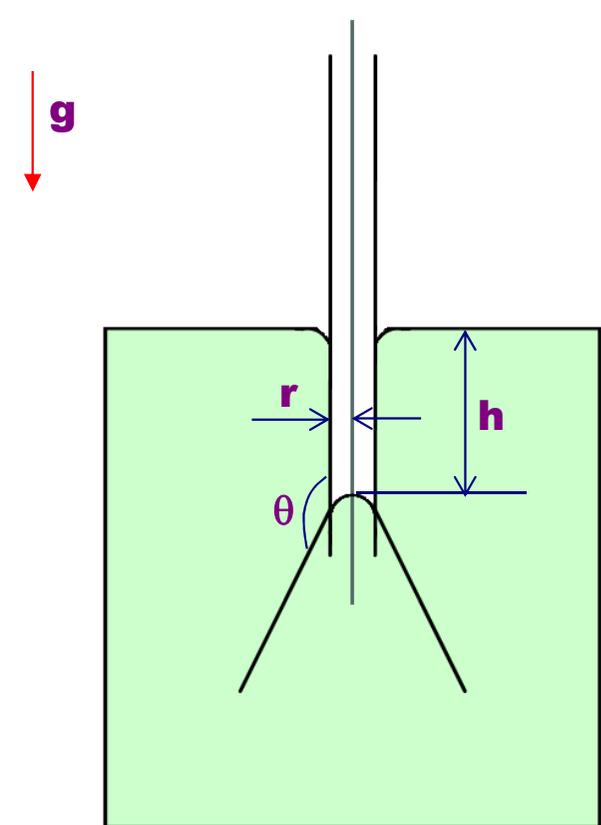
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



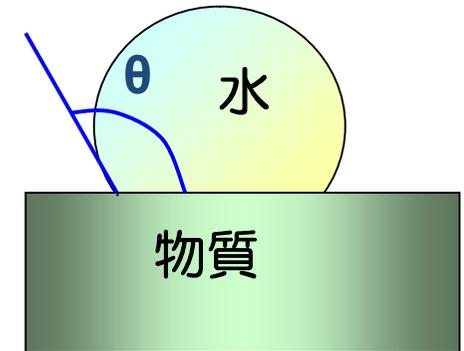
液体が管に濡れない場合

$$\theta > 90^\circ$$

撥水性と疎水性

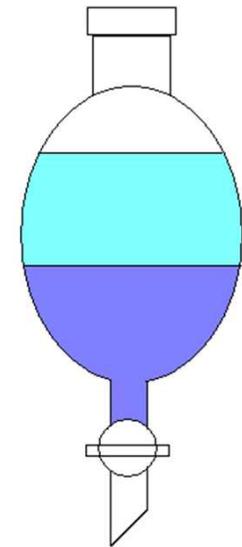
撥水性 → 水をはじく性質

『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くほど撥水性が強い』

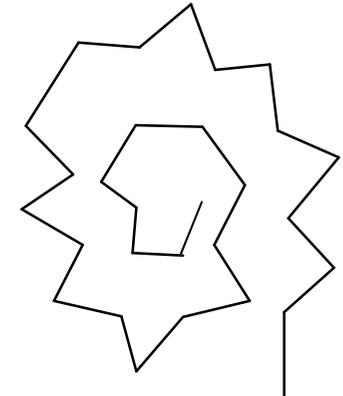
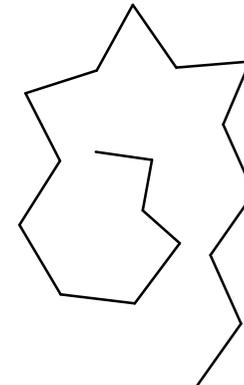
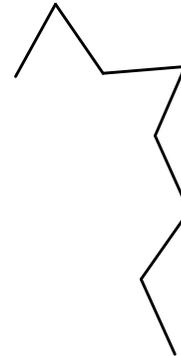
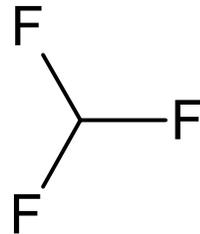


疎水性 → 水と混ざりにくい性質

物質を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 | Octane | Octadecane | Triacontane |
|-------------------|------------------|--------|------------|------------------------|
| 水の接触角(θ) | 120° | 140° | 126° | 108° |
| 分配係数(LogP) | 0.64 | 5.18 | 9.18 | 14.09 |
| 水への溶解度 (mg/L) | 4090 | 0.66 | 0.006 | 8.84×10^{-10} |

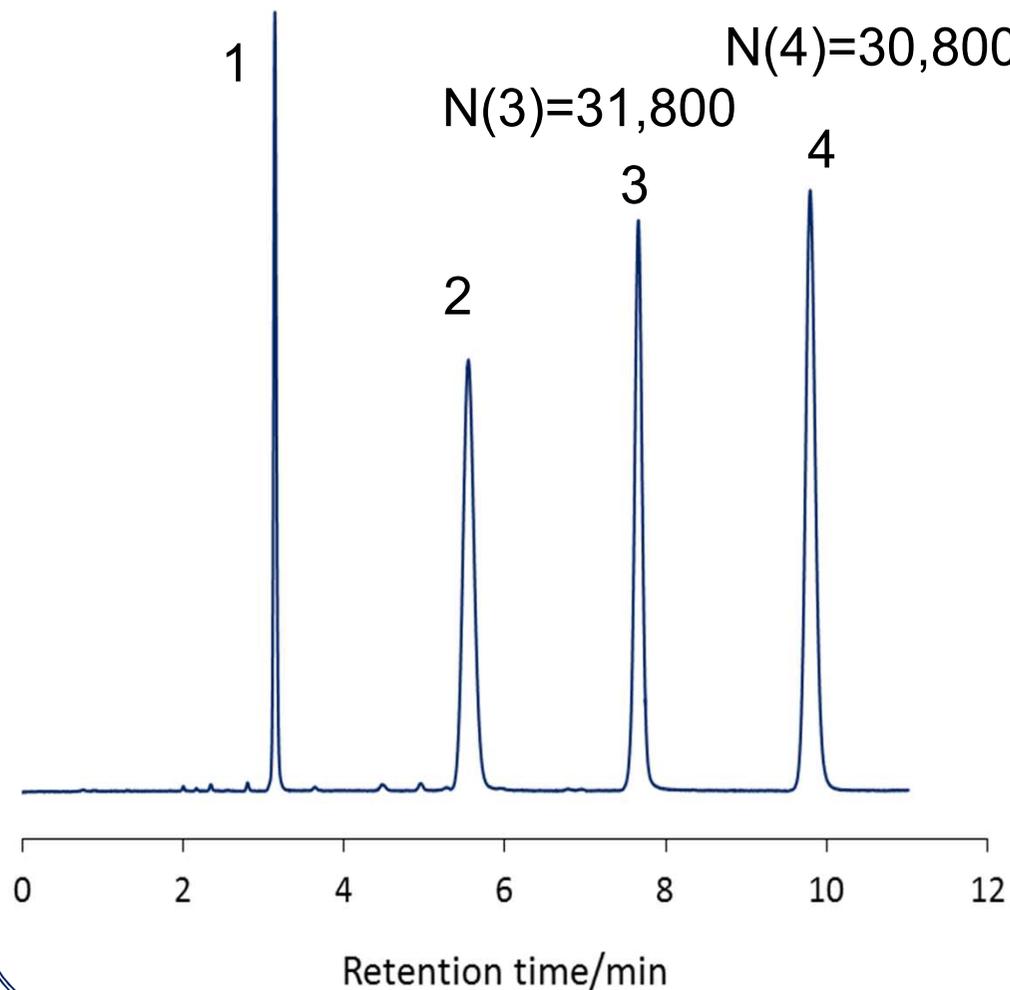
分析化学 Vol.59 No. 3 , P193-205(2010)

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 μ 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

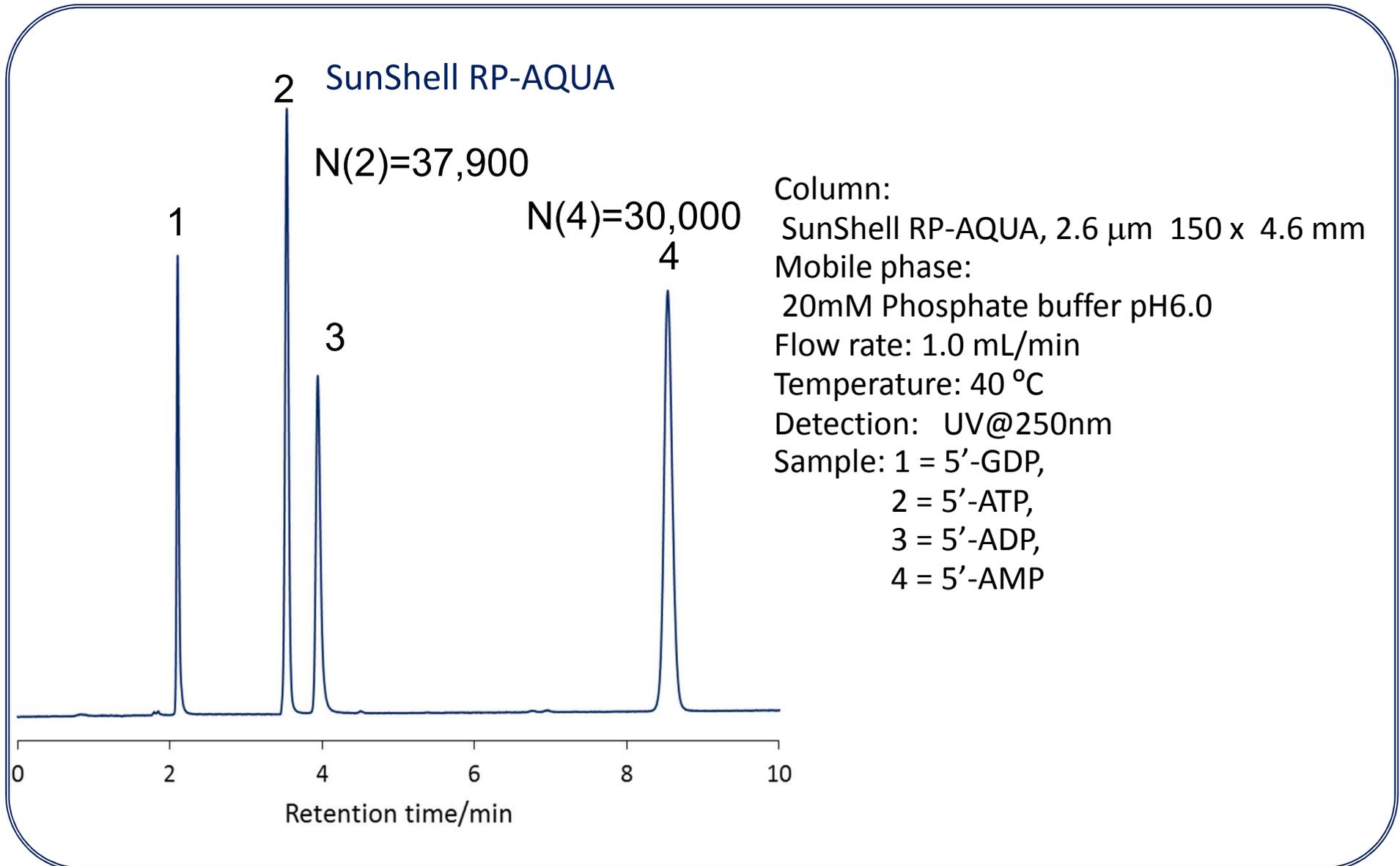
Sample: 1 = Nicotinic acid,

2 = Pyridoxal,

3 = Pyridoxine,

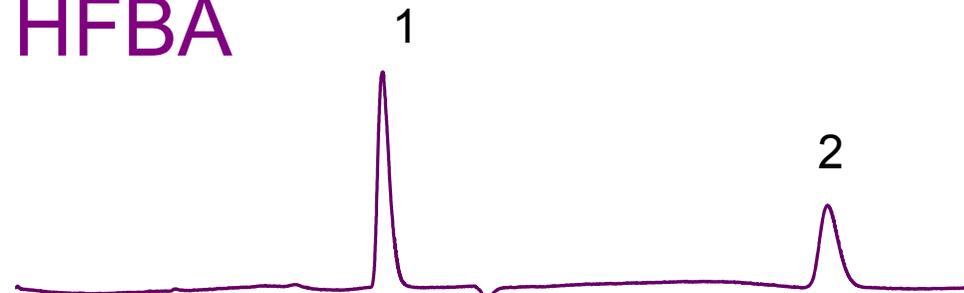
4 = Nicotinamide

ヌクレオチドの分離

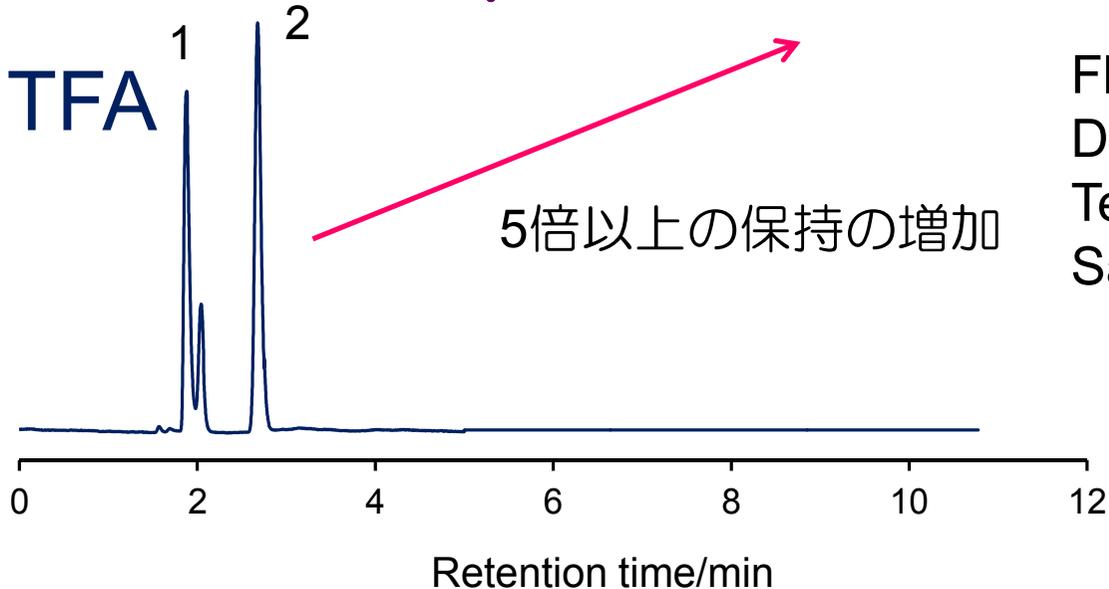


TFAとHFBAを用いた場合のアミノ酸の保持比較

0.1% HFBA



0.1% TFA



Column:

Sunrise C28 5 μ m
150 x 4.6 mm

Mobile phase:

0.1% HFBA and 0.1% TFA

Flow rate: 1.0 mL/min

Detection: RI and UV@210nm

Temperature: 30 °C

Sample: 1=D-alanine

2=D-alanine-D-alanine

アミノ酸の分離

Column: Sunniest RP-AQUA 5 μ m, 2.0x 150mm

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

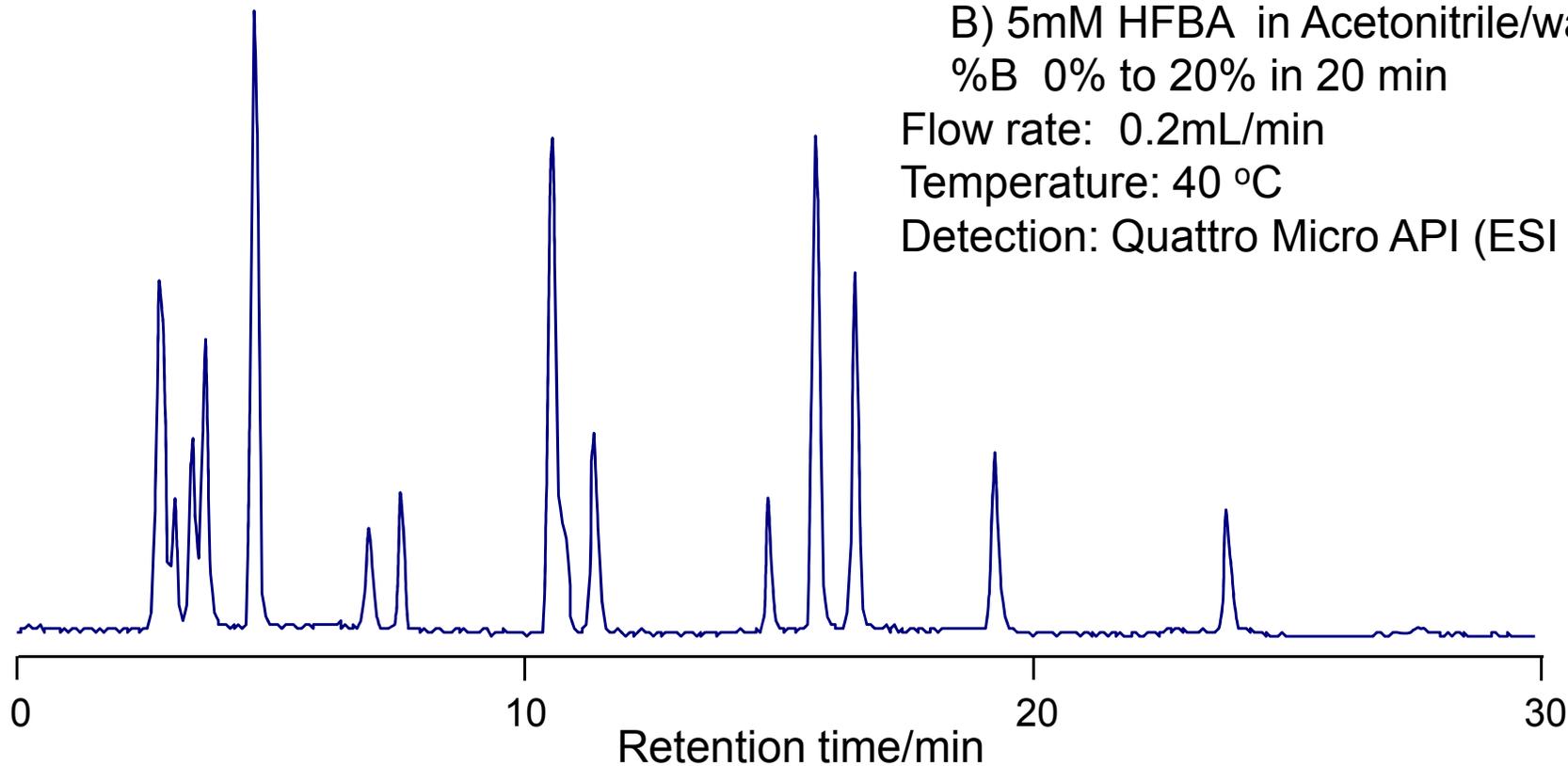
B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)

%B 0% to 20% in 20 min

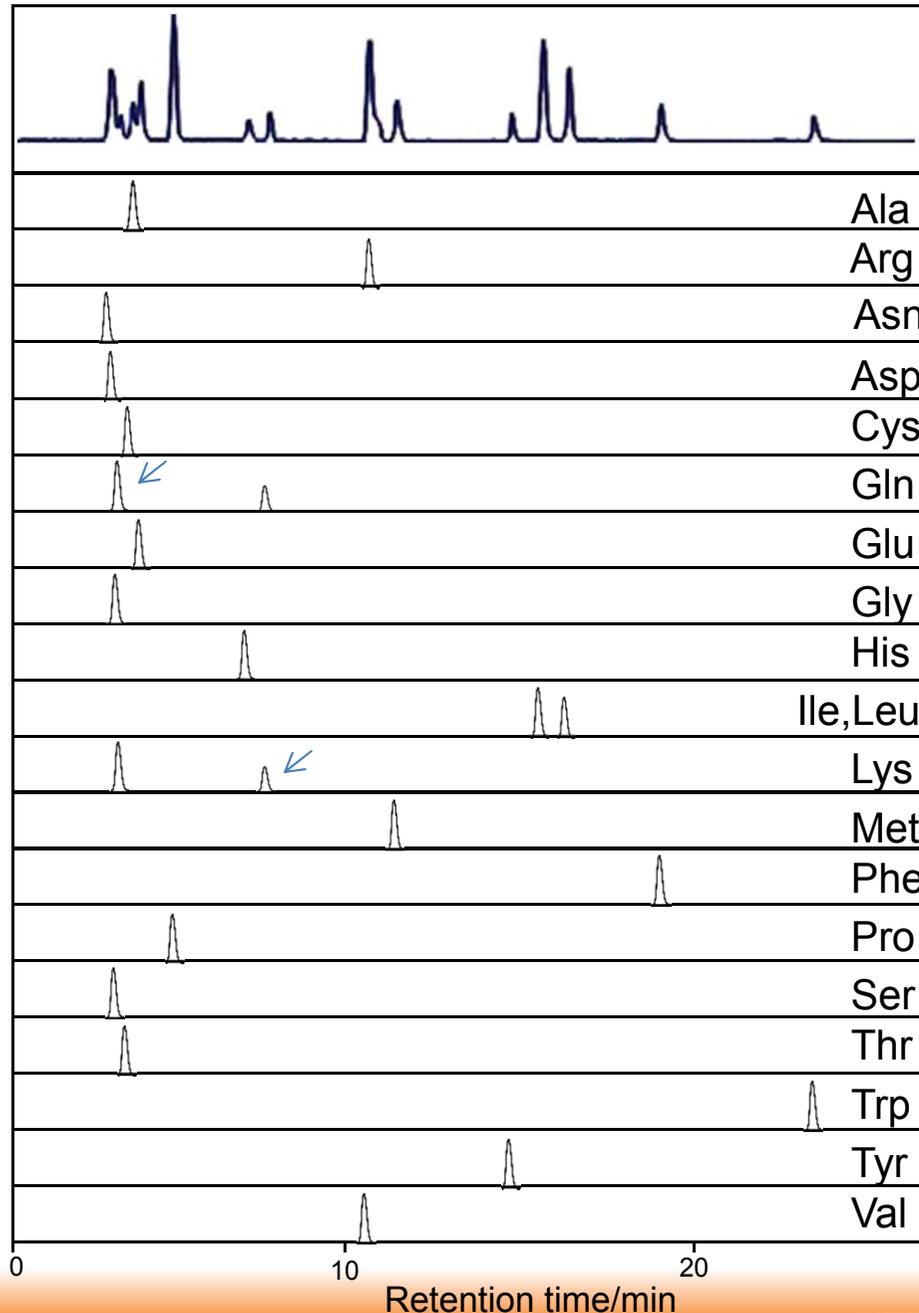
Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

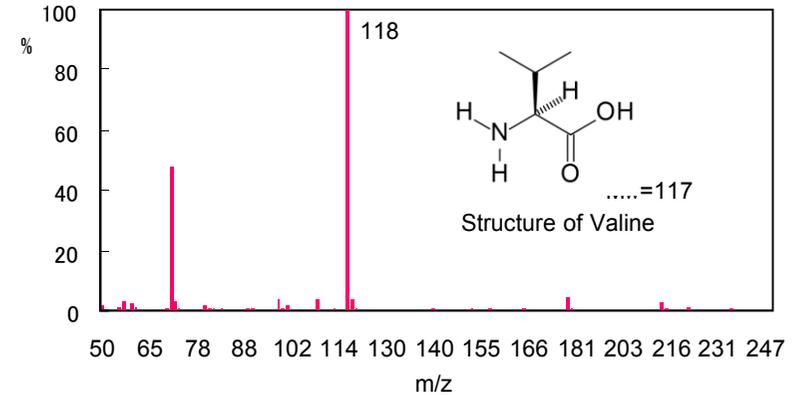


アミノ酸のLC/MS



m/z

90
175
133
134
122
147
148
76
156
132
147
150
166
116
106
120
205
182
118



Mass spectrum of Valine

Column: Sunniest RP-AQUA 5 μ 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

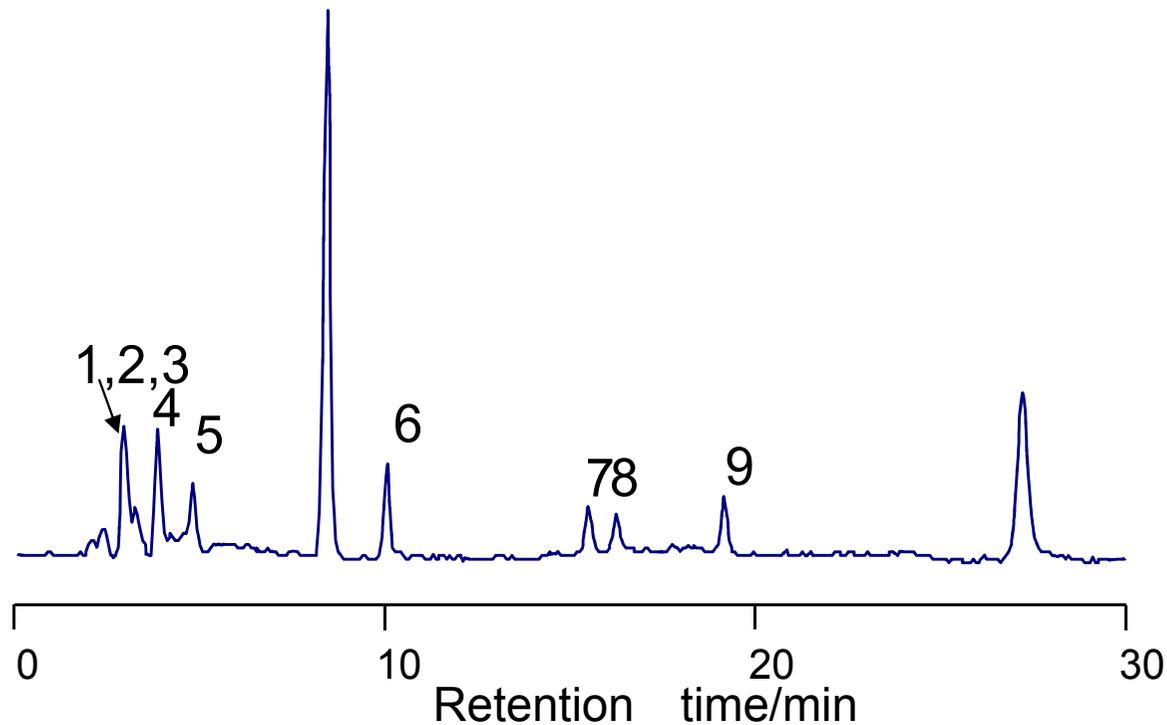
Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

アミノ酸の検出限界 (LC/MS)

| Analyze | Detection Limit ($\mu\text{mol/L}$) | Analyze | Detection Limit ($\mu\text{mol/L}$) |
|---------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|
| Ala | 3.2 | Leu | 0.55 |
| Arg | 3.7 | Lys | 3.1 |
| Asn | 3.9 | Met | 1.8 |
| Asp | 2.6 | Phe | 0.89 |
| Cys | 6.6 | Pro | 1.2 |
| Gln | 1.8 | Ser | 2.9 |
| Glu | 1.7 | Thr | 1.6 |
| Gly | 3.3 | Trp | 4.2 |
| His | 1.6 | Tyr | 2.1 |
| Ile | 0.57 | Val | 1.1 |

Detection Limit: S/N=3

紅茶中のアミノ酸のLC/MS



| | Analyte | Concentration (μmol/L) |
|---|---------|------------------------|
| 1 | Ser | 83.5 |
| 2 | Asp | 253 |
| 3 | Glu | 330 |
| 4 | Pro | 42.1 |
| 5 | His | 702 |
| 6 | Vai | 75.6 |
| 7 | Ile | 73.2 |
| 8 | Leu | 33.8 |
| 9 | Phe | 97.2 |

Column: Sunniest RP-AQUA 5μm, 2.0x 150mm

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

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

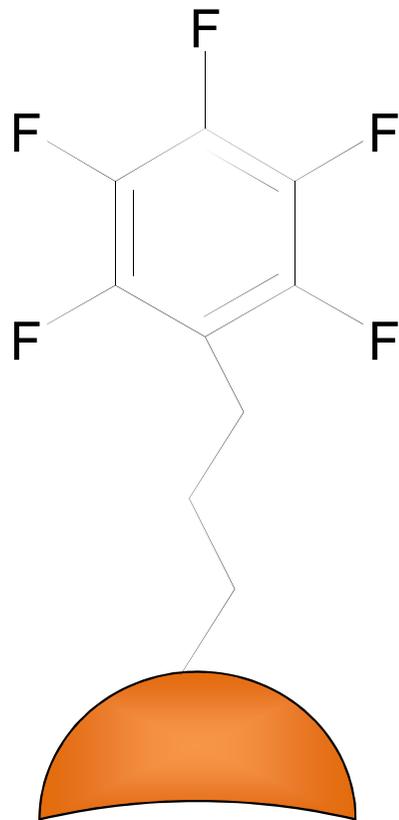
%B 0% to 20% in 20 min

Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

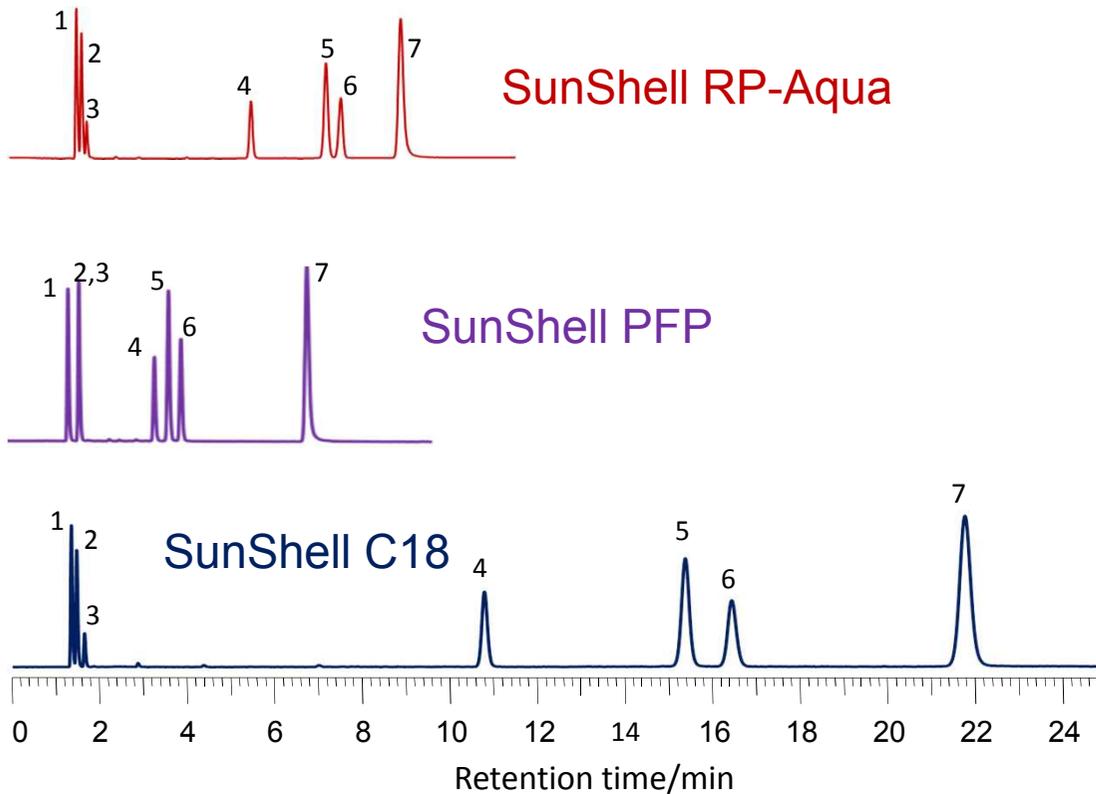
ペンタフルオロフェニル (PFP)



- 疎水性相互作用
- 水素結合性
- 双極子相互作用
- π - π 相互作用
- 静電的相互作用

- 極性化合物の保持が可能
- 立体選択性に優れている
- ハロゲン化合物の分離に有効

標準試料の分離



Column dimension: 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine,

3 = Phenol, 4 = Butylbenzene

5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene,

7 = Triphenylene

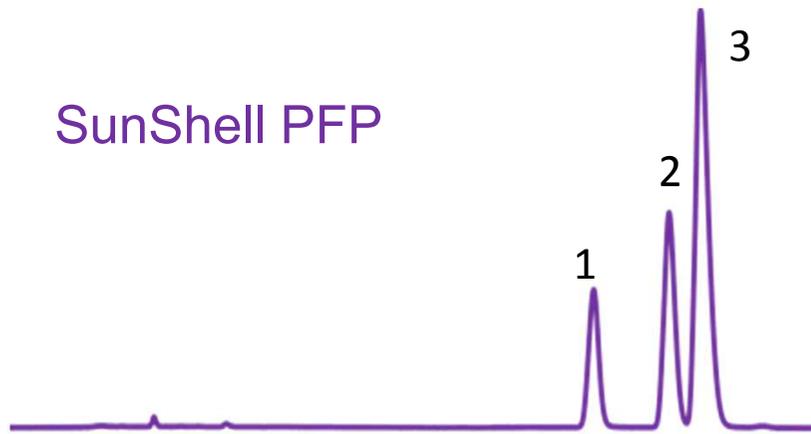
| | Hydrogen bonding (Caffeine/ Phenol) | Hydrophobicity (Amylbenzene/ Butylbenzene) | Steric selectivity (Triphenylene/ o-Terphenyl) |
|---------|---|--|--|
| RP-Aqua | 0.52 | 1.52 | 1.30 |
| PFP | 1.00 | 1.31 | 2.38 |
| C18 | 0.39 | 1.60 | 1.46 |

キシレン異性体の分離

SunShell C18



SunShell PFP



Retention time/min

SunShell C18, PFP 2.6 μ m 150 x 2.1 mm

Mobile phase:

CH₃OH/water=75:25 for SunShell C18

CH₃OH/water=60:40 for SunShell PFP

Flow rate: 0.3 mL/min

Temperature: 25 °C

Detection: UV@250nm

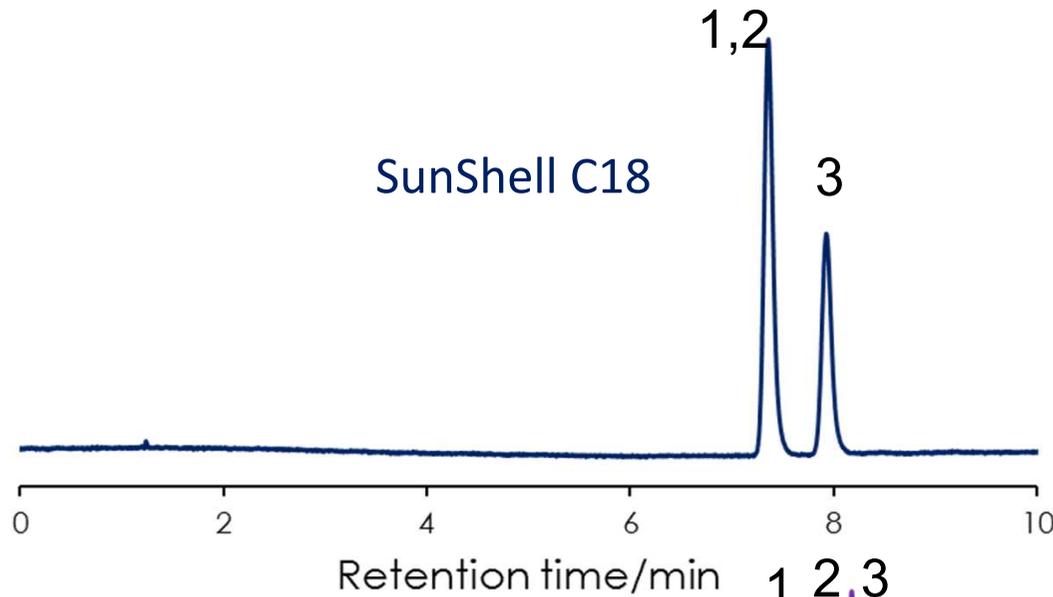
Sample: 1 = o-Xylene

2 = m-Xylene

3 = p-Xylene

SunShell PFPは異性体の分離についてもC18と異なる分離パターンを示します。

クレゾール異性体の分離



Column:

SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm

SunShell PFP, 2.7 μm 150 x 4.6 mm

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

Flow rate: 1.0 mL/min

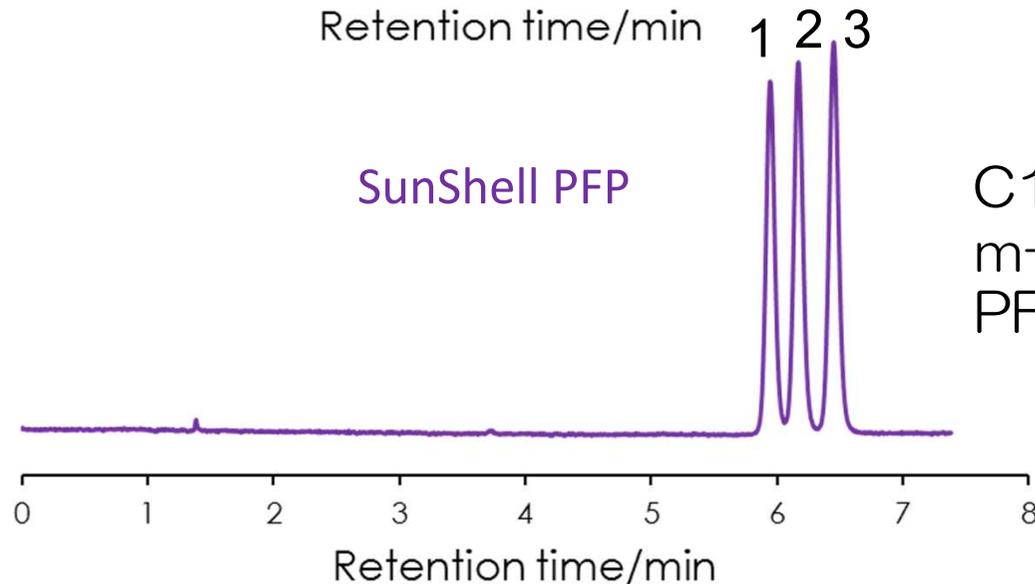
Temperature: 25 $^\circ\text{C}$

Sample: 1 = p-Cresol

2 = m-Cresol

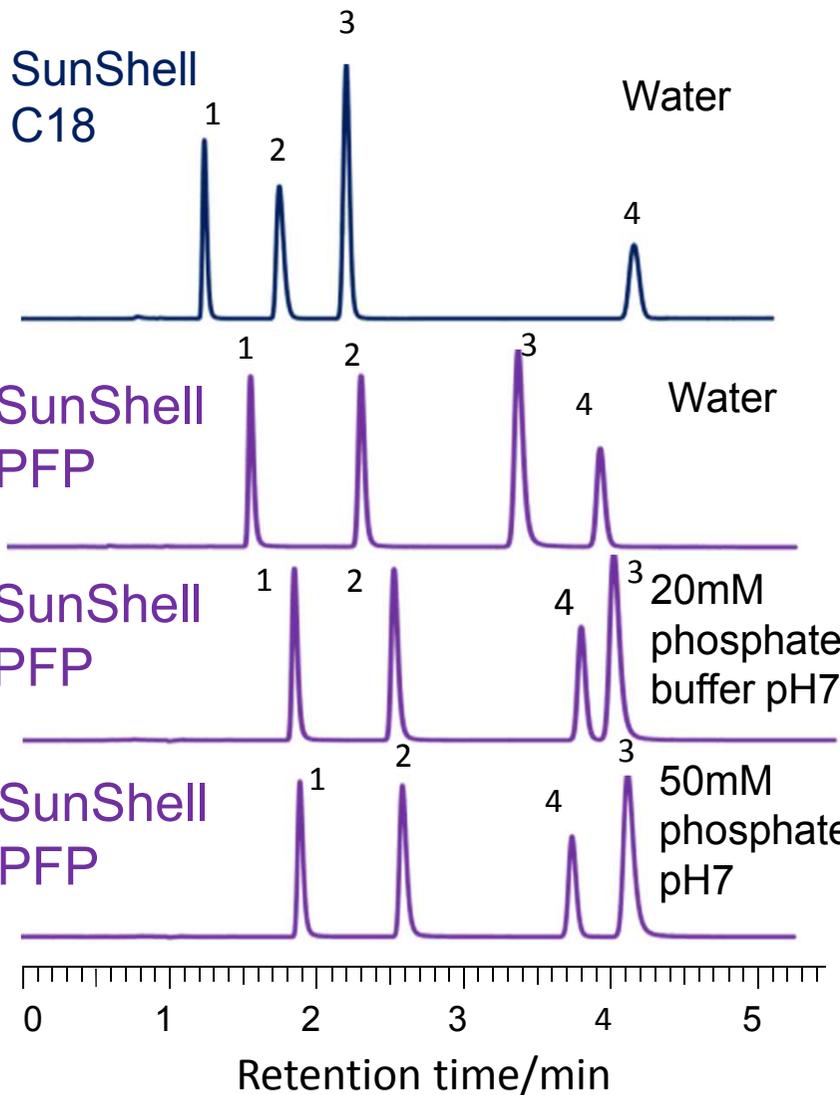
3 = o-Cresol

SunShell PFP



C18カラムではp-クレゾールと
m-クレゾールは分離不可能ですが、
PFP は分離可能です。

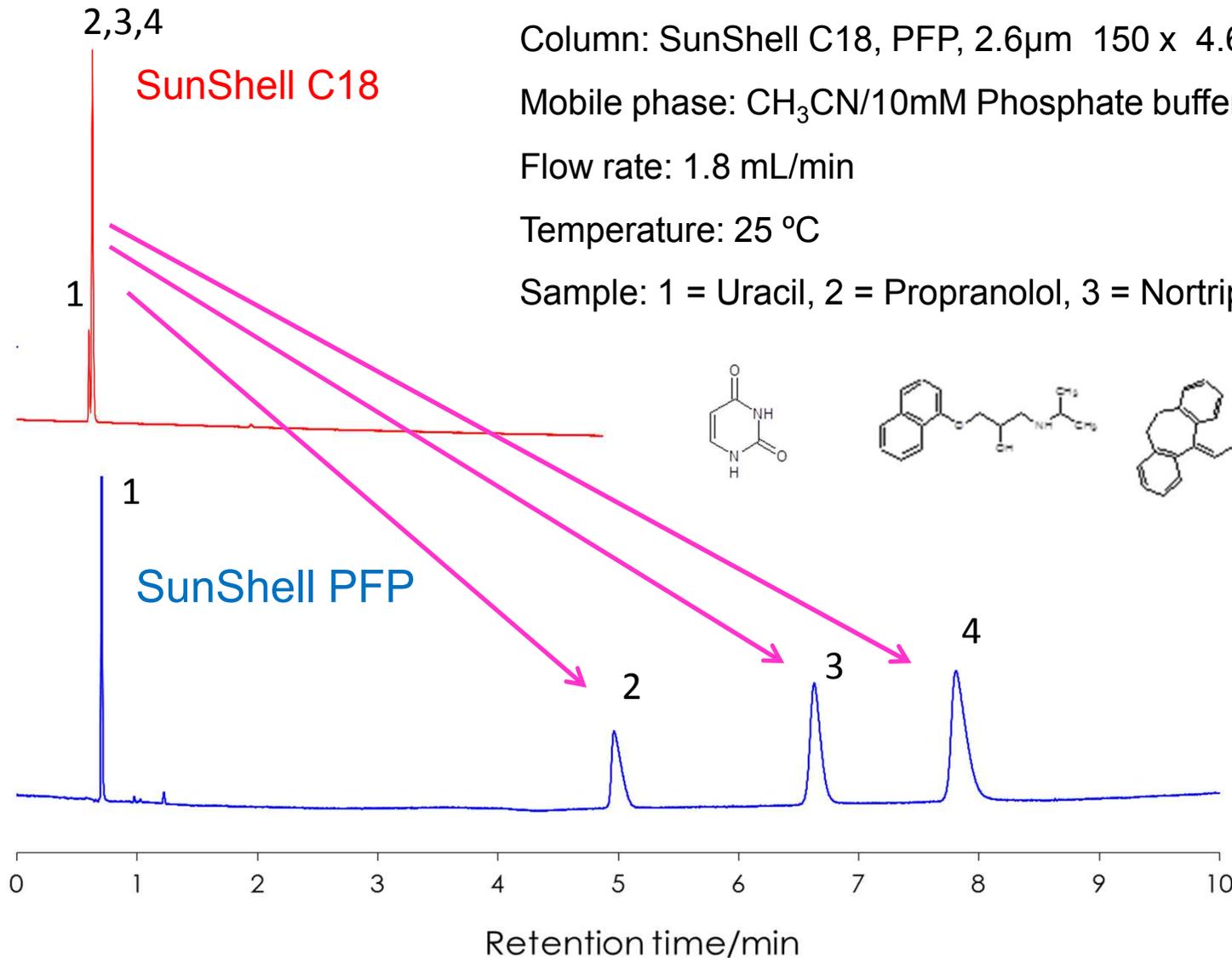
キサンチン類の分離



SunShell C18, PFP 2.6 μm 150 x 2.1 mm
 Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{water}$ or buffer=30/70
 Flow rate: 0.3 mL/min
 Temperature: 25 $^\circ\text{C}$
 Detection: UV@250nm
 Sample: 1 = Theobromine
 2 = Theophylline
 3 = Caffeine
 4 = Phenol

SunShell PFPはC18に比べ極性の高いカフェインを強く保持します。また塩濃度の調節で分離を変えることができます

C18とPFPによる塩基性化合物の保持比較



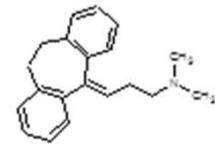
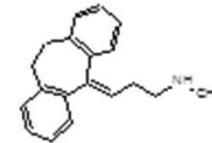
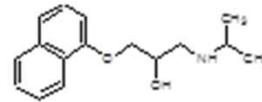
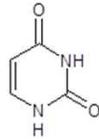
Column: SunShell C18, PFP, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/10mM Phosphate buffer pH7.0 = 80/20

Flow rate: 1.8 mL/min

Temperature: 25 °C

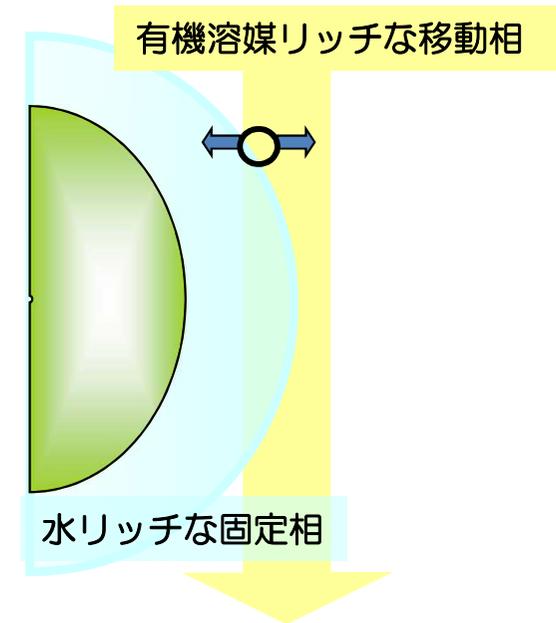
Sample: 1 = Uracil, 2 = Propranolol, 3 = Nortriptyline, 4 = Amitriptyline



PFPでHILIC・イオン交換？

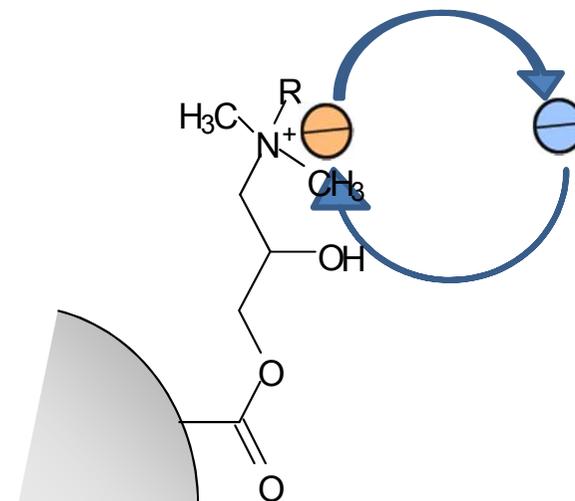
• HILICモード

- 固定相上に形成された水和層と移動相との分配
- 静電的相互作用、水素結合



• イオン交換

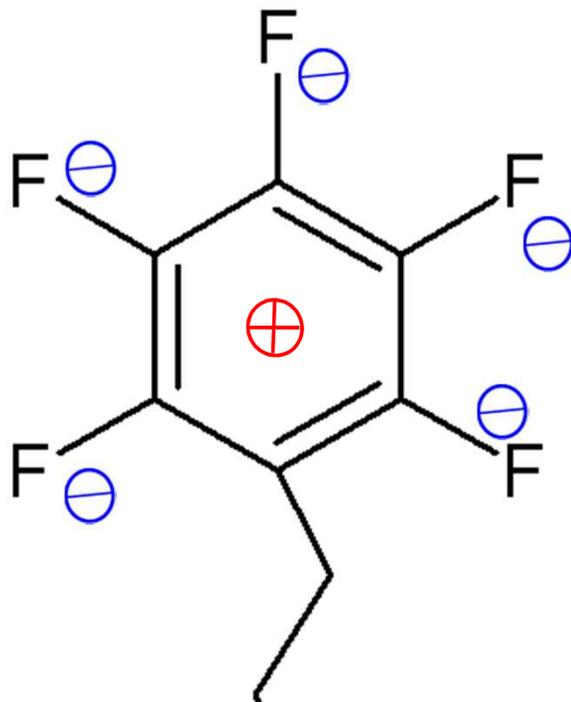
- 物質がイオン成分を取り込み、代わりに物質が持っていた他のイオン成分を放出する現象



PFPでHILIC・イオン交換

ペンタフルオロフェニル

| | |
|--------------|------|
| pKa | — |
| 分配係数(LogP) | 3.54 |
| 水の溶解度 (mg/L) | 50.8 |

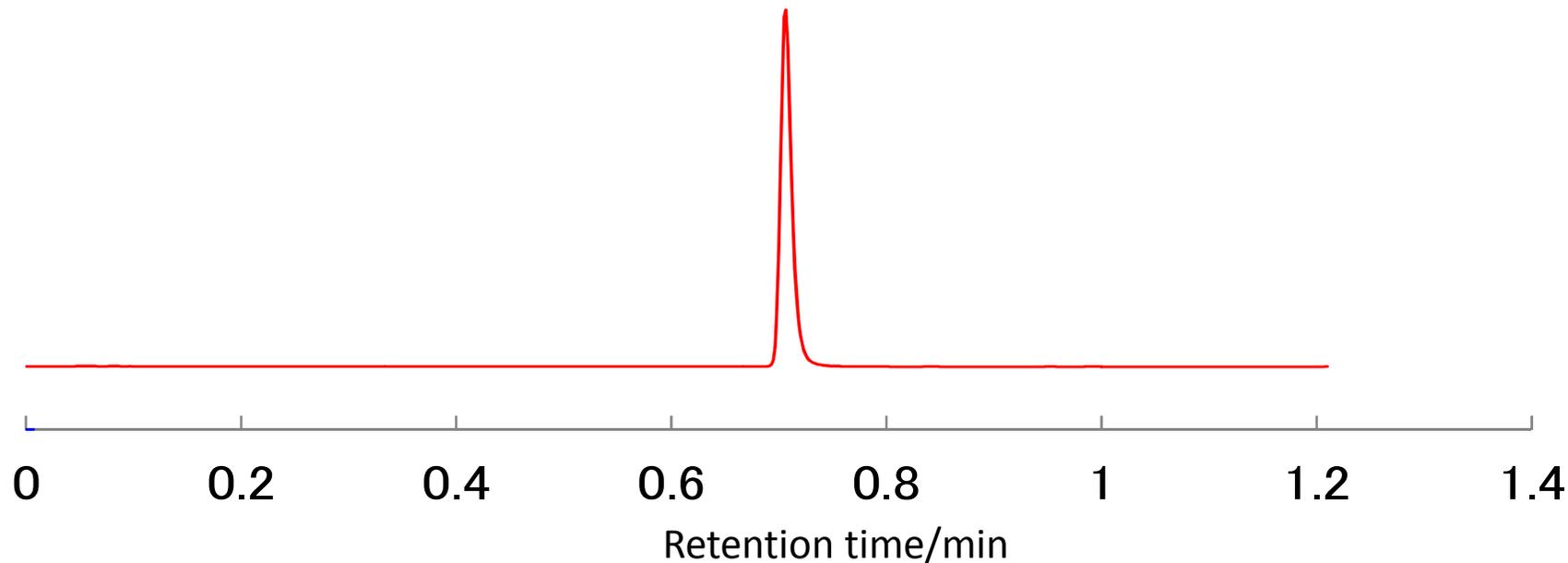


- PFPの化学的特性から水を保持するとは考えにくい
- PFP基が電化を持つ構造をしていない
- フッ素の強い電気陰性度により、電子の偏りが生じている



イオン交換に似た分離機構を示す

ウリジンの保持



Column: SunShell PFP, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/10mM Phosphate buffer pH7.0 = 80/20

Flow rate: 1.8 mL/min

Temperature: 25 °C

Sample: 1 = Uridine

ウリジンはPFPカラムに保持されない



ヒリックモードの分離はしていない

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る。
- C28カラムは、低極性溶媒を移動相とするとODSとは異なった分離を示す。
- PFPカラムは、優れた立体選択性を示す。
- PFPカラムでは、HILICモード、イオン交換とは異なった相互作用が働いている。