

## クロマニックテクニカルノート 1004

# SunShell HILIC-Amide の特性

HILIC (ヒリック) は Hydrophilic Interaction Chromatography (親水性相互作用クロマトグラフィー) の略で, Alpert により 1990 年に命名された水溶性化合物の順相モードでの分離であり, 逆相モードでは保持できないような高極性化合物に特に有効な分離手段であります。糖, アミノ酸, 核酸など逆相では有機溶媒ゼロの移動相を用いないと保持できないような場合でも, ヒリックでは 70%以上の有機溶媒を含む移動相を用いて分離でき, LC/MS での検出感度が向上することなどの利点が期待できます。現在各社から様々なヒリックカラムが入手可能であります。これらのヒリックカラムは親水性相互作用だけでなく, イオン交換相互作用を意図して加えたモノや, 意図せずに固定相内に存在している場合もあります。さらに固定相の種類により, 親水性の高いモノや低いモノもあり, カラム (固定相) により分離が大きく異なることも報告されています。

本レポートでは池上先生<sup>(1)</sup>により提唱されているパラメーターを用い, 15 種類のヒリックカラムを用い, 親水性, OH や CH<sub>2</sub> の有無の選択性さらに位置異性体の選択性について比較しました。

[1]. Y. Kawachi, et al., J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5903-5919.

## クロマニックテクノロジーズ

長江徳和 塚本友康

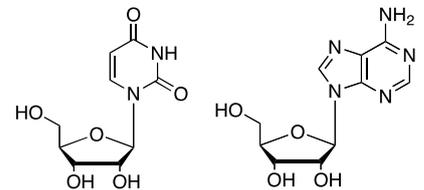
## <<親水性の比較>>

ヌクレオシドであるウリジンの保持指数を親水性のパラメーターとして比較しました。またアデノシン、ピダラビンの保持指数についても比較しました。

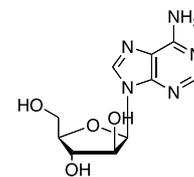
分析条件： Mobile phase: Acetonitrile/ammonium acetate buffer (20 mM, pH = 4.76) = 90:10 [v/v],

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
TSKgel 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 (U) アデノシン (A)



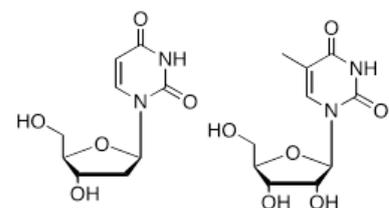
ピダラビン (V)

ウリジンを親水性の指標とした場合、SunShell HILIC-Amide はPolyHYDROXYETHYLとTSKgel Amide-80に次いで大きな親水性を示しました。なお、アデノシンやピダラビンの保持比較では、PolyHYDROXYETHYLとTSKgel Amid-80と肩を並べるほどの高親水性を示しました。親水性が高いほど保持が大きいことを意味しますので、ヒリック分離は有利になります。

## <<OHやCH<sub>2</sub>の有無の選択性>>

ウリジンと2-デオキシウリジンおよびウリジンと5-メチルウリジンとの分離係数から、OHやCH<sub>2</sub>の有無の選択性を比較しました。分析条件は親水性の比較と同じです

Column	U	2dU	α(OH)	5mU	α(CH <sub>2</sub> )
	k (U)	k (2dU)		k (5mU)	
ZIC-HILIC (5 μm)	2.11	1.04	2.03	1.26	1.67
ZIC-HILIC (3.5 μm)	2.10	1.02	2.07	1.23	1.71
Nucleodur HILIC (3 μm)	2.20	1.42	1.55	1.72	1.28
TSKgel Amide-80 (5 μm)	3.30	1.98	1.67	2.60	1.27
XBridge Amide (3.5 μm)	2.55	1.50	1.70	1.98	1.29
PolySULFOETHYL (3 μm)	1.58	0.74	2.13	1.07	1.48
PolyHYDROXYETHYL (3 μm)	3.92	2.04	1.92	2.88	1.36
CYCLOBOND I (5 μm)	0.70	0.58	1.21	0.62	1.13
LiChrospher Diol (5 μm)	1.50	1.10	1.36	1.30	1.15
Chromolith Si	0.31	0.31	1.00	0.28	1.12
HALO HILIC (2.7 μm)	0.64	0.60	1.08	0.56	1.16
COSMOSIL HILIC (5 μm)	1.60	1.00	1.60	1.40	1.14
Sugar-D (5 μm)	1.58	0.91	1.74	1.10	1.44
NH <sub>2</sub> -MS (5 μm)	2.44	1.30	1.88	1.88	1.30
SunShell HILIC-Amide (2.6 μm)	2.93	1.65	1.78	2.29	1.28



2-デオキシ  
ウリジン  
(2dU)

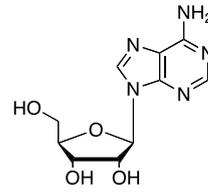
5-メチル  
ウリジン  
(5mU)

選択性は固定相に大きく依存し、両性イオン基結合型固定相は高い選択性を、Chromolith SiやHALO HILICなどベアシリカ固定相は低い選択性を示しました。SunShell HILIC-Amideなどアミド基を有する固定相の選択性は比較的高い値であり、保持が大きいことも考慮すれば、多くに試料に対し分離が良くなると考えられます。

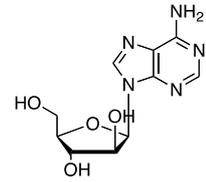
## <<位置異性体の選択性>>

アデノシンとビダラビンの分離係数からヒドロキシル基の位置異性体の選択性を比較しました。分析条件は親水性の比較と同じです。

Column	A	V	$\alpha(V/A)$
	k (A)	k (V)	
ZIC-HILIC (5 $\mu\text{m}$ )	1.55	2.32	1.50
ZIC-HILIC (3.5 $\mu\text{m}$ )	1.51	2.28	1.51
Nucleodur HILIC (3 $\mu\text{m}$ )	2.33	3.40	1.46
TSKgel Amide-80 (5 $\mu\text{m}$ )	3.80	4.90	1.29
XBridge Amide (3.5 $\mu\text{m}$ )	2.81	3.64	1.30
PolySULFOETHYL (3 $\mu\text{m}$ )	1.15	1.39	1.21
PolyHYDROXYETHYL (3 $\mu\text{m}$ )	3.75	4.93	1.31
CYCLOBOND I (5 $\mu\text{m}$ )	1.36	1.68	1.24
LiChrospher Diol (5 $\mu\text{m}$ )	2.50	3.30	1.32
Chromolith Si	0.73	0.85	1.16
HALO HILIC (2.7 $\mu\text{m}$ )	1.59	1.87	1.18
COSMOSIL HILIC (5 $\mu\text{m}$ )	2.20	3.00	1.36
Sugar-D (5 $\mu\text{m}$ )	1.88	2.72	1.45
NH <sub>2</sub> -MS (5 $\mu\text{m}$ )	2.13	2.90	1.36
SunShell HILIC-Amide (2.6 $\mu\text{m}$ )	3.55	4.84	1.36



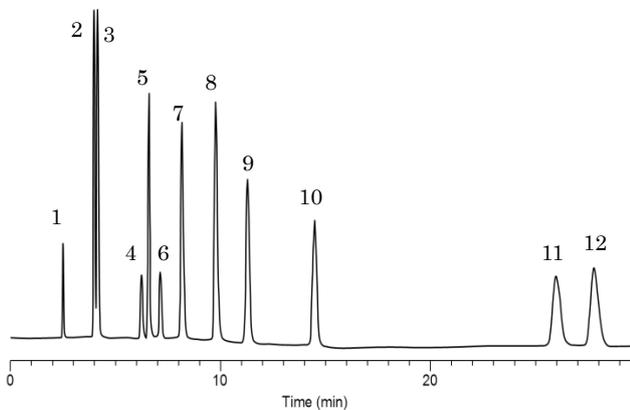
アデノシン (A)



ビダラビン (V)

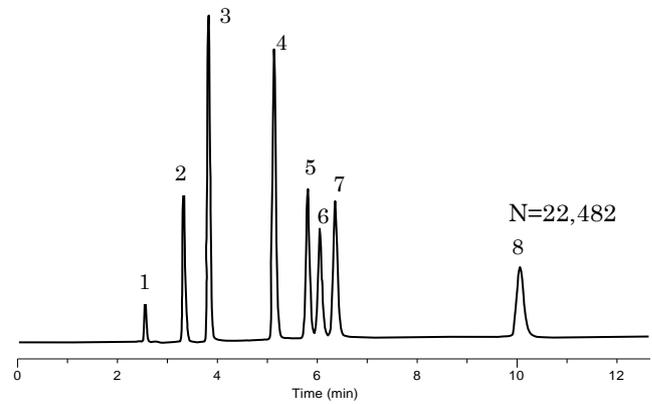
両性イオン基結合型固定相は保持は大きくありませんが、位置異性体の選択性は大きな値になりました。SunShell HILIC-Amideは保持の大きなTSKgel Aimde-80 とPolyHYDROXYETHYLとの比較では最も大きな位置異性体の選択性を示しました。

## <<パラメーターを求めるための分離>>



Column: SunShell HILIC-Amide (2.6  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 100 mm),  
 Mobile phase: Acetonitrile/20 mM Ammonium acetate buffer (pH 4.8) = 90:10 (v/v),  
 Flow rate: 0.549 ml/min,  
 Back pressure: 3.9 MPa,  
 Temperature: 30  $^{\circ}\text{C}$ ,  
 Detection: UV@254 nm.  
 Samples: 1, Toluene; 2, Theobromine; 3, Theophylline;  
 4, 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; 5, 2'-Deoxyuridine;  
 6, 4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside; 7, 5-Methyluridine;  
 8, Uridine; 9, Adenosine; 10, Vidarabine;  
 11, 3'-Deoxyguanosine; 12, 2'-Deoxyguanosine.

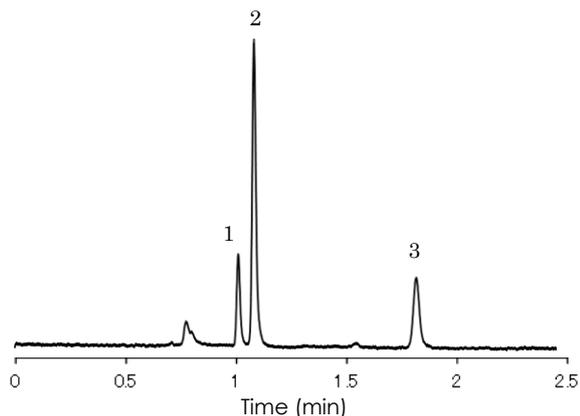
## <<ウリジン類の分離>>



Column: SunShell HILIC-Amide (2.6  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 100 mm),  
 Mobile phase: Acetonitrile/20 mM Ammonium acetate buffer (pH 4.8) = 90:10 (v/v),  
 Flow rate: 0.549 ml/min,  
 Back pressure: 3.9 MPa,  
 Temperature: 30  $^{\circ}\text{C}$ ,  
 Detection: UV@254 nm.  
 Samples: 1, Toluene; 2, Tegafur; 3, Trifluorothymidine;  
 4, 2'-Deoxy-2'-fluorouridine; 5, Thymidine;  
 6, 5'-Deoxy-5-fluorouridine; 7, 2'-Deoxy-5-fluorouridine;  
 8, 5-Fluorouridine.

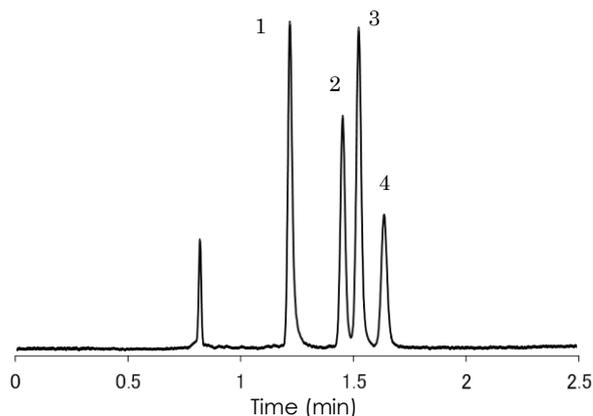
★SunShell HILIC-Amide は固定相の親水性が高く、シランで修飾したものとしては最大級の親水性を示しました。またコアシェル型充填剤であるため理論段数も高く、ピーク形状の良い分離が得られました。なお、これらのデータはすべて京都工芸繊維大学、池上亨先生よりご提供いただきました。池上先生に感謝いたします。

<<合成甘味料の分離>>



Column: SunShell HILIC-Amide, 2.6 μm 100 x 4.6 mm,  
 Mobile phase:  
 Acetonitrile/25 mM phosphate buffer (pH2.5) =8:2  
 Flow rate: 1.0 mL/min ,  
 Temperature: Ambient,  
 Detection: UV@215 nm,  
 Sample:  
 1, Aspartame; 2, Saccharin; 3, Acesulfame K.

<<配糖体の分離>>

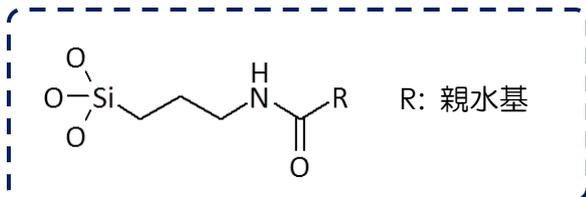


Column: SunShell HILIC-Amide, 2.6 μm 100 x 4.6 mm,  
 Mobile phase:  
 Acetonitrile/25 mM phosphate ammonium (pH4.9) =8:2  
 Flow rate: 1.0 mL/min ,  
 Temperature: Ambient,  
 Detection: UV@215 nm,  
 Sample:  
 1, Helicin; 2, Salicin; 3, Arbutin; 4, Rutin.

SunShell HILIC-Amide の物性値

	コアシェルシリカ			炭素含有量(%)	結合相	エンドキャッピング	使用最高圧	使用pH範囲
	粒子径(μm)	細孔径(nm)	比表面積(m <sup>2</sup> /g)					
SunShell HILIC-Amide	2.6	9	150	3	Amide	no	60 MPa	2 - 8

SunShell HILIC-Amide の固定相



SunShell HILIC-Amide 2.6 μm の価格

	内径(mm)	2.1		3.0		4.6	
	長さ(mm)	型番	価格	型番	価格	型番	価格
SunShell HILIC-Amide	30	CH6931	¥65,000	CH6331	¥65,000	CH6431	¥65,000
	50	CH6941	¥66,000	CH6341	¥66,000	CH6441	¥66,000
	75	CH6951	¥71,000	CH6351	¥71,000	CH6451	¥71,000
	100	CH6961	¥79,000	CH6361	¥79,000	CH6461	¥79,000
	150	CH6971	¥84,000	CH6371	¥84,000	CH6471	¥84,000

株式会社 クロマニックテクノロジーズ 代表取締役社長 長江 徳和  
 552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1  
 TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890  
 Email: info@chromanik.co.jp URL http://chromanik.co.jp