

JASIS 2013

SunShell コアシェルカラムの新展開

～2nd Choice・C18で分離困難な場合の選択肢～

クロマニックテクノロジーズ

塚本友康 長江徳和

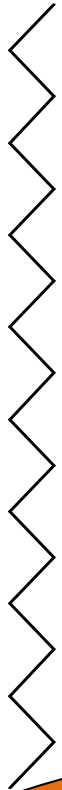
Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>

分離を変えるには・・・

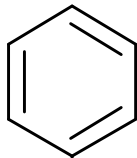
疎水性相互作用

アルキル基



π - π 相互作用

フェニル基

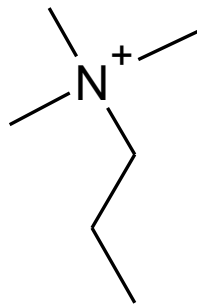


相互作用の異なるカラムに交換する

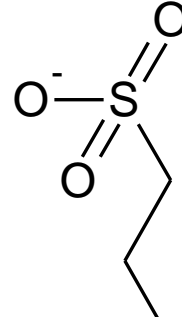
親水性相互作用

イオン交換相互作用

陰イオン
交換基

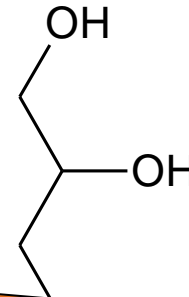


陽イオン
交換基

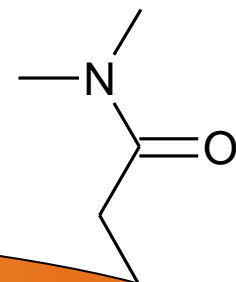


水素結合

ジオール基

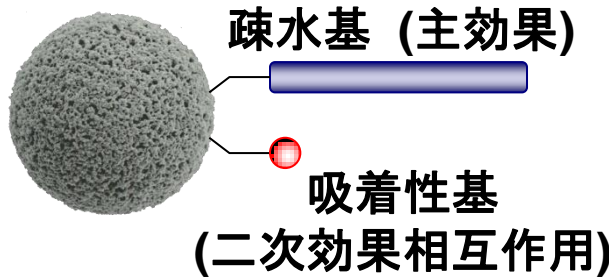


アミド基

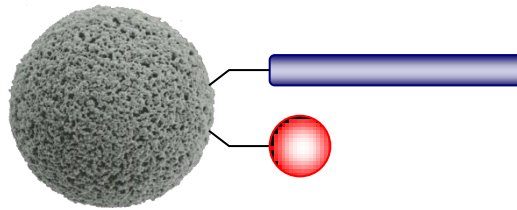


カラム充填剤基材

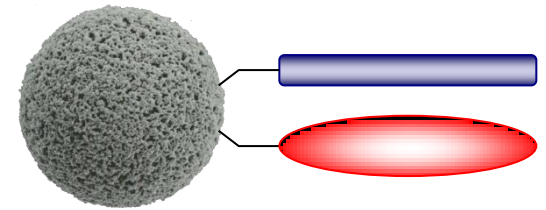
分離を変えるには・・・2



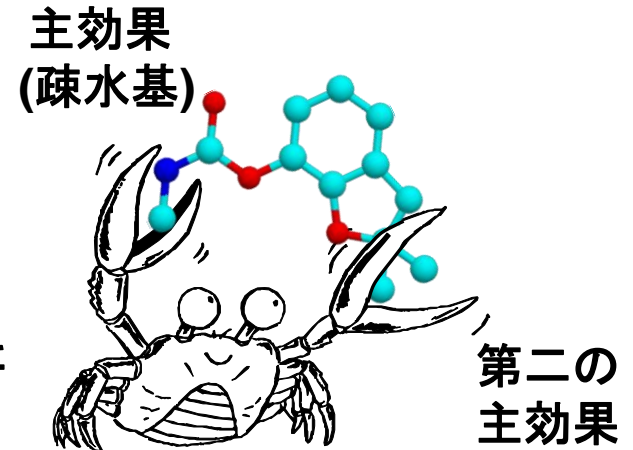
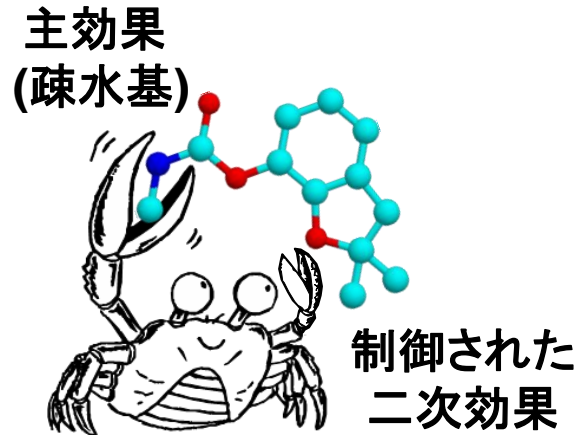
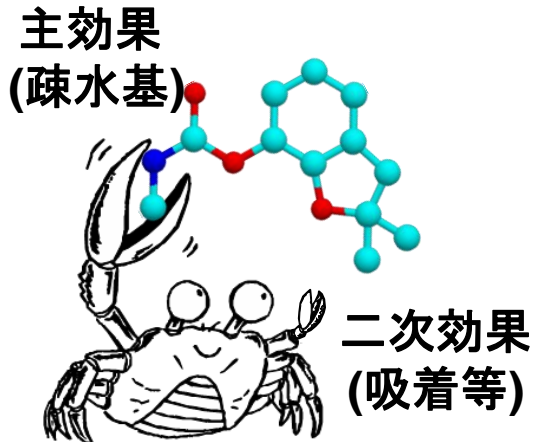
既存の分離剤



二次効果相互作用
制御型分離剤



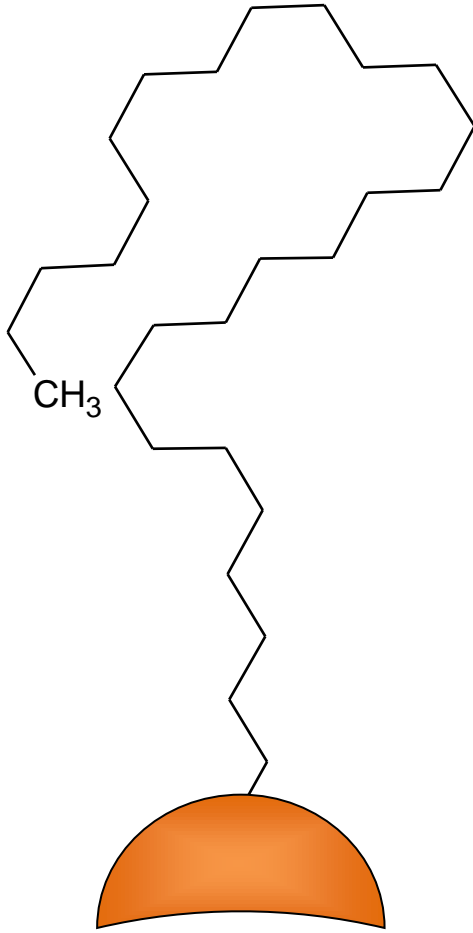
第二主効果を持つ
二足型分離剤



本日の内容

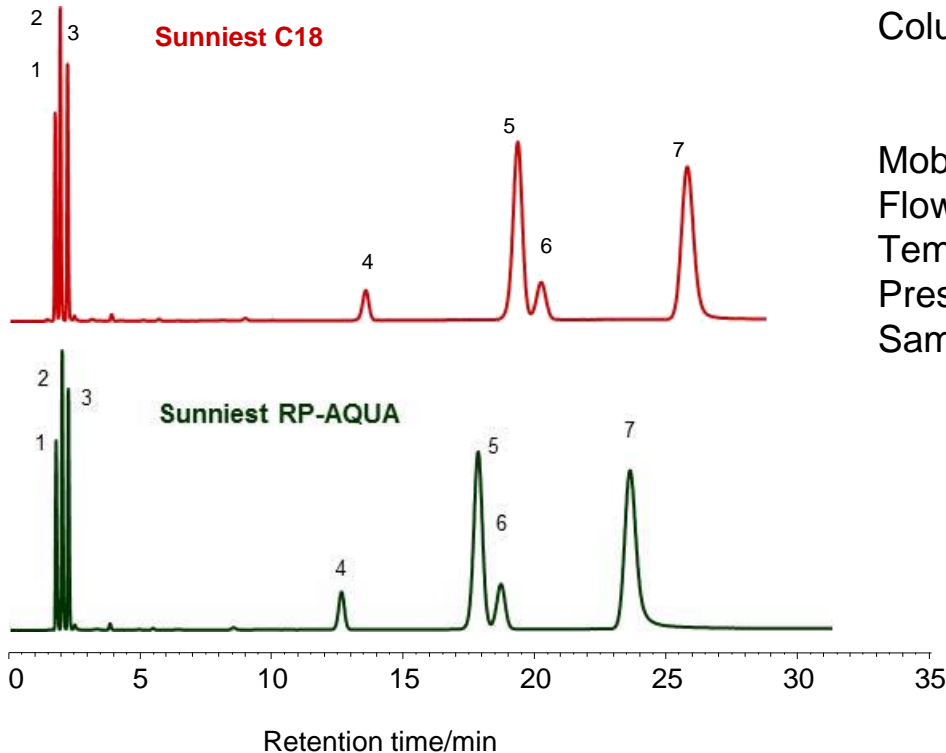
- C28カラムの紹介
 - 100%水系移動相で使用出来る理由
 - 親水性化合物の分離への適用
- PFPカラムの紹介
 - PFPカラムの分離の特長
 - PFPカラムでHILIC? イオン交換?
- Amideカラムの紹介
 - Amideカラムの分離の特長
 - C28カラムとの比較

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)

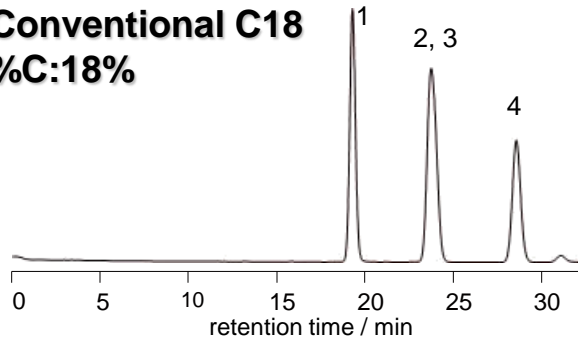
5 = o-Terphenyl, (N=15,000)

6 = Amylbenzene, (N=15,300)

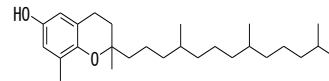
7 = Triphenylene, (N=14,500)

ODSとの比較1

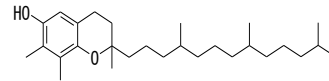
Conventional C18
%C:18%



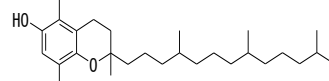
Column size: 4.6x250 mm
Mobile phase: 97/3=CH₃OH/H₂O
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 25 °C
Detection: UV at 295nm
Sample: 1=δ-Tocopherol



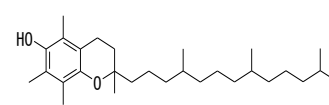
2=γ-Tocopherol



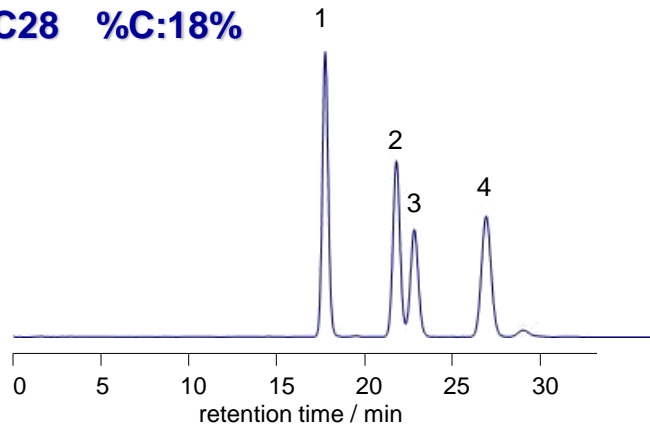
3=β-Tocopherol



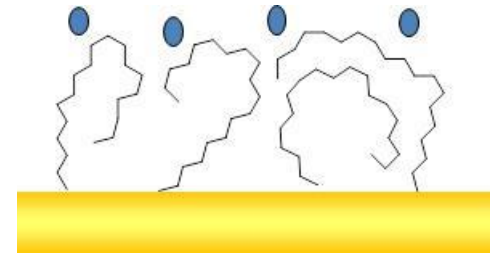
4=α-Tocopherol



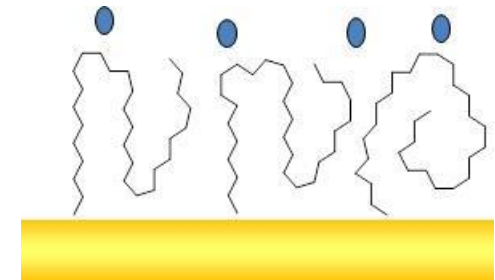
Sunrise
C28 %C:18%



C18

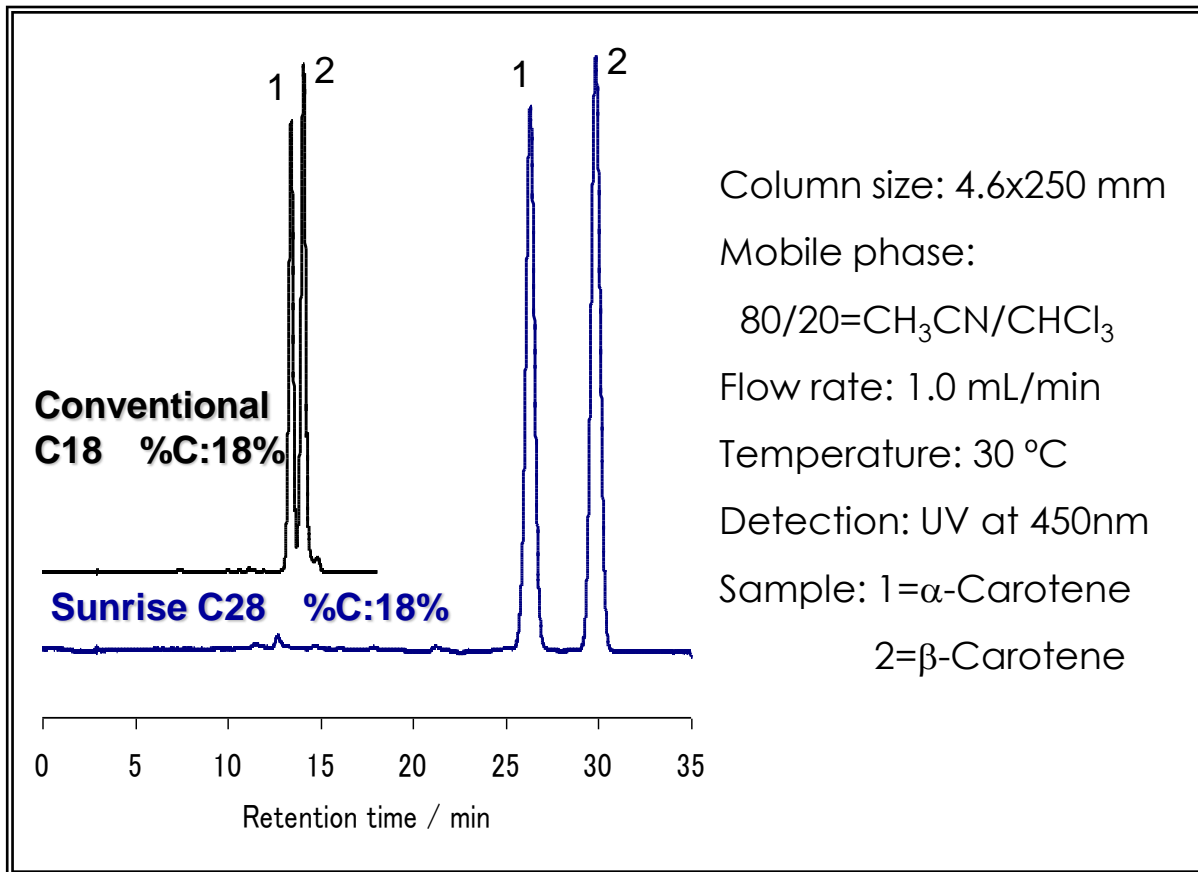


C28

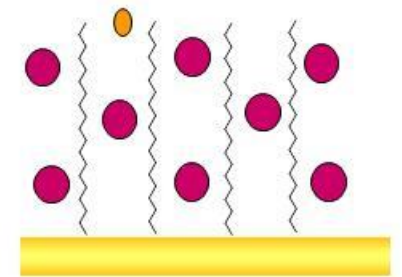


固定相容量は同じ

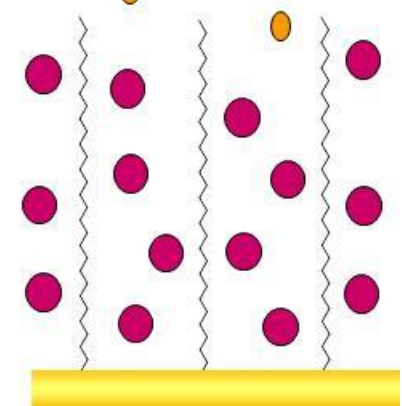
ODSとの比較2



C18

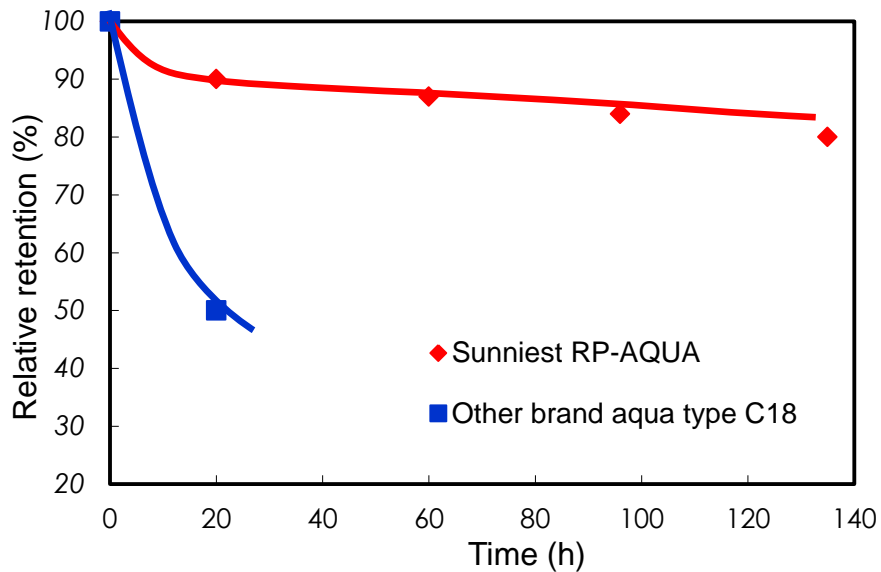


C28



固定相容量は2倍

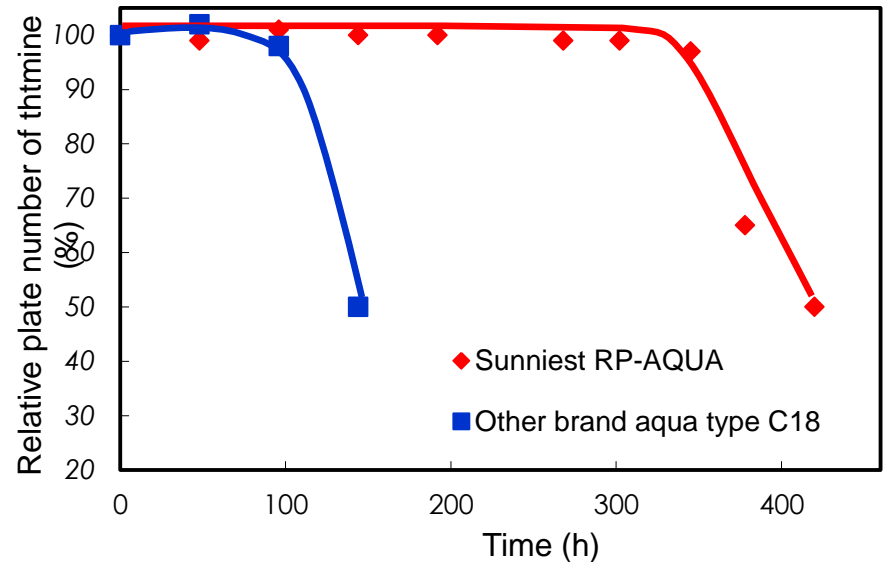
酸性、塩基性条件下の耐久性



Test conditions

Mobile phase: 0.5% TFA

Temperature: 60 °C



Test conditions

Mobile phase:

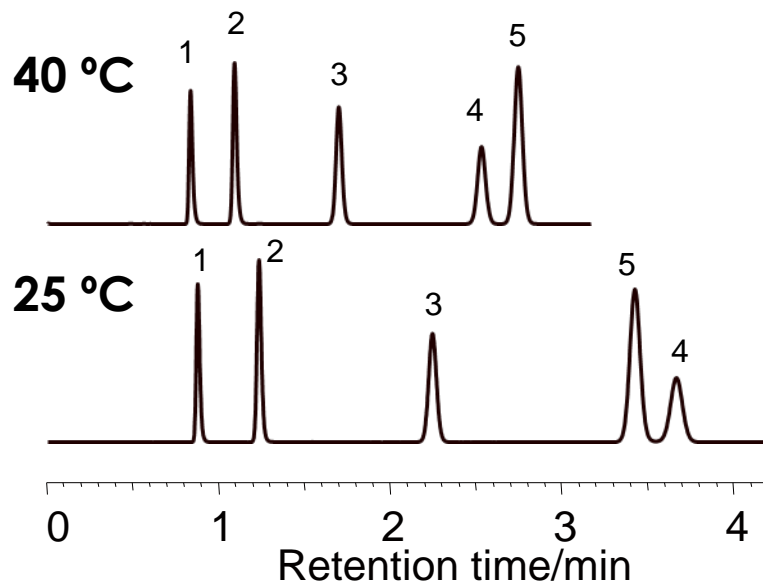
20 mM phosphate buffer (pH 8.0)

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

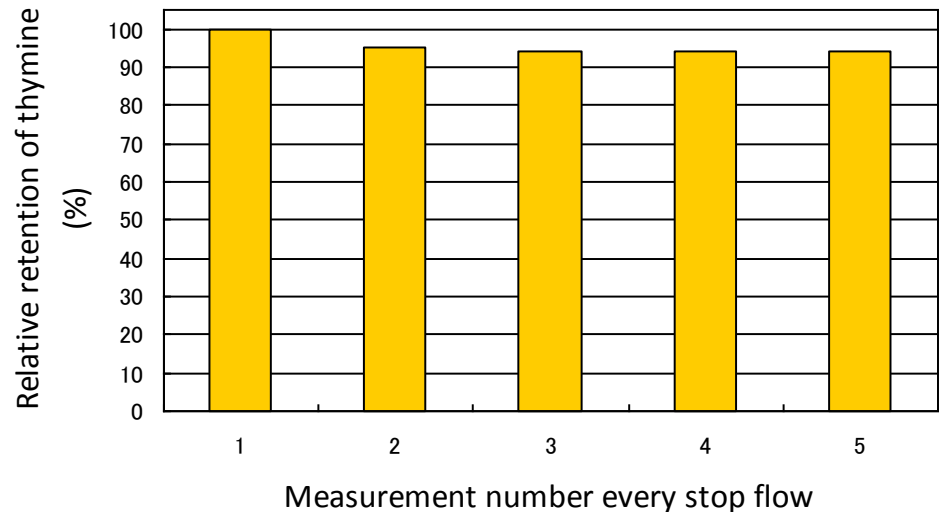
SunShell RP-Aqua の40 °Cでの保持

核酸塩基の分離



Column: SunShell RP-Aqua, 2.6 μ 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)



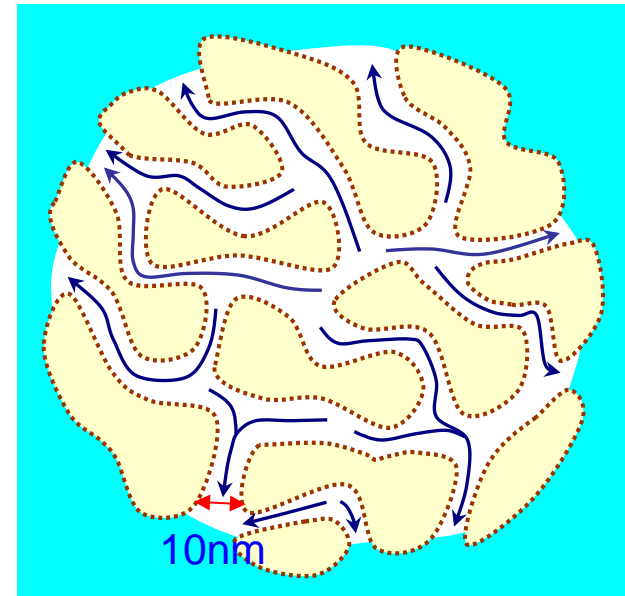
緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により、ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると、通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり、保持時間は大幅に減少しますが、SunShell RP-Aquaほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず、94%以上の再現性を示しました。

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



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

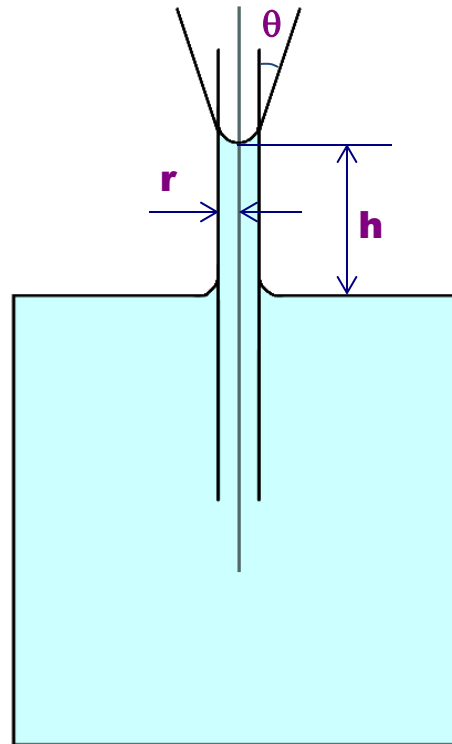
毛管現象の式:

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

γ : 表面張力

ρ : 液体の密度 (比重)

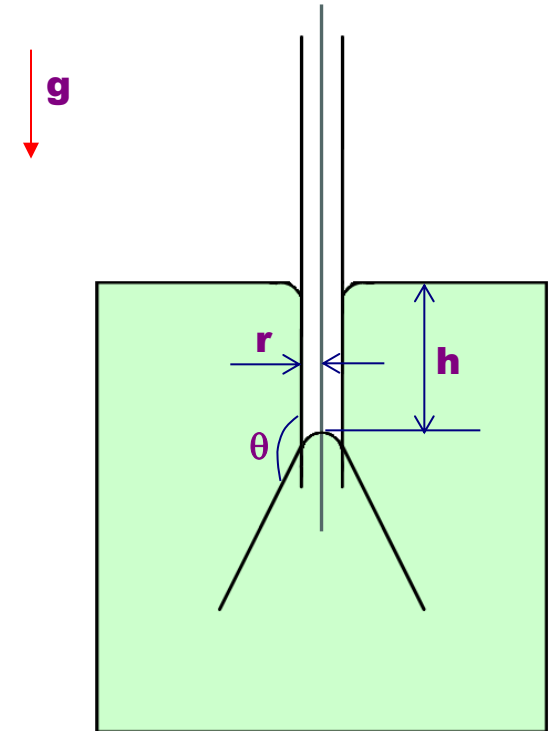
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



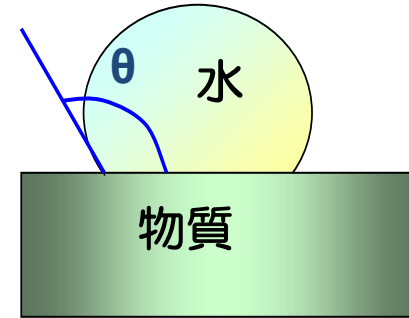
液体が管に濡れない場合

$$\theta > 90^\circ$$

疎水性と撥水性

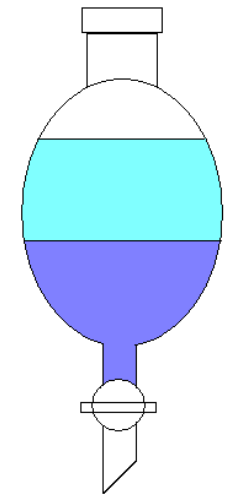
撥水性 → 水をはじく性質

『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』

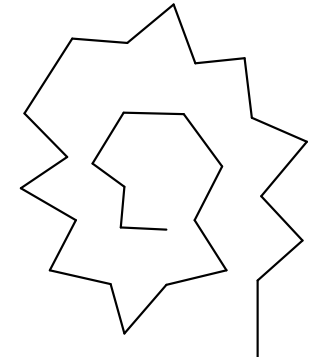
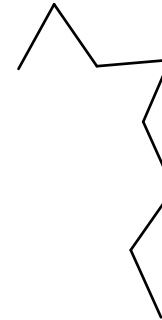
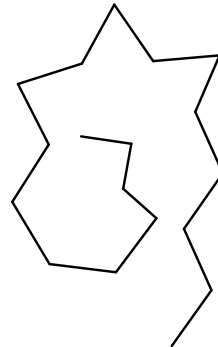
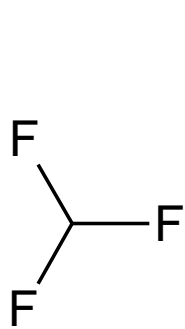


疎水性 → 水と混ざりにくい性質

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(θ)	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	8.84×10^{-10}

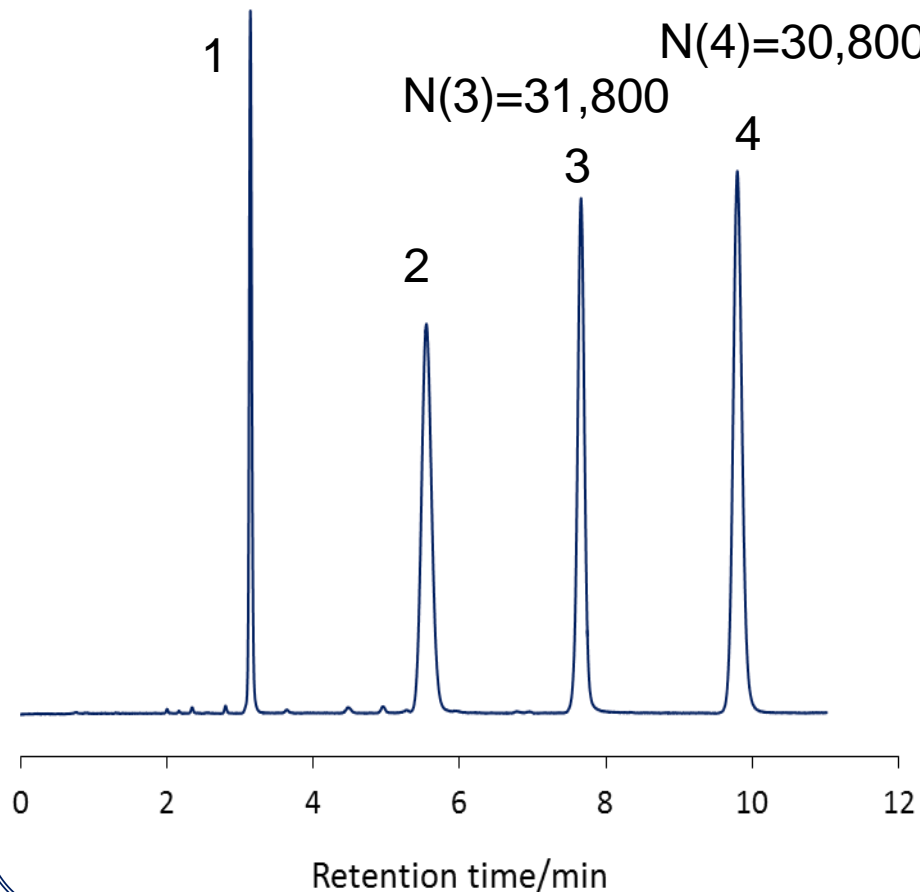
分析化学 Vol.59 No. 3, P193-205(2010)

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 $^{\circ}$ 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 μ m, 2.0x 150mm

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

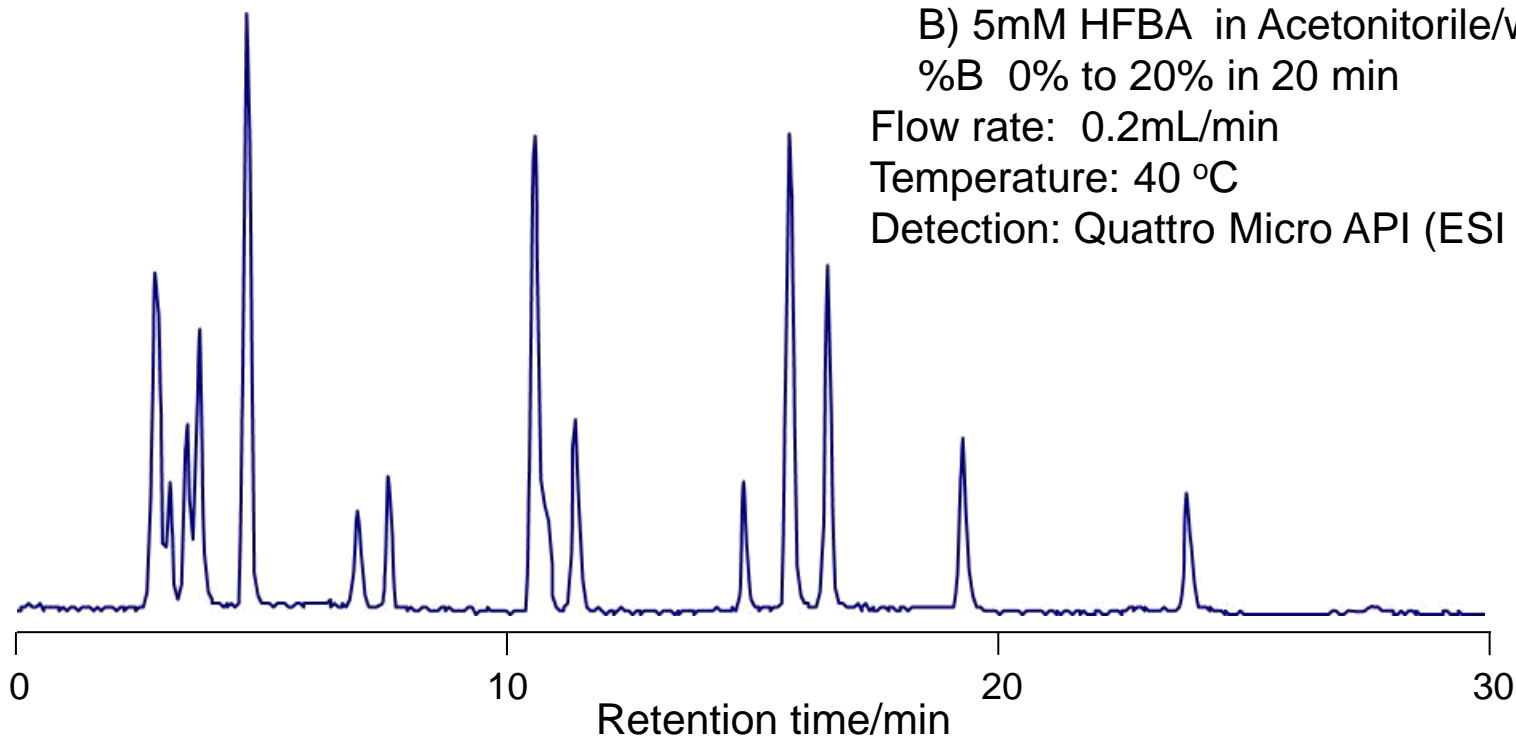
B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)

%B 0% to 20% in 20 min

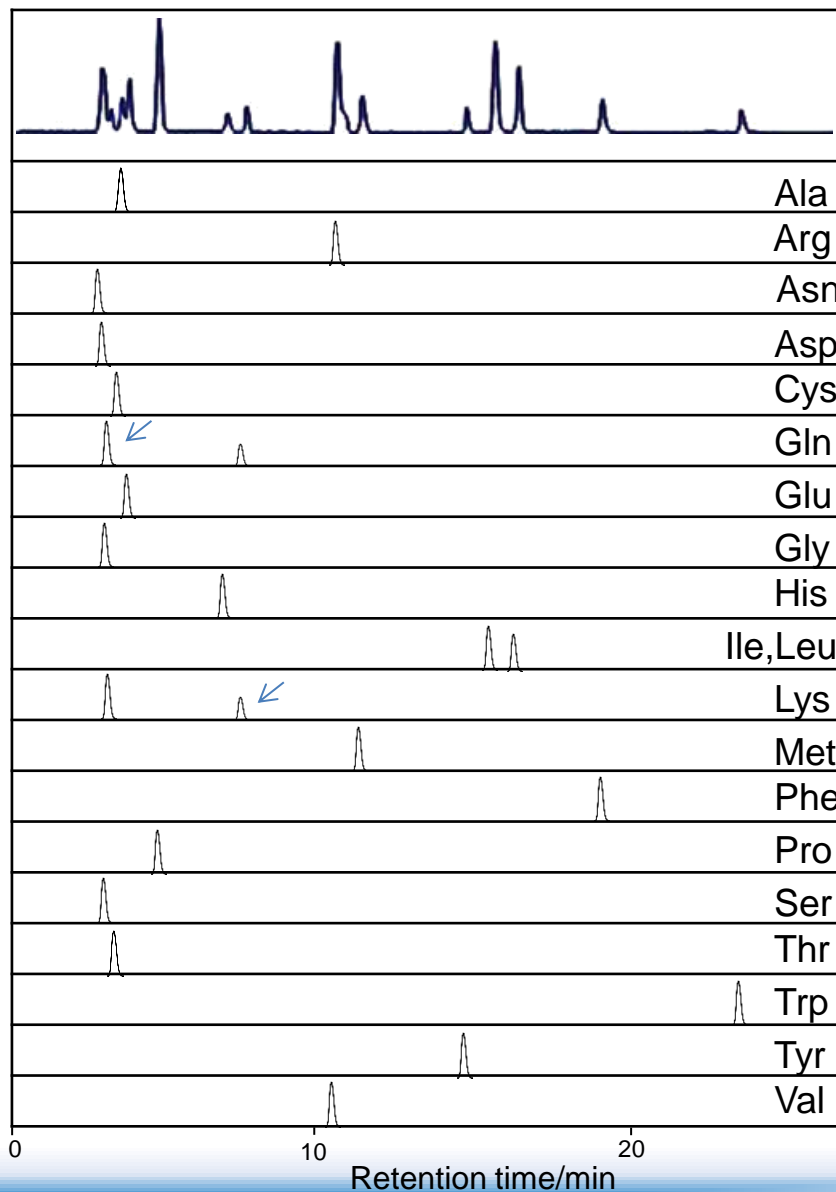
Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

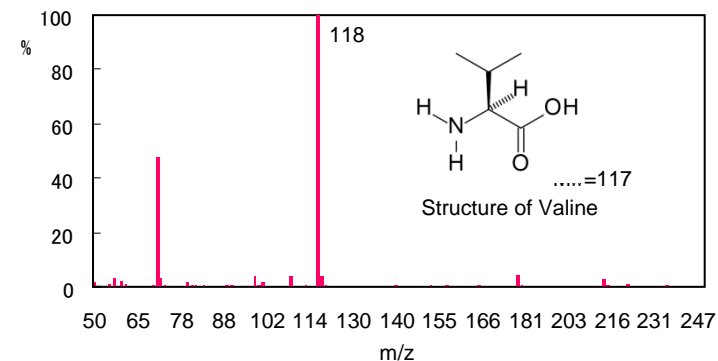
Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM



アミノ酸のLC/MS



m/z



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)

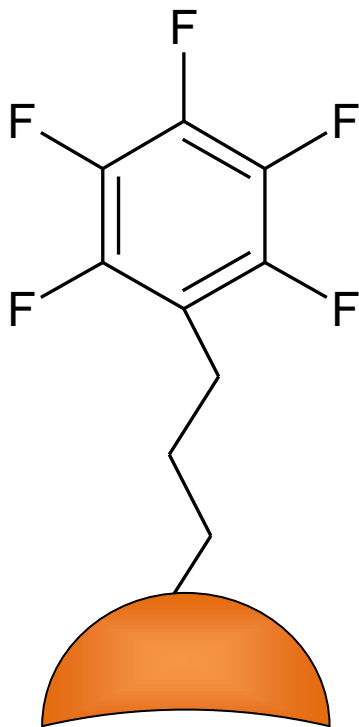
%B 0% to 20% in 20 min

Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

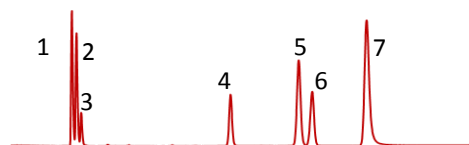
ペンタフルオロフェニル (PFP)



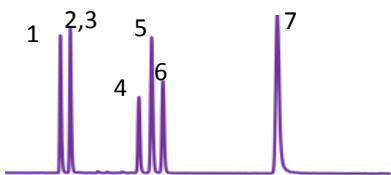
- 疎水性相互作用
- 水素結合性
- 双極子相互作用
- π - π 相互作用
- 静電的相互作用

- 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

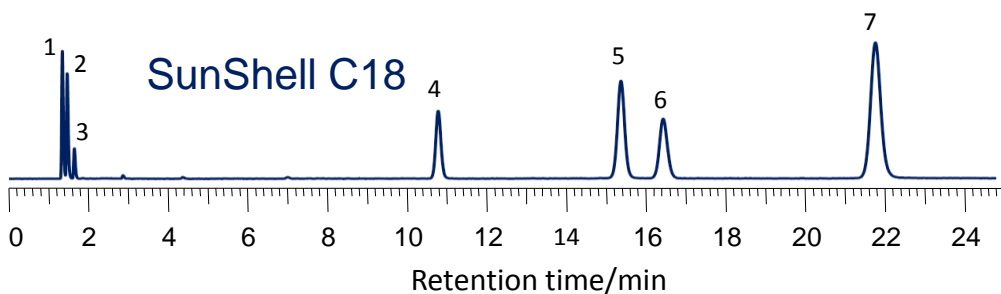
標準試料の分離



SunShell RP-Aqua



SunShell PFP



SunShell C18

Column dimension: 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25

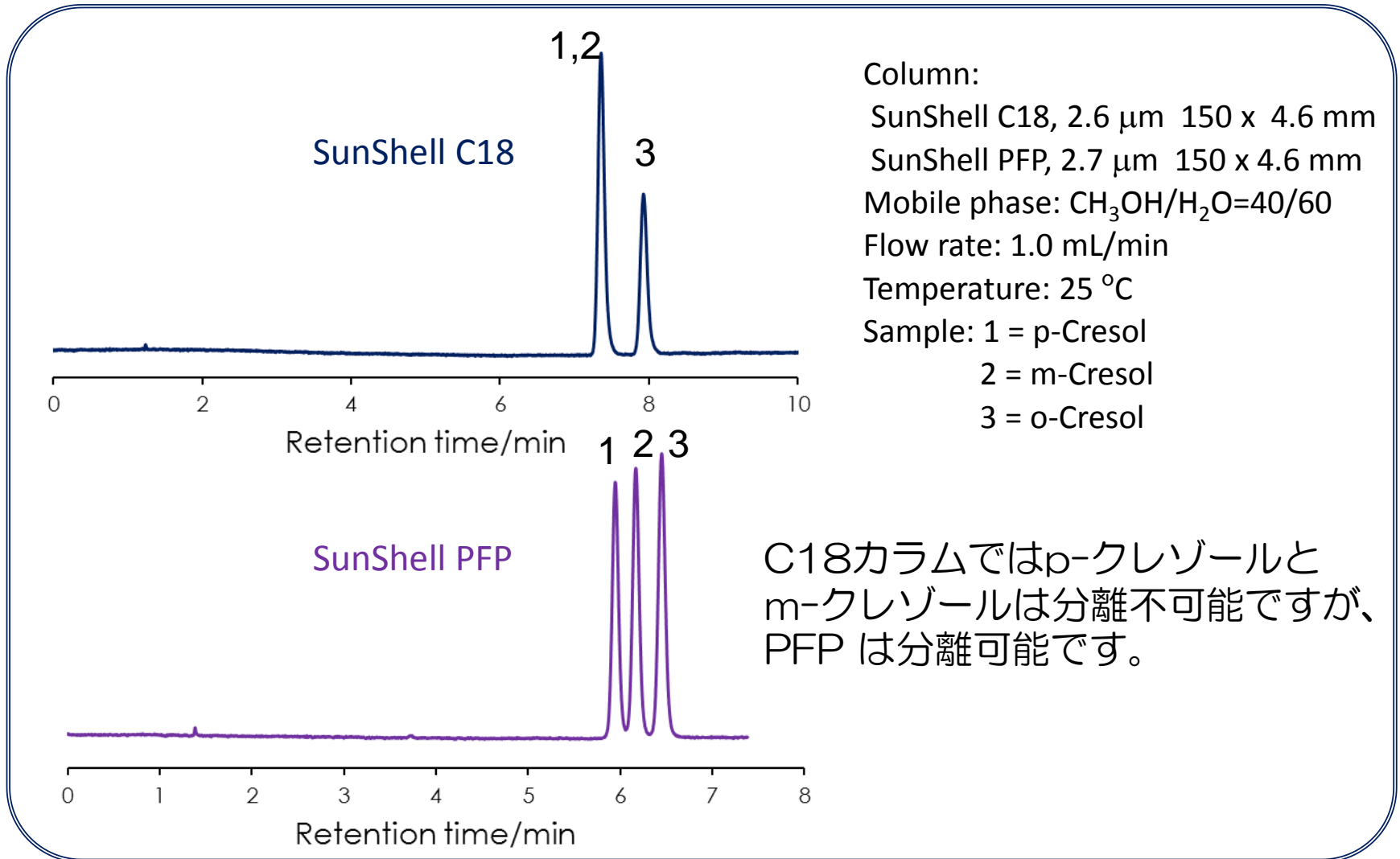
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

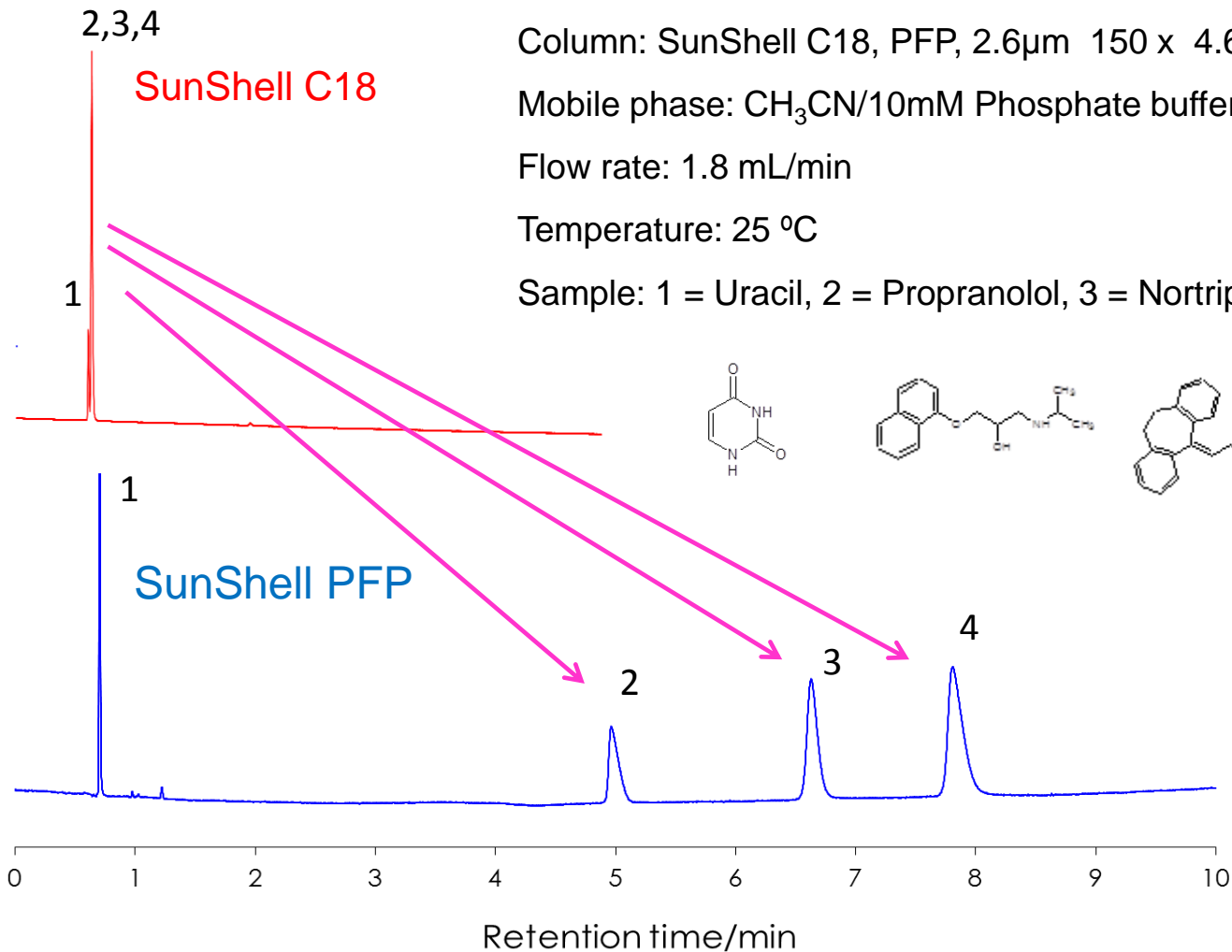
Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine,
 3 = Phenol, 4 = Butylbenzene
 5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene,
 7 = Triphenylene

	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

クレゾール異性体の分離



C18とPFPによる塩基性化合物の保持比較



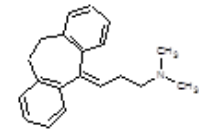
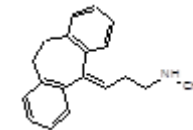
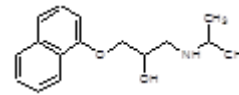
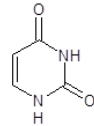
Column: SunShell C18, PFP, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

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

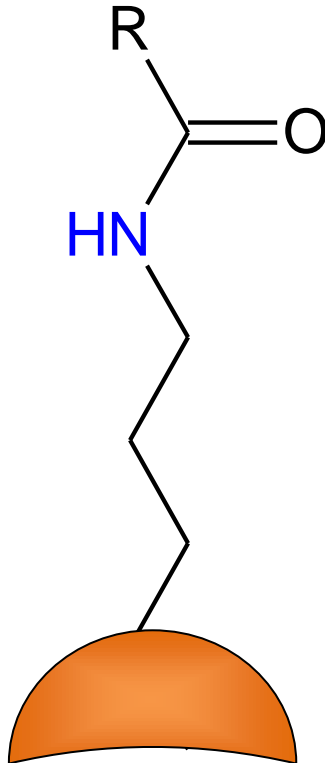
Flow rate: 1.8 mL/min

Temperature: 25 °C

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



Amide



- 親水性相互作用
- 水素結合性

- 極性化合物の保持に優れる
- MSとの相性が良い
- 電荷的に中性であり、低濃度の緩衝液で分離可能

Amide vs C28

Column:

SunShell Amide 2.6 μm : 100 x 4.6 mm

SunShell RPAqua 2.6 μm : 100 x 4.6 mm

Mobile phase: acetonitrile :

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

RPaqua : 20 mM phosphate buffer(pH7.0)

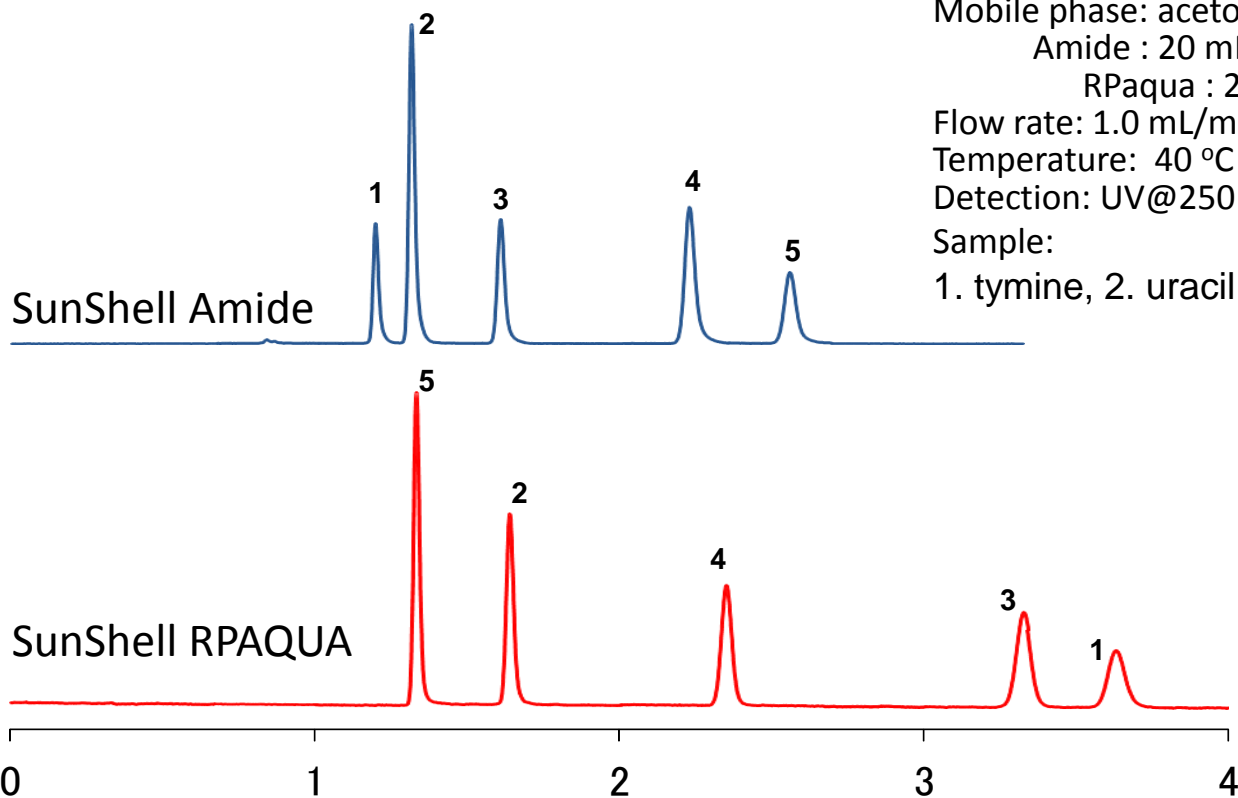
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

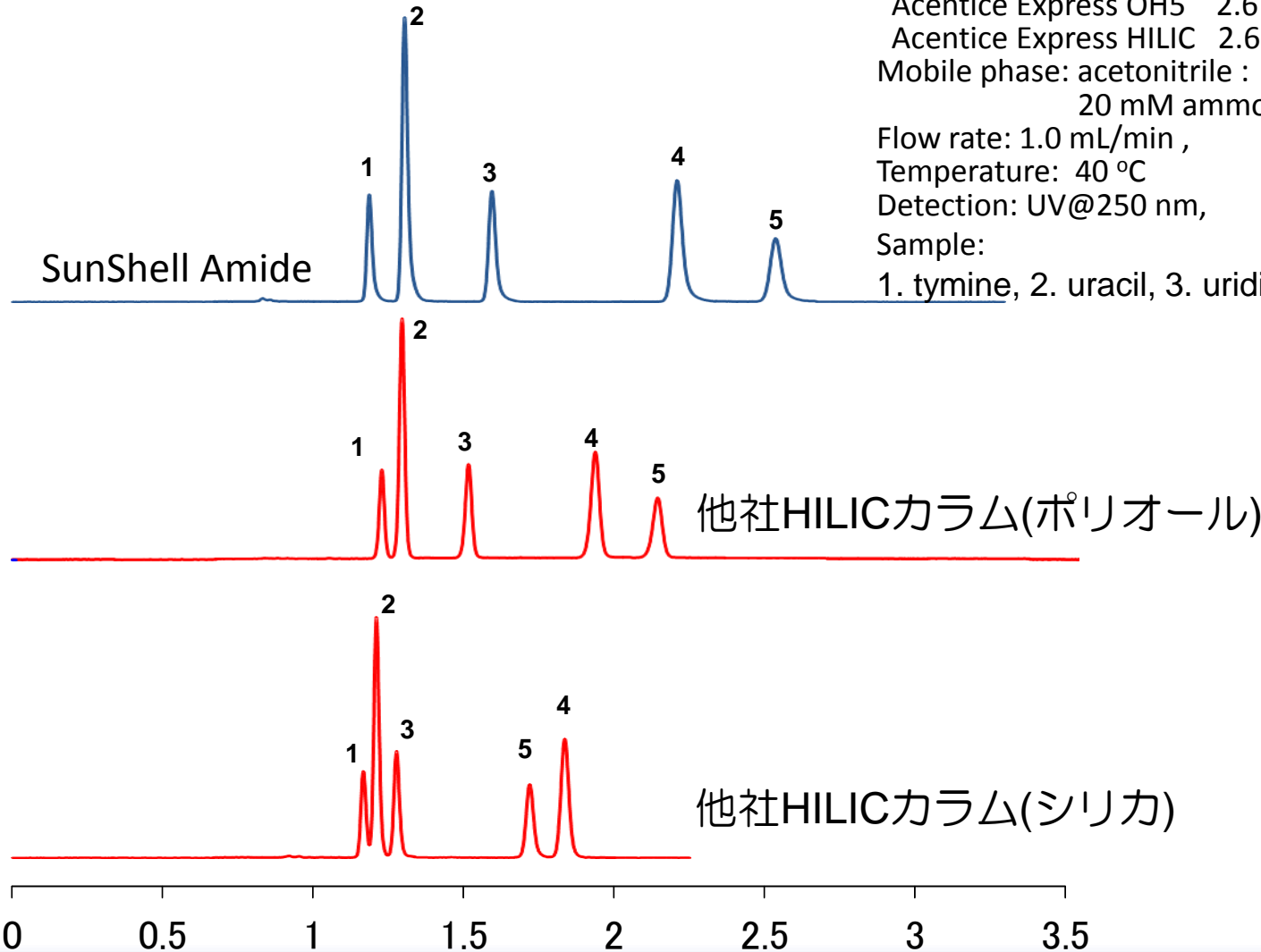
Sample:

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



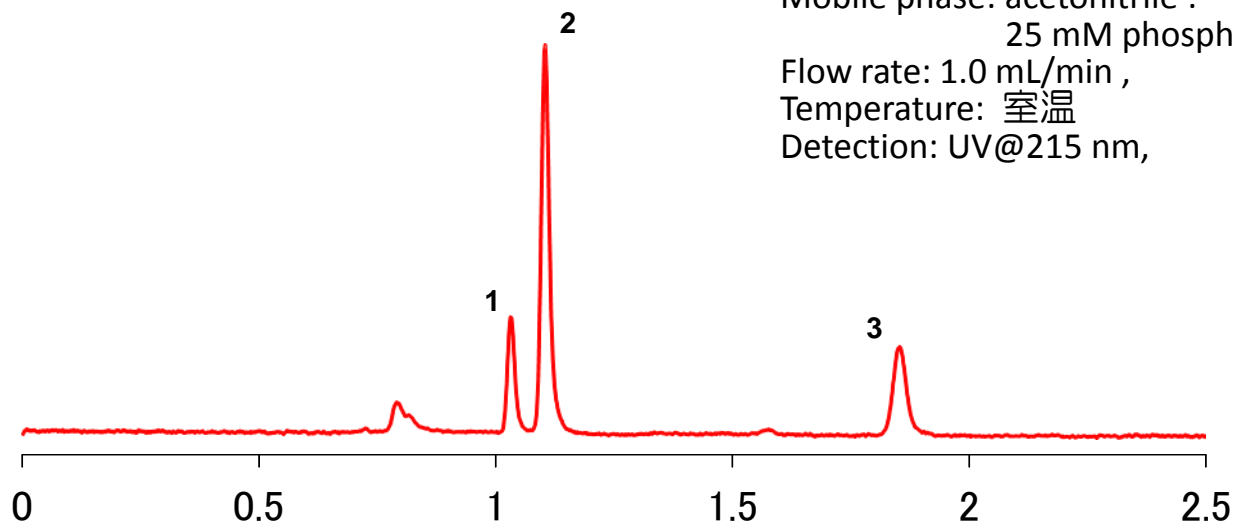
核酸塩基の分離

Column:
 SunShell Amide 2.6 μm : 100 x 4.6 mm,
 Acentice Express OH5 2.6 μm : 100 x 4.6 mm,
 Acentice Express HILIC 2.6 μm : 100 x 4.6 mm,
 Mobile phase: acetonitrile :
 20 mM ammonium acetate(pH4.7) =8:2
 Flow rate: 1.0 mL/min ,
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@250 nm,
 Sample:
 1. thymine, 2. uracil, 3. uridine, 4. cytosine, 5. cytidine

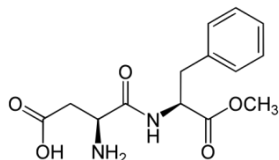


合成甘味料の分離

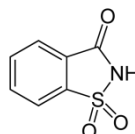
Column:
 SunShell Amide 2.6 μm : 100 x 4.6 mm,
 Mobile phase: acetonitrile :
 25 mM phosphate buffer (pH2.5) =8:2
 Flow rate: 1.0 mL/min ,
 Temperature: 室温
 Detection: UV@215 nm,



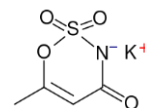
1. Aspartame



2. Saccharin,

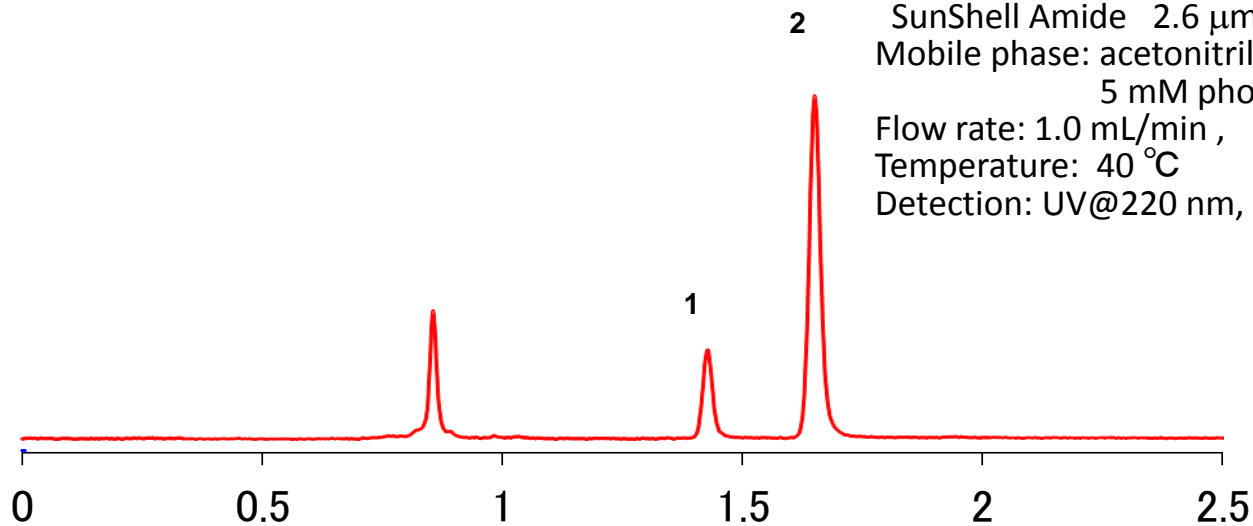


3. Acesulfame K,

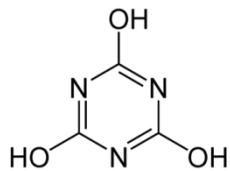


メラミンの分離

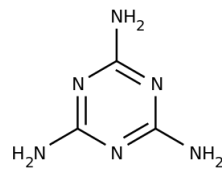
Column:
SunShell Amide 2.6 μm : 100 x 4.6 mm,
Mobile phase: acetonitrile :
5 mM phosphate Buffer (pH6.9) =75:25
Flow rate: 1.0 mL/min ,
Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$
Detection: UV@220 nm,



1. Cyanuric acid,



2. Melamine,



高分子分離用コアシェルカラム

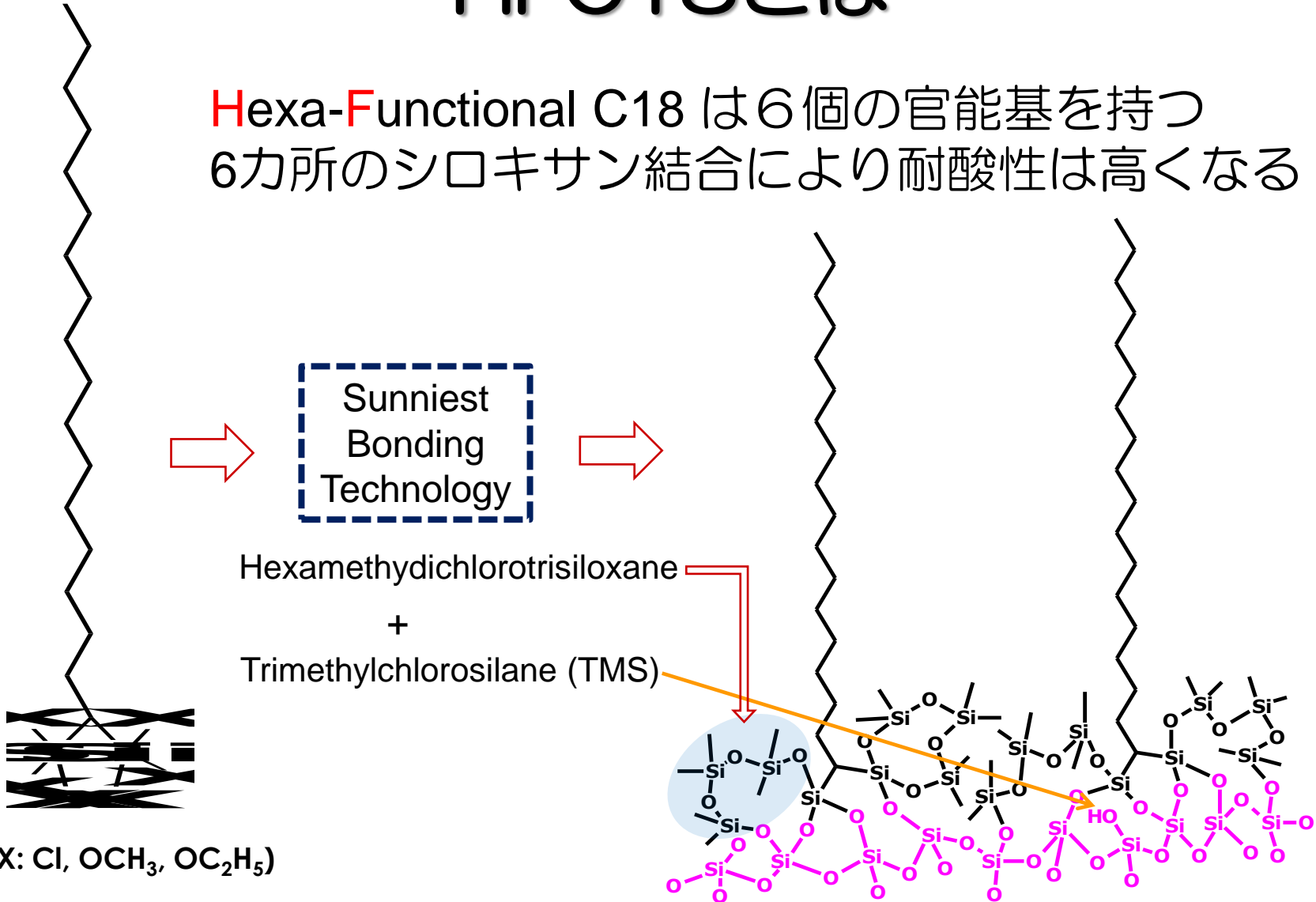
作成した粒子径2.6 μm で30 nmの細孔を持つ
コアシェル粒子を用いて以下のカラムを作成した

	P/N	Pore diameter	Surface area	Carbon loading	C18 Surface coverage	End-capping
SunShell HFC18-30 4.6 x 150 mm	C46471	30 nm	40 m^2/g	1.3%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
Amplus C8-30 4.6 x 150 mm	C36471	30 nm	40 m^2/g	1.2%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
Amplus C4-30 4.6 x 150 mm	C26471	30 nm	40 m^2/g	0.9%	3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes

Particle diameter is 2.6 μm for all.

HFC18とは

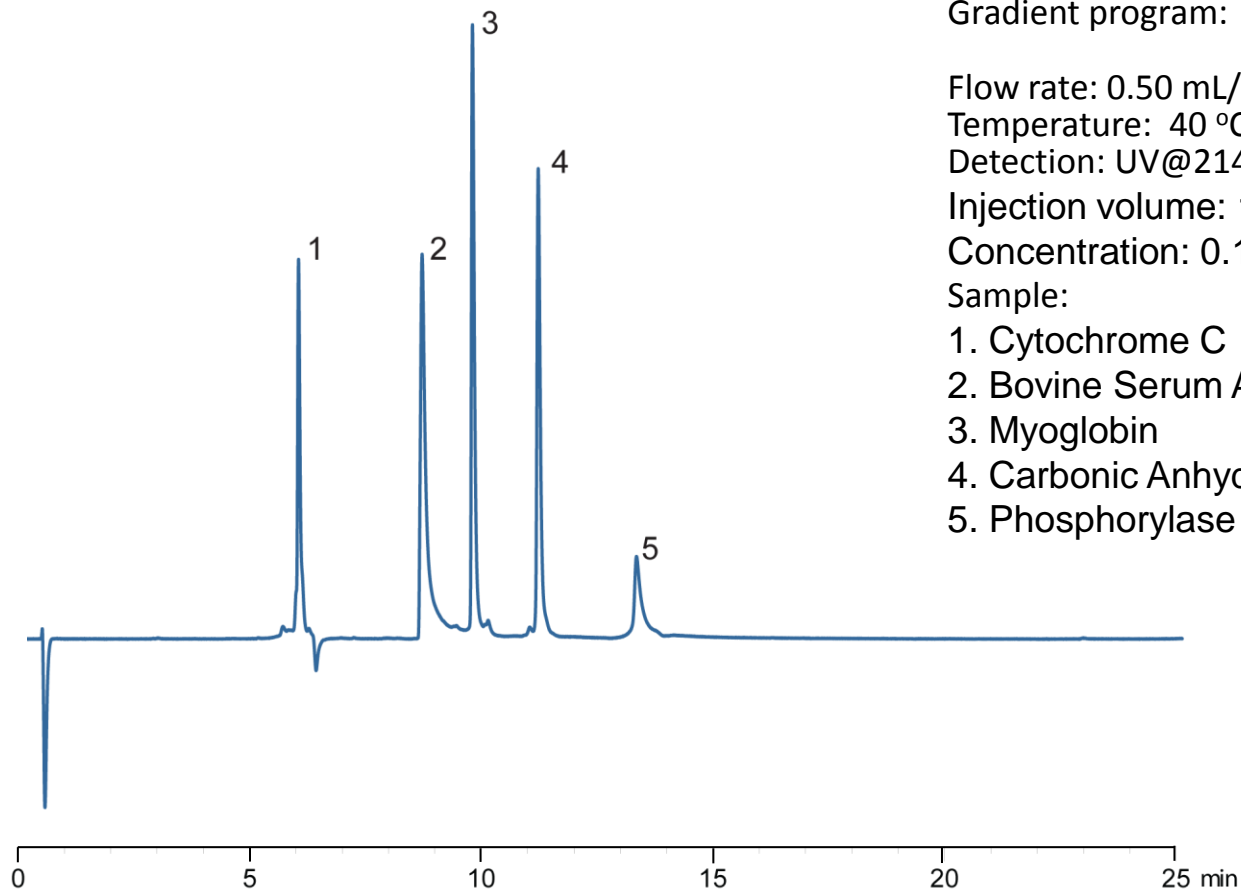
Hexa-Functional C18 は6個の官能基を持つ
6カ所のシロキサン結合により耐酸性は高くなる



HFC18試薬の概略図

シリカ表面への結合状態の概略図

タンパクの分離 (Amplus C4-30)



Column:

Amplus C4-30, 2.6 μm (30 nm) 100 x 2.1 mm,

Mobile phase: A) 0.1% TFA in water

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 25 min

%B 22% 70.5%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

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

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10 μL ,

Concentration: 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ each protein,

Sample:

1. Cytochrome C

2. Bovine Serum Albumin

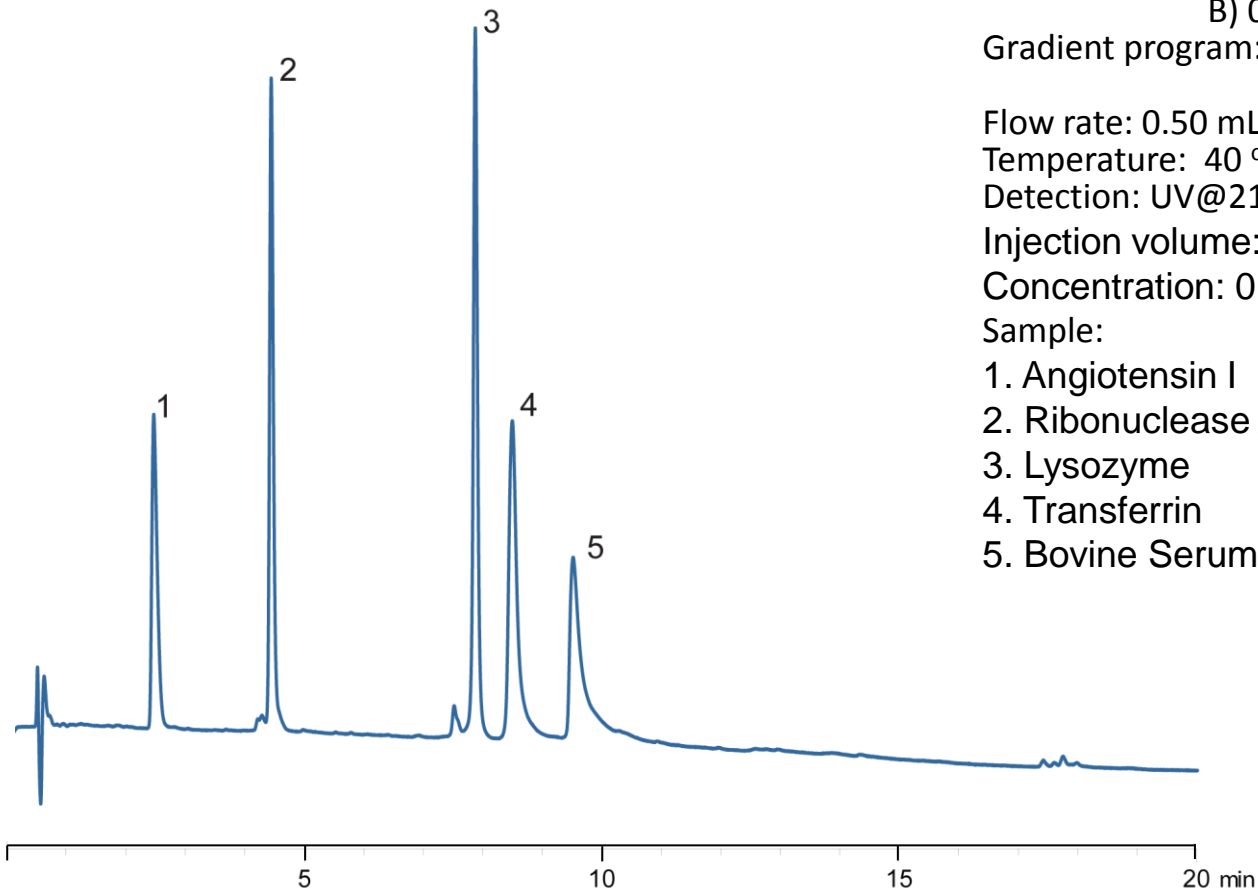
3. Myoglobin

4. Carbonic Anhydrase

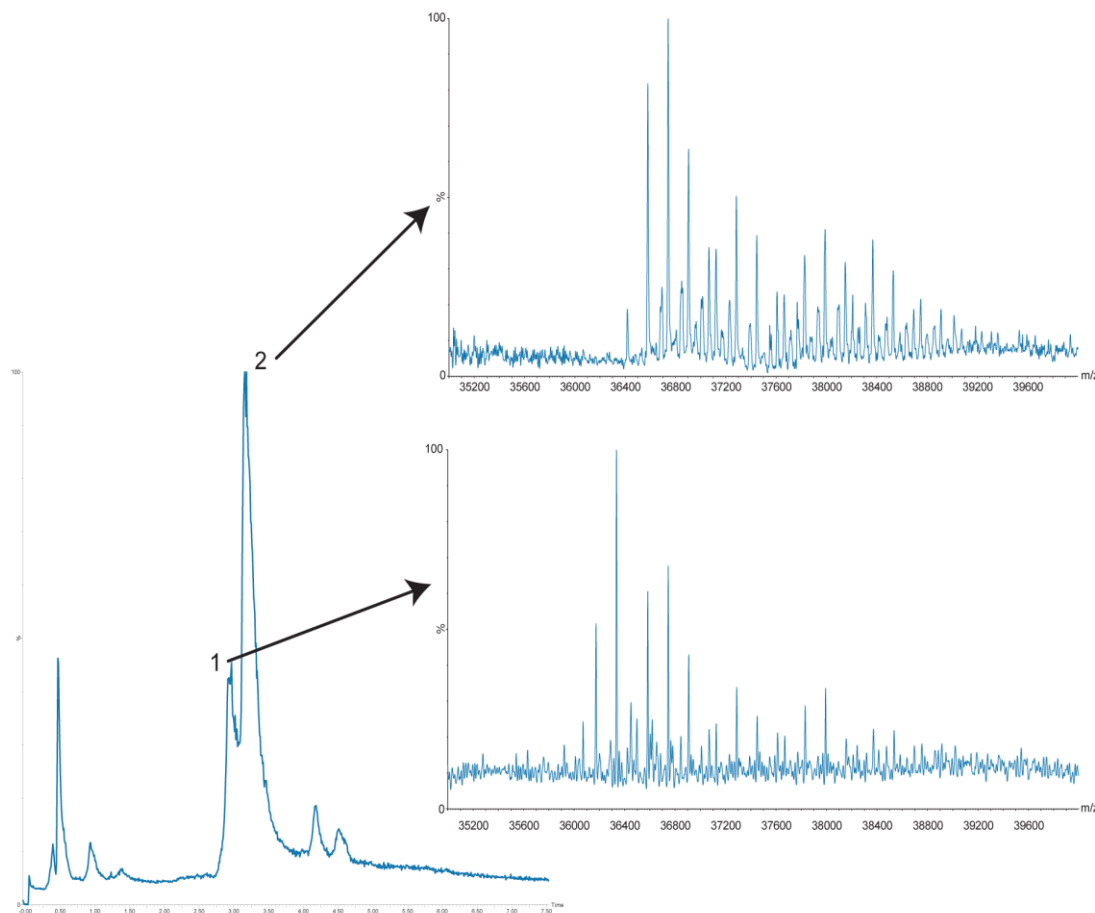
5. Phosphorylase B

タンパクの分離 (SunShell HFC18-30)

Column:
 Amplus C18-30, 2.6 μm (30 nm) 100 x 2.1 mm,
 Mobile phase: A) 0.1% TFA in water
 B) 0.1 % TFA in Acetonitrile
 Gradient program: Time 0 min 20 min
 %B 22% 70.5%
 Flow rate: 0.50 mL/min ,
 Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$
 Detection: UV@214 nm,
 Injection volume: 10 μL ,
 Concentration: 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ each protein,
 Sample:
 1. Angiotensin I
 2. Ribonuclease A
 3. Lysozyme
 4. Transferrin
 5. Bovine Serum Albumin



リパーゼの分離 (Amplus C8-30)



Column:

Amplus C8-30, 2.6 μm (30 nm) 100 x 2.1 mm,

Mobile phase: A) 0.1% Formic acid in water

B) 0.1 % Formic acid in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 10 min

%B 15% 60%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

Temperature: 60 $^{\circ}\text{C}$

Detection: MS,

Injection volume: 10 μL ,

Concentration: 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ each protein,

Sample:

1. Lipase Impurity

2. Lipase

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。
- PFPカラムは、優れた立体選択性を示す。
- Amideカラムは、高極性化合物の分離に有用である
- 30 nm細孔のコアシェルカラムはタンパク分離に有用である。