



2nd Choiceコアシェルカラム 長鎖アルキル基の実力 (極性物質から異性体まで)

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>





本日の内容

- RP-AQUA (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

- C30, C28カラムの紹介
 - C30カラムの特長
 - RP-AQUAカラムとの違い

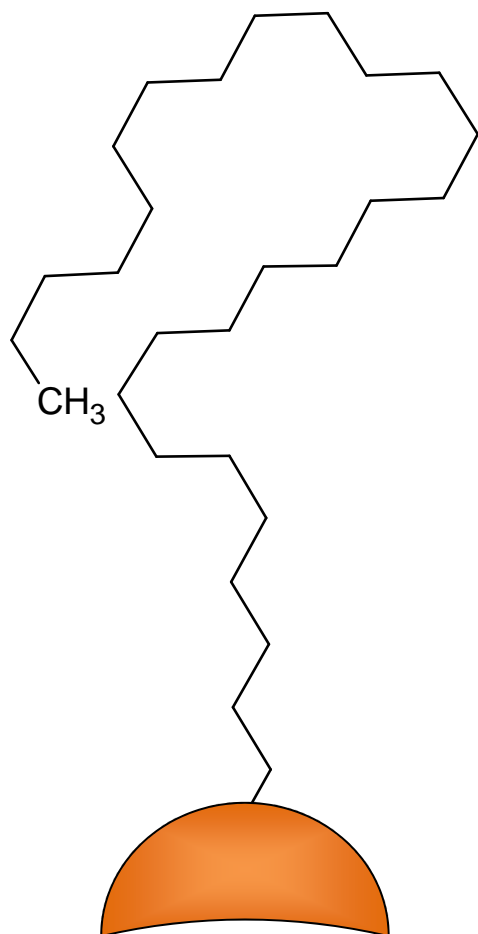


長鎖アルキル基カラムのラインナップ

- 親水性化合物向け長鎖アルキル基カラム
 - Sunniest RP-AQUA
 - SunAmor RP-AQUA
 - SunShell RP-AQUA

- 疎水性化合物向け長鎖アルキル基カラム
 - Sunrise C28
 - SunShell C30

RP-AQUA(C28)カラム

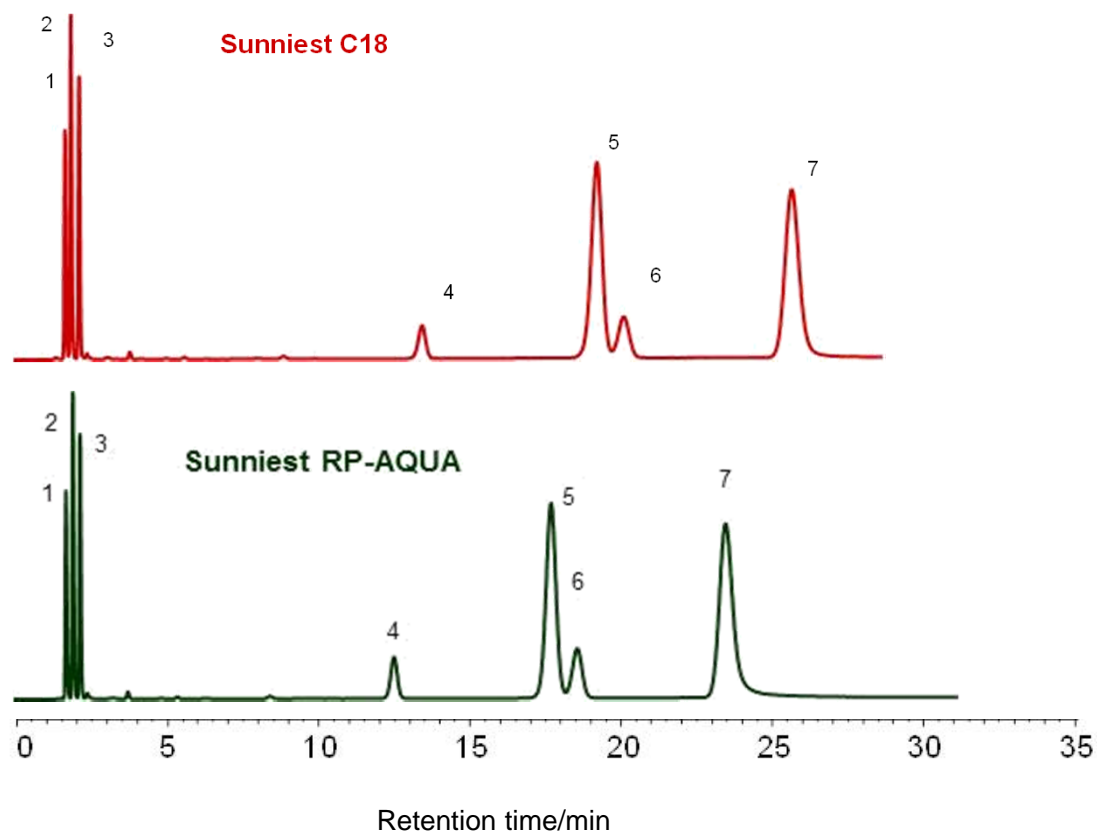


オクタコシル (C28)

- 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
- 極性基導入型C18より、耐久性が高い
- 親水性化合物の分離の使用可能



C18とRP-AQUAの標準試料の分離



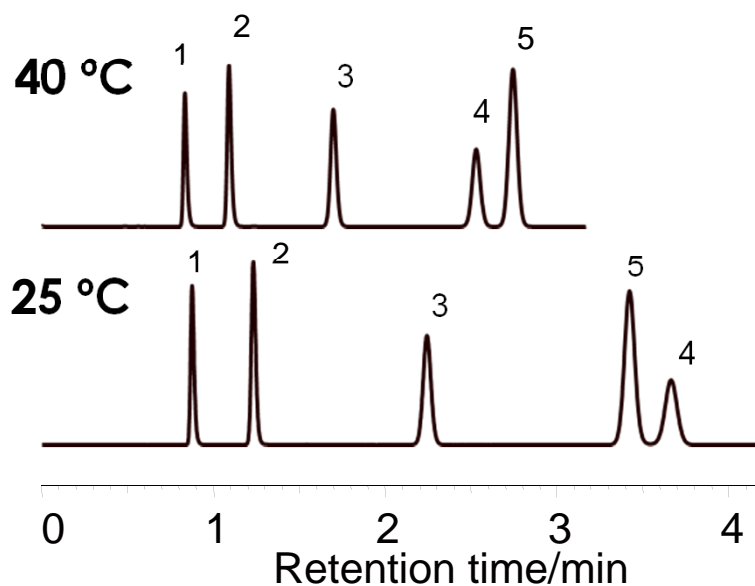
Column: Sunniest C18, 5 μ m 150 x 4.6 mm
Sunniest RP-AQUA, 5 μ m 150 x 4.6 mm
Sunniest C18, 5 μ m 150 x 4.6 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Pressure: 5.4 MPa

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)



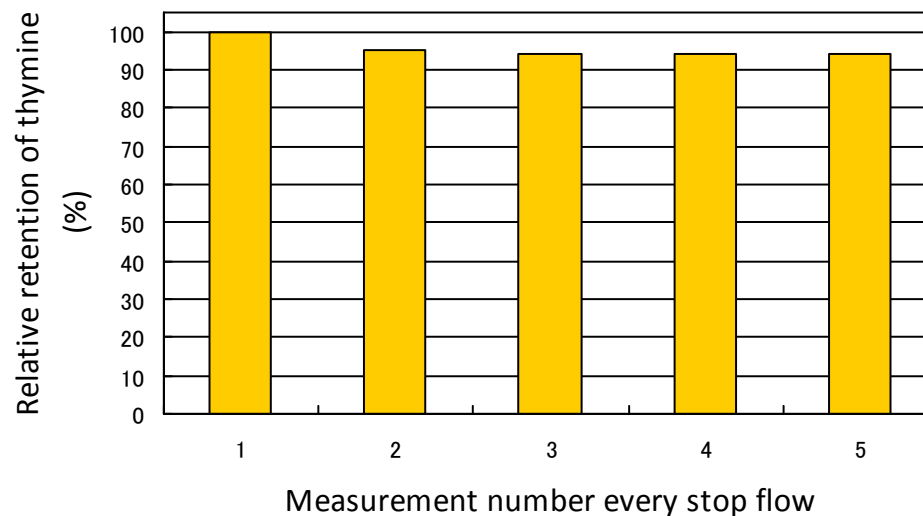
SunShell RP-Aqua の40 °Cでの保持

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

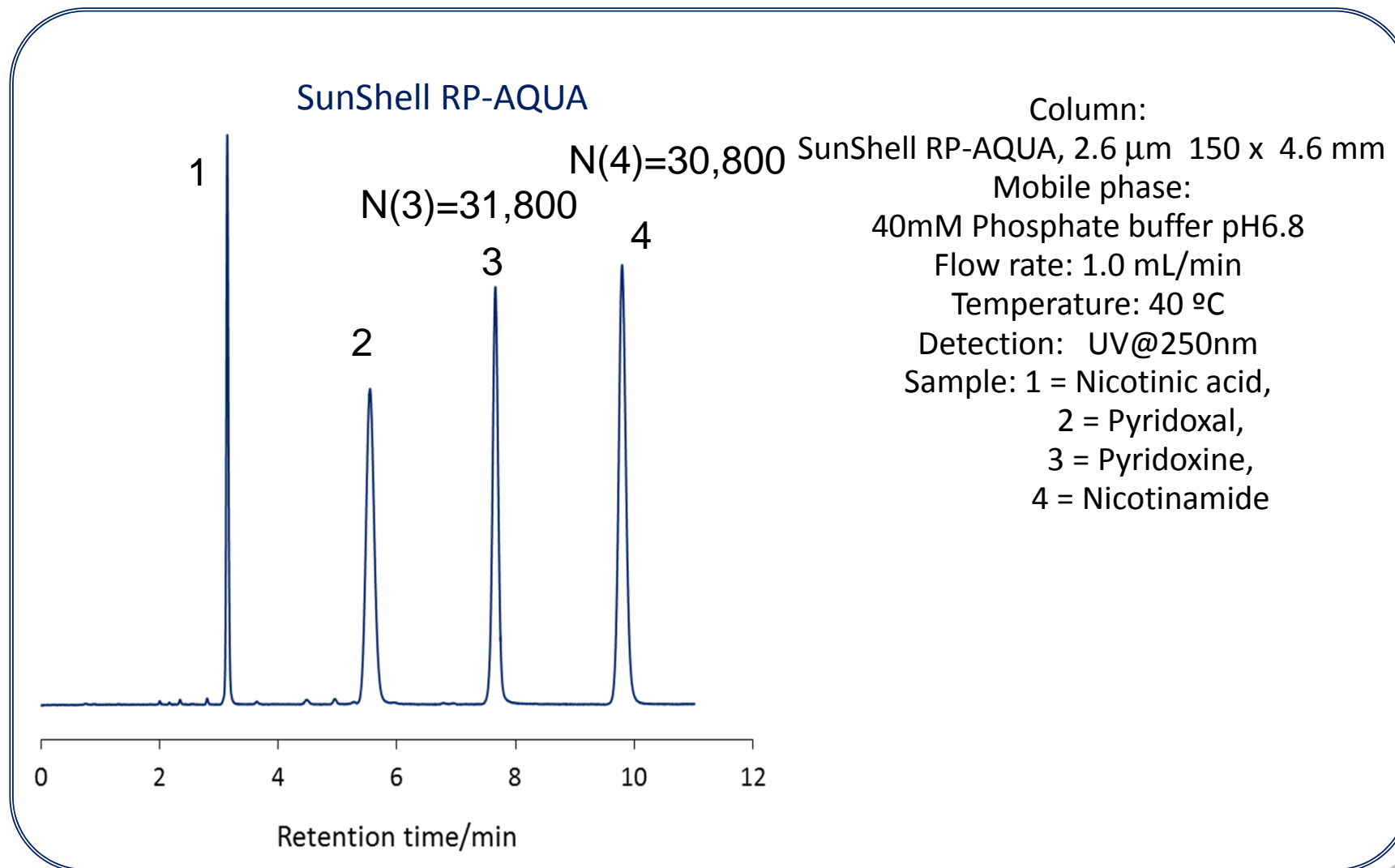
40°Cでのチミンの保持時間の変化 (ポンプ送液1時間停止毎に測定)



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。



水溶性ビタミンの分離





HILICと逆相クロマトグラフィーの比較

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)

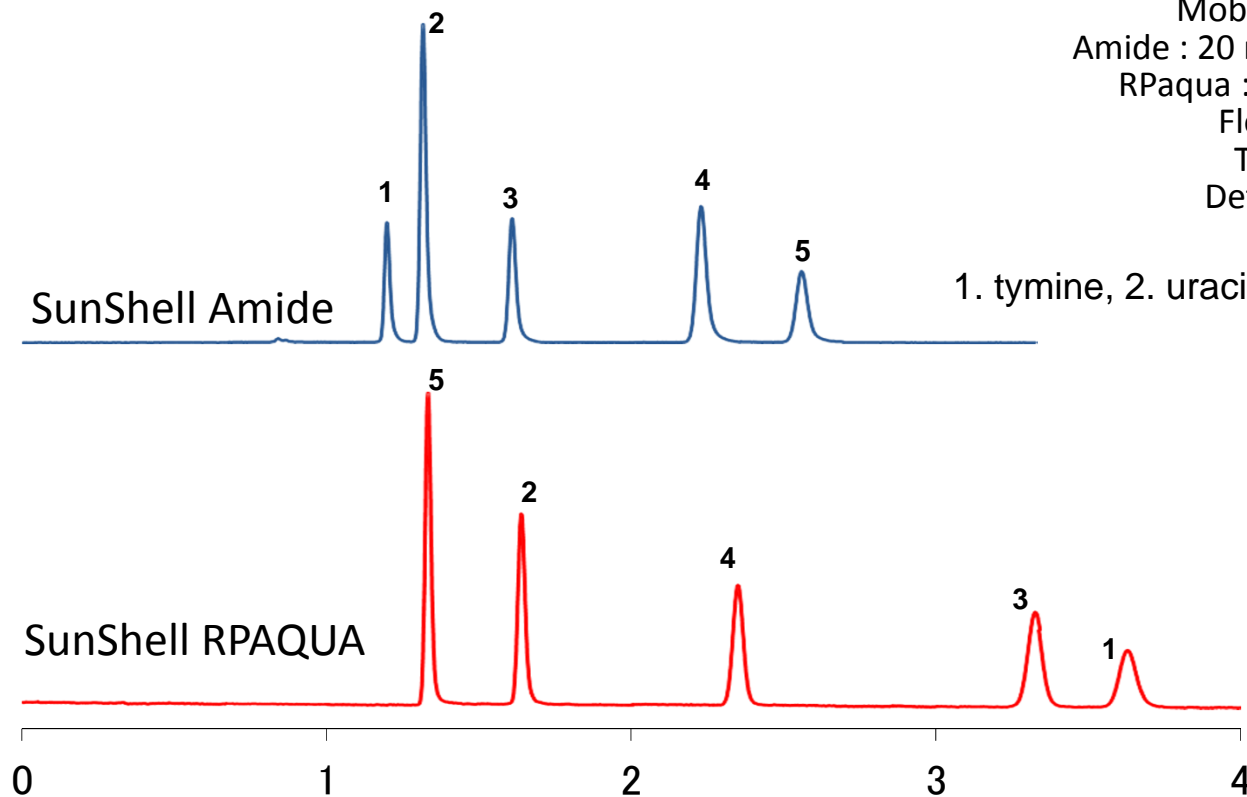
Flow rate: 1.0 mL/min

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

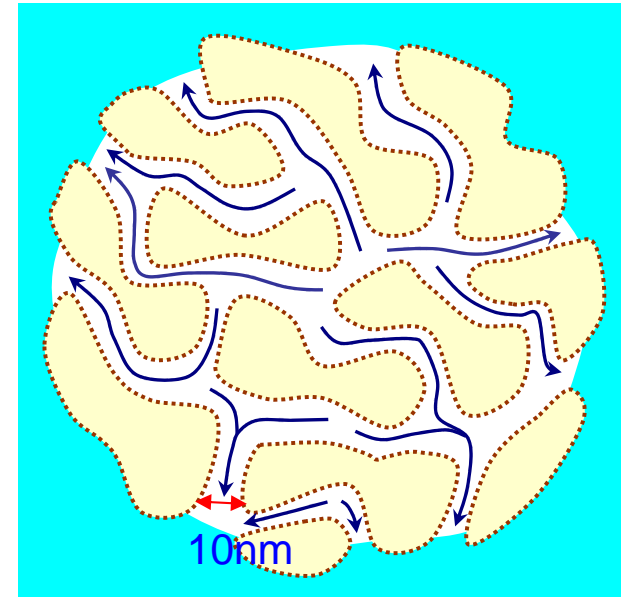
Detection: UV@250 nm

Sample:

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



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。この場合に作用してる圧力は0.006気圧である

内径が1 μ 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

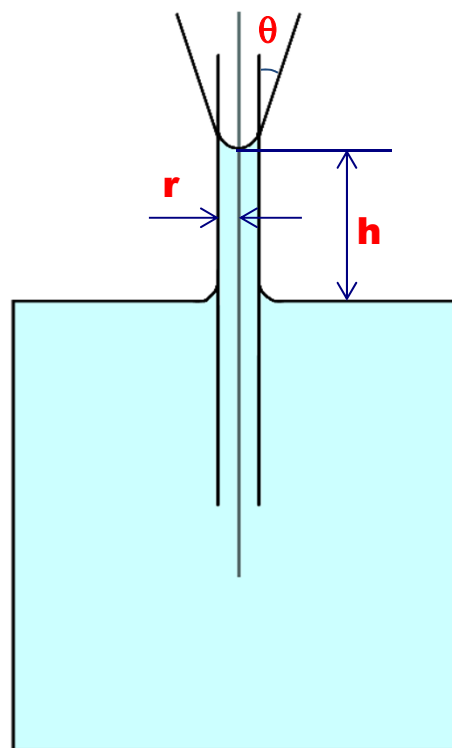
充填剤の細孔の大きさを考慮すると毛管現象によりこの1気圧は簡単に発生する



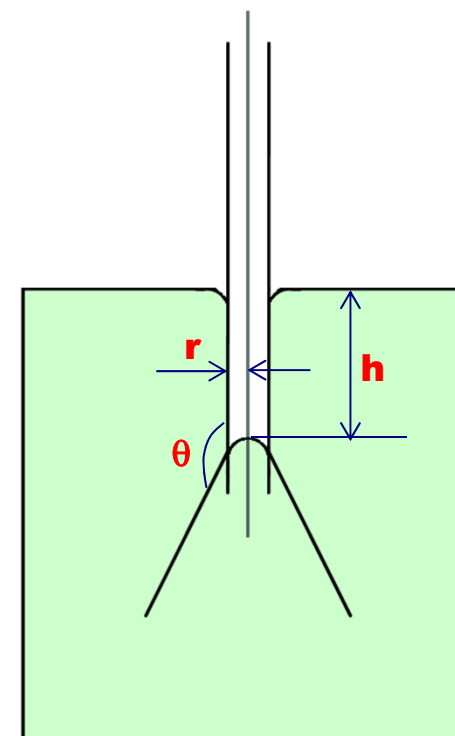
毛細管現象

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:
 $h = 2\gamma \cos \theta / (r\rho g)$
 γ : 表面張力
 ρ : 液体の密度(比重)



液体が管に濡れる場合
 $\theta < 90^\circ$



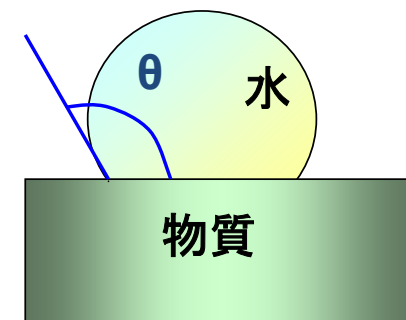
液体が管に濡れない場合
 $\theta > 90^\circ$



疎水性と撥水性

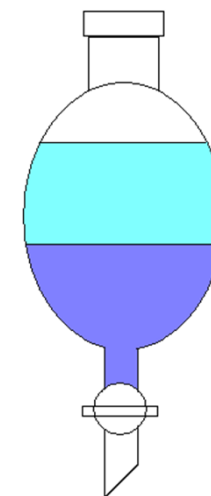
撥水性 → 水をはじく性質

『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』



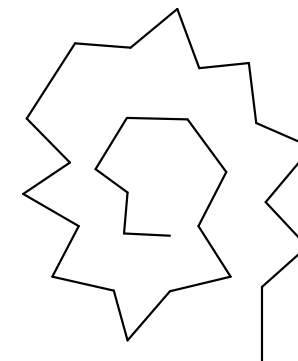
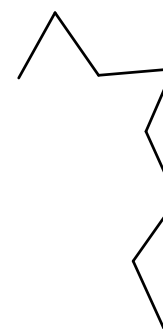
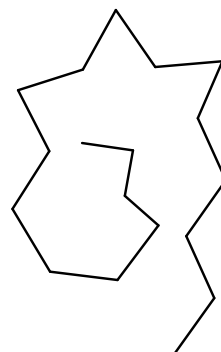
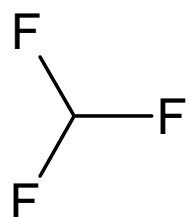
疎水性 → 水と混ざりにくい性質

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(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}

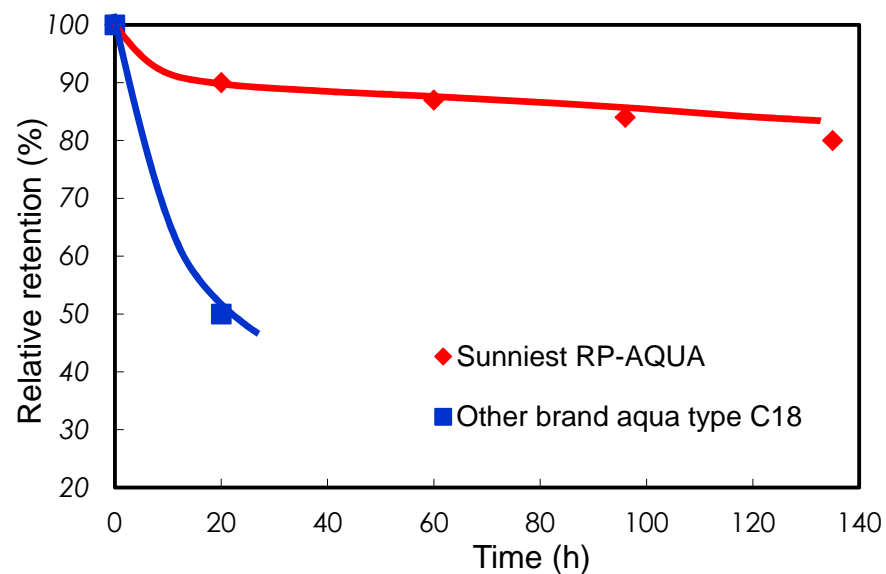
分析化学 Vol.59 No. 3, P193-205(2010)

疎水性(logP)が高いから撥水性(接触角)が高いわけではない

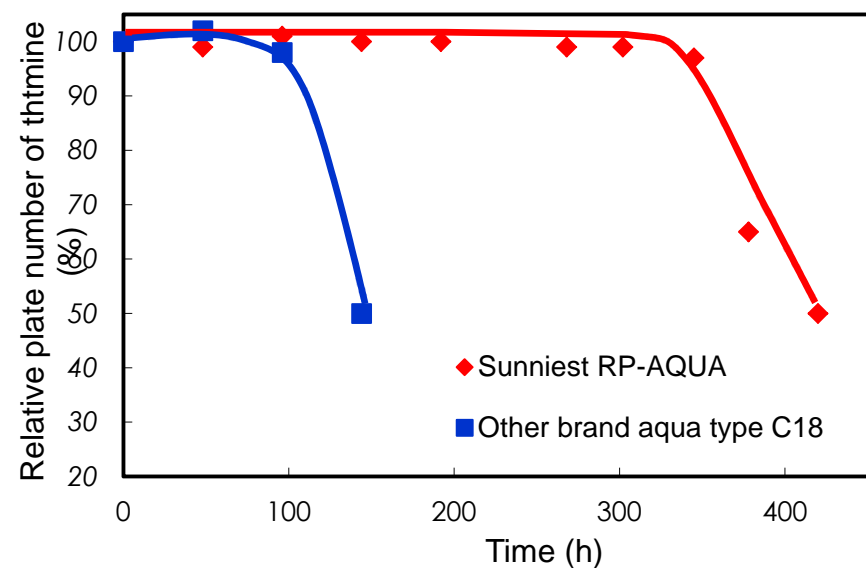
疎水性の高さ ≠ 撥水性の強さ



酸性、塩基性条件下の耐久性



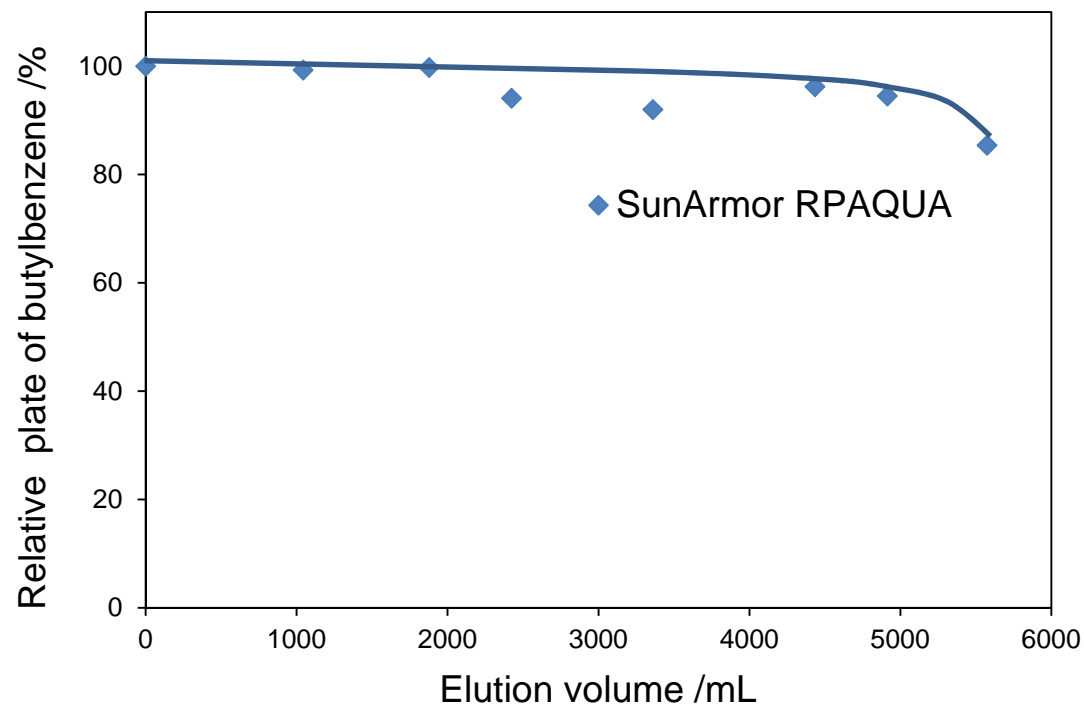
Test conditions
Mobile phase: 0.5% TFA
Temperature: 60 °C



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



SunArmor RPAQUAの耐久性



Durable test condition

Column dimension: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

10mM Ammonium bicarbonate(pH 10)

Flow rate: 0.2 mL/min

Temperature: 40 °C

Measurement condition

Column dimension: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=70/30

Flow rate: 0.2 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: acenaphthene

有機溶媒を用いないpH10の移動相でも高い
耐アルカリ性



アミノ酸の分離

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

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

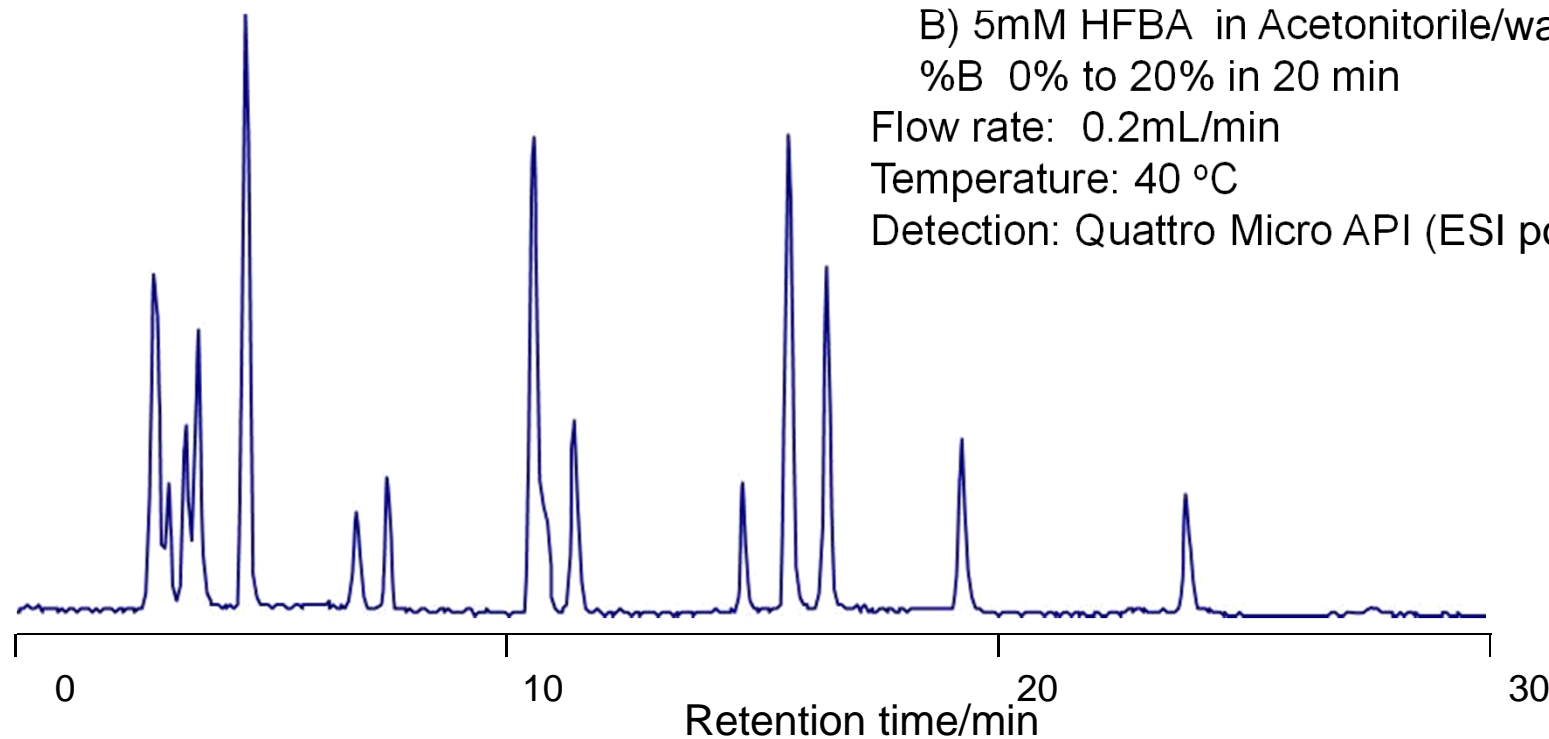
B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)

%B 0% to 20% in 20 min

Flow rate: 0.2mL/min

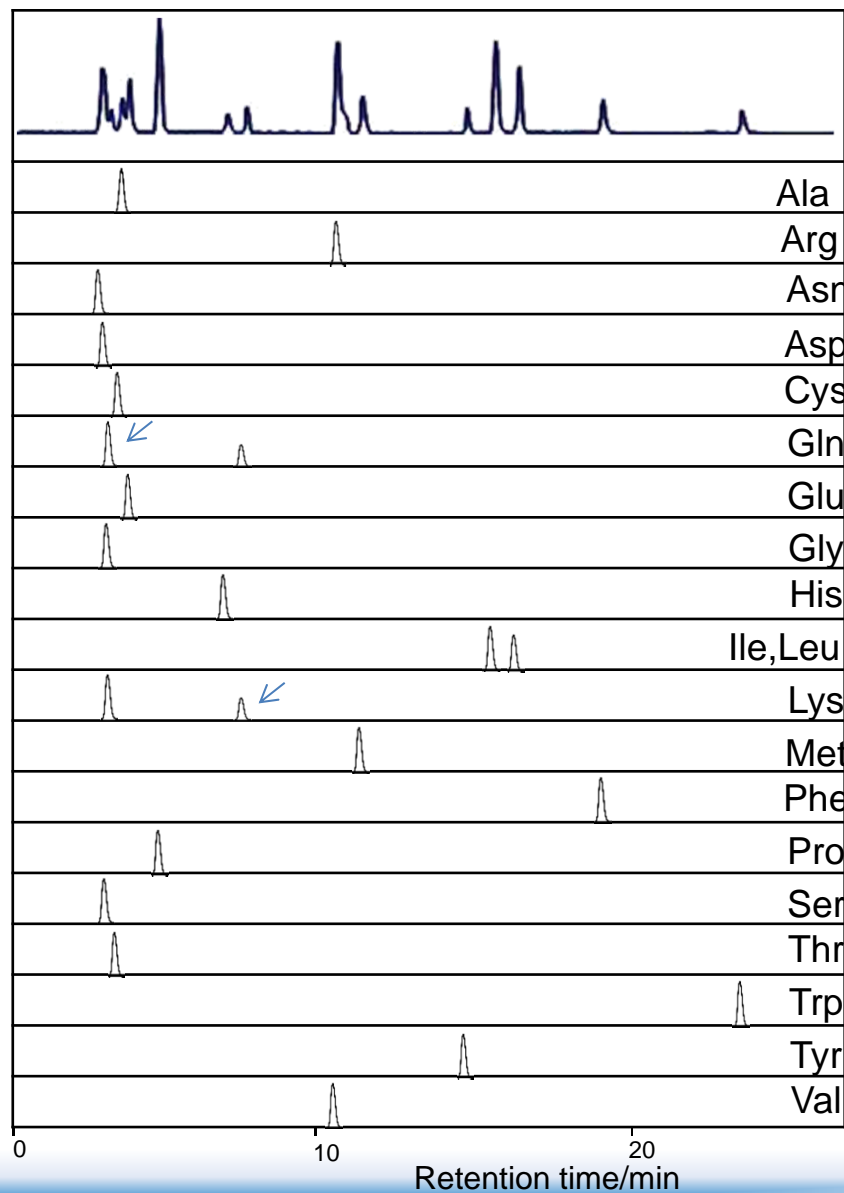
Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

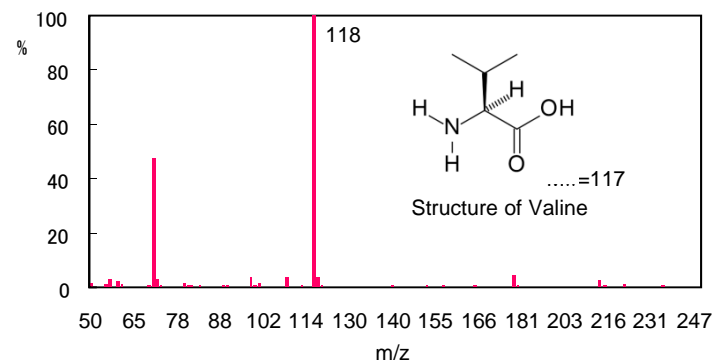




アミノ酸のLC/MS



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

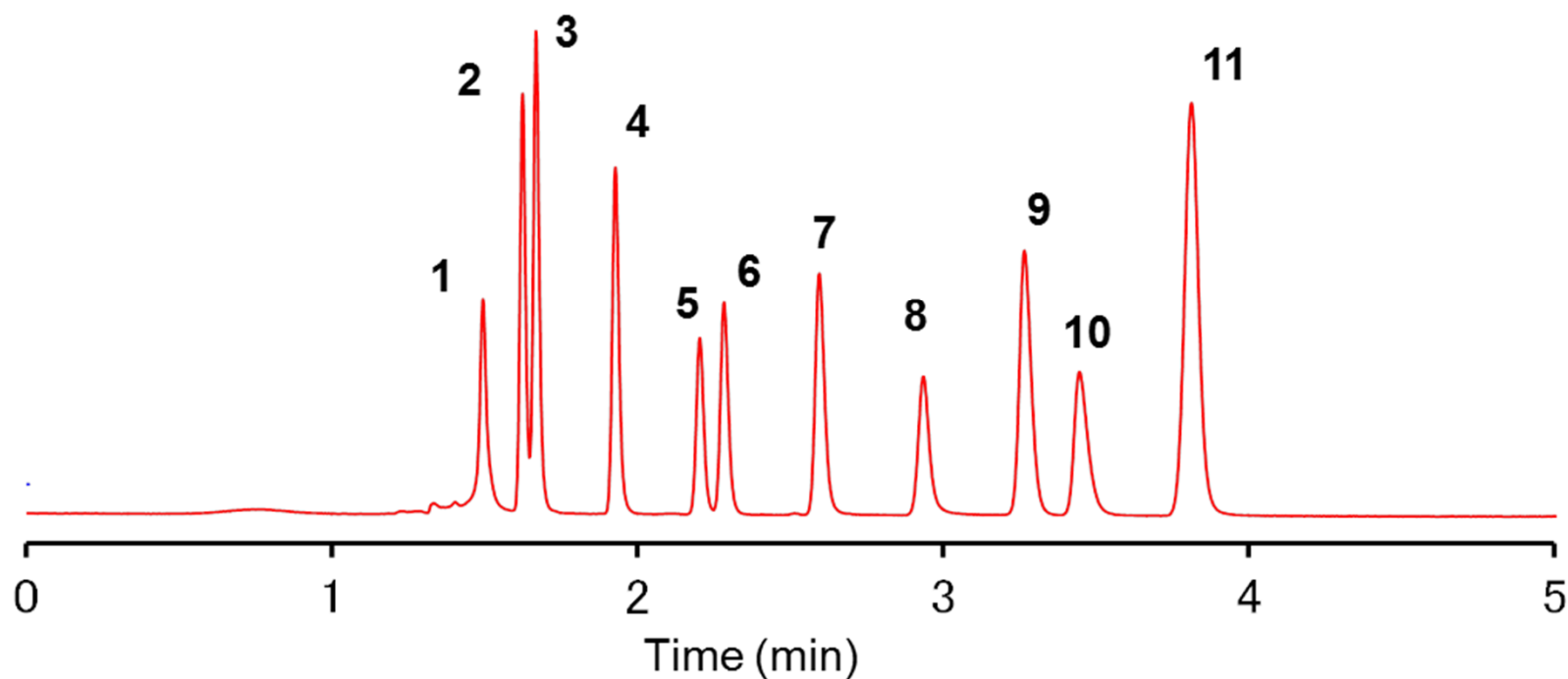
Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

118



有機酸の分離



Column: SunShell RP-AQUA 2.6 μm , 150 x 4.6 mm, Mobile phase: 0.025 M KH_2PO_4 , pH2.5

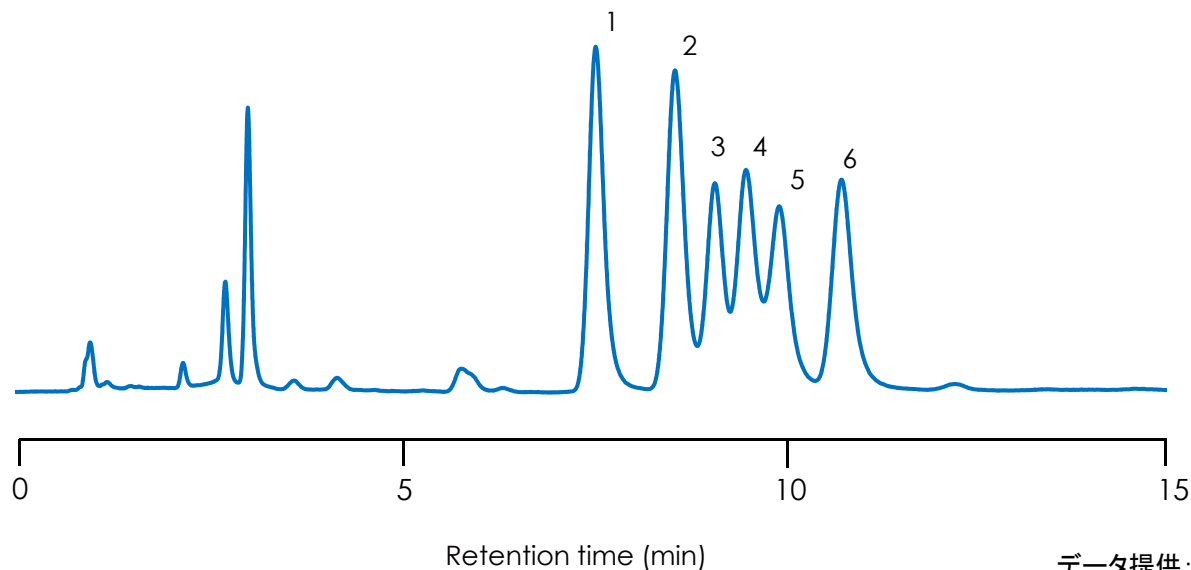
Flow rate: 1.0 mL/min, Column pressure: 32 MPa for 1.5mL/min, Temperature: 40 $^\circ\text{C}$

Detection: UV@210nm, Injection volume: 2 μL

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).



単糖の分離



データ提供: 東海大学 小玉修嗣先生

Column: SunShell RP-AQUA, 2.6um 100 x 4.6 mm

Mobile phase: 5 mM Phosphate and 25 mM tetraborate (pH 9.6)

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 20 °C

Detection: UV@220 nm

Sample: Monosaccharides derivatized with L-Tryptophan

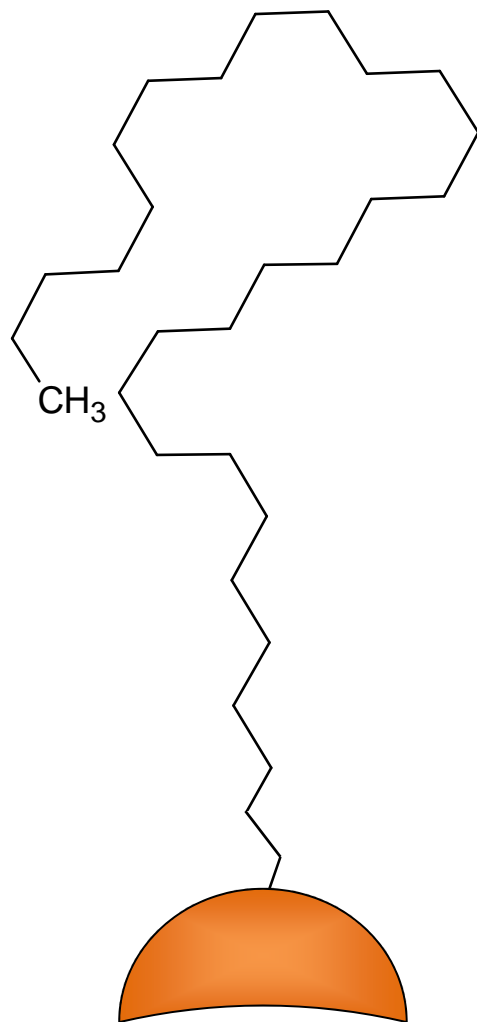
1 D-Galactose, 2 L-Galactose, 3 D-Glucose, 4, L-Mannose, 5 L-Glucose, 6 L-Mannose



- RP-AQUA (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

- C30, C28カラムの紹介
 - RP-AQUAカラムとの違い
 - C30カラムの特長

C30 C28カラム



トリアコンチル (C30)

- 疎水性相互作用が主な相互作用
- 疎水性の高い化合物分離に有用
- 構造異性体分離に有用

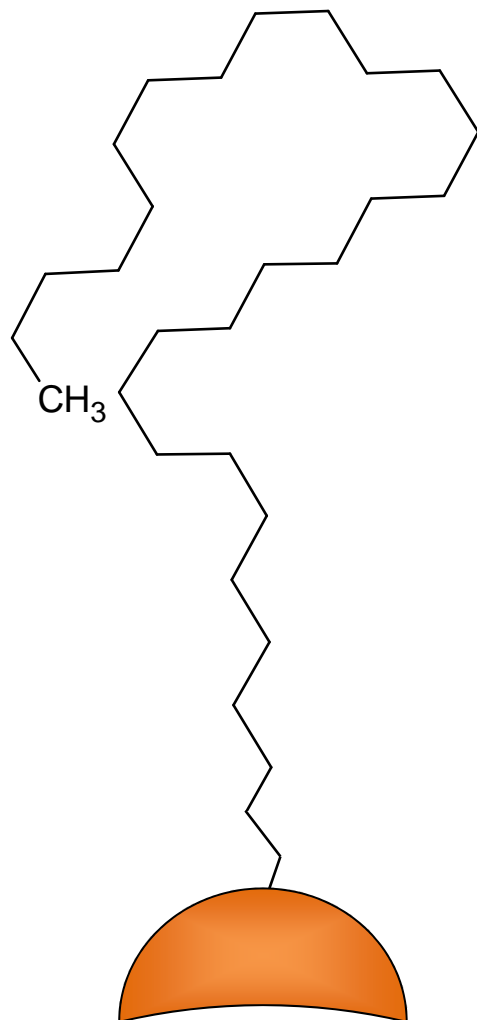


RP-AQUAとの違い

	SunShell C30	SunShell RP-AQUA
結合密度	1.9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	1.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
エンドキャッピング	TMS	Sunniest エンドキャップ
細孔径	12 nm	16 nm
pH範囲	2-8	2-8 (2-10)
対象化合物	異性体 低極性化合物	極性化合物

大きな違いは官能基の結合密度

C30カラムの注意点



トリアコンチル (C30)

結合密度が高いほど
異性体分離に優れる

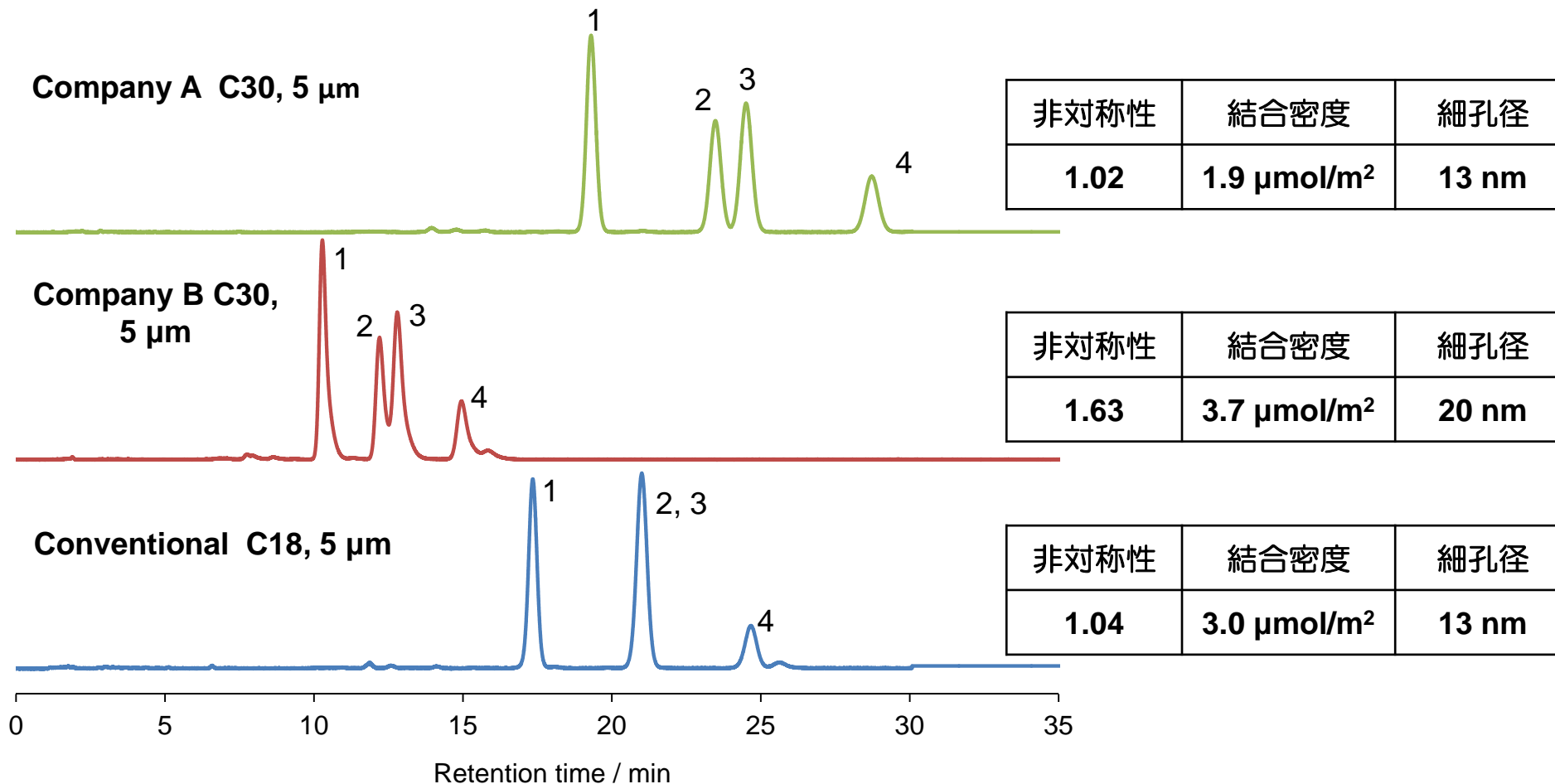


結合密度が高すぎると
ピークがテーリングする

結合密度が低いと
分離が不十分になる



結合密度の影響



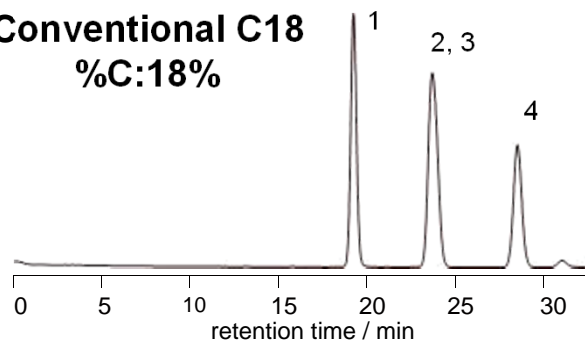
Column dimension, 250 x 4.6 mm;
mobile phase, methanol/water = 97/3;
flow rate, 1.0 mL/min;
temperature, 30 °C;
detection, UV295 nm;

sample,
1 = δ -tocopherol, 2 = γ -tocopherol,
3 = β -tocopherol, 4 = α -tocopherol

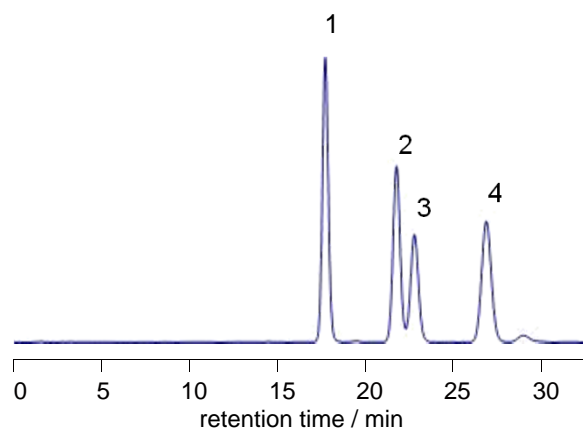


C18との比較1

Conventional C18
%C:18%



Sunrise C28 %C:18%



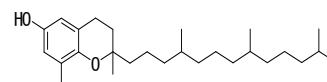
Column size: 4.6x250 mm
Mobile phase: 97/3=CH₃OH/H₂O

Flow rate: 1.0 mL/min

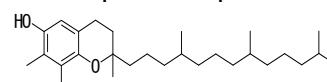
Temperature: 25 °C

Detection: UV at 295nm

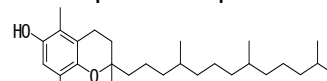
Sample: 1=δ-Tocopherol



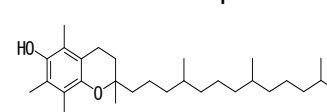
2=γ-Tocopherol



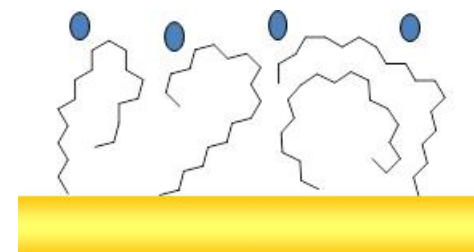
3=β-Tocopherol



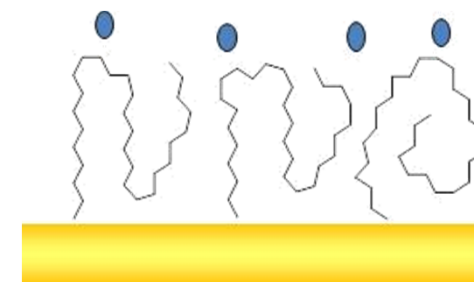
4=α-Tocopherol



C18



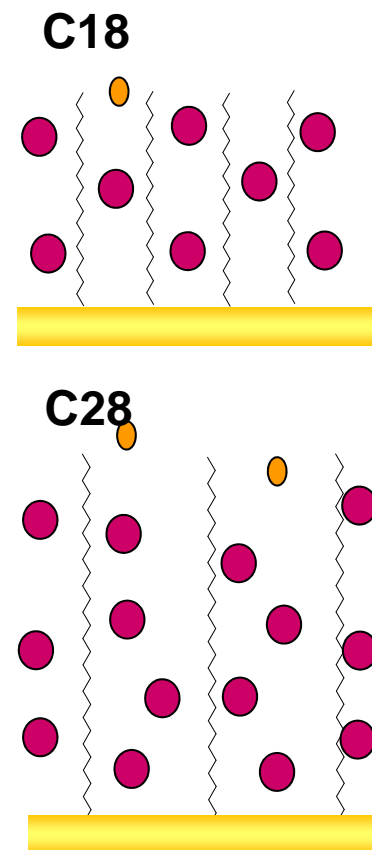
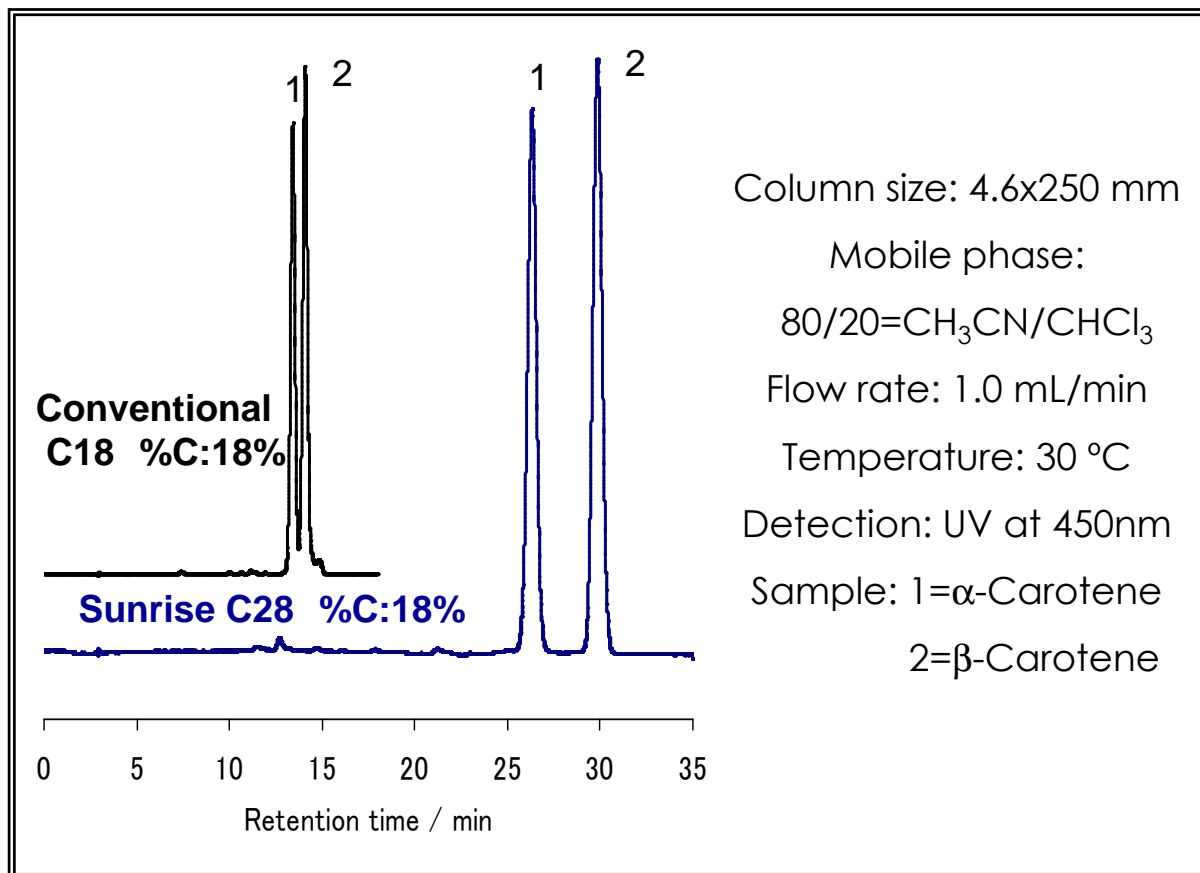
C28



固定相容量は同じ



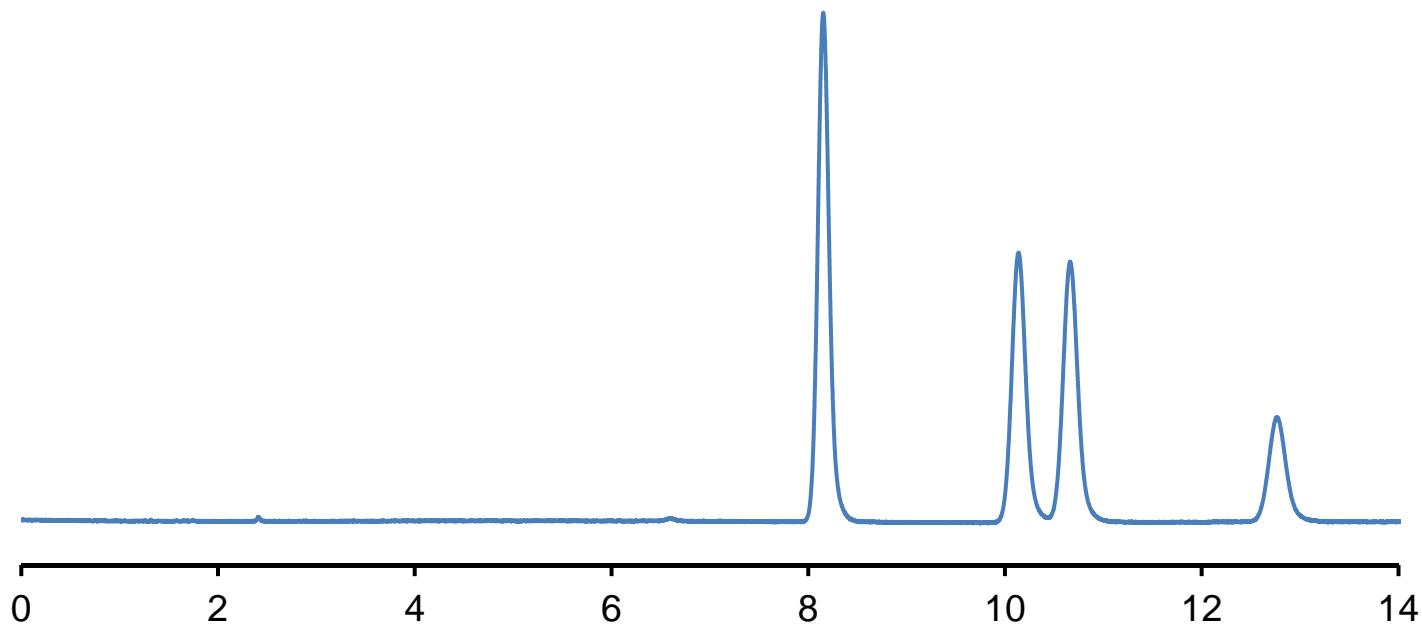
ODSとの比較2



固定相容量は2倍

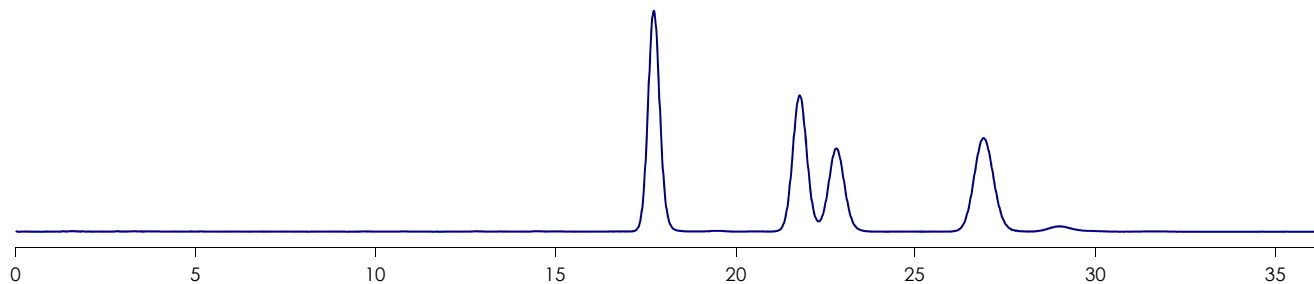


ビタミンEの分離比較



Column: SunShell C30, 2.6 μm 150 x 3.0 mm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 97/3$ Flow rate: 0.43 mL/min, Temperature: 25 $^\circ\text{C}$, Pressure: 15.5 MPa

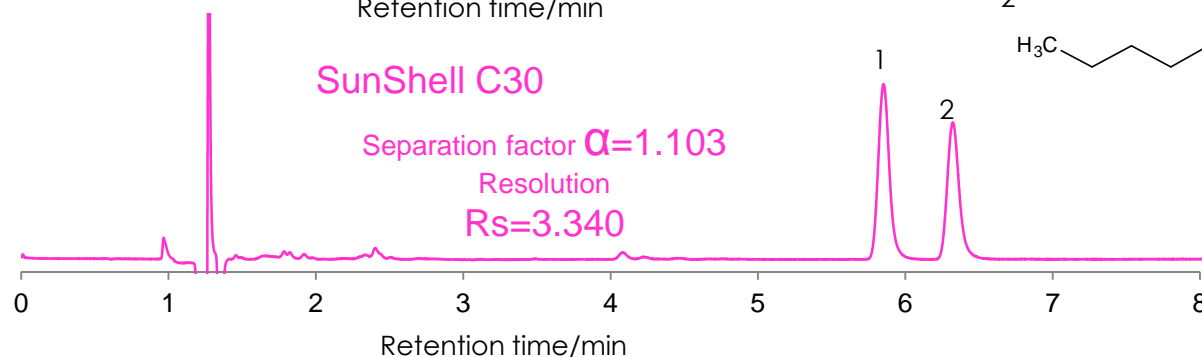
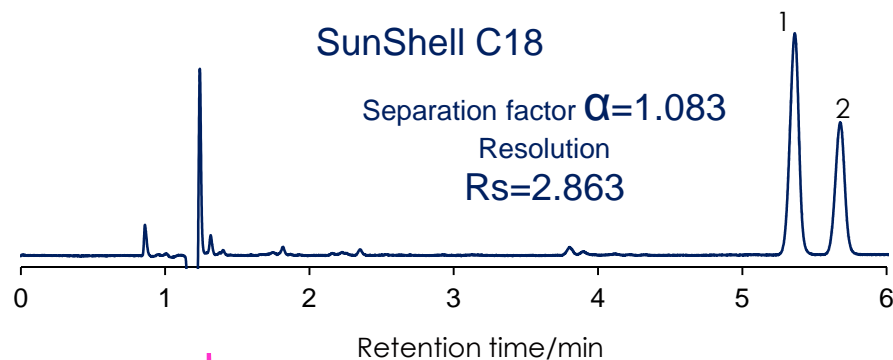


Column: Sunrise C28, 5 μm 250 x 4.6 mm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 97/3$ Flow rate: 1 mL/min, Temperature: 25 $^\circ\text{C}$



オレイン酸とエライジン酸の分離



Mobile phase: Acetonitrile:water:formic acid=90:10:0.05

Flow rate: 1.0 mL / min

Temperature: 40 °C

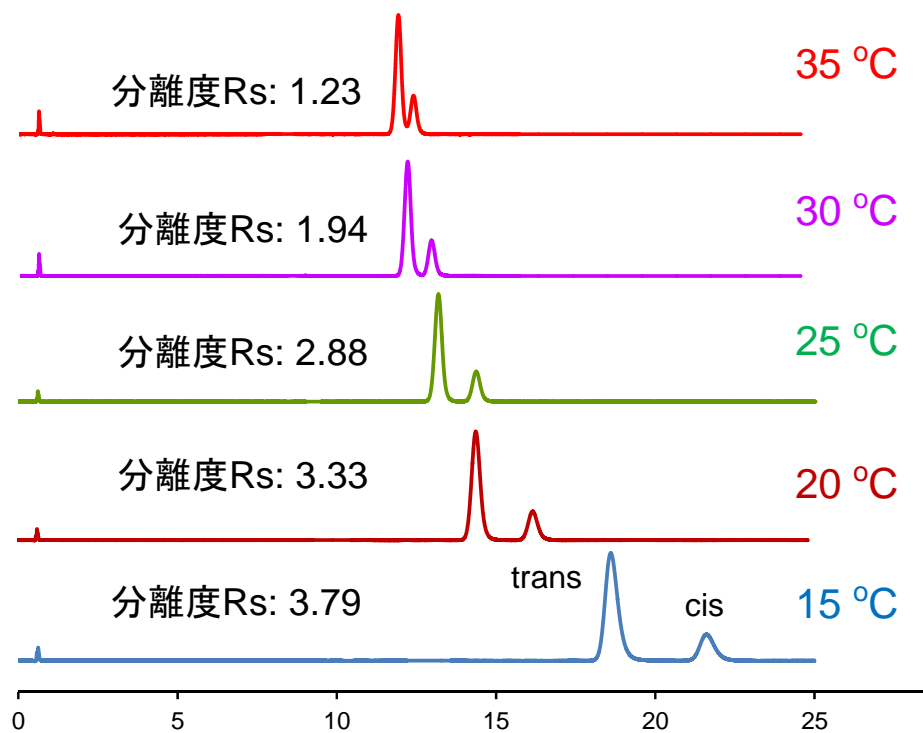
Detection: UV@215 nm

Sample: 1 = Oleic acid, 2 = Elaidic acid

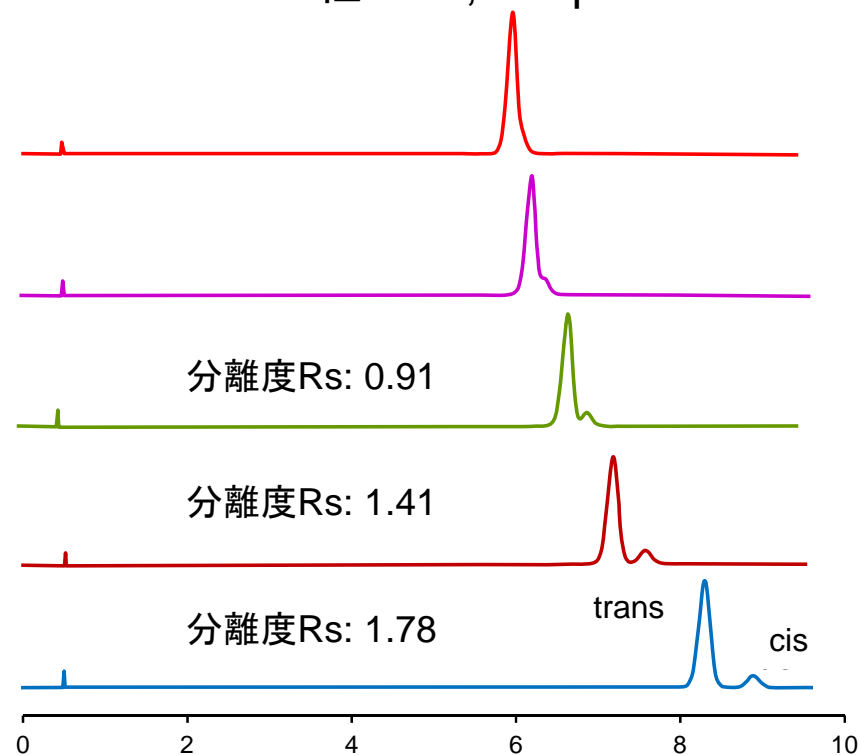


ビタミンK 1 異性体の分離比較

SunShell C30, 2.6 μm



T社 C30, 2.6 μm



Column: SunShell C30, 2.6 μm 100 x 2.1 mm
T社 C30, 2.6 μm 100 x 2.1 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O= 96/4
Flow rate: 0.35 mL/min,



まとめ

- 結合密度を低く調整したC28カラム、RP-AQUA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。
- RP-AQUAカラムは、水系移動相用C18カラムと比較すると高い耐久性を有している
- C30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。
- C30カラムは、C18カラムでは分離できない異性体分離を達成できる。
- 他社C30カラムと比べ、幅広い温度で異性体分離が達成可能である。