



P-27

# コアシェル型HILICカラムと 極性化合物分離のための逆相カラム の比較と評価

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](mailto:info@chromanik.co.jp)  
<http://chromanik.co.jp>





# 親水性化合物の分離

## HILICカラム

- 極性有機溶媒濃度の高い移動相を使用
- 極性の低い物質から溶出

## 逆相カラム

- 水系のみの移動相を使用
- 極性の高い物質から溶出

相補的な関係

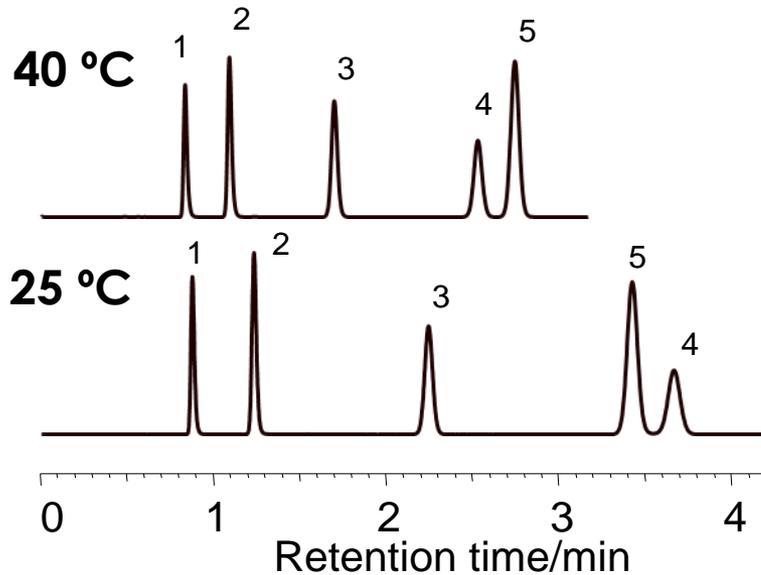
- 二次相互作用が強く作用

- カラムの劣化が早い

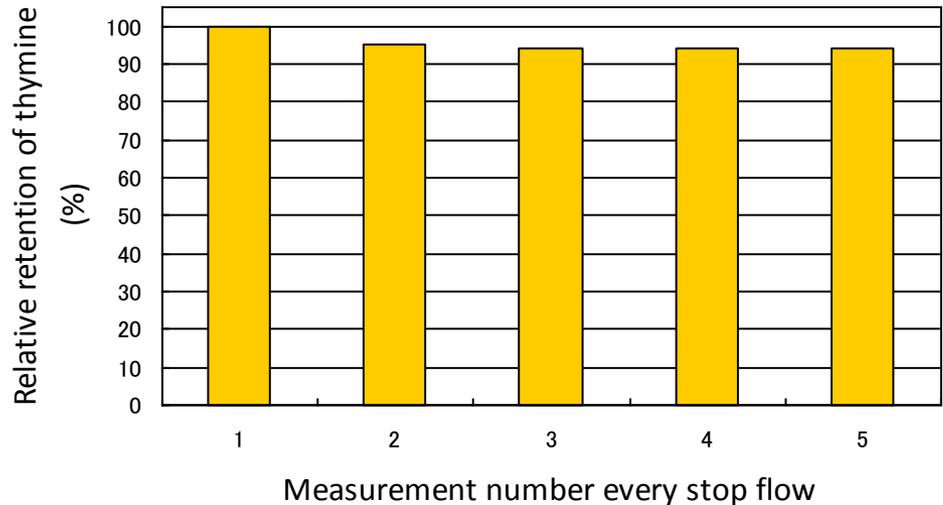
二種類のカラムを使い分けることで  
親水性化合物分離の幅を広げることが可能

# SunShell RP-Aqua の40 °Cでの保持

## 核酸塩基の分離



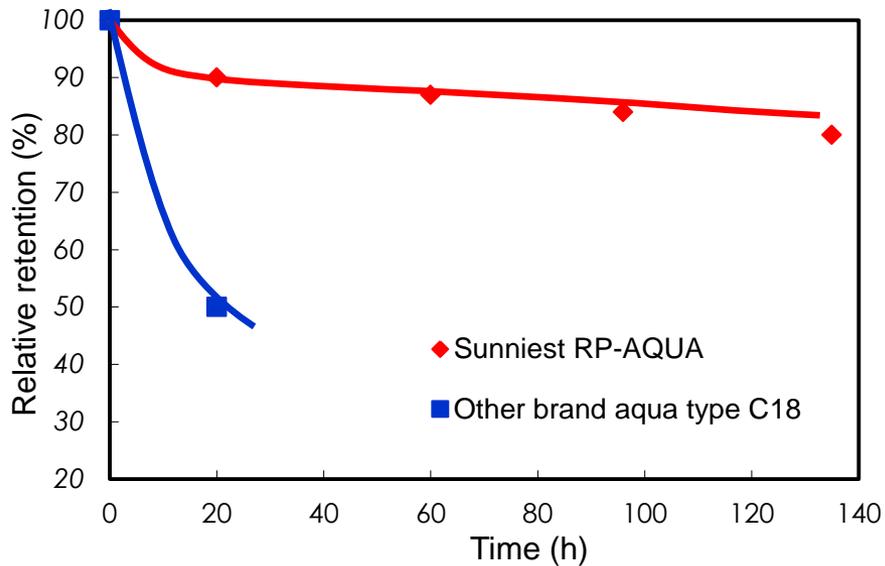
## 40°Cでのチミンの保持時間の変化 (ポンプ送液1時間停止毎に測定)



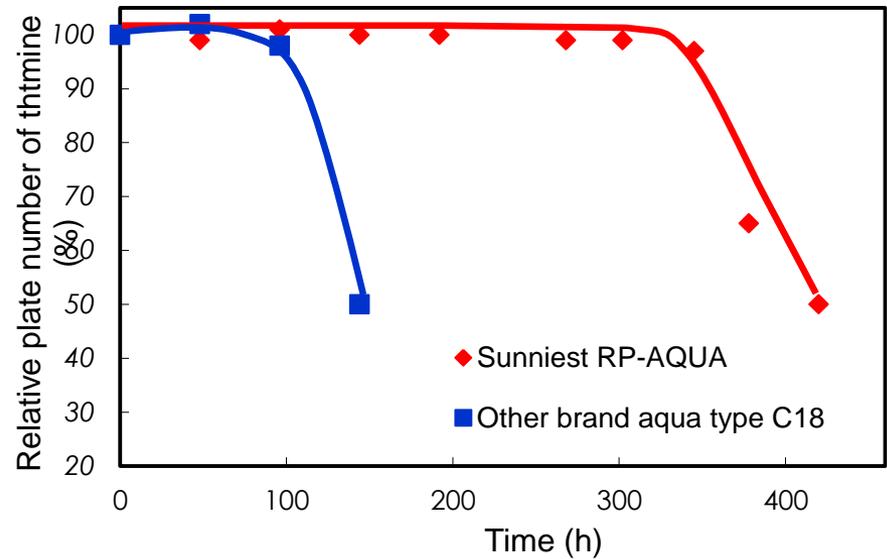
Column: SunShell RP-Aqua, 2.6  $\mu$ m 75 x 4.6 mm  
 Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C and 25 °C  
 Sample: 1 = Cytosine, 2 = Uracil, 3 = Thymidine,  
 4 = Uridine, 5 = Thymine

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。

# 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

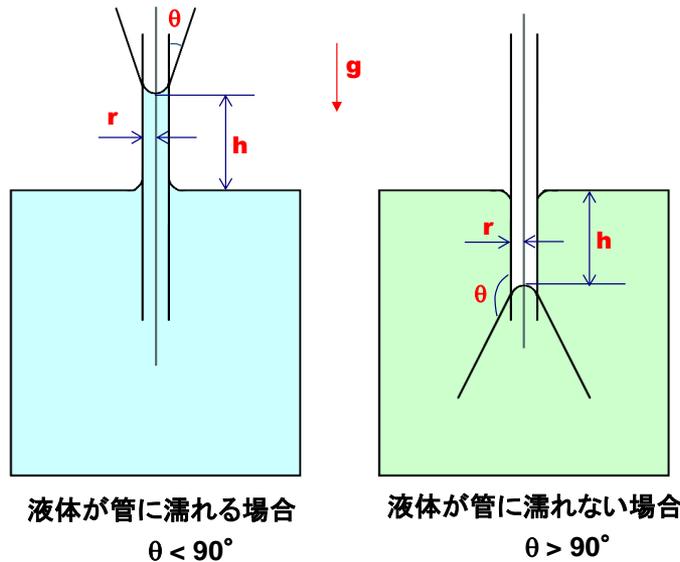
# 細孔からの移動相の抜け出し

毛管現象の式:

$$h = 2\gamma \cos\theta / (r\rho g)$$

$\gamma$ : 表面張力  $\rho$ : 液体の密度(比重)

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上昇作用して  
る圧力は0.006気圧である

内径が1 $\mu$ 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

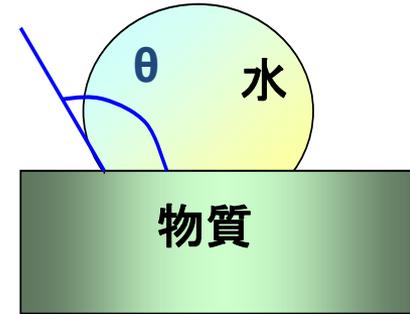
カラムを大気圧状態にして、移動相を充填剤の細孔から抜け出させる  
ために必要な圧力は1気圧である

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

# 疎水性と撥水性

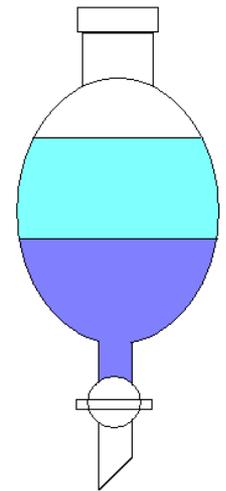
**撥水性** → 水をはじく性質

『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』

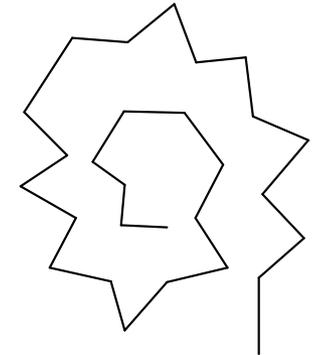
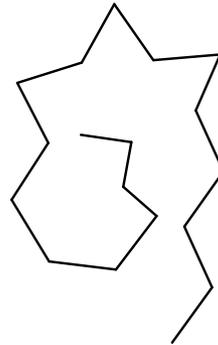
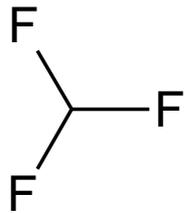


**疎水性** → 水と混ざりにくい性質

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( $\theta$ ) | 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   | $8.84 \times 10^{-10}$ |

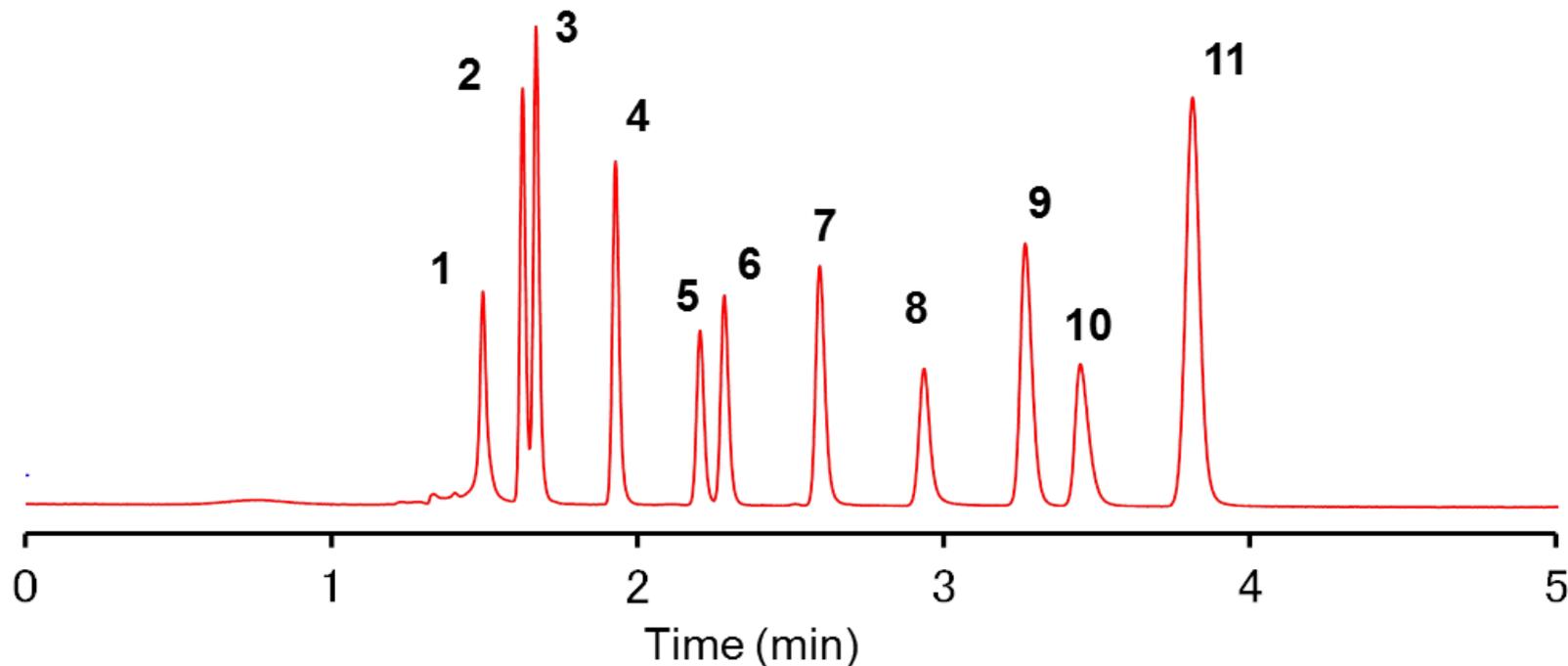
分析化学 Vol.59 No. 3, P193-205(2010)

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**



# 有機酸の分離



Column: SunShell RP-AQUA 2.6  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm, Mobile phase: 0.025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH2.5

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

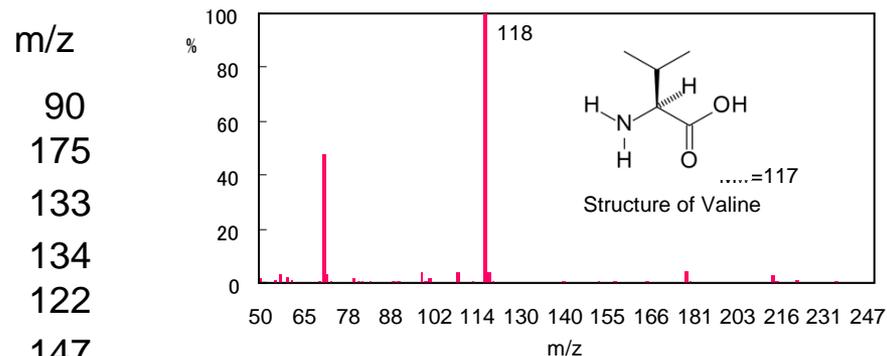
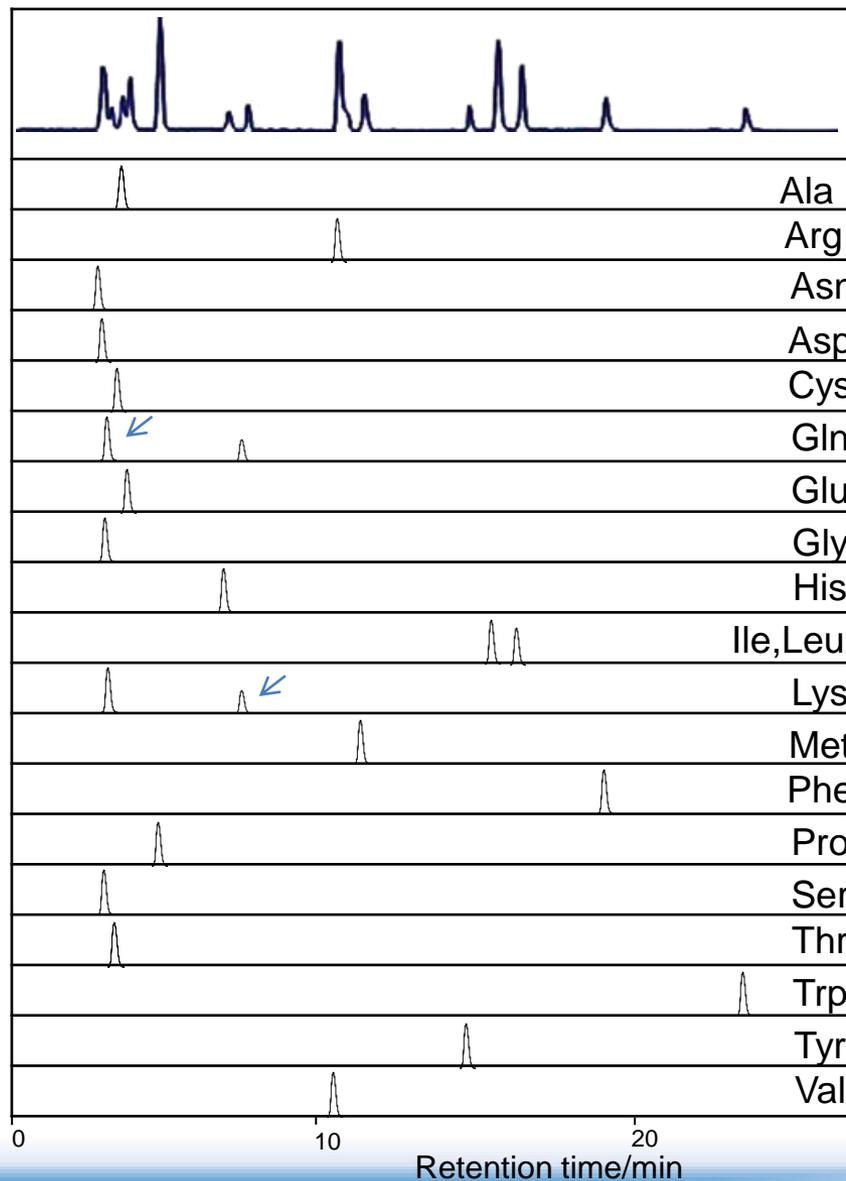
Detection: UV@210nm, Injection volume: 2  $\mu\text{L}$

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).





# アミノ酸のLC/MS



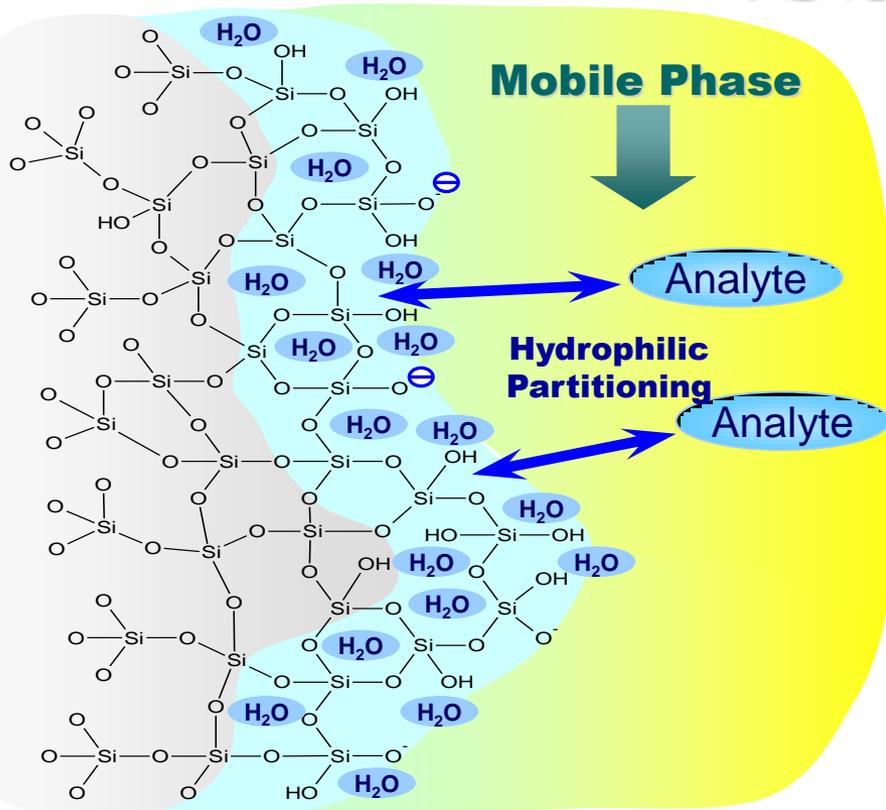
Mass spectrum of Valine

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

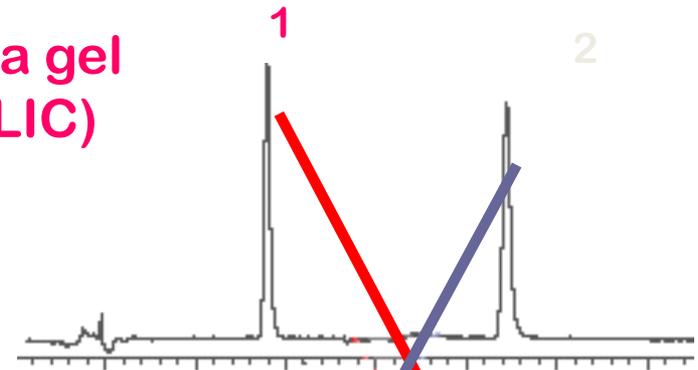
Column: Sunniest RP-AQUA 5 $\mu$ m, 2.0x 150mm  
 Mobile phase:  
 A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)  
 B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)  
 %B 0% to 20% in 20 min  
 Flow rate: 0.2mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM



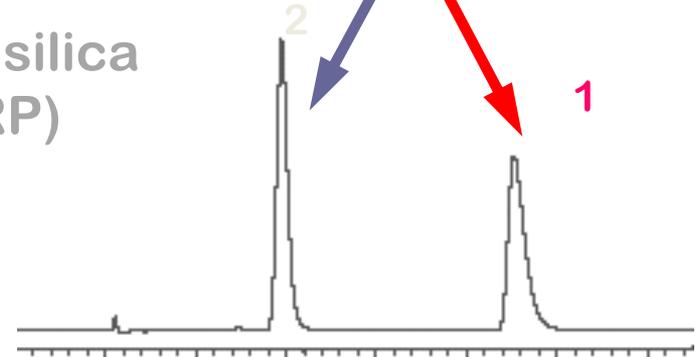
# HILICの分離メカニズム



Silica gel  
(HILIC)



ODS silica  
(RP)



## □ HILICの特徴として...

- 逆相系に用いる極性溶媒が使用可能である
- 固定相に形成された水和層との分配によって分離が起こると言われている
- 親水性が高い化合物ほど保持される特徴がある

# HILICカラムを設計するうえで・・・

## 1. 基材自身の親水性が高い

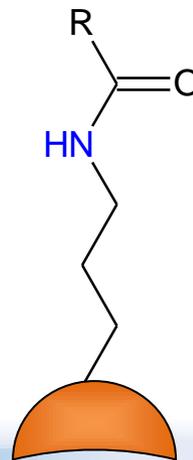
- 基材のみでもHILICで使用可能なシリカを選択
- コアシェルを使用することで高分離が可能

## 2. 導入されている官能基の構造

- 官能基が高い水和性を有し、高い密度で導入可能である
- 静電的な相互作用が極力低い
- 官能基の結合部位の疎水性が低いこと



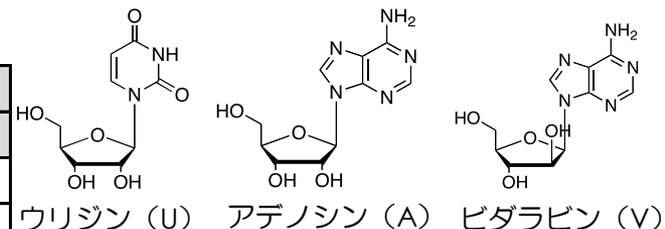
アミド基を選択





# 親水性の比較

※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) | Bar | 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  |
| 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  |

ウリジンの保持から充填剤の親水性を評価



保持が大きいほど充填剤の親水性が高い

同じHILICカラムであっても、親水性の違いが大きい

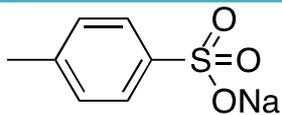


逆相カラムのように使い分ける必要がある

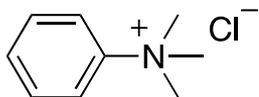
合成したSunShell HILIC-Amideは他の官能基を導入したHILICカラムの中でも大きな親水性を有していた

# イオン交換性の比較

| Column                               | U              | SPTS        | a(SPTS/U)   | U              | TMPAC       | a(TMPAC/U)  |
|--------------------------------------|----------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
|                                      | k (U)<br>20 mM | k (SPTS)    |             | k (U)<br>20 mM | k (TMPAC)   |             |
| ZIC-HILIC (5 mm)                     | 2.11           | 0.69        | 0.33        | 2.11           | 3.32        | 1.57        |
| ZIC-HILIC (3.5 mm)                   | 2.10           | 0.56        | 0.27        | 2.10           | 3.45        | 1.64        |
| Nucleodur HILIC (3 mm)               | 2.20           | 1.13        | 0.51        | 2.20           | 3.14        | 1.43        |
| Amide-80 (5 mm)                      | 3.30           | 0.89        | 0.27        | 3.30           | 4.57        | 1.38        |
| XBridge Amide (3.5 mm)               | 2.55           | 0.74        | 0.29        | 2.55           | 1.89        | 0.74        |
| PolySULFOETHYL (3 mm)                | 1.58           | 0.25        | 0.16        | 1.58           | 1.38        | 0.87        |
| PolyHYDROXYETHYL (3 mm)              | 3.92           | 0.87        | 0.22        | 3.92           | 3.34        | 0.85        |
| CYCLOBOND I (5 mm)                   | 0.70           | 3.32        | 4.73        | 0.70           | 0.45        | 0.63        |
| LiChrospher Diol (5 mm)              | 1.50           | 0.95        | 0.63        | 1.50           | 1.73        | 1.16        |
| Chromolith Si                        | 0.31           | 0.06        | 0.19        | 0.31           | 5.25        | 16.94       |
| HALO HILIC (2.7 mm)                  | 0.64           | 0.20        | 0.31        | 0.64           | 9.03        | 14.11       |
| COSMOSIL HILIC (5 mm)                | 1.60           | 1.28        | 0.80        | 1.60           | 0.78        | 0.49        |
| Sugar-D (5 mm)                       | 1.58           | 3.00        | 1.90        | 1.58           | 0.39        | 0.25        |
| NH <sub>2</sub> -MS (5 mm)           | 2.44           | 2.01        | 0.82        | 2.44           | 0.69        | 0.28        |
| <b>SunShell HILIC-Amide (2.6 mm)</b> | <b>2.93</b>    | <b>1.29</b> | <b>0.48</b> | <b>2.93</b>    | <b>1.18</b> | <b>0.44</b> |



Sodium p-toluenesulfonate (SPTS)



Trimethylphenylammonium chloride (TMPAC)

aの値により充填剤の  
イオン交換性が評価できる



値が小さいほどイオン交換性  
が低い

合成したSunShell HILIC-  
Amideは aの値が低くアニオン、  
カチオン交換ともに小さいこと  
が判明した



# 核酸塩基の分離

Column:

SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,

Acentice Express OH5 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm

Acentice Express HILIC 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,

Mobile phase: acetonitrile :

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

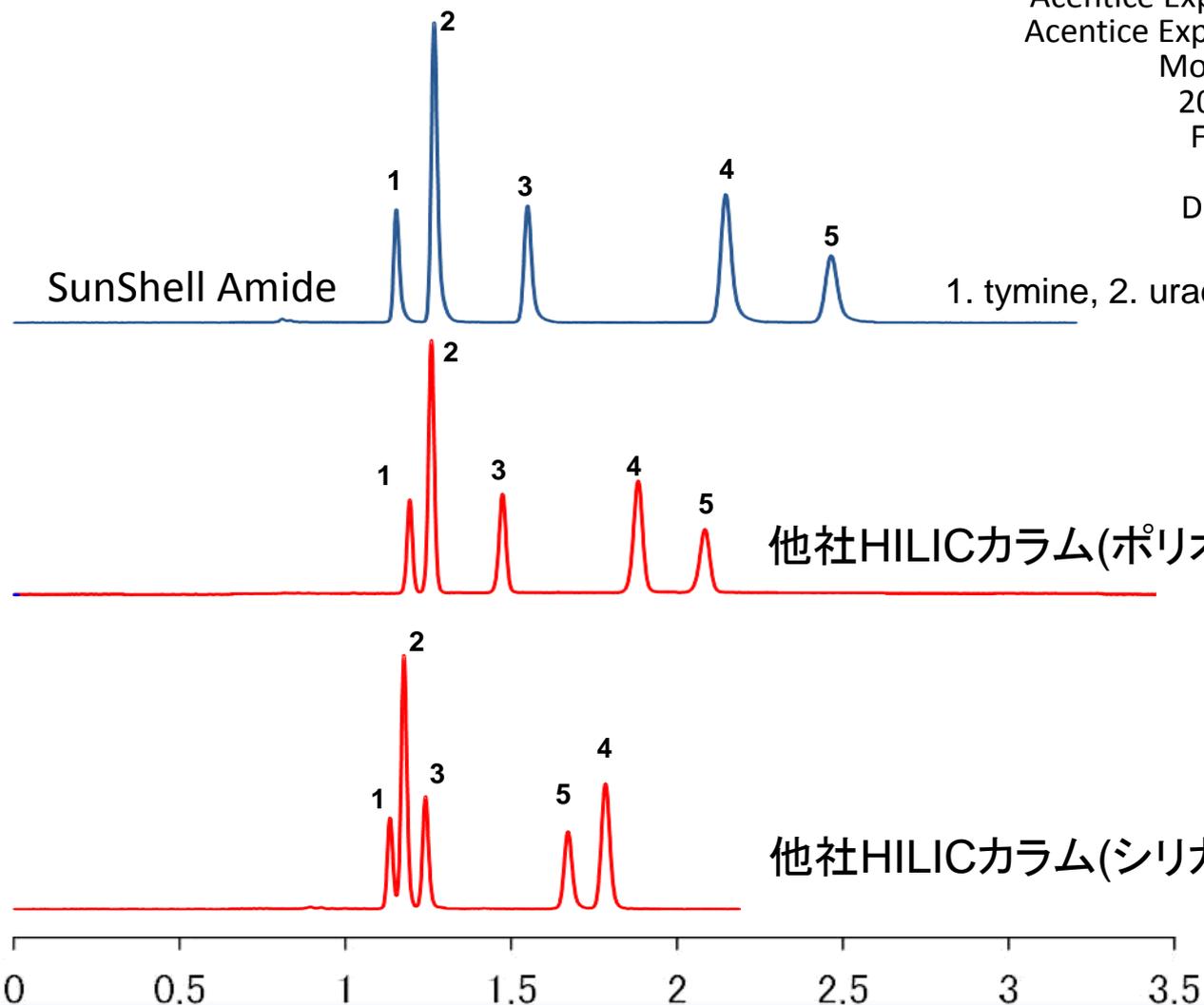
Flow rate: 1.0 mL/min ,

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

Detection: UV@250 nm,

Sample:

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





# HILICと逆相クロマトグラフィの比較

Column:

SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm

SunShell RPAqua 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm

Mobile phase: acetonitrile :

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

RPaqua : 20 mM phosphate buffer(pH7.0)

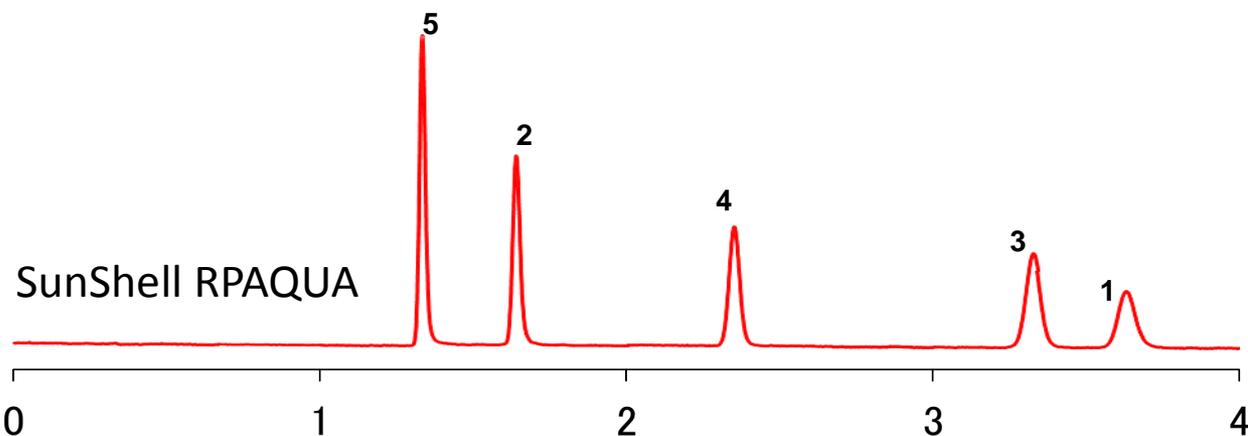
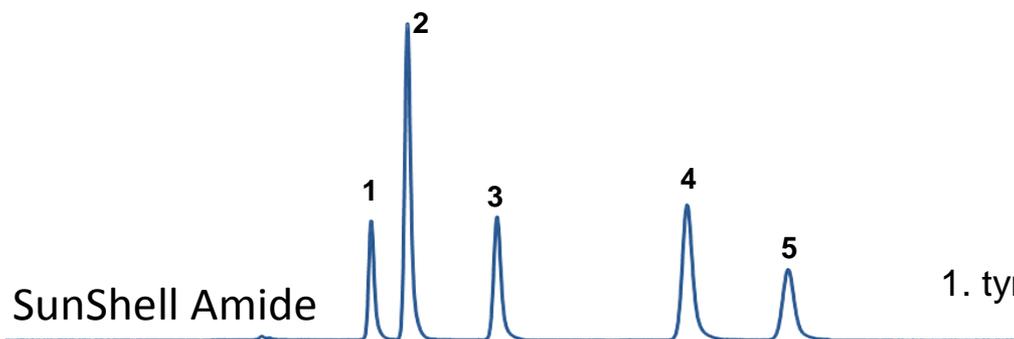
Flow rate: 1.0 mL/min

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

Detection: UV@250 nm

Sample:

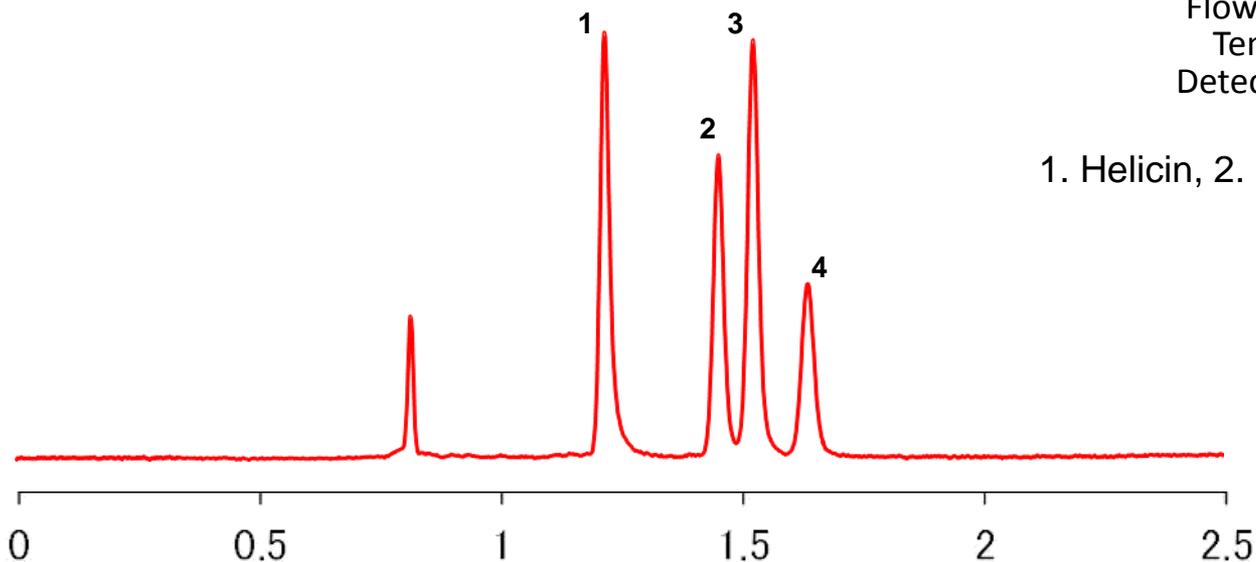
1. thymine, 2. uracil, 3. uridine, 4. cytosine, 5. cytidine





# 配糖体の分離

Column:  
SunShell Amide 2.6  $\mu\text{m}$  : 100 x 4.6 mm,  
Mobile phase: acetonitrile :  
25 mM phosphate Ammonium (pH4.9) =8:2  
Flow rate: 1.0 mL/min ,  
Temperature: 室温  
Detection: UV@215 nm,  
Sample:  
1. Helicin, 2. Salicin, 3. Arbutin 4. Rutin

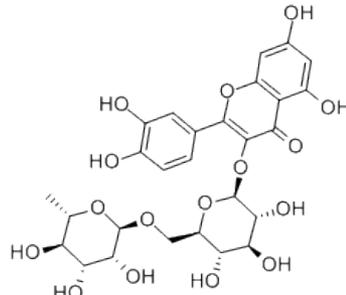
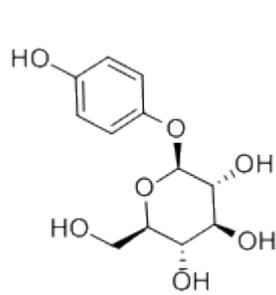
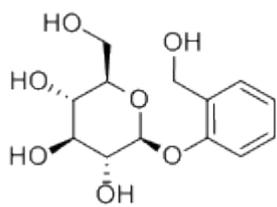
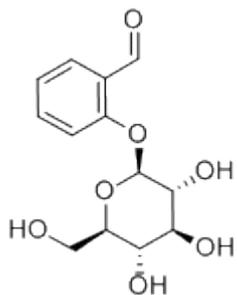


1. Helicin,

2. Salicin,

3. Arbutin

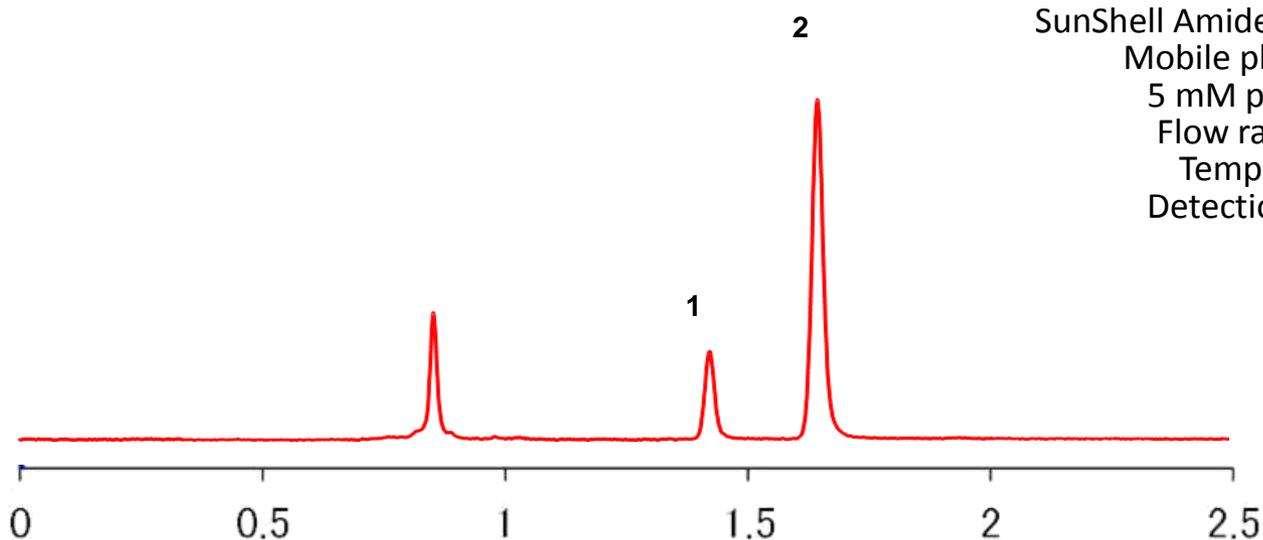
4. Rutin



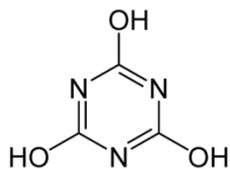


# メラミンの分離

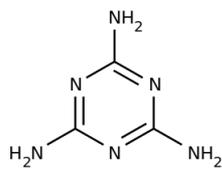
Column:  
SunShell Amide 2.6  $\mu$ m : 100 x 4.6 mm,  
Mobile phase: acetonitrile :  
5 mM phosphate Buffer (pH6.9) =75:25  
Flow rate: 1.0 mL/min ,  
Temperature: 40  $^{\circ}$ C  
Detection: UV@220 nm,



1. Cyanuric acid,



2. Melamine,





# 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った
- 作成したSunShell HILIC-Amideは、他のHILICカラムと比較した場合、高い親水性を示し、イオン交換性も低かった
- SunShell HILIC-Amideは、他社コアシェル型HILICカラムより長い保持を示した
- C28カラムとAmideカラムを核酸塩基を用いて比較した場合、その溶出順は概ね逆となった