

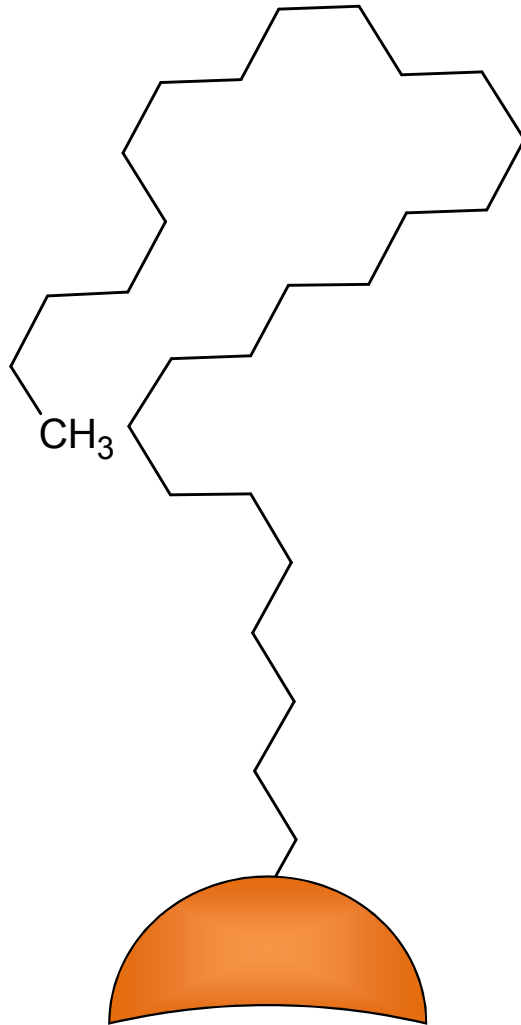
# HPLC用C18固定相と異なる分離特性を持つC28,C30およびPFP固定相の評価

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](mailto:info@chromanik.co.jp)**

***<http://chromanik.co.jp>***

# オクタコシル(C28)

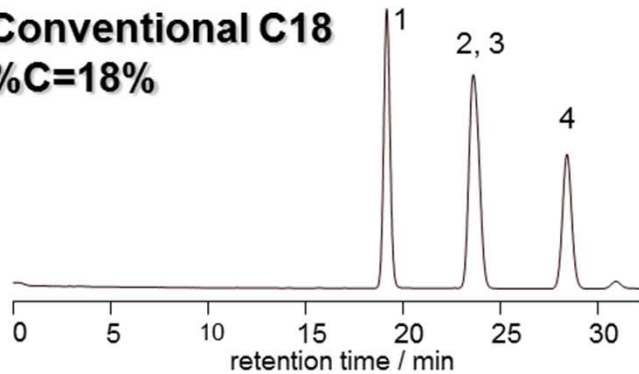


- 疎水性相互作用が主な相互作用

- 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

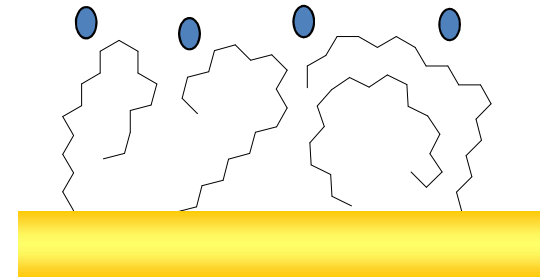
# ODSとの比較1

**Conventional C18**  
%C=18%

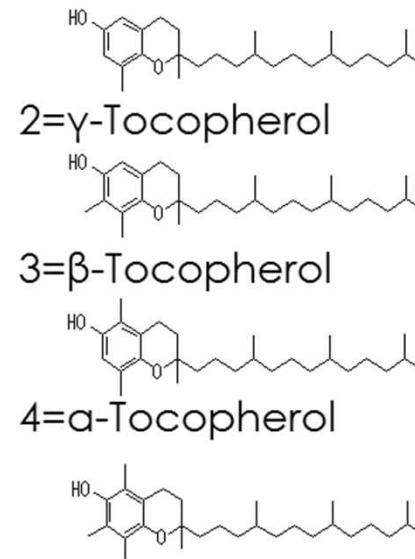
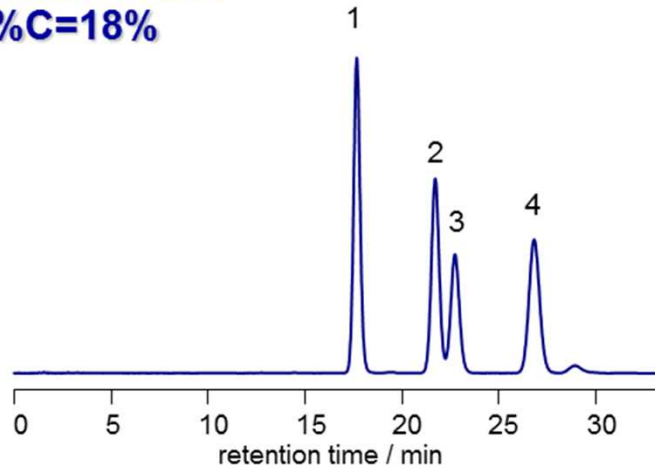


Column size: 4.6x250 mm  
Mobile phase: 97/3=CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Temperature: 25 °C  
Detection: UV at 295nm  
Sample: 1=δ-Tocopherol

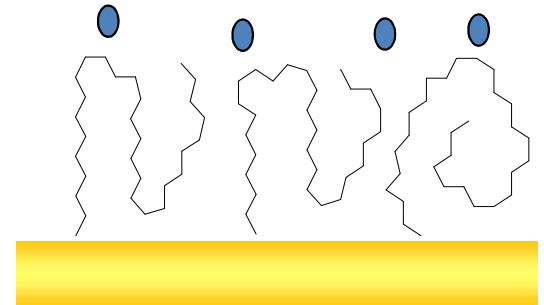
**C18**



**Sunrise C28**  
%C=18%

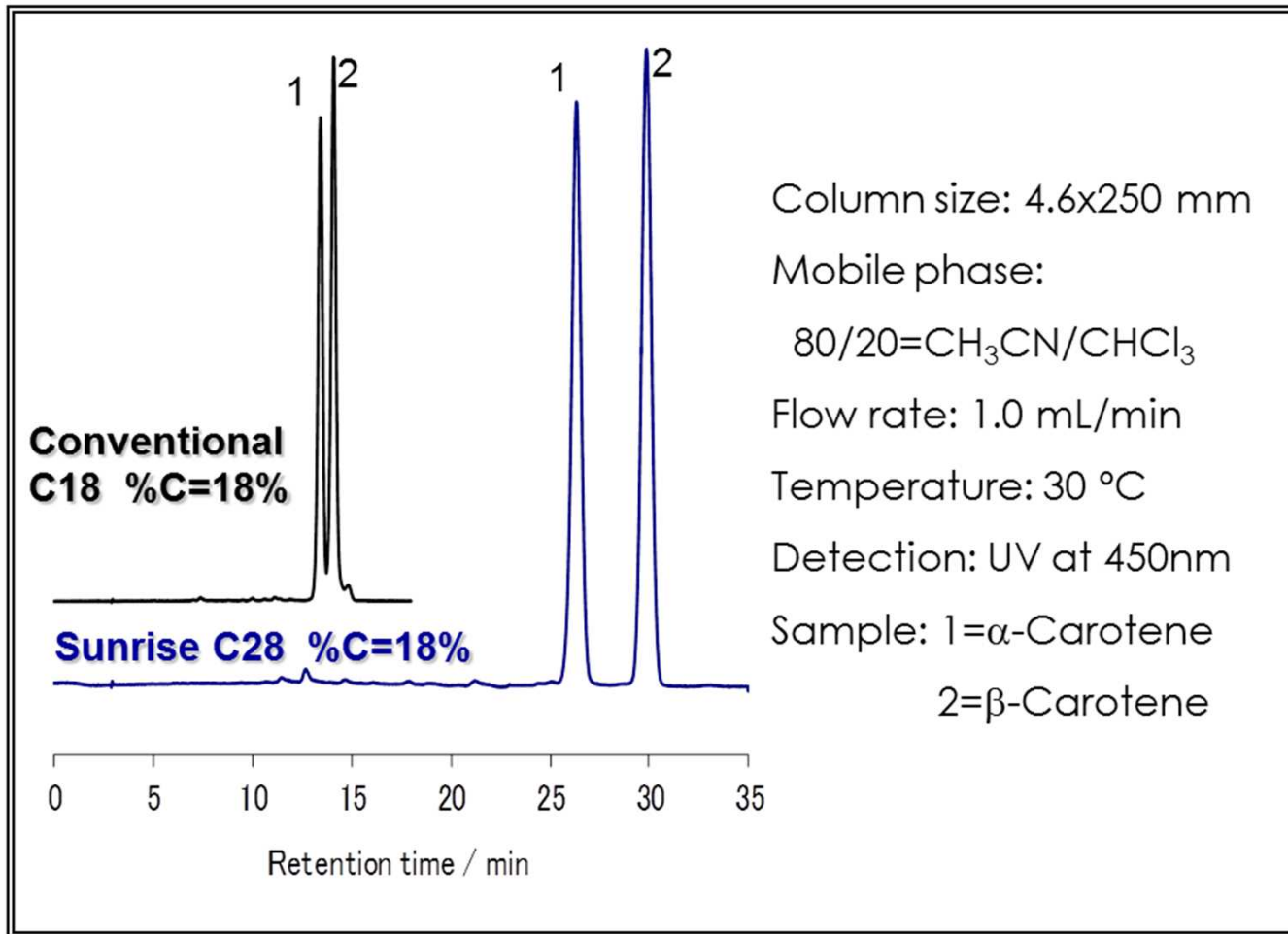


**C28**

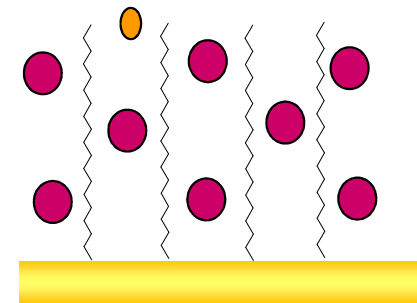


固定相容量は同じ

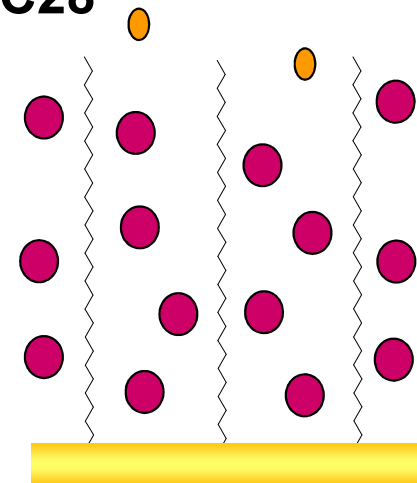
# ODSとの比較2



C18

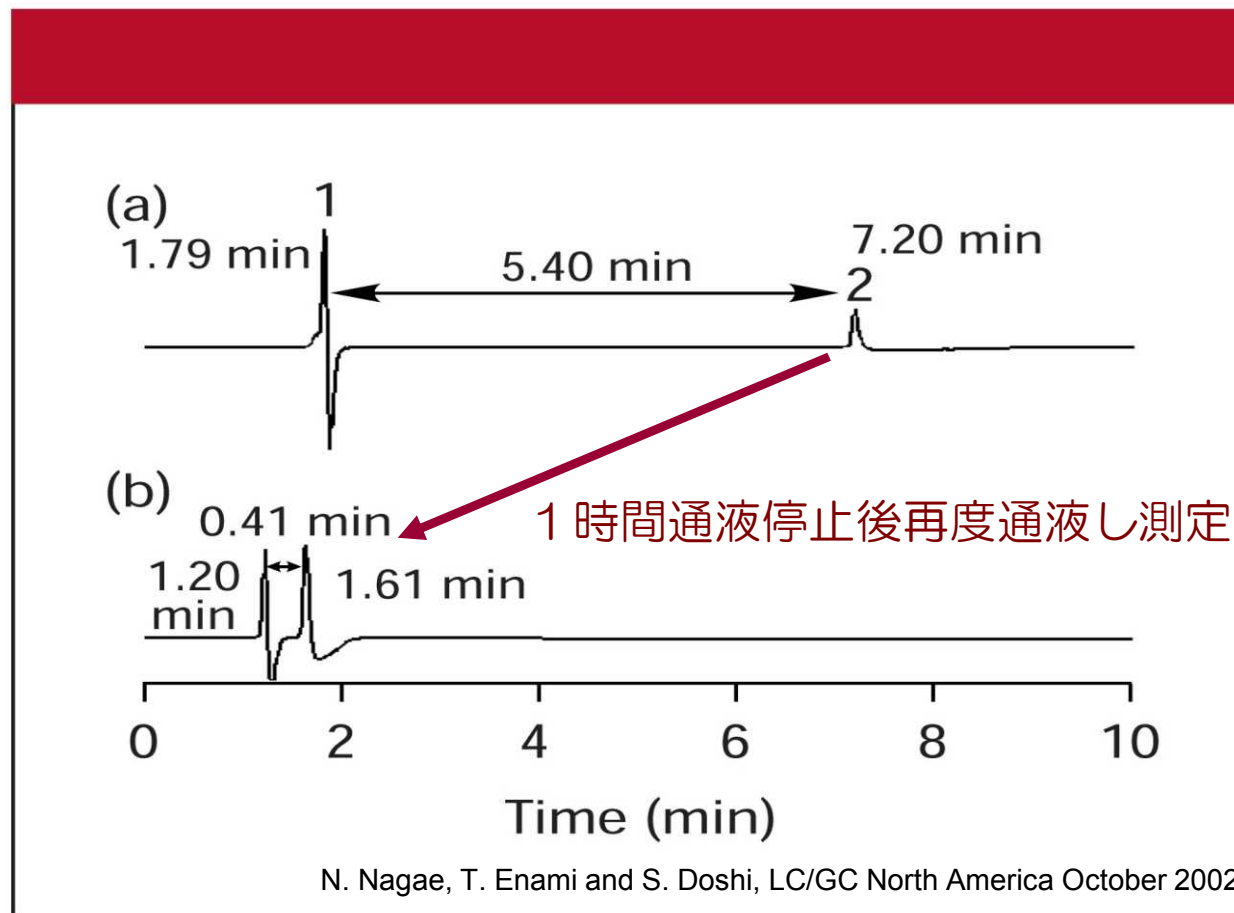


C28



固定相容量は2倍

# 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

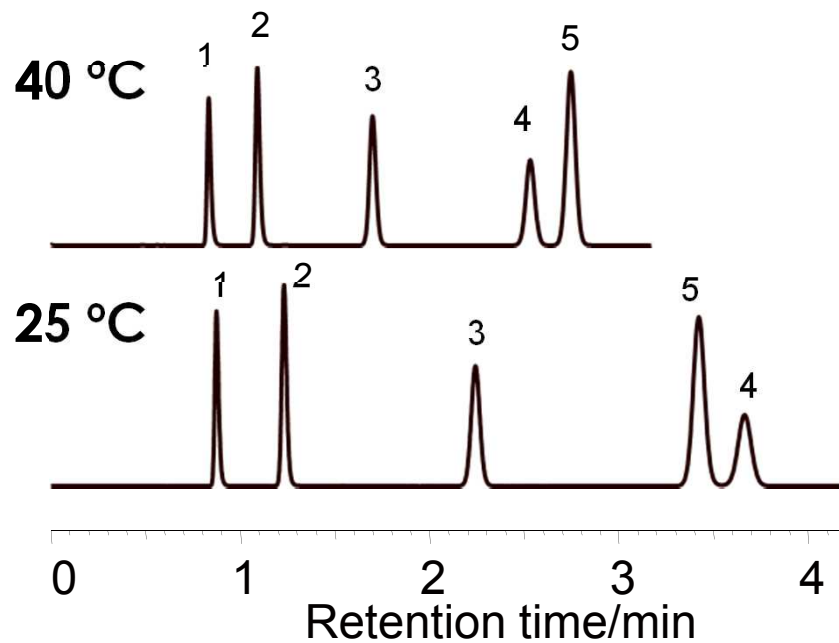
保持時間：5.40minから0.41minに減少



再現性がない

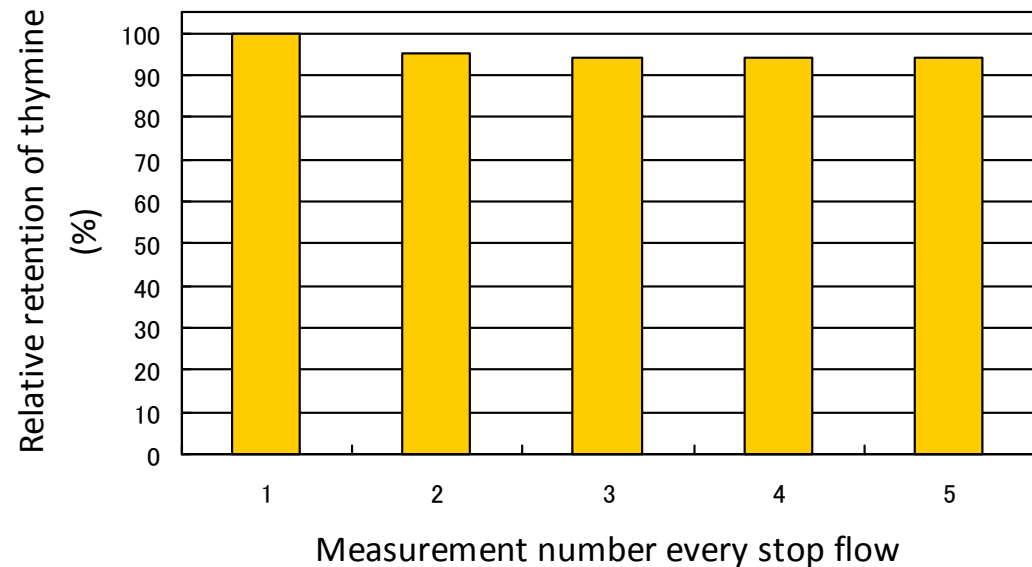
# SunShell RP-Aqua(C28) の40 °Cでの保持

## 核酸塩基の分離



Column: SunShell RP-Aqua, 2.6  $\mu\text{m}$  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)



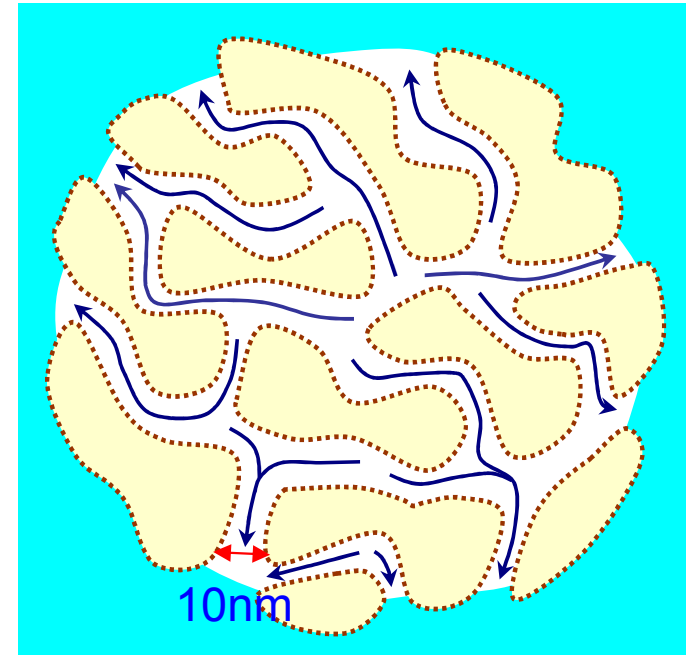
緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により、ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると、通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり、保持時間は大幅に減少しますが、SunShell RP-Aquaほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず、94%以上の再現性を示しました。

# 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

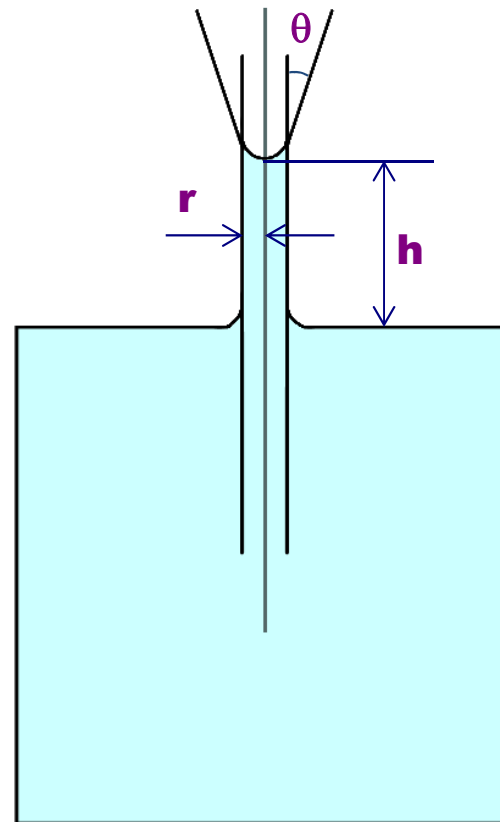
毛管現象の式:

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

$\gamma$ : 表面張力

$\rho$ : 液体の密度 (比重)

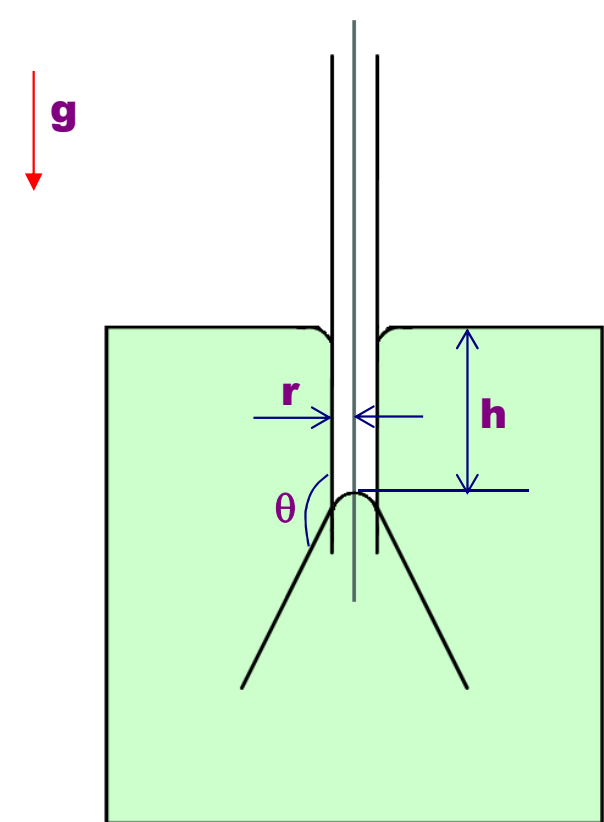
水とガラス管の場合



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

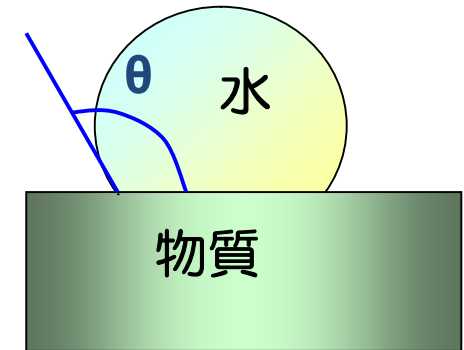
$$\theta > 90^\circ$$



# 撥水性と疎水性

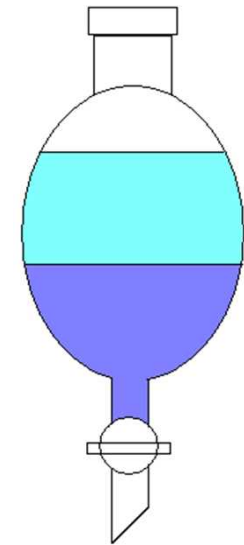
撥水性 → 水をはじく性質

『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』

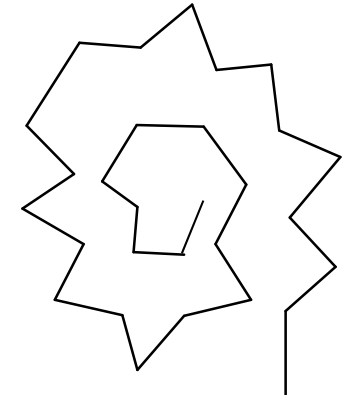
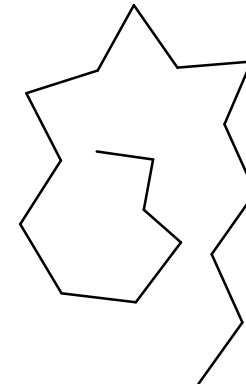
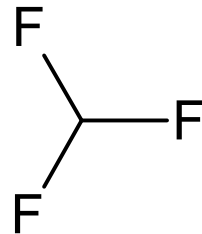


疎水性 → 水と混ざりにくい性質

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

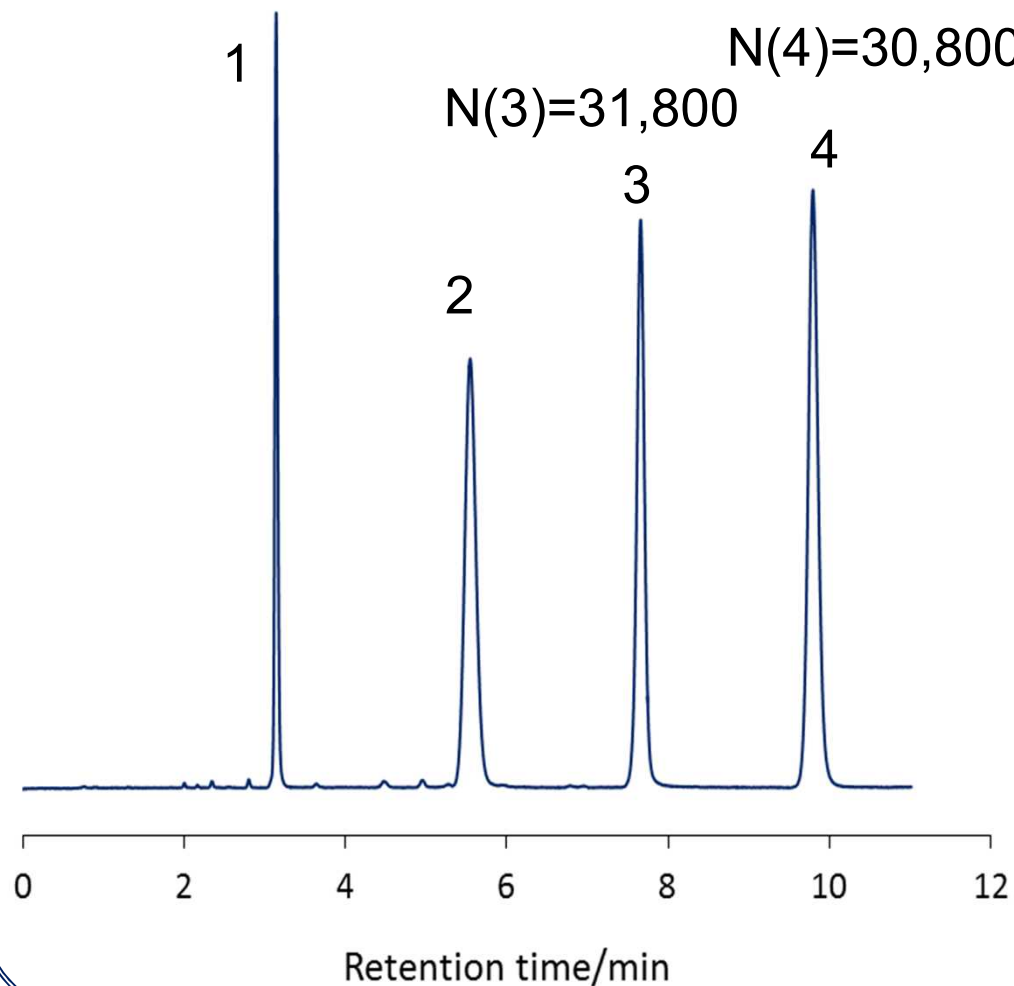
分析化学 Vol.59 No. 3 , P193-205(2010)

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

# 水溶性ビタミンの分離

SunShell RP-AQUA



Column:

SunShell RP-AQUA, 2.6  $\mu$ 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

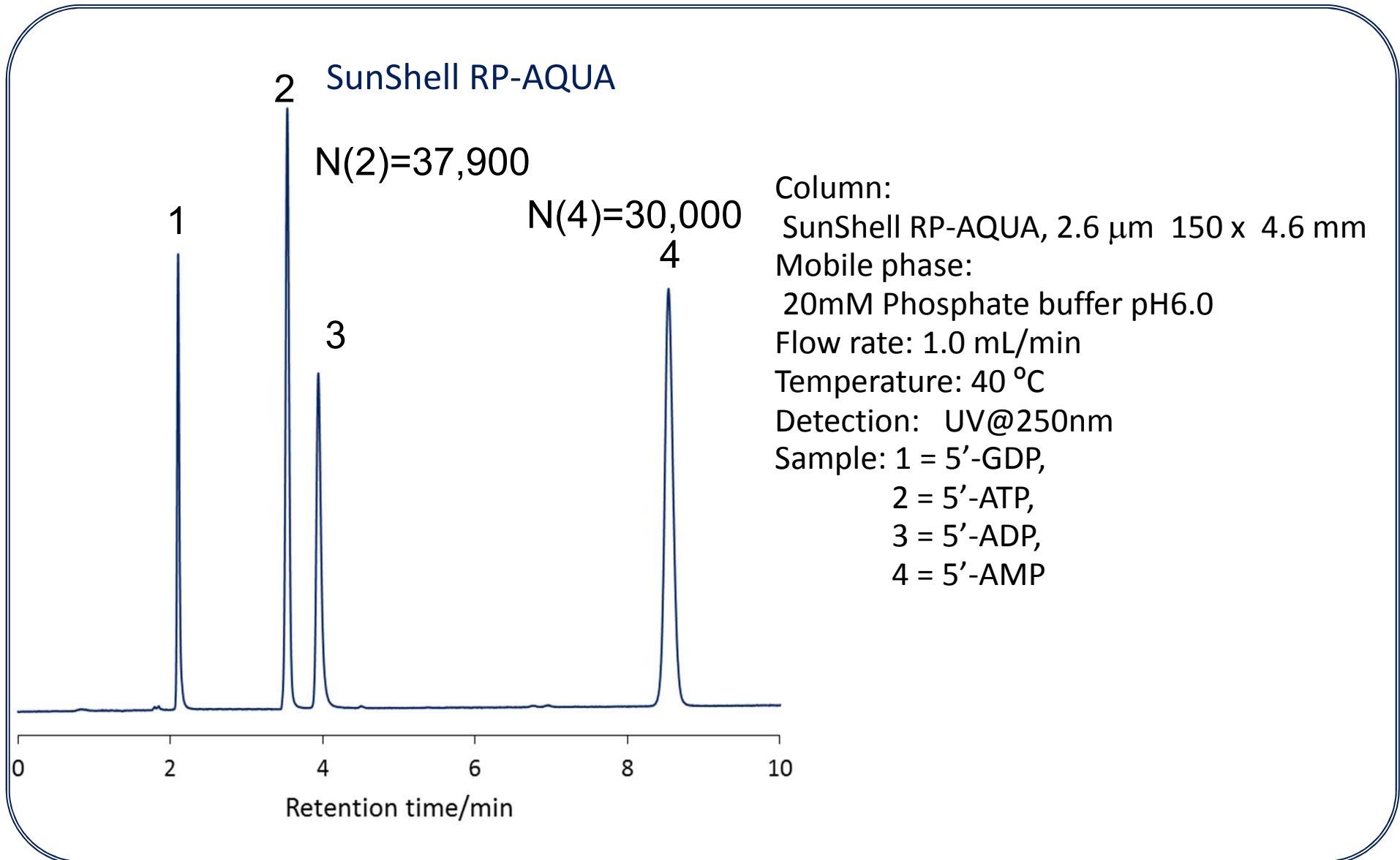
Sample: 1 = Nicotinic acid,

2 = Pyridoxal,

3 = Pyridoxine,

4 = Nicotinamide

# ヌクレオチドの分離



# アミノ酸の分離

Column: Sunniest RP-AQUA 5 $\mu$ m, 2.0x 150mm

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

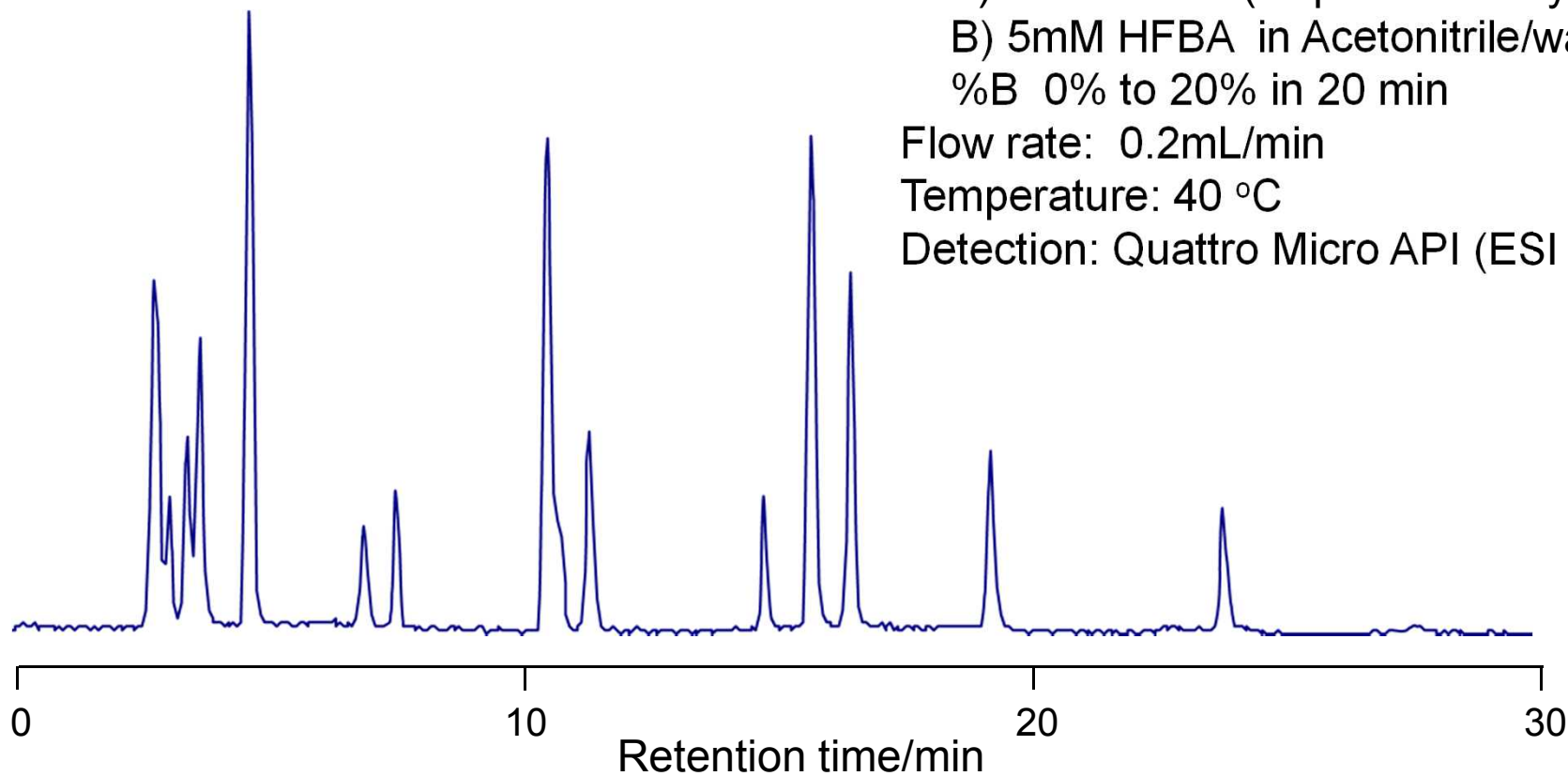
B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)

%B 0% to 20% in 20 min

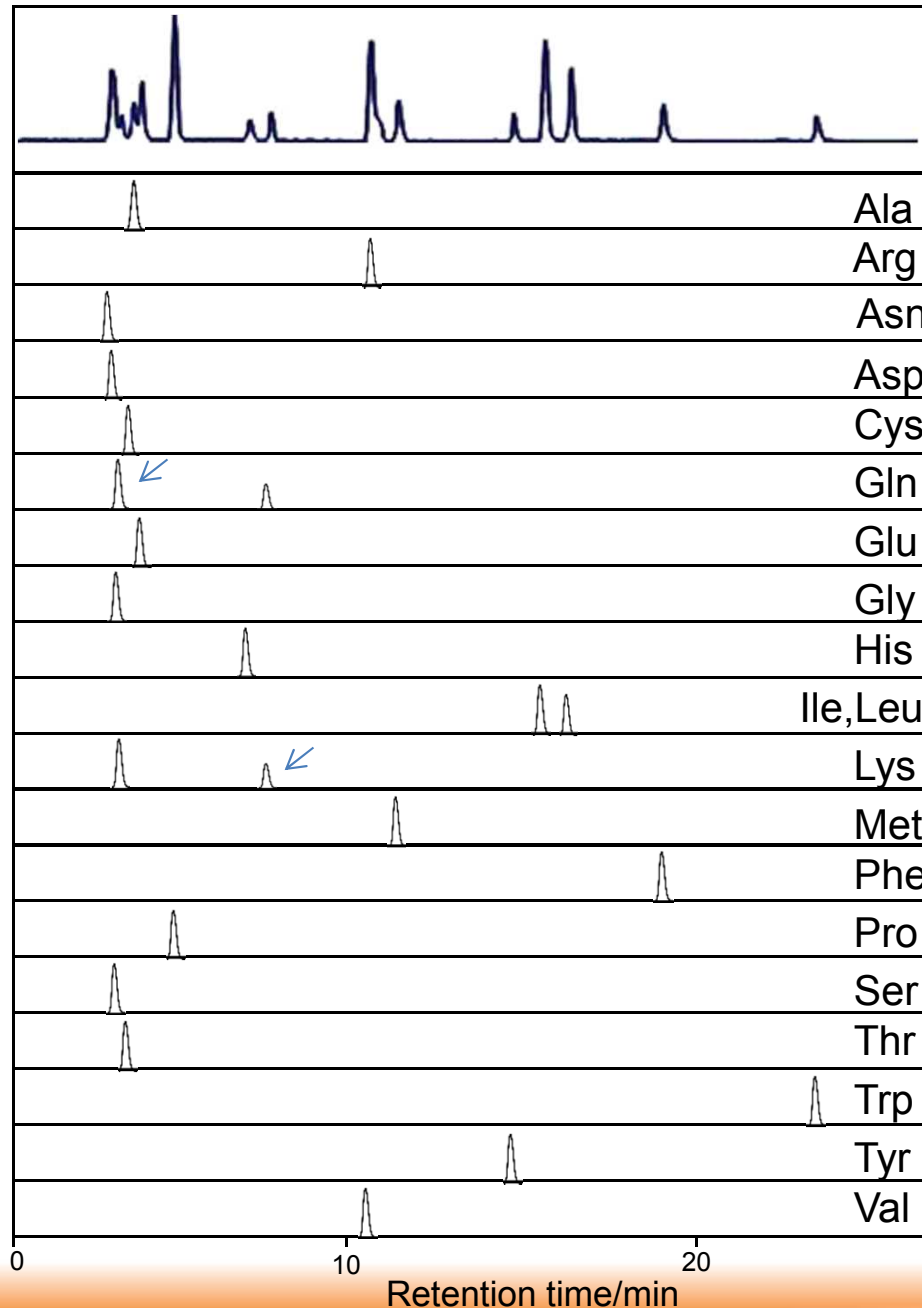
Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

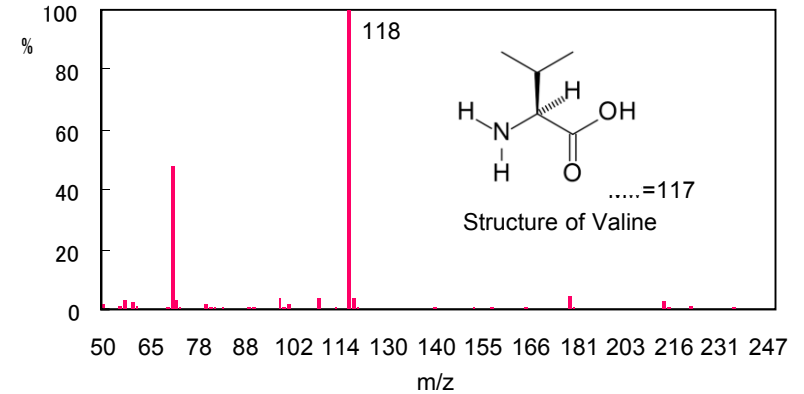


# アミノ酸のLC/MS



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 $\mu$ m, 2.0x 150mm

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

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

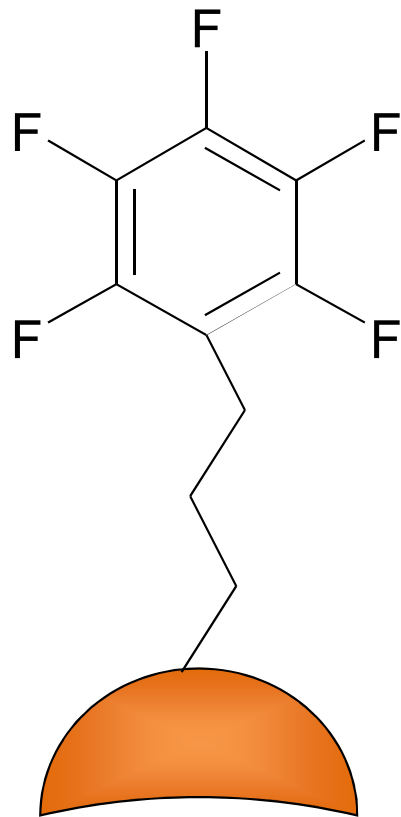
%B 0% to 20% in 20 min

Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

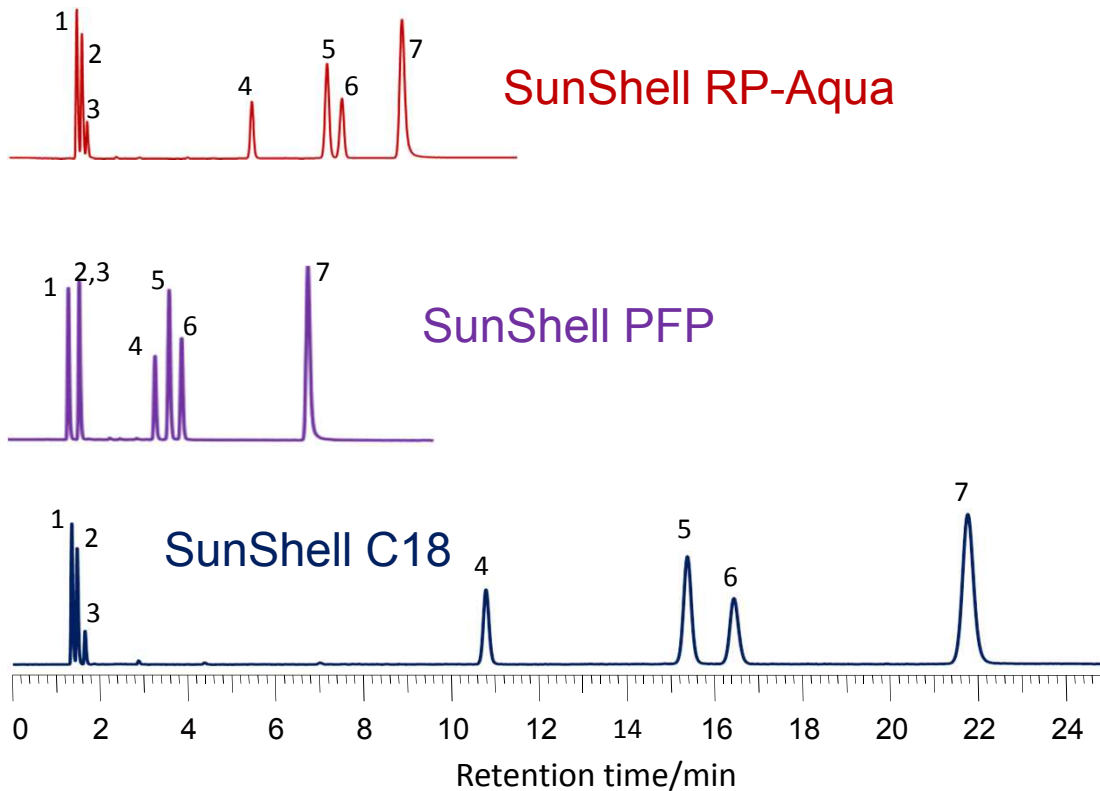
# ペンタフルオロフェニル (PFP)



- 疎水性相互作用
- 水素結合性
- 双極子相互作用
- $\pi$ - $\pi$ 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: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine,

3 = Phenol, 4 = Butylbenzene

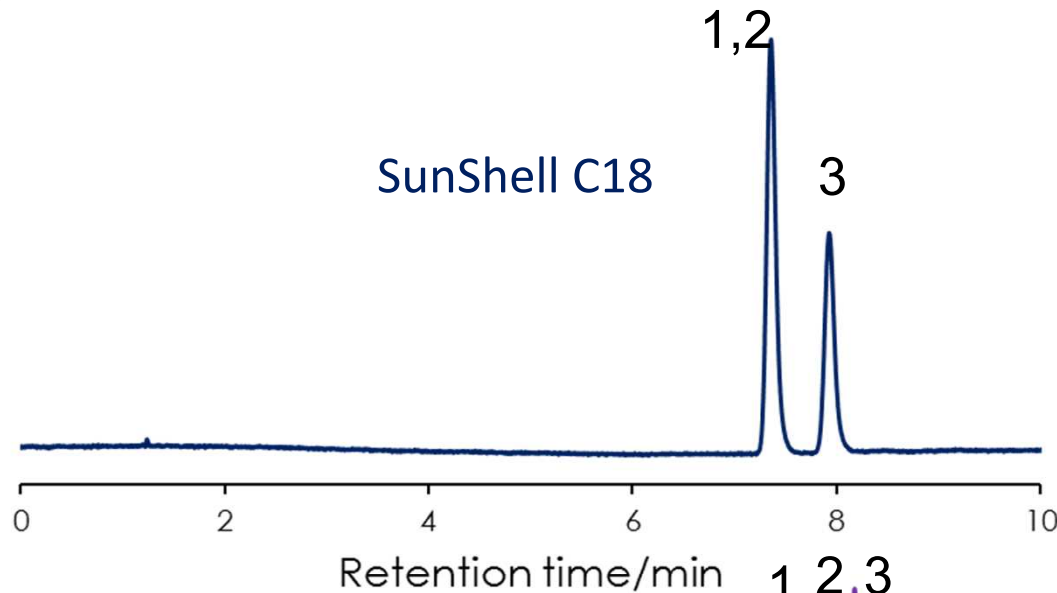
5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene,

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



Column:

SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

SunShell PFP, 2.7  $\mu\text{m}$  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

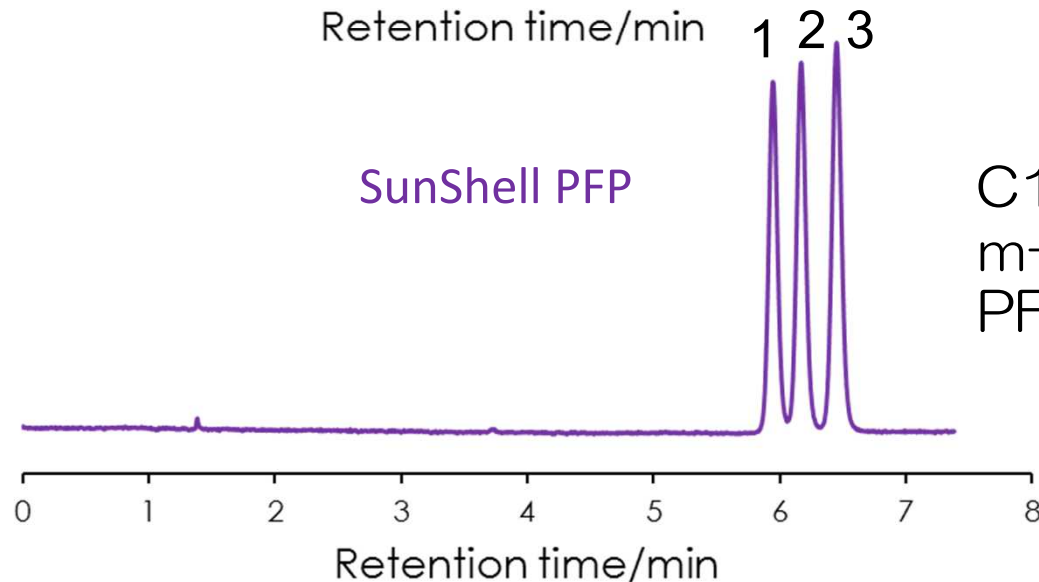
Temperature: 25  $^\circ\text{C}$

Sample: 1 = p-Cresol

2 = m-Cresol

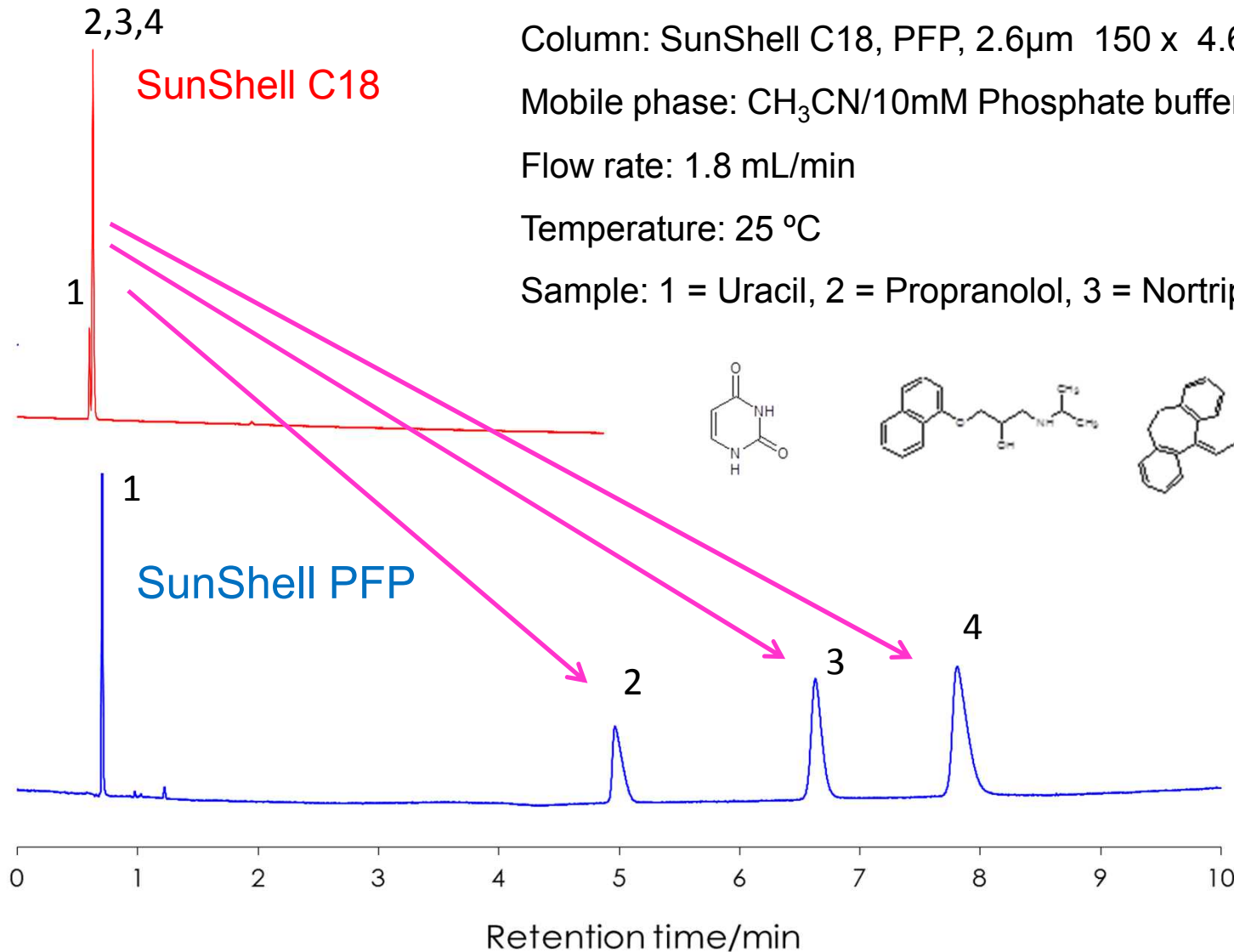
3 = o-Cresol

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。

# C18とPFPによる塩基性化合物の保持比較



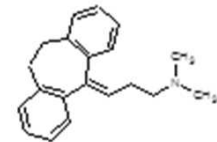
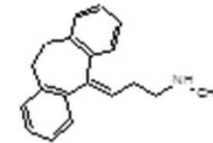
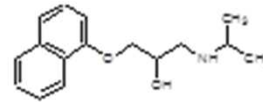
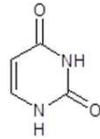
Column: SunShell C18, PFP, 2.6 $\mu$ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/10mM Phosphate buffer pH7.0 = 80/20

Flow rate: 1.8 mL/min

Temperature: 25 °C

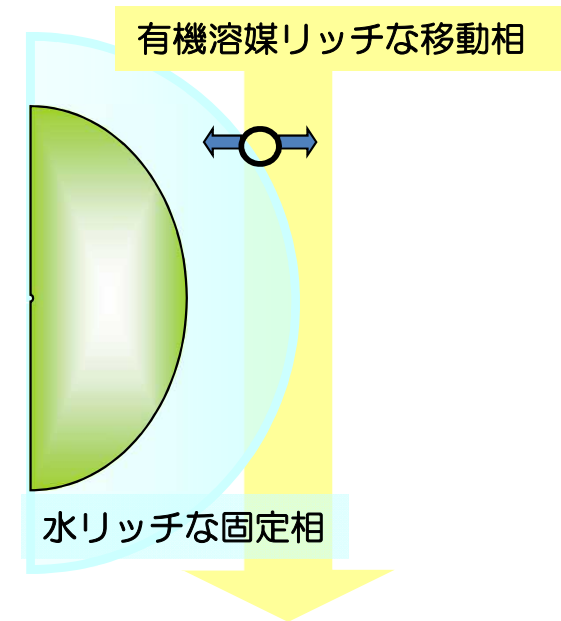
Sample: 1 = Uracil, 2 = Propranolol, 3 = Nortriptyline, 4 = Amitriptyline



# PFPでHILIC・イオン交換？

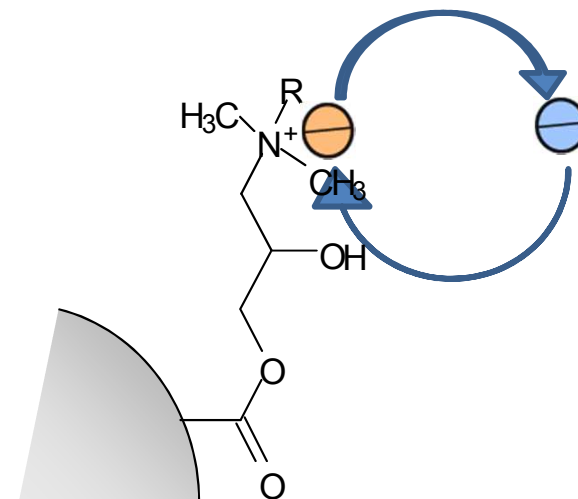
## • HILICモード

- 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

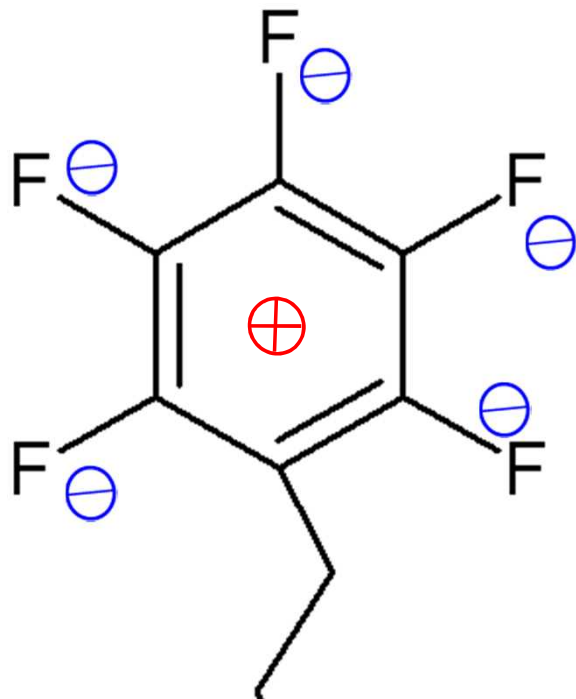
- 物質がイオン成分を取り込み、代わりに物質が持っていた他のイオン成分を放出する現象



# 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

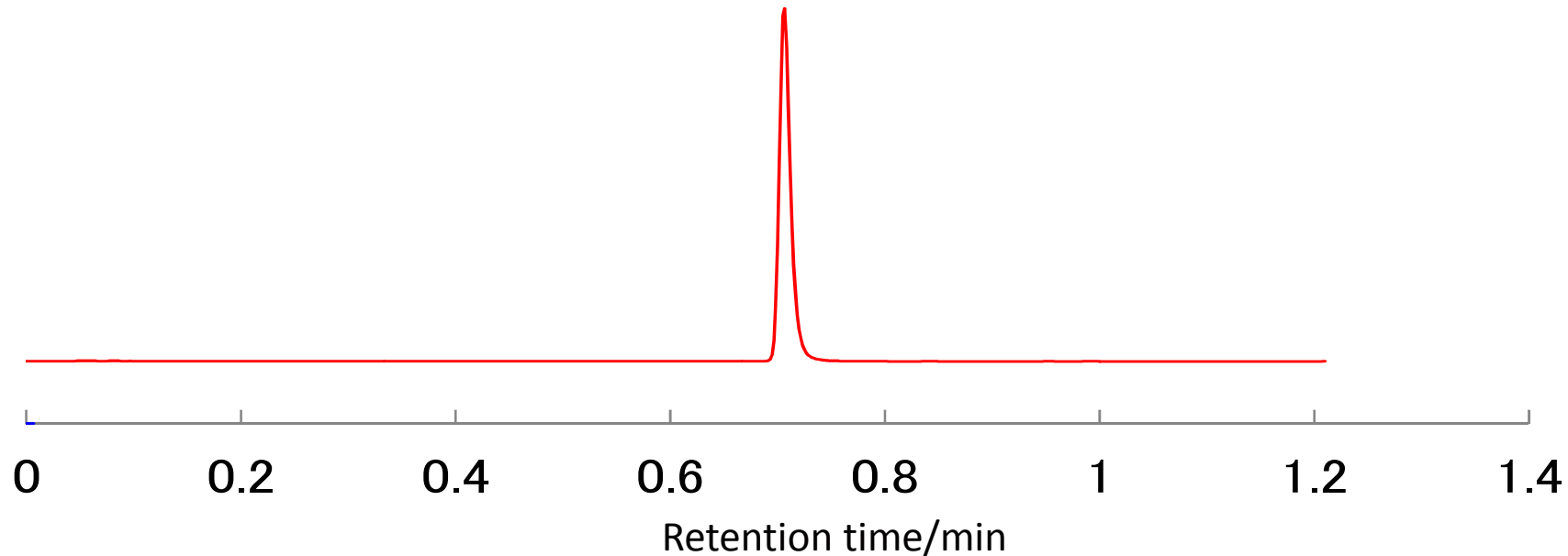


- PFPの化学的特性から水を保持するとは考えにくい
- PFP基が電化を持つ構造をしていない
- フッ素の強い電気陰性度により、電子の偏りが生じている



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 $\mu$ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/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。