

C18で分離できない時の2nd Choice: C28・C30・PFPがおもしろい

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

<http://chromanik.co.jp>

分離を変えるには・・・

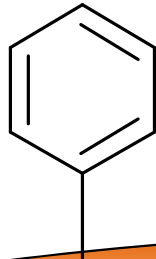
疎水性相互作用

アルキル基



π - π 相互作用

フェニル基

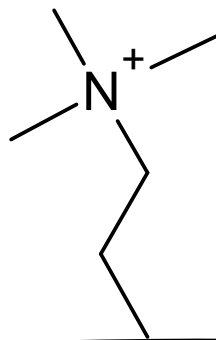


相互作用の異なるカラムに交換する

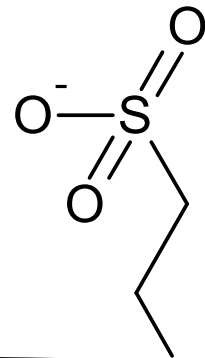
親水性相互作用

イオン交換相互作用

陰イオン
交換基

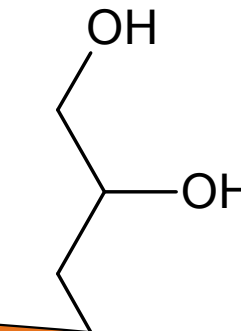


陽イオン
交換基

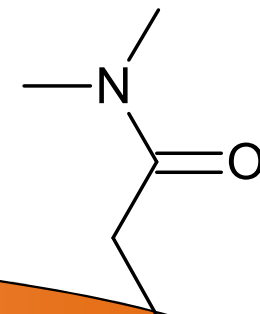


水素結合

ジオール基

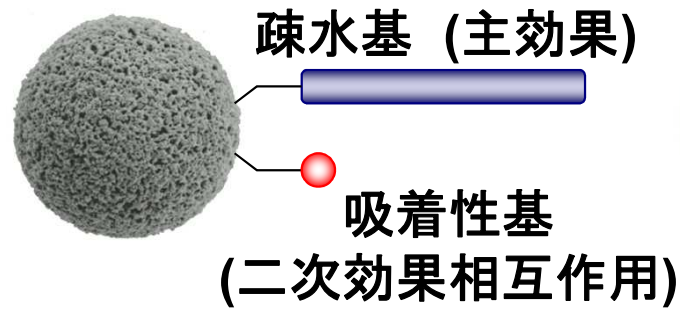


アミド基

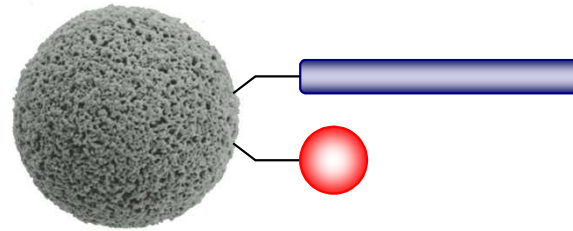
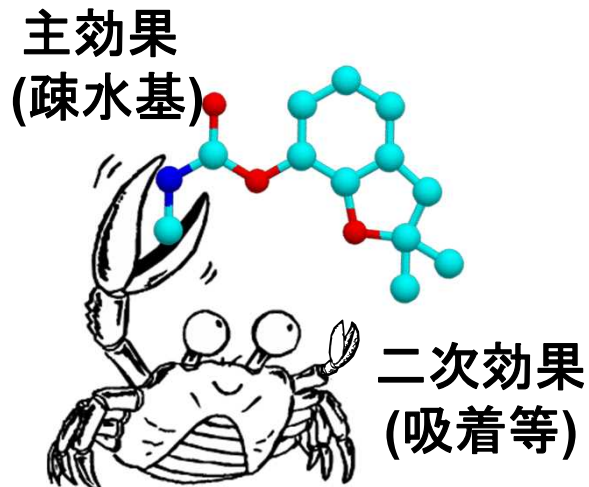


カラム充填剤基材

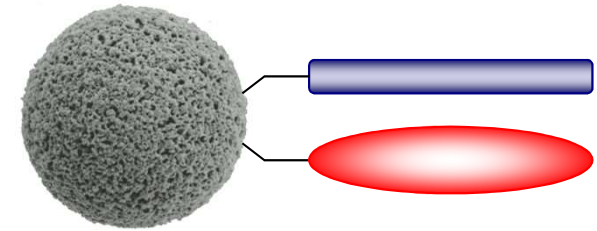
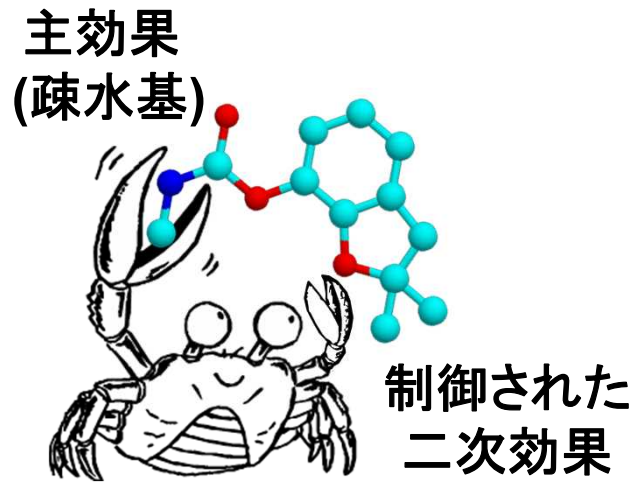
分離を変えるには・・・2



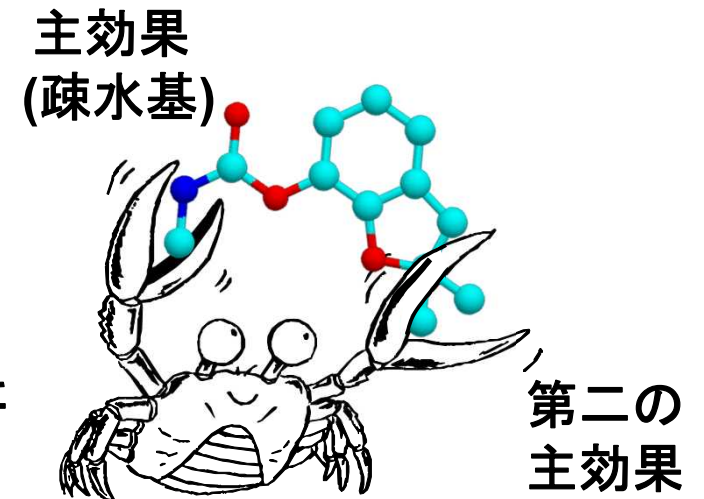
既存の分離剤



二次効果相互作用
制御型分離剤



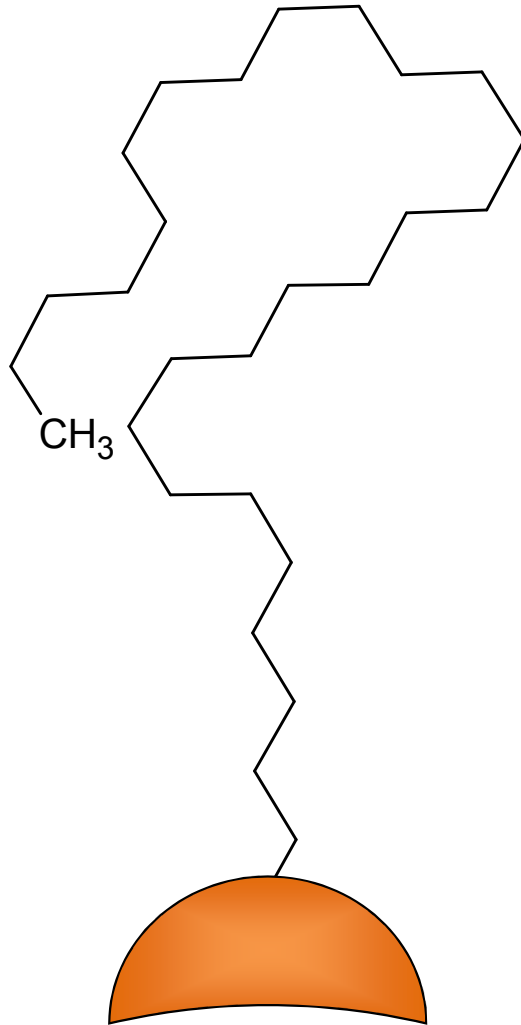
第二主効果を持つ
二足型分離剤



本日の内容

- C28カラムの紹介(C30)
 - 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(ペンタフルオロフェニル)
 - PFPカラムの分離の特長
 - PFPカラムでHILIC? イオン交換?

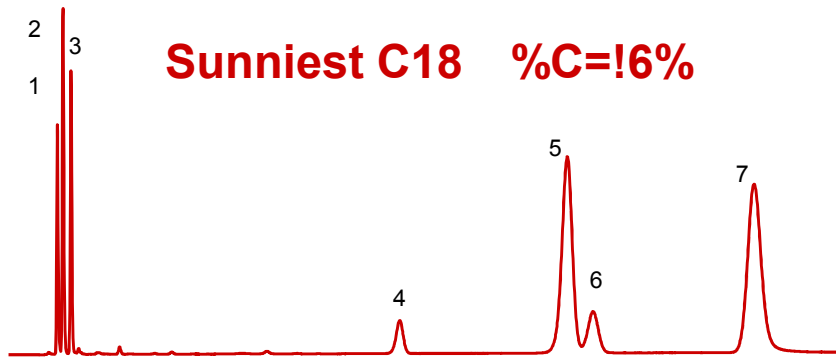
オクタコシル(C28)



- 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

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,

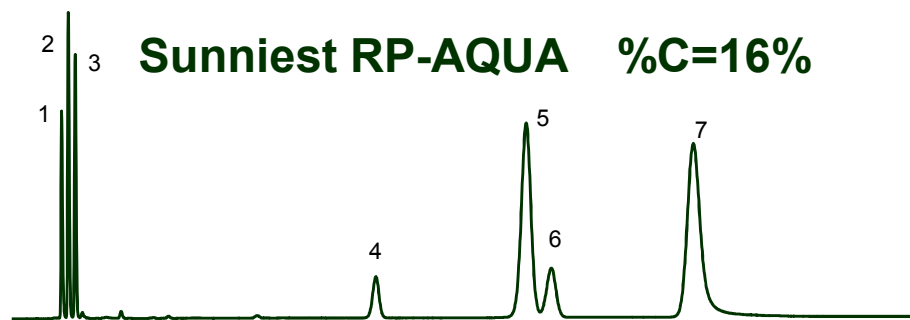
3 = Phenol,

4 = Butylbenzene, (N=15,700)

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

6 = Amylbenzene, (N=15,300)

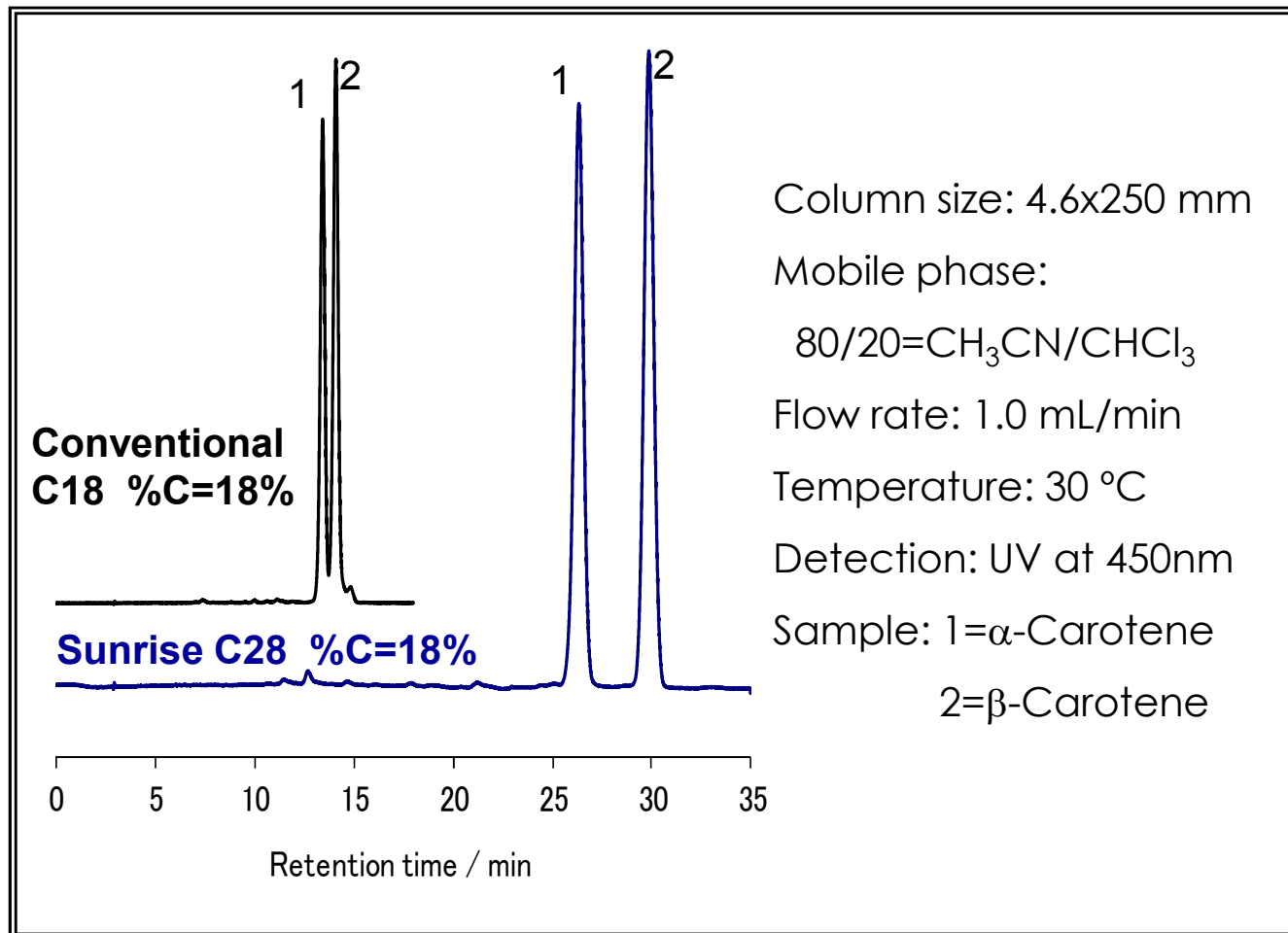
7 = Triphenylene, (N=14,500)



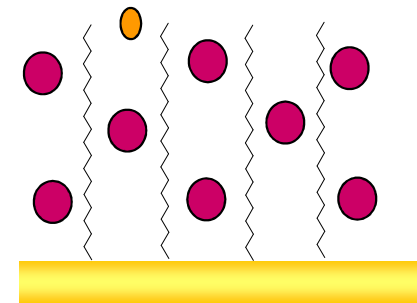
0 5 10 15 20 25 30 35

Retention time/min

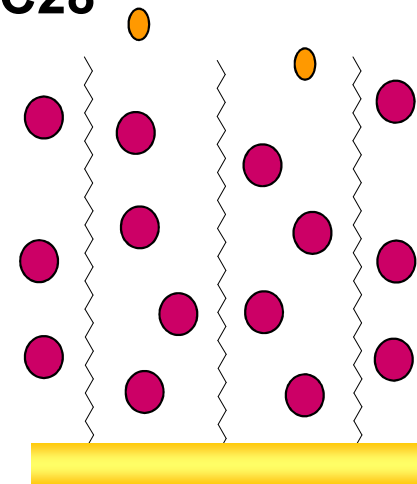
ODSとの比較2



C18

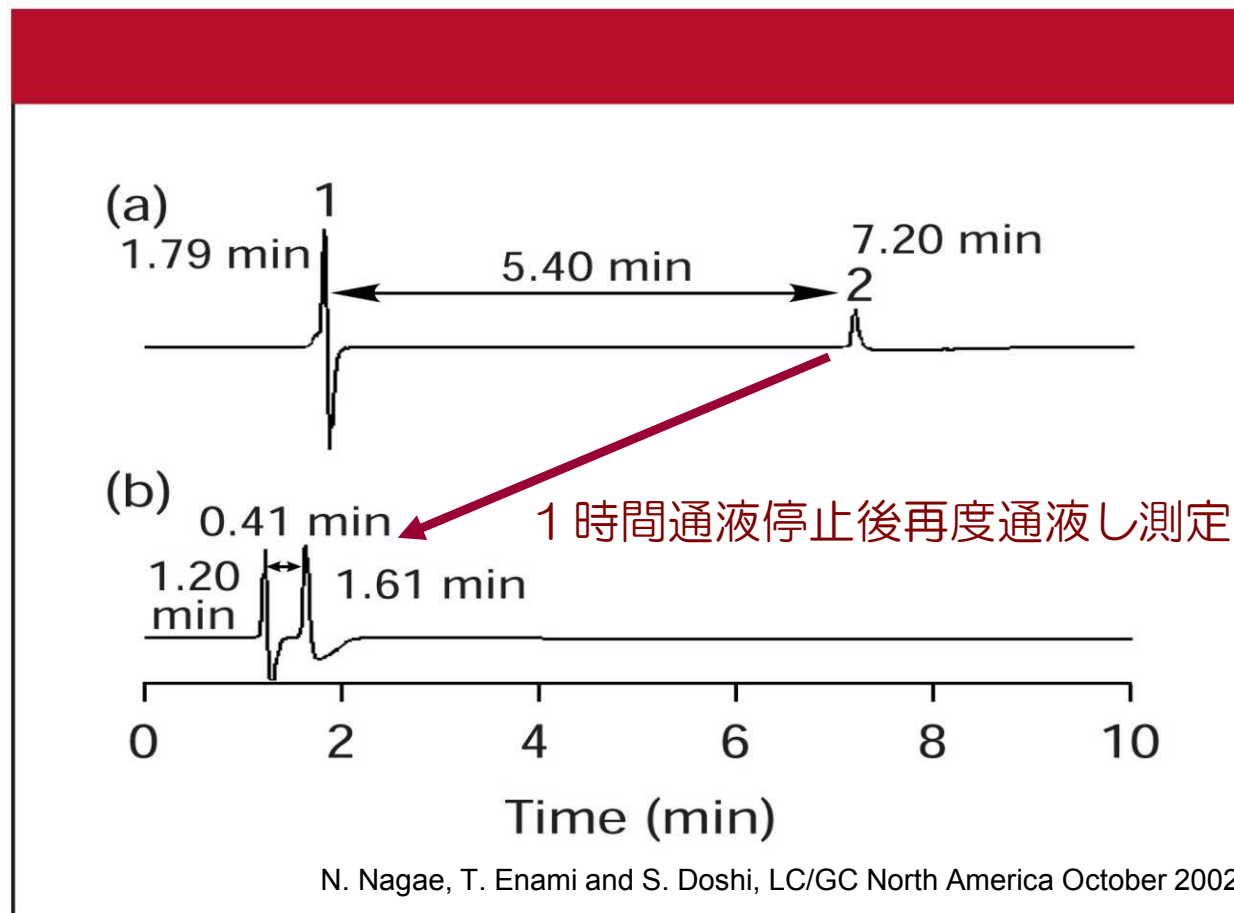


C28



固定容量は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

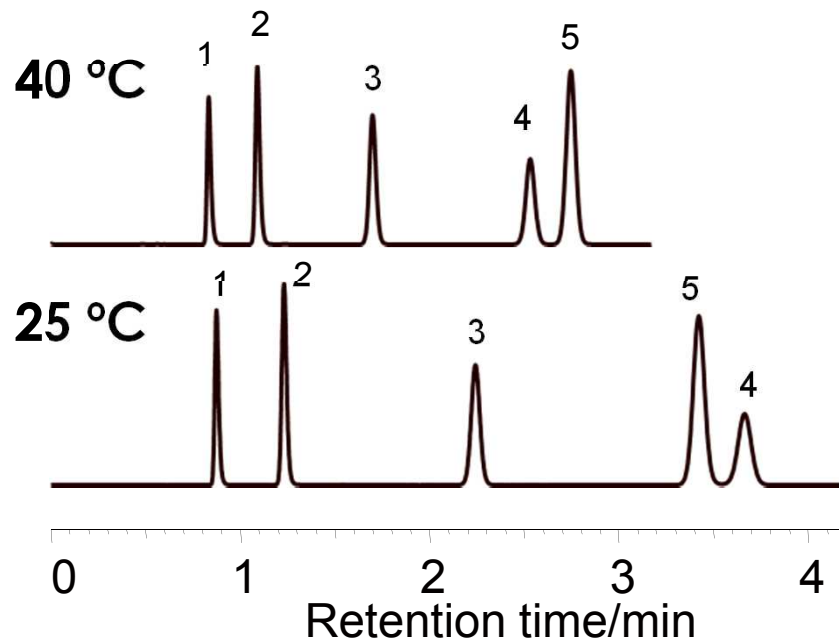
保持時間：5.40minから0.41minに減少



再現性がない

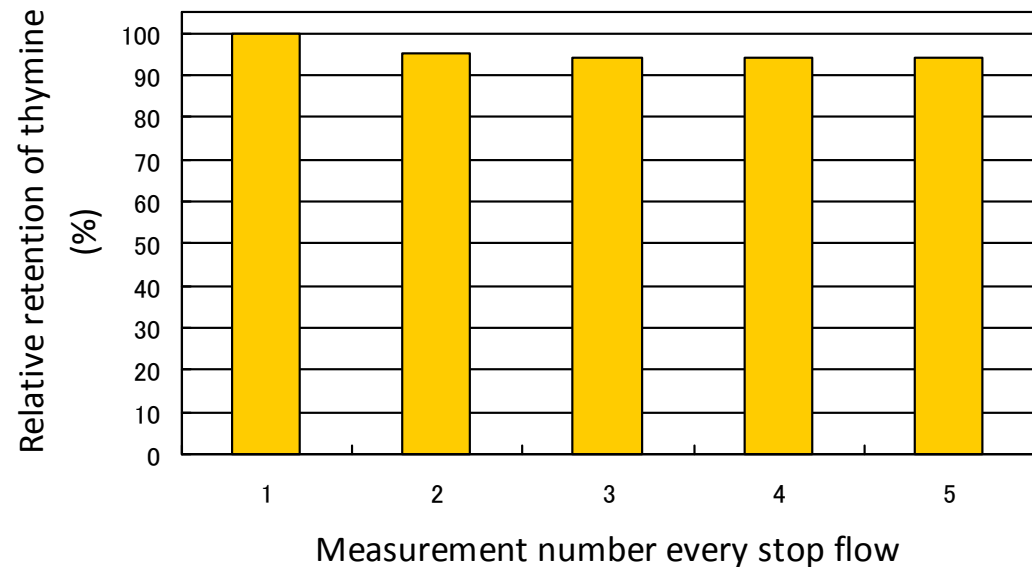
SunShell RP-Aqua(C28) の40 °Cでの保持

核酸塩基の分離



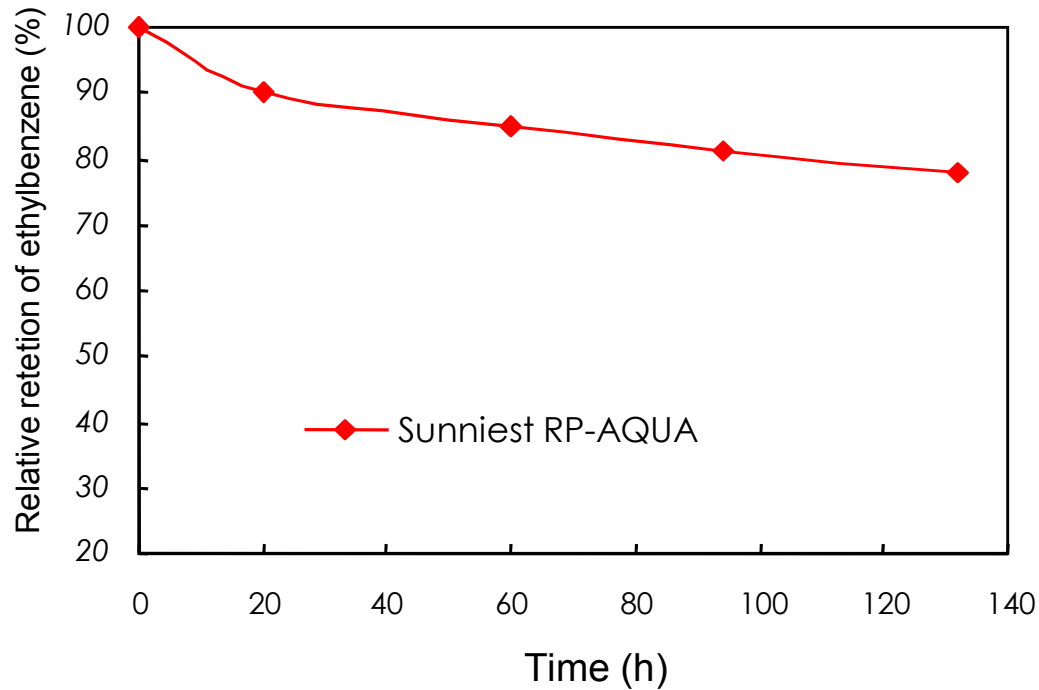
Column: SunShell RP-Aqua, 2.6 μ m 75 x 4.6 mm
 Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C and 25 °C
 Sample: 1 = Cytosine, 2 = Uracil, 3 = Thymidine,
 4 = Uridine, 5 = Thymine

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)



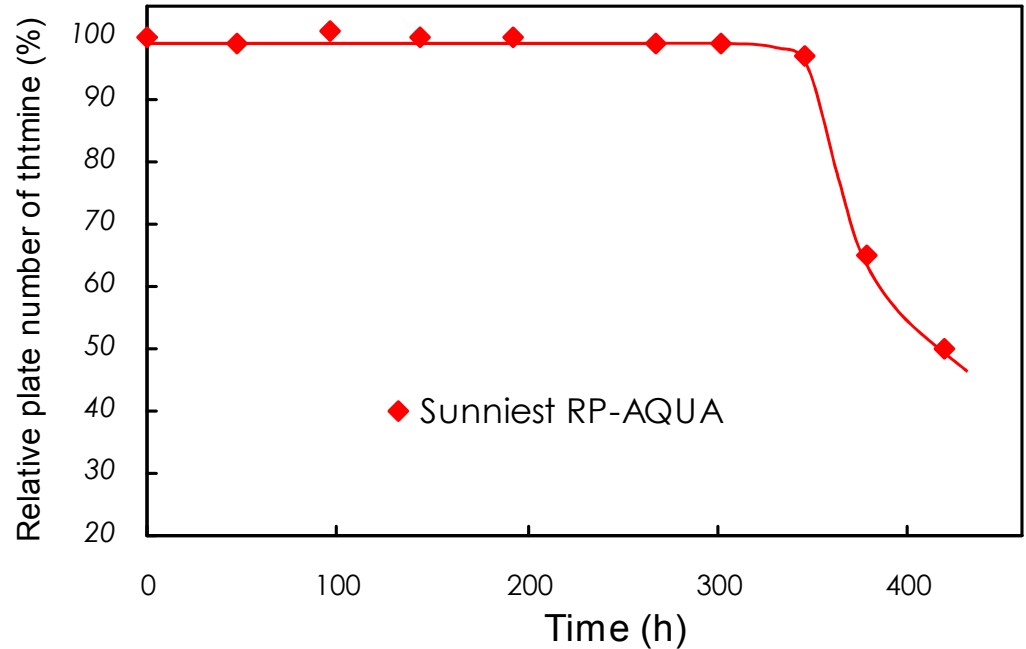
緩衝液のみの移動相を用いた場合の保持の再現性を試験しました。毛管作用により、ポンプを停止し充填剤周りの圧力を大気圧にすると、通常のC18カラムは細孔内からの移動相の抜けだしが起こり、保持時間は大幅に減少しますが、SunShell RP-Aquaほとんど細孔内からの抜け出しは起こっておらず、94%以上の再現性を示しました。

C28の酸性、塩基性条件下の耐久性



Durable test conditions

Column: Sunniest RP-AQUA, 5 μ m 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: 0.5% TFA
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 60 °C



Durable test conditions

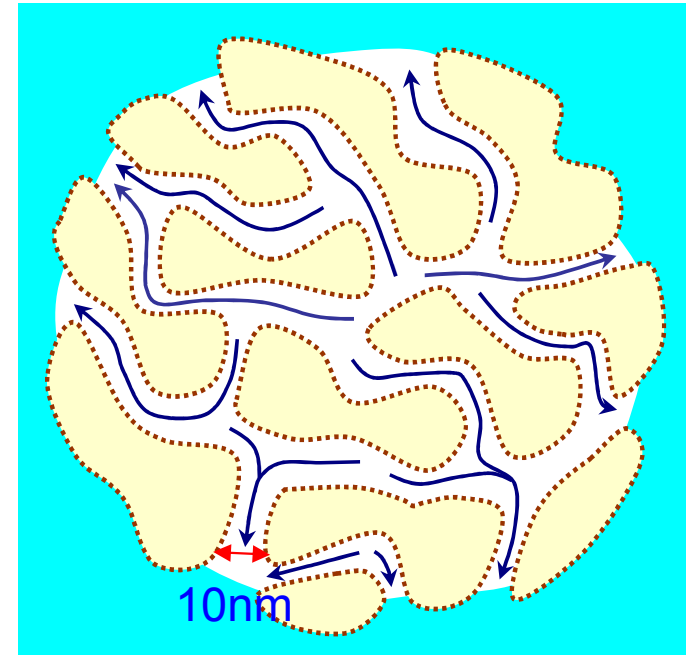
Column: Sunniest RP-AQUA, 5 μ m 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: 20mM Phosphate buffer pH8.0
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C

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

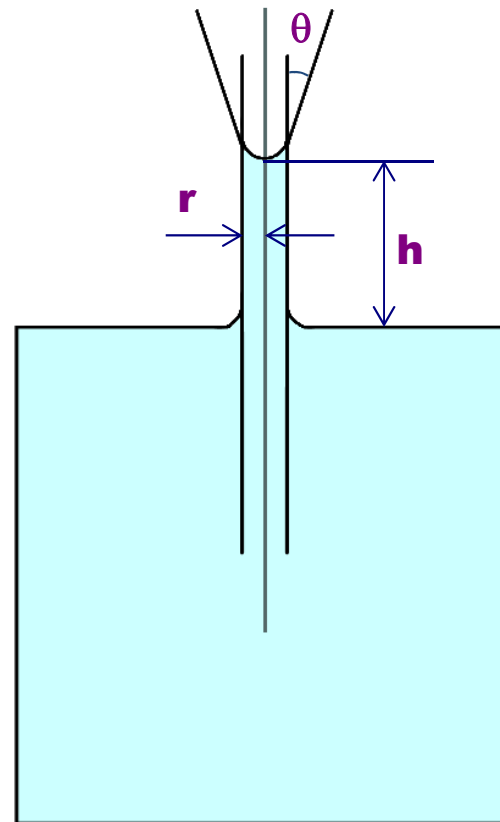
毛管現象の式:

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

γ : 表面張力

ρ : 液体の密度 (比重)

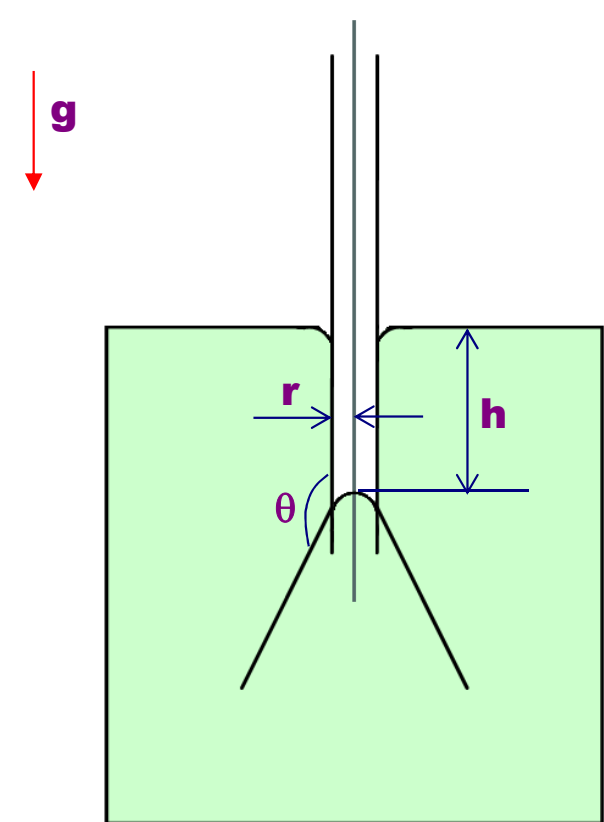
水とガラス管の場合



液体が管に濡れる場合

$$\theta < 90^\circ$$

水とテフロン管の場合



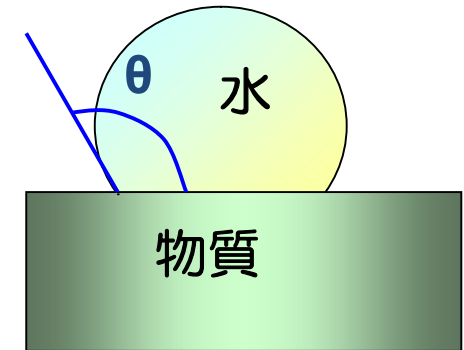
液体が管に濡れない場合

$$\theta > 90^\circ$$

撥水性と疎水性

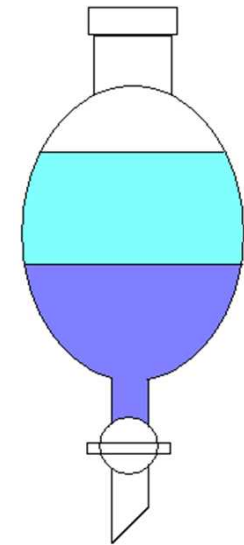
撥水性 → 水をはじく性質

『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』

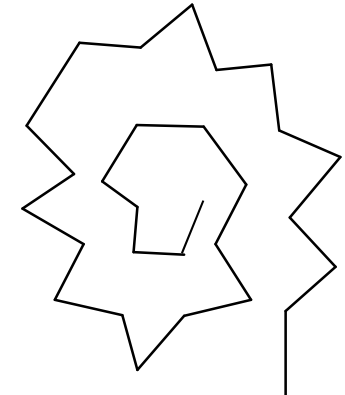
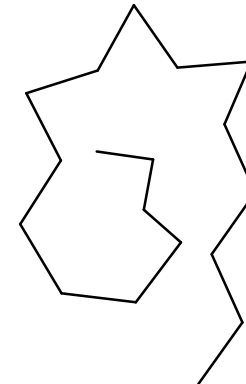
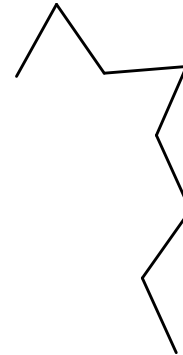
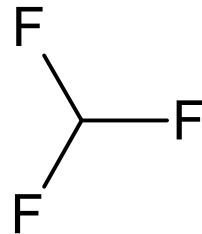


疎水性 → 水と混ざりにくい性質

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(θ)	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	8.84×10^{-10}

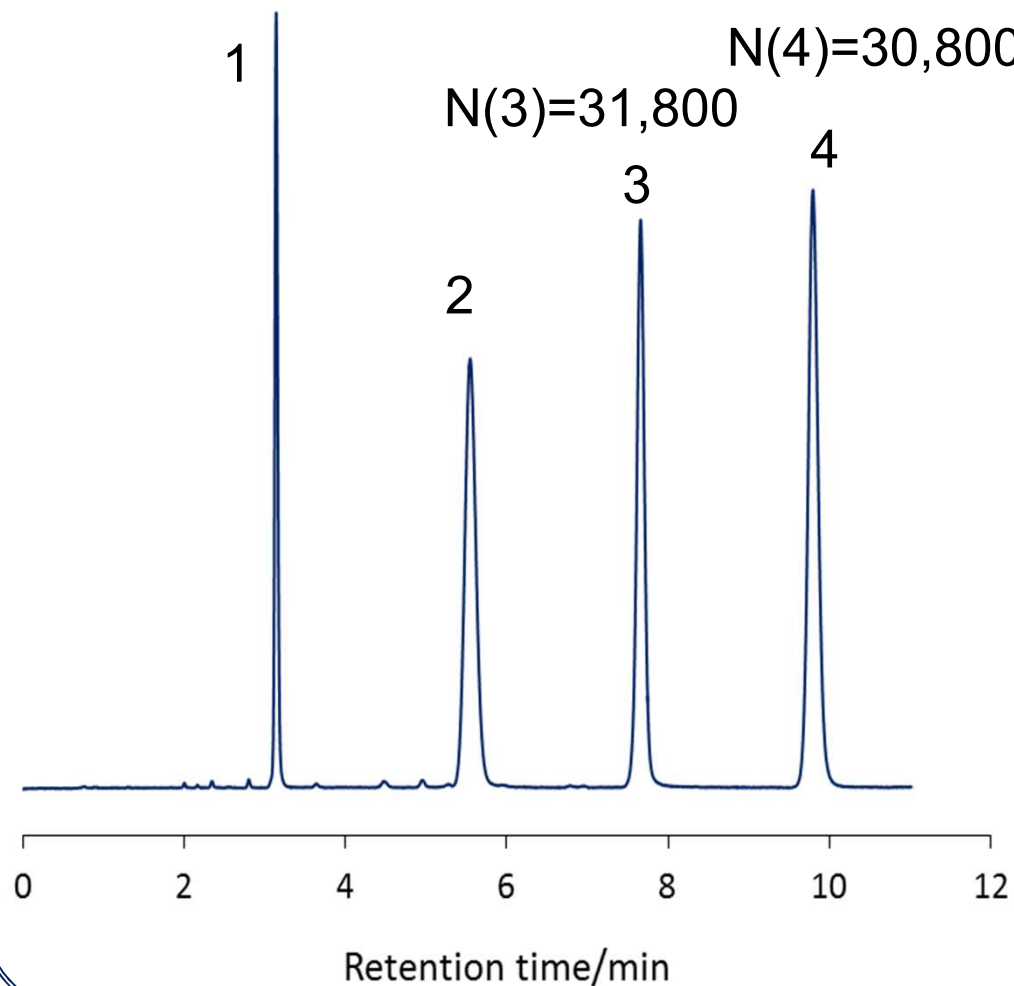
分析化学 Vol.59 No. 3 , P193-205(2010)

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 °C

Detection: UV@250nm

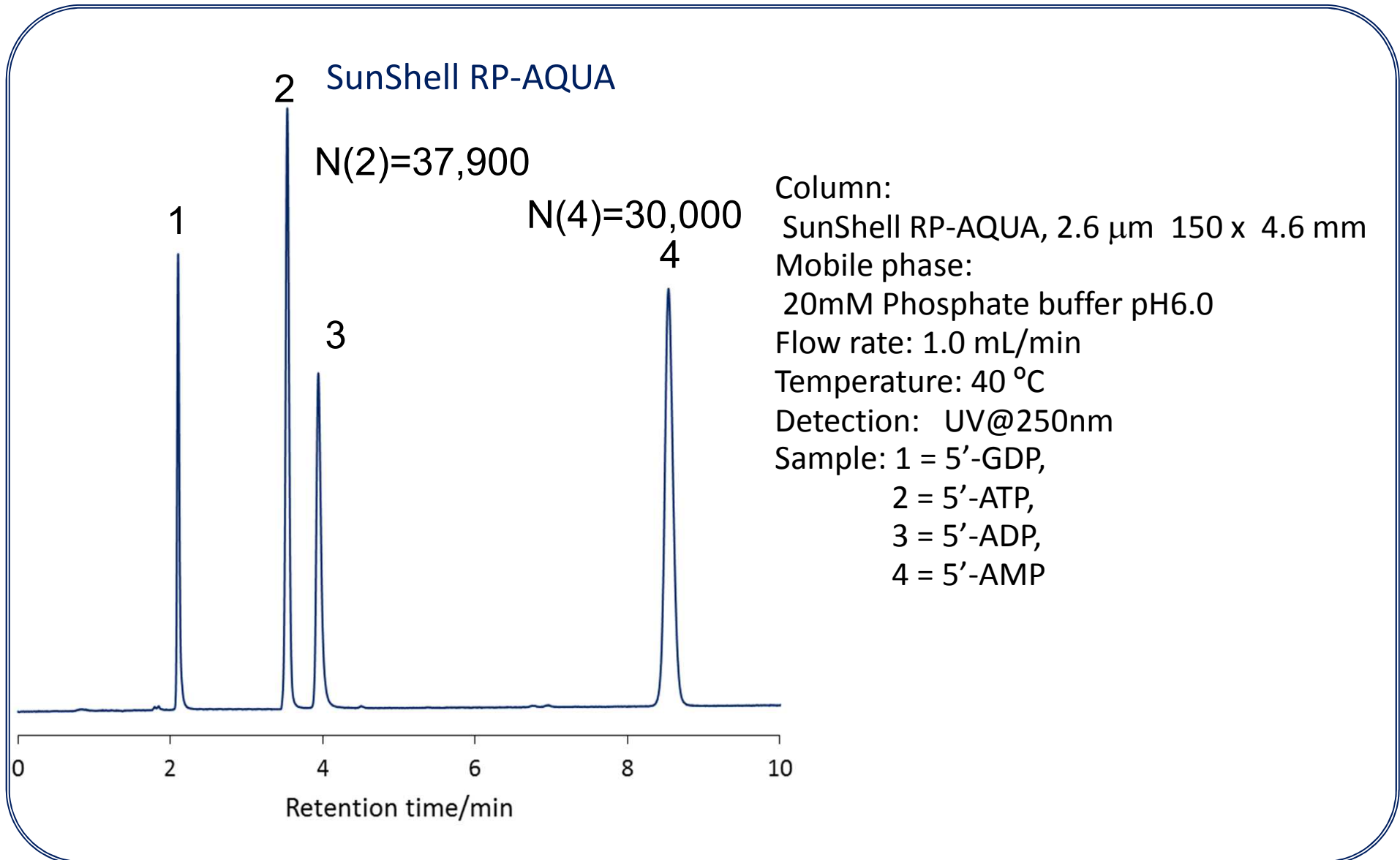
Sample: 1 = Nicotinic acid,

2 = Pyridoxal,

3 = Pyridoxine,

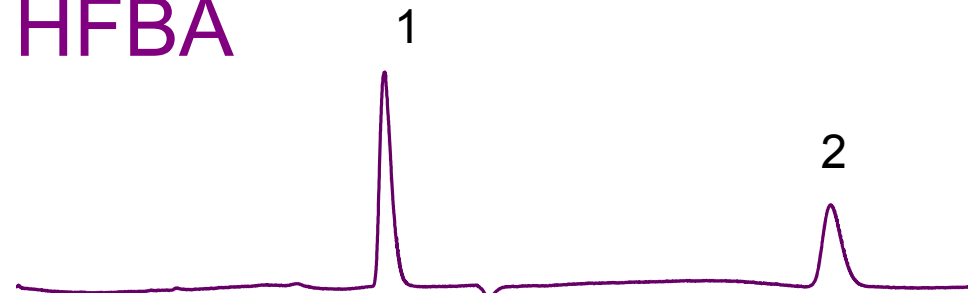
4 = Nicotinamide

ヌクレオチドの分離

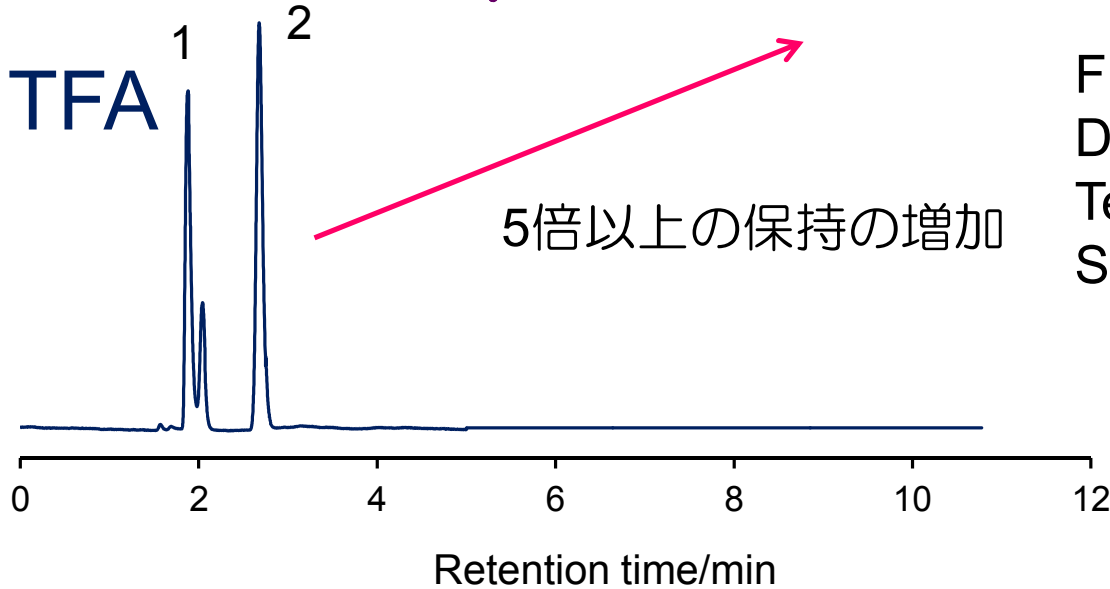


TFAとHFBAを用いた場合のアミノ酸の保持比較

0.1% HFBA



0.1% TFA



Column:

Sunrise C28 5 μ m
150 x 4.6 mm

Mobile phase:

0.1% HFBA and 0.1% TFA

Flow rate: 1.0 mL/min

Detection: RI and UV@210nm

Temperature: 30 °C

Sample: 1=D-alanine

2=D-alanine-D-alanine

アミノ酸の分離

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

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

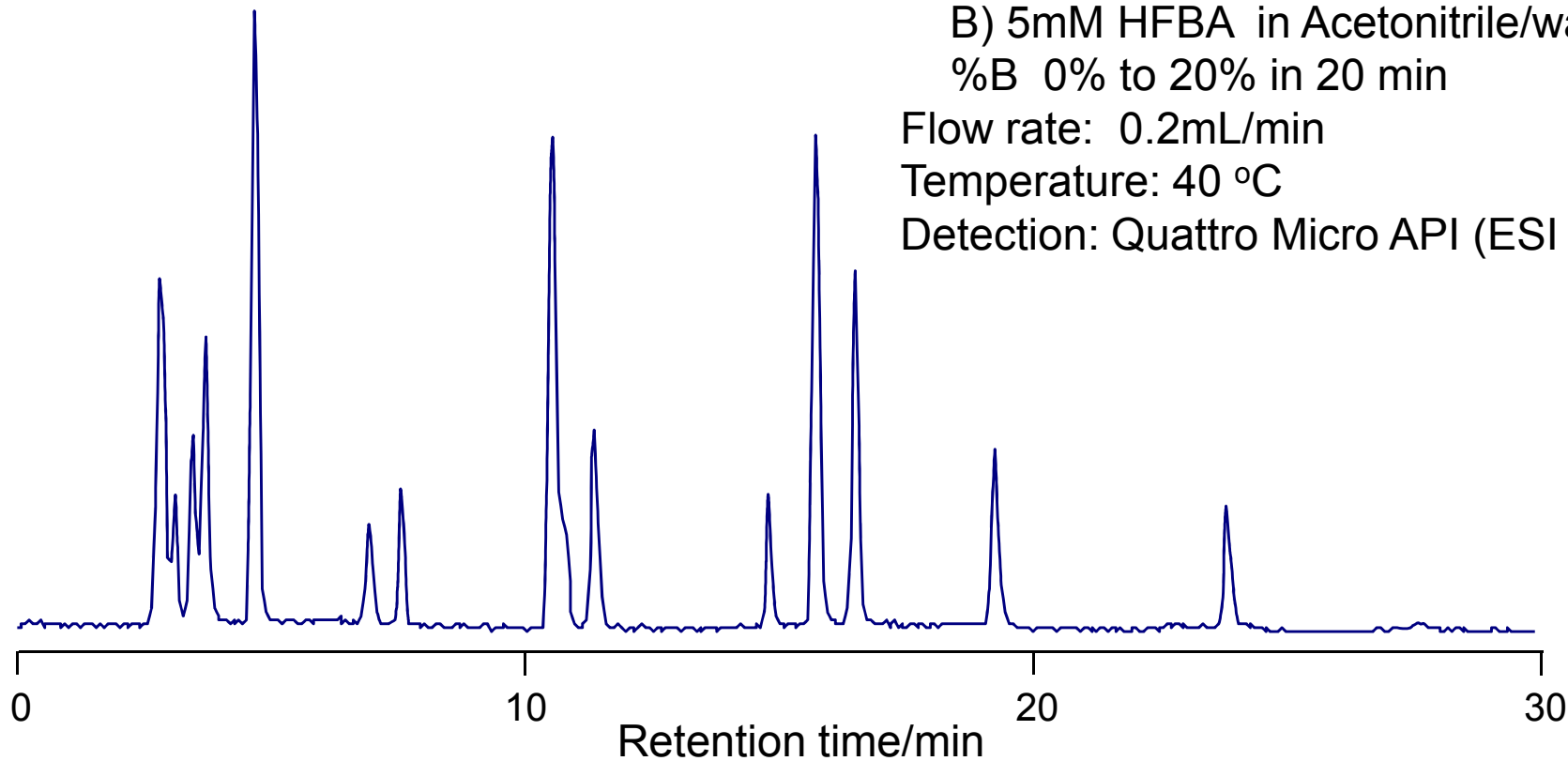
B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)

%B 0% to 20% in 20 min

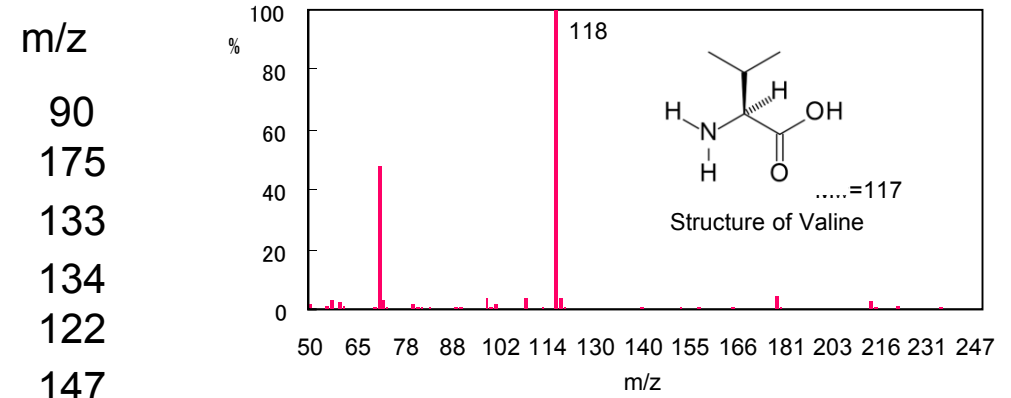
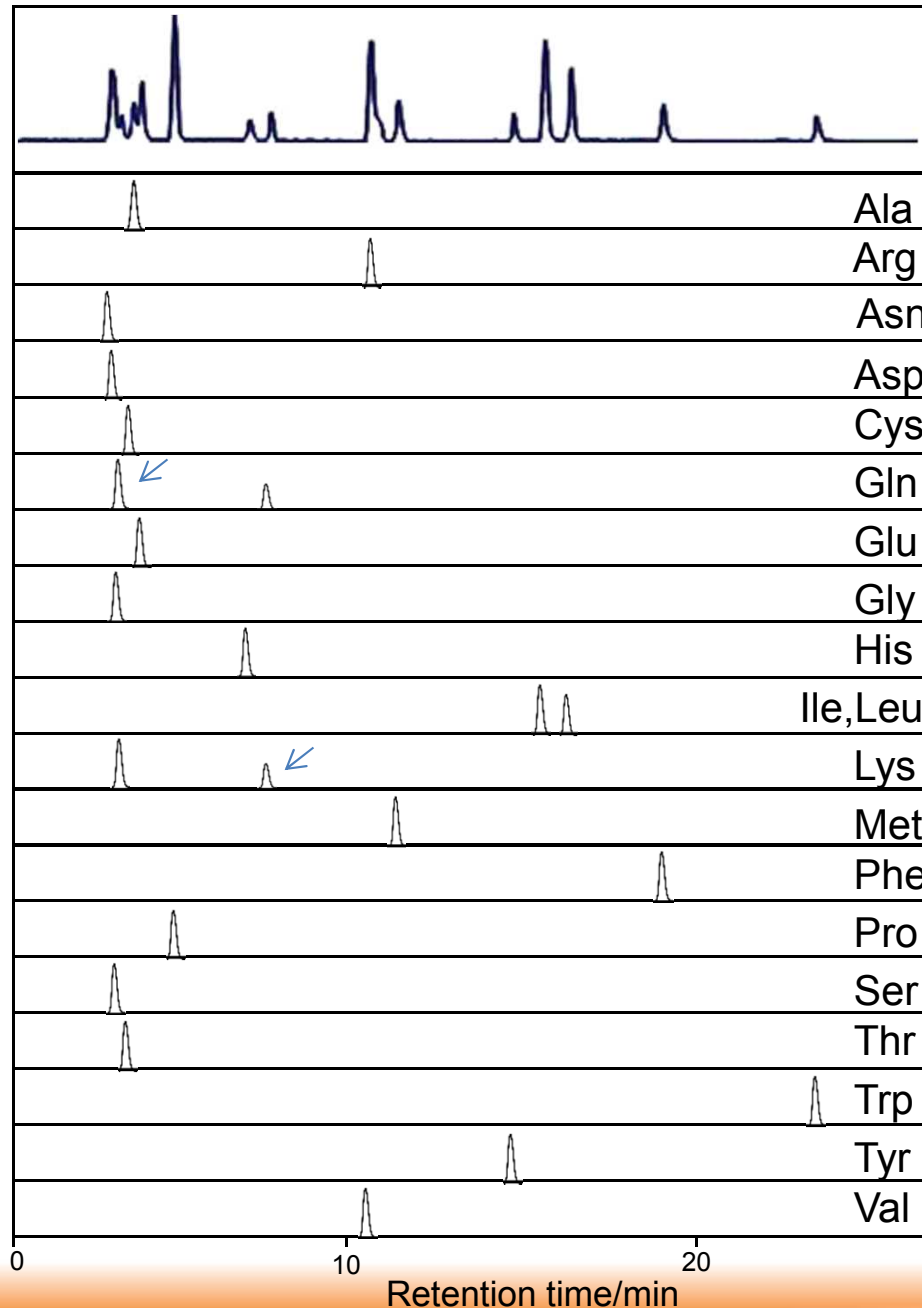
Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM



アミノ酸のLC/MS



Mass spectrum of Valine

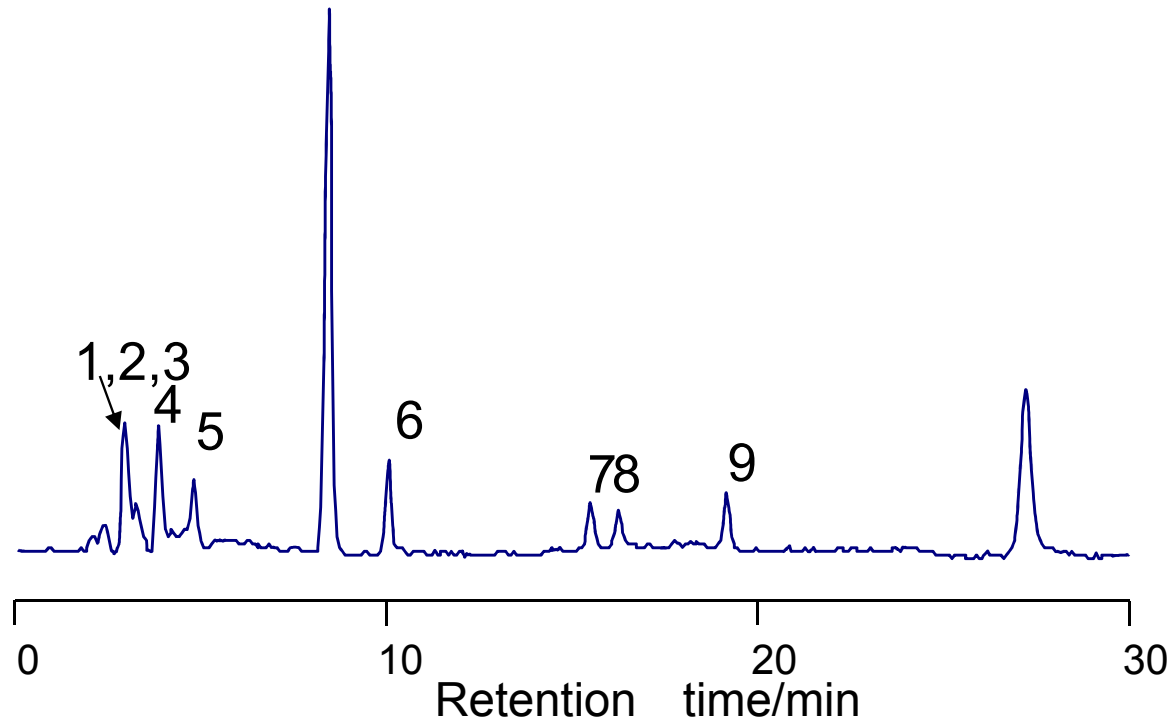
Column: Sunniest RP-AQUA 5 μ m, 2.0x 150mm
 Mobile phase:
 A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)
 B) 5mM HFBA in Acetonitrile/water(9/1)
 %B 0% to 20% in 20 min
 Flow rate: 0.2mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

アミノ酸の検出限界 (LC/MS)

Analyze	Detection Limit (μmol/L)	Analyze	Detection Limit (μmol/L)
Ala	3.2	Leu	0.55
Arg	3.7	Lys	3.1
Asn	3.9	Met	1.8
Asp	2.6	Phe	0.89
Cys	6.6	Pro	1.2
Gln	1.8	Ser	2.9
Glu	1.7	Thr	1.6
Gly	3.3	Trp	4.2
His	1.6	Tyr	2.1
Ile	0.57	Val	1.1

Detection Limit: S/N=3

紅茶中のアミノ酸のLC/MS



	Analyte	Concentration (μmol/L)
1	Ser	83.5
2	Asp	253
3	Glu	330
4	Pro	42.1
5	His	702
6	Vai	75.6
7	Ile	73.2
8	Leu	33.8
9	Phe	97.2

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

Mobile phase:

A) 5mM HFBA (Heptafluorobutyric acid)

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

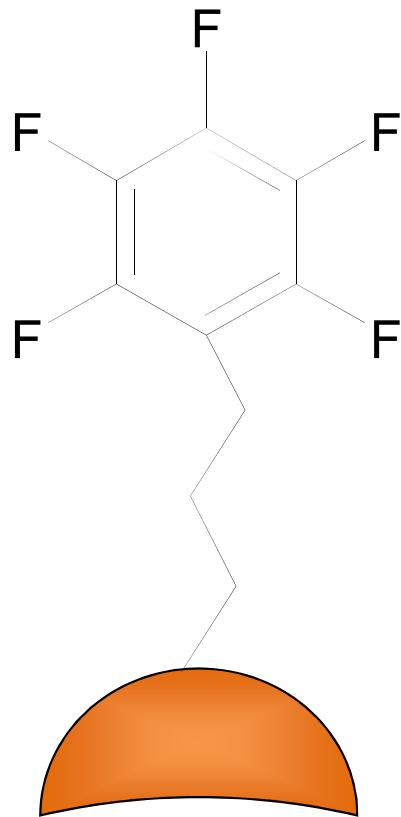
%B 0% to 20% in 20 min

Flow rate: 0.2mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: Quattro Micro API (ESI positive) SIM

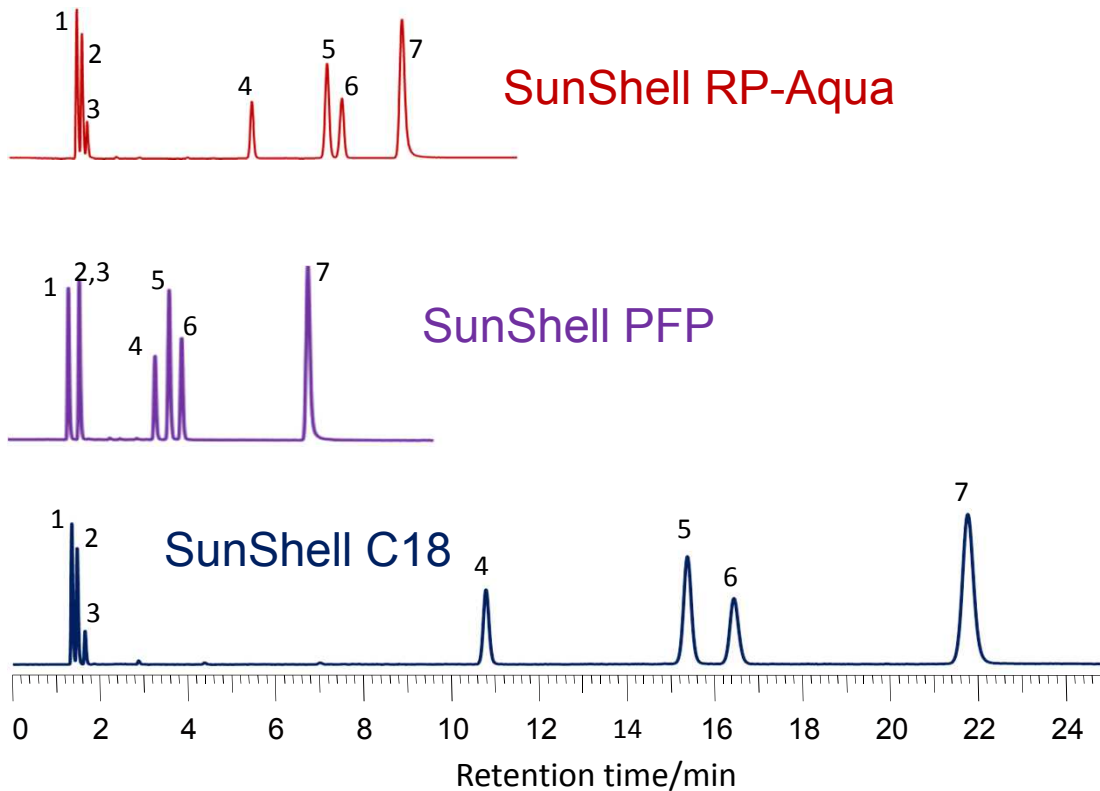
ペンタフルオロフェニル (PFP)



- 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



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

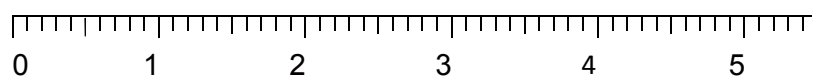
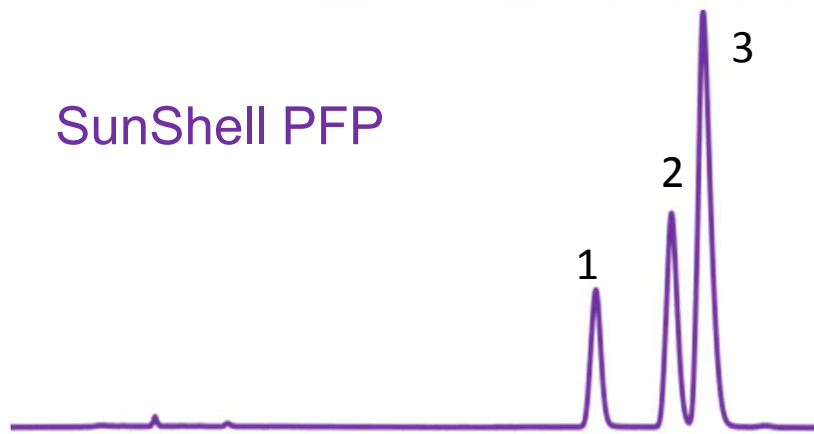
	Hydrogen bonding (Caffeine/Phenol)	Hydrophobicity (Amylbenzene/Butylbenzene)	Steric selectivity (Triphenylene/o-Terphenyl)
RP-Aqua	0.52	1.52	1.30
PFP	1.00	1.31	2.38
C18	0.39	1.60	1.46

キシレン異性体の分離

SunShell C18



SunShell PFP



Retention time/min

SunShell C18, PFP 2.6 μ m 150 x 2.1 mm

Mobile phase:

CH₃OH/water=75:25 for SunShell C18

CH₃OH/water=60:40 for SunShell PFP

Flow rate: 0.3 mL/min

Temperature: 25 °C

Detection: UV@250nm

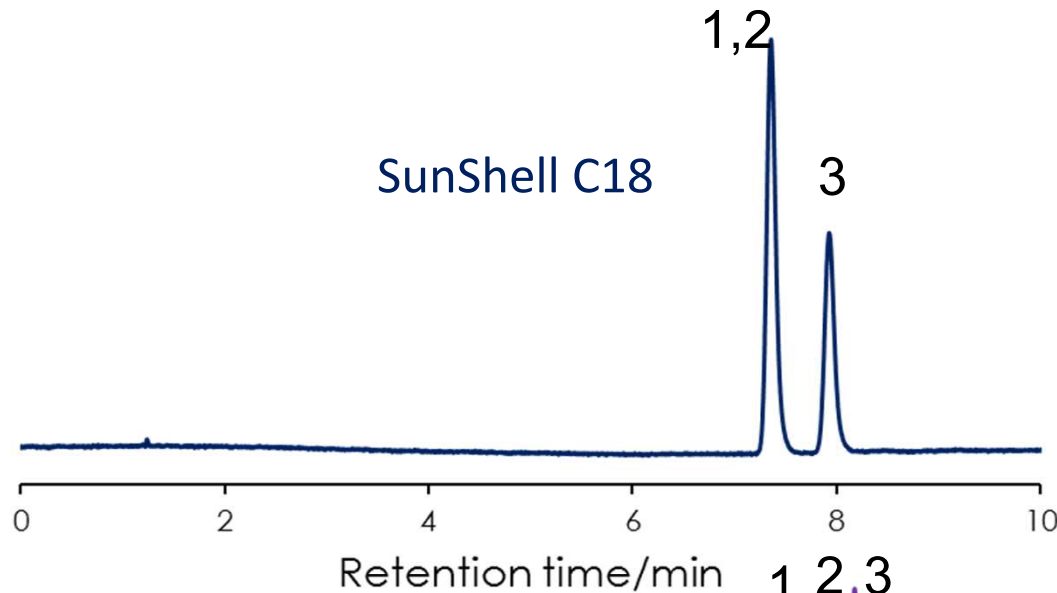
Sample: 1 = o-Xylene

2 = m-Xylene

3 = p-Xylene

SunShell PFPは異性体の分離についてもC18と異なる分離パターンを示します。

クレゾール異性体の分離



Column:

SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm

SunShell PFP, 2.7 μm 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

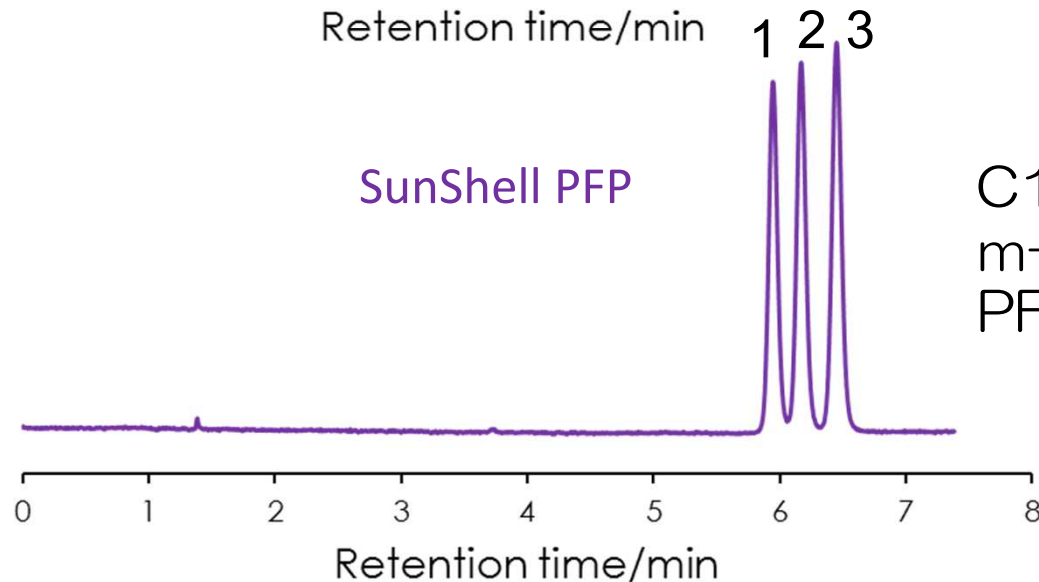
Temperature: 25 $^\circ\text{C}$

Sample: 1 = p-Cresol

2 = m-Cresol

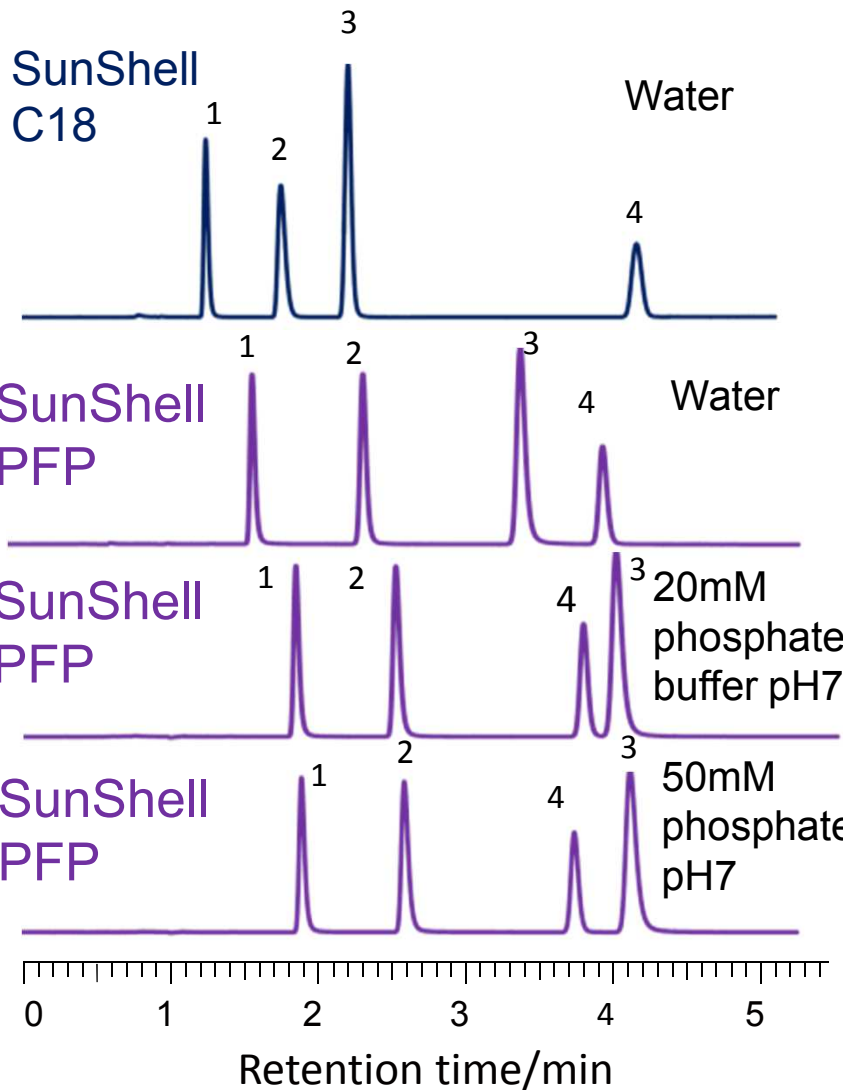
3 = o-Cresol

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。

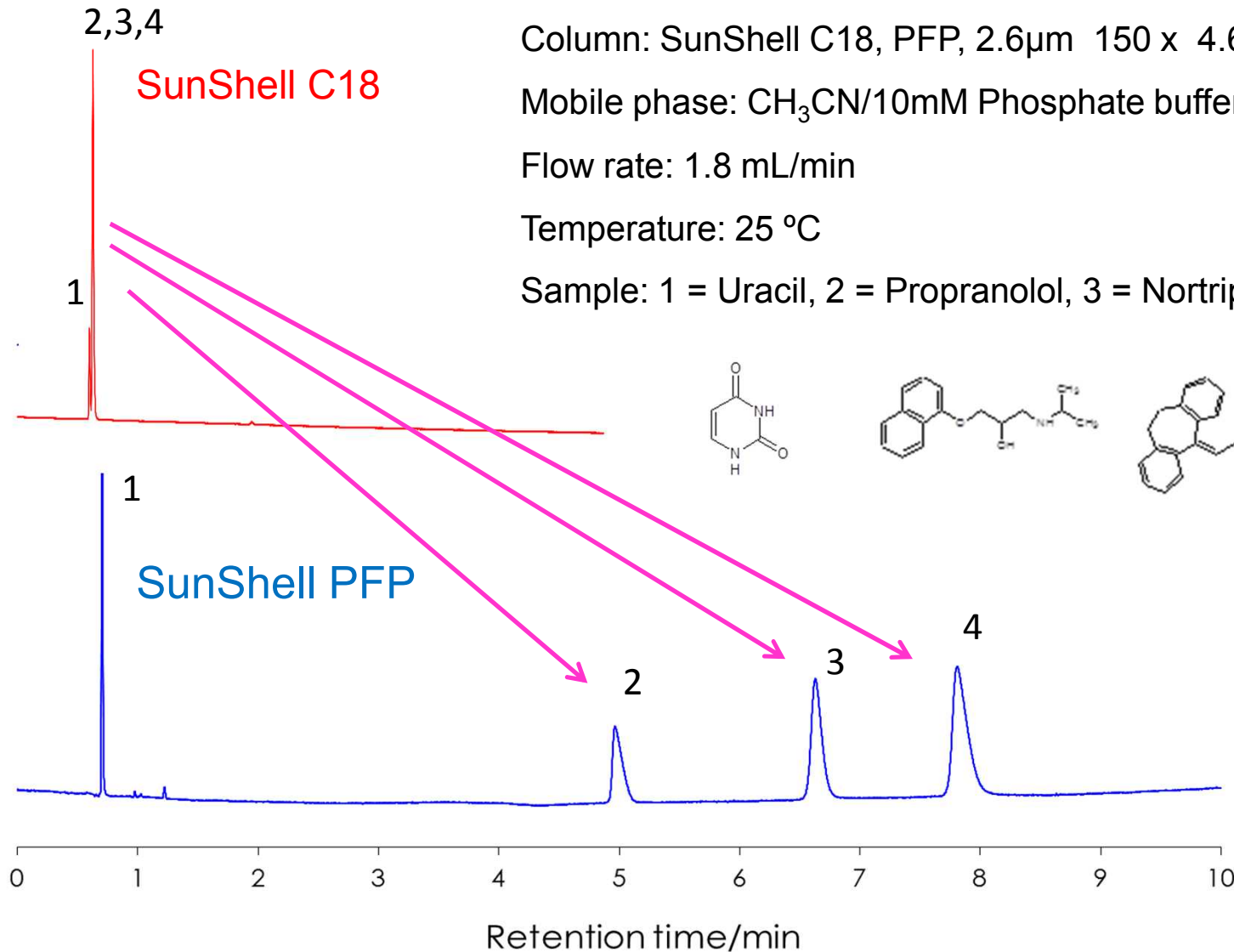
キサンチン類の分離



SunShell C18, PFP 2.6 μ m 150 x 2.1 mm
 Mobile phase: CH₃OH/water or buffer=30/70
 Flow rate: 0.3 mL/min
 Temperature: 25 °C
 Detection: UV@250nm
 Sample: 1 = Theobromine
 2 = Theophylline
 3 = Caffeine
 4 = Phenol

SunShell PFPはC18に比べ極性の高いカフェインを強く保持します。また塩濃度の調節で分離を変えることができます

C18とPFPによる塩基性化合物の保持比較



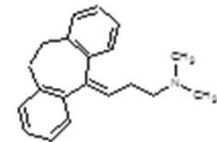
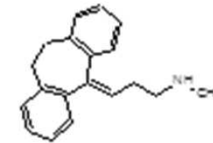
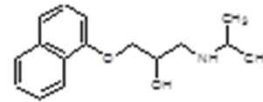
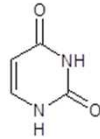
Column: SunShell C18, PFP, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

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

Flow rate: 1.8 mL/min

Temperature: 25 °C

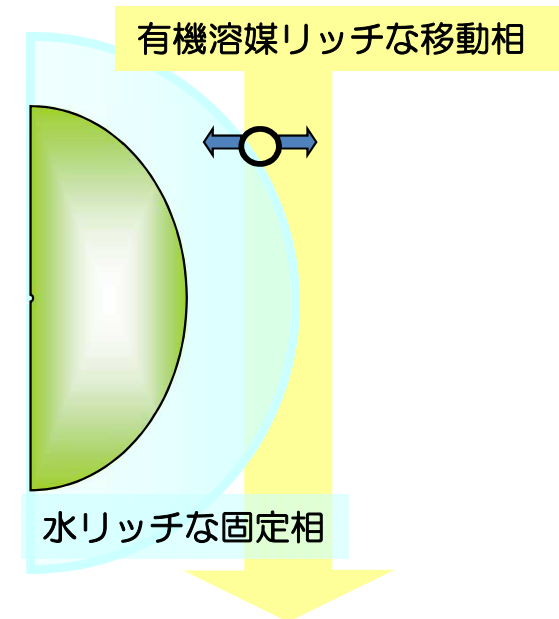
Sample: 1 = Uracil, 2 = Propranolol, 3 = Nortriptyline, 4 = Amitriptyline



PFPでHILIC・イオン交換？

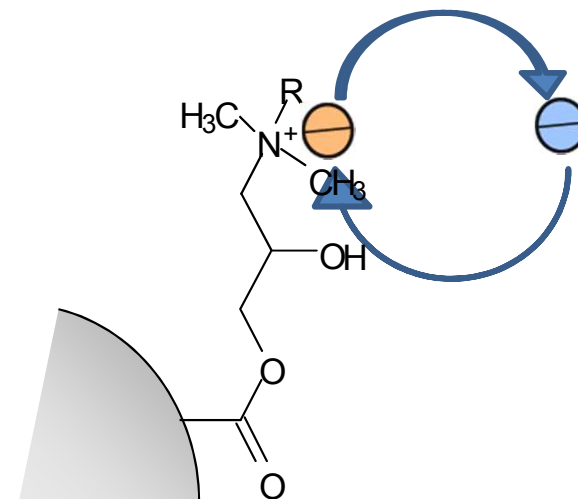
• HILICモード

- 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

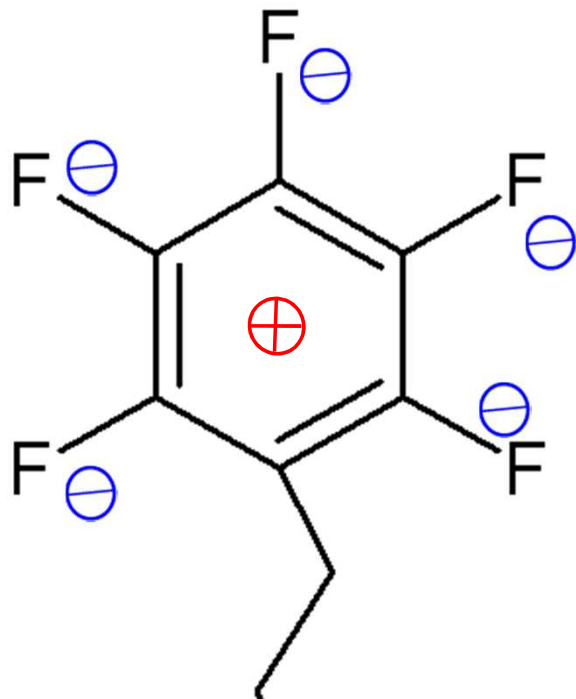
- 物質がイオン成分を取り込み、代わりに物質が持っていた他のイオン成分を放出する現象



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

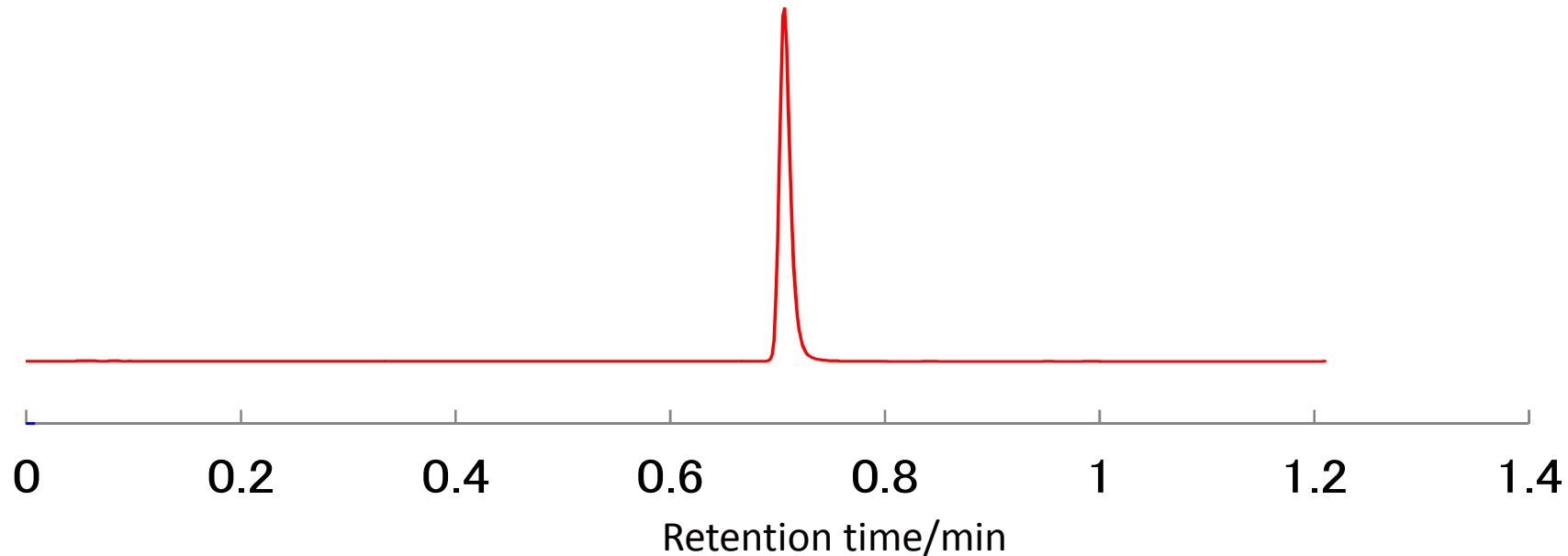


- PFPの化学的特性から水を保持するとは考えにくい
- PFP基が電化を持つ構造をしていない
- フッ素の強い電気陰性度により、電子の偏りが生じている



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 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 = 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。