

Hydrosphere C18

技術資料（1）

●もくじ

1.はじめに	1
2.親水性化合物の分離	1
3.分離特性	2
4.アプリケーション	5
5.まとめ	7

1. はじめに

逆相HPLCにおいてODSカラムは広範囲な化合物に適用されています。逆相の分離では溶質と固定相の疎水的な相互作用が主たる分離の機構となっています。そのため親水性化合物は固定相との疎水的な相互作用が小さいために通常のODSでは保持されにくくなります。Hydrosphere C18はこのような親水性化合物の分離に適しやすいよう充填剤表面に適度な親水性を有するように設計された製品です。従来の親水性化合物分離用カラムでは、一部の親水性化合物や塩基性化合物がテイリングする、耐久性が低いなどの問題がある場合があります。新しく開発したHydrosphere C18は、塩基性化合物のピーク形状も良好で耐久性も優れています。以下にこれらの特性を紹介します。

なお、本レポートに記載した「ODS-A」はYMC-Pack ODS-Aで汎用型の製品、「Pro C18」はYMC-Pack Pro C18で従来よりもさらに高度なエンドキャッピング処理がなされた製品です。

2. 親水性化合物の分離

核酸塩基のように親水性の高い化合物を分離する場合、保持されにくいため有機溶媒をまったく含まない溶離液を使用する場合があります。ところが、汎用型ODSにおいて有機溶媒を含まない溶離液を使用すると、カラムのみかけの疎水性が小さくなり化合物の保持が減少するという問題があります。これは疎水性の大きな充填剤表面と水が溶媒和し難いため官能基C18と水が反撥してC18の自由度が減少するためと考えられます。この現象は溶離液に有機溶媒を添加することで避けられますが、化合物によっては保持が小さくなりすぎて分離できなくなることもあります。イオンペア試薬の使用や化合物の誘導体化によって保持させることができますが、カラムの劣化を早めたり、操作が煩雑になるなどの問題が残ります。

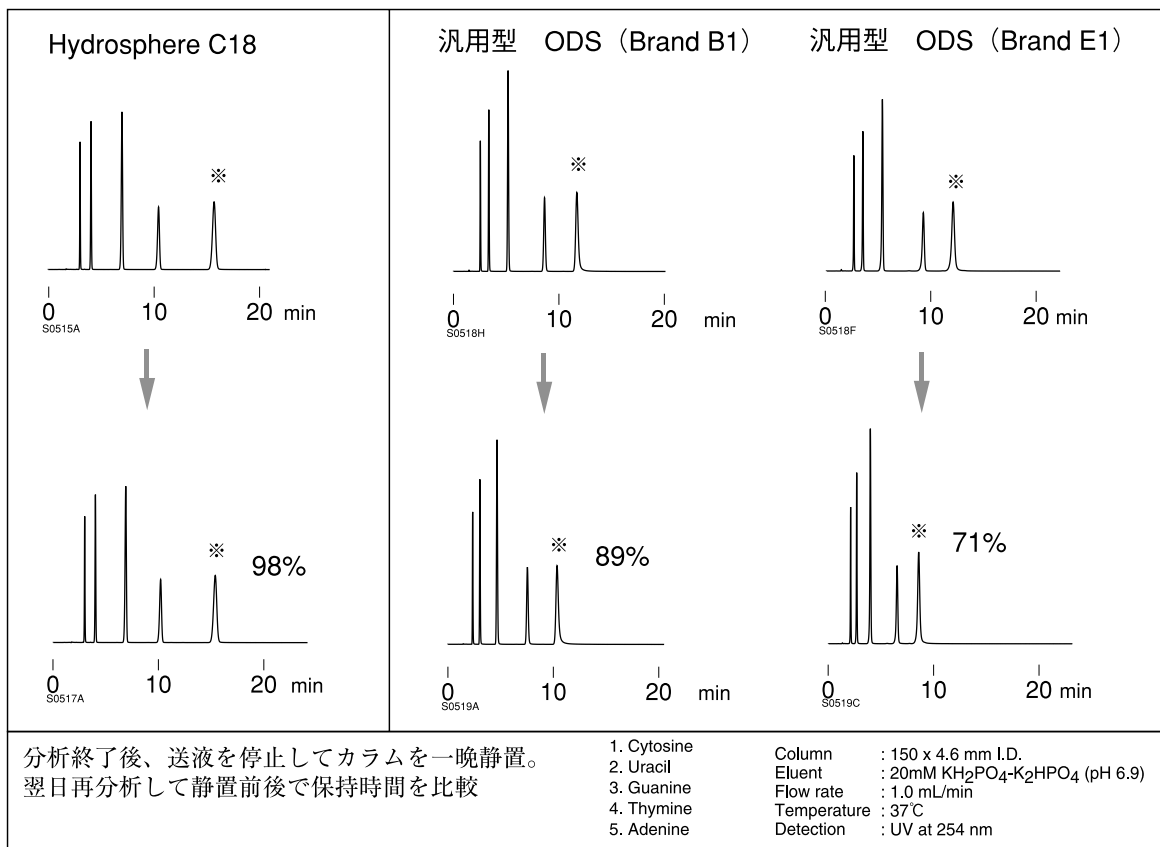


図1 水100%溶離液条件下における保持時間の再現性

図1ではHydrosphere C18および汎用型ODS(他社)について水100%溶離液を封入し、一晚静置した前後で核酸塩基の保持時間の変化を比較しています。静置前と静置後で5番目のピーク、アデニンの保持時間の変化率が、汎用型ODS(Brand B1)で89%、汎用型ODS(Brand E1)で71%と保持時間が減少しているのに対してHydrosphere C18は98%とほとんど変化ありません。Hydrosphere C18は表面が適度な親水性をもつように設計されているため、水との溶媒和が可能となり、有機溶媒を含まない溶離液でも保持時間の減少がなく再現性の良いクロマトグラムが得られます。

3.分離特性

3-1. 疎水性・立体選択性

Hydrosphere C18は表面に親水性をもたせ、C18の密度を小さくしています。図2に疎水性と立体選択性を評価したクロマトグラムを示しています。アミルベンゼンの保持係数(k'_4)が大きいほど疎水性が大きいことを、また、かさ高い構造のo-ターフェニルと平面的な構造のトリフェニレンの分離係数($\alpha_{5/3}$)が大きいほど立体選択性が大きいことを示しています。トリフェニレンなどの平面的な化合物は充填剤表面のC18の密度が大きくなったり、ポリメリックになることで保持が大きくなります。親水性を高め、C18の密度を小さくしたHydrosphere C18は汎用型のODS-AやPro C18と比較して疎水性、立体選択性ともに小さくなっていることがわかります。

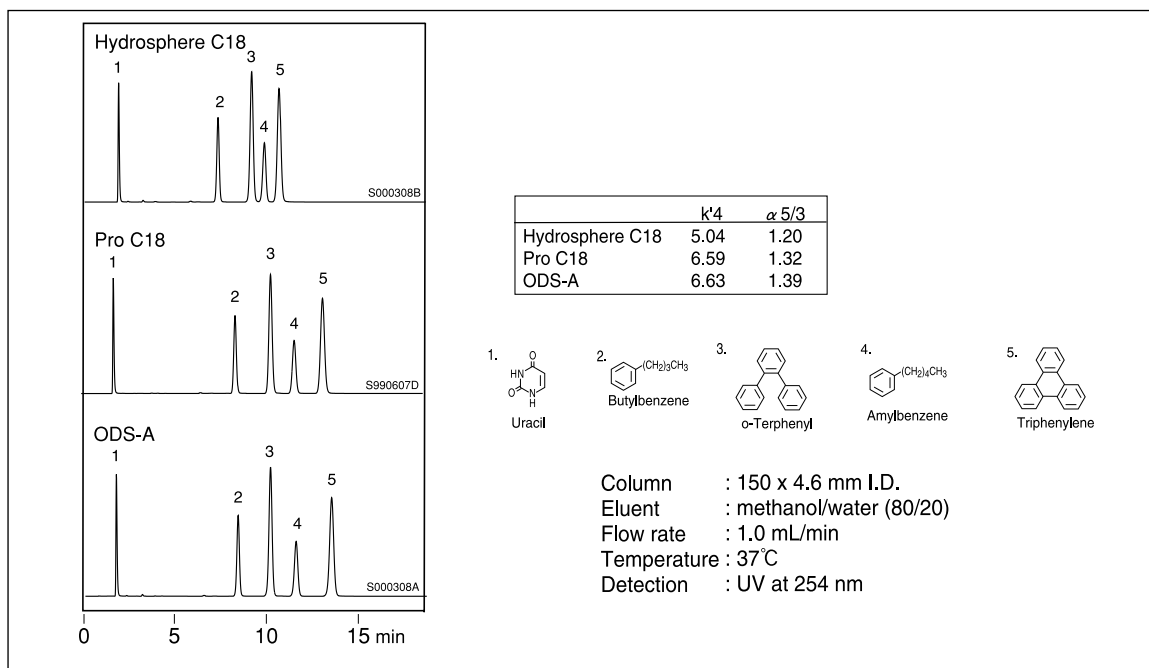


図2 疎水性・立体選択性

3-2. 水素結合性

図3に水素結合性を評価したクロマトグラムを示しています。水素結合性が大きいほど親水性化合物は保持されやすくなります。ODSの水素結合性は、一般的にはカフェインとフェノールの分離係数($\alpha_{2/1}$)で評価されていますが、フェノールも水酸基を有し保持には水素結合性が寄与していると考えられ正確に評価できない場合もあります。ここでは極性基をもたないベンゼンを用いてカフェインとベンゼンの分離係数($\alpha_{3/1}$)で評価しました。 α の数値が小さいほうが水素結合性が大きいことを示しています。Hydrosphere C18は汎用型のODS-AやPro C18と比較して水素結合性が大きいことがわかります。

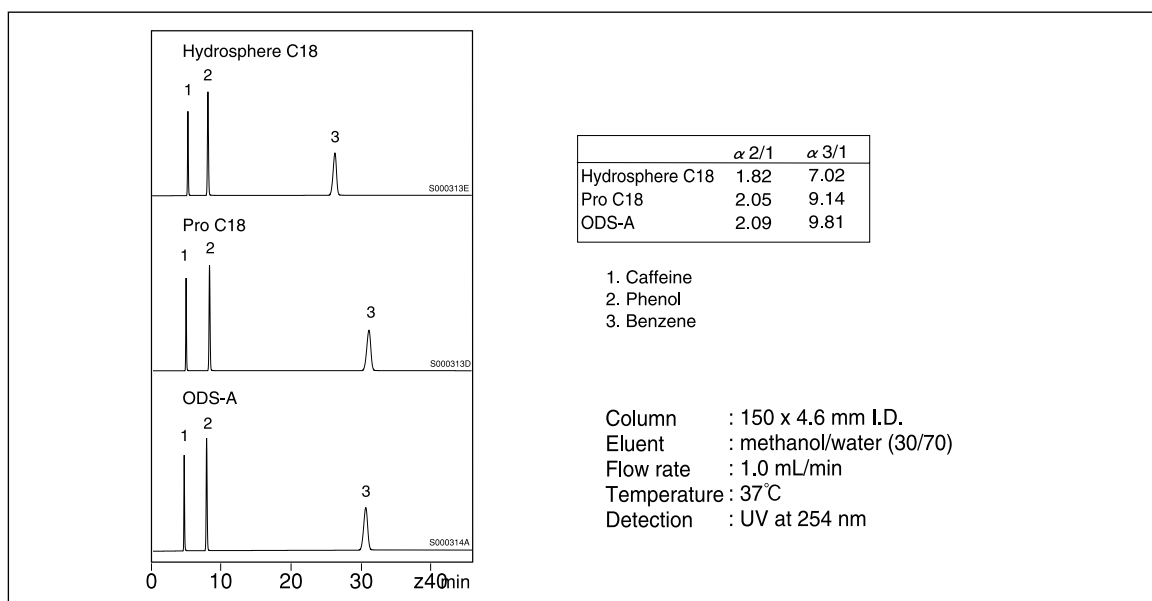


図3 水素結合性

3-3. 塩基性化合物の分離

図4から図6に塩基性化合物の分離のクロマトグラムを示しています。ピリジンおよび三環系抗うつ薬、抗ヒスタミン薬は塩基性化合物のなかでも特にテイリングしやすい化合物です。一般に親水性化合物の保持が大きいODSでは、このような化合物のテイリングは大きい傾向があります。ここに示した他社の製品のBrand G1およびBrand D1、Brand E2はいずれも親水性化合物の保持が大きいといわれているものです。表1にこれらの化合物の各カラムでのピーク形状をまとめて示しました。他社の製品では、化合物によってはテイリングが大きいものがあります。一方、Hydrosphere C18では独自のエンドキャッピング技術でシリカ表面を不活性化しているため、いずれの化合物もテイリングの小さい良好なピーク形状となっています。

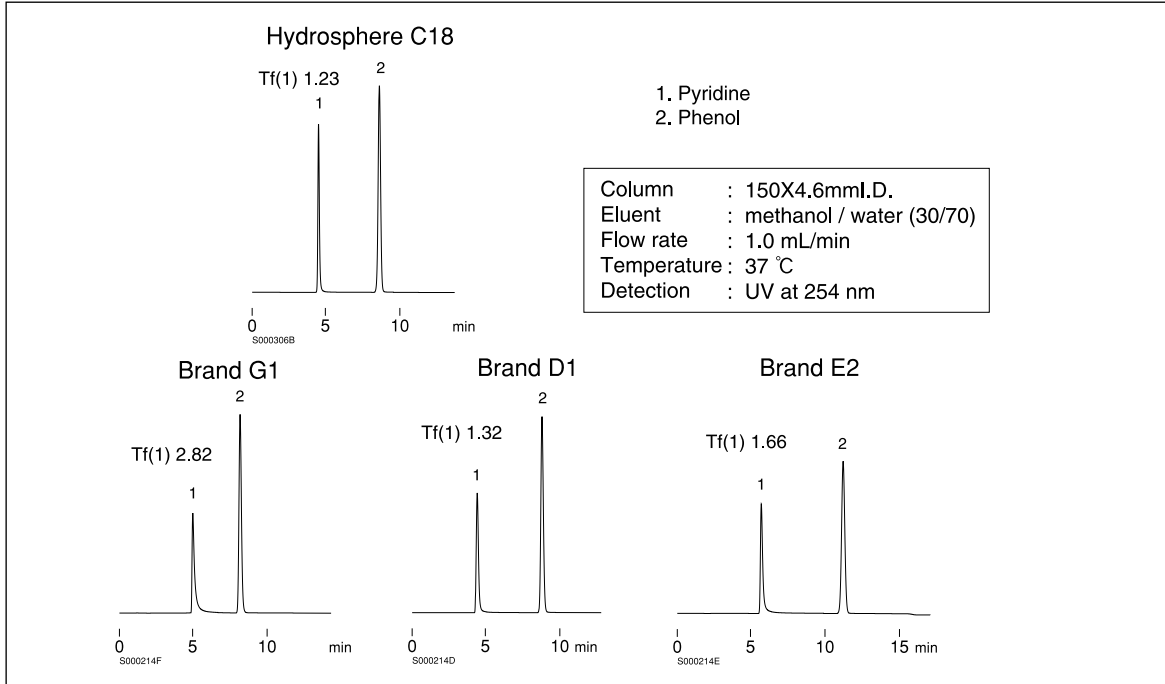


図4 ピリジン-フェノール

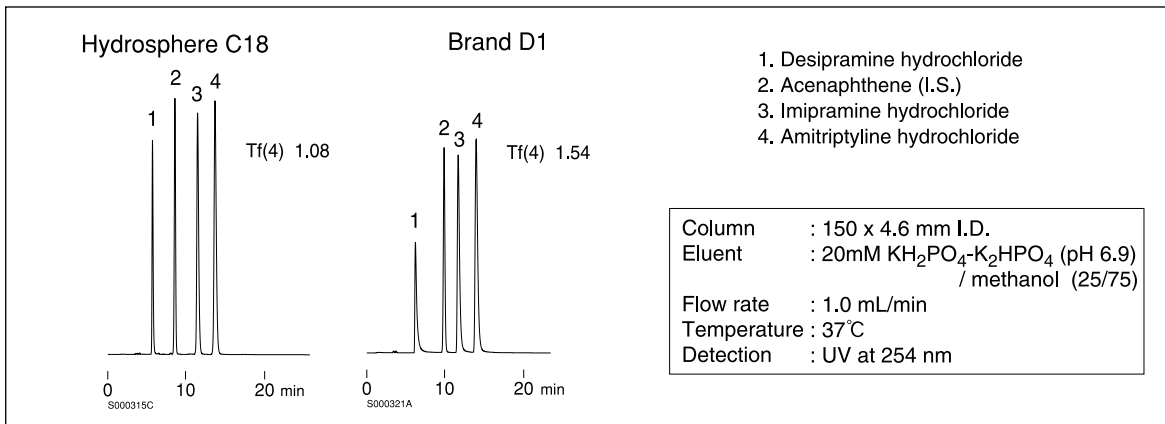


図5 三環系抗うつ薬

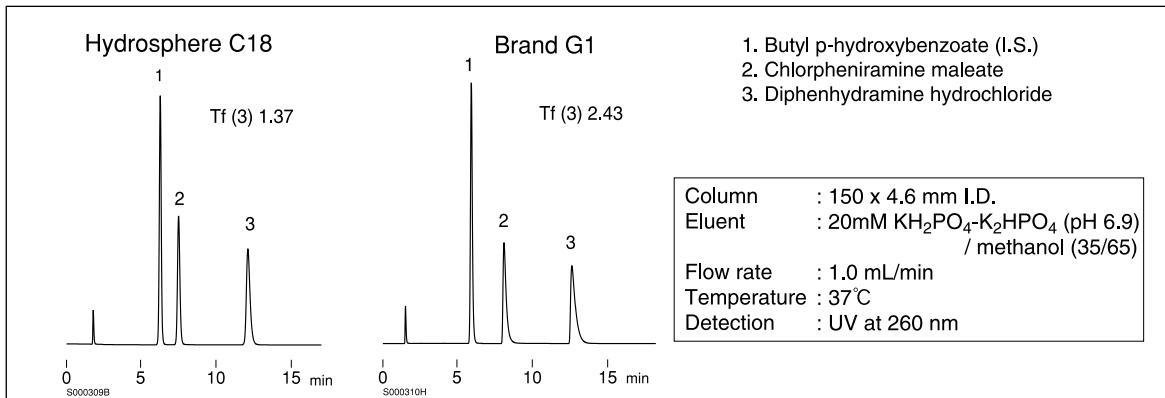


図6 抗ヒスタミン薬

	Pyridine	Amitriptyline	Diphenhydramine
Hydrosphere C18	○	○	○
Brand G1	×	△	×
Brand D1	○	△	△
Brand E2	△	○	△

○: $T_f \leq 1.5$
△: $1.5 < T_f \leq 2.0$
×: $T_f > 2.0$

表1 塩基性化合物のピーク形状

3-4. 混合試料の分離

それぞれ異なった特性を有する化合物の混合試料を用いて分離特性を比較したクロマトグラムを図7に示しています。トルエン(1)およびn-プロピルベンゼン(3)、n-ブチルベンゼン(5)は疎水性の化合物です。アセナフテン(4)は平面的な化合物です。疎水性および立体選択性が小さいHydrosphere C18ではPro C18やBrand J1と比較してこれらの化合物の保持は小さくなっています。一方、水酸基やカルボニル基を有するテストステロン(2)の保持は、Pro C18やBrand J1と比較してHydrosphere C18では大きくなっています。テストステロンの保持には疎水的な相互作用とともに水素結合性が大きく寄与しているためと考えられます。この結果、Hydrosphere C18ではトルエンとテストステロンの溶出順序が、Pro C18やBrand J1と比較して逆転しています。

アミトリプチリン(6)は塩基性化合物でBrand J1では大きくテイリングしていますが、Hydrosphere C18やPro C18ではこのようなテイリングしやすい塩基性化合物のピーク形状も良好です。

また、Hydrosphere C18とPro C18ではアミトリプチリンとn-ブチルベンゼンの分離度にも大きな差が認められます。このように汎用型のODSとは分離特性が異なるHydrosphere C18では、汎用型のODSでは分離できないものが分離できる可能性があり、テイリングしやすい塩基性化合物を含めて広範囲な化合物群に適用しやすい製品です。

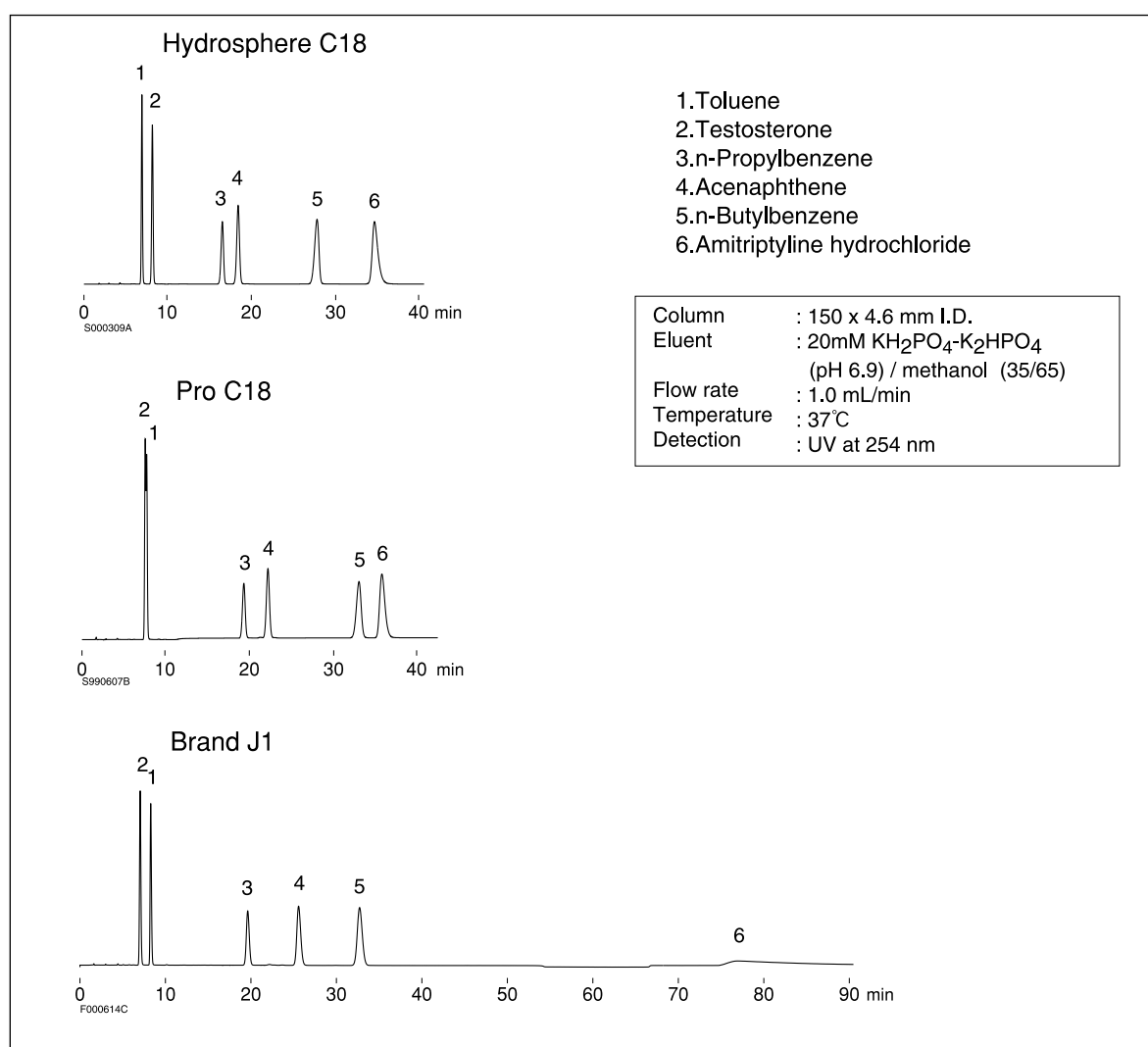


図7 混合試料の分離

4. アプリケーション

図8に有機酸の分離例を示しています。有機溶媒をまったく含まない分離液で分離しています。Brand A1と比較してHydrosphere C18ではクエン酸とフマル酸の保持が大きく分離も良好です。

図9にオリゴ糖の分離例を示しています。水素結合性が非常に小さいBrand 12ではほとんど保持されていませんが、Hydrosphere C18では良好な分離が得られています。

図10にサイコサポニンの分離例を示しています。サポニンなどの配糖体の保持には疎水的な相互作用とともに水素結合性も寄与していると考えられます。Brand B1では分離が不十分なサイコサポニンa (2)とb₂ (3)が、Hydrosphere C18では完全分離しています。

図11にペプチドの分離例を示しています。Brand E2ではBAM-12P (1)とβ-エンドルフィン (7)のピークがブロードになってテイリングしていますが、Hydrosphere C18では良好なピーク形状を示しています。BAM-12P、β-エンドルフィンとも塩基性ペプチドであることを考慮するとシリカ表面の不活性度の差がピーク形状の差となってあらわれていると考えられます。

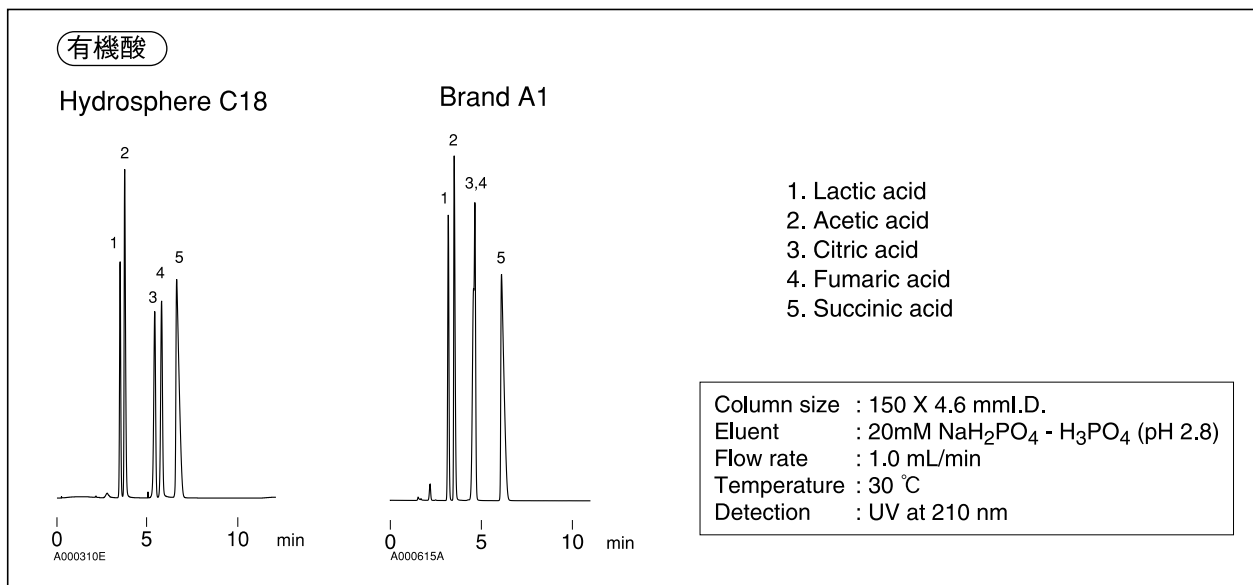


図8 有機酸

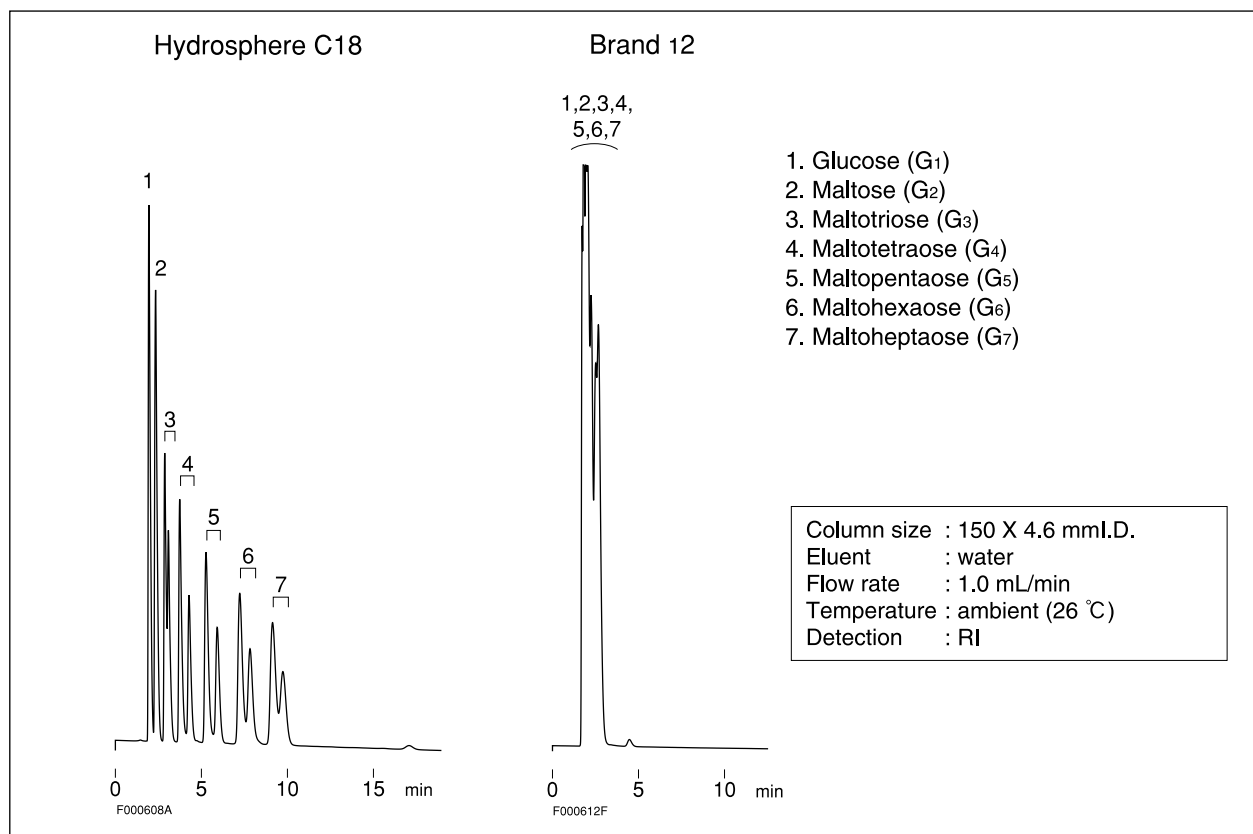
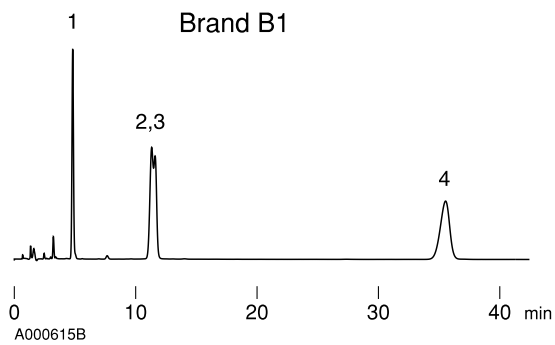
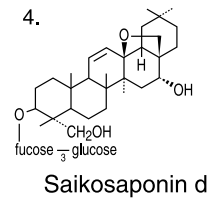
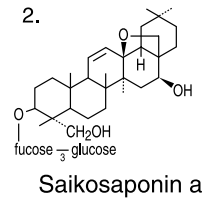
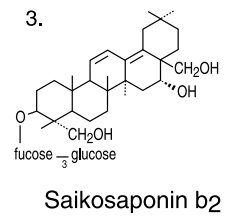
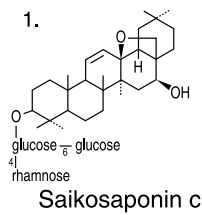
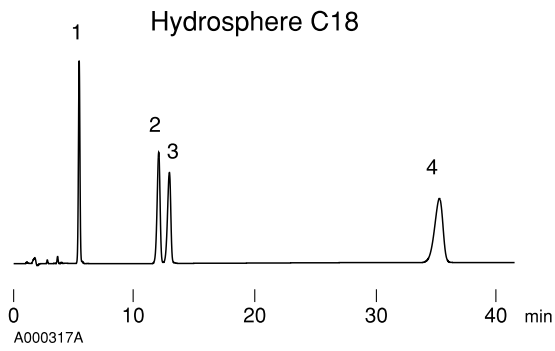


図9 オリゴ糖

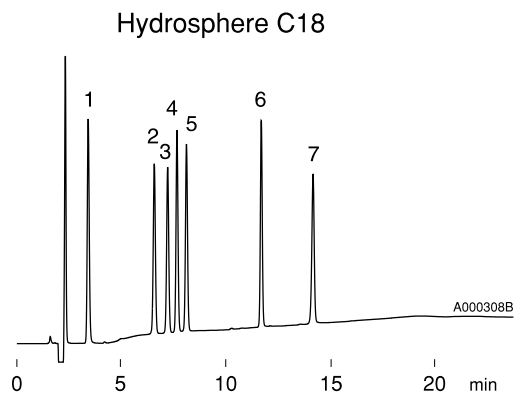
サイコサポニン



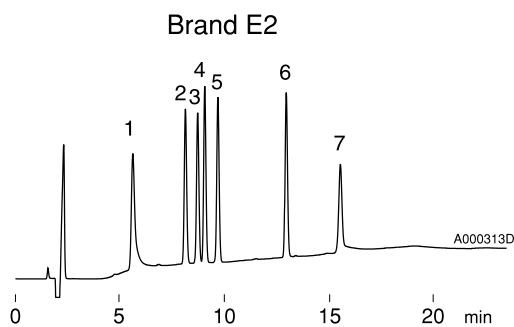
Column size : 150 x 4.6 mmI.D.
 Eluent : acetonitrile/water(38/62)
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Temperature : 37 °C
 Detection : UV at 210 nm

図10 サイコサポニン

ペプチド



1. BAM-12P
2. [D-Ala²,Met⁵]-Enkephalinamide
3. α-Endorphin
4. Methionine-Enkephalin
5. [D-Ala²,Met⁵]-Enkephalin
6. γ-Endorphin
7. β-Endorphin



Column size : 150 X 4.6 mmI.D.
 Eluent : A)water/TFA (100/0.1)
 B)acetonitrile/TFA (100/0.1)
 20-40%B(0-15min),
 40%B(15-20min)
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Temperature : 37 °C
 Detection : UV at 220 nm

図11 ペプチド

5. まとめ

Hydrosphere C18は、汎用型のODSと比較して充填剤表面の親水性が大きいため、親水性化合物の保持が大きく、汎用型ODSでは使用しにくい水100%の溶離液条件でも使用できます。また、独自のエンドキャッピング技術でシリカ表面を不活性化しているためテイリングしやすい塩基性化合物のピーク形状も良好で、耐久性も向上しています。これらの特長を有するHydrosphere C18は核酸関連物質や有機酸、糖類などの親水性化合物のほか配糖体やペプチドなど広範囲な化合物群の分離に有用と考えられます。

Hydrosphere C18 仕様

粒子径	5 μm
細孔径	12 nm
炭素含有率	12 %
使用可能 pH 範囲	2 - 8
使用温度範囲	50°C 以下 (推奨常用温度 20 - 40°C)

オーダーリングインフォメーション

粒子径 (μm)	カラムサイズ (内径X長さ mm)	製品番号	価格 (円)
S-5	2.0 X 50	HS-3C0	43,000
	2.0 X 75	HS-3C7	43,000
	2.0 X 150	HS-3C2	50,000
	3.0 X 50	HS-3E0	40,000
	3.0 X 150	HS-3E2	48,000
	3.0 X 250	HS-3E3	56,000
	4.6 X 50	HS-300	35,000
	4.6 X 75	HS-307	38,000
	4.6 X 100	HS-301	40,000
	4.6 X 150	HS-302	48,000

粒子径 (μm)	カラムサイズ (内径X長さ mm)	製品番号	価格 (円)
S-5	4.6 X 250	HS-303	56,000
	6.0 X 150	HS-312	56,000
	10 X 250	HS-323	125,000
	20 X 250	HS-343	230,000
	CombiChrom		
CombiScreen	4.6 X 50	HS-300-CC	40,000
CombiPrep	20 X 50	HS-340-CC	100,000

上記カラムサイズ以外のカラムの製造に関しては担当営業までお問い合わせください。

YMC 株式会社ワイエムシィ

国内営業部 〒600-8106
 京都市下京区五条通烏丸西入醍醐町284
 YMC烏丸五条ビル
 TEL 075-342-4550 FAX 075-342-4555

URL <http://www.ymc.co.jp>

販売店