

極性化合物分析へのアプローチ ～ 1st Choiceへの挑戦～

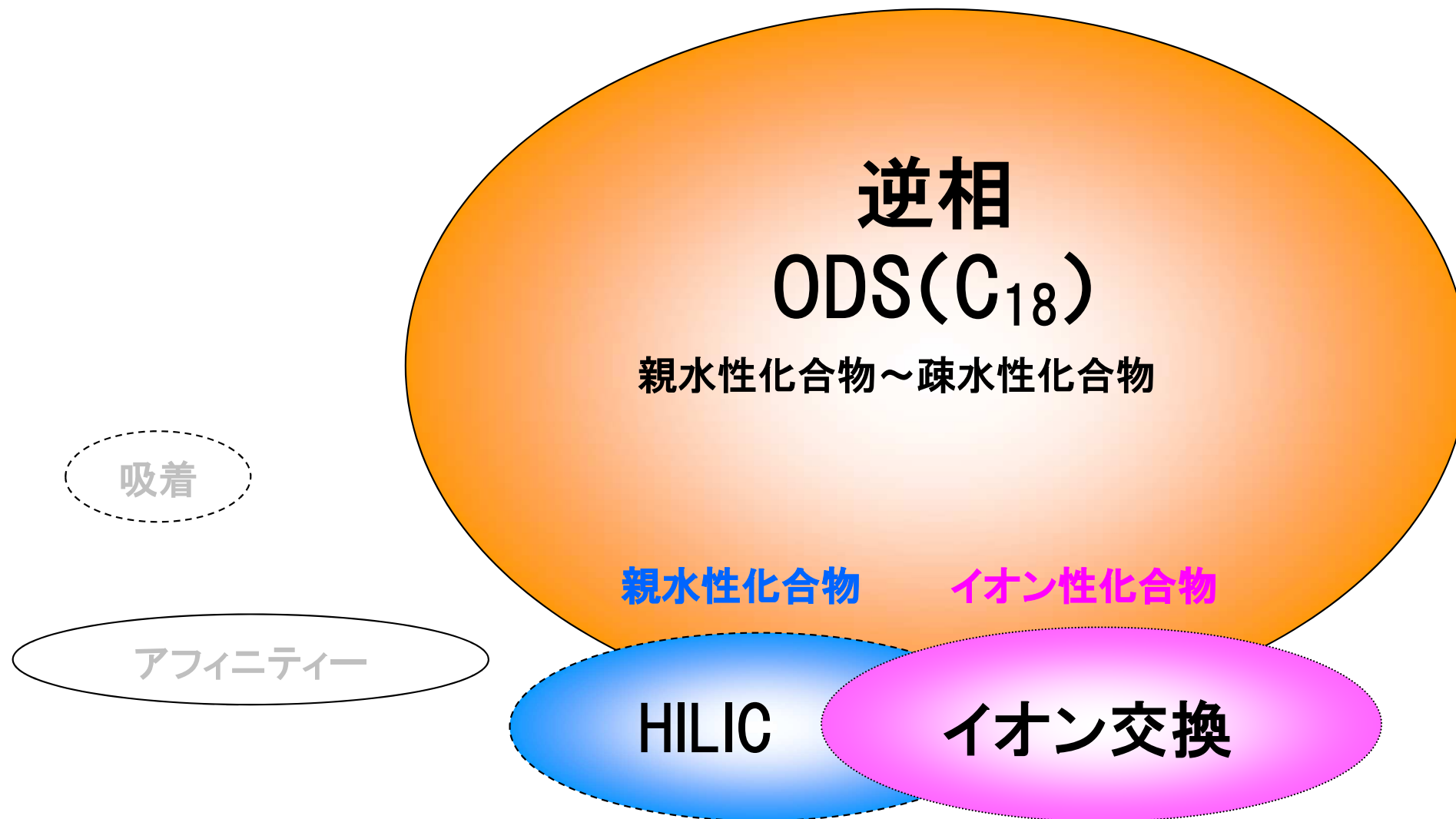
株式会社 大阪ソーダ

TEL: 06-6110-1598 FAX: 06-6110-1612

E-mail: silica@osaka-soda.co.jp

URL: <https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/>

HPLCにおけるカラム選択



一般的な低分子化合物であれば、まずはODSカラムから検討します。
条件検討において分離状態に不具合がある場合には、
カラム変更により溶出パターンを劇的に変更することもできます。

ODS(C₁₈)での保持が？

大きい

保持の大きな疎水性化合物は
疎水性の小さな官能基の逆相カラム

C₈, Ph, C₄, C₁, CN

ない or
小さい

保持の小さい極性化合物は
表面極性の高い逆相カラム

ADMEカラム

保持できないイオン性化合物は

イオン交換カラム

保持できない親水性化合物は

HILICカラム

| 本動画の内容

□ CAPCELL PAK ADME-HR

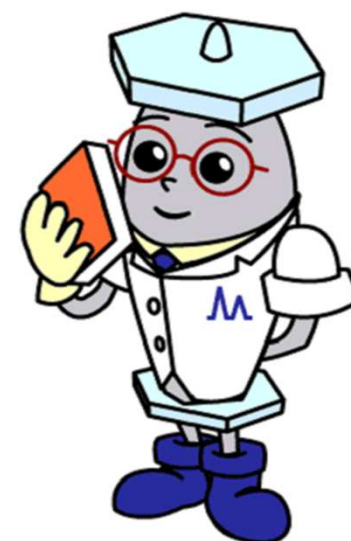
高極性化合物の保持・分離に優れ、極性化合物から疎水性化合物の一斉分析に最適な**逆相モード**

□ CAPCEL PAK SCX

疎水性相互作用を加えた**強カチオン交換(SCX)**

□ CAPCELL PAK CR 1:50, 1:20, 1:4 ミックスマード(CR)

SCX充填剤およびC₁₈充填剤を混合した**逆相とイオン交換**



逆相モード
ADMEカラム
(CAPCELL PAK ADME-HR, CORE ADME)

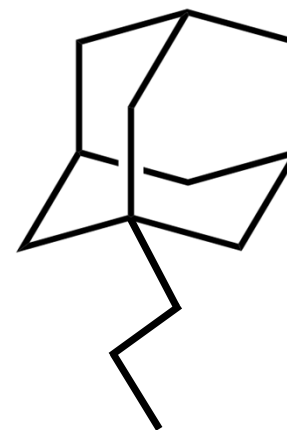
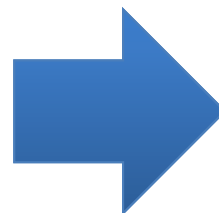
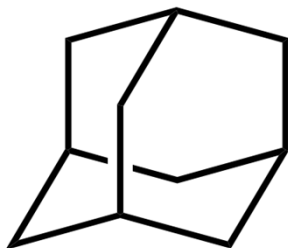
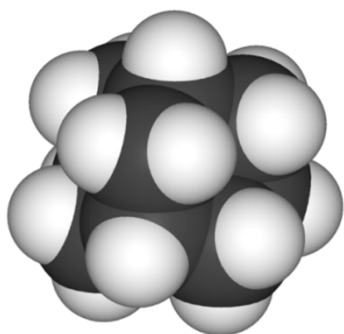
ADME(アドメ)とは・・・

極性化合物を保持させるために・・・

C₁₈やC₈のようなアルキル鎖ではなく、カゴ型のC₁₂アルキル基であるADME基。

- 移動相を検討する・・・
- 他の種類の逆相カラム(C₈, Ph, C₄など)を検討する・・・
- 高極性カラムを用いて、水系100%の移動相で・・・
- モードの変更(逆相からHILICモードへ)もあるけど・・・

やはり、多くの化合物に適用可能で、安定に使用可能で、かつ使い慣れている逆相モードのカラムで分析系を設計したい・・・

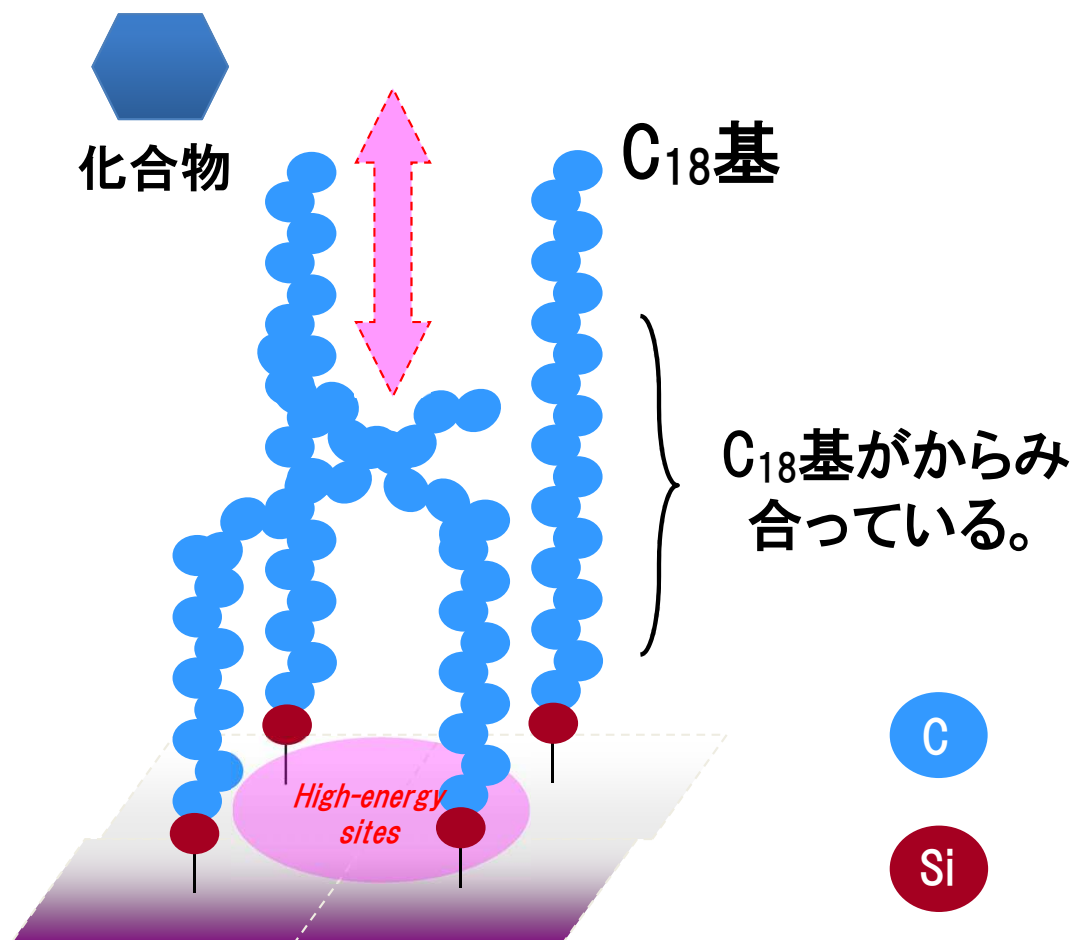


アダマンタン
(カゴ型)

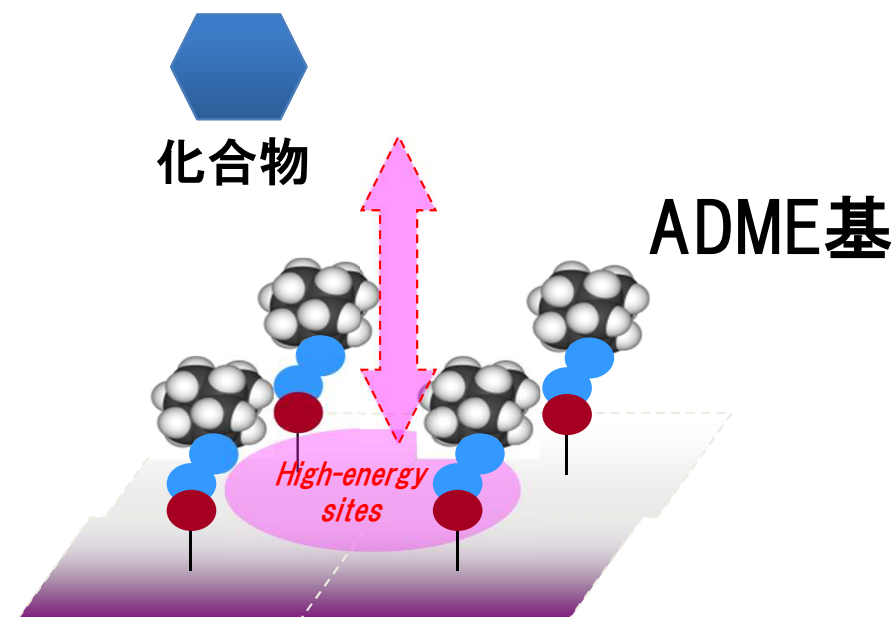
アダマンチルエチル基
(ADME基)

ADMEカラムとODS(C₁₈)カラムにおける 充填剤表面のイメージ図

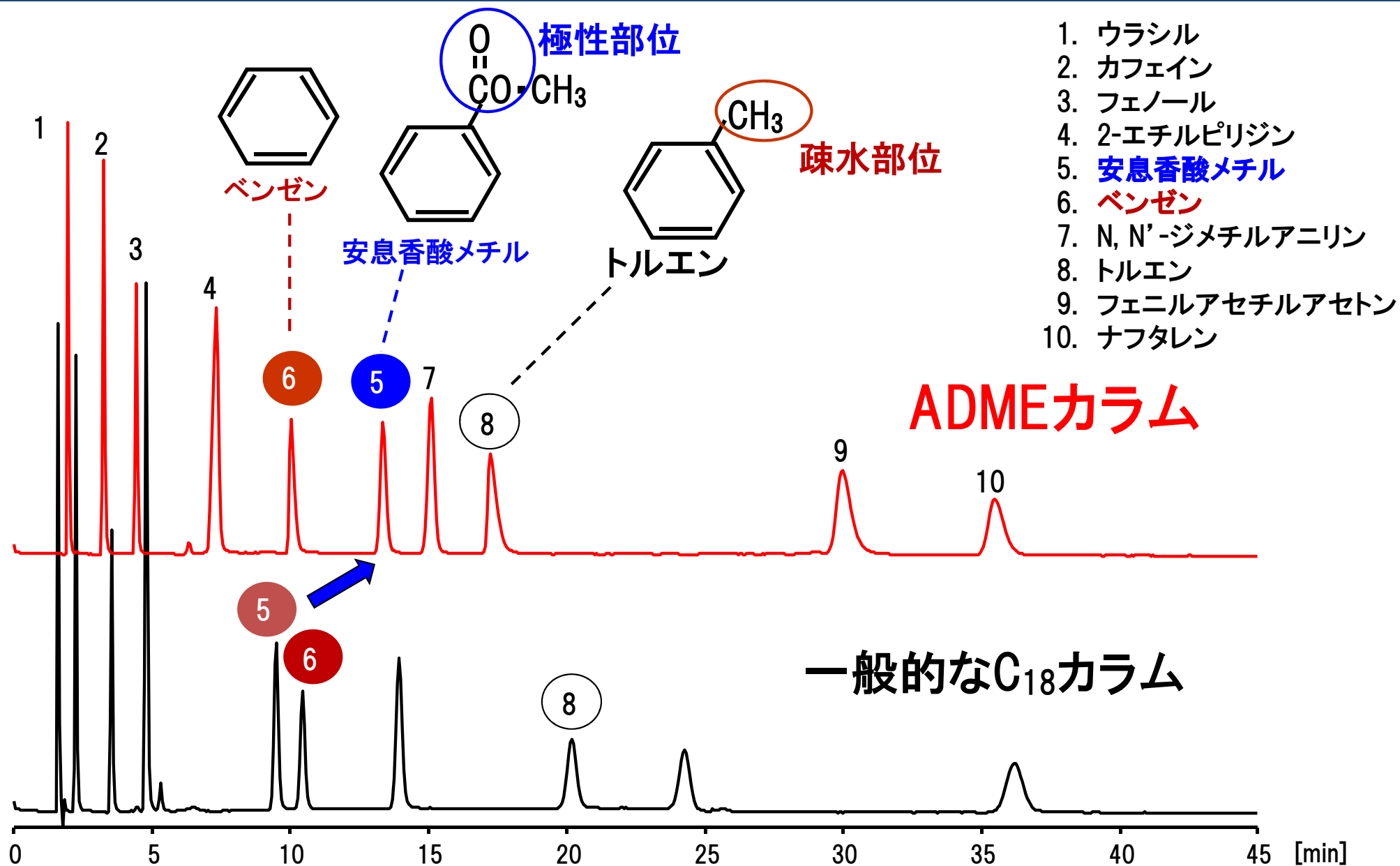
～ ODS(C₁₈)カラム～



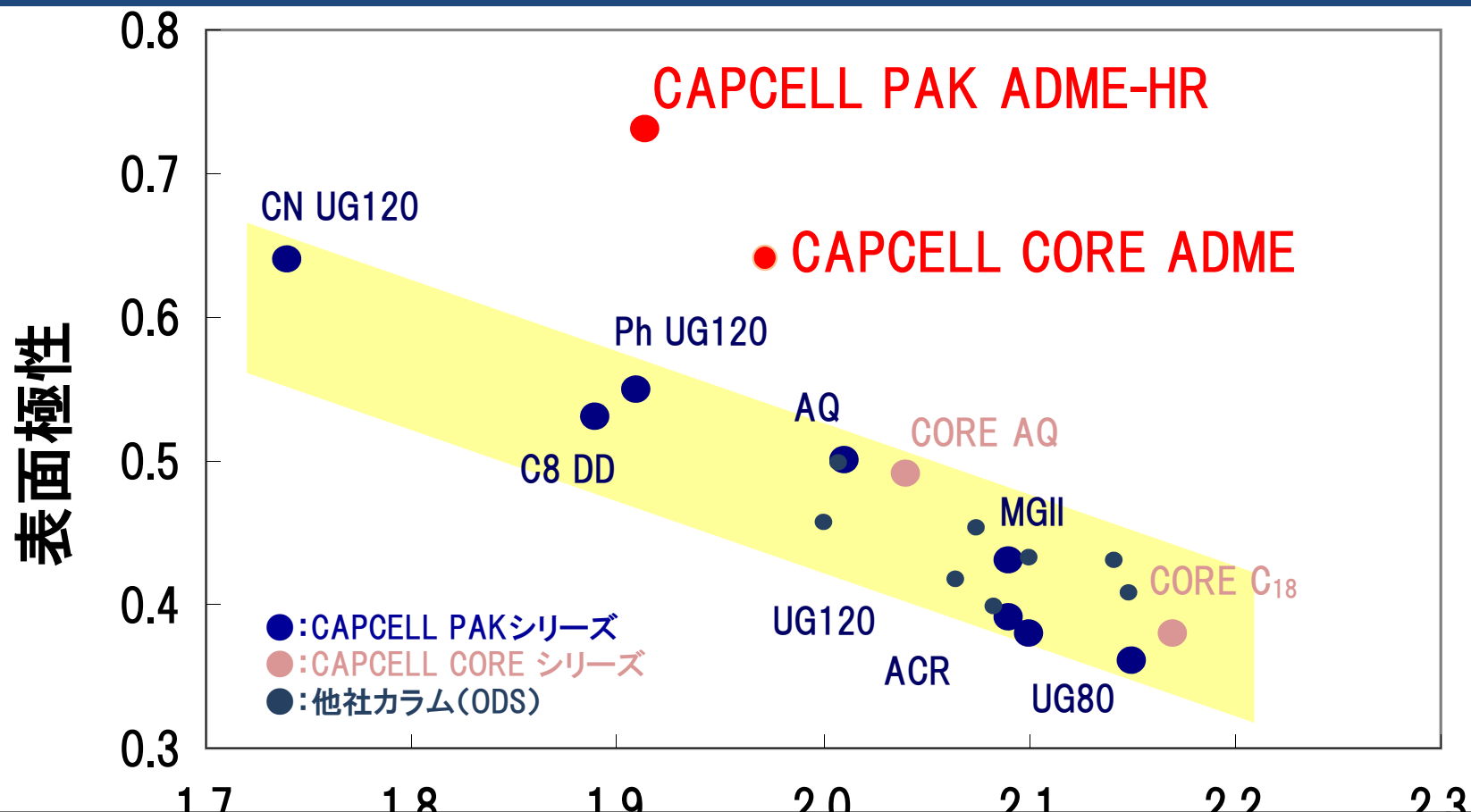
～ ADMEカラム～



カラムの評価 ~10種標準物質による評価~



パラメーターマップ



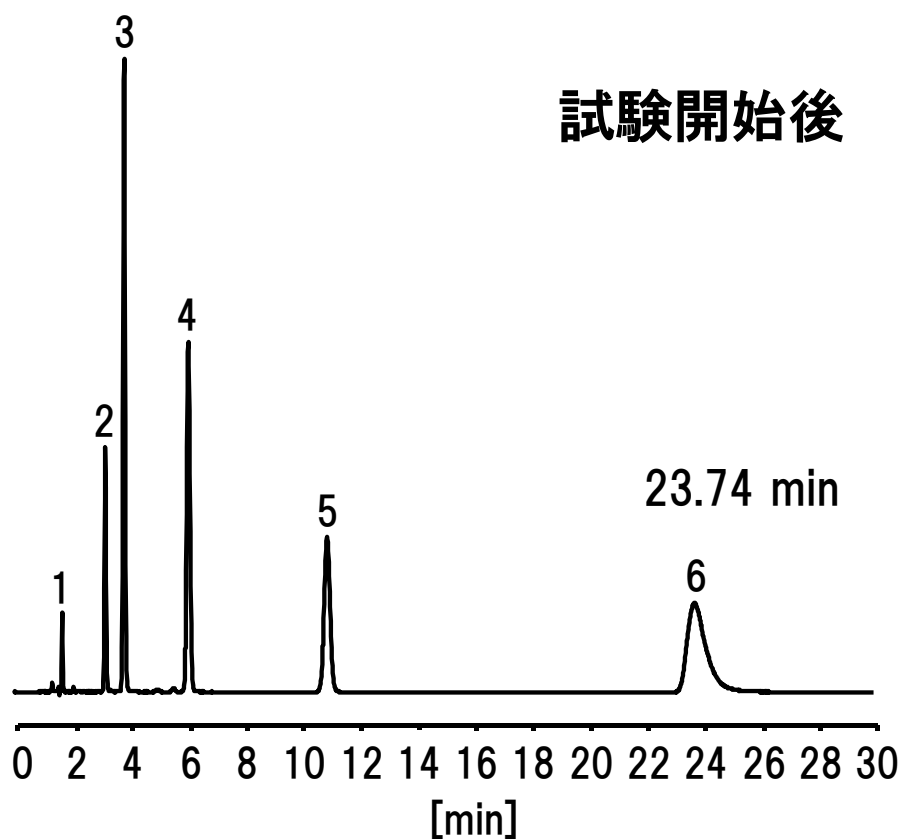
アダマンチル基を導入した充填剤で試してください
他に類を見ない特異なマッピングポジションを持つ充填剤が、
これまでの逆相カラムで達成できなかったユニークな分離を提供します。
⇒ 極性化合物(親水性)から疎水性化合物まで適用可能

CAPCELL PAK ADME-HR ~水系100%移動相の使用確認~

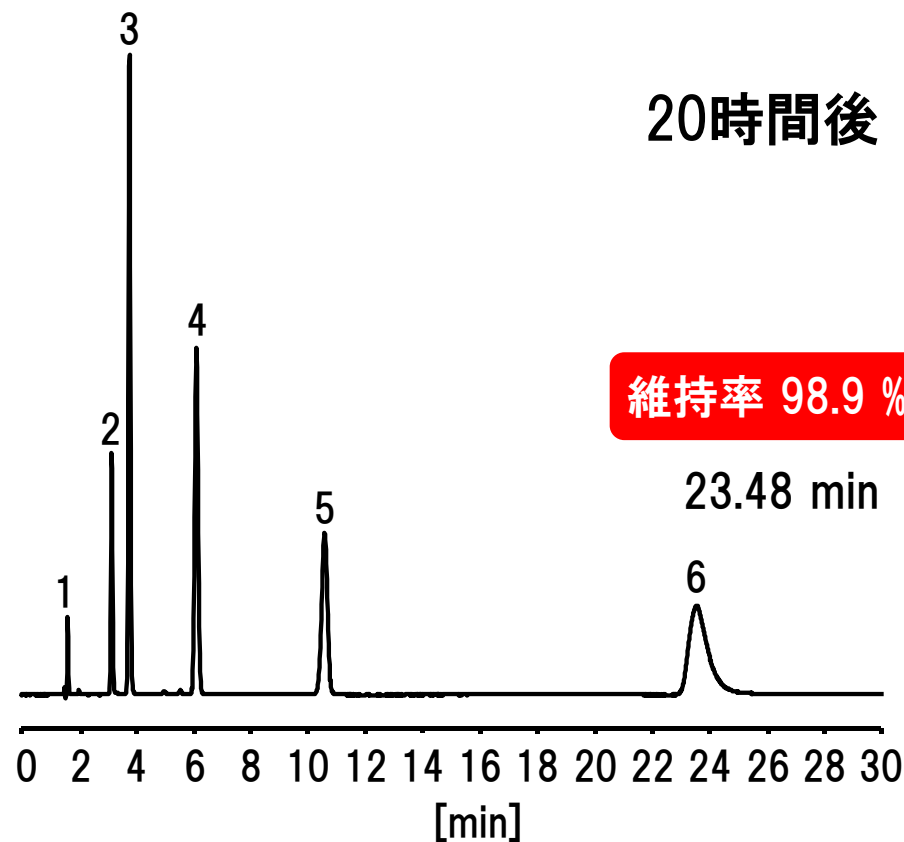
水系100%の移動相において、通液停止後の再現性が良好です。

【HPLC Conditions】

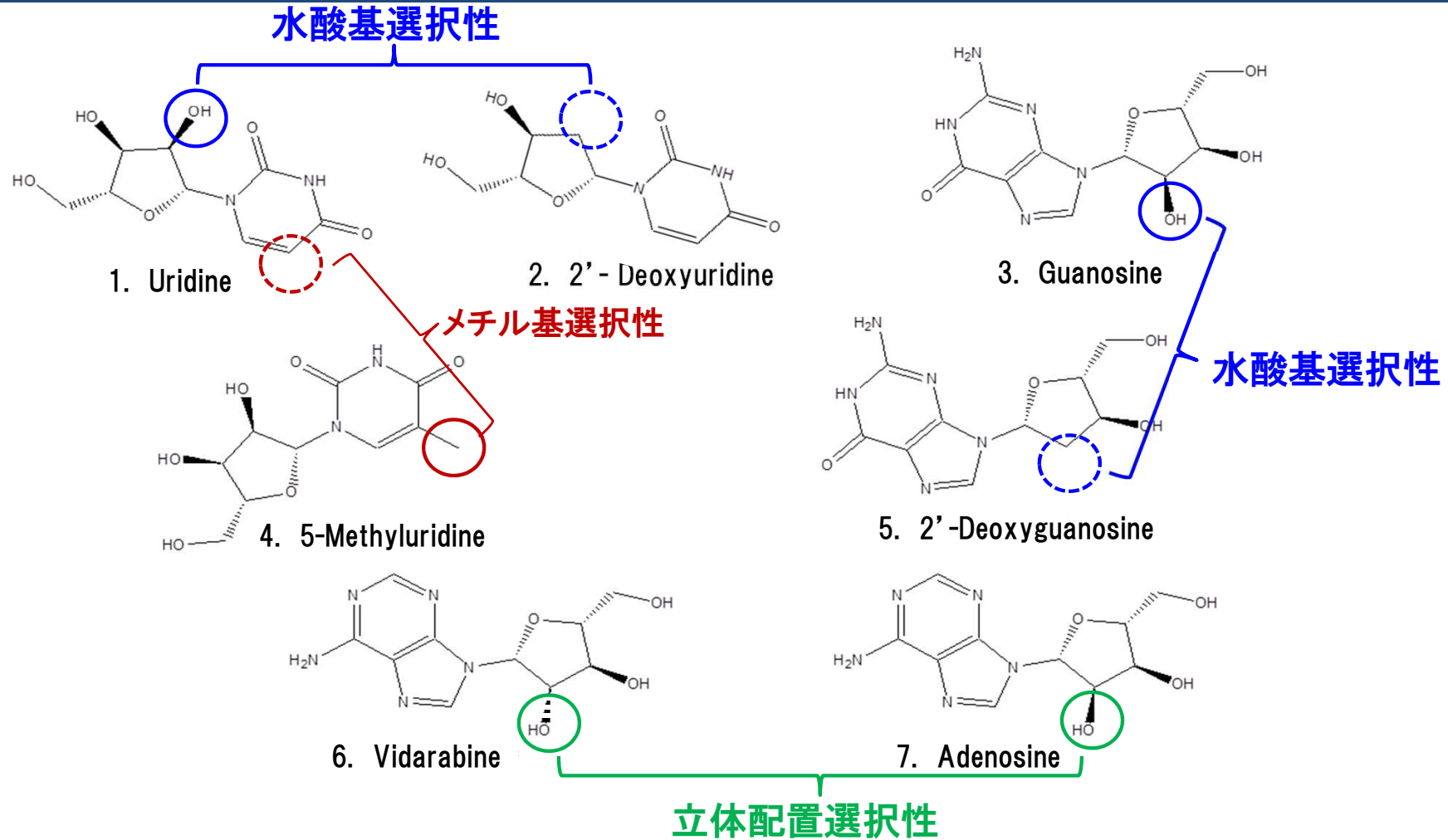
Column	: CAPCELL PAK ADME-HR S5 ; 4.6 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase	: 10 mmol/L KH ₂ PO ₄ , 10 mmol/L K ₂ HPO ₄
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 40 °C
Detection	: UV 254 nm
Inj. vol.	: 10 µL
Sample	: 1. Sodium nitrite 2. Cytosine 3. Uracil 4. Guanine 5. Thymine 6. Adenine



移動相
→
ストップ



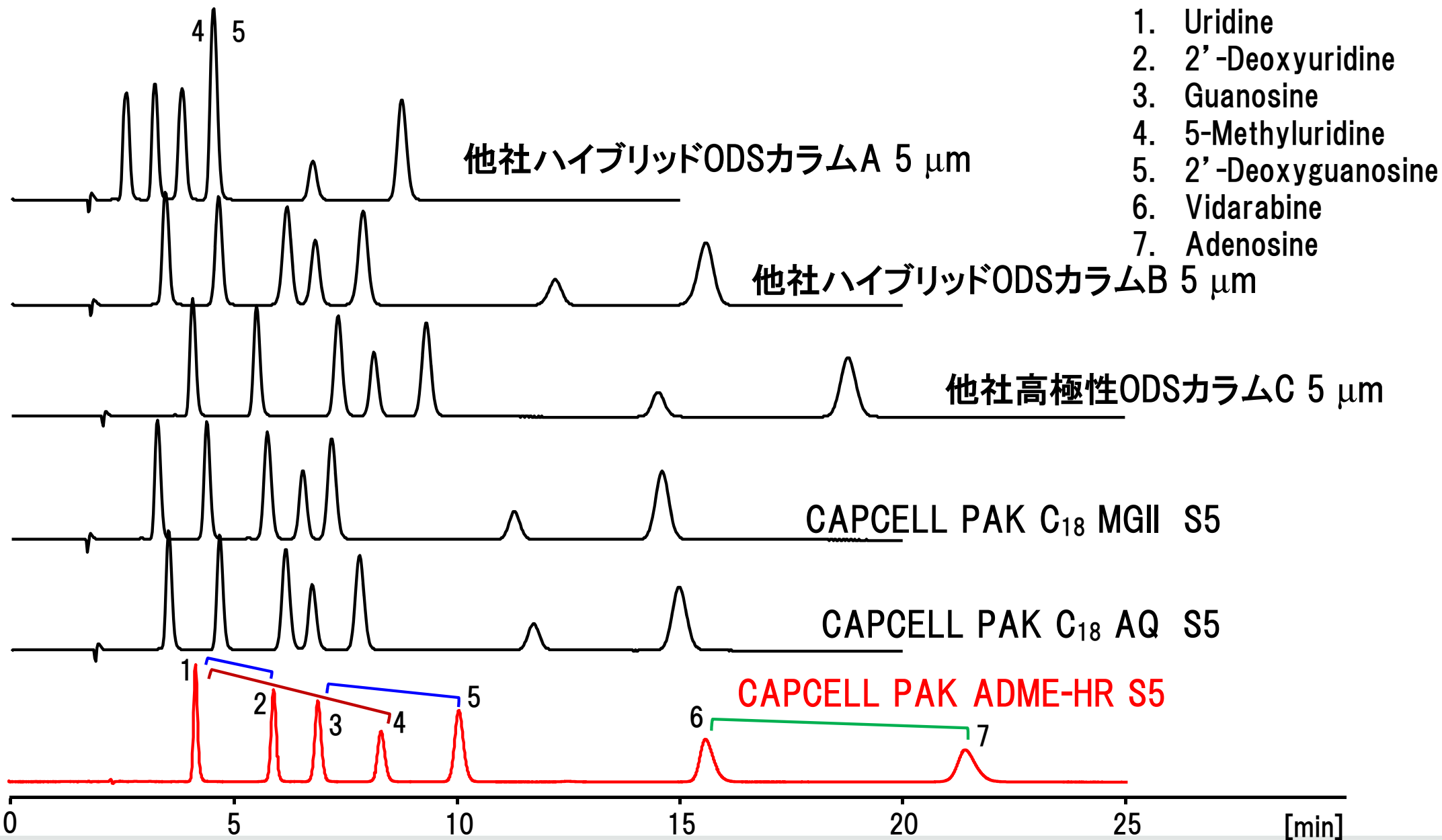
カラムの評価 ~ヌクレオシドによる評価~



【HPLC Conditions】

Column size	: 2.0 or 2.1 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase	: 10 mmol/L HCOONH ₄ / CH ₃ OH = 95 / 5
Flow rate	: 0.2 mL/min
Temperature	: 40 °C
Detection	: UV 254 nm
Inj. vol.	: 1 μL (100 μg/mL each.)

カラムの評価 ~ヌクレオシドによる評価~



カラムの評価

～ヌクレオシドによる評価～

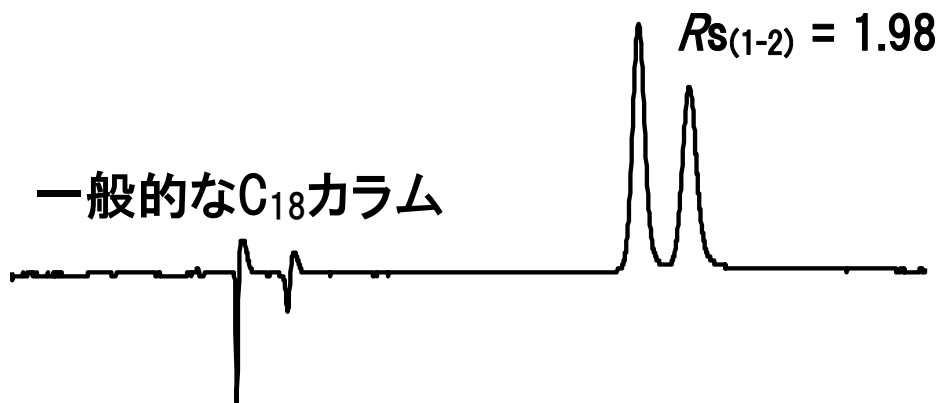
評価項目	OH基選択性		CH ₃ 基選択性	立体配置選択性	見かけ保持
	α (2'-dU/U)	α (2'-dG/G)	α (5-MU/U)	α (A/V)	RT(A)
他社ハイブリッド ODSカラムB 5 μ m	1.609	1.317	2.845	1.383	8.75
他社ハイブリッド ODSカラムA 5 μ m	1.612	1.365	2.727	1.316	15.58
他社高極性 ODSカラムC 5 μ m	1.625	1.356	2.771	1.334	18.77
CAPCELL PAK C ₁₈ MGII S5	1.603	1.335	2.727	1.337	14.60
CAPCELL PAK C ₁₈ AQ S5	1.623	1.371	2.753	1.326	14.98
CAPCELL PAK ADME-HR S5	1.726	1.614	2.730	1.421	21.39

ADMEカラムは最も保持が大きく、OH選択性(分離)及び立体選択性(ジアステレオマーの認識能)が高いカラムである。一方、適度なCH₃選択性も有している。

ADMEカラムの基本特性

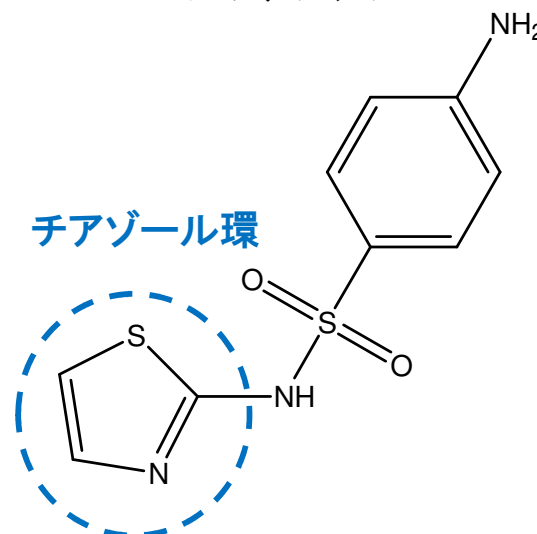
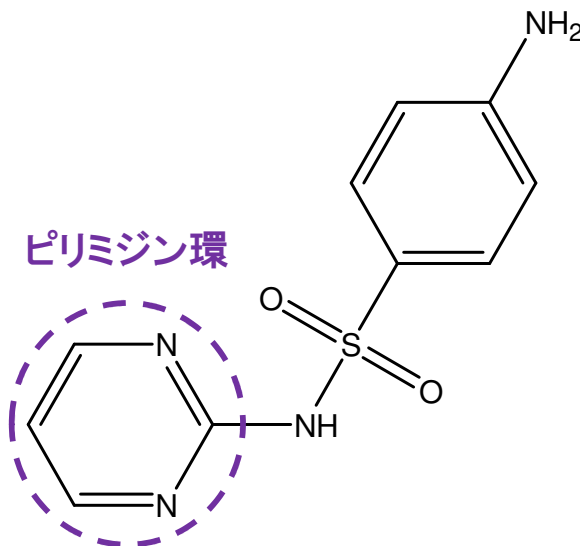
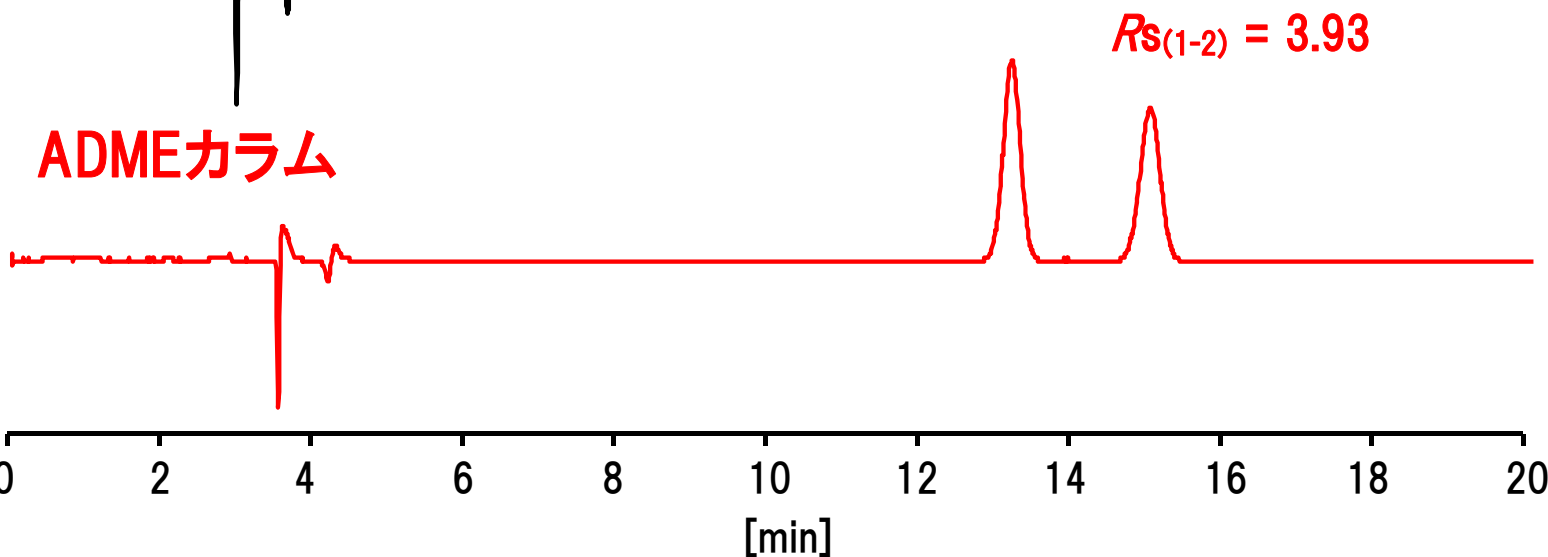
～サルファ剤の分析～

一般的なC₁₈カラム



極性基に対する
認識能が高い

ADMEカラム



【HPLC Conditions】

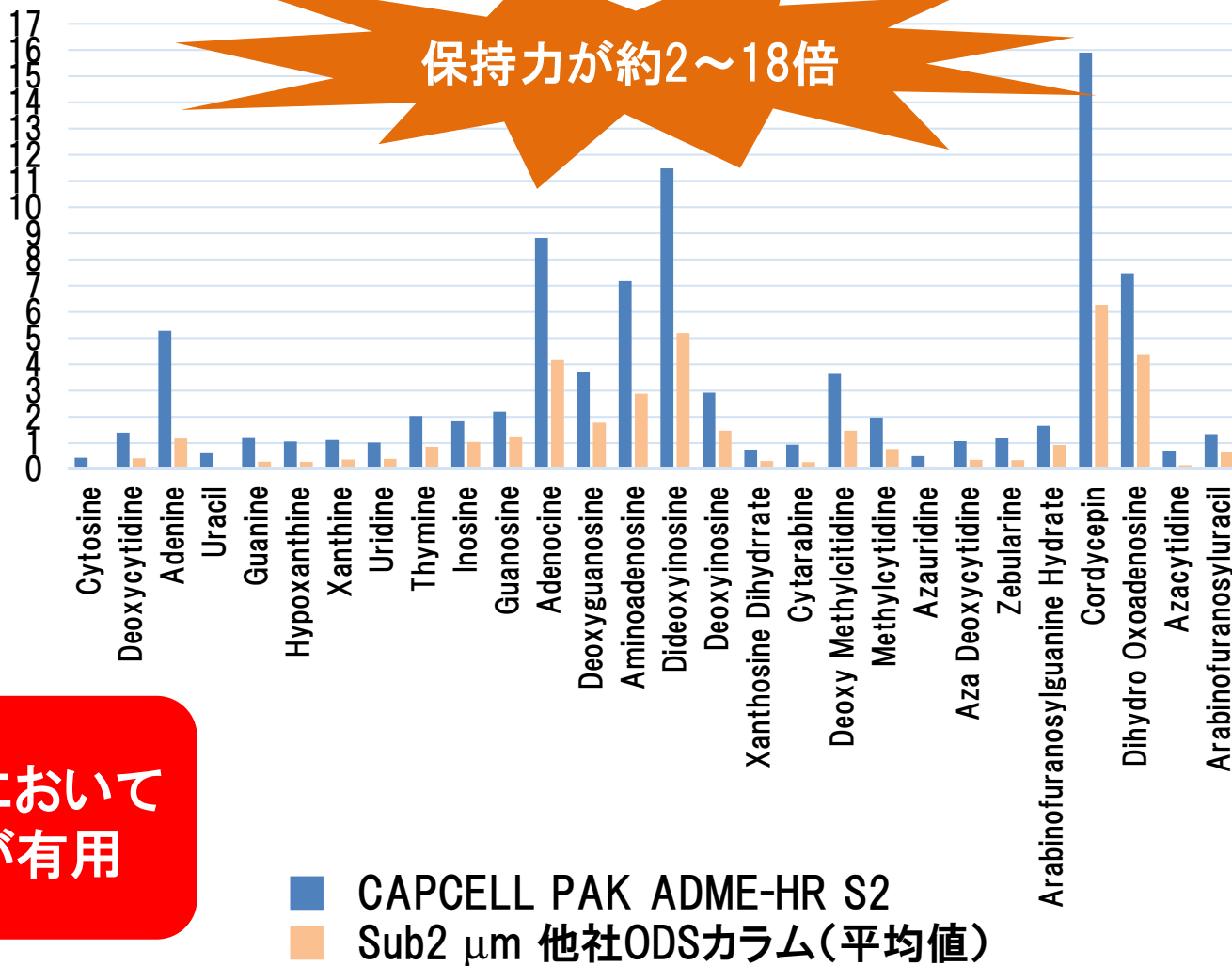
Column size	: S5 4.6 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase	: 25 mmol/L NaH ₂ PO ₄ / CH ₃ CN = 85 / 15
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 40 °C
Detector	: UV 265 nm
Inj. vol.	: 5 μL

核酸関連化合物に対する保持力

3種類の他社ODSカラム及びADMEカラムを用いて核酸塩基、ヌクレオシド及びヌクレオシドアナログの保持係数 k を比較し、その結果を示します。

極性の高い”核酸関連化合物”において保持力の改善にADMEカラムが有用

核酸塩基、ヌクレオシド及びヌクレオシドアナログに対する保持力

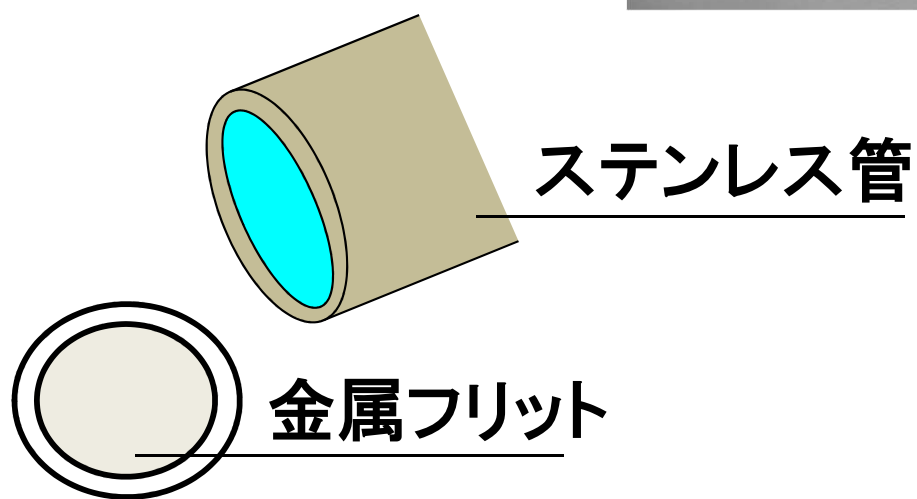


CAPCELL PAK INERT ADME-HR S3

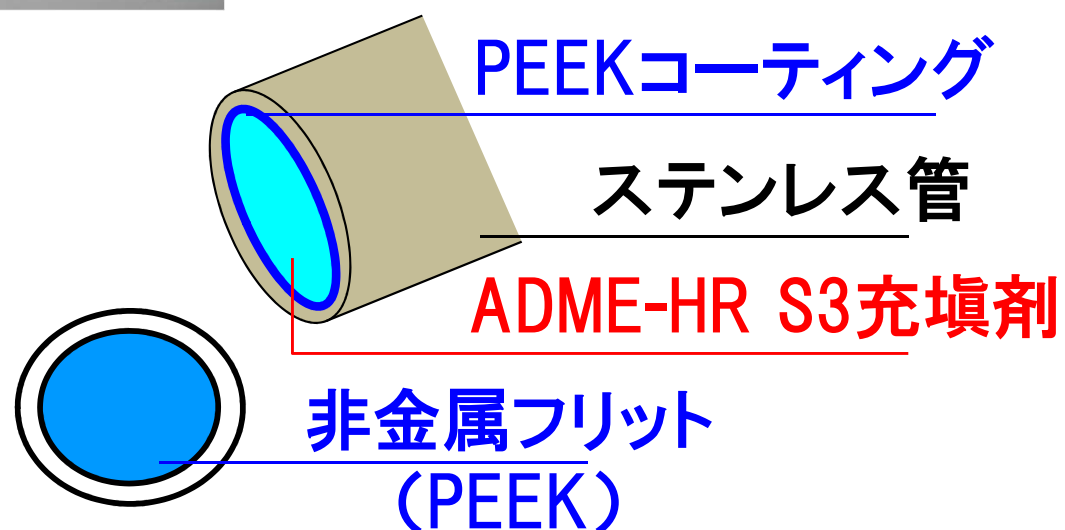
ADME-HR S3充填剤をメタルフリーカラムに充填



(従来品)



(メタルフリーカラム)



メタルフリー他社ODSカラムとの比較

【HPLC Conditions】

Mobile phase : 10 mmol/mL HCOONH₄ / CH₃CN = 99 / 1
Flow rate : 200 μL/min
Temperature : 40 °C
Detection : UV 260 nm
Inj. vol. : 2 μL
Sample : 1. ATP 2. ADP 3. AMP
Sample dissolved in : Mobile phase

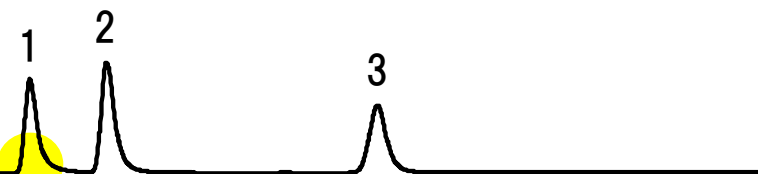
CAPCELL PAK INERT ADME-HR S3
2.0 mm i.d. x 150 mm

$S_1 = 1.52$



A社ODSカラム 3 μm
(メタルフリー)
2.1 mm i.d. x 150 mm

$S_1 = 1.79$



B社ハイブリッド型ODSカラム 3 μm
(メタルフリー)
2.1 mm i.d. x 150 mm

$S_1 = 2.61$



C社ODSカラム 3 μm
(メタルフリー)
2.0 mm i.d. x 150 mm

$S_1 = 1.81$



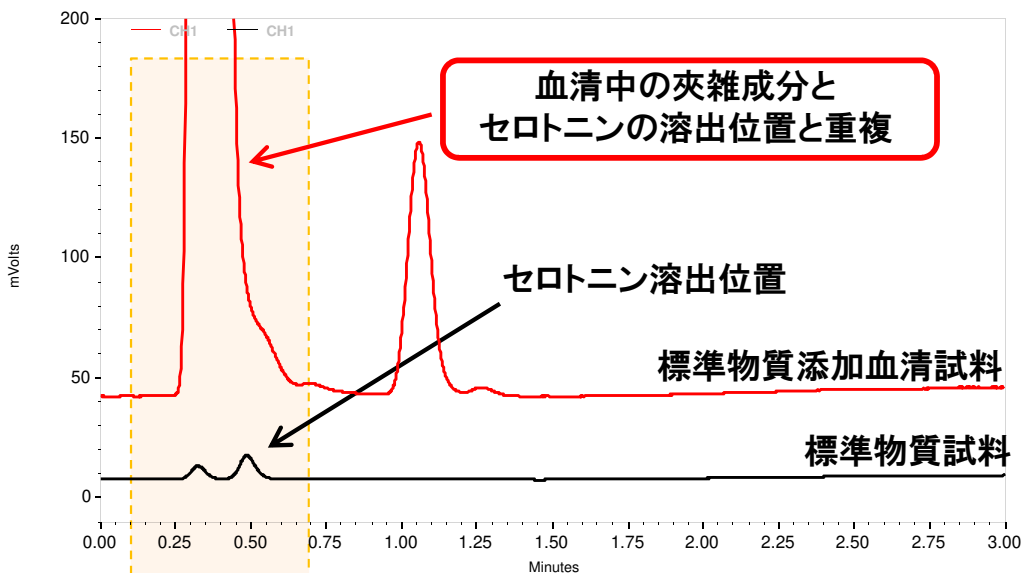
0 1 2 3 4 5 [min]

優れた不活性を有するカラムには、基材に高純度シリカゲルを用い、さらに修飾方法を最適化し配位結合性の影響を最大限低減することが必要となります。

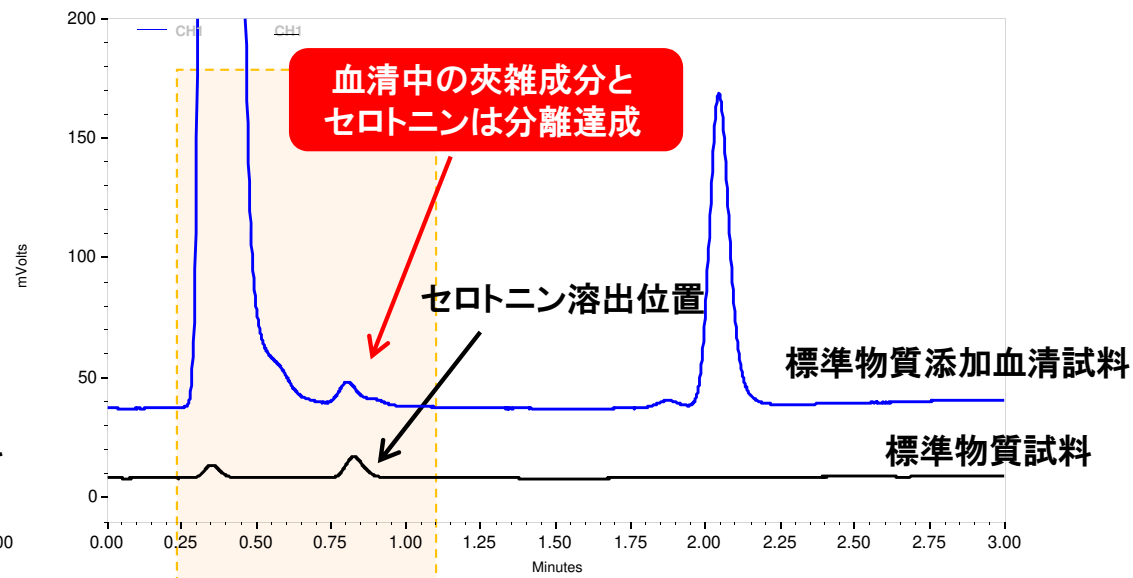
オリゴ核酸の分析、
少量分取での採用
が増加

ADMEカラムによるMSの感度向上

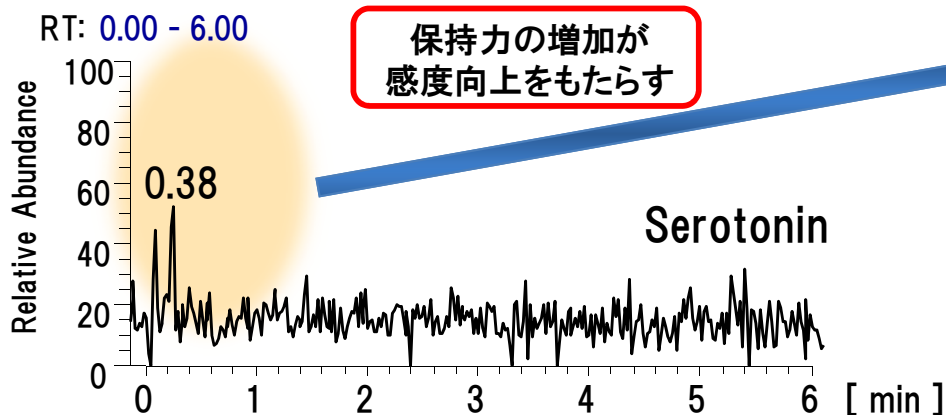
C₁₈カラム(検出器:NQAD)



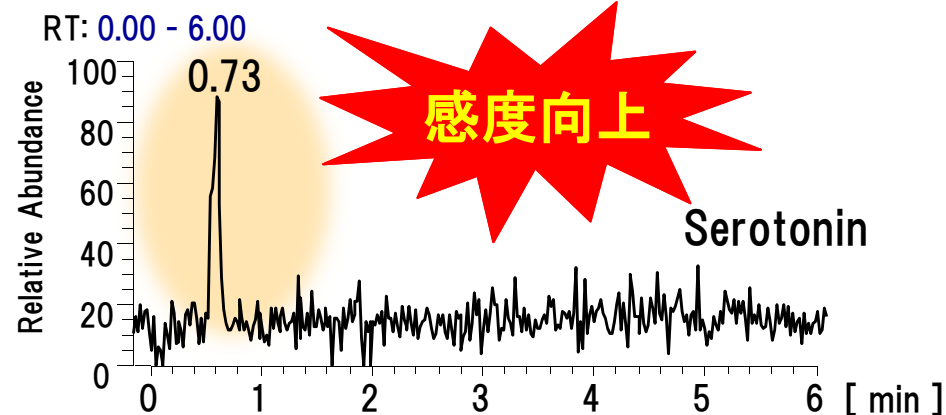
ADMEカラム(検出器:NQAD)



C₁₈カラム(検出器:MS)



ADMEカラム(検出器:MS)



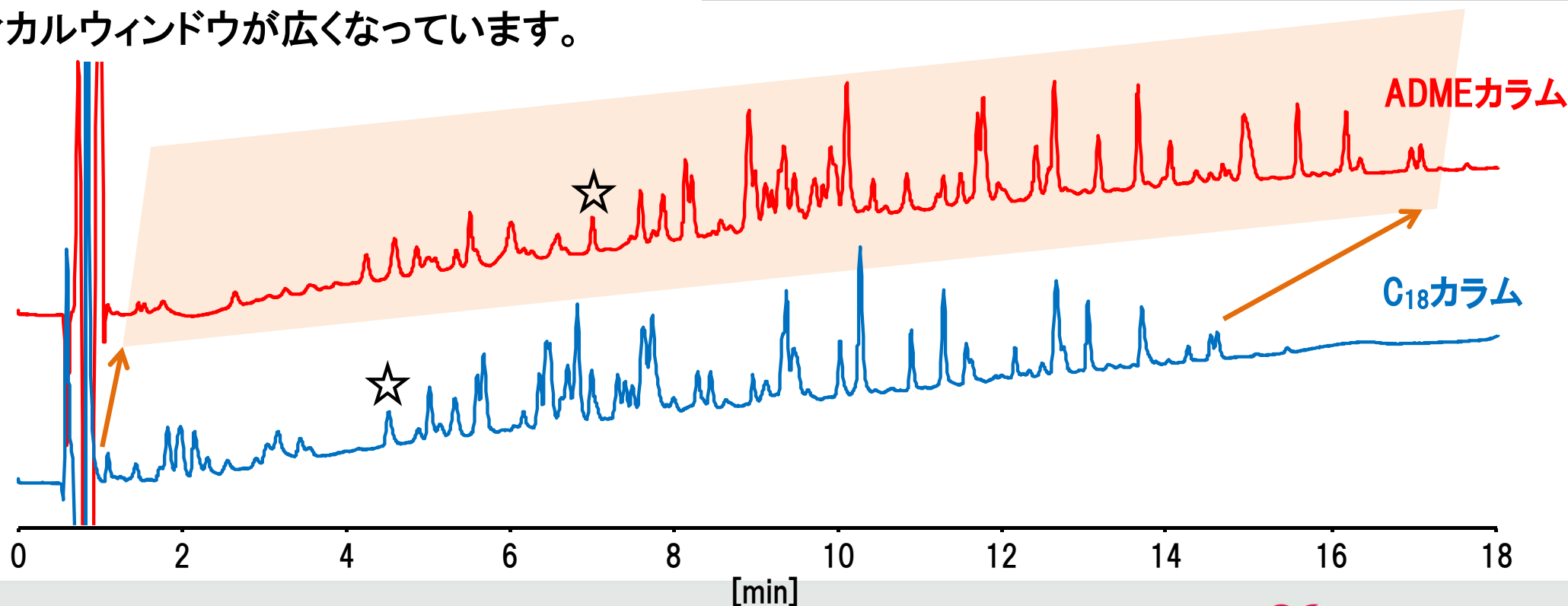
BSAトリプシン消化物の分析例 ～C₁₈カラムとの比較～

BSAトリプシン消化物を分析した例を示します。
sub2 μ mの一般的なC₁₈カラムと分離挙動を比較しました。

ADMEカラムは、C₁₈カラムと比較して相対的にペプチド全体の保持力の増加が認められ、アナリティカルウィンドウが広がっています。

【HPLC Conditions】

Column size	: S2 ; 2.1 mm i.d. x 50 mm (upper) S2 ; 2.0 mm i.d. x 50 mm (lower)
Mobile phase	: A) 0.1 vol% TFA B) 0.1 vol% TFA, CH ₃ CN B) 10 % (0 min) -> 50 % (20 min) -> 10 % (20.1min) Gradient
Flow rate	: 0.2 mL/min
Oven temp	: 40 °C
Detection	: UV 210 nm
Inj. vol.	: 2 μ L
Sample	: Tryptic digest of BSA (STD) in H ₂ O



高温高圧耐久性評価

超高速分析における耐久性は、カラムを選定する際に非常に重要なファクターです。

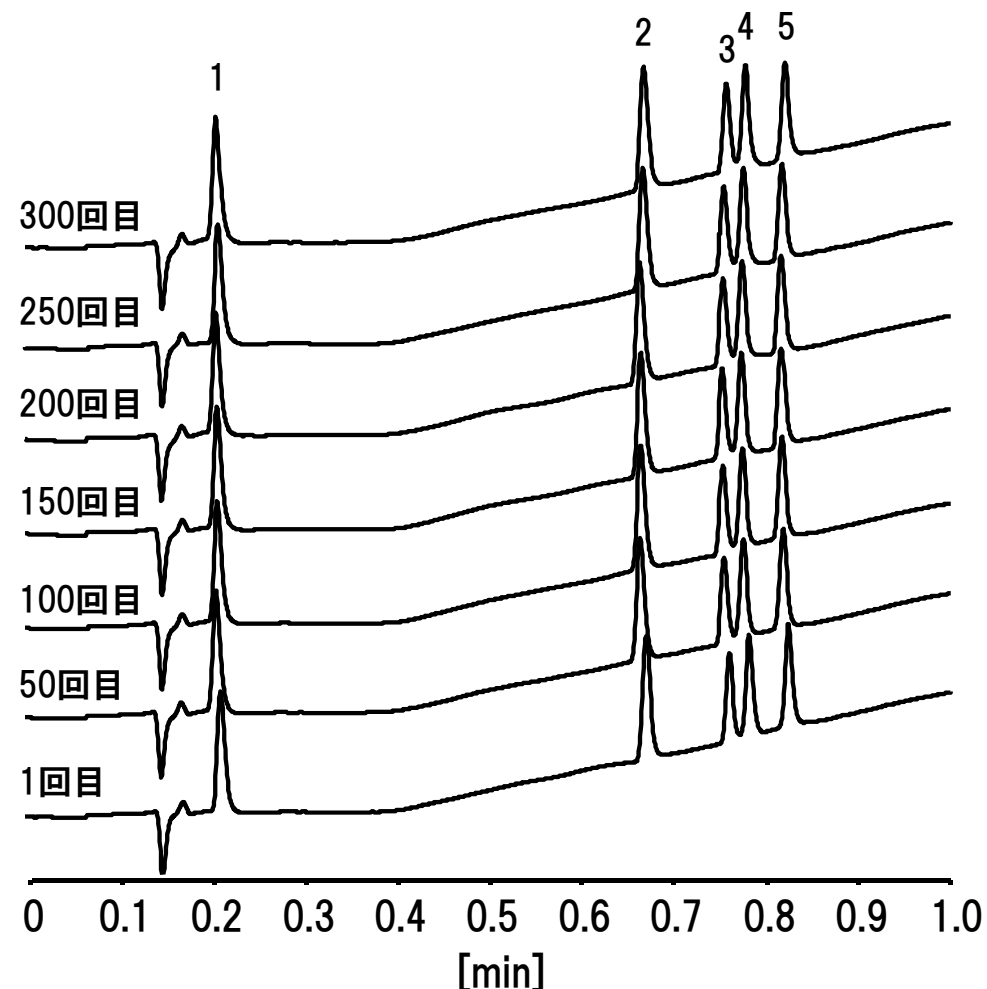
分析時間を1分以内の短時間に設定し高温高圧下の耐久性をNASCA2を用いて調査しました。
(カラム温度70 °C、圧力およそ70 MPa)

得られたクロマトグラムを右図に示します。
300回の連続分析において各サンプルの保持時間およびピーク形状は、ほとんど変化が見られませんでした。

この結果より、CAPCELL PAK ADME-HR S2はLC-MSで汎用されるギ酸系の移動相を用いた高温高圧下で非常に高い耐久性を有することがわかります。

【HPLC Conditions】

Column : CAPCELL PAK ADME-HR S2 ; 2.1 mm i.d. x 50 mm
Mobile phase : A) 0.1 vol% HCOOH, B) 0.1 vol% HCOOH in CH₃CN
B) 0 % (0 min) -> 100 % (1.0 min) -> 0 % (1.1min) Gradient
Flow rate : **1.5 mL/min**
Oven temp : **70 °C**
Detection : UV 210 nm
Inj. vol. : 1 μL
Sample : 1. Gly-Tyr 2. Val-Tyr-Val 3. Angiotensin II
: 4. Met-Enkephalin 5. Leu-Enkephalin (50 ppm each)
*Sigma aldrich H2016(peptide standard)
Sample dissolved in : H₂O



ADMEカラムのまとめ

- ODS(C₁₈)カラムで保持が小さい、分離ができない場合に条件はそのままでカラムを交換することで分離改善の可能性を持つ。
- 血清中の夾雑成分との分離に優れ、MSにおける感度を向上させることが可能。
- PEEKでコーティングしたクロマトグラフィー管を用いたCAPCELL PAK INERT ADME-HR S3は、金属配位性化合物を吸着することなく良好なピーク形状で分析することができる。また、他社メタルフリーODSカラムと比較してATPのピーク形状が最も良好であった。
- CAPCELL PAK INERT ADME-HR S3は、ODSカラムと比較して優れた保持力、異なる選択性及び良好なピーク形状を示すため、あらゆる分野の核酸関連化合物の分析、分取への適用が期待される。

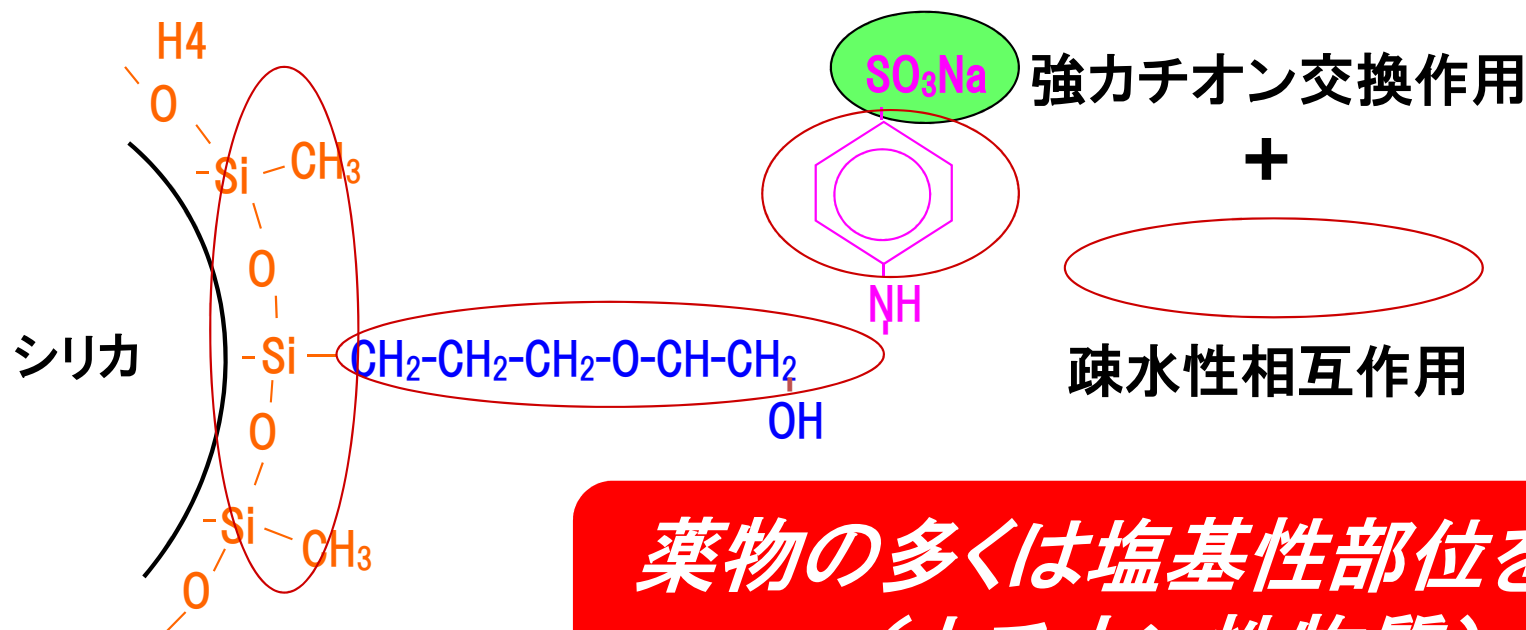
イオン交換 (SCX)

CAPCELL PAK SCXの特長

- 耐久性の向上
- ロット間の再現性が良好
- 均一性の高い表面修飾
- 強カチオン交換作用と疎水性相互作用による保持挙動

ポリマーコート型であるため

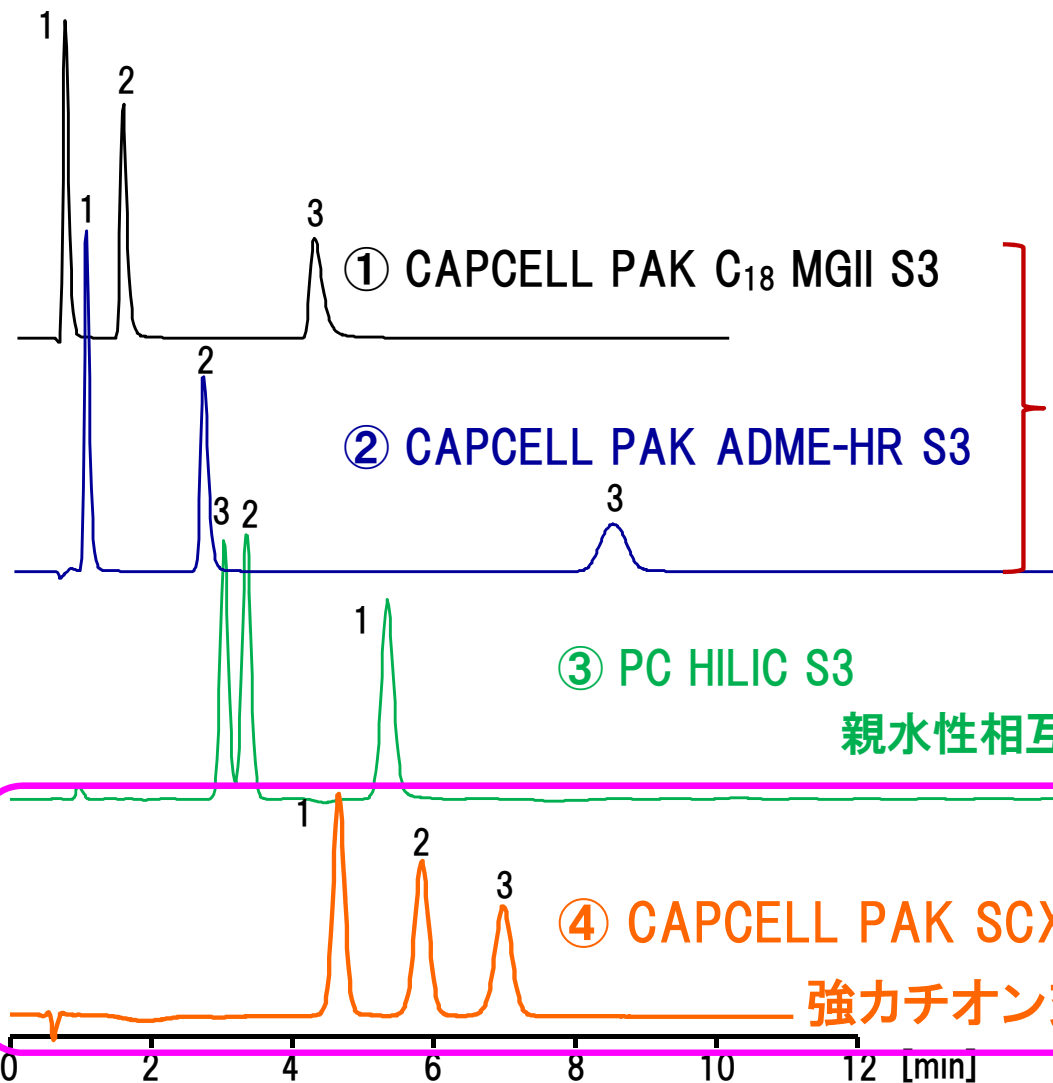
⇒ SO_3^- 基の導入方法に起因



薬物の多くは塩基性部位をもつ
(カチオン性物質)

ビグアナイド系糖尿病薬の分析

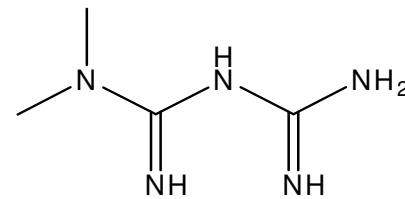
～異なるモードにおけるビグアナイド系化合物(糖尿病薬)の分析～



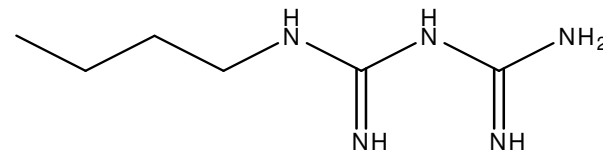
逆相モード

【HPLC Conditions】

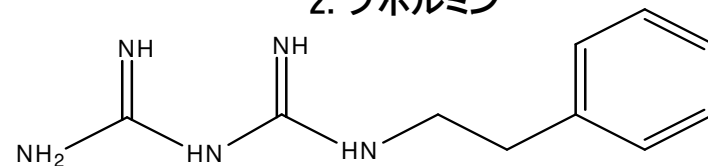
Column size : 2.0 or 2.1 mm i.d. x 50 mm
 Mobile phase : ①, ② 10 mmol/L HCOONH₄ / CH₃CN = 90 / 10
 ③ 50 mmol/L HCOONH₄ / CH₃CN = 10 / 90
 ④ 50 mmol/L HCOONH₄ / CH₃CN = 60 / 40
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature : 40 °C
 Detection : PDA 225 nm
 Inj. vol. : 1 μL
 Sample : 1. Metformin (100 μg/mL)
 2. Buformin (100 μg/mL)
 3. Phenformin (100 μg/mL)



1. メトホルミン



2. ブホルミン

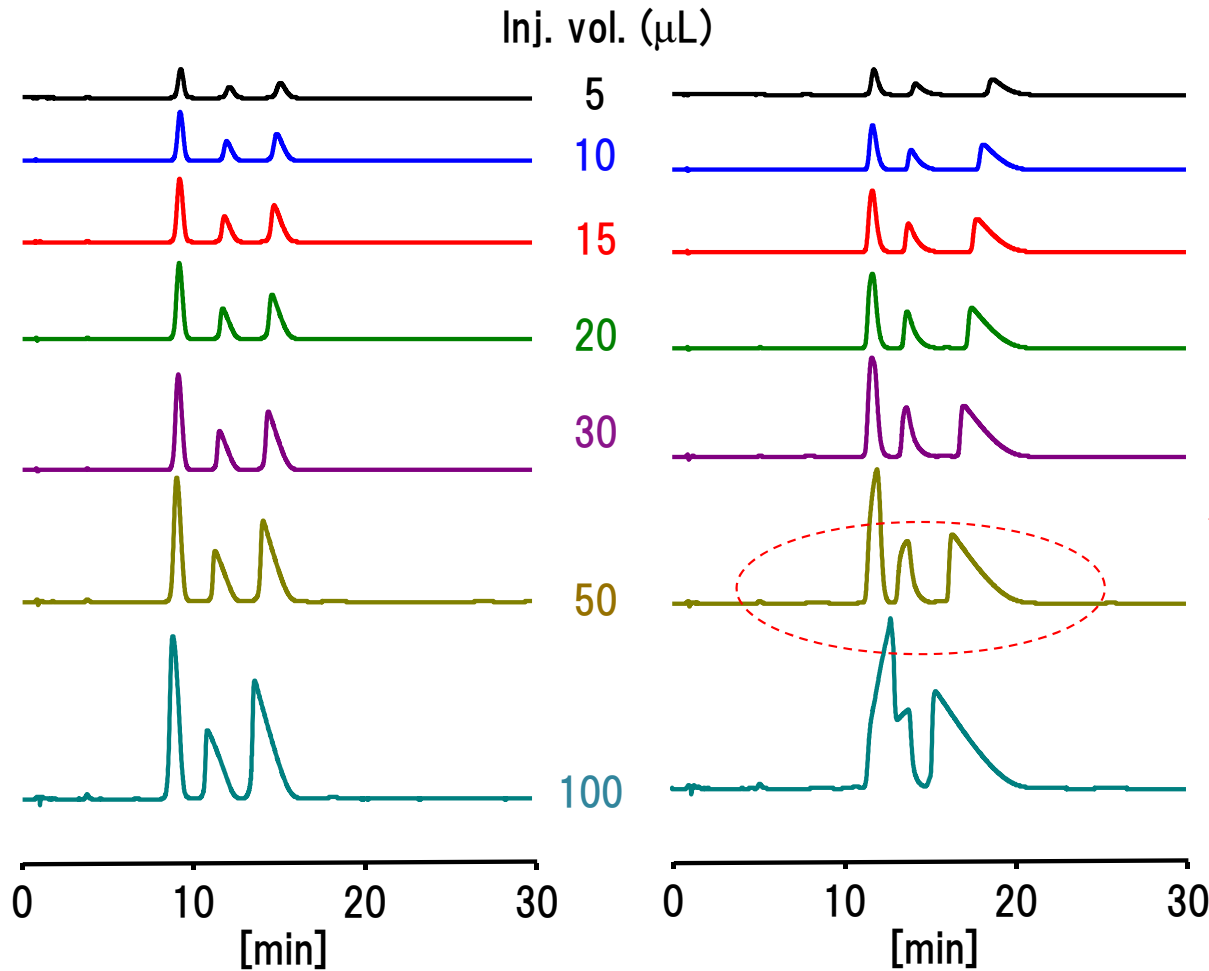


3. フェンホルミン

ビグアナイド系糖尿病薬の分析 ～注入負荷～

～他社製品との比較、注入量増加に伴うピーク形状の変化～

CAPCELL PAK SCX UG80 S5 他社 強カチオン交換カラム 5 μm



CAPCELL PAK SCX UG80 S5
は大きな負荷量を有する

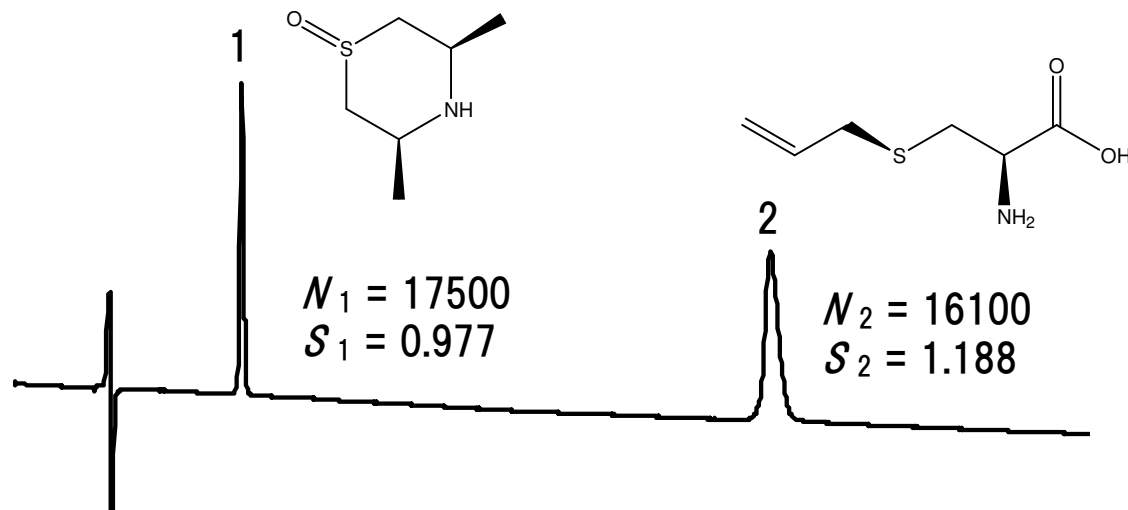
注入量の増加に伴い、ピーク形状が
崩れ始める

[HPLC Conditions]

Column size : 4.6 mm i.d. x 50 mm
Mobile phase : 50 mmol/L HCOONH₄ / CH₃CN = 60 / 40
Flow rate : 600 $\mu\text{L}/\text{min}$
Temperature : 40 $^{\circ}\text{C}$
Detection : UV 225 nm
Sample : 1. Metformin 2. Buformin 3. Phenformin
Sample dissolved in : Mobile phase (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each)

シクロアリイン及びS-アリルシステインの分析 ～ピーク形状～

CAPCELL PAK SCX UG80 S5 : 10 mmol/L KH₂PO₄

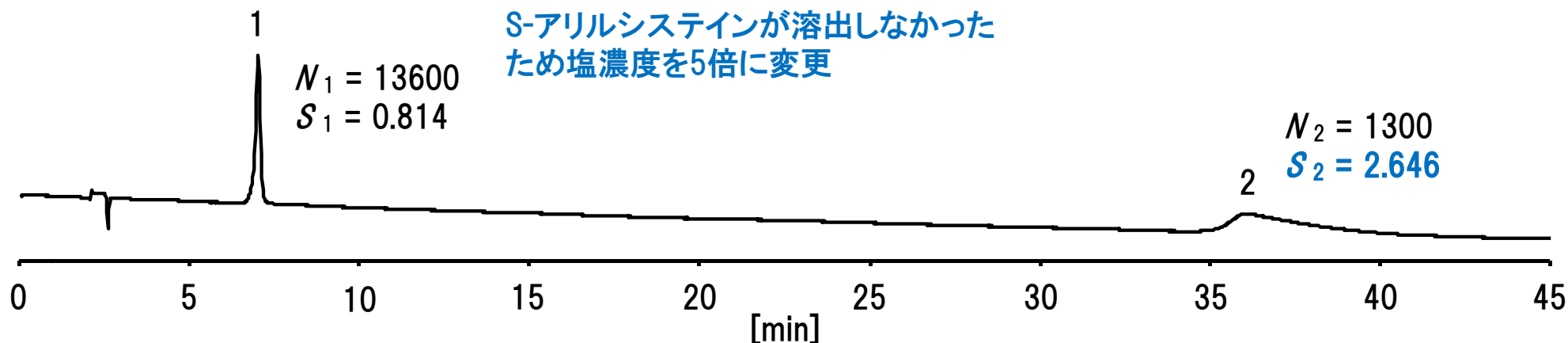


【HPLC Conditions】

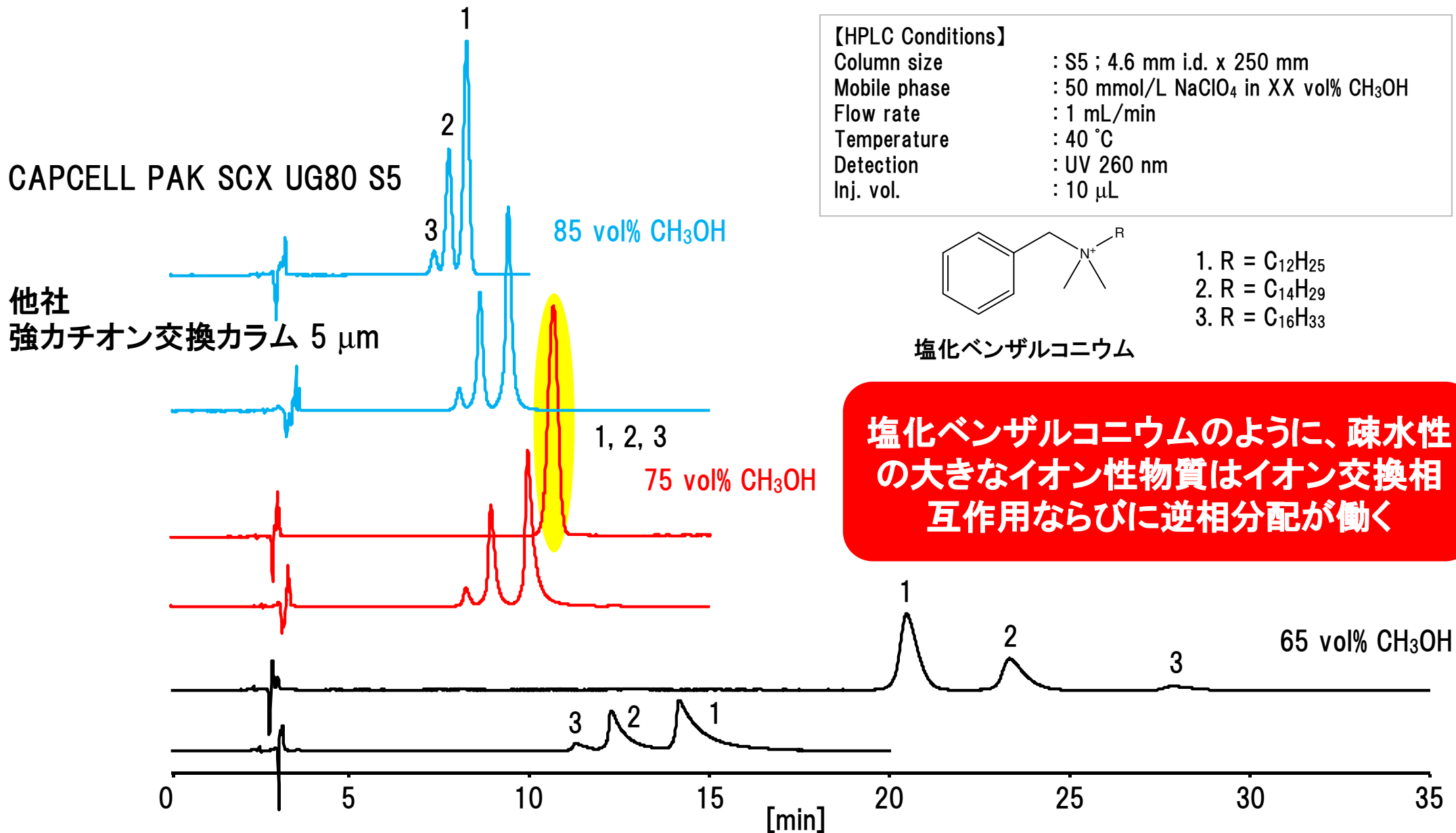
Column size	: S5 ; 4.6 mm i.d. x 250 mm
Mobile phase	: 10 or 50 mmol/L KH ₂ PO ₄ (adjusted at pH 2.5 with phosphoric acid)
Flow rate	: 1 mL/min
Temperature	: 45 °C
Detection	: UV 210 nm
Inj. vol.	: 5 μL
Sample	: 1. Cycloalliin 2. S-Allyl-L-cysteine
Sample dissolved in	: H ₂ O (500 μg/mL)

**CAPCELL PAK SCX UG80 S5
は均一性の高い表面修飾を施
しているためピーク形状が良好**

他社
強カチオン交換カラム 5 μm : 50 mmol/L KH₂PO₄



塩化ベンザルコニウムの分析

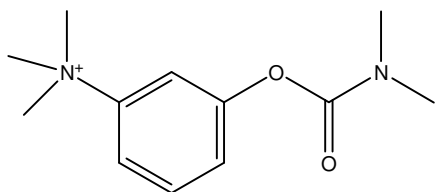


目薬中の四級アンモニウム塩の分析

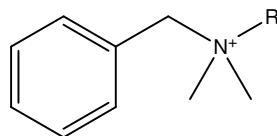
メタノール以外の有機溶媒でも特定の比率で塩化ベンザルコニウムを1本のピークとして分析することが可能

【HPLC Conditions】

Column	: CAPCELL PAK SCX UG80 S5 ; 4.6 mm i.d. x 250 mm
Mobile phase	: 30 mmol/L NaClO ₄ , H ₂ O / CH ₃ CN = 45 / 55
Flow rate	: 1 mL/min
Temperature	: 40 °C
Detection	: UV 260 nm
Inj. vol.	: 20 μL
Sample dissolved in	: H ₂ O

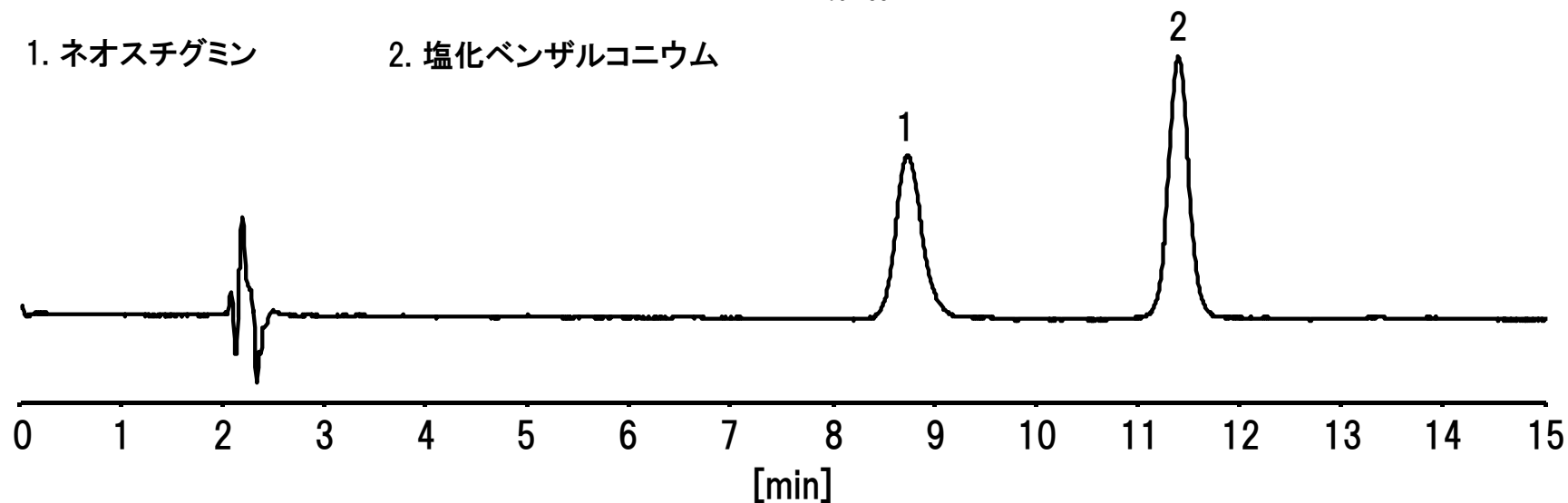


1. ネオスチグミン



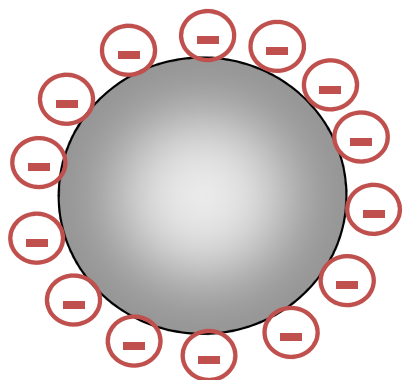
2. 塩化ベンザルコニウム

R = C₁₂H₂₅
R = C₁₄H₂₉
R = C₁₆H₃₃



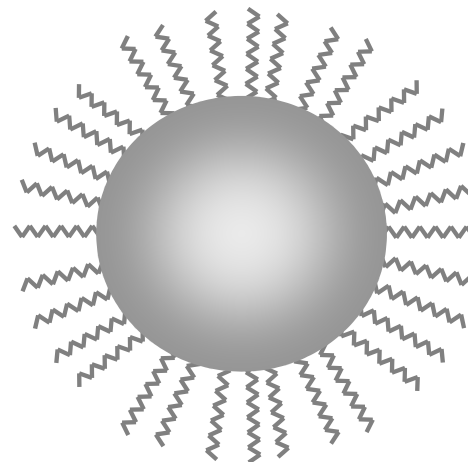
逆相とイオン交換 ミックスモード(CR)

CAPCELL PAK CR とは？（大阪ソーダ独自のカラム）



Cation exchange

and



Reversed phase

CAPCELL PAK CR

混合比は3種類▶

1 : 4

, 1 : 20

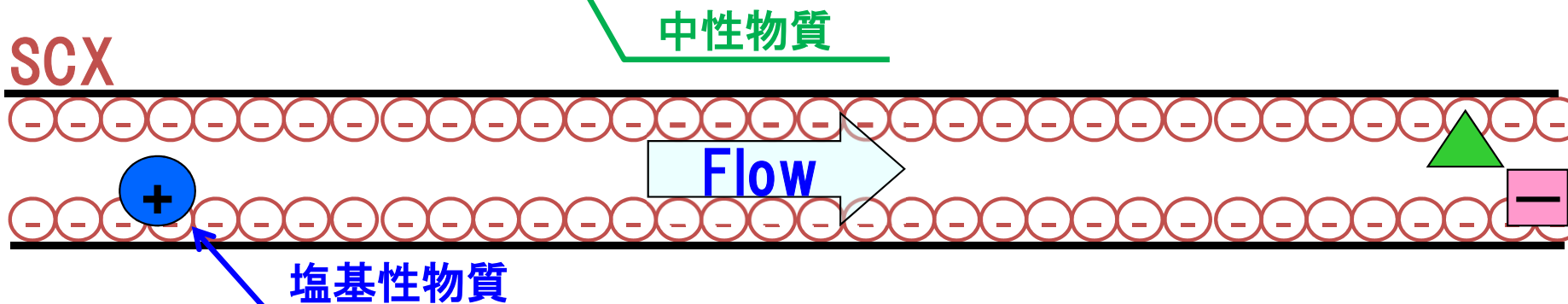
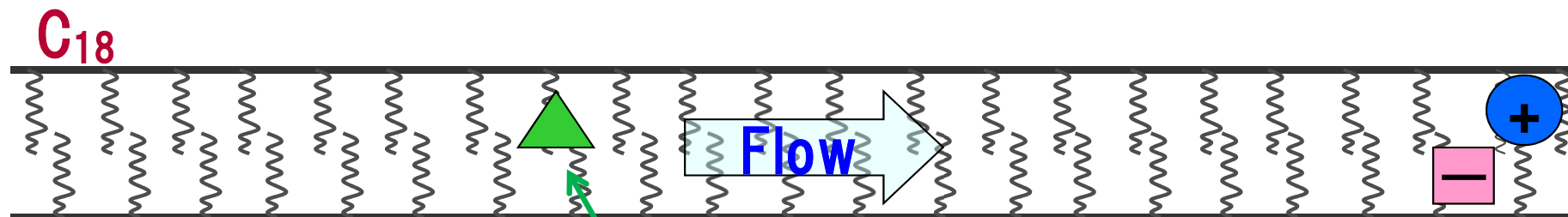
, 1 : 50

強

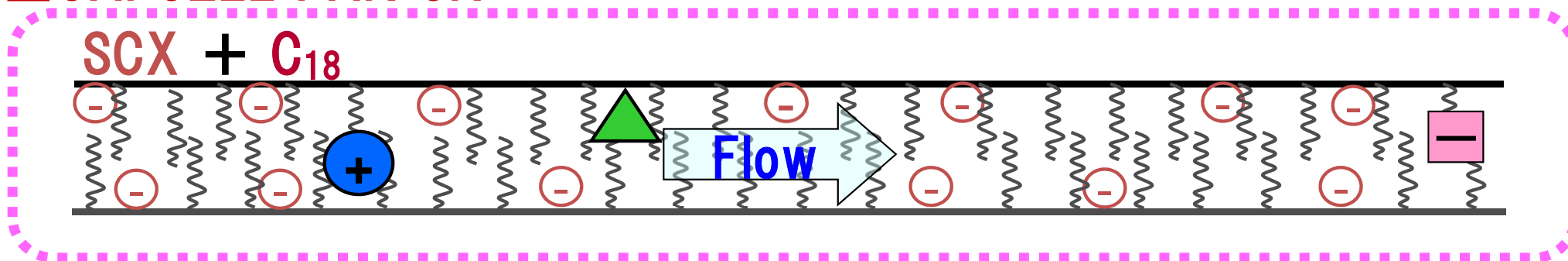
イオン交換作用

弱

CRの分離メカニズム



■ CAPCELL PAK CR



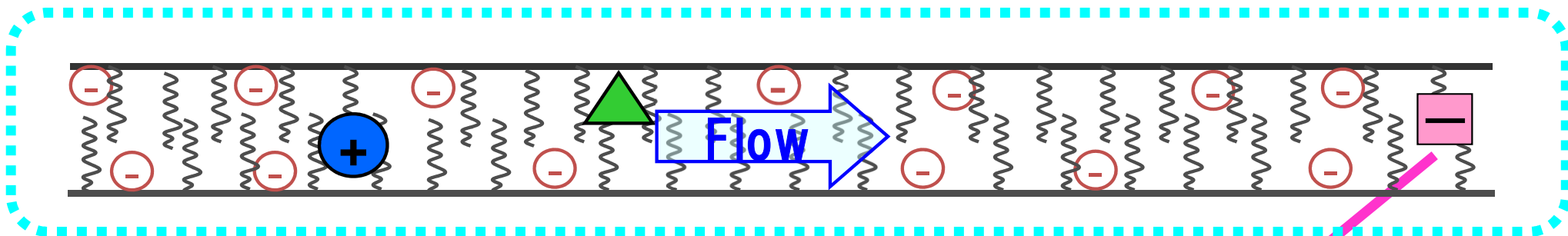
+ 塩基性物質

▲ 中性物質

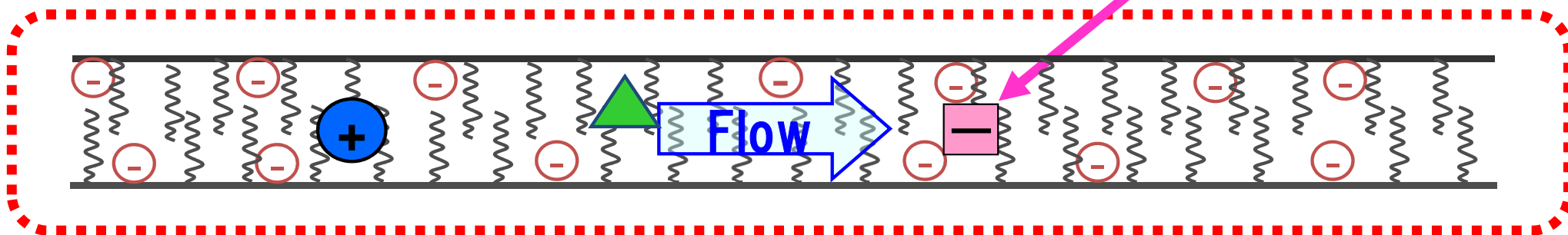
- 酸性物質

CRの分離メカニズム

■ under Neutral Conditions



■ under Acidic Conditions

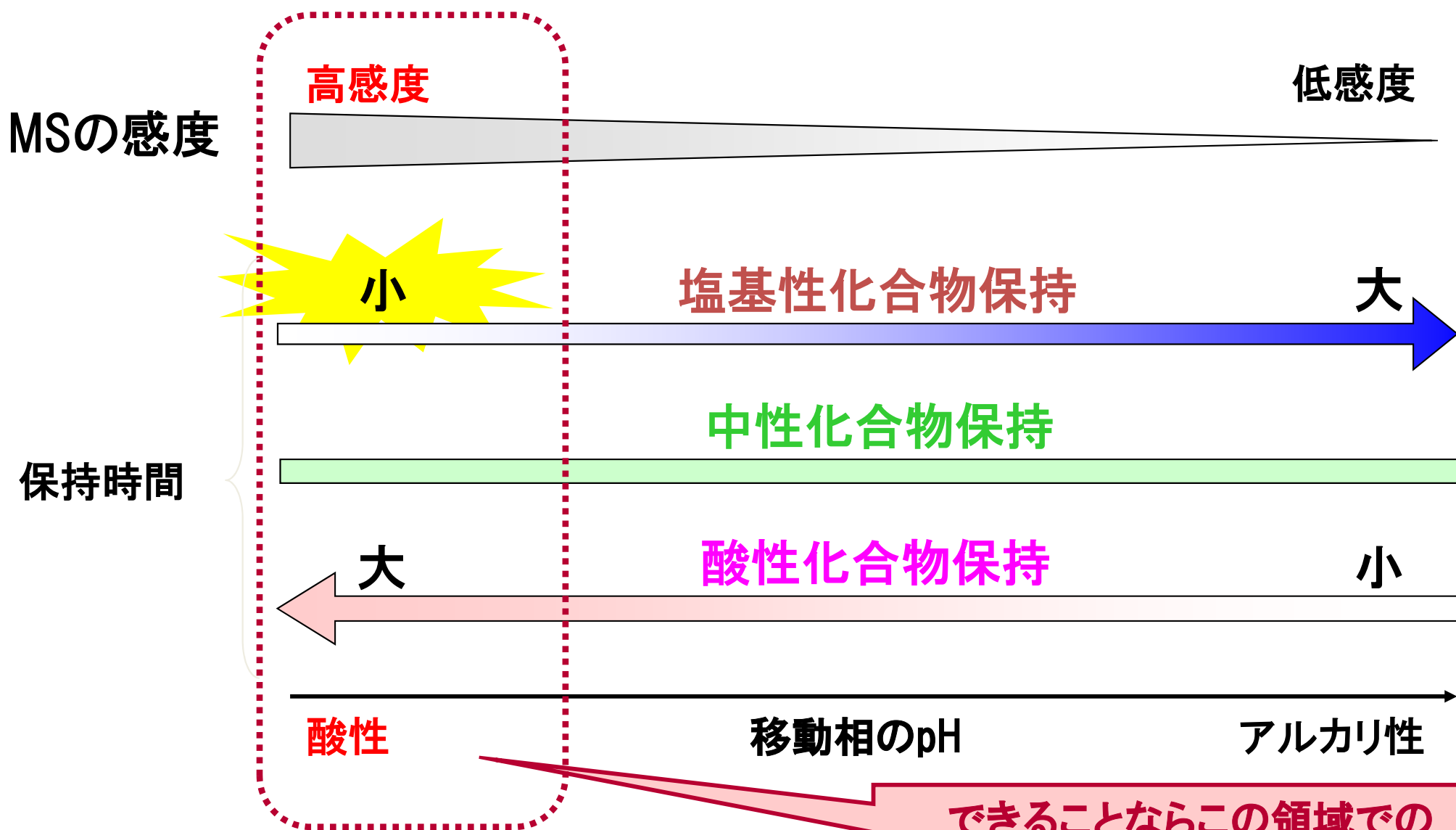


⊕ 塩基性物質

▲ 中性物質

⊖ 酸性物質

C₁₈カラムにおける移動相pHと保持(概念図)



塩基性物質の分析例

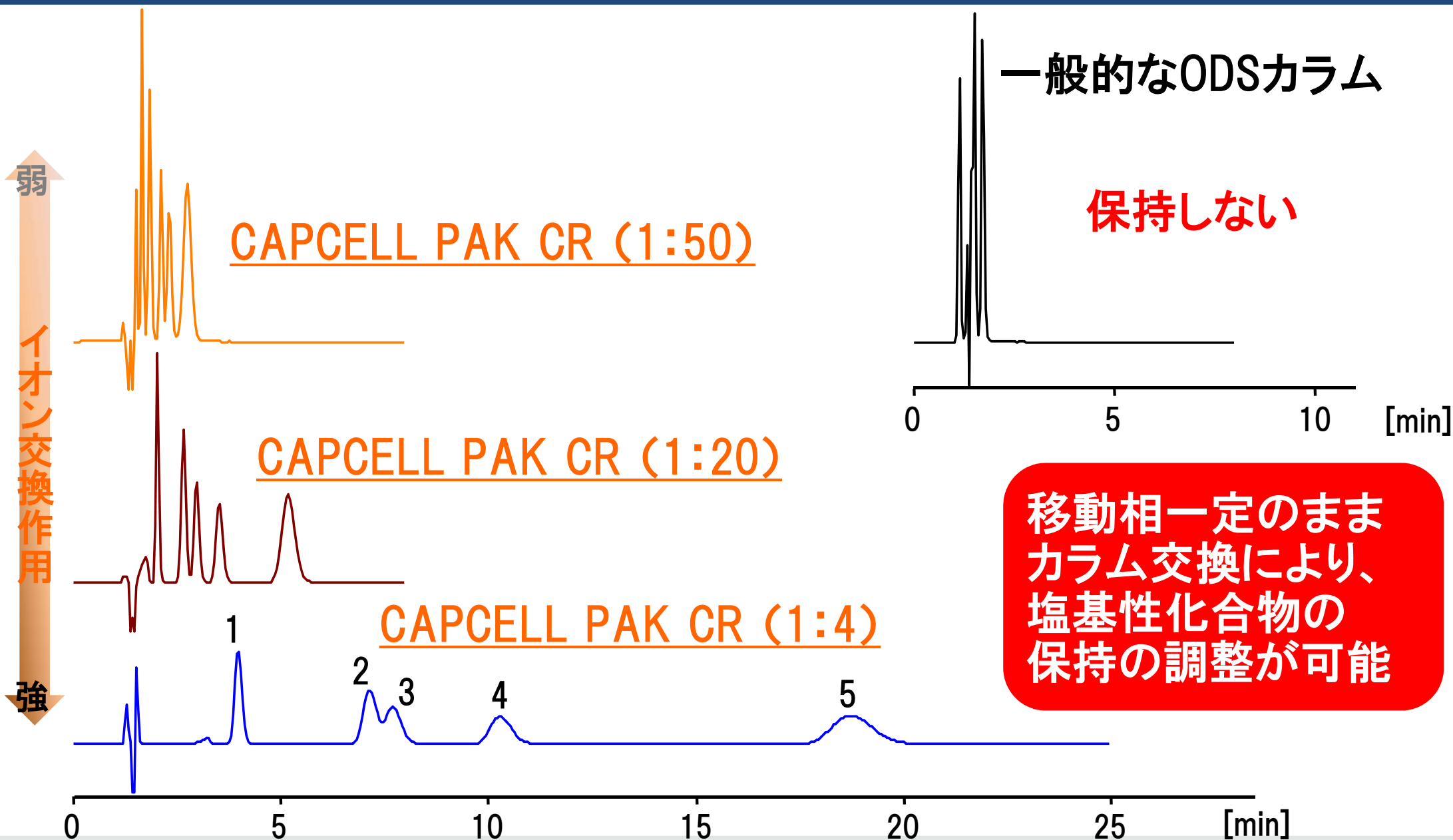
	pKa
1. ベラパミル塩酸塩	8.9
2. アルプレノロール塩酸塩	9.6
3. クロミプラミン塩酸塩	7.8
4. クロルプロマジン塩酸塩	6.9
5. ラニチジン塩酸塩	8.4

-- HPLC条件 --

カラムサイズ	: 2.0 mm i.d. x 150 mm
移動相	: CH ₃ CN / 10 mmol/L HCOONH ₄ (HCOOH, pH 3.0) = 70 / 30
流速	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40 °C
検出	: UV 220 nm
試料注入量	: 1 μL

有機溶媒リッチ

塩基性物質の分析例



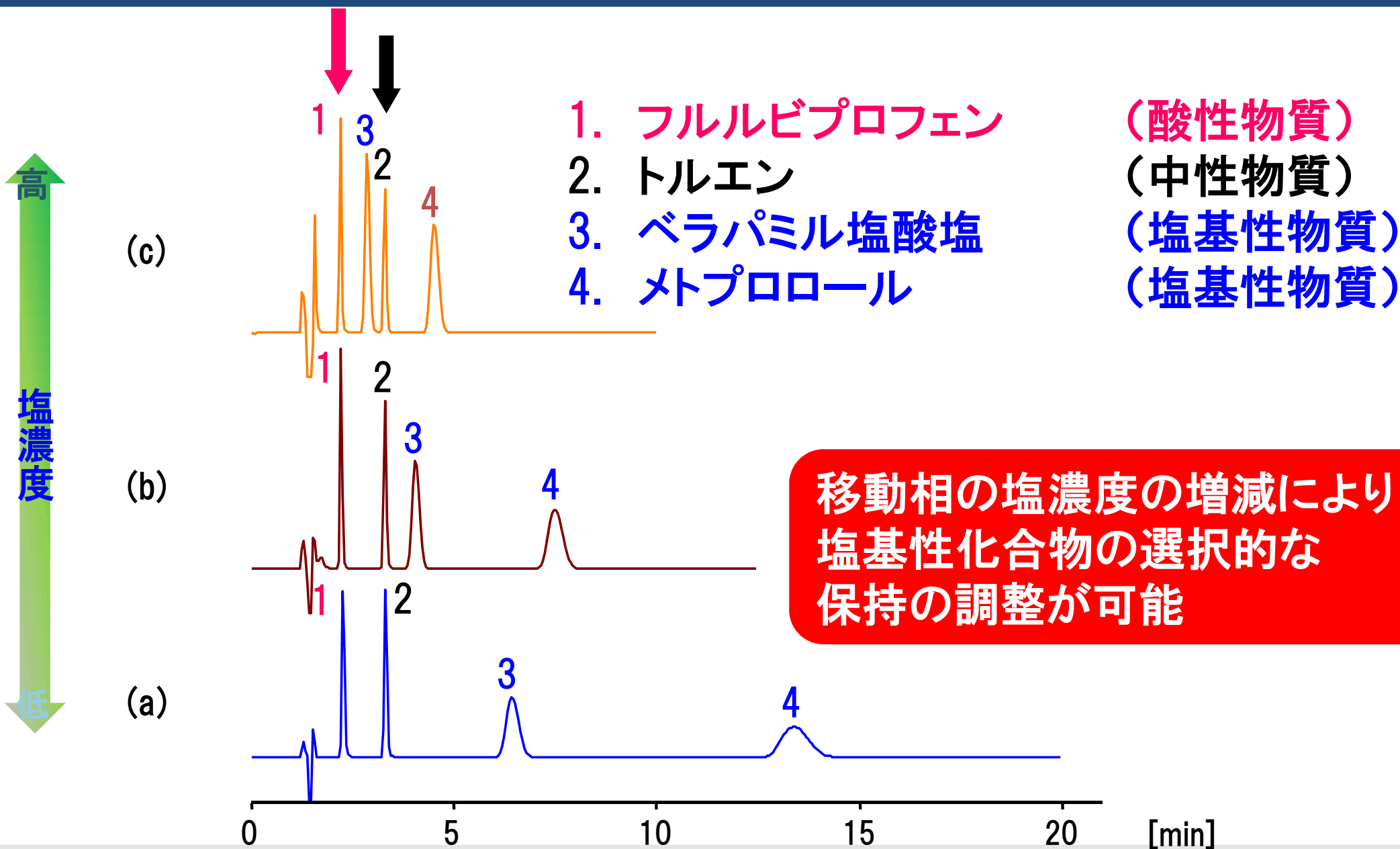
酸性、中性、塩基性物質の同時分析例

- | | |
|--------------|---------|
| 1. フルルビプロフェン | (酸性物質) |
| 2. トルエン | (中性物質) |
| 3. ベラパミル塩酸塩 | (塩基性物質) |
| 4. メトプロロール | (塩基性物質) |

-- HPLC条件 --

- カラム : CAPCELL PAK CR (1:4), 2.0 mm i.d. x 150 mm
- 移動相 : (a) CH₃CN / 5 mmol/L CH₃COONH₄ (CH₃COOH, pH 4.0)
(b) CH₃CN / 10 mmol/L CH₃COONH₄ (CH₃COOH, pH 4.0)
(c) CH₃CN / 20 mmol/L CH₃COONH₄ (CH₃COOH, pH 4.0)
比率はすべて、70 / 30
- 流速 : 0.2 mL/min 有機溶媒リッチ
- 温度 : 40 °C
- 検出 : UV 220 nm
- 試料注入量 : 1 μL

酸性、中性、塩基性物質の同時分析例



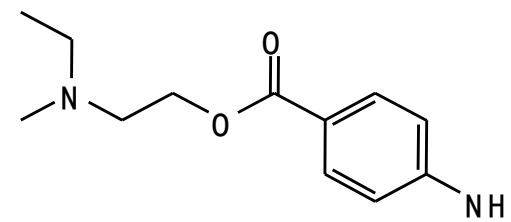
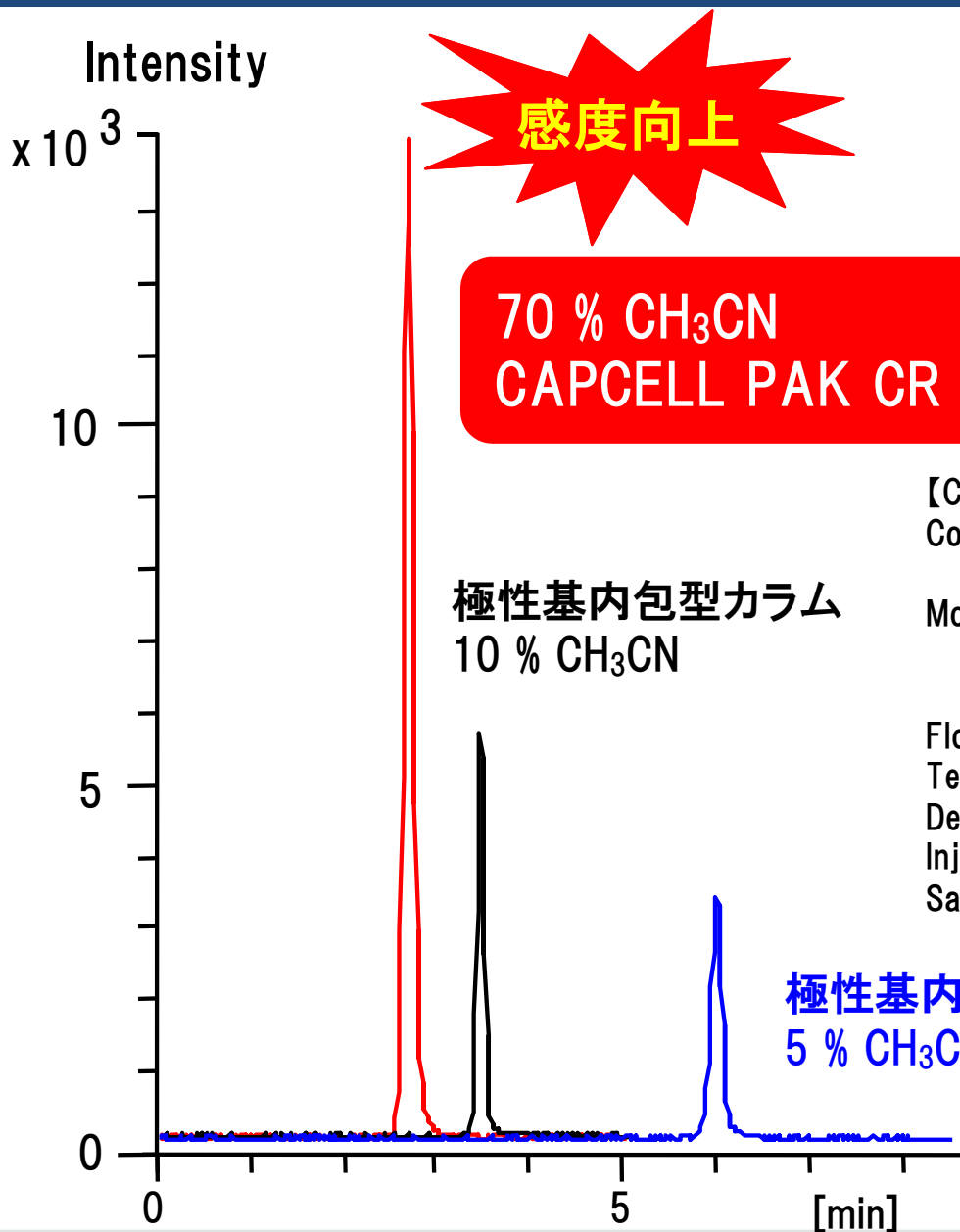
移動相中の有機溶媒の比率の影響によるMS感度

- (a) CAPCELL PAK CR (1:20) : 有機溶媒リッチ
(b) 他社極性基内包型カラム : 水リッチ

-- HPLC条件 --

- カラムサイズ : 2.0 or 2.1 mm i.d. x 150 mm
移動相 : CH₃CN / 10 mmol/L HCOONH₄ (HCOOH, pH 3)
(a) 70 / 30
(b) 10 / 90
(c) 5 / 95
流速 : 0.2 mL/min
カラム温度 : 40 °C
検出 : MS
試料注入量 : 2 μL
試料 : プロカイン

移動相中の有機溶媒の比率の影響によるMS感度



Procaine

【Conditions】

- Column : Red ; CAPCELL PAK CR (2.0 mm i.d. x 150 mm)
Black and blue ; 極性内包型 (2.1 mm i.d. x 150 mm)
- Mobile phase : A) 10 mmol/L HCOONH₄ (adjusted at pH 3 with HCOOH)
B) CH₃CN
A / B Black 30 / 70, Black 90 / 10, Blue 95 / 5
- Flow rate : 0.2 mL/min
- Temp. : 40 °C
- Detect : TOF-MS, Dual ESI, Positive mode
- Inj. vol. : 2 μL
- Sample : Procaine was dissolved at 1000 mg/mL in methanol,
and diluted to 1 mg/mL with each mobile phase.

| CAPCELL PAK CRのまとめ

- CAPCELL PAK CRは、酸性条件において、疎水性を有した酸性化合物、中性化合物および塩基性化合物の適度な保持が得られます。
- CRでは、異なる性質の充填剤の混合比率が3種(1:4、1:20、1:50)あり、サンプルにあわせてカラム選択が可能です。
- イオンペア剤が不要です。
- **有機溶媒含有率の高い移動相設計が可能**なため、逆相カラムと比較し、LC-MSにおける感度向上が期待できます。



ご清聴ありがとうございました

お問合せ先 株式会社 大阪ソーダ

クロマトグラフィー営業部

TEL : 06-6110-1598

e-mail : silica@osaka-soda.co.jp