

逆相 + イオン交換 マルチモードODSカラム

世界初の両イオン交換型マルチモードODSカラム … スケルツォODSファミリー

逆相+アニオン交換+カチオン交換+(順相)分離モード

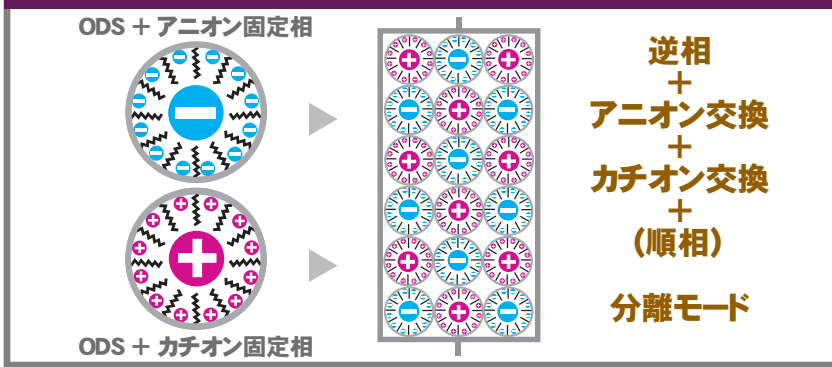
スケルツォ

Scherzo C18 Family

アニオン性化合物もカチオン性化合物も同時に分析が可能  
 ODS+イオン交換分離が可能  
 イオン交換能の強さにより3種類の充てん剤 (SS-C18, SM-C18, SW-C18)  
 高極性化合物の保持や分離に  
 一般ODSカラムの分離改善に  
 イオン対試薬不要のLC-MS対応

高純度全多孔性球状シリカ / 3 μm 粒子 / 13nm 細孔 / ODS+アニオン交換+カチオン交換固定相

C18+カチオン+アニオン固定相からなるODSカラム

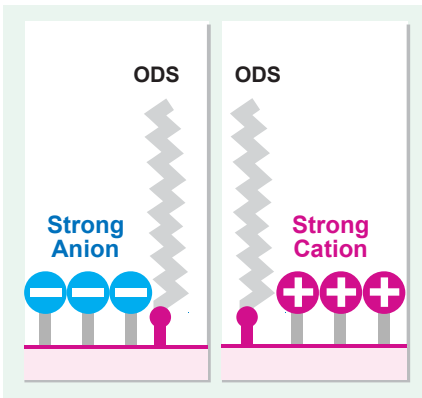


従来のODSカラムの課題であったイオン性高極性物質を、イオン対試薬を添加することなく保持させることができません。しかも、アニオンでもカチオンでもこの1本で分離が可能です。基本的に重要な疎水性は従来のODSと同等になるように設計されていますから、分析条件の検討においては従来カラム(Unison UK-C18)と対比しながらすすめることができます。

INNOVATION !

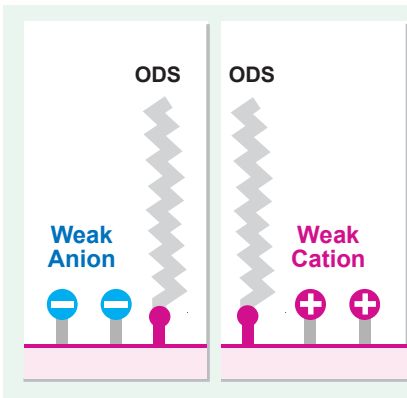
イオン交換能の異なる3種類のODSカラム

Scherzo SS-C18



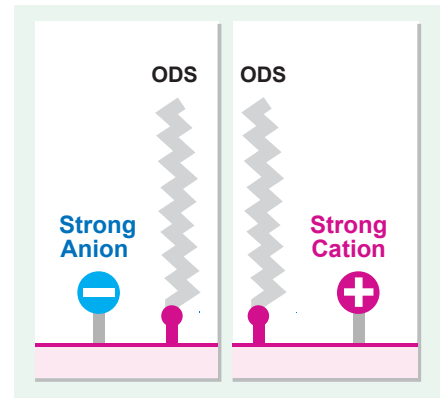
強イオンリガンドを多量に導入したODSです。双性イオンや弱イオンなど、比較的弱い電荷を持つ溶質を保持させたいときに有効です。

Scherzo SM-C18



弱イオンリガンドを適度に導入したODSです。中性移動相で塩基性物質も酸性物質も適度に保持するように設計されています。Unison UK-C18 の分離特性を変化させたいときにも有効です。

Scherzo SW-C18



強イオンリガンドをわずかに導入したODSです。強イオン性物質の保持や、ギ酸移動相における塩基性物質の保持に適しています。

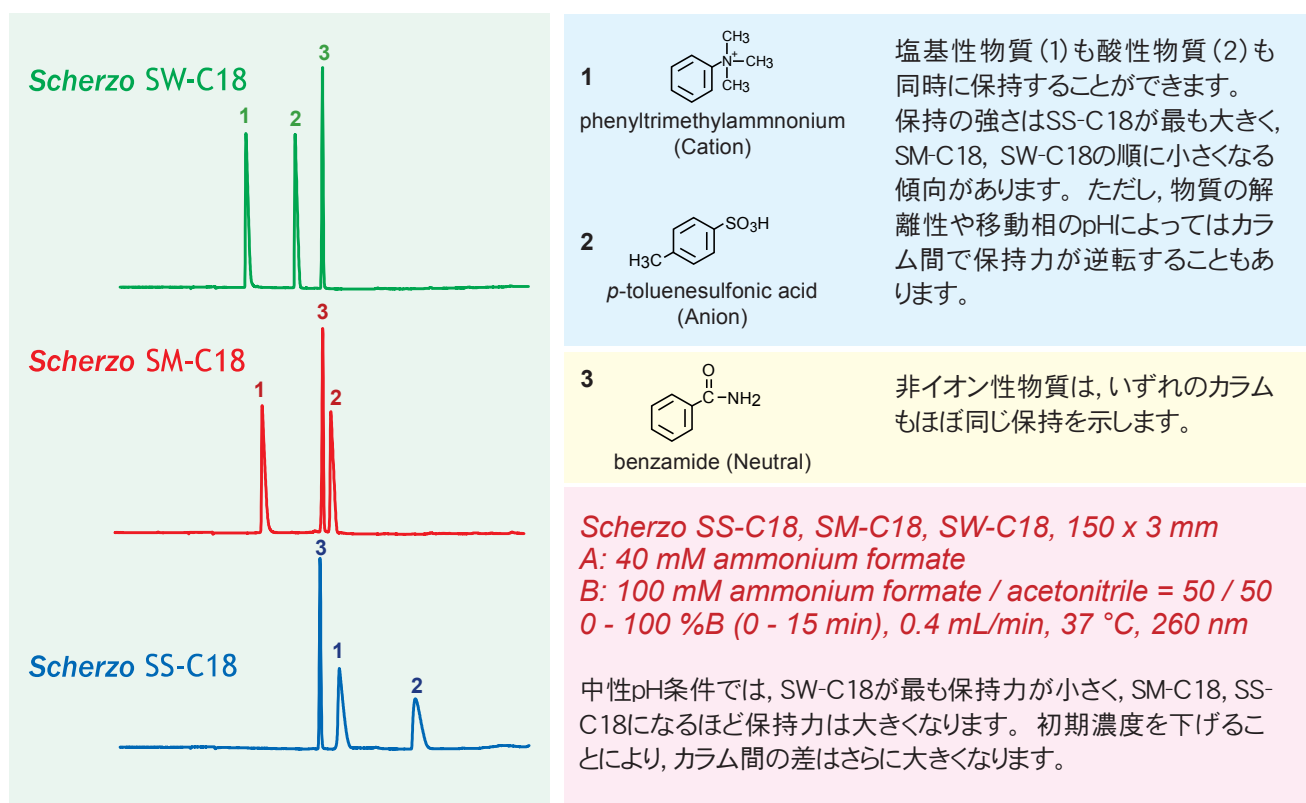
## ♪ Scherzo C18 カラムの分離モード

マルチモードODSカラム Scherzo C18 ファミリー(SS-C18, SM-C18, SW-C18)は、ODSリガンドの他に、アニオンリガンド、カチオンリガンドが導入されています。これにより、ODSとしての逆相モードだけでなく、イオン交換モードや順相モードも有しています。

分離モード	固定相	特性
逆相	オクタデシル基	有機溶媒濃度を上げる(移動相の極性を下げる)と保持が小さくなります。
アニオン交換	カチオン基	酸性物質を保持します。pHが低くなるほど保持する傾向があります。イオン強度(酸や塩濃度)を上げると保持は小さくなります。
カチオン交換	アニオン基	塩基性物質を保持します。SM-C18の場合はpHを高くするほど保持します。SS-C18やSW-C18はpHを低くするほど保持します。また、いずれもイオン強度を上げると保持は小さくなります。
順相	アニオン/カチオン基	水100%系移動相でも保持できない高極性物質は、50%以上の有機溶媒濃度になると、固定相との間の静電的相互作用により、保持が大きくなる場合があります。

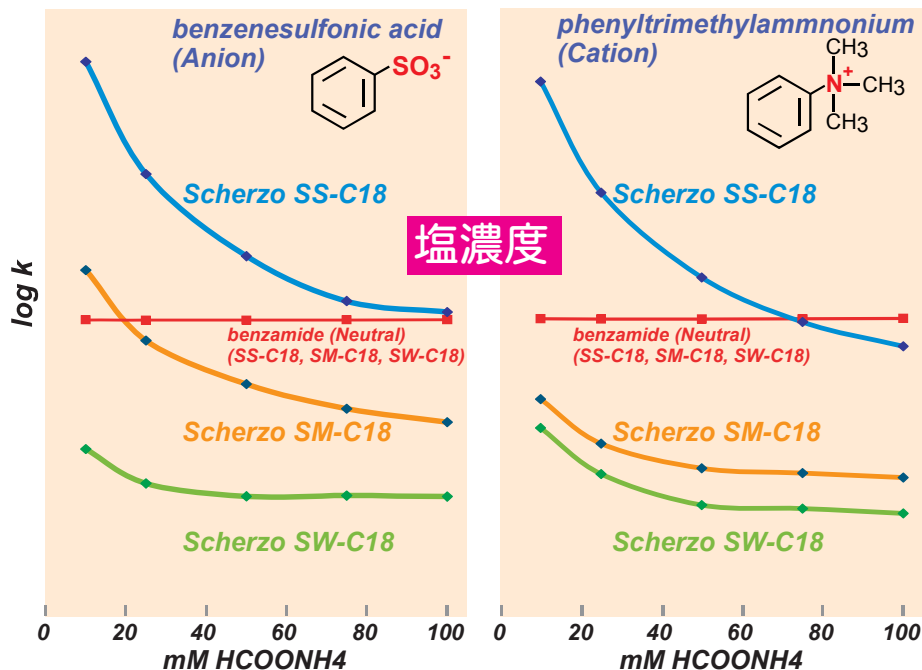
## ♪ Scherzo C18カラムの保持分離特性 (逆相+アニオン交換+カチオン交換)

マルチモードODS Scherzo C18 カラムは、ODSリガンドによる基本的な逆相分離に加え、アニオン交換モードとカチオン交換モードが同時に作用します。また、3種類のカラムのイオン交換能が異なるので、目的物質のイオン性の強さによって、最適なカラムを選択することができます。また、疎水性は Unison UK-C18 と同等に設計されていますから、これらのカラムの使い分けにより、保持・分離の可能性が大きく向上します。



## ♪ Scherzo C18 カラムの保持に影響する要因

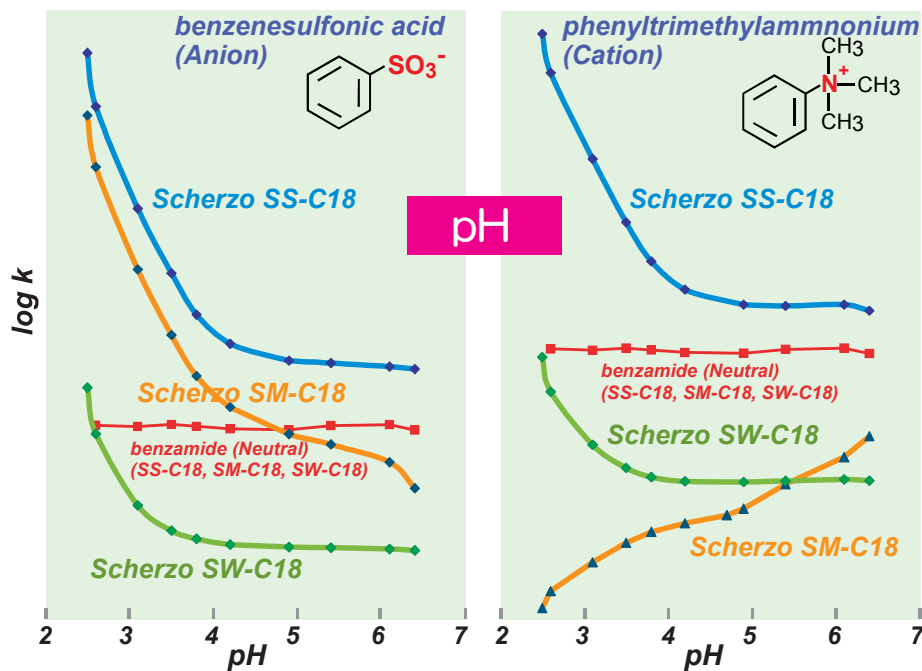
一般のODSカラムで困難だったイオン性物質の保持や分離は、Scherzoカラムの選択と移動相塩濃度やpHの最適化により、格段に改善できる可能性があります。Scherzoカラムを用いて分離の最適化をおこなう場合、pHだけではなく、イオン強度(酸や塩の濃度)が保持に大きな影響を与えます。これはイオン交換カラムと同様の原理です。逆相+両イオン交換モードを有するScherzoカラムの移動相には、有機溶媒、pH、イオン強度の最適化が重要です。



マルチモードODS, Scherzo カラムを用いてイオン性物質を溶出させる移動相条件としては、有機溶媒だけでなく「塩濃度」も重要です。

左図のように、3種類のScherzoカラムについて塩濃度を上昇させると、アニオン化合物、カチオン化合物いずれも保持が小さくなります。

同塩濃度においては、強イオンリガンドを多量に導入したSS-C18が最も保持が大きく、弱イオンを適度に導入したSM-C18、強イオンをわずかに導入したSW-C18の順で保持が小さくなります。目的物質のイオンの強さによって、3種類のScherzoの中から最適なカラムを選定することができます。



マルチモードODS, Scherzoカラムを用いてイオン性物質を溶出させる場合、移動相の「pH」条件が重要となります。酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムを用いた中性pHで溶出するか、ギ酸酸性で溶出するかによって、保持は大きく変化します。

強イオンリガンドからなるSS-C18やSW-C18は、移動相pHを低くすると保持が大きくなります。一方、弱イオンリガンドを導入したSM-C18の場合、塩基性物質に関しては、低pHではアニオンリガンドの解離が抑制され、イオン交換性がはたらかないために、保持は小さくなります。

## ♪ Scherzo C18 カラムによる溶出方法

### 非イオン性の疎水性物質

通常のODSと同様に有機溶媒濃度を最適化します。0.1%酢酸を移動相に添加すれば、再現性の高い分離が得られます。

### イオン性の疎水性物質

保持に最適なpHにおいて、20-100mM程度の塩や酸と有機溶媒の組み合わせにより、塩基性物質も酸性物質も同時に分析することができます。

### 弱イオン性の高極性物質

一般にSS-C18が推奨されます。保持や分離に必要なpHとイオン強度を最適化することにより、従来のODSでは保持が困難であった化合物が簡単に分離できる可能性があります。モノカルボン酸をイオンの保持させるには中性付近のpHが必要です。

### 強イオン性の高極性物質

一般にSW-C18が推奨されます。SS-C18やSM-C18では溶出できない場合に有効です。強イオン性物質は、イオンの相互作用が大きいため、低イオン強度から高イオン強度と有機溶媒の複合グラジエント溶出が望まれます。

## ♪ Scherzo C18 カラムの移動相調製例

Scherzo C18カラムはODSだけでなく両イオン交換リガンドが導入されており、移動相設計は難しいように感じられますが、「逆相カラム」と「イオン交換カラム」を同時に使用すると単純に考えることができます。多くの場合、以下のような基本的溶出条件が適用できます。

### アイソクラティック溶出例

water / acetonitrile / HCOOH = x / y / 0.1 (x+y = 100)

酸性移動相

50mM ammonium acetate / acetonitrile = x / y (x+y = 100)

中性移動相

### グラジエント溶出例

A) water / HCOOH = 100 / 0.1

B) water / acetonitrile / HCOOH = 30 / 70 / 0.5

酸と有機溶媒の濃度変化

A) 10mM ammonium acetate

B) 100mM ammonium acetate / acetonitrile = 30 / 70

中性塩と有機溶媒の濃度変化

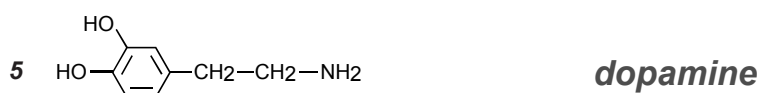
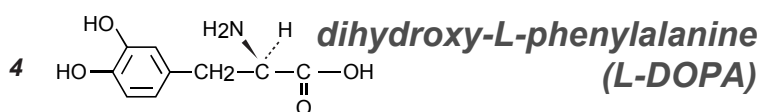
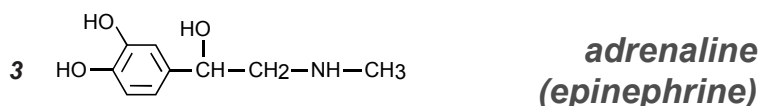
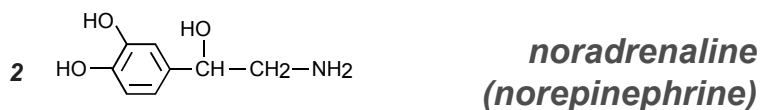
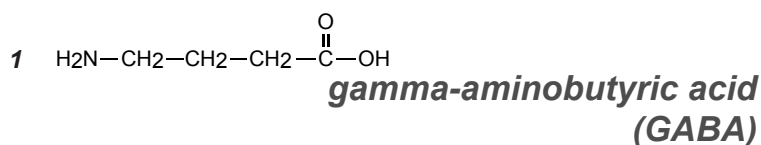
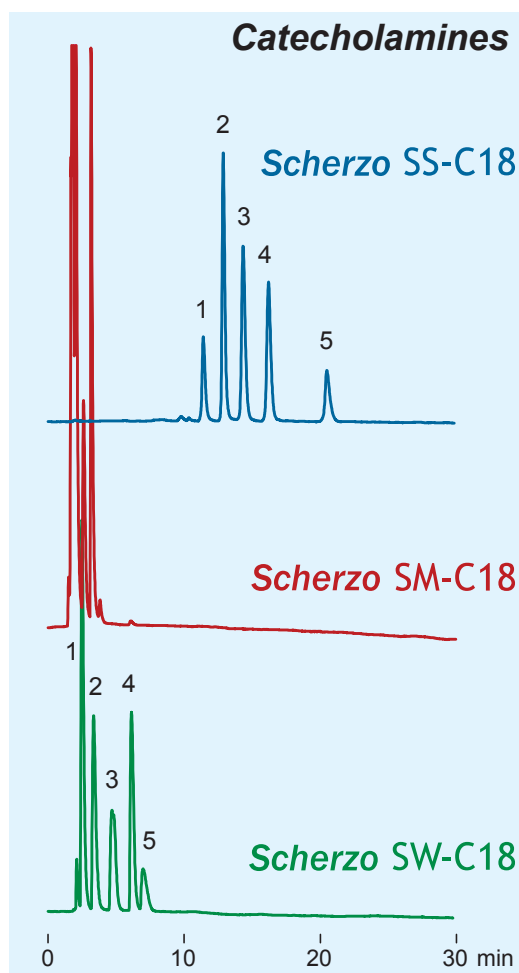
A) water / HCOOH = 100 / 0.1

B) 100mM ammonium formate / acetonitrile = 30 / 70

pH, イオン強度, 有機溶媒の複合グラジエント

## ♪ Scherzo C18 カラム比較・・・SS-C18で最適化した例（神経伝達物質）

Scherzo C18カラムは、それぞれに得意とする化合物があります。SS-C18は強イオンリガンドを多量に導入したもので、双性イオンや弱イオン性の化合物の保持に適しています。



150 x 3 mm

A: water / formic acid = 100 / 0.3

B: 100mM ammonium formate / acetonitrile = 70 / 30  
 0-60% B (0-30 min)

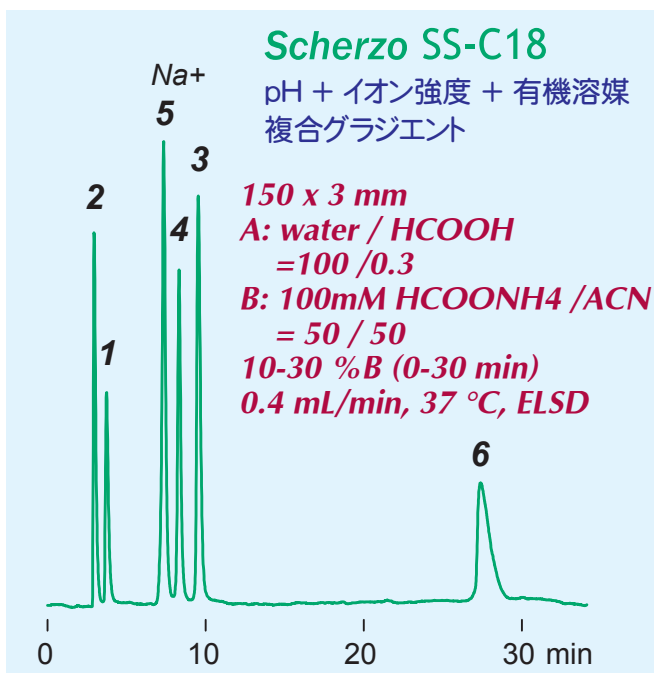
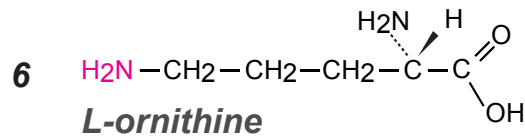
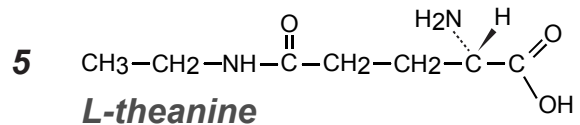
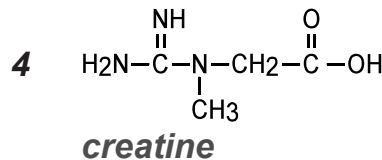
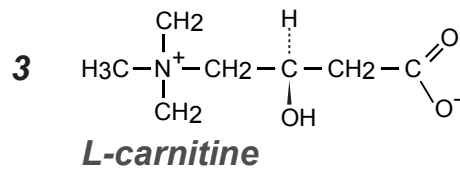
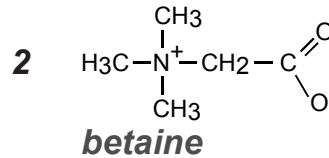
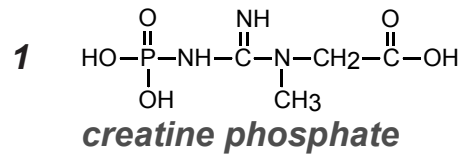
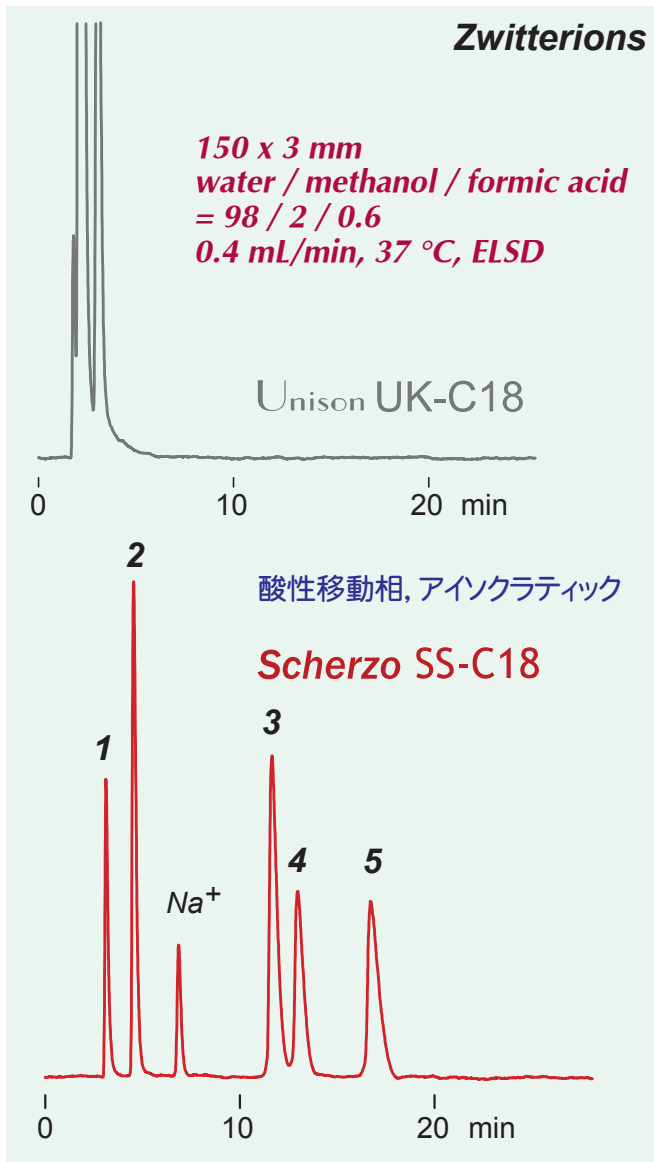
0.4 mL/min (9MPa), 37 °C, ELSD

強イオンリガンドを導入した SS-C18やSW-C18は、弱イオンリガンドのSM-C18よりも保持は大きくなります。またリガンド量の多いSS-C18は、高極性のイオン性物質の分離に威力を発揮します。ただし高速分析という点では、リガンド量の少ないSW-C18でも最適化できる可能性はあります。

GABAの保持のためにはギ酸系移動相が必要であり、dopamineの溶出には中性pH条件が必要であるため、本事例では、pH+イオン強度+有機溶媒の複合グラジエントを採用しています。

## ♪ Scherzo SS-C18 カラムの有効性 (双性イオン化合物)

等電点(pI)をもつ双性イオン(zwitterion)化合物は、分子内でアニオンとカチオンが相殺し、しかも極性が極めて高いために、一般のODSカラムでは保持や分離が極めて困難な化合物です。このような化合物に対して、強いイオンリガンドを導入したScherzo SS-C18は威力を発揮します。



アミノ酸に代表される双性イオン(zwitterions)は極性が高く、一般のODSカラムでは保持が困難な化合物群です。強いイオンリガンドを多量に導入した SS-C18を用いることにより、これらの双性イオンは簡単に保持・分離することができます。

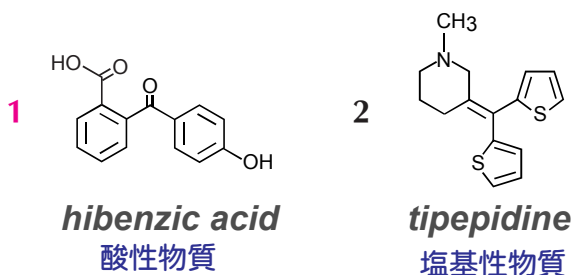
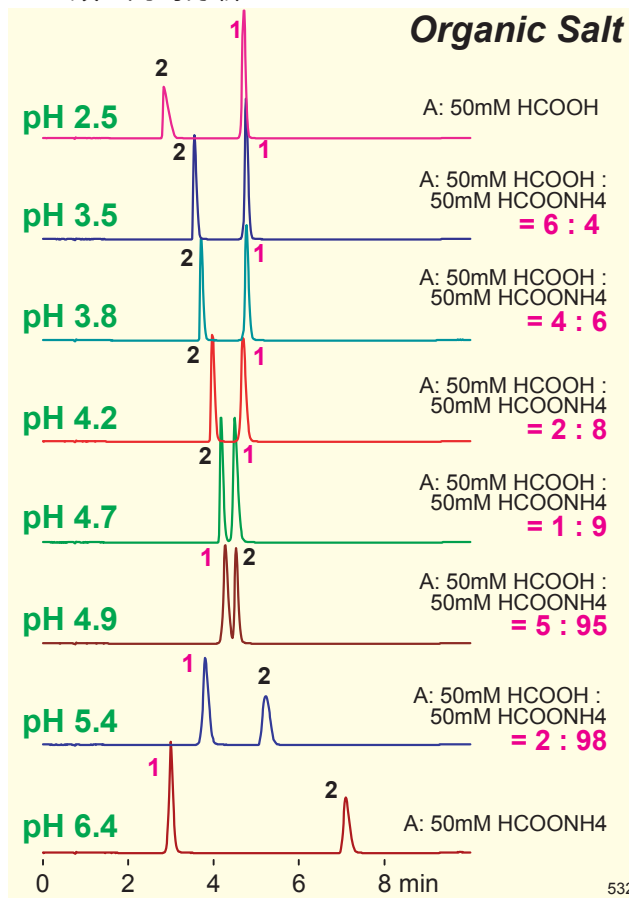
上図の例では、移動相をギ酸酸性条件にすることで化合物全体としては陽イオンになるため、固定相の強アニオンリガンドとイオンの相互作用して保持や分離が可能となります。さらにギ酸や有機溶媒の濃度を調整することで、最適なアイソクラティック分析条件が得られます。

下図は、同じSS-C18を用いたpH+イオン強度+有機溶媒の複合グラジエント溶出例です。双性イオンは一般に中性よりも酸性でイオン化しやすいために、グラジエント初期移動相は酸性pHにする必要があります。ただしオルニチンのようにアミノ基が付加されてカチオン性が強い物質は、酸性条件のままではイオンの相互作用が強いはたらくために溶出が困難です。このような場合、中性ではその作用は弱くなることから、酸性から中性pHに向かったpH勾配と、さらにイオン強度(塩濃度)と有機溶媒濃度を同時に上げる方法によって溶出が可能になります。

## ♪ Scherzo SM-C18 カラムの有効性 (塩類, ビタミン)

Scherzo SM-C18は、ODSリガンドの他に弱カチオン基と弱アニオン基を導入したカラムで、多くのイオン性化合物に適用できる汎用性の高いカラムです。塩類やビタミンの同時分析や、一般的ODSで困難な物質分離の選択性を変えたいとき、さらにはアルカロイドなどの塩基性物質の分析にも有効です。

### ● 塩類の同時分析



**Scherzo SM-C18, 50 x 3 mm**  
A: formate buffer, B: acetonitrile  
20-60 %B (0-8min), 0.4 mL/min, 37 °C, 280 nm

せき止め薬として多用されているチベピジン・ヒベンズ酸塩は、酸性と塩基性物質が共存しています。

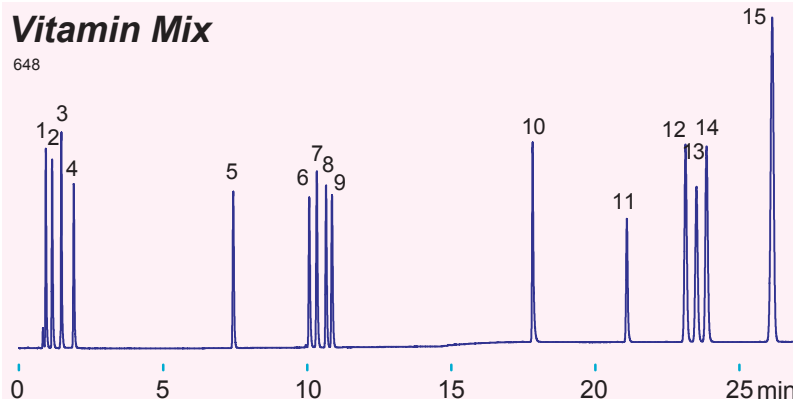
有機性の塩類を分析する場合、一般のODSカラムでも分析は可能ですが、夾雑物との分離で困る場合があります。Scherzo SM-C18であれば、pHを変えるだけで溶出順序を逆転させることも可能です。

塩基性物質はpHを高くするほど保持が大きくなり、酸性物質は逆に保持が低下します。Scherzo SM-C18は、特に中性付近でイオンの相互作用の効果が発揮されるように設計されています。

分析対象の感度や分離目的に応じて、溶出順序を簡単に替えることのできる Scherzo SM-C18は、ODSによる分離で困ったときに威力を発揮します。また有機塩だけでなく、NaClのような無機塩の同時分析も可能です。

### ● 水溶性-脂溶性ビタミンの一斉分析

**Scherzo SM-C18, 150 x 2 mm**  
A: 0.3% HCOOH aq.  
B: acetonitrile  
0%B (0-0.1 min)  
0-30%B (0.1-10 min)  
30%B (10-11 min)  
30-100%B (11- 12 min)  
100%B (12-26 min)  
0.3 mL/min, 30°C, 2μL(DMSO soln.)  
ELSD (SEDEX 90LT, 40°C, 3.5Bar)



	RT	%RSD (n=6)		LOD (S/N=3)
	Minutes	RT	Response	ng (o.c.)
1-B1: Thiamine	0.92	0.11	2.6	5.7
2-B8: myo-Inositol	1.14	0.09	6.2	6.3
3-B6: Pyridoxine	1.44	0.16	2.7	1.8
4-C: Ascorbic acid	1.94	0.25	2.4	9.6
5-B5: Pantothenic acid	7.32	0.15	6.8	6.9
6-B9: Folic acid	9.92	0.09	3.1	8.0
7-B12: Cyanocobalamin	10.17	0.11	4.1	4.6
8-B2: Riboflavin	10.49	0.11	3.4	5.0
9-B7: Biotin	10.70	0.09	4.2	4.8
10-A: Retinol	17.64	0.06	6.7	1.7
11-K2: Menaquinone	20.87	0.07	2.1	14.2
12-D2: Ergocalciferol	22.89	0.06	1.5	47.6
13-D3: Cholecalciferol	23.26	0.06	2.6	52.6
14-E: α-Tocopherol	23.61	0.07	1.6	45.0
15-K1: Phylloquinone	25.86	0.07	1.7	41.7

水溶性ビタミンは一般にイオン対試薬を必要とする高極性物質です。一方、脂溶性ビタミンは高濃度有機溶媒を必要とするため、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンを一斉に分析することは困難です。

Scherzo SM-C18を用いた本アプリケーションでは、ギ酸水溶液からアセトニトリルまでのグラジエントにより、15種類のビタミン類を一斉に分析しています。D2とD3も分離できています。また、チアミンのような塩基性物質も、アスコルビン酸のような酸性物質も同時に保持ができることが、マルチモードODSカラムの利点です。

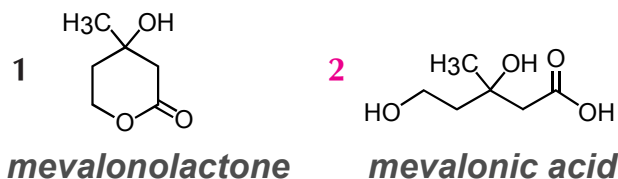
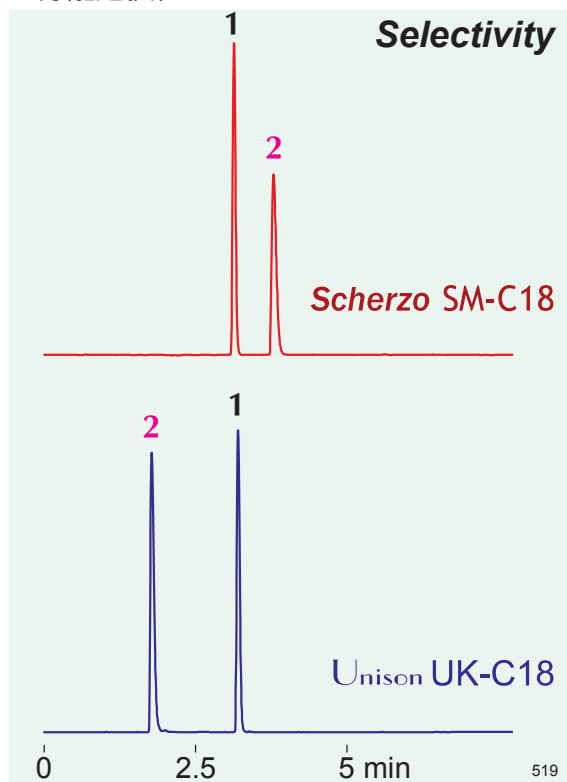
本アプリケーションではELSDにより検出していますが、揮発性移動相であることからLC-MSへの適用も可能です。

Data provided by Dr. Eric VERETTE, SEDERE S.A.S., France

## ♪ Scherzo SM-C18 カラムの有効性 (分離選択性)

Scherzo C18カラムは、Unison UK-C18と同じシリカ基材を用い、ODS導入量もほぼ同じです。ODSカラムによる不純物分析など分離が困難であるときに、選択性を変えることのできるScherzo SM-C18が効果的です。

### ● 分離選択性



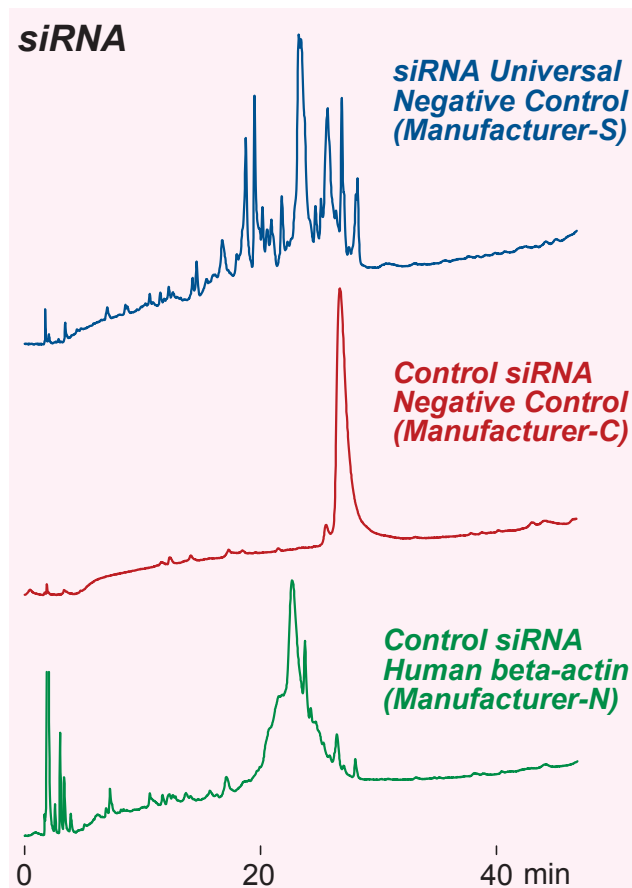
**150 x 3 mm**  
**5mM ammonium formate / acetonitrile = 90 / 10**  
**0.4 mL/min (10MPa), 37 °C, ELSD**

非イオン性物質の場合、Scherzo SM-C18とUnison UK-C18はほぼ同様の保持になるように設計されています。またイオン性物質は、中性pHにおいてアニオンでもカチオンでもSM-C18で保持します。これにより、一般的ODSであるUK-C18で分離が困難である分析に関しては、SM-C18にカラム交換するだけで、イオン性物質の保持を大きく変化させることができます。また、イオン性や構造が不明な物質の場合でも、中性pHの同一移動相でUK-C18とSM-C18を比較すると、物質がイオン性かどうかの判断が可能になります。

Scherzo SM-C18とUnison UK-C18の併用は、化合物の性質を把握する上でたいへん効果的です。

## ♪ Scherzo SW-C18 カラムの有効性 (酸性化合物)

Scherzo SW-C18は、強イオンリガンドをわざわざ導入するという、従来のイオン交換カラムにも見られない新しい発想をしています。これにより、強イオン性物質であっても溶出が可能になります。



現在、次世代の医薬品開発で注目されているsiRNA (small interfering RNA)は、21mer程度の塩基対からなる二本鎖RNAです。高極性でしかもリン酸が多く存在する、分離の難しい化合物のひとつです。

左図は、現在市販されているsiRNA試薬をScherzo SW-C18で分析したものです。siRNAの構造の違いと思われる複数のピークが確認されました。これは、核酸塩基の違いによる疎水性以外に、リン酸基の数に起因するイオンの相互作用の違いをSW-C18が認識していると考えられます。このように、siRNAの構造解析にSW-C18が貢献できると期待されます。

SW-C18は、siRNAだけでなく、ATPや一本鎖オリゴヌクレオチドのように、従来イオン対試薬が必要であった核酸系化合物に対しても、酢酸アンモニウムと有機溶媒の混合で分析することができます。

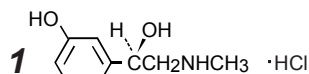
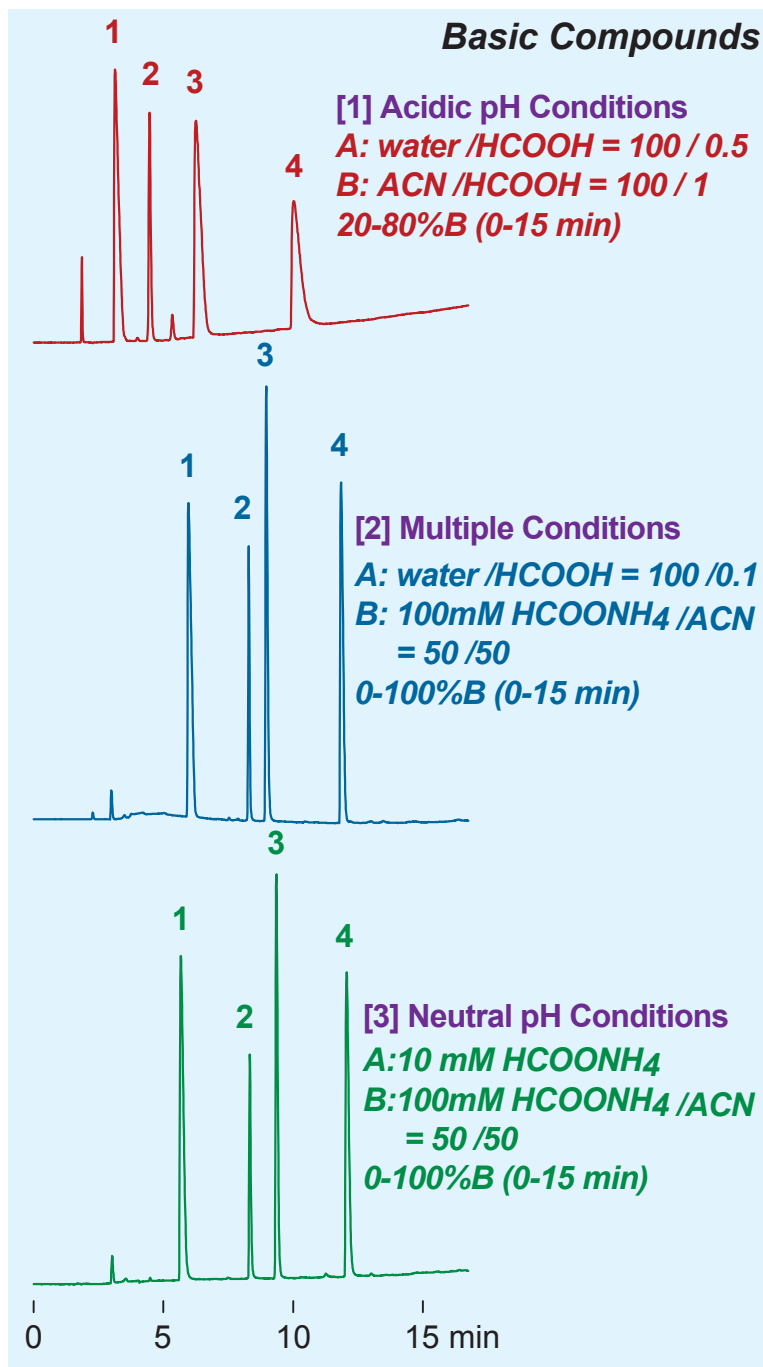
イオン性の高いリン酸系の化合物に対して、イオンリガンドをわざわざ導入したScherzo SW-C18が有効です。

**Scherzo SW-C18, 150 x 3 mm**  
**A: 10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>**  
**B: 200 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> / ACN = 85 / 15**  
**0-100%B (0-45 min)**  
**0.4 mL/min (10 MPa), 37 °C, 260 nm**

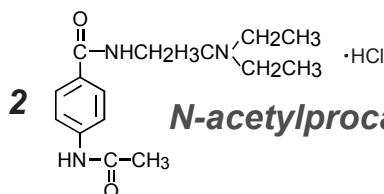
## ♪ Scherzo SW-C18 カラムの有効性 (塩基性化合物, 医薬品, 代謝物)

Scherzo SW-C18は、塩基性の医薬品やイオン性代謝物の分析に卓越した性能を発揮します。強イオンリガンドをわずかに導入していますから、低pHから中性までの各種条件で保持や分離が可能です。メタボローム解析や薬物動態研究など、LC-MSを用いた代謝分析への展開が期待されます。

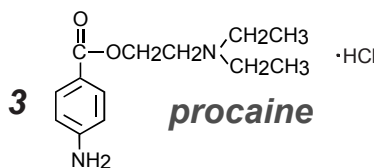
### ● 塩基性医薬品の溶出条件



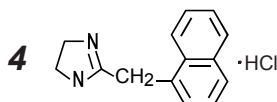
**phenylephrine**



**N-acetylprocainamide**



**procaine**



**naphazoline**

**Scherzo SW-C18, 150 x 3 mm**

**0.4 mL/min (9 MPa), 37 °C, 260 nm**

Scherzo SW-C18を用いて塩基性化合物をLC-MS互換の揮発性移動相で分析するには3種類の方法があります。

[1] ギ酸濃度+有機溶媒濃度グラジエントは、塩基性の薬物や代謝物をイオンの強く保持します。初期のギ酸濃度を調整することにより、広範囲の陽イオン化合物を分析することが可能となります。

[2] 低濃度ギ酸から高濃度ギ酸アンモニウムと有機溶媒濃度の複合グラジエントです。極めて極性の高い化合物から強いイオン性化合物までバランスよく溶出することができる、汎用性の高い溶出方法です。

[3] 中性pHにおけるイオン強度+有機溶媒グラジエントは、塩基性化合物も酸性化合物も同時に分析することができる、便利な溶出方法です。

## ♪ カラム情報

主な仕様: 基材:高純度シリカ, 粒子径:3μm, 細孔径:13nm, 固定相:ODS + アニオン交換 + カチオン交換 リガンド

カラム名	カラム内径	カラム長	ガードカラム
Scherzo SS-C18	0.075mm - 0.5mm	10mm, 20mm, 30mm	ガードホルダー
Scherzo SM-C18	1mm, 1.5mm, 2mm, 3mm	50mm, 75mm, 100mm	カートリッジカラム
Scherzo SW-C18	4.6mm, 6mm, 10mm	150mm, 250mm, 500mm	

取扱店

**Imtakt**  
インタクト株式会社

ホームページにおいでください。  
最新情報があります。



[www.imtakt.com](http://www.imtakt.com)

〒600-8813 京都市下京区中堂寺南町 京都リサーチパーク  
PHONE:075-315-3006 FAX:075-315-3009 E-mail: info@imtakt.com