

JASIS 2012 新技術説明会
Japan Analytical & Scientific Instruments Show

コアシェルカラムの上手な使い方:
ちょっとした注意事項とノウハウで大幅に
性能アップ!!!



クロマニックテクノロジーズ

塚本友康 長江徳和

<http://chromanik.co.jp>

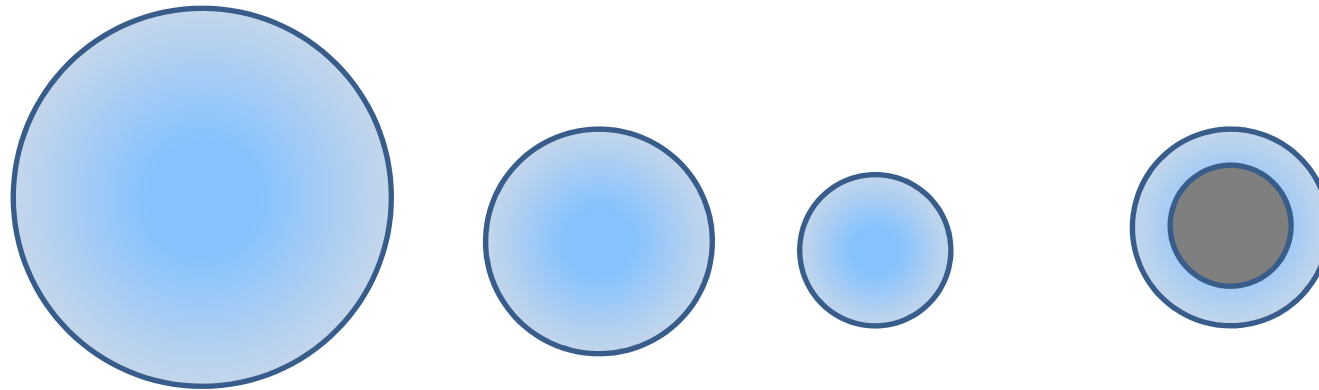
毎年のJASIS・薬学会等の資料を公開しております
コアシェルに関する最新情報も公開中!!



理論段数を上げるために

理論段高さ(HETP)を低くする

$$\text{HETP} \div 2.2 \times \text{粒子径}$$

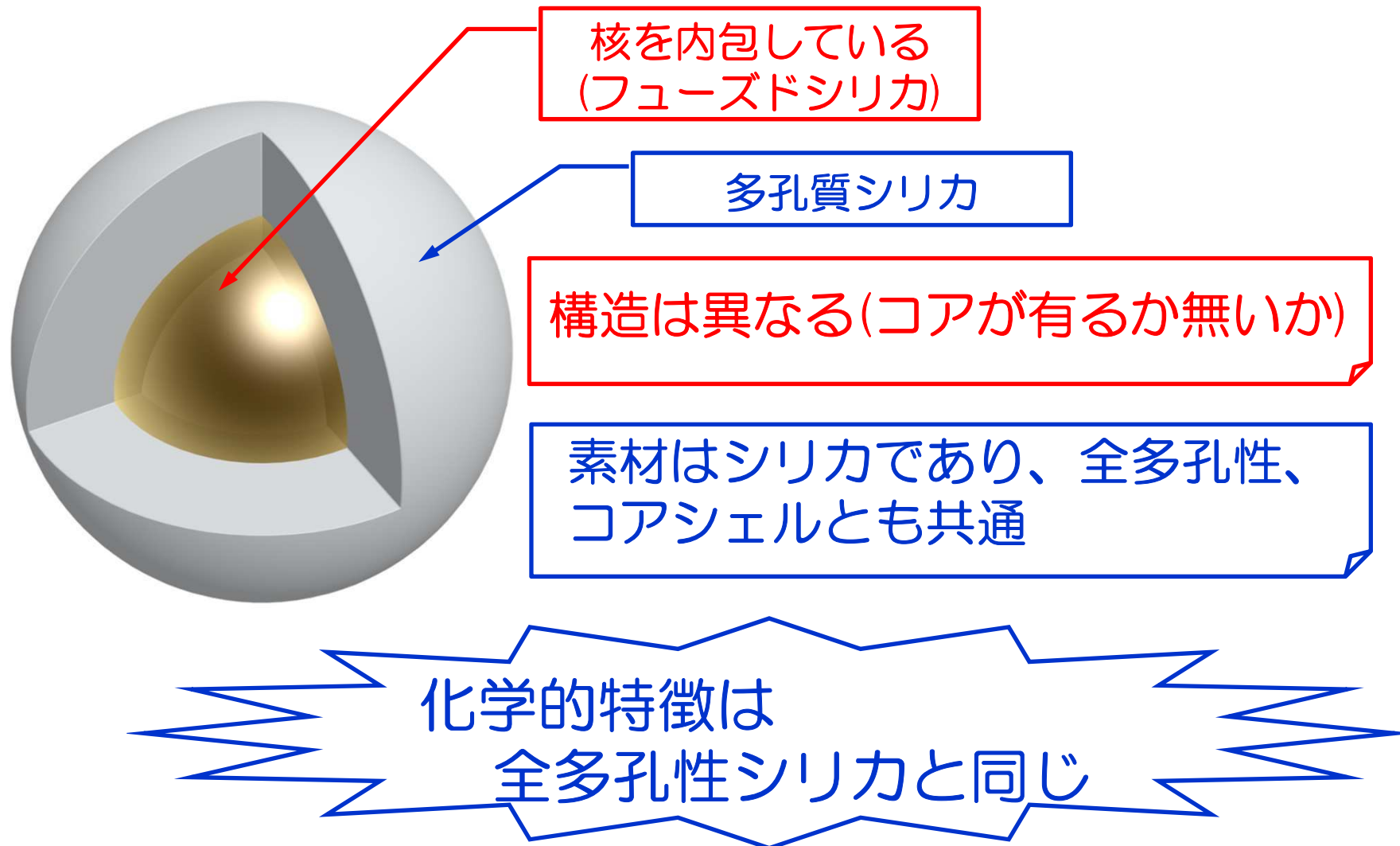


粒子径	5 μm	3 μm	2 μm	2.6 μm
理論段高さ	11.0 μm	6.6 μm	4.4 μm	4.4 μm

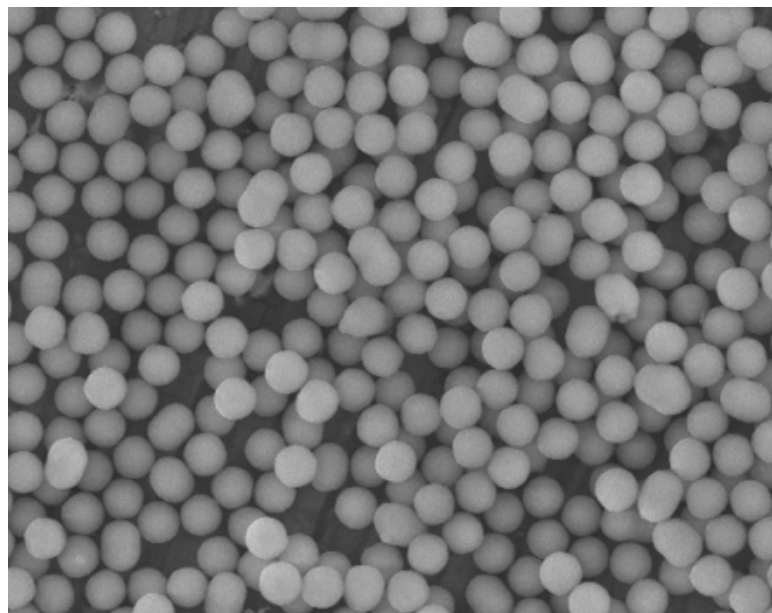
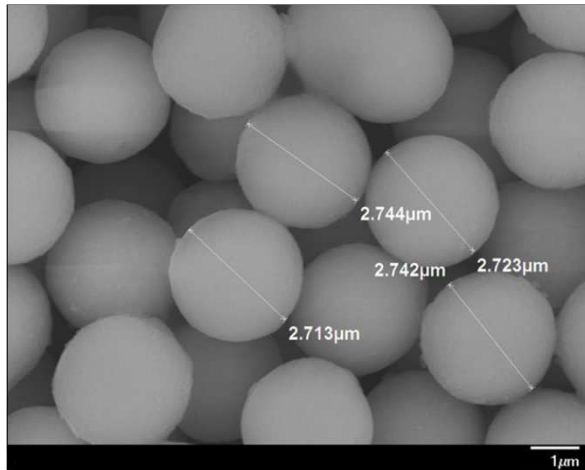
粒子径が小さいほど理論段高さは低くなる

?

全多孔性シリカ粒子と何が違う、何が一緒？

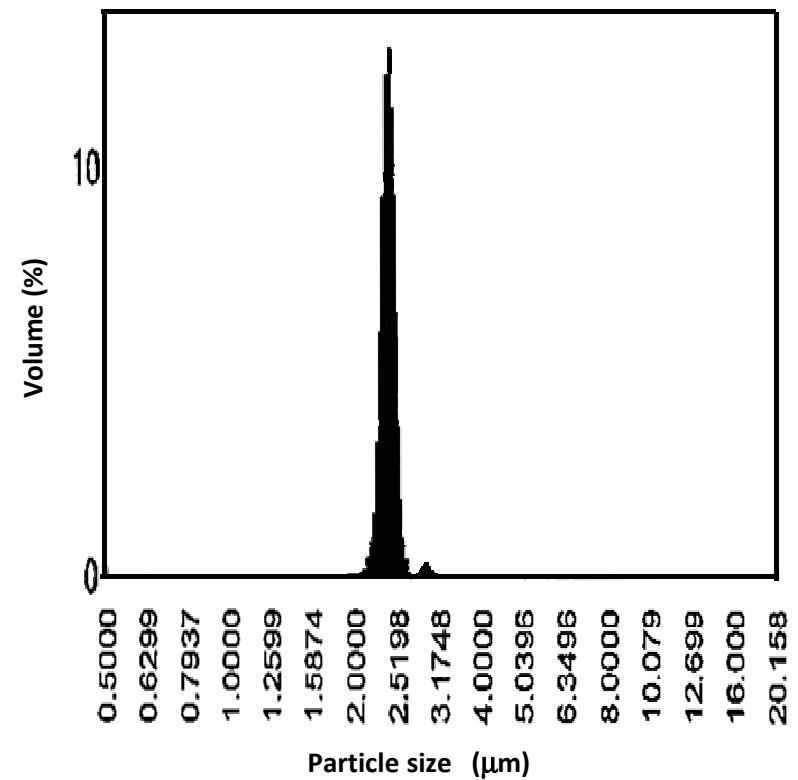


コアシェル粒子の粒度分布

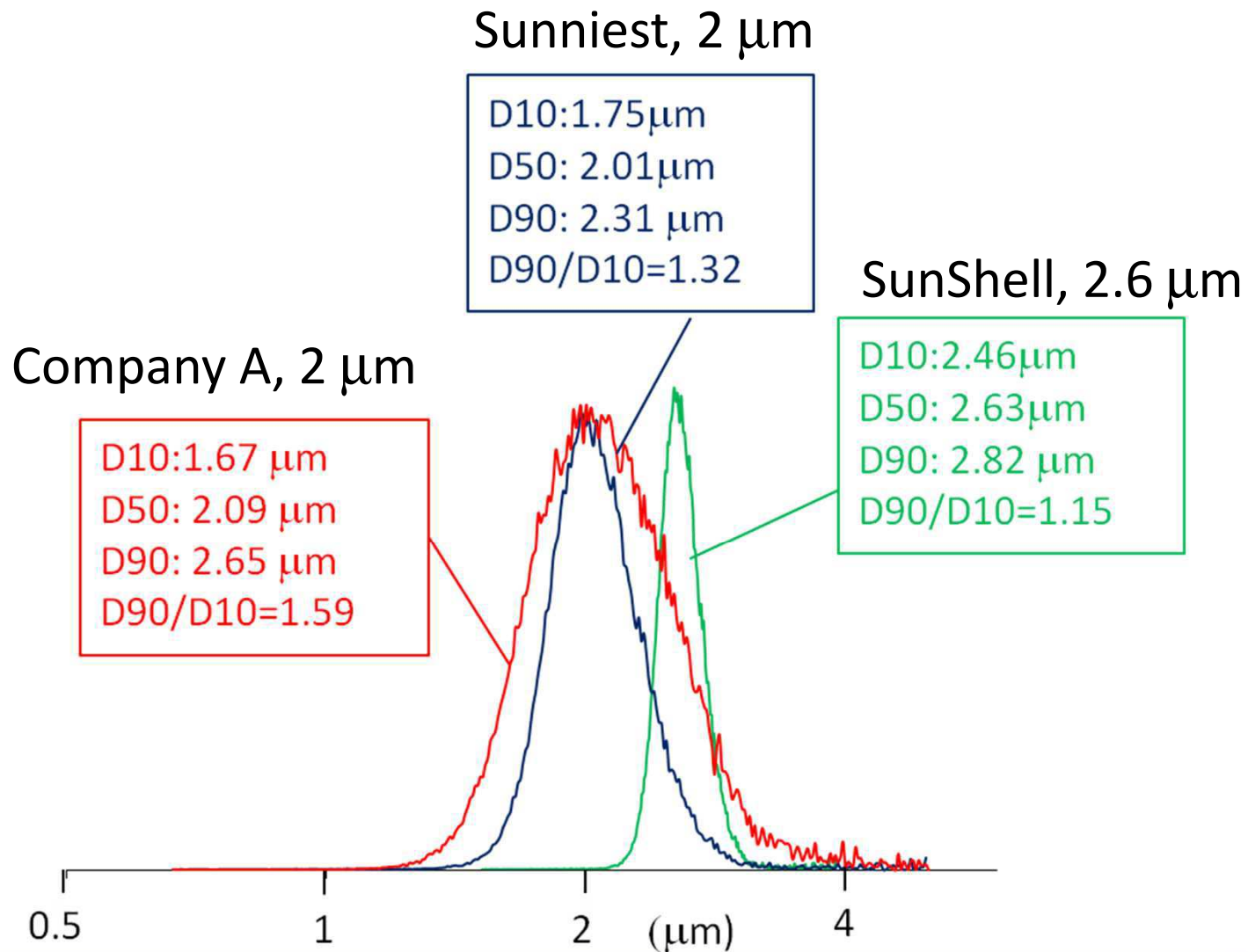


Coulter counter

$$D_{90}/D_{10}=1.12$$

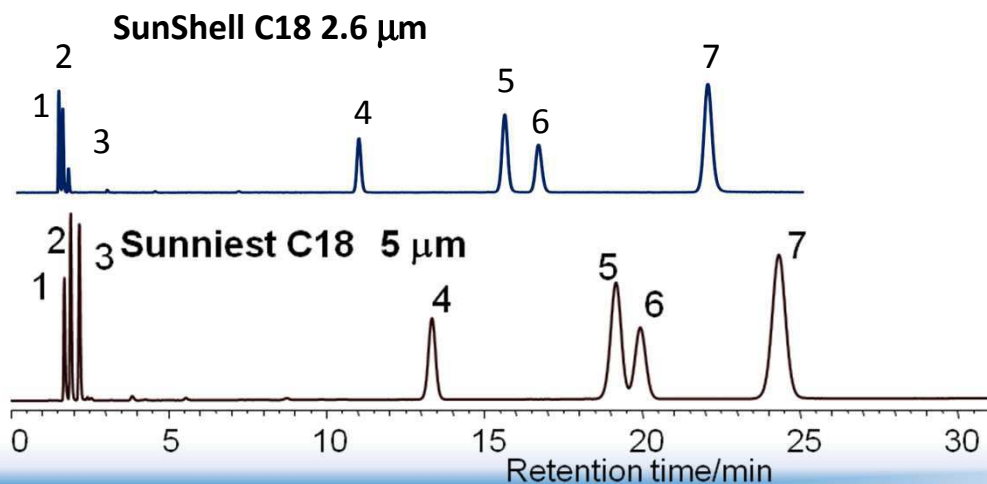


粒度分布の比較



全多孔性シリカとコアシェル型シリカの 標準試料の保持比較

比表面積	全多孔性シリカ Sunniest C18, 5 μm		コアシェル型シリカ SunShell C18, 2.6 μm		コアシェル型シリカ P社 C18, 2.6 μm	
	保持時間(t _R)	保持指数(k)	保持時間(t _R)	保持指数(k)	保持時間(t _R)	保持指数(k)
340 m ² /g			150 m ² /g		Effective 200 m ² /g	
1) ウラシル	1.70	0	1.34	0	1.36	0
2) カフェイン	1.90	0.12	1.46	0.09	1.49	0.10
3) フェノール	2.17	0.28	1.65	0.23	1.61	0.18
4) ブチルベンゼン	13.35	6.85	10.87	7.11	6.19	3.55
5) o-ターフェニル	19.19	10.29	15.49	10.56	8.15	4.99
6) アミルベンゼン	19.96	10.74	16.56	11.36	8.75	5.43
7) トリフェニレン	24.35	13.32	21.95	15.38	9.44	5.94



移動相: Methanol/water(75:25)

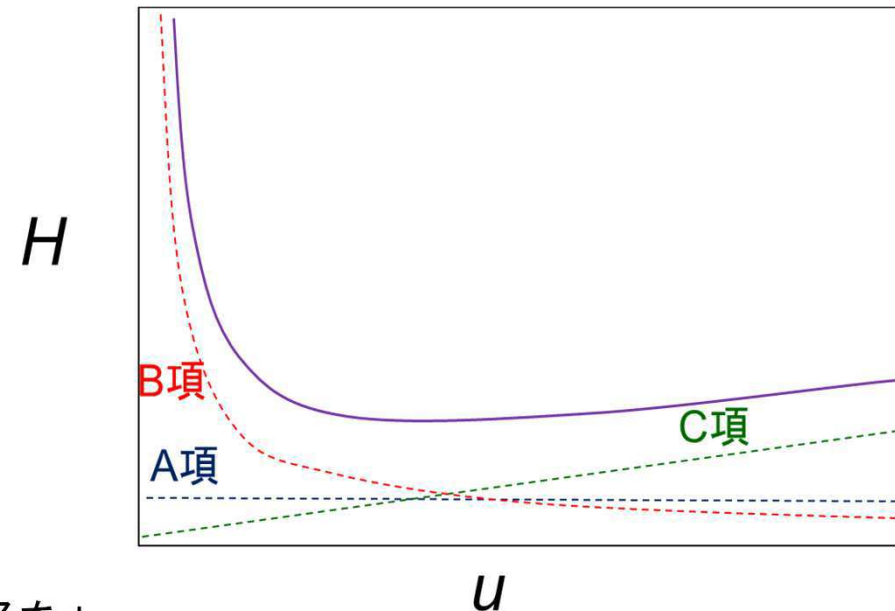
温度: 40°C

カラム: 150 x 4.6 mm

流速: 1.0 mL/min

Van Deemterの式

$$H = A d_p + B \frac{D_m}{u} + C \frac{d_p^2}{D_m} u$$



A項 : 多流路拡散、渦巻き拡散 : 粒径を d_p

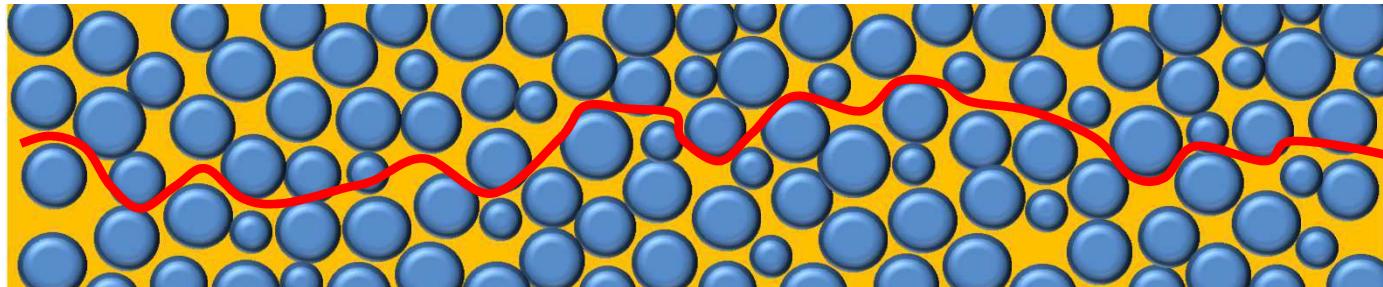
B項 : カラム軸方向への拡散、アナライトの移動相中の拡散係数を D_m

C項 : 物質移動の項 : 固定相-移動相での物質移動、粒子内での
拡散による物質移動に依存

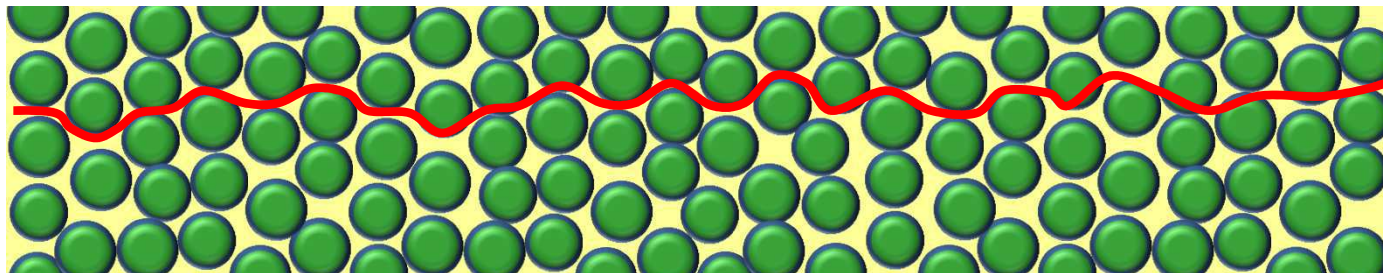
1. F. D. Antia and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 1-15.

多流路拡散・渦巻き拡散が小さくなる

粒度分布の広い充填剤（一般的な全多孔性シリカ, 粒子間空隙率:35%~40%）

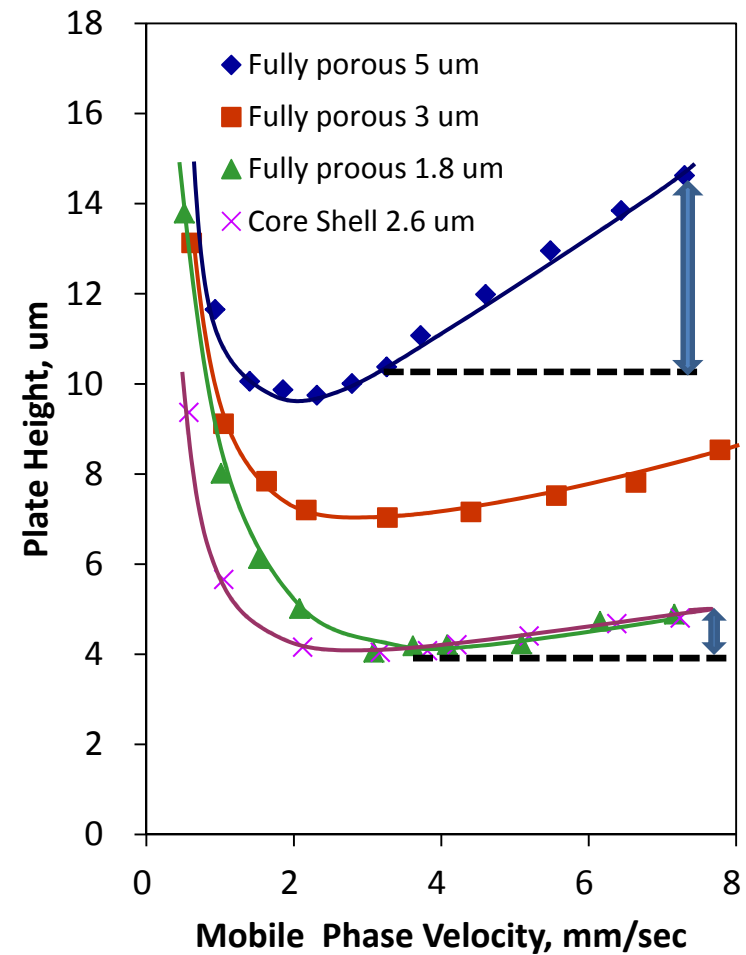
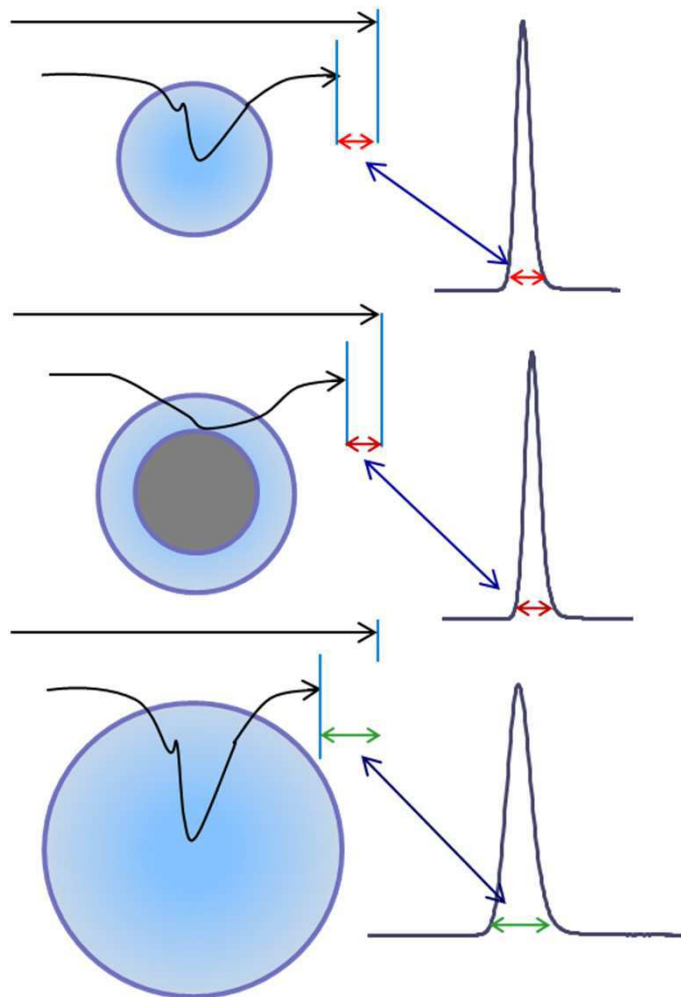


粒度分布の狭充填剤（コアシェルシリカ, 粒子間空隙率:30%~35%）

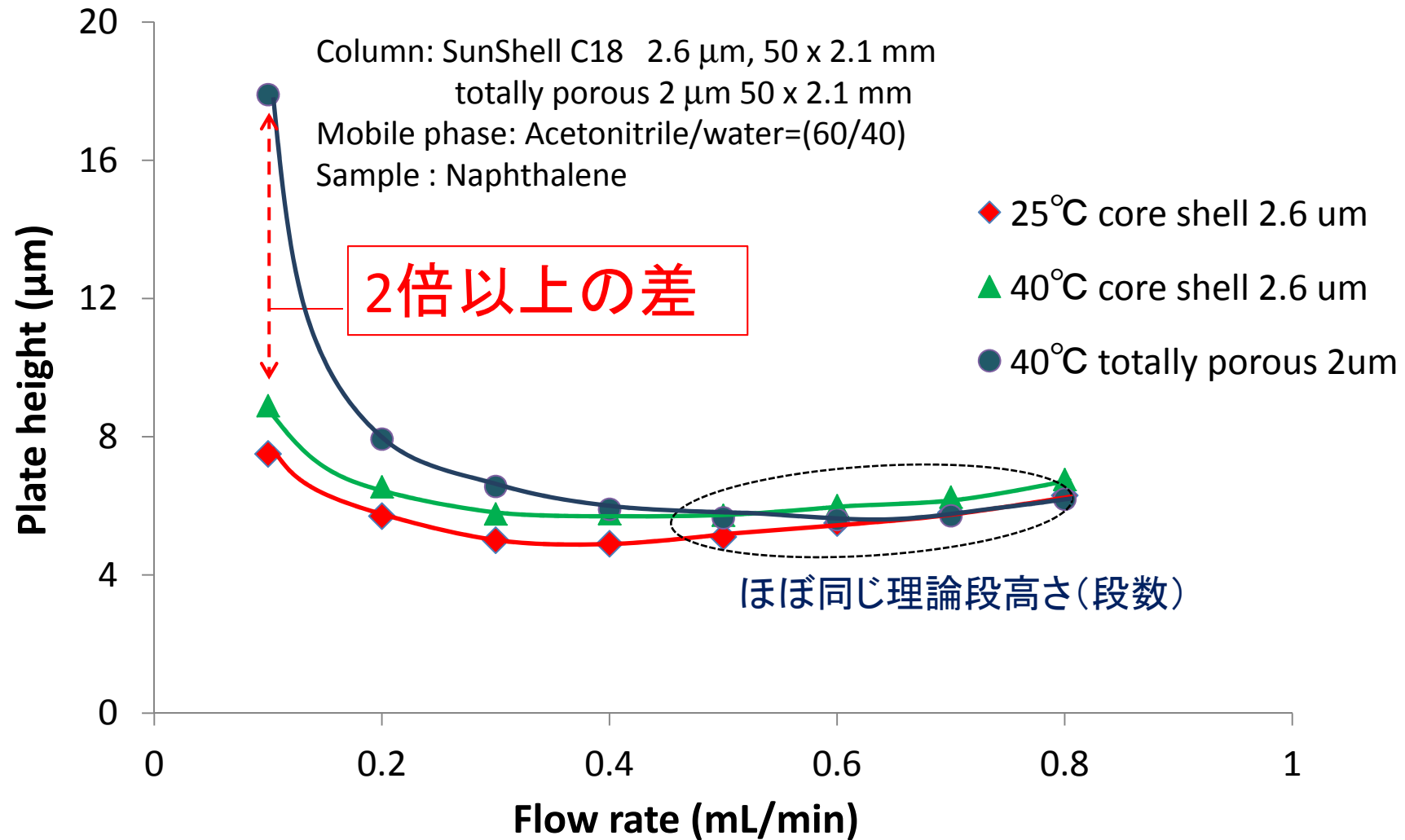


多流路拡散、渦巻き拡散が小さくなる → Ad_p のAが小さくなる

『拡散による物質移動（の遅れ）』はC項 に関係している



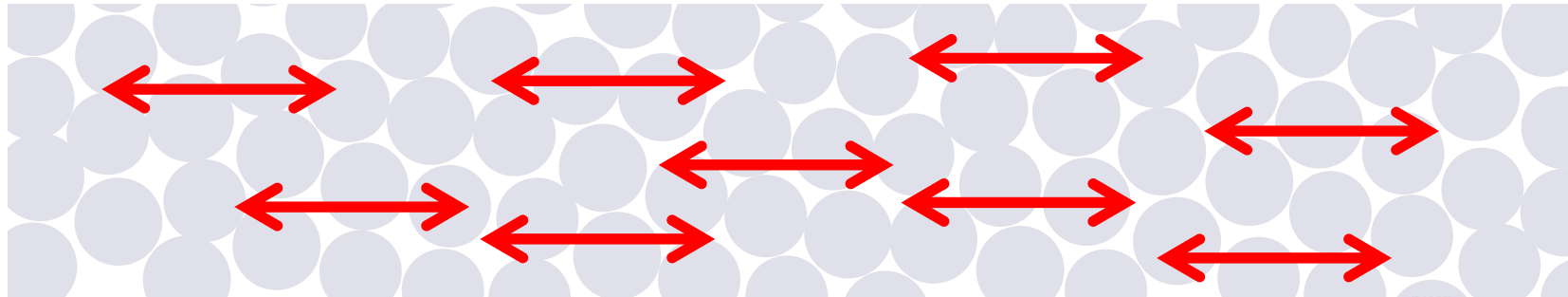
低流速時の理論段高さ



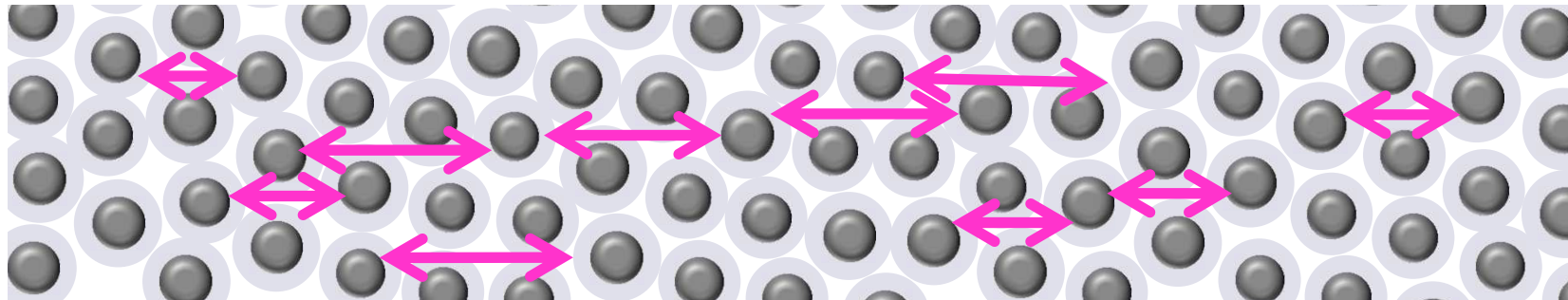
カラム軸方向への拡散

全多孔性充填剤

溶質は細孔内も粒子外と同様に拡散する



コアシェルシリカ



細孔のないコアの存在により、
カラム軸方向の拡散が阻害される



B項が小さくなる

コアシェル構造の利点

Van Deemter の式のA項, B項およびC項が小さくなる

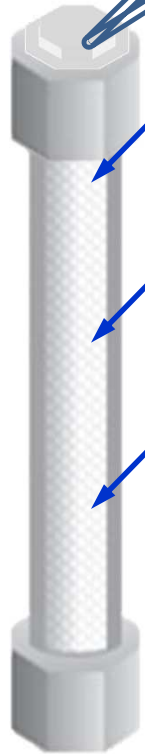
非常に狭い粒度分布の核(フューズドシリカ)が入手できるため, コアシェル粒子は粒度分布が狭く, 密な充填が比較的簡単にできる。この密な充填がA項を小さくする

コアが溶質の拡散を妨害し, 溶質のカラム軸方向への拡散が抑えられるため, B項が小さくなる

多孔質層が薄く, 多孔質内での溶質の拡散距離(移動距離)が短くなるため, C項が小さくなる

コアシェルカラムをHPLCで効率よく 使うために

全多孔性シリカカラムと比較して

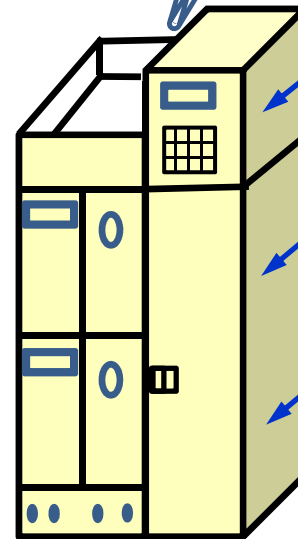


カラム内拡散が小さい

物質移動速度が速い

表面積が20%小さい

HPLCでの使用に必要なこと



応答速度の高速化

低拡散化

低試料負荷

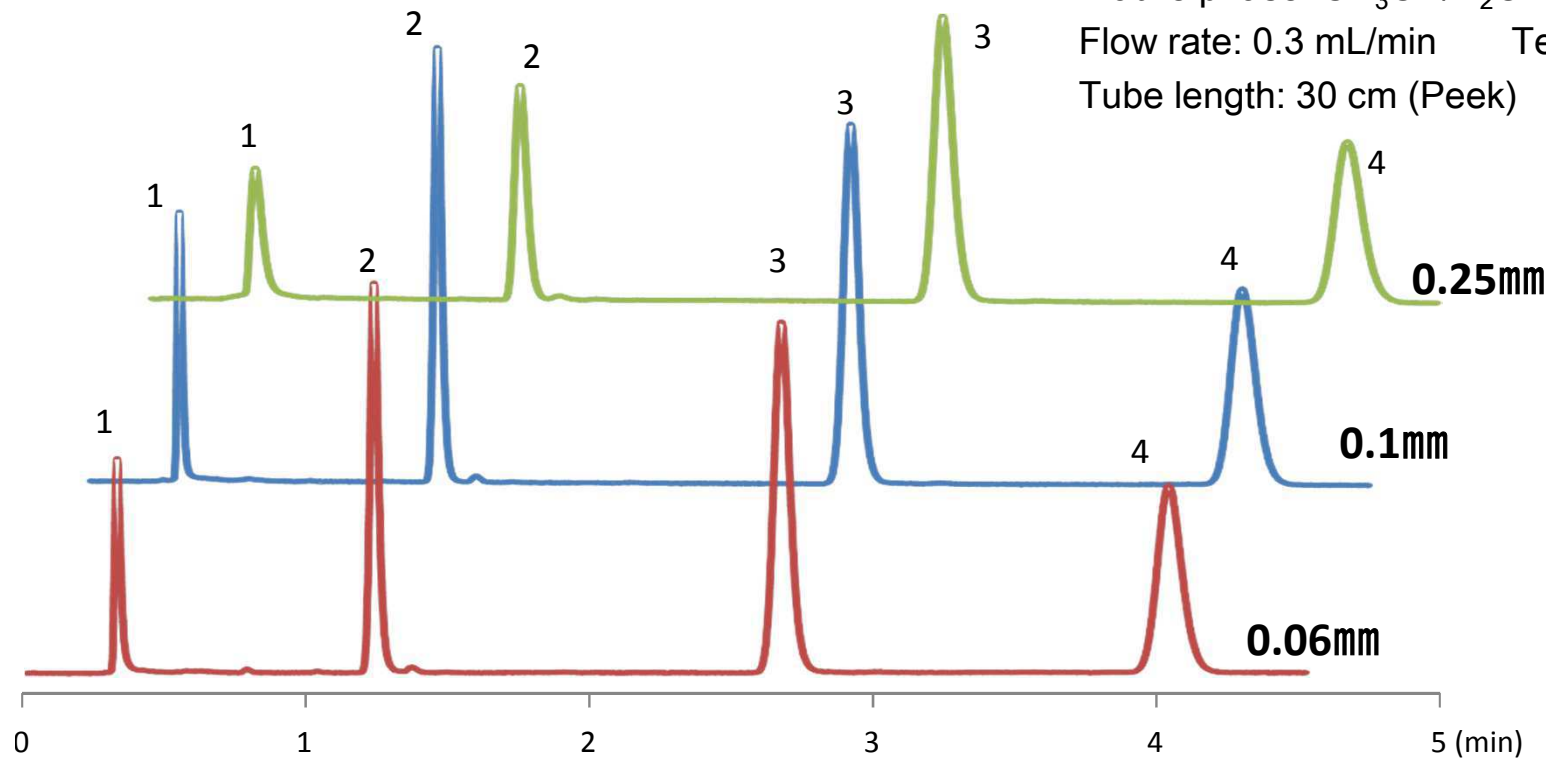
カラムー検出器間における配管の影響

Column: SunShell C18, 2.6 μ m 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

Flow rate: 0.3 mL/min Temperature: ambient

Tube length: 30 cm (Peek)



理論段数の平均値
(n=3)

	0.06mm	0.1mm	0.25mm
理論段数(1)	792	785	246
理論段数(2)	7790	7652	3535
理論段数(3)	10704	10345	7998
理論段数(4)	10113	9772	7689

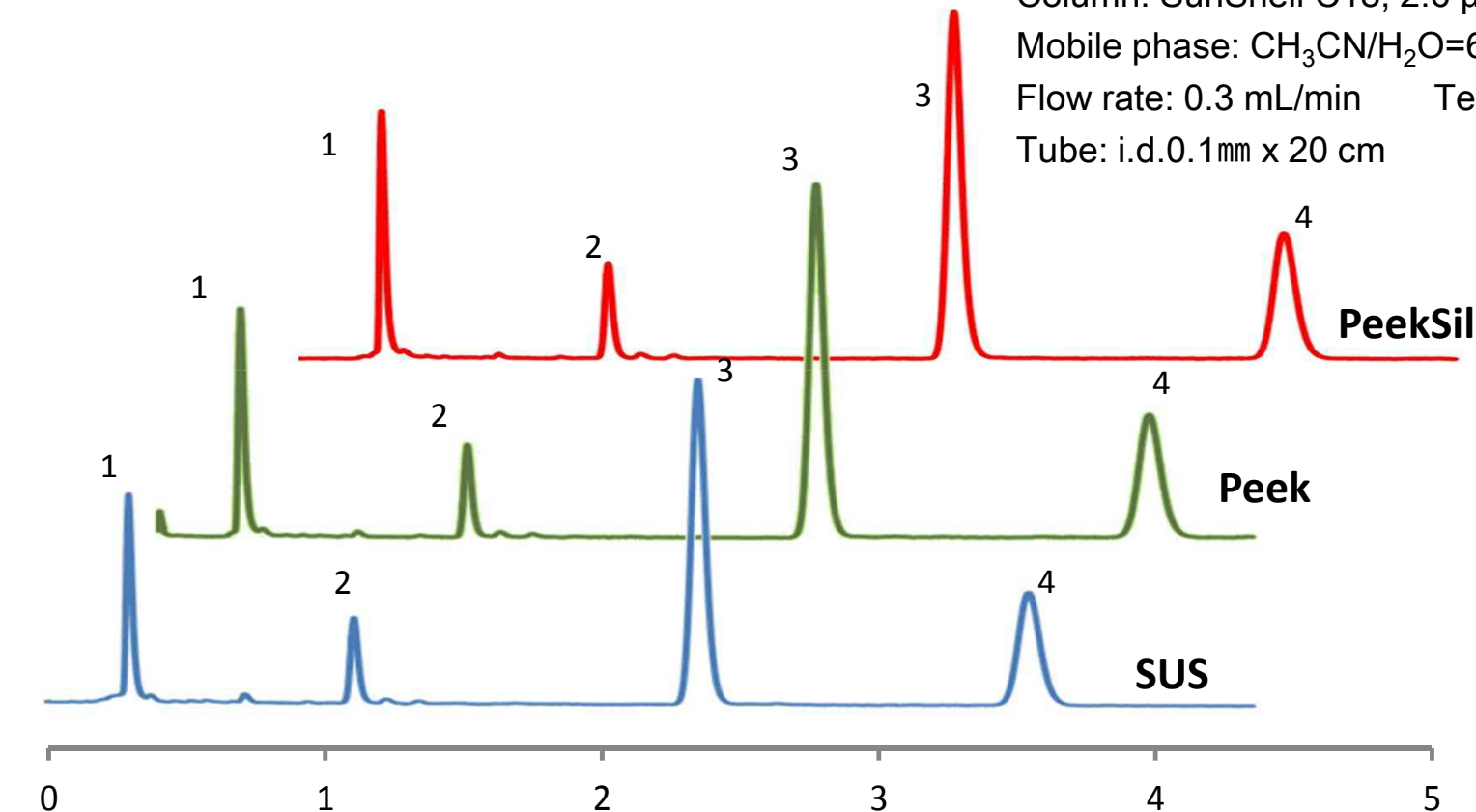
カラムー検出器間における配管の影響2

Column: SunShell C18, 2.6 μ m 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

Flow rate: 0.3 mL/min Temperature: ambient

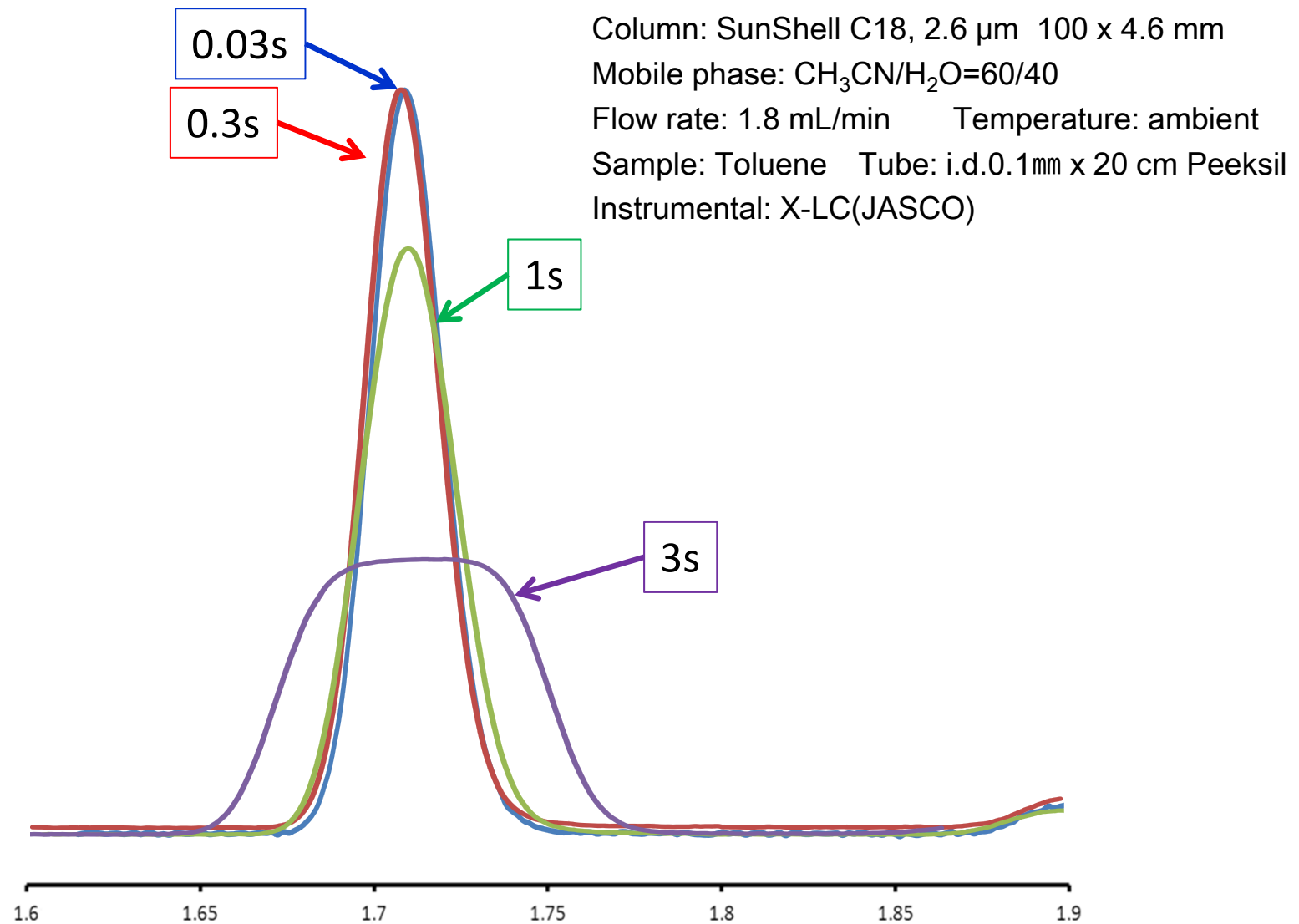
Tube: i.d.0.1mm x 20 cm



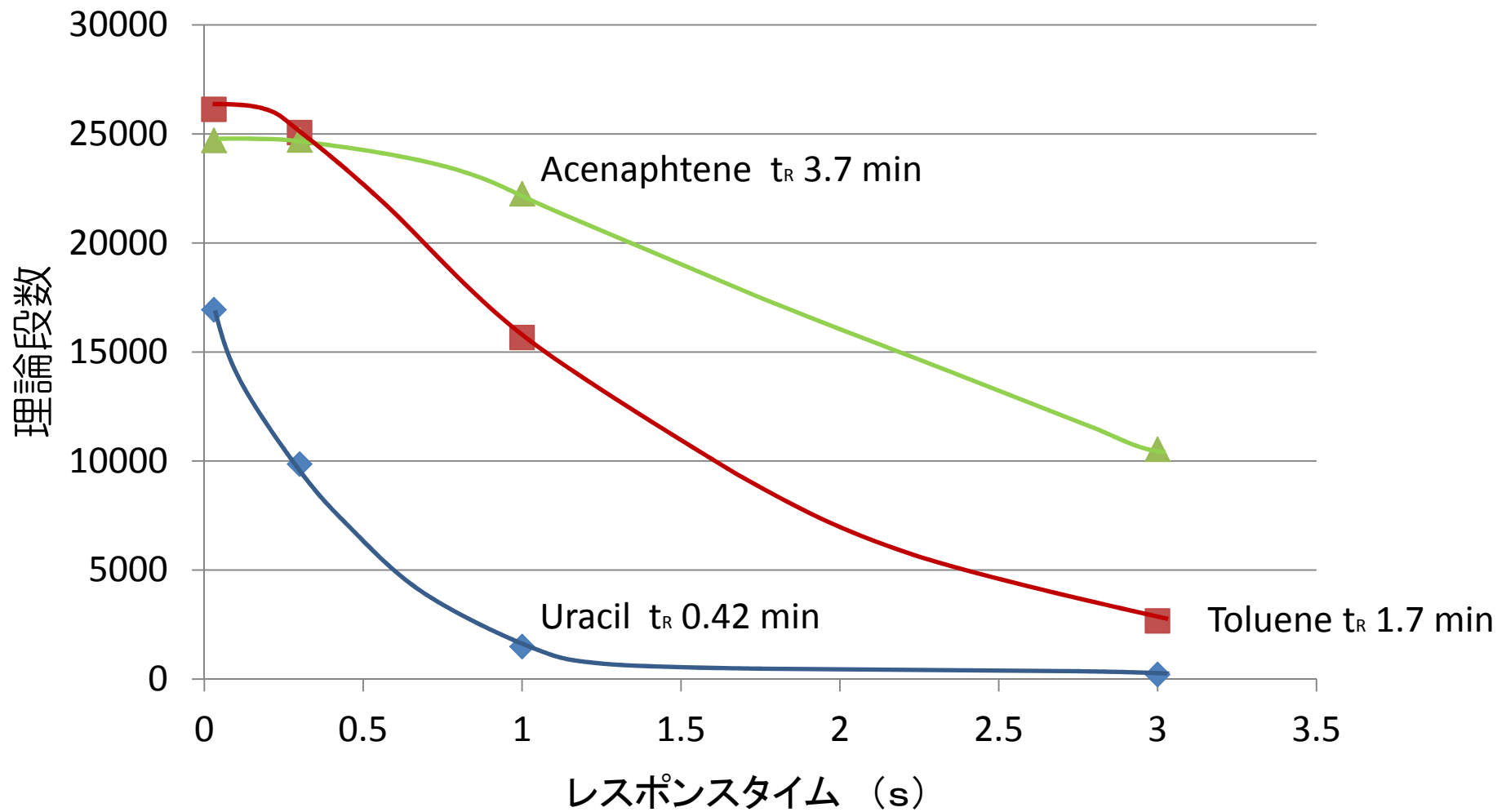
理論段数の平均値
(n=3)

	SUS	Peek	PeekSil
理論段数(1)	769	780	855
理論段数(2)	6572	6654	6985
理論段数(3)	9520	9406	9488
理論段数(4)	9348	9163	9227

検出器レスポンスタイムの影響

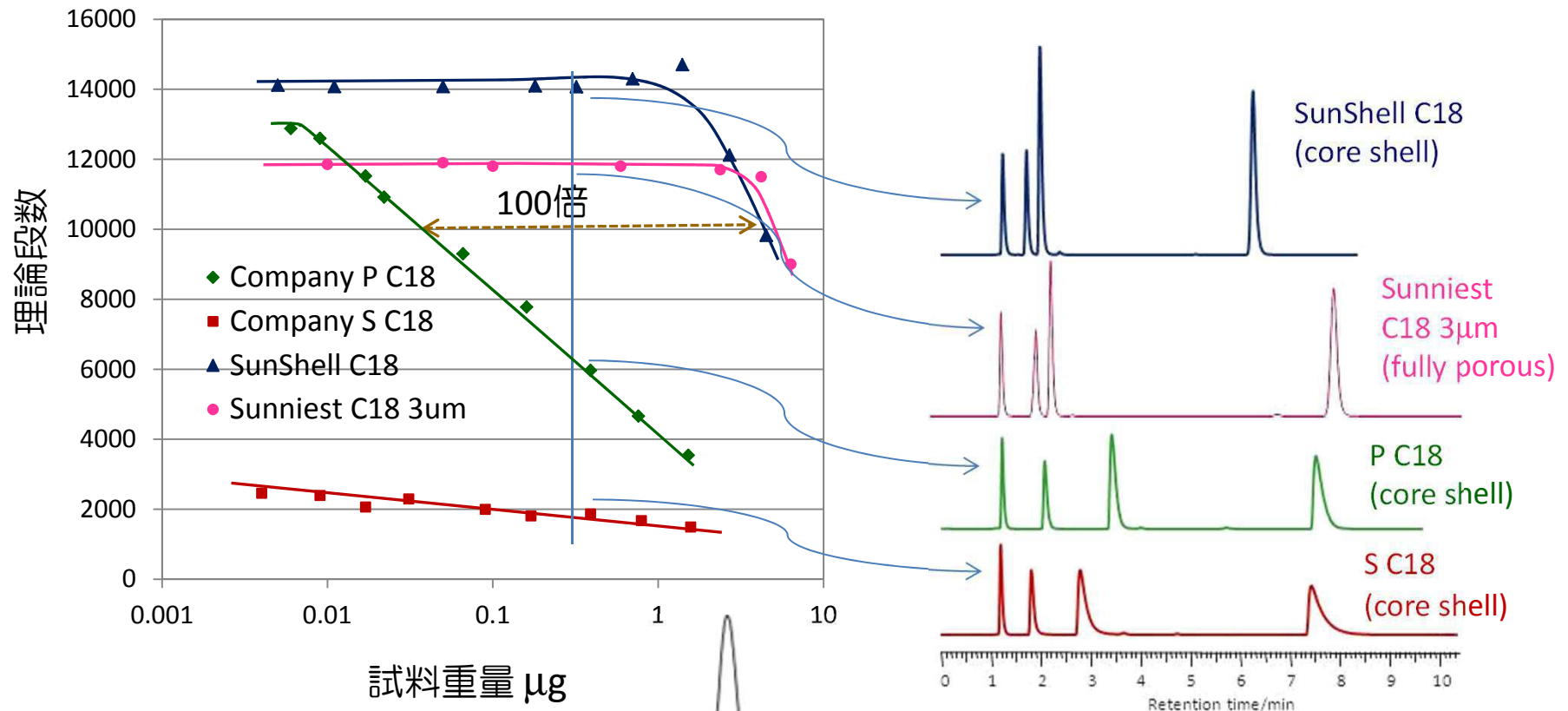


検出器レスポンスタイムの影響

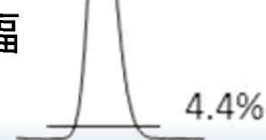


アミトリプチリンの負荷量の比較

移動相: アセトニトリル/20mMリン酸緩衝液pH7.0=(60:40)
カラムサイズ: 150 x 4.6 mm, 流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C

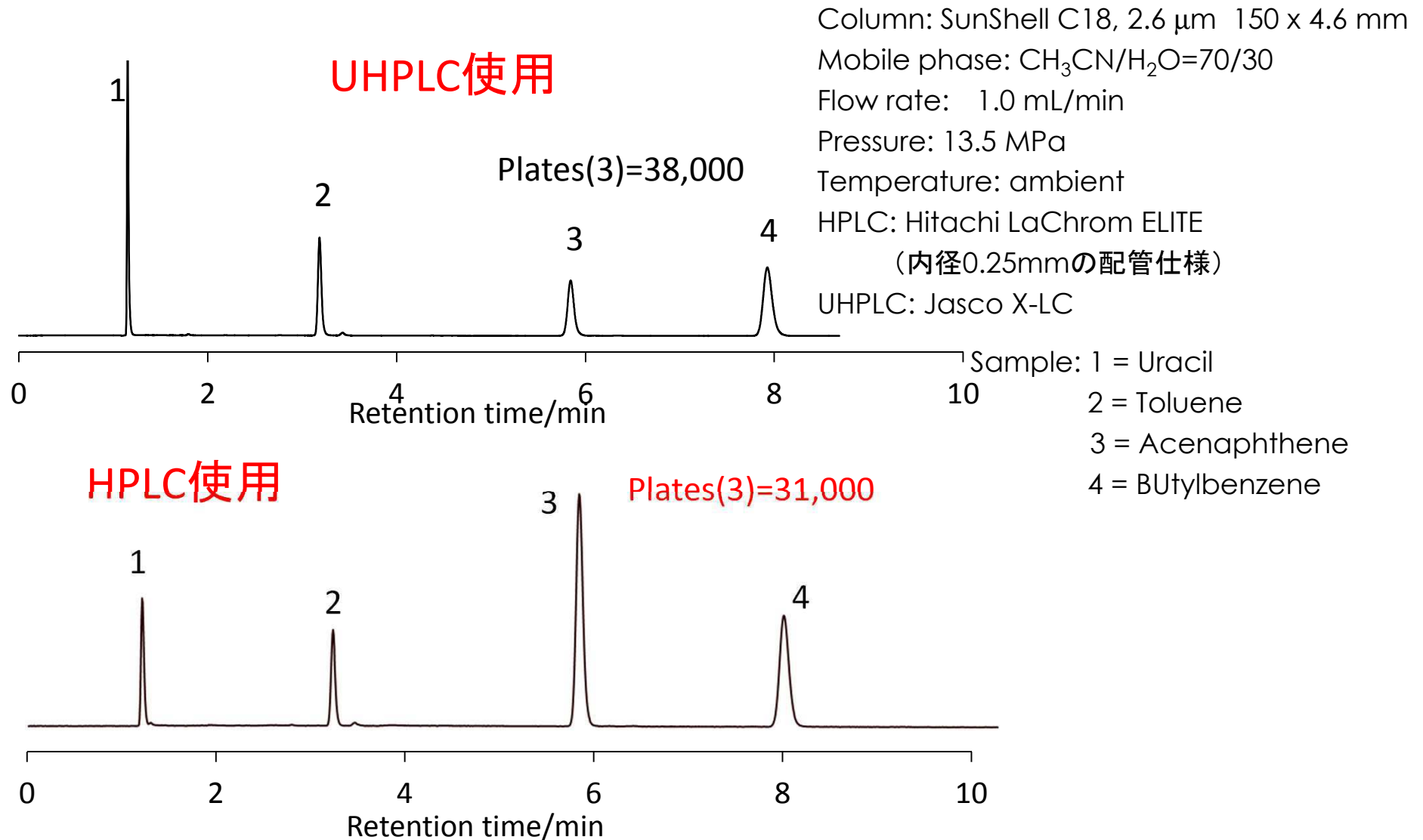


ピークの4.4%の高さの位置でのピーク幅で理論段数を計算 (5 σ 法)



試料: 1 = ウラシル, 2 = プロプラノロール,
3 = ノルトリプチリン, 4 = アミトリプチリン

コアシエルC18の標準試料の分離例 UHPLCとHPLCの比較



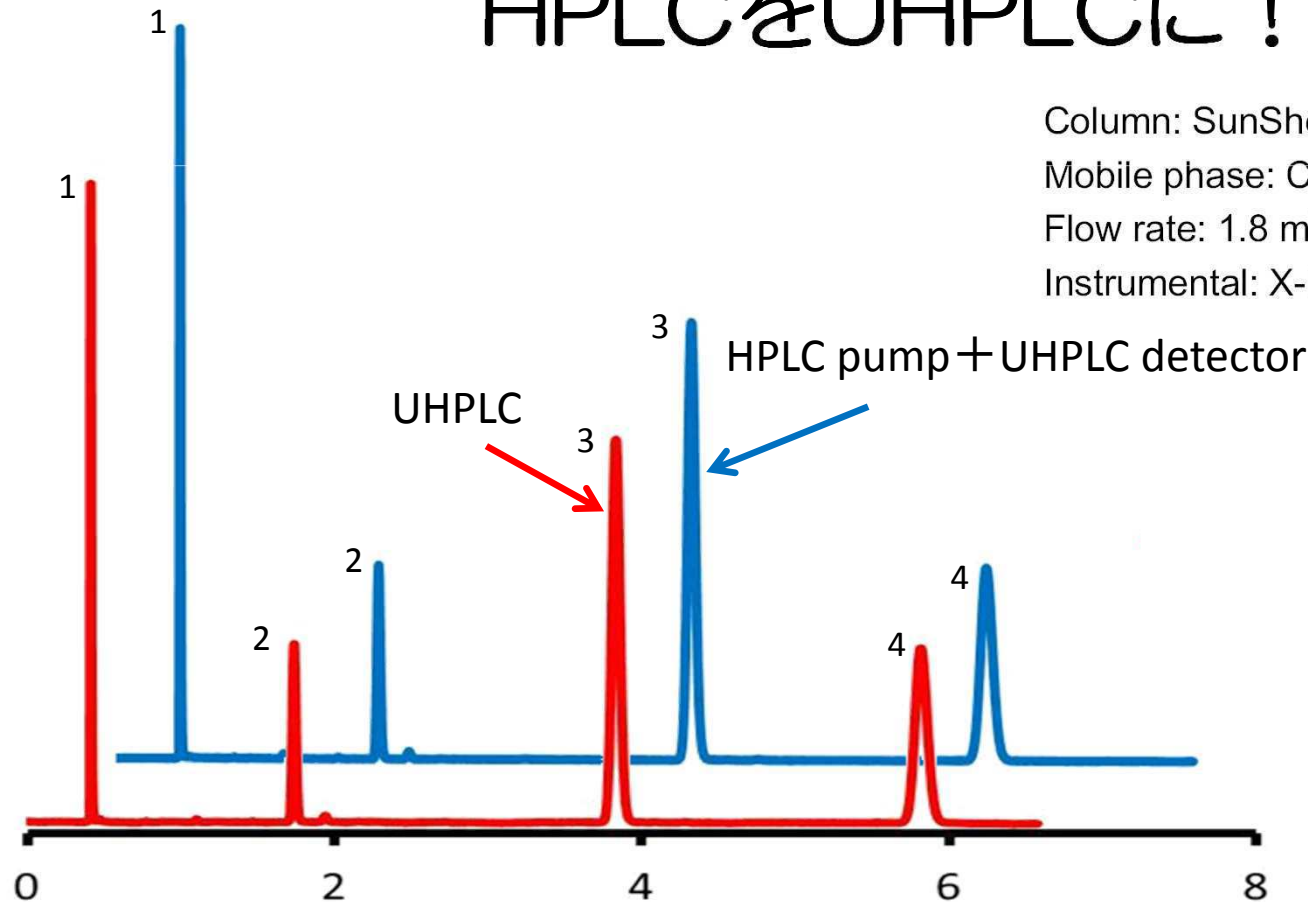
HPLCをUHPLCに！？

Column: SunShell C18, 2.6 μm 100 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

Flow rate: 1.8 mL/min Temperature: ambient

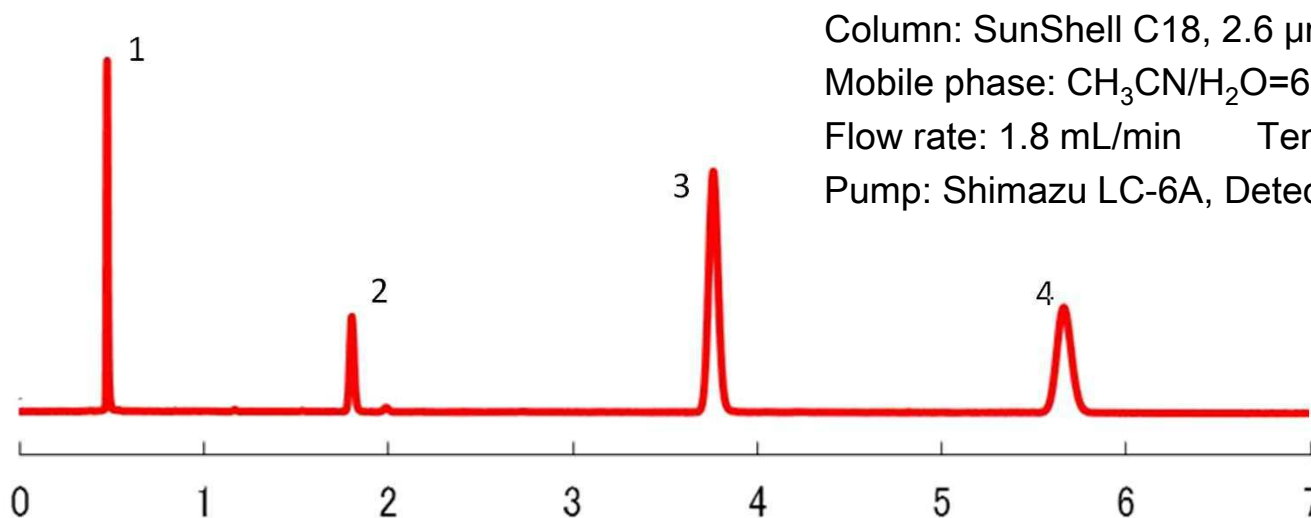
Instrumental: X-LC, LC2000Plus (JASCO)



	HPLC	UHPLC
理論段数(1)	16835	16900
理論段数(2)	26013	26107
理論段数(3)	24548	24505
理論段数(4)	22823	22791



旧式HPLCポンプ+UHPLC検出器



Column: SunShell C18, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

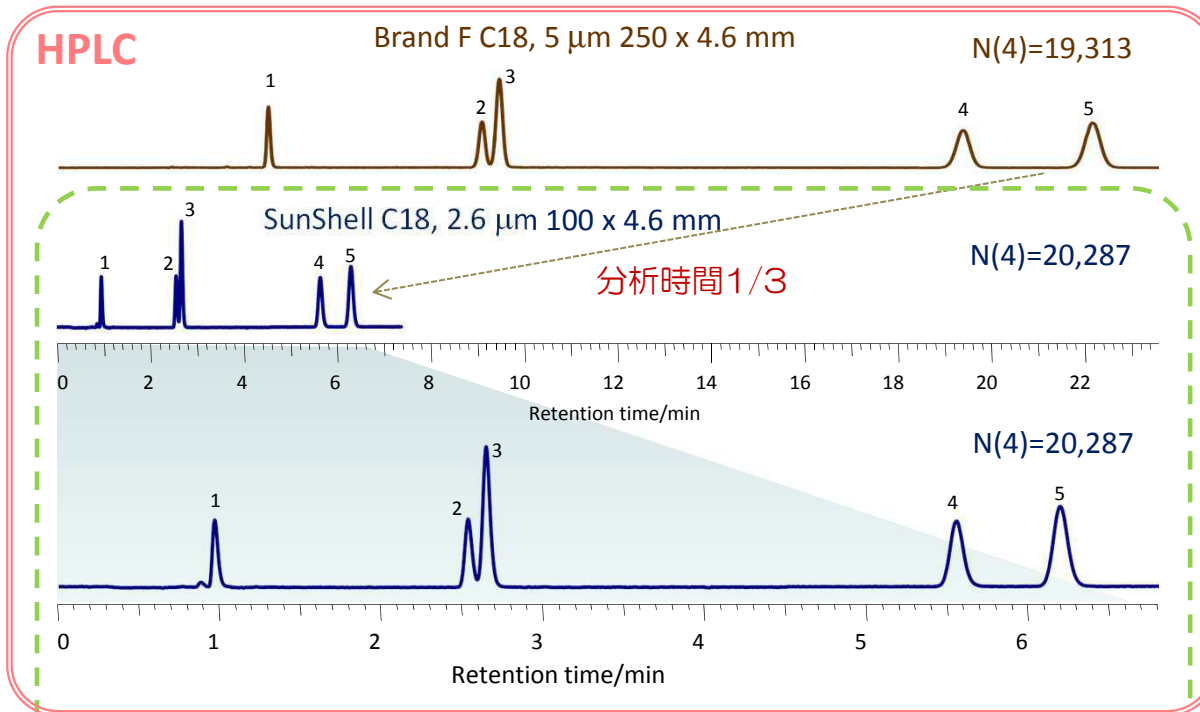
Flow rate: 1.8 mL/min Temperature: ambient

Pump: Shimadzu LC-6A, Detector: X-LC3075UV

	理論段数(1)	理論段数(2)	理論段数(3)	理論段数(4)
HPLC	16944	25727	24933	23211



イソクラティック溶離例 5 μ m C18からの移行



Column:

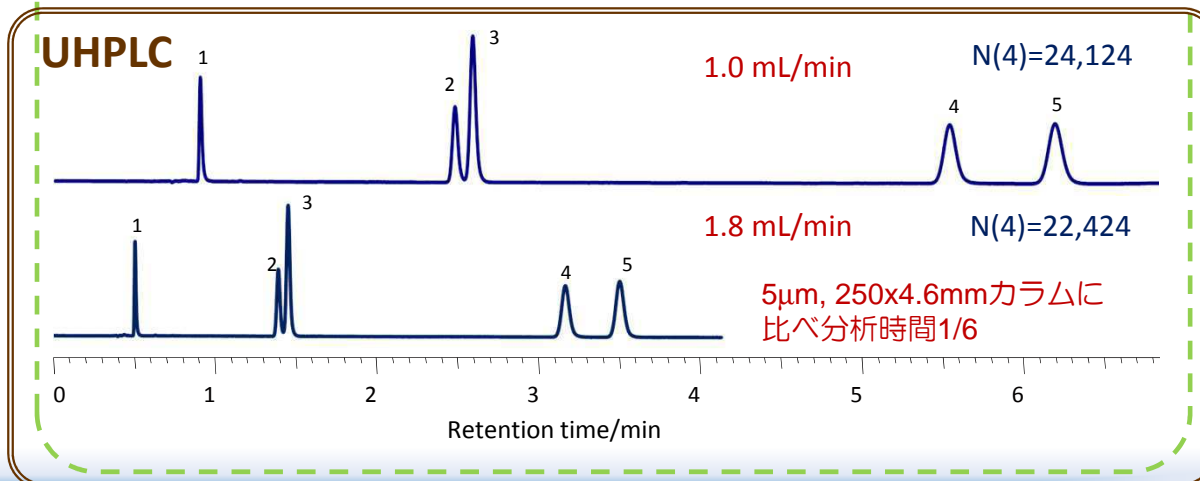
Brand F C18, 5 μ m 250 x 4.6 mm
SunShell C18, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm

Mobile phase:

CH₃CN/20mM Phosphoric acid = 45/55
Flow rate: 1.0 mL/min,
1.8 mL/min at the lowest chromatogram
Temperature: 25 °C

Pressure: 9.5 MPa for Brand F C18 5 μ m
13.4 MPa for SunShell C18 2.6 μ m
Detection: UV@230 nm

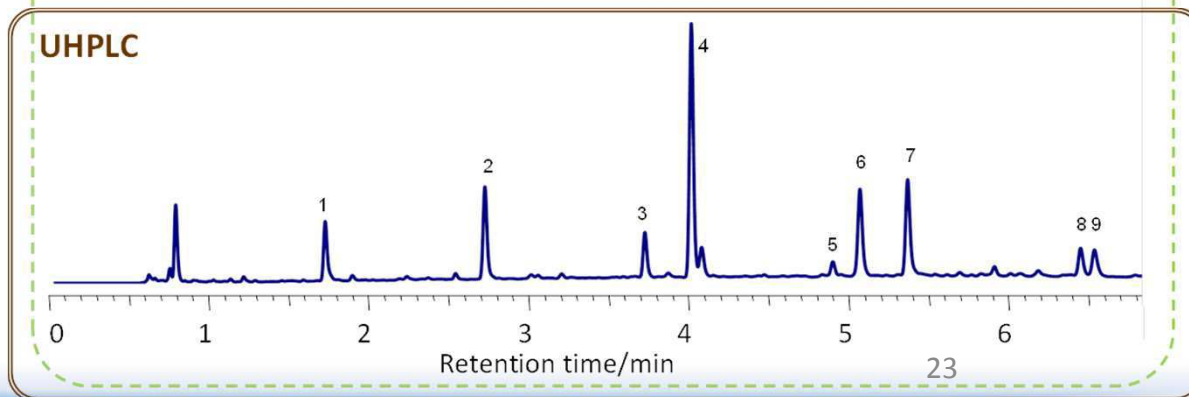
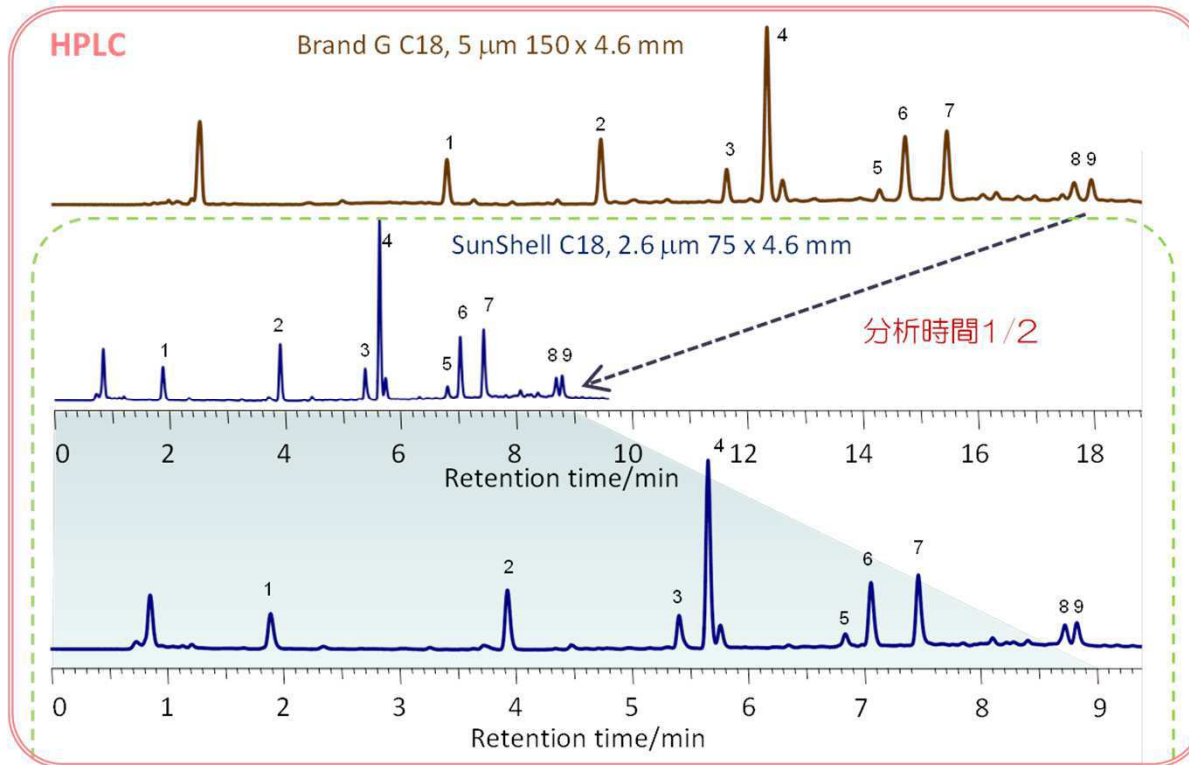
Sample: 1 = Benzydamine
2 = Ketoprofen
3 = Naproxen
4 = Indomethacin
5 = Ibuprofen



HPLC: Hitachi LaChrom ELITE
(内径0.25mmの配管仕様)

UHPLC: Jasco X-LC

グラジエント溶離例 5 μ m C18からの移行



Column:

Brand G C18, 5 μ m 150 x 4.6 mm
SunShell C18, 2.6 μ m 75 x 4.6 mm

Mobile phase:

A) 0.1% Phosphoric acid
B) CH₃CN

Gradient program for Brand G C18

Time	0 min	15 min	20 min
%B	2%	25%	25%

for SunShell C18

Time	0 min	7.5 min	10 min
%B	2%	25%	25%

Flow rate: 1.0 mL/min,

Temperature: 25 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: Oolong tea

1 = Gallic acid, 2 = Epigallocatechin, 3 = Catechin, 4 = Caffeine, 5 = Epicatechin, 6 = Epigallocatechin gallate, 7 = Gallic acid, 8 = Epicatechin gallate, 9 = Catechin gallate

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(内径0.25mmの配管仕様)

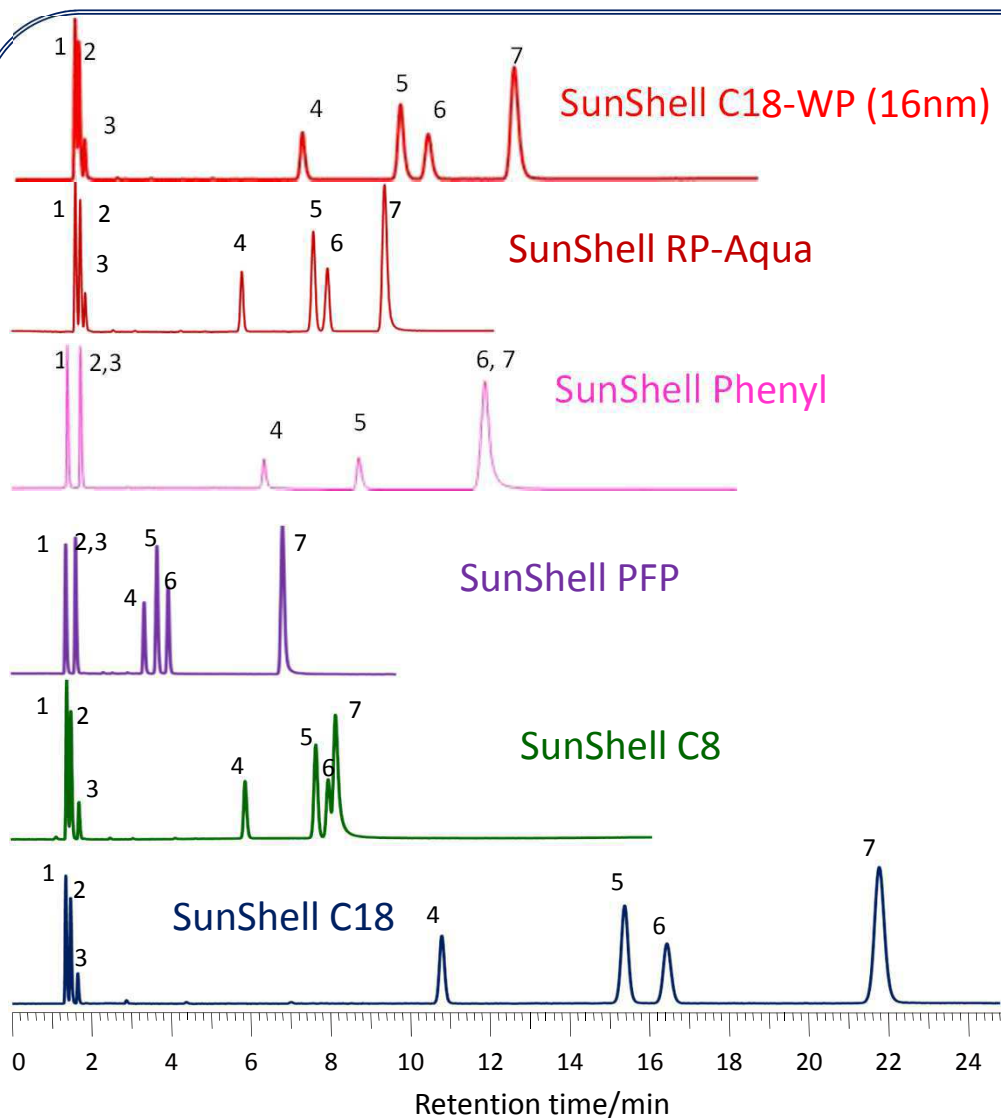
UHPLC: Jasco X-LC

23

まとめ

- コアシェル粒子は、全多孔性シリカ粒子と化学的な特徴は同じである
- コアシェルカラムは、カラム内拡散が小さく、物質移動が速いため高理論段数が得られる
- HPLCでコアシェルカラムを用いる場合、配管、検出器のレスポンスタイム、試料負荷量に注意が必要である
- HPLCポンプにUHPLC検出器を組み合わせて使用した場合、UHPLCと同等の結果が得られる

標準試料の分離比較



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

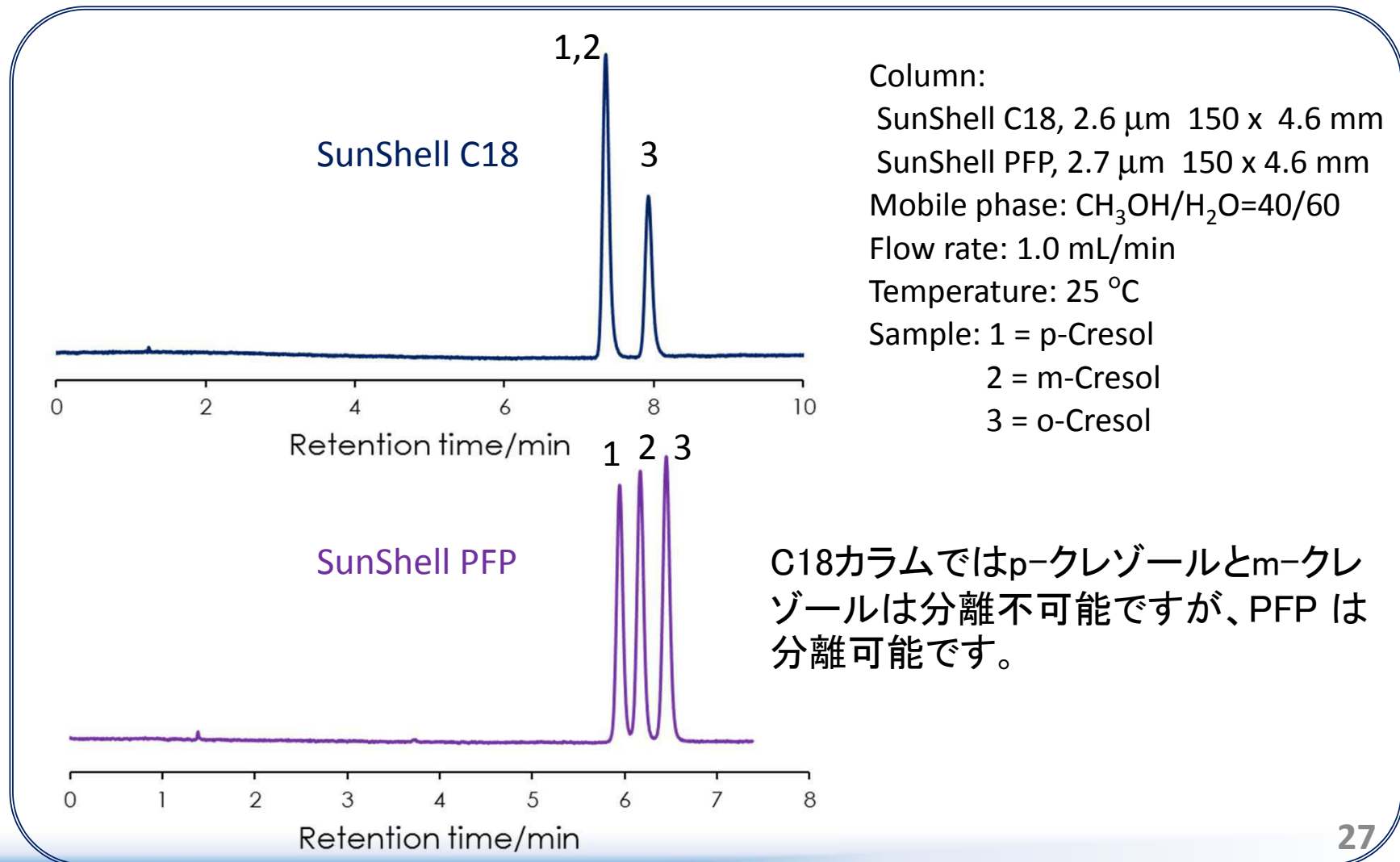
	Hydrogen bonding (Caffeine/ Phenol)	Hydrophobicity (Amylbenzene/ Butylbenzene)	Steric selectivity (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C18-WP	0.40	1.55	1.35
RP-Aqua	0.52	1.52	1.30
Phenyl	1.00	1.48	1.01
PFP	1.00	1.31	2.38
C8	0.32	1.46	1.08
C18	0.39	1.60	1.46

コアシェル型充填剤SunShell

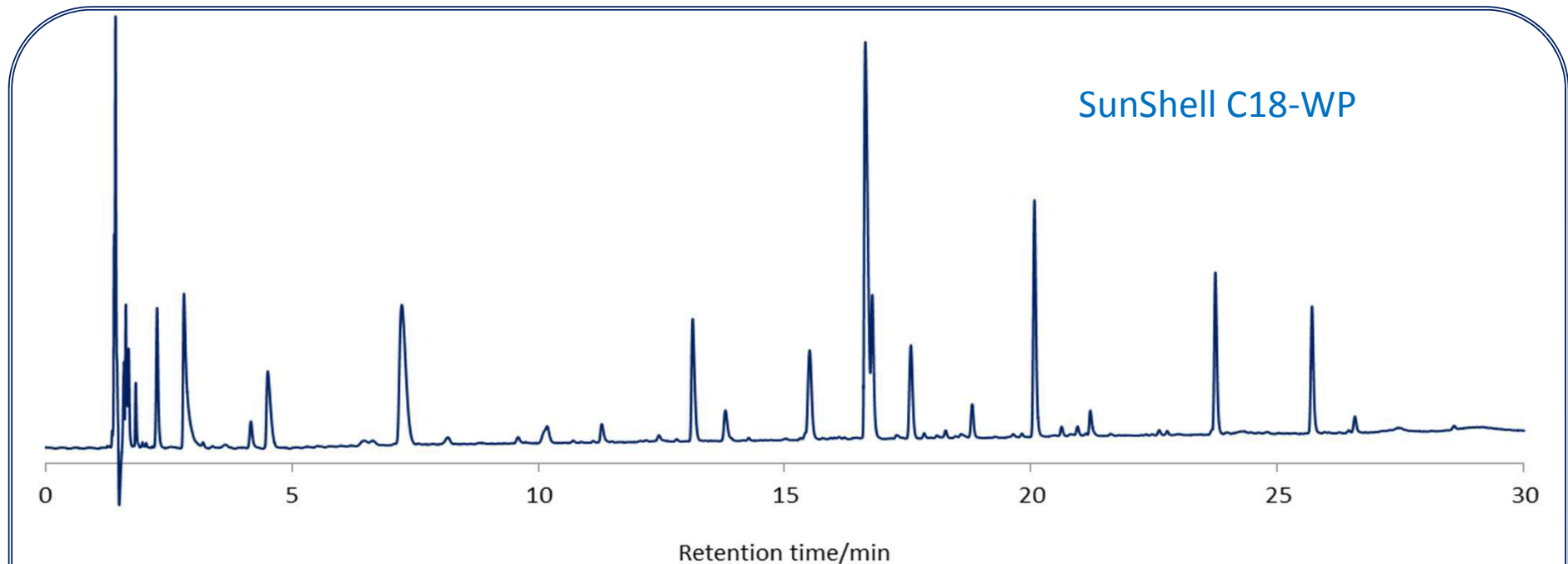
	コアシェルシリカ			結合相			
	粒子径 (μm)	細孔径 (nm)	比表面積 (m^2/g)	炭素含有量 (%)	結合相	使用最高圧	使用pH 範囲
SunShell C18	2.6	9	150	7	C18	60 MPa or 8,570 psi	1.5 - 10
SunShell C8	2.6	9	150	4.5	C8	60 MPa or 8,570 psi	1.5 - 9
SunShell PFP	2.6	9	150	4.5	Pentafluorophenyl	60 MPa or 8,570 psi	2 - 8
SunShell Phenyl	2.6	9	150	5	Phenylhexyl	60 MPa or 8,570 psi	1.5 - 9
SunShell RP-Aqua	2.6	16	90	4	C28	60 MPa or 8,570 psi	2 - 8 ^{a)}
SunShell C18-WP	2.6	16	90	5	C18	60 MPa or 8,570 psi	1.5 - 10

a) SunShell RP-Aquaカラムは水移動相で使用できるため、有機溶媒を含まない緩衝液での使用pH範囲を示す。

クレゾールの異性体の分離



SunShell C18-WPによるペプチドの分離



Column: SunShell C18-WP, 2.6 μm (16 nm) 150 x 4.6 mm,
SunShell RP-Aqua, 2.6 μm (16 nm) 150 x 4.6 mm

Mobile phase: A) 0.1% TFA in Acetonitrile/water(10:90)

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

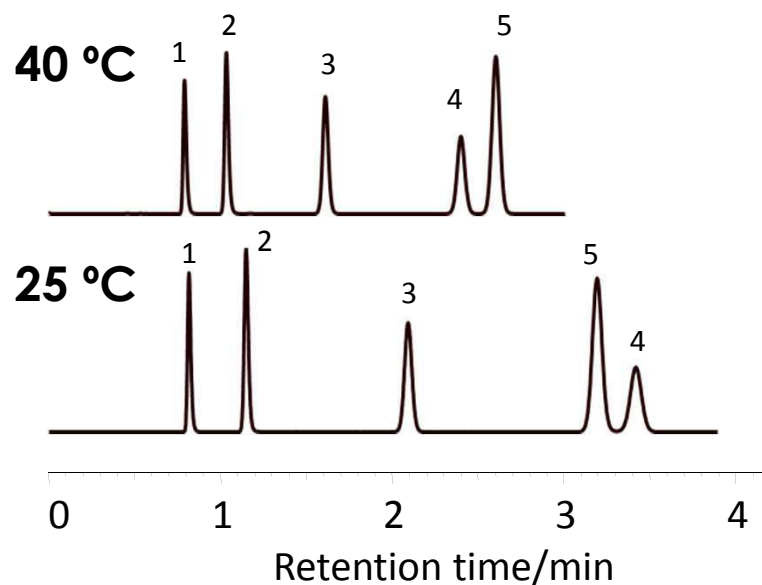
Gradient program:

Time	0 min	5 min	40 min
%B	5%	5%	50%

Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25 °C, Detection: UV@210 nm,
Sample: Tryptic digest of cytochrome C

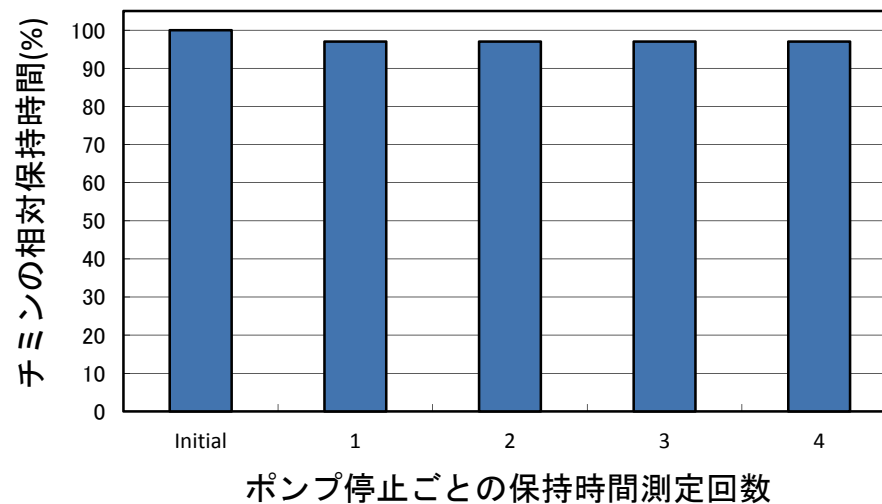
SunShell RP-Aqua の40 °Cでの保持

核酸塩基の分離



Column: SunShell RP-Aqua, 2.6 mm 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。

SunShell RP ガードフィルター

(C18結合カートリッジフィルター)



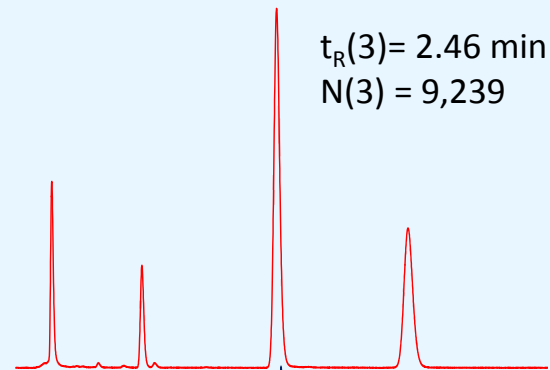
- ☆均一な細孔径を持つモノリス型ガラスフィルター（直径4mm,厚さ4mm）にC18を結合
- ☆夾雑物の捕捉によるカラム圧の上昇防止やC18結合相による吸着物の除去など、種々の逆相カラムのガードカラムとして利用可能
- ☆カートリッジ式で交換が容易
- ☆ホルダーを含めローデッドボリューム仕様（2.1x50mmカラムで5%の段数低下、4.6x150mmカラムで1%の段数低下）
- ☆内径2.1mm~4.6mmカラムに使用可能
- ☆SunShell RP Guard Filterの圧力損失は1 mL/minで約0.1MPa、またGuard Filter 本体の耐圧は60MPa
- ☆SunShell以外の逆相カラムにも汎用的に使用可能
- ☆アミトリプチリンのような塩基性化合物もテーリングのないシャープなピーク形状

SunShell RP Guard Filterの性能評価

SunShell C18, 2.6 μ m 50 x 2.1 mm

SunShell C18, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

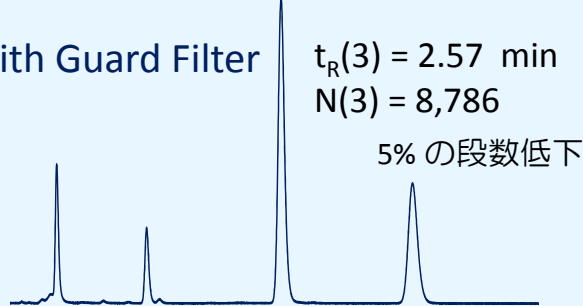
Without Guard Filter



$t_R(3) = 2.46$ min
 $N(3) = 9,239$

Mobile phase:
CH₃CN/H₂O=60/40 for 2.1 mm
CH₃CN/H₂O=70/30 for 4.6 mm
Flow rate:
0.3 mL/min for 2.1 mm
1.8 mL/min for 4.6 mm
Temperature: 25 °C
Detection: UV@250nm

With Guard Filter

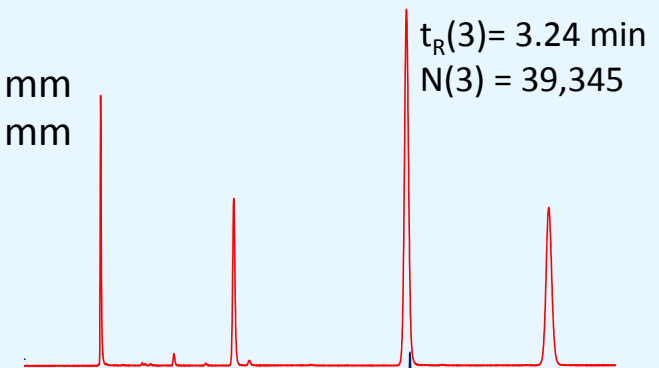


$t_R(3) = 2.57$ min
 $N(3) = 8,786$

5%の段数低下

Retention time/min

Without Guard Filter



$t_R(3) = 3.24$ min
 $N(3) = 39,345$

With Guard Filter



$t_R(3) = 3.26$ min
 $N(3) = 38,940$

ほとんど変化なし

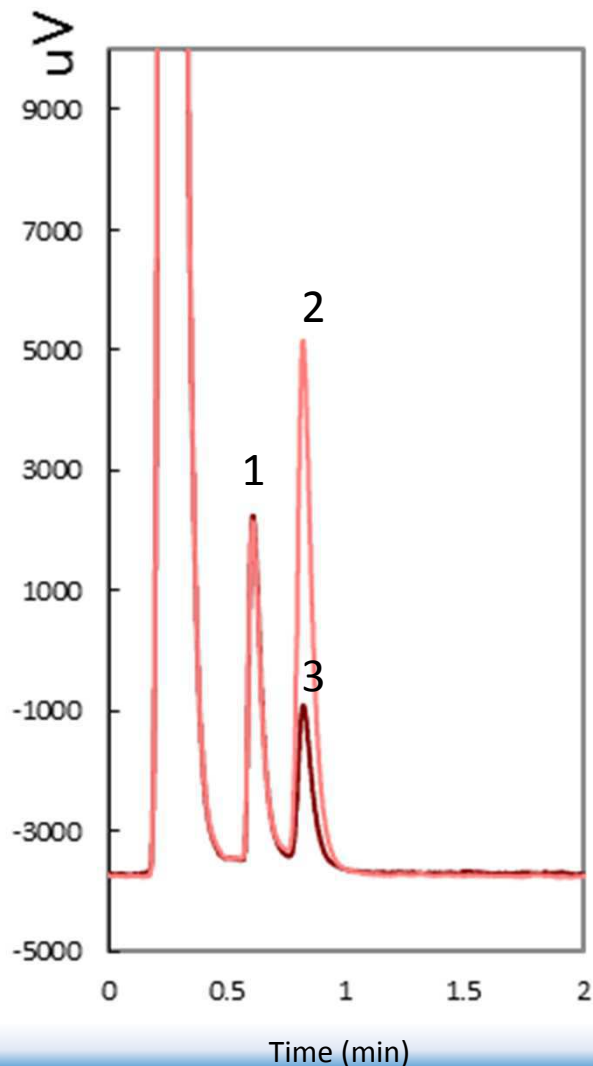
Retention time/min

Sample: 1 = Uracil
2 = Toluene
3 = Acenaphthene
4 = Butylbenzene

SunShell Al 微量アルミニウム測定専用カラム

★13ppbアルミニウム標準品の測定例
オキシンを用いたキレート錯体として測定

1 検体1minで測定完了
従来の5 μ mカラムの1/3に短縮



Column: SunShell Al 2.6 μ m, 4.6 x 30 mm
 Mobile phase: 2-Propanol/buffer (pH7) = 30/70
 Flow rate: 1.5 mL/min
 Column Temperature: 25 °C
 Pressure: 19.3 MPa
 Fluorescence detection: EX= 370 nm, Em= 504 nm
 Injection volume: 20 μ L
 Instrument: HPLC with 0.13 mm i.d. tubing from injector to detector.

1: Oxine peak
 2: 13ppb Aluminum standard solution
 3: Blank (pure water)
 Resolution of peak number 1 and 2: 2.00

This aluminum measurement is based on "Pharmaceutical Regulatory Science 35, 565-580 (2004)".