

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

コアシェルカラムの基礎講座  
これからコアシェルカラムを  
試してみたい方へ 必見！！



クロマニックテクノロジーズ

塚本友康 長江徳和

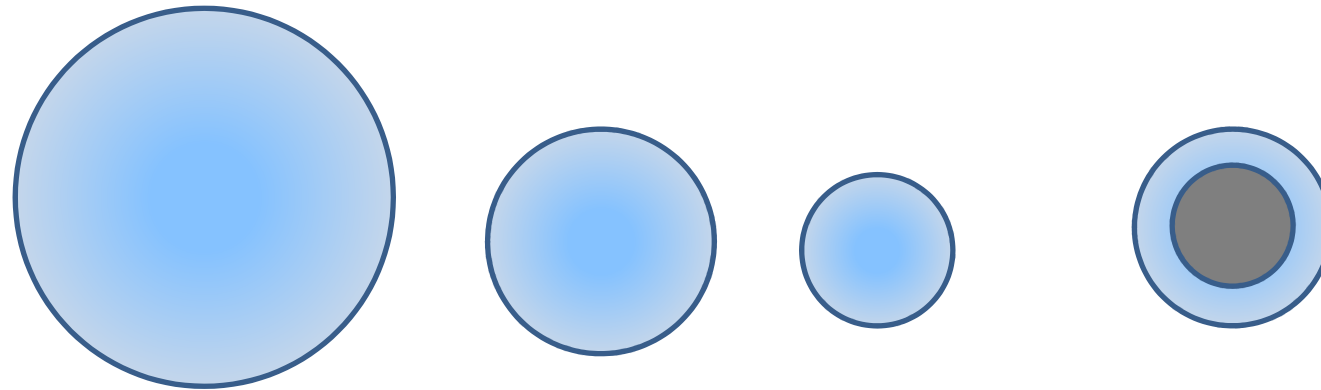
<http://chromanik.co.jp>

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

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



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

?

# コアシェル型シリカの歴史

1969年カークランドにより発表されたHPLCで使用されていた充填剤 - 直径 $30\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.5\mu\text{m}$ の多孔質層

2000年にカークランドらにより発表<sup>1</sup>, タンパク質の高速分離用充填剤 - 直径 $4\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.5\mu\text{m}$ の多孔質層 (細孔径 $30\text{nm}$ )

2007年三度カークランドらにより発表<sup>2</sup>, 全多孔性 $\text{sub}2\mu\text{m}$ 充填剤に匹敵する充填剤 - 直径 $1.7\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.5\mu\text{m}$ の多孔質層 (細孔径 $9\text{nm}$ )

(1) J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks, and G.S. Engel, J. Chromatogr., A 890, 3–13 (2000).

(2) J.J. Kirkland, T.J. Langlois, and J.J. DeStefano, Am. Lab. 39, 18–21 (2007).



• Fused-Core technology was developed by Jack Kirkland.

# コアシェル充填剤とは

## Superficially porous particle



コア（核）の周りに多孔質層が存在



粒子径によりカラム圧は決まり、粒子径の2乗に反比例してカラム圧は高くなる

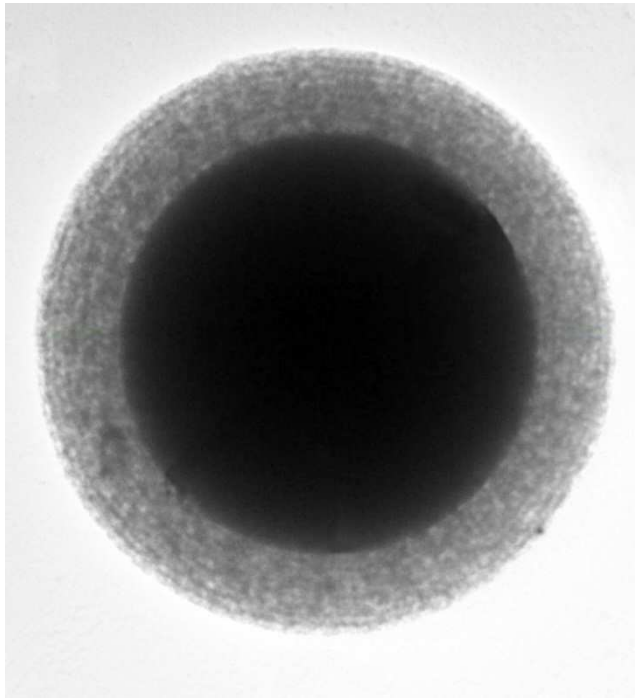


同じ粒子径の全多孔性の粒子に比べ、コアシェル粒子は多孔質層が薄いため、溶質の拡散距離が短くなり、速く平衡化するため、段数が高くなる

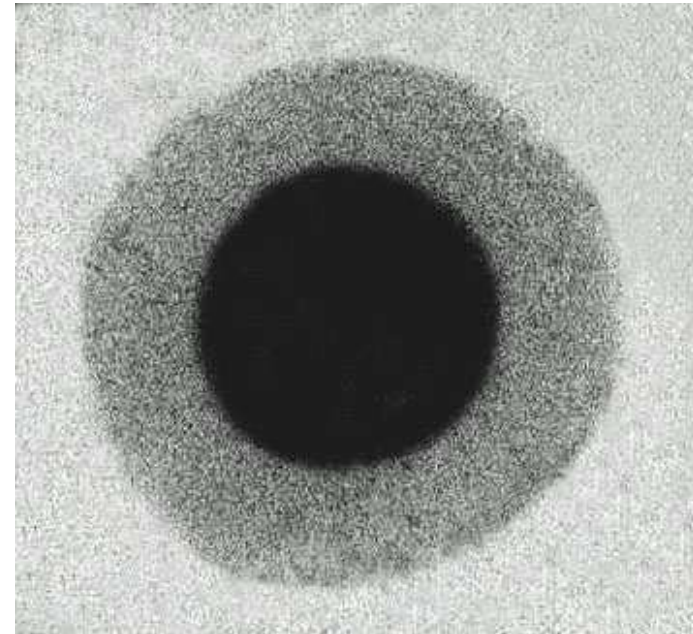


つまり、コアシェルは3 $\mu$ m粒子の圧力と同等であるにもかかわらず、サブ2 $\mu$ mの性能を発揮する

## 二種類のコアシェル構造のシリカ粒子



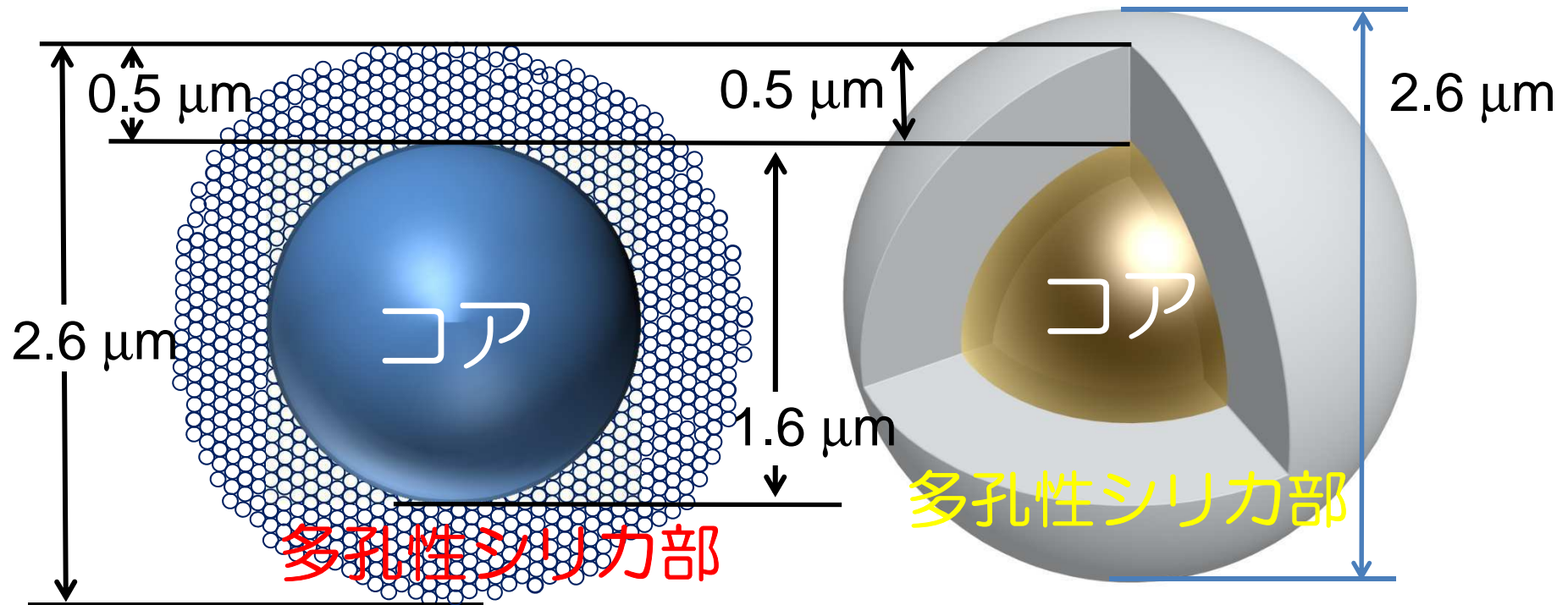
マルチレイヤー（多層）多孔質層構造



モノレイヤー（単層）多孔質構造



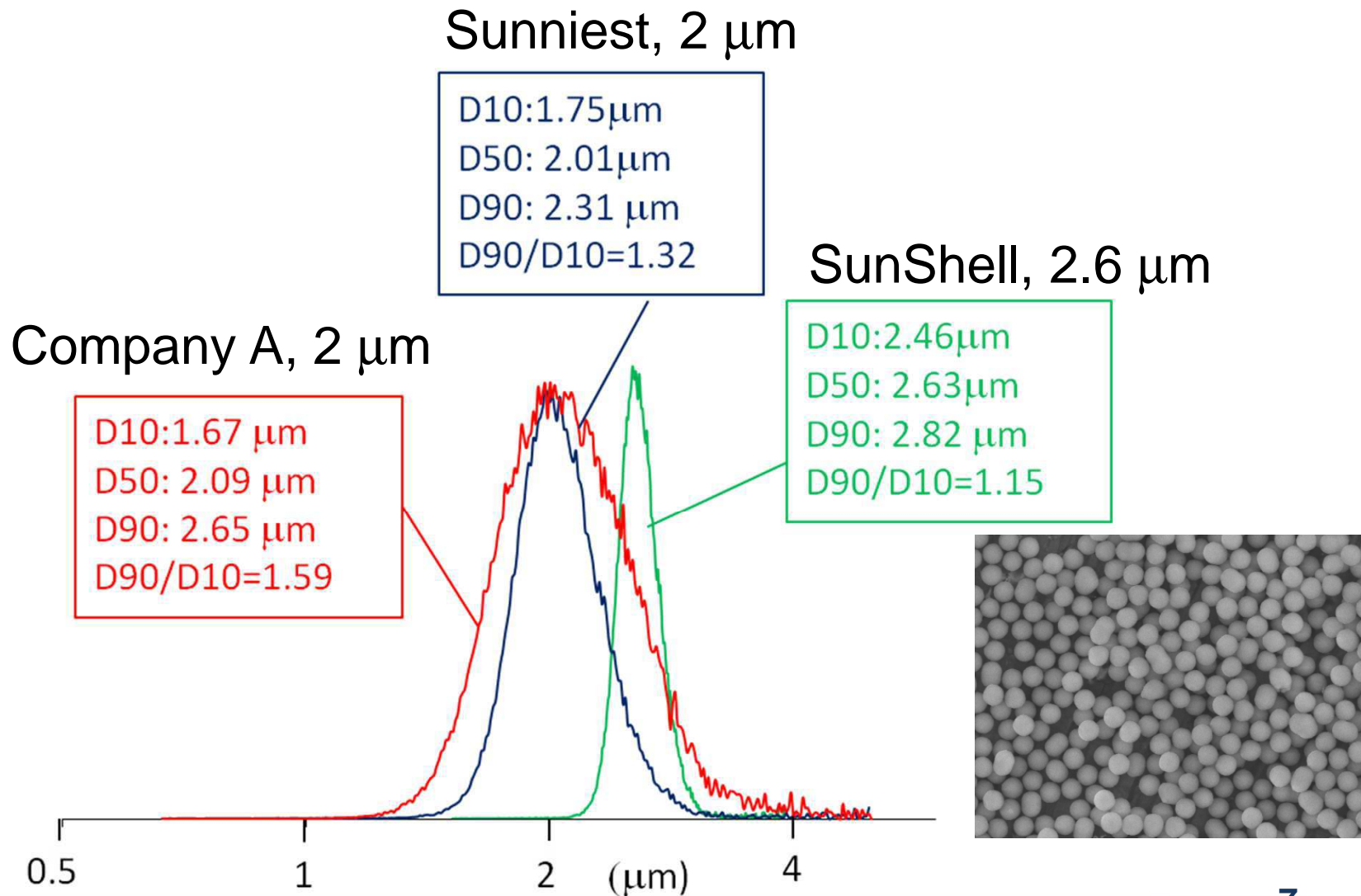
# SunShellシリカのコアシェル構造の概略図



モノレイヤー（単層）多孔質構造

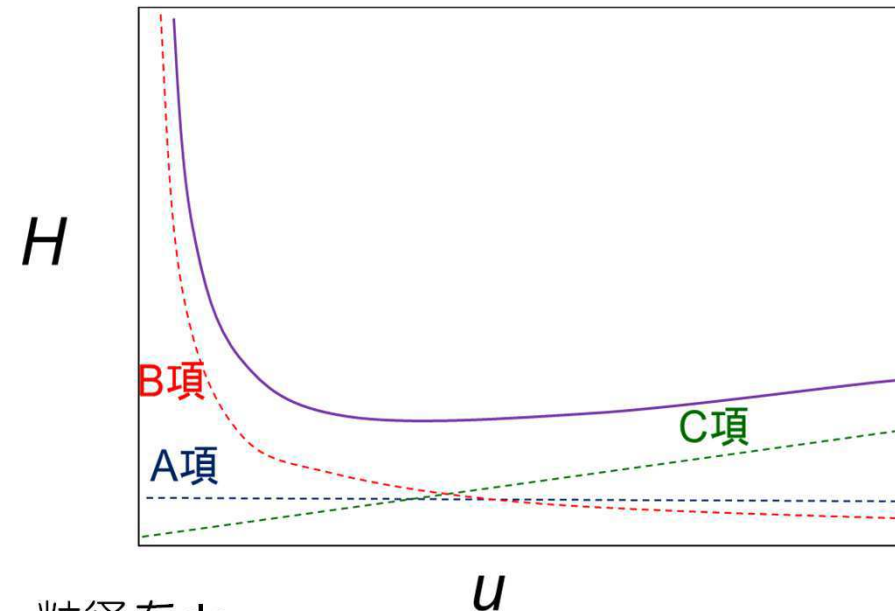
粒子径：2.6  $\mu\text{m}$ ，コア径：1.6  $\mu\text{m}$ ，多孔質層の厚さ：0.5  $\mu\text{m}$   
 細孔容積：0.30 mL/g，比表面積：150  $\text{m}^2/\text{g}$ ，細孔径：9 nm  
 （16 nm, 30 nm），多孔性シリカの体積の割合：77%

# 粒度分布の比較



# Van Deemterの式

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

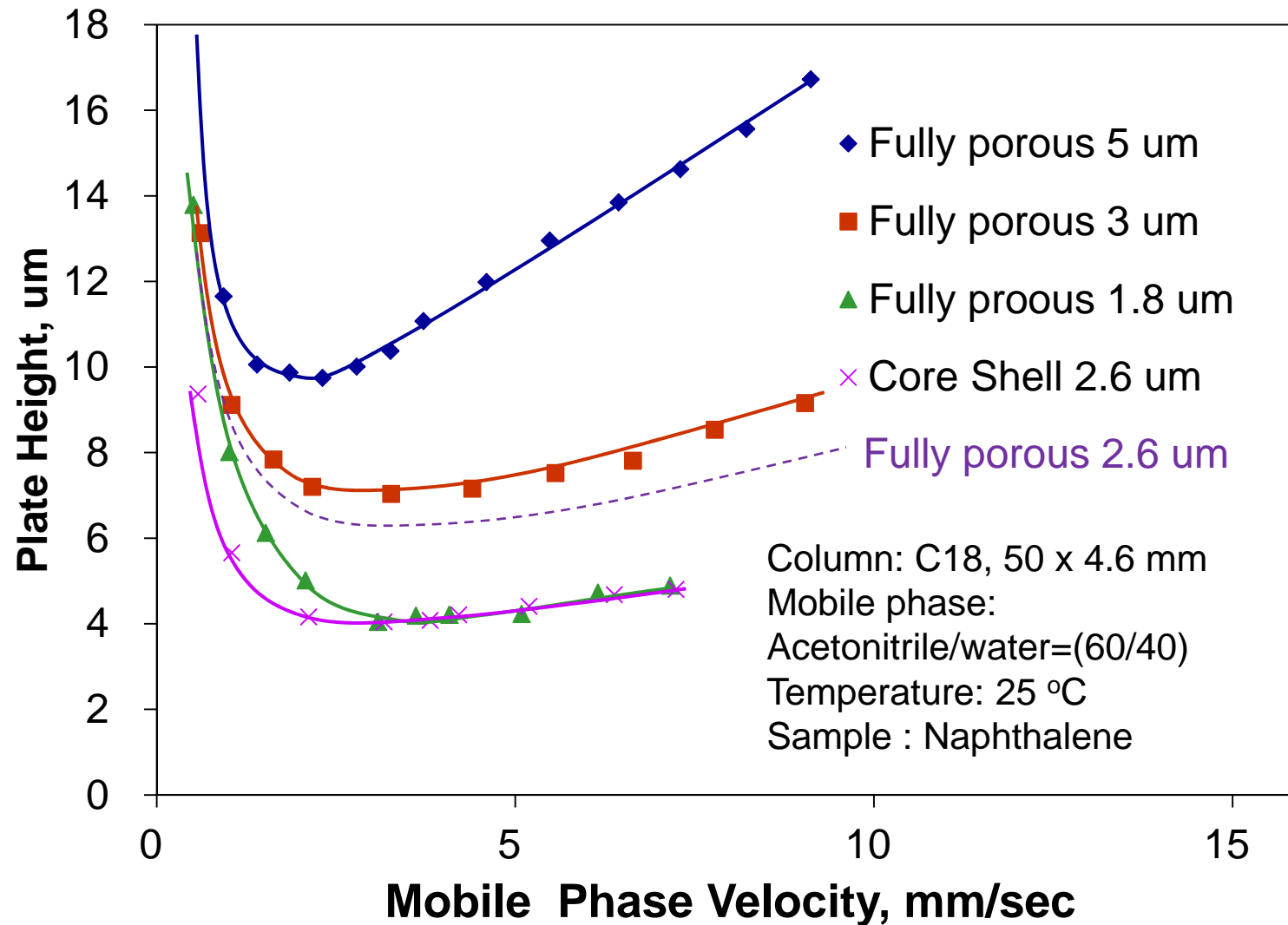


- A項 : 多流路拡散、渦巻き拡散 : 粒径を $d_p$
- B項 : カラム軸方向への拡散、アナライトの移動相中の拡散係数を $D_m$
- C項 : 物質移動の項 : 固定相-移動相での物質移動、粒子内での  
拡散による物質移動に依存

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

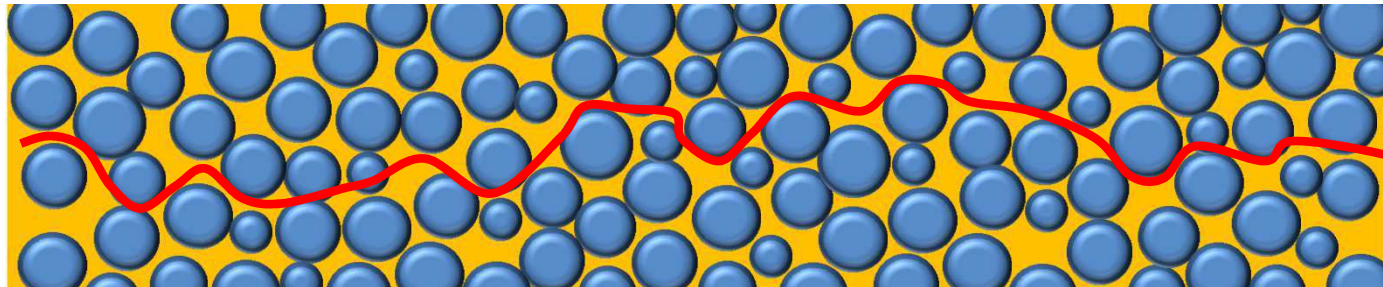


# 全多孔性とコアシェルの理論段高さの比較

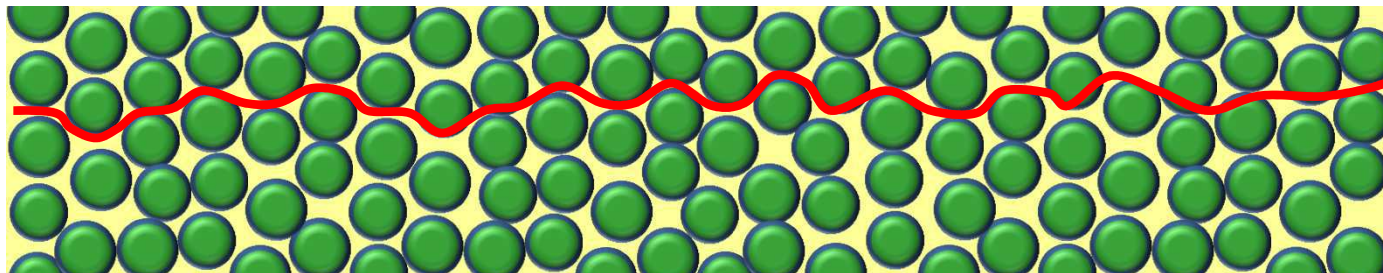


# 多流路拡散・渦巻き拡散が小さくなる

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%）

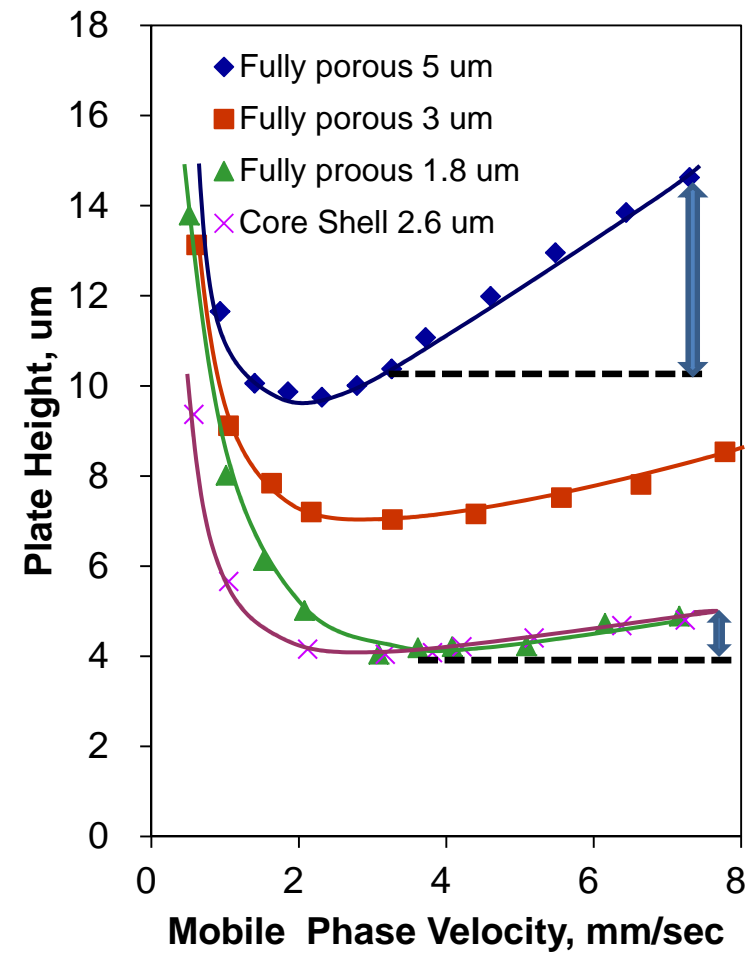
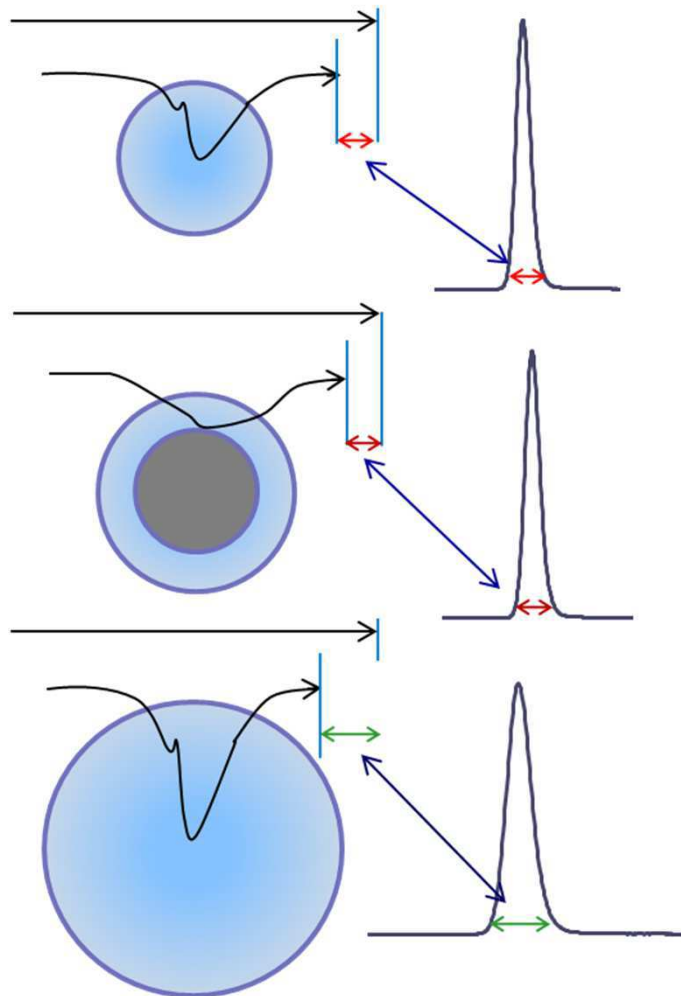


粒度分布の狭充填剤（コアシェルシリカ，粒子間空隙率:30%~35%）



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

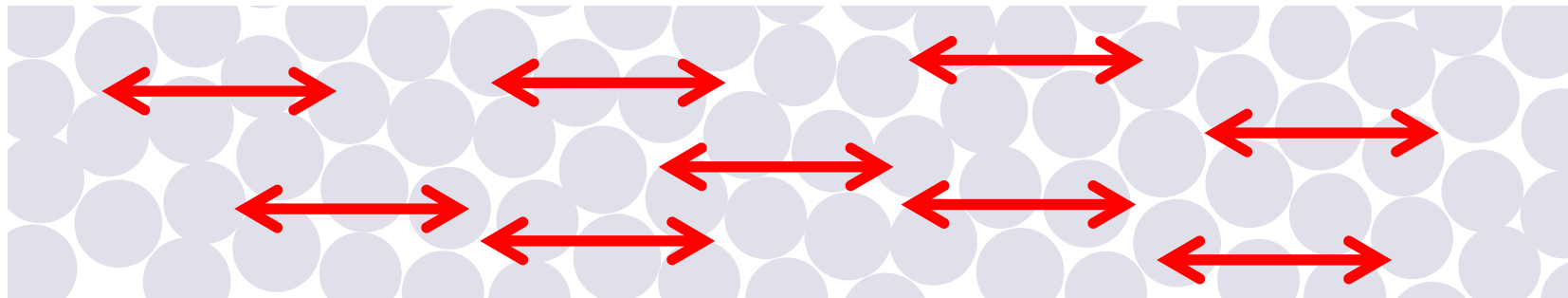
# 『拡散による物質移動（の遅れ）』はC項 に関係している



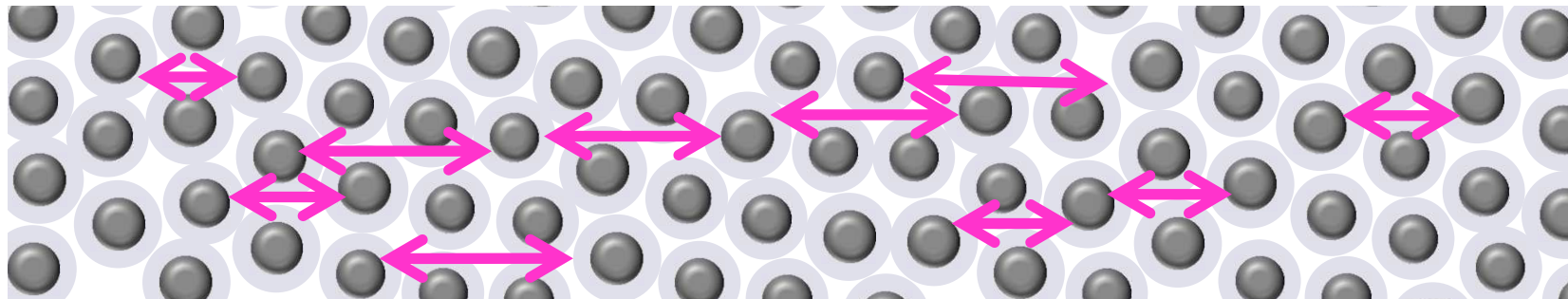
# カラム軸方向への拡散

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

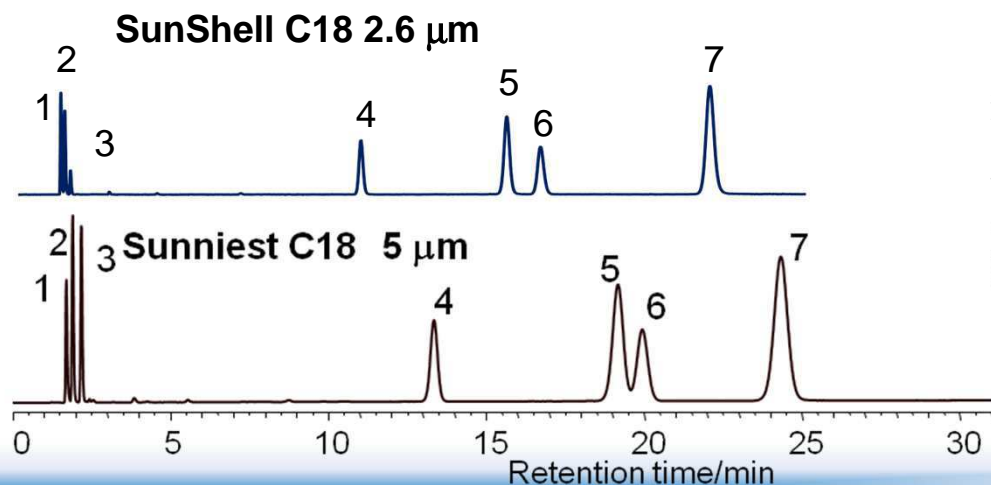
コアが溶質の拡散を妨害し、溶質のカラム軸方向への拡散が抑えられるため、B項が小さくなる

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



# 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 $\mu\text{m}$		コアシェル型シリカ SunShell C18, 2.6 $\mu\text{m}$		コアシェル型シリカ P社 C18, 2.6 $\mu\text{m}$	
	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 $\text{m}^2/\text{g}$			150 $\text{m}^2/\text{g}$		Effective 200 $\text{m}^2/\text{g}$	
1) ウラシル	1.70	<b>0</b>	1.34	<b>0</b>	1.36	<b>0</b>
2) カフェイン	1.90	<b>0.12</b>	1.46	<b>0.09</b>	1.49	<b>0.10</b>
3) フェノール	2.17	<b>0.28</b>	1.65	<b>0.23</b>	1.61	<b>0.18</b>
4) ブチルベンゼン	13.35	<b>6.85</b>	10.87	<b>7.11</b>	6.19	<b>3.55</b>
5) o-ターフェニル	19.19	<b>10.29</b>	15.49	<b>10.56</b>	8.15	<b>4.99</b>
6) アミルベンゼン	19.96	<b>10.74</b>	16.56	<b>11.36</b>	8.75	<b>5.43</b>
7) トリフェニレン	24.35	<b>13.32</b>	21.95	<b>15.38</b>	9.44	<b>5.94</b>



移動相: Methanol/water(75:25)

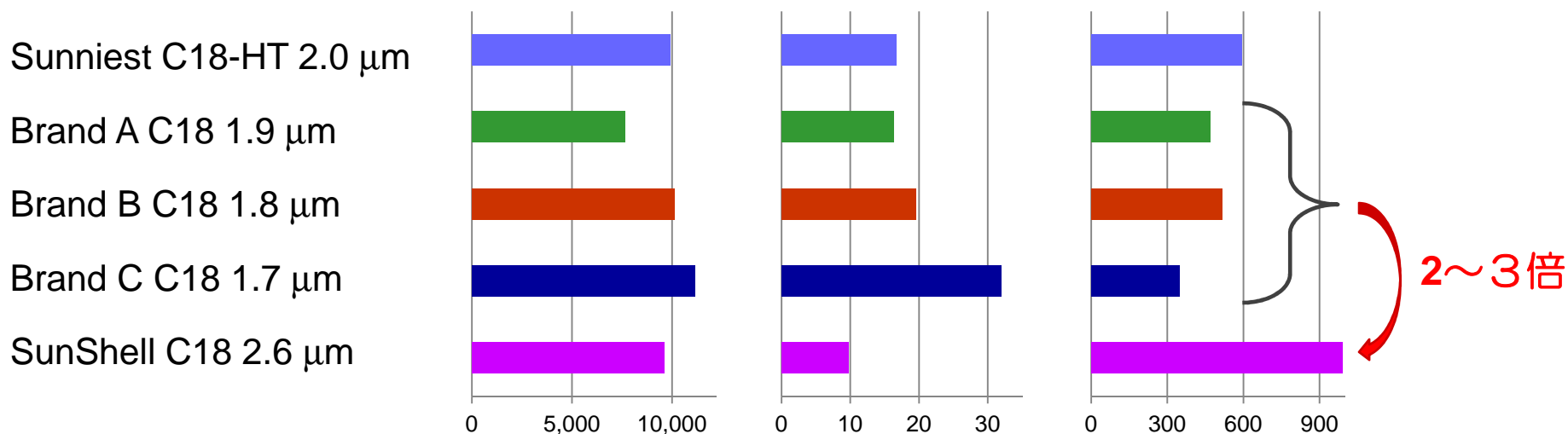
温度: 40°C

カラム: 150 x 4.6 mm

流速: 1.0 mL/min

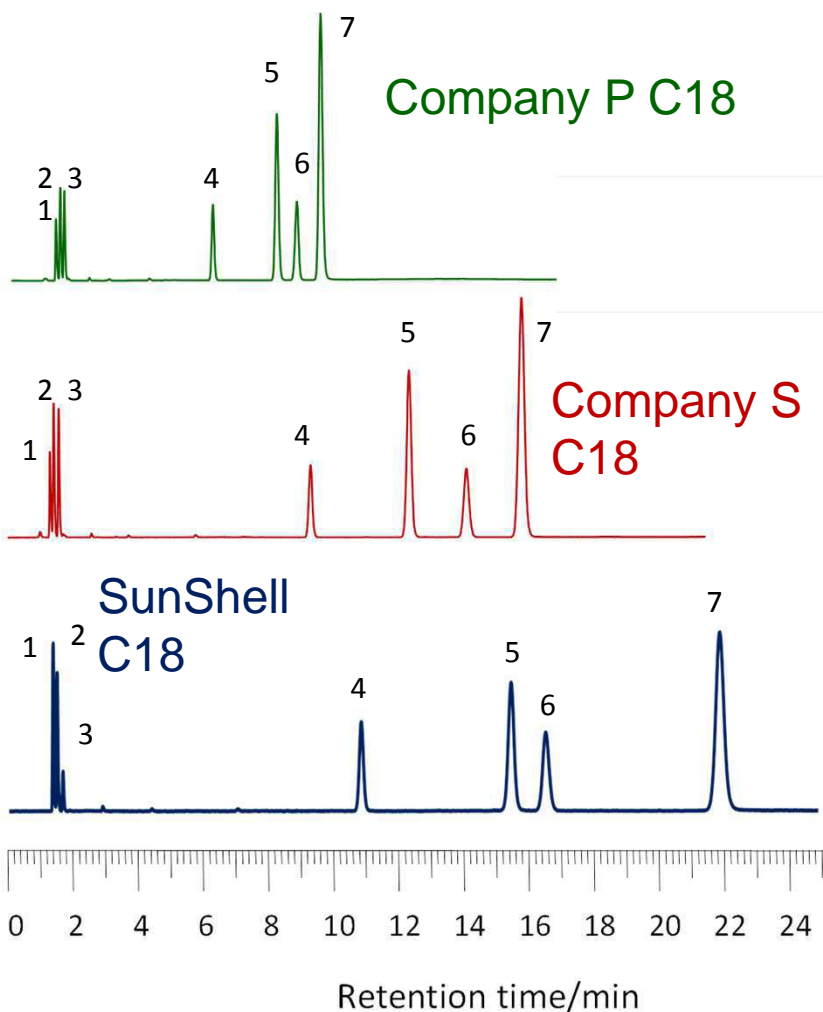
# 単位圧力あたりの段数比較

	Plates	Pressure(MPa)	Plates/pressure
Sunniest C18-HT 2.0 μm	9,900	16.7	593
Brand A C18 1.9 μm	7,660	16.3	470
Brand B C18 1.8 μm	10,100	19.6	515
Brand C C18 1.7 μm	11,140	32.0	348
SunShell C18 2.6 μm	9,600	9.7	990



Column: 50 x 2.1 mm C18, Mobile phase: Acetonitrile/water=(70/30), Temperature: 25 °C

# コアシェルC18の標準試料の保持比較



Column:

Company P C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

Company S C18, 2.7  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm

Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=75/25$

Flow rate: 1.0 mL/min

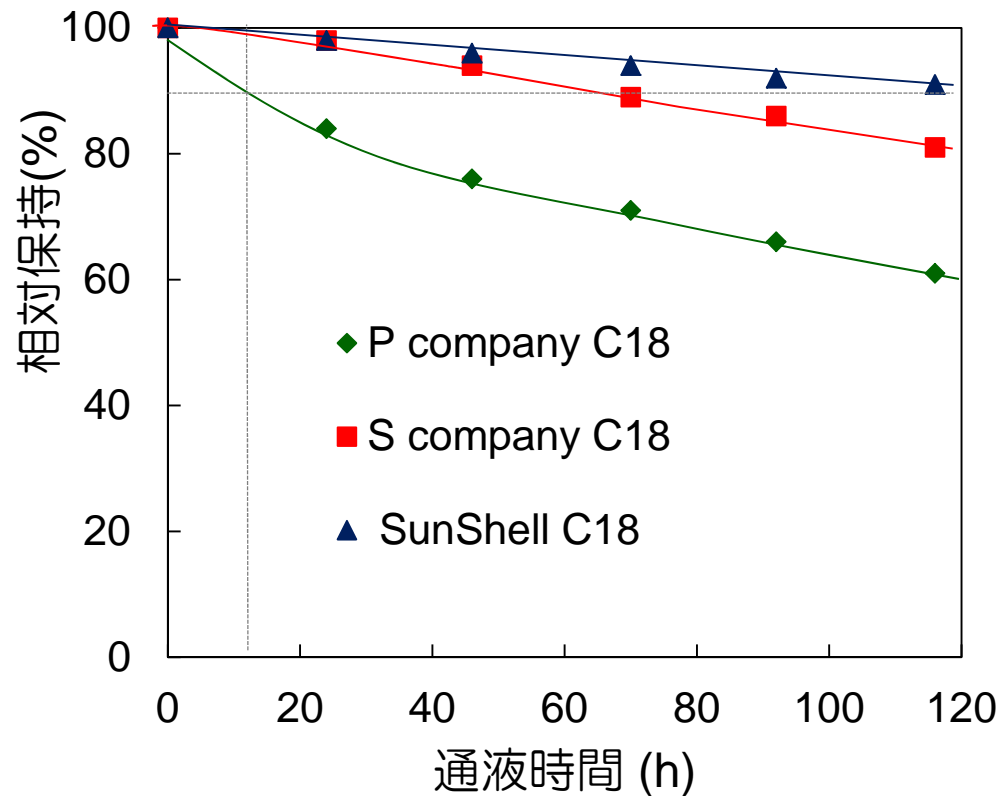
Temperature: 40  $^\circ\text{C}$

Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine, 3 = Phenol, 4 = Butylbenzene

5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene, 7 = Triphenylene

	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/o-Terphenyl)
Company P C18	0.48	1.54	1.20
Company S C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.39	1.60	1.46

# コアシェルC18の酸性条件での耐久性



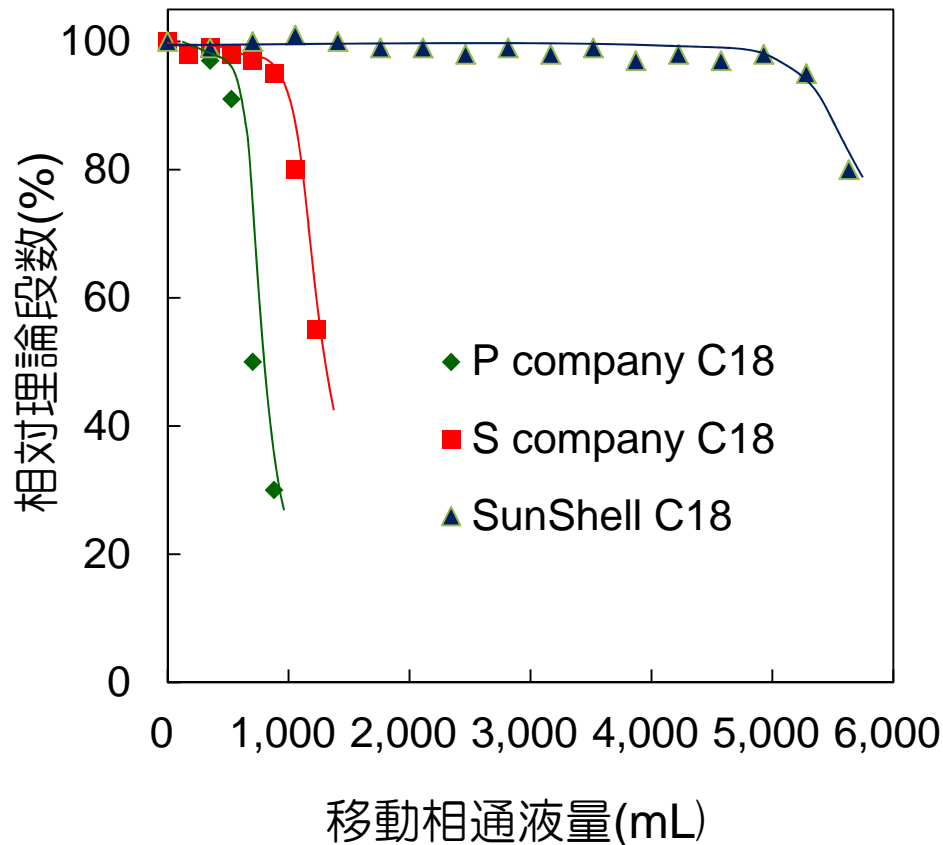
## 耐久性試験条件

Column size: 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/1.0%  
 TFA, pH1=10/90  
 Flow rate: 0.4 mL/min  
 Temperature: 80 °C

## 保持時間測定条件

Column size: 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40  
 Flow rate: 0.4 mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Sample: 1 = Uracil  
 2 = Butylbenzene

# コアシェルC18のアルカリ性条件での 耐久性



## 耐久性試験条件

Column Size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>OH/20mM Sodium borate/10mM

NaOH=30/21/49 (pH10)

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 50 °C

## 理論段数測定条件

Column Size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=70/30

Flow rate: 0.4 mL/min

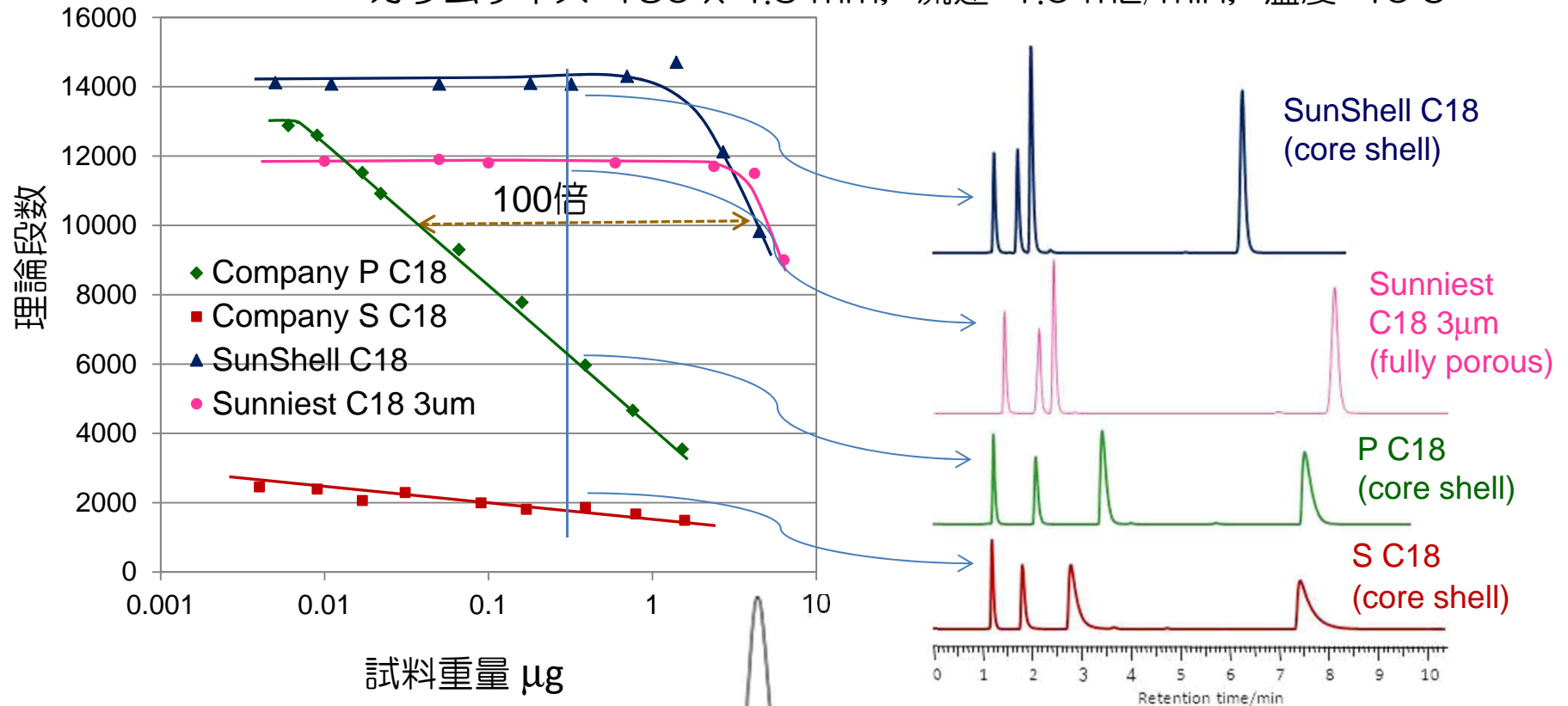
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Butylbenzene

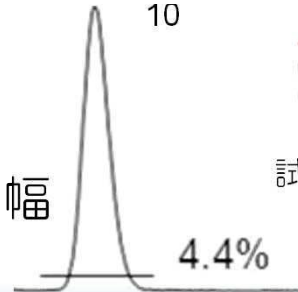


# コアシェルC18のアミトリプチリンの 負荷量の比較

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



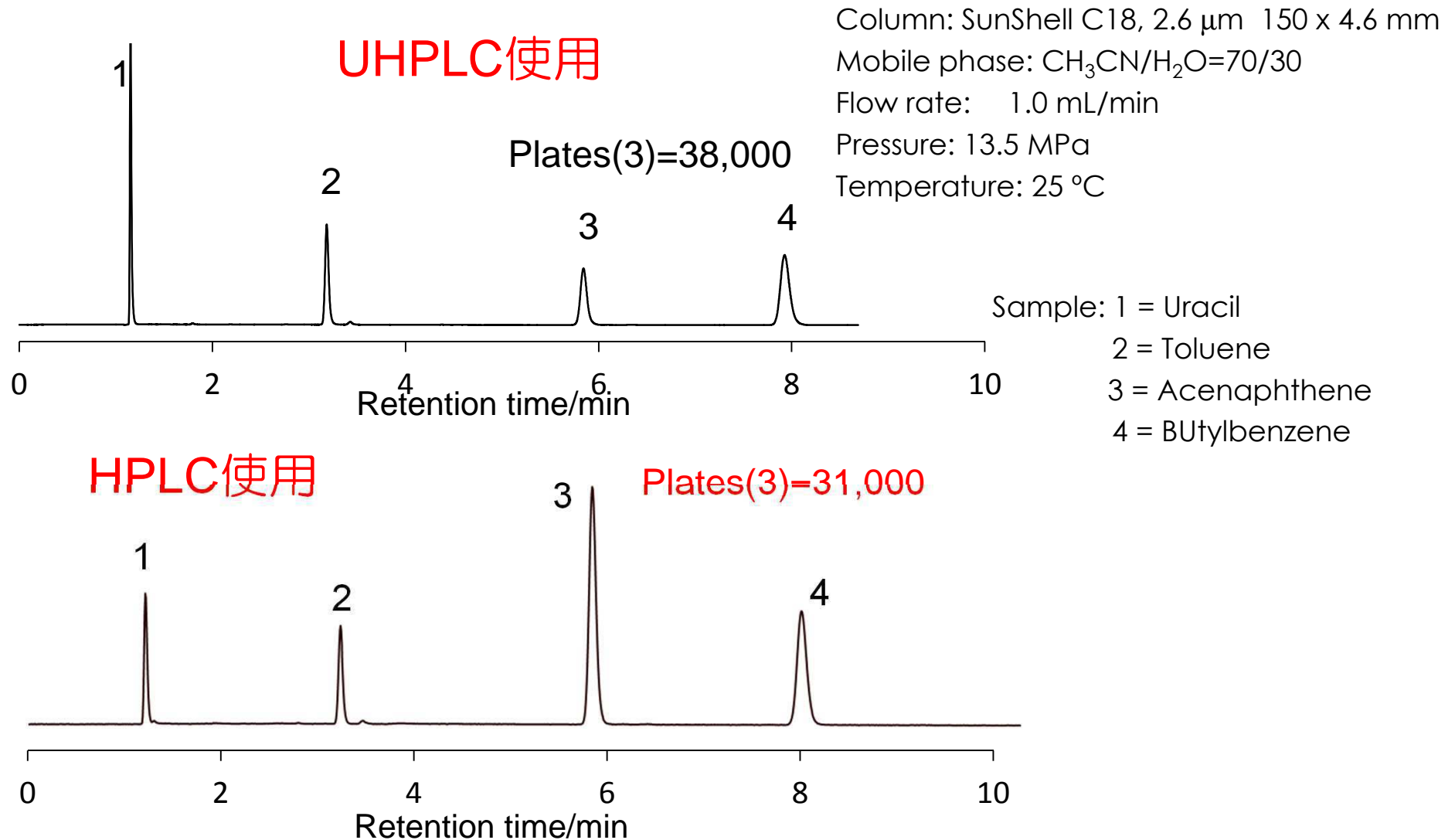
ピークの4.4%の高さの位置でのピーク幅  
で理論段数を計算 (5 $\sigma$ 法)



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

# コアシェルC18の標準試料の分離例

## UHPLCとHPLCの比較

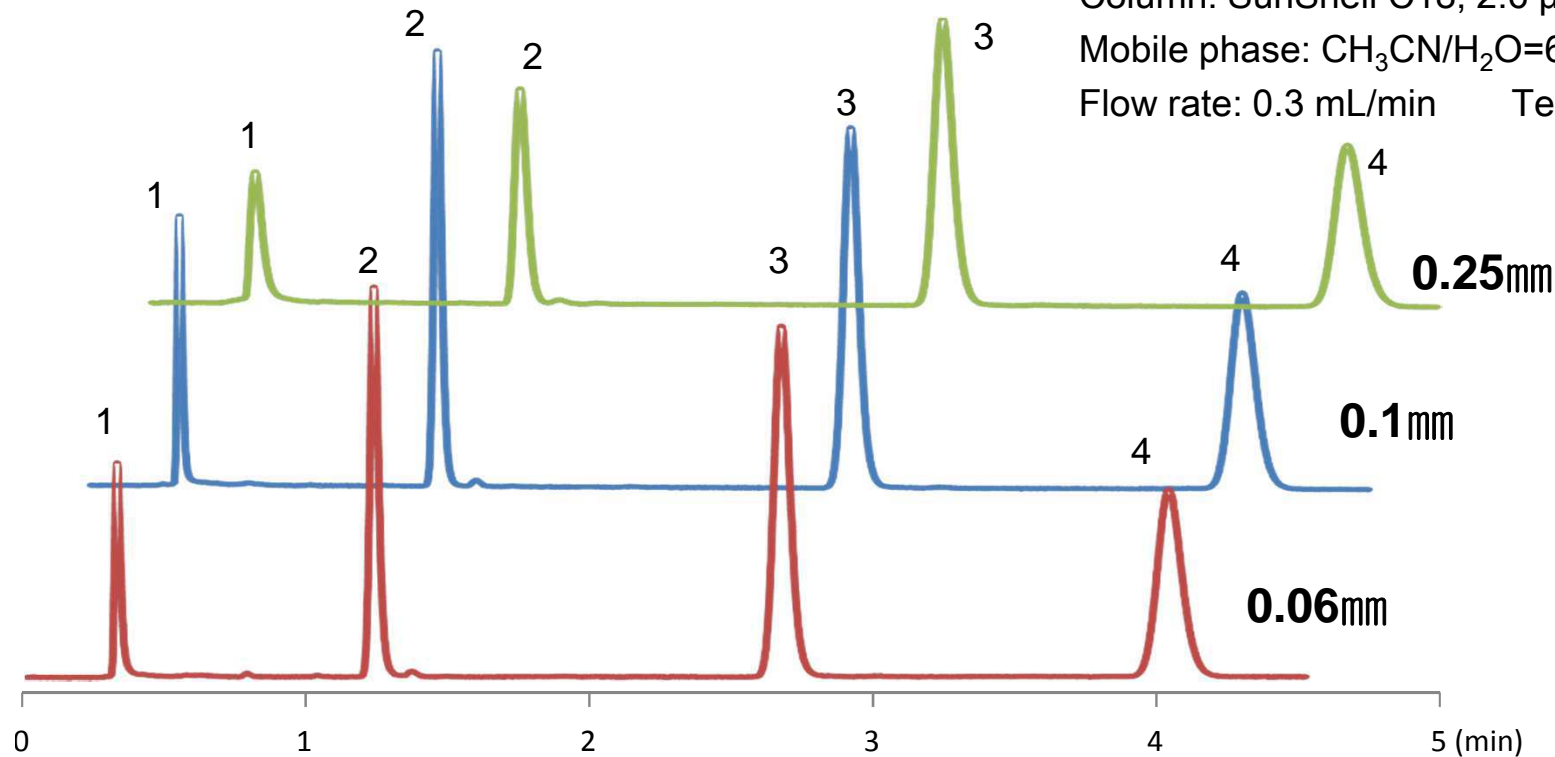


# カラムー検出器間における配管の影響

Column: SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  50 x 2.1 mm

Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=60/40$

Flow rate: 0.3 mL/min Temperature: 25  $^\circ\text{C}$

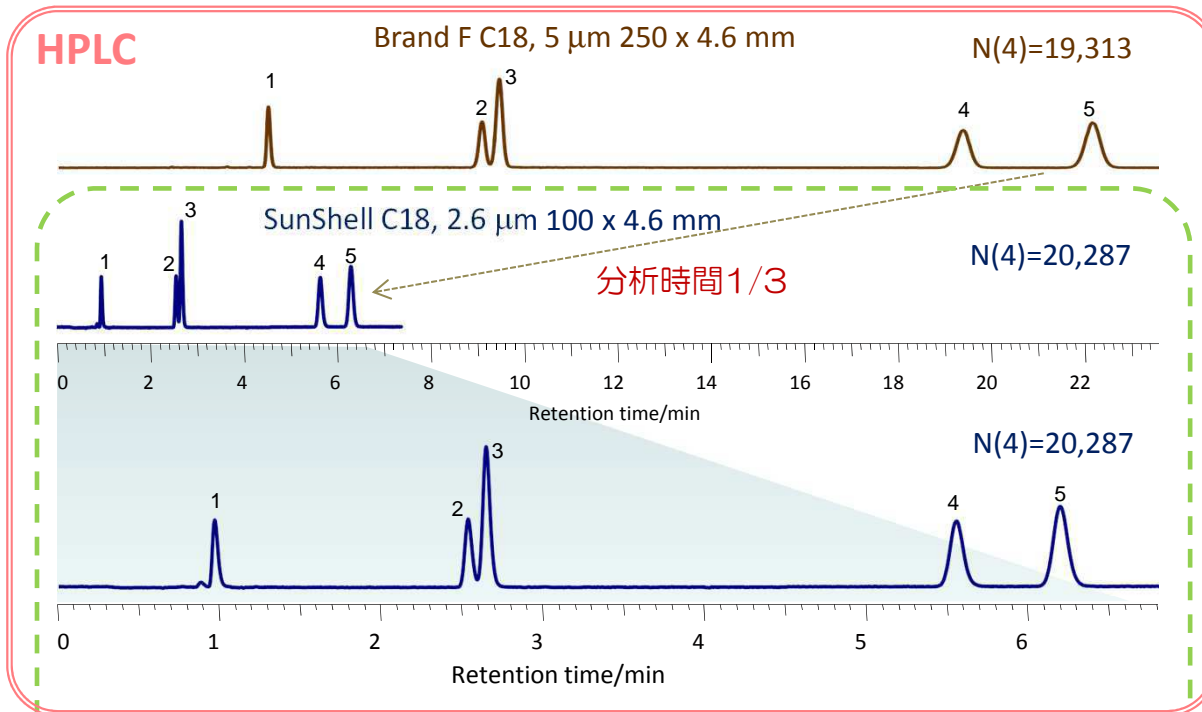


理論段数の平均値  
(n=3)

	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

# イソクラティック溶離例

## 5 $\mu$ m C18からの移行



Column:

Brand F C18, 5  $\mu$ m 250 x 4.6 mm

SunShell C18, 2.6  $\mu$ m 100 x 4.6 mm

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>CN/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  $\mu$ m

13.4 MPa for SunShell C18 2.6  $\mu$ m

Detection: UV@230 nm

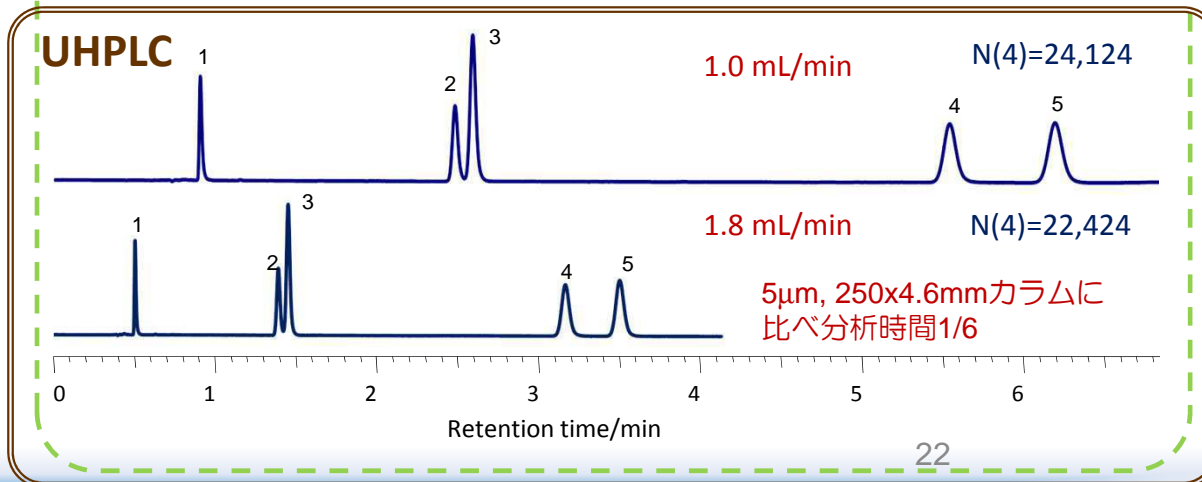
Sample: 1 = Benzydamine

2 = Ketoprofen

3 = Naproxen

4 = Indomethacin

5 = Ibuprofen

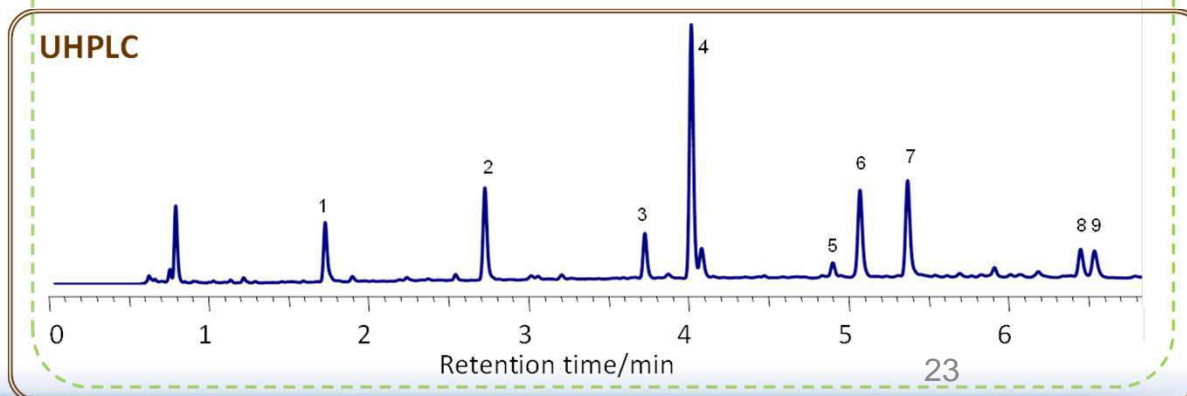
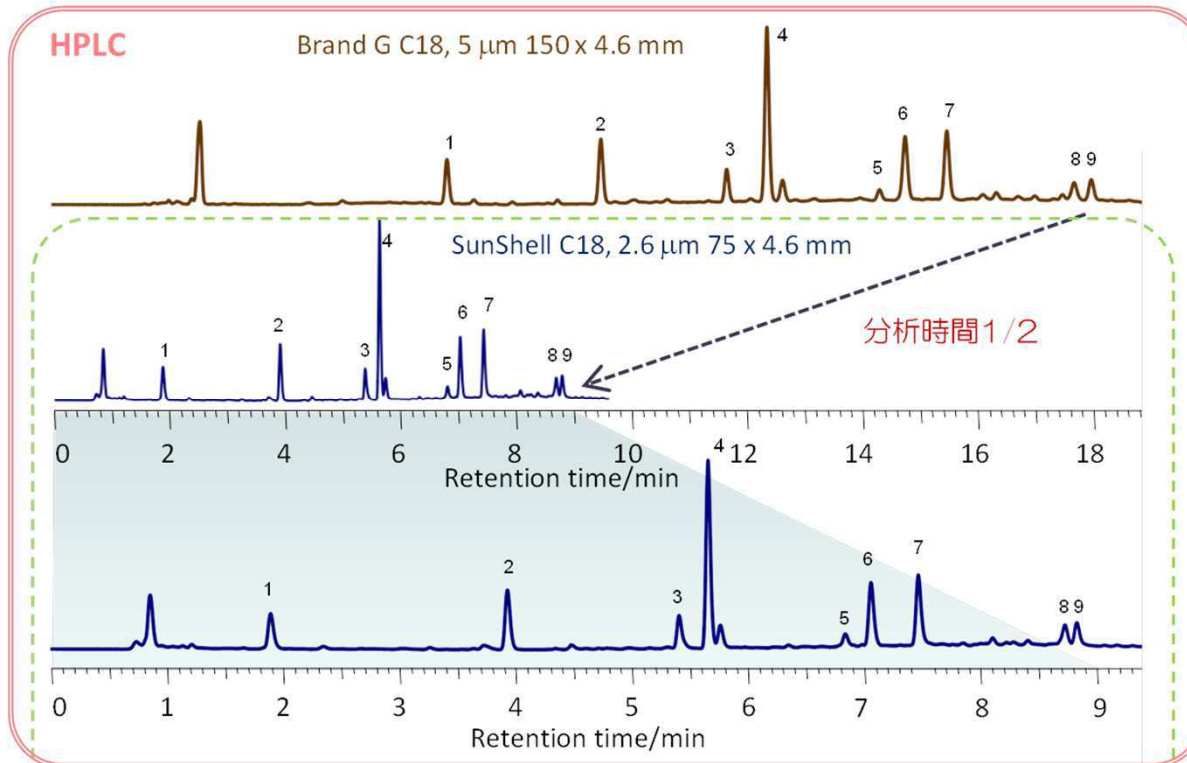


HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(内径0.25mmの配管仕様)

UHPLC: Jasco X-LC

# グラジエント溶離例 5 $\mu$ m C18からの移行



Column:

Brand G C18, 5  $\mu$ m 150 x 4.6 mm  
SunShell C18, 2.6  $\mu$ m 75 x 4.6 mm

Mobile phase:

A) 0.1% Phosphoric acid  
B) CH<sub>3</sub>CN

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

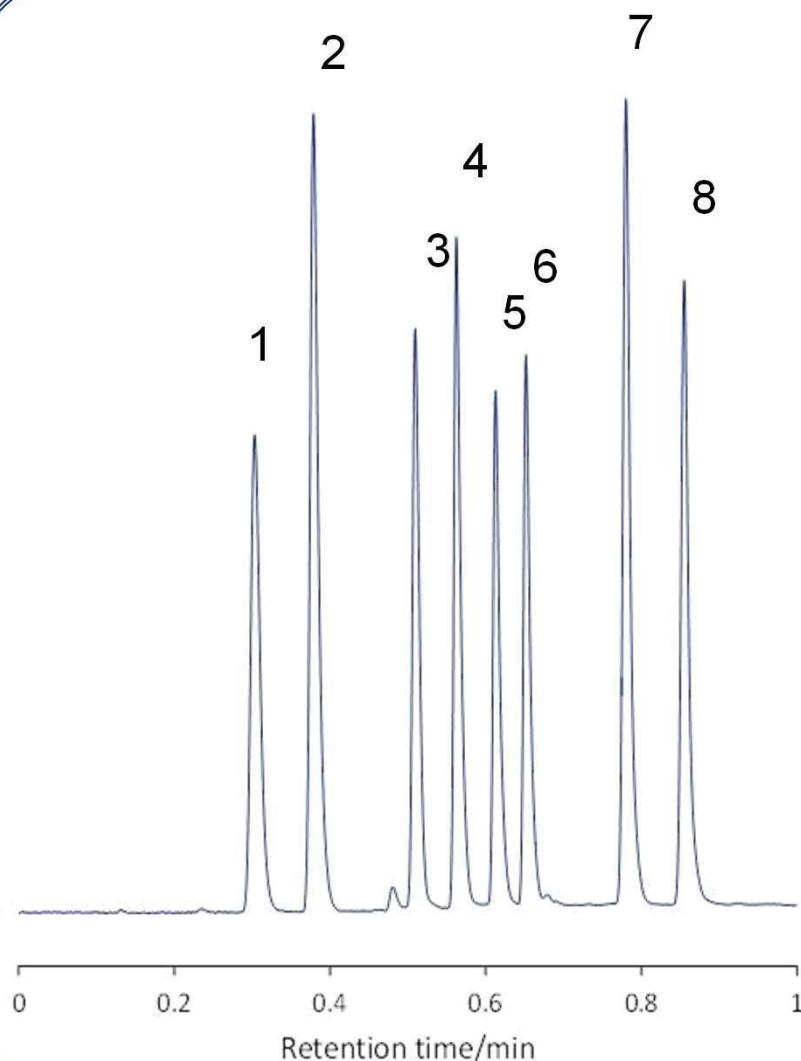
(内径0.25mmの配管仕様)

UHPLC: Jasco X-LC

23



# 高速分離例



Column: SunShell C18 2.6  $\mu\text{m}$ , 30 x 3.0 mm.  
 Mobile phase: A) Water, B) Acetonitrile; Gradient  
 (Acetonitrile %), 0.00 min - 35%, 0.40 min -  
 100%, 0.80 min - 100%, 0.85 min - 35%, 1 cycle;  
 1.8 min, (High-pressure gradient).

Flow rate: 1.0 mL/min.

Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$ .

Injection Volume: 1  $\mu\text{L}$ .

Wavelength: 200 - 500 nm, CH-9, 215 - 500 nm  
 (Max Abs.).

Sample: Mixture of ultraviolet absorbers,  
 1 = 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone,

2 = Ethyl *p*-aminobenzoate,

3 = 2,4-Dihydroxybenzophenone,

4 = 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone,

5 = 2,2'-Dihydroxy-4,4'-  
 dimethoxybenzophenone,

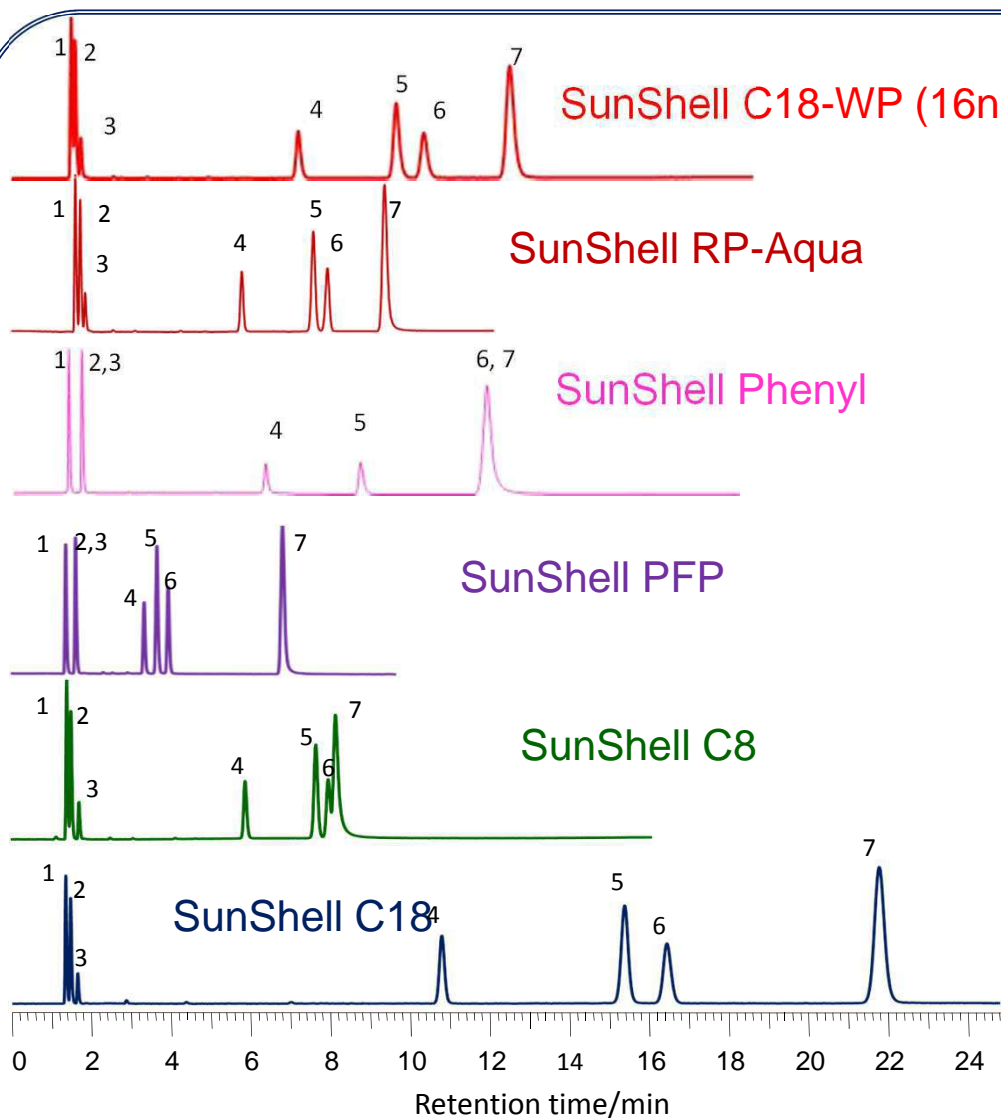
6 = 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone,

7 = 2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole,

8 = 4-*tert*-Butylphenyl salicylate.

Courtesy of Jasco.

# 標準試料の分離比較



Column dimension: 150 x 4.6 mm  
Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

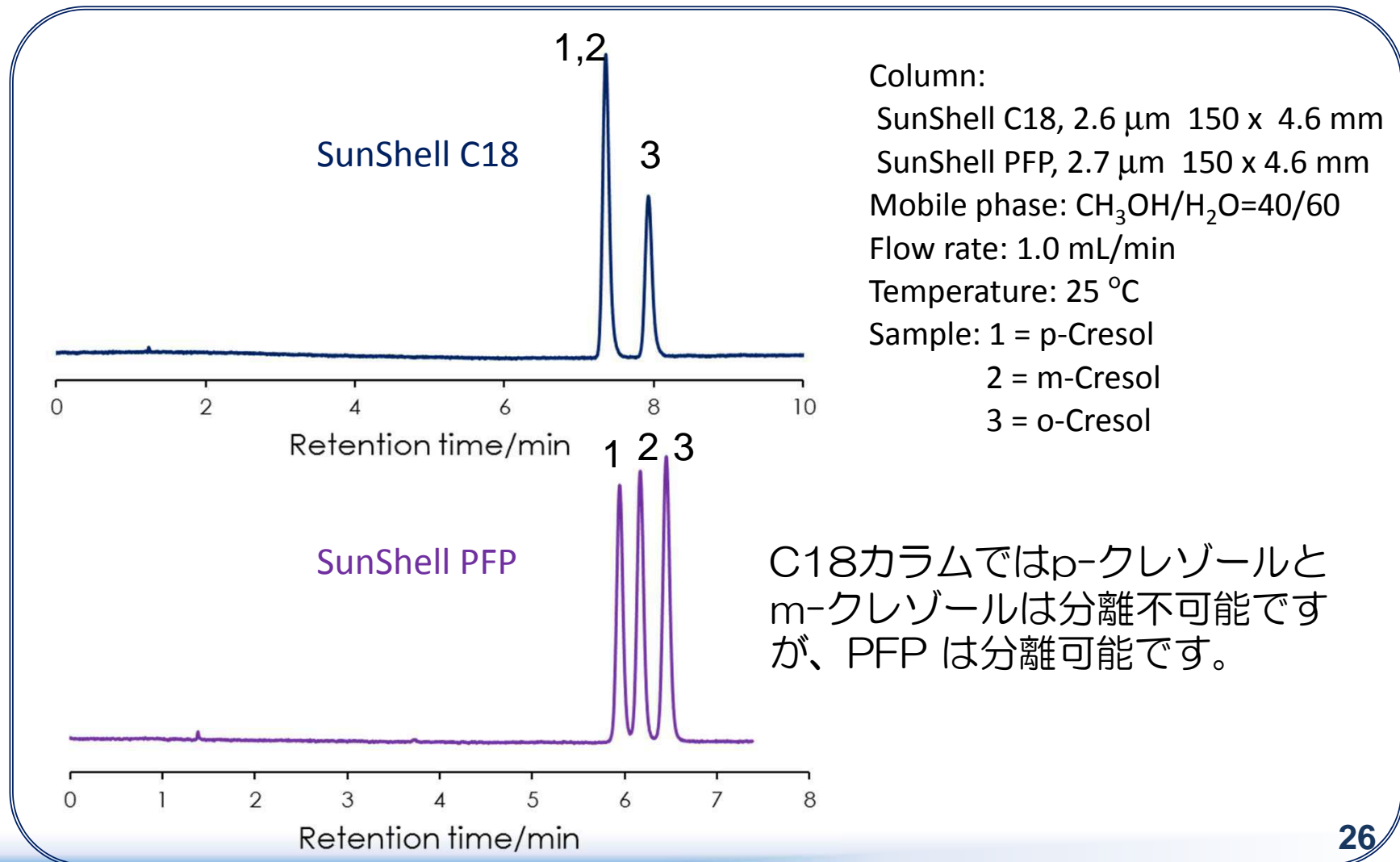
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine,  
3 = Phenol, 4 = Butylbenzene  
5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene,  
7 = Triphenylene

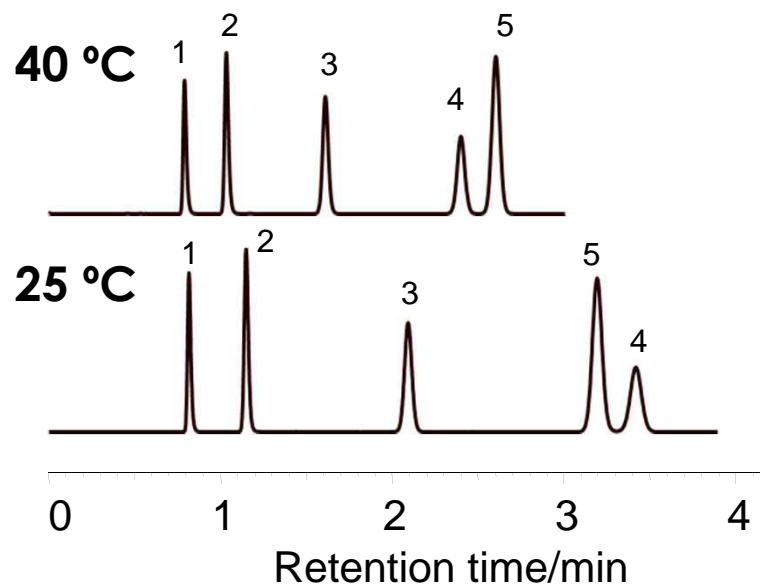
	Hydrogen bonding (Caffeine/ Phenol)	Hydrophobicity (Amylbenzene/ Butylbenzene)	Steric selectivity (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C18-WP	0.40	1.55	1.35
RP-Aqua	0.52	1.52	1.30
Phenyl	1.00	1.48	1.01
PFP	1.00	1.31	2.38
C8	0.32	1.46	1.08
C18	0.39	1.60	1.46

# クレゾールの異性体の分離



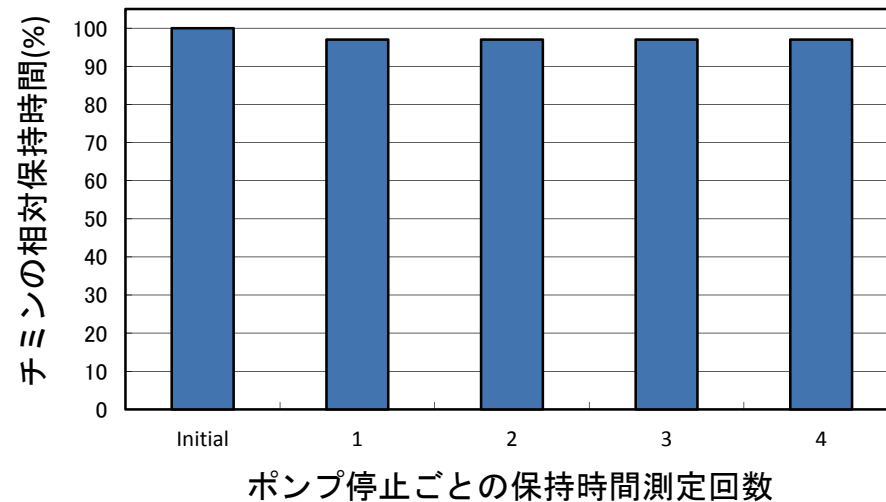
# SunShell RP-Aqua の40 °Cでの保持

## 核酸塩基の分離



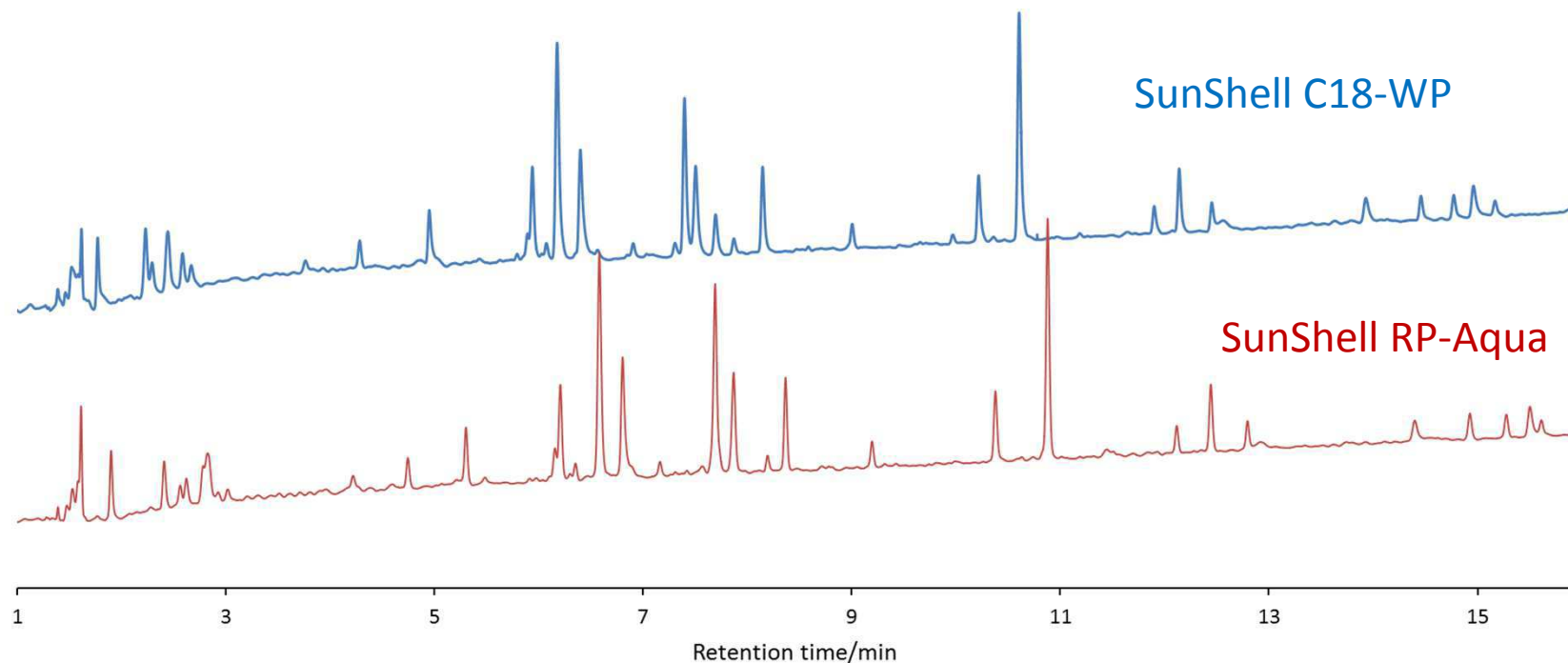
Column: SunShell RP-Aqua, 2.6 mm 75 x 4.6 mm  
 Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Temperature: 40 °C and 25 °C  
 Sample: 1 = Cytosine, 2 = Uracil, 3 = Thymidine,  
 4 = Uridine, 5 = Thymine

## 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 C18-WPとRP-Aquaによるペプチドの 分離



Column: SunShell C18-WP, 2.6  $\mu\text{m}$  (16 nm) 150 x 4.6 mm,  
SunShell RP-Aqua, 2.6  $\mu\text{m}$  (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: %B 0% – 100% in 35 min

Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25  $^{\circ}\text{C}$ , Detection: UV@210 nm,

Sample: Tryptic digest of myoglobin



# SunShell RP ガードフィルター

(C18結合カートリッジフィルター)



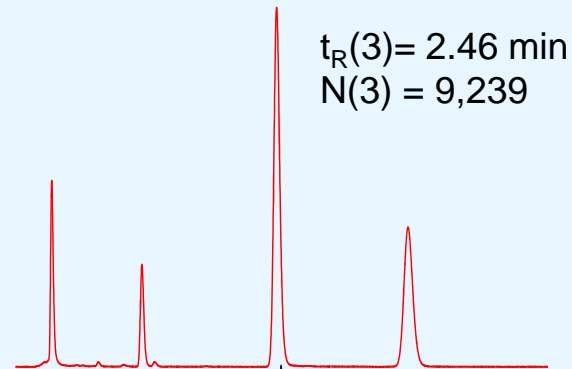
- ☆均一な細孔径を持つモノリス型ガラスフィルター（直径4mm,厚さ4mm）にC18を結合
- ☆夾雑物の捕捉によるカラム圧の上昇防止やC18結合相による吸着物の除去など、種々の逆相カラムのガードカラムとして利用可能
- ☆カートリッジ式で交換が容易
- ☆ホルダーを含めローデッドボリューム仕様（2.1x50mmカラムで5%の段数低下、4.6x150mmカラムで1%の段数低下）
- ☆内径2.1mm～4.6mmカラムに使用可能
- ☆SunShell RP Guard Filterの圧力損失は1 mL/minで約0.1MPa、またGuard Filter 本体の耐圧は60MPa
- ☆SunShell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  $\mu$ m 50 x 2.1 mm

SunShell C18, 2.6  $\mu$ m 150 x 4.6 mm

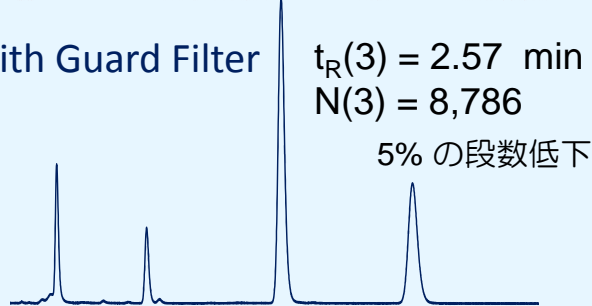
Without Guard Filter



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

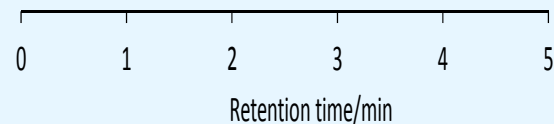
Mobile phase:  
CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40 for 2.1 mm  
CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=70/30 for 4.6 mm  
Flow rate:  
0.3 mL/min for 2.1 mm  
1.8 mL/min for 4.6 mm  
Temperature: 25 °C  
Detection: UV@250nm

With Guard Filter

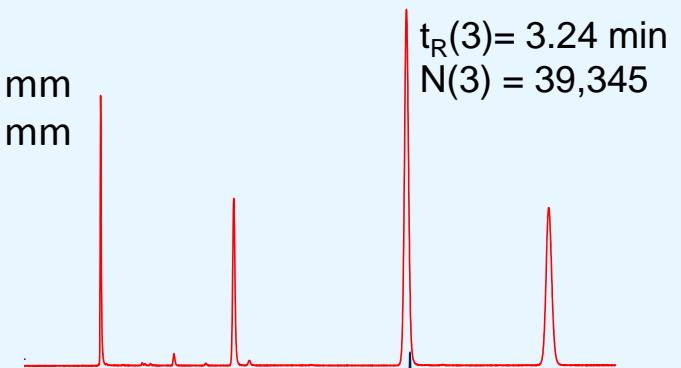


$t_R(3) = 2.57$  min  
 $N(3) = 8,786$

5%の段数低下



Without Guard Filter



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

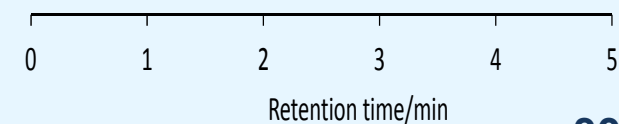
Sample: 1 = Uracil  
2 = Toluene  
3 = Acenaphthene  
4 = Butylbenzene

With Guard Filter



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

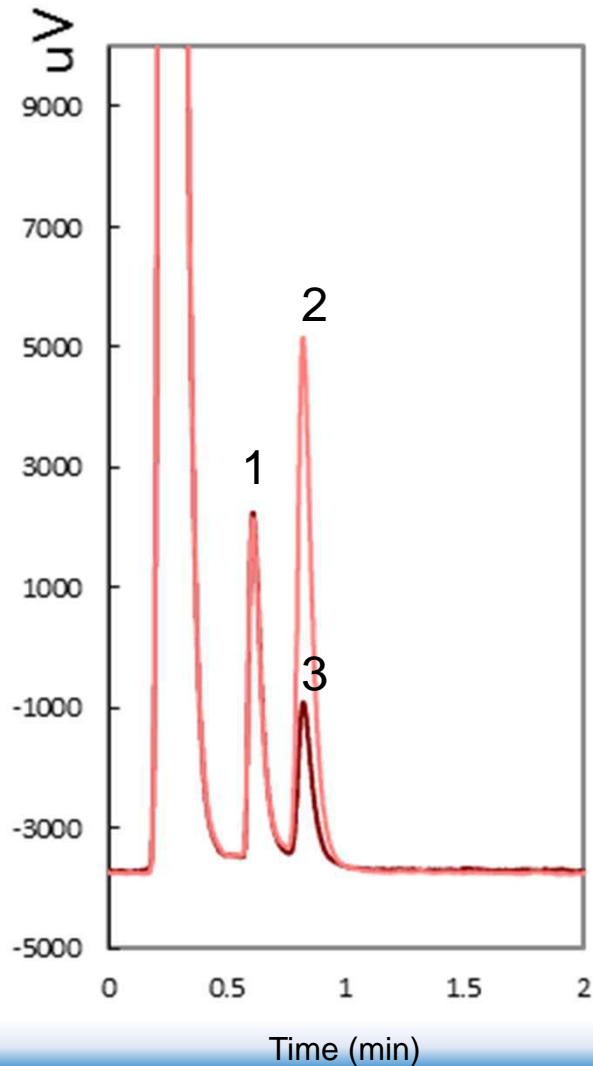
ほとんど変化なし



# 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 $\mu$ mカラムの1/3に短縮



Column: SunShell Al 2.6 $\mu$ 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  $\mu$ 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)".

## まとめ

- コアシエル型充填剤は全多孔性充填剤の1.5倍の理論段数の性能を有する。(2.6  $\mu\text{m}$ のコアシエルはsub 2  $\mu\text{m}$ の全多孔性と同じ理論段数になる)
- カラム圧は充填剤の径の2乗に反比例する。2.6  $\mu\text{m}$ のコアシエルは、sub 2  $\mu\text{m}$ の全多孔性の1/2以下のカラム圧となるため同一圧力条件下ではsub 2  $\mu\text{m}$ の2倍以上の理論段数を示す。
- 汎用の5 $\mu\text{m}$ , 4.6x150mm, 250mmカラムを用いる分析がSunShellでは4.6x75mm, 100mmで達成され、分析時間・使用溶媒量が大幅に削減できる。
- 今後、コアシエル型充填剤は広い分野において使用されていくことが予想される