

JASIS 2013

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～

クロマニックテクノロジーズ
塚本友康 長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp

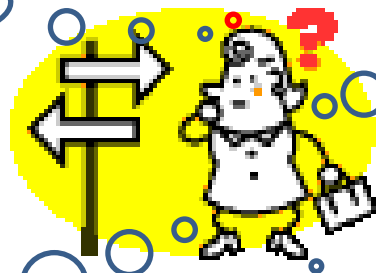
<http://chromanik.co.jp>

コアシェルカラムってどうなの？

- 速く分析したい
- 分離をよくしたい

- HPLCでも使えるって本当？
- 使ってみただけど・・・

- UHPLCがあるからコアシェルじゃなくても
- UHPLCでのメリットってあるの？



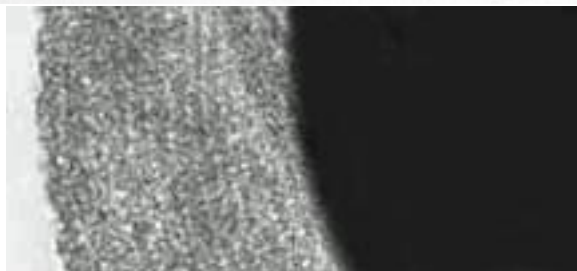
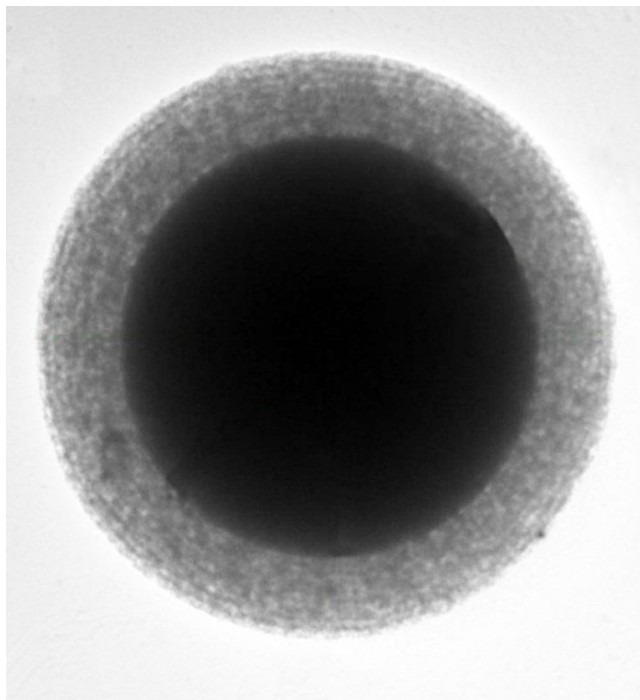
- 全多孔性の粒子より何が優れているの？
- 何が違うの？
- デメリットないの？

- コアシェルカラムってどのメーカーもいっしょなの？

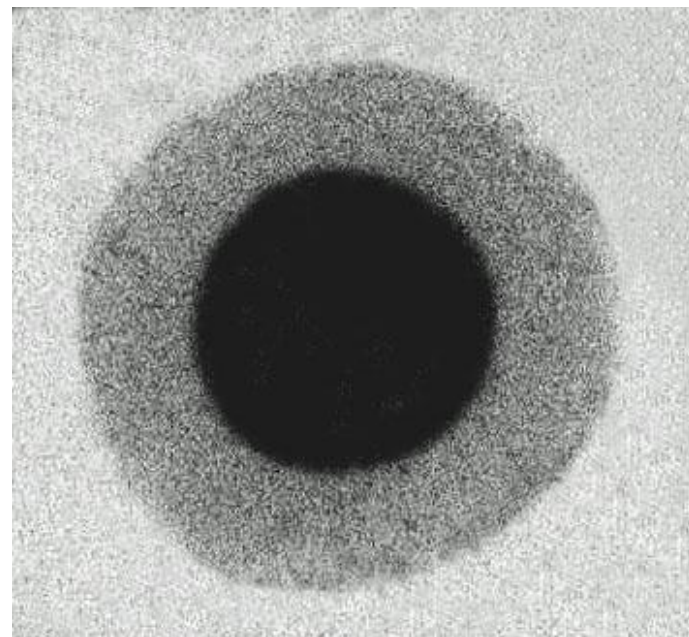
目次

- コアシェルカラムの特長
 - 全多孔性シリカ粒子との違い
 - 全多孔性シリカとの比較
- HPLCでコアシェルカラムを使う
 - HPLCでコアシェルカラムを使用する利点
 - コアシェルカラムを使用するための最適化
- UHPLCでコアシェルカラムを使う
 - コアシェルカラムの利点

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

全多孔性粒子と何が違う？

核を内包している(フューズドシリカ)

多孔質シリカ層

- 構造は異なる(コアがあるか無いか)
- コアがあるため、比表面積が小さい

• 素材はシリカであり、全多孔性、コアシェルとも共通

化学的特徴は全多孔性シリカと同じ

全多孔性シリカカラムで注意すべきこと



コアシェルシリカカラムで注意すべきこと

粒度分布の比較

Sunniest, 2 μm

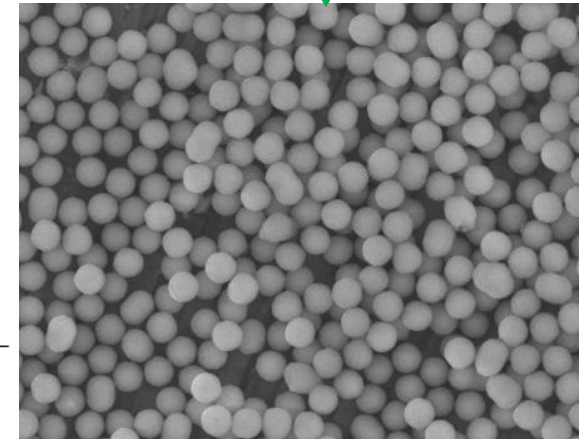
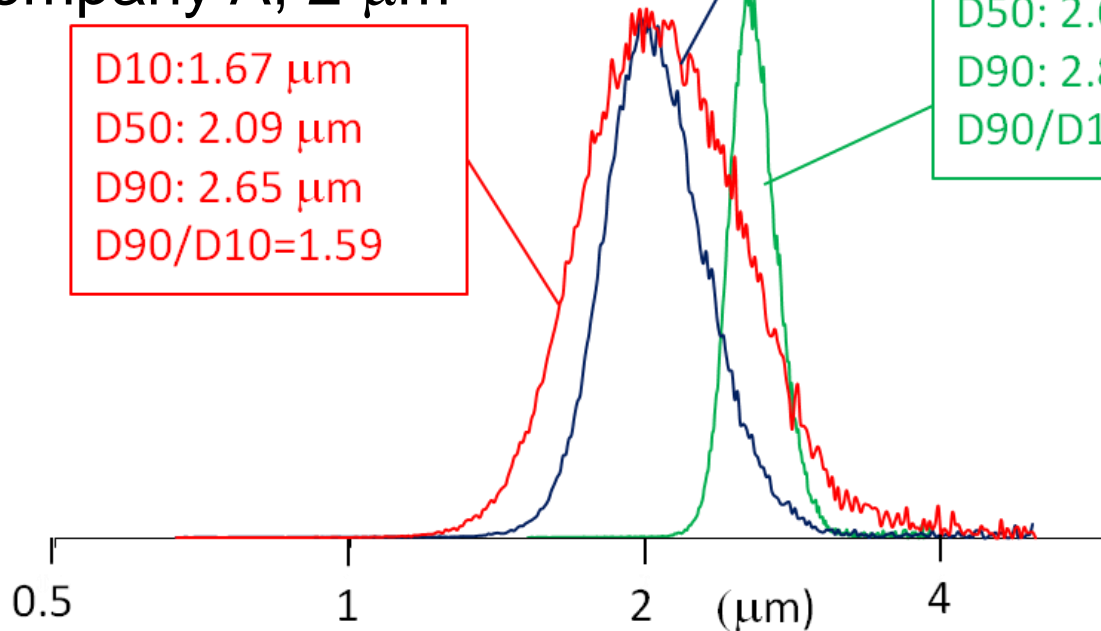
D10: 1.75 μm
 D50: 2.01 μm
 D90: 2.31 μm
 D90/D10 = 1.32

SunShell, 2.6 μm

D10: 2.46 μm
 D50: 2.63 μm
 D90: 2.82 μm
 D90/D10 = 1.15

Company A, 2 μm

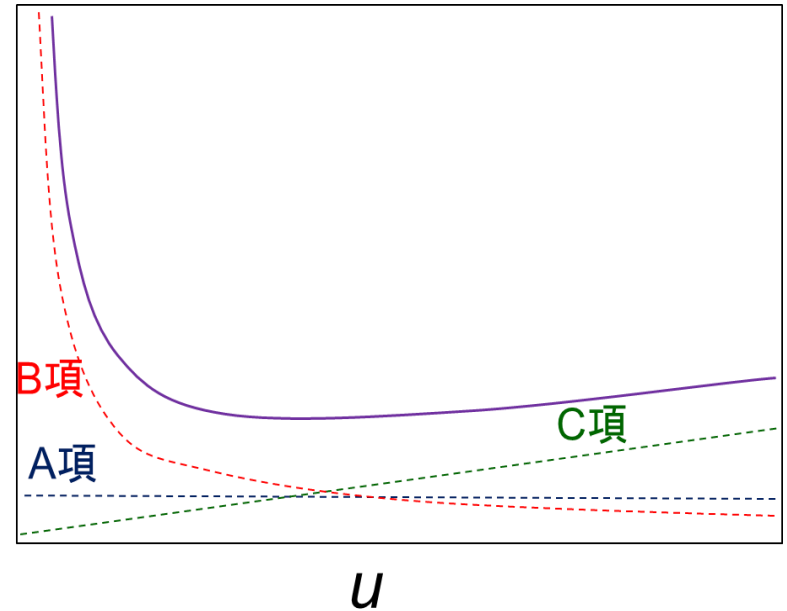
D10: 1.67 μm
 D50: 2.09 μm
 D90: 2.65 μm
 D90/D10 = 1.59



Van Deemterの式

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

H

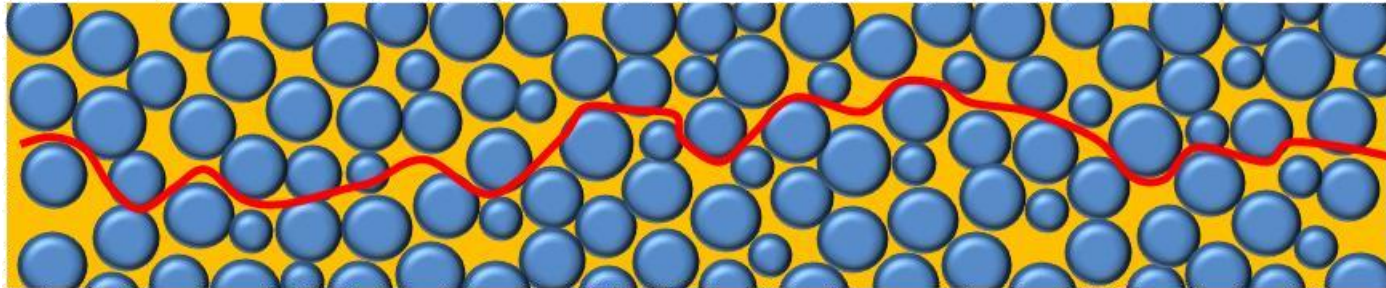


- A項 : 多流路拡散、渦巻き拡散 : 粒径を d_p
- B項 : カラム軸方向への拡散、アナライトの移動相中の拡散係数を D_m
- C項 : 物質移動の項 : 固定相-移動相での物質移動、粒子内での拡散による物質移動に依存

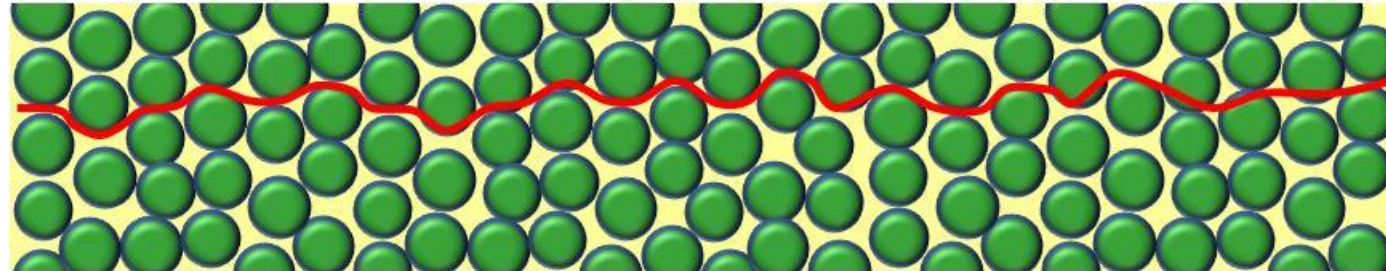
1. F. D. Antia and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 1-15.

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%）

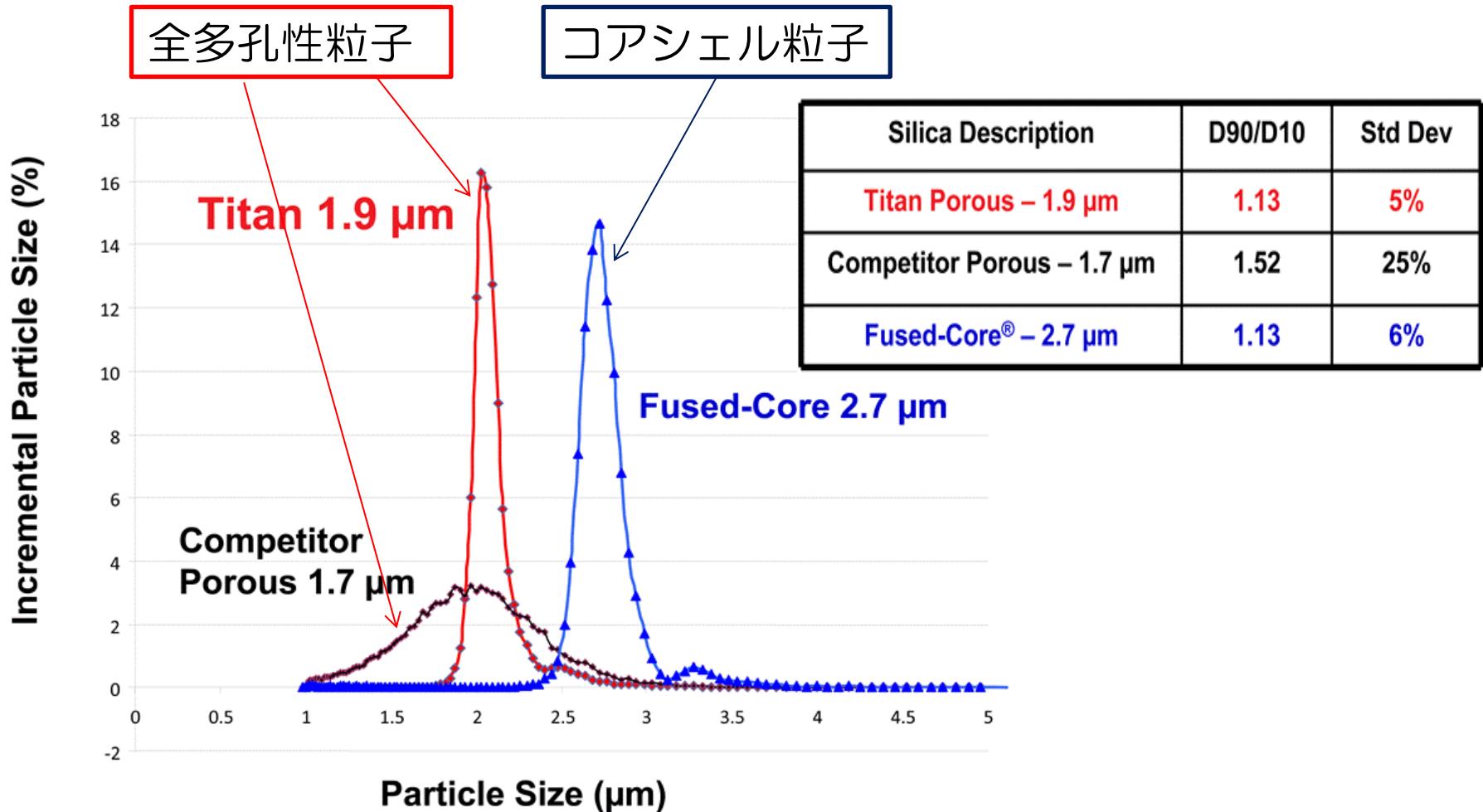


コアシェルシリカは・・・

粒度分布が狭いため、細密充填に近くなる

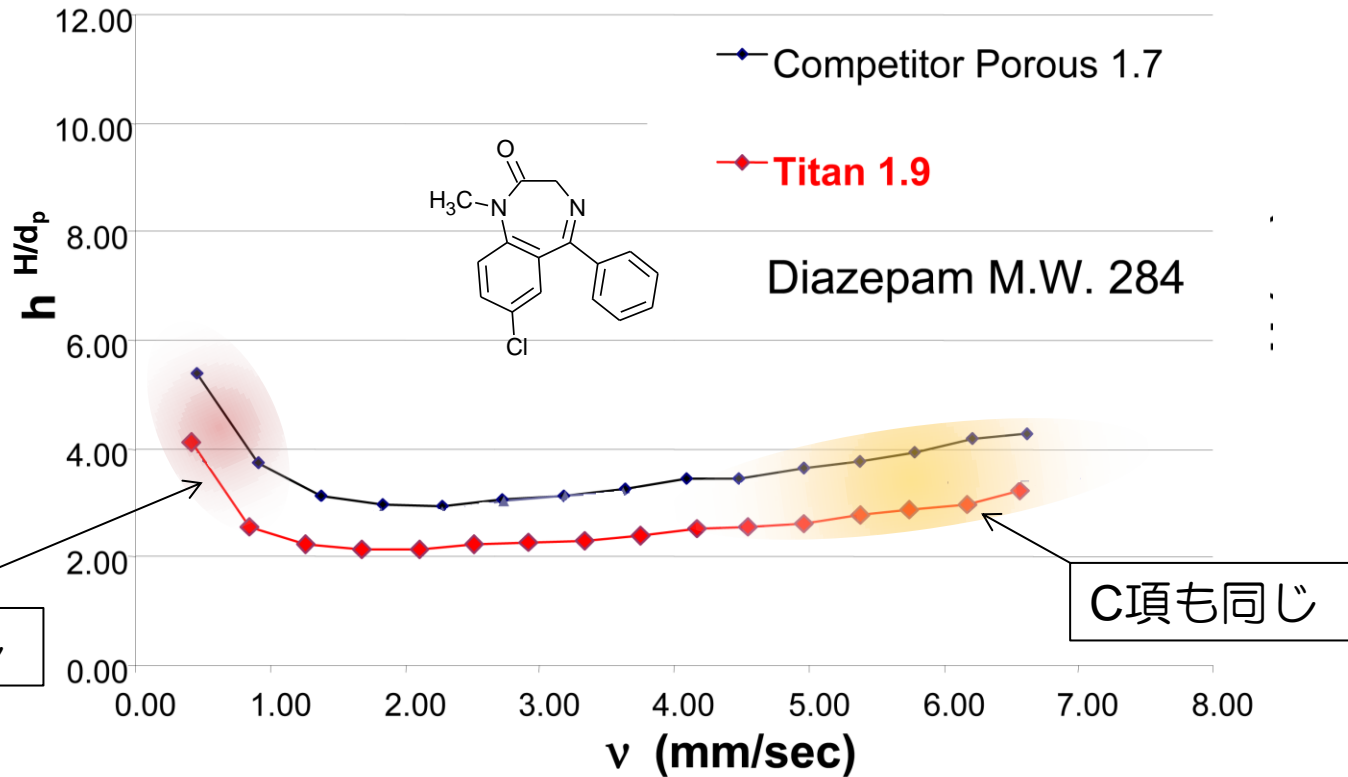

 多流路拡散・渦巻き拡散が小さくなる → Ad_p のAが小さくなる

粒度分布の比較2



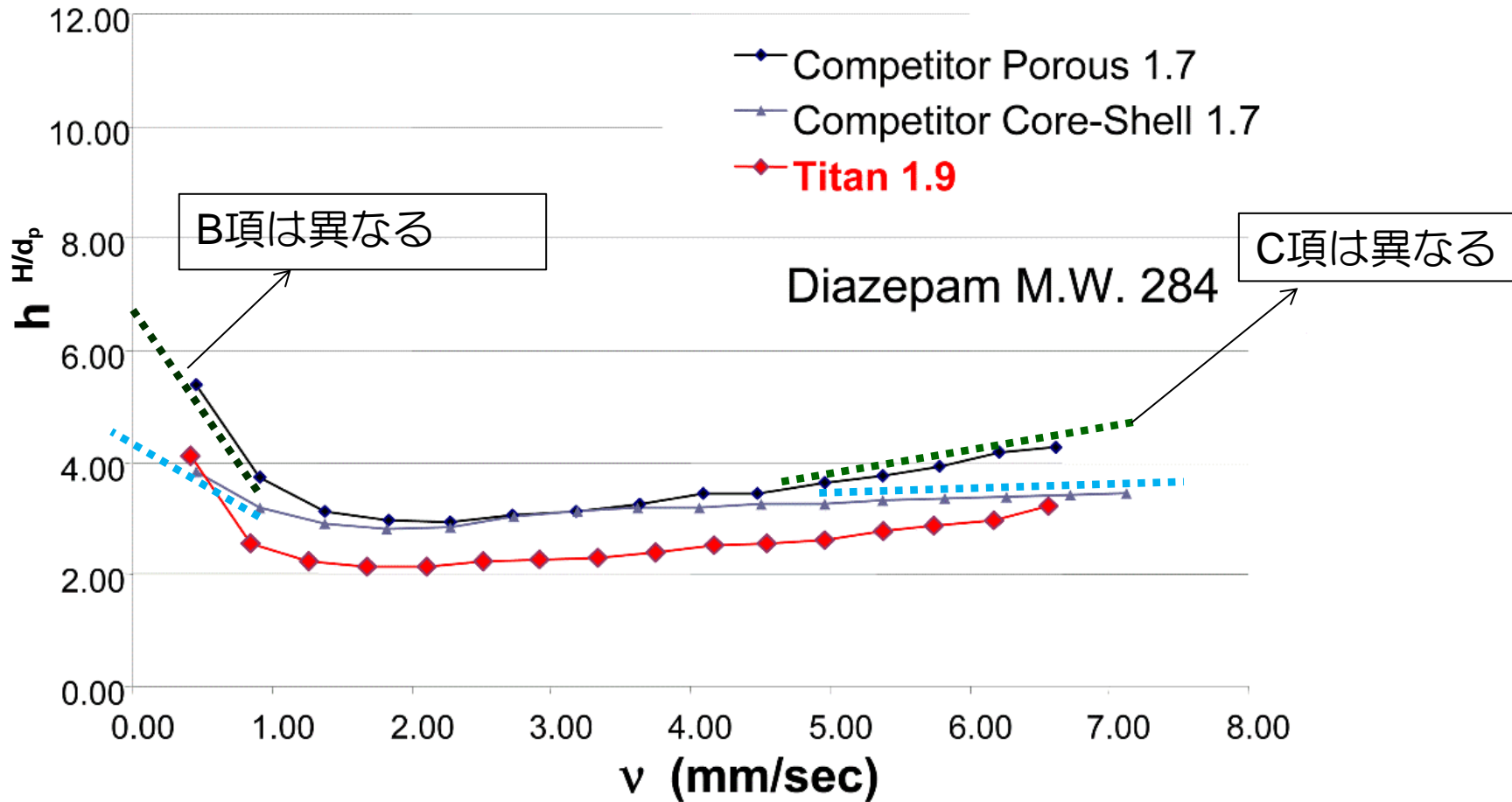
Van Deemter Plotの比較 (全多孔性 vs 全多孔性)

Columns: C18, 5 cm x 3.0 mm (40:60 acetonitrile:water + 0.1% formic acid, 35 °C)



Santasia et al. Poster presentation, P-332-Mon, HPLC 2012

Van Deemter Plotの比較 (コアシェル vs 全多孔性)

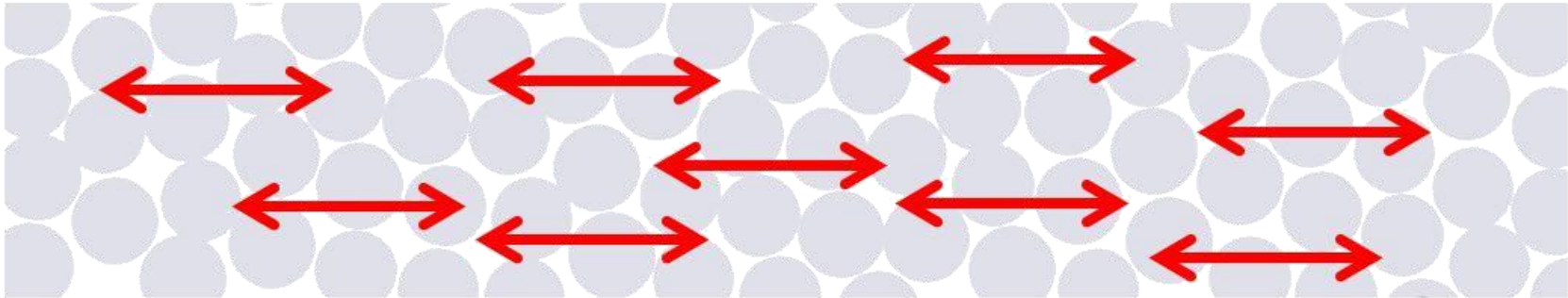


Santasia et al. Poster presentation, P-332-Mon, HPLC 2012

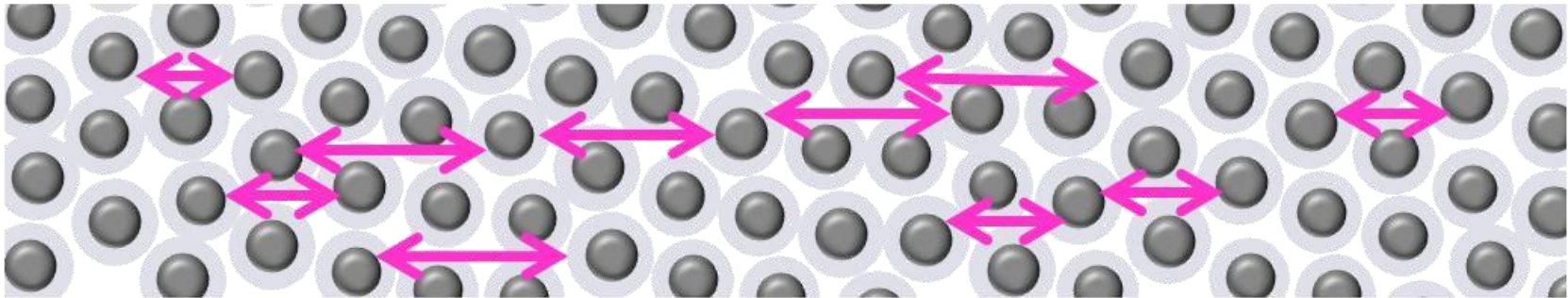
カラム軸方向への拡散とB項

溶質は細孔内も粒子外と同様に拡散する

全多孔性充填剤



コアシェルシリカ



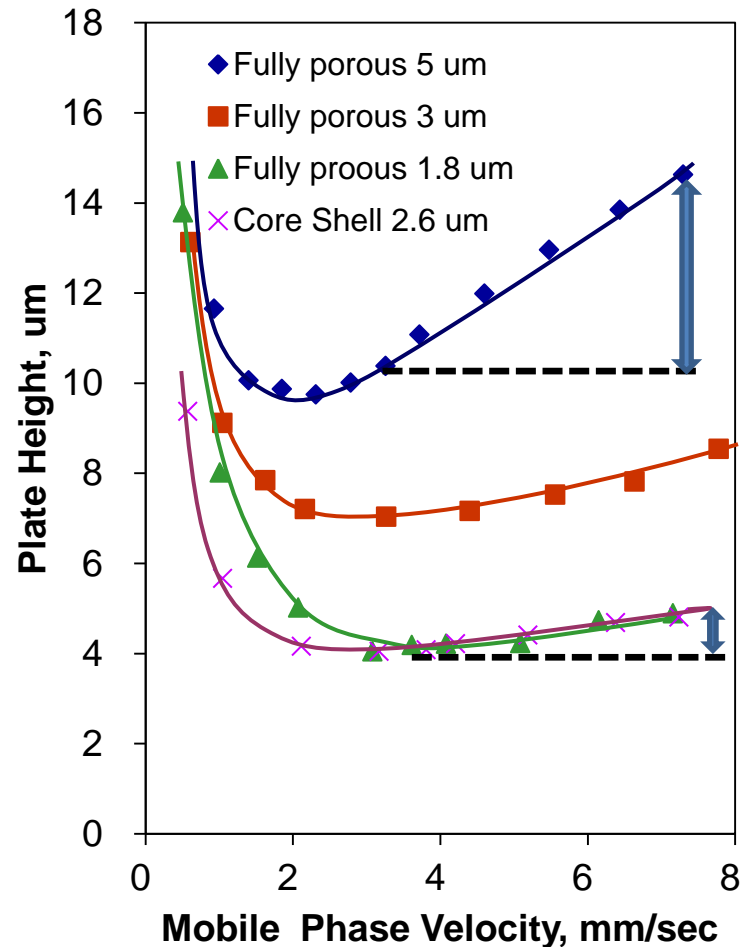
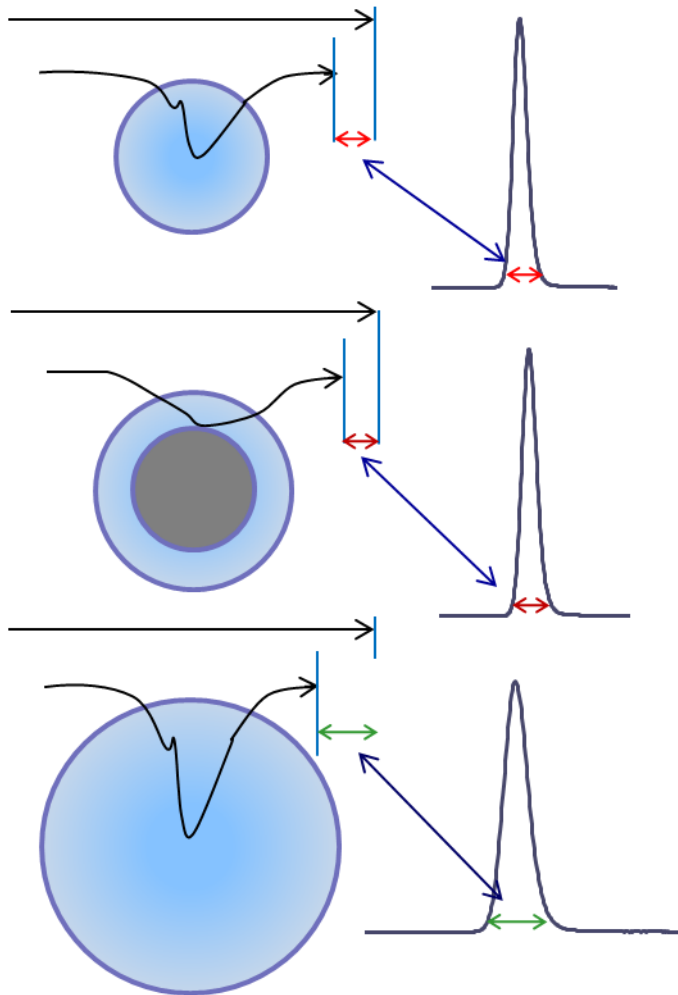
Flow rate (mL/min)

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

『拡散による物質移動（の遅れ）』とC項



コアシェルシリカは・・・

多孔質層が薄いため、溶質の拡散距離が短くなる → Cが小さくなる

全多孔性シリカとコアシェル型シリカ 2.6 μm と5 μm の標準試料の保持比較

NEW

	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 SunShell C18, 5 μm	
比表面積	340 m ² /g		150 m ² /g		90 m ² /g	
	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)
1) ウラシル	1.70	0	1.34	0	1.30	0
2) カフェイン	1.90	0.12	1.46	0.09	1.41	0.08
3) フェノール	2.17	0.28	1.65	0.23	1.57	0.21
4) ブチルベンゼン	13.35	6.85	10.87	7.11	8.93	5.87
5) o-ターフェニル	19.19	10.29	15.49	10.56	12.76	8.82
6) アミルベンゼン	19.96	10.74	16.56	11.36	13.43	9.33
7) トリフェニレン	24.35	13.32	21.95	15.38	16.76	11.89
相対値アミルベンゼン	100%	100%	83%	106%	67%	87%

コアシェル型シリカ 5 μm

コア径 : 3.4 μm

シェル層厚 : 0.6 μm

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

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

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

高い理論段数が得られる
カラムの性能が高い

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

流速が遅い条件でも理論段数の低下が少ない

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

流速が速い条件でも理論段数の低下が少ない

カラムにしたときは・・・

同じ表面処理をしていれば全多孔性シリカカラムと同じ選択性を示す

イソクラティック溶離例

5 μ m C18からの移行

HPLC

Brand F C18, 5 μ m 250 x 4.6 mm

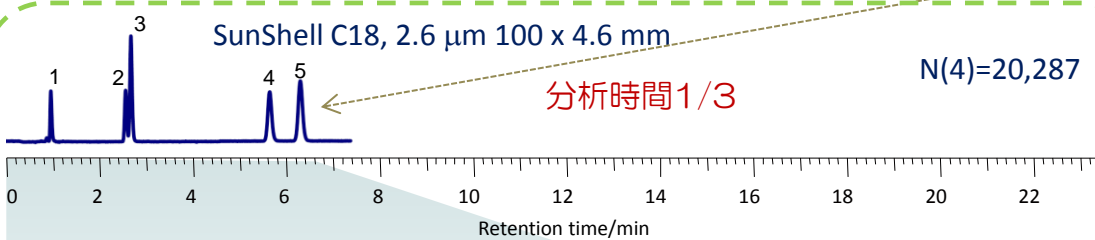
N(4)=19,313



SunShell C18, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm

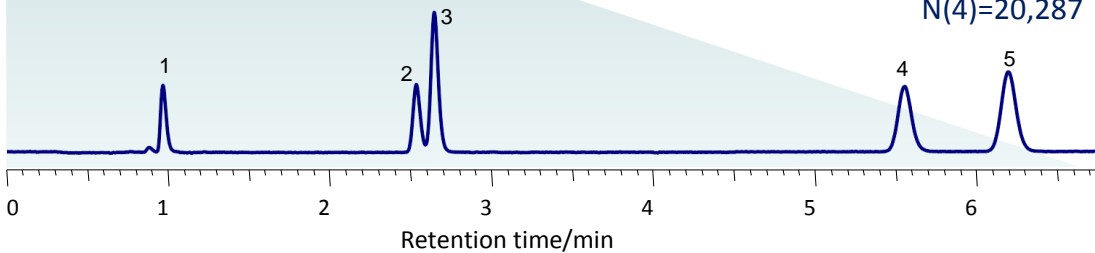
N(4)=20,287

分析時間1/3



Retention time/min

N(4)=20,287



Retention time/min

UHPLC

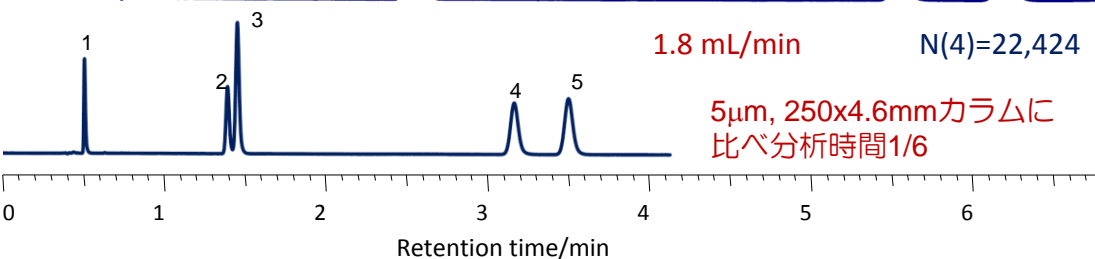
1.0 mL/min

N(4)=24,124



1.8 mL/min

N(4)=22,424



Retention time/min

5 μ m, 250x4.6mmカラムに
比べ分析時間1/6

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 = Benzylamine

2 = Ketoprofen

3 = Naproxen

4 = Indomethacin

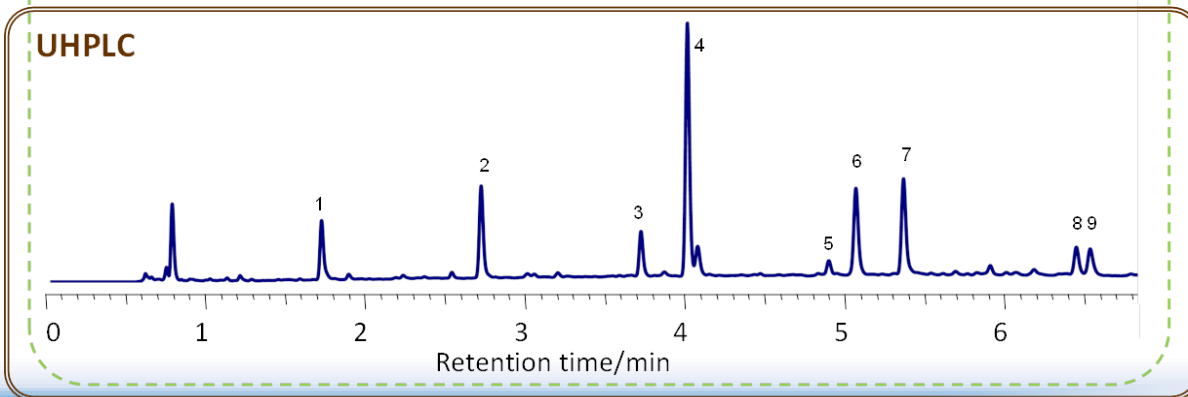
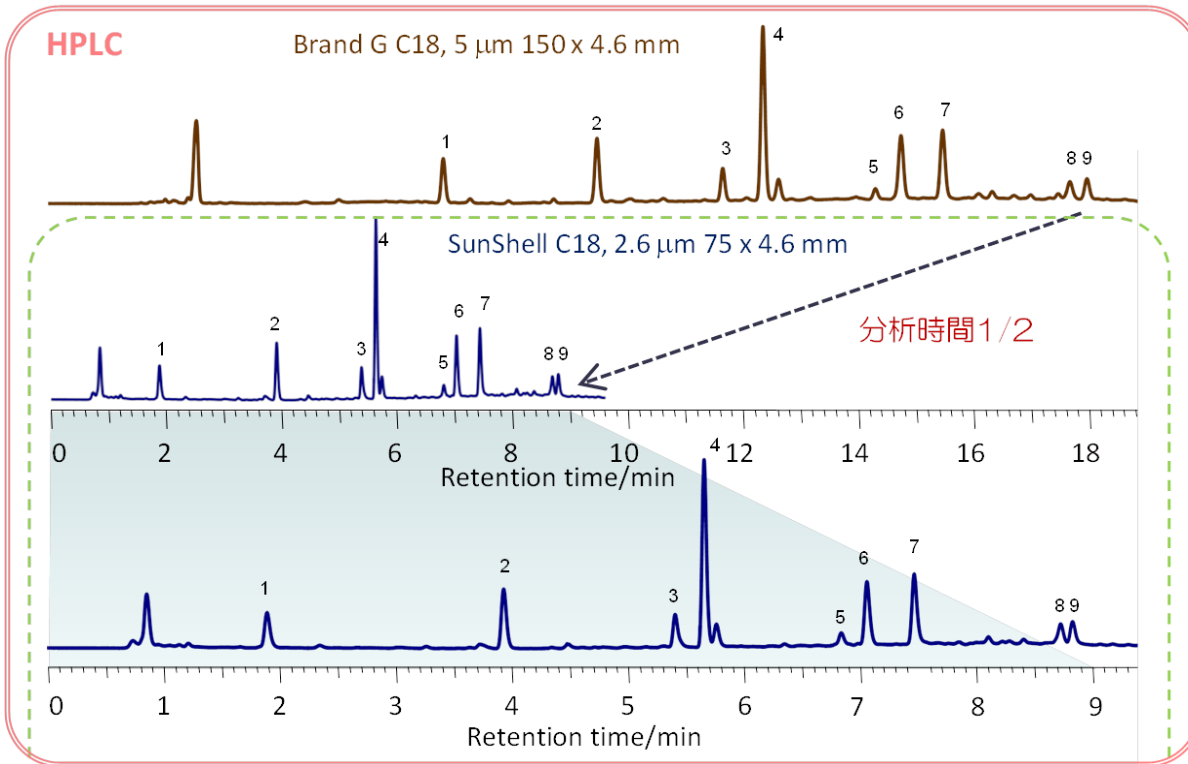
5 = Ibuprofen

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

コアシェルカラムをHPLCで使う

でも、ちょっとその前に.....

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

比表面積が20%小さい

HPLCでの使用で必要なこと

応答速度の高速化

低拡散化

低試料負荷

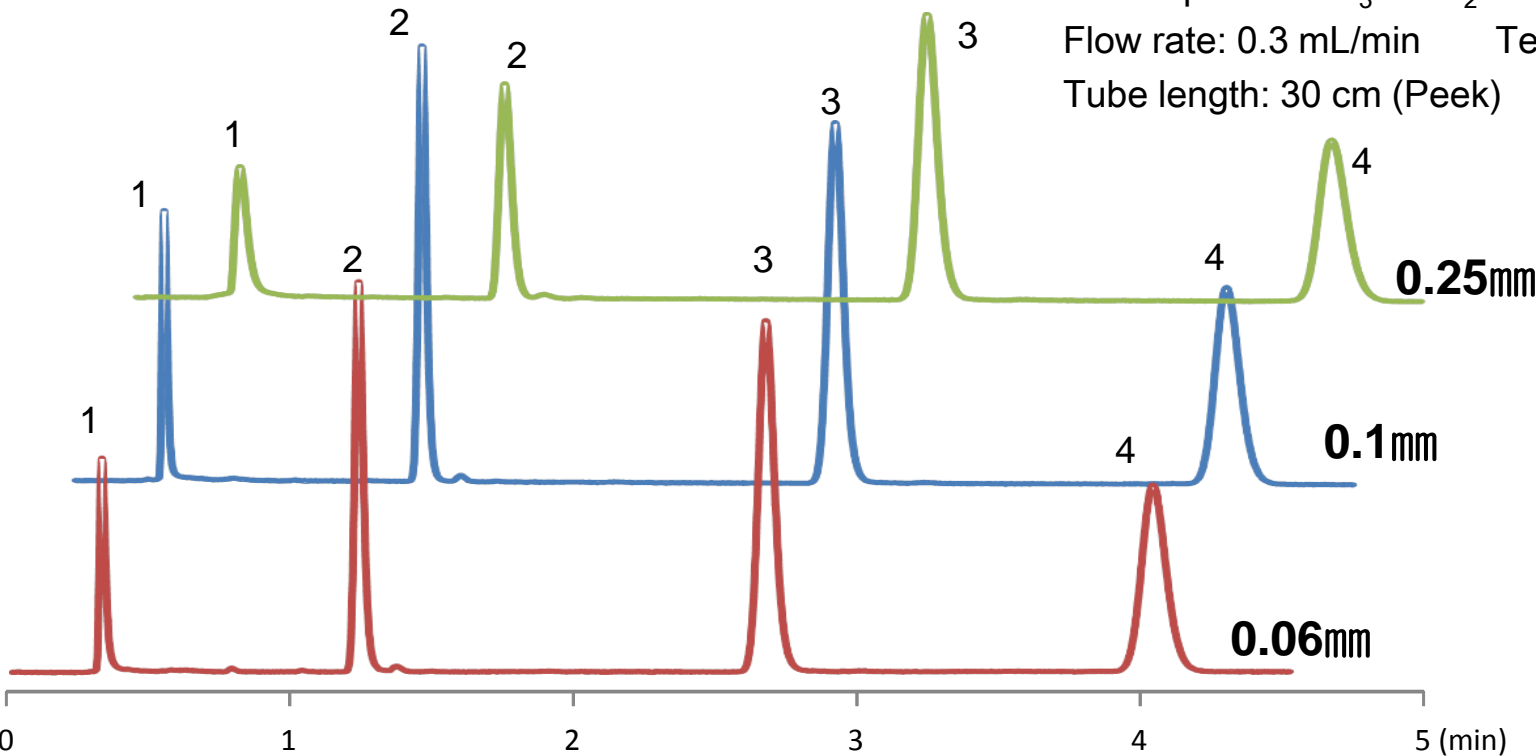
カラムー検出器間における配管の影響

Column: SunShell C18, 2.6 μm 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: ambient

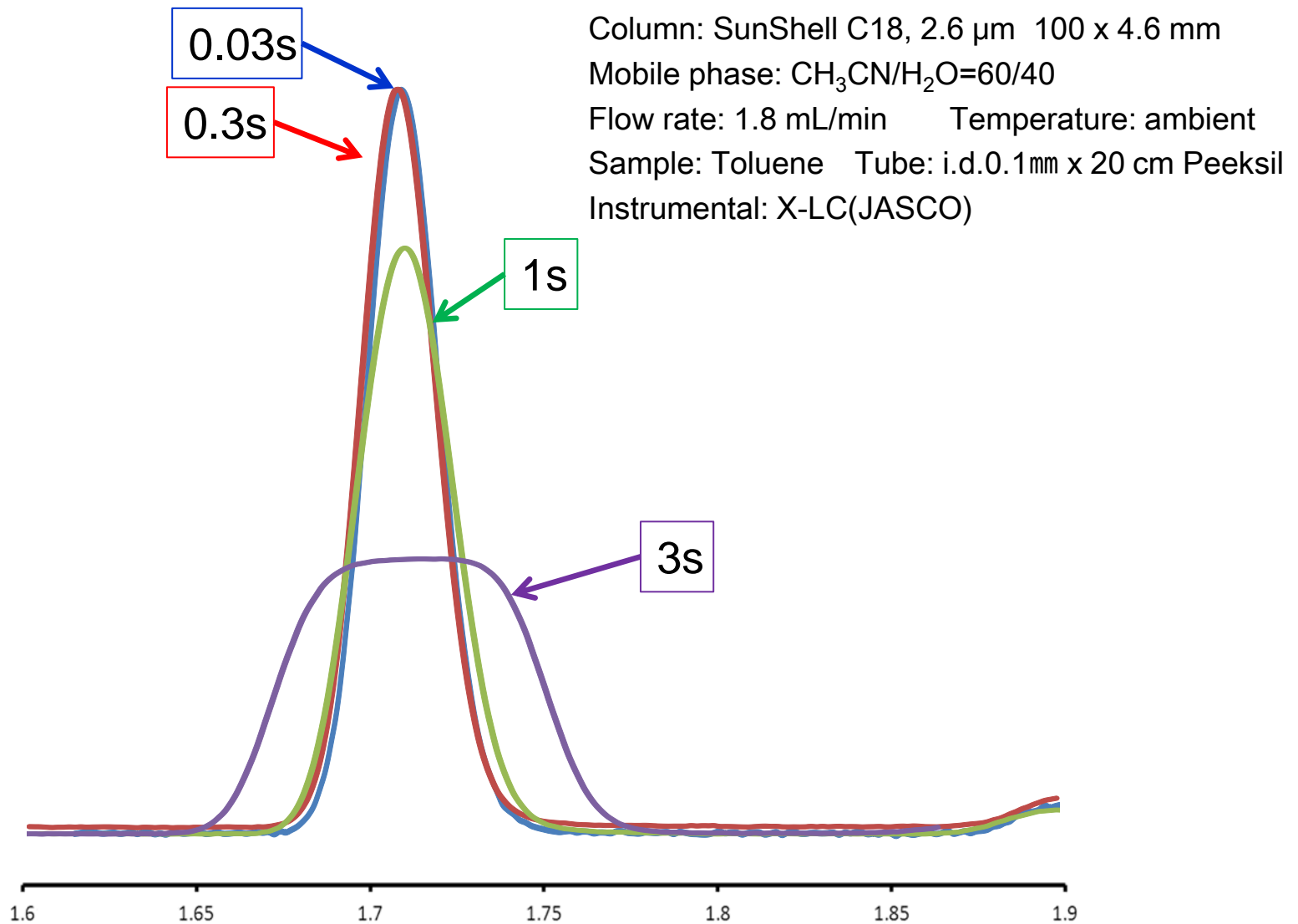
Tube length: 30 cm (Peek)



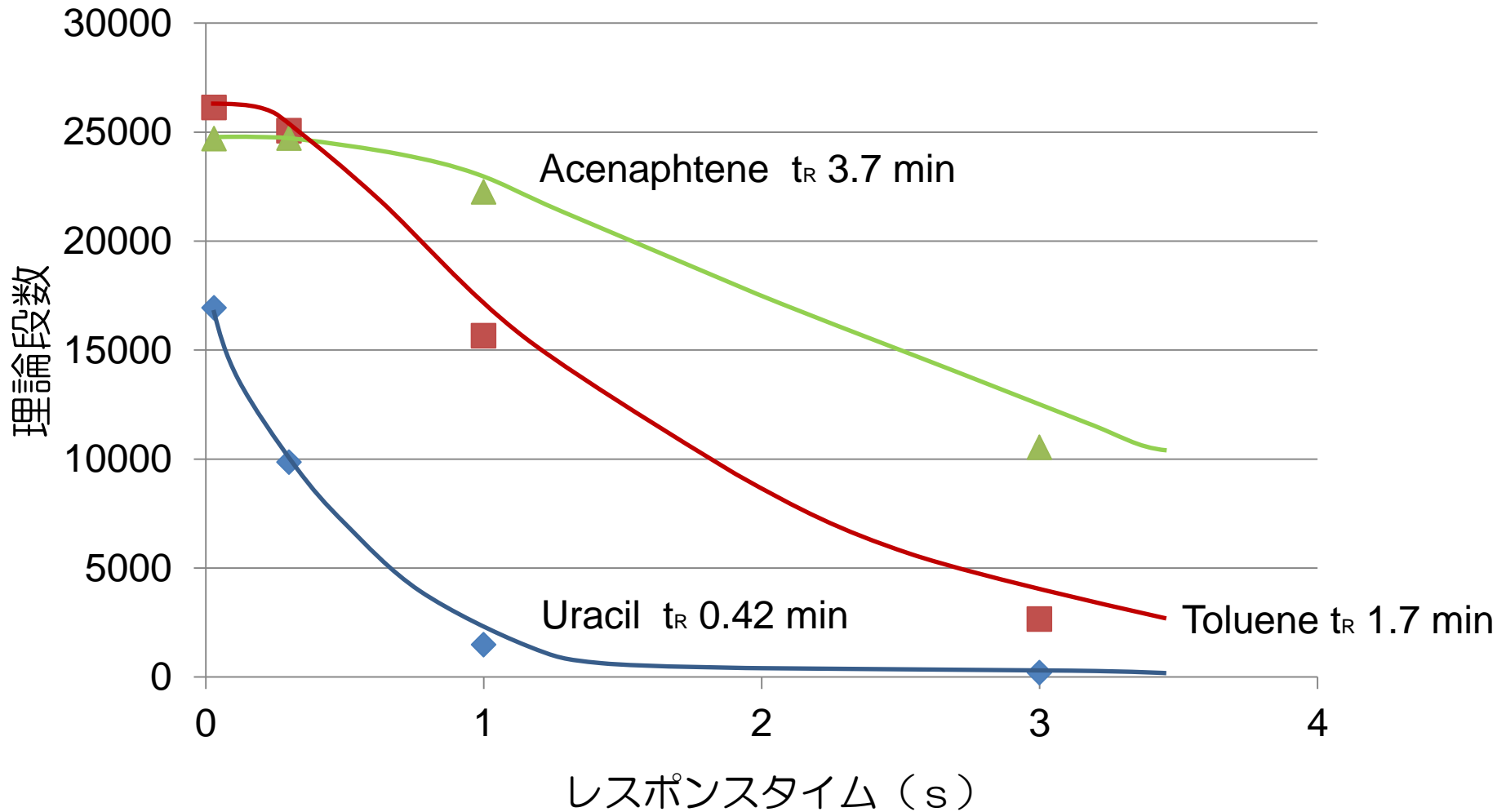
理論段数の平均値
(n=3)

	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

検出器レスポンスタイムの影響

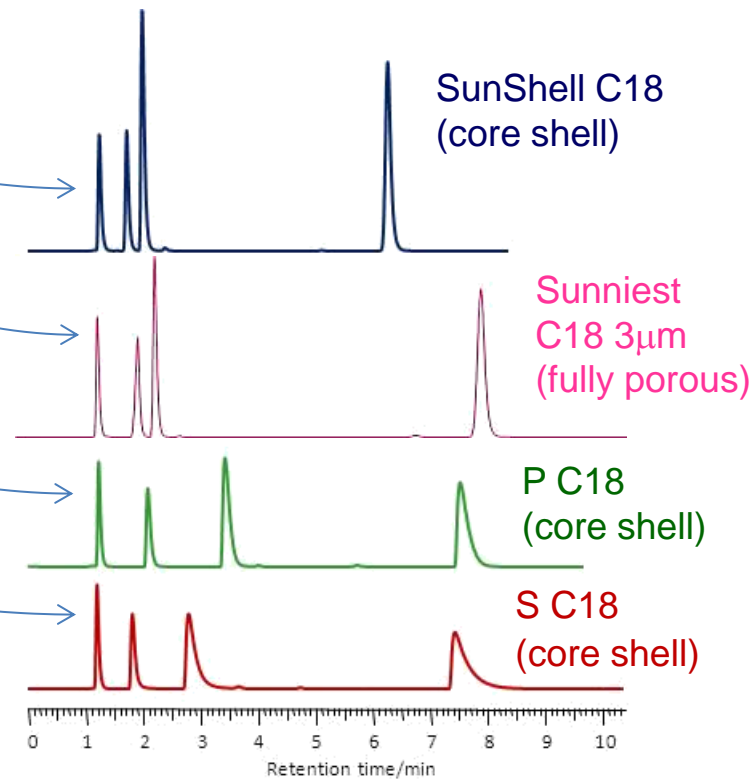
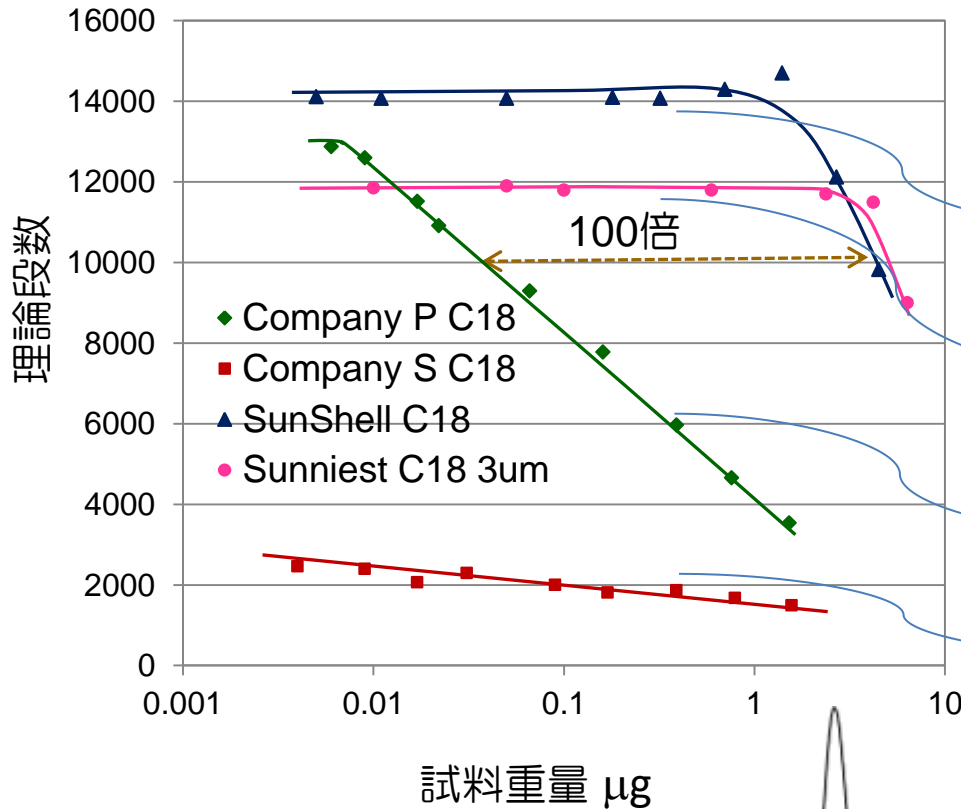


検出器レスポンスタイムの影響



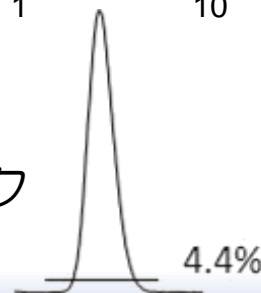
アミトリプチリンの負荷量の比較

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



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

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 (5σ法)



HPLCをコアシェルカラムに最適化すると

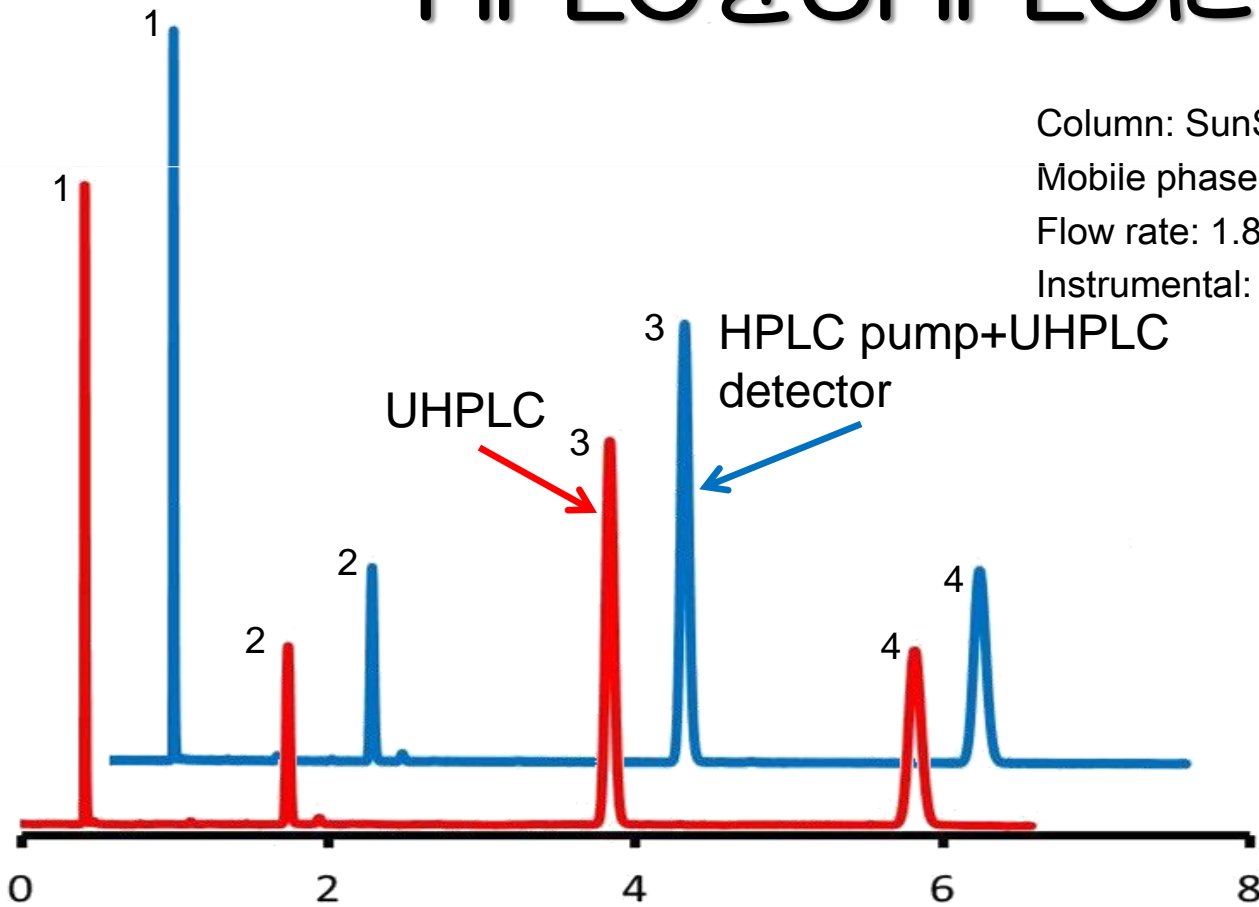
	最適化前	レスポンス タイム	配管	マイクロ フローセル	UHPLC
5 μm 全多孔性 カラム	10141	10463	11195	11738	11637
3 μm 全多孔性 カラム	15039	16494	17555	17969	18135
2.6 μm コア シェルカラム	14810	19819	22921	27146	28208



HPLCでも最適化を行えばコアシェルカラムをUHPLCに近い性能で使うことができることがある

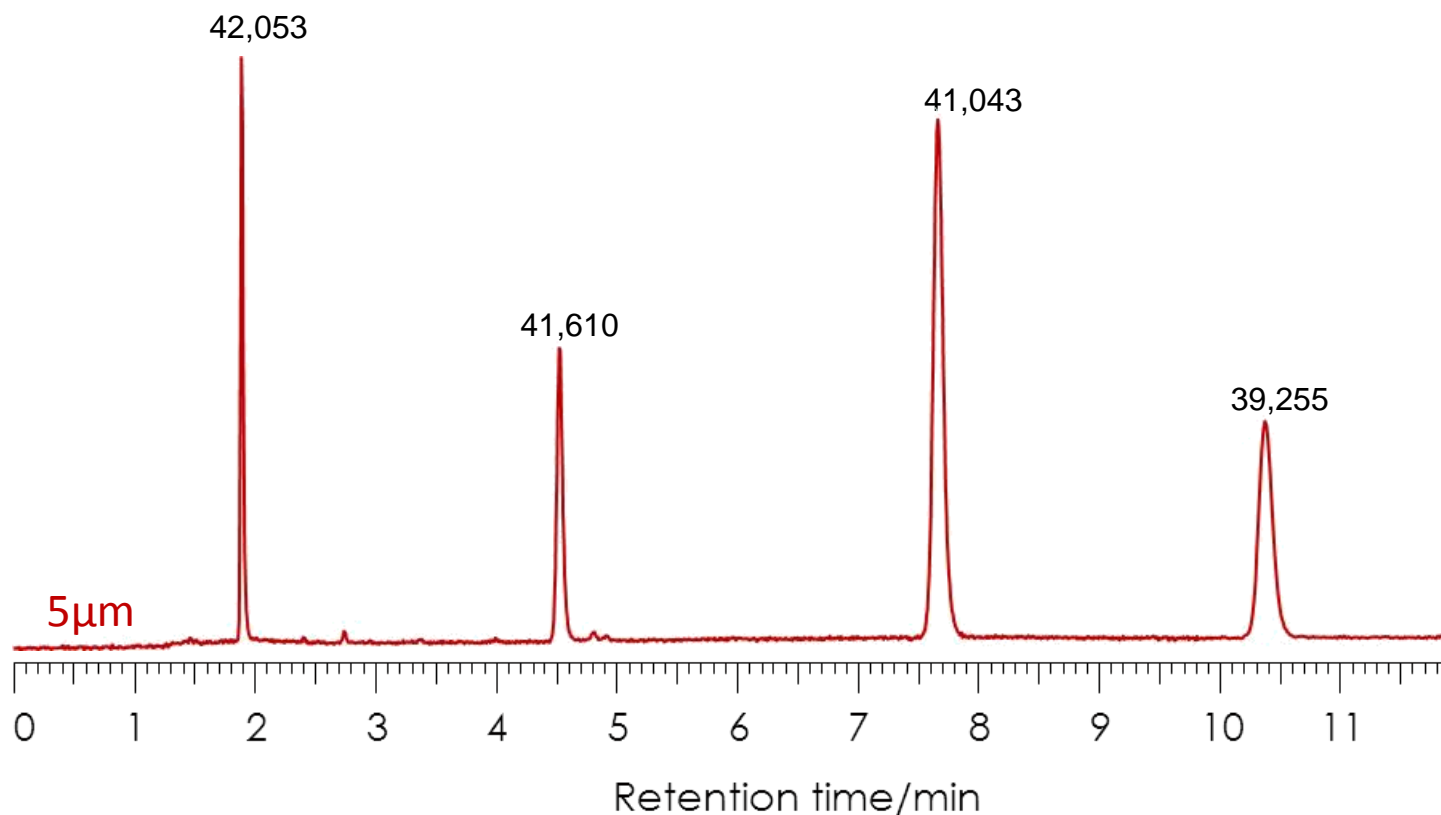
HPLCをUHPLCに！？

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
 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

SunShell 2.6 μm, 5 μm 4.6x250mmカラムの性能



Column: SunShell C18, 5 μm 250 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O= 70/30

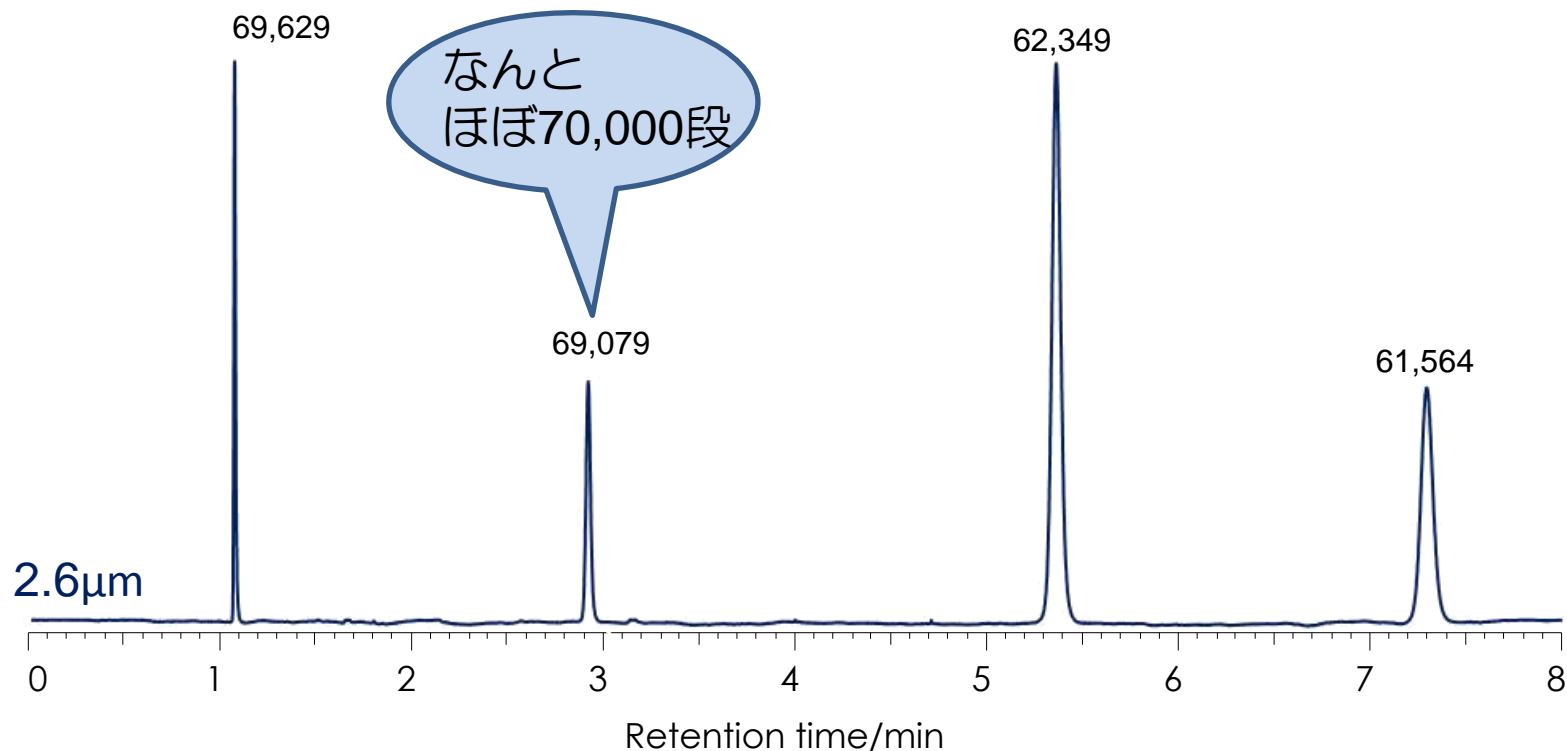
Flow rate: 1 mL/min,

Temperature: 40 °C

Pressure: 6.7 MPa for 5 μm Detection: UV@250 nm

Sample: 1 = Uracil, 2 = Toluene, 3 = Acenaphthene, 4 = Butylbenzene, HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

コアシェルカラムをUHPLCで使う



Column: SunShell C18, 2.6 μ m, 250 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O= 70/30

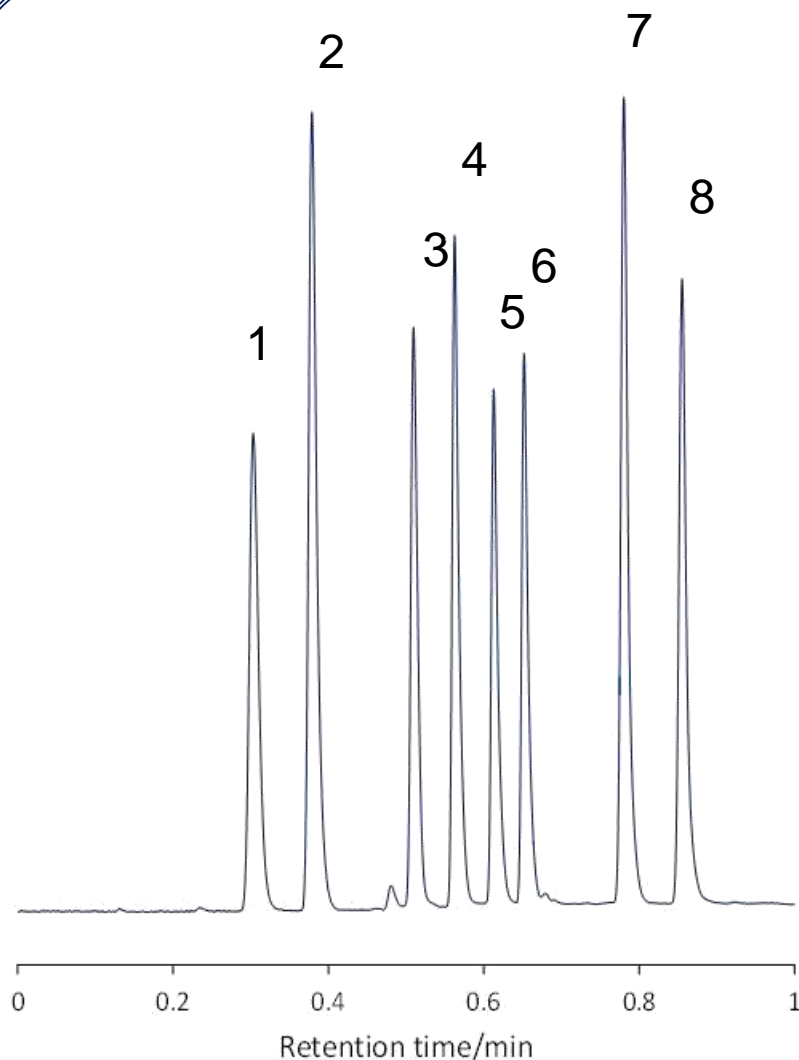
Flow rate: 1.8 mL/min,

Temperature: 25 °C

Pressure: 45 MPa for 2.6 μ m Detection: UV@250 nm

Sample: 1 = Uracil, 2 = Toluene, 3 = Acenaphthene, 4 = Butylbenzene, HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

高速分離例



Column: SunShell C18 2.6 μm , 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 μL .

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

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た
- コアシェルカラムは、sub-2 μm カラムと同じ高速分離も可能である