

カーボン固相抽出の革命ー Carbon X 登場！ and ヒリックSPE ・ZIC-HILICの活用法

クロマニックテクノロジーズ

長江徳和

info@chromanik.co.jp

新規カーボン積層型シリカSPE基材 Carbon coated on porous silica(COS)

目標とするCOS の特性

- ユニークな選択性
- 表面積が高い
- 取り扱いが簡単
- 再現性のある回収率 (Batch-to-batch, cartridge-to-cartridge)
- 回収率が高い
- 機械的安定性が高い
- 溶液流れが安定
- 充填剤への浸透性が高い
- 微粒子が存在しない
- 適した細孔径を採用
- 溶出物がない
- 粒度分布がせまい

COS 特長と利点

特長

機械的安定性, 微粒子がない, 新規な応用が可能, 通液性がよい

利点

フリットを通過する微粒を除去しているので, サンプリングのやり直しが少ない
強溶媒洗浄カートリッジ, 分取用素材による新しい応用例
カートリッジ間の再現性が高い

他製品の弱点

回収液の濁りの原因になる微粒子が粒子の充填する操作中に発生する
機械的強度の低さから適用できない応用例がある

市販されているカーボンの比較

Product	Material Type	Price (\$)/gram	Particle Size (μm)	Pore Size (Å)	Surface Area (m ² /g)	Disadvantage
COS	Carbon on Silica	5	SPE grade silica	~70	~150	
ENVI-18 (ODS) (1)	ODS bonded Silica	2.08	45	60	475	Not selective for polar analytes
ENVI-Carb™ Plus (1)	Spherical carbon molecular sieves	15	177-400	15-30	1149	Small pore size; low apparent surface area.
ENVI-Carb (1)	Graphitized carbon black	5	37-125	Non porous	100	Nonporous, fragile.
SampliQ (2)	Graphitized carbon black	5	37-125	Non porous	100	Nonporous, fragile.
Carboprep (3)	Graphitized carbon black	12		Non porous	90	Nonporous, fragile.
HyperSep (4)	Porous graphitic carbon	100	30	250	100	Too expensive for disposable cartridge.

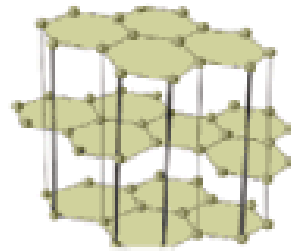
カーボン原料の比較

Material Type

Structure

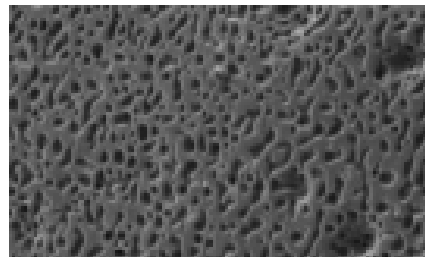
Characteristics

Carbon Black



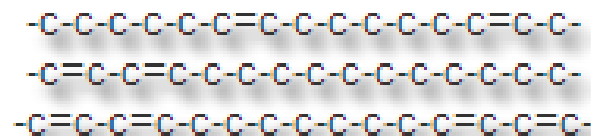
Mechanically unstable
Low Surface Area
Expensive
Fines

Porous Graphitic Carbon



Very Expensive
Complicated Production Process
Mechanically Unstable

Carbon coated silica

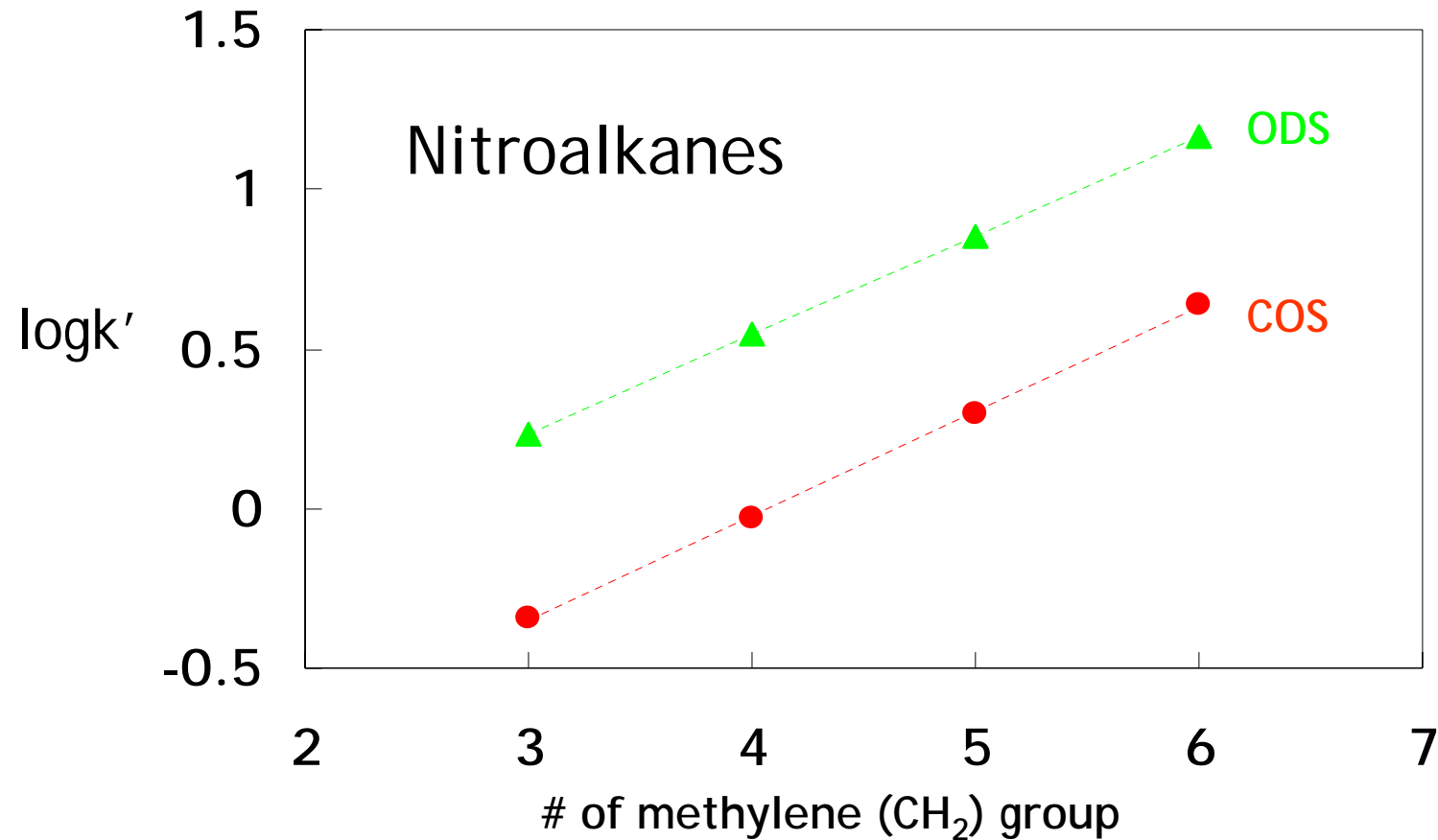


Porous Substrate

- ✓ Mechanically Stable
- ✓ High Surface Area
- ✓ Easy to Pack
- ✓ No Fines

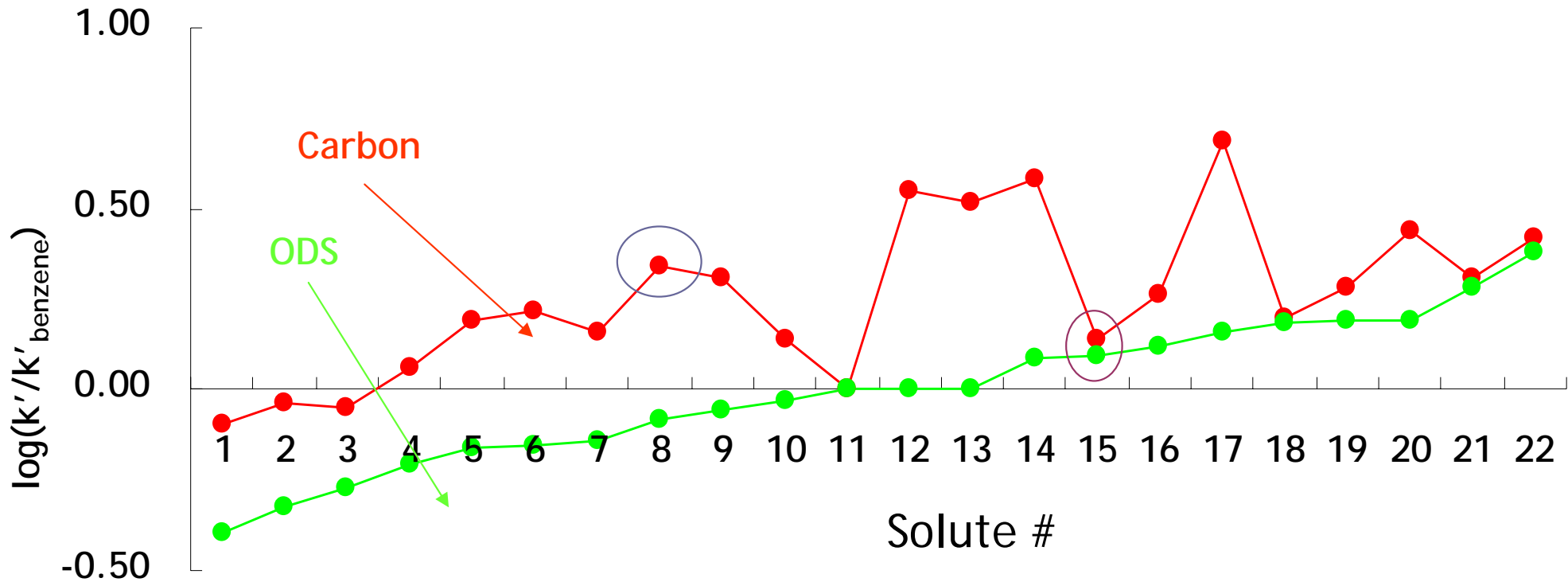
逆相としての特性 (メチレン1個と保持の関係)

ODS and Carbon Are Both Reverse Phase



* Mao, Y, Thesis, 2000

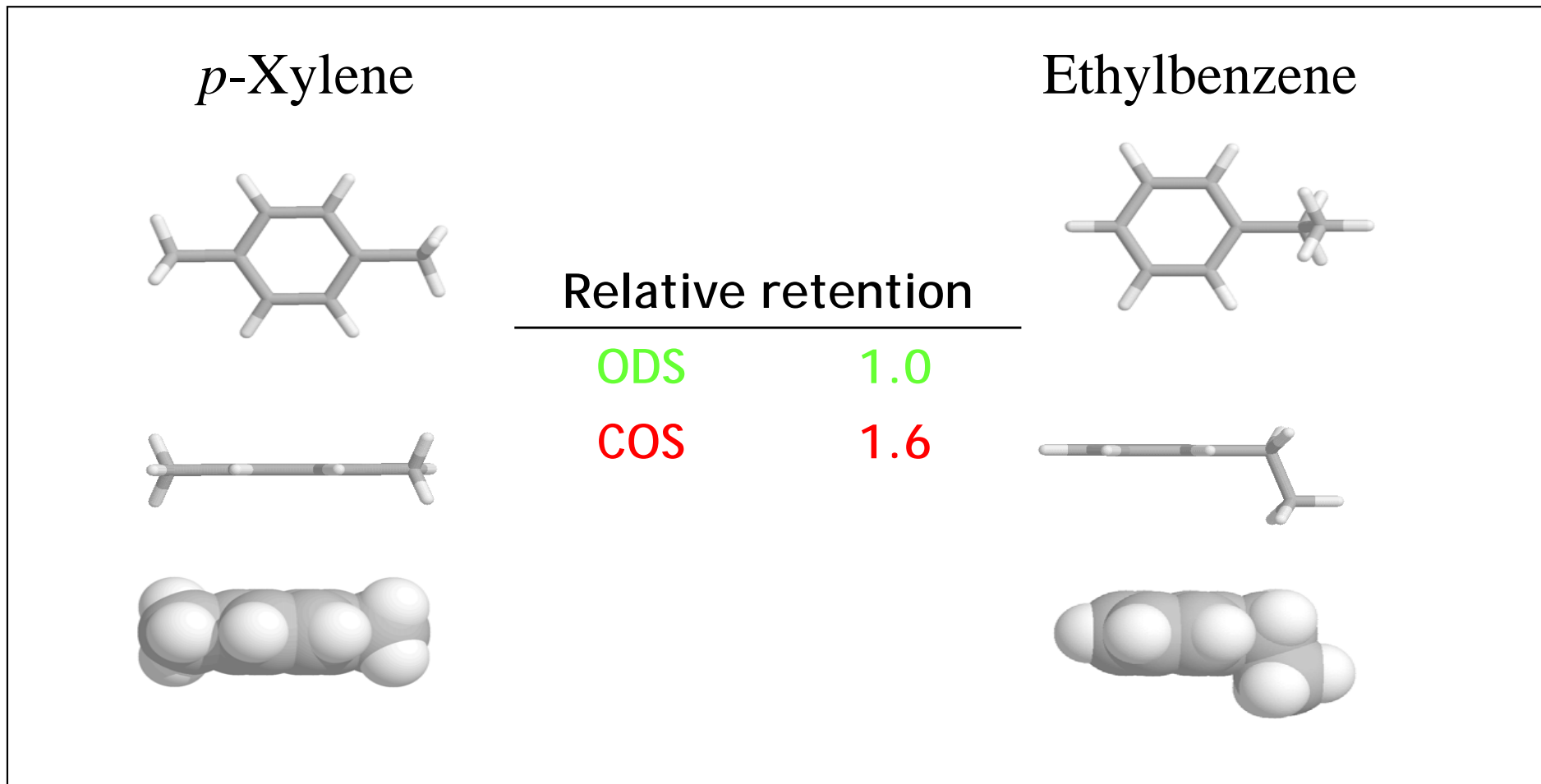
保持比較 (ODS & COS)



1	N-benzyl formamide	6	acetophenone	11	benzene	16	bromobenzene	21	propylbenzene
2	benzylalcohol	7	benzonitrile	12	p-nitrobenzyl chloride	17	naphthalene	22	n-butylbenzene
3	phenol	8	nitrobenzene	13	p-nitrotoluene	18	ethylbenzene		
4	3-phenyl propanol	9	methyl benzoate	14	benzophenone	19	p-xylene		
5	p-chlorophenol	10	anisole	15	toluene	20	p-dichlorobenzene		

* Jackson, P.T, Schure, M.R., Weber, T.P., Carr, P.W., Anal. Chem. 1997, 69, 416.

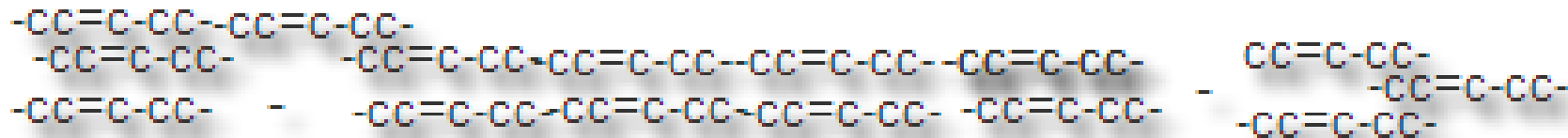
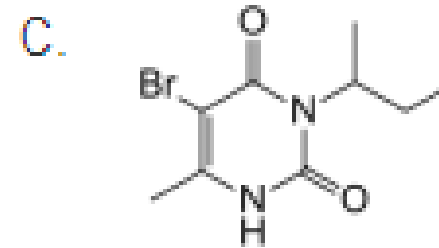
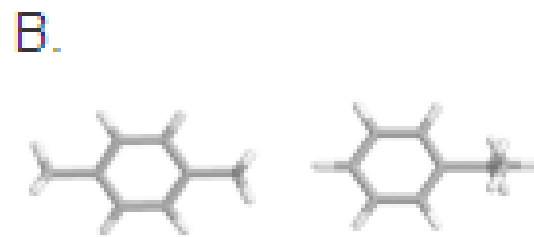
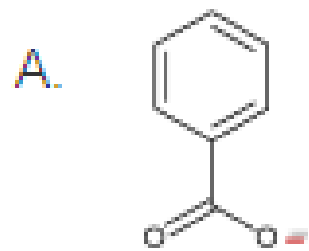
COS 異性体の選択性



応用例 Selected Applications

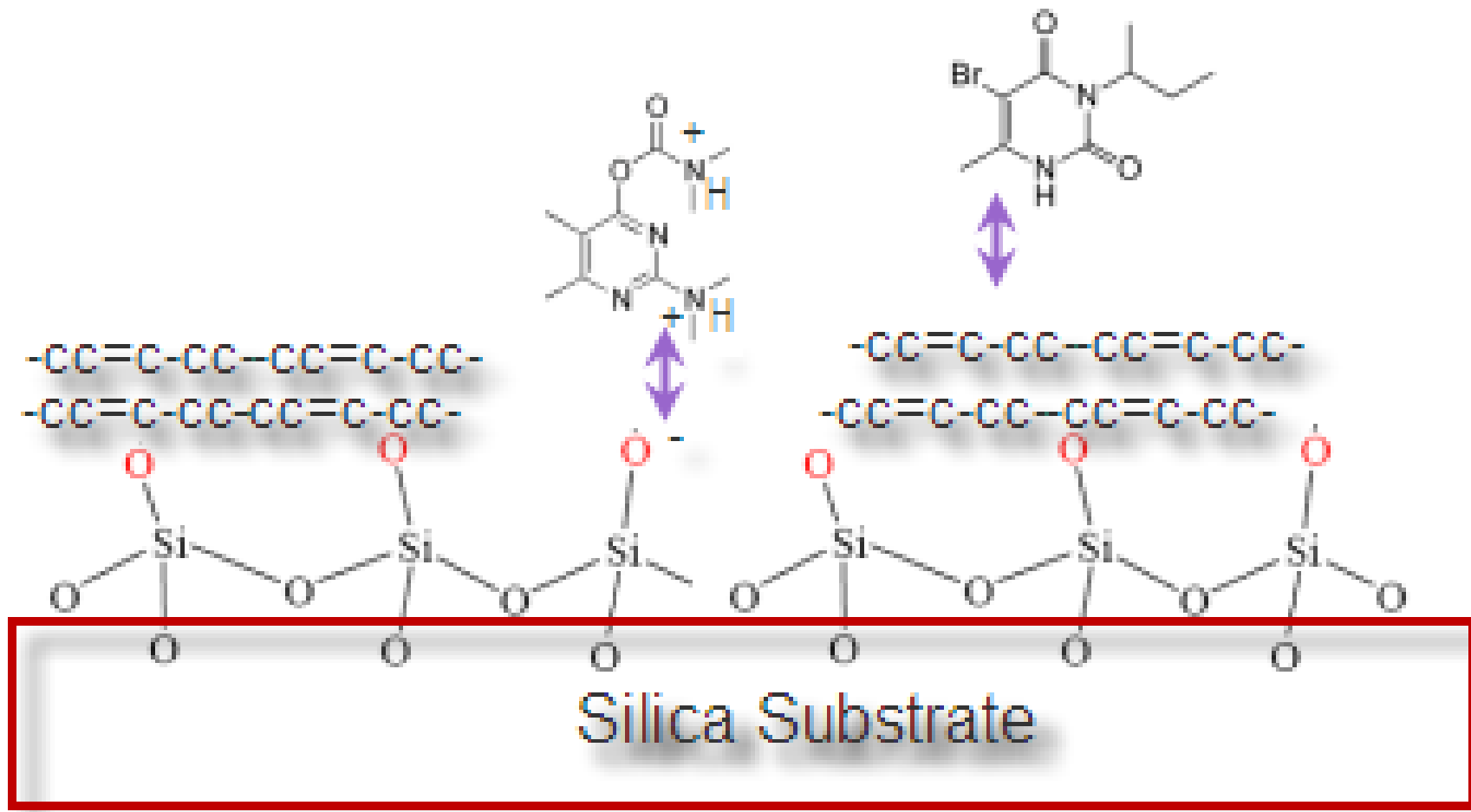
- 農薬, 殺虫剤, 除草剤(acidic, hydrophilic, etc.)
- Color Sorbents (Chlorophyll)
- 有機酸
- 異性体
- スルホン酸塩
- 疎水性医薬品
- PCBs

pH3以下でのカーボン表面の概略図



Silica Substrate

pH3以上でのカーボン表面の概略図



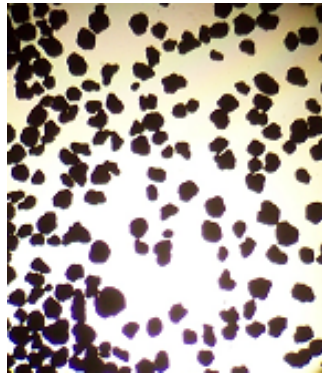


COS の規格

- Base Material: Silica
- Particle Size: 38-125 micron
- Particle Shape: Irregular
- Estimated Mean Pore Diameter: ~90 A
- Estimated Specific Surface Area: ~100 m²/g
- % Carbon Loading: 12

機械的強度

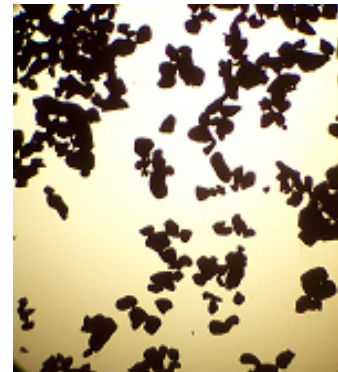
COS



摩擦後も粒子は壊れていない

Envi-Carb Carbon

Before



After



つぶされた粒子

操作:

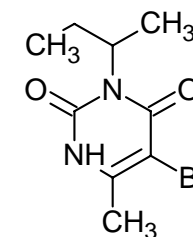
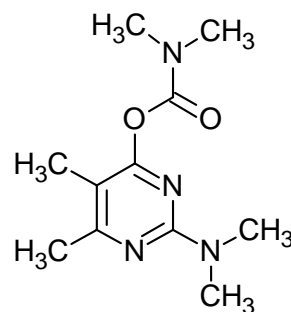
2枚のカラス板に粒子を挟み, ガラス板を滑らす

倍率: 20x

農薬の SPE の例

Step 1. 農薬のロードと溶出

- **Packing:** Cartridges packed with 0.7g of Carbon on silica
- **SPE Condition:** 5mL 4:1 CH₂Cl₂:ACN, then 2mL ACN, then 10mL 2% acetic acid in H₂O.
- **Sample Application:** 1mL Bromacil (in 10% MeOH in H₂O). Pirimicarb (1 mL)



- **Wash/Dry:** No change
- **Elution:** Pass 2 mL ACN, then 2- 2 mL of 4:1 CH₂Cl₂:ACN. Collect all eluent in same vessel. Evaporate to dryness and reconstitute with 80/20 H₂O/ACN.

農薬の SPE の例

Step 2: HPLCによる農薬の分離

- **Column-** Zorbax Eclipse XDB- C-18 4.6 X 50mm, 5 μ m
- **Mobile Phase A:** 10/90 ACN/H₂O with 0.1% Formic Acid
- **Mobile Phase B:** 90/10 ACN/H₂O with 0.1% Formic Acid
- 25 μ l injection
- **Detector:** 290nm
- **Column temp:** 35° C

Time (min)	%A	%B	Time (min)	%A	%B
0.2	80	20	0	95	5
32.0	60	40	5	20	80
35.0	0	100	5.5	20	80
40.0	0	100	6	95	5
41.0	80	20	7	95	5



COS カートリッジによるBromacil と Pirmicarb の回収率

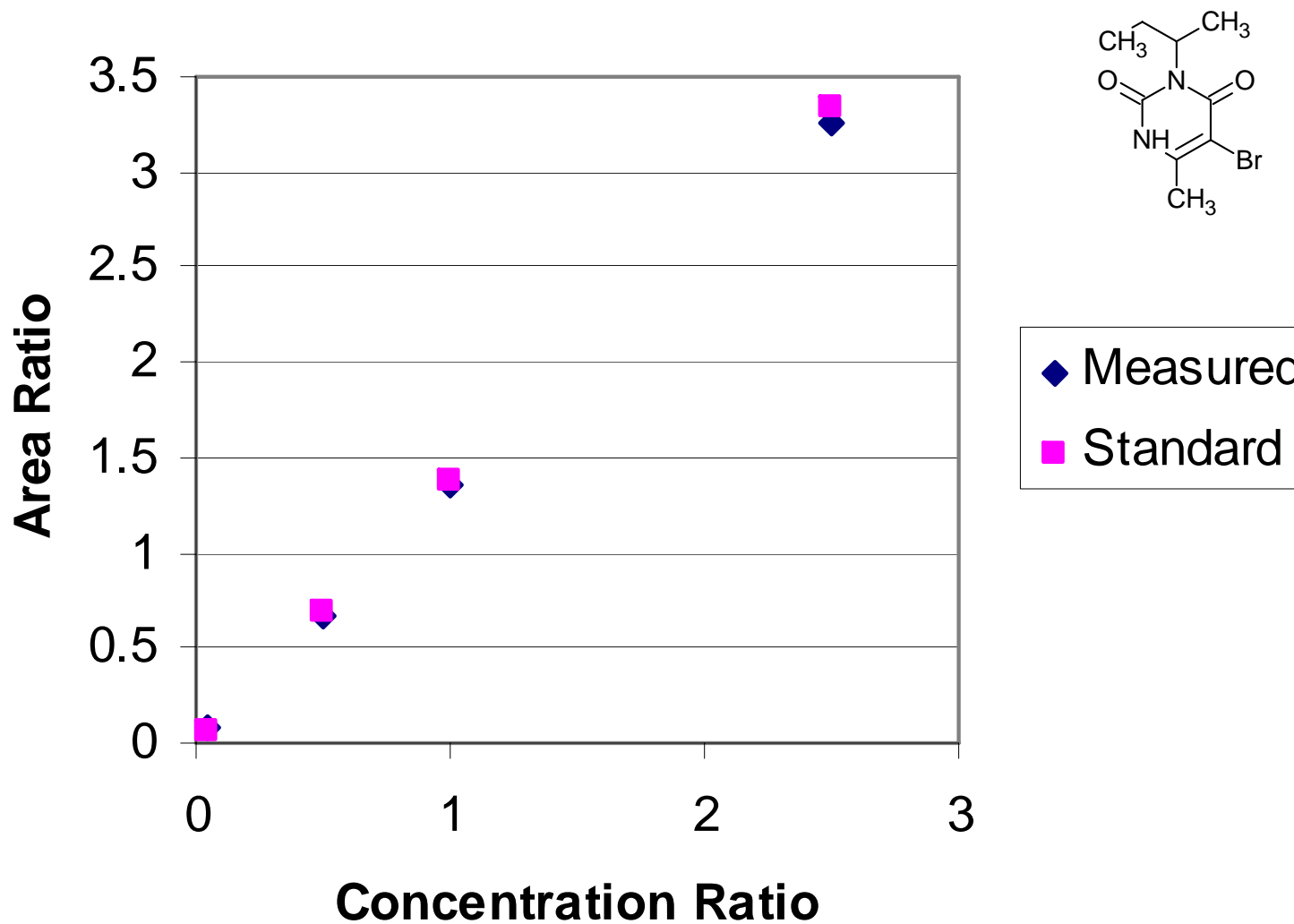
Batch	Pirimicarb standard		Bromacil		Batch	Pirimicarb standard		Bromacil			
Cart#	Average recovery	% RSD	Average recovery	% RSD	Cart #	Average recovery	% RSD	Average recovery	% RSD	Relative recovery %	
S9-1	98	1	97	1	S10-1	104	1	102	1	99	99
2	95	2	98	1	2	100	0	100	1	102	100
3	93	2	96	1	3	98	1	99	1	103	100
4	95	1	97	1	4	99	1	100	1	103	101
5	95	1	97	1	5	93	1	97	1	101	104
S10-1	91	1	90	1	S11-1	92	2	99	1	99	107
2	96	2	94	1	2	92	1	102	1	99	111
3	97	2	96	1	3	90	1	100	1	100	112
4	98	3	98	0	4	91	1	102	1	100	112
5	96	2	101	1	5	91	0	101	1	105	110

Cartridges: 0.9 g of COS, 3 separate batches

Recovery: N=5 replicates; 50 ug/mL Bromacil; 20 ug/mL Pirmicarb



COSによるBromacilの相対回収率の比較





COS バッチ間の特性

- % Carbon = 12% +/- 1% (N=10)
- Bromacil 回収率 = 95.7% +/- 4% ($N_{\text{batch}}=10$)
- Pirimicarb 回収率 = 94% +/- 4% ($N_{\text{batch}}=10$)



COS のフローテスト

Cartridge	COS		Envi-Carb	
	Ave Time(min)	% RSD	Ave Time(min)	% RSD
1	10:47	1%	10:03	4%
2	10:29	1%	8:18	4%
3	10:37	1%	4:46	1%
4	10:17			
5	10:45			

1. N= 3 for each cartridge

Flow test:

Measure time to pass 4mL of eluent 4:1 CH₂Cl₂/ACN through a 3 mL cartridge

試料負荷量と破過重量

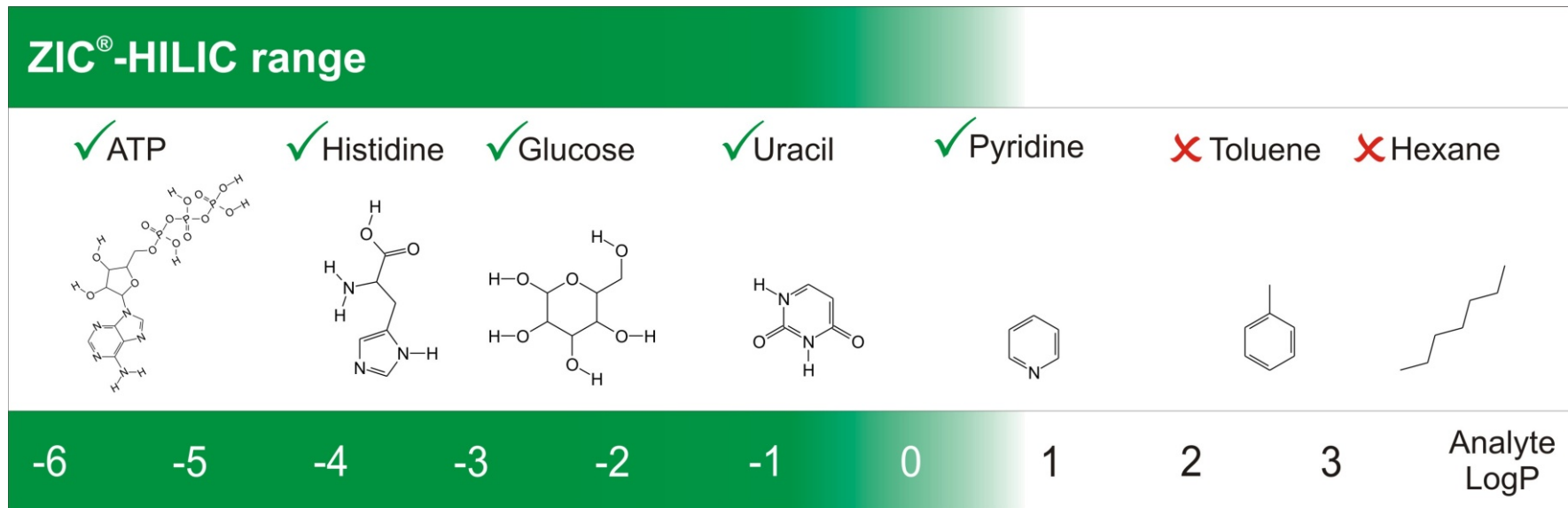
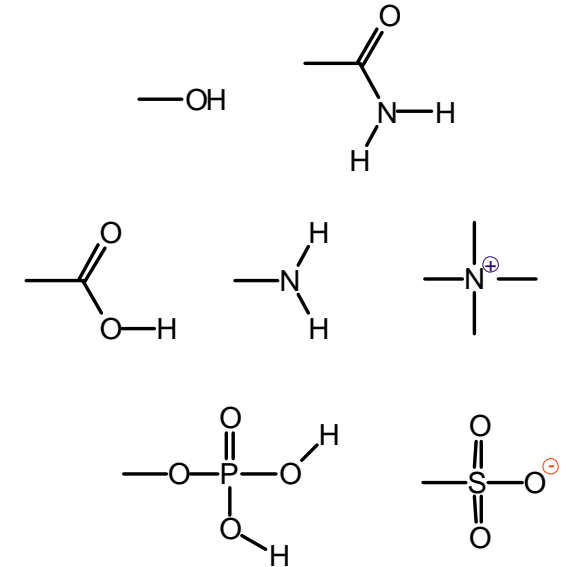
- 3 mL カートリッジを用い, 300 μ g/mLまで回収率の直線性が得られた
- 3 mL カートリッジでの破過重量は3 mgであった

ZIC-HILIC SPE の特長

ヒリックの条件

ヒリックで分離できる化合物

- LogP値が小さいかマイナス
- 親水性, イオン性またはイオン化する化合物



ヒリックにおける溶媒強度

Water > **Methanol** > **Ethanol** > **Propanol** > **Acetonitrile** > **Acetone**

溶媒極性減少

Decreased Solvent Polarity

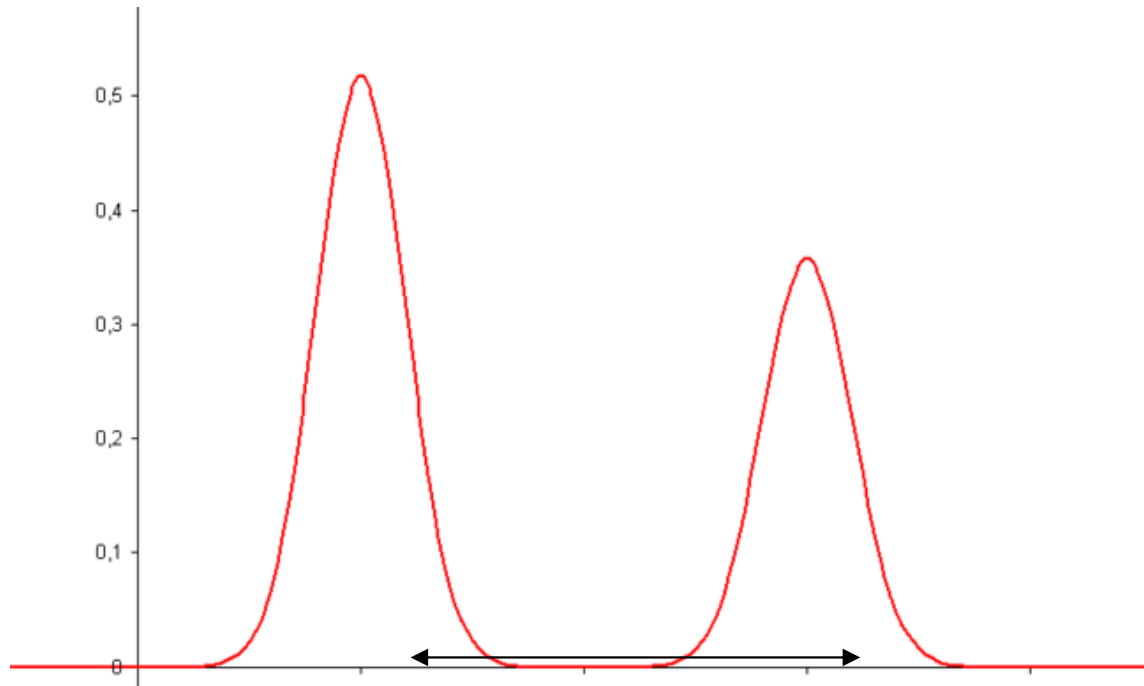
溶出力減少

Decreased Elution Power

保持力増加

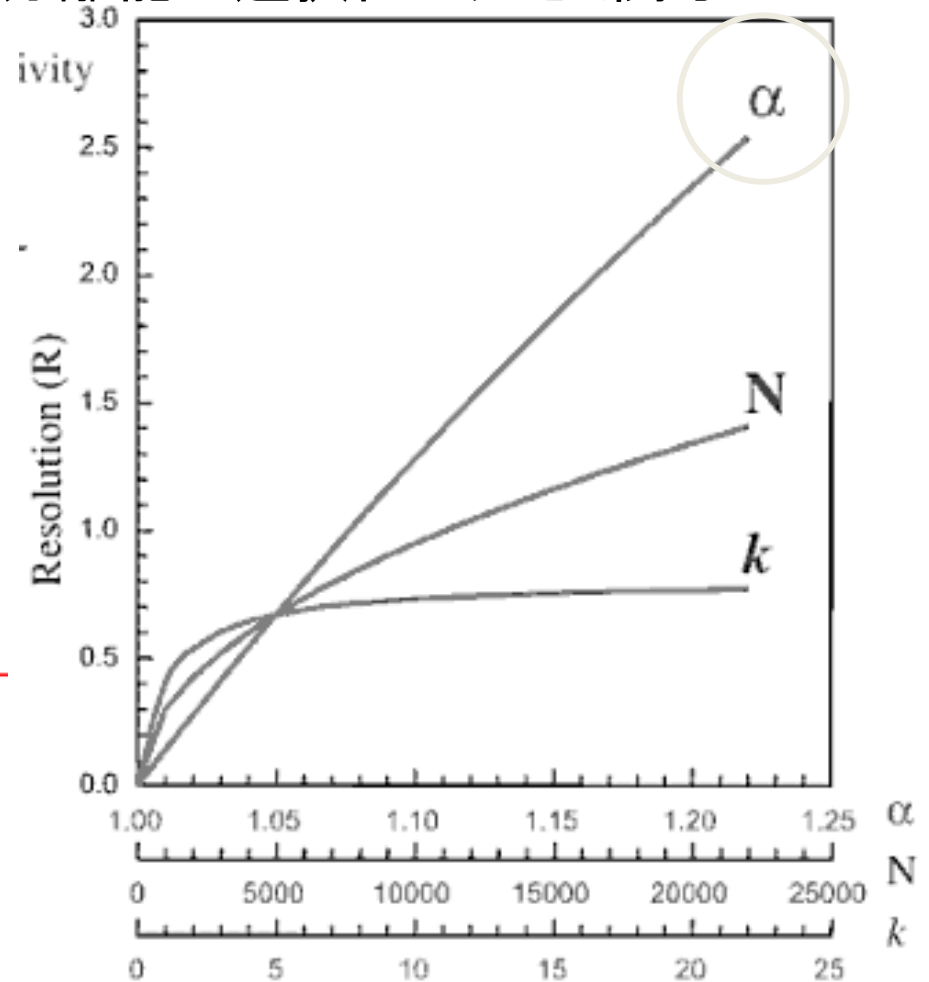
Increased Retention Capacity

選択性が重要!



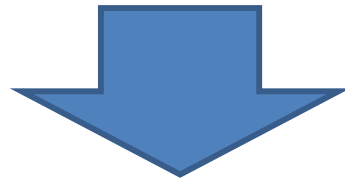
分離モードを変えると選択性は大きく変化

- 分離能は選択性が大きく関与



思い出してください!

逆相分離での試料調整は水の組成比の高い溶媒で行われることが多い!



Adjust injection volume!
or optimise sample prep!

固相抽出の選択性

逆相固相抽出

- ❖ 試料は水で希釈されSPEに注入される
- ❖ 有機溶媒で溶出させる

ZIC[®]-HILIC カラムで試料は濃縮できる

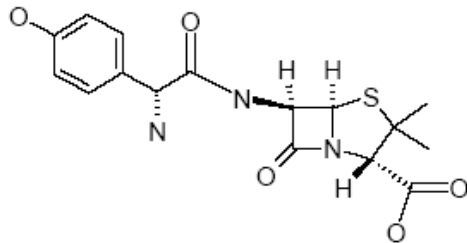
ZIC[®]-HILIC 固相抽出

- ❖ 試料はアセトニトリルで希釈されSPEに注入される
- ❖ 水または緩衝液で溶出させる

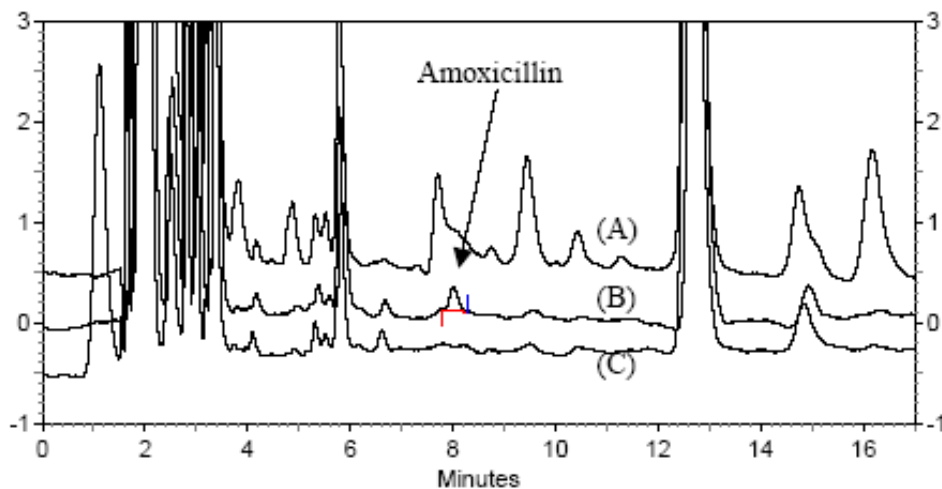
逆相カラムで試料は濃縮できる

ZIC[®]-HILIC SPE の応用例

プラズマのマトリックス中の測定物質を
妨害する成分を除去



amoxicillin



- (A) Acetonitrile (ACN) precipitated blank plasma
 (B) ZIC[®]-HILIC extracted ACN precipitated spiked plasma
 (C) ZIC[®]-HILIC extracted ACN precipitated blank plasma

抽出方法:

- ❖ アセトニトリルでプラズマを沈殿させる
(1.5 mL to 0.1 mL)
- ❖ 遠心分離後上澄みをロード
- ❖ ZIC[®]-HILIC SPE 1 mL 100 mg
プレコンディショニング: アセトニトリル(2 mL)
- ❖ アセトニトリルで洗浄後乾燥
- ❖ 水で溶出 (400 μ L)

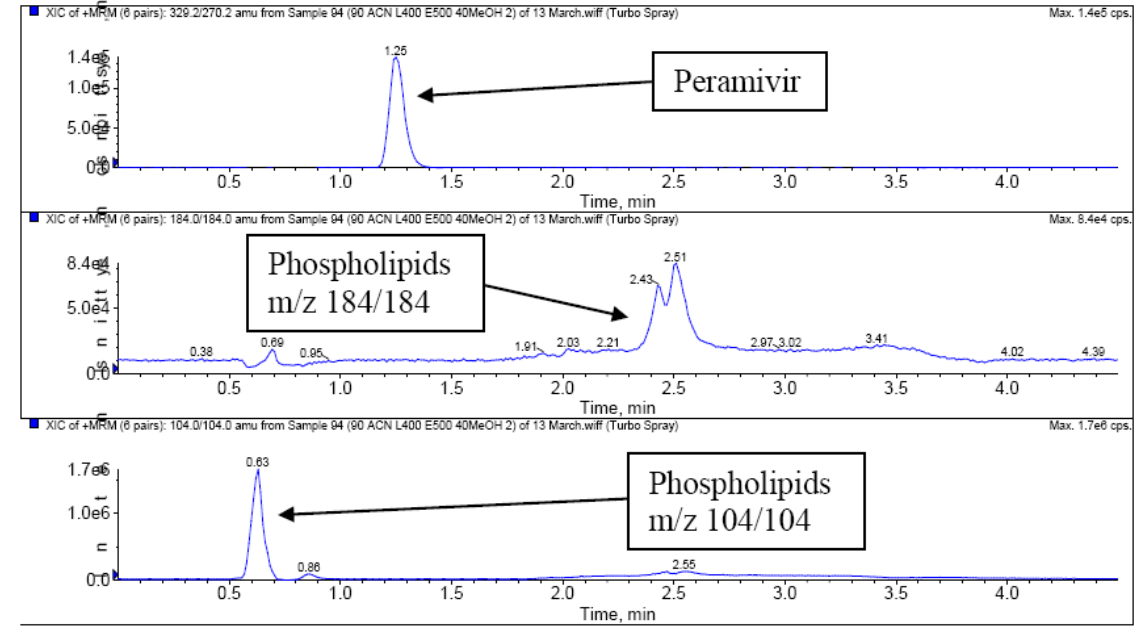
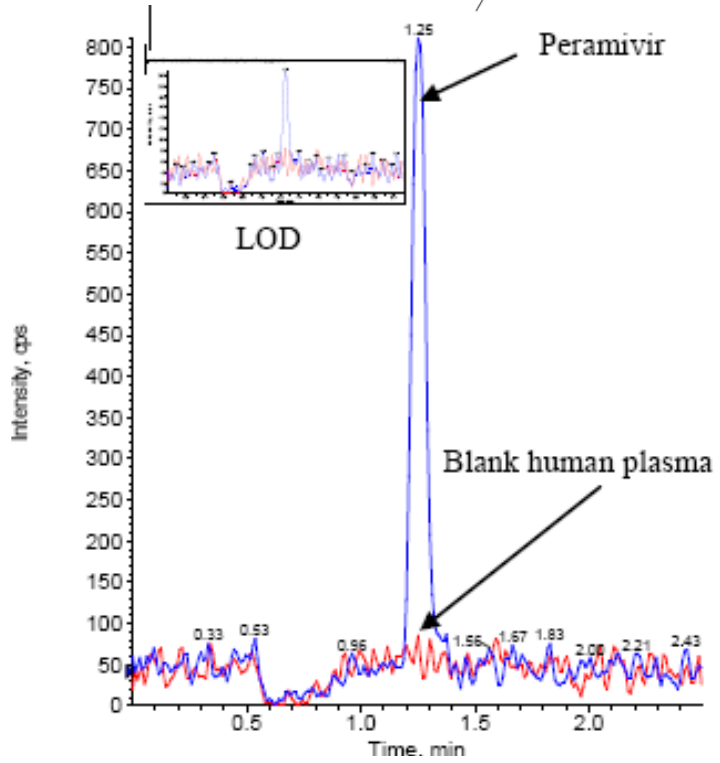
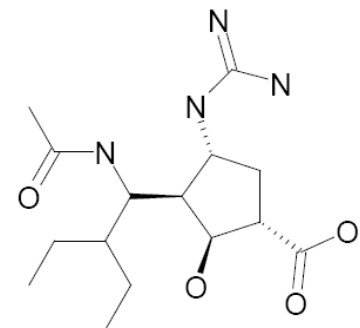
分離条件:

- ❖ Reversed phase column (Aquasil) at a flow rate of 1.0 mL/min, with isocratic 93% phosphate buffer (pH 2.5, 0.1 M), 7% ACN. Injection of 85 μ L, UV-detection at 230 nm

*N. Lindegårdh et al., Therapeutic Drug Monitoring, in press.

96-ウェルプレートの利用

ペラミビルは米バイオクライストファーマ社(BioCryst Pharmaceuticals)によって開発された、抗インフルエンザ薬です。ウィルスのノイラミニダーゼを阻害することで、インフルエンザウィルスの体内増殖・拡散を抑えます



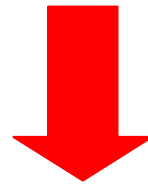
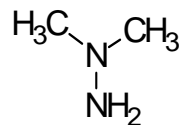
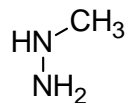
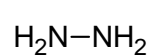
96-well ZIC®-HILIC clean-up & RPLC separation provide rapid, sensitive and selective results.

Extraction procedure optimized to minimize presence of phospholipids in SPE eluate.

Validated method to support analysis of drug after intravenous administration.

保持に与えるイオンの影響

Name	Ammonium Formate	Ammonium Acetate	Ammonium Phosphate	Sodium Phosphate	Triethylamine Phosphate
Hydrazine	26.00	27.87	44.94	37.39	> 60
Methyl hydrazine	20.02	21.53	33.03	29.42	46.75
1,1-Dimethylhydrazine	18.05	19.27	27.39	25.01	32.91
1,2-Dimethylhydrazine	14.96	16.27	22.23	20.85	29.18



保持時間

緩衝液中のアニオン: ギ酸 < 酢酸 << リン酸

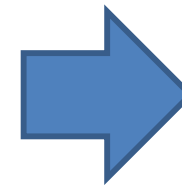
緩衝液中のカチオン: Na^+ < NH_4^+ < TEA^+

ホスマイスターシリーズ (Hofmeister series)

2010年9月以降新価格(値下げ)

ZIC[®]-HILIC SPE Cartridges

注文番号	充填剤量 [mg]	カートリッジ タイプ	カートリッジ 容量 [mL]	数 量 [本/箱]	価 格 [¥]	新価格 [¥]
ZIC[®]-HILIC シリンジ型固相抽出カートリッジ						
2942-010SQ	25	シリンジ型	1	100	74,000	63,500
2942-030SQ	100	シリンジ型	1	100	93,000	75,800
2942-031SQ	100	シリンジ型	3	100	93,000	88,000
2942-041SQ	200	シリンジ型	3	100	110,000	88,000
2942-051SQ	500	シリンジ型	3	100	180,000	134,000
2942-052SQ	500	シリンジ型	6	25	53,000	49,800
2942-062SQ	1000	シリンジ型	6	25	74,000	63,500
2942-132SQ	100	96 well-plate	2	1	70,000	60,400



* 上記価格に消費税は含まれておりません