

# HPLC,UHPLCそれぞれの視点から見た コアシェル型充填カラムと全多孔性充填 カラムとの比較

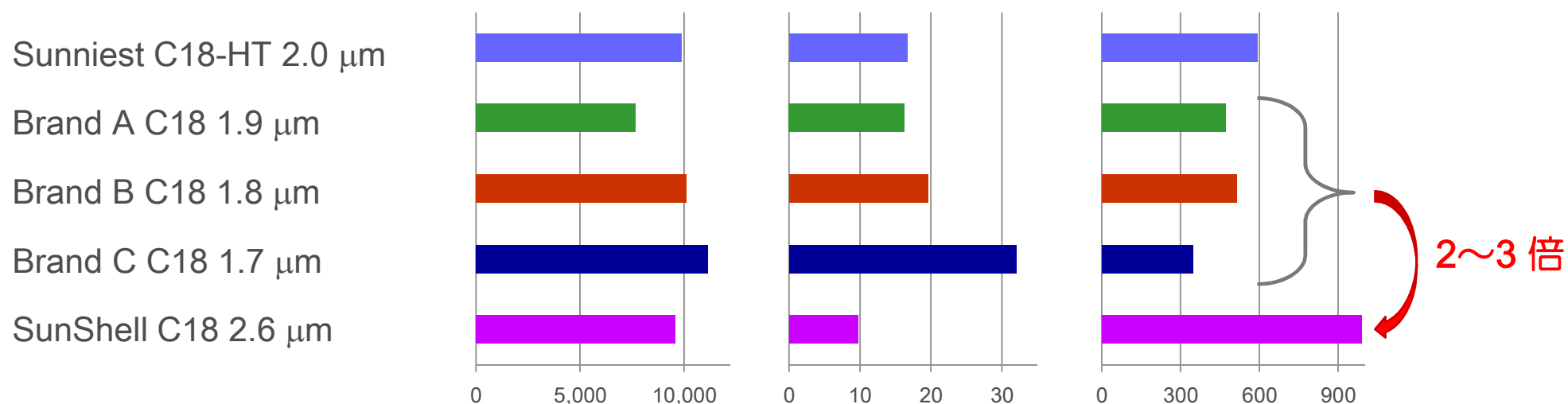
○塚本 友康, 長江 徳和  
(クロマニックテクノロジーズ)

## 表面多孔性シリカ（コアシェル）

- 細孔のない核（コア）と多孔質層から形成されているシリカ粒子であり、全多孔性シリカ粒子に比べ表面積は小さい
- 粒子全体に対する多孔質層の割合が77%と高いため、試料負荷量が低くなる欠点を克服
- 粒子細孔径が9nmで低分子化合物の分離に適している
- 同じサイズの全多孔性粒子の1.5倍の理論段数を有している
- 全多孔性シリカより狭い粒径分布が得られる

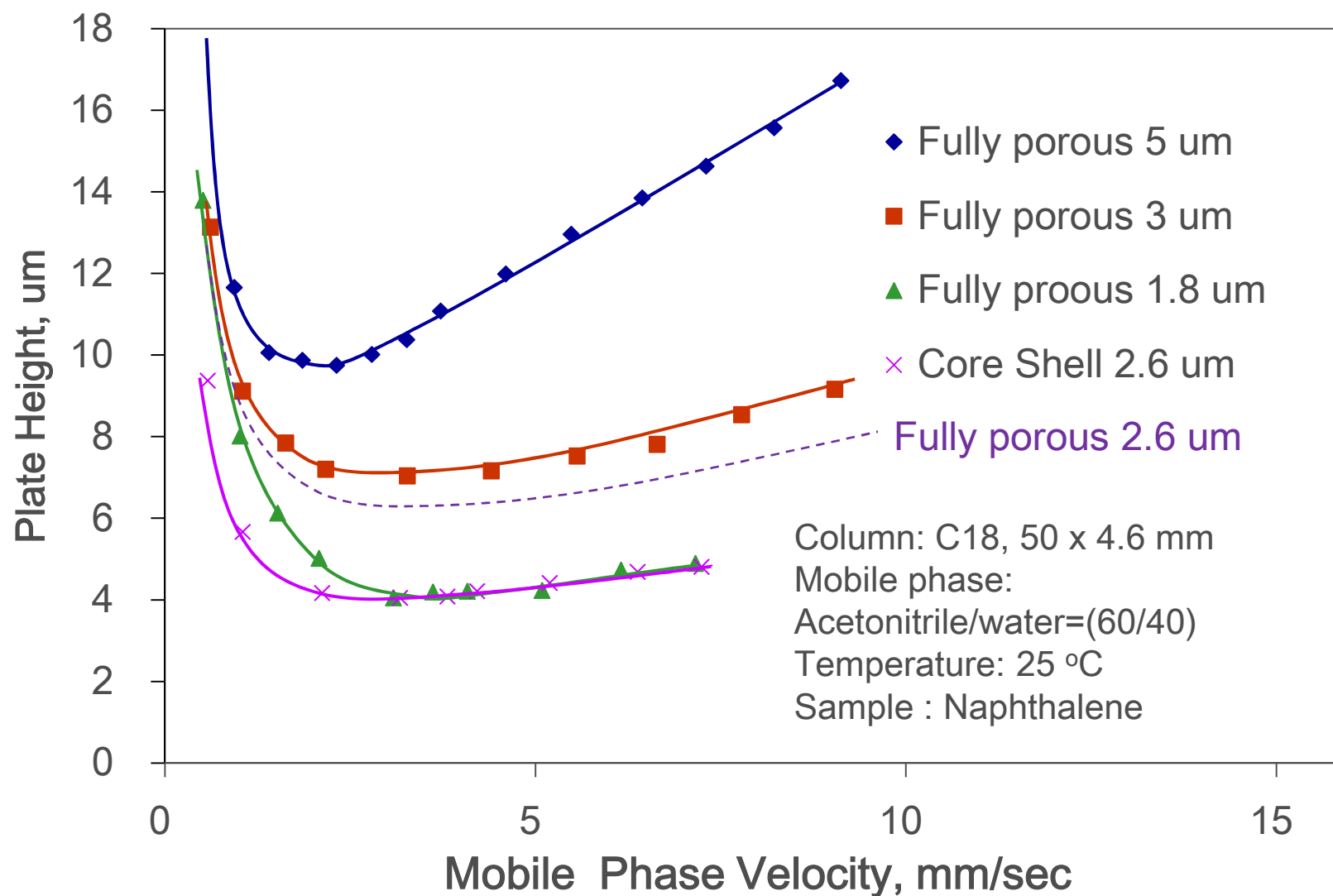
# 単位圧力あたりの段数比較

	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

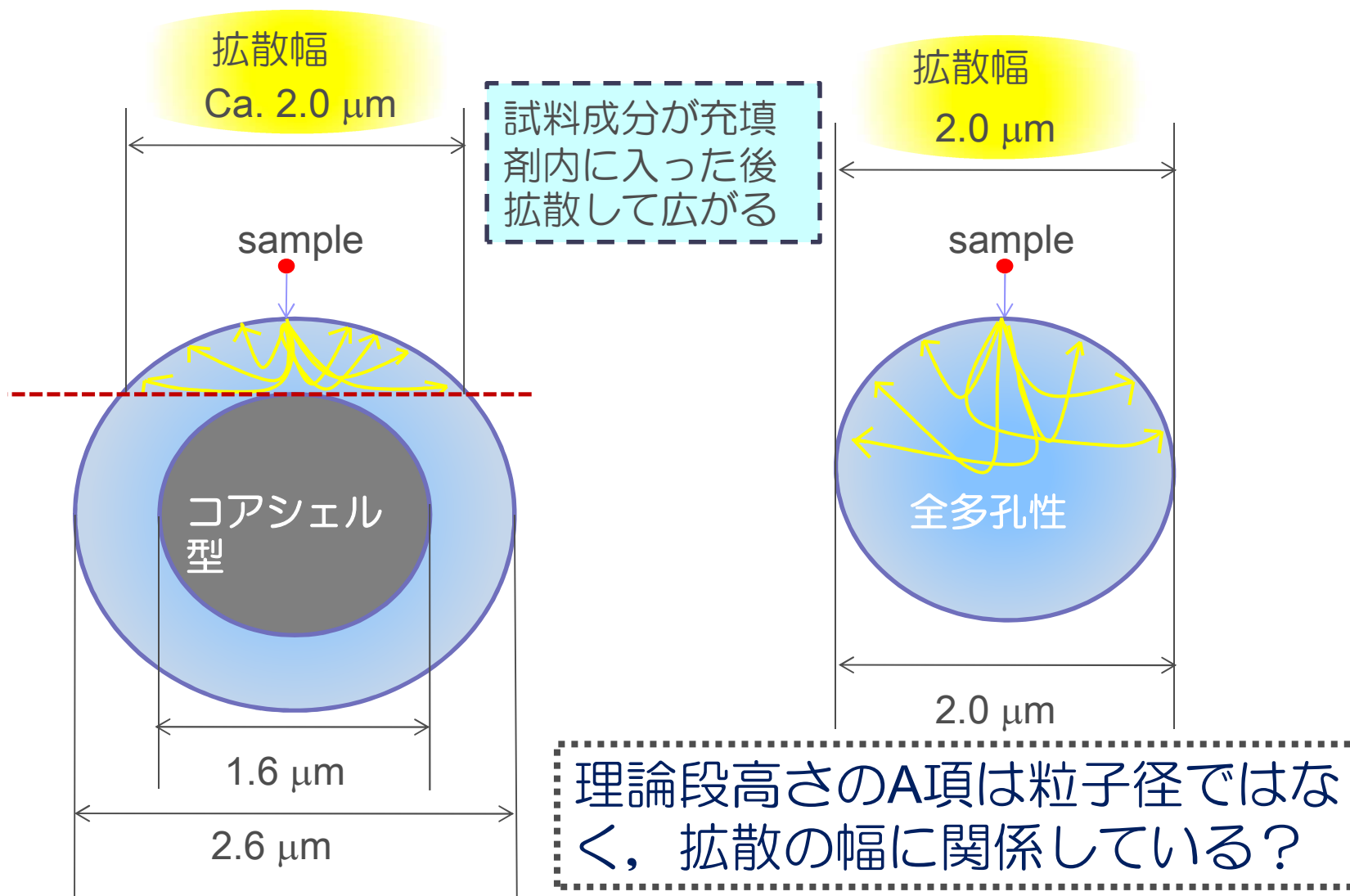


Column: 50 x 2.1 mm C18, Mobile phase: Acetonitrile/water=(70/30), Temperature: 25 °C

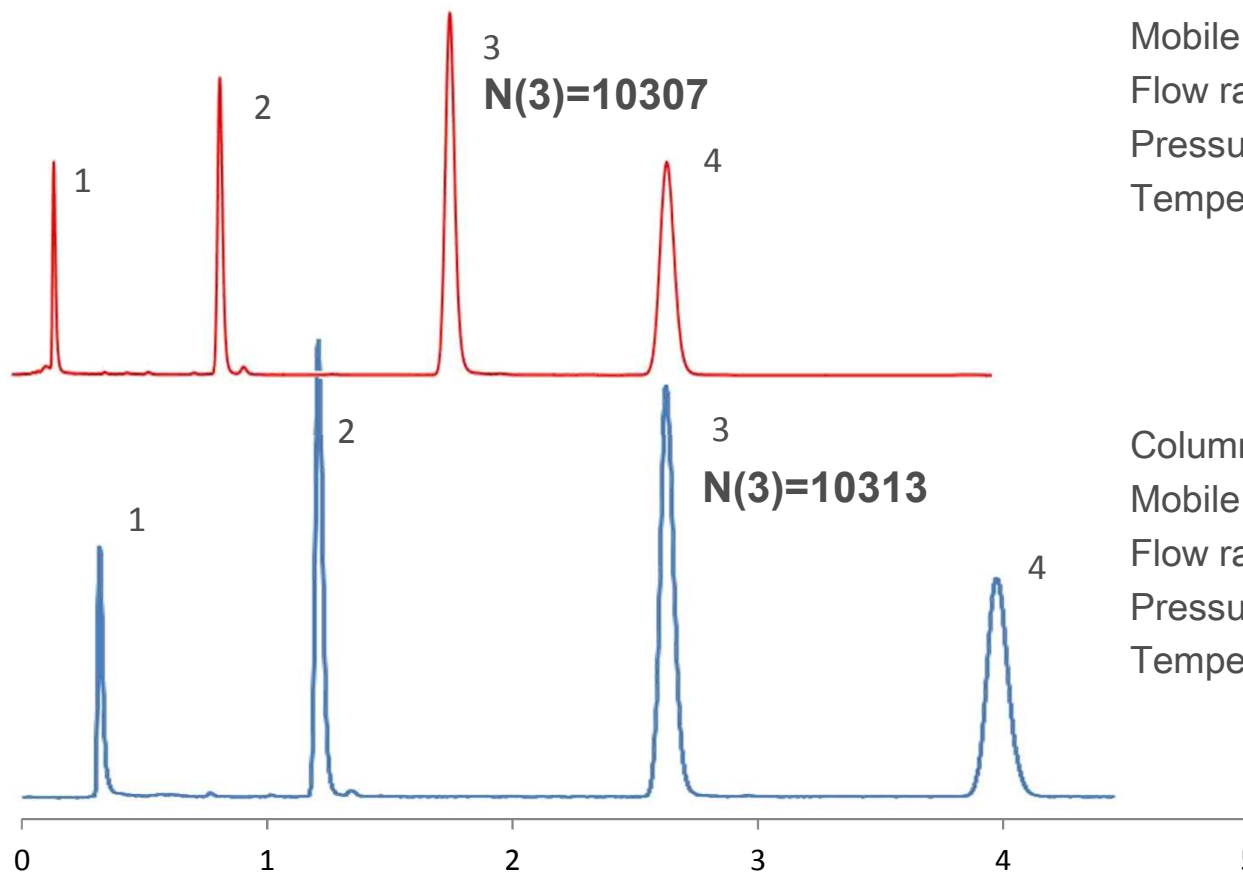
# 全多孔性とコアシェル型の理論段高さの比較



# コアシェル型と全多孔性充填剤の比較



# 2 $\mu\text{m}$ 全多孔性カラムとの比較



Column: Sunniest C18, 2  $\mu\text{m}$  50 x 2.1 mm

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

Flow rate: 0.6 mL/min

Pressure: 28 MPa

Temperature: 40°C

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

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

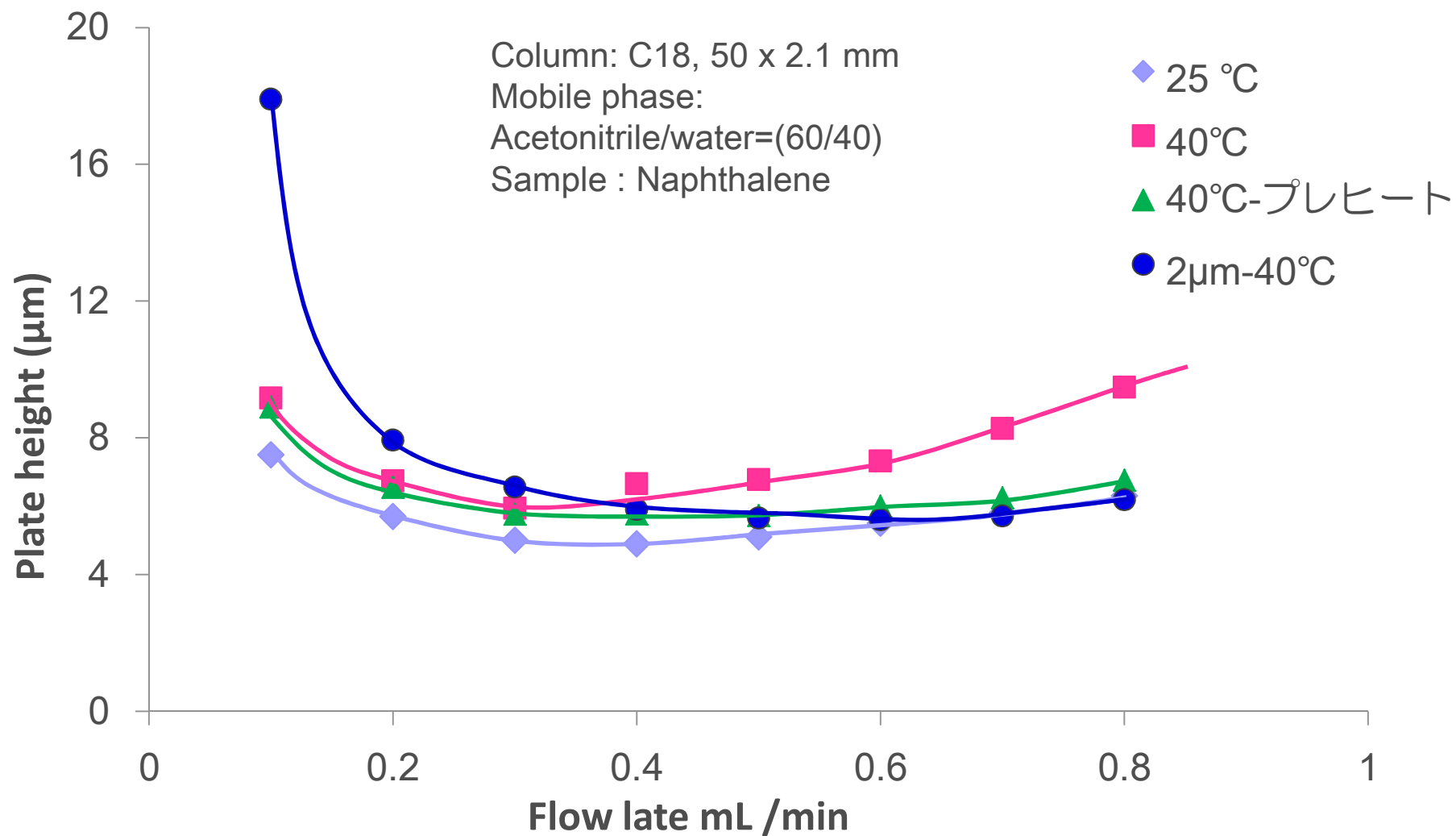
Flow rate: 0.3 mL/min

Pressure: 10 MPa

Temperature: 25 °C

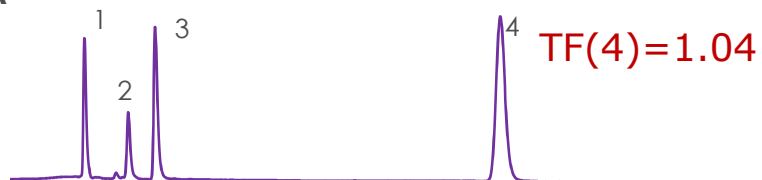
Sample: 1 = Uracil, 2 = Toluene, 3 = Acenaphthene, 4 = BUtylbenzene

# 温度の影響



# 塩基性化合物の分離の比較

**A Sunniest C18 (HMODTS), 5  $\mu$ m**



**B Sunniest C18-HT(HMODTS), 2  $\mu$ m**



**C SunShell C18(HMODTS), 2.6  $\mu$ m core shell type**



**D Brand D C18, 2.6  $\mu$ m core shell type**



**E Brand E C18, 5  $\mu$ m**



Column size: 150 x 4.6 mm for A, D and E

100 x 2.1 mm for B and C

Mobile phase:

CH<sub>3</sub>CN/20mM Phosphate buffer pH7.0=60/40

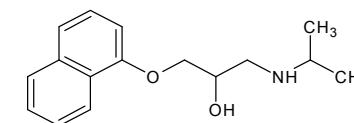
Flow rate: 1.0 mL/min for A, D, and E

0.4 mL/min for B and C

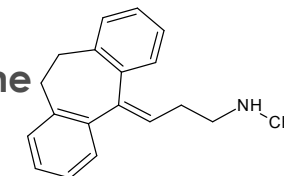
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

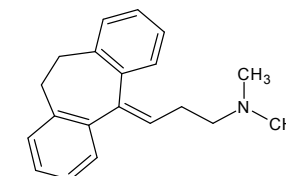
2 = Propranolol



3 = Nortriptyline



4 = Amitriptyline



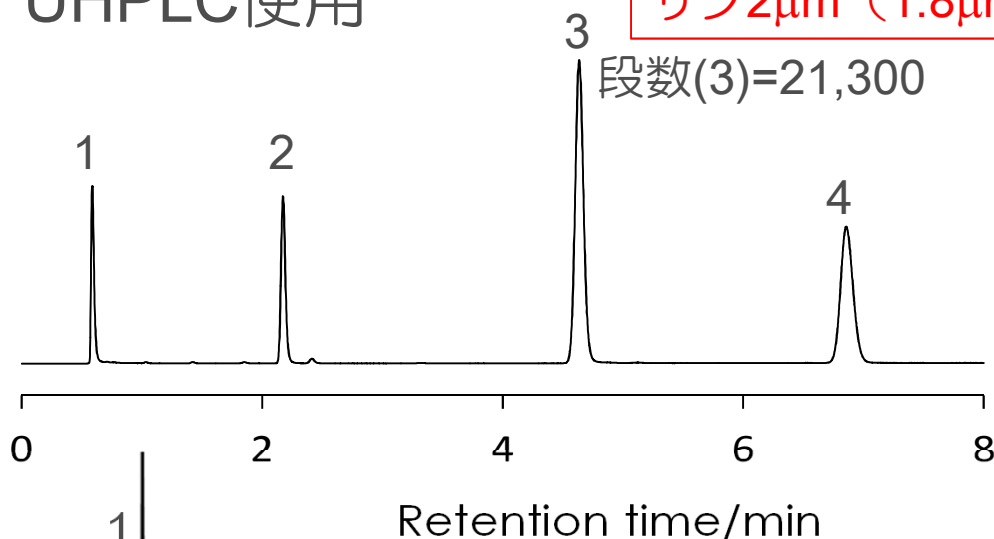
TF: USP tailing factor



# コアシェルC18の標準試料の分離例

UHPLC使用

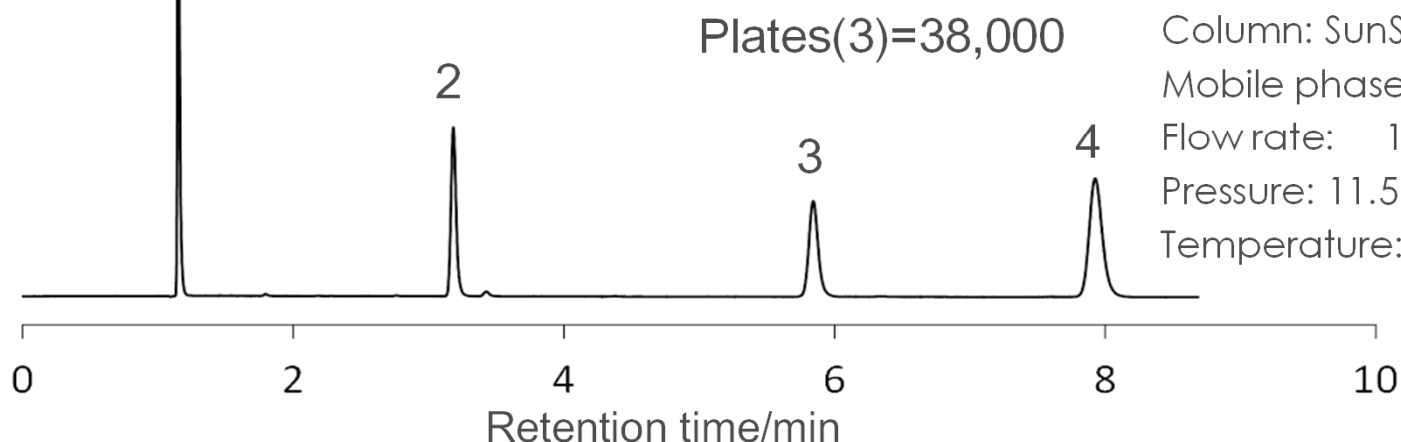
サブ2 $\mu\text{m}$  (1.8 $\mu\text{m}$ ) と同じ段数



Column: SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  100 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40  
 Flow rate: 0.3 mL/min  
 Pressure: 12.5 MPa  
 Temperature: 25 °C

サブ2 $\mu\text{m}$  (1.8 $\mu\text{m}$ ) の  
 半分以下の圧力

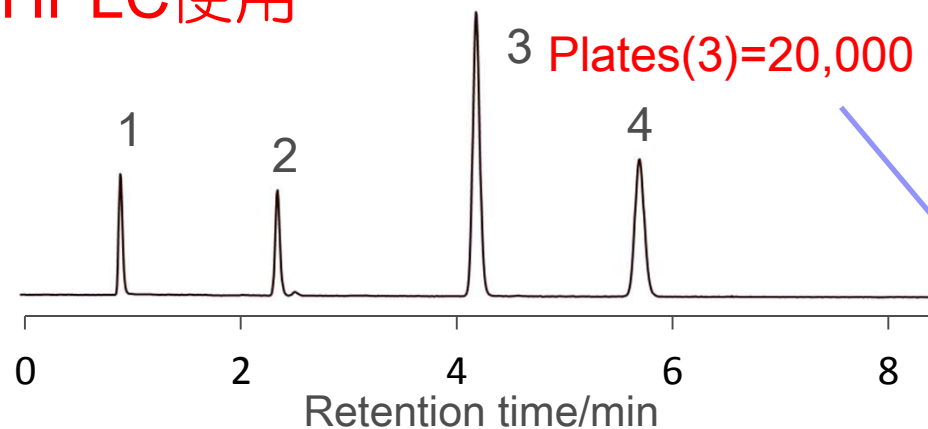
Sample: 1 = Uracil  
 2 = Toluene  
 3 = Acenaphthene  
 4 = BUtylbenzene



Column: SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=70/30  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Pressure: 11.5 MPa  
 Temperature: 25 °C

# HPLC使用時のコアシェルC18の標準試料の分離例

## HPLC使用



Column: SunShell C18, 2.6 mm 100 x 4.6 mm  
150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=70/30

Flow rate: 1.0 mL/min

Pressure: 9.5 MPa, 13.5 MPa

Temperature: 25 °C

Sample: 1 = Uracil

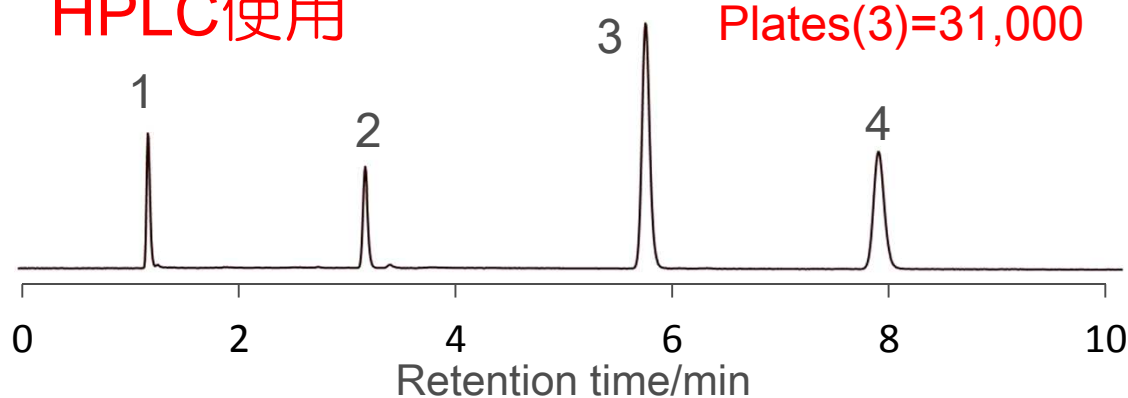
2 = Toluene

3 = Acenaphthene

4 = BUtylbenzene



## HPLC使用



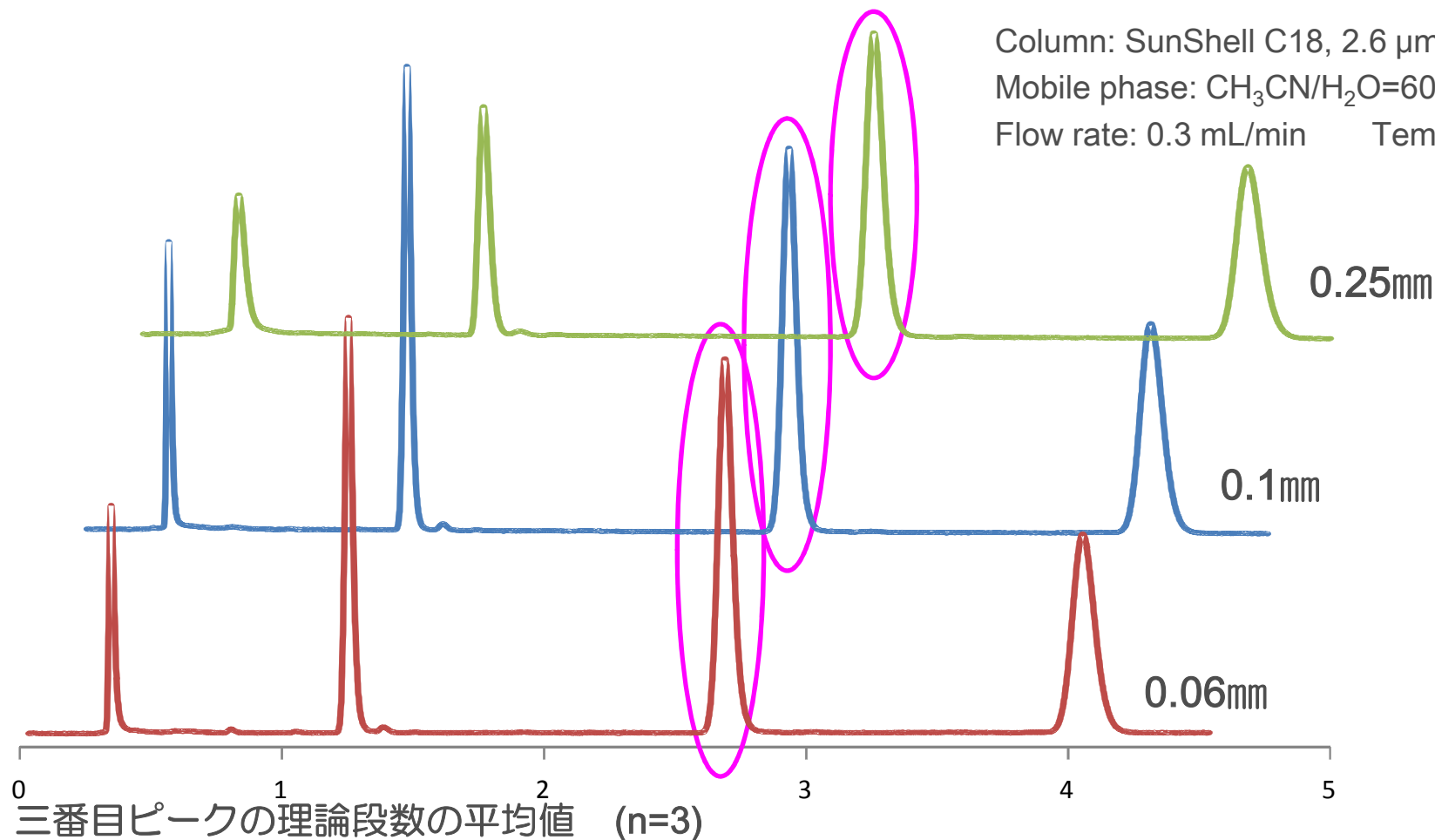
5μm 4.6x250mm (20,000  
段) と同じ段数



SunSell C18 100x4.6mm  
分析時間40%  
使用溶媒量40%

# カラムー検出器間における配管の影響

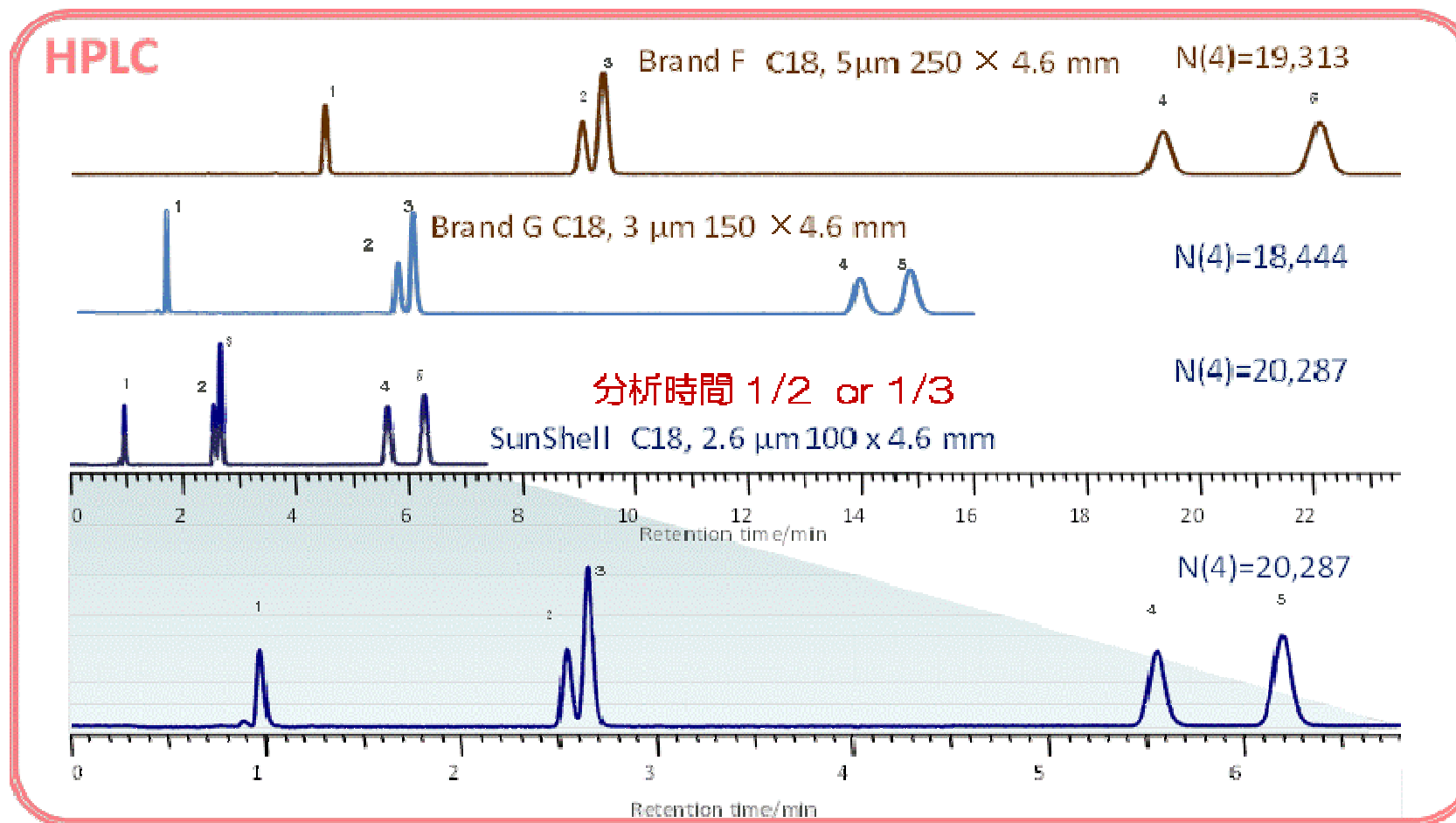
Column: SunShell C18, 2.6  $\mu$ m 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40  
 Flow rate: 0.3 mL/min Temperature: 25 °C



	0.06mm	0.1mm	0.25mm
理論段数	10704	10345	7998

# イソクラチック溶離例

5 $\mu$ m, 3  $\mu$ m C18からの移行



Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/20mM Phosphoric acid = 45/55

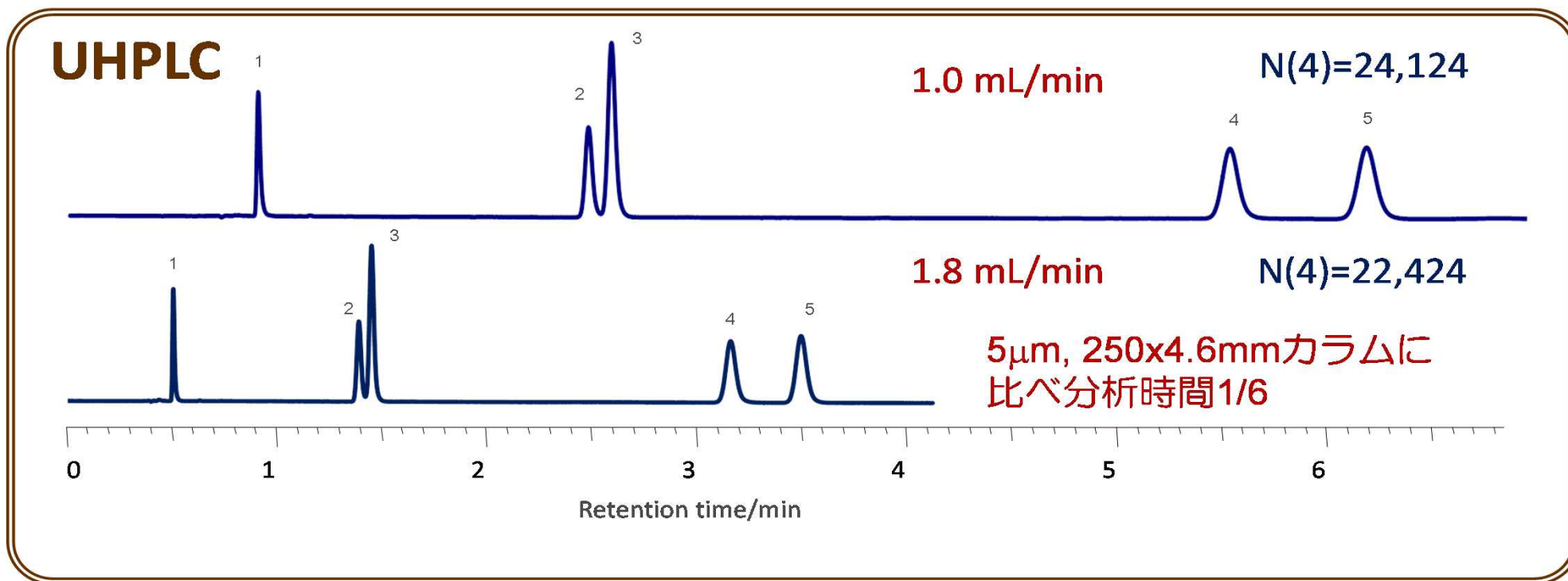
Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 25 °C, Detection: UV230 nm

Pressure: 9.5 MPa for Brand F C18 5 mm, 13.4 MPa for SunShell C18 2.6 mm

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

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

# イソクラチック溶離例 UHPLC



Column: SunShell C18, 2.6 mm 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

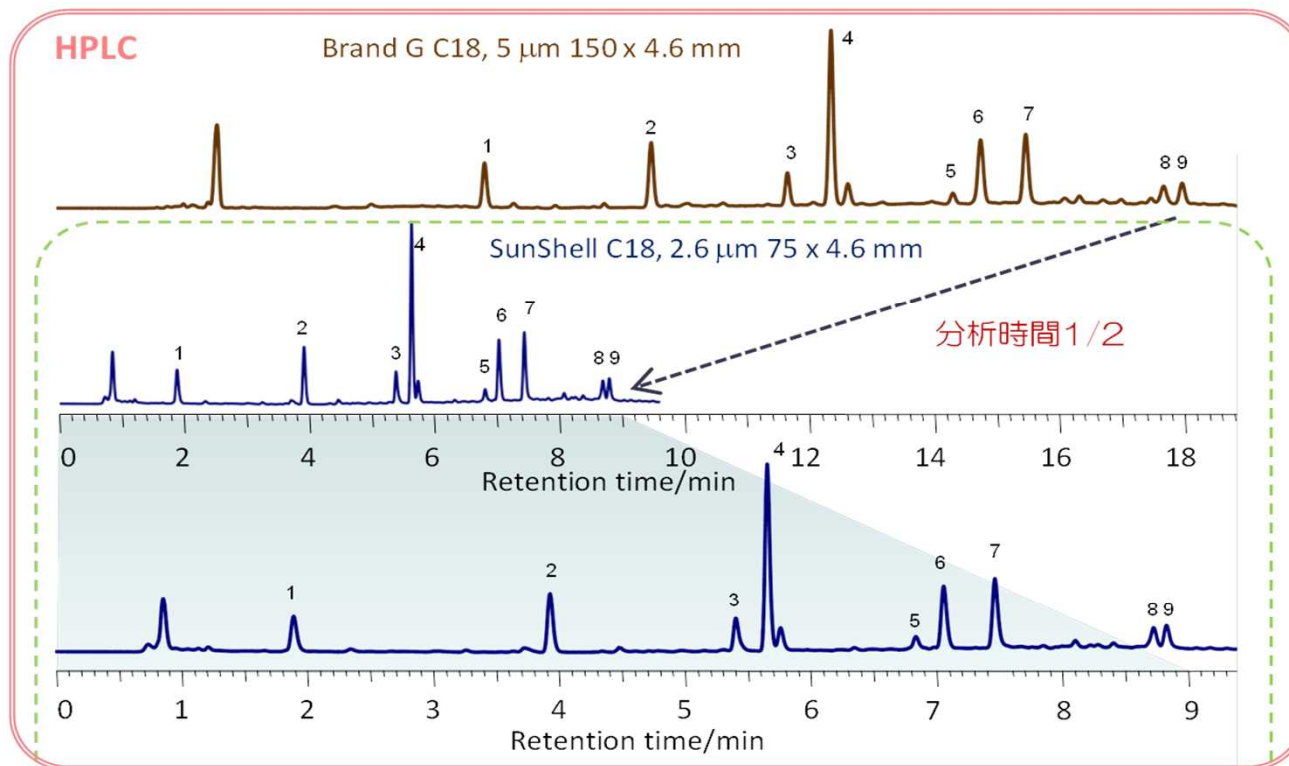
Temperature: 25 °C

Pressure 13.4 MPa Detection: UV230 nm

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

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 gallate, 8 = Epicatechin gallate, 9 = Catechin gallate

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(内径0.25mmの配管仕様)

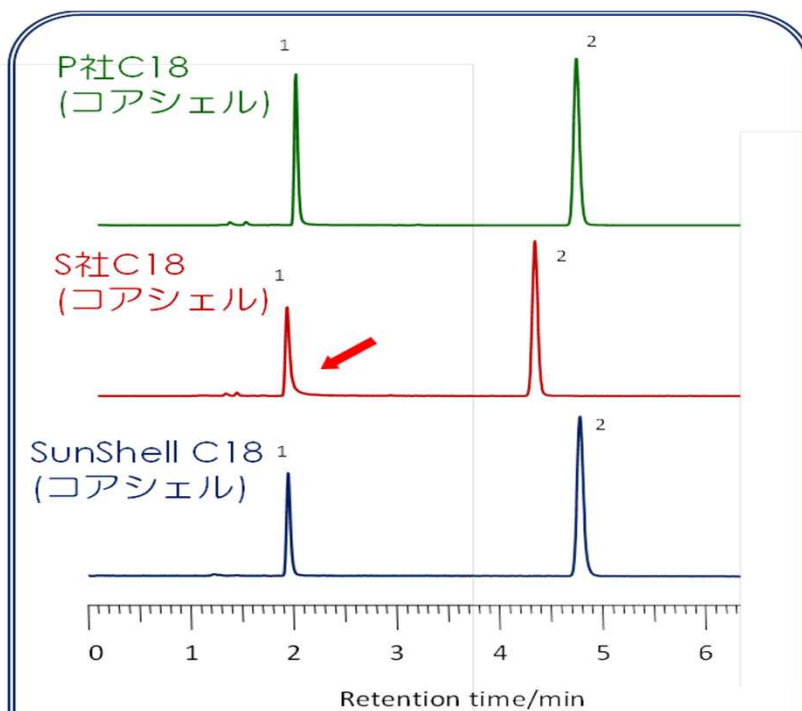
UHPLC: Jasco X-LC

## まとめ

- コアシェル型カラムの理論段数をHPLCとUHPLCで比較した結果、UHPLCでは25%程度高い性能を示した
- 内径0.1 mmの配管を用いると0.25 mmの配管とに比べ、20%程度理論段数の改善が観察された
- コアシェル型カラムでは、粒子径5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ のカラムに比べ、短いカラムで同等の分離が達成され、分析時間・使用溶媒量が大幅に削減できる
- コアシェル型カラムをHPLCに用いることは、分析の高速化、高感度化に有用であることが示唆された



## オキシンのピーク比較



Column:

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

Brand E 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:  $\text{CH}_3\text{CN}/20\text{mM}$

$\text{H}_3\text{PO}_4=10/90$

Flow rate: 1.0 mL/min

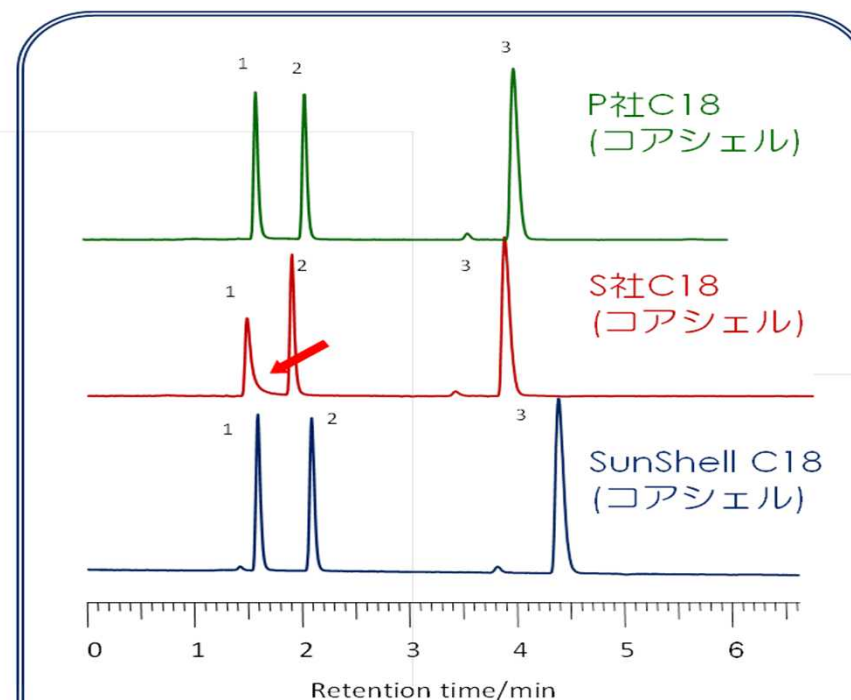
Temperature: 40 °C

Detection: UV@250nm

Sample: 1 = 8-Quinolinol (Oxine)

2 = Caffeine

## ギ酸のピーク比較



Column:

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

Brand E 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:  $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$

$\text{H}_3\text{PO}_4=2/98$

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

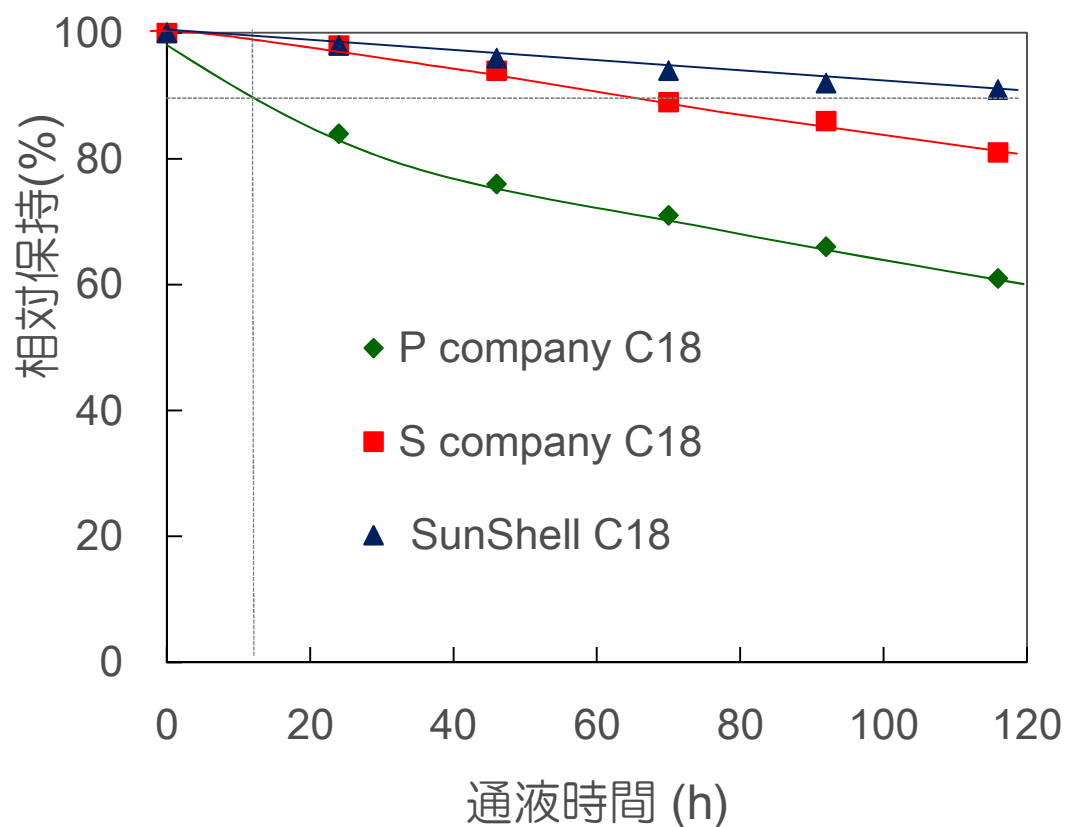
Detection: UV@210nm

Sample: 1 = Formic acid 2 = Acetic acid

3 = Propionic acid



# コアシェルC18の酸性条件での耐久性



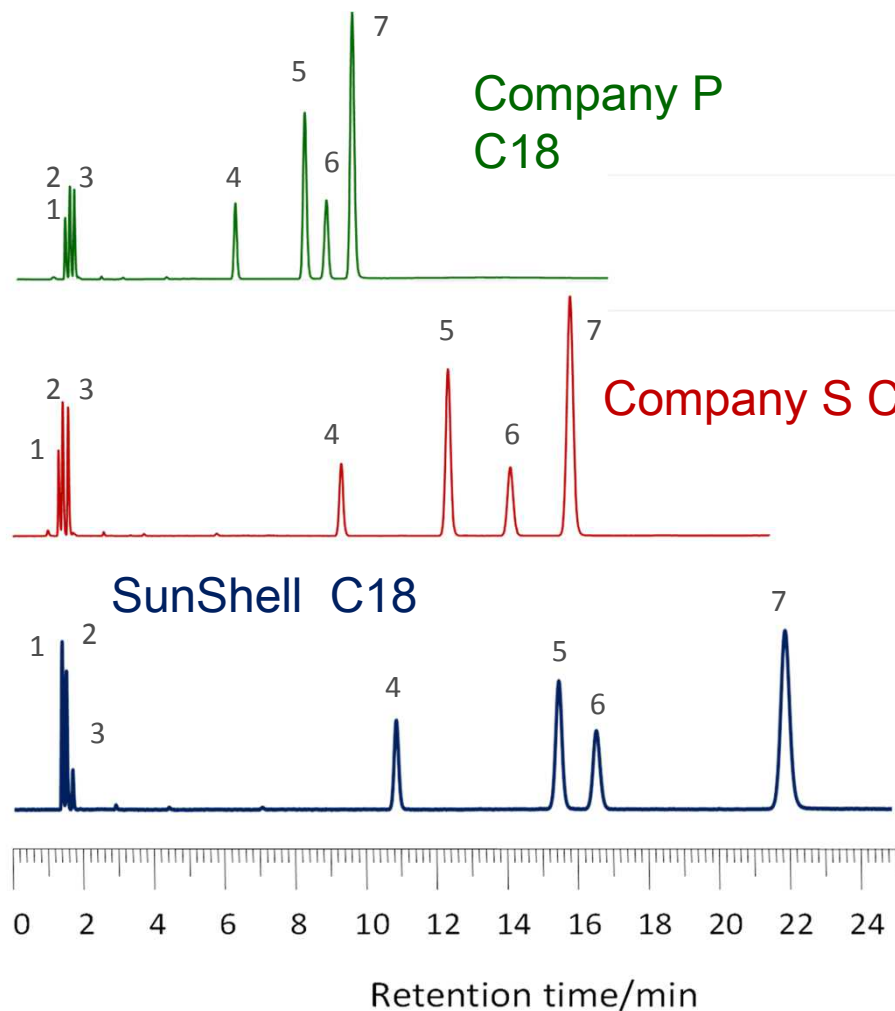
## 耐久性試験条件

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

# 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  $^\circ\text{C}$

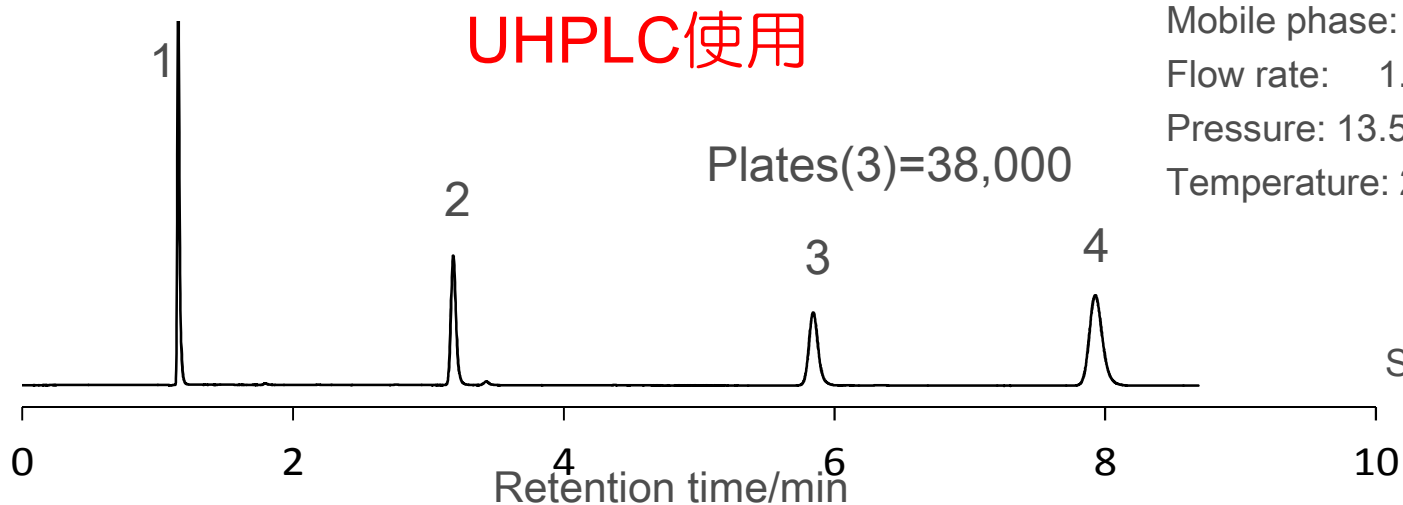
Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine, 3 = Phenol, 4 = Butylbenzene

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

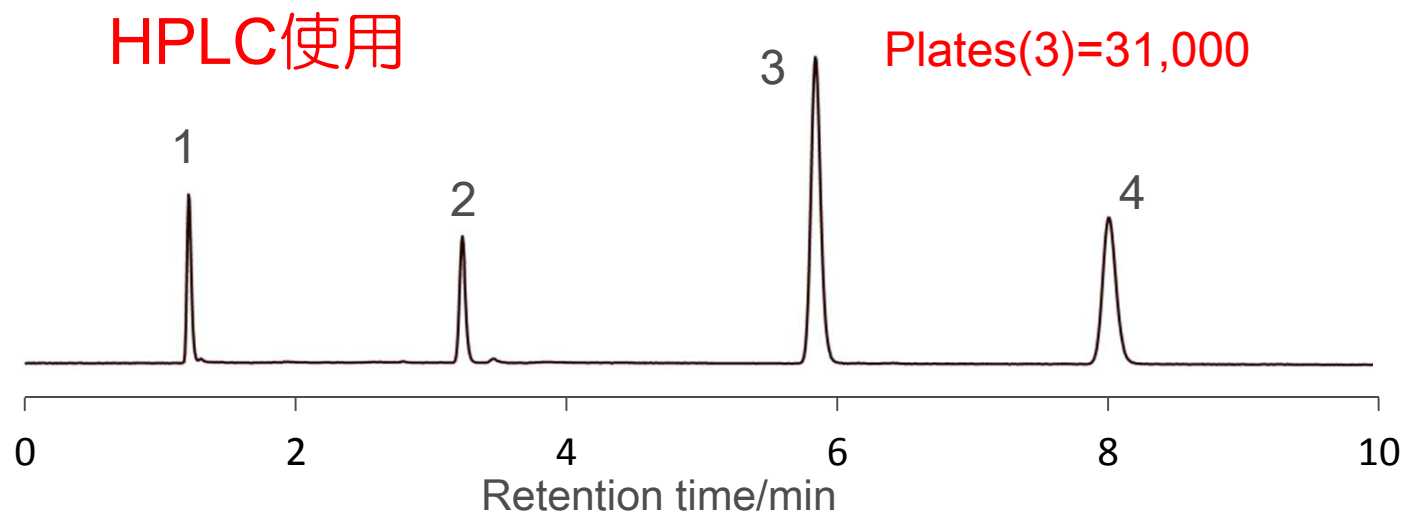
	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/o-Terphenyl)
Company P C18	0.48	1.54	1.20
Company S C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.39	1.60	1.46

# コアシェルC18の標準試料の分離例 UHPLCとHPLCの比較

Column: SunShell C18, 2.6 mm 150 x 4.6 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=70/30  
 Flow rate: 1.0 mL/min  
 Pressure: 13.5 MPa  
 Temperature: 25 °C



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



## 背景

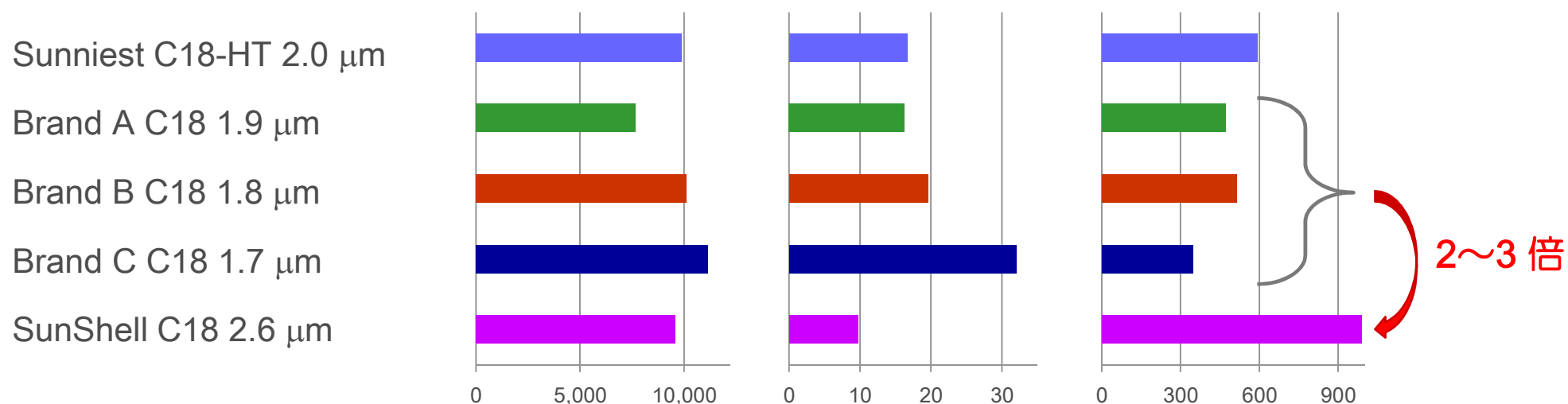
- ▶ 高速、高感度分析の必要性からサブ2  $\mu\text{m}$ の充填剤を用いる分析が注目されている
- ▶ それらカラムを使用する場合、圧力が高くなるため、高耐圧な装置(UHPLC)が必要となる
- ▶ コアシエル型充填剤は粒子径が2.6  $\mu\text{m}$ であるが、サブ2  $\mu\text{m}$ の充填剤と同等の性能が得られる。しかし、粒子径が約3  $\mu\text{m}$ であるため、圧力がそれほど高くない
- ▶ 様々なメーカーからUHPLCは販売されているが、現在でも多くのHPLCが使用されている



コアシエル型カラムのHPLCへの適用についてC18カラムを用いて検討を行った

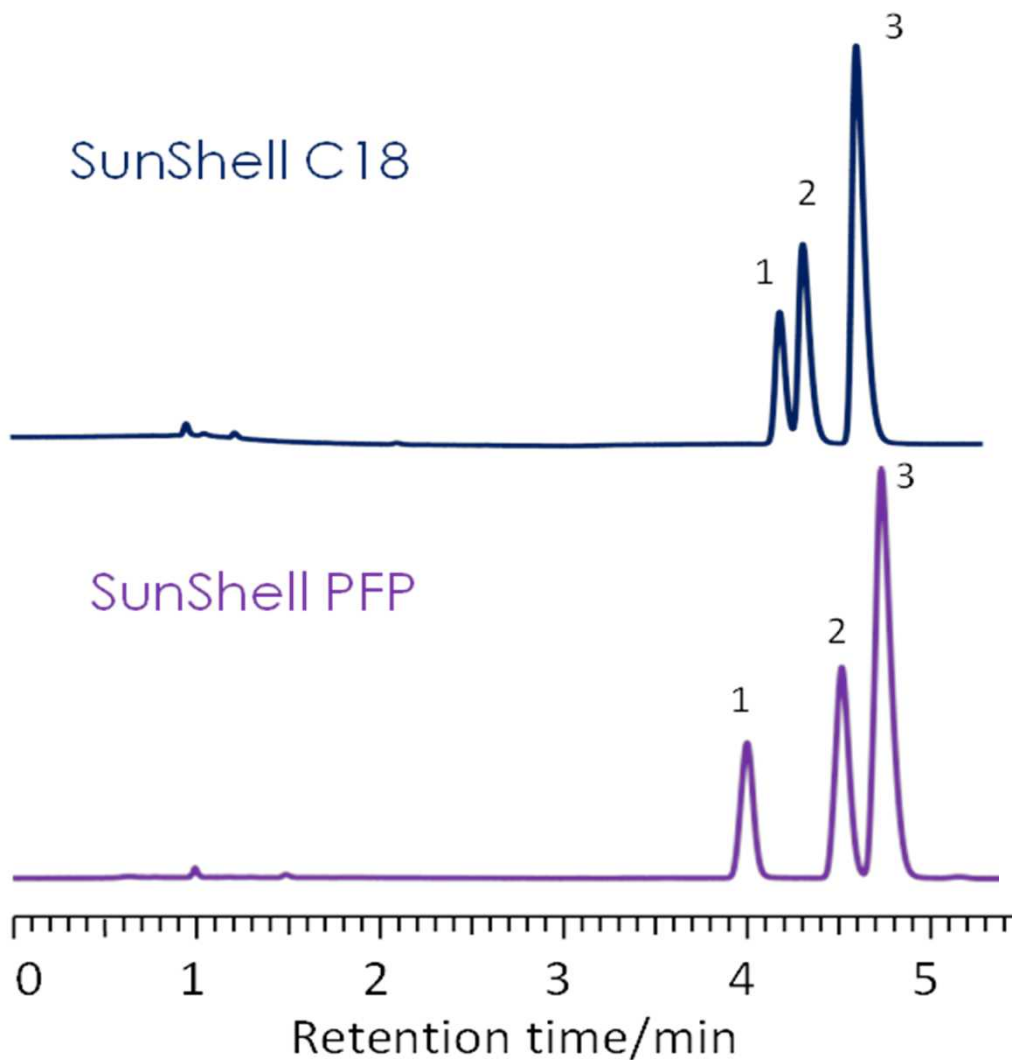
# 単位圧力あたりの段数比較

	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

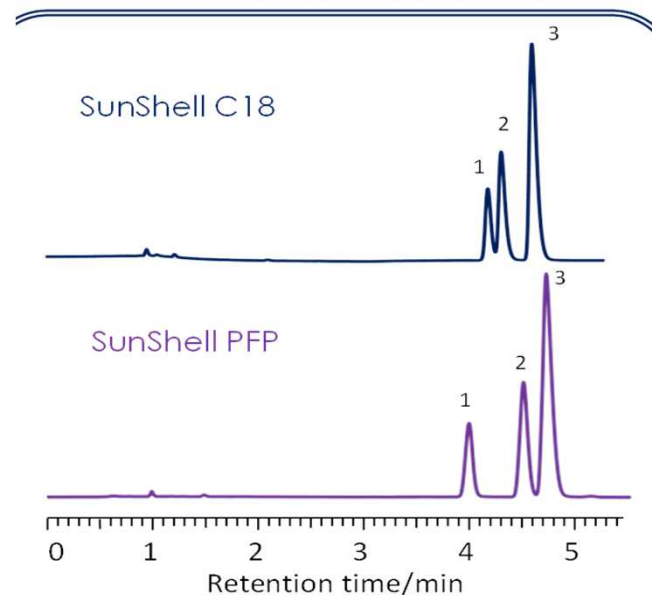


Column: 50 x 2.1 mm C18, Mobile phase: Acetonitrile/water=(70/30), Temperature: 25 °C

# SunShell C8とPFPの分離例

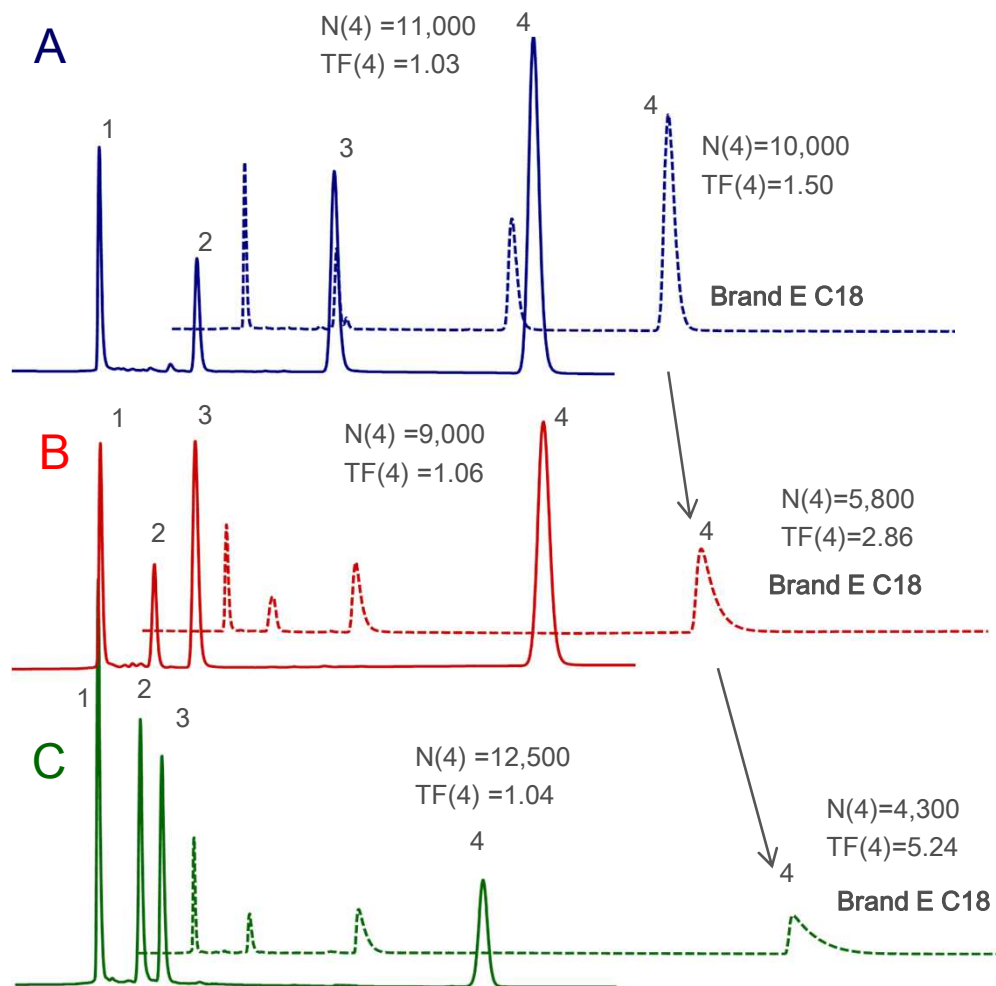


## キシレン異性体の分離比較



SunShell C18, PFP 2.6  $\mu$ m 150 x 2.1 mm  
 Mobile phase:  
 CH<sub>3</sub>OH/water=75:25 for SunShell C18  
 CH<sub>3</sub>OH/water=60:40 for SunShell PFP  
 Flow rate: 0.3 mL/min  
 Temperature: 25 °C  
 Detection: UV@250nm  
 Sample: 1 = o-Xylene  
 2 = m-Xylene  
 3 = p-Xylene

# アミトリプチリンのピーク比較I



Column: Sunniest C18(HMODTS), 5 mm 150 x 4.6 mm  
Re: Brand E C18, 5 mm 150 x 4.6 mm

Mobile phase:

**A)** CH<sub>3</sub>OH/20mM Phosphate buffer pH7.5 = 80/20

**B)** CH<sub>3</sub>OH/20mM Phosphate buffer pH6.0 = 80/20

**C)** CH<sub>3</sub>CN/20mM Phosphate buffer pH7.0 = 60/40

Flow rate: 1.0 mL/min

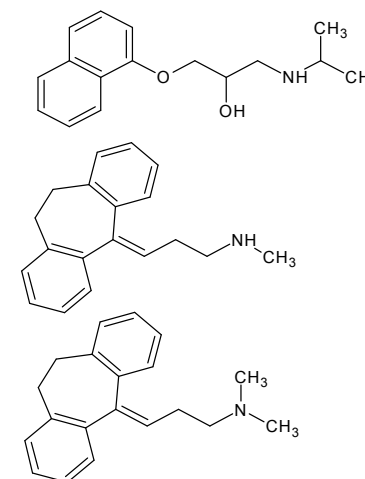
Temperature: 40 °C for **A** and **C**, 22 °C for **B**

Sample: 1 = Uracil,

2 = Propranolol,

3 = Nortriptyline,

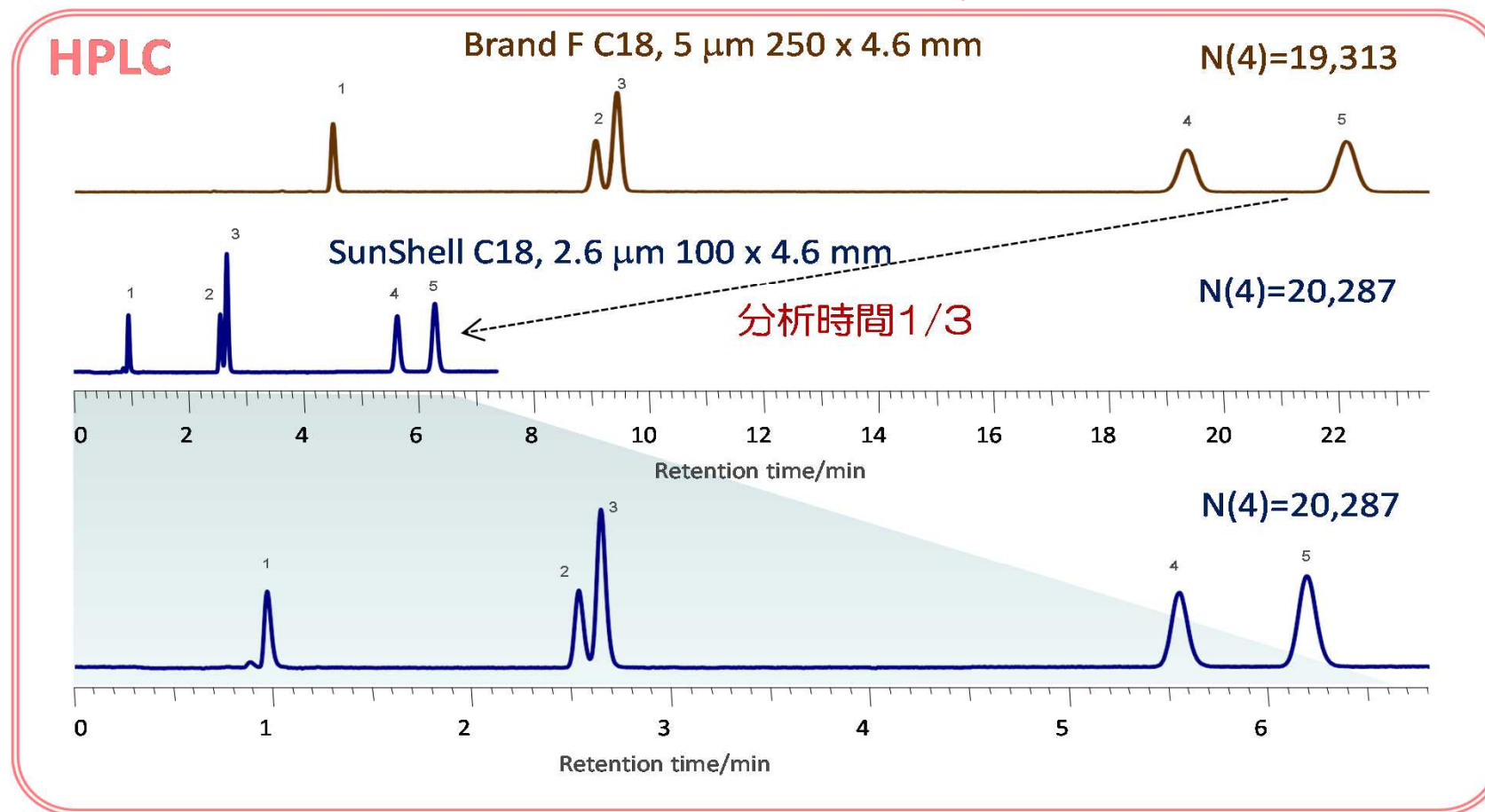
4 = Amitriptyline,



TF: USP tailing factor



# イソクラチック溶離例 5 $\mu$ m C18からの移行



Column: Brand F C18, 5 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, Temperature: 25 °C, Detection: UV230 nm

Pressure: 9.5 MPa for Brand F C18 5 mm, 13.4 MPa for SunShell C18 2.6 mm

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

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



