

コアシェル型充填カラムの 固定相の展開とその使用例

クロマニック テクノロジーズ

長江 徳和、塚本 友康

Norikazu Nagae, Tomoyasu
Tsukamoto

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>

シェルコア型シリカの歴史

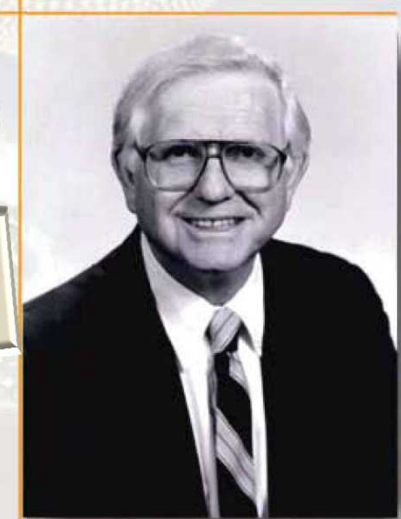
1969年カークランドにより発表されたHPLCで使用されていた充填剤 - 直径 $30\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.5\mu\text{m}$ の多孔質層

2000年にカークランドらにより発表¹, 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 30nm)

2007年三度カークランドらにより発表², 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 9nm)

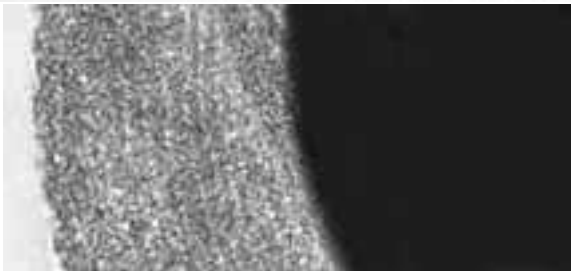
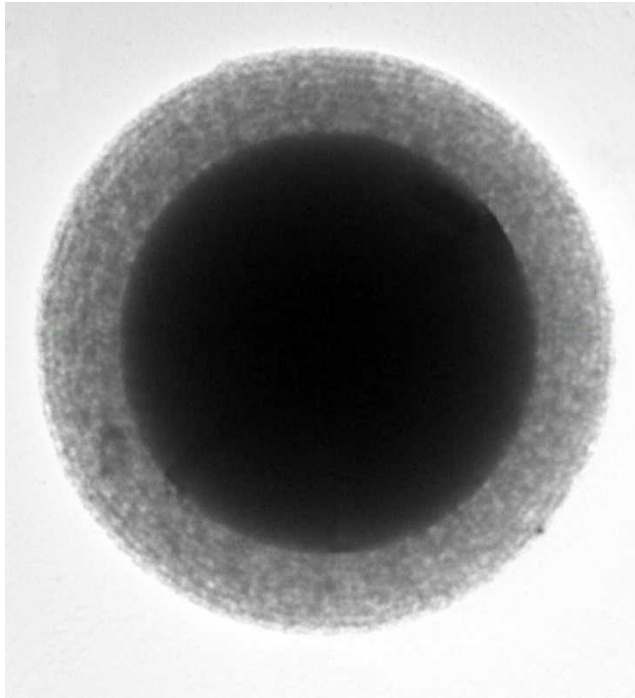
(1) J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks, and G.S. Engel, J. Chromatogr., A 890, 3-13 (2000).

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

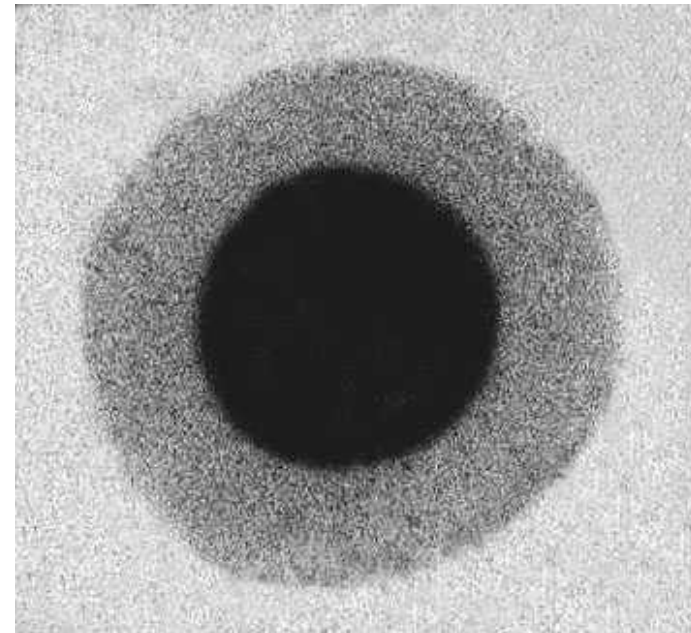


• *Fused-Core technology*
was developed by
Jack Kirkland.

二種類のコアシェル構造のシリカ粒子

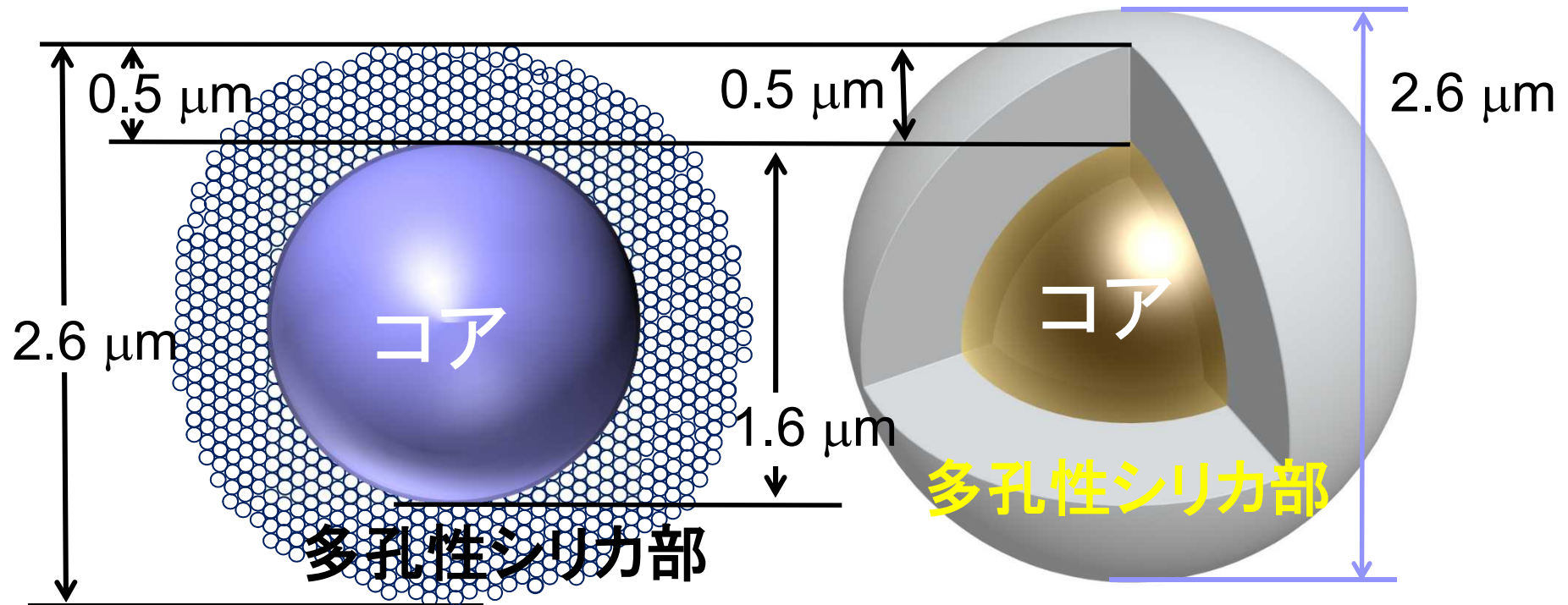


マルチレイヤー(多層)多孔質層構造



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



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

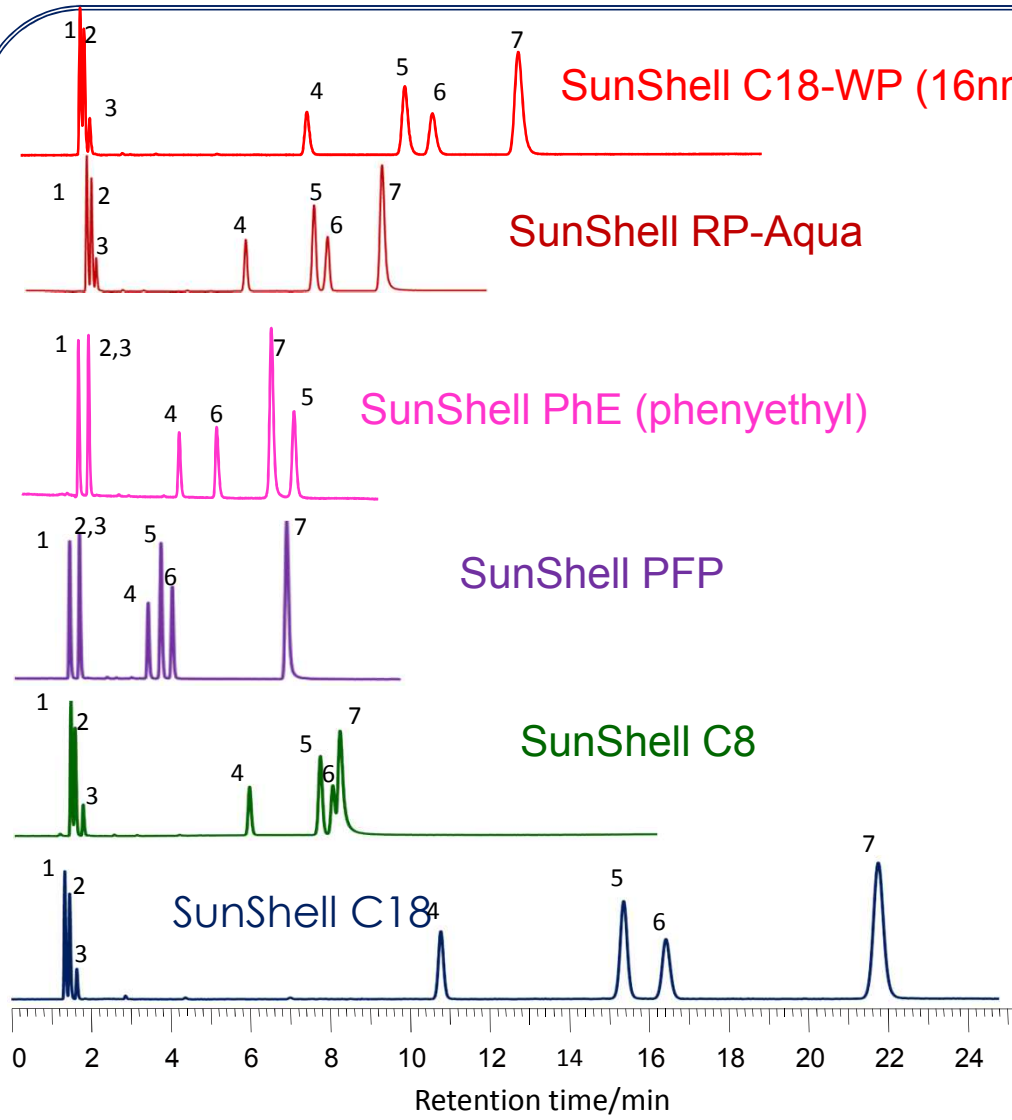
コアシェル型充填剤SunShell

	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 PhE	2.6	9	150	4	Phenylethyl	60 MPa or 8,570 psi	2 - 8
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。



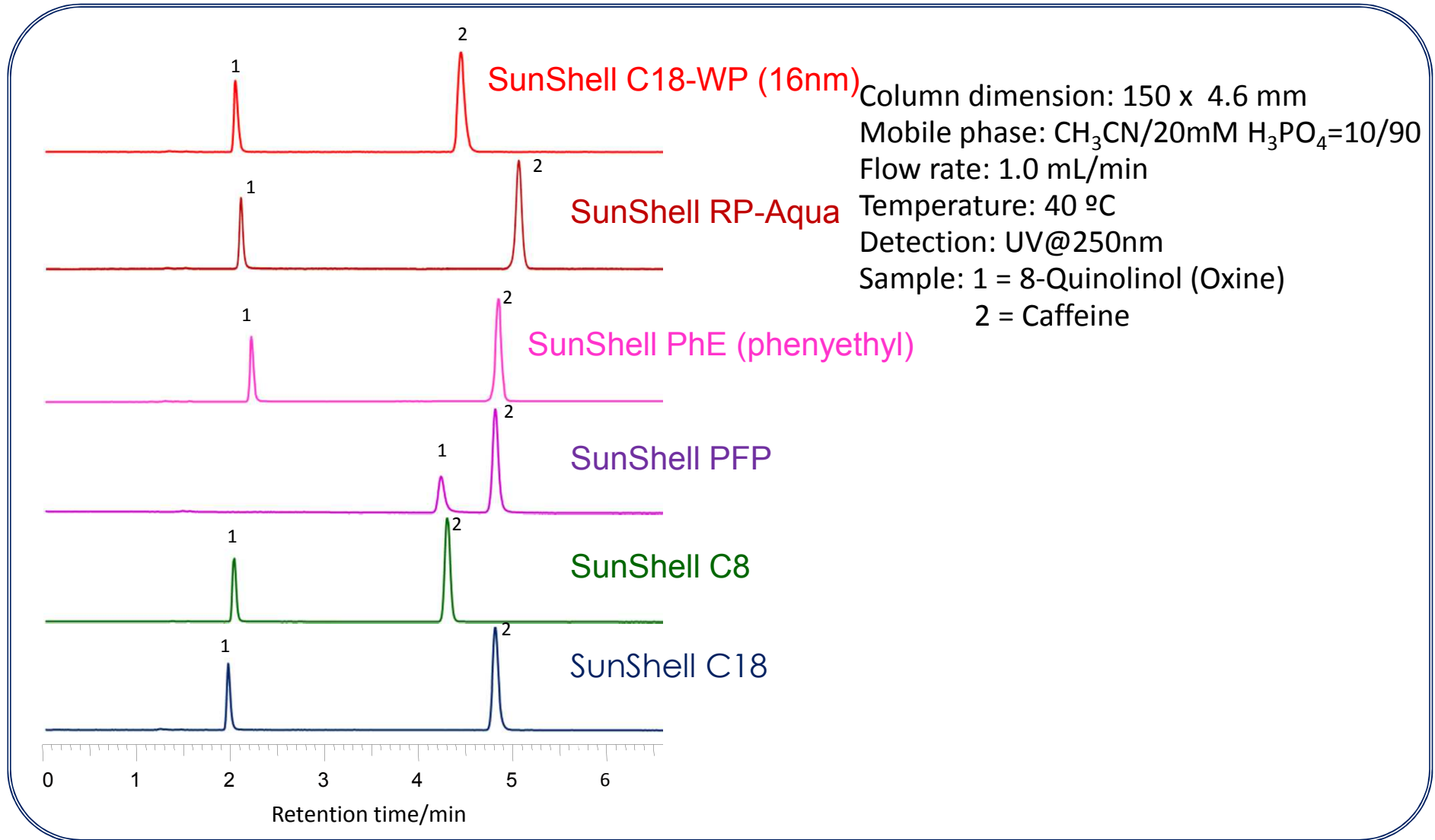
標準試料の分離比較



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

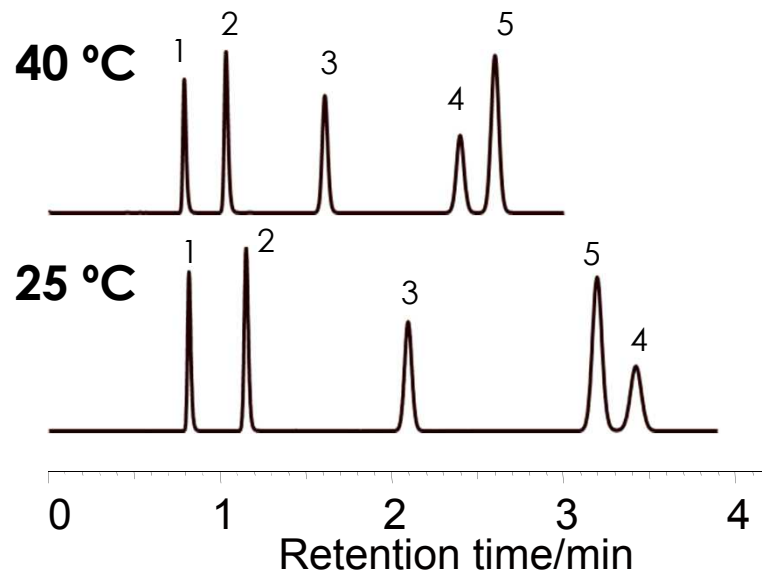
	Hydrogen bonding (Caffeine/ Phenol)	Hydrophobicity (Amylbenzene/ Butylbenzene)	Steric selectivity (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C18-WP	0.40	1.55	1.35
RP-Aqua	0.52	1.52	1.30
PhE	1.00	1.38	0.93
PFP	1.00	1.31	2.38
C8	0.32	1.46	1.08
C18	0.39	1.60	1.46

オキシシンとカフェインの保持比較



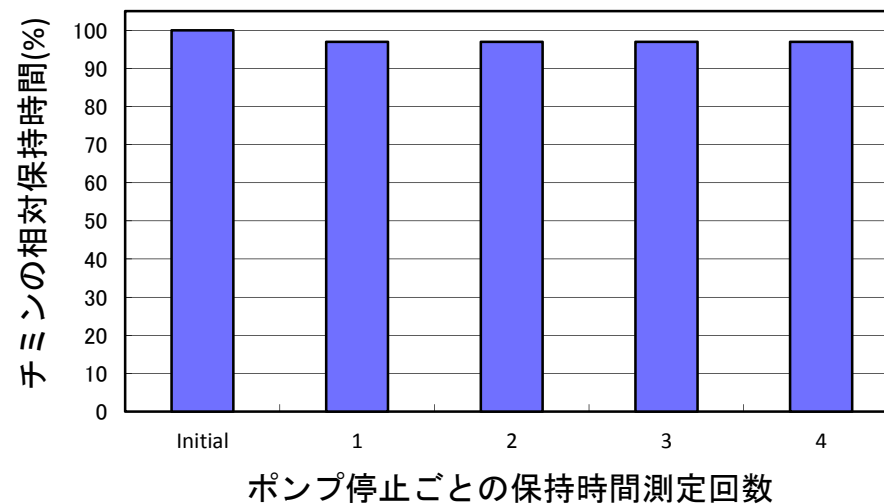
SunShell RP-Aqua の40 °Cでの保持

核酸塩基の分離



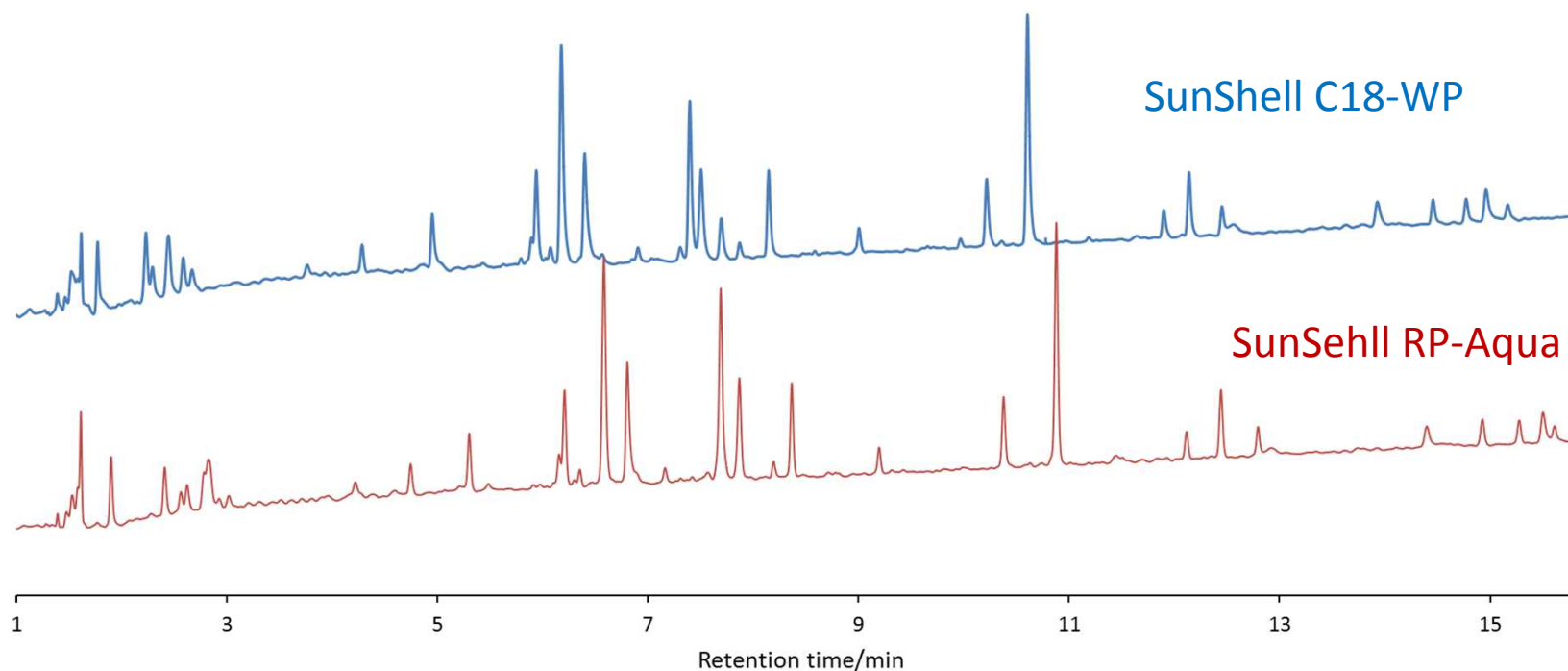
Column: SunShell RP-Aqua, 2.6 mm 75 x 4.6 mm
 Mobile phase: 10mM Phosphate buffer pH7.0
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C and 25 °C
 Sample: 1 = Cytosine, 2 = Uracil, 3 = Thymidine,
 4 = Uridine, 5 = Thymine

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 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)

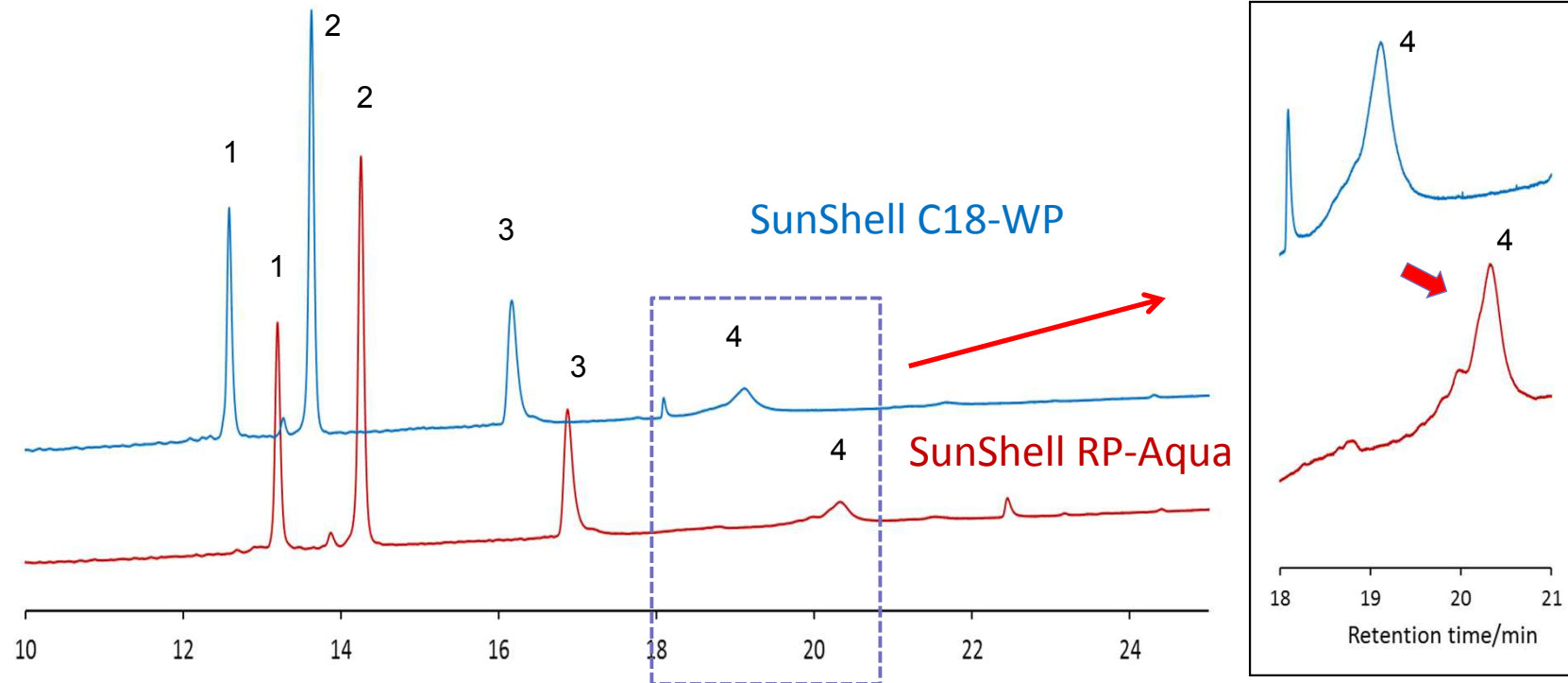
B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: %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 C18-WPとRP-Aquaによるタンパク質の分離



Retention time/min

Column: SunShell C18-WP, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm
SunShell RP-Aqua, 2.6 μ m 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

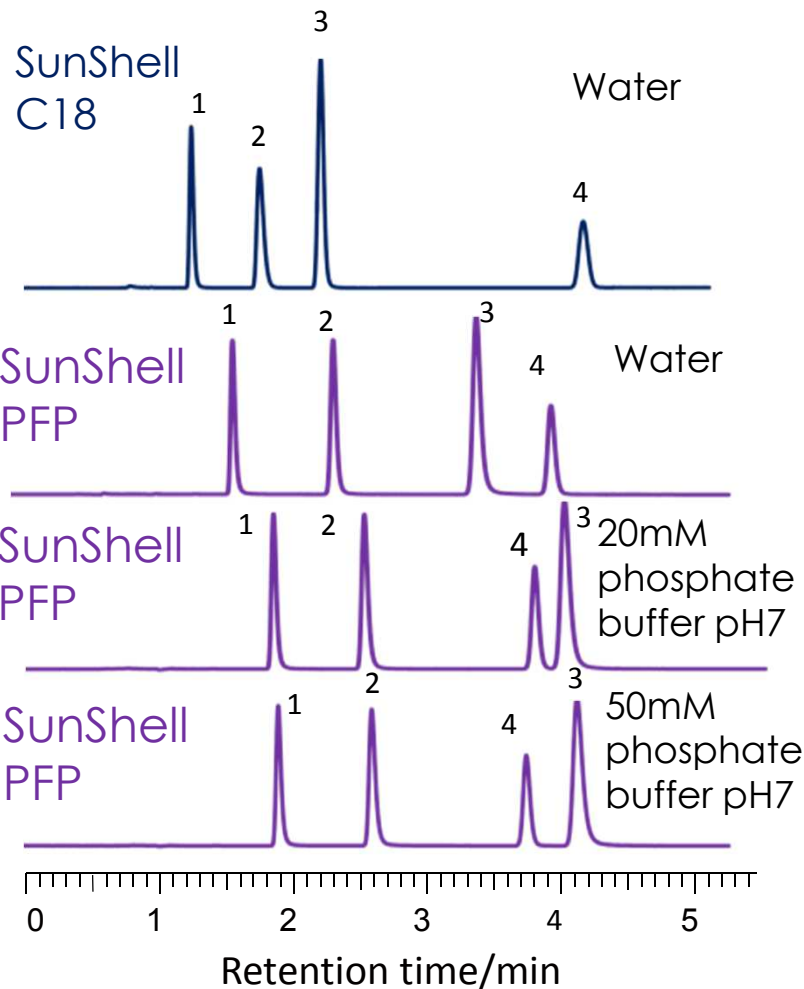
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 25 °C

Detection: UV@210 nm

Sample: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = Myoglobin, 4 - Ovalbumin

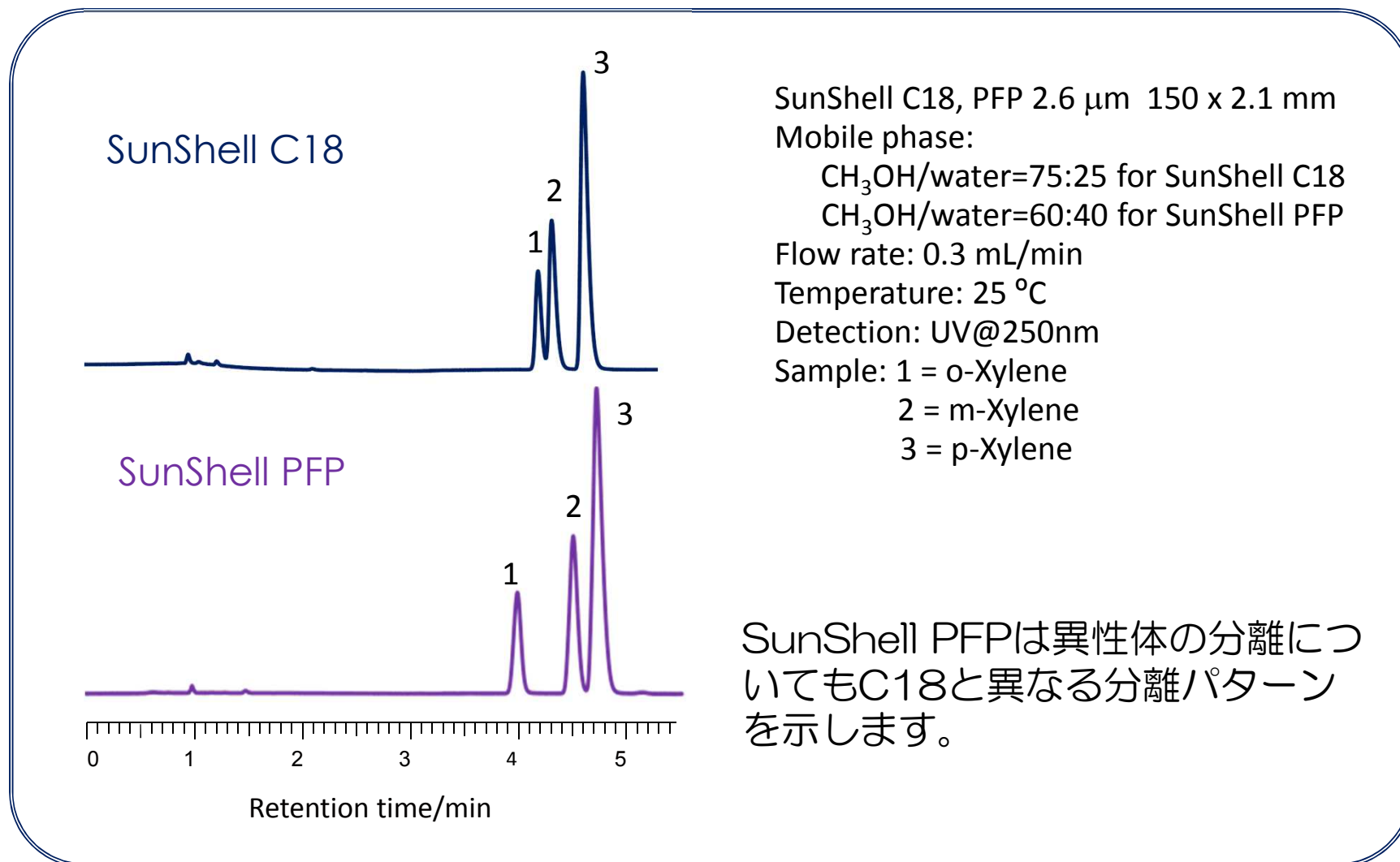
キサンチン類の分離比較



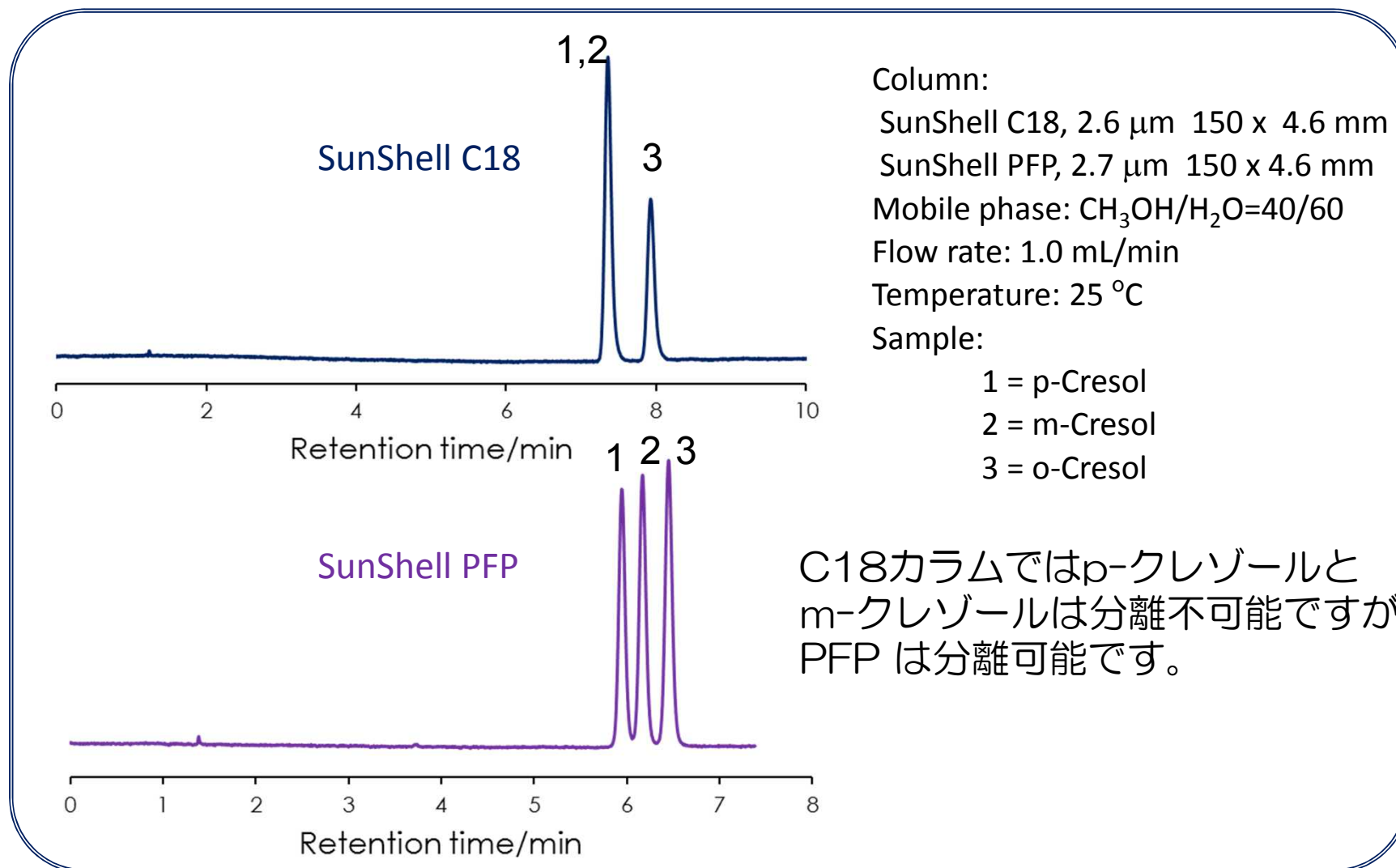
SunShell C18, PFP 2.6 μ m 150 x 2.1 mm
 Mobile phase: CH₃OH/water or buffer=30/70
 Flow rate: 0.3 mL/min
 Temperature: 25 °C
 Detection: UV@250nm
 Sample: 1 = Theobromine
 2 = Theophylline
 3 = Caffeine
 4 = Phenol

SunShell PFPはC18に比べ極性の高いカフェインを強く保持します。また塩濃度の調節で分離を変えることができます

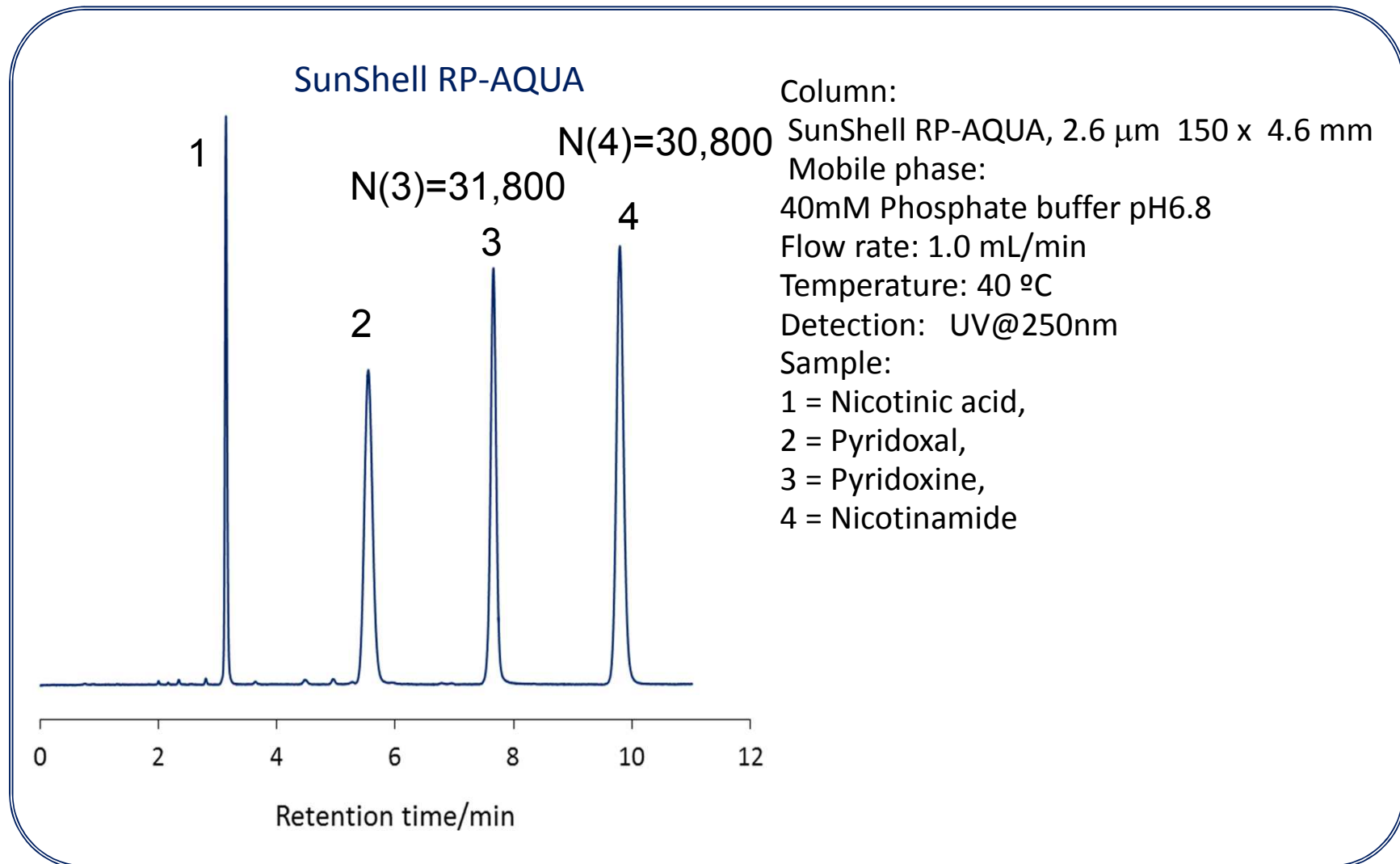
キシレンの異性体の分離



クロゾールの異性体の分離

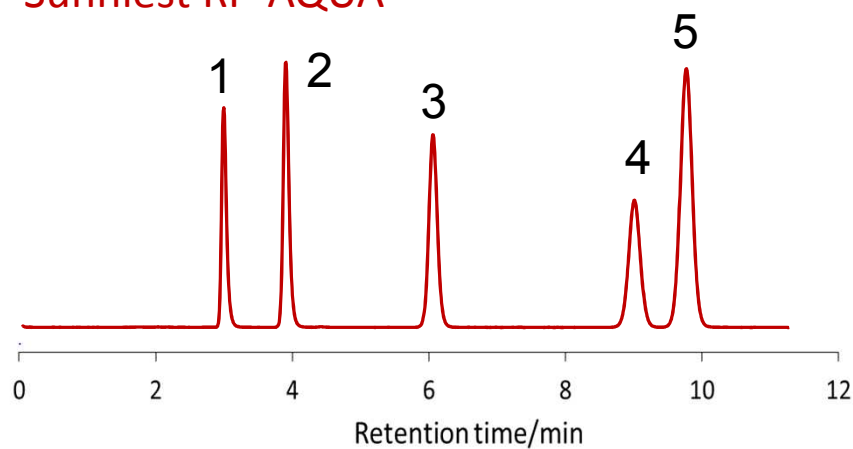


水溶性ビタミンの分離

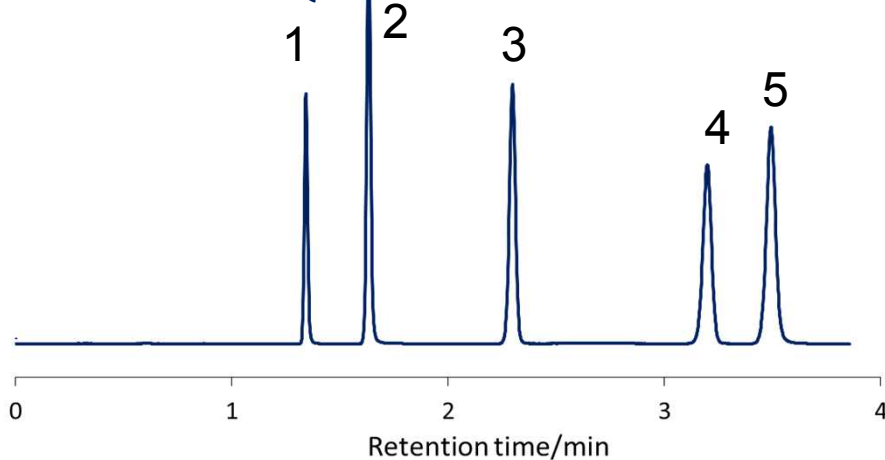


核酸塩基の分離比較

Sunniest RP-AQUA



SunShell RP-AQUA



Column:

Sunniest RP-AQUA 5 μ m 150 x 4.6 mm
SunShell RP-AQUA, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Water

Flow rate: 1.0 mL/min for Sunniest
1.5 ml/min for SunShell

Temperature: 24°C

Sample: 1 = Cytosine

2 = Uracil

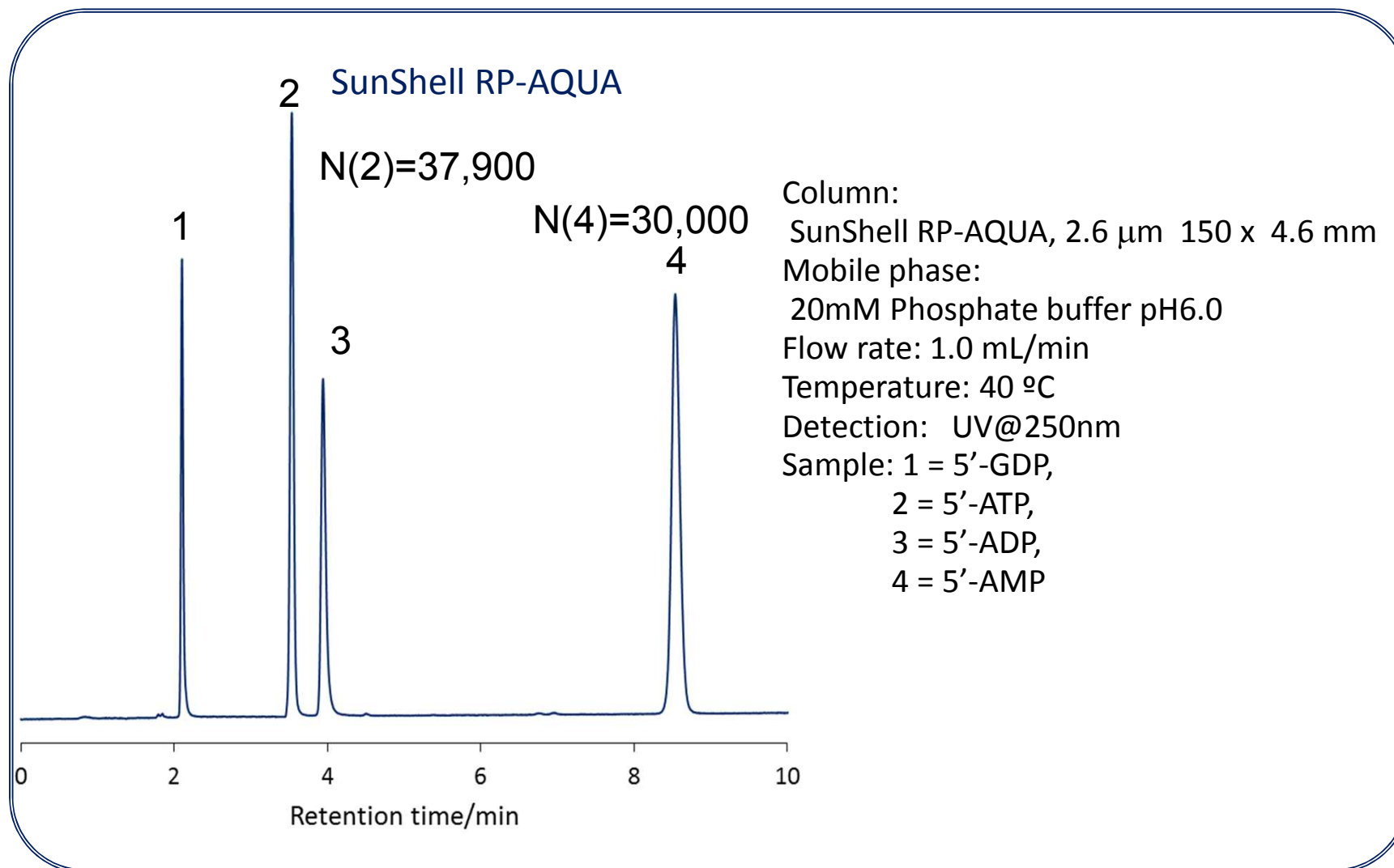
3 = Thymidine

4 = Uridine

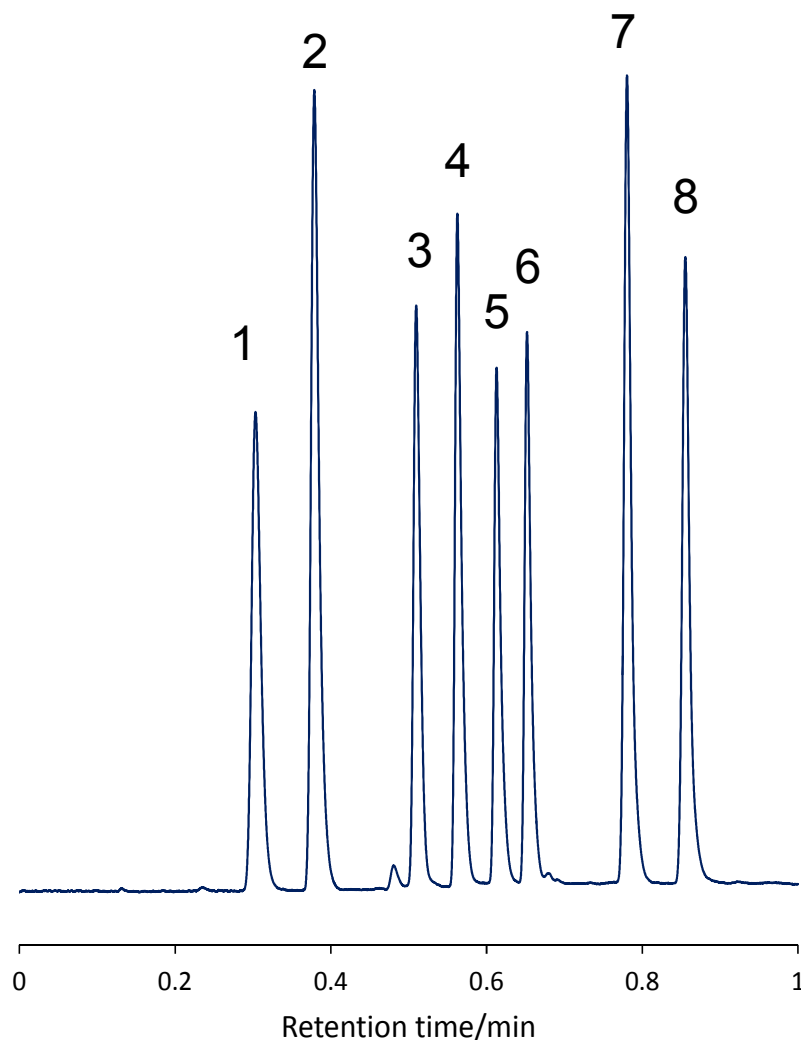
5 = Thymine

	Plate(5)	Resolution (4,5)
Sunniest	14,000	1.98
SunShell	30,000	3.79

ヌクレオチドの分離の分離



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 - 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.

SunShell RP ガードフィルター

(C18結合カートリッジフィルター)



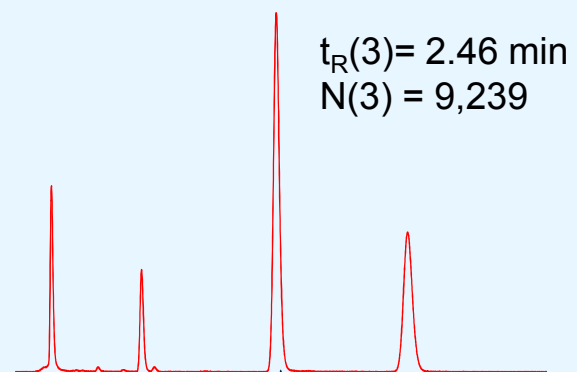
- ☆均一な細孔径を持つモノリス型ガラスフィルター（直径4mm,厚さ4mm）にC18を結合
- ☆夾雑物の捕捉によるカラム圧の上昇防止やC18結合相による吸着物の除去など、種々の逆相カラムのガードカラムとして利用可能
- ☆カートリッジ式で交換が容易
- ☆ホルダーを含めローデッドボリューム仕様（2.1x50mmカラムで5%の段数低下、4.6x150mmカラムで1%の段数低下）
- ☆内径2.1mm~4.6mmカラムに使用可能
- ☆SunShell RP Guard Filterの圧力損失は1 mL/minで約0.1MPa、またGuard Filter 本体の耐圧は60MPa
- ☆SunShell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



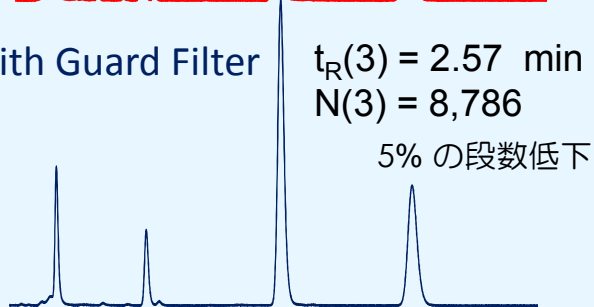
$t_R(3) = 2.46$ min
 $N(3) = 9,239$

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

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

With Guard Filter

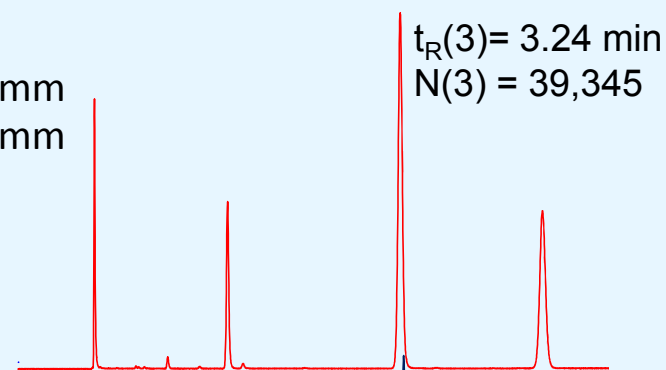


$t_R(3) = 2.57$ min
 $N(3) = 8,786$

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

まとめ

- コアシェル型SunShellカラムはC18, C8, PFP, PhE, C18-WPおよびRP-Aquaの六種類の固定相が利用可能
- 全多孔性充填剤と同様にコアシェル型充填剤も固定相を換えるることにより異なった選択性が得られる
- PFP固定相は極性化合物の相対保持が大きいことや異性体の分離がC18より優れていることが示された
- サブ2 μ m粒子と同等な高速分離がコアシェル型SunShellカラムでも達成された
- C18結合型ガードフィルターはガードカラムとしても使用でき、高性能なカラムでも段数低下は最低限であった