

コアシェルも全多孔性も徹底カバー 今さら聞けないC18カラムの 基礎とコツ

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>





全多孔性からコアシェルに変えたけど・・・

段数が・・・

サンプル調整の溶媒
負荷量
装置の容量

流速上げると・・・

検出器の取り込み時間
装置の容量

保持が・・・

サンプル調整の溶媒
負荷量
C18カラム選択

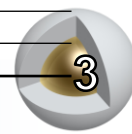
思っていたほど・・・

C18カラムはC18カラム
コアシェルと全多孔性の違い
圧力と粒子径の関連



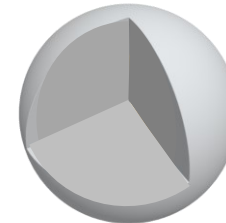
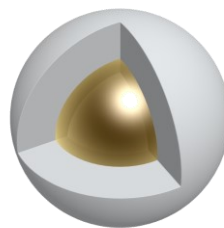
コアシェルカラム

	Manufacturer	Brand	Particle size (μm)	Porous layer thickness (μm)	Pore diameter (nm)	Surface area (m ² /g)	Bonded phase
1	Advanced Chromatography Technologies	UltraCore	2.5, 5		9.5	130	C18, Phenyl-hexyl
2	Advanced Materials Technologies	HALO	2.0, 2.7, 3.4, 4.6	0.2, 0.4, 0.5, 0.6	9, 16, 40, 100	120, 135, 15, 90	C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, Cyano, RP-Amide, HILIC, Pentahydroxy-HILIC, C4, Glycan
3	AkzuNobel	Kromasil ClassicShell/ EternityShell	2.5	0.5		110	C18, C8
4	Agilent Technologies	Poroshell	1.9, 2.7, 4, 5	0.25, 0.5	12, 30	130	C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, SB-Aq, Cysno, HILIC
5	Chrom4	Isosceles	2.6, 4.6	0.5, 0.6	9.5, 16	140, 90	C18, AQ, C8, C3, Phenyl-hexyl, PFP, Amide(HILIC)
6	ChromaNik Technologies	SunShell	2.0, 2.6, 3.4, 4.6	0.2, 0.4, 0.5, 0.6	9, 12, 16, 30, 100	150, 90, 40, 15, 22	C18, RP-AQUA, C8, PFP, Phenyl-Hexyl, 2-Ethylpyridine, HILIC-Amide, C30, Hexafunctional C18, C4
7	Dr Maisch	PeproShell	2.6				C18
8	Fortis Technologies	SpeedCore	2.6, 3.5, 5	0.4	8, 16, 30	140	C18, C18-Amide, C18-PFP, Diphenyl, PFP, HILIC C8, C4
9	GL Sciences	InertCore	2.4	0.3	9	100	C18
10	Interchim	Uptisphere CS Evolution	2.6	0.5	8.5	130	C18, C18 AQ, RP/SCX, HILIC, SILICA
11	Knauer	BlueShell	2.6, 4.5	0.5	8	130	C18, C8
12	Merck (supelco)	Ascentis Express/ BioShell	2.0, 2.7, 3.4, 5	0.2, 0.4, 0.5, 0.6	9, 16, 40,	120, 135, 80, 15, 90	C18, C8, C4, RP-Amide Phenyl-Hexyl, Biphenyl, Cyano, PFP, Pentahydroxy-HILIC
13	Macherey-Nagel	NucleoShell	2.7	0.5	9	130	C18, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
14	Nacalai Tesque	CosmoCore	2.6	0.5	9	150	C18, Cholesterol, Pentabromobenzyl
15	Nanologica	SVEA Core	2.6	0.5	9	130	C18, Phenyl-Hexyl
16	Perkin Elmer	Brownlee SPP	2.7	0.5	9, 16		C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, RP-Amide, HILIC
17	Phenomenex	Kinetex/ Aeris	1.3, 1.7, 2.6, 3.6, 5	0.2, 0.23, 0.35, 0.67	10, 20	200	C18, C8, Phenyl-hexyl, PFP, Biphenyl, HILIC, C4
18	Restek	Raptor	2.7		9	150	C18, Biphenyl, PFP, HILIC
19	Sepax Technologies	Opalshell	2.6	0.5	9	150	C18
20	Osaka Soda	Capcell Core	2.7	0.5	9, 16, 30	150	C18, AQ, Adamantyl, Phosphocholine, PFP
21	SCAS	Sumipax ODS Z-Shell Sumichiral OA-Shell P1	2.6	0.5	9, 30	150, 40	C18, Poly(diphenylacetylene) derivative
22	Shimadzu	Shim-pack Velox	1.8, 2.7, 5		9	100, 125, 130	C18, Biphenyl, PFPP, HILIC
23	SIELC Technologies	Coresep	2.7		9		Mixed mode: RP + cation exchange, RP + anion exchange, HILIC + ion exchange
24	Thermo Scientific	Accucore	2.6, 4		8, 15	130	C18, C8, AQ, Phenyl-Hexyl, Phenyl, C30, PFP
25	Waters	Cortecs	1.6, 2.7	0.26	9	100	C18, C8, Phenyl-Hexyl, HILIC
26	Welch	Boltimate	2.7	0.5	9	120	C18, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
27	YMC	Meteoric Core	2.7	0.5	8, 16	150, 90	C18, C8



全多孔性粒子と何が違う？

	コアシェル	全多孔性
素材	シリカ	
特徴	アルカリ条件に弱い	
粒度分布	狭い	広い
比表面積	狭い(150m ² /gほど)	広い(340m ² /gほど)
構造	ノンポーラスの核と多孔質層	多孔質
重量	重い	軽い



化学的特徴は全多孔性シリカと同じ

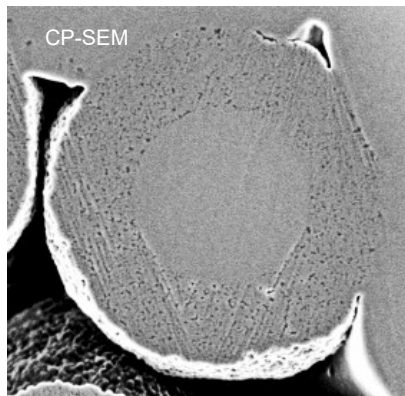
全多孔性シリカカラムで注意すべきこと



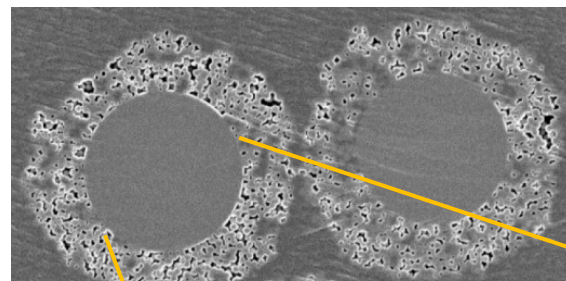
コアシェルシリカカラムで注意すべきこと



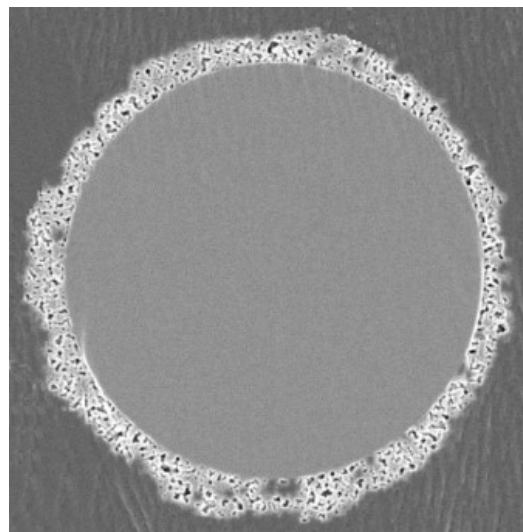
コアシェルシリカの電子顕微鏡写真



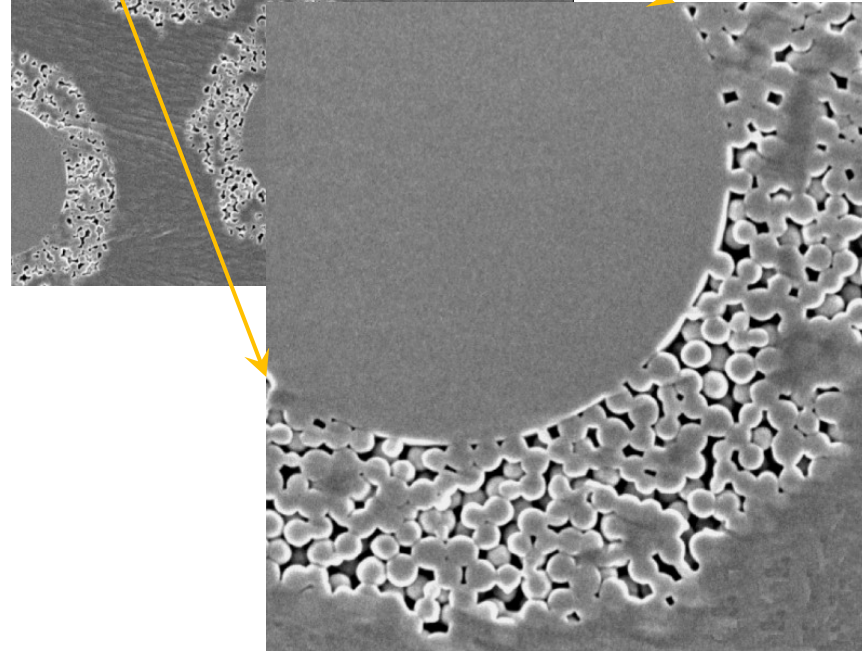
粒子径: 2.6 μm
細孔径: 16 nm



粒子径: 2.6 μm
細孔径: 100 nm



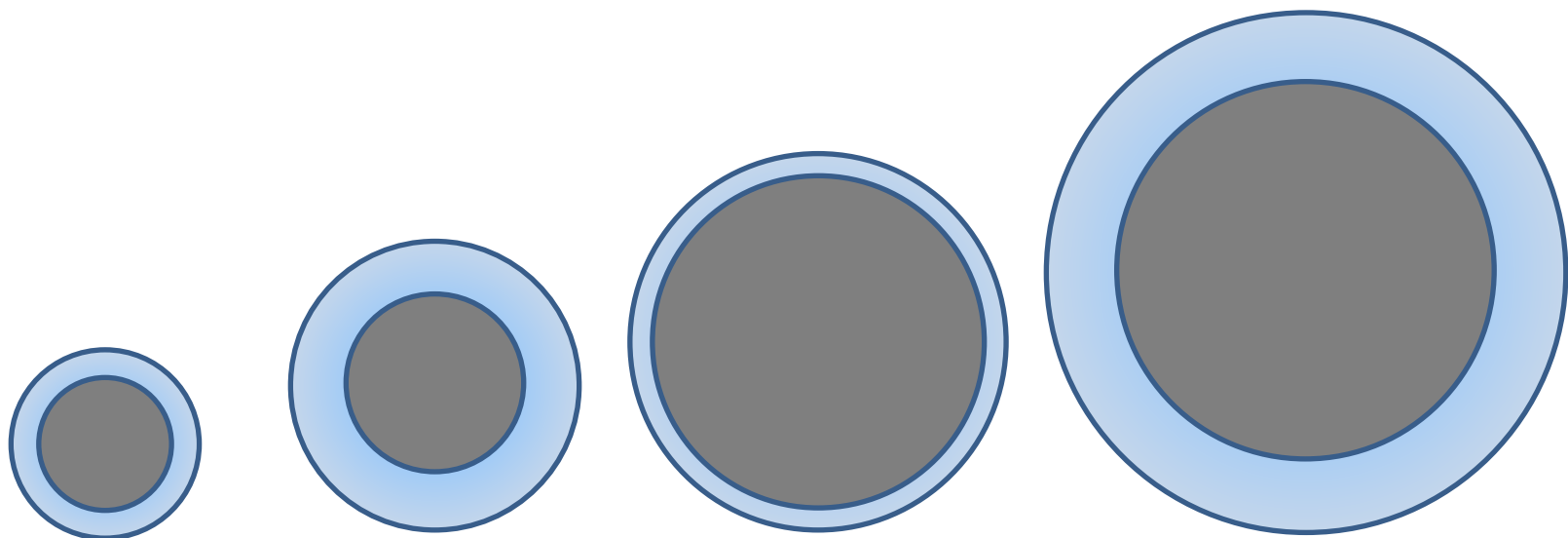
粒子径: 3.4 μm
細孔径: 30 nm



コアシェルシリカ粒子を樹脂包埋し、Arイオンミリングにより断面加工し、導通処理のためOs(オスミウム)蒸着して観察しました。コア（フェーズドシリカ）とその周りの多孔質層が確認できます。



市販されているコアシェル粒子



粒子径	1.3 - 2 μm	2.4 - 2.7 μm	3.4 - 3.6 μm	4 - 5 μm
細孔径	9 - 10 nm	8 - 16 nm, 30 nm, 100 nm	20 - 40 nm	8 - 12 nm
多孔質層	0.22 - 0.4 μm	0.3 - 0.5 μm	0.2 - 0.5 μm	0.2 - 0.6 μm
比表面積	100 - 120 m^2/g	90 - 150 m^2/g , 25 - 40 m^2/g	15 m^2/g	90 m^2/g
多孔質%	58 - 78%	58 - 77%	27%	60%



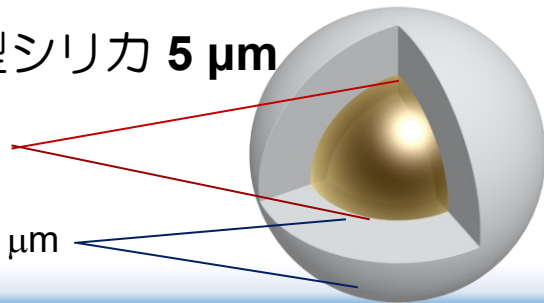
全多孔性シリカとコアシェル型シリカ 2.6 μm と5 μm の標準試料の保持比較

	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

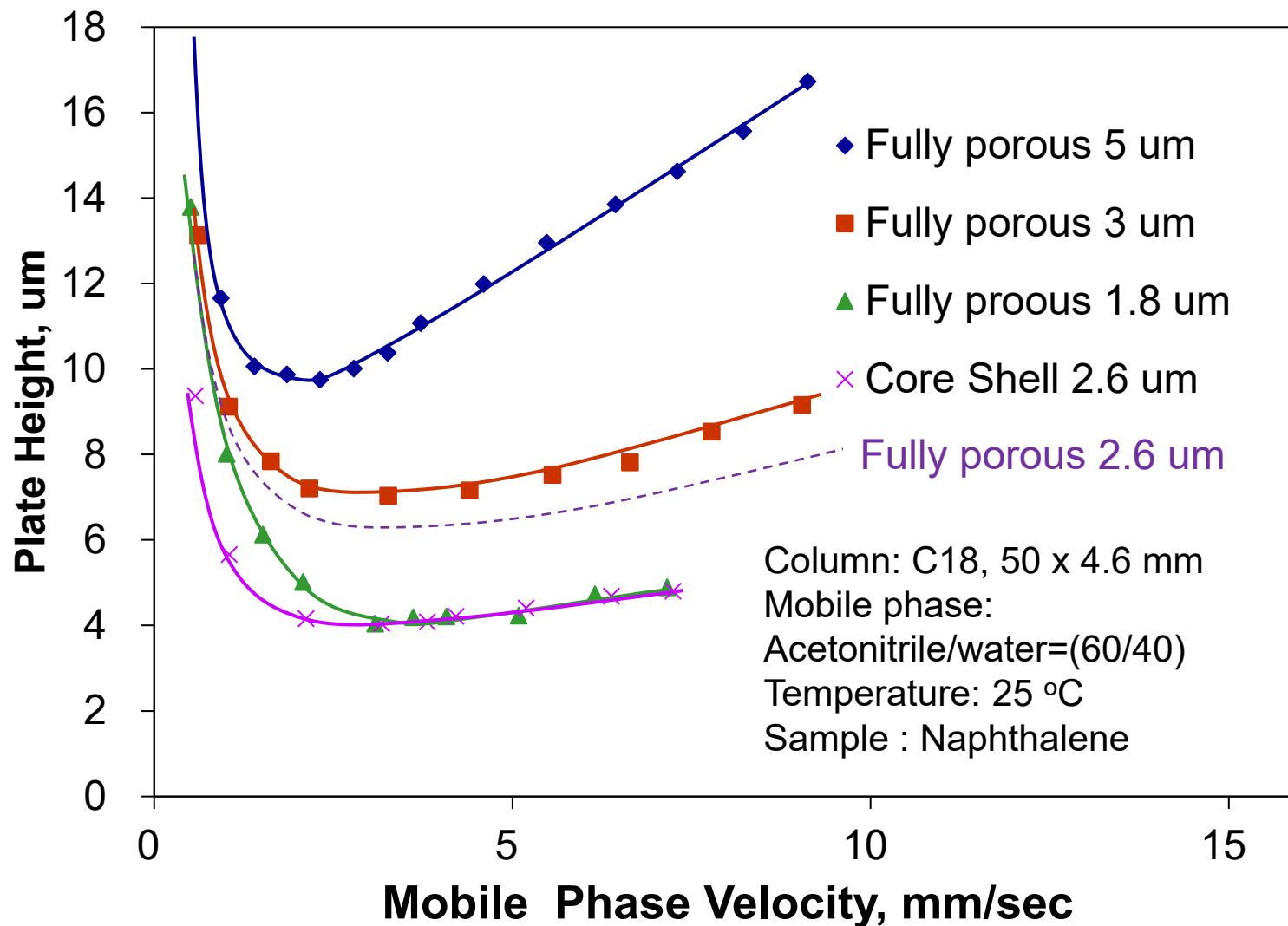
カラム: 150 x 4.6 mm

流速: 1.0 mL/min



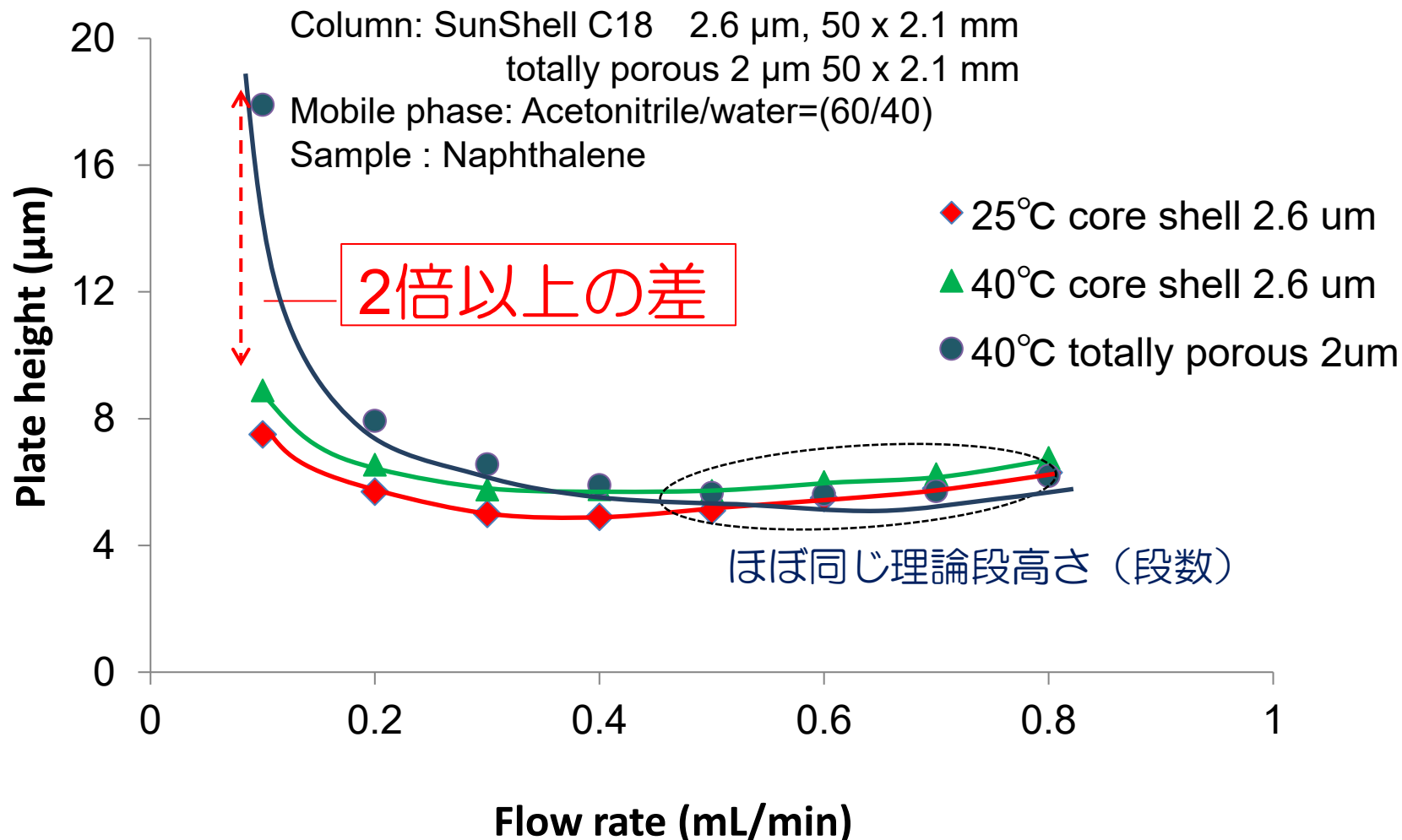


全多孔性とコアシェルの理論段高さの比較





低流速時の理論段高さ

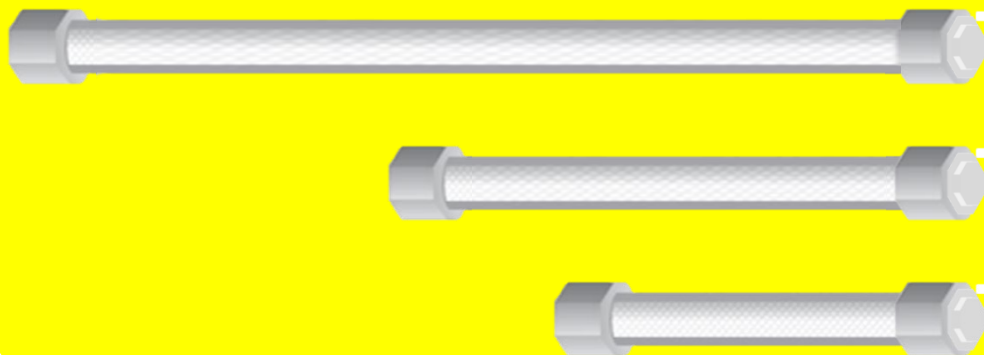




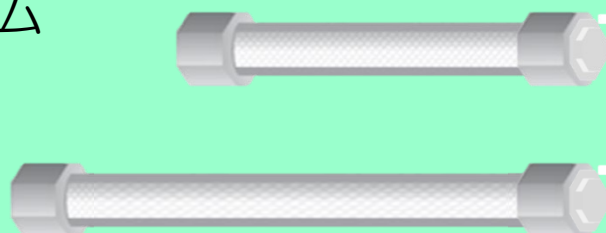
カラム長さと理論段数

理論段数が約20,000段になるカラム長さと粒子径

全多孔性カラム



コアシェルカラム



粒子径	長さ	圧力
5 μm	250 mm	低
3 μm	150 mm	中
Sub 2 μm	100 mm	高
2.6 μm	100 mm	中
5 μm	150 mm	低

同じ理論段数でも、長さが短いカラムは分析時間が短縮可能



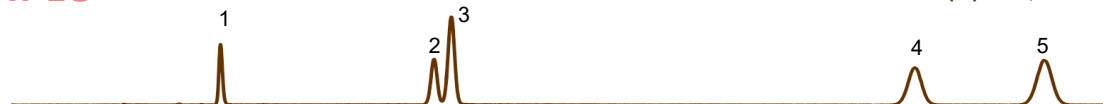
イソクラティック溶離例

5 μ m C18からの移行

HPLC

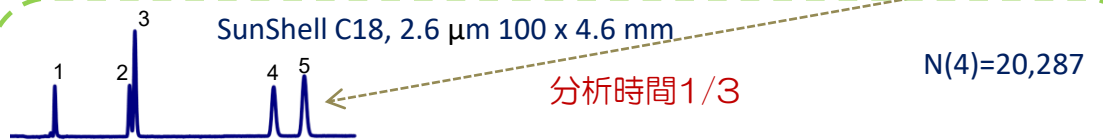
Brand F C18, 5 μ m 250 x 4.6 mm

N(4)=19,313

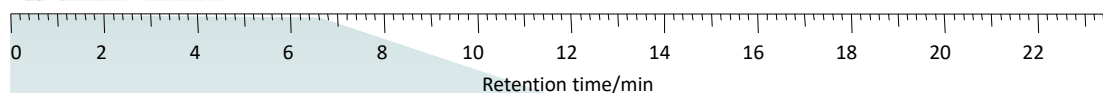


SunShell C18, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm

N(4)=20,287

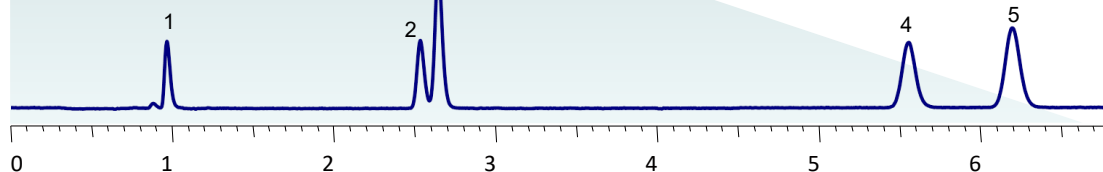


分析時間1/3



Retention time/min

N(4)=20,287



Retention time/min

UHPLC

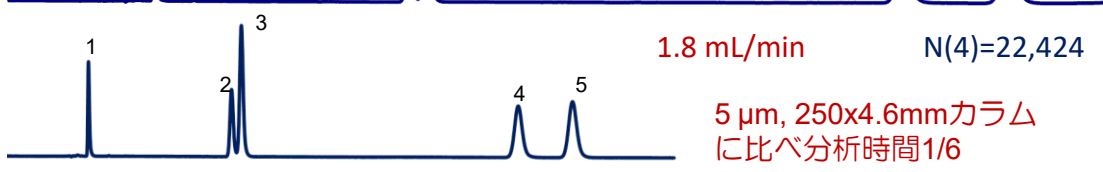
1.0 mL/min

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 = Benzydamine

2 = Ketoprofen

3 = Naproxen

4 = Indomethacin

5 = Ibuprofen

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

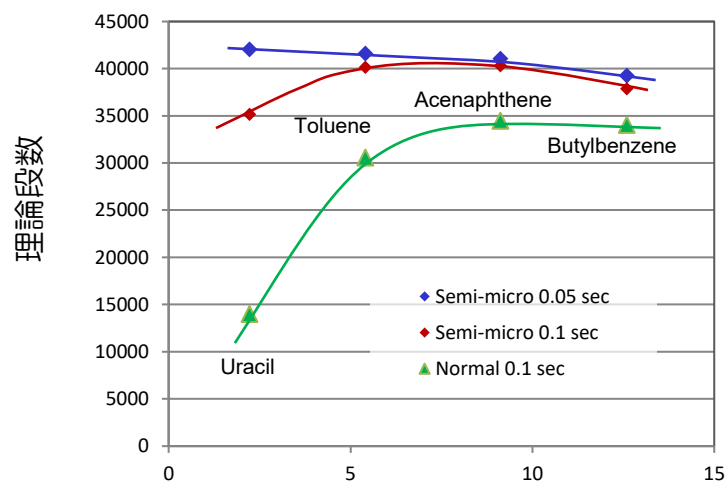
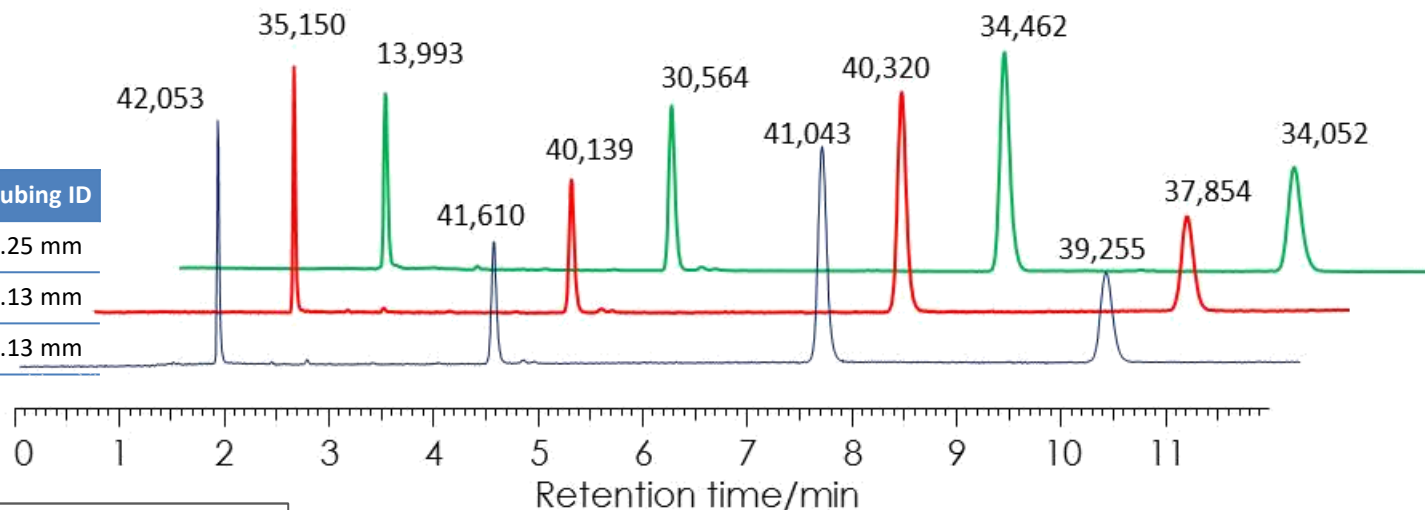
(内径0.25mmの配管仕様)

UHPLC: Jasco X-LC



通常仕様とセミマイクロ仕様のHPLCの比較

Flow cell	Response	Sampling	Tubing ID
Normal 13 μ L	0.1 sec	0.4 sec	0.25 mm
Semi-micro 3.2 μ L	0.1 sec	0.4 sec	0.13 mm
Semi-micro 3.2 μ L	0.05 sec	0.05 sec	0.13 mm



Column: SunShell C18, 5 μ m 250 x 4.6 mm
Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ = 70/30
Flow rate: 1.0 mL/min,
Temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$
Pressure: 6.7 MPa
Detection: UV@250 nm
Sample: 1 = Uracil
2 = Toluene
3 = Acenaphthene
4 = Butylbenzene



HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

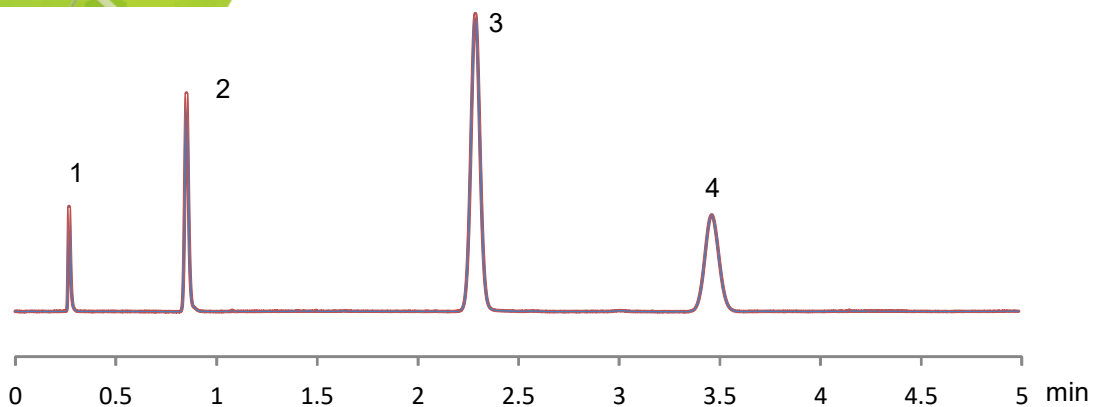


配管の影響



耐圧：130MPa
メタルフリー対応

Next Generation
UHPLC Connection
Technology



Connecting tube

Injector→Column: Marvel X, 0.075 mm i.d., 350 mm length

Column→Flow cell of UV: Marvel X, 0.075 mm i.d., 150 mm length

Column: SunShell C18, 2.6 μ m 50 x 2.1 mm

Mobile phase: Acetonitrile/water=60/40, Flow rate:0.30 mL/min

Temperature: RT, Detection: UV@250 nm, Injection volume: 0.4 μ L

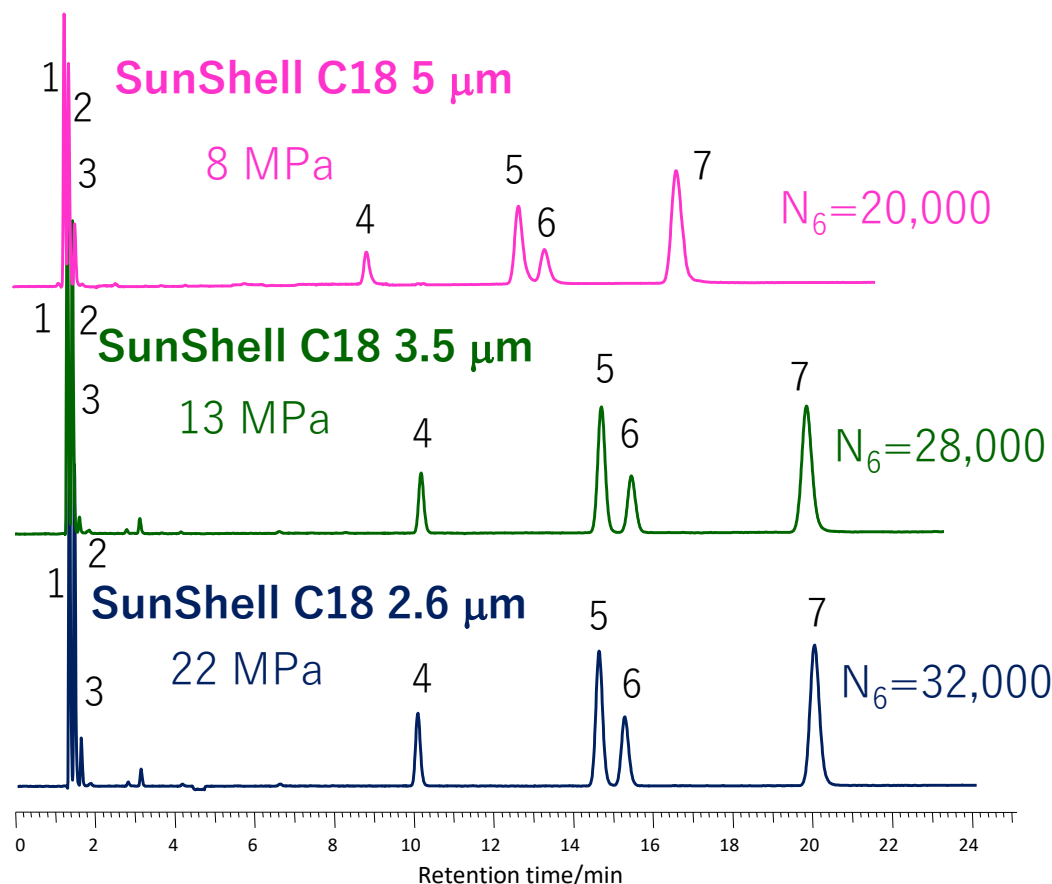
Sample: 1=Uracil, 2=Ethylbenzene, 3=Acenaphthene, 4=Butylbenzene

SunShell C18 2.6 μ m, 50 x 2.1 mm

	Peak No.	SUS	Marvel X
Efficiency	1	1107	2614
	2	6852	10146
	3	10976	11907
	4	10768	11129
Tailing factor	1	0.939	0.913
	2	1.320	1.210
	3	1.057	1.037
	4	1.041	1.051
Peak width, $h_{0.5}$ (min)	1	0.0201	0.0124
	2	0.0246	0.0199
	3	0.0513	0.0493
	4	0.0783	0.0772



粒子径の異なるコアシェルカラムの比較



Column size: 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 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Caffeine

3 = Phenol

4 = Butylbenzene

5 = o-Terphenyl

6 = Amylbenzene

7 = Triphenylene

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(Tubing, 0.25 mm i.d.)



汎用HPLCでも使用しやすい20MPa以下で
使用可能な粒子径3.5 μm を開発



全多孔性カラムとの比較

Column size: 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

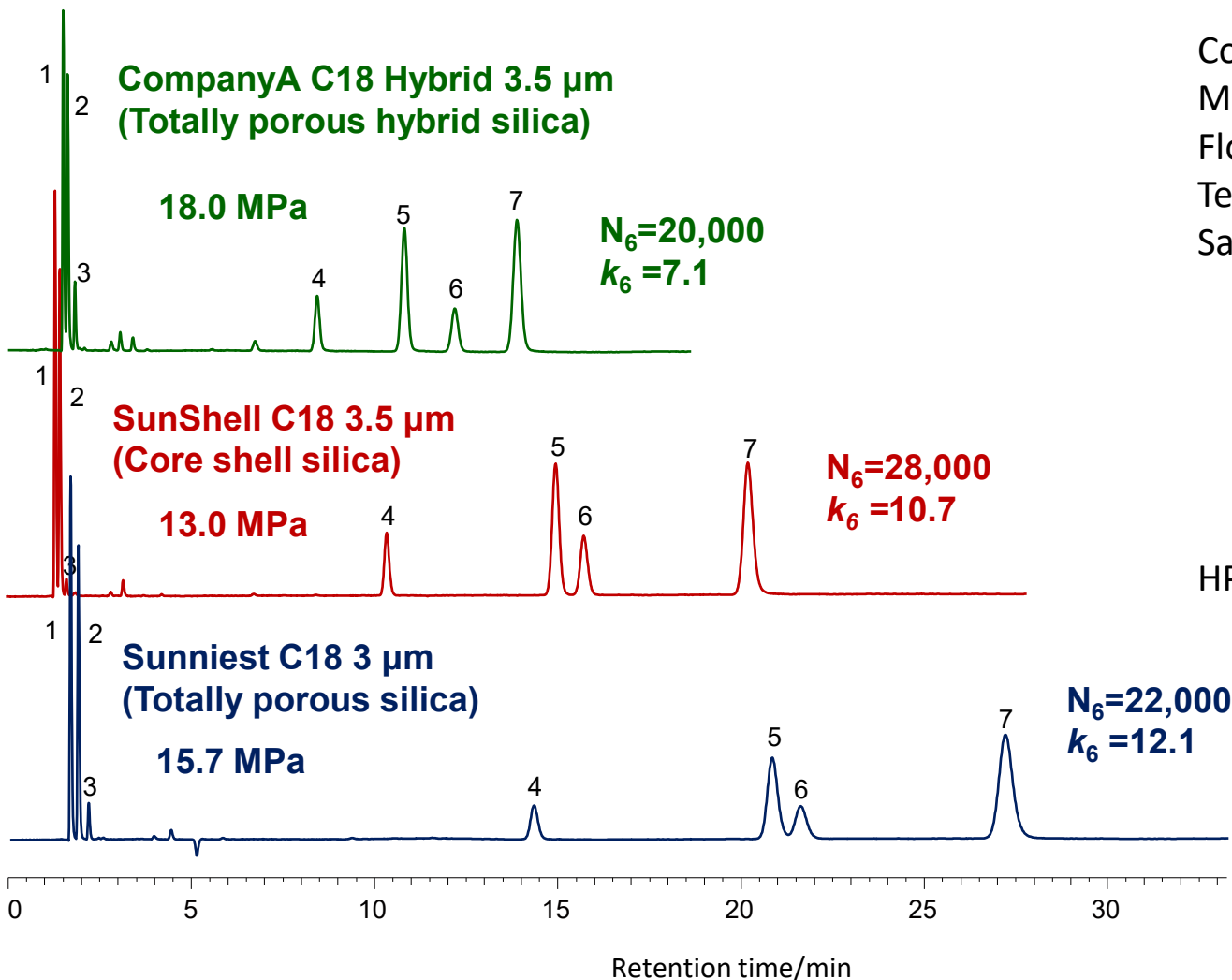
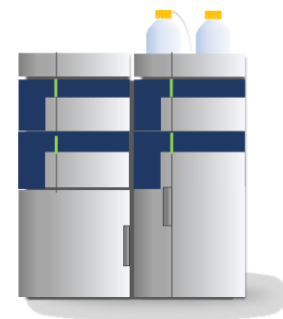
4 = Butylbenzene

5 = o-Terphenyl

6 = Amylbenzene

7 = Triphenylene

HPLC: Conventional HPLC instrument
(Tubing, 0.25 mm i.d.)





コアシェル粒子の多様性

	コアシェル	全多孔性
素材	シリカ	ポリマー、シリカ
粒子径	1.3 ~ 5 μm	1.5 ~ 10 μm
細孔径	8 ~ 100 nm	0 ~ 100 nm
比表面積	15 ~ 150 m^2/g	~ 400 m^2/g
多孔質層	0.2 ~ 0.6 μm	-
重量	重い	軽い

多孔質層の厚さを変えることで
より適した粒子を選択可能に



多孔質層の厚さが異なるコアシェルカラムの比較

Column: SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm, 0.5 μm layer) 100 x 2.1 mm, Sunshell C8-30HT, 3.4 μm (30 nm, 0.2 μm layer) 100 x 2.1 mm

Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 5 or 35 min

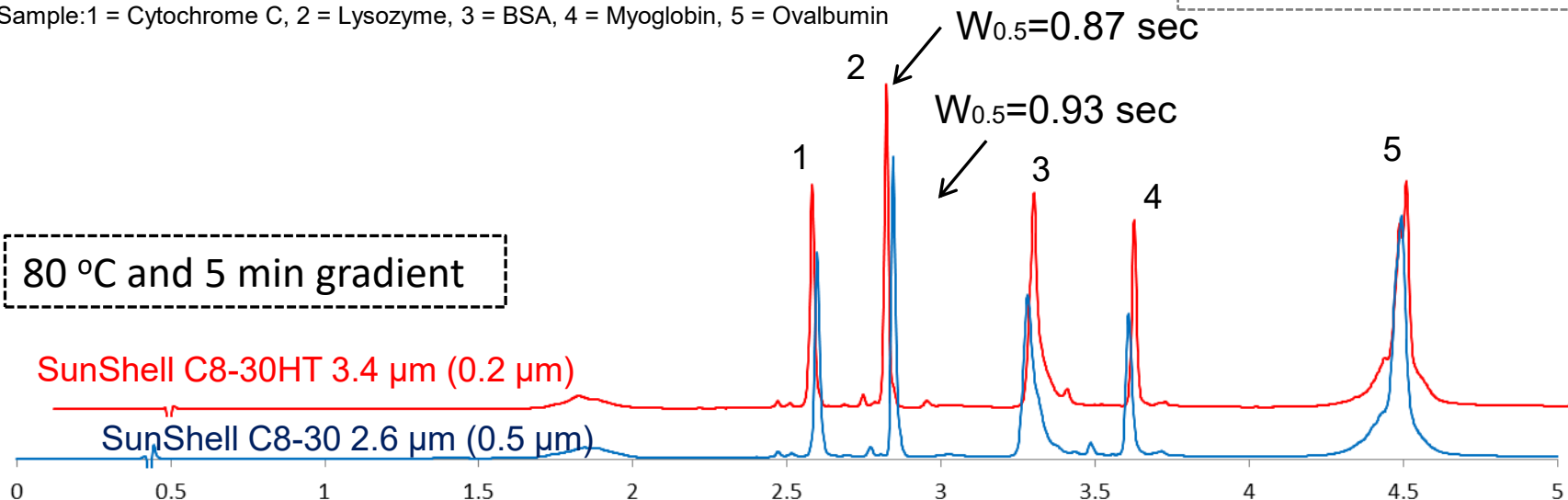
%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 60 or 80 $^{\circ}\text{C}$, Detection: UV@215 nm,

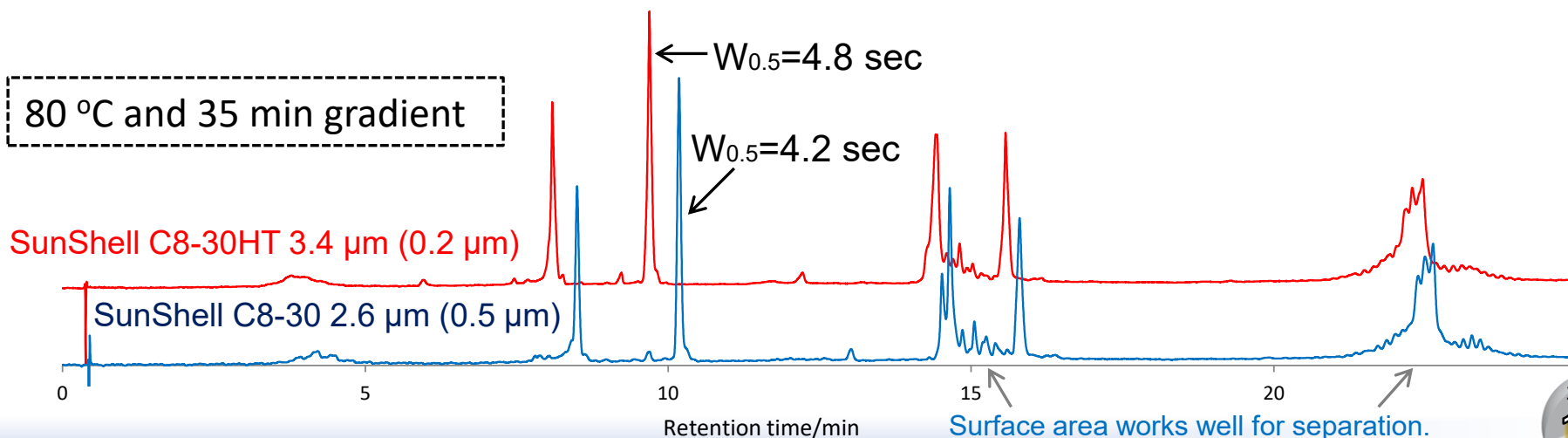
Sample: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA, 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

高速分離においては多孔質相が薄いほうが分離が良好

80 $^{\circ}\text{C}$ and 5 min gradient



80 $^{\circ}\text{C}$ and 35 min gradient





高分子用カラム

Column: SunShell C4-100, 2.6 μm (100 nm, 0.5 μm layer) 100 x 2.1 mm,

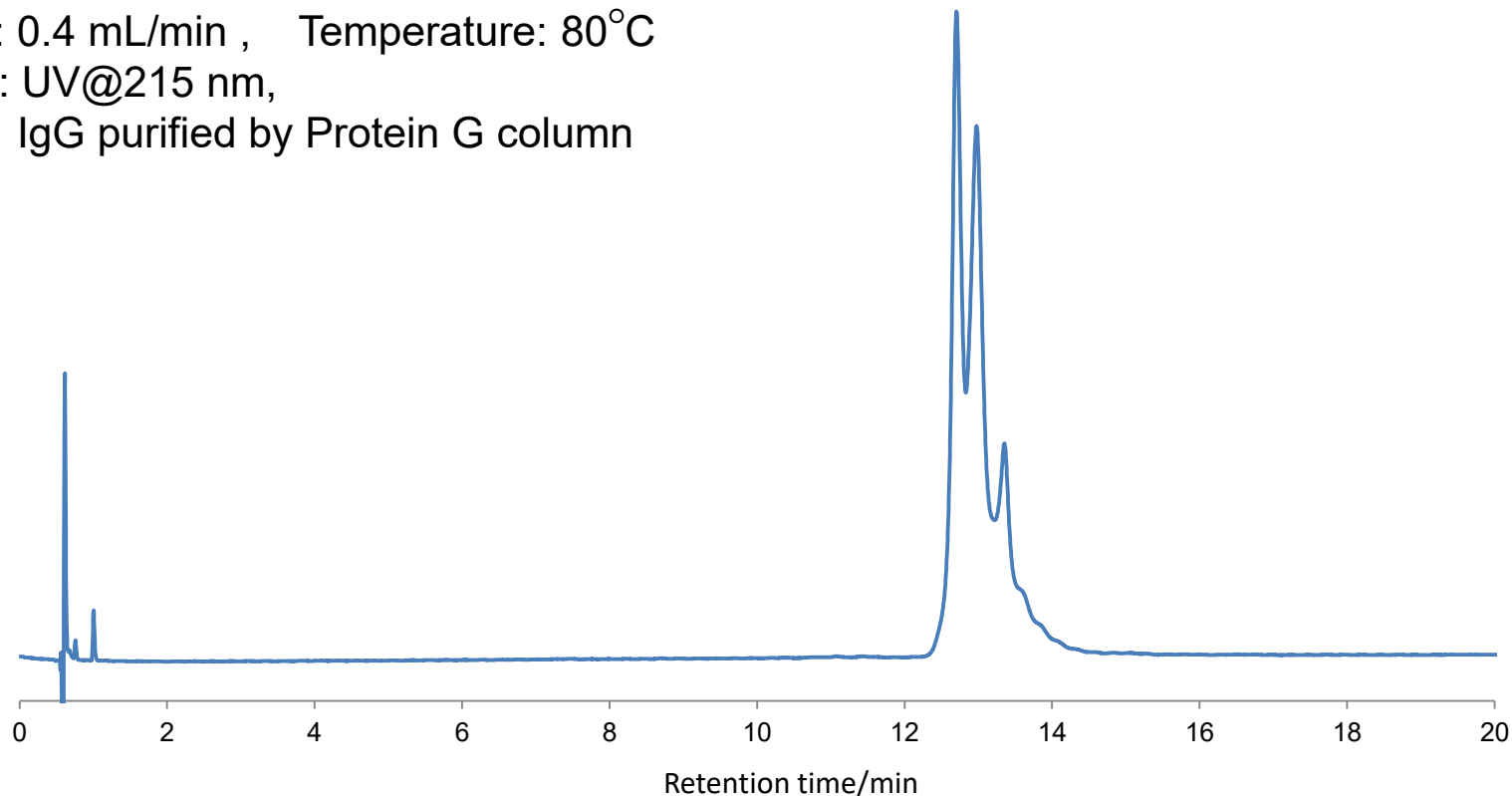
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.085 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 30 min
 %B 30% 45%

Flow rate: 0.4 mL/min , Temperature: 80°C

Detection: UV@215 nm,

Sample: IgG purified by Protein G column





コアシェルカラム3大イメージ

全多孔性シリカカラムと比べて

コアシェルカラムは

圧力が低い

保持が小さい

負荷量が少ない

本当??





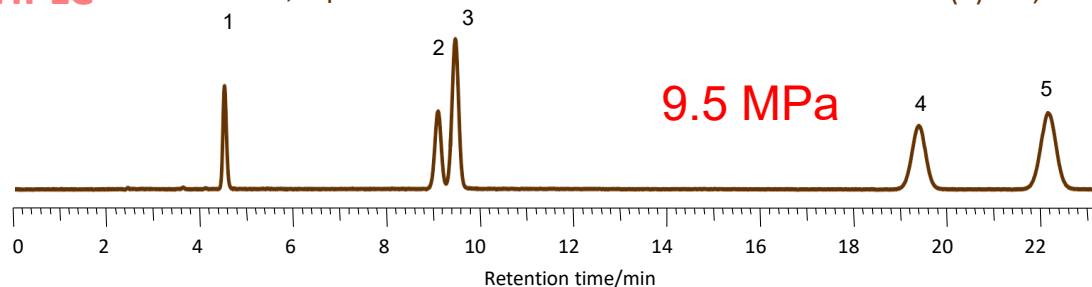
カラムの背圧

カラムの背圧は粒子径の2乗に反比例

HPLC Brand F C18, 5 μm 250 x 4.6 mm

N(4)=19,313

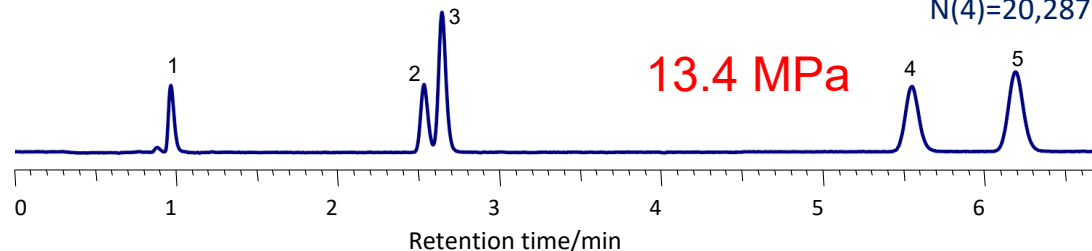
9.5 MPa



SunShell C18, 2.6 μm 100 x 4.6 mm

N(4)=20,287

13.4 MPa



Mobile phase:

$\text{CH}_3\text{CN}/20\text{mM}$ Phosphoric acid = 45/55

Flow rate: 1.0 mL/min,

Temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@230 nm

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(内径0.25mmの配管仕様)

2.6 μm では5 μm の約3.7倍の
圧になる

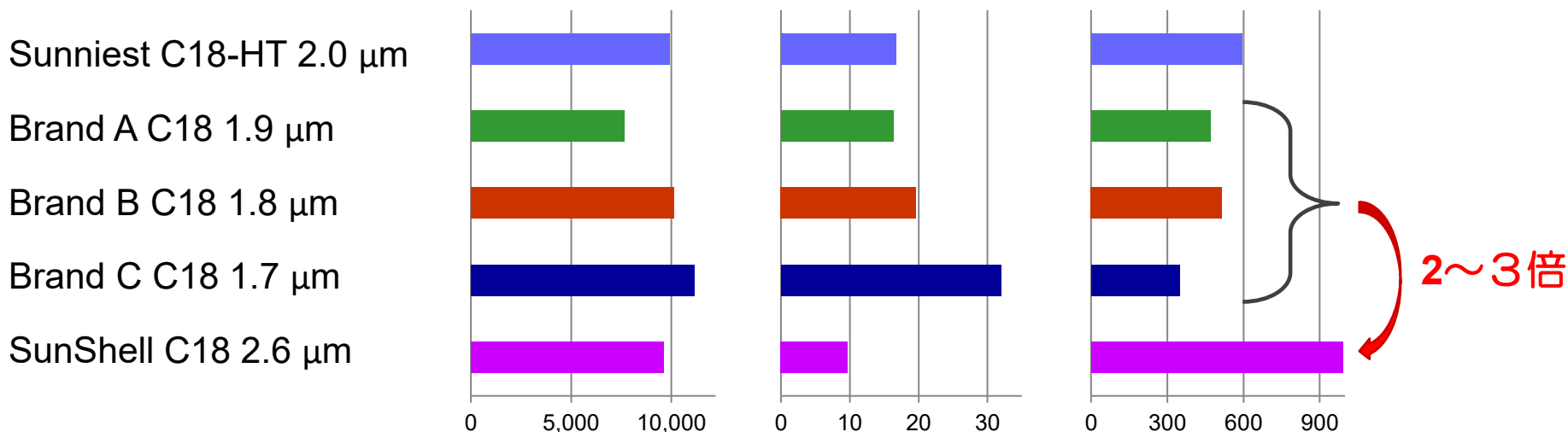
$$9.5\text{MPa} \times 3.7 \times 100/250 = 14.1\text{MPa}$$

粒子径に準じた背圧



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 $^{\circ}\text{C}$

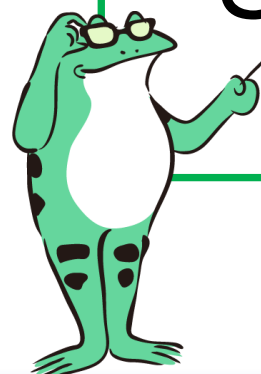


全多孔性シリカカラムと比べると

コアシェルカラムは圧力が低い

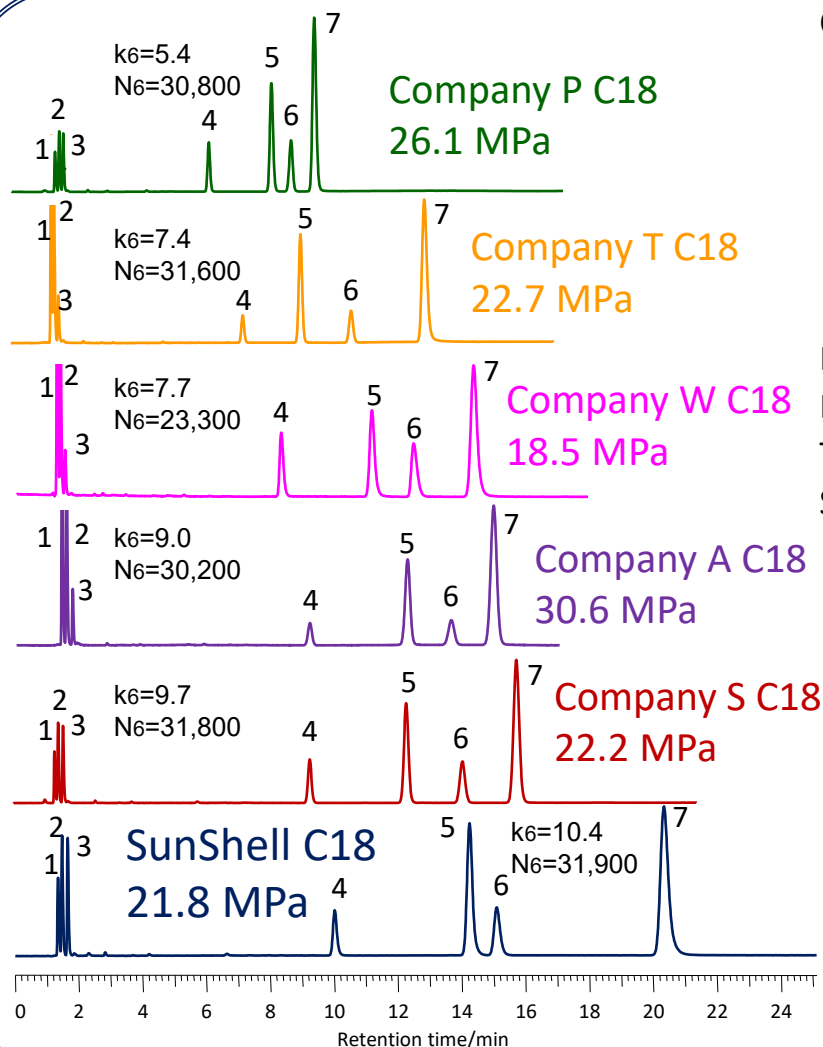


圧力は粒子径通りの高さ
だが理論段数は高い
Sub2 μm では使用できない
長さのカラムを使用可能





標準試料の分離比較



Column:

Company P C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (26.1 MPa, 30,800 plate)

Company T C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (22.7 MPa, 31,600 plate)

Company W C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (18.5 MPa, 23,300 plate)

Company A C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (30.6 MPa, 30,200 plate)

Company S C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm (22.2 MPa, 31,800 plate)

SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm (21.8 MPa, 31,900 plate)

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 T C18	0.35	1.56	1.50
Company W C18	0.38	1.59	1.32
Company A C18	0.42	1.57	1.25
Company S C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.39	1.60	1.46



物性値

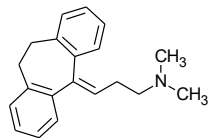
	炭素含有量 Carbon loading (%)	比表面積 Specific surface area ^a (m ² /g)	細孔容積 Pore volume ^a (mL)	細孔径 Pore diameter ^a (nm)
SunShell C18	7.3	125	0.261	8.34
Company S C18	8.0	133	0.278	8.20
Company A C18	8.5	135	0.414	12.3
Company T C18	8.8	130	0.273	8.39
Company W C18	7.3	113	0.264	9.32
Company P C18	4.9	102	0.237	9.25

a. C18充填剤を600°Cで8時間焼成し、アルキル基を焼き飛ばした後のコアシェル粒子を測定しました。この測定値はオリジナルのコアシェル粒子の値より小さくなります。

*全ての測定はクロマニックテクノロジーズ社内で行いました。

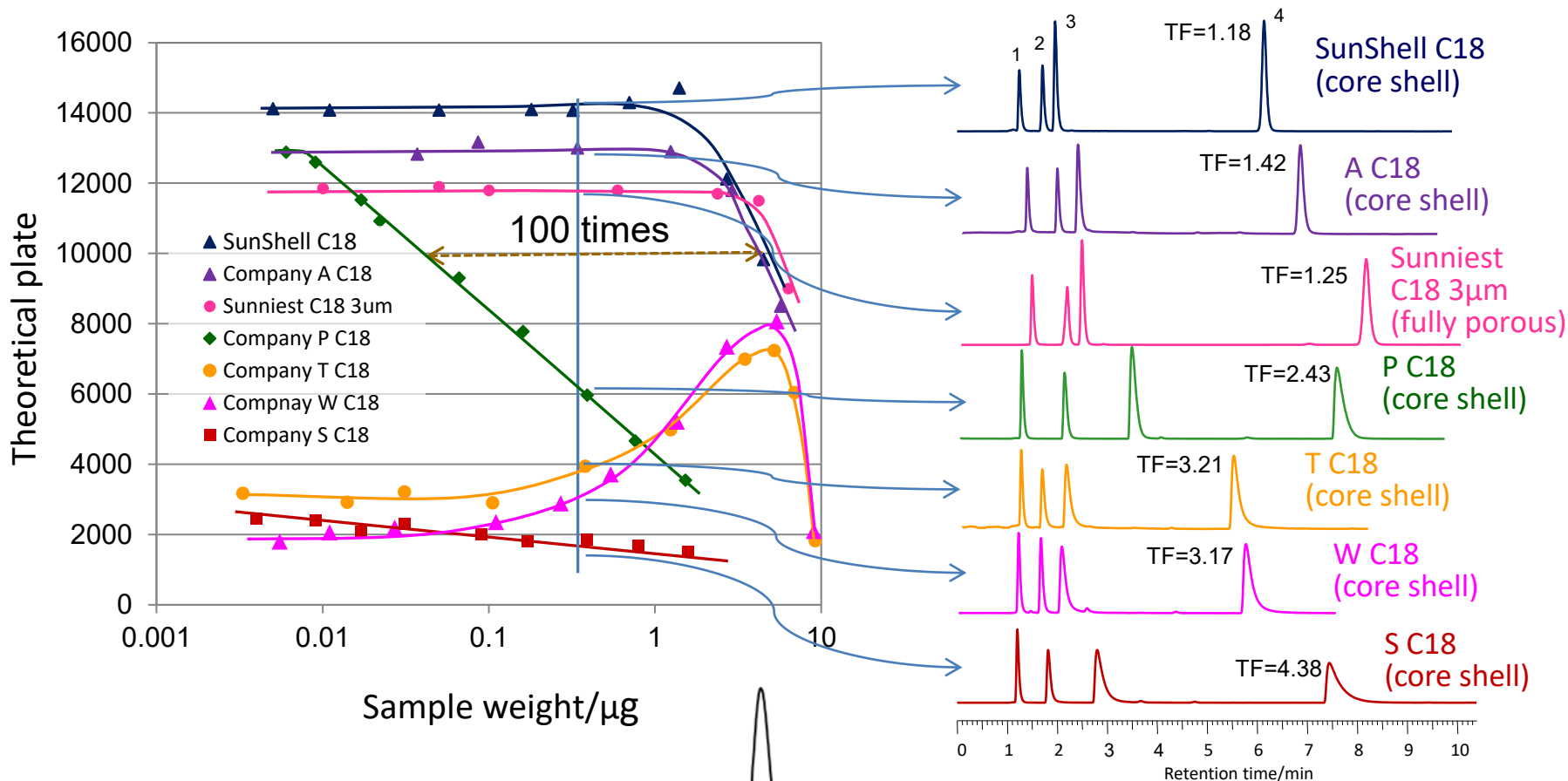


アミトリプチリンの負荷量比較

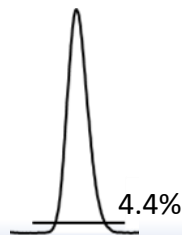


Mobile phase: Acetonitrile/**20mM phosphate buffer pH7.0**=(60:40)

Column dimension: 150 x 4.6 mm, Flow rate: 1.0 mL/min, Temp.: 40°C



理論段数はピークの高さの4.4%のピーク幅を用いる5シグマ法を用いました。



Sample: 1=Uracyl, 2=Propranolol, 3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline



全多孔性シリカカラムと比べると

コアシェルカラムは保持が短い



保持時間は短いが保持指数はほぼ同じ
負荷量は少ないがその差は20%



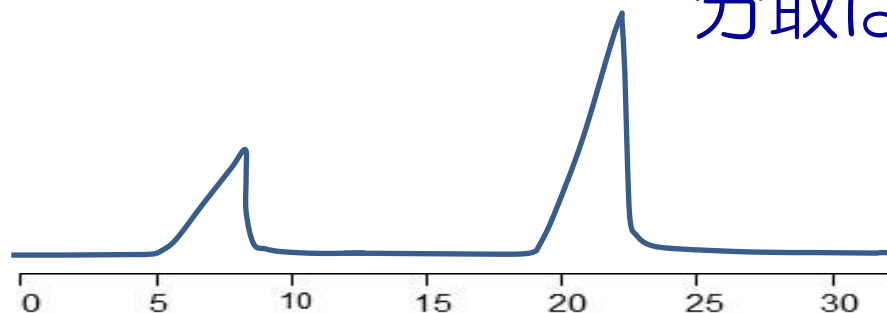
コアシェルカラムは保持時間・負荷量共に
メーカー間の差が大きい



負荷量が小さくなるということは・・・

分取する場合・・・

コアシェルカラムの
分取は・・・



- できるだけ負荷量を取る
- ピーク幅が広いことが多い
- ピーク形状が悪い時もある

- コストがかかる
- 回収効率が20%程度さがる
- コアシェルを使うメリットが少ない

分取においては全多孔性カラムの
ほうが向いている



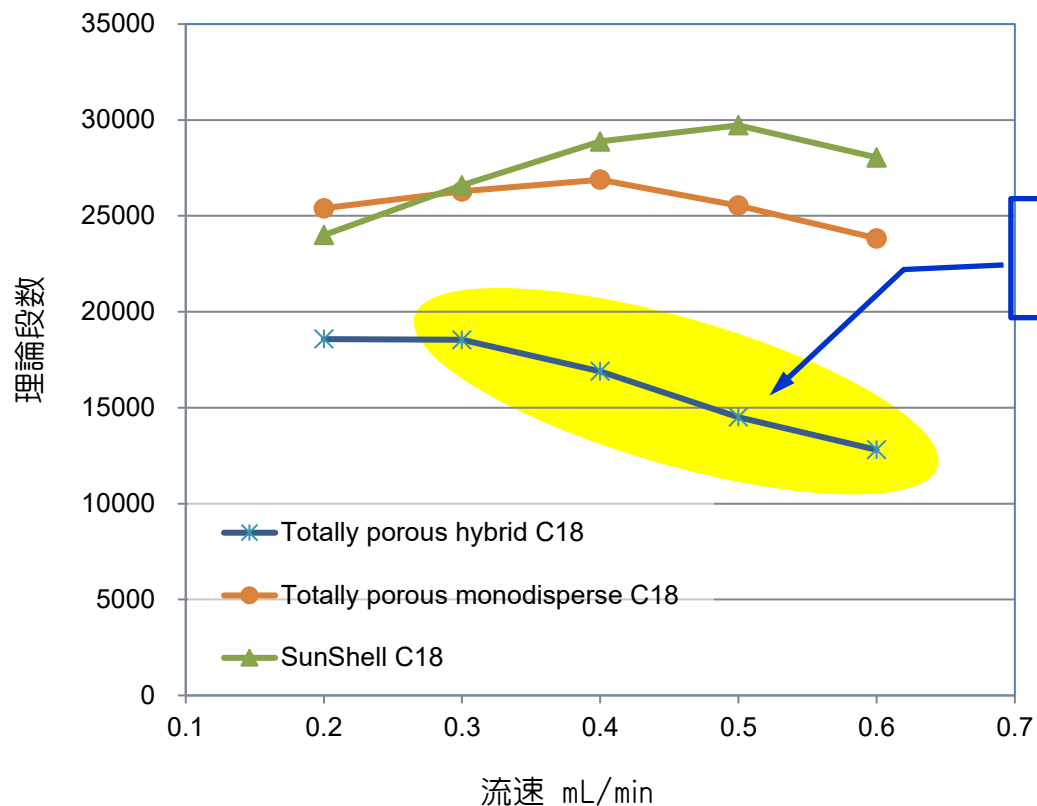
微粒子化のメリット、デメリット



- HPLC, UHPLC両方で使用可能
- 時短, 理論段数の両立が難しい場合がある
- UHPLCでのみ使用可能
 - 圧力が高压に
- 高速化, 高理論段数化が可能
 - 短いカラムで分離可能に



流速による理論段数変化



流速が上がるにしたがって
理論段数も上がるはず…

Column: 100 x 2.1 mm
Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40
Temperature: 40 °C
Sample: Acenaphthene,



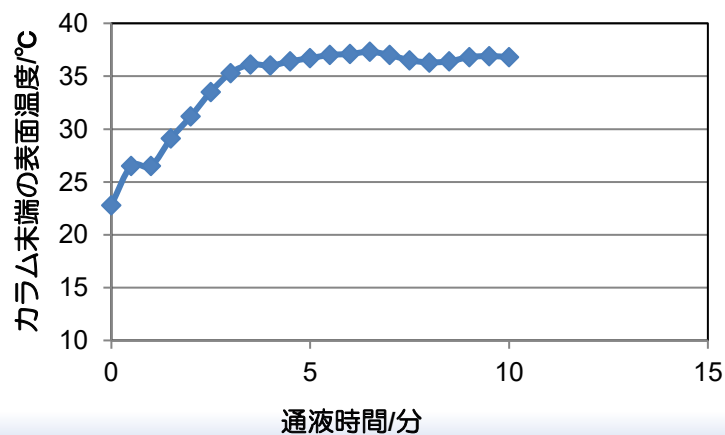
摩擦熱の発生



通液開始



9分後



カラム：コアシェル, 2.6 μm 150 x 4.6 mm

移動相：メタノール

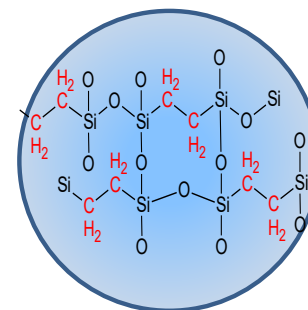
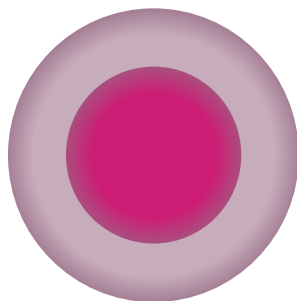
流速：5 mL/min

カラム圧：70 MPa

室温：23°C



粒子の熱伝導性



コアシェルシリカはコアが存在し、全多孔性シリカより熱伝導性が良く、摩擦熱の影響を受けにくいいため、より高い流速領域まで段数は上昇すると推測される。

全多孔性ハイブリッドシリカは、シリカ骨格に炭素鎖が入っているため、熱伝導性が悪く、カラム内の温度分布が均一でないため、通常の全多孔性シリカより、低流速で摩擦熱が原因となる段数低下が起こったと推測される。

***Fabrice Gritti, Georges Guiochon, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5069.**

A part of abstract

This unexpected result is accounted for by the three times smaller heat conductivity of the BEH bed (BEH 0.25 W/m/K) than that of the Kinetex bed (Kinetex 0.75 W/m/K).

コアシェルシリカの熱伝導性はハイブリッドシリカの3倍



まとめ

- ✓ コアシェルカラムは、特別圧力が低いわけではなく、近い性能を有する全多孔性シリカカラムと比較すると圧力は低い
- ✓ コアシェルカラムの保持は、同じ化学修飾をした全多孔性シリカカラムと比較すると、保持時間は短くなるが保持指数は変わらない
- ✓ コアシェルカラムのサンプル負荷量は、全多孔性カラムと比較すると20%減少する
- ✓ コアシェルC18カラムも従来の全多孔性C18カラムと同様にメーカー間、ブランド間に保持や負荷量に差があり、その差は大きい。
- ✓ 2 μ m以下の粒子において、摩擦熱によると考えられる段数低下はハイブリッドシリカが顕著であった。