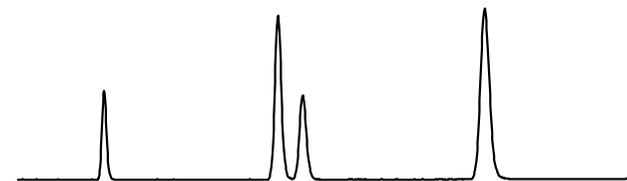


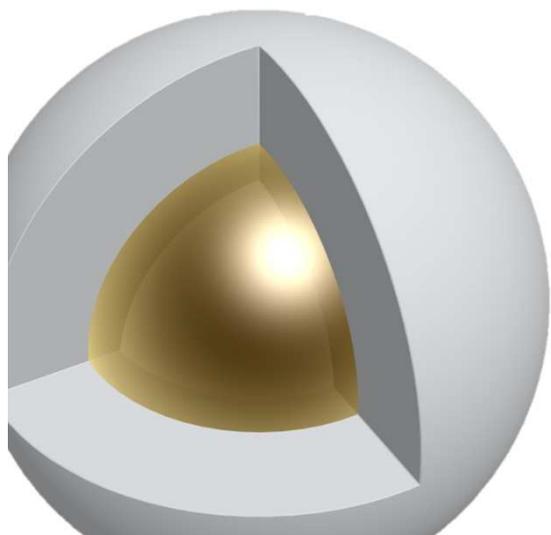
UHPLCライクな高分離性能を、



耐圧20 MPa以下の汎用HPLC装置で実現する方法

ChromaNik

C18で困った時の³ 逆相カラム選択と活用のコツ



株式会社クロマニック テクノロジーズ
小山 隆次

カラムコンシェルジュ宣言

“課題の解決に繋がる、
最善カラムをご案内”

分析対象

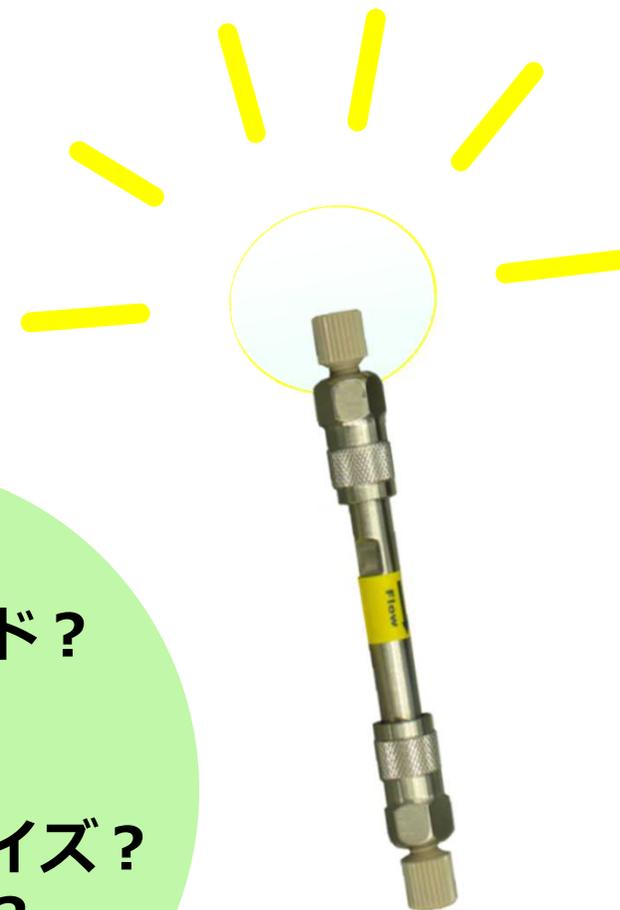
どのような試料？
夾雑成分は？
試料の溶解性？
濃度？
疎水性？高極性？

装置耐圧？
配管構成？
グラジエント？
検出器？
LC-MS？
内部容量？

装置

分析モード？
固定相？
粒子径？
カラムサイズ？
使用溶媒？
選択性？

カラム



本日の内容

— Enhance HPLC , with Core. —

- HPLCとUHPLCの違い
- コアシェルカラム の基本性能
- SunShell C18 **3.5 μm** の有用性
- C18で困った時の「**Biphenyl**」
- まとめ

HPLCとUHPLCの違い



HPLC装置 耐圧：20 MPa～40 MPa

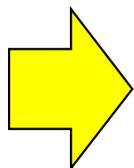
- ▶ システム容量：総じて**大きい**
配管内径0.25 mm、通常セル etc
- ▶ カラムの特徴：低背圧な充填剤
サイズ例:内径4.6 mm x 150 mm, 5 μ m

UHPLC装置 耐圧：100 MPa～(初期)

- ▶ システム容量：総じて**小さい**
配管内径0.18 mm以下、セミマイクロセル etc
- ▶ カラムの特徴：微粒子（2 μ m以下）
サイズ例:内径2.1 mm x 50 mm, 1.8 μ m



HPLC/UHPLCのオーバーラップ



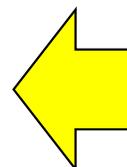
HPLC装置の「UHPLC」化

- ・高耐圧化(ex.60 MPa)
- ・システム容量の低減
- ・注入動作の改善etc

汎用性と高効率性の両立（近年のトレンド）

UHPLC装置の「HPLC」化

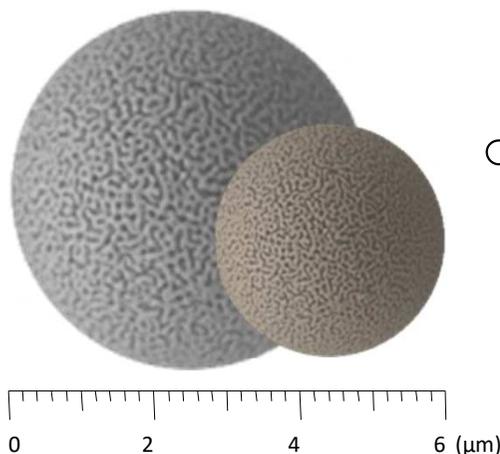
- ・モデル拡充(ex.80 MPa)
- ・メンテナンス性の向上
- ・HPLCとの切替機構etc



HPLCとUHPLCの違い



カラム
視点

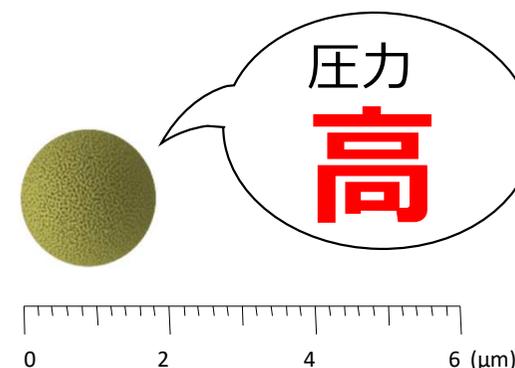


HPLC用充填剤 粒子径：3 μm , 5 μm

- ▶カラム効率低め。分析時間も長め
- ▶システム容量の影響を受けにくい
- ▶低圧力（一般的に、30 MPa以下）

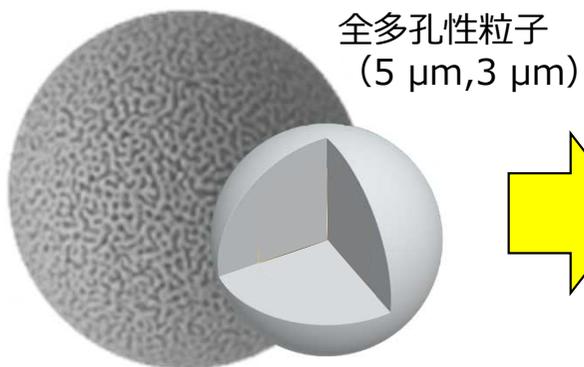
UHPLC用充填剤 粒子径：2 μm 以下

- ▶カラム効率高く、分析時間を短縮可
ショートカラムと高速化のメソッド開発が前提
- ▶システム容量の影響を受けやすい
カラム外の拡散要素を出来るだけ抑制することが重要



圧力
高

HPLC/UHPLCのオーバーラップ



全多孔性粒子
(5 μm, 3 μm)

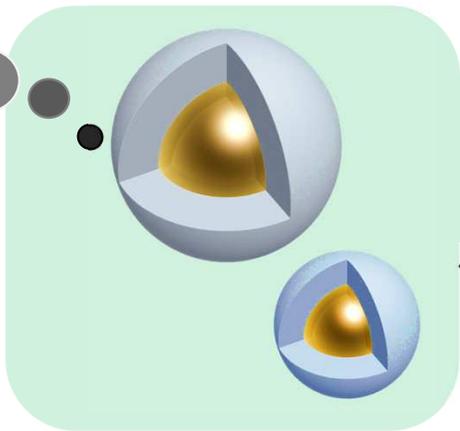


コアシェル型粒子
(5 μm, 3.5 μm)

HPLC分析を **高効率化** ↑



コアシェル型粒子
(2.6 μm, 2 μm)



全多孔性粒子
(2 μm以下)



UHPLC分析を **低圧力化** ↓

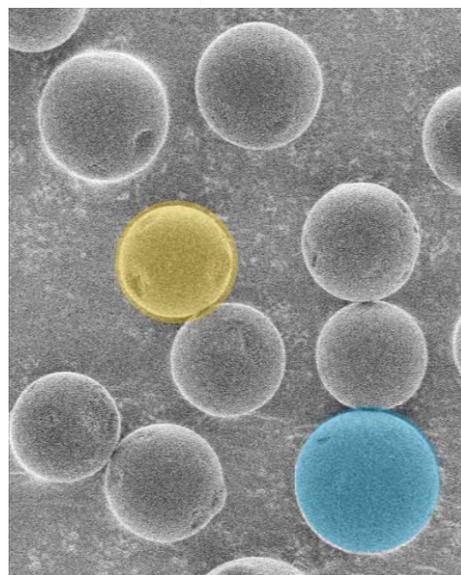
Core Shell particle

コアシェル粒子 の構造と特徴

背圧を上げずに効率を上げます。

粒度分布の違い ~多流路拡散の抑制~

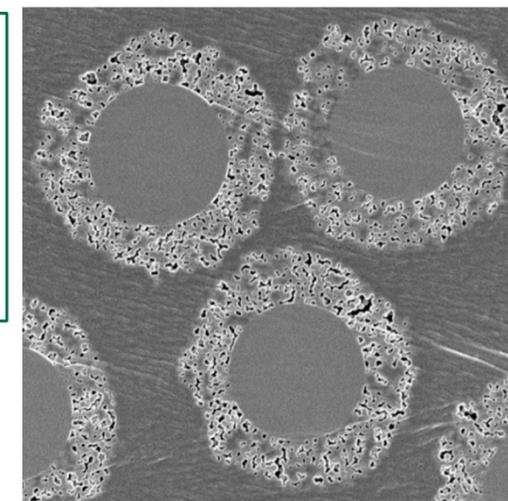
全多孔性粒子



5 μm 全多孔性粒子
の SEM画像 (参考)

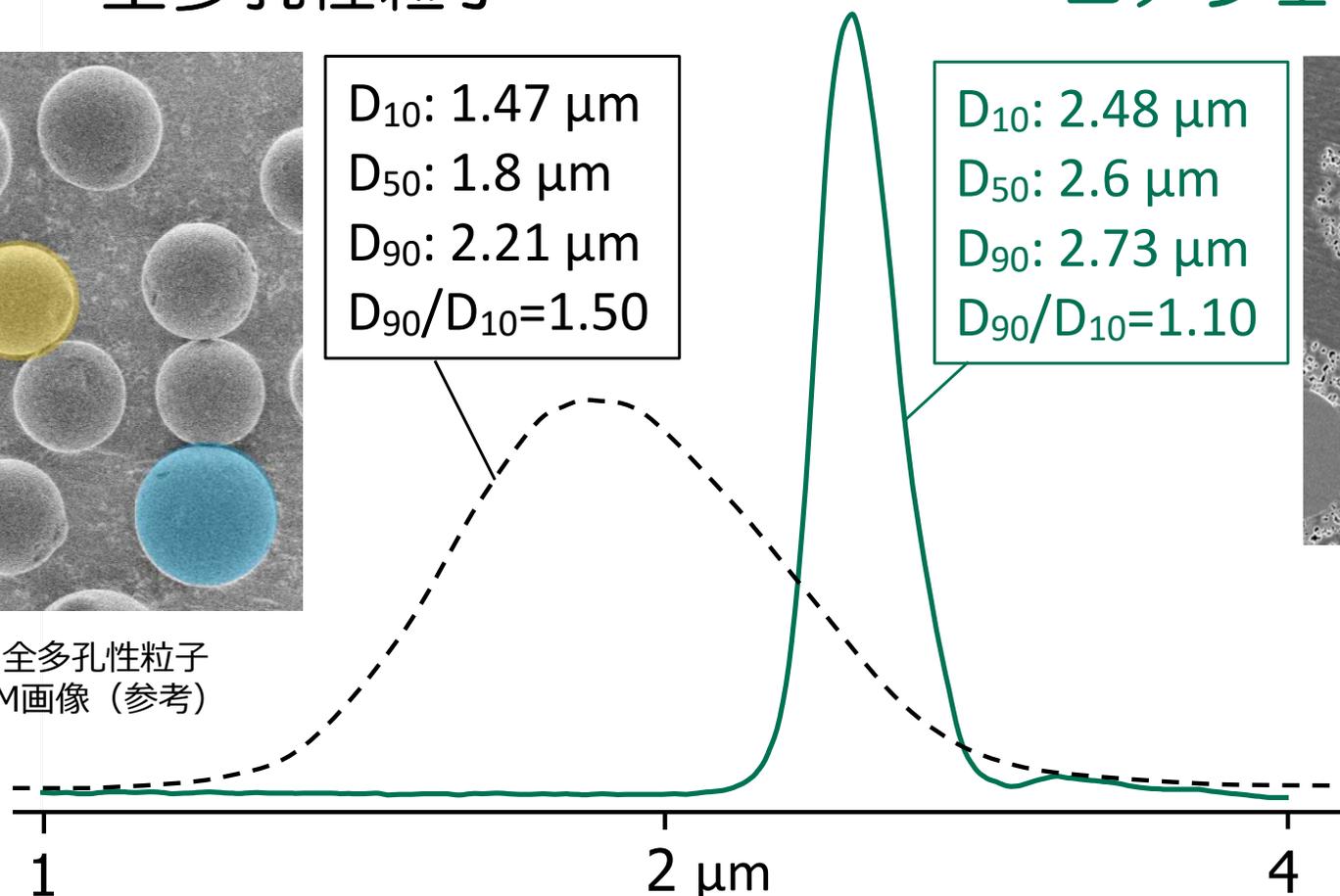
D_{10} : 1.47 μm
 D_{50} : 1.8 μm
 D_{90} : 2.21 μm
 $D_{90}/D_{10}=1.50$

コアシェル粒子



2.6 μm 表面多孔性粒子
(コアシェル粒子) 断面
の SEM画像

D_{10} : 2.48 μm
 D_{50} : 2.6 μm
 D_{90} : 2.73 μm
 $D_{90}/D_{10}=1.10$

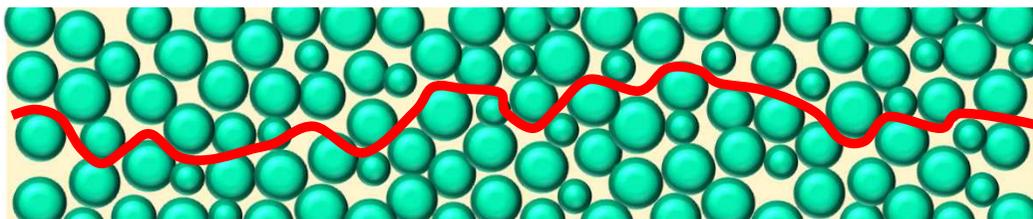


コアシェル粒子は粒度分布幅が狭い。

コアシェル高効率化の3要素

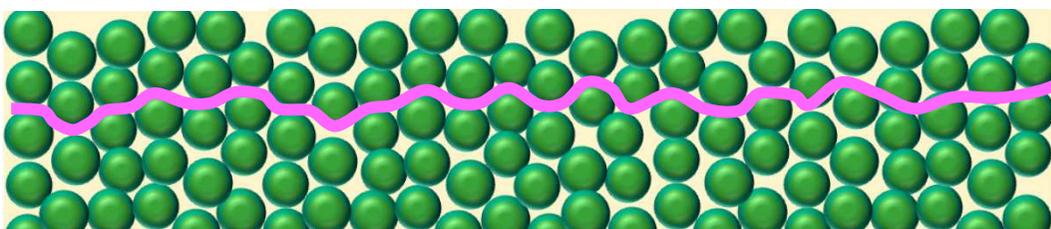
A

全多孔性充填剤



コアシェルシリカ

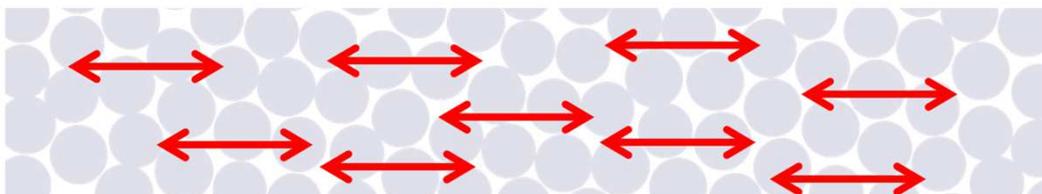
粒度分布幅が狭く、多流路・渦巻き拡散を小さく



B

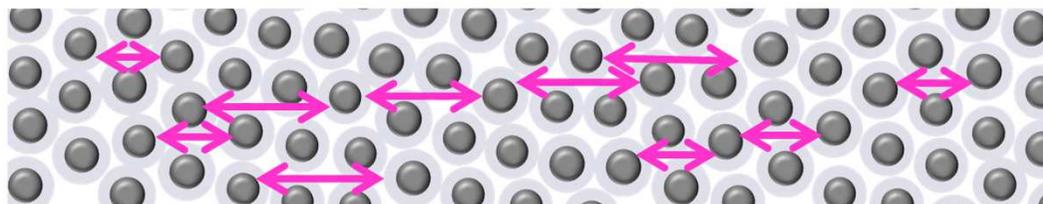
全多孔性充填剤

溶質は細孔内も粒子外と同様に拡散する



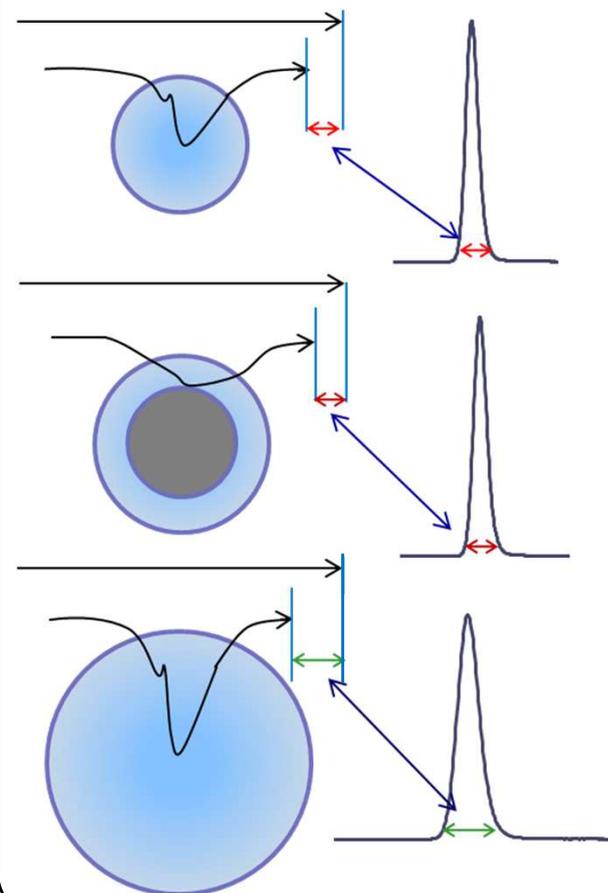
コアシェルシリカ

コアの存在により、カラム軸方向への拡散を小さく



C

充填剤内の、物質移動距離を小さく

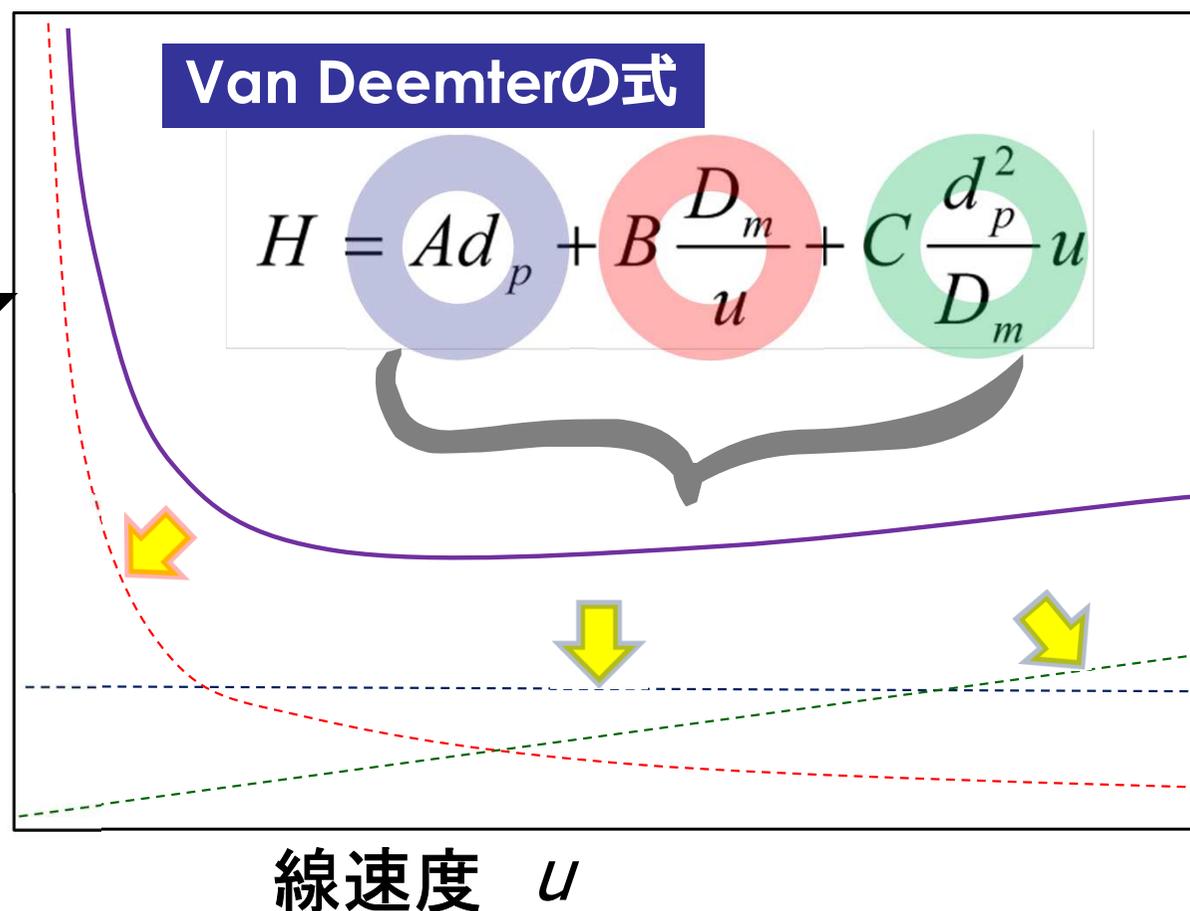
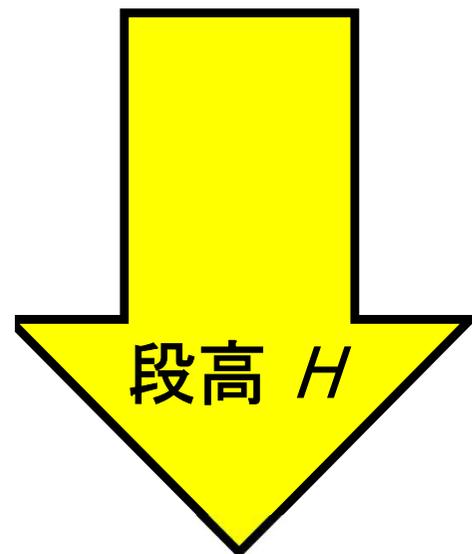


コアシェル粒子の高効率性

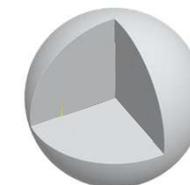
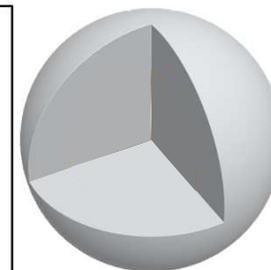
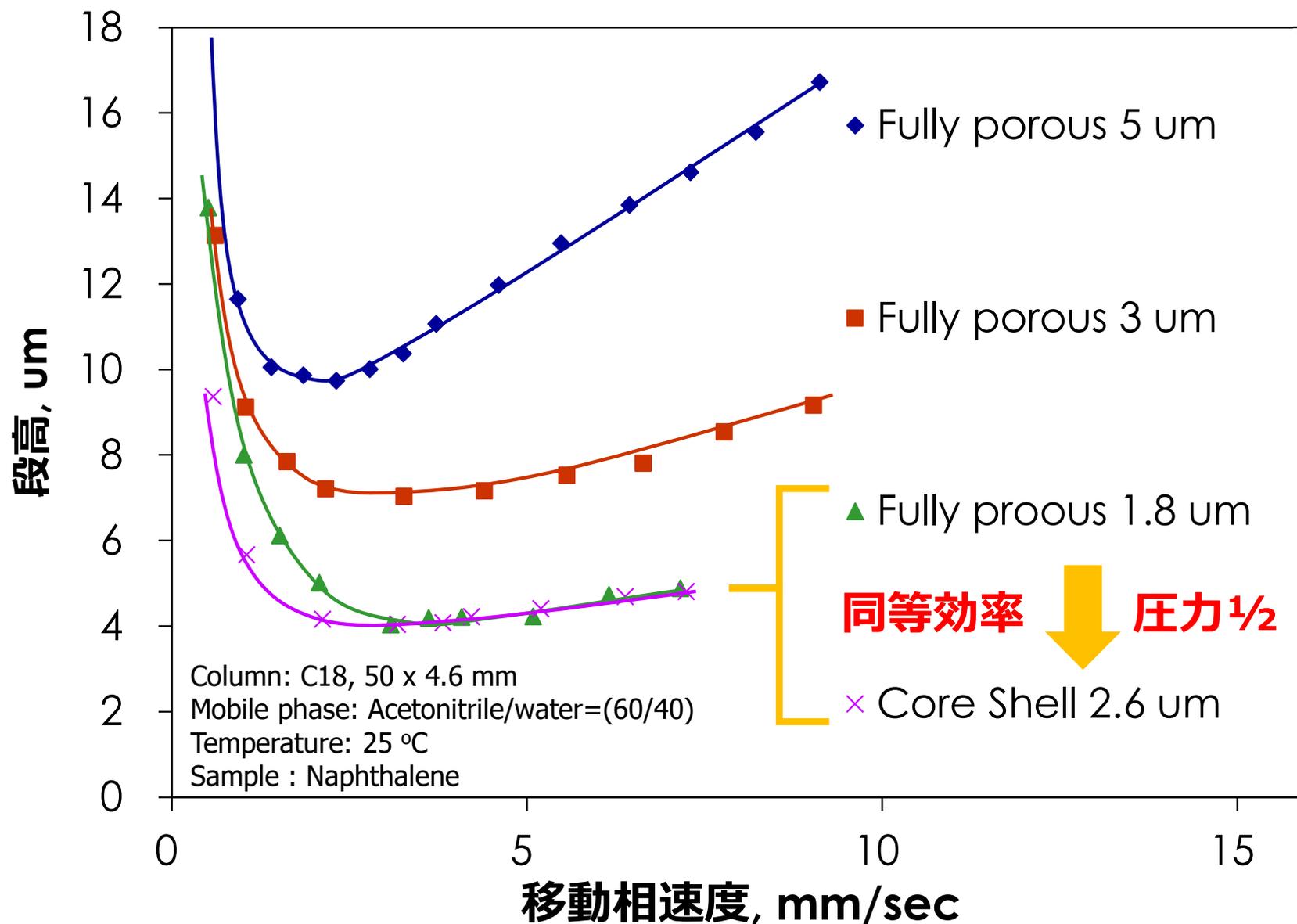
高い効率

低い段高(H)

3項全てを小さく



コアシェルと全多孔性の違い



コアシェルカラムの基本性能

- HPLCでUHPLCライクな性能を実現する上で、**低背圧かつ高効率**なカラム選択が鍵。
- コアシェルカラムは全多孔性カラムより**1.4~1.5倍ほど高効率**（同粒子径にて）
- 2.6 μm のコアシェルカラムは、1.8 μm の全多孔性カラムと同等効率で**圧力は $\frac{1}{2}$**

Enhance HPLC , with Core.

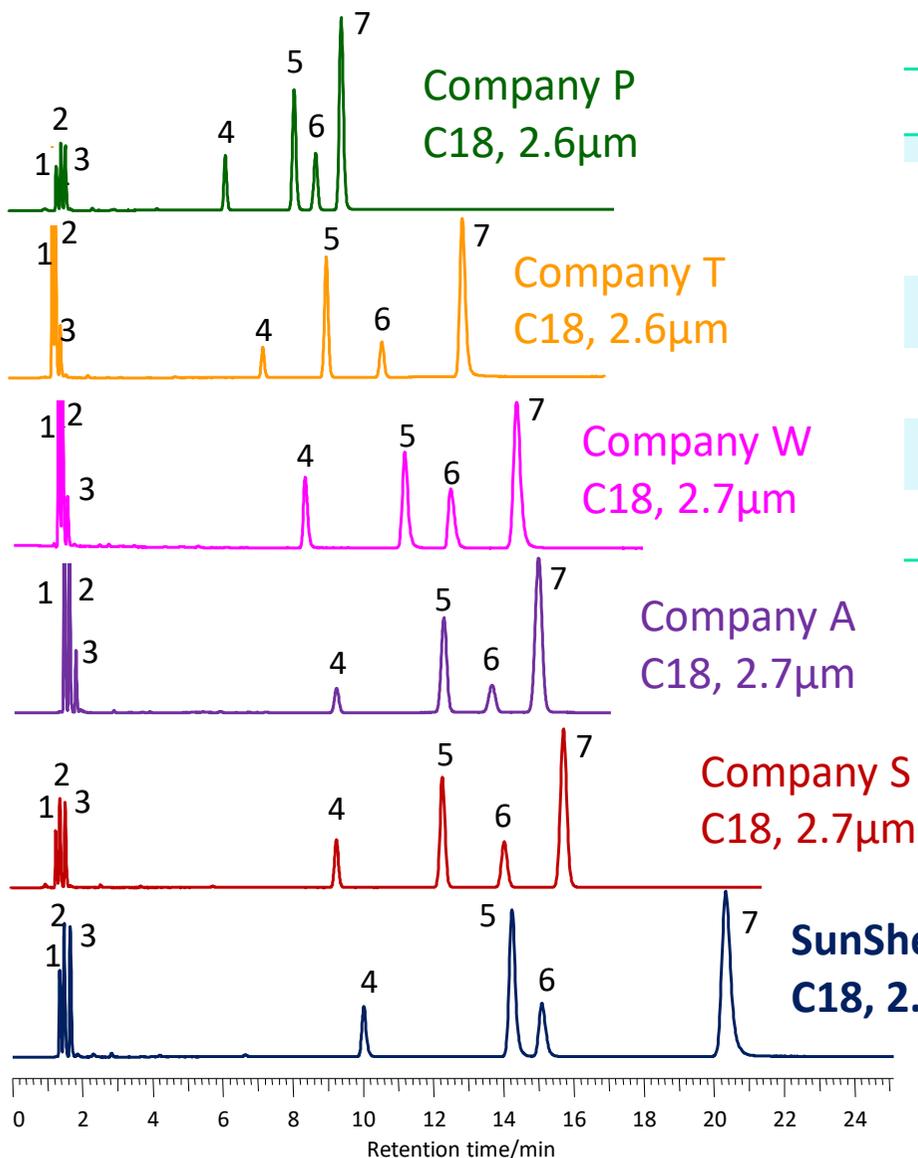


世界のコアシェルカラム (33社)

※当社調べ

Manufacturer	Brand	Particle size (μm)	Porous layer thickness (μm)	Pore diameter (nm)	Surface area (m ² /g)	Bonded phase
1 Acchrom	StarCore	2.0, 2.7, 4.6	0.4, 0.5, 0.6	9, 16	120, 135, 90	C18, C18 AQ, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC,
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, Biphenyl, PFP, Cyano, RP-Amide, HILIC, Pentahydroxy-HILIC, C4, Glycan
3 Agilent Technologies	PoroShell	1.9, 2.7, 4, 5	0.25, 0.5	12, 30	130	C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, SB-Aq, Cyano, HILIC
4 Bonna-Agela	Bonshell	2.7		9	150	C18
5 ChromaNik Technologies	SunShell	2.0, 2.6, 3.4, 3.5, 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, Biphenyl, 2-Ethylpyridine, HILIC-Amide, C30, Hexafunctional C18, C4
6 Dr Maisch	ReproShell	2.6, 2.7, 5		8, 9	130, 140	C18, C8, Biphenyl, Phenyl-hexyl, PFP, Si
7 Esporalab	Thunder CS	2.6, 3.5	0.5, 0.6	9	150	C18, Biphenyl, HILIC
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 FUJIFILM	Wakopak Core C18 ADRA	2.6				C18
10 GL Sciences	InertCore	2.4	0.3	9	100	C18
11 Glantreo	Eiroshell	1.7, 2.6		10, 30	130, 100	C18, C4, Phenyl-Hexyl, PFP, SILICA
12 Guangzhou Techway	GOWON	2.0, 2.7, 4.6	0.4, 0.5, 0.6	9, 16	120, 135, 90	C18, C18 AQ, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC,
13 Horizon Chromatography	AURASHELL	2.7, 3.5	0.25, .5	9, 16, 30	130, 90, 20	C18, C18/PFP, C4, HILIC
14 Interchim	Uptisphere CS Evolution	2.6	0.5	8.5	130	C18, C18 AQ, RP/SCX, HILIC, SILICA
15 Knauer	BlueShell	2.6, 4.5	0.5	8	130	C18, C8
16 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
17 Macherey-Nagel	NucleoShell	2.7	0.5	9	130	C18, Phenyl-Hexyl, Biphenyl, PFP, HILIC
18 Nacalai Tesque	CosmoCore	2.6	0.5	9	150	C18, Cholesterol, Pentabromobenzyl
19 Nanologica	SVEA Core	2.6	0.5	9	130	C18, Phenyl-Hexyl
20 Nouryon	Kromasil ClassicShell EternityShell	2.5	0.5		110	C18, C8
21 Perkin Elmer	Brownlee SPP	2.7	0.5	9, 16		C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, RP-Amide, HILIC
22 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
23 Restek	Raptor	2.7		9	150	C18, Biphenyl, PFP, HILIC
24 Sepax Technologies	Opalshell	2.6	0.5	9	150	C18
25 Osaka Soda	Capcell Core	2.7	0.5	9, 16, 30	150	C18, AQ, Adamantyl, Phosphocholine, PFP
26 SCAS	Sumipax ODS Z-Shell	2.6	0.5	9	150, 40	C18
27 Shimadzu	Shim-pack Velox	1.8, 2.7, 5		9	100, 125, 130	C18, Biphenyl, PFPP, HILIC
28 SIELC Technologies	Coresep	2.7		9		Mixed mode: RP + cation exchange, RP + anion exchange, HILIC + ion exchange
29 Thermo Scientific	Accucore	2.6, 4		8, 15	130	C18, C8, C4, AQ, Phenyl-Hexyl, Phenyl, C30, PFP, HILIC
30 VWR	UltraCore UltraCore BIO	2.5, 3.5, 5		9.5, 30, 50	115, 130, 16, 23	C18, C4, Phenyl-hexyl, Biphenyl, Diphenyl
31 Waters	Cortecs	1.6, 2.7	0.26	9	100	C18, C8, Phenyl-Hexyl, HILIC
32 Welch	Boltimate	2.7	0.5	9	120	C18, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
33 YMC	Meteoric Core	2.7	0.5	8, 16	150, 90	C18, C8

コアシェルカラム 6 社の比較



	保持係数 (Peak #6)	理論段数* (Peak #6)	圧力 /MPa	圧力あたりの * 理論段数の比
Company P C18	5.4	30,800	26.1	1
Company T C18	7.4	31,600	22.7	1.18
Company W C18	7.7	23,300	18.5	1.07
Company A C18	9.0	30,200	30.6	0.84
Company S C18	9.7	31,800	22.2	1.21
SunShell C18	10.4	31,900	21.8	1.24

コアシェル
複数メーカー
間の比較にて

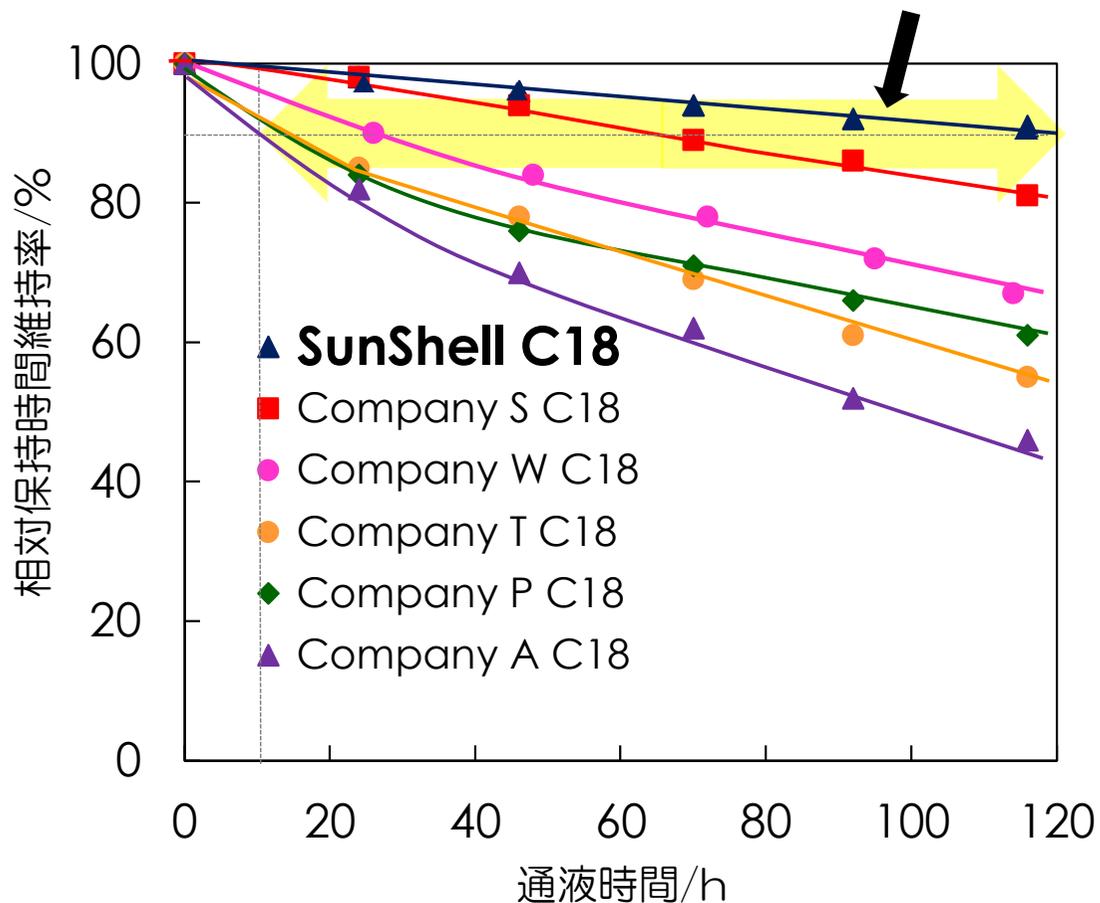
Column dimension :150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample :

1 = Uracil, 2 = Caffeine, 3 = Phenol,
 4 = Butylbenzene, 5 = o-Terphenyl,
 6 = Amylbenzene, 7 = Triphenylene

低背圧 & 高効率

市販コアシェルカラム6種

強酸性条件下での耐久性比較



耐久性試験条件

Column size: 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH₃CN/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: CH₃CN/H₂O=60/40

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil 2 = Butylbenzene

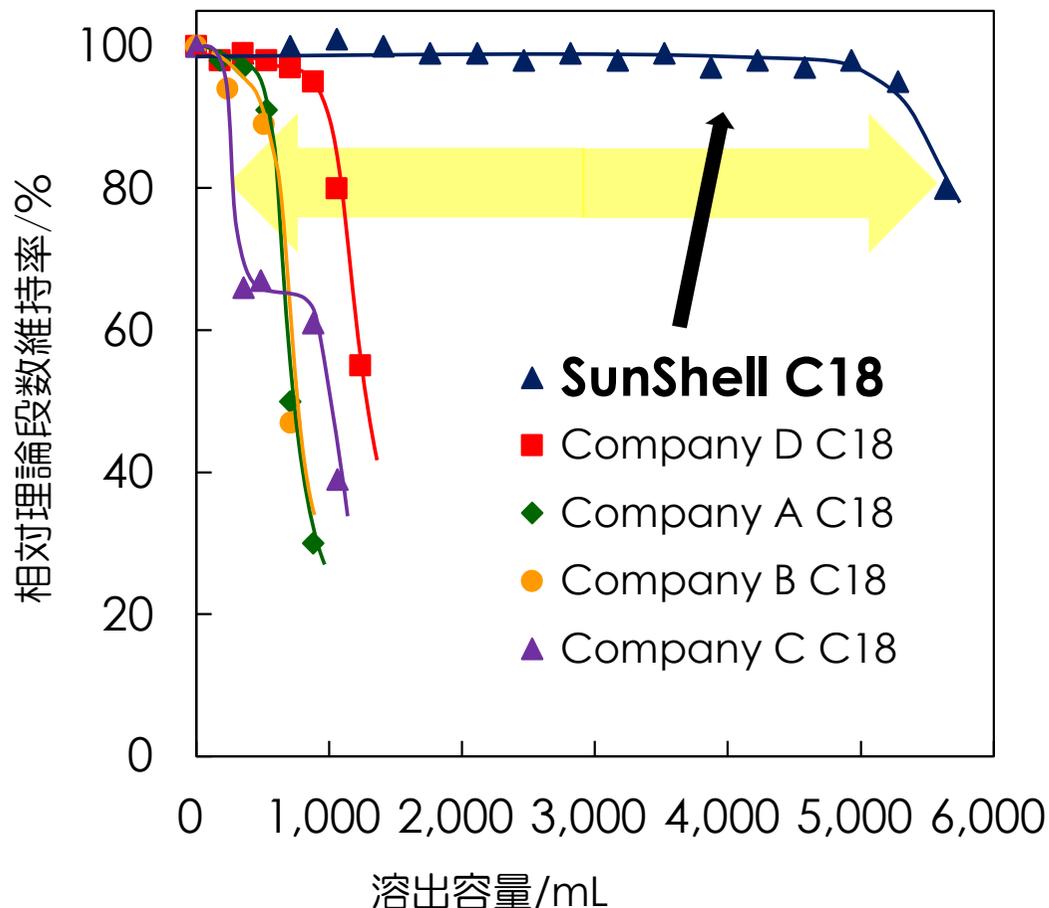
強酸性条件下では加水分解によってC18基が脱離する影響から、保持時間が減少

SunShell C18 は、酸(pH1)耐久性試験の結果

2~10倍 の耐久性の差 を示した。

市販コアシェルカラム6種

高アルカリ条件下での耐久性比較



耐久性試験条件

Column size: 50 x 2.1 mm , 2.6 or 2.7 μ m

Mobile phase: CH₃OH/20mM Sodium borate/10mM NaOH=30/21/49 (pH10)
 Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 50 °C

理論段数測定条件

Column size: 50 x 2.1 mm
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=70/30
 Flow rate: 0.4 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Sample: 1 = Butylbenzene

高アルカリ条件下ではシリカが溶け出すため、充填剤入口側が凹み、段数が低下

SunShell C18 は、アルカリ(pH10)耐久性試験の結果

5~10倍 の耐久性の差 を示した。

耐久性と、メーカー公称 pH範囲

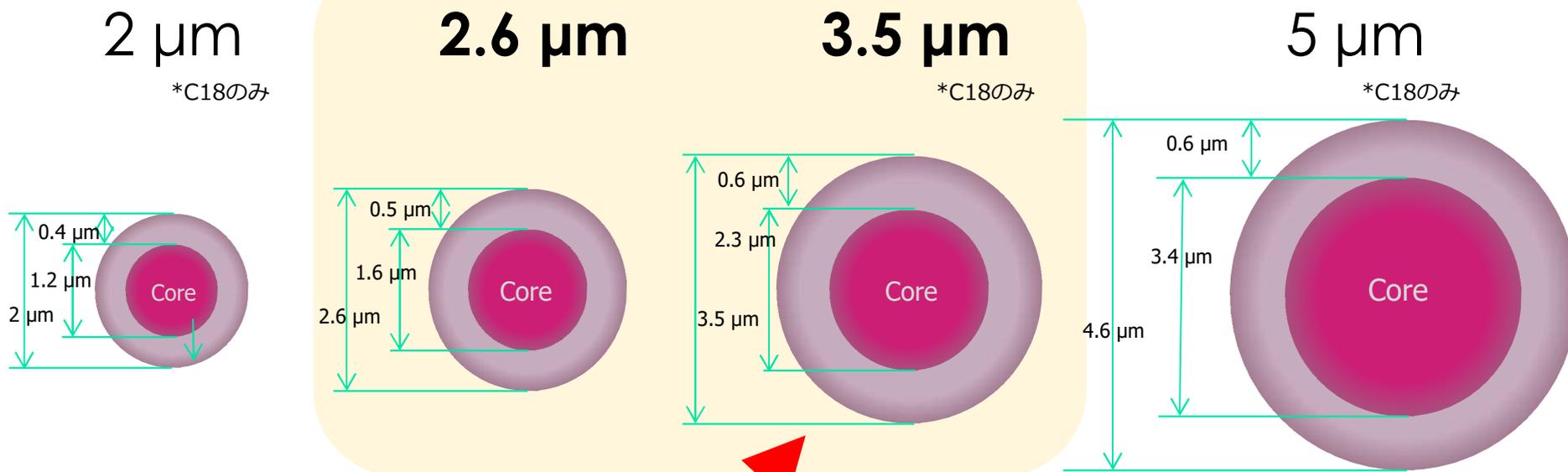
➡メーカーカタログ掲載仕様が同じでも、同等の耐久性とは限らない。

比較カラム	酸性 (pH 1試験)	アルカリ性 (pH 10試験)	カタログ掲載 使用可能 pH 範囲
SunShell C18	◎	◎	1.5 – 10
Company W C18	△	not tested	2 – 8
Company S C18	○	○	2 – 9
Company A C18	△	△	2 – 9
Company T C18	△	△	1 – 11
Company P C18	△	△	1.5 – 10

SunShell コアシェル粒子



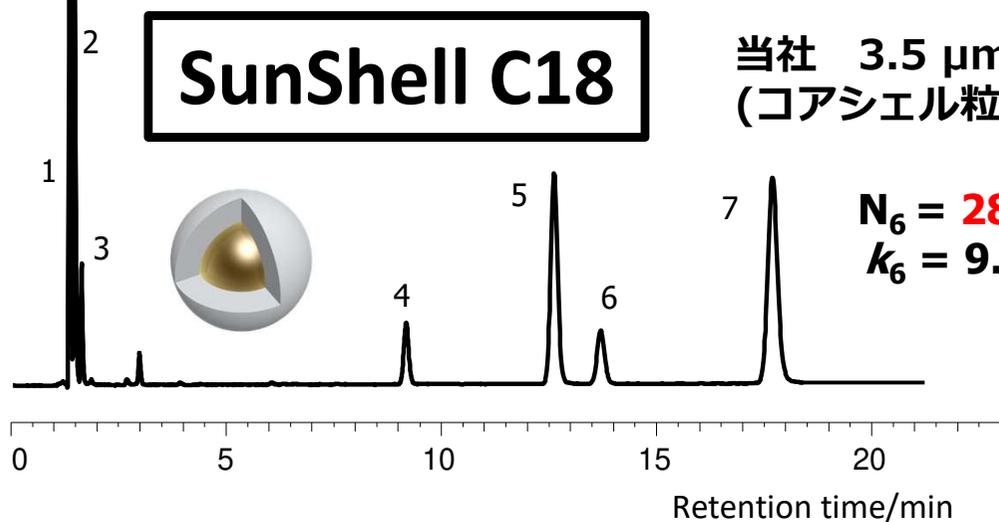
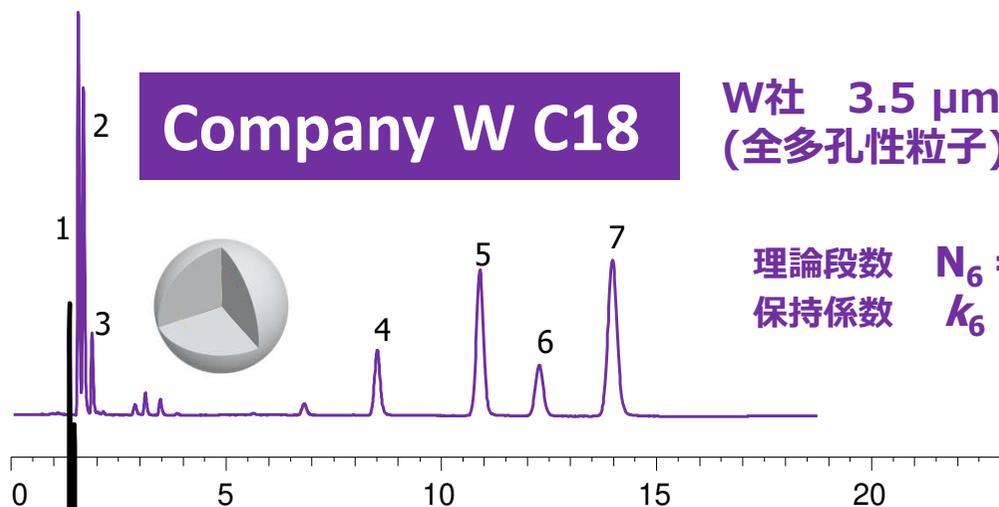
UHPLC-Performance



耐圧 20 MPa のHPLC装置で
最高のパフォーマンスを発揮



3.5 μ m (全多孔性 vs SunShell)



- Sample**
- 1.Uracil
 - 2.Caffeine
 - 3.Phenol
 - 4. Butylbenzene
 - 5.o-Terphenyl
 - 6.Amylbenzene
 - 7.Triphenylene

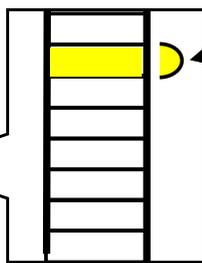
Column size: 150 x 4.6 mm
Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C

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

カラム	圧力 /MPa	圧力あたりの理論段数の比
W社 C18	18.0	1
SunShell C18	13.0	1.94

理論段数 (カラム効率) **+40%** 背圧 **-25%**

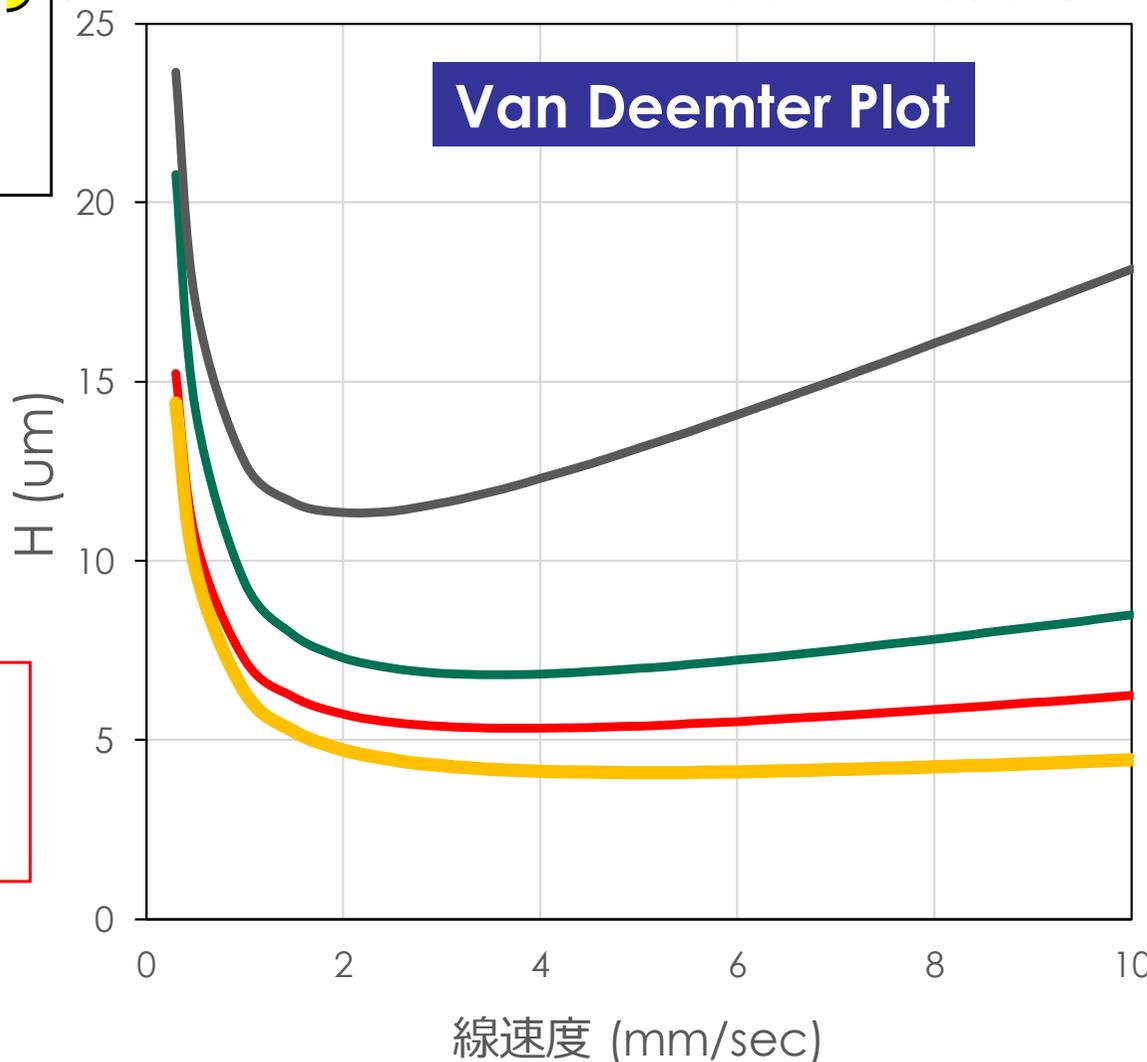
3.5 μ m (全多孔性 vs SunShell)



段高 (H) : 1 理論段あたりのカラム長さ
(低いほど、高効率)

$$H = L/N$$

L:長さ
N:理論段数

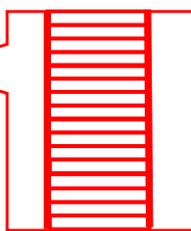


全多孔性 5 μ m

全多孔性 3 μ m

Core shell 3.5 μ m

Core shell 2.6 μ m

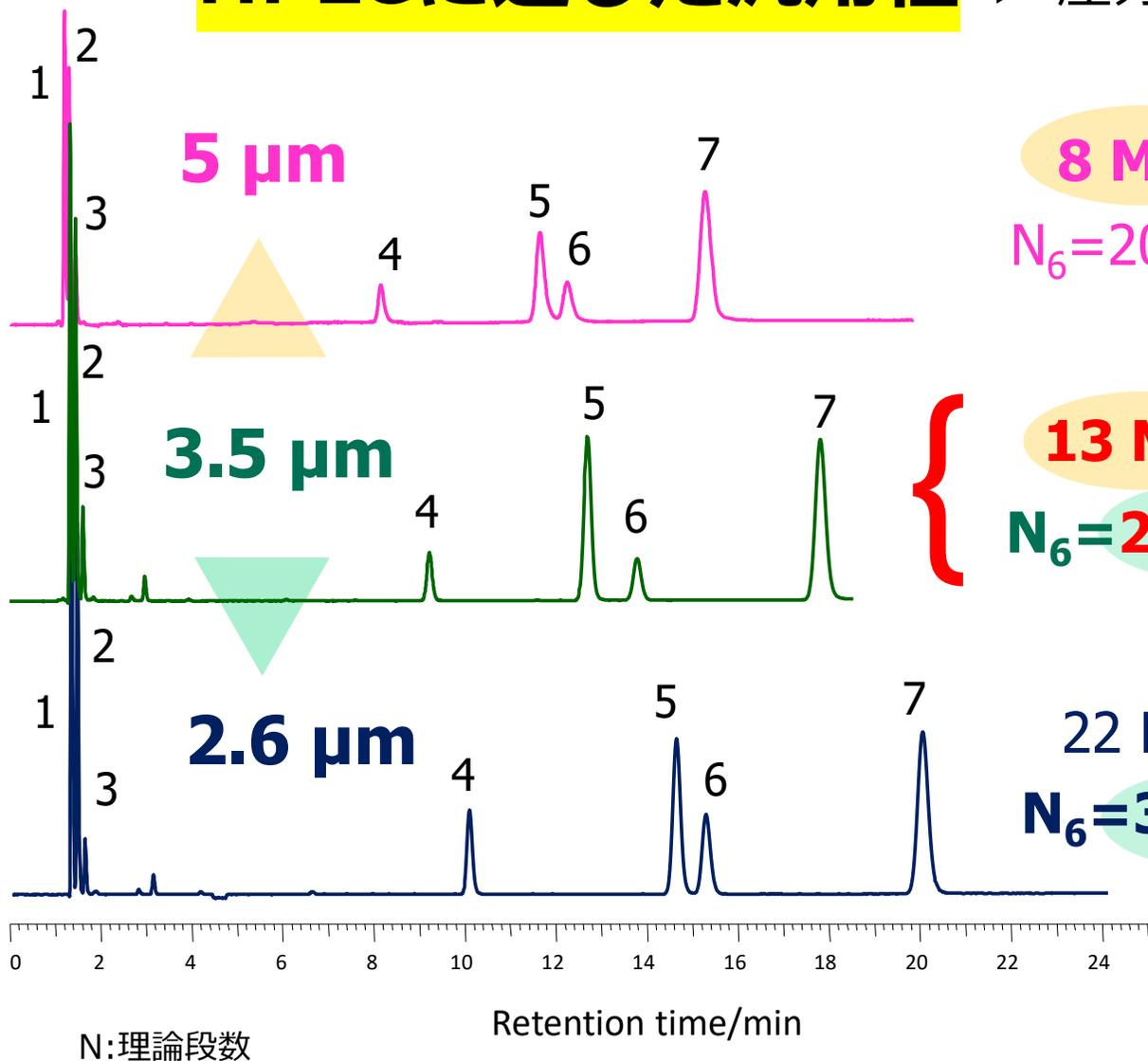


線速度 (mm/sec)

SunShell C18 3.5 μ m の有用性

HPLCに適した汎用性

▶ 圧力は5 μ m、性能は2.6 μ m寄り



Column: SunShell C18 150 x 4.6mm
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C

メタノール/水系

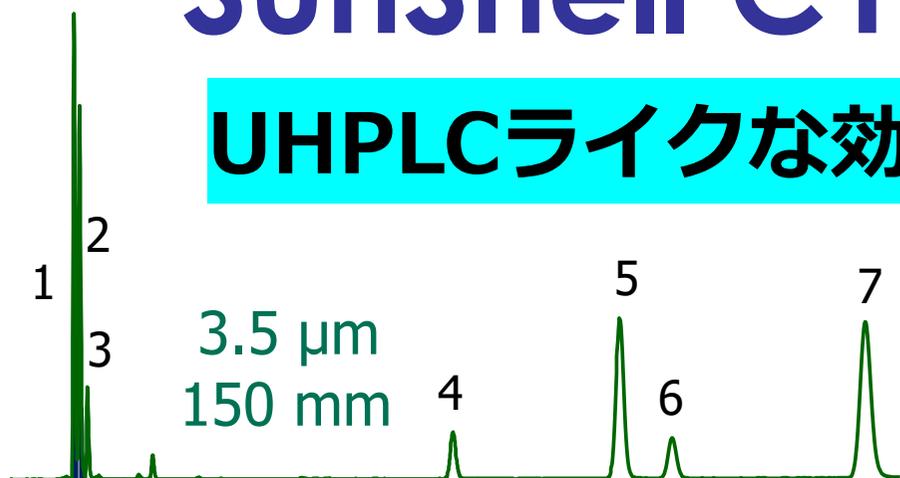
➔ 粘性高く、圧力が
高くなりやすい条件
でも、**15MPa未満**

Sample	
1.Uracil	4. Butylbenzene
2.Caffeine	5.o-Terphenyl
3.Phenol	6.Amylbenzene
	7.Triphenylene

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

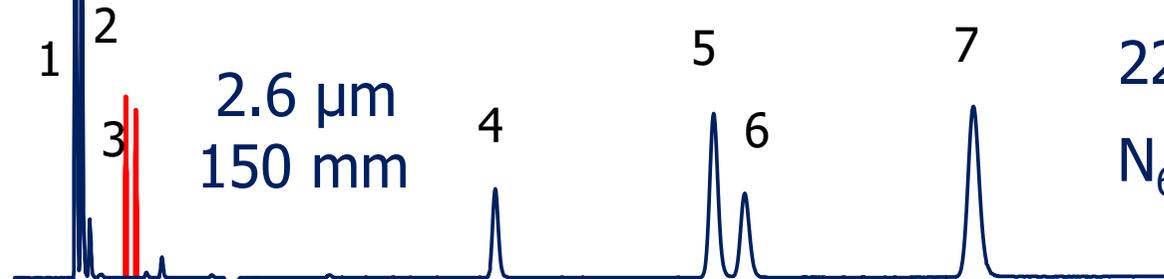
SunShell C18 3.5 μ m の有用性

UHPLCライクな効率性 ▶ UHPLC分析相当の、高理論段数



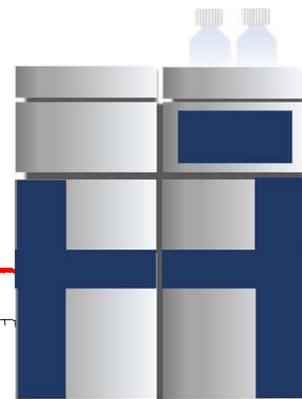
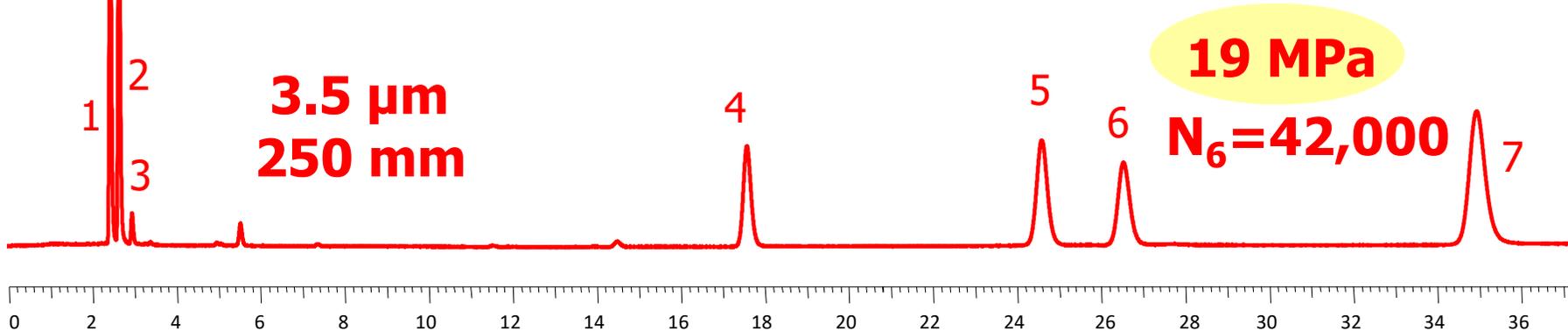
13 MPa
 $N_6=28,000$

Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Column: SunShell C18 4.6mm



22 MPa
 $N_6=32,000$

Sample 4. Butylbenzene
1. Uracil 5. o-Terphenyl
2. Caffeine 6. Amylbenzene
3. Phenol 7. Triphenylene
HPLC:
Conventional HPLC instrument
(Tubing, 0.25 mm i.d.)

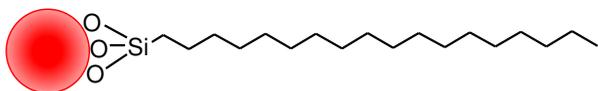


N:理論段数

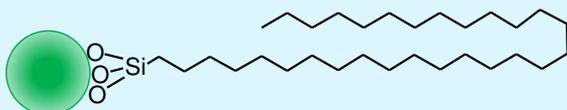
Retention time/min

SunShell カラム固定相 (逆相)

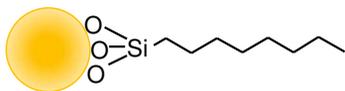
C18, C18-WP



RP-AQUA



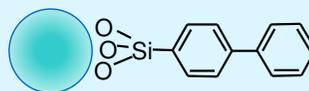
C8, C8-HT



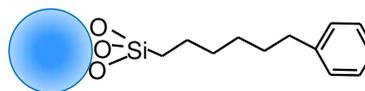
PFP&C18



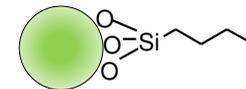
Biphenyl



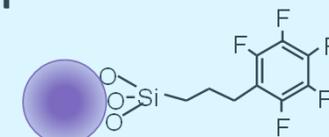
Phenyl



C4-100



PFP

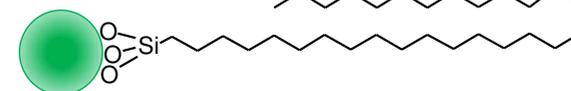


水100%使用可能

新固定相

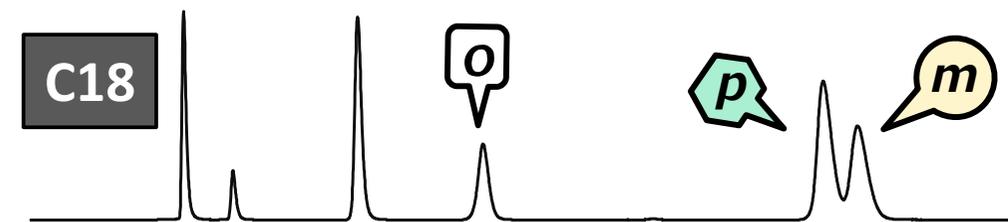
Sunniest End-capping
(高度不活性化処理)

C30



TMS End-capping

C18で困った時の「Biphenyl」



Column: SunShell 2.6 μ m 100 x 2.1mm

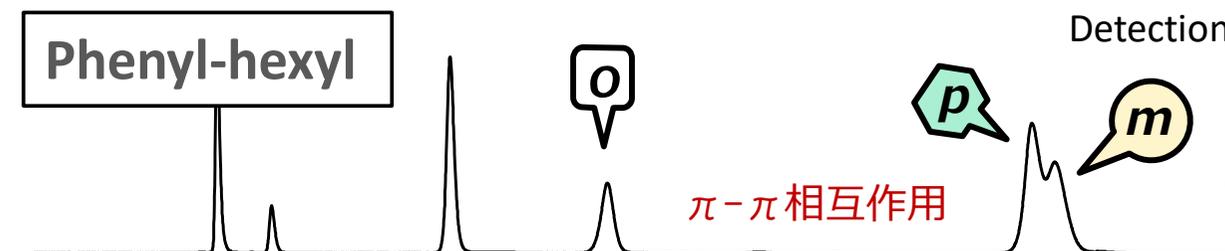
Mobile phase:

2-Propanol / 20 mM Ammonium acetate (pH 6.8) = 3/97

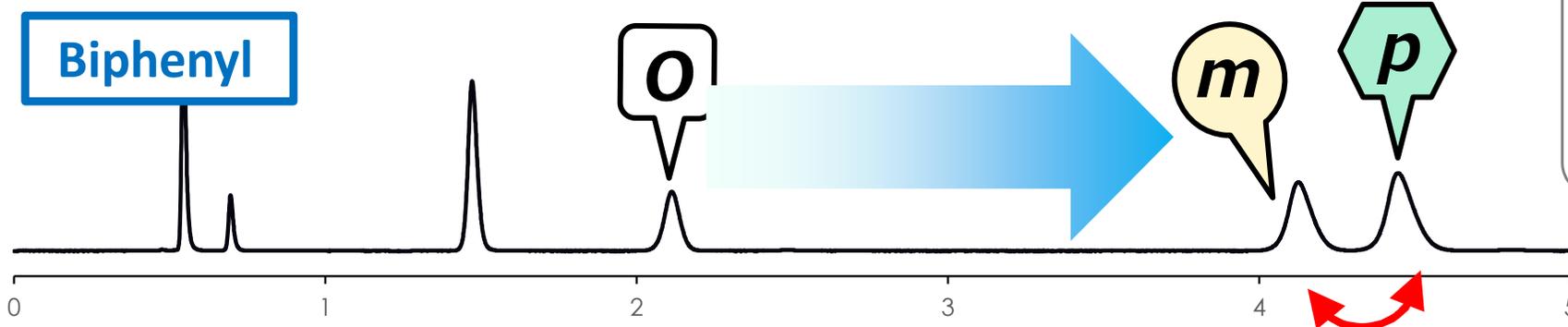
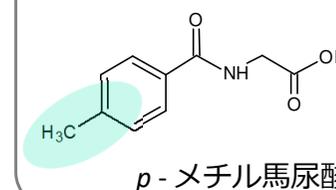
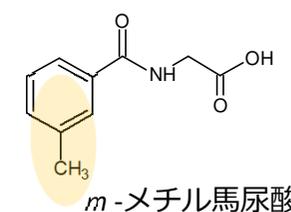
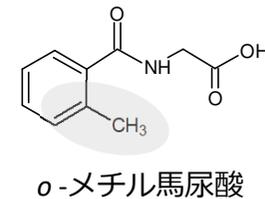
(有機溶媒にAcetonitrileを用いると、三重結合中 n 電子がフェニル固定相の n 電子と馴染み、試料保持が抑制される)

Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV@230 nm



Sample:



Biphenylでは、保持と共に **選択性** が大きく変化

Biphenyl 系 カラム 4 種の比較

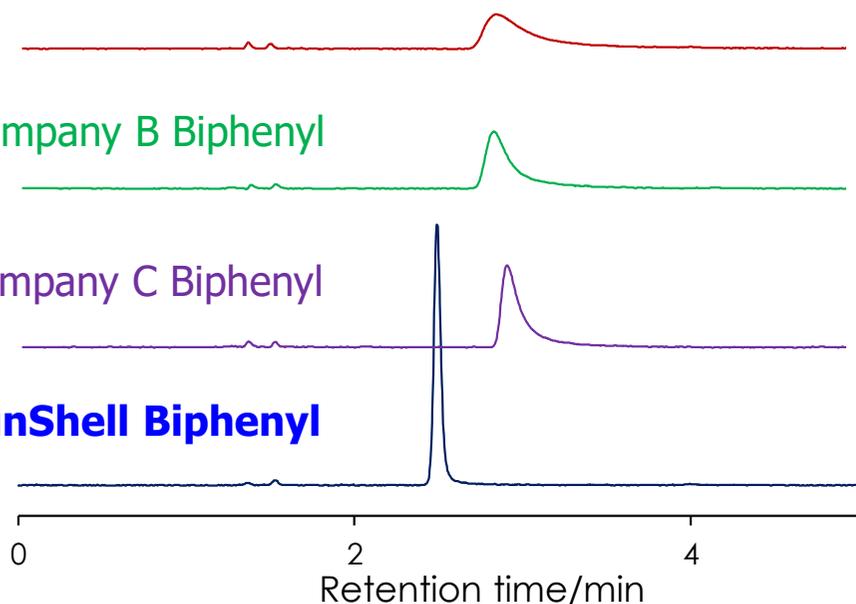
▼ 基材の違い

Company A Biphenyl

Company B Biphenyl

Company C Biphenyl

SunShell Biphenyl



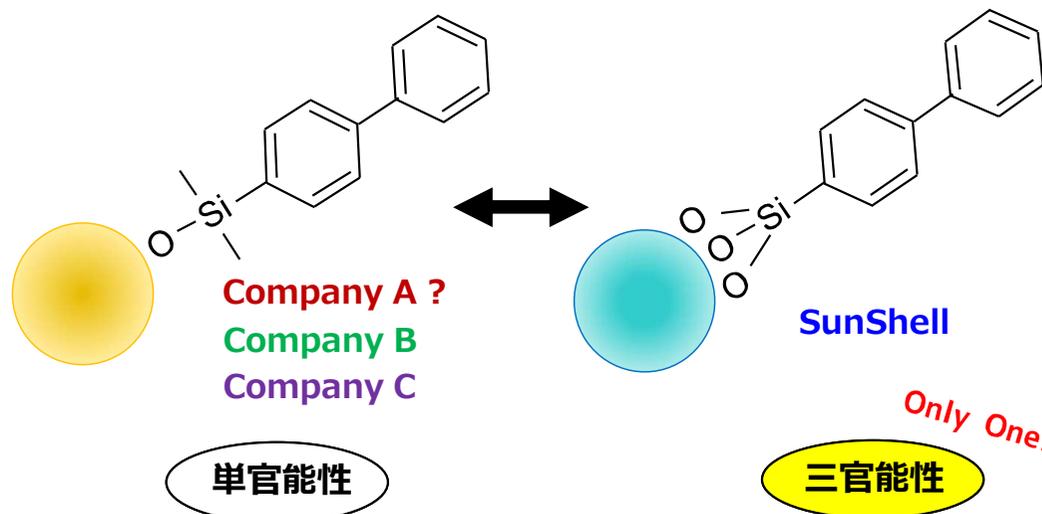
Column: 2.6 μm or 2.7 μm (Core-Shell) 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃CN/20mM H₃PO₄=10/90
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C Detection: UV@250 nm
 Sample: 8-Quinolinol (Oxine) ← 金属配位性化合物

金属不純物が多いほど **ピークがテーリング**

▼ 官能基の違い

Biphenyl 物性情報 (各メーカーカタログ記載より)

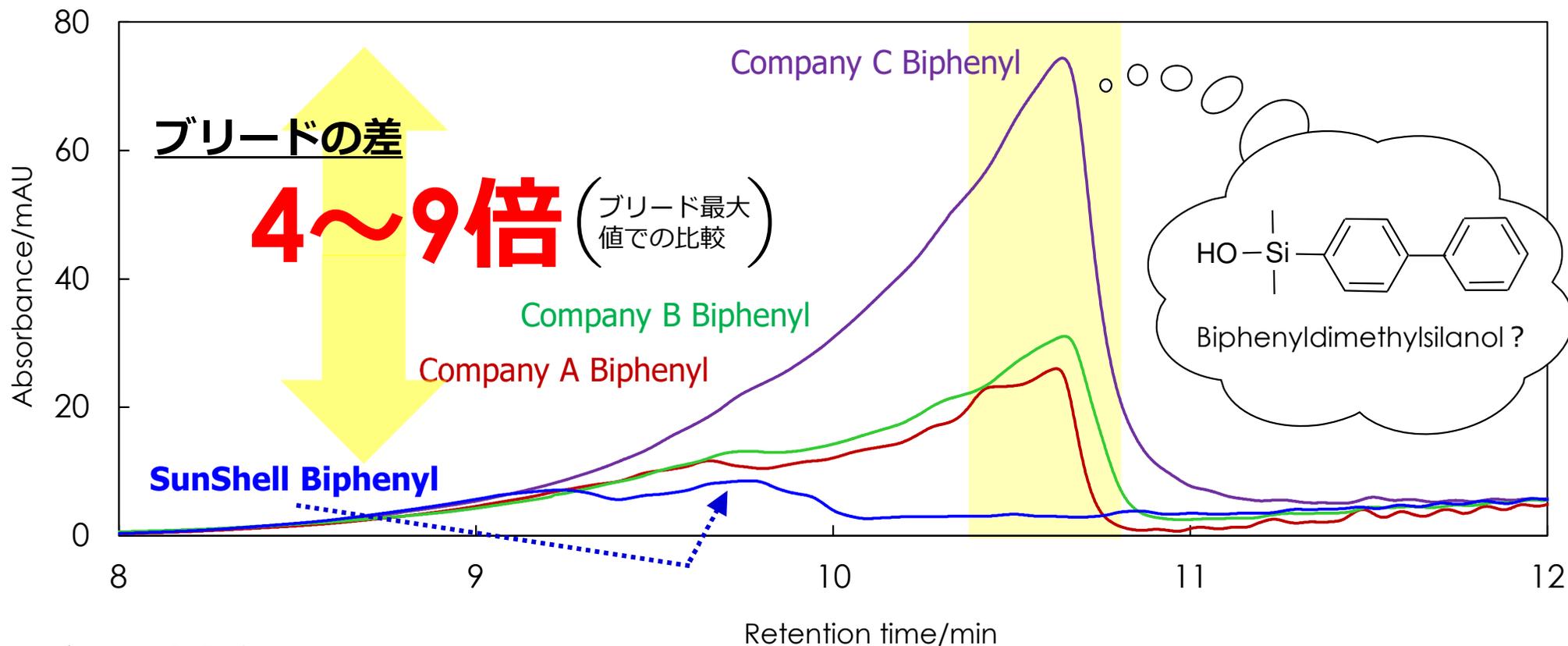
カラム種類	C%	固定相
Company A	11 %	Biphenyl ?
Company B	7 %	Biphenyldimethylsilane
Company C	7 %	Biphenyldimethylsilane
SunShell	5 %	Biphenyl



Only One!

市販コアシェルカラム4種

Biphenyl 強酸性ブリード試験



ブリード試験条件

Column dimension: 50 x 2.1 mm Flow rate: 0.3 mL/min
 Mobile phase: A) 1% H₃PO₄ (pH 1.2) Temperature: 40 °C
 B) Acetonitrile Detection: UV@250 nm

Gradient program

Time (min)	0	5	10	17	18	35
%B	10	10	90	90	10	10

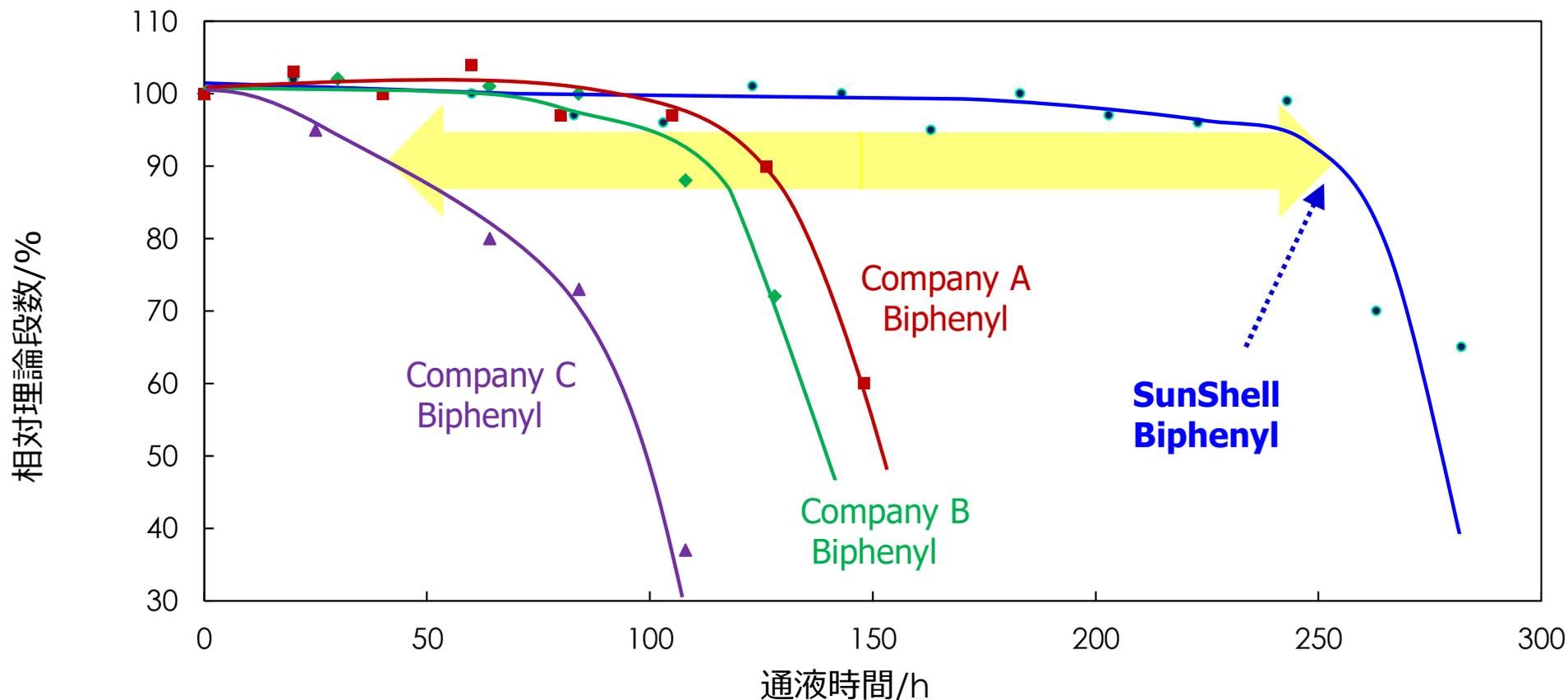
Chromatogram of a base line at the third gradient cycle

カラム種類	公称pH範囲*
SunShell Biphenyl	1.5 - 9
Company A C18	1.5 - 8.5
Company B C18	1.5 - 8.0
Company C C18	1.5 - 9.0

*各メーカー
カタログ記載
より

市販コアシェルカラム4種

Biphenyl 弱アルカリ耐久試験



耐久性の差

2~6倍

(相対理論段数90%における通液時間の比較)

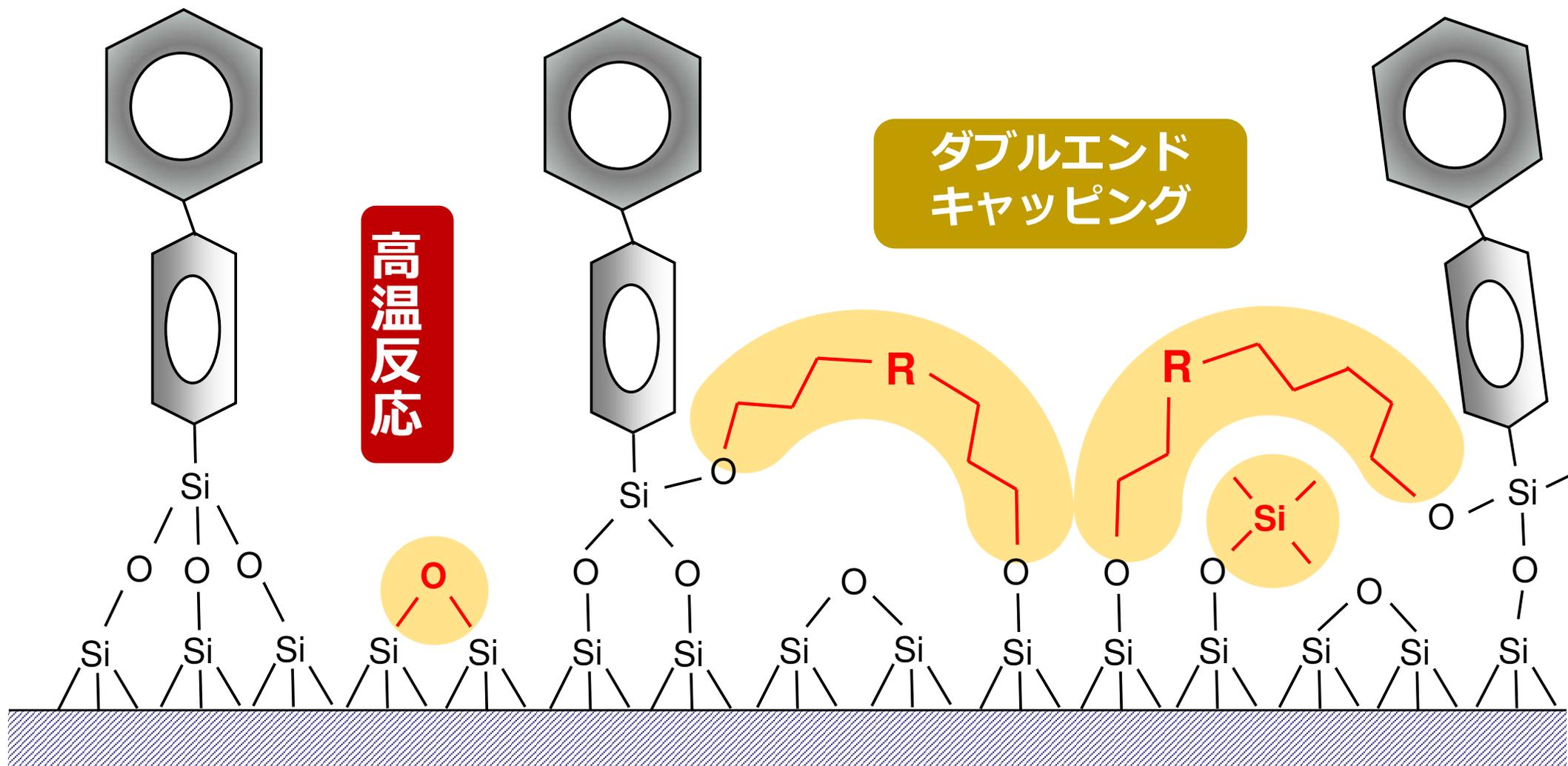
耐久性試験条件

Column dimension: 50 x 2.1 mm
 Mobile phase: **20 mM Sodium phosphate (pH 8.0)**
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Temperature: 40 °C

理論段数測定条件

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=50/50
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: UV@250 nm
 Sample: Butylbenzene

基盤技術 ~Sunniest End-capping~



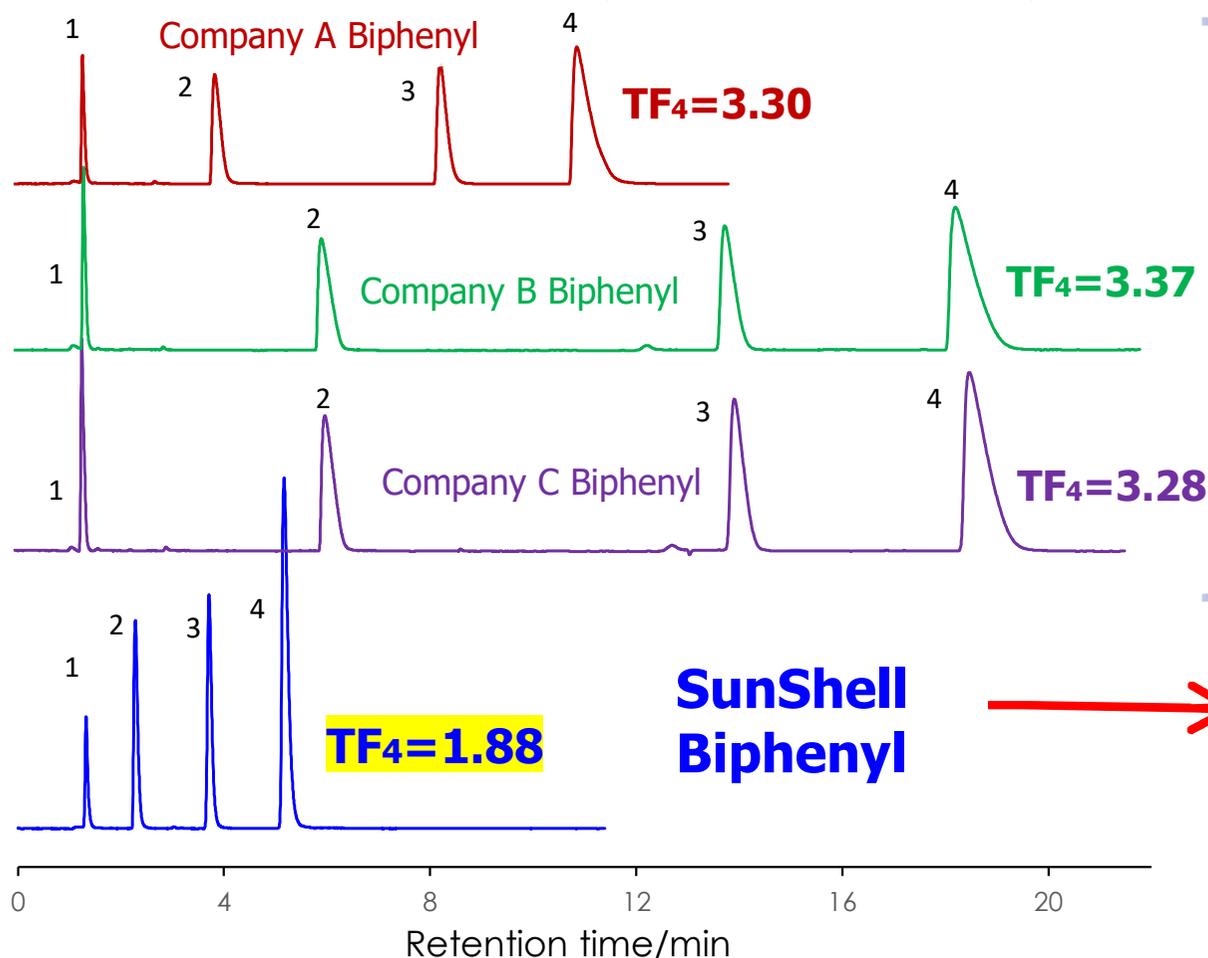
シラノール影響を最小に、高度不活性化

市販コアシェルカラム4種

Biphenyl 塩基性化合物ピーク

アミトリプチリン(#4)のピーク形状比較

(TF: テーリングファクター)



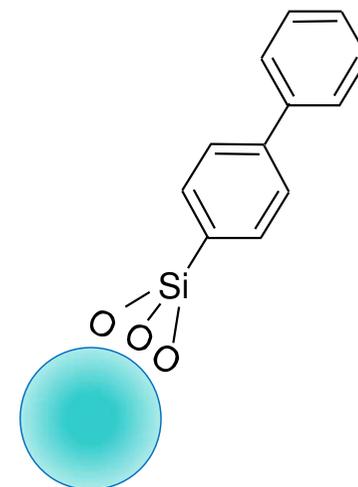
残存シラノール影響で塩基性化合物の吸着による保持が過度に働き、大きくテーリング (TFが3以上)

シラノール影響が小さく、塩基性化合物の吸着抑制が効いている (TFが2未満)

C18で困った時の「Biphenyl」

- SunShell Biphenyl 2.6 μm (コアシェル)
- Sunniest Biphenyl 5 μm (全多孔性)

- Biphenyl基の **ユニークな選択性**
- 塩基性化合物の **テーリング抑制**
- 酸 & 塩基性移動相への **高耐久性**
- LC-MSにも最適な **低ブリード性**



➔ **セカンドチョイスに最適**

まとめ

- ◆ UHPLCライクな高分離性能を耐圧20MPa以下の汎用HPLC装置で実現するためには、コアシェル型カラム SunShell C18 **3.5 μm** の選択が有用である。
- ◆ C18で困ったときの逆相カラムの二番手候補として、**Biphenyl**が有用。フェニルより高保持でユニークな選択性を持つ事から分析条件探索に向くと考えられる。
(有機溶媒にはAcetonitrileではなく、Methanol、2-Propanolを推奨)
- ◆ いずれも高度不活性化技術 (***Sunniest End-capping***) の効用によって、高い耐久性と低ブリード性能を持つ。コストパフォーマンスと試験法の信頼性向上への寄与が大きい事から、総合的にメソッド開発へ推奨できる。