

コアシェルも全多孔性も徹底カバー C18からHILICまで 今さら聞けないカラムを上手に 使いこなすための基礎とコツ

クロマニックテクノロジーズ

塚本友康 長江徳和

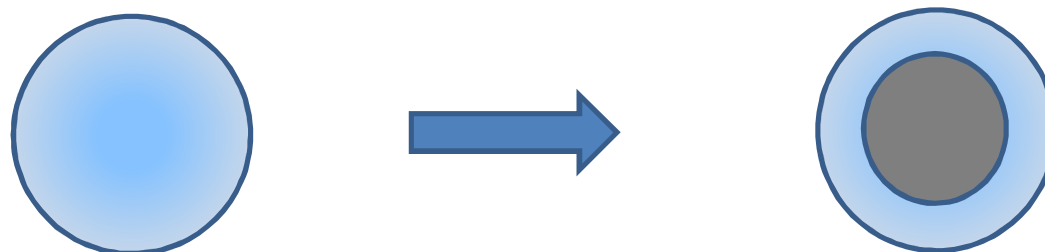
Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>





全多孔性？コアシェル？



全多孔性からコアシェルに変えたけど・・・

段数が・・・

流速上げると・・・

保持が・・・

思っていたほど・・・





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

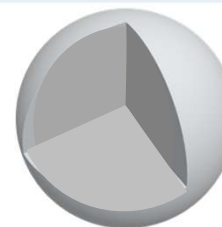
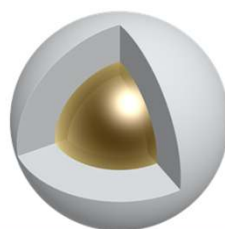
思っていたほど・・・

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



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

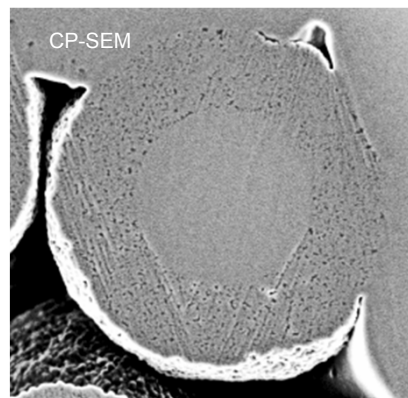


コアシェルシリカカラムで注意すべきこと

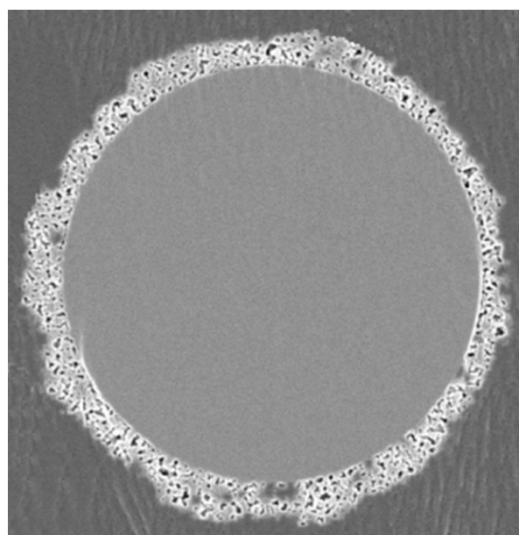




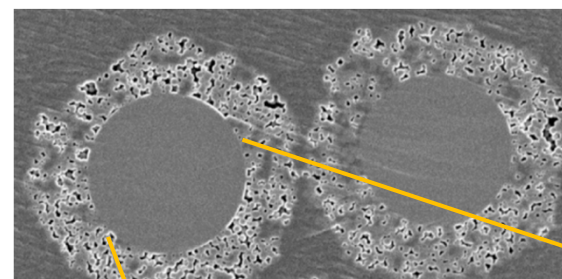
コアシェルシリカの電子顕微鏡写真



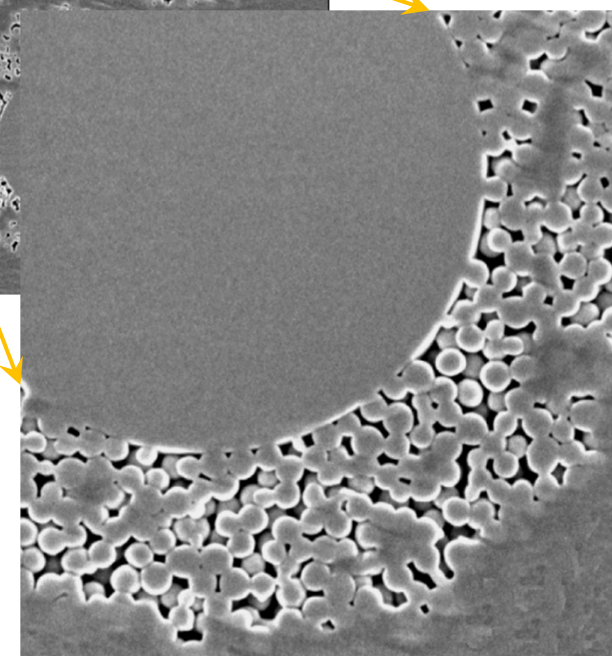
粒子径: 2.6 μm
細孔径: 16 nm



粒子径: 3.4 μm
細孔径: 30 nm



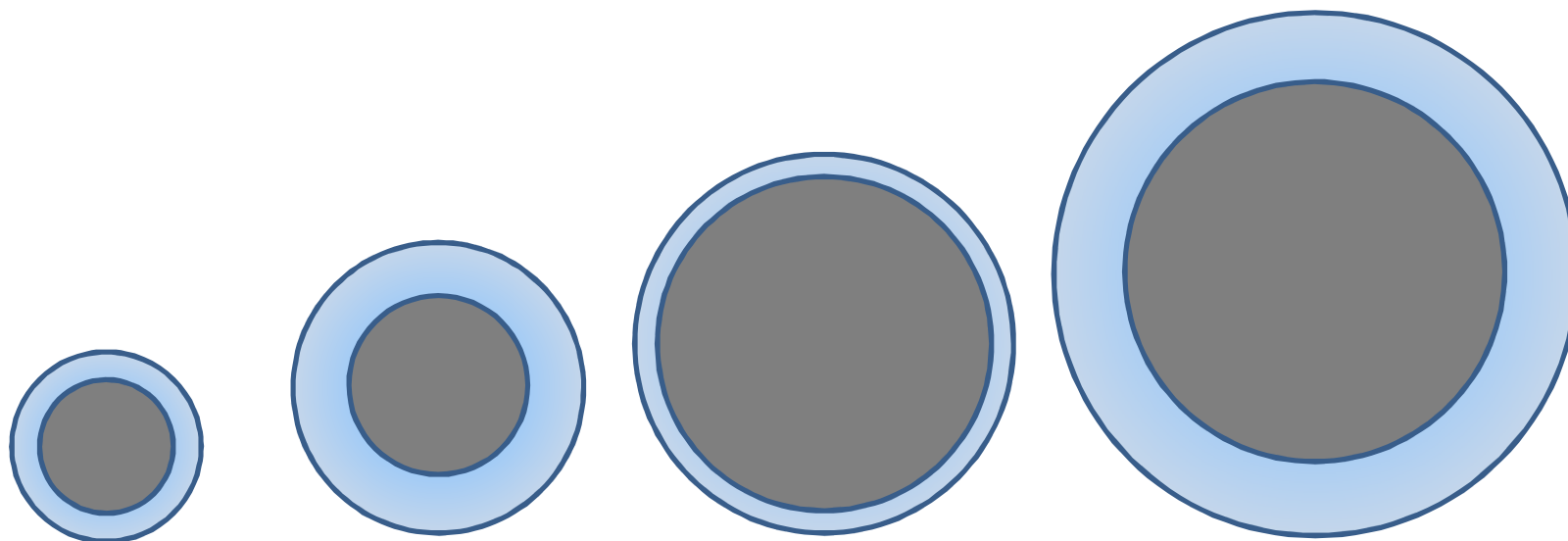
粒子径: 2.6 μm
細孔径: 100 nm



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.?- 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%



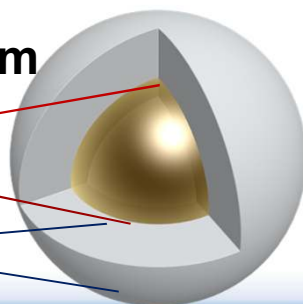
全多孔性シリカとコアシェル型シリカ 2.6 μ mと5 μ mの標準試料の保持比較

	全多孔性シリカ Sunniest C18, 5 μ m		コアシェル型シリカ SunShell C18, 2.6 μ m		コアシェル型シリカ SunShell C18, 5 μ m	
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 μ m

コア径 : 3.4 μ m

シェル層厚 : 0.6 μ m



移動相: Methanol/water(75:25)

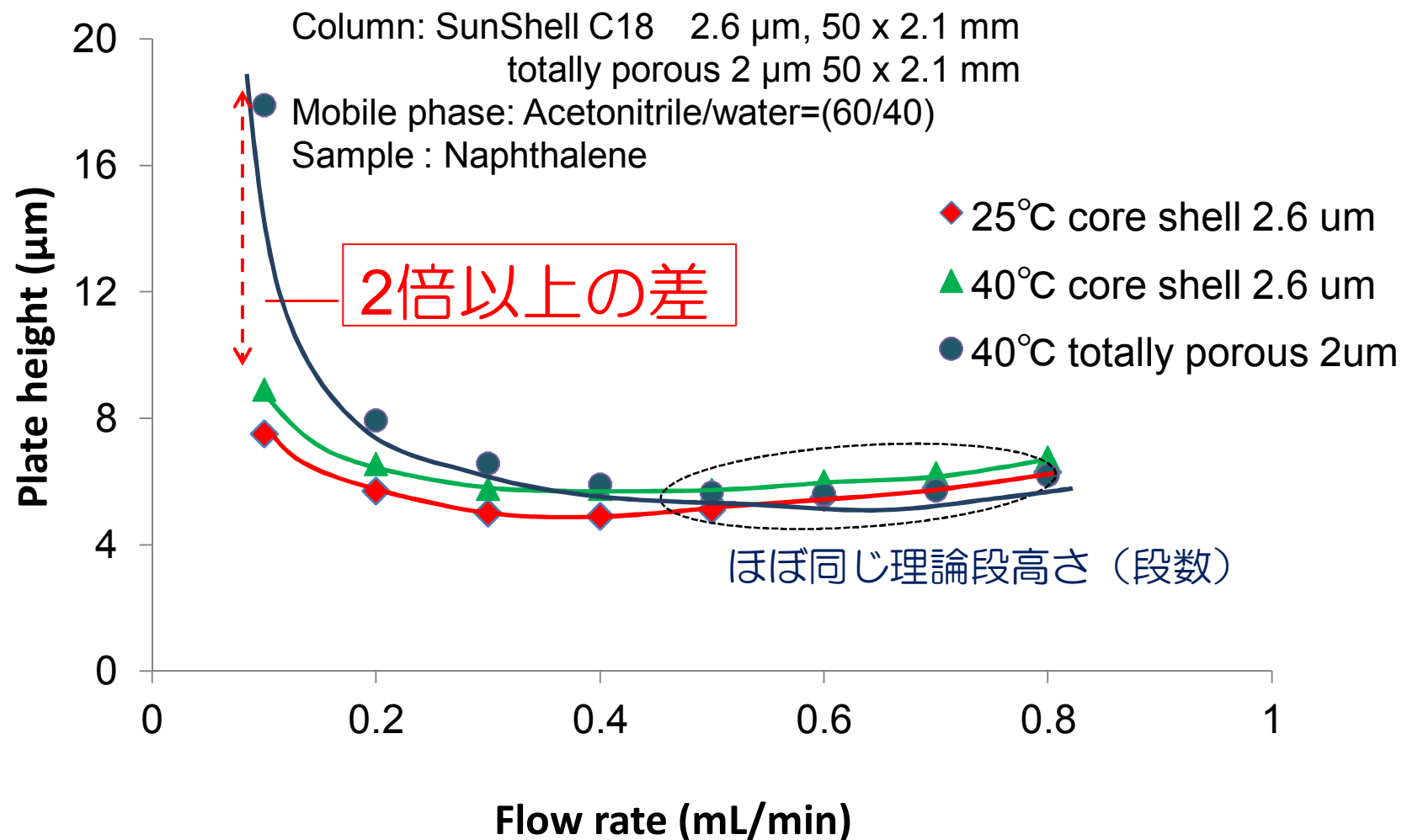
温度: 40°C

カラム: 150 x 4.6 mm

流速: 1.0 mL/min



低流速時の理論段高さ

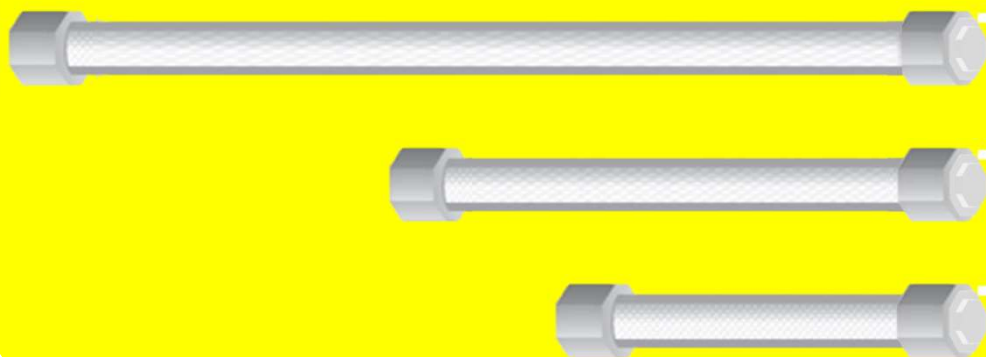




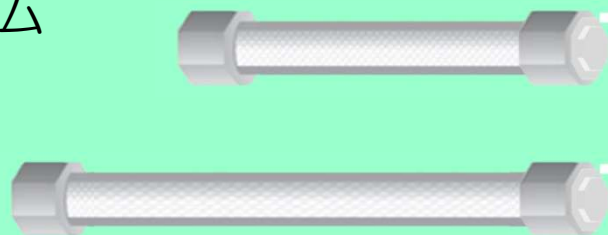
カラム長さと理論段数

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

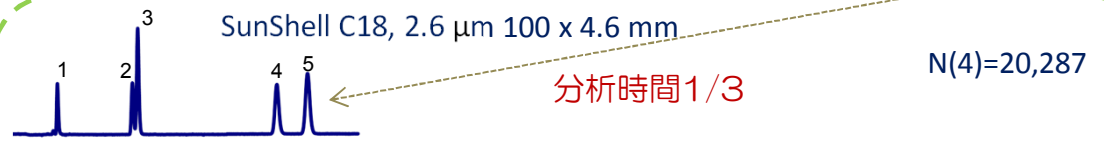
Brand F C18, 5 μ m 250 x 4.6 mm

N(4)=19,313

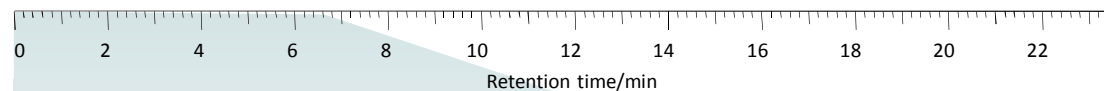


SunShell C18, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm

N(4)=20,287

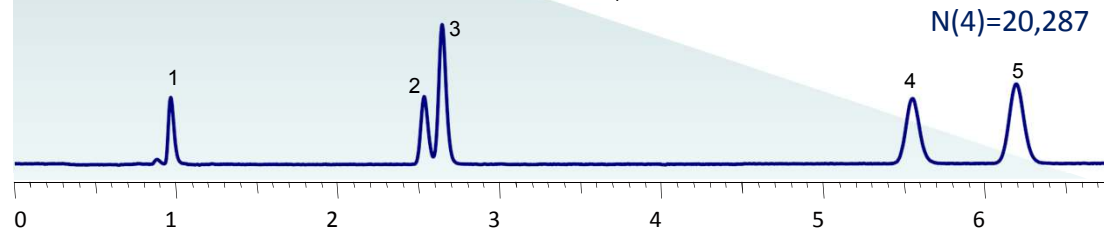


分析時間1/3



Retention time/min

N(4)=20,287



Retention time/min

UHPLC

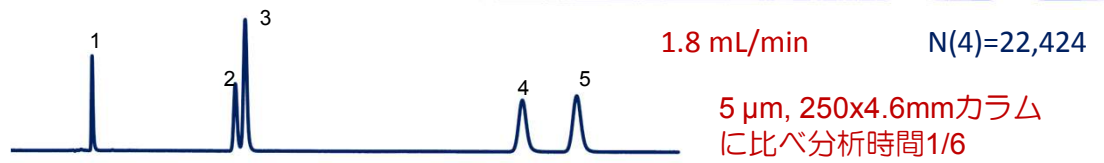
1.0 mL/min

N(4)=24,124



1.8 mL/min

N(4)=22,424



5 μ m, 250x4.6mmカラム
に比べ分析時間1/6

Retention time/min

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

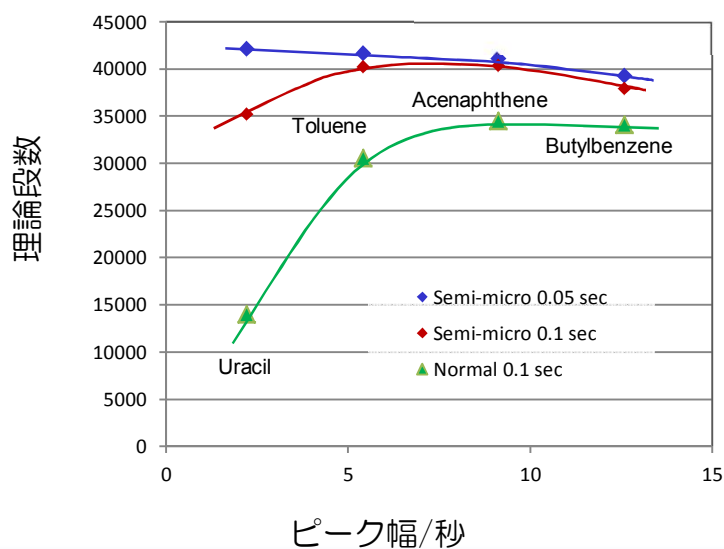
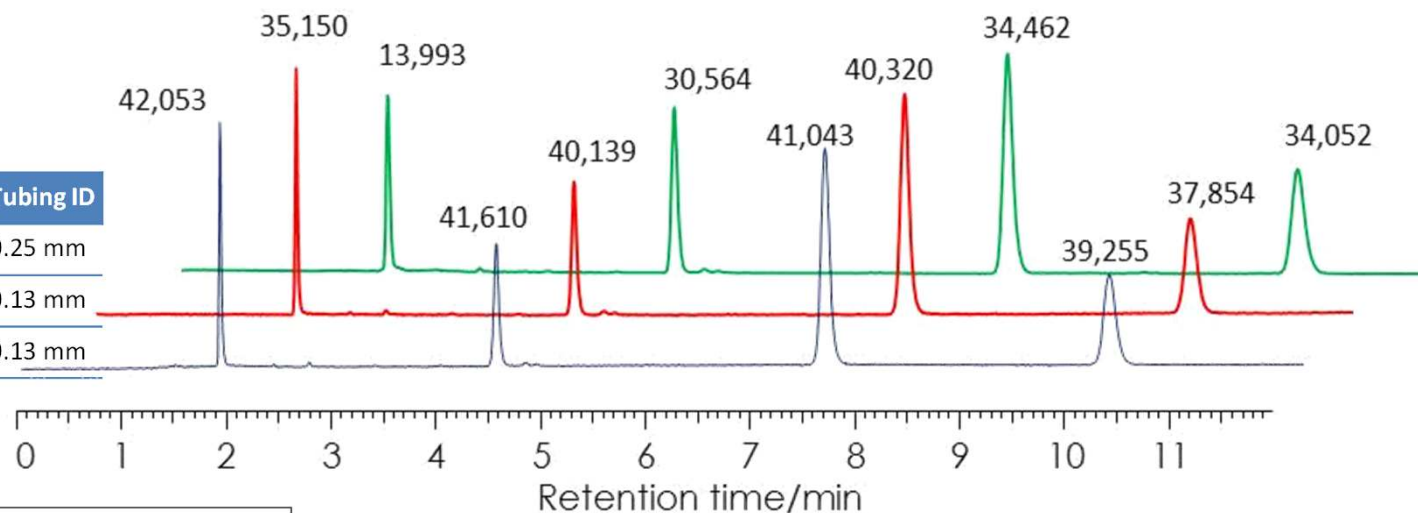
(内径0.25mmの配管仕様)

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



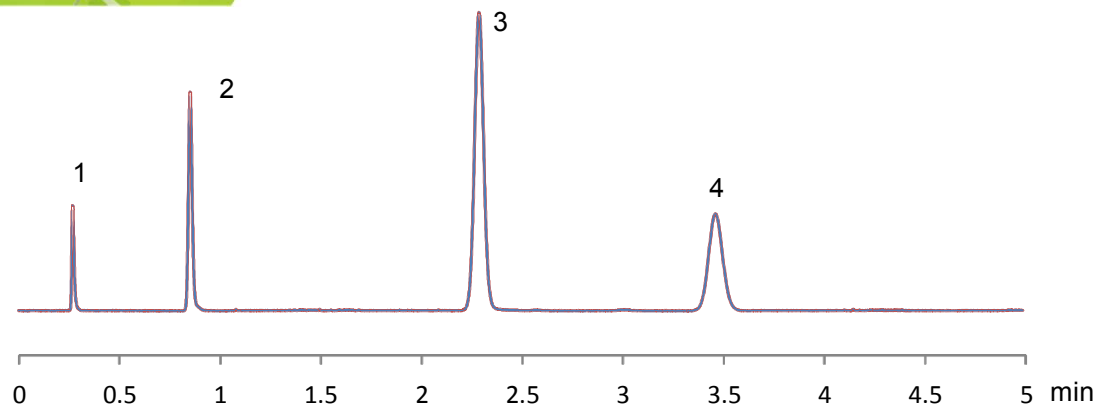
HPLC: Hitachi LaChrom ELITE



配管の影響



耐圧：130MPa
メタルフリー対応



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

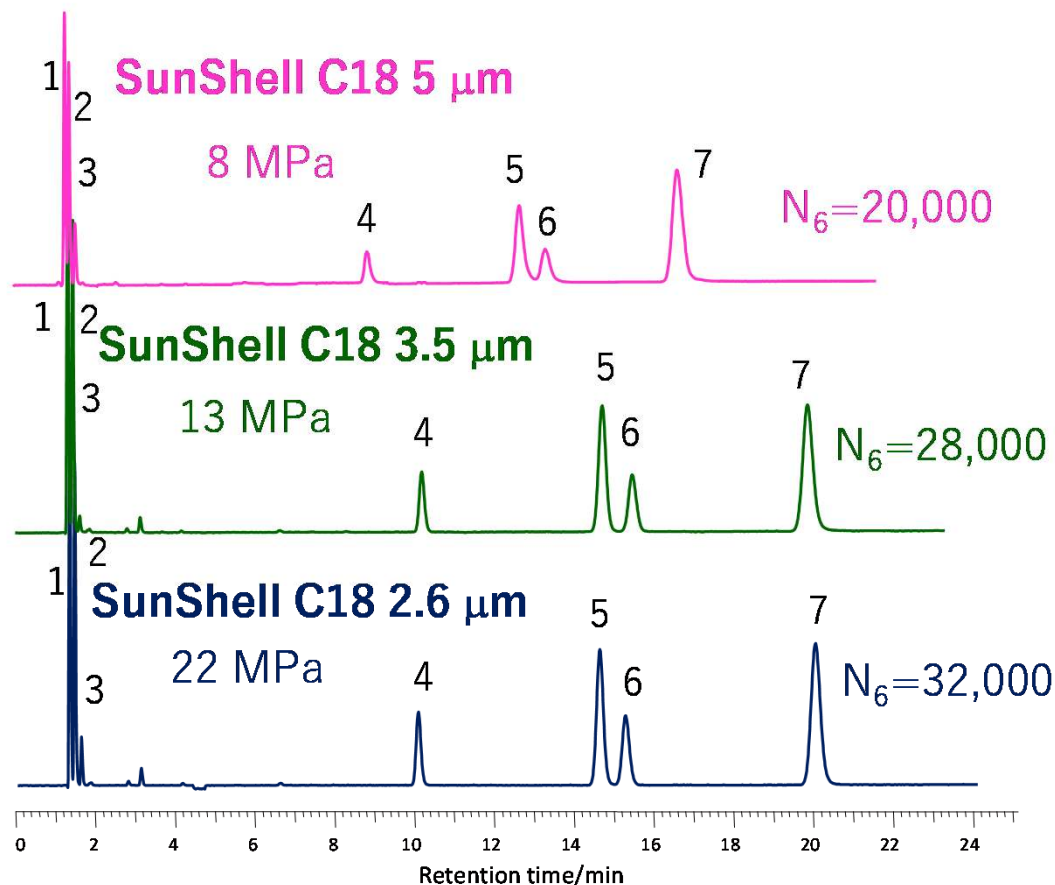
Sample: 1=Uracil, 2=Ethylbenzene, 3=Acenaphthene, 4=Butylbenzene

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

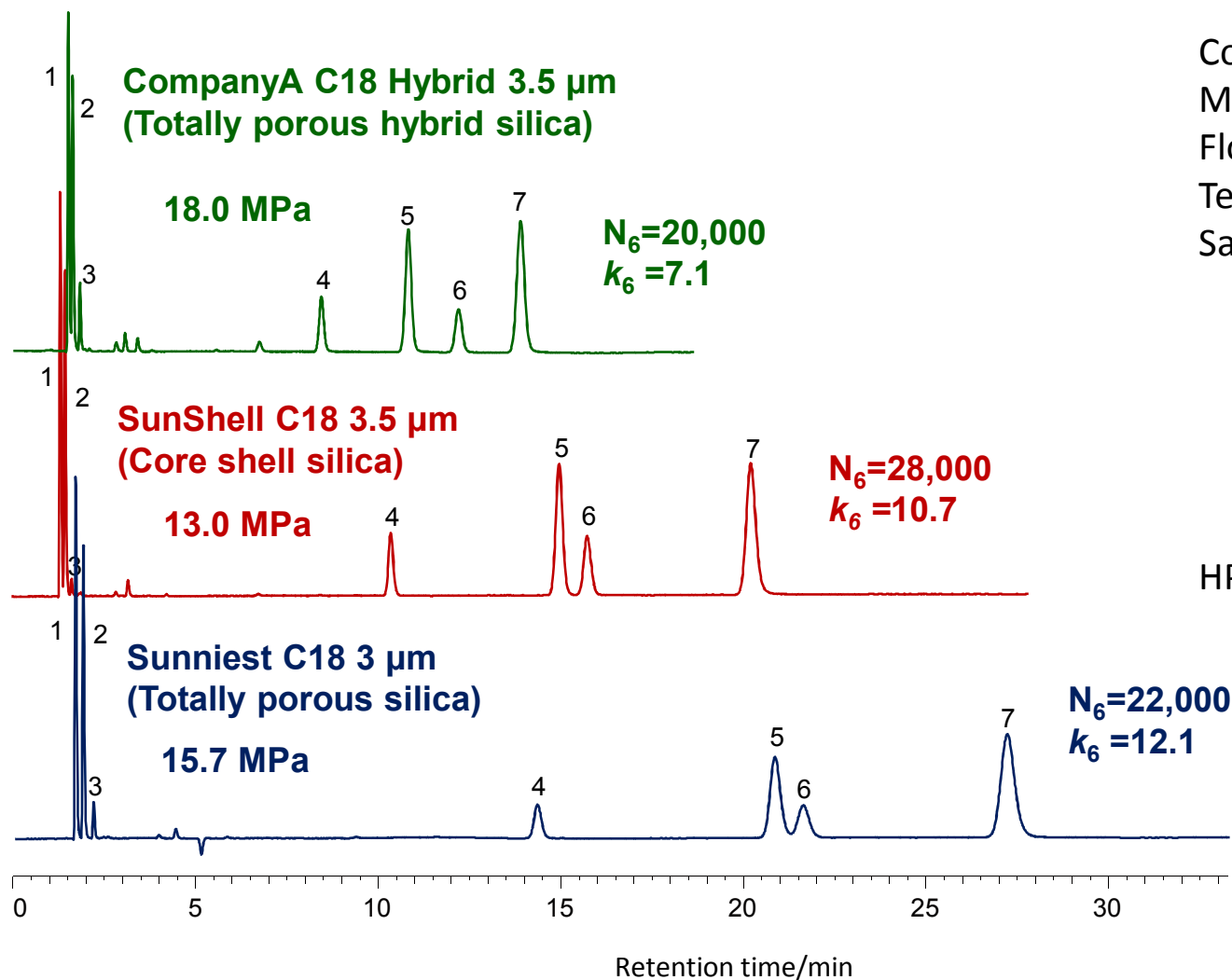
(Tubing, 0.25 mm i.d.)



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: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=75/25$
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Sample: 1 = Uracil

2 = Caffeine

3 = Phenol

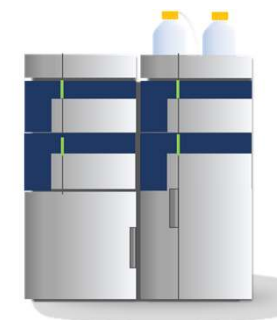
4 = Butylbenzene

5 = o-Terphenyl

6 = Amylbenzene

7 = Triphenylene

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





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

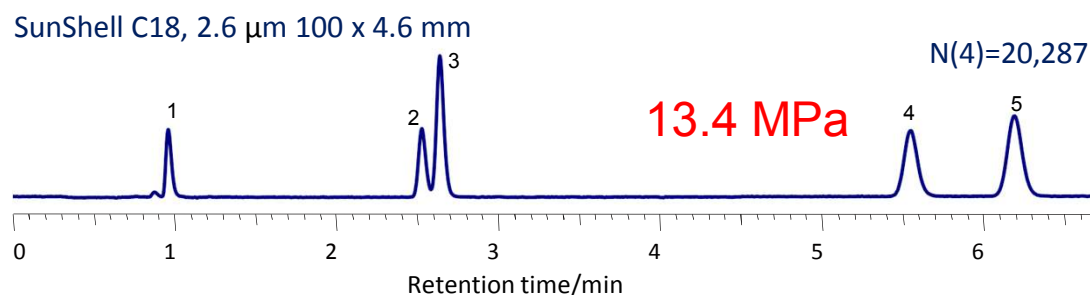
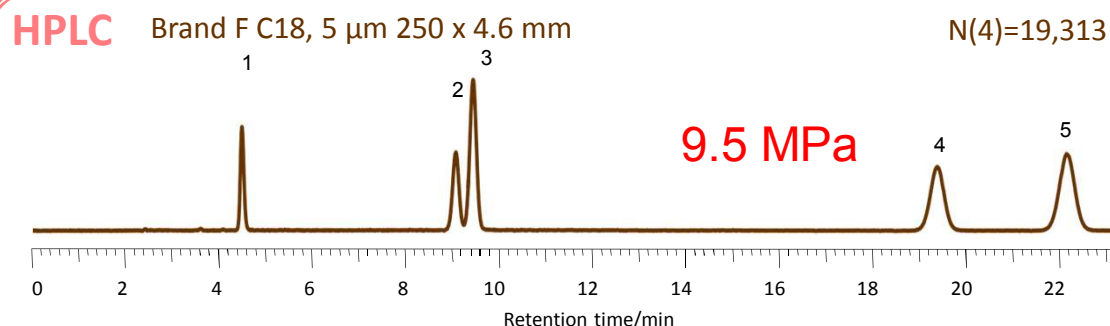
本当??





カラムの背圧

カラムの背圧は粒子径の2乗に反比例



Mobile phase:
CH₃CN/20mM Phosphoric acid = 45/55
Flow rate: 1.0 mL/min,
Temperature: 25 °C
Detection: UV@230 nm
HPLC: Hitachi LaChrom ELITE
(内径0.25mmの配管仕様)

2.6 μ mでは5 μ mの約3.7倍の
圧になる

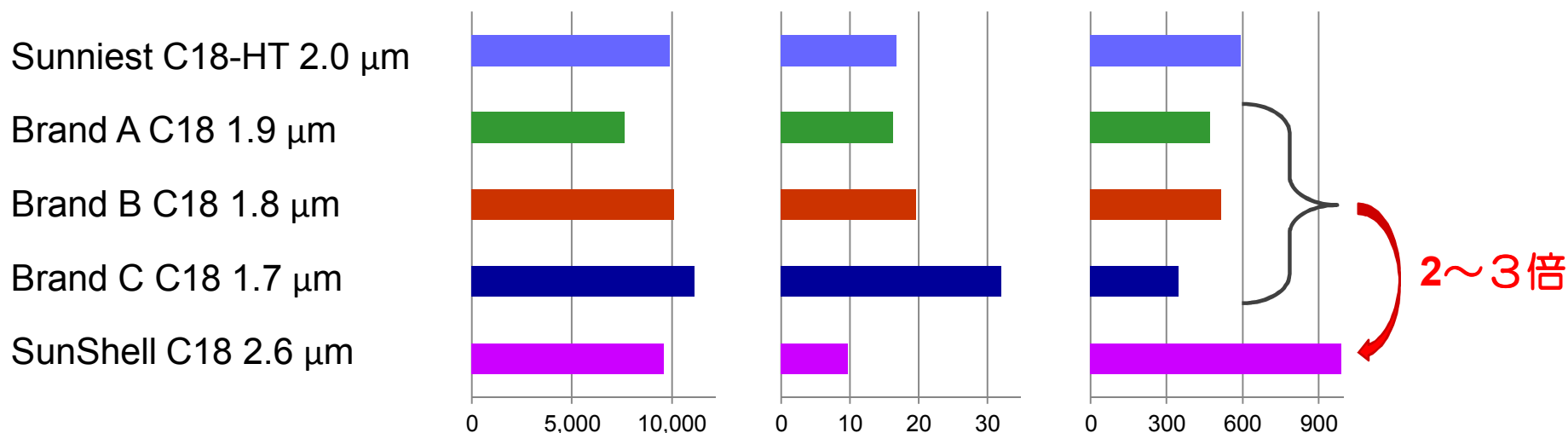
$$9.5\text{MPa} \times 3.7 \times 100/250 = 14.1\text{MPa}$$

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 °C

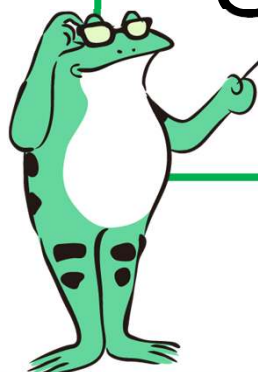


全多孔性シリカカラムと比べると

コアシェルカラムは圧力が低い

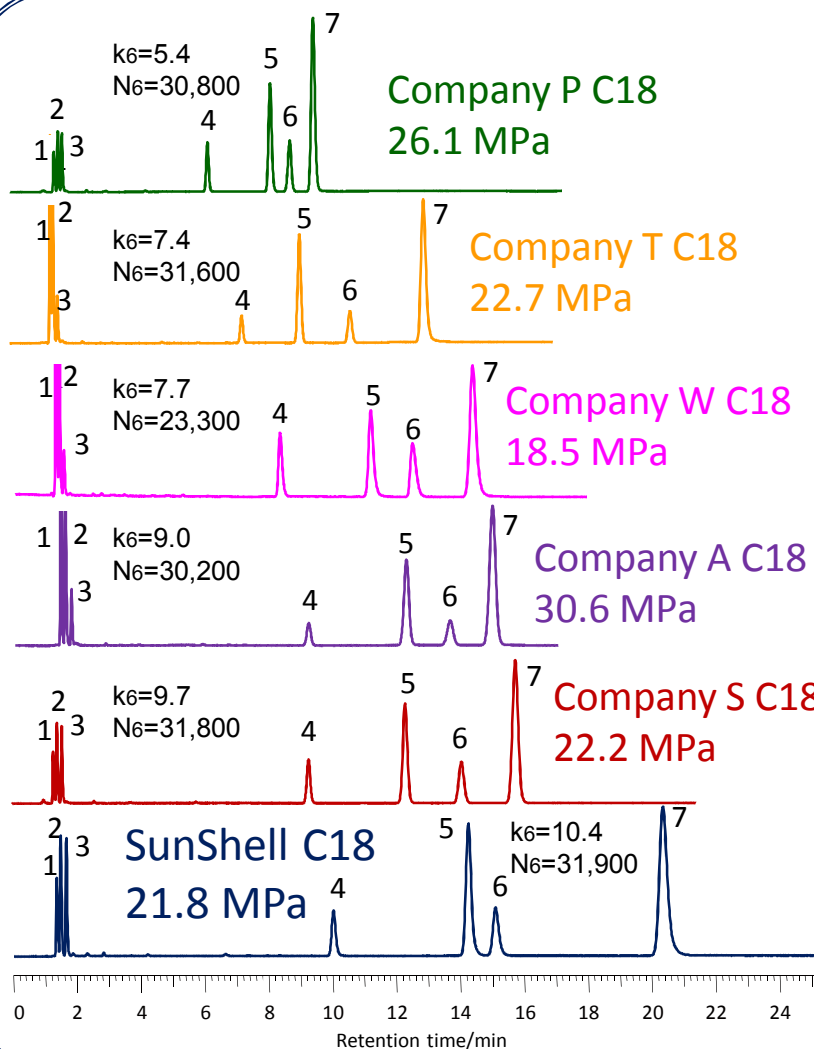


圧力は粒子径通りの高さ
だが理論段数は高い
Sub2 μm では使用できない
長さのカラムを使用可能





標準試料の分離比較



Column:

Company P C18, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm (26.1 Mpa, 30,800 plate)

Company T C18, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm (22.7 Mpa, 31,600 plate)

Company W C18, 2.7 μ m 150 x 4.6 mm (18.5 Mpa, 23,300 plate)

Company A C18, 2.7 μ m 150 x 4.6 mm (30.6 Mpa, 30,200 plate)

Company S C18, 2.7 μ m 150 x 4.6 mm (22.2 Mpa, 31,800 plate)

SunShell C18, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm (21.8 Mpa, 31,900 plate)

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

	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

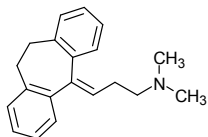
	炭素含有量 Carbon loading (%)	比表面積 Specific surface area ^a (m ² /g)	細孔容積 Pore volume ^a (mL)	細孔径 Pore diameter ^a (nm)
SunShell C18	7.3	125	0.261	8.34
Company S C18	8.0	133	0.278	8.20
Company A C18	8.5	135	0.414	12.3
Company T C18	8.8	130	0.273	8.39
Company W C18	7.3	113	0.264	9.32
Company P C18	4.9	102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

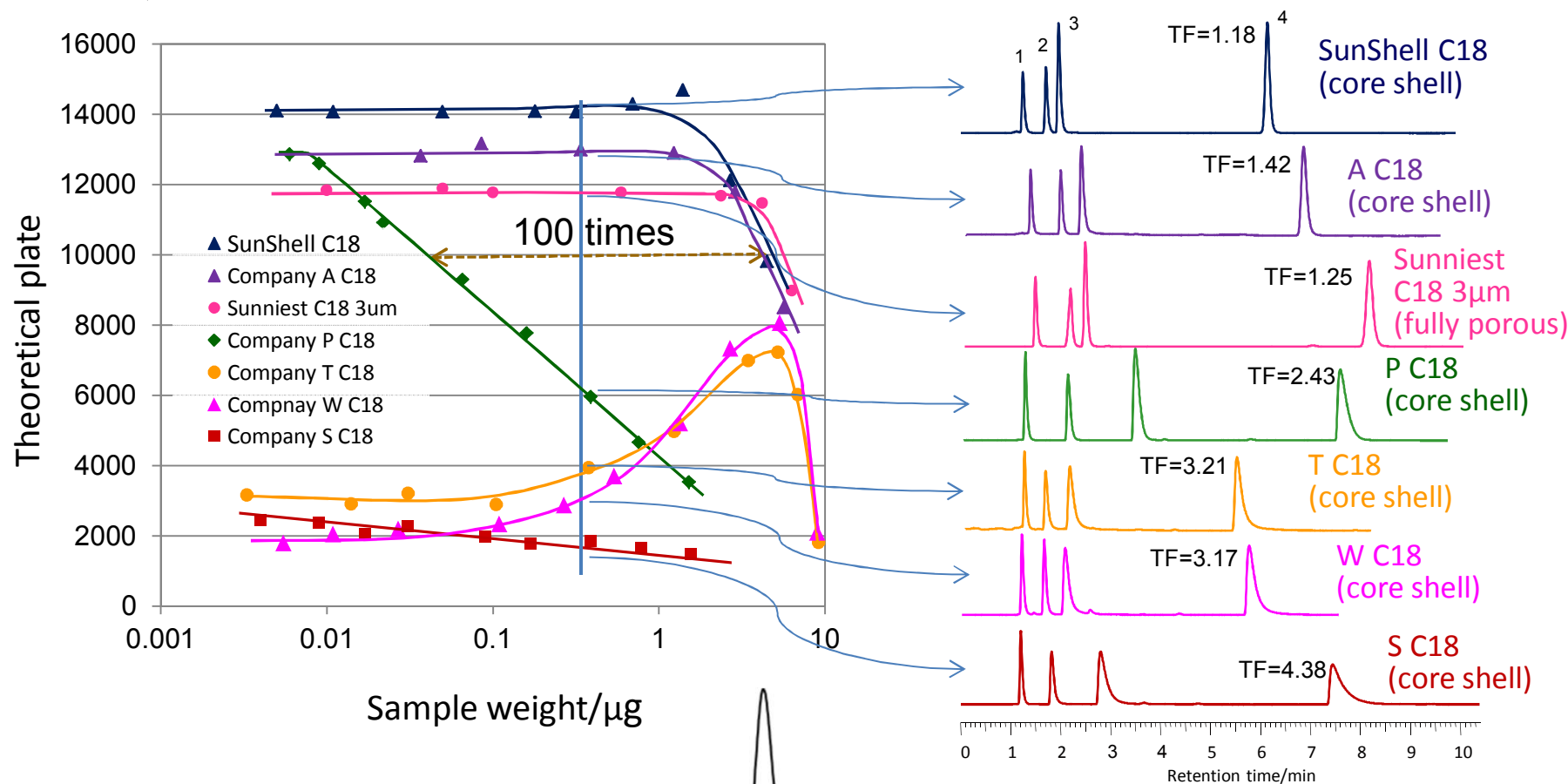
*全ての測定はクロマニックテクノロジーズ社内で行いました。



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=Uracil, 2=Propranolol, 3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline

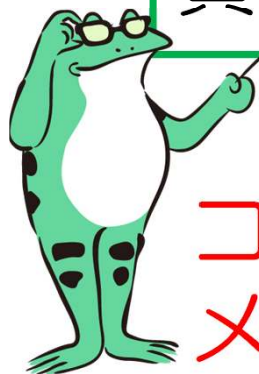


全多孔性シリカカラムと比べると

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%



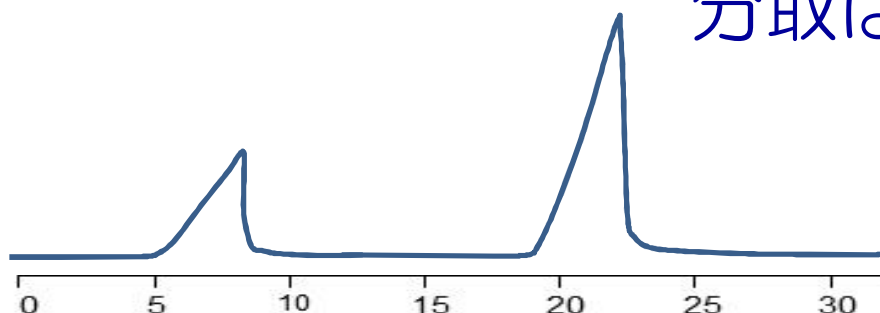
コアシェルカラムは保持時間・負荷量共に
メーカー間の差が大きい



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



HILICカラムをいざ使用してみると・・・

- 考えていたものより・・・

保持が短い？保持しない

保持時間の再現性が・・・

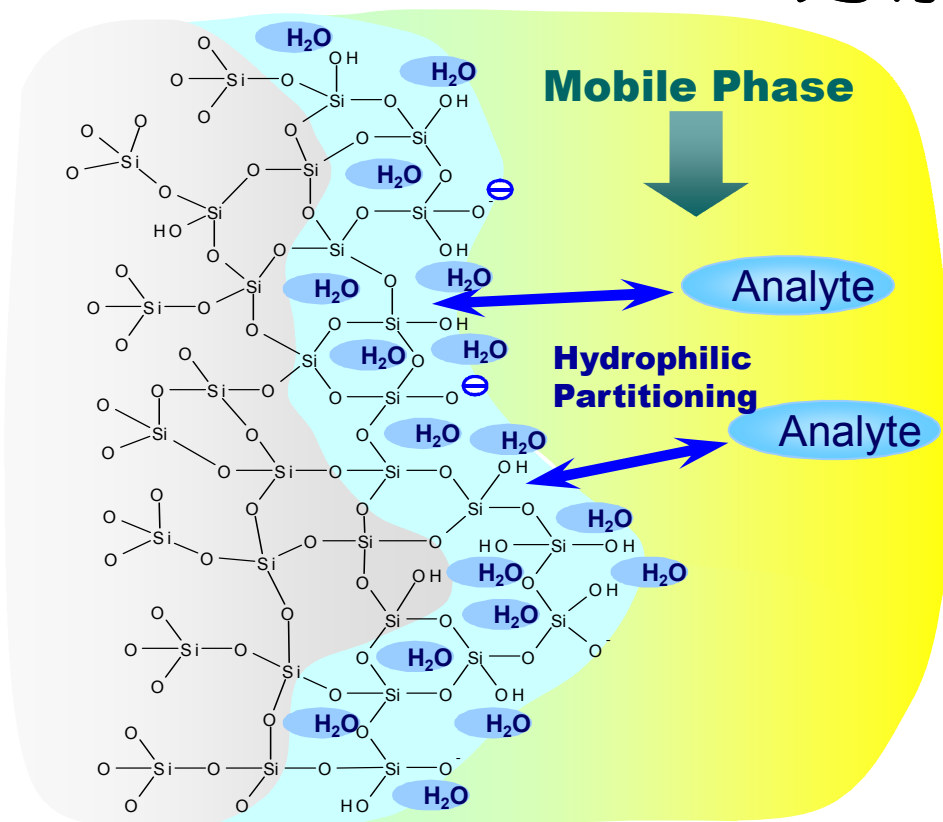
理論段数が低い気が・・・



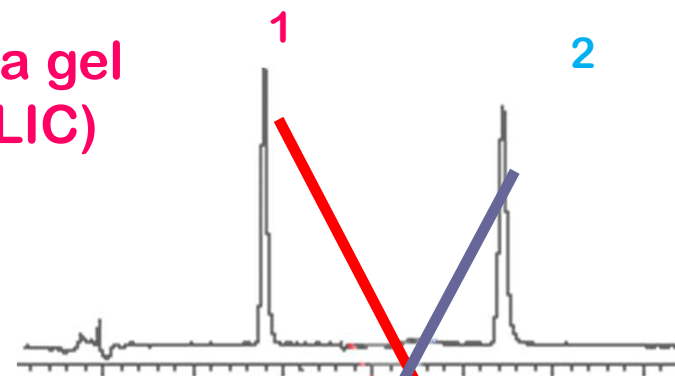
HILICはどうも使いづらい



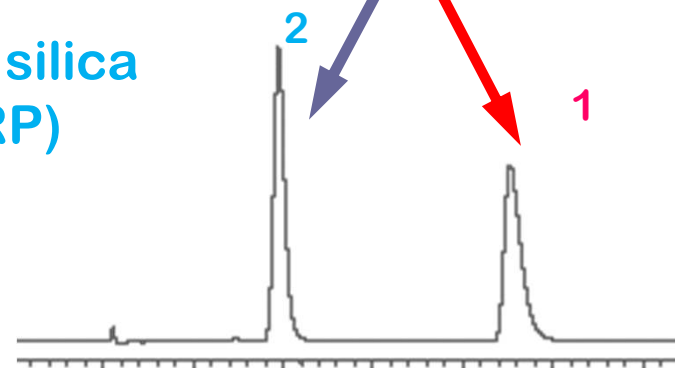
HILICの分離メカニズム



Silica gel
(HILIC)



ODS silica
(RP)



□ HILICの特徴として...

- 逆相系に用いる極性溶媒が使用可能である。
- 固定相に形成された水和層との分配によって分離が起こると言われている。
- 親水性が高い化合物ほど保持される特徴がある。



HILICを使用するうえでの注意点

- 保持が短い・保持がない場合
 - サンプル
 - 移動相もしくは水割合が低い溶媒で調整する
 - 移動相
 - 有機溶媒の割合を増やす
 - 塩の濃度を上げる、塩の種類を変える
- 理論段数が低い場合
 - サンプル
 - 負荷量を減らす
 - 移動相
 - 流速を遅くする

逆相クロマトグラフィーと比べ、試料中の溶媒(水)の影響を大きく受ける傾向がある
最適流速も逆相クロマトグラフィーより、低速になる傾向がある



いざ使用してみると・・・



保持時間の再現性が・・・



インジェクションによるベースラインの乱れ



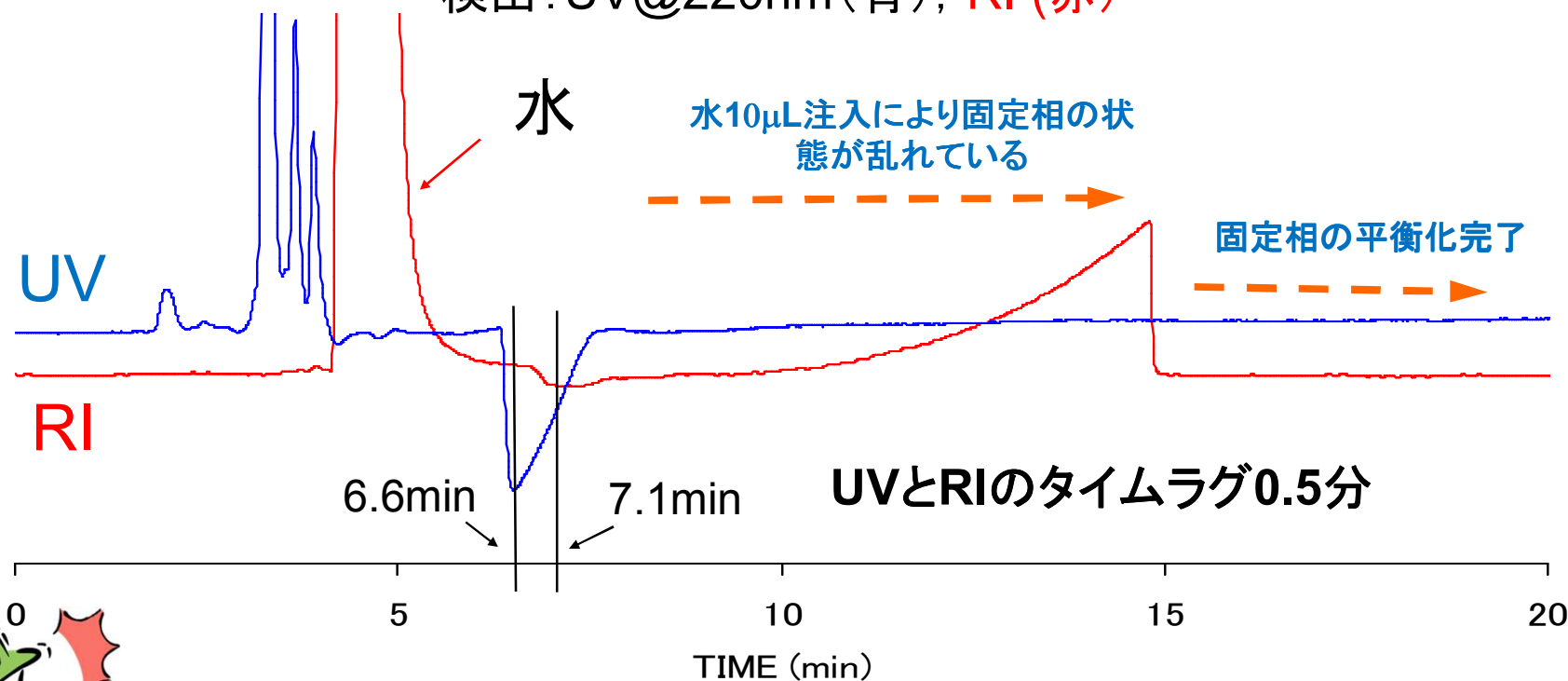
UVで見てるけどそんなことはないけど



水10 μ L注入時のヒリックカラムのクロマトグラム

移動相: 5mM酢酸アンモニウム/アセトニトリル(20:80)

検出: UV@220nm (青), RI (赤)



UVでは観察できないベースラインの変化が起きている!!



いざ使用してみると・・・



カラム間の再現性が・・・



移動相の使用履歴の違いが原因



逆相ではそんなことなかったけど・・・



手順

acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15

— 平衡化
— プリン体分析

acetonitrile : 20 mM phosphate buffer (pH6.8) =85:15

— 平衡化

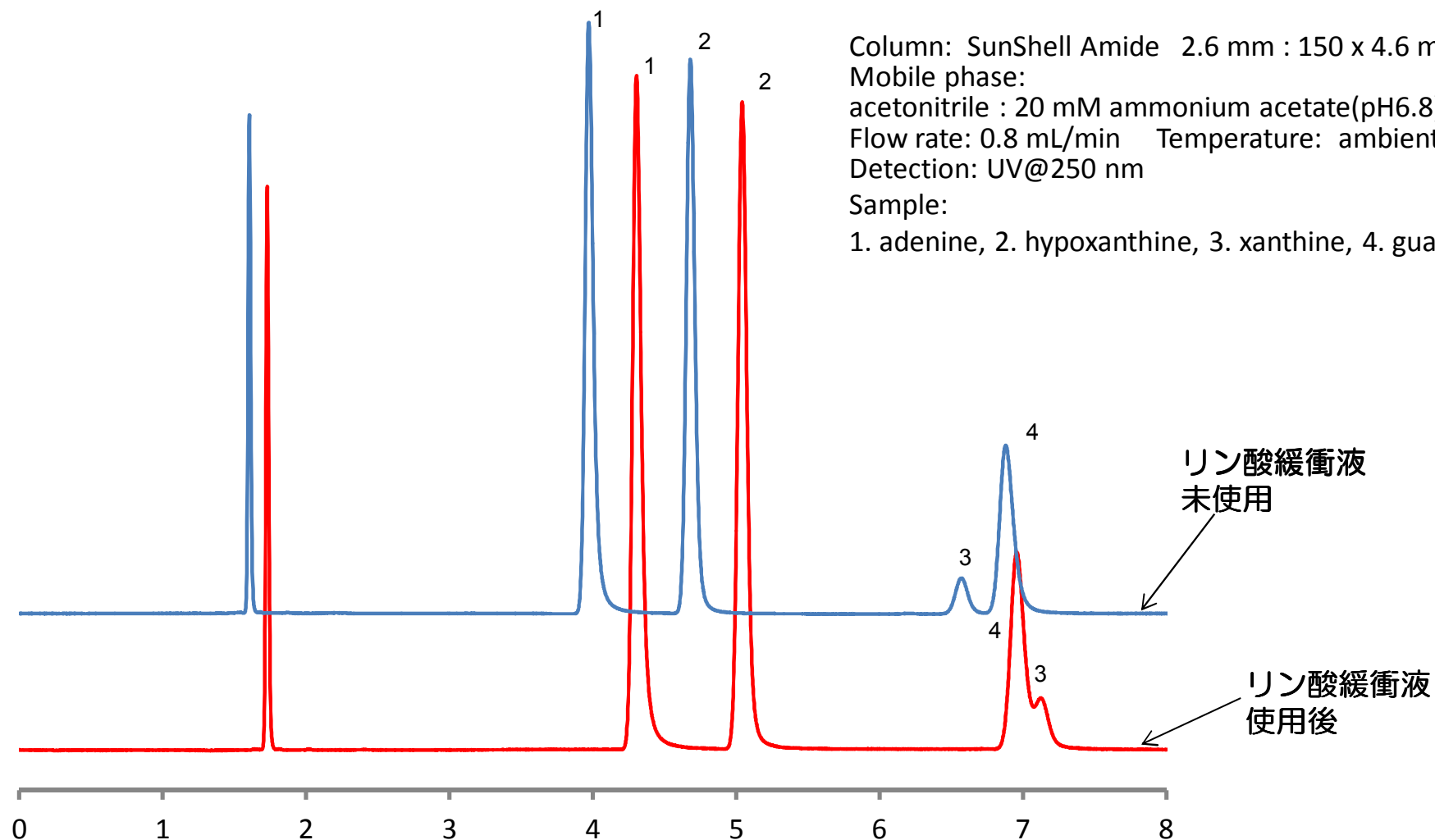
acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15

— 平衡化
— プリン体分析



移動相の使用履歴の影響

Column: SunShell Amide 2.6 mm : 150 x 4.6 mm,
Mobile phase:
acetonitrile : 20 mM ammonium acetate(pH6.8) =85:15
Flow rate: 0.8 mL/min Temperature: ambient
Detection: UV@250 nm
Sample:
1. adenine, 2. hypoxanthine, 3. xanthine, 4. guanine



移動相の使用履歴によってはその影響が
強く残り分離が変わることがある



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べ、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に保持や負荷量に差があり、その差は大きい。
- ✓ HILICモードで分析を行う場合、一般的な逆相モードより、サンプルの調整等、注意が必要な点が多い
- ✓ HILICモードで連続分析を行う場合、インジェクションによるベースラインの乱れを考慮する必要がある