

第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム P-15

5種類のコアシェル(ソリッドコア)型 C18充填剤の分離および物性の評価

○長江徳和，塚本友康
株式会社クロマニックテクノロジーズ
Email: info@chromanik.co.jp
[Http://chromanik.co.jp](http://chromanik.co.jp)

コアシェル型シリカの歴史

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 μm の核に厚さ0.5 μm の多孔質層

1967・1968年に基本特許は出願されている。

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 μm の核に厚さ0.5 μm 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sub2 μm 充填剤に匹敵する充填剤 - 直径1.7 μm の核に厚さ0.5 μm の多孔質層(細孔径9nm)



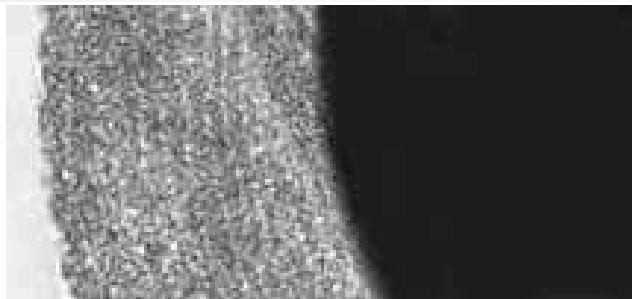
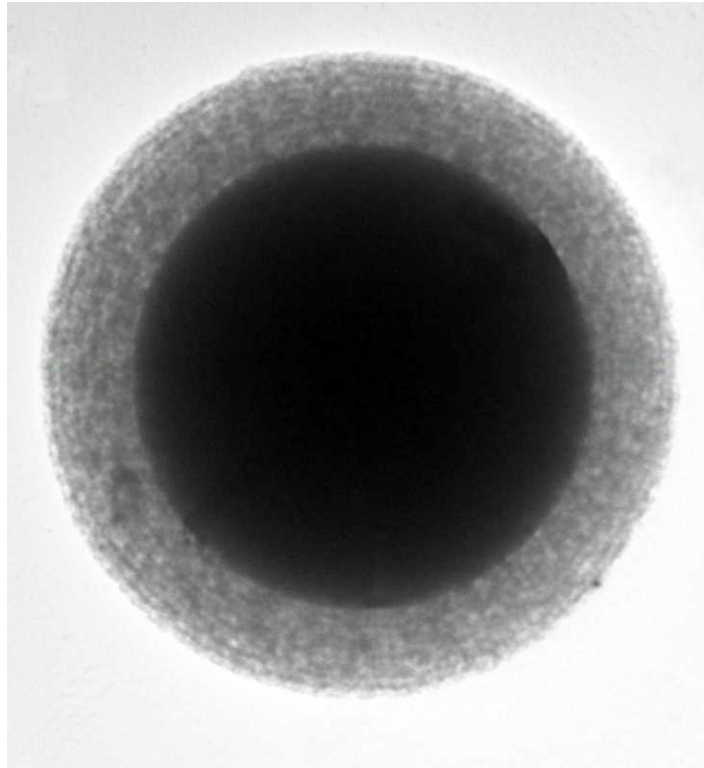
• Fused-Core technology was developed by Jack Kirkland.

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

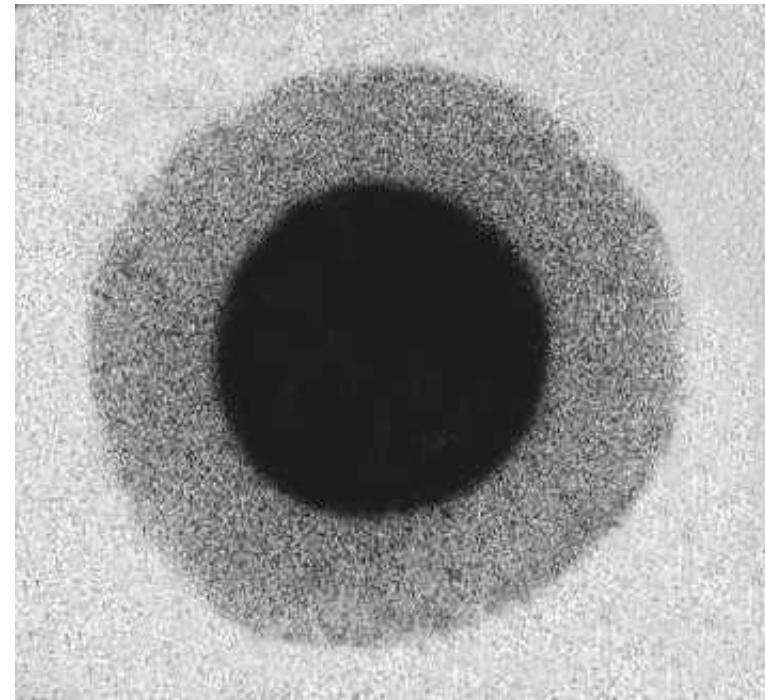
(2) J.J. Kirkland, T.J. Langlois, and J.J. DeStefano, Am. Lab. 39, 18-21 (2007).

2007年に微小粒子の製造法の特許が出願された。

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

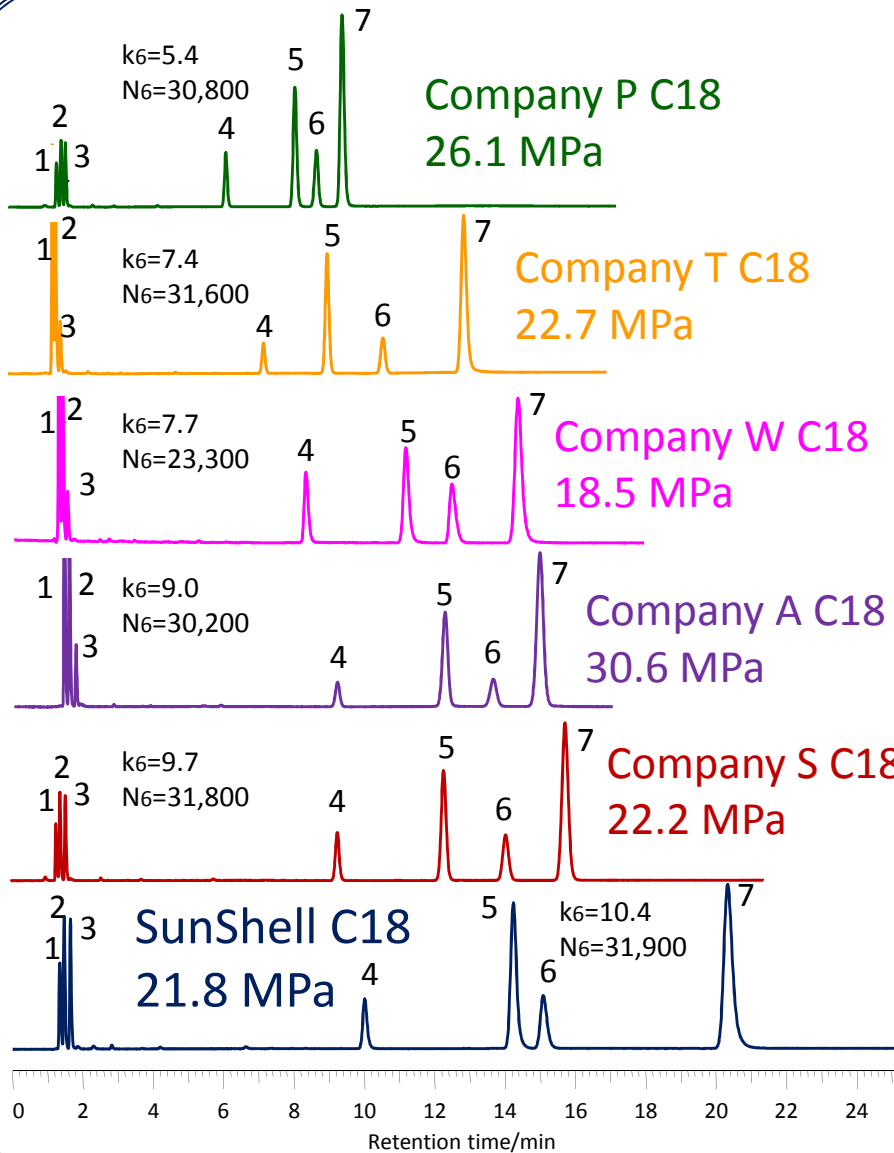


モノレイヤー(単層)多孔質構造

市販されているコアシェルカラム と評価したカラム(赤字)

- **Accucore C18 (T)**
- Aeris PEPTIDE XB-C18
- Amplus C18-30
- **Ascentis Express C18 (S)**
- BIOShell
- Brownlee SPP C18
- BlueShell C18
- **Capcell Core C18 (W)**
- CORTECS C18
- COSMOCORE C18
- HALO C18
- **Kinetex C18 (P)**
- Meteoric Core C18
- NUCLEOSHELL C18
- **Poroshell C18 EC (A)**
- Raptor ARC18
- SpeedCore C18
- **SunShell C18**
- Ultra Core C18
- Coresep 100

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: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=75/25$

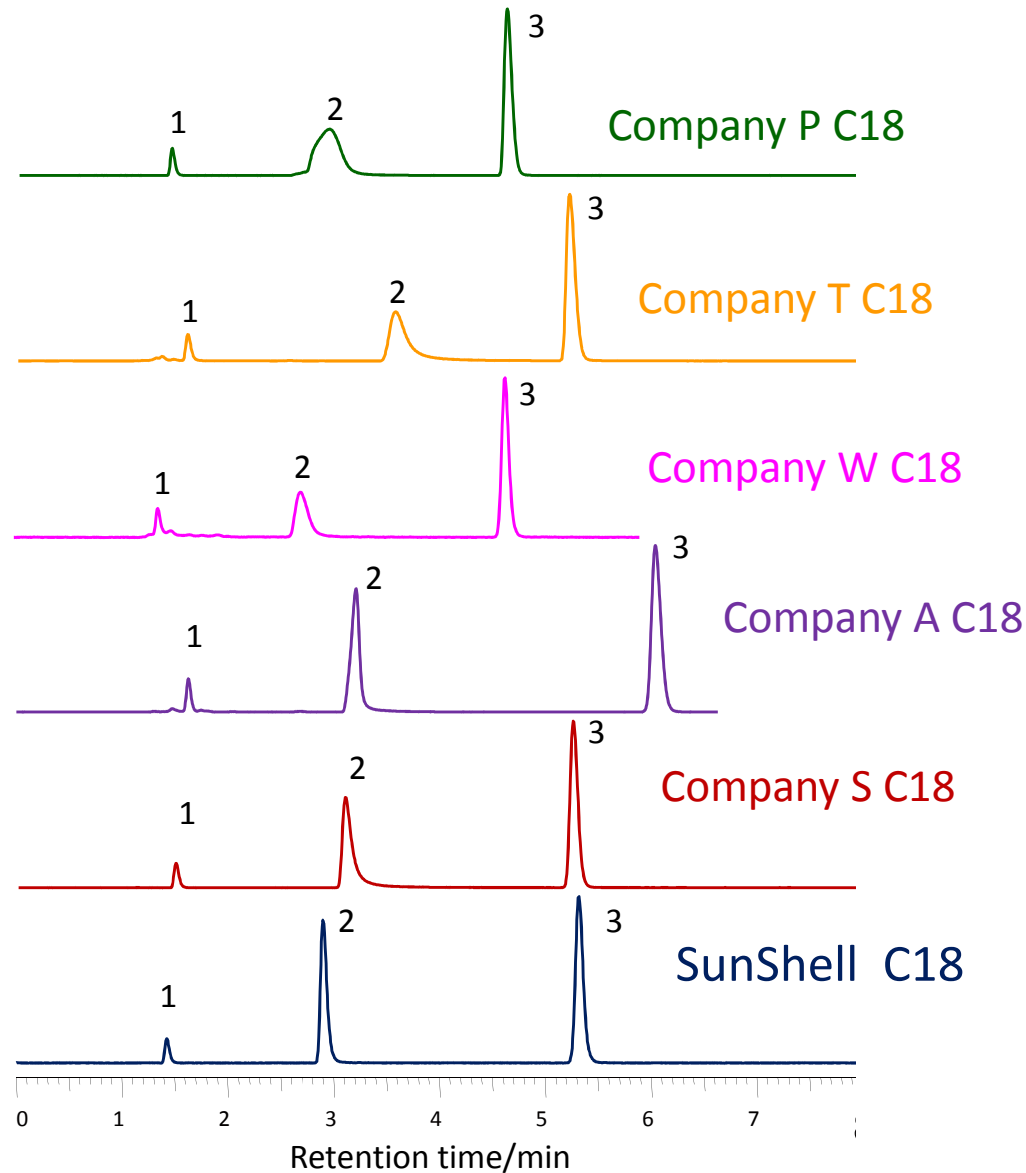
Flow rate: 1.0 mL/min

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

ピリジンピークの比較



Column:

- Company P C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Company T C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Company W C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- Company A C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- Company S C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=30/70$

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 $^\circ\text{C}$

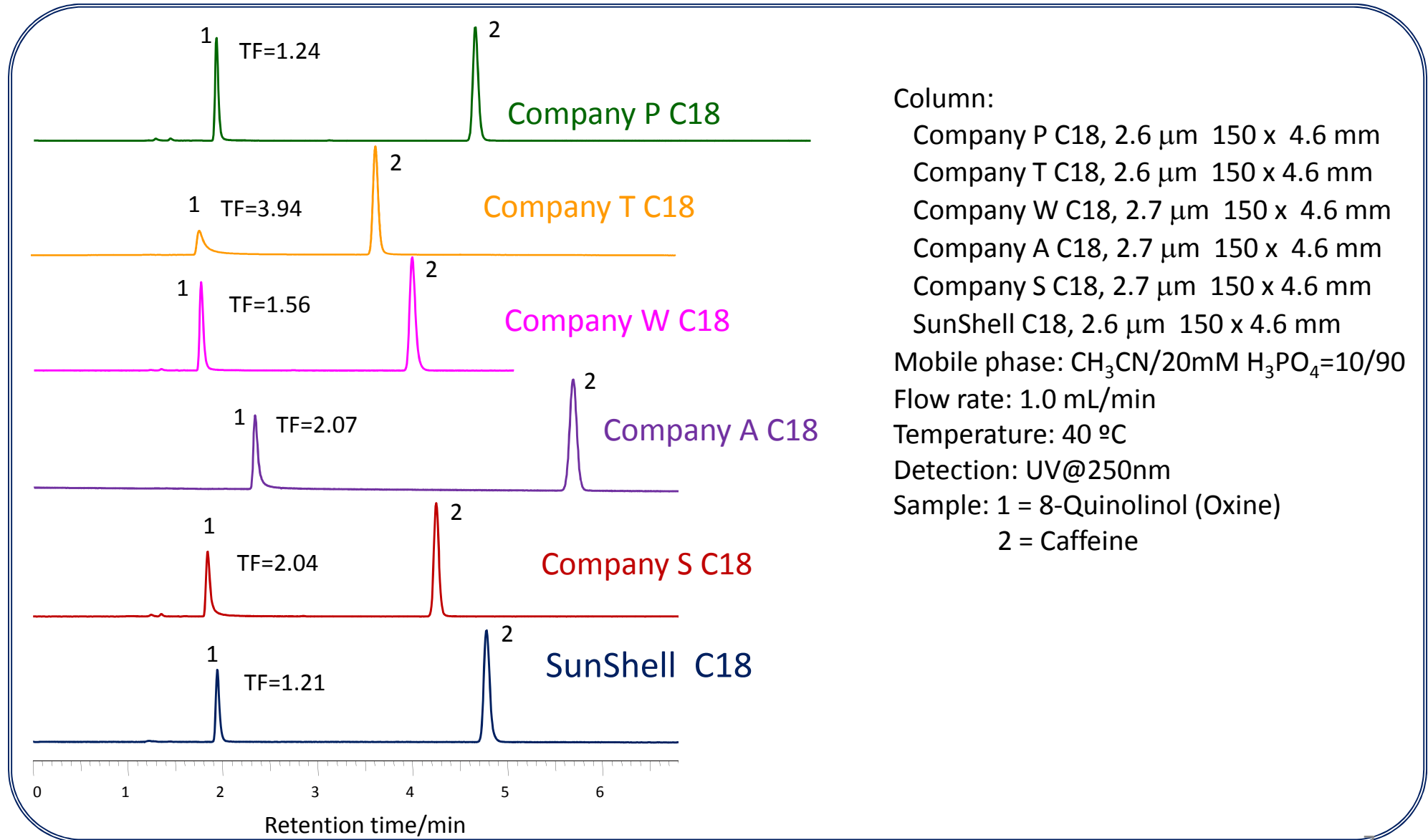
Detection: UV@250nm

Sample: 1 = Uracil

2 = Pyridine

3 = Phenol

金属配位性化合物オキシンの比較



Column:

- Company P C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Company T C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Company W C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- Company A C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- Company S C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/20\text{mM H}_3\text{PO}_4=10/90$

Flow rate: 1.0 mL/min

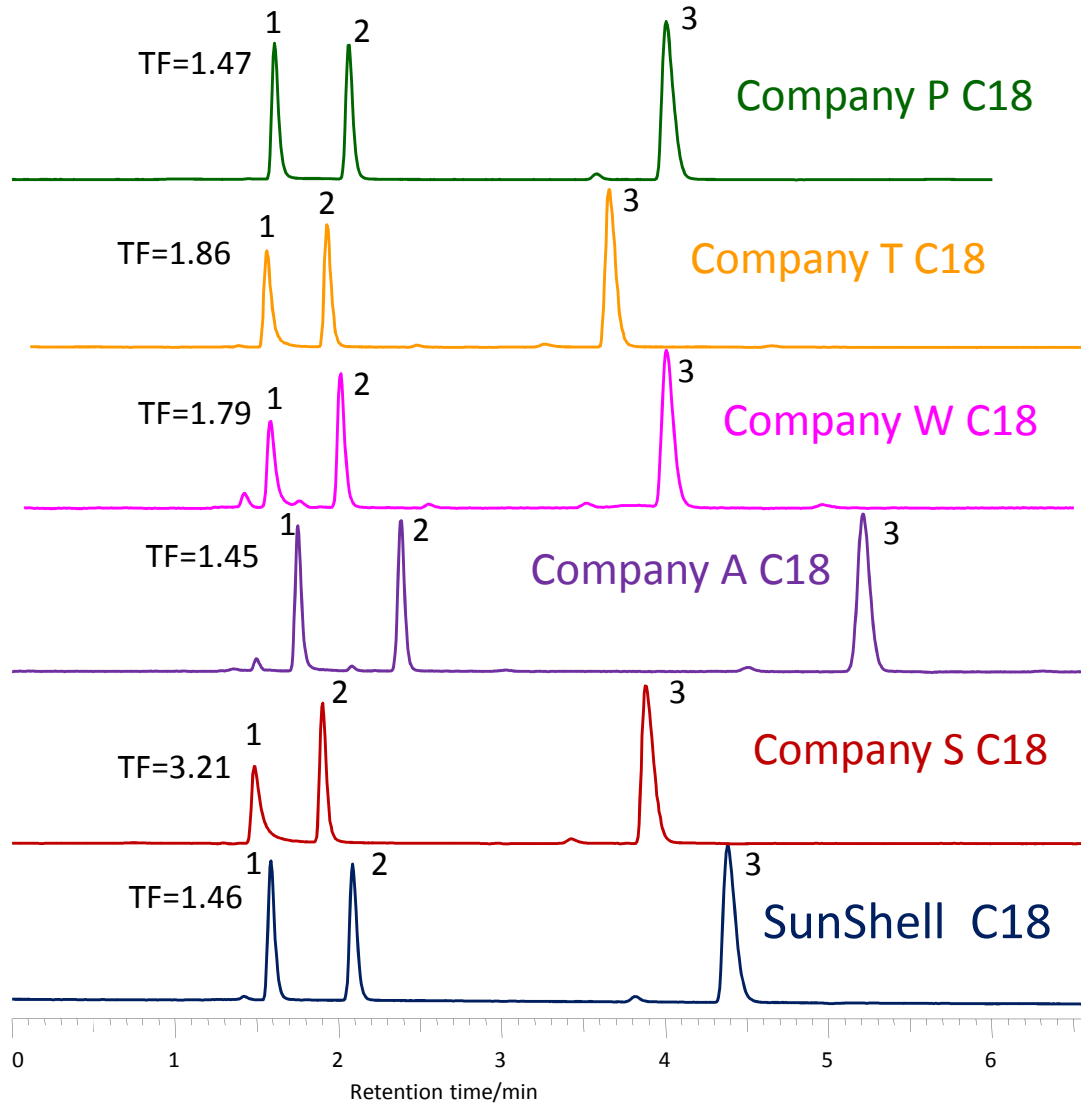
Temperature: 40 $^\circ\text{C}$

Detection: UV@250nm

Sample: 1 = 8-Quinolinol (Oxine)

2 = Caffeine

ギ酸ピークの比較



Column:

- Company P C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Company T C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Company W C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- Company A C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- Company S C18, 2.7 μm 150 x 4.6 mm
- SunShell C18, 2.6 μm 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

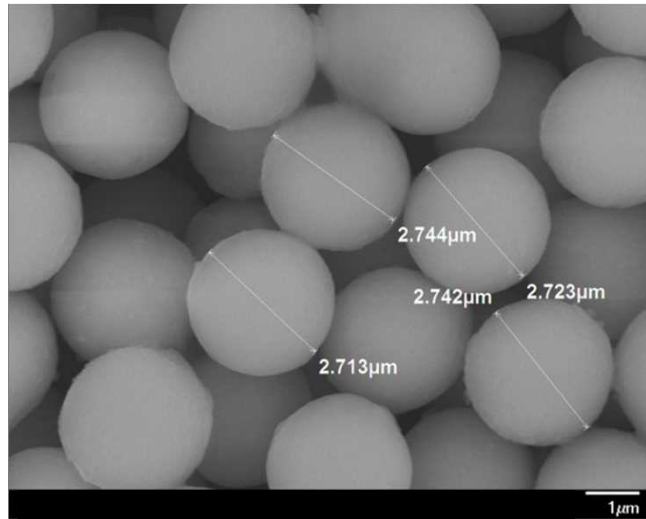
標準試料の分離比較のまとめ

	カラム圧 Pressure ^a	保持指数 Retention ^b	理論段数 Plate ^c	ピリジン Pyridine	オキシシン Oxine	ギ酸 Formic acid	Point
SunShell C18	○21.8	10.4	◎31,900	◎	◎	◎	14
Company S C18	○22.2	9.7	◎31,800	△	△	×	7
Company A C18	×30.6	9.0	◎30,200	◎	△	◎	10
Company W C18	◎18.5	7.7	×23,300	×	○	△	6
Company T C18	○22.7	7.4	◎31,600	×	×	△	6
Company P C18	△26.1	5.4	◎30,800	×	◎	◎	10

- a. Mobile phase; methanol:water=75:25, 40 °C, 1mL/min, 150 x 4.6mm
- b. Retention factor of amylbenzene
- c. Theoretical plate of amylbenzene

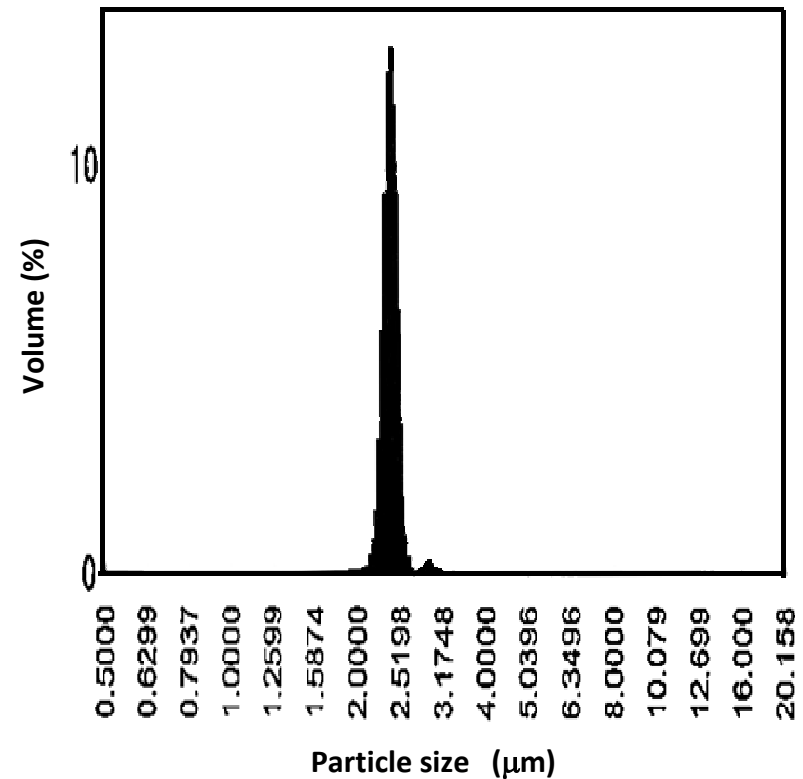
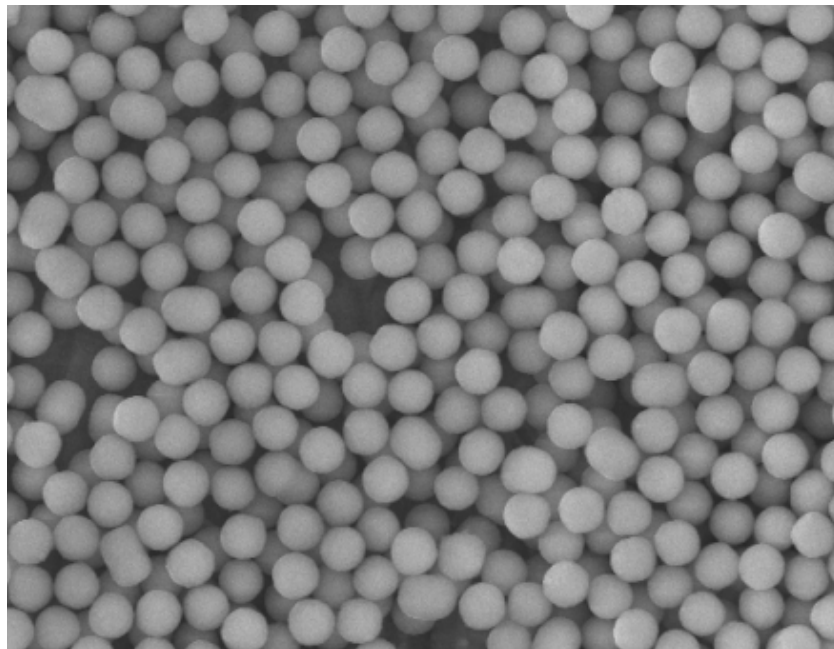
◎: 3 point, ○: 2 point, △: 1 point, ×: 0 point

他社コアシェル粒子の粒度分布

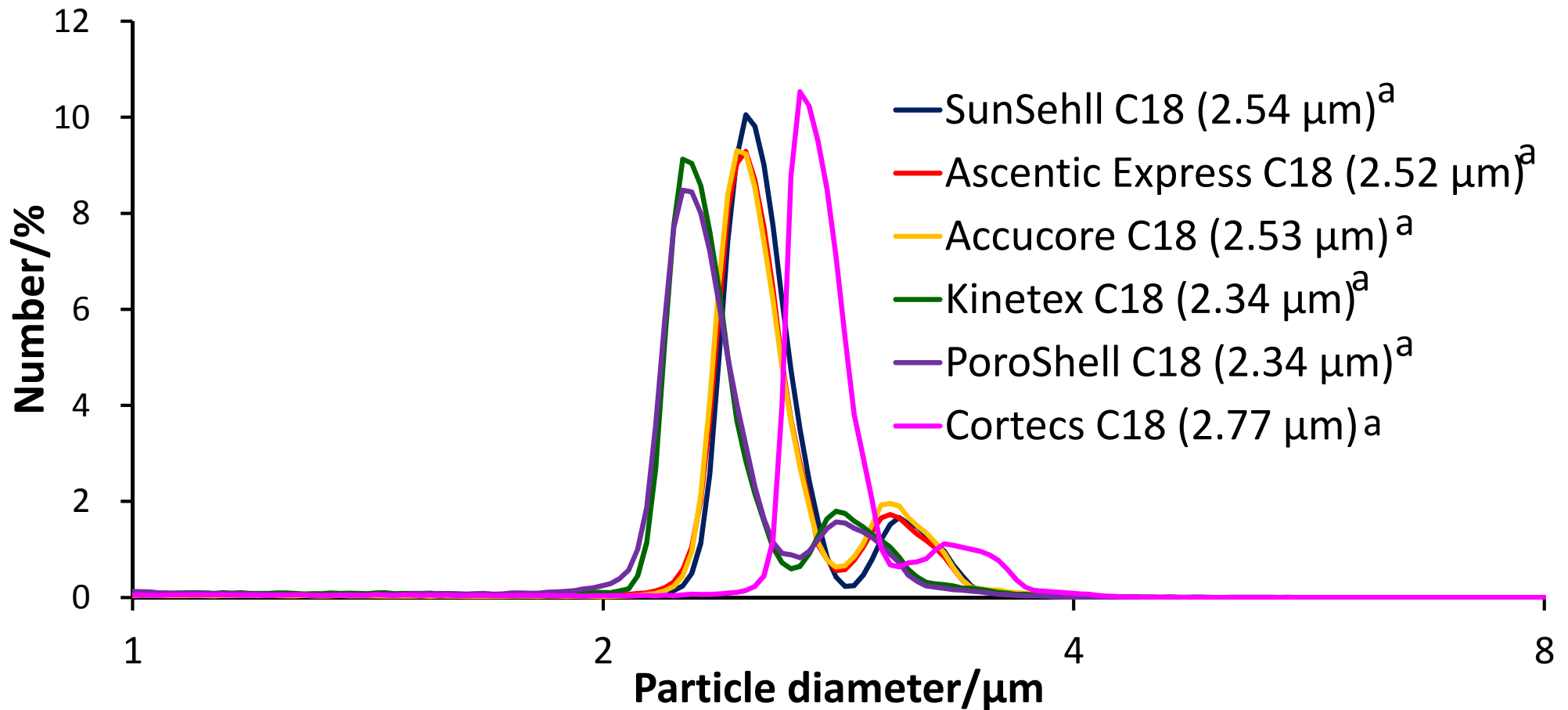


Coulter counter

$$D_{90}/D_{10}=1.12$$



粒度分布



a. 中位径

*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Beckman Coulter Multisizer 3で測定しました。この測定値はオリジナルのコアシェル粒子の値とは異なります。

物性値

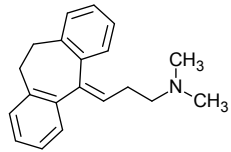
	炭素含有量 Carbon loading (%)	比表面積 Specific surface area ^a (m ² /g)	細孔容積 Pore volume ^a (mL)	細孔径 Pore diameter ^a (nm)
SunShell C18	7.3 (7) ^b	125 (150) ^b	0.261	8.34 (9) ^b
Company S C18	8.0	133 (150) ^b	0.278	8.20 (9) ^b
Company A C18	8.5 (8) ^b	135 (130) ^b	0.414	12.3 (12) ^b
Company T C18	8.8 (9) ^b	130 (130) ^b	0.273	8.39 (8) ^b
Company W C18	7.3 (6.6) ^b	113	0.264	9.32
Company P C18	4.9 (12 effective) ^b	102 (200 effective) ^b	0.237	9.25 (10) ^b

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。

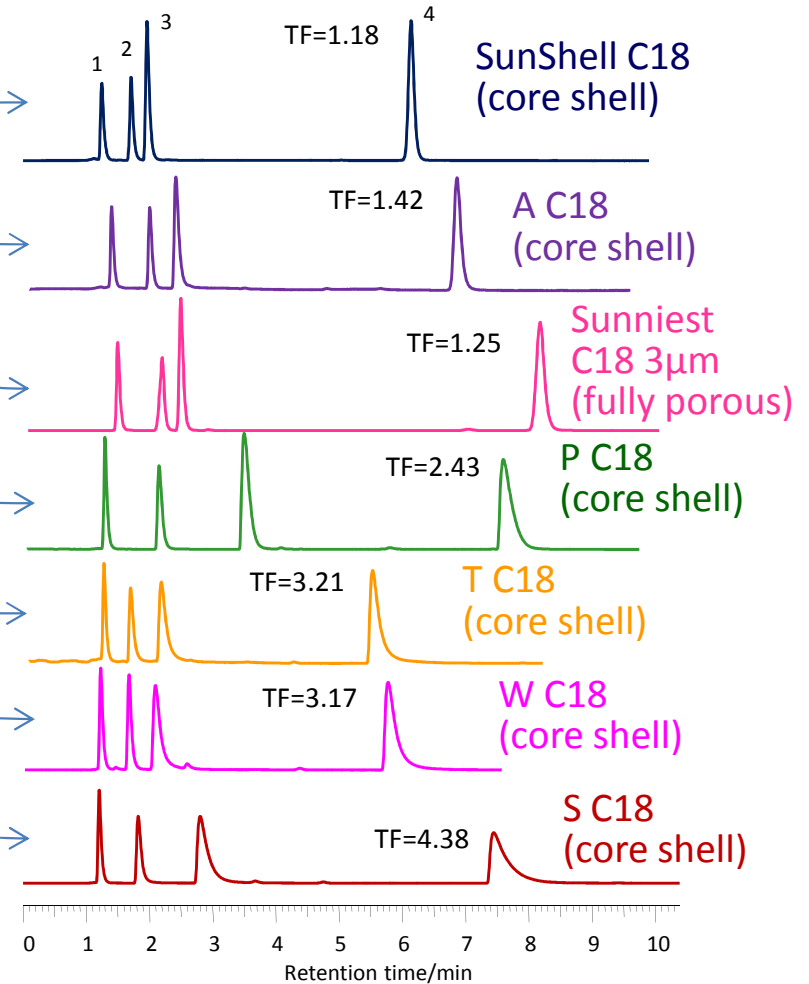
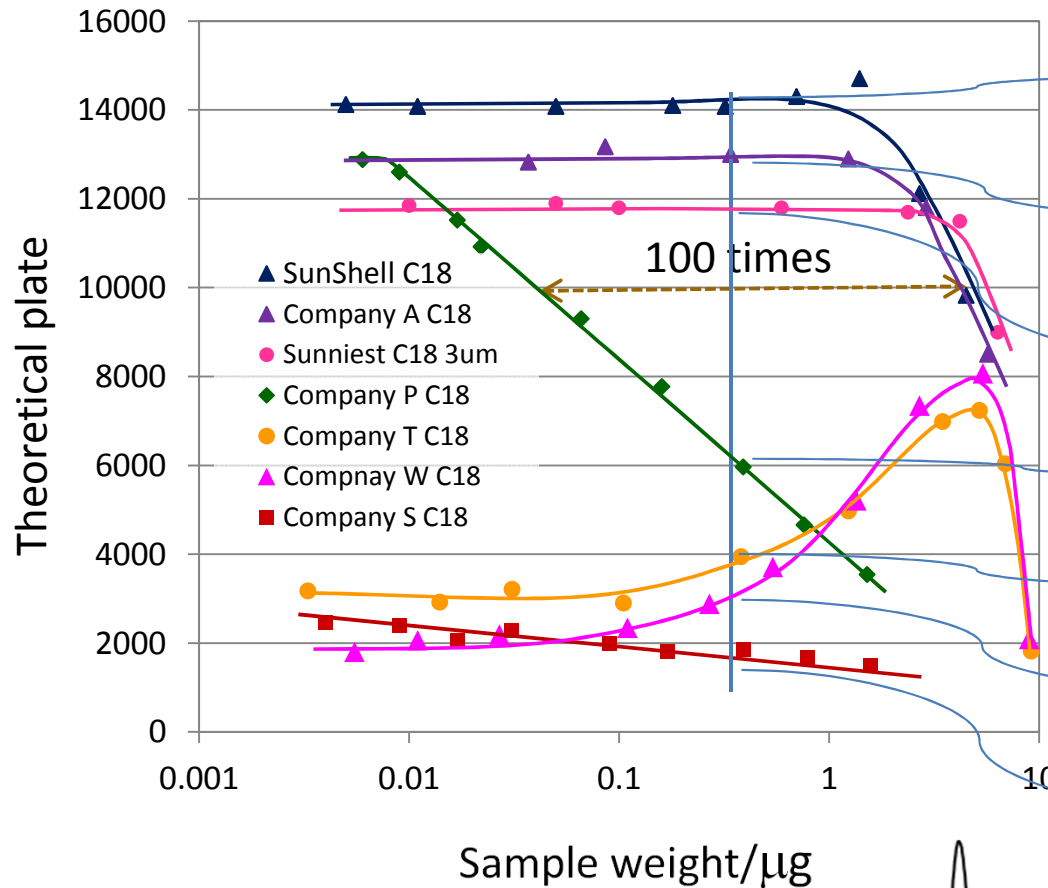
b. カタログに記載されている値

*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。

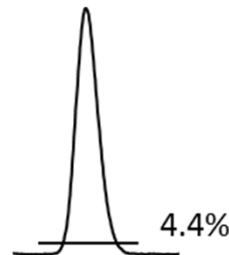
アミトリプチリンの負荷量比較 I



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。

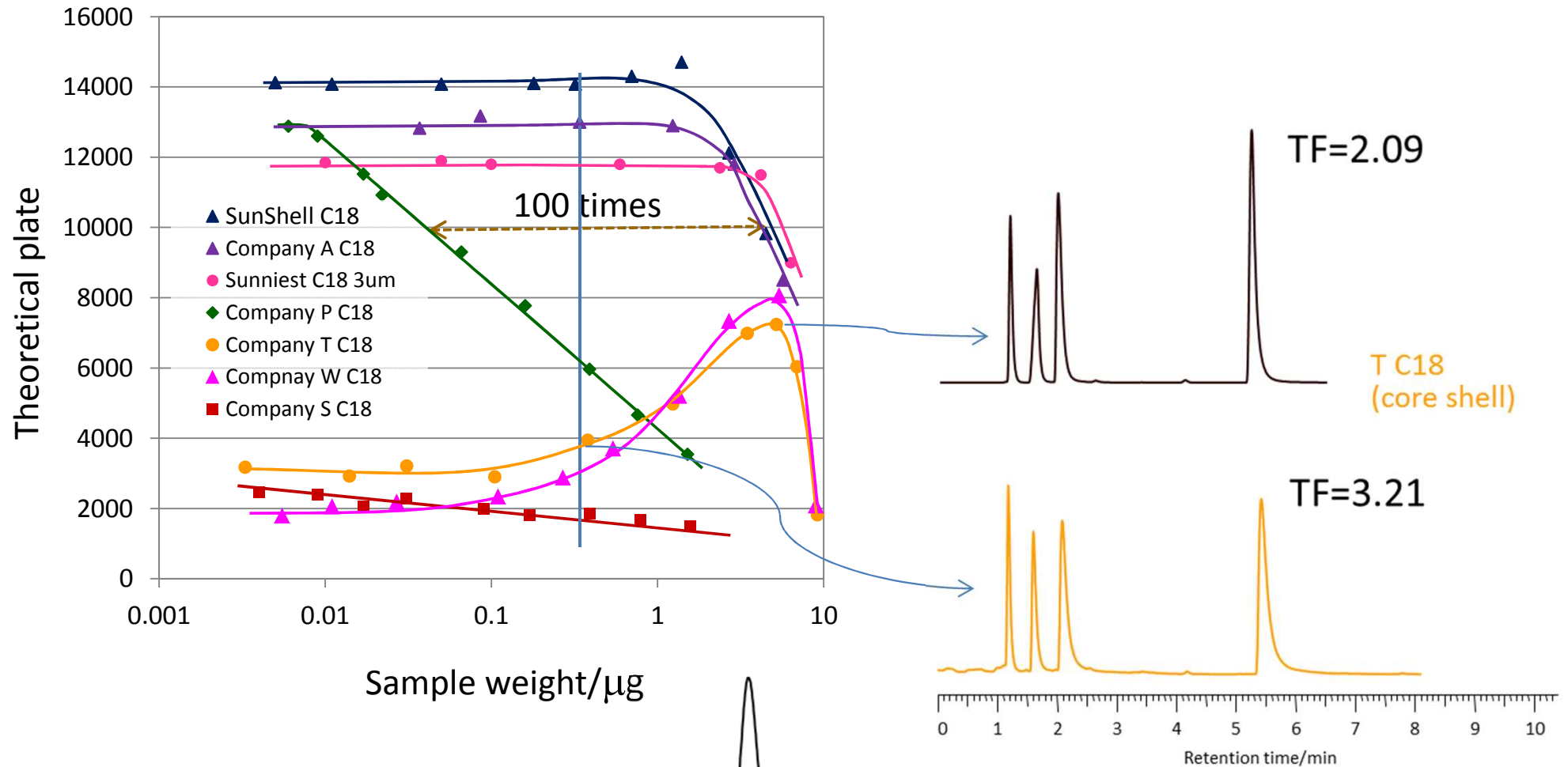


Sample: 1=Uracil, 2=Propranolol, 3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline

アミトリプチリンの負荷量比較 I

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

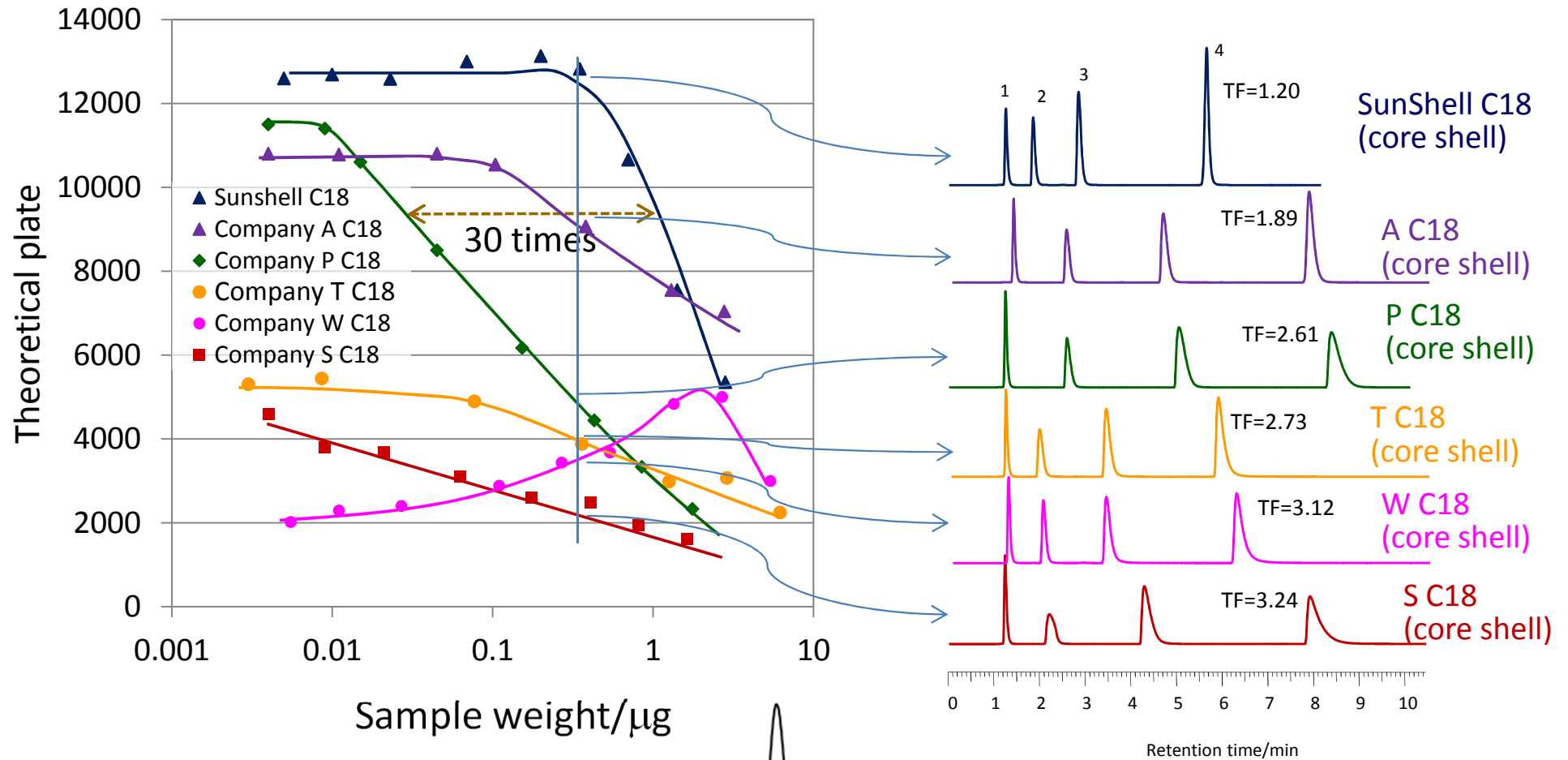


理論段数はピークの高さの4.4%のピーク幅を用いる5シグマ法を用いました。

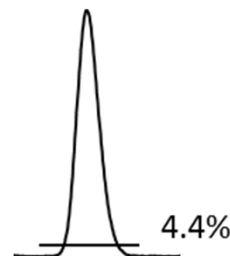
Sample: 1=Uracil, 2=Propranolol, 3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline

アミトリプチリンの負荷量比較 II

Mobile phase: Acetonitrile/**10mM ammonium acetate pH6.8**=(40:60)
 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。

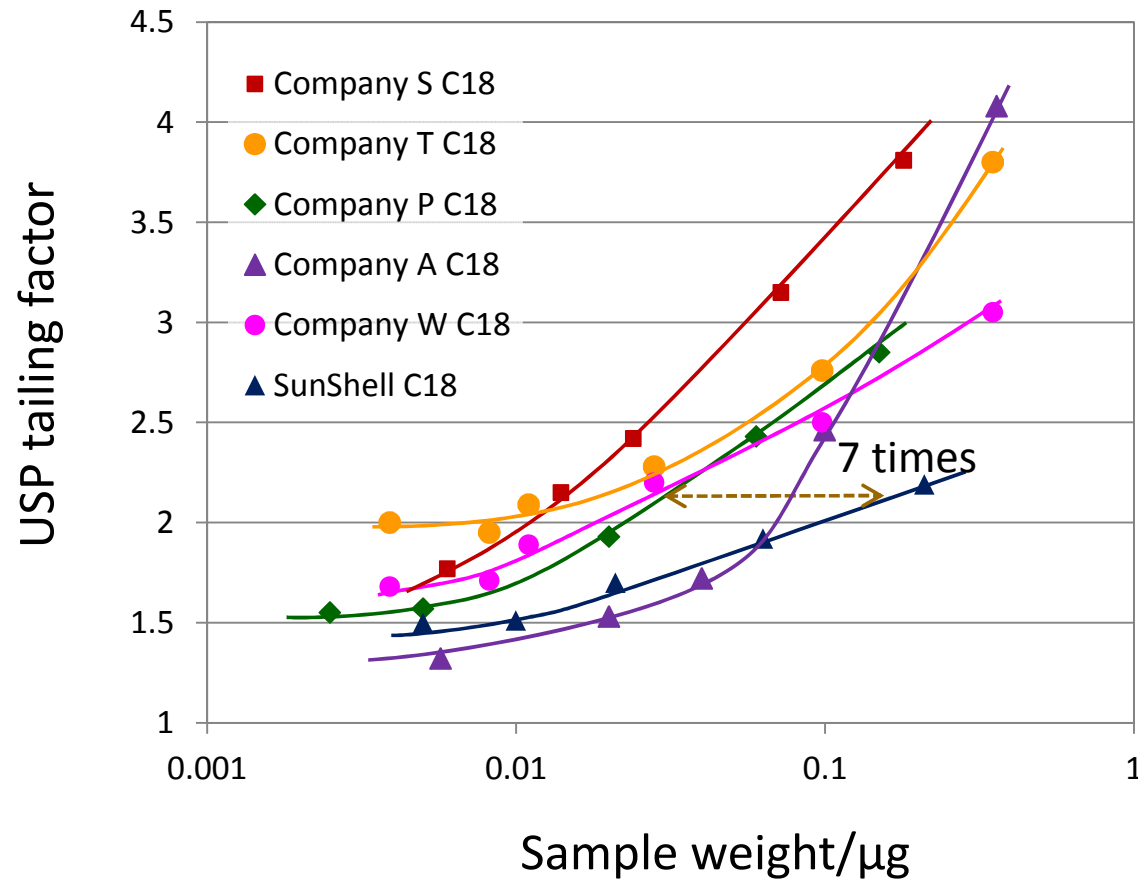


Sample: 1=Uracil, 2=Propranolol, 3= Nortriptyline, 4=Amitriptyline

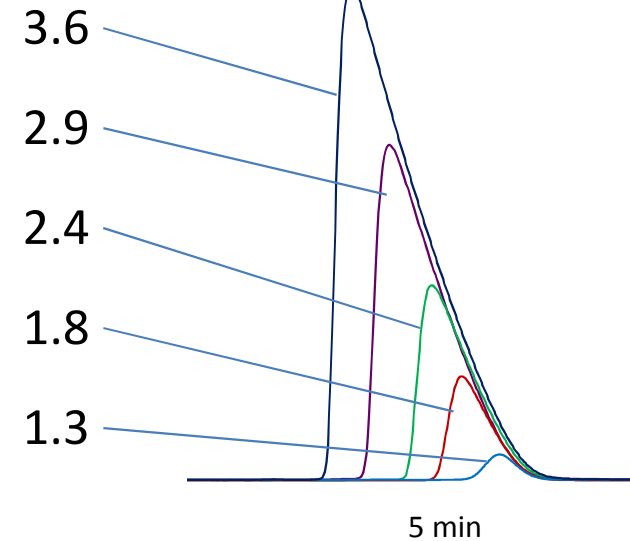
アミトリプチリンの負荷量比較 III

Mobile phase: Acetonitrile/**0.1% formic acid**=(30:70)

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

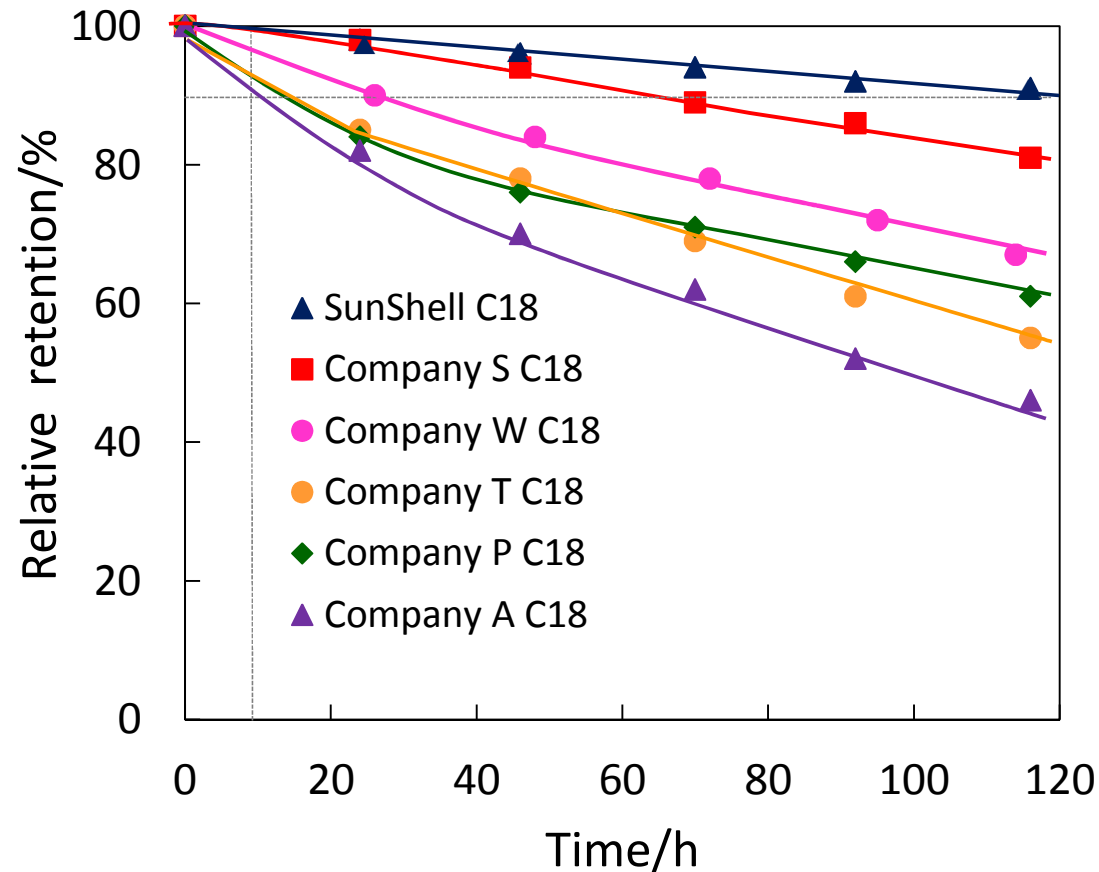


USP tailing factor



アセトニトリル/0.1%ギ酸移動相を用いるような、酸性でイオン強度の低い条件ではアミトリプチリンの負荷量は極端に低くなり、過負荷量では上図のようにテーリングを示すようになります。

酸性条件での耐久性 (加速試験)

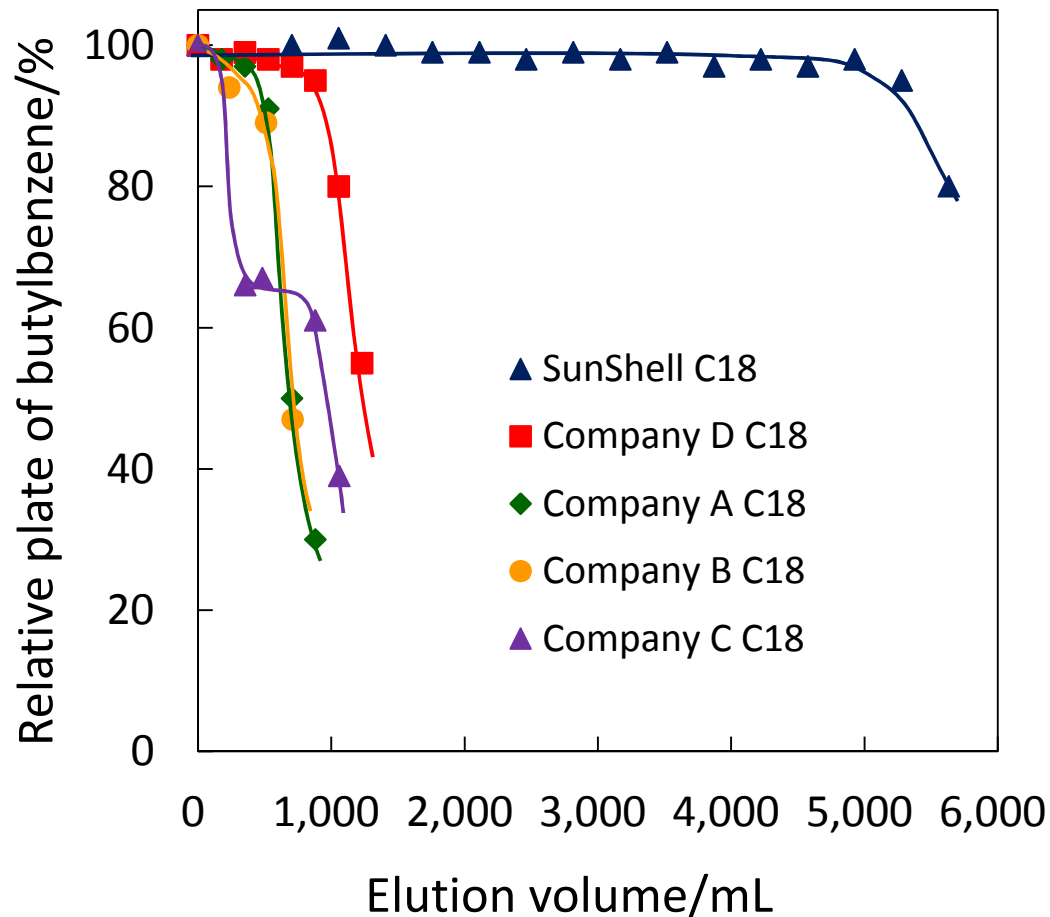


Durable test condition
 Column size: 50 x 2.1 mm
 Mobile phase: CH₃CN/1.0% TFA,
 pH1=10/90
 Flow rate: 0.4 mL/min
 Temperature: 80 °C

Measurement condition
 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

加速試験としてpH1で80°Cの条件を用いました。疎水性試料のブチルベンゼンの保持が90%に減少することは、酸によりアルキル基が10%脱離することを意味しています。この10%のアルキル基の脱離でカラム劣化を判断しますとSunShell C18は他社のC18に比べ、2倍から10倍の耐久性を示しました。

アルカリ性条件での耐久性



Durable test condition
 Column size: 50 x 2.1 mm
 Mobile phase:
 CH₃OH/20mM Sodium borate/10mM NaOH=30/21/49 (pH10)

Flow rate: 0.4 mL/min
 Temperature: 50 °C

Measurement condition
 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

有機溶媒の濃度が30%と比較的低く、pH 10で50°Cのアルカリ性条件での耐久性を比較しました。アルカリ性条件下ではシリカが溶け出すため、カラムの入口側がへこみ、段数が低下します。SunShell C18は他社C18の5倍から10倍の耐久性を示しました。

耐久性のまとめ

	酸性条件 pH 1	アルカリ性 pH 10	カタログに記載のpH 範囲
SunShell C18	◎	◎	1.5 - 10
Company S C18	○	○	2 - 9
Company W C18	△	not tested	2 - 8
Company A C18	△	△	2 - 9
Company T C18	△	△	1 - 11
Company P C18	△	△	1.5 - 10

まとめ

- ✓ 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ピーク形状に大きな差がある。
- ✓ カタログ値はあくまでも参考値であり，実際の測定値と大きくずれる場合がある。特に炭素含有量，比表面積や，使用pH範囲は要注意である。
- ✓ カラム圧は粒子径に依存し，カラム圧の高い充填剤は測定された粒子径も小さい値であった。
- ✓ SunShell C18は保持が大きく，酸性/塩基性・金属配位性化合物のピーク形状も良く，最も高い耐久性を示した。