

JASIS 2013

# コアシエルカラム, メーカー間の差はあるの？

## 1社のカラムのみで評価したら大失敗！

長江徳和

株式会社クロマニックテクノロジーズ

Email: [info@chromanik.co.jp](mailto: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年にカーランドらにより発表<sup>1</sup>, 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 $30\text{nm}$ )

2007年三度カーランドらにより発表<sup>2</sup>, 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 $9\text{nm}$ )

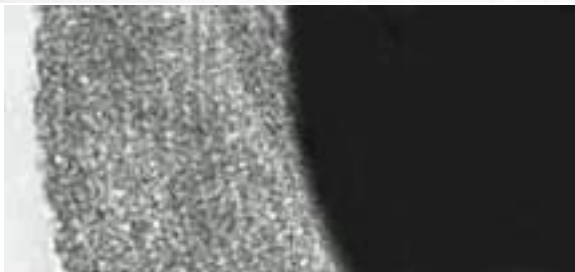
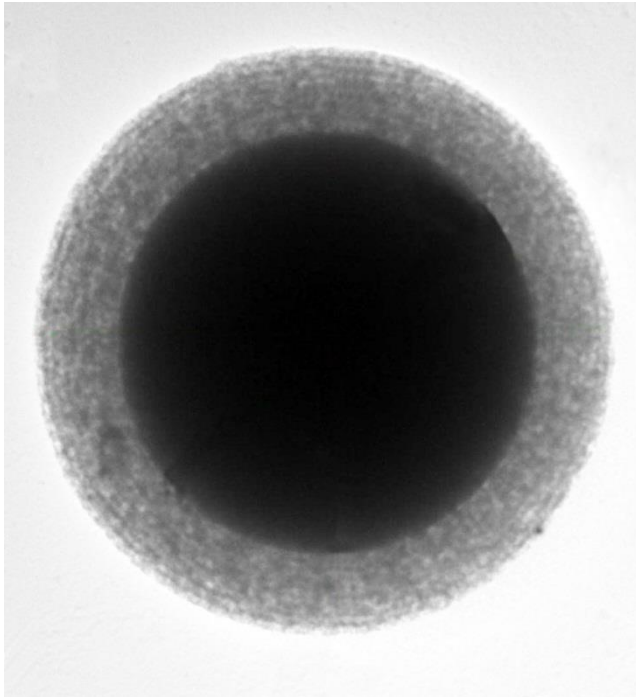
(1) J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks, and G.S. Engel, J. Chromatogr., A 890, 3–13 (2000).

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

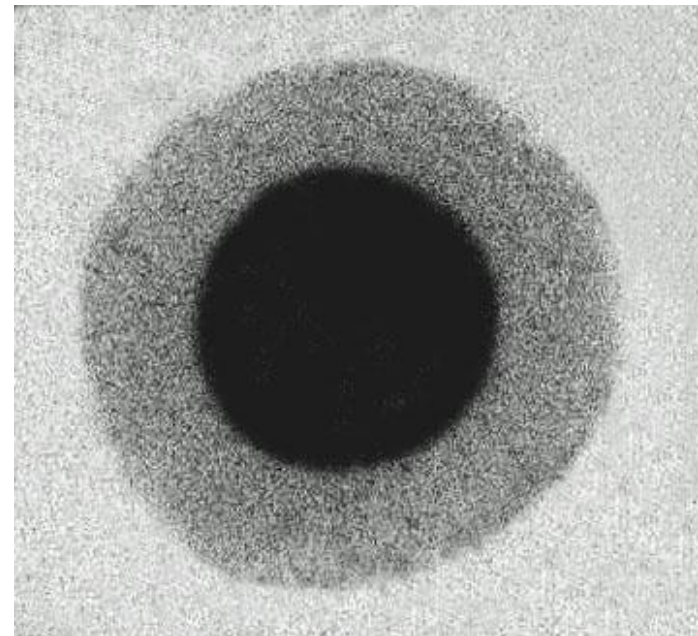


• Fused-Core technology was developed by Jack Kirkland.

# 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



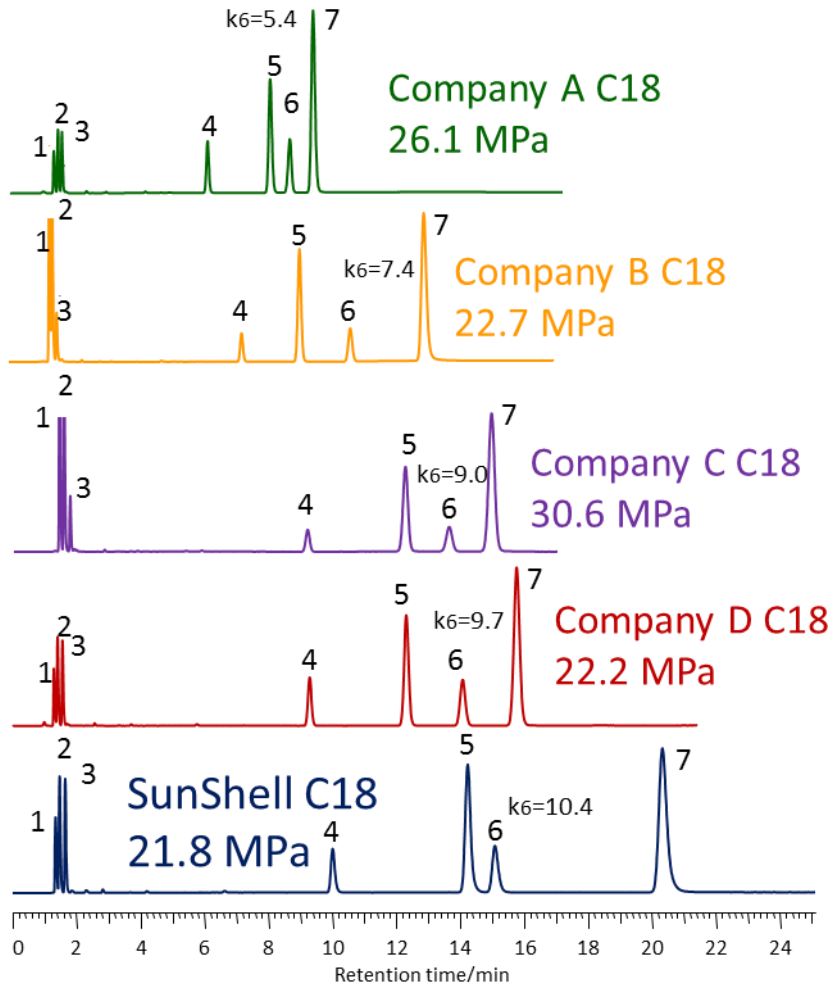
モノレイヤー(単層)多孔質構造

# 5種類のコアシェル型C18の比較

## 比較したカラム

1. Kinetex C18, 2.6  $\mu\text{m}$
2. Accucore C18, 2.6  $\mu\text{m}$
3. PoroShell C18 EC, 2.7  $\mu\text{m}$
4. Ascentis Express C18, 2.7  $\mu\text{m}$
5. SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$

# 標準試料の分離比較



Column:

Company A C18, 150 x 4.6 mm (26.1 MPa)

Company B C18, 150 x 4.6 mm (22.7 MPa)

Company C C18, 150 x 4.6 mm (30.6 MPa)

Company D C18, 150 x 4.6 mm (22.2 MPa)

SunShell C18, 150 x 4.6 mm (21.8 MPa)

Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=75/25

Flow rate: 1.0 mL/min

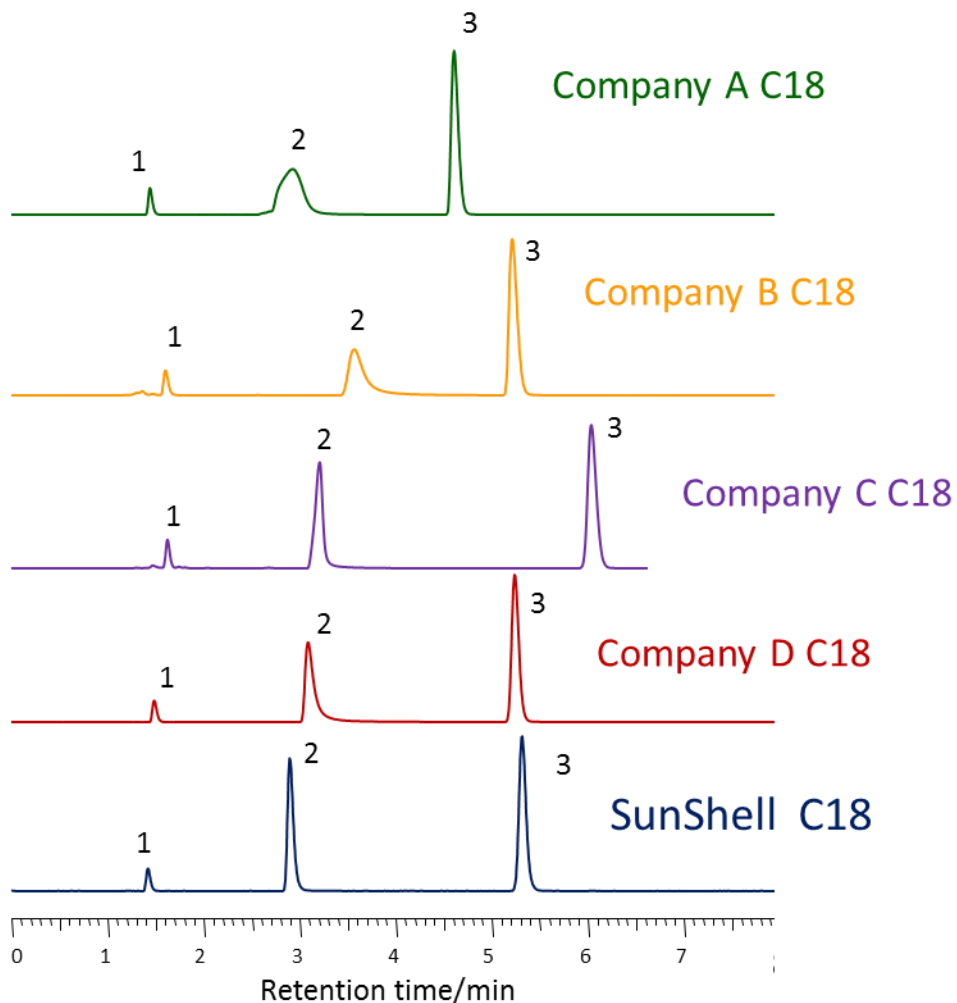
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine, 3 = Phenol, 4 = Butylbenzene

5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene, 7 = Triphenylene

	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/o-Terphenyl)
Company A C18	0.48	1.54	1.20
Company B C18	0.35	1.56	1.50
Company C C18	0.42	1.57	1.25
Company D 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 A C18, 150 x 4.6 mm

Company B C18, 150 x 4.6 mm

Company C C18, 150 x 4.6 mm

Company D C18, 150 x 4.6 mm

SunShell C18, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=30/70

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

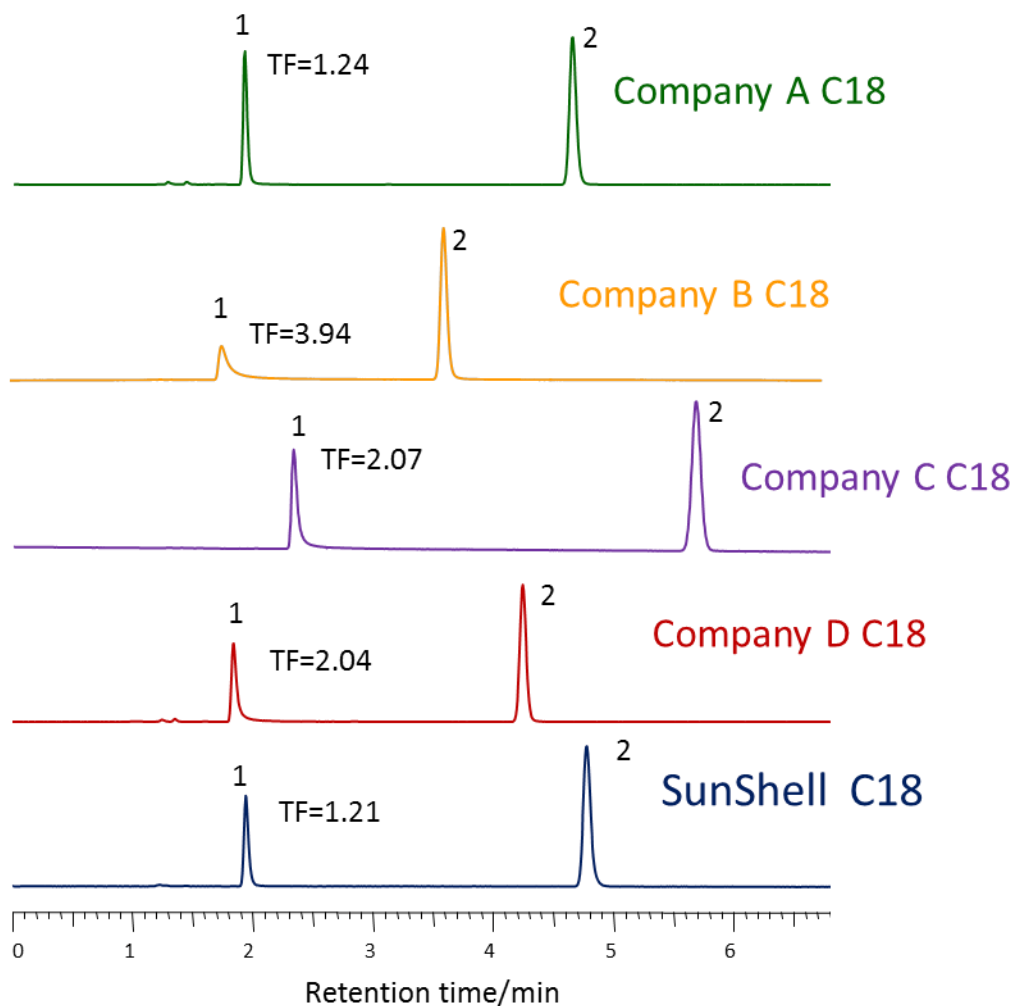
Detection: UV@250nm

Sample: 1 = Uracil

2 = Pyridine

3 = Phenol

# 金属配位性化合物オキシンの比較



Column:

Company A C18, 150 x 4.6 mm

Company B C18, 150 x 4.6 mm

Company C C18, 150 x 4.6 mm

Company D C18, 150 x 4.6 mm

SunShell C18, 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

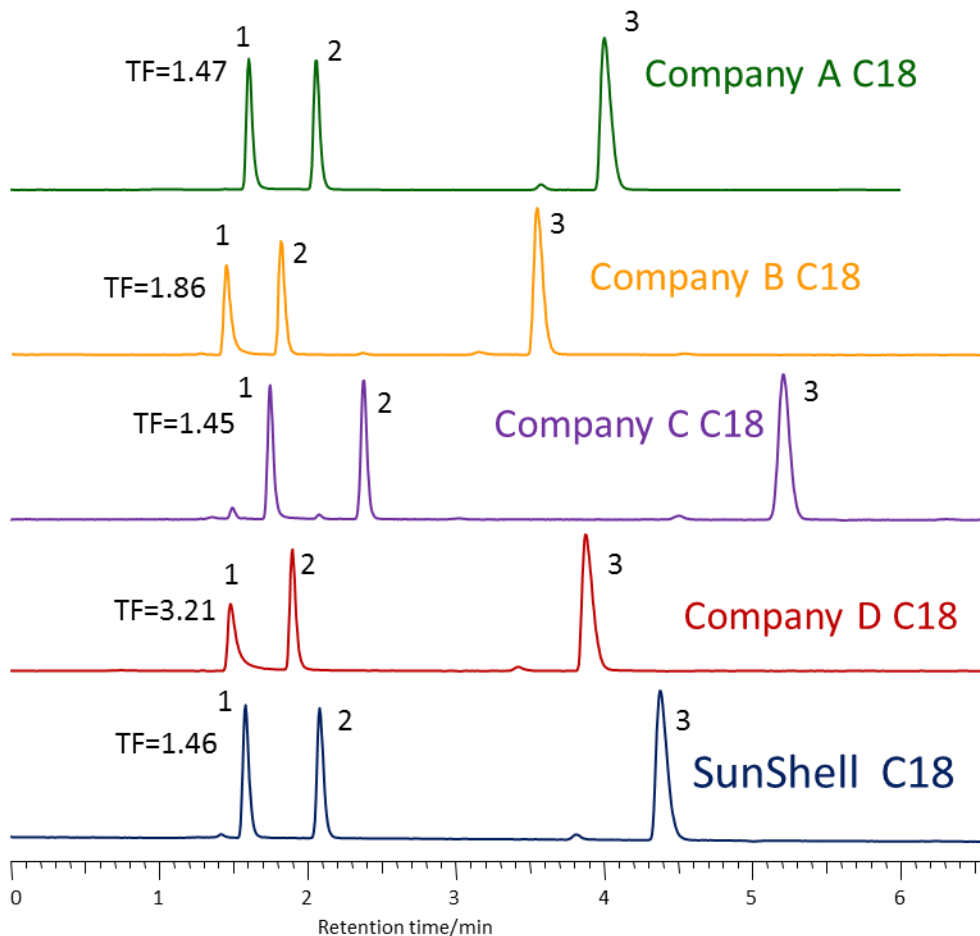
Temperature: 40 °C

Detection: UV@250nm

Sample: 1 = 8-Quinolinol (Oxine)

2 = Caffeine

# ギ酸ピークの比較



Column:

Company A C18, 150 x 4.6 mm

Company B C18, 150 x 4.6 mm

Company C C18, 150 x 4.6 mm

Company D C18, 150 x 4.6 mm

SunShell C18, 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

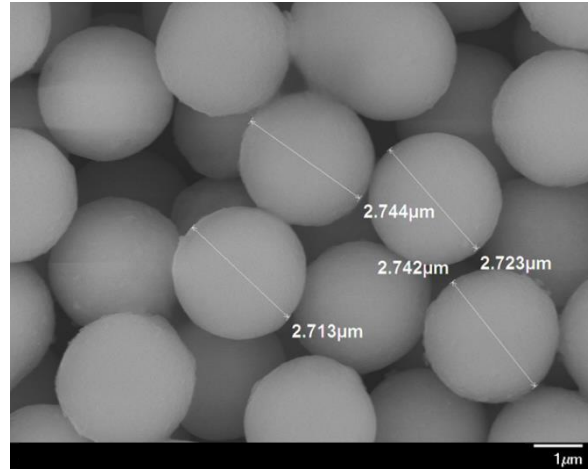
	カラム圧 Pressure <sup>a</sup>	保持指数 Retention <sup>b</sup>	ピリジン Pyridine	オキシシン Oxine	ギ酸 Formic acid	Point
SunShell C18	◎21.8	10.4	◎	◎	◎	12
Company D C18	◎22.2	9.7	△	△	×	5
Company C C18	×30.6	9.0	◎	△	◎	7
Company B C18	◎22.7	7.4	×	×	△	4
Company A C18	△26.1	5.4	×	◎	◎	7

a. Mobile phase, methanol:water=75:25, 40 °C, 1mL/min 150 x 4.6mm

b. Retention factor of amylbenzene

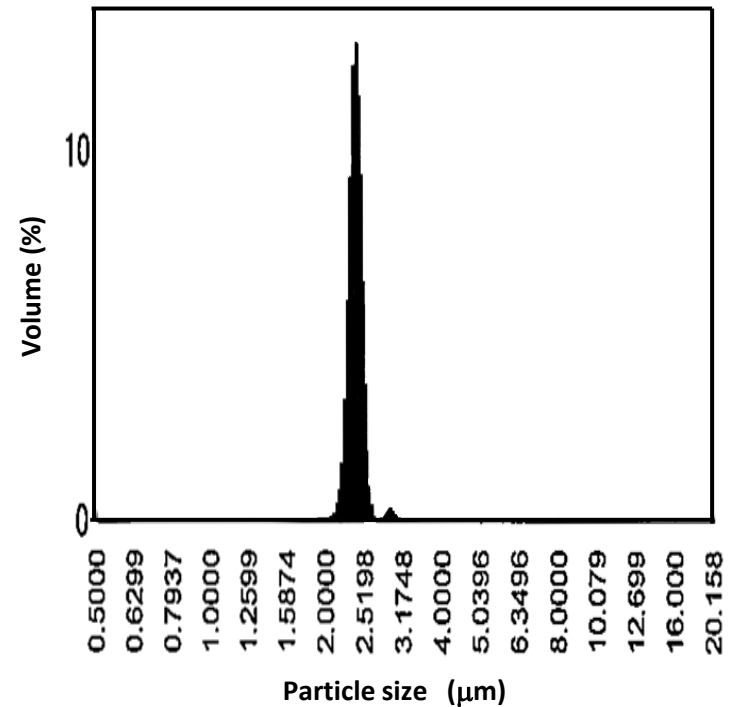
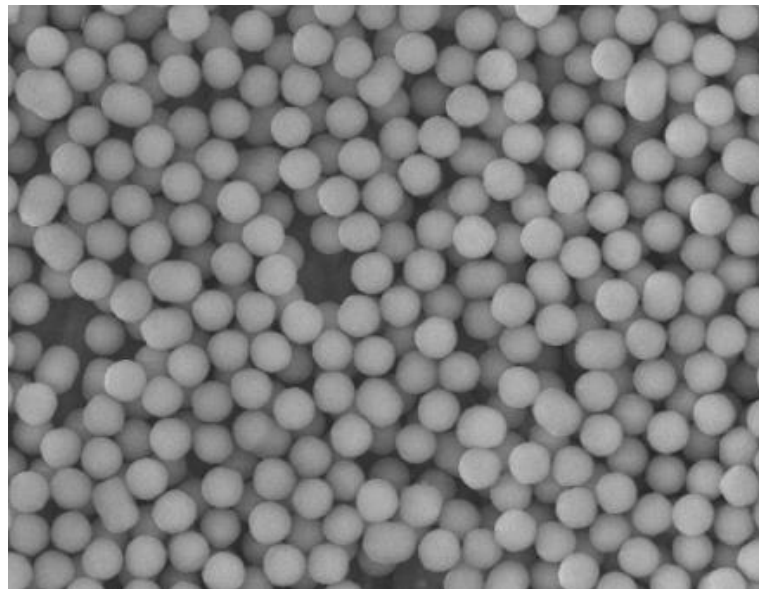
◎: 3 point, ○: 2 point, △: 1 point, ×: 0 point

# 他社コアシェル粒子の粒度分布

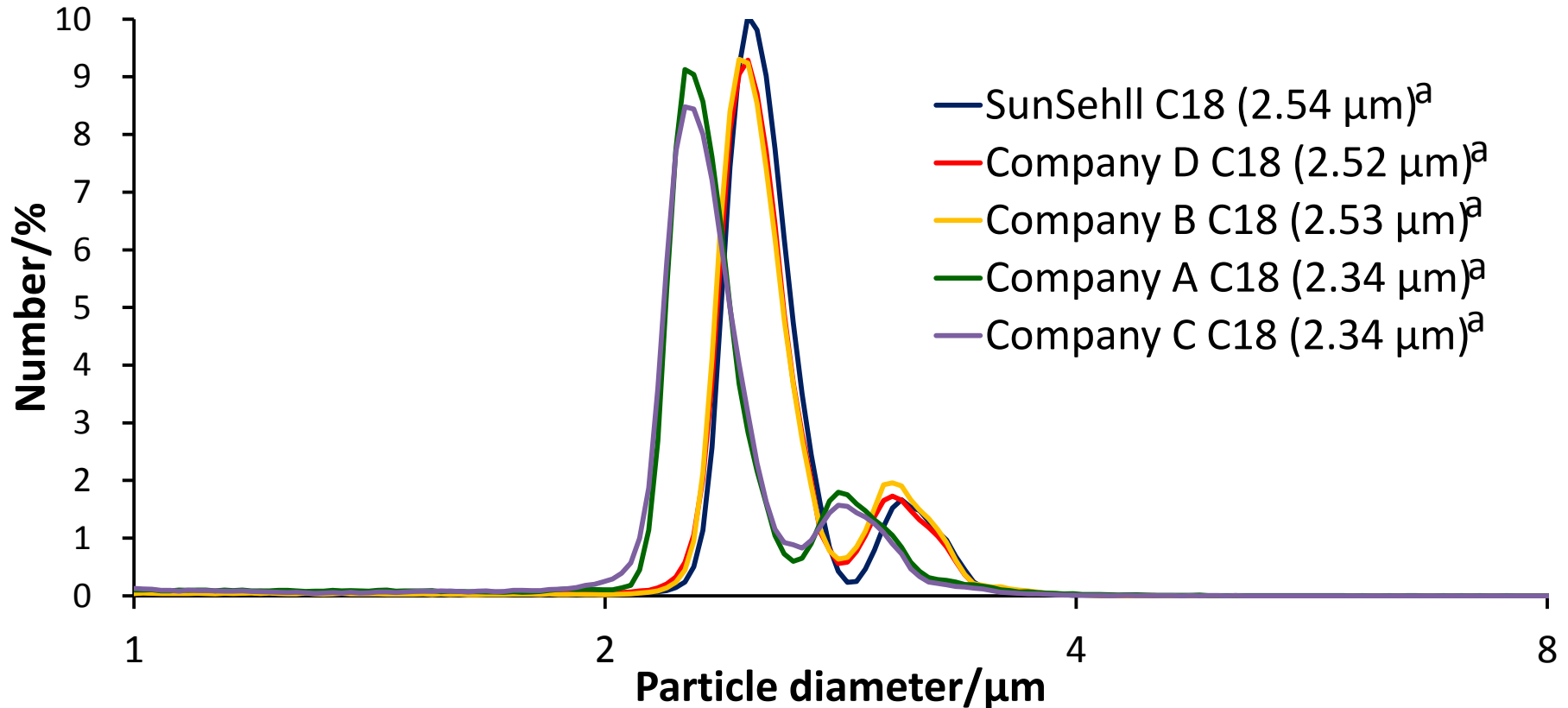


Coulter counter

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



# 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 <sup>a</sup> (m <sup>2</sup> /g)	細孔容積 Pore volume <sup>a</sup> (mL)	細孔径 Pore diameter <sup>a</sup> (nm)
SunShell C18	7.3 (7) <sup>b</sup>	125 (150) <sup>b</sup>	0.261	8.34 (9) <sup>b</sup>
Company D C18	8.0	133 (150) <sup>b</sup>	0.278	8.20 (9) <sup>b</sup>
Company C C18	8.5 (8) <sup>b</sup>	135 (130) <sup>b</sup>	0.414	12.3 (12) <sup>b</sup>
Company B C18	8.8 (9) <sup>b</sup>	130 (130) <sup>b</sup>	0.273	8.39 (8) <sup>b</sup>
Company A C18	4.9 (12 effective) <sup>b</sup>	102 (200 effective) <sup>b</sup>	0.237	9.25 (10) <sup>b</sup>

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。

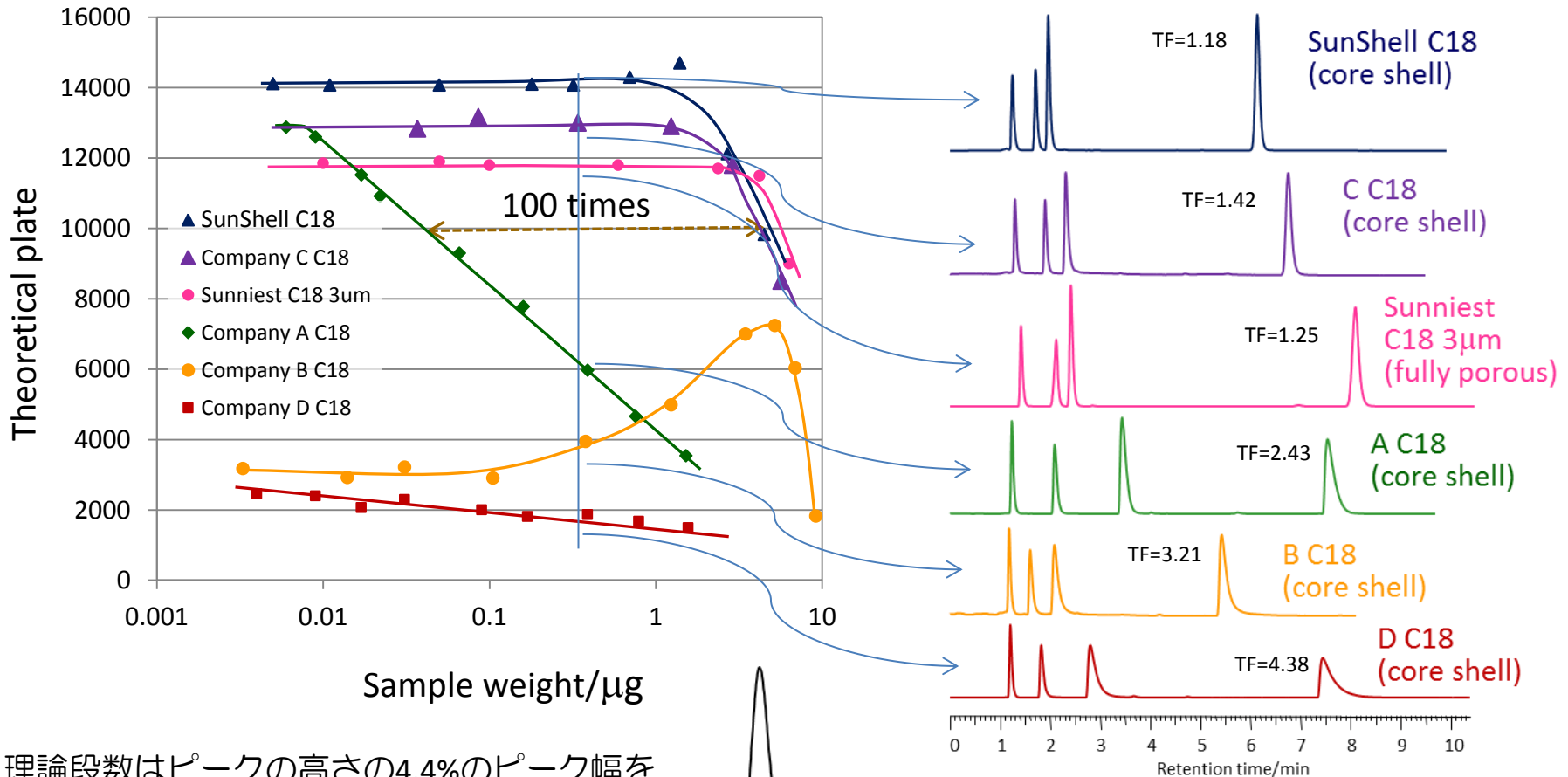
b. カタログに記載されている値

\*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



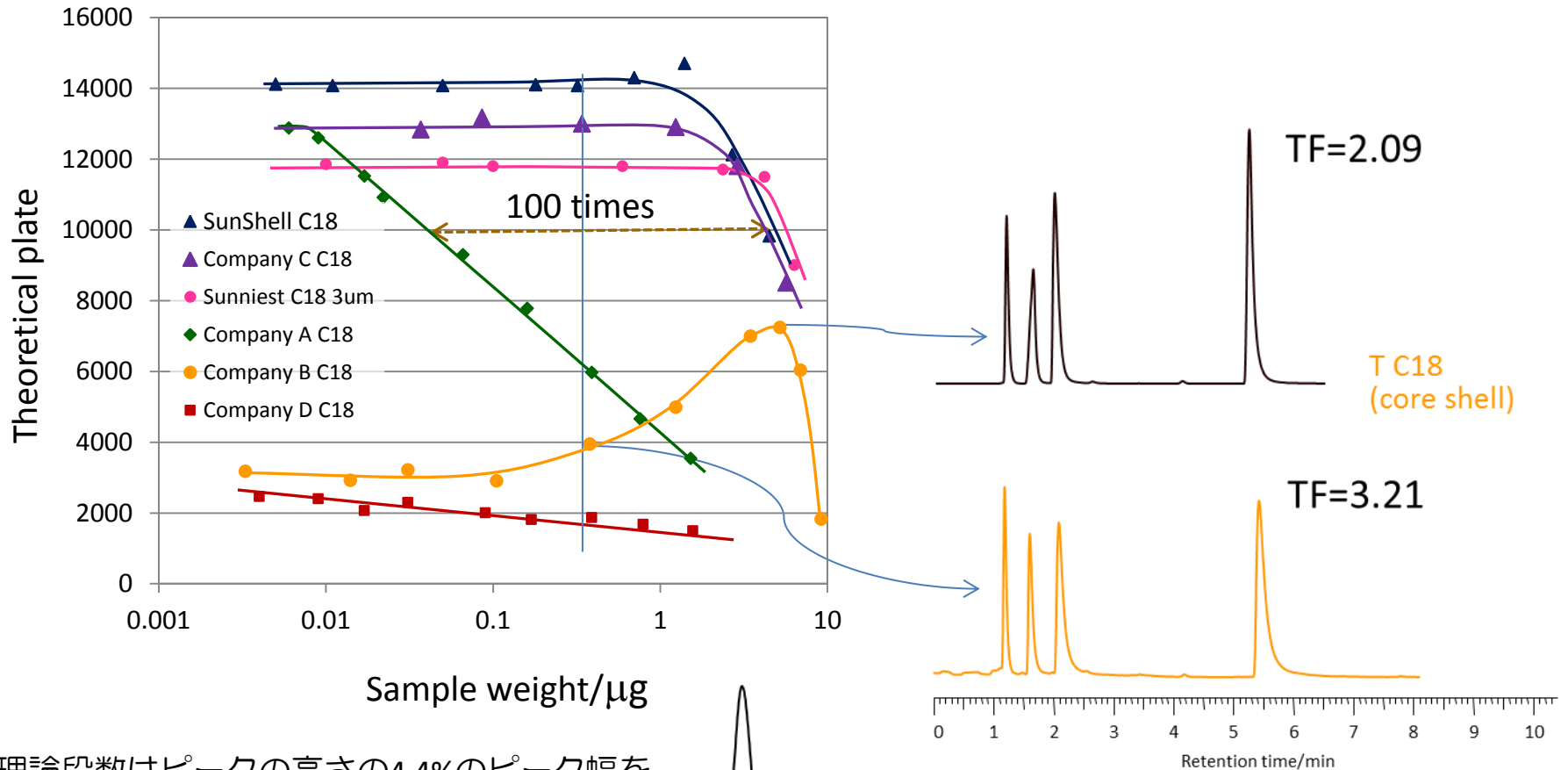
理論段数はピークの高さの4.4%のピーク幅を用いる5シグマ法を用いました。

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

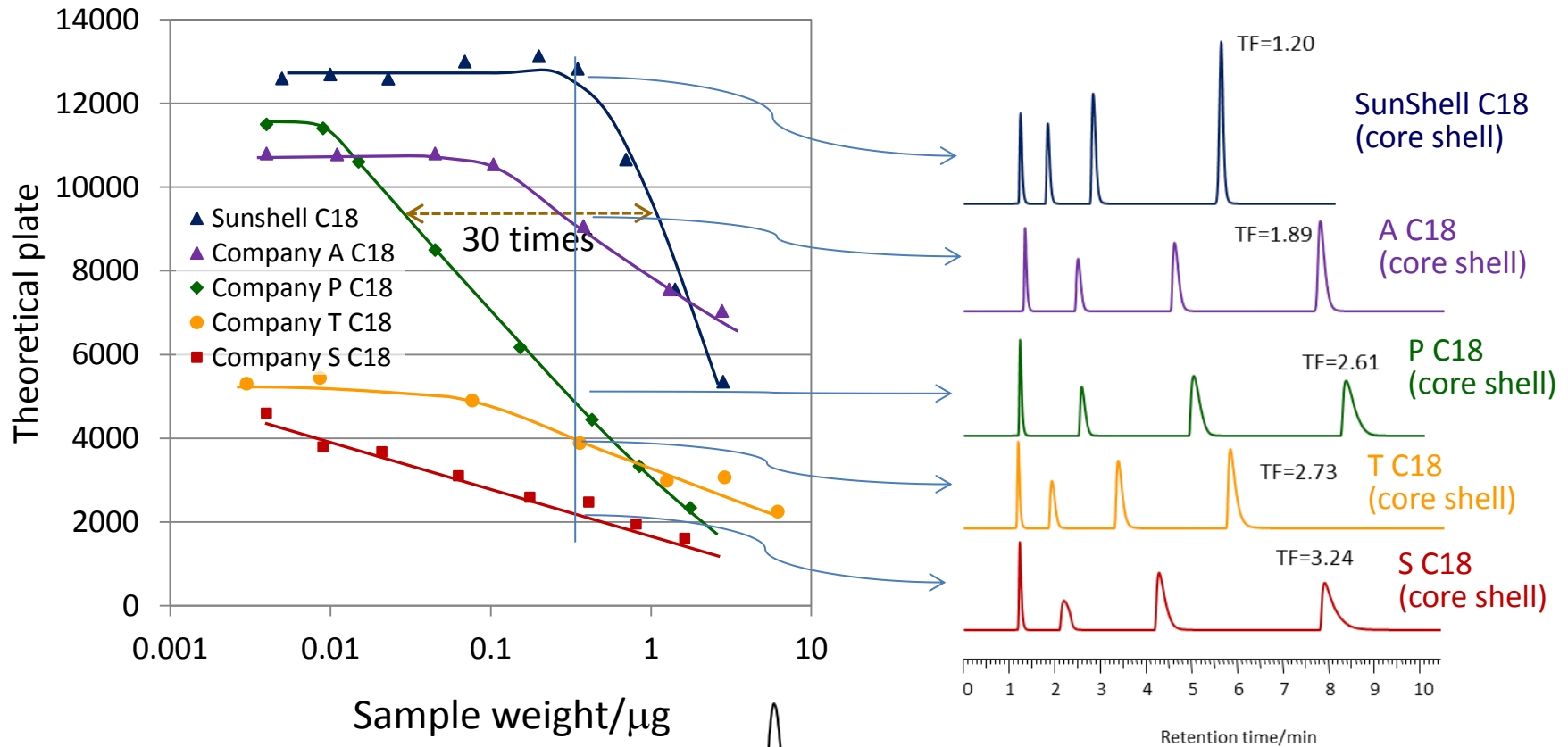


理論段数はピークの高さの4.4%のピーク幅を用いる5シグマ法を用いました。

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



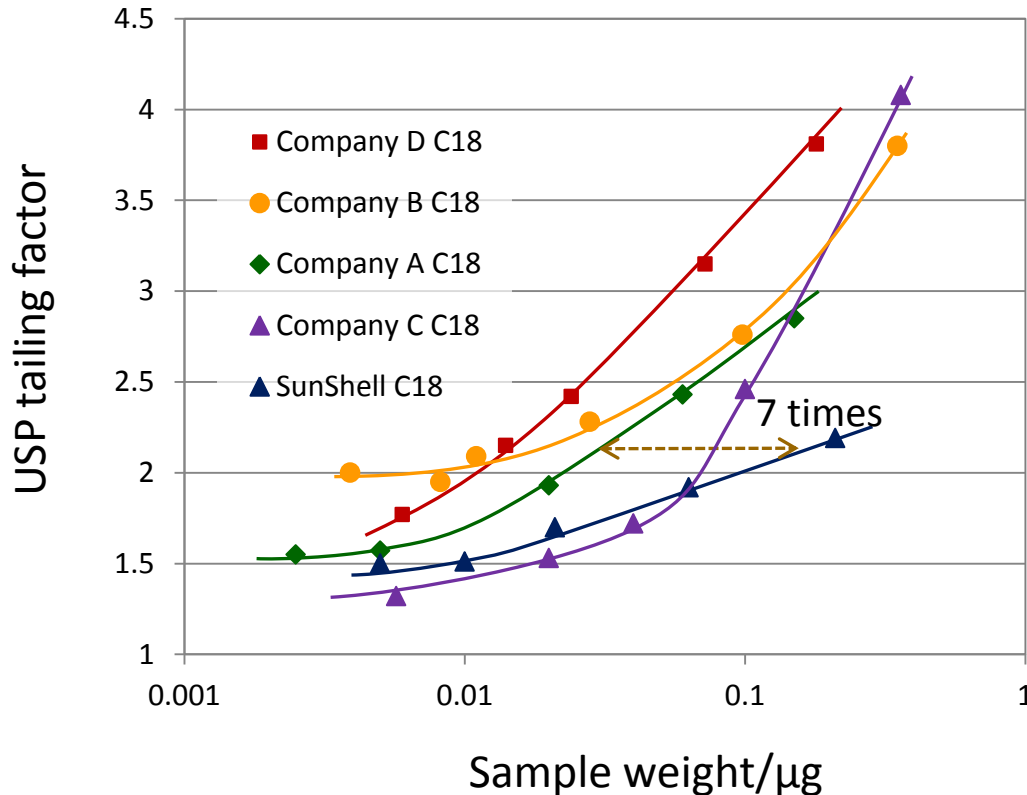
理論段数はピークの高さの4.4%のピーク幅を用いる5シグマ法を用いました。

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

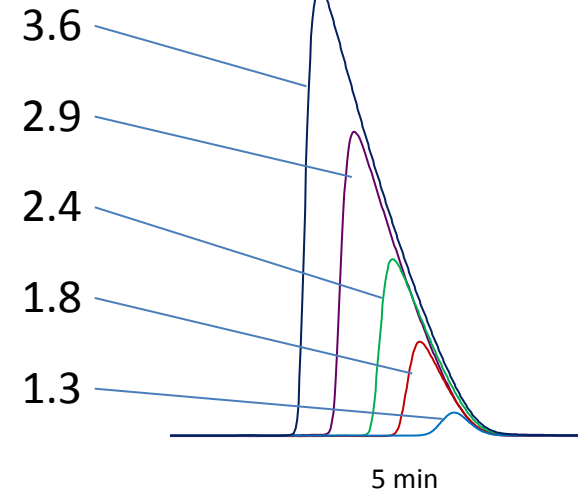
# アミトリプチリンの負荷量比較 III

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



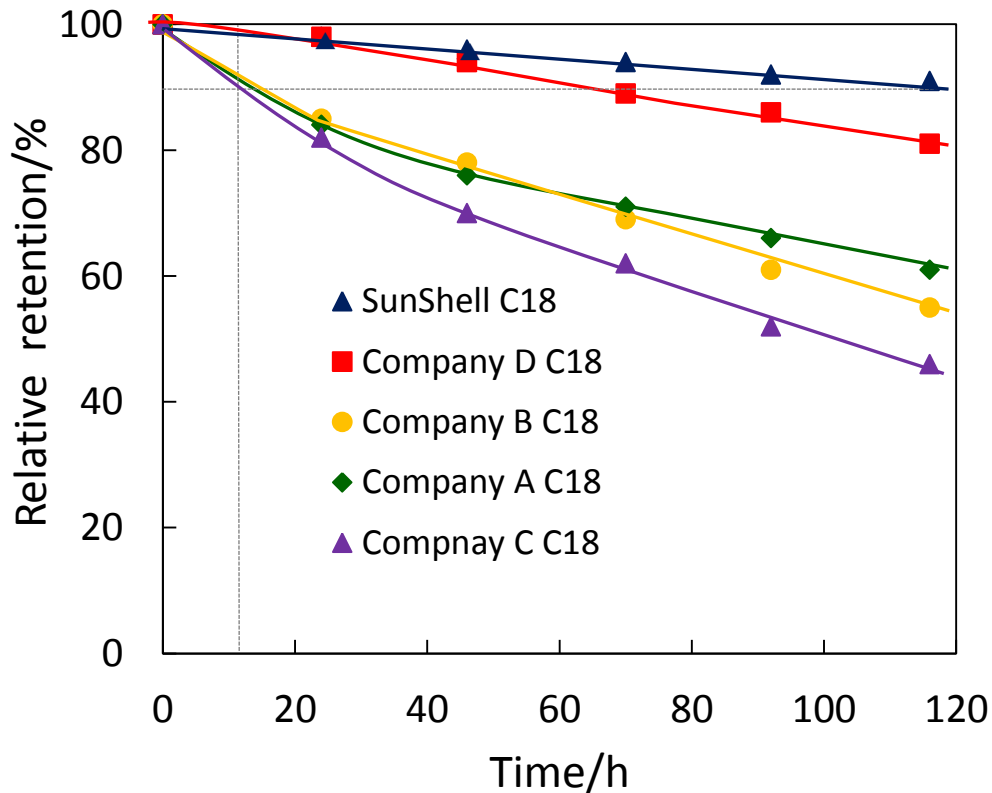
USP tailing factor



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)

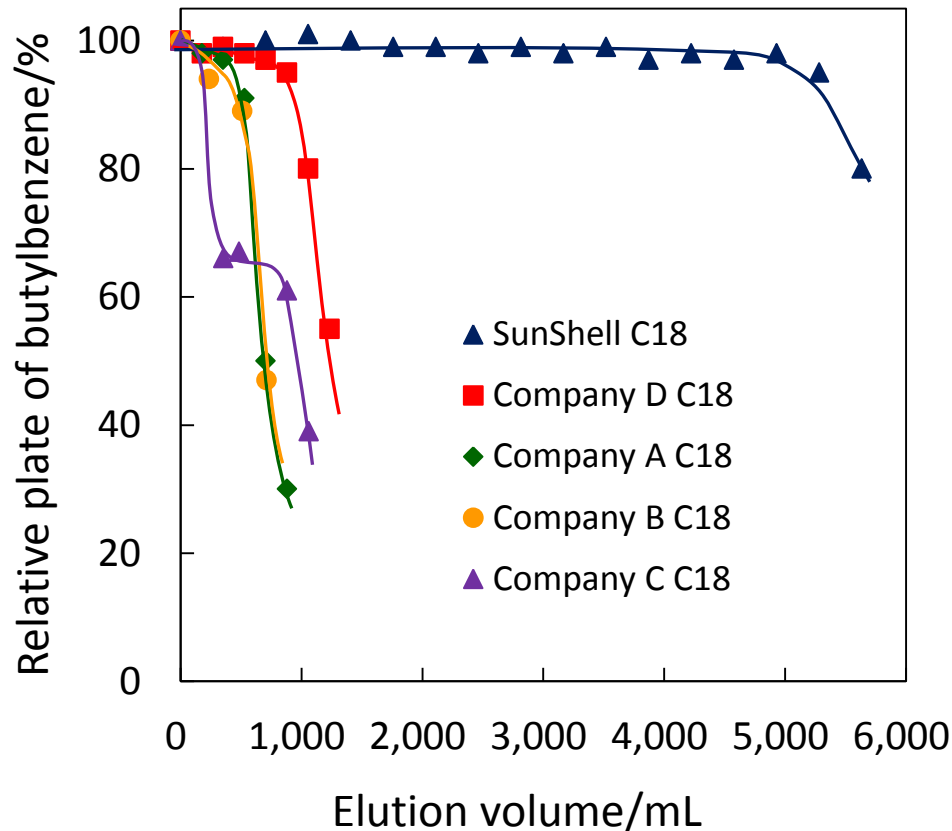


Durable test condition  
 Column size: 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/1.0% TFA, pH1=10/90  
 Flow rate: 0.4 mL/min  
 Temperature: 80 °C

Measurement condition  
 Column size: 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=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:  
 CH<sub>3</sub>OH/20mM Sodium borate/10mM NaOH=30/21/49 (pH10)

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

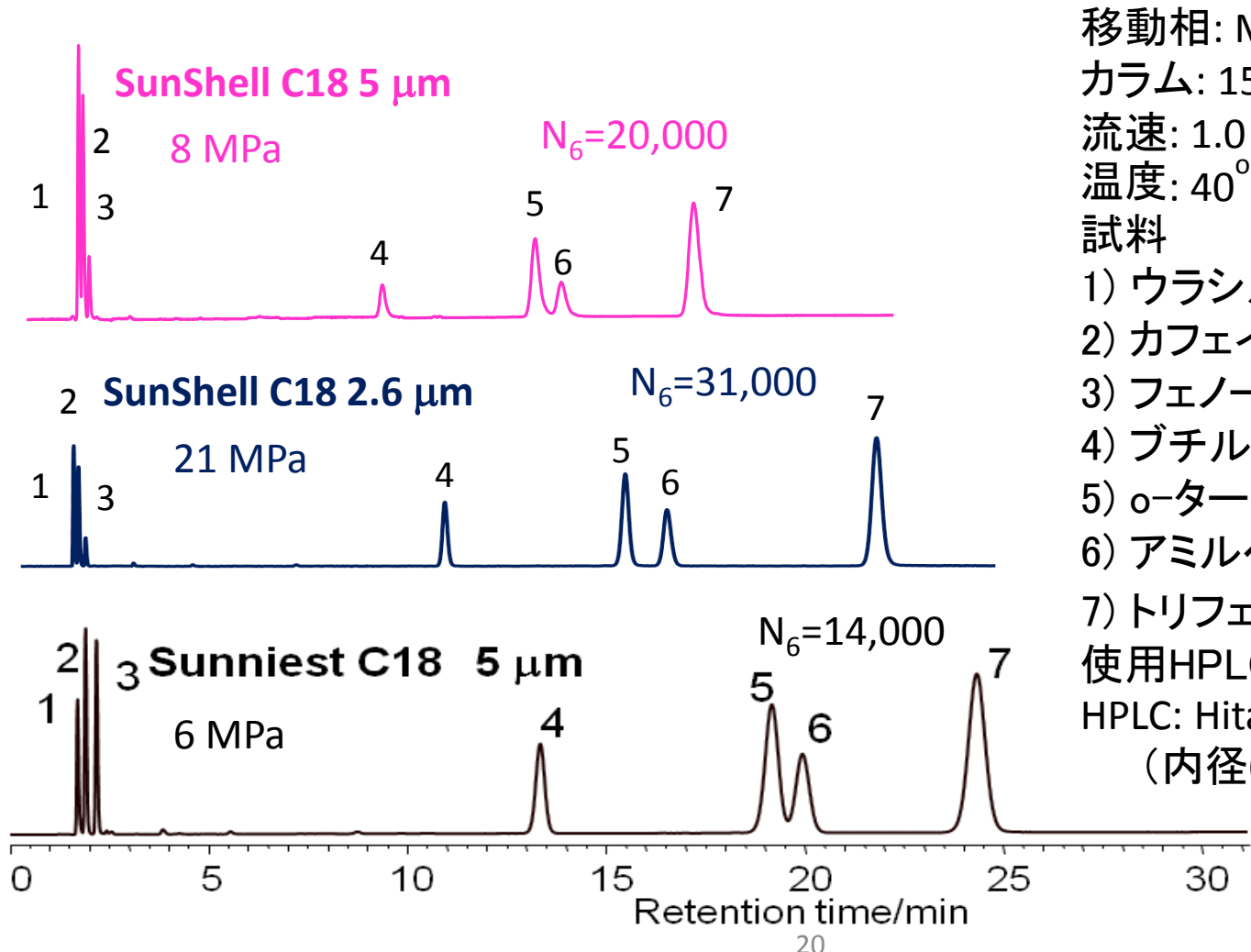
Measurement condition  
 Column size: 50 x 2.1 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O=70/30  
 Flow rate: 0.4 mL/min  
 Temperature: 40 °C  
 Sample: 1 = Butylbenzene

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 D C18	○	○	2 - 9
Company C C18	△	△	2 - 9
Company B C18	△	△	1 - 11
Company A C18	△	△	1.5 - 10

# 全多孔性シリカとコアシェル型シリカ2.6 $\mu\text{m}$ と5 $\mu\text{m}$ のHPLCを用いた理論段数とカラム圧比較



移動相: Methanol/water(75:25)

カラム: 150 x 4.6 mm

流速: 1.0 mL/min

温度: 40°C

試料

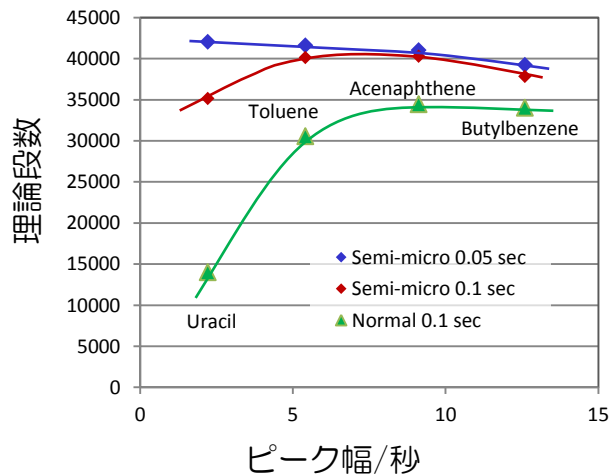
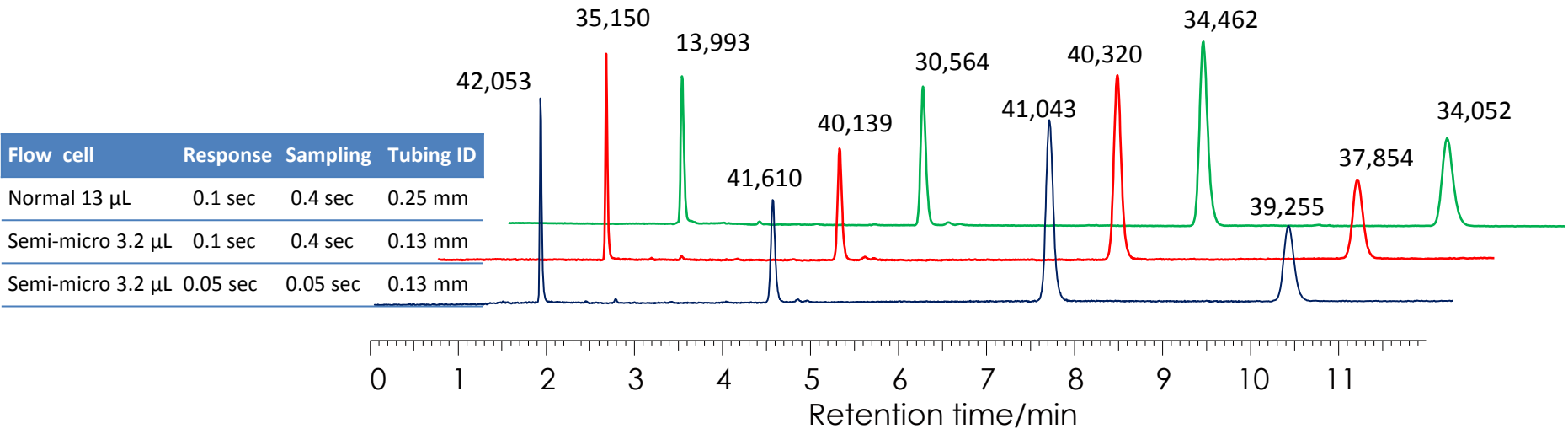
- 1) ウラシル
- 2) カフェイン
- 3) フェノール
- 4) ブチルベンゼン
- 5) o-ターフェニル
- 6) アミルベンゼン
- 7) トリフェニレン



使用HPLC:

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE  
 (内径0.25mmの配管仕様)

# 通常仕様とセミマイクロ仕様のHPLCの比較

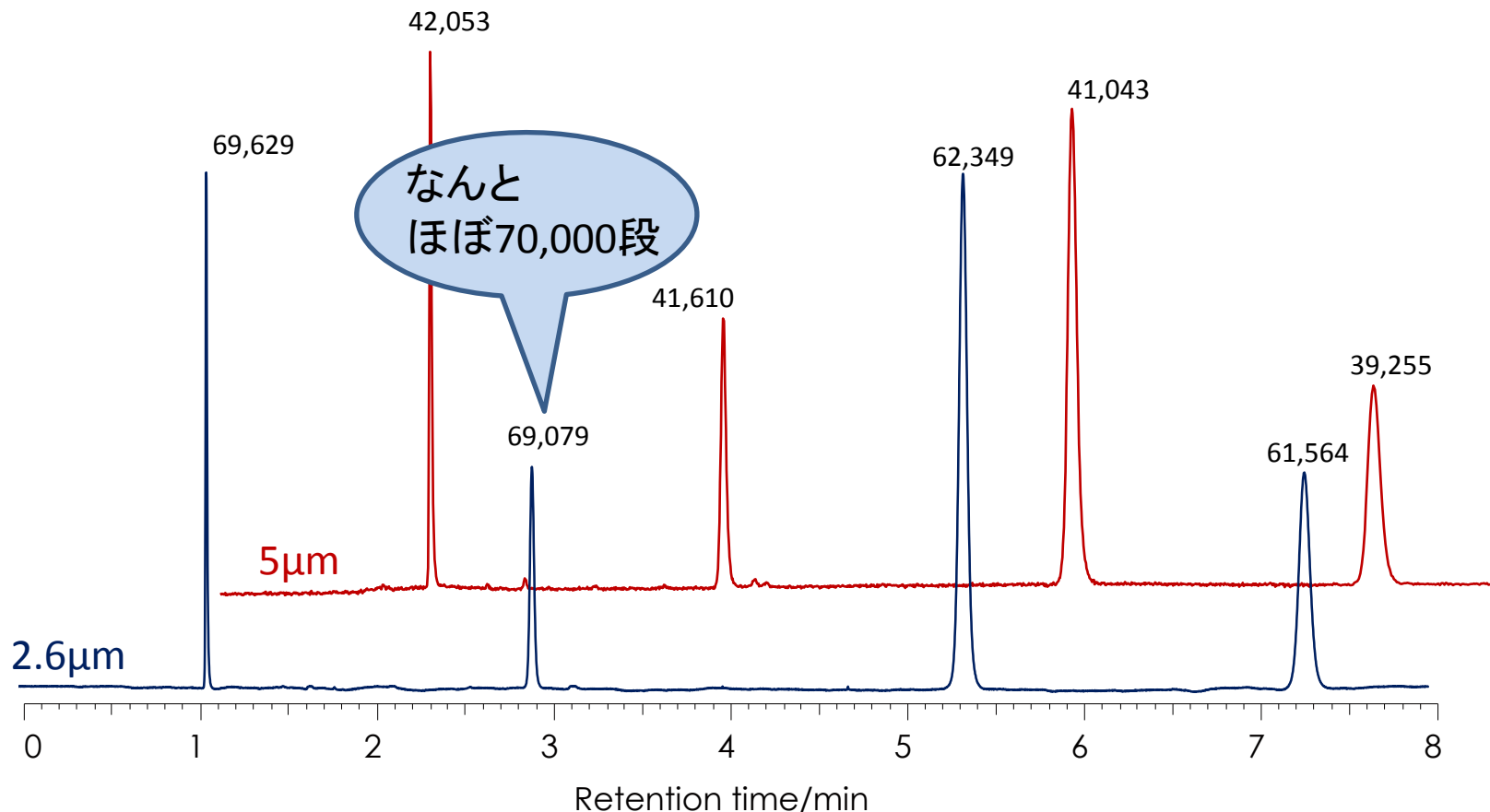


Column: SunShell C18, 5  $\mu$ m 250 x 4.6 mm  
 Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O= 70/30  
 Flow rate: 1.0 mL/min,  
 Temperature: 40 °C  
 Pressure: 6.7 MPa  
 Detection: UV@250 nm  
 Sample: 1 = Uracil  
 2 = Toluene  
 3 = Acenaphthene  
 4 = Butylbenzene

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE



# SunShell 2.6 $\mu$ m, 5 $\mu$ m 4.6x250mmカラムの性能



Column: SunShell C18, 2.6  $\mu$ m, 5  $\mu$ m 250 x 4.6 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O= 70/30

Flow rate: 1.8 mL/min,

Temperature: 25 °C

Pressure: 45 MPa for 2.6  $\mu$ m and 16 MPa for 5  $\mu$ m

Detection: UV@250 nm

Sample: 1 = Uracil, 2 = Toluene, 3 = Acenaphthene, 4 = Butylbenzene, HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

	内径(mm)	1.0		2.1		3.0		4.6		
	長さ(mm)	型番	価格	型番	価格	型番	価格	型番	価格	
SunShell C18	30	-----	-----	CB6931	¥65,000	CB6331	¥65,000	CB6431	¥65,000	
	50	CB6141	¥66,000	CB6941	¥66,000	CB6341	¥66,000	CB6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CB6951	¥71,000	CB6351	¥71,000	CB6451	¥71,000	
	100	CB6161	¥79,000	CB6961	¥79,000	CB6361	¥79,000	CB6461	¥79,000	
	150	CB6171	¥84,000	CB6971	¥84,000	CB6371	¥84,000	CB6471	¥84,000	
SunShell C8	30	-----	-----	CC6931	¥65,000	CC6331	¥65,000	CC6431	¥65,000	
	50	-----	-----	CC6941	¥66,000	CC6341	¥66,000	CC6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CC6951	¥71,000	CC6351	¥71,000	CC6451	¥71,000	
	100	-----	-----	CC6961	¥79,000	CC6361	¥79,000	CC6461	¥79,000	
	150	-----	-----	CC6971	¥84,000	CC6371	¥84,000	CC6471	¥84,000	
SunShell PFP	30	-----	-----	CF6931	¥65,000	CF6331	¥65,000	CF6431	¥65,000	
	50	-----	-----	CF6941	¥66,000	CF6341	¥66,000	CF6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CF6951	¥71,000	CF6351	¥71,000	CF6451	¥71,000	
	100	-----	-----	CF6961	¥79,000	CF6361	¥79,000	CF6461	¥79,000	
	150	-----	-----	CF6971	¥84,000	CF6371	¥84,000	CF6471	¥84,000	
SunShell C18-WP	30	-----	-----	CW6931	¥65,000	CW6331	¥65,000	CW6431	¥65,000	
	50	-----	-----	CW6941	¥66,000	CW6341	¥66,000	CW6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CW6951	¥71,000	CW6351	¥71,000	CW6451	¥71,000	
	100	-----	-----	CW6961	¥79,000	CW6361	¥79,000	CW6461	¥79,000	
	150	-----	-----	CW6971	¥84,000	CW6371	¥84,000	CW6471	¥84,000	
SunShell RP-AQUA	30	-----	-----	CR6931	¥65,000	CR6331	¥65,000	CR6431	¥65,000	
	50	CR6141	¥66,000	CR6941	¥66,000	CR6341	¥66,000	CR6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CR6951	¥71,000	CR6351	¥71,000	CR6451	¥71,000	
	100	CR6161	¥79,000	CR6961	¥79,000	CR6361	¥79,000	CR6461	¥79,000	
	150	CR6171	¥84,000	CR6971	¥84,000	CR6371	¥84,000	CR6471	¥84,000	
SunShell Phenyl	30	-----	-----	CP6931	¥65,000	CP6331	¥65,000	CP6431	¥65,000	
	50	-----	-----	CP6941	¥66,000	CP6341	¥66,000	CP6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CP6951	¥71,000	CP6351	¥71,000	CP6451	¥71,000	
	100	-----	-----	CP6961	¥79,000	CP6361	¥79,000	CP6461	¥79,000	
	150	-----	-----	CP6971	¥84,000	CP6371	¥84,000	CP6471	¥84,000	
SunShell HILIC-Amide	30	-----	-----	CH6931	¥65,000	CH6331	¥65,000	CH6431	¥65,000	
	50	-----	-----	CH6941	¥66,000	CH6341	¥66,000	CH6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CH6951	¥71,000	CH6351	¥71,000	CH6451	¥71,000	
	100	-----	-----	CH6961	¥79,000	CH6361	¥79,000	CH6461	¥79,000	
	150	-----	-----	CH6971	¥84,000	CH6371	¥84,000	CH6471	¥84,000	
SunShell 2-EP	30	-----	-----	CE6931	¥65,000	CE6331	¥65,000	CE6431	¥65,000	
	50	-----	-----	CE6941	¥66,000	CE6341	¥66,000	CE6441	¥66,000	
	75	-----	-----	CE6951	¥71,000	CE6351	¥71,000	CE6451	¥71,000	
	100	-----	-----	CE6961	¥79,000	CE6361	¥79,000	CE6461	¥79,000	
	150	-----	-----	CE6971	¥84,000	CE6371	¥84,000	CE6471	¥84,000	
SunShell HFC18-16	50	-----	-----	CG6941	¥66,000	CG6341	¥66,000	CG6441	¥66,000	
	100	-----	-----	CG6961	¥79,000	CG6361	¥79,000	CG6461	¥79,000	
	150	-----	-----	CG6971	¥84,000	CG6371	¥84,000	CG6471	¥84,000	
SunShell HFC18-30	50	-----	-----	C46941	¥66,000	C46341	¥66,000	C46441	¥66,000	
	100	-----	-----	C46961	¥79,000	C46361	¥79,000	C46461	¥79,000	
	150	-----	-----	C46971	¥84,000	C46371	¥84,000	C46471	¥84,000	
SunShell Al	30	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CA6431	¥130,000	
	40	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CA64B1	¥130,000	

# 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。
- ✓ SunShell C18, 5  $\mu\text{m}$  250x4.6mm カラムはHPLCをセミマイクロ仕様にすれば40,000段の性能が発揮される。
- ✓ SunShell C18, 2.6  $\mu\text{m}$  250x4.6mm カラムはほぼ70,000段の性能である。