



C18 カラム基礎講座 コアシェル、全多孔性どう使うのが 効果的？

クロマニックテクノロジーズ
塚本友康 佐藤誠 長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>





全多孔性？コアシェル？





分離を変えるには・・・

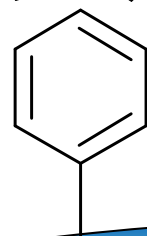
疎水性相互作用

アルキル基



π - π 相互作用

フェニル基

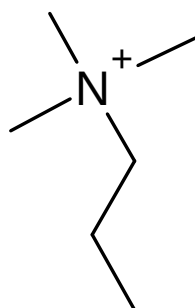


相互作用の異なるカラムに交換する

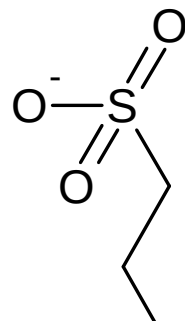
親水性相互作用

イオン交換相互作用

陰イオン
交換基

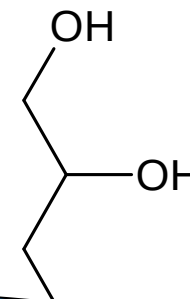


陽イオン
交換基

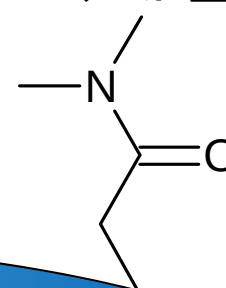


水素結合

ジオール基



アミド基

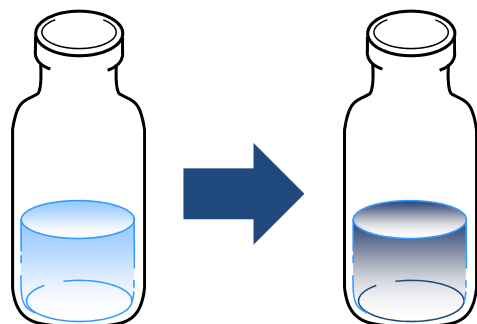


カラム充填剤基材



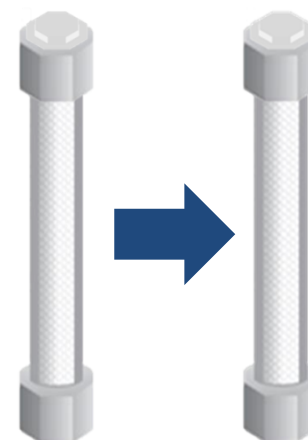
分離を変化させる

移動相を交換



相互作用の
強さ
働き方

カラムを交換



相互作用

メーカーやロットの違いで・・・
同じC18カラムなのに分離が変わることがある

二次的な相互作用が変わるから





カラムの性能を決める要因

化学修飾



コーティング	→ 耐久性
官能基の結合	→ 選択性
エンドキャッピング	→ 不活性化

化学修飾 → 分離に大きく影響



カラムの性能を決める要因2

基材の選択



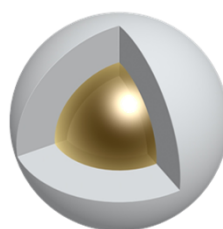
素材の選択	→ 耐久性・選択性
微粒子化	→ 高理論段数化
基材の形状	→ 高速化・高理論段数化

基材の選択 → 理論段数に大きく影響



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

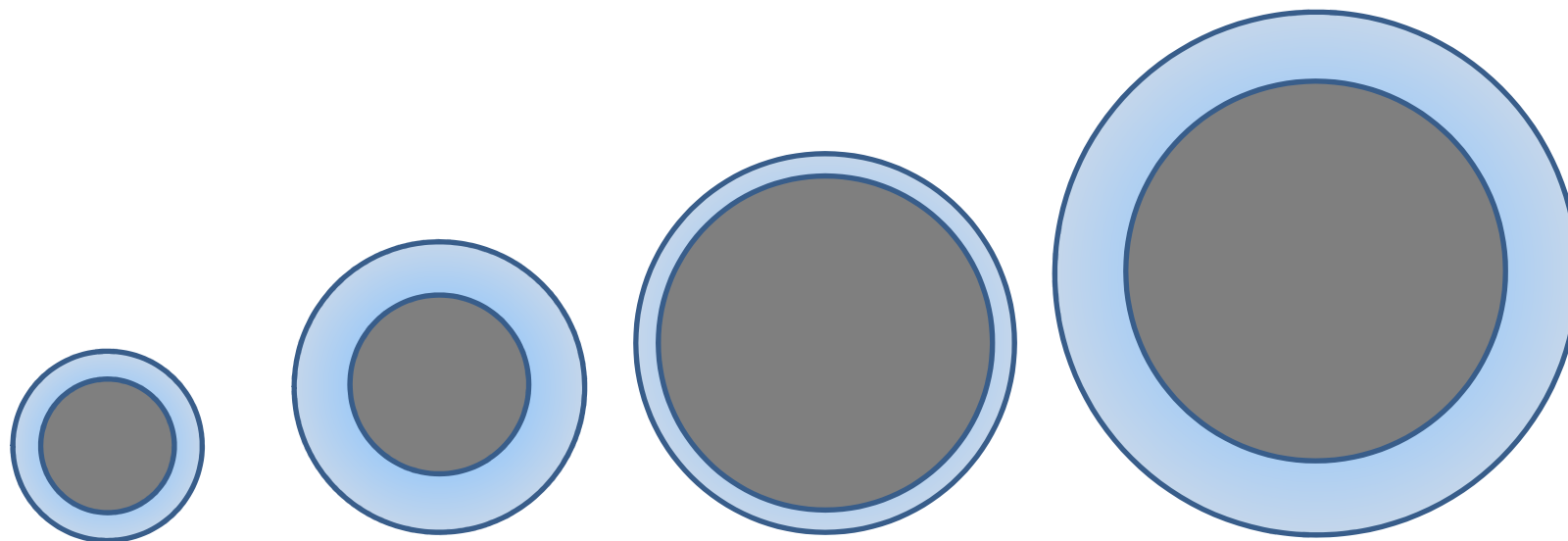


コアシェルシリカカラムで注意すべきこと





市販されているコアシェル粒子

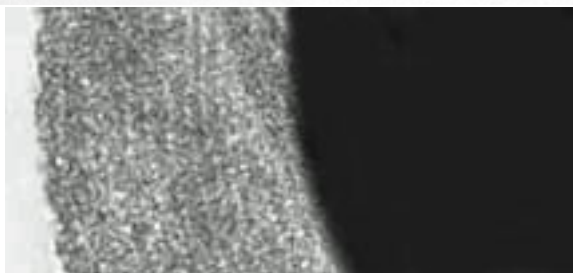
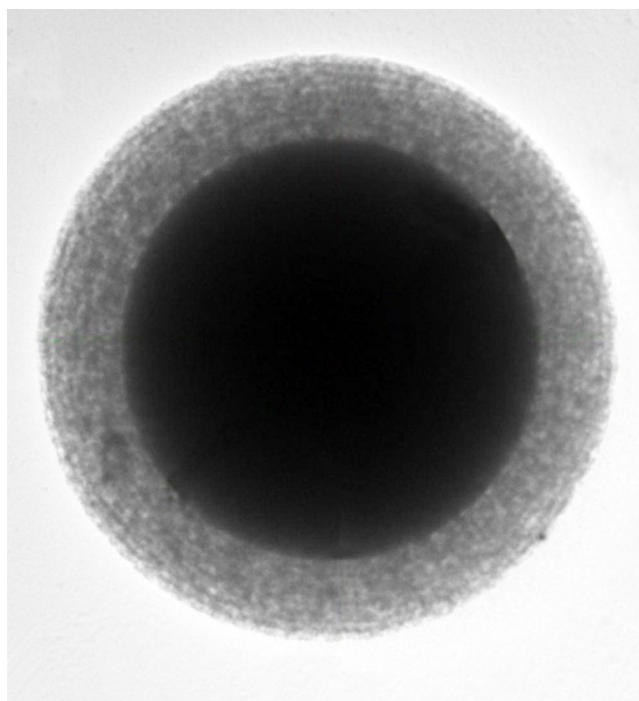


粒子径	1.3 - 2 μm	2.4 - 2.7 μm	3.4 - 3.6 μm	4 - 5 μm
細孔径	9 - 10 nm	8 - 16 nm, 30 nm, 100 nm	20 - 40 nm	8 - 12 nm
多孔質層	0.22 - 0.4 μm	0.3 - 0.5 μm	0.2 - 0.5 μm	0.2 - 0.6 μm
比表面積	100 - 120 m^2/g	90 - 150 m^2/g , 25 - 40 m^2/g	15 m^2/g	90 m^2/g
多孔質%	58 - 78%	58 - 77%	27%	60%

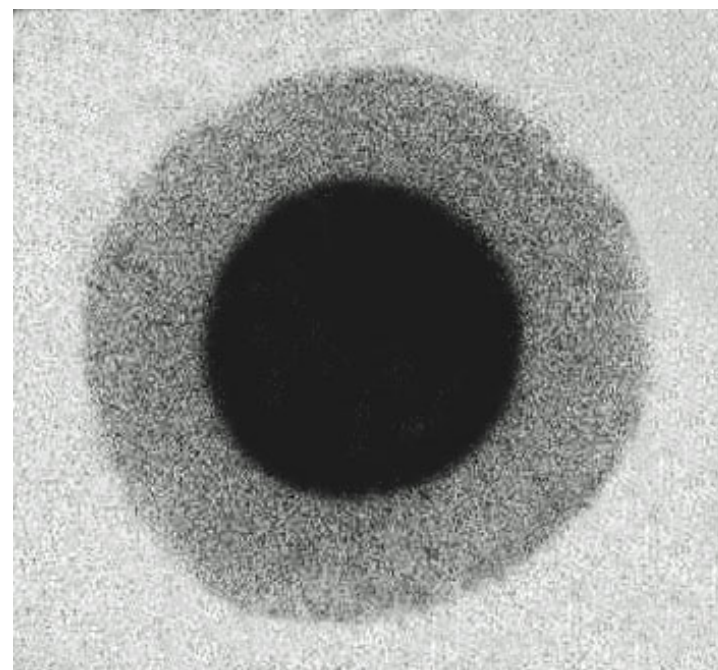




二種類のコアシェル構造のシリカ粒子



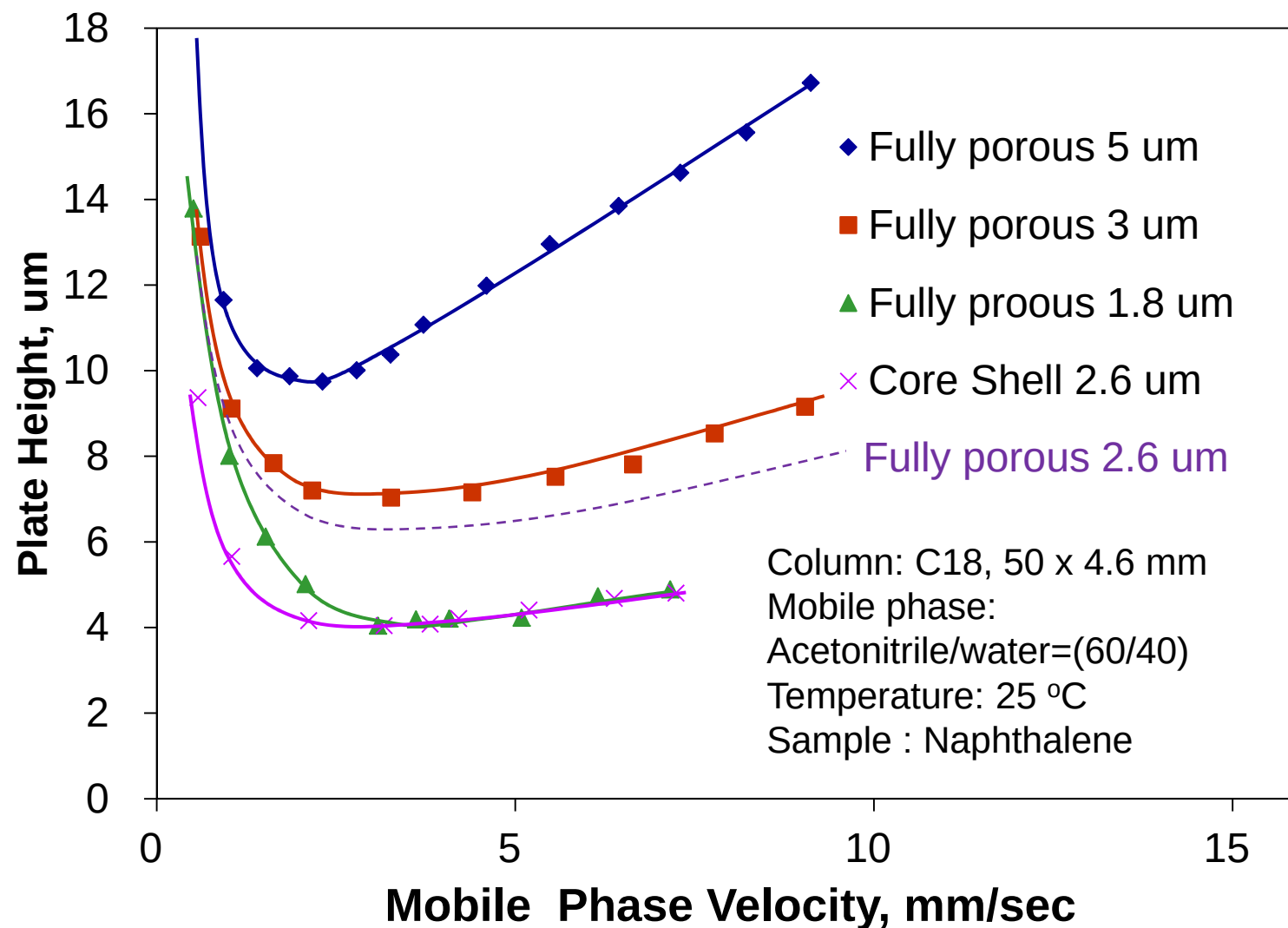
マルチレイヤー（多層）多孔質層構造



モノレイヤー（単層）多孔質構造



全多孔性とコアシェルの理論段高さの比較





◇ 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

◇ 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小さい

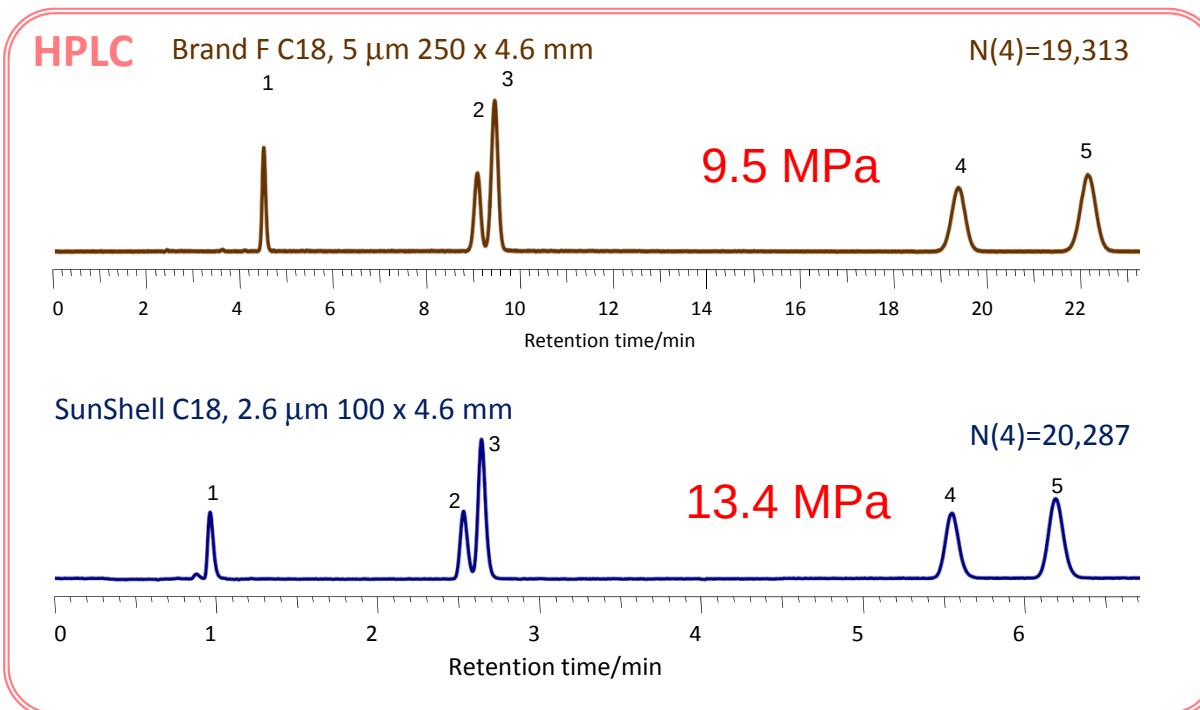
コアシェルカラムは負荷量が少ない





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

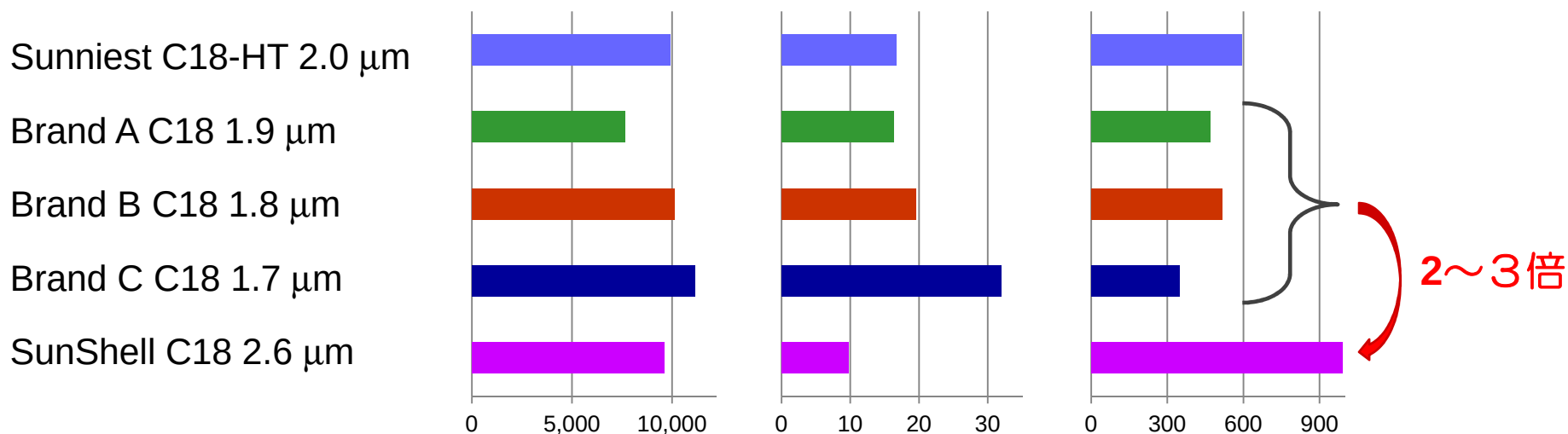
$$9.5\text{MPa} \times 3.7 \times 100/250 = 14.1\text{MPa}$$

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

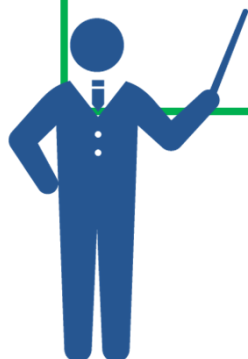


全多孔性シリカカラムと比べると

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





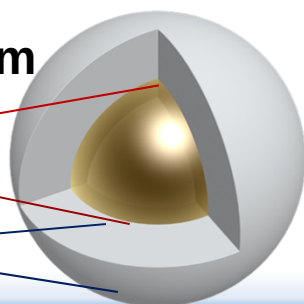
全多孔性シリカとコアシェル型シリカ 2.6 μ mと5 μ mの標準試料の保持比較

	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)

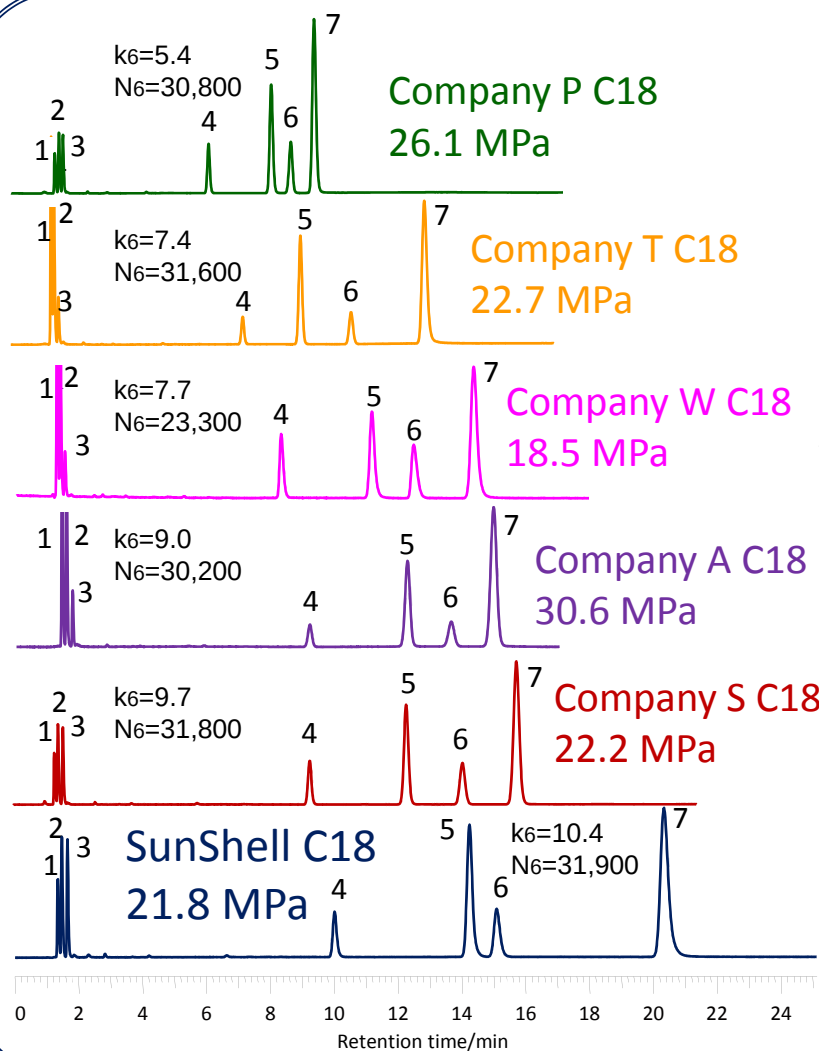
温度: 40°C

カラム: 150 x 4.6 mm

流速: 1.0 mL/min



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

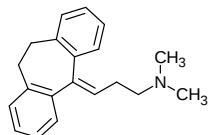
Sample: 1 = Uracil, 2 = Caffeine, 3 = Phenol, 4 = Butylbenzene

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

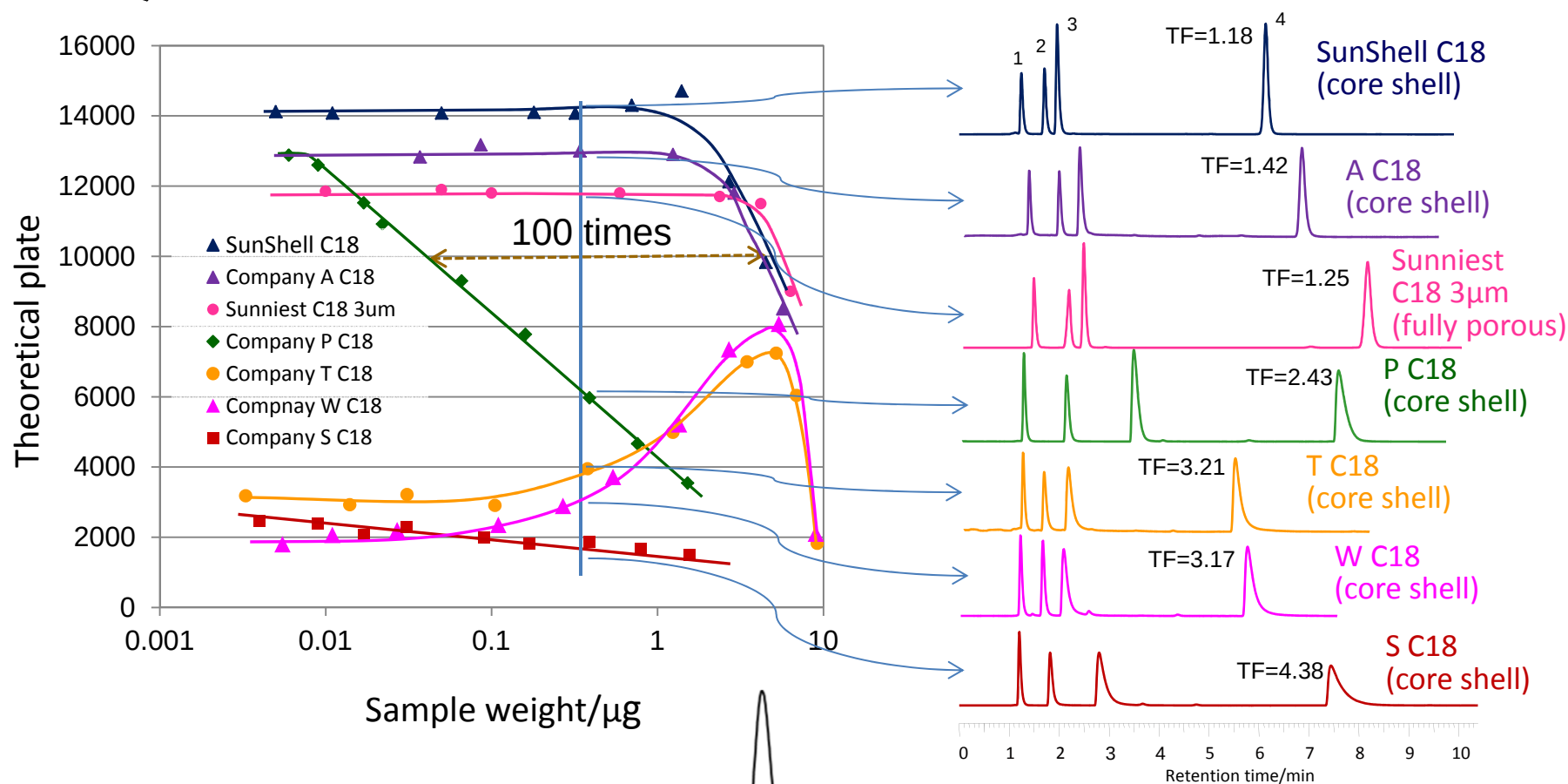
	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/o-Terphenyl)
Company P C18	0.48	1.54	1.20
Company T C18	0.35	1.56	1.50
Company W C18	0.38	1.59	1.32
Company A C18	0.42	1.57	1.25
Company S C18	0.44	1.60	1.31
SunShell C18	0.39	1.60	1.46



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



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。



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%



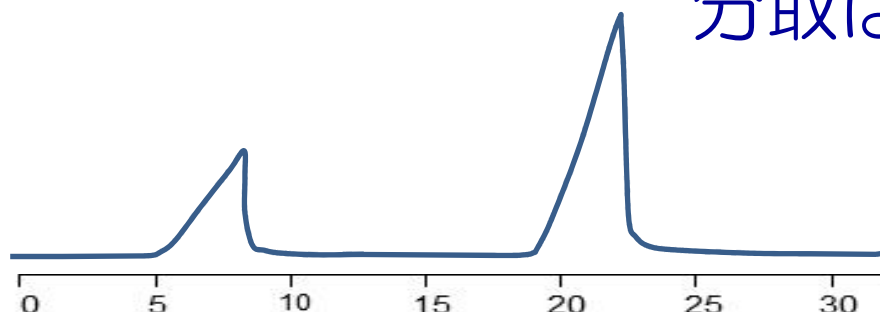
コアシェルカラムは保持時間・負荷量共に
メーカー間の差が大きい



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



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



多孔質相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

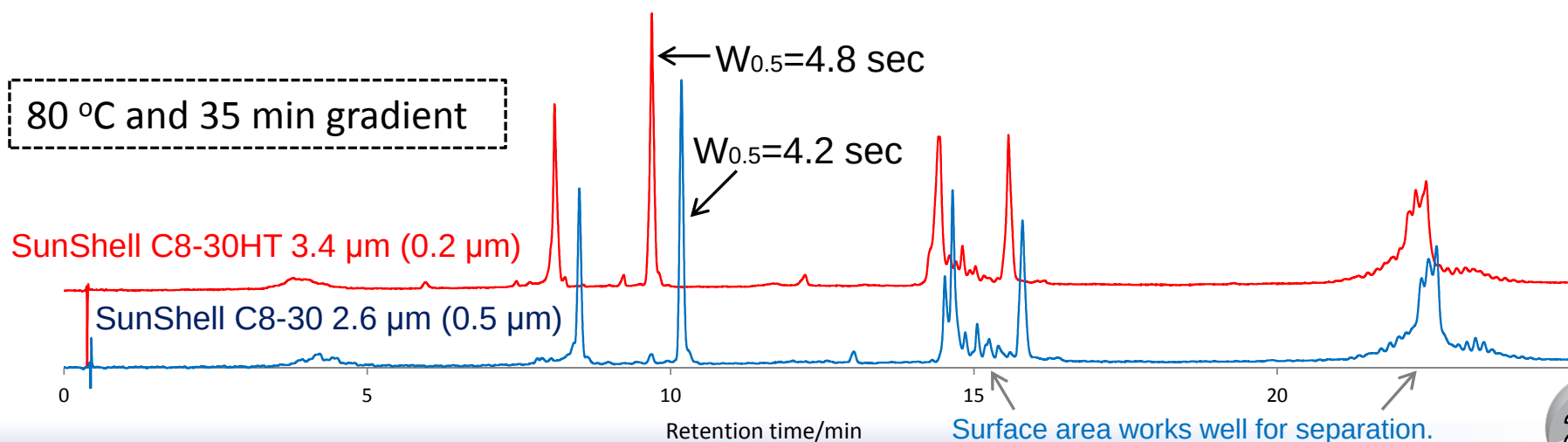
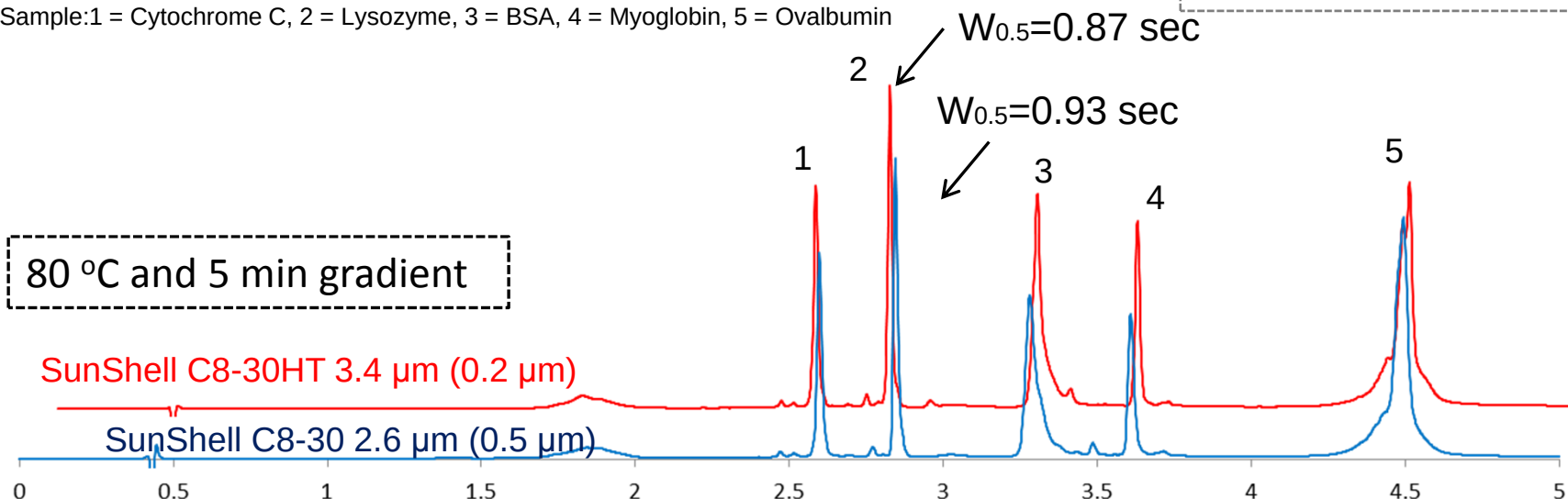
Gradient program: Time 0 min 5 or 35 min

%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





多孔質相の厚さが異なるコアシェルカラムの比較2

Column:

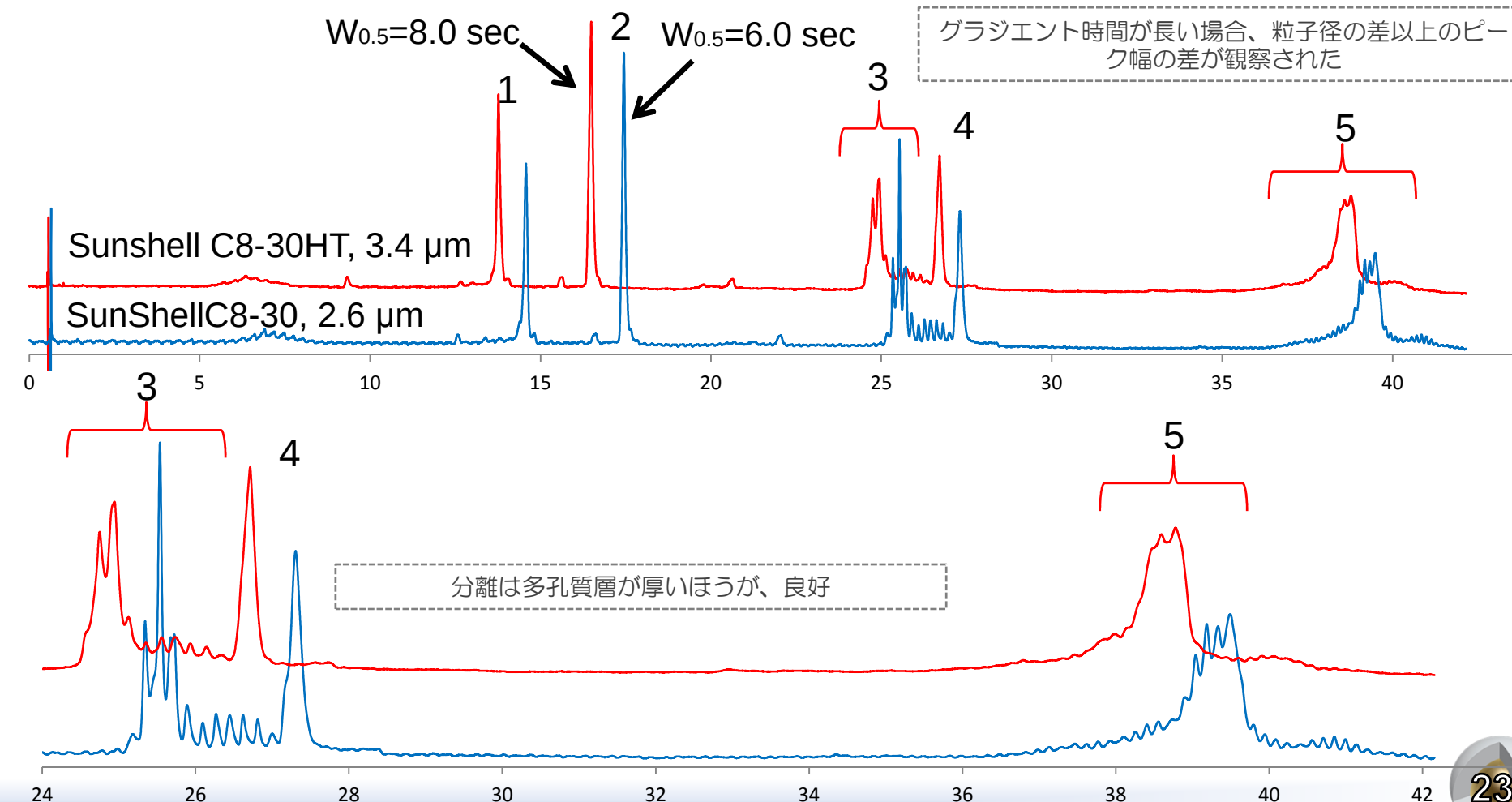
SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm, 0.5 μm layer) 150 x 2.1 mm, Sunshell C8-30HT, 3.4 μm (30 nm, 0.2 μm layer) 150 x 2.1 mm

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

Gradient program: Time 0 min 60 min
%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 80°C Detection: UV@215 nm,

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





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

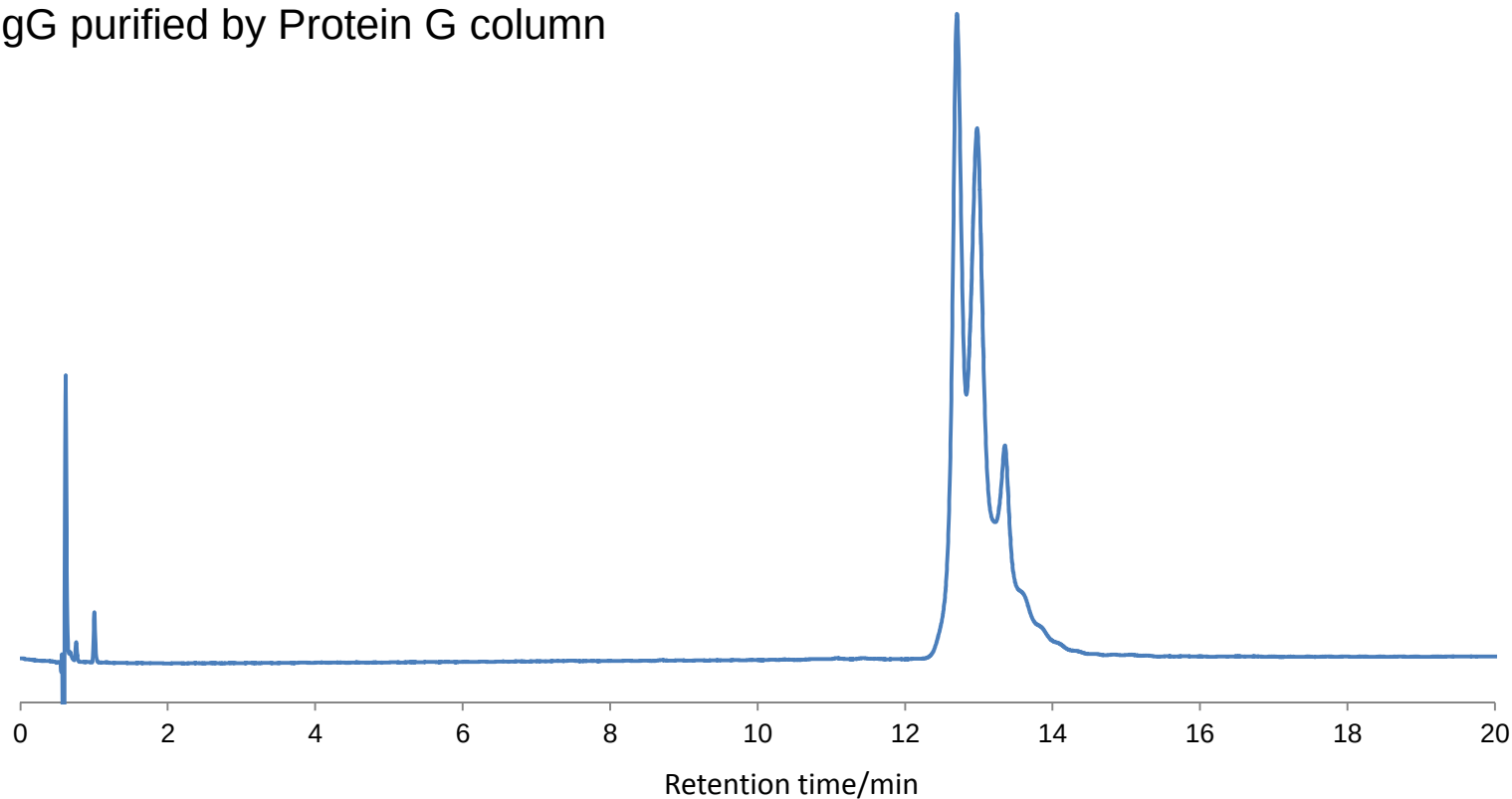
Gradient program: Time 0 min 30 min

%B 30% 45%

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

Detection: UV@215 nm,

Sample: IgG purified by Protein G column





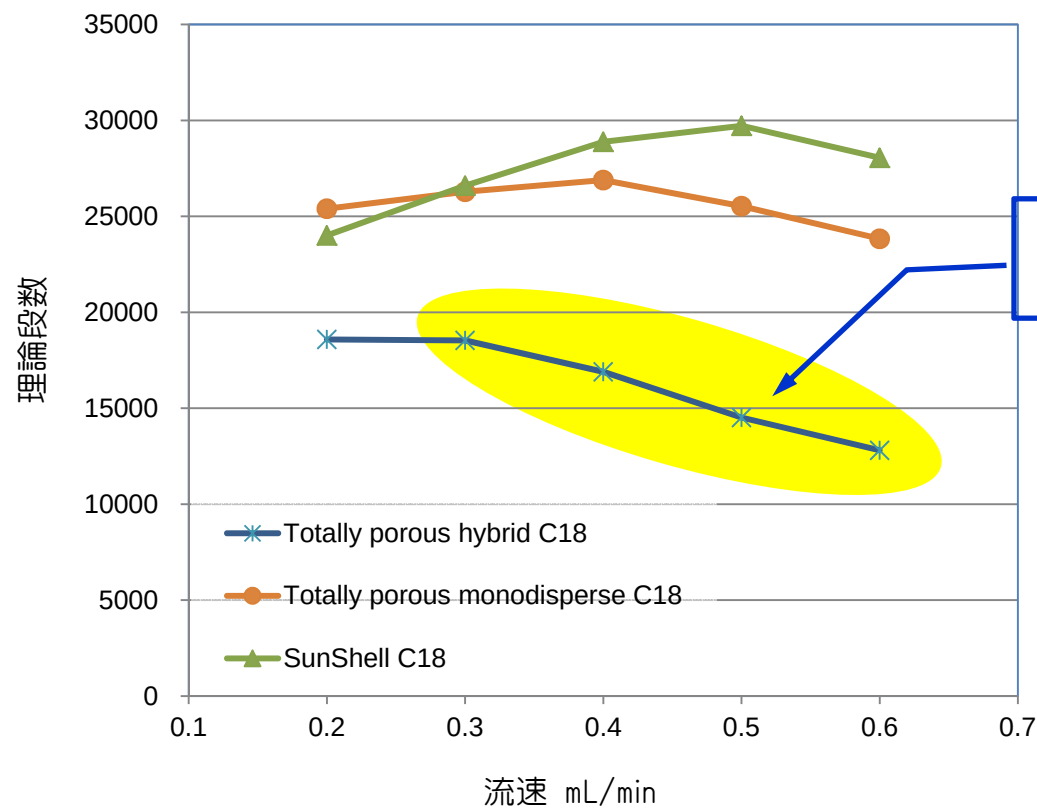
微粒子化のメリット，デメリット



- 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
 - 圧力が高圧に
- 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,



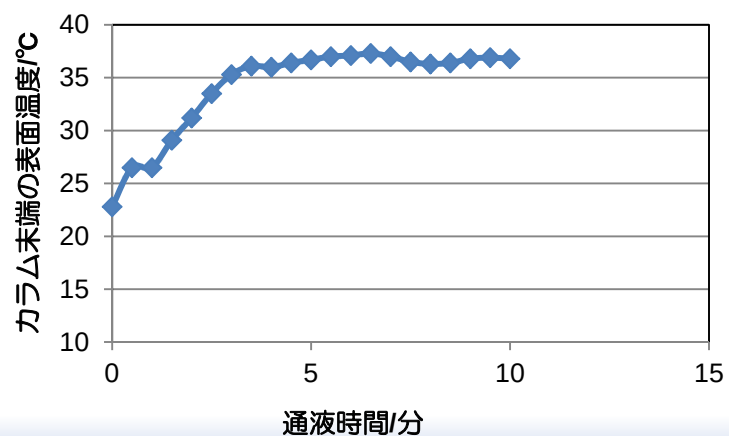
摩擦熱の発生



通液開始



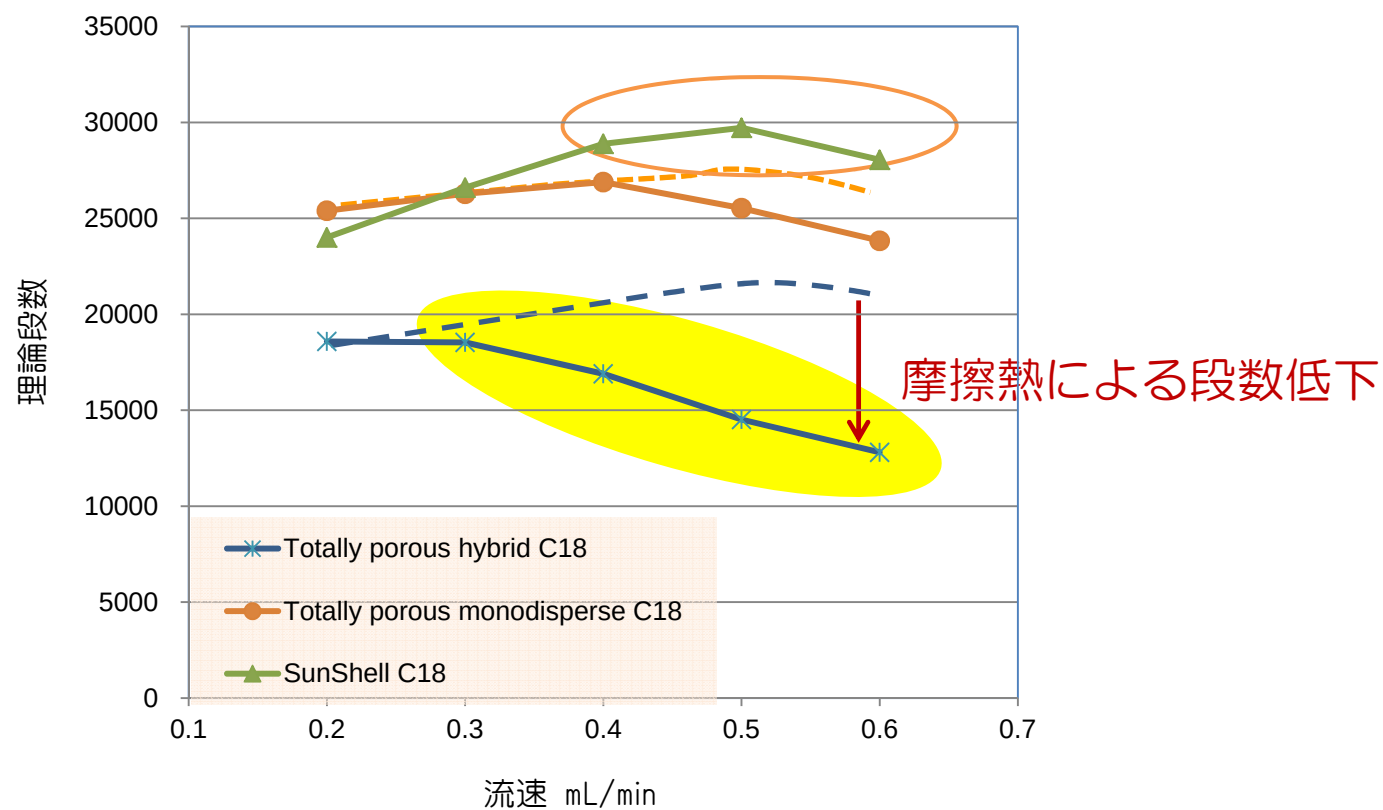
9分後



カラム：コアシエル, 2.6 μ m 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



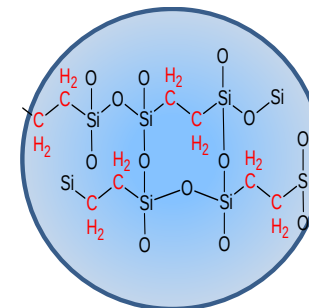
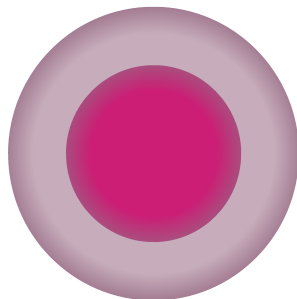
流速による理論段数変化



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



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).



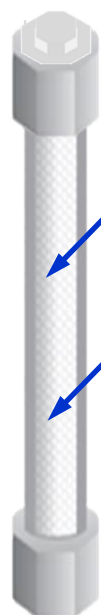
コアシェルシリカの熱伝導性はハイブリッドシリカの3倍



カラムを上手には・・

理論段数が高いカラムを使うにあたって・・・

ピークの溶出は早く、高理論段数化



カラム内拡散が小さい

物質移動速度が速い

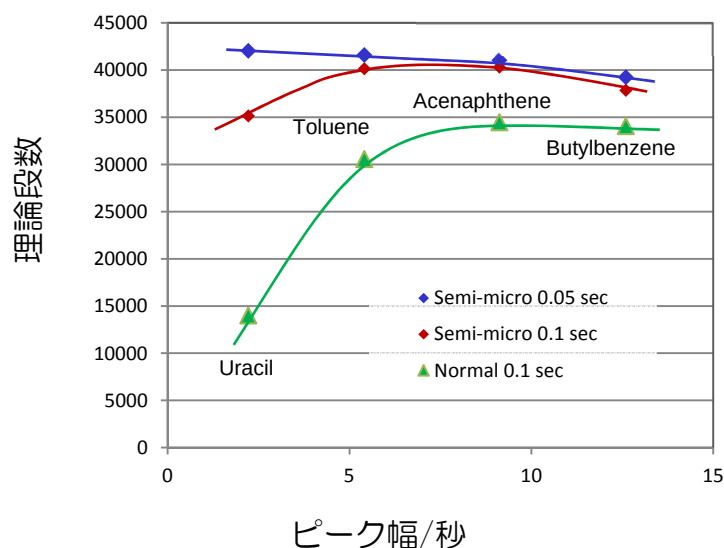
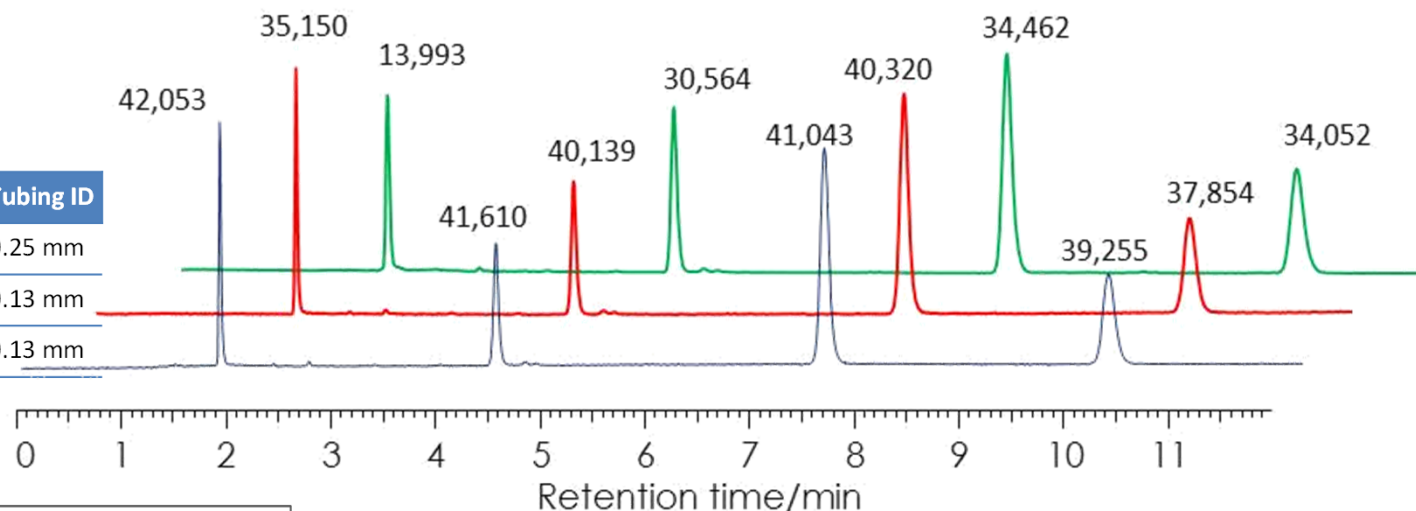


装置のチョットした容量が
結果に影響することに



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



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。