



LCカラムの基礎講座 全多孔性C18?コアシェルC18? どちらがどう良いの?

クロマニックテクノロジーズ 塚本友康 小島瞬 長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp

http://chromanik.co.jp







全多孔性?コアシェル?







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 微粒子化 基材の形状

→ 耐久性 • 選択性

→高理論段数化

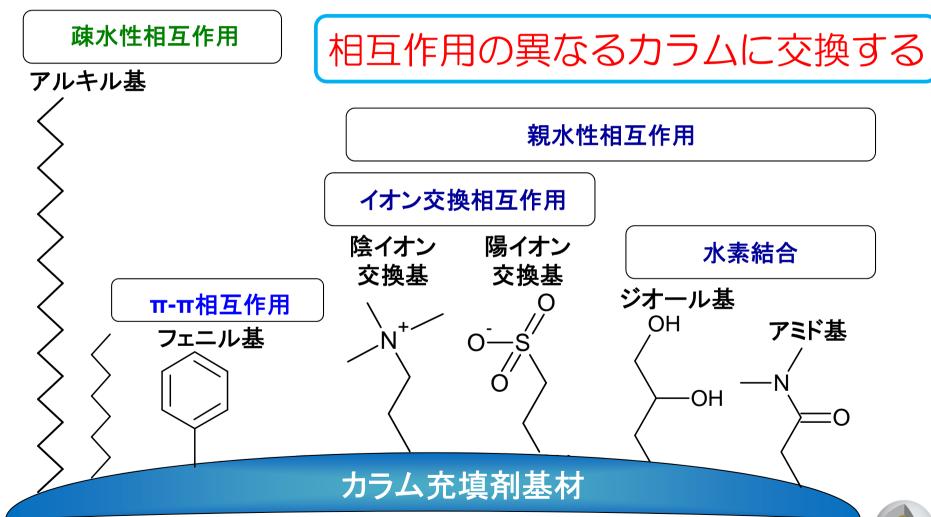
→ 高速化 • 高理論段数化

基材の選択 → 理論段数に大きく影響





分離を変えるには・・



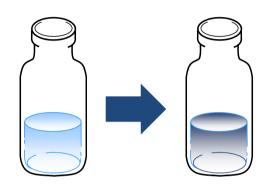




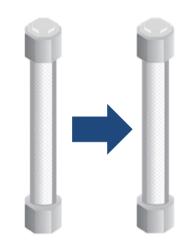
分離を変化させる

移動相を交換

カラムを交換



相互作用の 強さ 働き方



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



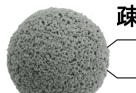
二次的な相互作用が変わるから





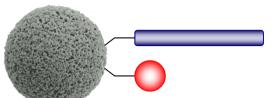


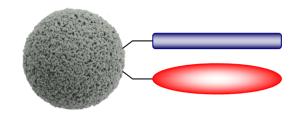
同じ官能基で差がでるのは?



疎水基 (主効果)

吸着性基 (二次効果相互作用)

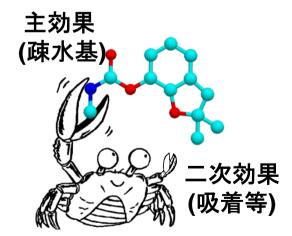




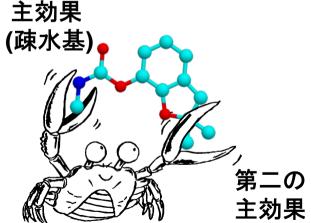
既存の分離剤

二次効果相互作用 制御型分離剤

第二主効果を持つ 二足型分離剤



主効果 (疎水基) 制御された 二次効果







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(150㎡/gほど)	広い(340㎡/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	軽しり	





化学的特徴は全多孔性シリカと同じ

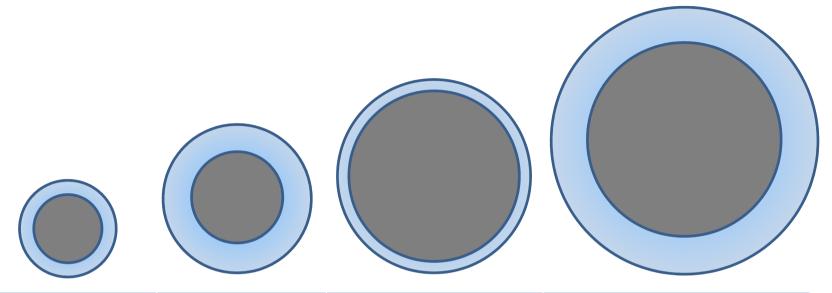
全多孔性シリカカラムで注意すべきこと

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

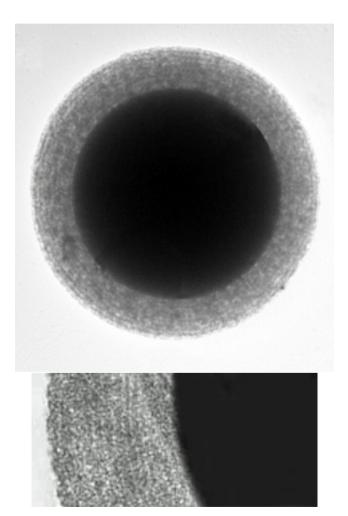


粒子径	1.3 - 2 µm	2.4 - 2.7 _{µm}	3.4 - 3.6 µm	4 - 5 μm
細孔径	9 - 10 nm	8 - 16 nm, 30 nm	20 - 40 nm	8 - 12 nm
多孔質層	0.22 - 0.4 µm	0.3 - $0.5~\mu m$	0.2 - 0.5 µm	0.?- 0.6 µm (非公開あり)
比表面積	100 — 120 m²/g	90 - 150 m ² /g, 40 m ² /g	15 m²/g (非公開あり)	90 m²/g (非公開あり)
多孔質%	58 – 78%	58 - 77%	27%	60%

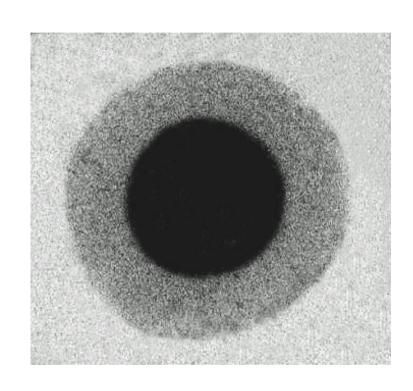




二種類のコアシェル構造のシリカ粒子



マルチレイヤー(多層)多孔質層構造

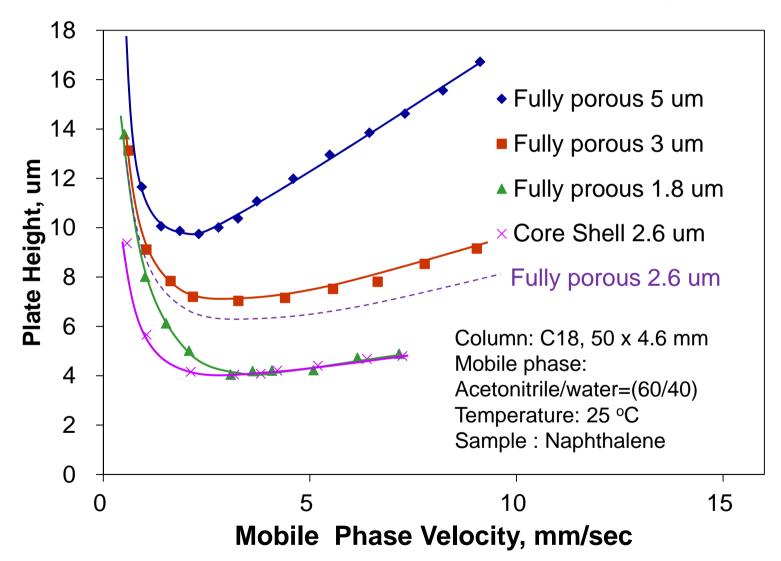


モノレイヤー(単層)多孔質構造





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

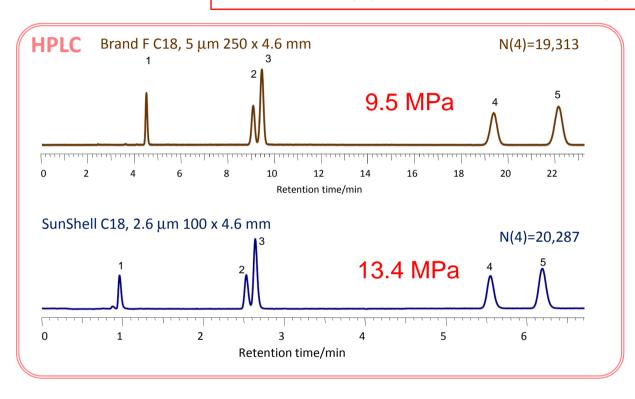






カラムの背圧

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 μmでは5 μmの約3.7倍の 圧になる

 $9.5 \times 3.7 / 2.5 = 14.1$

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

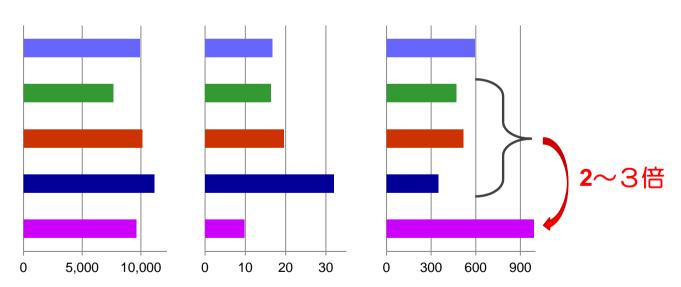
Sunniest C18-HT 2.0 μm

Brand A C18 1.9 µm

Brand B C18 1.8 µm

Brand C C18 1.7 µm

SunShell C18 2.6 μm



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に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 2.6μmと5μmの標準試料の保持比較

	全多孔性》 Sunniest	ソリカ C18, 5 μm	コアシェル SunShell C		コアシェル SunShell	レ型シリカ C18, 5 μm
比表面積	340	m²/g	150	m²/g	90 r	m²/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	80.0
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 μm**

コア径:3.4 μm ·

シェル層厚: 0.6 μm -

移動相: Methanol/water(75:25)

温度: 40℃

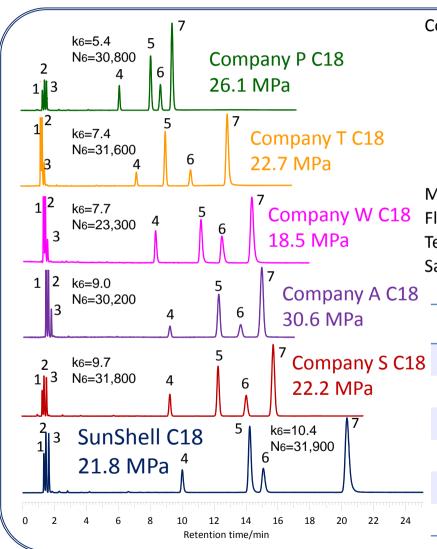
カラム: 150 x 4.6 mm

流速: 1.0 mL/min





標準試料の分離比較



Column:

Company P C18, 2.6 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

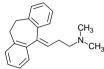
5 = o-Terphenyl, 6 = Amylbenzene, 7 = Triphenylene

<u>'</u>		, ,	•
	水素結合性 (Caffeine/Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/Butylbenzen e)	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

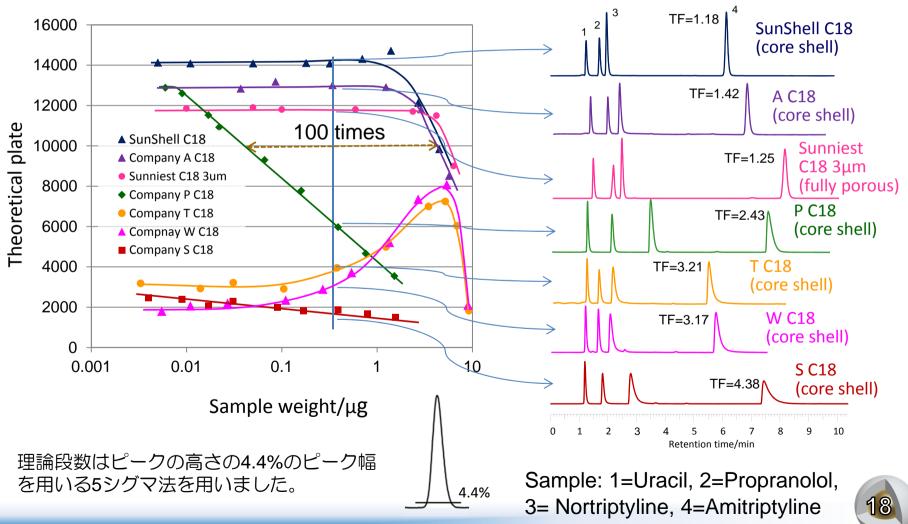




アミトリプチリンの負荷量比較 |



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







物性值

	炭素含有量 Carbon loading (%)	比表面積 Specific surface area ^a (m²/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℃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%



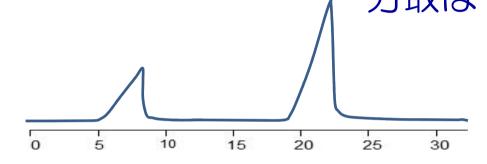
コアシェルカラムは保持時間・負荷量共に メーカ間の差が大きい





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 \sim 5 μ m	1.5 \sim 10 μ m
細孔径	$8\sim$ 100 nm	\sim 100 nm
比表面積	15 \sim 150 m²/g	\sim 400 m $^{\!\! \prime}$ /g
多孔質層	$0.2 \sim 0.6~\mu m$	-
重量	重い	軽しり

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



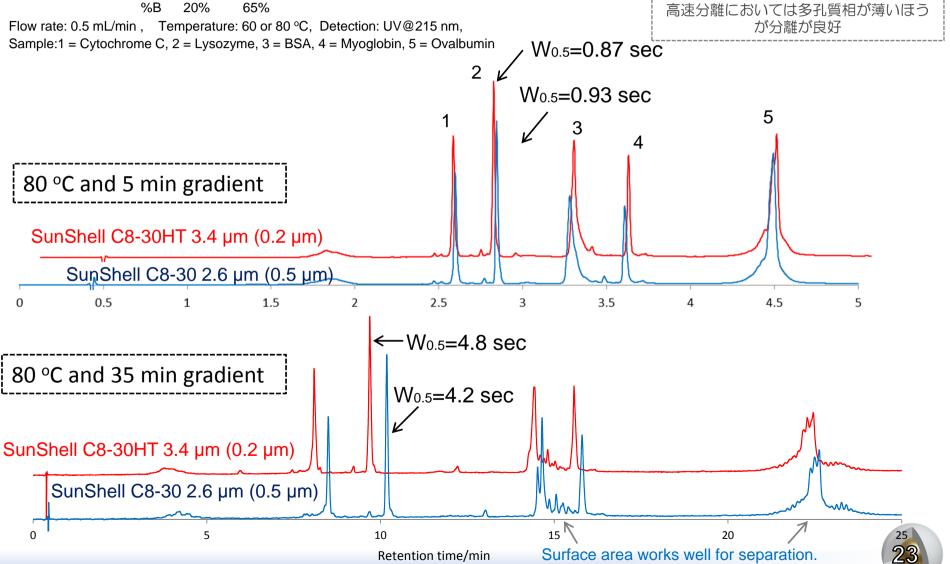


多孔質相の厚さが異なるコアシェルカラムの比較

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







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

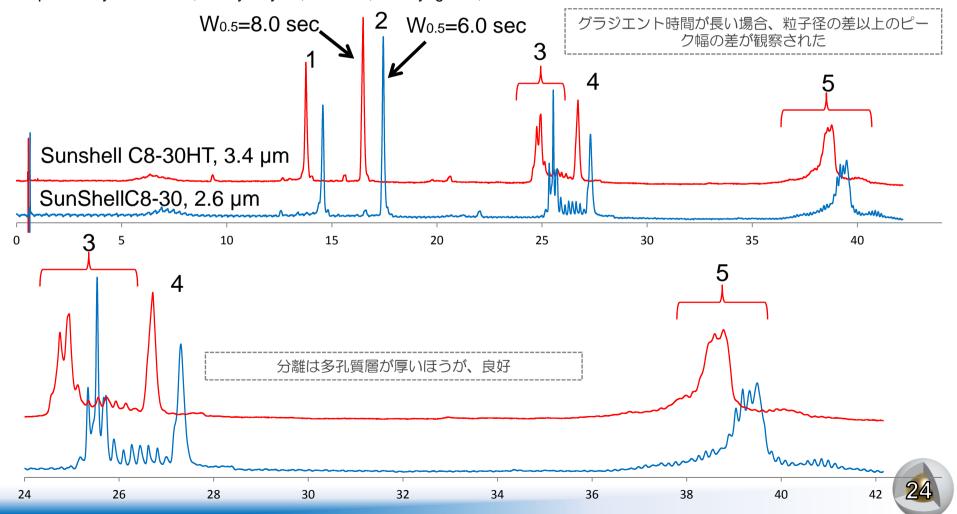
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

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







微粒子化のメリット、デメリット



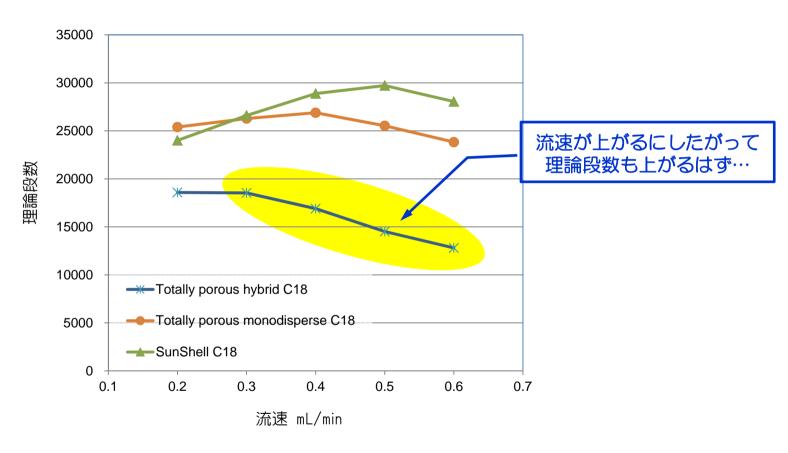
- HPLC, UHPLC両方で使用可能
- 時短,理論段数の両立が難しい場合がある

- 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



Column: 100 x 2.1 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

Temperature: 40 °C Sample: Acenaphthene,





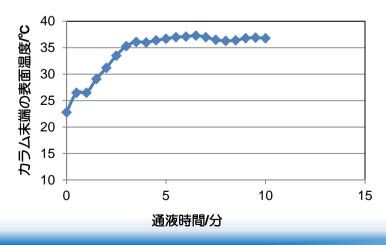
摩擦熱の発生







9分後



カラム: コアシェル, 2.6 μm 150 x 4.6

mm

移動相:メタノール

流速:5 mL/min

カラム圧:70 MPa

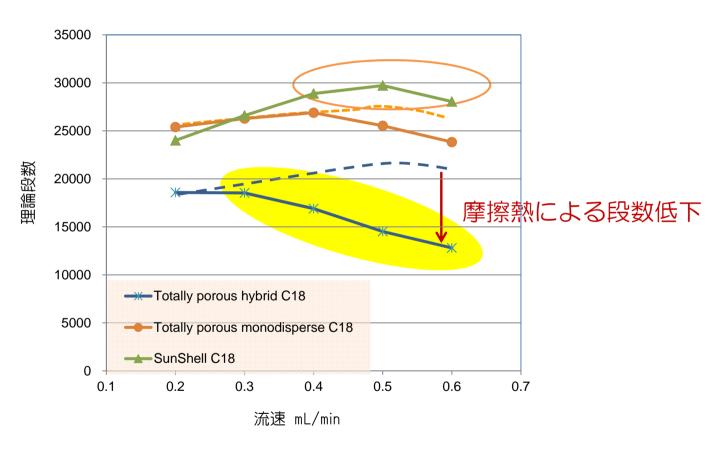
室温:23℃







流速による理論段数変化



Column: 100 x 2.1 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

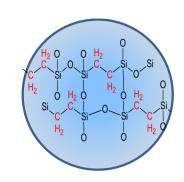
Temperature: 40 °C Sample: Acenaphthene,





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ッリドシリカの3倍





カラムを上手に使うには・・

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

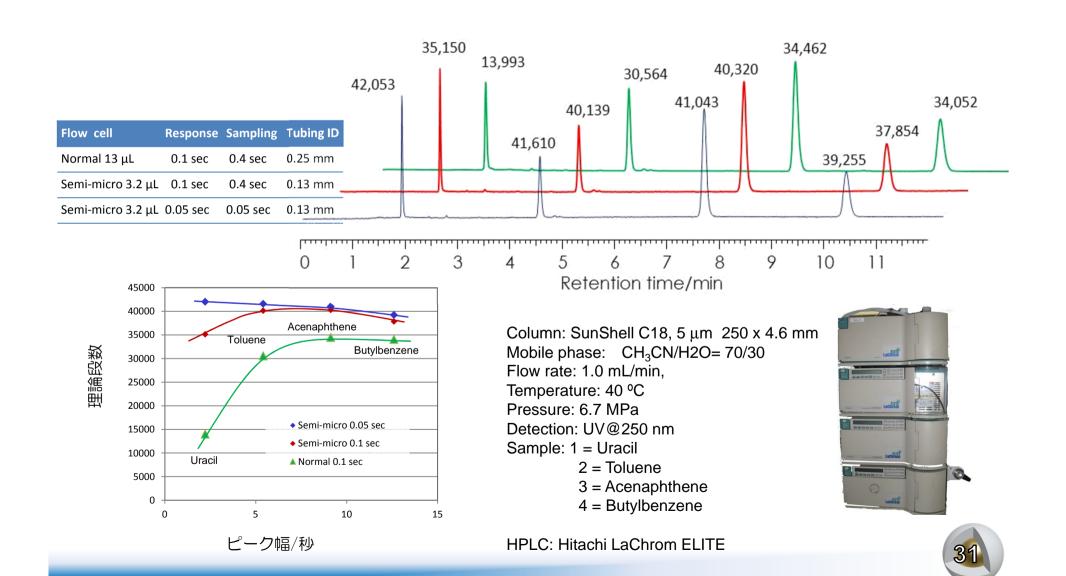


装置のチョットした容量が 結果に影響することに





通常仕様とセミミクロ仕様のHPLCの比較







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。
- ✓ 2µm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。