

UHPLC用カラムの上手な使い方

UHPLC(超高速液体クロマトグラフィー: Ultra High Performance Liquid Chromatography)は、粒子径 $2\mu\text{m}$ 前後の微粒子充填剤を用いたカラムを使用することにより、高速化、高分離化をはかった液体クロマトグラフィーです。短いカラムを用いて、移動相を高流速で送液することにより、画期的な分析時間の短縮ができます。標準的なカラム長さ(150 mm)を用いると、高分離分析が可能です。ここでは、UHPLC用カラムであるL-column2 ODS, $2\mu\text{m}$ の特徴を活かした「超高速分析」と「高分離分析」の例を紹介します。

Keywords L-column2 ODS, $2\mu\text{m}$ UHPLC 超高速液体クロマトグラフィー 高速化 高分離化
カラム圧力 超高速分析 分析時間短縮 高分離分析 高耐圧

UHPLC用カラムの特徴

■ 高速化

Fig. 1は、各充填剤粒子径の van Deemterプロットです。粒子径が小さくなると、理論段相当高さが最小になる移動相の線速度が大きくなり、その値の変化は幅広い線速度域で小さくなります。このためUHPLCでは分析の高速化がはかれます。

L-column2 ODS, $2\mu\text{m}$ の最適な線速度域は、2 mm/sec ~ 4 mm/secになります(内径2.1 mmの場合、1 mm/sec \equiv 0.2 mL/min)。

■ 高分離化

Fig. 1より、粒子径が小さくなると理論段相当高さが小さくなります。粒子径と移動相の最適線速度における理論段数は反比例します(補足1)。よって同じカラムサイズならば、 $2\mu\text{m}$ は $5\mu\text{m}$ の2.5倍の理論段数が得られます。

■ カラム圧力

粒子径が小さくなると、カラム圧力が高くなります(Fig. 2)。特に移動相を高流速で送液するUHPLCでは、高いカラム圧力で使用することになるので、高耐圧のカラムが必要になります。

(補足1)

理論段相当高さ(H)、カラム長さ(L)、理論段数(N)の関係は以下のようになります。

$$H = \frac{L}{N} \quad (1)$$

van Deemter の式は、移動相線速度(u)の関数として、式(2)で表されます。

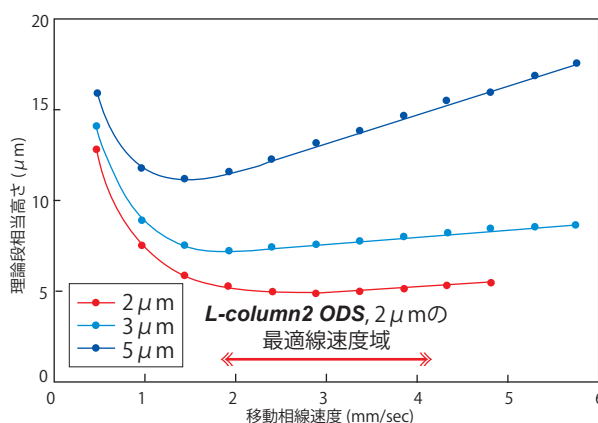
$$H = A \cdot dp + \frac{B}{u} + C \cdot dp^2 \cdot u \quad (2)$$

ここでdpは充填剤粒子径です。多流路拡散の項(A)と分子拡散の項(B)、物質移動の項(C)は、線速度及び粒子径によらない係数です。

最小理論段相当高さ(H_{min})と、これを得るときの最適線速度(u_{opt})を、式(2)より充填剤粒子径の関数として導くと次のようになります。

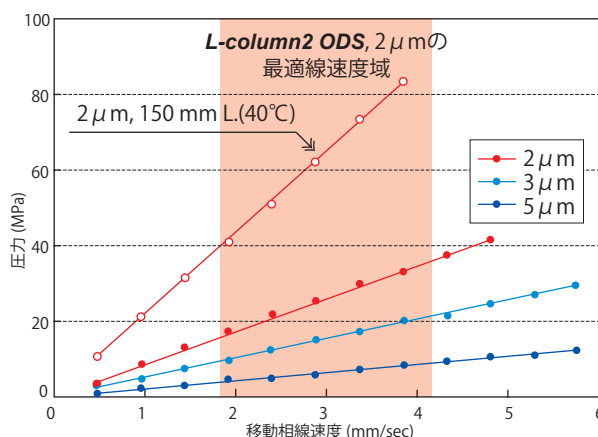
$$H_{min} = [A + 2 \cdot (B \cdot C)^{1/2}] \cdot dp \quad (3)$$

$$u_{opt} = \frac{(B/C)^{1/2}}{dp} \quad (4)$$



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 2.1 × 50 mm
Mobile phase: CH₃CN/H₂O (50/50); Temp.: 25°C; Inj.vol.: 0.5 μL
Sample: Naphthalene

Fig. 1 各粒子径のvan Deemterプロット



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 2.1 × 50 mm
Mobile phase: CH₃CN/H₂O (50/50); Temp.: 25°C; Inj.vol.: 0.5 μL
Sample: Naphthalene

* 圧力は配管及びシステムにかかる背圧を含む数値です。

Fig. 2 カラム圧力

超高速分析

■ 分析時間の短縮

5 μ mカラムと同じ理論段数を2 μ mで得る場合、カラム長さを1/3~1/2にできます(補足2)。カラムが短くなれば、必然的に分析時間が短縮します。**L-column2 ODS**では、5 μ mとほぼ同じ理論段数になる2 μ mは、以下のカラム長さになります。

5 μ m, 250mm \approx 2 μ m, 100mm
5 μ m, 150mm \approx 2 μ m, 75mm

ここでは、5 μ mでの分析を基準にしてどこまで分析時間が短縮できるかを実験しました。Fig. 3の安息香酸エステル7種の分析において、5 μ m(①)から同等の理論段数と分離度を保持しつつ、カラムを短くすることで、分析時間を1/6まで短縮することができました(②)。各成分の分離が十分ならば、さらに時間短縮がはかれます。カラム長さを50 mmにし、移動相を最適線速度の範囲内で最大にすることで、5 μ mの1/12の分析時間になりました(③)。

このように超高速分析では、カラムを短く、移動相を高流速で送液するため、カラム圧力(補足2)を考慮して50 mm以下のカラム長さが多く用いられます。

■ HPLC~UHPLC間の移行時の注意

一般にUHPLC対応カラムは内径2 mm~3 mmであり、内径4.6 mmを汎用カラムとするHPLCと互換性を維持するには、様々な注意が必要です。

[システム]

- ・デッドボリューム(配管、バルブなど)
- ・ミキサーボリューム(特にグラジエント分析)

[注入量]

- ・内径の断面積比に合わせる(試料溶媒によってはこの限りではない)

[移動相流速]

- ・内径の断面積比に線速度を合わせ、最適線速度の範囲内で設定する

[その他]

カラムのメーカー及び銘柄は同じものにします。特に吸着しやすい塩基性物質や配位化合物は、ピーク形状に差が出ます。

L-column2 ODSは、分離性能に関わるシリカゲル基材の粒子径以外の物性を各粒子径間で同一にし(Table 1)、ODS修飾からエンドキャッピングに至る製造を厳密に管理しているので、異なる粒子径でも、ほぼ同じピーク形状と分離挙動が得られます。

配位化合物は金属不純物に吸着しやすい物質です。Fig. 4では、配位性化合物であるヒノキチオールを、同じ銘柄で粒子径の違うカラムで分析した結果を比較しました。UHPLCではHPLCより高感度分析が求められるケースがありますが、**L-column2 ODS**, 2 μ mは低濃度でもシャープなピークで検出できます。

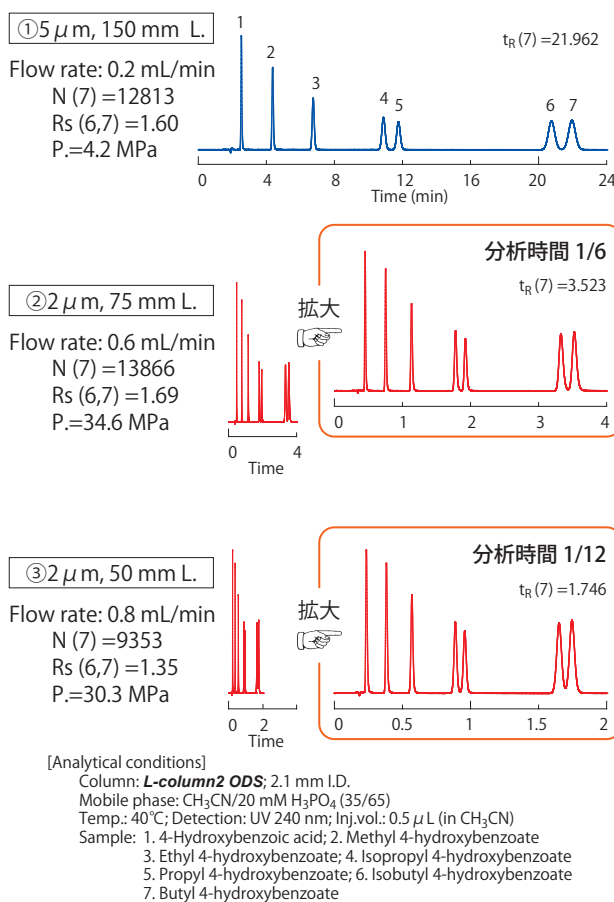


Fig. 3 分析時間の短縮

Table 1 シリカゲル基材の物性情報(抜粋)

L-column2 ODS; 2μm, 3μm, 5μm	
平均細孔径	12 nm
平均比表面積	340 m ² /g
平均炭素含有量	17%

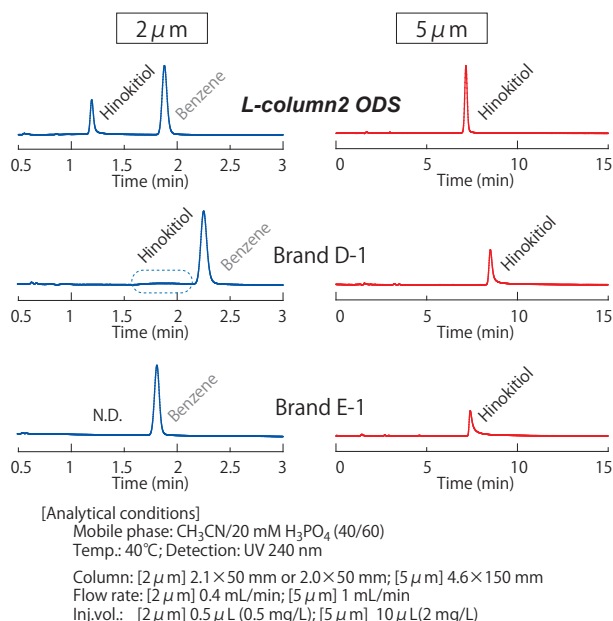


Fig. 4 粒子径の違いによるピーク形状の比較(配位化合物)

■ HPLCからUHPLCへの移行例

解熱剤主成分3種の分析において、標準的な内径のカラムを用いてHPLCからUHPLCへ移行しました(Fig. 5)。

まず内径の断面積比に移動相の線速度を合わせ、かつ、2 μ mの流速を最適線速度の範囲内で高速化をはかります。2 μ mは高理論段数を有するので、カラムを短くできます。なお、ここでは試料溶媒は移動相と同じ組成にしているため、注入量を内径の断面積比に合わせなくてもピーク形状に影響しません。

結果、カラム長さを1/2にして、流速を0.6 mL/minに設定することで、分析時間は1/6、使用溶媒量は1/10にすることができました。

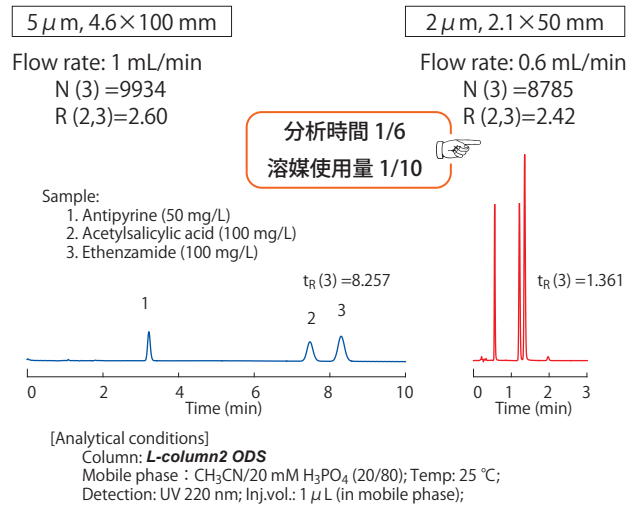


Fig. 5 HPLCからUHPLCへの移行(解熱剤)

高分離分析

■ 分離の向上

L-column2 ODS, 2 μ m は高理論段数を有します。Fig.3 ①と同サイズで移動相流速を最適化すると、2 μ mでは、実測値で約2.4倍の理論段数、分離度では1.6倍(補足2)の分離の向上ができました(Fig. 6)。

■ 高分離分析

理論段数はカラム長さに比例します。カラムを連結すれば、10万段以上の高理論段数を得ることができます。

Fig. 7は、カラム長さを最長600 mm(150 mmを4本連結)で高分離化をはかった例です。このときのカラム圧力は125.5 MPa(システム背圧を含む)になりました。カラム圧力が低い**L-column2 ODS**, 2 μ m だからこそ、カラム連結による高分離分析が可能です。連結に使用する配管を短くすれば、理論段数の低下はほとんどありません。

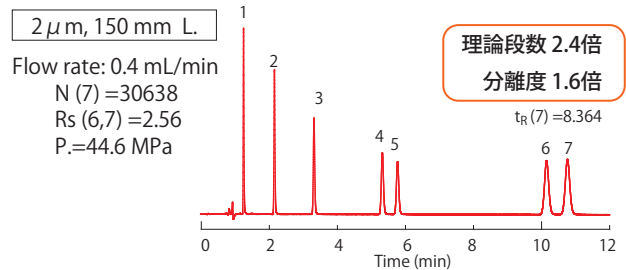
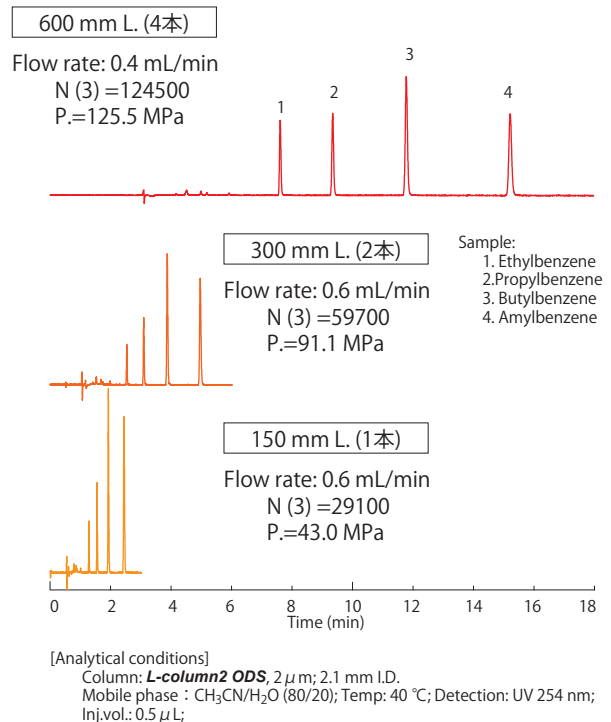


Fig. 6 分離の向上



*カラム連結には0.1 mm I.D. \times 50 mm L.の配管を使用しています。

Fig. 7 カラム連結による高分離分析

(補足2)

粒子径と移動相の最適線速度における理論段数(分離度)・カラム圧力は以下の関係になります(実測値)。

Table 2 粒子径と理論段数(分離度)・カラム圧力の関係

粒子径(μ m)	理論段数(分離度)	カラム圧力
2	$\frac{5}{2}$ (1.6)	$\frac{25}{4}$
3	$\frac{5}{3}$ (1.3)	$\frac{25}{9}$
5	1 (1)	1
10	$\frac{1}{2}$ (0.7)	$\frac{1}{4}$

*粒子径5 μ mを「1」とした場合

分離度R(又はRs)と理論段数(N)は、以下の関係にあります。

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k + 1} \quad (5)$$

ここで α は分離係数、 k は保持係数です。

■ ペプチドマッピングの高分離化

ペプチド断片を分析してタンパク質の一次構造を確認するペプチドマッピングは、抗体医薬品(バイオ医薬品)の特性解析や確認試験に用いられます。ピークが数多く検出でき、かつシャープであることが重要です。

Fig. 8は、糖タンパクであるトランスフェリンをトリプシン消化し、得られたペプチドを分析しています。分析時間が同じ場合(グラジエント勾配が同じ場合)、移動相流速を早くすると、ピークキャパシティは高くなります。カラムを連結すれば、さらに高いピークキャパシティが得られます。

このように低吸着、高分離の**L-column2 ODS, 2 μ m**を用いれば、高いピークキャパシティにより、高精度の結果が得られます。

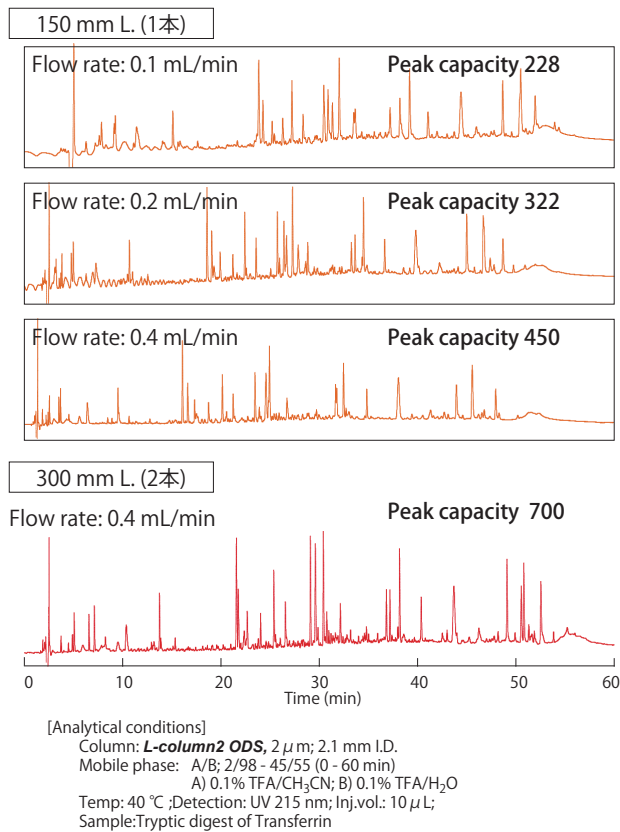


Fig. 8 ペプチドマッピング(Application No.2076)

耐圧について

UHPLC用カラムには耐圧が求められます。最高使用圧力が高いだけでなく、圧力変動があっても性能が安定しているカラムこそ高耐圧カラムといえます。

Fig. 9は、移動相ポンプを60秒毎に送液~停止を行い、圧力変動*1(8~96 MPa*2)を**L-column2 ODS, 2 μ m**に与えたときの理論段数の変化です。徐々に理論段数は低下していきますが、プレカラムフィルターを交換すると、2000回後も初期性能の90%を維持していることがわかります。このように**L-column2 ODS, 2 μ m**は、過酷な条件でも高耐圧なカラムであることがわかります(UHPLC用カラムの性能維持にはプレカラムフィルター装着及び適宜交換が必要です)。

L-column2 ODS, 2 μ mの推奨使用圧力(抜粋)

カラムサイズ	推奨使用圧力*3
2.1×150 mm	~80 MPa
2.1×100 mm	~60 MPa

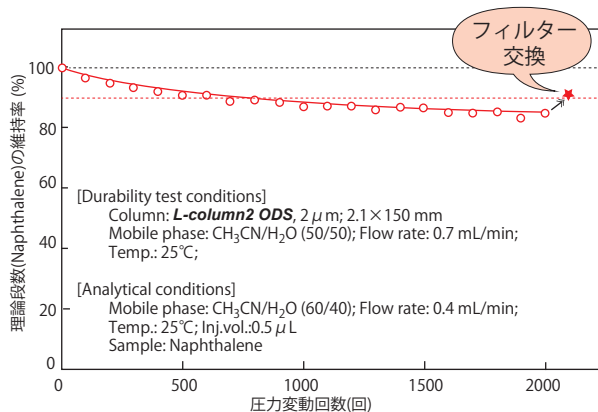


Fig. 9 耐久性試験(繰り返し圧力変動)

*1 Fig. 9では、加速してデータを採取するために設定した条件です。このような急激な圧力変動や圧力上限以上の使用は絶対にお止めください。

*2 配管及びシステムにかかる背圧を含む数値です。

*3 推奨使用圧力は2012年2月現在のものです。性能向上により変更の可能性がございます。

リーフレット内容に関してのお問合せは、最寄の代理店又は東京事業所クロマト技術部までご連絡ください。

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
<http://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部
e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地