

- HPLCカラム - 真の性能の利用のために

1. 分離を支配する要素
バンド拡がり
van Deemter 式
カラム外効果

理論段数
 $H = \sigma^2 / L$ 理論段高
A, B, C項 最適 u
 σ_{ext}^2 分散

2. 逆相クロマトグラフィー
溶質と固定相の相互作用
固定相の調製法と保持特性
シリノールと金属不純物の効果

分散相互作用
 $\alpha(CH_2)$ 値
二次的保持効果

3. HPLCの高性能化
微粒子充填剤
モノリスカラム
ピークキャパシティ
2D-HPLC

UPLC: N / t_0
(流路 / 骨格) サイズ比
真の分離性能?
高いピークキャパシティ

07RPLC

1

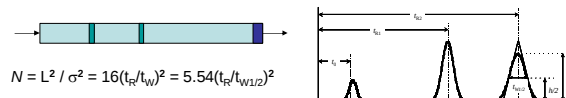
1. 分離を支配する要素

$$R_s = (\sqrt{N}/4) \cdot [(\alpha-1)/\alpha] \cdot [k/(k+1)] \quad (1)$$

分離度 理論段数 選択性 保持

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2) \quad (k: \text{保持係数} \text{ --- 固定相の保持能力, 移動相の溶出力})$$

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad (3) \quad (\alpha: \text{選択性, 分離係数} \text{ --- 官能基の効果})$$



$$N = L^2 / \sigma^2 = 16(t_R/t_0)^2 = 5.54(t_R/t_{W1/2})^2$$

バンド拡がり(を支配する要素)の理解(分散の可成性)

$$L/N = H = \sigma^2 / L = \sigma^2(\text{移動相}) + \sigma^2(\text{分子拡散}) + \sigma^2(\text{固定相})$$

$$\text{理論段高} = H = C_E d_p + C_D/u + C_S d_p^2 u$$

(N : 理論段数, L : カラム長, H : 理論段高, u : 移動相線速度, d_p : 粒子径, D_m : 拡散係数)

σ^2 : 溶質バンドのガウス分布の分散)

クロマトグラフィーは、固定相と移動相との間の溶質の分配係数における差を、移動速度の差に置き換えて分離を行う手法である。

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 用語

1. カラム (Column)
 2. 充填剤 (Packing material) particles
 3. 固定相 (Stationary phase)
 4. 移動相 (Mobile phase) solvent
 5. 保持、保持係数 (Retention factor = k)
(t_0 or t_{m0} : Column dead time or hold up time, t_R : Retention time)
 6. 分離係数 (Separation factor = α) selectivity
 7. 分離度 (Resolution = R_s)
-
8. 理論段数 (Number of theoretical plates = N) 分配平衡の回数
 9. 理論段高 (Height equivalent of theoretical plates = H) 1段相当カラム長
 10. ピークキャパシティ (Peak capacity = n_c) 分離可能ピーク数
 11. 分離インピーダンス (Separation impedance = E) 時間あたり、圧力あたり N
 12. 理論段数 / plate time (maximum N at minimum t_R/N) Poppe Plot
 13. 理論段数 / (maximum N at minimum t_R/N^2) Kinetic plot analysis

HPLC分離 - HPLCカラムの分離性能

- 課題1 HPLCにおける分離を支配する要素は何か。
- 課題2 カラムの性能(H = 単位カラム長あたりの溶質バンドの拡がり = ガウス分布の分散)は何に依存するか?
- 課題3 H を決める要素: A項, B項, C項とは?
- 課題4 カラムの性能を最大限に利用するために必要なことは?
- 課題5 カラムの真の理論段数(性能)とは?

07RPLC

4

カラム内でのバンド拡がりの記述 (Van Deemter equation (3))

1. multiple path (多流路拡散)
2. molecular diffusion (分子拡散)
3. slow mass transfer (遅い物質移動)

1956 J.J. Van Deemter

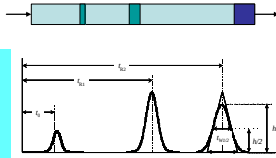
HETPの移動相流速に対する依存性を記述

$$N = L^2 / \sigma^2 = 16 t_R^2 / t_W^2 \quad (1)$$

$$H = \sigma^2 / L = L / N = h d_p \quad (2)$$

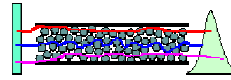
$$H = C_E d_p + C_D / u + C_S d_p^2 u \quad (3)$$

$$= A + B/u + Cu$$



http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Theory/th_vandm.html

Multiple path (多流路拡散) A項



カラム内の(直径方向の)異なる点で、移動相の流速が異なる。粒子の大きさ、形状、充填状態、空隙の大きさなどに依存する。

バンド拡がりに対する効果(A項)は、次のように表される。流速に依存しない。

$$H_p = 2\lambda d_p$$

http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Theory/th_vandm.html

07RPLC

6

Molecular diffusion (分子拡散)

移動相溶媒中、固定相上での分子拡散: カラム軸方向の成分がH(バンド拡がり)に寄与する。

$$H_d = 2 \gamma D_m / v \quad H = \sigma^2 / L, \sigma^2 = 2 D_m t_R \quad (t_R = L/u_{solute})$$

D_m : 拡散係数
 γ : obstruction factor
 v : (reduced) velocity

バンド拡がりに対する効果(B項)は、流速に反比例する。分子量の大きな溶質について、バンド拡がり(効果)が小さい。粒子の大きさ、形状、充填状態などにそれほど依存しない。

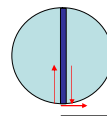
http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Theory/th_vandm.html

Kinetics of the mass transfer (物質移動の速さ、遅さ)

充填剤の中と外、固定相の中と外の移動、ならびに、吸着と脱着の効果を含む。
5 μm 充填剤の10 nmの細孔を考えるとサイズは500/1、細孔内の流速は無視できるほど小さい。分子は拡散によって移動する。
吸着、脱着の速度(遅いこと)は、通常、無視できる。

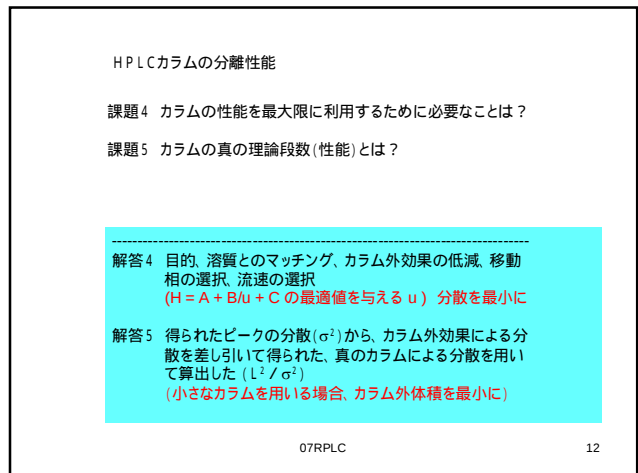
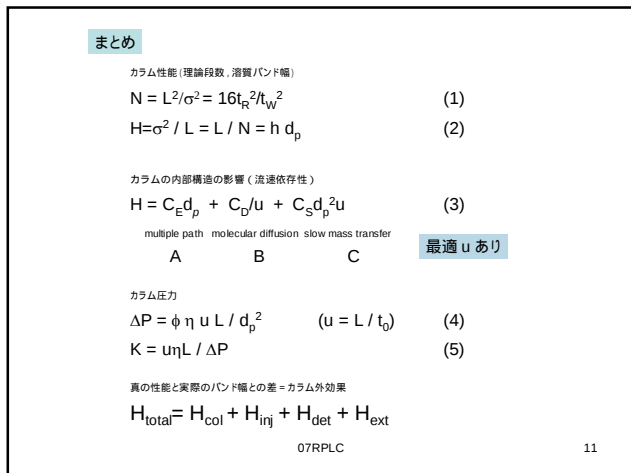
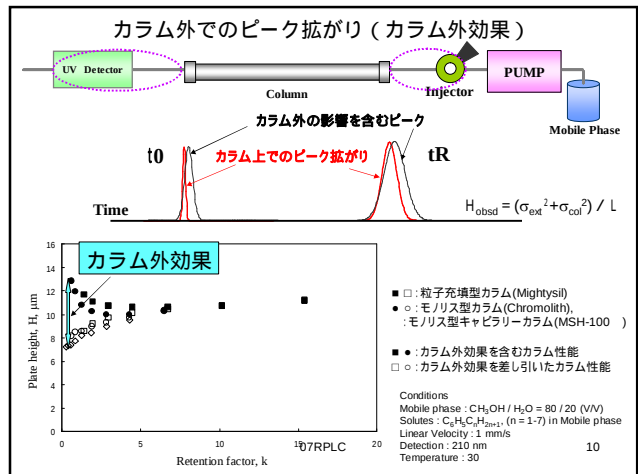
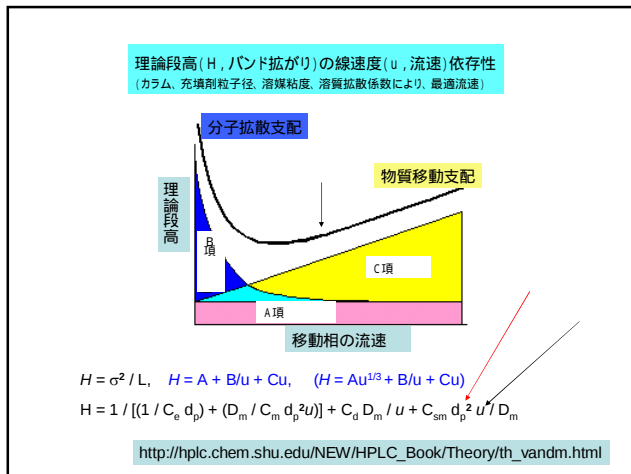
$$H_m = \omega \frac{d_p^2}{D_m} v \quad (10)$$

d_p : 粒子径
 D_m : 拡散係数
 ω : 粒子の細孔径分布、形状、粒子径分布により決まる係数
 v : (換算)線速度



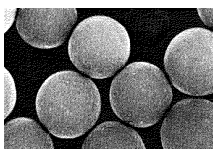
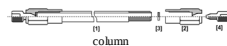
バンド拡がり(H)は、流速に比例。高速溶出で効果が大きい。

http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Theory/th_vandm.html

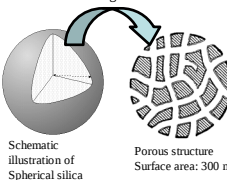


Reversed-phase LC (逆相クロマトグラフィー)

Packing materials for RPLC

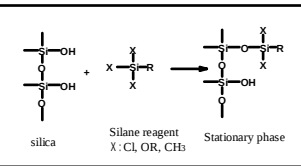


Packing material

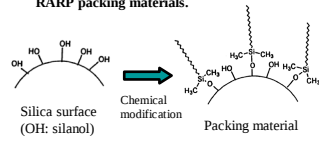


Schematic illustration of Spherical silica

Porous structure
Surface area: 300 m²/g



Schematic illustration of RARP packing materials.



13

C₁₈ column, CH₃OH-H₂O mobile phase

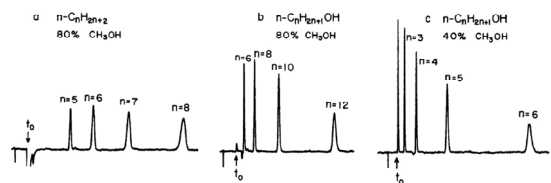


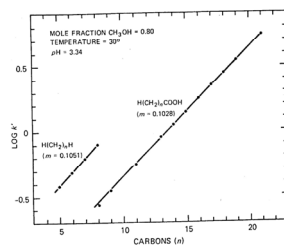
図4. 逆相クロマトグラフィーの分離パターン. アルカンとアルコールの溶出

炭素数が増加すると、一定の割合で保持(k)が増加する。移動相の水含有量が大きいと、1個の(CH₂)基による保持の増加率が大きい。α(CH₂)大

07RPLC

14

溶質分子(アルキルカルボン酸)の炭素数と逆相クロマトグラフィーにおける保持との関係



$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

$$\Delta \Delta G^0 = -RT \ln (k_2/k_1)$$

$$\Delta \Delta G^0 = -RT \ln \alpha(\text{CH}_2)$$

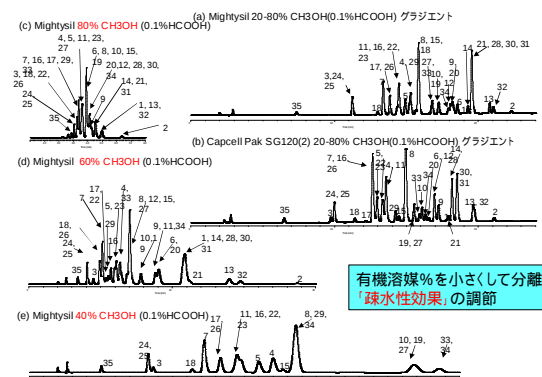
α(CH₂): 疎水性

炭素数の増加とともに、アルキル化合物のlog k は直線的に増加する。
log α(CH₂) = 一定、(移動相から固定相への移動にともなうエネルギー変化)。

液-液分配系、(アルカン-水、アルコール-水分配系)と同様、「疎水性」。

07RPLC

15

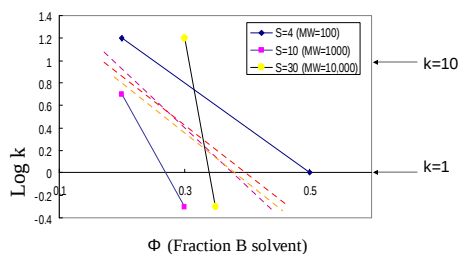


有機溶媒%を小さくして分離「疎水性効果」の調節

図5 逆相クロマトグラフィー分離条件の設定。(a,b)ベンゼン誘導体のグラジエント溶出、CH₃OH 20%→80%(20分)、(a) Mightysil C18 (4.6 mmx15 cm), (b) Capcellpak C18 (4.6 mmx15 cm)、(c-e) イソクラティック溶出(80-40% CH₃OH)、(b) Mightysil C18, (c) 80%, (d) 60%, (e) 40%。

07RPLC

16



移動相溶媒の効果 1

移動相のCH₃OH %の増加により、(直線的に)保持(log k)が減少する。保持の減少の度合い(直線の傾き)は、溶質の分子量に依存する。適当な時間(k範囲)で、分離が得られる条件を設定する。

07RPLC

17

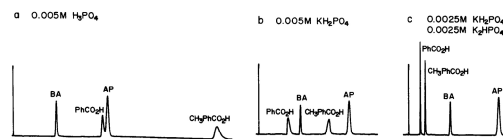


図6. カルボン酸の溶出と移動相pHの効果

移動相溶媒の効果 2 (pH)

イオンの保持は小さい。高性能のために、pH制御が必要。中性化合物の保持は、pHに依存しない。

07RPLC

18

逆相HPLCにおける疎水性以外の効果

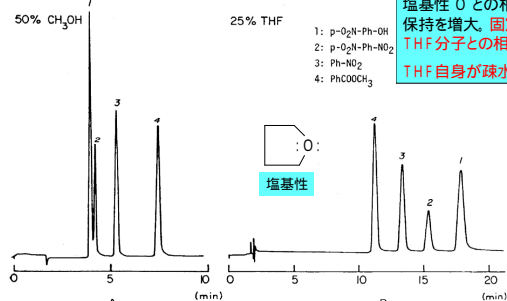


図7. 移動相有機溶媒(THF)による選択性(CH₃OHとの差)

逆相クロマトグラフィーにおける 有機溶媒による選択性の変化。
カラム: Hypersil C8 (4.6 mmx 15 cm), 流速 1 mL/min.

07RPLC

19

移動相溶媒の効果 3

酸(π酸)の保持が大きい。塩基性Oとの相互作用が保持を増大。固定相中のTHF分子との相互作用。THF自身が疎水性をもつ

逆相HPLCにおける固定相の効果 1

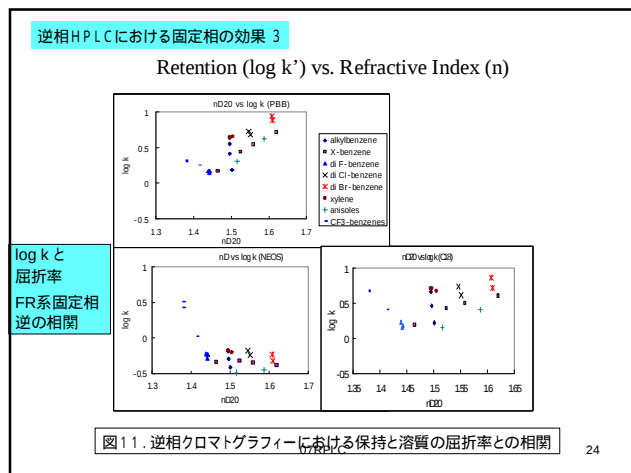
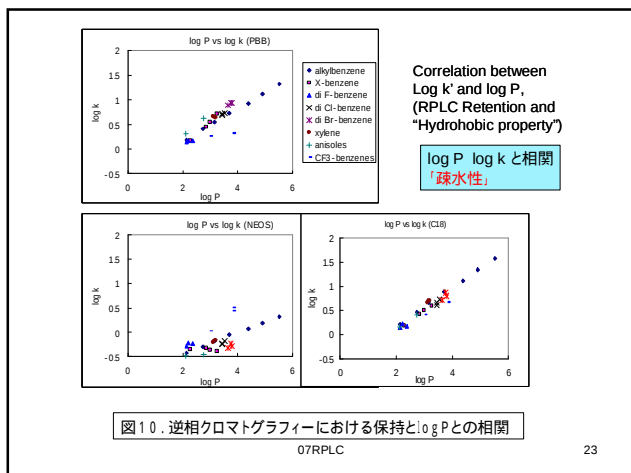
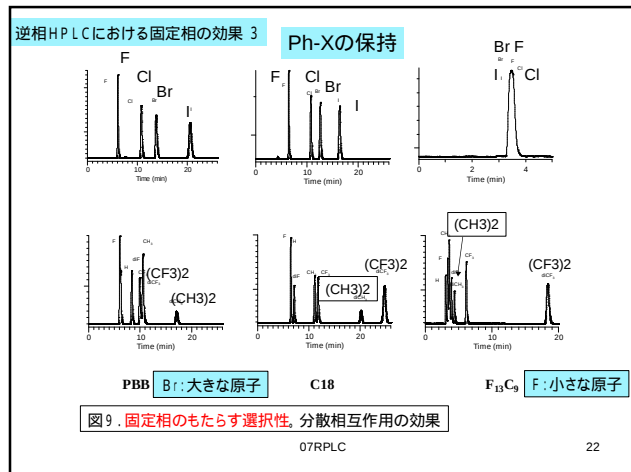
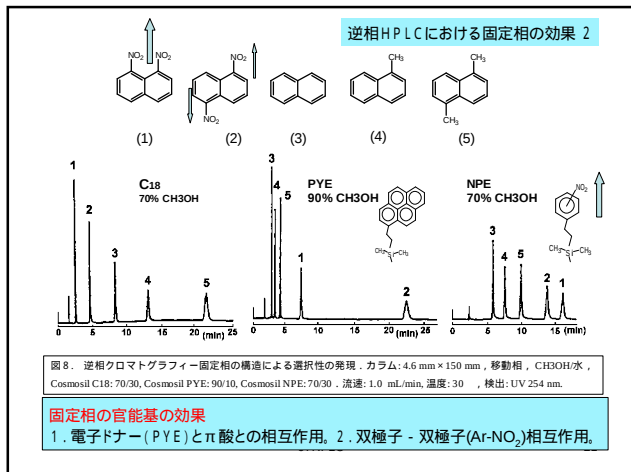
Polar interactions, Contribution of stationary phase
親水性溶質に対する固定相の効果 C18 vs C8

mobile phase	solute	C ₁₈	k'	C ₈
80% CH ₃ OH	pyrene	9.0	2.9	
	n-hexane	6.7	3.3	
	n-C ₁₂ H ₂₅ OH	9.4	5.3	
	n-C ₉ H ₁₉ COOCH ₃	7.2	4.1	
15% CH ₃ OH	n-C ₄ H ₉ OH	7.5	8.1	
	t-1,2-cyclohexane-dimethanol	23.3	24.3	
	t-1,4-cyclohexane-dimethanol	8.2	9.1	

C8固定相はC18と比較して、親水性基の保持に不利でない。低反応率のC18も同様。

07RPLC

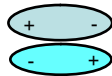
20



$$\alpha = (n_r^2 - 1) / (n_r^2 + 2)$$

n : refractive index 屈折率

α : polarizability 分極率



大きな分極率 = 強い分散相互作用(瞬間双極子 - 誘起双極子相互作用)

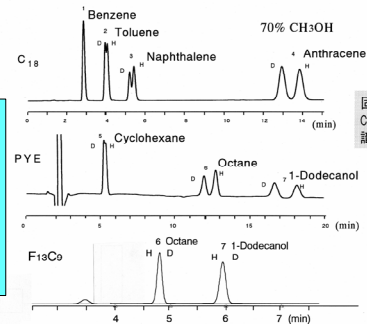
大きな原子(大きな、ゆるい電子軌道) vs. 小さな原子(小さな電子軌道)
I, Br, S, π 電子 F, O, H

07RPLC

25

逆相HPLCにおける固定相の効果 4

H / D isotope separation



芳香族グループ
同位体効果を
大きくする。

FR系で、同位体
効果が小さい。

固定相が
C-HとC-Dを
識別する。

図12. 保持に対するH/D同位体効果—分散相互作用の寄与

26

逆相HPLCにおける固定相の効果 4

表3. 保持に対する重水素同位体効果

Compound	kH/kD (%IE per D)		
	C18	PBB	F13C9
Naphthalene	0.680	0.688	0.168
Anthracene	0.748	0.752	0.178
Octane	0.347	0.427	-0.129
1-Dodecanol	0.343	0.414	-0.118

$\alpha(\text{CH}_2) = k(\text{amylbenzene})/k(\text{butylbenzene})$

$\alpha(\text{C}_4\text{H}_2) = k(\text{naphthalene})/k(\text{benzene})$

Mobile phase: 70% methanol

芳香族グループが同位体効果を大きくする。PBB(Br5)が最大のH/D識別を与える。FR系で、同位体効果が小さい。

逆相HPLCにおいて、溶質と固定相との分散相互作用は大きな効果をもつ。

07RPLC

27

逆相HPLCにおける固定相の効果 5

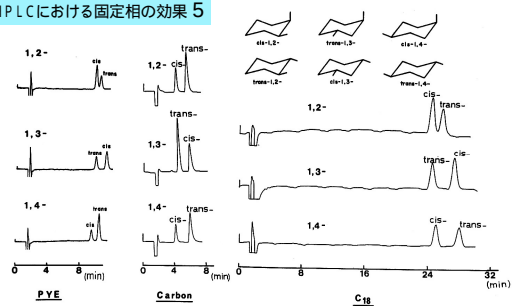


Fig. 4. Separation of dimethylcyclohexanes on C₁₈, PYE and carbon packing materials. Mobile phase: 70% methanol.

図13. Carbon充填剤の立体選択性 vs. PYE and C18

分散相互作用の大きさは距離の6乗に反比例する。立体効果が大きい。

07RPLC

28

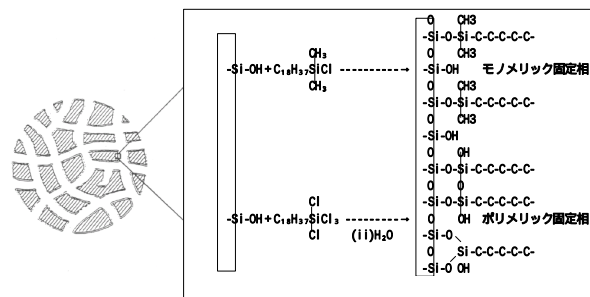
表2. 逆相クロマトグラフィー系において、溶質の保持をもたらす相互作用

疎水性相互作用 - 分子体積、表面積 水の構造性、水素結合の切断	移動相中
双極子 - 双極子相互作用 (官能基の水素結合) 溶媒和	移動相中
分散力 (瞬間双極子 - 誘起双極子相互作用)	固定相
立体効果 (立体的相補性)	固定相
電子供与体 - 受容体相互作用	固定相官能基
イオン - イオン相互作用	シラノール?

07RPLC

29

逆相HPLC固定相の調製法と保持特性



07RPLC

30

ODS化

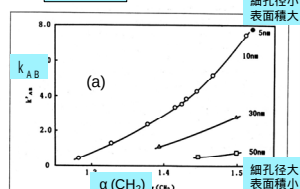


Figure 3. Correlation between k' values of anylbenzene in 80% methanol and surface coverage ($\alpha(\text{CH}_2)$ value in 80% methanol) of packing materials with various pore sizes prepared from Nucleosil. All packing materials were prepared from monochlorosilane without endcapping. Pore size of packing material is indicated in nm.

反応率 - C % - $\alpha(\text{CH}_2)$ 値 - 疎水性

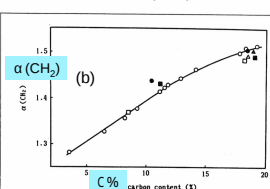
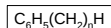


Figure 1. Correlation between $\alpha(\text{CH}_2)$ values in 80% methanol and carbon content of various C_{18} phases prepared from Develsil. $\square$: monochlorosilane, $\bullet$: monochlorosilane with endcapping, $\triangle$: dichlorosilane, $\blacktriangle$: dichlorosilane with endcapping. $\square$: trichlorosilane, $\blacksquare$: trichlorosilane with endcapping.

図14. 反応率(C%)と疎水性($\alpha(\text{CH}_2)$), $\alpha(\text{CH}_2)$ と保持能力(k)との関係

反応率 $\rightleftharpoons$ C % $\rightleftharpoons$ $\alpha(\text{CH}_2)$ 値 $\rightleftharpoons$ 疎水性
反応率 $\rightleftharpoons$ 固定相の量 $\rightleftharpoons$ 疎水性保持能力 (表面積)



07RPLC

31

RPLC ($\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$)

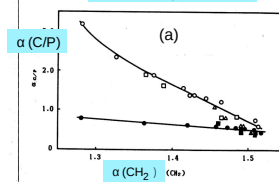


Figure 6. Effect of surface coverage ($\alpha(\text{CH}_2)$ value in 80% methanol) and endcapping on retention of caffeine relative to phenol in 30% methanol. Packing materials were prepared from Develsil. $\square$: monochlorosilane, $\bullet$: monochlorosilane with endcapping, $\triangle$: dichlorosilane, $\blacktriangle$: dichlorosilane with endcapping. $\square$: trichlorosilane, $\blacksquare$: trichlorosilane with endcapping.

順相 (アルカン溶媒)

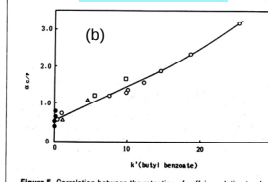


Figure 6. Correlation between the retention of caffeine relative to phenol in 30% methanol in RPLC mode and the retention of butyl benzoate in dichloromethane-heptane (5/95) in NPLC mode. Packing materials were prepared from Develsil. $\square$: monochlorosilane, $\bullet$: monochlorosilane with endcapping, $\triangle$: dichlorosilane, $\blacktriangle$: dichlorosilane with endcapping. $\square$: trichlorosilane, $\blacksquare$: trichlorosilane with endcapping.

図15. 反応率 ($\alpha(\text{CH}_2)$)と水素結合性 ($\alpha(\text{Caffeine/Phenol})$), $\alpha(\text{C/P})$ と順相における保持(k)との関係

反応率 $\rightleftharpoons$ シラノール量 $\rightleftharpoons$ 水素結合保持能力
二次シリル化 $\rightleftharpoons$ シラノール量 $\rightleftharpoons$ 水素結合保持能力

07RPLC

32

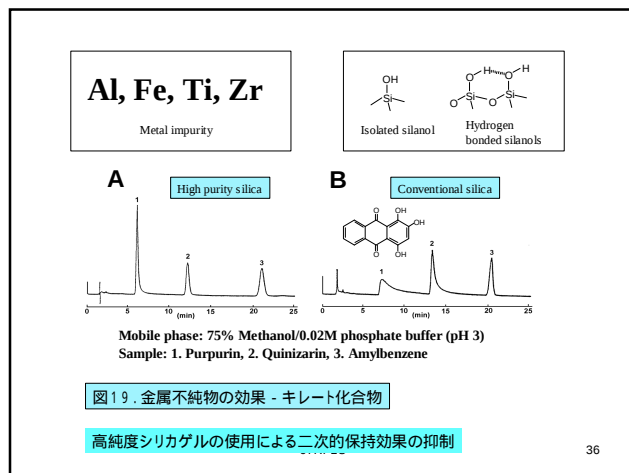
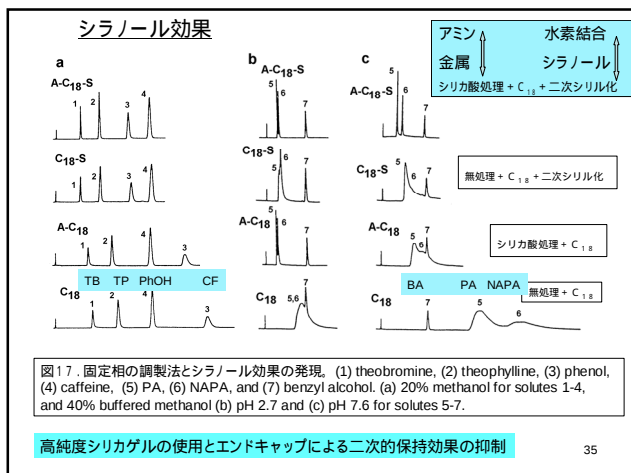
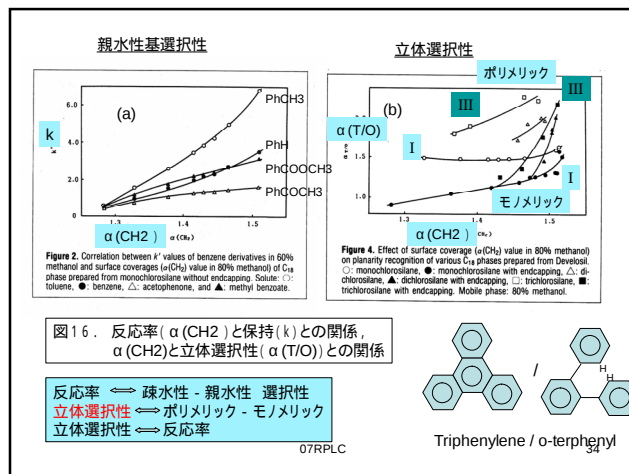
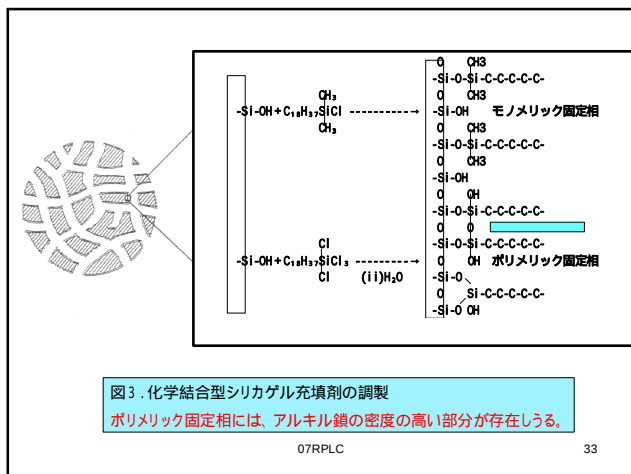


Table IV. Characterization of Commercial Packing Materials*							
Commercial column	K _{AS}	α ₁₁₈ (CH ₂)	α ₁₁₈	α _{GP}	pH > 7		α _{AP}
					α _{GP}	α _{AP}	
A Vydac 300-C ₁₈	2.05	1.49	1.94	0.66	0.62	0.03	
B Nucleosil 300-7C ₁₈	2.18	1.47	1.67	0.76	0.59	0.12	
C Cosmosil 5C ₁₈ -300	2.99	1.50	1.37	0.46	0.20	0.12	
D μBondapak C ₁₈	3.29	1.43	1.24	0.72	0.55	0.11	
E Cosmosil 5C ₁₈ -P	3.61	1.43	1.22	0.76	0.26	0.05	
F Hypersil ODS	4.16	1.46	1.75	1.29	2.49	1.43	
G TSKgel ODS-120A	4.28	1.44	2.13	1.26	1.16	0.09	
H Lichrosorb RP-18-II†	5.14	1.48	1.81	0.80	2.13	0.74	
I TSKgel ODS 80T ₁₈	5.55	1.47	1.28	0.64	0.54	0.01	
J Capcitolpak C ₁₈ SG	5.63	1.49	1.40	0.41	0.47	0.06	
K Inertsil ODS	5.82	1.48	1.32	0.53	0.26	0.07	
L Nucleosil 100-5C ₁₈	5.93	1.47	1.59	0.58	1.47	0.07	
M TSKgel ODS-120T	6.45	1.49	1.86	0.48	0.48	0.08	
N Lichrosorb RP-18-†	6.47	1.49	1.80	0.63	1.04	0.15	
O Cosmosil 5C ₁₈	7.21	1.51	1.51	0.45	0.15	0.08	
P YMC A-302 ODS	7.36	1.52	1.41	0.47	0.45	0.06	
Q Ultrasphere ODS	7.45	1.52	1.45	0.45	0.43	0.29	
R Develosil ODS-5	7.73	1.51	1.46	0.44	0.21	0.08	
S Zorbax BP-ODS	9.30	1.52	1.58	0.46	0.74	0.15	

* Suppliers of columns: Vydac, Separations Group; Nucleosil, Machery-Nagel; Cosmosil, Nacal; TSKgel, TSK Chemical Industries; μBondapak, Waters; Hypersil, Waters; TSKgel, Tosoh; Lichrosorb, Merck; Capcitolpak, Shodex; Inertsil ODS, Gaussoqu YMC; A-302 ODS, YMC; Ultrasphere ODS, Beckman; Develosil, Nomura Chemical; Zorbax, Du Pont.

† Lichrosorb RP-18II was purchased in 1986, and I and M were purchased in 1986.

* Suppliers of columns: Vydac, Separations Group; Nucleosil, Macherey Nagel; Cosmosil, Nacal Tesque; μBondapak C₁₈, Waters; Hypersil ODS, Shandon; TSKgel, Toho; Lichrosorb, Merck; Capcitolpak, Shisato; Inertsil ODS, Gaisiuro Kogyo; YMC A-302 ODS, YMC; Ultrasphere ODS, Beckman; Develosil, Nomura Chemicals; Zorbax, Du Pont.
† Lichrosorb RP-18-I was purchased in 1988, and it was purchased in 1985.

市販カラムの
特性

37

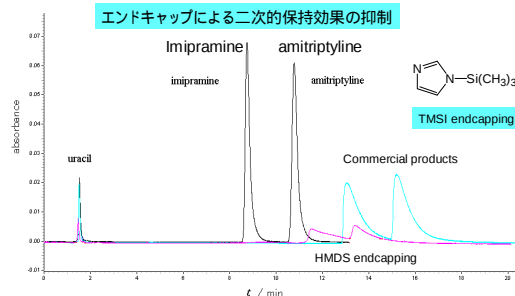


Fig 6. Separation of basic compounds (II).
Mobile phase: 70% methanol in 20 mM PBS (pH 7.6). Flow rate: 1 mL/min.
Temperature: 30 °C. Detection wavelength: 254 nm. Concentrations (mg/mL)
in 70% methanol / water: uracil 0.010, imipramine 0.261 and amitriptyline 0.281.
Injection volumes are 2 and 5 μL respectively.
J. Chromatogr. A, 1130, 175-181 (2006).

07RPLC

38

逆相クロマトグラフィーカラム保持特性の評価

1. アルキル基の量 (シリカ表面積とアルキル基密度)
アルキルベンゼンの保持、α (CH₂)
2. アルキル基間の距離 (monomeric or polymeric)
Monomeric: Si-O-Si-C₁₈H₃₇ → O-CH₃ → Si-O-H
Polymeric: Si-O-Si-C₁₈H₃₇ → O-O → Si-O-Si-C₁₈H₃₇
狭い空間 → 平面的化合物保持
α (CH₂), α (Triphenylene / ortho-terphenyl)
3. シラノール効果 (残存する SiOH → 水素結合性化合物のテーリング)
α (Caffeine / phenol)
4. シラノール効果 (解離した SiOH, 残留金属 → アミンのテーリング)
α (alkylamine / phenol) at pH < 3, at pH > 7
5. 金属不純物の効果 (金属 → キレート剤のテーリング)
α (purpurin / amylbenzene)
6. 官能基のもたらす識別能力 (電子供与体・受容体, 双極子性, 分散力の大小, 立体的識別)

適切な相互作用
立体効果
二次的保持効果の抑制
→ 高性能分離 (化学的な分離能力の理解)

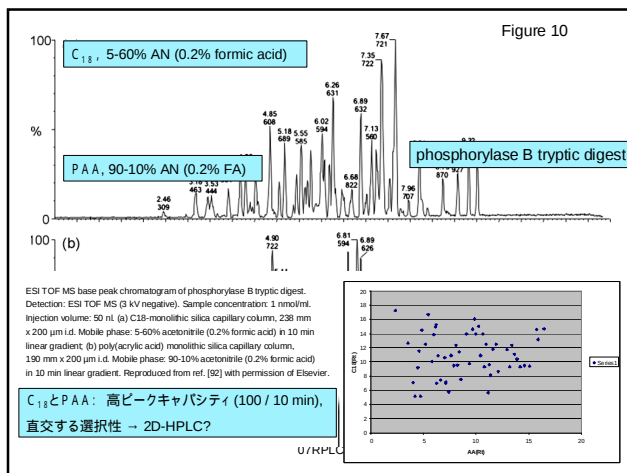
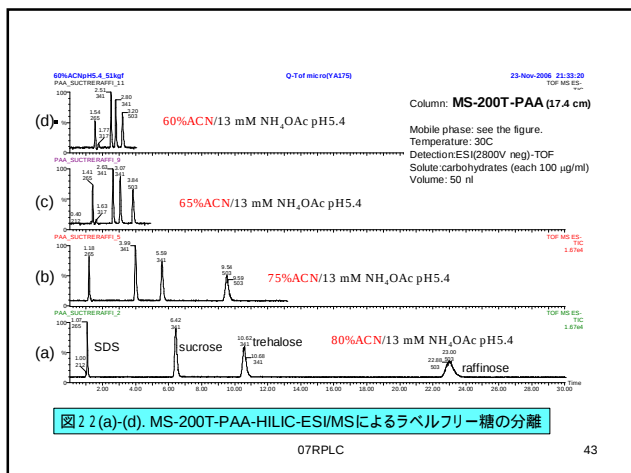
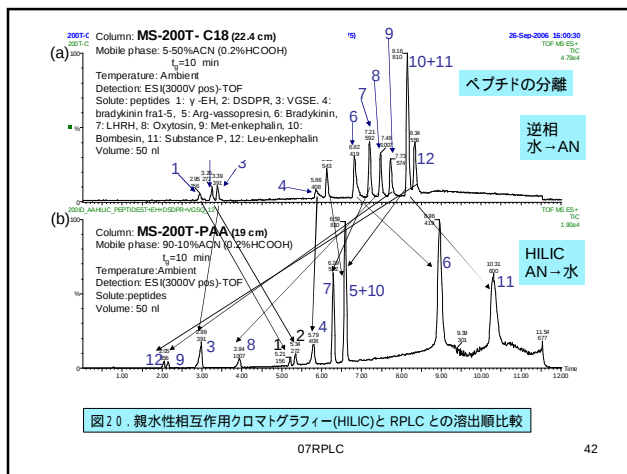
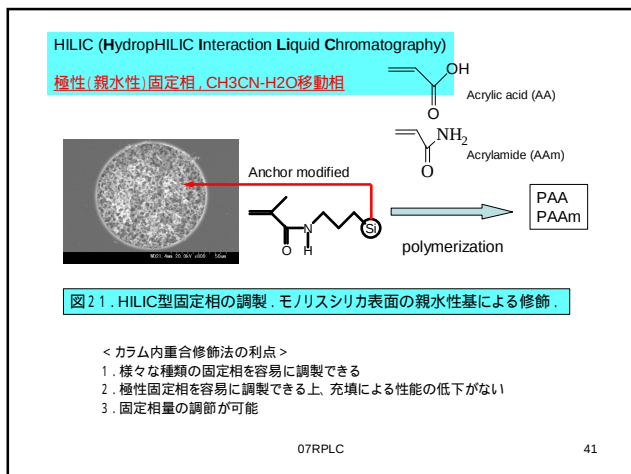
39

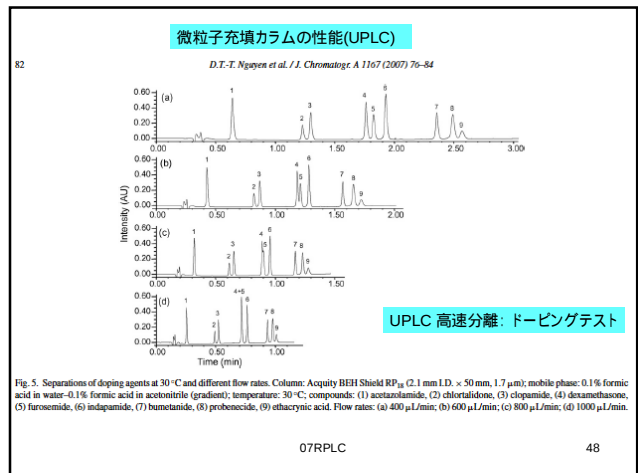
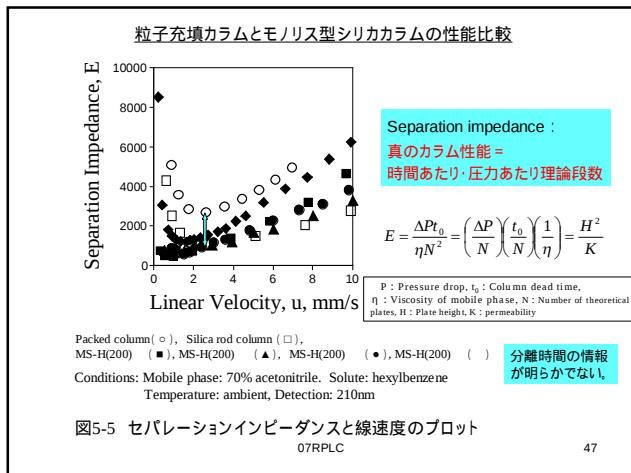
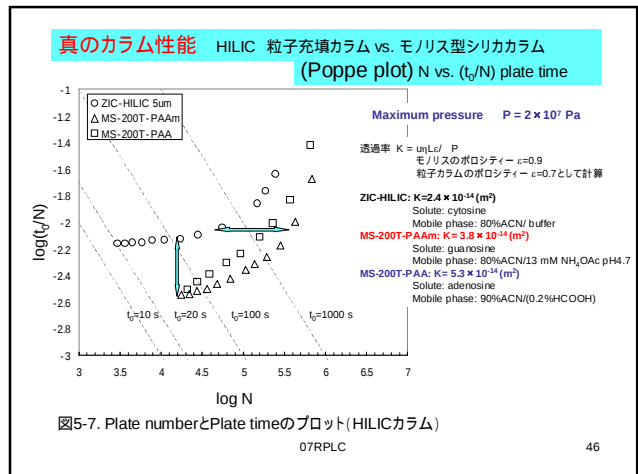
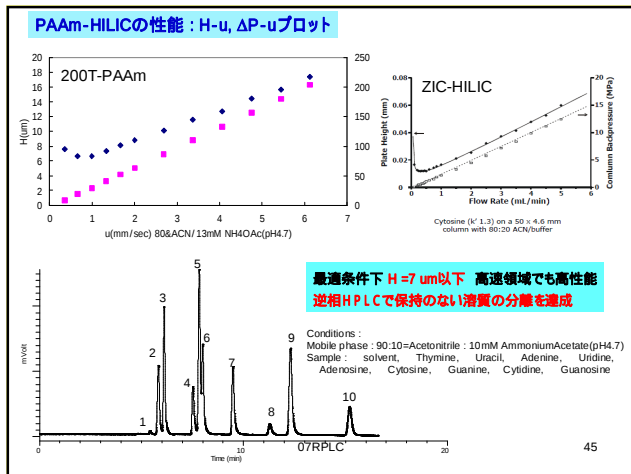
HPLCの課題

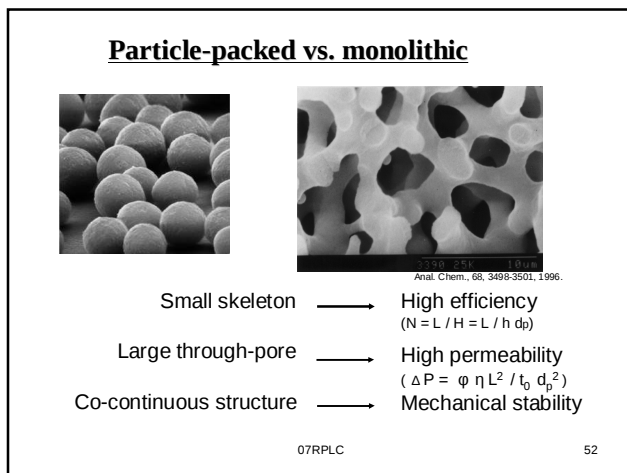
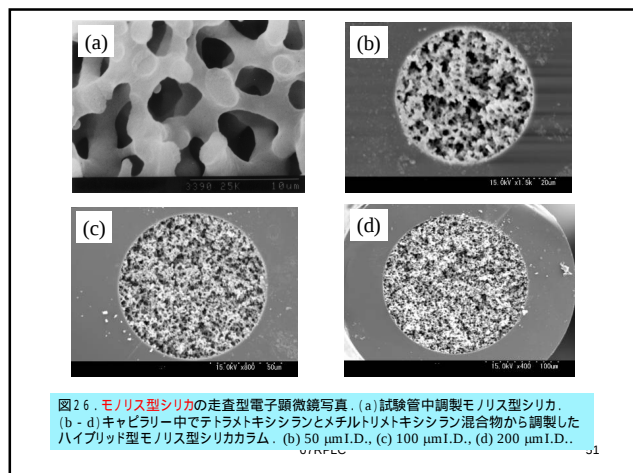
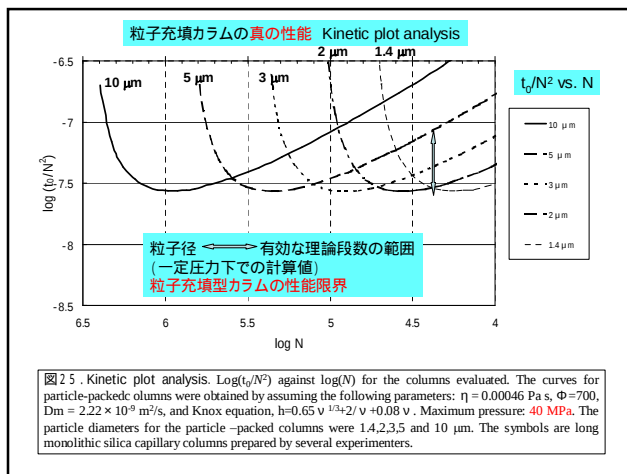
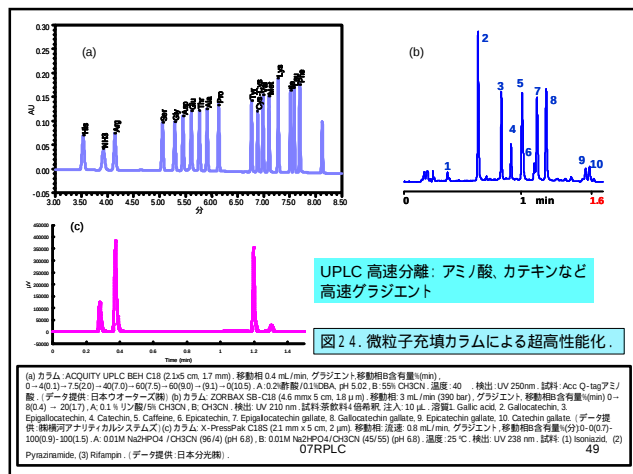
1. 親水性物質に対する分離能力
2. カラムの高性能化 (真の性能?)
3. 分析の高速化
4. 高ピークキャパシティ

07RPLC

40







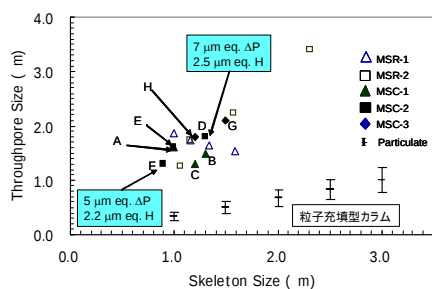


Figure 10. Plots of through-pore size against skeleton size for monolithic silica columns.

図27. モリス型シリカカラムの流路径と骨格径。

07RPLC

53

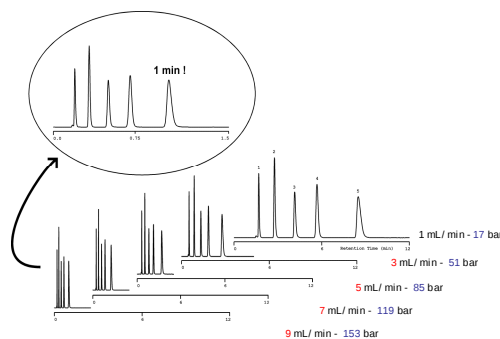


図28. モリス型シリカカラムによる高速化。

カラム: Chromolith RP 18e, 4.6 mm x 10 cm. 移動相: CH₃CN/0.1% トリフルオロ酢酸(TFA)=20/80 (v/v);
流速: 1-9 mL/min. 検出: UV 254 nm. 1. atenolol, 2. celiprolol, 3. metoprolol, 4. celiprolol, 5. bisoprolol.

54

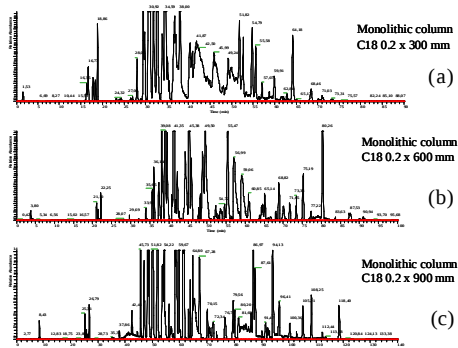
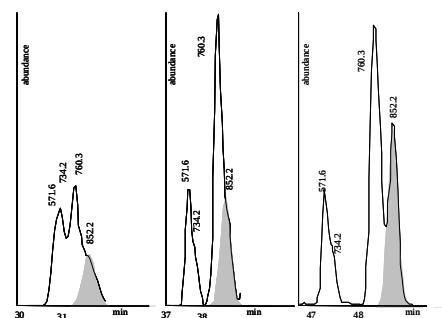


図30. キャピラリーHPLCによるグラジエント分離。試料: シロイヌナズナ葉のメタノール抽出物。カラム: モリス型シリカC18キャピラリーカラム200 mmID. (a) 30 cm, (b) 60 cm, (c) 90 cm. 移動相: (A) 6.5 mM 酢酸アンモニウム(pH 5.5), (B) CH₃CN. グラジエント: 移動相B含有量(分): (a) 5 ~ 20(15) ~ 70(22) ~ 100(57), (b) 5 ~ 20(15) ~ 70(23) ~ 100(75), (c) 5 ~ 20(16) ~ 70(23) ~ 100(110). 流速: (a) 2.6 mm/s, (b) 2.6 mm/s, (c) 1.8 mm/s. 検出: ESI-MS.

07RPLC

55



分離の改善によるイオンサプレッションの抑制, 高感度MS検出

07RPLC

56

ドメインの微小化、均一化 - 高速性能の向上, 5 μm 粒子の圧力で 2 μm の性能

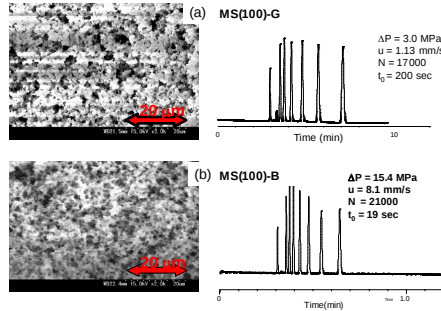


図2. モノリス型シリカキャピラリーカラムから得られたSEM写真とクロマトグラム。(参考文献9) 溶質: uracil 1番目のピークおよびアルキルベンゼン ($\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_n\text{H}$, $n=0-6$). カラム: (a) MS(100)-G and (b) MS(100)-B. 100 μm ID, 20 cm. 移動相: メタノール/水 = 80/20 温度: 30 $^{\circ}\text{C}$.

57

粒子充填カラムとモノリス型シリカカラムの性能比較

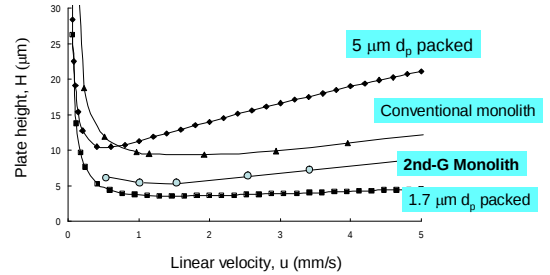


図2. カラム性能(H)の移動相線速度(u)依存性. 粒子充填カラム(粒子径 = 5, 1.7 μm 計算値). モノリス型シリカカラム(実験値). 移動相: 80% CH_3OH . 溶質: Hexylbenzene

圧力の要素なし

07RPLC

58

粒子充填カラムとモノリス型シリカカラム - カラムの真の性能

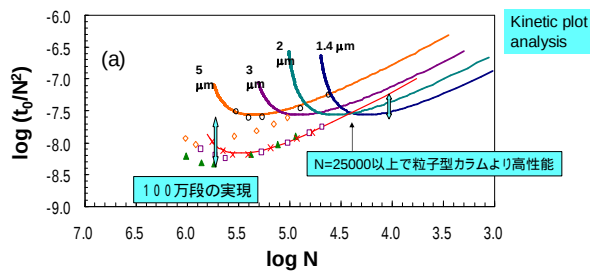


図31. モノリス型シリカ - C₁₈キャピラリーカラムの性能. Plots of the $\log(t_0/N^2)$ values against $\log(N)$ for the columns evaluated. The curves were obtained by assuming the following parameters: maximum pressure: 20 MPa, $\eta = 0.00046 \text{ Pa s}$, $\phi = 700$, $D_p = 2.22 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$, and Knox equation $h = 0.65 v^{1/2} + 2/v + 0.08 v$. The particle diameters for the particle-packed columns were: 1.4 μm , 2 μm , 3 μm , and 5 μm . The dashed lines indicate the required t_0 values in seconds. A previous monolithic silica column, MS(50)-D was indicated by (). The other symbols are the same as in Figure 6 for the columns.

07RPLC

59

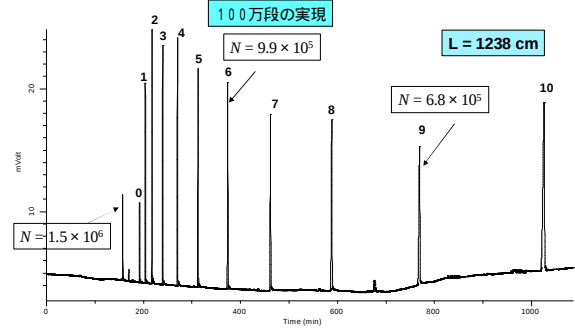


Figure 3. Separation of alkylbenzenes ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, $n=0-10$). Mobile phase: 80% CH_3CN . Column: three monolithic silica C_{18} columns connected in series, 8KM, 9KM, and 10KM, effective length 1238 cm (total length 1244 cm). $\Delta P = 46.6 \text{ MPa}$. $u = 1.31 \text{ mm/s}$. Detection: 210 nm. Temperature: 30 $^{\circ}\text{C}$. Sample: thiourea and alkylbenzenes.

ピークキャパシティ (クロマトグラフィーシステムの真の分離能力)



$R_s = 1$ となる分離可能 最大ピーク数

$$n_c = 1 + [(\sqrt{N}) / 4] \ln(t_R / t_0)$$

$k = 0-9$, $t_R = t_0 (1+k)$, $N = 1,000,000$ の場合

$$n_c = 1 + [1000 / 4] \ln(10) = 577$$

通常の15 cmカラムの場合: ?

07RPLC

61

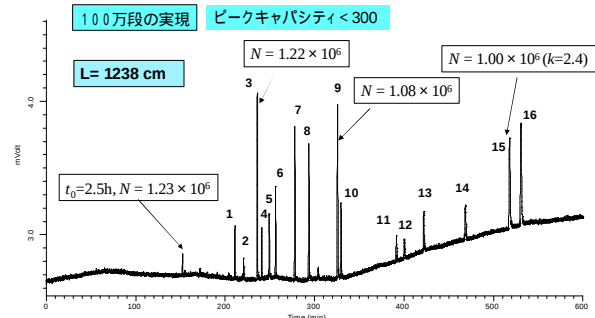


Figure 4. Separation of polynuclear aromatic hydrocarbons. Mobile phase: 80% CH₃CN. Detection: 254 nm. Temperature: 30 °C. Sample: 16-PAHs primary pollutants designated by EPA. Peak numbers: 1 naphthalene, 2 acenaphthylene, 3 fluorene, 4 acenaphthene, 5 phenanthrene, 6 anthracene, 7 fluoranthene, 8 pyrene, 9 chrysene, 10 benz(a)anthracene, 11 benzo(b)fluoranthene, 12 benzo(k)fluoranthene, 13 benzo(a)pyrene, 14 dibenz(a,h)anthracene, 15 indeno(1,2,3-cd)pyrene, and 16 benzo(g,h,i)perylene. (a) Column: monolithic silica C18 column 5KK, effective length 133 cm. $\Delta P = 4.7$ MPa. $u = 1.03$ mm/s. (b) Conditions as in Figure 3.

Peak capacity of gradient elution

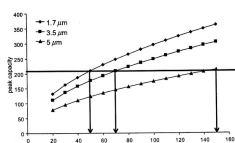


Fig. 4. Theoretical evolution of peak capacity as a function of column length and packing particle size – case of an initial gradient from 0% to 60% ACN in 30 min on a 150×4.6 mm, 5 μ m column. Gradient duration was adapted to the column geometry, with equations of part, Section 2. $\bullet$, particles of 1.7 μ m with a flow rate of 3 mL/min; $\blacktriangle$, particles of 3.5 μ m with a flow rate of 1.4 mL/min; $\blacktriangle$, particles of 5 μ m with a flow rate of 1 mL/min.

Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, In Press, Corrected Proof, Available online 6 July 2007.

Davy Guillaume, Dao T.T. Nguyen, Serge Rudaz and Jean-Luc Veuthey

07RPLC

63

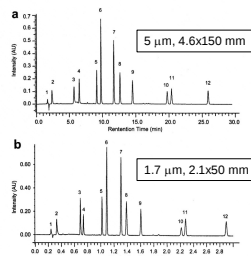
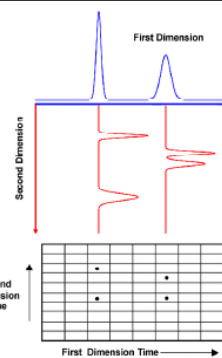


Fig. 5. Separation of a pharmaceutical formulation containing the main product (6) and 11 impurities in gradient mode with HPLC and UPLC system: (a) HPLC system; column: XBridge C₁₈ 150 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m; flow rate: 1000 μ L/min; injected volume: 20 μ L; total gradient time: 45 min. (b) UPLC system; column: ACQUITY BEH C₁₈ 50 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m; flow rate: 610 μ L/min; injected volume: 1.4 μ L; total gradient time: 5.1 min.



二次元HPLCのピークキャパシティ:

$$n_{c-2D} = n_{c1} n_{c2} = e_M n_{c1} n_{c2}$$

真の分離能力?

Fig. 2. Illustration of the multiplicative relationship between the peak capacity of the independent first and second dimensions in comprehensive two-dimensional separations.

D. R. Stoll, X. Li, X. Wang, P. W. Carr, S. E. G. Porter, S. C. Rutan
J. Chromatogr. A, Volume 1168, 3-43 (2007).

07RPLC

64

