

粒子径3 μ mの上手な使い方

逆相HPLC用充填剤の粒子径の主流は5 μ mですが、高分離を追求して3 μ mや、更に2 μ m以下が次々と登場しています。粒子径を小さくすることで分離の向上や、カラム長さと移動相流量の組み合わせで分析時間の短縮が可能になります。ここでは **L-column2 ODS** の最新データと共に粒子径3 μ mの上手な使い方をご紹介します。

Keywords 粒子径 3 μ m 理論段数の向上 カラム圧力

L-column2 ODS 粒子径 3 μ m の特長

粒子径3 μ mの特長は5 μ mと比較して分離能の向上にあります。理論段数は粒子径に反比例するので、同じカラムサイズでは3 μ mは5 μ mの約1.7倍の理論段数の向上になります (Table.1)。高度エンドキャッピングを施した **L-column2 ODS** の3 μ mは、低吸着性と高分離能共に **L-column ODS** をはるかに凌ぎ、シャープなピークが得られます (Fig.1)。

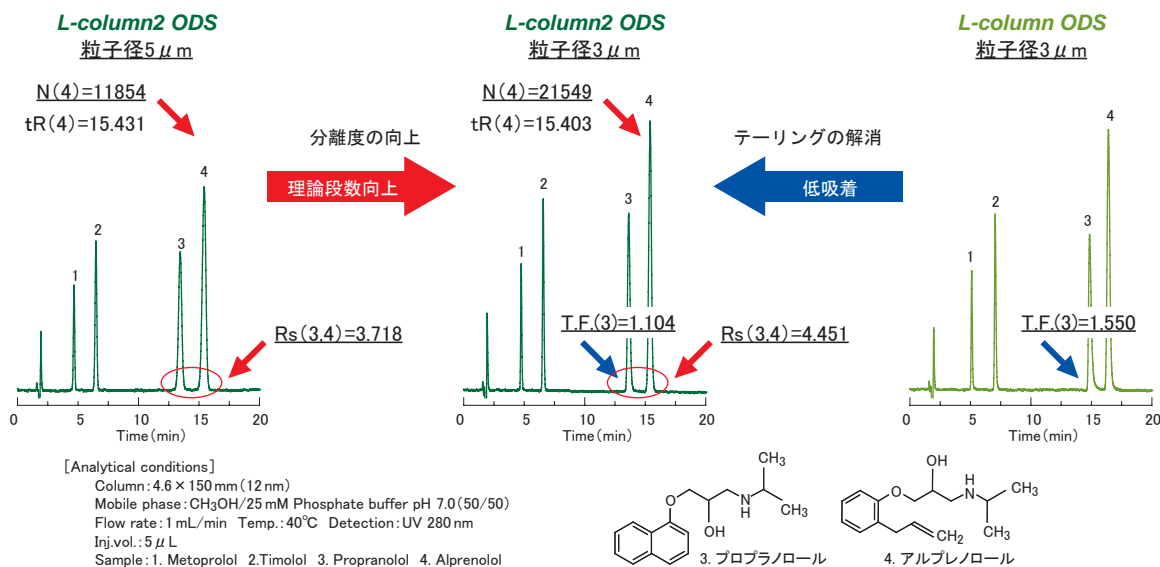


Fig.1 ベータ遮断薬 (L-column ODS VS L-column2 ODS)

分離能

■ 理論段数の向上

タンパク質を酵素分解したペプチドの分析は、元のタンパク質を同定する手段として用いられます。ピーク高さが高く、検出ピーク数が多いほど同定が確実になります。一般に生体分析では試料量が少なく低濃度での分析が余儀なくされるので、カラムの分離能は重要視すべき点です。トリプシン分解物の分析では、粒子径5 μ mは47ピークが検出されたことに対し、3 μ mでは、1.4倍の67ピークが検出され、各ピークの高さ、理論段数共に大きく向上しています (Fig.2)。

分析条件を変えず同じ分析時間で分離能を向上するためには、5 μ mから3 μ mへの移行が最も有効な手段です。

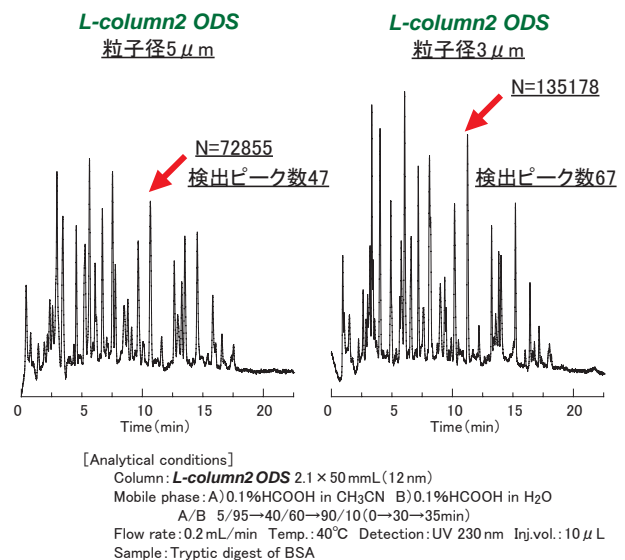


Fig.2 高分離分析 (トリプシン分解物)

■ 理論段数とカラム長さ

理論段数はカラム長さ按比例します。粒子径5 μ mのカラムから3 μ mに移行する場合、同等の分離能であれば以下のような選択が一般的です。

粒子径5 μ m, 長さ 250 mm → 粒子径3 μ m, 長さ 150 mm
 粒子径5 μ m, 長さ 150 mm → 粒子径3 μ m, 長さ 100 mm

■ 理論段数と流量

粒子径が小さくなると、理論段数は流量への依存度が小さくなります。内径4.6mmカラムにおいて、粒子径5 μ mでは、1.5mL/min付近で最大の理論段数が得られ、3 μ mでは1.5~2.5mL/minで最大理論段数が得られます。5 μ mに比較し3 μ mは最適流量範囲が広く、高流量での使用に適しています (Fig.3)。

カラム圧力

カラムをより長持ちさせるには、そのカラムの耐圧の上限を守り、その範囲内で使用してください。カラムの耐圧は充填時の圧力とシリカゲルの物理的強度に依存します。

L-column ODS、**L-column2 ODS** 共に独自の高压充填技術と完全球形シリカゲルにより耐圧性に優れています。

L-column ODS、**L-column2 ODS** の粒子径3 μ mは以下の範囲で使用してください。

内径6mm以下, 長さ50mm以下 → 20MPa以下
 内径6mm以下, 長さ100~150mm → 25MPa以下
 内径6mm以下, 長さ250mm → 30MPa以下

またカラム圧力の急激な変動は劣化の原因となります。充填剤が偏り、カラムの上部に隙間ができる「トップオフ」が生じ、ピーク割れを起こしてしまいます。

■ 流量

カラム圧力は粒子径の二乗に反比例します。同じカラムサイズでは粒子径3 μ mは5 μ mの約2.7倍のカラム圧力になります (Table.1)。

3 μ mは高流量での使用に適していますが、過度に長いカラムを用いると、カラムやシステムの耐圧上限を超えてしまい、かえって使い難くなります。そこで、要求する分離の程度とカラム長さの選択が重要になってきます (Fig.4)。

カラム圧力に影響する分析条件

■ 温度

カラム温度が高くなると、移動相の粘度が下がるため、カラム圧力を抑えることができます (Fig.5)。ただし温度を上げるとカラムの劣化が促進されるので、より長く安定して使用するには、カラムの耐久性が要求されます。

シリカゲル表面をほぼ完全に被覆した**L-column2 ODS**は、高耐久性であり、耐久性の差が顕著にあらわれる40 $^{\circ}$ C以上での分析にも最適といえます。

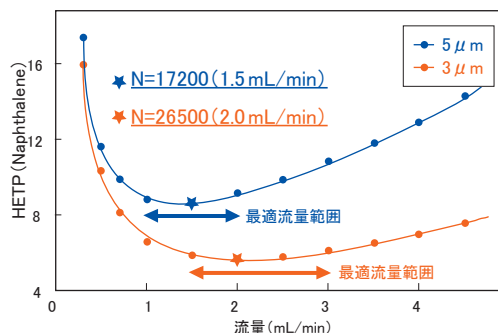
■ 有機溶媒

移動相に用いる有機溶媒の種類によってカラム圧力は変わります。有機溶媒比率が60%のとき、アセトニトリルはメタノールの約1/2のカラム圧力になります (Fig.6)。アセトニトリルは、幅広い比率で使用できるので、移動相として使いやすい有機溶媒です。

Table 1 粒子径と理論段数・カラム圧力の関係

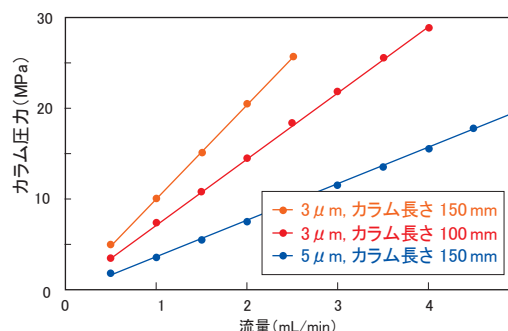
粒子径 (μ m)	理論段数	カラム圧力
2	$\frac{5}{2}$ (2.5倍)	$\frac{25}{4}$ (約6倍)
3	$\frac{5}{3}$ (約1.7倍)	$\frac{25}{9}$ (約2.7倍)
5	1	1
10	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$

※粒子径5 μ mを「1」とした場合



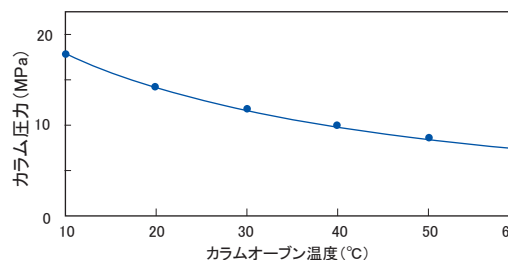
[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** 4.6 × 150 mm
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O (60/40) Temp: 40 $^{\circ}$ C

Fig.3 理論段高と流量の関係



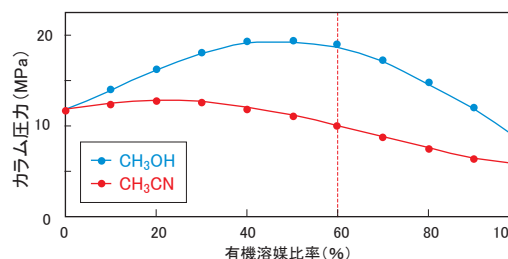
[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** 4.6 mm I.D.
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O (60/40) Temp: 40 $^{\circ}$ C

Fig.4 カラム圧力と流量の関係



[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** 4.6 × 150 mm (3 μ m, 12 nm)
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O (60/40) Flow rate: 1 mL/min

Fig.5 カラム圧力と温度の関係



[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** 4.6 × 150 mm (3 μ m, 12 nm)
 Flow rate: 1 mL/min Temp: 40 $^{\circ}$ C

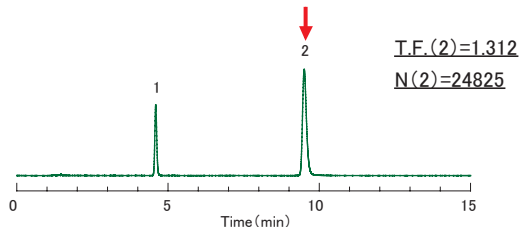
Fig.6 カラム圧力と有機溶媒比率の関係

有機溶媒の種類と分離の違い

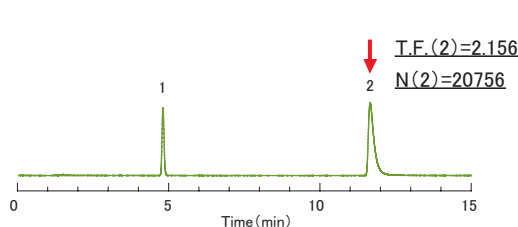
塩基性医薬品など吸着しやすい試料の分析は、アセトニトリルを移動相に用いるとメタノールよりピークのテーリングが大きくなります。また粒子径 $3\mu\text{m}$ では $5\mu\text{m}$ に比較しカラム圧力が高くなるので、粘度の高いメタノールの使用が制限され、ピークにテーリングがあってもアセトニトリルを使わざるを得ない状況になる場合があります。

① Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/25\text{mM}$ Phosphate buffer pH 7.0 (55/45)

L-column2 ODS カラム圧=12.6 MPa

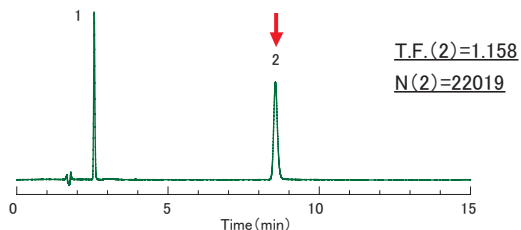


L-column ODS カラム圧=12.8 MPa

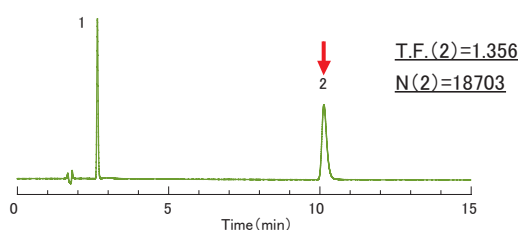


② Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/25\text{mM}$ Phosphate buffer pH 7.0 (80/20)

L-column2 ODS カラム圧=17.4 MPa

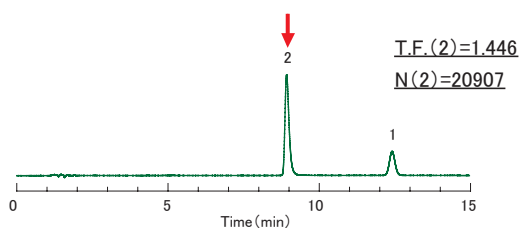


L-column ODS カラム圧=17.9 MPa

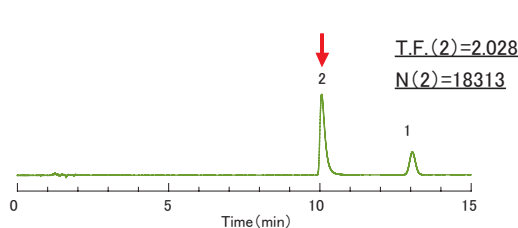


③ Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/10\text{mM}$ Ammonium acetate (40/60)

L-column2 ODS カラム圧=14.3 MPa

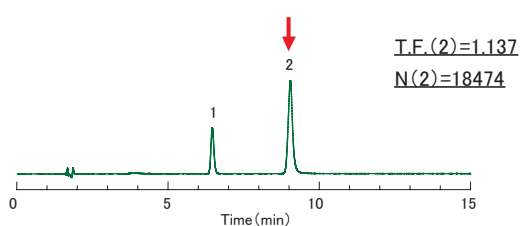


L-column ODS カラム圧=14.5 MPa

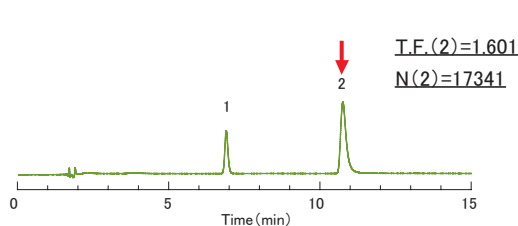


④ Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/10\text{mM}$ Ammonium acetate (65/35)

L-column2 ODS カラム圧=21.5 MPa



L-column ODS カラム圧=21.7 MPa



[Analytical conditions]

Column: $4.6 \times 150\text{mm}$ ($3\mu\text{m}$, 12nm)

Flow rate: $1\text{mL}/\text{min}$ Temp.: 40°C

Sample: 1. p-Hydroxybenzoic Acid iso-Butyl Ester (I.S.) 2. Amitriptyline

Inj.vol.: $2\mu\text{L}$ (each $100\text{mg}/\text{L}$)

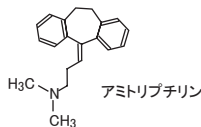


Fig.7 有機溶媒の種類と分離の違い(アミトリプチリン)

アミトリプチリンを10分前後に溶出させるように有機溶媒比率を変えて比較しました(Fig.7)。リン酸緩衝液で比較したところアセトニトリル(①)よりメタノール(②)の方がテーリングが少ないことがわかります。酢酸アンモニウムでは同様にアセトニトリル(③)よりメタノール(④)の方がテーリングが少なく、安息香酸とアミトリプチリンの溶出順が逆になります。有機溶媒や緩衝液の種類によって溶出挙動が変わる場合があるので注意が必要です。

L-column2 ODS は、理論段数とテーリングファクター共に**L-column ODS** より優れ、有機溶媒の種類を変えても最高のピーク形状と分離を示します。これは高度エンドキャッピングによるシリカゲル表面の不活性化度に関係します。粒子径 $3\mu\text{m}$ は $5\mu\text{m}$ に比較し、カラム圧力が高くなるため、メタノール・アセトニトリル移動相に関わらず使用できることは、カラム選択にあたって重要なポイントです。

分析時間の短縮

粒子径3 μ mカラムは5 μ mカラムの2/3の長さで同等の分離能が得られます。これにより分析時間は短くなり、使用溶媒の節約にもなります。カラム内容積が小さいのでグラジエントの際の移動相の置換や洗浄の時間も短くなり、ファーストカラムとして最適です。

3 μ mの高流量で理論段数の低下が少ない利点を活かせば、さらに分析時間を短くすることができます。

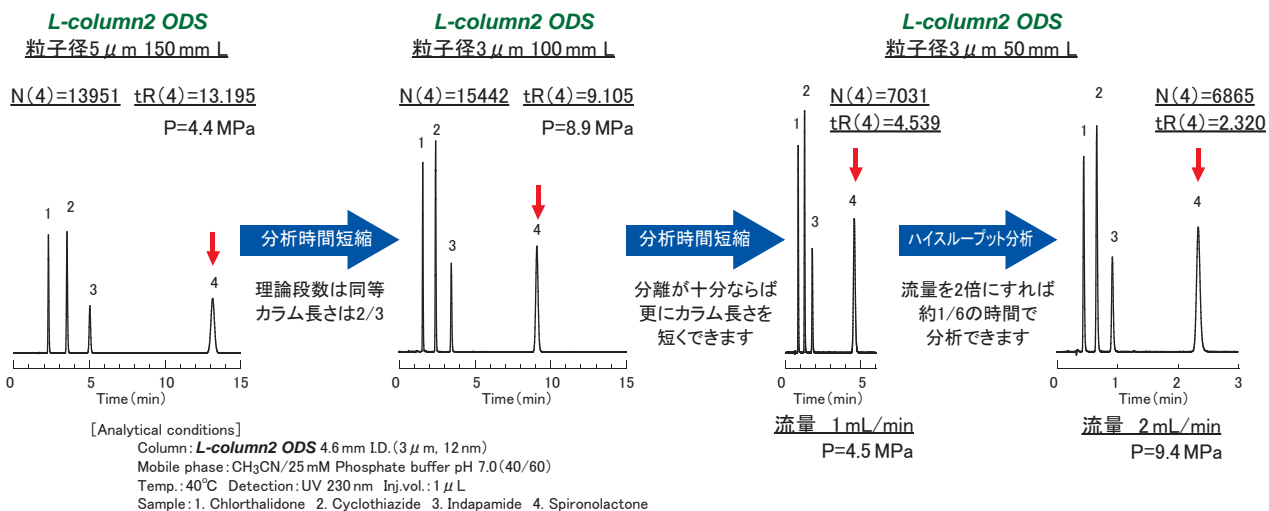


Fig.8 ハイスループット分析(利尿剤)

Line-up

L-column2 ODS 細孔径12 nm

粒子径 (μ m)	内径 (mm)		長さ(mm)											
			35		50		100		150		250			
			Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)	Cat.No.	価格(円)
5	0.075	ノコート			712370				712380					
		PEEKコート			712410				712420					
	0.1	ノコート			712350				712360					
		PEEKコート			712390				712400					
	0.2	PEEKコート			712290				712300					
		PEEKコート			712270				712280					
	1.5				712130		712160		712010					
			712240		712140		712170		712020			712220		
	3.0						722330		722260			722320		
									722040			722310		
4.0								722070			722080			
		722250		722150		722180		722090						
6.0								742510			742100			
								742520			742120			
10.0														
					742230									
20.0														
3	0.075	ノコート			711370				711380					
		PEEKコート			711410				711420					
	0.1	ノコート			711350				711360					
		PEEKコート			711390				711400					
	0.2	PEEKコート			711290				711300					
		PEEKコート			711270				711280					
	1.5				711130		711160		711010					
			711240		711140		711170		711020					
	3.0						721330		721260			721320		
4.0														
		721250		721150		721180		721070			721080			
6.0														
					741230									
10.0														
20.0														

※ ネジ型は全て1/16"ウォーターズジョイント(W)になります
※ 一覧にないサイズは、お問合せください

リーフレット内容に関してのお問い合わせは、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