

粒子径2 μ mの上手な使い方

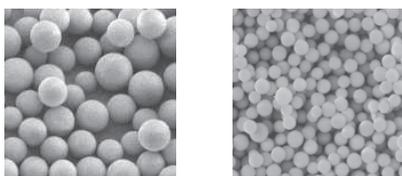
近年、分析時間の短縮、省溶媒及び高分離を目的として、超高速液体クロマトグラフ(UHPLC)及び専用カラムが飛躍的に普及しています。L-column2 ODSも粒子径2 μ mを加え、ラインナップも充実しました。ここでは2 μ mカラムの特徴とその使い方のコツを紹介します。

Keywords 超高速液体クロマトグラフ UHPLC Sub2 μ m 高分離能

粒子径の違いによる特徴

充填剤の粒子径を小さくすることで分離の向上、カラム長さや移動相流量の組み合わせにより分析時間の短縮が可能になります。

粒子径と理論段数・カラム圧力の関係を Table 1 に示します。



基材シリカゲル比較(写真左:5 μ m、右:2 μ m)

Table 1 粒子径と理論段数・カラム圧力の関係

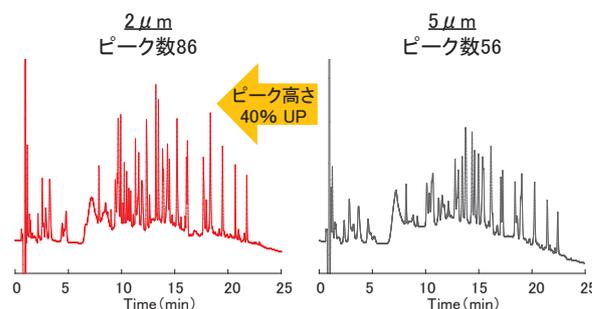
粒子径 (μ m)	理論段数	カラム圧力
2	$\frac{5}{2}$ (2.5倍)	$\frac{25}{4}$ (約6倍)
3	$\frac{5}{3}$ (約1.7倍)	$\frac{25}{9}$ (約2.7倍)
5	1	1
10	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$

※粒子径5 μ mを「1」とした場合

■ 粒子径と理論段数

理論段数は粒子径に反比例します。

Fig.1 はタンパク質を酵素分解したペプチドの分析です。ピーク高さが高く、検出ピーク数が多いほど元のタンパク質の同定が確実になります。BSAトリプシン分解物の分析にて、5 μ mカラムでは56ピークが検出され、2 μ mカラムでは1.5倍の86ピークが検出されました。2 μ mカラムを用いることで各ピークの高さ、理論段数及び分離度向上が示されています。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS 2.1 \times 50 mm (C18, 12 nm)
Mobile phase: A) 0.1% HCOOH in CH₃CN B) 0.1% HCOOH in CH₃CN/H₂O (5/95)
A/B 0/100 \rightarrow 55/45 (0 \rightarrow 30 min)
Flow rate: 0.2 mL/min Detection: UV 205 nm Inj. vol.: 10 μ L
Sample: 2 μ mol Tryptic digest of BSA (in H₂O)

Fig.1 粒子径の違いによる分離の向上(BSA分解物)

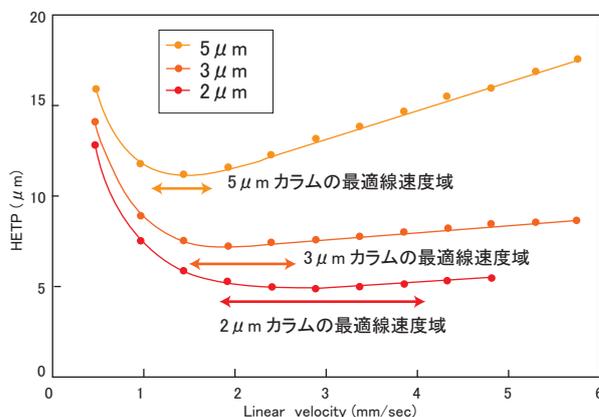
■ 粒子径と移動相流量

理論段数は移動相流量の影響を受けます。

粒子径が小さいほど、移動相流量を大きくしても理論段数は低下しません。

Fig.2 は線速度と理論段高を粒子径の違いによりプロットしたvan Deemterプロットです。理論段高が小さければ高分離能ということを示しています。

内径2.1 mmカラムにおいて、5 μ mカラムでは、0.2~0.4 mL/minの範囲で最大の理論段数が得られ、2 μ mカラムでは0.4~0.8 mL/minで最大理論段数が得られます。2 μ mカラムは最適流量域が広く、高流量での使用に適しています。



[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS (12 nm) 2.1 \times 50 mm
Mobile phase: CH₃CN/H₂O (50/50) Temp: 25°C Inj. vol.: 0.5 μ L
Sample: Naphthalene

Fig.2 各粒子径の van Deemter プロット

■ カラム圧力

カラム圧力は粒子径の二乗に反比例します。粒子径が小さいほど理論段数が高くなるのは利点ですが、カラム圧力が高くなるのは、カラムの耐久性やシステムへの負荷が生じます。これが2 μ mカラムの短所です。

そこで、「Sub2 μ m」と総称されるUHPLC用のカラムは、メーカーにより微妙に粒子径や充填方法に工夫がなされています。微粒子の持つ「高理論段数」は勿論、「低カラム圧」であることが、幅広い移動相条件に対応できる優れたカラムといえます。

Fig.3 では、市販のUHPLC用カラムを理論段数とカラム圧力でプロットしたものです。同じ2 μ mカラムでもメーカーによって理論段数及びカラム圧力に違いがあります。グラフの左上にあればそのカラムは、高分離能で使いやすいカラムといえます。

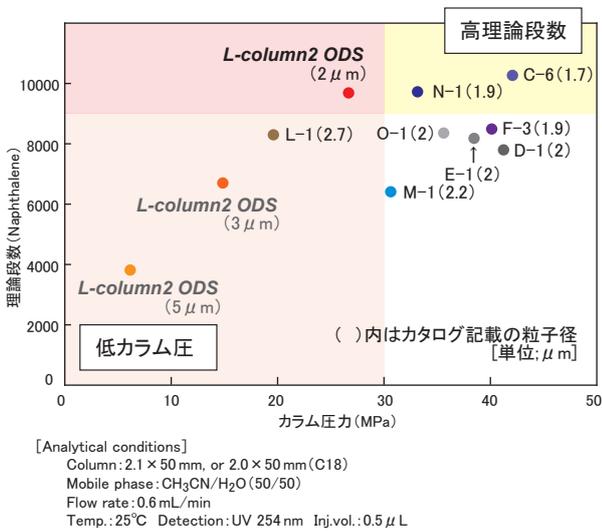


Fig.3 理論段数とカラム圧力のメーカー比較

Fig.4 の分析条件において、L-column2 ODS 2 μ m は、最適流量域でのカラム圧力は40 MPa以下なので、汎用LCシステムで分析の高速化が可能です。

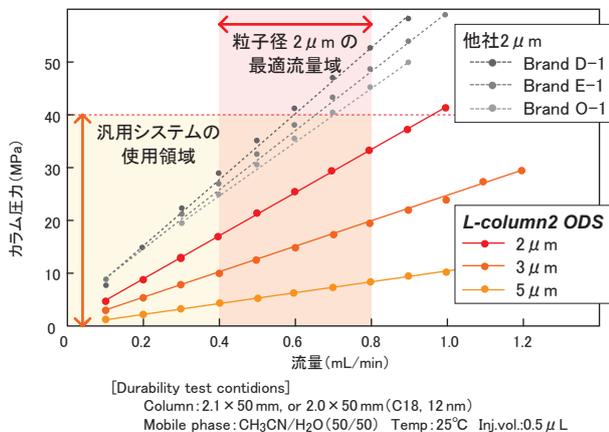


Fig.4 カラム圧力と流量

Fig.5 にカラム圧力と、有機溶媒の種類と温度との関係を示しました。分析温度を上げるとカラム圧力を抑えることができます。

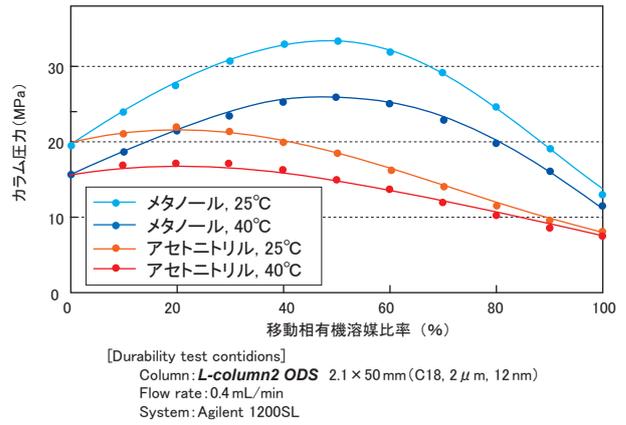


Fig.6 に、有機溶媒の種類による理論段数と温度の関係を示しました。温度を上げるとアセトニトリル移動相では理論段数が僅かに低下しますが、メタノール移動相では理論段数が高くなり、シャープなピークが得られます。しかし温度を上げると、カラム劣化を促進させるので、より高耐久性のカラムが必要とされます。

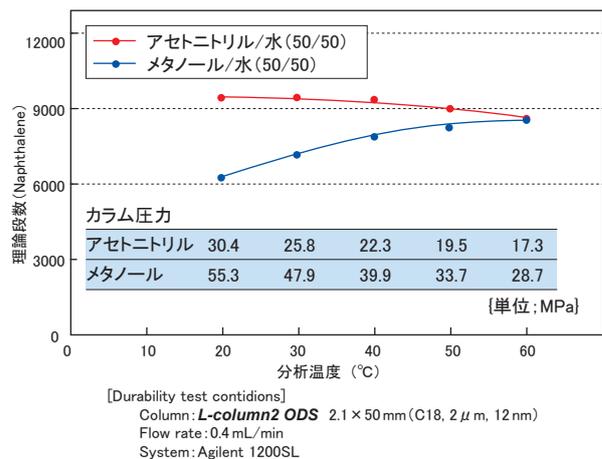


Fig.6 有機溶媒の種類による理論段数と温度の関係

2 μm カラムを用いた超高速分析への手引き

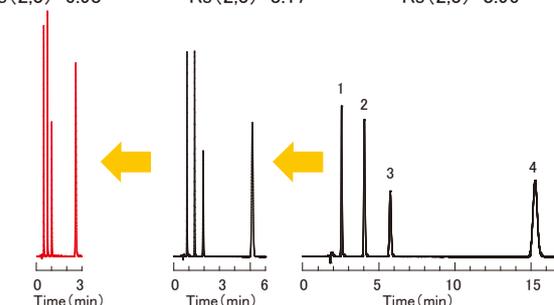
■ 超高速分析への手引き

2 μmカラムが超高速分析に用いられる理由は、微粒子の持つ高分離能と、高流量域で最適理論段数が得られることです。そのため、汎用の5 μmカラムと同等の分離能を得るには、カラム長さは1/2~1/3に短くできます。

以下のようなカラム選択が一般的です。

- 粒子径5 μm, カラム長さ250 mm → 3 μm, 150 mm
 → 2 μm, 100 mm
 粒子径5 μm, カラム長さ150 mm → 3 μm, 100 mm
 → 2 μm, 75 mm

2 μm 2.1×75 mm	3 μm 2.1×100 mm	5 μm 2.1×150 mm
Flow rate: 0.6 mL/min	Flow rate: 0.4 mL/min	Flow rate: 0.2 mL/min
33.0 Mpa	15.8 Mpa	4.3 Mpa
Rs(2,3)=6.98	Rs(2,3)=8.17	Rs(2,3)=8.96



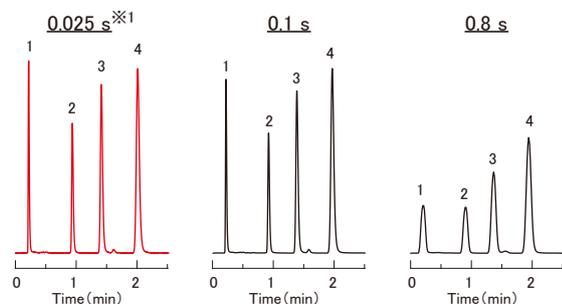
[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** (C18, 12 nm)
 Mobile phase: CH₃CN/25 mM Phosphate buffer pH7.0 (40/60)
 Temp.: 40°C Detection: UV 230 nm Inj.vol.: 0.5 μL
 Sample: 1. Chlorthalidone (100 mg/L) 2. Cyclothiazide (100 mg/L)
 3. Indapamide (100 mg/L) 4. Spironolactone (300 mg/L)
 System: Agilent 1200SL (標準セル, 配管0.17 mm I.D.)

Fig.7 利尿剤の超高速分析

超高速分析のノウハウ

①レスポンスタイム※1の影響

2 μmカラムを用いた超高速分析では、短時間に多くのピークが検出されるので、何秒毎にデータを採取するか(レスポンスタイム)が重要になります。Fig.8 では、レスポンスタイムを変えた場合の比較です。特に早く溶出する成分のピーク幅と高さが影響します。少なくとも0.1 s以上のレスポンスタイムが必要です。



[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** 2.1 × 50 mm (2 μm, C18, 12 nm)
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O (50/50)
 Flow rate: 0.6 mL/min
 Temp.: 25°C Detection: UV 254 nm Inj.vol.: 0.5 μL
 Sample: 1. Urasil 2. Benzene 3. Toluene 4. Naphthalene
 System: Agilent 1200SL

Fig.8 レスポンスタイムによるピーク形状の違い

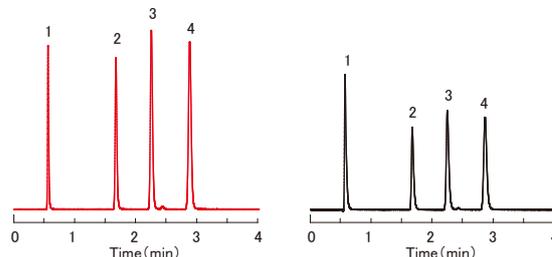
②デッドボリュームの影響

セミマイクロカラムは専用のセル及び内径の小さい配管に交換し、デッドボリュームを最小限にします。

Fig.9 は、セルと配管の違いによるチャートを示しました。コンベンショナルセルと0.17 mmの配管では理論段数が低下しピークがテーリングしてしまいます。特に早く溶出するピークはデッドボリュームの影響を受けやすくなります。

セミマイクロセル
 配管0.12 mm I.D.
 N(1)=4412
 N(2)=16618
 N(3)=18633
 N(4)=19974

コンベンショナルセル
 配管0.17 mm I.D.
 N(1)=2317
 N(2)=11174
 N(3)=13731
 N(4)=15438



[Analytical conditions]
 Column: **L-column2 ODS** 2.1 × 50 mm (2 μm, C18, 12 nm)
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O (60/40)
 Flow rate: 0.4 mL/min Temp.: 25°C Detection: UV 254 nm Inj.vol.: 0.5 μL
 Sample: 1. Urasil 2. Benzene 3. Toluene 4. Naphthalene
 System: Agilent 1200SL

Fig.9 デッドボリュームによるピーク形状の違い

カラムとLCとの接続部分も重要です。

L-column2 ODS 2 μm は、エンドフィットにWatersタイプを採用しています。フェラルの先の配管の長さは約3.5 mmに合わせ、デッドボリュームが生じないように接続します。使用圧力が高いのでステンレス製ジョイントで確実に接続します。タフコネクタを使用する場合は高耐圧のものを選択してください。

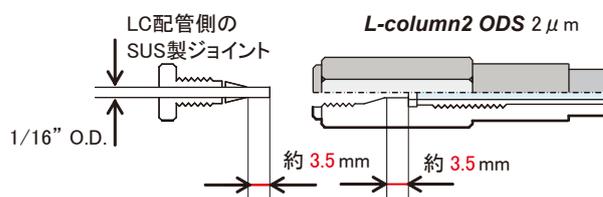


Fig.10 **L-column2 ODS**のネジ型式

※1 例えば「0.025s」の場合、0.025秒毎にデータ採取するという。機器メーカーにより名称が異なる

■ 2 μmカラムをより長く使うために
最近のUHPLC用カラムは、当初に比較し耐久性は向上しましたが、より長く安定して使うためには、幾つかの注意が必要が必要です。

- ・ **カラムに大きな圧力変動を与えない**
2 μmカラムは分析時のカラム圧力が高いので、送液ポンプを急に止めずに、徐々に流速を落とし、時間をかけてカラム圧力を下げていきます。特に短いカラム(50 mm以下)は、超高压、高流量で使用することが多いので、注意が必要です。
- ・ **必要以上に高流量で使用しない**
使用圧力許容範囲内で使用していても、過剰な流量で使用すると、トップオフ※2やチャネリング※3が生じる場合があります。
- ・ **試料は必ず0.2 μm以下のフィルタでろ過する**
2 μmカラムは目詰まりし易いので試料はもちろん、移動相も必ずろ過して使用します。
- ・ **プレカラムフィルタを使用する**
送液ポンプのシール部分など、微細なゴミはラインからも生じます。ゴミによるカラム圧力上昇は、カラム洗浄しても、なかなか除去できません(Fig.11)。

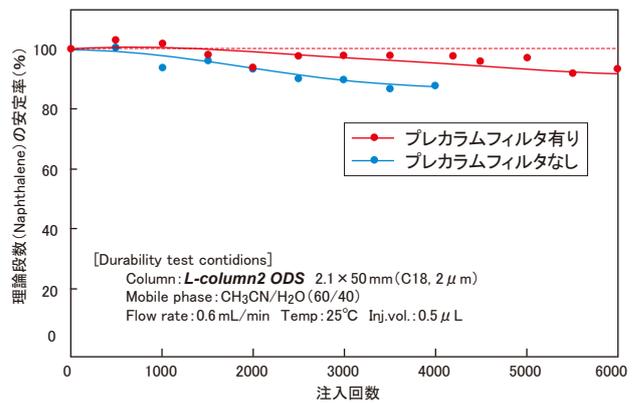


Fig.11 耐久性試験

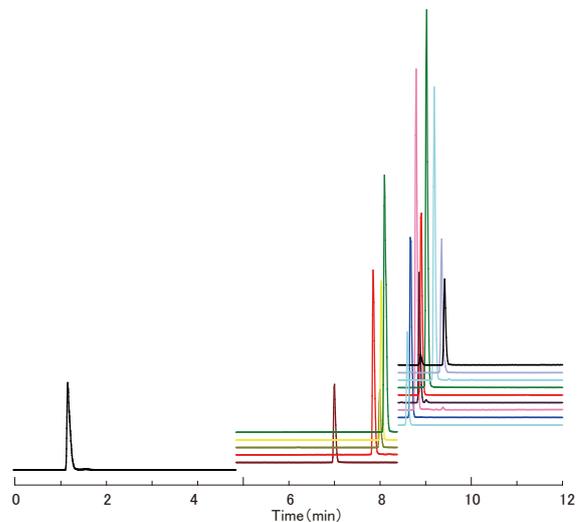
L-column2 ODS 粒子径2 μm は、高度エンドキャッピングによる低吸着は勿論ですが、「低カラム圧」「高分離能」「高耐久性」といった大きな特徴があります。性能を十分引き出すためには、注意事項に留意して上手に使うことがポイントとなります。

- ※2 カラムの入口部分に隙間ができること。カラム圧力が上昇し、ピーク割れやテーリングが生じます。一度起こると性能回復しません。
- ※3 カラム内にバイパスができること。ピーク割れやテーリングが生じます。

Application 抗うつ剤の分析

抗うつ剤には塩基性化合物が多く、HPLC分析を行う際には、カラムに吸着してテーリングが起こります。今回、三環系、四環系、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(Selective Serotonin Reuptake Inhibitors; SSRI)などの抗うつ剤15種類をLC/MSで一斉分析を行いました。移動相にはギ酸とアセトニトリルのグラジエント分析で、カラムはUHPLC用である**L-column2 ODS** 2 μmを使用しましたが、2 μmカラムとしては圧力が低いため、汎用の装置でも使用することが可能です。また、このときのカラム圧力は最大で26 MPaと低く、吸着しやすい抗うつ剤がシャープなピークで分析することができました。

No.	Name	M/Z	RT	No.	Name	M/Z	RT
1	Sulpiride	341.9	1.38	9	Imipramine	281.0	8.91
2	Trazodone	372.0	7.14	10	Fluvoxamine	318.9	8.97
3	Mianserin	264.9	7.97	11	Nortriptyline	263.9	9.02
4	Amoxapine	314.0	8.12	12	Amitriptyline	278.0	9.13
5	Citalopram	325.0	8.15	13	Trimipramine	295.0	9.3
6	Doxepin	280.0	8.22	14	Fluoxetine	309.9	9.46
7	Paroxetine	329.9	8.71	15	Sertraline	305.9	9.52
8	Desipramine	267.0	8.78				



[Analytical conditions]
Column: **L-column2 ODS** 2.1 × 100 mm (2 μm, C18, 12 nm)
Mobile phase: A) 0.1% HCOOH in CH₃CN B) 0.1% HCOOH in H₂O
A/B 10/90 → 60/40 → 100/0 (0 → 10 → 15 min)
Flow rate: 0.3 mL/min Inj. vol.: 1 μL (20 mg/L each) Temp.: 40°C
System: LC Alliance2695 MS ZQ (Waters Co.)

Fig.12 抗うつ剤の分析 (No.2067)

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