

カラムの選択

HPLC(UHPLC)のカラムの種類は数多くあります。同じメーカーでも銘柄の違いや粒子径の違いがあります。カラムの長さや内径、クロマトグラフィー管の材質の種類も様々です。分析を始めるときには、これらをどう選ぶかが大切になります。ここでは L-column シリーズにおけるカラムの選択について紹介します。

Keywords 官能基 粒子径(粒径) カラム長さ カラム内径

充填剤の選択

■ 官能基の選択

逆相クロマトグラフィーに用いるカラムは、基材表面に疎水性の官能基を導入した化学結合形充填剤を充填しています。L-column シリーズは主に3種類あります。

オクタデシルシリル化シリカゲル



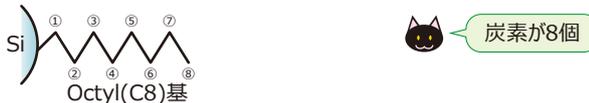
L-column シリーズ:

L-column ODS, L-column2 ODS, L-column3 C18
L-column ODS-P (細孔径30 nm)

オーディーエス シーゾウハチ
ODSカラム、またはC18カラムといえます。

ファーストチョイスカラムとして選択されます。参考となるデータも豊富で、化学的耐久性も高く、使いやすいカラムです。

オクチルシリル化シリカゲル



L-column シリーズ:

L-column C8, L-column2 C8, L-column3 C8

オクチルカラム、またはC8カラムといえます。

ODSと比較して炭素含有率が低く、疎水性が低いです。ODSでは溶出しにくい保持の強い物質の分析や、保持時間を短縮したい場合にセカンドチョイスとして選択します。

フェニルヘキシルシリル化シリカゲル



L-column シリーズ:

L-column2 C6-Phenyl

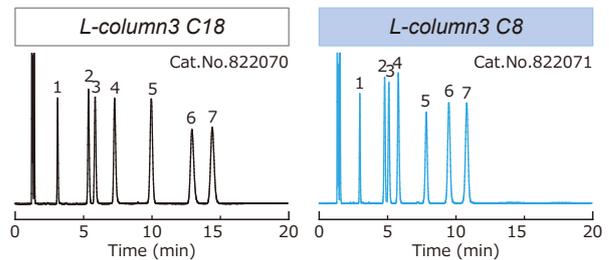
フェニルヘキシルカラム、またはC6フェニルカラムといえます。基材とフェニル基との間のアルキル基(スペーサー)の長さが違うものや、直接フェニル基が結合されているものがありますが、それらをまとめて「フェニルカラム」ということがあります。

疎水性相互作用と $\pi-\pi$ 相互作用を併せた分離機構により、芳香環を有する成分を特異的に認識します。ODSやC8とは異なる分析結果を得たい場合は、これを選択します。

分析例はありますか？

抗ヒスタミン薬

C8カラムの保持時間は、全体的に早くなります。



[Analytical conditions]

Column: 5 μ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃CN/25 mmol/L Phosphate buffer pH 7 (45/55)
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C
Detection: UV 220 nm; Inj. vol.: 1 μ L
Sample: 1. Chlorpheniramine; 2. Diphenhydramine;
3. Diphenylpyraline; 4. Homochlorcyclizine; 5. Hydroxyzine;
6. Clemastine; 7. Promethazine

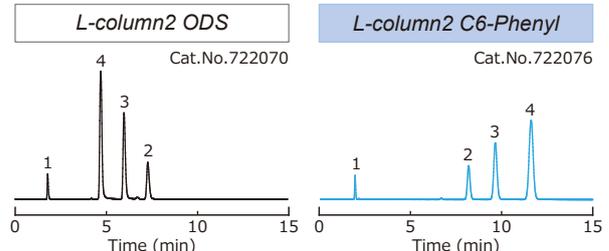
Application No.L3012

塩基性物質って、中性付近のアセトニトリルを用いた溶離液ではテーリングしやすいのに、L-column3 のピークはきれい。

L-column3 の低吸着性はトップレベルです。

ニトロベンゼン

ODSカラムは疎水性の低い順(log Powの小さい順)に溶出します。フェニルカラムは $\pi-\pi$ 相互作用による保持機構がはたらくため、ニトロ基の数の少ない順に溶出します。

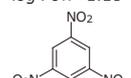


[Analytical conditions]

Column: 5 μ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: CH₃OH/H₂O (50/50)
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C
Detection: UV 210 nm; Inj. vol.: 1 μ L

Application No.L2090

1. Uracil (t₀ marker) log Pow=1.86*1
2. Nitrobenzene log Pow=1.49*1
3. 1,3-Dinitrobenzene log Pow=1.18*1
4. 1,3,5-Trinitrobenzene log Pow=1.18*1



※1 引用: 厚生労働省 職場のあんぜんサイト(<http://anzeninfo.mhlw.go.jp/>)

■ L-column シリーズの選択 ODSを例に

	L1	L2	L3
基材	全多孔質高純度シリカ	全多孔質高純度シリカ	PCSシリカ Perfect chemical stable silicaの略。 耐アルカリ性の非常に高い全多孔質高純度シリカ
エンドキャッピング	高温気相エンドキャッピング	高度エンドキャッピング 高温気相エンドキャッピングの反応効率を向上させた エンドキャッピングです。	耐久型高度エンドキャッピング PCSシリカに、進化した高度エンドキャッピングを施す ことで、化学的耐久性が飛躍的にアップしました。
使用pH範囲	pH 2 - pH 9	pH 1 - pH 9	pH 1 - pH 12 pH 12 !!
特徴	1990年からの安定供給と多くの使用実績により、掲載文献も多数あります。	基材の表面処理と充填の技術の進化により、高分離能・低吸着性・高再現性・高耐久性を実現しました。	更なる技術革新により、L-column2 と同等かそれ以上の性能と、幅広いpHで使用可能な化学的耐久性を兼ね備えた、オールラウンドカラムです。
塩基性物質試験 (SSRI)	シンメトリー係数(3): 1.58 1. Paroxetine 2. Citalopram 3. Fluoxetine Application No.L3007	シンメトリー係数(3): 1.38	シンメトリー係数(3): 1.24
特性試験 (分離特性)	水素結合性: 0.52 疎水性: 1.47 立体選択性: 1.55 1. Uracil (t ₀ marker) 2. Caffeine 3. Phenol 4. Butylbenzene 5. o-Terphenyl 6. Amylbenzene 7. Triphenylene Application No.L3003	水素結合性: 0.46 疎水性: 1.46 立体選択性: 1.58	水素結合性: 0.46 疎水性: 1.45 立体選択性: 1.35

Column: C18, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.

L-column3 column catalog

各項目※2を説明します。

耐酸性 (Low to High: L1, L2, L3)

耐アルカリ性 (Low to High: L1, L2, L3)

L-column シリーズの耐久性は昔から定評がありますが、中でも L-column3 は化学的耐久性が非常に高く、安定して使用できます。

吸着性 (Low to High: L3, L2, L1)

塩基性医薬品(SSRI)を中性で分析して、吸着性を評価しています。ピークが左右対称でシャープなほど、低吸着性な充填剤です。

耐久性と低吸着性、L-column3 はナンバーワン♡

特性試験は性能の良し悪しではなく、充填剤の持つ分離特性を示します。L-column2 と L-column3 は各項目に範囲を設け、充填剤の品質を管理しています。

このように L-column シリーズのODS(C18)でも、保持挙動が若干違います。文献や過去の分析に倣う場合は、同じ官能基・同じカラム銘柄を選択するのが無難ですね。

銘柄を変える場合は、保持時間などに注意、ですね。

水素結合性※3 (Low to High: L3, L2, L1)

2. Caffeine 3. Phenol

水素結合性の高いカフェインと水素結合性の低いフェノールの保持係数の比で、充填剤と分析対象物質との水素結合の影響の大きさを表します。

疎水性 (Low to High: L3, L2, L1)

6. Amylbenzene 4. Butylbenzene

アミルベンゼンとブチルベンゼンの保持係数の比で、保持力の大きさを表します。疎水性が高いほど、充填剤に強く保持され保持時間が大きくなります。

立体選択性 (Low to High: L3, L1, L2)

7. Triphenylene 5. o-Terphenyl

平面構造のトリフェニレンと 立体構造の o-ターフェニルの保持係数の比で、平面認識能を表します。立体選択性が高いほど平面構造を持つ分析対象物質の保持が強くなります。

※2 図は一般的なカラムと比較したときの L-column シリーズの位置のイメージです。試料や分析条件によって、このようにならないこともあります。

※3 一般に水素結合性が低いほど、十分にエンドキャッピングが施されている傾向にあります。化学修飾に用いる試薬の種類や、表面処理の密度によって値が大きくなる場合があります。

カラムサイズ, 粒子径の選択

一般によく用いられるカラムは、粒子径5 μm、内径4.6 mm、長さ150 mmです。分離向上させたい場合は、長さ250 mmを選択します。

■ 粒子径とカラム長さ

粒子径が小さくなると理論段数が高くなります。分離向上させたい場合は、小さい粒子径のカラムを選択します。カラム圧力が高くなるので、カラムやシステムの耐圧により使用が制限されます。

カラム長さや理論段数・保持時間は比例関係にあります。分離向上させたい場合は、長いカラムを選択します。この場合、分析時間が長くなるので、小さい粒子径と短いカラム(長さ)の組み合わせ等で、分析時間の短縮ができます。

粒子径5 μmを基準として、粒子径と移動相(溶離液)の最適流速における、理論段数とカラム圧力は以下になります。

粒子径	理論段数	カラム圧力	(参考: 理論段数がほぼ同等のカラム長さ)
5 μm	1	1	150 mm
3 μm	5/3 (1.7倍)	25/9 (2.8倍)	100 mm
2 μm	5/2 (2.5倍)	25/4 (6.3倍)	75 mm

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(溶離液)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。このため微粒子充填剤を用いたカラムは溶離液を高速で送液して分析の高速化が可能になります。セミアノカラム(内径1 mm~3 mm)が主流になります。

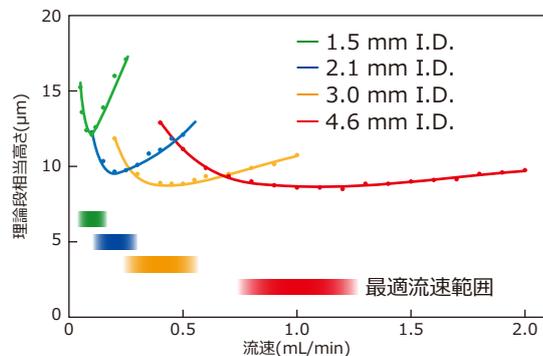
粒子径	最適線速度
5 μm	1~2 mm/sec
3 μm	1.5~3 mm/sec
2 μm	2 mm/sec~

異なるカラム内径でも、同じ線速度ならば保持時間は変わりません。最適流速は以下で求めます。
 $流速(\mu\text{L}/\text{min}) = 断面積(\text{mm}^2) \times 線速度(\text{mm}/\text{sec}) \times 60$

■ カラム内径

内径を細くすると最適流速が遅くなり、溶離液が削減できます。

同じHPLCシステムで、各内径の溶離液の流速と理論段相当高さの関係を示しました。理論段相当高さとは、カラム長さを理論段数で除した値です。



[Analytical conditions]
 Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 150 mm L.
 Eluent: CH₃CN/H₂O (60/40)
 Temp.: 40°C; Detection: UV 254 nm; Inj. vol.: 1 μL
 Sample: Naphthalene

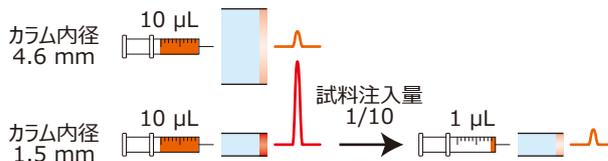
内径が細いほど、理論段相当高さが大きい、すなわち内径が細いほど理論段数が低く、分離が悪いように見えるのですが...

理論上は、内径にかかわらず理論段相当高さは同じです。内径が細いほど、カラムに対して、試料拡散の要因となる配管や検出器などのカラム外容積の比率が大きくなります。そのため実際の理論段数は低くなってしまいます。

なるほど。内径が細いほど、カラム以外の部分に注意ですね。

内径を細くすると感度が高くなります。同じ注入量の場合、感度は内径の断面積に反比例します。高感度化したい、試料注入量を少なくしたい場合は、内径の細かいカラムを選択します。

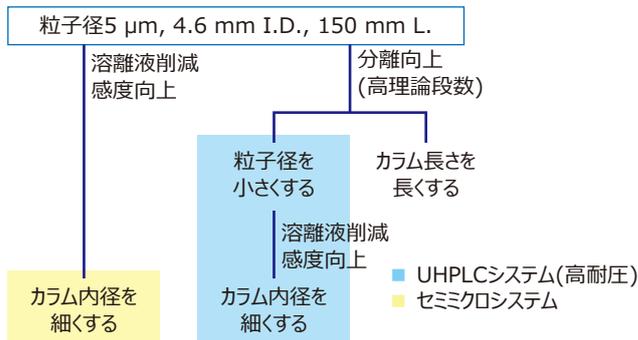
内径と感度のイメージです。



■ まとめ

逆相クロマトグラフィーにおいて、ファーストチョイスはODS(C18)カラムを選択します。

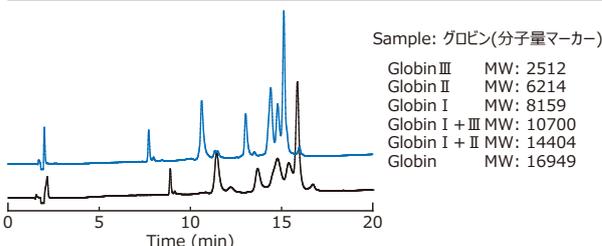
カラムサイズや粒子径を選択する際は、システムの性能(耐圧、流速、配管など)が合っているか確認してください。



参考: 充填剤の細孔径について

充填剤の細孔径と炭素含有率によって保持時間やピーク形状が異なります。分析対象物質の分子量により、カラムを使い分けることで、分離改善が期待できます。

カラム	細孔径	比表面積	炭素含有率
L-column ODS-P	30 nm	150 m ² /g	9 %
L-column ODS	12 nm	340 m ² /g	17%



[Analytical conditions]
 Column: 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A: 0.1% TFA in CH₃CN; B: 0.1% TFA in H₂O Gradient
 Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 25°C
 Detection: UV 220 nm; Inj. vol.: 10 μL

メソッド開発に有利なカラムを選択する

メソッド開発において、カラムの選択は重要です。ハイスベックなカラムを用いると、溶離液のpHや耐圧などに制限されず、理論的に分析条件を組み立てることができます。

ここではハイスベックなカラムとして L-column3 がメソッド開発に有利な点を紹介します。

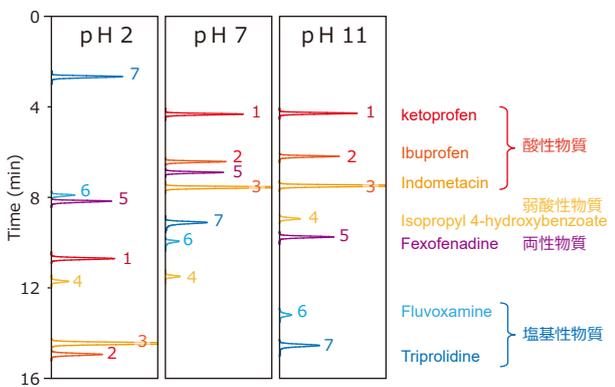
■ イオン性物質を分析する

イオン性物質は、保持時間やピーク形状の再現性をよくするため、緩衝液を用いて、解離状態を一定にして分析します。

イオン性物質は、溶液中で解離しやすい物質です。イオン形は保持が弱く、分子形は保持が強くなります。

	低pH	pKa(酸解離定数)	高pH
酸性物質	分子形が多く存在	←	イオン形が多く存在
塩基性物質	イオン形が多く存在	←	分子形が多く存在

溶離液のpHを変えて、医薬品など7成分の保持挙動を比較しました。アルカリ性溶離液を用いると、酸性や中性とは異なる分離パターンが得られます。



[Analytical conditions]
 Column: L-column3 C18, 5 μm; Size: 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A: CH₃CN, B: 25 mmol/L Phosphate buffer A/B, 20/80-70/30 (0-20 min)
 Flow rate: 0.3 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 220 nm
 Inj. vol.: 1 μL

pH 12で使える L-column3 は、アルカリ性溶離液でも、分析可能なんです。

L-column3 は、使用できるpH範囲が広いので、溶離液のpHを変えることで、イオン性物質の保持時間をコントロールすることができます。格段にメソッド開発の幅が広がります。

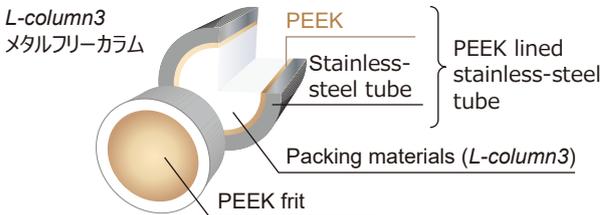
 参考文献

JIS K 0124: 2011 高速液体クロマトグラフィー-通則
 JIS K 0214: 2013 分析化学用語(クロマトグラフィー部門)

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

■ 配位性化合物を分析する

金属の影響を受けやすい配位性化合物、タンパク質やペプチド、リン酸基を有する物質を再現性良く分析するには、カラムを含めたシステムのメタルフリー化が必要です。



L-column3 メタルフリーカラムは、UHPLC用(粒子径2 μm)もあります。耐アルカリ性と高分離能を兼ね備えたカラムです。

分析対象物質の性質によってカラムを選択するのも大切です。

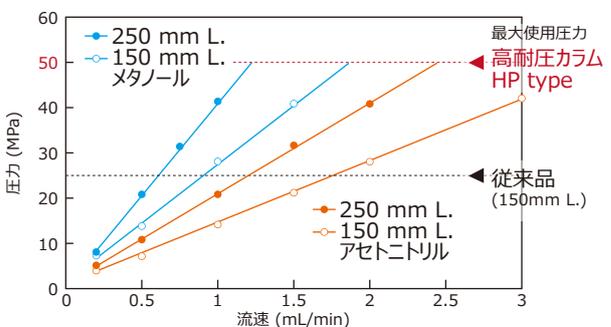
■ 溶離液にメタノールを使う

メタノールを溶離液に用いる場合、アセトニトリルに比較しカラム圧力が高くなるので、流速が制限されます。

メタノール/水系の溶離液で使っていたら、1 mL/minも流せない…カラム圧力が高くて使いにくかった。

L-column3 では、粒子径3 μmに高耐圧カラム(HP type : ハイプレッシャータイプ/エイチピータイプ)があります。最大使用圧力が50 MPaなので、メタノールでもストレスなく使えます。

溶離液の流速と圧力をプロットしました。従来品は最大使用圧力が25 MPa(150 mm L.)ですが、高耐圧カラムを使えば、高速分析が可能になります。



[Analytical conditions]
 Column: L-column3 C18, 3 μm, HP type; Size: 4.6 mm I.D.
 Eluent: CH₃CN or CH₃OH/H₂O (60/40); Temp.: 25°C
 System: Agilent:1260 Infinity II Prime LC

3 μmの最適流速範囲は内径4.6 mmで1.5 mL/minです(前ページ参照)。高耐圧カラムは、3 μmのカラム性能を存分に発揮できる設計なのです。

おお～ L-column3 HP type 使ってみよう♡

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



東京事業所 クロマト技術部
 e-mail chromato@ceri.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