

微粒子カラムとモノリスカラムを使いこなす

一般財団法人化学物質評価研究機構 オダノよしひさ 須藤良久

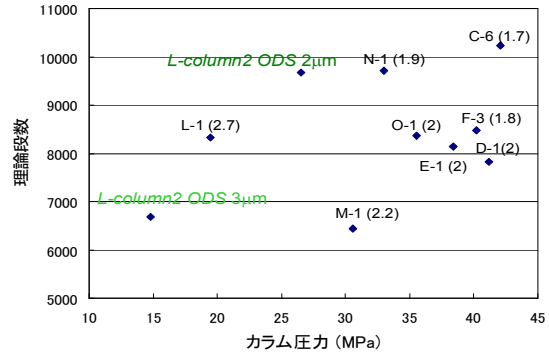
1. L-column2 ODS 2 μ m の特長

1.1 低圧かつ高理論段数

L-column2 ODS 2 μ m は粒度分布の狭いシリカゲルを使用しているため低圧でありながら、高理論段数を実現した。

Fig.1 カラム圧と理論段数の関係

HPLC 条件 カラムサイズ：2.1 \times 50mm or 2.0 \times 50mm；
移動相：アセトニトリル/水 (50/50)；温度：25 $^{\circ}$ C；流速：
0.6mL/min.



1.2 汎用 HPLC で使用可能

L-column2 ODS 2 μ m は低圧・高理論段数であるため、汎用 HPLC で UHPLC 分析が実現できる。

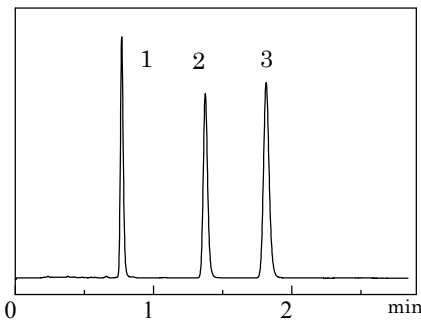


Fig.2 汎用 HPLC を用いた UHPLC 分析

HPLC 条件

装置：Shimadzu LC10ADvp+セミマイクロ仕様

マニュアルインジェクター(0.12 mm)

カラム：L-column2 ODS 2 μ m (2.1 \times 50 mm)

移動相：アセトニトリル/20 mM リン酸 (55/45)；

流速：0.6 mL/min；温度：40 $^{\circ}$ C；注入量：1 μ L；

試料：1.フルバスタチン, 2.メバスタチン, 3.ロバスタチン

2. システムのデッドボリュウムの影響

一般的に、sub2 μ m 充填剤は内径 2.1mm のセミマイクロカラムに充填して用いられる。セミマイクロカラムは、表 1 のように装置のデッドボリュウムにより理論段数が低下する。

表 1 装置のデッドボリュウムと理論段数の関係

配管内径(mm)*	検出器セル	インジェクター	ナフタレンの理論段数
0.25	コンベンショナル	オートサンプラー	1670
0.12	コンベンショナル	オートサンプラー	2720
0.12	セミマイクロ用	オートサンプラー	4250
0.12	セミマイクロ用	マニュアル	7740

*長さ 80cm

3. プレフィルターの必要性

UHPLC 用カラムはエンドフィッティングのフィルターの細孔径が小さいため目詰まりしやすい。

これを防ぐにはカラムの前にプレフィルターを装着することが必須である。

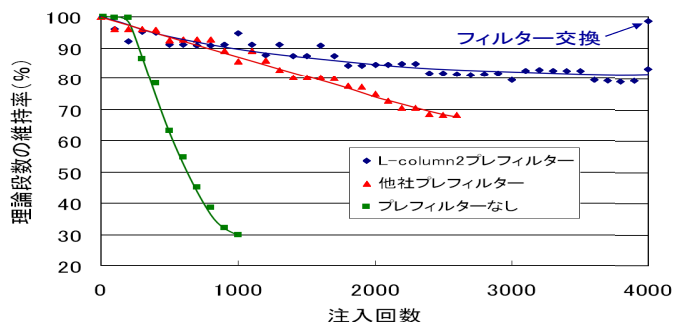


Fig.3 プレフィルターの効果

微粒子カラムとモノリスカラムを使いこなす

日本ウォーターズ(株) 佐々木俊哉(ささきしゅんや)

UPLC(Ultra Performance Liquid Chromatography)技術¹⁾は2004年に米国ピッツバーグカンファレンスで発表されてから現在まで医薬・食品・環境・化学工業・ライフサイエンスすべての分野へ急速に浸透し続けている。その理由は sub 2 μm の超高性能微粒子を充てんしたカラムと高耐圧低拡散システムによる飛躍的な分離と感度の向上がハイスループットと同時に得られることにある。

UPLC 上市から6年、蓄積された微粒子カラム使いこなしのこつの中からここでは以下の二つに焦点を当てて紹介する。

1. カラム外効果

カラム効率システムのカラム外容積の影響を受ける。

システムのカラム外容積は次の二つに分けて論じる必要がある。(Fig.1)

- 1) システム遅延容量(system dwell volume)
 - グラジエント分析の際の遅延時間に影響を与える
- 2) システム拡散容量(system bandsread volume)
 - カラム効率に影響を与える

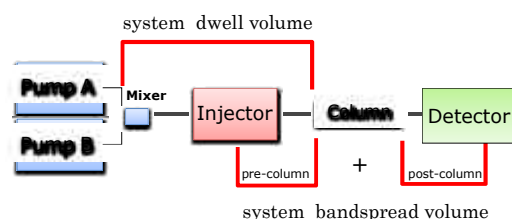


Fig.1 カラム外容積

微粒子カラムの高い効率を生かすためには小さな拡散容量のシステムが必要であり、また異なるシステム間におけるグラジエント分析の移管にはシステム遅延容量の違いを考慮する必要がある。

2. カラムケミストリー

微粒子カラムを使用する UPLC においても一般の HPLC と同様カラムケミストリーによる選択性変更が分析方法開発の鍵となる。UPLC 用カラムケミストリーとしては HPLC2010(Boston)で発表された CSH ケミストリー(Fig.2)を含めると15種類が使用可能で、これにより大幅な選択性変更が可能となる。特にエチレン架橋型ハイブリッド(BEH)ケミストリー²⁾と BEH に微小なチャージを加えた CSH ケミストリー³⁾との間の選択性の違いは大きく分析方法開発ツールとして興味深い。(Fig.3) 本座談会ではこれらに加え微粒子カラムの今後の課題についても議題としたい。



Fig.2 CSH™ (Charged Surface Hybrid)テクノロジー

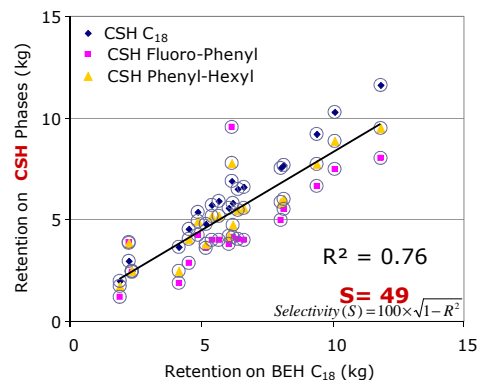


Fig.3 BEH ケミストリーと CSH ケミストリーの選択性相違度(S)

1) U.D.Neue, M.Kele, B.Bunner, A.Kromidas, T.Dourdeville, J.R.Mazzeo, E.S.Grumbach, S.Serpa, T.E.Wheat, P.Hong, M.Gilar, Advances in Chromatography Vol. 48, pp. 99-143, Taylor & Francis, 2009.
 2) K.D.Wyndham, J.E.O'Gara, T.H.Walter, K.H. Glose, N.L.Lawrence, B.A.Alden, G.S.Izzo, C.J.Hudalla and P.C.Iraneta, Anal. Chem., 2003, 75 (24), pp 6781-6788.
 3) P.C.Iraneta, K.D.Wyndham, D.R.McCabe and T.H.Walter, Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and Its Use in Liquid Chromatography, 720003469EN, Waters Corp., 2010

微粒子カラムとモノリスカラムを使いこなす

○清 晴世 / 柴田 亮 (メルク株式会社)

弊社は、モノリスカラム“クロモリス (Chromolith®)”の製造メーカーであると同時に、液晶事業部などの研究部門では、“モノリスカラム”や“微粒子カラム”を使用しているユーザーでもある。今回は、ラボラトリービジネス部/清がモノリスカラム“クロモリス”の製品としての特徴を、液晶事業部/柴田が微粒子カラムとモノリスカラムの特徴をユーザーの視点で紹介させて頂く。

モノリスカラム“クロモリス (Chromolith®)”の特徴 ～メーカーとして～

モノリスカラムとは、シリカゲルまたはポリマーを基材とした骨格構造をもつ固定相を用いたカラムの総称である。弊社のクロモリスは、シリカゲルを基材とし、外装に PEEK 樹脂を使用している。モノリスカラムの最大の特徴は、“高流速での高分解能分析が可能である”ということが挙げられる。物理的構造上、粒子充填型カラムに比べ、流路対骨格の口径比が大きく、カラム内の空隙率が 80% 以上と高い。これにより、驚異的に背圧が低く、また、流速増加に伴う分解能の低下が粒子充填型カラムに比べ、穏やかであるためであるため、“高流速での高分解能分析”を可能としている。

この特徴を生かす事により、高流速で分析を行い、一分析時間の短縮する事が可能であるばかりでなく、溶媒の流速を経時的に上昇させて保持時間の長い物質の溶出を早める”流速グラジエント”を利用し分析時間を劇的に短縮した事例¹⁾や、その低背圧を利用して、HPLC 用カラムを複数本連結し、粒子充填型カラムでは考えられない高理論段のカラムを作成した事例も発表されている。²⁾

微粒子カラムとモノリスカラムの特徴 ～ユーザーとして～

微粒子カラム、モノリスカラムとも従来のカラムに比べ分析の高速化や高分離化が可能となり、ユーザーとしては非常に魅力的なツールとなっている。そこで、いちユーザーの視点から、粒子径が 5 μm や 3 μm のカラムと比較したそれぞれの特徴を記した。

微粒子カラム

<長所>

- とにかく分離能が高く、早い。
- 分析時間が短いため、1日にできる分析数が多いことから、分析条件の検討が早い。

<難しい点>

- 高圧での送液が必要となるため、対応した装置購入の初期投資が必要となる。
- 0.2 μm フィルターでろ過された溶媒を使用しているが、背圧が上昇してくる傾向がみられる。
- インジェクション量の増加にピーク形状が影響を受けやすい傾向が見られる。

モノリスカラム

<長所>

- 分離能がよく、流速をあげてもピーク形状が保たれ、高速高分離が可能となる。
- 非常に低背圧のため、高流速や高粘度の溶媒組成にも対応ができる。また、従来の装置で対応できる。
- 分離能が不足している場合に直列にカラムを接続することで対応可能となる。
- 同じ内径で比較すると、従来のカラムに比べ試料負荷量が大きい傾向が見られた。また、インジェクション量を増やしてもピーク形状への影響が少ない。

<難しい点>

- 低背圧は分析の自由度をもたらしているが、一方で極端な低背圧により使用するシステムによっては送液が不安定になった事例がある。この場合、ミキサーとオートサンプラーの間に背圧管(内径の細い配管を使用している)を使用することで解決できる。
- 修飾基のラインアップが十分とはいえ、サイズが選べるものは主に C18 のみとなる。

上記の点から、私は高速高分離を突き詰めた微粒子カラムと自由度のモノリスカラムと考えている。非常に便利なツールなので、ぜひともお試しいただきたい。

1) 中沢真子, 篠野博, 長岡正人, 相山律男, Chromatography, 2003, Vol.24 No.2, 81-87

2) T.Bamba, E.Fukusaki, Y.Nakazawa, A.Kobayashi, J.Sep.Sci. 2004, 27, 93-296

微粒子カラムとモノリスカラムを使いこなす

ジーエルサイエンス(株), 京都工芸繊維大学 田中 信男 (たなかのぶお)

1. 高性能カラムの評価法

HPLC 用粒子充填カラムについて粒子の微小化による高性能化が行われてきたが、カラム理論段数(N)は粒子径(d_p)にはほぼ反比例し、送液圧力(ΔP)は粒子径の2乗に反比例する(式1, 2)ので、高速化について装置に付随する限界があり、高性能カラムは総合的な評価を必要とする。Knox は、理論段数(N)、理論段高(H)、透過率(K)、van Deemter プロットに加えて、Separation impedance (E)や換算理論段高(h)ー換算線速度(v)のプロットを用いて、粒子充填型カラムについて統一的な評価が可能であることを示した(1)。van Deemter プロットは異なる線速度におけるカラム性能の評価を可能とするが、送液圧力(透過率)が反映されない。E 値は送液圧力と理論段数の寄与を含むが、分離時間の要素を含まない。Poppe は一定圧力下の限界のカラム性能について $\log(t_0/N)$ を $\log(N)$ に対してプロットすることにより、理論段数、圧力、分離時間を総合的に評価することを可能とした(2)。Kinetic plot (3)は、 $\log(t_0/N^2)$ を $\log(N)$ に対してプロットすることにより、異種カラムについて限界的な性能(理論段数、分離時間)の比較を可能とする。

$$N = (L/\sigma)^2 = L/H, (H = h d_p) \quad (1) \quad (L: \text{カラム長}, d_p: \text{粒子径}, h(\text{最小値}) \sim 2)$$

$$K_V = (u_0 \eta L) / (\Delta P), \Delta P = \phi \eta u L / d_p^2 \quad (2) \quad (\eta: \text{溶媒粘度}, \phi: \text{flow resistance parameter}, K_V: \text{透過率})$$

2. 全多孔性粒子充填カラム、表面多孔性粒子充填カラム、モノリス型シリカカラムの比較

図1は40 MPaにおける Kinetic プロットである。全多孔性粒子充填カラムのプロットは計算値で、より小さな充填剤の使用(矢印(1))は、一定圧力で発現可能な最高理論段数の減少を意味する。市販カラムについて、矢印(2)に沿って、粒子径の減少により高速化と高理論段数が同時に達成されてきた。逆相クロマトグラフィーにおいて市販カラムの進歩(矢印(2))はこの圧力下の限界的性能に近づいており、小さな充填剤によるカラムの一層の高性能化には超高压が必要であることを示唆している。

表面多孔性粒子およびモノリス型カラムのプロットは実験値であり、これらのカラムが全多孔性粒子の限界より速い分離(小さな t_0)あるいは大きな N をもたらすことを示している。2.6-2.7 μm の表面多孔性粒子充填カラムは粒子径相当の透過率(K, 式2)と、2 μm 以下の全多孔性粒子に相当する N をもたらし、実用的な範囲で全多孔性粒子より高い性能を示す。これは非常に均一な粒子径がもたらす小さな eddy 拡散に加えて、短い粒子内拡散距離や小さな obstruction factor に基づく(4)。

骨格径約 1 μm , 空隙径 1.5 μm のモノリス型シリカカラムは、5 μm 粒子相当の圧力と 2.5 μm 粒子相当の理論段高 $H=5 \sim 5.5 \mu\text{m}$ をもたらし、高理論段数域で全多孔性粒子充填カラムより高い性能を示す(5)。低い圧力で大きな理論段数を発現する特徴は、小さな骨格と大きな空隙に基づいている。より大きな空隙径と空隙率をもつモノリス型シリカキャピラリー(骨格径+空隙径=3.5 μm , 空隙率 > 90%)は 100 万理論段を発現することができる。分離時間重視で 1-2 万段を必要とする場合、高压下ー微粒子充填カラムが有利であり、非常に大きな理論段数を必要とする場合、モノリス型シリカカラムが有利となる。

3. 高性能カラムに付随する課題

カラム外効果: 小さなカラムはカラム外効果の小さな HPLC システムを要求する。

圧力の効果: 高压においてイオンの保持係数は大きな影響を受ける。親水性溶質の保持も相当に変化し、疎水性の溶質はわずかな効果を受け、選択性が変化する(6)。

温度条件: 溶媒粘度を下げるためには高温での使用が有利であるが、Viscous heating 効果の抑制も重要である。

歴史的に 1-3 万段の領域で高速化が行われてきたが、20-50 MPa 以下の圧力で、5-50 万段を与える高理論段数の表面多孔性粒子充填カラムやモノリス型シリカカラムが実用的となる可能性もある。

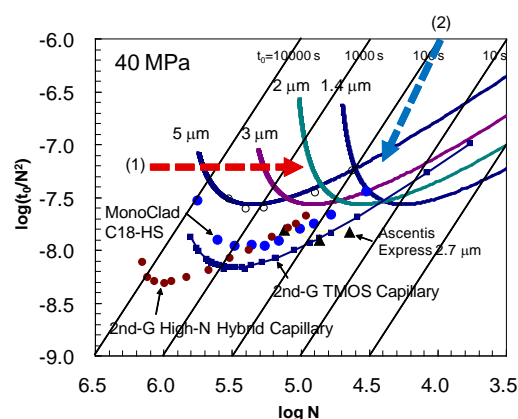


Figure 1. Kinetic plot analysis at 40 MPa. The curves for particulate columns were obtained by assuming $\eta=0.00046 \text{ Pa s}$, $\phi=700$, $D_m=2.22 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, and Knox equation, $h=0.65v^{1/3}+2/v+0.08v$.

(1) P. A. Bristow, J. H. Knox, Chromatographia, 10, 279-289 (1977). (2) H. Poppe, J. Chromatogr., A, 778, 3-21 (1997). (3) G. Desmet, et al, Anal. Chem. 77, 4058-4070 (2005). (4) F. Gritti, et al, J. Chromatogr. A. 1217, 1589-1603 (2010). (5) T. Hara, et al, Anal. Chem. 78, 7632-7642 (2006). (6) M. M. Fallas, et al, J. Chromatogr. A, 1217, 276-284 (2010).