

HPLC分離の基礎

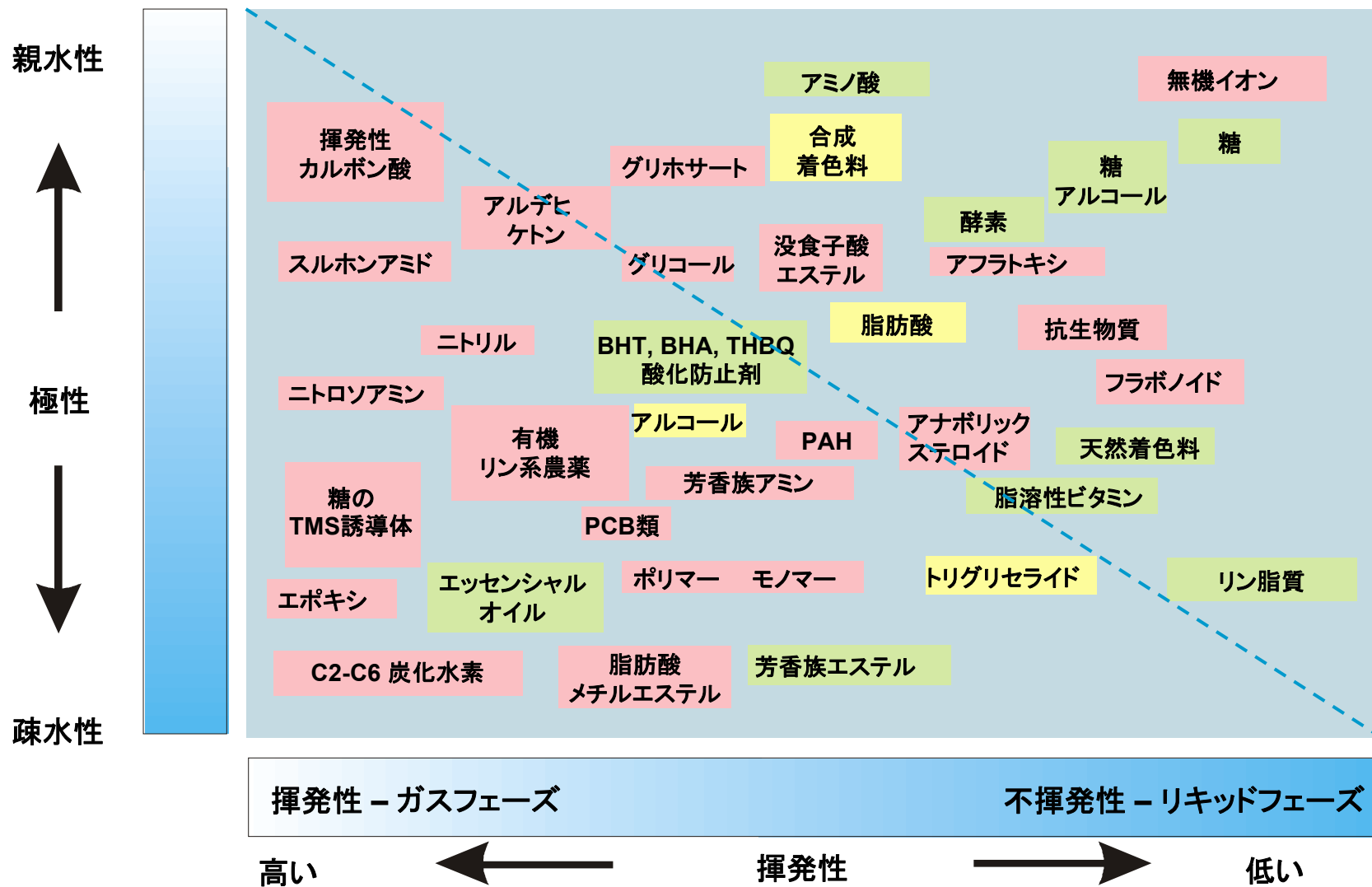


分離基礎コースの概要

- 主なHPLCの分離モード
- 重要な関係式
 - 分離度
 - van Deemterの式
- 主な用語と定義
- 下記の特性を左右する主要なパラメーターと 条件
 - 効率、選択性、リテンション
- 圧力の役割
 - Sub-2um



分離テクニック



HPLCの主な分離方法

ほとんどの化合物は、次の4つの分離モードで分離することができます:

- 分配モード

逆相分配クロマトグラフィーは最も広く利用されています

- 吸着モード

- イオン交換モード

- サイズ排除モード



分配モード

(逆相分配クロマトグラフィー)

原理: 分析対象物の移動相、固定相間での分配相互作用

- 固定相官能基: C18, C8, フェニル, C3等があります
- 移動相: 水 (緩衝液) + 有機溶媒 (メタノール、アセトニトリル等)を使用します
- 非極性、極性の分子に適用できます
- 保持の強さ
 - より極性の高い成分の方が保持力が弱くなります
 - 疎水性部位の多い物質ほど保持力が強くなります
- グラジエント分析もよく利用されます



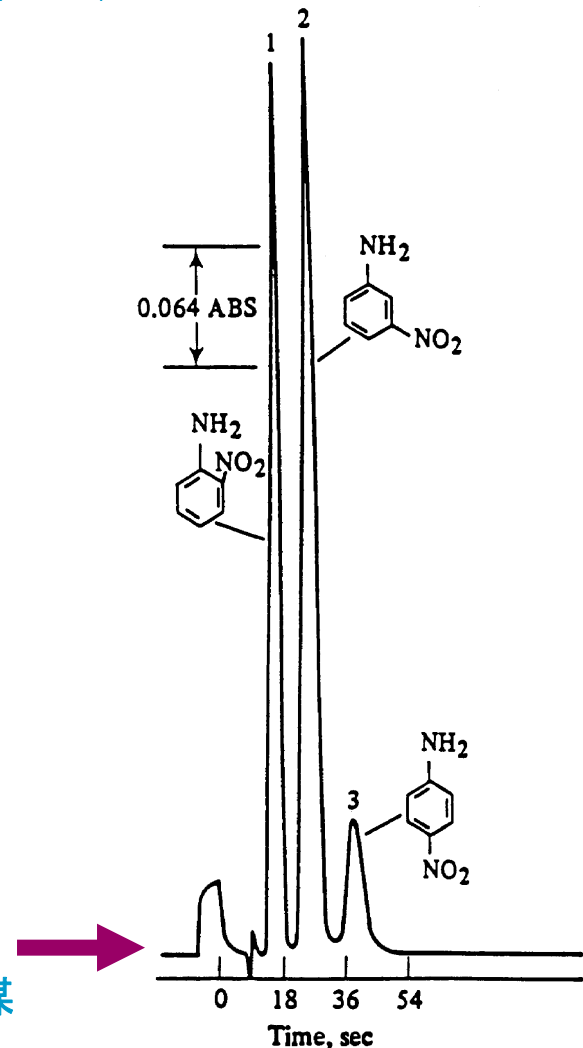
吸着モード (順相吸着クロマトグラフィー)

- 極性のある充填剤を利用します
→ シリカゲル
- 無極性の移動相を使用します
→ n-ヘキサン、イソオクタン、塩化メチレン、酢酸エチル 等
- 移動相の極性が高くなるほど保持力は下がります

順相を選択するケース

- 保持力の強い疎水性のサンプルを分析するとき
- 異性体を分離したいとき
- サンプルを無極性の溶媒に溶解しているとき
- 無極性溶媒でのピークの回収が必要なとき

ニトロアニリンの分離
HPLCカラム: シリカゲル
移動相: ヘキサン/塩化メチレン混合溶媒

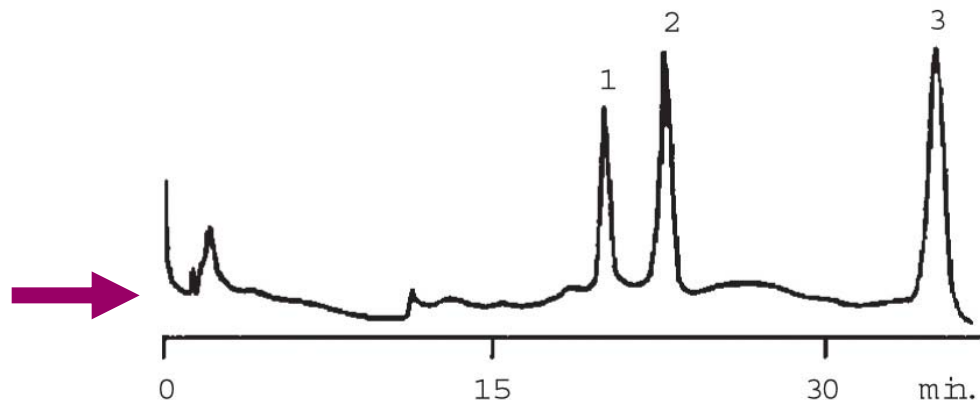


イオン交換モード (イオン交換クロマトグラフィー)

- カラム充填剤はスルホン酸、4級アンモニウムなどイオン性の官能基を持っています
- 移動相には緩衝液 (リン酸塩、ギ酸塩等) が用いられます
- 水溶液中の無機、有機イオンの分離に適しています

陽イオン交換樹脂($-\text{SO}_3^-$)での塩
基性タンパク質の分離

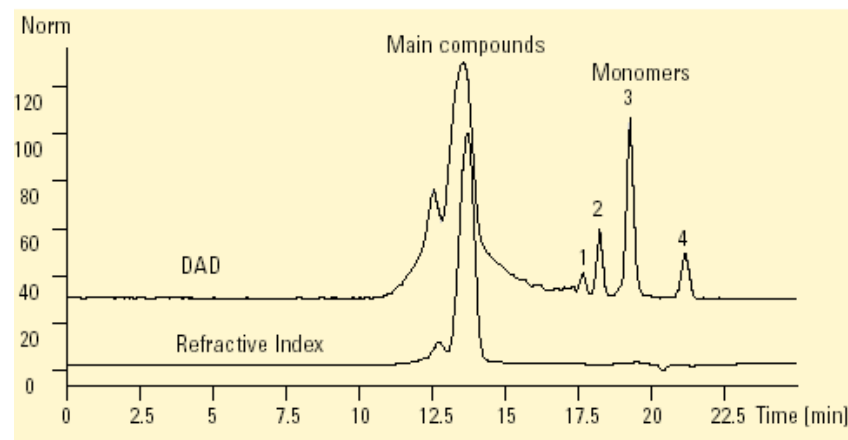
1. RNA ポリメラーゼ
2. キモトリプシノーゲン
3. リゾチーム



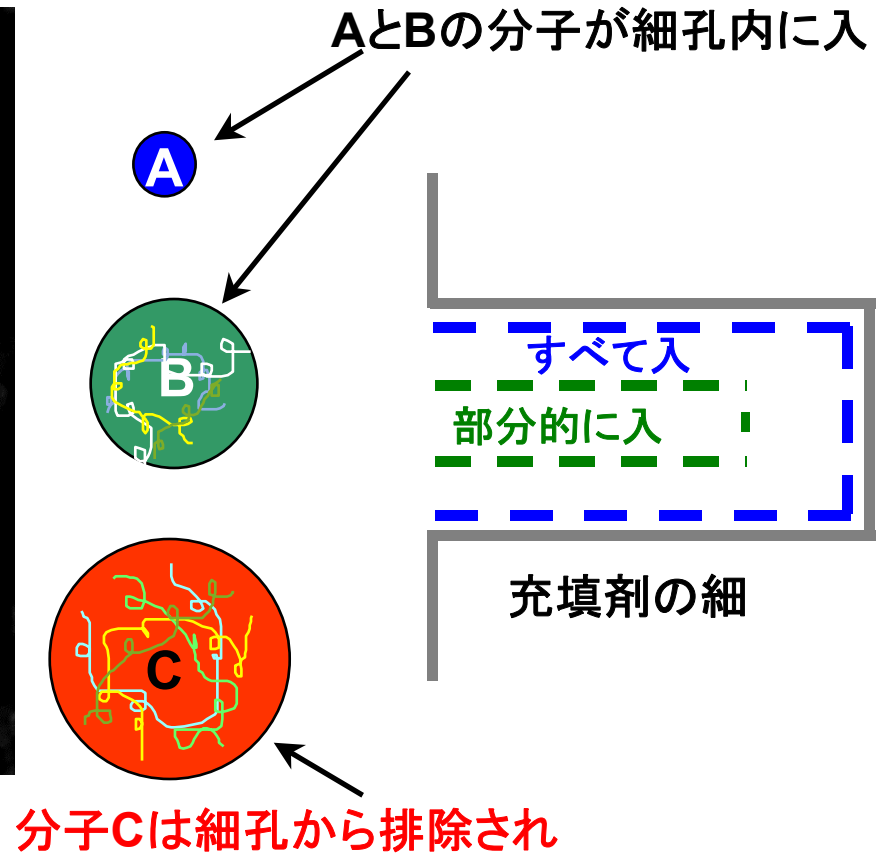
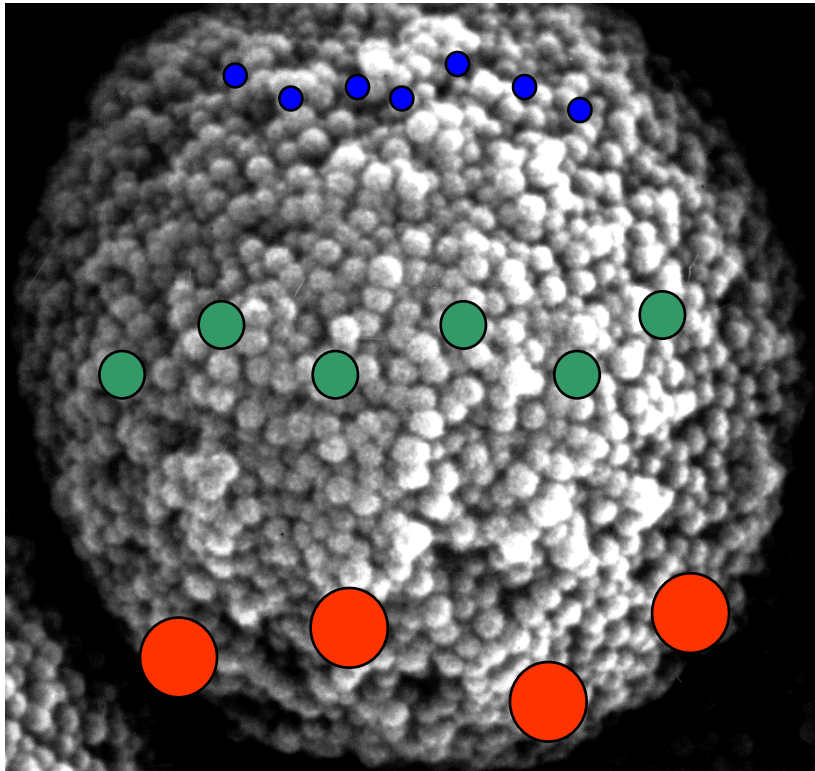
サイズ排除モード (サイズ排除クロマトグラフィー(SEC))

- 2種類の使用方法があります
 - 非水系SEC [ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)]
 - 水系SEC [ゲル濾過クロマトグラフィー(GFC)]
- サンプル物質と充填剤の間には相互作用がありません
 - 分子は多孔質の充填剤の細孔の中へ拡散していきます
 - 分子はその大きさの違いで分離されます
 - ✓ 細孔径よりも大きな分子は細孔内に入り込めないのに対し、細孔径よりも小さな分子は細孔内粒子内に入り込み充填剤内部へ浸透するので、両者が分離されます。
 - ✓ 細孔径より大きな分子が先に溶出し、小さな分子ほど溶出が遅くなります
- 移動相は分析対象物が溶解するものを選びます
- 主としてポリマーとタンパク質(高分子化合物)の分離に使われます

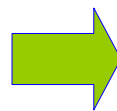
非水系SEC(GPC)カラムにおける
ポリブタジエンポリマーのクロマトグラム
モノマーはポリマーの後に溶出する
カラム: PLgel (mixed-D gel)
移動相: テトラヒドロフラン (THF)



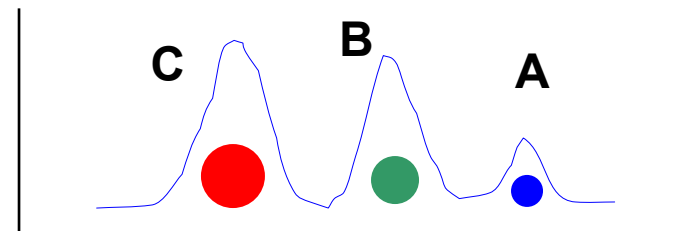
SECのメカニズム



分子は自由にポア内外を行き来し、分離される。最も大きな分子が最初に溶出し、次いで大きいもの、最後に最も小さな分子が溶出する。



シグナ



時



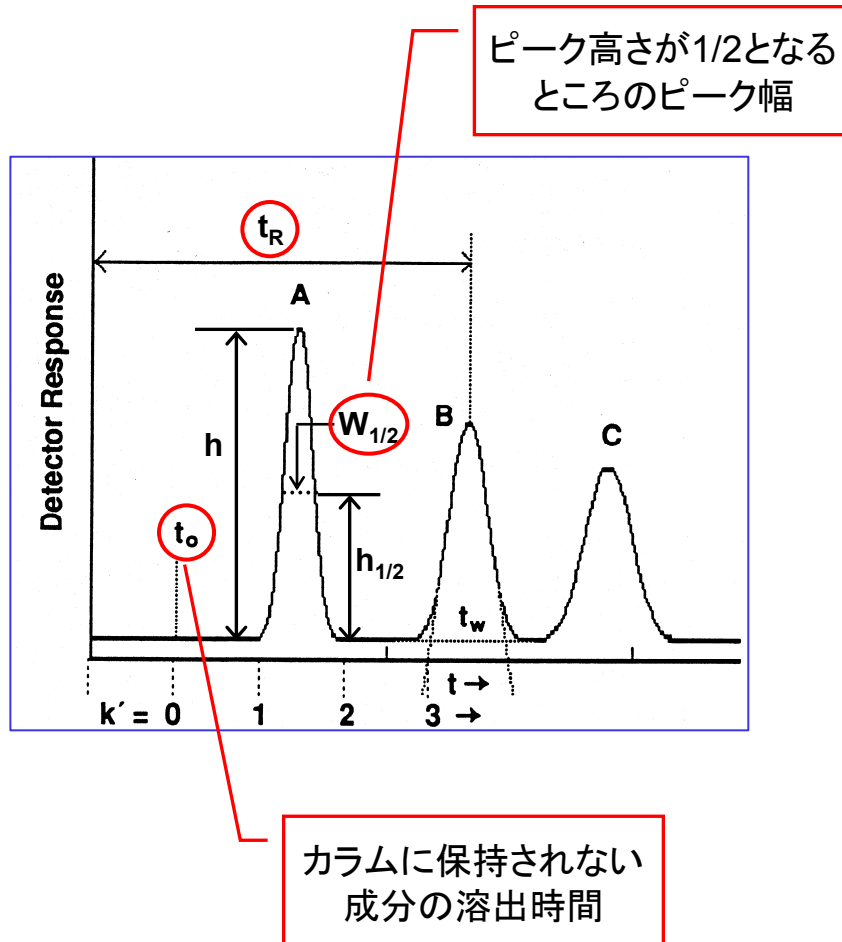
Agilent Technologies

Separation Fundamentals
Agilent Restricted
December 11, 2007

クロマトグラフィーの用語はいろいろあるけれど その意味は.....



クロマトグラフィーの用語



保持係数

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

分離係数

$$\alpha = k_2 / k_1$$

理論段数

$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2$$



クロマトグラフィーの用語

保持係数

異なった保持係数(k)をもつ二つの化合物は、分離可能です。

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$



クロマトグラフィーの用語

分離係数

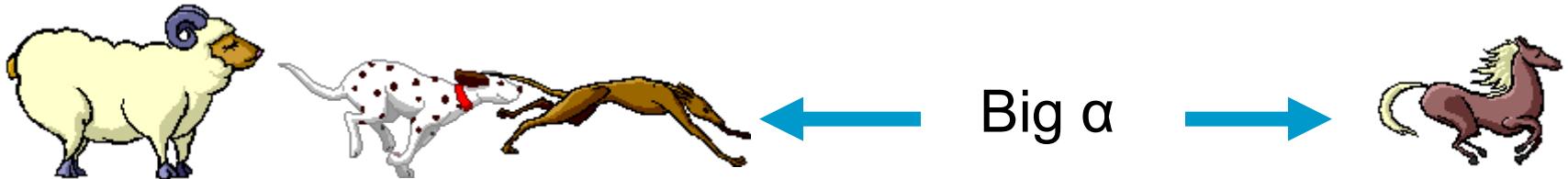
分離係数; α (選択性)

二つのピークのk がどの程度離れていて、分離可能かどうか

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

$$k_2 > k_1$$

$\alpha > 1$ で分離が可能



グラジエントリテンション (k^*)

グラジエント分析での選択性は、グラジエント保持係数によって決まります。

$$k^* = \frac{t_g F}{S \Delta\Phi V_m}$$

$\Delta\Phi$ = B 溶媒の変化率

S = 定数

F = 流速 (mL/min.)

t_g = グラジエント時間 (min.)

V_m = カラムの空隙体積 (mL)

- 低分子は $S \approx 4-5$
- ペプチド、タンパク質は $10 < S < 1000$

グラジエント分離では、異なったバンドにおける有効な k (k^*) の値はおおよそ同じです。



クロマトグラフの相対的な位置を変えずに 次のファクターを変えるとこのような関係ができます

これらが減少すると

このようになります

カラム長

t_G or F 減少

$\Delta\Phi$ 増加

カラム体積(i.d.)

t_G or F 減少

$\Delta\Phi$ 増加

$\Delta\Phi$ (同一カラム)

t_G or F 減少

$$k^* = \frac{t_G \cdot F}{S \cdot \Delta\Phi \cdot V_m}$$



クロマトグラフィーの用語

効率

N – 理論段数 – 多ければ多いほど良い

“プレート”とは蒸留の理論から受け継いだ用語で、LC では分離中の分析対象成分の相対的なピークの広がり度合いを指す。

– w (ピーク幅: クロマトグラム上で観察可能)

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{w} \right]^2$$

or

$$N = \frac{L}{H}$$

カラム長さ

HETP

理論段数



本物の皿

クロマトグラフィーの用語

分離度

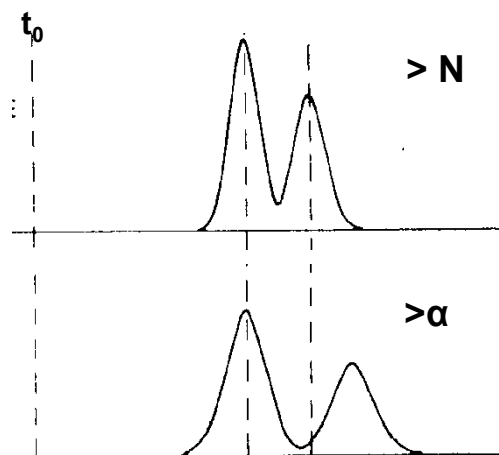
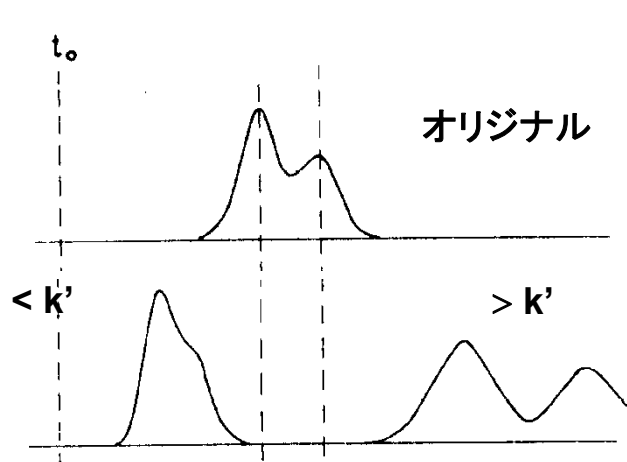
隣接するピーク間の距離

$R_s = 1.5$ はベースラインの分離

$R_s = 2$ はメソッド開発において望ましい値

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_1 + W_2)}$$

ピーク幅がどのくらいによって分離が決まります。
つまりピーク幅は狭い方が分離が良くなります。



分離 ...

3つのキーとなるパラメーターによって決まります

– 効率性、選択性、リテンション –

分離度を表す基本的な関係式

分離度は今までに出てきたいくつかの要素で表すことができます。

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{k}{(k+1)}$$

α = 分離係数 – 移動相、固定相によって決まります

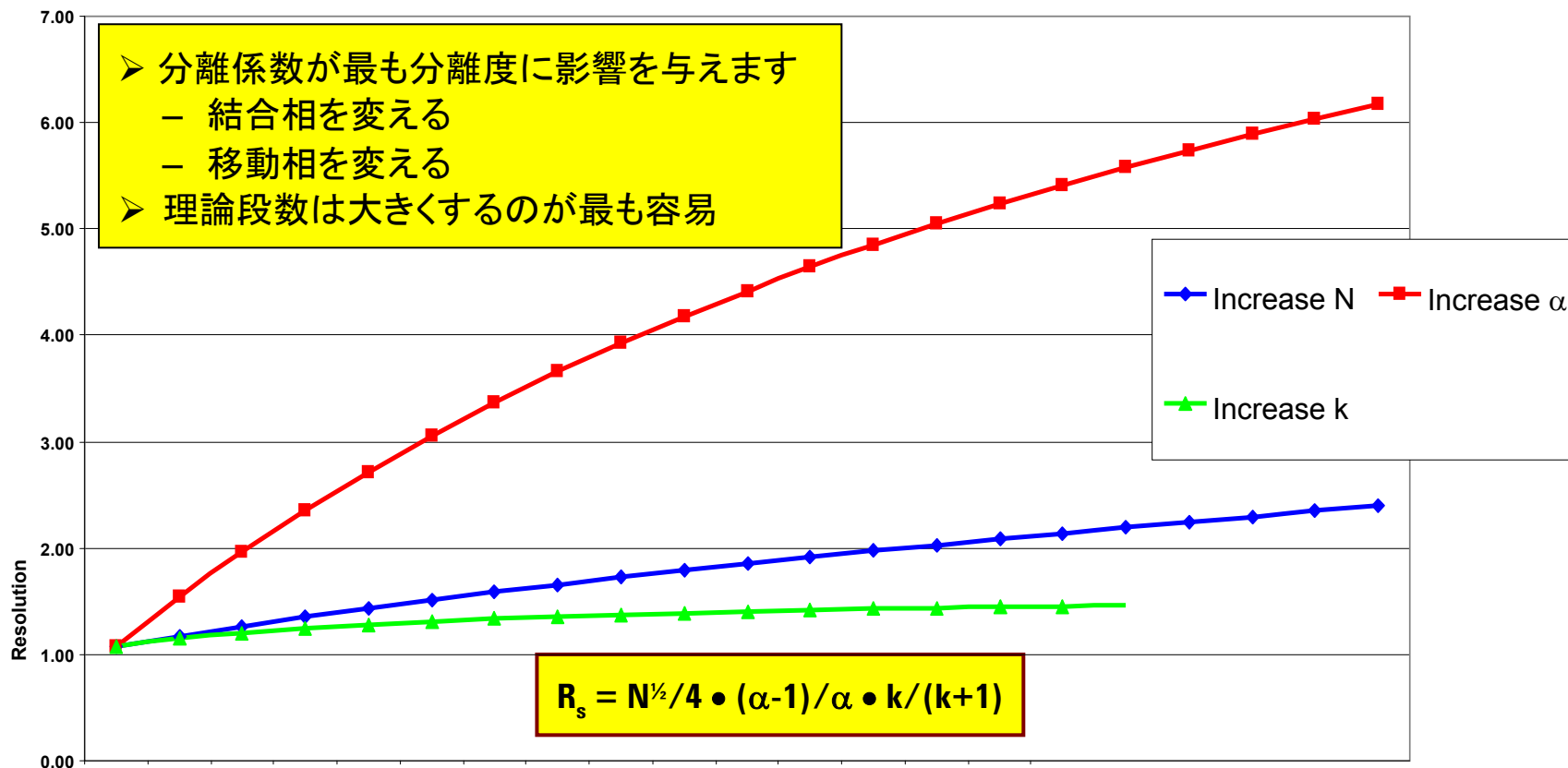
N = 理論段数 – 長さ、粒子サイズによって決まります

k = 保持係数 – 移動相と固定相によって決まります

グラジエント分析では、グラジエント勾配とdwell volume
(移動相が混合される場所からカラム入り口までの容積)
も考慮する必要があります



分離度におよぼす分離係数、理論段数、保持係数の影響

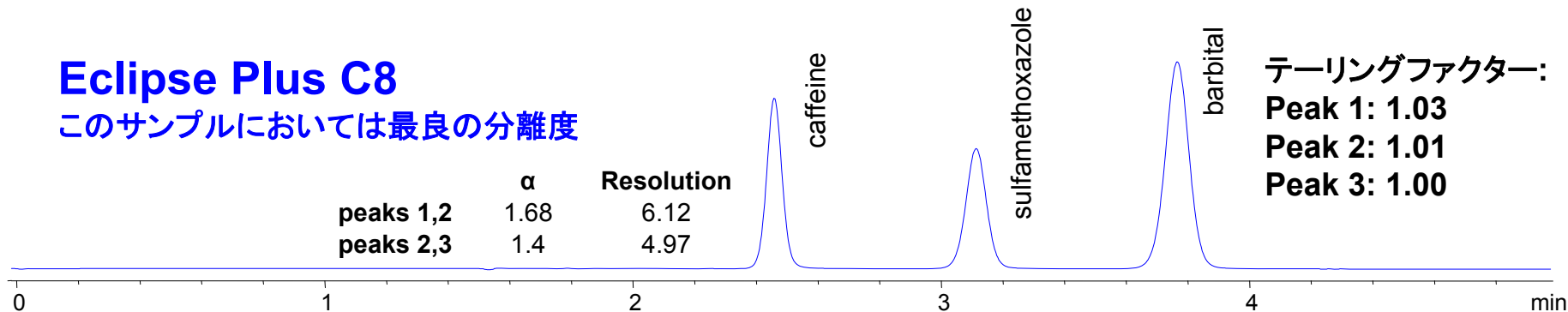


Plates :	5000	10000	15000	20000	25000
α :	1.10	1.35	1.60	1.85	2.1
k :	2.0	4.5	7.0	9.5	12.0

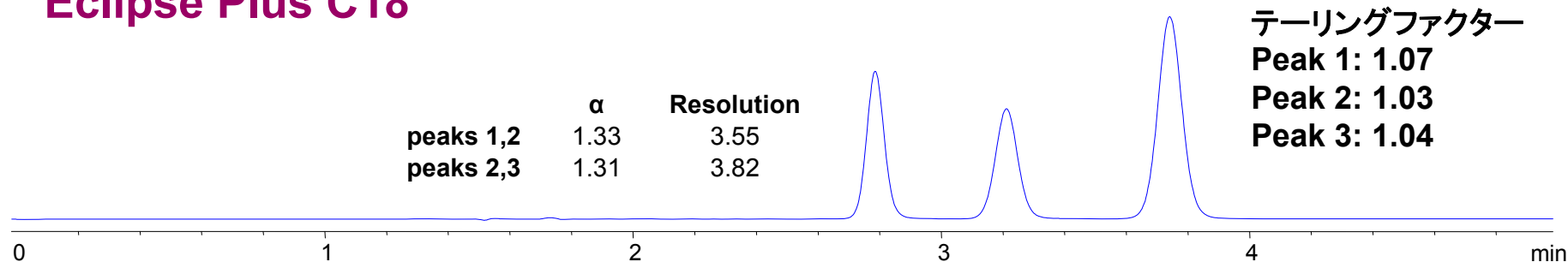
分離係数(α) のわずかな差は 分離度に大きく影響する可能性があります

Eclipse Plus C8

このサンプルにおいては最良の分離度

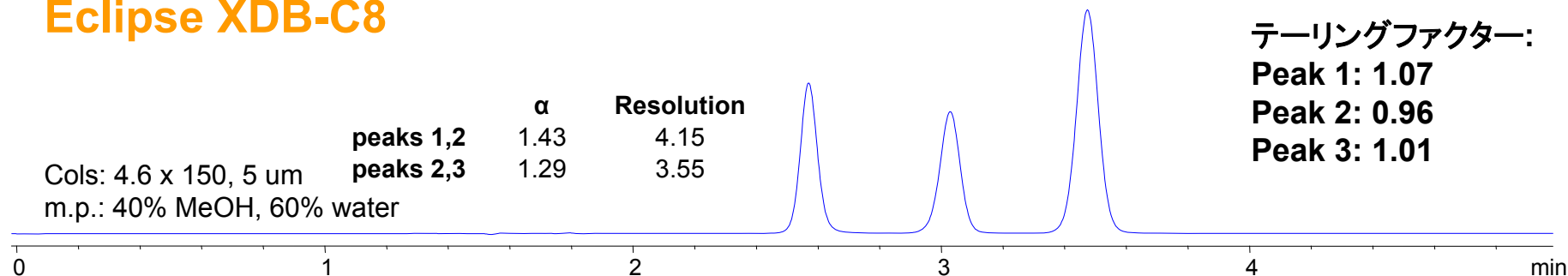


Eclipse Plus C18



Eclipse XDB-C8

Cols: 4.6 x 150, 5 μ m
m.p.: 40% MeOH, 60% water



α が最も効果が大いのに、Nに注目するのはなぜ？

答えは簡単です。

高理論段数が与えるもの:

- シャープなピーク
- より優れた検出能力
- 複雑なサンプルを分解できるピークキャパシティ

しかし...

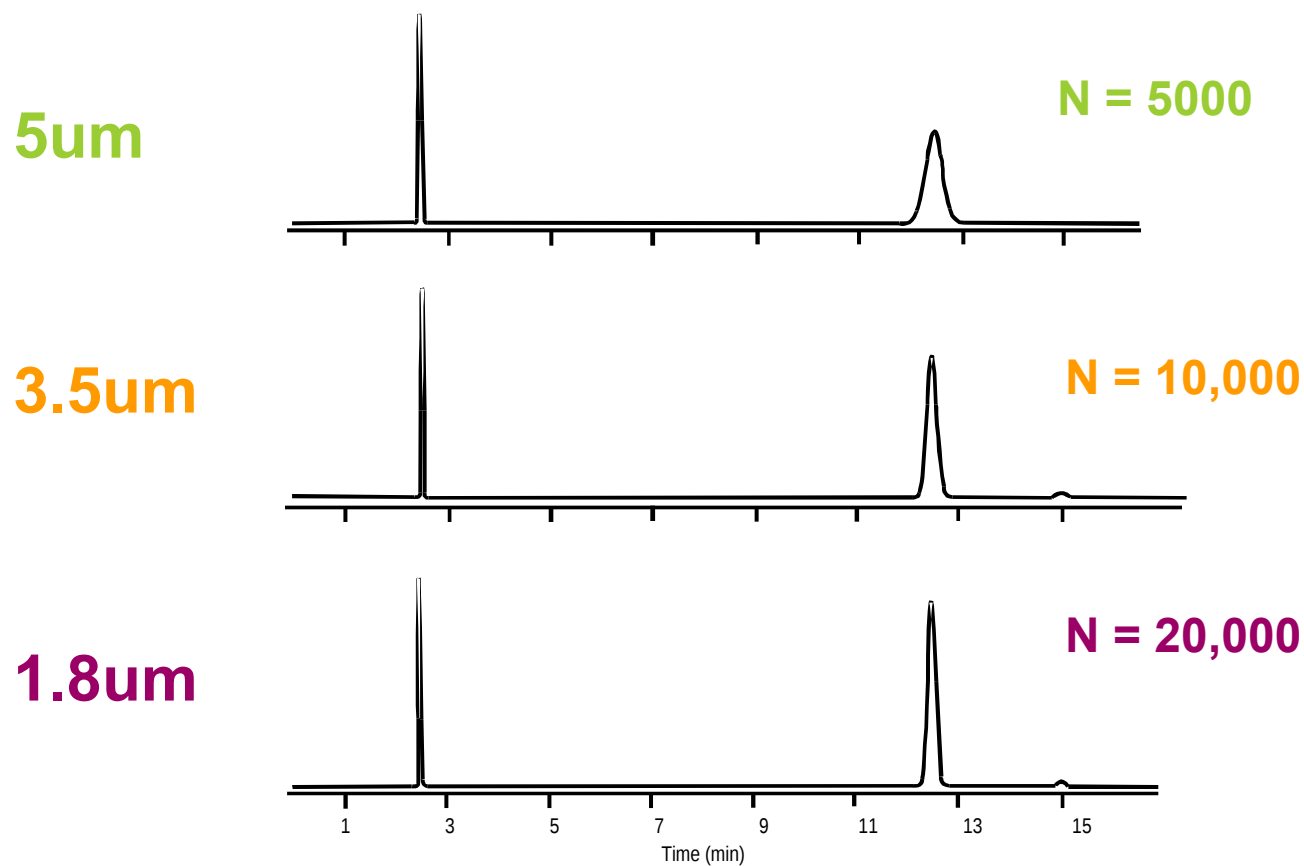
- 分離度は理論段数の $\sqrt{2}$ 倍でしか増加しません。
- 理論段数の増加は実験条件(分析時間、圧力)によって制限されています。

選択性(α) は最も役に立ちますが... 予測するのが難しく、メソッド開発は遅くなります。

注意:ソフトウェアがサポートされており、複数成分混合物の分離最適化はメソッド開発の時間を削減することができます (ChromSword)

<http://www.nskw.co.jp/chem/chemplus/ChromSword.htm>

N-理論段数向上に伴うピーク幅の減少

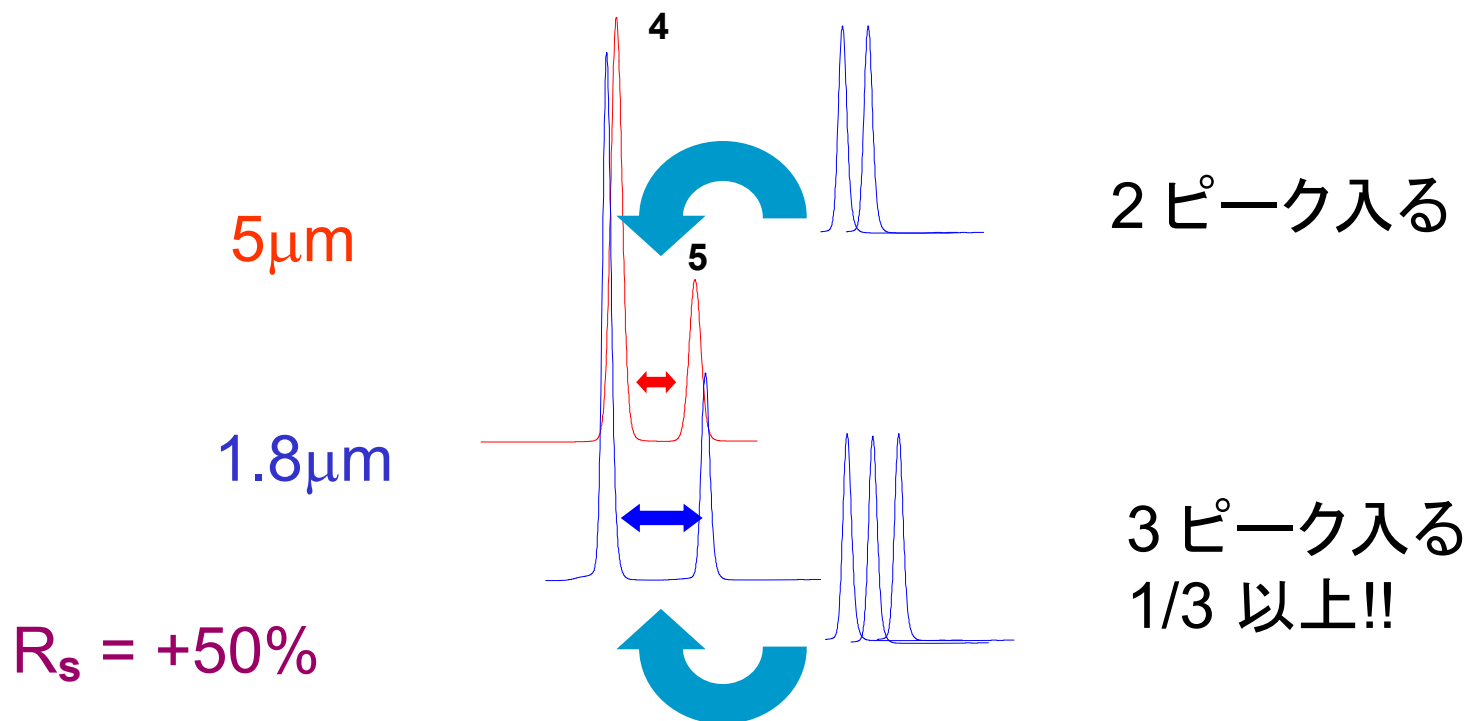


ピークキャパシティ

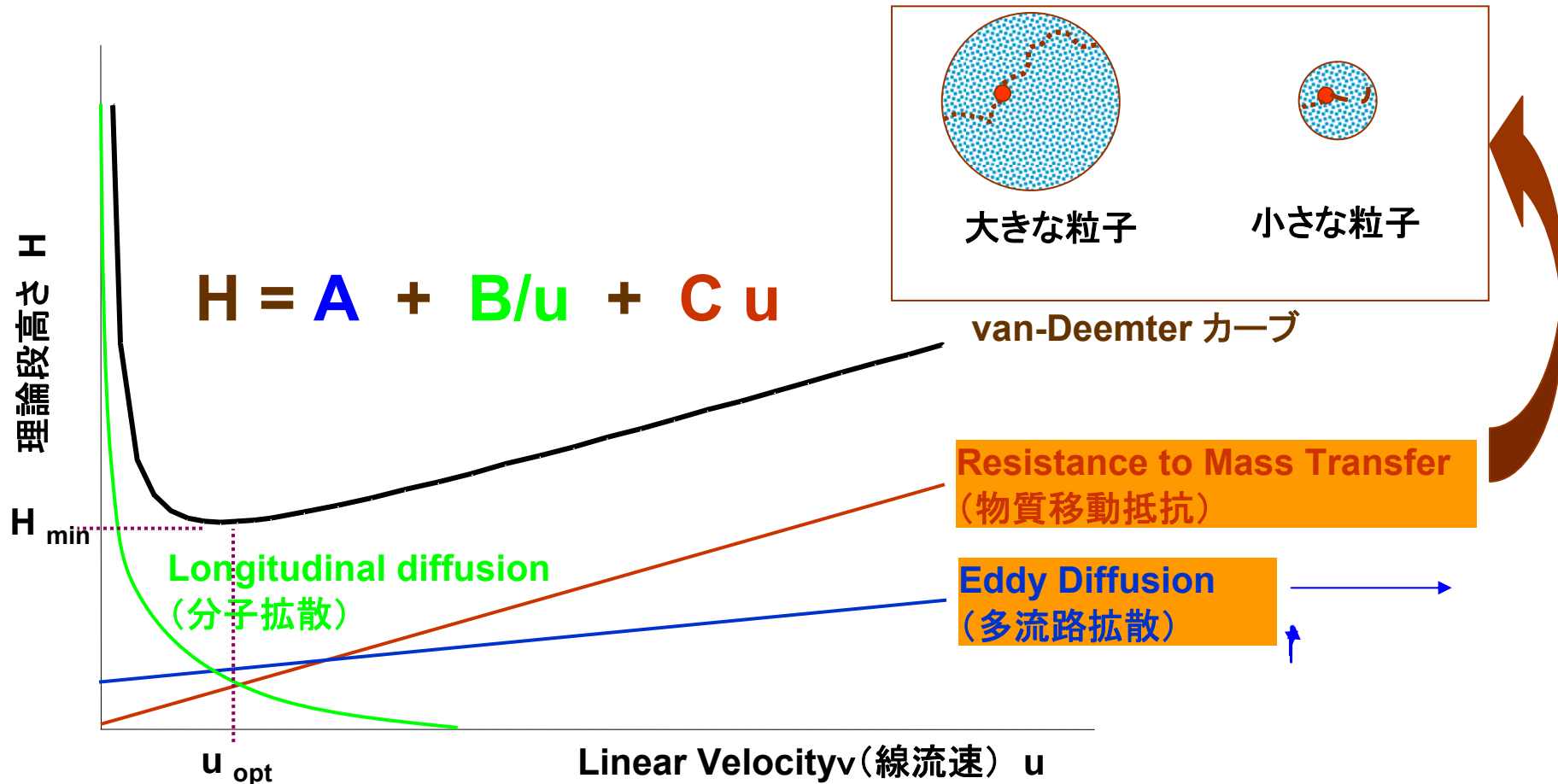
より大きなピークキャパシティー より多くのピーク分離

ピークキャパシティは、与えられたシステム(カラム長、粒子サイズ)、時間内で分離することができるピークの数(ある分離度、例えば例 $R_s=1$ の条件で)です。

効率を測るもう一つの尺度です。

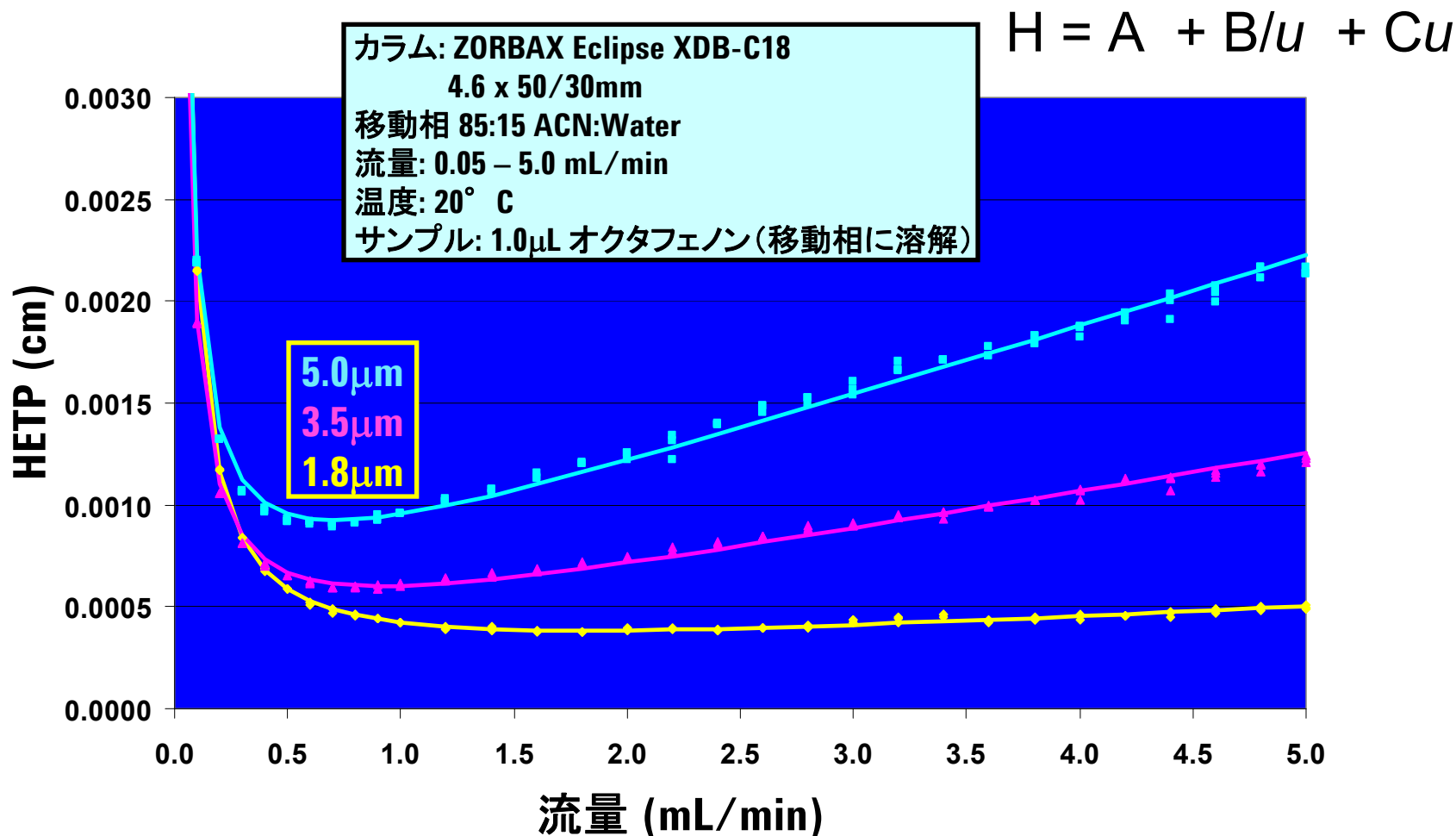


以上のことをまとめると van Deemterの式



理論段高さが低いほど理論段数が高くなり、分離は良くなります。

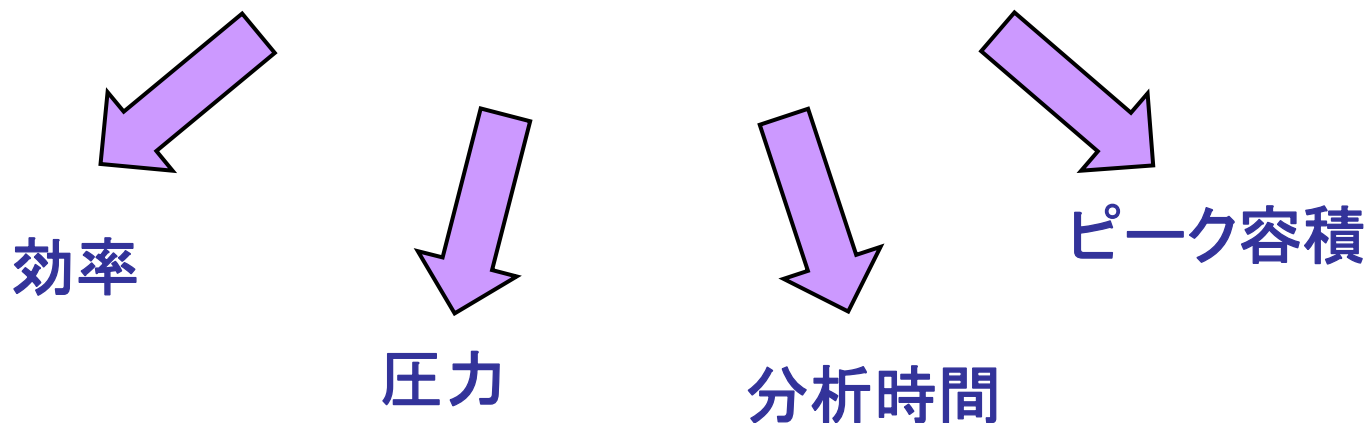
Van Deemterカーブ : HETP vs. 流量(体積)



粒子サイズが小さいほどカーブはフラットになり、高流速側での効率低下が小さくなります。

粒子サイズによって影響を受ける クロマトグラフパラメーター

最適な粒径



圧力について

粒子サイズが減少すると急激に圧力が増大します

HPLCカラムにおける圧力降下の関係式

$$\Delta P = \frac{\eta FL}{K^0 \pi r^2 d_p^2}$$

ΔP = 圧力降下

η = 移動相の粘度

L = カラム長

F = 流速

D_p = 充填剤の粒子径

r = カラム内径

K^0 = カラムの透過性

- ✓ 多くのパラメーターがカラム圧力に影響します
- ✓ 粒子径とカラム長が最も重要な因子です
- ✓ カラムが長く、粒子が小さいほど分離が良くなりますが、圧力も高くなります
- ✓ カラム圧はコントロール可能です



粒子径がクロマトグラフィーの キーパラメーターに与える影響(計算値)

粒子径 μm	流量 mL/min	カラム長さ cm	カラムの 空隙容積 mL	カラム圧 MPa	K=5のピークの 保持時間 min	t_0 min
2	1.0	6	0.6	17.2	3.6	0.6
3	1.0	10	1.0	12.8	6.0	1.0
5	1.0	15	1.5	6.9	9.0	1.5
10	0.2*	30	3.0	0.8	90	3.0

N = 13,000

k (最終ピーク) = 5

カラム内径 = 4.6 mm

移動相 = 100% water

***10 μm , 30 cmカラムで N= 13,000を達成するためには、流速は0.2 mL/minに抑えなければいけません。**



Agilent Technologies

Separation Fundamentals
Agilent Restricted
December 11, 2007

粒子径の小さいカラムは分離を改善しますが 圧力は増大します

従来のHPLCより 60%分離度が向上

例 アイソクラティック
不純物メソッド
7分付近の拡大



不純物4種
2つのベースラインが分離されていない!

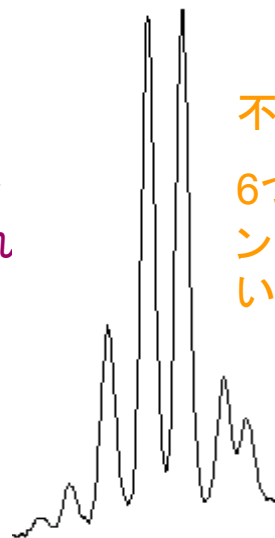
4.6 x 150, 5um

93 bar

N = 7259

Rs = 1.15

S/N = 42



不純物7種
6つのベースラインが分離されていない!

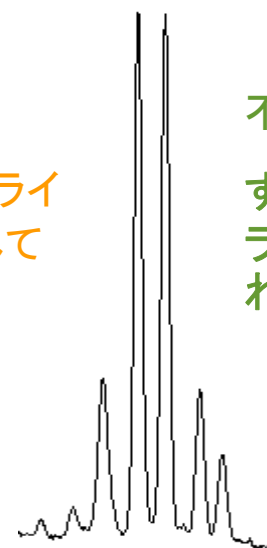
4.6 x 150, 3.5um

165 bar

N = 14862

Rs = 1.37

S/N = 50



不純物7種
すべてのベースラインが分離されている!

4.6 x 150, 1.8um

490 bar

N = 28669

Rs = 1.80 (+57%)

S/N = 44



Agilent Technologies

Separation Fundamentals
Agilent Restricted
December 11, 2007

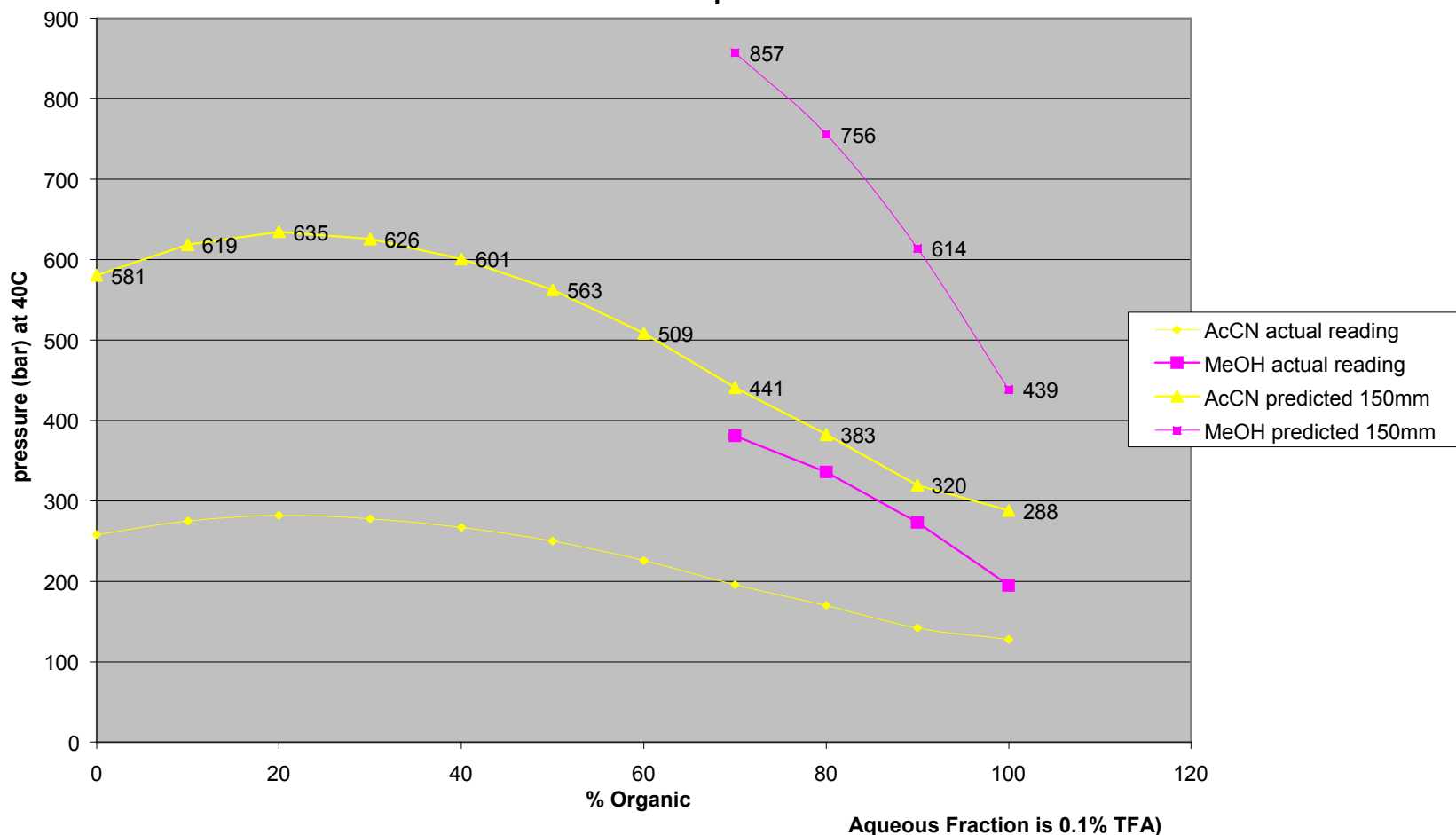
移動相

圧力にどのような影響を与えるか

1. 粘度 – 粘度が小さいほど圧力も低い
 - **アセトニトリル < メタノール** MeOH とACN の粘度の違いは大きく、圧力を低減する必要がある時はまずACNに変更してみてください。
 - **水 < 緩衝液** 緩衝液は粘度を増加させますが、有機溶媒の選択性の方がより重要です。グラジエント分析で設定される全ての組成比で、緩衝液が有機溶媒と完全に溶解するように気をつけてください。
2. 有機溶媒の混合比率 – 有機溶媒:水の移動相には圧力の最大点と最小点があり、各々の有機溶媒によってその範囲は異なります。
 - ACN/水系は、2.1 x 100mm カラムで40 MPa以下で(若干温度を高めに設定することで)使用できます。
 - 一方MeOH/水系では、ほとんどの混合比率で耐圧が60 MPaのRRLCシステムが必要です。

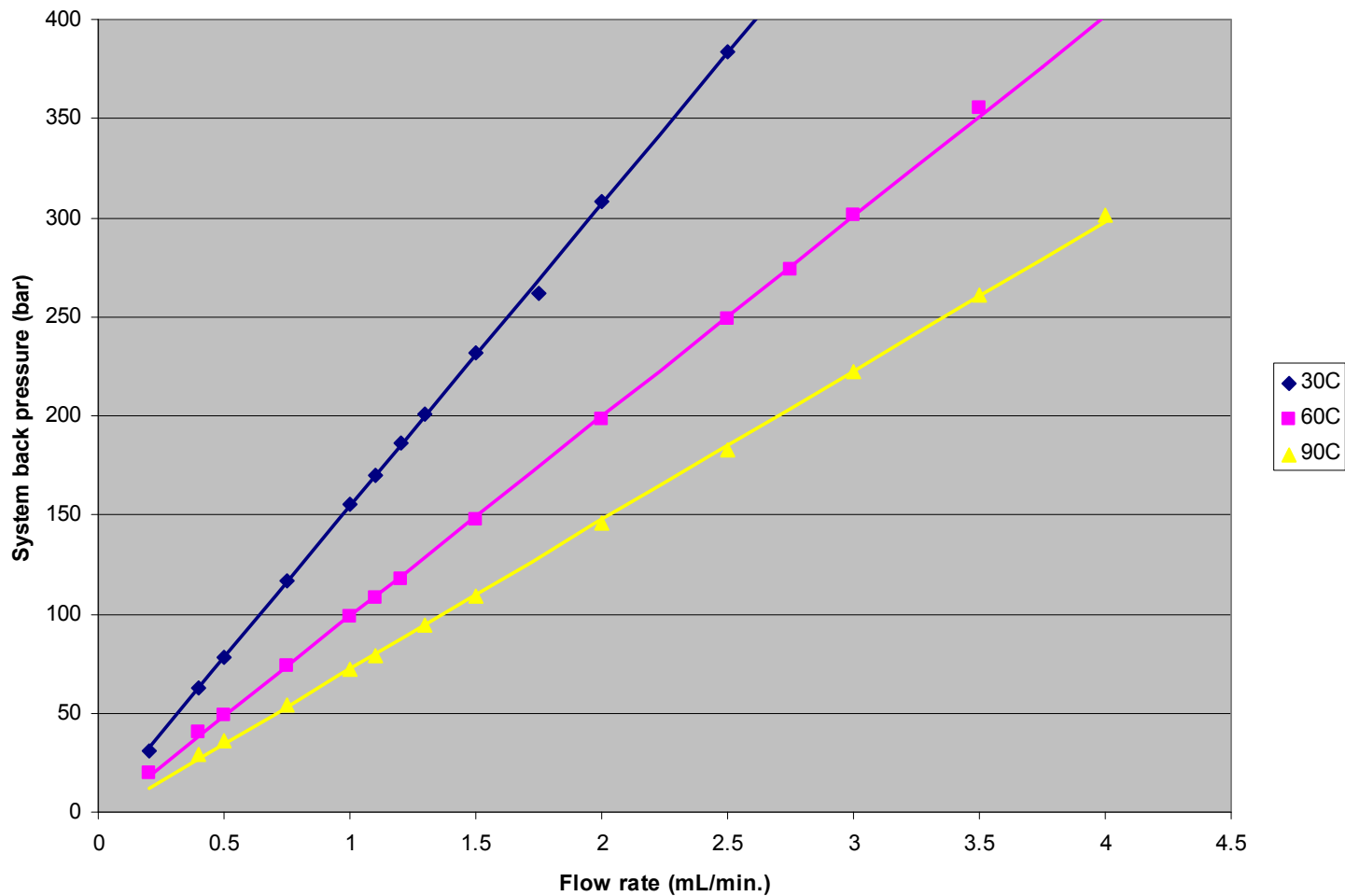
2.1 x 100 mmのカラム にかかる圧力 ACN vs. MeOH

Back Pressure of 600 Bar 1100 with a SB-C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 μ m Column Installed
F = 0.5 ml/min. Temperature = 40C



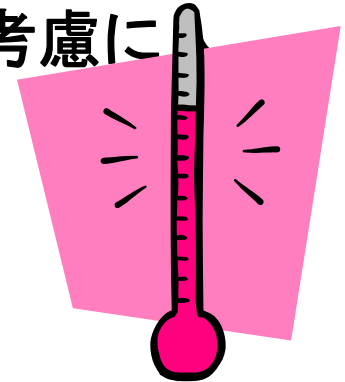
カラム温度を上げると圧力は低下します

Pressure, Analgesics Analysis,
mobile phase: 15% acetonitrile, 4.6 x 50 mm, 1.8 μ m



カラム温度を上げることのメリット

メソッド開発において、温度はパラメーターとして常に考慮に
れておかなければいけません。



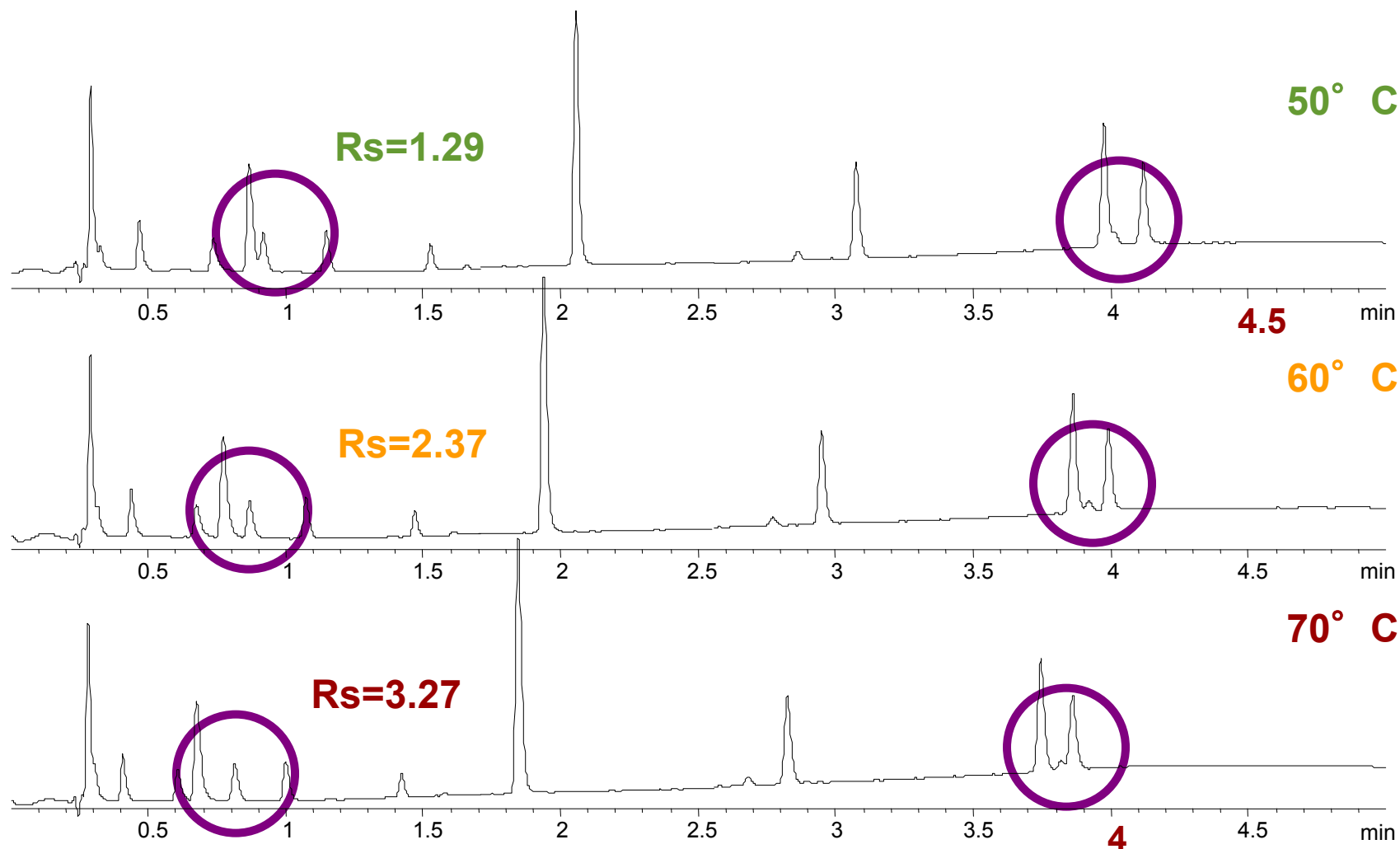
高いカラム温度は

- 移動相の粘度を低減させます
 - 圧力が下がることにより、sub 2 μm 以下の充填剤のカラムが使用可能になり、高速分析、高分離分析が可能になります
- より速い質量移動を提供します
 - 効率の改善 – 分離を改善
 - 分析時間の低減 – 分離を犠牲にせずに分析速度を上げる
- 分離係数(選択性)を変えることができる – 分離の最適化



分離と選択性の最適化のためにカラム温度を利用する

SB-C18 RRHT における心臓病薬10種のグラジエント分析 結果



まとめ

HPLC はパワフルな分析ツールです。

さまざまな種類の分離方法があります

逆相 (RP) が最も広く利用されています。

各々のパラメータがどのような意味かを知ることは重要です。

ここではたくさんのクロマトグラフィーのパラメータを紹介しました。

その多くはクロマトグラムから簡単に得ることができます。

重要な関係式

分離度

たくさんのパラメーターが分離に影響を与えます。

van Deemterの式

他の要因も (例: 圧力) 同様に分離に影響を与える可能性があります。