

Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムによる 効率の最大化

連結カラム技術により、5 分以内に理論段数 100,000 を実現

アプリケーションノート

食品、環境、化学、医薬品

著者

Angelika Gratzfeld-Hüsgen and
Edgar Naegele
Agilent Technologies
Waldbronn, Germany

概要

表面多孔質技術ベースのカラムは、サブ 2 μm 粒子ベースのカラムの代替の選択肢となります。表面多孔質技術ベースのカラムと Agilent 1290 Infinity LC システムとの組み合わせによって、高効率の分離を実現します。Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムは、サブ 2 μm 粒子ベースのカラムと比べて、次のことを提供します。

- より低い背圧
- 最高の効率
- 同等の容積容量



Agilent Technologies

はじめに

近年、サブ2 µm 粒子カラムは、その高い効率性のために多くの注目を集めています。サブ2 µm 粒子カラムは、Van Deemter の式によって評価される流量よりも高い流量で使用できます。最適な流量での効率と比べても、より高い流量での効率の損失はわずかです。つまり、分析時間とサイクル時間を短縮でき、よりすばやく結果を得ることができます。

しかし、サブ2 µm 粒子カラムには、粒子サイズが小さいために、背圧が大幅に高くなるという欠点があります。多くの場合、特にサブ2 µm カラムが長い場合には、LC 機器は400 bar を超える背圧に対応しなければなりません。

このカラムの代替となる新たな選択肢が、表面多孔性粒子技術をベースとするカラムです。背圧を大幅に低減しながらも、極めて分離能の高い分析¹を提供します。このカラムの効率は、サブ2 µm 粒子の効率と比べるとわずかに低くなりますが、背圧が低いため、カラムを連結して理論段数を大幅に増やすことも可能です。

このアプリケーションノートでは、3本の長い Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムを連結することで効率が飛躍的に高くなることを紹介します。また、特別な LC 機器を使用しない場合でも背圧を400 bar 以下に維持できることも示しています。この場合、より高い流量で分析時間や平衡化時間を短縮できます。最後に、2.7 µm 多孔性外殻カラムとサブ2 µm 粒子サイズカラムとを比較しました。

実験手法

機器

Agilent 1290 Infinity LC システムに、バイナリポンプ、オートサンブラ、カラムコンパートメント、光路長 10 mm のセルのダイオードアレイ検出器を搭載して、実験に使用しました。

カラム

Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューションハイスループット 4.6 mm × 150 mm、1.8 µm カラムと Agilent InfinityLab Poroshell 120、4.6 mm × 150 mm、2.7 µm カラムを使用しました。これらのカラムは最大 600 bar まで使用できます。

ソフトウェア

Agilent ChemStation ソフトウェアのリビジョン B.04.02

結果と考察

表面多孔質カラムの潜在的な利点

表面多孔質カラムの技術は、硬質コアと表面が多孔性の外殻を持つ粒子をベースとしています。これらの粒子は、1.7 µm の硬質コアと 0.5 µm の多孔性シリカ外殻で構成されています。全体として1個の粒子のサイズは約 2.7 µm です。2.7 µm の表面多孔質粒子では、サブ2 µm の全多孔質粒子よりも背圧は40～50% 低く、サブ2 µm の全多孔質粒子の80～90% の効率が得られます。表面多孔質粒子は全多孔質粒子よりも、狭い粒子サイズの分布を示します。この結果、より均一性が高いカラムとなり、カラムの拡散が低減します。同時に、粒子が小さく多孔性外殻のために、物質移動抵抗は低くなります。この結果、効率を損失することなく、高い流量を実現できます^{1,2}。

システムの構成

次の実験では Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムの性能を評価しました。使用したすべてのカラムの内径は 4.6 mm、カラム長は 150 mm でした。

- 1.5 mL/min で、1本のカラムでの理論段数を評価
- 1.5 mL/min で、3本連結したカラムの理論段数を評価
- より高い流量で、3本連結したカラムの理論段数を評価
- イソクラティックおよびグラジエント条件でのリテンションタイムの精度
- 多孔性外殻カラムとサブ2 µm 粒子カラムとの比較

カラム効率 (理論段数) は一般的に、イソクラティック条件を使用して測定します。対称のピークの場合、次の式を使用して理論段数 (N) を計算します。

$$N = 5.54 (RT/W)^2$$

上の式で、RT はリテンションタイム、W はピーク半値幅です。

1 本のカラムの場合の理論段数の評価

1 本のカラムで理論段数を評価するための化合物として、ウラシル、アセトフェノン、ベンゼン、トルエンを使用しました。

図 1 に、結果のクロマトグラムと評価した理論段数を示します。

結果はトルエンの場合、適用したクロマトグラフィー条件下で、約 35,000 段/カラムでした。

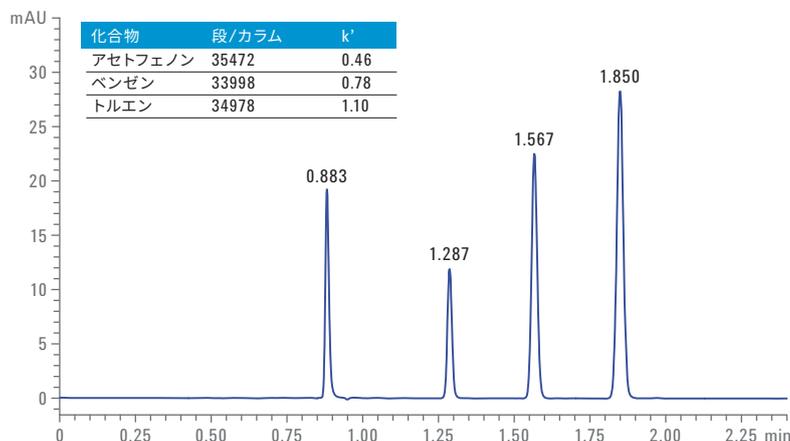


図 1. Agilent InfinityLab Poroshell 120、4.6 × 150 mm カラムの 1 本での理論段数を評価するためのクロマトグラム。

3 本連結したカラムの場合の理論段数の評価

カラム 1 本での理論段数は約 35,000 段でした。このため、3 本連結したカラムの理論段数の期待値は 105,000 段です。ステンレスキャピラリー、90 × 0.12 mm を使用してカラムを連結しました。さまざまな流量で理論段数を評価しました。

図 2 に、評価結果のクロマトグラムを示しています。400 bar LC システムを使用すると、1 mL/min の流量で約 80,000 段を得ることができます。しかし、耐圧が最高 1,200 bar のこの LC システムでは、より高い流量でより高い効率を得ることができます。

1.5 mL/min の流量では、得られた理論段数は約 103,000 段であり、その値は期待値に近くなります。

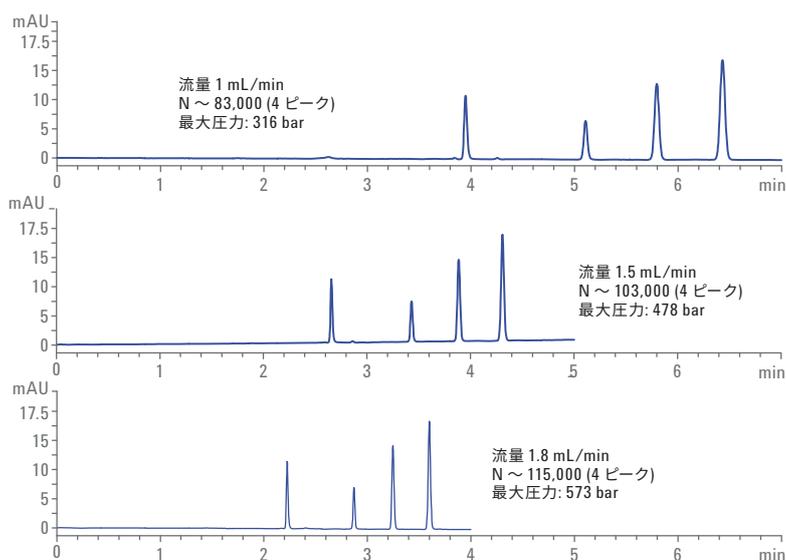


図 2. 異なる流量で 3 本の Agilent InfinityLab Poroshell 120、150 mm × 4.6 mm カラムを連結して理論段数を評価するための 3 つのクロマトグラム。

クロマトグラフィー条件

| パラメータ | 値 |
|-------|---|
| カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、150 mm × 4.6 mm、2.7 μm |
| サンプル | チオ尿素、アセトフェノン、ベンゼン、トルエン |
| 移動相 | 水:ACN = 30:70 |
| 流量 | 1.5 mL/min |
| 注入量 | 1 μL |
| カラム温度 | 50 °C |
| 検出器 | DAD 254 nm/10、Ref 360/100 nm、20 Hz、標準セル |

クロマトグラフィー条件

| パラメータ | 値 |
|-------|---|
| サンプル | チオ尿素、アセトフェノン、ベンゼン、トルエン |
| カラム | 3 本連結した Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、150 mm × 4.6 mm、2.7 μm カラム |
| 移動相 | 水:ACN = 20:80 |
| 流量 | 1、1.5、1.8 mL/min |
| 注入量 | 1 μL |
| カラム温度 | 60 °C |
| 検出器 | DAD 254 nm/10、Ref 360/100 nm、20 Hz、標準セル |

さらに、流量が 1.8 mL/min のときのトルエン理論段数が最良で約 115,000 段となり、リテンションタイムは 5 分未満でした (表 1)。

表 1. 1.8 mL/min 流量での理論段数。

| 化合物 | 段数 | k' |
|---------|---------|------|
| アセトフェノン | 114,120 | 0.29 |
| ベンゼン | 109,931 | 0.46 |
| トルエン | 114,800 | 0.62 |

k' 値が高い場合、カラムを 3 本連結して使用すると良好な結果が得られます。流量は 1.2 mL/min でした (図 3)。

イソクラティック条件下でのリテンションタイムの精度

1.5 mL/min でイソクラティック条件下で精度を評価してその結果とともに、図 4 に 6 回の連続分析を重ねて表示しています。リテンションタイムの精度は 0.034 % RSD 未満で、ウラシルを除くと面積の精度は 0.66 % RSD 未満です。

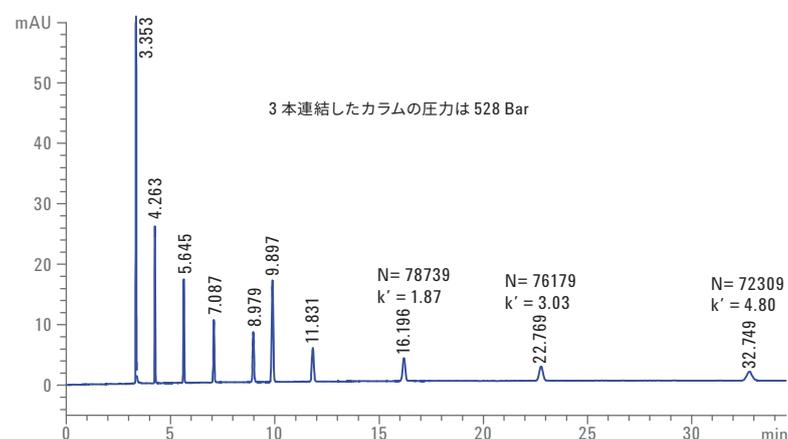


図 3. 3 本連結したカラムの k' 値が高い条件下にて、圧力 528 bar および流量 1.2 mL/min での理論段数

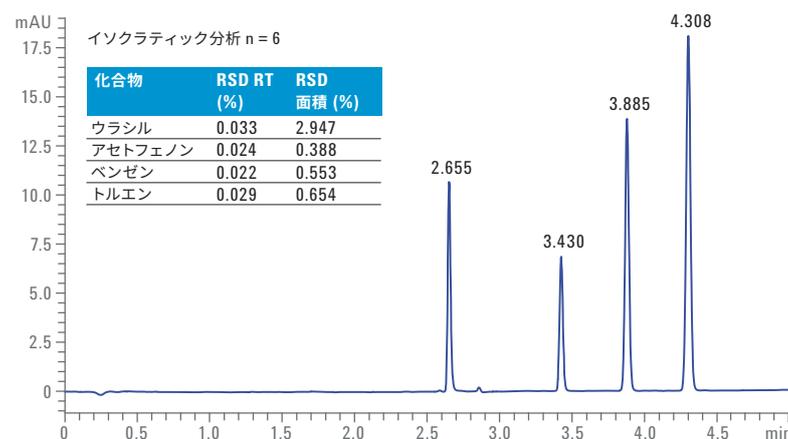


図 4. イソクラティック条件下での 6 回連続分析の重ね表示およびリテンションタイムと面積の精度データ。

クロマトグラフィー条件

| パラメータ | 値 |
|-------|---|
| サンプル | チオ尿素 + テストサンプル: 9 種類の化合物のセット、それぞれ 100 ng/μL で水/ACN (65/35) に溶解。 1. アセトアニリド、2. アセトフェノン、3. プロピオフェノン、4. プチロフェノン (200 ng/μL)、5. ベンゾフェノン、6. パレロフェノン、7. ヘキサノフェノン、8. ヘプタノフェノン、9. オクタノフェノン |
| カラム | 3 本連結した Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、150 mm × 4.6 mm、2.7 μm カラム |
| 移動相 | 水:ACN = 40:60 |
| カラム温度 | 60 °C |
| 流量 | 1.2 mL/min |
| 検出器 | DAD 254 nm/10 nm、ref 360/100 nm、20 Hz、標準セル |

クロマトグラフィー条件

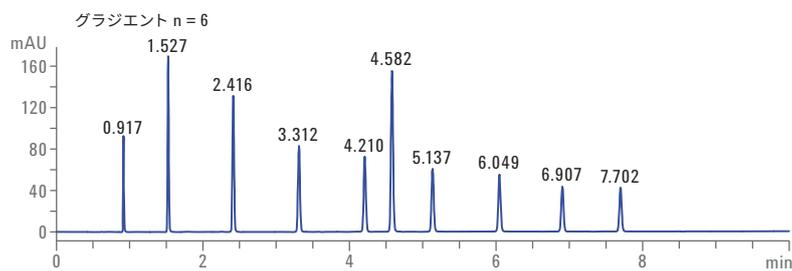
| パラメータ | 値 |
|-------|---|
| サンプル | ウラシル、アセトフェノン、ベンゼン、トルエン |
| カラム | 3 本連結した Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、150 mm × 4.6 mm、2.7 μm カラム |
| 移動相 | 水:ACN = 20:80 |
| 流量 | 1.5 mL/min |
| 注入量 | 1 μL |
| カラム温度 | 60 °C |
| 検出器 | DAD 254 nm/10、Ref 360/100 nm、20 Hz、標準セル |

グラジエント条件下でのリテンション タイムと面積の精度

10分間で35～95%のグラジエントを使用して、グラジエント分析の精度を評価しました。分析結果と10回の連続分析を重ねて図5に表示します。

チオ尿素を除くすべての化合物のリテンションタイムについて優れた精度 (RSD < 0.04 %) を得ることができました (図5)。

すべての化合物のピーク面積のRSDは、1 μ L 注入の場合0.38%未満でした。



| ピーク | RSD RT (%) | RSD 面積 (%) |
|------|---------------|---------------|
| チオ尿素 | 0.092 | 0.372 |
| 1 | 0.020 | 0.238 |
| 2 | 0.038 | 0.255 |
| 3 | 0.033 | 0.211 |
| 4 | 0.029 | 0.186 |
| 5 | 0.027 | 0.227 |
| 6 | 0.023 | 0.194 |
| 7 | 0.018 | 0.183 |
| 8 | 0.017 | 0.251 |
| 9 | 0.017 | 0.167 |

クロマトグラフィー条件

| パラメータ | 値 |
|--------|--|
| サンプル | チオ尿素 + テストサンプル: 9種類の化合物のセット、それぞれ 100 ng/ μ L で水/ACN (65/35) に溶解。 1. アセトアニリド、2. アセトフェノン、3. プロピオフェノン、4. プチロフェノン (200 ng/ μ L)、5. ベンゾフェノン、6. バレロフェノン、 7. ヘキサノフェノン、8. ヘプタノフェノン、9. オクタノフェノン |
| カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、150 mm \times 4.6 mm、2.7 μ m |
| 移動相 | 水と ACN |
| グラジエント | 0 分時に 35 % ACN、 10 分時に 95 % ACN |
| 流量 | 1.5 mL/min |
| 注入量 | 1 μ L |
| カラム温度 | 60 $^{\circ}$ C |
| 検出器 | DAD 245/10 nm、Ref 400/100 nm、20 Hz、標準セル |

図 5. 10 回連続のグラジエント分離の重ね表示およびリテンションタイムと面積の精度データ。

多孔性外殻カラムとサブ 2 μm 粒子カラムとのピークキャパシティの比較

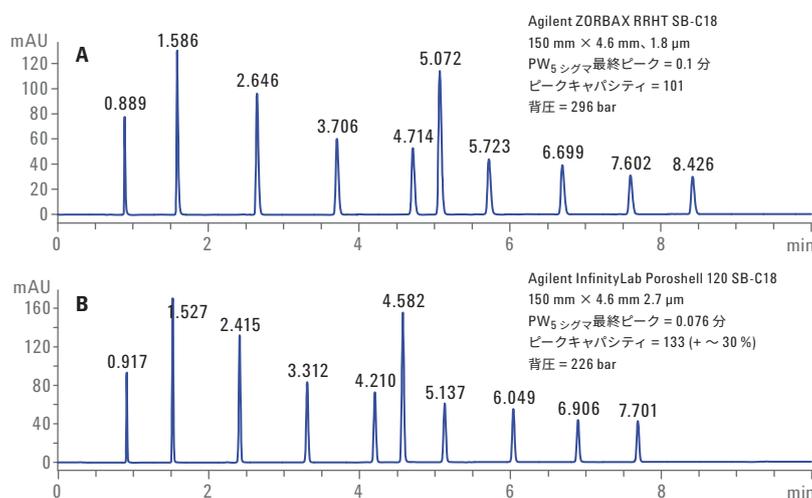
多孔性外殻カラムとサブ 2 μm カラムの差異を示すために、長さ 150 mm × 内径 4.6 mm の同じサイズのカラムを使用し、10 種類の化合物を分析して比較しました (図 6)。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムの方がより短い溶出時間およびより狭いピークの幅を示し、結果的に多孔性外殻カラムのピークキャパシティが高くなります。InfinityLab Poroshell 120 カラムは、ピークキャパシティが 101 ピークのサブ 2 μm カラムよりも高い 133 ピークのピークキャパシティを示しています。つまり、今回使用した条件下では、Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムは、サブ 2 μm カラムよりも 30 % 効率が高いことが分かります。

容積容量の比較

多孔性外殻カラムの容積容量が、1.8 μm 粒子を充填したカラムの容積容量と同じかまたは小さいかをテストするために、高濃度のサンプルを注入しました。注入量は 10 μL で、濃度は 10 μL 中に約 20 μg でした (図 7)。

今回選択した条件を使用した場合、メインピークに大きな差異は観察されませんでした。今回のケースではピークが早く溶出したため、InfinityLab Poroshell 120 カラムのピークの幅はいくらか小さくなりました。ピークの幅は一般的により小さくなります。



クロマトグラフィー条件

| パラメータ | 値 |
|--------|--|
| サンプル | チオ尿素 + テストサンプル: 9 種類の化合物のセット、それぞれ 100 ng/μL で水/ACN (65/35) に溶解。 1. アセトアニリド、2. アセトフェノン、3. プロピオフェノン、4. プチロフェノン (200ng/μL)、5. ベンゾフェノン、6. パレロフェノン、 7. ヘキサノフェノン、8. ヘプタノフェノン、9. オクタノフェノン |
| カラム | Agilent ZORBAX RRHT SB-C18、150 mm × 4.6 mm、1.8 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、150 mm × 4.6 mm、2.7 μm |
| 移動相 | 水と ACN |
| グラジエント | 0 分時に 35 % ACN、10 分時に 95 % ACN |
| 流量 | 1.5 mL/min |
| 注入量 | 1 μL |
| カラム温度 | 60 °C |
| 検出器 | DAD 245/10 nm、Ref 400/100 nm、20 Hz、標準セル |

図 6. 多孔性外殻カラムおよびサブ 2 μm 粒子カラムで分析されたフェノン混合物のクロマトグラム。

S/N 比の比較

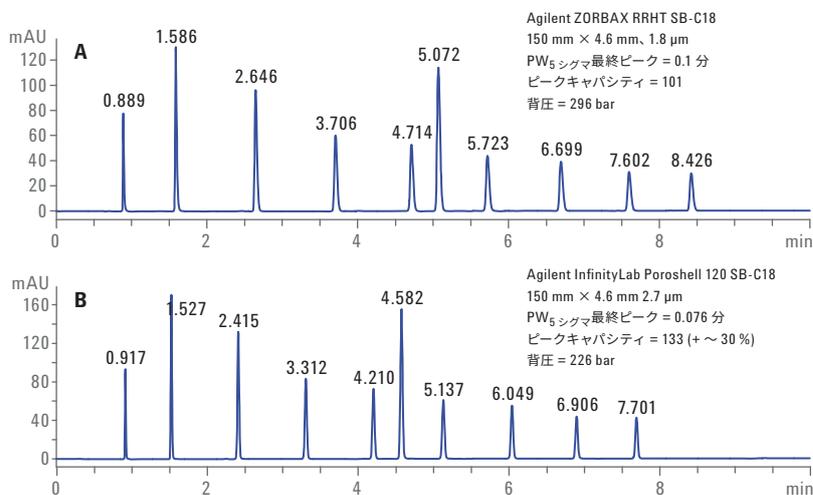
S/N 比を評価するために、医薬品の不純物を分析しました。各不純物は 0.02 ~ 0.03 % の範囲で存在していました。クロマトグラフィー条件を図 7 に示します。

図 8 は、クロマトグラム全体を重ねて一部分を表示しています。赤のトレースは InfinityLab Poroshell 120 カラムのクロマトグラム、黒のトレースはサブ 2 μm 粒子のカラムのクロマトグラムを表しています。

表 2 に、両方のカラムの S/N 比を計算で求めた結果を示しています。不純物 1 および 2 を、InfinityLab Poroshell 120 カラムとサブ 2 μm カラムで分析しました。

表 2. 多孔性外殻カラムと 1.8 μm 粒子カラムの S/N 比の比較

| ピーク | Agilent InfinityLab Poroshell 120 S/N 比 | 1.8 μm S/N 比 |
|-----|---|--------------|
| 1 | 14 | 13.6 |
| 2 | 12.8 | 12 |



クロマトグラフィー条件

| パラメータ | 値 |
|-------------|---|
| テストサンプル | 不純物を含むトラマドール 2,022 mL/mL |
| カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、150 mm × 4.6 mm、2.7 μm |
| ポンプ | |
| 溶媒 A | 水 + 0.2 % TFA |
| 溶媒 B | ACN + 0.16 % TFA |
| グラジエント | 5 分間で 17 ~ 45 % B、ストップタイム: 7 分、ポストタイム: 3 分 |
| 流量 | 1.5 mL/min |
| オートサンブラ | |
| 注入量 | 10 μL |
| 洗浄時間 | 10 秒 |
| カラムコンパートメント | |
| 温度 | 30 °C |
| DAD | 1290 270/10 nm、Ref. 360/100 nm、20 Hz、光路長 10 mm の標準フローセル |

図 7. 多孔性外殻カラムとサブ 2 μm カラムの容量の比較、注入量 10 μL = 20 μg。

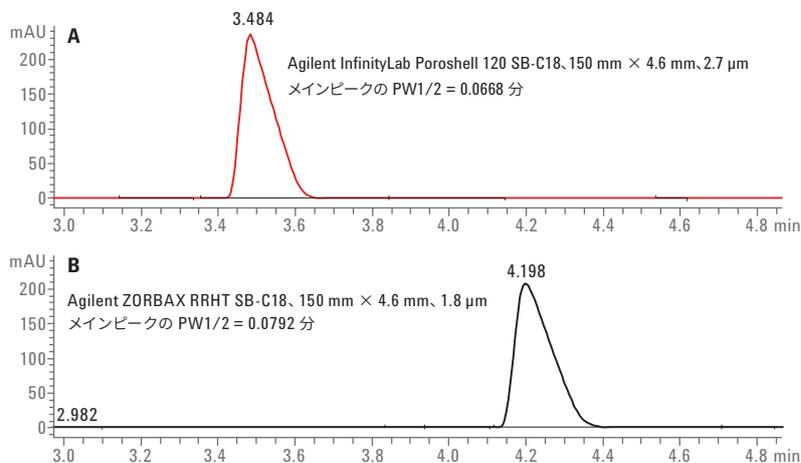


図 8. S/N 比の比較。赤は多孔性外殻カラムを黒のトレースは 1.8 μm 粒子カラムを表します。移動相溶媒に TFA を使用しました。

結論

多孔性外殻カラムが実際にサブ 2 μm カラムの代替カラムになることを示すことができました。背圧がより低いため、 $4.6 \times 150 \text{ mm}$ 、 $2.7 \mu\text{m}$ のカラムでは 400 bar の上限を超えずに 1 mL/min の流量に対応できます。今回の実験では、35,000 段または 235,000 段/m 以上の理論段数を実現できます。

3 本の $4.6 \times 150 \text{ mm}$ カラムを連結することで、600 bar の上限を超えずに 5 分以内に 100,000 段の理論段数を実現します。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムは、イソクラティック分析でもグラジエント分析でも優れた精度のデータを示しています。

同じクロマトグラフィー条件が適用される場合、一般的に InfinityLab Poroshell 120 カラムは同じ化学結合相のサブ 2 μm カラムよりも溶出時間が短くなることが予想されます。溶出時間が短くなることでピーク幅が小さくなり、その結果ピークキャパシティが大きくなります。

参考文献

1. Cunliffe, J. M.; Maloney, T. D. Fused-core particle technology as an alternative to sub-2- μm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3104-3109.
2. Griiti, F.; et al. Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *J. of Chromatog.A* **2007**, *1157*, 289-303.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, June 1, 2016

5990-5602JAJP



Agilent Technologies