

カラムの小型化による溶媒消費量の削減

アプリケーションノート

クロマトグラフィー全般、飲食業界

著者

John W. Henderson Jr.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

概要

LC カラムの内径 (ID)、長さ、および粒径を減らすことにより、溶媒消費量を最大 86% 削減し、1 回あたりの分析時間を最大 67% 短縮することができます。本実験では、ZORBAX Eclipse Plus C18 を使用し、ダイエット炭酸飲料のアイソクラティック分離とヒッコリー燻製調味料のグラジエント分析を行いました。カラムの内径 (ID)、長さ、および粒径のうち 1 つ、2 つ、または 3 つすべてを減らしたカラムに置き換えることにより、溶媒消費量の削減および分析時間の短縮を実現できることを示しています。



Agilent Technologies

はじめに

最近の傾向として、より環境負荷の少ない手法が好まれるようになってきました。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の分野においては、有機溶媒の使用量を削減することにより、環境負荷を明確に減らすことができます。溶媒の使用量削減は、環境だけではなく、経済的にもメリットがあり、さらには今後避けられない課題でもあります。2009年現在、世界的なアセトニトリル不足が液体クロマトグラフィー (LC) 業界に影響を及ぼしつつあり、アセトニトリルの節減が急務となっています。

アジレントが1990年代後半に発売したソルベントセーバー (3.0 ID) カラムは、HPLC における溶媒節減の先駆けとなりました。本アプリケーションノートでは、4.6 mm x 150 mm カラムを使用した一般的な LC 手法 2 種類を、それぞれソルベントセーバーを用いた手法に変換しています。1 つはダイエット炭酸飲料の分析で、サッカリン、カフェイン、アスパルテーム、および安息香酸のアイソクラティック分離を行います。もう 1 つは、肉を味付けするための濃縮ヒッコリー燻製調味料の成分分析です。多くの成分を含む複雑な混合物であるため、各成分の分離にはグラジエントを使用します。

最近の LC カラムでは、より短いカラムに、より小さな粒径の充てん剤を充てんすることにより、溶媒の使用量を減らしており、さらには分析時間の短縮にも成功しています。本実験では、2つの 4.6 mm x 150 mm メソッドを、3.5 μ m 粒径による Rapid Resolution (RR)、および 1.8 μ m 粒径による Rapid Resolution High Throughput (RRHT) メソッドとして実施しており、溶媒使用量の削減と分析時間の短縮を実証しています。

最後に、ソルベントセーバカラム技術と RRHT カラムサイズを組み合わせることにより、溶媒の使用を最大限に抑えられることを実証しました。

実験

試料:

水性濃縮ヒッコリー燻製調味料およびダイエット炭酸飲料は、地元のスーパーで購入しました。いずれも、特別な処理は施さずに、直接 0.2 μ m シリンジフィルタ経由でオートサンプリパイアルに注入しました。

元のメソッドで使用したカラム:

- ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 mm x 150 mm、5 μ m (部品番号 959993-902)

Solvent Saver 方式で使用したカラム:

- ZORBAX Eclipse Plus C18、3.0 mm x 150 mm、5 μ m (部品番号 959993-302)

- ZORBAX Eclipse Plus C18 ソルベントセーバPlus、3.0 mm x 100 mm、3.5 μ m (部品番号 959961-302)
- ZORBAX Eclipse Plus C18 ソルベントセーバHT、3.0 mm x 50 mm、1.8 μ m (部品番号 959941-302)

移動相:

ボトル A: 水
ボトル B: アセトニトリル
配合は図 1、2 を参照してください。

LC 器具:

Agilent 1200 シリーズ サーモスタット付きカラムコンパートメント SL を下記の構成で使用しました。

- G1312B バイナリポンプ。流量はカラム寸法に準ずる (各図参照)
- G1316B 温度制御カラムコンパートメント (TCC)、25 °C に設定
- G1315C ダイオードアレイ検出器 (DAD)
 - ヒッコリー燻製調味料: 202 nm、4 nm 帯域幅、およびリファレンス波長 360 nm、100 nm 帯域幅。G1315-60025 フローセル (パス 6 mm、容積 5 μ L)。レスポンスタイムは、元のメソッドでは 1 s に設定し、分析時間の短縮に合わせて延長する。
 - ダイエット炭酸飲料: 202 nm、4 nm 帯域幅、およびリファレンス波長 360 nm、100 nm 帯域幅。G1315-60025 フローセル (パス 6 mm、容積 5 μ L)。レスポンスタイムは、元のメソッドでは 1 s に設定し、分析時間の短縮に合わせて延長する。

カラムと配管のコネクタとして、フィンガータイトフィッティング (部品番号 5065-4426、10個入り) を使用し、カラムの脱着を容易にしました。

結果と考察

カラム径の縮小

Solvent Saver 3.0 mm ID カラムの特筆すべき点は、既存の 4.6 mm ID カラムを相当品と置き換えるだけで溶媒使用量を 50 % 以上削減し、感度も向上させられることです。

溶媒使用量の削減は、以下の数式で示すように、カラム内径の比率の 2 乗に比例して流量が削減されることにより、実現されています。

$$F_{3.0 \text{ id}}/F_{4.6 \text{ ID}} = \text{カラム径}_{3.0 \text{ ID}}^2/\text{カラム径}_{4.6 \text{ ID}}^2$$

移動相の定線速度における、低いほうの流量は、以下で求めることができます。

$$F_{3.0\text{ ID}} = F_{4.6\text{ ID}} \times \text{カラム径}_{3.0\text{ ID}}^2 / \text{カラム径}_{4.6\text{ ID}}^2$$

ダイエット炭酸飲料のアイソクラティック分析結果を図 1 に示します。流量を 1.0 mL/min から 0.43 mL/min に減らすことにより、移動相を分析あたり 57 % 削減することに成功しています。また、3.0 mm ID カラムへの注入量が半減しているにもかかわらず、クロマトグラフのピーク高が同じことから、感度がほぼ 2 倍となっていることがわかります。

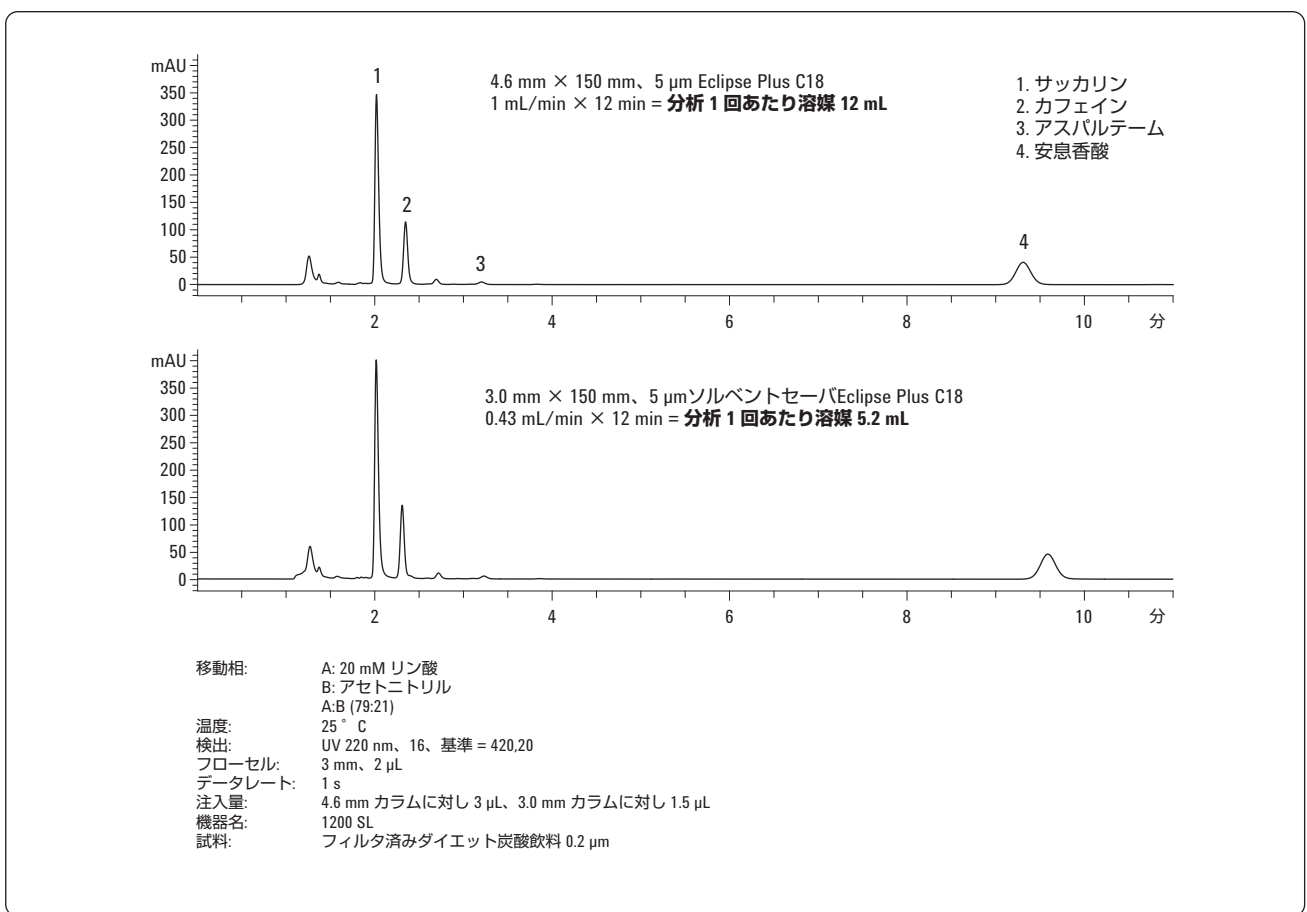


図 1. ダイエット炭酸飲料のアイソクラティック分離にソルベントセーバEclipse Plus C18 カラムを使用することで移動相を 57 % 削減

カラムサイズの削減は、グラジエントメソッドにおいても有効です。濃縮ヒッコリー燻製自然調味料を 4.6 mm × 150 mm、5 μm Eclipse Plus C18 カラムと 3.0 mm × 150 mm、5 μm カラムでそれぞれグラジエント分離した結果を図 2 に示します。低流量の 3.0 mm ID カラムを使用することにより、移動相を分析あたり 58 % 削減することに成功していることがわかります。ただし、溶出の遅い化合物は、左寄りに表れており、3.0 mm ID カラムの使用によってリテンションタイムが延びていることがわかります。

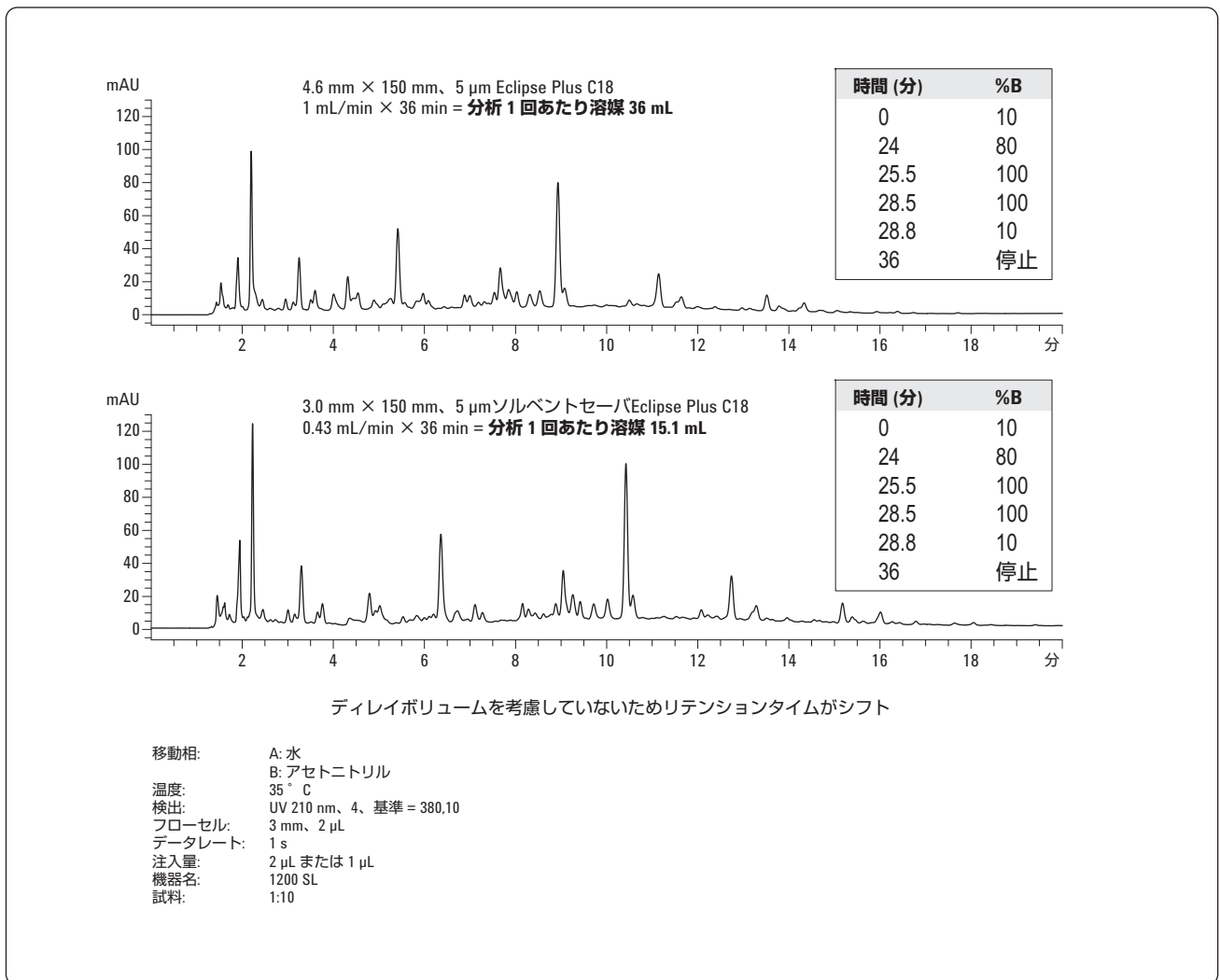


図 2. 濃縮ヒッコリー燻製自然調味料のグラジエント分離に Solvent Saver Eclipse Plus C18 カラムを使用することにより移動相を 57% 削減

ピークのリテンションの差異は、ディレイ時間の差、すなわちグラジエントが G1316B バイナリポンプ内における組成点からカラムヘッドへ到達するまでの時間の差によるものです。フローパスの容積はそのまま、流量のみ減るため、グラジエントのカラム到達時間が長くなるのです。これにより、溶出ピークが遅くなります。

リテンションタイムの差異を最小限に留める方法の 1 つとして、グラジエントの組成点からカラムまでのフローパス容積を減らすことです。フローパスのこの箇所を「ディレイボリューム」といいます。G1316B ポンプからスタティックミキサと接続キャピラリの 1 つを省くことにより、簡単にディレイ容積を減らすことができ、ディレイ時間の差を縮めることによって 2 つのクロマトグラムを近づけることができます (図 3 参照) [1]。

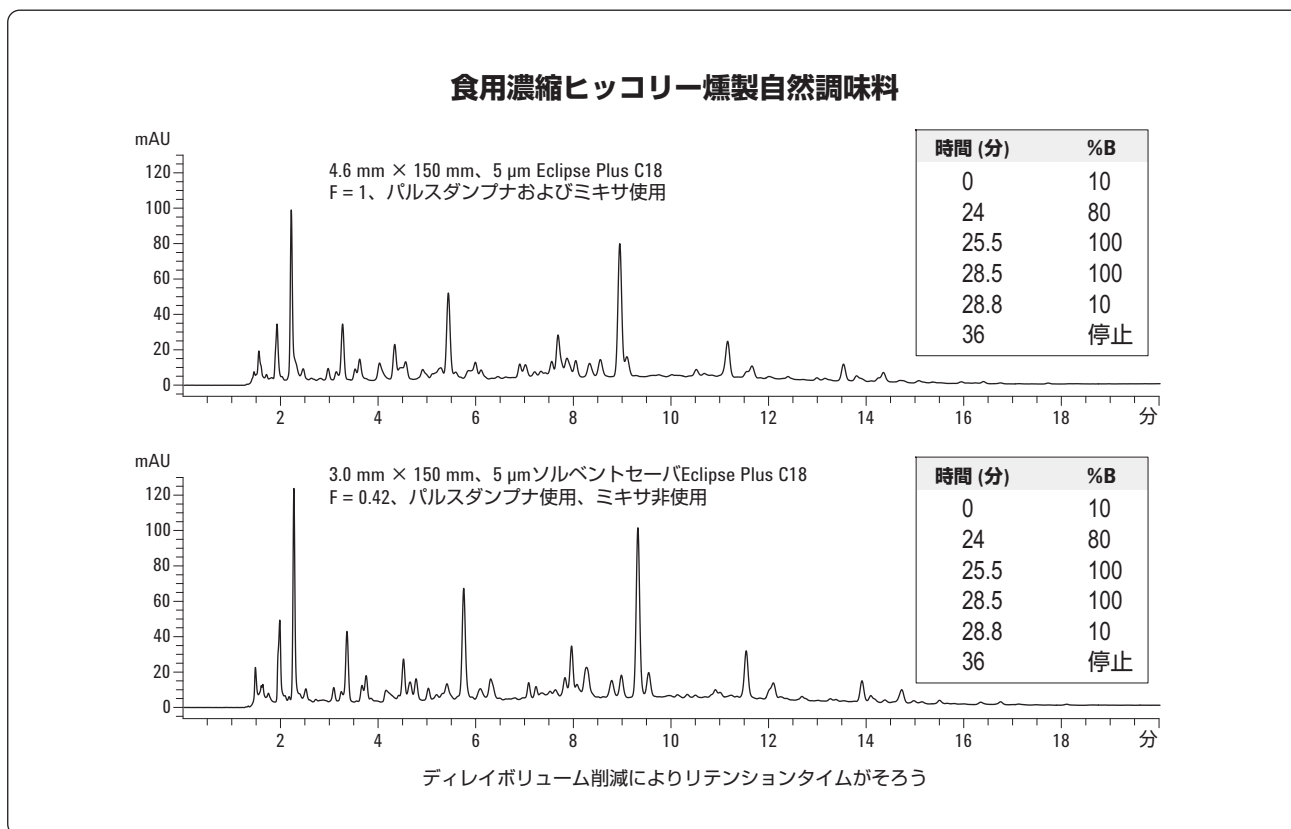


図 3. G1316B ポンプからスタティックミキサを省くことによりディレイボリュームが削減され、ピークがそろう

カラム長の短縮と粒径の縮小

溶媒使用量の削減と分析時間の短縮は、ソルベントセーバカラムの採用以外にも、5 µm カラムをより短い RRHT 1.8 µm (または RR 3.5 µm) カラムに置き換えることによっても実現可能で

す。グラジエント分析に短い RRHT カラムを使用した場合の結果を図 4 に示します。溶媒使用量はカラム長に比例します。分析時間もカラム長に比例しており、こちらは効果がより顕著であることがわかります。

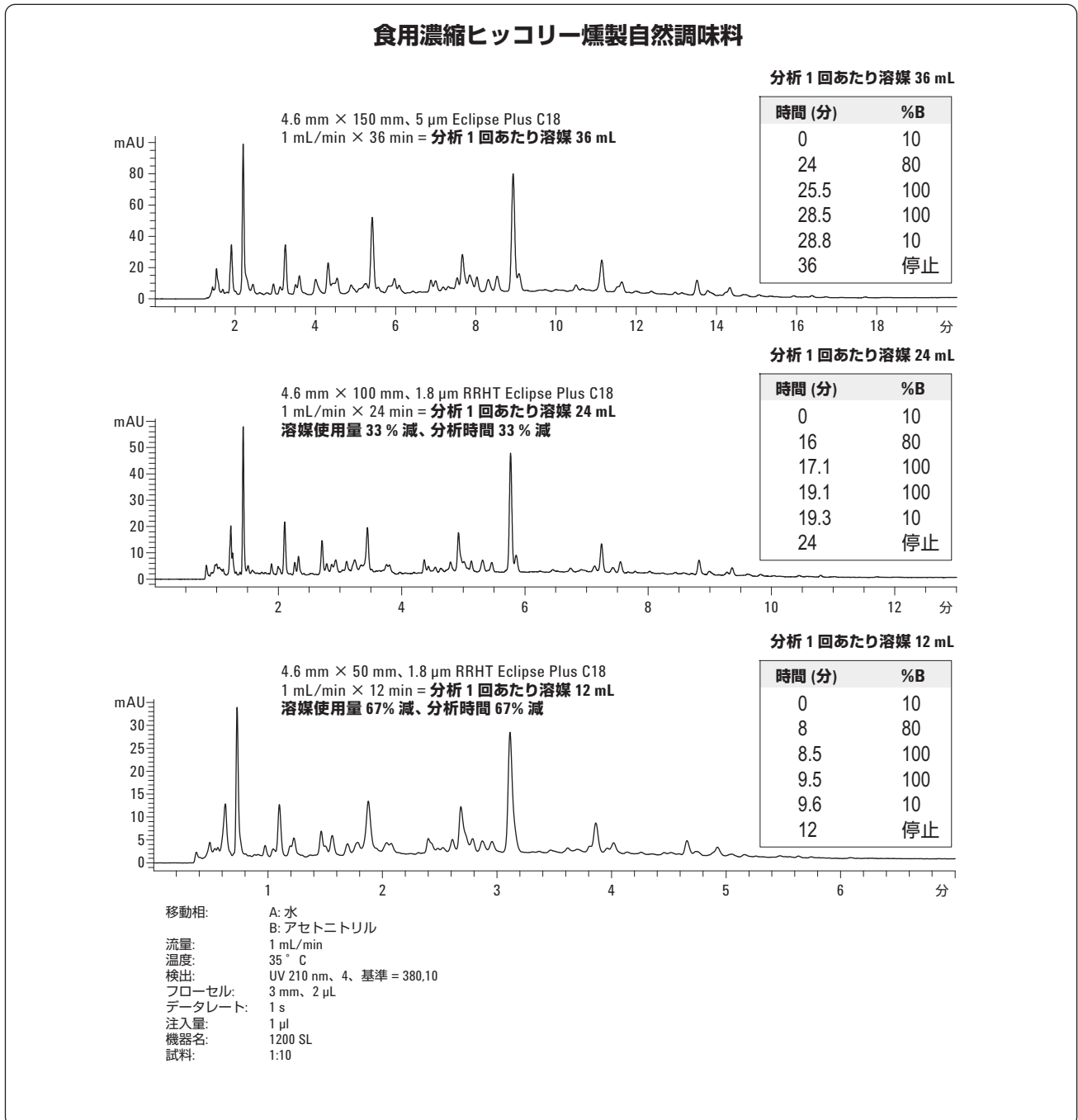


図 4. RRHT カラムによる分析時間の短縮と溶媒使用量の削減

カラム径縮小、カラム長短縮、および粒径縮小の複合効果

内径 3.0 mm、より短いカラム長、およびより小さな粒径を組み合わせることで、溶媒使用量と分析時間をさらに減らすことができます (図 5 参照)。RRHT カラム構成により、元の 4.6 mm x 150 mm メソッドと比較した場合、溶媒使用量は 57 ~ 86 % 減となり、分析時間は 36 分から 12 ~ 24 分まで短縮されます。

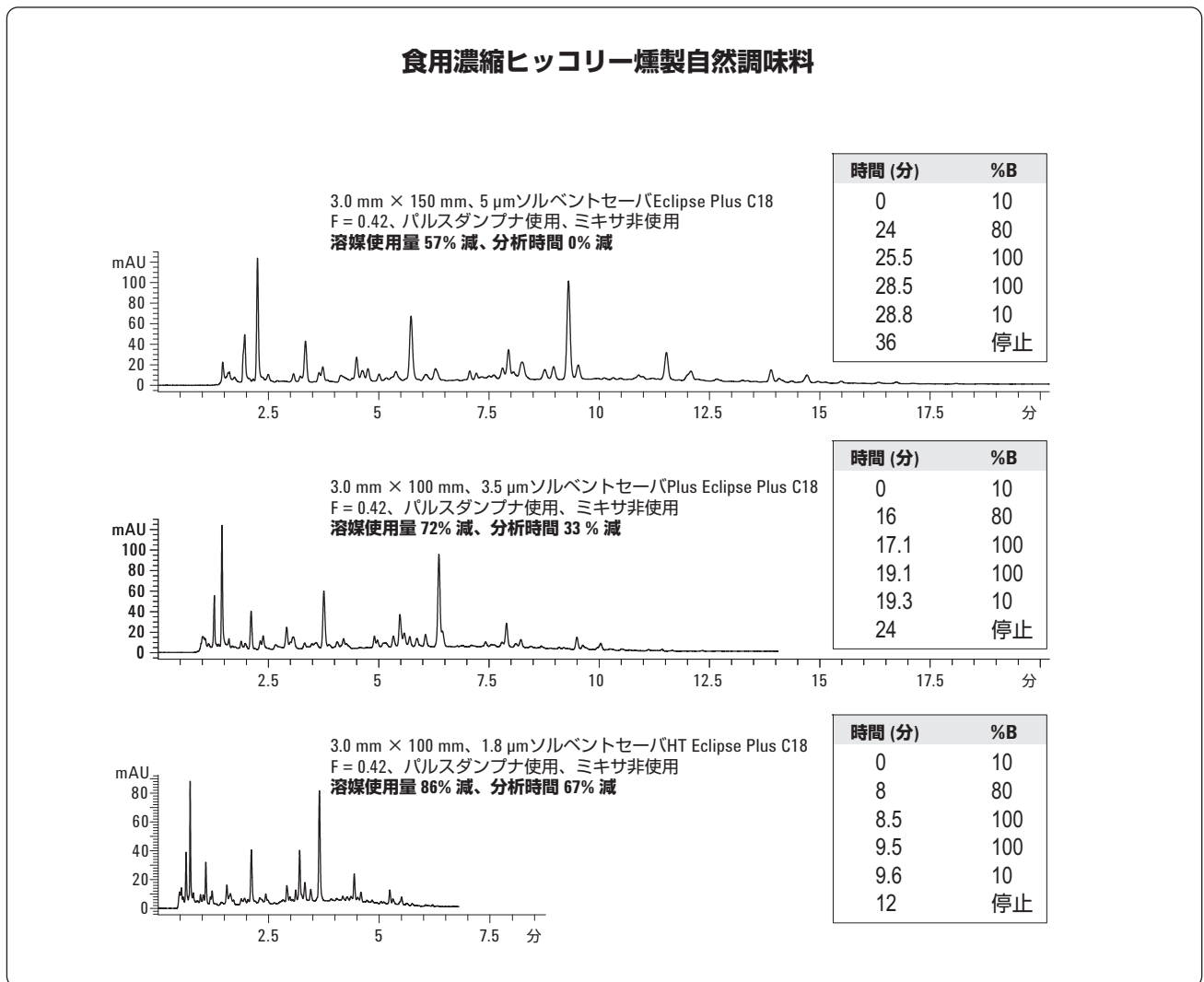


図 5. RR および RRHT メソッドの採用による溶媒使用量のさらなる削減

図 6 では、ダイエット炭酸飲料のアイソクラティック分析において図 5 同様に粒径とカラム長を変更した結果を示しています。ここでも、RR および RRHT カラムの使用により、最大 67 % の分析時間短縮と、最大 86 % の溶媒使用量削減が実現されています。ダイエット炭酸飲料の例を始めとする多くのケースでは、元の方法でも成分が十分に分離できているため、分析時間が短縮されても分解能はさほど低下しません。ただし、ヒッコリー燻製調味料のようにピークが多数存在する場合には、近接ピークの分解能が低下するおそれがあります。

しかし、大幅な分析時間短縮および溶媒使用量削減には、このようなデメリットを補って十分な魅力があると言えます。また、多くの場合、より素早く、より短い RRHT メソッドの移動相を最適化することにより、分解能を改善することもできます。分解能の改善には、分析時間と溶媒使用量を若干増やす必要がありますが、最終的な最適 RRHT メソッドの分析時間および溶媒使用量は、元のメソッドと比べて明らかに少なくなります。メソッドの最適化を不便であれば、いくつかの既製 RRHT カラム長 (30、50、75、100、150 mm) から選択することにより、十分な分解能を実現しつつ、時間と溶媒を節約することができます。

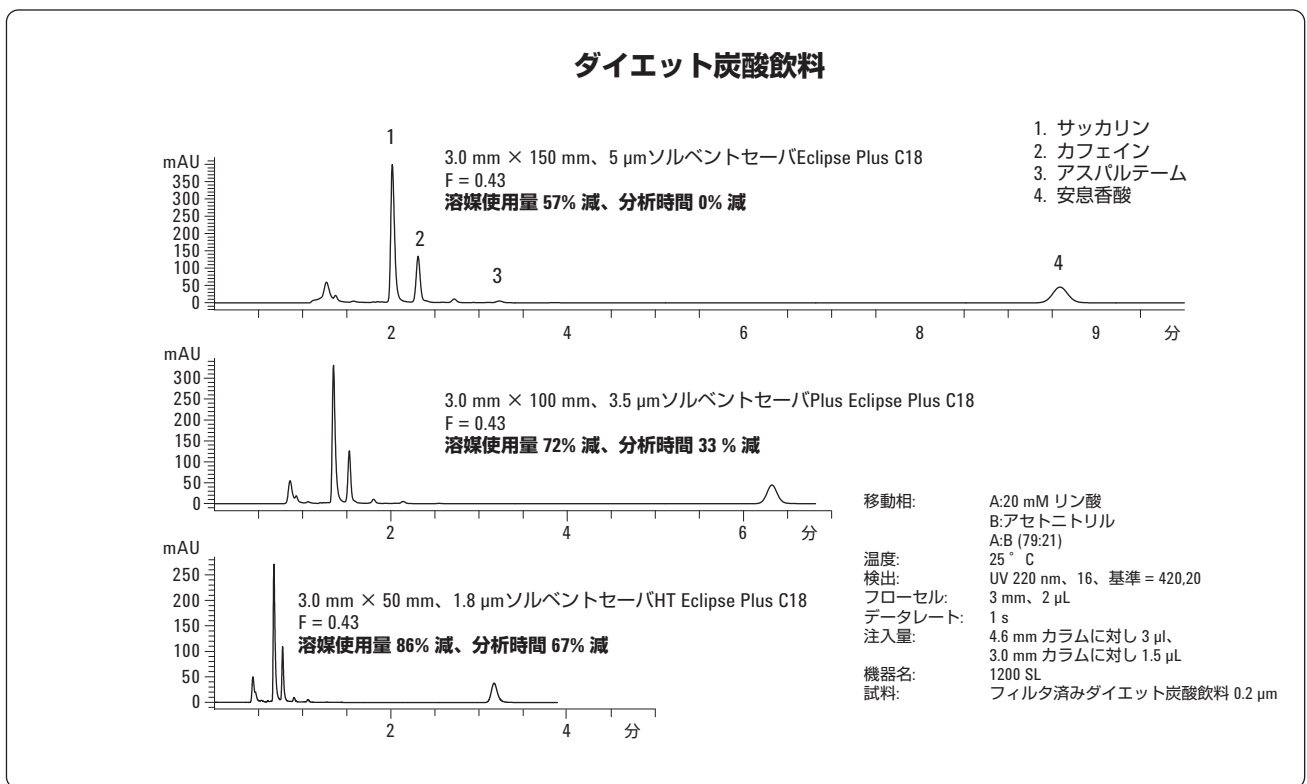


図 6. RR および RRHT メソッドの採用による溶媒使用量のさらなる削減

高流量

50 mm (および 100 mm) の RRHT カラムは、Agilent 1100 などの旧型 LC にも対応していますが、Agilent 1200 Rapid Resolution LC に対して最適化されています。耐圧性能は最大 600 bar です。流量を 0.43 mL/min から 1.25 mL/min に増やしたところ、分析時間は約 1/3 になりましたが、溶媒使用量にはほとんど変わりませんでした。図 7 に示すように、時間削減の影響は、圧力の上昇として表れました。

このような高流量 (4.6 mm ID カラムにおける 2.9 mL/min に相当) における圧力も、1200 LC システムおよび ZORBAX RRHT カラムの耐圧性能 (600 bar) であれば余裕で対応できます。カラム径の縮小、カラム長の短縮、粒径の縮小、および流量の増加を組み合わせることにより、移動相を 83 % 減らし、分析時間を 85 % 減らすことができました。

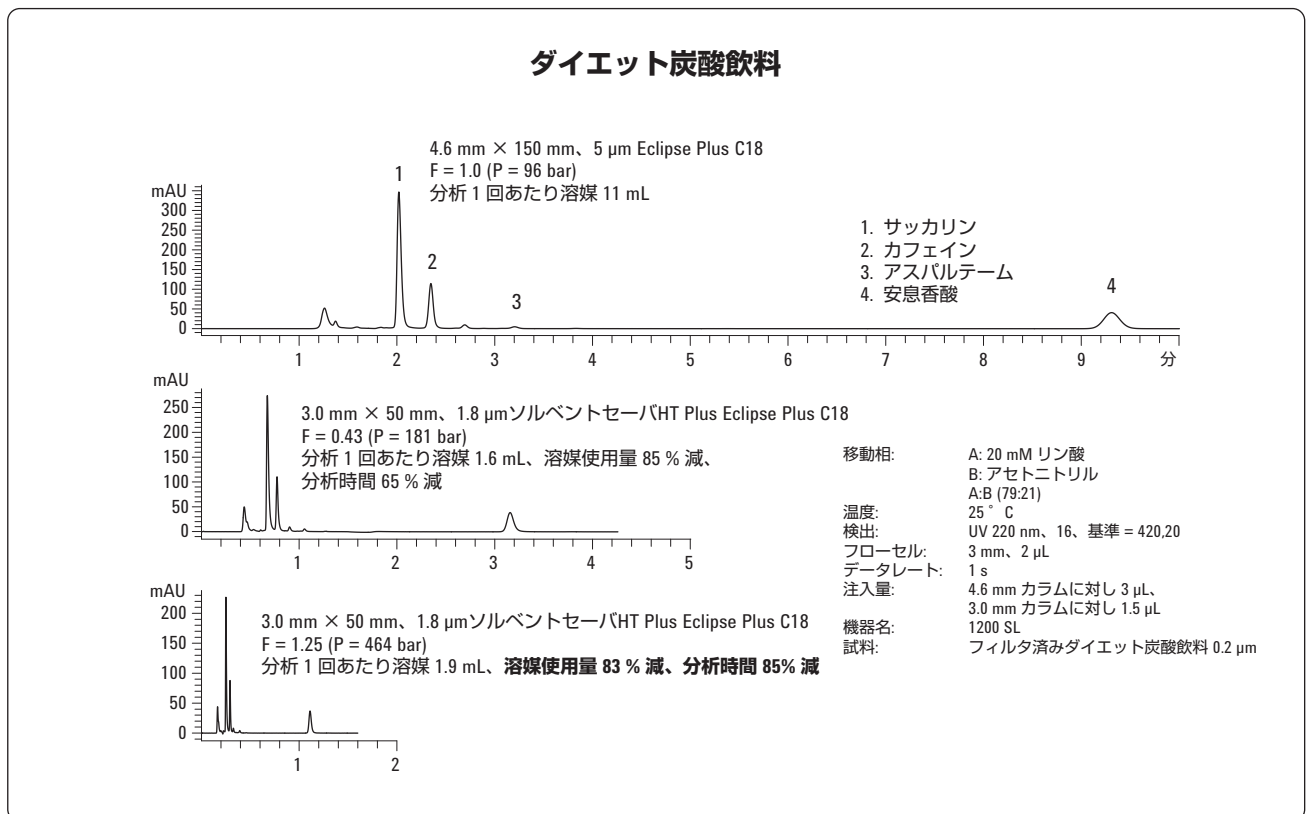


図 7. 高流量によるさらなる時間短縮

結論

本実験により、カラムの 3 つのパラメータ、内径、長さ、粒径を変更することにより、溶媒使用量および分析時間の両方またはいずれかを大幅に減らせることが示されました。溶媒使用量の削減に関しては、カラム内径およびカラム長の変更が最も大きく影響し、粒径を調整することによって分解能も維持できることがわかりました。それぞれの最適な組み合わせは、メソッドの最終目的や研究室の制限に依存するため、用途や研究所によって異なります。

カラム内径を 4.6 mm から 3.0 mm に縮小した場合の標準的な溶媒使用量削減率は 57 % です。より短い RRHT カラムで内径 3.0 mm を採用した場合、溶媒使用量と分析時間をさらに減らすことができます。カラム長はいくつか用意されているため、分解能、溶媒使用量、および分析時間のバランスを必要に応じて調整することができます。また、4.6 mm ID カラムから 3.0 mm ID ソルベントセーバカラムへの移行により、感度向上も実現することができます。

Solvent Saver カラム (3.0 mm ID) および RRHT カラム (1.8 μ m) の対応 LC は、Agilent 1100 および 1200 です。Agilent 1200 および RRHT カラムは、高圧に耐えられるように設計されているため、流量を上げてさらなる時間短縮を図ることができます。

参考資料

1. John W. Henderson, Jr., William Long, and Cliff Woodward, "High Throughput Gradient Optimization by Easily Minimizing Delay Volume," Agilent Technologies publication 5989-6665EN
2. John W. Henderson Jr. and William J. Long, "Tailoring Speed, Sensitivity, and Resolution in an RRHT Analysis of Cardiac Drugs," Agilent Technologies publication 5989-5899EN

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

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。

本文書に記載の情報、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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
April 8, 2009
5990-3882JAJP



Agilent Technologies