



# SEPARATION REPORT

## 低分子分離用樹脂系逆相クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel Octadecyl-2PWについて

### ——目 次——

	ページ
1. はじめに	1
2. 商品形態	1
3. 基本的性質	2
3-1. 流速とHETPとの関係	2
3-2. 有機溶媒交換性	3
3-3. 試料負荷量	4
4. 各種試料の分離	5
4-1. 保持比較	5
4-2. 塩基性物質の溶出比較	6
4-3. 金属の影響	7
4-4. アルカリ条件下での溶出比較	7
4-5. ペプチドの溶出比較	9
5. おわりに	10

## 1. はじめに

逆相クロマトグラフィーは、液体クロマトグラフィーにおいて最も汎用性の高い、また高分離能を有する分離手段であり、シリカゲル基材の充填剤を中心として各種の官能基を有する担体が用いられています。その中で樹脂系充填剤は、シリカゲルの弱点である化学的耐久性に優れているため酸性やアルカリ性条件下での分離に用いられてきました。

当社には、樹脂系逆相充填剤としてTSKgel Octadecyl-4 PW, Phenyl-5 PW RP, Octadecyl-NPRがあり、特にペプチド、タンパク質あるいは酵素などの高分子物質の分離に適した充填剤です。これらの担体は細孔径が大きく設計されており、低分子物質の分離分析には保持力が弱く、またカラム効率も低いものでしたが、今回新たに低分子物質の分離分析に適した樹脂系逆相充填剤としてTSKgel Octadecyl-2 PWを上市しました。

本稿では、TSKgel Octadecyl-2 PWの基本的性質、TSKgel Octadecyl-4 PW、及びTSKgel ODS-80 Tsとの分離性能の比較について述べます。

## 2. 商品形態

TSKgel Octadecyl-2 PWは、表-1に示すように2種類の充填カラム及び2種類のガードカラムとして供給されます。カラム内径は、4.6 mm及び6.0 mmが用意されています。充填剤の粒子径は5ミクロンと微粒子であるため、高理論段を得ることができます。したがって、低分子から高分子物質まで分離対象が幅広くなりました。当社の樹脂系逆相充填剤の一覧を表-2に示します。

表-1 TSKgel Octadecyl-2 PWの商品一覧

カラムサイズ	粒子径	品番
4.6 mm I.D.×15 cm	5 μm	017500
6.0 mm I.D.×15 cm	5 μm	017501
4.6 mm I.D.×1 cm	—	017502*
6.0 mm I.D.×1 cm	—	017503*

\*ガードカラム

表-2 TSK-GEL樹脂系逆相充填剤一覧

商品名	粒子径	官能基	分離対象物質
TSKgel Octadecyl-2 PW	5 μm	オクタデシル	一般低分子物質～オリゴマー
TSKgel Octadecyl-4 PW	7 μm	オクタデシル	オリゴマー、ペプチド
TSKgel Octadecyl-NPR	2.5 μm	オクタデシル	オリゴマー、ペプチド～高分子物質 (タンパク質)
TSKgel Phenyl-5 PW RP	10 μm	フェニル	ペプチド～高分子物質 (タンパク質)

### 3. 基本的性質

#### 3-1 流速とHETPとの関係

図-1に4.6 mm内径と6.0 mm内径カラムについて、流速とHETPとの関係を示します。適正流速は4.6 mm内径カラムでは0.4~0.6 ml/min、6.0 mm内径カラムでは0.5~0.8 ml/minであり、いずれも線速では2.4~3.5 cm/minの範囲です。表-3に最大流速と最大操作圧力を示します。最大流速は、最大操作圧力を越えない範囲で設定する必要があります。

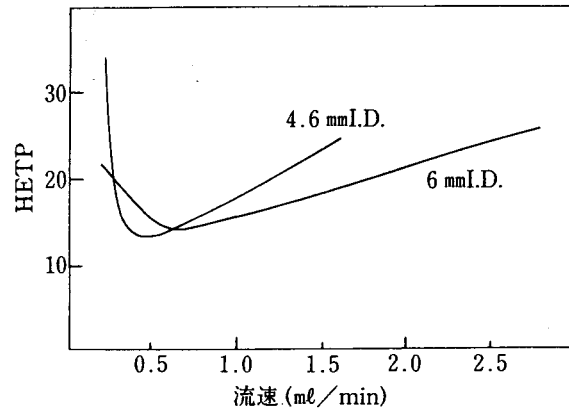


図-1 流速とHETPの関係

カラム；TSKgel Octadecyl-2 PW

(4.6 mm I.D.及び6.0 mm I.D.×15 cm)

溶離液；65%アセトニトリル

温度；35°C

検出；UV (254 nm)

試料；安息香酸ヘキシル

表-3 使用流速と操作圧力

カラムサイズ	最大流速	適正流速	最大操作圧力	適用pH範囲
4.6 mm I.D.×15 cm	1.2 ml/min	0.4~0.6 ml/min	150 kgf/cm <sup>2</sup>	2~12
6.0 mm I.D.×15 cm	2.5 ml/min	0.5~1.0 ml/min	150 kgf/cm <sup>2</sup>	2~12

### 3-2 有機溶媒交換性

6.0 mm内径カラムを用いて、有機溶媒交換性を調べました。カラムにアセトニトリル及びメタノールを送液し、純水100%へ、0.5 ml/minの流速でステップワイズに交換し、それぞれの有機溶媒に再置換する工程を繰り返した際の段数変化を調べました。図-2にその結果を示します。いずれの有機溶媒においても20回の繰り返し後もカラム効率の変化が小さく、耐有機溶媒交換性が良好であることを示しています。

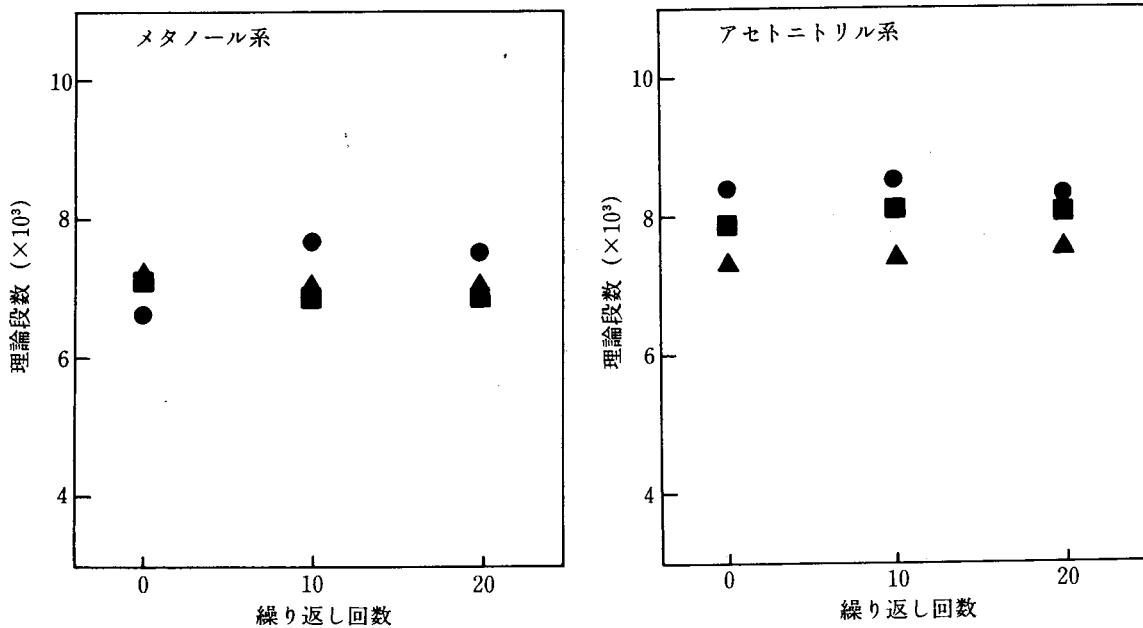
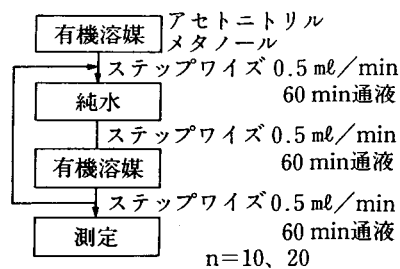


図-2 溶媒交換テスト

カラム；TSKgel Octadecyl-2 PW (6 mm I.D. × 15 cm)  
 溶離液；65%アセトニトリル  
 温度；室温  
 流速；1 ml/min  
 検出；UV (254 nm)  
 試料；安息香酸メチル (▲)、-ブチル (■)、  
 -ヘキシル (●)



溶媒交換テスト工程

### 3-3 試料負荷量

6.0 mm内径カラムを用いて試料負荷量を検討しました。その結果を図-3に示します。試料として、p-ヒドロキシ安息香酸ヘキシル及びノニルを用いて、注入量一定とし分離能の変化を調べました。試料負荷量30 $\mu$ g程度から分離能の低下が見られました。500 $\mu$ g負荷時のピーク幅は、1 $\mu$ g負荷時のピーク幅のほぼ2倍でした。

図-4に1 $\mu$ gと500 $\mu$ gで得られたクロマトグラムを示します。

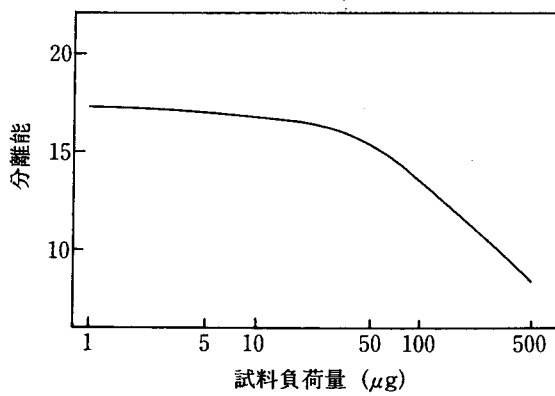


図-3 試料負荷量と分離能との関係

カラム；TSKgel Octadecyl-2 PW (6.0 mmI.D.×15 cm)  
溶離液；65%アセトニトリル  
流速；0.8 ml/min  
温度；35°C  
検出；UV(290 nm)  
試料；p-ヒドロキシ安息香酸ヘキシル、  
p-ヒドロキシ安息香酸ノニル (10 $\mu$ l)

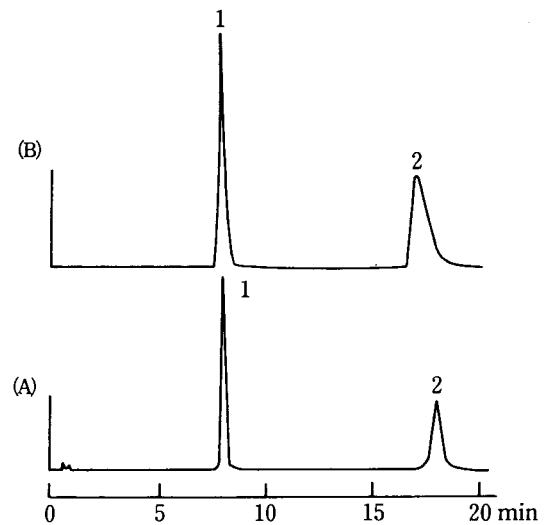


図-4 試料負荷量の分離への影響

カラム；TSKgel Octadecyl-2 PW (6.0 mmI.D.×15 cm)  
溶離液；65%アセトニトリル  
試料；1. p-ヒドロキシ安息香酸ヘキシル  
2. p-ヒドロキシ安息香酸ノニル  
(A)各1 $\mu$ g (B)各500 $\mu$ g  
その他条件は、図-3に同じ

#### 4. 各種試料の分離

TSKgel Octadecyl- 4 PW及びTSKgel ODS-80 Tsとの保持比較を各種試料について検討しました。

##### 4-1 保持比較

図-5、及び図-6に、安息香酸エステル類の各カラムにおける保持比較を示します。保持力に関しては、TSKgel Octadecyl- 2 PWはシリカ系充填剤であるTSKgel ODS-80 Tsとの比較では弱くなっていますが、

TSKgel Octadecyl- 4 PWとの比較では、溶出は約2倍遅くなっています。またカラム効率は、シリカ系充填剤よりも低いものの、TSKgel Octadecyl- 4 PWの2倍以上の性能が得られていることが解ります。また樹脂系充填剤はメタノール系ではアセトニトリル系に比較して段数が低下する傾向にあります。

(1)TSKgel Octadecyl- 2 PW

(2)TSKgel Octadecyl- 4 PW

(3)TSKgel ODS-80 Ts

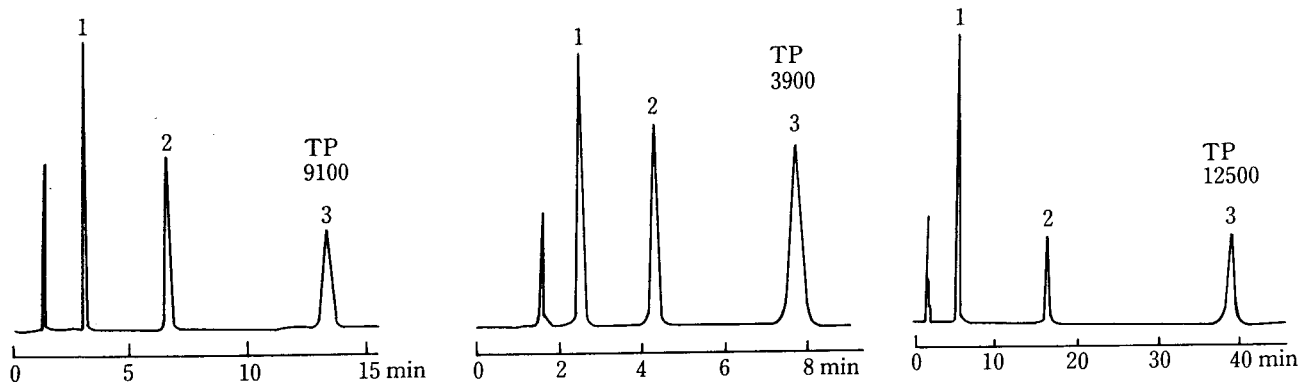


図-5 各カラムにおける安息香酸エステルの保持比較(1)

カラム；(1)TSKgel Octadecyl- 2 PW (4.6 mmI.D.×15 cm)

(2)TSKgel Octadecyl- 4 PW (4.6 mmI.D.×15 cm)

(3)TSKgel ODS-80 Ts (4.6 mmI.D.×15 cm)

溶離液；55%アセトニトリル

流速；1.0 ml/min

温度；35℃

検出；UV (254 nm)

試料；1. 安息香酸メチル 2. 安息香酸ブチル 3. 安息香酸ヘキシル

(1)TSKgel Octadecyl- 2 PW

(2)TSKgel Octadecyl- 4 PW

(3)TSKgel ODS-80 Ts

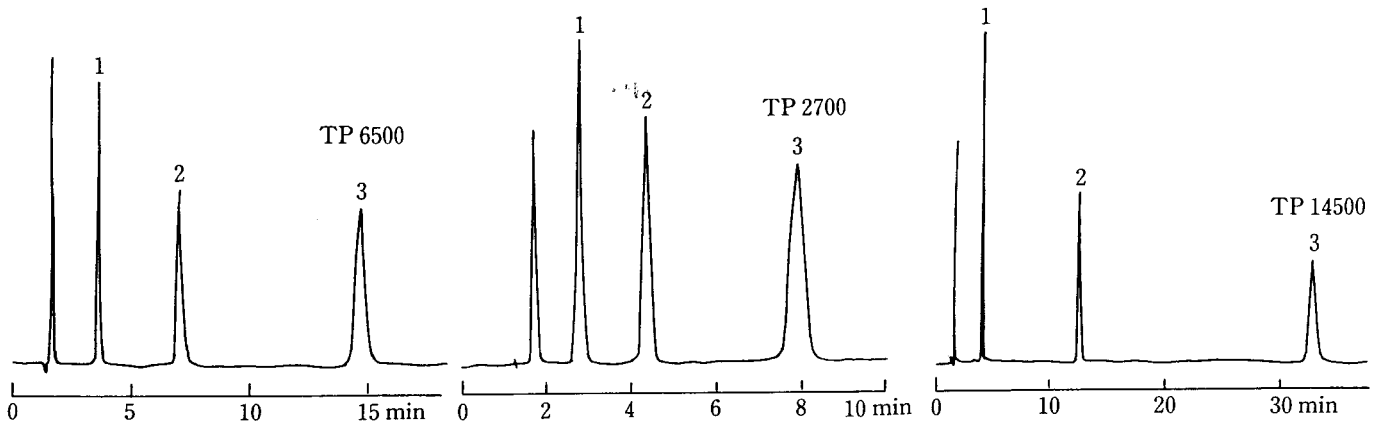


図-6 各カラムにおける安息香酸エステルの保持比較(2)

溶解液；70%メタノール

その他の条件は図-5に同じ。

#### 4-2 塩基性物質の溶出比較

図-7にピリジン-フェノールの溶出比較を示しました。TSKgel Octadecyl-2 PWではシリカ系充填剤 TSKgel ODS-80 Tsと同様にピリジンの吸着がなく、イオンの相互作用の少ない充填剤であることが解ります。また、図-8にはアニリン誘導体の溶出比較を示しましたがTSKgel ODS-80 Ts同様にいずれもシャープに溶出していることが解ります。

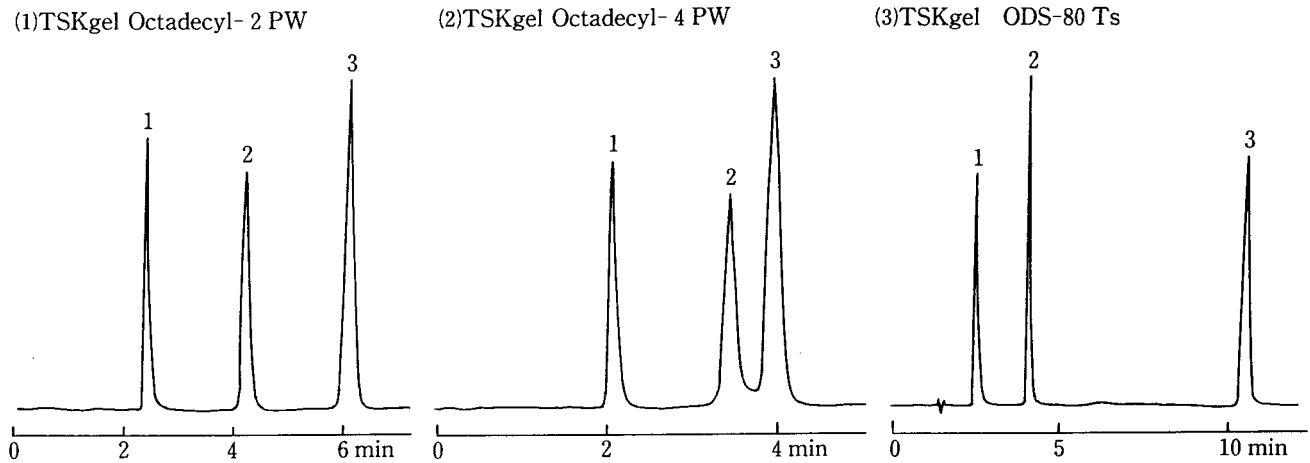


図-7 ピリジン-フェノールの溶出比較

カラム ; (1)TSKgel Octadecyl- 2 PW

(2)TSKgel Octadecyl- 4 PW

(3)TSKgel ODS-80 Ts (各 4.6 mmI.D.×15 cm)

溶離液 ; 40%アセトニトリル

流速 ; 1.0 ml/min 温度 ; 25°C 検出 ; UV (254 nm)

試料 ; 1. ピリジン 2. フェノール 3. 安息香酸メチル

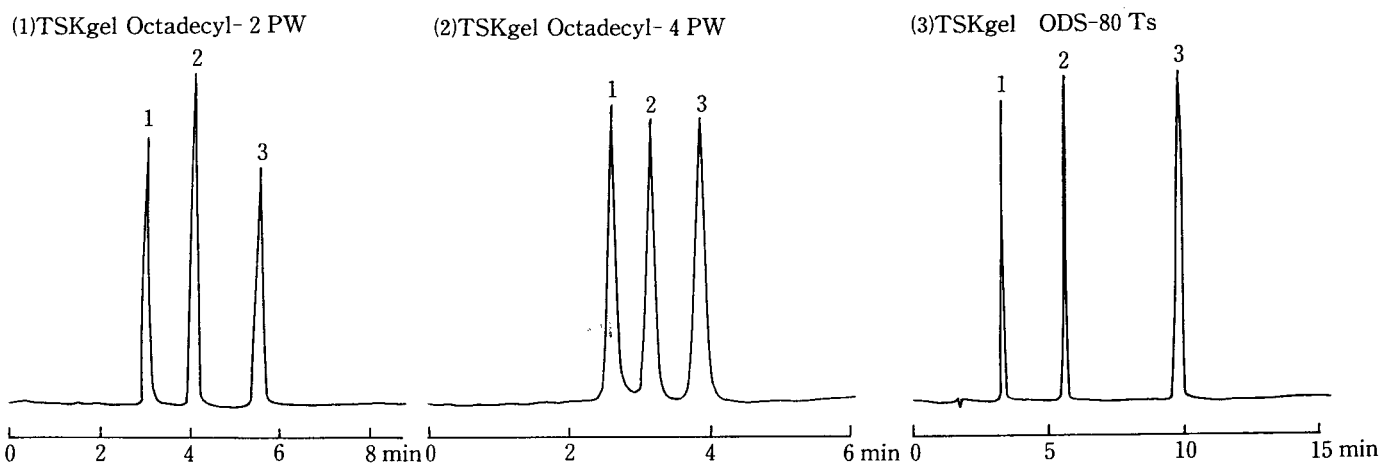


図-8 アニリン誘導体の溶出比較

カラム ; (1)TSKgel Octadecyl- 2 PW

(2)TSKgel Octadecyl- 4 PW

(3)TSKgel ODS-80 Ts (各 4.6 mmI.D.×15 cm)

溶離液 ; 20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) / アセトニトリル = 50 / 50 (V / V)

流速 ; 1.0 ml/min 温度 ; 25°C 検出 ; UV (254 nm)

試料 ; 1. アニリン 2. N-メチルアニリン 3. N,N-ジメチルアニリン

### 4-3 金属の影響

図-9に、充填剤中の金属の影響を受ける試料(8-キノリノール)の分離を示します。TSKgel Octadecyl-2 PWは、8-キノリノールが正常に溶出されており、TSKgel ODS-8 OTsと同様、金属の影響が最小限に抑えられています。

### 4-4 アルカリ条件下での溶出比較

図-10にTSKgel Octadecyl-2 PW及び4 PWについて、アルカリ条件下での溶出比較を示しました。ODSカラムでは、完全分離が困難な三環系抗うつ剤の分析において、TSKgel Octadecyl-2 PWでは、アルカリ条件を用いることにより、完全分離が達成できます。またTSKgel Octadecyl-4 PWよりも分離能及び保持力において優れていることがわかります。図-11に塩基性医薬品を酸性、中性及び塩基性条件下で分離した例を示しました。試料は中性およびアルカリ側で分離が良く溶離液のpHにより、試料の選択性と溶出位置が異なります。分離改善法として、中性やアルカリ側で安定に分離が行えることが樹脂系充填剤の大きな特徴です。

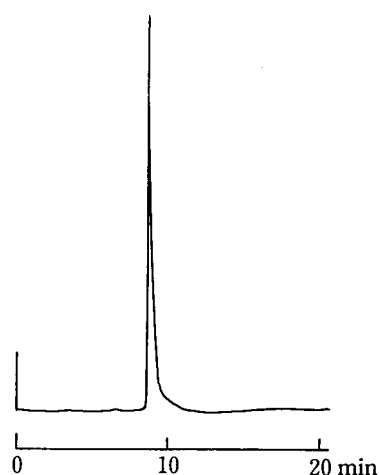


図-9 8-キノリノールの溶出比較

カラム; TSKgel Octadecyl-2 PW (6.0 mm I.D. × 15 cm)

溶離液; 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7) / アセトニトリル = 60 / 40

流速; 1.0 ml / min

温度; 35°C

検出; UV (230 nm)

試料; 8-キノリノール



(1)TSKgel Octadecyl- 2 PW

(2)TSKgel Octadecyl- 4 PW

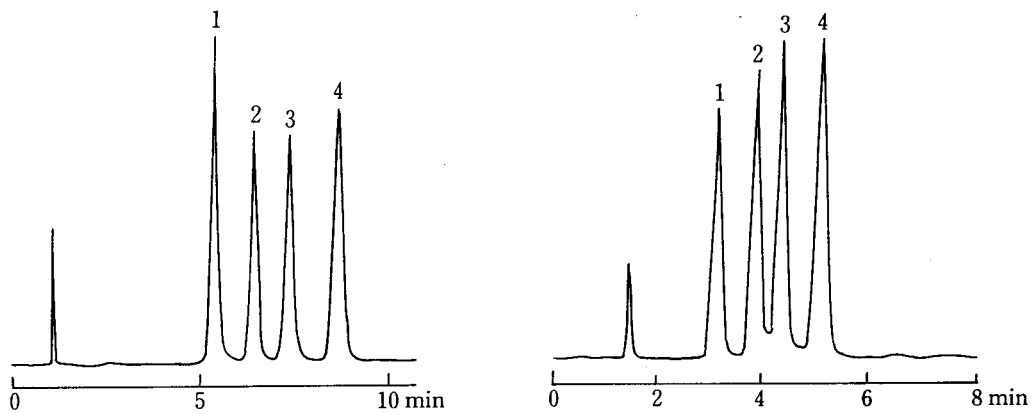


図-10 アルカリ条件下での三環系抗うつ剤の分離

カラム ; (1)TSKgel Octadecyl- 2 PW

(2)TSKgel Octadecyl- 4 PW (各 4.6 mm I.D. × 15 cm)

溶離液 ; 20 mMリン酸 2 ナトリウム (pH 11、NaOHで調整 / アセトニトリル = 40 / 60 (V / V))

温度 ; 35°C

流速 ; 1.0 ml / min

検出 ; UV (254 nm)

試料 ; 1. デシプラミン 2. イミプラミン 3. アミトリプチリン 4. トリミプラミン

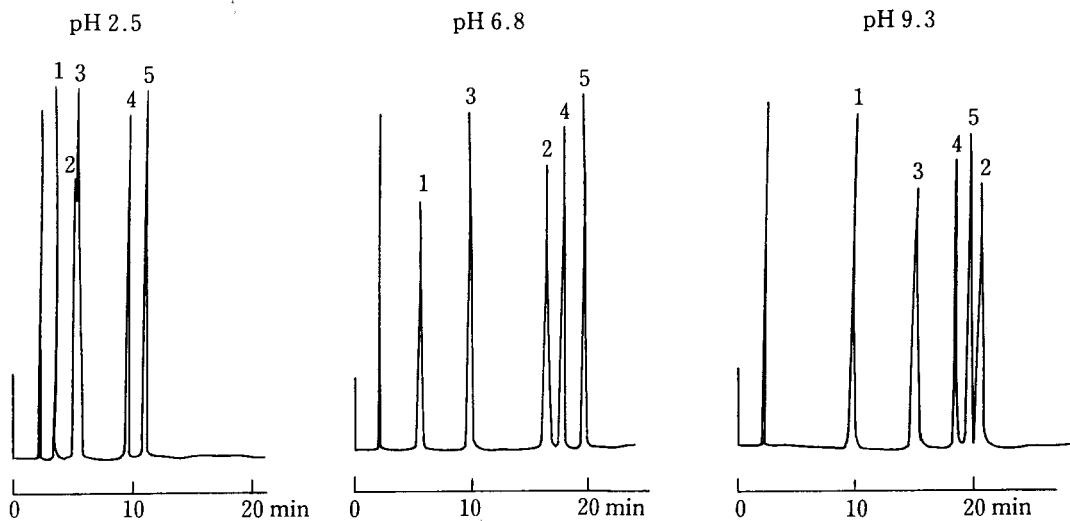


図-11 TSKgel Octadecyl- 2 PWでの塩基性医薬品の分離

カラム ; TSKgel Octadecyl- 2 PW (6.0 mm I.D. × 15 cm)

溶離液 ; A : 20 mMリン酸緩衝液(1)pH 2.5 (2)pH 6.8 (3)pH 9.3

B : アセトニトリル

A / B (80 / 20) → A / B (8 / 92) リニアグラジエント (30分)

流速 ; 1 ml / min

温度 ; 40°C

検出 ; UV (254 nm)

試料 ; 1 スルピリド 2 クロロフェニラミンマレイン酸塩 3 ジソピラミド

4 ジルチアゼム 5 ヒドロキシジン

#### 4-5 ペプチドの分離比較

各カラムにおけるペプチドの溶出比較を図-12に示します。TSKgel Octadecyl-2 PWでの溶出位置は、TSKgel ODS-80 Tsとほぼ同程度であり、また、分離性能もTSKgel Octadecyl-4 PWに比べ向上していることが解ります。

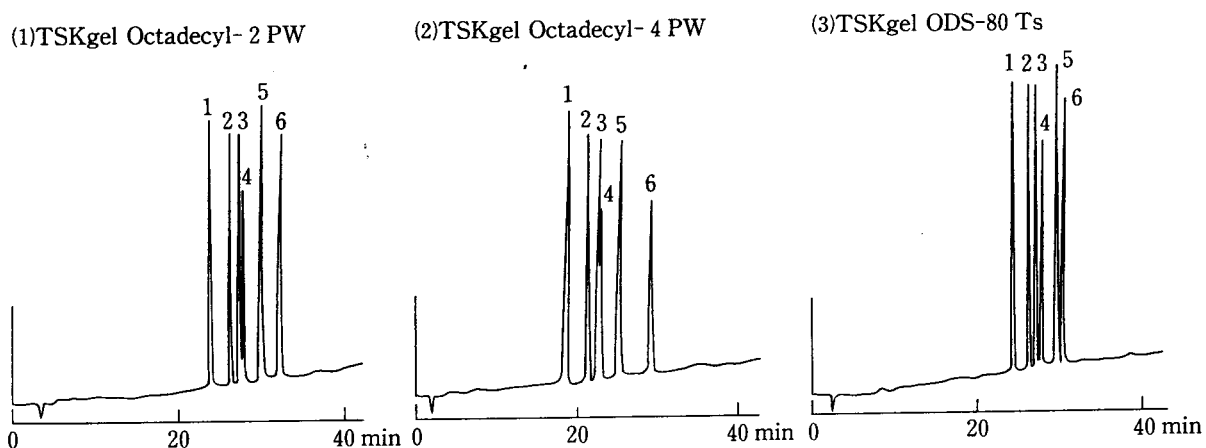


図-12 ペプチドの分離の比較

カラム；(1)TSKgel Octadecyl-2 PW

(2)TSKgel Octadecyl-4 PW

(3)TSKgel ODS-80 Ts (各 4.6 mmI.D.×15 cm)

溶離液；A：0.2%TFA

B：80%アセトニトリル in 0.2%TFA

A→Bリニアグラジエント (60分)

流速；1.0 ml/min

温度；25°C

検出；UV (220 nm)

試料；1.  $\alpha$ -エンドルフィン 2. ボンベシン 3. アンジオテンシンI

4.  $\gamma$ -エンドルフィン 5. ソマトスタチン 6. インシュリン

## 5. おわりに

TSKgel Octadecyl-2 PWは、微粒子が充填された低分子物質分離用逆相充填剤です。高カラム効率、化学的安定性、耐溶媒交換性が特徴です。TSKgel Octadecyl-2 PWが新たに加わったことによりTSKgel Octadecyl-4 PW、Octadecyl-NPR、Phenyl-5 PW RPに加え、樹脂系逆相充填剤が、低分子物質から高分子物質までの幅広い試料に適用できます。