



# SEPARATION REPORT

## 超高速逆相液体クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel Super-ODSについて

### ——目 次——

	ページ
1 はじめに	1
2 仕様	1
3 充填剤特性	1
4 クロマトグラフィー特性	2
5 分離に及ぼす因子	5
6 分離例	7
7 HPLCシステム等の注意点	9
8 おわりに	9

## 1. はじめに

逆相充填カラムは、高性能な分離性能、幅広い試料群への適応、操作性の簡便さなどの特徴により、分離分析の重要な手法として受入れられています。現在最も多用されている逆相充填カラムの粒子径は $5\mu\text{m}$ 程度であり、高理論段を示します。また、導入されている $\text{C}_{18}$ 層の密度を変化させることによって試料に対する選択性が異なることや、有機溶媒組成が $0\sim 100\%$ まで任意に選択できることなど、分離条件の設定も試料の特性に合わせて行える利点を持っています。

近年では、低流速域での分離（セミマイクロ化）や時間の短縮による分析の効率化（微小粒子化）等、省エネ志向の分析が求められています。前者（セミマイクロ化）では、分析カラムの内径を小さくすることにより、使用溶媒量を $1/5\sim 1/10$ とすることができます。また、後者（微小粒子化）では、粒子径を $3\mu\text{m}$ に微小化しカラム長さを短縮することにより、短時間で同等のカラム効率を得ることができます。

東ソーでは、高速・高分離を達成するため、従来の $3\mu\text{m}$ の粒子径を跳び越え、 $2\mu\text{m}$ のシリカ粒子をベースとした超高速逆層充填剤TSKgel Super-ODSを開発しました。本稿では、この充填カラムの特性を中心に紹介します。

## 2. カラム仕様

表-1にTSKgel Super-ODSのカラム仕様を示します。カラムサイズは $4.6\text{mm}$ 内径の長さ $5\text{cm}$ 及び $10\text{cm}$ の2種類が用意されています。また、分析カラム保護用のガードフィルタがあります。

## 3. 充填剤特性

表-2に、TSKgel Super-ODS及びTSKgel ODS-80Tsの物理的性質を示します。汎用逆相充填剤であるTSKgel Super-ODSは、細孔容積、比表面積共に、TSKgel ODS-80Tsよりも3分の1程度小さい値を有しています。一方、細孔径は反対にTSKgel Super-ODSが大きく設定されています。細孔容積、及び比表面積が小さく設定されているのは、高圧下での耐圧性を充分確保するためであり、また、細孔径が大きめに設定されているのは、 $\text{C}_{18}$ 層をポリレーヤーで導入し、保持力と選択性の確保を目的としています。

粒子径は平均 $2.3\mu\text{m}$ 付近であり、汎用充填剤の約半分であることが分かります。この微粒子を採用することにより、高理論段化が達成されます。また、粒子径分布の標準偏差も汎用品と比べ小さいことも、比較的低压で高理論段を達成するために不可欠な要因です。

表-1 TSKgel Super-ODSの仕様

品名	品番	カラムサイズ	保証理論段数/カラム
TSKgel Super-ODS	18154	4.6mm I.D. × 5cm	8000
TSKgel Super-ODS	18197	4.6mm I.D. × 10cm	16000
ガードホルダ <sup>®</sup> (4-4)	18206	(4mm I.D. × 4mm用)	—
Gフィルタ	18207	4mm I.D. × 4mm	—

表-2 逆相充填剤の物性 (ODS化後)

充填剤	細孔容積 (ml/g)	比表面積 ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	平均細孔径 (nm)	平均粒子径 x, SD ( $\mu\text{m}$ )	炭素含有量 (C%)
TSKgel Super-ODS	0.25 <sup>1)</sup>	96.8 <sup>1)</sup>	11.2 <sup>1)</sup>	2.29, 0.27 <sup>2)</sup>	約 8
TSKgel ODS-80Ts	0.63	312.8	8.2	5.06, 0.87	約15

1) 水銀ポロシメーターによる測定結果、2) SEMによる測定結果

## 4. クロマトグラフィー特性

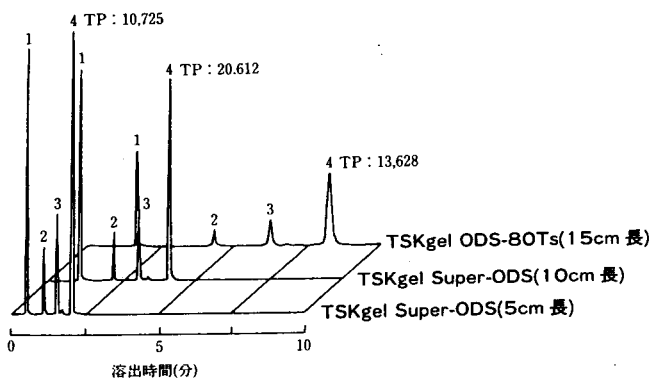
### 4-1 カラム効率

表-3に、市販の3 $\mu$ mの充填カラムとカラム段数の比較を示します。市販の3 $\mu$ mカラムは、理論段数が6~8000/5cm程度であり、TSKgel Super-ODSは10000段以上を有していることが分かります。しかも、高い理論段を有しているにもかかわらず、操作圧が3 $\mu$ mよりも低いかあるいは同程度であることから、TSKgel Super-ODSは充填剤の機械的強度が高いことを示しています。

表-4には10cmカラムの比較を示していますが、TSKgel Super-ODSは、低圧でしかも高理論段数であることが分かります。

TSKgel Super-ODSは、保持力が市販のODS充填剤に比べ小さいことが分かりますが3項で述べたように、比表面積の違いに起因するものです。

図-1にSuper-ODSの5cm及び10cmカラムとODS-80Tsの15cmカラムの保持比較を示します。



カラム：TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)  
 TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×10cm)  
 TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.×15cm)

溶離液；70%CH<sub>3</sub>OH

流速；1.0ml/min 温度；25°C

検出；UV(254nm)、マイクロセル使用

試料；1.ウラシル 2.ベンゼン 3.トルエン 4.ナフタレン

カラム	Rs(1/2)	Rs(2/3)	Rs(3/4)
Super-ODS(5cm)	16.44	8.09	7.56
Super-ODS(10cm)	24.42	11.43	10.70
ODS-80Ts	21.88	9.53	7.39

図-1 従来カラムとの比較(アイソクラティック溶出)

### 4-2 平面認識性

表-5に、TSKgel Super-ODS及びTSKgel ODS-80Tsにおけるo-ターフェニル(OT)/トリフェニレン(TR)の測定結果を示します。TSKgel ODS-80Tsに比べ、TSKgel Super-ODSでは保持係数(k')は小さいものの分離度及び分離係数はいずれも大きい値を示しました。これは、TSKgel Super-ODSのオクタデシル基がポリレーヤーで導入されている為、平面認識能が高いことに起因します。

表-3 5cmODSカラムのカラム効率の比較

カラム	粒子径 ( $\mu$ m)	フルオレン		分離度R <sub>s</sub> $\alpha$ (NAP/FLU)	操作圧* (kg/cm <sup>2</sup> )
		RT(min)	TP/カラム		
TSKgel Super-ODS	2	3.71	10728	2.30	97
A社ODS	3	6.10	7453	2.38	98
B社ODS	3	4.70	8701	2.27	124
C社ODS	3	6.58	5893	2.39	116
D社ODS	3	6.61	7652	2.38	94

\*70%メタノール、1ml/min、NAP；ナフタレン、FLU；フルオレン

表-4 10cmODSカラムのカラム効率の比較

カラム	粒子径 ( $\mu$ m)	ナフタレン		操作圧* (kg/cm <sup>2</sup> )
		RT(min)	TP/カラム	
TSKgel Super-ODS	2	4.06	20612	191
A社ODS	3	4.46	10651	262
B社ODS	3	3.47	11685	191

\*70%メタノール、1ml/min

表-5 平面認識能の比較

カラム	o-ターフェニル		トリフェニレン		分離係数 $\alpha$ (OT/TR)	分離度 Rs(OT/TR)
	k'	TP	k'	TP		
TSKgel Super-ODS	2.19	9596	3.84	6059	1.98	13.53
TSKgel ODS-80Ts	6.65	14163	8.00	14571	1.27	5.53

溶離液；80%メタノール (TSKgel Super-ODS)

85%メタノール (TSKgel ODS-80Ts)

流速；1ml/min 検出；UV(254nm)

### 4-3 残存シラノール基との相互作用

シリカゲル担体の欠点の1つに、残存シラノール基とイオン性物質との相互作用があげられます。一般に、残存シラノール基が充填剤表面に存在すると、酸性物質はイオン反発し、また塩基性物質は吸着され、正常なクロマトグラムを得ることが困難となります。図-2は、塩基性物質であるピリジンの溶出をTSKgel ODS-80Tsと比較したクロマトグラムです。いずれの充填剤においても、ピリジンは正常に溶出していることが分かります。したがって、いずれのカラムもエンドキャップが十分に達成されていることが分かります。

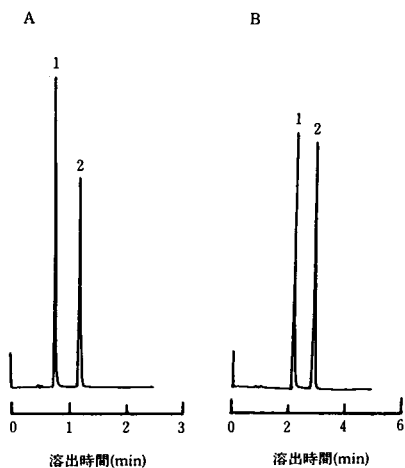


図-2 TSKgel Super-ODSとTSKgel ODS-80Tsとの溶出比較

カラム：A. TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)

B. TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.×15cm)

溶離液：A. 30%アセトニトリル、

B. 50%アセトニトリル

流速：1.0ml/min 温度：25°C

検出：UV(254 nm)、マイクロセル使用

試料：1. ピリジン、2. フェノール

### 4-4 金属キレート化合物の溶出

金属キレート化合物は、充填剤表面に存在する金属種(たとえば、鉄、あるいは銅イオン等)と金属錯体を形成することにより、試料の回収率が悪くなったり、ピーク形状が大きく歪んだりします。また、酸化還元を受けやすい物質などは、カラム内で分解され、ピーク形状の変化や回収率低下など、いずれの場合も再現性ある結果が得られなくなります。

TSKgel Super-ODSやTSKgel ODS-80Tsは、これら金属種と物質との相互作用を防ぐため、シリカゲル原料や製造工程から金属種が混入しない製造法で調整された高純度シリカゲルです。このため、金属キレート化合物や酸化性物質などのクロマトグラフィーにおいても、金属との相互作用がなく、良好な再現性が得られます。図-3は金属キレート化合物である8-キノリノールのクロマトグラムです。正常に溶出していることが分ります。

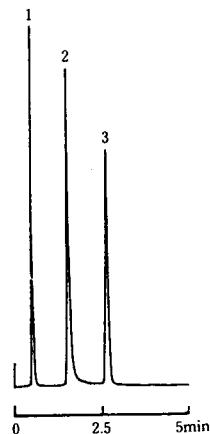


図-3 金属キレート剤のクロマトグラム

カラム；TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)

溶離液；20mMりん酸緩衝液(pH6.8)/アセトニトリル=70/30)

流速：1.0ml/min

温度：40°C

検出；UV(245nm)、マイクロセル使用

試料；1. ウラシル、2. 8-キノリノール、3. メチル安息香酸



## 5. 分離に及ぼす因子

分離に及ぼす因子は、通常の分析カラムに対しても同様ですが、カラム内容積が小さくなると、様々な因子がカラム効率に影響を及ぼします。ここでは、これらの因子について考えてみます。

カラム効率に影響を及ぼす因子は、大別すると以下の様になります。

- I) ボイドボリューム
- II) 検出器のレスポンス
- III) 試料注入量

I) は特に、カラム外での広がり、カラム内の広がりに分けられます。カラム内では、特にカラムの構造上の問題であり、TSKgel Super-ODSで採用しているカラムは、徹底的にローデッド化を意図し、設計されています。

カラム外では、①配管類、②検出器のセルボリュームが上げられます。

表-6 にインジェクター/カラム間、及びカラム/検出器間の配管容量のカラム効率に及ぼす影響を示します。表から明らかなように、配管容量が $2\mu\text{l}$ を越えると約10%、カラム効率が低下します。インジェクター/カラム間の方が、カラム/検出器間のボイドボリュームよりカラム効率に及ぼす影響が大きいことが分かります。

表-6 配管容量のカラム効率に及ぼす影響

インジェクター/カラム*			カラム/検出器**		
配管長さ (cm)	容量 ( $\mu\text{l}$ )	HETP ( $\mu\text{m}$ )	配管長さ (cm)	容量 ( $\mu\text{l}$ )	HETP ( $\mu\text{m}$ )
10	0.79	4.66	10	0.79	4.66
15	1.19	4.70	15	1.19	4.70
30	2.36	5.23	30	2.36	4.74
50	3.93	5.51	50	3.93	5.35
70	5.50	5.89	70	5.50	5.54

配管は内径0.1mmを用いた。

\* ; カラム/検出器間0.1mmI.D.×10cm、

\*\* ; インジェクター/カラム間0.1mmI.D.×10cm。

カラム ; TSKgel Super-ODS (4.6mmI.D.×5cm)

溶離液 ; 70%メタノール 流速 ; 1 ml/min

検出 ; UV (254nm)、マイクロセル使用

試料 ; フルオレン

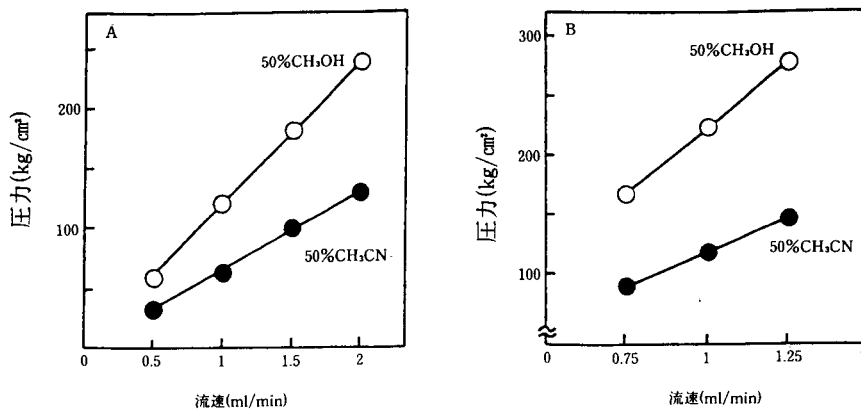


図-5 溶離液組成と圧力の関係

カラム : A. TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)

B. TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×10cm)

溶離液 : 50%CH<sub>3</sub>OH、50%CH<sub>3</sub>CN

流速 : 0.5~2.0ml/min

温度 : AMBIENT

表-7に検出器のセルボリュームのカラム効率に及ぼす影響を示します。用いた検出器は、2 $\mu$ lのマイクロセル (UV-8020)、10 $\mu$ lの標準セル (UV-8010) 及びローデッドボリュームタイプのセル (PTHアミノ酸分離用、UV-8010) を用いました。

ローデッドボリュームタイプのセルでは、カラム効率はマイクロセルの6%ダウンでしたが、標準セルでは、ヒートシンク部の容量が約30 $\mu$ lとなるため、70%も低下しました。このようにTSKgel Super-ODSのような短いカラムを用いる場合には、セルボリュームをできるだけ小さくすることが必要です。

II) の検出器のレスポンスも高速分離ではカラム効率に大きな影響を与えます。表-8に検出器のレスポンスとカラム効率の関係を示します。

時定数が大きくなると、分解能が悪くなり、理論段数は大きく低下することが分かります。したがって時定数は出来るだけ小さな値を選択する必要があります。図-6に各時定数で測定したクロマトグラムを示します。3secでは、ピーク幅が大きくなり、分離性能が極端に低下していることがわかります。

表-7 セルボリュームのカラム効率に及ぼす影響

セルボリューム ( $\mu$ l)	カラム段数 (理論段数の低下率) TP/5cmカラム
2 (マイクロセル)	10769 (0%)
10(ローデッドボリュームタイプ)	10150 (6%)
10 (標準セル)	3104 (71%)

溶離液；70%メタノール、試料；フルオレン

表-8 検出器のレスポンスとカラム効率の関係

時定数	ナフタレン理論段数 TP/カラム(低下率)	分離度 $\alpha$ (TOL/NAP)
50msec	10529 (0%)	13.37
1 sec	6996 (34%)	10.37
3 sec	3420 (68%)	6.87

溶離液；70%メタノール、試料；トルエン(TOL)、ナフタレン (NAP)

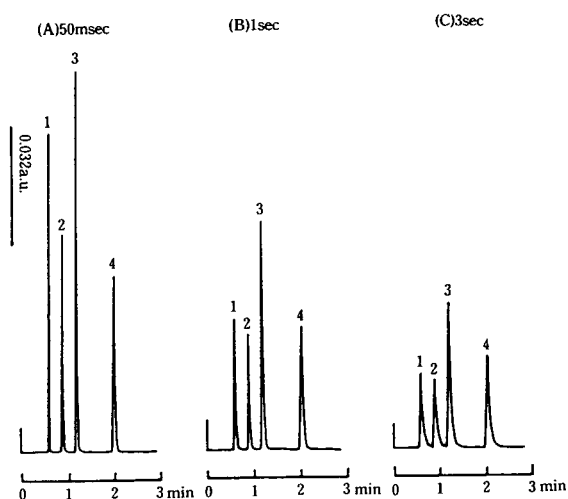


図-6 検出器の時定数の段数に及ぼす影響

カラム；TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)

溶離液；70%メタノール

流速；1.0ml/min

試料；フルオレン 温度；25°C

検出器；UV(254nm)、マイクロセル使用

時定数；(A)50msec、(B)1sec、(C)3sec

III) は、カラム性能を維持できる注入量の限度に関するものです。可能な注入量は、溶離液組成と試料溶液組成に関係します。図-7に試料注入量とカラム効率の関係を示しました。溶媒組成と同様の組成に溶解した試料を注入する場合、TSKgel Super-ODS (5 cmカラム)では、ゲル容量がTSKgel ODS-80Tsの1/3であること、及び比表面積が小さいことにより、カラム効率は少ない注入量で低下し始めています。TSKgel Super-ODSでは、10 $\mu$ l以下が、注入量の目安です。しかし、試料溶液の有機溶媒量を40% (溶離液の有機溶媒量が70%の場合) にすることにより、カラム効率の低下なしに5倍程度注入量を増やすことができることがわかります。

## 6. 分離例

図-8に薬物の高速分離例を示します。流速を1 ml/minから4 ml/minまで変化させた場合、分析時間が3分から1分以内へと高速分離が達成できます。各流速での分離能は、流速と共に徐々に低下していますが、分析時間は1/4となります。

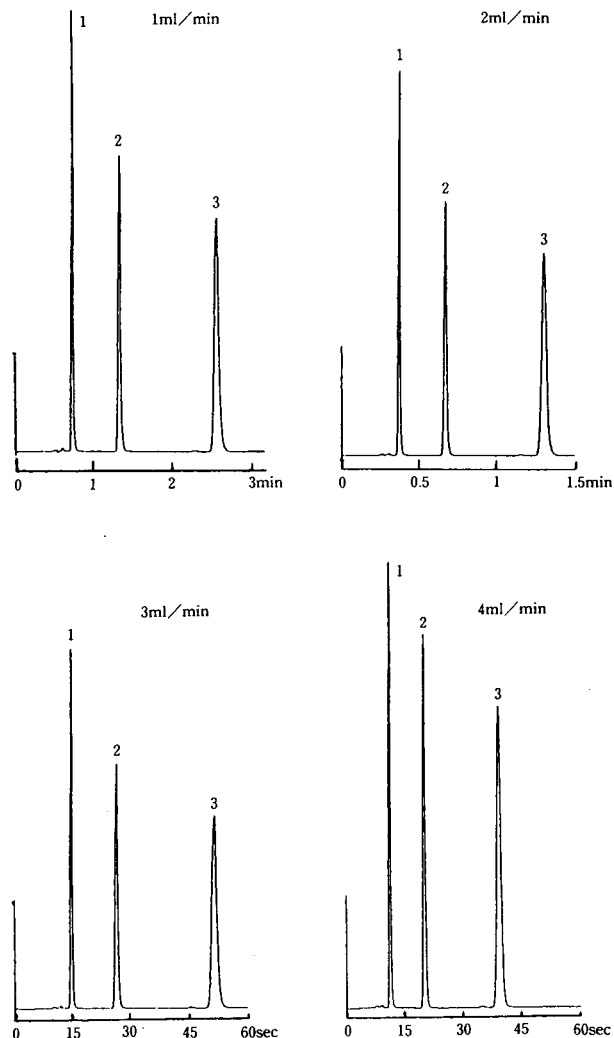


図-8 TSKgel Super-ODSにおける流速と分離の関係  
カラム; TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)  
溶離液; 20mM リン酸緩衝液(pH2.5)/アセトニトリ  
ル=80/20

流速; 1~4 ml/min 温度; 25°C  
試料; 1.カフェイン、2.サリチルアミド、3.フェナセチン  
検出; UV(254nm)、マイクロセル使用

流速	溶出位置(min)			分離能	
	試料 1	試料 2	試料 3	Rs(1/2)	Rs(2/3)
1ml/min	0.73	1.33	2.58	14.45	16.17
2ml/min	0.37	0.67	1.30	13.04	15.08
3ml/min	0.25	4.44	0.86	12.01	14.20
4ml/min	0.19	0.33	0.66	10.34	12.95

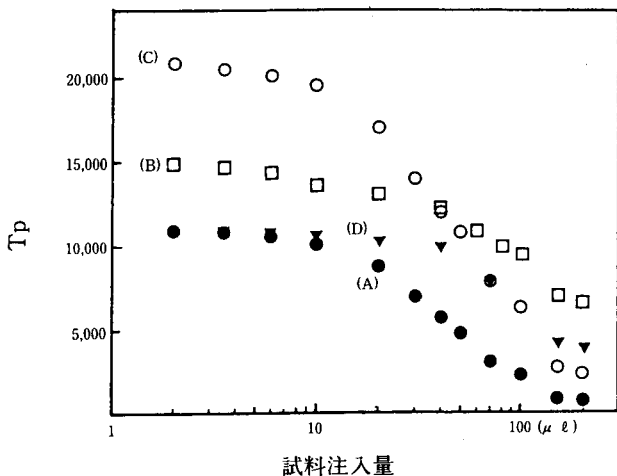


図-7 試料注入量とカラム効率(理論段数)

カラム; (A)、(D)TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)  
(B)TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.×15cm)  
(C)TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×10cm)

溶離液; 70%メタノール

流速; 1.0ml/min 温度; 25°C

検出; UV(254nm)

試料; ナフタレン(0.1 mg/ml)、(A)(B)(C)、70%メタノールに溶解、(D)40%メタノールに溶解、(0.1 mg/ml)



図-9はビタミンD<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>の分離例です。モノレーヤーのTSKgel ODS-80Tsでは十分な分離が達成されていませんが、ポリレーヤーのTSKgel Super-ODSでは、迅速で、しかも高分離が得られています。

図-10はペプチドの分離例です。ペプチドやタンパク質の超高速分離には、ポリマー系非多孔性逆相充填剤(2.5 $\mu$ m)であるTSKgel Octadecyl-NPRが使用されますが、充填剤の疎水性が弱く、特に親水性ペプチドの保持力が弱いという欠点がありました。一方、TSKgel Super-ODSは疎水性も充分強く多孔性であるため、親水性の高いペプチド類にも良好な分離を示しています。

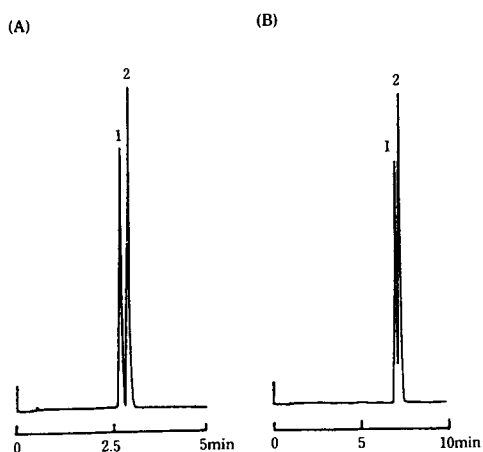


図-9 ビタミンD<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>の分離比較

カラム；(A)TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)

(B)TSKgel ODS-80Ts(4.6mmI.D.×15cm)

溶離液；メタノール

流速；1ml/min 温度；25°C

検出；UV(254nm)、マイクロセル使用

試料；1. ビタミンD<sub>2</sub>、2. ビタミンD<sub>3</sub>

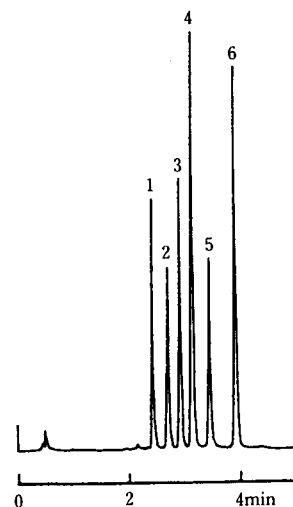


図-10 ペプチドの分離比較

カラム；TSKgel Super-ODS(4.6mmI.D.×5cm)

溶離液；13mM HClO<sub>4</sub>/アセトニトリル

アセトニトリル10%から50%まで10分間のリニアグラジエント

流速；2ml/min 温度；25°C

検出；UV(220nm)、マイクロセル使用

試料；1. オキシトシン、2.  $\alpha$ -エンドルフィン、3. ボンベシン、4. Leu-エンケファリン、5.  $\gamma$ -エンドルフィン、6. ソマトスタチン  
いずれも0.1~0.2 $\mu$ g注入。

## 7. HPLCシステム等の注意点

5項で示したように、TSKgel Super-ODSの性能を充分引き出すためには、HPLCシステム等に関して若干の注意が必要です。表-9にその注意点を示します。

## 8. おわりに

TSKgel Super-ODSはシリカゲルを微粒子化し、高速・高分離性能化を達成できる逆相充填カラムです。高強度の高純度シリカゲルをベースとし、C<sub>18</sub>層をポリレーヤーで導入した充填剤であり、残存シラノール基及び金属の影響の少ない分離が得られます。

よりよくTSKgel Super-ODSの性能を引き出すためには、出来る限りデッドボリュームを小さくしたシステムでの分離を行って下さい。カラム外での広がり、分離性能を低下させる大きな原因となります。

表-9 TSKgel Super-ODS 使用上の注意点

HPLシステムには以下の点に注意が必要です。

- ※ 配管、検出器等でのピークの広がりを迎える。
- ※ サンプルがオーバーロードしないようにする。
- ※ 分析時間が短い（5分以内）ので、検出、データ処理の設定に注意する。

### 配管：

0.1mmID配管を使用。長さ30cm以下が望ましい  
接続パイプセット・Lタイプが使用可能；接液面（両末端）がファインカット仕上げになっています。  
（品番018686：¥10,000、0.1mmID×40cm、2組入り）

0.1mmID配管が必要な部分

- a) インジェクションバルブ/カラム（ガードフィルタ）入口間  
あるいは、オートサンブラ/カラム（ガードフィルタ）入口間
- b) カラム出口/検出器入口間（検出器入口側配管）

### グラジェントミキサ：

スタティックミキサA（品番08407）を使用する場合、5～20分グラジェント  
ダイナミックミキサ（品番08410）を使用する場合、10～20分グラジェント

### オートサンブラ（サンプル注入）：

サンプル注入量は、5～10 $\mu$ l。サンプル濃度は、50 $\mu$ g/ml程度

### カラム：

ガードフィルタを必ず接続し、カラムを保護する。  
（ガードホルダ：品番18206、Gフィルタ：品番18207）  
ガードホルダには、接続用配管セットが標準付属品となっています。

### カラムオープン：

25 $^{\circ}$ C以上で使用可能；40 $^{\circ}$ Cでは、室温より圧力減少、理論段数は向上します。

### 検出器：

UV検出器は、マイクロフローセルあるいは、低ボリューム型セルが必要です。

UV-8020：マイクロフローセル（品番17545）

標準セル（入口側配管をLタイプ配管に交換する）

UV-8010：ローデッドボリュームタイプ（品番16590）

標準セル（入口側配管をLタイプ配管に交換する）

レスポンス：50msecまたは150msecに設定

### データ処理：

サンプリングピッチ：50msec