

高速液体クロマトグラフィー用充填カラム

ULTRON

技術資料 No.5

光学分割クロマトグラフィー用充填カラム,

ULTRON ES-OVM (オボムコイド)

— 目 次 —

	ページ
1 はじめに	2
2 pH とキャパシティーファクターの関係	2
3 分析温度の影響	2
4 有機溶媒に対する安定性	3
5 移動相緩衝液の種類と分離能	3
6 内径 6mm φ カラムによる分離の向上	4
7 セミ分取カラム	5 ~ 6
8 医薬品の分離例	7
9 仕様および価格	7



信和化工株式会社

1. はじめに

ULTRON ES-OVM は、逆相タイプで使いやすい、ピーク形状がよい、微量代謝物質の研究に供しやすい、分析対象物質の適用範囲が広い、など多くの優れたメリットがあり需要が増大しております。

「技術資料 4 Ver.2」では充填カラムの基本的特性について説明しましたが、その後検証を重ねました項目についてご説明致します。

2. pH とキャパシティーファクターの関係

酸性化合物は、pH の増加に対してキャパシティーファクターが減少し、塩基性化合物は逆に増加します。

移動相 pH をオボムコイドの等電点 (3.9~4.3) 以下にしますと、酸性化合物のキャパシティーファクターが急激に減少します (図 1 参照)。

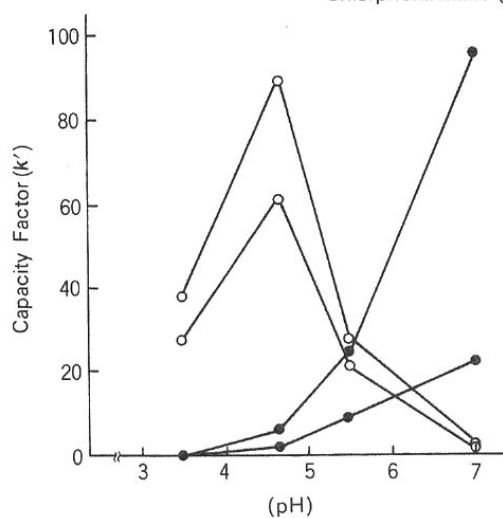
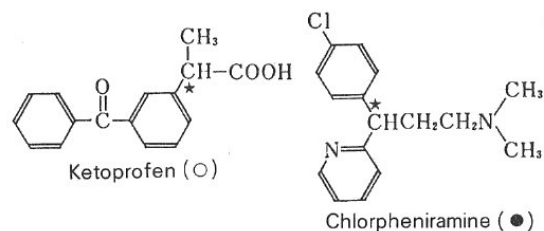
ULTRON ES-OVM の使用可能な pH 範囲は 3~7.5 です

3. 分析温度の影響

分析温度を 5~40°C に変化させ、保持時間、理論段数、分離度に与える影響を検証しました。

理論段数は、40°C において最大で、5°C の約 4 倍となり、分離度は 20°C 付近で最大となりました (表 1 参照)。

ULTRON ES-OVM は、40°C においても変性することなく使用できます。



Mobile phase : 20mM-KH₂PO₄ / C₂H₅OH = 100/ 5
Flow rate : 1.0 mL/min.
Detector : UV-220nm (0.08AUFS)

	Column Temperature				
	5°C	11°C	19°C	28°C	40°C
<i>k</i> 1	18.67	11.49	7.79	4.97	2.59
<i>k</i> 2	23.94	14.59	9.68	6.05	3.06
α	1.28	1.27	1.25	1.22	1.18
<i>N</i> 1	446	722	1059	1224	1899
<i>N</i> 2	380	563	796	890	1282
<i>R</i> s	1.12	1.35	1.44	1.21	1.08

Column : **ULTRON ES-OVM** (4.6mm ϕ \times 150mm)
Mobile phase : 20mM-KH₂PO₄ (pH=4.6)/C₂H₅OH = 100/10
Flow rate : 1.0 mL/min.
Detector : UV-220nm (0.08AUFS)
Sample : Propranolol

図 1 pH とキャパシティーファクター

4. 有機溶媒に対する安定性

アセトニトリルおよびエタノールの 50%水溶液を 0.5mL/min で 50 時間直接カラムに流して、随時光学分割能を調べましたが、変化は全くありませんでした。

疎水性の強い試料は、有機溶媒を 50%まで添加して分析することができます。また、吸着した試料の洗浄にも使用できます。

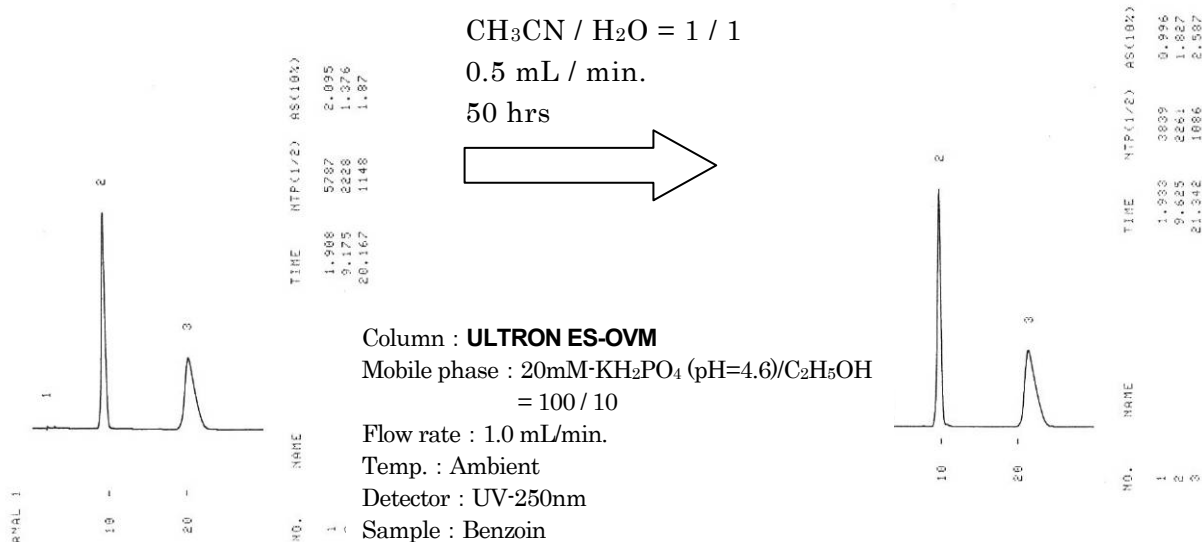


図2 通液前のクロマトグラム

図3 通液 50hrs 後のクロマトグラム

5. 移動相緩衝液の種類と分離能

光学異性体の分離は移動相の選択が重要です。一般的には 20mM-KH₂PO₄ 水溶液あるいはリン酸緩衝液 (k_1 / k_2) に有機溶媒を添加した移動相を使用しますが、他の緩衝液 (ギ酸、酢酸、クエン酸) についてもリン酸緩衝液とほぼ同等の分離が得られることを確認しました。

また、ギ酸アンモニウム緩衝液でランニングしましたが光学分割能には変化はありませんでした。

緩衝液の種類	α	R_s
20mM リン酸二水素カリウム水溶液 pH=4.6	2.66	7.47
20mM ギ酸-ギ酸アンモニウム pH=4.6	2.55	6.09
20mM 酢酸-酢酸ナトリウム pH=4.6	2.75	6.40
20mM クエン酸-リン酸水素ナトリウム pH=4.6	2.49	6.42

分析条件は図 2 に同じ

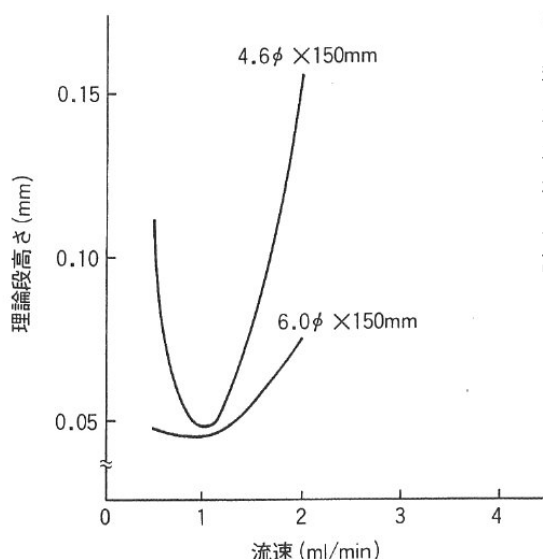
6. 内径 6mmφカラムによる分離の向上

内径 4.6mmφ、及び 6.0mmφカラムで移動相の流量を変え検証しました。分離が不十分な場合には、カラムボリュームを大きくした内径 6mmφカラムの選択が効果的です。

◎カラムボリュームが大きいほど *R_s* 値は大きくなります。

◎流速 1mL/min の場合、6mmφ×150mm カラムの圧力は、4.6mmφ×150mm カラムの 60~70%程度になります。

6.1 流速と HETP の関係



移動相：20mM KH₂PO₄ (pH=4.6)/C₂H₅OH = 100/10

流速：1.0 mL / min.

温度：25 °C

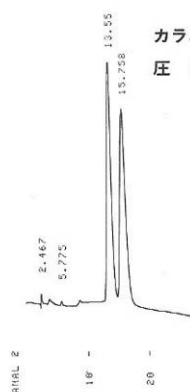
検出：UV-250nm

注入量：0.4μL (1.5mg/mL)

試料：Benzoin

図 4 流速と HETP の関係

6.2 カラムサイズによる分離の比較



カラムサイズ：4.6φ × 150mm
圧力：110kg/cm²

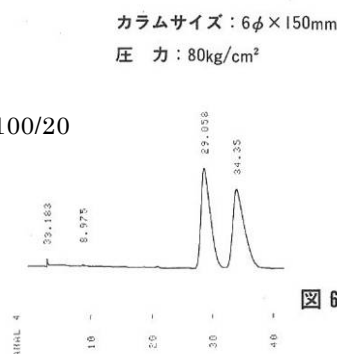
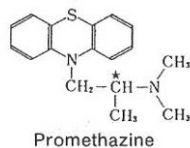
カラム：ULTRON ES-OVM

移動相：20mM KH₂PO₄ (pH=4.6)/C₂H₅OH = 100/20

流速：1.0 mL / min.

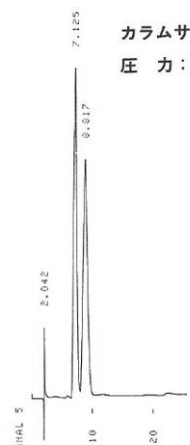
温度：25 °C

検出：UV-220nm



カラムサイズ：6φ × 150mm
圧力：80kg/cm²

図 6



カラムサイズ：4.6φ × 150mm
圧力：95kg/cm²

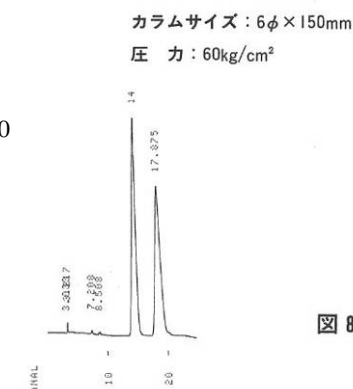
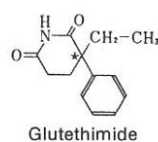
カラム：ULTRON ES-OVM

移動相：20mM KH₂PO₄ (pH=4.6)/C₂H₅OH = 100/10

流速：1.0 mL / min.

温度：25 °C

検出：UV-220nm



カラムサイズ：6φ × 150mm
圧力：60kg/cm²

図 8

7. セミ分取カラム

ULTRON ES-OVM Prep はアミノ化シリカゲル (120Å、10μm) をベースにしています。

タンパク質系のリガンドは、アフィニティータイプに属しますので、吸着サイトが小さく、負荷量が少ない傾向にあります。ラセミ体の試料は純度が高く、夾雑物が少ないため、 R_s 値の大きな試料は高純度で分取することが可能になります。

7.1 流速と理論段数および分離度の関係

流速の増加と共に理論段数と分離度はゆるやかに低下してきます (図 9 参照)。分析カラム 4.6φ で 1mL/min の場合、20φ では約 19mL/min の流速に相当しますが、実際は R_s 値と分取時間を考慮して決める必要があります。

7.2 試料希釈溶媒の影響

分取カラムに試料溶液を大量に注入する場合、試料溶媒の種類によって理論段数やピーク形状に影響を及ぼす場合があります。

試料を良溶媒で溶解、希釈する場合や、貧溶媒で希釈した時の理論段数への影響を図 10 に示しました。

Propranolol は水やアルコールに溶解しますが、アルコールの方が良溶媒のため、注入容量が 50μL 以上で理論段数の低下が起こります。水で希釈した場合には 100μL 注入しても理論段数の低下は認められません。

これらのことから、試料は良溶媒で溶解させ、さらに溶出力の弱い溶媒で希釈して注入することができれば一番望ましいと思われれます。

カラム : ULTRON ES-OVM Prep
(20φ × 250mm)
移動相 : 20mM KH₂PO₄ (pH=4.6)/C₂H₅OH = 100/10
温度 : 25 °C
検出 : UV-220nm (0.04AUFs)
試料 : Chromezanone

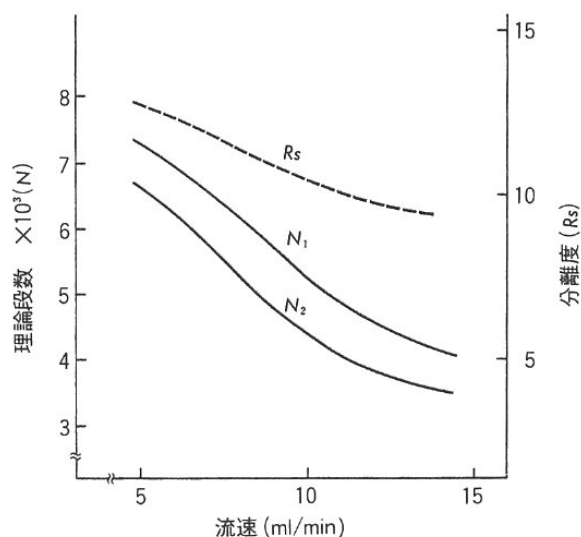


図 9 流速と N、 R_s の関係

カラム : ULTRON ES-OVM Prep
(20φ × 250mm)
移動相 : 20mM KH₂PO₄ (pH=4.6)/C₂H₅OH = 100/20
流速 : 9mL/min
温度 : 25 °C
検出 : UV-220nm
試料 : Propranolol
絶対注入量 0.8μg (一定)

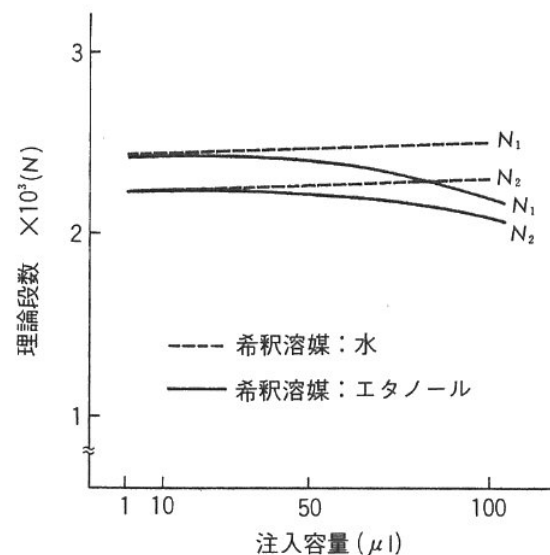


図 10 試料希釈溶媒と理論段数

7.3 分離度と試料負荷量の関係

試料最大負荷量は分離度 (R_s) によって大きく異なってきますので、分析カラムで極力 R_s 値が大きくなるような分析条件の探索が重要になってきます。

表 3 に R_s が 1.06 の場合と R_s が 3.17 の場合を例にとって最大負荷量の目安を示しています。また、図 11~15 にクロマトグラムを示します。

表 3 R_s 値と最大負荷量

分離度(R_s)	完全分離(mg)	最大負荷量(mg)
1.06	—	0.2
3.17	1	2

カラムサイズ 20φ×250mm、分離度は負荷量が 10~30μg での値です。
最大負荷量は分離の限界値です。

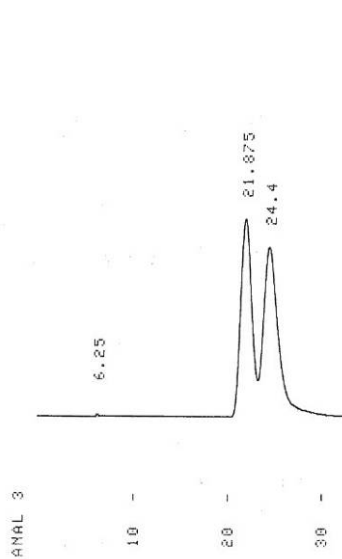


図 11 Propranolol 10μg

カラム : ULTRON ES-OVM Prep
(20φ×250mm)
移動相 : 20mM KH₂PO₄ / C₂H₅OH = 100/20
流速 : 9mL/min
分析圧 : 60kg/cm²
温度 : 25 °C
検出 : UV-220nm
試料 : Propranolol

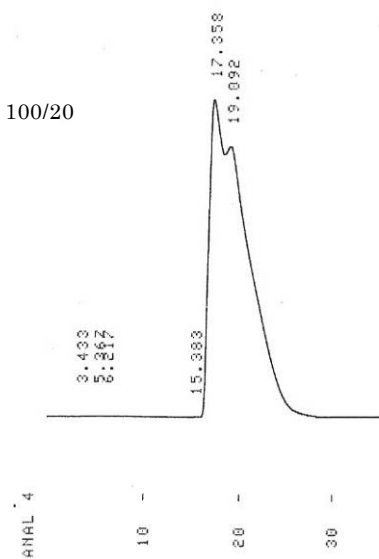


図 12 Propranolol 0.2mg

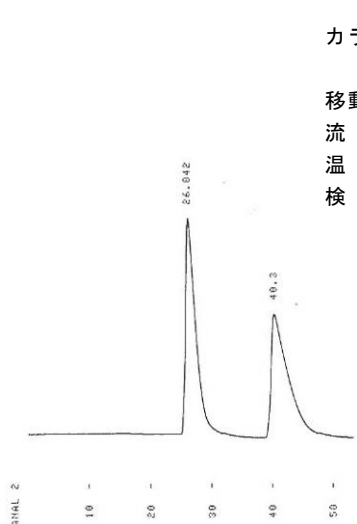


図 13 Bunitrolol 30μg

カラム : ULTRON ES-OVM prep
(20φ×250mm)
移動相 : 20mM KH₂PO₄ (pH6.5) / C₂H₅OH = 100/3
流速 : 9.9mL/min
温度 : 25 °C
検出 : UV-220nm

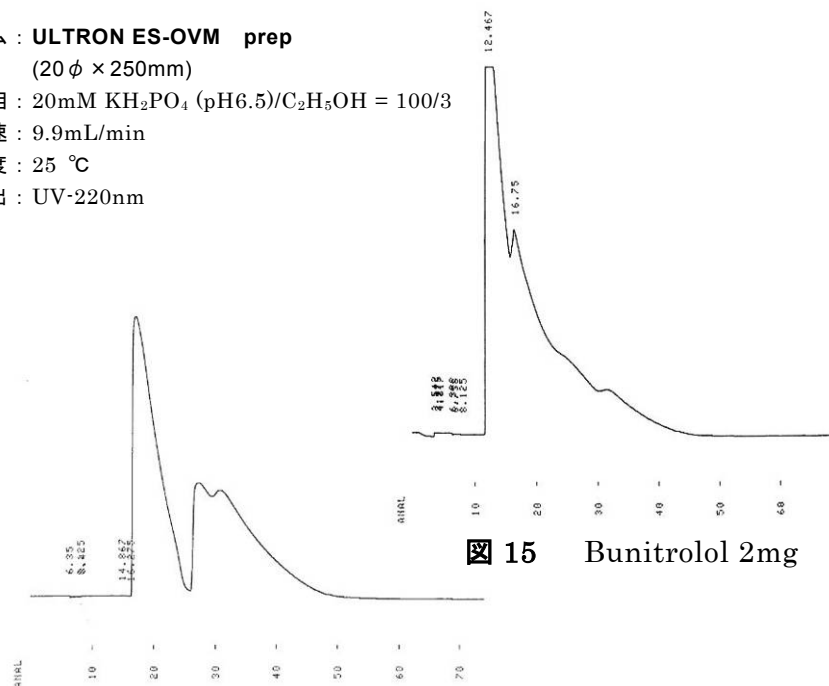


図 14 Bunitrolol 1mg

図 15 Bunitrolol 2mg

8. 医薬品の分離例

表 4 医薬品の分離度

Substance	<i>R_s</i>	Substance	<i>R_s</i>	Substance	<i>R_s</i>
Acetyl pheneturide	2.74	Chlorpheniramine	4.09	Mephobarital	1.70
Alimemazine	6.06	Chlorprenaline	2.34	Methylphenidate	1.13*
Alprenolol	1.09*	Dimethindene	4.33	Oxprenolol	1.38
Bay K-8644 (Dihydropyridine Derivative)	5.92	Disopyramide	2.04	Pindolol	2.04
Benproperine	3.27	Flurbiprofen	1.27	Profenamine	3.31
Benzoin	7.71	Glutethimide	1.36	Proglumide	1.76
Biperiden	3.17	Glycopyrronium bromide	1.73	Promethazine	1.42
Bunitrolol	3.08	Homochlorcyclizine	3.04	Propranolol	1.30
Chloperastin	2.85	Hydroxyzine	2.15	Tolperisone	3.91
Chlormezanone	6.48	Ibuprofen	1.33	Trihexyphenidyl	5.16
Chlorphenesin	2.23	Ketoprofen	1.99	Trimipramine	3.69
		Meclizine	3.71	Verapamil	1.49

* Column Size 6.0φ×150mm

9. 仕様および価格

品名	平均粒子径(μm)	カラムサイズ(mm)	用途	定価(円)
ULTRON ES-OVM ナローボアカラム	5	150×2.0 I.D.	血中薬物分析	180,000
ULTRON ES-OVM	5	150×4.6 I.D.	一般分析用	180,000
〃	5	150×6.0 I.D.	高分離用	250,000
ULTRON ES-OVM・G	5	10×4.0 I.D.	ガードカラム	32,000
ULTRON ES-OVM	10	250×4.6 I.D.	セミ分取検討用	165,000
ULTRON ES-OVM Prep	10	250×20.0 I.D.	セミ分取用	1,650,000
ULTRON ES-OVM Prep・G	10	15×8.0 I.D.	セミ分取ガードカラム	66,000

※お問い合わせ下さい

●カラムフィッティングはウォーターズ型と互換性があります。

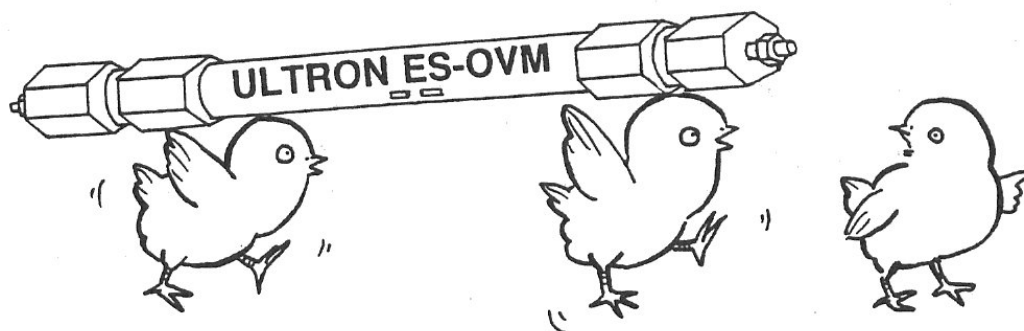
●カラム封入液は水 / 2-プロパノール = 2 / 1 水溶液です。

●他のカラムサイズはお問合せ下さい。

※仕様は改良のため、予告なく変更することがありますのでご了承下さい。

ULTRON 技術資料

- No.1 ポリマー系有機酸専用カラム ULTRON PS-80H
- No.2 ポリマー系糖,糖アルコール専用カラム
ULTRON PS-80N,PS-80C,PS-80P
- No.3 非水系 ULTRON GPC カラム
- No.4 光学分割カラム ULTRON ES-OVM カラム
Ver.2
- No.5 光学分割カラム ULTRON ES-OVM カラム
- No.6 光学分割カラム ULTRON ES-OVM
(ナローボアカラム)
- No.7 光学分割カラム ULTRON ES-OVM カラム



信和化工株式会社

〒612-8307 京都市伏見区景勝町50番地2

TEL 075-621-2360 FAX 075-602-2660

e-mail: info@shinwa-cpc.co.jp

U R L : <http://shinwa-cpc.co.jp/>