

## Super Edge Empty Mini Column

### エンプティミニカラムの汎用性と充填後のカラムの性能評価- 1

JNC のエンプティミニカラムは様々なメーカーのクロマトグラフィー担体を充填することができます。このデータファイルでは実際に充填しパックドカラムを調製してその評価を行った結果を紹介し、今回紹介するデータは、充填したカラムの充填品質を理論段数と対称性ファクター( $A_s$ )により評価した結果です。

#### 1 各種クロマトグラフィー担体のパックドカラムの充填品質

Cellufine™はセルロースを基材としています。この他にもアガロース、ポリマーが基材として利用され各社から販売されています。これら多様な基材のクロマトグラフィー担体をエンプティミニカラムにカラムに充填し、その充填が最適にされているかを評価しました。

#### 充填方法

充填は、スターターキットに同封の充填ツールを使用してマニュアルに従って行いました。マニュアルは、*Super Edge* のWebサイトから入手することができます。

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/se/index.html>

#### 材料

下記に示した各種のクロマトグラフィー担体を代表例としました。

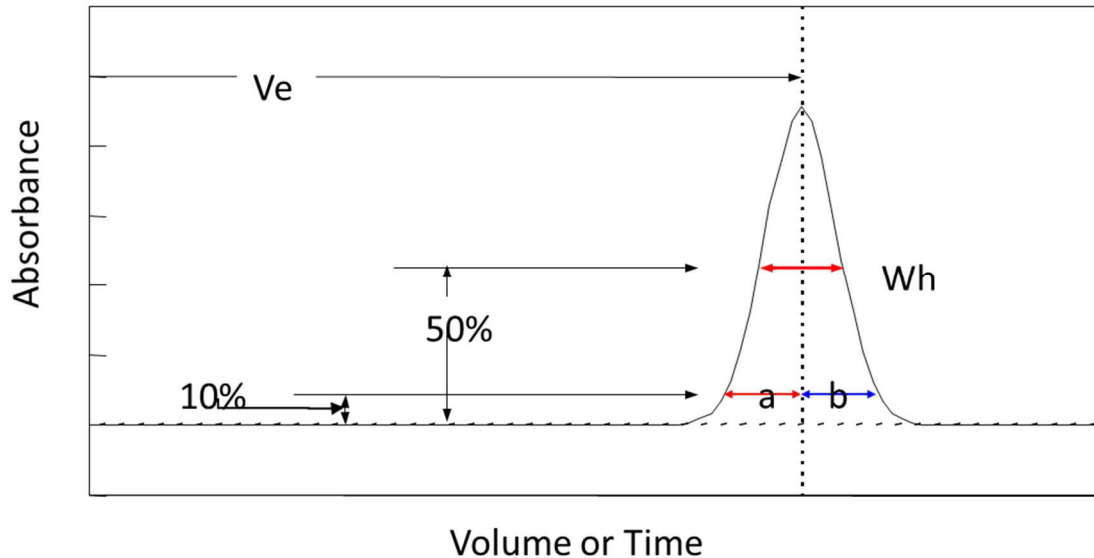
|     |                     |               |         |         |
|-----|---------------------|---------------|---------|---------|
| JNC | Cellufine Sulfate   | dp70 $\mu$ m  | アフィニティー | セルロース基材 |
| JNC | Cellufine MAX Butyl | dp90 $\mu$ m  | 疎水性相互作用 | セルロース基材 |
| JNC | Cellufine MAX S-h   | dp90 $\mu$ m  | 強カチオン交換 | セルロース基材 |
| G 社 | S-CEX(1)            | dp30 $\mu$ m  | 強カチオン交換 | アガロース基材 |
| G 社 | S-CEX(2)            | dp50 $\mu$ m  | 強カチオン交換 | アガロース基材 |
| G 社 | S-CEX(3)            | dp75 $\mu$ m  | 強カチオン交換 | アガロース基材 |
| G 社 | Q-AEX(4)            | dp90 $\mu$ m  | 強アニオン交換 | アガロース基材 |
| T 社 | Sulfate(5)          | dp45 $\mu$ m  | カチオン交換  | ポリマー基材  |
| T 社 | S-CEX(5)            | dp75 $\mu$ m  | カチオン交換  | ポリマー基材  |
| T 社 | Butyl-HIC(5)        | dp100 $\mu$ m | 疎水相互作用  | ポリマー基材  |
| B 社 | Q-AEX(6)            | dp50 $\mu$ m  | 強アニオン交換 | ポリマー基材  |

#### 測定方法

装置は市販のクロマトグラフィーシステムを使用した。流速は30cm/h、ピークは UV あるいは電気伝導度計でモニターした。ピーク形成物質はカラム体積の1%をインジェクションした。

#### 計算方法

理論段数と対称性ファクターは、マーカとなる物質の溶出ピークから計算しました。計算方法は以下に  
しめしましたが、クロマトグラフィーシステムのソフトウェアでもこれらの値が得られる場合がありますので  
適宜利用する事が可能です。



|   |      |  |
|---|------|--|
| <b>Calculation</b><br><br>$HETP = L/N$<br>$N = 5.54 \times (Ve/Wh)^2$<br>$As=b/a$ | L    | column length (cm or m)                                |
|   | Ve   | elution time or volume                                 |
|   | Wh   | half width of peak                                     |
|   | a,b  | peak width of 10% of peak height , (a) front, (b) rear |
|   | Note | Ve, Wh and a,b were should same dimension              |

このデータファイルでは、カラム効率の比較のために1m当たりの理論段数(N/m)と粒子当たりの理論段数高さ(RPH)を計算しました。

$$N/m = N/(m/\text{カラム長さ}m)$$

$$RPH = HETP/dp$$

: RPH(Reduction of plate height) , dp(粒子の平均径)

## 結果

Table1は充填したカラムの理論段数と対称性ファクターの測定結果のまとめです。

| Table1 Performance of packed column                           |                     |          |                     |              |        |        |           |                          |
|---|---------------------|----------|---------------------|--------------|--------|--------|-----------|--------------------------|
| Packed with various resins into <i>Super Edge</i> Mini Column |                     |          |                     |              |        |        |           |                          |
| Manufa<br>cturer  | Product name        | Particle | HETP measurement    |              |        |        |           | Flow rate<br>measurement |
|   |                     | diameter | Injection<br>sample | Mobile Phase | Column | Plates | Asymmetry | Flow rate at 0.4MPa      |
|   |                     | dp       | 1%CV                | Flow 30cm/h  | size   | /meter |           | (with 0.2MPa F.R*.)      |
|   |                     | μm       |                     |              |        | N/m    | As        | mL/min                   |
| JNC   | Cellufine Sulfate   | 70       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 6166   | 1.0       | 6.5                      |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 6929   | 1.2       | 11.5                     |
| JNC   | Cellufine MAX Butyl | 90       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 6629   | 0.9       | 14.0                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 6671   | 0.9       | 15.0                     |
| JNC   | Cellufine MAX S-h   | 90       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 5830   | 0.9       | 11.0                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 7076   | 1.1       | 14.0                     |
| G   | S-CEX(1)            | 30       | 1M-NaClq            | 0.1M-NaClq   | 1mL    | 12056  | 0.9       | 5.0                      |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 11342  | 1.4       | 10.0                     |
| G   | S-CEX(2)            | 50       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 9493   | 1.0       | 7.0                      |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | -      | -         | -                        |
| G   | S-CEX(3)            | 75       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 7012   | 1.1       | 16.0                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 7971   | 1.3       | 18.0                     |
| G   | Q-AEX(4)            | 90       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 5137   | 0.9       | 11.5                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 6338   | 1.1       | 13.5                     |
| T   | Sulfate (5)         | 45       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 8030   | 1.2       | 11.0                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | -      | -         | -                        |
| T   | S-CEX(5)            | 75       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 7007   | 1.2       | 15.0                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 7013   | 1.2       | 15.5                     |
| T   | Butyl-HIC(5)        | 100      | 1M-NaClq            | water        | 1mL    | 5984   | 1.2       | 18.0                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 5100   | 1.3       | 16.0                     |
| B   | Q-AEX(6)            | 50       | 2%-acetone          | water        | 1mL    | 8575   | 1.0       | 10.5                     |
|   |                     |          |                     |              | 5mL    | 8621   | 1.2       | 18.0                     |

(1) polystyrene/divinyl benzene polymer matrix (4)Highly cross-linked agarose  
 (2) high-flow agarose base matrix/ polymer-grafted ligand (5)hydroxylated methacrylic polymer  
 (3)Highly cross-linked agarose with dextran surface extender (6)hydroxylated methacrylic polymer  
 \*F.R. : flow restrictor

理論段数はカラムが適正に充填されたかを判断する指標として使うことができます。Table1にはカラム長さ1m当たりの理論段数(N/m)を示しました。5,000 から 12,000 のオーダーで様々な値となっております。N/m は粒子径の大きさに依存する事が知られており、粒子径が小さい方が大きくなります。今回の測定でもFig. 1に示したように粒子径とN/mに相関がみられます。

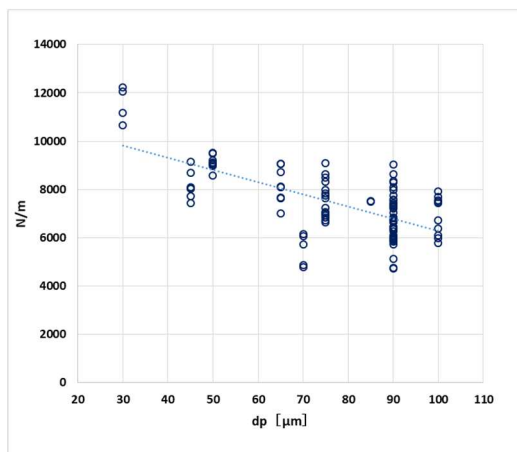


Fig. 1 粒子径(dp)とN/mの関係

G社のQ-AEX(4)の理論段数の目安によれば3,000N/mを超えていれば良いとされており、今回の測定値の5,000は十分に良い状態であると言えます。

還元理論段数は粒子当たりの理論段数高さで一般的に3以下、プロセス用の大型カラムでは3~5であれば良い状態あると判断できます。そこで本データファイルでもPRHを求めて比較しました(Fig. 2)

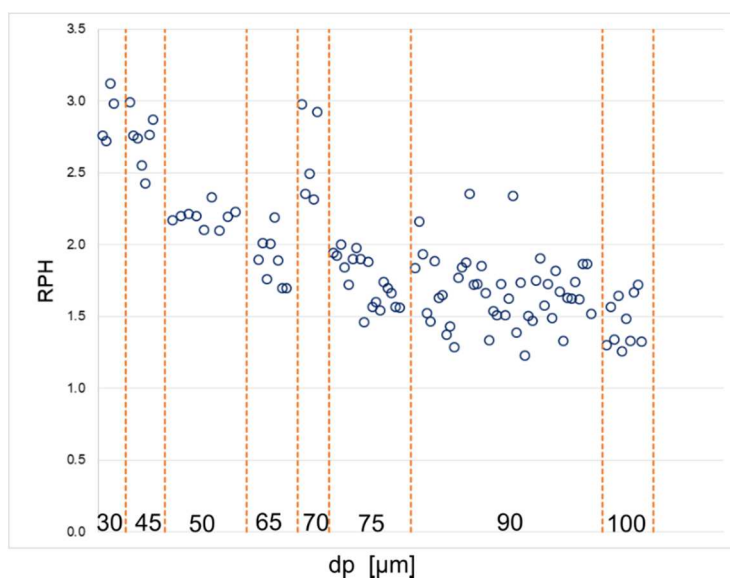


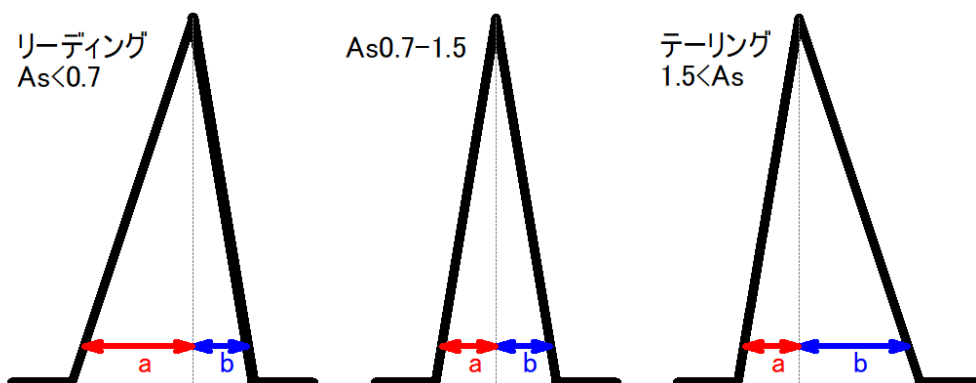
Fig.2 還元理論段数(RPH)と粒子径(dp)の関係

還元理論段数は粒子径が小さいと大きくなる傾向がみられましたが、RPH3以下となっており良好な状態で充填できていることが確認できました。

## 対称性ファクター(As)

溶出ピークはシャープで左右対称が望ましいです。理論段数はシャープさの度合いを示しますが、Asはピークの

対称性を表しています。As は理想的には1ですが、0.7～1.5の範囲であれば良い状態だと言われています。



$As = b/a$   $a \gg b$  の時はリーディング パッキング圧力が高すぎる

$b \ll a$  の時はテーリング パッキング圧力が低い

この他の原因として、移動相とピーク測定用物質の組み合わせでリーディングする場合や、クロマトグラフィー担体とピーク測定用物質が相互作用するとテーリングが見られる事があるので、測定の条件設定の検討が必要な場合がある。多くの場合はアセトン／水(あるいはバッファー)で測定可能ですが、その他に塩類を用いて電気伝導度でピークをモニターする方法、あるいは紫外部に吸収のある硝酸塩などを用いてUVでピークをモニターする方法もあります。

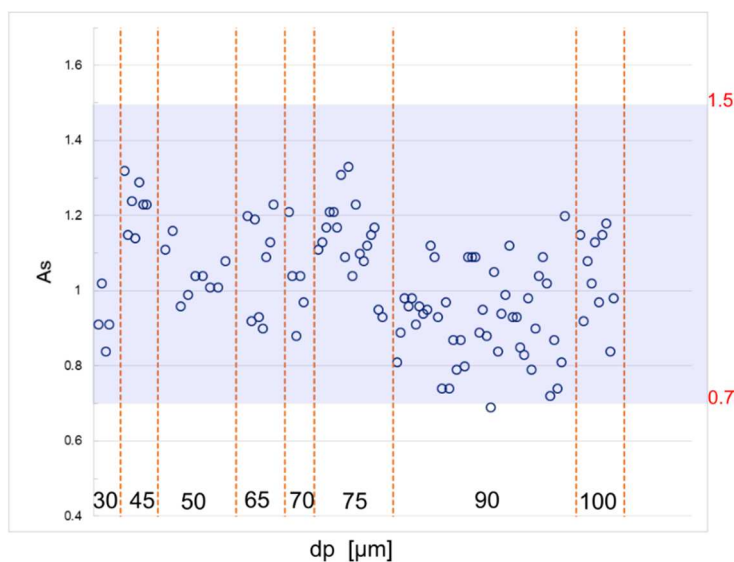


Fig.3 対称性ファクター(As)と粒子径(dp)の関係

Fig.3はAsとdpの関係を示した図です。理論段数とは異なり粒子径との相関はみられませんでした。色塗した範囲が0.7～1.5を表し、今回の測定結果は範囲内に収まっており、良好な充填状態です。またFig.4に実際のクロマトグラムの例を示しました。4回の繰り返しを行い、ベースラインをずらしてグラフ化しました。ピーク形状、再現性ともに問題無いことがわかります。

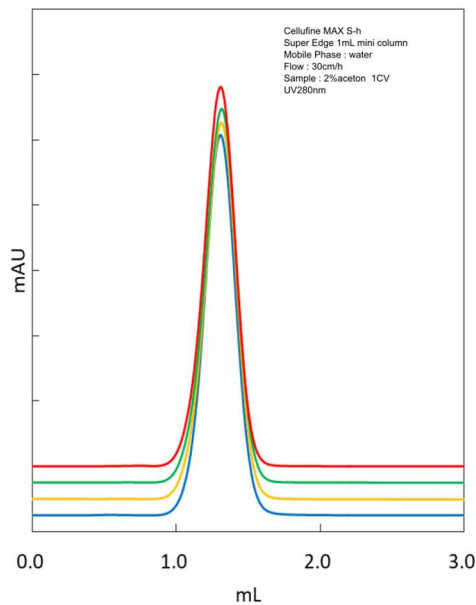


Fig.4 Cellufine MAX S-h/Super Edge 1mL カラムのアセトンピーク形状

## まとめ

|         | Column Vol. | Theoretical plates |        | Reduction theoretical plate |        | Symmetry factor |        |
|---------|-------------|--------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------|--------|
|         |             | N/m                | ± S.D. | RPH                         | ± S.D. | As              | ± S.D. |
| Average | 1mL         | 7425               | ± 1400 | 1.89                        | ± 0.5  | 1.02            | ± 0.15 |
|         | 5mL         | 6754               | ± 1262 | 18.2                        | ± 0.4  | 1.15            | ± 0.16 |
| MAX     | 1mL         | 12239              |        | 3.12                        |        | 1.33            |        |
|         | 5mL         | 11342              |        | 3.02                        |        | 1.47            |        |
| MINI    | 1mL         | 4716               |        | 1.23                        |        | 0.69            |        |
|         | 5mL         | 4418               |        | 1.33                        |        | 0.73            |        |
| N       | 1mL         |                    |        | 107                         |        |                 |        |
|         | 5mL         |                    |        | 65                          |        |                 |        |

JNCの *Super Edge* エンプティミニカラムへ各種クロマトグラフィー担体を充填し高品質なパックドカラムを調製する事ができた。

- エンプティミニカラムスターターキットに同封されている充填ツールを使って、簡単に再現性のある充填が可能である
- 粒子径 30-100  $\mu\text{m}$ 、セルロース、アガロース、ポリマー由来の様々な基材でかつ、アフィニティー、疎水性相相互作用、イオン交換の吸着系モードのクロマトグラフィー担体の充填が可能である。
- パックドカラムは、還元理論段数(RPH)3以下、As0.7~1.5 の範囲内となり高品質な充填が可能である。