

2um粒子径充填カラムによるHPLCからUHPLCへのメソッド移管

○堀切 智¹

(野村化学株式会社)

はじめに

逆相系において高極性化合物の保持と分離は非常に困難である。別の手段として親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を使用するケースも多いが、平衡化の時間や再現性という点では多くの時間を必要とする。近年、2um充填剤とUHPLCの組み合わせにより、その分析時間は大幅に短縮されるようになった。そのため、平衡化に要する時間が分析時間より長く必要になってしまうなどのデメリットも起こりうる。そこで、弊社はC18カラムにて高極性化合物の保持と分離に有益なカラムの開発を行った。水系100%移動相での使用も可能となるこのカラムは保持時間の増大を図ることができるために、有機溶媒を取り入れることも可能となり、LC/MSへの感度向上も期待できる。本研究において、生体試料をターゲットにHPLCからUHPLCへのメソッド移管および、これを可能とするカラム外の影響も検討したので報告する。

UHPLCメソッド移管への手順

本研究におけるメソッド移管は、オリジナルメソッドとして、粒子径5um、カラムサイズ4.6x150mmにて検討を行う。その後、システムに付属するソフトウェアによりUHPLC高速化プログラムを用いて移管を行った。

Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x150mm)
によるオリジナルメソッドの開発

上記で得られた解析結果をもとにソフトウェアを用いて
UHPLCメソッドを作成

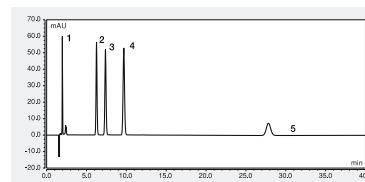
Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x50mm)
によるUHPLCへのメソッド移管を実行

UHPLCメソッド移管までのフローチャート



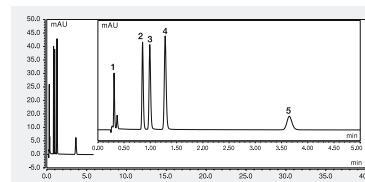
■本研究にて用いたシステム
Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish H
■ソフトウェア
Chromelcon® 7

プリント誘導体におけるUHPLCメソッド移管例



オリジナルメソッド

Conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x150mm)
Mobile phase : 0.1% TFA
Flow rate : 1.0mL/min
CC Temperature : 30°C
Detection : UV20nm
Sample : 1. Allantoin 2. Hypoxanthine
3. Uric acid 4. Xanthine 5. Inosine
Injection volume : 2.0uL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume : 10uL



Conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x50mm)
Mobile phase : 0.1% TFA
Flow rate : 0.474mL/min
CC Temperature : 30°C
Detection : UV220nm
Sample : 1. Allantoin 2. Hypoxanthine
3. Uric acid 4. Xanthine 5. Inosine
Injection volume : 0.16uL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume : 10uL



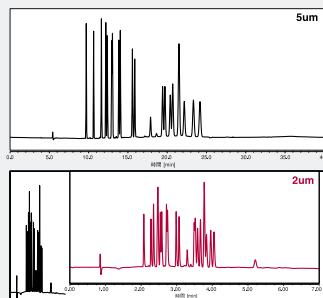
移管後の分離度

	オリジナルメソッド	UHPLC
Allantoin	28.13	14.60
Hypoxanthine	4.52	3.36
Uric acid	7.47	4.98
Xanthine	20.42	19.50
Inosine	—	—

オリジナルメソッドより移管されたUHPLCメソッドは適度な分離度を与えると共に、大幅な時間短縮と溶媒の節約に貢献する。スムーズな移管が可能になる。

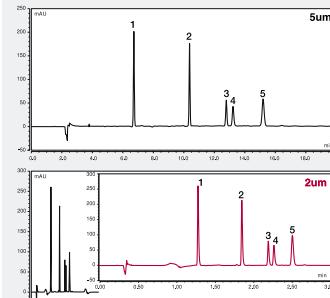
スループット効率x6.8におけるアプリケーション

PTH-アミノ酸UHPLCメソッド移管



Conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x250mm)
Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x100mm)
Mobile phase: A) 25mM Ammonium phosphate, pH3.0
B) Acetonitrile
Flow rate: 5.0mL/min 2um: 0.332mL/min
CC Temperature: 30°C (ForcedAir)
Detection: UV254nm
Sample: 20mixture PTH-Amino acid (each 10pmol/ml)
Injection volume: 5um: 2.0uL 2um: 0.16uL
System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume: 10uL
Gradient: [5um]
Time/min %B Curve Time/min %B Curve
0.00 10 5 0.00 10 5
12.0 45 5 2.10 45 5
30.0 45 5 5.30 45 5
30.1 10 5 5.31 10 5

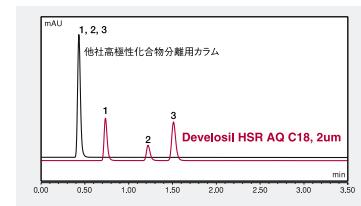
ペプチドUHPLCメソッド移管



Conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x250mm)
Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x50mm)
Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA
B) Acetonitrile + 0.1%TFA
Flow rate: 5.0mL/min 2um: 0.474mL/min
CC Temperature: 50°C (ForcedAir)
PCC Temperature: 40°C
Autosampler Temperature: 20°C
Detection: UV230nm
Sample: 1. Gly-Tyr (0.02mg/mL)
2. Val-Tyr-Val (0.02mg/mL)
3. Met-Ile-Asp (0.02mg/mL)
4. Arg-Gly-Gly (0.02mg/mL)
5. Leu-Asp-Asp (0.02mg/mL)
Injection volume: 5um: 20.0uL 2um: 0.16uL
System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume: 10uL
Gradient: [5um]
Time/min %B Curve Time/min %B Curve
0.00 10 5 0.00 10 5
10.0 25 5 1.47 25 5
20.0 25 5 2.93 25 5
20.1 0 5 2.95 0 5

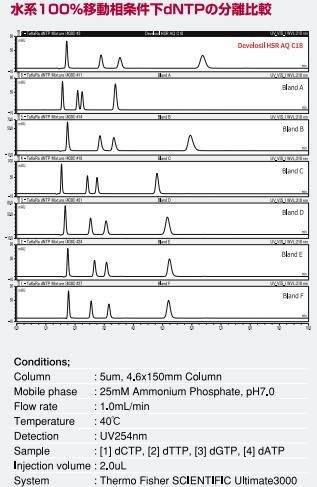
カラムの選択

逆相系において高極性化合物は保持が弱く、特に高極性化合物間の分離においてはピークが重なる場合が多い。本研究ではこの分離を可能とするカラムの開発を行った。下図は水系100%移動相にて高極性化合物の分離を比較した例。他社高極性化合物用カラムと比較しても、カラム長が短くても十分な保持を与えるため、UHPLCに有益な成果をもたらす。



Conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x50mm)
Brand A C18, 2um (2.1x50mm)
Flow rate : 0.474mL/min
CC Temperature : 30°C (ForcedAir)
Detection : UV210nm
Sample : 1. Allantoin 2. Ascorbic acid 3. Uracil
Injection volume : 0.25uL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume : 10uL
Flow cell : 2.5uL

水系100%移動相条件下dNTPの分離比較

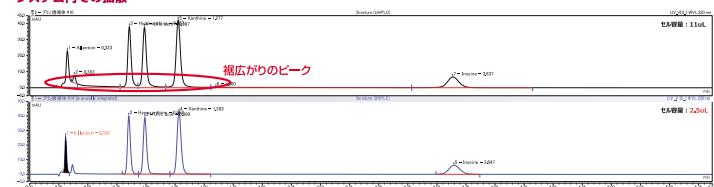


UHPLCメソッド移管における注意点

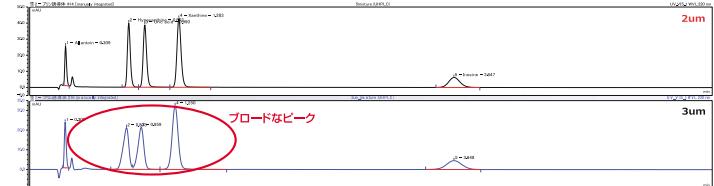
拡散を低減!!

充填剤の微粒子化に伴い、システムのデッドボリュームにも最大の配慮を!!

システム内での拡散



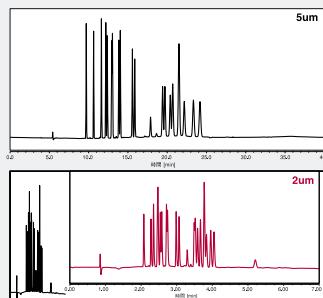
粒子内での拡散



UHPLCメソッド移管のメリットは、「2um充填剤による分離度の維持・向上」、その高分離度から「カラムのスケールダウン」、これに付随する「時間の短縮・省溶媒化」にある。これを達成するには最適なカラムの選択と拡散に配慮されたシステムの選定が重要である。

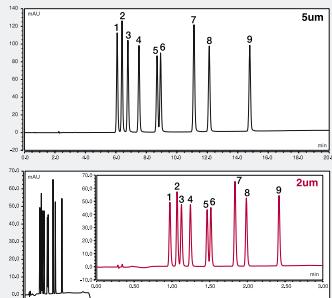
スループット効率x6.8におけるアプリケーション

サルファ剤UHPLCメソッド移管



Conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x150mm)
Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x50mm)
Mobile phase: A) Water + 0.1%HCOOH
B) Acetonitrile + 0.1%HCOOH
Flow rate: 5.0mL/min 2um: 0.474mL/min
Temperature : 40°C
Detection: UV254nm
Sample: 20mixture Sulfonamide (each 10pmol/ml)
Injection volume: 5um: 20.0uL 2um: 0.16uL
System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume: 10uL
Gradient: [5um]
Time/min %B Curve Time/min %B Curve
0.00 10 5 0.00 10 5
10.0 25 5 1.47 25 5
20.0 25 5 2.93 25 5
20.1 0 5 2.95 0 5

核酸関連化合物UHPLCメソッド移管



Conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x150mm)
Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x50mm)
Mobile phase: A) 50mM Ammonium Formate, pH7.0
B) Acetonitrile
Flow rate: 5.0mL/min 2um: 0.474mL/min
Temperature : 40°C (ForcedAir)
Detection: UV254nm
Sample: 1. Cytosine (0.06mg/mL)
2. Uracil (0.05mg/mL)
3. Ctidine (0.05mg/mL)
4. Uridine (0.05mg/mL)
5. Thymine (0.05mg/mL)
6. Adenine (0.05mg/mL)
7. Guanosine (0.05mg/mL)
8. Sulfamethoxazole (0.10mg/mL)
9. Sulfadimethoxine (0.10mg/mL)
Injection volume : 5um: 2.0uL 2um: 0.16uL
System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_Horizon
Mixer volume: 10uL
Gradient: [5um]
Time/min %B Curve Time/min %B Curve
0.00 10 5 0.00 10 5
12.0 12 5 1.76 12 5
15.0 12 5 2.20 12 5
15.1 0 5 2.15 0 5

NOMURA CHEMICAL