

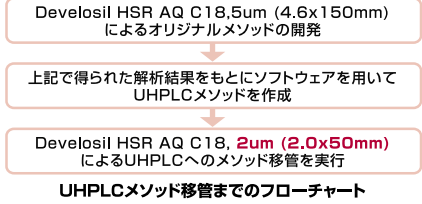
2μm粒子径充填カラムによるHPLCからUHPLCへのメソッド移管

はじめに

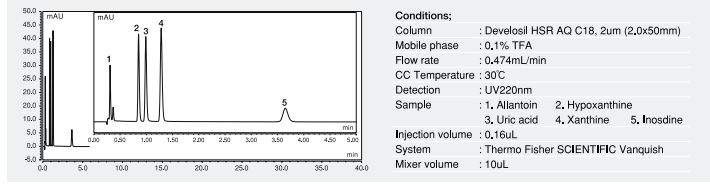
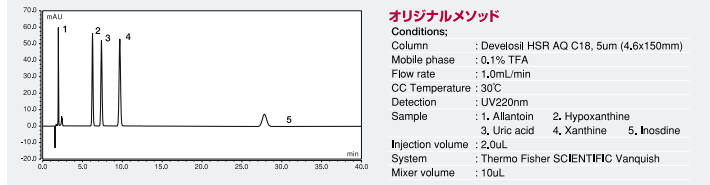
逆相において高極性化合物の保持と分離は非常に困難である。別の手段として親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を使用するケースも多いが、平衡化の時間や再現性という点では多くの時間を必要とする。近年、2μm充填剤とUHPLCの組み合わせにより、その分析時間は大幅に短縮されるようになった。そのため、平衡化に要する時間が分析時間より長く必要になってしまうなどのデメリットも起こりうる。そこで、弊社はC18カラムにて高極性化合物の保持と分離に有益なカラムの開発を行った。水系100%移動相での使用も可能となるこのカラムは保持時間の増大を図ることができ、有機溶媒を取り入れることも可能となり、LC/MS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5μm、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。



プリン誘導体におけるUHPLCメソッド移管例



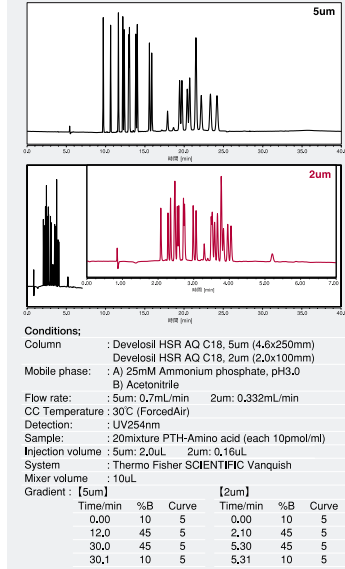
Chromleon® 7によるUHPLCメソッドの構築ソフトウェアより構築されるメソッドにて流速・分離度ファクタや最高圧力など分析に必要な情報が瞬時に生成される。目安ではありながら、高い精度で変換されるため余計な手間を必要としないため、スムーズな移管が可能になる。

成分	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		

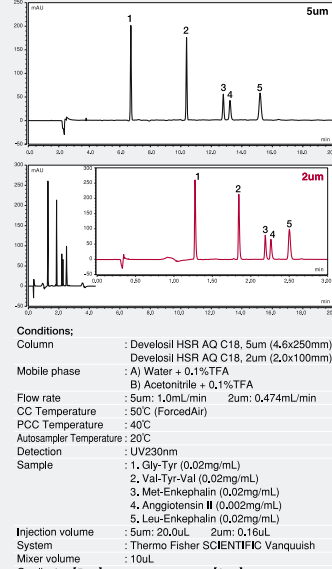
オリジナルメソッドより移管されたUHPLCメソッドは適度な分離度を与えると共に、大幅な時間短縮と溶媒の節約に貢献する。

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

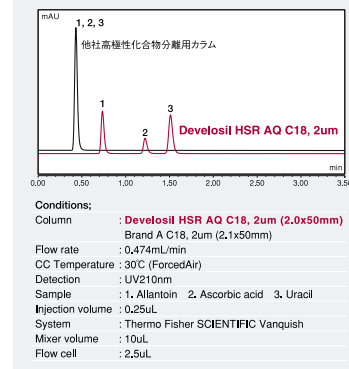


ペプチドUHPLCメソッド移管

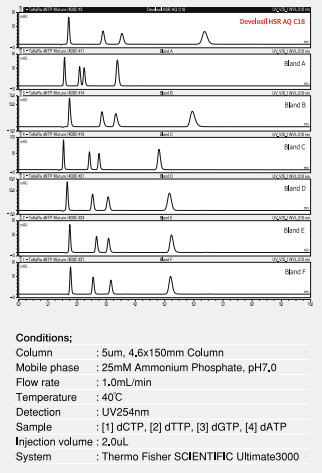


カラムの選択

逆相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で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。



水系100%移動相条件下dNTPの分離比較

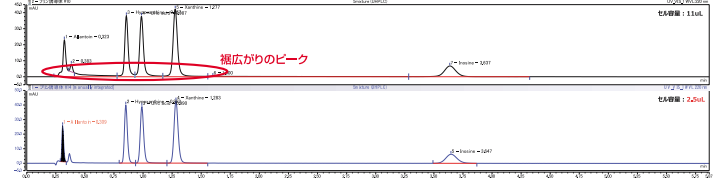


UHPLCメソッド移管における注意点

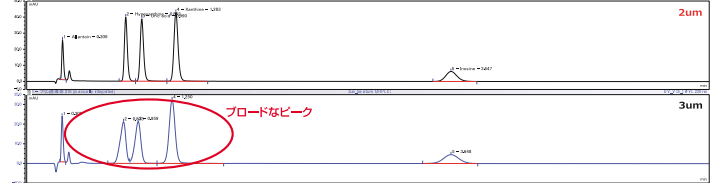
拡散を低減!!

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、「2μm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。