

ODSカラムによる高極性化合物の保持とUHPLCメソッド移管

堀切 智 (野村化学株式会社)

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。

Develosil HSR AQ C18, 5μm (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

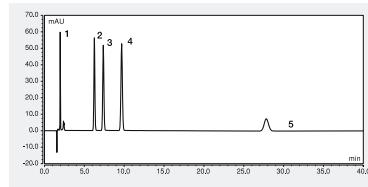
Develosil HSR AQ C18, 2μm (2.0x50mm) によるUHPLCへのメソッド移管を実行

UHPLCメソッド移管までのフローチャート



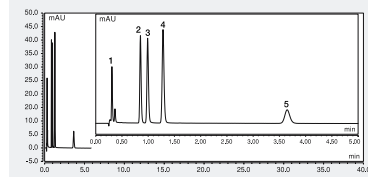
■本研究にて用いたシステム
Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish H
■ソフトウェア
Chromeleon® 7

プリン誘導体におけるUHPLCメソッド移管例



オリジナルメソッド

Conditions;
Column : Develosil HSR AQ C18, 5μm (4.6x150mm)
Mobile phase : 0.1% TFA
Flow rate : 1.0mL/min
CC Temperature : 30°C
Detection : UV220nm
Sample : 1, Allantoin 2, Hypoxanthine
3, Uric acid 4, Xanthine 5, Inosidine
Injection volume : 2.0μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume : 10μL



Conditions;
Column : Develosil HSR AQ C18, 2μm (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, Inosidine
Injection volume : 0.16μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish
Mixer volume : 10μL

項目	オリジナルメソッド	UHPLCメソッド
分析時間	約15分	約5分
検出感度	約100ng/mL	約10ng/mL
ピーク幅	約10分	約1分
圧力	約10MPa	約10MPa
溶媒消費量	約10mL	約10mL

Chromeleon® 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。

	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	—	—

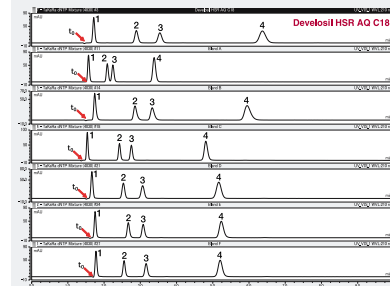
オリジナルメソッドより移管されたUHPLCメソッドは適度な分離度を与えると共に、大幅な時間短縮と溶媒の節約に貢献する。

カラムの選択

高極性化合物分離用カラム

逆相にて高極性化合物を最大に保持させるための条件として、水系100%移動相が使用できることが必須である。下記に水系100%移動相条件下でのdNTP(4種)を用いた分析例を示す。

水系100%移動相によるdNTPの分離比較



Conditions;
Column : Develosil HSR AQ C18, 5μm (4.6x150mm)
Mobile phase : 25mM Ammonium phosphate, pH7.0
Flow rate : 1.0mL/min
Temperature : 40°C
Sample : 1,dCTP 2,dTTP 3,dGTP 4,dATP (each 0.5mmol/L)
Injection volume : 1.0μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Ultimate 3000

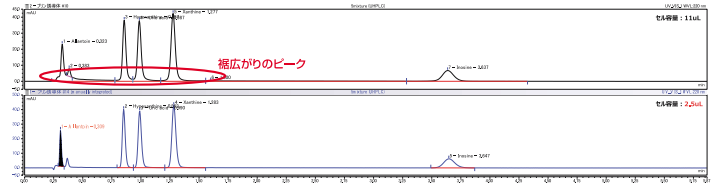
dNTPの分離比較にて、カラムは全て水系100%移動相にて使用可能、且つ、高極性化合物分離用のものを使用。一言に高極性化合物用といっても使用するシリカゲルの表面積、ODS導入率等の物性の違いにより保持が大きく変わる。Develosil HSR AQ C18では保持・分離ともにクラス最大となり、to-dCTP間の分離も良好であることから十分な定量分析も期待できる。

UHPLCメソッド移管における注意点

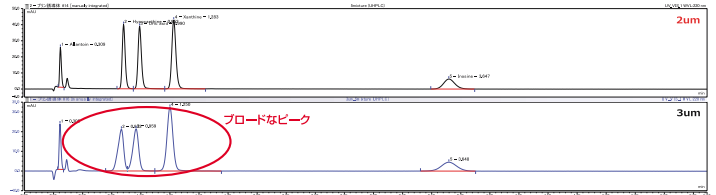
拡散を低減!!

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



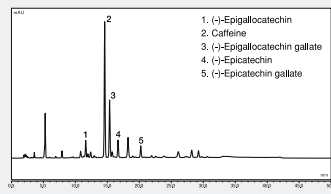
粒子内での拡散



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。

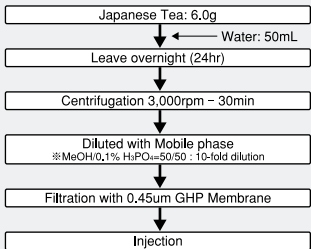
お茶中カテキンの分析 — UHPLCメソッド移管

Original method (HPLC)

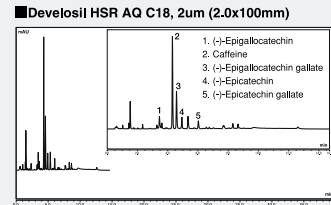


HPLC Conditions;
Column : Develosil HSR AQ C18, 5μm (4.6x150mm)
Mobile phase : A) 0.1% Phosphoric acid B) Methanol
Flow rate : 1.0mL/min
Temperature : 40°C (ForcedAir)
Detection : UV280nm
Sample : Japanese Tea
Injection volume : 10μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer volume : 10μL
Gradient :
0.0 90 10 5
30.0 50 50 5
40.0 50 50 5
40.1 90 10 5
50.0 End

Preparation of samples

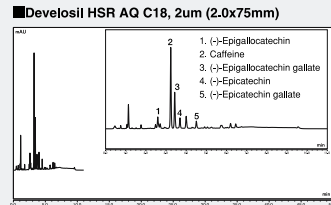


UHPLC method



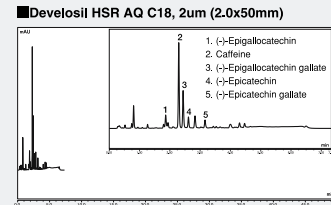
HPLC Conditions;
Column : Develosil HSR AQ C18, 2μm (2.0x100mm)
Mobile phase : A) 0.1% Phosphoric acid B) Methanol
Flow rate : 0.474mL/min
Temperature : 40°C (ForcedAir)
Detection : UV280nm
Sample : Japanese Tea
Injection volume : 1.13μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer volume : 10μL
Gradient :
0.0 90 10 5
8.8 50 50 5
11.7 50 50 5
11.8 90 10 5
14.7 End

Injection volume : 89% cut
Solvent usage : 86% cut
Measurement time : 71% cut
Throughput : x3.4



HPLC Conditions;
Column : Develosil HSR AQ C18, 2μm (2.0x75mm)
Mobile phase : A) 0.1% Phosphoric acid B) Methanol
Flow rate : 0.474mL/min
Temperature : 40°C (ForcedAir)
Detection : UV280nm
Sample : Japanese Tea
Injection volume : 0.98μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer volume : 10μL
Gradient :
0.0 90 10 5
6.6 50 50 5
8.8 50 50 5
8.82 90 10 5
11.0 End

Injection volume : 90% cut
Solvent usage : 90% cut
Measurement time : 78% cut
Throughput : x4.5



HPLC Conditions;
Column : Develosil HSR AQ C18, 2μm (2.0x50mm)
Mobile phase : A) 0.1% Phosphoric acid B) Methanol
Flow rate : 0.474mL/min
Temperature : 40°C (ForcedAir)
Detection : UV280nm
Sample : Japanese Tea
Injection volume : 0.8μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer volume : 10μL
Gradient :
0.0 90 10 5
4.4 50 50 5
4.4 50 50 5
5.87 50 50 5
5.88 90 10 5
7.3 End

Injection volume : 92% cut
Solvent usage : 93% cut
Measurement time : 85% cut
Throughput : x6.8

Comparison of Separation in each column

Sample	5μm, 4.6x150mm	2μm, 2.0x100mm	2μm, 2.0x75mm	2μm, 2.0x50mm
(-)-Epigallocatechin	12.89	12.52	8.89	7.46
Caffeine	3.14	3.53	2.71	2.92
(-)-Epigallocatechin gallate	5.26	4.54	3.50	3.06
(-)-Epicatechin	13.88	13.57	10.72	9.20
(-)-Epicatechin gallate	—	—	—	—