

新規UHPLC C30カラムによる極性化合物の分析

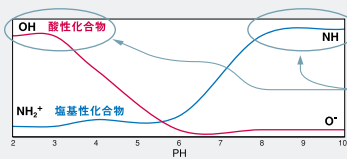
○堀切 智¹⁾

(¹⁾野村化学株式会社)

はじめに

通常、逆相カラムでの分析において、化合物の解離⇄非解離の状態は極めて考慮すべき点であり、ほぼ分子の状態にして分析するのが最良となる。非解離の状態(イオンの多い状態)では、保持をさせるのが困難であり、水系リッチの条件にせざるを得ない。そのため、水系100%移動相でも使用できるカラムが普及している。しかし、LC/MSでの分析を考慮した場合、水系リッチな分析系は十分な感度を得ることができないのが難点である。そこで、弊社ではこれらの諸問題を解決するUHPLCカラムシリーズの開発を行うと同時にイオンペア試薬を極力使用しないメソッドの構築を行ったので報告する。

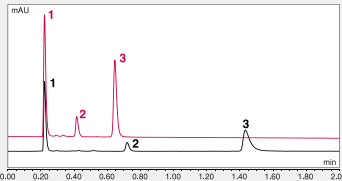
移動相pHによる保持の変化(逆相カラム)



逆相カラムでのメソッド開発の大前提

- 分子の状態で測定しなければ保持を得ることができない!!
- 中性化合物はpHの影響を受けずにほぼ同じ保持を示す。

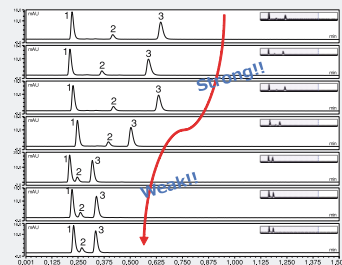
Develosil UHPLC C30, 1.6μmを用いた移動相pH変化による塩基性化合物の保持pH3にすることで保持の減少が起こるものの、適度な保持と分離を達成する。ピーク形状、感度の向上を図ることができたため、LC/MSへの導入も可能とする。



Analytical conditions:
Column : Develosil UHPLC C30, 1.6μm (2.0x50mm)
Mobile phase : Acetonitrile/10mM HCOONH₄, pH7.0=60/40
Flow rate : 0.5mL/min
Temperature : 40°C
Detection : UV260nm
Sample : 1, Uracil
2, Propranolol
3, Amitriptyline
Injection volume : 0.16μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H

Develosil UHPLCシリーズの保持比較

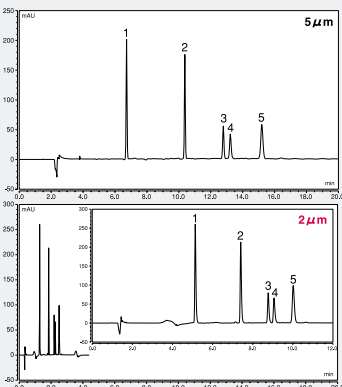
Develosil UHPLCシリーズであれば酸性条件であっても塩基性化合物は保持され、有機溶媒の組成をさらにコントロールすることができ、UHPLCメソッド開発におけるさらなる選択肢を追加することが可能となる。



Analytical conditions:
Column : Develosil UHPLC C30, 1.6μm (2.0x50mm)
Develosil UHPLC C18, 1.6μm (2.0x50mm)
Develosil UHPLC C8, 1.6μm (2.0x50mm)
Develosil UHPLC C1, 1.6μm (2.0x50mm)
Other UHPLC C18, 1.9μm (2.0x50mm)
Other UHPLC C18, 2.5μm (2.0x50mm)
Other UHPLC C18, 1.7μm (2.0x50mm)
Mobile phase : Acetonitrile/10mM HCOONH₄, pH3.0=60/40
Flow rate : 0.5mL/min
Temperature : 40°C
Detection : UV260nm
Sample : 1, Uracil
2, Propranolol
3, Amitriptyline
Injection volume : 0.16μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H

イオンペア試薬を使用しないペプチドのメソッド開発

【従来までのUHPLCを用いるペプチド分析例】

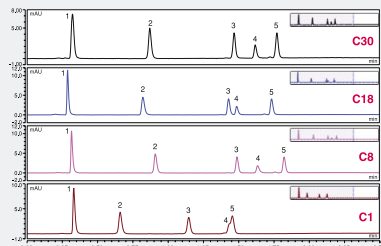


Analytical conditions:
Column : Develosil HSR AQ C18, 5μm (4.6x150mm)
Develosil HSR AQ C18, 2μm (2.0x50mm)
Mobile phase : A) Water + 0.1% TFA
B) Acetonitrile + 0.1% TFA
Gradient : 5μm
min mL/min %B Curve
0.00 1.0 0 5
10.0 1.0 25 5
20.0 1.0 25 5
20.1 1.0 0 5
2μm
min mL/min %B Curve
0.0 0.5 5 5
2.20 0.5 50 5
3.67 0.5 50 5
3.68 0.5 5 5
Temperature : 50°C
Detection : UV230nm
Sample : 1, Gly-Tyr 2, Val-Tyr-Val
3, Methionine-Enkephalin 4, Angiotensin II
5, Leucine-Enkephalin
Injection volume : 0.16μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer volume : 10μL

HPLC→UHPLCへのメソッド移管

HPLCでのデータを取得後、ソフトウェアを使用してメソッド移管を実施。分離の際の化合物3-4間の分離度もほぼ再現されている。

【イオンペア試薬を使用しないメソッド】



Analytical conditions:
Column : Develosil UHPLC C30, 1.6μm (2.0x50mm)
Develosil UHPLC C18, 1.6μm (2.0x50mm)
Develosil UHPLC C8, 1.6μm (2.0x50mm)
Develosil UHPLC C1, 1.6μm (2.0x50mm)
Mobile phase : A) 10mM HCOONH₄, pH3.0
B) Acetonitrile/10mM HCOONH₄, pH3.0=90/10
Gradient : min mL/min %B Curve
0.00 0.5 15 5
1.47 0.5 35 5
2.93 0.5 35 5
2.95 0.5 15 5

TFA
+
有機溶媒
初期から有機溶媒
含むグラジエント条件

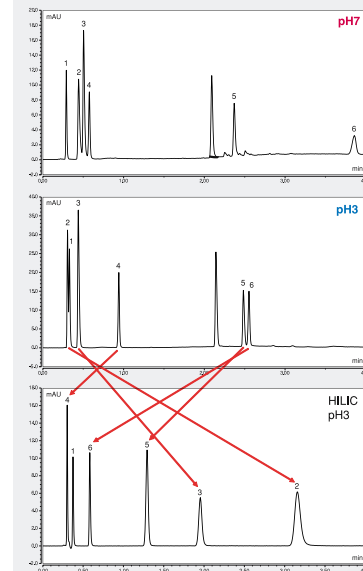
MSへの負担軽減+
感度向上への第1歩!!

Injection volume : 0.16μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer volume : 10μL

選択性の向上: pH変化 → HILICへ

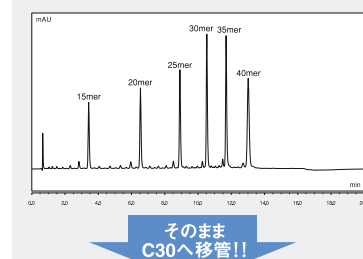
選択性の向上

Develosil UHPLCシリーズ (C30, HILIC)を用いて塩基性化合物の保持の変化をモニタリング。C30において、pH7→pH3に変更することで保持の減少が起こるものの、ピーク形状の改善やピーク感度の向上に大きく貢献する。また、全体的な溶出の変更にはHILICを採用することで、全く異なる選択性を得ることが可能となる。



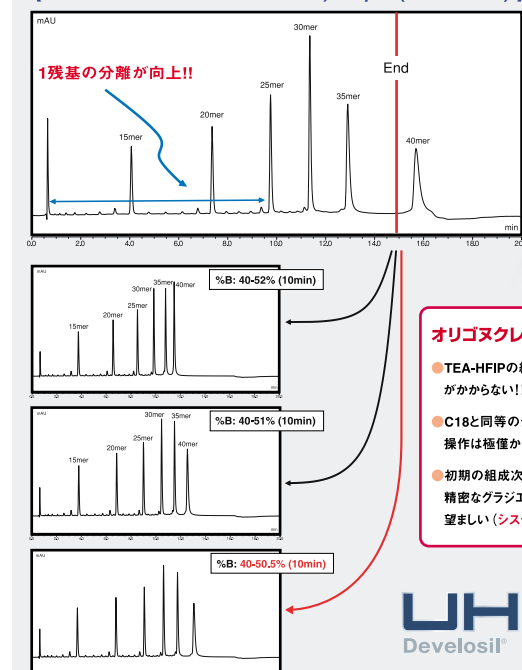
Analytical conditions:
Column : Develosil UHPLC C30, 1.6μm (2.0x50mm)
Develosil UHPLC HILIC, 1.6μm (2.0x50mm)
Mobile phase (C30) : A) 10mM HCOONH₄, pH7 or pH3
B) Acetonitrile
Gradient : pH7
min mL/min %B Curve
0.0 0.5 10 5
2.20 0.5 70 5
3.67 0.5 70 5
3.68 0.5 10 5
pH3
min mL/min %B Curve
0.0 0.5 5 5
2.20 0.5 50 5
3.67 0.5 50 5
3.68 0.5 5 5
Mobile phase (HILIC) : Acetonitrile/10mM HCOONH₄, pH3.0=90/10
Flow rate (HILIC) : 0.5mL/min
Temperature : 40°C
Detection : UV254nm
Sample : 1, Uracil
2, Metformine
3, Phenylephrine
4, Acetaminophene
5, Paroxetine
6, Bromhexine
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer : 10μL

オリゴヌクレオチドの分析



Analytical conditions:
Column : Develosil UHPLC C18, 1.6μm (2.0x50mm)
Mobile phase : A) 15mM TEA + 400mM HFIP, pH≈8.0
B) Mobile phase A / Methanol =50/50
Gradient : min mL/min %B Curve
0.0 0.2 40 5
10.00 0.2 50 5
15.00 0.2 50 5
15.1 0.2 40 5
Temperature : 50°C
Detection : UV260nm
Sample : Oligonucleotide Ladder Standard
(Agilent Technologies)
Injection volume : 1.0μL
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H
Mixer volume : 10μL

【Column: Develosil UHPLC C30, 1.6μm (2.0x50mm)】



オリゴヌクレオチド分析のポイント

- TEA-HFIPの組み合わせが条件検討の時間がからない!!
- C18と同等の分離を示すための有機溶媒操作は極僅か!!
- 初期の組成次第では高速化が可能だが、精密なグラジエントがかけられるシステムが望ましい(システムとカラムのマッチング)!!

UHPLC
Develosil®