

UHPLCへのメソッド移管におけるカラムの選定と注意点

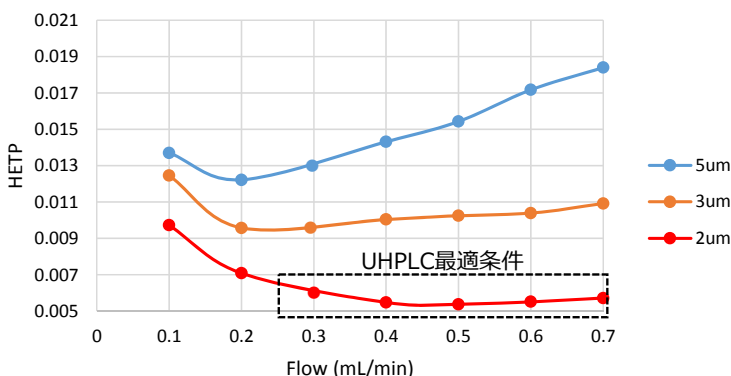
はじめに

現在の分析ワークは5 μ m, 3 μ m充填剤のHPLCから2 μ m充填剤を中心とするUHPLC (UPLC)へ移行しつつあります。2 μ m充填剤を使用することにより理論段数、分離能の向上および高流速時における性能の維持が確保され、従来の分析メソッドを大幅に短縮することが可能となります。しかし、その一方でカラムの圧力は従来よりも大きな負荷をかけることになるため、カラム耐圧・システム耐圧に優れたものを選定する必要があります。本レポートでは弊社所有のシステムを例にHPLCからUHPLCへのスマートなメソッド移管をご紹介します。

粒子径の違いによる性能維持

粒子径の違いにより、理論段数、分離度の向上はもちろんですが、高流速時における性能の維持が2 μ m充填剤の真骨頂といえます。

Van Deemter Plot



Conditions;

Column: Develosil HSR AQ C18, 5 μ m, 3 μ m, 2 μ m (2.0x100mm)

Mobile phase: ACN/Water=70/30 **Temperature:** 40°C

Detection: UV254nm **Sample:** Pyrene **Injection volume:** 0.5 μ L

System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_Horizon

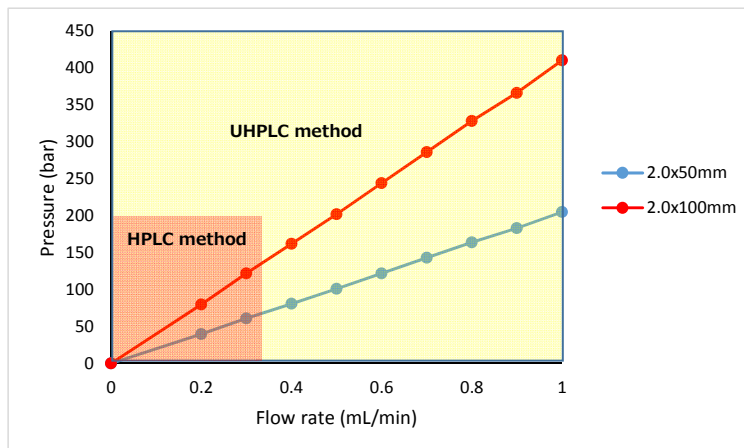
充填剤粒子径以外は条件を全て統一し、流速を変化させた際の理論段高さを検討しました。5 μ mおよび3 μ m粒子径は0.2mL/minにて最大の性能を発揮するのに対して2 μ m充填剤は0.4~0.5mL/minにおいて最大の性能を発揮し、さらに流速を上げてもその性能を維持します。

これにより、さらなる高速化が期待でき、省溶媒化などコスト面でもメリットが実現します。

※本データは全ての化合物に対して保証するものではありません。使用するシステムや条件によって性能が変わることがあります。

カラムサイズの違いによる圧力

当然のことながら粒子径が小さくなるに従い、カラム圧力も高くなります。下図は2 μ m粒子径にてカラム長さを変えた場合の圧力を比較しています。



※このデータはシステム圧を差し引いた値をプロットしています。

Conditions;

Column: Develosil HSR AQ C18, 2 μ m

Mobile phase: ACN/Water=70/30 **Temperature:** 40°C

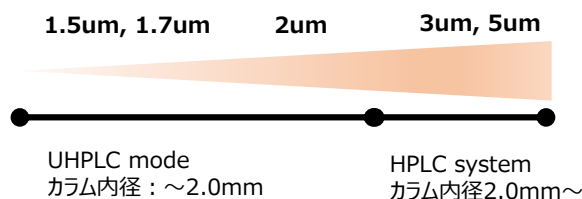
System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_Horizon

従来のDevelosil HPLCカラムではカラム耐圧を20MPaとしています。これに対して、2 μ m充填剤カラムの耐圧は60MPaとしていますので分離・性能を許容できる範囲まで流速を上げて使用することや、長いカラムを用いて高分離能な分析が可能となります。

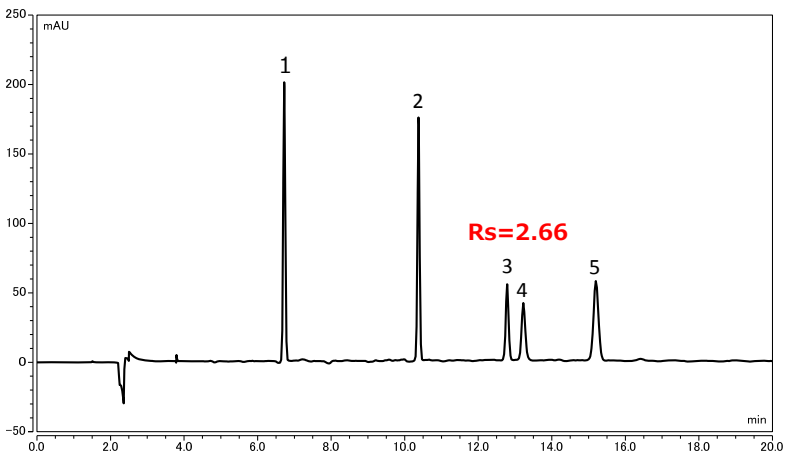
※本データは全ての化合物に対して保証するものではありません。使用するシステムや条件によって性能が変わることがあります。

HPLCからUHPLCへのメソッド移管

実際にHPLCからUHPLCへメソッド移管を検討していきます。HPLCにて正確なメソッドを組むことが重要となり、現在、市販されているUHPLCシステムはソフトウェアも充実しているため、システム1台でこのメソッド移管を行うこともできます。



[ペプチド5成分をHPLCからUHPLCへメソッド移管例-HPLC]



Conditions;
 Column: Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x150mm)
 Mobilephase: A) Water+0.1%TFA B) Acetonitrile+0.1%TFA
 Flow rate: 1.0mL/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-Enkephalin (0.02mg/mL)
 4.Angiotensin II (0.02mg/mL)
 5.Leu-Enkephalin (0.02mg/mL)
 Injection volume: 20.0uL
 Mixer volume: 10uL
 System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_Horizon
 Software: Thermo Fisher SCIENTIFIC Chromeleon 7

Time (min)	%B	Curve
0.00	0	5
10.0	25	5
20.0	25	5
20.1	0	5

ここで得られた結果を装置に付属しているソフトウェアを使ってUHPLCメソッドを構築していきます。

変換パラメータ

現在のカラムと新しいカラムの仕様を指定してください。
 もっと分離を促進するには、促進度を上げるか、新しいカラムの流量を上げてください。

	現在のカラム	新しいカラム
全長(L)	150.0	50.0 [10.0...1000.0 mm]
内径(D)	4.6	2.1 [0.1...100.0 mm]
粒子径(P)	5.0	2.2 [0.1...100.0 μm]
促進度(O)		1.00
流量(F)	1.000	0.474 [0.001...5.000 ml/min]
圧力限度(R)		600 [0...1517 bar]

移管時における必要な流速が表示されています

上記データより3と4の分離度を維持する設定をしています。カラム長さが1/3であっても大きく分離度を落とすことなく再現できそうです。

結果	現在のカラム	新しいカラム	節約
分離度ファクタ (EP)	2.66	2.31	
最高圧力	122 bar	476 bar	
注入量	20.00 μl	1.60 μl	92%
溶離液使用量	30.000 ml	2.084 ml	93%
測定時間	30.000 min	4.400 min	85%
スループット		x6.8	

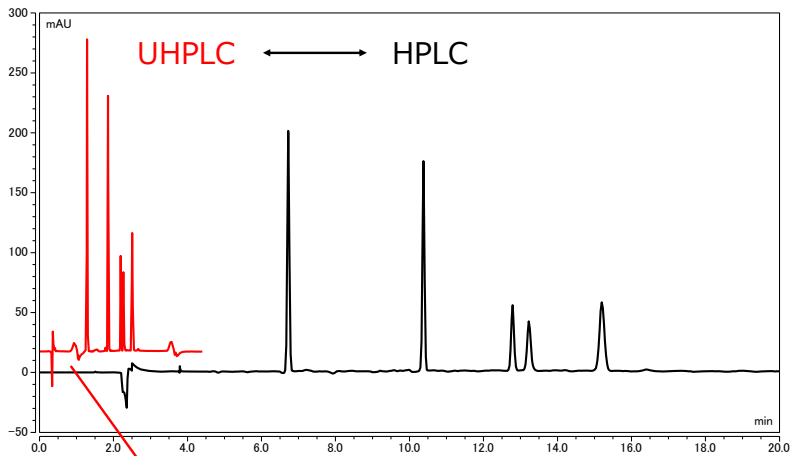
移管時における圧力（グラジエント溶出の場合は最大圧力）が表示されています。システムの耐圧を超える場合にはHPLCメソッドから再構築する必要があります。

UHPLCへメソッドを移管することにより大幅に溶媒と時間を削減することが可能となります。

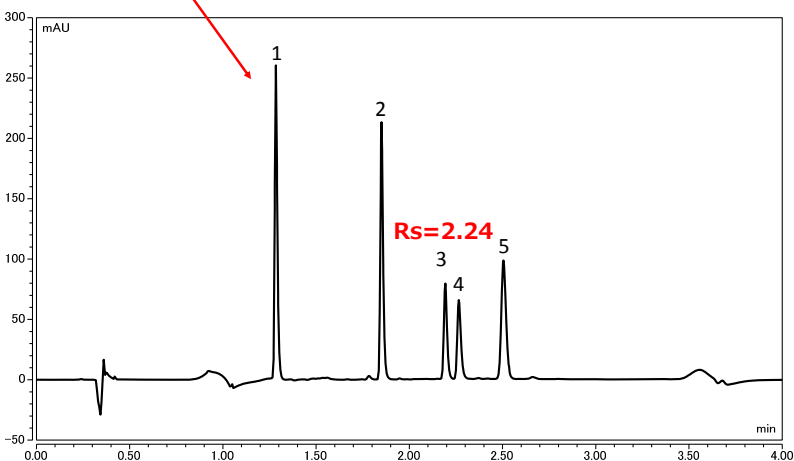
※本研究で用いたソフトウェアによるメソッドはおおよその目安に留まります。実際の粒子径の違いやカラムサイズによって結果が異なります。

[ペプチド5成分をHPLCからUHPLCへメソッド移管例-UHPLC]

全ページにて構築されたメソッドを運用した結果を示します。



拡大



Conditions;

Column: Develosil HSR AQ C18, 2 μ m (2.0x50mm)
 Mobilephase: A) Water+0.1%TFA B) Acetonitrile+0.1%TFA
 Flow rate: 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-Enkephalin (0.02mg/mL)
 4.Angiotensin II (0.02mg/mL)
 5.Leu-Enkephalin (0.02mg/mL)
 Injection volume: 1.60 μ L
 Mixer volume: 10 μ L
 System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_Horizon
 Software: Thermo Fisher SCIENTIFIC Chromeleon 7

Time (min)	%B	Curve
0.00	0	5
1.47	25	5
2.93	25	5
2.95	0	5

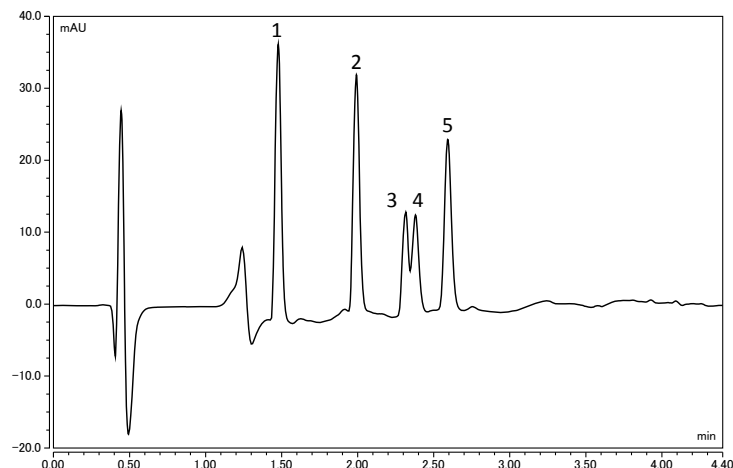
ソフトウェアにより自動で構築されたUHPLCメソッドは、維持したい分離度をほぼ正確に再現されています。この移管されたメソッドはオリジナルのメソッドの約8回分に相当することからも高い効率化を実現しています。

真のカラム性能を引き出すために

真のカラム性能を発揮させるためには、カラムはもちろんのこと、選択するシステムも重要な要素となります。システムは各メーカーによって配管の内径やフローセルなど流路内の拡散の程度が異なります。大きく拡散されたサンプルは得られるピークに大きく影響するため、システムの選定には十分な検討が必要となります。

右図には上記UHPLCメソッドをHPLCシステムにて運用した例になります。拡散が大きいためピークがブロードとなり、ピーク高さや3,4の分離が十分に得られず、カラム性能が十分に発揮されていないことが分かります。

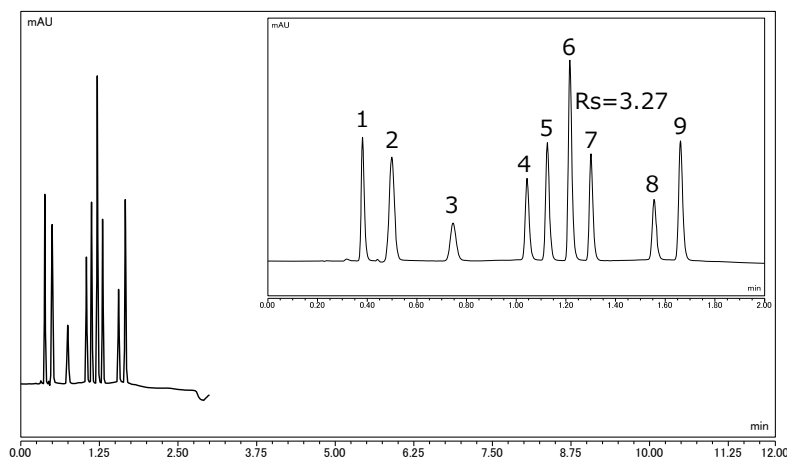
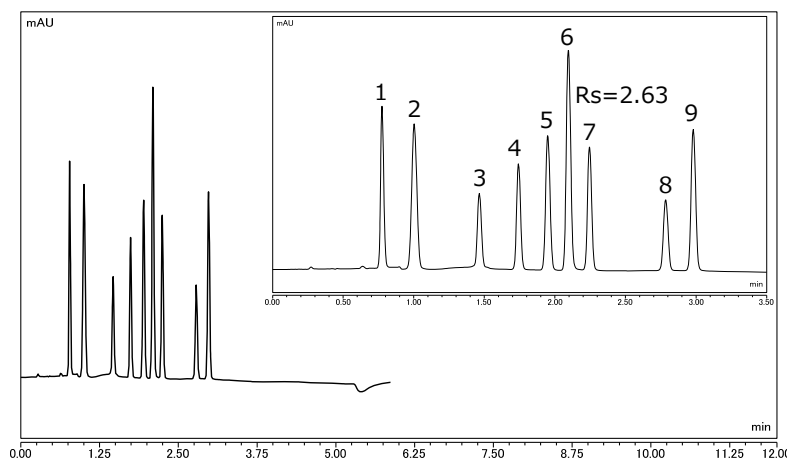
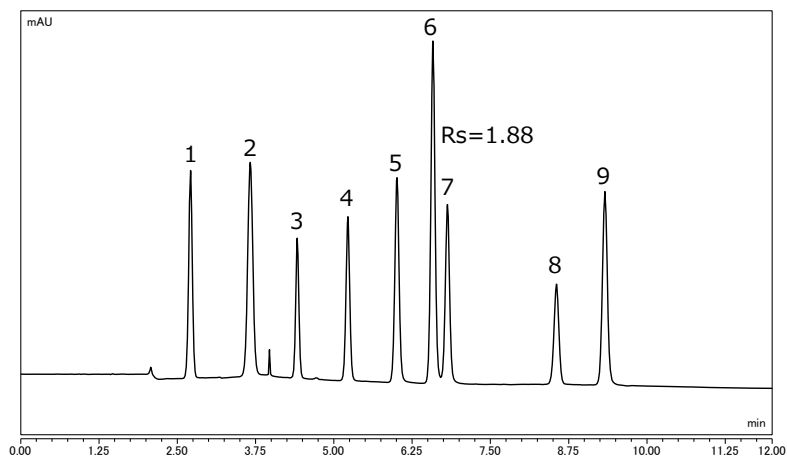
[カラム性能が十分に発揮されないケース]



汎用HPLCを用いた2 μ m充填剤によるペプチドの分析

※分析条件は上記UHPLCメソッドに従う

[核酸関連化合物のUHPLCメソッド移管例]



最大限に引き出されたカラム性能は、真の高速化・高分離能を提供します。
 これによって、時間短縮および溶媒の削減が大幅に達成され、生産性が向上します。

Conditions;

Column: Develosil HSR AQ C18, 5um (4.6x150mm)

Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x100mm)

Develosil HSR AQ C18, 2um (2.0x50mm)

Mobilephase: A) 25mM Ammonium Phosphate, pH7.0

B) Acetonitrile

Flow rate: 1.0mL/min (5um)

0.474mL/min (2um)

CC Temperature: 40°C (ForcedAir)

PCC Temperature: -

Autosampler Temperature: -

Detection: UV254nm

Sample: 1.Cytosine (0.06mg/mL)

2.Uracil (0.05mg/mL)

3.Cytidine (0.05mg/mL)

4.Uridine (0.05mg/mL)

5.Thymine (0.05mg/mL)

6.Adenine (0.05mg/mL)

7.Guanosine (0.05mg/mL)

8.Thymidine (0.05mg/mL)

9.Adenosine (0.05mg/mL)

Injection volume: 2.0uL (5um)

0.23uL (2um, 2.0x100mm)

0.16uL (2um, 2.0x50mm)

Mixer volume: 10uL

System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_Horizon

Software: Thermo Fisher SCIENTIFIC Chromeleon 7

Gradient (5um, 4.6x150mm)

Time (min)	%B	Curve
0.00	0	5
12.0	12	5
15.0	12	5
15.1	0	5

Gradient (2um, 2.0x100mm)

Time (min)	%B	Curve
0.00	0	5
3.52	12	5
4.40	12	5
4.43	0	5

Gradient (2um, 2.0x50mm)

Time (min)	%B	Curve
0.00	0	5
1.76	12	5
2.20	12	5
2.22	0	5

[弊社所有のHPLC,UHPLCと適合するカラム粒子径・サイズ]

下記の表は弊社が所有しているシステムとそれに適した粒子径、カラム内径、カラム長さを示しています。

所有システム	Thermo Fisher SCIENTIFIC/Vanquish H	Thermo Fisher SCIENTIFIC/Ultimate 3000	Waters/alliance 島津製作所/10A 日本分光/2000Plus
適合粒子径	2um, 3um, 5um	3um, 5um	3um, 5um
適合カラム内径	2.0~4.6mm	2.0~4.6mm	3.0~4.6mm (3um) 3.0~10mm (5um)
適合カラム長さ	50~250mm	50~250mm	50~250mm (3um) 50~300mm (5um)
Develosil 適合シリーズ	Develosil HSR UHPLC Develosil HSR Develosil HB など上記を含む全ての充填剤	Develosil HSR UHPLC ※システムの耐圧内での使用 Develosil HSR Develosil HB など上記を含む全ての充填剤	Develosil全ての充填剤 Develosil Semi-prep
その他の適合システム	Waters I-Class Waters H-Class (Bio含む) 島津製作所 Nexera X2 日本分光 Extrema UHPLC	Waters ACQUITY Arc 島津製作所 Nexera XR 島津製作所 Nexera-i 日本分光 Extrema RHPLC	

※その他適合システムについては弊社独自の調査に基づいて記載をしております。ご使用の際にはシステムのスペックをご確認ください。

[Develosil HSR AQ C18, 2um価格表]

P/N	Product Name	Particle Size (um)	Pore Size (Å)	Inner Diameter (mm)	Length (mm)	Price (yen)
73-220050W	HSR AQ C18-2	2	80	2.0	50	60,000
73-220075W	HSR AQ C18-2	2	80	2.0	75	65,000
73-220100W	HSR AQ C18-2	2	80	2.0	100	70,000
73-22015W	HSR AQ C18-2	2	80	2.0	150	80,000
73-220250W	HSR AQ C18-2	2	80	2.0	250	110,000

[ご注文・お問い合わせ]



野村化学株式会社

〒489-0004 愛知県瀬戸市日出町15

TEL: 0561-48-1853 FAX: 0561-48-1434

e-mail: info@develosil.net

Web: www.develosil.net