

テクニカルレポート No.29

HPLC⇔UHPLCメソッド移管 –システム・カラムのマッチング–

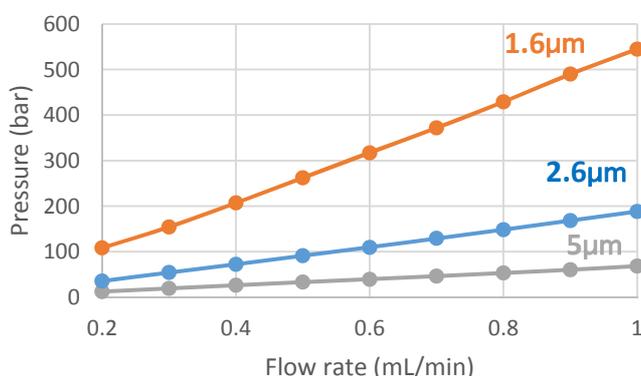
1. はじめに

弊社では、2019年6月より新シリーズ「FlexFire」シリーズを発売しました。このシリーズは1.6 μ mカラムとUHPLCシステムを用いた短時間での分析がメインとなりますが、品質管理⇔研究・開発間でのメソッド移管のやり取りをスムーズに実行するために2.6 μ m、5 μ mのラインナップも追加されています。

本レポートでは品質管理⇔研究・開発においてカラム性能を最大限に発揮する手立てを弊社所有のシステムを用い紹介します。ここでは、システムとカラムのマッチングが重要なカギを握っています！！

2. 粒子径の選択

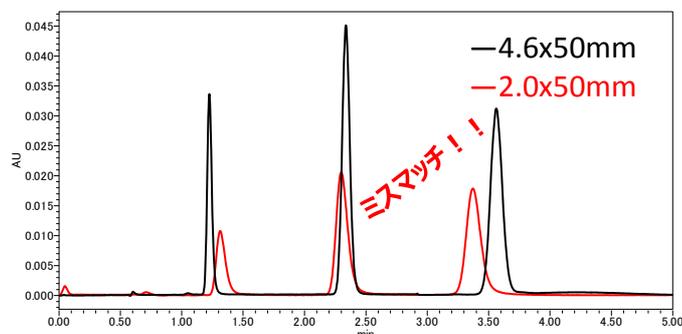
粒子径の選択は、メソッド移管を行う際に結果のみならず移管パラメーターを設定するうえで重要な役割を果たします。



NG：微粒子による圧力超過
カラム内径の選択ミス（デッドボリューム）

すでに所有しているシステムを用いるのであれば、そのシステムがどのくらいの圧力まで耐えられる仕様なのかを知っておく必要があります。

また、「デッドボリューム」もカラム性能に大きな影響を与えますので、カラム性能をフルに引き出せるシステムを選定してください。



■ システムとカラムのマッチング

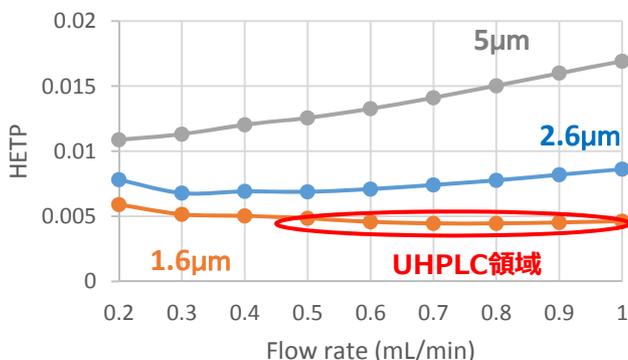
HPLCシステムにて異なる内径のカラムを評価した場合、内径2.0mmカラムにおいてデッドボリュームの影響が出ているのが分かります。結果、ここで使用したシステムは内径4.6mm以降であればカラム性能をフルに発揮できるシステムですので、内径2.0mmのカラムを使用するのであれば、これに対応したシステムにて測定する必要があります。

メーカーによってデッドボリュームや使用範囲など仕様もかなり異なりますので、所有のシステムもしくは導入予定のシステムが適正であるかの確認は必須といえます。

3. 適正な流速

粒子径に応じて得られる理論段数は異なり、流速を変えることで流速の最適化を図ることができます。

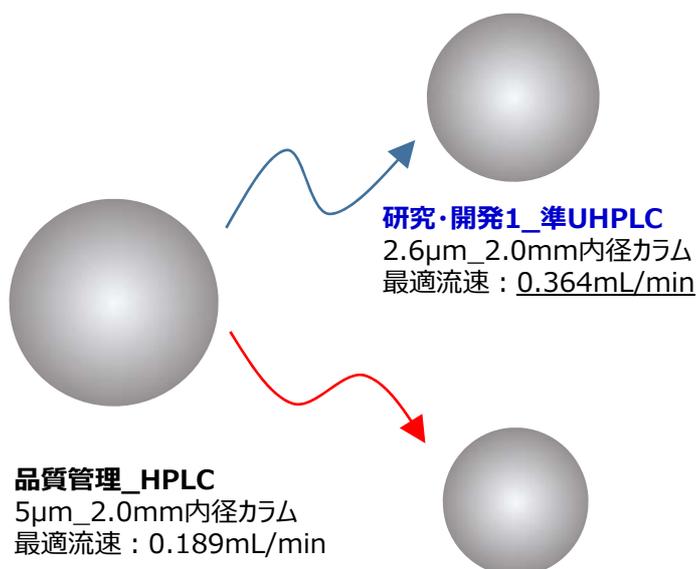
いかに移管前のメソッドで最適化ができるかによって、移管後の性能が決まります。



Conditions;

Column: Develosil FlexFire C18 (2.0x50mm)
Mobile phase: Acetonitrile/Water=60/40
Flow rate: 0.2mL/min~1.0mL/min
Temperature: 40°C
Detection: UV254nm
Sample: Naphthalene
Injection volume: 0.16µL

研究・開発で構築されたメソッドを品質管理に移行することを想定した場合、各粒子径の最適流速は下記の通りとなります。



移管後の流速はソフトウェアで計算された値を記載しています。

研究・開発2_UHPLC
1.6µm_2.0mm内径カラム
最適流速: 0.591mL/min

ソフトウェアより導き出された2.6µm、1.6µmにおける最適化された流速は、いずれもほぼ一番高い理論段数をとることが可能と予測されます。

4. 分離度とL/dp値

メソッド移管において最も重要となるのは分離度です。分離度はL(カラム長さ) / dp(粒子径)に比例することが分かっていますので、カラム長さを選定する際の目安になります。

移管前 : 5µm, 2.0x150mm

カラム	直径 (D):	2,000	mm
	長さ (L):	150	mm
	粒子径 (dp):	5.0	µm
	L/dp:	30,000	

移管後 : 1.6µm, 2.0x50mm

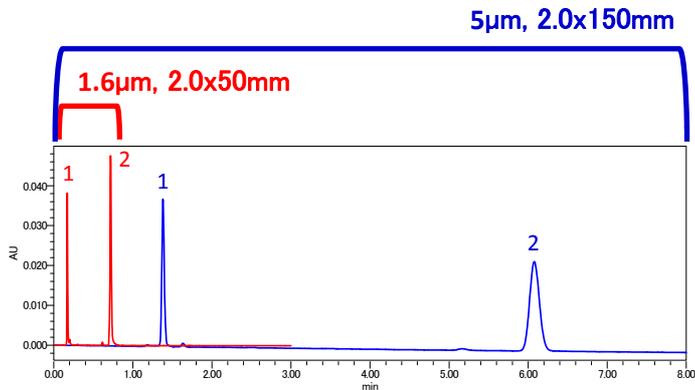
カラム	直径 (D):	2,000	mm
	長さ (L):	50	mm
	粒子径 (dp):	1.6	µm
	L/dp:	31,250	

メソッド移管時にこのL/dp値に差があると移管跡の分離度に大きな影響を与えます。移管後のL/dp値が大きいと元の実験よりも大きくなり、逆に小さいと分離度は小さくなっていきます。

メソッド移管には移管前のカラムからどの粒子径に移行するかでメソッドが大きく変わります。また、システムスペックの範囲内にカラム性能がマッチングするかも事前チェックしておく、よりスムーズな移管が実行できます。

5. メソッド移管例

元の分析には5 μ m, 2.0x150mmとし、移管先は1.6 μ m, 2.0x50mmへソフトウェアを使って移管しました。



Conditions:

Column: Develosil FlexFire C18, 5 μ m (2.0x150mm)
Develosil FlexFire C18, 1.6 μ m (2.0x50mm)

Mobile phase: Acetonitrile/Water=60/40

Flow rate: 5 μ m: 0.189mL/min
1.6 μ m: 0.591mL/min

Temperature: 40°C

Detection: UV254nm

Sample: 1.Uracil
2.Naphthalene

Injection volume: 5 μ m: 0.3 μ L
1.6 μ m: 0.1 μ L

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

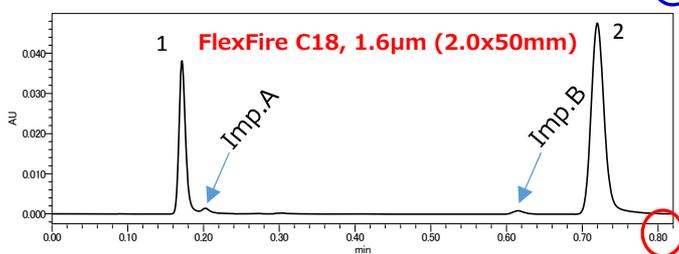
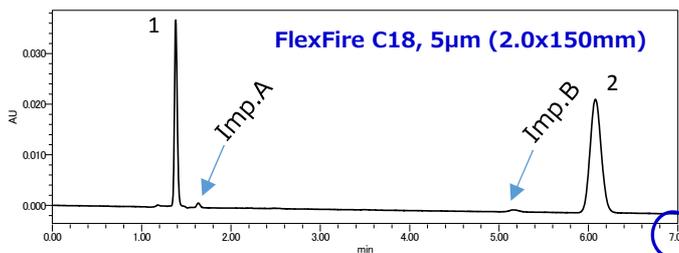
この移管例は、FlexFireシリーズの出荷毎試験を元に実行しました。極めてシンプルな条件ですが、この条件で整合性がとれなければ、複雑な条件(グラジエント溶出)では小さな差が大きな差につながります。

元のHPLCメソッドでは7.00minで分析終了するのに対し、UHPLCメソッドではわずか0.82minで終わることができます。また、その際の整合性は個別のクロマトグラムが示すようにほぼ一致することが分かります。

また、このメソッド移管は1.6 μ mから5 μ mへと行っても同じ結果となります。そのため、品質管理⇔研究・開発においても迅速に分析を実行することが可能となります。

ソフトウェアから算出された値と実際の分析結果では異なることがあります。これには、充填剤の分布や空隙率などの全ての要素が考慮されているわけではありません。何の要素から移管された値を出しているのかを事前に確認しておくが良いと思います。

【個別のクロマトグラム】



6. 中分子ペプチドのメソッド移管例

次は弊社所有のHPLCおよびUPLCシステムを用いてグラジエント条件下でのメソッド移管例を示します。

ソフトウェアによって、UHPLC→HPLCへと移管されたグラジエントメソッドは高い再現性を得ることができました。



※画像提供 日本ウォーターズ(株)様

Conditions:

Column: Develosil FlexFire C18, 1.6 μ m (2.0x50mm)
Develosil FlexFire C18, 5 μ m (4.6x150mm)

Mobile Phase: A) Water + 0.05%DFA
B) Acetonitrile + 0.05%DFA

Gradient (UHPLC)	min	mL/min	%A	%B	Curve
	0.00	0.591	80	20	
	5.04	0.591	60	40	6
	5.05	0.591	80	20	6

Gradient (HPLC)	min	mL/min	%A	%B	Curve
	0.00	1.000	80	20	
	47.25	1.000	60	40	6
	47.34	1.000	80	20	6

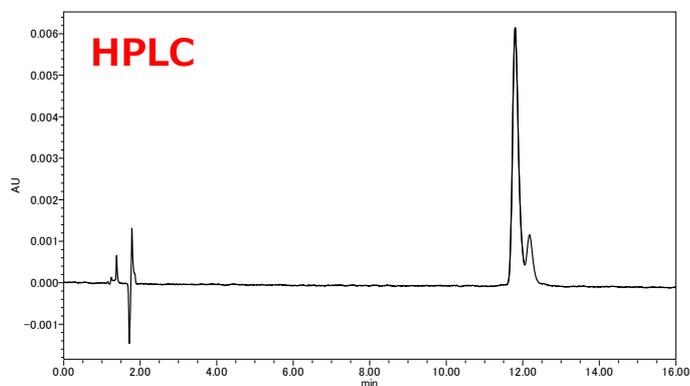
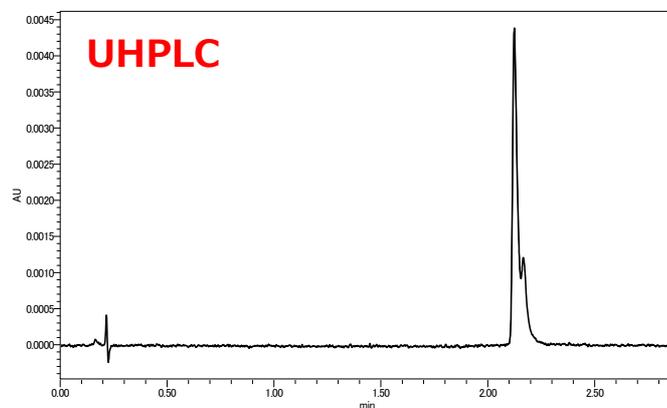
Temperature 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV280nm

Sample: Insulin, Human, recombinant (0.65mg/mL)

Injection volume: UHPLC: 0.2 μ L
HPLC: 3.2 μ L

system: UHPLC: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS
HPLC: Waters alliance



メソッド移管を確実に成功させるには、適したカラム、システムの選択が重要です。配管一つでデッドボリュームを発生させ、結果に甚大な影響を与えることも稀ではありません。

FlexFireシリーズは粒子径を問わず同じ物性を維持しているため、メソッド移管時において再現性の高い結果を与えることができます。このことはカラムを選択するうえで重要なファクタであることは間違いありません。

■ お問い合わせ/Contact us



野村化学株式会社

〒489-0004 愛知県瀬戸市日の出町15
Tel: 0561-48-1853 Fax: 0561-48-1434
e-mail: info@develosil.net

Nomura Chemical Co., Ltd.

15, Hinode-cho, Seto, 489-0004, Japan
Tel: +81-561-48-1853 Fax: +81-561-48-1434
e-mail: info@develosil.net

Develosil USA

Develosil USA

10060 Carroll Canyon Rd. Ste. 100 San Diego, CA 92131
Phone: 858-800-2433
Web: <https://develosil.us/>