

テクニカルレポート No.31

0.1%ギ酸移動相におけるUHPLCアプリケーション

はじめに

メソッドを構築する際には様々な条件を検討されていると思います。中でもpH条件は極めて重要で化合物のピーク形状に大きな影響を与えるため、大きな時間を費やすことが多いのではないのでしょうか？

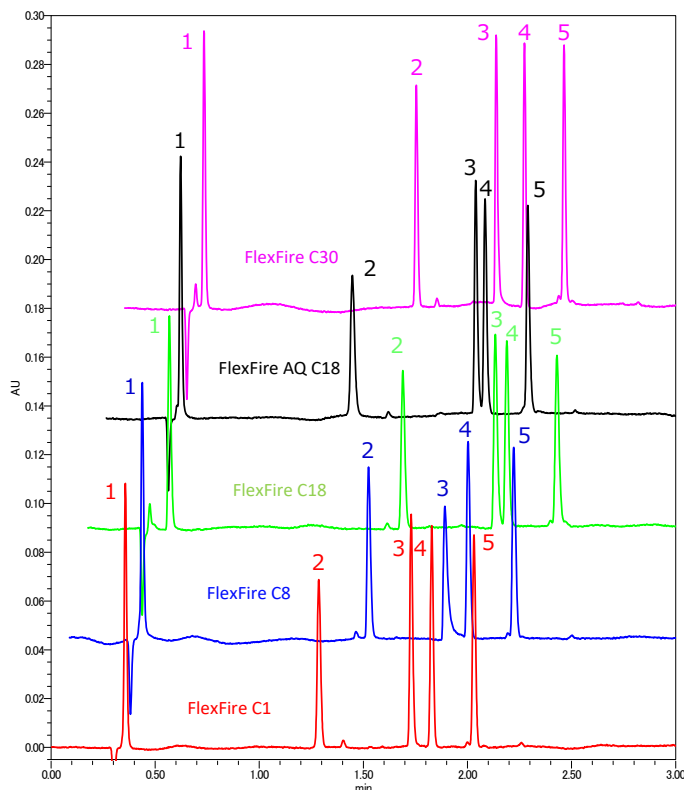
本レポートでは0.1%ギ酸にフォーカスしたUHPLCカラムのアプリケーションデータの取得を行いました。このアプリケーションデータはLC/MSメソッドにもすぐに適用することができます。

■弊社が使用している添加剤一覧

| 液性 | 添加剤名 |
|-------|-----------------|
| 酸性 | 酢酸、ギ酸、DFA、TFA |
| 中性 | トリエチルアミン酢酸 |
| アルカリ性 | アンモニア水、トリエチルアミン |

多くの検出器に対応させるため、揮発性の添加剤を選択しています。UV検出器のみであれば、リン酸も使用する場合があります。

低分子ペプチドの分析



Conditions:

Column: FlexFire series, 1.6um (2.0x50mm)
Mobile phase: A) Water+0.1%HCOOH B) Acetonitrile+0.1%HCOOH

Gradient:

| min | mL/min | %A | %B | Curve |
|------|--------|----|----|-------|
| 0.00 | 0.5 | 95 | 5 | |
| 1.46 | 0.5 | 75 | 25 | 6 |
| 2.93 | 0.5 | 75 | 25 | 6 |
| 2.96 | 0.5 | 95 | 5 | 6 |

Temperature:

40°C

Sample:

HPLC Peptide standard mixture (SIGMA)
1. Gly-Tyr
2. Val-Tyr-Val
3. Angiotensin II
4. Methionine Enkephaline
5. Leucin Enkephaline

Injection volume:

0.2uL

System:

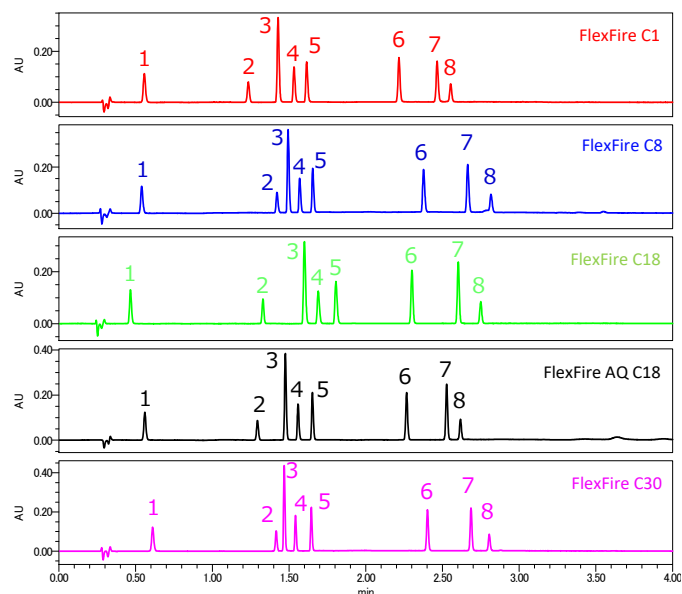
Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100uL

低分子ペプチドは移動相にTFAを添加して分析する例もありますが、FlexFireシリーズでは0.1%ギ酸条件下で低分子ペプチドの分析が可能です。

医薬品の分析



Conditions;

Column: FlexFire series, 1.6um (2.0x50mm)
 Mobile phase: A) Water+0.1%HCOOH B) Acetonitrile+0.1%HCOOH

Gradient:

| min | mL/min | %A | %B | Curve |
|------|--------|----|----|-------|
| 0.00 | 0.5 | 90 | 10 | |
| 2.2 | 0.5 | 30 | 70 | 6 |
| 3.67 | 0.5 | 30 | 70 | 6 |
| 3.68 | 0.5 | 90 | 10 | 6 |

Temperature:

40°C

Sample:

1.Acetoaminophen 2.Guaifenesin 3.Propranolol
 4.Diphenhydramine 5.Bromhexine 6.Ketoprofen
 7.Flurbiprofen 8.Ibuprofen

Injection volume:

0.2uL

System:

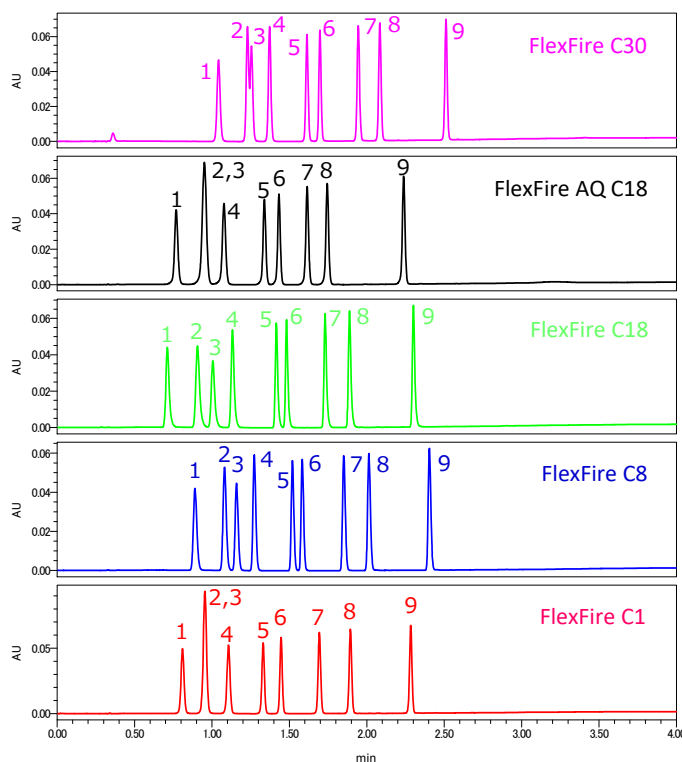
Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100uL

これまでリン酸系緩衝液で行ってきた分析もギ酸移動相でも可能です。UHPLCとの組み合わせで手間と分析時間の短縮をさらに加速させます。

サルファ剤の分析



Conditions;

Column: FlexFire C30 1.6um (2.0x50mm)
 FlexFire AQ C18 1.6um (2.0x50mm)
 FlexFire C18 1.6um (2.0x50mm)
 FlexFire C8 1.6um (2.0x50mm)
 FlexFire C1 1.6um (2.0x50mm)
 Mobile phase: A) Water + 0.1% HCOOH B) Acetonitrile + 0.1%HCOOH

Gradient:

| min | mL/min | %A | %B | Curve |
|------|--------|----|----|-------|
| 0.00 | 0.5 | 90 | 10 | |
| 2.20 | 0.5 | 60 | 40 | 6 |
| 3.67 | 0.5 | 60 | 40 | 6 |
| 3.68 | 0.5 | 90 | 10 | 6 |

Temperature:

40°C

Detection:

UV275nm

Sample:

1. Sulfadiazine (49ug/mL)
 2. Sulfathiazole (51ug/mL)
 3. Sulfapyridine (52ug/mL)
 4. Sulfamerazine (52ug/mL)
 5. Sulfamethazine (53ug/mL)
 6. Sulfamethoxyypyridazine (50ug/mL)
 7. Sulfachloropyridazine (52ug/mL)
 8. Sulfamethoxazole (52ug/mL)
 9. Sulfadimethoxine (53ug/mL)

Injection volume:

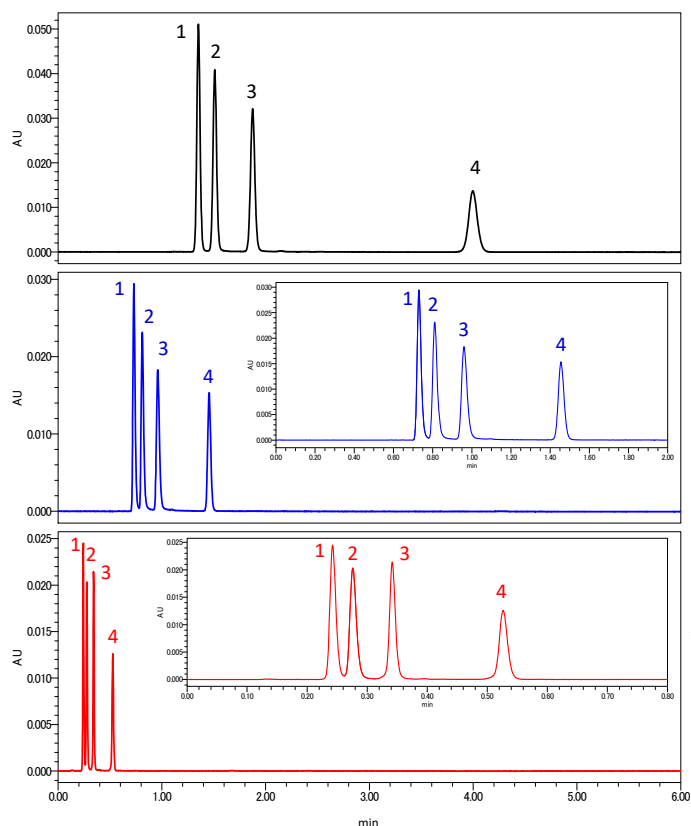
0.2uL

System:

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

サルファ剤の分析において、結合密度の高いFlexFire C18およびC8において完全分離を達成します。

カテコールアミンの分析



Conditions;

Column: FlexFire AQ C18 5µm (2.0x150mm)
 FlexFire AQ C18 2.6µm (2.0x100mm)
 FlexFire AQ C18 1.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase: 0.1% HCOOH

Flow rate: 5µm: 0.2mL/min
 2.6µm: 0.3mL/min
 1.6µm: 0.5mL/min

Temperature: 40°C

Detection: UV260nm

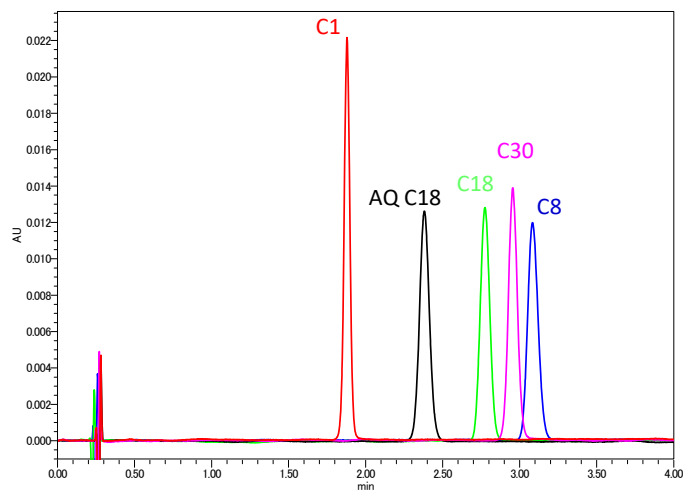
Sample: 1. Norepinephrine (98ug/mL)
 2. Epinephrine (96ug/mL)
 3. Dopamine (97ug/mL)
 4. Tyrosine (98ug/mL)

Injection volume: 5µm: 0.5µL
 2.6µm: 0.3µL
 1.6µm: 0.2µL

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

0.1%ギ酸移動相によるカテコールアミンのUHPLCメソッド移管例です。約4分で完結するHPLCメソッドは1.6µmパーティクルのUHPLCへ移管されることにより約40秒で完結します。

ジクロフェナク Naの分析



Conditions;

Column: FlexFire C30 1.6µm (2.0x50mm)
 FlexFire AQ C18 1.6µm (2.0x50mm)
 FlexFire C18 1.6µm (2.0x50mm)
 FlexFire C8 1.6µm (2.0x50mm)
 FlexFire C1 1.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase: Acetonitrile/0.1%HCOOH=40/60

Flow rate: 0.5mL/min

Temperature: 40°C

Detection: UV275nm

Sample: 1. Diclofenac Na (99ug/mL)

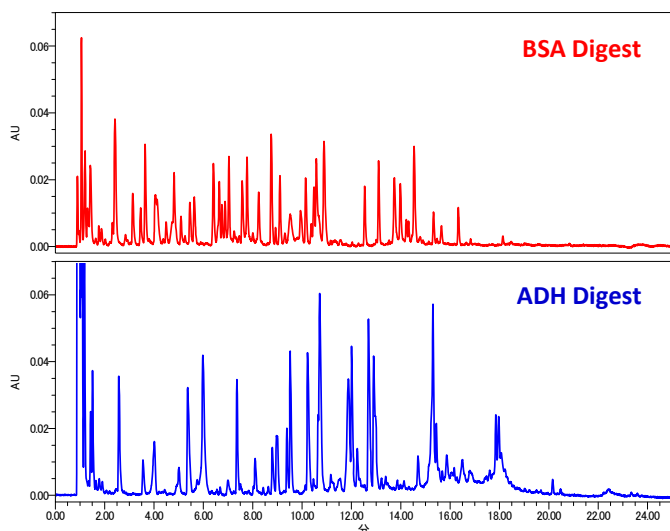
Injection volume: 0.2µL

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

FlexFire C1はその低吸着性を活かすことで他の充填剤よりも高感度に検出することが可能です。



タンパク質消化物の分析



Conditions;

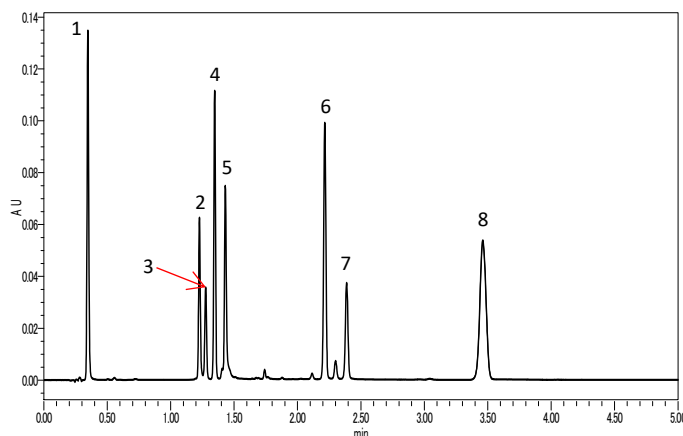
Column: FlexFire mAb-RP, 2.6 μ m (2.0x100mm)
 Mobile phase: A) Water+0.1%HCOOH B) Acetonitrile+0.1%HCOOH

| Gradient: | min | mL/min | %A | %B | Curve |
|-----------|------|--------|-----|----|-------|
| | 0.00 | 0.3 | 100 | 0 | |
| | 30.0 | 0.3 | 50 | 50 | 6 |
| | 30.1 | 0.3 | 100 | 0 | 6 |

Temperature: 40°C
 Detection: UV210nm
 Sample: BSA Digest
 ADH Digest
 Injection volume: 10 μ L
 System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS
 Mixer: 100 μ L

低分子化されたタンパク質はTFAを使用しなくとも、0.1%ギ酸条件下でも十分な結果を得ることができます。

ポリフェノール類の分析



Conditions;

Column: Flex Fire C18, 1,6 μ m (2.0x50mm)
 Mobile phase: A) Water + 0.1% HCOOH
 B) Acetonitrile + 0.1% HCOOH

| Gradient: | min | mL/min | %A | %B |
|-----------|------|--------|----|----|
| | 0.00 | 0.5 | 80 | 20 |
| | 1.28 | 0.5 | 45 | 55 |
| | 3.60 | 0.5 | 45 | 55 |
| | 3.61 | 0.5 | 80 | 20 |

Temperature: 40°C
 Detection: UV260nm
 Sample: 1.Puerarin (10.4 μ g/mL) 2.Baicalin (10.2 μ g/mL)
 3.Resveratrol (9.5 μ g/mL) 4.Daidzein (11.6 μ g/mL)
 5.Quercetin (9.0 μ g/mL) 6.Biochanin A (9.7 μ g/mL)
 7.Curcmin (10.0 μ g/mL) 8.Ipriflavone (11.4 μ g/mL)
 Injection volume: 0.2 μ L

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS
 Mixer: 100 μ L

0.1%ギ酸などのシンプルな移動相条件は最短で結果を得られるため、ファーストメソッドに最適なものとなります。

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

