Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY Arcシステムを使用した HPLC分析条件のスループットの向上

Amanda B. Dlugasch, Thomas E. Wheat, and Patricia R. McConville
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- HPLC で12分の分析条件を UHPLC では 4 分に短縮
- ソリッドコアで充填剤粒子径 2.7 µm の CORTECS カラムを使用することにより、カラム効率や分離能を損なわずに線速度と流量を増加
- カラム容量の少ないカラムを使用することによる溶媒使用量の削減

ウォーターズのソリューション

ACQUITY® Arc™ システム

2998 フォトダイオードアレイ(PDA) 検出器

CORTECS® カラム

ACQUITY UPLC® カリキュレータ

キーワード

HPLC、UHPLC、分析法の近代化、
ソリッドコアパーティクル

はじめに

ルーチンで確立された HPLC の分析条件を使用しているラボでは、様々な理由で分析条件の向上が必要になる可能性があります。法規制下においては、確立された HPLC 分析条件はバリデーションされているため、一般的には変更は不要であるか、軽微な変更のみが行われます。しかし、分析時間の短縮・溶媒消費量の削減・廃液の削減・1 サンプルの分析にかかるコスト削減のため、分析条件を変更することがあります。また、分析条件を変更しても、感度・直線性・真度・精度を保つ必要があります。このような場合にも、最新の装置と分析カラムを導入することにより、分析の質を低下させることなくラボを効率化させることが可能です。

本アプリケーションノートでは、ACQUITY Arc システムを用いて、確立された HPLC 分析条件の分析時間を短縮する方法をご紹介します。分析時間 12 分の HPLC 分析が、UHPLC の分析条件では 4 分になります。ACQUITY Arc システムは低拡散であり、分析カラムに合わせてシステム容量を選択できる機能と組み合わせて、分離を向上させることができます [1,2]。さらに、圧力上限が 9,500 psi であるため、2 µm 程度までの細かい充填剤のカラムを使用することも可能です。本アプリケーションで紹介する分析例では、CORTECS カラムのソリッドコアケミストリーを使用することで、流量を増やしても分離が保たれます [3]。カラムケミストリー、ソリッドコアテクノロジー、LC システムを組み合わせると、効果的に HPLC 分析条件の効率を向上させることができます。

図 1. ACQUITY Arc-PDA システム。このシステムでは、現行の HPLC の分析条件を再現することに加え、充填剤粒子径が 2.x µm のカラムを使用して分析法をスケールダウンすることで分析法を改善することが可能です。

分析条件

全多孔性のカラム、XBridge® BEH C_{18} 5µm、4.6 mm × 50 mm カラムを使用して従来の HPLC 条件にてサンプル分析を行いました。カラム効率の高いソリッドコアパーティクル [4] を活用するため、UHPLC 分析ではカラムを変更して、CORTECS C_{18} 2.7 µm、3 mm × 50 mm のカラムを使用しました。CORTECS カラムは線速度を速めても同等の分離を示すため、溶媒使用量を削減するために 3 mm 内径を選択しました。カラムを変更する際には、カラムカリキュレーター（図 2）を使用して分析条件のグラジエントテーブルとサンプル注入量を決定しました。この例では、分析のスループット向上が主な目的であるため、流量は 1.5 mL/ 分としました。

図 2. カラムカリキュレーター。変更後のグラジエントテーブルを算出するために、元の分析条件と変更後の分析条件に関して、カラム長・カラム内径・粒子径・注入量・システムのデュエルボリューム・変更後のシステムの耐圧を入力します。続いて、元のグラジエントテーブルを入力すると、変更後のカラム用の新しいグラジエントテーブルが算出されます。表面多孔性のカラムを使用すると線速度を上げても全多孔性のカラムと同等の分離を示すため、分析時間を短縮するために、スケーリングされた 0.85 mL/ 分ではなく 1.5 mL/ 分で送液しました。

サンプル詳細情報と調製方法

ACQUITY Arc システムに 2 種類のカラムを用いて、5 種類の化合物を含む試料（UPC²® グラジエントスタンダード、製品番号 186006551）の分析を行いました。バイアルに UPC² グラジエントスタンダード 100 µL と、50/50 水 / メタノールの溶媒を 900 µL を混合しました。

HPLC/UHPLC 条件

LC システム： ACQUITY Arc システム、30 cm カラムヒーター

2998フォトダイオードアレイ検出器、10 mm 分析用フローセル

測定波長：254 nm

サンプリングレート：20 ポイント / 秒

フィルタータイムコンスタント：標準

データ管理：Empower 3 FR2 SR1

	HPLC 条件	UHPLC 条件
カラム	XBridge BEH C_{18} 5 µm, 4.6 mm x 50 mm	CORTECS C_{18} 2.7 µm, 3 mm x 50 mm
カラム温度	30℃	30℃
サンプル温度	10℃	10℃
注入量	5.0 µL	2.1 µL
流量	1.0 mL/min	1.5 mL/min
流路	パス1	パス1
移動相	移動相A：0.1 %ギ酸水溶液、移動相B：0.1 %ギ酸含有メタノール	移動相A：0.1 %ギ酸水溶液、移動相B：0.1 %ギ酸含有メタノール
グラジエント	移動相B 5-80%/9分	移動相B 5-80%/2.5分
1回の分析あたりの溶媒消費量	12 mL	6 mL

結果および考察

ACQUITY Arc システムは、HPLC・UHPLC の双方で使用可能です。ACQUITY Arc システムにて典型的な HPLC の分析を実行した結果を図 3 に示しました。続いて、同じ分析条件を、カラムケミストリーを変更して UHPLC カラムを使用することで分析時間を短縮して行いました。カラムケミストリーは、XBridge C_{18} カラムをソリッドコアパーティクルのカラムに変更しました [5]。より細かい充填剤を使用することで、線速度を上げても同等の分離を得ることができる一方、溶媒消費量も削減させることが可能です。また、カラム内径を 4.6 mm から 3.0 mm へスケールダウンすると、溶媒使用量がさらに減少します。ソリッドコアパーティクルを使用すると、このような分析条件でより高いカラム効率を得ることができます。そのため、より細かい全多孔性の充填剤のカラムと同等の分離を得ることが可能です。ソリッドコアパーティクルを充填したカラムでは線速度を速くしてもカラム効率が落ちないため、短い分析時間でよりよい分離が得られます。

このようなカラムケミストリーと ACQUITY Arc システムを組み合わせると、HPLC の分析条件を向上させることが可能です。ACQUITY Arc システムには従来の HPLC システムと比較して、低拡散のパッシブプレヒーターと低拡散のフローセル（2998 PDA）を備えています。装置以外の条件を変更しなかった場合、低拡散の LC システムでは、分離と感度が向上します。ACQUITY Arc システムは最大流量が 5 mL/ 分、耐圧 9,500 psi のため、より広範囲の分析条件をサポートします。元の HPLC 分析条件の最大圧力が約 1,900 psi で、向上させた分析条件の最大圧力が約 7,500 psi となりましたが、装置の耐圧 9,500 psi を十分満たします。

化合物	HPLC分析条件、USP分離度	UHPLC分析条件、USP分離度
Thymine	–	–
Caffeine	36.6	32.7
Coumarin	15.0	13.1
Prednisone	14.1	14.4
Flavone	16.6	16.2

表 1. HPLC・UHPLC 分析条件における各ピーク間の分離度

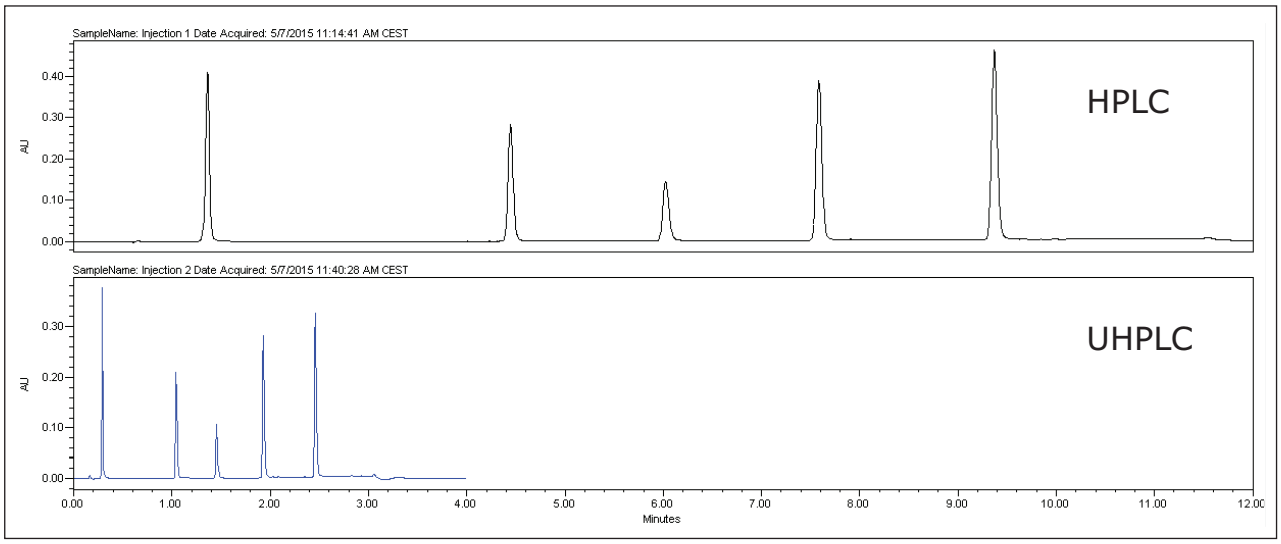

図 3. ACQUITY Arc システムを用いた HPLC 分析条件と UHPLC 分析条件の比較。溶出順：thymine, caffeine, coumarin, prednisone, flavone。

元の HPLC 分析の結果と UHPLC 分析の結果を比較すると、同等の結果が短時間で得られました。HPLC の 12 分の分析条件は、1 分析あたり 4 分に短縮されました。流量を上げましたが、溶媒消費量は UHPLC 分析条件では 1 分析あたり 12 mL から 6 mL へ半減しました。双方の分析条件において、ピーク間の分離度は同等でした。サンプルの注入量をカラム容量に対して比例計算したところ、同等のピーク面積・高さとなりました（図 3，4）。

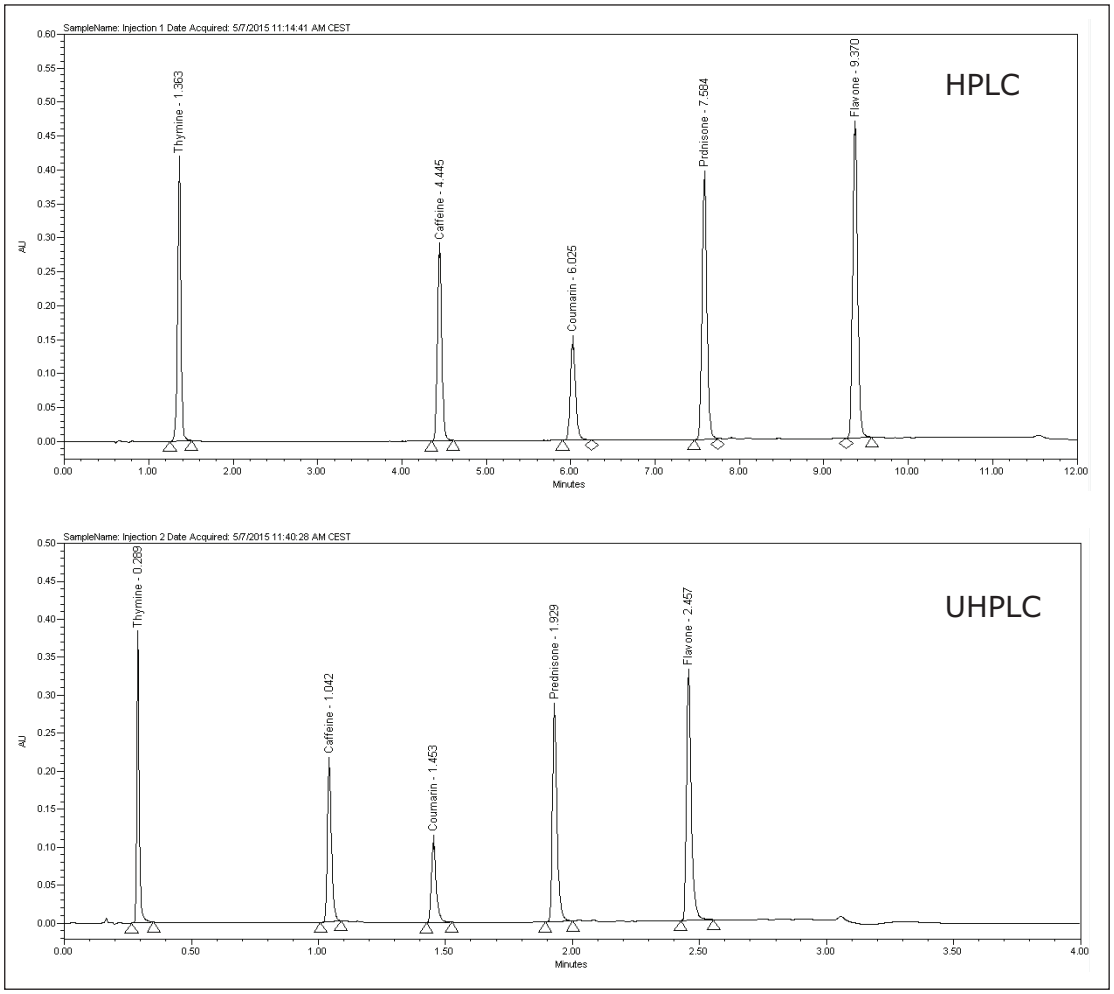

図 4. ACQUITY Arc システムにおける HPLC 分析条件と UHPLC 分析条件の比較。X 軸の値は上下で異なります。同等なクロマトグラムとなりました。

結論

ACQUITY Arc システムとソリッドコアのカラムテクノロジーを用いて HPLC 分析条件を UHPLC 分析条件に移管する方法を、5 種の化合物を含むサンプルの分析を例に示しました。分析時間を短縮することは求められますが、分離を保つことも重要です。その結果、ラボの効率が高まります。

カラム内径を 4.6 mm から 3 mm へ変更することで、溶媒消費量が半減しました。ソリッドコアパーティクルを充填した CORTECS カラムを使用して分析を行うと、元の分析条件の 3 ～ 4 倍スループットが向上しました。ACQUITY Arc システムによって、HPLC の分析条件を向上させ、分析時間が短く効率的な UHPLC 分析条件に移管することが可能です。

参考文献

1. Waters Poster Library number: PSTR134867237 Title: The Impact of LC Instrument Characteristics on Method Migration and Method Transfer; Paula Hong, Jennifer Simeone, Patricia R. McConville
2. Journal of Chromatography A, Volume 1216, Issue 32, 7 August 2009, Pages 5979-5988, Kenneth J. Fountain, Uwe D. Neue, Eric S. Grumbach, Diane M. Diehl
3. Jonathan E. Turner, Bonnie A. Alden, Mia Summers, Kenneth Berthelette, Kenneth J. Fountain. Transferring HPLC Gradient Methods Using CORTECS Solid-Core Particle Columns. Waters Application Note 720005104en. 2014 July
4. CORTECS Columns Combined Brochure. Waters Part Number 720004675en. 2015 Feb.
5. CORTECS Columns Applications Notebook. Waters Application Note 720004739en. 2014 May

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、CORTECS、XBridge、UPC² および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
Arc は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2017 Waters Corporation. Produced in Japan. 2017年2月 720005567JA PDF