

HPLC ⇄ UHPLC間のメソッド移行時の留意点

温度変化の影響を受けやすい化合物の場合

J110725A

Triart C18は、充填剤ロット間だけでなく異なる粒子サイズ(5, 3, 1.9 μm)間での分離再現性に優れ、HPLCとUHPLC相互のきわめてシームレスかつ堅牢なメソッド移行が可能なカラムです。ただし、わずかな温度の違いで保持やピーク形状が変化しやすい化合物においてはHPLC⇄UHPLC間でメソッド移行をする際に、分離(溶出)パターンが変わり、再現性が得られにくい場合があります。このシートでは、その実例と再現性良くメソッド移行するためのポイントをご紹介します。

分析高速化における溶出パターンの変化とUHPLCシステムによる違い

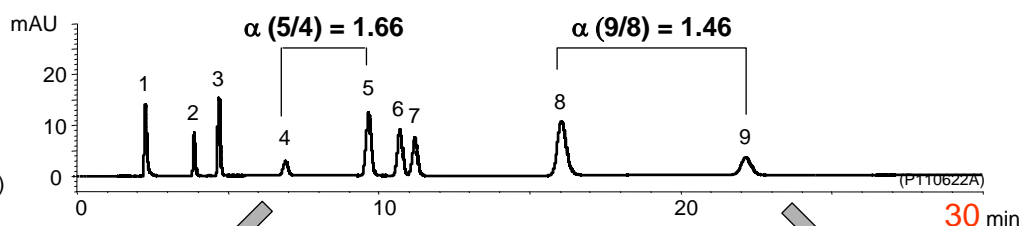
—水溶性ビタミン9成分の分析高速化(40°C)—

HPLC method*

5 μm 250 X 4.6 mml.D.

0.80 mL/min at 40°C

(* 食品中の食品添加物分析法準拠)



UHPLC method

1.9 μm 100 X 2.0 mml.D.

線速度 (at 40°C)

X1 (0.15 mL/min)

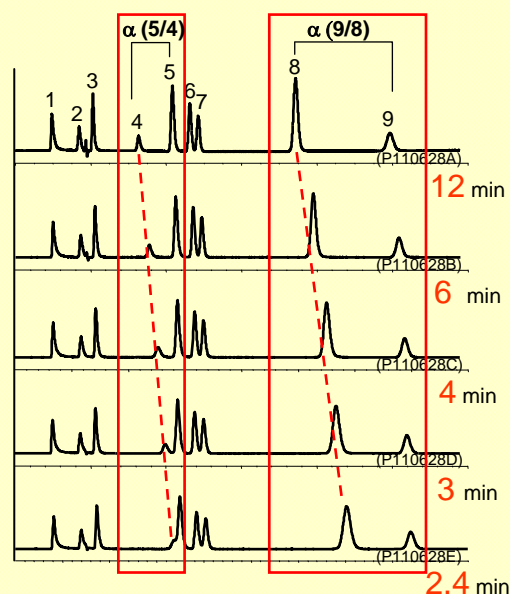
X2 (0.30 mL/min)

X3 (0.45 mL/min)

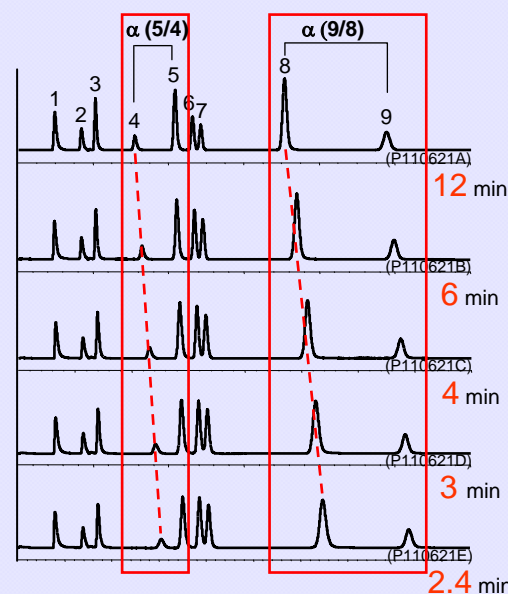
X4 (0.60 mL/min)

X5 (0.75 mL/min)

System A (温調: 空気循環式)



System B (温調: ヒートブロック式)



1. Thiamine HCl (Vitamin B₁)
2. Pyridoxine HCl (Vitamin B₆)
3. Nicotinamide
4. Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂)
5. L-Ascorbic acid 2-glucoside
6. L-Ascorbic acid (Vitamin C)
7. Erythorbic acid
8. Riboflavin (Vitamin B₂)
9. Nicotinic acid

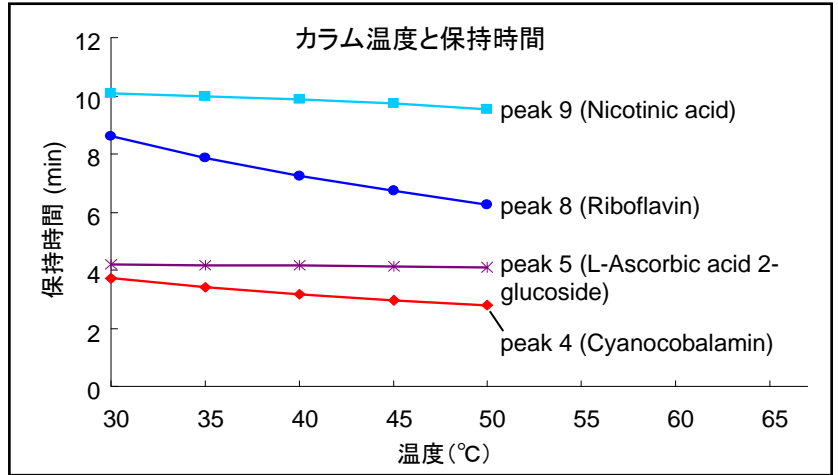
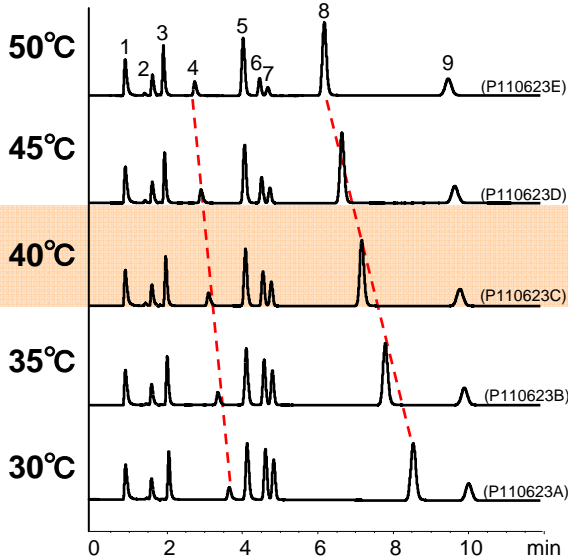
流速	System A (空気循環式)		System B (ヒートブロック式)	
	α (5/4)	α (9/8)	α (5/4)	α (9/8)
0.15 mL/min	1.43	1.55	1.40	1.46
0.30 mL/min	1.30	1.44	1.34	1.42
0.45 mL/min	1.21	1.36	1.30	1.38
0.60 mL/min	1.12	1.29	1.26	1.36
0.75 mL/min	1.04	1.22	1.23	1.33

水溶性ビタミン9成分のHPLC分析メソッドをUHPLC分析メソッドに移行した例です。カラムをHPLC用の5 μm 250 X 4.6 mml.D.からUHPLC用の1.9 μm 100 X 2.0 mml.D.に変更し線速度を5倍まで上げたところ、高流速になるほどpeak 4(Cyanocobalamin)およびpeak 8(Riboflavin)とその後に溶出するピークとの分離が悪くなり、選択性(分離係数α)に変化が生じていることがわかります(□で囲んだ部分)。また、同一カラム・同一条件でもUHPLCシステム間で溶出パターンに差が見られ、System Aの方が流速上昇とともに変化が大きくなっています。両UHPLCシステムはカラムオープンの温調方式が異なることから、分析時のカラム内温度差が影響している可能性を考え、各化合物の分離の温度依存性を確認しました。

Column : YMC-Triart C18
 Eluent : phosphate buffer*/acetonitrile (90/10)
 ※ Dissolve 1.4 g KH₂PO₄ in 800 mL water → add 26 mL 10% tetrabutylammonium hydroxide (TBA · OH) → adjust pH 5.2 by 20% H₃PO₄ → add water to make 1000 mL
 Detection : UV at 260 nm
 Sample : 5 μg/mL
 Injection : 10 μL for 4.6mml.D., 2 μL for 2.0mml.D.

分離の温度依存性の確認

Column : 1.9 μ m 100 X 2.0 mmI.D.
Flow rate : 0.15 mL/min
System : UHPLC System B
(その他分析条件・化合物は前頁に同じ)



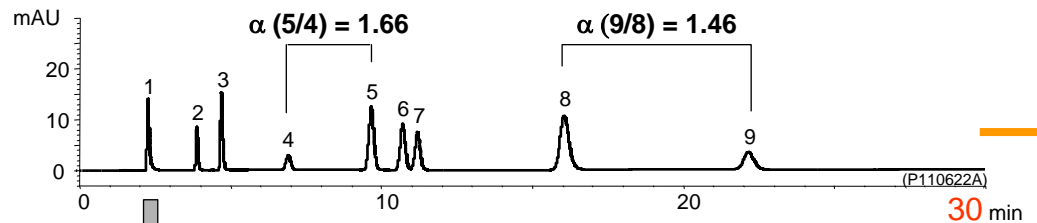
同一カラム・同一システムを用いて分析温度のみ40°Cから±10°C変化させた場合の溶出パターンを比較しました。クロマトグラムおよびグラフから、peak 4 (Cyanocobalamin) と peak 8 (Riboflavin) はその他成分に対して分析温度による保持の変動が顕著に大きいことが分かります。また、このカラム温度を下げた場合と前頁のUHPLC分析で線速度を上げた場合の変化が類似していることから、分析高速化において線速度上昇とともにカラム内部温度が低下していることが示唆されました。

UHPLCメソッド設定時のワンポイント — 温度依存性が高い化合物の分離を再現性よく移行するために —

HPLC method*
5 μ m 250 X 4.6 mmI.D.

0.80 mL/min at 40°C

(* 食品中の食品添加物分析法準拠)



UHPLC method
1.9 μ m 100 X 2.0 mmI.D.

線速度 & カラム温度

X1 (0.15 mL/min) at 40°C

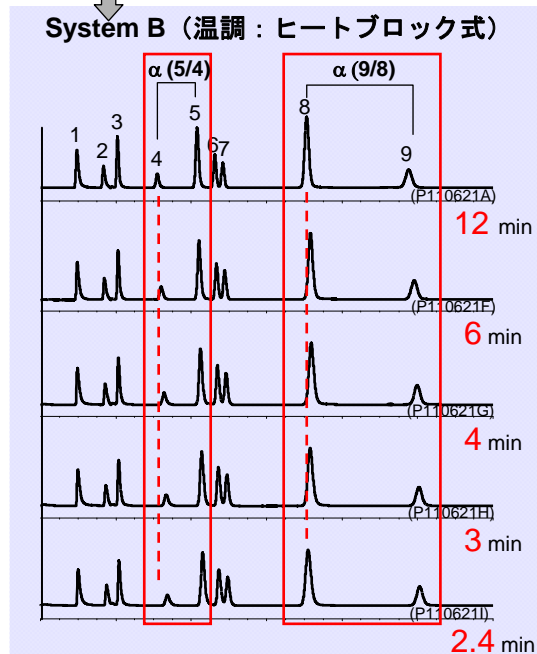
X2 (0.30 mL/min) at 42°C

X3 (0.45 mL/min) at 44°C

X4 (0.60 mL/min) at 46°C

X5 (0.75 mL/min) at 48°C

(その他分析条件・化合物は前頁に同じ)



流速	System B (ヒートブロック式)	
	$\alpha(5/4)$	$\alpha(9/8)$
0.15 mL/min at 40°C	1.55	1.46
0.30 mL/min at 42°C	1.50	1.46
0.45 mL/min at 44°C	1.47	1.47
0.60 mL/min at 46°C	1.45	1.49
0.75 mL/min at 48°C	1.44	1.43

分析時間 X 1/13
溶媒使用量

UHPLC分析においては高速化を目的に短いカラムを線速度を上げて使用することが一般的ですが、このような場合、移動相の加温が不十分となりやすく、この十分に加温されない溶媒がカラム容積に対して多量に流れ込むことによってカラム内部温度が低下し、本例のように溶出パターンに影響をおよぼすことがあります。また、カラムの中心部と内壁部との温度勾配によりピークの歪みが生じる場合もあります。このような影響を低減し分離再現性を向上させるには、高速化時に移動相およびカラム温度をあらかじめ流速/カラム容積に対して適切な温度に高める(反対に低速化時には低くする)方法が効果的です。

ここでは前頁とシステム(System B使用)や流路は変えずに、線速度増加にあわせてカラムオープン設定温度を2°Cずつ上げることによって高速条件下でのカラム内部温度低下を抑制した例を示しています。線速度を5倍まで上げてHPLC分析の分離がほぼ維持されており、前頁よりも再現性よく分析時間を1/13に短縮することが可能でした。この他に移動相のプレヒート流路を長くする方法も一案ですが、試料がカラムに導入されるまでの拡散が大きくなることで分離能が低下する場合がありますため、低拡散タイプなどシステムに応じて適切なパーツを選択してください。