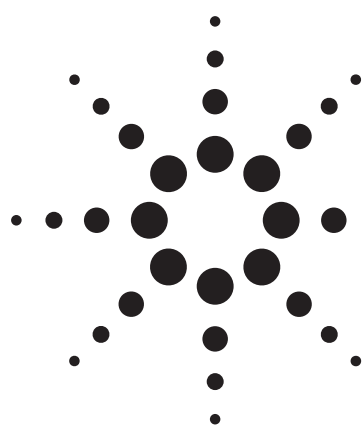


ディレイボリユームの低減による ハイスループットグラジエントの最適化



アプリケーション

著者

John W. Henderson, Jr., William Long, and Cliff Woodward
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要約

ハイスループットグラジエント分析を開発する場合、通常は、カラム再平衡時間の短縮とグラジエントディレイボリユームの低減を検討します。ZORBAX ラピッドレゾリューションハイスループット (RRHT) カラムを用いると、分析サイズのカラムと比較して再平衡時間が大幅に短縮され、さらに、G1312B ポンプは流路がシンプルであるため、システムのディレイボリユームも減少します。低容量カラムを用いたグラジエントには、ディレイボリユームが少ないことが求められます。標準ディレイボリユームコンフィグレーションと低ディレイボリユームコンフィグレーションのクロマトグラムを比較してこの必要性を示しました。ポンプを低容量カラムに対して最適化すると、ピーク幅が狭まり、スループットが高まります。さらに、RRHT C18 固定相を C8 に置き換えると、分析時間を短縮できます。

緒言

短い RRHT カラムは、高性能液体クロマトグラフ (HPLC) グラジエントメソッドに最適です。1.8 μm 粒子を充てんした短い (30 ~ 50 mm) カラムは、従来の 5 μm 粒子の長い (100 ~ 250 mm) カラムよりも高流量で用いることができ、再平衡化も迅速に行えます。再平衡化時間の短縮は、グラジエントメソッドをハイスループットグラジエントメソッドに向上させるための重要な方策です。短い RRHT カラムは、カラム容量が少ないため再平衡化時間も短縮され、その結果、分析時間が短くなります。

この利点にもかかわらず、グラジエントメソッドではクロマトグラフィの結果 (分離など) が元のクロマトグラムと厳密に一致しない恐れがあるため、イソクラチックメソッドと比較してグラジエントメソッドの変更を躊躇する傾向があります。標準ボア (内径 4.6 mm) からナローボア (内径 2.1 mm) グラジエントへ変換する場合、この傾向は特に顕著となります。問題となるのは、グラジエントが形成される地点からカラム先端までに要する時間、あるいはボリユームを再現することです。これは、ディレイタイムまたはディレイボリユームと呼ばれます。グラジエント中に、カラム内の移動相の組成がある時点で異なるということが起こると、保持時間の違いや対象ピークの分離の違いを引き起こす原因になります。

このアプリケーションノートでは、ディレイボリユームを低減し、低容量 RRHT グラジエントメソッドによる分析結果を向上させるための、ポンプの流路を構成するパーツの変更について説明します。



実験

Agilent ラピッドレゾリューション LC (RRLC) システム構成:

- G1365C 多波長型検出器 (MWD) 254 nm、G1315-60024 ミクロフローセル (光路長 3 mm、容量 2 μ L)、応答時間設定 0.5 秒
- G1312B バイナリポンプ SL、移動相 A: 0.1 % ギ酸水溶液 (v/v) B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液 (v/v)、流量: 内径 2.1 mm カラムに対して 1.5 mL/min、内径 4.6 mm カラムに対して 5 mL/min

内径 0.12 mm のキャピラリでカラム恒温槽熱交換器をバイパスしたため、カラム温度は室温でした。

ZORBAX RRHT カラム:

- Eclipse Plus C18、2.1 x 30 mm、1.8 μ 、部品番号 959931-902
- Eclipse XDB-C8、4.6 x 30 mm、1.8 μ 、部品番号 924975-906

サンプルは、ウラシル (20 μ g/mL) と C3 ~ C10、C12、C14 のアルキルフェノン (各 100 μ g/mL) の 50% アセトニトリル/水溶液です。

結果および考察

ハイスループットメソッドの要点

特定の分析では、短いカラムで十分な分離が得られます。低分子では、移動相またはグラジエント条件を変更することで分離を調節できます。RRHT カラムに使用される ZORBAX 1.8 μ m 粒子は、従来の 5 μ m 粒子で充てんされた長いカラムと同じ効率を持ちます。たとえば、4.6 x 100 mm 1.8 μ m カラムは、4.6 x 250 mm 5 μ m カラムとほぼ同じ理論段数 (N) を有します:

$$N_{\text{ideal}} = L/2d_p$$

L はカラム長 (μ m)、 d_p は粒径 (μ m) です。分母の係数 2 は、カラム外デッドボリュームなどの理論段数を低下させる要素により変わる (2.5 など) ことがあります。

250 mm カラム: $N_{\text{ideal}} = 250,000 / 2 (5) = 25,000$;
RRHT 100 mm カラム: $N_{\text{ideal}} = 100,000 / 2 (1.8) = 27,778$ 。

100 mm RRHT カラムは、長さが短いため、スループットは単純に計算して 2.5 倍速くなります。さらに、RRHT 独自の粒度分布により、他のサブ 2 ミクロンカラムと比較して背圧が低いという特長があります。これにより、高い流量とハイスループットが可能です。

ハイスループットグラジエント分析を開発する標準的な手法は、カラム再平衡化時間の短縮とグラジエントレイボリュームの低減です。

短い RRHT カラムによる、カラム再平衡化時間の短縮

1.8 μ m 粒子を充てんしたカラムは RRHT カラムと呼ばれ、大きな粒子を充てんした分析カラムよりもカラム容量が小さくなります。4.6 x 150 mm カラムは、2.49 mL のカラム容量で、同じ内径の 50 mm のカラム容量は、その 2/3 の 0.83 mL です。2.1 x 30 mm の容量は 0.10 mL で、通常の分析カラムの 1/25 です。そのため、カラム平衡時間や移動相の量も 1/25 になります。ZORBAX の 80 \AA 粒子では、カラムの空隙容量はカラム容積の約 60% になります。4.6 x 150 mm カラムは、2.49 mL x 0.60 = 1.5 mL になり、2.1 x 30 mm の充てんカラムは約 0.1 mL x 0.60 = 0.06 mL で、1/25 の容積になります。

カラムを再平衡化するために、グラジエントの初期移動相がカラム 5 本分の容量が必要とされると仮定します。1 mL/min で操作する ZORBAX 4.6 x 150 mm カラムでは、5 カラム容量 x 1.5 mL/カラム容量 = 7.5 mL、7.5 mL/1 mL/min = 7.5 min の再平衡化時間、となります。

RRHT カラムは以下のように迅速に再平衡化できます。

- 2.1 x 30 mm: 5 カラム容量 x 0.06 mL/カラム容量 = 0.3 mL; 0.3 mL / 0.2 mL/min = 1.5 min の再平衡化時間
- 4.6 x 30 mm: 5 カラム容量 x 0.3 mL/カラム容量 = 1.5 mL; 1.5 mL / 1 mL/min = 1.5 min の再平衡化時間

短い RRHT カラムの 1.8 μ m 粒子は、高流量で効率を落とさないように設計されているため、実際の平衡化時間は、RRHT ではさらに短くなると予想されます。

低ディレイボリュームが必要な低容量 RRHT カラムでのグラジエント

同一のカラム線流速を達成するために、内径 2.1 mm メソッドの流量は、内径 4.6 mm メソッドの約 5 分の 1 (4.8 分の 1) 未満です。

$$F_2 = F_1 (id_2/id_1)^2$$

F_2 と F_1 は、新しい流量と既存の流量で、 id_2 と id_1 はそれぞれのカラム内径です。流量は内径の 2 乗に比例するため、4.6 mm から 2.1 mm に縮小すると、流量が約 1/5 に減ります。

グラジエントメソッドでは、ディレイタイム (グラジエント形成地点からカラム先端までのグラジエントに要する時間) は 5 倍長くなります。内径 4.6 mm と 2.1 mm どちらのカラムでもサンプルは 0 分に注入されるため、内径 2.1 mm のカラムを使用する場合には、サンプルはグラジエントがカラム先端に到達するまで、初期移動相のままイソクラチックで 5 倍長い時間カラムの中を移動します。そのため、内径 4.6 mm と 2.1 mm のカラムでは全く異なるクロマトグラムになる可能性があります。

ディレイタイムを短縮するには、高流量で操作する、あるいはカラム上流の容量を減らし、グラジエントがカラムに速く到達するようにする、の 2 通りの方法があります。

1200 HPLC システムでは、以下のようなディレイボリュームを低減するいくつかの方法があります。

- 内径 0.17 mm の配管の代わりに内径 0.12 mm の配管を用いる
- カラム恒温槽の標準熱交換器を短いキャピラリでバイパスするか、低拡散熱交換器キットを用いる (G1316-80003 と G1316-83200)
- サンプルループと計量シリンジをバイパスするようにオートサンプラをプログラムする (自動ディレイボリュームモード;オン)
- 標準ディレイボリュームから低ディレイボリュームにバイナリポンプを再配管する

標準ディレイボリュームと低ディレイボリュームに、G1312B バイナリポンプを変更することは簡単です [1]。1/4" と 9/16" レンチと図 1a と 1b の図解があれば実行できます。溝付き 1/4" ナットドライバー (部品番号 05023-0240) を使うと、キャピラリを圧力トランスデューサに容易に接続できます。

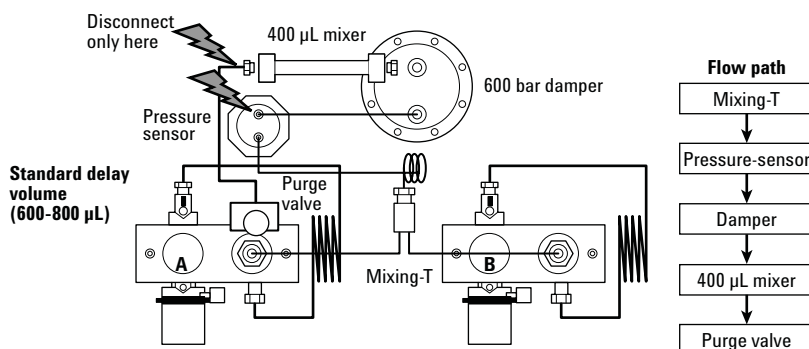


図 1a. G1312B LC ポンプの標準ディレイボリュームコンフィグレーション。流路中の 2 つの接続を変更することにより、簡単にディレイボリュームを低減できます。

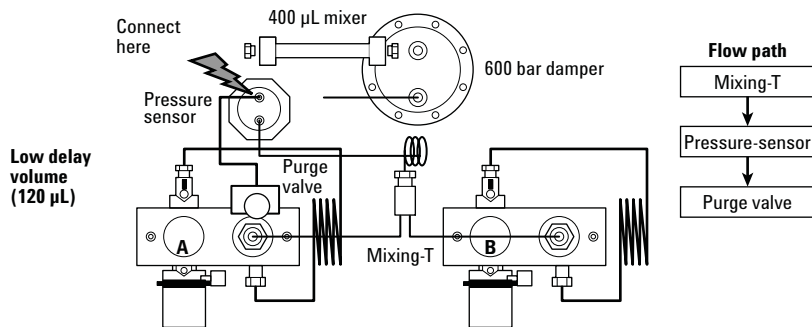


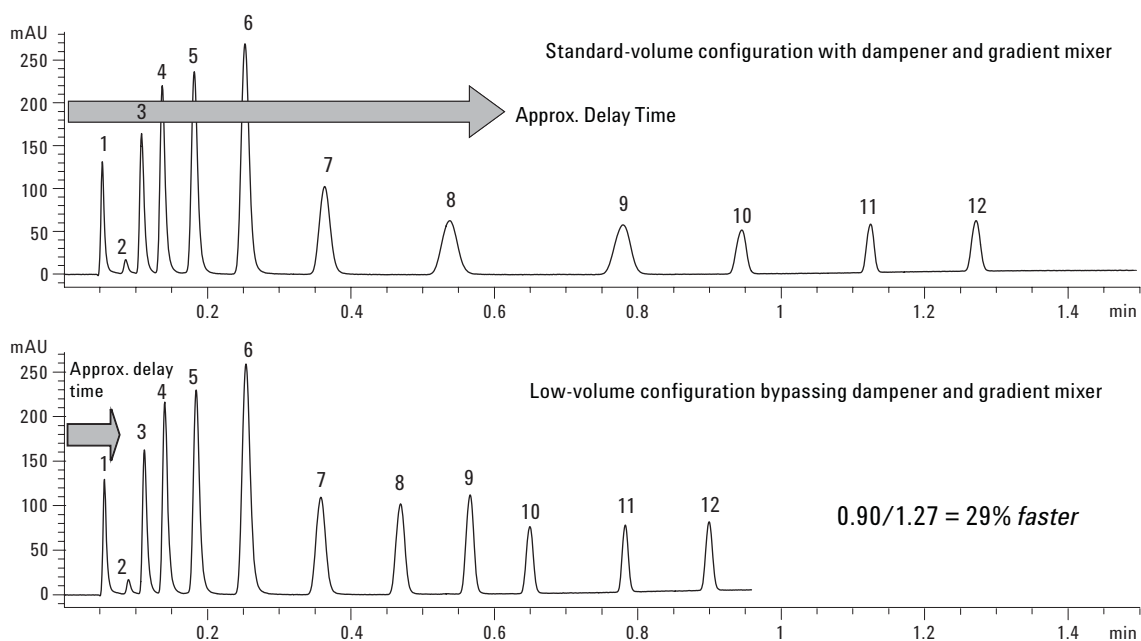
図 1b. G1312B LC ポンプの低ディレイボリュームコンフィグレーション。パージバルブに接続されたキャピラリは、圧力センサーに接続されています。

図 2 と図 3 では、ディレイボリューム低減による分析結果の差を示しています。

図 2 は、バイナリポンプを用いた、2.1 x 30 mm RRHT Eclipse Plus C18 によるアルキルフェノン類分析 (グラジエント溶出) における標準ディレイボリュームと低ボリュームコンフィグレーションの比較です。グラジエントは時間ゼロで開始し 0.5 分で移動相 B を 100% にするプログラムですが、実際はカラムより上流のデッドボリュームにより、グラジエントがカラムに到達する前に顕著なディレイタイムを生じます。これは、カラムから溶出する幅広いピーク (ピーク 1 ~ 9) として確認されます。約 0.5 分でようやくグラジエントが注入したサンプルに到達し、ピーク 10 ~ 12 がシャープになっています。

低ボリュームコンフィグレーションでは、最も早く溶出するピークはインクラチックで溶出していますが、後で溶出するピークの幅は狭くなり、グラジエントがカラム先端により早く到達したことを示しています。低ディレイボリュームにポンプを設定することで、全体の分析時間は約 30% 短縮されました。

図 3 は、2.1 x 30 mm Eclipse Plus C18 の代わりに、4.6 x 30 mm RRHT Eclipse XDB-C8 を用いた例です。流量は 5 mL/min であるため、標準ディレイボリュームと低ディレイボリュームのディレイタイムの差は小さくなります。ピークの広がり、内径 2.1 mm メソッドほど顕著ではありません。しかし、ポンプを低ディレイボリュームに設定すると、分析時間が 14% 短縮されます。



Column: ZORBAX Rapid Resolution HT Eclipse Plus C18, 2.1 mm x 30 mm

Mobile phase: A: 0.1% formic acid, B: 0.1% formic acid in ACN

Gradient: 70 to 100% B/0.5 min

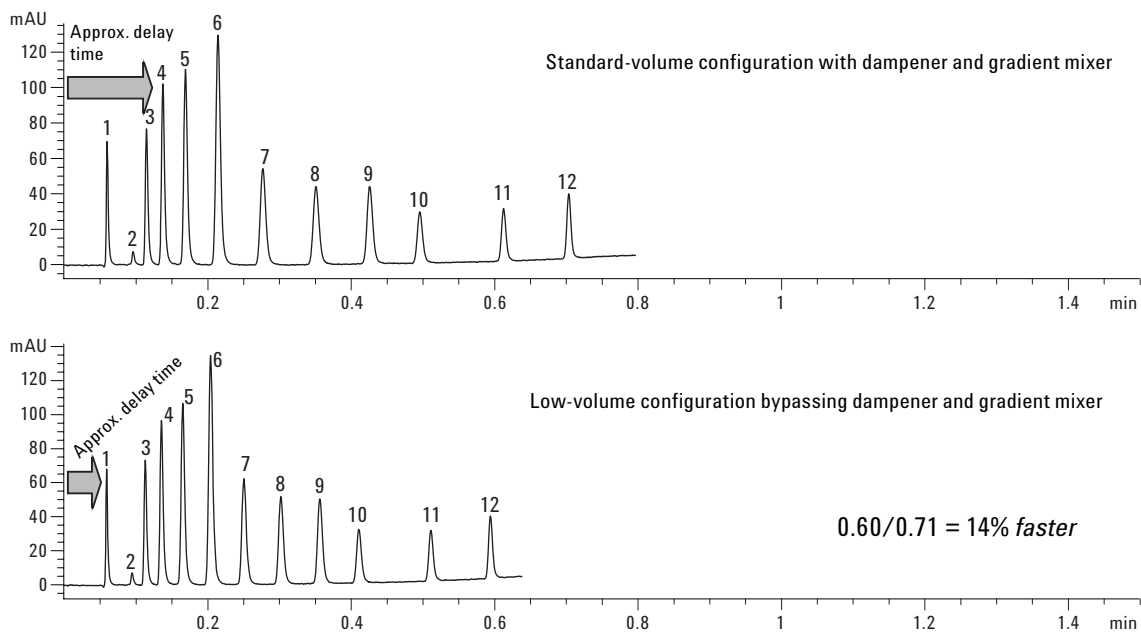
Flow rate: 1.5 mL/min

Temperature: 25 °C

Detection: UV 254 nm, micro flow cell, data rate: 0.5 s

Sample: Uracil (peak 1) and alkylphenones C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C12, C14 (peaks 3-12)

図 2. ナローポア RRHT カラムのディレイボリュームを小さくすると、高いスループットが得られます。



Column: ZORBAX RRHT Eclipse XDB-C8, 4.6 mm × 30 mm
Mobile phase: A: 0.1% formic acid, B: 0.1% formic acid in ACN
Gradient: 70 to 100% B/0.5 min
Flow rate: 5 mL/min
Temperature: 25 °C
Detection: UV 254 nm, micro flow cell, data rate: 0.5 s
Sample: Uracil (peak 1) and alkylphenones C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C12, C14 (peaks 3-12)

図 3. 標準ポア RRHT カラムのディレイボリュームを小さくしても、あまり影響はありません。

スループットをスピードアップする固定相の選択

低い移動相線流速でも、異なる固定相 Eclipse XDB-C8 を用いることで Eclipse Plus C18 と比較して保持時間を短縮できました。図 2 と 3 を比較すると、分析時間は 0.9 分から 0.6 分に短縮されています。スループットの顕著な増加は短いアルキル相によるものでした。さまざまな固定相を検討することで、保持時間、選択性、分離を変えることができます。ハイスループットメソッドを最適化するため、ZORBAX には様々なカラム長、内径、1.8 μm 固定相が用意されています。

低容量スタティックミキサ

低ディレイボリュームモードでは、有機溶媒の比率が低い (20%) 領域では、移動相成分の UV 吸収の差によるベースライン異常が起こる恐れがあります。現象はベースラインの乱れです。質量分析計 (MSD) などの他の種類の検出器では影響を受けません。このような影響を最小限に抑えるために、200 μL スタティックミキサ (部品番号 5067-1565) をオプションで使用できます。これを使用するためには、バイナリポンプ SL のファームウェアを (A.06.06 [001]) にする必要があります。このファームウェアは、ダンパーなしの 200 μL ミキサ用に最適化されています。ファームウェアにより、ポンプストロークを 20 μL から 10 μL にします。

トリフルオロ酢酸 (TFA) は、水とアセトニトリル中で大きく異なる UV 吸収を持ちます。図 4 には、低容量のカラムに有機溶媒比率の低いグラジエントをかけたとき、ミキサを使用しない場合と低容量スタティックミキサ/ファームウェア A.06.06 [001] を使用した場合のベースラインを示します。低容量スタティックミキサ/ファームウェア A.06.06 [001] を使用しないと、有機溶媒比率の低い領域でベースラインノイズはより大きくなります。

多くの場合、移動相に吸収の大きな違いはありません。図 5 は、抗生物質クリンダマイシンとリンコマイシンの分離を、コンフィグレーションの異なる 1200 SL で行った結果の比較です。化合物の疎水性が非常に異なるため、適切な時間でこれらを溶出させるには有機溶媒比率の低いグラジエント (10 ~ 40% MeOH/2 分) が必要です。また、発色団がないため低波長 (205 nm) で検出し、高速分析用に低容量カラム (2.1 x 30 mm) を選択して、マイクロフローセルを使用しました。上のクロマトグラムは、ミキサとダンパーをバイパスしファームウェア (A.06.04 [002]) を搭載した低容量モードの 1200 SL システムでの分析結果です。図 4 (有機溶媒比率の低いグラジエント、低容量カラム、低波長検出) でベースラインの乱れを生じたのと同じ条件にもかかわらず、ベースライン異常は現れていません。下のクロマトグラムは、ファームウェア (A.06.06 [001]) と 200 μL ミキサを用いた結果です。

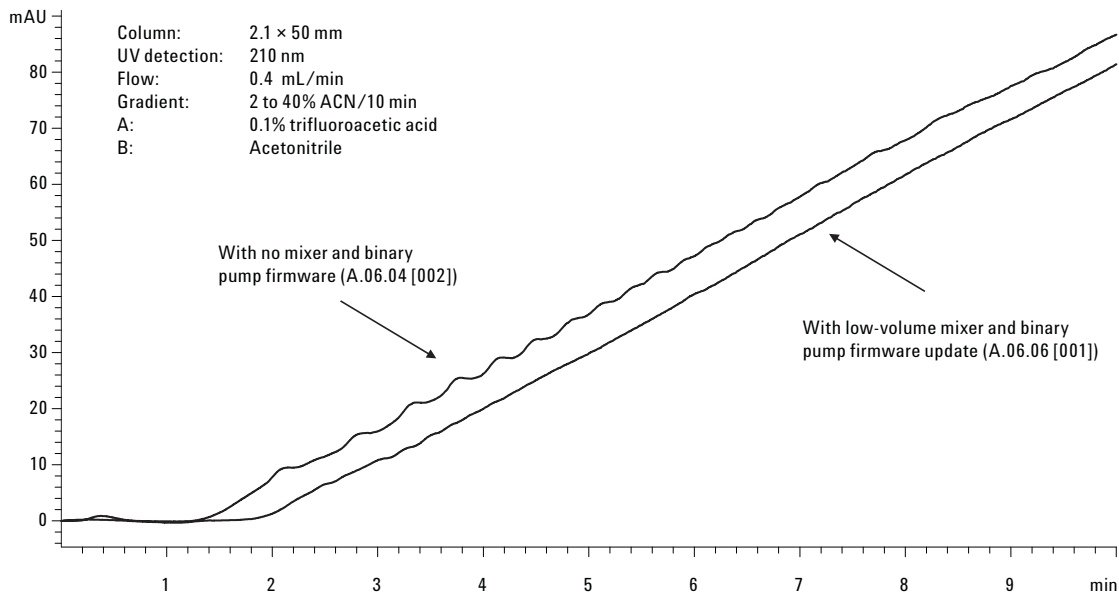
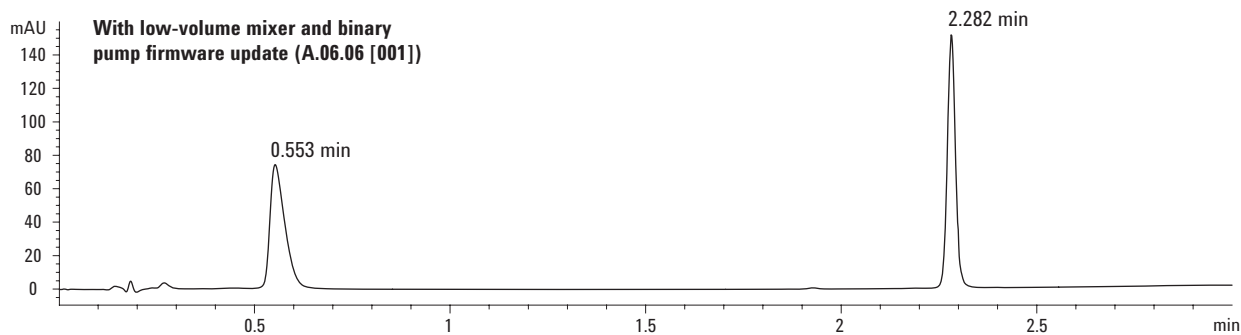
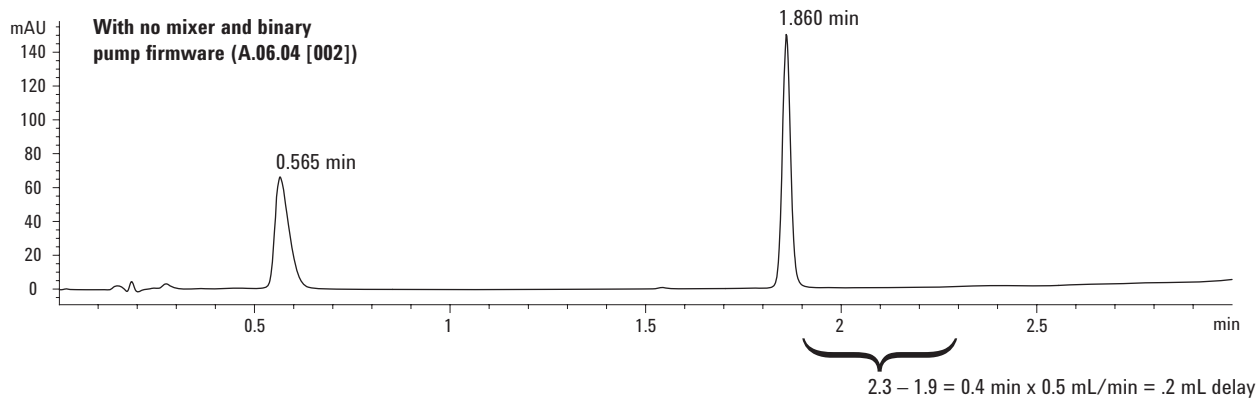


図 4. ベースラインに影響を及ぼす UV 吸光度差は、低容量ミキサとファームウェア更新で軽減されます。



Column: ZORBAX RRHT SB-C18, 2.1 x 30 mm cartridge
 Mobile phase: A: 20 mM phosphate pH 2.8, B: ACN, Gradient: 10 to 40% B/2 min
 Flow rate: 0.5 mL/min
 Temperature: Ambient
 Detection: UV 205 nm, micro flow cell, Data rate: 0.5 s
 Sample: Lincomycin (peak 1) and clindamycin (peak 2)

図 5. 低容量ミキサオプションにより、わずか 0.2 mL のディレイボリュームの増加で、ベースラインノイズを最小限に抑えます。

予測されたとおり、ディレイボリュームはミキサの容量により増加しました。図中に計算結果が記載されています。最初のピークはディレイタイム内に初期移動相のイソクラチックで溶出してしまうため、保持時間は両方の場合で同じです。

グラジエントメソッドを異なる HPLC システムで使用したり、RRHT カラムを用いたより速いメソッドにスケール

ダウンするときには、ディレイボリュームを簡単に測定したり変更できることが重要です。図 6 には、この方法を提示します。また、ダンパーを取り付けるかどうかも検討でき、それぞれのグラジエントメソッドに対して、最適な混合や最適なディレイボリュームを複数の方法で検討することができます。

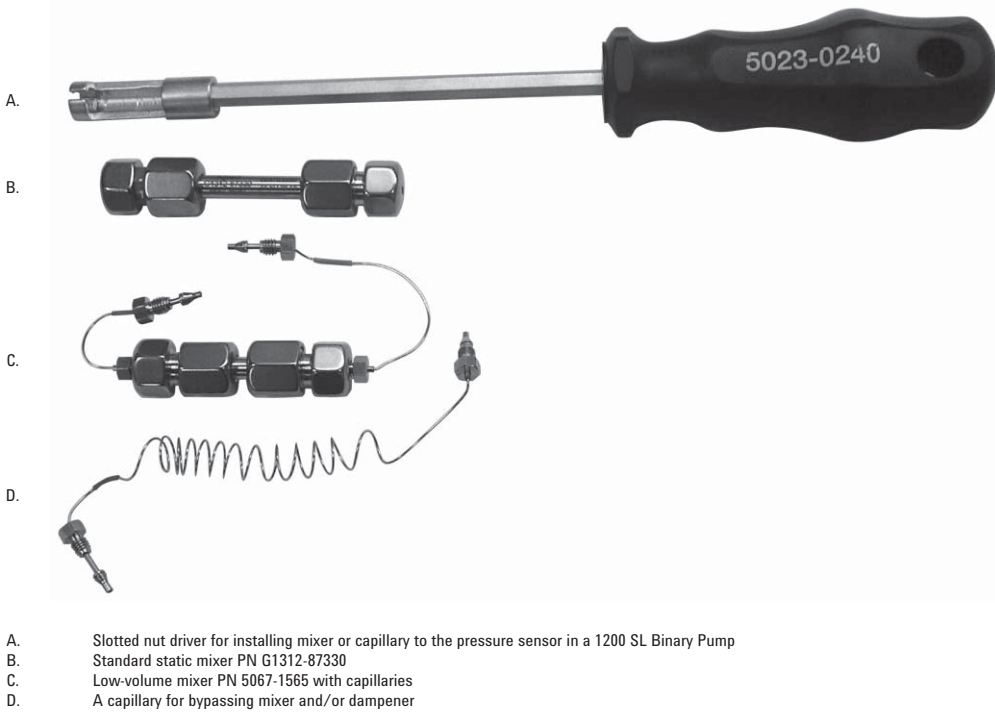


図 6. さまざまなミキサやキャピラリを用いて、ディレイボリュームを調整できます。

結論

低容量 RRHT カラムは、迅速なカラム再平衡化により、ハイスループットグラジエントメソッドに役立ちます。大容量の分析サイズのカラムと比較してスループットを大幅に向上できます。

特に内径 2.1 mm カラムでは、ディレイボリュームを低減することで、分析時間を短縮し、グラジエントスループットを高めることができます。G1312B バイナリポンプを低ディレイボリュームコンフィグレーションに設定することで、グラジエントの移動相組成はカラムにより速く到達し、初期移動相が一定組成で流れる時間やディレイタイムを最小限に抑えます。結果として、ピークは鋭く、分析時間は短くなります。

異なる固定相のカラムを検討することで、選択性、保持時間を大幅に変えることが可能で、分析時間をさらに短縮でき、ラボの生産性を高めることが可能です。

参考文献

1. Optimizing Performance of the Agilent 1200 Rapid Resolution LC System, Agilent Publication G1312-90300, March 2006, p.159.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
September 6, 2007
5989-6665JAJP