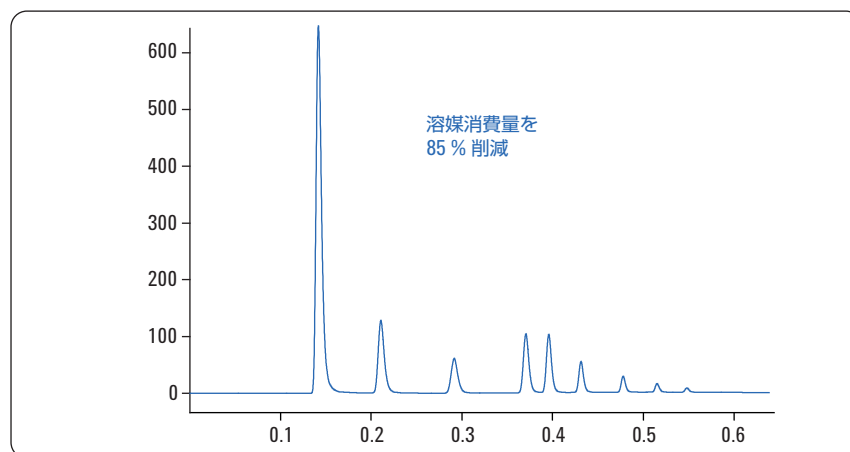


HPLC の溶媒消費量の削減

LC カラム長さ/内径/粒子径のダウンサイズによる、アセトニトリル不足への対応

テクニカルノート



はじめに

HPLC 分析の移動相成分として広く使用されている溶媒、アセトニトリルは、世界経済の悪化により、2008 年度の終わりに近づくに従って世界的な不足状態に陥ってしまいました。2009 年 1 月にはアセトニトリルの販売価格が 1 リットルあたり約 100 ドルという数字を記録しました。アセトニトリルには、この販売価格のほぼ倍額に相当する処分費用もかかります。分析ラボにとっては、この HPLC 溶媒をできる限り節約することが緊急の課題になっています。アセトニトリルをどこまで節約できるかは、個々のラボの使用環境によって異なります。規制によって検証済みメソッドの使用が義務づけられているラボでは、メソッドの選択肢の幅が狭いため、溶媒の節約法も限られてきます。規制されていない環境 (溶媒節約の選択肢の幅が広いラボ) とは異なる対策を講じる必要があります。



Agilent Technologies

概要

1120 Compact LC、1200 シリーズ HPLC、1200 シリーズ RRLC (Rapid Resolution LC) といったアジレントの LC システムでは、幅広い選択肢から溶媒の節約法を選ぶことができます。

- 長さが同じでも内径の小さなカラムを使用すれば、溶媒の消費量とコストを 50~60 % 削減できます。
- 最大 400 bar の背圧に耐えられる機器の場合、粒子サイズを小さくすることでカラムの長さを短くし、溶媒の消費量とコストを最大 70 % 削減できます。
- 400 bar を超える背圧に耐えられる機器で高速または超高速 LC を実行する場合、粒子サイズを 2 ミクロン未満にしてカラムの長さをさらに短くすることで、溶媒の消費量とコストを最大 85 % 削減できます。

バリデーション済みメソッドの使用が規制により義務づけられているラボでは、メソッドの変更には一定の制限があるため、多くの場合メソッドに大幅な変更を加えることはできません。ただし、カラム内径や粒子径の変更といったような小さな変更が許容される場合は、溶媒の消費量を減らすための対策を立てることができます。変更の許容範囲が広ければ、大幅な削減が達成できます。表 1 は、欧州薬局方と米国薬局方で認められる LC カラムの寸法/粒子サイズの許容範囲をまとめたものです。^{1,2}

寸法	米国薬局方	欧州薬局方
長さ	± 70 %	± 70 %
内径	± 25 %	± 25 %
粒子径	50 % まで小さくできる (大きくすることは不可)	50 % まで小さくできる (大きくすることは不可)

表 1
欧州薬局方および米国薬局方で認められる LC カラムのサイズ/粒子径変更の許容範囲

さまざまな節約策がありますが、最も有望な対策は、カラム長さと粒子径を小さくするか、もしくはカラムの内径を小さくするという方法です。

- カラムの内径を 4.6 mm から 2.1 mm に小さくします。粒子径はそのまま、または半分にします。この方法の場合、LC システムは、内径 2.1 mm のカラムを使用することができる低ディレイボリューム、低拡散のシステムが必要です。
- カラムの内径を 4.6 mm から 3.0 mm に小さくします。粒子径はそのまま、または半分にします。一般的に、この方法では通常の LC システムが使用できます。
- 粒子径 1.8 μm の粒子を充填した内径 4.6 mm の短いカラムを高流量で使用して、分析時間と平衡化時間を可能な限り短縮します。この場合、400 bar を超える背圧に耐えられる LC システムが必要です。
- 粒子径 1.8 μm の粒子を充填した内径 2.1 mm の短いカラムを通常の流量または高流量で使用します。この方法を採用する場合、LC システムは、内径 2.1 mm のカラムを使用することができる低ディレイボリューム、低拡散のシステムが必要です。流量を上げる場合、LC 機器が 400 bar を超える背圧に耐えられる必要があります。

- 粒子径 3.5 μm の粒子を充填した内径 3 mm の短いカラムを使用します。5 μm の粒子を充填した内径 4.6 mm のカラムと比べた場合、溶媒の消費量も大幅に減ります。背圧が 400 bar 以下に抑えられる流量であれば、粒子径 1.8 μm の粒子を充填した 50 mm x (内径) 4.6 mm のカラムを使用することもできます。この方法の利点は、通常の LC システムが使用できるということです。

以下に例を挙げて上記の各節約法の効果を示します。この検討で使用したカラムは Agilent ZORBAX カラムです。使用したアジレントの LC システムは節約法ごとに異なります。それぞれのクロマトグラフ結果には正確なシステム構成を付記してあります。無償で CD³ に収録されている「Agilent メソッドトランスレータおよびコストセービングカリキュレータ」は、メソッドを変更する際に役立つ便利なツールです。

分離条件

サンプル: 以下の各物質をそれぞれ 100 ng/ μ L の濃度で水/アセトニトリル (65/35) に溶解した混合溶液。
1. アセトアニリド、
2. アセトフェノン、
3. プロピオフェノン、
4. プチロフェノン、
5. ベンゾフェノン、
6. バレロフェノン、
7. ヘキサノフェノン、
8. ヘプタノフェノン、
9. オクタノフェノン

カラム: ZORBAX RRHT SB-C18、
100 x 2.1 mm、1.8 μ m (最高使用圧 600 bar) と、ZORBAX RRHT SB-C18、
100 x 4.6 mm、1.8 μ m (最高使用圧 600 bar)

移動相: A: 水、B: アセトニトリル
グラジエント: 35% B (0分) \rightarrow 95% B (5分) \rightarrow 95% B (8分)

ストップタイム: 8分
ポストタイム: 5分
流量: 0.6 mL/min (内径 2.1 mm のカラムの場合)
1.5 mL/min (内径 4.6 mm のカラムの場合)

注入量: 1 μ L、10 秒間のニードル洗浄
カラム温度: 50 $^{\circ}$ C
検出: シグナル波長 245/10 nm、リファレンス波長 360/80 nm
データ取込速度 20 Hz、ピーク幅 > 0.01 min、スリット 8 nm、光路長 10 mm、容量 13 μ L の標準フローセル (4.6 x 50 mm のカラムの場合) 光路長 3 mm、容量 2 μ L のマイクロフローセル (2.1 x 50 mm のカラムの場合)

例 1:

カラムの内径を小さくした場合

この例では、内径 4.6 mm のカラムを内径 2.1 mm のカラムに変更しましたが、クロマトグラムや分析時間に大きな変化は見られません (図 1)。この方法を採用する場合、LC 機器は、内径 2.1 mm のカラムを使用することができ、かつ 400 bar を超える背圧に耐えられる必要があります。カラムの内径を小さくするだけで 60% という大幅な溶媒節約が実現できました。アセトニトリルの購入費用と処分費用を合わせたコストが 1 リットルあたり 300 ドルになるとした場合、通常の分析 100 回分の費用総額は 405 ドルになります。内径 2.1 mm のカラムを使用した場合のコストは約 162 ドルです。つまり、費用の 60% を節約できるということになります (表 2)。

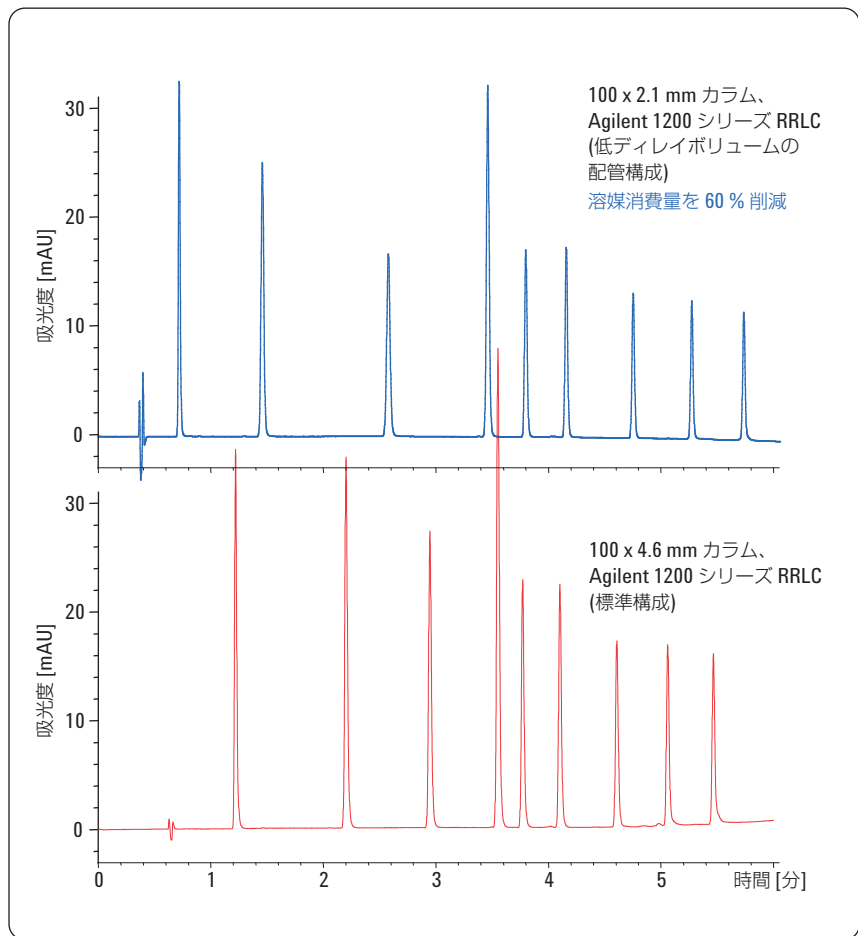


図 1
カラムの内径を小さくすることによって溶媒消費量を 60% 削減

	100 x 4.6 mm のカラム	100 x 2.1 mm のカラム
1 回あたりのアセトニトリル消費量	13.5 mL	5.4 mL
1 回あたりのアセトニトリル購入費用	1.35 ドル	0.54 ドル
1 回あたりのアセトニトリル処分費用	2.7 ドル	1.08 ドル
1 回あたりの費用総額	4.05 ドル	1.62 ドル
100 回あたりの費用総額	405 ドル	162 ドル
100 回あたりの費用節約総額		243 ドル

表 2
マイクロボアカラムの利用による溶媒および費用の節約

ピーク 5 の分離度が向上するという利点もあります。内径 4.6 mm のカラムを使用したときの分離度は 5.09 でしたが、内径 2.1 mm のカラムを使用すると、分離度が 7.8 に向上しました。

分離条件

Agilent 1200 シリーズ RRLC システムで 超高速 LC を実行した場合

サンプル: フェノン類混合溶液 (5188-6529)、
希釈率 1:10
カラム: ZORBAX RRHT SB-C18、
50 x 4.6 mm、1.8 μm
移動相: A; 水、B; アセトニトリル
グラジエント: 50 % B (0分) → 100 % B (0.3分)
流量: 5 mL/min
ストップタイム: 0.6 分
カラム温度: 60 °C
注入量: 3 μL
検出: VWD SL Plus、波長 245 nm、
データ取込速度 160 Hz、
ピーク幅 > 0.0025 分、
光路長 10 mm の標準フローセル

Agilent 1200 シリーズ HPLC システムで コンベンショナル LC を実行したときの条件

サンプル: フェノン類混合溶液 (5188-6529)、
希釈率 1:10
カラム: ZORBAX SB-C18、150 x 4.6 mm、
5 μm
移動相: A; 水、B; アセトニトリル
グラジエント: 35 % B (0分) → 95 % B (10分)
流量: 1.5 mL/min
ストップタイム: 10 分
カラム温度: 50 °C
注入量: 3 μL
検出: VWD、波長 245 nm、
データ取込速度 10 Hz、
ピーク幅 0.05 分、
光路長 10 mm の標準フローセル

例 2:

カラム長を短くして流量を上げた場合

この例では、150 x 4.6 mm のカラムを 50 x 4.6 mm のカラムに変更し、流量を上げました (図 2)。従来の LC を使用した場合、アセトニトリルの費用総額は、分析 100 回あたり 585 ドルになります。これに対して、超高速 LC では 90 ドルの費用しかかかりませんでした。つまり、85 % の費用が節約できます。さらに、分析時間が 17 分の 1 に短縮化され、S/N 比が約 1.5~2 倍向上するという利点もあります。

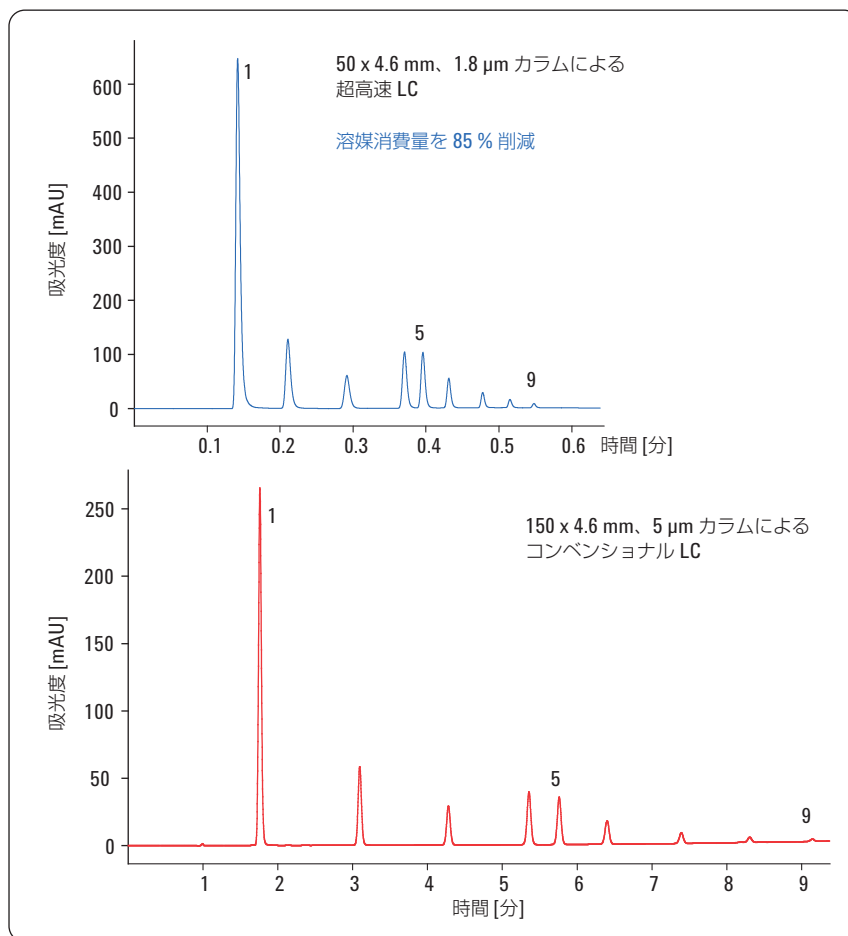


図2
コンベンショナル LC から超高速 LC への変更によって溶媒の消費量を 85 % 削減

	150 x 4.6 mm のカラム (従来の LC)	50 x 2.1 mm のカラム (超高速 LC)
1 回あたりのアセトニトリル消費量	19.5 mL	3.0 mL
1 回あたりのアセトニトリル購入費用	1.95 ドル	0.30 ドル
1 回あたりのアセトニトリル処分費用	3.90 ドル	0.60 ドル
1 回あたりの費用総額	5.85 ドル	0.90 ドル
100 回あたりの費用総額	585 ドル	90 ドル
100 回あたりの費用節約総額		495 ドル

表 3
超高速 LC に変更した場合の費用節約

分離条件

Agilent 1200 シリーズ RRLC システムで ナローポア LC を実行したときの条件

カラム: ZORBAX RRHT SB-C18、
50 x 2.1 mm、1.8 μm
移動相: A: 水、B: アセトニトリル
グラジエント: 5 % B (0分) → 75 % B (10分)
流量: 0.5 mL/min
ストップタイム: 10 分
ポストタイム: 2 分
注入量: 1.5 μL
カラム温度: 40 °C
検出: VWD SL Plus、波長 225 nm、
ピーク幅 > 0.0025 分

Agilent 1120 Compact LC システムで コンベンショナル LC を実行したときの条件

カラム: HC-C18 (2)、150 x 4.6 mm、5 μm
移動相: A: 水、B: アセトニトリル
グラジエント: 0 % B (0分) → 90 % B (15分)
流量: 1.5 mL/min
注入量: 20 μL
カラム温度: 40 °C
検出: VWD、波長 225 nm、ピーク幅 >
0.0025 分、レスポンスタイム 0.06
秒

例 3:

コンベンショナル LC からナローポア LC に変更した場合

この例では、農薬の分析メソッドをコンベンショナル LC からナローポア LC に変更しました。内径 2.1 mm の短いカラムを使用することによって、溶媒の消費量を 80 % 削減できました。分析/平衡化時間は、どちらのメソッドでもほぼ同じでした (図 3)。LC 機器は、ナローポアカラムに対応したものがが必要です。この例では、分析速度が向上するだけでなく、ピーク 3 とピーク 4 との分離能やピーク 8 と未知の不純物との分離能が向上するという利点も確認されました。

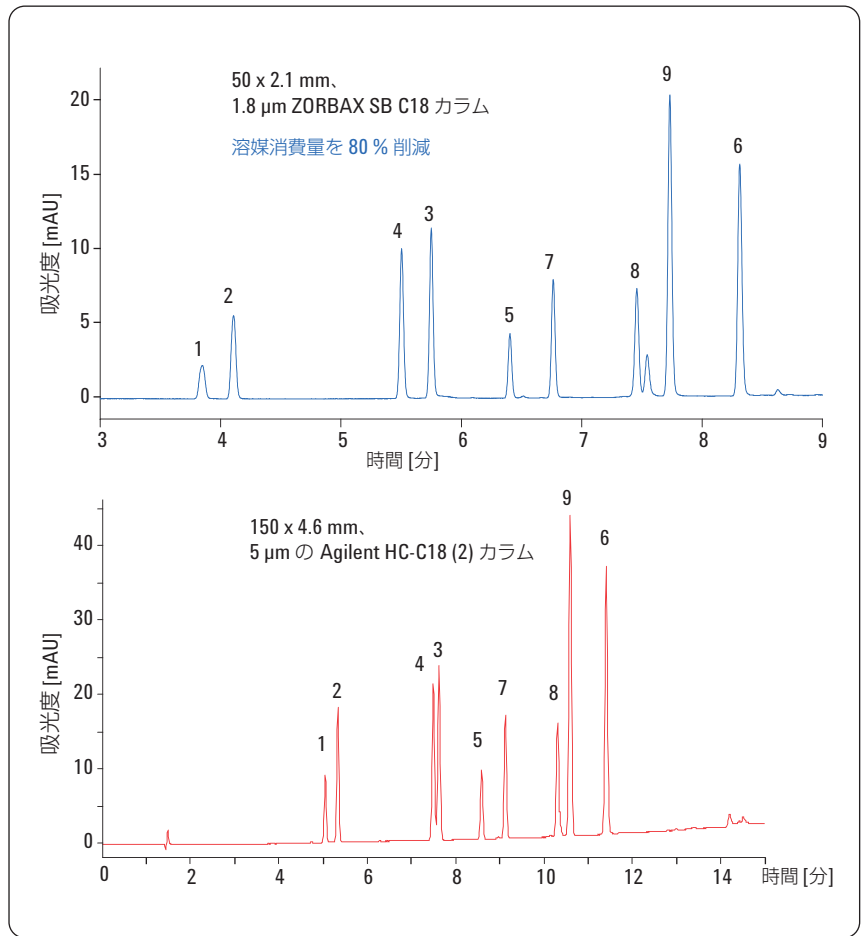


図 3
ナローポアカラムの使用によって
溶媒の消費量を 80 % 削減

ピーク番号	化合物名
1	メタミトロン
2	クロリダゾン
3	シマジン
4	シアナジン
5	プロメトリン
6	クロルトロン
7	ジウロン
8	プロバジン
9	タープチラジン

分離条件

Agilent 1200 シリーズ LC システムで

短いナローボアカラムを使用したときの条件

サンプル: トラマドール (主成分) の濃度
2 mg/mL、4 種類の不純物を 1.3~
2.2 % となるように添加

カラム: ZORBAX SB-C18、100 x 3.0
mm、3.5 μ m

移動相: A; 0.1 % TFA, B; 0.65 % TFA/アセト
ニトリル

グラジエント: 10 % B (0分) \rightarrow 45 % B (4分)

流量: 0.8 mL/min

注入量: 3 μ L

カラム温度: 30 $^{\circ}$ C

検出: DAD、シグナル波長 270/10 nm、
リファレンス波長 360/100 nm、
光路長 10 mm

Agilent 1200 シリーズ LC システムで

長い標準ボアカラムを使用したときの条件

サンプル: 4 種類の不純物が 0.7~1.25 % の
濃度で含まれるトラマドール

カラム: ZORBAX SB-C18、150 x 4.6 mm、
5 μ m

移動相: A: 0.1 % TFA
B: 0.65 % TFA/アセトニトリル

流量: 1 mL/min

グラジエント: 10 % B (0分) \rightarrow 45 % B (8分) \rightarrow
45 % B (10.5分) \rightarrow 10 % B (11分)
 \rightarrow 10 % B (15分)

カラム温度: 30 $^{\circ}$ C

注入量: 5 μ L

検出: VWD、波長 270 nm、レスポンス
タイム 0.25 秒 (14 Hz 相当)

例 4:

カラムの長さとお内径を小さくした場合

この例では、カラムの長さを 150 mm から 100 mm に、カラムの内径を 4.6 mm から 3.0 mm に小さくしました (図 4)。LC 機器は、400 bar までの圧力に耐えられるものです。溶媒消費量を 65 % 削減することができ、分析時間が 50 % 短縮しました。

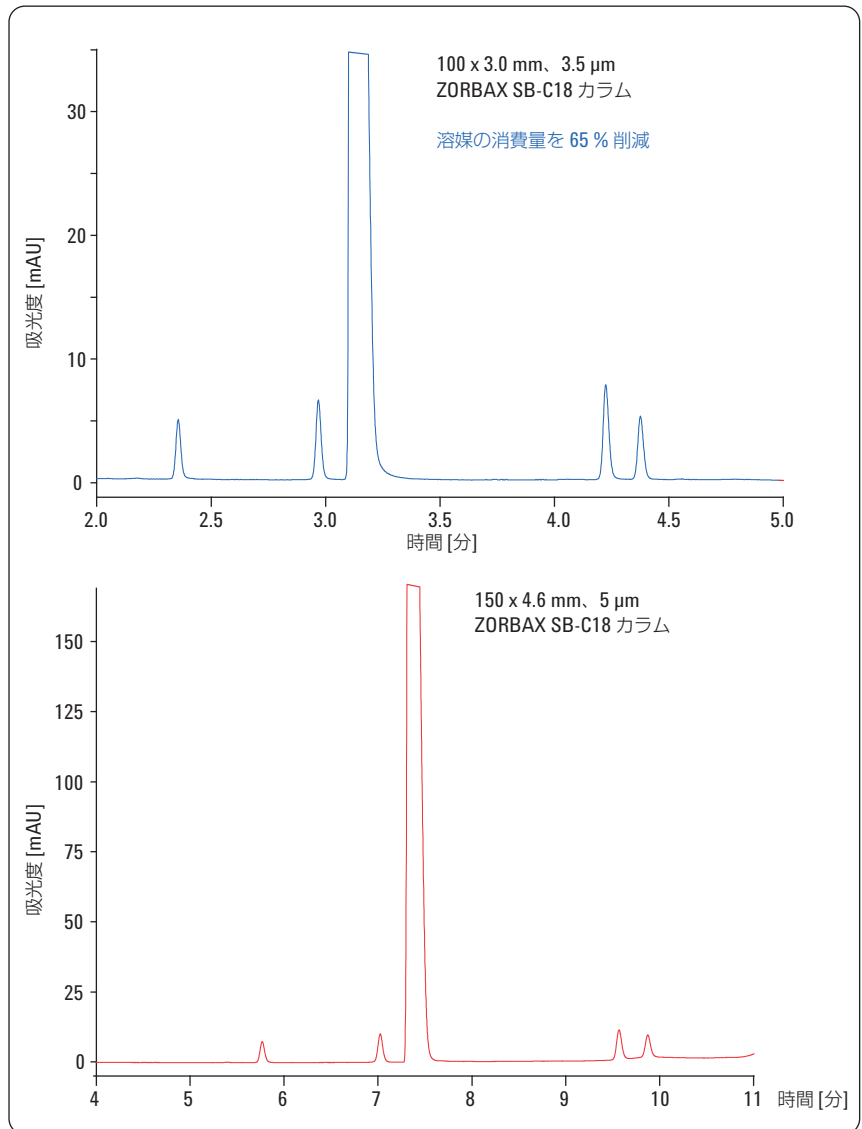


図 4
カラムの長さを短くし、内径を 4.6 mm から 3 mm に変更して、溶媒の消費量を 65 % 削減

分離条件

Agilent 1200 シリーズ RRLC システムで粒子径の小さな短いナローポアカラムを使用したときの条件

カラム: ZORBAX SB-C18、
50 x 3.0 mm、1.8 μ m
移動相: A: 水、B: アセトニトリル
グラジエント: 0.5 % B (0分) \rightarrow 7.5 % B (5分)
流量: 1.2 mL/min

ストップタイム: 5 分
ポストタイム: 2 分
注入量: 3 μ L
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
検出: VWD、波長 225 nm、
ピーク幅 > 0.0025 分

Agilent 1120 Compact LC システムで粒子径の大きな長い標準ポアカラムを使用したときの条件

カラム: Agilent HC-C18 (2) カラム、
150 x 4.6 mm、5 μ m
移動相: A: 水、B: アセトニトリル
グラジエント: 10 % B (0分) \rightarrow 90 % B (15分)
流量: 1.5 mL/min
注入量: 20 μ L
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
検出: VWD、波長 225 nm、
ピーク幅 > 0.0025 分、
レスポンスタイム 0.06 秒

例 5:

カラムの長さ、内径、および粒子径を小さくした場合

この例では、カラムの長さを 150 mm から 50 mm に、カラムの内径を 4.6 mm から 3.0 mm に小さくしただけでなく、粒子径も 5 μ m から 1.8 μ m に縮小しました。カラムの粒子径を 2 ミクロン未満にすることによって、溶媒の消費量を 72 % 削減できました。分離能が向上して分析/平衡化時間が短くなるという利点もあります (図 5)。

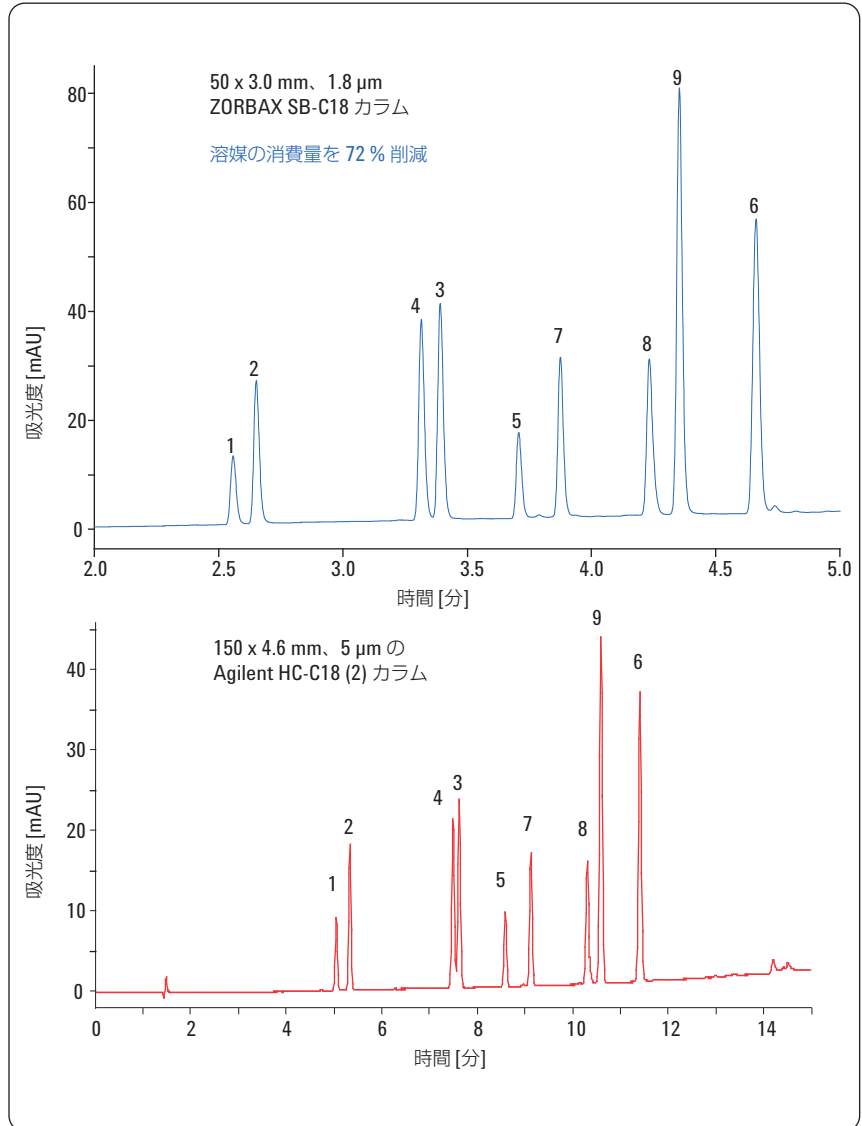


図 5
カラムの長さ、内径、および粒子径を小さくすることによって溶媒の消費量を 72 % 削減

ピーク番号	化合物名
1	メタミトロン
2	クロリダゾン
3	シマジン
4	シアナジン
5	プロメトリン
6	クロルトロン
7	ジウロン
8	プロバジン
9	タープチラジン

結論

HPLC 分析の溶媒の節約策として採用できる方法は数多くあります。バリデーション済みメソッドの変更が規制によって制限されているラボの場合、許容限度内でカラムの長さや内径を可能な限り小さくするというのも1つの方法です。この方法を採用すれば、溶媒の消費量を50～60%削減できます。したがって、アセトニトリルの購入/処分費用も50～60%節約できることとなります。メソッドの新規開発や大幅な変更が許容される環境であれば、カラムの粒子径を2ミクロン未満にするという方法が効果的です。この方法を採用すれば、溶媒の消費量/費用を65～85%削減できます。同時に、分析時間と平衡化時間が大幅に短縮化されます。どちらの方法を採用する場合にも、LCシステムが変更後のメソッドにおける背圧の変化やパフォーマンスを低下させないディレイボリュームおよび拡散に対応していることが重要になります。

参考文献

1. FDA: "Methods: method verification and validation", Document number *ORA-LAB5.4.5, Version No.: 1.2, revised 09-09-05.*
2. USPC Official 12/1/08-4/30/09, General Chapters: <621> Chromatography.
3. Agilent CD: 「Agilent 1200シリーズRRLCシステムCD-ROM：三ヶ国語版」、資料番号5989-9365EN、**2008.**

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published February 1, 2009
Publication Number 5990-3472JAJP



Agilent Technologies