

Technical Review

逆相系パッキドカラムによる高速グラジエント分析

江幡美穂¹、廣江宜久²、荒井裕子¹、沓名 裕²、城田 修¹

High Speed Gradient Analysis Using a Reversed-Phase Packed Column

Miho Ebata¹, Yoshihisa Hiroe², Hiroko Arai¹, Hiroshi Kutsuna² and Osamu Shiota¹¹ Shiseido LC Application Lab., 2-2-1 Hayabuchi, Tsuzuki, Yokohama 224-8558 Japan² Chromatographic Research Lab. 2-2-1 Hayabuchi, Tsuzuki, Yokohama 224-8558 Japan

Abstract

Ultimate performances of short packed C-18 columns were studied to meet the current high-throughput trend. Using a short Capcell Pak MG II S 3 column (2.0 mm I.D. x 20 mm), retention behaviors of seven standard sulfa drugs were examined under gradient elution with increased flow rates. After the optimization, it was possible to shorten a run time to 1.7 min with base-line separations among the seven peaks. The gradient system was also applied to peptide mapping in LC. A tryptic digest of human albumin could be run at a run time of 2.5 min.

緒言

90年代中期に紹介されたコンビナトリアルケミストリーの手法に呼応するように発達したハイスループットスクリーニング (high-throughput screening, HTS) の概念も今やHPLCの分野にも求められるようになった。著者等のグループではこれまでLC用オートサンプラーに生じるキャリーオーバーからの迅速な系の初期化と言う観点でこの問題に取り組んできた。本検討では高流速条件におけるカラム性能に焦点を当てた基礎データ及び応用データを紹介する。近年、スルーポアを有するモノリシックなジェオメトリーが高速分析に結びつく事例が多く紹介されているが、供給も安定しLCカラムの主軸といえるパッキドカラムの高速分離性能を今一度検証する必要がある。高速分析への適応性を重視し開発されたCAPCELL PAK C 18 MG II S 3を用い検討を行う。

実験

【HPLC条件】装置：ナノスペースSI-2グラジエントシステム (資生堂) を用いた。

カラムはCAPCELL PAK C 18 MGII S 3 (2.0 mm i.d.x 20 mm)、カラム温度は40℃とした。サルファ剤の分析には、移動相：(A) 0.1 vol%ギ酸、水、(B) 0.1 vol%ギ酸、メタノールを用いた。組成のタイムプログラム等、その他の条件は図中に示した。試料は各物質100 µg/mLとした。ペプチドマッ

ピングは、移動相：(A) 0.05 vol% ギ酸、水、(B) 0.05 vol%ギ酸、アセトニトリルを用いた。組成のタイムプログラム等、その他の条件は図中に示した。試料はヒトアルブミンを定法に従いトリプシン消化を行ったものを使用した。

結果と考察

7種のサルファ剤 (図1に一例を示した) の分析において、同一の組成比タイムプログラムを用い、2液の合計流量だけを標準的なものから5倍の1 mL/minまで増加させた例を図2に示した。仮に横軸を時間ではなく移動相通過量とするとこれはグラジエント溶出の傾斜を5倍まで減少させることに相当する。このとき、容量を横軸としたピーク間隔は当然増加することとなる。図1の様に時間軸で表現するとこの間隔の増加は各ピーク間の分離係数の向上として観測することができる。

更に合計流量を1 mL/minとして、組成比タイムプログラムを連続分析が安定して行える限界まで短縮化した例を図3

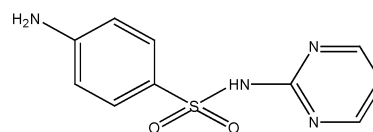


図1. サルファ剤の構造例 (sulfadiazine)

¹ (株)資生堂 ファインケミカル事業部 アプリケーションラボ

² (株)資生堂 マテリアルサイエンス研究センター クロマト開発室

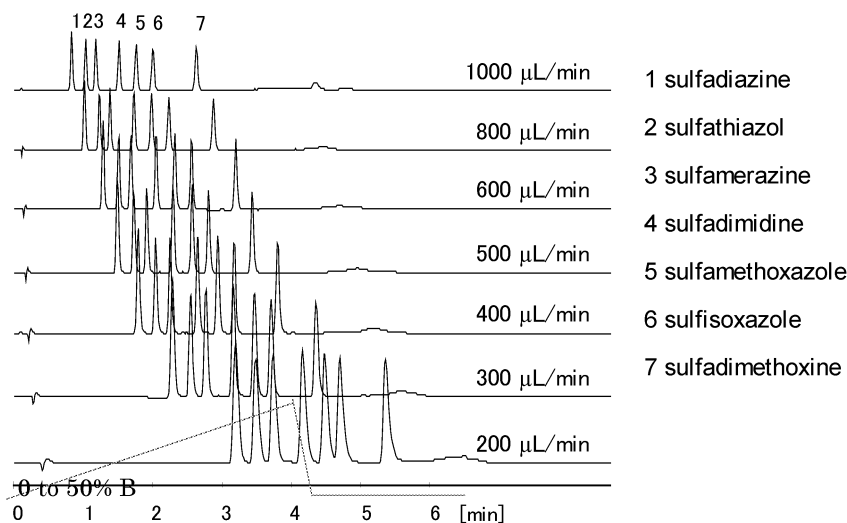


図2. 同一混合比プログラムで流速を増加させた例

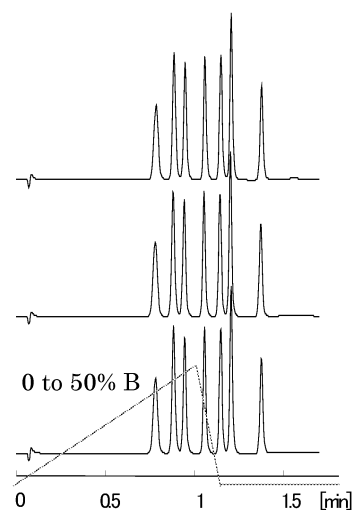


図3. 最大流速 (1 mL/min) にて混合比プログラムを最短とした例

表1. 最短プログラムにおける保持時間の再現性 (RSD)

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7
RSD	0.352	0.256	0.198	0.122	0.108	0.093	0.082

※ピーク番号は図2に対応

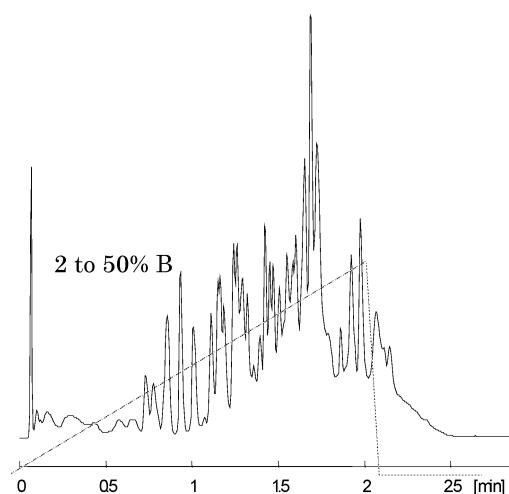


図4. ヒトアルブミンのトリプシン消化物

に示した。この例では7種の物質が1.7分のサイクルで繰り返し分析が可能であることが示唆された。各ピークの保持時間の相対標準偏差 (10回連続測定による) も十分に小さい値

を示した (表1)。この時の圧力は16 MPa程度であり、充分ルーチン分析に応用出来るレベルと言える。

タンパク質のトリプシン分解物を同様に短いカラムを用い高流速にて分離した例を図4に示した。タイムプログラムの短縮化を試み、1試料当たり2.5分にて安定した連続分析を行えるという結果を得た。これら2種の物質群の分離例から、短いCAPCELL PAK C18 MGII S3のパックドカラムは多成分系のハイスループット分析に有用なツールであることが示唆される。LC-MSにおいても、近年のインターフェイス技術やスキャン速度性能を考慮すると本検討で示した手法は無理なくマッチし、多くのアプリケーションでの利用が期待できる。

結論

CAPCELL PAK C18 MGII S3の短いカラムと通常の5倍の流速を組み合わせた系を用いると、多成分からなる試料のグラジエント溶出において各ピーク間の分離を損なうことなく飛躍的な分析時間の短縮が可能である。