

■以UHPLC对BSA消化物的高速高分离分析

AS/LC-031

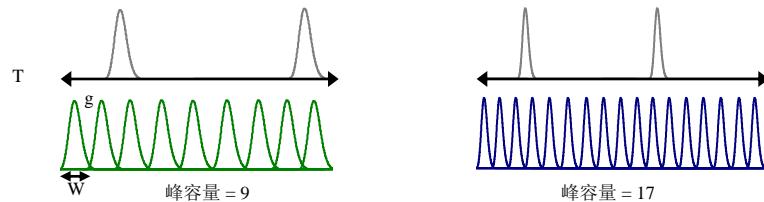
肽图法是一种将蛋白质以酶进行消化，将产生的肽片段以LC等进行分离，通过比较其色谱特征，以确认构成氨基酸的变化的分析方法。最近也应用于生物药品的质量评价。由于将出现多个肽峰，所以高分离性能，以及峰面积和保留时间良好的重现性就成为了非常重要的因素。

在此，对以日立超高速液相色谱仪 ChromasterUltra Rs进行测定得到的高分离、高速分析结果进行介绍。使用BSA消化物作为模型样品，使用HPLC用色谱柱和UHPLC用高分离色谱柱进行了分离，对峰容量（Peak capacity）进行了比较。

◆峰容量◆

$$\text{峰容量} = 1 + T_g / W (4\sigma)$$

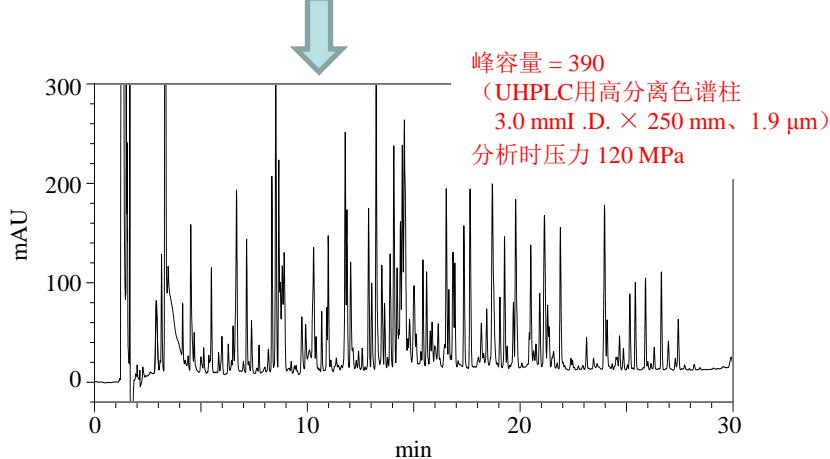
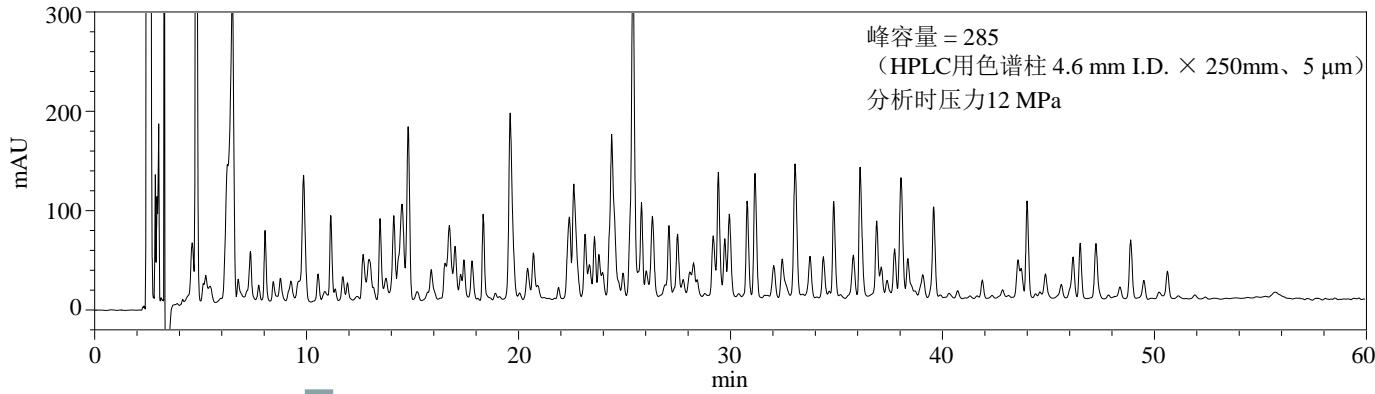
表示的是“在一定的梯度时间 T_g 内，有多少个峰宽为 W 的峰”。 W 为检出的所有峰宽的平均值。常被用作梯度洗脱时评价分离的指标，如果是尖峰的话峰容量更大。



（包含选配品及客户配置物品。）

ChromasterUltra Rs

■BSA（牛血清白蛋白）消化物的测定例



峰容量 = 285
(HPLC用色谱柱 4.6 mm I.D. × 250mm、5 μm)
分析时压力12 MPa

峰容量 = 390
(UHPLC用高分离色谱柱
3.0 mm I.D. × 250 mm、1.9 μm)
分析时压力 120 MPa

LaChromUltra II C18色谱柱采用比以往的硅胶物理化学耐久性更优的无机-有机复合型硅材料，实现了高耐压。因此，此次又新推出了理论塔板数可以达到50000的UHPLC用高分离色谱柱（1.9 μm、250 mm长）。

通过使用这样的色谱柱，可以在HPLC用色谱柱1/2的分析时间内得到约1.4倍的峰容量。通过使用140 MPa的高耐压系统、高耐压色谱柱，实现了上述分析。

<HPLC用色谱柱测定条件>

色谱柱 : LaChrom II C18 (5 μm) 4.6 mm I.D. × 250 mm
流动相 : A) 0.05 % TFA / H₂O (v/v)
B) 0.05 % TFA / CH₃CN (v/v)
5 % B (0 min) → 45 % B (60 min)
流速 : 1.0 mL/min
柱温 : 40 °C
检测波长 : UV 214 nm (DAD)
进样量 : 10 μL

<UHPLC用高分离色谱柱测定条件>

色谱柱 : LaChromUltra II C18 (1.9 μm) 3.0 mm I.D. × 250 mm
流动相 : A) 0.05 % TFA / H₂O (v/v)
B) 0.05 % TFA / CH₃CN (v/v)
5 % B (0 min) → 45 % B (30 min)
流速 : 0.85 mL/min
柱温 : 40 °C
检测波长 : UV 214 nm (DAD)
进样量 : 5 μL

主要仪器配置: ChromasterUltra Rs DAD系统

(6170二元泵、6270自动进样器、6310柱温箱、6430二极管阵列检测器、组织器)

注意: 本资料所示数据仅为测定例用数据而非可保证仪器性能的数据。