the Analytical Scientist

Agilent Technologies

二次元システムの活用、Pat Sandra、Gerd Vanhoenacker 4

漢方薬のコンプリヘンシブ2D-LC分析 11

大手医薬品メーカーでの 2D-LC の利用、Cadapakam J. Venkatramani 16

2D-LC メインストリームの形成、Michael Frank、Jens Trafkowski 25

二次元液体クロマトグラフィーの概要

二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) は、もはや扱いが困難な特殊分野向けの技術ではありません。機器の発展に伴い、メインストリーム向けにシンプルなものへと改良された技術です。本書では、多次元に関する数名のエキスパートと 2 名の新規ユーザーによる、2D-LC の分離能力のヒントやコツと、高く評価されているさまざまな情報を共有します。

MORE EFFICIENCY
MORE FREE TIME

新製品 Agilent 1290 Infinity II LC

Agilent 1290 Infinity II LC は、次世代の UHPLC を
具現化するシステムです。
効率化の新たなスタンダードを確立します。

真の UHPLC の実力をご覧ください。
EfficientUHPLC.agilent.com

UHPLC 分析をもっと快適にしませんか？
#EfficientUHPLCでトークに参加してください。

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Agilent Technologies

2D-LC の紹介と プロセスの概要

2014 年の前半、アジレント･テクノロジーは、明確な目的を持って我々にアプローチしてきました。その目的とは、二次元液体クロマトグラフィーが、いかにシンプルにそして堅牢に進化したかを示すことでした。

こうして、「2D-LC の概要」が誕生しました。それに加えて示されたのが、「分析科学者×アジレント･テクノロジー」という協力体制です。これは、非常に多くの実を結んできました。

この分野における何人かの著名人と、複数の主要なアプリケーション分野にわたり共同作業できたことは大変な喜びでした。RIC の Pat Sandra 氏と Gerd Vanhoenacker 氏は、まず「二次元システムの活用」から始めました。これにより、基本的な背景理論を提供し、複雑なサンプルで高ピークキャパシティを実現するという要求への解答として、2D-LC を紹介しました。それと同時に、「2D-LC の新規ユーザー」では 2 人の科学者がクローズアップされました。この 2 人は、つい最近二次元システムを導入したばかりで、その体験について率直に話してくれました。他の著者としては、Genentech 社の Cadapakam J. Venkatramani 氏、デュースブルクエッセン大学の Oliver Schmitz 氏がいらっしゃいます。

このメッセージを確実に伝えるため、さらに 2 人の著者、Koen Sandra 氏と Dwight Stoll 氏は最近、2D-LC の実践的な側面について詳細に踏み込んだウェビナーを開催し、質問にもその場で回答しています。このウェビナーのオンデマンドバージョンには、tas.txp.to/1114/2DLCwebinar からアクセスできます。

アジレントと分析科学者はともに、この概要が 2D-LC に関する議論の始まりであり、決して終わりではないと考えています。最後に、読者の皆様からのこの記事に関するご質問、フィードバックをお待ちしております。

Rich Whitworth
編集者

目次

4 二次元システムの活用
Pat Sandra、Gerd Vanhoenacker

4 2D-LC と私
Dwight Stoll 氏へのインタビュー

8 2D-LC を使用した漢方薬の調査
Oliver Schmitz、Duxin Li

11 ソリューション:漢方薬の
コンプリヘンシブ 2D-LC 分析

12 二次元バイオ分析
Koen Sandra、Gerd Vanhoenacke、Pat Sandra

15 Agilent 1290 Infinity 2D-LC を使用した
モノクローナル抗体消化物の分析

16 大手医薬品メーカーでの 2D-LC の利用
Cadapakam J. Venkatramani

19 ソリューション: キラル医薬品物質の
アキラル･キラルハートカット 2D-LC 分析

20 2D-LC の新規ユーザー
Bernd Kammerer 氏とOle Gron 氏への
インタビュー

23 ソリューション:生物製剤の
複合型 N グリカンのオンライン
2D-LC 分析

25 2D-LC メインストリームの形成
Michael Frank 氏と Jens Trafkowski 氏への
インタビュー

二次元システムの活用

一次元液体クロマトグラフィーから二次元液体クロマトグラフィーへの移行は、複雑なサンプル分析で求められる高いピークキャパシティの実現に向けた大きな一歩です。

Pat Sandra、Gerd Vanhoenacker

これまで、クロマトグラフィーシステムの分離パフォーマンスはカラム効率 (N) の面から説明されていました。液体クロマトグラフィー (LC) では、この値はカラム充填剤の粒子径 (d_p) とカラム長 (L) に依存します。多孔質粒子では $N=L/2\ d_p$ を使用します。2006 年に、表面多孔質粒子が再導入され、最先端機器による理論段数は、薄い多孔質シェルでの高速分子移動により $L/1.5\ d_p$ に近づきました。また約 10 年前には、sub-2 µm 多孔質粒子のカラムテクノロジーが目覚ましい進歩を遂げました。こうした動きと、最大 120 MPa の圧力にも耐えうる改良された LC 機器の組み合わせにより、速度と分離能に関する新たな可能性が LC 分析者に開かれたのです。今日行われている複雑な分析にとって、理論段数は効果的なパフォーマンス指標ではありません。これに代わり現在広く受け入れられているのがピークキャパシティ n_c です。1967 年に Giddings 氏によって導入 (1) された n_c は、最初のピークと最後のピーク間で、ある分離度 (通常 1) で分離された対象成分の最大ピーク数です。もともとはイソクラティック分離に導入されたのですが、LC のグラジエント溶出または GC の温度プログラミングによってはるかに高いピークキャパシティを実現できることに Horvath 氏と Lipsky 氏 (2) が最初に気付きました。一般的にグラジエント溶出のピークキャパシティの計算に用いられる式は $n_c = 1 + t_g/W$ です (3)。ここでの t_g はグラジエント実行時間、W は平均ピーク幅です (4 s)。

高耐圧装置と小さい粒子径カラムが導入される前は、従来の一次元 LC (1D-LC) でピークキャパシティは最大で 200 程度でした。現在は、sub-2 µm 多孔質粒子 (または表面多孔質粒子) により、50 分で 570 のピークキャパシティ、180 分で最大 850 のピークキャパシティが得られます (4)。カラムのピークキャパシティ (ピーク/分) は、サンプルの複雑性にあわせてグラジエント時間やフローを調整することで最適化できます。

しかし、バイオ関連、食品、環境、天然物分析において、非常に複雑な混合物を分離するのに、このようにして得られるピークキャパシティで十分とは言えないのが現状です。ピークキャパシティはサンプル中の成分の数を大幅に上回る必要があります。ピークオーバーラップの統計理論 (5) によれば、サンプル中の成分の数がピークキャパシティの 37 % を超えるとピーク分離能は大きく損なわれます。実際、ランダムに分散したサンプル成分の 98 % を分離するには、ピークキャパシティが成分数の 100 倍を超える必要があります (6)。つまり、100 の成分を含んだサンプルの「クロマトグラフィーで」分離を行うには 10,000 の n_c 値 (理論上約 $1x10^8$ に相当) が必要になるということです。幸いなことにサンプルの複雑性を解き明かす手段はクロマトグラフィーだけではありません。最新質量分析計 (MS) の選択能力によって分離側のハードルは多くのアプリケーションで大幅に下げられています。しかし、最も強力な MS 機器を使う場合でも、初期段階で分離を最大限にしておくことは非常に重要です。高いピークキャパシティが必要になることの多い QA/QC ラボにおいて質量分析計がまだ確立されていない場合は、これが不可欠です。n_c を増加させる方法として一番効率の高い方法が多次元 LC、特に二次元 (2D-LC) です。

2D-LC と私

2000 年から 2D-LC の研究を続ける Dwight Stoll 氏が、自身の研究におけるコアテクノロジーの利点について語ります。

2D-LC に携わるようになったきっかけと理由を教えてください。

2000 年当時、私は Peter Carr 氏と一緒に働いていました。彼は HPLC 分離の高速化に関して多くの研究を続けていました。それまでに培った高速分離に関する専門知識を二次元に応用しようと決意した私達は、5〜10 時間かかっていた実行時間をパフォーマンスは落とさずに 30 分まで短縮することを目指したのです。

当時の 2D-LC はどうでしたか?

ほぼ全員が、独自にシステムを構築し独自のソフトウェアを作成していました。歴史的に見て、堅牢な 2D-LC システムの供給には非常に大きな障壁がありました。しかし、この障壁は「既製」ソリューションの増加とともに取り除かれつつあります。これによって間違いなく、この強力な技術 (2D-LC) の概念が変わり、使用状況も変化していくことでしょう。

2D-LC について

オンライン 2D-LC は「ハートカット」アプローチとコンプリヘンシブアプローチの 2 つに分けることができます (本書の『2D-LC 101』参照)。ハートカット 2D-LC では選択されたリテンションの時間枠内で成分が分離されますが、コンプリヘンシブ 2D-LC (今、注目しているのはこちらです) ではサンプル全体が一次元目と二次元目の分離の対象になります。実際、コンプリヘンシブクロマトグラフィーの最初の事例は 70 年前のペーパークロマトグラフィー (PC) によるアミノ酸の分離でした (7)。1 つの向きで溶媒 A による開発の後、90 度紙片の向きを変え溶媒 B による 2 回目の開発が行われました。PC によるデータ処理を考慮すると、これがシンプルなやり方でした。

コンプリヘンシブ 2D-LC では、切り替えバルブ (2 流路切り替え) によって 2 つのカラムを実質直列につなぎ、一元目カラムから溶出された少量のフラクションを繰り返し、交互に二次元目カラムに導入します。標準的なコンプリヘンシブ 2D-LC 2 流路切り替えは 2 つの収集ループを持つ 10 ポート切り替えバルブです。次のフラクション (ループ 2) の二次元目カラムへの導入は、前のフラクション (ループ 1) がカラムから完全に溶出する時にのみ行うことができます。一次元目カラムでは分析時間に制限はありませんが、二次元目カラムでの分析時間 (グラジエント後の平衡化時間を含む) は流路切り替え周期と同じかそれより短くなければなりません。理想的なコンプリヘンシブ 2D-LC の組み合わせの場合、ピークキャパシティの合計は一次元目カラムのピークキャパシティと二次元目カラムのピークキャパシティを乗算したもの ($n_c t = n_c 1 \times n_c 2$) になります。理論的には、$n_c 1 = 500$ (高分離能) のカラムと $n_c 2 = 20$ (高速) のカラムを結合させることで 10000 のピークキャパシティが得

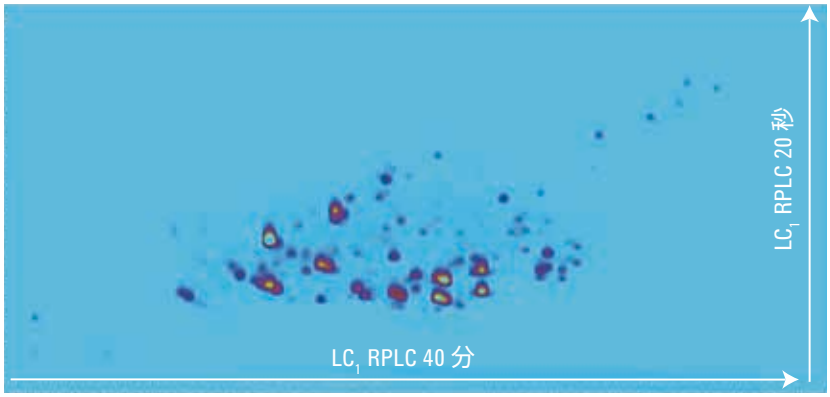


図 1. 320 nm UV により記録された、シトラス入り緑茶内のポリフェノールの RPLC と RPLC の 2D プロット。一次元目は C18 カラムを用い、0.1 % ギ酸水溶液とメタノールによるグラジエント溶出です。二次元目はフェニルヘキシルカラムを用い、0.1 % ギ酸水溶液とアセトニトリルによるグラジエント溶出です。

主な利点は何でしょうか?

次の 3 つが最大の利点です。

i) 分離能と得られる情報に関して 2D-LC 技術が発揮する圧倒的パワー
ii) 隠されたピークに関するデータの信頼性の向上。これがハートカット 2D-LC の人気が急速に高まった理由です。
iii) 30 分かかる一次元分離を 10 分に短縮し、二次元にふるい分けることで失われた分離能を取り戻すことによるスループット向上の可能性

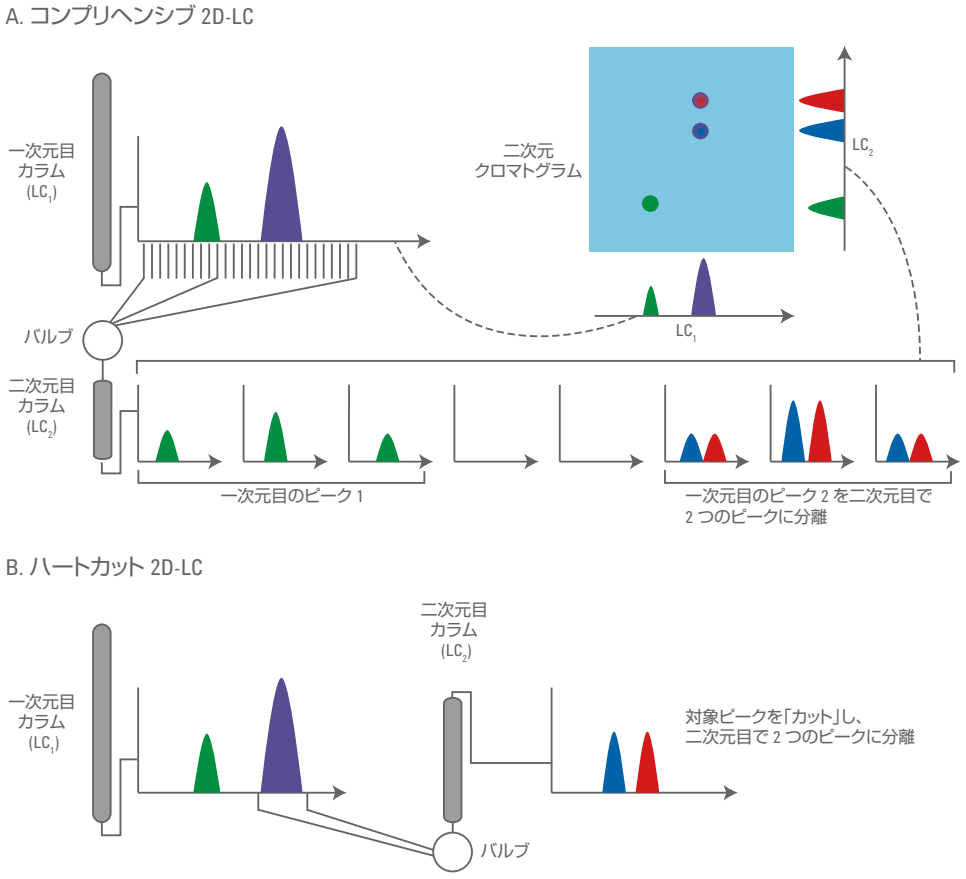
私自身はこの最後のポイントに非常に興味を持っています。既存メソッドの変換は厄介なものですが (分離が変化してしまうため)、これによりメソッド開発に将来性があることは明らかです。30 分かかる一次元分離に満足するのではなく、最終目標を念頭におき、最大限の効率を得られるような分離能力を投入してメソッド開発を進めることもできるのです。

2D-LC は難しいのではありませんか?

実際専用機器が出回るようになる前から、2D-LC は必ずしも難しかったわけではありません。ただ、どうやったら最大限の効果を引き出せるのかが分かるまでに時間がかかりましたし、専門知識や経験も必要でした。医薬品業界やその他の巨大産業に従事する分離科学者にはよそ見をしている暇はないのです。

私達の関心の多くは主にコンプリヘンシブ 2D-LC に向けられています。研究者はこれを活用して手元のサンプルに含まれる成分についてグローバルな分析結果を得ようとしています。しばらくはハートカット分離作業の方が簡単だっ

2D-LC 101



コンプリヘンシブ 2D-LC では、切り替えバルブを使用して、一次元目カラムから出る溶液全体を二次元目カラムへ送ります。このバルブはごく一部の溶出部分を二次元目カラムに送り込み、20〜30 秒という高速グラジエントで分析します。データ取り込み後は、両方の次元のクロマトグラムを統合します。ハートカット 2D-LC では、一次元目カラムから出る溶液の一部だけを二次元目カラムへ送ります。分離の中心からピークを切り離すことにより、二次元目において高分離効率で分析することができます。通常、二次元目の分析時間は、一次元目の収集時間より長くなります。

たのですが、最近「ルネサンス」が起こりつつあるようです。医薬品業界は新規技術の導入に積極的です。巨大ベンダーによってテクノロジーが提供されると、それはほとんど常に業界の全く新たな分野で展開されるようになります。

「簡易な 2D-LC」が促進された裏にはどのような進歩があったのでしょうか?

これまで、二次元目では非常に速いグラジエント溶出は無理だということが一つの大きな課題でした。しかし、ポンプ技術の進歩によってグラジエントのディレイボリュームは 1 mL から 100 µL にまで減ったのです。それが大きな節目でした。ソフトウェア開発にかけた時間によってユーザーの操作性も飛躍的に向上しました。

どの段階で 2D-LC が主力技術になるのでしょうか?

10 年前の私 (だけでなく皆) の目には、2D-LC はあまりにも複雑なため、2D-LC のパフォーマンスが一次元分離よりも優れていることが確実にならない限り、努力しても見合わないことは明らかでした。シミュレーションや実験を重ねた今では二次限目の分離が優れたことにより、クロスオーバー時間 (分析のランタイム)は約 10〜15 分になりました。(1)。これが 2D-LC の開発を続けようという大きなモチベーションになりました。同じ実行時間ではるかに優れた分離を実現する可能性のあるアプリケーションがたくさんあります。

今は 2D-LC 導入への転換期なのでしょうか?

意識の高まり、ベンダーソリューションの普及、一次元分離の壁に阻まれているという意識の変化、これらすべてが二次元分離への関心をさらに高めています。最近も大手医薬品メー

られます。ただし、二次元の分離が完全に得られることはないため、実験から得られる $n_c t$ は理論上のそれよりも低くなります。コンプリヘンシブ 2D-LC では、合計分析時間は一次元目カラムでの分析時間よりわずかしか長くならない(通常 1 分)ことに注意してください。

二次元目の分離が最適になるのは、2 つの次元の分離メカニズムにおけるリテンションのプロファイルが明確な場合です。直交性が高くなればなるほど理論上のピークキャパシティに近づきます。高い直交性の例には、順相の LC (NPLC) と逆相の LC (RPLC)、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と RPLC、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と RPLC、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) と RPLC、さらに超臨界液体クロマトグラフィー (SFC) と RPLC などの組み合わせがあります。RPLC × RPLC の組み合わせは、定義上は直交性が低いとされていますが、2 つの次元で pH が異なるペプチド分析など、特定のアプリケーションには興味深い結果を提供します(8)。さらに、RPLC × RPLC では、溶媒の非適合性は問題にならず、図 1 で説明されているように QA/QC 環境に応用できる非常に安定したメソッドの開発が可能です。

コンプリヘンシブ 2D-LC は十分に成熟しているため広く適用可能で、ルーチン環境にも応用できます。これは特に、コンプリヘンシブモードとハートカットモードの両方に対応した堅牢な機器を用いる場合に当てはまります。

Pat Sandra 氏と Gerd Vanhoenacker 氏は、ベルギー、コルトレイク市の Research Institute for Chromatography に所属しています。

参考文献

"Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry", Editor L. Mondello, (John Wiley & Sons Hoboken , NJ, USA, 2011).
Agilent Technologies 2D-LC
アジレント･テクノロジーのアプリケーションノート:
tas.txp.to/0314/2D-LC

参考文献

1. J. C. Giddings, "Maximum Number of Components Resolvable by Gel Filtration and Other Elution Chromatographic Methods", Anal. Chem.39, 1027-1028 (1967).
2. C. G. Horvath and S.R.Lipsky, "Peak Capacity in Chromatography", Anal.Chem.39, 1893 (1967).
3. U. D. Neue, "Theory of peak capacity in gradient elution", J. Chromatogr.A 1079, 153-161 (2005).
4. G. Vanhoenacker et al., Agilent Technologies, Application Note 5990-4031 EN, 2009.
5. J. M. Davis and J. C. Giddings, "Statistical Theory of Component Overlap in Multicomponent Chromatograms", Anal.Chem. 55, 418-424 (1983).
6. J. C. Giddings, "Sample Dimensionality:A Predictor of Order-Disorder in Component Peak Distribution in Multidimensional Separation", J. Chromatogra.A 703, 3-15 (1995).
7. R. Consden, A. H. Gordon, and A. J. P. Martin, "Qualitative Analysis of Proteins:A Partition Chromatographic Method Using Paper", Biochem.J. 38, 224-232 (1944).
8. I. François et al., "Tryptic Digest Analysis by Comprehensive Reversed Phase × Two Reversed Phase Liquid Chromatography (RP-LC×2RP-LC) at Different pHs", J. Sep. Sci.32 1137-1144 (2009).

カーからこんな電子メールが届いたばかりです。「我が社には一次元分離以上のものが必要です。ぜひお力を貸してください」。言い換えれば、例として、Genentech がアジレントに 2D-LC の製品番号を問い合わせてた時、LC 分離技術に大きな変革が起きていると判断できます。

最も普及するのはどこだと思われますか?

そうですね、ポリマー分析に従事する多くのグループが比較的長期にわたって 2D-LC を使用しており、優れた結果を多くあげています。この分野における彼らの努力は賞賛に値します。おそらくそれは今後も続くでしょう。

思うに、普及という面で今後最も目立ってくるのはバイオ医薬品業界になりそうです。何と言っても、2D-LCについては、この業界の得るものが最大なのですから。また、プロテオミクスで学んだ教訓を活かせるので比較的始めやすいということもあります。この手法では一次元目の分離はイオン交換で二次元目の分離は逆相で実行されるのですがこれは非常に良い組み合わせです。急激に伸びてきているという噂を耳にしています。

Dwight Stoll 氏は米国ミネソタ州のグスタフアドルフス大学分析化学部の准教授です。

参考文献

1. D. R. Stoll, X. Wang, and P. W. Carr, "Comparison of the Practical Resolving Power of One- and Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Metabolomic Samples", Anal.Chem.80, 268-278 (2008).

2D-LC を使用した漢方薬の調査

二次元液体クロマトグラフィーというといかにも重要そうな響きがありますし、見事な画像が生成されることも確かです。しかし、複雑なサンプルの分析に二次元液体クロマトグラフィーは不可欠なのでしょうか? ここでは、2D-LC が様式と実態の両面で優れていることを明らかにしていきます。

Oliver Schmitz、Duxin Li

漢方は太古からの技術です。現存する中国最古の医学書『黄帝内経』は紀元前 2 (または 1) 世紀にまで遡ります。初期の中国医学では、それぞれが何百あるいは何千もの化合物を含んでいる複数の植物から 1 つの製剤を作り出すのが一般的でした。現在もそれは基本的に変わっていません。通常の漢方薬製剤はきわめて複雑なのです。西洋医学に匹敵する製品管理は大きな課題となっています。より効果的な薬への探求が深まる中で、当然のことながら漢方薬は世界中から大きな注目を集めるようになりました。その結果、研究者達は漢方の化学成分と薬理活性、ひいては治療活性の起源に注目するようになったのです。

本質的な分離

高分解能質量分析 (HRMS) を用いるラボが増えてきているため、検出前に必要になる分離を行うための努力は減る一方だという意見をおそらく誰もが一度は耳にしたことがあると思います。クロマトグラフィー研究者でない人にとっては、こうした意見はむしろ魅力的に聞こえるかもしれません。しかし、現実には、こうした意見はあまり意味を成しません。サンプルのすべての成分が同時にイオン源に注入され、なおかつそれらの化合物が大部分の割合でイオン化される場合、漢方薬のように複雑なサンプルでは、数千ものラジカルカチオンが形成されます。そして、ESI または APCI のような大気圧イオン源では、こうして発生したラジカルカチオンのすべてが反応するか相互に作用し、それぞれがイオン化の時点から MS への進入までにおよそ 20,000 回の衝突に遭遇します。その結果、イオン化抑制やアーティファクト生成が起こる可能性があります。これは問題です。解決方法はあるのでしょうか?それは、MS の前に高性能クロマトグラフィープラットフォームを追加することです。HRMS の場合でも、このような組み合わせが (おそらく常に) グローバルスタンダードです。

コンプリヘンシブ 2D-LC または LC x LC なら複雑なサンプルに適した高性能分離を実現できます。実際、私達のグループではコンプリヘンシブ技術を専門に扱い漢方のさまざまな薬草を分析しています。GC x GC-MS ではより多くの無極性物質が分析され、LC x LC-MS ではより多くの極性化合物が分析されます (図 1 参照)。

もちろん他の分析技術と同様、LC x LC にもメリットとデメリットがあり、それらはアプリケーションによって異なります。私達にとっての LC x LC のデメリットは、一次元 LC と比べると MS 検出の感度が低くなるおそれがあり、メソッド開発がより複雑であるということでしょう (1)。しかし、メリットは明白です。(ページ 4 の最初の記事で述べられているとおり) はるかに高いピークキャパシティと、一次元目および二次元目でのリテンションタイムに応じてピーク強度を表す等高線プロットを生成する機能です。これらはフィンガープリント式の分析に最適なのです。

本格的な使用

では LC x LC 分離をさらに最適化するにはどうしたらよいでしょうか?答えは、使用するグラジエントプログラムにあります (図 2 参照)。私達のシステムでは二次元目にシフトグラジエントを使用することができます。このグラジエントではフルグラジエントプログラムより狭い範囲の移動相組成を使用しますが、リテンションに応じて濃度範囲をシフトします。シフトグラジエントは実際には並行グラジエントとフルグラジエントの組み合わせです。並行グラジエントと同様、より低い濃度範囲は弱く保持されたフラクションのリテンションを可能にし、より高い濃度範囲は保持力の強いフラクションを溶出するのに適しています。シフトグラジエントはグラジエントの変化率の幅を狭めることができ、グラジエントの戻り時間を短縮することが可能です。

RPLC x RPLC システムでは、一次元目で初期に溶出された化合物は二次元目で保持が弱まり、一次元目の途中で溶出された化合物は二次元目の途中で溶出され、一次元目の後期に溶出された化合物は二次元目で保持が強まります。さらにシフトグラジエントは連続的に実行されているため分析時間全体に対して二次元目の情報が得られます。

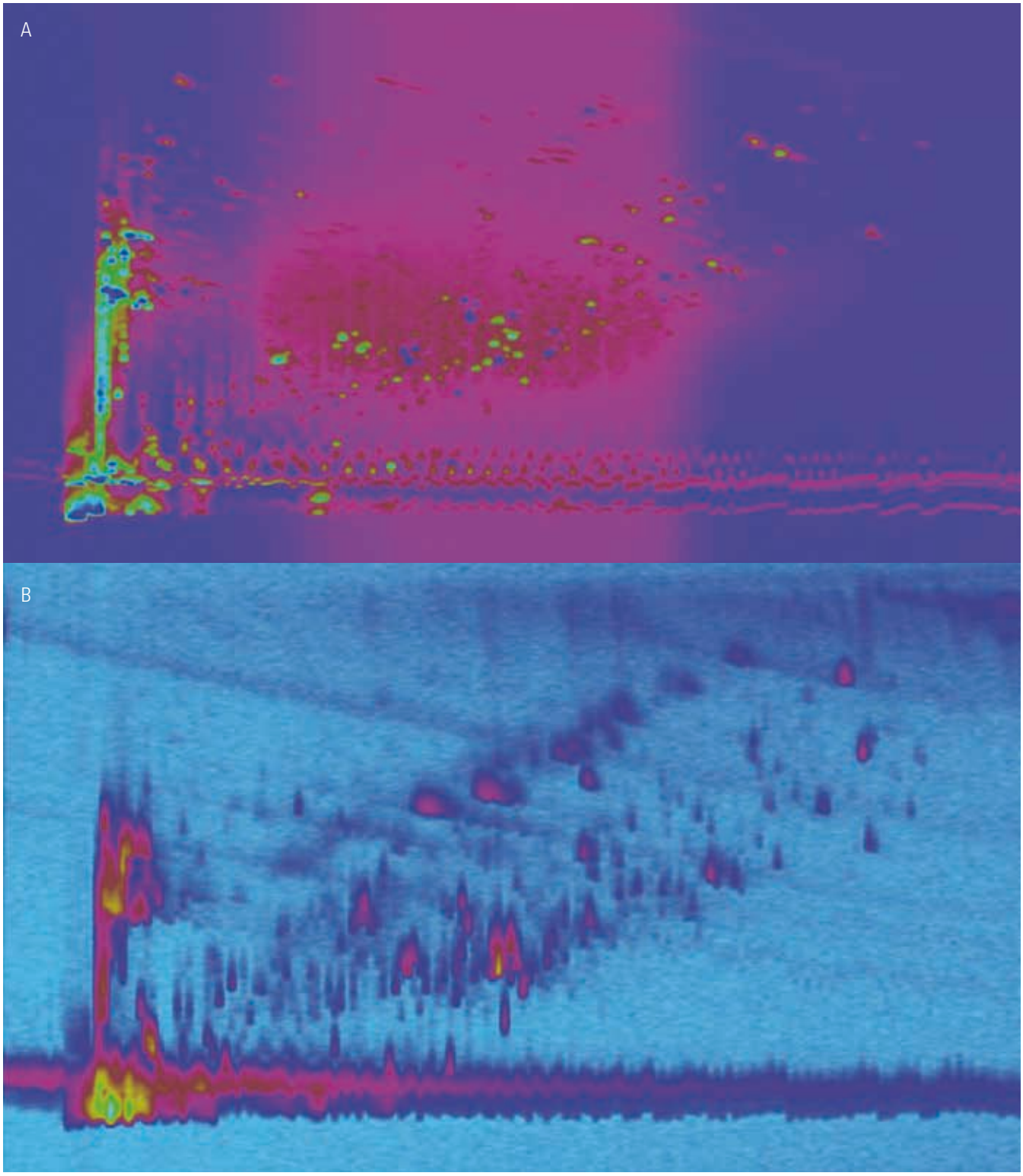


図 1. 2 つの薬草ハンシレンとオルデンランディアの水様抽出物の LC x LC 分析 (A: ダイオードアレイ検出器、B:ESI-qTOF-MS)。

図 3、4 で示されるとおり (2)、シフトグラジエントにより二次元目の分離能力が大幅に向上することは明らかです。

2D-LC にすべきか、2D-LC 以外にするべきか、それが問題です。
2D-LC の威力を活用すべきでしょうか?複雑なサンプルの分離能力を向上させたいのであれば、ぜひそうすべきです。疾病バイオマーカーの同定のようなノンターゲット分析では、LC x LC-MS を用いることで分析効率が飛躍的にアップしますが、これはまだ始まりにすぎません。次のステップは LCxLC-IMS-qTOF-MS です。この初期調査の一部が私達のラボで目下進行中です。

Oliver Schmitz 氏は応用分析化学の教授です。Duxin Li 氏はドイツのデュースブルクエッセン大学博士課程を修了しています。

参考文献

1. A. P. de la Mata and J. J. Harynuk, "Limits of Detection and Quantification in Comprehensive Multidimensional Separations", Anal.Chem. 84, 6646-6653 (2012).
2. D. Li and O. J. Schmitz, "Use of Shift Gradient in the Second Dimension to Improve the Separation Space in Comprehensive Two-dimensional Liquid Chromatography", Anal. Bioanal.Chem.405, 6511-6517 (2013).

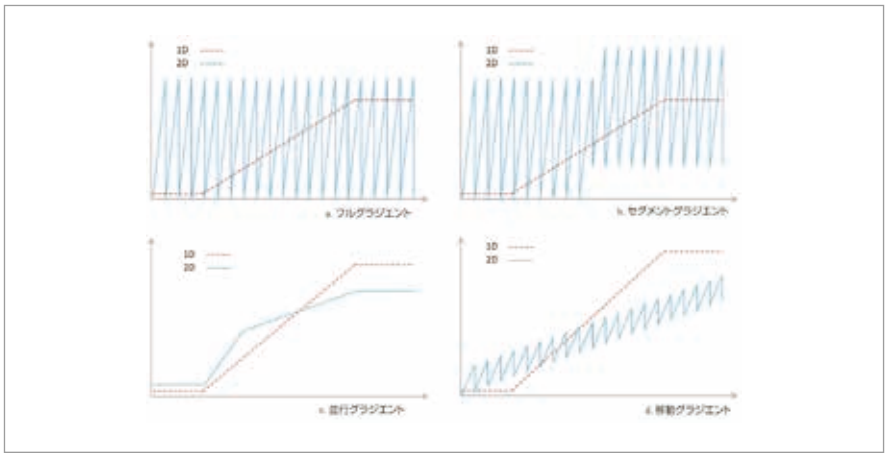


図 2. 2D-LC で使用されるさまざまなグラジエントプログラム

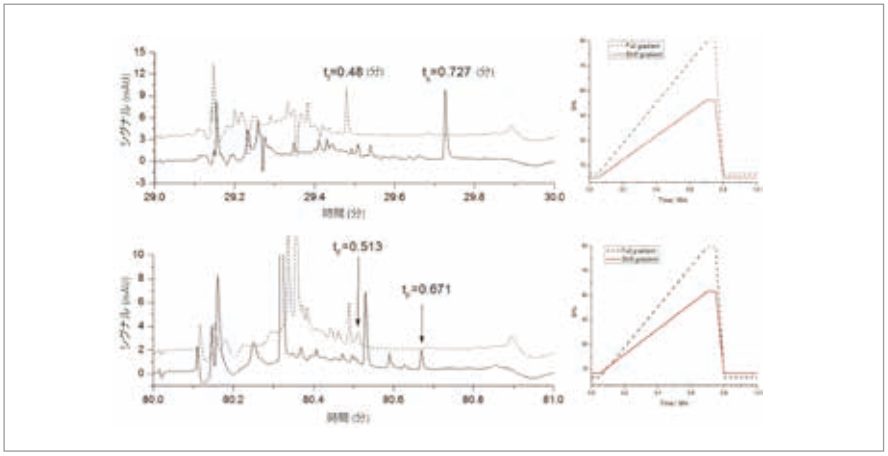


図 3. フタバムグラとオルデンランディアの水抽出による LC x LC 分析のフラクション 29 (上部クロマトグラム) および 80 (下部クロマトグラム) のフルグラジエント (点線) とシフトグラジエント (実線) の比較 (右側の該当グラジエントプログラムを使用)

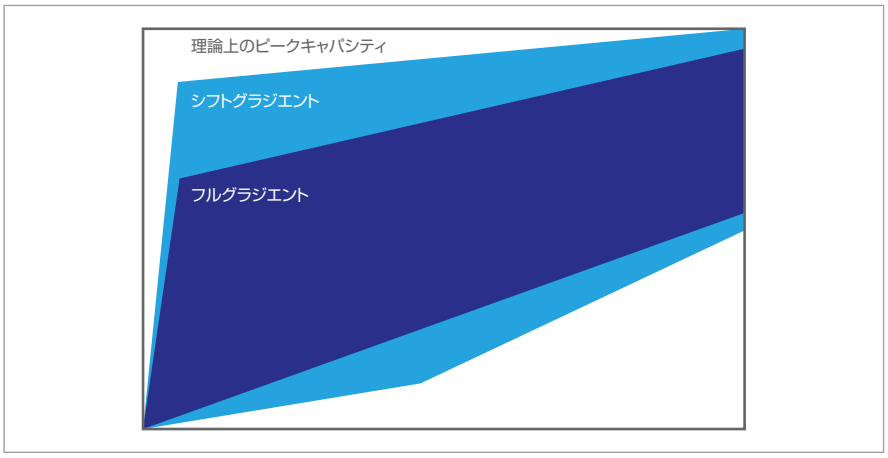


図 4. フルグラジエントとシフトグラジエントのピーク分布範囲の比較 (出典: 参考文献 3)

漢方薬のコンプリヘンシブ2D-LC分析

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションを用いたクロマトグラフィー分離能の最大化

Sonja Krieger、Jens Trafkowski

はじめに

伝統的中国医療の一つの側面である漢方薬には、1 つの植物、または複数の植物の製剤が使われています。漢方薬の有効性は、植物に含まれる複数の成分の相乗効果に応じて異なります。漢方薬に用いられる植物のサンプルは非常に複雑であるため、その分析にはコンプリヘンシブ二次元液体クロマトグラフィー (コンプリヘンシブ 2D-LC) メソッドが適しています。

結果と考察

コンプリヘンシブ 2D-LC 分析では、植物のサンプルは煎剤として調製しました。漢方薬に用いられる植物の煎剤には、極性がそれほど顕著でない化合物が多く含まれるほか極性の顕著な化合物も幅広く含まれています。そのため、一次元目の分離には Agilent ZORBAX SB-Aq カラムを選択しました。このカラムは親水性化合物を保持し、水 100 % 移動相条件で使用できます。さらに、有機溶媒にはメタノールを使用し、両方の移動相に 0.1 % ギ酸を加えることで、桑枝成分の分離が向上しました。80 分間でメタノール 0 % から 95 % のグラジエント条件で分離を行いました。

二次元目の分離に適したカラムを選ぶために、複数のカラムをテストしたところ、Agilent ZORBAX Bonus-RP カラムが高速グラジエントで最も優れた分離を実現しました。一次元目分離と二次元目分離の選択性の差異は、溶離液としてアセトニトリルを用い、両方の溶離液に 0.1 % のギ酸を加えることで実現しました。両次元の直交性の向上だけでなく、メタノールに比べて生成される背圧が低いという理由からアセトニトリルの使用も功を奏しました。そのため、より高い流動率を二次元目に展開できました。

アクセスできる 2 つの次元の分離面積を広げるために、図 1 に示すとおりシフトグラジエントを二次元目に適用しました。図 2 に直交性の高い分離が示されています。

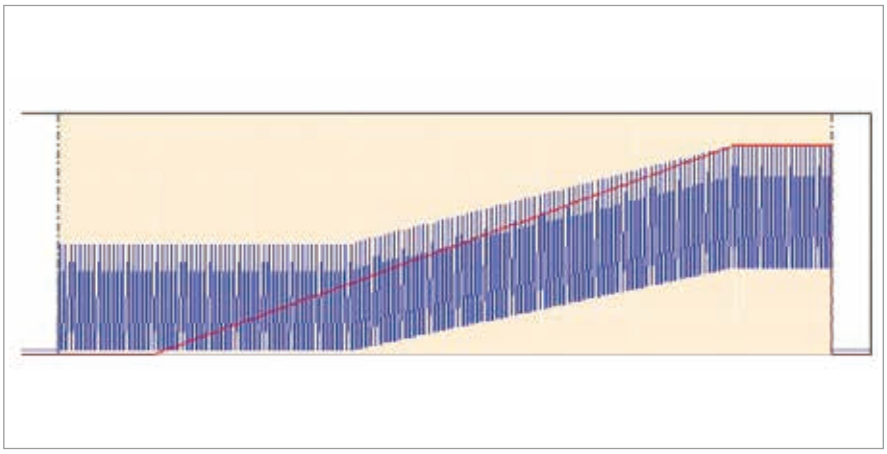


図 1. 桑枝煎剤の化合物の二次元分離向けに設計された複雑なグラジエント

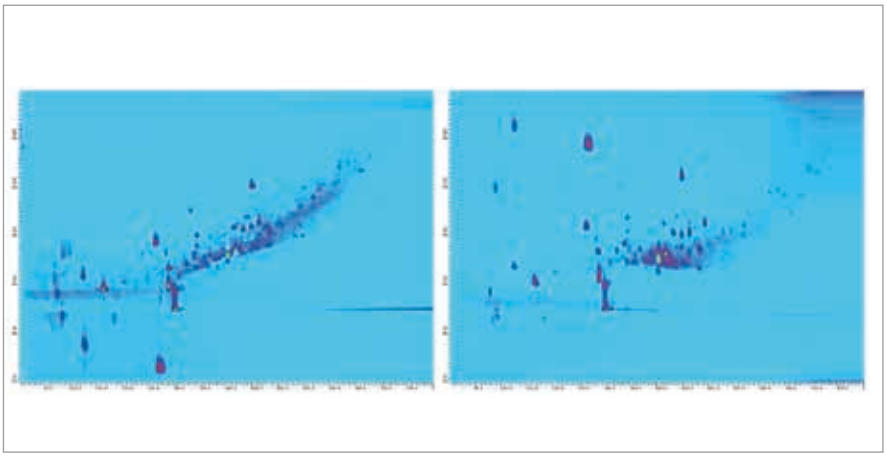


図 2. 桑枝煎剤のコンプリヘンシブ 2D-LC 分析。(A) アセトニトリル 5 % から 95 % まで反復二次元グラジエントを使用。(B) 複雑な二次元グラジエントを使用 (254 nm での検出)。

結論

コンプリヘンシブ 2D-CL は薬草製剤の分析に理想的です。特に 2 つの分離次元で 2 つの RP フェーズを組み合わせる場合に適しています。

システムの詳細については tas.txp.to/2DLC/herb からご覧いただけます。

二次元バイオ分析

2D-LC 使用による生物製剤および バイオシミラーの市場への投入

Koen Sandra、Gerd Vanhoenacker、
Pat Sandra

近年、医薬品売り上げの上位 10 位の大部分を、癌や自己免疫疾患といった命にかかわる疾患の治療に広く用いられるモノクローナル抗体や遺伝子組み換えタンパク質などのタンパク質医薬品が占めています。これらの売り上げを飛躍的に伸ばしている生物製剤は近い将来、特許が失効することから、バイオシミラーおよび「バイオジェネリック」の市場で非常に注目されています。

企業が革新的な生物製剤あるいは後発品であるバイオシミラーのどちらを開発しているかに関係なく、詳細な特性解析を行う必要があります。実際、臨床で使用または市販する前に、製品特性は厳密にモニタリングされなければなりません。低分子医薬品よりもはるかに複雑なため、タンパク質生物製剤の特性解析は非常に困難であり、通常、さまざまな分析技術および分析手法が使用されています (1)。

ペプチドマッピングは、調査対象の分子について非常に詳細な情報が得られるため、一般的な特性解析手法です。例として、150 kDa のモノクローナル抗体を考えてみましょう。トリプシン消化によって、広いダイナミック濃度範囲でさまざまな物理化学的性質を持つ 100 個以上のペプチドを生成します。これらの消化物と関連する複雑性には、最高の分離能力が必要です。一次元分離 (1D-LC) と比べると、二次元 LC および特に包括的な 2D-LC (LC × LC) は2 つの次元に直交性があり、一次元目で得られた分離が二次元目に送られる場合も維持されている限りピークキャパシティが劇的に向上しています。

2D-LC ベースのペプチドマッピングの直交型の組み合わせには、強カチオン交換と逆相 LC (SCX × RPLC)、親水性相互作用クロマトグラフィーと逆相 LC (HILIC × RPLC)、2 つの次元で pH レベルが異なる (2-4) 逆相 LC と逆相 LC (RPLC × RPLC) があります。分離メカニズムが完全に異なるため、最も高い直交型は SCX × RPLC および HILIC × RPLC で得られます。RPLC × RPLC は特に興味深く、両方の次元における優れた溶媒の適合性は RPLC × RPLC をもっとも堅牢なものにしますが、極端な pH での RPLC の分離時に主な選択性の違いが得られるように、ペプチドの両イオン性により、非常に高いピークキャパシティ (個々の次元での高いカラム段数により) と優れた直交性を依然として実現しています。

図 1 は、RPLC × RPLC を使用した、モノクローナル抗体トラスツズマブの 2 つの生産バッチの 2D-LC のトリプシンペプチドマップを示しています。トラスツズマブは 1998 年からハーセプチンとして販売されています。現在も、HER2 陽性乳癌の治療に用いられています。ペプチドマップは、同定および純度を評価するための豊富な情報を提供します。トラツズマブは、62 のトリプシンペプチド (20 個の軽鎖と 42 個の重鎖) で構成され、それらの大部分がベースライン分離されます。これらのトリプシンペプチドの一部には、脱アミド化、異性化、酸化などの変化しやすいアミノ酸が含まれています。このような生成物に関連する不純物は、製品の安全性および効能の両方に影響するため、厳密なモニタリングが必要です。

このような変化に関しての 2D-LC 技術の利点を、図 2 に示しています。ストレスを受けていない先発薬と pH ストレスを受けた先発薬の 2D-LC ペプチドマップを拡大表示しています。トラスツズマブを 3 日間 pH 9 でストレス処理した場合、脱アミド化イベントが大幅に増えます。この変化は、軽鎖の 3 つ目のトリプシンペプチド内にあるアスパラギンで発生し、ストレスを受けていないサンプル中に約 10 % 観察されます。ピーク同定は MS を使用して得られ、変化した場所は MS/MS によって明らかにされました。

RPLC × RPLC 手法と UV 検出との組み合わせに伴う精度 (リテンションタイム RSD < 0.2 %、面積 RSD < 5 %、n=5 の場合) により、これは図 1 の生産バッチ間や先発薬生物製剤とバイオシミラー間の適合性を示す強力なアプローチになります。

そこで、生物製剤の開発パイプラインにおいて、どこから 2D-LC の真の利点が得られるのかという大きな疑問が生じます。初期段階の開発では一次元 LC-MS を使用することが可能です。RPLC カラムは 500 を超えるピークキャパシティを十分に示し広く普及しており、高分解能質量分析と組み合わせると強力な特性評価エンジンとなります。しかし、開発パイプラインとともに進み臨床使用や市販段階に入る場合、可能な場合は MS を UV 検出器に置き換える必要があり、それによって2D-LC が実現する高い分解能の真価が発揮されます。商用機器の出現は確かに、生物製剤の分析において 2D-LC をより広範に使用するうえで大きな一歩を示しています。

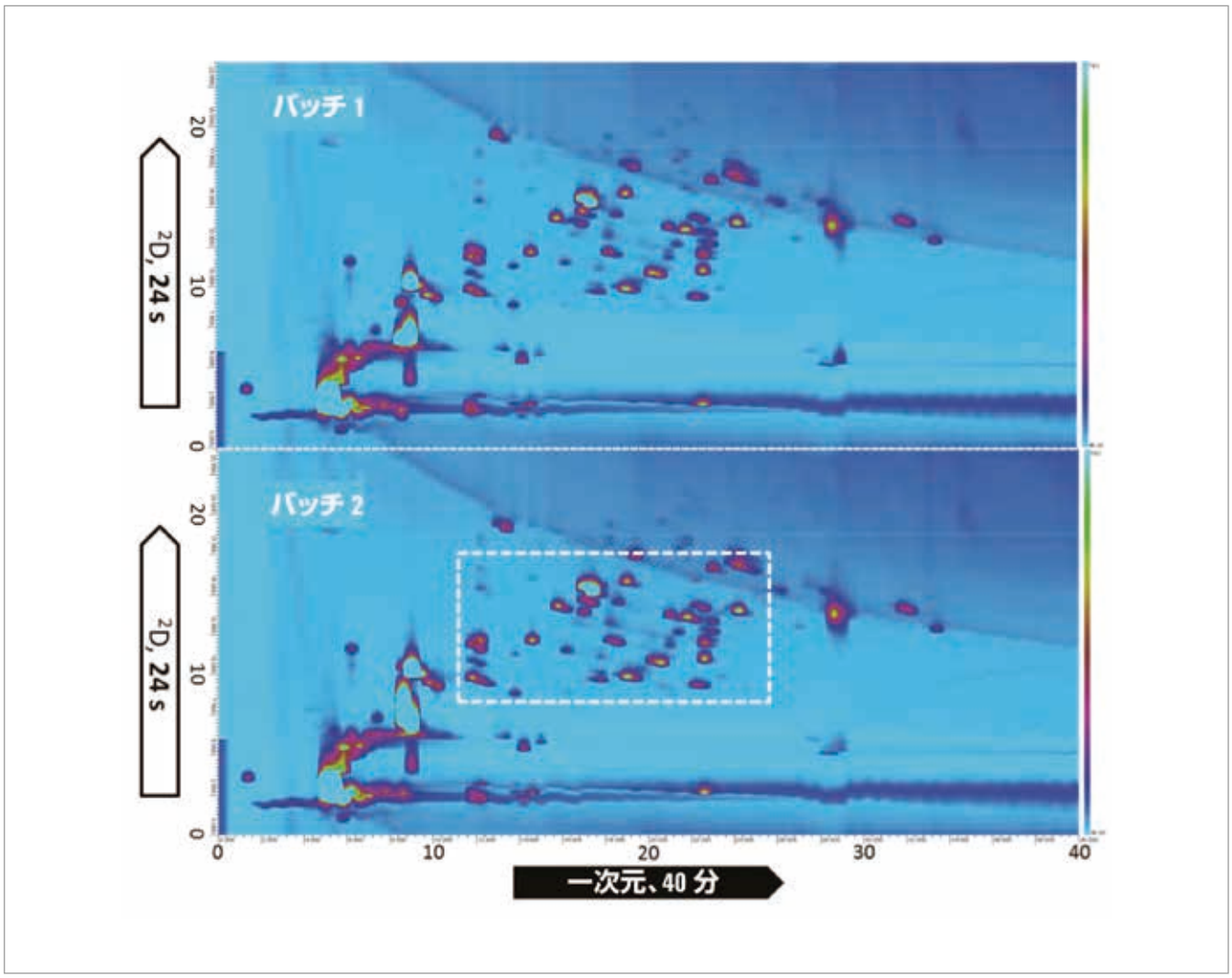


図 1. 2 つのハーセプチン生産バッチの 2D-LC ペプチドマップ一次元目および二次元目の分離は、それぞれ高 pH と低 pH による逆相 LC で構成されています。フラクションは、デュアルループインタフェースを使用して、一方の次元からもう一方の次元に移動しました。214 nm で UV 検出が実行されました。

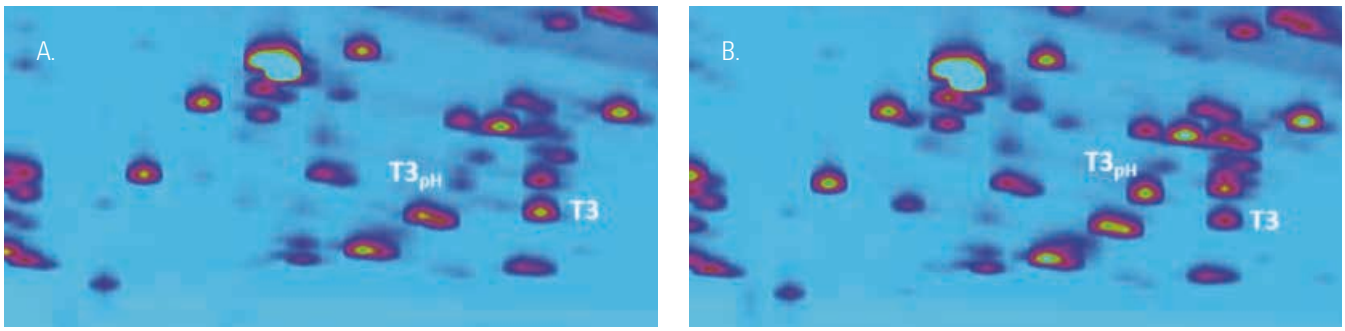
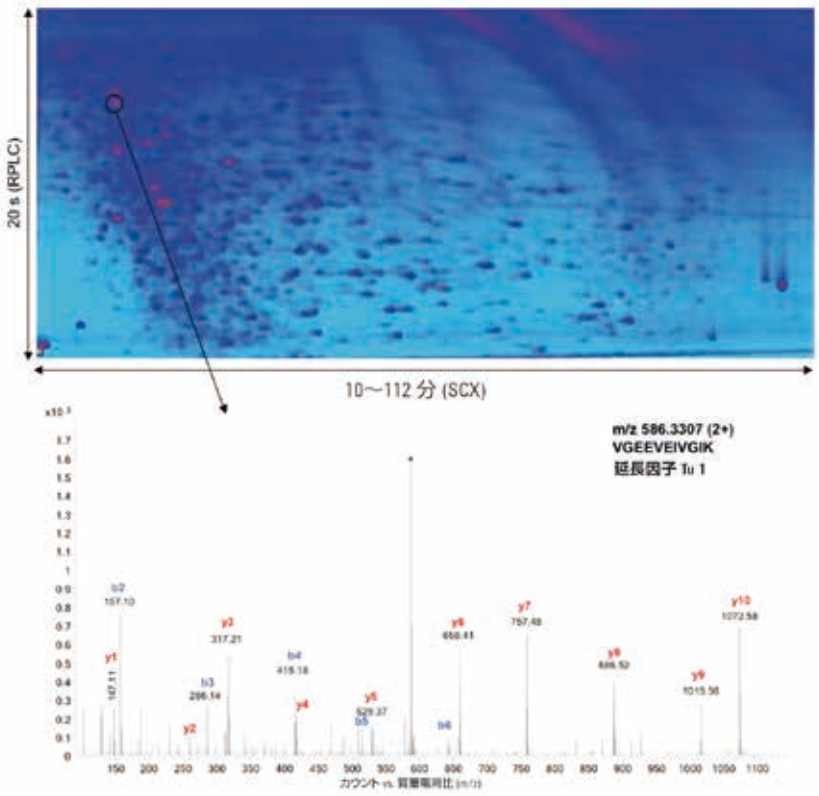


図 2. モノクローナル抗体の軽鎖にアスパラギン脱アミド化を示す、ストレスを受けていない (A) と pH ストレスを受けた (B) ハーセプチン生産バッチの 2D-LC ペプチドマップの拡大表示T3 は軽鎖の N 末端から数えて 3 つ目のトリプシンペプチドを示します。$T3_{pH}$ は脱アミド化変異体を示します。

生物製剤分析を超える 2D-LC を基にした ペプチドマッピング

著者 Koen Sandra、Gerd Vanhoenacker、Pat Sandra

二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) ベースのペプチドマッピング:、全大腸菌溶菌液のトリプシン消化物の SCX × RPLC 分離の有用性が示されています。ピークキャパシティは 1D-LC と比べて大幅に向上します。2 つの次元間の高い直交性により顕著な分離が得られ、高速 Q-TOF MS システムとの接続により、観察されたスポットでペプチドおよびタンパク質の同定を解析することができます。



Koen Sandra 氏は研究開発ディレクター、Gerd Vanhoenacker 氏は LC 製品のスペシャリスト/マネージャ、Pat Sandra 氏は設立者であり社長です。三氏は、ベルギー、コルトレイクの Research Institute for Chromatography に所属しています。

参考文献

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra. J. Chromatogr.A, 1335, 81-103 (2014).
2. G. Vanhoenacker, K. Sandra, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, U. Huber, E. Naegele, Agilent Technologies, Appication Note 5991-2880EN (2013).
3. G. Vanhoenacker, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, K. Sandra, Anal.Bioanal.Chem, Special Issue "Multidimensional Techniques", in preparation.
4. K. Sandra, M. Moshir, F. D'hondt, R. Tuytten, K. Verleysen, K. Kas, I. Francois, P. Sandra, J. Chromatogr.B, 877, 1019-1039 (2009).

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションによる、モノクローナル抗体消化物の分析

二次元液体クロマトグラフィー

HILIC x RPLC-MS

Gerd Vanhoenacker、Koen Sandra、Isabel Vandenheede、
Frank David、Pat Sandra、Udo Huber

はじめに

治療用モノクローナル抗体 (mAbs) のような生物製剤は、さまざまな疾患の治療において重要性を増しています。ペプチドマッピングは、包括的な特性解析や純度測定に広く利用されている技術です。mAb 消化物と関連する複雑性には、最高の分離能力が必要です。包括的な二次元 LC (LC×LC) は、一次元分離と比べると、ピークキャパシティが大幅に向上します。

結果と考察

この記事では、Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムと組み合わせた Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションを使用した、トラスツズマブのトリプシン消化物の分析での HILIC×RPLC の応用を解説しています。一次元での HILIC と二次元での RPLC との組み合わせは、LC×LC セットアップでのペプチドのような化合物成分の適切な直交性 (orthogonality) を提供します。この直交性および相補性はさまざまなレポートで証明されていますが、多くの場合、ストップフロー手法やオフライン LC×LC 手法が使用されています。図 1 にトラスツズマブの LC×LC ペプチドマップが示されています。等高線プロットは MS トータルイオンカレントデータを使用して作成されました。Agilent MassHunter Bioconfirm ソフトウェアを使用し、高い質量精度 (< 5 ppm) での理論的トラスツズマブ配列と実験で収集されたデータを整合することによって、各スポットは特定されました。結果として生じた分離は、一次元と二次元の両方で適切な直交性を示しています。

開発メソッドの適用性を、ストレスを受けたサンプルとストレスを受けていないサンプルの両方で評価しました。トラスツズマブには消化の前に強制分解を行いました。ストレスを受けたデータとストレスを受けていないデータとの比較により、分解生成物が明らかになります。図 2 はペプチド T41 とその酸化生成物の抽出イオンプロットを示しています。ストレスを受けていないサンプルと酸化ストレスを受けたサンプルとの比較から、ストレスを受けていないトラスツズマブは既に少量の酸化生成物を含んでいることが分かります。図 2 の挿入図は質量スペクトルを示しています。

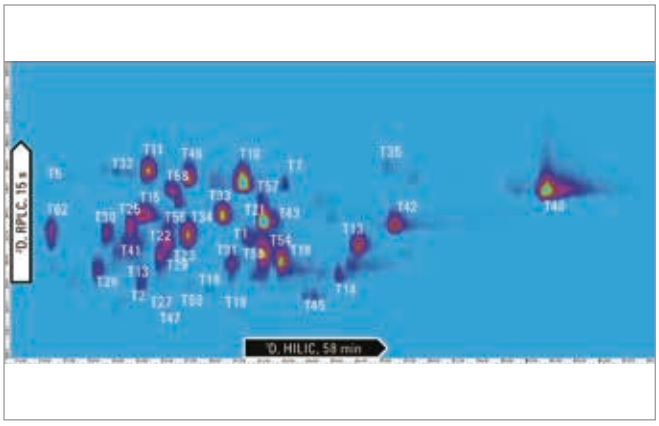


図 1. トラスツズマブのトリプシン消化の分析を表す LC x LC 等高線プロット。

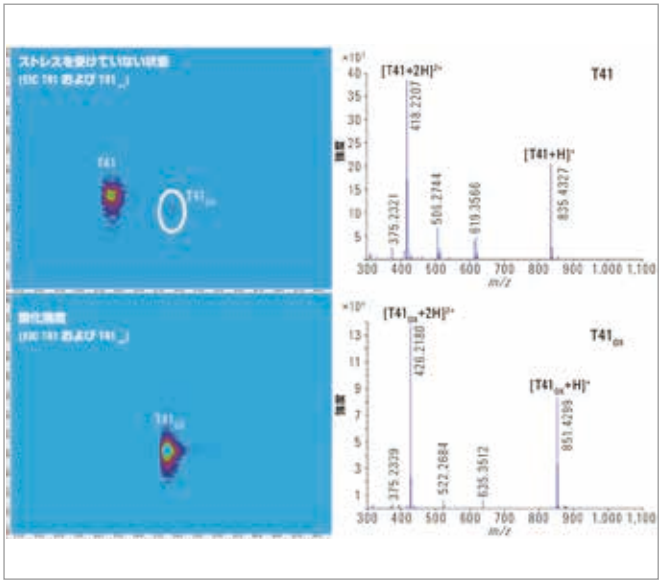


図 2. ストレスを受けていないトラスツズマブと酸化ストレスを受けたトラスツズマブのトリプシン消化の分析を表す LC x LC 抽出イオンの等高線プロット。

結論

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションと Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムとの組み合わせは、モノクローナル抗体消化物の包括的な分析に最適です。詳細にペプチドマッピング分析するために LC×LC を高性能質量分析計と組み合わせた場合の可能性は、ストレスを受けたトラスツズマブ消化物とストレスを受けていないトラスツズマブ消化物の分析結果に如実に示されています。

完全なソリューションについては、tas.txp.to/2DLC/antibody を参照してください。

大手医薬品メーカーでの 2D-LC の利用

10 年以上前から二次元液体クロマトグラフィーの潜在力は疑う余地はありませんでした。現在、より成熟した 2D-LC が製薬分野における分析でより大きな役割を担う準備ができています。

Cadapakam J. Venkatramani

大学院生のころ私は、1990 年代前半に包括的な二次元ガスクロマトグラフィー (GC) システムを発明した後の故 John B. Phillips 教授の研究に魅了されました。私の二次元システムへの関わりは、John B. Phillips 教授のグループに入ったときから始まりました。相補的な相を使用してさらなる分離を実現する、二次元目カラムへの一次元目カラム溶媒全体のサンプリングの将来性に非常に興奮しました。卒業研究のほとんどを 2D-GC に、特に、石油サンプルの分離に充てました。もっとも重要な出来事は、包括的な 2D-GC を使用した、石油サンプル中の 4,000 種類を超えるサンプル成分の分離で、技術的な可能性を十分に示すことができたことです (1)。1990 年代後半、私は医薬品企業に入社し、2D-GC コンセプトを液体クロマトグラフィー (LC) に拡張するのに最適な場所であることを悟りました。2000 年代の初めになってようやく機会が訪れ、実際に 2D-LC のゴールに向かって突き進みました。これは場所も時も的を射ていました。

手作りの 2D-LC

二次元 GC は機能していたので、2D-LC も機能することはわかっていました。「システムをどのように構築するか」が大きな問題でした。市販の機器はありませんでしたが、幸運にも隣り合った複数の HPLC システムがあったため、問題は、それらのシステムを構成し、2D-LC インタフェースをデザインして一次元目カラムの溶媒を二次元目カラムに移動することでした。手短に言うと、12 ポートの 2 ポジションバルブを使用してシステムを統合し、この研究を 2003 年ごろに発表しました (2)。この論文では、さまざまな 2D-LC セットアップを紹介しました。たとえば、二次元目に並列したシングルカラムおよびデュアルカラム、複数の検出器などです。実際、私たちが当時行っていたことは、多次元 LC における現在の研究に非常に似ています。当時の私たちは先を進んでいたのでしょう。

もちろん、独自のシステムを構築するにあたり、課題に直面しました。問題の 1 つは、バルブの切り替えの前後にノイズが発生し、ノイズスパイクと共溶出する不純物の識別が困難になりました。バルブのタイミングを適切に同期させることが必要でしたが、システムの制約を考慮すると至難の業でした。トリガーとして、自動的かつ高い再現性でプロジェクトのニーズに合わせて 30、60、90 秒ごとにシーケンスの切り替えを開始する高速電子タイマーを統合しなければなりませんでした。要約すると、主に 3 つの懸案事項がありました。(i) 2 つの HPLC システムを互いに伝達し合えるようにするにはどのように構成するのか、(ii) 1 次カラムからフラクションをどのように適切に採取し、さらに分離するために 2 次カラムヘッドで濃縮させるか (iii) バルブ切り替えによって発生するベースラインノイズをどのように低減するかを考慮しなければなりませんでした。これらはデータを得る以前の懸念です。

2D-LC システムから 2 次元データを検索することは同じように困難でした。HPLC システムは 1 次カラムのリテンションタイムとして、一連の検出器レスポンスを採取可能ですが、二次元目のリテンションタイムとは関連付けされていませんでした。データ取り込みの周期とバルブの切り替え周期を考慮しながら Excel で手動で作り直す必要がありました (3、4)。酸性、塩基性、中性化合物からなるサンプル混合物を、酸性を一次元、塩基性を二次元の混合モードの固定相で分離した 2D 等高線プロットを図 1 に示します (4)。サンプル成分は酸性と塩基性のゾーンに分離され、中性は対角線に沿っています。二次元平面でのサンプル成分の位置は化学的性質を反映しています。

困難でしたが、コンセプトを実証するための十分なデータを得ることができ、努力が報われました。面白いことに、独自の未発表の研究に、当時、私たちは 2 µm 以下のカラムを使用しており、それが後にサブ 2 µm クロマトグラフィーとして一般的に知られるようになるとは思いもしませんでした。高効率、高速な分離には小さい粒径 (1.8 µm) のカラムを使用する必要があることを知っていただけです。

要するに、最初の数年間、2D-LC には相当な創造力と懸命な努力が要求されましたが、見返りとして大きな報酬が得られました。

2D-LC を次の段階へ

アジレント独自の 2D-LC-MS モデルが導入される約 2 年前まで、私は自家製のシステムを使用していました。

現在、私たち研究者はこれまで直面してきた問題の多くについて心配する必要はありません。2D-LC は非常にシームレスで直観的なプロセスになりました。もはや、少数の研究者専用の研究ツールではなく、反復性のあるグラジエント機能を備えた市販ツールです。各グラジエントは、以前のグラジエントよりも徐々に高い有機強度で始まり、効率を向上します。以前は浅いグラジエントを両方の次元で使用せざるを得ませんでしたが、最新のシステムでは、反復性のあるグラジエントのプログラミングがほぼ無制限で、まったく新しい各種アプリケーションへ使用範囲を広げています。

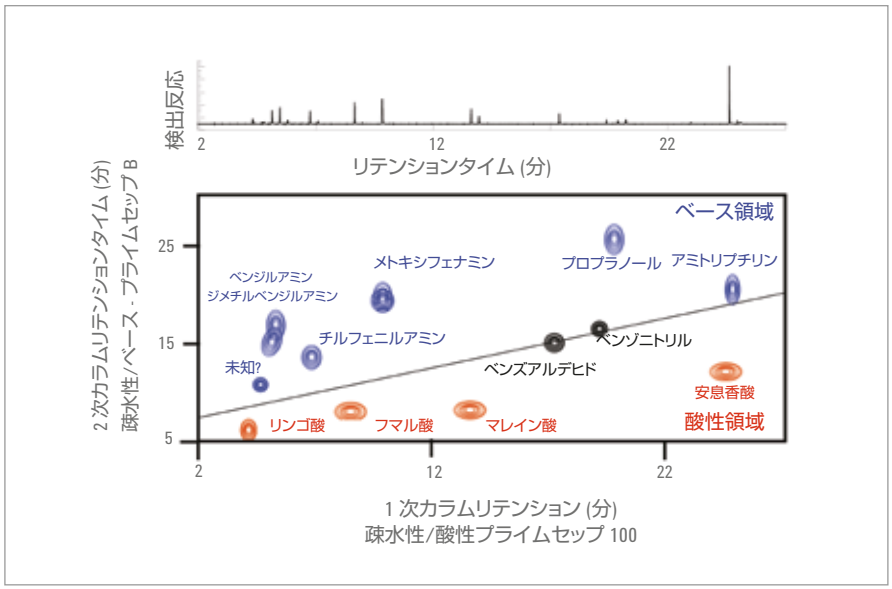


図 1. 一次元目の Primesep-100 カラムと二次元目の Primesep-B カラムでのテスト用混合物の相補的な 2D-LC 分離。一次元クロマトグラム (上図) から二次元等高線プロットを生成しました。
1 次カラム流速は 0.5 mL/分で、2 次カラム流流速は 3.25 mL/分です。UV 検出は 215 nm です。

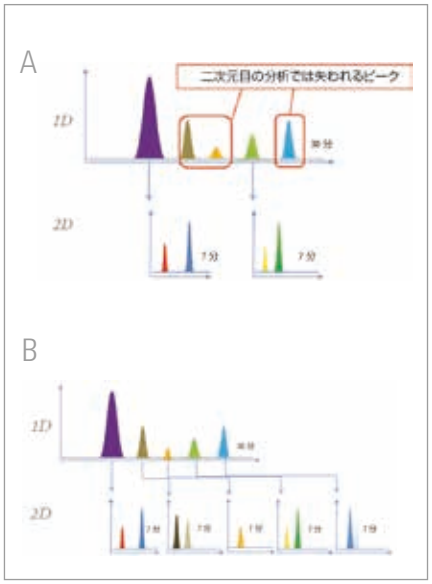


図 2.A. 標準ハートカット 2D-LC。B. マルチハートカッティングを可能にするピークパーキングソリューション搭載の 2D-LC。、12 サンプルループ中への複数のフラクションの収集と保存に対応。

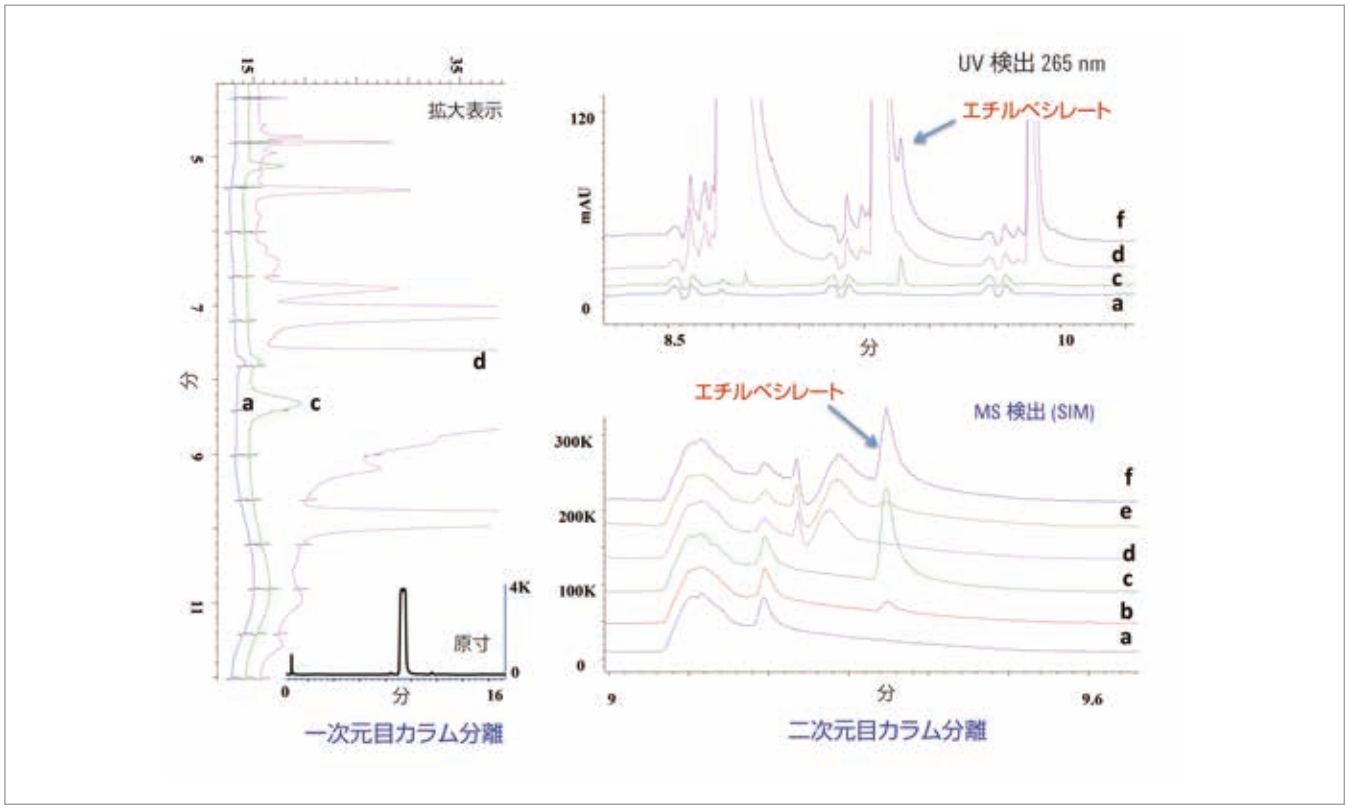


図 3. 医薬品有効成分 (API) に添加された遺伝毒性不純物のエチルベシレートの 2D-LC-MS 分離。左側のプロットは C18 カラム (5 cm x 2.1 mm x 1.8 µm) での 1 次カラム分離です。1 次カラム分離のフルスケールプロットが挿入されています。右側のプロットは移動したフラクションの二次元目カラム分離を 265 nm の UV 検出を使用してモニタリングしたもの (上図) およびエチルベシレートを特徴付けるイオンを MS-SIM を使用してモニタリングしたもの (M+1 イオン、下図) です。二次元目では、フェニルヘキシルカラム (5 cm x 2.1 mm x 1.8 µm) を使用しました。
エチルベシレートは UV 検出器付きの 2 次カラムを使用して一部が分離されました。下図の無添加のサンプルおよび添加されたサンプルの MS トレースは、MS 検出器付きの 2D-LC で採取しました。a は希釈剤ブランク、b はエチルベシレートの 0.5 ppm 標準、c はエチルベシレートの 5 ppm 標準、d は無添加の API、e はAPI (10 mg/mL) に添加された 0.5 ppm エチルベシレート、f はAPI (10 mg/mL) に添加された 5 ppm エチルベシレートです。

2D-LC の使用に関する クイックヒント

1. サンプルを把握します。
2. 作業目的および今回の作業に 2D-LC が適していることを確認します。
3. 文献を確認します。他の研究者による これまでの成果を確認します。 同じことを繰り返す必要は ありません。
4. 使用可能な市販の機器を確認し 目的に合わせて作業を容易にします。
5. いろいろ試しながら、実験を 楽しみます。

製薬分野における分析で、私たちは、主要な医薬品有効成分に含まれるあらゆる微量の共溶出不純物の分離と同定に特に興味を持ちました。しかし、メインピークの付近に溶出する化学成分は多くの場合、構造が似ており (または異性体)、特異的で感度の高い HPLC メソッドの開発は難しく、ダイオードアレイ検出器 (DAD) および MS のような従来の検出技術には限界があります。さらに、これらの不純物の濃度レベルは多くの場合、数桁小さいものです。例えるなら、世界で一番高い建造物 (ドバイのバージカリファ) サイズの主要成分ピークを観察しようとする一方で、その真下の通りの歩行者サイズの不純物を見逃すまいとするようなものです。2D-LC を使用し、別の分離メカニズムを二次元で使用することによって共溶出成分を見つける機会を再び得ました。これは医薬品業界にとって大きな利点です。

低分子医薬品サイエンスでは、主成分の付近に限定される不純物分析には完全なコンプリヘンシブ 2D-LC はあまり導入されていません。選択的あるいは擬似の包括的メソッド (拡張されたハートカットに似たもの) を採用する傾向があります。現在メインピークだけでなくより多くのフラクションを二次元目カラムに送るために、一次元目カラムの流量を遅くすることで (例えば 1 mL/min から 0.05 mL/min にする) ようやく 30 秒から 60 秒毎に二次元クロマトグラムが得ることができます。アジレントが HPLC 2014 で導入した最新の技術は、マルチハートカット用のピークパーキングソリューションです。これにより、複数のフラクションを 12 サンプルループ中に収集して保存し、後で順次分析できます (図 2 を参照)。これを使用することで、一次元で流量を遅くする必要はなくなるはずです。医薬品業界にとって非常に価値のあることだと思います。現在、デモバージョンの結果を待っている段階です。

医薬品業界における 2D-LC の可能性のもう 1 つの例に、潜在する共溶出のための MS 非対応メソッドの評価があります。1 次カラムから MS 非対応移動相の少量を 2 次カラムに導入して、MS に影響を与えることなくさらに分離することができます。また、患者の健康に大きく影響するためきわめて低濃度で定量されなければならない遺伝毒性不純物の分析における 2D-LC のアプリケーションにも可能性を見出しています。共溶出する遺伝毒性不純物の分析における 2D-LC-MS のアプリケーションを図 3 に示しています。エチルベシレート、1 次カラム内の API ピーク中にある遺伝毒性不純物の共溶出は、UV 検出を使用した二次元目で一部が分離されます。MS のような特異的で高感度の検出器の使用は、濃度が 4 桁以上異なる共溶出不純物の検出を可能にし、2D-LC の能力を実証します。

アキラル/キラル分析は、特にキラル中心の数の増加に伴って、2D-LC が重要な役割を担うもう 1 つの領域です。私たちは、2D-LC を使用してアキラル分析とキラル分析に同時に取り組みその早期の研究でコンセプトの証拠を示しました (5)。

将来、共溶出の安定性試験メソッドを評価し、フィードバックメカニズムとしてルーチンメソッドを最適化または向上するために 2D-LC が使用されるようになると確信しています。2D-LC を研究ツールとして開発初期に採用することによって、より堅牢な安定性試験メソッドが得られると思います。

以上の利点から判断すると、2D-LC が今後 5〜7 年の間に主流となり始めても不思議ではありません。特に、規制当局が潜在的な共溶出についてより強硬な姿勢をとり、安定性試験分析メソッドを詳細に検査するような場合には想定できることです。

Cadapakam J. Venkatramani 氏は、Small Molecules Pharmaceutical Science (米国、カリフォルニア、サンフランシスコ) のシニアサイエンティストです。

参考文献

1. C. J. Venkatramani and J. B. Phillips, "Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography Applied to the Analysis of Complex Mixtures", J. Microcolumn Sep. 5, 511-519 (1993).
2. C. J. Venkatramani and Y. Zelechonok, "An Automated Orthogonal Two-dimensional Liquid Chromatograph", Anal.Chem.75, 3484–3494 (2003).
3. C. J. Venkatramani and A. Patel, "Towards a Comprehensive 2-D-LC-MS Separation", J. Sep. Sci.29, 510-518 (2006).
4. C. J. Venkatramani and Y. Zelechonok, "Two-dimensional Liquid Chromatography with Mixed Mode Stationary Phases", J. Chromatogr. A 1066, 47-53 (2005).
5. C. J. Venkatramani et al., "Simultaneous, Sequential Quantitative Achiral-Chiral Analysis by Two-dimensional Liquid Chromatography", J. Sep. Sci.35, 1748-1754 (2012).

キラル医薬品物質のアキラル-キラルハートカット2D-LC分析

Agilent 1290 Infinity 2D-LC システムを使用したエナンチオマー化合物の同時定量による不純物分析

Sonja Krieger、Udo Huber

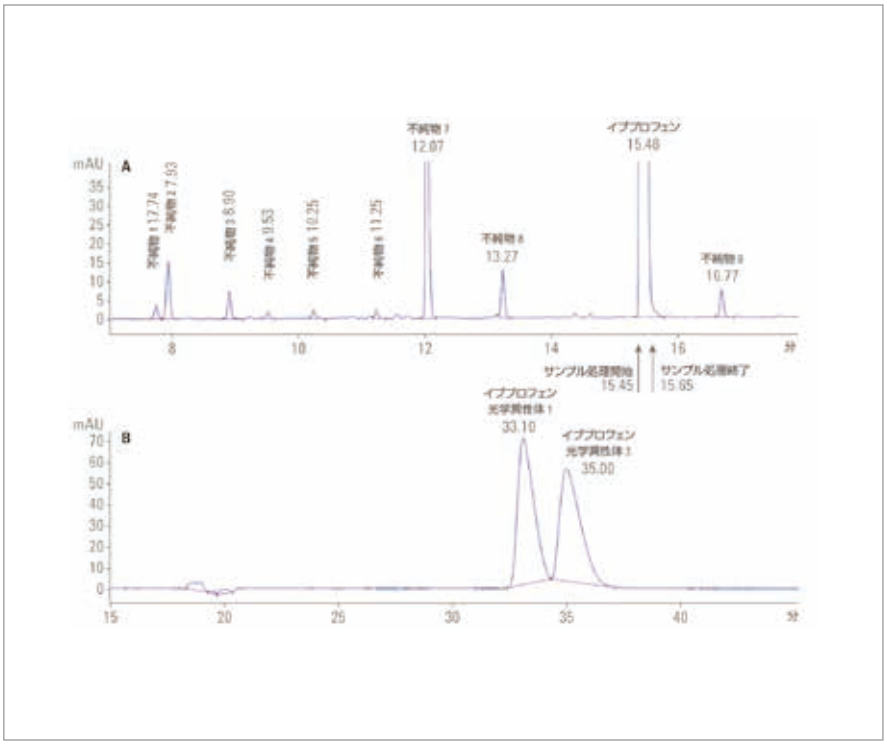


図 1. A. は、一次元目逆相カラムでイブプロフェンおよび不純物 1〜9 が分離された状態を示します。図 1.B. は、エナンチオマーを分離するために、イブプロフェンのピークをハートカットして二次元目キラルカラムに移した状態を示します。

はじめに

Q3A (R2) の ICH ガイドラインによると、新原薬内の不純物のレベルが 0.05 % 以上の場合は報告が必要であり、0.1 % 以上の場合は同定する必要があります。キラル医薬品のエナンチオマーは、薬物動態挙動および薬理活性に違いが見られる場合があります。あるエナンチオマーは薬理活性でも、別のエナンチオマーは不活性のことがあり、極端な場合は毒性を示すこともあります。このため、FDA は立体異性の新医薬品開発に関するガイドラインを発表しました。このガイドラインでは、キラル中心を持つ医薬品の立体異性の組成を明らかにし、最終製品の仕様では、立体異性の点から見た純度を保証することを要求しています。

結果と考察

医薬品物質に含まれる不純物の分析は、その物質の濃縮溶液を液体クロマトグラフィーで分析することで実施できます。医薬品物質から分離された不純物が、主要化合物に起因する大きなピークの横にある小さなピークとして検出されます。

API のエナンチオマー組成の同時定量によるキラル医薬品物質内の不純物分析をラセミ体イブプロフェンで行いました。図 1A は、イブプロフェンの一次元目逆相分析の結果を示すクロマトグラムです。この図では、複数の不純物が主要化合物から分離されているのがわかります。

一次元目カラムからの溶出は、15.45 分にループ充填時間 0.20 分でサンプリングされて、イブプロフェンのピークを二次元目キラルカラムに導入して、エナンチオマーを分離します。図 1 は、一次元目カラムの溶出がカットされて二次元目カラムに移され (A)、二次元目キラルカラムでイブプロフェンエナンチオマーが分離される様子を示しています (B)。イブプロフェンエナンチオマーは、二次元目キラルカラムにおいて Rs = 1.25 の分離度で分離されています。

結論

この記事は、Agilent 1290 Infinity 2D-LC システムが、キラル医薬品物質の不純物分析および API のエナンチオマー組成の同時定量に最適であることを示しています。一次元目では、逆相分離を使用して API からアキラル不純物を分離しました。エナンチオマー組成の定量において、API を二次元目キラルカラムに移すために、ハートカット手法を使用しました。

システムの詳細については、tas.txp.to/2DLC/chiral を参照してください。

2D-LC の新規ユーザー

二次元液体クロマトグラフィーの経験はまだ比較的浅い 2 人が、これまでの経験を活かして、将来この技術をいかに利用するかについて議論されています。

メタボロミクスマスタ

Bernd Kammerer 氏は、ドイツのフライブルク大学 Center for Biosystems Analysis (ZBSA) でメタボロミクス関連の施設長を務めています。その研究内容は、生物系内に幅広く存在する代謝物を同定して定量することです。Bernd 氏は、代謝物およびメタボローム分析 (特に MS および NMR メソッド) において幅広い科学的経験をお持ちで、クラスター分析およびメタボロミクスデータマイニングのバイオインフォマティクスメソッドを専門にされています。

メタボロミクス固有の分析ニーズとは何でしょうか?

代謝物濃縮は複雑でダイナミックレンジも広いため、定量および定性分析は非常に困難です。通常、ターゲット化合物は、質量の範囲が 100〜1000 Da の低分子です。これらの化合物は、細胞培養サンプル、尿、血液などの幅広い生物マトリックスの研究対象となります。精度の高い MS 分析が必要である一方で、非常に有効なクロマトグラフィーによる分離が不可欠です。

この 10 年間で 2D-LC に対する考え方はどのように変化しましたか?

10 年前、2D-LC は、一次元目および二次元目オフラインを連結することにより実施していました。この手法は高い分離能力を示していましたが、時間を要する手法でもありました。現在の 2D-LC システムでは、この点は完全に解決されています。現在では、時間のロスをなくしてエラーの原因を極力減らしたコンプリヘンシブ 2D-LC を実施することができます。

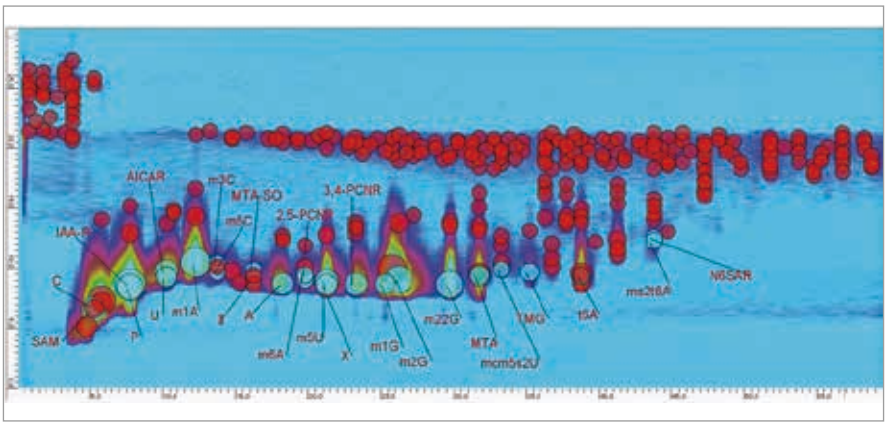


図 1. 2D-LC-QTOF MS による SPE 精製尿サンプル内の修飾ヌクレオチドの検出

最初に 2D-LC を検討したときの問題点は何でしたか?

我々の主要な研究プロジェクトは、人の乳癌を早期に発見するための代謝シグネチャの同定です。これを実施するために、極めて複雑な複数の生体サンプルを分析しています。ターゲットの物質は修飾ヌクレオシドとリボシル誘導体ですが、これらは化学構造の点ではほとんど差がなく、LC では保持時間がほぼ同じになります。その結果として、クロマトグラフィーのレベルを上げる、つまり二次元分離を採用することにしました。

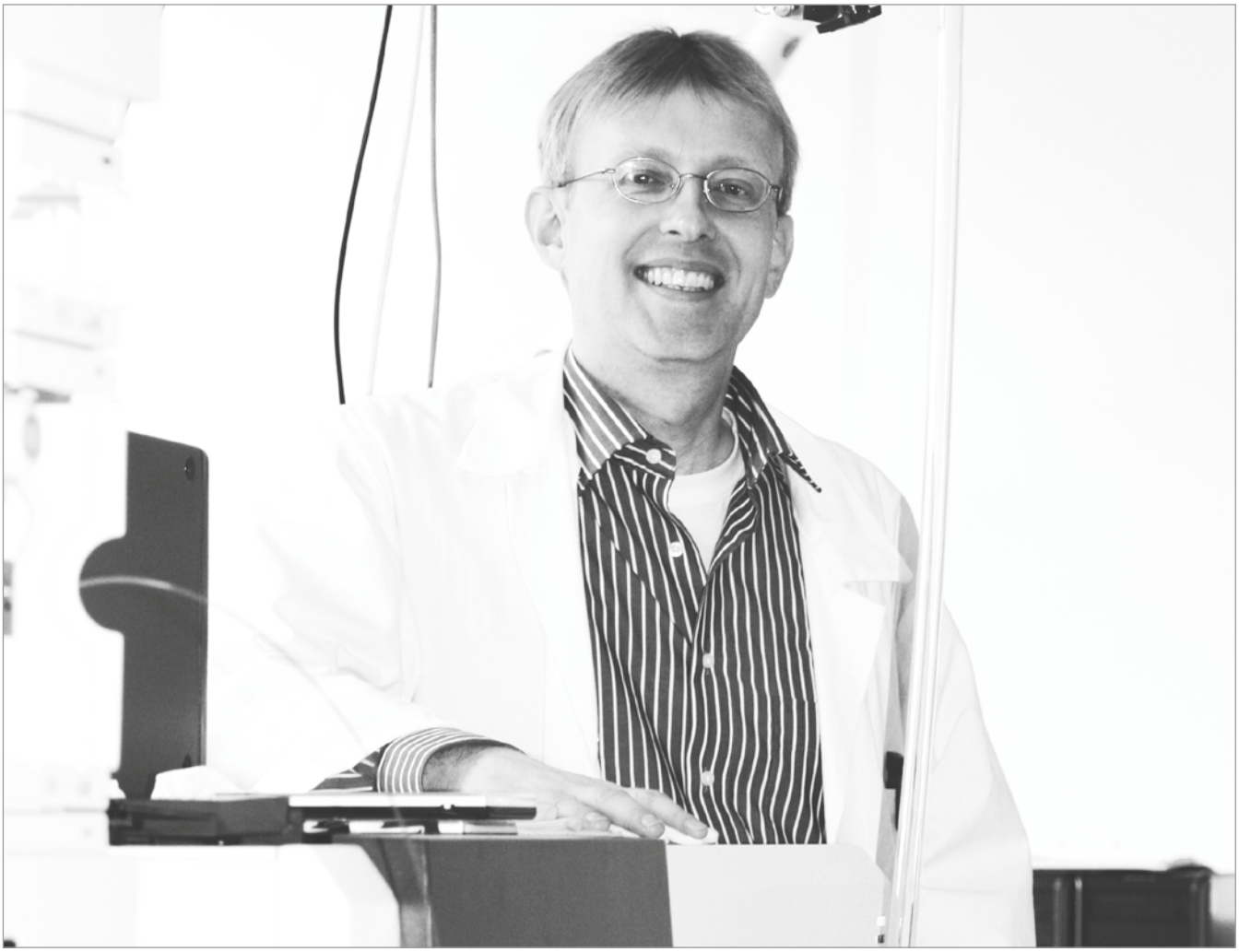
通常、メタボロミクスでは、数百もの化合物を含む複雑なマトリックスを取り扱うため、どうしても分離能力が必要になります。分離が不十分であると、高い反応性を持つラジカル陽イオンが形成される可能性があります。この場合、MS に入るまでにイオン源 (ESI や APCI) 内で相互作用が発生し、イオン化抑制やアーティファクトを引き起こしてしまいます。これまでにも 2 つの異なる生体状態は区別できていたため、重要になるのは、特にイオン化抑制に関連する、ターゲット化合物の (半) 定量分析の精度を向上させることです。分離能力を向上させると、以前は検出できなかった代謝物が定量可能になるという別のメリットも生じます。

2D-LC に何を期待していましたか?

2 つの点に期待していました。まず、実際に取り扱う構造的分類は特異な修飾ヌクレオチドであり、単一のカラムを使用するだけでは分離するのが困難な異性体とヌクレオチドを適切に区別する必要がありました。また、バックグラウンドノイズを制限するために、二次元目分離で複数のピークを精製する必要もありました。

これまでの作業体験をお聞かせください。

新しい技術の採用を開始したばかりで、現在はメソッドの最適化の最中です。メソッド開発の最初のステップは、適切な分離メカニズムを選択することです。カラム寸法、溶媒、および溶出のグラジエントはすべて、現在の分析精度を向上させる可能性があります。また、カラムの材



質の組み合わせを変えることにより、直交性、リテンション、およびピークキャパシティの点で顕著な違いが生じることも考えられます。今回の 2D-LC は、ダイオードアレイ検出器とともにスタンドアロンのシステムとして使用することができますが、複数の質量分析計と組み合わせて使用することもできます。この高度な機能性と柔軟性は、複雑な生化学的経路の研究において重要になります。

現在、膨大な実サンプルへのコンプリヘンシブ測定結果に期待しています。最初の測定結果は非常に期待が持てるものです (図 1 を参照)。

メタボロミクスにおいて、さらに 2D-LC が採用されることへの期待はありますか?

もちろん、あります。汎用的に適用できるという点において、コンプリヘンシブ 2D-LC の重要性はますます増大しています。また、2D-LC は、複数のイオン源と MS 溶液を組み合わせるという点において、分析化学アプリケーションや、特に、複雑なマトリックスと複雑な成分スペクトルに対処する必要がある研究では欠かせないものになるでしょう。

将来 2D-LC をどのようにお使いになりますか?

今回の 2D-LC システムを複数の質量分析計と組み合わせて、幅広いサンプルとクロマトグラフィーの課題に対処していくことを計画しています。当面の課題に対して、クロマトグラフィーメソッドを最適化することが重要になるのは明らかです。特に、修飾ヌクレオチドで頻繁に発生する構造異性体の分離において、2D-LC が新たな展望を開いてくれることでしょう。

不純物分析科学者

Ole Gron 氏は、分光分析による分離科学の道に進んだ後、10 年以上にわたって医薬品業界の仕事に従事していました。Ole 氏は現在、Vertex 社の分析開発部門サンディエゴ研究開発サイトに所属し、創薬の最初の生成段階から臨床試験に至るまでをサポートする職務に従事しています。

2D-LC の使用期間はどれくらいですか?

これまで 2 年間にわたり、Vertex 社で 2D-LC を大規模に導入するべきかどうかを判断するために、その技術について評価してきました。

2D-LC に関して特別な課題はありますか?

正直に申し上げると、最初 2D-LC について知ったとき、斬新であるとは感じましたが、私の環境では実際的な必要性が認められませんでした。結局、他の分野で見られる過剰なまでのクロマトグラムに悩まされることはありませんでしたから。ただし、実際の商品化によって少し真剣に検討を始めました。十分に堅牢なシステムを構築しなくても、その技術を試すことができたからです。我々の主要な目的は、不純物分析にあります。私たちのクロマトグラムは過剰ではないものの、共溶出する構造が関連した不純物分離が目的です。2 つの独立した直交型の LC メソッドを実施することにより、信頼性を確認しています。実際、できるだけ多くの結果を最短時間で得る必要がありました。これら 2 つの 1D 処理を単一の 2D-LC メソッドに統合できないものかと考えました。

2D-LC の操作性の難易度はどうですか?

もちろん、習熟期間は存在します。また、慎重に設定する必要がある多数のパラメータも存在します。ただし、設定に慣れてくると、システムを稼働するのが比較的簡単になります。さらに重要なことは、常に同一の結果が得られるため、販売されているこのシステムを信用できるようになったことです。堅牢性も重要な点です。

現在、2D-LC システムをどのように使用していますか?

これまでは、一次元目分離でマルチハートカットを使用して、それぞれの不純物ピークを処理してきました。現在では、二次元目で処理時間を長くする「ピークパーキング」という手法を使用して各不純物を捉えるようにシステムを設定しています。

将来、医薬品業界に 2D-LC は浸透していくでしょうか?

これから爆発的に浸透していくとは考えていません。医薬品業界はかなり保守的であるため、新技術を採用するまでには時間を要するのです。ただし、より優れた機能を経験してしまったら、もう後戻りできなくなるでしょう。これまで多数の異なるアプリケーションで 2D-LC を評価してきました。この経験から判断すると、Vertex 社では来年か再来年のうちに導入数が増加することが予想されます。

まだ 2D-LC に関する経験が浅い方は、この 2 人から学んでみましょう。Koen Sandra 氏と Dwight Stoll 氏によるオンデマンドウェビナーが、次のサイトで公開されています。tas.txp.to/1114/2DLCwebinar

バイオ医薬品のマルチハートカットとコンプリヘンシブ2D-LC分析

Agilent 1290 Infinity 2D-LC システムを使用した高分解能の複合型 N グリカンのオンライン 2D-LC 分析

Sonja Schneider、Edgar Naegele、Jens Trafkowski、Sonja Krieger

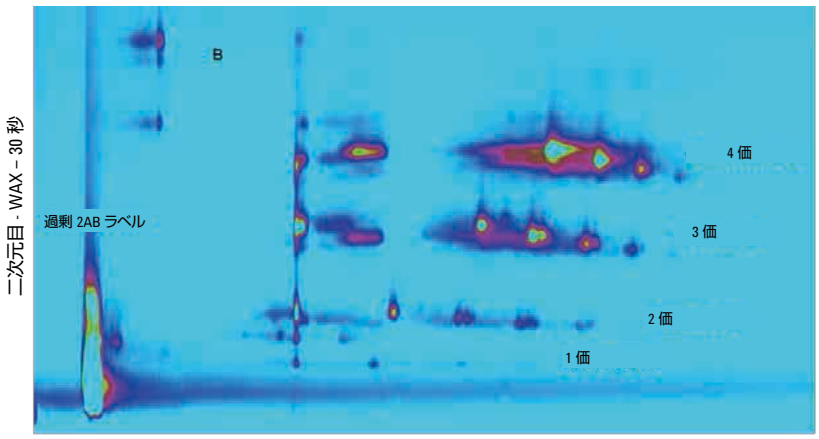


図 1. フェチュイン (A) および EPO (B) のコンプリヘンシブ HILIC/WAX 2D-LC 分離 (直交性が高い分離を示す)。二次元目のイオン交換クロマトグラフィーでは、グリカンの電荷像が明確に示されています。

はじめに

エリトロポエチンタンパク質 (EPO) は、30400 ダルトン (Da) の糖タンパク質ホルモンで、赤血球の生成を調整する作用があります (赤血球生成)。EPO のグリコシル化には、複数のグリコシル化部位が含まれており、各部位がさまざまなグリカン構造を持つことができるため、非常に可変的です。この結果、グリカン構造は、微小不均一性と呼ばれる大規模な複雑性を引き起こします。遺伝子組み換えヒト EPO (rhEPO) は、癌と関連する貧血症、慢性腎不全、HIV 感染症などのさまざまな疾患の治療において、非常に効果的であることが証明されています。生物製剤のグリカンプロファイルの詳細な特性解析は、1 つの規制項目です。これは、グリコシル化の違いにより、人体内の薬力学と薬物動態の両方の挙動に影響を与える可能性があるためです。その結果、効率的で詳細なグリコシル化分析において、高度な分析技術を開発することが必要になります。

結果と考察

通常、放出されたグリカンの標準的な HPLC 分析に使用するメソッドは、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) です。このメソッドは、高感度の蛍光検出用 2 アミノベンズアミド (2AB) による標識化の後に実施します。HILIC は、流体力学半径に従って効率的にグリカンを分離する一方で、EPO などのサンプルに見られる、分岐グリカン構造の複雑な混合物を完全に分離するには不十分です。幸いなことに、弱/強アニオン交換クロマトグラフィー (WAX/SAX) では、グリカン内の酸性単糖類の数と配置に応じて、直交性が高い分離が実施されます。WAX/SAX と HILIC を組み合わせることにより、二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) におけるピークキャパシティを拡大する可能性が非常に高くなります。これは、この 2 つの分離技術が高い直交性を示すためです。

Agilent 1290 Infinity 2D-LC システムでは、コンプリヘンシブ分析および (マルチ) ハートカット分析の両方でオンライン 2D-LC ワークフローを使用することができます。コンプリヘンシブ 2D-LC 分析では、2 ポジション/4 ポートデュオバルブを介して接続された 2 つのサンプルループを使用して、一次元目のすべてのピークを取り込みます。二次元目で高分解能が必要な場合は、1290 Infinity のマルチハートカット 2D-LC システムを用いることで、より長いサイクルタイムと長いカラムを使用することが可能であり、より高い柔軟性を得ることができます。

2D 分離ではピークキャパシティと分解能が高くなり、さらに HILIC 次元による多数の共溶出ピークも WAX により適切に分離されます。二次元目分離は、電荷によってグリカンをグループ化します。中性グリカンは注入ピークと共に溶出し、間もなく一価グリカンが溶出されます。二次元目で、塩グラジエントを行うことで、二価、三価、四価、および少量の五価フェチュイングリカンに分離されます。EPO アイソフォームは、有効電荷に応じて分類されます (エポエチンアルファ、ベータなど)。この設定では、同時電荷プロファイリングを、適切に分離されたグリカンピークパターンと組み合わせることができます。コンプリヘンシブ 2D-LC クロマトグラムにおいて、両方の分離メカニズムが完全に直交している例を示します (図 1)。この手法では、サンプルすべての全体像をスクリーニングして取得できる可能性があります。この全体像は、フィンガープリンティング分析で使用できます。

高分解能を実現するために、新しいマルチハートカット 2D-LC 手法が開発されています。この設定では、コンプリヘンシブ 2D-LC セットアップの 2 つのサンプリングループの代わりに、6 つのサンプルループを装備した 6 ポジション/14 ポートバルブを 2 つ使用します。(図 2)。

マルチハートカット 2D-LC では、長サイクル時間または長カラムを使用することにより、二次元目でも高分解能を実現しています。このよう

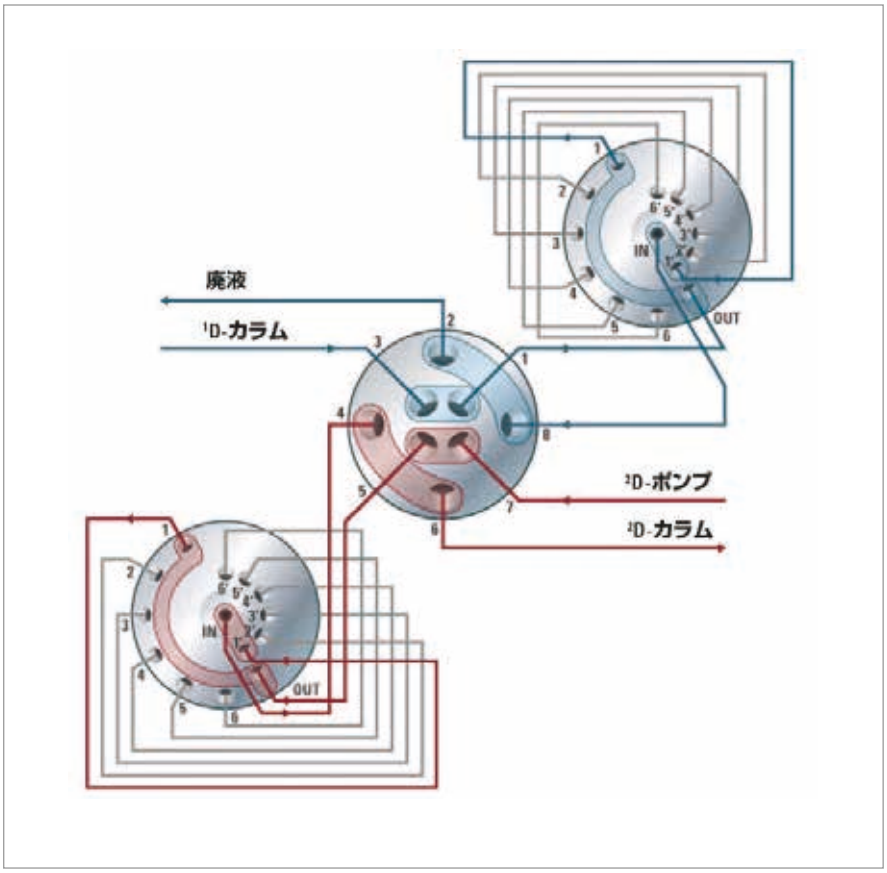


図 2.2 ポジション/4 ポートデュオバルブを、12 個の設置済み 40 µL ループを備えた 2 つの 6 ポジション/14 ポートバルブと組み合わせた配管図

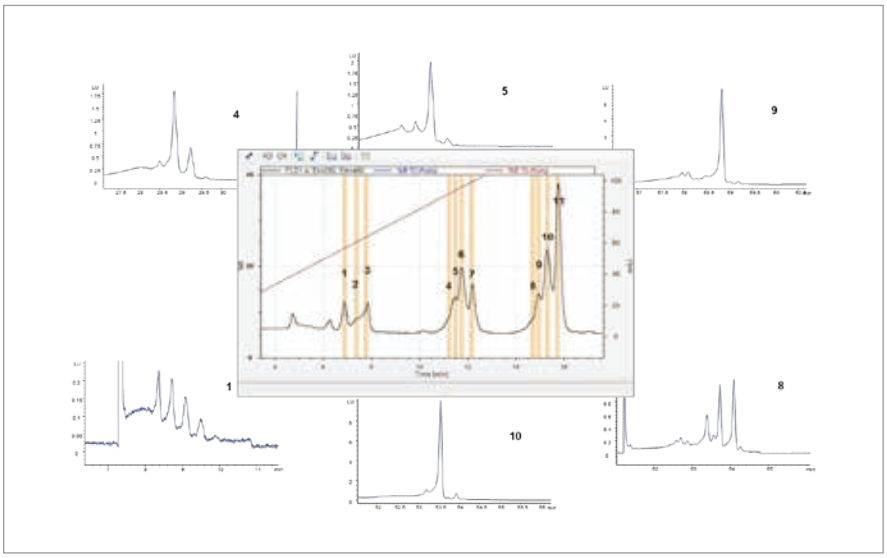


図 3. マルチハートカット設定で高い分解能を実現した 6 つの例。番号 8 でマーキングされた領域で、最大 8 個のピークを分離。

に柔軟性が向上したことにより、現在のアプリケーションの二次元目で HILIC を使用することができます。コンプリヘンシブ 2D-LC では分析時間を非常に短くしないとなりませんが、HILIC カラムは再平衡化時間を長くする必要があるため、使用が困難でした。グラジエント時間の 3.5 分は、再平衡化時間が 1.4 分で分析を行いました。グリカンは短 HILIC カラムに保持されており、適切な 2D 分解能が実現しています (図 3)。マルチハートカット設定内での HILIC 分離の分解能を 6 つの例で示します (ピーク番号 1、4、5、8、9、および 10)。大部分のピークでは、一次元目で 1 つの主要なピークが現れています。また、数個の基本ピークが検出されて分離されています。例えば、ピーク番号 8 の例では、二次元目で最低 8 個のピークが検出されています。

結論

コンプリヘンシブとマルチハートカット 2D-LC を組み合わせて単一の機器上で実施すると、糖タンパク質のコンプリヘンシブ分析の最適なツールになります。

システムの詳細については、
tas.txp.to/2DLC/glycan を参照してください。

2D-LC メイン ストリームの形成

二次元液体クロマトグラフィーは、決して新しい技術ではありません。ただし、2D-LC の他に類を見ない分離能力に利便性、信頼性、および再現性が追加されたのは比較的最近のことです。その結果はどうなったでしょう。現在、2D-LC は幅広いユーザーに受け入れられています。ここで、Michael Frank 氏と Jens Trafkowski 氏により、この技術に対するこれまでのアジレントの取り組み、および将来への見通しについて説明していただきましょう。

Michael Frank 氏は、液体相分離部門グローバルマーケティングシニアディレクターです。この部門は、分析システムとキャピラリー電気泳動も担当しています。Michael 氏は、10 年前にアジレントに入社する以前は、Graffinity Pharmaceuticals 社 (後に、Santhera 社に名称変更) の分析ディレクターでした。元々はハイデルベルク大学で無機化学を専攻し、化学の博士号を取得しています。

Jens Trafkowski 氏は、液体相分離部門のグローバルプロダクトマネージャで、2012 年に Agilent 1290 Infinity 2D-LC システムの責任者を引き継がれました。Jens 氏は、2011 年にアジレントに入社する以前は、6 年間アプリケーションスペシャリストとして経験を重ね、LC-MS システムのトレーニングとテクニカルサポートを担当してこられました。元々は、ボンの法医学研究所で法医学および毒物学を専攻し、LC-MS/MS アプリケーションに関する研究で博士号を取得しています。

Michael、アジレントの LC 戦略について簡単に説明していただけますか?

Michael Frank: アジレント･テクノロジーは、幅広い分析 LC システムを提供することにより、ルーチンシステムから最先端分野の研究者が使用する高性能なシステムに至るまで、さまざまなお客様のニーズに応えています。

我々の上位ポートフォリオから、可能な限り高性能の製品を提供するという明確な意図が理解していただけると思います。主な取り組み項目は、「効率」です。これは、次の 3 つの分野に分類できます。

1 つ目は、分析効率です。お客様が分析上の複雑な問題を解決するために、最適なデータを提供します。

2 つ目は、機器効率です。オペレータが簡単に対話できるシステムを提供します。例えば、即座に新規メソッドを作成するシステムなどが挙げられます。

3 つ目は、ラボ効率です。下位互換性を維持することにより、既存のラボ環境に簡単に統合できる必要があります。これにより、操作全体のコストが削減されるなどのメリットが生じます。

先に述べたように、我々の戦略で一貫して重要なことは、下位互換性の維持です。つまり、最新のシステムはすべて、以前のシステムと整合性を保つことが何より重要なのです。研究開発部門が最も時間を費やしているのがこの点です。

では、2D-LC はどこに向かうのでしょうか?

MF: 我々の考えでは、二次元 LC は、最高のピークキャパシティと分離能を実現しているため、複雑なサンプルに適しています。分離能およびピークキャパシティを向上させる方法は多数存在します。まずは、粒子径を小さくすることです。この考え方により、UHPLC が誕生し、我々もその分野へと移行しました。ただし、粒子径が小さくなると、システムの背圧が増加し、ピークキャパシティの実際のゲイン (上げられる圧の割合) は小さくなってしまいます。2D-LC では、ゲインはパーセントポイントでは測定せず、2 または 3 の係数で測定します。

2D-LC を自社製の実験用技術としての位置付けから発展させるために相当な調査をしました。このときに注目したのは、LC に関する基本的な知識さえあれば操作できる、堅牢な汎用システムです。そこで、2012 年に 2D-LC を 1 つの技術として確立し、我々のシステムが生産性の高い環境で使用される機会を得ました。例えば、大手医薬品メーカーのラボにおけるメソッド開発です。この時点で、当初の特殊分野を対象とした技術的関心という点からは遠く離れていました。

すでに多数の企業が、2D-LC を使用した科学論文を発表しました (そのうちのいくつかは、この付録を通し参考文献として紹介しています)。これは、2D-LC が、有効な技術としてメインストリームの市場に受け入れられているという素晴らしい兆候でした。また、我々が目指している目標でもありました。

Jens Trafkowski: 2D-LC は、お客様が複雑な問題をより簡単に解決する選択肢を増やしたことで、既存のポートフォリオを拡張できたという点で、我々の戦略に完璧に適合しています。この技術を完全に商品化することにより、他に類を見ない使いやすさを提供し、ミスが発生するリスクを低減することができます。また、並行して多彩な分析を実施し、いくつかのメソッドやプロトコルも作成しました。これにより、ユーザーは、余計な設定をしなくてもすぐに結果を得ることができます。それと同時に、我々が作成した 2D-LC 入門書を参照して、技術の背後にある理論について理解することもできます。これは、新しい技術を導入する際の最適な手法であると考えています。技術を習得してしまえば、既存の分析ツールボックスに対しても、他に類を見ない柔

軟性の高い技術を追加することができます。

共同開発の重要性については
どうお考えでしょうか?

MF: 開発の初期の段階から、学界と産業界の両方において、複数の 2D-LC 指導者と密接に協力していくことは非常に有意義な経験でした。この指導者達は、我々のシステムを綿密に調査して、適切な助言をしてくれました。この助言を基にして、さらに利便性を高め、パフォーマンスを向上させることができました。
現在の協力対象は、元々の指導者やエキスパートから、多次元に関する経験がまだ浅いラボへと移っています。これも我々メーカーにとっては、非常によい兆候です。2012 年から、いくつかの改良を重ねてきました。例えば、最近商品化したマルチハートカット 2D-LC (17 ページの図 2 を参照) は、ユーザーにとって完結したキットであり、特に、医薬品業界では非常に有効な製品です。

2D-LC のニーズがあまり高くない場合について
どうお考えですか?

MF: よい質問ですね。ユーザーが主に 1D LC を使用して、2D-LC を必要とする頻度が低い場合、1D と 2D を簡単に切り替えられる構成であれば、機器の使用方法を最適化することができます。つまり、2D-LC システムが部屋の隅で埃をかぶったままになることもなくなります。このような柔軟性を提供することは、ラボ効率という点で我々の考え方を非常によく表しています。

「2D-LC 入門書」(背表紙裏側を参照) を既に
出版されていると思いますが、教育という観点
から、お客様にどようなものを提供していく
予定ですか。

MF: これまで、2D-LC に関する再教育という点に注力し、技術セミナーのカンファレンスでも非常に活発に活動してきました。しかし、アプリケーションノートのライブラリは急速に拡大しています。これらの資料は、2D-LC の動作原理や対象領域だけではなく、目的に応じていかに柔軟性のある技術を提供するかについて洞察力を与えてくれます。ハートカット、マルチハートカット、コンプリヘンシブというそれぞれの技術が、異なる方法で追加のピークキャパシティを使用して、独自のメリットを生み出しています。ほとんどの場合において、2D-LC の潜在ユーザー層が必要とするシステムはすでに開発済みです。
JT: ユーザーにはシステムから可能な限り高いパフォーマンスを引き出していただくことを願っています。そのために重要なことは、知識と教育です。アプリケーションスペシャリストとしての経験から、ユーザーは技術について少し詳しくなるとさらに自信を得て、結果がかなり改善されることがわかっています。これを実現することが、我々の永遠の使命です。

将来の 2D-LC 開発に期待できることは
何でしょうか?

MF: 将来の計画についてあまり詳細にはお話しできませんが (競合他社は是非聞きたいことでしょうけど)、はっきりと言えるのは、我々には確固たる目標があるということです。例えば、最も重大な目標の 1 つは、2D-LC メソッドの設定をさらに簡単にすることです。他の LC メソッドと同様、ユーザーが安心して 2D-LC に取り組んでいけるように、複雑な設定をすべて取り去るのが最終的な目標です。その点において、データ分析機能を拡張していくことも重要になります。
JT: 我々の技術開発がこれで終わりではないことは明らかです。検討中のアイデアや可能性は多数存在しており、そのうちのいくつかはお客様が提案されたものです。開発は常に進行中のプロセスで、またそうでないといけません。我々は技術リーダーとして、その地位を維持する必要があります。

最大の注目点はどこであるとお考えですか?

MF: 実際、二次元 LC は複雑なサンプルに適しています。市場規模の点から言うと、限度はないと考えています。例えば、加工食品内のアレルギー誘発物質を検出している企業があります。また、炭化水素処理業界で使い道を模索している企業もあります。生物製剤は、複雑なサンプルと切り離して考えることはできません。また、不純物分析やメソッド開発の観点から、低分子分析のアプリケーションも多数存在します。このように、対象となるアプリケーションの幅はかなり広くなっています。また、お客様の信頼度が増して、他の分野での成功事例を目の当たりにすることにより、この幅はますます広くなることが予想されます。
現時点では、2D-LC は初期導入段階の領域を越えて、最大の関心事が分離能力であるアプリケーションへと移行しています。2D-LC が、UHPLC の後継製品となることを期待しています。10 年前、UHPLC が使用されていたのは、圧倒的に企業や学術機関の研究開発部門でした。しかし現在は、一般的な使用機器として普及しています。
2D-LC の将来を判断する適切な指標になるのは、他の分析システムメーカーもこの分野に移行し始めているという事実です。我々が早期にこの技術を調査したのは正しい選択であったと確信しています。市場の先駆者として大きなメリットがあり、その立場を決して諦めるつもりはありません。
JT: 2D-LC は複数のアプリケーション分野において、何度となくその優位性を証明してきました。ユーザーもそのメリットを認識しているため、今後は新しいアプリケーション分野も加わることになるでしょう。そのすべてを予想することはできませんが、特定の分野に制限するつもりはありません。バイオ分析から食品に至るまで、またその間のすべての分野において、2D-LC は根付いていくことでしょう。

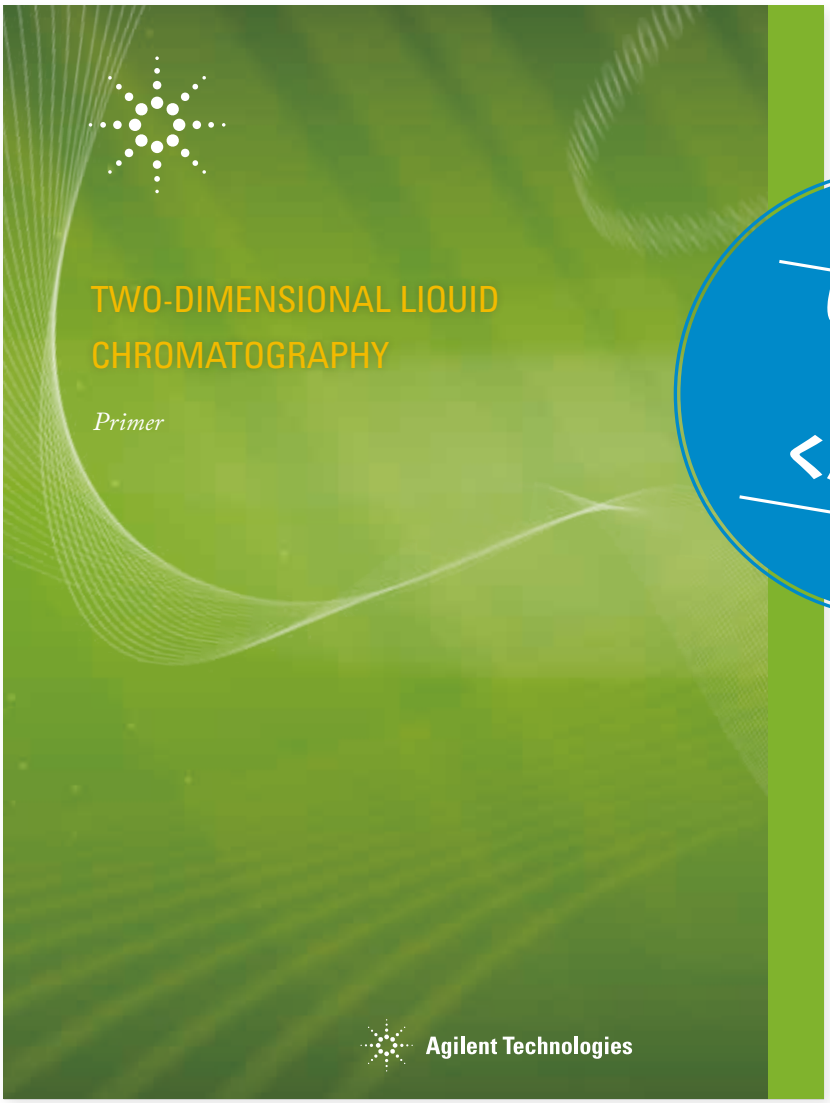
最後に何か力強いお言葉をお願いします。

JT: クロマトグラフでは 1 つのピークも見逃すことはできないため、信頼性および再現性のあるシステムが要求されます。このシステムこそ、まさに我々が提供するシステムにほかなりません。
MF: 2D-LC の存在を知って何らかの興味がある場合は、安心してお任せください。2D-LC は、かつてないほど高速に分析上の問題を解決できる他に類を見ないツールです。必要なのは、1D-LC から 2D-LC への移行という、ほんの小さなステップだけです。

2D-LC 入門書を差し上げます

二次元液体クロマトグラフィー

米国ミネソタ州ミネアポリス、ミネソタ大学所属、Peter W. Carr 博士
米国ミネソタ州セントピーター、グスタフアドルフス大学所属、Dwight Stoll 博士



いますぐ
ご予約
ください。

2015 年春公開
agilent.com/chem/jp から
オンラインでご予約いただけます。
(英文のみ)

Agilent Technologies

二次元液体
クロマトグラフィーの
概要

Agilent Technologies

the
Analytical Scientist

agilent.com/chem/infinity-2DLC

5991-5363JAJP、Printed November 19, 2014

アジレント・テクノロジー株式会社

カストマコンタクトセンタ　0120-477-111