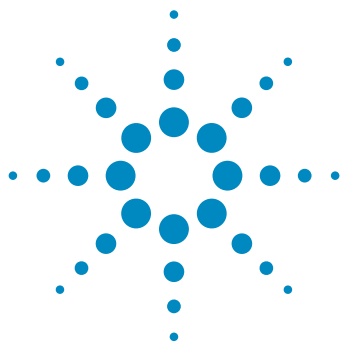




コンプリヘンシブ 2D-LC のメソッド開発

カラムおよび溶媒のスクリーニングによる
直交性の最も高い RPLC × RPLC 分離法の探索

技術概要

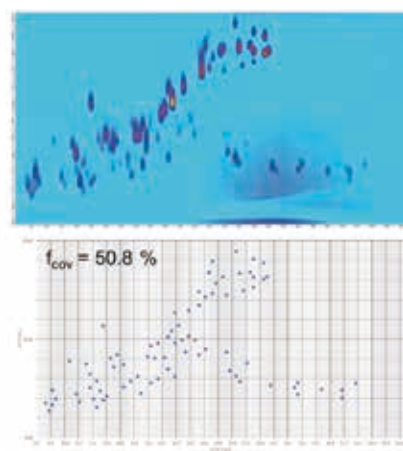
著者

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

コンプリヘンシブ 2D-LC は、1D-LC よりも分離能力が高いことから、複雑なサンプルの分析において大きな可能性が見込まれています。一般には、2 つの逆相分離法 (RPLC×RPLC) を組み合わせた形で使用されていますが、1D-LC では得られない高い分離能力を最大限に活かすためには、一次元目と二次元目で互いに直交する分離法を使用することが重要になります。

この技術概要では、複雑なサンプルを分析するための、両次元に逆相 LC を用いたコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドの開発アプローチについて説明します。開発するコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドでは、最大限の分離能力を引き出すために、二次元分離空間のフラクショナルカバーエージを最大限に高めることを目指します。



Agilent Technologies

はじめに

複雑なサンプルに含まれる多数の化合物をクロマトグラフィーによって分離するには、優れた分離能力、すなわち高いピークキャパシティを実現するクロマトグラフィーメソッドが必要です。ピークキャパシティとは、一定の分離時間内に特定の分離能で分離できるピークの最大数です。ピークキャパシティの理論的概念は、クロマトグラフィー分離法の分離能力を特徴付ける指標として使用されています¹。コンプリヘンシブ 2D-LC または LC×LC は、一次元液体クロマトグラフィー (1D-LC) よりも分離能力が高いことから、複雑なサンプルの分析において大きな可能性が見込まれています²。以前の技術概要では、Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションにより、同じ分析時間で実質的なピークキャパシティを一次元 HPLC または UHPLC メソッドの 3 ~ 4 倍に向上できることが示されています³。

コンプリヘンシブ 2D-LC の分離能力が 1D-LC より高いことは、ピークキャパシティの積の法則で説明できます⁴。理論的には、コンプリヘンシブ 2D-LC 分析のピークキャパシティ (n_{2D}) は、一次元目のピークキャパシティ (1n) と二次元目のピークキャパシティ (2n) の積になります (方程式 1)。

$$n_{2D} = ^1n \times ^2n$$

方程式 1

ただし、この式は、一次元目の分離と二次元目の分離が相互に完全に独立し (直交し)、かつ一次元目の分離が維持された状態で二次元目へと送られる場合にのみ成り立ちます。実際のコンプリヘンシブ 2D-LC 分析のピークキャパシティは、次の式で計算することができます (方程式 2)^{1, 2}。

$$n_{2D} = \frac{^1n \times ^2n}{\beta} \times f$$

方程式 2

方程式 2 の係数 β は、一次元目から二次元目への移送時にサンプルループ内で生じる、一次元目で分離された化合物の部分的な再混合 (アンダーサンプリング) を考慮するためのものです。一次元目の特定の分離に対し、モジュレーション時間が短いほど一次元目から二次元目へと送られるフラクション量が少なく、アンダーサンプリングの影響は小さくなります。

係数 f は、一次元目の分離と二次元目の分離間の不完全な直交性、すなわち二次元分離空間の限定的なカバー率を補正するためのものです。この補正係数 f の指標として、原理上ピークで対応できる二次元分離空間の割合 (フラクショナルカバーレッジ、 f_{cov}) を使用することができます²。

コンプリヘンシブ 2D-LC におけるピークキャパシティの概念の詳細については、*Agilent Technologies Primer 「Two-Dimensional Liquid Chromatography: Principles, Practical Implementation and Applications」*⁵をご覧ください。

コンプリヘンシブ 2D-LC 用のメソッドを開発するための最初のステップでは、一次元目と二次元目の分離モードを選択します。このとき、一次元目と二次元目で相互に直交する分離法を用いることが重要なのは、方程式 2 から明らかです。直交性の高い分離モードの組み合わせとして、例えばイオン交換クロマトグラフィー (IEX) と逆相 LC (RP)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と RP、順相 LC (NP) と RP などがあります⁵。2 つの RP 分離法の組み合わせでは、各分離メカニズムの間に相関性がありますが、コンプリヘンシブ 2D-LC では、この分離モードの組み合わせが最も広く使用されています^{2, 6}。これは、RP 分離法の持つ広い適用性と高い分析効率、質量分析 (MS) 検出との両立性、一次元目と二次元目の相性の良さ、および選択性の異なる固定相の豊富さによるものと考えられます^{2, 5}。

両方の次元に RP を用いたコンプリヘンシブ 2D-LC メソッド (RPLC×RPLC) を開発する場合は、選択性の異なるカラム対を選択する必要があります。RP カラムをその選択性によって分類するためのアプローチとして、疎水性減算モデル (HSM) があります。HSM では、RP カラムとさまざまな分析対象物との相互作用が、疎水性、立体障害性、酸性度、塩基性度、およびイオン交換容量にもとづいて表されます。この HSM をもとにカラムの選択性係数を計算し、2 つの RP カラムの選択性の違いを表す指標として使用することができます^{1, 2, 5 ~ 8}。これにより、コンプリヘンシブ 2D-LC メソッドにおいて、高いフラクショナルカバーレッジを実現する可能性の高い 2 つの RP カラムを選択できます⁵。ただし、リテンションと選択性が、カラムだけでなく、移動相 (有機溶媒の種類、pH) や温度にも左右されることを忘れてはなりません^{2, 6}。また、コンプリヘンシブ 2D-LC 分析で高いフラクショナルカバーレッジを達成できるかどうかは、分離システム (カラムと移動相) の特性とサンプルの特性の両方によって決まります。例えば、あるサンプルで高いフラクショナルカバーレッジを実現する 2 つの分離システムの組み合わせが、別のサンプルではフラクショナルカバーレッジが低くなることも十分にあり得ます^{2, 5}。

特定のサンプルに対する 2 つのカラムまたは分離システムの相対的な選択性は、例えば 2 つのカラムでのリテンションタイムの相関性から推定することができます^{1, 7}。

この技術概要では、複雑なサンプルを分析するための、両次元に RP LC を用いたコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドの開発アプローチについて説明します。

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションに溶媒バルブとカラム選択バルブを追加で搭載しました。このバルブにより、ハードウェアを交換しなくても、カラムおよび溶媒のスクリーニング分析を行えます。今回紹介するメソッド開発アプローチでは、まず、HSM にもとづく選択性の違いを考慮して、6 種類の RP 固定相を選択しました。その後、最初のステップで、選択した固定相と、複数の有機溶媒 (アセトニトリル、メタノール) および移動相 pH 値 (酸性、pH 5 および pH 8 に緩衝化) を用いて、カラムおよ

び溶媒の一次元目スクリーニングを実施しました。その結果をもとに、コンプリヘンシブ 2D-LC メソッドでの組み合わせに最適な分離システム (固定相と移動相) を選択するために、取り得るすべての組み合わせについて、選択した化合物の保持係数の相関性を計算しました。相関性が最も低かった組み合わせを、コンプリヘンシブ 2D-LC 設定で、二次元目にフルグラジエントを適用して評価しました。また、これにより得られた 2D-LC クロマトグラムからフラクショナルカバレッジを求めました。フラクショナルカバレッジが最も高かった組み合わせに対し、フラクショナルカバレッジをさらに高めるために、二次元目の分離に適用するシフトグラジエントを設計しました。

実験方法

使用機器

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションにより、カラムおよび溶媒の二次元スクリーニングを行いました。このシステムは次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (2 x G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ (G7167B)、冷却システム (オプション #100) を搭載
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (2 x G7116B)、8 カラム選択バルブ (G4239C) およびキャピラリキット (G4239C オプション #005) を搭載
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (2 x G7117B)、Max-Light カートリッジセル 10 mm (G4212-60008) を搭載
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (4 x G1170A)、溶媒選択バルブ (G4235A) を搭載
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 つの 80 μ L ループを装着した 2 ポジション/4 ポートデュオバルブ (2D-LC バルブヘッド、1,200 bar (p/n 5067-4214)) を搭載

ハードウェアを交換することなく一次元目および二次元目でカラムと溶媒をスクリーニングするために、一次元目と二次元目の Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプに 2 つの溶媒選択バルブを装着しました。これにより、溶媒選択バルブに搭載されているポンプを含め、各ポンプチャンネルで 13 種類の溶媒を切り替えられるようになりました。また、一次元目と二次元目で、8 カラム選択バルブを装着した Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタットを使用することにより、6 つのカラムと追加のバイパスおよび廃液ポジションを切り替えられるようになりました。

カラムおよび溶媒の一次元スクリーニングでは、Agilent Jet Stream デュアルエレクトロスプレーイオンソース (G1958-65268) を装着した Agilent 6530 Accurate-Mass Q-ToF LC/MS システムを使用し、質量分析 (MS) 検出を実施しました。Q-ToF LC/MS システムは、MS モードで動作させたため、ToF LC/MS システムも同様に使用可能です。カラムおよび溶媒の一次元スクリーニングでは、一次元目のダイオードアレイ検出器 (DAD) のアウトレットを MS に接続しました。

ソフトウェア

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition ソフトウェア (rev. C.01.07 [27]) と Agilent 1290 Infinity 2D-LC Acquisition ソフトウェア製品 (バージョン A.01.02 SP1)
- Agilent MassHunter ワークステーション ソフトウェア、Agilent 6200 シリーズ TOF および Agilent 6500 シリーズ Q-ToF 用の LC/MS データ取り込み (バージョン B.05.01)、定性分析 (バージョン B.06.00)
- GC Image LCxLC-HRMS Edition ソフトウェア (バージョン 2.5b0)、2D-LC データ分析用、GC Image 社製 (米国ネブラスカ州リンカーン)

カラム

一次元スクリーニングおよび 2D-LC の一次元目:

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、
2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μ m (p/n 959758-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8、
2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μ m (p/n 959758-906)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、
2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μ m (p/n 959758-912)
- Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP、
2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μ m (p/n 858768-901)
- Agilent ZORBAX RRHD SB-CN、
2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μ m (p/n 858700-905)
- Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH、
2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μ m (p/n 959764-918)

2D-LC の二次元目:

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、
3.0 $\times$ 50 mm、1.8 μ m (p/n 959757-302)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8、
3.0 $\times$ 50 mm、1.8 μ m (p/n 959757-306)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、
3.0 $\times$ 50 mm、1.8 μ m (p/n 959757-312)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH、3.0 $\times$ 50 mm、
1.8 μ m (p/n 959757-318)
- Agilent ZORBAX RRHD SB-CN、3.0 $\times$ 50 mm、
1.8 μ m (p/n 857700-305)
- Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP、
3.0 $\times$ 50 mm、1.8 μ m (カスタム)

試薬

溶媒はすべて LC グレードのものを使用しました。アセトニトリルおよびメタノールは、Merck 社 (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (EMD Millipore 社、マサチューセッツ州ビレリカ、米国) を装着した Milli-Q Integral システムで生成しました。酢酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、ギ酸、酢酸、およびアンモニア溶液は、Sigma-Aldrich 社 (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。

サンプル

今回の調査を通して使用したサンプルは、多環芳香族炭化水素、フタル酸エステル、フェノン、および農薬からなる 4 種類の混合液とウラシル (ボイドマーカー) の混合液で、70 種類の化合物が含まれています。

多環芳香族炭化水素 (PAH)、mix 25、US EPA 16 (YA20950025AB、Dr. Ehrenstorfer 社、アウクスブルグ、ドイツ)、次の化合物 16 種の 2,000 µg/mL アセトン/ベンゼン溶液:

アセナフテン
アセナフチレン
アントラセン
ベンゾ[a]アントラセン
ベンゾ[a]ピレン
ベンゾ[b]フルオランテン
ベンゾ[k]フルオランテン
ベンゾ[ghi]ペリレン
クリセン
ジベンゾ[a,h]アントラセン
フルオランテン
フルオレン
インデノ[1,2,3-cd]ピレン
ナフタレン
フェナントレン
ピレン

フタル酸エステル、analytes mix 3

(YA08060300HE、Dr. Ehrenstorfer 社、アウクスブルグ、ドイツ)、次の化合物 17 種の 1,000 µg/mL ヘキササン溶液:

安息香酸ベンジル
フタル酸ビス(2-*n*-ブトキシエチル)
フタル酸ビス(2-エトキシエチル)
フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)
フタル酸ビス(2-メトキシエチル)
フタル酸ビス(4-メチル-2-ペンチル)
フタル酸ブチルベンジル
フタル酸ジアミル
フタル酸ジ-*n*-ブチル
フタル酸ジシクロヘキシル
フタル酸ジエチル
フタル酸ジヘキシル
フタル酸ジイソブチル
フタル酸ジメチル
フタル酸ジノニル
フタル酸ジ-*n*-オクチル
フタル酸ヘキシル-2-エチルヘキシル

フェノン、RRLC 確認用サンプル

(Agilent Technologies、ヴァルトブロン、ドイツ)、次の化合物 9 種の 100 µg/mL アセトニトリル水溶液:

アセトアニリド
アセトフェノン
ベンゾフェノン
ブチロフェノン
ヘプタノフェノン
ヘキサノフェノン
オクタノフェノン
プロピオフェノン
バレロフェノン

農薬、mix 34 (L18000034AL、Dr. Ehrenstorfer 社、アウクスブルグ、ドイツ)、次の化合物 27 種の 10 µg/mL アセトニトリル溶液:

アトラジン
アトラジン-デスエチル
アトラジン-デスエチルデスイソプロピル
クロロクスロン
クロルプロファム
クロルトロン
クリミジン
シアナジン
ジウロン
フェヌロン
イソプロツロン
リニユロン
メタミロン
メタザクロル
メタベンズチアズロン
メトプロムロン
メトラクロール
メトキスロン
メトリブジン
モノリヌロン
プロメトリン
プロバジン
プロファム
セブチラジン
シマジン
テルブチラジン
テルブトリン

ウラシル (Sigma-Aldrich 社、シュタインハイム、ドイツ)、1,000 µg/mL 水溶液

サンプルは、5 µL の PAH 混合液、10 µL のフタル酸エステル混合液、100 µL のフェノン混合液、1,000 µL の農薬混合液、および 10 µL のウラシル溶液を混合して調製しました。サンプルには、各化合物が約 9 µg/mL 含まれています。MS 検出を用いたカラムおよび溶媒の一次元スクリーニングでは、サンプルをアセトニトリルで 1:10 に希釈しました。

メソッド

カラムおよび溶媒の一次元スクリーニング	
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP Agilent ZORBAX RRHD SB-CN Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH (それぞれ 2.1 × 100 mm, 1.8 μm)
溶媒	A) H ₂ O + 0.1 % 酢酸、B) アセトニトリル + 0.1 % 酢酸 A) H ₂ O + 0.1 % 酢酸、B) メタノール + 0.1 % 酢酸 A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5、B) アセトニトリル A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5、B) メタノール A) 10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 8、B) アセトニトリル A) 10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 8、B) メタノール
グラジエント	0 分 – B 20 % 10 分 – B 95 %
ストップタイム	15 分
ポストタイム	5 分
流量	0.500 mL/min
温度	40 °C
注入量	1 μL、2 μL ウォータプラグにより注入
DAD 検出	220 nm/4 nm、リファレンス 400/100 nm および 254/4 nm、リファレンス 400/100 nm、 データレート 40 Hz
MS 検出	Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムをポジティブイオン化モード、取り込み レート 5 スペクトル/秒、および次の Agilent Jet Stream ESI ソース条件: ガス温度 300 °C ガス流量 8 L/min ネブライザ 50 psi シースガス温度 300 °C シースガス流量 9 L/min キャピラリ 3,000 V ノズル 500 V

二次元スクリーニング	
一次元目	
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH (それぞれ 2.1 × 100 mm、1.8 μm)
溶媒	A) H ₂ O + 0.1 % ギ酸、B) メタノール + 0.1 % ギ酸 A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5、B) アセトニトリル A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5、B) メタノール
グラジエント	0 分 – 0.100 mL/min で B 20 % 50 分 – 0.100 mL/min で B 100 % 60 分 – 0.100 mL/min で B 100 % 61 分 – 0.400 mL/min で B 20 %
ストップタイム	70 分
温度	40 °C
注入量	5 μL (水 5 μLを吸引後、試料を吸引し注入)
DAD 検出	220 nm/4 nm、リファレンス 400/100 nm および 254/4 nm、リファレンス 400/100 nm、 データレート 20 Hz、ストップタイム 60 分
二次元目	
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH (それぞれ 3.0 × 50 mm、1.8 μm)
溶媒	A) H ₂ O + 0.1 % ギ酸、B) メタノール + 0.1 % ギ酸 A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5、B) アセトニトリル A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5、B) メタノール
流量	2.500 mL/min
グラジエント	0.00 分 – B 20 % 0.27 分 – B 100 %
² D グラジエント ストップタイム	0.40 分
モジュレーション時間	0.50 分
モジュレーション	80 μL ループ、モジュレーション時間 0.50 分 モジュレーションオン: 0~60 分
温度	60 °C
DAD 検出	220 nm/4 nm、リファレンス 400/100 nm および 254/4 nm、リファレンス 400/100 nm、 データレート 80 Hz、ストップタイム 60 分

最終的な 2D-LC メソッド	
一次元目	
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8、2.1 × 100 mm、1.8 μm
溶媒	A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5 B) アセトニトリル
グラジエント	0 分 – 0.100 mL/min で B 20 % 50 分 – 0.100 mL/min で B 100 % 60 分 – 0.100 mL/min で B 100 % 61 分 – 0.400 mL/min で B 20 %
ストップタイム	70 分
温度	40 °C
注入量	5 μL (水 5 μLを吸引後、試料を吸引し注入)
DAD 検出	220 nm/4 nm、リファレンス 400/100 nm および 254/4 nm、リファレンス 400/100 nm、データレート 20 Hz、ストップタイム 60 分
二次元目	
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH、3.0 × 50 mm、1.8 μm
溶媒	A) 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5 B) メタノール
流量	2.500 mL/min
グラジエント	0.00 分 – B 30 % 0.27 分 – B 35 %
¹⁰ グラジエントストップ タイム	0.40 分
モジュレーション時間	0.50 分
グラジエント	B 30 % (0.00 分) - B 100 % (60 分)
モジュレーション	B 35 % (0.27 分) - B 70 % (30 分) - B 100 % B (40 分)
モジュレーション	80 μL ループ、モジュレーション時間 0.50 分、モジュレーションオン: 0~60 分
温度	60 °C
DAD 検出	220 nm/4 nm、リファレンス 400/100 nm および 254/4 nm、リファレンス 400/100 nm、データレート 80 Hz、ストップタイム 60 分

結果と考察

コンプリヘンシブ 2D-LC 用のメソッド開発アプローチの要点を示すために、サンプルとして多環芳香族炭化水素、フタル酸エステル、フェノン、および農業からなる複雑な混合液を使用しました。調製したサンプルには、ボイドマーカーとして使用したウラシルを含め、70種類の化合物が含まれています。

最初のステップでは、分析対象サンプルに対する選択性が異なる RP 分離法を特定するために、カラムおよび溶媒の一次元スクリーニングを実施しました。この一次元スクリーニングに使用した 6 種類の RP 固定相は、HSM にもとづくクロマトグラフィー選択性の分類を考慮して選択しました。選択した RP 固定相は、Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8、Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP、Agilent ZORBAX RRHD SB-CN、および Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH です。600 種類以上の RP カラムの特性を Web ベースのデータベース (www.hplccolumns.org) で参照することができます。このデータベースでは、カラムの選択性を基準にカラムを比較できます。例えば、Bonus RP および Eclipse PAH の選択性が Eclipse Plus C18 または Eclipse Plus C8 カラムとは異なることが、このデータベースでわかります。移動相には、複数の有機溶媒 (アセトニトリルおよびメタノール) と複数の pH 値 (酸性、pH 5 および pH 8 に緩衝化) を使用しました。カラムおよび溶媒の一次元スクリーニングでは、化合物を複数のクロマトグラム間で追跡できるように、MS 検出を行いました。

図 1 に、Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル (A) および Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール (B) により得られたクロマトグラムを示します。

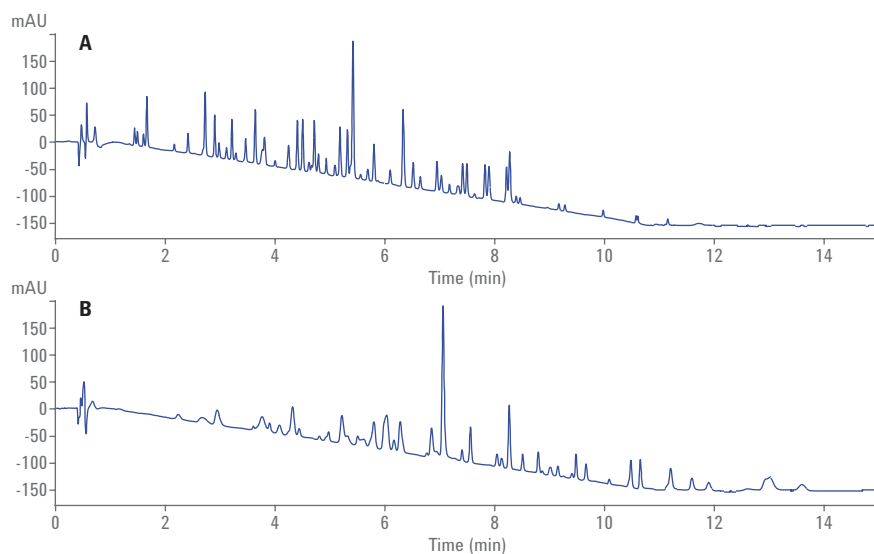


図 1. 濃度 9 µg/mL のサンプルのUV 検出 (220 nm) による一次元分析結果。(A) Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、(B) Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール。

サンプル化合物の同定と、クロマトグラム間でのピークの追跡を行うために、TOF-MS で精密質量を検出しました。予測したとおり、多環芳香族炭化水素およびフェノールは、選択した条件ではイオン化できませんでした。また、サンプル中の特定の化合物は異性体であるため (プロメトリンおよびテルブトリンなど)、TOF-MS 検出では区別することができませんでした。全体として、ほとんどのクロマトグラムで 30 種類の農薬とフタル酸エステルを確実に同定することができました。図 2 に、Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル (A) および Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール (B) を用いた一次元分析で同定した化合物のクロマトグラムを示します。

同定したサンプル化合物の化合物情報を MassHunter からエクスポートしました。これらの同定した化合物のリテンションタイムと、ウラシルのリテンションタイムから求めたボイド時間をもとに、カラムと溶媒のすべての組み合わせについて、同定した化合物の保持係数 (k) を Excel で計算しました。また、分析したサンプルに対して最も異なる選択性を示す 2 つの分離システム (カラムと溶媒の組み合わせ) の組み合わせを評価するために、取り得るす

べての分離システムの組み合わせについて、保持係数の相関性を計算しました。

概して、一方の分離システムでアセトニトリルを使用し、もう一方の分離システムでメタノールを使用する分離システムの組み合わせは、両方の分離システムで同じ有機溶媒を使用する分離システムよりも低い相関性を示すことがわかりました。両方の次元に RP を用いたコンプリヘンシブ 2D-LC において、一方の次元でアセトニトリルを使用し、もう一方でメタノールを使用するのが一般的なのはそのためです²。

分析したサンプルでは、移動相の pH 値が選択性に大きく影響することはありませんでした。ただし、酸性/塩基性度が広範囲にわたる化合物を含むサンプルの場合は、同様のカラムでも異なる pH 値で使用することで、選択性の違いを生み出すことができます²。

計算により求めた保持係数の相関性が最も低かったのは、次の分離システムの組み合わせです。また、比較のため、保持係数の相関性が高かった組み合わせも示します。

- Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノールおよび Eclipse Plus C8 と 10 mM の酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル ($R^2 = 0.957$)
- Eclipse PAH と 10 mM の酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリルおよび Bonus RP と H₂O + 0.1 % ギ酸/メタノール + 0.1 % ギ酸 ($R^2 = 0.957$)
- Eclipse PAH と 10 mM の酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリルおよび Eclipse Plus Phenyl-Hexyl と H₂O + 0.1 % ギ酸/メタノール + 0.1 % ギ酸 ($R^2 = 0.960$)
- Eclipse Plus C18 と 10 mM の酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリルおよび Eclipse Plus Phenyl-Hexyl と 10 mM の酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル ($R^2 = 0.998$)

分析対象サンプルに対する 2D クロマトグラムのフラクショナルカバレッジが最も高い組み合わせを特定するために、上記の分離システムの組み合わせを、二次元目で見ルグラジエントを用いたコンプリヘンシブ 2D-LC 設定で評価しました。

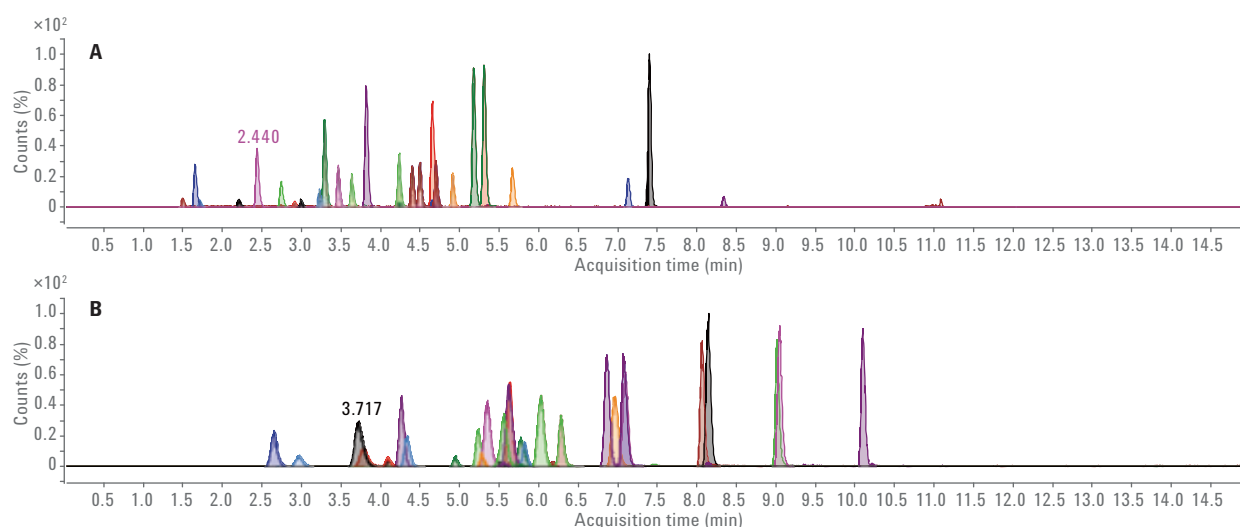


図 2. 濃度 0.9 µg/mL のサンプルの MS 検出による一次元分析結果。同定した化合物の EIC を示しています。
(A) Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、(B) Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール。

2D クロマトグラムのフラクショナルカバレッジの算出には、Gilar-Stoll 法を使用しました。Gilar 他は、両方の次元のピーク幅と同じサイズで 2D 分離空間を「ビン」に分割し、そこに正規化したリテンションデータをプロットすることにより、二次元系の直交性を幾何学的に表現しました。直交性は、このプロット上でピークが占有するビンのパーセンテージから求められます⁹。一方、Stoll によって提唱された Gilar 法の改良版では、ビンサイズをユーザーが選択でき、占有されたビンを含む境界線内には空のビンも含まれます。これは、分析した実際のサンプルには該当しなくても、使用した分離法により、占有されたビンを含む境界線内にある空のビンにも化合物を溶出可能であることを意味しています^{1, 10}。

コンプリヘンシブ 2D-LC 設定で評価した分離システムの組み合わせによるフラクショナルカバレッジを求めるために、二次元分離後に、検出されたピークのリテンションタイムをグリッド上にプロットしました。このグリッドのビンサイズは、5 σ での平均ピーク幅にもとづき、一次元目は 0.34 分、二次元目は 0.6 秒としました。このプロットで、ピークによって占有されたビンを含む境界線内にあるビンのカウントしました。次に、フラクショナルカバレー

ジを、有効分離枠内にあるビンに対する境界線内のビンのパーセンテージとして計算しました。有効分離枠は、一次元目については 6 分 (k = 2) からグラジエント終了まで、二次元目についてはグラジエント開始から 24 秒の終了までとしました。図 3 に、フラクショナルカバレッジを求めるために使用したクロマトグラムとリテンションタイムのプロットを示します。これは、一次元目で Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール、二次元目で Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリルを用いて、また一次元目と二次元目の分離システムを逆に用いて、コンプリヘンシブ 2D-LC 設定により得られたものです。比較のため、一次元目で Eclipse Plus C18 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、二次元目で Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリルを用いた場合のクロマトグラムとリテンションタイムのプロットも示します。また、表 1 に、コンプリヘンシブ 2D-LC 設定で評価したすべての分離システムの組み合わせについて求めたフラクショナルカバレッジをまとめます。

表 1 からわかるように、最高のフラクショナルカバレッジが得られたのは、ZORBAX Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノールおよび Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリルの組み合わせです。予測したとおり、求めたフラクショナルカバレッジは、カラムおよび溶媒の一次元スクリーニングをもとに計算した相関係数とある程度関連性があります。ただし、一次元スクリーニングの相関係数の計算では、サンプル中の特定の化合物 (農業およびフタル酸エステル) のみが考慮されていることに注意してください。

分離システムのさまざまな組み合わせの二次元評価では、二次元目で、B を 20 ~ 100 % の範囲で変化させるフルグラジエントを使用しました。これは、二次元目に注入されるすべてのフラクシオンに対し、B が 20 ~ 100 % の範囲で変化する同じグラジエントが適用されたということです。フルグラジエントでは、一次元目から二次元目への移送時に高いバンド幅抑制効果が得られ、二次元目のピーク幅が非常に狭くなります。その一方で、一般にフラクショナルカバレッジは低くなり、化合物の分布が対角線の周囲に集まる傾向にあります。これは、一次元目の RP カラムで保持力の弱い化合物は、二次元目の RP カラムでも弱い保

表 1. コンプリヘンシブ 2D-LC 設定で評価した分離システムの組み合わせにおける有効 2D 分離空間のフラクショナルカバレッジ

一次元目のカラムと移動相	二次元目のカラムと移動相	分画 カバレッジ (%)
Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	17.2
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール	18.4
Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	Agilent ZORBAX RRHD Bonus RP と H ₂ O + 0.1 % 酢酸/メタノール + 0.1 % 酢酸	13.0
Agilent ZORBAX RRHD Bonus RP と H ₂ O + 0.1 % 酢酸/メタノール + 0.1 % 酢酸	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	14.6
Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl と H ₂ O + 0.1 % 酢酸/メタノール + 0.1 % 酢酸	10.2
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl と H ₂ O + 0.1 % 酢酸/メタノール + 0.1 % 酢酸	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	14.9
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	9.6
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル	8.0

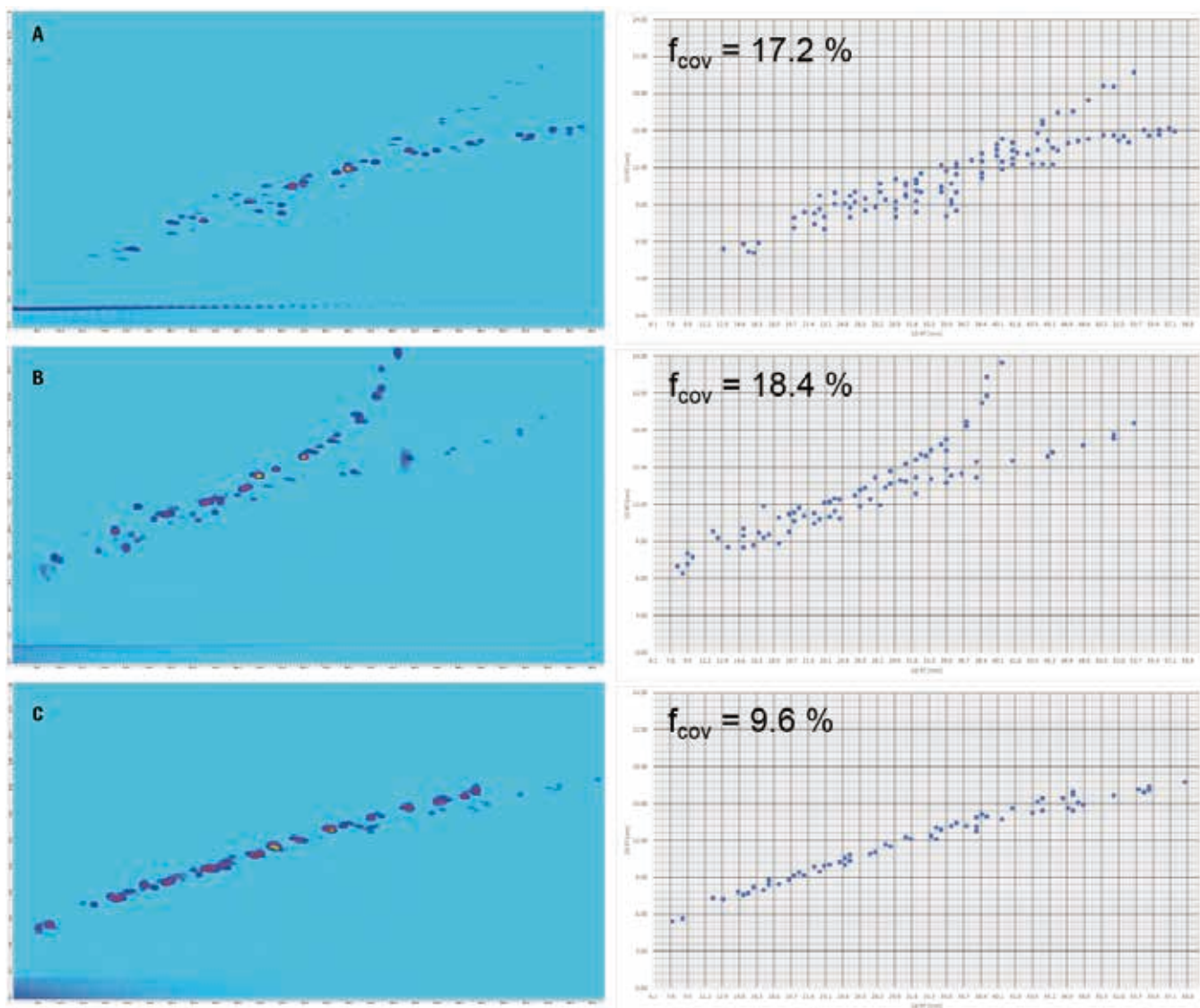


図 3. コンプリヘンシブ 2D-LC 設定で評価した分離システムの特定の組み合わせの UV 検出 (220 nm) による 2D-LC クロマトグラムとリテンションタイムのプロット。
 (A) 一次元目: Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール、二次元目: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル。
 (B) 一次元目: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、二次元目: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール。
 (C) 一次元目: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、二次元目: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl と 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル。

持力を示す傾向にあるためです。分離システムの特定の組み合わせに対し、二次元目でシフトグラジエントを適用することにより、フラクショナルカバレッジを高めることができます^{2, 11}。シフトグラジエントを使用すると、一次元目でのリテンションタイムの増加に伴って二次元目のグラジエントが連続的に変化し、二次元目のカラムに注入される各フラクションが、より浅く、わずかに異なるグラジエントを示すようになります。

一次元目で Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノール、二次元目で Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリルを用いた組み合わせのためのシフトグラジエントを開発することにより、フラクショナルカバレッジを高めることができました。ただし、一次元目の Eclipse PAH カラムから遅く溶出する多環芳香族炭化水素に

ついては、二次元目でのグラジエント開始時の有機溶媒のパーセンテージが高くなるためバンド幅抑制効果が低下し、二次元目のピーク幅が広くなりました (データの掲載なし)。一般に、二次元目で疎水性の高いカラムを使用すると、バンド幅抑制効果を高めることができます²。

一次元目で Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、二次元目で Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノールを用いた組み合わせに対し、フラクショナルカバレッジを高めるためのシフトグラジエントを開発しました。これを図 4 に示します。

図 5 は、最終的なコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドにより得られたクロマトグラムです。このメソッドでは、一次元目で Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、二次元目で Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノールを用い、二次元目でシフトグラジエントを適用しました。フラクショナルカバレッジを求める際は、一次元目のビンサイズが 0.41 分、二次元目のビンサイズが 2.5 秒 (5 σ での平均ピーク幅) のグリッドを使用しまし

た。二次元目のピーク幅が広がっているのは、シフトグラジエントの使用により、二次元目のカラムに注入される個々のフラクションに適用されるグラジエントが浅くなったためと考えられます。二次元目でシフトグラジエントを使用することにより、フラクショナルカバレッジは大幅に高まり、50 % を超えました。また、二次元目でフルグラジエントを用いた場合に部分的または完全に共溶出していたサンプル化合物を分離できました。

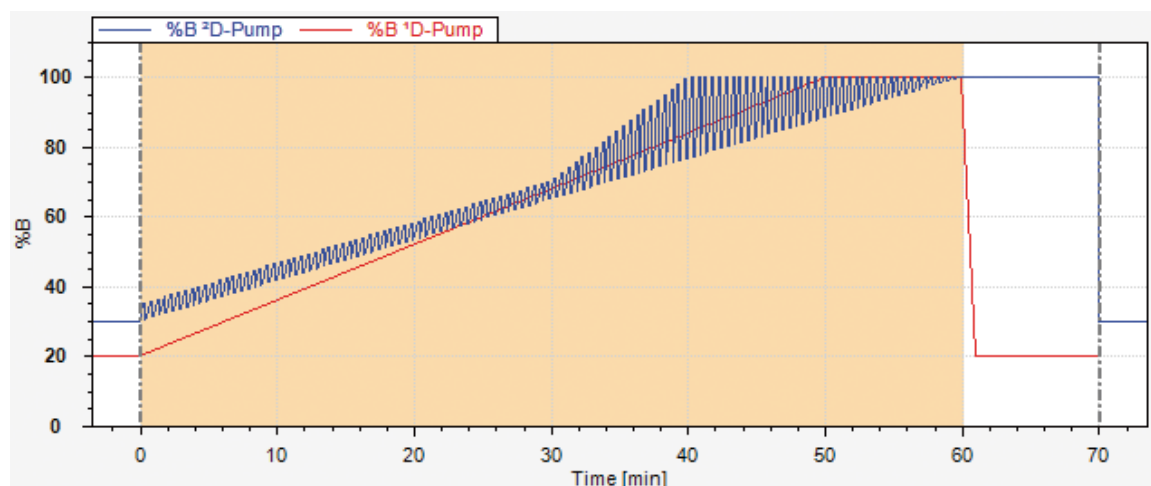


図 4. 一次元目で Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、二次元目で Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノールを用いたコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドの二次元目の分離用に開発したシフトグラジエント (最終的な 2D-LC メソッド)

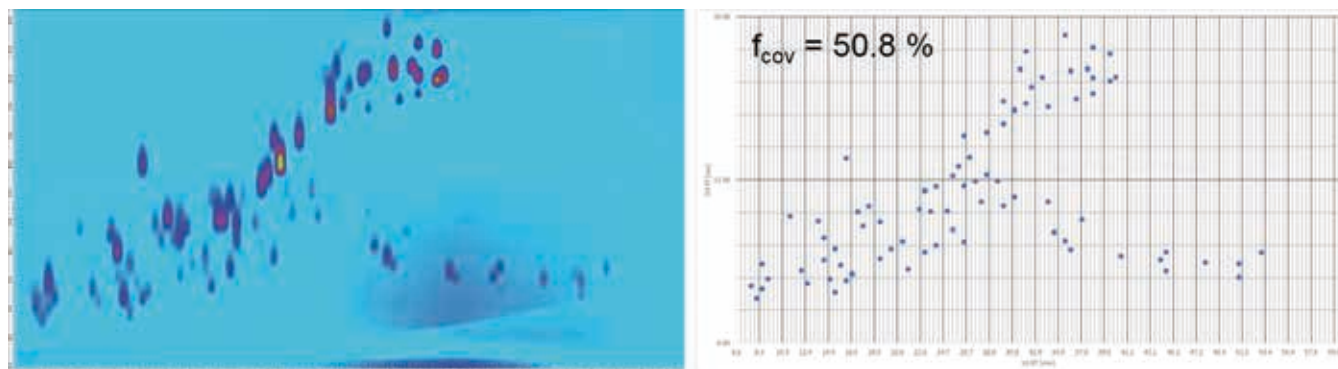


図 5. 一次元目で Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/アセトニトリル、二次元目で Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH カラムと 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5/メタノールを用い、二次元目でシフトグラジエントを適用したコンプリヘンシブ 2D-LC メソッドの UV 検出 (220 nm) による 2D-LC クロマトグラムとリテンションタイムのプロット (最終的な 2D-LC メソッド)

結論

コンプリヘンシブ 2D-LC は、1D-LC よりも分離能力が高いことから、複雑なサンプルの分析において大きな可能性が見込まれています。一般にコンプリヘンシブ 2D-LC では、分離モードとして 2 つの RP 分離法 (RPLC×RPLC) を組み合わせた形で使用されていますが、1D-LC では得られない高い分離能力を最大限に活かすためには、一次元目と二次元目で互いに直交する分離システム、すなわち選択性の異なる分離システムを使用することが重要になります。選択性の異なる RP カラムを選択するための 1 つの手段として、RP カラムをその選択性にもとづいて分類する HSM があります。カラムおよび溶媒の一次元目のスクリーニングでは、保持係数の相関性を基準に、特定のサンプルに対する 2 つの分離システムの相対的な選択性を評価することができます。また、求められた 2D-LC クロマトグラムのフラクショナルカバレッジを使用することで、コンプリヘンシブ 2D-LC 設定における分離システムのさまざまな組み合わせの直交性を比較できます。さらに、分離システムの特定の組み合わせに対し、二次元目でシフトグラジエントを適用することにより、フラクショナルカバレッジを大幅に高めることができます。

参考文献

1. Rutan, *et al.* Fractional coverage metrics based on ecological home range for calculation of the effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1255*, 267–276.
2. Li, *et al.* Practical considerations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems (LCxLC) with reversed-phases in both dimensions, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 153–167.
3. Vanhoenacker, *et al.* Increasing Peak Capacity with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-6123EN, **2015**.
4. Giddings. Two-dimensional separations: concept and promise, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1258A–1260A, 1262A, 1264A passim.
5. Carr, Stoll. Two-Dimensional Liquid Chromatography; Principles, Practical Implementation and Applications, *Agilent Technologies Primer*, publication number 5991-2359EN, **2015**.
6. Graesboll, *et al.* Using the hydrophobic subtraction model to choose orthogonal columns for online comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2014**, *1326*, 39–46.
7. Allen, *et al.* Impact of reversed phase column pairs in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2014**, *1361*, 169–177.
8. Bassanese, *et al.* Protocols for finding the most orthogonal dimensions for two-dimensional high performance liquid chromatography, *Talanta* **2015**, *134*, 402–408.
9. Gilar, *et al.* Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6426-6434.
10. Davis, *et al.* Dependence of effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations on the distribution of peak capacity between the two dimensions, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8122-8134.
11. Li, Schmitz. Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 6511-6517.

www.agilent.com/chem/jp

本資料に記載の情報は、予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Published in Japan, February 1, 2016

5991-6542JAJP



Agilent Technologies