



Agilent 1290 Infinity II 2D-LC による 高分離能サンプリング 2D-LC

共溶出物質についての信頼性の高い定量

技術概要

著者

Susanne Stephan
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションでは、包括的 2D-LC (LCxLC) とマルチハートカット 2D-LC と高分離能サンプリング 2D-LC との間の切り替えが容易に行えます。この技術概要では、一次元目 (¹D) における共溶出物質の高い信頼性での定量を可能にする高分離能サンプリング 2D-LC の利点を紹介します。例として、緑茶に一般的に含まれる化合物の定量を使用しています。化合物 (+)-カテキンと (-)-エピカテキンを一次元目で分離し、標準ワークフローを使用しそれぞれの ¹D ピークを基に定量を行いました。一次元目で化合物 (-)-エピガロカテキンガレートとカフェインが共溶出しましたが、二次元目で分離することができました。高分離能サンプリング 2D-LC では、¹D ピーク全体を二次元目 (²D) のカラムに送ることができます。この手法により、二次元目のピークを基に 2 つの化合物を高い信頼性で定量することができました。



Agilent Technologies

はじめに

一次元液体クロマトグラフィー (1D-LC) を用いた多くのアプリケーションで、実サンプルに含まれる化合物の定量分析が実現されています。しかし、信頼性の高い定量は、ピークが重ならない場合にのみ実現できます。複雑なサンプルの分析では二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) の使用により、一次元目で共溶出した化合物を二次元目で分離することができます。

包括的 2D-LC (LCxLC) では、サンプル全体が分画され、各フラクションが²D カラムに送られます¹。一方、ハートカット 2D-LC では、選択されたピークのフラクションのみがサンプリングされ二次元目でさらに分析されます^{2, 3}。Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションでは、²D サイクルを実行しながら複数のカットを貯めておくことが可能です^{4, 5}。この技術概要では、2D-LC のさらなるオプションとして、Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションで使用できる高分離能サンプリングを解説します。

図 1 は、高分離能サンプリングにおいて、¹D クロマトグラムから選択した時間範囲の複数の小さなフラクションを収集して、ターゲット化合物を分析できることを示しています。各カットがサンプリンググループ内で貯められ、すべてのカットが連続して二次元目で分析されます。このケースでは一次元目で得られた分離能を維持していました。この手法は選択的で包括的な 2D-LC⁶ と言われています。さらに、選択した化合物の総量が二次元目に確実に送られ分析されました。このため、信頼性の高い定量が、二次元目の 1 つの化合物に属するすべてのカットを合計することにより可能になります。この設定により、複雑なサンプル中のターゲット化合物と¹D ピークの分離が不十分な場合でも、¹D ピーク全体にわたって定量化することができます。選択された共溶出化合物は高分離能サンプリングプロセスで処理され、2D 分離後の信頼性の高い定量化を可能にします。例としてこの技術概要では、緑茶に一般的に含まれている 3 種類のカテキン ((+)-カテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキンガレート) と、キサンチンとしてのカフェインの定量化を示します^{7, 8}。緑茶飲料は茶植物であるチャノキを原料に製造され世界中で飲用されており、抗酸化作用、抗菌性作用、抗腫瘍作用といった健

康への効果が知られ注目が広がっています^{7, 8}。健康への効果に関して裏付けのある緑茶中の主な化合物は、カテキンとキサンチンです^{8, 9}。

分析条件

装置

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションは、次のモジュールで構成しました。

- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、サンプル冷却システム (オプション #100) を搭載
- 2 台の Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)、光路長 10 mm の Max-Light カートリッジセル (G4212-60008) を搭載
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 ポジション/4 ポート デュオバルブ (2D-LC バルブヘッド、G4236A) を搭載

- 2 台の Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、40 μ L ループ付きマルチハートカットバルブ (G4242-64000) を搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition リビジョン C.01.07 SR2 [255] と Agilent 1290 Infinity II 2D-LC Acquisition ソフトウェア製品、バージョン A.01.03 [021]

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルとメタノールは Merck 社 (ダルムシュタット、ドイツ) から、トリフルオロ酢酸は Sigma-Aldrich 社 (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンカートリッジを備えた Milli-Q Integral システム (Millipak、EMD Millipore 社、ベルリカ、マサチューセッツ州、米国) で精製しました。カフェイン、(+)-カテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキンガレートは Sigma-Aldrich 社 (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。

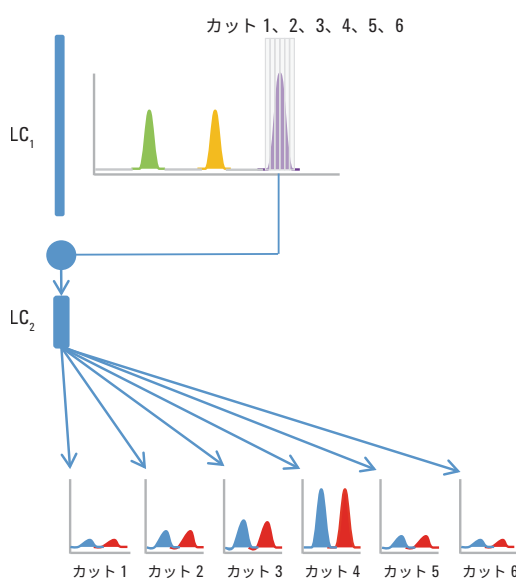


図 1. 高分離能サンプリング 2D-LC の説明図

サンプル

緑茶 (番茶、日本) は、Ettli Kaffee 社 (エットリンゲン、ドイツ) から購入しました。水性抽出物は、100 mL の熱湯を 1.75 g の乾燥した緑茶に加えて準備しました。5 分間攪拌した後、上澄みを 0.45 µm ポアサイズのシリンジフィルタ (再生セルロース) でろ過して水で 1:2 に希釈しました。(+)・カテキンと (-)・エピカテキンの定量では、希釈しないお茶を注入しました。(-)・エピガロカテキンガレートとカフェインの定量では、希釈したサンプルを分析しました。

高分離能サンプリング 2D-LC メソッド

パラメータ	内容
カラム	
一次元目	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD、 2.1 × 100 mm、1.8 µm (p/n 959758-902)
二次元目	Agilent ZORBAX Bonus-RP RRHD、 2.1 × 50 mm、1.8 µm (p/n 857768-901)
¹D ポンプ	
溶媒 A	水 + 0.05 % トリフルオロ酢酸
溶媒 B	メタノール + 0.05 % トリフルオロ酢酸
流量	0.2 mL/分
グラジエント	0 分: 5 % B 10 分: 60 % B 11 分: 95 % B
²D ポンプ	
溶媒 A	水 + 0.05 % トリフルオロ酢酸
溶媒 B	アセトニトリル + 0.05 % トリフルオロ酢酸
流量	1 mL/分
グラジエント	0 分: 5 % B 1.40 分: 95 % B
2D グラジエントストップタイム	1.40 分
2D サイクルタイム	2.00 分
ストップタイム:	15 分
ポストタイム	5 分
高分離能サンプリング	
タイムベース	7.07 分
サンプリング時間	2.8 秒
カット数	6
マルチカラムサーモスタット	
一次元目	20 °C
二次元目	20 °C
マルチサンブラ	
注入量	1 µL
ニードル洗浄	メタノール:水 50:50 で 10 秒
¹D ダイオードアレイ検出器	
波長	280 nm/4 nm、リファレンス 395 nm/10 nm
データレート	40 Hz
²D ダイオードアレイ検出器	
波長	280 nm/4 nm、リファレンス 395 nm/10 nm
データレート	80 Hz

高分離能サンプリングのためのメソッド設定

高分離能サンプリングは、図 2 に示すように、12 のサンプリングループを保持する 2 個のマルチハートカットバルブに接続された 2 ポジション/4 ポートデュオバルブで構成された Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションで実行しました。このセットアップにより、最大 10 の連続するカットをサンプリングして分析するまで貯めておくことができます。高分離能サンプリングでは、サンプル損失を防ぐために 80 % 以下のループ充填を推奨しています。図 3 は ²D ポンプで使用するメソッド設定を示しています。最初に、サンプルの 1D-LC 分離を実行し、クロマトグラムをリファレンス信号プレビューウィンドウとしてロードしました。高分離能サンプリングを目的のピークについて、ピーク幅全体をカバーする 6 つのカットによって時間ベースで設定しました。提供された ¹D 条件では、2.8 秒のサンプリング時間は 23 % のループ充填に相当します。

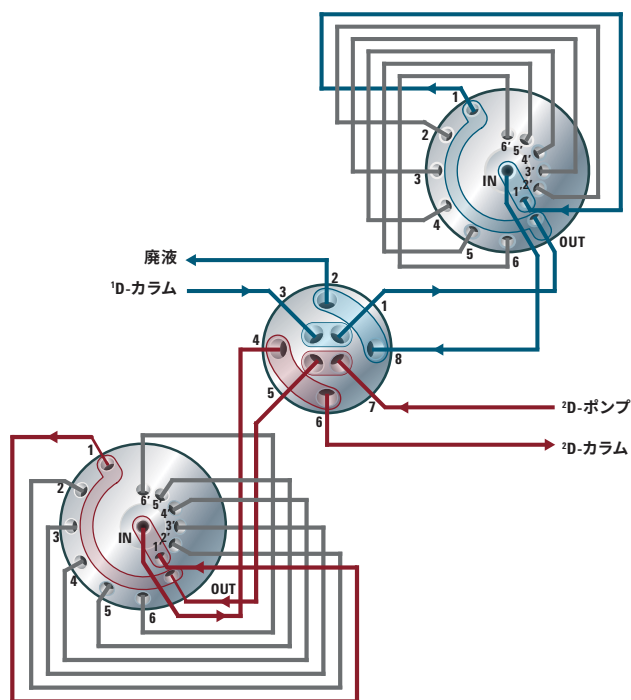


図 2. 12 のサンプリングループを保持する Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションのセットアップ

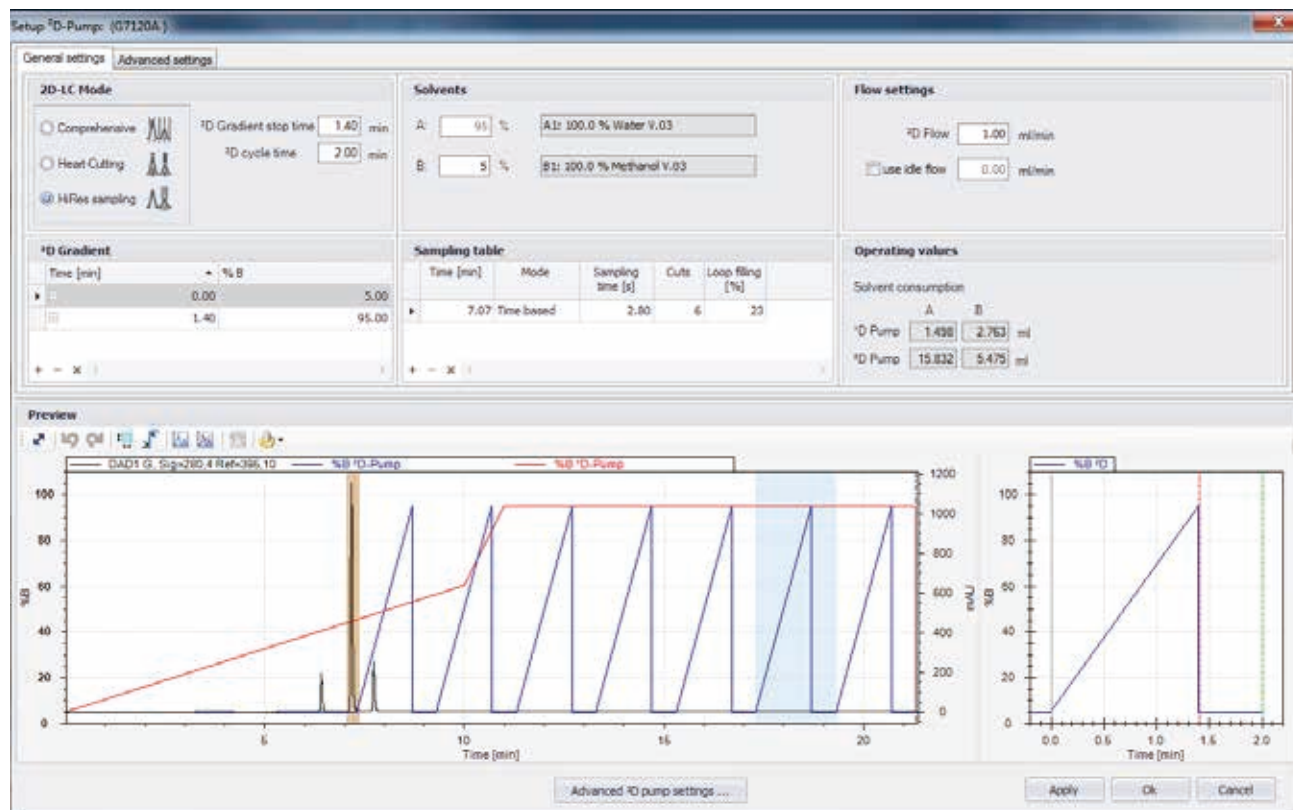


図 3. ²D ポンプのメソッド設定

結果と考察

定量

緑茶の水性抽出物を高分離能サンプリング 2D-LC で分析しました。図 4 は、緑茶サンプルの一次元クロマトグラムを示しています。(+)・カテキンおよび (-)・エピカテキンは適切に分離されていますが、カフェインと (-)・エピガロカテキンガレートは共溶出するため、1D-LC 分離により定量することはできません。高分離能サンプリングを使用し、カフェインと (-)・エピガロカテキンガレート (図 5A) が含まれるピークの時間範囲で 6 個のカットをサンプリングして二次元目に注入しました。図 5B のサンプリング表に、各カットのサマリも表示されています。このメソッドのサンプリングにより、シンプルなハートカット手法ではより大きな影響となる⁴、わずかなリテンションタイムのシフトが一次元目で生じた場合でも、信頼性の高い定量が可能になります。もう 1 つの利点は、サンプリング時間が短いために二次元目に注入するサンプルが少量で済むことです。この結果、ピーク全体を 1 フラクションでサンプリングする手法

よりも高い品質のクロマトグラムを実現できます。すべてのカットの²D クロマトグラムが、カフェインと (-)・エピガロカテキンガレートとの適切な分離を示し、図 5C に重ね表示されています。ソフトウェアで、1 つの化合物のピークを

すべてのシングル²D クロマトグラムについて積分し定量します。図 5D のピークの表は、各化合物のピーク面積の合計を示しています。

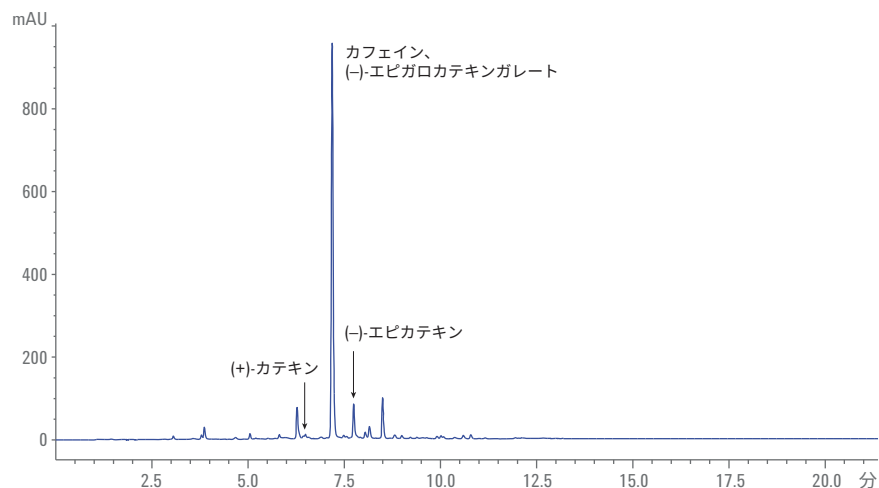


図 4. カフェインと (-)・エピガロカテキンガレートの共溶出のある緑茶の水性抽出物の¹D クロマトグラム

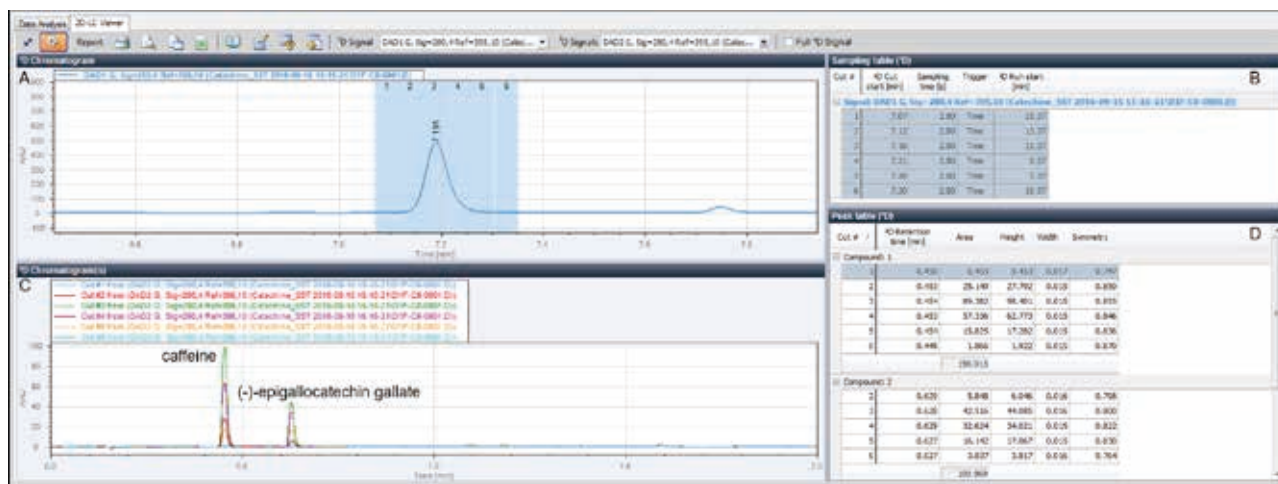


図 5. 2D-LC Viewer。A) カフェインと (-)・エピガロカテキンガレートを含むピークの幅全体について 6 つの連続するカットのある¹D クロマトグラム。B) 一次元目から得られた 6 つのカットのサンプリング表。C) 6 カットすべての²D クロマトグラムの重ね合わせ表示。D) 2 つの化合物について各カットのピーク面積とピーク面積の合計を示す二次元目のクロマトグラムのピーク表。

濃度範囲が 5 ～ 220 µg/mL の (+)-カテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキンガレートおよびカフェインの標準溶液を前述のメソッドで 2 回分析しました。(+)-カテキンと (-)-エピカテキンについては、ChemStation ソフトウェアの標準の積分およびキャリブレーション機能を使用してそれぞれの一次元目のピークを評価しました。図 6A および 6B は、良好な直線性を持つ ($R^2 > 0.999$) この 2 つの化合物の検量線を示しています。(-)-エピガロカテキンガレートとカ

フェインのキャリブレーションは、各化合物の²D ピーク面積の合計を使用して実行されました。図 7 は ChemStation の 2D-LC Viewer タブ内で計算されたピーク面積の合計を新しいレベルとして Data Analysis タブ内のキャリブレーションテーブルに追加できることを示しています。2 つの化合物について、図 6C と 6D に示すように、キャリブレーション範囲全体で、 R^2 の値が 0.999 以上の良好な直線性が得られています。

前述のように、緑茶サンプルのターゲット化合物の定量には、(+)-カテキンと (-)-エピカテキンについては¹D ピークを使用し、(-)-エピガロカテキンガレートとカフェインについては二次元目のピークの合計を使用しました。調査した緑茶飲料には、2 回の分析の平均値として、5.2 µg/mL の (+)-カテキン、68.9 µg/mL の (-)-エピカテキン、198.8 µg/mL の (-)-エピガロカテキンガレート、167.7 µg/mL の カフェインが含まれていました。

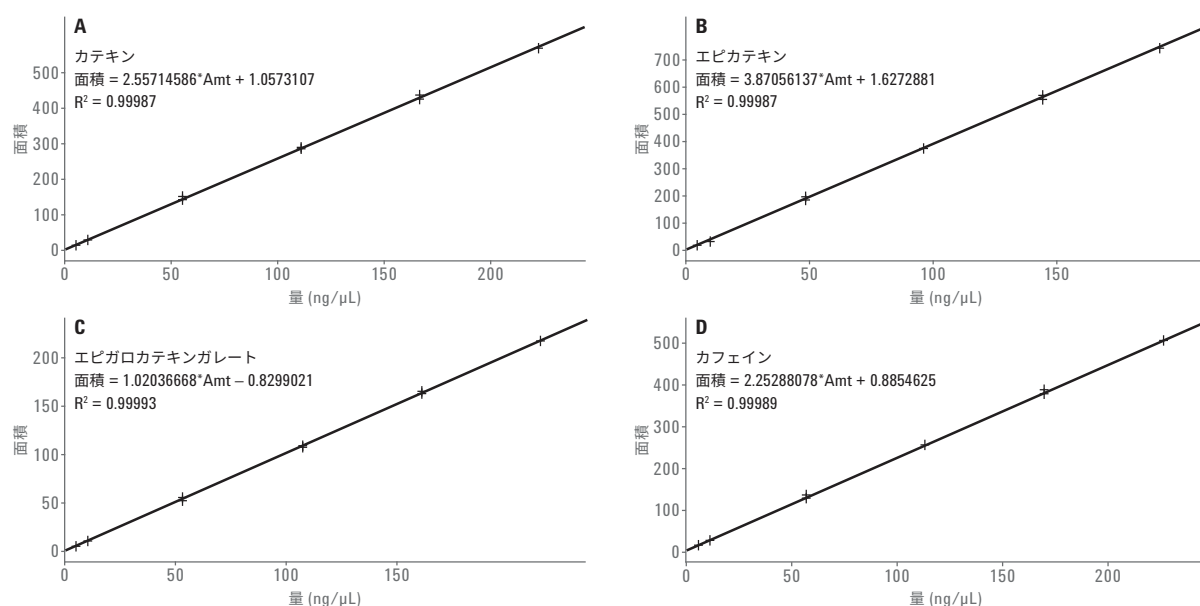


図 6. 4 つのターゲット化合物の 5 ～ 220 µg/mL の範囲の検量線。(+)・カテキン (A) と (-)・エピカテキン (B) の検量線は¹D ピークから作成し、(-)・エピガロカテキンガレート (C) とカフェイン (D) の検量線は²D ピークの合計から作成しました。

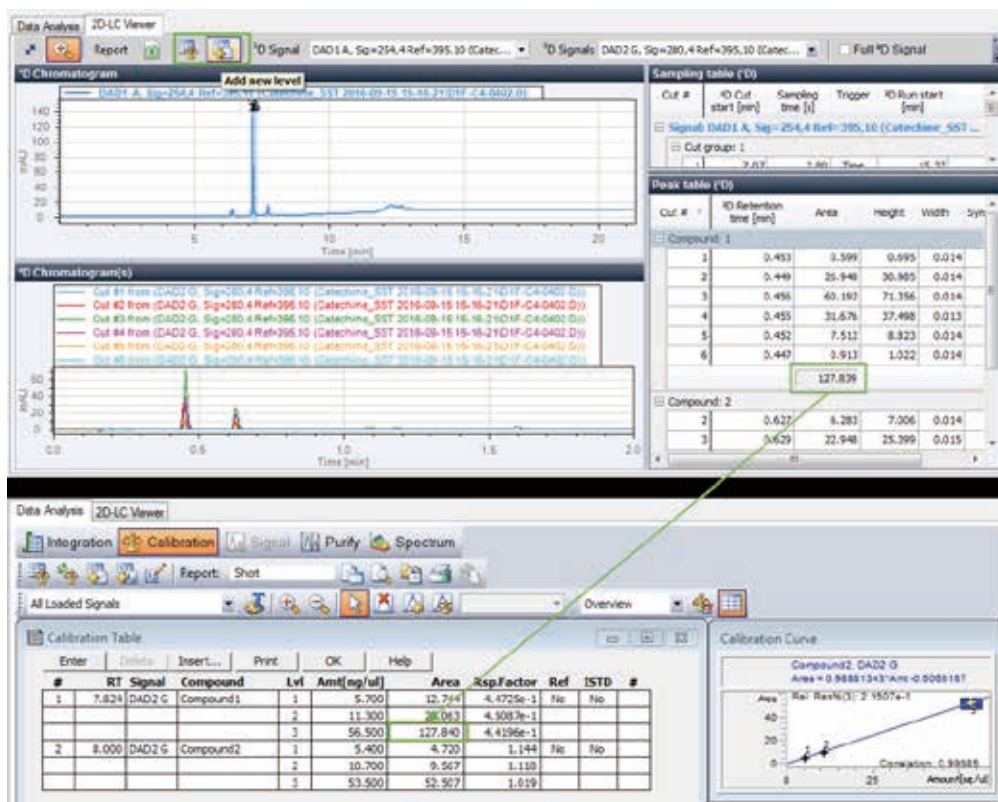


図 7. 高分離能サンプリング 2D-LC 分析後の Agilent OpenLab CDS ChemStation と Agilent 1290 Infinity II 2D-LC Acquisition ソフトウェアでのキャリブレーションの実行。Add new level (新規レベルの追加) をクリックすると、2D-LC Viewer タブ内に示す各化合物の ^1D ピーク面積の合計 (緑色でマーク) が Data Analysis タブの Calibration Table に移されます。

再現性

高分離能サンプリング 2D-LC メソッドの再現性を確かめるために、100 $\mu\text{g/mL}$ のカフェインおよび 3 種類のカテキンが含まれる標準混合液を連続して 6 回分析しました。図 8A ではすべての ^1D クロマトグラムを重ね合わせて表示しています。図 8B ではすべての ^2D クロマトグラムを重ね合わせて表示しています。カフェインと (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) の合計ピーク面積は、前述のように、 ^2D クロマトグラムから求めました。相対標準偏差 (RSD) は、カフェインでは 1.2 %、(-)-エピガロカテキンガレートでは 1.1 % でした。

結論

この技術概要では、Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションの高分離能サンプリングの機能を紹介しています。一次元目で共溶出する化合物をいくつかのフラクションにサンプリングして、二次元目で連続的に分離できました。緑茶サンプルを用いた例証により、一次元目で分離する化合物は ^1D ピークにより定量でき、一次元目で共溶出する化合物は高分離能サンプリング 2D-LC により同一の分析内で分析され高い信頼性で定量できることを示しています。

参考文献

1. Marriott, P. J.; Wu, Z.; Schoenmakers, P. Nomenclature and Conventions in Comprehensive Multidimensional Chromatography—an Update. *LCGC Eur.* **2012**, 25(5), 266–275.
2. Lee, C.; *et al.* Application of Heart-Cutting 2D-LC for the Determination of Peak Purity for a Chiral Pharmaceutical Compound by HPLC. *Chromatographia* **2013**, 76(1–2), 5–11.
3. Naegele, E. Detection of Impurities by Heart Cutting Using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0834EN, **2012**.
4. Buckenmaier, S. Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution for Multiple Heart-Cutting, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-5349EN, **2015**.
5. Krieger, S. Application of Multiple Heart-Cutting 2D-LC in Method Development for Impurity Analysis, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5349EN **2015**.
6. Stoll, D. R.; *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **2015**, 87(16), 8307–8315.
7. Jankana, B.; Wandee, Y. Catechins and Caffeine Contents of Green Tea Commercialized in Thailand. *J. Pharma. Biomed. Sci.* **2012**, 22(22), 1–7.
8. Dufresne, C. J.; Farnworth, E. R. A Review of Latest Research Findings on the Health Promotion Properties of Tea. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, 12(7), 404–421.
9. Rahim, A. A.; Nofrizal, S.; Saad, B. Rapid Tea Catechins and Caffeine Determination by HPLC Using Microwave-Assisted Extraction and Silica Monolithic Column. *Food Chem.* **2014**, 147, 262–268.

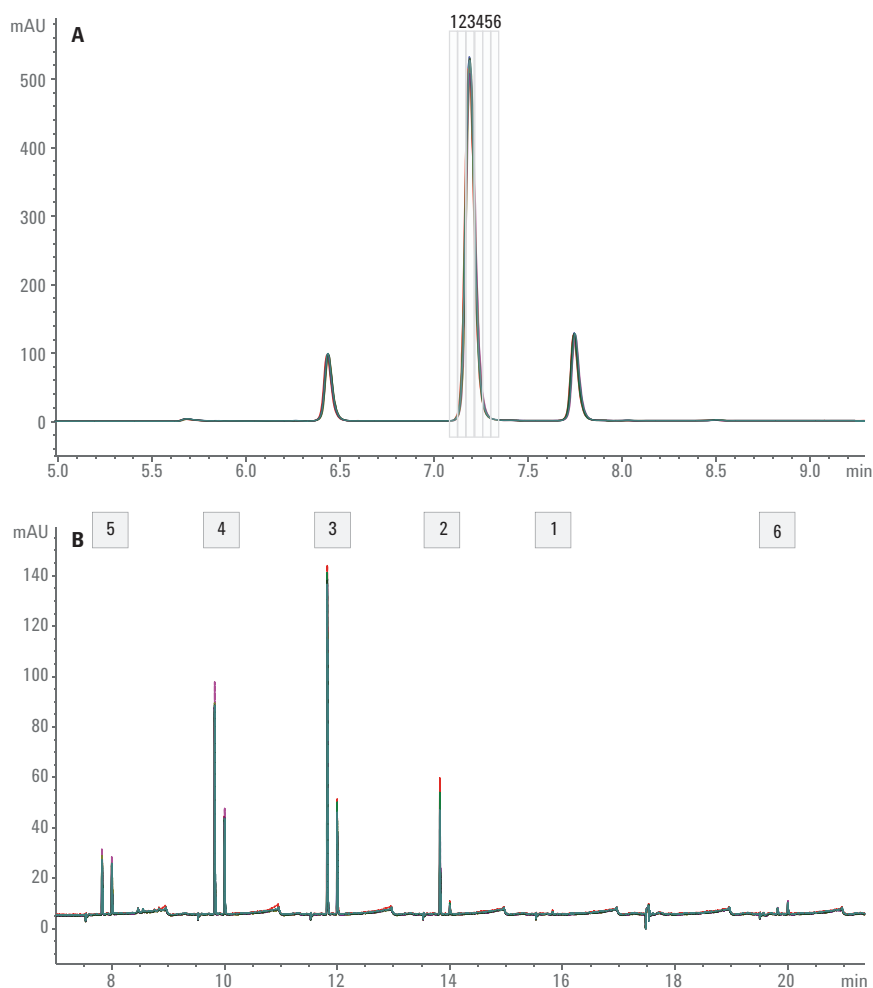


図 8. カフェイン、(-)-エピガロカテキンガレート、(+)-カテキン、(-)-エピカテキンを含む標準混合液の 6 回連続注入の重ね合わせ表示。A) ^1D クロマトグラムと 7.07 分で開始するタイムベースでサンプリングされた 6 つのフラクション (サンプリング時間は 2.8 秒)。B) 6 つのフラクションのフル ^2D 信号。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等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

Printed in Japan, December 1, 2016

5991-7637JAJP



Agilent Technologies