Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

# ACQUITY Arc システムで CORTECS T3 カラムを用いた脂溶性抗酸化物質分析の性能およびサイクルタイム向上

Kenneth D. Berthelette and Thomas Swann
Waters Corporation, Milford, MA, USA

## アプリケーションのメリット

- ACQUITY® Arc™ システムを用いたHPLCからUHPLCへのグラジエント分析法移管の実証
- CORTECS® T3カラムを用いた分離の向上、分析時間短縮、溶媒消費量削減

## ウォーターズのソリューション

CORTECS T3カラム

Atlantis® T3カラム

Alliance® HPLCシステム

ACQUITY Arcシステム

Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア(CDS)

## キーワード

CORTECS T3、Alliance HPLC、ACQUITY Arc、Atlantis T3、Empower 3、抗酸化物質

## はじめに

加工食品は賞味期限が長く、これは1つには、酸化的フリーラジカル連鎖反応による脂肪酸の分解を遅らせるために抗酸化物質を添加していることによるものです。このような食品添加物の分析は、使用される添加物が食品規制機関により認可されているかを判定するため重要です。

脂溶性抗酸化物質分析として、以前にAlliance HPLCシステムで 5 µm Atlantis T3 HPLCカラムを用いて実施した例があります[1]。分離は十分でしたが、新規カラムテクノロジーとLCシステムを用いることで、さらに向上できます。本アプリケーションノートでは、オリジナルのHPLC分析法をACQUITY Arcシステムと2.7 µm CORTECS T3カラムを用いてUHPLC分析法に移管して、分析時間と溶媒消費量を削減しながら、より良好な分離が得られました。

## 実験方法

### LC分析条件

LCシステム：　Alliance HPLC
ACQUITY Arc

カラム　：　Atlantis T3、5 µm、4.6×150 mm
（製品番号 186003747）

CORTECS T3、2.7 µm、3.0×75 mm
（製品番号 186008488）

移動相A：　水

移動相B：　アセトニトリル

移動相B：　メタノール

移動相D：　2％ギ酸水溶液（混合して 0.1％ギ酸）

グラジエント（Atlantis T3）：

| 時間（分） | %A | %B | %C | %D |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 60 | 17.5 | 17.5 | 5 |
| 4 | 40 | 27.5 | 27.5 | 5 |
| 6 | 14 | 40 | 41 | 5 |
| 15 | 14 | 40 | 41 | 5 |
| 16 | 60 | 17.5 | 17.5 | 5 |
| 20 | 60 | 17.5 | 17.5 | 5 |

グラジエント（CORTECS T3）：

| 時間（分） | %A | %B | %C | %D |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 60 | 17.5 | 17.5 | 5 |
| 2 | 40 | 27.5 | 27.5 | 5 |
| 3 | 14 | 40 | 41 | 5 |
| 7.5 | 14 | 40 | 41 | 5 |
| 8 | 60 | 17.5 | 17.5 | 5 |
| 10 | 60 | 17.5 | 17.5 | 5 |

グラジエントSmartStart：
サンプル注入 133 µL前にグラジエント開始

流速：　2.0 mL/min（Atlantis T3）
0.85 mL/min（CORTECS T3）

カラム温度：　30℃

検出（UV）：　280 nm

注入量：　10.0 µL（Atlantis T3）
2.1 µL（CORTECS T3）

データ管理：　Empower 3 CDS

サンプル調製：　65：17.5：17.5　水：メタノール：アセトニトリルを用いて以下の化合物を記載した濃度で含むサンプル混合物を調製しました。化合物の構造は図 1 に示しました。

1. Propyl Gallate (0.05 mg/mL)
2. 2,4,5-Trihydroxybutyrophenone (0.05 mg/mL)
3. Tert-butylhydroquinone (0.1 mg/mL)
4. Butylated hydroxyanisole (0.1 mg/mL)
5. 2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol (0.1 mg/mL)
6. Octyl Gallate (0.05 mg/mL)

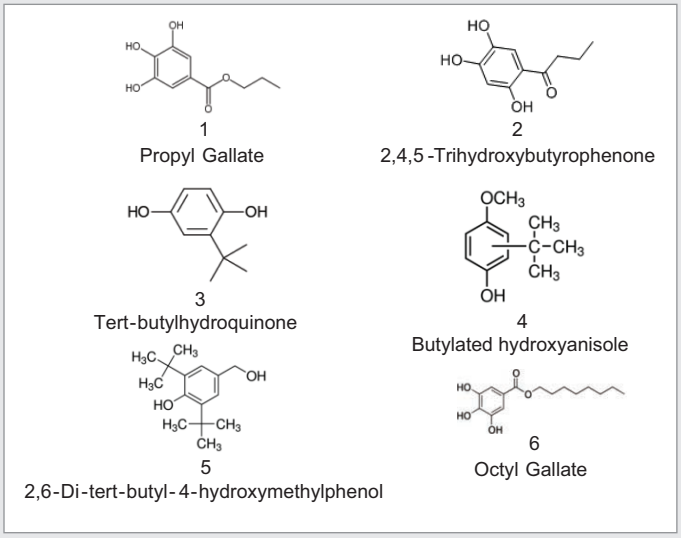


*図 1. 脂溶性抗酸化物質の構造*

## 結果および考察

グラジエント分析法の移管は2ステップで行います。まず、オリジナル分析法と移管先の分析法間におけるカラムサイズと粒子径の変更に応じてグラジエントプロファイルをスケーリングします。これはウォーターズのカラムカリキュレーター[2]を用いて容易に行えます。次に、LCシステム間のデュエルボリューム(グラジエントディレイボリューム)について考慮する必要があります。デュエルボリューム(ポンプからカラム手前までの容量)は容易に測定できます[3]。またEmpowerでは、グラジエントSmartStart機能を用いてデュエルボリュームの違いを補正できます[4]。

ACQUITY Arcシステムはmulti-flow path™ テクノロジーにより、装置メソッドの若干の変更でHPLCおよびUHPLC両方のモードで分析を実施できます。ACQUITY Arcソルベントマネージャーには流路が2つあり、HPLC用の流路(パス1)もしくはUHPLC用の流路(パス2)から選択します。装置メソッドで適切な流路を選択することで、ACQUITY ArcシステムではHPLCおよびUHPLCどちらのシステムとも同様に分析を実施できます。表1には、筆者らが測定したAllianceおよびACQUITY Arc (パス1)のデュエルボリュームを示しています。これらのデュエルボリュームは、カラムの代わりにユニオンで繋いで、移動相B (例えばアセトンなど)中でUV吸収をもつ化合物を用いてグラジエント分析することで測定しました。デュエルボリュームを測定した後、ACQUITY Arcシステムでの分析法はデュエルボリュームの違いを考慮して補正し、分離におけるシステムデュエルボリュームの影響を効率的に低減するため、"サンプル注入133 µL前にグラジエント開始"というグラジエントSmartStartという設定を用いました。

| システム | デュエルボリューム(mL) |
|---|---|
| Alliance HPLC | 1.080 |
| ACQUITY Arc (Path 1) | 1.213 |

*表1. 使用したシステムのデュエルボリューム測定*

図2は、Alliance HPLCシステムでAtlantis T3、4.6 × 150 mm、5 µmカラム(製品番号18600347)を用いて脂溶性抗酸化物質を分析したオリジナルの分離を示しています。6種類の主要な化合物にについて良好な分離が得られ、ピーク3と4の間に3種類の不純物(2種は共溶出、差し込み図を参照)が溶出していました。カラム再平衡化を含む、本分析の全体としての分析時間は20分で、消費移動相量は40 mLでした。

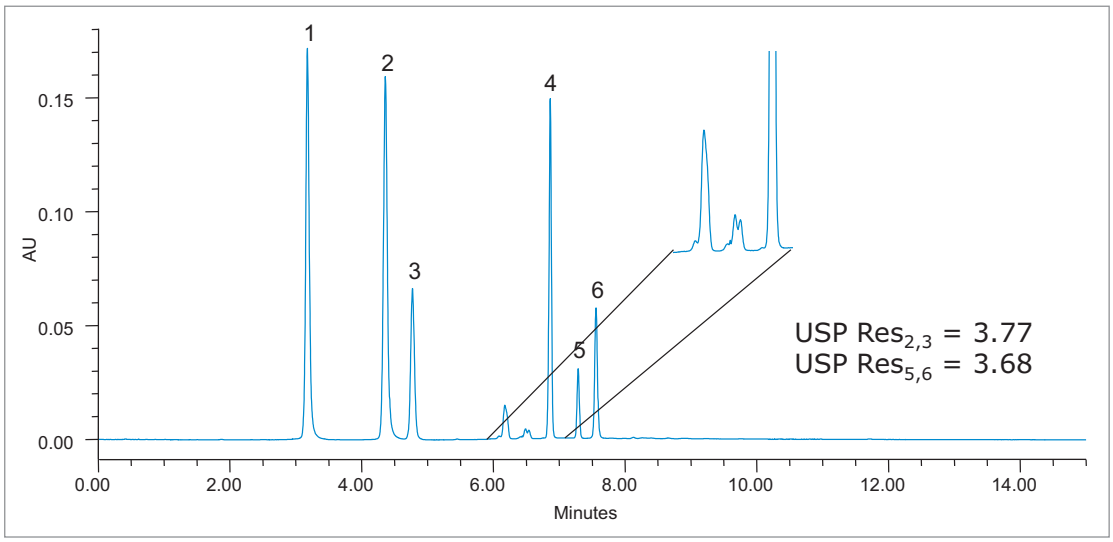


*図2. Alliance HPLCシステムでAtlantis T3、4.6×150 mm、5 µmカラムを用いた6種類の脂溶性抗酸化物質の分離*

移管した分析法は、ACQUITY Arc システムでCORTECS T3、3.0×75 mm、2.7 µmカラム（製品番号186008488）を用いて実施し、抗酸化物質のクロマトグラムは図3に示しました。主要成分の分離が向上しながら、不純物の分離も向上しました（オリジナルで共溶出していた2種も分離、差し込み図を参照）。サンプルの分析時間は50％（20分から10分に）低減し、移動相消費量は約1/5に低減しました。

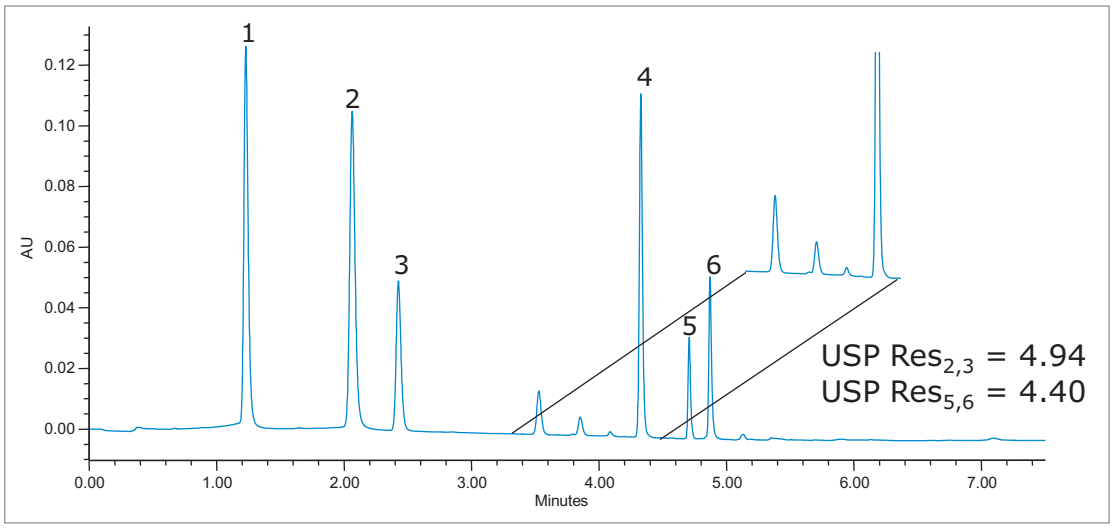


*図3. ACQUITY Arc システムで CORTECS T3、3.0 × 75 mm、2.7 µm カラムを用いた6種類の脂溶性抗酸化物質の分離*

## 結論

従来のHPLC分析法では多くの場合、許容可能な分離が達成されますが、長い分析時間と溶媒消費量が多いという面が犠牲となります。これら従来からの分析法を、より新しいカラムとLCシステムに移管することで、分析時間と溶媒消費量を削減しながら、多くの場合、分離を向上できます。結果として、時間とコストを両方削減しながら、高品質の結果を得られます。脂溶性抗酸化物質の分離を5 µm Atlantis T3カラムを用いたHPLCシステムから2.7 µm CORTECS T3カラムを用いたUHPLCシステムに移管し、結果として、ピークの分離が向上し、サンプル分析時間を50%、溶媒消費量を約1/5に削減しました。

## 参考文献

1. Analysis of Lipid Soluble Antioxidants using Atlantis T3. Waters Application Note WA60209.
2. Waters Column Calculator Version 2.0 download and release notes.
3. Diagnostic: Measuring Dwell Volume. Diagnostic: Measuring Dwell Volume. LC Resources, 2006. Web. 6 June 2016. http://www.lcresources.com/resources/TSWiz/hs410.htm
4. Simplifying Methods Transfer: Novel Tools for Replicating Your Established Methods on an ACQUITY Arc System. Waters Application Note 720005469en.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

**日本ウォーターズ株式会社** www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、Atlantis、CORTECS、Alliance、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
ACQUITY Arc および Arc Multh-flow path は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年9月 72005786JA PDF