



HPLC バルブソリューション: 脱塩アプリケーション①

リン酸移動相による分離とターゲットピークのハートカットによる質量分析計での検出



<要旨>

HPLC 分離の際に多用されるリン酸やリン酸塩は不揮発性の添加剤です。不揮発性の塩を使用した既存の分離条件は LC/MS に適さないため揮発性添加剤を使用した分離条件に変更する必要がありますが、ピークの溶出順が変化したり、クロマトグラムのパターンが変わることがあります。

ここでは、不揮発性の添加剤を使用した分離を行いつつ、バルブを用いてターゲットピークをハートカットし、質量分析計での検出を行いました。また、組成式推定ソフトウェア (MassWorks) を使用し、採取したマススペクトルから組成式推定を行いました。

Key Words: バルブソリューション、不揮発性移動相の MS 検出、不純物分析

1. はじめに

HPLC による分離分析はリン酸やリン酸塩などを用いて行われることがあります。このような不揮発性移動相の分析条件は、そのままの移動相条件では LC/MS へ導入できません。

移動相の添加剤を揮発性の化合物に変更しても良好な分離が得られない場合や、溶出順序やパターンが変化しピークのトラッキングができないこともあります。

ここでは、六方バルブを使用したシステムを用い、LC/MS に適応不可能なリン酸移動相による分離からターゲットピークのみを直接揮発性移動相に移送し、質量分析計での検出を行いました。

2. 実験条件

ジクロフェナクを 1000 mg/L に調製し、試料としました。

Table 1 分析条件

1D分離	Agilent Infinity 1260 LC System
Column	ZORBAX Eclipse Plus C8, 4.6 x 150 mm, 3.5 μm
Mobile phase	A: 0.1% phosphoric acid B: Methanol A/B=34/66
Injection volume	4 μL
Column temp	40 °C,
Flow rate	1.0 mL/min
DAD	254 nm

脱塩	Valve + Pump
Column	Poroshell SB-C18, 2.1 x 50 mm, 2.7 μm
Mobile phase	A: 0.1% formic acid B: 0.1% formic acid in ACN
Gradient	10%(0 min) -> 10%(4.1 min) -> 100%(5 min) -> 10%(5.1 min)
loop volume	100 μL
Valve Position	1 ->2 (0 min), 1->6 (4.1 min)
Column temp	40 °C,
Flow rate	0.4 ml/min

MS	Agilent 6120 Single Quadrupole LC/MS
Gas Temp.	350°C
Dry Gas Flow	12 L/min
Neb Pressure	40 psi
Capillary Voltage	1500V
MS on	4.7 min
Mass Range	150-350 positive
Fragmentor	100 V

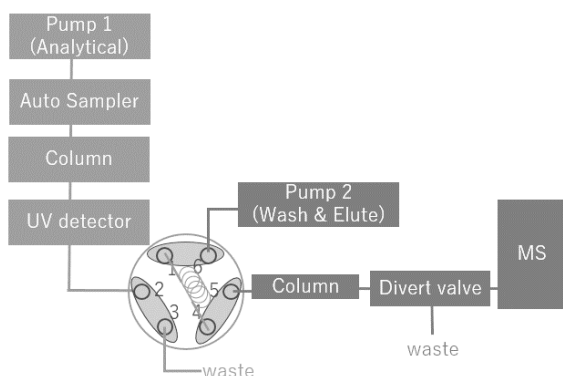


Fig. 1 システムの構成例

Pump(G1312B), Auto sampler(G1329B), TCC(G1316C),

DAD(G1315C), 2nd Pump(G1312B), Valve(G1170A),



3. 結果および考察

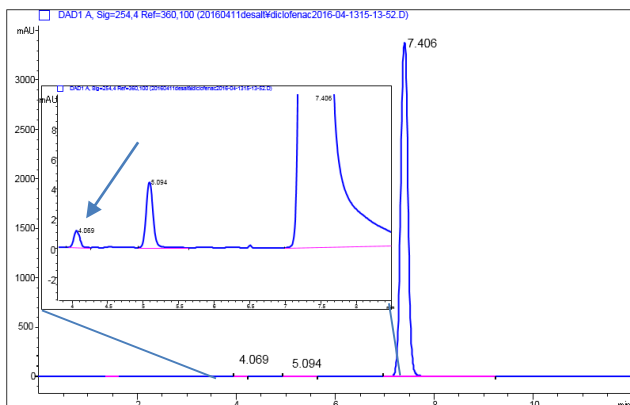


Fig. 2 1000 mg/L のクロマトグラムと拡大したクロマトグラム
ジクロフェナク 1000 mg/L を分析したところ、
UV クロマトグラムにて不純物ピークが認められ
ました(Fig.2)。4.07 分に溶出するピークはメイン
ピークに対し 0.018% (UV 面積値) でした。この
ピークが溶出する画分をハートカットし LC/MS
に導入しました。

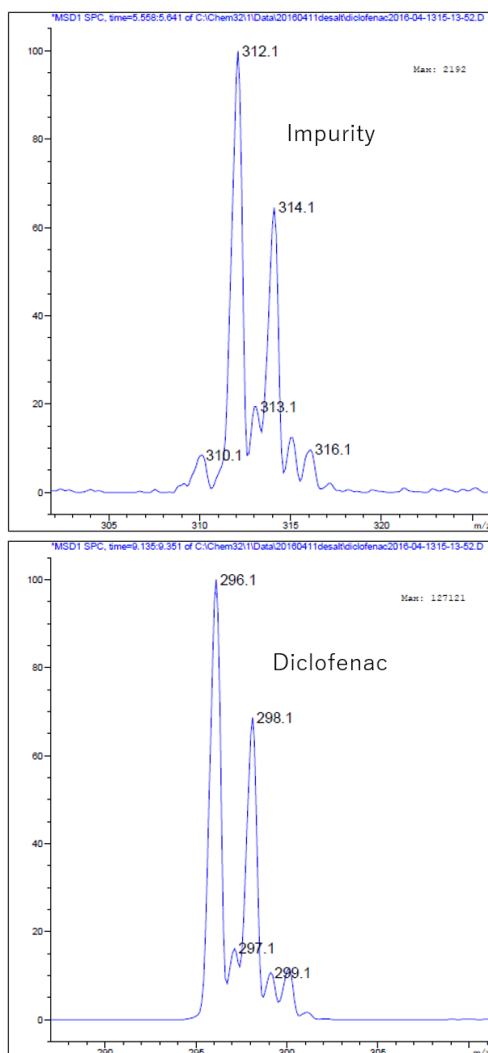


Fig.3 LC/MS に導入されたピークのマススペクトル

本システムで得られたマススペクトルを Fig.3
に示しました。この測定では同一分析でメインピー
クのマススペクトルも採取しました。

組成式推定ソフトウェア (MassWorks) を使用
し、得られたマススペクトルから組成式推定を行
いました。ジクロフェナク ($C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$,
 $M=297$) を校正用物質とし、不純物ピークの組成
式を推定したところ $C_{14}H_{11}Cl_2NO_3$ であると推定さ
れました(Fig. 4)。この組成はジクロフェナクのベン
ゼン環に OH 基が付加した、既知の不純物
(Hydroxy diclofenac) でした。

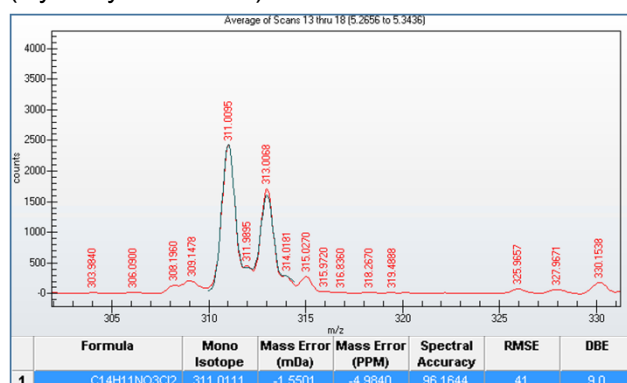


Fig.4 MassWorks による組成推定結果

4. まとめ

2 position/6 port バルブを用い、不揮発性の移動相
による分離条件からターゲットピークのみを揮発性
移動相の系に移送し、LC/MS 検出を行いました。

UV の面積値による存在比 0.018% の微小なピーク
のマススペクトルを得ることができ、MassWorks に
より組成を推定することが可能でした。組成推定の結
果、既知の不純物ヒドロキシジクロフェナクであると
推察されました。

【LC-MS-201606HK-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、
本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について
一切免責とさせていただきます。

また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

<http://www.agilent.com/chem/jp>



Agilent Technologies