



HPLC バルブソリューション:脱塩アプリケーション③ リン酸緩衝液による HPLC 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 の移動相として多用されるリン酸やリン酸塩は不揮発性の添加剤であり LC/MS の移動相としては適さないため、揮発性の添加剤を使用した移動相条件に変更する必要があります。しかし、移動相の変更により、ピークの溶出順序や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、リン酸を含む移動相で分離を行い、バルブを用いて複数のターゲットピークをハートカットして質量分析計での検出を試みました。その結果、簡単なメソッド設定で複数のピークのマススペクトルを得ることができました。

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 ではリン酸やリン酸塩などの不揮発性の塩を含む移動相がよく利用されます。このような不揮発性の移動相条件は、そのまま LC/MS へ適用することができません。移動相の添加剤を揮発性の化合物に変更した場合、良好な分離が得られない場合や、溶出順序が変化し、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、十方バルブを使用した脱塩システムを構築し、複数ピークの脱塩及び MS 検出の検証を行いました。

2. 実験条件

ジクロフェナクを 100 mg/L に超純水に溶解し、3 日間日光に照射したものを試料としました。

Table I 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
Gradient	55%B(0 min) -> 75%B(25 min)
Injection volume	50 µL(100 mg/L)
Column temp	40 °C,
Flow rate	1.0 mL/min
DAD	254 nm
Time table	0.5, 3.9, 4.5, 6.0, 6.8, 7.6, 9.4, 13.3, 15.0, 16.2, 18.0, 20.4 min

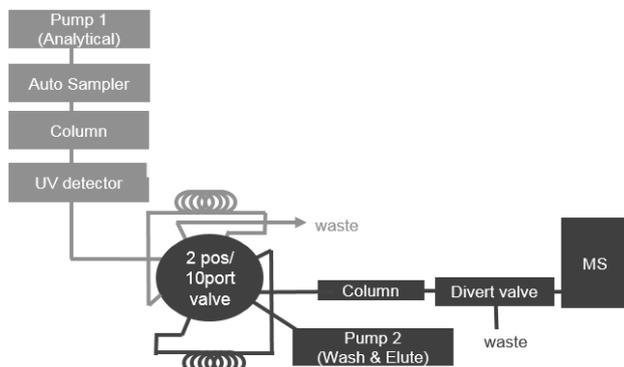


Fig. 1 システムの構成例

Pump(G1312B), Auto sampler(G1329B), TCC(G1316C),
DAD(G1315C), 2nd Pump(G1312B), Valve(G1170A), (G1390B)

脱塩	2 position/10 port Valve + Pump
Column	ZORBAX XDB-C8, 2.1 x 30 mm, 3.5 µm
Mobile phase	A: 0.1% formic acid B: 0.1% formic acid in ACN
Gradient	30%(0 min) -> 85 %(0.3 min)
loop volume	100 µL
Valve Position	Change Position: Increase valve position(0 min)
Flow rate	0.5 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	80 V



3. 結果および考察

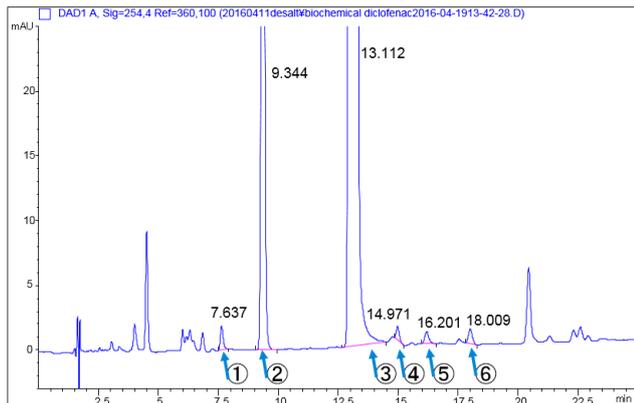


Fig. 2 UV 検出のクロマトグラムとターゲットピーク

日光を照射したジクロフェナクを分析したところ、UV 検出のクロマトグラムで不純物ピークが認められました (Fig.2)。そこで、クロマトグラム上に矢印で示した溶出時間にバルブを動作させ、フラクションを揮発性移動相の系に移送し MS 検出を行いました。最も近接しているピークは④と⑤のピークで約 1.2 分離れて溶出していました。

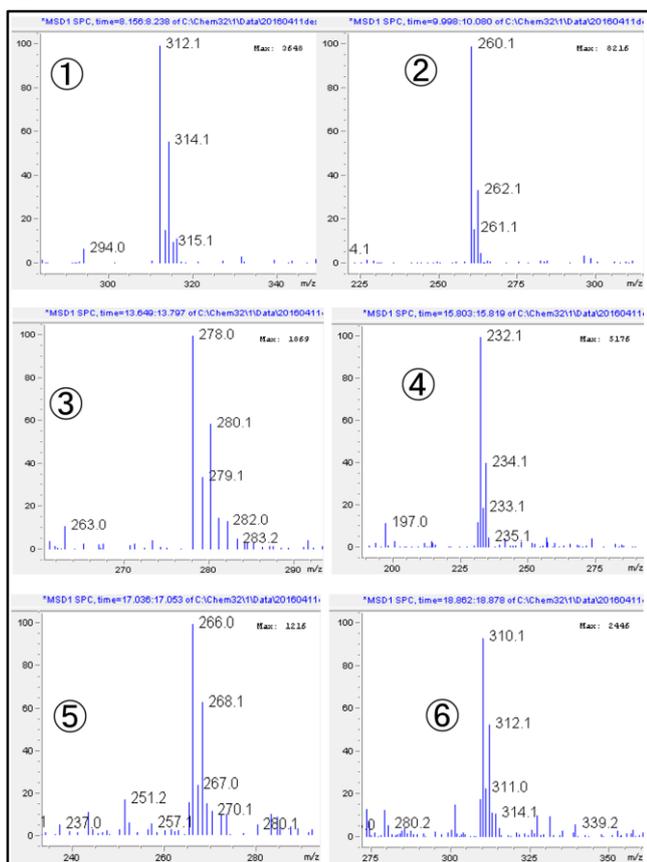


Fig.3 LC/MS に導入されたピークのマススペクトル

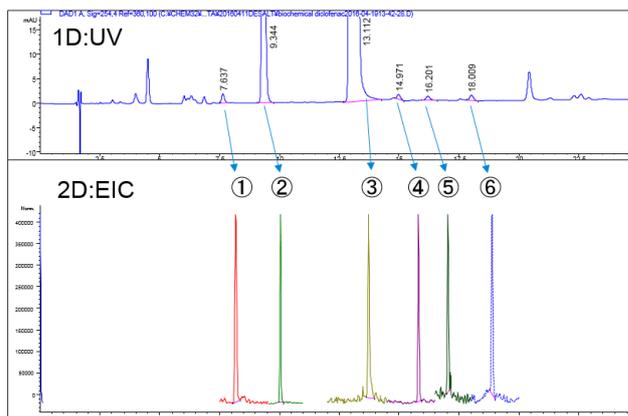


Fig.4 UV クロマトグラムとマスククロマトグラム

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。各不純物ピークの分子量関連情報を得ることが可能でした。

マスククロマトグラムを抽出し、一次元目の UV クロマトグラムと同時に表示させた図を Fig.4 に示しました。

4. まとめ

2 position/10 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。

本実験では、UV クロマトグラムにおいて近接したピークの LC/MS によるマススペクトル採取が 1 回の分析で可能であることが確認されました。

【LC-MS-201606HK-003】

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