



HPLC バルブソリューション: 脱塩アプリケーション④

リン酸緩衝液による HPLC 分離とアテノロールの不純物ピークのア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、クロマトグラムの溶出パターンが変わることがあります。

ここでは、アテノロールと不純物を不揮発性移動相で分離しつつ、バルブを用いて不純物ピークをアートカットし、MS 検出を行いました。アートカットした不純物ピークの良いスペクトルを得ました。

Key Words: バルブソリューション、不揮発性移動相分離と MS 検出、不純物分析、アテノロール

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。

通常、不揮発性移動相による分離の系は、揮発性移動相に変更すれば LC/MS 分析可能ですが、アテノロールと不純物の分離分析の場合、リン酸緩衝液を用いない系では良好な分離が得られません。

ここでは十方バルブを使用し、複数ピークのアートカットにおいてメソッドの入力が簡便なシステムを構築し、複数ピークをターゲットとした場合のアートカット及び質量分析計での検出の検証を行いました。

2. 実験条件

アテノロールを 80000 mg/L にメタノールで調製し試料としました。

Table I 分析条件

1D分離	Agilent Infinity 1260 LC System
Column	ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 µm
Mobile phase	A: 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 B: Acetonitrile
Gradient	2%B(0 min) -> 2%B(2 min) -> 22%B(22 min)
Injection volume	2 µL(80000 mg/L)
Column temp	50 °C,
Flow rate	1.0 mL/min
DAD	220 nm
Time Table	3.9, 6.0, 6.6, 7.4, 8.9, 9.3, 13.1, 16.1 min
脱塩	2 position/10 port Valve + Pump (+ 2 position/ 6 port)
Column	ZORBAX XDB-C18, 2.1 x 15 mm, 3.5 µm
Mobile phase	A: 0.1% formic acid B: 0.1% formic acid in Acetonitrile
Gradient	2%(0 min) -> 80 %(0.3 min)
loop volume	100 µL
Valve Position(10 port)	Increase valve position(0 min)
Flow rate	0.6 mL/min
Valve Position(6 port)	Use Valve Position: Position2(LC/MS) 0 min: Change position (Position1) 0.2 min: Change position (Position2)
MS	Agilent 6120 Single Quadrupole LC/MS
Gas Temp.	350°C
Dry Gas Flow	13 L/min
Neb Pressure	40 psi
Capillary Voltage	2500V
Mass Range	130-500 positive
Fragmentor	100 V

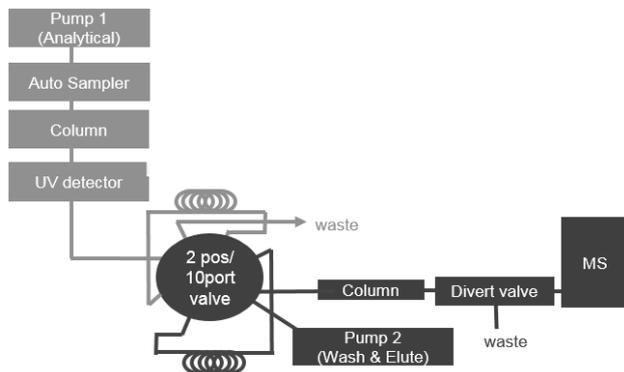


Fig. 1 システムの構成例

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



3. 結果および考察

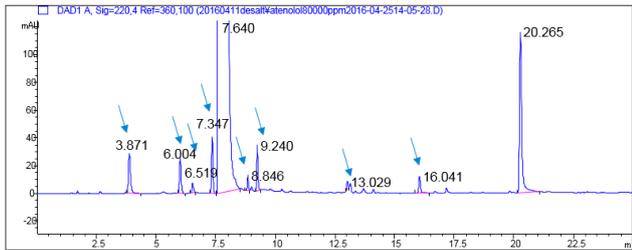


Fig. 2 UV クロマトグラムとズームしたクロマトグラム

アテノロールの 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)。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揮発性移動相の系に移送し MS 検出を行いました。

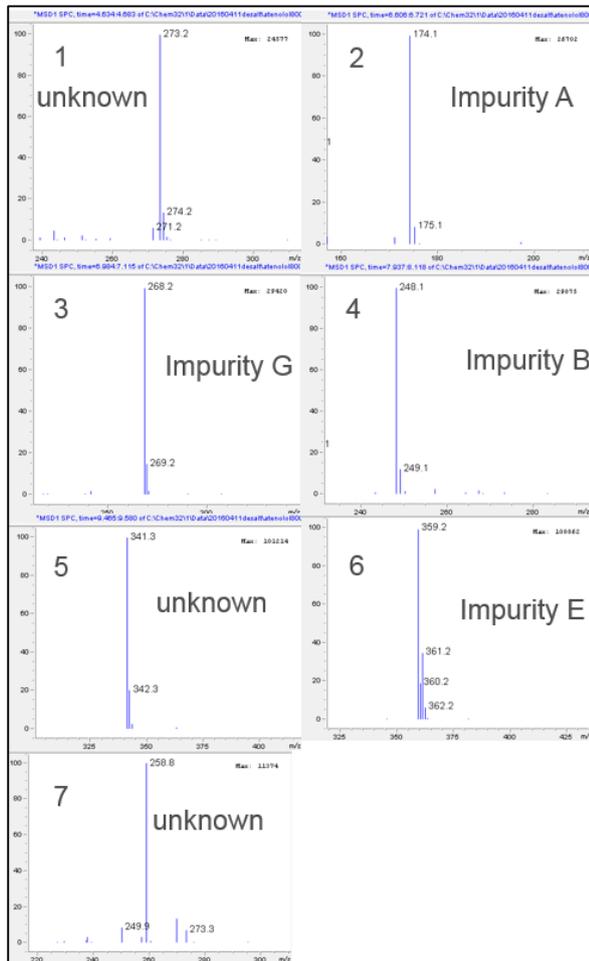


Fig.3 LC/MS に導入されたピークのマスペクトル

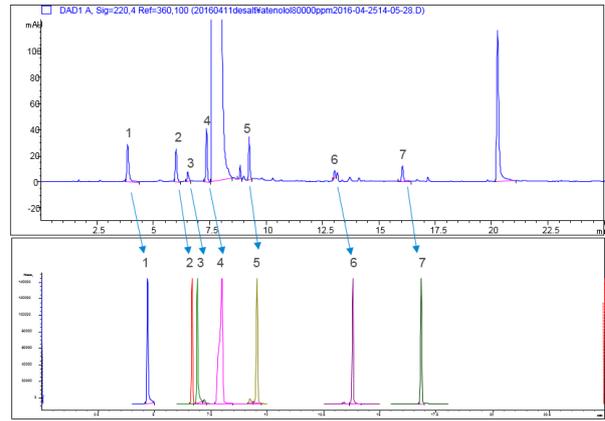


Fig.4 UV クロマトグラムとマスククロマトグラム

本システムで得られたマスペクトルを Fig.3 に示しました。それぞれの不純物ピークの分子量関連情報を得ることができ、一部のピークは既知の不純物と一致しました。

それぞれの不純物に由来するマスククロマトグラムと一次元目の UV クロマトグラムと並べて表示させた図を Fig.4 に示しました。

脱塩カラムの後方に六方バルブを接続し、カラムに非保持の画分をバルブカットすることも可能でした。これにより不揮発性移動相の流入を完全にカットした状態で LC/MS に導入できるため、イオン源の汚染のリスクをさらに減らすことができました。

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。通常不揮発性移動相では確認することができない分子量関連情報を得ることができました。また、脱塩カラムの後ろに六方バルブを追加することで、非保持の画分をカットすることができました。

【LC-MS-201606HK-004】

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