



HILIC カラム分析における低容量注入の再現性



<要旨>

HILIC カラムを使用した分析では、注入量を増やすとピーク形状が悪くなることがあります。そこで Agilent Infinity II LC を用いて、低容量注入での再現性を検証しました。その結果、わずか 0.1 μL 注入でも再現性は 4.01 % (面積%RSD 評価) であり、Agilent Infinity II LC は HILIC カラム分析において有効なツールであることが示されました。

Key Words: 親水性化合物、HILIC カラム、LC/MS/MS、低容量注入再現性

1. はじめに

親水性相互作用クロマトグラフィ (HILIC) は一般的な逆相分配クロマトグラフィでは保持しない高極性の化合物を保持し、分離することができます。また有機溶媒比率が高い条件で高極性化合物を溶出することができます。そのため、LC/MS 分析においては脱溶媒効率が高い条件でサンプルをイオン化でき、感度向上が期待できる分離手法として知られています。

しかしながら、HILIC カラムを用いた分析では、注入量を増やすとピーク形状が崩れてしまう事が知られており、LC の低容量領域での注入再現性が分析の精度を決定づけることもあります。そこで Agilent Infinity II LC を用いて、極性化合物であるウラシルを測定対象とし、HILIC カラムでの分析を検討しました。

2. 実験条件

装置には Agilent Jet Stream (AJS) イオン源を装着した Agilent Technologies 製 Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS を使用しました。分析用カラムには Agilent Technologies 製 AdvancedBio Glycan を使用しました。このカラムの充填剤表面はアミド基で修飾されており、極性化合物を HILIC モードで分離することができます。移動相にはアセトニトリル及び 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液を使用しました。その他分析条

件は表 1 に示した通りです。

表 1. LC/MS の分析条件

HPLC	: Agilent 1290 Infinity II LC
カラム	: AdvancedBio Glycan 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm , (P/N:685775-913)
カラム温度	: 40 $^{\circ}\text{C}$
移動相	: A: 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : B: アセトニトリル 90 %B (イソクラテック)
流速	: 0.25 mL/min
注入量	: 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 μL
MS	: Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS
イオン化法	: Agilent Jet Stream (ESI, Negative)
ネブライザ圧力	: 50 psi
ドライガス	: 13 L/min at 250 $^{\circ}\text{C}$
シースガス	: 12 L/min at 350 $^{\circ}\text{C}$
キャピラリー電圧	: 1500 V
ノズル電圧	: 0 V
フラグメンタ	: 100 V
コリジョン	: 25 V
モニタイオン	: 111.0 > 42.2

3. 結果および考察

図 1 に、0.1、0.5、1.0 および 2.0 μL 注入量における、ウラシルの SRM クロマトグラムを示しました。ウラシルの濃度は 1 $\mu\text{g/L}$ で、希釈溶媒は水を用いました。半値幅はそれぞれ、0.050、0.066、0.101、0.181 分でした。注入量が 0.1 μL から 0.5 μL に増加した場合は、半値幅はわずかに増加するだけにとどまりましたが、0.5 μL から 1.0 μL からに増えた場合は、半値幅が約 1.5 倍になることが分かりました。この結果から、ウラシルを HILIC カラムで分析するためには、低容量



注入を行う必要があることが示されました。そこで次に、各注入量における再現性を検討しました。

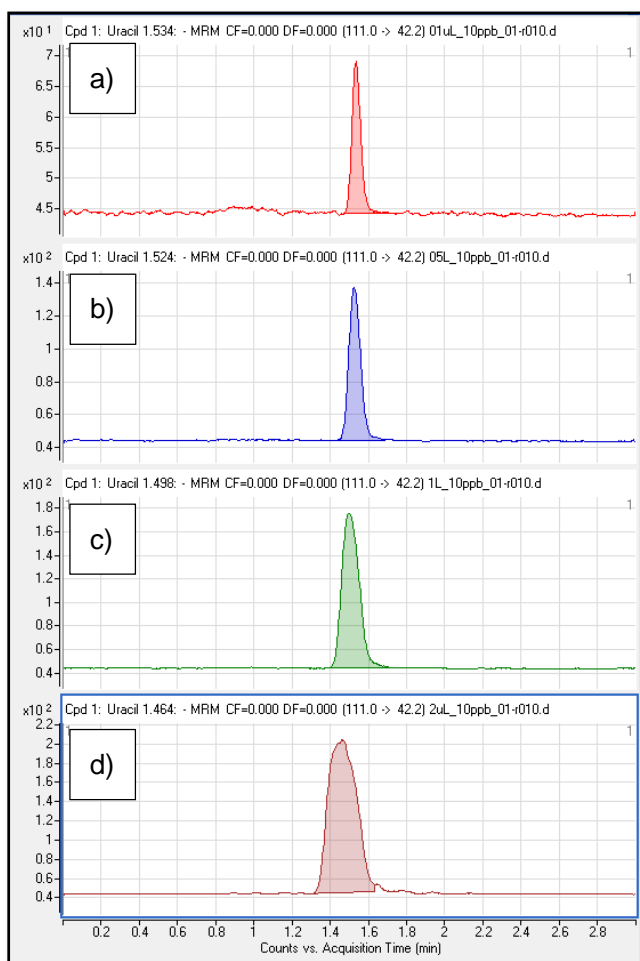


図 1. 注入量を変えた時のウラシルの SRM クロマトグラム。注入量は a) 0.1 µL、b) 0.5 µL、c) 1.0 µL、d) 2.0 µL。

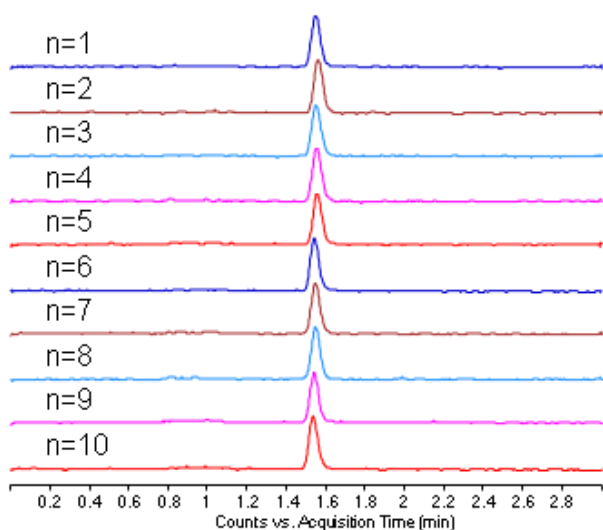


図 2. 0.1 µL 注入の繰り返し SRM クロマトグラム

表 2. 各注入量における再現性のまとめ

Data	0.1 µL			0.5 µL		
	RT	Area	Height	RT	Area	Height
n=1	1.548	82.8	25.8	1.524	399	92
n=2	1.561	78.1	23.5	1.521	399	90
n=3	1.548	74.5	21.6	1.524	389	90
n=4	1.555	73.8	21.5	1.528	401	94
n=5	1.555	77.7	24.2	1.518	406	94
n=6	1.541	81.3	26.0	1.524	384	88
n=7	1.544	79.8	25.3	1.521	382	88
n=8	1.548	82.3	25.4	1.521	395	91
n=9	1.541	80.4	26.1	1.518	402	95
n=10	1.534	82.0	25.0	1.524	405	93
average	1.548	79.3	24.4	1.522	396	91
%RSD	0.505	4.01	7.08	0.213	2.13	2.70

Data	1 µL			2 µL		
	RT	Area	Height	RT	Area	Height
n=1	1.504	771	122	1.451	1613	147
n=2	1.504	799	125	1.441	1579	149
n=3	1.498	812	129	1.444	1667	154
n=4	1.501	821	132	1.444	1632	154
n=5	1.514	814	133	1.464	1599	147
n=6	1.504	801	127	1.451	1635	156
n=7	1.504	806	126	1.441	1653	154
n=8	1.498	835	131	1.451	1675	155
n=9	1.504	844	138	1.467	1692	156
n=10	1.498	841	132	1.464	1657	159
average	1.503	814	129	1.452	1640	153
%RSD	0.336	2.72	3.52	0.697	2.16	2.73

図 2 には、10 回繰り返し分析の SRM クロマトグラム重ね書きを示しました。すべての SRM クロマトグラムにおいてピーク形状が良好で、保持時間もほぼ一致していることが示されています。解析結果は表 2 にまとめました。その結果、わずか 0.1 µL 注入でも再現性は 4.01% (面積 %RSD 評価) と非常に良好であることがわかりました。また、0.5 µL 注入では再現性が 2.13% でした。以上より、Agilent Infinity II LC は HILIC カラムのパフォーマンスを最大限に引き出せるツールであり、MS のインレット LC として優れた性能を発揮できる LC であることが示されました。

【LC-MS-201703YD-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
www.agilent.com/chem/jp