

LC/MS と Agilent Poroshell HPH C18 を 用いた低 pH および高 pH における 乱用薬物の分析

アプリケーションノート

低分子医薬品

著者

William Long
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

このアプリケーションノートでは、ポジティブイオンモードのエレクトロスプレー (ESI+) で汎用グラジエントを用いて、高および低 pH における乱用薬物に関する複数の化合物の LC/MS を比較します。通常、分析対象分子のイオン化状態は移動相の pH に左右され、塩基性化合物が中性になる高 pH 移動相では、ポジティブイオンモードのエレクトロスプレーにおける LC/MS のイオン化効率が大幅に低くなるものと予想されます。しかし、各種のサンプル (タンパク質、ペプチド、アミノ酸など) を検証した多くの研究では、移動相 pH の増大に影響を受けないか、感度が向上する場合もあることが観察されています [1-6]。高 pH 移動相は ESI+ における塩基性化合物のイオン化を抑制しません。ポジティブイオンは豊富に形成され、多くの場合、高 pH における分析対象成分のレスポンスは、低 pH の酸性移動相よりも向上します。この知見は重要です。というのも、汎用的な溶出メソッドの適用範囲を、これまでは保持が難しかった極性のある塩基性化合物の分析にまで広げることが可能になるためです。

ただし、高 pH 条件は、従来のシリカ HPLC カラムに損傷を与えることが明らかになっています。Agilent Poroshell HPH C18 などの高 pH での耐久性を高めた新しいカラムを使えば、高 pH でもカラム寿命に悪影響を与えずに、pH の制御を利用して選択性と感度を調整することが可能です。これらのカラムを使用したクロマトグラフィー分析では、表面多孔性粒子技術を用いたメソッド開発において広範な pH を調査することができます。この技術は高い効率と速度のために、ますます広く採用されるようになっていきます [7]。



Agilent Technologies

メソッド

実験では、Agilent 6460 トリプル四重極質量分析計を検出器とした Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。これは、以下で構成されます。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ。最大 1,200 bar での送液に対応し (G4220A)、溶媒バイパスバルブ内は PEEK シール (ロータシール PEEK FL p/n 5068-0171)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (TCC) (G1316C)
- PEEK ロータシール (5068-0170 ロータシール PEEK FL) を用いた Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent Poroshell HPH C18、3 × 100 mm、4 μm (p/n 695970-502)

PEEK FL シールは炭酸水素アンモニウム緩衝液で使用します。Agilent 1290 シリーズ機器の標準ロータシールはポリイミドを原料としており、限定的な pH 範囲 (1~10) をサポートしています。PEEK FL ロータシールは特殊な PEEK 混合材料を原料としており、より広範な pH 範囲 (1.0~12.5) をカバーしています。UHPLC は A-line ラックに取り付けられました。システムは、分散を最小限に抑えるために、0.075 μm のチューブで配管されました。これにより、内径 0.12 mm または 0.17 mm の従来のチューブよりも背圧が高くなりますが、4 μm の Poroshell HPH C18 には圧力がほとんど発生しないため、問題はありません。表 1 には MRM トランジションとモニタリングされたイオンが表示されています。

ギ酸アンモニウムとギ酸各 5 mM を用意し、pH 3 の低 pH 緩衝液を調製しました。ギ酸アンモニウムは Sigma-Aldrich から、再蒸留ギ酸は GFS から購入しました。pH 10.5 の緩衝液を調整するために使用された炭酸水素アンモニウムと水酸化アンモニウムは Sigma-Aldrich から供給されました。

表 1. この実験で使用された化合物用の MRM トランジション

化合物	プリカーサ イオン	フラグメンタ 電圧	プロダクト イオン 1	コリジョン エネルギー 1	プロダクト イオン 2	コリジョン エネルギー 2
ストリキニーネ	335.2	195	184	41	156	53
アルプラゾラム	309.1	179	281	25	205	49
MDMA	194.1	97	163	9	105	25
アンフェタミン	136.1	66	119.1	5	91	17
トラゾドン	372.2	159	176	25	148	37
メベリジン	248.2	128	220.1	21	174.1	17
ベラパミル	455.3	158	165	37	150	45
メサドン	310.2	112	265.1	9	105	29
プロアジフェン	354.2	153	167	29	91.1	45
ジアゼパム	285.1	169	193	45	154	25
THC	315.2	150	193.2	20	123.3	30

結果と考察

このアプリケーションノートでは、これらの化合物の溶出を、塩基性移動相における場合と酸性移動相における場合で比較した結果、塩基性化合物は塩基性移動相においてより長時間保持されることが明らかになっています。塩基性化合物は完全にプロトン化され、逆相 HPLC におけるイオン性化合物よりも良好に保持されます。これらの化合物はより良好に保持されるため、より多様な溶媒の調整が可能です。これにより、図 1 で示されるように、より良好なピーク間隔を実現します。グラジエントと移動相の条件は図 1 に示されています。最後に、酸性移動相よりも塩基性溶媒において、一部の成分のピークが大きくなっています。塩基性移動相では、トラゾドン、ベラパミル、メサドン、プロアジフェンのピークが大幅に大きくなっています。これは pH の影響によることもありますが、化合物がより長期間保持され、より高い有機移動相で溶出していることも一因となっています。

結論

Agilent Poroshell HPH-C18 は、pH 10 炭酸水素アンモニウム緩衝液などの高 pH 移動相を用いて、長期 (注入 2,000 回以上) にわたって使用できることがすでに明らかになっています。したがって、クロマトグラフィー分析では、表面多孔性粒子技術を用いたメソッド開発において広範な pH を調査することができます。この技術は高い効率と速度のために、ますます広く採用されるようになっていきます。表面多孔質粒子を用いた高 pH 移動相の使用は有効かつ実用的な方法です [8]。

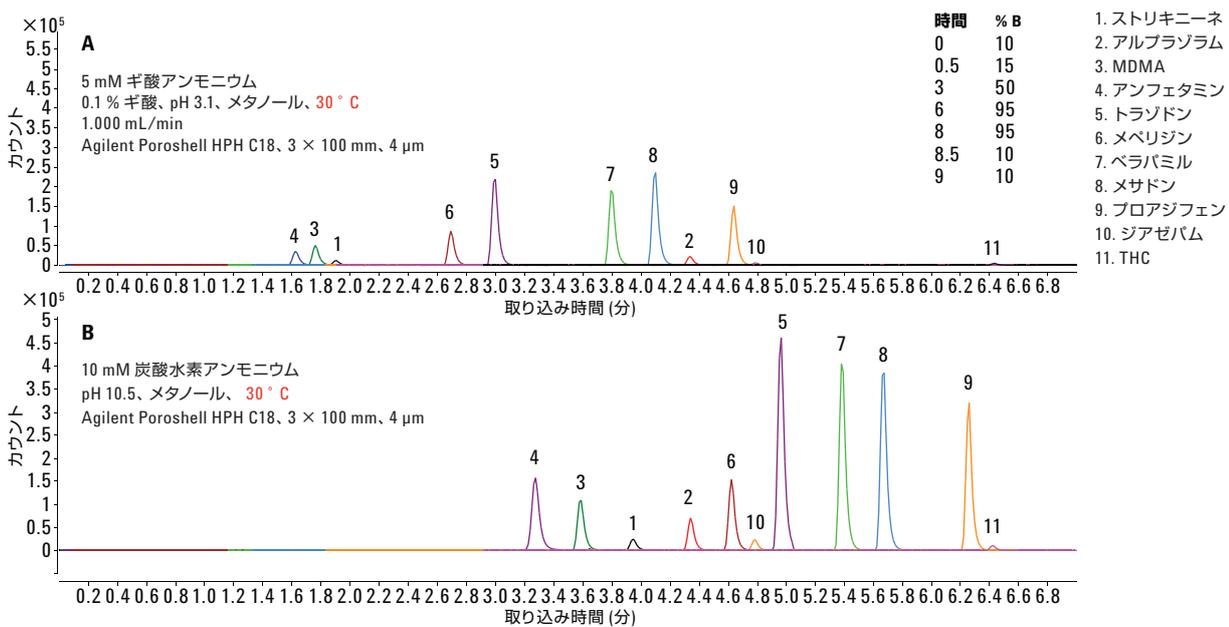


図 1. Agilent Poroshell HPH C18、4 µm カラムを用いた低および高 pH における分離

参考文献

1. R. Chirita-Tampu; C. West, L;Fougere; C. Elfakir. Advantages of HILIC Mobile Phases for LC-ESI-MS-MS Analysis of Neurotransmitters. *LCGC Europe*. **2013**, *26*, 128-140.
2. H. P. Nguyen; K. A. Schug. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1465-1480.
3. S. Zhou; K. D. Cook, J. Am. Soc. Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-way-round or right-way-round? *Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 961-966.
4. B. E. Boyes. Separations and Analysis of Peptides at High pH. 4th WCBP, San Francisco Ca. **2000**.
5. F. E. Kuhlmann; A. Apffel; S. M. Fischer; G. Goldberg; P. Goodley. Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 1221-1225.
6. C. R. Mallet; Z. Lu; J. R. Mazzeo, Rapid Commun. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 49-56.
7. W. J. Long; A. E. Mack; X. Wang; W. E. Barber. Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles. *LCGC* **2015**, *33* (4).
8. A. E. Mack; J. R. Evans; W.J. Long. *Fast Analysis of Illicit Drug Residues on Currency using Agilent Poroshell 120*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication Number. 5990-6345EN, **2010**.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem

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損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

©Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan

December 11, 2015

5991-6523JAJP



Agilent Technologies