

## 親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と LC/MS によるパラコートとジクワットの高速分離

### 著者

Andrew Kennedy and  
Adam Bivens  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

このアプリケーションノートでは、次世代の Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムと親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) を用いて、特に分析が困難なパラコートとジクワットのペアを分離する方法について説明します。パラコートとジクワットは、含有する 2 つの 4 級アンモニウム基が原因で高極性になるため、逆相クロマトグラフィーでは保持や分離が簡単には行えません。従来は、これらの化合物の保持を誘発するために、一般的にイオンペアリング剤が用いられていました。しかし、この手法は、システムの汚染、高いバックグラウンド、シグナルの抑制などの制限によって悪影響を受けるため、これらの問題を解決するために、HILIC カラムを用いて分析をしました。

## はじめに

逆相クロマトグラフィーでは非極性固定相が用いられていますが、これにより多数の極性農薬の保持と分離が妨げられています。

イオンペアリングは、極性化合物の保持と分離に使用されている従来の手法です。ただし、この手法には次に示す 2 つの大きな欠点があります。

- イオンペアリング剤は、使用後長時間が経過すると LC/MS システムを汚染する可能性があり、高いバックグラウンドを引き起こしたり、カラムの選択性を変更させたりする原因にもなります。
- イオンペアリング剤を分析するためのモードで動作させると、バックグラウンドが非常に高くなり分析対象物の信号が抑制されてしまうため、MS 分析は 1 イオン化モードでの動作に限定されてしまいます。

これとは反対に、HILIC は逆相クロマトグラフィーと同じシステムと溶媒を使用している一方で、イオンペアリングが原因の問題を発生させずに、極性化合物の保持と分離を行える手法です。

ただ HILIC での分析が困難な原因は、パラコートとジクワットに強い正の電荷を与えていることです。この場合、表面のシラノールとの相互作用により深刻なテーリングを引き起こし、カラム上で過剰に長い時間保持されてしまいます。次世代の Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムは、新しい両性イオンベース相を採用することでこの制限を克服しており、優れたピーク形状を得られます。

## 実験方法

### 試薬および薬品

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。超高純度 LC/MS グレードのアセトニトリルは J. T. Baker (センターバレー、ペンシルベニア州、米国) から購入しました。純水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用しました。ギ酸 (FA、p/n G2453-85060) は Agilent Technologies から入手しました。ギ酸アンモニウム、パラコート標準、およびジクワット標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。

### 実験器具と材料

- Agilent InfinityLab フィッティング
  - **カラム入口:** Agilent クイックコネクト (p/n 5067-5965)
  - **カラム出口:** Agilent クイックターン (p/n 5067-5966)
- バイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付、認定、2 mL、100 個 (p/n 5182-0716)
- Agilent 圧着スクリュューキャップ、PTFE/赤シリコンセプタム (p/n 5190-7024)
- Agilent バイアルインサート、250  $\mu$ L、不活性ガラス、樹脂足付 (p/n 5181-8872)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- 超遠心機 (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- Vortexer および Multi-Tube Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1,000 mL (p/n 9301-6526)
- Agilent InfinityLab セーフティキャップ、GL45、3 ポート、ベントバルブ x 1 (p/n 5043-1219)

### 装置構成

- Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity LC シリーズ用 Agilent 超低分散キット (p/n 5067-5189)
- Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア
- Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS
- Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース

### サンプル前処理

パラコートおよびジクワット標準は 0.25 mM 水溶液に混合し、それ以上のサンプル前処理は行わずに分析しました。

### 移動相前処理

200 mM ギ酸アンモニウム原液を水で調製し、ギ酸で pH 3 に調整しました。移動相 A (水性) は原液を水で 9:1 に希釈して調製し、移動相 B (有機) は原液をアセトニトリルで 9:1 に希釈して調製しました (両移動相の最終イオン強度 = 20 mM)。

## 分析条件

HPLC	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-924)
移動相 A	20 mM ギ酸アンモニウム水溶液、pH = 3
移動相 B	20 mM ギ酸アンモニウム、pH = 3, 90 % アセトニトリル
流量	0.80 mL/min
カラム温度	30 °C
注入量	0.25 μL
合計分析時間	8 分
グラジエント	時間 (分)    % B
	0                80
	1                80
	5                73
	6                80
8                80	
MS	
イオン化モード	ESI ポジティブ
ガス温度	300 °C
ガス流量	7.0 L/min
ネブライザ	45 psi
シースガス温度	400 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリ電圧	3,500 V
ノズル電圧	0 V

## 結果

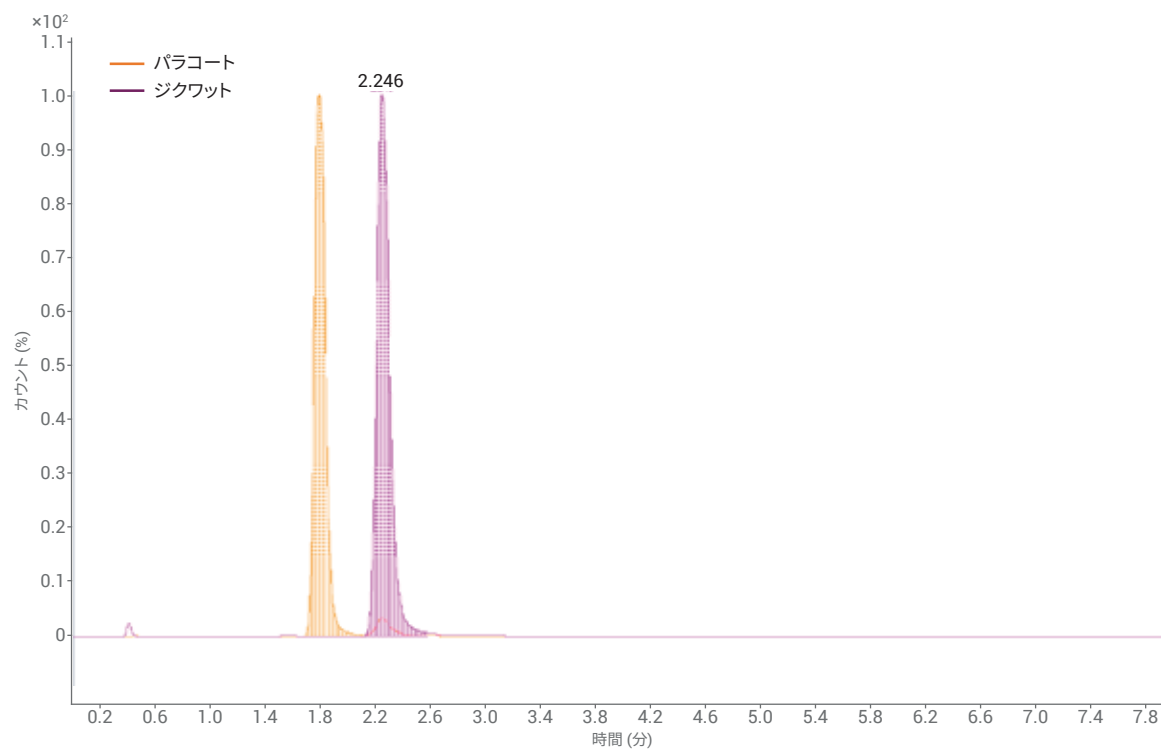


図 1. Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS システムと Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムによるパラコートとジクワットの分離

## 結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムにより、分析困難なパラコートとジクワットのペアを適切に分離することができ、条件と溶媒によってイオン抑制や汚染が発生することはなく、MS に適したワークフローが得られました。

ピークは最小のテーリングでベースライン分離されており、電荷中性表面の重要性とカラムの高い分離能力が示されました。

InfinityLab Poroshell HILIC-Z カラムを用いた HILIC ワークフローは、従来のイオンペアリングと比較して、システムを汚染せず MS の高い性能を制限なく活かすことができ、極性化合物の高品質なクロマトグラフィーを実現します。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、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. 2017

Printed in Japan, December 18, 2017

5991-8830JAJP