

InfinityLab Pro iQ および OpenLab CDS を 用いた高性能 MS ベース分取

著者

野田 莉帆
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

シングル四重極 LC/MS を搭載した分取精製システムを用いて、さまざまな条件で分取精製を行いました。ディレイキャリブレーションを実施することで、正確にトリガー検出器とフラクションコレクタの間のディレイを算出し、高純度・高回収率の分取精製が実現可能であることを示しました。さらに、MS 検出をトリガーとして利用することで、UV 吸収のない化合物や複雑なマトリクスを含む試料に対しても高い選択性で分取でき、従来の UV ベース分取より柔軟な分取設定が可能となります。これにより、分取精製ワークフローの効率化が期待できます。

測定システム

Agilent 1260 Infinity II 分取精製 LC/MSD システム

- G7111B クォータナリポンプ
- G7129A バイアルサンブラ
- G7130A カラムオープン
- G7114B 可変波長検出器
- G7170B MS フローモジュレータ
- G7111B クォータナリポンプ (VL)
- G1364F フラクシオンコレクタ
- G6160B シングル四重極 LC/MS, Pro iQ
- ソフトウェア OpenLab CDS version 2.8 FP2

回収率・純度向上のため、ディレイキャリブレーションを実行し、検出器とフラクシオンコレクタの到達時間の差を正確に計測・登録しました。

すべてのデータの取得は、Scan および SIM の同時取り込みとしました。MS 分取ターゲットの設定に基づき、SIM イオンは自動的に割り当てられました。

1. MS トリガーによるポジティブ/ネガティブターゲットイオンの同時分取

条件

市販栄養ドリンクを 0.2 μm のフィルタ濾過し、サンプルとしました。分析条件は表 1 に示します。

モノアイソトピック質量 456.0 および 466.0 の化合物について、ポジティブおよびネガティブイオン化モードにおけるプロトン化体および脱プロトン化体を、それぞれ独立したターゲットとして選択しました。

Pro iQ ベースの MS ベース分取精製では最大 4 種のトリガー条件を設定可能であり、今回はプロトン付加体をトリガー A、プロトン脱離体をトリガー D に割り当てました (図 1, 2)。トリガーの組み合わせには OR を使用しました。

表 1. 分析条件

市販栄養ドリンク	
カラム	Poroshell 120 EC-C18 4.6*50 mm, 4 μm (PN : 699970-902)
移動相	A : 0.1 % ギ酸水溶液 B : アセトニトリル 5 %B (0-1 min) →50 %B (10 min) →100 %B (10.1-12 min)
流量	1.2 mL/min
メイクアップ	10 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル = 1/1,v/v 0.5 mL/min
UV	220 nm
注入量	10 μL
カラム温度	40 °C
フローモジュレータスプリット比	100:1 (希釈率 1:50)
MS	ESI-Positive, Negative 同時採取
ドライガス	13 L/min at 350 °C
ネプライザ圧力	50 psi
キャピラリ電圧	3000 V
フラグメンタ電圧	100 V
分取トリガー付加体とトリガー条件 組み合わせ	プロトン付加体 トリガー条件 A プロトン脱離体 トリガー条件 D
分取スレッシュホールド値	A 60,000 D 1,000

フラクシオンコレクション

有効 無効

UV	MS	MS ピークトリガー			
		MS 1	MS 2	MS 3	MS 4
使用		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ピーク検出器		G6160B: SG2526R102	G6160B: SG2526R102	G6160B: SG2526R102	G6160B: SG2526R102
使用するシグナル		A	B	D	NOT
ピーク検出モード		スレッシュホールド	スレッシュホールド	スレッシュホールド	スレッシュホールド
スレッシュホールド		60000.000 カウント	50000.000 カウント	1000.000 カウント	100000.000 カウ...
アップスロープ		7327.27 カウント/s	5.00 カウント/s	31611.39 カウント...	5.00 カウント/s
ダウンスロープ		52906.44 カウント...	5.00 カウント/s	2023.39 カウント/s	5.00 カウント/s
上限スレッシュホールド		2000000.000 カ...	1500000.000 カ...	1500000.000 カ...	1500000.000 カウ...
ピーク採取時間を制限		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ピーク採取時間		30.000 sec	30.000 sec	30.000 sec	30.000 sec

トリガーの組み合わせ

AND
 OR
 AND/OR
 複合条件

図 1. フラクシオンコレクタ設定画面

結果

分取結果を図 3 に示します。ターゲット 466 のプロトン付加イオン (緑) に基づいてトリガー設定を行った場合、単一のトリガー条件ではターゲット 456 (ピンク) の回収率を最大化することは困難でした。しかし、複数のトリガー条件を併用することで、両ターゲットを良好に分取することが可能となりました。

複数のトリガー条件を設定することにより、感度にかかわらずさまざまな化合物を同時に効率よく分取可能であることが示唆されました。

結果画面では、フラクション位置、容量、トリガー情報などの情報を一目で確認できます。

化合物の編集

化合物

化合物名	分子式	モノアイソトピック質量	フラクションコレクタ ピークトリガー
Compound1		456.0	A
2		466.0	A
Compound1-n		456.0	D
2-n		466.0	D

ドwell (ms) 20

付加

ポジティブイオン

- electron
- +H
- +Na
- +K
- +NH4

ネガティブイオン

- +electron
- H
- +Cl
- +Br
- +HCOO
- +CH3COO
- +CF3COO

電荷の状態

- 1
- 2
- 3

化合物名	分子式	付加イオン種	z	モノアイソトピック質量	フラクションコレクタ ピークトリガー	m/z	極性
Compound1		(M+H)+	1	456.0	A	457.0	ポジティブ
2		(M+H)+	1	466.0	A	467.0	ポジティブ
Compound1-n		(M-H)-	1	456.0	D	455.0	ネガティブ
2-n		(M-H)-	1	466.0	D	465.0	ネガティブ

適用

表 2. トリガー設定

ポジティブイオンにはトリガー A を、ネガティブイオンにはトリガー D を選択しました。



図 3. 複数トリガー条件を適用した場合の分取結果画面

2. UV 吸収を持たない化合物の高選択性分取

条件

表 2. 分析条件

PEG	
カラム	Poroshell 120 EC-C18 4.6*50 mm 4 μm (PN : 699970-902)
移動相	A : 超純水 B : アセトニトリル 20 %B (0 min) ---40 %B (10 min) ---20 %B (10.1-13 min)
流量	1.2 mL/min
メイクアップ	10 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル = 4/6,v/v 0.5 mL/min
UV	220 nm
注入量	10 μL
カラム温度	40 °C
フローモジュレータスプリット比	100:1 (希釈率 1:50)
MS	ESI-Positive
Scan 範囲	m/z 150 - 1000
ドライガス	13 L/min at 350 °C
ネブライザ圧力	50 psi
キャピラリ電圧	3000 V
フラグメンタ電圧	150 V
分取トリガー 付加体	2 価、プロトン付加体、アンモニウム付加体
分取スレッシュールド値	A : 100,000 NOT : 500,000

サンプルは ポリエチレングリコール (PEG、PL2070-7001 Mp 1.5 k) を超純水で溶解させ分析に供しました。

ターゲットは 重合度 31 の PEG プロトン付加およびアンモニウム付加の 2 価イオンを選択しました (図 4-a)。フラクションコレクタのトリガーは A を選択しスレッシュールド 100,000 としました。

さらに、高純度なフラクションを得るため、近接ピークである重合度 30 および 32 のピークが設定したスレッシュールド値以下になるまで分取を行わない NOT トリガーを追加しました (図 4-b)。フラクションコレクタ設定画面 (図 1) において、使用シグナルに NOT を指定し、スレッシュールドを 500,000 に設定しました。

結果

図 5 に、NOT 設定の有無による分取結果を示します。重合度 31 のイオンはいずれの条件でも検出され、MS トリガーにより選択的に分取されました。NOT 設定を適用した場合には、近接する重合度 30 および 32 のピークが一定値以下になるまで分取を抑制するため、分取容量が少なくなり、不要なピークを効果的に除外できました。

さらに、得られた画分を再分析した結果を図 6 に示します。NOT トリガーを適用した条件では、近接ピークの影響が排除され、より純度の高いフラクションが得られたことが確認できました。

化合物の編集

化合物

化合物名	分子式	モノアイソトピック質量	フラクシヨコレクタ ピークトリガー
n-31	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 1OH	1382.8	A

ドウェル (ms) 20

付加

ポジティブイオン

- electron
- +H
- +Na
- +K
- +NH₄

ネガティブイオン

- +electron
- H
- +Cl
- +Br
- +HCOO
- +CH₃COO
- +CF₃COO

電荷の状態

- 1
- 2
- 3

(+NH₄)⁺

(M+(NH₄)+H)²⁺

(M+2(NH₄))²⁺

化合物名	分子式	付加イオン種	z	モノアイソトピック質量	フラクシヨコレクタ ピークトリガー	m/z	極性
n-31	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 1OH	(M+2(NH ₄)) ²⁺	2	1382.8	A	709.4	ポジティブ
n-31	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 1OH	(M+2H) ²⁺	2	1382.8	A	692.4	ポジティブ

適用

化合物の編集

化合物

テーブルの最後に行を追加

化合物名	分子式	モノアイソトピック質量	フラクシヨコレクタ ピークトリガー
n30	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 0OH	1338.8	NOT
n-31	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 1OH	1382.8	A
n32	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 2OH	1426.8	NOT

ドウェル (ms) 20

付加

ポジティブイオン

- electron
- +H
- +Na
- +K
- +NH₄

ネガティブイオン

- +electron
- H
- +Cl
- +Br
- +HCOO
- +CH₃COO
- +CF₃COO

電荷の状態

- 1
- 2
- 3

(+NH₄)⁺

(M+(NH₄)+H)²⁺

(M+2(NH₄))²⁺

化合物名	分子式	付加イオン種	z	モノアイソトピック質量	フラクシヨコレクタ ピークトリガー	m/z	極性
n30	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 0OH	(M+2(NH ₄)) ²⁺	2	1338.8	NOT	687.4	ポジティブ
n30	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 0OH	(M+2H) ²⁺	2	1338.8	NOT	670.4	ポジティブ
n-31	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 1OH	(M+2(NH ₄)) ²⁺	2	1382.8	A	709.4	ポジティブ
n-31	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 1OH	(M+2H) ²⁺	2	1382.8	A	692.4	ポジティブ
n32	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 2OH	(M+2(NH ₄)) ²⁺	2	1426.8	NOT	731.4	ポジティブ
n32	H(C ₂ H ₄ O) ₃ 2OH	(M+2H) ²⁺	2	1426.8	NOT	714.4	ポジティブ

適用

図 4. トリガー設定

PEG の重合度 31 のみをトリガーとする設定 (a) および 重合度 30,32 を NOT とする設定 (b) の例

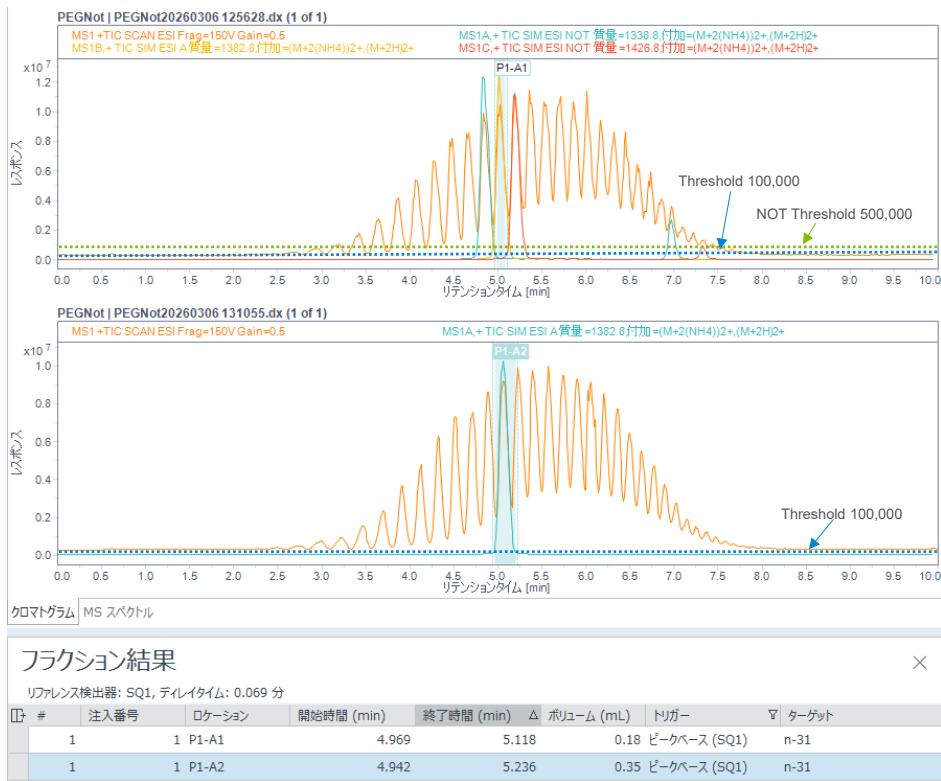


図 5. NOT 設定なし (下)、NOT 設定あり (上) の場合の分取結果比較

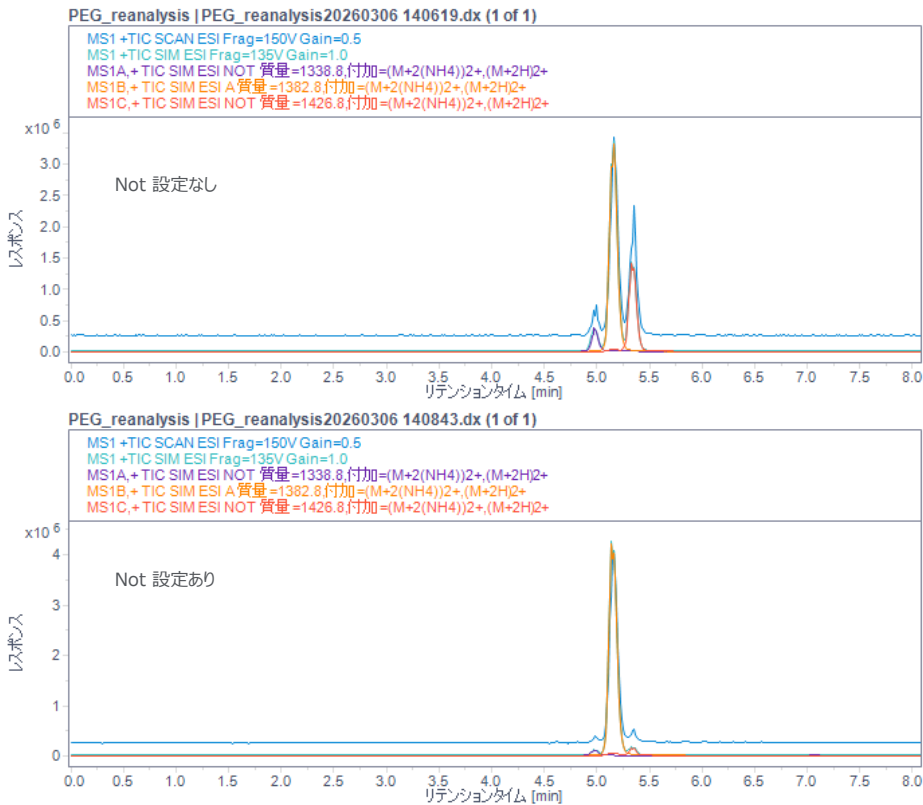


図 6. 再分析結果 (上: NOT 設定なし、下: NOT 設定あり)

3. 多価イオン検出によるペプチド高感度 MS トリガー分取

条件

表 3. 分析条件

Peptides	
カラム	Poroshell CS-C18 4.6*50 mm 2.7 um (PN : 699975-942)
移動相	A : 0.2 %TFA 水溶液 B : アセトニトリル 10 %B (0 min) --80 %B (10 min) --10 %B (10.1-13 min)
流量	1.2 mL/min
メイクアップ	0.3 % ギ酸水溶液 / アセトニトリル = 3/7,v/v 0.5 mL/min
UV	220 nm
注入量	20 uL
カラム温度	40 °C
フローモジュレータスプリット比	100:1 (希釈率 1:50)
MS	ESI-Positive
Scan 範囲	m/z 100-1600
ドライガス	13 L/min at 350 °C
ネブライザ圧力	50 psi
キャピラリ電圧	3000 V
フラグメンタ電圧	150 V
分取トリガー付加体	3-7 価、プロトン付加体 トリガー A
分取スレッシュホールド値	MS トリガー A 4,000 UV 200 mAU

サンプルは Parathyroid Hormone (ペプチド研より購入) を超純水に溶解したものを使用しました。

ターゲット化合物の分子式 (C181H291N55O51S2) を入力し、ターゲットとして、プロトン付加体の 3-7 価のイオンを設定しました。トリガーとして、MS のトリガー A のトリガーをスレッシュホールド 4,000 かつ UV のトリガーをスレッシュホールド 200 mAU、トリガーの組み合わせは AND としました。

結果

図 7 に示すように 3-7 価のイオンを良好に検出し、分取することが可能でした。一般的に TFA を移動相で使用する場合、MS での感度低下が想定されますが、メイクアップ溶液としてギ酸溶液を用いることで、良好なピーク形状と MS での感度を損なうことなく分取・マススペクトル確認することができました。

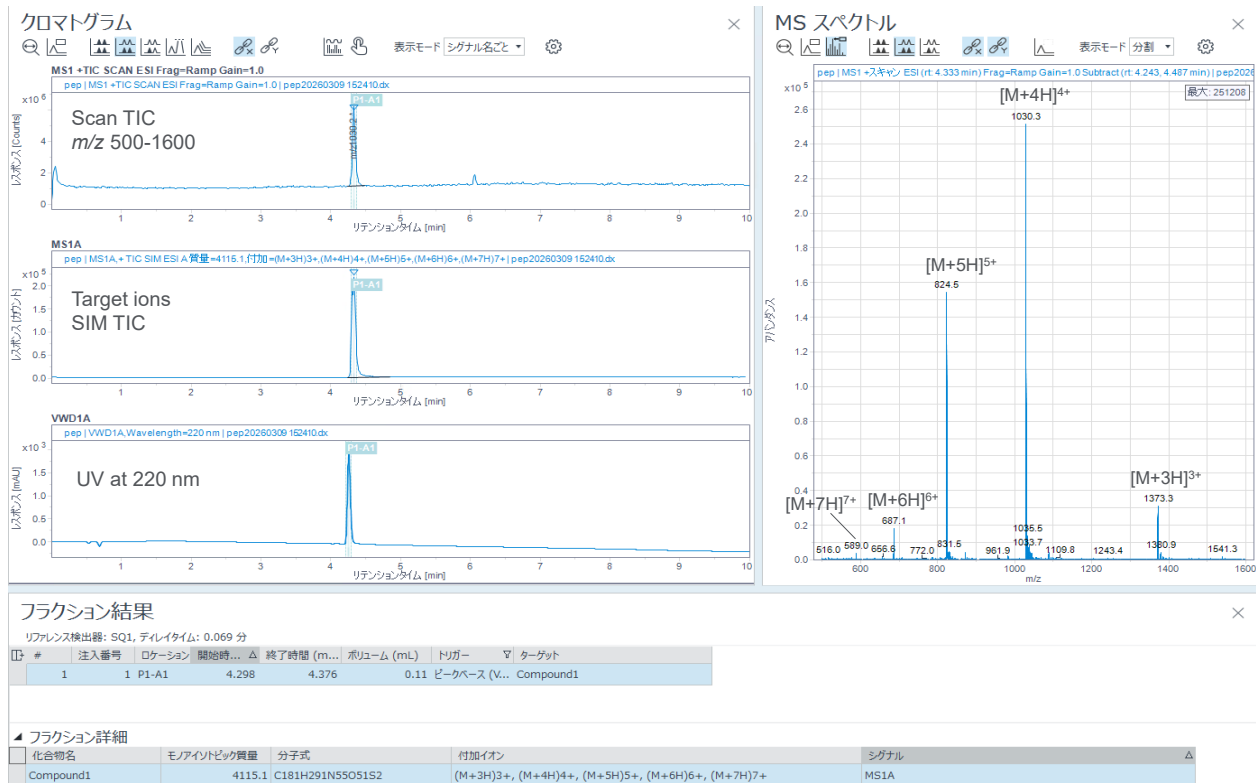


図 7. ペプチド分取精製結果

まとめ

Pro iQ を搭載した分取精製システムを用いて、さまざまな条件で分取性能を評価しました。MS 検出を使用することで、UV 吸収を持たない化合物や複雑な試料であっても高い選択性を示し、より高純度に分取精製できることが明らかになりました。また、OpenLab CDS の柔軟なトリガー設定機能により、多様な条件の組み合わせで分取の制御を行うことが可能であり、高純度かつ高回収率の分画を得ることができます。これにより分取精製ワークフローの効率化が期待できます。

参照

1. [Purify with Ease Using Mass-Based Fraction Collection with InfinityLab Pro iQ and OpenLab CDS](#)
5994-8704EN
1. [Agilent 1260 Infinity II 分取精製 LC/MSD システムを用いた油脂中トリアシルグリセロールの MS ベース分取](#)
5994-7880JAJP

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

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いません。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。

DE-013573

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2026

Printed in Japan, April 3, 2026

5994-9134JAJP