

InfinityLab LC/MSD iQ による UV 吸収を持たない化合物の分析 ～エチレングリコール・脂肪酸～



Authors

林 慶子
内藤 厚子
澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

HPLC で UV 吸収を持たない化合物を検出するためには、RID（示差屈折率検出器）や ELSD（蒸発光散乱検出器）を使用します。

RID はさまざまな化合物の検出に適用できますが、グラジエント分析には適しません。一方 ELSD はグラジエント分析が可能です。揮発性化合物の検出は不利なケースが多く、検量線は累乗近似曲線となります。

InfinityLab LC/MSD iQ は、HPLC 分析のための MS 検出器です。一般的な MS 検出器に必要なメソッドパラメータ設定を省略する自動測定モードが実装されています。本アプリケーションノートでは UV 検出器では分析が困難なエチレングリコールの定量性の確認及び遊離脂肪酸の検出と定性を行いました。

Key words : HPLC の検出器、UV 吸収を持たない化合物

システム

1290 Infinity II High Speed ポンプ(G7120A)
 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
 1290 Infinity II MCT (G7116B)
 InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)

分析対象

エチレングリコールは50%アセトニトリルで調製し試料としました。脂肪酸はTHFで調製し試料としました。

分析条件

表1. HPLC条件 (エチレングリコール)

HPLC	
移動相	5 mM酢酸アンモニウム：アセトニトリル=25：75
流速	0.3 mL/min
カラム	Shodex NH2P-40 3E
カラム温度	30°C
分析時間	10分
注入量	10 µL

表2. MSD iQ詳細設定 (エチレングリコール)

iQ	
ガス温度	250°C
ガス流量	10 L/min
ネプライザ圧力	30 psi
キャピラリ電圧	4500V
極性	Positive
シグナル	$m/z=80$, fragmentor=60

表3. HPLC条件 (脂肪酸)

HPLC	
移動相	5 mM酢酸アンモニウム：アセトニトリル=25：75
流速	0.5 mL/min
グラジエント	50%B (0 min) →100%B (3 min)
カラム	Poroshell HPH-C8 2.1 x 50 mm, 2.7 µm P.N.: 699775-706
カラム温度	40°C
分析時間	6分
注入量	1 µL

LC/MS条件は自動測定モード(極性：Negative)にて設定
 Scan (m/z :120-450) またはSIM (m/z =279,281,283)

結果

UV吸収を持たない化合物の定量分析の例としてエチレングリコールを分析しました。

図1に1 mg/Lのエチレングリコール標準試料のクロマトグラムを示しました。5.8分にエチレングリコールのピークが溶出しました。0.01 mg/Lの標準試料を分析したところ、S/Nは10でした(図2)。ELSDやRIDよりも高感度に測定することが可能でした。

MSD iQの直線性を確認するため、0.01から1 mg/Lの範囲の検量線を作成しました(図3)。決定係数0.999以上の良好な直線性を示しました。

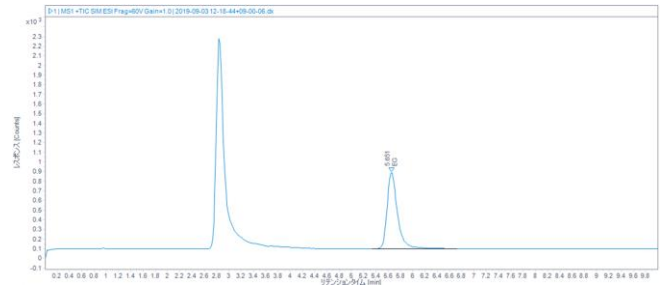


図1. エチレングリコール1 mg/Lのクロマトグラム

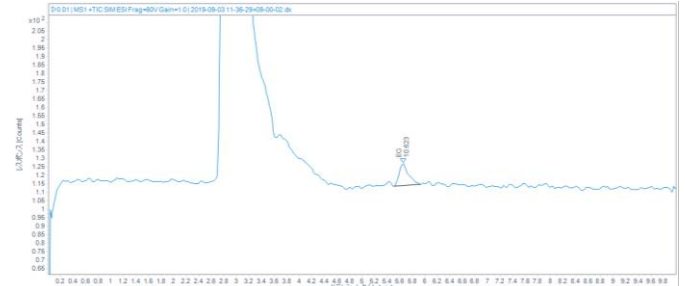


図2. エチレングリコール0.01 mg/Lのクロマトグラム

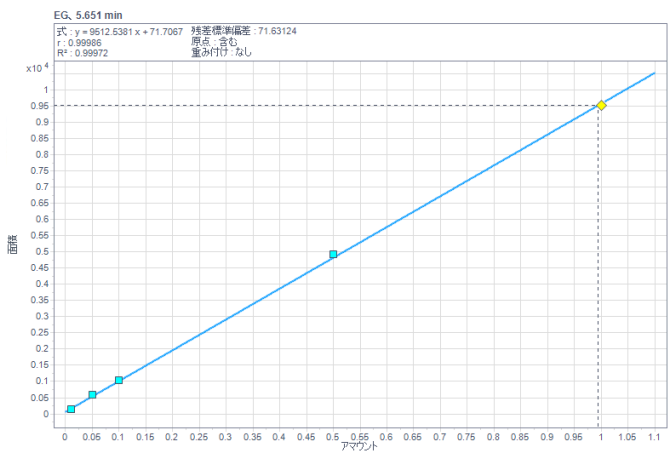


図3. エチレングリコール0.01から1 mg/Lの直線性 ($R^2 > 0.999$)

次に定性分析の例として脂肪酸をScan分析しました。LC/MSD iQにはイオン化条件のメソッドパラメータ設定を省略する自動測定モードが実装されています。自動測定モードで分析した脂肪酸10 mg/Lのクロマトグラムを図4に示しました。ピークアノテーションの設定を行うとピークの上部にベースピークの m/z を表示させることができ、クロマトグラムを見るだけでピークの定性情報を得ることが可能です。図4ではプロトンが脱離したイオンが観測されリノール酸(分子量：280, m/z =279)、オレイン酸(分子量：282, m/z =281)ステアリン酸(分子量：284, m/z =283)の順に溶出していることが分かりました。

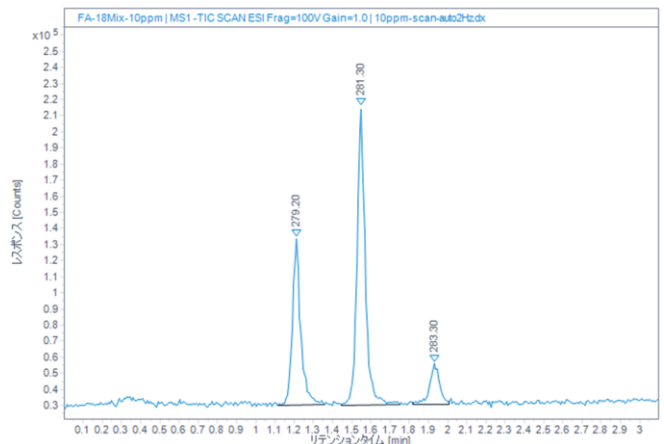


図4. 脂肪酸10 mg/Lのクロマトグラム(Scan)

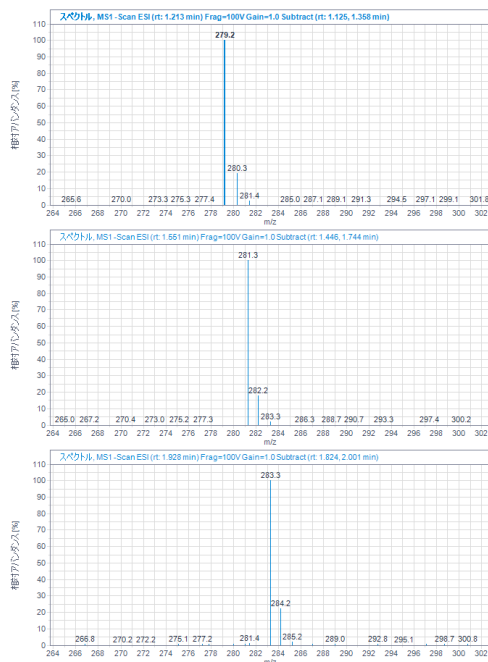


図5. 各ピークのマスペクトル(Scan)

測定パラメータ

スキャンタイプ	極性	化合物名/セグメント名	質量 (m/z)
SIM	ネガティブ	279	279
SIM	ネガティブ	281	281
SIM	ネガティブ	283	283

目標ポイント/秒 (Hz) SIM %

標準サイクルタイム (ms/サイクル)

図6. 自動測定の設定

表示列の選択

表示列	チェック	単位	値	パラメータ	測定モード	注入回数
1 一般設定の列	<input checked="" type="checkbox"/>					
2 10ppb-advance6 MS1-SIM(279) ESI Frag=100V Gain=1.0 SIM04.d	<input checked="" type="checkbox"/>	100.00000		D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1
3 10ppb-auto3pt MS1-SIM(279) ESI Frag=100V Gain=1.0 SIM02.d	<input checked="" type="checkbox"/>	110.00000		D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1
4 SIM質量	<input checked="" type="checkbox"/>	3000.00000		D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1
5 キロボルト電圧	<input checked="" type="checkbox"/>	3500.00000		D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1
6 ドラッグ温度	<input checked="" type="checkbox"/>	4000.00000		D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1
7 ドラッグ流量	<input checked="" type="checkbox"/>			D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1
8 オンプライザー	<input checked="" type="checkbox"/>		50.00000	D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1
9 フラグメント	<input checked="" type="checkbox"/>		55.00000	D1F-e7	FA-autoSIM-advanced6.amx	1

図7. メソッドオーバーライドのシーケンス設定例

自動測定モードによるSIM分析とアドバンスト測定モードによる最適化を行いました。自動測定モードではスキャン範囲もしくはSIMイオンを入力するだけで測定条件が自動的に設定されます (図6)。自動測定モードによる分析後アドバンスト測定モードにてイオン源パラメータの最適化を行い双方のデータを比較しました。アドバンスト測定モードでは、メソッドオーバーライド機能により、最適化したいパラメータをシーケンステーブル上で編集可能であるため、容易に最適化が可能です (図7)。自動測定モードで分析した際にはピーク高さ208、S/N=51という結果が得られましたが、アドバンスト測定モードにて最適化を行った結果ピーク高さ225、S/N=55と10%程度の改善が見られました (図8)。

まとめ

UV吸収を持たない化合物の一例としてエチレングリコールの分析を行いました。LC/MS分析ながらHPLCと同様の操作性で定量分析を行うことができ、HPLCに用いられるRIDやELSDよりも高感度に分析することが可能でした。また良好な直線性を示し、定量分析に適していることが示されました。

自動測定モードで脂肪酸の定性分析を行いました。HPLC条件とスキャン範囲を入力するだけで適切なイオン化条件が自動で設定されます。自動測定モードで得たクロマトグラムのピークを確認すると、マスペクトルから定性情報を容易に得ることが可能でした。

自動測定モードとアドバンスト設定モードで最適化した分析条件での比較を行いました。シーケンス分析とメソッドオーバーライドを組み合わせて最適条件を作成しました。リノール酸は10%程度ピーク高さが高くなりました。本分析例では自動測定モードで作成されるメソッドは、メソッド完成度が高いことが明らかになりました。

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. 2019

LC-MS-201909HK-001

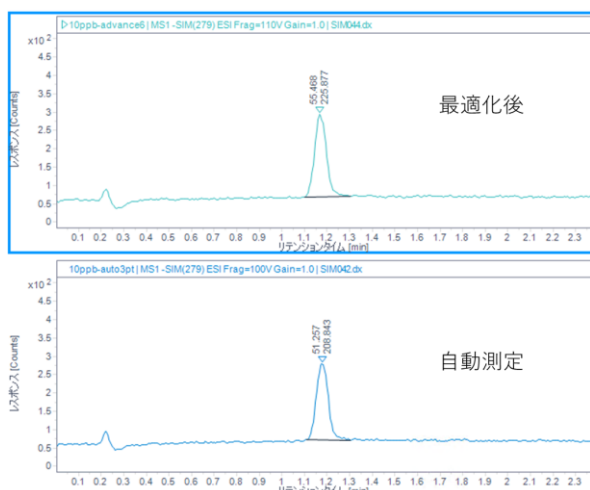


図8. 10 µg/Lリノール酸のクロマトグラム(SIM)

上: パラメータを最適化したクロマトグラム

下: 自動測定で得られたクロマトグラム