Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ピークトラッキング、同時溶出の検出を効率化する
- Empower 3 ソフトウェアによるマススペクトルとUVスペクトルデータの統合 -

Paula Hong and Patricia R McConville
Waters Corporation

アプリケーションのメリット

- マススペクトルと UV スペクトルデータを統合することにより、ピークトラッキングと同時溶出の有無の確認が一度の分析で可能に
- フレキシブルなソフトウェアと 4 液混合送液が可能な ACQUITY UPLC H-Class システムとの融合により、Auto•Blend Plus を利用し pH の異なる移動相の自動調製が可能に
- Empower 3 によるマススペクトルデータと UV スペクトルデータの一括解析により、作業手順を変えずにデータ解析を効率化

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム
（Auto•Blend Plus™ 機能内蔵）

ACQUITY UPLC PDA 検出器

ACQUITY® QDa™ 検出器

Empower® 3 ソフトウェア FR2

キーワード

ピーク同定、同時溶出ピーク、クオータナリーソルベントマネージャ（4 液送液ポンプシステム）、Auto•Blend Plus、鎮痛剤

はじめに

逆相クロマトグラフィー（RPLC）の分離における分析法開発には、様々なデータ解析など、一般的に時間のかかる段階が多く存在します。また、多くのスクリーニング手法において、検出は UV 検出のみに頼ることが多く、存在するピークを見逃す、同時溶出ピークが存在するなど不十分な情報を得てしまうこともあります。

質量が同じ化合物を MS 検出器で識別することは難しく、微量成分がバックグラウンドにより検出できない、重要な成分であってもイオン化しくい化合物があるといったケースもあります。また、UV 吸収を持たない化合物を UV でピークトラッキングすることも不可能です。UV スペクトルデータを用いる場合にも、確実な同定は難しいこともあります。多くの場合、ある UV スペクトルが同時溶出した複数成分のスペクトルの総和であるのかどうかを識別するのは容易ではありません。同時溶出する成分の濃度差が大きい場合、濃度の低い成分のスペクトルは容易には検出できなくなってしまいます。さらに、UV スペクトルは移動相の影響、特に pH により変化します。

このような困難を解決する方法として、物理的特性や化学的特性のように、化合物の異なる特性を検出することが可能な複数の検出器を用いることが考えられます。そして、それぞれの検出器からのデータを一つのソフトウェアで統合することができればより容易で、効率的なデータ解析が可能になります。

実験方法

試料調製

アセチルサリチル酸、アセトアミノフェン、2-アセトアミドフェノール、アセトアニリド、フェナセチン、カフェインを含む一連の鎮痛剤を、水 / アセトニトリル= 90：10 にてそれぞれ 0.2 mg/mL に調製

UPLC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class および ACQUITY Isocratic Sample Manager（ISM）

UV 検出器： ACQUITY UPLC PDA

カラム： ACQUITY UPLC BEH C_{18}、1.7 µm、2.1 × 50 mm

カラム温度： 30℃

サンプル温度：20℃

移動相 A： 125 mM ギ酸水溶液

移動相 B： 125 mM 酢酸アンモニウム水溶液

移動相 C： アセトニトリル

移動相 D： 水

移動相組成： Auto•Blend Plus により調製

ニードル洗浄液：0.05% ギ酸含有 水 / アセトニトリル= 50:50

パージ液： 水 / メタノール= 90:10

シール洗浄液：水 / メタノール= 90:10

流速： 0.60 mL/ 分

グラジエント：2-10% アセトニトリル /0.5 分、10-50% アセトニトリル /0.3 分

検出波長： 245 nm

サンプリングレート：20 ポイント / 秒

タイムコンスタント：標準（0.1 秒）

ISM 溶媒： 0.1% ギ酸含有 水 / アセトニトリル= 90:10

ISM 流速： 0.5 mL/ 分

注入量： 1 µL

MS 条件

MS システム： ACQUITY QDa 検出器

イオン化モード：ESI ポジティブ、ネガティブ

取り込み範囲： *m/z* 100-250

サンプリングレート：5 Hz

キャピラリー電圧：0.8 kV

コーン電圧： 10 V

脱溶媒温度： 600 ℃

クロマトグラフィーデータ管理

Empower 3 FR 2

結果および考察

今回の実験では、ACQUITY UPLC H-Class および ACQUITY UPLC PDA、ACQUITY QDa の 2 種類の検出器を用いて鎮痛剤混合試料の分析を行いました。操作には Empower 3 ソフトウェアを使用しました。pH5 の移動相を用いた第一段階のスクリーニングの結果、図 1 に示すように 6 成分のうち 5 成分を分離することができました。

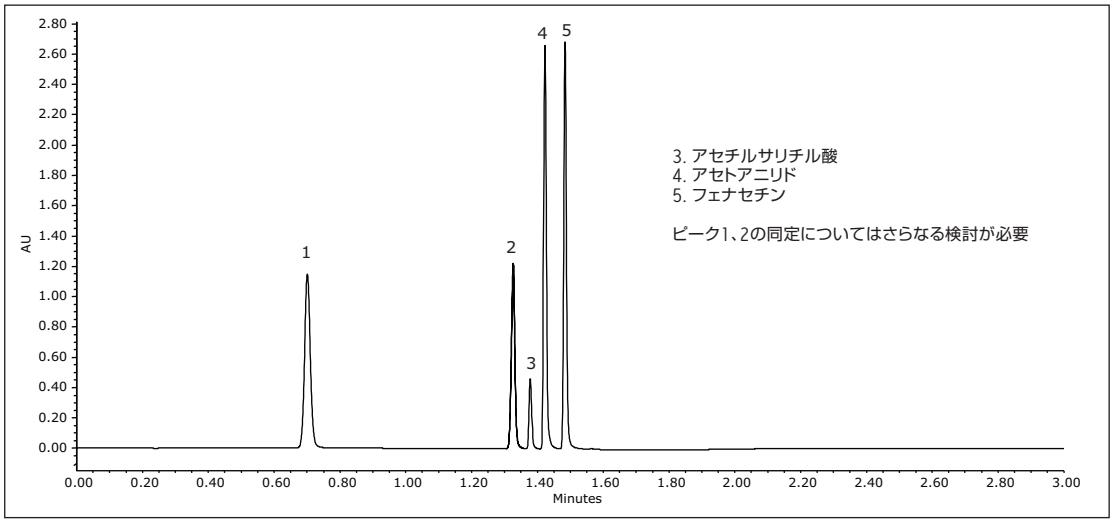

図 1. pH5、UV245 nm における鎮痛剤試料の UV クロマトグラム

分離されたピークの同定と同時溶出の有無の判断のため、マススペクトルと UV スペクトルの両方を並行して解析しました。特有の *m/z* を有する化合物の同定にはマススペクトルデータを利用しました。例えばピーク 4 は、アセトアニリド (*m/z* 136.0)、ピーク 5 は、フェナセチン (*m/z* 180.0) と仮同定しました。同様に、ピーク 3 については、ネガティブモードでのイオン化により得られた結果からアセチルサリチル酸 (*m/z* 137.0) と同定しました。しかしピーク 1 とピーク 2 の同定に関しては、マススペクトル、UV スペクトル両方のデータをさらに検討する必要があると考えられました。

混合試料中には、同じ質量の 2 化合物(アセトアミノフェン、2 - アセトアミドフェノール)が存在します(モノアイソトピック質量 152.1)。図 1 の分離において、ピーク 1 とピーク 2 には、同一の *m/z* のスペクトルが存在しており、ピーク 2 には、他にも顕著なイオンが検出され、同時溶出が示唆されました。同じ質量の化合物の同定には UV 検出によるスペクトルデータが必要となり、また、ピーク 2 に混在する他の成分の十分な分離も要求されます。

ピーク 2 の純度を評価するため、Empower3 ソフトウェアの質量分析レイアウトを使用しました（図 2）。図 3 に示したように、1.3 分のピークの前方（Leading）では、*m/z* 152、*m/z* 110 のスペクトルが検出されました。一方、ピーク後方（Trailing）では 3 種のスペクトルが見られ、その存在比はピーク頂点とは異なります。3 種類のイオンの存在は複数成分が同時溶出していることを示唆しており、特にイオンの存在比が異なっていること、*m/z* 195 のイオンがピーク前方に存在しないことからクロマトグラム上の分離が不十分であることが考えられます。もしピーク全体でイオンの存在比が一定であれば、イオン源におけるフラグメンテーションの可能性が考えられます。混合試料中の既知の成分から判断すると、ピーク後方の主要成分はカフェインと同定されます（*m/z* 195.0）。またピーク前方では、同質量の化合物（アセトアミノフェン、2 - アセトアミドフェノール）のイオンとともにフラグメントイオンとして知られる *m/z* 110.0 が含まれています。[1]

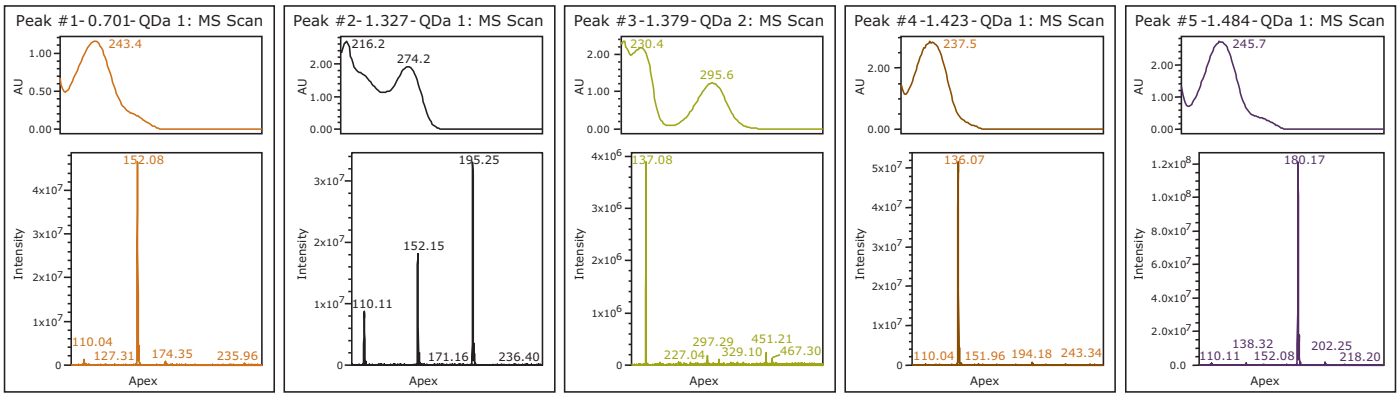

図 2. Empower 3 質量分析レイアウトによる鎮痛剤混合試料のマススペクトル / UV スペクトルの同時表示
ピーク 2 を除き、ピークトップには、1 種類の顕著なマススペクトルが得られている。ピーク 2 では 3 種類のイオンが顕著に検出されている。

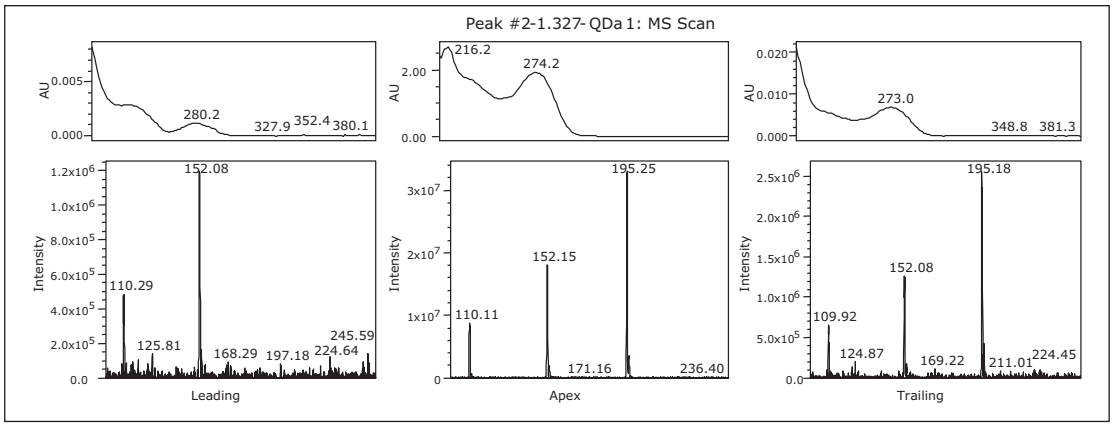

図 3. ピーク 2 のマススペクトルと UV スペクトルを表示した Empower 3 質量分析レイアウトの純度画面
ピーク前方、頂点、後方の比較により、イオン比に差異が認められ、複数成分の同時溶出が示唆される。

ピーク 2 の同時溶出成分の分離を改善するため、フレキシブルなソフトウェア、装置メソッドのグラジエントテーブルに pH を直接入力できる Auto•Blend Plus 機能を用いて移動相の pH による影響の評価を行いました。[2] Auto•Blend Plus 機能により、システムが指定した pH の移動相を自動調製するため、pH の異なる移動相を一つ一つ調製する必要はありません。

図 4 に示したように、pH の上昇に伴い、同時溶出する 2 成分の分離の選択性に変化が見られました。pH6 の条件で未分離ピークの後方（ピーク B）に顕著なスペクトル（*m/z* 195）はカフェインによるものと考えられました。pH7 では、2 成分がベースライン分離され、カフェイン（ピーク B）は 1.2 分のピーク A の後に溶出しました。

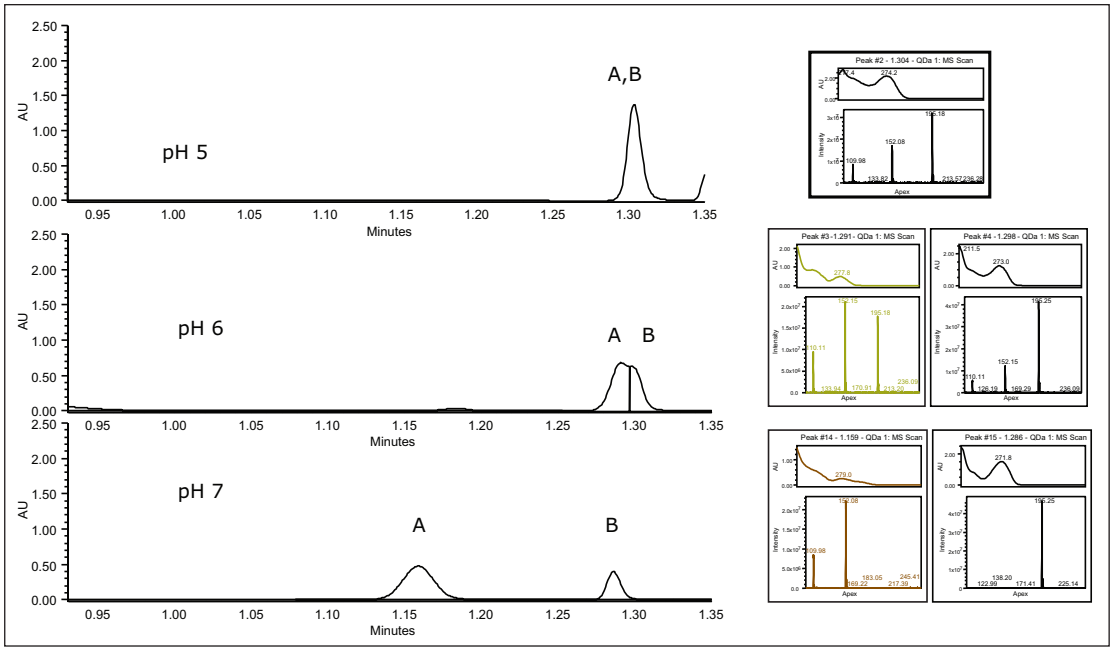

図 4. ピーク 2 における移動相 pH の影響　pH の上昇に伴いカフェインと 2- アセトアミドフェノールの分離が向上し、pH7 でベースライン分離を達成。

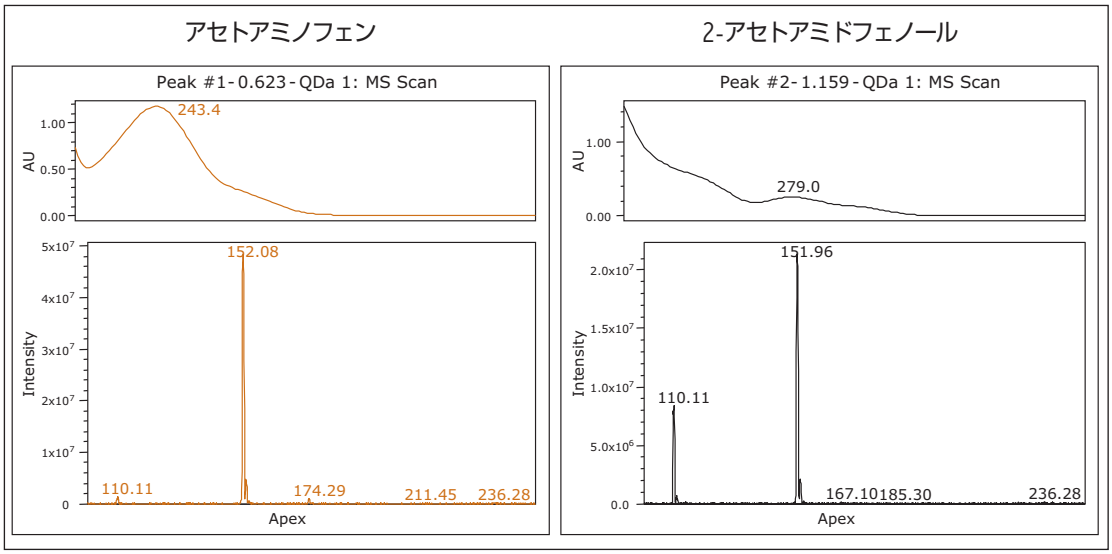

図 5. Empower 3 質量分析レイアウトのピーク純度表示画面による同じ質量の 2 化合物のマススペクトルおよび UV スペクトル
同質量の化合物の場合には UV スペクトルによる同定が可能。

移動相 pH7 での、同質量の化合物のうちの一つであるピーク A とカフェイン（ピーク B）のベースライン分離（図 4）により、UV スペクトルを利用した同質量の 2 化合物のピークトラッキングが可能となりました。一方、ピーク 1（図 1）とピーク A（図 4）に見られた顕著なスペクトルは同一であり、ピーク A では *m/z* 110 のフラグメントイオンも検出されました（図 5）。同質量の成分が存在する場合には、マススペクトルと UV スペクトルの双方を比較することによりピーク同定のための情報が得られます。ピーク 1 の UV スペクトルがアセトアミノフェンのスペクトル（λ max. 243 nm）と一致することからピーク 1 がアセトアミノフェンであり、後方に溶出するピーク A が 2- アセトアミドフェノールであると同定されました。

結論

1 種類の検出技術のみを用いての分析法開発には様々な困難が伴います。UV スペクトルデータはピーク純度、ピーク同定の点で有用ですが、複数成分の同時溶出下でピークトラッキングを行うことは困難です。一方、マススペクトルデータは化合物の質量情報と照らし合わせることでピーク同定が可能ですが、同じ質量の化合物が存在する場合には、その他の情報が必要となります。また一般的に各成分の完全な分離が求められ、これにより UV 検出による迅速な同定のみならず、より信頼できる定量も可能となります。

一般的には、このような事象を同定するためにはさらなる分析が必要となります。しかし、UV 検出、MS 検出の両方を用いるクロマトグラフィーシステムと簡単で効率的なソフトウェアが融合されることにより、一度の分析でピーク純度、同時溶出の判断材料が提供され、分析法開発をより単純化することが可能になります。

参考文献

1. Manion JA *et al.* NIST Standard Reference Database 17. In NIST Chemical Kinetics Database, National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, Maryland, 20899-8320, 2008; Vol. Version 7.0 (Web Version).
2. Chavali A, Wheat TE, McConville PR. In Automating pH Manipulation in Reversed-phase Method Development, 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, the Netherlands, June 16-20, 2013; Waters Corporation, Poster: Amsterdam, the Netherlands, 2013.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、UPLC、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。QDa および Auto•Blend Plus は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan.

2014年3月 720004846JA PDF