

3章 LC/MS に用いる LC 分析法

液体クロマトグラフィー (LC) は、20 世紀の初め、ロシアの植物学者 Tswett が、植物の葉から抽出した色素類を分析するために考案したものが、その始まりであるといわれる。炭酸カルシウム、アルミナ、シリカゲルなどの粉末をガラス管に詰め (カラム)、その上部に目的の試料を載せて適当な溶媒を流し続け、試料中の各成分の吸着性の差を利用して分画捕集する方法は、各方面の研究に用いられてきた。

しかしながら、この LC は分離に要する時間が長いことが欠点であり、その点ではあまり実用的とはいえなかった。LC では移動相が液体であるため、分子拡散速度が遅く、物質移動に要する時間が長いことが高速化できなかった原因である。

1960 年代に入ってカラム充填剤の改良、1970 年代には高圧ポンプで溶離液を高速で流す方式が採用され、LC における高速化が実現した。これが高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography、HPLC) と呼ばれるようになった。LC という分離分析法は GC と違ってカラムの加熱が不要で、試料の熱分解の危険はなく、また、溶媒とカラムを適当に選べば脂溶性物質から水溶性物質まで修飾せずに各成分に分離できることが大きな利点であるため、HPLC は様々な領域で繁用されるようになった。

さらには、どのような有機化合物にも適用できる汎用型で高感度な検出方法を求める動きが活発となり、質量分析計 (MS) と LC の結合はその特性からも極めて合理的な分析系として期待された。しかしながら、移動相として使われる液体を連続的に、かつ能率よく除去することが LC と MS の直結の大きな障害となっていた。

これに対して、これまでの章に述べられているように様々なインターフェースが研究、開発され、実用化されるようになった。LC/MS は最近ようやく安定した分析技術になりつつある。

ここでは、LC/MS の中で物質の分離を担う LC の基本について述べる。

3.1 HPLC 概論

3.1.1 HPLC における分離と特徴

固定相と移動相に対する親和力の違いを利用して溶質を分離する方法がクロマトグラフィーである。分離の場であるカラムが“段”と称する多数の不連続な小容器から構成されると仮定して、試料成分の移動の様子を多段液液分配 (抽出) と同じ状況に例えて説明する理論を段理論 (plate theory) という。各段に含まれる移動相はすべて次の段に流れ込んで停止し、その中の試料成分はその間に固定相と移動相に分配されて平衡に達し、また移動相全量が次の段に流れて平衡に達する、と考えると、理論段数が大きい場合には溶離曲線は正規分布で示される。

$$C = \frac{Q}{\sqrt{2\pi} V_R / \sqrt{N}} \exp \left\{ -\frac{(V - V_R)^2}{2V_R^2 / N} \right\}$$

ここで、 C ：試料成分の濃度、 Q ：試料成分のカラムへの負荷量、

V ：試料注入時から流れた移動相の容積、 V_R ：保持容量、 N ：理論段数

一方、クロマトグラフィーにおいては van Deemter によって移動相の線速度 u とカラム性能（理論段高さ H ）の関係が示されている。ピークは理想状態では広がらないと仮定し、理想状態からのずれがカラム上のピークを広げるとして、4種類の因子、即ち H_p （多流路拡散）、 H_d （分子拡散）、 H_s （固定相中の物質移動）、および H_m （移動相中の物質移動）を考え、これらがカラムの理論段高さ H の増加に及ぼす影響について考察された。

$$H = H_p + H_d + H_s + H_m$$

これは実際的には $H = A + B/u + Cu$ と表される。

H_p すなわち A 項は多流路拡散または渦拡散に基づく理論段高さであり、固定相充填剤のつまり方や粒子径に依存する。 H_d すなわち B 項は分子拡散に基づく理論段高さであるが、HPLC では液体中の分子拡散係数が小さく、ほとんど無視できる。 H_s および H_m 、すなわち C 項は、物質移動におけるピークの広がりへの寄与を示すものである。

カラムの理論段高さ H と線速度 u の関係を全般的にみると、流速が小さい時には B 項がピークの広がりに対して寄与が大きい、流速が大きくなるにつれて C 項の寄与が大きくなる。 H の極小値はその中間で得られ、カラム効率は最大になるが、HPLC では C 項の傾きがあまり大きくないため、その極小値はあまり明確ではない。また、ガスクロマトグラフィーに比べて移動相の低流速領域でのピークの広がりへの寄与は少ない。

3.1.2 分離カラムとカラム充填剤

3.1.2.1 分離カラムとサイズによる分類

ステンレス、PEEK樹脂、あるいはガラスライニング製などの管の両端にフィルター（フリット）を取り付け、内部に固定相充填剤を詰めたものが分離カラムとして使われる。クロマトグラフィーの利用目的は一般的に分取と分析の二つに集約され、分析用 HPLC では内径 4～6 mm、長さ 10～30 cm のサイズが一般的である。しかし、これより大きな分取用カラム、あるいは小さなマイクロ、セミマイクロタイプのもも目的に応じて選ぶことができる。一方、分離カラムの保護の目的で 1～5 cm 程度の短いカラムがプレカラムやガードカラムとして用いられることがある。

最近の HPLC では、内径 4.6 mm、長さが 15 cm あるいは 25 cm の充填カラムが通常サイズとして使用されているのに対して、HPLC カラムのマイクロ化の動きがある。その利点は以下の通りである。

移動相および固定相（充填剤）の使用量が少ない。

カラム内径の減少により、溶質のカラム内での広がりが小さくなり、感度が上昇する。つまり、微量分析や貴重な試料の分析に有利となる、

カラム内の熱伝達が速いので、通常のカラムより高効率が得られる。

移動相の流量が小さいため、ほかの分析機器（例えば質量分析計(MS)）との結合が通常カラムを用いた HPLC よりも容易となる。

実際、LC/MS ではセミマイクロカラムがよく使われる。

表 3.1.2-1 分析用カラムのサイズと流量の比較

分類	カラム内径	移動相流量	試料負荷量
コンベンショナル	4.0 ~ 6.0mm	0.76 ~ 1.7 ml/min	数 μ g
セミマイクロ	1.0 ~ 2.1 mm	0.047 ~ 0.21 ml/min	数 100 ng
マイクロ	0.2 ~ 0.8 mm	0.002 ~ 0.030 ml/min	数 10 ng

分析用カラムについてサイズによる分類を表 3.1.2-1 に示す。導入できる試料負荷量はカラム内の充填剤の重量にほぼ比例していると考えられる。

3.1.2.2 カラム充填剤

充填剤には種々のタイプがあるが、ここでは代表的なものについて記述する。

(1) シリカゲル

最も一般的で、古くから用いられている充填剤であるシリカゲルは、細孔を表面に多数有する多孔性シリカゲルが吸着クロマトグラフィーに使用される。分離はシリカゲル表面のシラノール基と溶質分子との吸着の差に基づくので、単位重量あたりの表面積が大きいほうが分離効率が高い。細孔内部の表面積が分離にかかわるので、溶質分子が内部に入りうる細孔径をもつことが必要で、一般に孔径 60 ~ 100 のものを使用されている。

粒子の形状には球状と破砕状（不定形）があり、球状のほうが充填効率が高く、現在は主流となっている。粒子径は 3 ~ 10 μ m（主に 5 μ m）のものが使われ、粒子径が小さいほど単位長さあたりのカラム理論段数は大きくなるが、カラムの圧力損失も大きくなる。

しかしながら、シリカゲルは順相クロマトグラフィーでしか使用できない、分離効率があまりよくない、塩基性で使えない、などの理由から、最近では HPLC で使われることが少なくなっている。

(2)化学結合型シリカゲル充填剤

シリカゲルによる吸着以外の効果で分離するため、シリカゲル表面のシラノール基に種々の官能基を化学結合させたものが広く用いられている。極性あるいは無極性の官能基を結合させたもの、イオン交換基を結合させたものなど様々な種類のものがある。

最も一般的なものは ODS (Octa Decyl Silane) シリカであり、シリカゲル表面に炭素数 18 (C_{18}) のアルキル鎖を付けたものである。また、 C_{18} 基の結合の仕方により異なる ODS シリカがある。さらに、シリカゲル表面にはシラノール基が残っており、これをエンドキャッピング処理したゲルが現在は主流となっているが、残存シラノール基の量によってもクロマトグラフ特性が異なってくるため、ODS シリカといっても違いがある。

結合させるアルキル鎖の炭素数をオクチル基、ブチル基、メチル基などのように減らしたものもある。また、官能基としてフェニル基、ジオール基、ニトリル基、アミノ基を用いたものは、極性が順次大きくなる。

一方、イオン交換基として強酸性 ($-SO_3H$)、強塩基性 ($-N^+(CH_3)_3+OH^-$)、弱酸性 ($-COOH$)、弱塩基性 ($-NH_2$) の各イオン性基を結合させた充填剤もあり、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの充填剤として使用されている。

化学結合型シリカゲル充填剤は、シリカゲルをベースとしているため、やはり塩基性条件での使用は適さない。

(3)有機系ポリマー

ポリマーゲルも充填剤として使用されている。例えば、ポリスチレン系ゲルはスチレンとジビニルベンゼンとの共重合体が主に使用されている。サイズ排除クロマトグラフィーには、このポリマーゲルが多用される。60~100 の細孔径を有するポリスチレンゲルは多孔質ポリマーと呼ばれ、吸着クロマトグラフィーに使用される。

ポリメタクリレート、ポリヒドロキシメタクリレート、ポリビニルアルコールゲルなども利用されている。さらに、これらのポリマーゲルに ODS 基などを化学結合した化学結合型ポリマーゲル、化学結合シリカゲルと同様のイオン交換基を付けたものも使用されている。

ポリマーゲル系充填剤は幅広い pH 範囲で使用でき、特にシリカゲルベースの充填剤に比べて高アルカリ耐性が優れている。しかし、機械的強度は弱く、移動相とする

溶媒の種類によっては体積変化のあるものがあり、使用が制限される場合がある。

3.1.3 分離モード

固定相と移動相を適当に組み合わせることにより、HPLC では順相あるいは逆相のように分離モードを選択することができる。また、同様の HPLC システムでカラムを取り替えることによって、サイズ排除クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーとすることもできる。

(1) 順相クロマトグラフィー

表 3.1.3-1 溶媒強度パラメーター

溶 媒	粘 度 (cP 20)	沸 点 ()	UVカット 初波長 (nm)	屈 折 率	アルミナ に対する 溶媒強度 (⁰)
フッ化アルカン			-	1.250	-0.25
n-ヘキサン	0.23	36	210	1.358	0.00
イソオクタン	0.50	99	210	1.404	0.01
ヘキサン	0.30	69	210	1.375	0.01
n-デカン	0.92	174	210	1.412	0.04
シクロヘキサン	1.00	81	210	1.427	0.04
シクロペンタン	0.47	50	210	1.406	0.05
二硫化炭素	0.37	46	380	1.626	0.15
四塩化炭素	0.97	77	265	1.466	0.18
キシレン	0.70		290	~1.50	0.26
イソプロピルエーテル	0.37	68	220	1.368	0.28
トルエン	0.59	111	285	1.496	0.29
ベンゼン	0.65	80	280	1.501	0.32
エチルエーテル	0.23	35	220	1.353	0.38
クロロホルム	0.57	62	245	1.443	0.40
塩化メチレン	0.44	40	245	1.424	0.42
メチルイソブチルケトン	0.54	118	330	1.394	0.43
テトラヒドロフラン	0.55	66	220	1.408	0.45
二塩化エチレン	0.79	57	230	1.445	0.49
メチルエチルケトン	0.40	80	330	1.381	0.51
アセトン	0.32	56	330	1.359	0.56
ジメチルケトン	1.54	107	220	1.442	0.56
酢酸エチル	0.45	77	260	1.370	0.58
酢酸メチル	0.37	57	260	1.362	0.60
シメチルスルホキシド	2.24	189		1.477	0.62
アニリン	4.40	184		1.586	0.62
ジエチルアミン	0.38	56	275	1.387	0.63
ニトロメタン	0.67	101	380	1.394	0.64
アセトニトリル	0.37	82	210	1.344	0.65
ピリジン	0.94	116	305	1.510	0.71
イソプロパノール	2.30	82	210	1.378	0.82
n-プロパノール	2.30	97	210	1.385	0.82
エタノール	1.20	78	210	1.361	0.88
メタノール	0.60	64	210	1.329	0.95
エチレングリコール	1.99	198	210	1.427	1.11
酢 酸	1.26	118		1.327	大
水	1.00	100	200	1.333	大

固定相の極性が移動相の極性より高い分離系を順相クロマトグラフィーという。代表的な例は、シリカゲルを用いた吸着クロマトグラフィーである。シリカゲル表面のシラノール基に試料分子が吸着し、吸着-脱着を繰り返して分離されてゆく。すなわち、吸着力の強い溶質の保持が大となる。固定相には極性の強いシリカゲルやアルミナなどが用いられ、移動相には無極性の溶媒（ヘキサンなど）に極性溶媒を加えたものを用いる。溶媒の極性は溶媒強度パラメーター（ ϵ^0 ）（表 3.1.3-1）が目安となるが、混合溶媒の場合に加成性は小さく、極性の大きい溶媒の値の影響が大きくなる。

そのほかの吸着媒体としてポリスチレンゲルなどがある。これは、メタノールやヘキサンを移動相とすると、吸着クロマトグラフィーとなる。ポリスチレンは中極性であり、メタノールを移動相とすると逆相、ヘキサンを移動相とすると順相となる。そのほか化学結合型の NH_2 -シリカや CN -シリカなども極性があることから、順相クロマトグラフィーの固定相として使用される。

(2)逆相クロマトグラフィー

順相クロマトグラフィーに対して、移動相の極性が固定相の極性より高い分離系を逆相クロマトグラフィーという。逆相 HPLC では、疎水性充填剤として C_{18} 基を化学結合した ODS シリカが固定相としてもっともよく使用される。このほか、オクチル基（ C_8 ）、ブチル基（ C_4 ）、トリメチル基（ C_3 ）を化学結合したのも目的に応じて使用される。ほかにもポリマーゲルに化学結合させたものもある。

溶質は化学結合型充填剤に固定化された有機相（液体）と相互作用することにより保持され、移動相への溶解度が高い溶質から順に溶出する。この分離機構を詳しくみると、一般的には、溶質の保持に対する移動相の性質やその組成の影響が液々分配の場合と類似しているため、分配クロマトグラフィーとして扱われることが多いが、ODS シリカでは吸着、分配のどちらともいいがたいものがあり、疎水性相互作用によるといわれている。

逆相 HPLC でよく用いられる溶媒はメタノールとアセトニトリルで、これに水を添加して一定組成の混合溶媒（アイソクラティック）で溶離させるか、あるいは組成を時間とともに変化させる勾配（グラジエント）溶離を行う。メタノールあるいはアセトニトリルと混合する水の割合を増していくと、移動相の極性が増大して固定相への保持が大きくなるので、グラジエント溶離では水の割合の多い状態から溶媒の割合を増していくプログラミングがよく行われる。

逆相 HPLC においては解離したイオン性物質は固定相に保持されにくい。そのため、例えばカルボン酸のような酸性物質では移動相の pH を下げ、また、アミンのような塩基性物質では pH を上げて、溶質のイオン化を抑制して固定相への保持を大きくするイオン制御法をとることがある。しかし、シリカゲルベースの充填剤の使用可能 pH

範囲は 2~8.5 で、この範囲以外ではシリカゲルが分解する。このため、ポリマーゲルをベースにした ODS や、シリカゲル表面をシリコンポリマーでコートして ODS を付けたカプセル型などが使われる。

(3)イオン交換クロマトグラフィー

イオン性化合物とカラム充填剤のイオン性残基との間のイオン交換現象を利用するクロマトグラフィーをイオン交換クロマトグラフィーという。溶質が陽イオンで、固定相が陰イオンのとき、陽イオン交換クロマトグラフィー、その逆を陰イオン交換クロマトグラフィーという。



陰イオン交換カラムとしては、第 4 級アンモニウム基（強塩基性陰イオン交換基）やジエチルアミノエチル基（弱塩基性陰イオン交換基）など、また陽イオン交換カラムとしてはスルホプロピル基（強酸性陽イオン交換基）やカルボキシメチル基（弱酸性陽イオン交換基）などの官能基が用いられる。また、イオン交換カラムにおいてもポリマーゲルをベースにしたものと、シリカゲルをベースにしたものの両方がある。

移動相は、種々の無機塩を含む水溶液であることが多く、塩の種類、濃度により保持の大きさが変化する。イオン交換モードでは移動相組成を徐々に変化させるグラジエント溶離が多く用いられる。

溶質イオンのイオン化が抑えられる pH では、溶質分子はまったく保持されず溶出する。また、完全解離の状態では pH の影響は受けない。このことは、溶離液中での溶質分子の非解離状態と解離状態の割合に関係している。

交換容量の極めて低いイオン交換体を用いたイオン交換クロマトグラフィーはイオンクロマトグラフィーと呼ばれ、水試料中の低濃度のハロゲンや硫酸、硝酸などのイオン種の分析に用いられている。

(4)イオン対クロマトグラフィー

イオン性物質は、(3)のイオン交換クロマトグラフィーで分離できるが、逆相系の化学結合型固定相を使うことのできるイオン対（ペア）クロマトグラフィーが有用な場合がある。逆相クロマトグラフィーでは極性が高く解離した溶質はそのままではほとんど保持されないが、イオン対クロマトグラフィーでは、溶質イオンと反対の電荷を持ち、かつ大きな疎水性基を持つ試薬を対イオンとして移動相に加えて、カラム内で溶質イオンとイオン対を形成させ、中性物質として逆相系カラムに保持させるものである。

イオン性物質であるので、移動相には緩衝液/有機溶媒の系（例えば水/メタノールの系）を用いる。この場合、固定相には、ODS シリカを用いることが多い。

溶質イオンに対する対イオン（カウンターイオン）として P^+ （溶質イオンが陰イオンの時、陽イオンが対イオン）を移動相に加えておくと、イオン対が次式のように形成される。



解離していない SP^+ は中性物質として挙動し、固定相に保持されるようになる。

逆相系イオン対クロマトグラフィーの例を表 3.1.3-2 に示す。順相系では、シリカゲルに対イオンを含む緩衝液を保持させたものが固定相になり、極性の小さな溶離液を移動相として用いる。

表 3.1.3-2 逆相系イオン対クロマトグラフィーの代表例

移動相	対イオン	対象となる試料
水/アセトニトリル(pH7.5)	テトラブチルアンモニウムイオン	スルホン酸、カルボン酸
水/アセトニトリル(pH3~4)	ドデシル硫酸イオン	アミン

(5)アフィニティークロマトグラフィー

生体分子、特にタンパク質などの物質にみられるような非常に特異的で強固に分子会合する性質を利用して、特定分子を選択的に分離する方法があり、アフィニティークロマトグラフィーとよばれる。鍵と鍵穴の関係にたとえられる酵素と基質（あるいは阻害剤）、抗体と抗原との間の特異的な分子会合などを用いて、一般にはタンパク質などの特定の分子を分離することができる。目的物質と結合する分子（リガンド）は、アガロースなどの細孔をもった親水性ポリマーの上に固定化される。この固定相を用いたカラムで、分離は通常、吸着と脱着の2段階で行われる。試料中の目的成分は、固定化されたりガンドと選択的に結合し、共存物質はそのままカラムから溶出する。次に、pH やイオン強度などの溶出条件を変えて、保持された目的成分をリガンドから溶出させる。

(6)サイズ排除クロマトグラフィー

溶質分子がその大きさとカラム充填剤の網目構造の孔径との相対関係から分離される手法はサイズ排除クロマトグラフィーと呼ばれる。シリカゲル系やポリマーゲル系充填剤は、多くの細孔からなる三次元網目構造を持っており、ゲルの網目構造の中へ入り込む小さな溶質分子は遅く、ゲル内には入り込めない大きな溶質分子は早くカラムから溶出する。

ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）は、耐圧性のある架橋ポリスチレン系ゲルを用い、非水系溶媒を移動相として合成高分子などの分離、分析を行う方法である。一方、主として生体高分子の単離や精製あるいは分析のために開発された方法としてゲルろ過（GFC）がある。耐圧性のあるポリマー系ゲルやジオール基を結合させたシリカゲルなどの親水性充填剤が登場して、水系溶媒を移動相としてタンパク質や核酸などの生体高分子の分離、分析が行われるようになった。

3.2 対象物質とLC条件

3.2.1 カラムの選択

試料を分析する場合、分析条件を設定することが必要である。LC分析においては、分析カラム(固定相)と移動相の組み合わせで試料成分の保持を決定し、目的とする分離を達成することができる。従って、分析カラム(固定相)及び移動相の選択が特に重要となる。

分析カラムは分析対象物質が水溶性であるか、有機溶媒に可溶か、あるいは、極性が非極性か等の物理的性質やマトリックスの物理的・化学的性質等によって選択しなければならない。また、分析の対象とする物質数をも考慮する必要がある。

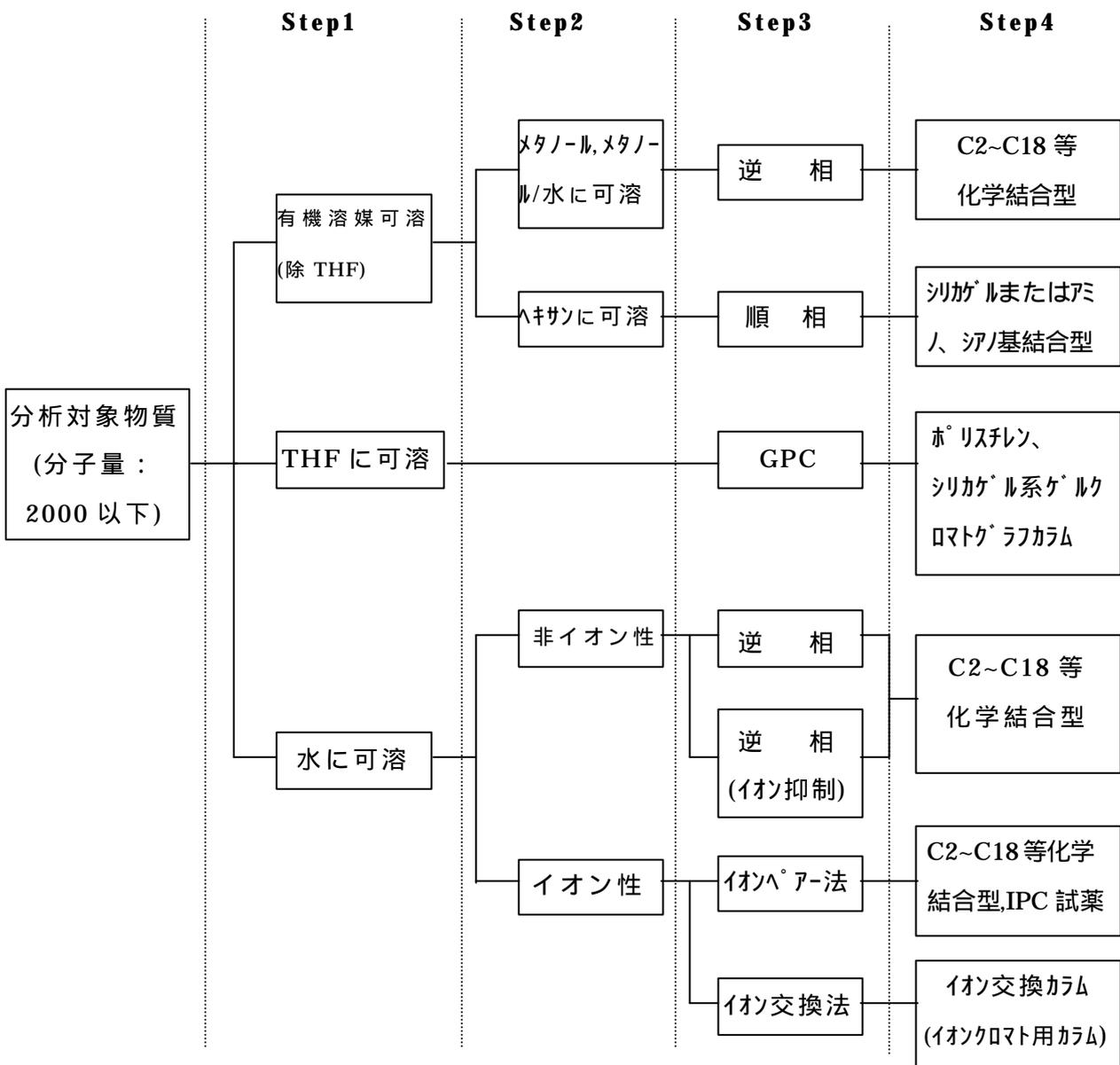


図 3.2.1-1.分析対象物質と分析カラムの関係

ここでは、環境分析等で取り扱う物質は、数 100 ~ 1000 程度の分子量を持つ物質と考え

られるので、分析対象物質の分子量が 2000 以下の物質についての簡単な分析カラムの選択法を図 3.2.1-1 に示す。

例えば、分析対象物質が農薬 6 成分(オキシシン銅、アシュラム、チウラム、イプロジオン、ベンスリド)である場合、図 3.2.1-1 に従ってカラムを選択してみよう。

Step1：上記の農薬 6 成分が水に溶解易いか、あるいは解け難い（有機溶媒に解け易い）か等物性を調べる。

上記の 6 成分についての溶解度は、表 3.2.1-1 のとおりである。

表 3.2.1-1 . 各物質の溶解度

分析対象物質	水(ppm)	メタノール(g/L)	ヘキサン(g/L)
オキシシン銅	0.07	0.116	<0.01mg
アシュラム	4000	290	- *
チウラム	30	<10 (エタノール)	0.04
イプロジオン	13	25	- *
ベンスリド	25	- *	- *
シマジン	5	0.4	- *

*：数値の記述なし（最新農薬データブック、ソフトサイエンス社 1997）

表 3.2.1-1 から、アシュラム以外はいずれも水には数十 ppm 程度しか解けないが、有機溶媒には解け易い物質であることがわかる。

Step2：表 3.2.1-1 から 6 物質ともヘキサンに対する溶解度はメタノールへの溶解度より低いようである。水に不溶でヘキサンよりもメタノールによく溶けると判断できる。

Step3：Step1 と Step2 より上記の農薬 6 成分については、逆相分配系の分離モードによって分離される可能性がある

Step4：そこで、シリカゲルの表面にオクタデシル基（C18）、オクチル基（C8）等を化学結合させた化学結合型充填剤の分析カラムを選択すると良い。

上記 Step1 ~ Step4 によって C2~C18 化学結合型分析カラムのなかで何を選択するかであるが、これらの直鎖アルキル基結合型の充填剤は、アルキル基の鎖長が長い程、そして炭素量が多い充填剤ほど強い保持力を示す。

しかし、保持されにくい（早く溶出する）物質についての保持時間はアルキル鎖長が長くても、保持能はそれほど変化しないので極性の大きく異なる成分を含む試料の分析には、C18 よりも C4 のようなアルキル鎖長の短いカラムを選択することにより分

表 3.2.1-2 充填剤と炭素含量

充填剤	炭素含量(%)
C18	17
C8	9
C4	6
C2	4

析時間を短縮することができる。表 3.2.1-2 に代表的な C2~C18 直鎖アルキル基結合型の充填剤の炭素含量を示す。但し、炭素含量は各メーカーによって、また基剤の形状(球形か破砕形等)、粒子径などによって若干異なる。

上記農薬 6 物質の分析には、まず C18 の分析カラムで試みると良い。分離の状態をみて C8 などアルキル鎖長の短いカラムについて試験するもの良い。

次に、主な物質について一般的 LC 分析で使用されている分析カラムの例を表 3.2.1-3 に示す。

表 3.2.1-3 分析対象物質と分離カラム

分析対象物質	分析カラム	移動相
農薬類 農薬 6 成分 (オキシ銅、アシュラム、シマジン、チウラム、イプロジオン、ベンスリド) 殺菌剤 (チオファネートメチル、チウラム、ジクロメジン、トリフルミゾール、ペンシクロン) 除草剤 (ダイカンバ、ベンスルフロメチル、メフェナセット、プロモブチド、ピリプチルカルブ)	C18 (4.6mm ×150mm) (基剤としては、シリカゲルやポリスチレン等が用いられている) C18 (4.6mm ×150mm) C18 (4.6mm ×150mm) C18 (4.6mm ×150mm)	アセトニトリル/水 アセトニトリル/5mM 酢酸ナトリウム(pH6.5)等 10mM リン酸二水素カリウム水溶液(pH2.2) アセトニトリル/10mM リン酸二水素カリウム水溶液(pH3.5) アセトニトリル/10mM リン酸二水素カリウム水溶液(pH3.5)
フタル酸エステル類	C18、C8 (4.6mm ×150mm)	アセトニトリル/水 アセトニトリル/5mM 酢酸ナトリウム(pH6.5)等
有機酸	シリカ NH (4.6mm ×150mm) C18(ポリマー系) (4.6mm ×150mm) 種々の対イオンを持つスルホン化ポリスチレン系その他、専用カラムが多数市販されている。	アセトニトリル/水 10mM リン酸水溶液 リン酸水溶液 水または塩化ナトリウム水溶液 アセトニトリル/水(NaCl を添加する場合もある)
カルボニル化合物 (DNPH*誘導体として)	C18, C8 (4.6mm ×150mm)	アセトニトリル/水

フェノール類	C18 (4.6mm ×150mm)	アセトニトリル/10mM リン酸
多環芳香族類	C18 (4.6mm ×150mm)	アセトニトリル/水
塩基性ペプチド	C18 (4.6mm ×150mm)	アセトニトリル/ 0.05% TFA(pH2.3)
糖類 (エチレングリコール、キシロース、d(+,-)フラクトース、)、水酸化モノラクトース等) (ラフィノースラクトース、グルコース、ガラクトース、キシリトール等)	シリカ NH (4.6mm ×250mm) 陽イオン交換分析カラム (8.0mm ×300mm)	アセトニトリル/水 水
食品類 水溶性ビタミン(ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミン C、リボフラビンリン酸ナトリウム、リボフラビン、葉酸等) 脂溶性ビタミン (ビタミン D ₂ 、D ₃)	C18、C8 (4.6mm ×150mm) C18、C8 (4.6mm ×150mm)	メタノール/50mM リン酸ナトリウム(pH2.5) アセトニトリル/メタノール アセトニトリル/水
タンパク質 (ミオグロビン、トリプシノゲン、リゾチーム、チトクローム)	陽イオン交換カラム (8.0mm ×75mm)	20mM リン酸(pH7.0)/ 20mM リン酸(pH7.0) +0.5M NaCl

*2,4-ジニトロフェニルトラジン

分析対象物質は、代表的な物質についてのみ示した。

これら物質を LC/MS で分析する場合にも表 3.2.1-3 に示されている分析カラムは基本的に使用可能である。表 3.2.1-3 にも示されている様に、C18(ODS)分析カラムがほとんどの対象物質の分離に使用されていることから LC/MS 分析においても C18 系の分析カラムでまず分離を試みることも一つの方法である。

また、各物質(糖、有機酸分析用は特に多数有)に専用の分析カラムが多数市販されている。上記以外の物質の分析については、各メーカーのカatalog等を参照すると良い。

ところで、LC 分析特に環境分析では、そのほとんどが逆相分離モードで分離分析されており、順相モードでの分析例がほとんどない。その原因として次のことが挙げられる。

順相モードでの分析で最も注意することは、分析試料をも含めた分析系全体から水分を排除することである。環境分析では、水分を含む試料を取り扱うことが多く、また、試料の前処理が煩雑な場合が多いために水分の除去が難しい。さらに、順相モードでの分析では、保持時間の再現性が悪いという問題がある。この様なことから、LC 分析では逆相分離モードの分析が殆である。

3.2.2 移動相の選択

LC で使用する移動相は、分離モードや使用する分析カラムによってその選択が制限されることが多く、また固定相との組み合わせによって各成分の保持力を決定する。組み合わせが不適當であれば、カラムを素通りするか、完全に保持されて溶出しなない。一般には数種の溶媒を混合して保持力を調整し、適当な分離能を得ることが重要である。

主な分離モードから LC で一般的に使用されている移動相を表 3.2.2-1 に示す。

表 3.2.2-1 LC で使用される主な移動相

分離モード	移動相溶媒
順相	ヘキサン、ベンゼン、トルエン、四塩化炭素、二硫化炭素、シクロヘキサン、クロロホルム、ジクロロメタン
逆相	メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ジオキサン、テトラヒドロフラン (THF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、水
イオン交換クロマトグラフィー	種々の無機塩を含む水溶液
GPC	メタノール、エタノール、アセトニトリル、THF、ジメチルホルムアミド (DMF)、アセトン、クロロホルム、酢酸エチル、DMSO、
イオン対クロマトグラフィー (IPC)	上記順相及び逆相使用溶媒にイオン対試薬を添加

現在、LC 分析では前述したようにほとんどの場合逆相クロマトグラフィー（極性の大きい固定相と極性の小さい移動相の組み合わせ）による分離が用いられている。逆相クロマトグラフィーでよく使用される移動相は、表 3.2.1-1 に示す溶媒の中でも主に水とメタノールあるいは水とアセトニトリルの極性混合溶媒である。

移動相についても一般に LC で使用できる溶媒は LC/MS でも使用可能であり、これらの溶媒のみを使用する限りにおいては特に問題はないが、LC 分析と同様に次のような点に注意する必要がある。

API 等インターフェース部は非常に内径の小さい流路系で構成されていること、また分析カラムの両端には 2 μ m のフィルターが取り付けられていること等から流路系や、カラムの目詰まりを防ぐために使用前に少なくとも 2 μ m 位のフィルターで濾過する必要がある（一般的には 0.45 μ m のフィルターで濾過）。LC 分析でも同様である。

ポンプでの脈流や流量変動による送液不良や、カラム効率の低下等を除くために移動相溶媒の脱気を行う必要がある。

アセトンやトルエンのように溶出力の大きい溶媒を使用する場合は、LCのポンプヘッド部のテフロンシール等を傷めることもあるので注意が必要である。使用後は、メタノール等で十分に洗浄する。

アセトニトリルは、イオン化条件によってはプロトドナーになり得ないことがある。100%で使用する場合は酸を添加することも必要である。

3.2.3 移動相の pH 調整

イオン解離性物質の分析を行う場合は、特に逆相系での分析において移動相に緩衝液や酸またはアルカリを添加して移動相の pH を調整し、試料の解離を抑制して分離を行うことがある。

一般に、緩衝液とは、弱酸とその塩が共存している水溶液のことであるが、強酸や強塩基を加えても pH の変化を抑える性質はある。目的物質の解離が抑制できる pH 範囲の緩衝液を選択すると良い。表 3.2.3-1 に LC で使用される代表的な緩衝液を示し、表 3.2.3-2 には、一部の緩衝液組成と pH 領域について示す。

表 3.2.3-1 LC で使用される代表的な緩衝液

酸 類	ギ酸、酢酸、リン酸、クエン酸、酒石酸、ほう酸、トリフルオロ酢酸、
塩 基 類	水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(通称：トリス)ジエチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン
塩 類	ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム

前述したように LC 分析では、ほとんどの場合において逆相クロマトグラフィーによる分離が用いられており、またその時に使用される緩衝液はリン酸緩衝液が主である。

しかし、LC/MS 分析においては、3.2.2 でも記述したように流路系の目詰まりやイオン化等に悪影響を及ぼすために不揮発性の物質を系に導入することは好ましくない。従って、リン酸ナトリウムや酢酸ナトリウム等の不揮発性緩衝液の使用は不適當で、アンモニウム塩等の揮発性緩衝液を使用する必要がある。アンモニア+ギ酸または酢酸、トリメチルアミン+ギ酸または酢酸などが一般に用いられている。表 3.2.3-2 では揮発性と不揮発性に分けて示した。

表 3.2.3-2 緩衝液と pH 領域

	緩 衝 液 組 成	pH 領域
揮 発 性	酢酸+ギ酸	2 付近
	ピリジン+ギ酸	2.3 ~ 3.5
	ピリジン+酢酸	3.5 ~ 6.0
	トリメチルアミン+ギ酸または酢酸 (トリエチルアミンを用いる場合もある)	3.0 ~ 6.0
	炭酸アンモニウム+アンモニア	8.0 ~ 9.5
	アンモニア+ギ酸または酢酸	6.0 ~ 10.0
	モノ(またはトリ)エタノールアミン+塩酸	6.5 ~ 11.0
	トリメチルアミン+二酸化炭素 (トリエチルアミンを用いる場合もある)	7.0 ~ 12.0
不 揮 発 性	0.1N 酒石酸+0.1M 酒石酸ナトリウム	1.4 ~ 4.5
	0.1M クエン酸ナトリウム+0.1N 水酸化ナトリウム	4.9 ~ 6.8
	M/30 リン酸二水素カリウム+ M/30 リン酸水素二 ナトリウム	5.2 ~ 8.3
	0.05M 炭酸ナトリウム+0.1M 炭酸水素ナトリウム	8.9 ~ 11.4
	0.1N 酢酸+0.1M 酢酸ナトリウム	3.2 ~ 6.2

一例として、表 3.2.3-3 に緩衝液に酢酸アンモニウムと酢酸を用いた場合の pH と保持時間の関係について示す。

表 3.2.3-3 移動相の pH と保持時間

物 質 名	pH:3.9	pH:4.5	pH:5.7	pH:6.5
2-Phenoxybutyric acid	4.4	3.8	2.0	1.7
Phthalic acid	5.3	3.3	2.4	1.6
Anthranilic acid	8.5	7.3	3.6	2.2
n-Valeric acid	9.9	9.6	5.1	2.7
Benzoic acid	10.0	8.4	1.7	1.4
o-Toluic acid	11.1	10.1	4.4	2.7
m-Toluic acid	11.6	11.3	7.2	3.9
p-Toluic acid	11.6	11.5	7.8	3.9
Myristic acid	16.4	16.9	15.8	15.3
Palmitic acid	18.2	18.4	16.7	15.9

LC 条件：分析カラム：C18 系(4.6mmφ × 150mm) 流量：1ml/min

移動相：メタノール/酢酸アンモニウム水溶液 (pH：3.9 ~ 6.5)

表 3.2.3-3 はカルボン酸類について、移動相の pH 変化と保持時間の関係を一例として示したものである。特にイオン性物質の保持が移動相の pH 変化によって大きく影響している。わずかの pH 変化でまったく異なった分離パターンを呈することがある。従って、移動相の pH を適切に調整することは非常に重要なことである。

LC/MS 分析における緩衝液の選択及び使用に関しては以下の点に注意する必要がある。

流路系の目詰まりが分析に悪影響を及ぼすためにアンモニウム塩等の揮発性緩衝液を使用することが重要である。リン酸ナトリウムや酢酸ナトリウム等の不揮発性の物質を系に導入することは好ましくない。

目的サンプルの解離が抑制できる pH 範囲の緩衝液の選択をする。一般に弱酸及び弱塩基は、それらの $pK_a \pm 1$ の範囲で緩衝能力を持つと言われているため、分離するためには移動相の pH をできるだけ目的物質の pK_a に近い pH に調整することが望ましい。

分析カラムに使用されている基剤がシリカゲルの場合は、アルカリ性の緩衝液の使用は望ましくない。シリカゲルの場合の使用適用範囲は約 pH2 ~ 8.5 であり、アルカリ側では、シリカゲルが溶出する。最近、低 pH(pH1 ~ 6)や pH8 よりかなり高い pH 条件で使用可能な分析カラムも市販されている。

ポラスポリマーを基剤に使用した分析カラムについては、pH の適用範囲は広い。緩衝液の濃度は、吸着性のある物質についてはある程度高い方が良好に溶出されるが、充填剤の劣化が速くカラムの寿命は短くなる。従って、できるだけ低い濃度の方が良い。通常使用されている濃度は、0.01M ~ 0.1M 程度である。

移動相の pH は適切に調整すること。わずかの pH 変化でまったく異なった分離パターンになってしまうことがある。

揮発性の物質であっても添加することによって、流路系等に吸着しバックグラウンドとして常にマススペクトルとして現われ、目的物質の測定の妨害となることがある。

3.2.4 イオン対 (IPC) 試薬

IPC 試薬の主な使用目的は、試料が強酸性または強塩基性物質の分析を行う場合、あるいは、イオン性物質が混在している試料で移動相の pH を変えても良好な分離が得られない場合に移動相に添加して良好な分離を得ることである。

強酸性または強塩基性物質は、移動相中で完全に解離していると考えられるために、分析カラムにまったく保持されずに溶出するか、保持されても形の悪いピークとなって溶出する。この様な物質については、移動相にイオン対(IPC)試薬を添加することで試料イオンと対イオンとの疎水性の複合分子を形成させることで、固定相に保持され、良い分離を得ることができる。

表 3.2.3-4 IPC 試薬

塩基性物質分析用 IPC 試薬	酸性物質分析用 IPC 試薬
1-プロパンスルホン酸ナトリウム 1-ブタンスルホン酸ナトリウム 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 1-オクタンスルホン酸ナトリウム 1-ノナンスルホン酸ナトリウム トリフルオロ酢酸 ペンタフルオロプロピオン酸 ヘプタフルオロ酪酸 ノナンフルオロ吉草酸	トリヘキシルアミン トリヘプチルアミン トリ-n-オクチルアミン 水酸化テトラアンモニウム 水酸化テトラブチルアンモニウム リン酸テトラブチルアンモニウム 酢酸-di-n-ブチルアミン

表 3.2.3-4 に主な IPC 試薬を示す。表 3.2.3-5 には、イオン性試料を分析する場合の移動相の pH とその pH でのイオン状態及び使用する IPC 試薬の関係を示す。

表 3.2.3-5 イオン性試料の移動相 pH 条件と IPC 試薬

イオン性試料の性質	イオン状態	分離方法 (IPC 試薬)	移動相の pH
強酸性 弱酸性 弱塩基性 強塩基性	イオン性 非イオン性 イオン性 イオン性	陰イオン分析用 IPC 試薬 pH 調整、緩衝液使用 陽イオン分析用 IPC 試薬 陽イオン分析用 IPC 試薬	PH2 ~ 5
強酸性 弱酸性 弱塩基性 強塩基性	イオン性 イオン性 非イオン性 イオン性	陰イオン分析用 IPC 試薬 陰イオン分析用 IPC 試薬 pH 調整、緩衝液使用 陽イオン分析用 IPC 試薬	PH7 ~ 7.5

一般的に、IPC 試薬の濃度は 5mM 程度での使用が望ましく、移動相 pH は表 3.2.3-5 にも示されているように pH2 ~ 7.5 に調整する。これら IPC 試薬についても LC/MS 分析では、緩衝液の使用に際しての同様の注意が必要である。特に、流路系への吸着し易い物質(アミン系等)の使用は避ける。また、アセトニトリル/水の場合、分子量の大きな IPC 試薬は溶け難くなるので注意する。

3.2.5 参考文献

クロマトグラフィー分離システム：原昭二、森定雄、花井俊彦編著、丸善 1981

化学セミナー；クロマトグラフィー - ：津田孝雄、丸善 1998

各社カラムカタログ