

分析法開発における LC/MS 分析条件設定の実際

岡山県環境保健センター

劔持 堅志

1. はじめに

環境汚染物質の微量分析は、主にガスクロマトグラフ質量分析法（GC/MS）により行われてきたが、GC/MS は難揮発性物質、極性の高い物質、熱分解性物質等の分析が困難であることから、GC/MS のみを用いた化学物質モニタリングには限界が生じていた。一方、液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS）は、難揮発性物質、高極性物質、高分子物質、熱分解性物質等の分析に適しており、従来 GC/MS で分析が困難とされていた物質群を高感度に測定できるため、今後の化学物質モニタリングを推進していく上で主要な分析手段になるものと考えられる。

このため、LC/MS の能力を活用した分析法の開発が求められているが、LC/MS には従来の GC/MS とは異なった検討課題が数多く存在する。分析法開発をスムーズに進めていくためには、高感度で精度の良い測定条件を定め、これを基礎に分析法の検討を進める必要がある。そのため、ここでは LC/MS 分析条件の設定に焦点をあてて、その具体的な検討事項、留意点等について述べる。

2. LC/MS を用いた分析法開発の一般的手順

LC/MS を用いて分析法を開発する際の一般的なフローを図 1 に示した。分析法の開発では、高感度で精度の良い測定値が得られることが基本条件となるため、分析条件の最適化は最も重要な検討課題となる。分析条件の最適化は、イオン化法の選択、MS 測定条件の最適化及び LC 測定条件の最適化の 3 ステップからなる。

以下にその詳細を述べる。

2.1 イオン化法の選択

分析目的物質に適したイオン化法を選択し、基本的な測定条件を定める。現在、イオン化法としてはエレクトロスプレー法（ESI）と大気圧化学イオン化法（APCI）が主に用いられている。ESI は中～高極性のイオン性化合物、多価イオンが生じやすい生体高分子等の測定に適しており、逆に APCI は ESI でイオン化しにくい低極性化合物をイオン化できる利点がある。しかし、ESI は、APCI に比較して高感度な場合が多く、また、広範な物質をイオン化できる傾向があることから、まず ESI でのイオン化を試みた後に、APCI でのイオン化を検討する手順が効率的と考えられる。

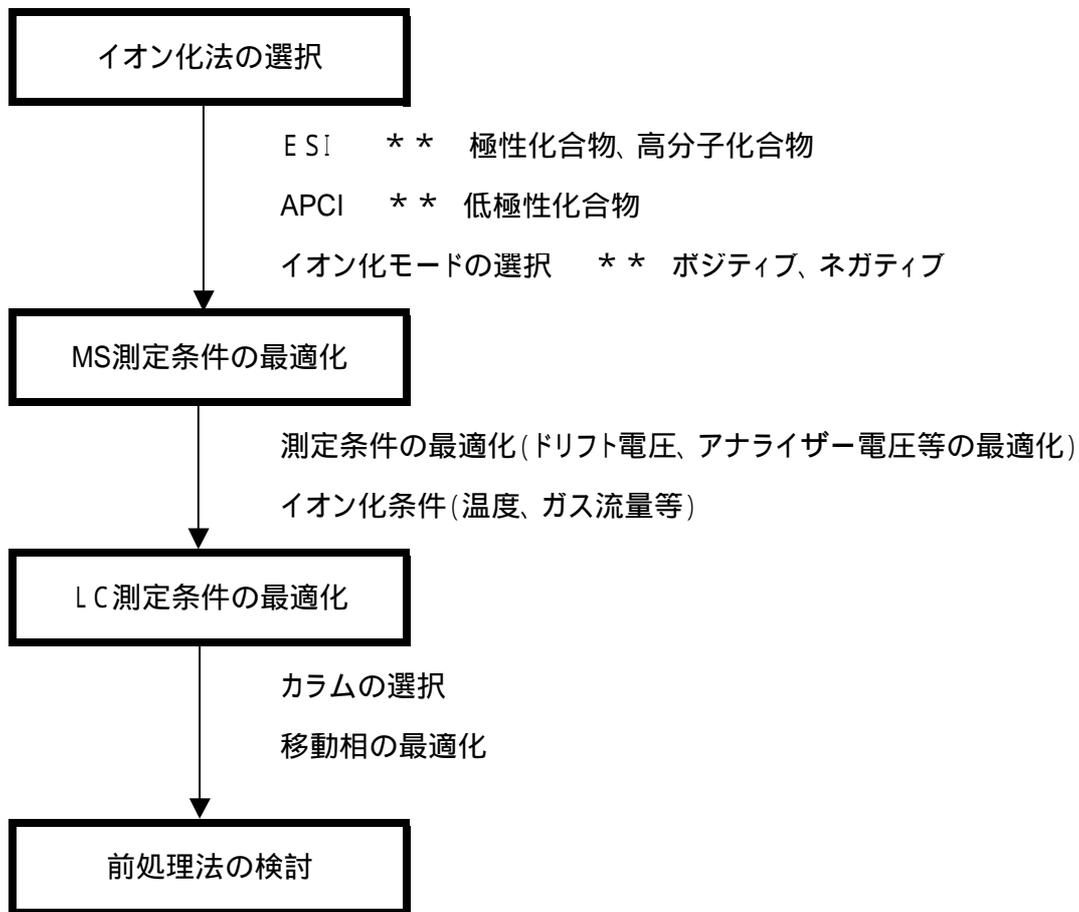


図1 分析法開発におけるLC/MSの最適化手順

イオン化の検討は、一般にシリンジポンプを用いて $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 程度の速度で標準溶液をイオン源に導入して測定する方法（インフュージョン測定）で行われることが多い。ESIのポジティブモードでは、 H^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 等が付加した $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ イオンが生成し、ネガティブモードでは $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$ 、 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 等のイオンが生成する。また、APCIでは、ポジティブモードでは $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、ネガティブモードでは $[\text{M}-\text{H}]^-$ が主に生成する。図2に示すように、イオンの検出が予想される質量範囲をスキャンしながら生成したイオンを検出するが、イオン源の電圧値が不適切な場合はイオンが観測されないことがあるため、ドリフト電圧（機種によりコーン電圧、フラグメンター電圧、エクストラクト電圧とも言う）等を変化させながらイオンを検出する必要がある。なお、インフュージョン測定では標準溶液のイオン源への注入速度は $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 程度となり、ESIではイオン源の温度が高いとイオン化が妨げられるため、イオン化室の温度を通常より下げて測定する必要がある。逆に、APCIでは正常なイオン化のためには $0.2 \sim 1 \text{ ml}/\text{min}$ 程度

の移動相流量が必要なため、シリンジポンプの流出液に HPLC を用いて移動相を追加して測定する。

LC/MS のイオン化は、分析目的物質が持つ官能基に大きく影響されるが、標準物質を溶解している溶媒の種類や組成にも大きく影響される。このため、インフュージョン測定で用いる標準液の溶媒組成は、予想される HPLC 測定の移動相と類似した組成とし、また、必要に応じてギ酸、酢酸アンモニウム等を添加して、分析対象物質がイオン化できる pH に調整してイオン化を促進させる。図 2 に示した Thifensulfuron-methyl の例では、注入溶媒が 50%メタノール溶液の状態では全くイオン化しなかったが、5mM 程度の酢酸アンモニウムを添加することで明瞭な擬分子イオン ($[M+H]^+$) を検出できた。

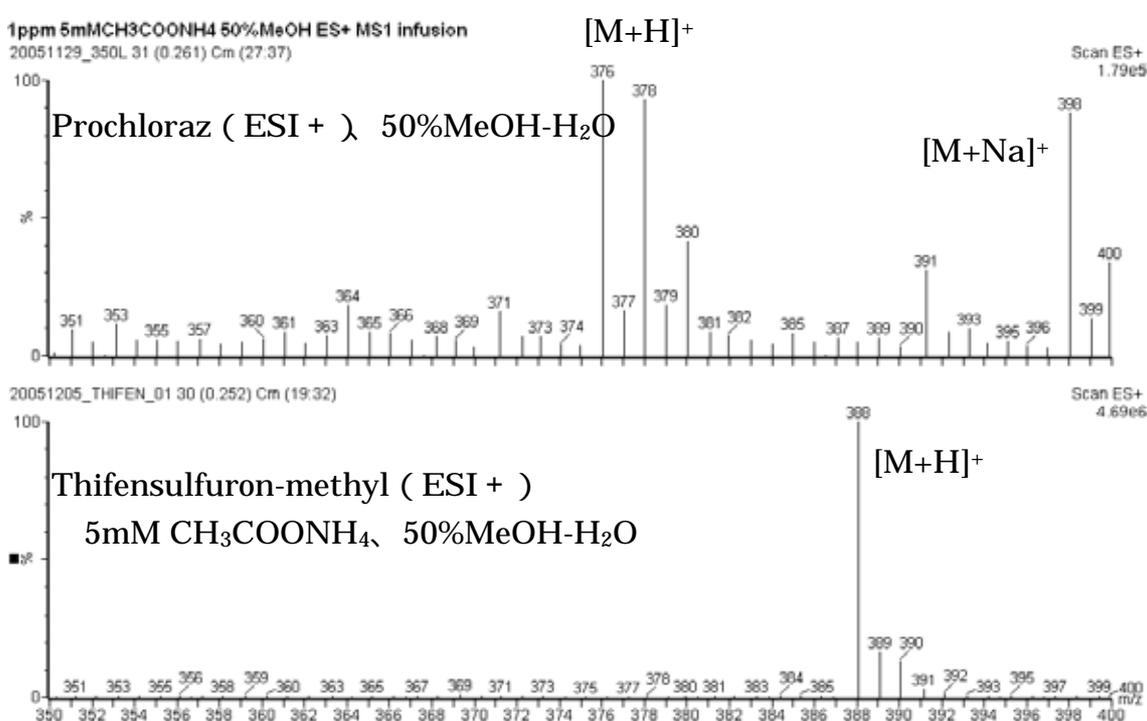


図 2 インフュージョン測定を用いたモニターイオンの検出

イオン化しやすい物質は、インフュージョン測定で容易に明確なピークをとらえることができるが、イオン化しにくい物質や図 2 の Prochloraz の例に示すようにイオン源バックグラウンドが高い場合には、生成したイオンとバックグラウンドを判別することが困難となる。こうした場合には、HPLC に空カラム (ピークチューブ) を装着して MS に接続し、オートサンブラから標準液を注入 (フローインジェクション) して測定するのが効率的である。図 3 にフローインジェクションによる測定例を示したが、この方法では、バックグラウンド消去も可能なため、バックグラウンドが高い APCI 測定でも明瞭なマススペクトルを得ることが可能で、短時間でイオン化の有無をスクリーニングできる利点がある。また、測定の

自動化が可能のため、移動相の組成やイオン源のパラメータを順次変化させながら測定することもできる。なお、フローインジェクション測定においてピークのテーリングやブロード化が認められる場合は、オートサンプラから MS までの経路において対象物質の吸着や滞留が生じている可能性があるため、移動相の組成を変更したり、配管の交換、接続部におけるデッドボリュームの点検等を行う必要がある。なお、フローインジェクション測定では、測定対象物質は標準液を溶解している溶媒と分離しないでイオン源に導入されるため、マススペクトルが標準液溶媒の影響を受けて変化し、LC カラムを用いた測定と異なる場合があるので注意を要する。

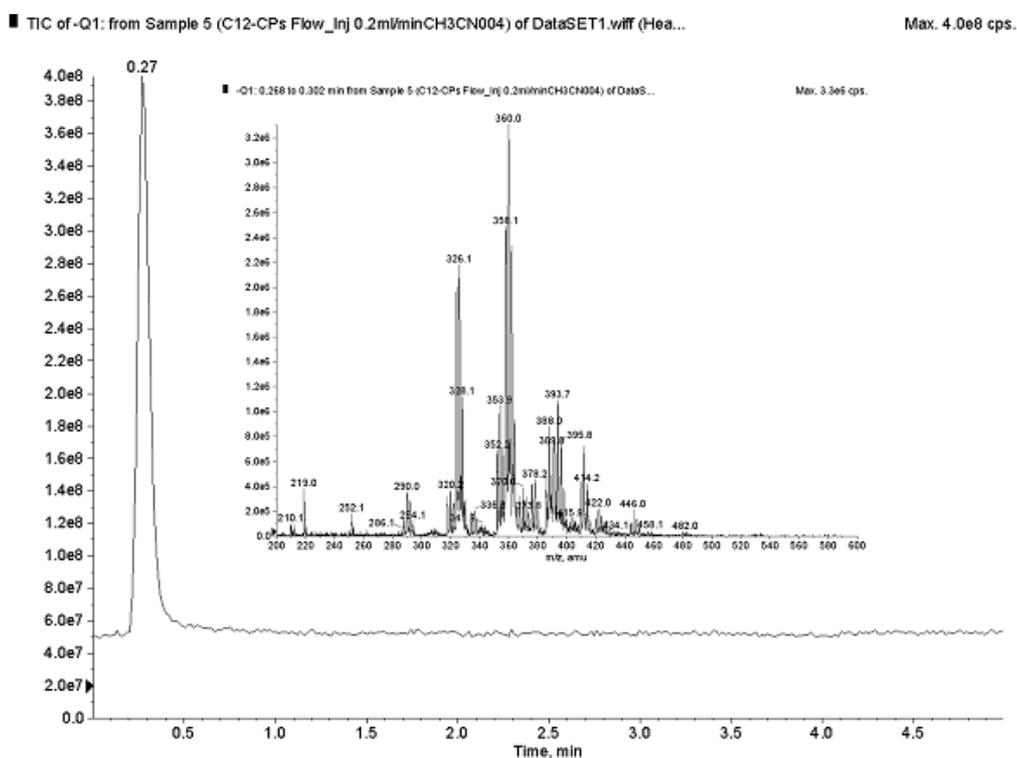


図3 フローインジェクション測定を用いたイオン化の検討（短鎖塩素化パラフィン）

2.2 MS 測定条件の最適化

LC/MS を用いた微量測定は SIM 測定や MS/MS 測定により行われる。このため、高感度測定を行うためには、ターゲットイオンをイオン化の過程でできるだけ多く生成させるとともに、効率的に MS のアナライザー部（イオン光学系）へ導入するための条件を定める最適化を行う必要がある。最適化は、イオン源部及びアナライザー部の各種電圧値の最適化とイオンソース部のパラメータ（ガス流量、温度等）の最適化からなるが、その手順は使用する機種によって若干異なり、自動化されている場合も多い。

イオン源部及びアナライザー部の最適化では、ドリフト電圧等を変化させて生成したターゲットイオンを効率的にイオン源部に導入するとともに、アナライザー部の各種電圧を

変化させて導入したイオンを効率的に検出器に導く条件を設定する。SIM 測定では、分析対象イオンの強度をモニターし、その強度が最大になるように電圧値を調整する。MS/MS 測定は、前章（LC/MS による環境汚染物質の分析）の図 2 に示されているように、MS1（Q1）で選択したプレカーサイオン（前駆イオン）をコリジョンセル（Q2）で窒素、アルゴンガス等と衝突させて解離させ、生成したプロダクトイオンを更に MS2（Q3）で選択して測定する方式である。前駆イオンは MS1（Q1）で SIM モードと同じ条件で選択されることから、MS1（Q1）の設定値は SIM の測定条件とほぼ同一の値となる。このため、MS/MS 測定の最適化では、SIM の測定条件に加えて コリジョンセルと MS2（Q3）の測定条件の最適化が行われる。

以上の操作で得られたイオン源部及びアナライザー部の最適化値は、物質に固有の数値であり、測定プログラムに入力する必要がある。また、これらの数値の大部分は、イオン源の種類（ESI または APCI）が変わっても変化しないことから、データベース化しておくことが望ましい。

図 4 に農薬である Thiram のプロダクトイオンスキャンスペクトルを示したが、Thiram はプロダクトイオンとして M/Z 196、120 及び 88 を生成する。MS/MS 測定の最適化では、プレカーサイオン（M/Z 241）から生成するプロダクトイオン（M/Z 88 または 120）の強度を高める方向で調整する。なお、プロダクトイオン（M/Z 88）は低質量領域にあることから、SIM 測定ではバックグラウンドが高く高感度分析が不可能であったが、MS/MS 測定では十分な感度と S/N 比を確保することができた。

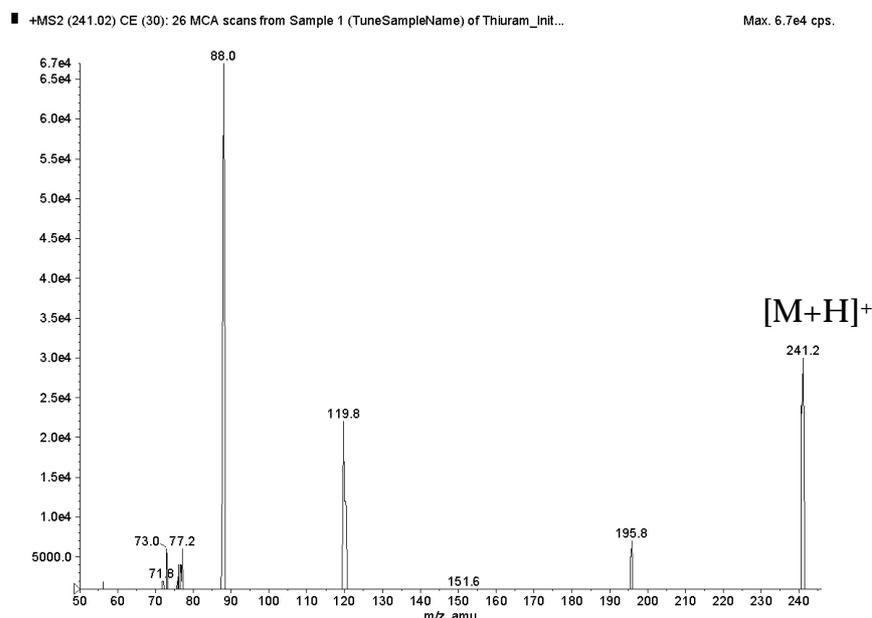


図 4 Thiram の MS/MS スペクトル（プロダクトイオンスキャン）

MS/MS 測定では、まず最初に MS1 (Q1) でプレカーション選択し、これをコリジョンセル (Q2) で解離させた後、生成したプロダクトイオンを更に MS2 (Q3) で選択していることから、目的物質と同一の質量数を持つ妨害物質のプロダクトイオンが目的物質と同じ質量数になる確率は低いため、極めて妨害の少ない測定が可能になる。図 5 に Thifensulfuron-methyl の MS/MS 測定の例を示したが、SIM 測定ではカラムバックに由来する妨害ピークの影響を著しく受けているのに対し、MS/MS 測定ではバックグラウンドが極めて低く、高感度に測定できた。SIM 測定ではバックグラウンドの影響を著しく受けることから、高感度測定を行うためには、イオン源やカラムに起因するバックグラウンドをできるだけ下げるとともに、分析試料のクリーンアップが必要となる場合が多い。

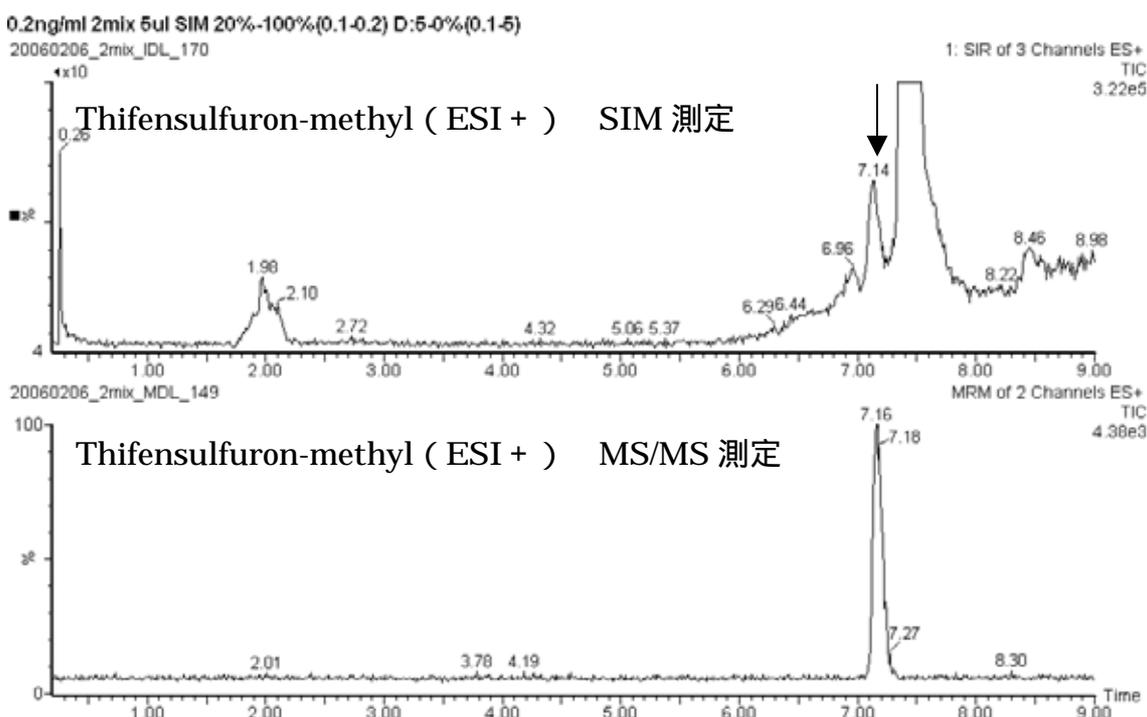


図 5 SIM 測定と MS/MS 測定における妨害ピークの影響 (0.2ng/ml)

分析対象物質毎のイオン源部及びアナライザー部の各種電圧値の最適化が終了した後、イオンソース部のパラメータ (ガス流量、温度等) の最適化を行う。イオンソース部の最適化の対象となるネブライザーガス流量、カーテンガス流量、イオンソース温度などは、測定対象物質毎に設定する必要はなく、イオン源の種類や LC 条件 (移動相の組成、流速等) によって変化することから、LC 条件が極端に変化した場合や、イオン源を変更した場合には再設定する必要がある。イオンソース部の最適化は、空カラムを接続した HPLC を用いてフローインジェクション測定により行われる。最近の LC/MS 測定では多成分を同時に分析する機会が多いことから、イオンソース部の最適化は、測定対象物質を代表すると考え

られる物質を選定し、対象物質全体が感度良く安定して測定できる条件に設定する。

2.3 LC 測定条件の最適化

高感度測定を行うためには、LC 分離においてできるだけシャープなピークを得るとともに、固定相及び移動相に由来するバックグラウンドを低く保つ必要があり、LC 分離条件の設定が重要となる。しかし、LC/MS では移動相に不揮発性の塩類を添加することができないため、HPLC 分析の LC 分離条件をそのまま LC/MS 分析に適用することは困難である。

LC/MS 分析では、GC/MS と異なり、試料注入直後からの測定が可能であり、LC カラムに不可逆吸着する場合を除いて、必ず目的物質のピークを観察できる利点がある。このため、文献等でカラム選択のための情報が得られない場合は、まず最初に、カラム長の短い（5cm 程度）ODS（C18）系カラムを選択し、LC 分離における基本的な特性を最初に把握するのが効率的である。短いカラムは目的物質を短時間で溶出できることから、様々な分離条件を短時間でテストできる利点がある。

例えば、

保持時間が短すぎる場合は	カラム長の増加 固定相炭素含量の増加（C18 C30） 移動相組成の変更、塩類添加
吸着が認められる場合	移動相の組成、pH 変更 固定相炭素含量の減少（C18 C8） 他の固定相への変更
全くピークが検出できない場合	固定相の変更

図6に水溶性が強い Thifensulfuron-methyl を吸着力の強い C30 を固定相とするカラムで測定した例を示した。当該物質は塩類を添加しない状態ではリーディングが著しかったが、5mM 酢酸アンモニウムを添加すると、ピークがシャープになり、イオン強度も増加した。逆に Prochloraz は、酢酸アンモニウムを添加するとイオン強度が減少したため、Thifensulfuron-methyl が溶出した直後には酢酸アンモニウムを添加しないグラジエント条件とした。Thifensulfuron-methyl などの水溶性物質では、注入する試料液の溶媒組成も LC 分離に大きな影響を与えるため、注入溶媒の組成はグラジエント初期の溶媒組成と同一にする必要があった。しかし、注入溶媒を含水させた場合には、物質によっては含水溶媒中で分解する可能性もあるため、十分に注意する必要がある。なお、当該物質は酢酸アンモニウムが存在しないとほとんどイオン化しないが、低圧グラジエント方式の HPLC に特有なグラジエントプロポーショニングバルブ（GPV）から酢酸アンモニウムがわずかに混入するため、塩類無添加の移動相条件でも当該物質のピークが観察された。

一方、比較的疎水的な物質を分析する場合には、固定相の炭素含量を減少させるのが効果的な場合がある。図7に中鎖塩素化パラフィンの測定例を示したが、中鎖塩素化パラフ

インは C18 では短いカラム（50mm）であってもピーク幅が広くテーリングする傾向を示したが、C8 カラムではシャープなピークとなり、感度を向上させることができた。

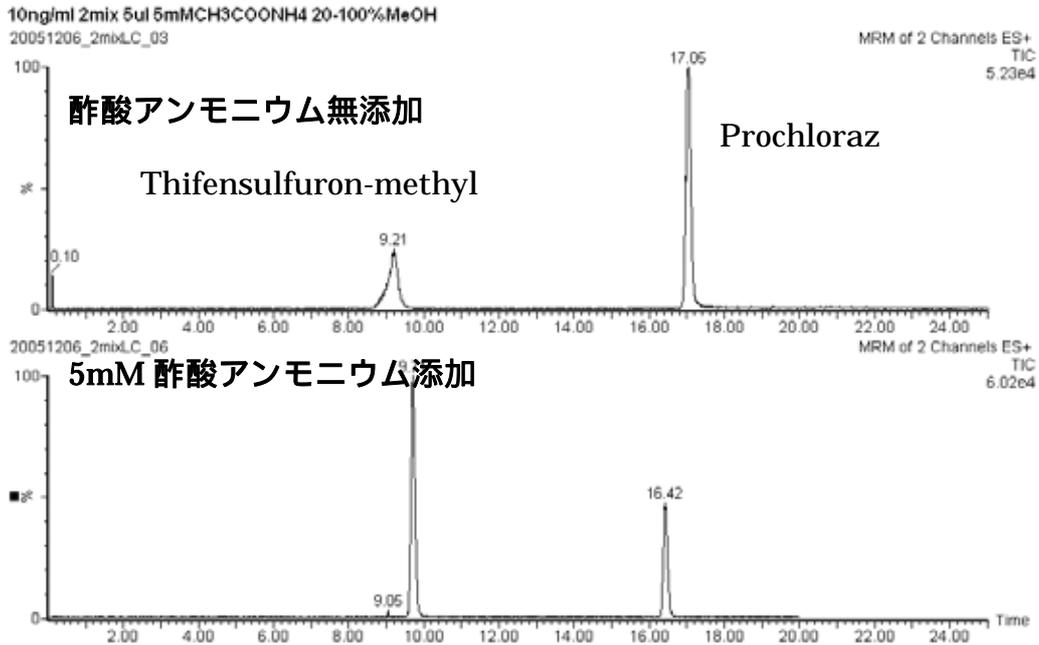


図6 塩類の添加による LC 分離の改善効果
(カラム：C30、2.1mm、150mm、20%MeOH 100%MeOH / 10min)

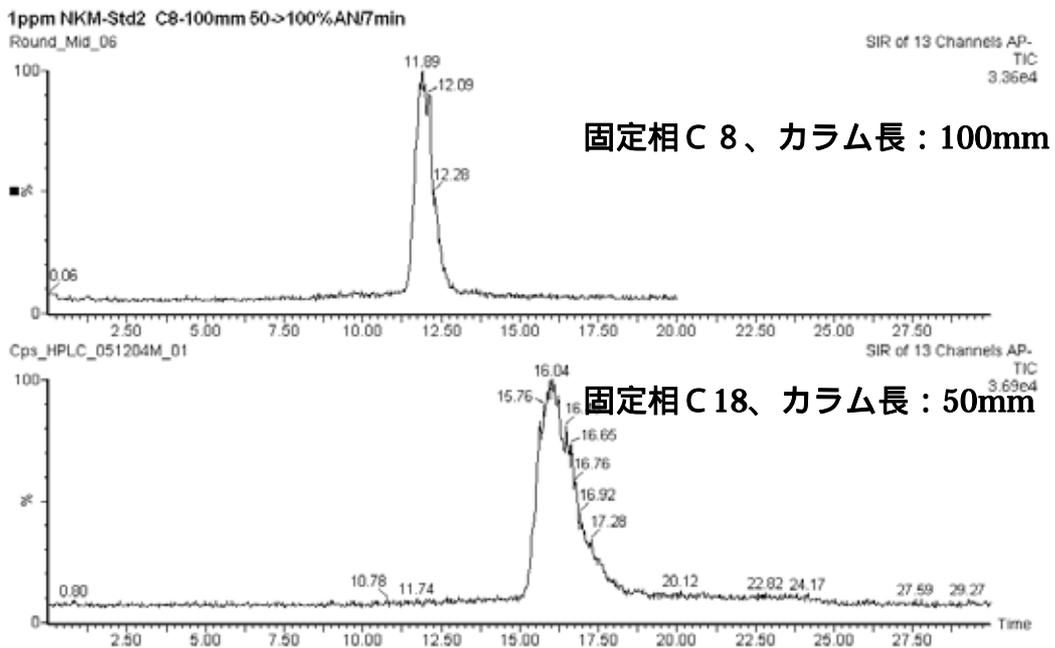


図7 固定相の炭素含量の与える LC 分離への影響（中鎖塩素化パラフィン）

ODS 系のカラムを使用し、揮発性の塩類（ギ酸、酢酸、アンモニア等）を移動相に添加してグラジエント分析することにより、大部分の物質は LC 分離が可能になるが、物質によっては全く分離されない場合がある。このような場合には、分析目的物質の物性に応じてポリマー系、GPC 系、イオン交換系等のカラムを試みる必要があるが、多種類のカラムが市販されていることから、十分な情報収集を行う必要がある。例えば、イミノクタジン三酢酸塩は吸着力が極めて強いために、ODS 系のカラムでは、移動相に次亜塩素酸ナトリウムを添加して吸着性を減少させて分離しているが、LC/MS では次亜塩素酸ナトリウムは使用できない。図 8 にイミノクタジン三酢酸塩を ODS 系のカラムと親水性ビニルポリマーのサイズ排除（SEC）カラムで測定した例を示したが、イミノクタジン三酢酸塩は次亜塩素酸ナトリウムを添加しない ODS 系カラムでは著しい吸着現象が生じたが、サイズ排除（SEC）系カラム（東ソー AW2500）では良好に分離され、高感度分析が可能であった。

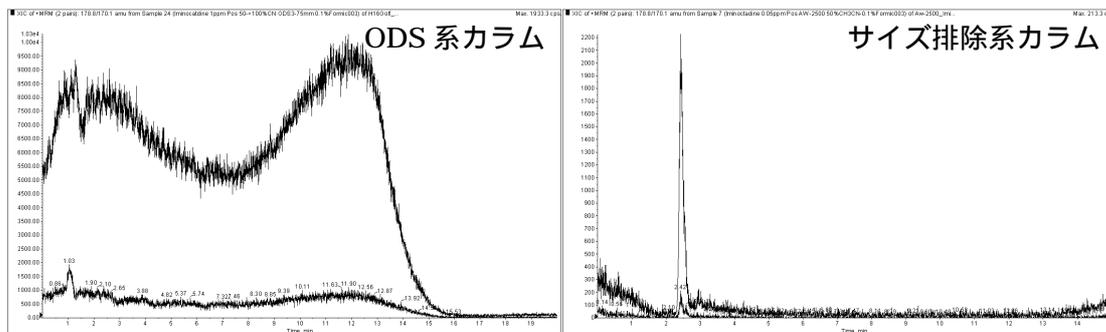


図 8 イミノクタジン三酢酸塩の ODS 系カラム及びサイズ排除カラムにおける分離
（カラム：2.1mm、150mm、50%MeOH 100%MeOH / 10min、0.1%ギ酸添加）

LC 分離条件の検討では、次々にカラムを交換して分離能を確認するが、新品やしばらく使用していなかったカラムからは、MS イオン源を汚染する物質が溶出する可能性がある。このため、カラムを LC/MS に接続する際は、カラムからの溶出液を MS に導入しない状態、または他の HPLC 装置に接続するなどして、予めカラムをエージングしておくことが望ましい。

一方、グラジエント分析を行う場合には、分析が終了する毎に移動相の組成を初期状態に戻すが、HPLC の送液プログラムと実際の溶媒組成とはかなりのタイムラグが存在すること、溶媒組成が一定となってもカラム固相と移動相間の平衡化にはかなりの時間を要するため、平衡化時間は十分長い時間（15 分以上）を確保する必要がある。LC/MS では HPLC と MS 装置が同期して測定が行われるが、HPLC の平衡化時間中は、MS 測定は不要である。このため、HPLC の流路を MS からドレイン流路に切り替えることができる装置では、平衡化時間中や妨害物質が多量に分離される保持時間の間は、流路をドレインに切り替え

る設定を行うことにより、MS イオン源の汚染をかなり防止できる。

3．分析法開発における留意点

GC/MS を用いた分析法開発では、目標検出下限値をクリアすることを目的に、大量の試料を溶媒抽出し、高濃縮測定する方法が採用されてきた。試料に共存する難揮発性成分は、GC/MS に使用されているキャピラリーカラムの分離特性を著しく損なうことから、GC/MS におけるクリーンアップ操作は、主として、試料液中に存在する難揮発性成分や妨害成分を除去することを目的に行われている。一方、LC/MS では、試料の抽出は ODS、ポリマー系等の固相カートリッジを使用する固相抽出法で行われる場合が多く、LC の分離も ODS 系カラムを用いて移動相をグラジエントして分析する場合が多くなっているため、試料液に共存する難揮発性成分が LC カラムに沈着してカラムの分離性能を損なう可能性は少ない。このため、LC/MS 分析におけるクリーンアップは、妨害成分の除去とイオン源内部の汚染防止を目的として行われることから、GC/MS を用いる分析法に比較して簡単な場合が多い。

分析精度の向上を目的に GC/MS 法では内標準法とサロゲート法が使用されているが、LC/MS はソフトなイオン化であるため、共存物質のイオン抑制効果により目的物質と内標準物質のイオン化率が変動し、定量精度が極端に悪化する場合がある。このため、内標準法を採用する場合は十分な検討を行う必要があり、現状ではできるだけ安定同位体標準品を使用するサロゲート法を採用することが望ましい。

LC/MS 感度の向上は、従来よりも少ない供試量で高感度に測定できる分析法の開発を可能にする。供試量が減少することにより、共存する妨害物質の影響は小さくなり、クリーンアップ操作が簡略化できるため、分析に要する時間と労力を削減することが可能になる。このような分析法の簡略化は、多成分同時分析法の開発を容易にするとともに、分析の自動化も促進するものと考えられる。

4．おわりに

分析法の開発で培われてきた分析技術の多くは、GC/MS による測定を前提に開発が進められてきたことから、非極性物質の分析に適した方法が多く、LC/MS で分析対象となる場合が多い高極性物質、高分子化合物等に効率的に分析できる技術の開発は遅れている。特に最近の環境分析では、水溶性物質、有機金属化合物、高分子化合物等に対する分析需要が増加しており、これらの化学物質を高感度に分析できる分析技術の開発が要請されており、今後の更なる発展が期待されている。

参考文献

環境庁環境保健部環境安全課：LC/MS を用いた化学物質分析法開発マニュアル、平成 12 年 4 月