

## LC/MSによる環境汚染物質の分析

大阪市立環境科学研究所 森脇 洋

### 1 はじめに

液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)は高極性難揮発性物質、熱分解しやすい化合物などガスクロマトグラフィー質量分析法(GC/MS)での検出が困難な物質を測定しうる可能性を有している。さらにUVや蛍光を検出器として用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法と比較して、高感度、高選択的な分析が期待できる。このため、マトリックス成分が多く、また分析対象物質が幅広い物性を有する環境分析においてその適用が望まれており、近年、検討が進んでいる。<sup>1</sup>

ここでは最初にLC/MSの使用方法を簡単に説明し、併せて環境分析へLC/MSを適用する際の問題点、留意点について述べたい。

### 2 LC/MSの使用手法

LC/MSの使用を検討するためには、どのような物質がLC/MSで検出できるのか、あるいは検出が困難なのかという点を、見極めなければならない。その最も単純な目安は化合物の極性である。LC/MSのイオン化法はエレクトロスプレー法(ESI)と大気圧化学イオン化法(APCI)が一般的に用いられている。前者は移動相を噴霧し、その霧滴に電圧をかけることにより生じるイオン種を電氣的に引き抜き、質量分析計へと送る方法であり、後者は移動相を噴霧、気化後、気相状態の溶媒分子を放電によりイオン化させ、このイオン化された溶媒分子と物質とのプロトンの授受を中心とした化学反応により生成したイオンを質量分析計へと導入する手法である(ちなみにESI/MSを開発したFenn氏は2002年度ノーベル化学賞を受賞された。<sup>2)</sup>。極性の高い物質は、ESI, APCIどちらのイオン化法でも感度よく検出できる。とくにアミノ基のようにプロトンが付加しやすい官能基、あるいはカルボキシル基のようにプロトンを放出しやすい官能基を有する化合物については感度がよい。一方、極性の低い化合物は溶液内でのプロトンの脱着、あるいは気相におけるイオン化反応が起こりにくく、イオン化が十分に進行しない。

極性の高い物質は一般に揮発性が低いのでGC/MSでの検出が困難な場合も多い。そのため、誘導体化を行い、揮発性を高めた後にGC/MSに試料を導入するという分析法が広く用いられてきた。LC/MSはこのような操作を必要としないことが多く、難揮発性物質の分析においては分析法の単純化が期待できる。

また、ESI/MSは多価イオンのピークが得られるので分子量が数万というタンパク質などの高分子の直接検出も可能である。このことを利用した様々な高分子分析がさかんに行われており、とくに生体高分子の研究においてはすでにESI/MSは重要な役割を果たしている。<sup>3,4</sup>

逆にLC/MSによる検出が困難である化合物の例としては極性の低い化合物、例えばベン

ゼン、アルキルベンゼン、多環芳香族炭化水素化合物(PAHs)などが挙げられる。ただし、これら物質にもアミノ基や水酸基などのプロトン授受を行いやすい置換基を有する類は LC/MS で感度よく検出できる。

次に LC/MS 測定の際、考慮すべき条件について触れよう。LC/MS の測定条件はイオン化方法、イオンモードの選択、ドリフト電圧が重要なパラメーターとなる。

イオン化法としては前述したように ESI と APCI の二種が主に用いられている。一般的に極性の高い化合物については ESI のほうが APCI よりも感度が良いとされている。また、逆に極性が比較的低い化合物は APCI のほうが検出しやすい傾向がある。例えば、多環芳香族化合物は感度が低いものの APCI により検出できるのに対し、ESI では検出が困難である。<sup>5</sup>

イオンモードはポジティブかネガティブかの選択をしないといけない。分析したい物質をポジティブイオンモードで測定するか、ネガティブイオンモードで測定するかの判断は、その化合物が有する置換基の種類により決定できる。すなわちプロトンが付加しやすい官能基を有する化合物の場合、ポジティブイオンモードが、プロトンを放出しうる官能基を持つ物質についてはネガティブイオンモードが適切であると考えられる。一般にポジティブイオンモードの方がネガティブイオンモードよりもバックグラウンド値が高いこと、ポジティブイオンモードではナトリウム付加体などのプロトン付加イオン以外のイオンが検出されることが多い点、また ESI/MS においてはネガティブイオンモードで放電が生じ、感度が悪くなることもある、などのファクターを考慮に入れ、イオンモードの決定をすべきであろう。<sup>6</sup>

イオン化部における条件設定で最も重要なファクターはドリフト電圧である。ドリフト電圧とはイオン化部で生成したイオンをマスへと引き込む電圧のことである。この電圧が低すぎるとイオンのマスへの移動が不十分となり、感度が出ない。一方、高すぎるとイオンのフラグメンテーションが進行する。ドリフト電圧を上げると、イオンの移動速度は速くなる。このため、ドリフト電圧を上げるほど、イオンがインターフェイスに存在する窒素分子などと衝突する際、大きな内部エネルギーを得ることになる。この内部エネルギーが結合解離エネルギーを超えるとフラグメンテーションが起こる。このようにドリフト電圧を上げてフラグメンテーションを起こす手法を CID と言い、この手法の構造解析への利用が、さかんに検討されている。

LC/MS において得られるマススペクトルはポジティブイオンモードではプロトン付加イオン  $[M+H]^+$ 、ネガティブイオンモードではプロトン脱離イオン  $[M-H]^-$  のみが見られるケースが多い。これらのイオンピークができるだけ感度よく得られるようなドリフト電圧をそれぞれの物質について、探索する必要がある。

イオン化条件を決定後、LC の分離条件を検討しないといけない。しかし、LC/MS を用いる場合、カラム分離に用いる移動相に制限があることに注意しないといけない。

一般に HPLC におけるカラム分離には pH 調整試薬としてリン酸バッファーが多用され

ている。しかし、リン酸バッファーは LC/MS には使用すべきでない。リン酸バッファーは難揮発性であるため移動相の噴霧部、あるいはイオン化部とマスのインターフェイス部において析出し、イオンの通過孔を詰まらせ、イオンの通過を妨げるからである。このため感度が大きく減少したり、不安定になったりする。カラム分離に pH 調整が必要な場合は添加剤として、揮発性の物質を用いなければならない。酸性側に調整するのならギ酸、酢酸など、塩基性側にはアンモニアを添加するのが一般的である。

また移動相の十分な霧化、あるいは気化が行えないとイオン化が進行しにくくなるので移動相には粘度、沸点の高い溶媒を用いるべきでない。移動相に用いる有機溶媒はメタノール、アセトニトリルが一般的であり、これらと水の混合溶液が使用されるのがほとんどである。ピーク形状、分離をよくするためにグラディエントは多用される。この際、ピークの得られる保持時間での溶媒組成において最適な霧化、気化の温度条件を設定する。

環境分析など粗雑物の多い分析においては分離が非常に重要な意味を持つ。LC カラムは一般に GC のキャピラリーカラムと比較して、その分離能力は劣る。LC/MS は粗雑物までイオン化し、そのピークを拾うため、前処理や分離が不十分であると分析対象物質のピークが隠れてしまう。すなわち、試料の前処理、分離条件の最適化には十分な検討が必要となる。環境分析に LC/MS を使用するには、前処理方法、カラムの選択、移動相条件の設定など、考慮すべき点は多い。これらの条件を試行錯誤により決定し、分析へと移る。

以上、LC/MS を使用する際の条件について述べた。また、LC/MS の使用の手順をフローチャートとして図 1 にまとめた。<sup>7</sup>

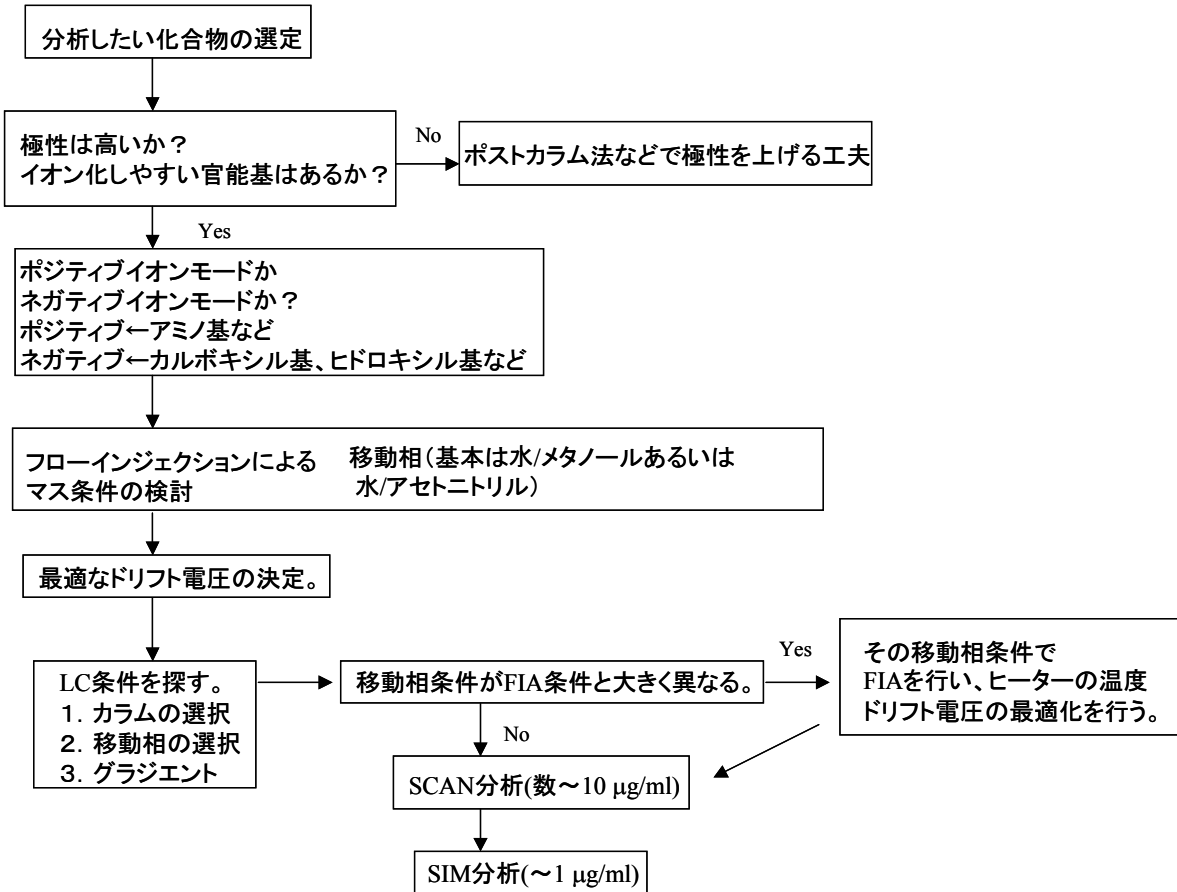


図 1 LC/MS 測定の手順

LC/MS における選択性を上げるために近年、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC/MS/MS) がよく使用されている。LC/MS/MS のモデルを図 2 に示す。LC/MS/MS は二つの MS を連結し、一つ目の MS で生成したイオン種のうちの一つを前駆イオンとして選択し、二つ目の MS で、その前駆イオンの分解によって生じるプロダクトイオンを検出する方法である。この手法により、高い同定能力に基づく定性分析はもちろんのこと、複雑なマトリックスを含む試料から目的物質を定量分析することが可能となる。LC/MS/MS の使用に際しては、マススペクトル、マスマススペクトルの測定を行い、前駆イオン、プロダクトイオンを決定した後、前駆イオンの衝突解離を行うための電圧の設定等が必要となる。

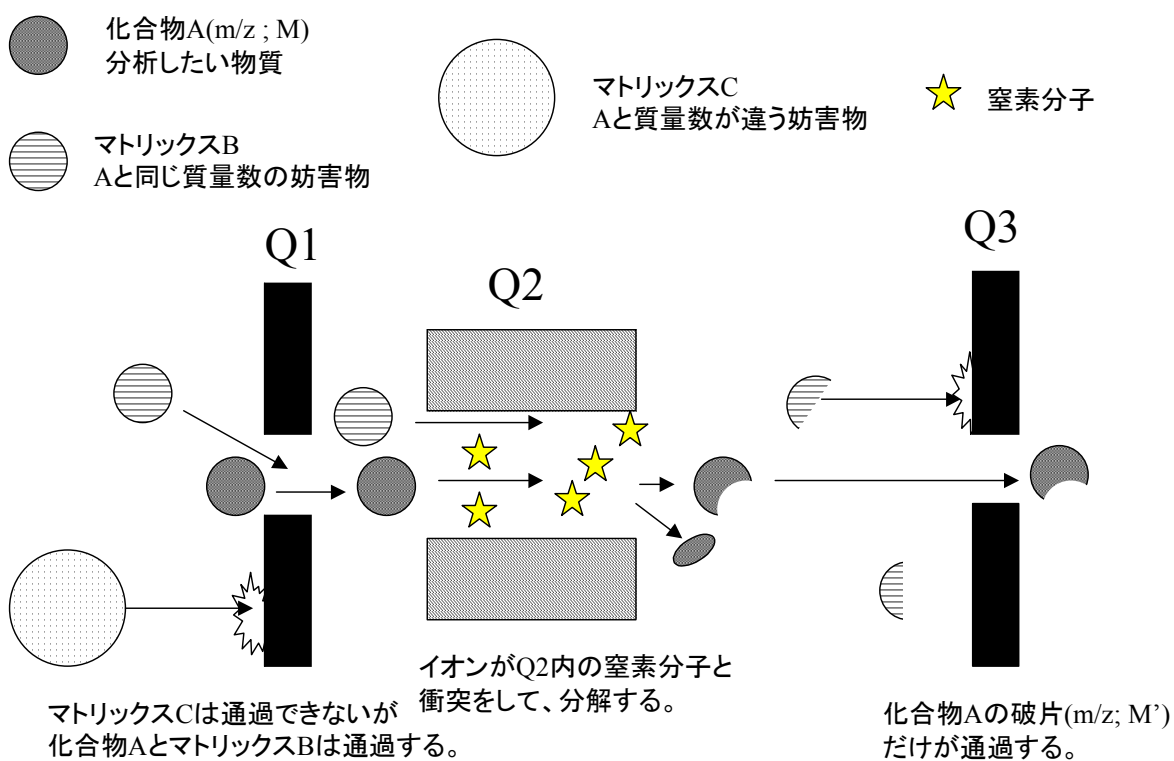


図 2 LC/MS/MS のモデル図

### 3 LC/MS の有する問題点とその解決法

LC/MS は従来の検出法では分析が困難であった物質の検出が実行できる可能性を有している。また誘導体化などの分析操作を省けることも多い。しかし、一方で環境マトリックスとの分離が不十分であると分析物質のピークが妨害されることがある。これは LC/MS が高感度であり、微量のマトリックスをも検出してしまうこと、LC の分離能に限界があることなどに起因する。また、とくに有機金属化合物などについては LC/MS 適用のための前処理法が確立されていないことも原因として挙げられる。マトリックスの影響を減らすために、例えば LC/MS/MS を用いて選択性を上げること、あるいは前処理法を進展させ、マトリックスとの分離を厳重に行うことなどの工夫が必要となる。対象となる化合物の分離に最適なカラム、移動相条件を見出すことも重要である。

LC/MS は定性能力が GC/MS と比較して一般的に低いとされている。その原因として、マススペクトルがシンプルなパターンを示すことが多い点、マススペクトルデータベースの構築が不十分であることが挙げられる。LC/MS のデータベース構築のための問題点としては、インターフェイスのドリフト電圧などパラメーターにより大きな差異が出ること、LC/MS の機種により分析条件のパラメーターに違いがあること、得られるマススペクトルに機種差が生じることがある点などが考えられる。これら LC/MS データベース構築上の問題点を考慮に入れた上で、著者らは LC 分離条件、MS 条件、分離状況、マススペクトル情報など包括的な情報を有する LC/MS データベースを作成できないか検討中であり、本マニュアルでもその手法について概説している。<sup>8</sup>

さらに LC/MS は検出できる化合物に限界がある。前述したように、とくに ESI/MS は極性の低い化合物の検出が困難であり、多環芳香族化合物はほとんど検出ができない。このためカラムで多環芳香族化合物を分離後、トロピリウムカチオンや銀イオンを添加し、多環芳香族化合物のイオン性錯体を形成させ、それを検出するなどの応用が図られている。<sup>9</sup>  
<sup>10</sup>また、極性の低い化合物に極性の高い官能基を導入し、LC/MS 分析に供する誘導体化法の例も報告されている。<sup>11</sup>このような手法を用いて LC/MS 適用の範囲を広げる工夫が行なわれているが、今後の課題である。

#### 4 おわりに

LC/MS を使用するうえで知っておきたい LC/MS の特徴、またその手順について概説した。LC/MS は GC/MS で検出が困難である物質の分析への適用という形で威力を発揮し、環境分析において、今後、重要な役割を果たしていくと考えられる。

#### 参考文献

1. 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
2. 森脇 洋：2002 年度ノーベル化学賞について．生活衛生,2002, 46, 253-255.
3. 原田健一、田口 良、橋本 豊編：生命科学のための最新マスペクトロメトリー,2002, 講談社サイテントィフィック.
4. Kayganich K., Murphy R.: Fast atom bombardment tandem mass spectrometric identification of diacyl, alkylacyl, and alk-1-enylacyl molecular species of glycerophosphoethanolamine in human polymorphonuclear leukocytes, *Anal. Chem.*,1992, 64, 2965-2971.
5. Marvin C., Smith R., Bryant D., McCarry B.: Analysis of high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr A*, 1999, 863(1), 13-24.
6. Kudaka I., Kojima T., Saito S., Hiraoka K.: A comparative study of laser spray and electrospray, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2000, 14, 1558-1562.
7. LC/MS 研究会, 全国公害研会誌, 2000, 25,102-120.
8. 森脇 洋, 上堀美知子, 古武家義成, 鈴木 茂, 花田善文：LC/MS データベースの構築について．環境と測定技術,2003, in contribution.
9. Moriwaki, H.: Electrospray mass spectrometric determination of 1-nitropyrene and non-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons using tropylium cation as a post-column HPLC reagent. *Analyst*, 2000, 125, 417-420.
10. Takino M., Daishima S., Yamaguchi K., Nakahara T.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using silver nitrate as a post-column reagent, *J. Chromatogr A*, 2001, 928(1), 53-61.
11. Nakagawa Y., Hashimoto Y.: Polar Derivatization of 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone and Sensitive Analysis by Semimicro-LC/ESI-MS, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 2002, 50, 330-336.