特集
2

化学物質微量分析の最新動向

LC/MS/MS 測定における
ハイスループット化について

佐藤 太*・佐々木 秀輝*

キーワード：LC/MS/MS, UPLC™, イオン抑制, ハイスループット

1. はじめに

環境中のさまざまな汚染物質が、どこから供給され、どのように移動または分布し、最終的にどのような形になるのかを調べることは、人間を含む環境全体を健全な状態に保つために、非常に重要なことである。かつては重金属などの無機化合物が汚染物質として問題となってきたが、近年ではダイオキシンや農薬などの有機化合物による汚染に関心が集まっている。こうした有機微量汚染物質は、環境中で広範囲に存在するだけでなく、非常に低い濃度でも人体や環境へ作用する恐れがある。さらに、土壌や水などの環境試料は、目的の微量汚染物質以外に、さまざまな物質を含んでいる複雑な混合物であるため、より高感度な測定をするためには、共存する妨害物質から目的とする化合物を明瞭に分離する必要がある。

ガスクロマトグラフ／質量分析計 (GC/MS) や高速液体クロマトグラフ／質量分析計 (LC/MS) は、複雑な混合物から目的の化合物を分離するため、極性などの個々の物質の性質で分離を行なうクロマトグラフィーと質量の違いで分離を行なう質量分析計を組み合わせた分析機器であり、微量有機汚染物質の分析に大きな役割を果たしてきた。特に LC/MS は、過去10年間に装置性能が向上し、環境分析の分野で幅広く使用されるようになっていく。このような流れを受けて、平成16年4月1日に施行された新しい「水質基準に関する省令」では、農薬の多成分分析の公定法に LC/MS が測定機器として採用されている。

LC/MS は高い測定感度と選択性をもつため、

多数の汚染物質を同時に、高感度に分析することが可能であるが、有機微量汚染物質の研究やモニタリング調査を詳細に行なうためには、より短い時間で、数多くの試料を分析することが求められる。本報では、従来の LC/MS のハイスループット分析における問題点、それを解決するひとつの手段としてのウルトラパフォーマンス液体クロマトグラフ (UPLC™) について、さらに、UPLC™ と MS 検出器を組み合わせることによる利点について言及する。

2. これまでのハイスループット分析

環境試料の分析の工程は、試料の前処理と機器による測定の2つに大きく分けられる。前処理はさらに試料から目的の化合物を取り出す抽出と、同時に抽出される妨害物質を取り除く精製の2つで構成される。前処理と測定は互に関連しており、目的化合物と妨害物質の選択性が高い機器を測定に用いれば、前処理における精製操作は大幅に省略することが可能となる。選択性に優れた LC/MS を測定機器として用いれば、それだけで分析全体のスループットを向上させることができる。

図-1 は水道原水を500倍濃縮し、LC/MS および LC/MS/MS で測定した例である¹⁾。LC/MS の中でも特に LC/MS/MS は、マルチプル・リアクション・モニタリング (MRM) により非常に特異的な検出が可能のため、クロマトグラム上に試料由来の妨害となるピークがほとんど見られない。このためクロマトグラフィーによる分離もできる限り簡単に行ない、測定時間を短くしようと

Increasing throughput for determination using liquid chromatography tandem mass spectrometry

*日本ウォーターズ㈱マスマスベクトロメトリーテクノロジー Futoshi SATO, Hideki SASAKI

・ a, c : 水道原水500倍濃縮試料, b, d : 水道原水500倍濃縮試料にメコプロップを2.5 ppb 相当測定前添加した試料.

図-1 LC/MS/MSとLC/MSのクロマトグラムの比較¹⁾

する手法が考えられてきた。例えば、長さ15cmの分析カラムを2～3cmに変更すれば、保持時間は5分の1程度に短縮できる。さらに、カラムを短くすることでカラム圧力が下がるため、線速度を上げることが可能となり、分析時間はさらに短くすることができる。従来のハイスループット分析はこうした手法が主流であり、カラムは溶媒ピークを分離するために使用する程度の位置づけにすぎなかった。しかしながら、試料溶液中には試料由来の複雑な組成を持つ妨害物質が存在し、短いカラムを用いたハイスループット分析では、これら妨害物質と目的化合物が分離されずに分析カラムから溶出してくる。この共溶出によって引き起こされる現象がマトリックス効果である。

3. マトリックス効果

マトリックス効果とは、LC/MS測定において試料溶液中の目的化合物のレスポンスが、標準溶液と比べて増加または低下する現象で、エレクト

ロスプレーイオン化法(ESI)で特に顕著に起こることが知られている。血漿や尿などの生体試料では以前から報告されているが²⁻⁴⁾、処理場からの放流水や河川水などのさまざまな環境試料などでも引き起こされる⁵⁻⁷⁾。マトリックス効果のうち、レスポンスが低下する現象は、イオン抑制とも呼ばれ、正確な定量結果を得る妨げとなり、また、分析法の定量下限値を制限する要因となる。

マトリックス効果に対しては2つの対処法が考えられる。ひとつは、検量線の作成方法の変更であり、内部標準法やmatrix matched 検量線などの方法がある。特に安定同位体を内部標準にすれば、目的化合物と物理化学的な挙動が一致するので、かなり高い補正効果が期待できる。しかしながら、安定同位体が入手できる化合物は限られており、また、安定同位体の標準物質は高額なため、特に多成分分析を行なう場合にこの手法を適応することは困難である。

もうひとつの対処法は、前処理における精製により妨害成分を取り除くこと、および測定の際のクロマトグラフィーにより妨害成分との分離を行なうことである。Fergusonらは⁸⁾、下水処理放流水の前処理にアフィニティーカラムを用いて、エストラジオール類に対して特異的な精製を行なうことにより、LC/MSにもかかわらずLC/MS/MSと同程度の高感度な分析を行っており、同時にイオン抑制を防ぐことに成功している。しかしながら、17 β -エストラジオールとエストロンのモノクローナル抗体を使用したアフィニティーカラムを用いたため、試料溶液を用いた回収試験では17 α -エチニルエストラジオールの回収率は2%に低下してしまっている。このように、より厳しい精製を行なうということは、測定する成分を限定することになり、多成分の同時分析には向いておらず、前処理も含めた分析全体の効率も低下する。

また、従来のHPLCでクロマトグラフィーの分離を重視すれば、分析時間が長くなるので、同様に分析の効率が低下してしまう。このように、マトリックス効果に対して万能な対処法はないが、正確な定量結果を得るためには、何らかの対処を行ない、分析法の評価を行なう必要がある。従来のハイスループット分析では、マトリックス

図-2 van Deemter プロット、各粒子径におけるカラムの理論段高と移動相の線速度⁹⁾

効果の影響が強く出る懸念があり、より一層の注意が必要となる。

4. UPLC™とは

UPLC™とは、2 μ m以下の粒子径の分析カラムに、高い線速度で移動相を流すことにより、分離の向上と分析時間の短縮を、同時に実現する新しい分離の技術であるが、その原理は従来のHPLCの理論から導かれるもので、非常に単純である。図-2は異なる粒子径のカラムにおける理論段高（一段あたりのカラムの長さ）と移動相の線速度との関係を示したものである⁹⁾。図から明らかなように、カラム長さが同じならば、粒子径が小さくなるにつれて理論段高は低くなり（理論段数は高くなり）、かつ理論段高が低いま（理論段数が高いま）維持される線速度の範囲は高流速側に幅広く広がっていく。つまり、長さが同じカラムの場合、粒子径が小さいほうが、理論段数が高くなるため分離が向上し、さらに、移動相の線速度を高くしても分離効率が維持される。これは分離の向上と分析時間の短縮が同時に可能となることを意味している。このような理論上の利点を得るためには、高压に耐えうるシステムの開発などの技術的な困難を伴うが、これを実現したものがUPLC™である。

UPLC™の高い分離効率は、単に目に見える

個々の測定物質のピーク分離の向上だけではなく、見えない妨害との分離の向上という利点を持つため、マトリックス効果の影響が少ないハイスループット分析を実現する可能性をもつ。以下にUPLC™/MS/MSの分析例を示す。

5. 分析時間の短縮

図-3は、HPLCとUPLC™を使用して、28成分の農薬をMS/MSで分析した時の、MRMクロマトグラムを示したものである¹⁰⁾。UPLC™を用いることで、グラジェント終了後の平衡化時間も含めた全分析時間を30分から5分の1の6分へ短縮することができた。ESI-LC/MSでは、イオン化の際の効率を最適にするため、移動相の流速を0.2mL/min程度にすることが多いが、LCのシステムによっては、グラジェントの時にポンプで混合された溶媒がカラムへ到達するまでのディレイタイムが、無視できないほど大きくなる。それに対してUPLC™では、高い線速度を実現するために、カラム内径に対して相対的に高い流速で移動相を流すので、このディレイタイムも小さくすることができる。これによるグラジェントの平衡化時間の短縮も、UPLC™により分析のサイクル時間が短くなる理由のひとつである。

UPLC™とHPLCでは、充填剤の特性やグラジェント条件が異なるためクロマトグラムのパターン

(a) HPLC/MS/MS MRM クロマトグラム, (b) UPLC™/MS/MS MRM クロマトグラム

1: チラム, 2: ベンタゾン, 3: カルボフラン, 4: 2,4-D, 5: トリクビル, 6: イブプロロン, 7: オキシ銅, 8: アシラム, 9: ベンシリド, 10: メコプロップ (MCP), 11: カルバリル (NAC), 12: チオファネートメチル, 13: カルプロパミド, 14: グラボン, 15: ジウロン (DCMU), 16: メソミル, 17: ペノミル, 18: ベンフラカルブ, 19: プロベナゾール, 20: ダイムロン, 21: ペンシルフロメチル, 22: トリシクラゾール, 23: アゾキシストロビン, 24: ハロスルフロメチル, 25: フラザスルフロ, 26: チオジカルブ, 27: シデュロン, 28: mbc(カルベンダジム)

図-3 農薬28成分のMRMクロマトグラム¹⁰⁾

が若干異なっており, UPLC™により分離が向上した部分とそうでない部分があった. そこでピーク・キャパシティによる比較を試みた. ピーク・キャパシティは, グラジェント分析における分離を示す指標であり, グラジェントをかけている時間にベライン分離したピークの数を表している. この分析におけるHPLCとUPLC™のピーク・キャパシティはそれぞれ67と72であり, 分析時間が短くなっても分離が維持されていることが示された.

6. イオン抑制の低減

つぎに, 医薬品のベラパミルを用いて, 従来のハイスループット分析とUPLC™でイオン抑制の影響を比較した例を示す¹¹⁾. 評価には, 分析カラムとMS検出器の間にTEE(3つのラインを接続するコネクタ)をつけて, ベラパミルの標準溶液を混合するように組んだLC/MSを用いている. 図-4はこのシステムで, 除タンパクしたラットの血漿をグラジェント分析した時の, ベラパミルのSIMクロマトグラムである. カラムの充填剤と移動相の流速はそれぞれ, HPLCでは3.5 μ mと270 μ l/min, UPLC™では1.7 μ mと550 μ l/minであり, その他の条件は同一となっ

ている.

クロマトグラムのネガティブピークは, 生体試料由来のイオン抑制を生じさせる妨害物質に相当する. どちらのクロマトグラムでも, 枠線で示された部分に合計5本の妨害物質のピークが存在するが, UPLC™ではピークがシャープであり, ベースライン分離されている. これはUPLC™を用いることでイオン抑制が生じる可能性を削減できることが示している.

このように, UPLC™をMSと接続すれば分析時間の短縮と同時に, LC/MSで定量分析を行なうときの問題点であるマトリックス効果の抑制が期待できる. このことは正確な定量結果を効率よく得るためには非常に大きな利点となる.

7. 分離の改善

これまでは既知化合物の定量試験の迅速化とイオン抑制について述べてきたが, UPLC™による分離の向上ということに焦点をあてて, 別の側面からMS検出器と組み合わせた場合の利点について考えてみる. 図-5は医薬品のデキストロメトロファンのラットの肝ミクロゾーム代謝物を, HPLCおよびUPLC™によりTOF-MSでスキャン分析した際の, N-脱アルキル代謝物のスペク

(a) UPLCTM/MS, (b) HPLC/MS図-4 UPLCTMとHPLCのイオン抑制の比較⁽¹¹⁾ (a) HPLC, (b) UPLCTM図-5 HPLCとUPLCTMのスペクトルの比較⁽¹²⁾

トルを示したものである⁽¹²⁾。薬物の代謝物同定の分析では、試料の組成が非常に複雑であり代謝物の種類も多いため、クロマトグラフィーの分離が重要になる。この分析例ではHPLCのピーク・キャパシティが20なのに対してUPLCTMでは100以上に増加している。このため、同時溶出する化

合物が大幅に減少し、それぞれのピークのスペクトルの純度が高くなっている。

また、代謝物の分析においては多数の構造異性体を同定することが求められるが、構造異性体は質量分離できないためクロマトグラフィーでの分離が必要となる。図-6はプロクロロペラジンの水酸化物をHPLC/MSとUPLCTM/MSで測定したものである⁽¹²⁾。HPLCでは3つのピークしか確認できないが、UPLCTMでは8つの構造異性体すべてが確認できている。これはUPLCTMにより分離が向上したこと、およびピークがシャープになりかつイオン抑制が低減できたため低濃度の代謝物が確認できたことの相乗効果により、可能になったと考えられる。

このように、質量分離を行なうMS検出器においても、クロマトグラフィーの分離が向上することは、データの質の向上という大きな利点がある。近年、四重極MSよりもスキャン感度に優れているTOF-MSを用いた環境試料のモニタリング分析例が発表されているが、こうしたスキャン分析においてスペクトルの質を高めること

図-6 HPLC と UPLCTM の構造異性体のピーク分離の比較¹²⁾

は、迅速なデータの解析を行なううえで重要となると思われる。

8. ま と め

LC/MS は今後ますます汎用の装置として環境分析の分野で活用されるようになる。それに伴い分析のハイスループット化が求められるが、LC/MS で正確な分析結果を得るためには、クロマトグラフィーの分離は無視できない要素である。分離効率が高い UPLCTM を MS 検出器と組み合わせることで、分析時間の短縮やマトリックス効果の抑制などのさまざまな利点が得られるため、迅速で信頼性の高い分析法の構築が期待できる。

参 考 文 献

- 1) 佐藤太, 佐々木秀輝: 水道法農業の LC/MS/MS を用いた一斉分析について, 第13回環境科学討論会講演要旨集, 276-277 (2004)
- 2) Müller, C., Schäfer, P., Störzel, M., Vogt, S., Weinmann, W.: Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries, *Journal of Chromatography B*, **773**, 47-52 (2002)
- 3) Annesley, T. M.: Ion Suppression in Mass Spectrometry, *Clinical Chemistry*, **49**, 1041-1044 (2003)
- 4) Stokvis, E., Rosing, H., Beijnen, J. H.: Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 401-407 (2005)
- 5) Freitas, L. G., Götz, C. W., Ruff, M., Singer, H. P., Müller, S. R.: Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1028**, 277-286 (2004)
- 6) Lindberg, R., Jarnheimer, P., Olsen, B., Johansson, M., Tysklind, M.: Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards, *Chemosphere*, **57**, 1479-1488 (2004)
- 7) Miao, X., Metcalfe, C. D.: Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **75**, (15), 3731-3738 (2003)
- 8) Ferguson, P. L., Iden, C. R., McElroy, A. E., Brownawell, B. J.: Determination of Steroid Estrogens in Wastewater by Immunoaffinity Extraction Coupled with HPLC-Electrospray-MS, *Analytical Chemistry*, **73**, (16), 3890-3895 (2001)
- 9) Swartz, M. E.: UPLCTM: An Introduction and Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **28**, 1253-1263 (2005)
- 10) 佐藤太, 佐々木秀輝: UPLC/MS/MS を用いた一斉分析について, 第14回環境科学討論会講演要旨集, 660-661 (2005)
- 11) Gibb, I., Sprake, E., Preece, S., McManus, E., Diehl, D.: Effect of Sample Preparation and Chromatographic Separation on Matrix Effects in Quantitative Bioanalysis, *British Mass Spec Society Meeting* (2005)
- 12) Castro-Perez, J., Plumb, R., Granger, J. H., Beattie, I., Joncour, K., Wright, A.: Increasing throughput and information content for *in vitro* drug metabolism experiments using ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 843-848 (2005)