

Technical Review

環境分析における LC-MS/MS と固相抽出カラムの利用

佐々木俊哉

The use of LC-MS/MS and solid phase extraction column
for the environmental analysis

Shunya Sasaki

*Nihon Waters K.K., No. 5 Koike Bldg.**1-3-12 Kita-Shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0001, Japan***Abstract**

Over the last decade, the combination of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry has become the most important tool in many fields, especially when a determination of specific analytes in a complex matrix needs to be performed such as measurement of residual contaminants in the environment. The reason for this widespread acceptance is the high selectivity and high sensitivity of MS techniques that permit the detection of very low levels of target analytes in the presence of a complex matrix background. However, experience has taught that, while detection is no longer an obstacle, quantitative determination of the species of interest may be problematic. Steps must be taken prior to analysis to minimize or eliminate matrix effects via sample clean-up techniques such as solid phase extraction. The use of LC-MS/MS and solid phase extraction(SPE) column for the environmental analysis are explained in this paper.

Keywords: liquid chromatography mass spectrometry, solid-phase extraction, matrix effect, ion suppression

1. はじめに

環境分析の特徴のひとつに環境中の複雑かつ大量のマトリックス成分の存在がある。それに対して測定すべき成分は ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) オーダーもしくはそれ以下と微量で、高分離および高選択的な分析技術が必要とされる。

ガスクロマトグラフ質量分析計や高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS, LC-MS/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うクロマトグラフィーと質量の違いで分離を行う質量分析計を組み合わせた分析機器であり、環境中に残留する農薬類など微量有機物質の分析に大きな役割を果たしてき

た。

特に LC-MS 及び LC-MS/MS は、不揮発性化合物や熱に不安定な化合物及び高極性化合物に対しても誘導体化などの化学処理をしないで測定することができ、また過去10年間に装置性能が向上したことにより、環境分析の分野でも幅広く使用されるようになってきている。しかしながら LC-MS、LC-MS/MS を使用する場合でも測定対象成分が大量のサンプルマトリックス成分と未分離で共溶出するとそのイオン化が影響を受け、正確な定量が困難となることが知られており、固相抽出などのサンプル前処理技術によりマトリックス成分の除去をすることが効果的である。ここでは環境分析の LC/MS

日本ウォーターズ株式会社

〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第五小池ビル

Tel: 03-3471-7191

Fax: 03-3471-7118

E-mail: shunya_sasaki@waters.com

に的を絞る、LC/MSの機器構成、各種イオン化法の特徴、試料中の夾雑成分（マトリックス）の影響および試料の前処理に関して解説する。

2. LC/MS システム構成

Figure 1 に代表的な LC/MS システムの構成を示す。

HPLC の溶出液がイオン源に入り、後述の方法でイオン化される。イオン源では移動相溶媒等の不用な液相が除去され、イオンとなった成分がマスアナライザーへ導入される。イオン源では溶媒除去と併せて、サンプル溶液中の塩や汚れをマスアナライザーへ入れないためにスプレーの向きを変える等の工夫が施されているものもある。環境分析においては、比較的汚いサンプルを分析することが多いため、イオン

源の汚れに対する耐久性とメンテナンスのし易さは重要なポイントである。

マスアナライザーには四重極型、飛行時間型、イオントラップ型もしくはこれらのハイブリッド型がある。

環境分析においてターゲットが定まっている場合の定量分析に最も多く使用されるのは四重極型マスアナライザーで、これを一つ持つシングル四重極型質量分析計と、複数持つタンデム四重極型質量分析計（Figure 2）がある。タンデム四重極型質量分析計は二つの四重極型マスアナライザーの間にコリジョンセル（六重極など）を持つが、初期のコリジョンセルは四重極だったため、トリプル四重極の名前が使われる場合もある。またシングル四重極質量分析計を使用したものをLC-MS、タンデム四重極質量分析計を使用したものをLC

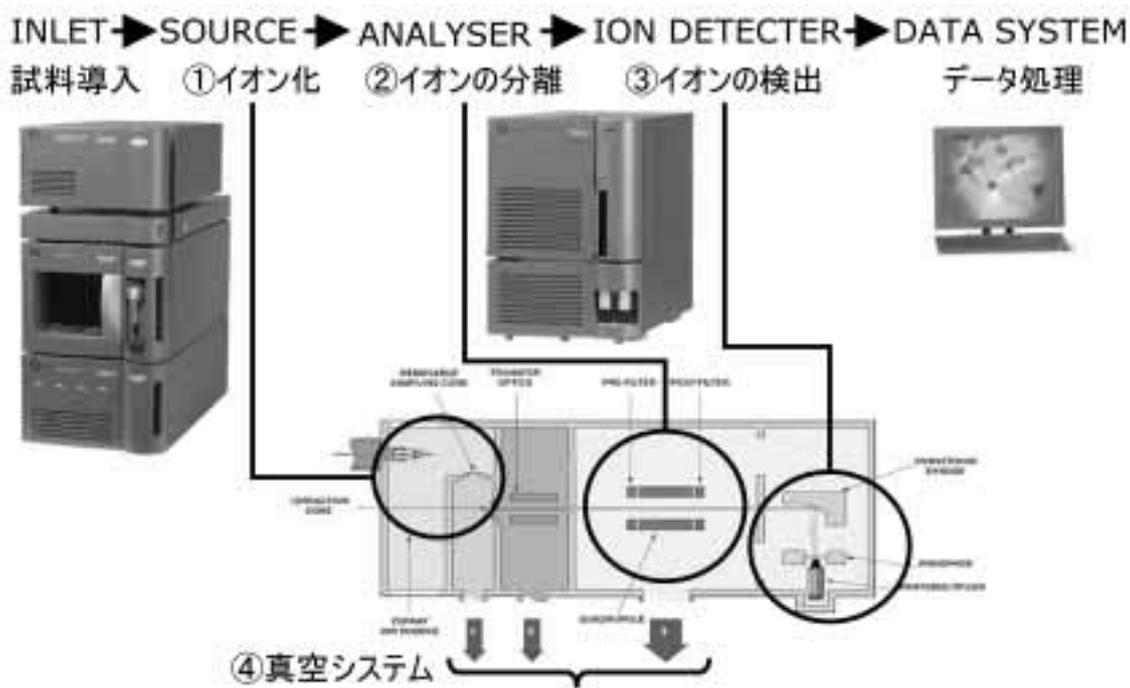


Figure 1. A typical LC/MS system configuration.

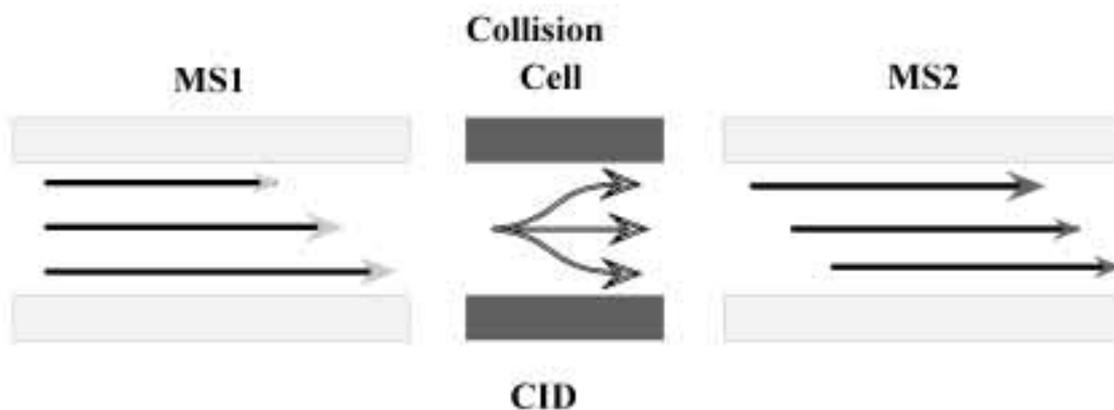


Figure 2. A structure of tandem quadrupole mass spectrometer.

-MS/MS と表記することが多い。

タンデム四重極型質量分析計ではコリジョンセルでアルゴンなどのコリジョンガスと衝突させることによりイオンを解離（衝突誘起解離）させ、プロダクトイオンを生成させることにより構造情報が得られると共に、シングル四重極質量分析計と比べより高い選択性が得られる。

タンデム四重極型質量分析計で定量分析を行う場合に使用されるMRM (Multiple Reaction Monitoring) はMS1で特定のイオンを選択し、さらにコリジョンセルで衝突誘起解離後、MS2で特徴的なフラグメントイオンを選択することにより、バックグラウンドノイズを大幅に減らすことができ、S/N比が向上する。

ターゲット化合物とまったく同じ分子量を持つ妨害物質が共存すると選択的検出ができなくなるシングル四重極型質量分析計と比べ、環境分析などマトリックス成分の多いサンプルの場合、高感度化が可能となる (Figure 3)。

3. LC/MS のイオン化法

質量分析計は、まず試料を気相イオンにし、真空中でイオンを質量/電荷比 (m/z) に従って分離した相対イオンの電流値を記録する。HPLC から導入される試料は液体である為、これを気相にしイオン化するインターフェース部分が重要な役割を果たす。

LC/MS インターフェースとして近年最もポピュラーなのはHPLC で分離した試料溶液を静電噴霧あるいは加熱噴霧により、微細な液滴にし大気圧下で気相イオンを生成する大気圧イオン化 (API) インターフェースである。

本インターフェースで使用されるイオン化方法には、エレ

クトロスプレーイオン化 (ESI) や大気圧化学イオン化 (APCI)、大気圧光イオン化 (APPI) などがあるが、環境分析において汎用的に使用されている ESI および APCI の原理を以下に解説する。

3-1 エレクトロスプレーイオン化 (ESI)

HPLC からの溶出液は導電されたステンレスキャピラリーから噴霧されることにより帯電液滴を生成し、窒素ガスによる霧化で小さな液滴を生じさせる。この液滴は、さらに溶媒部分を蒸発させることにより、イオンが液相から気相へと飛び出す方法である (Figure 4)。

中～高極性及びイオン性の化合物や、低～高分子 (タンパク質では150kDa 程度まで) の幅広い化合物を効率よくイオン化でき、また生体高分子、ポリマーでは多価イオンを生成する。熱に不安定な化合物や非共有結合複合体もイオン化できる。LC/MS で使用されるイオン化手法の中で最も高感度であり、汎用性も広いため環境分析において最も多用されているイオン化である。ただし、低極性化合物においては ESI が困難なものもあり、その場合は APCI が使用される。また移動相の pH、有機溶媒種と混合比、バッファーおよび添加剤の種類と濃度、マトリックス成分の共存などによってイオン化効率が変動するため、高感度かつ頑健な分析メソッド開発のためにはこれらのファクターの最適化が重要である。

3-2 大気圧化学イオン化 (APCI)

HPLC からの溶出液は、高温ヒーターとネブライザーガス (霧化ガス) の働きによって、キャピラリーの出口で気化される。溶媒と溶質試料の蒸気が、コロナ放電による EI で生

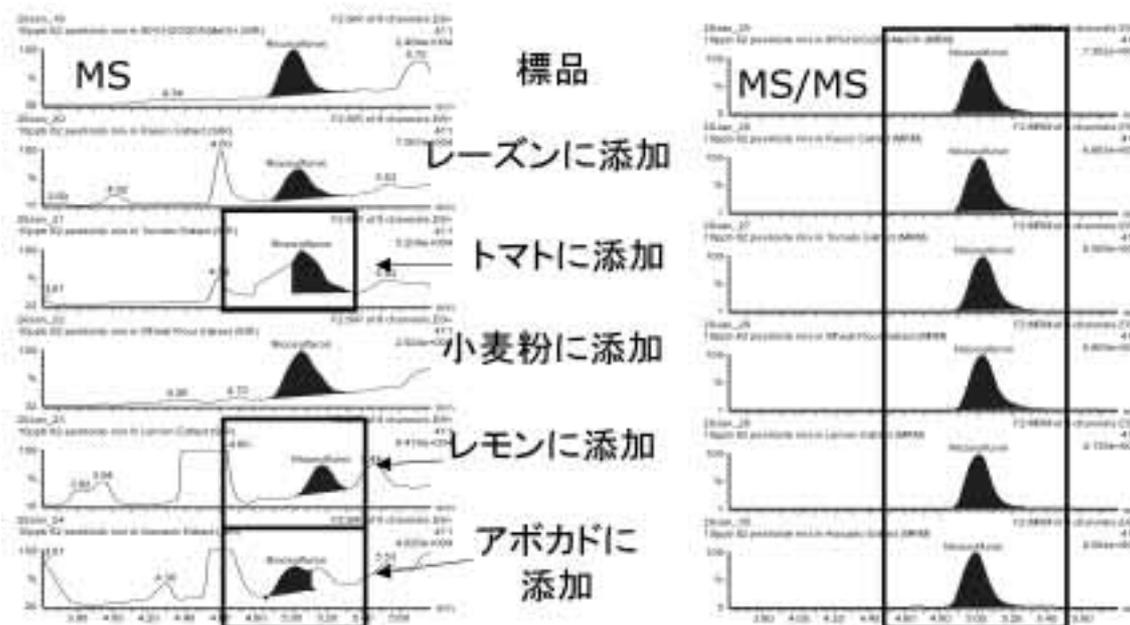


Figure 3. Comparison examples between LC-MS and LC-MS/MS analyte: nicosulfuron.

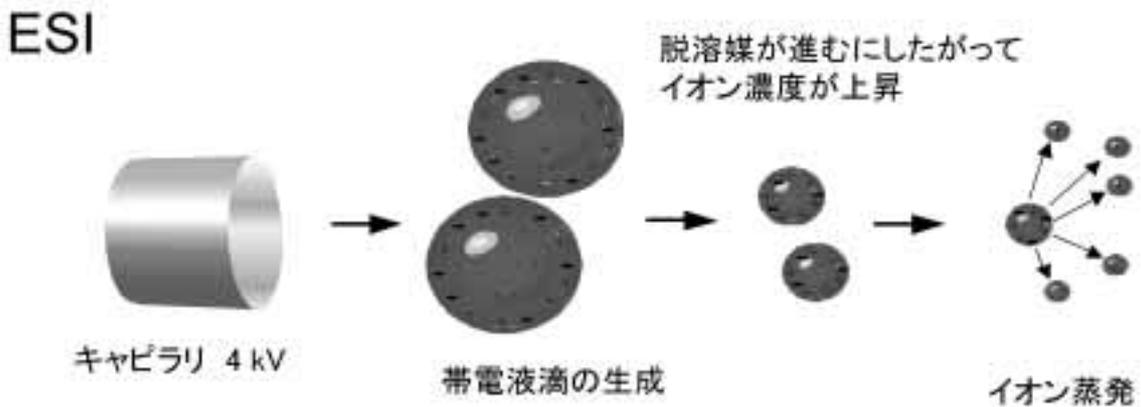


Figure 4. Electrospray ionization (ESI).

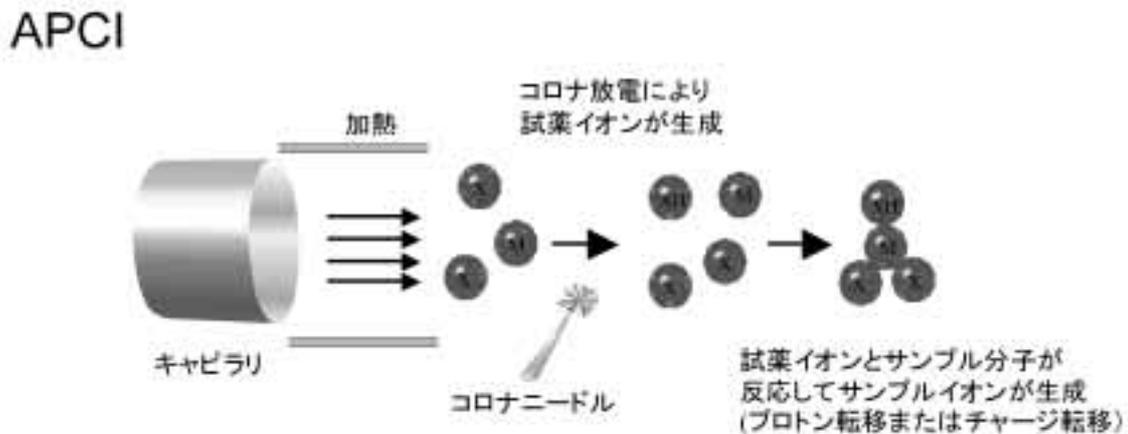


Figure 5. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI).

成した N_2^+ や H_2O^+ 及び O_2^- といった初期イオンと溶媒の反応で $\text{H}_3\text{O}^+[\text{H}_2\text{O}]_n$ 及び $\text{O}_2^-[\text{H}_2\text{O}]_n$ などの試薬イオンが生成する。この試薬イオンと溶質試料間のプロトンあるいは電荷の移動によりイオン化する (Figure 5)。APCI では一般的に一価のイオンが生成する。ESI でイオン化しにくい低極性化合物もイオン化する場合が多いが、熱に非常に不安定な化合物の場合は、熱分解の可能性もある。

前述のように化合物の性質により ESI が適している場合もあれば APCI が適している場合もある。またイオン化においてかける電荷の極性により正電荷イオンが得られるポジティブイオン化モードと負電荷イオンが得られるネガティブイオン化モードがありこれも化合物の性質により選択される。既知化合物において予め十分な情報がある場合は特定のイオン化法とポジティブまたはネガティブのイオン化モードを選ぶことができるが、既存情報が少ない場合はこの中から最適な組み合わせを検討する必要がある。また、環境分析のように幅広い特性の化合物を一斉分析する場合は、ひとつの分析で ESI、APCI のイオン化法それぞれのポジティブ、ネガティブイオン化モード全部が必要となることも多い。このような

目的に対応して最近では ESI+/-、APCI+/- を高速スイッチングして同時取り込みができる装置も開発されている。

Figure 6 に代表的な LC/MS イオン化法の適用範囲を示す。

4. 環境分析におけるサンプル前処理の必要性

前述のように環境分析においては多量に存在するサンプルマトリックス中の ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) オーダーもしくはそれ以下の微量成分を測定することがある。分析効率を上げるためには、試料をそのまま直接分析することが理想であるが、実際には試料中の妨害物質除去を必要とする場合や対象成分の濃縮を必要とする場合にサンプル前処理が必要となる。

LC-MS/MS においては、妨害物質除去のための前処理は必要ないと考えがちであるが、正確なマススペクトルを得るためや、サンプルマトリックスのイオン化効率への影響「マトリックス効果」を排除するために前処理を必要とすることが多い。以下にマトリックス効果について説明する。

4-1 マトリックス効果について

特に ESI によるイオン化において、液滴内に測定対象成分

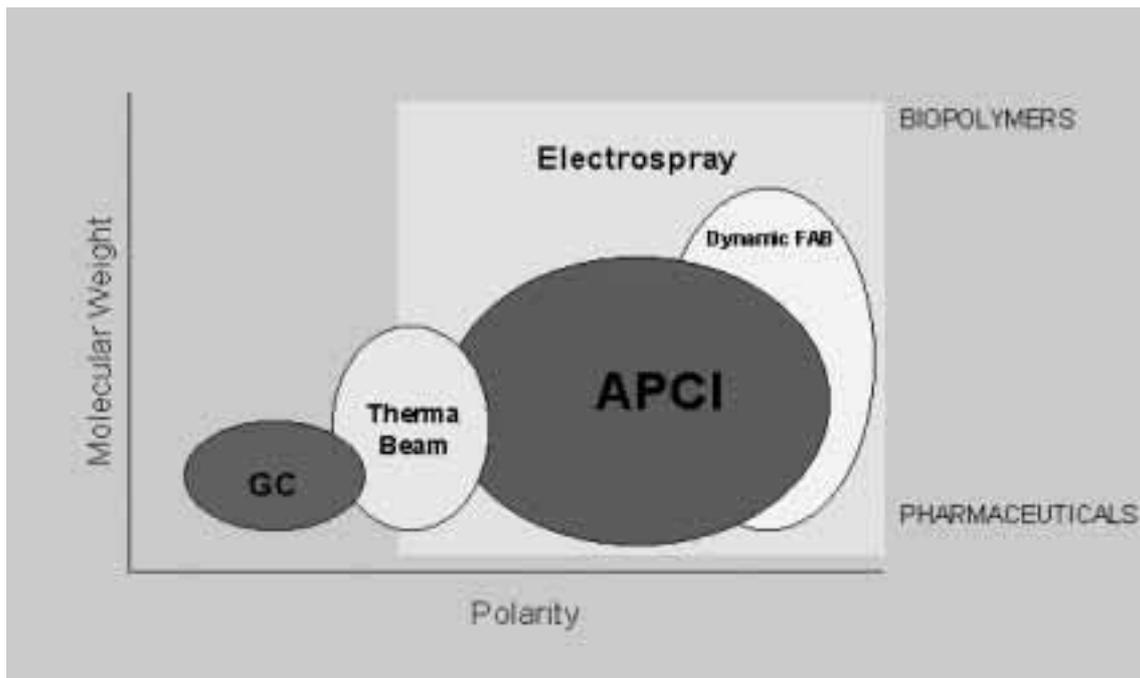


Figure 6. Applicable scope of ionization methods.

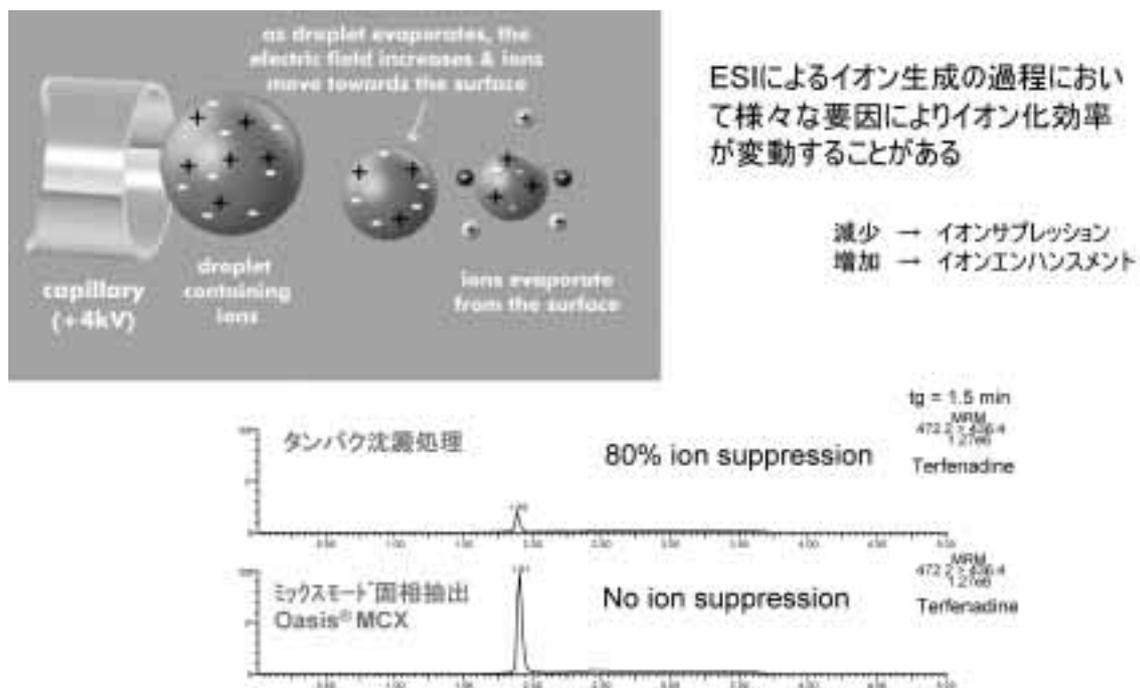


Figure 7. An example of matrix effect.

以外の成分が多量に共存していると、対象成分のイオン化効率に影響を与えることがある。イオン化効率が減少する場合、イオンサプレッション、増加する場合はイオンエンハンスメントと呼ばれる。

サンプルマトリックス成分が分析対象成分と未分離で共溶出しイオン化効率に影響を与えることをマトリックス効果と

呼ぶ。マトリックス効果によるイオンサプレッションが強い場合、たとえ選択性の良いタンデム四重極型質量分析計を使用しても初めのイオン化が十分に起こっていないことから必要な感度が得られない場合がある。更に重要なのは、定量分析においてマトリックス効果により正確な定量値が得られなくなることである (Figure 7)。

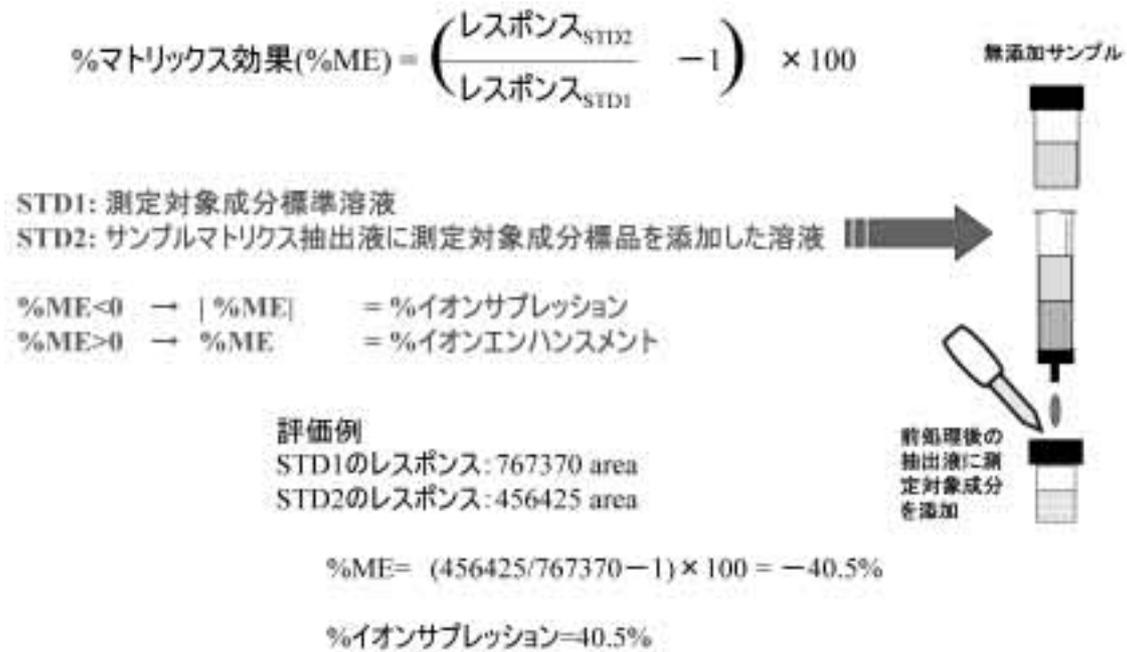


Figure 8. Quantitative assessment of matrix effects.

問題なのは、例えばLC-MS/MS MRMにおいては前述のように特定イオンのみを高選択にモニターできるため、マトリックス効果が起こっていてもそれを察知できないことが多いということである。そのため、マトリックス効果が起こる可能性が高い環境分析においては、予めどのぐらいのマトリックス効果が起こっているか定量的に評価する必要がある。評価方法としては無添加サンプルを所定の方法で前処理した溶液に後から測定対象成分を添加して調製した標準溶液と、マトリクスを全く含まない対象成分のみの標準溶液のレスポンスの比を使用する方法がある (Figure 8)。

4-2 マトリックス効果の対策

マトリックス効果の影響を削減する方法としては以下がある。

- 測定対象成分を完全単離する
- 安定同位体を内部標準として使用する
- マトリクスを含む標準溶液で検量線を作成し補正する
- サンプル前処理でマトリクス成分を除去する

理想的には全ての測定対象成分の安定同位体を内部標準として使用することだが、必ずしも安定同位体が入手可能で無い事もあり、また入手できても高価で使用できない場合もある。マトリクス成分を含む標準溶液で検量線を作成する方法は原則として測定サンプルセットにおいてマトリクス成分の組成と濃度が同一の場合にのみ正確な補正が可能である。

サンプル前処理はマトリクス効果を削減するために非常に効果的な対策であり環境分析でも多く使用されている。次項に環境分析において多く使用されている固相抽出法につい

て説明する。

5. 固相抽出

液体クロマトグラフィーの固定相 (固相) を小さな樹脂製 (一部ガラス製製品も使用されている) カラムに充填し、精製および濃縮を行う方法で、少ない有機溶媒で迅速かつ簡便にサンプル前処理を行うことができる (Figure 9)。

固相抽出カラムの基本的な使用方法としては、目的成分または妨害成分を固相に保持させてから、適当な溶媒にて脱離抽出する方法 (Figure 10) と、反対に目的成分は保持させず素通りで回収し、マトリクス成分など妨害成分を固相に保持させて除く方法がある (Figure 11)。

的確な固相により最適化された固相抽出法は、精製効果が高く、回収率、精度共に良好、簡便・迅速であり、作業による差も出にくい。

また、有機溶媒消費量も少なく、自動化も可能と、理想に近い方法のひとつである。が、固相の選択もしくは使用方法を誤ると、良い結果は得られない。以下に固相抽出に焦点をあて、その選択方法とトラブルシューティングについて解説する。

5-1 固相の種類と選択方法

固相抽出法には、HPLC で使用される固相のほとんどが利用可能である。Figure 12に現在使用されている代表的な固相について紹介する。

利用可能な固相の種類が多いということは最適な固相の選択が必要ということでもある。固相の選択方法には種々あるが、Figure 13にサンプル溶液のタイプによる選択ガイドライ

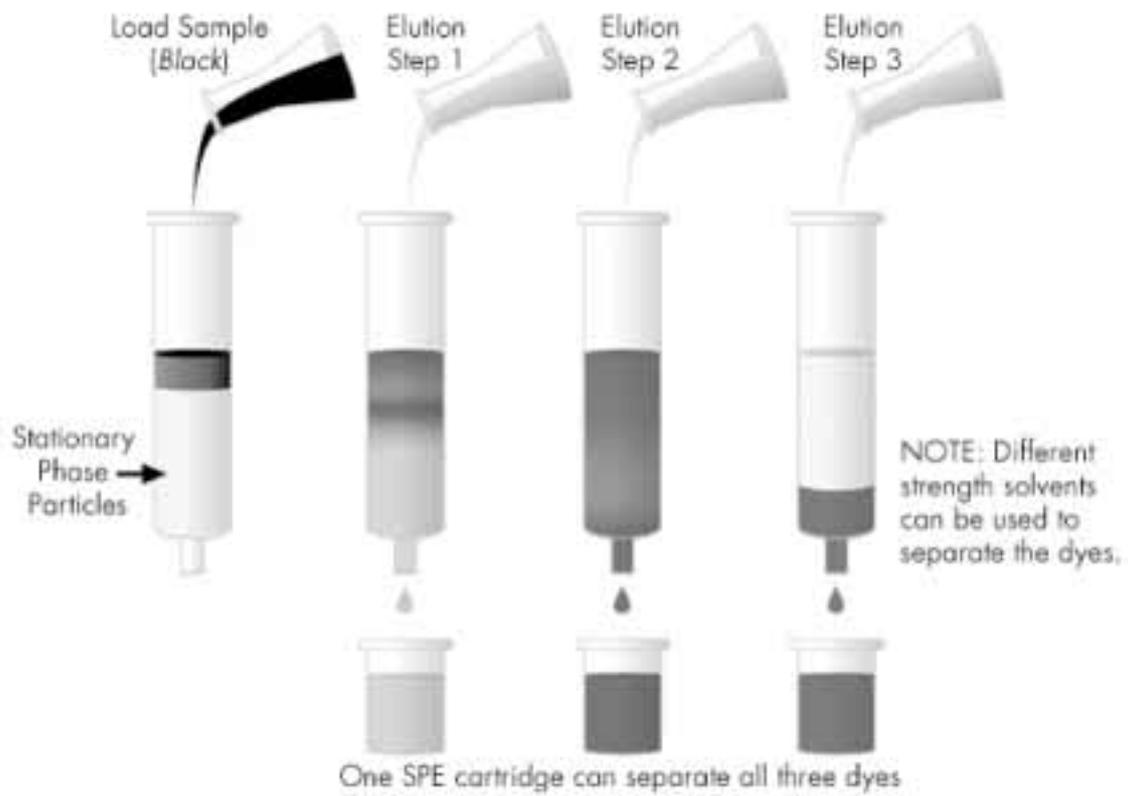


Figure 9. Solid-Phase Extraction (SPE).

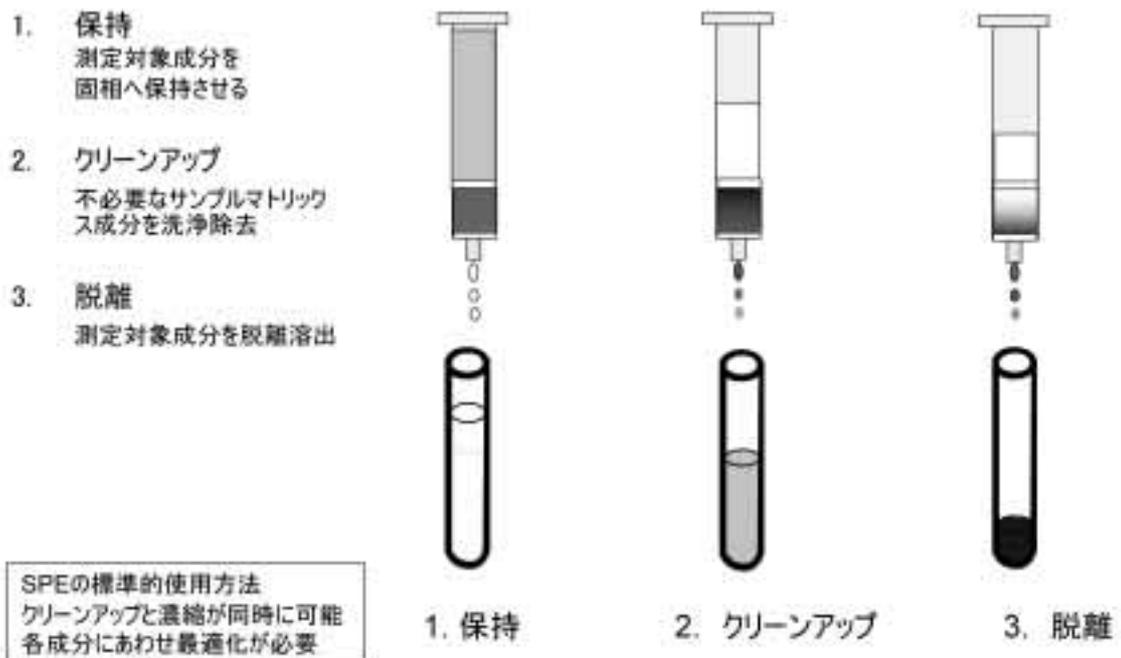


Figure 10. SPE Retention-Cleanup-Elution method.

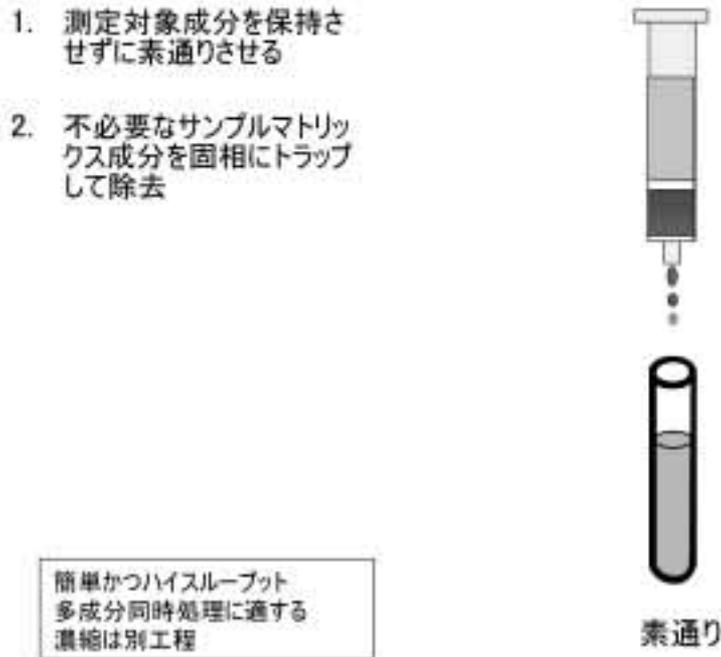


Figure 11. SPE Pass-Through Cleanup method.



Figure 12. SPE sorbents.

ンを紹介する。分析試料が水系試料である場合は逆相固相による抽出が最適である。水環境中の汚染物質などの前処理には逆相固相抽出法が多く使用されている。疎水性が弱く、高極性の化合物は逆相固相への保持が弱いことがあり、活性炭が使用される。逆相固相と活性炭固相を接続し、逆相固相側からサンプルをロードすると疎水性化合物は逆相固相に濃縮

され逆相固相に保持しない高極性化合物は活性炭固相に濃縮される。本手法を使用することにより高極性化合物から疎水性化合物まで同時に抽出が可能になる (Figure 14)。本手法の水道水質中の1,4-ジオキサン検査方法への応用例を Figure 15に紹介する。

分析対象成分がイオン性である場合は、イオン交換固相、

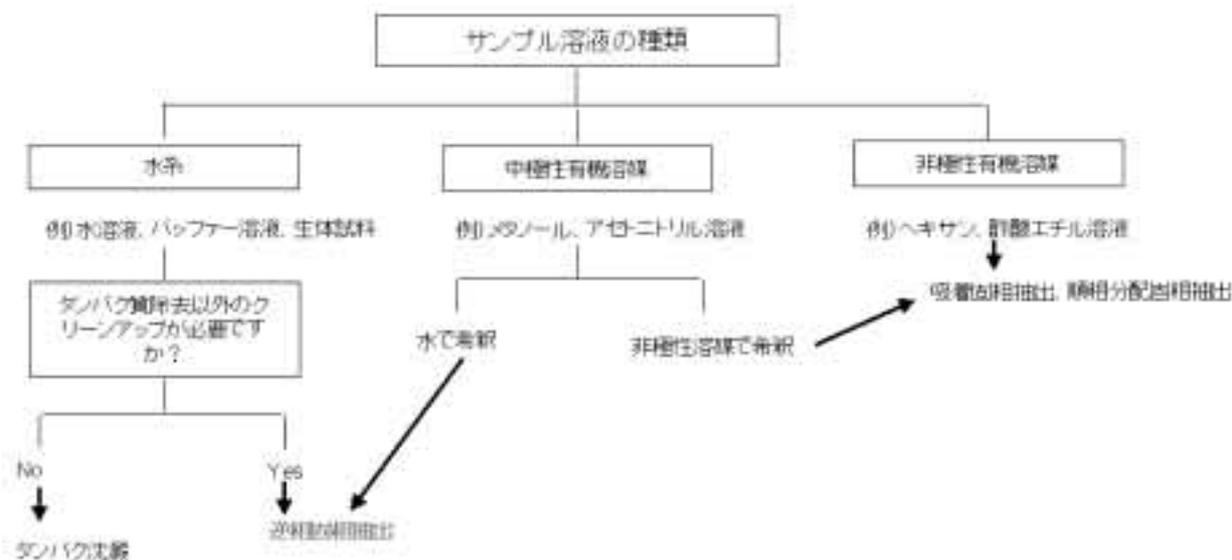


Figure 13. SPE mode selection guide.

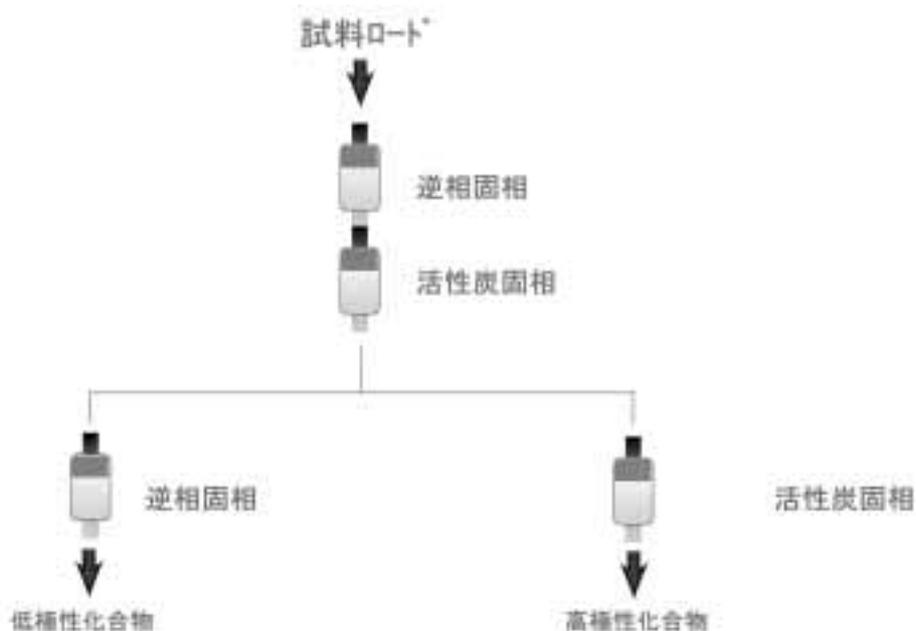


Figure 14. A tandem SPE method.

イオン交換—逆相ミックスモード固相 (Figure 16) が使用される場合もある。逆相固相が幅広い化合物の一斉抽出に適しているのに対して、イオン交換及びイオン交換—逆相ミックスモード固相はイオン性化合物の選択的抽出に適している。また、逆相固相は水系試料の前処理には適しているが、有機溶媒溶解試料の前処理には適していない（有機溶媒を除去または混合比を下げる必要がある）ことに対して、イオン交換及びイオン交換—逆相ミックスモード固相は有機溶媒中のイオン性化合物を抽出することも可能である。

5-2 固相抽出トラブルシューティング

固相抽出において低回収率や再現性低下、精製効果が得ら

れないなどのトラブルが発生した場合は、分析対象成分を既知濃度で添加した試料を用いて回収試験をおこない、対象成分がどの画分にどのぐらい存在しているかを定量的に把握し、トラブルの原因がどこにあるかを確定する必要がある。原因がどこにあるかが確定すると、それに応じた対策を実施することが可能になる。

以下に、逆相固相抽出法において対象成分を固相に保持させてから、洗浄し脱離をする方法について、4つのステップに分けて、各ステップにおけるトラブルとその改善方法について解説する。

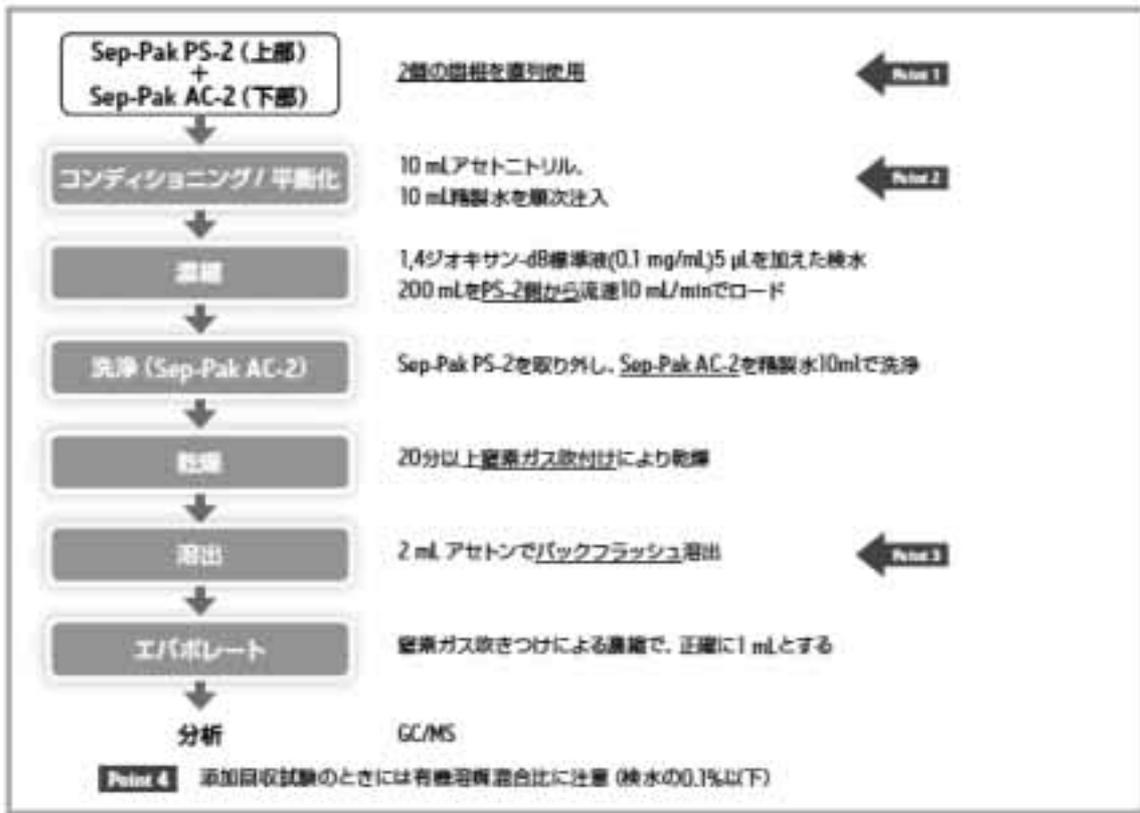


Figure 15. JPMHLW DWQS method for 1,4-dioxan.

5-2-1 ステップ1：試料調製

固相抽出を実施する前の試料調製時に起こる可能性のあるトラブルとその改善方法について下記に紹介する。

【想定されるトラブル】

- 試験管への吸着
- 試料中の固形物への吸着
- 不安定成分

【改善方法】

- シリル化した試験管あるいはプラスチック製試験管を使用
- 更に完全にホモジネートする
- 温度、照度のコントロール、溶媒選択

5-2-2 ステップ2：試料ロード

試料調製に続いて固相のコンディショニング&平衡化を行い、試料をロードする。本ステップにおける素通り液を分析し、そこへ対象成分が溶出している場合に想定されるトラブルとその改善方法について記述する。

【想定されるトラブル】

- 不適切なコンディショニング
- 対象成分の保持が弱い
- 試料マトリックスの変動
- ボリュームオーバーロード

—マスオーバーロード

【改善方法】

- 固相にあった適切なコンディショニングを実施
- シリカベース C18の場合、乾燥させないこと
- 脱離力の弱い溶媒で希釈する
- 保持の強い固相を使用する
- 大きなカートリッジを使用する
- 一定の pH 及びイオン強度にバッファライズする
- ロード容量を小さくする

5-2-3 ステップ3：洗浄

試料ロードに続いて、洗浄を行い、妨害成分をクリーンアップする。本ステップにおける溶出液を分析し、そこへ対象成分が溶出している場合に想定されるトラブルとその改善方法について記述する。

【想定されるトラブル】

- 対象成分の保持が弱い
- 試料マトリックスの変動

【改善方法】

- 保持の強い固相を使用する
- 大きなカートリッジを使用する
- 脱離力の弱い洗浄液を使用する
- 洗浄液の容量を減らす

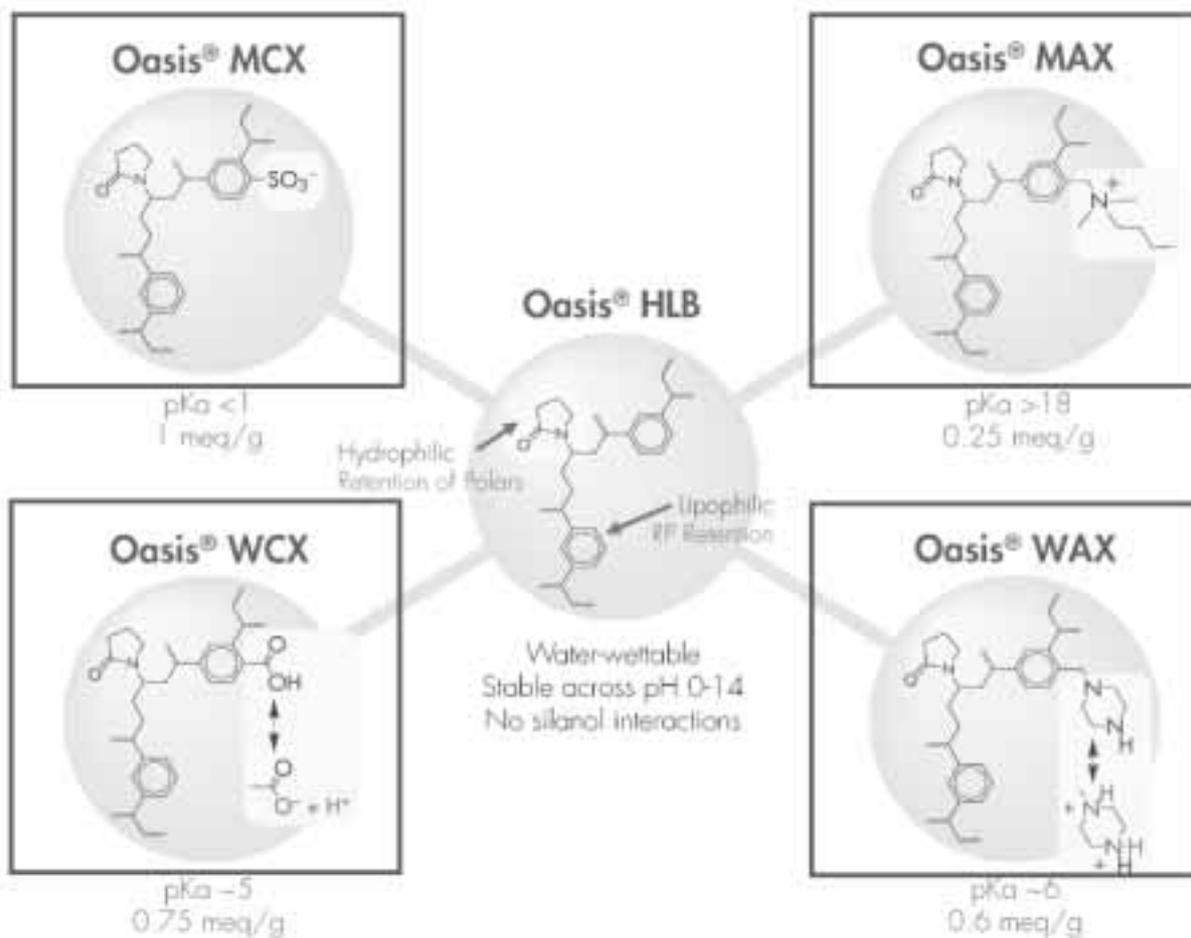


Figure 16. An example of ion exchange–reversed phase mixed mode SPE sorbents.

逆相固相抽出脱離効率改善
 バックフラッシュ

バックフラッシュにより脱離効率を改善することが可能

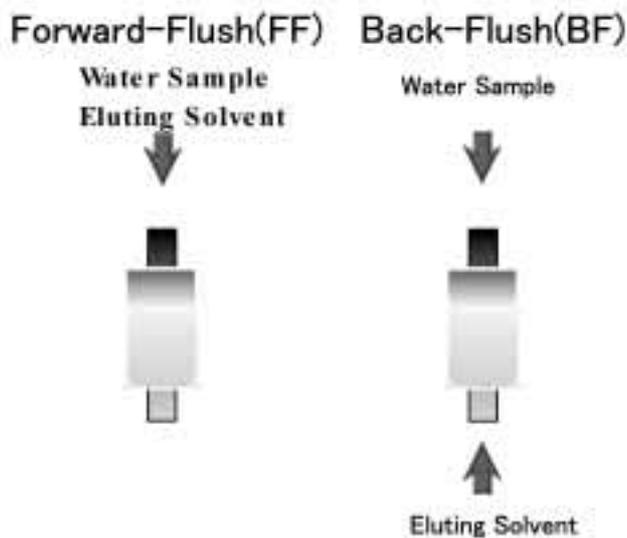


Figure 17. Back-Flush elution method.

—一定の pH 及びイオン強度にバッファライズする

5-2-4 ステップ4：脱離

5-2-2、5-2-3のどちらの分画にも対象成分が溶出せず、それでも回収率が悪い場合、5-2-1対象成分の分解や容器への吸着以外に固相への保持が強く固相にまだ残存していることが想定される。その場合、下記について検討する。

【想定されるトラブル】

—保持が強すぎる

【改善方法】

- 脱離溶媒の容量を増やす
- 脱離力の強い溶媒を使用
- 脱離流速を遅くする
- バックフラッシュ
- 固相を保持の弱いものへ変更

保持が強い成分は固相カラムの入り口に濃縮されるため、試料ロード方向と反対側から脱離溶媒を送液する方法（バックフラッシュ法）によって、脱離効率を改善することができる（Figure 17）。

6. おわりに

以上簡単に環境分析で利用されている LC-MS/MS と固相抽出カラムについて解説した。ここ10年間の高速液体クロマトグラフ質量分析計の技術革新と普及率増加は目覚ましい。今後も更なる発展が予測されるが、性能が向上すればするほど高感度かつ高精度な分析が可能になり、LC 部分の分離および前処理の重要性は間違い無く増加し、その使いこなしが環境分析の品質向上の鍵となると考えられる。