

液体クロマトグラフィー質量分析法の基礎と測定時の注意点

小林 まなみ

1 液体クロマトグラフ質量分析計

1.1 はじめに

この章では、液体クロマトグラフと質量分析計の基礎を説明する。近年では、液体クロマトグラフ質量分析計（以下略、LC-MS）を、分析機器として最初に使用する人も増えている。この装置を問題なく使用する為には、ブラックボックスのように思えるこの装置の基本構成や原理を理解することが重要である。

1.2 液体クロマトグラフ

液体クロマトグラフィー（以下略、LC）は分離分析法のひとつであり、これを1900年代に最初に実証したのはロシアの植物学者ミハイル・ツヴェットであった。LCによる試料の成分分離は、分析種の保持力が移動相と固定相で異なるという原理に基づいている。混合試料（紫色）を、移動相を流している固定相＝カラムに注入すると、固定相への保持力の違いにより青色の分析種バンドと赤色の分析種バンドとして分離され、カラムから溶出する（図1）。このカラムから溶出した分析種を各種検出器で検出し、得られた電気信号をコンピューターに取り込み、時間軸に対して信号強度を記録したものがクロマトグラムである。

移動相や固定相の種類によるLCの分離モードは複数存在する。代表的なLCの分離モードは、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換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がある。また、近年のLCは、カラムの充填剤としてより微小な3 μm以下

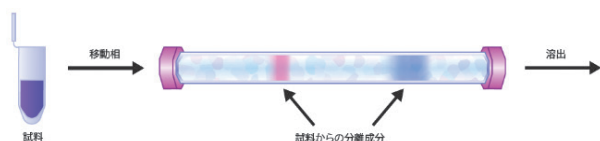


図1 LCの原理

の粒径のものを使用し、LCシステムの耐圧を高い圧力に対応することで高速・高分離分析を向上させた超高速液体クロマトグラフィー（以下略、UHPLC）も利用されている。

カラムによる分析種分離後の検出は、主なものとして示差屈折率検出器（RID）、紫外・可視吸光度検出器（UV-VIS）、蛍光検出器（FLD）、電気伝導度検出器（CD）、蒸発光散乱検出器（ELSD）など、分析種の光学的特性を用いて行われている。LCの基本構成は、①ポンプ；液体移動相の送液、②オートサンプラ；検体試料の注入、③カラム；検体試料中の成分を分離、④検出器；分離された成分の検出で成り立っている。

1.3 基本構成

LC-MSは、LC分離システムと質量分析計、および、それらを連結するインターフェイスで構成されている。LC-MSのインターフェイスでは、液体中の分析種を脱溶媒と同時に分析種のイオンを気相へ取り出さなければいけない。そのためLC-MSインターフェイスの使用においていくつかの制限がある。LCからLC-MSへのメソッド移管には、移動相の適合性や流速などを考慮する必要がある。

LC-MSの基本構成は、前述したLCに①インターフェイス（イオン化部）；成分のイオン化および液体移動相の除去、②質量分離部；質量電荷比（ m/z ）の違いに応じてイオンを分離、③イオン検出部；分離したイオンを検出で成り立っている。LC-MSでは、インターフェイスまでは大気圧下であるが、MSのイオンガイド、質量分離部、およびイオン検出部はすべて真空中に格納される。また、質量分析計の一般的な検出器は、二次電子増倍管である。検出器に到達したイオンの量は信号強度に変換後、コンピューターに出力、記録される。

1.4 質量分析計の原理

質量分析計（以下略、MS）は分析種をイオン化し、生じたイオンの質量電荷比（ m/z ）の違いを利用し、分離した個々分析種のイオン強度を測定する。

マススペクトルは、 m/z 値に対する相対的なイオン強

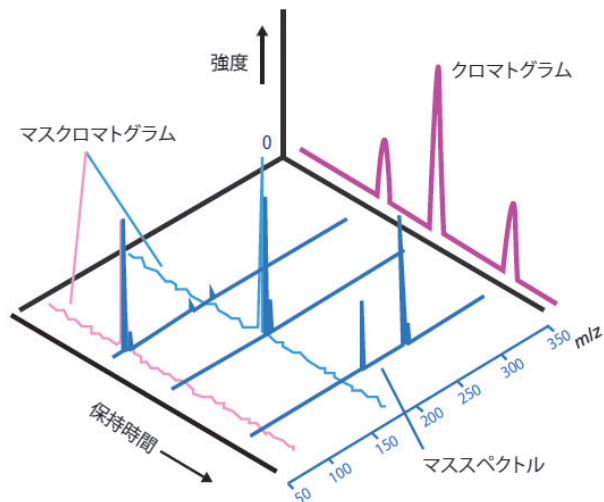


図2 マススペクトルのイメージ図

度をグラフにしたもので、LC-MSは分離分析の間、一定の時間間隔（約数百 msec）でマススペクトルを取得しつづけることができる。図2に、マススペクトルのイメージ図を示す。マススペクトルは分析種の分子量により違いが表れることから、定性情報として利用される。MSの長所は、1・2で示した他の検出器に比べ高い感度と高い選択性が得られることである。

1.5 インターフェイス

LCは分析種を液体状態で分離するため、不揮発性、熱に不安定な分析種を分析することができる。しかし、LCの移動相溶媒（液体）を高真空の質量分析計に直接導入することは困難であり、LC-MSの実用化には大気圧イオン化法であるエレクトロプレーイオン化法（以下略、ESI）の開発を待たねばならなかった。ESIは極性化合物を静電噴霧し、大気圧下で移動相溶媒を霧化のち大半を除去し、同時に分析種のイオンの一部を質量分析計内に導入することで安定な質量分析（検出）を可能にした。大気圧下でイオン化する手法としてESIの他に大気圧化学イオン化（以下略、APCI）や大気圧光イオン化（以下略、APPI）があり、これらを総称して大気圧イオン化法と呼ぶ。

マススペクトルはイオン化法により異なる。図3には（A）電子イオン化法（以下略、EI）によるマススペクトルと（B）ESIによるマススペクトルを示す。ガスクロマトグラム質量分析計（以下略、GC-MS）でよく用いられるEIは、真空内でガス状の試料に電子線を衝突させることによりイオン化をおこなう。この時、分子イオン： M^+ が生成される。この分子イオンはラジカルカチオン（奇数電子のイオン）で不安定なため、分子イオンの生成と同時に分子の開裂が起こる。そのためEIのマススペクトルでは、分子イオンとその開裂によるいくつかのフラグメントイオンが観察される。

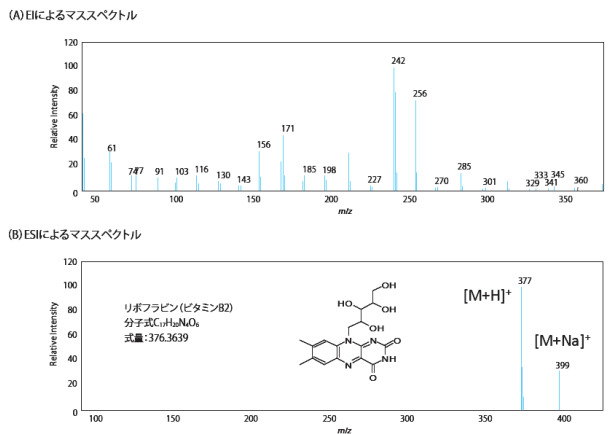


図3 (A) EI と (B) ESI によるリボフラビンのマススペクトル

一方、LC-MSでよく用いられるESIは、分析種のイオン性・極性を利用してイオン化するため、“EIに比べてソフトなイオン化法”と呼ばれている。観察されるプロトン化分子 $[M+H]^+$ 、ナトリウムイオン付加型分子 $[M+Na]^+$ などは、ラジカルイオンではないので、フラグメンテーションはあまり起こらない。主に分子量に関する情報が得られるという特長がある。

ESIのイオン化機構の模式図を図4に示す。試料溶液を±3~5 kVの高電圧を印加したキャピラリーを通過させることで帯電液滴を生成させる（エレクトロスプレー現象）。この状態では分析種のイオンはまだ液滴内に存在している。帯電液滴は大気圧下で脱溶媒され小さな液滴へと変化する。液滴内に存在する分析種のイオン同士の反発により液滴が分裂、分析種イオンが気相へと放出される（イオン蒸発現象）。気相に放出された分析種のイオンを高真空に導入して質量分析をおこなう。真空が不十分で残留ガス（空気や水）のさまざまな分子と衝突し、イオン軌道が曲げられたり、イオンが消滅したりす

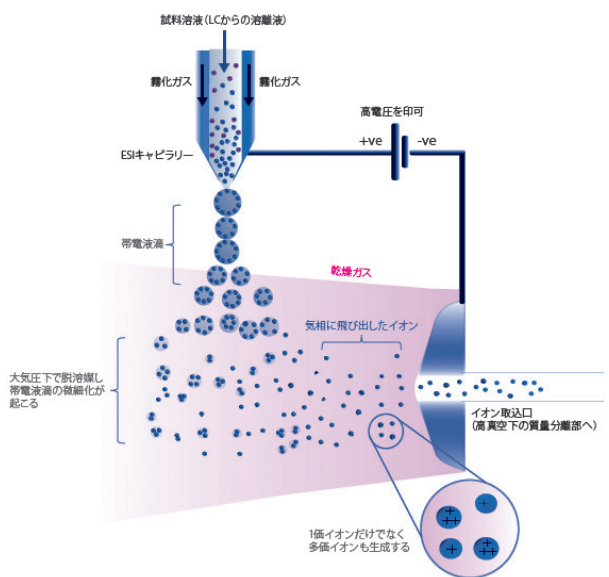


図4 ESIのイオン化機構の模式図

ると、検出器にイオンは到達することができない。イオンが衝突せずに自由に飛行できる距離の平均を「平均自由行程」という。高真空を保つことで、平均自由行程がイオン源 - 検出器間距離より長くなると、イオンは問題なく検出器に到達することができる。四重極型 MS では真空度を通常 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ Pa で動作させ、平均自由行程は、5~10 m になるように設計されている。

エレクトロスプレー現象を利用した本来の ESI では数 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度の試料溶液が限界であるが、現在の ESI は、霧化ガスを併用することで数百 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度の試料溶液に対応することができる。ESI は、高極性、難揮発性、熱的不安定性化合物の溶液内での性質をうまく利用してイオン化している。観察されるイオン種は、正イオンではプロトン化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、アンモニウムイオン付加型分子 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 、負イオンでは脱プロトン分子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、塩素イオン付加型分子 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ などが観察される。その他、移動相として使用した有機溶媒や酸、酢酸などが付加したイオンなども観察される。

ESI は、特に移動相（溶離液）の流速に留意する必要がある。大気圧下での脱溶媒（微細液滴化）を効率的におこなうには、流速は低い方が適している。そのため、LC-MS では、内径 2 mm 程度のセミマイクロカラムが多く使用される。この内径のセミマイクロカラムの場合、LC 分析では 0.2 から 0.3 mL/min、UHPLC 分析では 0.4 から 0.6 mL/min の流速で用いることが一般的である。流速が大きくなると脱溶媒が難しくなるため、ESI を搭載したほとんどの LC-MS は、加熱乾燥ガスやヒータを利用した脱溶媒を補助する機能を搭載している（帯電液滴の微細化）。また、ESI では帯電液滴の微細化だけでなく、帯電液滴の生成（分析種のイオン性・極性）に留意する必要がある。ESI はアミノ基やカルボキシル基を有する極性化合物のイオン化に適している。アミノ基を有する塩基性化合物は、分子型とイオン型の平衡状態で存在する。この割合は溶液の pH に依存し、分子型とイオン型の濃度が等しい時の pH が pKa となる。pKa より pH が低ければ平衡はイオン型が増加、pKa より高ければ平衡は分子型が増加に傾くことになる。ESI によるイオン化は分子型よりイオン型の濃度が増加したほうが効率よくおこなうことができる。ただし、これはイオン化という観点での理論であり、実際の LC-MS 分析では LC による分離のしやすさ（逆相系カラムを使用した場合、分子型の方が良好な分離を行うことができる）の観点で考える必要もある。

1.6 質量分離部

質量分析では、静電場などを利用してイオン (m/z) を識別する。質量分離に先立ち、イオンを収束させることも重要である。インターフェイス（イオン化部）で生じたイオン群を収束させ、非イオン性粒子を除去する技

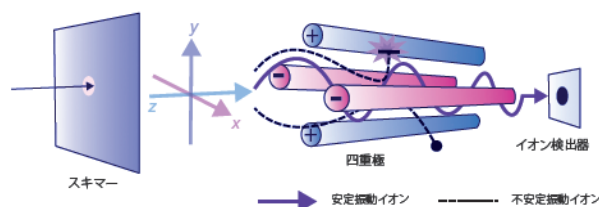


図5 四重極型質量分離部の模式図

術により、高感度分析を可能にした。1900年初めにイギリスの物理学者 J.J. Thomson¹⁾ は、イオンを電場と磁場によって屈曲させることで正イオンの質量と電荷の比を測定し、ネオンに質量の異なる同位体が存在することを発見した。これが質量分析の始まりである。この原理をもとに扇形磁場型質量分析計が開発された。本章では、一般的な汎用 LC-MS で使用されている四重極型の質量分離部についてのみ説明する。

四重極型の質量分離部は4個の円柱状（内側が双曲面）の金属ロッドが中心軸から等距離となるよう配置された四重極（Quadrupole）電場を用い質量分離を行う（図5）。四重極には直流（D.C.）と高周波の交流または無線周波数（RF）の両方を印加することで、ターゲットとする m/z を持つイオン群のみが四重極を通過して検出器に到達できる。検出器に到達したイオンの量は信号に変換され、コンピューターに出力される。

インターフェイスで生成したイオンは z 方向に加速されるが、その際に印加されるのは数十ボルト程度の比較的弱い電圧である。これらのイオン群は小さい開口部（スキマー）を通り抜けて四重極に進入する。同じ極性の電圧が対角線位置にあるロッドに印加され、逆の極性の電圧が隣接位置にあるロッドに印加される。これにより四重極内部には、高速に相が変化する電場が形成される。こうして x および y 方向に周期的に変動する電場をイオン群が通過する。四重極への印加を一定のパラメーターでおこなうことで、 m/z が特定の範囲内にあるイオン群のみが安定振動を維持し、検出器まで到達する。対照的に m/z 値が範囲外のイオン群は振動が不安定化し、四重極と衝突するかシステム外へ飛散して検出部には到達することができない。

四重極型質量分離部を通過して検出器に到達できるかどうかは図6に示すイオン安定領域図（Mathieu 方程式の解）に従う。

質量が異なる m_1 , m_2 , m_3 が安定振動して検出器に到達するには、各々青、赤、黄で示した領域内の条件に収める必要がある。図に示した走査線（1）のように、直流電圧（ y 軸）と高周波交流電圧（ x 軸）を変化させることで、走査線が各々の領域を通過するときのみ、 m_1 , m_2 , m_3 のイオンだけを順番に、検出器に到達させる（スキャンモード、以下略 Scan）。また、操作線上の一点に電場条件を固定することにより、特定イオンだ

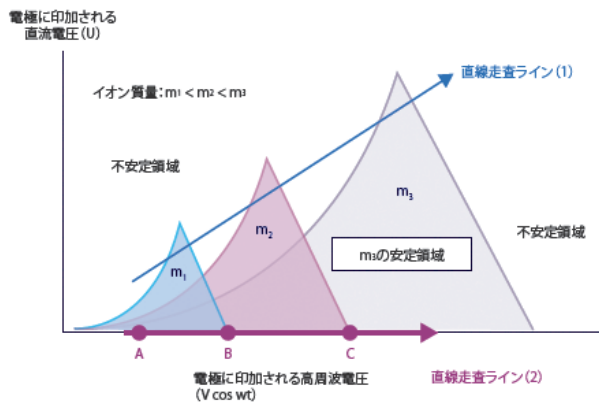


図6 四重極型質量分離部のイオン安定領域図

けが四重極ロッド内を通過することができる（選択イオンモニタリングモード、以下略SIM）。

このような四重極型質量分析計は、装置の小型化を可能とし、比較的真空で稼働でき、高速分析にも対応しやすく、高い再現性や高感度などの特長を有していることから、汎用装置の技術として広く利用されている。

さらに、三連四重極型質量分析計（以下略、LC-MS/MS）では、三つの四重極を連結し、第1質量分離部（MS1）で特定の質量を選択し、そのイオンを第2のコリジョンセルで、強制的に開裂させ生成したイオンを第3質量分離部（MS3）で測定する方法が用いられる。MS1で選択したイオンをプリカーサイオンと呼ぶ。プリカーサイオンを開裂させる手法は色々あるが、代表的な手法としてアルゴンガスや窒素ガスを衝突させることでイオンを開裂させる手法（衝突誘起解離、CID）が広く用いられている。CIDなどにより開裂したイオン群を、MS3で測定しMS/MSスペクトルを得る。生成したイオン群をプロダクトイオン、得られたマススペクトルをプロダクトイオンスペクトルと呼ぶ。この構造情報は定性に利用できる。例えば同じ m/z のプリカーサイオンであっても、構造が異なれば異なる m/z のプロダクトイオンを与える。異なる m/z のプロダクトイオンを与えるのであれば、両者は明確に区別することができ、より高い選択的検出が可能になる。類似化合物の区別だけでなく、バックグラウンドノイズもプリカーサイオンの m/z とプロダクトイオンの m/z の二つの選択性で排除することが可能であり、バックグラウンドノイズを大幅にカットすることができる。

LC-MS/MSのシステムは、MS1 および MS3 に、Scan

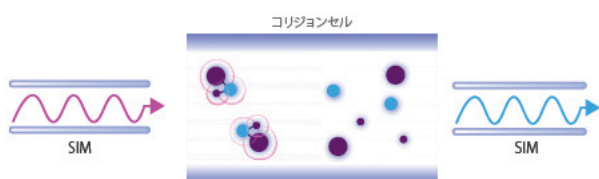


図7 MRMモードの概念図

またはSIMモードを組み合わせることで、より多様な測定をおこなうことができる。定量分析で一番活用されている分析手法は、MS1（SIM）で特定のイオン（プリカーサイオン）を選択し、コリジョンセルでの開裂により生成した特定のイオン（プロダクトイオン）をMS3（SIM）で分析する手法である（図7）。この手法を多重反応モニタリング（以下略、MRM）と呼ぶ*1。このMRMを用いると、たとえ同じ m/z のイオンであっても、構造が異なる分析種はCIDにより異なるプロダクトイオンが生成する可能性がある。プリカーサイオンとプロダクトイオンの組合せによりイオンを検出するので、非常に選択性の高いクロマトグラムを得ることができ、高選択高感度分析が可能となった。一度に同時測定する分析種が多い場合や、生体試料（血液や尿）、食品など複雑なマトリクスが分析を妨害する場合、MRM分析モードは非常に有効である。

1・7 LC-MSに適した移動相

高真空を必要とするMSを結合するには、LC移動相（溶離液）から、液体溶媒を可能な限り除去し、イオン化された分析種を質量分離部に導入できるようなLC移動相（溶離液）を選択する必要がある。大気圧イオン化法（ESI、APCIなど）では、LCの移動相（溶離液）としてよく利用されるリン酸緩衝液やクエン酸緩衝液などの不揮発性移動相（溶離液）を利用することはできない。なぜなら、インターフェイスで脱溶媒した時に不揮

表1 LC-MSに適した溶離液

基本的な移動相溶媒
a) アルコール類 (メタノール, エタノール, 2-プロパノールなど)
b) アセトニトリル
c) 水 (必要な場合はpH調整)
pH調整試薬 (揮発性 ≤ 20 mM)
酸
a) 酢酸
b) ぎ酸
c) トリフルオロ酢酸 (TFA)
塩基
d) アンモニア水
e) 酢酸アンモニウム
f) ぎ酸アンモニウム
揮発性の高いイオン対試薬
塩基性化合物の保持用
a) ベルフルオロ炭酸塩, C2~C8
酸性化合物の保持用
b) ジブチルアミン
c) トリエチルアミン (TEA)

*1 選択反応モニタリング (SRM) と呼ぶこともあるが、本稿ではMRMと表す。

発性の塩が析出し、質量分析計へイオンを導入する入口を物理的に塞ぐためである。LC で不揮発性移動相を使用している場合は、分析条件を変更する必要がある。移動相の変更だけで分析種の分析の目的が達成できない場合は、LC 分離モードの変更なども考える必要がある。LC-MS に適した溶離液を表 1 に示す。

逆相系で使用される水、メタノール、アセトニトリルなどは LC-MS インターフェイスに適した溶媒である。LC 分離またはイオン化に影響する pH 調整が必要である場合、揮発性のある酢酸やギ酸、それらのアンモニウム塩を使用することができる。酢酸やギ酸の場合、0.1～0.5 % 程度、それらのアンモニウム塩の場合、2～20 mM 程度の濃度での使用が推奨される。揮発性塩使用の場合は、できる限り低い濃度の方がイオン化効率は良く、感度が高い分析ができることが多いので分離面で問題がなければ低濃度の使用を推奨する。

一般的によく用いられる逆相系の分離モードでは、疎水性が弱い化合物はカラムに保持できず、分離分析ができないため、移動相にイオンペア試薬を利用することができるが、LC-MS では揮発性イオンペア試薬を使用する。分析種が塩基性化合物の場合、揮発性を高めるためアルキル鎖をフッ素で置換した比較的鎖長の短い LC-MS 用のイオンペア試薬や、分析種が酸性化合物の場合、ジブチルアミン、トリエチルアミン (TEA) などのイオンペア試薬を用いることができる。ただし、これらイオンペア試薬はそれ自体がイオン化し、LC や MS に残留し、バックグラウンド上昇の要因となるため注意が必要である。そのため、これらイオンペア試薬を使用する際には、装置を専用化するか、使用前に充分影響を考慮した上で使用し、使用後には装置を入念に洗浄するなどの必要がある。

このように LC-MS では、移動相 (溶離液) に制限があるため分離挙動を変更するためには、親水性化合物の保持が可能な PFPP (pentafluoro phenylpropyl) カラムや、親水性相互作用クロマトグラフィーカラム (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)、逆相とイオン交換のミックスモードカラム、アルキル鎖長の異なるカラムなどが利用されることも多い。

2 測定時の注意点

2.1 測定開始時の確認事項

測定開始時、MS 内部の真空度と ESI キャピラリーの状態確認が重要である。LC-MS は、MS 内部の高真空を維持する必要のある装置であり、測定開始時には、必ず最初に装置の真空度を確認することを推奨する。真空を維持するために稼働している複数の真空ポンプの動作確認や、装置内部における真空度異常の有無を確認する。通常より真空度が異常に低い場合 (高真空) には、イオンの取り組み口に固形の異物が付着してイオンの取り込

みを阻害していないかを確認する。異物が観察された場合、そのイオン取り込み口の異物を除去、洗浄を実施することで、この問題を回避できる場合もある。日頃より、装置使用時の真空状態の記録を残すことをしておけば、真空の変化にも気づきやすくなり、迅速な対応が可能となる。次に重要なのが、インターフェイスにおける ESI キャピラリーのスプレー状態確認である。キャピラリーの詰りの有無や、スプレーの偏りを確認する。これらに問題がある場合、キャピラリーの洗浄や交換を実施する。

2.2 液体クロマトグラフの汚染

LC 流路も定期的に確認することを推奨する。移動相瓶中のサクシオンフィルターの汚れやつまりなども見落としがちな項目である。また、特に分析試料が通過するオートサンプリングより下流の流路は、マトリクスの多い試料を分析した場合に汚染されやすい部分である。LC 部の流路汚染が確認された際には、メタノール、アセトニトリル、2-プロパノールなどの有機溶媒で数時間流路を洗浄する。この時、MS 部には洗浄液が導入しないようにすることも重要である。

逆相モードの分析であれば、分析メソッドに流路とカラムを洗浄するために有機溶媒比率が高い溶離液が流れる時間を長く設定した条件を組み込み、分析ごとに洗浄を実施することも効果的である。また、一連の分析の終了時には、流路とカラムを洗浄するメソッドを実行する運用も推奨される。

2.3 インターフェイスの汚染

大気圧イオン化法は、その装置の移動相履歴によってマススペクトルが変化するようなイオン化法であり、装置使用の履歴情報が重要となる。

インターフェイスの汚れは、それらがイオン化しない化合物であれば特に問題はないが、高濃度の分析種やマトリクスが残存してバックグラウンドの上昇として影響する場合がある。一連の分析終了時に、メタノールなどの有機溶媒でインターフェイス内面を拭くことが必要である。

また、装置の校正に使用するオートチューニングの標準試料、例えばポリエチレングリコール (PEG) の残存もバックグラウンドの上昇として影響がある。この時は、インターフェイスの温度を最高温度 (例えば 500 °C) に数時間設定し、それら化合物を焼き切る作業もバックグラウンド低減には効果的である。

測定開始時には、いきなり分析を開始するのではなく、超純水とメタノールなどを流し、比較的広範囲のイオンを Scan でモニターすることを推奨する。その時、通常みられないような特定のイオンが強度高く検出された場合、それらの汚染要因を考慮し適切な対処法を実施

する。

移動相に 0.1 % ぎ酸水とアセトニトリルを使用している場合、正イオンではアセトニトリルのプロトン化分子 $[M+H]^+$ m/z 42 と 2 量体 $[2M+H]^+$ m/z 83, 負イオンではぎ酸の脱プロトン分子 $[M-H]^-$ m/z 45, と 2 量体 $[2M-H]^-$ m/z 91 が検出されるため、それらイオンを Scan の測定範囲外に設定したほうがバックグラウンドのレベルは低くなる。このように使用している移動相の含有成分もイオン化され、検出されることを考慮しておく必要がある。

その他、移動相として使用していなくても、装置に残存した分子種がイオン化に影響する場合がある。この例として、アンモニア付加イオンが挙げられる。このイオンを定量イオンとして用いる場合、移動相にアンモニウム塩を含有させてイオン化を安定化させることが必要である。

2.4 移動相に関する注意点

移動相として使用する水や有機溶媒のグレードも重要である。移動相に含有している夾雑成分もイオン化し検出されてバックグラウンド上昇の要因となる。基本的に LC-MS で使用する水は、超純水製造装置で製造した水（比抵抗率 18.24 MΩ・cm）や、市販の LC-MS 用超純水を使用する。有機溶媒も LC-MS グレードを推奨する。特殊な例として、PFAS 分析には、PFOS・PFOA 分析用超純水やメタノール、アセトニトリルが販売されている。

また、LC-MS 用移動相瓶は実験室内で専用化することを推奨する。過去に実験室にある履歴不明の瓶を使用したことで、意図せずイオンが塩素付加体として検出されるなど苦い経験をしたことがある。

さらに、移動相瓶の洗浄に界面活性剤を使用することは厳禁である。界面活性剤は非常に残存しやすく、界面活性剤の種類によってはイオン化されバックグラウンド上昇の原因となる。新しい移動相瓶は、超純水や LC-MS 用グレードの有機溶媒で洗浄して使用する。移動相瓶の蓋に内蔵される内蓋にも注意が必要である。ある蓋の内蓋を使用し、移動相瓶中に有機溶媒を入れるとその内蓋表面から m/z 536 と 610 の環状シロキサンのアンモニア付加体と推定されるイオンが検出された事例もある。

なお、移動相瓶への溶媒の継ぎ足し使用も厳禁である。移動相溶液調製時には、溶液の種類と日付を明記し、1 週間を目安に使用、交換時には全溶液を交換する。

また、LC-MS の移動相を調製するためのメスシリンダーも水系、有機溶媒系として LC-MS 専用化を推奨する。

2.5 サンプルとバイアル

分析する目的によってサンプルもさまざまな種類と容

量が想定される。重要なのは、目的の分析種が可溶性溶媒に溶解すること、固形物が存在しないこと、注入することができる容量であること、バイアルの表面に吸着しないこと等々である。サンプルを入れるバイアルについても、さまざまな注意点があり、用途に応じて適切な選択が求められる。一般的に、親水性化合物はガラスに吸着、疎水性化合物はポリプロピレン（PP）に吸着する。最近では、各種バイアルに LC-MS 品質証明付きの低汚染バイアルや低吸着バイアルが販売されている。LC-MS は高感度検出する装置であり、扱う分析種の濃度も低濃度であるので、これらバイアルを使用する事を推奨する。あるバイアルを使用した時に、目的の分析種がバイアルに存在しており、悩まされたという事例もある。バイアルもいくつかの種類を用意して、問題があればバイアルを変更することも必要である。

また、PP バイアルなどで、蓋にセプタムがない場合、オートサンブラのニードルが試料を吸引した後、ニードルの外側のぬぐいが不十分で高濃度のサンプルを注入した後、他のバイアルに分析種を持ち込むということや、サンプル溶液が揮発してしまうというリスクも考慮してバイアル選択をすることが必要である。動物用医薬品の分析で PP バイアルに有機溶媒を入れて使用する場合、分析種の吸着は抑えられるが、PP から溶出した夾雑成分でマススペクトルが複雑になるので、分析対象化合物の質量をあらかじめ算出しておくなどの準備が必要である。

2.6 キャリーオーバー対策

LC-MS は高感度の検出が可能な装置である。高感度の分析種ほどキャリーオーバーの問題が発生しやすいのも、皮肉な話である。MRM トランジション最適化の為に、比較的高濃度（ppm オーダー）の分析種を複数回注入した後、溶媒ブランクを注入してキャリーオーバーピークが検出されるようになったという事例がある。LC-MS/MS の定量分析には、MRM トランジションの構築作業が必要であるが、低濃度の分析種から注入して最適化作業を行うことも不用意なキャリーオーバーを発生させないためには重要なポイントである。

また、キャリーオーバーが発生した時には、順序立てた要因追及が必要である。最初に、オートサンブラ内部（注入口、ニードル、ニードルシール、サンプルループ、バルブのロータなど）とそれ以外の要因かを切り分ける必要がある。サンプルを非注入で分析し、キャリーオーバーのピークが検出されるかを確認する。この注入動作なくピークが検出された場合、分析種はカラム、カラム以降の流路に残存、または、移動相に汚染している可能性が高い。別のカラムを保有している場合は、カラムを交換して確認することができる。流路の洗浄や、移動相を新しくするなどして、流路と移動相の要因を確認する。

一方、サンプルを非注入で分析し、キャリアオーバーのピークが検出されなかった場合、オートサンプラの注入口周りに分析種が残存している可能性が高くなる。この時、溶媒ブランクを複数回連続して注入して分析した時、キャリアオーバーのピークの強度が減少していくのであれば、キャリアオーバー問題を解決することが比較的容易であると考えられる。高濃度の分析種を分析した後複数回溶媒ブランクを注入し、問題のないレベルまでキャリアオーバーのピークの強度を下げるか、溶媒ブランクよりも分析種が溶解しやすい溶媒を注入量より大量に注入することも効果的である。一般的には、定量分析の場合、溶媒ブランクのピーク面積値が、検量線の一番低濃度のピーク面積値の10分の1以下であれば許容されると考える。

2.7 オートサンプラの最新機能

2.6のようなキャリアオーバーの問題対策の為に、各社のオートサンプラにはニードルやそのリンス機能が搭載されている。そもそもニードルに特殊加工を施して、低キャリアオーバーを実現している機体、また、ニードル外側リンスの為に、複数種類の違うリンス液を使用でき、ニードル外部をポンプで送液し洗浄する事が出来る機体もある。また、注入口とニードルの接触点を複数のリンス液で洗浄する機能もあり、あらゆるキャリアオーバー問題に対応できるように用意がなされている。それら機能を使用してキャリアオーバー対策を構築できるようになっている。

3 装置管理

3.1 装置管理とその運用

2.3で説明したように、LC-MSは装置の使用履歴情報が重要である。装置の使用にあたり、装置の真空度、使用移動相、測定分析種、オートチューニング、メンテナンスを記録し、誰もが装置の状態を把握できるような管理を運用することが推奨される。

3.2 日常点検

日常点検記録では、装置の真空度、装置の温度やガス流量のパラメーターが正常に設定どおりに実行されるか、インターフェイスのクリーニングを実行したかを記

録するのがよい。

3.3 定期点検

定期的なMS装置校正のオートチューニング合格確認、LC装置の流量正確さ、注入精度の点検などを実施することが適切な装置の運用に役立つ。

この時、窒素ガス発生器、質量分析計のロータリーポンプやターボ分子ポンプ、検出器の使用時間確認もおこない、各機器のオーバーホールの準備に備えることも必要である。

3.4 さいごに

LC-MSの使用にあたって、コンタミやキャリアオーバーの問題を考える為に、多くの要因に関する知識が必要であることをご理解いただけたと思う。測定開始時に、装置の状態を他人任せにせず、一から順を追って確認することが大切である。LC-MSは真空を常時引いており、高級な装置に見えるが、使用して即故障するものでもないで、多くの使用や経験を積み重ねてさまざまなノウハウを蓄積していくことにより、円滑な分析作業ができると思う。少しでもこの記事が、皆様のお役に立つことができたら幸甚である。

文 献

- 1) J. J. Thomson : *Proceedings of the Royal Society A*, **89**, 1 (1913).
- 2) 豊田岐聡, 荒川隆一, 中村健道, 石濱 泰, 角井伸次, 森脇 洋: “質量分析学—基礎編—”, 豊田岐聡 編著, 日本質量分析学会 監修.
- 3) E. de Hoffmann, V. Stroobant : “*Mass Spectrometry : Principles and Applications*”, 3rd Edition.



小林 まなみ (KOBAYASHI Manami)
株式会社 島津製作所 分析計測事業部 Solutions
COE ヘルスケアソリューションユニット食品G
(〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25-40 Shimadzu Tokyo Innovation Plaza (殿町事業所)). 京都府立大学農学部農芸化学科. 第1種放射線取扱主任者. 《現在の研究テーマ》国内外の食品市場で使用される分析機器のプロモーション, アプリケーション開発. 《趣味》ゴルフ, 旅行.
E-mail : manami@shimadzu.co.jp