

LC-MS/MS の分析メソッド追加作業

藏増 亮佑*

鳥取大学技術部 生物生産管理部門 乾燥地科学分野

1. 概要

液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)は、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に質量分析計(MS)を連結した分析装置である。LC-MS/MSはLC-MSにMSをもう1台連結したものであり、LC-MSでは1回のみ行われる質量分析がLC-MS/MSでは2回行われる。そのため、LC-MS/MSはLC-MSよりも高い分析精度をもつとされる。

乾燥地研究センターにはLC-MS/MSが導入されており、主に麦などの植物サンプル、土壌中の化合物の定性・定量分析に使用されている。LC-MS/MSで新規に分析メソッドを追加するには、分析対象の化合物(分析種)のMS条件検討、HPLCの条件検討を行う必要がある。本報告では、分析メソッド追加作業に関して実例をもとに記述する。

1.1. MS 条件検討

分析種毎にプレカーサーイオン、プロダクトイオン、フラグメンター電圧、コリジョンエネルギー等の検討を行い、分析メソッドに反映する。

<MS/MS について>

HPLC から出てきた分析種はイオン化され、導入部に印加される電圧(フラグメンター電圧)によりMSに導入される。MS1では特定の m/z *¹を有するプレカーサーイオン*²が選択されてコリジョンセルに送られる。続くコリジョンセル内では、コリジョンガス分子(原子)が衝突することでプレカーサーイオンが開裂して、プロダクトイオン*²が生成される。最後のMS2では、プロダクトイオンの中から特定の m/z を有するイオンが検出器に送られる。プレカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z は化合物の同定に、フラグメンター電圧とコリジョンエネルギーはプレカーサーイオンとプロダクトイオンの生成量に関係するためいずれも決定しなければならない。

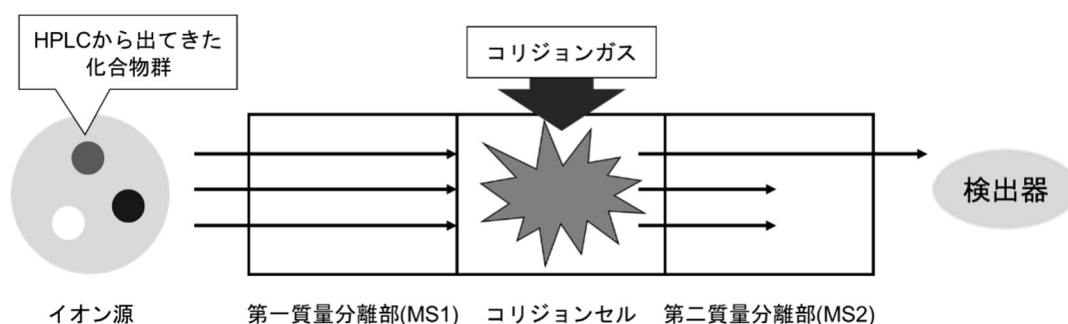


図1 MS/MSの構成

*¹ イオンの質量を統一原子質量単位(基底状態にある1個の¹²C原子の質量の1/12)で割った値 m を、更にイオンの電荷数 z で割った値。

*² プレカーサーイオンはMS1までで生成されるイオン群、プロダクトイオンはコリジ

ヨンセル内でプレカーサーイオンが開裂して生成されるイオン群のこと。

1.2. HPLC の条件検討

溶媒，カラム，流速，グラジエント条件等の検討を行い，分析メソッドに反映する。

<HPLC について>

クロマトグラフィーは混合物の分離法のひとつであり，カラムを通すことで混合物を分離する方法である．この分離は各化合物の移動相及び固定相^{*3}との相互作用の大きさの差を利用している．溶媒の種類やカラムの種類，移動相の流速，グラジエント条件はいずれもカラム内での分離に関わるため決定する必要がある．^{*3} 移動相はカラム

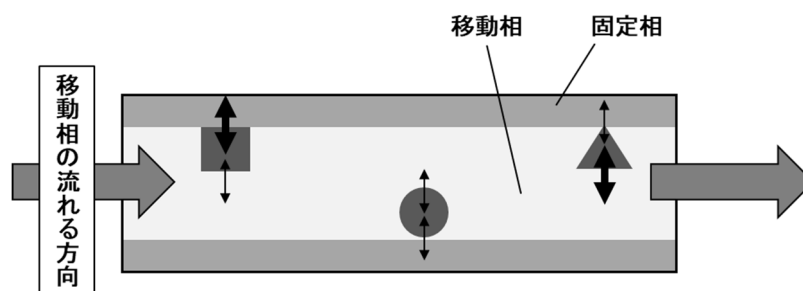


図2 カラム内での混合物の分離

内で化合物を運搬する役割を，固定相はカラム内に化合物を留める役割を果たしている．HPLCでは溶媒が移動相，カラムの充填剤が固定相である。

2. 実際の検討手順

利用者からの希望により分析メソッド(Oleanolic acid, Hederagenin, Phytolaccagenic acid 用)を追加した際の条件検討の手順を記述する．条件検討では共通して

- ✓ LC-MS/MS : Agilent 6420 (アジレント・テクノロジー)
- ✓ カラム : Discovery® HS F5 HPLC カラム，2.1 × 250 mm，5 μm (Sigma-Aldrich) を使用している。

2.1. MS 条件検討

Oleanolic acid (1.010 mg)，Hederagenin (1.080 mg) (図3，図4)を50%メタノール水溶液10 mLに溶かし，100 μg/mL 標準溶液とした．また，Phytolaccagenic acid (1.000 mg) (図5)を50%メタノール水溶液1 mLに溶かし，1 mg/mL 標準溶液とした．続いてこれらを50%メタノール水溶液で希釈し，Oleanolic acid，Hederagenin，Phytolaccagenic acid の10 μg/mL 標準溶液を調製した．調製した標準溶液に対してカラムを外したうえでMS2 Scan，Product Ion Scan^{*4}測定を行い，分析種のプレカーサーイオンの m/z ，プロダクトイオンの m/z ，フラグメンター電圧，コリジョンエネルギーを決定した．決定したMS条件は分析メソッドに反映した．

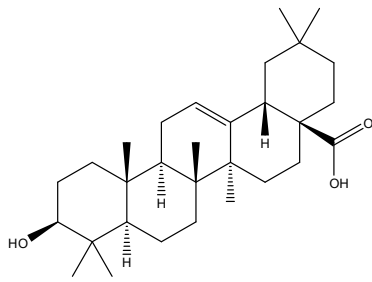


図 3 Oleanolic acid

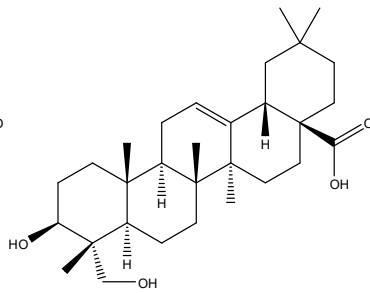


図 4 Hederagenin

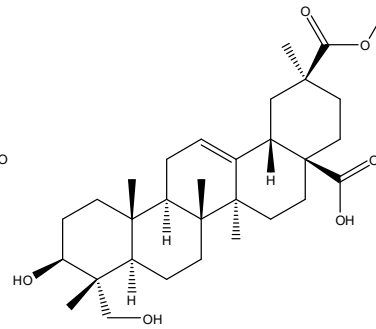


図 5 Phytolaccagenic acid

表 1 MS 条件

	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmenter (V)	Collision energy (V)	Polarity
Oleanolic acid	439.4	203.1	130	25	Positive
Oleanolic acid	439.4	191.1	130	13	Positive
Hederagenin	455.4	203.2	135	24	Positive
Hederagenin	437.43	391.5	135	20	Positive
Phytolaccagenic acid	499.4	481.1	130	9	Positive
Phytolaccagenic acid	499.4	111	130	25	Positive

Gas Temp. : 300 °C

Gas Flow (N₂) : 10 L/min

Nebulizer : 30 psi

Capillary : 4000 V

*4 MS2 Scan と Product Scan はともに LC-MS/MS の測定モードで、ここでは分析種のプレカーサーイオンとプロダクトイオンを決定するために使用している。MS2 Scan ではプレカーサーイオンがそのまま検出器まで送られるので、標準溶液に対して MS2 Scan を行うことで分析種のプレカーサーイオン群の m/z を決定することができる。Product Ion Scan は特定のプレカーサーイオンに由来するプロダクトイオン群の m/z を測定するモードであり、標準溶液に対して Product Ion Scan を行うことで分析種のプロダクトイオン群の m/z を決定することができる。

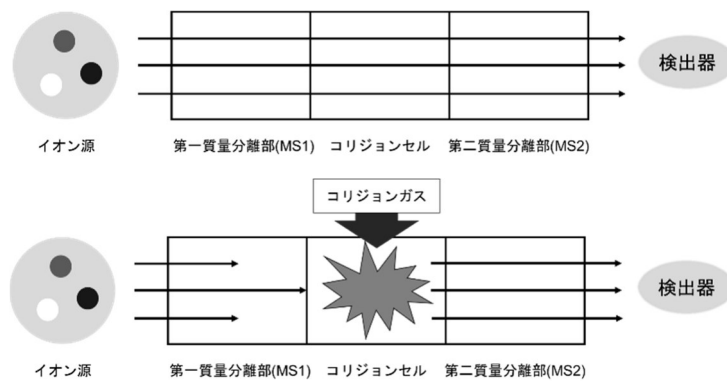


図 6 MS2 Scan (上), Product Ion Scan (下)

2.2. HPLC の条件検討

乾燥地研究センターで使用している汎用条件をもとに HPLC 条件を検討した。まず、汎用条件を使用して測定を行ったところ、保持時間*5 は異なるもののピークが重なってしまい、分離には至らなかった。

*5 サンプルをカラムに注入してから検出器に検出されるまでにかかる時間。

表 2 乾燥地研究センターで使用している汎用 HPLC 条件

Time (min)	A 0.1% Formic acid aq (%)	B Acetonitrile (%)
0	100	0
2.0	50	50
5.0	75	25
11	65	35
10	5	95
18	5	95

Flow Rate : 0.25 mL/min

Column Temp. : 40 °C

Injection Volume : 3.0 μL

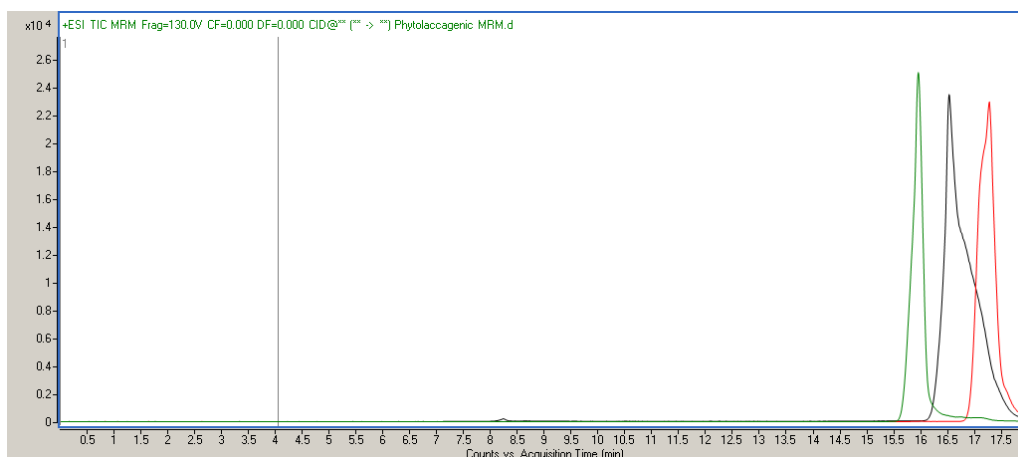


図 7 表 2 条件で得られたクロマトグラム

上記の結果を踏まえてグラジエント条件の再検討を行った。アセトニトリルの濃度を高くした条件(表 3)で再測定を行ったところ、ピークの重なりが解消され、保持時間が短縮されたクロマトグラムが得られたので、この HPLC 条件を分析メソッドに反映した。

表 3 アセトニトリルの濃度を高くした HPLC 条件

Time (min)	A 0.1% Formic acid aq (%)	B Acetonitrile (%)
0	100	0
2.0	50	50
5.0	50	50
10	25	75
15	25	75

Flow Rate : 0.25 mL/min
 Column Temp. : 40 °C
 Injection Volume : 3.0 μL

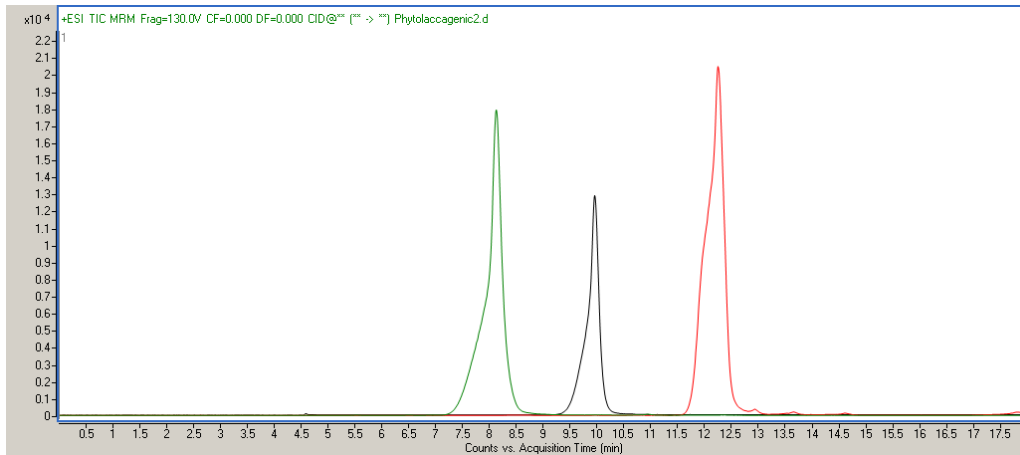
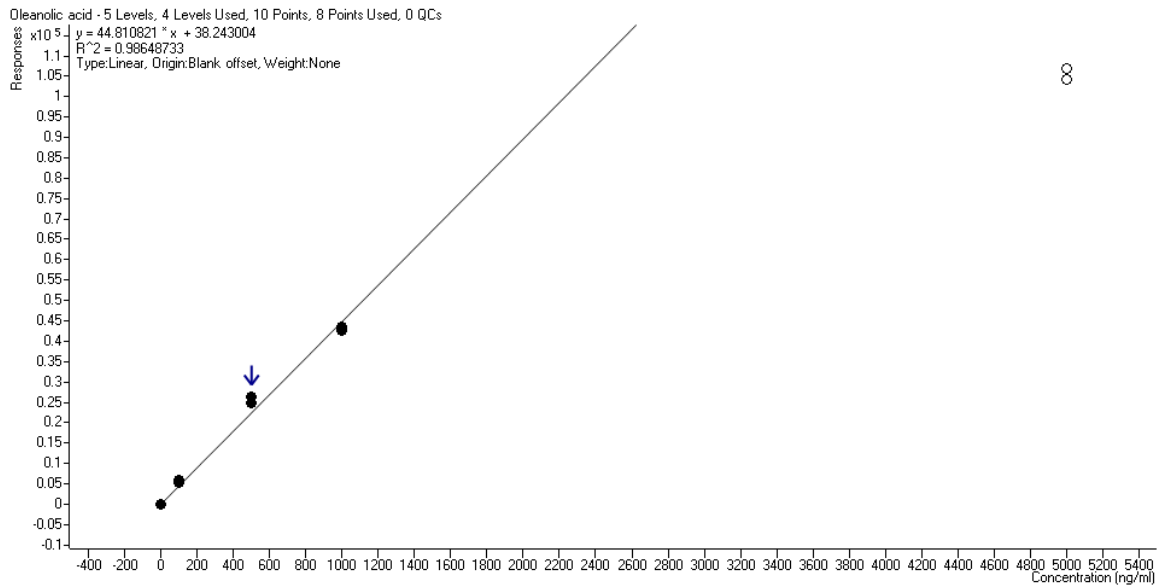


図 8 表 3 条件で得られたクロマトグラム

3. 結果

条件検討を行い,新しく追加する分析メソッドの MS 条件と HPLC 条件を決定した.追加した分析メソッド用いて検量線を作成したところ, 0 ppb ~ 1000 ppb の範囲で直線性が確認された. 今後は実際の分析に使用しつつ, 分析メソッドに修正を加えていく.



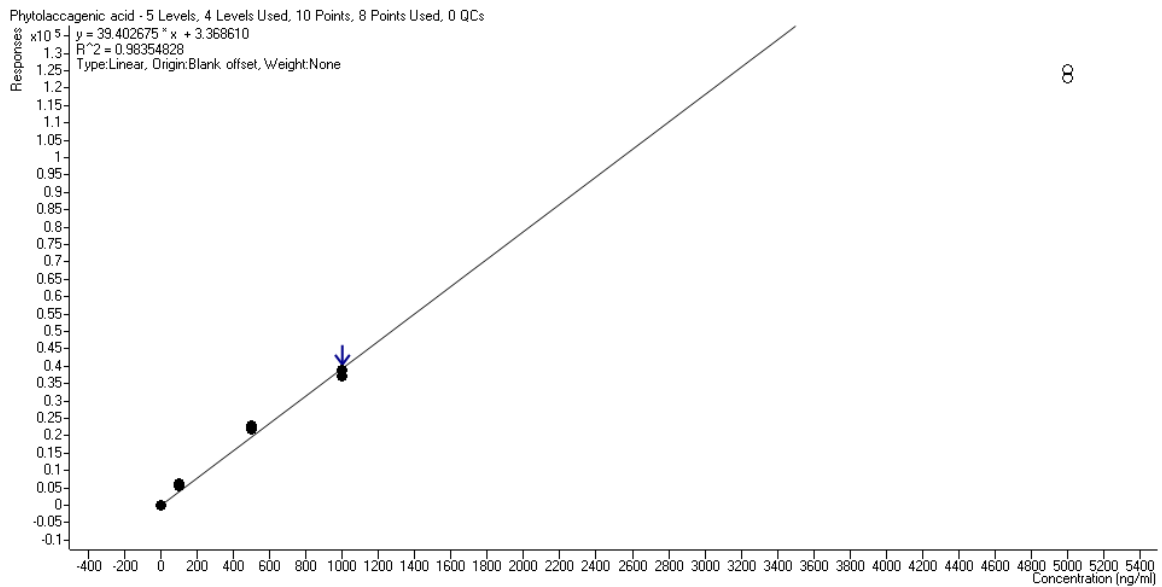
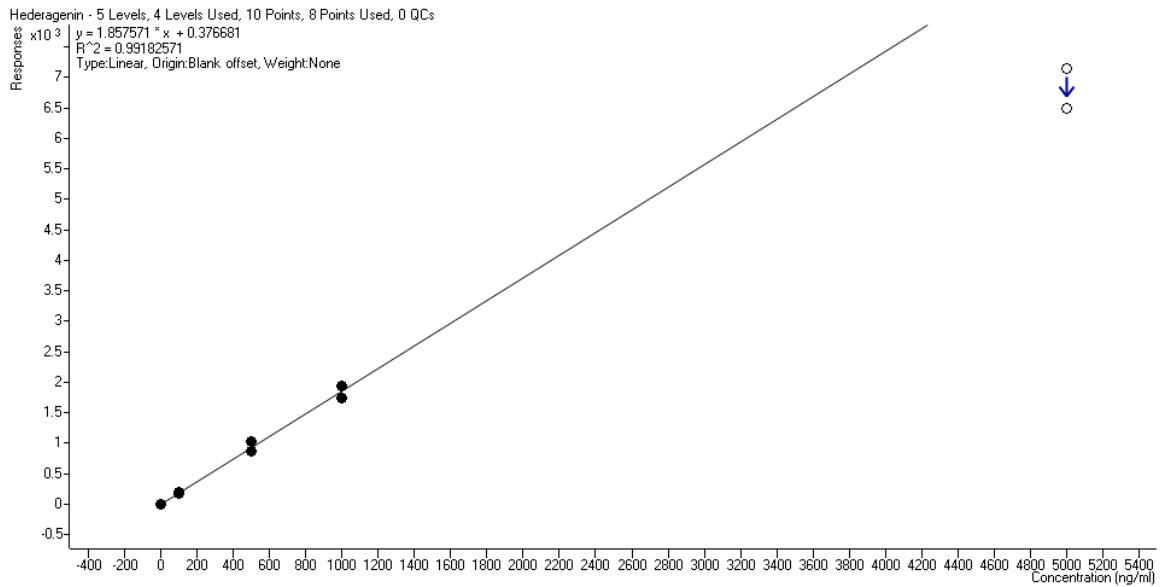


図 9 Oleanolic acid, Hederagenin, Phytolaccagenic acid の検量線

- 1) 中村洋. “LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用”. オーム社, 2014.
- 2) 株式会社島津製作所. “LC-MS の基礎ガイド”. 株式会社島津製作所. 2022.
https://www.an.shimadzu.co.jp/lcms/support/lib/foundation_guide.htm, (参照 2022-11-11).

* E-mail: r.kuramasu@ml.tech.tottori-u.ac.jp