

超高速測定に対応した LC/MS、LC/MS/MS およびその分析例

Ultra high Speed LC/MS & LC/MS/MS

渡辺 淳

Jun WATANABE

株式会社島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部

MS ビジネスユニット アプリケーショングループ

〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

TEL 075-823-1334

E-mail jun_wtnb@shimadzu.co.jp

1. はじめに

LC/MS はその選択性および感度の高さから、医薬、食品、環境などの分野で幅広く用いられている。そのフロント部に使用されている HPLC は 1970 年代に実用化され広く普及しており、2000 年代には充填剤の微粒子化とシステムの高耐圧化により飛躍的な分析時間の短縮を果たした超高速 LC (UHPLC) が登場した。近年、分析時間の短縮にともなう生産性の向上のメリットから、UHPLC は急速に普及し、更なる充填剤の改良、システム耐圧の向上に伴って、超高速分析はより一般的な分析手法として確立されつつある。

この UHPLC の急速な普及に伴って、LC/MS においてもフロント部に UHPLC を使用することにより超高速分析を行う UHPLC/MS としての用途が広がりつつある。同時に、超高速分析において感度、安定性の高い分析をおこなうために、MS にも「超高速検出」が要求されるようになった。

島津製作所では、超高速分析に対応した LC/MS、LC/MS/MS としてシングル四重極型質量分析計である LCMS-2020、トリプル四重極型質量分析計である LCMS-8030 を開発した。LC/MS、LC/MS/MS が超高速に対応するにはどのような性能が必要であるか、分析例を交えて紹介する。

2. 超高速検出

UHPLC/MS による超高速分析では、化合物がシャープな状態で MS に導入されるため、ピーク幅が狭くなる。定量結果や感度、再現性の安定したデータを得るには、一般的にピークに対して 10 点以上のデータポイントが必要とされているが、従来の LC/MS でのデータポイント間隔ではポイント数が少ないため、本来のピーク形状からの乖離が大きくなり、ピーク形状のゆがみが生じ、再現性の低いクロマトグラムになってしまう(図1)。このため、超高速分析 LC/MS では、従来の分析より短時間で MS のデータ取得を行う

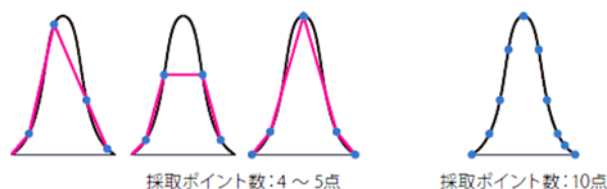


図1. 採取ポイント数とクロマトグラム形状の関係

ことが必要となる。

2-1. 高速正負イオン化切り替え

多成分の一斉分析や未知試料の定性分析においては、正イオンの検出と負イオンの検出を交互に切り替えながら測定することが必要になるケースも多い。この場合、正負イオンの検出極性切り替え時には測定を行えないタイムロスが発生する（図2）。LCMS-2020 および LCMS-8030 では、この正負イオン化切り替え時間を 15 msec という短時間で行うことができるため、超高速分析でもイオン化極性の異なる化合物を短時間で切替えながら同時に検出することができる。

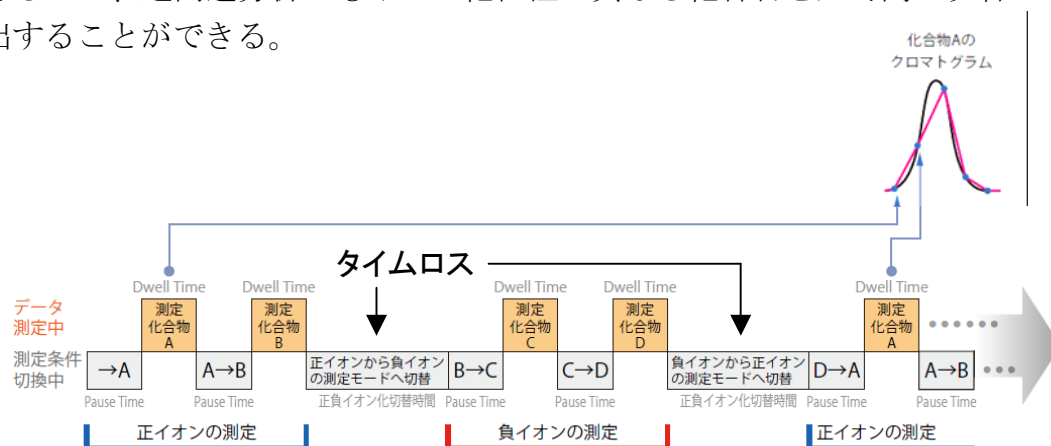


図2. 化合物 A~D の4成分を正負イオン化切替しながら MRM 測定する場合の測定切替模式図

2-2. 高速スキャン

超高速分析においてスキャン測定を行う場合、前述のデータポイントの観点から短時間でスキャンを行うために、高速なスキャンスピードが要求される。一方、スキャンスピードを速くした際の問題点として、1回のスキャン動作の時間内に四重極ロッドを通過できるイオンの総数が少なくなるため、感度が低下することが知られている。さらに、 m/z 値が大きなイオンでは、四重極ロッドの通過に長い時間を要するため、感度の低下がとりわけ顕著となる（図3）。LCMS-2020 と LCMS-8030 は m/z 値の大きさとスキャンスピードに応じて四重極ロッドへの印加電圧を自動的に最適化する技術を採用しており、高感度を維持したまま高速スキャンが可能となっている（図4）。

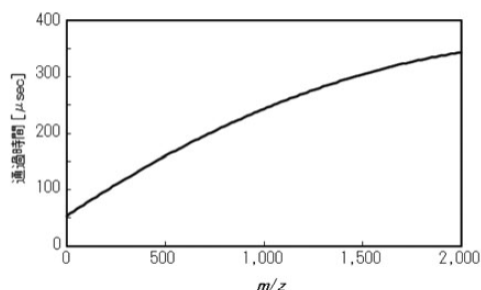


図3. m/z 値と四重極ロッド通過時間の関係

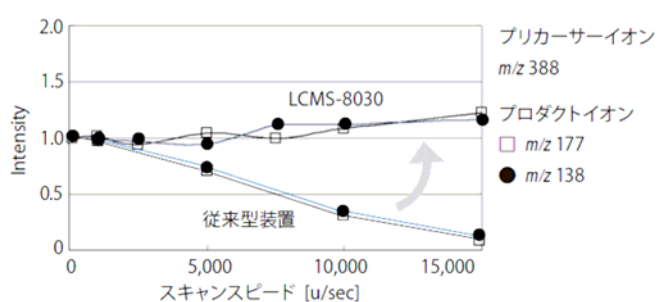


図4. スキャンスピードと感度の関係 (プロダクトイオンスキャン)

LCMS-2020、LCMS-8030 では、高速スキャンにおいても良好なパフォーマンスを維持することができ、最速 15000 u/sec という高速スキャン測定が可能となっている。とりわけ、LCMS-8030 では高速スキャンにより、プロダクトイオンスキャン・プリカーサーイオンスキャン・ニュートラルロススキャン、MRM などの種々のスキャンモードの測定を切り替えながら同時に行えるようになるため、より多くの定性情報を一度の分析で得ることができる。図 5 に農薬 29 成分を 1.5 分以内で高速分離し、MRM 測定およびそれをトリガーとしたプロダクトイオンスキャン測定を実施した例を示す。正負イオンを同時に検出しているにもかかわらず、高速スキャン性能と 15 msec の高速正負イオン化切り替えにより、UHPLC の幅の狭いピークを確実に検出している。さらに、短い時間でスキャン測定ができるため、同時に定量に必要なデータポイントを確保できる。

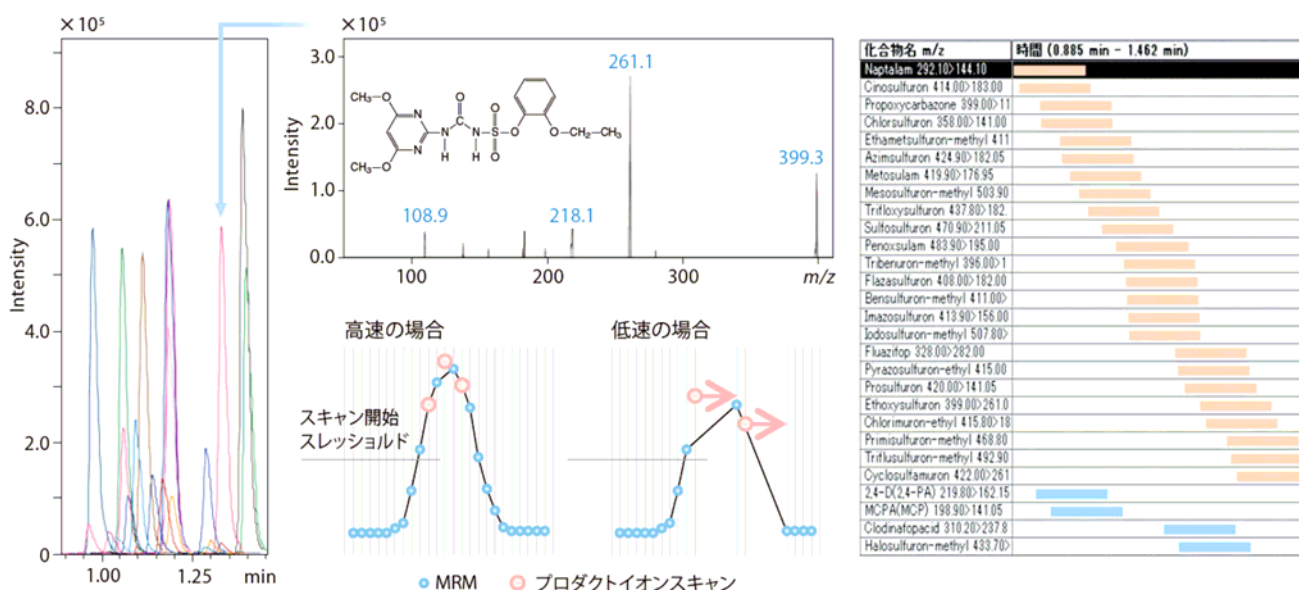


図 5. 農薬 29 成分の MRM クロマトグラムと MRM をトリガーとしたプロダクトイオンスキャンのマススペクトル

2-3. コリジョンセルでのイオン減速防止技術 –感度維持・クロストーク防止・高速質量切り替え–

トリプル四重極型 LC/MS/MS の測定ではコリジョンセル内でイオンをフラグメンテーションさせるが、その際にイオンが減速する。この結果、イオンパスに入ったイオンの一部が検出器に到達する前に MRM チャンネルが切り替わるため、信号強度の低下が生じる。Dwell time (MRM におけるイオンの測定時間) が短い高速 MRM 測定時ではこの影響は顕著である。一方で、コリジョンセルに残ったイオンが次の MRM チャンネルの検出に影響することによりクロストークが生じる。

検出するイオンを切り替える時にも、測定が行えない切り替え時間 (Pause time) が発生する (図 2)。電圧を変更して安定化させ、イオンパス、特にコリジョンセルに残っているイオンを一掃するための時間である。短いサイクルで検出を行う必要がある超高速分析では Pause time を短縮することにより、測定時間 (Dwell time) に時間を多く割り当てること

ができるため、測定化合物を増やしたり、感度を向上させたりすることができる。ただし、Pause time を短縮しすぎると、電圧安定化が得られないことによるデメリットとしてデータが安定しない、ノイズが出る、ベースラインが高くなる、といった影響が、コリジョンセルに残っているイオンが一掃されないことによるデメリットとしてクロストークが生じる、という影響が生じる。

こういった問題に対し、現在、各社のトリプル四重極型 LC/MS/MS でいろいろな名称の技術が採用されている。技術的な内容はほぼ同じで、コリジョンセル内でのイオンの減速を防止することが要点である。

島津製作所トリプル四重極型 LC/MS/MS の LCMS-8030 では UF-sweeper® 技術がこれに相当する。UF-sweeper® によりイオンの減速が防止される結果、Dwell time を短く設定した超高速測定時でも信号強度は低減することなく維持され (図 6)、さらにイオンの検出器までの到達時間を短くすることができるため、クロストークが生じやすい条件においてもその影響が抑えられ、高精度な分析を行うことができる (図 7)。

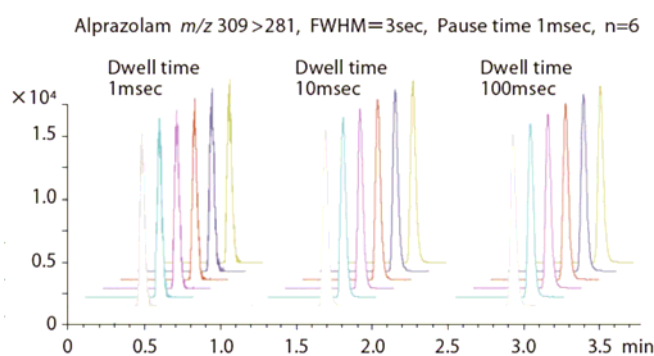


図 6. Dwell Time とイオン強度の関係

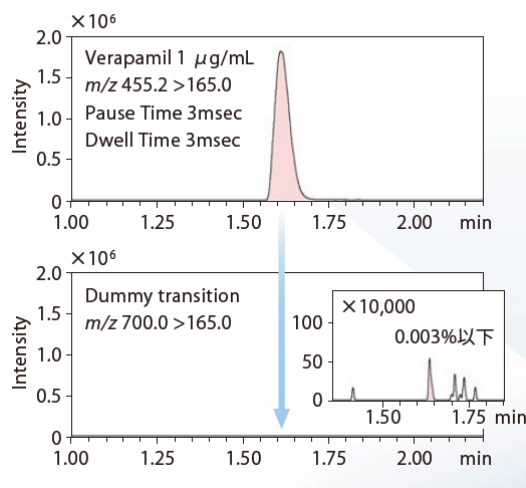


図 7. クロストークテスト ; 試料にはベラパミルを使用

このように LCMS-8030 では、Dwell time、Pause time とも 1 msec で測定しても大きなイオン強度の低下を生じることがない。さらに前述の高速正負イオン化切り替えとの融合により、従来の LC/MS/MS と比較して、超高速分析のシャープなピークを安定して精度良く検出することができる。

3. UHPLC/MS/MS による分析例

3-1. 医薬品の MS-MS/MS 自動測定による構造確認

MS スキャンおよびそれをトリガーとしたプロダクトイオンスキャン測定を行うモードを用いて、医薬品の構造確認を目的とした測定例を紹介する。図 8 に示すメソッドを用いて測定を行った。MS スキャンと自動プロダクトイオンスキャンの測定を実施することで、MS スキャンによる分子

| CE | タイプ | イベント# | +/- |
|------|---------------|-------|-----|
| | Q3 スキャン | 1 | + |
| -20V | トプロダクトイオンスキャン | 2 | + |
| -40V | トプロダクトイオンスキャン | 3 | + |
| | Q3 スキャン | 4 | - |
| 20V | トプロダクトイオンスキャン | 5 | - |
| 40V | トプロダクトイオンスキャン | 6 | - |

図 8. メソッド

量確認だけでなく、より詳細な構造情報を得ることができる。さらにこの測定は正負イオン化切り替えを行いながら測定した。本測定はスキャンスピードの高速性、正負イオン化切り替えの高速性が必要となる。

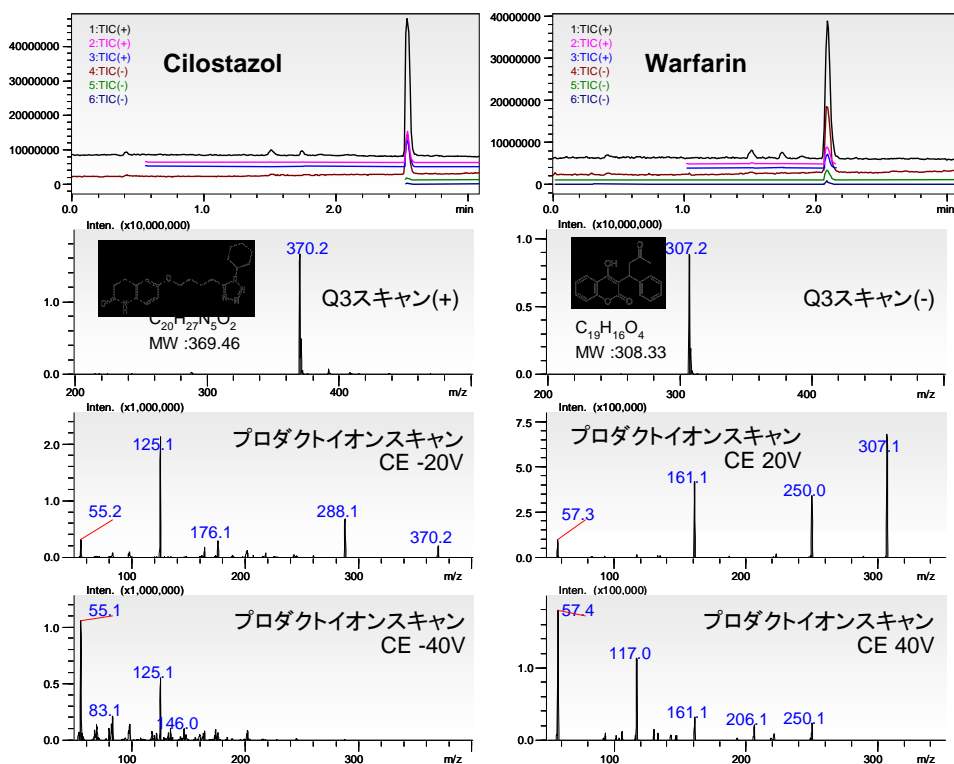


図9. 測定結果
Cilostazol、Warfarin

測定は医薬品1成分ずつ、全部で26成分について行った。代表的な結果としてCilostazolとWarfarinの測定データを図9に示す。

26成分中、正イオンで24成分、負イオンで6成分、このうち正負イオン両方で4成分が検出できた(表1)。すべての成分が正負いずれかのモードで検出されており、本方法が化合物の探索・合成確認に有効であることがわかる。

3-2. プリカーサーイオンスキャンによるLASの一斉検出

LAS(直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム;陰イオン界面活性剤)はCIDによるMS/MSにおいて、右図のようなフラグメントを生じるため、直鎖の炭素数によらず m/z 183のフラグメントイオンを生成する。このLAS共通のフラグメントイオン m/z 183を利用し、プリカーサーイオンスキャンによるLASの一斉検出を試みた。通常、トリプル四重極

表1. 26成分検出結果

| | Compound | MW | Detection | |
|----|---------------------|--------|-----------|----------|
| | | | Positive | Negative |
| 1 | Atenolol | 266.16 | ○ | × |
| 2 | Procaine | 236.15 | ○ | × |
| 3 | Lidocaine | 234.17 | ○ | × |
| 4 | Atropine | 289.17 | ○ | × |
| 5 | Yohimbine | 354.19 | ○ | ○ |
| 6 | Chlorpheniramine | 274.12 | ○ | × |
| 7 | Propranolol | 259.16 | ○ | × |
| 8 | Alprenolol | 249.17 | ○ | × |
| 9 | Tetracaine | 264.18 | ○ | × |
| 10 | Diphenhydramine | 255.16 | ○ | × |
| 11 | Doxepin | 279.16 | ○ | × |
| 12 | Desipramine | 266.18 | ○ | × |
| 13 | Imipramine | 280.19 | ○ | × |
| 14 | Nortriptyline | 263.17 | ○ | × |
| 15 | Amitriptyline | 277.18 | ○ | × |
| 16 | Verapamil | 454.28 | ○ | × |
| 17 | Carbamazepine | 236.09 | ○ | × |
| 18 | Isopropylantipyrene | 230.14 | ○ | × |
| 19 | Alprazolam | 308.08 | ○ | × |
| 20 | Triazolam | 342.04 | ○ | × |
| 21 | Cilostazol | 369.22 | ○ | ○ |
| 22 | Nifedipine | 346.12 | ○ | ○ |
| 23 | Diazepam | 284.07 | ○ | × |
| 24 | Warfarin | 308.10 | ○ | ○ |
| 25 | Chloramphenicol | 322.01 | × | ○ |
| 26 | Nitrendipine | 360.13 | × | ○ |

型質量分析計においてプリカーサーイオンスキャンはスキヤンスピードが速くなるとマスずれが生じることが知られている。これはスキヤンを行う Q1 と検出器の間に距離があることに起因する。LCMS-8030 ではこのマスずれを補正する MS 校正が実施される。その検証に、スキヤンスピードを上げていったときの検出される m/z 値についても確認を行った。

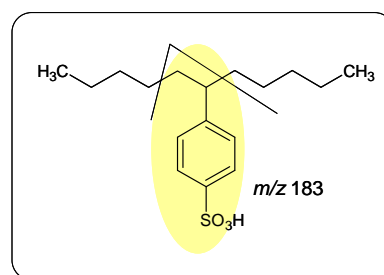


図10. LAS (C11)の構造

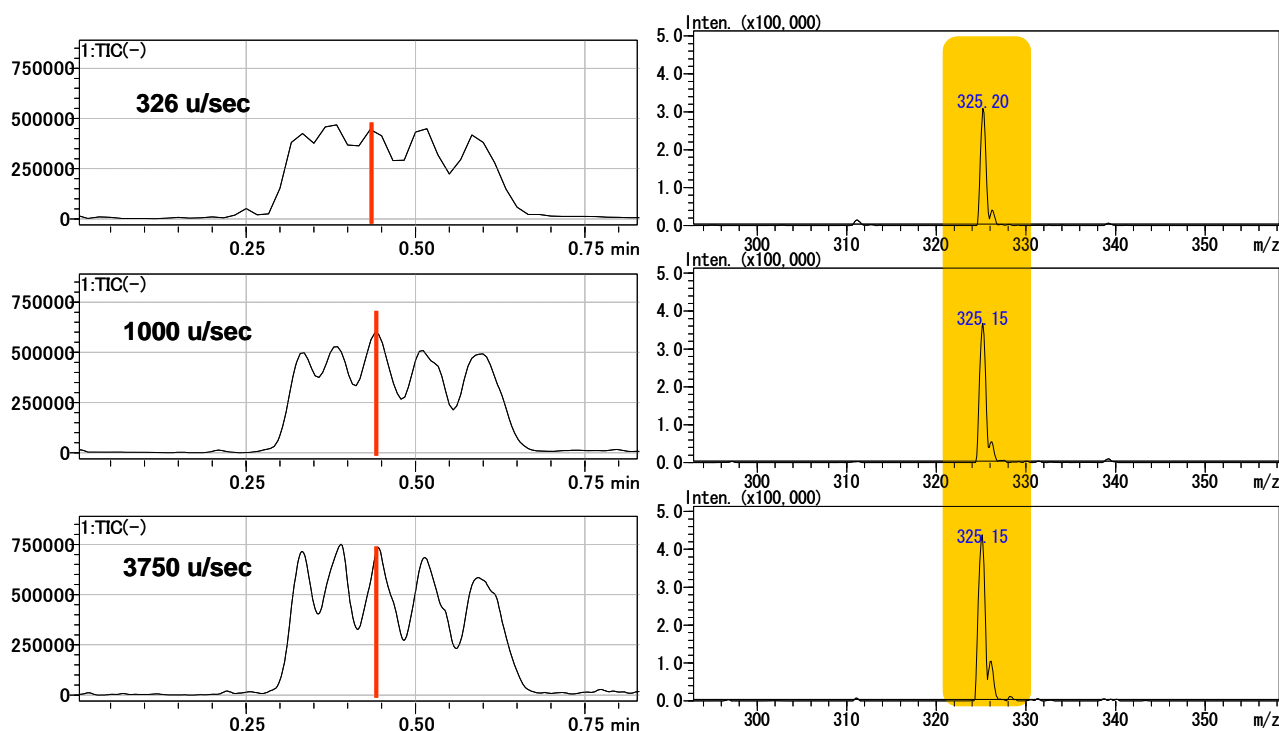


図 11. プリカーサーイオンスキャン測定の結果

サンプルは LAS 標準溶液を使用。左：TIC クロマトグラム 右：C12 (3 番目のピーク) のピークトップのマススペクトル

本測定では LC の分離条件が超高速測定であり、300u/sec 程度のスキヤンスピードではデータポイント数が足りず、適切なピーク形状が得られなかった。3000u/sec 以上の高速スキヤンスピードにすることで、十分なデータポイントが得られた。また、326、1000、3750u/sec の各スキヤンスピードにおいて、検出された化合物の m/z 値のずれは見られなかった。

4. まとめ

近年急速に普及しつつある UHPLC との組み合わせにより UHPLC/MS (MS) として超高速分析を行うために、MS に要求されるポイントについて紹介した。

シングル四重極型質量分析計 LCMS-2020 およびトリプル四重極型質量分析計 LCMS-8030 は UHPLC/MS (MS) として超高速分析でも安定した精度良い分析が可能である。