

液体クロマトグラフ-質量分析装置によるアクリルオリゴマーの分析

名古屋研究機構 分析研究室 高田 じゅん

1 緒 言

液体クロマトグラフィー(LC)やガスクロマトグラフィー(GC)に代表されるクロマトグラフィーは複数成分からなる試料の分離分析に大きな威力を発揮する。一方、質量分析(MS)は高い検出感度と分子構造情報を得る能力を兼ね備えているという他の分析法にはない特長がある。このような利点を持つ2つの分析装置を結びつける、すなわちクロマトグラフの検出器として質量分析装置を用いることで「混合物中の微量成分の分離・同定・定量」が可能になる。このような分析装置として分析研究室ではGC-MSを所有しており、揮発性有機化合物や高分子材料からの発生ガス分析などに活用してきた。しかしGC-MSでは難揮発性化合物や高極性化合物の分析は困難であり、測定できる分子量範囲も数百までに制限されるという欠点がある。これに対して液体クロマトグラフィーの検出器を質量分析装置とした液体クロマトグラフ-質量分析装置(LC-MS)は比較的高極性の化合物の分析を得意としており、且つ分子量は数万まで測定可能である。このようにLC-MSは広い適用範囲を持っているため分子量数百程度の医薬品からペプチドタンパク質にいたるまで様々な化合物の分析に活用されている¹⁾²⁾。

分析研究室では2005年にLC-MS装置を導入し、種々の試料への応用を試みてきた。本稿ではLC-MS装置の原理と特徴、実際の測定例を紹介する。

2 LC-MSの装置構成

LC-MSの装置構成を図1に示す。液体クロマトグラフにより分離された試料の各成分は溶離液と共にイオン化部に導入される。イオン化部では導入された各成分がイオン化されて質量分析部へと導かれる。用いられるイオン化法にはESI法とAPCI法の2種類があり、それぞれ得意とする化合物が異なるので測定化合物の性質によって使い分けが必要である。質量分析部ではイオンがその質量電荷比(m/z)によって分離され、各成分の質量情報を与える。また、質量分析部は2台の質量分析装置が組み込まれたタンデム型と呼ばれる形式であり、プロダクトイオンスキャンやSRMなどのいくつかの測定モードが使用できる。これらについては後述する。

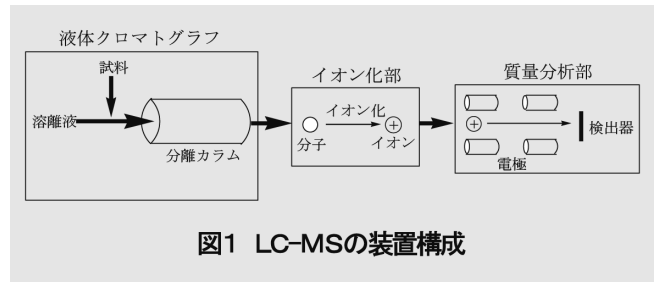


図1 LC-MSの装置構成

3 イオン化法の原理

LC-MSで用いられる主なイオン化法にはESI法とAPCI法の2つがある³⁾。

ESI法(electrospray ionization)の原理を図2に示した。ESI法では試料溶液を供給するキャピラリーの先端に数kVの電圧を印加した状態で試料溶液を噴霧する。キャピラリー先端では印加された電圧により表面が帯電した液滴が形成されるが測定分子はまだイオン化していない。この液滴は加熱されて溶媒が蒸発していき、それに従って液滴は小さくなる。液滴が小さくなると表面電荷による反発力は強くなっていき、溶媒の表面張力より反発力の方が大きくなると液滴は一気に微細化されて測定分子がイオン化される。ESI法は比較的高極性・高分子化合物に適したソフトなイオン化法である。また、1つの測定分子に2つ以上の電荷が付加した多価イオンが生成しやすいという特徴がある。

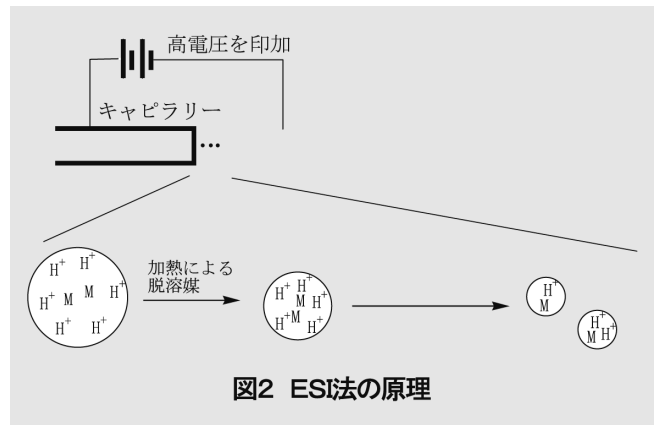
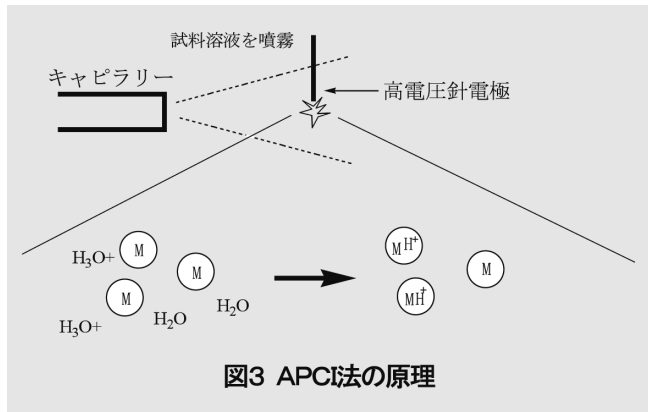


図2 ESI法の原理

APCI法の原理を図3に示した。分離カラムから出てきた試料溶液はキャピラリーから噴霧されると同時に加熱されて溶媒が除去されるが、この時点ではまだ測定分子はイオン化されていない。キャピラリーの近くには数kVの電圧を印加した針電極がありコロナ放電を起こす。この放電によって針電極のまわりの窒素ガスや水分子、

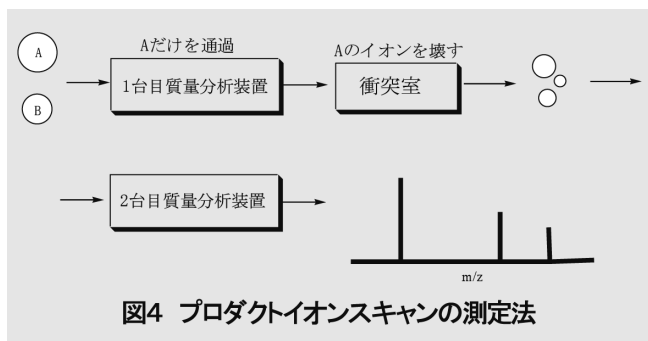
溶媒分子がイオン化される。これらのイオン種と測定分子が反応して測定分子がイオン化される。このイオン化は大気圧(atmospheric pressure)下で化学イオン化(chemical ionization)を行っているためAPCI法と呼ばれている。APCI法は比較的低極性・低分子化合物に適したイオン化法である。



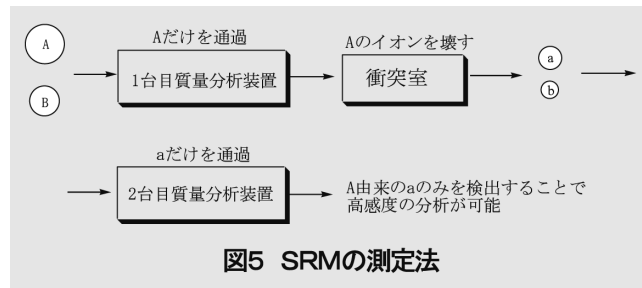
4 タンデム型質量分析装置での測定法

2で述べたように今回導入したLC-MSの質量分析部には2台の四重極型質量分析装置が搭載されている。このような形式をタンデム型と呼び、1台の質量分析装置ではできない測定が可能になる。その代表がプロダクトイオンスキャンとSRMである。

プロダクトイオンスキャンは測定分子の構造情報を得るのに威力を発揮する測定法である。原理を図4に示した。まず1台目の質量分析装置で構造情報が欲しい分子だけを通過させる。その分子をコリジョンセル内で壊し、生成したプロダクトイオンを2台目の質量分析装置で分析する。こうして得たプロダクトイオンのマススペクトルから元の分子の構造を推定することができる。



SRM(selected reaction monitoring)は微量成分の定量に威力を発揮する測定法である。原理を図5に示した。まず1台目の質量分析装置で定量したい分子だけを通過させる。その分子をコリジョンセル内で壊してプロダクトイオンを生成させる。プロダクトイオンの中から再度特定のものを選んで2台目の質量分析装置ではこれだけを検出器へと通過させる。この測定では夾雑イオンとの分離を質量分析装置で行なっているためノイズが非常に小さくなり、高感度な分析が可能となる。



5 LCシステムの特長

分離カラムの充填剤はその粒径が小さいほど分離能は向上する。これは次の2つの理由による。

体積に対する比表面積が大きくなり、分離に使える充填剤表面のリガンド量が増加する。

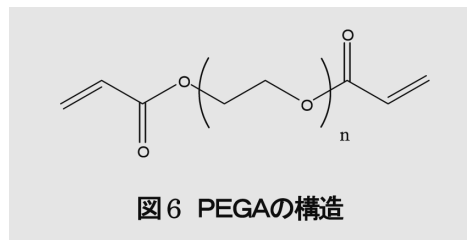
充填率が高くなり、デッドボリュームとなる充填剤間の隙間が少なくなる。

ただし、充填率が上がるためにカラムを使用する時の圧力も高くなってしまい、充填剤やLC装置に十分な耐圧性を持たせないと使用することができなくなる。このような制約からカラム充填剤の粒径は通常3μmと5μmのものが使用されている。ところが最近Waters社より発売されたACQUITY UPLC(ultra performance liquid chromatography)というシステムは装置・充填剤に十分な耐圧性を持たせ、充填剤の粒径が1.7μmという分離カラムの使用を可能にした。これによって一般的なHPLC装置の数分の一の分析時間で高い分離能が得られるようになった。今回導入したLC装置はこのACQUITY UPLCであり、短時間で多数の試料の分析が高分離能で行なえるというメリットが期待できる。

6 分析事例の紹介

6.1 アクリレートオリゴマーの分析

ポリエチレングリコールアクリレートオリゴマー(PEGA 図6)の分析をLC-MSにて行い、得られたTIC(total ion chromatogram)を図7に示した。



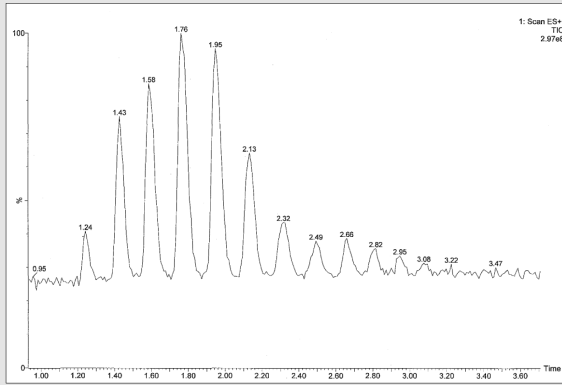


図7 PEGAのTIC

PEGAはポリエチレングリコール鎖の鎖長に分布がある。図7を見るとこの鎖長の違いによって各成分が分離されていることが予想できる。通常のLC装置ではPEGAの分離を行なうのに15分の分析時間が必要である。しかし、今回の分析では約3分で分離を終了している。これはACQUITY UPLCを使用によって短時間で高分離能が得られることを示している。

次にTICのピークの同定を行なった。図8に $m/z=303$ 、 320 、 325 の3つのマスクロマトグラムを示した。この3つの m/z 値はそれぞれPEGAの $n=4$ のプロトン付加体、アンモニウム付加体、ナトリウム付加体である。これらのピークの保持時間が一致していることから保持時間1.6分のピークはPEGAの $n=4$ のものであることが分かる。

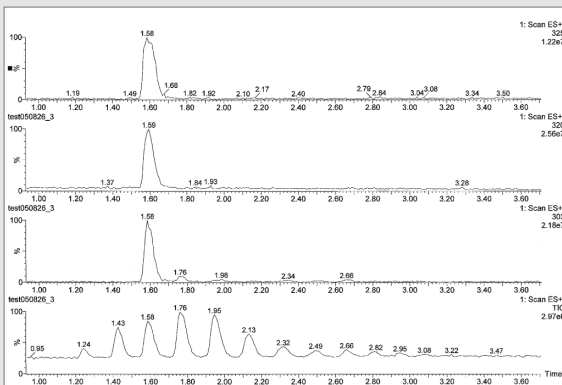


図8 PEGA $n=4$ のマスクロマトグラム

図9に $m/z=325$ 、 369 のマスクロマトグラムを示した。 $m/z=325$ はPEGA $n=4$ のナトリウム付加体(中段)で $m/z=369$ はPEGA $n=5$ のナトリウム付加体(上段)のピークである。これを最下段のTICと比較すると n が増加すると保持時間は0.18分長くなることが分かる。TICの隣り合ったピーク間の保持時間の違いをみるとどこでも0.18分になっている。これよりTICの各ピークはポリエチレングリコールの鎖長の違いによって分離されていることが確認できた。

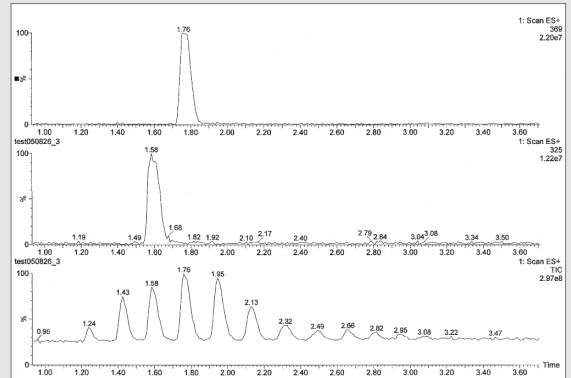
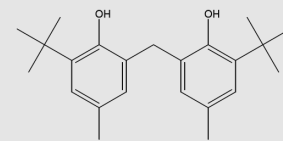


図9 PEGA $n=4$ とPEGA $n=5$ のマスクロマトグラム

これまでアクリレートオリゴマーの組成分析を行う際には構成成分を分取した後、個々の成分をNMRやMALDI-TOFMSを用いて同定していた。これは非常に労力のかかる方法であるがLC-MSを用いることで質量情報から各ピークの同定を速やかに行なうことが可能になった。

6.2 酸化防止剤の分析

化学製品には主成分以外に種々の添加剤が使用されており、それが性能を発揮する上で重要な役割を果たすことがある。そのため添加剤も重要な分析対象の一つである。今回は試料としてアクリレートオリゴマー1000ppmの溶液に酸化防止剤である2,2'-メチレンビス(4-メチル-6-*t*-ブチルフェノール) (MBMBP 図10)を用いてLC-MSによる分析を行った。



$m/z=339$ (Negative)
図10 MBMBPの構造

図11にMBMBPのマスクロマトグラムを示した。多量のアクリレートオリゴマーが存在するにも関わらずS/Nのよいピークが得られており、添加剤の分析に対してもLC-MSが有効な分析法であることが分かる。

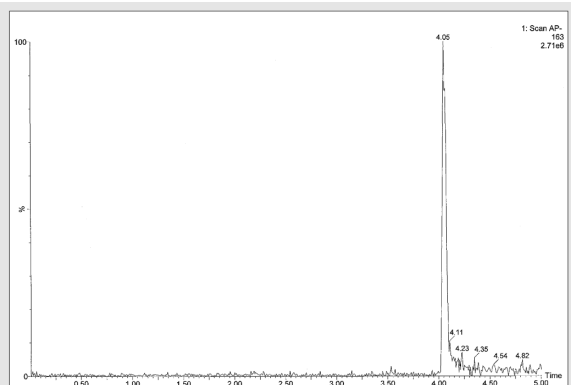


図11 MBMBPのマスクロマトグラム

図12にLC-MSで得られたMBMBPのマススペクトルを示した。化学構造から算出した m/z 値は339であるが、それより強く $m/z=163$ のシグナルが検出された。これは図13に示した機構で生成したプロダクトイオンのシグナルであり、このような情報から構造を推定することも可能である。

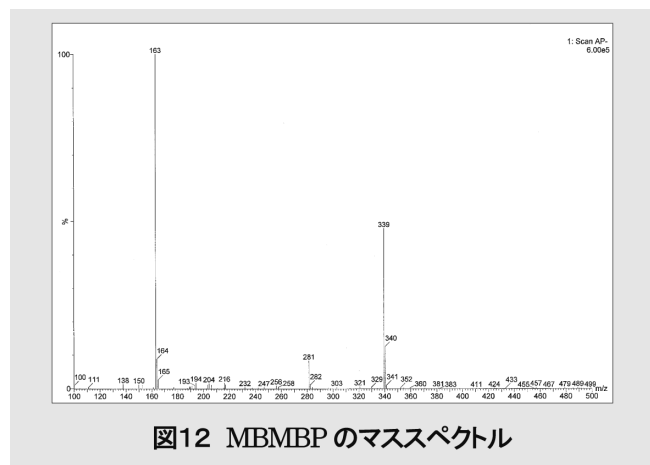


図12 MBMBPのマススペクトル

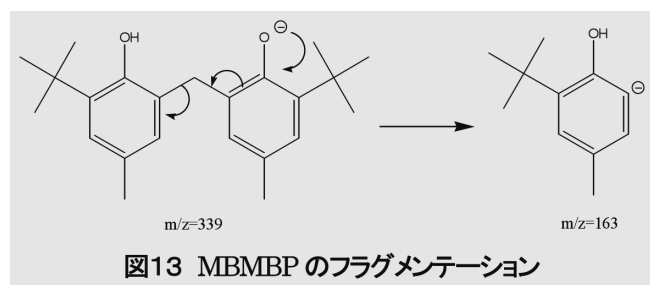


図13 MBMBPのフラグメンテーション

7 まとめ

LC-MSの原理と分析事例を示し、その有効性を述べてきたが乗り越えなければならない課題もある。

まず分析条件の設定の難しさがある。ESI法やAPCI法は測定試料の性質によって最適な分析条件が変わってくる。そのため、特に測定経験がない試料に関しては分析条件の決定に多くの時間が必要になることがある。

次にマススペクトル解析の難しさがある。今回紹介した事例では構造既知であるため問題はないが、未知試料の分析時にこれは大きな問題になる。構造解析では4で述べたプロダクトイオンスキャンを用いるが、生成するプロダクトイオンの種類はLCの溶離液組成やイオン化条件で大きく変動する。そのためGC-MSのようなライブラリーの構築が難しく、化合物の同定にライブラリーデータを使用することができないため、未知試料の構造解析は困難になることが多い。

これらの課題を克服するにはLC-MSに関する深い知識と分析経験が必要である。少しでも早くLC-MSを使いこなすレベルに達するよう努力したいと考えている。

- 1) 原田健一, 岡尚男, "LC/MSの実際 天然物の分離と構造決定", 講談社サイエンティフィク (1996)
- 2) 原田健一, 田口良, 橋本豊編, "生命科学のための最新マススペクトロメリー ゲノム創薬をめざして", 講談社サイエンティフィク (2002)
- 3) 志田保夫, 笠間健嗣, 黒野定, 高山光男, 高橋利枝, "これならわかるマススペクトロメリー", 化学同人 (2001) p.76 ~ 85.