

第13回JBFシンポジウム

LC/MS(/MS)の 分析法開発基礎講座

丹羽 誠（日本新薬株式会社）



今日の話のScope

- LC/MS/MS(三連四重極タイプ)を用いる場合を想定
- 定量法の作成について説明
- 「測定は行うが、メソッド作成を普段は行わない」方にも聞いていただける内容とする
- 分析対象物質は低分子薬物をイメージ



本日の内容

(本日はサイエンスベースの話とさせていただきます。
スペクトルをとったら駄目な業務もあるかもしれません。)

■ LC/MS/MSのメソッド作成

□ アプローチ1

- 類似物質の先行研究を模倣し、微調整、出来たら良しとする。

- LC/MS/MSは一般的になってきて、この形が増えている印象。

□ アプローチ2

- ゼロから作ることに立ち返ってみる(今日の話の中心)。

- 基本を押さえたらそれほど難しいことではない。

- 知っておくことで普段の仕事の余裕が増すのではないか。

■ +αの話として

- 「切り口としてのマススペクトル」を少し意識しよう。

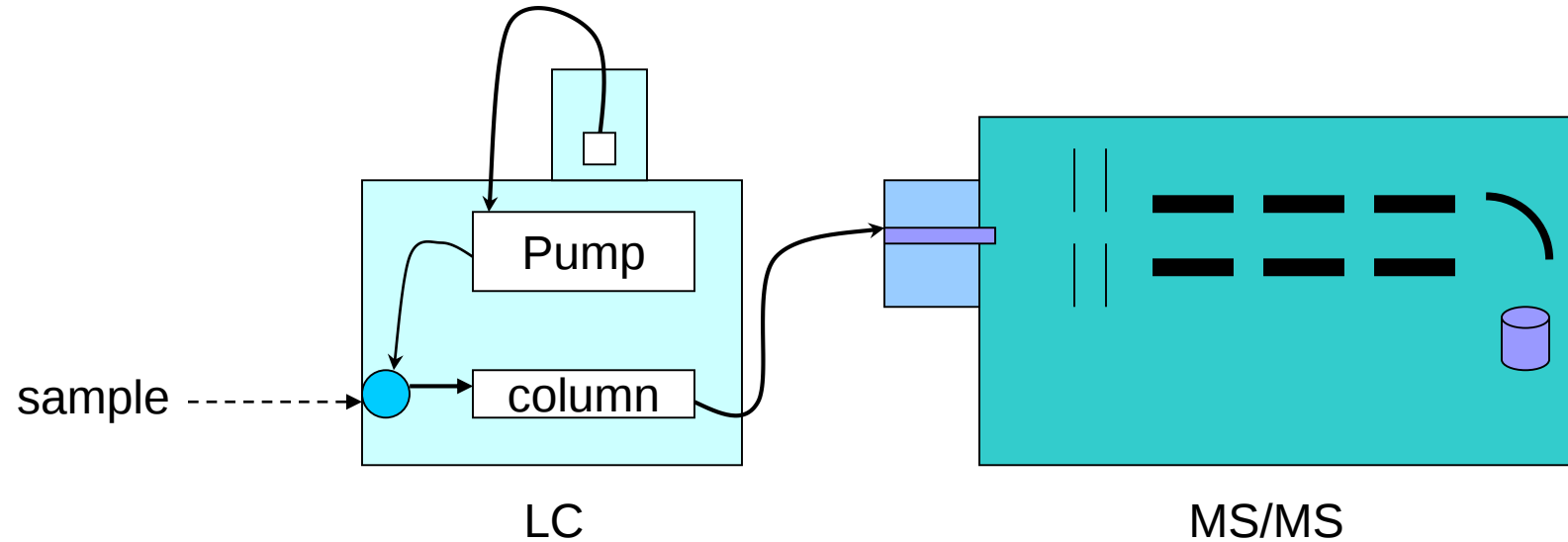
- トラブルの検出に役立つと考える。



はじめに



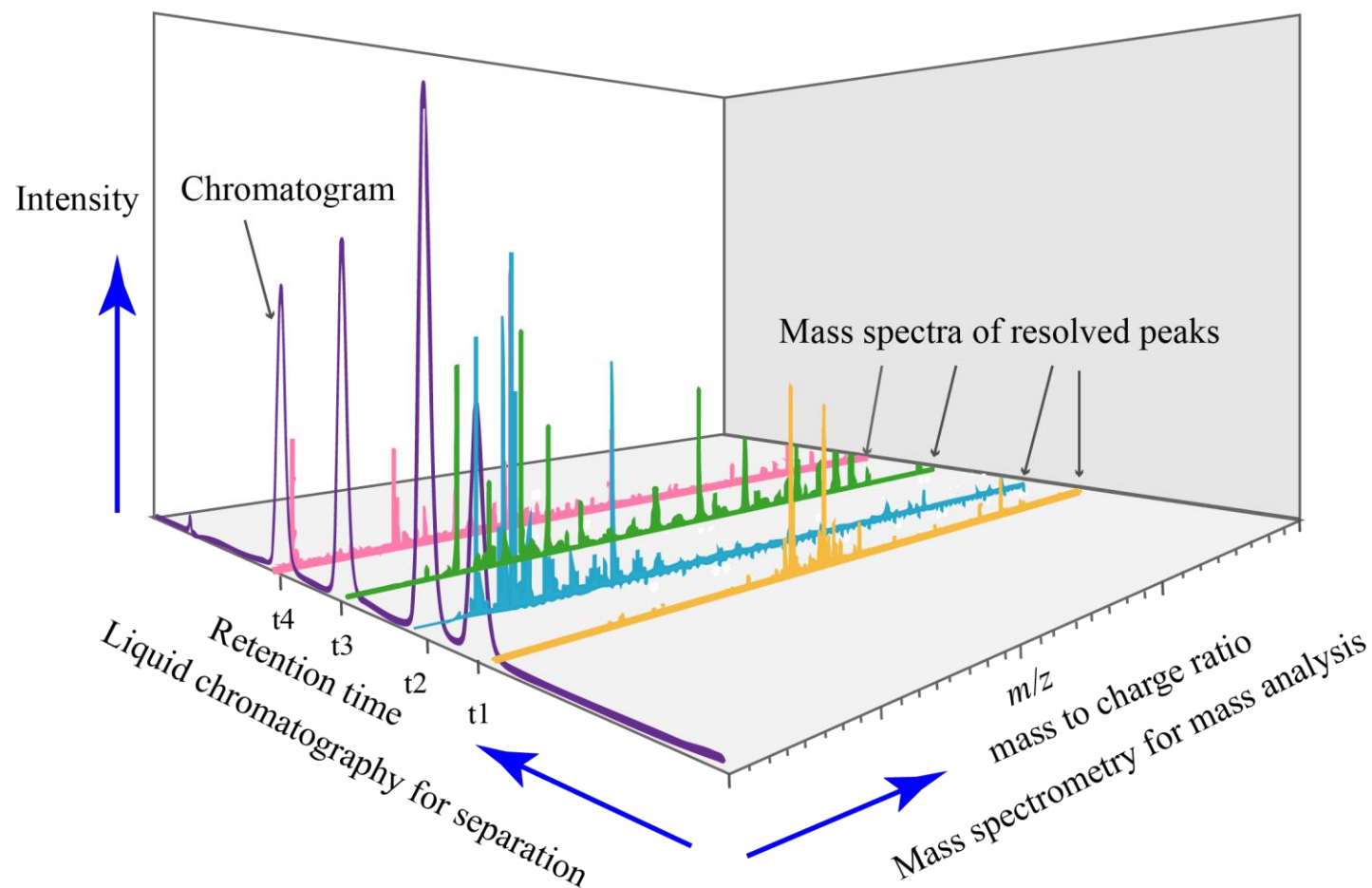
LC/MS/MS装置=LCとMS/MSの結合



- LCで分離＋MS/MSで検出
 - LC → 物性(極性、水溶液中の荷電状態)に基づく分離
 - MS → 化学構造に基づく選択的検出

特徴の異なる方法を組み合わせることで選択性を高めている=信頼されている方法





多次元のデータ構造を本来持っている
(通例、LC/MS/MS定量ではfull scan
はしないが)

メソッド作成



ゼロからのメソッド作成

■ ゼロからといっても・・・

- 例えば、本当はベテラン研究員は経験則を持っている
- いつもこのくらいで出来ている→そこから微調整で実は概ねできている

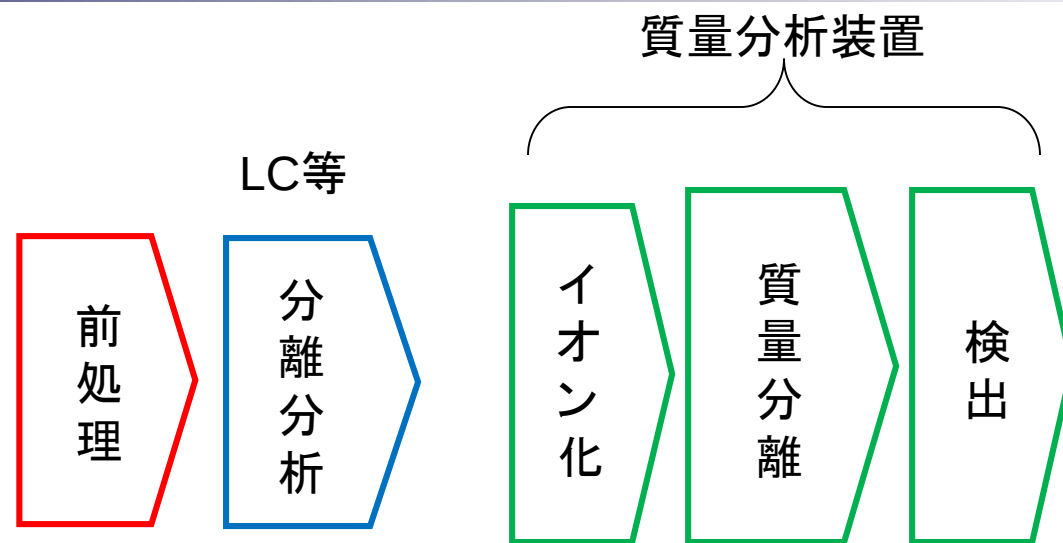
■ 一方で、

- ゼロからでもメソッド作成出来るという感覚を持つことで、「たいていの状況に対応できる」という自信になるのではないだろうか
- メソッド作成の流れについて基本的な確認をしておくことは意義があるのではないか

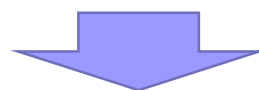
とも思う



メソッド開発



- 大きく分けて**前処理**、**LC(分離)**、**MS(検出)**と3つの要素がある



どれを最初に検討するか

初めはマトリックスを含まない標準品を使用

- **検出**できないと最適化検討のしようがない＝**MS(検出)**を最初に検討し安定させる
- 次に**LC**を検討し選択性を高める
- その状態で最後に**前処理**を検討する

今回ここに絞る



MS/MS最適化



新しい化合物に対しMS/MS側でやること

- 化学構造式・組成式を調べる またはExact Massを知る
 - (念のため: 平均分子量は使用しない)
- MSで $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ を探す
- 確認できたら、最適化をかける
 - 質量分離部 Parameters
 - Source / Gas Parameters

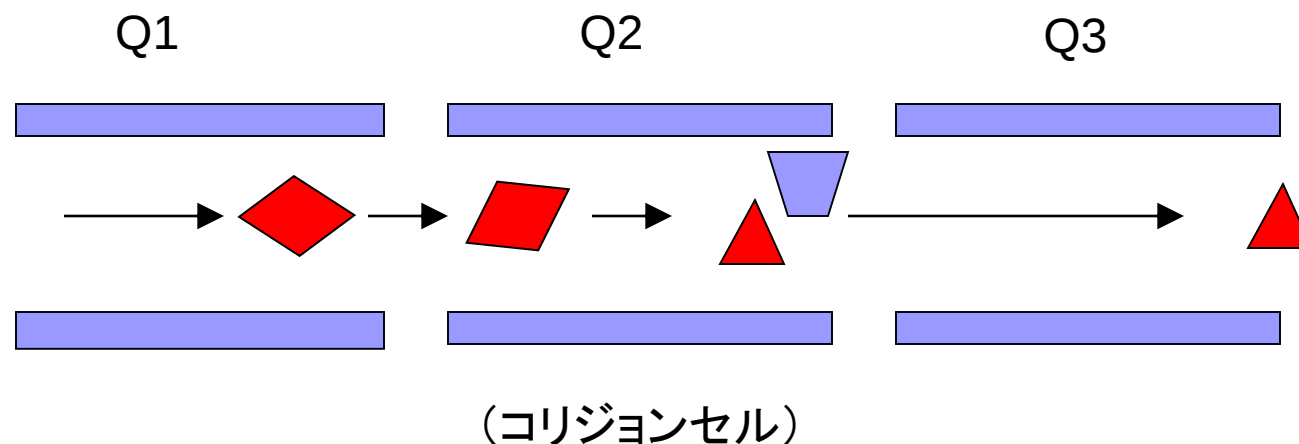
化合物ごとに決める条件、つまり、

- ①Precursorイオン m/z 、Productイオン m/z が特定でき、
- ②それらを取り出す電圧差が最適化でき、
- ③イオン源のガス流量(LCと兼ね合いがあるが)が最適化できれば完成

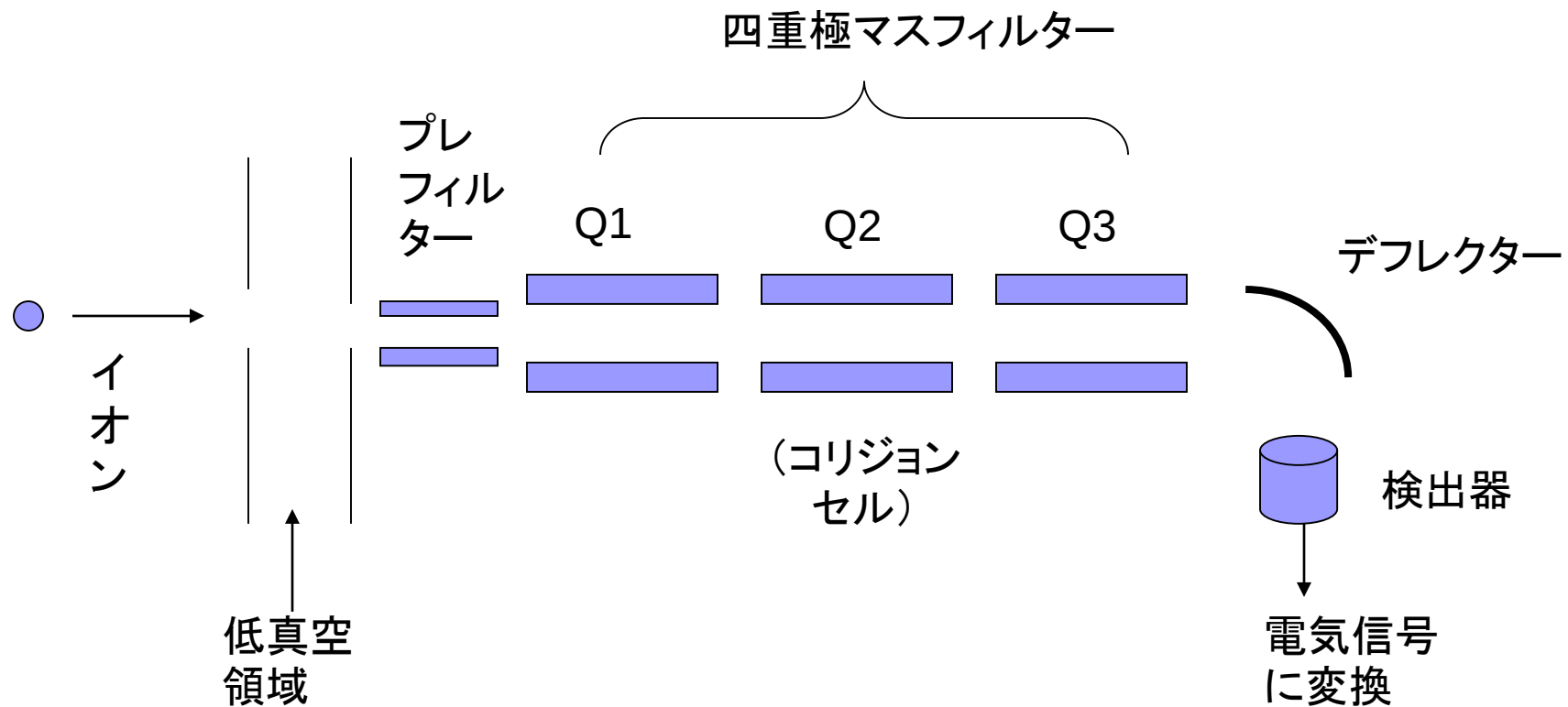


MS/MSとは

- タンデム質量分析法＝MSを2回行う方法
- Q1で1つのイオン(目的イオン)を分離する
- Q2でイオンをガス分子(N_2 、Ar、Xeなど)に衝突させて開裂させる
- 開裂して生成したイオンを更にQ3で分離する
- 2回確認しているから、より確からしい



MS/MS質量分離部の構造

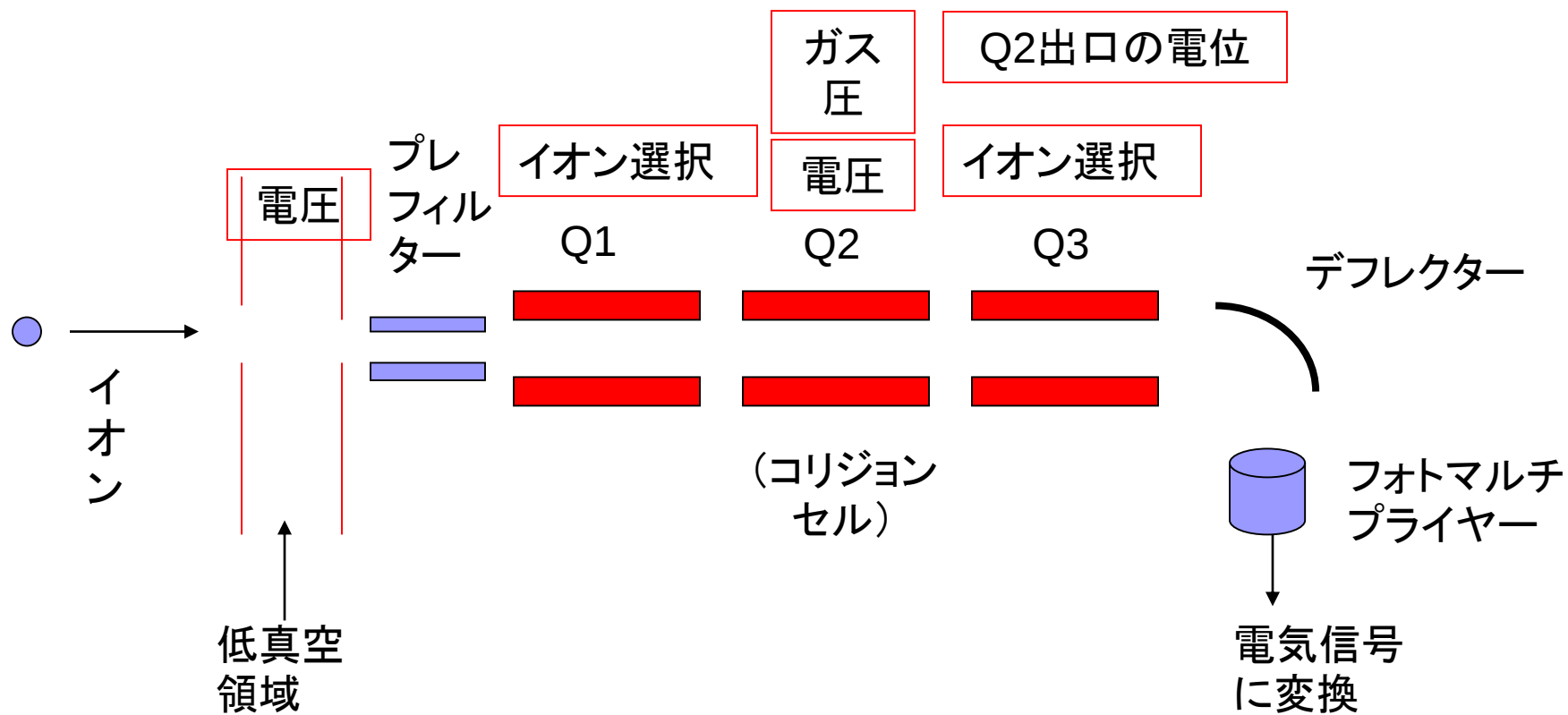


MS条件最適化と関係する箇所を重点記載

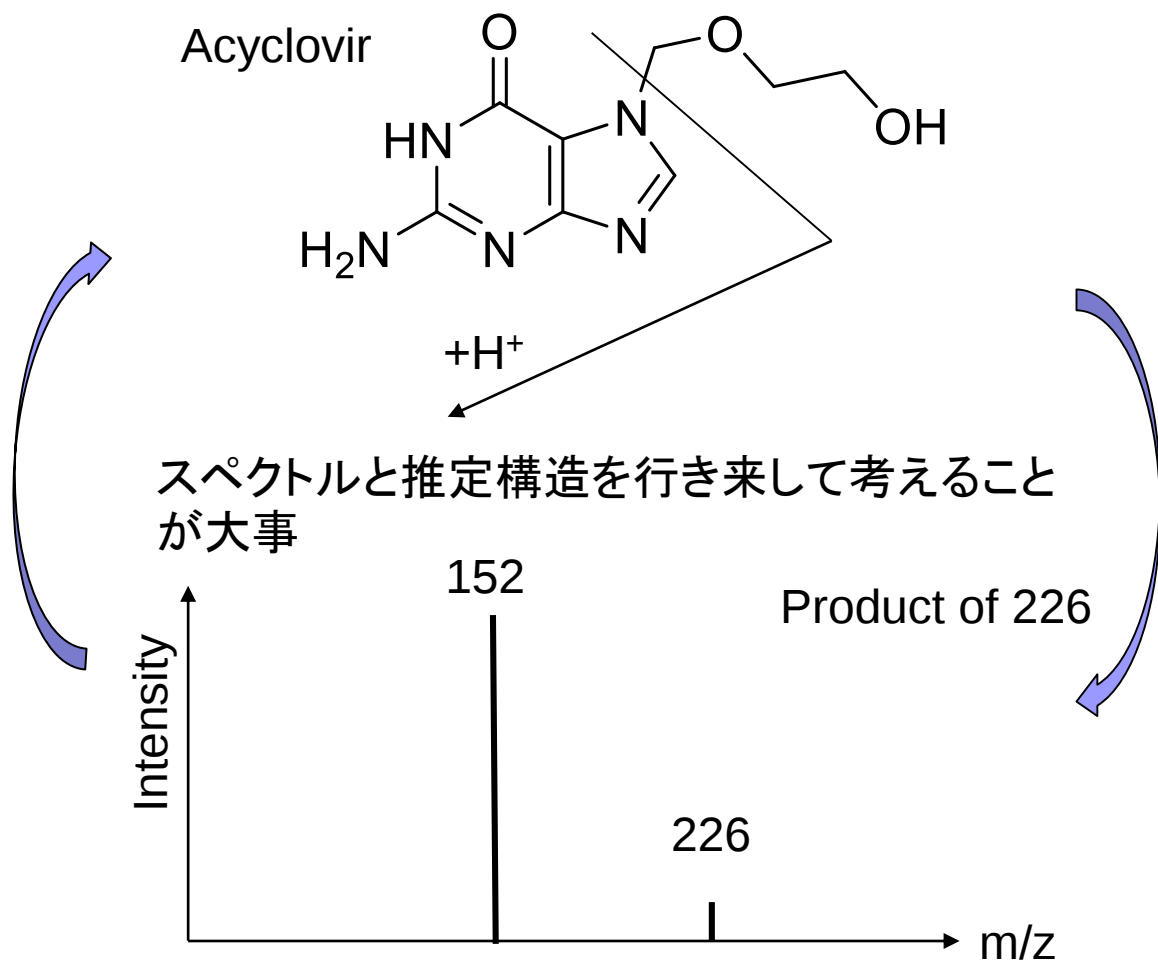


化合物ごとに設定するところ

概ね、ソフトウェアが自動的にやってくれる



開裂 (Collision-induced Dissociation, CID) の例



- 何が生成しそうかを考えながら、product ion m/z と突き合わせることでかなり解釈が出来る(特に低分子でシンプルなスペクトルの場合)。
 - 基本的に、原子の手の数(炭素4、窒素3)は維持される=Product Ion整数部の偶数・奇数で窒素数の見当がつく(窒素ルール)
 - 二重結合は残りやすい
 - NやOの隣で切れやすい(電子を安定に保持しやすいため)
- 帰属できていることが、自信を持って定量できるかのポイントにはなる。



MS/MS最適化の注意点

- ソフトウェアがやってくれるが、出来れば装置から離れず観察すること
 - 装置設定に問題があって、ピークが出なくなるときもある
 - →最初からやり直し、時間の無駄になる
- 装置から離れた場合は、データを読み出して確認すること
- 分析対象物質でないもの(溶媒や不純物)を最適化していないか注意する
 - 溶媒クラスター: 溶媒分子が集合したものがMSに現れ、ターゲットの m/z に観察されることがある。これを最適化してしまうと、低真空領域の電圧(declustering potential)が異常に小さい値に最適化される
 - 不純物で偶々 m/z が同じものを最適化してしまった場合、product ionの帰属が出来ないことで気づくことが可能
 - ときどき慣れた人に見てもらうのが理想的ではある



LC最適化



HPLCについて

■ 最も高頻度には逆相を使用する

□ 経験則によりラボ・研究者ごとに第一選択を持っている

□ 例)

■ 0.1vol%ギ酸／アセトニトリル + ODSカラム

■ 0.1vol%ギ酸含有1~10mMギ酸アンモニウム／アセトニトリル + ODSカラム

■ pH成り行き5~10mMギ酸アンモニウム／メタノール + ODSカラム

■ pH10炭酸水素アンモニウム-アンモニア + 耐アルカリODSカラム

□ 中性スタートでマイナートラブル(分析対象物質が何かと相互作用するなど)に逢うのを避けるには酸性スタートが無難

□ 推奨を次ページにまとめてみた

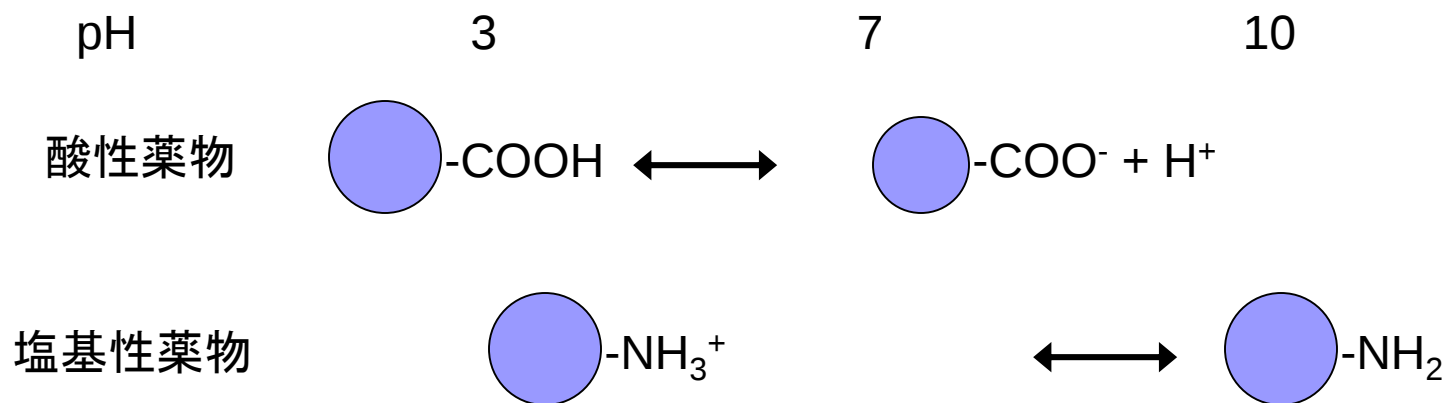


分類	溶液・溶媒	長所	短所	総合
水溶液側	0.1%ギ酸のみ	調整が楽 MSでPosイオンが確実に得られる 酸性なので会合・吸着を回避できている気がする	Pos多価イオンが出来過ぎるときがある 塩基性化合物のLC保持が小さくなりすぎる	出発点としては良い
	0.1vol%ギ酸含有1~10mMギ酸アンモニウム	上記メリットを維持しながら、アンモニウムイオン共存効果を期待(金属付加イオンの抑制、カオトロピックイオンとしてのLCテーリング抑制)	調整が面倒 塩により濃度依存的にやや感度下がる	最適化の一つ
	pH成り行き 5~10mMギ酸アンモニウム	弱酸のNegイオンも得やすい アンモニウムイオン共存により上記メリット期待	たまに中性ゆえのトラブル(分析対象のイオン会合)に遭う	汎用条件かつ最適化の一つ
	pH10炭酸水素アンモニウム-アンモニア	弱酸のNegイオン得やすい 塩基性化合物の保持が大きくなるので有機溶媒濃度を高く設定でき、結果感度を高くできることが多い	アルカリ対策(カラム、溶媒瓶)が必要	最適化の一つ
有機溶媒側	アセトニトリル	LC段数を高くできる(メタノールよりピークが細くなる傾向)	ランニングコスト	
	メタノール	アセトニトリルでテーリングする場合に回避策として有効	段数はアセトニトリルより出にくい	



pH設定をする目的=分析対象の挙動を決める

- HPLC-UVでは分離が困難なとき、意図的に妨害を回避できるpHにするが、LC/MS(/MS)では挙動を安定させる意味が大きい。
- 解離型(電荷有り)は比較的親水性、非解離型は疎水性となる
 - 逆相では、非解離型の保持が大きい
⇒pHによって保持が変わる場合がある。

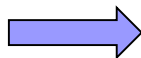


注意: HCOONH_4
は成り行き中性だが
緩衝能無し

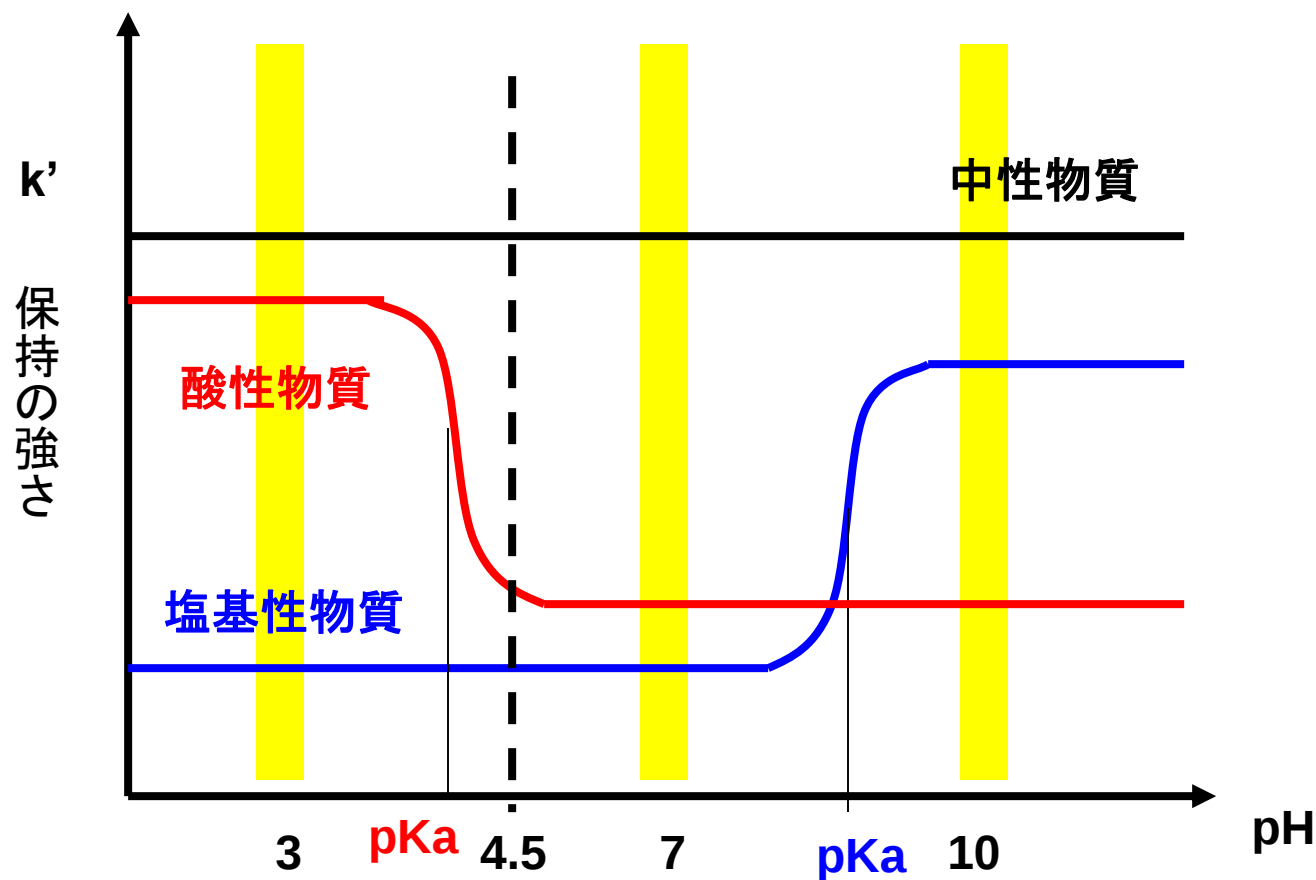


pH設定と保持の関係図

pH設定



- ①分析対象の挙動を決める。
- ②カラムの残存シラノールの挙動を決める。
- 経験則からは、pH4.5程度を境に、酸性では非解離型の様子



概ね、安定させる目的からは、pH3,7,10を考えればよい

(pKaの違いを積極的に利用して分離する場合には、pH4~5を使用する場合もある)



移動相とMSイオン化の相性

■ ESIの場合

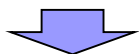
- 有機溶媒濃度は40～80%がイオン化に有利
- 分析対象物質が移動相で解離しているほうがイオン化に有利
- LC保持の増大に拘泥せず、MS感度を優先する必要がある
- 保持が必要な場合、高保持型ODSに変えることも一方法
 - 固定相の表面積が大きいものに変えれば、分離は変わらないが、保持は大きくなる。
- 感度が必要な場合、酸性と塩基性移動相を実験的に試すことも良いかもしれない



メソッド開発小括

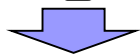


化合物情報取得
(少なくとも精密質量、
できれば化学構造)

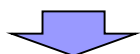


MS/MS
最適化

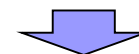
Q1 $[M+H]^+$ 等確認
低真空領域電圧最適化
Q3 Product Ion 確認
CAD電圧最適化



SRM条件決定



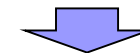
イオン源温度・
霧化/乾燥ガス流量決定



LC
最適化

第一選択条件

0.1% HCOOH / Acetonitrile +
ODS



他に検討すべき条件

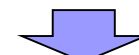
- ・Methanol or Acetonitrile
- ・pH10、pH7
- ・+ 1~10mM HCOONH₄
- ・他アイデアあれば



前処理
最適化

第一選択条件

他に検討すべき条件



最適化完了



切り口としてのマスペクトル



LC/MS (/MS) の特徴

便利な点

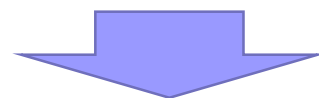
- 思った m/z にレスポンスがあると自信を持ってその後のメソッド最適化を進めることができる

面倒な点

- 思った m/z にレスポンスが無いと一気にわからなくなる
- MSで自動最適化をしてもLC/MSに進むとピークが出ないときがある

スペクトルに付加イオン・多価イオンが見えていないか

付加イオンや多価イオンが圧倒的など



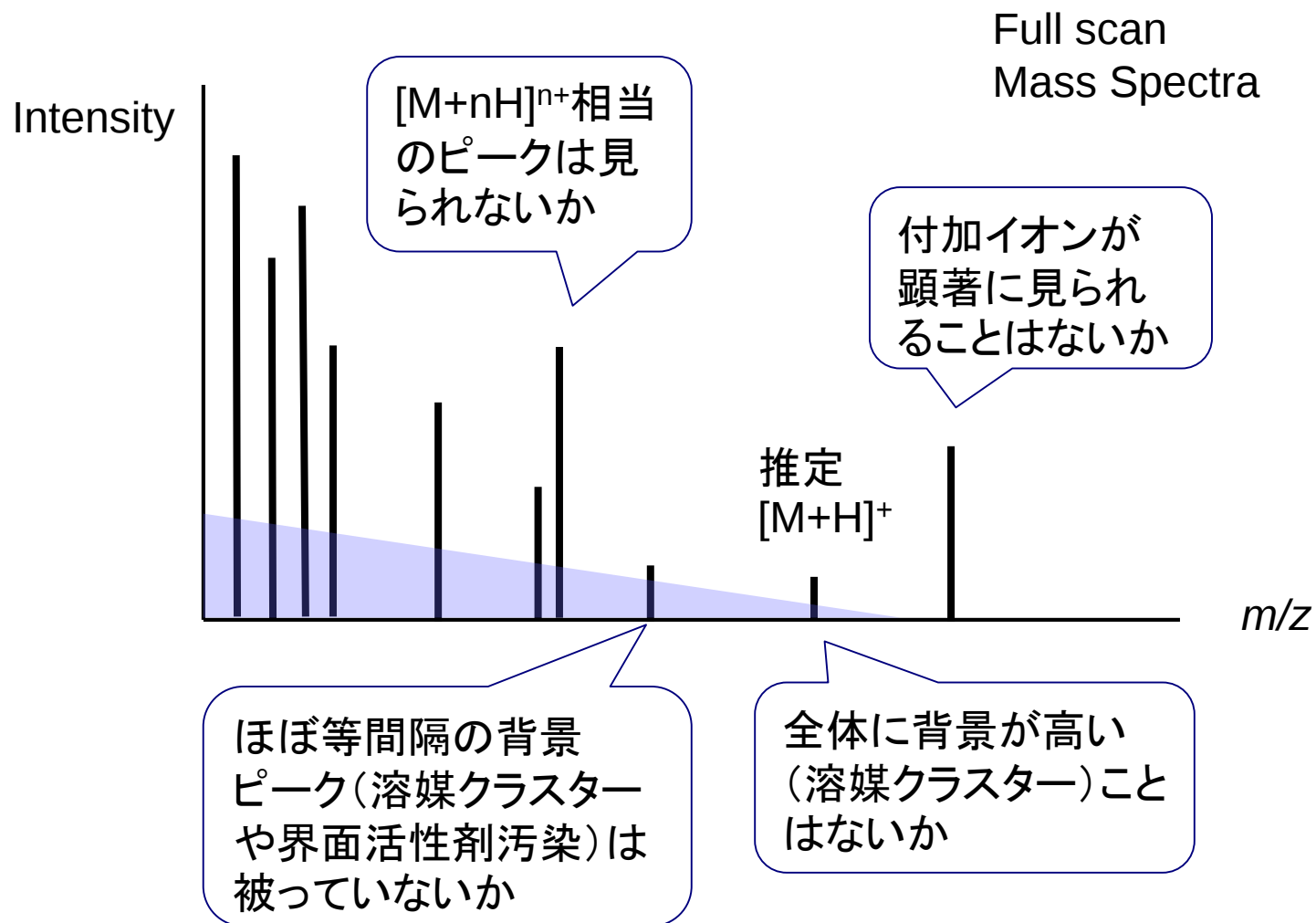
怪しいときは、スペクトルを確認するとよい。

溶媒クラスターや不純物が高く、そちらを最適化していた

最適化された電圧に違和感がないか、Product ionがスカルス力でないか

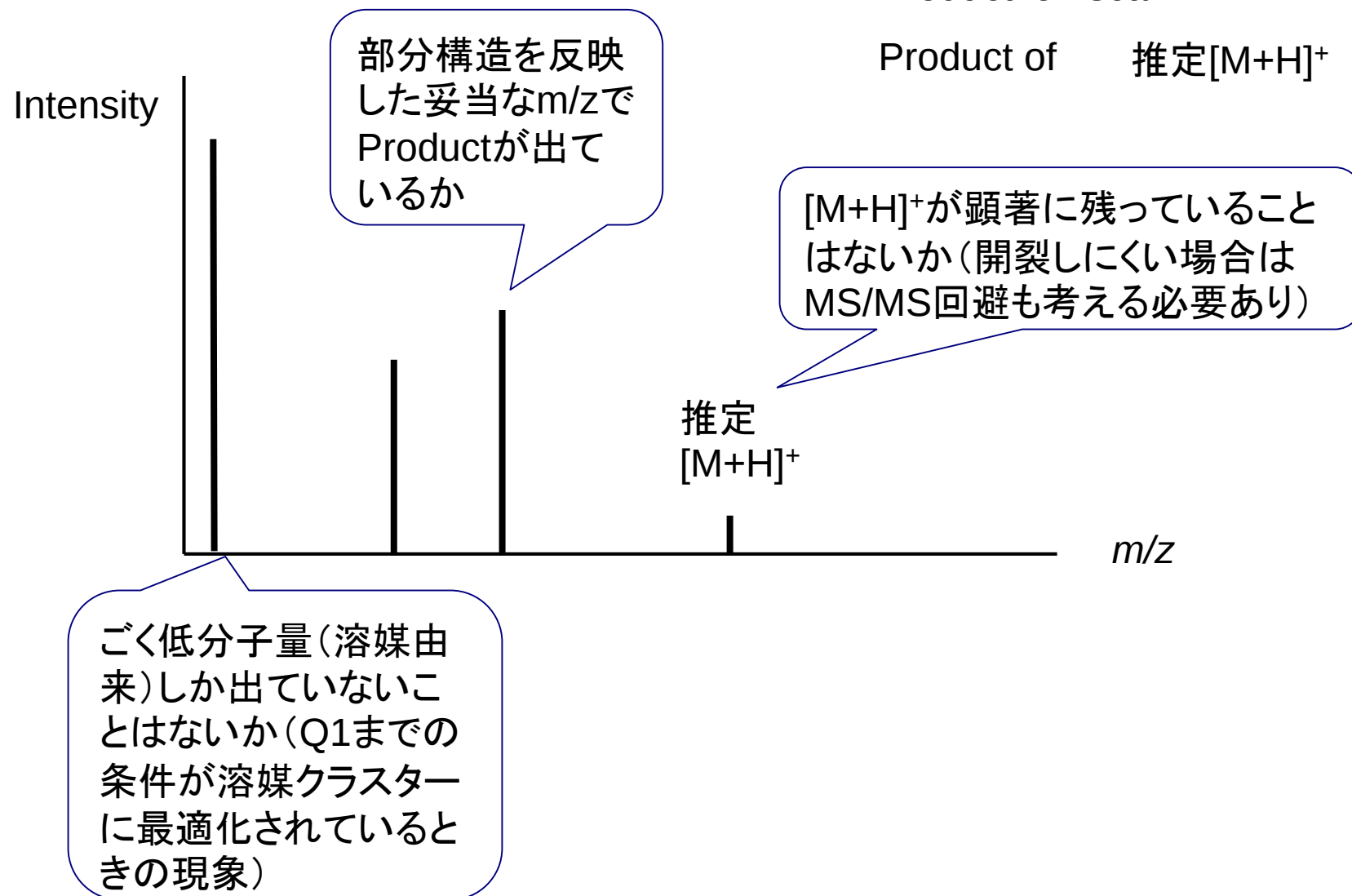
Full scanマスマスペクトル取得と見直し

①付加イオンや多価イオンが圧倒的で、 $[M+H]^+$ や $[M-H]^-$ を捉えられないか、感度が低い → マスマスペクトルを見直すとよい



Product ion scan (Q3)取得と見直し

②予想 m/z に溶媒クラスターイオンが出ており、そちらを最適化してしまった→product ion scanを見直すとよい



まとめ

- メソッド「開発（模倣でなく）」は順序を理解すれば難しくない
- スペクトルを意識するとトラブル対策に役立つ

本内容が少しでもお役に立てば幸いです。
ご清聴ありがとうございました。

