

E-learning Program

# HPLCおよびLC/MSの 概要について

早稲田大学 環境保全センター



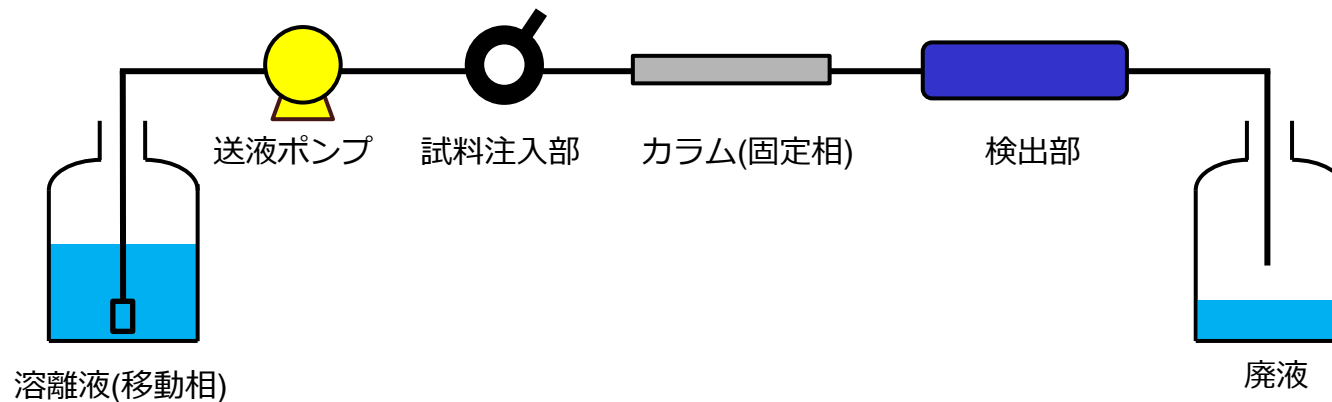
WASEDA University



# HPLCの基礎

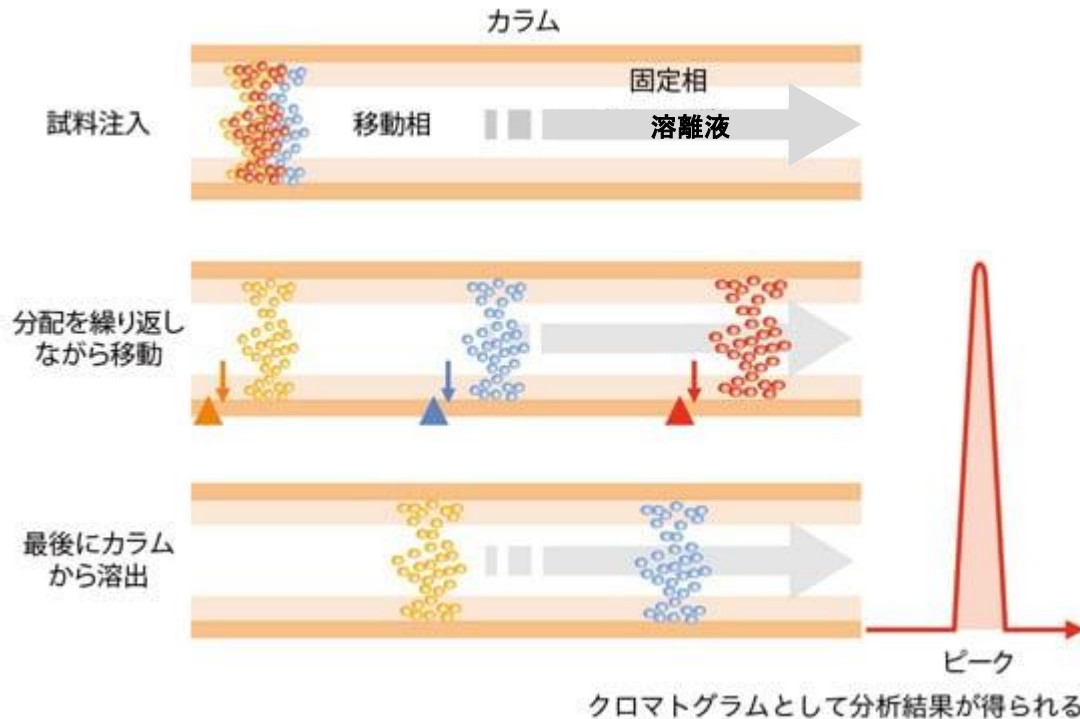
クロマトグラフィーとは、物質が固定相とこれに接して流れる移動相との親和力（相互作用）の違いから混合中の各物質を分離する方法で、液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)の場合、分析対象は液体中に溶解させ、液体の移動相を用いる。移動相は送液ポンプにより、カラム（固定相）から検出器へ一定速度で流れていき、複数の成分が混合した試料をカラムに注入し、カラム内で分離する。

カラム出口に設置した検出器でモニターし、成分を定性・定量分析する。



# カラムの分離機構

カラムの中を進む速度は成分毎に異なるため、注入時は混合状態だとしても、カラムから出て検出器で成分が検出される時間（リテンションタイム; RT）が異なる。RTは、化合物の分子量、極性等で決まることが多い。また、カラムの種類に応じて大きく変わる。



# 主なHPLCの分離モード

分離モード	特徴
<b>順相クロマトグラフィー</b> (Normal Phase Chromatography; NPC)	固定相の極性が移動相の極性よりも高い条件で分離が行われる。一般的に極性が高いもの程RTが長くなり、移動相の極性を上げると溶出が早くなる。カラムの充填剤には、主としてシリカ系充填剤が使用される。 また、順相クロマトグラフィーの一種として、親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic interaction chromatography; HILIC) がある。逆相クロマトグラフィーでは分離が難しい極性の高い糖やペプチドなどで用いられる。
<b>逆相クロマトグラフィー</b> (Reverse Phase Chromatography; RPC)	HPLCで最もよく用いられるモードで、固定相の極性より移動相の極性が高い条件で分離が行われる。一般的に極性が低いもの程RTが長くなり、移動相の極性を下げると溶出が早くなる。カラムの充填剤としては、シリカゲルを担体としてアルキル基などを化学結合させたものと樹脂を基本とするもの等が使用される。

その他、水に溶けてイオンになる物質や無機イオンをイオン交換樹脂で分離するイオンクロマトグラフィー、分子量が大きい高分子成分を「ふるい」のような充填剤を用いて分子の大きさにより分離を行うサイズ排除クロマトグラフィー等がある



# 主な検出器の種類

検出器	特徴
UV-VIS検出器	最も一般的に用いられている。光源にD2とWランプ等を使用して紫外から可視領域の光を照射することで吸収する光（吸収波長）を検出する
<b>ダイオードアレイ検出器（DAD）</b>	UV-VIS同様紫外から可視光のスペクトルを得ることができる。UV-VIS検出器ではサンプル側の受光部が1つしかないのに対し、多数のフォトダイオードアレイ（半導体素子）を並べることでの広い波長範囲の情報を一度に取り込むことができる。
蛍光（FL）検出器	光を照射して励起させ、その後の放出する光（蛍光）を検出する
示差屈折率（RI）検出器	溶離液と屈折率の差のある成分を検出する。紫外吸収のない成分も検出できるが、一般的に感度は低い。
電導度検出器	導電率をモニタすることにより、主に無機イオンを検出する。イオンクロマトグラフィーでよく用いられる。
<b>MS(質量分析)</b>	カラムで分離された成分をイオン化し、質量分析器で検出する（LC-MS, LC-MS/MS）



# 環境保全センターの分析装置

## 【HPLC】

メーカー名：Agilent Technologies

機器名：1260 Infinity II

検出器：DAD 波長範囲190～600nm

移動相：水／有機溶媒(アセトニトリル、メタノール等)

場合によっては酸や緩衝液等を添加

カラム：ODSカラム

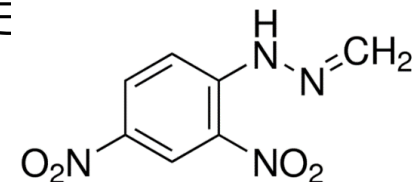
※オクタデシルシリル(Octadecylsilyl) 基で表面が修飾(疎水化)された化学結合型多孔性球状シリカゲルを固定相として充填

分析対象：UV-VISによって検出できる共役化合物で、逆相モードで分離できるもの

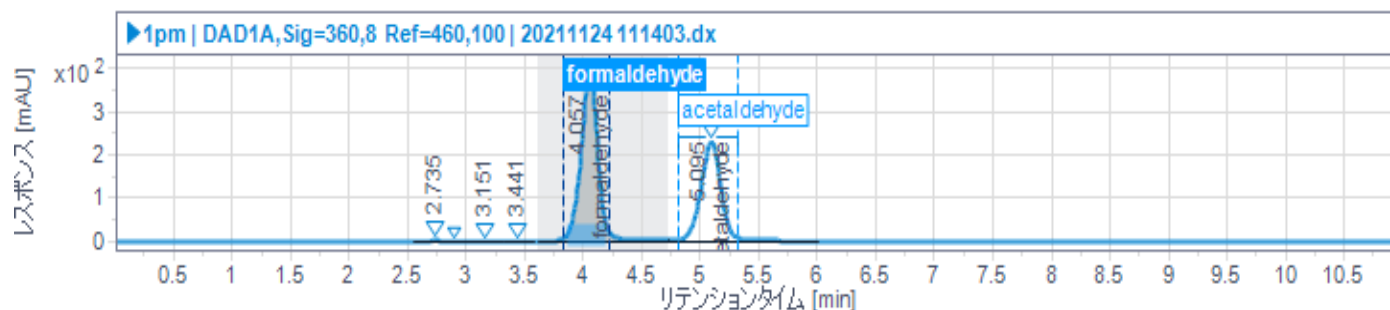


# HPLCによる分析事例

例)室内のホルムアルデヒドの定量分析  
DNPH (ジニトロフェニルヒドラジン) で誘導体化後測定



ホルムアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン

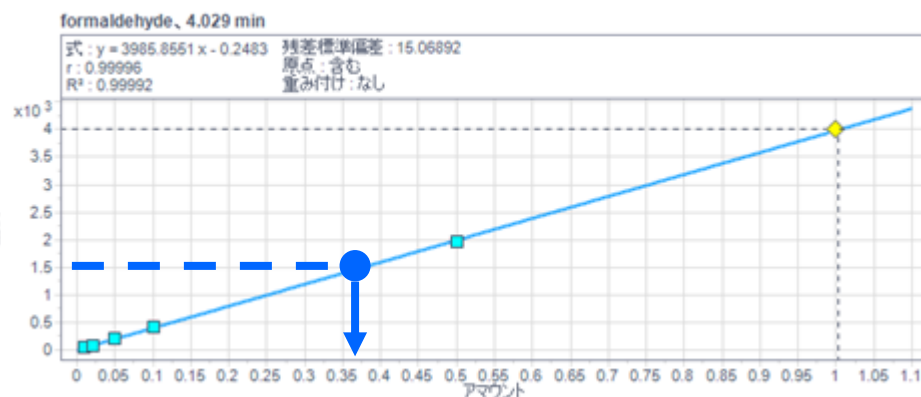


主な測定条件

項目	条件
カラム	L-column ODS 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm
移動相	60vol%アセトニトリル 溶液(アイソクラティック)
流速	1mL/min
カラム温度	40 $^{\circ}$ C

RT $\rightarrow$ 成分の種類(定性)  
ピークの面積 $\rightarrow$ 各成分の濃度(定量)

検量線



標準試料を用いて検量線を作成し、  
目的の化合物の濃度を算出



# LC/MSについて

**GC/MS**は・・・

比較的分子量の気体または揮発性有機化合物、  
熱安定性の高いもの

**LC/MS**は・・・

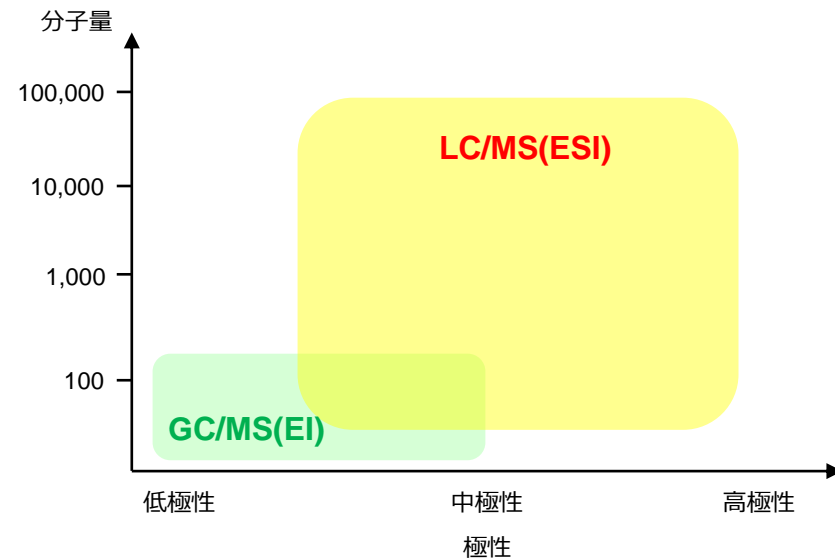
移動相に溶解するもので、GC/MSで不得意な難揮発性、  
熱に不安定なもの

## 【研究分野】

糖類、アミノ酸、有機酸、医薬品  
生体資料の代謝物構造解析 など

## 【環境分析】

上水試験方法  
大気中の有害物質など  
(パーフルオロカーボン等)



※LC/MSは分析法、LC-MSは装置を表す





# 環境保全センターの分析装置

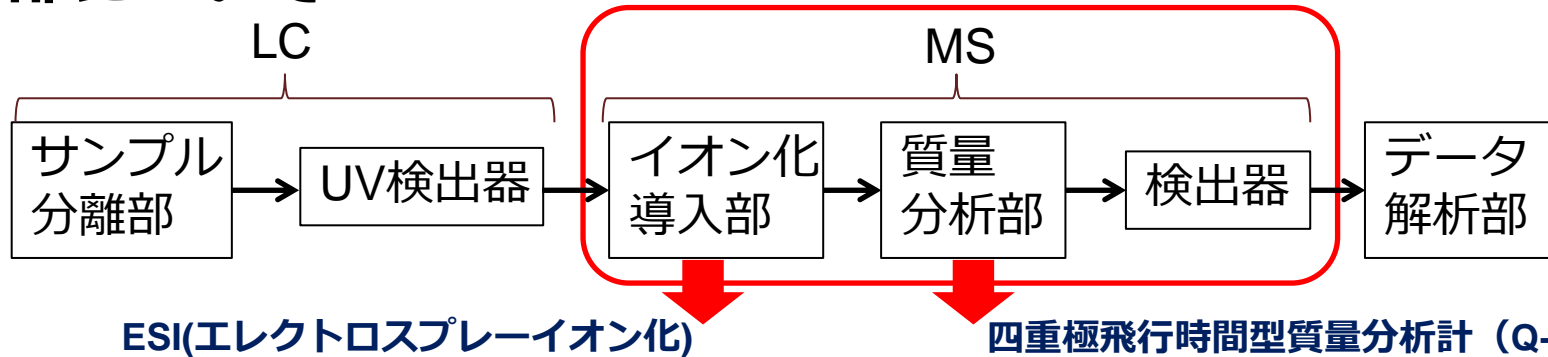
## 【LC-MS】

- ・メーカー名：日本Waters
- ・機器名  
LC部：Acquity UPLC<sup>®</sup> H-Class  
MS部：Xevo G2-XS QTOF
- ・イオン化法：ESI
- ・移動相  
水／有機溶媒(アセトニトリル、メタノール等)  
場合によっては酸・塩基、緩衝液等を添加
- ・カラム  
逆相系：ODSカラム、順相系：HILIC  
カラム(アミノカラム、アミドカラム)



# LC-MSの構成

## MS部について



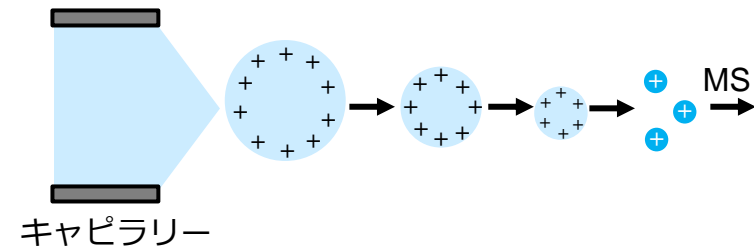
ESI(エレクトロスプレーイオン化)

四重極飛行時間型質量分析計 (Q-TOF)

## ESI(エレクトロスプレーイオン化)とは

### 【原理】

- ・ LC部により分離された試料溶液は先端に高電圧を印可したキャピラリーへと達し、窒素ガスにより液滴中の溶媒が蒸発させられ電荷密度が増加する
- ・ 一定の電荷密度に達すると同種電荷の反発により液滴がさらに小さくなり、気相イオンを形成



### 【特徴】

- ・ ソフトなイオン化のため、基本的にフラグメントイオン(分子イオンが開裂した断片のイオン)は発生しない
- ・ 化合物によっては多価イオンを形成
- ・ 熱に不安定なものや難揮発性の試料にも有効



# ESIによって生成されるイオン種

極性	移動相溶媒	生成しやすい付加イオン
+	メタノール	$[M+H]^+$ , $[M+Na]^+$ , $[M+K]^+$
+	アセトニトリル	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ , $[M+Na]^+$
+	含酢酸アンモニウム	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$
-	酸を含まない系	$[M-H]^-$ , $[M+Cl]^-$
-	含酢酸、酢酸アンモニウムなど	$[M-H]^-$ , $[M+CH_3COO]^-$
-	含ギ酸	$[M-H]^-$ , $[M+HCOO]^-$
-	含酢酸アンモニウム	$[M-H]^-$ , $[M+CH_3COO]^-$

「LC/MS,LC/MS/MSの基礎と応用」(オーム社)より

- ・ポジティブ(正イオン検出)モードでは $[M+H]^+$ 、ネガティブ(負イオン検出)モードでは $[M-H]^-$ が主に検出される
- ・移動相溶媒によっては、含有されるイオン種が付加した形で検出のされる場合がある



# LC-MSの構成

## MS部について

### 四重極飛行時間型質量分析計 (Q-TOF)とは

- ・ 前段には、イオンの分離・開裂が可能な四重極型を、後段には精密質量分析が可能な飛行時間型質量分析計(TOF) を搭載

#### 各質量分析について

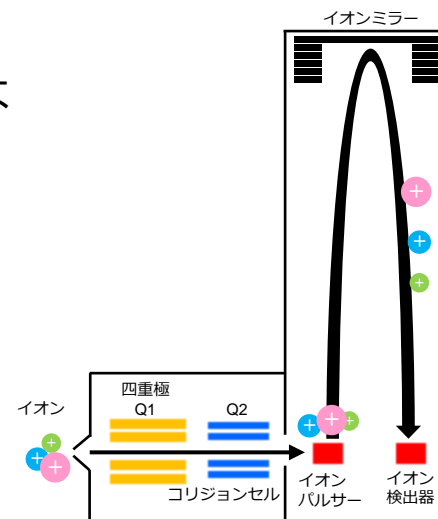
四重極形質量分析計の原理と応用 | JAIMA 一般社団法人 日本分析機器工業会

<https://www.jaima.or.jp/jp/analytical/basic/mass/qms/>

飛行時間形質量分析計の原理と応用 | JAIMA 一般社団法人 日本分析機器工業会

<https://www.jaima.or.jp/jp/analytical/basic/mass/tofms/>

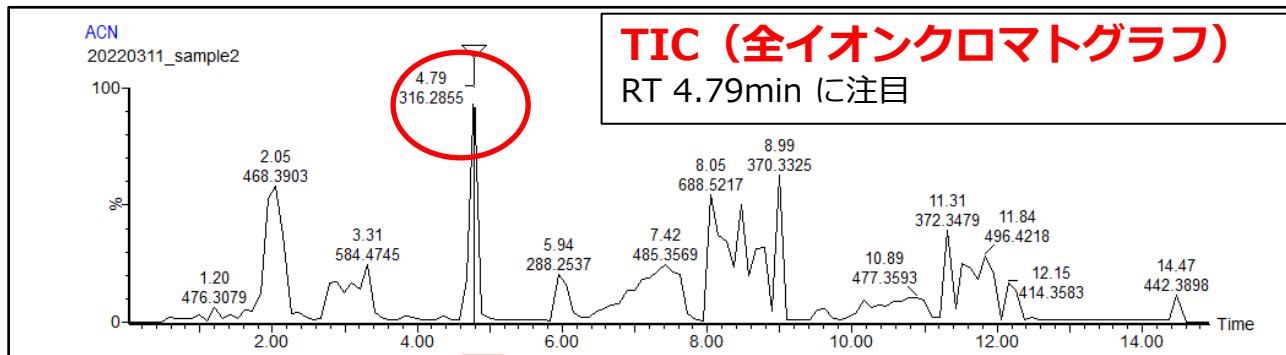
- ・ MSモードでは、Q1 (四重極) ,Q2 (コリジョンセル) は通過させて、TOFでプレカーサーイオン(衝突により分子が開裂される前の状態のイオン)の精密質量を測定 (組成式の決定)
- ・ MS/MSモードでは、Q1 (四重極) で、特定の質量数のみを通過させ、Q2 (コリジョンセル) で開裂させ、TOFでフラグメントイオンの精密質量を測定 (構造式の決定)



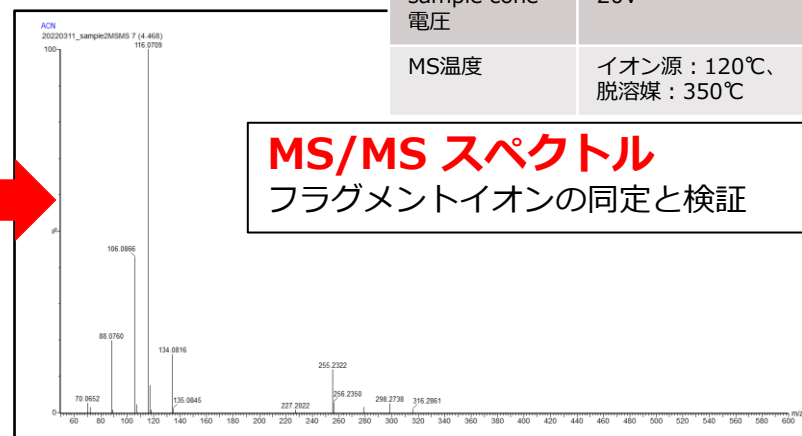
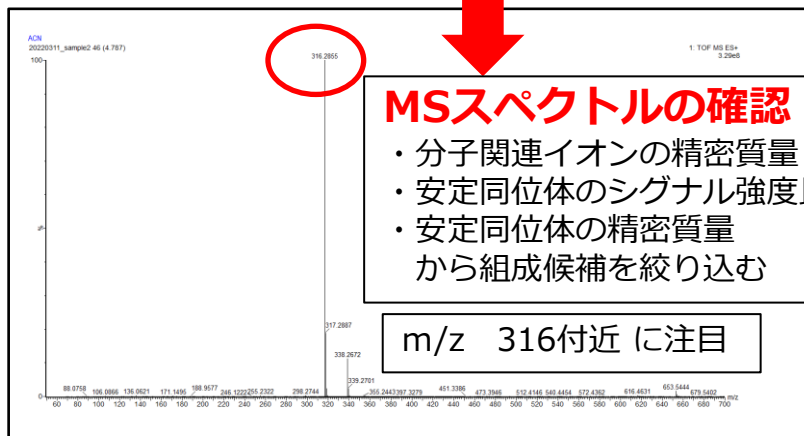
# LC/MSによる分析事例

## 【定性分析】

例) 洗剤に含まれる成分の定性分析

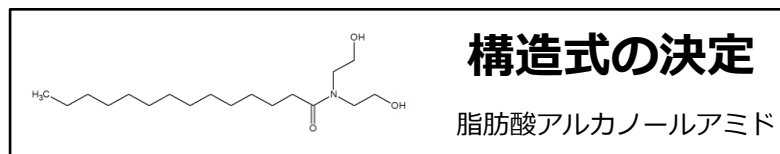


主な測定条件	
項目	条件
カラム	ACUQUITY UPLC HSS T3 1.8μm 2.1×100mm
移動相	A:アセトニトリル溶液, B:2mM酢酸アンモニウム 水 溶液, A:B=70:30~95:5
流速	0.2mL/min
カラム温度	40℃
イオン化 モード	ESI ポジティブ
capillary電圧	0.5kV
sample cone 電圧	20V
MS温度	イオン源 : 120℃、 脱溶媒 : 350℃



### 化合物のプロファイリング

- ①分子量の決定
- ②構造式の決定
- ③分子の同定



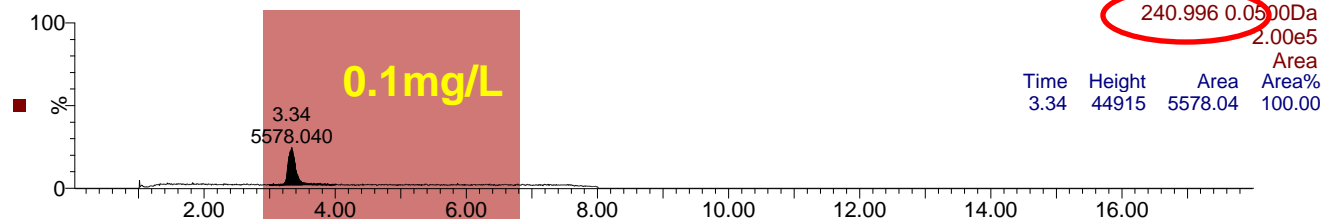
# LC/MSによる分析事例

## 【定量分析】

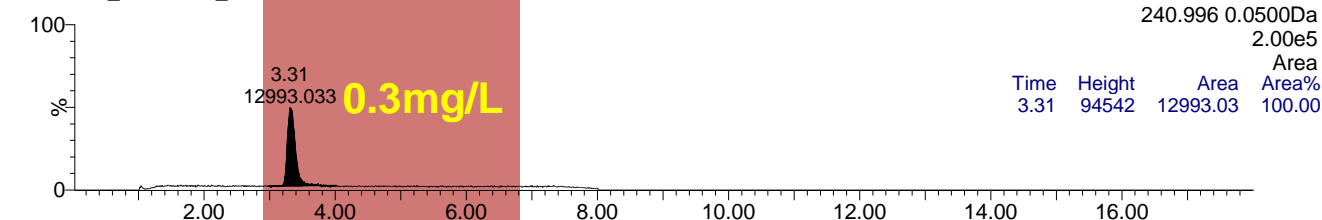
例) 排水中のチウラムの定量分析

0.5kV0.1ppm

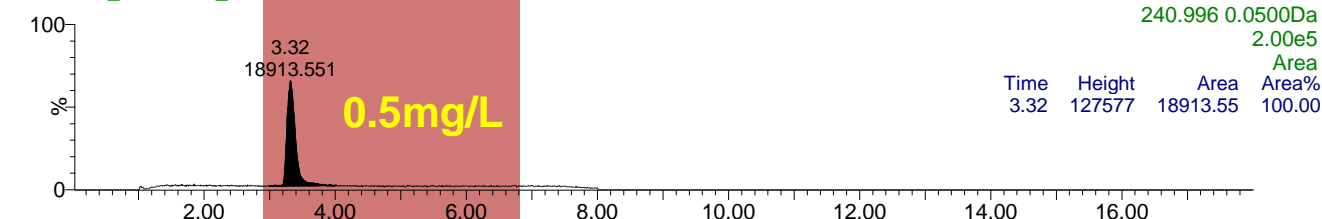
20170907\_Thiuramst\_01



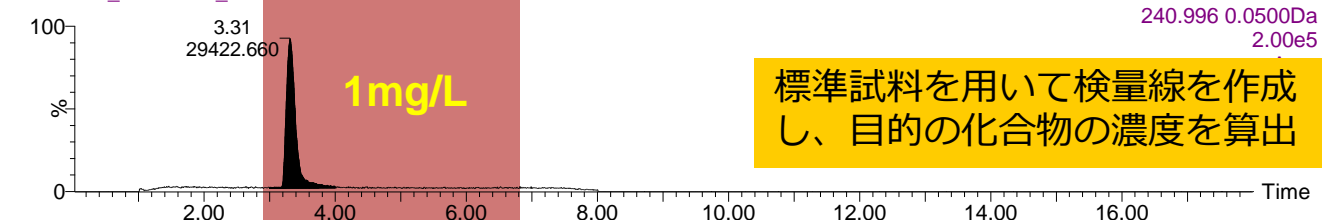
20170907\_Thiuramst\_03



20170907\_Thiuramst\_05

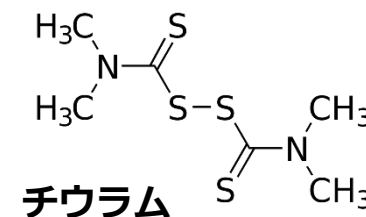


20170907\_Thiuramst\_10



標準試料を用いて検量線を作成し、目的の化合物の濃度を算出

目的のイオンのみを抽出したマスクロマトグラフを取得



主な測定条件

項目	条件
カラム	ACUQUITY UPLC BEH C18 1.7 $\mu$ m 2.1 $\times$ 100mm
移動相	A:0.1vol% 酢酸 アセトリル溶液 B:0.1vol%酢酸 水溶液 A:B=50:50~90:10
流速	0.2mL/min
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
イオン化モード	ESI ポジティブ
capillary電圧	0.5kV
sample cone 電圧	20V
MS温度	イオン源：120 $^{\circ}$ C、 脱溶媒：300 $^{\circ}$ C



# LC/MSで使用する薬品・器具等

## 【使用する水】

超純水

## 【移動相に使用する有機溶媒】

- ・ アセトニトリル、メタノール、IPAなど
- ・ 試薬のグレードはLC/MS用グレードが望ましい

### ※LC/MSグレード

- ・ HPLC用の規格（UVの検出基準等）に加え、パーティクル（0.05 $\mu$ m以上）の数を規定
- ・ LC/MS分析適合試験（質量分析計で分析する際のバックグラウンドノイズが一定基準以下かどうか）



# LC/MSで使用する薬品・器具等

## 【移動相に使用する酸、アルカリ、緩衝液】

- ・揮発性の試薬を使用
  - ギ酸、酢酸、アンモニア等
  - ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム等
- ・リン酸、リン酸塩等の不揮発性塩は使用しない
- ・過塩素酸、硫酸等の無機酸等は腐食するので使用しない

## 【器具等】

- ・ガラス器具洗浄は洗浄剤を使用しない（界面活性剤の検出）
  - 保全センターのガラス器具は、お湯ですすぎ(×3)、超純水で置換(×3)
- ・使用前のガラス器具も有機溶媒、超純水で洗浄
- ・試料のバイアルは低吸着性または不活性処理をしたものを使用（コンタミ防止）





# 前処理について

HPLCやLC/MSでは、試料の中の分析種分離、妨害成分の除去、高感度化、機器の保守等のため、測定する試料の特性にあわせて必要な前処理を行う

## 【ろ過】

ラインの汚染を最小限にとどめるため、シリンジフィルターや遠心式フィルターを用いて、微粒子、沈殿物、コロイド物などを除去

孔径 HPLCの場合 0.45 $\mu$ m

LC/MSの場合 0.2 $\mu$ m/0.22 $\mu$ m

## 【除タンパク】

生体試料等では共存するタンパク質がライン中で析出して詰まりを発生させる恐れがあるため、沈殿法等で除去後、さらにサイズ排除フィルターを用いて遠心分離する等して徹底して取り除く



# 前処理について

## 【抽出】

有機溶媒抽出（液液抽出）や固相抽出等で分析種を抽出

## 【脱塩】

多量の塩類が存在する場合、汚れや詰まりの原因になるため除去

## 【誘導体化】

そのままでは測定が難しい場合には、検出感度や分離能改善のため、化合物の一部を別の原子団に置換して誘導体化

## 【濃縮・希釈】

感度に対して分析種の濃度が低い場合には試料の濃縮を、濃度が高い場合には適切な溶媒(移動相に近い組成)で希釈  
(初回測定時は1mg/L程度に)



# 分析するにあたっての準備

## 【分析条件の検討】

文献を検索する、教員や先輩達に過去の類似の事例を聞く

- ・ カラムの選定
- ・ 移動相の組成
- ・ pH（そのカラムに使用可能な範囲内で）
- ・ グラジエント条件
- ・ 測定波長(主にHPLC)
- ・ 質量分析計のモード（ポジティブ、ネガティブ）(LC/MS)

## 【サンプル溶液の調製】

- ・ 前処理の実施
- ・ 試料が移動相に溶解するか確認

サンプルは移動相の初期組成に近いものに溶解  
初めは薄いサンプルで測定 1mg/L程度で  
※移動相の準備は、環境保全センターで対応します



# おわりに

今回説明した内容は、HPLC, LC/MSを利用する上で必要不可欠な情報です。きちんと理解したうえで利用するようにしてください。より深い内容を知りたい方は、専門書等を閲覧することをお勧めします。ご視聴ありがとうございました。

参考資料：

1. 島津製作所HP(HPLC), <https://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/support/faq/faq4.htm>
2. 島津製作所HP(LC/MS), <https://www.an.shimadzu.co.jp/lcms/application.htm>
3. アジレント・テクノロジーHP, <https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1000138>
4. JISK0136:2015 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則,  
<https://kikakurui.com/k0/K0136-2015-01.html>
5. LC/MS,LC/MS/MSの基礎と応用（オーム社）

