

# 負イオンモード LC-ESI-MS で水サンプルを 分析した場合に生じるイオン化抑制の削減 アプリケーション

環境

## 著者

Neil Cullum  
Anglian Water Services Laboratories  
Hinchingsbrooke Business Park  
Kingfisher Way, Huntingdon, Cambs  
UK

## 要旨

LC-ESI-MS (エレクトロスプレーイオン化液体クロマトグラフィー/質量分析)を負イオンモードで実行した場合に生じるイオン化抑制効果を減少させる実験条件を、2種類の化合物、ステロイド性エストロゲンと酸性除草剤を使用し説明します。

## はじめに

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を負イオンモードで使用する場合、イオン化抑制が問題となります。この分析では、抽出効率が非常に似ている複数のマトリックスから目的成分を回収する場合、回収率が目に見えて低下します。

イオン化抑制の原因は、たいていの場合、エレクトロスプレー源のイオン化過程でマトリックス成分と目的成分の間で競合が起こり、イオンが形成される液滴から離れてしまうことによります。この抑制効果は化合物によって異なり、主に水の割合が高い水系移動相条件で発生するとされています。

イオン化抑制効果を減少させ、目的成分の抽出効率を向上させるためにはいくつかのアプローチがあります。

- マトリックスのクリーンアップ：サンプル抽出物から望ましくない物質を除去します。化学的クリーンアップ法は、測定成分の数が少ない場合は適用できるかもしれませんが、測定成分の数が多くなると成分間で物理的、化学的性質が異なってくるために適用できないことがあります。例えば、極性の高い化合物は固相カートリッジ上で保持されない、洗浄ステップでカートリッジから溶出してしまうといった可能性があります。
- 目的のマトリックスから抽出された標準物質の使用。このアプローチは、分析するマトリックスが一つだけならうまくいくでしょう。複数のマトリックスを少しずつ分析するとなると、サンプル処理能力が低下してしまいます。
- 内標準 (ISTD) の使用。個々の測定対象化合物を取り扱う際にはかなり有効なアプローチです (重水素化合物が入手可能である場合)。しかし、分析する化合物の数が多いと、必要となる内標準物質の数が多くなり、メソッドを複雑にしてコストを上げてしまう可能性があります。
- 複数のイオン化モードが利用可能な場合、メソッドの開発中にいくつか試してみます。例えば、大気圧化学イオン化法 (APCI) や大気圧光イオン化法 (APPI) などです。これらのイオン源はどちらもマトリックス抑制効果の影響をあまり受けません。しかし、分析する化合物の種類が多いと、すべての目的成分に適用できない場合があります。目的成分のうち、あるものは熱に反応しやすい一方で、他のものはイオン化しないことがあります。そこで、正負モードの切り替えがイオン化抑制に対処するために有効であることが示されました<sup>1</sup>。例えば、イマザピル (除草剤) は、異なるマトリックスではそれぞれ異なる回収率を示しました<sup>2</sup>。イマザピルを負イオンモードの ESI で分析した場合、回収率は地下水で 73 %、(地表水源からの) 水道水では 48 % となりました。しかし、正イオンモードで分析する



Agilent Technologies

と、両方のマトリックスで回収率が 90 % 以上となりました。ただ、このアプローチはいずれかのモードでしかイオン化できない化合物もあるため、すべての目的成分に適用できるとはかぎりません。

- マトリックス干渉成分と十分分離して目的化合物を溶出する、または化合物をより高度な有機溶媒マトリックスに転換するため、より保持力が高い LC 条件を使用します。
- その他試してみた方法：バッファおよび/または pH の調整、ポストカラムでの有機溶媒の添加、ナノスプレーの使用。

このアプリケーションノートでは、酸性の化合物を分析するとき、pH の調整と 2-プロパノールのポストカラム添加を組み合わせればイオン化抑制効果を減らすことができることを示します。その中で、2つの例が示されます。

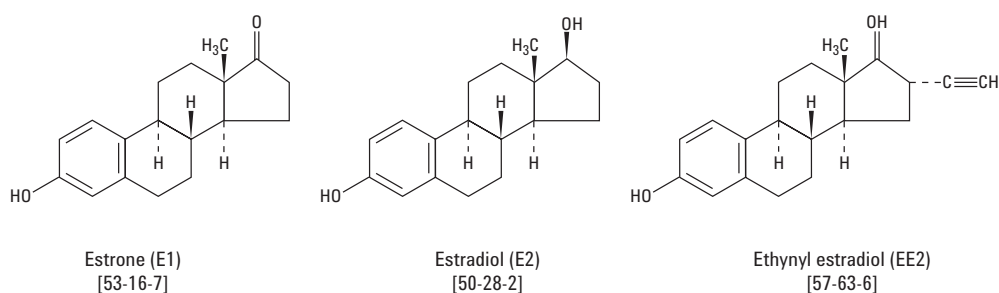


図1. テストしたステロイド性エストロゲンの構造

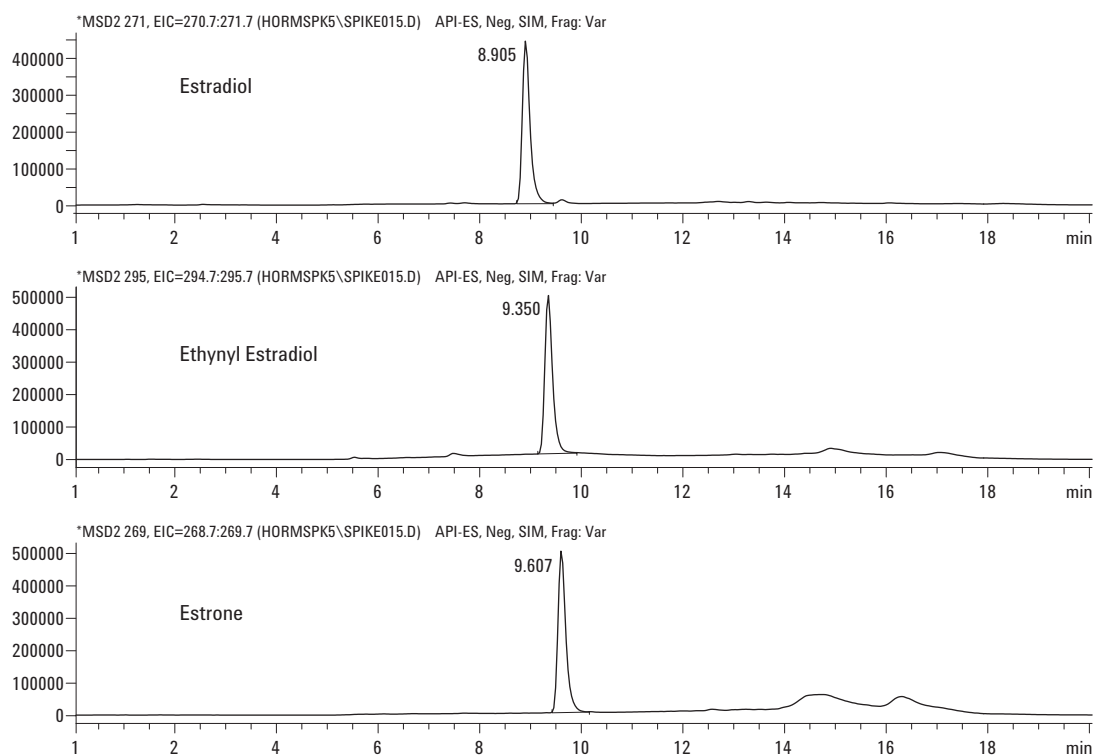


図2. 混合標準物質の抽出イオンクロマトグラム (EIC)。各標準物質を 25 ng/L で添加。

## 実験

最初の例は、ステロイド性エストロゲンです。これらの化合物には、エストロン (E1)、エストラジオール (E2)、およびエチニルエストラジオール (EE2) が含まれます。図 1 を参照してください。

初めに、HPLC グレード水とアセトニトリルを使った単純な LC グラジエントメソッドで、3 種類のステロイド化合物を分離しました。この分離は、それぞれのステロイドにフローインジェクション分析 (FIA) を行って取得した負イオンエレクトロスプレーの最適化条件の下で実行しました。図 2 を参照してください。

## テスト A

各標準物質を 10 ng/L 添加した純水に固相抽出法 (SPE) を適用し、その後 LC/MS 分析を実行しました

6 つの複製サンプル (n=6) から以下の結果が得られました。

E1 = 9.99 の± 0.25 ng/L (回収率 100 %)

E2 = 8.97 ± 0.40 ng/L (回収率 90 %)

EE2 = 9.61 ± 0.35 ng/L (回収率 96 %)

テスト A から得られた結果では、純水からの高い回収率と再現性が示されています。

## テスト B

同じ抽出手順と LC/MS 条件を使って、(地表水源から得られた) 水道水に各標準物質を 10 ng/L で添加したものをテスト A と同様に分析しました。

6 つの複製サンプル (n=6) から以下の結果が得られました。

E1 = 4.93 ± 0.27 ng/L (回収率 49%)

E2 = 2.47 ± 0.20 ng/L (回収率 25%)

EE2 = 3.70 ± 0.51 ng/L (回収率 37%)

テスト B の回収率は、純水のテスト結果 (テスト A) よりもかなり低く (範囲 25 % ~ 50 %)、精度も低いものでした。

## テスト C

テスト C の目的は、テスト B で水道水を使用して得た低い回収率の原因は抽出効率か、あるいはイオン化抑制かを調べることです。ブランク水道水にこれまでと同じ抽出法を使用し、その抽出物に各標準物質を 20 ng/L 添加して分析しました。図 3 を参照してください。

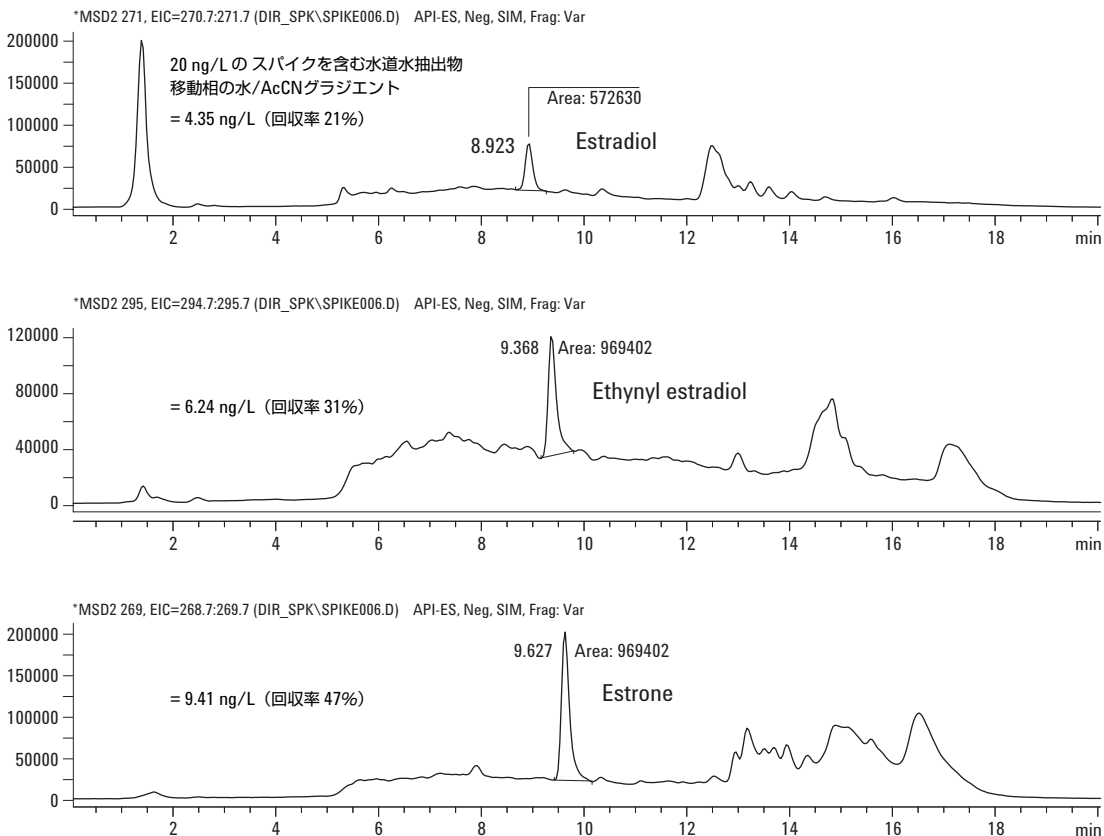


図3. 各標準物質を 20 ng/L 添加した水道水抽出物の EIC

6つの複製サンプル(n=6)から以下の結果が得られました。

E1 = 9.41 ± 0.52ng/L (回収率 47%)  
E2 = 4.35 ± 0.41ng/L (回収率 21%)  
EE2 = 6.24 ± 0.29ng/L (回収率 31%)

この回収率は、テスト B の回収率と似ています。水道水抽出物の直接添加では、回収率が低くなっています。直接添加によって得たこの低い回収率は、抽出効率が低いからではなく、イオン化抑圧が原因となっていると考えられます。

### テスト D

文献では、少量のアンモニア(0.1%)を水に入れるとステロイド化合物のイオン化が高まるという LC 移動相条件が報告されています。移動相を調製し、カラムには高 pH 領域条件に適している ZORBAX Extend LC カラムを使用しました。水道水には各標準物質を 10 ng/L 添加し、抽出操作によって得た抽出物を新しい移動相条件で分析しました。図 4 を参照してください。

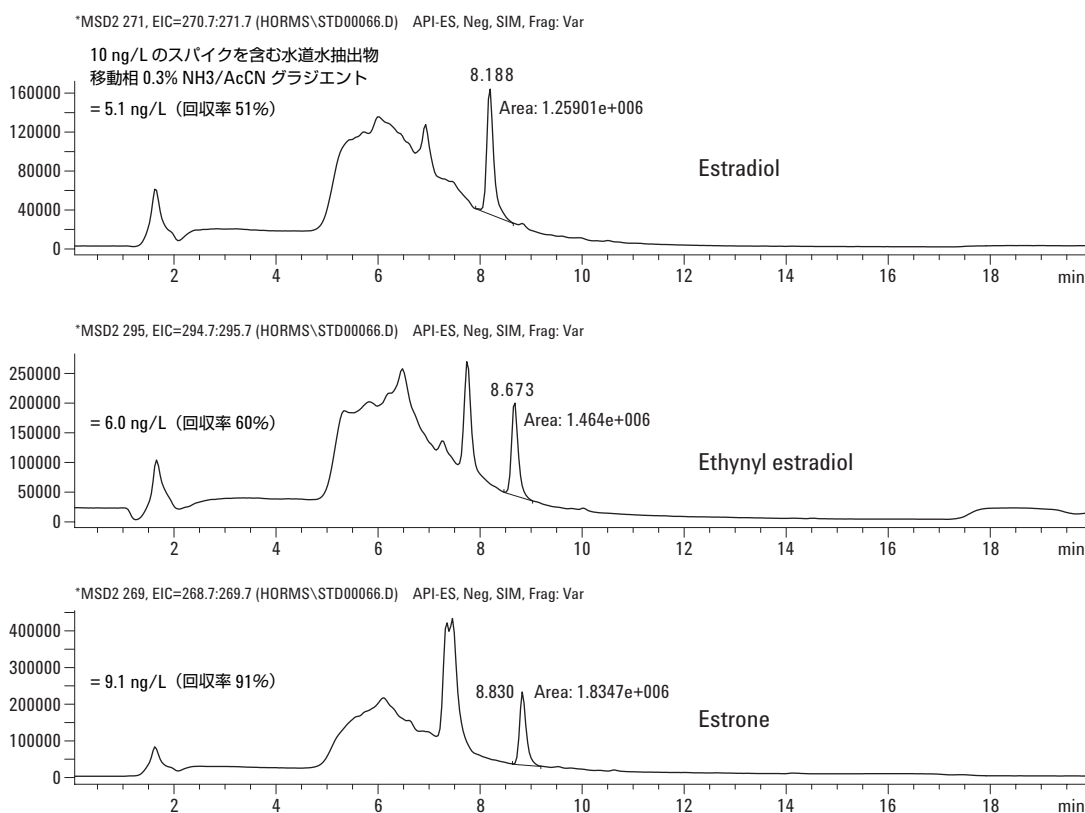


図4. 各標準物質を 10 ng/L 添加し、新しい LC 条件を使って分析した水道水抽出物の EIC

6つの複製サンプル(n=6)から以下の結果が得られました。

E1 = 7.86 ± 0.35 ng/L (回収率79%)  
 E2 = 6.24 ± 0.24 ng/L (回収率62%)  
 EE2 = 6.37 ± 0.49 ng/L (回収率64%)

標準物質ではピークアバンドンスの増加が4～5倍あることが観察され、すべての検量線で優れた直線性が得られました。

テストCと比べ、テストDの移動相条件では回収率が向上しました。抽出法は同じですが、アンモニアを移動相に添

標準物質	テストCの回収率	テストDの回収率
E1	47	79
E2	21	62
EE2	31	64

加することでイオン化抑制が明らかに減少しました。

移動相にアンモニアを使用すると、3つのステロイド化合物すべてに対して回収率が大幅に上昇しましたが、それでもなお純水で得られた値(テストA)と比較すれば低い回収率にとどまっています。

## テストE

ポストカラム添加試薬として有機溶媒(主にアルコール類)を使用してイオン化抑制効果を減少させる方法について記します。テストDと同じLC条件、および分析カラムの後にティーを使用し、カラム溶離剤に流量0.2mL/minで2-プロパノールを添加しました。各標準物質を10ng/L添加した水道水に抽出法後、この分析条件を適用して分析しました。図5を参照してください。

12の複製サンプル(n=12)から以下の結果が得られました。

E1 = 9.44 ± 0.26 ng/L (94%の回収率)  
 E2 = 8.92 ± 0.26 ng/L (89%の回収率)  
 EE2 = 8.24 ± 0.24 ng/L (82%の回収率)

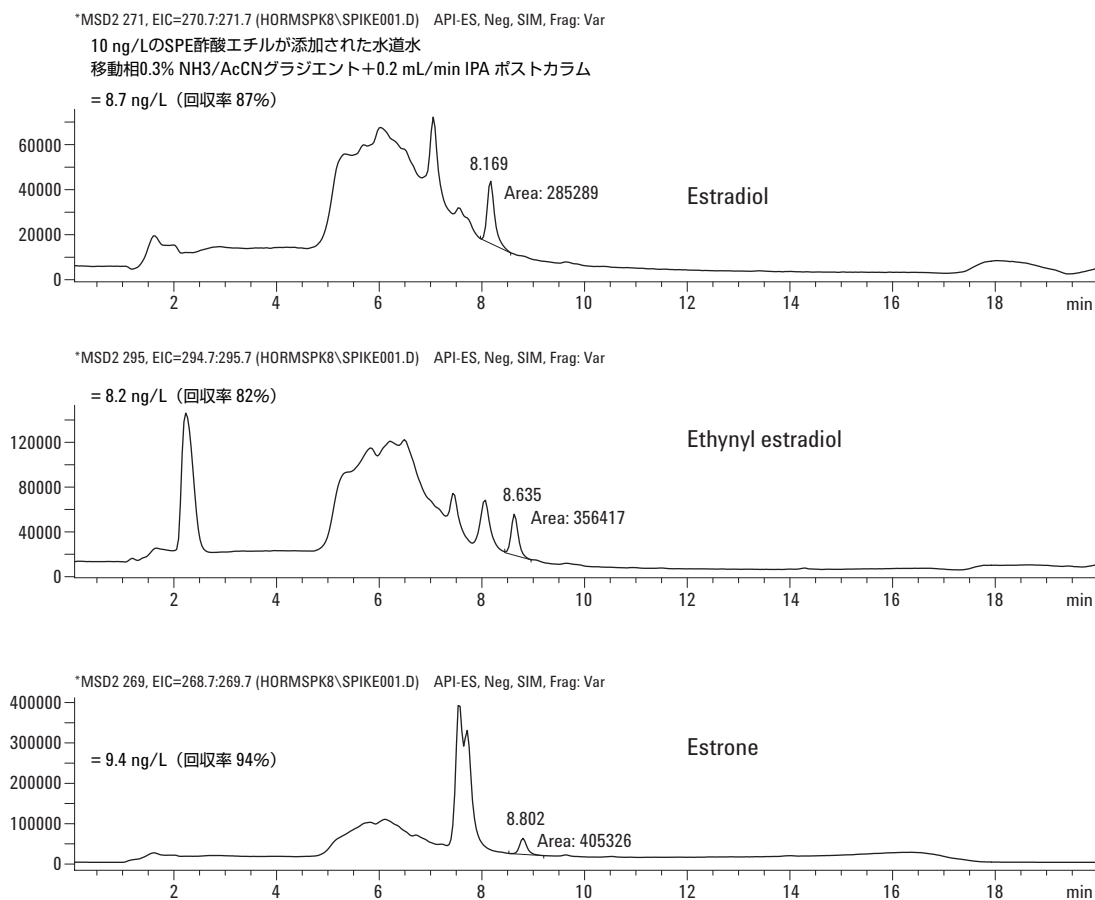


図5. 各標準物質を10 ng/L 添加し、IPA ポストカラム添加を行った水道水のEIC

テスト D と比べ、テスト E の移動相条件では回収率が向上しました。そのため、抽出法は同じですが、移動相溶離剤に 2-プロパノールをポストカラム添加することでさらにイオン化抑制効果を減少させることができました。表 1 を参照してください。

表 1. 各テスト条件のパーセント回収率

標準物質	テストAの %回収率	テストBの %回収率	テストCの %回収率	テストDの %回収率	テストEの %回収率
E1	100	49	47	79	94
E2	90	25	21	62	89
EE2	96	37	31	64	82

### ステロイドの例からの結論

テスト C の結果によって、ステロイド化合物の回収率の低さは抽出効率の低さではなく、イオン化抑制が原因であることが示されました。テスト E の抽出メソッドでは 80 % を上回る回収率が得られたことから、移動相にアンモニアを使用すること、2-プロパノールをポストカラム添加することによって、ステロイド性エストロゲンの分析におけるイオン化抑制を減少させることができたと結論づけることができます。

### 最終テスト条件

#### LC条件

機器	Agilent 1100シリーズHPLC		
カラム	ZORBAX Extend-C18、2.1 mm×150 mm×3.5 μm		
温度	60 °C		
移動相 A	HPLCグレード水の0.1%アンモニア水溶液		
移動相 B	アセトニトリル		
グラジエント	開始	%B	5
	0.5 min	%B	5
	1.0 min	%B	40
	12.0 min	%B	80
	13.0 min	%B	80
	13.5 min	%B	5
流量	0.3 mL/min		
ポストカラム添加	2-プロパノールを0.2 mL/minで添加		
質量分析計条件			
乾燥ガス流量	13.0 L/min		
乾燥ガス温度	350 °C		
ネブライザ圧力	50 psi		
Vcap	3000 V (負イオン)		
SIM イオン	E1	= 269	フラグメンター電圧 = 190 V
	E2	= 271	フラグメンター電圧 = 210 V
	EE2	= 295	フラグメンター電圧 = 200 V

2 つ目の例は酸性除草剤です。酸性除草剤も、イオン化抑制効果の影響を受けやすい化合物です。そのような化合物には、ジクロロフェノキシ酢酸、MCPA、ジクロロプロップ、メコプロップ、2,4-DB、MCPB、プロピザミドなどがあります。

### 実験

酸性除草剤の分離は HPLC グレード水による 0.01 % ギ酸水溶液とアセトニトリルによるグラジエント溶離によって行いました[2]。移動相には酸が含まれ、化合物の保持と分離を助けません。移動相に薄いアンモニア溶液 (0.1 %) を使用する代わりに、ポストカラムで 2-プロパノールを添加する際にトリエチルアミンを 0.01 % 濃度で直接添加する方法をとりました。この混合液は、0.2 mL/min の流量でポストカラム添加しました。すべてのサンプルは、テストされるすべての化合物、マトリックスに 0.1 μg/L 添加しました。分析結果は表 2 に示されています。

データはどちらも妥当性検査済みのメソッドから得たもので、各データは 11 回分の複製サンプル分析の結果で構成されています。

表 2. 酸性除草剤のパフォーマンス値 (%回収率として表示)

化合物	ポストカラムなし		ポストカラムあり*	
	井戸水 (%)	水道水 (%)	井戸水 (%)	水道水 (%)
2,4-D	85.0	76.7	85.3	84.0
MCPA	91.5	83.2	84.9	84.4
ジクロロプロップ	95.8	89.8	84.3	85.0
メコプロブ	96.6	93.9	82.9	82.7
2,4-DB	90.7	81.6	87.1	87.8
MCPB	93.2	84.2	87.6	88.6
プロピザミド	86.8	87.5	82.6	84.6

\* ポストカラム添加では 0.01%トリエチルアミンと2-プロパノールの溶液を 0.2 mL/min で添加。

酸性除草剤の分析結果では、ポストカラム添加をしないと  
きにはイオン化抑制効果があることが表 2 に示されていま  
す。特に、2,4-D、MCPA、2,4-DB、MCPB およびジクロロ  
プロップでは、2 つのマトリックス間の回収率の差が 10 %  
近い値であることが示されています。

0.01 % のトリエチルアミンを含む 2-プロパノール溶液を  
ポストカラム添加すると、マトリックス間の回収率の差が  
ほとんどなくなり、イオン化抑制効果を減少させることが  
わかりました。

## 参照文献

1. Cullum, C-K. Meng, and P. Zavitsanos, "Effect of Sample Matrix on Suppression of Ionization in Water Samples Using LC-ESI-MS". (「LC-ESI-MS分析における水サンプル中夾雑物がイオン化抑制に与える影響」 Agilent Technologies、Pub. No. 5989-0371JAJP, [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp))
2. N. Cullum, P. Stephens, and S. Evans, "Determination of Acidic Herbicides in Groundwater and Potable Water by LC/MSD using Selective Ion Monitoring" Agilent Technologies, publication 5988-5882EN, [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

## さらに詳しくは...

当社の製品およびサービスの詳細についてはウェブサイト  
([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111  
横河アナリティカルシステムズ株式会社  
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilent は、この文書に含まれる誤り、あるいは本資料の提供、履行、使用に関連して  
生じた付随的または間接的な損害について一切の責任を負いません。  
本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in the USA  
May 31, 2005  
5989-2883JAJP