

分析用水の水質がLC、LC/MS分析に及ぼす影響とその検証

横河アナリティカルシステムズ株式会社 下位 典子、熊谷 浩樹
日本ミリポア株式会社 ラボラトリーウォーター事業本部 石井 直恵
Laboratory Water Division, Millipore S.A.S. Ichiro Kano

緒言

LC分析において、移動相の調製に用いる溶媒の純度は検出感度、クロマトグラムのゴーストピークの出現、定量精度などに影響を与えるため極めて重要である。なぜなら、グラジエント溶離において移動相に含まれる不純物がカラムに保持され、移動相を切り替えたときにピークとして溶離し、目的試料成分と保持期間が重なったり、ベースラインのノイズおよびドリフトの原因となるからである。¹⁾

さらに、環境・食品分野等で規制される化学物質は毎年増え続け、その規制値は極めて低濃度である。このため、高速・高感度分析が要求されるようになってきており、溶媒中に含まれる不純物は今まで以上に分析に影響をおよぼすようになってきている。

そこで、本報では移動相に使用する水がLC・LC/MS分析へ及ぼす影響について検討を行った。

実験1 水質が及ぼすゴーストピークの影響

方法

1) 分析装置

Agilent1100シリーズ

デガッサ : G1322A

ポンプ : G1312A (バイナリポンプ)

オートサンプラ : G1368A (冷却機能付ウェルプレートサンプラ)

カラム恒温槽 : G1316A

検出器 : G1315B (ダイオードアレイ検出器 : DAD) および G1946D (質量選択検出器 : MSD)

データ処理 : Agilent ケミステーション

2) 分析条件

カラム : ZORBAX SB-C18, 2.1x150mm, 5 μ m

移動相 : A = H₂O (0.1%CH₃COOHを含む)
B = CH₃CN (0.1%CH₃COOHを含む)

移動相流量 : 0.2 mL/min.

グラジエント : Time 0 - 60 - 90 - 100 min
B 0 - 0 - 100 - 100 %

ポストタイム : 20 min

カラム温度 : 40

DAD検出波長 : 210 nm (BW = 8 nm, Ref. = Off)

MSD : Ionization = Electrospray

Polarity = Positive

Mass Range = 50 ~ 1000 m/z

Fragmentor = 120 V

Nebulizer gas = N₂ (40psi)

Drying gas = N₂ (10L/min, 350)

グラジエント条件に示すように、移動相A100%を60分間送液し、水に含まれる有機物をカラムに保持させた。その後、30分で移動相Bを0%から100%にグラジエントをかけ、カラムに保持した有機物を溶離させた。

3) 移動相Aに使用した水

次頁に示す4種の純水を使用した。

超純水 Milli-Q Gradient

水道水（東京都三鷹市）を純水装置 Elix 5 で純水化した後、タンクに貯水し、Milli-Q Gradient で用時精製したものを使用した。（EQG-5S システム）Milli-Q Gradient は、波長 185nm の有機物酸化分解用紫外線ランプにより、TOC が 5ppb 以下の低有機物濃度の超純水が得られ、これを移動相 A に使用した。

超純水 Milli-Q Academic

水道水（東京都三鷹市）を純水装置 Elix 5 で純水化した後、タンクに貯水し、Milli-Q Academic で用時精製したものを使用した。（EQA-5S システム）Milli-Q Academic は、紫外線ランプを有さないため、超純水中に含まれる有機物量は TOC 20ppb 程度であった。

A 社 HPLC グレード水

A 社製 HPLC グレード水を開封後速やかに使用した。

B 社 HPLC グレード水

B 社製 HPLC グレード水を開封後速やかに使用した。

結果

結果を Fig.1 に示す。ダイオードアレイ検出および MS 検出、どちらにおいても最もゴーストピークが少ない結果が得られた水は Milli-Q Gradient であった。一方、20ppb と TOC 濃度が高い Milli-Q Academic 水では、より多くのピークが観察された。即ち、超純水装置における紫外線ランプによる TOC 濃度の低減は LC および LC/MS 分析におけるゴーストピークの低減に効果があることが分かった。

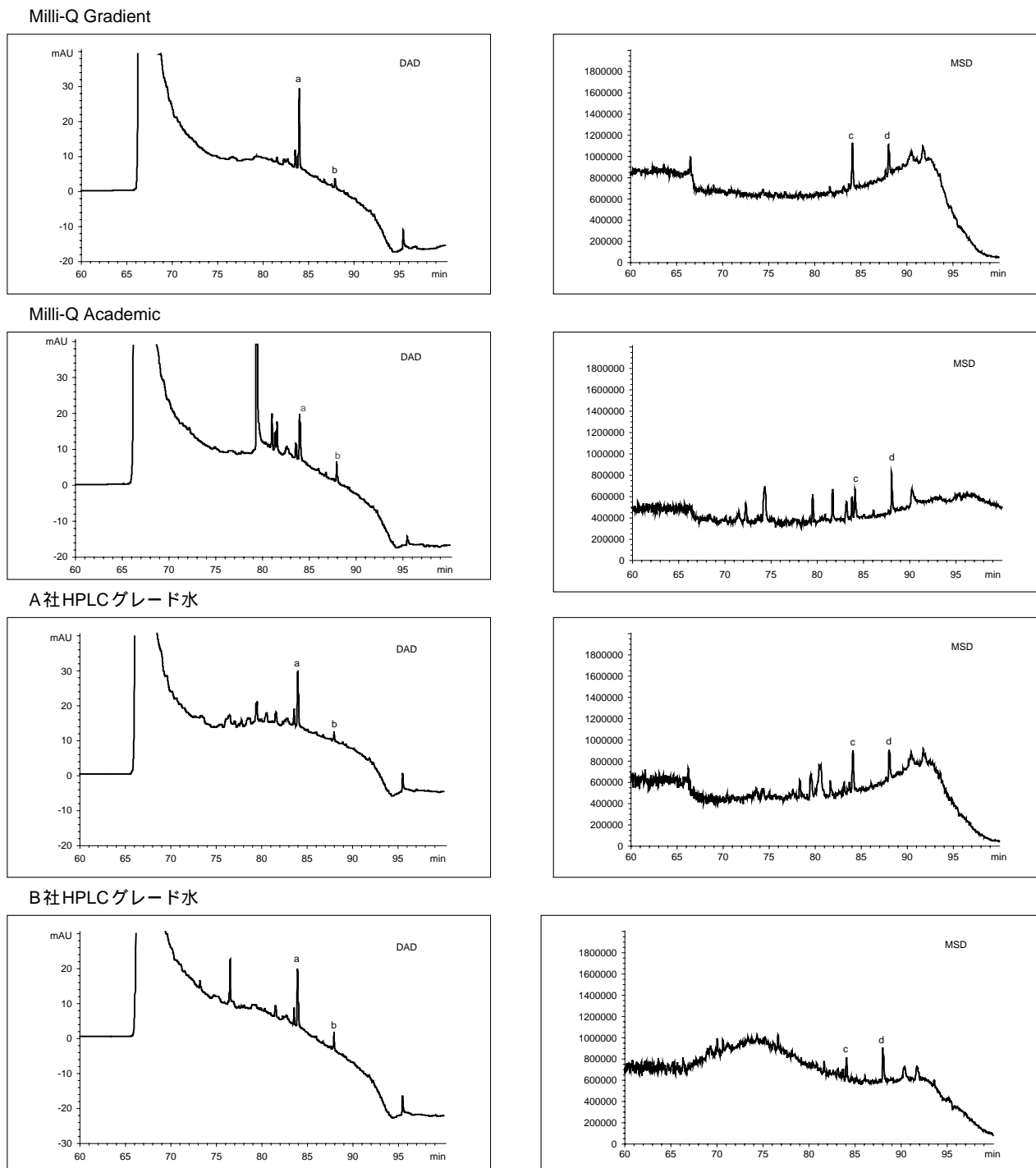


Fig.1 LC、LC/MSによる各種分析用水の比較

市販HPLCグレード水は2種類ともに、Milli-Q AcademicとMilli-Q Gradientのほぼ中間の水質であった。

また、いずれの水においても、ダイオードアレイ検出のa、bおよびMS検出のc、dのピークが検出された。これ

らは、水由来の有機物であるのか、他の要因（アセトニトリル、酢酸、装置等）からのピークであるのかは今回は特定していない。

実験2 水質が分析結果に及ぼす影響

実験1より、移動相に用いる水の水質がゴーストピークに影響を及ぼすということが明らかとなった。そこで、実験1で最もゴーストピークが多かったMilli-Q Academic水および最もゴーストピークの少なかったMilli-Q Gradient水を使用して合成抗菌剤の分析を行い、水の純度が実際の分析に与える影響について検討を行った。

方法

分析装置は実験1と同じものを用いた。また、分析条件は以下に示すとおりである。

移動相AにはMilli-Q Academic水とMilli-Q Gradient水を用いた。

また、サンプルには各10ppmのカルバドックス (CDX)、スルファジメトキシ (SDMX)、ピロミド酸 (PMA) およびナイカルバジン (NCZ) の合成抗菌剤4成分を用いた。

分析条件

カラム : ZORBAX SB-C18, 2.1x150mm, 5 μ m

移動相 : A=H₂O (0.1%CH₃COOHを含む)
B= CH₃CN (0.1%CH₃COOHを含む)

移動相流量 : 0.2 mL/min.

グラジエント : Time 0 - 20 min

B 20 - 80%

ポストタイム : 20 min

カラム温度 : 40

MSD : Ionization = Electrospray

Polarity = Positive

Mass Range = 100 ~ 500 m/z

Fragmentor = 120 V

Nebulizer gas = N₂ (40 psi)

Drying gas = N₂ (10L/min, 350)

結果

結果をFig.2、3に示す。Milli-Q Gradient水を移動相として使用した場合は4種の化合物をきれいに分離・検出することができた。一方、Milli-Q Academic水を使用した場合は、ブランク（試料注入なし）の時点でゴーストピークが検出され、その一部がナイカルバジンのピークと重なり、正確な分析を行うことができなかった。

すなわち、移動相に用いる水の水質は実際の分析に大きく影響を及ぼすことが確認された。

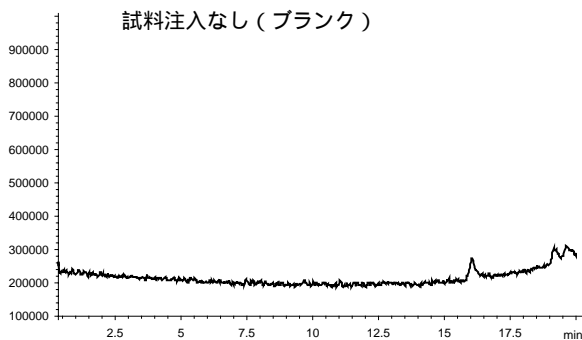


Fig.2 合成抗菌剤分析結果 (Milli-Q Gradient 水使用の場合)

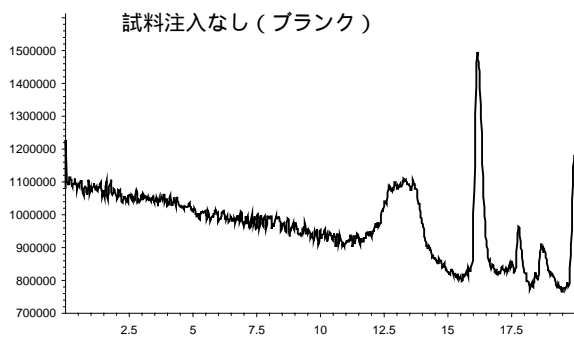
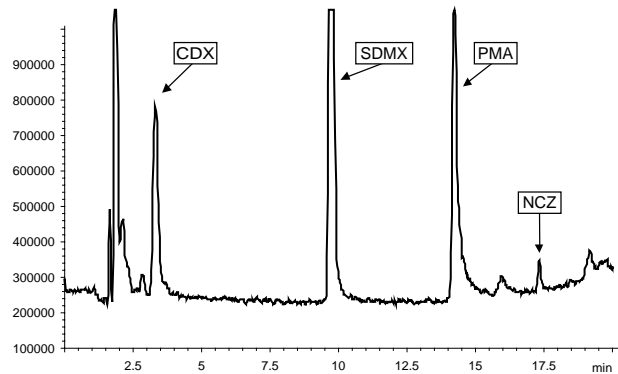
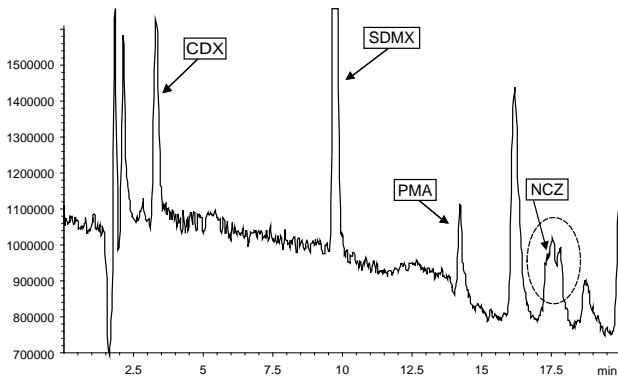


Fig.3 合成抗菌剤分析結果 (Milli-Q Academic 水使用の場合)



考 察

実験1では、水に含まれるHPLCに問題となる不純物量を比較するために、各水（移動相A）を60分間カラムに通し、水中の不純物をカラムに吸着させた。これは、移動相として用いた水をそれぞれ12 mLもの大量のサンプルインジェクションに相当するため、最もバックグラウンドが少なかったMilli-Q Gradientにおいてもピークが確認された。

実験2では、移動相に用いる純水の質が、実際の分析に及ぼす影響を検討した。その結果、移動相に用いる水の高純度化が、目的ピークの検出（分離）および分析感度の向上に寄与することが確認された。

すなわち、LCおよびLC/MS分析において、移動相に用いる分析用水の選択は非常に重要である。

最近の超純水装置は用途別に異なる精製方法が採用されているが、LCおよびLC/MS分析においては、単なる“超純水”ではなく、“LC、LC/MSに適した精製方法を採用した超純水”この場合クロマトグラムの質に関与する有機不純物を除去する“有機物酸化分解用UVランプを精製過程に有する超純水装置”が必要である。

また、超純水に残存する有機物量は超純水装置の性能のみならず、前処理として用いる純水装置の性能が大きく寄与し、蒸留装置やイオン交換ポンペを純水装置として用いた場合には、低有機物濃度の超純水を精製することができない。²⁾³⁾すなわち、LC、LC/MS解析に適した超純水の水質を得るためには、超純水装置の性能単体のみならず、純水装置と超純水装置の組み合わせ、つまり超純水システムとして性能を考慮する必要がある。本結果より、純水装置としてElix、超純水装置としてMilli-Q Gradientの組み合わせにより、LC、LC/MSに適した水質が達成された。さらに、超純水の水質が分析に適しているかを常時確認するために、超純水の水質管理としてTOCモニタリングの有効性

が示唆された。

また、ここで重要なことは、これらの問題が発生したときの原因を特定することができるか、という点である。原因が水由来である可能性が疑われる場合、原因物質である不純物と関連付けられた指標、ここではTOC値を確認することが有効である。このとき、超純水装置のコンディションを検証することも重要である。超純水のTOCをモニターしたとしても、その値が真の値でなければ、モニターする意味をなさないからである。

これまで移動相に用いる水の純度が、LCやLC/MSの分析にも大きく影響することを示したが、これらの問題の要因が必ずしも水質であるわけではなく、分析装置のコンディションによるところも大きい。分析装置を適切なコンディションに維持して使用することは当然であるが、何らかの異常が発生した場合は、その原因を迅速に特定しメンテナンスを行うことが重要である。今回使用したAgilent 1100には、不具合現象とこれに関連する装置上の異常箇所およびその確認テスト、さらにメンテナンス法がパッケージされた自己診断機能が搭載されており、迅速な対応が可能である。さらに、分析装置全体の性能検証を自動的に行う機能（Operational Qualification/Performance Verification、OQ/PV）も搭載されており、マニュアル操作による検証作業と比較して時間とコストの大幅な低減が可能である。定期的な性能検証と適切なメンテナンスを実施することにより、分析装置のコンディションを常に適切に維持することが容易となる。

すなわち、信頼性の高い分析データを得るためには、分析に適した超純水装置および分析装置を選定し使用することが必要であるが、これらの装置を適切に管理しその性能を検証することも極めて重要である。

参考文献

- 1) 環境分析のための機器分析第5版、P360、丸善（1996）
- 2) 石井直恵ら：The R&D Notebook vol.5、日本ミリポア（株）（1999）
- 3) 石井直恵；The R&D Notebook vol.6、日本ミリポア（株）（1999）

MILLIPORE

日本ミリポア株式会社
ラボラトリーウォーター事業本部

お問い合わせ先

東京 / 〒108-0073 東京都港区三田1-4-28 三田国際ビル TEL. (03) 5442-9714 (直)
大阪 / 〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-1-1 新大阪プライムタワー TEL. (06) 6390-0595 (直)
九州 / 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-13-9 住友生命博多駅東ビル TEL. (092) 471-8266 (直)
<http://www.millipore.com/nihon> E-mail: jplw-info@millipore.co.jp