

ノート

相互利用可能な LC/MS/MS スペクトルライブラリ 作成のための研究 (第 1 報)

— プロダクトイオンスキャンによる MS/MS スペクトル取得条件の検討 —

豊田 安基江, 杉村 光永, 松尾 健, 寺内 正裕, 伊達 英代, 井原 紗弥香,
森田 晃祥*, 山辺 真一**, 肥塚 加奈江**, 藤原 美智子***, 立野 幸治***

Studies on the Production of the Mass Spectral Reference Library Generated by LC/MS/MS (Part 1)

— The Examination of the MS/MS Spectrum Acquisition Condition by the Product Ion Scan —

AKIE TOYOTA, MITSUNORI SUGIMURA, TAKESHI MATSUO, MASAHIRO TERAUCHI,
HIDEYO DATE, SAYAKA IHARA, AKIYOSHI MORITA*, SIN-ICHI YAMABE**,
KANAE KOEDUKA**, MICHIKO FUJIWARA*** and KOUJI TACHINO***

(Received Oct. 24, 2008)

Summary : A mass spectral reference library is being developed and tested, to enable discovery scientists to more rapidly and reliably identify chemical substances.

We tried to build the mass spectral reference library in collaboration study by 4 prefectures in Chugoku region (Tottori, Okayama, Yamaguchi and Hiroshima) . All spectra in this library organized from product ions generated by electrospray ionization in LC/MS/MS experiments.

As a result, a similar spectrum pattern was provided in each device. The library is being built about 300 chemical substances.

Keywords : LC/MS/MS, mass spectral reference library, product ion scan

緒 言

未知の標的物質を同定するために、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) による分析では、標的物質と標準物質とのプロダクトイオンスキャンによるフラグメントイオンのパターン (以下、MS/MS スペクトル) の比較を行い、検証する手法が一般的に用いられている。

ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) による分析では、NIST や Wiley 等のライブラリを利用することで約 530,000 件のデータベースからの MS スペクトルの検索が可能である。これらライブラリは GC/MS の機種に関わらず利用可能であるため一般的に広く利用されている。しかしながら、LC/MS/MS 分析においては、装置あるいは分析条件によって得られる MS/MS スペク

トルは異なることから、現在、LC/MS/MS で広範囲な化学物質に対応しているライブラリは少ない。そのため MS/MS スペクトルの検索を行う場合には、分析機関それぞれが装置固有のライブラリを作製する必要がある。

今回、中国地方 4 県 (鳥取県、岡山県、山口県、広島県) の公的研究機関が共同で、健康危機管理を目的として、農業、動物用医薬品、医薬品及び自然毒等、食品中に混入する可能性が想定される物質を対象に、相互に利用可能な LC/MS/MS スペクトルライブラリの作製を試みたので報告する。

方 法

1. 試薬等

MS/MS スペクトルの比較に用いた標準品 : アセフェート標準品はいずれの県も和光純薬 (株) 製、ピテ

* 鳥取県衛生環境研究所 : Tottori Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

** 岡山県環境保健センター : Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health

*** 山口県環境保健センター : Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health

ルタノール標準品は山口及び広島県が林純薬工業（株）製，鳥取県及び岡山県が和光純薬（株）製，ピリダフェンチオン標準品は鳥取，岡山及び山口県が和光純薬（株）製，広島県が林純薬工業（株）製，ベンシクロン標準品は鳥取及び岡山県が和光純薬（株）製，山口及び広島県が関東化学（株）製，メプロニル標準品は鳥取及び岡山県が和光純薬（株）製，山口及び広島県が関東化学（株）製を使用した。

さらに，MS/MS スペクトルライブラリの登録には各県で保有の標準品を用いた。

標準品はメタノール又はアセトニトリルに溶解し，0.01 ~ 100 µg/mL の標準溶液を調製した。

その他の試薬はすべて残留農薬分析用あるいは HPLC

用を使用した。

2. 装置

用いた装置は Table 1 に示した。

3. 測定条件

LC/MS/MS の測定条件は Table 2 に示した。

4. MS/MS スペクトルの取得

標準溶液をそれぞれインフュージョンで注入し， $m/z = M-1$ または $M+1$ を確認した後，6 通りのコリジョンエネルギーの電圧 (CE) (-20, -35, -50, +20, +35 及び +50) について MS/MS スペクトルを取得した。

Table 1. LC/MS/MS System of Each Laboratory

Prefectural institute	HPLC	MS/MS
Tottori	Agilent1100 series Agilent Technologies, Inc.	API 3000 TM LC/MS/MS system Applied Biosystems Corp. (Analyst [®] Software ver.1.4.2)
Okayama	Prominence SHIMADZU Corp.	3200 Q TRAP [®] LC/MS/MS system Applied Biosystems Corp. (Analyst [®] Software ver.1.4.2)
Yamaguchi	Agilent1100 series Agilent Technologies, Inc.	API 2000 TM LC/MS/MS system Applied Biosystems Corp. (Analyst [®] Software ver.1.4.2)
Hiroshima	Agilent1100 series Agilent Technologies, Inc.	API 3000 TM LC/MS/MS system Applied Biosystems Corp. (Analyst [®] Software ver.1.4.2)

Table 2. Analytical Conditions

Column	phenomenex [®] Mercury MS Luna C18 (10 mm×2.0 mm i.d. 3 µm) Waters Atlantis [®] HILIC Silica (15 mm×2.1 mm i.d. 3 µm)			
Column temp.	40°C			
Flow rate	0.2 mL/min			
Mobile phase	Solvent A; 5 mmol/L ammonium acetate			
Gradient profile	Time (min)	0	5	8
	B (%)	20	95	95
Injection volume	1 ~ 10 µL			
Ionization	ESI (-), (+)			
Scan type	Product ion scan			
Ionspray voltage	-4500V (-), 5500V (+)			
Collision energy (CE)	-20, -35, -50 eV (-), 20, 30, 50 eV (+)			
Declustering Potential (DP)	-30V (-), 30V (+)			
Focusing Potential (FP)	-200V (-), 200V (+)			
Ion source temp.	400°C (API2000, API3000), 500°C (3200Qtrap)			
Dwell time (sec)	1			

MCAは30サイクルとした。さらにその後、LCカラムを装着して標準溶液を注入し、インフュージョンの場合と同様にMS/MSスペクトルを取得した。最終的に1物質あたり12種類のMS/MSスペクトルを取得した。

なお、標準溶液はあらかじめ1～10 μLをLC/MS/MSに注入し、各CEにおいてTICを確認した。このTICからS/N比を求め、S/N > 20となる濃度に適宜調整したのちMS/MSスペクトルの取得に用いた。

5. MS/MS スペクトルライブラリの登録

MS/MS スペクトルライブラリには、それぞれの標準物質について、MS/MS スペクトル、物質名、CAS No., IUPAC 名、分子量、分子式及び構造式を登録した。

結果及び考察

1. LC 条件の検討

農薬、動物用医薬品、医薬品及び自然毒等、食品中に混入する可能性が想定される物質を分析対象としたことから、広範な化学物質が分析可能な条件を考え、移動相に、イオン化を促進するための5 mmol/L 酢酸アンモニウム存在下で、アセトニトリル-メタノール混液(1:1)を用いたグラジエント条件とし、アセトニトリル-メタノール混液を20%から5分で95%まで変化させて3分間保持した。分析時間の短縮のために10 mmのC18カラムを用いた。このカラムでMS/MSスペクトルが取得できない物質については、15 mmのSilicaカラムを用いることとした。その結果、各県保有の標準品のうち、約300物質について良好なピーク形状が得られ、スペクトルを取得した。

これらのことから、スペクトル採取時のLC条件を本状態に統一することとした。

2. MS 条件の検討

それぞれの標準溶液(0.01～100 μg/mL)をシリンジポンプを用いて直接MS/MSに注入しインフュージョンによる測定条件を検討した。ライブラリ登録のためには一定条件下でのMS情報の蓄積が必要であることから、それぞれの物質ごとに、可能な限りESI negative (neg.)及びpositive (pos.)の両モードで測定を行うこととした。それぞれの測定モードにつき、DP電圧を-30V (neg.)及び30V (pos.), FP電圧を-200V (neg.)及び200V (pos.)に固定してQ1スキャンを行い、それぞれの測定条件においてm/z=M+1及びM-1のプレカーサーイオンを確認した。このプレカーサーイオンについて、CEを-20, -35及び-50eV (neg.), 20, 35及び50eV (pos.)に変化させて質量数50～M+20の範囲でプロダクトイオンスキャンを行いMS/MSスペクトルを取得した。

その後、カラムを装着し、インフュージョンと同様の条件による測定を行いMS/MSスペクトルを取得することとした。最終的に、統一した条件で測定することにより、インフュージョンと、カラム分離を行う方法で併せて1物質あたり最大で12通りのMS/MSスペクトルを取得することとした。

3. MS/MS スペクトルの比較

アセフェート (MW 183.2), ビテルタノール (MW 337.4), ピリダフェンチオン (MW 340.3), ペンシクロン (MW 328.8) 及びメプロニル (MW 269.3) の5農薬について得られたMS/MSスペクトルを各県ごとに比較した (Fig.1)。ビテルタノールについてはnegativeモードでの感度が悪く、positiveモードのスペクトルのみを採用した。

いずれの物質においても各県の装置で得られたMS/MSスペクトルは同一条件でほぼ一致した。

このことから、今回使用した装置でライブラリが共有可能であることが示された。

4. MS/MS スペクトルライブラリの登録

現在、約300物質のスペクトルを登録し、LC/MS/MS分析においてスペクトル検索が可能となった。

5. まとめ

これまでに、地方自治体において健康危機管理を目的とした有機化学物質の迅速分析・検索システムの構築の取り組みがなされ[1]、特にGC/MSによる分析で有効に活用されている[2]。LC/MS/MSでは、熱分解しやすい化合物や極性化合物など比較的広範囲な物質の分析が可能である。この特徴から、LC/MS/MS各装置に共通したライブラリを作製することで、健康危機管理への対応がより強化されると考えられる。今後も各研究機関の連携によりライブラリの収載物質数を増やしていくことが必要と考えられた。

文 献

- [1] 伊藤光男, 小林信彰, 米田篤史, 田中敏嗣, 井上成人: 有機化学物質の迅速分析・検索システム Chemofind 2001 神戸市環境保健研究所報, 29,63-82 (2001).
- [2] 伊藤光男, 上田泰人, 田中敏嗣: 健康危機管理のためのGC/MS分析事例 (Chemofind システムを用いた迅速同定事例) 神戸市環境保健研究所報, 35, 44-50 (2007).

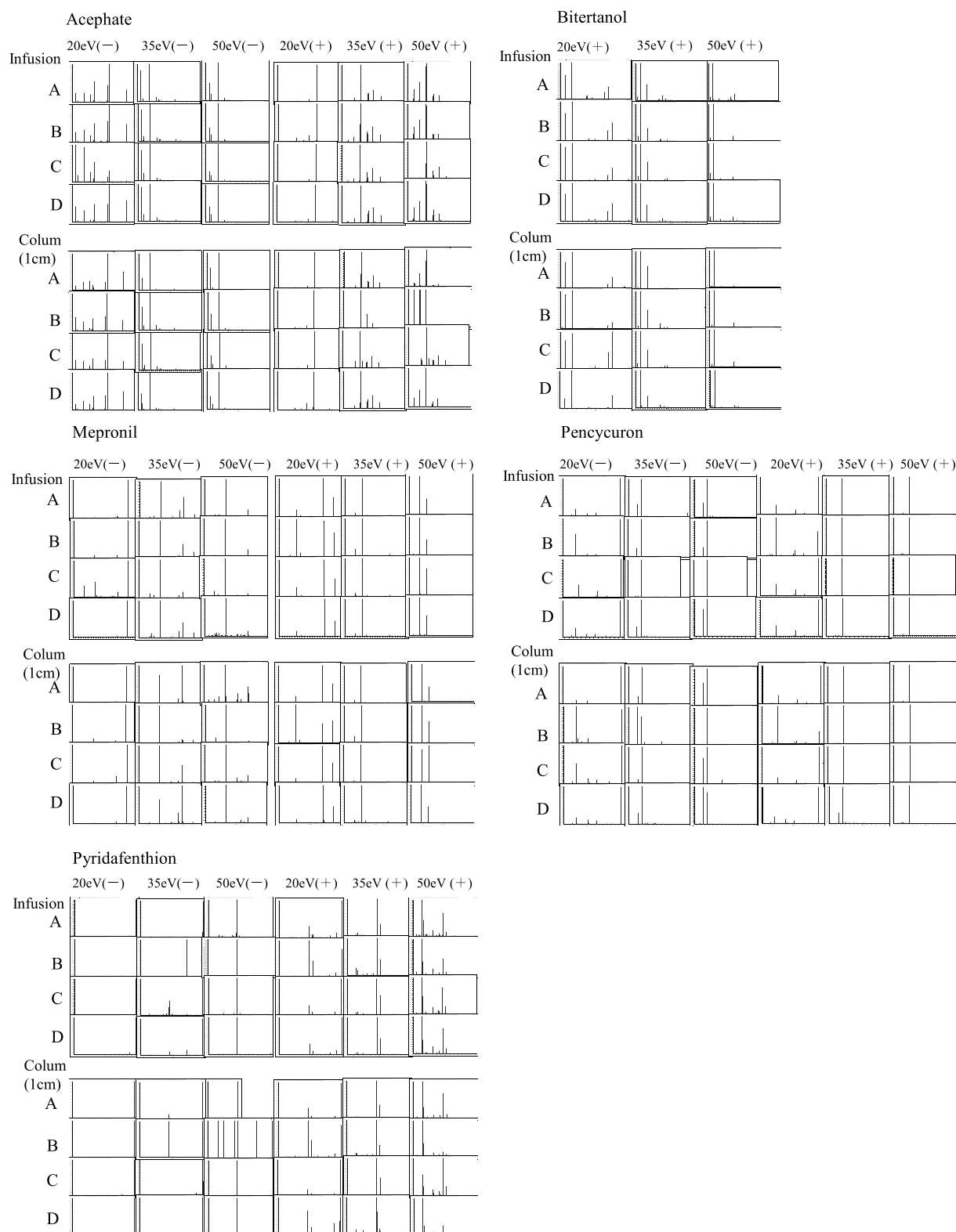


Fig. 1 The comparison of the MS/MS spectrum pattern by the various CE of 5 pesticides provided in each prefecture. A: Tottori, B: Okayama, C: Yamaguchi and D: Hiroshima