

LC/MS によるレボグルコサン，ガラクトサン，マンノサンの分析法の検討

清水 明 市川有二郎 堀本泰秀 内藤季和

1 はじめに

微小粒子状物質(PM_{2.5})については2009年に環境基準が定められ，PM_{2.5}の成分分析に関するガイドラインが2011年に策定された。その中で，「石炭燃焼やバイオマス燃焼等の特定の発生源に関する情報を得られると考えられる場合には，多環芳香族炭化水素，レボグルコサン，水溶性有機炭素などの物質についても可能な限り調査を実施することが望ましい。」とされている。ここではポストカラム法¹⁾を用いたLC/MSによるレボグルコサン及びその立体異性体であるガラクトサン，マンノサンの分離分析法の検討を行ったので，その結果について報告する。

2 分析方法の概要

表1，図1～3に示したレボグルコサン(Lev)，ガラ

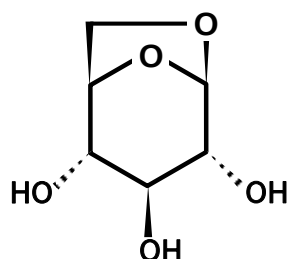
クトサン(Gal)，マンノサン(Man)を分析対象化合物とした。内標準として安定同位体標識化合物のレボグルコサン-*d*₇を使用した。MSの各パラメーターの最適化を行い，SRM, ESI Negativeで測定を行った。

LC部ではHILICカラムを使用して中性条件で各化合物の分離・溶出を行い，ポストカラム法によりアンモニア水溶液を移動相に混和することにより塩基性としてMS部でのイオン化を促進した。

大気環境試料については，GC/MSにより Lev 等を分析している既報²⁾に準じてサンプリング，ろ紙からの抽出操作を行った。その抽出液1 mLを分取，窒素気流下で濃縮乾固し，アセトニトリルで1 mLとしたものをLC/MS測定用の試験液とした。

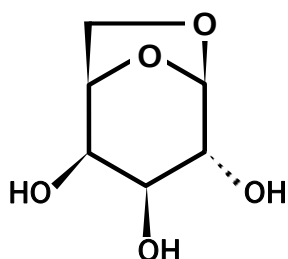
表1 分析対象化合物と LC/MS 測定時のモニターイオン

Symbol	Compound	Target ion	Qualifier ion
Lev	Levoglucozan	161 > 101	161 > 85
Gal	Galactosan	161 > 101	161 > 85
Man	Mannosan	161 > 101	161 > 85
Lev- <i>d</i> ₇	Levoglucozan- <i>d</i> ₇	168 > 105	—



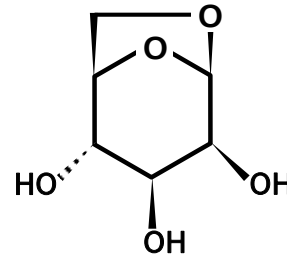
CAS 番号：498-07-7
分子式：C₆H₁₀O₅

図1 レボグルコサン



CAS 番号：644-76-8
分子式：C₆H₁₀O₅

図2 ガラクトサン



CAS 番号：14168-65-1
分子式：C₆H₁₀O₅

図3 マンノサン

3 結果

LC の移動相をグラジエント条件で送液し、ポストカラム法によりアンモニア水溶液を移動相に混和して ESI Negative で測定することにより、Lev, Gal, Man を分離、定量することが可能となった。今回示した測定条件(表 2)による検出下限値(IDL)は、Lev 0.71 ng/mL, Gal 0.34 ng/mL, Man 0.35 ng/mL であった。また、ろ紙の抽出操作時に添加した Lev-d7 の回収率が 90%以上と良好であり、Lev-d7 を内標準として Lev, Gal, Man の定量が行えると考えられた。以下に、本分析法の検討結果を示した。

3・1 MS スペクトル

Lev の MS スペクトルを測定したところ、ESI Positive ではプロトン付加イオン $[M+H]^+$ 、(m/z 185)はほとんど検出されなかったが(図 4)、ESI Negative では脱プロトン化イオン $[M-H]^-$ 、(m/z 161)が観測されたので、モニターイオンとして使用することとした(図 5)。

3・2 LC 条件の検討

LC/MS による Lev, Gal, Man の分析法については、

表 2 LC/MS の測定条件

LC/MS : Waters Alliance e2695 / Xevo TQ-S micro	
(LC) カラム : SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm×150 mm ; 3.5 μ m, 200 Å)	
移動相 :	A ; 水 B ; アセトニトリル
0 → 0.5 min	A : B = 3 : 97
0.5 min	A : B = 10 : 90
0.5 → 10.0 min	B : 90 → 75
カラム流量 : 0.2 mL/min カラム温度 : 35 °C 試料注入量 : 10 μ L	
ポストカラム注入 : 0.05%アンモニア水溶液 5 μ L/min	
移動相条件の初期化 (流量 : 0.3 mL/min)	
0 → 5.0 min	A : B = 50 : 50
5.0 → 20.0 min	A : B = 3 : 97
(MS) キャピラリー電圧 : 2.8 kV モニターイオン : 表 1 参照	
コーン電圧 : 15 V	コリジョンエネルギー : 10 eV
イオン化法 : ESI(-)	測定モード : SRM
ソース温度 : 120 °C	デゾルベーション温度 : 500 °C
コーンガス : N ₂ 50 L/hr	デゾルベーションガス : N ₂ 1000 L/hr

既報^{3),4)}を参考にして、シリカ基材の HILIC 系カラムで LC 条件の検討を行った。LC の移動相条件をアイソクラティックからグラジエントに変更することにより、Man と Gal の 2 物質を定量できる程度に分離することが可能となった(図 6, 図 7)。

3・3 ポストカラム法¹⁾による高感度化

LC 条件の変更により Man, Gal の分離は可能となったが、水/アセトニトリルだけの移動相溶媒では 100

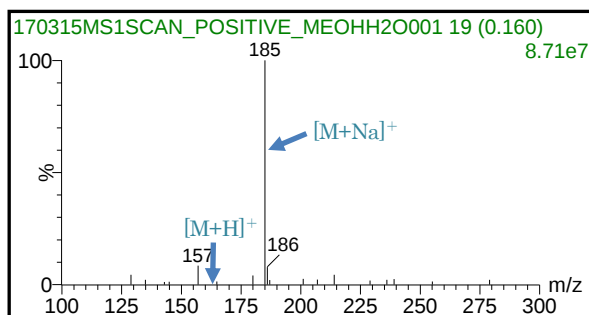


図 4 Lev のマスペクトル (ESI-Positive)

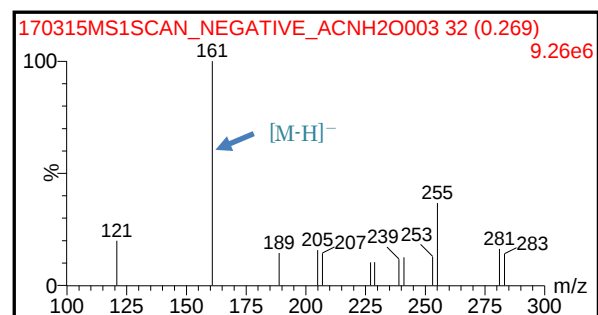


図 5 Lev のマスペクトル (ESI- Negative)

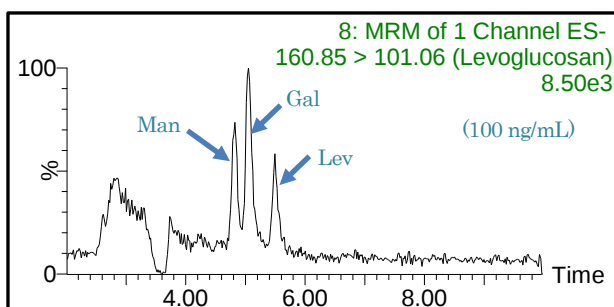


図 6 Lev, Gal, Man 標準液のクロマトグラム (アイソクラティック条件で測定)

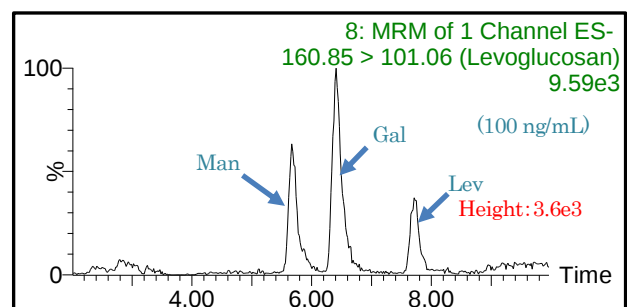


図 7 Lev, Gal, Man 標準液のクロマトグラム (グラジエント条件で測定)

ng/mL の Lev 標準液の検出感度が 3.6×10^3 程度と低かったため(図7, 表3), 対象化合物のイオン化促進を行う方法として, ポストカラム法により分離カラムの後にアンモニア水溶液を混和することを検討した。その結果, 移動相溶媒の流速 0.2 mL/min に対して 0.05%アンモニア水溶液を 5 μ L/min の流速で混和することにより, アンモニアの無い場合と比べ 30 倍程度の良好な感度(1.1×10^5)が得られた(図7, 8, 表3)。

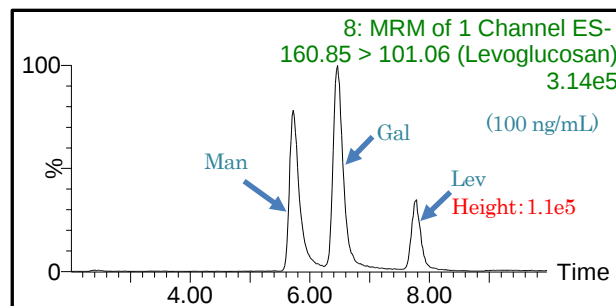


図8 Lev, Gal, Man 標準液のクロマトグラム
(グラジエント条件+ポストカラム法)

3・4 大気環境試料の測定結果

大気環境試料の分析フローを図9に, LC/MS による測定時のクロマトグラムを図10に示した。

LC/MS による測定時は, GC/MS による測定時に必要な対象物質の誘導体化の作業を省略して, 分取した試料の濃縮, 定容のみで, 試験液として供することが可能となった。

4 考察・まとめ

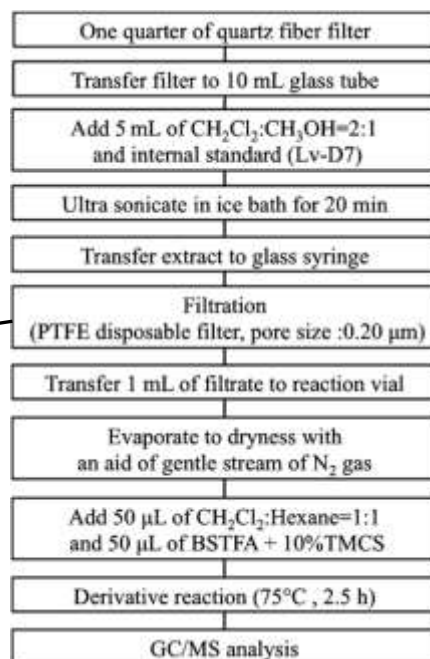
PM_{2.5} 中の有機化合物(Lev, Gal, Man)について LC/MS による分析法の検討を行った。LC 移動相のグラジエントとポストカラム法により良好な感度で対象化合物の分離分析を行うことが可能となった。また, 今回の LC/MS の測定における Lev の IDL 試料換算値は 0.59 ng/m³ であり, これまでに行っている GC/MS による分析時²⁾ の 0.67 ng/m³ と比べ同等以上の低い値となった。一方, 大気環境試料を分析したクロマトグラムでは夾雑物質のピークも認められるため, LC/MS 分析に適した抽出溶媒や濃縮倍率についての検討を行う必要があると考えられた。

表3 ポストカラム法による
検出感度の変化 (Peak Height)

	NH ₃ 無添加	NH ₃ 添加
Lev	3.6×10^3	1.1×10^5
Gal	9.6×10^3	3.1×10^5
Man	6.1×10^3	2.5×10^5
Lev-d ₇	2.4×10^3	8.6×10^4



< LC/MS による分析 >



< GC/MS による分析¹⁾ >

図9 大気環境試料の分析フロー

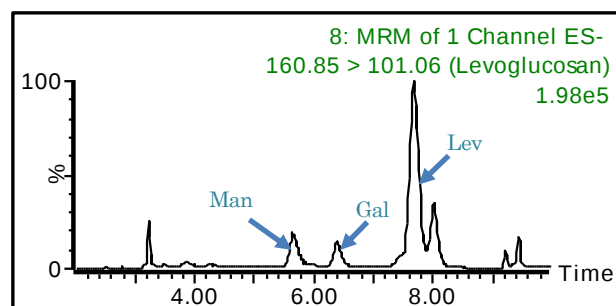


図10 大気環境試料のクロマトグラム

引用文献

- 1) 高速液体クロマトグラフィー通則. 日本工業規格 JIS K 0124(2011).
- 2) 市川有二郎, 井上智博, 大橋英明, 渡邊剛久, 石井克巳, 内藤季和: 2013年11月4日に東日本として初めて注意喚起が実施された千葉県の PM_{2.5} 高濃度エピソードの要因推定. 大気環境学会誌, 第50巻(第3号), 152-165(2015).
- 3) 小西千絵, 代田千秋, 宝輪勲, 倉重千恵子: 微小粒子状物質中レボグルコサンの LC-MS/MS を用いた分析法の検討. 第53回大気環境学会年会講演要旨集, 272 (2012).
- 4) 浅野勝佳, 菊谷有希, 浦西克維, 中西誠: PM_{2.5} 成分分析における LC/MS/MS を用いたレボグルコサン類の測定について. 第56回大気環境学会年会講演要旨集, 275 (2015).