

## 第 4 章 LC/MS に用いる MS 分析法

### 4.1 よりよいイオン化の技術

LC/MS のインターフェイスは LC 分離後の溶出液の気化、試料のイオン化、大気圧から質量分析系内の真空への移行という多様な役割を果たしている。LC の分離条件、試料、質量分析系の条件はこれらのインターフェイスの役割を妨げないようにしなければならない。本マニュアルはインターフェイスとして最近、主に用いられている大気圧化学イオン化法 (APCI)、エレクトロスプレー法 (ESI) そしてフリット FAB を取り上げている。各イオン化法の理論は 2 章に詳細を記した。本章ではそれぞれのイオン化法について LC 分離条件に対する制限、またイオン化効率を向上させるための工夫、さらにインターフェイスの条件がイオン化に与える影響について述べる。

#### 4.1.1 大気圧化学イオン化法 (APCI)

##### 4.1.1.1 LC 分離条件に対する制限

LC/MS の分析条件は LC の分離条件、MS 条件の双方を鑑みて、適切な条件を設定しなければならない。LC 分離の手法、アプリケーションについては 3 章で述べた。ここでは溶媒、pH 調整試薬、イオンペア剤の APCI/MS に与える影響について述べ、LC 分離のアプリケーションに対する制限について記す。

##### (1) 溶媒の種類

APCI は気相での化学反応によるイオン生成法であるので、イオン化に関しては溶媒の種類、性質による影響は ESI に比べて小さい。

一般的に用いられる溶媒はメタノール、アセトニトリル、水である。有機溶媒 100% あるいは水 100% を溶媒として用いることも可能である。とくにメタノール-水系、アセトニトリル-水系が広く使用されている。ESI と比較して使用できる溶媒の種類が多く、極性の低い溶媒でも使用可能である。

とくに使用すべきでない溶媒は高沸点、高粘度のものである。高沸点、高粘度な溶媒を用いると試料へのイオンキャリアーとなる溶媒分子の気化が進まず、試料のイオン化が起こり難くなる可能性がある。表 4.1.1-1 に LC に用いられる種々の溶媒の粘度と沸点をまとめた。一般的に水 (粘度 ; 1.00cp、沸点 ; 100 ) より、粘度、沸点が高い溶媒の使用は望ましくない。

また、詳細は後述するが、溶媒の気化を十分に進行させるために脱溶媒のための温度条件を溶媒の種類により変化させる必要がある。

表4.1.1-1 LCに用いる溶媒の粘度と沸点<sup>a</sup>

溶媒	粘度 <sup>b</sup> ( /mPas)	沸点 ( )
n-ペンタン	0.23	36
イソオクタン	0.5	99
ヘキサン	0.31	69
n-デカン	0.92	174
シクロヘキサン	1.0	81
シクロペンタン	0.47	50
二硫化炭素	0.37	46
四塩化炭素	0.97	77
p-キシレン	0.64	140
イソプロピルエーテル	0.37	68
トルエン	0.59	111
ベンゼン	0.65	80
エチルエーテル	0.23	35
クロロホルム	0.57	62
塩化メチレン	0.44	40
メチルイソブチルエーテル	0.54	118
テトラヒドロフラン	0.4	66
二塩化エチレン	0.79	57
メチルエチルケトン	0.4	80
アセトン	0.32	56
ジオキサン	1.54	107
酢酸エチル	0.45	77
酢酸メチル	0.37	57
ジメチルスルホキシド	2.24	189
アニリン	4.4	184
ジエチルアミン	0.38	56
ニトロメタン	0.67	101
アセトニトリル	0.37	82
ピリジン	0.94	116
イソプロパノール	2.39	82
n-プロパノール	2.2	97
メタノール	0.61	78
エタノール	1.19	64
エチレングリコール	19.9	198
酢酸	1.22	118
水	1.00	100

a 化学便覧 日本化学会編などを参考にした。

b 粘度は 20°C における値を示した。

## (2)pH 調整試薬の影響

3 章でも述べたように LC 分離条件において pH は重要なファクターである。移動相への様々な pH 調整試薬の添加が試料のよりよい分離を図るために用いられている。LC/APCI/MS への pH 調整試薬の影響、適用について以下に記す。

リン酸ナトリウムや酢酸ナトリウムなどの不揮発性の pH 調整試薬は LC/APCI-MS へ基本的に適用できない。これは、これらの pH 調整試薬がイオン導入口であるスキマーコーンや噴霧部に吸着し、析出することにより、目詰まりを生じさせ、イオンの生成、あるいは移動を妨げるためである。さらに不揮発性物質は沸点上昇効果を持ち、溶媒の沸点を上げ、溶媒のスムーズな気化に悪影響を与える恐れがあり、この点からも使用に適さない。

揮発性がある pH 調整試薬として LC によく使用されるアミン類は LC/APCI/MS 系中へ添加すると、そのイオン化効率が非常に高いために装置に対する汚染の影響が大きい。このため、その使用は避けるべきである。一方、ギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムといった揮発性の緩衝剤、トリフルオロ酢酸、水酸化アンモニウムなど揮発しやすい酸・塩基は使用が可能である。最も一般的に用いられているのは酢酸アンモニウムである。なお酢酸系の pH 調整試薬の使用は酢酸イオンと正に荷電した溶質との間での非極性錯体の形成によりカラム効率が低下することがあるので注意が必要である。また pH 調整試薬がマススペクトルに与える影響としては酢酸アンモニウムなどアンモニウム塩を用いた場合に  $[M+NH_4]^+$  イオンが検出されることが挙げられる。

表 4.1.1-2 pH 調整試薬の種類とその pH 域ならびに APCI-MS への適用性

試薬名	pH域	LC-APCI-MSへの適用性
<b>緩衝液</b>		
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KOH	2~11	不揮発性であり、不適正。
酢酸/酢酸ナトリウム	3~6	不揮発性であり、不適正。
酢酸/酢酸アンモニウム/NH <sub>4</sub> OH	5~9	使用可。
炭酸水素アンモニウム/炭酸アンモニウム/NH <sub>4</sub> OH	8~10	不揮発性であり、不適正。
炭酸水素ナトリウム/炭酸ナトリウム/NaOH	9~11	不揮発性であり、不適正。
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /Na <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /NaOH	7~11	不揮発性であり、不適正。
<b>酸・塩基・塩</b>		
<b>過塩素酸</b>		
トリフルオロ酢酸	1~2	使用可。濃度0.05%以下で使用。
クエン酸	2~6	使用可。
<b>リン酸</b>		
<b>酢酸</b>		
酢酸アンモニウム	4~6	使用可。
炭酸水素ナトリウム	6~7	使用可。
炭酸ナトリウム		不揮発性で使用不可。
水酸化アンモニウム		不揮発性で使用不可。
ジエチルアミン	8~10	使用可。
	4.4~6.4	使用可であるが、装置の汚染に注意。

APCI に使用が可能な pH 調整試薬の濃度の上限は一般的に 100mM 程度である。その濃

度が感度に大きな影響を与える場合もあるのでその適用には注意を要する。pH 調整試薬とその pH 域、さらに APCI/MS への適用の是非について表 4.1.1-2 にまとめる。

pH 調整試薬による感度の変化については 4.2.2 で述べる。

### (3)イオンペア剤

イオンペア剤は LC 分離にどうしても必要な時以外は LC/APCI/MS に使用しないほうが良い。イオンペア剤使用の問題点は pH 調整試薬と同様に噴霧部やスキマーにおける詰まりの要因となる点、イオン化した試料とイオンペア剤が二次的に反応し、試料イオンを中性化することがある点が挙げられる。また分析系に吸着しやすいイオンペア剤はバックグラウンドの原因となりやすい点にも留意すべきである。

イオンペア剤の LC/APCI-MS への適用はあまり例がない。イオンペア剤としてはテトラブチルアンモニウムオキサイドのような揮発性の塩が APCI-MS に適用可能であると考えられる。主なイオンペア剤とその分子量、LC/APCI-MS への適用について表 4.1.1-3 にまとめた。

表 4.1.1-3 イオンペア剤の種類、構造式、分子量ならびに LC-APCI-MS への適用性

試薬名	構造式	分子量	LC-APCI-MSへの適用性
<b>塩基性試料用</b>			
1-プロパンスルホン酸ナトリウム	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$	146.14	不揮発性のため適さず。
1-ブタンスルホン酸ナトリウム	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	160.16	不揮発性のため適さず。
1-ペンタンスルホン酸ナトリウム	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na}$	174.19	不揮発性のため適さず。
1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{SO}_3\text{Na}$	188.22	不揮発性のため適さず。
1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{SO}_3\text{Na}$	202.24	不揮発性のため適さず。
<b>酸性試料用</b>			
トリヘキシルアミン	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5]_3\text{N}$	269.15	装置汚染の影響が大きく適さず。
トリヘプチルアミン	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6]_3\text{N}$	311.6	装置汚染の影響が大きく適さず。
トリオクチルアミン	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7]_3\text{N}$	353.67	装置汚染の影響が大きく適さず。
水酸化テトラエチルアンモニウム	$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4\text{NOH}$	147.26	使用に適している。
水酸化テトラブチルアンモニウム	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_4\text{NOH}$	259.47	使用に適している。

#### 4.1.1.2 イオン化効率の向上

APCI/MS による測定においてイオン化効率の向上は直接、感度の向上につながる。測定したい分子の性質をふまえ、できるだけイオン化効率のよい分析条件を設定することが微量分析には重要である。

質量分析条件の探索の第一歩はポジティブモードかネガティブモードかの選択である。ポジティブモードとネガティブモードは機器的に変換でき、簡単に実測することが可能であるが、ここではどちらを選択すればいいかの目安の付け方を述べる。次に、よりよくイオン化が進行するような溶媒の選択、条件さらにポストカラムの使用法について記す。

#### (1) ポジティブモードかネガティブモードかの選択

APCI は基本的に気相でのイオン分子反応による化学イオン化法を利用している。このため、プロトン移動反応に代表される化学反応についての知見が必要である。最初にポジティブモードで起こる正イオンの移動反応について述べる。

APCI のポジティブモードで最も一般的に見られるのは次式のようなプロトン移動反応である。



この反応が発熱性 ( $G < 0$ ) であるならば、反応は拡散律速支配となり、大きな反応速度係数が期待できる。すなわち、反応効率がよく、イオン化が進行しやすくなり、高感度な検出が可能となると考えられる。

この反応のエンタルピー変化は分子 A, B のプロトン親和性の差により与えられる。すなわち、A のプロトン親和力よりも B のプロトン親和力が大きければ、 $\text{AH}^+$  から B へのプロトン移動が起こり、 $\text{BH}^+$  が得られる。APCI では使用する溶媒から生成するイオンがこの式の  $\text{AH}^+$ 、すなわち反応イオンとなる。例えば移動相にメタノールを含む溶媒系では主に  $(\text{CH}_3\text{OH})\text{H}^+$  がこの反応イオンとなる。 ( $(\text{CH}_3\text{OH})_2\text{H}^+$  が反応イオンとなることもある。) このとき、メタノールのプロトン親和力は  $182.1\text{kcal/mol}$  であるので、イオン化したい物質のプロトン親和力はこれより大きくなければいけない。

分析の対象物質のプロトン親和力が分かっている場合は希である。例えば含酸素、硫黄化合物などのプロトン親和力は水 ( $1648\text{kcal/mol}$ ) とアンモニア ( $202.3\text{kcal/mol}$ ) の中間くらいであり、含窒素化合物のプロトン親和力はアンモニアより大きい。付録に様々な物質のプロトン親和力、電子親和力のデータ検索法を掲載した。

一方、ネガティブイオンモードでは



というプロトン移動反応が一般的である。このプロトン移動反応のエンタルピー変化は分子 BH の酸性度、あるいは結合解離エネルギーと  $\text{A}^-$  のプロトン親和力の差による。エネルギー的には溶媒分子イオン  $\text{A}^-$  のプロトン親和力と試料 BH の酸性度を見ることにより、その感度は予想できる。すなわち、溶媒分子イオン  $\text{A}^-$  のプロトン親和力が大きいほど、また BH の酸性度が高いほど、感度はよくなると考えられる。

分析の対象物質がプロトンを付加したり、あるいは放出したりするにはプロトンを授受しうる置換基の存在が重要なファクターとなる。窒素などの非共有電子対を有する原子が

らなる置換基はプロトン付加しやすく、すなわちポジティブモードで感度がよく、一方、水酸基やカルボキシル基は脱プロトン化しやすいので、ネガティブモードで感度がいい。

例えばアミノ基を有する農薬 Linuron や Diuron は APCI のポジティブモードでプロトン付加したマススペクトルが観測できる (図 4.1.1-1、図 4.1.1-2)。またエストラジオールと p-tert-ブチル安息香酸(図 4.1.1-3、図 4.1.1-4)ではそれぞれネガティブモードでプロトンの脱離したマススペクトルが得られた。なおフラーレン(C<sub>60</sub>)はプロトン授受に關与するような置換基を有さないが、APCI のポジティブイオンモードで検出できることが知られている。

Linuron (200µg/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ; 4.0µA  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 positive mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5ml/min  
 Fragmentor voltage ; 80V  
 Injection volume ; 5µl  
 Instrument ; HP1100MSD

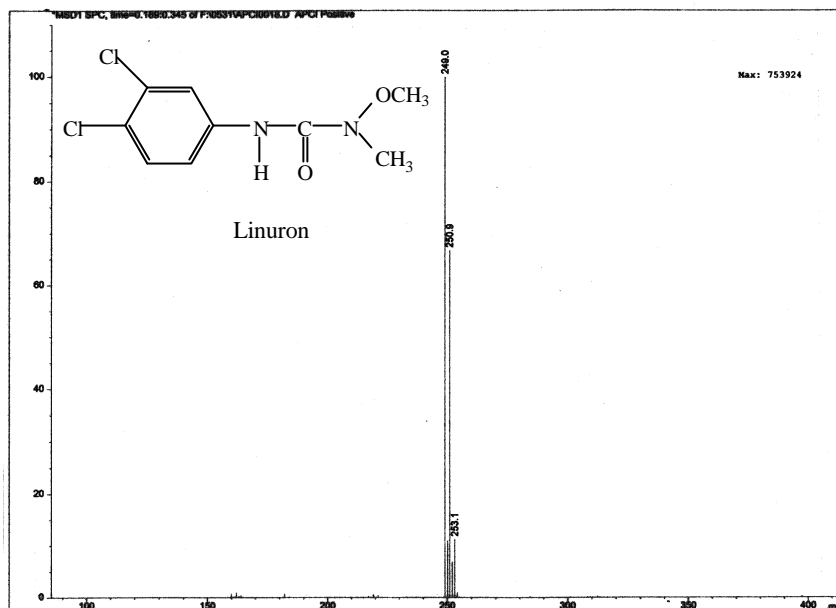
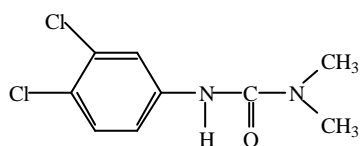


図 4.1.1-1 Linuron の APCI-MS スペクトル



Diuron

Diuron (50µg/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ; 4.0µA  
 Drying gas temp. ; 350  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Vaporizer temp.; 473  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 positive mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5ml/min  
 Fragmentor voltage ; 50V  
 Injection volume ; 5µl  
 Instrument ; HP1100MSD

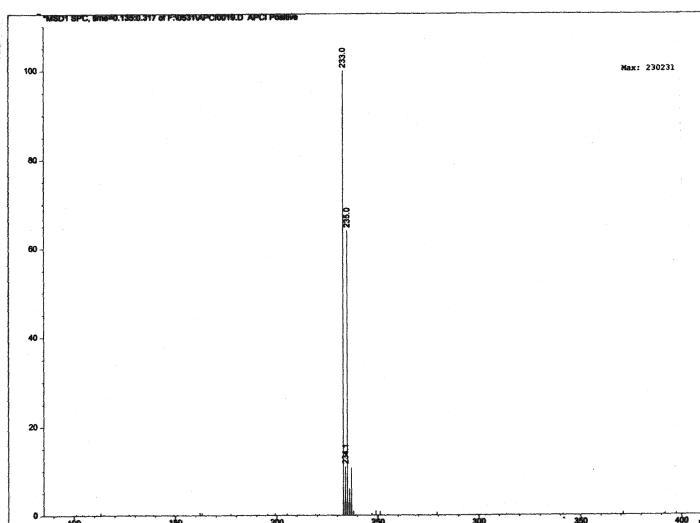
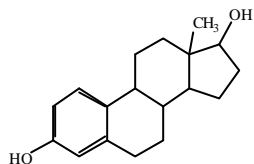
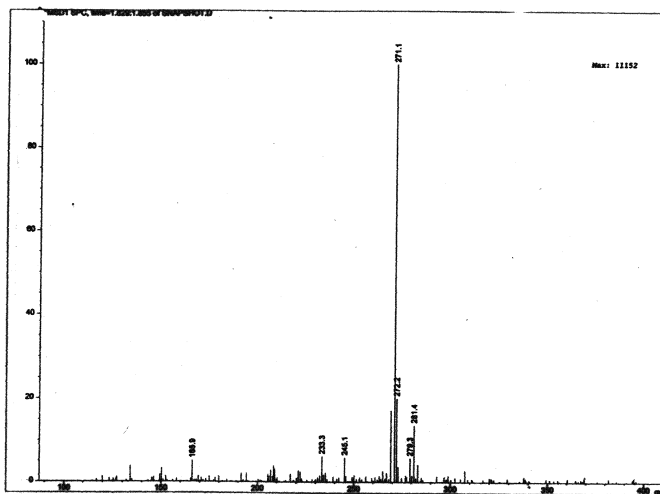


図 4.1.1-2 Diuron の APCI-MS スペクトル

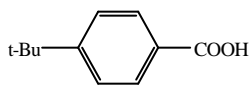


17β-Estradiol

17β-estradiol (2.0μg/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ;4.0μA  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Fragmentor voltage ;150V  
 Injection volume ; 5μl  
 Instrument ; HP1100MSD

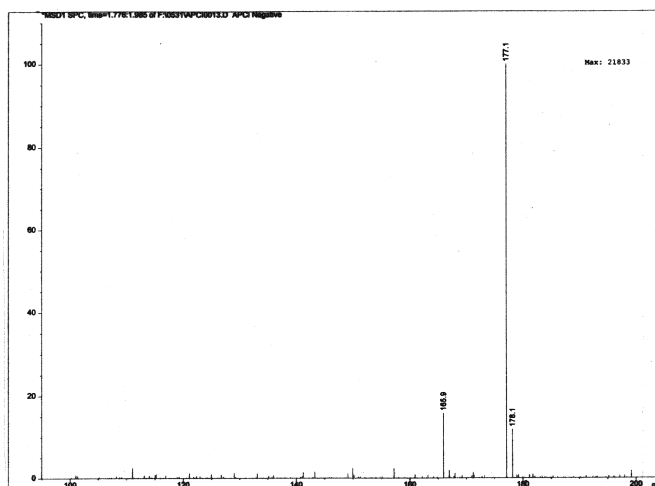


☒ 4.1.1-3 17b-estradiol の APCI-MS スペクトル



4-t-Butylbenzoic acid

p-t-Butylbenzoic acid (5.0μg/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ;4.0μA  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Fragmentor voltage ;70V  
 Injection volume ; 5μl  
 Instrument ; HP1100MSD



☒ 4.1.1-4 p-t-Butylbenzoic acid の APCI-MS スペクトル

## (2) 溶媒の選択と検出感度

APCI は分析対象物質の気相における反応に基づいているので、ESI と比較して、溶媒の種類および pH が感度に与える影響は小さい。留意点としては酸性条件の pH 調整試薬として LC-MS で一般的に用いられるトリフルオロ酢酸が正イオンとの相互作用により、分析物の測定感度を下げる可能性があることが挙げられる。このような作用を防ぐためにトリフルオロ酢酸の移動相中の濃度は 0.05% 以下で使用したほうがいい。同様の理由で酢酸は 1% 以下の濃度で使用すべきである。

図 4.1.1-5 は種々のクロロフェノール類について pH を 4-10 の範囲で変化させ、フローインジェクション法により、APCI/MS の感度の変化を示したものである。pH の調整はトリフルオロ酢酸と水酸化アンモニウムにより行った。測定条件は表 4.1.1-4 に示した。この pH 領域では殆ど感度の変化がないことが分かる。

表 4.1.1-4 クロロフェノール類の APCI/MS 条件

機種	Hitachi M-1200 AP/ES
キャリアー流量	1.0ml/min
スキャン範囲	100-400
スキャン速度	50amu/sec
ドリフト電圧	70V
マルチプライヤー電圧	1,800V
ニードル電圧	3,000V
フォーカス電圧	90V
分解能	48
霧化部温度	180
脱溶媒室温度	400
第一細孔温度	120
試料注入量	20ml

APCI は ESI と比較して、プロトン以外のイオンが付加する擬分子イオンが観測されることはまれである。しかし、アンモニウム共存条件で  $[M+NH_4]^+$  が観測されることがある。定量イオン選択の際、これらの付加反応にも注意したい。しかし、ESI でしばしば観測されるナトリウム付加イオンはほとんど観測されない。ナトリウムイオンと安定な錯体を形成するジベンゾ 18-クラウン-6-エーテルは ESI ではナトリウム付加イオンが観測されるが、APCI ではプロトン付加体、 $H_2O^+$  付加体のピークが得られたのみで、ナトリウム付加イオンは見られなかった (図 4.1.1-6)。



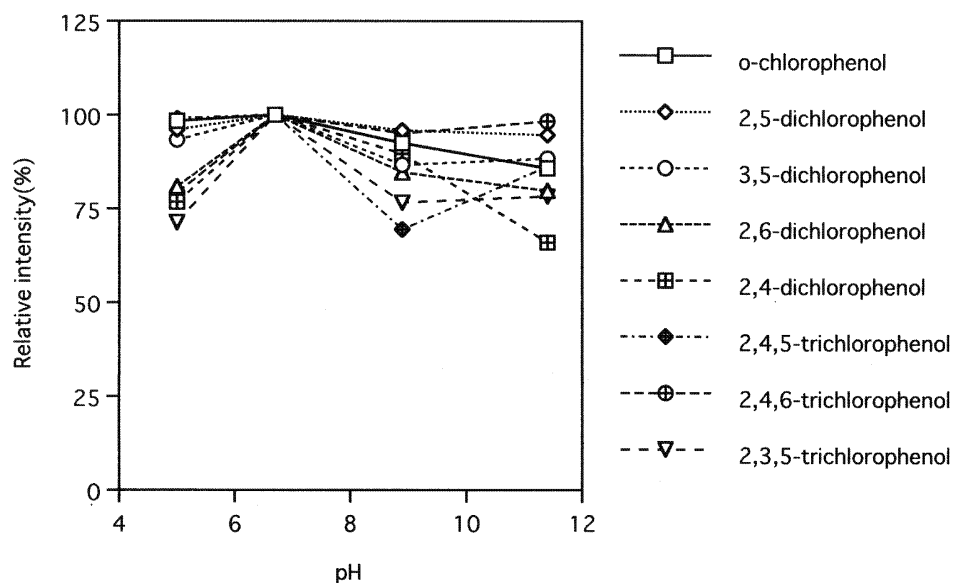


図 4.1.1-5 種々のクロロフェノールの pH による感度変化

Dibenzo-18-crown-6-ether  
 (5.0 $\mu$ g/ml)  
 Scan ; 100-400  
 Cap. Vol. ; 3500V  
 Corona current ; 4.0 $\mu$ A  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp. ; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 positive mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Fragmentor voltage ; 50V  
 Injection volume ; 5 $\mu$ l  
 Instrument ; HP1100MSD

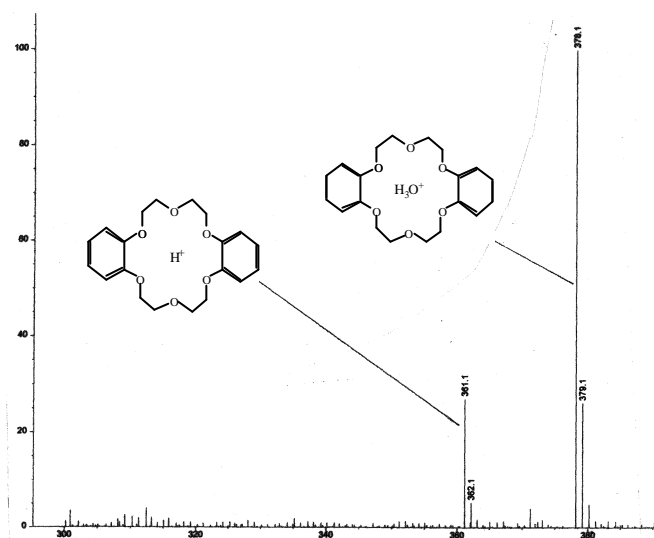


図 4.1.1-6 Dibenzo-18-crown-6-ether の APCI-MS スペクトル

### (3)ポストカラム

LC 分離の移動相条件のままではイオン化が充分、進行せず、感度を得られない場合、カラム分離後、添加剤を含んだ溶媒を加え、MS による検出を効率的にするポストカラム法が用いられる。液相での試料イオン化反応があまり影響しない APCI では ESI と比較し、ポストカラム法の導入例は少ない。

#### 4.1.1.3 イオン化条件の最適化

##### (1)移動相の流量

APCI は気体となった溶媒分子へのコロナ放電が測定対象物質のイオン化について最初の反応となる。すなわち、流量が大きいほどイオン化された溶媒分子が増え、感度が増す傾向がある。しかし、溶媒は気化すると体積が膨張し、MS の真空度に影響を与えてしまう。MS の真空を保つために LC からの溶媒の流量は制限される。機器の発達により数 ml/min の大流量が可能な技術も報告されているが、一般的に流量としては 0.1-1.0ml/min の範囲で使用されている。実際、LC/APCI/MS の測定例を見ると、1.0ml/min の流量で行われているものが多い。

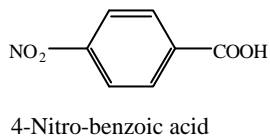
##### (2)ドリフト電圧

インターフェイスにおいて生成したイオンを質量分析部に導入するために印加する電圧をドリフト電圧という。なおドリフト電圧は機種によりフラグメンター電圧、エクストラクト電圧、コーン電圧などと呼ばれることもある。ドリフト電圧を高くすることにより、インターフェイスにある窒素原子とイオンの衝突が激しくなり、イオンのフラグメンテーションが進む。これを CID(collision induced dissociation)と呼ぶ。CID によりフラグメントイオンが検出でき、物質の定性あるいは構造の推定に役立つ。一方、SIM モードで擬分子イオンを選択する場合には CID の起きにくい条件のドリフト電圧を選択するほうがいい。ドリフト電圧が低すぎると質量分析部へのイオンの導入量が減少し、感度の低下につながる。このため、各分析物質についてドリフト電圧を変化させ、最も感度がよくなるドリフト電圧を選択する操作が必要となる。

例えば 4-ニトロ安息香酸についてはネガティブモード、ドリフト電圧 50V で、プロトン脱離したピーク 166 が唯一のピークとして得られる。(図 4.1.1-7)しかし、ドリフト電圧を 90V と上げるとカルボキシル基が切れるフラグメンテーションが進み、166 のピーク強度は下がり、フラグメントイオンの 122 のピークが得られてくる(図 4.1.1-8)。

また分析対象物質の分子量もドリフト電圧の選択に大きく影響する。分子量が 972 と比較的高分子量である  $\alpha$ -シクロデキストリンはドリフト電圧 100V 以下では分子イオンピークは観測されず、最適ドリフト電圧は 150V であった(図 4.1.1-9)。これは 100V 以下で

はシクロデキストリンの脱プロトンしたイオンを引き抜くエネルギーが不十分なためであると考えられる。



4-Nitrobenzoic acid (5.0 $\mu$ g/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ; 4.0 $\mu$ A  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Injection volume ; 5 $\mu$ l  
 Instrument ; HP1100MSD

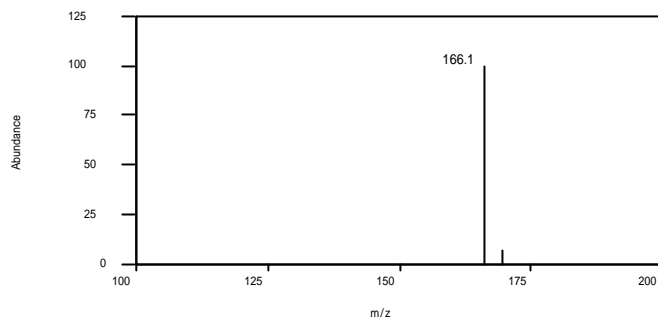


図4.1.1-7 4-Nitrobenzoic acidのAPCI-MSスペクトル (Fragmentor voltage ; 50V)

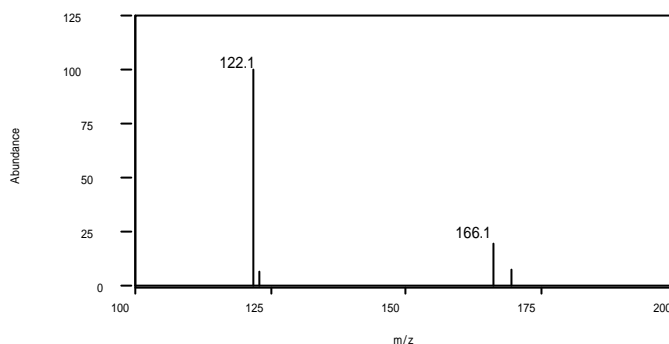


図4.1.1-8 4-Nitrobenzoic acidのAPCI-MSスペクトル (Fragmentor voltage ; 90V)

$\alpha$ -Cyclodextrin (1000 $\mu$ g/ml)  
 Scan ;300-1000  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ; 4.0 $\mu$ A  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Fragmentor voltage ;150V  
 Injection volume ; 5 $\mu$ l  
 Instrument ; HP1100MSD

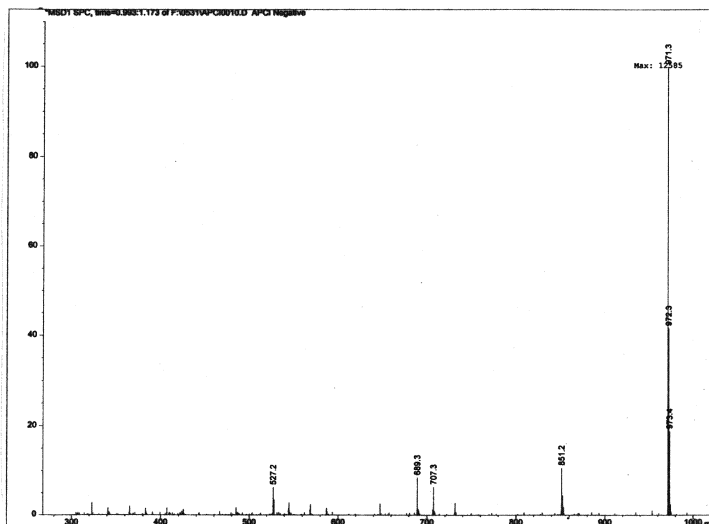


図 4.1.1-9  $\alpha$ -Cyclodextrin の APCI-MS スペクトル

### (3)ニードル電圧

APCI はニードル電極に高電圧をかけ、気化した溶媒分子とニードル電極間のコロナ放電を経てイオン化反応を起こす。したがってニードル電極には適当な高電圧が必要となる。一般的にポジティブモードでは 3000 ~ 4000V、ネガティブモードでは-2500 ~ -3500V 程度のニードル電圧で使用する。とくに特殊な手法を用いない限りはそれぞれ 3000V, -2500V とニードル電圧を固定して測定すればいい。

### (4)温度条件

APCI は溶媒の気化、除去のために温度をインターフェイスでかける必要がある。溶媒の気化が十分に起こらなければ APCI のイオン化効率は低くなる。したがって溶媒組成により十分な気化が起こるインターフェイス温度を設定しなければならない。図 4.1.1-10 にメタノール/水系溶媒組成比とその適切なインターフェイスの温度の関係を一例として示した。

基本的に温度を上げるほど、溶媒の気化が起こり、イオン化が効率よく進みやすくなるが、同時に試料の熱分解反応が起こりやすくなる。とくに熱分解性の試料を分析する場合は移動相の溶媒の気化と測定対象物質の熱分解性という二つの観点からインターフェイスの温度を選択する必要がある。

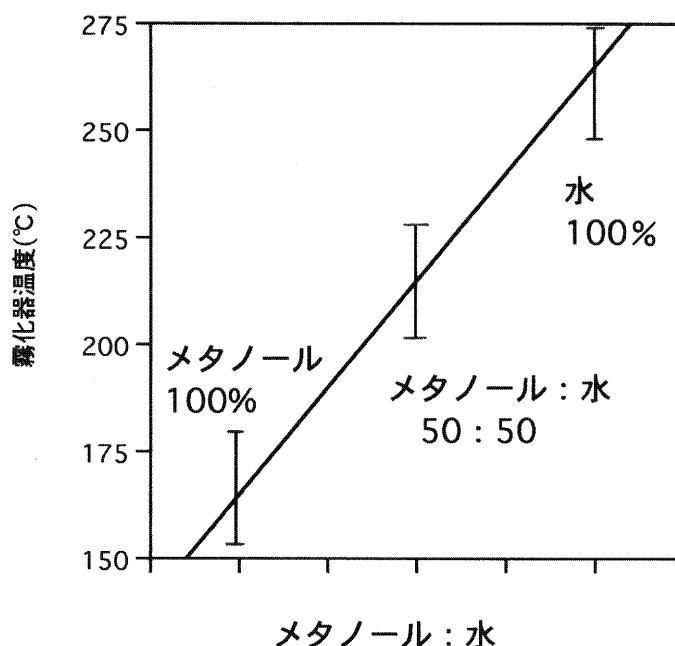


図4.1.1-10 移動相流量1ml/minにおける移動相の溶媒組成と霧化器の最適温度の関係

#### (5)LC/APCI-MS 条件設定のための手順

LC/APCI-MS の条件は LC 分離条件と APCI-MS 条件の双方について最適となるバランスが取れたものにしなければならない。以下にその一般的な手順を記す。物質により LC 分離、MS の感度に大きな差が出るので分析したい物質毎にこの操作を行うことが必要である。

##### フローインジェクションによる測定

- 溶媒はメタノール:水=1:1 あるいはアセトニトリル:水=1:1 で行う。
- 数  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度の試料溶液を用い、SCAN でマススペクトルを得る。
- ネガティブモードかポジティブモードかの選択する。
- ドリフト電圧の最適値の探査する。

##### LC 分離条件の検討

- 溶媒の種類、グラジエント、カラム温度などを考慮し、適切な分離条件を見つける。
- 分離できない場合は揮発性 pH 調整試薬やイオンペア剤の利用を考える。

##### インターフェイス温度の最適化

- 移動相の水分量など溶媒組成からその沸点の高低を判断し、さらに、分析物の熱安定性を考慮に入れ、インターフェイス温度を決める。

##### LC-APCI-MS 測定 (SCAN SIM)

#### 4.1.1.4 APCI/MS スペクトルの例

図 4.1.1-11 ~ 図 4.1.1-15 に外因性内分泌かく乱化学物質として挙げられている化合物(ポリクロロビフェニルオール、2,4-ジクロロフェノール、ビスフェノール A、ジエチルstilbestrol)の APCI/MS スペクトルを示す。これらの化合物はいずれも水酸基を持ち、ネガティブモードで測定したところ M-H アニオンのピークが得られた。これらの化合物は ESI のネガティブモードでも検出可能である。

2',3,3',4',5-pentachloro-4-biphenylol(10 $\mu\text{g/ml}$ )  
Scan ;100-450  
Cap. Vol .; 3500V  
Corona current ; 4.0 $\mu\text{A}$   
Drying gas temp. ; 350  
Vaporizer temp.; 473  
Drying gas flow ; 6.0 l/min  
Neb. Pressure ; 60psig  
negative mode  
Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
Flow rate ; 0.5 ml/min  
Fragmentor voltage ; 130V  
Injection volume ; 5 $\mu\text{l}$   
Instrument ; HP1100MSD

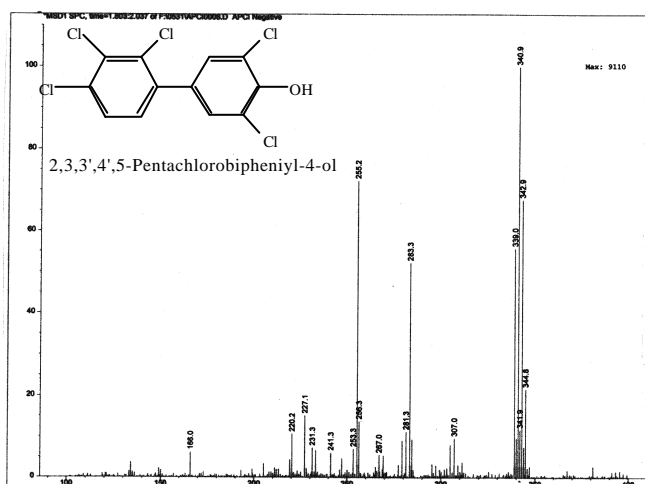


図 4.1.1-11 2',3,3',4',5-pentachloro-4-biphenylol の APCI-MS スペクトル

2,2',3,4',5,5',6-heptachloro-4-biphenylol (10 $\mu$ g/ml)  
 Scan ;100-450  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ; 4.0 $\mu$ A  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Fragmentor voltage ;130V  
 Injection volume ; 5 $\mu$ l  
 Instrument ; HP1100MSD

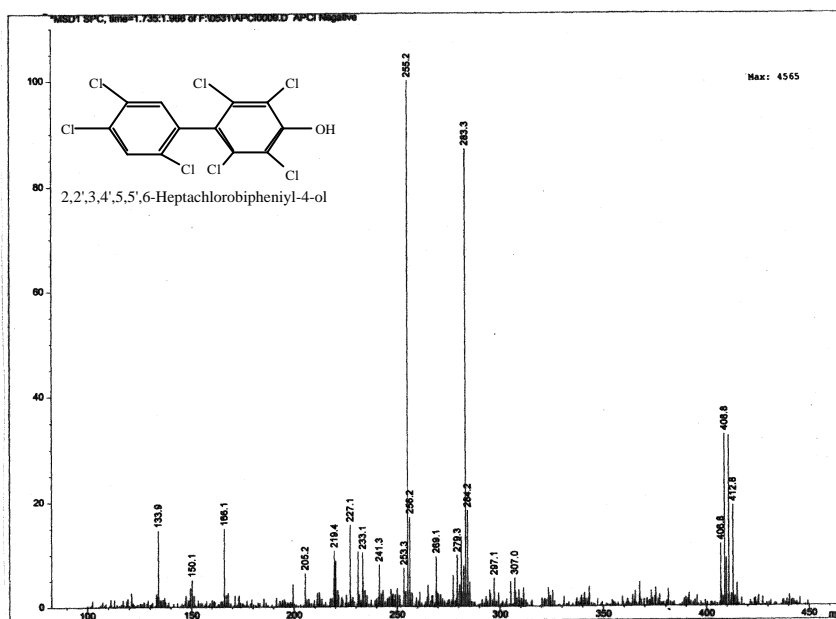


図 4.1.1-12 2,2',3,4',5,5',6-heptachloro-4-biphenylol の APCI-MS スペクトル

2,4-Dichlorophenol (5.0 $\mu$ g/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ; 4.0 $\mu$ A  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Fragmentor voltage ;90V  
 Injection volume ; 5 $\mu$ l  
 Instrument ; HP1100MSD

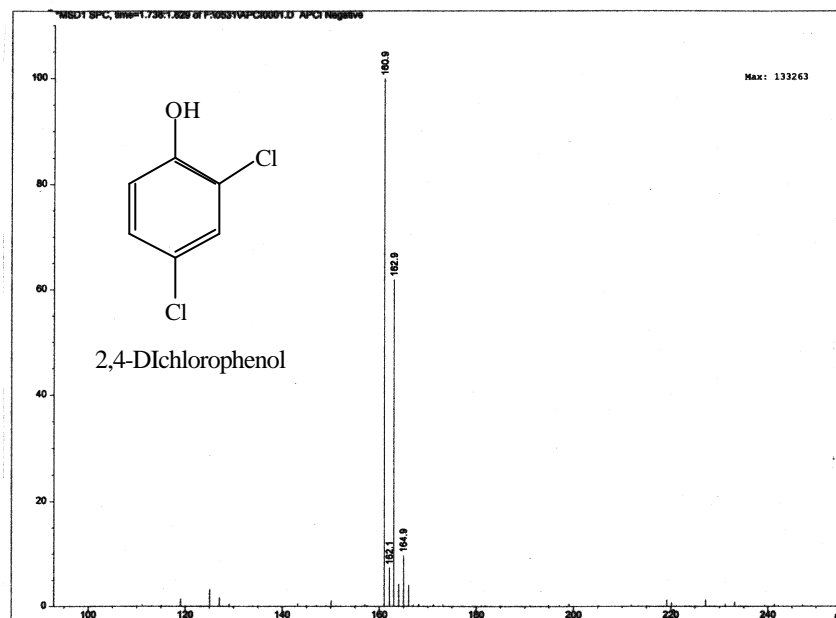


図 4.1.1-13 2,4-Dichlorophenol の APCI-MS スペクトル

Bisphenol A (5.0 $\mu$ g/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol ; 3500V  
 Corona current ; 4.0 $\mu$ A  
 Drying gas temp. ;  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0  
 Neb. Pressure ;  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeO :H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5  
 Fragmentor  
 Injection volume  $\mu$ l  
 Instrument ;

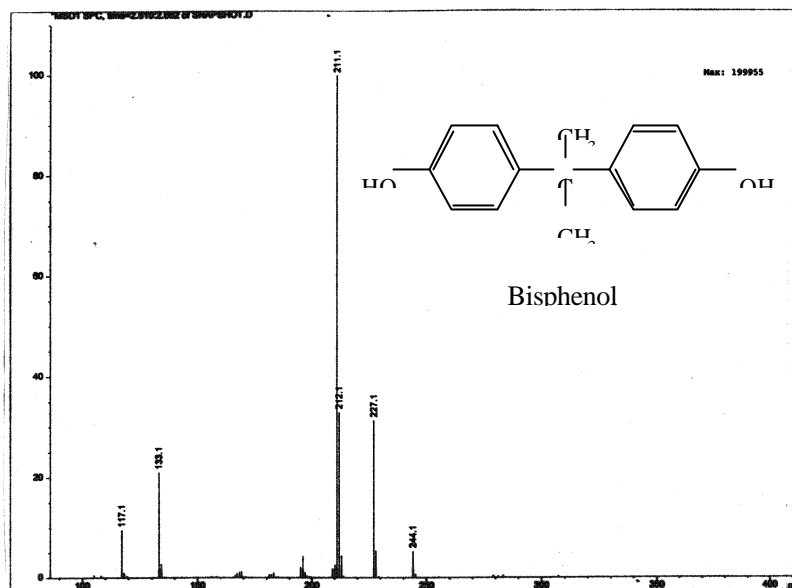


図 4.1.1-14 Bisphenol A の APCI-MS スペクトル

Diethylstilbestrol (10 $\mu$ g/ml)  
 Scan ;100-400  
 Cap.Vol .; 3500V  
 Corona current ; 4.0 $\mu$ A  
 Drying gas temp. ; 350  
 Vaporizer temp.; 473  
 Drying gas flow ; 6.0 l/min  
 Neb. Pressure ; 60psig  
 negative mode  
 Mobile phase ; MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1  
 Flow rate ; 0.5 ml/min  
 Fragmentor voltage ;130V  
 Injection volume ; 5 $\mu$ l  
 Instrument ; HP1100MSD

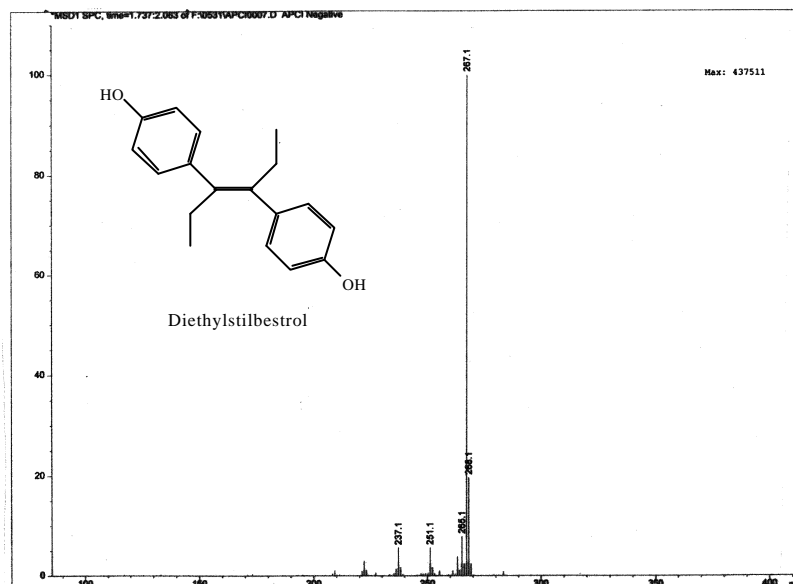


図 4.1.1-15 Diethylstilbestrol の APCI-MS スペクトル

#### 4.1.2 エレクトロスプレー(ESI)法

ESI 法は、静電噴霧現象を利用して、溶液中に存在するイオンを、そのまま気相中のイオンとして取り出す方法である。従って、ESI ではキャピラリー先端からの帯電液滴の生成効率は、キャピラリー先端の大きさと電界強度、移動相の流量、電気伝導度や表面張力に代表される噴霧溶媒の性質などに大きく依存する。

この章では、LC 条件の LC/MS/ESI 法へ適用する場合の留意点、主に移動相及び移動相の pH 調整等について述べ、さらにイオン化効率を向上させるためのインターフェース及び MS に関する技術等、分析条件最適化について記述する。

##### 4.1.2.1 溶媒の選択

ESI では、帯電した液滴を生成させること、そして溶媒を蒸発させることによって液滴を分裂させ、さらに微少な高い電荷を持った液滴が生成されることが望まれる。従って、溶媒は気化し易く、かつ表面張力が小さく、粘性が低いことが要求される。ESI に適していると考えられている一般的な溶媒を表 4.1.2-1 に示す。

表 4.1.2-1 ESI に適する溶媒

溶 媒	粘 性 率 <sup>*1</sup> cP	表面張力 <sup>*1</sup> Nm <sup>-1</sup>	沸 点
水	1.0	0.073	100
メタノール	0.61	0.022	78
アセトニトリル	0.37	0.029	82
エタノール	1.19	0.022	64
プロパノール	2.20	0.024	97
イソプロパノール	2.39	0.021	82
ブタノール	2.95	0.025	83
アセトン	0.32	0.024	56
ギ酸	1.80	0.038	101
酢酸	1.22	0.028	118
ジクロロメタン	0.44	0.028	40
ジメチルスルホキシド(DMSO) <sup>*2</sup>	2.24	0.043	189

\*1：20 での値

\*2：使用するときには 10%以下での使用が望ましい。



表 4.1.2-1 の中で、特に表面張力の大きい水は、気化熱も大きく、また溶媒和が強いので擬分子イオンの生成を抑制するため、その比率を大きくしない方がよい。

電気伝導度の高いトリフルオロ酢酸や、イオンが生成しないトルエンその他ベンゼン、四塩化炭素、ヘキサン、クロロホルム、二硫化炭素、シクロヘキサン及び芳香族炭化水素類等は ESI には適当でないと言われている溶媒である。

#### 4.1.2.2 pH 調整試薬

イオン解離性物質について LC での最適な分離を得るためには pH 調整を必要とする場合が多い。このような場合 LC では、ほとんどがリン酸ナトリウムや酢酸ナトリウムなど無機塩の緩衝液を使用している。これらは不揮発性の物質であり、3.2.3 でも記述したように LC/MS では特にインターフェース部での流路系の目詰まりを起こすことになる。さらに不揮発性のため脱溶媒に過剰のエネルギーを必要とし溶質分子のより微細な液滴の生成を妨げることになる。また、イオン化効率の低下及びイオン強度が減少することによる感度低下の原因につながる。

表 4.1.2-2 メタノール

/ 酢酸アンモニウム系	
m / z	イオン
50	CH <sub>3</sub> OH · NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
68	CH <sub>3</sub> OH · H <sub>2</sub> O · NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
82	(CH <sub>3</sub> OH) <sub>2</sub> · NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

表 4.1.2-3 水 / 酢酸アンモニウム系

m / z	イオン
35	NH <sub>3</sub> · NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
36	H <sub>2</sub> O · NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
54	(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> · NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
77	(CH <sub>3</sub> COOH · NH <sub>3</sub> · NH <sub>4</sub> -18) <sup>+</sup>
78	CH <sub>3</sub> COOH · NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

Negative では、(CH<sub>3</sub>COOH)<sub>2</sub>-H<sup>-</sup> : 119

CH<sub>3</sub>COOH · H<sub>2</sub>O-H<sup>-</sup> : 77

表 4.1.2-4 アセトニトリル / 酢酸アンモニウム系

m / z	イオン
41	CH <sub>3</sub> CN <sup>+</sup>
59	CH <sub>3</sub> CN NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
77	CH <sub>3</sub> CN H <sub>2</sub> O NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
100	(CH <sub>3</sub> CN) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

従って、ESI では揮発性物質を使用する必要がある。使用可能な pH 調整試薬は前項 3.2.3 移動相の pH 調整の項の表 3.2.3-2 の上段に示す揮発性試薬であり、一般的によく使われている緩衝液は、酢酸、酢酸アンモニウム及びギ酸等である。

ただし、酢酸アンモニウムを使用した場合には、試料イオンにアンモニウムイオンが付加したイオンを形成し、そのため擬分子イオンのピーク強度が低下することがある。また、酢酸アンモニウムはアセトニトリルには溶解し難いので、移動相にアセトニトリルを使用する時は注意する。

表 4.1.2-2～表 4.1.2-4 に酢酸アンモニウム等アンモニウム塩を使用した場合にマススペクトルとして現われるイオンを示す。pH 調整試薬の濃度は、特に ESI の場合は、イオン化効率に影響を及ぼすので低濃度(10mM 程度)での使用が適当である。

#### 4.1.2.3 イオンペア(IPC)剤

IPC 剤が、強酸性及び強塩基性物質の分析に用いられることは、3.2.4 IPC 試薬の項で述べた。IPC 試薬の使用についても pH 調整試薬の場合と同様の問題がある。不揮発性の物質は噴霧部やスキマー部の目詰まりの原因となり、また、気相での微細な液滴の生成時に目的イオンと二次的反応を起こし目的イオンを中性化し、ESI で要求される帯電した液滴の生成を妨げることになる。

IPC 試薬を使用する場合は、表 3.2.3-4 及び表 3.2.3-5 を参考に揮発性のものを選択する。LC 分析で一般的に使用されている揮発性の IPC 試薬は、トリエチルアミンやヘキサフルオル酪酸及び水酸化テトラブチルアンモニウムなどであり、これらは、LC/MS でも使用可能である。但し、アミン系の試薬は分析部の流路系に吸着し易くバックグラウンドの原因になる。

ところで、LC/MS で IPC 試薬を用いた実際の分析例はほとんど報告されていないのが現状である。

#### 4.1.2.4 イオン化の向上

ESI 法は、静電噴霧現象を利用してイオン化する方法であることはすでに述べた。ESI キャピラリー先端からの帯電液滴の生成効率及びイオン化に影響する重要な点として、そのメカニズムから主に、次のようなことが考えられる。

ESI インターフェースのキャピラリー先端における帯電した液滴の生成

帯電した液滴の微細化

クーロン力の反発による液滴の分裂

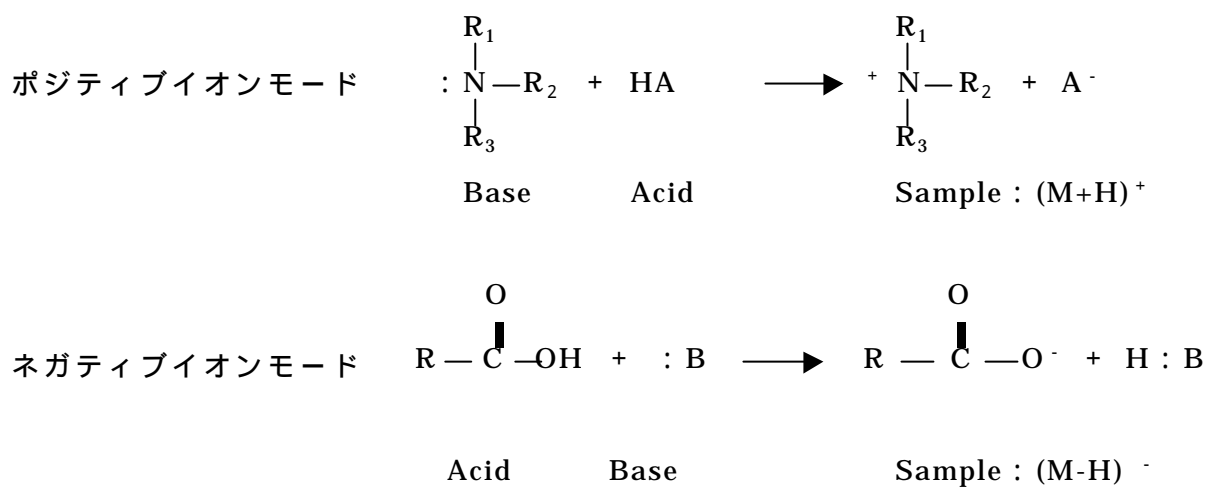
上記 ～ に影響を与える要因には、移動相溶媒と流量、噴霧ガス流量及び脱溶媒を伴ったイオンの脱離やイオン収束のために印可する電圧などである。

この項では、主にこれらの要因を最適化する方法などについて記述する。

##### (1)正あるいは負イオンモードの選択

ESI 法によるイオン化はソフトなイオン化であり、イオン性及びプロトン親和性の高い化合物をイオン化し、正(ポジティブ)あるいは負(ネガティブ)イオンの分子量情報を示すスペクトルが得られる。正あるいは負イオンのどちらのモードを選択するかは各々物質によって異なり、また、得られる感度にも大きな違いがみられる。

従って、モードの選択は重要である。一般に塩基性の強い N 原子等を含む化合物は、正イオンモードの測定で (M+H)<sup>+</sup> イオンを、カルボン酸やスルホン酸などは、負イオンモードの測定で (M-H)<sup>-</sup> イオンが得られる。図 4.1.2-1 に置換基によるイオン化モードの選択例を示す。



## (2) 溶媒の選択

キャピラリー先端における帯電した液滴の生成効率は、キャピラリー先端の大きさと電界強度及び ESI で生成される帯電液滴の大きさ(半径)は溶媒の密度、流量及び表面張力と正の関係にあるということから、移動相の流量(流速)、電気伝導度や表面張力に代表される噴霧する溶媒の性質などに依存する。

通常、ESI インターフェース部のキャピラリー先端は、±3 ~ 5kV 程度の高電圧が印可されていることが適当とされ、キャピラリーは外形約 0.2mm、

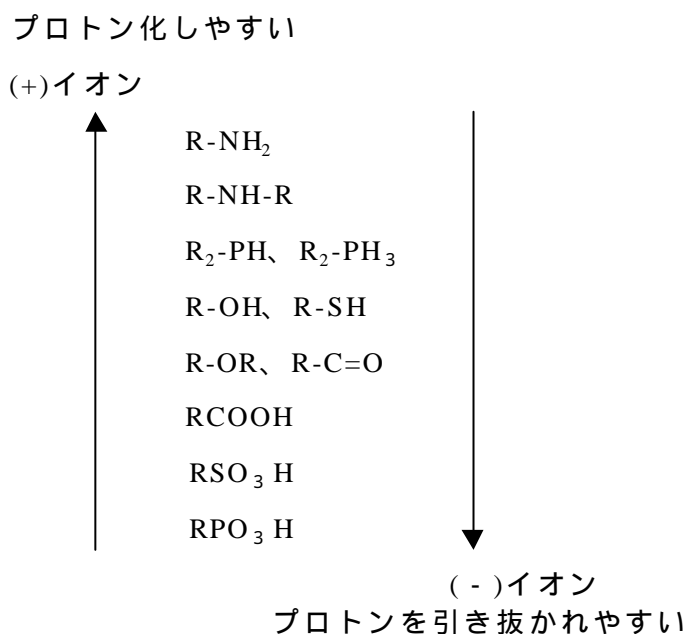


図 4.1.2-1 置換基によるイオン化モードの選択例

内径 0.1mm 程度のものが一般的である。そこで、この先端部での帯電液滴の生成は、移動相溶媒の性質に大きく関係することになる。さらに、脱溶媒をスムーズに行い帯電液滴をさらに微細化する過程においても溶媒は重要な役目を担っている。

LC/MS 分析では、LC の分離条件から使用する溶媒が決定される場合が多い。基本的には、前章 3.2.2 移動相の選択で示したような溶媒は LC/MS でも使用可能であるが、表面張力の大きい溶媒、粘度の高い溶媒などは ESI では好ましくない。また、電気伝導度の高い溶媒もイオン化を阻害する。

現在、LC 分析のほとんどは前項 3.2.1 で記述したように水分と再現性等の問題から逆相系で分離されることが多く、移動相にはメタノールやアセトニトリルが使用されている。従って、逆相系での分離分析の多くなる LC/MS 分析でも、まずこれらの溶媒で試みるとよい。実際に、LC/MS 分析でメタノールやアセトニトリルが一般的に使用されている。しかし、分析対象物質によっては、使用する溶媒によってイオン強度に大きな差が見られる場合が起こる。特に、メタノールでは高感度検出可能である物質が、プロトンドナーになり難いアセトニトリルでは感度が非常に悪い場合があるので注意する。

### (3)流量

LC から溶出した溶媒が MS へ導入されると気化されて、体積の膨張（表 4.1.2-5）を起こし MS の真空度が劣化する。MS では高真空を保つ必要性から LC からの溶媒の流量が制限されるが、それ以上に、図 4.1.2-2 に示すようにイオン化法により流量の制限がある。

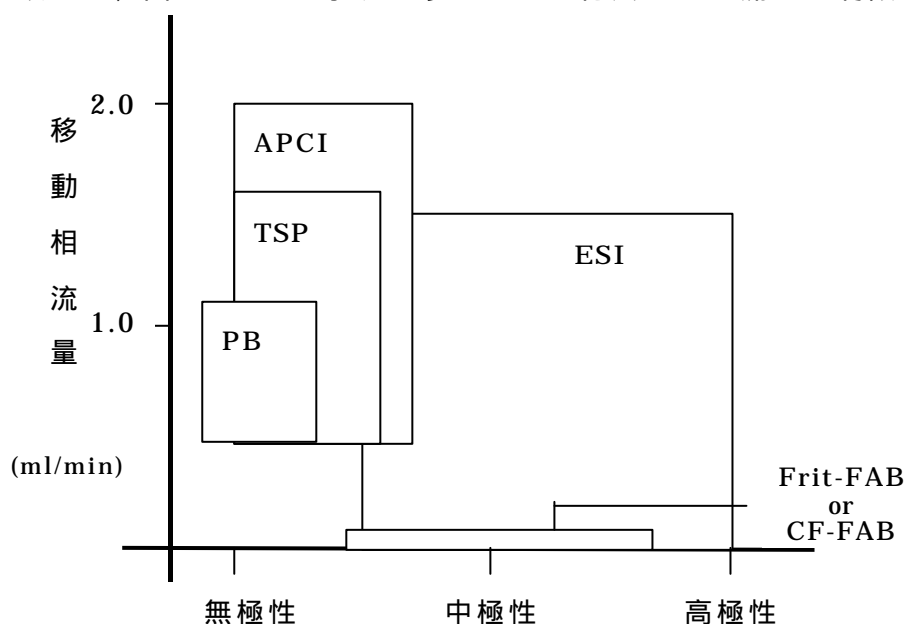


図 4.1.2-2 LC/MS インターフェースと流量

APCI : Atmospheric pressure chemical ionization、 ESI : Electrospray ionization  
PB : Particle beam、 TSP : Themospray、 Frit-FAB : Frit-Fast atom bombardment  
CF-FAB : Continuous flow-fast atom bombardment

表 4.1.2-5 LC から MS へ導入された場合の液体(移動相溶媒)の体積 (cm<sup>3</sup>/min)

column	Conventional	Semi-micro	Micro
内径 (mm)	4.0~4.6	1.0~2.0	0.2~0.5
流速 (ml/min)	1.0	0.2	0.005
Methanol	550	110	3
Water	1240	248	6

特に、ESI 法では、キャピラリー先端からの帯電液滴の生成効率、4.1.2.1 溶媒の選択の項で示したような溶媒の性質に加え、移動相流量にも大きく依存する。ESI のキャピラリーは通常内径が 0.1mm 程度であり、流量が多いと微細な液滴が生成されにくく、イオン強度が減少する。一般的には、数十  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l 程度で使用されている。

表 4.1.2-6 LC のカラム内径と流量

内径 (mm)	流量 ( $\mu$ l/min)
0.32	3 - 8
1.0	30 - 60
2.0	200 - 400
4.6	800 - 2000

ESI では、分析カラムにセミマイクロカラムを使用し、0.2ml/min の流量で分析することが多い。しかし、通常の分析カラム(内径 4.6mm、長さ 150mm)を使用し、1ml/min 程度の流量で分析する場合は、LC の溶出液を ESI キャピラリーへ導入される前に Tee などを用いてスプリットすることも多い。

参考までに、表 4.1.2-6 には一般に使用されている LC 分析カラムのカラム内径と流量の関係を示した。

#### (4)キャピラリー電圧

目的物質を含む LC 溶出液から静電噴霧現象によって帯電した液滴を生成させるために ESI キャピラリーに印可する電圧を言う。そして、対極との間で電場を発生させる。この条件で、キャピラリー先端から流出する溶液表面は、尖った先端で平衡状態と推定される円錐形の Taylor cone と呼ばれる状態となり、理想的な帯電液滴の流れが放出される。通常は、 $\pm 3 \sim 5$  kV の高電圧が印可されている。印可電圧が高すぎるとこの状態がくずれ、複数の先端を持つスプレーになり、さらに高くするとコロナ放電が起こる。また、MS スペクトルのノイズが増大する原因になる。

#### (5)ドリフト電圧

インターフェースの大気圧下において生成したイオンを差動排気部へ導入するために印可する電圧をドリフト電圧(メーカーによって他の呼称を用いている場合もある)と言う。

ドリフト電圧を高くすると 噴霧ガス(主に窒素)との衝突が激しくなりイオンのフラグメンテーションが起こる。そのため目的とするイオン(主に擬分子イオン)の生成効率が悪くなる。API 法特有の CID(collision induced dissociation)法は、このドリフト電圧を利用して噴霧ガス(中性分子)と多数回衝突させてフラグメンテーション起こすことを目的とした方法である。CID 法はソフトイオン化における分子構造情報を得る手段としては効果的であるが、しかし、擬分子イオンを生成させるという目的からは好ましくない。

最適なドリフト電圧は、物質によって異なる。例えば、同じカルボン酸類であっても分子量によって最適な電圧値が異なる。従って、数種の物質が混合された試料を測定する場合は、個々の物質についての最適値を求める必要がある。装置によっては、ドリフト電圧をも含めたインターフェース部等の条件について最適化する支援ソフトが提供され自動設定可能である。

#### (6)ポストカラム法

一般に有機化合物は有機溶媒中では中性で存在する。ESI ではイオンの状態で存在することが望ましい。そのために、LCで分離された後に LC ポンプ等によって pH 調整試薬やイオンペア試薬を供給してイオン化を促進させる場合や、また次のような方法によるポストカラム法を行う。

- ・移動相に用いた水の混合比率を小さくすることで水との溶媒和を弱くし、目的物質のイオン性を高める
- ・イオン性の高い緩衝液を用いた分析では、より弱い酸を添加して緩衝液の濃度を薄めるとともにこの酸との弱いイオンペアを生成させて脱離しやすいイオンとする (HFBA と TFA の存在下でプロピオン酸を添加すると感度が増加する。図 4.1.2-4 参照)
- ・サンプルにプロトネーションする部位がない場合、金属を付加させてプロトン化する (50  $\mu$ M 程度の酢酸ナトリウムを添加して  $[M+Na]^+$  を生成させることで感度を上げることがある)
- ・インターフェース (特に ESI) に適した流量を保つために溶媒を増加、または減少させる

図 4.1.2-3 にポストカラム法を用いる場合の構成例を示す。

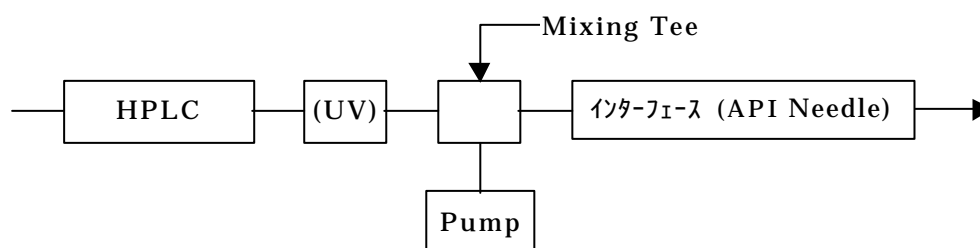


図 4.1.2-3 ポストカラム法を用いる場合の構成例

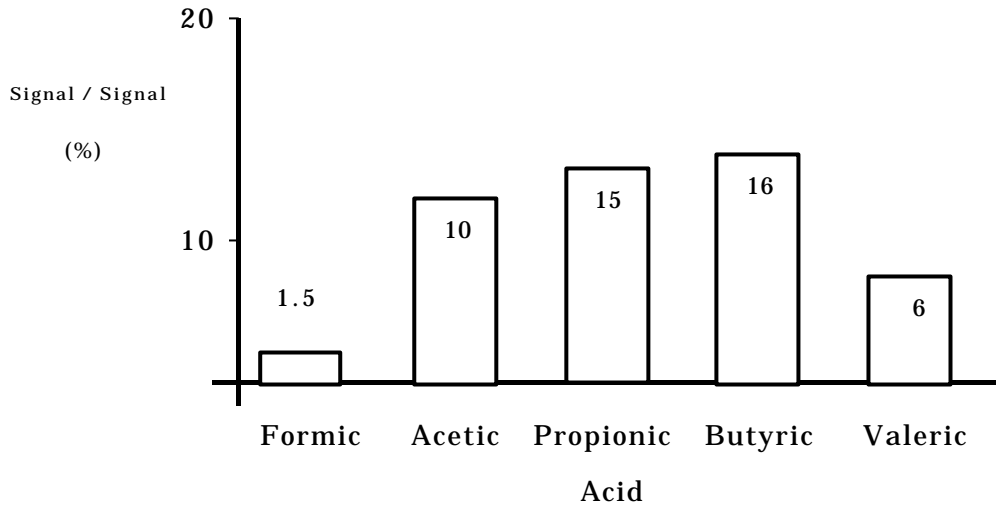


図 4.1.2-4 酸添加による感度の増加 (各 20% 添加) (HP 社 1998 年 LC/MSD セミナーテキストより)

ポストカラム用ポンプから供給される流量は、移動相流量に加算される。従って、ESI インターフェースに導入される流量については適切な流量に調整する必要がある。また、ポストカラム用ポンプから供給される流量が多い場合は、試料が希釈され試料の MS への導入量が減少するなどの難点がある。

また、添加する試薬濃度についてもイオン化効率に影響を及ぼし、ピーク強度が変化する。カルボン酸類にトリエチルアミンを添加した場合の一例を図 4.1.2-5 に示す。添加濃度は 0%、0.05%、0.1%、0.5% である。

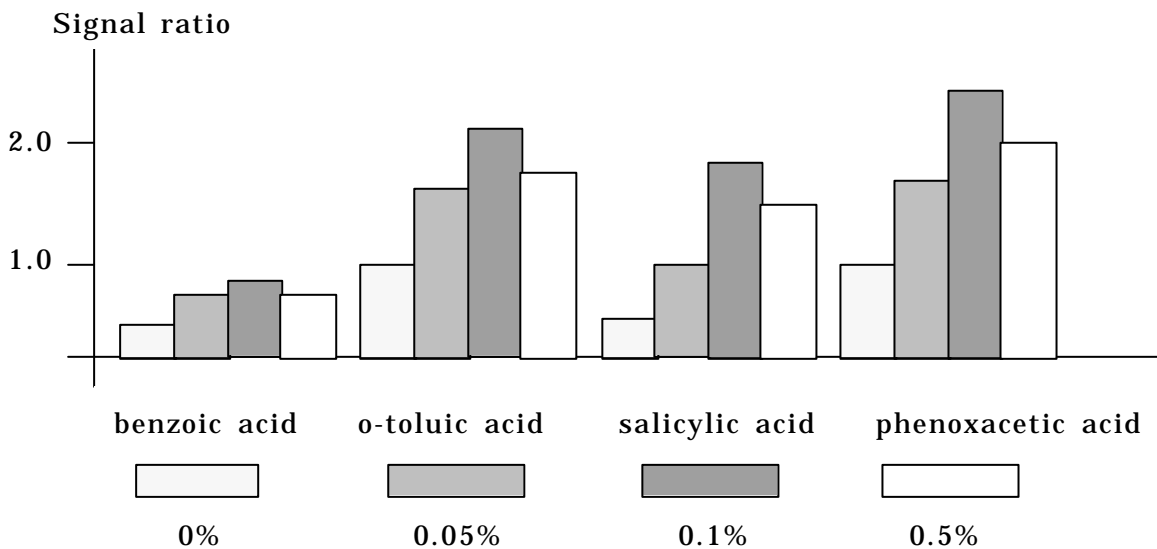


図 4.1.2-5 添加試薬濃度と応答シグナル比

#### 4.1.2.5 多価イオンスペクトル

ESI 法の特徴の一つは、他のイオン化法では見られない多価イオンスペクトルが生成することである。ペプチドやタンパク質など数千から数万の分子量をもつ化合物が、加熱気化されること無く、 $(M+nH)^{n+}$ や $(M-nH)^{n-}$ の多価イオンとして得られ、高分子量物質の質量を決定することが可能である。

しかし、QMS で多価イオンを測定する場合は、QMS の分解能が低いことから、分子量の精確さにかけることがある。多価イオンを測定する場合には、装置のマス軸を精密に合わせる必要がある。次式に示されるように、多価イオンからの分子量は電荷の数を基本にした掛け算で計算されるので、マス軸のずれが大きいと分子量のずれも大きくなる。

多価イオンのスペクトルから分子量の計算は次式によって行う。

$$n_2 = n_1 + 1 \quad n \quad : \text{イオンの電荷数} \quad n_1 < n_2$$

$$n_1 = m_1 / (m_2 - m_1) \quad m_n \quad : \text{得られたスペクトルの質量数} \quad m_1 < m_2$$

$$M_1 = n_1(m_1 - x) \quad M_n \quad : \text{2つのスペクトルの質量数から計算された分子量}$$

$$MW = \text{ave}(M_1, M_2, M_3, \dots) \quad MW \quad : \text{求める物質の平均分子量}$$

$x$  : 付加しているアダクツイオンの質量数(通常は水素)  
計算ソフトが各メーカーから提供されている。

図 4.1.2-6 に示すようなスペクトルが得られた場合の計算例を示す。

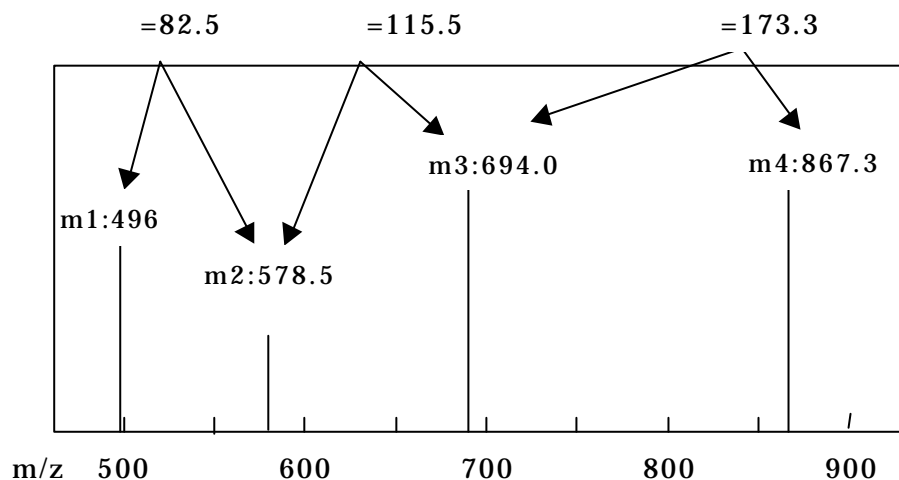


図 4.1.2-6 多価イオンのスペクトル例

$$n_1 = 496 / (578.5 - 496) \quad M_1 = 6(496 - 1)$$

$$= 6.012 \quad = 2970.0$$

$$n_2 = 578.5 / (694.0 - 578.5) \quad M_2 = 5(578.5 - 1)$$

$$= 5.008 \quad = 2887.5$$

$$n_3 = 694.0 / (867.3 - 694.0) \quad M_3 = 4(694.0 - 1)$$

$$= 4.004 \quad = 2772$$

求める分子量 =  $M_1$ 、 $M_2$ 、 $M_3$ 、... の平均値



#### 4.1.2.6 LC/ESI/MS 条件設定のための手順

LC/ESI/MS の分析条件は LC 分離条件と ESI/MS 条件がともに最適となるような条件であることが理想的である。以下に条件選択のための簡単な手順を示す。

フローインジェクションによる測定

- a 溶媒はメタノール：水（1：1）あるいはアセトニトリル：水（1：1）を使用。  
（一般に LC では逆相モードでの分離と考えて良い）
- b ポジティブモードかネガティブモードかの選択  
目的物質のマススペクトルを得るためにまず SCAN モードで行う。濃度は十分に正確なマススペクトルが確認できるような濃度（おおよそ数  $\mu\text{g/ml}$ ）とする。
- c ドリフト電圧の最適値の探査（物質によって異なる）

LC 分離条件の検討

- a 分離カラム及び移動相溶媒の選択、グラジエント条件あるいはカラム温度などを考慮し、適切な分離条件を見つける。
- b 分離が不十分であれば pH 調整試薬あるいはイオンペア試薬の利用を考える。  
これら試薬は揮発性であること及び分析系への吸着等の問題が無いことを確認する。  
インターフェースの条件検討（上記、からの情報をもとに、カラムを接続して実際の LC 分析条件でインターフェースの条件検討をする。）
- a 分析対象物質に最適なキャピラリー電圧、ドリフト電圧等の選択  
物質によってドリフト電圧などの最適な条件が異なるときは複数の値を設定することになる---プログラミングでの設定

以上 ~ から分析対象物質のモニターイオン(LC/MS ではほとんどが擬分子イオン)と保持時間の関係から LC 分離能が十分であることを確認する。

LC-ESI-MS 測定(SCAN →SIM)

標準試料及び実試料等の測定

#### 4.1.2.7 参考文献

Paul Kebarle and Liang Tang ;AnalChem.,1993,65,972A-986A

Robert D.Voyksner; Environ. Sci. Technol.,1994,28,118A-127A

質量分析法の新展開：土屋正彦、大橋 守、上野民夫；現代化学・増刊 15、東京化学同人  
LC/MS の実際(天然物の分離と構造決定)：原田健一、岡 尚男；講談社サイエンティフィック  
化学便覧 基礎編 改定四版：日本化学会；丸善

### 4.1.3 CF(Frit)-FAB 法

#### 4.1.3.1 LC 分離条件に対する制限

Frit-FAB では、被検成分とマトリックスイオンとの間で起こる酸塩基反応が、主なイオン生成反応であるため、被検成分とマトリックスとの関係は強くイオン化に影響する。しかし、移動相や緩衝液のイオン化への影響は API 等に比べると少ない。特に、移動相は大部分が Frit 内で気化するため、API のように移動相の組成が強くイオン化に影響することは稀である。従って、LC 分離条件に対する制限も比較的少なく済む。ただし、Frit-FAB イオン化ではマトリックスに関連した LC 条件の制限がいくつかある。

ここでは、主にグリセリンをマトリックスに用いた Frit-FAB 法について、その留意点やイオン化効率を促進させるための技術等について述べる。

##### (1) 移動相溶媒

Frit-FAB の移動相溶媒は、フリット内で容易に揮発し、測定成分をイオン化する上において影響の少ない溶媒が理想的である。グリセリンをマトリックスとした場合では、水、メタノール、アセトニトリルが主に移動相溶媒として使用されている。また、これらの有機溶媒は、グリセリンでは FAB イオン化されにくいという利点もある。ヘキサンも Frit-FAB では使用できるが、グリセリンはヘキサンに溶けないため、ヘキサンに可溶な他のマトリックスを選択する必要がある。マトリックスと移動相の組み合わせは、「4.1.3.6 参考文献 1)」に詳しく記載されているので参照されたい。

図 4.1.3-1 に、メタノール/水(1:1)を移動相としたときのポジティブ及びネガティブイオン化におけるバックグラウンドのマスペクトルを示す。

移動相には、pH 調整剤として酢酸を 20mM になるように、またマトリックスとしてグリセリンを 1v/v%となるように各々添加した。酢酸は溶媒中で解離して負イオンとして存在するため、ネガティブモードではベースピークとして酢酸由来の  $m/z$  59 ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) が大変強く現れる。ネガティブモードでは、その他にグリセリン付加体の  $m/z$  151 ( $[\text{Gly} + \text{CH}_3\text{COO}]^-$ ) が、またグリセリンのプロトン脱離イオン  $m/z$  91 ( $[\text{Gly}-\text{H}]^-$ ) が見られる。ポジティブモードでは酢酸由来のピークは観察されず、グリセリンのプロトン付加イオン  $m/z$  93 ( $[\text{Gly}+\text{H}]^+$ ) 及び  $m/z$  185 ( $[2\text{Gly}+\text{H}]^+$ ) のイオンが強く現れる。装置及び測定条件を表 4.1.3-1 に示す。

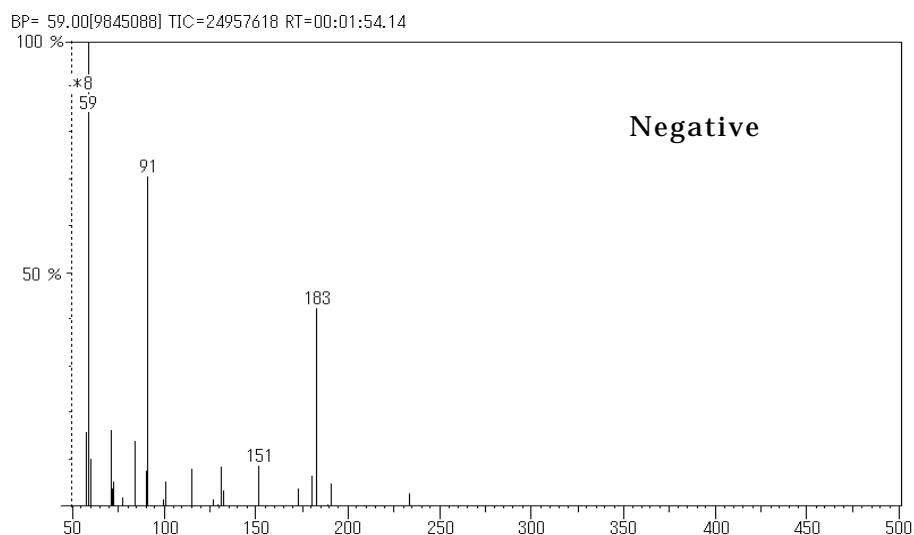
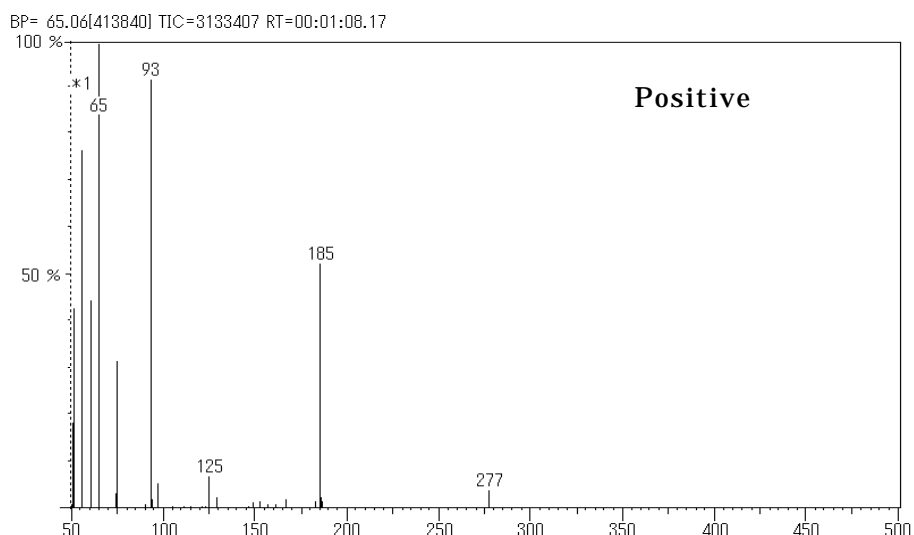


図 4.1.3-1 測定モードの違いによるバックグラウンドのマススペクトル

表 4.1.3-1 装置及び測定条件

装置名	日本電子製 JMS-700
インターフェイス	: Frit-FAB
移動相流量	: 0.5 mL/min
イオン化法	: 高速原子衝撃法 (FAB), 衝突ガス Xe
中性原子加速電圧	: 6 kV
イオン源温度	: 55 (scan), 80 (SIM)
イオン加速電圧	: 10 kV
イオン源圧力	: $2 \times 10^{-2}$ torr
MS測定条件(Scan)	: 範囲 m/z 45~500, スピード 1 sec/cycle
MS測定条件(SIM)	: チャンネル数 6, スイッチング 100msec/ch

## (2) 緩衝液

Frit-FAB における移動相の pH 緩衝液としては、揮発性のある酢酸アンモニウムがよく使用されている。また、マトリックスとして用いることが出来るエタノールアミンが LC-Frit-FAB-MS の場合には有用であるとの報告がある [ K. Kamei, et al.(1988) ]。

移動相の pH 調整には、通常の液体クロマトグラフで使われているトリフルオロ酢酸、塩酸、パーフルオロ酪酸、酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム等が使用できる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でよく使われるリン酸緩衝液等の不揮発性緩衝液は、APCI や ESI のように目詰まりを引き起こし装置に負荷を与えるような影響はないが、緩衝液自体の FAB イオン化によるイオン化効率が高過ぎるため、被検成分のイオン化が妨害されてしまう、という問題がある。また、生成するイオンへのナトリウムやリン酸イオン等の付加が起こり、マススペクトルが複雑化し、解析が困難になるなど、実際の使用頻度は低い。

### 4.1.3.2 イオン化効率の向上

#### (1) 測定モードの選択

水質汚濁防止法等の法規制対象物質の中から水溶性の 8 種の農薬を選択し、Frit-FAB を用いてポジティブ及びネガティブモードでのマススペクトルを測定した。対象物質を表 4.1.3-2 に、その構造式を図 4.1.3-2 にそれぞれ示した。

移動相には、酢酸を 20mM 及びグリセリンを 0.2 %の濃度で含むメタノール/水(1:1)を用いた。試料の注入は、対象物質濃度 100mg/L のメタノール溶液を各々作成し、その 20  $\mu$ L を連続フローインジェクションで注入した。装置及び測定条件を表 4.1.3-1 に、ポジティブ及びネガティブモードで FAB イオン化によるマススペクトルを図 4.1.3-3 ~ 図 4.1.3-10 に示す。

多数のフラグメントイオンのピークが観察され、APCI 法及び ESI 法と比較して、フラグメンテーションが起こりやすいことがわかる。

以下に、各々の測定モードでの各物質毎のマススペクトルの特徴を述べる。

#### a) ネガティブモードでイオン強度の高い物質

##### <アシュラム、トリクロピル酸及びメコプロップ>

これら 3 物質は酸性であるため、ネガティブモードで  $[M-H]^-$  の疑分子イオンが明瞭に観察された。また、これらの物質はポジティブモードでもイオン強度は低いものの  $[M+H]^+$  の疑分子イオンあるいは  $M^+$  の分子イオンが測定され、FAB イオン化では比較的安定にイオン化することが可能であった。

#### b) 両方の測定モードでイオン強度の高い物質

<オキシシン銅、ベンスリド、チウラム>

オキシシン銅は、ポジティブモードでは、オキシシンと銅の 1:1 錯体の m/z 208 がベースピークとなり、ネガティブモードでは、オキシシンのプロトン脱離イオンがベースピークとなった。イオン強度はネガティブモードの方が強かった。

チオリン酸エステルであるベンスリドは、ポジティブ及びネガティブモードの両方でイオン強度の強いフラグメントイオンが出現し、分子構造から比較的容易に類推できるフラグメントイオンを生成した。しかし、チウラムのフラグメンテーションの解析は難しく、また、選択イオン検出法での定量イオンに使うには支障のある質量数のイオンであった。

3 物質とも Frit-FAB ではイオン化効率の高いフラグメントイオンを得ることができたが、分子イオンあるいは疑分子イオンは観察されなかった。

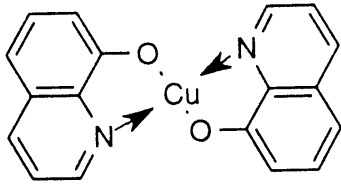
c) イミダクロプリド及びエトフェンプロックス

両物質とも Frit-FAB では、安定したマススペクトルを得ることが出来なかった。イミダクロプリドがポジティブモードで疑分子イオンを含む比較的構造解析に有用なイオンを得ることができたが、イオン強度は他の物質に比べ低かった。

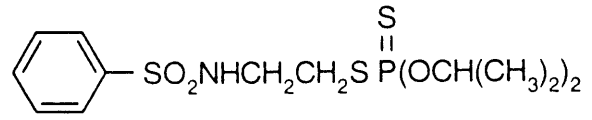
表 4.1.3-2 Frit-FAB によるマススペクトル測定対象物質 [mg/mL]

物質名	用途	CAS 番号	基準値等				
			環境基準	要監視指針値	排水基準	ゴルフ場指針値	公共水指針値
1 オキシシン銅	殺菌	10380-28-6		0.04		0.4	
2 チウラム	殺菌	137-26-8	0.006		0.06	0.06	
3 アシュラム	除草	3337-71-1				2	
4 トリクロピル*	除草	55335-06-3				0.06	
5 ベンスリド(SAP)	除草	741-58-2				1	0.1
6 メコプロップ(MCPP)	除草	16484-77-8				0.05	
7 イミダクロプリド	殺虫	13861-41-3					0.2
8 エトフェンプロックス	殺虫	80844-07-1					0.08

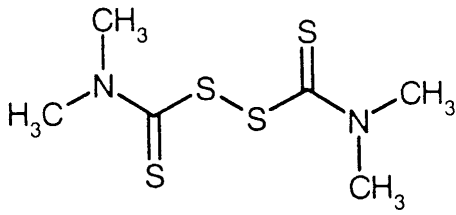
\* ) トリクロピル及びトリクロピル酸の合算値



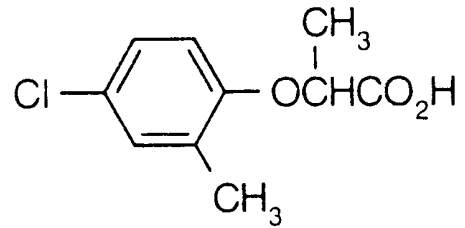
オキシシン銅



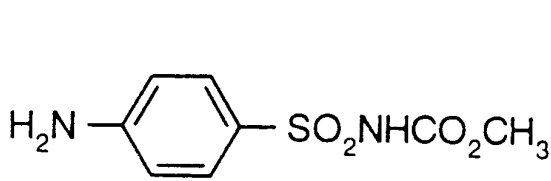
ベンスリド



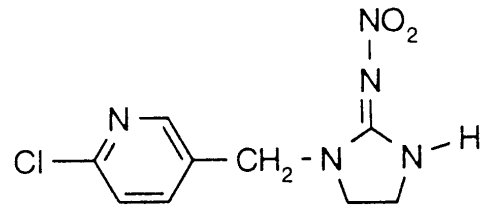
チウラム



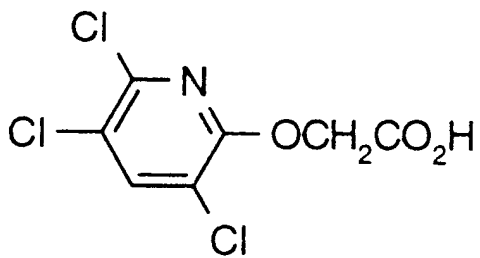
メコプロップ



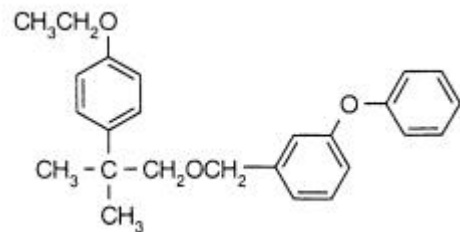
アシュラム



イミダクロプリド



トリクロピル酸



エトフェンプロックス

図 4.1.3-2 マススペクトル測定対象物質

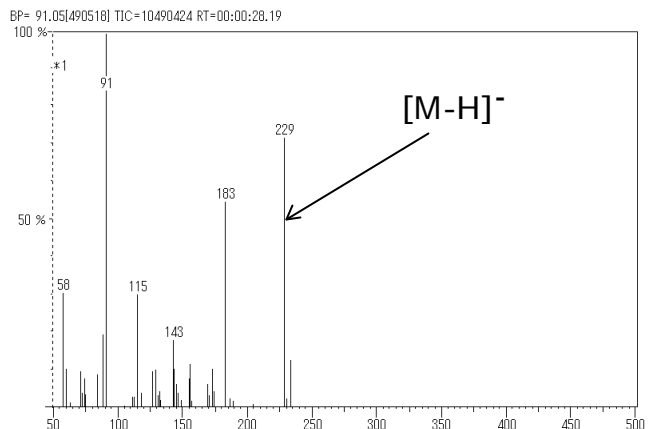
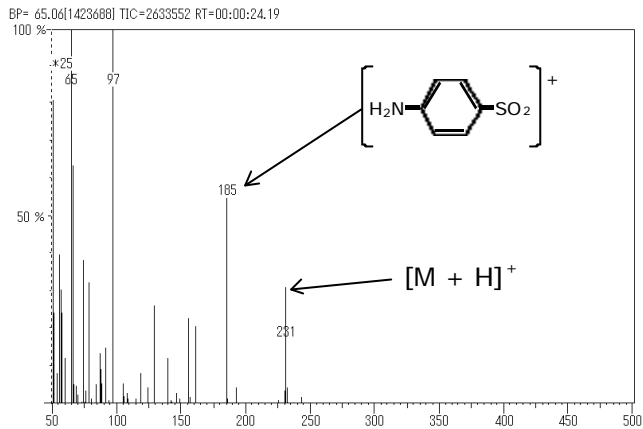


図 4.1.3-3 アシュラムの FAB マススペクトル (左:ポジティブ, 右:ネガティブ)

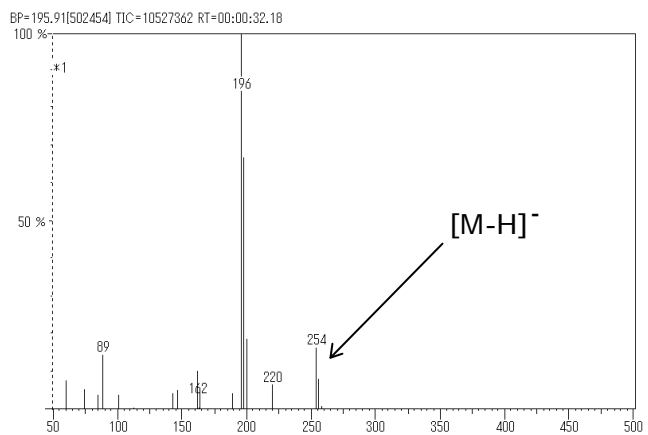
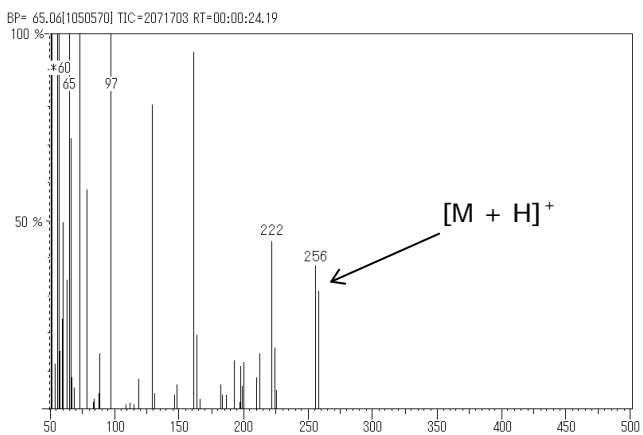


図 4.1.3-4 トリクロピル酸の FAB マススペクトル (左:ポジティブ, 右:ネガティブ)

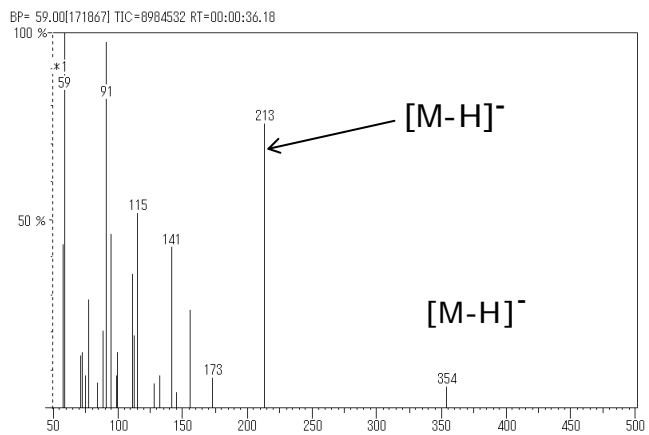
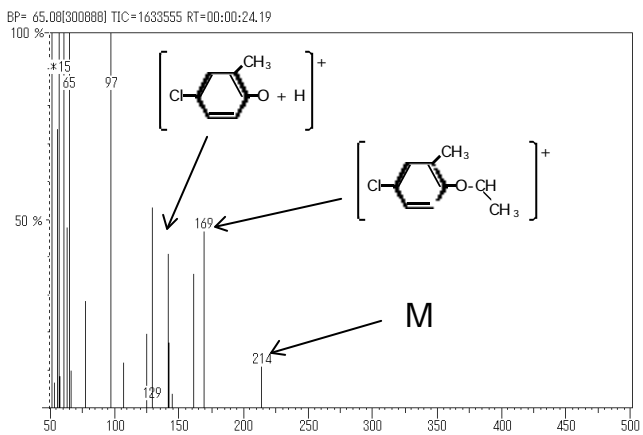


図 4.1.3-5 メコプロップの FAB マススペクトル (左:ポジティブ, 右:ネガティブ)

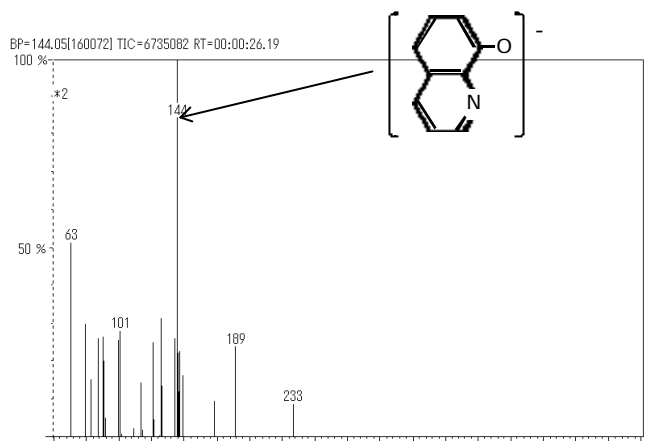
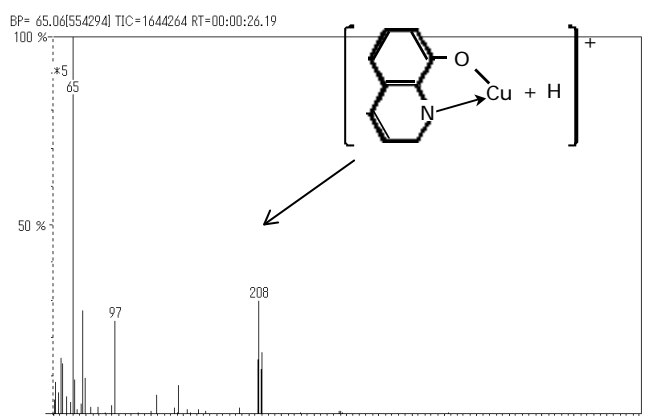


図 4.1.3-6 オキシ銅の FAB マスペクトル (左:ポジティブ, 右:ネガティブ)

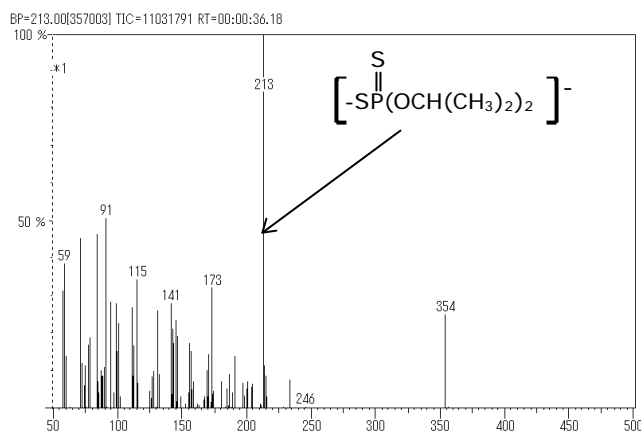
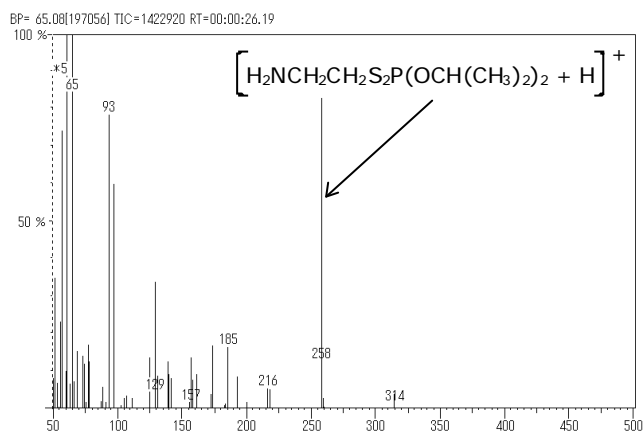


図 4.1.3-7 ベンスリドの FAB マスペクトル (左:ポジティブ, 右:ネガティブ)

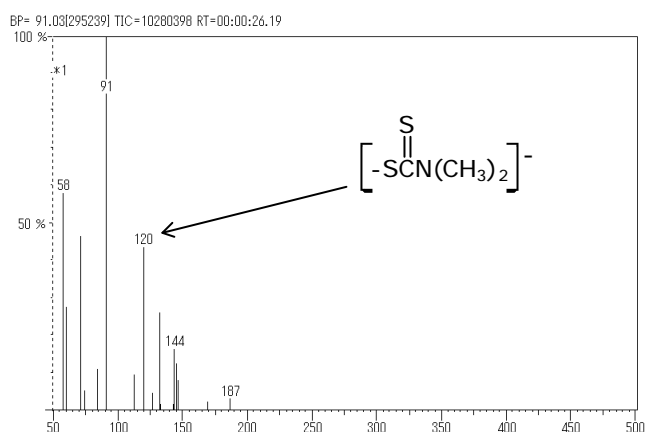
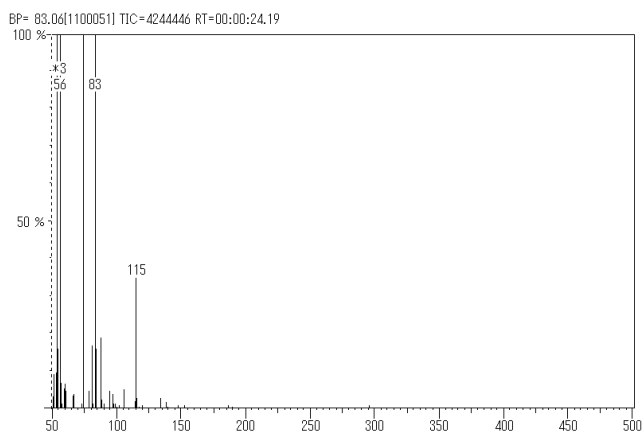


図 4.1.3-8 チウラムの FAB マスペクトル (左:ポジティブ, 右:ネガティブ)



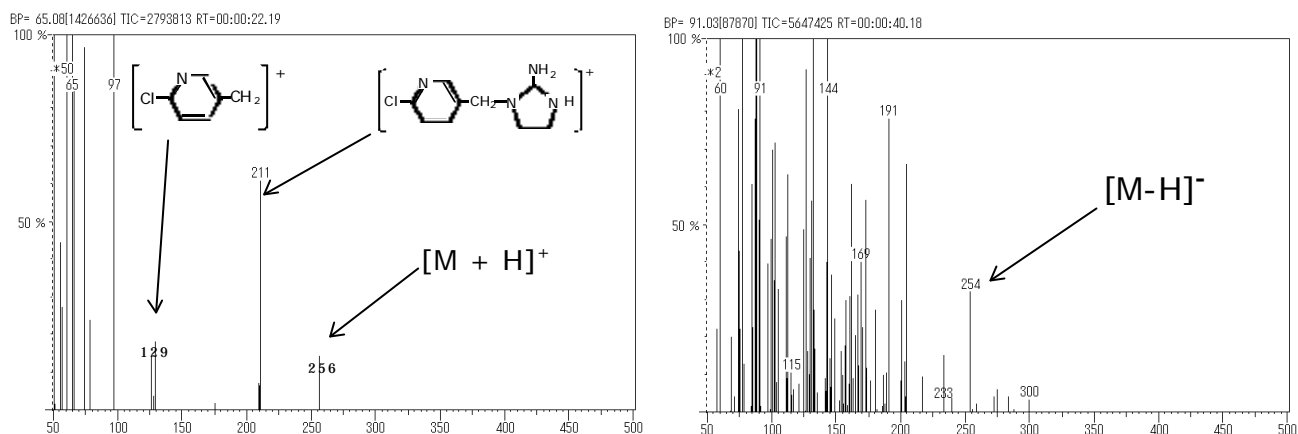


図 4.1.3-9 イミダクロプリドの FAB マススペクトル  
(左:ポジティブ, 右:ネガティブ)

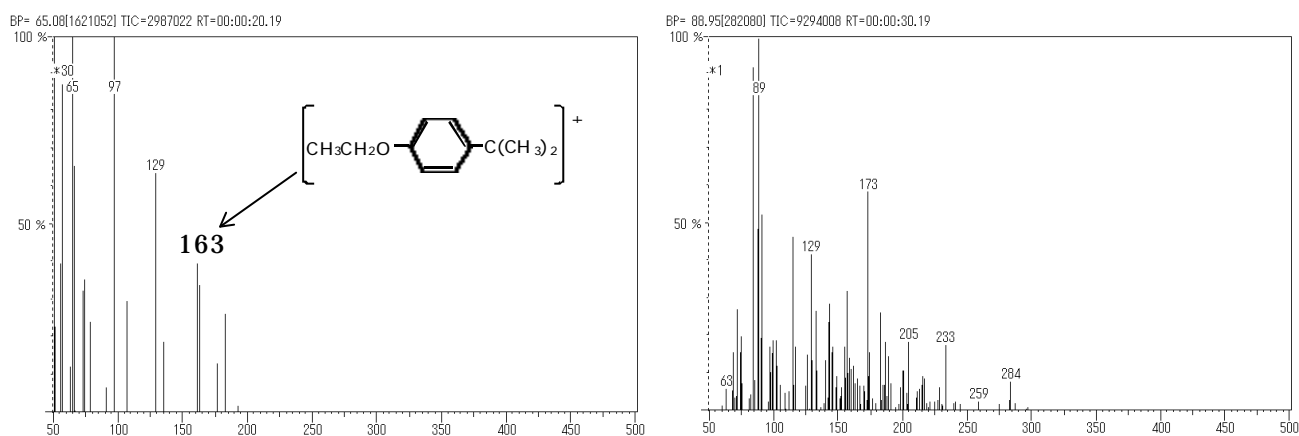


図 4.1.3-10 エトフェンプロックスの FAB マススペクトル  
(左:ポジティブ, 右:ネガティブ)

表 4.1.3-3 移動相組成

移動相	組成
移動相	0.2 %グリセリン含有メタノール / 水 ( 1 : 1 )
移動相	0.2 %グリセリン含有メタノール / 水 ( 1 : 1 ) ( 20mM 酢酸含有、pH3.5 )
移動相	0.2 %グリセリン含有メタノール
移動相	0.2 %グリセリン含有メタノール ( 20mM 酢酸含有、pH3.5 )

(2) 溶媒の選択 - 移動相組成による水溶性農薬の感度比較 -

前述の農薬を対象に、メタノール及びメタノール/水を移動相とした場合の組成の違いによる感度の比較を行った。移動相の違いを表 4.1.3-3 に、測定条件を表 4.1.3-1 に示す。感度の比較は選択イオン検出法 (SIM 法) で行い、試料注入は、各測定成分を各々 10 µg/ml ずつ含む混合溶液 20 µl を連続フローで注入した。なお、各測定成分とも各移動相間でマススペクトルに大きな違いはなかったため、それぞれ 1 つの定量フラグメントイオンを用いて感度の比較を行った。測定結果を表 4.1.3-4 に示す。各々の特徴を以下に述べる。

表 4.1.3-4 移動相組成の違いによるイオン強度の比較

物質名	m/z	移動相組成			
		移動相	移動相	移動相	移動相
オキシ銅	208	100	66	33	33
アシュラム	231	100	66	33	33
ベンスリド	258	50	50	50	100
メコプロップ	214	100	100	100	100
イミダクロプリド	211	100	66	33	33
エトフェンプロックス	163	25	25	100	75

注) 各物質毎に最もイオン強度が強くなる移動相の組成を 100 としたときのイオン強度の比較

a) オキシ銅、アシュラム及びイミダクロプリド

通常の液体クロマトグラフィーでは、良好な分離条件を得るため pH 調整を行うことが多い。ここでは、その一例として 20mM 酢酸を添加した移動相について検討を行っている。しかし、オキシ銅、アシュラム及びイミダクロプリドの 3 物質については、移動相の 0.2 %グリセリン含有メタノール/水(1:1)が、最も感度が高く、メタノールのみの場合と比較して 3 倍程度高い。また、ポジティブモードでは、これらの物質については、酢酸の添加は被検成分のイオン化効率の低下を引き起こしている。これは、プロトン供与体として働くマトリックスのグリセリンから生じたプロトンが、酢酸イオンあるいは酢酸に消費されたためであると推測される。オキシ銅については、この理由以外に、pH の違いによるオキシ銅と銅の 1 対 1 錯体の解離平衡の違いも影響しているものと考えられる。

b) エトフェンプロックス

上記 3 物質とは逆にエトフェンプロックスでは、メタノールのみの場合がもっとも高感度であった。これは、他と比較してエトフェンプロックスの脂溶性が高いことが影響しているものと思われる。

### c) メコプロップ

メコプロップはそれぞれの移動相間で感度の差が見られなかった。これは、FAB イオン化では、マトリックスとの分子-イオン反応で生じるイオンだけでなく、移動相中で既に解離しているイオンも検出されるためである。今回はネガティブモードについては検討していないが、メコプロップ等カルボキシル基を含む有機酸については、プロトンが解離しやすい pH 条件で、ネガティブモード測定することが、感度の向上につながると考えられる。この具体的な方法としては、HPLC での分離後に送液ポンプを用いて新たに緩衝液を添加して MS に導入するなどの方法がある。

### (3) マトリックスの選択

Frit-FAB 法のマトリックスには、グリセリン、トリエタノールアミン、m-ニトロベンジルアルコール(NBA)等が主に用いられている。これらは測定対象物質の極性により、極性の強い化合物にグリセリン、極性の弱い化合物に NBA というように使い分けることができる。

移動相中のマトリックス濃度については、0.1%程度の濃度でも十分にイオン化することができる。しかし、移動相中のマトリックス濃度があまり高過ぎると、移動相の粘性を増加させ、ベースラインを不安定にするなど HPLC での障害を引き起こすことがある。通常、グリセリンの場合は、0.2%程度が移動相中のマトリックス濃度として適当であるとされている。

### 4.1.3.3 インターフェースの条件

#### (1) 流量

HPLC 側から MS 側に供給される移動相は、空圧スプリッターなどによって分割することで、イオン源への導入量を制御している。イオン源への導入量は感度に影響し、通常 5~10  $\mu$  L/min が適切である。しかし、導入量を実測することは不可能であるため、バックグラウンドのイオン強度を観測しながらスプリット比を調整し、適切な導入量を設定する。

#### (2) イオン化室温度

FAB イオン化では、基本的に加熱の必要はない。しかし、移動相溶媒として水を使用した場合には、気化時に Frit 内で水が凍結し、安定な FAB イオン化を妨害することがある。このため 50 程度の加温が推奨されている。

今回の測定ではメタノール/水(4:6)を移動相とした場合、50 では凍結による影響が観測

されたため、80 に加温したところイオン強度が安定し、適切な FAB イオン化が得られた。

#### 4.1.3.4 LC-Frit-FAB-MS 条件設定のための手順

LC-Frit-FAB-MS の条件設定は LC 分離条件と Frit-FAB-MS 条件の双方について最適となるバランスがとれたものにしなければならない。以下にその一般的な手順を記す。物質により LC 分離、MS の感度に大きな差が出るので、被検成分毎にこの操作を行うことが必要である。

##### (1)フローインジェクションによる測定

溶媒はメタノール/水(1:1)あるいはアセトニトリル/水(1:1)で行う。

被検成分は scan でマススペクトルを測定するために数十  $\mu\text{g/ml}$  程度の濃度にする。

ネガティブモードあるいはポジティブモードのどちらの測定にするか選択する。

移動相の最適導入量を決める(スプリット比を決める)

##### (2)LC 分離条件の検討

溶媒の種類、グラジエント、カラム温度などを考慮し、適切な分離条件を見つける。

うまく分離できない場合は、揮発性 pH 調整試薬やイオン対試薬の利用を考える。

##### (3)インターフェイス温度の最適化

水を用いた場合、Frit が凍結による目詰まりを起こす場合があるため、移動相の水分量など溶媒組成からその沸点の高低を判断し、さらに、被検成分の熱安定性を考慮に入れ、インターフェイス温度を決める。

##### (4)LC-Frit-FAB-MS 測定

SCAN での測定

SIM での測定

#### 4.1.3.5 まとめ

FAB イオン化は、これまでアミノ酸等の不揮発性物質やたんぱく質等の高分子化合物の構造解析など、主に定性分析に用いられてきた。FAB イオン化と Frit を組み合わせた Frit-FAB は、試料を連続的に質量分析計で測定することができ、かつ、極微量濃度域での検出を可能とした。今回の検討においても、Frit-FAB を用いることによって数十 ppb の水溶性農薬の検出が可能であり、Frit-FAB と液体クロマトグラフとの結合が、環境中に存在する水溶性化合物の分析に非常に有用と考えられた。しかし、現段階では、数十 ppb の濃度レベルまでピークとして検出はできるものの、その濃度域での定量値の再現性は認められず、環境中微量化学物質の定量やスクリーニングに使用するためには、今後、極微量濃度域で再現性良く定量できる装置の改良や測定条件などを検討する必要性が示唆され

た。

#### 4.1.3.6 参考文献

- 1)日本電子 Application Note, MS42, MS43, MS55, MS62, MS63, MS72, MS101, MS109,  
MS131, MS144, MS159
- 2)K. Kamei, K. Kitahara, A. Momose, K. Matsuura, H. Yuki : Mass Spectrosc. (Japan), vol.36,  
115(1988)