

●液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計 (LC-TOFMS) を用いた分離分析 Separation Analysis by Liquid Chromatograph time of flight mass spectrometer

窪田 耕三
Kouzou Kubota

Key Word : Liquid Chromatograph, time of flight mass spectrometer, exact mass, isotope

1 はじめに¹⁾

LC/MS は、液体クロマトグラフィー質量分析の略号であり、LC により混合試料を分離して、カラム溶出液をオンラインで質量分析計に導き、各分離成分の定性、定量をおこなう手法である。LC/MS をおこなうための装置 (液体クロマトグラフと質量分析装置との複合システム) が LC-MS である。

類似の分析手法に GC/MS がある。GC/MS では、EI-MS で得られるマススペクトルのフラグメントパターンを、膨大なマススペクトルデータベースから検索することで成分を同定する。この成分同定の容易さから、汎用装置として広く普及することになった。しかしながら、GC/MS では試料を気化することが必須であり、高分子化合物など気化しない試料や、熱的に不安定な試料には、そのままでは適用できない課題があった。

一方、LC 分析では、原理上、溶離液に溶解できれば分析対象となりうることから、被験試料の適用範囲が広い。LC/MS は 1980 年代に開発されてはいたが、検出感度等に課題があった。1988 年、Fenn らによりエレクトロスプレーイオン化法が開発されたことを契機に、装置の改良が進み、溶液状態の試料が高感度で連続的にイオン化できるようになった。このことにより LC-MS も汎用的な分析装置として広く使用されるようになり、弊社でも 2005 年に装置導入し、オリゴマー等の組成解析等に活用している²⁾。一般的な四重極型質量分析計を用いる LC/MS では、分離成分の分子量情報 (整数質量) を得ることができるが、化学構造情報を得るのは GC/MS ほど簡単では無く、分光学的な分析データ等も併せて総合的に化合物を推定する。近年、精密質量測定可能な質量分析計を備えた LC-MS も普及している。このような装置を用いると、精密質量データから分離成分の組成式情報が得られ、化学構造解析に繋げることができる。弊社でも飛行時間型質量分析計を備えた装置 (LC-TOFMS) を 2018 年に導入し、活用している。本報では、LC-TOFMS について、測定原理と特徴、および実際の測定事例を紹介する。

2 分析の原理¹⁾⁻⁴⁾

2.1 LC-MS 装置構成

LC-MS の装置構成の概念図を図 1 に示す。液体クロマトグラフにより分離された試料の各成分は溶離液と共にイオン化部に導入される。イオン化部では導入された各成分がイオン化されて質量分離部へと導かれる。質量分離部ではイオンがその質量電荷比 (m/z) によって分離され、各成分の質量情報が得られる。

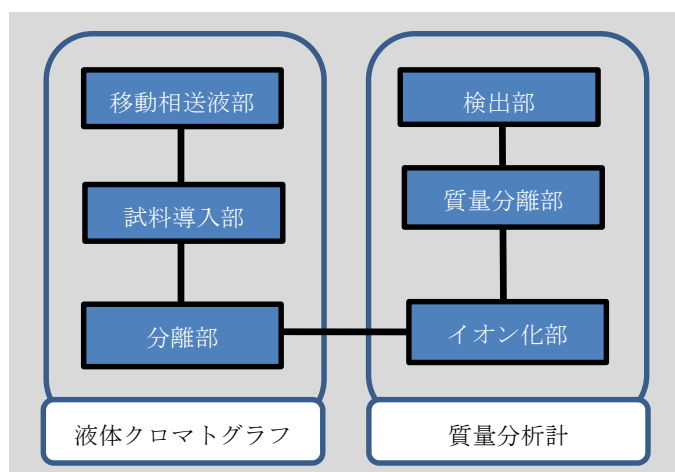


図1 LC-MS 装置構成の概念図

2.2 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

ESI (electrospray ionization) は、現在の LC/MS 分析において最も汎用的に使用されているイオン化法である。ESI イオン源の模式図を図 2 に示す。LC カラムからの溶出液は、キャピラリーを通り窒素ガスと共に大気圧下に噴霧される。その際、キャピラリーの先端に数 kV の電圧を印加すると、電荷分離が起こり、一方の極性に帯電した液滴が生成する。この液滴は加熱されて溶媒が蒸発していき、それに従って液滴は小さくなる。液滴が小さくなると表面電荷による反発力は強くなっていき、溶媒の表面張力より反発力の方が大きくなると液滴は一気に微細化される。そして、液滴表面に存在するプロトンやナトリウムイオンと、測定分子とが接触する

ようになり、気相状態のイオンが生成する。ESI法は、フラグメンテーションが起こりにくいソフトなイオン化法であり、正イオンモードでは、プロトン付加イオン、ナトリウム付加イオンなどが分子関連イオンとして検出される。

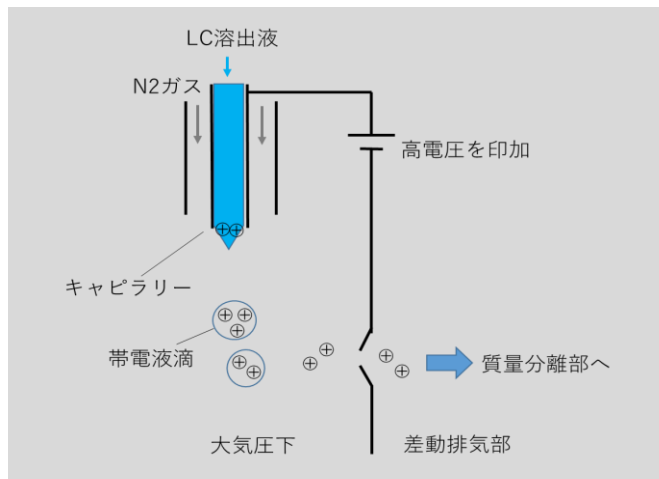


図2 エレクトロスプレー法イオン源の模式図

2.2 飛行時間型質量分析計(TOFMS)

飛行時間型質量分析計 (time of flight mass spectrometer) は、イオン化した試料を高電圧で加速させ、高真空無電場領域 (フライトチューブ) を一定距離飛行させ、飛行時間の違いによりイオンを分離する装置である (図3参照)。理想的には $qV=1/2mv^2$ (q はイオンの電気量、 V は加速電圧、 m はイオンの質量、 v はイオンの速度) の式が成り立つことから、各イオンが一定距離を飛行するのに要する時間を測定することで、そのイオンの質量を算出することができる。例えば $m/z=200$ のイオンが、 $6kV$ で加速され、 $2m$ の距離のフライトチューブを飛行するのに要する時間は $25 \mu s$ となる。TOFMS装置は、原理がシンプルで、歴史の古い装置ではあるが、初期のものは分解能が低く普及していなかった。しかしながら、近年、直交加速法、リフレクトロン、パルサー技術等の進歩により、分解能が飛躍的に向上しており、半値幅分解能で 30000 を超えるものも市販されるようになった。

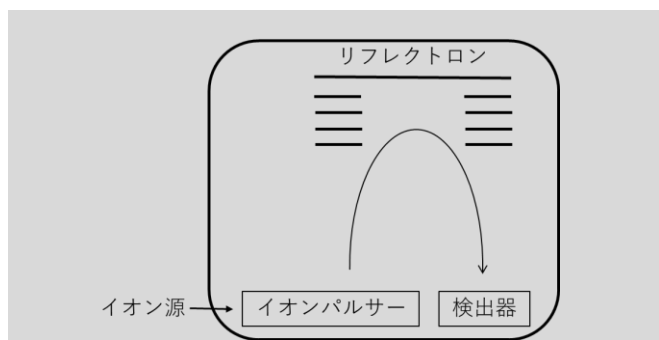


図3 飛行時間型質量分析計の模式図

2.3 精密質量測定による組成推定

適切に質量校正された高分解能質量分析計にて質量分析をおこなうと、精密質量データが得られる。精密質量がわかることのメリットとして、その成分の組成式を推定できることが挙げられる。例として、整数質量 28 の3つの化合物 (窒素分子、一酸化炭素、エチレン) を比べてみる。精密質量値を表1に示す。これを見るとミリ質量単位レベルでは差異があることが確認でき、このレベルの正確性を保証できる質量分析をおこなえば、これらの化合物を区別することが可能となる。最新の精密質量測定可能な質量分析装置には、マスペクトルデータから組成式を推定する機能が付属しており、同位体ピークの精密質量や、同位体ピーク強度比も踏まえた推定結果を与えてくれる。

表1 整数質量 28 の化合物の精密質量値

化合物	精密質量値
窒素分子	28.0061
一酸化炭素	27.9949
エチレン	28.0123

3 測定事例

3.1 エラストマー成形材料の添加剤

エラストマー成形材料について、それに含まれる添加剤の同定を検討した。被験試料を、イソプロパノールを用いて抽出操作をおこない、抽出液を LC/MS 分析に供した。トータルイオンクロマトグラムを図4に示す。複数の成分が検出されていることが分かる。強く検出されている保持時間 3.94 分のピーク1について、そのマスペクトルを図5に示す。アンモニウム付加イオンおよびナトリウム付加イオン、カリウム付加イオンが検出されていると判断でき、整数質量 1176 の化合物であることが分かる。

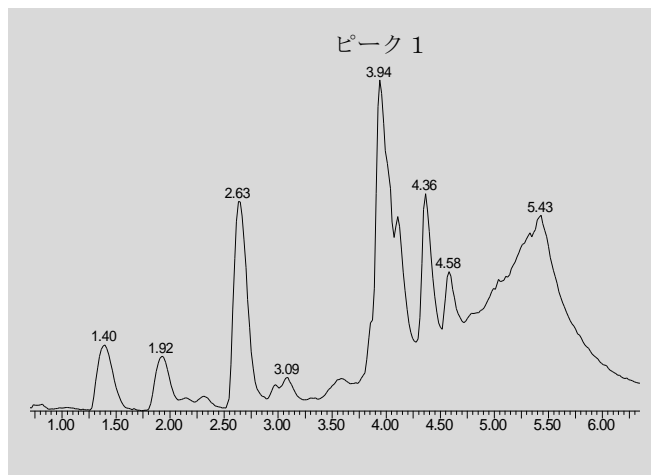


図4 トータルイオンクロマトグラム (エラストマー抽出成分)

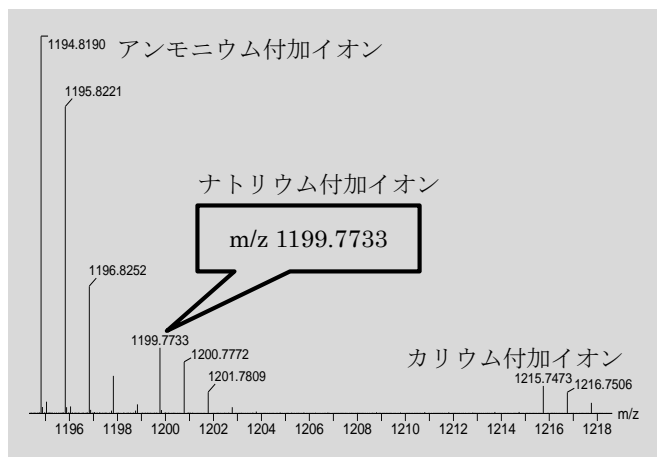


図5 ピーク1のマススペクトル

ナトリウム付加イオンの精密質量データを用いて、組成式推定を試みた。構成元素条件は以下のように設定した。

- ①構成元素の種類として、C, H, N, O を想定。
- ②同位体比から、Cの数を、60~85。それに伴い、Nの数は30以下。
- ③質量数の「窒素ルール」から、Nは含まないか、もしくは偶数個含む。

組成式推定結果を表2に示す。許容質量誤差 ± 0.005 のときは、組成式候補が16個もあるのに対し、許容質量誤差 ± 0.003 のときは、組成式候補が7個になり、さらに許容質量誤差 ± 0.001 を保証できれば、組成式候補は2つに絞り込める。質量分析値の正確性が組成式推定に重要であることが分かる。また、構成元素条件をより限定できれば、組成式候補を更に絞り込むことができる。今回のケースでは、構成元素をC, H, Oのみと仮定すると、許容質量誤差 ± 0.005 であっても組成式候補は1つとなる。また、仮にエステル構造を含むと想定できれば、Oが1つ以下の組成式を除外することが

表2 m/z 1199.7733 の組成推定結果

許容誤差	± 0.005	± 0.003	± 0.001
組成候補	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂ Na C ₇₁ H ₉₆ N ₁₄ O ₂ Na C ₇₀ H ₁₀₀ N ₁₀ O ₆ Na C ₇₄ H ₁₀₄ N ₄ O ₈ Na C ₆₁ H ₁₁₂ N ₂ O ₁₉ Na C ₆₇ H ₉₂ N ₂₀ Na C ₆₉ H ₁₀₄ N ₆ O ₁₀ Na C ₇₅ H ₁₀₀ N ₈ O ₄ Na C ₆₂ H ₁₀₈ N ₆ O ₁₅ Na C ₆₀ H ₉₆ N ₂₀ O ₅ Na C ₆₈ H ₁₀₈ N ₂ O ₁₄ Na C ₆₆ H ₉₆ N ₁₆ O ₄ Na C ₇₆ H ₉₆ N ₁₂ Na C ₈₁ H ₁₀₀ N ₄ O ₃ Na C ₆₃ H ₁₀₄ N ₁₀ O ₁₁ Na C ₆₁ H ₉₂ N ₂₄ ONa	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂ Na C ₇₁ H ₉₆ N ₁₄ O ₂ Na C ₇₀ H ₁₀₀ N ₁₀ O ₆ Na C ₇₄ H ₁₀₄ N ₄ O ₈ Na C ₆₁ H ₁₁₂ N ₂ O ₁₉ Na C ₆₇ H ₉₂ N ₂₀ Na C ₆₉ H ₁₀₄ N ₆ O ₁₀ Na	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂ Na C ₇₁ H ₉₆ N ₁₄ O ₂ Na

できる。このように、精密質量測定値から組成式推定をおこなう場合には、測定値の正確性（誤差）の見積り、および構成元素条件の見積りが重要となってくる。今回のケースでは、汎用的な酸化防止剤であるイルガノックス 1010 相当品（図6参照）であると判断できた。ナトリウム付加イオンの理論値は m/z 1199.7738 であり、測定値との誤差は 0.0005 と極めて小さく、正確な質量分析値が得られていることが分かる。

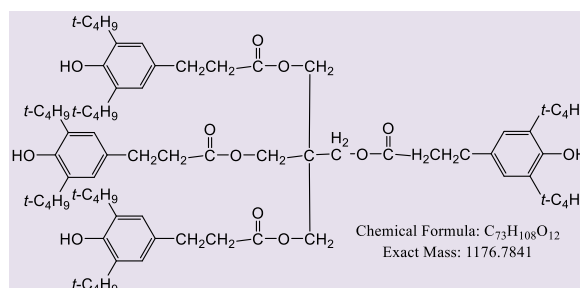


図6 イルガノックス 1010 化学構造

3.2 防かび剤中の有効成分

市販の空気清浄機の中にある防かび剤中の有効成分を同定することを試みた。ペレット状防かび剤を有機溶媒に浸漬して、可溶分を LC/MS 分析に供した。トータルイオンクロマトグラムを図7に示す。

検出ピーク2のマススペクトルを図8に示す。同位体パターンをみると、[M+2]の相対比が若干大きいことがわかる。各元素の同位体存在度を考慮すると硫黄を含む成分であると推察できた。これを踏まえて構成元素条件を以下のように設定し、プロトン付加イオンの組成推定を実施した。

- ①構成元素の種類として、C, H, N, O, S を想定。
- ②同位体比および質量値から、Cの数を5~15。Sの数を1~2。
- ③質量数の「窒素ルール」から、Nを奇数個含む。

組成式推定結果を表3に示す。分子量が小さいため、許容質量誤差 ± 0.005 としても、組成式候補が2個に絞られた。世の中で知られる防かび物質を踏まえて考えると、当該成分はチアベンダゾール（図9参照）と判断できた。

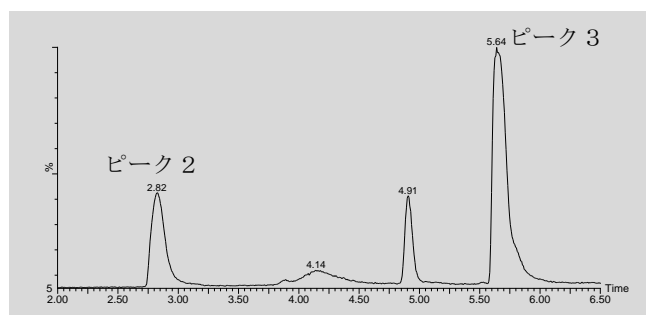


図7 トータルイオンクロマトグラム(防かび剤抽出成分)

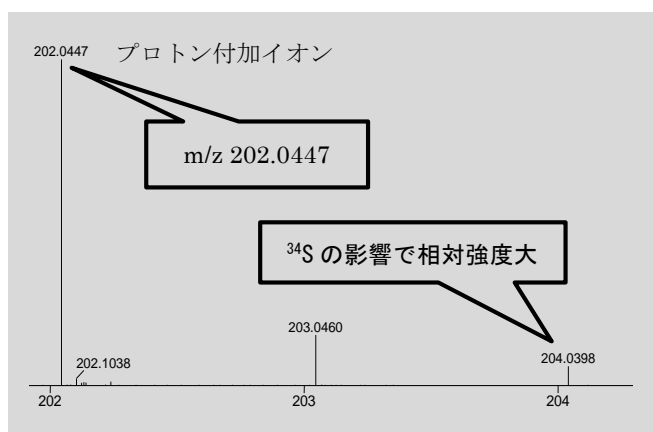


図8 ピーク2のマススペクトル

表3 m/z 202.0447 の組成推定結果

誤差	±0.010	±0.005	±0.002
組成候補	C ₁₀ H ₈ N ₃ S C ₇ H ₁₂ N ₃ S ₂ C ₅ H ₈ N ₅ O ₂ S C ₈ H ₁₂ NO ₃ S C ₈ H ₁₂ NOS ₂	C ₁₀ H ₈ N ₃ S C ₇ H ₁₂ N ₃ S ₂	C ₁₀ H ₈ N ₃ S

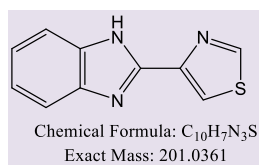


図9 チアベンダゾール化学構造

次に、検出ピーク3のマススペクトルを図10に示す。精密質量値が整数質量値より、かなり小さくなっていることが特徴として挙げられる。有機化合物に含まれる可能性のある元素を考慮すると、ヨウ素を含むことが示唆された(ヨウ素は、¹²⁷I が天然存在度 100%であり、質量値 126.904468 u)。またピーク2のマススペクトルと同様に [M+2] イオンのw 相対強度が高いことから硫黄を含むことも示唆された。以下の構成元素条件にて、プロトン付加イオンの組成推定を実施した。

- ①構成元素の種類として、C, H, N, O, S, I を想定。
- ②同位体比および質量値から、C の数を 4~15。S の数を 1~2。I の数を 1~2。
- ③質量数の「窒素ルール」から、N は含まないか、もしくは偶数個含む。

組成式推定結果を表4に示す。許容質量誤差±0.001とすると、組成式候補は1個に絞られ、汎用的な防かび物質であるジヨードメチルパラトリルスルホン(図11参照)プロトン付加イオンと組成式が合致した。

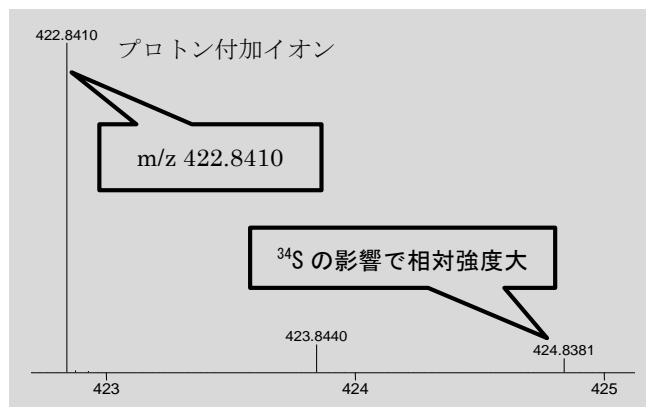


図10 ピーク3のマススペクトル

表4 m/z 422.8410 の組成推定結果

誤差	±0.005	±0.003	±0.001
組成候補	C ₈ H ₉ I ₂ O ₂ S C ₉ O ₈ IN ₂ SI C ₁₃ O ₃ IN ₂ S ₂ C ₄ H ₅ I ₂ N ₆ S C ₄ H ₉ I ₂ O ₇ C ₄ O ₁₀ IN ₄ S C ₁₁ H ₅ I ₂ O ₂ C ₅ O ₁₃ IN ₂ C ₅ H ₁₃ I ₂ O ₂ S ₂ C ₅ H ₅ I ₂ O ₃ N ₄ C ₆ H ₄ IO ₈ N ₂ S ₂	C ₈ H ₉ I ₂ O ₂ S C ₉ O ₈ IN ₂ SI C ₁₃ O ₃ IN ₂ S ₂ C ₄ H ₅ I ₂ N ₆ S C ₄ H ₉ I ₂ O ₇ C ₄ O ₁₀ IN ₄ S	C ₈ H ₉ I ₂ O ₂ S

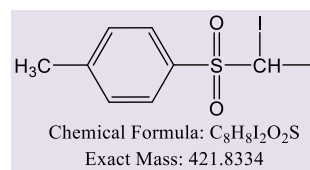


図11 ジヨードメチルパラトリルスルホン化学構造

4 まとめ

LC-TOFMS の化学工業分野における有用性について、幾つかの測定事例を挙げて紹介した。LC-TOFMS では、質量分析データから各分離成分の組成式を推定することができ、定性能力が高い。今後も、さまざまな局面で活用していきたい、知見を深めていきたい。

引用文献

- 1) 日本分析化学会編, “LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用”, 中村洋 監修, オーム社 (2014).
- 2) 高田じゅん, 東亜合成グループ研究年報, **9**, 38 (2006).
- 3) 志田保夫, 笠間健嗣, 黒野定, 高山光男, 高橋利枝, “これならわかるマススペクトロメトリー”, 化学同人 (2001).
- 4) 中田宗隆, “なっとくする機器分析”, 講談社 (2007).