

大気圧イオン化法(API法)によるLC/MSに関する基礎的研究

Fundamental Studies on LC/API-MS

内山秀文*・松島美一**・永田佳子**・高井信治*

Hidefumi UCHIYAMA, Yoshikazu MATSUSHIMA, Yoshiko NAGATA and Nobuharu TAKAI

1. はじめに

クロマトグラフィーと質量分析器を直結させる分析法はクロマトグラフィーの分離能力と質量分析法の高感度かつ迅速な定性能力という両者の長所を生かした理想的な分析法であると考えられる。ガスクロマトグラフィー(GC)についてはGC-MS直結法がほぼ完成した手法として確立されており、特に最近になって急速な進歩をとげたキャピラリーカラムGC/MSなど広い実用的分野で活用されている。しかしGCの場合、試料が気化しやすく熱に対し安定でなければならないという制約があり、また分析可能であっても誘導体化などの処理を必要とするものも多い。これに対し液体クロマトグラフィー(LC)では逆相、順相、イオン交換などの諸方法がすでに各方面で活用されており、極性が大きい、もしくは熱に対し不安定であるような化学種についても、分離分析することが可能であるので、分析対象はGCに比べ、格段に拡大される。

しかし実際にLCとMSを直結するとすると、2つの装置が両極端における分析条件で作動しているため、インターフェースには困難な役目が担わされることとなる。LCでは試料が難揮発性の緩衝剤やイオン対試薬などが共存する希薄溶液として取り扱われているのに対して、MSでは試料化合物を気化-イオン化し、高真空中での電場や磁場によって分離・検出しているからである。具体的には、LCは、一般に0.1~1.0ml/minの液体を送り出すが、MSの真空排気系はガスとして1ml/min、つまり1μl/minの液体を排気する能力しか持っていない。そのため、インターフェースの部分で溶媒が何らかの形で気化除去されなければならない。

これまでに移動ベルト法や、サーモスプレー法などのインターフェースが考案されているが¹⁾、今回、大気圧イオン化法(API法)をインターフェースとするシステムが

考案された。

これは、常圧の下で大量の溶媒を分離除去し、コロナ放電でサンプルのみをMSに導入するものである。このシステムによる分析法を確立するため、LCの分離のための溶媒系および試料のイオン化条件について、基礎的な研究を行ったので報告する。

2. 概要

このAPIをインターフェースとして用いたLC/MSは、溶媒を気化、除去するため、生体試料の分離によく用いられるリン酸やクエン酸などの、不揮発性のものや結晶性のバッファーは移動相として用いることができない。このため、移動相をメタノール/水系に限定し、添加剤としても、酢酸、アンモニアなどAPI/MSで使用できるものを用いて、まずLCでの分離条件について検討した。

LCで分離したものについて、次にそれらをMSに導入し、イオン化条件を検討しつつデータを収集したところ、いくつかの医薬品でマススペクトルを得た。

3. 装置

装置はHitachi M-1000型質量分析器でLC部、インターフェース、四重極質量分析器、データ処理部からなる。LC/APIインターフェースは、溶媒を質量分析器に送り込む前に、ガス化、イオン化する部分である。

図1にLC/APIインターフェースの構成図を示す。液体クロマトグラフから流出した試料と移動相溶媒は、テフロンパイプを通り、霧化器によって霧状となり空中に噴霧される。空中に浮いた試料には多くの溶媒が付加しているが、脱溶媒室を通過する間に、溶媒分子は加熱され蒸発し、理想的には、試料分子が単独で空中に浮いた状態となる。

この後、試料と溶媒は針電極部、第1細孔、第2細孔を通り、MSへと導入されるが、この部分を図2に示す。

試料分子は、針電極部へ進み、ここで、コロナ放電により溶媒分子が1次イオン化され、さらにこのイオンと

*東京大学生産技術研究所 第4部

**共立薬科大学

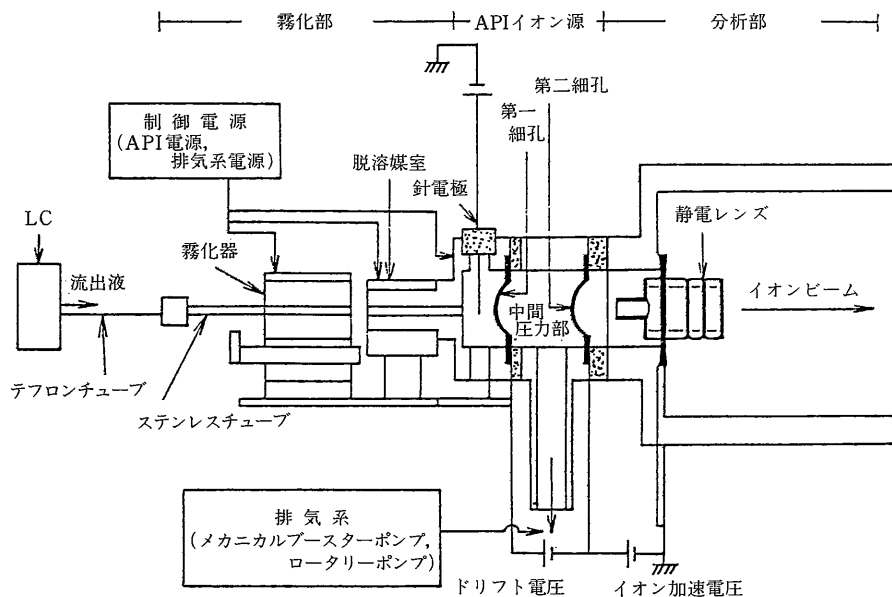


図1 LC/APIインターフェイスの構造図

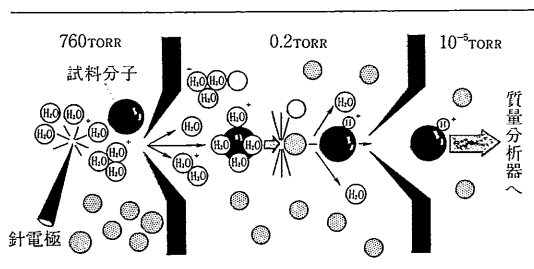


図2 試料分子のイオン化（概念図）

試料分子が衝突することにより電荷が移動し（イオン分子反応）、試料分子はイオン化される。このイオンが第1、第2細孔を通して、質量分析部へ送られ分析される。この際、第1、第2細孔間に加えられる電圧（ドリフト電圧）が動かすことにより、試料分子に溶媒分子の付加したイオン（クラスターイオン）の脱離や、分子自身が解離したイオン（フラグメントイオン）の大小を加減することができる。

4. 実験結果

図3は、カフェイン、テオフィリン、テオブロミンの3種のキサンチン誘導体の分離を示したものである。カフェイン、テオフィリン、テオブロミンの順に溶出した。

図4はかぜ薬の成分であるアスピリン、アセトアミノフェン、カフェインの分離について示したものである。アスピリン、アセトアミノフェン、カフェインの順に溶

出した。

以上LCで分離した5種類の試料をそれぞれ単独でLCによる分離を行わずMS直接導入したところ、はっきりとイオン化がみられたため、この2種類の混合物についてLC/MSによる分析を行った。

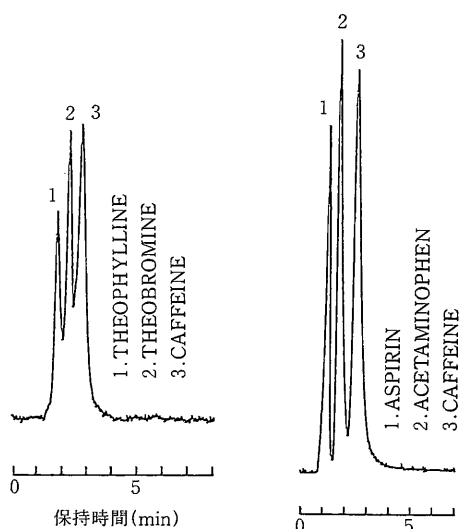
図5にカフェイン、テオフィリン、テオブロミンのマスプロットグラムを示す。図中のTICはTotal Ion Currentで、MSで検出されたすべてのイオンの量をあらわしている。下の2つのクロマトグラムは、質量数(M/Z)が195と181のものをそれぞれとりだしたマスプロットグラムである。クロマトグラムは、図3のLCで分離したチャートと同じように、テオフィリン、テオブロミン、カフェインの順になっている。テオフィリンとテオブロミンは、分子量が180で、それにプロトンが付加し、181のM/Zになったものがベースピークとして検出され、またカフェインは、分子量が194で、それにプロトンが付加し、195のM/Zになったものがベースピークとして検出される。

そこで、それぞれのピークについて、マスペクトルを示す。図6、図7、図8は、それぞれテオフィリン、テオブロミン、カフェインのマスペクトルを示したものである。ベースピークは前述のようにそれぞれの試料分子にプロトンが付加した $[M+H]^+$ を表している。

図9に、アスピリン、アセトアミノフェン、カフェインのマスプロットグラムを示した。

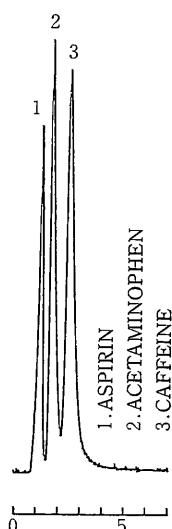
3種の医薬品は、図4のLCで分離したチャートと同じ

研究速報



Column MPG-ODS
Column size 4×150mm
Eluent MeOH:H₂O=30:70
(1% NH₄OH)
Flow rate 0.7ml/min
Detector UV 254nm

図3 クロマトグラム



Column MPG-ODS
Column size 4×150mm
Eluent MeOH:H₂O=30:70
Flow rate 1.0ml/min
Detector UV 254nm

図4 クロマトグラム

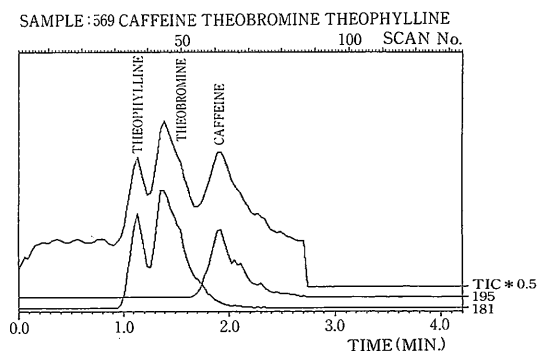


図5 マスクロマトグラム

ように、アスピリン、アセトアミノフェン、カフェインの順に溶出している。アスピリンは分子量が181であるが、熱に対し不安定であり、インターフェースにおいて気化、脱溶媒を行う過程で分解し、M/Z121のフラグメントを安定して生成する。アセトアミノフェンは分子量が151で、それにプロトンが付加し152のM/Zになったものがベースピークとして検出され、またカフェインは前と同様に、分子量194にプロトンが付加したM/Z195のものが、ベースピークとして検出されている。

次に、それぞれのピークについてマスペクトルを示す。

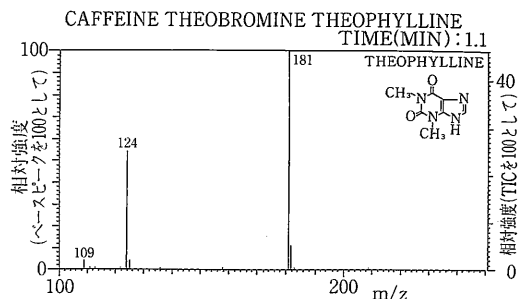


図6 マスペクトル

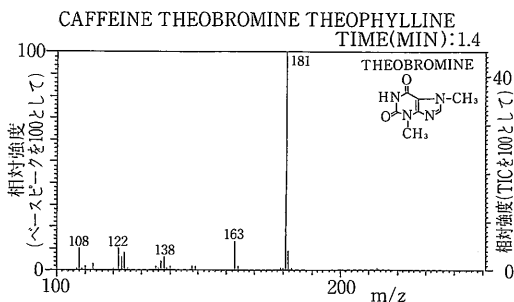


図7 マスペクトル

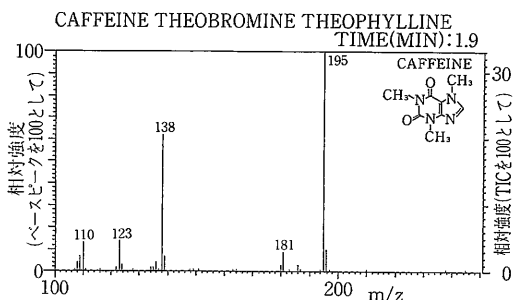


図8 マスペクトル

図10は、アスピリンのマスペクトルを示したものである。ベースピークは、アスピリンのフラグメント(M/Z121)を表している。

図11は、アセトアミノフェンのマスペクトルを示したものである。ベースピークは、アセトアミノフェンの分子にプロトンが付加した[M+H]⁺を表している。

図12は、カフェインのマスペクトルを示したものである。ベースピークは、カフェインの分子にプロトンが付加した[M+H]⁺を表している。

5. ま と め

今回の実験ではいくつかの試料を用いて、LC分離のための溶媒の液組成の検討を行い、API-MSに用いるこ

研究速報

SAMPLE: 593 ASPIRIN, ACETAMINOPHEN, CAFFEINE
SCAN No. 100

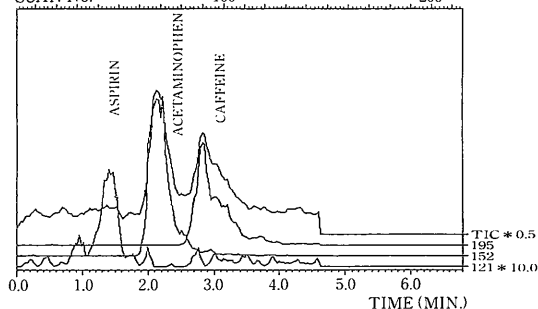


図9 マスクロマトグラム

ASPIRIN, ACETAMINOPHEN, CAFFEINE

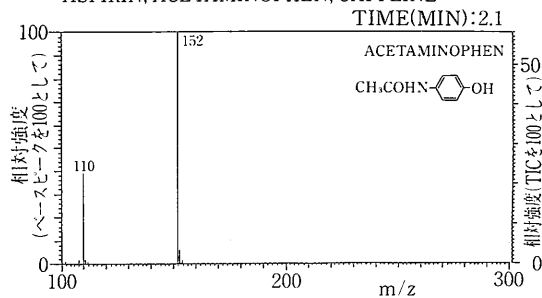


図11 マススペクトル

ASPIRIN, ACETAMINOPHEN, CAFFEINE

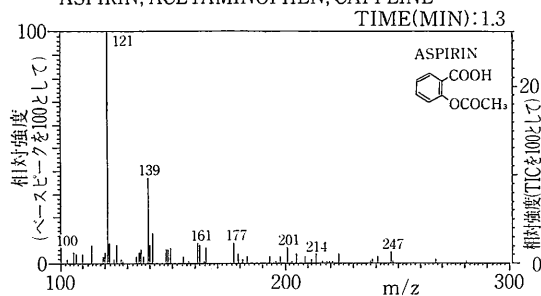


図10 マススペクトル

ASPIRIN, ACETAMINOPHEN, CAFFEINE

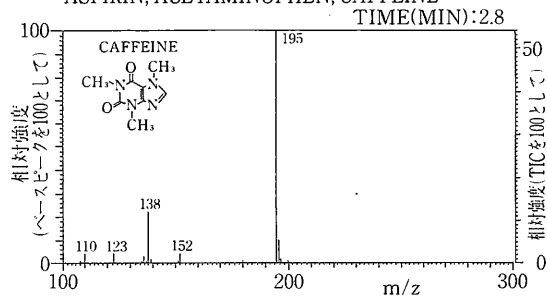


図12 マススペクトル

とのできる分離系を確立した。そして、分離した試料をMSの装置に導きイオン化してマススペクトルを得ることができた。今後は各種の試料に対し、さらにイオン化の条件を検討することにより、API法によるLC/MSの利用範囲を拡大していきたいと考えている。

また、このMSではいくつかのピークだけを測定して定量を行うことができるので、生体内でのいろいろな代謝産物について分離・同定し、さらに定量分析するという研究に対する活用も期待される。

最後にこの研究を行うにあたり実験に協力された共立薬大の福間百合さん、後藤小夜子さんに感謝致します。

(1991年1月28日受理)

参 考 文 献

- 1) 土屋正彦, 大橋 守, 上野民夫: 質量分析法の新展開 現代化学増刊15 1988年 9 月
- 2) E.C.Huan, T. Wachs, J.J. Conboy, J.D. Henion, Anal. Chem., 62, 713-725, (1990)
- 3) Sakairi, M.; kambara, H., Anal. Chem., 60, 774-780, (1988)
- 4) Kushi, Y.; Rokukawa, C.; Numajiri, Y.; kato, Y.; Handa, S., Anal. biochem., 182, 405-410, (1989)
- 5) Kato, Y.; Takahashi, S.; Hirose, H.; Sakairi, M.; Kambara, H., Biomed. Environ. Mass Spectrom., 16, 331-334, (1988)
- 6) Kato, Y.; Numajiri, Y., J. Chromatogr., 535 (1991)