ガスクロマトグラフと質量分析計の結合について

池 川 信 夫*

Combination of Gas Chromatograph and Mass Spectrometer.

Nobuo IKEKAWA*

I. ま え が き

数年前本誌¹⁾においてガスクロマトグラフィー（以下GCと略す）の最近の進歩とGCと他の機器との連結について述べ、その中でGCとマススペクトロメーターとの直結法（以下GC-MS法と略す）の概略について述べたが、近年GC-MS法についての関心が非常に高まり、かつその研究報告がますます多くなってきたので、これについてやや詳しく述べようと思う。

最近GCは装置の進歩とともに不揮発化合物を揮発性誘導体に変える方法（特にTMSi化）の進歩によって一段と応用範囲が広がり、広く天然物一般、および生体内微量成分等の分析法としてますます重要になってきた。そこでGCで分離されたピークのそれぞれのスペクトルが直ちに記録されて、それらの構造解析を同時に行なえば、広く有機化合物の研究上役立つことは間違いない。GCと他の機器例えば赤外線スペクトロメーターやラジオカウンタなどと連結した装置が市販されるようになったが、中でもMSとの直結装置は最も秀れたものといえる。

このようなGCを基本とした各種分析法を有機化合物の気相分析法としてまとめることができ、分析化学の非常に重要な新しい分野となった。特に生化学などの分野ではこれまで全くみられなかった気相分析法が大きくクローズアップされている。

GCは分離能、感度など種々の特徴をもっているが各種スペクトルに比べ同定の手段としては確実性に欠けている。一方MSは構造解析上すでに必須の方法となっているが、欠点は試料が混合物である場合にはその解析が困難である。GCとMSはともに試料をガス状として分

析する点および微量試料で分析できる点など類似点をもつ反面その性能の得失は互に相補うものである。近年両装置とも分子の大きなものまで測定できるように進歩したので、生体内微量成分あるいは天然物化学などの分野において両者の関係はますます密接になってきた。

GCに日常用いられている水素炎イオン化検出器は1~0.01 r 程度の物質の分析に用いられ、さらにエレクトロンキャプチャーを用いれば1 ng~1 pgの物質の検出が可能である。MSの感度は通常の直接導入法で0.01 rの試料の同定が可能であるが最近のMass fragmentography²⁾を用いればpg程度の検出が可能である。各種スペクトルの測定感度を表1に示すが、MSの感度が他のスペクトルに比べ圧倒的に高いことがわかる。

II. 直結装置の概略

GCで分離した試料をいったんトラップしてMSへ導入する方法はマススペクトルをゆっくり測定できるため感度と分解能がよく、高速スキャンニングの必要がないなどの利点があるが、サンプル量の多い場合とGCでの分離が十分である場合に限られる。試料成分が多いとき、

表1 各種スペクトルの測定感度

	Detection limit μg	Identification limit μg
MS		
Batch inlet	1	10^2
Direct inlet	$10^{-3}\sim 10^{-4}$	10^{-2}
GC-MS	10^{-4}	10^{-2}
Mass fragmentography ²⁾	10^{-6}	
nmr		
Standard sample	10^3	10^4
Microcell	3×10^2	3×10^3
24-hr-time-averaged	10	10^2
IR		
Microcell	3×10	3×10^2
Ultramicrocell	3	3×10

* 東京工業大学 ()

* Tokyo Institute of Technology ()

微量である場合、分離が完全でない場合などでは GC からでた成分を直接 MS に入れる必要がある。1959 年頃からタイムオブフライト型 (TOF 型) MS を用いて GC・MS の直結が報告されているが、TOF 型は小型で応答が速いなどの利点があるが分解能が 200~300 程度なので分子量の大きい化合物には利用できない¹⁾。

直結装置における最も重要な点は GC で送られてきたキャリアガスをいかにして除いて MS 測定に必要な $10^{-5} \sim 10^{-6}$ mm Hg の減圧度に下げるかにある。その本格的な研究は 1964 年スウェーデン Karolinska 研究所の Ryhage²⁾ とアメリカ MIT の Biemann³⁾ によって発表された。それぞれ独自のキャリアガス除去装置すなわちモレキュラーセパレーターを考案して、有機化合物全般に応用できる GC-MS 直結に成功した。装置の概略を図 1 に示す。注入されたサンプルは GC のカラム中で分

ば直ちにそのスペクトルから構造が推定できるようになっている。

単収斂 MS でも二重収斂 MS でも同じように GC と直結できるが現在のところ二重収斂の高分解能 MS を用いたデーターは少なく、ほとんど単収斂 MS が使われている。

III. モレキュラーセパレーター

キャリアガスを除きサンプルだけ MS に導入する方法について数種の方法が報告されその中の二、三のものは実用化され広く用いられている。そのモレキュラーセパレーターを大別すると、1) ジェット型のもの。2) キャリヤガスが壁膜を通して除かれ有機物のみ MS に導入されるもの。3) 反対に有機物が膜を通過して MS に入りキャリアガスは膜を通らずに除かれるものの 3 種に分けられる。いずれも原理的には同位元素の分離に使用されているものを GC-MS に応用したものが多く、それらについて以下述べる。

1. ジェット型セパレーター (Becker-Ryhage 型)²⁾

Becker がウランウムの分離のために考案したジェットセパレーターを Ryhage が改良したもので図 2 に示すように内径 0.004~0.01 インチのジェットを持ち、2 段階にキャリアガスが除かれる。重い分子は接近した 2 個のジェットを通して MS に直進し、軽い He は拡散してポンプでひかれる。初段セパレーターは排気速度 9.5 m³/h のフォアポンプで排気され、He 流量 30 ml/min で約 0.1 mmHg の圧力になる。残った He はさら

に次段セパレーターで除かれる。次段は 10^{-6} mmHg で、空気に対して 150 l/s の排気速度をもつ油拡散ポンプで排気され、 10^{-3} mmHg 以下の圧になっている。その結果 He の 99% が除かれ、サンプルは最高 75% がイオン源に達する。

セパレーターの効率について詳しい実験結果が報告³⁾されている。まず He 流量と MS の感度についての実験ではメチルステアレート 0.1 μ g を注入し、He 流量を 18~45 ml/min まで変化させて全イオン量を測定した結果、流量を上げるとピーク面積が増し 30 ml/min (イオ

図 1 GC-MS 装置の略図

離されてモレキュラーセパレーターに入る。ここで大部分のキャリアガス (この場合 He を使用) は除かれキャリアガスよりも分子の大きなサンプルだけが MS のイオン源に入る。サンプルはイオン化され、その約 10% はトータルイオンモニターに感じて記録され GC のピークが描かれる。この部分は GC のイオン化検出器と同じように働いている。大部分のイオンはマグネットを通りマルチプライヤーに感じ、増幅され、ビジュグラフによって数秒の間にそのマススペクトルが得られる。したがって GC のピークが出た所でビジュグラフのスイッチを押せ

図 2 Ryhage 型セパレーター

ンソース内圧 1.2×10^{-6} mmHg に対応) でピーク面積は最高になる。またセパレーターの出口でメチルステアレートの回収率がしらべられている。セパレーターの後に 2.5×600 mm の U 字管をつけて -198° に冷却し、U 字管の先に水銀拡散ポンプをつけて引く。He 27 ml/min の流量で GC のカラム入口からサンプルを 50 μ g 注入する。セパレーターを通ったサンプルは U 字管にたまるのでその量を定量した結果第 1 セパレーターで約 16%，第 2 セパレーターで約 40% の損失が見られた。

GC 入口と MS の直接導入系から同量のサンプルを注入してセパレーターを通過してイオンソースへ入る量を比較した結果メチルパルミテートで 65~75% が MS に入り、テトラメチルピラチンでは約 65% が MS に入ることがわかった。

n_o , n_e を各々セパレーター前後での成分のモル比とすると分離係数 (separation factor) S は

$$S = \frac{n_e(1-n_o)}{n_o(1-n_e)} = \frac{n_e}{n_o}$$

で計算される。上述のメチルパルミテートの場合の実験条件は、カラム内 He 30 ml/min, 分析管内圧 1.2×10^{-6} mmHg で、この真空度は MS へ He が 0.25 ml/min 流入した場合に対応する。したがって

$$S = \frac{n_e}{n_o} = \frac{65/0.25}{100/30} = 86$$

最高の濃縮率と感度が得られるためのジェットの内径、ジェット間の距離、セパレーター内の圧力などが検討されて現在の市販品となっている。このセパレーターの特長は濃縮率が大きく、サンプルの損失が非常に少なく、デッドボリウムが少ないのでメモリー効果が少ない

ことなどで、そのほかすべての温度で効率がよく、流速が大きくても使用でき、また機械的に組立てが簡単で掃除し易いなどの利点がある。

セパレーター内でのサンプルの分解はほとんど見られない。分子の小さいものでは効率がおちるといわれているが、効率がおちるのは分子量 30 以下でそれ以上のものでは問題ない。以上を総合してこのセパレーターは非常に秀れたもので、Ryhage によって開発された GC-MS 直結装置は LKB-9000 として市販されており、文献上現在生化学および有機化学の分野でもっとも多く使われている。

2. 多孔質ガラス管を用いる方法 (Watson-Biemann 型) Watson, Biemann¹⁾ によって報告されたもので図 3 に示すように多孔性のガラス管 (外径 8 mm, 壁

図 3 Watson-Biemann 型モлекуラーセパレーター

の厚さ 2 mm, 長さ 8 インチ) によるセパレーターである。外套管は真空ポンプで引かれているので小さな穴 (内径 0.9~1.4 μ) を通して He が除かれ、より分子の大きなサンプルは直進する。多孔性壁面からの He と有機分子との拡散速度の差を利用したもので、セパレーター内での拡散を行なわせるためにはガスの平均自由行程が通過する穴の径 (約 1 μ) の 10 倍でなければならないという。これはセパレーターの管内圧が数 mmHg と対応している。セパレーターの前後に絞りをつけるが、入口の絞りは He が拡散し易い減圧にするためと、GC からセパレーターへの流量をきめるために重要である。また出口の絞りは MS のイオンソースの最高時圧に関係し、全装置の感度をコントロールするので両絞りの径はセパレーターにとって非常に重要である。Biemann によれば絞りの径は入口約 0.2 mm, 出口約 0.1 mm で、この時操作中のイオンソース内圧は $1 \sim 2 \times 10^{-5}$ mmHg である。

Grayson ら²⁾ は Biemann 型セパレーターと後述の Lipsky 型セパレーターについてセパレーターの温度と He 流量をかえたときの分離収率 Y と濃縮率 N を特に低分子量のエタン、 n -ヘキサンなどについて検討した。 Y と N は

Q_{MS} : MS に入ったサンプル量

Q_{GC} : セパレーターに入ったサンプル量

He_{MS} : MS への He 量

He_{GC} : セパレーターの He 量
とすると、

$$Y = \frac{Q_{\text{MS}}}{Q_{\text{GC}}}$$

$$N = \frac{Q_{\text{MS}}/\text{He}_{\text{MS}}}{Q_{\text{GC}}/\text{He}_{\text{GC}}} = Y \frac{\text{He}_{\text{GC}}}{\text{He}_{\text{MS}}}$$

として表わされる。 Y は装置がサンプルを MS のイオンソースにどの位通せるかの能力を表わしており、効率を表わすわけではない。また N が大きくてもイオンソースへのサンプル量が少なくではよいスペクトルが得られないので実際のセパレーターの実用性と Y , N 間の関係は複雑である。

Grayson の用いている装置ではセパレーターとイオンソースの間にニードルバルブを取付け、開閉できるようになっている。普通約 1/5 程度開いて使用している。ニードルバルブの調節で He 流量を 100 ml/min 位まで上げてイオンソース内圧は $1 \sim 2 \times 10^{-6}$ mmHg 程度である。

Y , N と He 流量 (5, 10, 15 ml/min), セパレーター温度 (75, 150, 225, 300°) との関係をまとめると次のようになる。

	実 験 値	流 量	温 度
Y	分子量 30~128 で 15~65%	流量に無関係	75~300° にする と 15~20% 減
N	分子量 30~128 流量 5~15 ml/min で 5~20	流量 5 → 15 ml/ min で 60~80% 増加	150° 以上で温度 に無関係

流量を上げると N が増し、多くの実験で 100 ml/min で好結果を得ている。温度は低い方がよいか、低く過ぎるとサンプルがセパレーター前で凝縮してしまうので、セパレーターの Y を最適にしてしかもサンプルの濃縮を防ぐため GC のカラム温度に合わせてセパレーター部も昇温した方がよいと述べている。

この型のセパレーターの特長は比較的セットし易く、操作も容易である。キャリアガス流量幅が広く使用でき、比較的よい濃縮率が得られるなどである。欠点としてはガラスであるからこわれ易く、吸着によるメモリー効果が大きく、洗浄できない。またサンプルが分解する場合があり、デッドボリウムがかなり大きいと分離した成分の再混合が起るなどの危険がある。LKB 以外の MS ではこのセパレーターが多く使われている。また 2 段に使用している装置もある。最近 Markey⁷⁾ は Biemann 型セパレーターを生化学的に使用できるよう改良している。すなわち多孔性ガラス管の長さを短くして 2 インチとし、イオンソースへの絞りは内径 0.2 mm, 長さ

2.5 cm のキャピラリーとし、 GC とセパレーター間は内径 2 mm のキャピラリーを使用し、できるだけデッドボリウムを少なくしている。セパレーターを短くすることによって濃縮率はほとんど変わらないという。また GC とセパレーターの間にオールガラスシステムの二段のバルブをつけている。

3. 金属膜を用いる方法 McCloskey⁸⁾ はガラスの代りに図 4 のような多孔性ステンレス管(穴の大きさ 0.1

図 4 McCloskey 型セパレーター

μ) とステンレスジャケットからなるセパレーターを発表している。セパレーター内壁をアルカリ洗浄後ジメチルジクロロシランでシラン化した後ベーキングして使用する。コレスタンの場合 He 流速 35 ml/min では 40% がイオンソースに到達し、イオンソース圧は 1.8×10^{-6} mmHg で、その時の濃縮率は 108 であった。また流速 7 ml/min では 48% がイオンソースに達するが濃縮率は 10 であった。このセパレーターの長所は高温に加熱することができベーキングが可能で、熱伝導性がよいこと、溶媒で洗浄が可能などである。ステロイド、スクレオサイド TMSi などの分析例を報告している。

Cree⁹⁾ は多孔性銀薄膜から He を選択的に拡散させる方法を考案した。多孔性銀膜 2 枚の外側から真空にひくと、 He は膜を通してポンプに引かれ、サンプルが濃縮されて MS に入る。セパレーターの本体は直径 3.4 インチのステンレス製超真空フランジ 2 枚よりなる。全装置は 450° まで加熱可能で膜がこわれたり汚れたときは膜の部分だけ簡単に交換でき、また銀膜の孔の大きさは可変である。セパレーター内のデッドボリウムはかなり大きく、またサンプルのセパレーター内の滞留時間が長いので、分解が起ると考えられるが詳しいデータの詳細な報告がない。

山内¹⁰⁾らが発表しているソリッドデスク型濃縮器もこれと似た原理にもとづいている。Blumer¹¹⁾ も多孔質銀膜のセパレーターをまた Lucero¹²⁾ は銀-パラジウム合金膜を多段に使用する方法を発表しているが、これらにつ

いても詳しい濃縮率の検討および応用範囲の検討が報告されていないので実用的な価値はまだ不明である。

4. テフロン膜を用いる方法 (Lipsky 型のセパレーター) Lipsky¹³⁾ は有機ポリマー薄膜が気体に対して種々の透過性を示すという原理を応用してセパレーターを考案した。真空中 300°まで耐えるポリマー薄膜を検討し、He に対してよい透過性を示し、またバックグラウンドのないものとしてテフロンを使用した。厚さ 0.005 インチ、内径 0.01 インチ、外径 0.02 インチ、長さ 7 フィート、表面積 20 cm² のテフロンキャピラリーを図 5 のようにセットし外側を真空中に引く。

図 5 Lipsky 型モレキュラーセパレーター

He の透過速度は膜の両側の圧力差、温度、薄膜の表面積に比例し、膜の厚さに反比例する。このうち最も重要なのは温度で、P を He の透過速度とすれば

$$P = P_0 \exp(-E_p/RT)$$

ただし、P₀ は定数、E_p は透過の活性化エネルギー、R は気体定数、T は絶対温度である。したがって He の透過度は T に関して級数的に増加することになる。実験の結果至適操作濃度は 250~260° (+室温) で、このとき He は十分除かれ、しかも溶質の損失は最小であった。イオンソースに入る有機物は 40~70% で、イオンソース内圧も 2~3×10⁻⁵ mmHg である。セパレーター温度を 300° にすると He は全部除かれるが、溶質も膜を通して外側に拡散してしまう。200° では溶質の損失はないが、He の除去が不充分である。

Grayson ら⁹⁾ は前述の如く分離収率 Y と濃縮率 N について Lipsky 型と Biemann 型セパレーターを比較しているが、温度を 280, 300, 320°, He 流量を 5, 10, 15 ml/min にかえたときの実験結果は次の通りである。

	実験値	流量	温度
Y	分子量 30~128 で 50~90%	流量 5→15 ml/ min で 30~40 減	この温度範囲で は温度に無関係
N	分子量 30~128 ; 流量 5~15 ml/ min で 1~5	流量 5→15 ml/ min で 2~2.5 倍 増加	同上

操作温度は 280~330° がよく、270° 以下では Y=100 % N=1 でセパレーターの働きをしない。350° では数時間で使用不可能になる。このセパレーターは適当な温度

と圧力下では有機化合物に比べ He の透過性は非常にいいが、種々の化合物に対して適当に操作するのはむずかしい。

5. シリコン膜を使用する方法 Llewellyn¹⁴⁾ らはこれまでの方法と異なり、キャリアガスから有機分子を抽出する型のセパレーターを発表した。これはメチルシリコンの膜が GC の充てん剤の液相と同じように作用して、He と有機分子が膜に接触すると有機分子だけが膜を通して拡散することを応用したものである。その略図を図 6 に示す。

図 6 Llewellyn 型セパレーター

膜の透過性は溶解度と拡散速度できまる。He の場合、拡散速度は速いが吸着エネルギーが非常に小さくほとんど膜にとけこまない。したがって透過性は非常に小さい。一方有機分子は溶解度が大きいので透過性が大きく、膜を通して低圧側に引かれる。図 6 の装置では 2 段のセパレーター（膜）を使用している。このセパレーターの濃縮率は大きく、また流量、ガス圧もあまり関係ないという利点があるが、有機膜が固定相のように作用するので、膜部分で分離が起り、また物質により拡散速度が異なるので、強度の比較ができないなどの欠点がある。

Black ら¹⁵⁾ は厚さ 0.002 インチ、穴の大きさ 0.2 μ の多孔性銀膜にシリコンポリマーをコーティングしたセパレーターを作り、Llewellyn 型の 2 段および 1 段のセパレーターと比較している。フェニルメチルシリコンポリマーを用い、GC と TOF 型 MS とを接続している。

Llewellyn 型セパレーター 2 段のものはイオンソース内圧 1~3×10⁻⁷ torr を保つが、温度によってはピーク幅が広がる。1 段にすると He がシリコン膜をかなり通り、表面積 3 cm² で 50~200° の温度では MS の排気量が不十分である。フェニルメチルシリコンはメチルシリコンよりかなり通過性がわるく、1 段でも MS の排気量 (160 l/sec) で 2~5×10⁻⁶ torr が可能である。これを GC のキャピラリーカラムにつけ香料の研究等に使用中であるという。

Hawes¹⁶⁾ はこの型のセパレーターを全ガラス製に改

良し、1 段のメチルシリコン膜を用い、セパレーターの部分をカラム恒温槽の中に組入れ、水素炎イオン化検出器へ導く部分とシリコン膜を通して MS へ行く部分に分け両者の GC のピークの比較をしている。アルコールなどでは MS のイオンモニターの方のテーリングが目立っている。

最近 Grayson¹⁷⁾らはシリコン膜と銀膜を 2 段に使用するセパレーターを発表している。分離収率および濃縮度を測定しているが、それによれば第 1 段の分離収率は 90~100%，第 2 段では 40~60% で、全体として 40~60%，濃縮率は第 1 段が 2~20，第 2 段が 1~2 で全体として 2~40 であるという。

これらのセパレーターはいずれも分子の小さいものにはある程度用いられるが、大きなものあるいは極性のあるものには十分用い得ないであろう。

IV. 操 作 法

装置の略図は図 1 に示す通りである。カラムからの成分がイオンソースに入りイオン化されると、そのうちの約 10% が電極に集められ増幅後記録されて、GC の検出器となる。これをみながら MS をスキャンニングさせる。MS の記録計は 1~2 秒で m/e 12~500 まで記録できる。短時間にスキャンできるので、測定中の成分の分圧はほとんどかわらず、イオン強度の変化によるスペクトルの妨害はみられない。衝撃用電子エネルギーは 20 eV またはイオン量を多くするために 70 eV で行なうが、キャリアガスがイオン化されると、全イオン電流はイオンソース内圧に依存することになりクロマトのベースラインが変動する。この欠点をなくすために衝撃用電子エネルギーを 20 eV にセットする。He のイオン化電圧は 24.8 eV であるから m/e 4 に対応するイオン電流はほとんどない。またイオンモニターは 20 eV で記録し、MS のレコーダーをスキャンニングするときだけ 70 eV に自動的に切り変わるような装置もある。

MS の感度がよいのでサンプル量 0.1 μ g 以下で定性可能である。分析する試料を予め精製する必要がない上に混合不純物も MS で同定できる。GC で完全に分離しないものでも MS が 1~2 秒でとれるので同定可能である。また連続的に分析できるので、1 回に処理できるサンプル数が増すなど多くの利点がある。

GC-MS 装置では次のことを考慮しなければならない。

- 1) カラムの型、材質、充てんカラムまたはキャピラリーカラム等。またカラムを交換する場合の容易さ。
- 2) ガスクロマト装置。温度、キャリアーガスの流速等。

- 3) モレキュラーセパレーターでは次のことが必要である。

- a キャリヤガスの除去。
- b サンプルの損失または分解なしに種々のキャリヤガス流量で減圧にできる。
- c メモリ-時間が少ない。
- d デッドボリウムが少ない。
- e 洗浄が容易である。

- 4) 必要なサンプル量、セパレーター内でのサンプルの損失。

- 5) MS のイオンソース、種々のアクセサリ等。

特に注意しなければならないのはデッドボリウムを最小にし、またコールドスポットをなくし、均一に加熱することによって、サンプルのテーリングと拡散を防ぐことである。したがって GC 出口と MS のイオンソースは出来るだけ近い方がよい。セパレーター内での吸着を防ぐために Biemann 型ではシラン処理を行なうのが有効である¹⁸⁾。これはガラスでもステンレスでも有効であるとされている。

デッドボリウムを少なくするために Levy ら¹⁹⁾は Biemann 型セパレーターをガラス導入係へつなぐ位置について検討を加えており、また Gaugenberghe ら²⁰⁾はカラム出口からセパレーターまでのガラス管にアビエゾンをコーティングしたガラスビーズを充てんしている。

GC-MS 直結装置での GC の部分はほんの一部にすぎないが GC のテクニックは非常に重要である。特に揮発性の少い高分子のものの分析には GC の充てん剤が分析の成否を決めるのであらかじめその分離を GC で十分吟味しておかなければならない。GC で一見分離しているようにみえても実際には分れておらず、MS のピークが混合物を示している場合がよくあるので、できるだけ GC のテーリングを少なくする必要がある。そのために水酸基やアミノ基などを TMSi 化してから GC に導入することはよく行なわれている。

GC の液相蒸気のバックグラウンドを絶えず注意する必要がある。これをできるだけ少なくするためにカラムはよく空焼きしてから用いなければならない。なるべく蒸気圧の高い液相を使うことが必要である。普通 GC-MS として使用する場合は、GC だけで使用する時の液相の最高使用温度よりできるだけ低い方がよい。分離が主目的でない場合は短いカラム、また場合によってはより細いカラムを使うとよい。カラム温度が低くてすみ、バックグラウンドを最少にできる。

イオンモニターのピークを見ながら MS のチャートをスキャンニングすればよいが、図 7 のようにカラムの出

図 7

口約 10 cm 手前から一部を検出器の方に導いて GC のクロマトグラムを描かせておくと、イオンモニターのピークの前に GC のピークを知ることができるので、どこで MS を測定するかを決めるのに便利である²¹⁾。

GC のカラムにキャピラリーを用いて揮発性物質を分析する際はキャリアガスの流量は数 ml/min であるので He の除去は比較的容易であるが、ステロイド等を分析する場合にはキャリアガスの流量は 50~100 ml/min であるのでセパレーター前後のパイプの内径、加温等十分注意する必要がある。

V. 応 用 例

これまで述べてきたように GC-MS は非常にすぐれた分析手段で、有機化学、天然物化学、生化学をはじめ広い分野でその有用性が実証されている。以下述べる応用例は GC-MS を用いた研究のごく一部である。

GC-MS は香料、食品の香りの分析などには必須の方法であり、また公害問題の原因究明などにも大いに役立っている。これらについてはすでに多くの研究に利用されているので研究発表もますます盛んになるであろう。

脂肪酸の分析についても多くの報告がある。たとえば Ryhage²²⁾ は天然バター中の脂肪酸の詳しい分析を行なっているが、それによれば直鎖の飽和および不飽和以外に多くの異性体が存在していることが明らかになった。

Capella²³⁾ はポリ不飽和脂肪酸を OsO_4 で処理してジヒドロ体としたのち TMSi 化して GC-MS 分析を行な

い、混合物のまま脂肪酸の二重結合の位置を決定している。この TMSi 誘導体は MS で TMSi 基の α -位の切断ピークが大きく出るという利点がある。Niehaus²⁴⁾ はポリ不飽和脂肪酸を OsO_4 でポリオキシ酸としたのちメチル化し、その GC-MS 分析から二重結合の位置を決定している。また McCloskey²⁵⁾ は OsO_4 酸化後アセトンと処理して O-イソプロピリデンとして GC-MS を測定する方法を発表している。

Oord²⁶⁾ はカニの胃液から乳化物を単離し、それを加水分解して脂肪酸、sarcosine, taurine を得た。この脂肪酸部分を GC-MS で分析し、dodec-5-enoic acid 60%, decanoic acid 7%, tetradecatrienoic acid 5% からなることを見出した。また脊椎動物の消化管中の主な表面活性剤が胆汁酸であるのに比べ、カニでは胆汁酸が存在せず fatty acylsarcosyltaurine であることがわかった。

シクロプロパン環を有する脂肪酸はバクテリア、植物、原生動物等に広く存在する。そのシクロプロパン環の位置を決定するのは困難であったが、Pt で接触還元しその混合物を GC-MS で分析すると簡単に構造が決定できる²⁷⁾。

天然有機化合物の分析にも多く使われている。たとえば植物中のクマリン類²⁸⁾、フェノール類²⁹⁾、ダイテルペン³⁰⁾、アルカロイド類³¹⁾、各種ステロイド類などである。MacMillan³²⁾ は植物中のジベレリン類の検索に GC-MS を用いている。たとえば図 8 は *Phaseolus multiflorus* の未熟種子の粗酸性成分をメチルエステル化およ

図 8 ジベレリン粗抽出物 (TMSi, Me エステル)

(1% SE-30 column, 10'×1/8" i.d.; helium carrier gas at 30 ml/min.; initial temp. 160° then programmed to 250° at 2.5°/min.)

び TMSi 化して分析したチャートである。このほか GC-MS によって bamboogibberellin, A_{20} , A_{24} などを同定している³²⁾。

動植物ホルモンあるいは昆虫の性誘引物質やフェロモ

ンのような天然の微量生理活性物質の研究に GC-MS は特にその威力を発揮する。Röller ら³²⁾ は giant silkworm, *Hyalephora cecropia* の雄蛾数千匹の腹部から juvenile hormone (幼若ホルモン) の純品 50 μ g を単離した。純ホルモン 20 μ g を接触還元した生成物の GC-MS の結果など、ほとんど MS のデーターだけからその構造 (1) を決定した。このものの構造はそれ迄類似式

が提出されていたことによって MS の解析を容易にしたと思うが、注目すべきことは GC-MS を用いると反応生成物をそのまま分析できることで、精製する必要がないので非常に微量で構造決定できる。

生合成の研究に応用した例としては prostagrandin の研究があげられる³⁴⁾。prostagrandin 類は C_{20} の不飽和脂肪酸に 3 個酸素が入って生成するが、この酸素の由来をきめるのに GC-MS が有用な手段となった。8, 11, 14-eicosatrienoic acid と $^{18}O_2$ より prostagrandin E_1 (PGE_1) を生合成し、粗生成物のままジメトキシ誘導体として GC-MS で分析し、得られた MS から ^{18}O が 2 個 CH_3 O-基に入ったことがわかり (2)、したがって PGE_1 の水酸基 2 個は O_2 から由来したものであることが確認された。

生体内のステロイド類は GC 以外の方法では分離が困難であることは周知の通りであるが、このためステロイドの分離分析には GC-MS は非常に有用で、今日までも報告が多い。ステロール類の GC-MS では Knights の植物ステロール³⁵⁾、著者らのバクテリア中のステロール³⁶⁾、海そう中のステロール³⁷⁾、Eneroth ら³⁸⁾ のステロールの代謝の研究などがある。また、血液中の微量ステロイドの GC-MS での分析も報告されている^{39, 5)}。Horning ら⁴⁰⁾ は尿中ステロイドの GC による分析に GC-MS 法を盛んに用いているが、最近新生児の尿中ステロイド⁴¹⁾ は特殊な一群のステロイドであることを GC-MS によって明らかにした。またコルチコステロイドの環状ボロネートエステル⁴²⁾、メチルハロアセトンケタール⁴³⁾、

アンドステロン-MO-TMSi⁴⁴⁾ などの GC 分析におけるピークの同定に GC-MS が使われている。

酸の存在下で $H_2^{18}O$ との平衡反応でカルボニル基に ^{18}O を導入する方法は MS 測定用のラベル化合物を合成するのに用いられているが、McCloskey ら⁴⁵⁾ は各種ステロイドケトンの ^{18}O の取り込み速度を GC-MS を用いて測定し、立体障害、二重結合等に依存する ^{18}O との交換を正確に比較した。その結果はステロイドのカルボニル基の数、位置などの推定および MS 用にラベル位置のちがうジまたはトリケトン体の合成に有用である。

GC-MS の sphingosine の研究への応用⁴⁶⁾、ceramide 類の GC 分析および構造解析への応用^{47, 48)}、リン脂質の GC 分析への応用⁴⁹⁾、ヌクレオサイド類の分析⁵⁰⁾ なども報告されている。

GC-MS によるポリペプチドのアミノ酸配列の決定は Biemann らによっても研究されているが、Bayer ら⁵¹⁾ の方法はまずペプチドをベンジル化し SH を S-ベンジル体とし、これを部分加水分解後予めセファデックスのカラムで大きいペプチドと小さいペプチドに分け、後者を N-トリフロアセチル-メチルエステルとして GC-MS で分析する。合成ノナペプチド Cys(Bzl)-Ser⁴-oxytocin に応用した例をあげると、その GC 分析は図 9 のごとく分かれ、その MS からそれぞれのピークの構造が決定され、それからペプチドの構造は表 2 のごとく組立てられる。

熱分解 GC と MS との直結も高分子の分析等に重要で

図 9 Cys(Bzl)-Ser⁴-oxytocin の加水分解物のガスクロマトグラム

LKB 9000 gas chromatograph-mass spectrometer; column, 5% SE-30 on chromosorb P, 5 ft, 1/8 in, steel, 130°C, 3°/min to 250°C; detector, total ion current; ion source, 290°C; separator, 280°C; injector, 300°C.

L = solvent	5 = TFA-ser-asp-(OMe) ₂
1 = TFA-leu-gly-OMe	6 = TFA-pro-leu-gly-OMe
2 = TFA-cys(Bzl)-OMe	7 = TFA-cys(Bzl)-pro-OMe
3 = TFA-pro-leu-OMe	8 = TFA-tyr-ile-OMe
4 = TFA-ile-ser-OMe	9 = TFA-cys(Bzl)-pro-leu-OMe

表 2 TFA-ペプチドエステルの GC-MS によって同定されたペプチドフラグメントとアミノ酸配列

Cys(Bzl)-tyr-ile-ser-asn-cys(Bzl)-pro-leu-gly

tyr-ile
ile-ser
ser-asn
cys(Bzl)-pro
cys(Bzl)-pro-leu
pro-leu
pro-leu-gly
leu-gly

ある。Simmonds ら⁵²⁾はこの装置を用いて岩石を分類し、熱分解生成物がアミノ酸、炭化水素、脂質、ポルフィリン等の分解したものと考えてそれぞれもとのものと関連させて分類することにより、現在の生物学的起源に由来する物質と化石や隕石の有機物が区別できることを報告している。

二重収斂 MS と GC と結合した文献はまだ少ないが、Biemann⁴⁾はMattauch-Herzog 型 MS と GC を直結し、生成した全イオンを focal plane 上の写真乾板に集めて記録している。GC から出る成分ごとに乾板の位置をずらせるが、この方法は同一ピークを測定している間イオンが乾板に当たって積分されることになるので成分ガス濃度が時間によって変化してもかまわないし、全ハイマスが同時に記録されるので高速スキャンニングする必要がない。高分解能 MS で高速スキャンニングさせコンピューターを用いてピークが数百あるスペクトルから短時間でエレメントマップを得る方法が Chapman ら⁵³⁾および Lipskey ら^{54, 55)}によって報告されている。

GC-MS 法の重要な利点の一つはキャピラリーカラムで分離したものの同定である。1 サンプル中 50~100 成分にもなる香気成分などの混合物は捕集法は困難で同定は不可能である。TOF 型 MS とキャピラリーカラムとの接続は 1962 年にはじめて発表されている。充てんカラムと異なる点は、普通流速が 1~2 ml/min 程度なので全流量の 25~100% を MS に導入することができることと、ピークが鋭いために速くスキャンニングする必要がある。溶出物をカラム出口で分け MS と検出器に導く方法、カラム出口を直接減圧のイオンチャンバーにつなぐ方法、セパレーターを用いる方法などがある。Simon ら²²⁾の発表しているタバコの煙では 168 のピークが表われ、それらを MS で同定している。Stevens ら⁵⁶⁾はブドー(マスカット)の香いの研究を行ない、抽出物の GC の 78 のピークの大部分を同定している。また McFadden ら⁵⁷⁾はストロベリーオイルの分析を行なっ

ている。

化合物が非常によく似ているとき、GC では分離されないが、MS を検出器として用いて分離されていない成分の割合をきめるという GC-MS の応用例が Sweeley ら⁵⁸⁾によって開発された。これは混合物が既知のもので各成分に特有な m/e 値があるとき、試料が GC から出ている間、この特定の m/e 値のイオン強度変化を一定時間毎に同時に記録するものである。時間に対してイオン強度をプロットして得られる曲線は丁度 GC のチャートに相当するもので、装置のリレーと分圧回路で加速電圧を高速スイッチングすることによって簡単に結果が得られる。トレーサーとして安定同位元素を用いる生化学の研究などにも 1 μ g 以下の試料で利用できるのですぐれた方法である。たとえば β -glucose-TMSi と重水素化合物 β -glucose-d₇-TMSi は SE-30 で全く分離されないが、この方法によれば D 化合物が若干早く溶出していることがわかり、また面積から混合比が測定できる。また dehydroepiandrosterone TMSi (3) と epiandrosterone TMSi (4) の混合物を m/e 270 (3 の M⁺-90) と m/e 272 (4 の M⁺-90) の連続記録によって 20 ng でも分離定量できることを示している。

これと同じ原理に基くもので LKB 社で開発した多重イオン検出器(Accelerating Voltage Alternator, AVA)を用いれば 3 種の m/e 値のイオン強度変化を同時に記録できる。これを用いて GC の検出器としてはこれまでにない超高感度検出が行なえるようになった。これを Mass Fragmentography と呼ぶ。Hammar ら⁵⁹⁾はこれを chlorpromazine の血中代謝物の同定に用いている。chlorpromazine を投与した患者の血漿から抽出した methyl-2-chlorophenothiazinyl propionate のようにはっきりした GC のピークとして表われているものは通常の GC-MS によって同定されるが、GC のピークとして表われないような代謝物については何ら手がかりが得られない。そこで血漿抽出物を代謝物のフラグメントとして予想される m/e 232, 234, 246 のイオンについて AVA で連続記録させると図 10 のようなカーブが得られる。血中に monodesmethyl および didesmethyl chlorpromazine が存在することがその保持時間と 3 つの m/e の強度比から容易に決定できる。Mass Fragmentography は非常に感度よく chlorpromazine の場合 10⁻¹²g (1 pg = 3 × 10⁻¹⁵ mol) の検出が可能であるという。この研究では 2~3 ml の血液でその代謝産物の同定を行なっていることは注目すべきことで、生体内微量成分や医薬品代謝の研究に非常に重要な方法である。

図 10 Chlorpromazine 投与 (毎日 75 mg)
患者血漿のマスフラグメントグラム

LKB-9000, 0.75% Versamid 900, 1.2m×1.8mm i. d.,
236°, 50 eV
DMCP-TFA=desmethyl chlorpromazine trifluoroacetate
DDMCP-TFA=didesmethyl chlorpromazine trifluoroacetate

VI. む す び

以上 GC-MS 法の現状と応用例について述べた。GC-MS-コンピューターの 3 者の直結した装置も使われはじめています。GC-MS 法は広く有機化学, 生化学, 医学の研究に必須の方法として将来ますます利用される情勢にある。このような気相分析はこれらの分野に新しく導入されたものであり, 現在の研究に役立つことはもちろん, 新しい研究が生みだされるであろう。

本稿を書くにあたって東大応微研森崎尚子さんにご援助して頂いた。厚く感謝するしだいである。

(昭和 45 年 6 月 15 日受理)

文 献

- 池川, 有合化 **24** 853 (1966)
- C. Hammer, B. Holmstedt, R. Ryhage, *Anal. Biochem.* **25** 532 (1968)
- R. Ryhage, *Anal. Chem.* **36** 759 (1964); *Acta Chem. Scand.* **17** 2025, 2504 (1963); **18** 1099 (1964)
- J. T. Watson, K. Biemann, *Anal. Chem.* **36** 1135 (1964), **37** 844 (1965)
- R. Ryhage, *Arkiv för Kemi* **26** 305 (1967)
- M. A. Grayson, C. J. Wolf, *Anal. Chem.* **39** 1438 (1967)
- S. P. Markey, *Anal. Chem.* **42** 306 (1970)
- P. M. Krueger, J. A. McCloskey, *Anal. Chem.* **41** 1930 (1969)
- R. F. Cree, *Pittsburgh Conference on Anal. Chem. March* 1967
- 山内, 上条, 質量分析 **17** 613 (1969)
- M. Blumer, *Anal. Chem.* **40** 1590 (1968)
- D. P. Lucero, F. C. Haley, *J. Gas Chromatog.* **6** 477 (1968)
- S. R. Lipsky, C. G. Horvath, W. J. McMurray, *Anal. Chem.* **38** 1585 (1966)
- D. P. M. Llewellyn, D. P. Littlejohn, *Pittsburgh Conference on Anal. Chem. Feb.* (1966)
- D. R. Black, R. A. Flath, R. Teranishi, *J. Chromatogr. Sci.* **7** 284 (1969)
- J. E. Hawes, R. Mallaby, V. P. Williams, *J. Chromatogr. Sci.* **7** 690 (1969)
- M. A. Grayson, C. J. Wolf, *Anal. Chem.* **42** 426 (1970)
- W. D. MacLeod Jr, et al. *Anal. Chem.* **40** 841 (1968)
- R. L. Levy, H. D. Gesser, J. B. Westmore, *J. Chromatog.* **32** 740 (1968)
- K. van Gauwenberghe et al., *J. Gas Chromatog.* **6** 72 (1968)
- F. A. I. M. Leemans, J. A. McCloskey, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **44** 11 (1967)
- J. A. Völlmin, W. Simon et al., *Helv.* **49** 1768 (1966)
- P. Capella, C. M. Zorlat, *Anal. Chem.* **40** 1458 (1968)
- W. G. Niehaus Jr, R. Ryhage, *ibid* **40** 1840 (1968)
- J. A. McCloskey, M. J. McClelland, *J. Am. Chem. Soc.* **87** 5090 (1965)
- A. van den Oord, H. Danielsson, R. Ryhage, *J. Biol. Chem.* **240** 2242 (1965)
- J. A. McCloskey, J. H. Law, *Lipids* **2** 225 (1967)
- T. Furuya et al., *Chem. Pharm. Bull.* **15** 1362 (1967)
- E. D. Pellizzari et al., *J. Chromatog.* **40** 283 (1969)
- R. A. Appleton, A. McCormick, *Tetrahedron* **24** 633 (1968)
- J. MacMillan, R. J. Pryce, *Tetrahedron Letters* **No. 24** 2241 (1967)
- J. MacMillan et al., *ibid.* **No. 49** 5009 (1967), **No. 13** 1537 (1968), **No. 27** 3137 (1968)
- H. Röller, K. H. Dahn, C. C. Sweeler, B. M. Trost, *Angew. Chem.* **79** 190 (1967)
- R. Ryhage, B. Samuelsson, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19** 279 (1965)
- B. A. Knights, *J. Gas Chromatog.* **1967** 273
- K. Schubert, N. Ikekawa et al., *European J. Biochem.* **5** 246 (1968)
- N. Ikekawa, N. Morisaki, K. Tsuda, *Steroids* **12** 41 (1968)
- P. Eneroth et al., *J. Lipid Res.* **5** 245 (1964), *Steroids* **6** 707 (1965)
- J. Sjövall, R. Vihko, *Steroids* **7** 447 (1966)
- E. C. Horning, M. G. Horning, N. Ikekawa et al., *J. Gas Chromatog.* **1967** 283
- M. G. Horning, E. C. Chambaz et al., *Anal. Biochem.* **31** 512 (1969)
- C. J. W. Brooks, J. Watson "Gas Chromatog. 1968" ed. Harbourn p. 129 (1969)

- 43) G.A. Sarfaty, H.M. Fales, *Anal. Chem.* **42** 288 (1970)
- 44) E.C. Horning, B.F. Maume, *J. Chromatog. Sci.* **7** 411 (1969)
- 45) J.A. McCloskey, "Methods in Enzymology" ed. Lowenstein, Vol XIV. p. 382 (1969)
- 46) R.C. Gaver, C.C. Sweeley, *J. Am. Chem. Soc.* **88** 3643 (1966)
- 47) G. Casparrini, E.C. Horning, M.G. Horning, *Chem. Phys. Lipids* **3** 1 (1969)
- 48) B. Samuelsson, K. Somuëlsson, *J. Lipid Res.* **10** 41 (1969)
- 49) M.G. Horning, G. Casparrini E.C. Horning, *J. Chromatog. Sci.* **7** 267 (1969)
- 50) J.A. McCloskey, A.M. Lowson, K. Tsuboyama et al., *J. Am. Chem. Soc.* **90** 4182 (1968)
- 51) E. Bayer, W.A. Koenig, *ibid.* **7** 95 (1969)
- 52) P.G. Simmonds, G.P. Shulman, C.H. Stembri-
dge, *J. Chromatog. Sci.* **7** 36 (1969)
- 53) J.R. Chapman et al., "Gas Chromatography
1968" ed. Harbourn, p. 252 (1969)
- 54) S.R. Lipsky et al., "Gas Chromatography 1966"
ed. Littlewood, p. 299 (1967)
- 55) W.J. McMurray, B.N. Greene, S.R. Lipsky,
Anal. Chem. **38** 1194 (1966)
- 56) K.L. Stevens et al., *J. Agr. Food Chem.* **14**
249 (1965)
- 57) W.H. McFadden et al., *J. Chromatog.* **18** 10
(1965)
- 58) C.C. Sweeley, W.H. Elliott, I. Fries, R. Ryha-
ge, *Anal. Chem.* **38** 1549 (1966)

20 頁からつづき

この染料表を一見して気付くことは、旧版にくらべて国産染料のウェイトが大幅に増加したことであり、国産対抗品がなく、外国品の名称だけが挙げられている染料は比較的少なくなった。これは日本国内で使用頻度の高い染料を集めるという編集方針にもよるが、旧版発行以後10年間の各染料メーカーによる国産化の努力の成果といえる。また各種属ごとの表のはじめに、その種属についての簡単な説明が加えられたのは親切である。

また染色堅ロウ度試験法は旧版では JIS 法が未整備で各国の規格や、輸出織物用試験法が載っていたが、新版では全面的に JIS 法に統一され、制定済みおよび近く制定予定の試験法がほとんどすべて収録されている。

旧版はいきなり「識別と評価」にはじまり、この大冊に統一を与えるべき総論を欠いていたが、新版には充実した総論がある。なかでも 1.5 「染料・顔料の物性」の節は最新の理論的成果の集成であり、合成化学と応用の

間の橋渡しとして有益である。

旧版から約 100 ページ増加しただけの紙数にこれだけの内容を盛り込むため、染料の識別と評価および染着率曲線の 2 章がなくなり、染色性試験法や測色に関する解説が極めて簡単になったことはいささか淋しいが、これは旧版を併用すれば補うことができよう。

なお小さいことかも知れないが、Vat Violet 1, Vat Blue 6 および 14 の構造式で塩素の置換位置が染料表と有機顔料表で異なっている。この点に関してはまだ確証がなく、二つの表の執筆者、編集者が違うため止むを得ないことと思うが、改版の機会に誤解のない表式に統一されることを望む。

いずれにしてもこの新しい便覧は前述のように、染料・染色に携わる者だけでなく、広く有機工業色素を扱う研究者、技術者にとって非常に信頼できる地図となり、磁石となるものと信ずる。

(村上尚道)