

図2 質量分析計—ガスクロマトグラフ直結分析装置

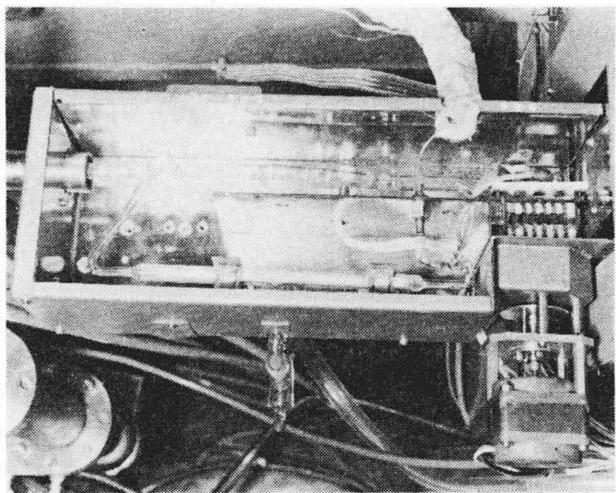


図3 キャリヤガス分離器直結部分

る量)が小さいために、試料の許容量が非常に少なく、一般の試料導入に使用する注入器(マイクロシリンジ)では大きすぎるので、カラム入口で流量の一部を分岐排出(スプリット)している。カラムの終端を約1.5 mほぐし、オープン壁を経てキャリヤガス分離器に直結した(図3参照)。この連結部にはテープヒータを巻き、中央部を熱電対により測温した。この部分の温度は分析温度よりも、また昇温した場合にはその到達温度よりも約5~10°C高めに設定した。特に温度の均一性が非常に重要であり、カラムオープン壁には別の板ヒータを添え、冷温点のないように格別の注意を払った。

2.2 質量分析計(MS)

使用した装置は、日立RMU-6D形MSである。GCを直結するに際しての特別の改造は行なっていないが、特に考慮した点を簡単に述べる。

(1) 磁場走査電源

高速走査が必要なので走査時間の時定数を変え、質量範囲M/e 12~500を約3, 5, 10秒で走査できるようにした。

(2) 全イオンモニタ

GCにより分離された成分は順次MSのイオン源に導入されイオン化される。そしてイオン源から発射されたイオンビームが磁場によって質量分散を起こす前に検出されるならば、そこでGCのスペクトルを得ることができる。図1に示すようにイオン源を出た位置にコレクタ板をそう入し、イオンビームの一部をカットして増幅記録した。この場合、キャリヤガスによるバックグラウンド電流が大きく、微量試料の増加分がこのバックグラウンド分に重畳するために検出感度が低下する。そのためバックグラウン

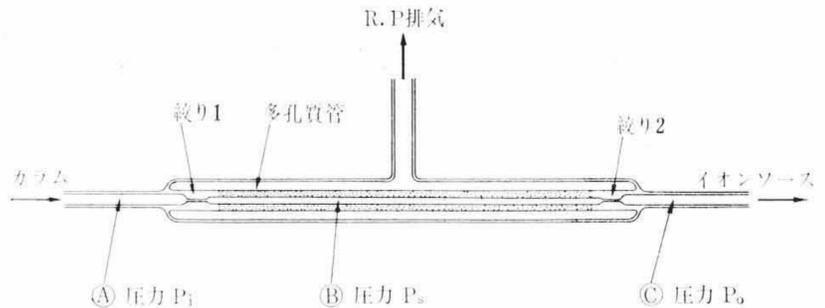


図4 キャリヤガス分離器の原理図

ド分を打ち消すバックアップ回路を設け、高感度で検出記録ができるようにした。

(3) 記録計(UV感光直記式高速記録計)

GC直結実験には、高速走査記録が必要であるが、従来の定量分析用オンロググラフでは、ガルバの応答速度および記録紙の送り速度が不適当なため、特にハネウエル社製1508形ビジコーダを使用した。実際に使用したガルバは、応答速度を多少犠牲にした比較的高感度のものである。ガルバの周波数応答は400 c/s、記録紙送り速度は15~30 cm/sで実験を行なった。

2.3 キャリヤガス分離器(WBS)⁽⁵⁾⁽⁷⁾

GCのカラム出口における圧力は、使用状態では、1気圧よりやや高い圧力となっている。しかるにMSの分析管内は、 10^{-7} mmHgのけたの高真空であるので、このままではGCとMSを直接連結することは不可能である。GCの流出量の一部のみを分岐してイオン源に導入し、MSの作動限界真空度 10^{-5} mmHg以下に流量を制御すれば可能となるが、キャリヤガスと試料との比が大きくて、試料自体の導入量が少なくなる。筆者らはWatson-Biemann方式の多孔質ガラス管を用いたキャリヤガス分離器(Watson-Biemann type Separator 以下WBSと略す)をPerkin-Elmer社を通して入手することができたので、GCのカラム出口にこのWBSを接続した。この結果キャリヤガスの多くを排気し、試料成分を比較的能率よくMSのイオン源に導入することができた。図3, 4にその外観および構造を示す。このWBSは軽い分子と重い分子を選別する一種のフィルタとして作用する。そのためキャリヤとしてはなるべく分子量の小さい水素あるいはヘリウムを使用することが望ましい。フィルタ効果を持つのは図4の多孔質管の部分であり、その孔径は平均 1μ である。この部出が気体の分子量の大小に対して、選別的に排気作用を行なうことになる。分析中のMS分析管内真空度は約 $2\sim4 \times 10^{-6}$ mmHgであった。

3. 実験と検討

3.1 試料濃縮率

GC流出物がWBSを通過するとき、キャリヤのほうが試料よりも大量に除去される結果、MSにはいるガス中では試料が相対的な意味で濃縮されていることになる。この濃縮率の大小はGC/MS直結分析における最も重要な因子となるもので、これを次のような方法によって測定した。約1%のフロンガス(CClF₃ m. w. 136)を混合したヘリウムガスを使用し、WBSを通した場合と、通さない場合との質量スペクトルからフロンとヘリウムのピーク比を求めればよい。MSの条件を一定に保持した状態において、まずフロン混合ヘリウムガスをWBSに通すことなく、一般分析と同様にMS導入系からイオン源に導入し、ヘリウム(He)およびフロン(Fr)のピークの高さを測定して、その比をとる。

$$r_1 = \frac{Fr}{He} \dots\dots\dots (1)$$

つぎに同一混合ガスをWBSに通し、WBSを排気しながらイオン源に導入し、フロン(Fr')およびヘリウム(He')のピークの高さの

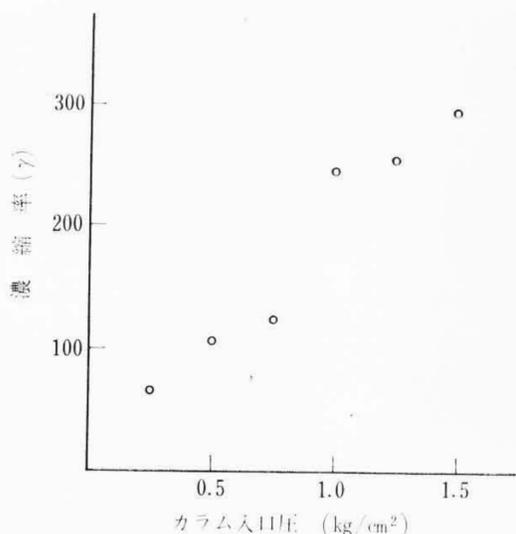


図5 試料濃縮率の測定

比をとる。

$$r_2 = \frac{Fr'}{He'} \dots \dots \dots (2)$$

(1) および(2)式より濃縮率を $\gamma = r_2/r_1$ と定義することができる。

図5に測定結果の一例を示す。フロンとヘリウムの分子量の平方根の比は $\sqrt{138/4} \approx 5.8$ で、分子直径の比を4~5と考えても、濃縮率 γ は約20~30と予想したのであるが、結果は5~10倍も大きい値を示した。これはフロンの分圧が小さいためか、実効的に壁に入射するフロンの分子数が予想以上に小さいことによると考えられる。また流量に対して γ が直線的に増加していることはWBS管内④における圧力がかなり低くなっているためかも知れない。そこで、WBSの動作原理を気体運動論的に簡単に考察してみた。

気体分子の平均自由行程は周知のように次式で与えられる。

$$\lambda = \frac{p}{\sqrt{2} \pi (2r)^2 n} \text{ [cm]} \dots \dots \dots (3)$$

- ここに、 p : 圧力 (mmHg)
- r : 分子半径 (cm)
- n : 分子密度 (個/cm³)

分子直径としてはヘリウムの直 $2r = 2.2 \times 10^{-8}$ cm をとり、上式より計算すると、WBS管内圧力 $p = 1.0, 0.1, 0.01$ mmHg に対する平均自由行程はそれぞれ0.14, 1.4, 14 mmとなる。WBSの寸法は内径が数mm, 長さ10cm程度であるから、この部分の圧力が 10^{-2} mmHg のけたまで減圧されれば、少なくとも多孔質壁に対する直径方向では、分子どうしの衝突なしに分子が壁に衝突すると考えてよい。分子流条件の下で、壁をたたく分子数は $Z = C \cdot p / \sqrt{MT}$ [個/cm²/s] (ここに、 C : 常数, p : 圧力, M : 分子量, T : 絶対温度) であるから、ある温度、圧力の下では、分子量の平方根に逆比例する。WBSにおいては、この壁が多孔質ガラスでできているから、この壁を通過する分子の数は壁にぶつかる分子の数に比例すると考えてよい。一方壁の穴のサイズはミクロンのけたであるから管内圧力が、10 mmHg ないし、それ以下であれば、そのコンダクタンス $U = C \cdot \sqrt{RT/M}$ [cm/s] (ただし、 C : 常数, R : 1モルに対するガス常数, T : 絶対温度, M : 分子量) はやはり分子量の平方根に逆比例する。したがって、WBSを通して排気される分子数は、

- (1) 管内圧力が0.01 mmHg程度ならば、管内でも、管壁でも、ともに分子流条件となって、分子量に逆比例し
- (2) 0.1~10 mmHg程度なら、管内では分子流、管壁では粘性流となって、分子量の平均根に逆比例することになる。濃縮率が意外に大きいのは(1)の条件によるものかも知れない。

3.2 感 度

質量分析計はもちろんのこと、すべての分析機器において、検出限界を検討することは、非常に重要であり、天然物の分析においては、極微量成分が重要な役割を果たす場合が多いので、どの程度の微量の試料まで測定可能かということが特に意味をもってくる。質量分析計の感度に関する要素はかなり多くあるので、まずそれらについて述べる。イオン源の条件については、イオン加速電圧1,800 V (質量範囲 $M/e 2 \sim 600$)、電子加速電圧70 eV、全電子電流80 μA 、イオン出射スリット幅0.02 mmである。イオン電流検出系については、二次電子増倍管、高速直流増幅器、およびビジュオドを含めての感度は、4.3 mV/divである。試料として、キシレン (P-Xylene, C_8H_{10} , M. W: 106) を用い、カラム温度および圧力を変えて質量分析計でそれぞれスペクトルを記録し、感度をプロットした。

試料導入には、マイクロシリンジを用い、毎回同じ量だけ注入した。カラムの温度および圧力を上げると、イオンモニタのピーク形状は鋭くなっていく。質量分析計の感度はピークの高さのみによって決まり、ピークの面積にはよらないので、分離度をそこなわない限り、高い温度と圧力にて使用するほうが有利である。

キャピラリカラムを使用する場合、カラムを最高効率で作動させるには、一般に注入試料量が非常に微量となり、マイクロシリンジで注入するのは困難であるから、注入した試料の一部をスプリットし、カラムにはその一部だけが導入される方式をとっている。内径0.5 mm, 長さ45 mのキャピラリカラムを使用し、並列に内径3 mm, 長さ1 mのU字形パックドカラムを取り付けた。キャピラリカラムおよびパックドカラムの流量比は約1:13である。

例として、カラム温度90°C, 圧力1.0 kg/cm²の場合につき感度を計算してみる。試料キシレン、0.25 μl (比重0.86として、215 μg) を注入して、二次電子増倍管電圧1 kV (利得 1.8×10^3) のとき、キシレンの親ピーク ($M/e: 106$) は110 divの振れがあった。二次電子増倍管の電圧を2.6 kV 平均最大利得の電圧として概算すれば感度は200倍に増加する。さらに、スペクトル上の1 divが試料何 μg に相当するかを計算すれば、 $215/110 \times 200 \approx 0.01 \mu g/div$ となる。このときの雑音レベルは2 divあったから、雑音等価試料量としては0.02 μg である。これは注入された試料が全部カラムを通過するものとしたときの値となる。前述のように、実際にはカラムにはいる流量を1/13にスプリットして排出しているのだから、これを考慮しなければならない。しかしスプリット出口を閉じた場合と開いた場合を比較したとき、閉じた場合でも2倍しか感度が増加しなかった。この原因については目下検討中であるが、一応注入試料量の1/2がカラムを通るものとして、0.01 μg が現在のところ検出限界と考えられる。今後検出感度を向上させるには、高感度のイオン源の開発が必要であるが、現在の装置でも、イオン源出射スリット幅を広くすること (高分解能にする必要はあまりないため)、イオン加速電圧を上げること、電子電流を多くとること、二次電子増倍管の感度のS/N比をよくすることなどの方法により、感度をさらに10~100倍に向上させることは期待できそうである。

3.3 分 離 能

クロマトグラフ的分離能については、現在のところキャピラリカラムの最高性能を保つことはできていない。その原因は、キャリアガス分離除去器やデッドボリウムにおける試料成分の拡散によるものと考えているが、分析例にみられるとおり、現状でも十分実用になる程度の分離能を示していることがわかる。

4. 応 用 例

4.1 クリプトピマール酸

テルペン化合物の多くは天然物より抽出されるが、純粋に取り出

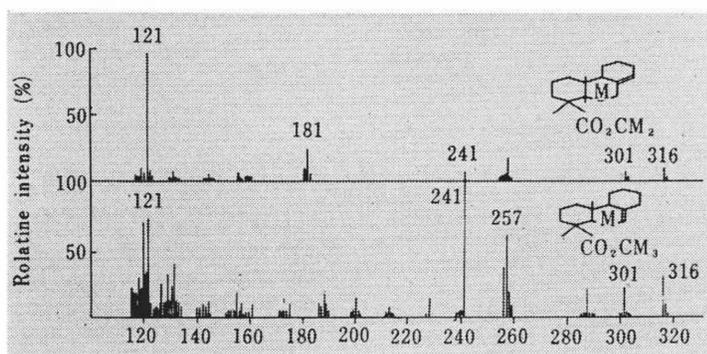
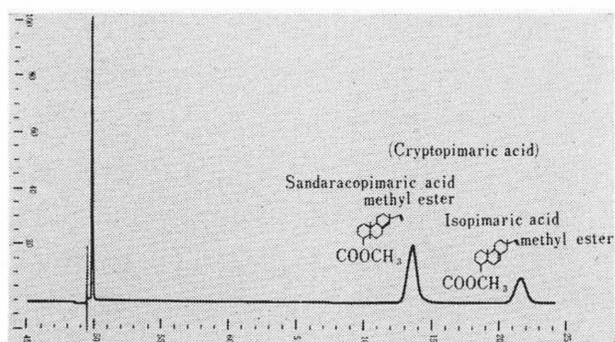
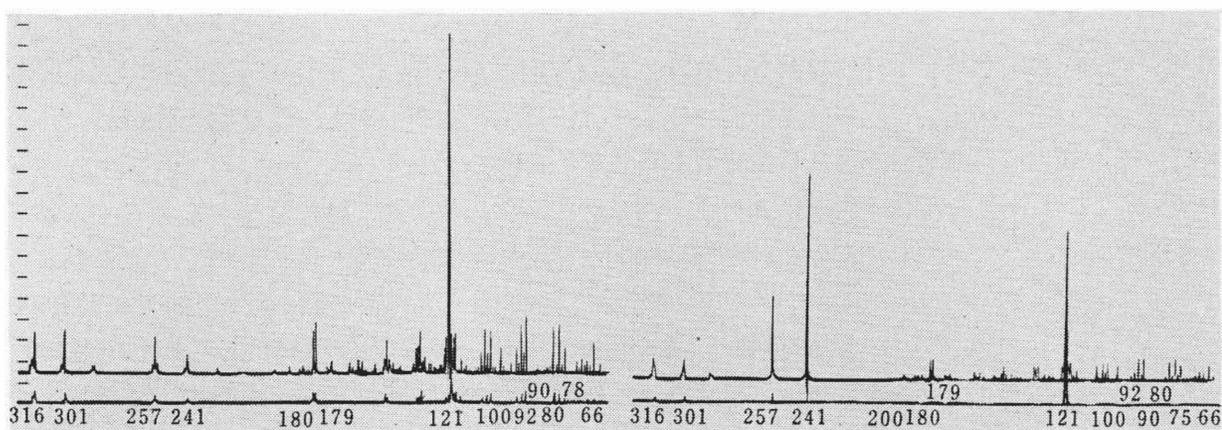
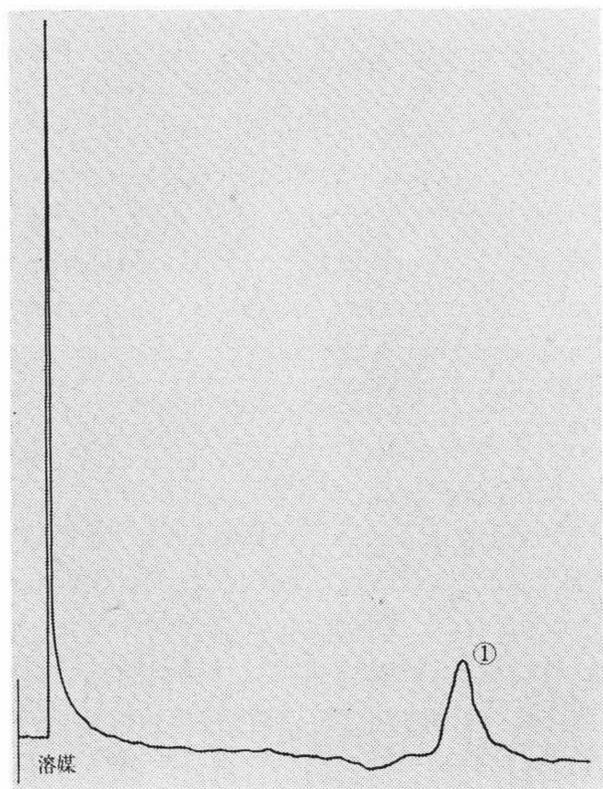


図6 クリプトピマール酸クロマト
質量分析計のスペクトル

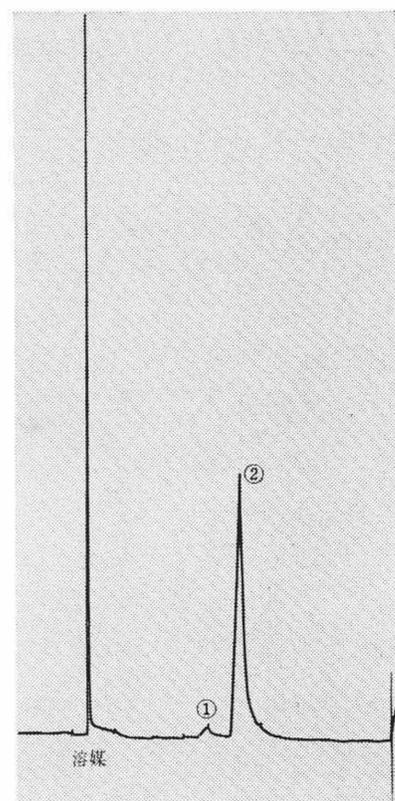


カラム： アピエゾン L 0.5 mm φ, 45 m
温度： 240°C
キャリア： ヘリウム 1.25 kg/cm²
試料量： 1 μl

図7 テストステロンアセテートのクロマトグラム

することが困難であったり、放置すれば酸化重合などによって変質しやすい試料が多いことなどの理由から、一般に基礎的データの蓄積が不十分なようである。

ジテルペン化合物であるクリプトピマール酸は単一な物質と考えられていたが、ごく最近二つの物質からなる混合物であることが



カラム： アピエゾン L 0.5 mm φ, 45 m
温度： 200°C
キャリア： ヘリウム 1.2 kg/cm²
試料量： 1 μl

図8 アルカロイドのクロマトグラム

GCの分離で明らかになった。この試料を本装置で測定した結果は図6に示すとおりであるが、それぞれの質量スペクトルからその一つはサンダラコピマール酸、他はイソピマール酸と確認された。この二つの異性体では二重結合の位置が異なるため、この結合に関与する解裂に大きな差があってこのように違った質量スペクトルになるものである。

4.2 ステロイドおよびアルカロイド

ステロイドおよびアルカロイド化合物では生化学的に興味あるものが多く、応用範囲を広める意味から従来困難と考えられていた金属キャピラリカラムを用いて分析を行なってみた。

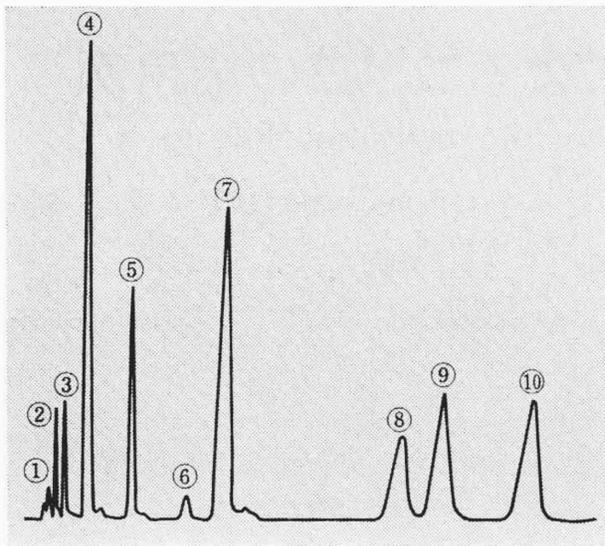
ステロイド化合物としてテストステロンアセテートを用い、図7のようなガスクロマトグラムを得た。質量スペクトルからこれがテストステロンアセテートであることを確認した。

アルカロイドについても石膏アルカロイドである粗精製デンドロビン (Dendrobin Crude) を試料として測定した結果図8のようなガスクロマトグラムを得た。この1および2のピークについて得られた質量スペクトルから、これらの物質が、デンドロビンラクトン (C₁₆H₂₅NO₃) およびデンドロビン (C₁₆H₂₅NO₂) であることがそれぞれの純粋な物質の質量スペクトルとの比較で確認された。

これらの化合物の分離分析は実験条件の設定がかなりむずかしいものとされており、われわれの今回の測定においても検討すべき点が多に残されているので、ここでは結果の一端について述べるにとどめ、その詳細については今後の検討の結果をも含めて後日機会をみて報告したいと考えている。

4.3 綿実油

綿実油の脂肪酸メチルエステルについての分析結果を次に示す。カラム内径 0.5 mm φ, 長さ 45 m のキャピラリカラムでカラム剤には Butanediol Succinate Polyester を用いた。温度 180°C (一定) キャリヤガスはヘリウム 0.6 kg/cm², 試料注入量は 0.2 μl である。得られたガスクロマトグラムを図9に示す。1~10のピークについてそれぞれ質量スペクトルを得たが、1および6についてはその同定を行なうことができなかった。その他のピークについては下記の成分であることが確認された。



- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1. ? | 2. $C_7H_{15}COOCH_3$ |
| 3. $C_9H_{19}COOCH_3$ | 4. $C_{11}H_{23}COOCH_3$ |
| 5. $C_{13}H_{27}COOCH_3$ | 6. ? |
| 7. $C_{15}H_{31}COOCH_3$ | 8. $C_{17}H_{35}COOCH_3$ |
| 9. $C_{17}H_{33}COOCH_3$ | 10. $C_{17}H_{31}COOCH_3$ |

図9 綿実油のクロマトグラム

- | | | |
|------------------------------|-----------------------|--------|
| 2. Methyl-n-Octanoate | $C_7H_{15}COOCH_3$ | MW=158 |
| 3. Methyl n-Decanoate | $C_9H_{19}COOCH_3$ | MW=186 |
| 4. Methyl n-Dodecanoate | $C_{11}H_{23}COOCH_3$ | MW=214 |
| 5. Methyl n-Tetradecanoate | $C_{13}H_{27}COOCH_3$ | MW=242 |
| 7. Methyl n-Hexadecanoate | $C_{15}H_{31}COOCH_3$ | MW=270 |
| 8. Methyl n-Octadecanoate | $C_{17}H_{35}COOCH_3$ | MW=298 |
| 9. Methyl Octadecenoate | $C_{17}H_{33}COOCH_3$ | MW=296 |
| 10. Methyl Octadecandienoate | $C_{17}H_{31}COOCH_3$ | MW=294 |

6のピークについては、その質量スペクトルが脂肪酸系のものとは異なるので、不純物と考えられる。

5. 結 言

キャリアガス分離除去器(WBS)を使用することにより、ガスクロマトグラフ(GC)を高真空の質量分析計(MS)に直結し、GCより

分離流出する各成分につき、それぞれ質量スペクトルを得た。本実験の結果、(1)感度についてはほぼ予想された値(10 nanogram)を得ることができたこと、(2)WBSの効率は予想以上に高いこと、(3)分離能については、GC自体と比較するとやや低いが、十分実用になること、などが明らかになった。

現在残された興味ある問題点は、極微量試料の分離と検出限界の追求である。分離能低下の原因については、GCカラムを出たあとのイオン源にいたるまでの流路“特にキャリアガス分離器”について、実験的、理論的に追求しなければならないと考えている。減圧GCについては、従来何の利点もないとされているが、キャピラリカラムを使用する場合、すべての試料がカラムの最高分離能を必ずしも必要としないので、減圧、高温に操作することにより、迅速分析が可能となり、熱的に不安定な試料に対する一つの分析法になり得るのではないかと考える。実際に減圧ガスクロマトグラフ的に使用し、ステロイドおよびアルカロイドのピークを得ていることから、その可能性が予想できる。

おわりに、結果の検討など種々ご指導いただいた名古屋大学平田教授、東北大学北原教授、名城大学立松教授に、またクリプトピマール酸の分析について終始ご指導いただいた特殊法人理化学研究所池川先生に厚くお礼申し上げます。またご協力いただいた質量分析計およびガスクロマトグラフの関係各位に深く感謝する。

参 考 文 献

- (1) R. S. Gohlke: Anal. Chem. 31, 535 (1959)
- (2) G. Brunner, L. Jenckel, K. Kronerberg(ATLAS Co.): Sales Literature (1962)
- (3) A. E. Banner, R. M. Elliott, W. Kelly(A. E. I. Limited): Sales Literature (1964)
- (4) R. Ryhage: Anal. Chem. 36, 759 (1964)
- (5) K. Biemann: Anal. Chem. 36, 1135 (1964)
- (6) R. Ryhage: Anal. Chem. 37, 435 (1965)
- (7) J. T. Watson, K. Biemann: Anal. Chem. 37, 844 (1965)
- (8) W. H. McFadden: Anal. Chem. 36, 2362 (1964)
- (9) A. H. Struck, E. B. Delaney (Perkin-Elmer Co.): Sales Literature (1965)