

GC/MS, LC/MS のための 誘導体化

小川 茂

はじめに

クロマトグラフィーにおける前処理法の一つである誘導体化法は、古くから行われており、クロマトグラフィーが、現在、ここまで発展してきたのに少なからず貢献している。

ガスクロマトグラフィーでは、その原理上、気体や気化できる試料を分析できる。数多くの化合物がそのまま測定できるが、難揮発性化合物や熱により分解してしまうような熱に不安定な化合物は、そのままの分子では測定できない。そこで、それら化合物を誘導体化試薬と反応させ、揮発性、熱安定性に富んだ誘導体に変えることによって、ガスクロマトグラフ分析が可能となる。

また、検出器の発展も誘導体化試薬の開発に影響を及ぼしている。例えば、電子捕獲検出器 (ECD) が、F, Cl, Br, I などのハロゲン原子を含む化合物に対して、選択的に、高感度で検出することは、一般的によく知られている。そこで、ハロゲン原子を含まない化合物に対し、ハロゲン原子含有官能基を備えた誘導体化試薬を使用させることにより、ハロゲン原子含有化合物に変える。この誘導体化によって、ECD による選択的、高感度分析が可能となる。

最近では、ほとんどの分析機関で、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) が一般的に使用されてきており、GC/MS 用誘導体化試薬もいくつか市販されている。

一方、液体クロマトグラフィーでは、その原理上、試料は液体か、固体でも適当な溶媒に可溶性性状であることが必要である。ガスクロマトグラフィーとは異なり、液体クロマトグラフィーにおける誘導体化は、媒質に可溶化させることを目的とはしていない。よく使用されているのは、検出方法に依存した誘導体化が主である。例えば、液体クロマトグラフィーでよく使用されている検出

器は、紫外可視検出器 (UV-VIS)、蛍光検出器 (FL) などの光学的検出器であるが、分析目的の化合物がこれらの検出器に全く応答しない場合やわずしかか応答しない場合、応答が高まるような誘導体化が用いられる。

液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) は、医薬・創薬分野では早くから使われていたが、最近、環境、食品分野でもかなり普及しつつある。

そこで、本稿では、GC/MS, LC/MS のための誘導体化とその試薬類の取り扱いについて述べる。

1 GC/MS における誘導体化¹⁾²⁾

1・1 誘導体化の目的

一般的なガスクロマトグラフィーにおける誘導体化の目的は、以下のような項目となる。

- ①難揮発性化合物を揮発性に変える。
- ②目的成分の熱安定性を増し、熱分解を防ぐ。
- ③カラム固定相に対する不可逆的吸着を減少させる (テーリングの抑制)。
- ④目的成分ピークの分離を改善する。
- ⑤検出器に対する感度を向上させる。
- ⑥光学異性体の分離をよくする。

GC/MS 分析における誘導体化は、上記の目的に加えて、以下の目的で行われる。

- ⑦例えば、二重結合位置の決定といった化合物の構造解明を容易にするような、マススペクトルのフラグメンテーションを誘起する。
- ⑧フラグメンテーションプロセスの研究および誘導体に重水素のような安定同位体を組み込むことで、構造解明のプロセスを助ける。
- ⑨分子イオン強度あるいは関連するイオン強度を増大させ、分子量決定を行う。
- ⑩イオン強度の増大、高質量イオンの形成により、高感度分析を可能とする。
- ⑪負イオン化学イオン化 (NICI) による検出のために強力な電子捕獲基を導入し、高感度分析を可能とする。
- ⑫強度の大きな複数イオンを調製し、その強度比をモニ

ターすることで、分析の特異性を増大させる。

⑬ハロゲンや他の質量欠損の原子を導入することで、化学的な干渉を抑制し、高分解能質量分析検出を容易にする。

このように、GC/MS 特有の誘導体化の目的は、構造解析や高感度化、選択性など、その検出器である質量分析計の特徴を高めることに主眼が置かれている。

1・2 誘導体化

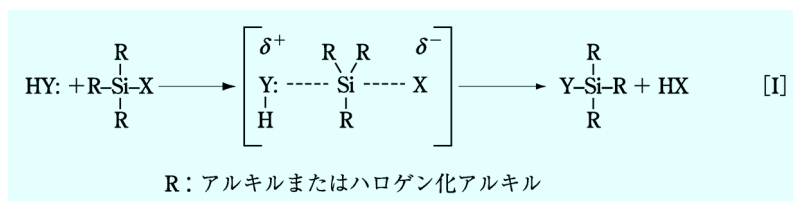
GC/MS の誘導体化法は、基本的には、通常のガスクロマトグラフィーの誘導体化法と同じであり、シリル化、アシル化、エステル化、環状誘導体化がよく使われ

ている。これらの誘導体化法については、参考図書^{1)~3)}が多々あるので、詳細についてはそちらを参考にさせていただきたい。ここでは、それぞれの誘導体化の概略と誘導体化を行う際の留意点について述べる。

(1) シリル化

シリル化は、難揮発性物質を揮発性物質に変えたり、テーリングの抑制によく使用されている誘導体化であり、GC/MS においても、構造解析を容易にするマススペクトルを与えるので、最もよく利用されている。

その一般的なシリル化の反応機構は、[I]式で表される。



最もよく用いられるシリル化はトリメチルシリル化 (TMS 化) で、活性水素を持つ化合物のほとんどに適用できる。化合物の持つ、それぞれの官能基でシリル化のしやすさは、アルコール>フェノール>カルボン酸>アミン>アミドの順になり、立体障害の影響からアルコールの中では、1級>2級>3級の順で、アミンでは、1級>2級の順になる。

主なシリル化剤を表1に示す。

シリル化剤の反応の強さは、次の順になる：TMSI>BSTFA>BSA>MSTFA>TMSDMA>TMSDEA>MTMSA>TMCS>HMDS。

シリル化剤は、一般に引火性、感湿性および刺激性のある液体であるので、取り扱いには以下のような注意が必要である。

表1 主なシリル化剤

ヘキサメチルジシラザン (HMDS)	$(\text{CH}_3)_3\text{SiNHSi}(\text{CH}_3)_3$
ジメチルジクロロシラン (DMCS)	$(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$
トリメチルクロロシラン (TMCS)	$(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$
<i>N,O</i> -ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (BSA)	$\begin{array}{c} \text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{C}=\text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$
<i>N</i> -メチル- <i>N</i> -トリメチルシリルアセトアミド (MTMSA)	$\text{CH}_3\text{CON}(\text{CH}_3)\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
<i>N</i> -メチル- <i>N</i> -トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA)	$\text{CF}_3\text{CON}(\text{CH}_3)\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
<i>N</i> -トリメチルシリルジメチルアミン (TMSDMA)	$(\text{CH}_3)_3\text{SiN}(\text{CH}_3)_2$
<i>N</i> -トリメチルシリルジエチルアミン (TMSDEA)	$(\text{CH}_3)_3\text{SiN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
<i>N,O</i> -ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (BSTFA)	$\text{CF}_3\text{C}[\text{OSi}(\text{CH}_3)_3]=\text{NSi}(\text{CH}_3)_3$
<i>N</i> -トリメチルシリルイミダゾール (TMSI)	$\begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$
<i>tert</i> -ブチルジメチルクロロシラン (<i>t</i> -BDMCS)	$(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$
<i>N</i> -メチル- <i>N-tert</i> -ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CF}_3\text{C}-\text{N}-\text{Si}-\text{C}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$

- 使用の際は、火気厳禁で換気のよい場所で作業する。
- 目、皮膚、呼吸器官との接触をさける。
- 火気から離れた、乾燥冷暗所で保管する。
- 再び使用する場合は、使用前に試薬が変性していないか確認する。
- 試薬をアンプル等から取り出す場合は、乾燥したシリンジ等で取り出す。

シリル化は、酸または塩基を触媒として加えることで、その反応を迅速に行うことができる。TMCSは、効果的な触媒として、最も広く用いられている。一般に、最も強いシリル化剤の組み合わせとして知られているのは、BSA : TMSI : TMCS = 1 : 1 : 1 で混合したものである。また、シリル化を効率的に行うため、加熱する場合がある。その際、留意すべきは、シリル化剤とその誘導体は、湿気による加水分解が起こりやすいので、特に、湯浴上で加熱する場合、水蒸気から保護するため、反応は密封容器の中で行うべきである。高温で反応させる場合には、シリル化剤の熱安定性とともに関容器の熱安定性も考慮すべきで、100℃以上の場合でも使用可能な強化ガラス製反応容器を用いるべきである。

シリル化剤は単独で用いることも可能であるが、多くの場合、ピリジン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド (DMF)、テトラヒドロフラン (THF)、ジメチルスルホキシド (DMSO) などの溶媒とともに用いられる。溶媒は、試料、試薬いずれとも反応しないことが重要である。

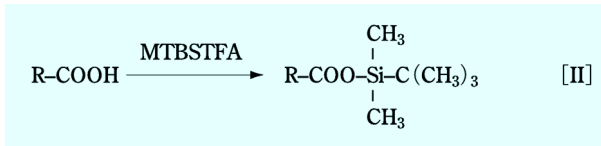
GC/MSにおいて、よく用いられる誘導体化は、TMS化である。TMS誘導体のTMS基 $[(CH_3)_3Si]^+$ は、質量分析計による電子衝撃イオン化 (EI) マススペクトルで、 m/z (質量電荷比 : イオンの質量 m を電荷 z で割った値) 73 イオンを与える。このイオンは、TMS誘導体のEIマススペクトルのほとんどすべてに、強度の大きなピークとして見受けられる。そのため、このイオンに注目することにより、多成分のクロマトグラムの中からTMS誘導体ピークを見いだす助けとなる。

シリル化された誘導体は、長期間保管する場合、熱、湿気、光などで分解する。特に、TMS誘導体は、湿気に弱く加水分解されやすいため、誘導体化反応中も水分との接触を極力避け、誘導体化は、ガスクロマトグラフ分析の直前に行うべきである。

TMS化以外で、GC/MSにおいてよく使われるシリル化剤として、*tert*-ブチルジメチルクロロシラン (*t*-BDMCS) と *N*-メチル-*N*-*tert*-ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) がある。

t-BDMCSは、フェノール性、アルコール性水酸基と反応して安定した *tert*-ブチルジメチルシリル (*t*-BDMS) 誘導体をつくり、MTBSTFAは、室温で5~20分間放置すれば反応は進行し、*t*-BDMS誘導体をつ

くる ([II] 式)。



t-BDMS誘導体分子Mは、GC/MS分析において立体的障害を持つ *t*-ブチル基が脱離しやすいため、そのマススペクトルにおいて、*t*-ブチル基が脱離した $[M-C(CH_3)_3]^+$ 、すなわち、 $[M-57]^+$ がイオン強度の高い基準ピークとなる場合が多い。そのため、分子量の決定や選択イオン検出 (SIM) による定量分析に適している。

また、TMS誘導体が、加水分解されやすいのに対し、*t*-BDMS誘導体は、加水分解に対し非常に安定である。

MTBSTFAは、単独で用いるより、1% *t*-BDMCSを添加した混合物として使用の方が効果的である。*t*-BDMCSが触媒として作用し、反応性を著しく高める。それら混合品も市販されている。

(2) アシル化

アシル化反応によりシリル化と同様に、活性水素を持つアミノ基 (-NH₂)、水酸基 (-OH)、チオール基 (-SH) がアシル化剤と反応してアシル誘導体を生成する。アシル化剤は、無水フルオロアシル化剤、フルオロアシルイミダゾールと *N*-メチル-*N*-ビス (トリフルオロアセトアミド) (MBTFA) のグループなどに分類される。このうち、GC/MS分析でよく使用されるアシル化剤は、トリフルオロ無水酢酸 (TFAA)、ペンタフルオロ無水プロピオン酸 (PFPA)、ヘプタフルオロ無水酪酸 (HFBA) などの無水フルオロアシル化剤である。これらを表2に示す。

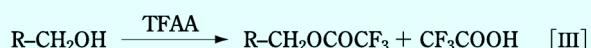
フルオロアシル誘導体は、誘導体化前の質量に比べ質量が大きく増加し、GC/MS分析において、そのマスマグメントイオンの強度は大きい。この誘導体は、フッ素化合物となっているため、電子捕獲性が高く、電子捕獲検出器 (ECD) による分析に有用である。同様に、

表2 主な無水フルオロアシル化剤

トリフルオロ無水酢酸 (TFAA)	$CF_3-C(=O)-O-C(=O)-CF_3$
ペンタフルオロ無水プロピオン酸 (PFPA)	$CF_3-CF_2-C(=O)-O-C(=O)-CF_2-CF_3$
ヘプタフルオロ無水酪酸 (HFBA)	$CF_3-CF_2-CF_2-C(=O)-O-C(=O)-CF_2-CF_2-CF_3$

ECD とイオン化過程が類似している負イオン化学イオン化 (NICI) 質量分析にも有用であり、高感度分析が可能である。

しかし、無水フルオロアシル化剤 (例えば、表 2) を用いる場合は、その誘導体化反応において副生成物として生成するフルオロ酸に注意しなくてはならない ([III] 式)。



この酸副生成物は、分析カラムなどに損傷を与えるので、GC に導入する前に、取り除いておく必要がある。

1.3 GC/MS 分析における留意点

ある物質を誘導体化することにより、通常、その分子量は、その物質のもとの分子量より増加する。増加する程度は、使用する誘導体化剤の種類や誘導体化される物質の持っている置換される官能基の数によって異なる。例えば、誘導体化剤として、アシル化剤である HFBA を用いた場合、活性水素がヘプタフルオロブチル基 (-COC₃F₇) と置換するため、分子量は 196 増加する。置換される官能基が複数あれば、分子量は、その倍数で増加していく。最近では、四重極型などの卓上 GC/MS の測定質量範囲が 1000 付近までと広がっているが、測定する誘導体の分子量または主要な *m/z* 値が測定質量範囲を越えないよう誘導体化剤の選択を考慮すべきである。

また、GC/MS に限らず一般の GC 分析にも言えることであるが、誘導体化後、未反応の誘導体化剤も GC 導入すると分析カラムや検出器にダメージを与える場合がある。また、このような場合には、それらの誘導体化剤を取り除くか、感度の許す限り注入量を減らすべきである。

2 LC/MS における誘導体化

2.1 誘導体化の目的

一般のガスクロマトグラフィーにおける誘導体化の目的は、その移動相が気体であることから、試料の揮発

性、熱安定性を高め、より安定して気化することに主眼が置かれていたが、液体クロマトグラフィーにおいては移動相が液体なため、試料は液体のままでもよく、揮発性、熱安定性を高める必要はない。このため、一般の液体クロマトグラフィーの誘導体化の目的は、分離能を改善するためもあるが、いかに目的成分を検出可能とすることに主眼が置かれている。これは、液体クロマトグラフィーでは、紫外・可視検出器や蛍光検出器といった光学的検出器が汎用^{はんよう}されている。これらの検出器を使用して紫外・可視領域に吸収のない物質や非蛍光性物質を検出する場合には、検出できる化合物に誘導体化する必要があるためである。

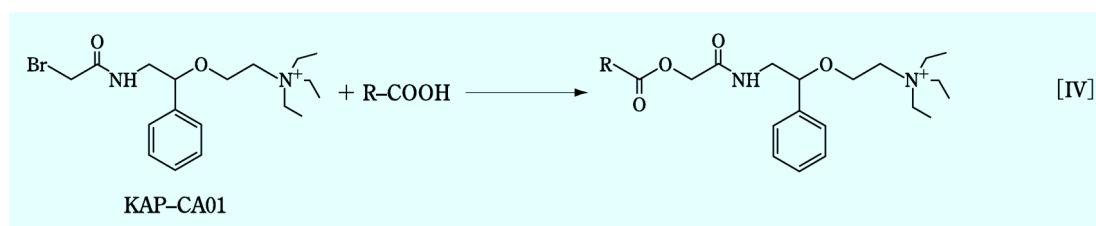
一方、LC/MS における誘導体化の目的は、主に、以下の点にあると思われる。

- イオン化効率を高め、感度を向上する。
- 構造解析を容易にするような、マススペクトルのフラグメンテーションを誘起する。

2.2 誘導体化

LC/MS における誘導体化試薬については、日々検討がなされている。例えば、テストステロンの還元体であるジヒドロテストステロンは、毛包組織の萎縮、毛乳頭細胞の分裂抑制を引き起こすといわれており、高度な検出が望まれていたが、*p*-トルエンスルフォニルイソシアネートで誘導体化することにより、MS に対する応答性が、テストステロンで 103 倍、ジヒドロテストステロンで 197 倍上昇した⁴⁾。また、生体内ビタミン D の分析では、実用的な感度が得られないなどの問題があったが、Cookson 型試薬を用いた誘導体化により、イオン化効率が十数倍増加した⁵⁾。など多くの報告がなされている^{6)~8)}。

LC/MS 分析において、目的物質を的確にイオン化することは重要であり、その目的のため一般には、試料溶液に酸性物質やナトリウムなどの無機塩を添加する方法が採られているが、この方法には問題があり、逆にイオン化が阻害される場合があると指摘されていた。そこで、鈴木ら⁹⁾は、それらの問題を解決する新たな誘導体化試薬を開発した。その試薬 (KAP-CA01) の構造とカルボキシル基を含む試料との反応例を [IV] 式に示す。

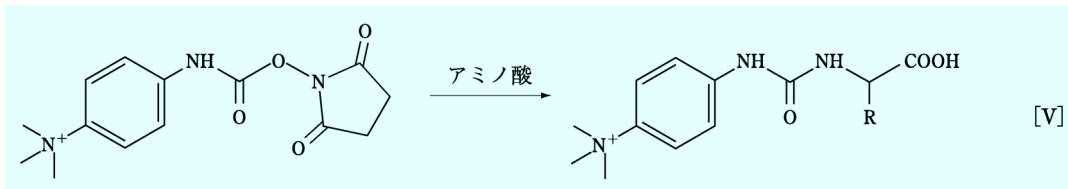


この試薬は、イオン性官能基として、四級アンモニウ

ム基を有しているため、反応後の分子は全体が電荷を帯

び、マススペクトルのピーク強度を増加させ、高感度測定を可能とした。この試薬の測定対象物質との結合部位は、様々な官能基に付け替えることが可能であり、付け替えた官能基の種類により、アミノ基、ホルミル基、水酸基などと特異的に反応するため、幅広い物質への適用が可能である。

また、LC/MS/MSでのアミノ酸分析に適したアミノ基誘導体化試薬が開発された¹⁰⁾。この試薬も、イオン化効率を高める部分構造を有するため、誘導体化アミノ酸が、LC/MS/MSでアトモレベル(10⁻¹⁸モル)の高感度で検出できると言われている。その試薬の構造と反応例を[V]式に示す。



文 献

- 1) K. Blau, J. Halket 著, 中村 洋監訳: “分離分析のための誘導体化ハンドブック”, (1996), (丸善).
- 2) 池川信夫編集: “最新ガスクロマトグラフィー [IV]”, p. 251 (1981), (廣川書店).
- 3) 河合 聡: “ガスクロマトグラフィ入門”, (1987), (三共出版).
- 4) 村上祐一, 中村 洋: Separation Sciences 2006 講演要旨集, p. 67 (2006).
- 5) 島田和武, 東 達也: 分析化学, **51**, 487 (2002).
- 6) S. J. Barry, S. Monte, R. M. Carr, S. J. Lane, W. J. Leavens, I. Waterhouse: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 603 (2003).
- 7) 中川由美子, 橋本 豊: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50**,

330 (2002).

- 8) W. Li, Y.-H. Li, A. C. Li, S. Zhou, W. Naidong: *J. Chromatogr. B*, **825**, 223 (2005).
- 9) 本田亜希, 鈴木祥夫, 鈴木孝治: ぶんせき, **2004**, 643.
- 10) 宮野 博, 新保和高: *細胞工学*, **25**, 1410 (2006).



小川 茂 (Shigeru OGAWA)

ジーエルサイエンス株式会社カスタマーサポートセンター (〒358-0032 埼玉県入間市狭山ヶ原 237-2)。東京理科大学大学院理工学研究科工業化学専攻修士課程修了。《趣味》ゴルフ, ソフトボール。

新刊紹介

ICP 発光分析・ICP 質量分析の基礎と実際

— 装置を使いこなすために —

上本道久 監修

(株)日本分析化学会関東支部 編

分析者には装置の特徴を十分に理解した上で、使用目的にあわせて適切に装置を使いこなすことが要求されるが、最近の ICP-AES, ICP-MS 装置について実務レベルで平易に解説された書籍は多くない。本書は、日本分析化学会関東支部が開催している「機器分析講習会」の最新テキストを元に加筆改訂された書で、以下の内容からなる。1 章では ICP 発光分析法, ICP 質量分析法の測定原理と最近の動向が概説され、2 章以

降、金属材料の分析、半導体・セラミックスの分析、高純度試薬の分析、河川水・底質の分析、食品の分析、廃棄物の分析と続く。それぞれの試料ごとに、試料のサンプリング、保管から秤量、前処理、標準溶液の調製、測定、データ整理と順を追って詳細で平易な説明がなされている。さらに、図表、実例、写真が多用され、微量分析の初心者さえ実際の手順を容易にイメージできる工夫が随所に施されている。また、Q & A 欄を利用して、ノウハウや tips 的な事項まで、多くの分析技術者が実際に一度は直面したであろう問題の多くが取り上げられ、丁寧な回答がなされている。「実際の試料の取扱いと測定までの分析操作に役立つ『実用的解説書』を目指した。(監修のことばより)」とあるとおり、ICP-AES, ICP-MS に従事する技術者にとって必要十分な知識が、基礎から応用まで大変コンパクトにまとめられている。初心者からベテラン技術者まで、現場の分析者から管理者までぜひ一読をお勧めしたい。

(ISBN 978-4-274-20539-2・A 5 判・232 ページ・2,800 円+税・

2008 年刊・オーム社)