九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

超臨界流体クロマトグラフィー質量分析におけるイ オン化機構の解析

藤戸(井上),由佳

https://hdl.handle.net/2324/7157293

出版情報:Kyushu University, 2023, 博士(理学), 課程博士 バージョン: 権利関係:

博士論文

超臨界流体クロマトグラフィー質量分析における

イオン化機構の解析

2023年6月

九州大学大学院 システム生命科学府

生命医科学講座 メタボロミクス分野

藤戸(井上) 由佳

目次

略号・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
第一章 緒論
1.1. 超臨界流体・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3
1.2. 超臨界流体クロマトグラフィー・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
1.3. 質量分析 大気圧イオン化法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11
1.4. 超臨界流体クロマトグラフィー質量分析法・・・・・・・・・・・・・・15
1.5. 本研究の目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17
第二章 SFC/ESI-MS のイオン化メカニズムの解析・・・・・・・・・・・・・・19
2.1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
2.2. 実験材料および実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20
2.2.1. 試薬・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20
2.2.2. 分析装置および SFC 分析条件・・・・・・・・・・・・・・・・・20
2.2.3. MS 分析条件・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
2.3. 結果と考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25
2.3.1. SFC のモディファイアにメタノールおよびアセトニトリルを用いた際の
MS 感度比較・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25
2.3.2. SFC のモディファイアにメタノールを用いた際のメトキシルカルボン酸生
成の有無の確認・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29
2.3.3. メタノールに対する CO ₂ の割合と MS 感度の関係性の解析・・・・・・33
2.4. 小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38
第三章 SFC/ESI-MS における MS 検出感度向上のための移動相条件最適化と実試料
分析への応用・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39

3.1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39
3.2. 実験材料および実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40
3.2.1. 試薬・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
3.2.2. 分析装置および SFC 分析条件・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41
3.2.3. MS 分析条件・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43
3.3. 結果と考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43
3.3.1. モディファイアに添加する塩濃度と MS 感度との関係性確認(実験 3-
$1a) \cdot \cdot$
3.3.2. モディファイアに塩を添加した際のメトキシルカルボン酸生成量の確認
(実験 3-1b)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47
3.3.3. 異なる塩濃度の移動相条件下における農薬の SFC/MS 分析 (実験 3-2)・・50
3.4. 小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・53
第四章 総括と展望・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・54
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・57
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・59
論文目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65
付録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・66

略号

- AA:: Ammonium acetate, 酢酸アンモニウム
- ACN: Acetonitrile, アセトニトリル
- AF: Ammonium formate, ぎ酸アンモニウム
- APCI: Atmospheric pressure chemical ionization, 大気圧化学イオン化法
- API: Atmospheric pressure ionization, 大気圧イオン化法
- BA: Benzoic acid, 安息香酸
- BPR: Back pressure regulator, 背圧調整弁
- CI: Chemical ionization, 化学イオン化法
- CO₂: Carbon dioxide, 二酸化炭素
- DDM: Diazodiphenylmethane, ジアゾジフェニルメタン
- DL: Desolvation line, 脱溶媒管
- EI: Electron impact ionization, 電子衝撃イオン化法
- ESI: Electrospray ionization, エレクトロスプレーイオン化法
- FID: Flame ionization detector, 水素炎イオン化検出器
- GC: Gas chromatography, ガスクロマトグラフィー
- GC/MS: Gas chromatography/mass spectrometry, ガスクロマトグラフィー質量分析法
- GC-MS: Gas chromatograph-mass spectrometer, ガスクロマトグラフ質量分析装置
- HPGC: High pressure gas chromatography, 高圧ガスクロマトグラフィー
- HPLC: High performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー
- *I*: Ionization efficiency, イオン化効率
- Ji: Total ionization processes, イオンの総量
- Jv: Rate of vaporization, 気化効率
- LC: Liquid chromatography, 液体クロマトグラフィー
- LC/MS: Liquid chromatography/mass spectrometry, 液体クロマトグラフィー質量分析法
- LC-MS: Liquid chromatograph-mass spectrometer, 液体クロマトグラフ質量分析装置
- MeOH: Methanol, メタノール
- MRM: Multiple Reaction Monitoring, 多重反応モニタリング
- MS: Mass spectrometry, 質量分析
- m/z: Mass to charge ratio, 質量電荷比

- *p*-ABA: *p*-aminobenzoic acid, *p*-アミノ安息香酸
- Pc: Critical point, 臨界圧力
- SFC: Supercritical fluid chromatography, 超臨界流体クロマトグラフィー
- SFE: Supercritical fluid extraction, 超臨界流体抽出
- SFC/MS: Supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, 超臨界流体クロマトグラフ

ィー質量分析法

SFC-MS: Supercritical fluid chromatograph-mass spectrometer, 超臨界流体クロマトグラフ 質量分析装置

- Tc: Critical temperature, 臨界温度
- UV: Ultraviolet spectrometer, 紫外分光器

第一章 緒論

1.1. 超臨界流体

物質は、温度や圧力の条件によって固体・液体・気体の状態をとる(物質の三 態). 例えば, 水は常温・常圧では液体であるが, 常圧では 100℃以上で水蒸気 (気体)に、0℃で氷(固体)となる.密閉容器に水を半分入れて加熱すると、 水(液相)は膨張しながら蒸発し密度が低下する一方で,気相は液相から水蒸気 が供給されることで密度が増加する。温度がさらに上昇すると容器内の圧力が 高まり,液相と気相の密度は近づいて最終的に同じになるが,それ以上の温度に すると気体はいくら圧縮しても液体とならない高密度のガス状態となる.この 状態を超臨界状態といい、物質が超臨界状態になる温度と圧力はそれぞれ臨界 温度(t_c), 臨界圧力(P_c)と呼ばれる(図 1-1). 臨界点(Critical point)の概念は, 1822 年 C. Cagniard de la Tour が大砲の砲身を用いて行った実験によって発見さ れたと言われている[1,2]. 大砲の砲身に液体と球を入れて蓋をし、加熱をしな がら砲身をたたいたり動かしたりして球が転がる音を聞くことで、音の変化が 無くなる(液相が消失する)温度があることを見出した.この発見を受けて,T. Andrews が二酸化炭素を用いて温度・圧力・体積の関係を系統的に調査し、現在 使用されている臨界点(Critical Point)の名称を提案した[3].



図 1-1. 純物質の相図

超臨界流体は,臨界温度と臨界圧力を超えた"圧縮しても液体にならない高密 度ガス様の流体"であり,表1-1に示すとおり,ガス(気体)と同様に粘度が低 く,気体と液体の中間の拡散性を持つ.また,超臨界流体の密度は液体と同程度 に高く,液体と同様に溶解力を持つとともに,その溶解力は圧力によって大きく 変わる.超臨界流体が特殊な溶解能を持つことは、今から140年以上前の1879 年にJ.B. HannayとJ. Hogarthにより発見され報告されている[4].超臨界流体は しばらくの間は物理化学的な基礎研究対象に留まっていたが、物質を溶解する 性質を持ち、溶媒として利用できることが明らかとなって以降、物質を抽出・分 離する超臨界流体抽出(Supercritical fluid extraction, SFE)や超臨界流体クロマト グラフィー(Supercritical fluid chromatography, SFC)の技術開発や SFE, SFC を用 いた応用研究が進んだ. SFE においては, 溶解力が圧力によって制御できる点に 着目し, 目的の物質のみを選択的に抽出する手法として有効利用されている. コ ーヒー豆からカフェインを除去するデカフェなどがその一例である. また SFC においては, 拡散性の高さや粘性の低さから, 高流量で移動相を流してもシステ ム圧力を低く抑えることができ, 高流量下で高速かつ高分離な分析が達成でき る点に大きな利点がある.

各物質は、臨界温度・臨界圧力を超えた状態で超臨界流体となるが、超臨界流体として最もよく用いられるのは二酸化炭素(CO₂)である.代表的な物質の臨界値を表 1-2 に示す.二酸化炭素が超臨界流体に最もよく利用される理由としては、臨界点が低く室温付近の温和な条件で超臨界状態にすることができる(圧力:7.38 MPa,温度:31.1℃)、毒性や燃焼性がなく扱いが容易である、また環境負荷が少ないことが挙げられる.また、超臨界 CO₂ は低極性であるが、極性溶媒(モディファイアやエントレーナと呼ばれる)と混和する性質があるため、極性溶媒の種類や添加比率を変えることで極性をダイナミックに変化させることができ、抽出やクロマトグラフィーにおいて幅広い化学的な性質をもつ溶質に適用できる.

表 1-1. 物質の各状態における物性値

Physical properties	Gas	Supercritical fluid	Liquid
Density (kg/m ³)	0.6-2	200-900	600-1600
Viscosity (Pa·s)	10-5	10-5-10-4	10-3
Diffusion coefficient (m ² /s)	10-5	10-7-10-8	<10-9

Components	Critical Temperature	Critical Pressure	
	t _c (°C)	P _c (MPa)	
Methane (CH ₄)	-82.7	4.60	
Ethylene (C ₂ H ₄)	9.2	5.04	
Carbon dioxide (CO ₂)	31.0	7.38	
Ethane (C_2H_6)	32.3	4.88	
Nitrous oxide (N ₂ O)	36.5	7.24	
Propylene (C ₃ H ₆)	91.8	4.60	
Chlorodifluoromethane (CHClF ₂)	96.2	4.97	
Propane (C ₃ H ₈)	96.7	4.25	
Dichlorodifluoromethane (CCl ₂ F ₂)	111.9	4.14	
Ammonia (NH ₃)	132.4	11.35	
Methanol (CH ₃ OH)	239.5	8.09	
Benzene (C ₆ H ₆)	289.1	4.89	
Tolene (C ₇ H ₈)	318.7	4.10	
Water (H ₂ O)	374.2	22.12	

表 1-2. 代表的な超臨界流体の臨界定数

1.2. 超臨界流体クロマトグラフィー

SFC は、超臨界流体を移動相とする分離技術である. 超臨界流体がクロマトグ ラフィーの移動相として利用できることは、1958 年 J. Lovelock によって提案さ れ, その後 1962 年に Klesper らが初の SFC の報告として高圧ガスクロマトグラ フィー (High pressure gas chromatography: HPGC) を発表した[5]. 1966 年には, Sie とその共同研究者らが "High-Pressure Gas Chromatography with Supercritical Fluids"というタイトルで論文を発表し、二酸化炭素を移動相として用いた際に 種々の固定相との相互作用について考察、液体ー固体間の吸着や液体ー液体間 の分配クロマトグラフィーモデルを提案・実証するとともに,移動相の圧力変化 と分析種の保持係数の変化に相関性があることを示した[6-9]. Klesper らのグル ープは、流量と圧力を独立して制御することができ、高圧セルを備えたフィルタ 一分光光度計を検出器として用いた SFC 装置を 1968 年に発表[10], 1970 年には Jentoft らが圧力のプログラムが可能な SFC システムを発表した[11]. これによ り、温度制御によって保持係数を変化させるガスクロマトグラフィー(Gas chromatography, GC)が熱に不安定な化合物の分析に課題を持つのに対し、SFC は圧力制御による新しい分離手法として注目された.

SFC に関する研究がもっとも盛んに行われたのは 1980 年代から 90 年代にかけての 10 年間であり, この期間に今日の SFC 技術の基礎となる研究が多くなされた. 1981 年に Novotny と Lee らのグループが, ジメチルポリシロキサンなどを固定相として内壁にコーティングした内径 50 µm のフューズドシリカ管を用

いた中空キャピラリーカラム SFC を実現した [12]. それまでの研究ではパック ドカラム (充填カラム) が用いられていたが, 中空キャピラリーカラムの利用に よってパックドカラムにおける差圧問題が解決されることが期待された.しか し、中空キャピラリーカラム SFC には、圧力と流量を独立して制御できないと いう技術的課題があった.これは、中空キャピラリーカラムでは、圧力制御は流 路抵抗を持つ抵抗管を用いて行っており、移動相の流量を変えることで圧力を 変化させているためである. 圧力を高めようとすると, 移動相流量を高める必要 があり, 適切な圧力と線速度を両立することが困難であった. また, 当時の SFC は GC の代替としての利用が主であり、主要検出器である水素炎イオン化検出 器(Frame ionization detector: FID)を用いた検出ではバックグラウンド上昇の問 題から有機溶媒を使用することができず、移動相は CO₂ のみに限定された.こ のような課題から、中空キャピラリーカラム SFC は結果的にあまり普及しなか ったが、その一方でパックドカラム SFC の研究は継続的に行われた. 1982 年, Gere らは高速液体クロマトグラフ (High performance liquid chromatograph: HPLC) の改造によって SFC システムを開発し, 3, 5, 10 μm の異なる粒子径の充填剤 を用いて多環芳香族の分析を行った. その結果, 粒子が細かいほどカラム効率が 向上し, HPLC よりも SFC の方がより高いカラム効率を示すことを示した[13]. また、この現象は高流量域で顕著であり、SFC の最適線速度は HPLC の約5倍 であることを明らかにした[13]. その後, パックドカラム SFC は分取 SFC の開 発やキラル分離の研究とともに広がり今日の SFC の主流となっているが、分析 スケールでパックドカラム SFC が利用され始めたのは 1990 年代以降とごく最

- 8 -

近のことである.これは、製薬分野や食品分野における多成分のハイスループッ ト分析ニーズの高まりに対して、LC とは異なる分離特性を持つこと、また幅広 い物性の化合物を網羅的にかつ迅速に測定できる SFC の利点が合致したことが 背景にある.当初,SFC では CO2 のみを移動相として使用する分析手法が主流 であったが、CO2に極性溶媒(モディファイア)を段階的に混ぜて分析中に移動 相の極性をダイナミックに変化させる手法が受け入れられ、広く用いられるよ うになった[14]. モディファイアとして CO2に添加する有機溶媒の比率は数%か ら 50%以上になることがあるが、CO2 と極性溶媒の混合物では CO2 のみの場合 よりも臨界点が高くなる. そのため, 通常の分析条件下では, 超臨界状態ではな く亜臨界または液相状態で分離が行われている. SFC の分離パラメータには, 温 度・圧力・モディファイア組成があるが、モディファイア量を変化させることに よって移動相の相状態を変化させ、一つのシステムで超臨界流体クロマトグラ フィーと液体クロマトグラフィーを連続的に行うことも可能であり、適用範囲 の広さも大きな利点である.一方,LCとは異なる分離特性や、複数のパラメー タが分離に影響することから、分析条件の検討には時間を要する場合もある. 2006 年に、West と Lesellier が SFC の包括的な研究を行い、溶媒和パラメータモ デルによって溶質の特性と溶質-固定相間の相互作用を明らかにした[15-17]. これらの研究や知見により、SFC のユーザーは測定対象化合物に応じた固定相 の選択が可能となった.

SFC の基本的な流路図を図 1-2 に示す. SFC は一般的に, CO₂ ボンベ, CO₂ ポ ンプ, モディファイアポンプ, オートインジェクタ, カラムオーブン, 分離カラ

- 9 -

ム,背圧調整弁(back pressure regulator, BPR),検出器から構成される.ボンベ から供給される CO₂ は, CO₂ ポンプに内蔵された熱交換器によって冷却された 状態で液化炭酸としてカラムまで流れ,カラムオーブンによって臨界温度以上 に加熱される.また,分離カラムの下流に設置された BPR によって,臨界圧力 以上の圧力に設定し,系内で超臨界状態を作り出す.検出器に,紫外可視吸光度 検出器(UV 検出器)などの検出器を用いる場合は,検出器は BPR の上流に設 置するが,質量分析計(MS)を検出器として使用する場合,検出器は BPR の下 流に設置する.超臨界 CO₂は, BPR を通過すると気化し溶解性を失うため,MS 検出器を用いる場合は, BPR の手前または直後からメイクアップ溶液と呼ばれ る溶媒を添加する.その場合,追加でメイクアップポンプが必要となる.



図 1-2. SFC の基本的な流路図

1.3. 質量分析 大気圧イオン化法

質量分析(mass spectrometry; MS)は、物質をイオン化し、電場磁場との相互 作用によって原子や分子を質量電荷比(m/z,m:イオンの質量,z:イオンの電 荷数)によって分離、測定する手法である。1912年にJ.J.Thomsonが放物線型 質量分析計を開発したのが最初であり[18]、その後弟子のF.W.Astonが速度収束 質量分析計の開発に成功し、既知元素のほどんどに同位体が存在することを明 らかにした[19].Astonの研究では、ガス放電イオン化法が用いられたが、その 同時期にA.J.Dempsterによって電子衝撃イオン化(electron impact ionization, El) 法が開発された[20].EI法は、低質量で揮発性の分子のイオン化に適しており、 真空下で試料をイオン化することから、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS)法で一般的に用いられている。質量分析では、試料を気相イオンにす ることが必要であり、EI法以外にもこれまでに様々なイオン化法が開発されて きた。

大気圧イオン化(atmospheric ionization; API)法は,質量分析が生命科学の分 野で利用され始めた 1970 年代に発表され,難揮発性かつ質量の大きな分子を測 定するために,LCと MS をつなぐ必要性が高まる中で開発された手法である[21, 22]. LC では,試料は液体の状態で MS のインターフェイスに導入されることか ら,液体試料を大気圧条件下で気化・イオン化する必要がある.大気圧イオン化 法として最初に開発されたのは,大気圧化学イオン化(atmospheric chemical ionization, APCI)法で,キャピラリーを 400-500℃の高温加熱することで LC か

- 11 -

ら流れてきた溶液試料を気化し、コロナニードル先端での放電を利用して試料 をイオン化する方法である(図1-3). GC-MSで用いられるソフトイオン化法の 一つである化学イオン化(chemical ionization, CI)法とイオン化の機構は同じで、 APCIでは気化した溶媒分子が反応ガス(プロトン供与やプロトン脱離に寄与) の役割を担う. APCIでは、低極性から中極性の化合物で一定の揮発性を持ち、 また高温で気化することから熱安定性の高い化合物が測定対象となる.



図 1-3. APCI 法の概念図

エレクトロスプレーイオン化(electrospray ionization; ESI)法は, APCI に次い で開発された大気圧イオン化法であり, ESI の根本原理であるエレクトロスプレ ー現象は, 雷の放電メカニズムを解明するための研究の過程で発見された[23]. 1917年に Zeleny は, 高電場に液滴を置くと, その表面が電場と同じ方向に円錐 状に引っ張られ, 一定の限度を超えると微細な液滴となって円錐の先端から引 きちぎられることを見出した[24]. 1964 年に Taylor が詳細な実験を行い考察を 加えて報告した[25] ことから,円錐状のスプレーは一般的に Taylor コーンと呼 ばれている(図1-4).質量分析のための ESI は,1983 年に J. B. Fenn らのグルー プによって開発され,現在広く利用されている ESI ソースの原型を作り出した. ESI は,中極性から高極性化合物の測定に適しており,ペプチドやタンパク質, アミノ酸,脂質,有機酸などの生体分子にも適用できる. APCI よりも幅広い化 学特性を持つ化合物,特に含水溶媒に溶ける極性分子を測定対象とすることが できることから,現在 LC-MS で用いるイオン化として ESI が最も良く使用され ている(図1-5). ESI は,キャピラリーに高電圧を印可することで生じる電荷分 離による分析対象物のイオン化(プロトン化/脱プロトン化)と,脱溶媒を伴う 液相から気相へのイオン抽出の二つのプロセスでイオンが生成される[26].前者 は,プロトン親和性や酸性度などの熱化学的性質,後者は疎水性や親水性などの 物理的性質が関与すると考えられており,生成されるイオンの総量(J)は分析対 象物のイオン化効率(J)と気化効率(J)の積に支配される[27, 28].

 $J_{\rm i} = {\rm I} \times J_{\rm v}$

移動相の化学的・物理的特性は,分析対象物のイオン化効率と気化効率に影響 を与えるため,良好な MS 感度を得るためには移動相条件の最適化が極めて重 要となる.



図 1-4. ESI 法の概念図



図 1-5. ESI 法と APCI 法の分析対象

1.4. 超臨界流体クロマトグラフィー質量分析法

SFC と MS は、ともに幅広い化学的特性を持つ化合物の網羅的な分離検出に 適しており、この二者の組み合わせは非常に相性が良いと言える.SFC と MS の 連結による分析は、1978 年に Randall らによって"Dense Gas Chromatography / Mass Spectrometer Interface"というタイトルで初めて報告された[29]. その約 10 年後に LC-MS の技術が確立し、製薬分野や食品分野などにおける分析ニーズの 高まりの中で、LC とは分離特性が異なる SFC をクロマトグラフィーとして用い た SFC/MS への期待や需要が高まり、特に複雑なマトリクス中における微量成 分の検出が必要とされるメタボロミクスや農薬分析での応用が拡大した[30-34].

SFC/MS では、LC/MS と同様にイオン化には大気圧イオン化法である ESI 法 または APCI 法が利用される. イオン化法は分析対象物の化学的特性によって使 い分けられるが、化合物の網羅性の観点から ESI 法が一般的に用いられている (以降、単に SFC/MS と記載する場合は SFC/ESI-MS を指す.また LC/MS につ いても同様). LC/MS では、分析対象物は液体の状態で ESI キャピラリーに導入 され、液相条件下でイオン化が行われるが、SFC/MS では CO₂移動相は BPR の 出口で気化されるため、ESI キャピラリー内にはガス化した CO₂ とモディファ イアとして用いる有機溶媒(液体)が混和した状態で導入される.この場合、ガ ス化した CO₂ によってキャピラリー内では気化が起こり、化学イオン化(CI) 法様のイオン化が進行する可能性がある.また、ESI キャピラリーの先端からは CO₂ ガスが噴射されるため、通常 ESI で観察されるテイラーコーンの形成によ

- 15 -

る液滴生成は起こらないと考えられる. このように, SFC/MS では CO₂の存在に よって従来の LC/MS とは異なる機構でイオン化が行われている可能性があるも のの,イオン化メカニズムについてはほとんど研究がなされていない. いくつか の先行研究では, LC/MS と SFC/MS で測定を行った際に, LC/MS よりも SFC/MS の方が高い感度が得られるという報告がなされている[35,36]. MS 検出にて良好 な感度を得るためには,移動相条件(流量や組成)および,移動相条件に則った MS インターフェイスパラメータ(温度,ガス流量,インターフェイス電圧値) の最適化が重要であるが, SFC/MS では LC/MS のようにイオン化メカニズムに 沿って理論的に最適条件を導き出すことが難しく,経験則に頼らざるを得ない 点も多かった.

これまでの研究において, CO₂が水に溶解したときに重炭酸イオンが生成する のと同様に, CO₂とアルコールが混和するとアルコキシル炭酸イオンが生成する ことが示唆されている. 2001年にK. N. West らは,カルボン酸の検出・定量プ ローブであるジアゾジフェニルメタン (DDM) とアルコール-CO₂複合体の反応 を用いて, CO₂とアルコール存在下でアルコキシルカルボン酸が生成することを 示した[37].また,2017年にC. West らや Akbal らは,SFC では CO₂ とメタノー ルが混和することによって移動相の pH が低下することを示し,メトキシルカル ボン酸の生成(図 1-6)が pH の低下の要因である可能性を示唆している[38,39].

図 1-6. メトキシルカルボン酸生成の化学反応式

理論上,メトキシルカルボン酸は,ぎ酸や酢酸などの酸性添加剤と同様に,プ ロトン供与体として正イオンモードでのイオン生成に寄与する可能性がある. しかし,これまでに SFC/MS でメトキシルカルボン酸が生成することを直接的 に示した報告はなく,またイオン化との関係性についても検証された例はない.

SFC/MS 分析では、感度や分離の両面において移動相条件の最適化は非常に重要である.特に、SFC の移動相として用いられる超臨界 CO₂は、LC で用いられる有機溶媒とは物理化学的性質が異なり、また SFC では一般的に超臨界 CO₂に 混和しない水を移動相に含まないことから、固定相と分析対象物がより強く相互作用する傾向がある(化合物の吸着が起こりやすい).そのため、SFC/MS では、カラムへの分析対象化合物の吸着を防ぐため、移動相に塩を添加するケースが多い.これまでの先行研究においても、モディファイアやメイクアップ溶液に、 揮発性塩である酢酸アンモニウムやぎ酸アンモニウムを 1-10 mM の濃度で添加した溶液を用いたアプリケーションが多数報告されている[32,33,36,40,41].添加する塩濃度は、LC/MS 分析の経験に基づいて決定されることが多いが、これまで SFC/MS 分析で一般的に用いられてきた塩濃度が、SFC/MS の分離やイオン化効率向上の観点で最適な濃度であるかについては深く検証されていない.

1.5. 本研究の目的

SFC/MS 分析における分析条件の最適化は、分離と検出を両立させ良好な結果 を得るうえで非常に重要なプロセスであるが、現状は最適な分析条件を見出す

- 17 -

ためには多くの試行錯誤を必要とする.本研究では,SFC/MS において ESI をイ オン化に用いた際のイオン化メカニズムを解析し,MS 検出に最適な分析条件を 見出すための指標を示すことを目的とした.第二章では,イオン化の過程におい て,CO₂がメタノールと反応しメトキシルカルボン酸が生成するか否かの確認 と,メトキシルカルボン酸がイオン化 (MS 検出感度)に与える影響をモデル化 合物を用いて系統的に検討した.第三章では,SFC/MS におけるメトキシルカル ボン酸生成メカニズムに関する知見をもとに,移動相組成を変更することによ ってより高感度な MS 検出が可能かどうかの検証を行った.さらに,農薬分析を 例に用いて,第二章で得られた分析条件最適化に関する知見が実際のアプリケ ーションに応用可能かどうかを確認した.

第二章 SFC/ESI-MS のイオン化メカニズムの解析

2.1. 緒言

SFC/ESI-MS では、CO2移動相は BPR の出口で気化されるため、ESI キャピラ リー内にはガス化した CO2 と有機溶媒(液体)が混和した状態で導入される. また, ESI キャピラリーの先端(出口)からは CO₂ ガスが噴射されるため, SFC/ESI-MS では ESI の根本原理であるテイラーコーンの形成による液滴生成は 起こらないと予想される.そのため、通常の LC/ESI-MS とは異なる機構でイオ ン化が起こっていると考えられる. 先行研究にて, CO2 とアルコール存在下でア ルコキシルカルボン酸が生成することが示されており[37], CO2とメタノールが 混和した際に生成すると考えられるメトキシルカルボン酸は、ぎ酸や酢酸など の酸性添加剤と同様にプロトン供与体として正イオンモードでのイオン生成に 寄与する可能性がある.しかし,SFC/ESI-MS でメトキシルカルボン酸が生成し ていることを直接的に示した報告例はなく、イオン化との関係も深く検証され ていない. これより本章では、SFC/ESI-MS において、アルコキシルカルボン酸 が生成しているか否かを MS 分析によって確認・検証し, アルコキシルカルボン 酸が分析対象物のイオン化に与える影響を調査した.

2.2.実験材料および実験方法

2.2.1. 試薬

メタノール (LC/MS グレード) およびアセトニトリル (LC/MS グレード) は, 富士フイルム和光純薬社 (大阪,日本) から購入した.液化二酸化炭素 (99.9% グレード,福岡,日本,吉田産業社製) を SFC 移動相として使用した.系統的 なイオン化の評価を行うにあたり,テスト化合物として,置換基が異なる芳香族 化合物,安息香酸 (BA,pKa 4.2), *p*-アミノ安息香酸 (*p*-ABA, pKa 4.8), *p*-ヒ ドロキシ安息香酸 (*p*-HBA, pKa 4.6),ベンズアミド (pKa 13) および アニリン (pKa 27) の 5 成分を選択した.各化合物の試薬は,富士フイルム和光純薬社か ら購入した.5種類のテスト化合物の試料原液 (100 ng mL⁻¹) は,メタノールを 用いて調製した.これをメタノールで適宜希釈したものを実験に用いた.

2.2.2. 分析装置および SFC 分析条件

SFC 部には、CO₂ 送液ポンプ(LC-30AD_{SF}), モディファイアおよびメイクア ップ溶媒用送液ポンプ(LC-30AD, 2 台), オートインジェクタ(SIL-30AC), カ ラムオーブン(CTO-20AC), BPR(SFC-30A)を備えた島津製作所製 Nexera UC システム(京都, 日本)を使用した. MS 検出器には, LCMS-8060 トリプル四重 極型質量分析計(島津製作所製), 装置制御およびデータ解析には LabSolutions (島津製作所製)を使用した. 実験に用いた装置(フローインジェクション SFC システム)の構成を図 2-1 に示した.



図 2-1. フローインジェクション SFC システムの構成図

Y. Fujito, et al., Anal. Chim. Acta, 1246, 340863, (2023)より転載.

本章の実験では、移動相組成とイオン化の関係性を確認するため、移動相の CO₂とメタノール濃度(流量)を変化させるが、溶媒注入時にオートインジェク タ内部の移動相と試料溶媒の間で溶解度に差があると、化合物によっては流路 内で析出や吸着を起こし、ピーク形状の悪化や MS 検出感度に影響を与える可 能性がある.試料注入時の移動相条件を統一するため、オートインジェクタの上 流から有機溶媒(溶媒1)のみを 0.1 mL/minの一定流量で送り、オートインジェ クタの下流で CO₂と有機溶媒(溶媒2)を加えて総流量と移動相組成を調整し た.CO₂と溶媒2のチューブは、オートインジェクタの下流側でT型ジョイン トを用いてメイン流路に接続した.オーブン温度は 40°C、BPR の設定圧力は 40 MPa とした.テスト化合物とカラムとの吸着等の相互作用の違いがピーク面積 に影響する可能性を考慮し、カラムを用いないフローインジェクション法で実 験を行った.

2.2.3. MS 分析条件

イオン化には ESI 法を用い,分析は正負極性切り替えモードによる多重反応 モニタリング(Multiple Reaction Monitoring, MRM)を実施した.各テスト化合 物の MRM パラメータは,表 2-1 に示した.ネブライズガス流量は 3 L/min,加 熱ガス流量は 10 L/min,乾燥ガス流量は 10 L/min に設定した.また,ブロック ヒーター温度は 400 ℃,脱溶媒(DL)温度は 250 ℃,加熱ガス温度は 300 ℃に 設定した.イオン化電圧は,正イオンモードでは+4 kV,負イオンモードでは-3 kV を使用した.

/1× △ thm	哲学	MRM トランジション	コリジョンエネルギー
116日初	1型1生	(m/z)	(V)
	+	123>123	-11
空自禾融 (~V。12)		123>61	-20
		123>108	-23
	-	121>77	+14
		139>139	-12
	+	139>91	-16
n と ドロキシ(字自禾融 (nKa 1 6)		139>69	-18
p-こ下ロイン女志官政 (pKa 4.0)		139>55	-27
		137>93	+13
	-	137>65	+28
	+	138>94	-15
n アミノ字自禾酸 (nKa18)		138>76	-39
p-7 < 7 女心自致 (pKa 4.6)		138>65	-29
	-	136>92	+15
		122>77	-27
	+	122>79	-15
ベンズアミド (pKa 13)		122>51	-41
	-	120>120	+11
		120>62	+11
	+	94>77	-22
$\mathbb{Z} = [1] \setminus (nV_{2}, 27)$	I	94>51	-30
/ - / / (pKa 27)		92>92	+8
	-	92>45	+9

表 2-1. テスト化合物 MS 分析における MRM パラメータ

2.3.結果と考察

2.3.1 SFC のモディファイアにメタノールおよびアセトニトリルを 用いた際の MS 感度比較

弱酸であるアルコキシルカルボン酸は、酢酸やギ酸と同様にプロトン供与体 として作用し、正イオンモードにおいてイオン化を促進すると予測される.移動 相にメタノールを使用した場合、CO₂と反応してメトキシルカルボン酸が生成す るが、非プロトン性有機溶媒であるアセトニトリルはメトキシルカルボン酸を 生成しないと考えられる. MS におけるイオン生成量は、ESI キャピラリー内部 での試料分子のイオン化効率と、キャピラリー外部での凝集相からの試料分子 の気化効率の積で表されるが、メトキシルカルボン酸によるイオン生成量への 影響は、前者のイオン化効率に関連するものである.後者の、ガス化した CO₂が 試料分子の気化促進に影響している可能性を事前に調査するため、CO₂にメタノ ールまたはアセトニトリルを添加した際の MS 感度変化を比較した.各実験区 の条件を表 2-2 に示した.

	Solvent 1		Solvent 2		CO ₂	
Conditions	Composition	Flow rate (mL/min)	Composition	Flow rate (mL/min)	Flow rate (mL/min)	Total flow rate (mL/min)
a	MeOH or AcCN	0.1	MeOH or AcCN	0.1	0	0.2
b	MeOH or AcCN	0.1	MeOH or AcCN	1.1	0	1.2
с	MeOH or AcCN	0.1	MeOH or AcCN	0.1	1.0	1.2

表 2-2. 各実験区の移動相組成と流量

テスト化合物を,酸性化合物 (BA, p-HBA),塩基性化合物 (アニリン、ベン ズアミド),中性化合物 (p-ABA) に分類し,それぞれのイオン化挙動を観察し た. 結果を図 2-2 に示す. 各条件におけるテスト化合物のピーク面積値は, 100% メタノール条件(0.2 mL/min,条件 a, コントロール)で検出されたピーク面積 値を1としたときの相対面積値で示した.一般的に, MS インターフェイスに導 入する溶媒(SFC 移動相のモディファイア)の流量が増えると、MSの濃度依存 性の性質と脱溶媒効率の低下によって MS 検出強度は下がると予想される. 実 際に、今回の実験では、有機溶媒 100%で流速を 0.2 mL/min (条件 a) から 1.2 mL/min (条件 b) に変更した際、メタノール、アセトニトリルいずれにおいても テスト化合物のピーク面積値は低下した.また,正イオンモード,負イオンモー ドのいずれでも同様の傾向が見られた.一方,メタノールまたはアセトニトリル に CO₂を 1.0 mL/min の流速で添加し総流量を 1.2 mL/min とした条件 c では、メ タノールでは正イオンモードで条件 a の 1.8-19 倍(平均 7.2 倍)の面積値上昇 (感度向上), 負イオンモードで 0.02-0.4 倍(平均 0.2 倍)の面積値低下(感度 - 26 -

低下)が観察された.アセトニトリルでは,条件 c のピーク面積は正イオンモー ドで条件 a の 0.7-3.1 倍 (平均 1.7 倍),負イオンモードで 0.9-1.5 倍 (平均 1.2 倍) であった.条件 a と条件 c で得られたピーク面積値の t 検定 (Student's t-test)を 行った結果,メタノールでは正イオンモード,負イオンモードともにすべての化 合物で有意差 (p<0.05)が認められた.一方,アセトニトリルではすべての化合 物において正イオンモードで有意差が認められたが,負イオンモードでは有意 差は認められなかった (p>0.05).メタノールとアセトニトリルでは,流量や CO₂ との混合比による感度変化の傾向に違いがみられることが確認され,また CO₂ を加えた際の顕著な感度向上は,メタノールを用いた正イオンモードでのみ観 察された.CO₂によって気化効率が変化すると仮定すると,正負イオンモードに 関係なく同様の傾向を示すと考えられる.これより,イオン生成量の決定には気 化効率以外の要因が重要であり,メトキシルカルボン酸の生成がイオン化に寄 与している可能性が示唆された.



図 2-2. CO₂ にメタノールおよびアセトニトリルを添加した条件下における相対ピーク面積比較

(A)正イオンモード、(B)負イオンモード.エラーバーは n = 6 反復実行の標準偏差を示す.メタノールとアセトニトリルにおける条件 a と条件 c の差の統計的有意性は Student の t-test を用いて評価した (*p<0.05, **p<0.01). Y. Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載.

2.3.2 SFC のモディファイアにメタノールを用いた際のメトキシル

カルボン酸生成の有無の確認

次に、メタノールと CO₂を混和した際にメトキシカルボン酸が生成している 可能性を検証するため、移動相バックグランドのマススペクトルを観察した.負 イオンモードにおける、メタノールまたはメタノール/CO₂のバックグラウンド のマススペクトルを図 2-3 (a)、(b) に示した.メタノール/CO₂のバックグラウン ドマススペクトルでは、メトキシルカルボン酸の脱プロトン化分子[M-H]- に相 当するイオンが m/z 75 にベースピークとして観測された.また、確認のために 他のアルコールとして、エタノールおよび 2-プロパノールを用いて同様にバッ クグラウンドを測定した結果を図 2-3 (c)、(d)に示した. CO₂存在下において、エ タノールではエトキシルカルボン酸、2-プロパノールではプロポキシルカルボン 酸の脱プロトン化分子に相当するイオンが m/z 89、m/z 103 にそれぞれ観測され た.また、m/z 75、83、103 の MS/MS 分析を行ったところ、CO₂が脱離した (*Δ*44) フラグメントイオンがそれぞれ観測された (図 2-4).



図 2-3. 負イオンモードでの SFC 移動相バックグラウンドのマススペクトル (a) メタノール 1.2 mL/min, (b) メタノール/CO₂ = 0.2/1.0 mL/min, (c) エタノール/CO₂ = 0.2/1.0 mL/min, (d) 2-プロパノール/CO₂ = 0.2/1.0 mL/min, Q3 スキャン, スキャンレンジ: *m/z* 10-200, イオン積算範囲: 0.5-1.0 min (減算なし). Y. Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載.





(a) プリカーサイオン: *m/z* 75 (メタノール/CO₂), (b) プリカーサイオン: *m/z* 89 (エタ ノール/CO₂), (c) プリカーサイオン: *m/z* 103 (2-プロパノール/CO₂), コリジョンエネ ルギー:+10 V. Y. Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載.
先行研究[38,39]にて、CO₂にメタノールを添加すると移動相の見かけの pH が 低下することが報告されているが、これはメトキシカルボン酸の生成が要因で あることが本実験の結果から推測できる.移動相 100%メタノールの条件(図 2-3 (a))においても m/z 75 のイオンがわずかに検出されたが、これは空気中の CO₂ がメタノールに溶解し、その結果少量のメトキシルカルボン酸が生成したため と推測される.この仮説を検証するため、一般的な LC 条件である木/メタノー ル移動相のバックグラウンドも調査した.その結果、CO₂を移動相に用いない木 /メタノール条件においても m/z 75 のイオンが観測された.また、水の比率が高 い条件では、水と CO₂が混和して生成する炭酸イオン[HCO₃]に相当する m/z 61 も検出された(図 2-5).



図 2-5. LC 条件 (水/メタノール) におけるバックグランドマススペクトル (負 イオンモード) (a) 水/メタノール = 10/0, (b) 水/メタノール = 9/1, (c) 水/メタノール = 5/5, (d) 水/メ

タノール= 1/9. 全体流量: 1.2 mL/min. Y. Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載.

2.3.3 メタノールに対する CO₂の割合と MS 感度の関係性の解析

これまでの実験結果から、メタノール/CO₂中ではメトキシルカルボン酸イオ ンが生成し、正イオンモードにおけるイオン化に寄与していることが強く示唆 された.これより次に、メタノールに対する CO₂比率が高まった際に MS 感度 がどのように変化するかを確認するための実験を行った.移動相の総流量は、通 常の SFC/MS 分析でよく使われる流量範囲である 1.2 mL/min に固定し、CO₂ と メタノールの流量をそれぞれ適宜変化させることで組成を変えた.移動相の組 成と流速を表 2-3 にまとめた.

	Solvent 1		Solvent 2		CO ₂		
Conditions	Composition	Flow rate (mL/min)	Composition	Flow rate (mL/min)	Flow rate (mL/min)	Total flow rate (mL/min)	CO ₂ ratio (%)
а	MeOH	0.1	MeOH	1.1	0	1.2	0
b	MeOH	0.1	MeOH	0.7	0.4	1.2	33
с	MeOH	0.1	MeOH	0.5	0.6	1.2	50
d	MeOH	0.1	MeOH	0.3	0.8	1.2	67
e	MeOH	0.1	MeOH	0.1	1.0	1.2	83
f	MeOH	0.1	MeOH	0	1.1	1.2	92

表 2-3. 各実験区における移動相組成と流量

図 2-6 に, CO₂比率を 6 段階(0%, 33%, 50%, 67%, 83%, 92%)で変化さ せたときの各化合物のピーク面積値の推移を示した. 正イオンモードでは, すべ ての化合物が CO₂比率の増加に伴い, 段階的にピーク面積が増加することが確 認された. 負イオンモードでは, すべての化合物において 83%以上でわずかな 面積値上昇が見られるものの, 33%の条件でピーク面積が著しく減少しており, CO₂比率には関係なく CO₂が存在することによって MS 感度が低下する傾向が 見られた. この実験では, CO₂比率が変化しても総流量は一定であるため, CO₂ 比率が大きくなるに従って MS インターフェイスに導入される液体 (メタノー ル)量は減少する. 正イオンモードにおける MS 感度の向上は, MS インターフ ェイスへのメタノール量の減少による可能性も残るが,先の実験(図 2-2)では, 条件 a (CO₂なし) と条件 c (CO₂あり)ではともに MS インターフェイスへの メタノール導入量は 0.2 mL/min であったにも関わらず, テスト化合物の正イオ ンモードでのピーク面積は,条件 a に対して条件 c で向上した. このことから, 本実験で観測された正イオンモードのピーク面積の増加は,メタノール比率の 減少によるものではなく, CO₂の影響によるものであると考えられる.



図 2-6. SFC 移動相中 CO2 比率と各テスト化合物の面積値変化

(a) 正イオンモード, (b) 負イオンモード. 各条件のピーク面積は, CO₂ 0%条件で得ら れたピーク面積を1とした場合の相対ピーク面積で示した(平均±SD, n=6). 移動相総 流量は1.2mL/min. Y. Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載. 正イオンモードでは、メタノールに対する CO₂比率と MS 感度の間に正の相 関がみられたことから、次に CO₂比率を変えてメトキシルカルボン酸イオン(*m/z* 75)の生成量を調べ、メトキシルカルボン酸の生成量とテスト化合物の感度上昇 に相関がみられるかを確認した. 図 2-7 は、CO₂ 0%条件下で検出された *m/z* 75 のイオン強度を 1 とした場合の、各条件における *m/z* 75 イオンの相対強度を示 している. *m/z* 75 のピーク強度は、CO₂比率が高くなるに従って増大する傾向が 見られたが、CO₂比率が 83%以上になるとピーク強度は減少した. この結果は、 メトキシルカルボン酸の生成には、CO₂ の絶対量よりも CO₂ とメタノールの組 成比が重要である可能性を示唆している.





各条件下のイオン強度は、CO₂0%条件で検出された *m/z*75のイオン強度を1とした時の相対イオン強度で示した(平均±SD, n = 3).移動相総流量は1.2mL/minとした.Q3スキャン、スキャンレンジ: *m/z*10-200、イオン積算範囲:0.5-1.0 min(減算なし).Y.Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載.

図 2-7 に示した CO2 比率による m/z 75 のピーク強度の変化は、 負イオンモー ドで CO2 比が 33%になるとピーク面積が減少する(図 2-6)という結果と相関がみ られることから、負イオンモードでのイオン化抑制はメトキシルカルボン酸イ オンの生成と関連していると考えらえる. 一方で, 正イオンモードでは, メトキ シルカルボン酸生成量を基に考えると、CO2比率 83%以上の条件ではピーク面 積は減少することが予測できるが、実際の結果は CO2 比率 83%以上の条件にお いても右肩上がりにピーク面積は上昇し、メトキシルカルボン酸イオンの生成 量とは傾向が一致しなかった. CO2 は BPR の出口で気化するため、気体として MS インターフェイスに導入される. したがって, CO₂は ESI キャピラリー内で 起こるイオン化だけではなく, ESI キャピラリーの外で起こる脱溶媒にも寄与し ており,イオン化に寄与する十分量のメトキシルカルボン酸イオンが生成して いる条件下では, CO2ガスによる脱溶媒(試料分子の気化)促進に相乗的に寄与 している可能性も考えられる. CO2 とアセトニトリルが混和した際はメトキシル カルボン酸は生成しないが、CO2比率が高くなった際に正イオンモードではピー ク面積値の上昇が見られたと同時に、負イオンモードでも一部の化合物でピー ク面積の増加が見られた.これらの結果から、SFC/ESI-MS において、CO2ガス が試料分子の気化効率の向上にも寄与している可能性が示唆された. 図 2-6 の結 果では, 正イオンモードにおける CO2 比率の上昇に伴う面積値変化(上昇)は, 化合物によって多少の傾向の違いがみられた. 化合物の疎水性は, 気化(脱溶媒) の過程において、液滴内部から表面へのイオン転移と脱離に重要なファクター となるが、ペプチドを ESI 測定した先行研究では、ペプチドの疎水度とイオン

- 37 -

生成量に相関がみられることが確認されている [42]. イオン生成量は、キャピ ラリー内で起こるイオン化の効率とキャピラリー外部で起こる気化の効率の積 で表されるが、これらの作用が化合物の化学的特性に従って複雑に絡み合って いると予想される.

2.4. 小括

SFC/ESI-MS では、メタノールと CO₂が混和した際にメトキシルカルボン酸が 生成していることを MS 分析を通して実際に確認した.メタノールに CO₂ が加 わることで、正イオンモードでは MS 感度向上が確認されたことから、メトキシ ルカルボン酸がプロトン供与体として感度向上に寄与していると考えられる確 認された.一方、負イオンモードでは、イオンサプレッションによる感度低下を もたらすことを確認した.また、MS インターフェイスに導入された CO₂ ガス は、試料分子が気化する際の脱溶媒にも影響を与えている可能性が示唆された.

第三章 SFC/ESI-MS における MS 検出感度向上のための移動相条 件最適化と実試料分析への応用

3.1. 緒言

前章にて,移動相にメタノール/CO2 を用いた場合に,メトキシルカルボン酸 の生成によって正イオンモードでは感度が向上する一方で、負イオンモードで は感度が低下することが明らかとなった. LC/ESI-MS 分析において負イオンを 検出する場合, 化合物を解離状態にしてイオン化を促進させる目的で, 中性 pH のアンモニウム塩を含む移動相が広く用いられる[43-45].また、負イオンモード でイオン化を阻害する要因となる移動相中の酸由来の負イオンに対して、アン モニウム塩の添加によりカウンターイオン(陽イオン)を供給することで、分析 対象化合物の負イオン検出を容易にする目的もある.また,SFC では,移動相に 水を含まないため、LC に比べて分析対象物と固定相がより強く相互作用し、化 合物がカラムに吸着しやすくなる傾向がある.SFC/MS 分析でもアンモニム塩を 含むモディファイアが使用されるケースがあるが、カラムへの化合物の吸着を 防ぎ分離や感度を向上させる目的もある.SFC/MS分析では、モディファイアや メイクアップ溶媒に添加する塩の濃度は、LC/MS 分析の経験に基づいて決定さ れることが多いが、これまで SFC/MS 分析で一般的に用いられてきた塩濃度が、 SFC/MS の分離やイオン化効率の向上の観点で最適な濃度であるかどうかにつ いては深く検証されていない.

本章では、モディファイアへの塩の添加によって、CO2とメタノールが混和し た際に生じるメトキシルカルボン酸による負イオンモードでの感度低下が抑制 できるかどうかを確認した.また、前章および本章の基礎実験で得られた MS 感 度向上における移動相選択に関する知見の実用性を確認するため、実際のアプ リケーションとして農薬分析を例にとりあげ、さまざまな移動相条件下で測定 した際の MS 検出感度を確認した.農薬は、化合物によって様々な物理化学的性 質を持っており、一斉分析を通して幅広い化学特性を持つ化合物における検証 が可能であることから、好適な分析対象と考えた.

3.2. 実験材料および実験方法

3.2.1. 試薬

メタノール (LC/MS グレード) およびアセトニトリル (LC/MS グレード) は, 富士フイルム和光純薬社 (大阪,日本) から購入した.酢酸アンモニウムおよび ギ酸アンモニウムは,シグマアルドリッチ社 (セントルイス,ミズーリ州,米国) から購入した.液化二酸化炭素 (99.9%グレード,福岡,日本,吉田産業社製) を SFC移動相として使用した.テスト化合物には,第二章と同様に安息香酸 (BA, pKa 4.2), *p*-アミノ安息香酸 (*p*-ABA, pKa 4.8), *p*-ヒドロキシ安息香酸 (*p*-HBA, pKa 4.6), ベンズアミド (pKa 13) および アニリン (pKa 27) の 5 成分を用い た.農薬分析には,農薬混合物 (PL2005 農薬 LC/MS Mix 1-10, PL2005 農薬 GC/MS Mix 1-7, STQ 法農薬混合標準溶液,大阪,日本,林純薬社製)を使用した.こ れらの混合物に含まれる化合物のうち, ESI で検出可能な 441 化合物を分析対象 化合物(logPow:-4.21~7.70)とした.各農薬標準混合溶液を混合し,アセトニ トリルで 100 ng mL⁻¹の濃度に調製し,分析に供した.

3.2.2. 分析装置および SFC 分析条件

移動相に塩を添加した際のテスト化合物の感度確認(実験 3-1)では,第二章 と同様の装置構成および分析条件を用いた(図 2-1,フローインジェクションSFC システム).

農薬分析(実験 3-2)には、オートインジェクタの上流に CO₂ ポンプとモディ ファイアポンプの両方を設置した一般的な SFC 流路構成を用いた(図 3-1, SFC/MS 分析システム).SFC/MS 分析では、MS インターフェイスに分析対象物 を導入する際に、移動相の流量を安定させるとともにイオン化を補助する目的 で少量の溶媒(メイクアップ溶液)を添加することがある.今回の実験では、CO₂ 濃度が低い条件からのグラジエント分析を実施したため、メイクアップ溶液を 使用した.メイクアップ溶液は、BPR の上流から添加し、BPR を通過した後は スプリットすることなく MS に全量導入した.SFC 部には、CO₂送液ポンプ(LC-30AD_{SF})、モディファイアおよびメイクアップ溶媒用送液ポンプ(LC-30AD)、 オートインジェクタ(SIL-30AC)、カラムオーブン(CTO-20AC)、BPR(SFC-30A) を備えた島津製作所製 Nexera UC システム(京都、日本)を使用した.MS 検出 器には、LCMS-8060 トリプル四重極型質量分析計(島津製作所製)、装置制御お

- 41 -

よびデータ解析には LabSolutions (島津製作所製)を使用した.

農薬分析(実験 3-2)では、モディファイアおよびメイクアップ溶液には、メ タノールまたはぎ酸アンモニウム(1 mM もしくは 5 mM)を含むメタノール、 分析カラムには Shim-pack UC-RP (2.0 mm I.D.×150 mm L,粒子径 3 µm,島津製 作所製)を用いた.オーブン温度および BPRの圧力はそれぞれ 40 ℃および 15 MPa に設定し、グラジエントプログラムは次のとおり設定した.2%B,0分;2%-10% B,0-12分;10-80% B,12-20分;80% B,20-25分;2% B,25-30分とした(B はモディファイアを示す).移動相流速は 0.6 mL/min,メイクアップ溶液の流速 は 0.1 mL/min に設定した.



図 3-1. SFC/MS 分析システムの構成図

Y. Fujito, et al., Anal. Chim. Acta, 1246, 340863, (2023)より転載.

3.2.3. MS 分析条件

イオン化には ESI 法を用い,分析は正負極性切り替えモードによる多重反応 モニタリング (Multiple Reaction Monitoring, MRM)を実施した.実験 3-1 では, 第二章と同様の MRM 分析条件 (表 2-1)を使用した.また,MS インターフェ イスパラメータ (ネブライズガス流量,加熱ガス流量,乾燥ガス流量,ブロック ヒーター温度,脱溶媒 (DL)温度,加熱ガス温度,イオン化電圧)も,第二章 と同様の条件を使用した.実験 3-2 で使用した各農薬の MRM パラメータは,補 足表 1 に示した.固定インターフェイスパラメータは,ネブライズガス流量 3 L/min,加熱ガス流量 10 L/min,乾燥ガス流量 10 L/min,ブロックヒーター温度 400 ℃,脱溶媒 (DL)温度 250 ℃,加熱ガス温度 300 ℃に設定した.イオン化 電圧は,先行研究 [36] に基づいて正イオンモード・負イオンモードそれぞれ+5 kV,-5 kV に設定した.

3.3. 結果と考察

3.3.1. モディファイアに添加する塩濃度と MS 感度との関係性確認 (実験 3-1a)

SFC/MS 分析において移動相への塩の添加は,LC/MS と同様にイオン化を阻害し MS の感度低下をもたらすため,できるだけ低濃度であることが望ましい. 本実験では、多くのアプリケーションで一般的に用いられる 1,5,25 mM の濃度を採用し、塩には酢酸アンモニウムを用いて、移動相中の塩濃度と MS 感度の-43関係性を調査した.移動相の組成と流速を表 3-1 にまとめた.

	Solvent 1		Solvent 2		CO ₂		
Conditions	Composition	Flow rate (mL/min)	Composition	Flow rate (mL/min)	Flow rate (mL/min)	Total flow rate (mL/min)	
а	MeOH	0.1	0 mM AA-MeOH	0.1	1.0	1.2	
b	MeOH	0.1	1 mM AA-MeOH	0.1	1.0	1.2	
с	MeOH	0.1	5 mM AA-MeOH	0.1	1.0	1.2	
d	MeOH	0.1	25 mM AA-MeOH	0.1	1.0	1.2	
e	MeOH	0.1	1 mM AA-MeOH	1.1	0	1.2	

表 3-1. 条件 a-e の移動相組成および流量(条件 e は実験 3-1b のみ)

図 3-2 に、塩を添加したメタノール/CO₂ で得られた各化合物の相対ピーク面 積値を示した(塩を添加しないメタノール/CO₂ 条件下で得られた各化合物のピ ーク面積を1とした).負イオンモードでは、塩を含むモディファイアを使用し た条件下で、全ての化合物において相対面積は1以下となった.これは、CO₂存 在下における負イオンモードでの感度低下は、塩の添加によって防げないこと を示している.さらに、塩の添加は正イオンモードにおける感度低下も引き起こ し、CO₂による感度向上のプラスの効果も塩のイオンサプレッションにより打ち 消されることが確認された.



図 3-2. メタノールに塩を添加した際の各テスト化合物の感度比較 (a) 正イオンモード,(b) 負イオンモード.各条件下のピーク面積値は,条件 a (0 mM 酢 酸アンモニウム (AA) を含むメタノール/CO₂)で得られた面積値を1とした時の相対値 で示した (平均±SD, n=6) 流速はすべての条件で1.2 mL/min (メタノール/CO₂=0.2/1.0 mL/min) に設定した. Y. Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載.

3.3.2. モディファイアに塩を添加した際のメトキシルカルボン酸生成量の確認(実験 3-1b)

実験 3-1a にて,メタノール/CO2 移動相に塩を添加しても負イオンモードでの 感度低下は抑制されないことが確認されたことから、塩を添加した移動相条件 下でのメトキシルカルボン酸の生成量を確認した.結果を図 3-3 (a) に示した. 1 mM 酢酸アンモニウム添加時のメトキシルカルボン酸のイオン強度は、塩非存 在下の約80%となり、塩濃度の上昇とともにイオン強度は減衰し、25 mM 酢酸 アンモニウム添加時にはイオンが検出されなくなった.実験 3-1a (図 3-2) では, 酢酸アンモニウム添加によっていずれのテスト化合物でも一様に感度低下が確 認されており, 25 mM 酢酸アンモニウム条件においても感度改善はみられなか った. 塩濃度の上昇に伴ってメトキシルカルボン酸の生成量が減少しても, 負イ オンモードでの感度低下は抑制されず、メトキシカルボン酸の生成量と負イオ ンモードにおける感度低下には相関はみられないことが分かった. また, 酢酸ア ンモニウムを含む移動相条件下では、塩濃度の上昇にともなって酢酸イオン [CH₃COO]⁻の検出が優位となり、メトキシルカルボン酸に置き換わることが確 認された(図 3-3 (b)). これらの結果から,移動相への塩添加時の感度低下は, 塩由来の陰イオンによるイオンサプレッションに起因すると推測される.

酢酸アンモニウムの添加は、メトキシルカルボン酸イオンの生成を抑制する 一方で、酢酸イオンが生成し陰イオンの検出を妨害するようになるため、結果的 に負イオンモードでの感度低下は抑制されないものと考えられる.また、添加し た塩に由来するアンモニウムイオン[NH4]⁺ が分析対象物の酸性部位と相互作用 -47-

し、ESI キャピラリー内で分析対象物由来の陰イオンが中和されている可能性も 考えられる. Mallet らは、LC/MS 分析において、塩の添加は正イオンモードと 負イオンモードともに感度低下をもたらすが、その感度低下は負イオンモード でより顕著であることを示した [46]. 正・負イオンモードで挙動が異なるこの 現象は、イオンサプレッションだけでは説明することができず、塩に由来する陽 イオンによる分析対象物の中和など、他のイオン化メカニズムが負イオンモー ドでの感度低下に関係している可能性が考えられる.また,別の先行研究におい て、メトキシルカルボン酸の生成によって移動相の pH が低下し(メタノール /CO₂ 混合液の pH は 4-5 程度), 負イオンモードの SFC/MS 分析では感度低下が 生じることが報告されている[38,39]. 本研究にて, この移動相の pH の低下はプ ロトン供与体として働くメトキシルカルボン酸の生成によるものであり、正イ オンモードでの検出感度向上に寄与する一方で、負イオンモードではイオンサ プレッションによる感度低下をもたらすことを確認した. SFC において, モディ ファイアへの塩添加は、カラムへの分析物の吸着を防ぎ、分離向上やピーク形状 の維持に役立つと考えられる.一方, SFC/MS 分析で MS 検出感度を最大化する という観点においては、塩を含まないメタノールが最適なモディファイアであ ることが本研究から明らかとなった. 吉岡らは, アクリルアミドの SFC/MS 分 析において、塩を含まないメタノール/CO2条件が良好な MS 感度を得るうえで 最も適していると報告しており[47]、これは我々の知見と一致する.SFC/MSは、 ぎ酸や酢酸などの酸を添加しなくとも移動相は酸性状態にあり、LC/MS に対し て正イオンモードでの検出に有利であるが、負イオンモードでの検出は LC/MS

- 48 -

に比べて逆に不利な条件となる.本研究では, CO₂存在下における負イオンモー ドでの感度低下を防ぐ方策を見出すことはできなかった.現段階においては,負 イオンモードでの高感度分析を実現するためには,LC/MS 分析のほうが望まし いと言える.





(a) 各条件における m/z 75 (メトキシルカルボン酸)の相対イオン強度. AA 添加なし条件時のイオン強度を1とした.
(b) 各条件における m/z 59 (酢酸)および m/z 75 の絶対イオン強度(平均±SD, n=3).
総流量はすべての条件で1.2 mL/min とした(メタノール/CO₂=0.2/1.0 mL/min).
Q3 スキャン(負イオンモード),スキャンレンジ: m/z 10-200,イオン積算範囲: 0.5-1.0 min (減算なし).
Y. Fujito, et al., Anal. Chim. Acta, 1246, 340863, (2023)より転載.

3.3.3. 異なる塩濃度の移動相条件下における農薬の SFC/MS 分析

上述の基礎実験の結果, SFC/MS 分析で高い MS 検出感度を得るためには, 塩 を含まないメタノール/CO₂ が最も適した移動相であることが明らかとなったが, これらの移動相選択に関する知見の実用性を実アプリケーションを用いて検証 するため,幅広い化学的特性を持つ化合物の分析例として, 農薬を対象としての 一斉分析を実施した(実験 3-2).

移動相に添加する塩濃度は先行研究[36]をもとに決定し、5種類の移動相条件 で測定を実施した.モディファイアおよびメイクアップ溶液の組成を表 3-2 に示 した.

Conditions	Modifier	Make-up solvent	
а	No salt addition	No salt addition	
b	1 mM AF	No salt addition	
с	1 mM AF	1 mM AF	
d	5 mM AF	No salt addition	
e	5 mM AF	5 mM AF	

表 3-2. 条件 a-e の移動相組成

条件 e で得られた各分析化合物の面積値を基準(1)として,各条件下でピー ク面積が上昇した(相対面積値が2.0以上),低下した(0.5 未満),変化なし(0.5-2.0)の化合物の数を調べ,図 3-4 にまとめた(対象化合物は正イオンモード: 378 化合物,負イオンモード:20 化合物). 正イオンモードでは,モディファイ アおよびメイクアップ溶液中の塩濃度が低下するにしたがって,条件 e よりも - 50 - 大きなピーク面積を示す化合物が増加した.条件bでは,82%の化合物が条件e に比べて大きなピーク面積値を示したが、条件 a では 61%にその化合物数は減 少した. また,条件 a に対して条件 b で 2 倍以上のピーク面積値を示す化合物 が 103 成分存在した. 負イオンモードでは, 正イオンモードと同様に塩濃度が 低い条件下で良好なピーク面積値を示す化合物数が多く,条件 a が最も良い結 果となった. 一方で, 条件 b よりも条件 a で小さいピーク面積を示す化合物も 存在し、基礎実験とは異なる結果も得られた.条件 a において条件 b よりも有 意にピーク面積値が低下した化合物について詳細に確認した結果、非解離性の 化合物またはプリカーサイオンがアンモニウム付加イオン[M+NH4]+ である化 合物が大半であった. アンモニウム塩の添加は, アンモニアよりプロトン親和性 の低い化合物の正イオンモードでのイオン化を促進し、塩濃度の十分低い条件 においては良好なピーク面積値が得られるものと推測される. なお, 条件 a で は、テスト化合物のうち2%の化合物でテーリングやピークの歪みといったピー ク形状の悪化が見られた.これは,塩の添加により一部の分析対象物においてカ ラムへの吸着が抑制されていることを示しているが、ピーク形状に違いが見ら れた化合物の面積値の上昇(改善)はみられなかった.これは、塩添加によって カラムへの吸着を防止する正の効果と、イオンサプレッションによる負の効果 がともに起こっており、負の効果が勝っていることを示唆している.本実験の結 果から, 農薬の SFC/MS 分析では, モディファイアとして 1 mM の塩を含むメタ ノール、メイクアップ溶液には塩を含まないメタノールを用いた条件(条件 b) が適していると判断した. 農薬の化学的性質は多種多様であり、中にはカラムへ の吸着性が高いものもある. そのため, 良好なクロマトグラフィー分離を得るためには塩の添加が必要とされるが, 塩の添加は感度に悪影響を与えるため, 添加 濃度はクロマトグラフィーの形状と MS 感度のバランスをとるべく慎重に検討 する必要があると言える.



図 3-4. 条件 e で得られたピーク面積値に対して各条件(a-d)でピーク面積が 増加(2.0以上),減少(0.5未満),または変化なし(0.5-2.0)となった化合物の 数(%)

条件 e で得られたピーク面積値を 1 として, 各条件下におけるピーク面積値を相対値で 比較した. Y. Fujito, et al., *Anal. Chim. Acta*, 1246, 340863, (2023)より転載.

3.4. 小括

本章では、移動相に塩を添加することによってメトキシルカルボン酸の生成 は抑制されるものの、塩由来の陰イオン生成によってイオンサプレッションが 生じ,結果的に正・負両イオンモードにおいて MS 検出感度が低下することを確 認した.また,添加した塩に由来するアンモニウムイオン[NH4]+が分析対象物 の酸性部位と相互作用し, ESI キャピラリー内で分析対象物由来の陰イオンが中 和されている可能性も示唆された.前章および本章の基礎実験を通して, MS 検 出感度を最大化することを目的とした場合,SFC/MS 分析においては,塩を含ま ない移動相条件が適していることを明らかとした. ただし, 農薬成分の一斉分析 においては、分析対象物と固定相の相互作用に起因するいくつかの要素を加味 したうえで移動相条件を決定する必要があり,塩添加の必要性や最適な塩濃度 は目的化合物や分離条件によって変わることを確認した. 良好な分離を維持す るためには塩の添加が必要な場合もあるが、イオンサプレッションを最小限に 抑えるためには添加する濃度はできるだけ低く抑えるのが好ましく、分離に寄 与するモディファイアに対して塩を添加し、メイクアップ溶液には塩を添加し ないといった工夫が必要とされる.ただし、プリカーサイオンにアンモニウム付 加イオンを使用する脂質分析などはその例外である [30].

第四章 総括と展望

近年,SFC/MS は様々なアプリケーションに利用されており,特にマトリクス が複雑で高度な分離と高感度検出が求められる農薬や環境汚染物質などの規制 対象化合物,生体試料中の代謝物の分析等に用いられている.これまで,SFC/MS 分析において良好な分離を実現するためには,モディファイアの適切な選択が 重要であることは広く認知されていたものの,移動相条件が MS の検出感度に 与える影響についてはほとんど注目されていなかった.水と有機溶媒を用いる LC/MS と CO₂を用いる SFC/MS では移動相条件が大きく異なるが,SFC/MS 分 析では LC/MS の条件をベースにして添加剤の種類や濃度が設定されることも多 かった.

先行研究[38,39] にて、SFC では CO₂ とメタノールが混和することによって移 動相の pH が低下することが明らかとなっており、メトキシルカルボン酸の生成 が pH の低下の要因である可能性が示唆されてきた.理論上、メトキシルカルボ ン酸は、ぎ酸や酢酸などの酸性添加剤と同様に、プロトン供与体として正イオン モードでのイオン生成に寄与する可能性があるが、SFC/MS でメトキシルカルボ ン酸が生成することを直接的に示した報告はなかった.

第二章では, ESI をイオン化に用いた SFC/MS 分析において, メタノールと CO₂ が混和した際にメトキシルカルボン酸が生成することを MS 分析によって 実際に確認した.また,メトキシルカルボン酸は,正イオンモードではプロトン 供与体として分析対象物の感度向上に寄与する一方で,負イオンモードではイ オンサプレッションによる感度低下をもたらすことを明らかにした.

第三章では、移動相への塩の添加がメトキシルカルボン酸生成による負イオ ンモードでの感度低下を抑制できる可能性を検証したが, SFC/MS 分析における 移動相への塩の添加は、塩由来の陰イオンによるイオンサプレッションによっ て,正・負両イオンモードで感度低下を引き起こすことを確認した.これより, SFC/MS 分析にて MS 検出感度を最大化するためには, 塩を添加しないメタノー ル/CO2の移動相条件が最適であると結論づけた.ただし、実アプリケーション (農薬分析)を用いた検証を通して、分析対象物が固定相(カラム)と強い相互 作用を持つ場合や、分析対象物が塩由来の陽イオンアダクト型で検出されるよ うな場合には塩添加が必要とされる場合もあるが、MS 検出感度の観点からはそ の濃度はできる限り低い方が好ましいことが分かった。実アプリケーションで は、分析対象化合物の化学的特性のみならず、 試料由来のマトリクスがイオン化 や分離に影響を与えるケースも想定する必要があるが、生体試料や食品、医薬品 など、マトリクスの性質は試料によって多様である. 実アプリケーションでは、 試料と対象化合物の組み合わせが様々であるため、分析条件の最適化のプロセ スは複雑化する.本研究で得られた知見をもとにして、今後、添加剤の種類や添 加量に関してさらなる詳細な検討を行う必要がある.

SFC/MS 分析では、LC/MS 分析と共通の ESI プローブを用いることから、こ れまでは LC/MS と同様の機構でイオン化が起こっていると考えられてきた.本 研究は、同じ ESI プローブを用いたとしても、SFC/MS と LC/MS では異なるイ オン化が起こっていることについて初めて言及した点において、本研究の意義

- 55 -

は大変大きい. ESI では、キャピラリー内で起こるイオン化とキャピラリー外部 で起こる気化の二段階でイオンが生成されるが、分析対象物の化学的特性や移 動相の条件に応じて二つの反応が複雑に絡み合っていると考えられる.本研究 では前者のイオン化に着目して機構の解析を行ったが、今後、CO2が気化に与え る影響や、イオン化と気化の関係性についても深く検証することが課題である. SFC/MS 分析には、分離に寄与するモディファイアと MS 検出を補助するメイク アップ溶液を用いる.これらの移動相組成を適切に設定し、最適化することが良 好な MS 検出感度を確保する上では重要となるが、従来は SFC/MS 分析におけ る移動相選択は経験則や試行錯誤に頼る部分も多かった.本研究の知見が SFC/MS 分析における最適な分析条件の設定、またモディファイアおよびメイク アップ溶液の最適組成を決定するための指標となり、SFC/MS のアプリケーショ ン開発を促進するとともに、幅広い産業分野への利用拡大に寄与することを期 待して、結びの言葉とする.

謝辞

本論文は、筆者が九州大学大学院システム生命科学府生命医科学講座メタボ ロミクス分野博士課程に在籍し行った研究成果をまとめたものです.

本博士研究を実施する機会を与えていただき,終始適切な助言と細部にわた るご指導を賜りました,九州大学生体防御医学研究所 馬場健史教授と和泉自 泰准教授に深謝の意を表します.また,本博士論文の主査を快諾してくださった 九州大学生体防御医学研究所 久保田浩行教授,副査を快諾してくださった九 州大学生体防御医学研究所 神田大輔教授および慶応大学政策・メディア研究 科 平山明由准教授には,貴重な助言とご指導をいただき,深く感謝いたします. 本研究において,常に新たな視点で物事を捉えるためのヒントを与えてくだ さり,数々の貴重な助言を賜りました,横浜市立大学 高山光男名誉教授には深 く感謝いたします.

本研究および論文作成にあたり、きめ細かなご指導およびご助言を賜り、また 日常業務の調整においても様々な配慮と協力をいただいた株式会社島津製作所 早川禎宏部長に心より感謝申し上げます.

本研究のデータ採取や解析において,貴重な時間をいただき多大なる協力を いただいた,九州大学生体防御医学研究所 高橋政友助教および,中谷航太助教 に心より感謝いたします.また,大学生活や研究室での実験をサポートしてくだ さった同研究室の諸先輩方,後輩の皆様に心から感謝いたします.

最後に、博士課程にチャレンジすることを後押しし、温かく見守ってくださっ

た京都工芸繊維大学 故山岡亮平名誉教授,また常日頃より支え応援してくれ た家族と,株式会社島津製作所の同僚の皆様に心から感謝の意を表し,謝辞とい たします.

引用文献

- C. de la Tour, Exposé de quelques résultats obtenus par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides, tels que l'eau, l'alcool, l'éther sulfurique et l'essence de pétrole rectifiée, *Ann. Chim. Phys.* 21 (1822) 127-132, 178-182.
- 2. 佐古猛,岡島いづみ,超臨界流体のはなし,*日刊工業新聞社*,(2006) pp13-14.
- T. Andrews, The Bakerian Lecture: On the continuity of the gaseous and liquid states of matter, *Trans. Roy. Soc. London*, 159 (1869) 575-590.
- H.B. Hannay, J. Hogarth, On the solubility of solids in gases, *Roy. Soc. London*, 30 (1880) 200-205.
- 5. E. Klesper, A.H. Corwin, D.A. Turner, High pressure gas chromatography above critical temperatures. *J. Org Chem*, 27 (1962) 700-701.
- 6. S.T. Sie, W. Van Beersum, G.W.A. Rjinders, High-pressure gas chromatography with supercritical fluids, *Sep. Sci.*, 1(4) (1966) 459.
- S.T. Sie, G.W.A. Rjinders, High-pressure gas chromatography with supercritical fluids, Sep. Sci., 2(6) (1967) 699.
- 8. **S.T. Sie, G.W.A. Rjinders**, High-pressure gas chromatography with supercritical fluids, *Sep. Sci.*, 2(6) (1967) 729.
- 9. S.T. Sie, G.W.A. Rjinders, High-pressure gas chromatography with supercritical fluids, *Sep. Sci.*, 2(6) (1967) 755.
- N.M. Karayannis, A.H. Corwin, E.W. Baker, E. Klesper, J.A. Walter, Apparatus and materials for hyperpressure gas chromatography of nonvolatile compounds, *Anal. Chem.*, 40, (1968) 1736.
- 11. **R. E. Jentoft, T. H. Gouw**, Pressure-programmed supercritical fluid chromatography of wide molecular weight range mixtures, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 138-142.

- M. Novotny, S. R. Springston, P. A. Peaden, J. C. Fjeldsted, M. L. Lee, Capillary supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.*, 53.3 (1981) 407-414.
- 13. **D. R. Gere, R. Board, D. McManigill**, Supercritical fluid chromatography with small particle diameter packed columns, *Anal. Chem.*, 54.4 (1982) 736-740.
- 14. C. F. Poole, Supercritical fluid chromatography, *Elsevier*, (2017) pp10.
- C. West, E. Lesellier, Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: I. Alkylsiloxane-bonded Stationary Phases, J. Chromatogr. A, 1110.1-2 (2006) 181-190.
- C. West, E. Lesellier, Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: III. Polar Stationary Phases. J. Chromatogr. A, 1110.1-2 (2006) 200-213.
- C. West, E. Lesellier, Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: IV. Aromatic Stationary Phases. J. *Chromatogr. A*, 1115.1-2 (2006) 233-245.
- J. J. Thomson, XIX. Further experiments on positive rays, *Philos. Mag. J. Sci.*, 24 (1912) 209-253.
- 19. F. W. Aston, Mass-spectra and isotopes, Edward Arnold, London, (1933).
- A. J. Dempster, A new method of positive ray analysis, *Physical Review*, 11.4 (1918) pp. 316-325.
- E.C. Horning M. G. Horning, D. I. Carroll, R. N. Stillwell, New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure, *Anal. Chem.*, 45, (1973) 936-943.
- 22. **D. I. Carroll, I Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegele**, E. C. Horning, Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid

chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 2369-2373.

- M. Yamashita, J. B. Fenn, Negative ion production with the electrospray ion source, J. Phys. Chem., 88 (1984) 4671-4675.
- 24. J. Zeleny, Instability of electrified liquid surfaces, *Phys. Rev.*, 10 (1917) 1.
- G. I. Taylor, Disintegration of water drops in an electric field, *Royal Soc. London A*, 280 (1964) 383.
- 26. 高山光男, ぶんせき, 2009 (2009) 2.
- 27. **T, Nishikaze, M. Takayama**, Study of factors governing negative molecular ion yields of amino acid and peptide in FAB, MALDI and ESI mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.*, 268 (2007) 47-59.
- D. Asakawa, S, Moriguchi, M. Takayama, Influence of amino acid composition and phosphorylation on the ion yields of peptides in MALDI-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 23 (2012) 108-115.
- L. G. Randall, A. L. Wahrhaftig, Dense gas chromatography/mass spectrometer interface, *Anal. Chem.* 50.12 (1978) 1703-1705.
- H. Takeda, Y. Izumi, M. Takahashi, T. Paxton, S. Tamura, T. Koike, Y. Yu, N. Kato,
 K. Nagase, M. Shiomi, T. Bamba, Widely-targeted quantitative lipidomics method by supercritical fluid chromatography triple quadrupole mass spectrometry, *J. Lipid Res.*, 59 (2018) 1283-129.
- G. L. Losacco, O. Isamail, J. Pezzatti, V. G. Ruiz, J. Boccard, S. Rudaz, J. L. Veuthey,
 D. Guillarme, Applicability of Supercritical Fluid chromatography-Mass spectrometry to metabolomics. II-Assessment of a comprehensive library of metabolites and evaluation of biological matrices, *J. Chromatogr. A*, 1620 (2020) 46102<u>1.</u>

- 32. **M. Ishibashi, T. Ando, M. Sakai, A. Matsubara, T. Uchikata, E. Fukusaki, T. Bamba**, High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1266 (2012) 143-148.
- 33. V. Cutillas, M. Murcia-Morales, M. M. Gomez- Ramos, S. M. Taha, A. R. Fernandez-Alba, Supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in dried spices. Benefits and drawbacks, *Anal. Chim. Acta*, 1059 (2019) 124-135.
- 34. L. Novakova, M. Rentsch, A. G. Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J.Veuthey, D. Guillarme, Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: Analysis of biological samples, *Anal Chim. Acta*, 853 (2015) 647-659.
- 35. A. G. Perrenoud, J-L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: From hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds, *J. Chromatogr. A*, 1339 (2014) 175-184.
- 36. Y. Fujito, Y. Hayakawa, Y. Izumi, T. Bamba, Importance of optimizing chromatographic conditions and mass spectrometric parameters for supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1508 (2017) 138-147.
- K. N. West, C. Wheeler, J. P. McCarney, K. N. Griffith, D. Bush, C. L. Liotta, C. A.
 Eckert, In situ formation of alkylcarbonic acid with CO₂, *J. Phys. Chem. A*, 105 (2001) 3947–3948.
- C. West, J. Melin, H. Ansouri, M. M. Metogo, Unravelling the effects of mobile phase additives in supercritical fluid chromatography. Part I: Polarity and acidity of the mobile phase, *J. Chromatogr. A*, 1492 (2017) 136-143.

- L. Akbal, G. Hopfgartner, Effects of liquid post-column addition in electrospray ionization performance in supercritical fluid chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 1517 (2017) 176-184.
- 40. Y. Yang, Y. Liang, J. Yang, F. Ye, T. Zhou, G. Li, Advances of supercritical fluid chromatography in lipid profiling, *J. Pharma. Anal.*, 9 (2019) 1-9.
- 41. **B. Velde, D. Guillarme**, I. Kohler, Supercritical fluid chromatography-Mass spectrometry I metabolomics: Past, present, and future perspectives, *J. Chromatogr. B*, 1161 (2020) 122444.
- 42. I. Osaka, M. Takayama, Influence of hydrophobicity on positive- and negative-ion yields of peptides in electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 28 (2014) 2222-2226.
- 43. H. Takeda, Y. Izumi, S. Tamura, T. Koike, Y. Koike, M. Shiomi, T. Bamba, Lipid profiling of serum and lipoprotein fractions in response to pitavastatin using an animal model of familial Hypercholesterolemia, *J. Proteome Res.*, 19, 3 (2020) 1100-1108.
- 44. V. Shulaev, G. Isaac, Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry
 A metabolomics perspective, J. Chromatogr. B, 1092 (2018) 499-505.
- 45. L. Akbal, G. Hopfgartner, Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry using data independent acquisition for the analysis of polar metabolites in human urine, *J. Chromatogr. A*, 1609 (2020) 460449.
- C. R. Mallet, Z. Lu, J. R. Mazzeo, A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (2004) 49-58.
- 47. **T. Yoshioka, Y. Izumi, Y. Nagatomi, Y. Miyamoto, K. Suzuki, T. Bamba**, A highly sensitive determination method for acrylamide in beverages, grains, and confectioneries

by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, 294 (2019) 486-492.

論文目録

本学位論文に関連する論文

 Y. Fujito, Y. Izumi, K. Nakatani, M. Takahashi, Y. Hayakawa, M. Takayama, T. Bamba, Understanding the mechanism of CO₂-assisted electrospray ionization for parameter optimization in supercritical fluid chromatography mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 1246 (2023) 340863.

補足表 1. 実験 3-2 のテスト化合物の MRM パラメータ

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Dichlorvos	+	237.95>220.95	-9
Methacrifos	+	258.10>208.90	-12
Butylate	+	218.20>57.10	-16
Mevinphos	+	225.10>127.00	-17
EPTC	+	190.10>128.20	-12
Dithiopyr	+	401.90>354.00	-19
Prohydrojasmone	+	255.10>152.90	-14
Sulfotep	+	323.00>97.00	-37
Allidochlor	+	174.10>98.10	-14
Flufenacet	+	364.15>152.20	-21
Flufenpyr-ethyl	+	426.00>409.00	-13
Tebupirimfos	+	319.00>153.10	-30
Carfentrazone-ethyl	+	412.00>345.90	-24
Cadusafos	+	270.80>97.00	-36
Allethrin	+	303.20>135.10	-12
Dicrotophos	+	237.90>72.00	-26
Isazophos	+	314.10>120.00	-28
Phosphamidon	+	300.00>174.00	-14
Ethoprophos	+	243.10>97.00	-31
Diazinon	+	305.10>169.10	-22
Fluazinam	-	463.00>416.00	+20
Isoxaflutole	+	360.15>251.15	-17
Metalaxyl	+	280.10>220.00	-14
Acrinathrin	+	559.20>181.00	-31
Fluacrypyrim	+	427.20>145.20	-24
Etrimfos	+	293.10>265.00	-17
Mecarbam	+	330.00>227.00	-10
Iprobenphos	+	289.10>205.00	-11
Diallate	+	270.10>86.00	-16
Ethofumesate	+	304.10>287.00	-11

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Phorate	+	261.00>75.20	-11
Cycloate	+	216.25>83.10	-18
Acetochlor	+	270.10>224.10	-11
Lactofen	+	479.20>344.00	-16
Phoxim	+	299.00>77.10	-30
Molinate	+	188.10>55.00	-25
OH-DMP/Tepraloxydim metabolite	+	260.90>229.10	-8
Cyflufenamid	+	413.20>295.15	-16
Oxabetrinil	+	250.00>233.10	-8
Isofenphos oxon	+	330.20>201.00	-24
Butafenacil	+	492.15>331.00	-24
Thiofanox sulfone	+	268.10>57.00	-13
Oxadiazon	+	345.10>302.90	-13
Chlorpropham	+	214.10>172.10	-17
Propachlor	+	212.10>170.10	-16
Dimethenamid	+	275.80>168.10	-24
Triadimefon	+	294.10>69.00	-22
Trifloxystrobin	+	408.80>186.10	-19
Naled (Dibrom)	+	395.80>127.20	-21
Metolachlor	+	284.10>252.10	-16
Pirimicarb	+	239.25>72.10	-22
Pendimethalin	+	282.20>212.00	-11
Clomazone	+	239.90>125.00	-21
Triallat	+	304.00>143.00	-27
Spiroxamine	+	298.20>144.20	-20
Isouron	+	212.20>72.00	-23
Sethoxydim	+	328.20>178.10	-19
Butachlor	+	312.20>238.00	-12
Disulfoton sulfone	+	307.00>97.00	-30
Chlorfenvinphos	+	361.00>155.00	-15
Pirimiphos methyl	+	306.10>164.10	-23
Tetramethrin	+	332.20>164.10	-24
Isofenphos	+	346.10>217.10	-22
Propaphos	+	306.00>222.00	-15
Phenthoate	+	320.75>246.80	-10
Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
-----------------------------------	----------	----------------------	----------------------
Aramite	+	352.25>191.30	-15
Isoxathion-oxon	+	298.10>242.00	-18
Pretilachlor	+	312.20>252.10	-17
Mefenpyr-diethyl	+	373.10>326.90	-15
Piperonyl butoxide	+	356.20>177.00	-14
Esprocarb	+	266.20>91.10	-25
Triflumizole metabolite	+	295.00>43.10	-27
Pyraflufen ethyl	+	413.00>339.00	-20
Flamprop methy	+	336.10>105.20	-15
Pyriminobac methyl (E)	+	362.10>330.00	-15
Dichlofenthion	+	315.00>258.90	-14
Fosthiazate	+	284.10>104.10	-21
Furathiocarb	+	383.25>195.10	-20
Tetraconazole	+	372.00>159.00	-30
Ethion	+	385.00>143.00	-25
Iprovalicarb	+	321.35>119.20	-23
Benfuracarb	+	410.90>195.10	-25
Chlorpyrifos	+	352.00>97.00	-30
Cyhalothrin (isomer)	+	467.10>225.10	-19
Nereistoxin oxalate (Nereistoxin)	+	149.90>105.00	-20
Ditalimfos	+	299.90>148.20	-21
Chlorpyriphos-methyl	+	321.80>124.95	-25
Quinalphos	+	299.10>147.10	-22
Pyrazophos	+	374.10>222.10	-22
Resmethrin	+	339.20>128.10	-43
Diflufenican	+	395.10>265.90	-24
Indoxacarb	+	528.15>150.15	-25
Omethoate	+	214.10>125.00	-23
Thiofanox sulfoxide	+	252.10>104.20	-12
Butamifos	+	333.10>96.00	-31
Monocrotophos	+	240.90>127.10	-21
Fenpropathrin	+	367.00>125.10	-17
Thiobencarb	+	257.80>125.10	-21
Dichlofluanid	+	350.00>223.90	-15
Bromophos-methyl	+	366.80>125.30	-16

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Benalaxyl	+	326.20>148.10	-21
Bupirimate	+	317.20>166.00	-24
Bifenthrin	+	440.00>181.20	-16
Carbosulfan	+	381.20>118.10	-21
Benoxacor	+	277.10>260.00	-10
Tetrachlorvinphos(CVMP)	+	366.95>127.15	-16
Tolylfluanid	+	364.00>238.00	-15
Profenophos	+	375.00>304.70	-19
Triflumizole	+	346.00>278.00	-11
Propargite	+	368.20>231.10	-11
Fonofos	+	247.00>109.10	-21
Propoxur	+	209.90>93.10	-24
Fenoxanil	+	346.10>302.00	-16
Methidathion	+	320.00>145.00	-12
Simeconazole	+	294.20>70.10	-22
Ethoxyquin	+	218.20>160.10	-34
Isoxadifen-ethyl	+	296.10>232.00	-17
Tolclofos-methyl	+	300.75>269.00	-15
Fenothiocarb	+	254.00>72.10	-22
Piperophos	+	354.10>170.70	-23
Promecarb	+	208.10>109.10	-15
Isoprocarb	+	194.10>95.00	-16
Isoxathion	+	313.80>105.20	-15
Fenitrothion	+	277.85>109.35	-22
Terbucarb	+	295.00>109.20	-29
Pentoxazone	+	371.10>286.00	-18
Fenobucarb	+	208.25>95.10	-15
Flucythrinate	+	469.20>412.00	-13
Tralkoxydim	+	330.30>138.10	-22
Isoprothiolane	+	290.80>231.00	-12
Kresoxim-methyl	+	313.80>196.00	-13
Metolcarb(MTMC)	+	166.10>109.10	-12
Bromobutide	+	311.90>194.00	-13
Bromophos-ethyl	+	394.90>338.80	-17
Dimepiperate	+	264.00>146.10	-9

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
XMC	+	180.10>123.10	-12
Xylicarb	+	180.00>123.10	-13
Probenazole	+	224.00>41.10	-13
Azamethiphos	+	325.00>183.00	-17
Salithion	+	216.90>107.10	-22
Diethofencarb	+	268.20>124.20	-31
Flusilazole	+	316.00>247.00	-18
Tepraloxydim_DMP	+	342.10>250.00	-14
Phenothrin, mixture of isomers	+	351.20>183.10	-21
Spirodiclofen	+	411.10>313.10	-14
Oxpoconazole metabolite I	+	338.90>143.10	-14
Carbofuran	+	222.25>165.15	-13
Picolinafen	+	377.00>238.00	-27
Indanofan	+	341.20>175.15	-14
Propazine	+	230.20>146.20	-23
Propiconazol	+	342.00>158.90	-28
Acephate	+	184.00>143.00	-10
Pyridaphenthion	+	340.65>188.85	-23
Fensulfothion	+	309.00>281.00	-15
Buprofezin	+	306.20>201.10	-12
Iprodione	+	329.85>244.80	-16
Penconazole	+	283.90>70.00	-17
Vinclozolin	+	285.80>70.20	-17
Thiocyclam	+	181.90>137.00	-18
Diclofop methyl	+	358.10>281.00	-15
Prothiofos	+	345.00>240.90	-20
Monolinuron	+	215.15>126.00	-20
Fluvalinate	+	503.00>181.00	-32
Fenoxaprop-ethyl	+	362.15>288.20	-20
Pyrifenox (E,Z)	+	295.00>93.10	-23
Flumiclorac pentyl	+	440.90>307.90	-24
Nitralin	+	363.10>288.90	-19
Aldoxycarb	+	240.20>86.10	-23
Anilofos	+	368.10>199.00	-16
Myclobutanil	+	289.10>70.10	-22

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Tebufenpyrad	+	334.20>117.00	-35
Crimidine	+	172.10>136.00	-21
Sulfentrazone	-	385.25>307.15	24
Cyanofenphos	+	304.10>157.00	-22
Napropamide	+	272.20>171.00	-18
Prometryn	+	242.10>158.00	-22
Terbutryn	+	242.10>158.00	-25
Diphenamid	+	239.90>134.20	-21
Pyroquilon	+	174.20>132.20	-23
Epoxiconazole	+	330.15>121.25	-23
Vamidothion	+	288.10>146.10	-12
Pyributicarb	+	331.20>181.00	-16
Chlorthiophos	+	361.00>304.90	-17
Cypermethrin	+	433.10>191.00	-16
Sulprophos	+	323.00>218.90	-17
Diclobutrazol	+	328.00>70.10	-22
Pyraclofos	+	361.00>257.00	-23
Aminocarb	+	209.00>137.10	-23
Cloquintocet-mexyl	+	336.20>238.10	-17
Carbophenothion	+	343.00>157.10	-13
Tebuthiuron	+	229.25>172.15	-19
Azaconazole	+	300.00>159.00	-28
Triazophos	+	314.10>162.10	-19
Bifenox	+	359.00>310.00	-14
Phosalone	+	368.00>182.00	-17
Permethrin	+	408.10>183.10	-21
Ethiofencarb	+	226.10>107.00	-21
Oxadixyl	+	296.20>219.10	-15
Atrazine	+	216.10>174.10	-18
Iprodione metabolite	-	328.30>141.15	+18
Fenpyroximate	+	422.30>366.20	-17
Fipronil	-	435.00>330.00	+16
Novalron	+	493.10>158.10	-22
Folpet	+	295.80>279.20	-9
Phosmet	+	335.00>160.10	-16

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Thenylchlor	+	324.10>127.10	-13
Hexythiazox	+	353.25>228.10	-16
Dioxacarb	+	224.10>123.00	-16
Fenvalerate	+	437.20>167.20	-18
Esfenvalerate	+	437.10>167.30	-19
Hexaconazol	+	314.10>70.00	-22
Dimethirimol	+	210.30>71.10	-35
Paclobutrazole	+	294.10>70.10	-22
Triadimenol (isomer)	+	296.10>70.10	-22
Tribenuron methyl	+	396.10>155.00	-13
Metominostrobin (E, Z)	+	285.10>194.00	-21
Quizalofop-ethyl	+	373.20>299.10	-19
EPN	+	324.10>157.00	-30
Diclocymet	+	330.00>173.00	-22
Dimethametryn	+	256.20>186.00	-21
Dimethoate	+	230.00>125.00	-21
Azinphos ethyl	+	346.00>77.10	-45
Edifenphos	+	310.80>282.80	-13
Cafenstrole	+	351.10>100.10	-11
Cyazofamid	+	325.00>108.10	-15
Fenoxycarb	+	302.20>88.10	-22
Ametryn	+	228.10>186.00	-19
Butocarboxim	+	208.10>75.10	-12
Butocarboxim sulfoxide	+	207.10>75.10	-12
Imazamethabenz-methyl	+	289.20>144.00	-35
Propyzamide	+	256.00>190.00	-14
Pyrimethanil	+	200.10>107.00	-24
Pyrazosulfuron-ethyl	+	415.25>182.25	-23
Flutriafol	+	302.10>70.10	-22
Thifluzamide	+	528.60>148.10	-42
Furametpyr	+	334.25>157.15	-35
Pyrazolate	+	439.10>91.15	-39
Halfenprox	+	494.00>183.10	-22
Triflumuron	+	359.10>156.00	-17
Silafluofen	+	426.30>287.15	-12

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Methomyl	+	163.20>88.00	-10
Acibenzolar-S-methyl	+	211.10>136.00	-31
Azinphos-methyl	+	318.00>132.15	-16
Metribuzin	+	215.10>187.10	-18
Hexazinone	+	253.20>71.10	-32
Oxaziclomefone	+	376.20>190.15	-16
Methiocarb	+	226.25>169.10	-10
Pyriproxyfen	+	322.10>96.10	-16
Propaquizafop	+	443.80>100.20	-22
Simazine	+	202.10>104.00	-25
Pyrazoxyfen	+	402.90>91.10	-42
Prochloraz	+	376.00>308.00	-13
Methamidophos	+	142.20>94.00	-15
Fluquinconazole	+	376.00>349.00	-20
Tolylfluanid metabolite	+	214.90>106.00	-16
Oxamyl	+	237.20>72.10	-13
Carpropamid	+	336.10>139.10	-20
Chinomethionat	+	235.00>207.00	-14
Cyanazin	+	240.80>214.00	-17
Cycloprothrin	+	499.00>181.10	-40
Dichlofluanid metabolite	+	200.90>92.00	-21
Azoxystrobin	+	404.25>372.20	-14
Clomeprop	+	324.15>120.25	-24
Terbacil	-	214.90>159.00	+18
Prosulfuron	+	419.90>141.00	-21
Diniconazol	+	326.10>70.10	-25
Dimetomorph	+	388.25>301.15	-22
Deltamethrin	+	523.00>281.00	-17
Endosulfansulfate	-	418.80>97.10	+22
Linuron	+	249.10>160.00	-18
Fluazifop	+	328.20>282.15	-20
Benzofenap	+	431.15>105.25	-36
Cinidon-ethyl	+	411.10>393.90	-11
Ethofenprox	+	394.00>177.20	-17
Quinoxyfen	+	308.00>197.00	-31

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Simetryn	+	214.10>96.00	-25
Methabenzthiazuron	+	222.20>165.10	-17
Bromuconazole	+	378.00>158.95	-30
Haloxyfop	-	360.25>288.15	+14
Carbofuran-3-hydroxy	+	238.10>163.20	-15
Uniconazole P	+	292.20>42.90	-30
Difenoconazole	+	406.10>250.90	-25
Lufenuron	-	509.10>339.10	+15
Cyproconazole	+	292.00>70.00	-23
Primisulfuron methyl	+	469.00>254.00	-19
Halosulfuron-methyl	-	433.20>252.10	+19
Tebuconazol	+	308.20>70.10	-22
Bromacil	+	261.00>204.90	-14
Flutoranil	+	324.10>242.00	-25
Pyridaben	+	365.20>147.10	-25
Mecoprop+Mecoprop-P	-	213.30>141.15	+14
Mefenacet	+	298.80>148.10	-15
Pyriftalid	+	319.20>139.10	-32
Cyprodinil	+	226.30>93.10	-36
Fenbuconazole	+	336.90>70.00	-22
Oxycarboxin	+	268.15>175.00	-16
Mepanipyrim	+	224.15>106.10	-27
Pyraclostrobin	+	388.20>194.10	-14
Fluthiacet-methyl	+	403.90>274.00	-29
МСРВ	-	227.30>141.10	+9
Pyrimidifen	+	378.20>184.00	-25
Propoxycarbazone	+	416.10>199.00	-22
Carbendazim	+	192.10>160.20	-19
Bifenazate	+	301.10>170.00	-19
Azafenidin	+	338.10>55.20	-45
Tolfenpyrade	+	384.00>197.10	-30
Bitertanol	+	338.40>43.00	-35
Triflusulfuron methyl	+	493.00>264.00	-24
Mepanipyrim metabolite	+	243.90>200.10	-19
Thiodicarb	+	355.15>88.15	-22

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Carboxine	+	236.10>143.10	-15
Clofentezine	+	303.10>138.00	-16
Hexaflumuron	-	459.10>439.00	+10
Triticonazole	+	318.20>70.10	-17
Bensulfuron-methyl	+	411.25>149.20	-23
Naproanilide	+	292.25>171.25	-15
Diflubenzuron	+	311.10>158.10	-15
Flufenoxuron	+	489.00>158.25	-20
Carbetamide	+	236.90>192.10	-9
Thiofanox	+	219.00>145.20	-14
Carbaryl(NAC)	+	202.20>145.10	-12
Azimsulfuron	+	425.20>182.15	-18
ТСМТВ	+	238.90>180.00	-14
Lenacil	+	234.90>153.20	-16
Acequinocyl hydroxy	-	341.40>341.40	+10
Ethylchlozate	+	239.10>165.00	-18
Mepronil	+	270.20>119.10	-23
Tebufenozide	+	353.35>133.20	-21
MCPA(MCP)	-	199.25>141.10	+14
Flazasulfuron	+	408.15>182.15	-21
Fenamidone	+	312.20>92.10	-24
Metsulfuron-methyl	+	382.00>166.90	-17
Teflubenzuron	+	381.00>158.00	-23
Clodinafopacid	-	310.25>238.15	+14
Triclopyr	-	254.00>196.00	+9
Fenarimol	+	331.00>268.00	-23
Norflurazon	+	304.10>284.00	-23
Cloransulam-methyl	+	430.15>398.25	-14
Ethoxysulfuron	+	399.20>261.10	-16
Chlorsulfuron	+	358.15>141.25	-20
1-Naphthaleneacetic Acid	-	185.35>141.20	+11
Chlorimuron-ethyl	+	415.15>186.20	-20
Penoxsulam	+	484.20>195.15	-30
Trifloxysulfuron	+	438.15>182.15	-21
Zoxamide	+	336.00>187.00	-23

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Cumyluron	+	303.20>185.10	-14
Methoxyfenozide	+	369.30>149.10	-18
Cinosulfuron	+	414.25>183.20	-18
Thifensulfuron-methyl	+	388.15>167.25	-17
Chlorfluazuron	+	540.00>382.90	-21
1-Naphtyl acetamide	+	186.10>141.25	-18
Pencycuron	+	329.25>125.20	-27
Tricyclazole	+	190.20>163.00	-23
Imazaquin	+	312.25>69.20	-34
Boscalid	+	343.10>307.10	-20
Acetamiprid	+	222.80>126.00	-21
Chromafenozide	+	395.30>175.15	-16
Famoxadone	+	392.20>331.10	-10
Imazosulfuron	+	413.00>153.20	-14
Quinoclamine	+	208.00>105.10	-24
Triasulfuron	+	402.15>167.20	-19
Dymron(Daimuron)	+	269.25>151.15	-14
Sulfosulfuron	+	471.15>211.25	-16
Florasuram	+	360.20>129.10	-23
Benzibicyclon	+	447.00>256.95	-25
Imibenconazole	+	410.80>125.20	-31
Propanil	+	218.00>162.00	-14
Diuron(DCMU)	+	233.10>72.10	-22
Iodosulfuron-methyl	+	508.10>167.15	-21
Chloroxuron	+	291.20>72.10	-22
Thiamethoxam	+	292.10>211.10	-13
Diclosulam	+	406.10>161.00	-28
Parathion-ethyl	+	292.10>122.00	-18
Fluridone	+	330.25>309.20	-37
Cyclosulfamuron	+	422.25>261.20	-18
Abamectin B1a	+	890.60>305.30	-27
Oryzalin	+	347.20>288.20	-18
Ethametsulfuron-methyl	+	411.25>196.25	-18
Fludioxonil	-	246.90>180.00	+28

Compounds	Polarity	MRM transition (m/z)	Collision Energy (V)
Diclomezine	+	255.20>123.10	-41
Pymetrozine	+	218.10>105.00	-22
Fenhexamid	+	302.20>97.15	-26
Foramsulfuron	+	453.25>182.25	-21
Mesosulfuron-methyl	+	504.20>182.15	-28
Triforine	+	434.90>389.90	-12
Imidacloprid	+	256.15>209.15	-16
Inabenfide	-	337.00>122.00	+15
Flumetsulam	+	326.15>129.20	-27
Phenmedipham	+	318.20>168.10	-16
Desmedipham	+	318.00>136.10	-27
Thiacloprid	+	253.15>126.10	-21
Clothianidin	+	250.10>169.10	-14
Gibberellin	-	345.40>143.15	+27
Metosulam	+	418.15>175.15	-27
Chloridazon	+	222.15>92.10	-28
Naptalam	+	292.20>144.10	-11
Forchlorfenuron	+	248.20>129.10	-18
Thidiazuron	+	221.20>102.00	-16