

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4600909号
(P4600909)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62	X
GO 1 N 27/64 (2006.01)	GO 1 N 27/62	F
GO 1 N 30/72 (2006.01)	GO 1 N 27/64	B
HO 1 J 49/04 (2006.01)	GO 1 N 30/72	C
HO 1 J 49/10 (2006.01)	GO 1 N 30/72	G
請求項の数 26 (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-535208 (P2001-535208)	(73) 特許権者	302058864
(86) (22) 出願日	平成12年10月26日(2000.10.26)		エムディーエス インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2003-515105 (P2003-515105A)		スルー イッツ エムディーエス サイエ
(43) 公表日	平成15年4月22日(2003.4.22)		ックス ディヴィジョン
(86) 国際出願番号	PCT/CA2000/001270		カナダ国 エル4 ケイ 4 ヴィ8 オンタ
(87) 国際公開番号	W02001/033605		リオ州 コンコード フォー ヴァリー
(87) 国際公開日	平成13年5月10日(2001.5.10)		ドライヴ 7 1
審査請求日	平成19年10月26日(2007.10.26)	(74) 代理人	100073184
(31) 優先権主張番号	60/162, 709		弁理士 柳田 征史
(32) 優先日	平成11年10月29日(1999.10.29)	(72) 発明者	ロブ, デイモン ビー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
			6 1 1 オークランド マザー ストリー
			ト 1 4 8
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 大気圧光イオン化 (A P P I) : 液体クロマトグラフィー質量分析法のための新しいイオン化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体試料の分析方法において、前記方法が：

- (1) 試料流として溶媒及び検体を含む試料溶液を提供する工程；
 - (2) 前記試料流にドーパントを与える工程；
 - (3) 前記溶媒及び前記検体の蒸気化を促進するために、前記試料流の小滴の噴霧を形成する工程；
 - (4) 前記噴霧内の前記小滴を蒸気化し、よって前記試料を気態にする工程；
 - (5) 前記工程(2)の後、大気圧にある領域において、前記ドーパントをイオン化するために前記試料流を光で照射し、よって前記イオン化されたドーパントと前記検体との間の連続衝突及び中間体としてはたらく溶媒分子との前記検体の間接衝突の内の少なくとも1つが、前記検体のイオン化を生じさせる工程；及び
 - (6) 前記イオンを、前記イオンの質量分析のために、質量分析計の質量分析器に通す工程；
- を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記工程(5)において、液態での照射を実行するために、前記工程(4)の前に前記試料流を照射する工程を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記工程(5)において、気態での照射を実行するために、前記工程(4)の後に前記試料流

を照射する工程を含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ドーパントを与える前記工程(2)が、ドーパントを独立に添加する工程及び前記溶媒を前記ドーパントとして利用する工程の内の 1 つを含み、前記ドーパントが液態または気態の内の 1 つで与えられることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記工程(3)、(4)及び(5)において前記試料流及び前記イオンを誘導するためのガイドを備える工程を含むことを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記イオンの集束を促進するための形状につくられた末端をもつガイドを備える工程を含むことを特徴とする請求項 5 記載の方法。

10

【請求項 7】

補助静電集束素子を備える工程及び、前記工程(5)において前記試料流が照射される域と前記質量分析計の流入口との間に電位差を与える工程を含むことを特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記工程(3)、(4)及び(5)において前記試料流を第 1 の方向に流し、前記工程(6)において前記イオンを、前記第 1 の方向に概ね直交する第 2 の方向で、前記質量分析器に通す工程を含むことを特徴とする請求項 5, 6 または 7 記載の方法。

【請求項 9】

20

前記工程(3)、(4)、(5)及び(6)の全てにおいて前記試料流を基本的に同じ方向に通す工程を含むことを特徴とする請求項 5, 6 または 7 記載の方法。

【請求項 10】

前記工程(5)において陽イオン及び陰イオンの内の 1 つを形成する工程を含むことを特徴とする請求項 2, 3, 4, 5 または 6 記載の方法。

【請求項 11】

請求項 4 記載の方法において、複数の検体を含む試料溶液に前記方法を実施し、よって前記検体の全てが少なくともある程度イオン化される工程を含み、前記方法が前記相異なる検体を分離して弁別するために前記検体イオンを質量分析工程にかける工程をさらに含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 12】

少なくとも前記工程(5)において前記検体が照射される域と前記質量分析計の流入口との間に集束電位差を与える工程を含むことを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 13】

前記試料溶液に熱噴霧器プローブを通過させることにより前記工程(3)及び(4)を実施する工程及び並びに前記溶媒及び前記検体の小滴の形成及び蒸気化を促進し、さらに、前記蒸気の前記イオン化領域への輸送及び前記イオン化領域の通過も促進するための補助ガス流を与える工程を含むことを特徴とする請求項 1 から 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

前記ドーパントを含む補助ガスを前記熱噴霧器プローブに供給することによる、前記工程(2)における前記ドーパントを添加する工程を含むことを特徴とする請求項 13 記載の方法。

40

【請求項 15】

前記工程(3)の前に、前記検体をその他の物質から分離するために、前記試料流に液相分離を受けさせる工程を含むことを特徴とする請求項 1, 3, 5 または 13 記載の方法。

【請求項 16】

前記工程(6)が実質的に大気圧より低い圧力で作動される質量分析計に前記イオンを通す工程を含むことを特徴とする請求項 1 から 15 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

比較的大量のいくつかのイオン化可能種及び比較的少量のイオン化されるべき検体を含む

50

試料溶液から形成された試料流の光照射のための装置において、前記装置が：

前記試料流の蒸気化のために前記試料流から小滴の噴霧を形成するための噴霧形成手段；

前記試料流にドーパントを供給するためのドーパント供給手段；

前記イオン化可能種をイオン化するために大気圧にある領域において前記試料流を光照射し、よって、前記イオン化された種と前記検体との間の連続衝突及び前記イオン化された種と前記検体との間の中間反応の内の少なくとも1つにより前記検体の電荷移動及びイオン化を生じさせるための手段；及び

前記試料流の光照射により形成された前記イオンの質量荷電比を決定するための質量分析計；

10

を備えることを特徴とする装置。

【請求項18】

光照射するための前記手段が、前記イオン化可能種をイオン化するに十分なエネルギーを有する光子を供給するために選ばれたランプを含むことを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項19】

噴霧を形成するための前記手段が、噴霧器ガスの供給のための流入口を備える、噴霧器を含むことを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項20】

前記噴霧器が補助ガスのための流入口を備えることを特徴とする請求項19記載の装置。

20

【請求項21】

前記ドーパントが液相で供給され、前記試料溶液と混合されることを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項22】

前記ドーパントが気相で供給され、蒸気化された前記試料流と混合されることを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項23】

前記噴霧器が：前記小滴の噴霧を形成するための流出口を有する、前記試料流を受け取るための毛管；前記蒸気化された試料流を誘導するための、前記毛管の前記流出口から伸びるチャンネル；並びに溶媒及び前記検体の蒸気化を促進するための、前記毛管の前記流出口に近接して前記チャンネルを囲むヒーターを備えることを特徴とする請求項19または20記載の装置。

30

【請求項24】

前記蒸気化された試料流及び前記イオンのための前記チャンネルを定め、前記噴霧器と前記質量分析計との間に伸びる接続ブラケット、並びに、前記接続ブラケットと前記質量分析計との間に集束電位差を与えるための、前記接続ブラケットに接続された高電圧電源手段を備えることを特徴とする請求項23記載の装置。

【請求項25】

光照射するための前記手段がレーザを含むことを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項26】

40

前記小滴の噴霧を形成する前に前記試料溶液に液相分離を受けさせるための、前記噴霧形成手段に接続された、液体分離手段を備えることを特徴とする請求項17記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は液体クロマトグラフィ(LC)及び質量分析法(MS)に関する。さらに詳しくは、本発明は光イオン化(PI)をLC及びMSとともに使用することによる改善されたイオンの生成及び検出を提供するための方法及び装置のいずれにも関する。

【0002】

発明の背景

50

大気圧光イオン化(A P P I)は知られているが、液体クロマトグラフィー質量分析法(L C - M S)にはこれまで適用されていなかった。さらに、光イオン化検出(P I D)がガスクロマトグラフィー(G C)とともに長年使用されてきているにもかかわらず、L Cと組み合わせられたP Iの報告は非常に少ない。

【0003】

G Cにおける光イオン化検出は一般に、真空紫外(V U V)光子を発生する放電ランプの使用を含む。これらの光子の内の1つが、その光子のエネルギーより低い第一イオン化ポテンシャル(I P)をもつ、カラム溶離剤内の分子に吸収されると、単光子イオン化がおり得る。これにより生成された光イオンは適当な捕集電極を通して流れる電流として検出され；クロマトグラフィー試験の間に検出される電流を時間に対してプロットすることによりクロマトグラムを得ることができる。P I D - G Cに対しては、放電ランプは通常、光子のエネルギーが検体のI Pより大きいがキャリアガスのI Pよりは低くなるように選ばれる(ほとんどの有機分子は7 ~ 10 e Vの範囲のイオン化ポテンシャルをもち；通常のG Cキャリアガスはこれより高い値を示し、例えばヘリウムでは23 e Vである)。したがって、検体のイオン化が選択的に起こることができ、低バックグラウンド電流を達成することができる。

10

【0004】

数少ない初期の報告がL CとP Iとの組合せに関する文献にある(J. T. シェルムンド(Sc hermund), D. C. ロック(Locke), Anal. Lett.誌, 第8巻, 611 ~ 625ページ(1975年); D. C. ロック, B. S. ディングラ(Dhingra), A. D. ベイカー(Baker), Anal. Chem.誌, 第54巻, 447 ~ 450ページ(1982年); J. N. ドリスコル(Driscoll), D. W. コンロン(Conron), P. フェリオリ(Feroli), I. S. クラル(Krull), K.-H. ズィー(Xie), J. Chromatogr.誌, 第302号, 43 ~ 50ページ(1984年); J. S. M. デ・ウィット(De Wit), J. W. ヨルゲンソン(Jorgenson), J. Chromatogr.誌, 第411号, 201 ~ 212ページ(1987年))。しかし、これらの報告はまた、質量分析無しの、光イオン電流の直接検出に依存していた。一般的なL C溶媒も比較的高いI Pを有している(水, I P = 12.6 e V; メタノール, I P = 10.8 e V; アセトニトリル, I P = 12.2 e V)から、選択的イオン化は上記報告の実験でも可能であった。すなわち、上記報告の方法はG Cで用いられるような光イオン化検出と同様であった。大多数の場合、L Cカラムからの液体溶離剤は、イオン化領域に入る前に完全に気化され、イオン化は気相でおこっていた。しかし、上記の研究の内の1つは液相溶離剤の直接光イオン化に関わっていた(D. C. ロック, B. S. ディングラ, A. D. ベイカー, Anal. Chem.誌, 第54巻, 447 ~ 450ページ(1982年))。

20

30

【0005】

トレースレベルの検体が大量のキャリアガスまたは溶媒の存在の下で検出されなければならない、またイオン電流だけが測定されている場合、光イオン化が選択的であることが肝要である。そうでなければ、キャリアガスまたは溶媒から生成されたイオンが注目する検体のイオンを覆い隠すことになり得るであろう。しかし、検出の前に光イオンを分離するために、すなわち所望の検体イオンを溶媒分子またはいずれかの不純物から生じるイオン化種のようなその他のイオン化種から分離するように、質量分析器が用いられれば、上記要件を排除できる。

40

【0006】

少数であるが質量分析法と組み合わせられたA P P Iの報告もある。イオン移動度分光法(I M S)と結び付けられたA P P Iには非常に多くの例があったが(M. A. バイム(Baim), R. L. イーサートン(Eatherton), H. H. ヒル(Hill)ジュニア, Anal. Chem.誌, 第55巻, 1761 ~ 1766ページ(1983年); C. S. レジャー(Leasure), M. E. フライシャー(Fleischer), G. K. アンダーソン(Anderson), G. A. アイスマン(Eiceman), Anal. Chem.誌, 第58巻, 2142 ~ 2147ページ(1986年); G. E. スパングラー(Spangler), J. E. ロエール(Roehl), G. B. ペイテル(Patel), A. ドルマン(Doeman), 米国特許第5, 338, 931号(1994年); H.-R. ドーアリング(Doering), G. アーノル

50

ド(Arnold), J. アドラー(Adler), T. レーベル(Roebel), J. リーメンシュナイダー(Riemenschneider), 米国特許第 5, 968, 837 号(1999 年)), 発明者等が知り得た、大気圧で生成された真の光イオン質量分析に関する報告は 3 つしかない(I. A. レベルスキー(Revel'skii), Y. S. ヤシン(Yashin), V. N. ボスネセンスキー(Vosnesenskii), V. K. クロッチキン(Kurochkin), R. G. コスティヤノフスキー(Kostyanovskii), Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim 誌, 第 9 号, 1987~1992 ページ(1986 年); I. A. レベルスキー, Y. S. ヤシン, V. K. クロッチキン, R. G. コスティヤノフスキー, Zavodskaya Laboratoriya 誌, 第 57 巻, 1~4 ページ(1991 年)から記載された、「分析の化学的及び物理的方法(Chemical and Physical Method of Analysis)」, 243~248 ページ(1991 年); I. A. レベルスキー, Y. S. ヤシン, V. N. ボスネセンスキー, V. K. クロッチキン, R. G. コスティヤノフスキー, 旧ソビエト社会主義共和国連邦発明者証第 1159412 号(1985 年))。A P P I と M S の組合せが実行可能であることを確立した A P P I - M S 実験を述べている上記の 3 論文では、ヘリウムキャリアガス流内のガス状試料混合物の直接分析が行われた。四重極質量分析計による分析のためにガス状混合物からイオンを生成するため、水素放電ランプ($h\nu = 10.2\text{ eV}$)が用いられた。重要なことには、試料混合気について得られたスペクトル内の試料イオンの相対存在量は試料濃度に依存することがわかった。高試料濃度では、イオン-分子反応、特に電荷(電子)移動が質量スペクトルの外観形状を歪ませた: この電荷移動は、最低の I P をもつ種への電荷の大部分の移動を生じさせた。他に、優勢な分子または擬分子のイオンが大気圧における P I により生成され、イオン化過程にフラグメンテーションがほとんどおこらないことを示していることが分かった。最後に、溶媒蒸気(水またはメタノール)がヘリウム流内を運ばれる試料混合気に入ると、この方法に関して感度の低下が見られた。

【0007】

A P P I の L C - M S との組合せの展望に関して、溶媒蒸気の存在がイオン形成効率を低下させるという知見は問題である。この効果は、気化した溶媒分子がどのように光子を吸収し、よって試料からの光イオンの生成に利用できる光子束を減少させるかを述べた、P I D - L C の最後の研究者等には知られていた(J. S. M. デ・ウィット, J. W. ヨルゲンソン, J. Chromatogr. 誌, 第 411 号, 201~212 ページ(1987 年))。初期の A P P I - M S 研究による別の興味深い観察結果は、電荷移動反応がスペクトルの最終外観形状に与える効果である。この観察結果は、A P P I スペクトルにおけるイオンの相対存在量が、元来の光イオンが質量分析の前に受ける反応に依存するであろうという事実を告げている。大気圧イオン化法では一般に当てはまるように、高い衝突頻度のため、かなりの反応がおこる前にイオン源からイオンをサンプリングするようにスペクトル測定がなされない限り、得られる陽イオンスペクトルには高い陽子親和性及び/または低いイオン化ポテンシャルをもつ種が優勢になる傾向が確実に生じる(陰イオン大気圧イオン化の場合には、高い気相酸性度または高い電子親和性をもつ分子が陰イオンスペクトルで優勢になる)。

【0008】

従来の L C - M S 機器の多くは、コロナ放電に依存してイオン化を促進する。通常の構成は、液体クロマトグラフィ過程に続いて試料が導入される、試料溶液の霧化及び気化のための、当業者には既知の、熱噴霧器を備える。試料は、別の液相試料分離法に続いて、あるいは分離過程を含まない液体供給装置から導入することもできる(以下の好ましい実施形態に関する議論を参照されたい)。

【0009】

コロナ放電(C D)には独自の要件がある。C D 源においては、放電の開始及び維持に高電位が必要であり、このことは独立のイオン輸送機構の使用に制限を課す。C D からイオンを輸送するために管を用いることはできない。それは、輸送管が何らかの効果をもつためには輸送管がイオン源の極めて近くになければならず、實際上イオン源を取り囲んでいなければならないからである。しかし、C D 源が機能するためにはニードル先端に強電場が存在しなければならず、この電場がニードルと輸送管との間への電位差の印加により維持

されるならば、生成されたイオンは、電場による加速により輸送管に向かい、急速に失われてしまうであろう；逆に、輸送管がニードルの電位に近い電位に保たれていれば、上記の機構によるイオン損失は最小限に抑えられるであろうが、ニードルの周りに適当な高電場がないために、少数のイオンしか生成されないであろう。

【0010】

A P C I (大気圧化学イオン化)は、G C用電子捕獲検出器と同様の配置で、細管内におかれた放射性 ^{63}Ni 箔から放出される高エネルギー電子によって開始させることもできる。 ^{63}Ni 箔は、L C用検出器としての大気圧イオン化—質量分析法の初期の応用の1つで用いられて成功している(E. C. ホーニング(Horning), D. I. キャロル(Carroll), I. ズィディック(Dzidic), K. D. ヘーゲル(Haegeler), M. G. ホーニング(Horning), R. N. スティルウェル(Stillwell), J. Chromatogr. Science誌, 第12巻, 725~729ページ(1974年))。しかし、 ^{63}Ni 箔の重大な実用上の欠点は、放射性物質に関する

10

【0011】

大気圧光イオン化は装置が維持される電位とは無関係であり、放射性物質は使用されないから、A P P I 源にはそのような制限は存在しない。このため、(C D源の別の制限要因である)安定放電の維持にかかわりなく、輸送管の位置及び形状を選択することができる。さらに、サンプリングオリフィスに向かうイオンの輸送を最適化するために輸送管の電位を独立に制御できる。1つまたは複数の補助静電イオン集束素子をイオン化過程に影響することなくイオン源に付加することもでき、これは(コロナ放電または電子スプレーイオン化では実際的でない)A P P I 独自の特徴である。

20

【0012】

A P P I では、イオン—分子反応は、輸送管内においてドーパント光イオン、溶媒分子及び検体分子間でおこり、正味の結果は(有利な熱力学的条件が存在すれば)電荷が検体分子に移されることである。

【0013】

A P P I によるイオン形成効率を高めるためにドーパントを使用するという考えは、大気圧イオン化にドーパントが用いられた例がいくつか報告されているので、全く先例がないわけではない。例えば、P I —I M S の感度を高めるためのドーパントとしてのアセトン及びトルエンの使用が、国際特許出願(WO第93/22033号)及び米国特許第5, 968, 837号に述べられている。また、ベンゼンが関与する電荷交換反応を利用して、陽子親和性が低い試料に対してコロナ放電イオン化の感度を高めることに成功している(S. N. ケットカー(Ketkar), J. G. デュラック(Dulak), S. ディーンドハヌー(Dheandhanoo), W. L. フィテ(Fite), Anal. Chim. Acta誌, 第245号, 267~270ページ(1991年))。発明者等の知る限り、液体クロマトグラフィの溶離剤からの光イオンの生成を強めるためにドーパントがこれまでに用いられたことは全くない。

30

【0014】

発明の概要

本発明の発明者等が気付いたことは、イオン化後反応がA P P I 質量スペクトルの解析を複雑にし得るが、高められた感度を得るためにこれらの反応を利用できることである。上述したように、気化L C溶離剤のP Iを試みる場合、限られた光子束をやはり吸収できる過剰な溶媒分子のため、検体分子の直接P Iは統計的におこりそうもない事象である。これまでP I—L Cに用いられていたランプは全て、最も一般的に用いられるL C溶媒のほとんどのI Pより低い光子エネルギーをもっていた。これにより、溶媒のイオン化は実質的に防止されるが、それでもなお、溶媒は光を吸収して所望の検体のイオン化を妨げる。したがって、上記の実験における総イオン生産率は極めて低かった。

40

【0015】

本発明の発明者等はさらに、気化L C溶離剤中のイオン化可能分子の割合を全体のかなりの率を占めるまで高めれば、放電ランプにより生成されるイオンの数を大きく増加させることに気付いた。これを達成できる2つの手段：1) 溶媒分子自体がイオン化されるよ

50

うな、より高エネルギーの放電ランプの使用；及び2）液体溶離剤への、または溶離剤から生成された蒸気への、大量の、光子エネルギーより低いIPを有するドーパントの添加がある。選ばれたイオン化可能分子の再結合エネルギーが比較的高いか、またはその陽子親和性が低ければ、その分子の光イオンはイオン化領域に存在する種と陽子すなわち電荷の移動により反応することができる。負の検体イオン形成に対しては他の機構、とりわけ、共鳴電子捕獲、解離をとともなう電子捕獲、イオン対形成、陽子移動及び電子移動が原因となり得る。イオン化領域は大気圧にあるから、熱力学的に有利であれば、光イオンの電荷が検体に効率的に移されることが高い衝突率により保証されるであろう（明らかに、反応領域内に存在する不純物に依存して、いかなる数の競合反応もおこり得る）。

【0016】

イオン生成率を高めるための上述した第1の方法(1)の使用には実用上の問題がある；問題とは、必要な高エネルギー光子に透明であり、かつ水の存在の下で安定である窓材料が現在存在しないことである。また、イオン化における感度低下にともない、さらに高エネルギーのランプも必要である。しかし、用途の多くに対して、未知の試料組成の場合には、普遍的な、非選択的イオン化法が望ましいから、高感度は望ましくない。本発明は、適当なランプを用いることによる溶媒自体の励起を図る。上述した第2の方法(2)の利点は、ランプ窓の安定性の他に、初期試薬イオンを選択できることである；これは方法(1)でも可能ではあるが、かなりわずかな可能性しかない。

【0017】

さらに本発明では、全ての、パルス出力型及び連続出力型のいずれのタイプのランプもPIに使用できる；好ましい実施形態は連続出力型ランプを利用する。したがって、PIは、いずれか適当な(3段四重極、単段四重極、TOF(飛行時間)、四重極-TOF、四重極イオントラップ、FT-ICR(フーリエ変換-イオンサイクロトロン共鳴)、扇形等の)質量分析器とともに、LC(分離が含まれているかまたはいない、全ての液体試料法)に適用される。

【0018】

すなわち、可能なイオン化機構には：気化検体の直接PI、溶離剤内のドーパントのPIに続くイオン-分子反応によるイオン化、溶媒がドーパントとしてはたらく場合に溶媒のPIに続くイオン-分子反応によるイオン化等がある。ランプのエネルギーが、溶離剤の、または溶離剤から生成された蒸気(ドーパントはガスとして別に導入することができる)の少なくとも1つの主要成分をイオン化するに十分であれば、どのランプが上記のいずれに対して用いられようとも問題ではない。

【0019】

フッ化リチウムでつくられた窓は約11.8 eVまで光学的に透明であり、(ランプの設計に依存して)11.2, 11.6及び11.8 eVの光子を与えることができるアルゴンランプに用いられる。しかし、フッ化リチウムは吸湿性であり、フッ化リチウム窓は湿気にさらされると急速に劣化し、高温により事態は一層悪化する。したがって、ほとんどのLC溶媒システムにおける高水分含有及び溶媒を気化するに必要な高温により、フッ化リチウム窓を装着したランプには限られた実用寿命しかないと考えられる。それにもかかわらず、LCに対する光イオン源として、ただし、ドーパントが存在しない場合に、溶媒の主要成分(例えばメタノール、エタノールまたはイソプロパノール)がランプによりイオン化可能である場合にのみ、さらにランプ窓を保護するために特別な予防措置がとられる場合にのみ、アルゴン放電ランプを使用できると考えられる。アルゴンランプは、溶媒自体の主要成分自体はランプによるイオン化が可能ではないが、ドーパントが添加される、方法(2)の態様に用いることもできる。現在のフッ化リチウム窓の限界を克服する、新しい窓材料が利用可能になり得ることも認識されるべきである。またPIはおそらく、無窓光源とともに、これらが利用可能になれば、運用されることになるだろう。

【0020】

APPIによるイオン生成を強めるための上述した第2の方法は、IPがより低いドーパント種を選び、よって異なる光源を用い得るようにすることにより、フッ化リチウム窓を

10

20

30

40

50

もつランプのための要件を排除できる。例えば、適当な高い再結合エネルギーまたは低い陽子親和性をもつ、10 eVの光子でイオン化可能なドーパントに対しては、クリプトン放電ランプを用いることができる。クリプトンランプには通常、水蒸気の存在の下でより一層安定であり、11.3 eVまで光学的に透明なフッ化マグネシウム窓が装着されている。クリプトンランプを用いれば、溶媒分子の存在の下でドーパントを選択的にイオン化することが可能であり、よって、イオン源におけるイオン-分子化学反応をある程度制御する機会が与えられる。本手法で与えられる選択性は、フッ化マグネシウム窓を装着したランプに予期されるより長い寿命とあいまって、フッ化マグネシウム窓をもつランプと組み合わせたドーパントの使用を、LC-MSとともにAPPIを実施する好ましい方法とする。

10

【0021】

アルゴンまたはクリプトンが満たされたランプは市販されており、上記の議論では例として与えられている；所望の光子エネルギーを作り出す、その他のガスで満たされたランプも同様に、十分に使用することができる。

【0022】

本発明の方法の利点は、感度が、ランプ寿命とは逆の関係にあるランプ電流に大きくは依存しないこと、すなわち感度を大きく低下させずに低電力でランプを運転できることである(0.4 mAと2 mAでの感度差はおそらく10~15%)。したがって、本方法は比較的に経済的であるという予期されていなかった利点を提供する。ドーパントがなければ感度はランプ電流に比例する；この違いの原因となる機構はまだ解明されていない。

20

【0023】

試料への光照射は通常は気相で行われるであろうし、これがほとんどの試料に対して最も効率的な手法であろうと思われる。しかし、噴霧化及び気化の前に液体を光イオン化することが可能である(D.C.ロック, B.S.ディングラ, A.D.ベーカー, Anal. Chem.誌, 第54巻, 447~450ページ(1982年))。考慮すべきいくつかの要因がある：1) 液相溶媒分子は単離された気相溶媒分子より低いIPを有し、ほとんどの溶媒の直接PIは10 eV光子により生じるであろう；したがって、LiF窓は必要とされない；2) イオン-電子再結合が液相ではかなり速く、よっておそらく感度に問題が生じるであろう；及び3) 液体とランプ窓の直接接触により窓の劣化速度が速まり得る。これらの要因に基づけば、本発明の方法はおそらく、噴霧化及び気化が後におこる液体の直接PIを利用するか、あるいは気化が後におこる噴霧化によりつくられた小滴のPIを利用する態様で適用できる。気化過程に、サイエックス(SCIEX)ターボイオンスプレーイオン源で利用される集成装置と同様のある集成装置において、イオンを小滴から遊離させることができる。しかし、以下に説明するように、発明者等は上記の方法が本発明の好ましい実施形態かどうかはたらくとは考えていない。

30

【0024】

本発明の第1の態様にしたがえば、検体試料の分析方法が提供され、この方法は：

- (1) 試料流として溶媒及び検体を含む試料溶液を提供する工程；
- (2) 試料流にドーパントを与える工程；
- (3) 溶媒及び検体の気化を促進するために、試料流の小滴の噴霧を形成する工程；
- (4) 噴霧内の小滴を気化する工程；これにより試料は気態になる；
- (5) 工程(2)の後、大気圧にある領域において、ドーパントをイオン化するために試料流を光で照射する工程；これにより、イオン化されたドーパントと検体との間の連続衝突及び中間体としてはたらく溶媒分子との検体の間接衝突の少なくとも1つが検体のイオン化を生じる；及び
- (6) イオンの質量分析のために質量分析計の質量分析器にイオンを通す工程；を含む。

40

【0025】

本方法は、工程(5)において、液態において照射を行うために工程(4)の前に試料流を照射する工程、あるいは気態において照射を行うために工程(4)の後に試料流を照射する工

50

程を含むことができる。

【0026】

ドーパントを与える工程(2)は、独立したドーパントを添加する工程及び溶媒をドーパントとして利用する工程の内の1つを含むことができ、ドーパントは液態及び気態の内の1つで与えることができる。

【0027】

本方法は、工程(3)、(4)及び(5)において試料流を誘導するためのガイドを備える工程を含むことが好ましく、ガイドはイオンの集束を促進するような形につくられた末端を備えることができる。

【0028】

本方法は、補助静電集束素子を備える工程及び工程(5)における試料流照射域と質量分析計の流入口との間に電位差を与える工程を含むことができる。

【0029】

工程(3)、(4)及び(5)において試料流を第1の方向に流し、工程(6)において一般には第1の方向に直交する第2の方向でイオンを質量分析器に通すことが好ましいと考えられる。しかし、本方法は、工程(3)、(4)、(5)及び(6)の全てにおいて試料流を基本的に同じ方向に通す工程を含む。

【0030】

本方法は工程(5)において陽イオンまたは陰イオンの形成に用いることができる。

【0031】

本方法は複数の検体を含む試料溶液について実行でき、これにより全ての検体が少なくともある程度イオン化される。本方法は、相異なる検体を分離し、弁別するために、検体イオンに質量分析を受けさせる工程をさらに含む。

【0032】

検体を他の物質から分離するために、工程(3)の前に、試料流を液相分離にかける工程を含む本方法を、試料溶液に実施することができる。

【0033】

本発明の別の態様は、比較的大量のいくつかのイオン化可能種及び比較的小量のイオン化されるべき検体を含む試料溶液から形成される試料流の光照射のための装置を提供し、この装置は：

試料流の気化のために試料流から小滴の噴霧を形成するための噴霧手段；

試料流にドーパントを供給するためのドーパント供給手段；

イオン化可能種を大気圧でイオン化し、イオン化種と検体の間の連続衝突及びイオン化種と検体との間の中間反応の内の少なくとも1つが検体の電荷移動及びイオン化を生じるように、試料流を大気圧にある領域で光照射するための手段；

及び

試料流を光照射することにより形成されたイオンの質量荷電比を決定するための質量分析計；

を備える。

【0034】

光照射のための手段は、イオン化可能種をイオン化するに十分なエネルギーを有する光子を与えるように選ばれたランプを含むことが好ましい。

【0035】

光照射のための手段はレーザを含むことが可能である。

【0036】

好ましい実施形態の詳細な説明

本発明のよりよい理解のため及び本発明をどのように実施できるかをより明確に示すため、本発明の好ましい実施形態を示す添付図面を、例として、ここで参照する。

【0037】

初めに図1を参照すれば、本発明にしたがう装置は質量分析計10(ここではパーキンー

10

20

30

40

50

エルマー(Perkin-Elmer)(P E)サイエックスA P I 3 6 5－3段四重極質量分析計)を備える。装置の液体クロマトグラフィ部は自動サンプラー1 4(ここではP E シリーズ2 0 0自動サンプラー)から供給を受ける液体クロマトグラフィカラム1 2を備える。自動サンプラー1 4は続いて2台のポンプ1 6, 1 8(ここではP E シリーズ2 0 0マイクロL Cポンプ)に接続され、これらのポンプ1 6, 1 8から供給を受ける。

【0038】

カラム1 2(ここではベータベーシック－1 8(Batabasic-18)；キーストーンサイエンティフィック社(Keystone Scientific, Inc.)；粒径3 μ m；長さ5 0 mm；内径2 mm)は、図1に2 0で簡略に示され、以下でより詳細に説明される、熱噴霧器プローブに接続された流出口を有する。熱噴霧器プローブ2 0は、図1にやはり簡略に示され、以下でより

10

【0039】

既知の態様で、噴霧器ガス供給源2 4が熱噴霧器プローブ2 0に接続される。質量分析計1 0と熱噴霧器プローブ2 0との間に補助ガス配管2 6が備えられる。A P P Iイオン源部2 2へのドーパント供給のために、溶媒ポンプ2 8(ここではハーバードアパラタス(Harvard Apparatus)モデル2 4 0 0－0 0 1シリンジポンプ)も熱噴霧器プローブ2 0に接続される。

【0040】

ドーパントは相異なる様々な方法で添加できると考えられる。例えば、ドーパント蒸気を、噴霧器ガスまたは補助ガスに添加するか、あるいは独立配管を通して供給することができるであろう。また、(以下で詳説されるように)ランプを透明に保つためにフラッシングガスが与えられる場合には、ドーパント蒸気をおそらくフラッシングガスとともに供給できるであろう。さらに、ドーパントを液態溶媒自体とすることができ(次の段落を参照されたい)、あるいはドーパントを液態溶媒に溶解させるかまたは混合することができる；この混合はプロセスのどのような段階(例えば、カラムの前、カラムの後、または熱噴霧器プローブ内)においても行うことができる。

20

【0041】

本発明において、“ドーパント”は：入射V U V光子を吸収し、この光子によりイオン化され、さらに、最終結果として電荷を所望の検体に移動させることができる反応を行う、いかなる種も意味する。したがって、いくつかの応用に対しては、溶媒自体(例えばメタノール)がある種の状況(高エネルギーランプ)の下でドーパントとして機能できる；さらに、本明細書で説明されるドーパントの2つの例である、トルエン及びアセトンはいずれもいくつかの応用のためにL C溶媒として用いることができる。別の応用では、ドーパントを液体とするか、または液体溶離剤に溶解させた揮発性固体とすることができる。絶対的な要件は、ドーパントが検体のイオン化過程における中間体であること、すなわちドーパントが光イオン化に対して高効率を示し、所望の検体への電荷移動に高効率を示すことである。

30

【0042】

ランプ4 6の保持及び取付のための器具並びに(図2 a及び2 bには示されていない)筐体を備える、熱噴霧器プローブ2 0及びA P P Iイオン源2 2の両者の詳細を示す図2 a及び2 bに移る。A P P Iイオン源2 2には、基本的には非改造の熱噴霧器プローブ2 0を使用するが、サイエックスA P I 3 6 5質量分析計とともに提供される熱噴霧器(HN)大気圧化学イオン化(A P C I)源で一部を構成したA P P Iイオン源2 2も用いた。HN－A P C I源は本発明の手法を実行可能にするために改造されている。HN－A P C I源は、A P P Iが実行可能であるためにはA P C Iと同じ態様でのL C溶離剤の気化が必要であると考えられるため、便宜がよい。付加的な利点は、質量分析器の真空インターフェースを改造する必要なしに新しいイオン源2 2を質量分析計1 0に直接接続できることである。さらに、これにより、新しいイオン源と標準の熱噴霧器－A P C I源との間の比較が、2つのイオン源のための筐体が基本的に同じであるから、容易に可能になる。

40

【0043】

50

熱噴霧器プローブにドーパントを与えるために、簡単な集成配管を利用した。熱噴霧器内で補助ガス送気管にシリンジポンプからの石英ガラス毛管を入れた。この領域は高温であり、よってドーパントは直ちに気化し、補助ガス流により気化領域、次いでイオン化領域に沿って押し流される。ドーパント輸送管をHNプローブとインターフェースできる方法は数多くあるが、これを達成する厳密な手段は重要ではない。

【0044】

熱噴霧器プローブ20は石英管30及び石英管を囲むヒーター32を有する。石英管30内には、クロマトグラフィカラム12からの溶離剤のための毛管34がある。毛管34を囲んで、噴霧器ガスのための環状チャネルを定める、管36があり、図2a及び2bでも噴霧器ガス供給源は24で示されている。

10

【0045】

外管36と石英管30との間には、やはり26で示される、補助ガス供給源が接続された別の環状チャネルがある。このチャネルを通して、ドーパントがシステムに導入される。

【0046】

噴霧器気化室は全体として38で示される。

【0047】

集成噴霧器気化部全体はステンレス鋼製円筒33内に収められ、円筒33は一端でHNプローブの基部(ここを通して様々なガス及び液体配管がなされる)に取り付けられ、他端には蒸気流が入れるように石英管がそこから若干伸び出す開口がある。

【0048】

円筒33の末端を囲んで、石英管30の末端と接続ブラケット42との間に、絶縁スリーブ40が備えられる。スリーブ40は(デュポン(DuPont)社から供給される)ベスペル(Vespel)(商標)でつくられることが、必須ではないが、好ましい。スリーブ40により、接地されている熱噴霧器プローブ20の電位に対して接続ブラケット42を高電位に保つことができる。断熱ではなく電気絶縁がスリーブの一義的な機能である。

20

【0049】

ランプホルダ44も、やはりベスペル(商標)であることが好ましい、電気絶縁材料でつくられ、接続ブラケット42の対応する寸法につくられた内腔に取り付けられる。ランプ46はランプホルダ44に取り付けられ、陰極への電気接続部48を備える。ランプ電源50がランプ陰極接続部48及び接続ブラケット42に接続される。接続ブラケット42は適当な導電材料、ここではステンレス鋼でつくられる。ランプ陽極49が接続ブラケット42に電氣的に接続している。既知の態様で、高電圧電源52がランプ電源と接地との間に接続される。

30

【0050】

スリーブ40は、アーク放電を防止するため、またベスペル(商標)の何らかの熱劣化がスリーブ40の機械的強度及び／または絶縁能力を低下させる可能性を最小限に抑えるためにも、比較的厚く、すなわち4mmにつくられる。接続ブラケット42及びスリーブ40はHNプローブ20の所定の位置に固定される。

【0051】

この好ましい実施形態において、ランプ46は、カソーデオン社(Cathodeon Ltd.)(英国ケンブリッジ(Cambridge))のモデルPKS100直流(DC)毛管クリプトン放電ランプとした。高電圧電源50は同じくカソーデオン社のモデルC200電源である。この公称10.0eVランプには、10.0及び10.6eV光子の透過を可能にするフッ化マグネシウム窓56が装着されている。孔54(直径4mm、厚さ0.5mm)がブラケット42に設けられている。この孔54により、ランプ窓56からブラケットの、本実施形態では内径が7mmの、それを通して蒸気が出る中心孔43内への光子の通過が可能になる。2つのイオン化波長におけるランプ発光の絶対強度及び相対強度はいずれも測定しなかった。

40

【0052】

試料が比較的汚れている、すなわち汚染物質が混じっていることがあり得る、いくつかの

50

応用では、ランプ窓を清浄に保つために、ブラケット 4 2 を改造して孔 5 4 の上をまたは孔 5 4 を通って持続的に流れるフラッシングガスとしての何らかのガスの通路を設けることが望ましいであろう。

【0053】

電源 5 0 には、電源 5 0 をランプ 4 6 及び接続ブラケット 4 2 とともに、接地に対して、高電圧電源 5 2 により決定される、± 6 k V までの電圧でフローティング状態におけるように、改造及び絶縁を施した。

【0054】

カソードオンに推奨されているように、電源 5 0 の負リードとランプ 4 6 の陰極との間に直列に、ランプ電流、したがって光子束の制御を可能にする電流制限抵抗器 5 1 を挿入した。本明細書で説明される A P P I 実験に対しては、この抵抗を 0. 7 0 m A のランプ電流が得られる 1 M Ω に設定した(例えば、外部抵抗器がなければ、ランプはほぼ 2. 2 m A で駆動されることになる)。

【0055】

接続ブラケット 4 2 には、噴霧器 2 0 で生成されるイオン流を誘導するための誘導管 6 0 が備えられる。図 2 a の第 1 の実施形態は、サンプリングオリフィスと直面して配された誘導管を示す；すなわち、ガス流は一直線にサンプリングオリフィスに誘導される。これは、以下で詳述される、実験作業を行った実施形態である。好ましい、第 2 の実施形態が図 2 b に示され、ガス流の方向がカーテンプレートに一直線の向きではなく、カーテンプレートの前面に平行になるように、カーテンプレート及びサンプリングオリフィスに対して直交する向きに、誘導管 6 0 が配されている。この好ましい配置には、中性汚染種がサンプリングオリフィスを汚すことはおそくないであろうという利点がある。ガス流の方向がカーテンプレートに平行または垂直である必要はない；(好ましい実施形態は結局、ほとんど直交関係になるが)考え得るいかなる向きも用いることができる。検体イオンの軌跡はサンプリングオリフィスに向けて曲げるが、影響を受けない中性汚染種は曲げないために、1 つまたはそれより多い補助静電集束素子を、直交またはその他の好ましい配置を利用するいずれの A P P I 源にも導入することができる。さらに、本方法はカーテンプレートを利用する機器に限定されない；本方法は、通常は大気圧の、高圧領域から真空領域への間のインターフェースを利用するいかなる質量分析器にも、インターフェースが達成される手段にかかわらず、適用することができる。

【0056】

簡単のため、図 2 a 及び 2 b においては、同様のコンポーネントには同じ参照数字が与えられ、それらのコンポーネントの説明は繰り返されない。

【0057】

図 2 a 及び 2 b は、P E -サイエックス 3 段四重極質量分析計の通常のコポーネントもいくつか示す。すなわち、カーテンプレート 6 2 があり、またカーテンプレート 6 2 の背後にオリフィスプレート 6 4 がある。既知の態様で、質量分析計の真空への溶媒の流入を阻止する(あるいは少なくとも減じる)ために、通常は乾燥窒素の、カーテンガスをカーテンプレートとオリフィスプレートとの間に供給することができる。すなわち、既知の態様で、イオンはカーテン及びオリフィスプレート 6 2, 6 4 を通過して、分析のための質量分析計に入る。カーテンプレート、カーテンガス、及びオリフィスプレートは、サイエックス質量分析計で実施され、参考として与えられる、大気圧イオン化源から質量分析計の真空内にイオンを誘導するための構成要素である。大気圧イオン化源から真空内にイオンを輸送するためのその他の要素を装備した質量分析計も同様に、大気圧におけるイオン化により、上述したようにまた本発明にしたがって、生成されたイオンの質量分析に十分用いることができる。

【0058】

新しいイオン源を用いて、ドーパントの使用により様々なタイプの試料に対して達成することができる、A P P I - L C - M S 感度の増大を示すために実験を行った；2 種のドーパント、トルエン及びアセトン、この点での有用性に関して試験した。さらに、A P P

I法の相対感度を評価するために、A P P I実験に用いた試料の全てを、別の非改造H N - A P C I源でも分析した。最後に、溶媒組成がイオン化効率に影響しうる重要な変数であるから、L C - M S実験の全てを、2種の最も普通に用いられる複合溶媒である、メタノール／水及びアセトニトリル／水を用いて繰り返した。

【0059】

本方法の感度は、質量分析計10のカーテンプレート62に対してランプ46及び接続ブラケット42に印加されるオフセット電位に依存することがわかった。誘導管60は実効的にブラケット42の延長であるから、要素42、46及び60には同じオフセット電位がかけられる。A P I 365質量分析計の通常動作時には、カーテンプレートに印加する電位の設定値を接地に対して1.0 kVとし、極性は分析されるイオンの極性と同じとした。ランプオフセット電位を与えるために、別の高電圧電源、ネアマグ(Nermag)(フランス国)モデルI N P 156を用いた。一般に、ランプオフセット電位の最適値は、ランプオフセット電位の大きさがカーテンプレート62の電位の大きさより少なくとも若干高いという条件下で、接続ブラケット42とカーテンプレート62との間隔に関係し、重要なパラメータが電場強度であることを示すように見えた。この特性は完全には研究されておらず、証明されておらず、まだ完全には理解されていない。本明細書で説明される実験については、誘導管60の末端をカーテンプレート62の前面のわずか数mmの位置に固定し、最適オフセット電位は陽イオンに対して+1.2 kV、すなわちカーテンプレートの電位より200 V高い値であった。陰イオンモードでは、ランプオフセット電位の大きさを陽イオン分析に対して最適化した後に、単にその極性を切り換えることにより高感度を得ることができた。誘導管60の形状は、プレート64のオリフィスへのイオン輸送を最適化するため及び／またはオリフィスへのイオン化されていない溶媒または検体または汚染物材料の侵入を低減または排除するために、多くの流儀で変えることができる。

【0060】

ランプへの電気接続は、A P P I源20の筐体の側面を通して行った。本来のコロナ放電ニードルのための高電圧接続部を2ピンコネクタと取り替えた；一方(電源50からの負高電圧)の接続は電気接続部48を介してランプのリング陰極に行い、他方(電源50からの高電圧帰線)はランプ46の基部で陽極49に電気接続されている接続ブラケット42本体に行った。

【0061】

これらの実験に用いたP EサイエックスA P I 365-3段四重極質量分析計10は、上述したように、H N イオン源の1つに重要な変更を行っただけで、基本的に改造はしていない。マスクルーム(MassChrom)バージョン1.0データシステムを用いて、システム制御及びデータ取得を行った。本明細書で説明される実験については、単M Sモードだけを用いた。質量分析計は、直接試料注入及び選択イオンモニタリング(S I M)を用いてそれぞれの検体について最適感度を得るために、L C 2 T u n e - 1.3機器制御及びデータ取得ソフトウェアを用いて調整した。また、L C 2 T u n e ソフトウェアを用い、最適化中に確立した機器状態ファイルを利用して、それぞれの検体について全走査スペクトルを得た。全走査実験には以下のパラメータ：始点質量、30 a m u；終点質量、500 a m u；ステップ、1 a m u；滞留時間、5ミリ秒；ピークホッピング、オン；及び走査間休止時間、5ミリ秒、を用いた。混合検体実験については、サンプルコントロール(Sample Control)ソフトウェア(バージョン1.3)を用いた。混合検体実験においては、4種の検体のそれぞれのS I Mを、それぞれの質量における滞留時間を200ミリ秒として行った；モニタしたイオンのそれぞれについて、質量分析計の電圧を、L C 2 T u n e ソフトウェアを用いてあらかじめ決定した最適値に設定した。

【0062】

A P P Iイオン化法とA P C Iイオン化法とを比較する実験中は、それぞれの熱噴霧器プローブに対する温度及びガス流量設定を含む、質量分析計の動作パラメータを変更していない。A P C I実験に利用したニードル電流は、2.5 μ Aに設定した。

【0063】

熱噴霧器プローブのヒーター温度は450℃に維持した。

【0064】

化学薬品

カルバマゼピン、アクリジン、ナフタレン、硫化ジフェニル及び5-フッ化ウラシル(5FU)をオルドリッチ(Aldrich)社から購入し、純化をさらに行うことなく使用した。上記試料のそれぞれについて、濃メタノール原溶液を作成した。

【0065】

それぞれの試料が個々に分析される全走査実験については、希釈メタノール／水溶液(体積で50／50)を試料のそれぞれについて作成した。カルバマゼピン溶液の濃度はアクリジン溶液と同じく、0.2μMとした；同様に、ナフタレン溶液及び硫化ジフェニル溶液の濃度はともに20μMとした。5FU溶液の濃度は1μMとした。SIM混合検体実験については、(5FUを除く)上記試料の全てを含む別のメタノール／水(50／50)溶液を、カルバマゼピン、アクリジン、ナフタレン及び硫化ジフェニルの最終濃度がそれぞれ、0.2μM, 0.2μM, 20μM及び20μMになるように作成した。

【0066】

液体クロマトグラフ

本明細書に説明される実験の全てに対して、溶離剤流は、既知の態様で、2台のPEマイクロLCポンプ16, 18からなる高圧混合勾配HPLCシステムにより供給した。ポンプ16は水を送るために用い、ポンプ18はメタノールまたはアセトニトリルの有機移動相のために用いた。溶媒は全て、実験前及び実験中にヘリウムでスプレーした。本明細書で提示される実験にはバッファまたはその他の添加剤を用いていないが、これはバッファ及び添加剤が一般にAPPIに適合しないことを意味するものではない。200μl／分の全流量を内径2mmのHPLCカラムと組み合わせて用いた。自動サンプラー14に組み込まれた5μl試料ループを用い、既知の態様で、試料を注入した。

【0067】

カラムには、キーストンサイエンティフィック社の、粒径3μm、長さ50mm、内径2mmの、ベータベシック-18を用いた。ドーパントは、ハーバードアパラタス・シリンジポンプにより、1mlハミルトン(Hamilton)気密シリンジから25μl／分で送った。ドーパントも含めて、用いた溶媒の全てはHPLC級とした。

【0068】

全走査実験について、試料をカラムに注入し、アイソクラチック条件を用いて溶離した。データが本明細書に提示される全走査実験に用いた移動相はメタノール／水である；それぞれの分析に対するメタノール／水比は、許容できるピーク形状及び短い保持時間が得られるように設定した。カルバマゼピン、アクリジン、ナフタレン、硫化ジフェニル及び5FUのそれぞれに対し、60／40, 70／30, 75／25, 80／20及び70／30のメタノール／水比を用いた。

【0069】

混合物分析実験には勾配溶離を既知の態様で採用し、メタノール／水とアセトニトリル／水を一日おきに用いた。データ取得は、注入の瞬間に自動サンプラーからコンピュータに送られるトリガでLC勾配プログラムと同期させた。

【0070】

結果及び考察

APPI質量スペクトル

上に挙げた5種の検体のそれぞれについての全走査APPI質量スペクトルが図3a～3eに示される。これらのスペクトルは、カラム上での、単成分溶液のアイソクラチック分析により得られた。ドーパントとしてトルエンを用いた。それぞれの試料について示されるスペクトルはクロマトグラムのピーク頂からとられたものであり、バックグラウンドが差し引かれている。完全には差し引かれなかった溶媒イオンではなく、検体イオンがスペクトルで卓越するように、m/zが30から100の質量範囲は図から省略されている。

【0071】

図 3 a 及び 3 b はそれぞれカルバマゼピン($m/z = 236$)及びアクリジン($m/z = 179$)のスペクトルであり、それぞれの試料の MH^+ イオンを明瞭に示している。カルバマゼピンは、 $m/z = 194$ にあるフラグメントからの卓越信号から明らかなように、A P P I または A P C I では熱減成を誘起することなしに分析することはできない、比較的脆弱な分子である。カルバマゼピン及びアクリジンの分子イオン(ラジカル陽イオン M^+)に対するどのような信号も、ほとんど得られない。逆に、図 3 c 及び 3 d に示されるように、ナフタレン($m/z = 128$)及び硫化ジフェニル($m/z = 186$)のスペクトルは分子イオン(ラジカル陽イオン M^+)だけを示す。それぞれの種に帰することができる信号強度は同様であるが、ナフタレン及び硫化ジフェニルのスペクトルは、カルバマゼピン及びアクリジンより濃度が 100 倍高い試料からとられたことに注意されたい。これらのデータから、A P P I 法の効率がナフタレン及び硫化ジフェニルに対しては、現在のところ、カルバマゼピン及びアクリジンに対する効率よりかなり低いことは明らかである。

10

【0072】

上記の種について観測されたイオン化効率の相違を説明するため、イオン化がドーパントの光イオンにより開始される反応に第一義的に依存することを初めに証明する必要がある。この知識は、ドーパント無しでのイオン生成はほとんど無視できる(以下の図 4 と図 5 を比較されたい)という観測に由来する。すなわち、検体の光イオン化断面積の差の効果は弱められ、イオン化効率が A P P I 源におけるドーパントの光イオン化後におこるイオン-分子反応に強く支配されると推測できる。いくつかの種の優先イオン化の原因となる機構に関しては、分析のために選ばれた分子間の最も明白な差がそれぞれの相対陽子親和性にある；カルバマゼピン及びアクリジンはいずれも陽子を受け入れることができる窒素を少なくとも 1 つ有するが、ナフタレン及び硫化ジフェニルはそのような塩基性部位をもたない。したがって、陽子親和性が高い種が優先的にイオン化されるという観測は、A P P I 源においては陽子移動反応が電荷交換反応より卓越しているという経験的結論を指し示している。予備検討によれば、観測された結果の原因となる反応経路が少なくともいくつかあることが示される；重要な過程の 1 つにはドーパント光イオンの溶媒分子との反応が関与し、溶媒分子は続いて陽子親和性が高い検体との陽子移動による反応を行うことができる。

20

【0073】

一連のスペクトルの最後である図 3 e は、5-フッ化ウラシルの陰イオン走査である。 $m/z = 129$ にある卓越ピークは検体の MH^- イオンに対応する。この図は、本明細書で提出される A P P I 法が陰イオンモードでも用い得ることを示すために含められた。今までのところ、陰イオンモードでなされた研究は少ししかない。

30

【0074】

A P P I クロマトグラム

図 4 a 及び 4 b に提示される A P P I クロマトグラムは、選択イオンモニタリング(S I M)により検出された、 $m/z = 237$, 180 , 128 及び 186 のイオン電流を合わせて示したものである。4つのピークは、溶離順に、カルバマゼピン(1 pM 注入)、アクリジン(1 pM)、ナフタレン(100 pM)及び硫化ジフェニル(100 pM)についての信号に対応する。これらのクロマトグラムはいずれも、添加ドーパントの恩恵を受けずに得られた(これらの実験に対しては、A P P I 源から集成ドーパント導入部品が取り外され、熱噴霧器への補助ガス配管が標準的な方式でなされた)。図 4 a は L C 溶媒がメタノール及び水からなる場合に得られた代表的なクロマトグラムを示し、図 4 b はアセトニトリル/水実験について得られた代表的クロマトグラムである。この実験では、有機移動相にメタノールが用いられた場合にナフタレン及び硫化ジフェニルについて 2~3 倍の感度増大が見られたことを除けば、溶媒の組成はクロマトグラムにほとんど影響していない。しかし、いずれの溶媒系に対しても、カルバマゼピン及びアクリジンに対するイオン化効率が、陽子親和性が低い種に対するイオン化効率よりかなり高いことがここでもわかる(検体毎に試料を注入していることに注意されたい)。これらの分子の光イオン化断面積にそれほど顕著な差があるとは思えない(これらの分子は全て芳香環を含み、光子エネルギー

40

50

より低い I P を有している)から、光イオン化は明らかに、上記事例で観測されたイオン化の原因となるただ 1 つの機構ではなく、あるいは主要な機構でさえない。したがって、検体のイオン化は主として、トルエンについて観測された態様と同様の態様で反応する、溶媒中のトレースレベルの量の不純物から形成された光イオン中間体を介しておこっているのかもしれない。イオン化機構が何であることを確信をもって言うために利用できる十分な証拠は現在のところないが、これらのデータは、ともかく、LC-MS のためのイオン化方法としての直接光イオン化の効率が極めて低いことを説明するために確実に役立つ。

【0075】

図 5 のクロマトグラムは、図 4 a 及び 4 b に提示したデータを収集するために分析した試料溶液と同じ試料溶液から得られたものであるが、勾配に用いた有機溶媒はメタノールである。アセトニトリル／水について得られた結果は非常に似ているが、(図 6 a 及び 6 b の A P P I クロマトグラムに示されるように)アクリジンについては若干弱い信号が得られた。図 5 には 2 つのクロマトグラムが重ね合わされている；1 つはドーパントとしてトルエンを用い、もう 1 つはアセトンを用いて収集された。初めにトルエンの例を考察すれば、ドーパントのない場合に比べて感度(及び信号対雑音比)の増大が顕著である(ドーパントがない図 4 のイオン／秒の倍率をドーパントがある図 5 の倍率と比較されたい)；カルバマゼピン及びアクリジンについてはピーク域がほぼ 100 倍増大している。ナフタレン及び硫化ジフェニルに関する増大はそれほど顕著ではないが、それでも約 25 倍とかなりの増大になっている。これらのデータは、ドーパントとして用いたトルエンが、陽子親和性が低い種と高い種のいずれに対しても、陽子移動または電荷交換反応を介して A P P I の感度を強め得ることを示す。陽子移動反応ははるかに卓越しているように見えることに改めて注意されたい。一方、アセトンを用いて得られた A P P I クロマトグラムは、アセトンが高い陽子親和性をもつ化合物に対してのみ有効なドーパントであることを示す；ナフタレン及び硫化ジフェニルについては感度の増大が全く見られない。したがって、ドーパントの選択が A P P I の感度及び選択性に影響する重要な要因である。

【0076】

A P P I と A P C I との比較

A P P I と標準的 A P C I 源とを比較する実験の結果が図 6 a 及び 6 b に提示される。図 6 a のメタノールが有機溶媒の場合には、A P P I によりカルバマゼピン及びアクリジンについて得られた信号が A P C I 源で得られた信号より少なくとも 8 倍大きかった；陽子親和性の低い種に対する A P C I のメタノールの存在下における感度がほとんどゼロであることがわかったので、ナフタレン及び硫化ジフェニルに関する増大はさらに高い。図 6 b のアセトニトリルを用いた場合には、カルバマゼピン及びアクリジンについては A P P I の A P C I に対する優位性が維持されるが、ナフタレン及び硫化ジフェニルに対する A P C I の感度がかなり向上し、A P P I の感度よりそれほど低くはなかった。

【0077】

本発明の好ましい実施形態を示し、説明したが、様々な変更及び改変がなされ得ることが当業者には明らかであろう。

【0078】

例えば、上述した実験は標準大気圧(すなわち約 1 バール)で行われたが、動作圧力のある範囲にわたって変え得ることが当業者には理解されよう。概略の上限は約 2 バールすなわち 2 気圧であろうし、適当な装置を用いれば、概略の下限は約 0.1 バール、すなわち 10 分の 1 気圧であろうと考えられる。10 分の 1 気圧の動作圧力でさえ、真空またはほぼ真空の条件で P I が一般に行われる、従来技術で見られる代表的な動作圧力より数桁高いことが理解されよう。全般には、本発明の趣旨は、試料溶液源(すなわち LC)とほぼ同じ動作圧力にあり、質量分析計の隣接流入チャンバに適した圧力にある領域で、気化及びイオン化がおこるであろうということにある。

【0079】

したがって、特許請求の範囲は、本発明の精神及び範囲内にあるような変更及び改変を包含するとされる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明にしたがう装置の略図である

【図 2 a】 本発明にしたがう装置の第 1 の実施形態の側断面図である

【図 2 b】 本発明にしたがう装置の第 2 の実施形態の側断面図である

【図 3 a】 カルバマゼピンのイオン化を示す、図 2 a の装置で得られた質量スペクトルである

【図 3 b】 アクリジンのイオン化を示す、図 2 a の装置で得られた質量スペクトルである

【図 3 c】 ナフタレンのイオン化を示す、図 2 a の装置で得られた質量スペクトルである

【図 3 d】 硫化ジフェニルのイオン化を示す、図 2 a の装置で得られた質量スペクトルである

【図 3 e】 5-フッ化ウラシル(5-FU)のイオン化を示す、図 2 a の装置で得られた質量スペクトルである

【図 4 a】 ドーパントがない状態における、選ばれた物質について検出された、選ばれたイオン電流を合わせて示すイオン電流クロマトグラムである

【図 4 b】 ドーパントがない状態における、選ばれた物質について検出された、選ばれたイオン電流を合わせて示すイオン電流クロマトグラムである

【図 5】 相異なるドーパントの効果を示す、図 4 a に用いたものと同じ試料溶液からのクロマトグラムである

【図 6 a】 A P P I を A C P I と比較しているクロマトグラムである

【図 6 b】 A P P I を A C P I と比較しているクロマトグラムである

【符号の説明】

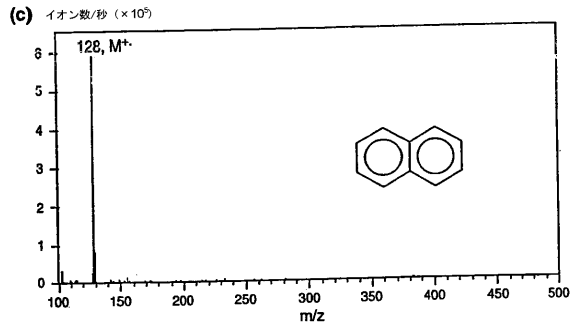
- 1 0 質量分析計
- 1 2 液体クロマトグラフィカラム
- 1 4 自動サンプラー
- 1 6, 1 8 ポンプ
- 2 0 熱噴霧器プローブ
- 2 2 大気圧光イオン化イオン源部
- 2 4 噴霧器ガス供給源
- 2 6 補助ガス配管
- 2 8 シリンジポンプ

10

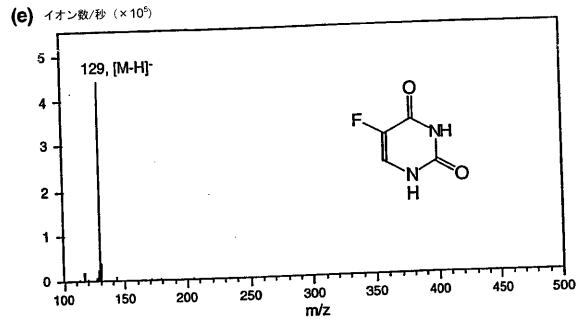
20

30

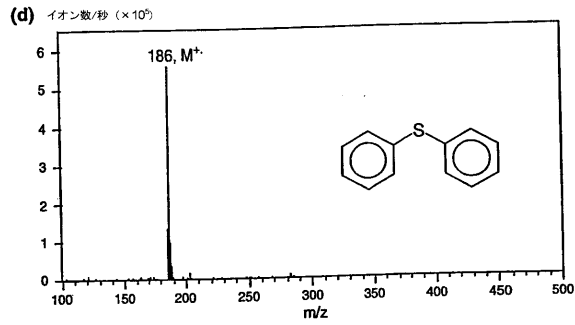
【図 3 c】



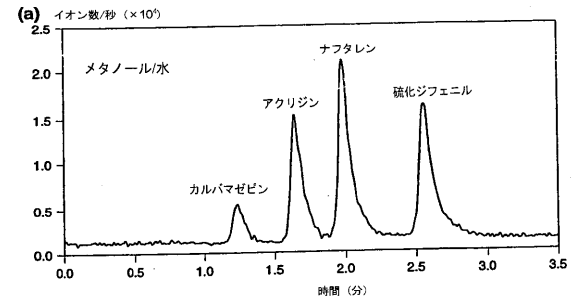
【図 3 e】



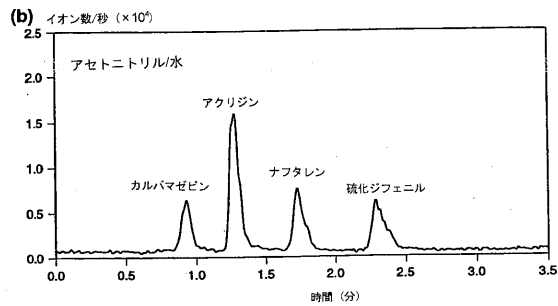
【図 3 d】



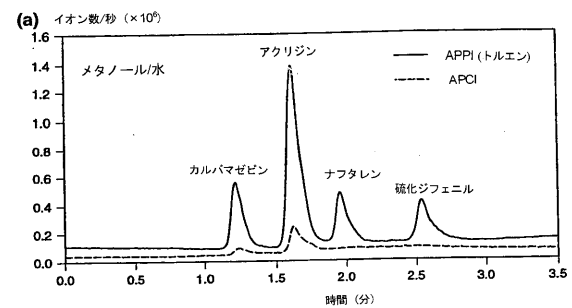
【図 4 a】



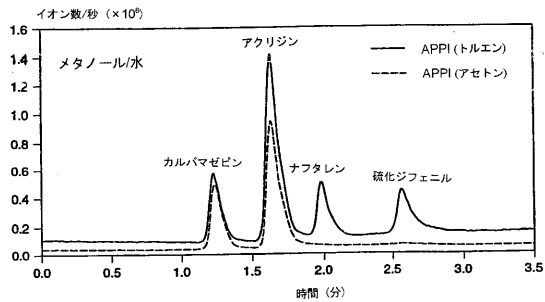
【図 4 b】



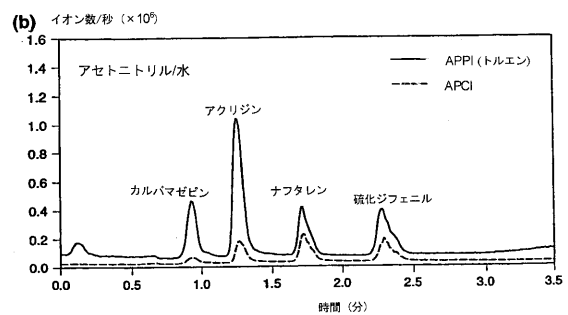
【図 6 a】



【図 5】



【図 6 b】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
H 0 1 J 49/04
H 0 1 J 49/10

(72)発明者 ブラフィンス, アンドリエス ピエテル
オランダ国 NL-9 3 5 1 ペーイェー レーク カレシエラーン 1 7

審査官 島田 英昭

(56)参考文献 特開平04-101345 (JP, A)
米国特許第05917185 (US, A)
国際公開第98/053308 (WO, A1)
特開平11-064283 (JP, A)
特開平02-176459 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N27/62-27/70
H01J49/00-49/48
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)