

## 同位体希釈法トリプル四重極 ICP-MS (ID-ICP-MS) を用いた、バイオディーゼル中の硫黄の精密定量

### アプリケーションノート

石油化学

#### 著者

Lieve Balcaen, Frank Vanhaecke<sup>1</sup>,  
Glenn Woods<sup>2</sup>, Martín Resano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ghent University, Department  
of Analytical Chemistry,  
Ghent, Belgium

<sup>2</sup>Agilent Technologies UK Ltd.,  
Stockport, Cheshire, UK

<sup>3</sup>University of Zaragoza,  
Department of Analytical  
Chemistry, Zaragoza, Spain



#### はじめに

有機物中の硫黄 (S) の精密で高感度かつ迅速な分析メソッドの開発は、様々なアプリケーションにおいて有用です。本アプリケーションノートでは、バイオディーゼル中の S の定量にフォーカスしますが、本メソッドは生体物質や硫黄混合薬中の S や他元素の同定にも応用できます。

バイオディーゼルは天然油から得られる再生可能な燃料で、少しの改良または改良なしでディーゼルエンジン車に使用することができます。バイオディーゼルとは、料理油、動物脂肪、植物油などの“バイオ”原料から得られるアルキルエステルのことです。バイオディーゼル中の主な分子は、FAME という脂肪酸メチルエステルです。各国に排ガス規制 (ASTM や ISO) が存在するため、バイオ燃料中の最大硫黄含有量が重要になってきています。これらの規制では、燃料中の硫黄含有量の最高含有量や、ディーゼルエンジン中の硫黄の最低含有量を定めています。



**Agilent Technologies**

従来バイオ燃料の分析は、ICP 発光分光分析法 (ICP-OES) や原子吸光分析法 (AAS/FAAS) が用いられてきました。しかし、これらの分析手法では炭素マトリクスによる連続的なバックグラウンドの上昇による深刻な干渉の問題があり、分析できる元素も限られ、検出下限も十分なものではありません。有機マトリクス中の硫黄の定量は ICP-MS においても容易ではなく [1,2]、コリジョン/リアクションセル (CRC) を用いても、様々な多原子イオンのスペクトルが S の同位体と重なってしまうため測定が困難です (表 1 参照)。二重収束型高分解能 ICP-MS (HR-ICP-MS) を用いての分析は、四重極よりコストがかかり、一般的に普及していません。また、HR-ICP-MS は、硫黄の同位体を他の元素から分別するため、イオン透過率および感度が 10 倍減少してしまいます。

そこで本研究では、新たな ICP-MS であるトリプル四重極 ICP-MS (ICP-QQQ) の MS/MS モードを用い、バイオディーゼル中の S を同位体希釈法にて定量しました。

表 1. S 同位体と  $S^{32}$  生成イオンの天然同位体存在比、および S 同定を阻害する干渉イオン

同位体	同位体比 (%)	スペクトル干渉をもたらすイオン
$^{32}S^+$	95.04	$^{16}O^{16}O^+$ , $^{14}N^{18}O^+$ , $^{15}N^{16}O^+H^+$
$^{33}S^+$	0.75	$^{32}S^1H^+$ , $^{16}O^{16}O^1H^+$ , $^{16}O^{17}O^+$ , $^{15}N^{18}O^+$ , $^{14}N^{18}O^1H^+$
$^{34}S^+$	4.20	$^{33}S^1H^+$ , $^{16}O^{18}O^+$
$^{32}S^{16}O^+$	95.04	$^{48}Ti^+$ , $^{48}Ca^+$ , $^{36}Ar^{12}C^+$
$^{33}S^{16}O^+$	0.75	$^{49}Ti^+$ , $^{32}S^{17}O^+$ , $^{31}P^{18}O^+$
$^{34}S^{16}O^+$	4.20	$^{50}Ti^+$ , $^{50}Cr^+$ , $^{50}V^+$ , $^{38}Ar^{12}C^+$ , $^{36}Ar^{14}N^+$ , $^{32}S^{18}O^+$ , $^{33}S^{17}O^+$

## 実験

### 装置条件

全ての測定は Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS を用いて行いました。

8800 では、オクタポール CRC は二つの四重極アナライザの間に搭載されています (図 1 参照)。始めの四重極 (Q1) を通過するイオンは、MS/MS モードの場合は設定された 1 質量数のみとなり、シングルクワッドモードでは“全開”となり、全てのイオンが通過できます。オクタポール CRC はノーガスモードまたはコリジョンガスモード (運動エネルギー分別 (KED) や衝突解離により多原子イオンを排除する) や、反応ガスモード (干渉物や対象物イオンを選択的に反応させ干渉物をなくす方法)、もしくは双方を組み合わせる使用することができます。

本研究では、ICP-QQQ の 3 つのモードを用いました。

1. Q1 がイオンガイドとして働くシングルクワッド (SQ) モード (SQ イオンガイドモードとも言われます)
2. Q1 がバンドパスフィルタとして働き、 $S^+$  と  $S^{32}O^+$  イオンがシステムを通過できるようバンドパスを十分広く設定されたシングルクワッド (SQ) モード (SQ バンドパスモードとも言われます)
3. Q1 が目的の前駆イオンに設定され (このケースでは  $S^+$  の同位体)、Q2 はその反応物イオンの質量数 (このケースでは  $S^{32}O^+$ ) に設定されている MS/MS マスシフトモード (MS/MS モードとも言われます)

上記の 3 種類のモードでの分析は他の様々なアプリケーションにも応用でき、ICP-QQQ 特有の分析モードである MS/MS モードの強みを再認識できます。 $^{32}S$  と  $^{34}S$  の信号をモニターし、

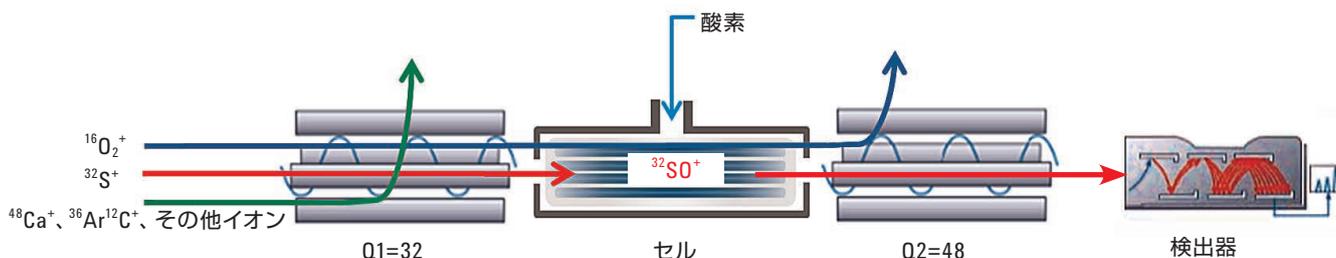


図 1. ICP-QQQ の MS/MS モードの説明図。目的元素ではないもの (本ケースでは  $^{48}Ca^+$ ,  $^{36}Ar^{12}C^+$  や他のイオン) はコリジョン/リアクションセルに入る前に Q1 にて排除され、 $m/z=48$  にて  $^{32}S^{16}O^+$  を測定して  $^{32}S$  を定量します。

干渉フリーを実現するために MS/MS モードを用い困難なマトリクスに対して同位体希釈法を行いました。

ICP-QQQ は有機溶媒分析用にし、プラズマに導入される有機物蒸気の量を抑えました。ペリチエ冷却式スプレーチャンバは  $-5^{\circ}\text{C}$  に設定され、標準装備の内径 2.5 mm インジェクターノズルは内径 1 mm の有機溶媒用ノズルに変更しました。インターフェースに炭素が蓄積するのを防ぐため、酸素ガス (Ar ガス中 20 % 混合) をスプレーチャンバに導入しました。最高の感度を出すため、有機溶媒用の様々なプラズマ条件を試してイオンレンズを最適化しました。表 2 に用いた装置条件を示します。

表 2. ICP-QQQ の装置設定

パラメータ	値
RF 出力	1450 W
キャリアガス流量	0.98 L/min
O <sub>2</sub> オプションガス流量	75 mL/min
スプレーチャンバ温度	$-5^{\circ}\text{C}$
ORS <sup>3</sup> リアクションガス流量 (O <sub>2</sub> )	0.4 mL/min
Q1 バイアス	-2 V
オクタポールバイアス	-9 V
Q2 バイアス	-18 V

## サンプルと試薬

標準物質として NIST SRM 2773 (国立標準技術研究所、米国) を用いてメソッドの精度を確認しました。Isoflex 社 (米国) の 98.8 % <sup>34</sup>S スパイク (硫酸ナトリウム) を同位体希釈液として、SPEX CertiPrep 社 (米国) の単元素 10 g/kg 無機標準溶液を検量線標準液や逆 ID-MS に用いました。なお、高純度試薬のみをサンプルの調製に用いました。水は、Direct Q-3 Milli-Q (ミリポア社、米国) にて蒸留され、HNO<sub>3</sub> (pro analysis, ChemLab、ベルギー) はサブボイリング蒸留法にて浄化しました。全てのサンプルと標準物質は 0.14 M HNO<sub>3</sub> 含有の無水エタノール (USP グレード、Fisher Scientific 社、イギリス) にて希釈しました。

## サンプル前処理

検量線の直線性を確認するため、10 g/kg の硫黄単体元素標準液をエタノールに希釈し、0~850 μg/kg の標準溶液を調整しました。

同位体希釈法を行うため、0.1 g 粉末を 0.14 M HNO<sub>3</sub> 10 mL に加え、およそ 2.25 mg/g の S となるよう <sup>34</sup>S スパイク物質を調製し、溶液 A としました。その後、スパイク液 A 250 mL を天然同位体比 (1 g/kg) の硫黄標準溶液 65 mL に混ぜ、0.14 M HNO<sub>3</sub> 25 mL にて希釈しました。これにより、<sup>34</sup>S リッチのスパイクが ~90 % まで希釈され、さらに正確で精密にスパイクを特徴づけることができます。この“希釈された”<sup>34</sup>S スパイク溶液 (溶液 B) は天然同位体比の S 標準溶液を用いた逆 ID-MS 法により <sup>34</sup>S が 0.711 mmol/g と定量されました。

およそ 1 g のバイオディーゼルサンプル (NIST SRM 2773) を直接 15 mL ポリプロピレンチューブに計り入れ、スパイク溶液 B (~0.2 g) を加えました。さらに溶液をエタノールにて 25 mL に希釈しました。3 つの異なるサンプルとスパイクを用意し、メソッドの再現性を確認しました。上記の同じ手順で、バイオディーゼルサンプルは加えずブランク溶液を調整しました。

## 結果と考察

純エタノールで薄めた S の標準溶液 (濃度 0~850 μg/kg) の検量線の直線性を、それぞれのサンプルについて 3 種類の測定モードにて評価しました。

シングルクワッド (SQ) イオンガイドモードでは、Q2 の質量数を 32、33、34 にセットして S 元素を直接測定しました。SQ バンドパスおよび MS/MS モードでは、酸素リアクションガスをオクタポールセルに導入して S<sup>+</sup> イオンが SO<sup>+</sup> に変換され、<sup>32</sup>S<sup>+</sup>、<sup>33</sup>S<sup>+</sup>、<sup>34</sup>S<sup>+</sup> をそれぞれ Q2 の m/z = 48、49、50 として測定しました。MS/MS モードでは、前駆イオンのみをセルに入ることができるように、Q1 はそれぞれ 32、33、34 と設定しました。

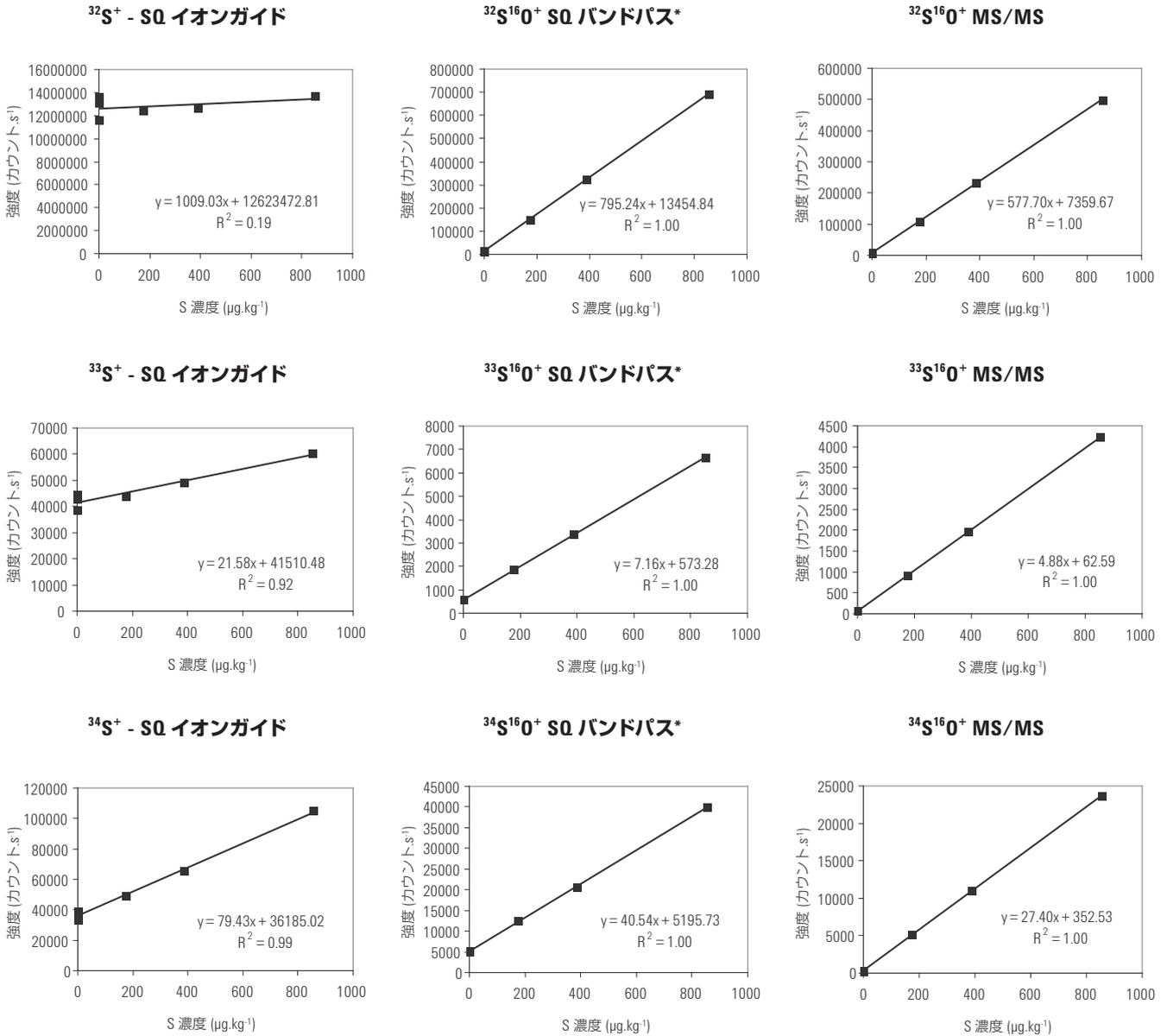


図 2. <sup>32</sup>S<sup>+</sup>, <sup>33</sup>S<sup>+</sup>, <sup>34</sup>S<sup>+</sup> の 0~850 µg/kg の検量線 (SQ イオンガイドモード) および <sup>32</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>33</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>34</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup> (SQ バンドパスモードおよび MS/MS モード)。The Royal Society of Chemistry (RSC) の許可を得て再現しました。

\*注: SQ バンドパス生成物イオンの測定は <sup>x</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup> と記してありますが, SQ バンドパスモード (従来の ICP-QMS のバンドパスフィルタリングと同様) はセルに入るイオンを精密にコントロールできないため, これらの質量数での信号は他の生成物イオンとの組み合わせになります。例えば, *m/z*=50 では <sup>34</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup> と同質量数に <sup>32</sup>S<sup>18</sup>O<sup>+</sup> が存在します。

図2に示した検量線から分かるように、常に存在する酸素起因のスペクトラム干渉により SQ イオンガイドモードでのSの定量はほぼ不可能です(表1参照)。リアクションモードを導入し、酸素ガスを使用することによりこの状況は改善されます。SQ バンドパスと MS/MS モードの検量線の直線性は良好ですが、SQ バンドパスの検量線では原点のオフセットを確認することができます(特に  $m/z=49$  および  $m/z=50$ )。これは、De Wolf et al.[3]にもある通り SQ バンドパスモードでの測定においてもスペクトラム干渉が起こっているためと考えられます。

しかし、MS/MS モードでは、ブランクの値が著しく下がり、 $m/z=48, 49, 50$  の信号強度は S の天然同位体比と一致します。これは、理論的には MS/MS モードを使用すれば、有機物マトリクス中の少なくとも S の主な同位体 2 種類は干渉なしで測定できるということが言えます。ICP-QQQ の MS/MS モードの更なる利点は、選択されたイオンを透過し測定することです。Q2 を Q1 +16 と設定するマシフトは、 $^{16}\text{O}$  原子 1 つが追加されたイオンのみを測定します。SQ バンドパスの酸素リアクションモードおよび従来の ICP-MS で起こり得る、 $m/z = 50$  での  $^{32}\text{S}^{18}\text{O}^+$  などの干渉は、マシフトモードでは起こりません。

本メソッドの検出下限 (LOD) は信号強度 (s) の標準偏差および検量線の傾き (m) から、次の式より求められました。LOD=3 (s m<sup>-1</sup>)。信号強度の標準偏差は回帰曲線の y 切片の標準偏差より決定しました。

硫黄の LOD はそれぞれ  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$  に対して 5、4、7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (もしくは 4、3、6  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) となりました。これら S の 3 つの同位体の LOD は、その存在比の違いにも関わらずとも類似しており、これは使用したエタノール中に含まれている S によるものだと考えられます。LOD が内部標準偏差の 3 倍で算出されるときは (例: ひとつの検量線ブランクの繰り返し測定の標準偏差など)、より低い硫黄の LOD が得られました。( $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  で 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  または 0.4  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$  で 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  または 1.6  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。しかし、 $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^+$  (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  または 5  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) では LOD は低くなりませんでした。) この方法で算出された装置の LOD は S の天然同位体存在比を反映しています。有機マトリクス中の S の LOD 値は過去にあまり報告されていませんが、比較のためいくつかを以下に記します。Smith et al.[4]、Sulyok et al.[5] および De Wolf et al.[3] は  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  としてそれぞれ 16  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{L}$  という値を報告しています。しかし、 $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$  を用いた場合は、きわめて高い値が得られています (300  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) [3]。これらの LOD 値は HR-ICP-MS を用いると、 $^{32}\text{S}^+$  および  $^{34}\text{S}^+$  にてそれぞれ 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{L}$  と低く算出されました。

MS/MS テクノロジーの強みはマトリクスが Ca や Ti を多く含んでいる場合でも S の算出値が明らかに良好なものとなることです。装置が SQ バンドパスモードの場合 (従来の ICP-MS でバンドパスセルを使用した場合と同様)、セルに入射するイオンのマスレンジが  $\text{S}^+$  前駆イオンと  $\text{SO}^+$  生成物イオン両方になるよう設定します。この条件では  $m/z=48$  の Ca と Ti イオンはセルに導入され、 $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  測定のため  $m/z=48$  に設定された Q2 を通過してしまいます。しかし、MS/MS モードでは、Q1 が特定の S 前駆イオンのみを通すため (本ケースでは  $m/z=32$ )、Ca および Ti イオンはイオンビームから拒絶され、Q2 に入射することができません (図1)。図3に、47.55~50.55 amu のマスレンジの (i) エタノールブランクおよび (ii) 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  Ca、Ti を含むエタノールブランクのスペクトルを示します。それぞれの溶液に対し、SQ バンドパスモード (A) および MS/MS モード (B) でのスペクトルが示されています。SQ バンドパスモードでは、 $m/z=48, 49, 50$  の際に Ca および Ti がサンプルに加わると明らかに信号強度が上がりましたが、MS/MS モードでは二つのスペクトルに大きな違いは出ませんでした。

さらに、SQ バンドパスおよび MS/MS モード (C) でのエタノールブランクの信号強度を比較すると、MS/MS モードのピークは低く、S の天然同位体存在比と一致します。これは SQ バンドパスモードのブランク値が S のブランク値と干渉成分の合計であることが言えます。

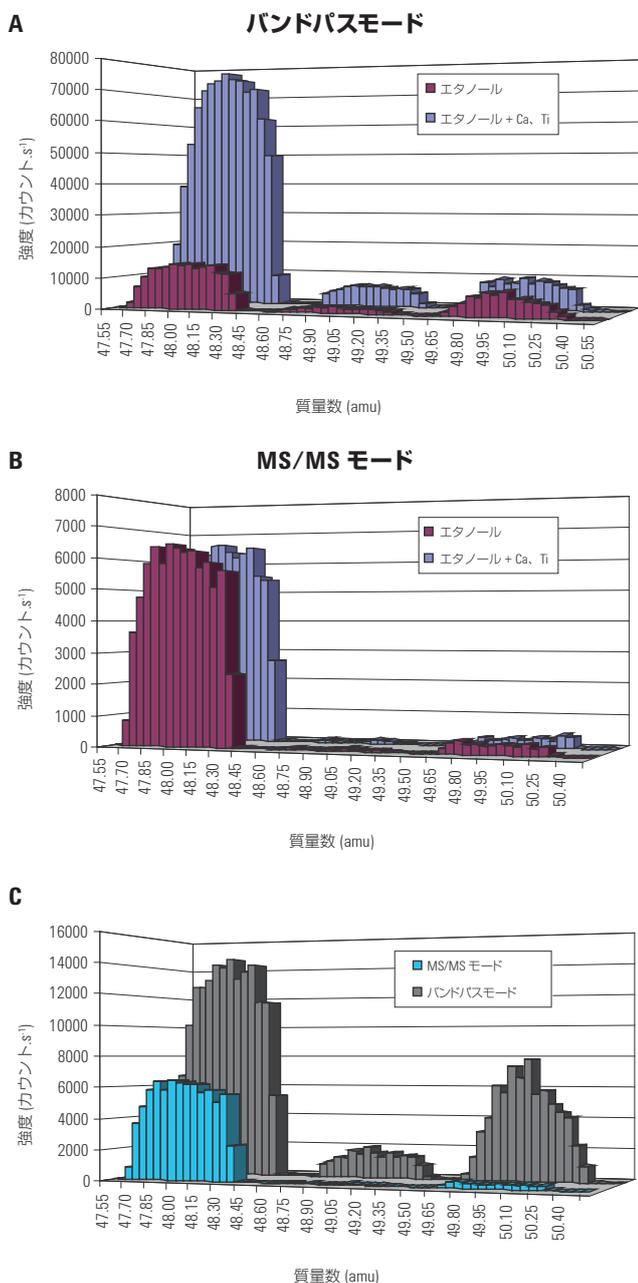


図 3. 47.55~50.55 amu での (i) エタノールブランク、(ii) Ca および Ti を含むエタノールブランクのスペクトラム、8800 の SQ バンドパスモード (A) および MS/MS モード (B) で測定。(C) SQ バンドパスモードおよび MS/MS モードでのエタノールブランク溶液の比較。The Royal Society of Chemistry (RSC) の許可を得て再現しました。

### 同位体希釈法 ICP-QQQ を用いた NIST SRM 2773 (バイオディーゼル) 中の S の定量

バイオディーゼル標準物質 NIST SRM 2773 中の S を定量するため、ICP-MS/MS メソッドを開発しました。この標準物質は動物油の供給原油から作られた 100 % のバイオディーゼルの S の認証値は  $7.39 \pm 0.39 \mu\text{g}/\text{kg}$  です。ICP-MS で測定する上で必要なサンプル前処理は、エタノールで希釈するのみです。

スパイクは  $^{34}\text{S}$  がエンリッチされているため、 $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$  比を ID 法に用いました ( $m/z=48$  での  $^{32}\text{S}$  分析 ( $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ ) および  $m/z=50$  での  $^{34}\text{S}$  分析 ( $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$ )。全ての信号強度はエタノールブランクを用いてブランク補正を行いました。全ての同位体比は実験で得られ、質量差別効果は一定であるとして、マスバイアス補正は行いませんでした。SRM+ スパイクの 3 種類の混合溶液および 2 種類のエタノールブランク+スパイクの混合液を ID-ICP-MS/MS にて測定しました。ブランクの平均値は  $0.011 \mu\text{g}/\text{g}$  となり、測定値より差し引かれました。ID-ICP-MS/MS にて得られた S の定量結果を表 3 にまとめます。3 つの SRM サンプルの結果は、全て認証値とよく一致しました。さらに、95 % の信頼区間の値から、この測定結果は精密だけではなく、再現性が高いということが分かります。

表 3. 同位体希釈法 (ID)-ICP-MS/MS を用いた NIST SRM 2773 (バイオディーゼル) 中の S の定量結果

サンプル	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	認証値 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
SRM 2773 - 1	7.234	$7.39 \pm 0.39$
SRM 2773 - 2	7.227	$7.39 \pm 0.39$
SRM 2773 - 3	7.231	$7.39 \pm 0.39$
平均	7.231	$7.39 \pm 0.39$
標準偏差	0.003	
95 % 信頼区間	$7.231 \pm 0.015$	

## 結論

Agilent ICP-QQQ の MS/MS モードを用い、有機マトリクス中の S を定量できる新たなメソッドの開発に成功しました。S の干渉物は分析対象イオンを酸素と反応させて除去し、質量数  $M + 16$  amu にて  $SO^+$  として測定しました。ICP-QMS を用いる S の測定は、酸素リアクションガスを利用して  $S^+$  イオンを  $SO^+$  イオンに変換する手法で、今まで様々な論文で紹介されてきました。しかし、有機マトリクスまたは Ca、Ti、Cr を含んだマトリクス ( $SO^+$  に干渉するもの) の分析については、同位体希釈法や同位体比分析では十分な精度を得ることができませんでした。

8800 ICP-QQQ の MS/MS モードにて同位体希釈法を行えば、 $^{32}S$  および  $^{34}S$  への干渉をより抑えることができます。始めの四重極は、マスフィルターとして CRC に入射するイオンの質量数を選択し、Ca、Ti、ArC などがセルに入る前に不要であればそれを除去します。セルに入射するイオンをコントロールできるということは、他のマトリクスやサンプル中の分析元素の存在に関わらず、反応は安定で予期できるものであるということです。酸素ガスにより  $S^+ + 16$  amu としてマスシフトをし、S を  $SO^+$  として間接的に測定することにより、 $O_2$ 、NO、NOH、 $NOH_2$  など考えられる  $S^+$  への干渉は完全除去または避けることができます。

新たな MS/MS メソッドによりバイオディーゼルの模擬物質中の S の定量は成功しました。本研究ではバイオディーゼルが測定されましたが、S を含む同様のサンプルでもこのメソッドが応用できます。我々はこのメソッドを活かし、将来的にはオンライン HPLC-ICP-MS による S 含有物質の同位体分析を検討しています。

## 関連情報

本アプリケーションは以下の論文でも紹介されています。  
Accurate determination of S in organic matrices using isotope dilution ICP-MS/MS, Lieve Balcaen, Glenn Woods, Martín Resano and Frank Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, 28, 33-39.

## 参考文献

1. G. Woods, F. Fryer, Direct Elemental Analysis of Biodiesel by 7500ce ICP-MS with ORS, Agilent publication, 2008, 5989-7649EN
2. G. Woods, F. Fryer, Direct elemental analysis of biodiesel by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389:753-761
3. K. De Wolf, L. Balcaen, E. Van De Walle, F. Cuyckens and F. Vanhaecke, A comparison between HPLC-dynamic reaction cell-ICP-MS and HPLC-sector field-ICP-MS for the detection of glutathione-trapped reactive drug metabolites using clozapine as a model compound, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 419-425.
4. C. J. Smith, I. D. Wilson, L. Weidolf, F. Abou-Shakra and M. Thomsen, Enhanced detection of sulphur and phosphorous containing compounds in HPLC-ICP-MS using chemical resolution via hexapole-based reaction with oxygen, *Chromatographia*, 2004, 59, S165-S170.
5. M. Sulyok, S. Hann, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, G. Stingeder and G. Koellensperger, Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 856-863.

## 謝辞

Lieve Balcaen の研究は、オランダ国立科学研究基金 (FWO-Vlaanderen) の支援により実現しました。Martín Resano よりスペイン国科学・革新省に謝意を表します。(プロジェクト番号 CTQ2009-08606)

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2013  
Printed in Japan, May 1, 2013  
5991-2337JAJP

