

# 有機質量分析

高橋 豊, 川畑 慎一郎

本稿では、有機質量分析の中で、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) とマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) について、分析上の留意点などを述べる。

## 1 LC/MS

LC/MS および装置の目覚ましい発展に伴い、誰でも簡単に LC/MS 分析を行うことができるようになってきた。しかし、紫外可視検出器などの汎用検出器はんようを利用する LC やガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) に比べると、良いデータを得るためには分析者に豊富な経験が要求される。LC/MS 分析において、悩みを抱えている分析者も多いと思う。本章では、有機質量分析の中で LC/MS にフォーカスし、試料の前処理や分析上の注意点やコツについて解説する。

### 1.1 試料の前処理

複雑なマトリックス成分を含む試料 (生体試料や環境試料) を LC/MS 分析するとき、試料の前処理が重要であることは言うまでもないが、例えば以下に示すように、精製した試料や購入した試薬を分析する場合でも、前処理をすることによってより良いデータが得られる場合がある。

精製した試料や購入した試薬を LC/MS 分析する場合、シリンジポンプを用いて試料溶液を連続導入する“インフュージョン測定”や、カラムの代わりにユニオンを接続し、LC のインジェクターから試料を導入する“フローインジェクション (ループインジェクション) 測定”を行うことが多い。このような手法を用いた分析において、S/N の悪いマススペクトルが得られた経験はないだろうか? その理由は、塩類などの不純物による影響である場合が多い。

Failure toward Success in Analytical Techniques—Organic Mass Spectrometry.

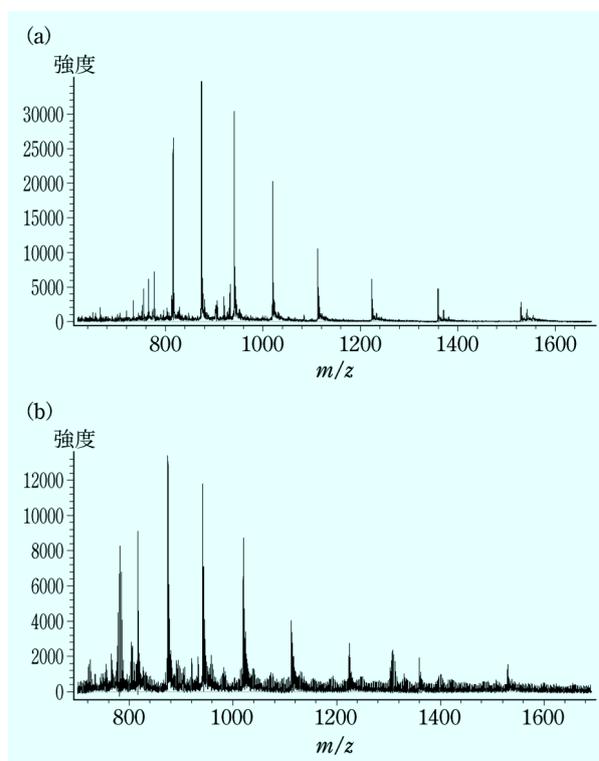


図1 シトクロム C のマススペクトル (a: 脱塩操作有, b: 脱塩操作無)

ループインジェクション測定により得られた市販シトクロム C のマススペクトルを図 1 に示す。固相抽出による脱塩処理の有無により、マススペクトルの S/N を比較した。脱塩処理を施した場合のマススペクトルは、しない場合のそれに比べて、ベースラインノイズが大幅に減少して明瞭めいりょうになっているとともに、強度も 3 倍程度に増加していることが分かる。

### 1.2 容器について

#### 1.2.1 ガラス器具

試料の前処理操作や移動相溶媒の保存にガラス器具を

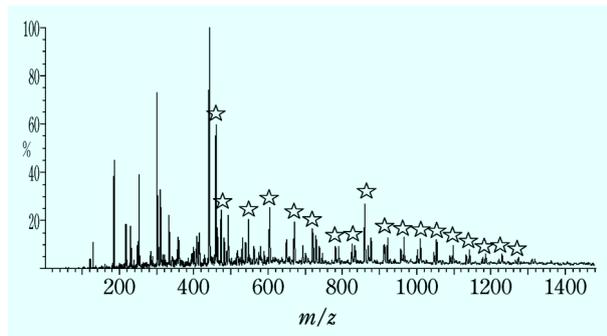


図2 洗剤由来の残存成分のマススペクトル

用いる場合、洗剤を使用して洗浄した器具は用いないことが望ましい。洗剤がわずかに残存していると、それが試料中に溶出して、あたかも試料成分であるかのように観測されるからである。特に、紫外/可視光 (UV/VIS) の波長領域に吸収を持たない種類の界面活性剤から成る洗剤は、LC分析では観測されないので注意が必要である。図2に、洗剤を用いてガラス器具を洗浄し、十分に濯いだ後、内壁に僅かに残った洗剤成分をメタノールで抽出、10倍濃縮した試料を正イオンエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) で測定したときのマススペクトルを示す。質量電荷比 ( $m/z$ ) 400付近から高  $m/z$  領域の主なイオン (☆印) は洗剤由来であり、44 u ごとにピークが観測されていることから、ポリエチレングリコール系の界面活性剤であることが分かる。

### 1・2・2 サンプルチューブ

一般に「エッペンチューブ」と呼ばれるプラスチック製のサンプルチューブを使用する場合、内壁からの溶出成分に留意する必要がある。チューブの種類によっては、内壁から多量の成分が溶出されることがある。図3に、2種類のプラスチック製サンプルチューブの内壁から、メタノールによって溶出された成分の正イオンESIスペクトルを示す(5種類測定して顕著な2種類を選択)。

注目すべきは、各スペクトルのメインピーク強度である。図3(a)では、メインピーク強度が14000であるのに対して、(b)では500である。(b)の強度であれば、バックグラウンドレベルと言えるので、試料に含まれていても問題になることはないと考えられる。一方、(a)の強度は、かなり高いレベルと言えるため、試料に含まれていると、あたかも試料成分であるかのような振る舞いをするので推測される。

プラスチック製のサンプルチューブを使用する場合、あらかじめ使用する溶媒で内壁からの溶出成分を確認しておくとうまい。また、サンプルチューブ以外にも、固相抽出に使用されるC18カートリッジにおいても同様な可能性が考えられるので注意が必要である。

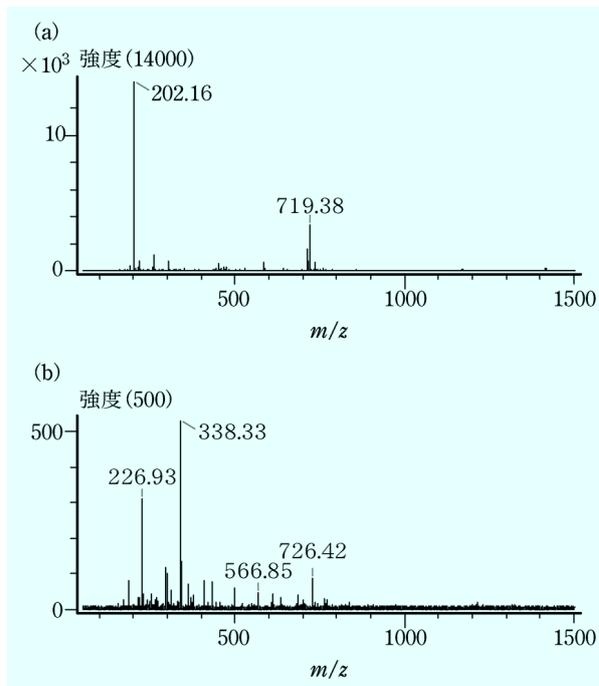


図3 プラスチック製サンプルチューブからの溶出成分のマススペクトル

### 1・2・3 バイアルキャップのセプタム

オートサンプラー用のサンプルバイアルキャップとして、シリコン製のセプタムが使われている。セプタムの主成分と考えられるポリジメチルシロキサンが、次のような理由で試料中にコンタミネーションすることがある。

- (1) 試料溶液をバイアルに長期間保存することによる溶出。
- (2) 試料注入の際、オートサンプラーニードルに付着する。
- (3) ニードルによってセプタムが削られ、破片が試料に混入する。

いずれの場合においても、セプタム由来の成分が試料にコンタミすることで、あたかも試料成分であるような振る舞いをするので注意が必要である。図4は、市販のLC/MS用のバイアル瓶にメタノールを入れ、市販のセプタムで密閉した状態で、LCのオートサンプラーを用いて同じバイアル瓶から2度続けてメタノールを注入し、大気圧化学イオン化 (APCI) 法で正イオン測定を行ったときのマススペクトルである。1回目の測定では、全イオンクロマトグラム (TIC) 上に顕著なピークは観測されていないが、2回目の測定では、ポリジメチルシロキサン由来のピークが観測された。このことから、1回目にインジェクションした際、オートサンプラーニードルによって削り取られたセプタムの破片がバイアル瓶内に落ち、その破片から溶出したポリジメチルシロキサンが検出されたと考えられる。

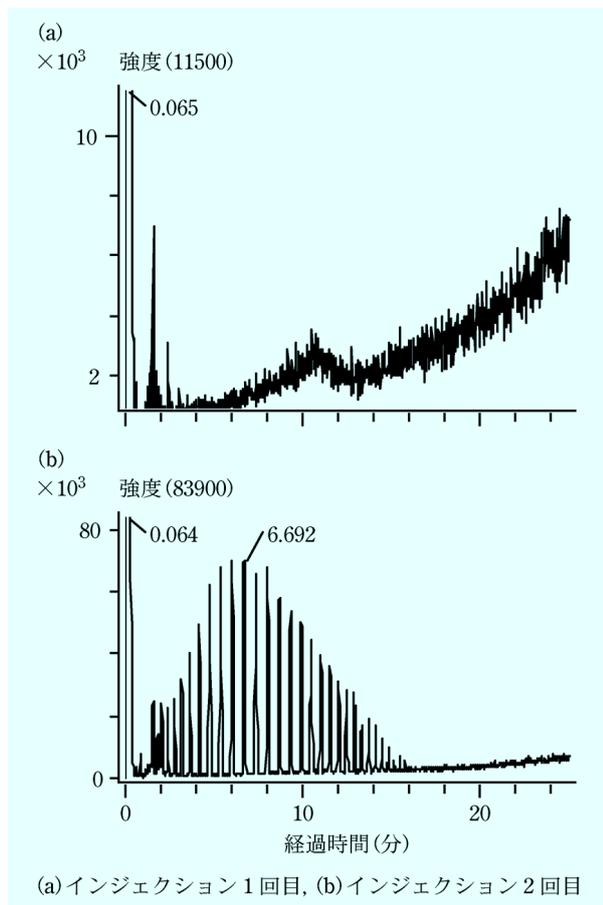


図4 ブランク溶媒測定時のTIC

### 1.3 移動相溶媒

LC/MSで使用されるLCは、ほとんどの場合逆相系である。ここでは、逆相LC/MSでよく用いられる移動相溶媒について説明する。

LCで一般的に用いられているリン酸塩系の不揮発性緩衝液が、LC/MSには適していないことはよく知られている。イオン源の構造によっては、不揮発性緩衝液が使用可能なものもあるが、緩衝液を使用しない場合や揮発性緩衝液を使用した場合に比べると、少なからず感度が低下するのが現状である。そのような不揮発性緩衝液は、揮発性緩衝液に置き換えて使用することを強く推奨する。また、有機溶媒に関しても、イオン源の種類(ESIかAPCIか)によっては、“シグナルが安定しない”、“感度が悪い”などの理由から、使用が推奨されない溶媒もある。以下に、逆相LC/MSでの使用が推奨される緩衝液や有機溶媒についてまとめた。

#### 1.3.1 有機溶媒

(1) メタノール：アセトニトリルと比較してカラム圧は高くなる。負イオン測定に適している。正イオンESI測定に用いると、 $[M+Na]^+$ イオンが観測されやすい。

(2) アセトニトリル：カラム圧が低く、最もポピュラーな溶媒。メタノールよりも若干溶出力が高い。正イ

オンESI測定に用いると、 $[M+NH_4]^+$ イオンが観測されやすい。

(3) エタノール：アセトニトリルよりも更に溶出力が高いが、カラム圧が非常に高くなる。

(4) アセトン：溶出力が高く、水にも溶けやすいので、疎水性の高い化合物のODSカラムでの分析に適している。

(5) テトラヒドロフラン (THF)：アセトンと同様に溶出力が高い。バックグラウンドイオンが多く生成され、試料のイオン化に悪影響を与えることがあるので注意が必要。

(6) クロロホルム：溶出力が高く、水にほとんど溶けない。アセトニトリル100%の系でもODSカラムに吸着する様な疎水性の高い化合物の分析に用いる。負イオン測定に用いると、 $[M+Cl]^-$ イオンが観測され易い。

#### 1.3.2 緩衝液 (推奨濃度)

(1) 酢酸, ギ酸 (0.1%)：LC/MSで最も汎用的に使用される。緩衝能はもたず、プロトンの発生源として使用される。

(2) 酢酸アンモニウム (10 mM)：LC/MSでは最もポピュラーな緩衝液。酸性物質に弱いイオン対効果を示す。

(3) トリフルオロ酢酸 (TFA) (0.1%)：ペプチドなどアミン系化合物に適する。酸性度が高すぎるために負イオン測定には適さない。まれに負イオン測定でTFA付加イオンとして良いデータを与えることがある。

(4) パーフルオロブタン酸 (PFBA) (0.05%)：TFAではODSに保持されにくい、親水性の高いアミン系化合物の分析に有効である。オクタンスルホン酸等の代わりになる。

(5) ジブチルアミン酢酸 (5 mM)：カルボン酸やスルホン酸系化合物のイオン対試薬として使用できる。

(6) トリエチルアミン酢酸 (5 mM)：ジブチルアミン酢酸と同様に使用される。N-Hを持たないために、LCラインやイオン源内に残存しにくい。

### 1.4 LC/MS 装置

#### 1.4.1 配管

LC/MS分析で良い結果を得るには、LC装置とMS装置を接続するための配管やLC装置内部の配管・UVセル容量などに注意する必要がある。LC/MS装置構成において、UVなどLC装置内部の検出器とMS装置を直列に接続する機会が多い。移動相流量に対して配管やセルの容量が大きすぎると、カラムで分離された試料成分がLC装置とMS装置の間で拡散してしまい、ピークのテーリングやブロードニング、感度低下などを引き起こす原因となる。セル容量の目安は、1分当たりの移動相量の5%程度以下が適している(1 mL/minの移動相

流量のとき 50  $\mu$ L 以下)。

配管に関しては、カラム内径 (移動相流量) に適した内径や長さを選択することが重要となる。特に、カラム出口から ESI イオン源入り口までの配管の内径と長さに注意が必要である。カラム内径 (移動相流量) に対して大きすぎる内径の配管を使用するとデッドボリュームとなり、カラムで分離されたピーク形状をイオン源まで保つことができなくなる。目安としては、セミマイクロ (カラム内径 1~2 mm) で 0.1~0.15 mm, ミクロ (カラム内径 0.3~0.5 mm) で 0.075~0.1 mm, ナノ (カラム内径 0.1 mm 以下) で 0.05 mm 以下となる。

#### 1.4.2 LC 装置からの溶出物

新品の LC 装置を LC/MS 装置の構成として使用する場合、LC 装置から溶出するバックグラウンドイオンに注意する必要がある。新品の LC 装置にメタノールなどの溶媒を通液し、すぐに MS へ接続すると、44 u や 74 u 間隔で多数のピークを示すスペクトルが観測されることがある。図 5(b) に、新品の LC ポンプに 0.1% ギ酸/メタノール混液を通液してすぐに ESI-MS に接続して測定したバックグラウンドスペクトルを示す。また比較のため、十分に使い込まれた LC ポンプに同じ溶媒を通液して得られるバックグラウンドスペクトルを図 5(a) に示す。図 5(b) では、 $m/z$  1000 以上の領域に 74 u 間隔で複数のピークが観測されている。これは、ポンプ内部で使用されているシリコン製部品から溶出するケイ素化合物由来のイオンであると推測される。これらは UV 吸収をもたない化合物であることが多く、LC 単体

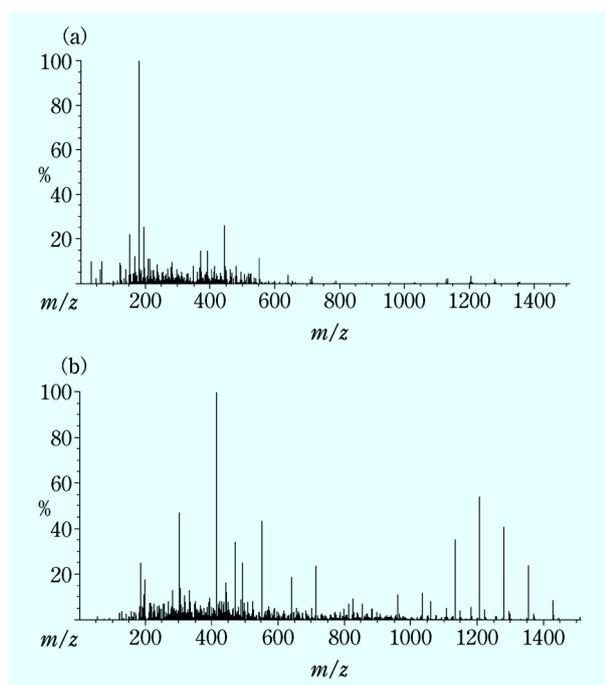


図 5 使い込んだ LC ポンプ(a), および新品の LC ポンプ(b)からの溶出成分由来のマススペクトル

(UV/VIS 検出) での使用時には問題にならない。新品の LC 装置を LC/MS として使用する際には、日常的に使用する溶媒を十分通液 (最低でも 1 mL/min の流量で 24 時間) し、エージングを行うことを推奨する。

#### 1.5 トラブルとイオン源メンテナンス

MS は破壊分析の装置である。従って、試料を破壊する部分、すなわちイオン源の汚れは避けて通れない問題である。特に LC/MS においては、イオン源の汚れが感度に大きな影響を与える。最近の装置は、汚れにくい工夫がなされているものも多いが、それでも全く汚れないという MS 装置は存在しない。イオン源は、汚れたら洗浄する、あるいは定期的に洗浄することが必要であり、これを怠ると以下に示すような様々なトラブルに見舞われることになる。

##### 1.5.1 感度の低下

ESI イオン源の概略図を図 6 示す。大気圧下で生成したイオンは、スプレイヤーとオリフィス 1 との電位差によってオリフィス 1 に引き付けられ、次いで分析部へと導かれる。オリフィス 1 の汚染によって電圧が印加されにくくなり、オリフィス 1 にイオンを引き込む効率が低下、結果として感度が低下するというトラブルに発展する。こまめにオリフィス 1 の洗浄を行うことが、第一の予防策であろう。表面が汚れていなくても、細孔の内側にごみなどが付着している場合もあるので、細い針で突っ突くなどの洗浄方法も有効である。

##### 1.5.2 イオンシグナルの消失

上述した状態で更にイオン源を放置すると、オリフィス 1 の細孔が目詰まりを起すことがある。当然、イオンはオリフィス 1 を通過できなくなるため、イオンシグナルが全く観測されないというトラブルに見舞われる。このとき、イオン源の真空度が、通常よりもかなり高めになっていると思われる。定期的に真空度をチェックすることで、このようなトラブルを予防することができる。

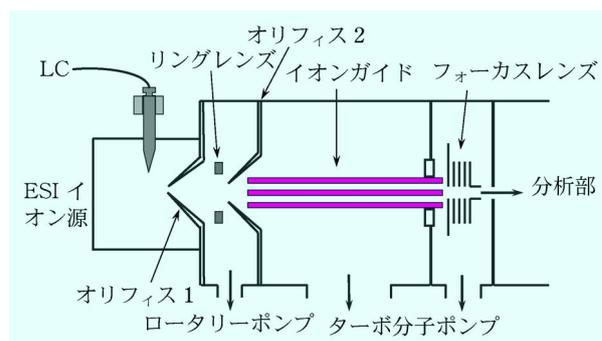


図 6 ESI イオン源の概略図

### 1.5.3 絶縁不良

イオン源には、絶縁性の部品が多数使われている。それらが汚れる（炭素膜のようなものが付着する）ことで絶縁不良を起こし、本来なら絶縁されていなければならない部品同士に電流が流れ、シグナルが観測されなくなる、放電、電気系の基盤等にダメージを与える、などのトラブルが起こることが考えられる。絶縁部品は、金属部品に比べると洗浄しにくく、洗浄によって絶縁性が完全に元に戻ることは期待できないので、定期的な交換が推奨される。

### 1.5.4 キャピラリーの目詰まり

ESI, APCI プローブは、LC の出口が接続され移動相溶媒などが流れる内管と、窒素ガスが流れる外管からなる二層構造が一般的である。内管としては、内径数十ミクロンのステンレス製やフューズドシリカ製のキャピラリーが使用される。内径が小さいために、試料溶液にごみなどが混入していると、キャピラリーが目詰まりを起こす原因となる。回避法としては、試料溶液を汚す、ユニオンの代わりにラインフィルターを使用する、などが挙げられる。

### 1.6 マススペクトルの解釈

LC/MS の用途の多くは、「LC-UV クロマトグラムで注目したピークの同定」であろう。その場合、「まずは分子量を知りたい」という希望が多いと思われる。

一方、ESI や APCI を用いた LC/MS 測定の結果得られたマススペクトルは、GC/MS のマススペクトルのように  $M^+$  イオンが観測されることはほとんどない。基本的には、正イオン検出でプロトン付加イオン ( $[M+H]^+$ )、負イオン検出でプロトン脱離イオン ( $[M-H]^-$ ) が観測されやすいが、イオン源の種類やイオン極性、溶媒条件によっては、それ以外の付加イオンが観測され、スペクトルの解釈（分子量の決定）を複雑にすることがある。しかし、適度な強度で複数の付加イオンが観測される場合、それらの質量差を利用して、分子量を決定することができる。

例えば、水/メタノール系の移動相溶媒を用い、ある精製された化合物 A を正イオン ESI で測定し、図 7 に示すようなスペクトルが得られたら、この化合物の分子量は「500」と決定することができる。

一方、単一ピークのみ観測された場合、その結果だけから分子量を決定することは、かなりのリスクを伴う。図 7 の例で示した測定条件の場合では、 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$  のどちらか一方だけが観測されることが珍しくないからである。溶媒条件やイオン極性、イオン源を変更して再測定することが推奨される。

参考として、溶媒とイオン源の種類、イオン極性によって観測されやすいイオン種を表 1 に示す。ただ

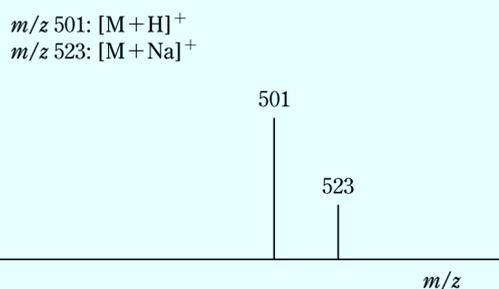


図 7 化合物 A のマススペクトル（正イオン ESI）

表 1 LC/MS のマススペクトルで観測される付加イオン種例

イオン化法	移動相溶媒	生成しやすい付加イオン
正イオン検出		
ESI	メタノール	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ , $[M+Na]^+$ , $[M+K]^+$
	アセトニトリル	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ , $[M+Na]^+$ , $[M+K]^+$
	含酢酸アンモニウム トリエチルアミンなど	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ , $[M+H+N(CH_2CH_3)_3]^+$
APCI	メタノール	$[M+H]^+$ , $[M+H+CH_3OH]^+$
	アセトニトリル	$[M+H]^+$ , $[M+H+CH_3CN]^+$
	酢酸アンモニウム トリエチルアミンなど	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ , $[M+H+N(CH_2CH_3)_3]^+$
負イオン検出		
ESI	酸を含まない系	$[H-H]^-$ , $[M+Cl]^-$
	含酢酸, 酢酸アンモニウムなど	$[H-H]^-$ , $[M+CH_3COO]^-$
	含ギ酸	$[H-H]^-$ , $[M+HCOO]^-$
	含トリフロロ酢酸	$[H-H]^-$ , $[M+CF_3COO]^-$
APCI	酸を含まない系	$[H-H]^-$ , $[M+Cl]^-$
	含酢酸, 酢酸アンモニウム	$[H-H]^-$ , $[M+CH_3COO]^-$
	含ギ酸	$[H-H]^-$ , $[M+HCOO]^-$
	含トリフロロ酢酸	$[H-H]^-$ , $[M+CF_3COO]^-$

し、表 1 の例は、装置の種類や設置環境、測定条件、溶媒のグレードや保存状態などで変わることがあると思われるので、了承されたい。

## 2 MALDI-MS

MALDI-MS は、前章の LC/MS とともに適用範囲の広い質量分析手法として注目され広く普及しているが、いざ実際に自分のサンプルを測定してみても、なかなか思いどおりの結果が得られず、困惑する場合も多いようである。より良い結果を得るためにいくつか留意したいポイントについて、以下解説する。

### 2.1 MALDI-MS 装置の概略

MALDI-MS 装置では、試料表面にレーザー光線を

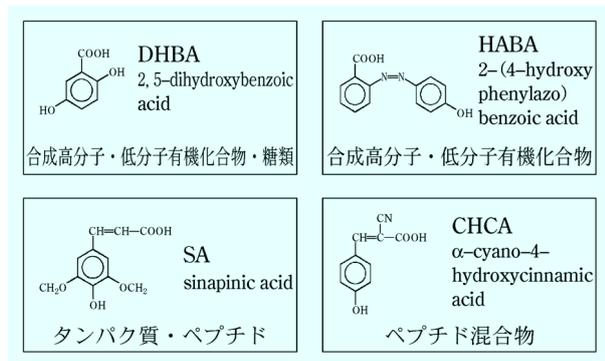


図8 汎用されるマトリックス

照射することにより対象化合物をイオン化し、続いて質量分析部により各イオンの ( $m/z$ ) に応じた分離を行いマススペクトルを得る。試料には、イオン化を補助する目的でマトリックス (図8) をあらかじめ添加しておく。装置の機構や原理については、すでに本誌で解説<sup>1)</sup>されているので適宜参照されたい。

## 2.2 事前調査

MALDI-MS では、特に以下の項目につき事前の検討が欠かせない。

### 2.2.1 その分子はイオン化する可能性があるか

質量分析法すべてに共通の必要条件として、対象化合物にはイオン化する性質が求められる。MALDI では、光エネルギーによって試料表面 (固相) から試料分子を脱離/イオン化させ、分子を分解せずにイオンとして真空中 (気相) へ取り出す。そのためには、まず化合物が分子としての明確かつ強固な構造を有していることが求められる。共有結合のみで構成された分子は問題が少ないが、イオン性化合物、錯化合物 (特に多くのリガンドを持つもの)、あるいは弱い相互作用で形成された分子集合体 (例: タンパク質複合体) などは、そのままの形でのイオン化は困難な場合が多い。また、イオン化するためには分子に多少なりとも極性が必要である。例えば、ワックスなどの飽和炭化水素のイオン化がうまくいかないという相談を受けることがあるが、これらの化合物は分子内にほとんど分極がないのでイオン化しにくく、MALDI の測定対象ではないと考えたほうが良い。

### 2.2.2 マトリックスの選定

MALDI でイオン化がうまく達成できないという失敗は、より適切なマトリックスを選択することで解決する場合がある。マトリックスとして多くの試薬が提案されているが、対象化合物に応じて適否がある。頻用されるマトリックスを図8に4種挙げた。その他のマトリックスの一覧表としては、成書<sup>2)3)</sup>あるいは試薬メーカーのカタログ<sup>4)</sup>を参照されたい。実践的には、文献での過

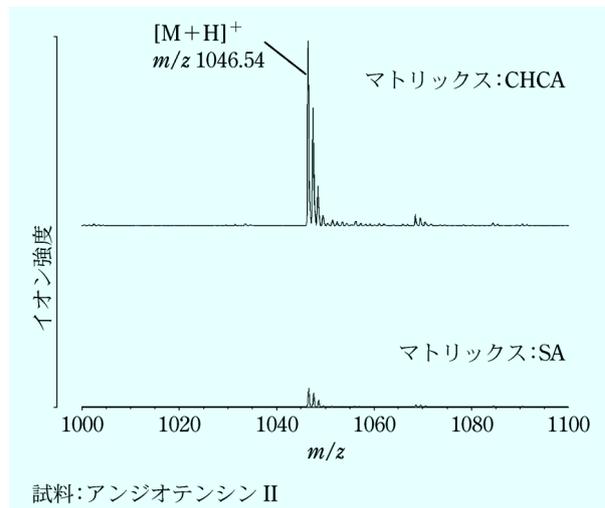


図9 MALDI-MS スペクトルのマトリックス依存性

去事例を参考に数種類の候補を選び、実際に測定したうえで最も良い結果を与えるマトリックスを採用するのが常道である。マトリックスの種類によってマススペクトルが変化する例を図9に示した。

### 2.2.3 文献調査

通常の文献調査をするだけのことなので、わざわざここで書くべきことではないはずだが、先例の調査をせずに場当たりの挑戦をしている事例が散見されるので、注意喚起のため一項目を設けた。ただし、過去の文献 (おおむね2000年以前) では、現在の視点からは必ずしも最適とは言えない測定条件が記載されている場合がある。特にマトリックスの使用に関する技術の発達は著しいので、極力最新の報文を参照されたい。

### 2.2.4 口コミによる情報収集

MALDI-MSに限らず質量分析法は、ここ数年の間に激しい発達・変革を遂げているが、その成果は必ずしも論文化されているとは限らない。特に企業研究機関での成果が公表されることはほとんどないという事情もある。情報不足を補うためには、ヒューマンネットワークを介した収集活動が欠かせない。日頃から学会での懇親会や勉強会、あるいはメーカー開催のユーザーズセミナーなどの機会を活用して、現場担当者同士の交流を密にしておきたい。

## 2.3 試料調製

### 2.3.1 精製

MALDI は夾雑物に比較的寛容なイオン化法であるが、それでもイオン化を阻害するような物質の共存は好ましくない。高分子量化合物のピークがうまく観測できないという測定の失敗は、共存する低分子量成分、特に塩類によってイオン化が阻害されているためであること

が多い。精製法として最も確度が高いのはLCによる分取である。逆相モードやサイズ排除モードなど、試料に応じて検討されている。特に、サイズ排除モードによって幅広い分子量分布の試料をあらかじめ狭い分子量範囲に制限しておく手法は、イオン化の段階での成分相互のサプレッション効果を避けるために有効である。また、手間をかけずにペプチドやタンパク質を精製（主として脱塩）するために、ピペットチップ型マイクロカラム製品が市販されており、水系溶液からの精製に適している。

### 2.3.2 溶媒

MALDI-MSで良い結果を得るためには、マトリックスと試料との均質な混合結晶を作製することが必須条件であるので、溶媒の選択は重要なポイントである。よく用いられる溶媒としては、水、アセトニトリル/水、クロロホルム、テトラヒドロフランなどが挙げられる。乾燥過程におけるむらの発生を避けるため、なるべく混合溶媒は避け、試料およびマトリックスの両方をよく溶解する共通の溶媒を用いる。

また、難揮発性の溶媒の使用は避けるべきである。例えば、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルフォルムアミド (DMF)、硫酸、高濃度リン酸緩衝液などである。一方、揮発性であっても沸点が極端に低い溶媒 (例：ジエチルエーテル、ジクロロメタン、アセトン等) は、サンプルプレートへの溶液搭載が困難な場合がある。

### 2.3.3 器具

試料溶液を取り扱う際に使用する容器、測容器、あるいはピペットチップなどからの溶出物 (添加剤やアルカリ金属等) がイオン化を阻害することがあり注意を要する。特に有機溶媒を使用する場合には、必ずガラス製の器具を使用したい。その他、第1章LC/MSの「1.2 容器について」とほぼ同じ注意を払う必要がある。併せて参照されたい。

### 2.3.4 試料搭載方法

マトリックスと試料とを混合溶液として用意し、それをサンプルプレートに塗布する「dried droplet法」、マトリックスのみを先にサンプルプレートに塗布しておき、後から試料溶液を重ね塗布する「thin layer法」、マトリックスと試料の混合結晶を破砕する「crash crystal法」などが提案されている。試料搭載手順によっては感度や分解能が大きな影響を受けることがある。これは析出したマトリックス結晶の形態が変化するためで、例えば、DHBAでペプチドを測定する場合などは、DHBAの針状結晶が析出していることが重要な要件であるのでdried droplet法が有効だが、その他の調製法では良好な結果を得にくい。マトリックスの特性や析出過程をよく理解して臨むことが重要であろう。

また、試料のピーク強度を増大させようとして多量のマトリックスと試料を搭載する事例がままあるが、必要以上の搭載量はかえってピーク強度を低下させる。目的成分のピーク強度が弱いのは、適切な試料調製がなされていないことが原因であると考えたほうが良い。

## 2.4 イオン化

### 2.4.1 レーザー強度の最適化

測定中に最も注意すべきはレーザー強度の最適化である。うまくピークが観測できないためにレーザー強度を上げすぎて、分解能が著しく低下したり、試料が分解するという失敗が多く見受けられる。目的の分子が検出できる最低限のレーザー強度が最適とされる。それを超えた高い強度でも測定は可能だが、同時に光分解生成物が検出されるようになり、また質量分解能も低下するので注意が必要である。図10に、種々のレーザー強度のもとで得られたピーク形状を示す。

### 2.4.2 ラスタリング照射 vs マニュアル照射

通常、測定は複数回 (数十～数百) のレーザー照射を繰り返し、個別に得られたスペクトルを積算平均化して代表スペクトルとする。その際、試料表面の一箇所に固定しての測定では、表面のむらに影響されて代表的でないスペクトルとなるおそれがあるので、レーザー照射位置を移動しながら積算する手法が採られる。最近の市販装置では、ラスタリング等の名称で自動的に移動する機能が搭載されている。他方、試料の状態によってはイオンの生成する部位が極めて限定的で、上記ラスタリングでは結果的に貧弱なスペクトルになってしまう場合がある。例えば、DHBAマトリックスは針状結晶を生成しやすく、結晶上の狭小な位置でしかイオンが生成しない場合がある。その場合には、マニュアル操作で「スイートスポット」を探索して、その箇所での積算を行うことで質の高いマススペクトルを得ることができる。ただし、この技法は測定者のスキルに左右されやすく、また

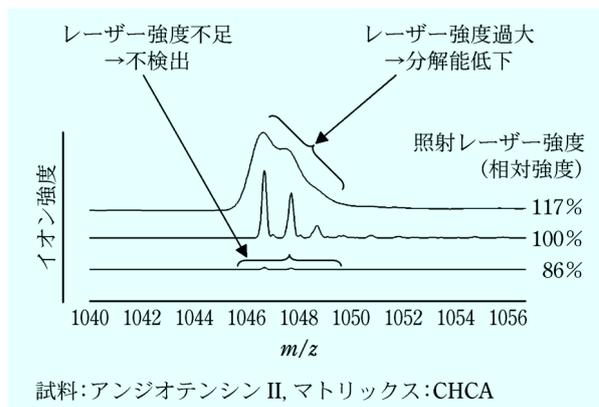


図10 レーザー強度によるピーク形状の変化

主観的・恣意的な結果に陥りやすいので注意を要する。

## 2.5 質量分離・検出

飛行時間型の質量分析装置では、イオンを直線的に飛行させてそのまま検出する「リニアモード」と、電位勾配によって屈曲させてから検出する「リフレクトロンモード」が搭載されている。前者は、イオン源で生成したイオンはすべて検出器に到達するので高感度であり、また高分子量までの検出が可能である。後者は、イオン初期加速時の飛行速度のばらつきを反射過程で補正することができるので、高い質量分解能が得られる。短所としては、飛行時間が長くなるためイオンとしての寿命が短い高質量化学種は検出できない点がある。比較的小さな分子（分子量で数千以下）が対象である。タンパク質など高分子量化合物のピークがうまく観測できないという失敗例は、リフレクトロンモードで測定を行っていることが原因の場合がある。

## 2.6 データの解釈

LC/MSの章でも解説されているように、得られたマススペクトルの解釈にあたっては多様なイオン種の形態を考慮する必要がある。特にMALDIイオン化では、分子量を示すイオンとして以下の化学種が検出されることが多い。

- (1)  $[M+H]^+$  : ペプチド, タンパク質, 核酸, 高極性有機化合物
- (2)  $[M]^+$  : 低極性有機化合物, 顔料, 含金属化合物
- (3)  $[M+cation]^+$  : 糖, 合成高分子
- (4)  $[M+matrix]^+$  : タンパク質

これらは絶対的なものではない点に留意されたい。例えば、ペプチドであってもトレース量程度のNaの存在によって、Na付加イオンが検出される例はままある。

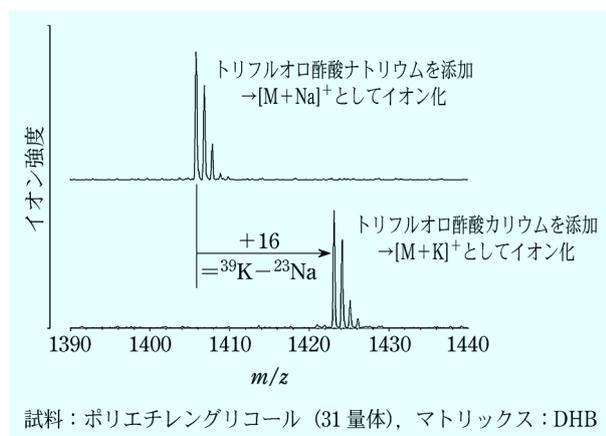


図11 アルカリ金属付加イオンの確認

さらには、複数種の陽イオンの存在下では多数の陽イオン付加イオンが検出される場合があり、あたかも複数の成分が混在していると誤った解析をしている事例があるので、測定条件や試料の特性を考慮しながらイオン種を検討しなければならない。陽イオンが付加していることを証明するためには、別種の陽イオン塩の添加によってピーク位置がシフトすることを利用する。例えば、 $[M+Na]^+$ と推測されるピークが検出された場合、さらにKClなどのKイオン供給物質を添加して $[M+K]^+$ を生成させ、これに伴うピークシフト ( $^{23}\text{Na} \rightarrow ^{39}\text{K} : +16$ )を観察する(図11)。

## 参考資料

### 1 に関する資料として

日本質量分析学会編：“マススペクトロメトリーってなあに”，(2001)。

液体クロマトグラフィー研究懇談会編：“液クロ龍の巻” (2002)，(丸善)。

液体クロマトグラフィー研究懇談会編：“液クロ彪の巻” (2003)，(丸善)。

液体クロマトグラフィー研究懇談会編：“液クロ犬の巻” (2004)，(丸善)。

液体クロマトグラフィー研究懇談会編：“液クロ武の巻” (2005)，(丸善)。

液体クロマトグラフィー研究懇談会編：“液クロ文の巻”，丸善

### 2 に関する資料として

1) 田中耕一：ぶんせき，1996，253。

2) 日本分析化学会編：“改訂5版 分析化学データブック”，p. 152 (2004)，(丸善)。

3) J. H. Gross：“Mass Spectrometry A Textbook”，p. 418 (2004)，(Springer)。

4) Sigma-Aldrich：“Analytix 6-2001”，p. 5 (2001)。



高橋 豊 (Yutaka TAKAHASHI)

日本電子(株)分析機器本部 MSG 技術チーム (〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2)。群馬大学大学院工学研究科修士課程修了。工学博士(群馬大学)。《現在の研究テーマ》LC-MS 関連装置の研究開発。《主な著書》“液クロを上手に使うコツ”(丸善)。《趣味》トライアスロン、スキー、ボウリング、テニス。E-mail: tyutaka@jeol.co.jp



川畑慎一郎 (Shin-ichirou KAWABATA)

(株)島津製作所分析計測事業部 (〒305-0031 茨城県つくば市吾妻 3-17-1)。千葉大学大学院工学研究科修士課程修了。《現在の研究テーマ》MALDI-MS 応用技術開発。《主な著書》“色材と高分子材料のための最新機器分析法”(共著)(ソフトサイエンス社)。《趣味》古い電気製品の修理、古代遺跡めぐり。E-mail: kawabata@shimadzu.co.jp