

オービトラップ型イオントラップを有する質量分析計の原理と応用研究

オービトラップとはイオントラップ質量分析計の一種であり、2005年に開発されて以来、コンパクト、より高分解能、高感度等の開発が進み、未知の非標的化合物の高精度分析が可能となった。特に、優れた選択性(分解能)と感度が求められる食品、環境、医療から最新のプロテオミクスの研究において幅広く応用されるようになった。本稿では、装置の原理および改良の背景から最新の応用分析事例まで、最先端の研究を紹介する。

Thomas MÖHRING (日本語訳 ヴィンセント 知子)

はじめに

Orbitrap という名称の質量分離ユニットを搭載した製品 (図1) を2005年に上市してからすでに13年経ち、プロテオーム、メタボローム解析などの生化学研究から、薬物動態研究、環境や食の安全、化学工業材料の分析まで、非常に幅広い分野、用途で使用されるようになった。本解説ではまず Orbitrap 開発の歴史を紹介したのち、アナライザーとして高い完成度に至った現在の Orbitrap の動作原理を解説する。最後に更なる最新研究のひとつを紹介する。

1 オービトラップ質量分析計の歴史

Orbitrap の原理は意外にも1923年にまで遡り、Orbitrap の学術名称にもなっている Kingdon によってイオンストレージデバイス Kingdon Trap¹⁾として開発さ

れた。このデバイスは、両端を閉じた金属筒の中心にワイヤー電極を配置した単純な構造で、運動エネルギーを持ったイオンをデバイス内に入射したとき、そのイオンの持つ電荷とは反対の電位をワイヤー電極に印加することで、イオンをデバイス内にトラップすることができた。このときのイオンの運動は、ワイヤー電極を周回する回転運動と筒の軸方向の振幅運動で表すことができ、運動エネルギーが一定の場合にはイオンの質量と回転、振動運動の周波数には相関があることが方程式とともに示された。しかし、この Kingdon Trap の単純な構造ではイオンの回転運動と振幅運動間のエネルギー移動が連続的に発生し、回転、振動運動それぞれの周波数が常に変動し続けるために、質量分析計としての利用には課題が残っていた。

Orbitrap の開発者である Alexander Makarov (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) は電極

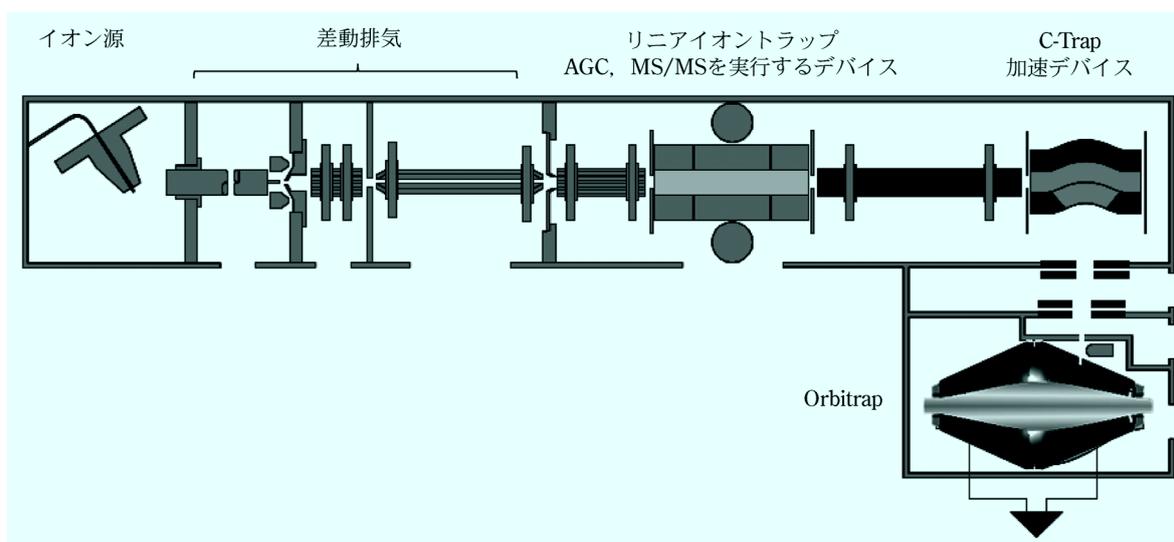


図1 上市 (2005年) 当時の Orbitrap システムの概略 (Thermo Fisher Scientific の許可を得て転載)

の配置（構造）と軌道の関係から、振幅運動の周波数が一定となる解を導き、1999年、ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics でプロトタイプの実験データとともに発表し、翌年に論文として報告した²⁾。これが現在の Orbitrap の原型となっている。Orbitrap をイオンストレージデバイスとしてではなく、質量分析計として利用するためにはイオンの運動によって電極に生じる誘導電流の周波数を正確に計測する必要があり、コヒーレントな状態である必要がある。1999年当時は MALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化）法によって試料をパルス状にイオン化させて Orbitrap にイオンを導入することで位相を揃えていた。しかし、MALDI 法は分析用途に限られてしまうため、エレクトロスプレーイオン化（ESI 法）など連続的にイオンを生成するイオン化法と組み合わせるための研究がイオンをパケット化して Orbitrap に導入するデバイスの開発として進められ、C-Trap が考案された。C-Trap は連続的に装置に導入される試料イオンをいったんトラップし、非常に短時間のイオンパケットとして Orbitrap にイオンを導入するデバイスである。この開発により ESI 法などが使用できるようになり、液体クロマトグラフ（LC）を接続して LC-MS として運用できるなど利便性が大幅に向上した。しかし、Orbitrap が持つ高い質量分解能や質量確度を常に維持するにはさらに課題があり、それはイオンによる空間電荷の影響であった。Orbitrap はイオンを小さな空間内で運動させるため、必然的にイオンによる空間電荷の影響（Space-Charge Effects）をうけて質量分解能や質量確度、分析精度などの性能低下が起こる。空間電荷の影響はイオン量によって異なるので、LC-MS として使用した場合には、時々刻々と性能が変化することになり安定した結果が得られない。これに対し、プロトタイプの段階で Electrodynamic squeezing（後述）という仕組みによってこの影響を軽減したが、さらにイオントラップ質量分析計で実績を上げていたイオン量制御機能（AGC：Auto Gain Control）を組み込むことで大きく改善がなされた。AGC は試料濃度にかかわらず Orbitrap に導入されるイオン量を常に一定にする機能であり、接続したクロマトグラムの全時間において安定した分析が可能となった。このように、複数の課題を解決することで、2005年、リニアイオントラップと Orbitrap のハイブリッドシステム（図1）が初めて上市された。リニアイオントラップは AGC 機能を担うだけでなく、多段階 MS/MS（MSⁿ）機能も有していたことから、多くの研究者、特にプロテオミクス研究の分野で活用された。後にリニアイオントラップを搭載しない装置が開発され、AGC 機能は C-Trap で実行されるようになった。研究者からの要求は高感度、高分解能、定量性、複数の開裂手法の利用など多岐にわたり、現在も開発が進められているが、特に分

解能については超高電場 Orbitrap や Enhanced-FT などの開発によって、質量分解能として6万（2005年当時）から現在では50万に性能向上が図られている。本誌では、これらのキーテクノロジーについて解説する。

2 Orbitrap 質量分析計の原理と仕組み

Orbitrap はイオンの誘導電流を周波数として記録するデバイスを指す用語である。この Orbitrap を質量分析計として用いるには、誘導電流の位相を揃えるために C-trap と組み合わせる必要がある。市販されている装置は、イオントラップや四重極など様々なデバイスがハイブリッド化されているが、すべての装置に C-trap と Orbitrap が必ずセットで組み込まれている。この節では、Orbitrap 質量分析計として動作させるための C-Trap, Orbitrap について解説する。

2.1 Orbitrap の検出原理

Orbitrap は中心電極と二つの碗状電極から構成され、碗状電極を中心電極の左右からかぶせたような配置になっている（図2）。二つの碗状電極は絶縁体によって電氣的に絶縁されており、それぞれからリード線でアンプ、そして A/D コンバータへと接続されている。

中心電極は、測定するイオン電荷とは逆の電位（正イオンを分析するときは負電位、負イオンを分析するときは正電位）が印加されている。C-trap からパケット状に加速されたイオンを碗状電極の縁に開けられた穴から Orbitrap 内に入射すると、中心電極の電位によってさらに加速され、中心電極の周回運動を開始する。この運動は中心電極の周りの回転運動速度 $\{\omega_\phi$, 式(1)}, 軌道半径 r の振動速度 $\{\omega_r$, 式(2)}, 中心電極の軸方向の振動運動速度 $\{\omega$, 式(3)} の三つで表すことができる。

$$\omega_\phi = \omega \sqrt{\frac{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 1}{2}} \dots\dots\dots(1)$$

$$\omega_r = \omega \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 2} \dots\dots\dots(2)$$

$$\omega = \sqrt{\frac{e}{(m/z)} \cdot k} \dots\dots\dots(3)$$

このとき、 R は入射したときの初期軌道半径、 R_m はイオンの現在の軌道半径、 k は現在の軌道における像面湾曲係数である。Orbitrap の特殊な形状により、軸方向の振動運動速度 (ω) は軌道半径 R_m の変数ではなくなり、 m/z のみの変数となる。イオンの振動運動は碗状電極に誘導電流を生じるので、その電流の周波数 f ($f = \omega / 2\pi$) を記録することで m/z に関する情報を得ることができる。 ω_ϕ や ω_r の運動は電極が碗状をしているので、信号として記録されない。式(3)から ω は m/z が

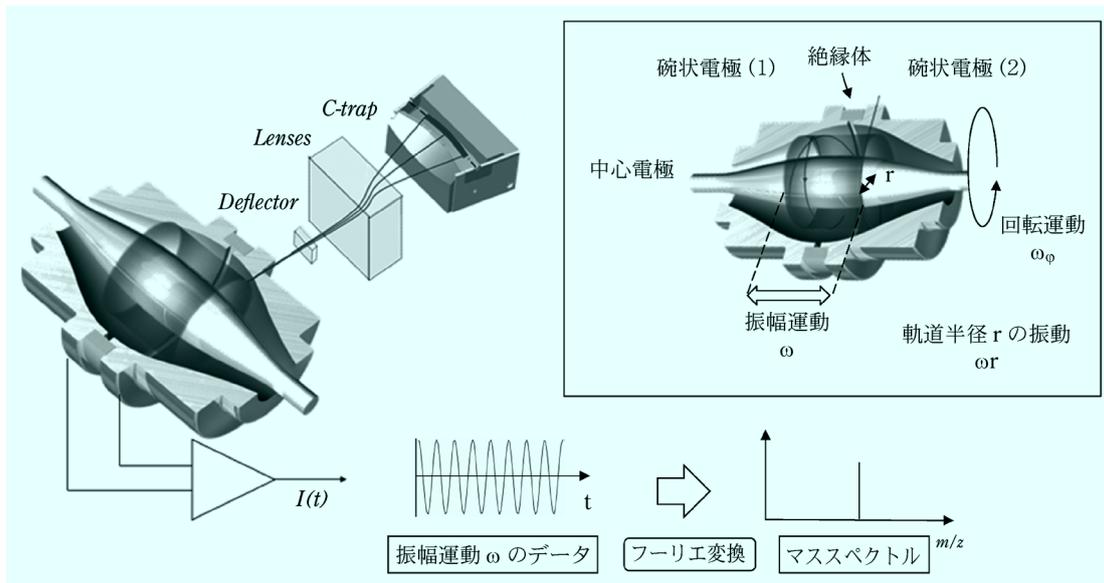


図2 Orbitrapの形状と検出原理 (Thermo Fisher Scientificの許可を得て転載)

小さいほど大きな数値、すなわち高い周波数となることが分かる。この質量分析計は飛行時間型質量分析計 (TOF-MS : time-of-flight mass spectrometer) の類似として説明すると分かりやすい。TOF-MSは全てのイオンを一定のエネルギー (E) で加速し、一定距離 (フライトチューブの長さ) を飛行して検出器へ到達した時間を計測している。エネルギー保存則 $E=mv^2/2$ の公式から、 m が小さい、すなわち m/z が小さいイオンほど速く飛行している。Orbitrapの場合も、すべてのイオンは一定のエネルギーで加速されているので m/z が小さいイオンほど速く飛行していることになり、振動運動も速く、高い周波数で記録される、ということである。

TOF-MSはフライトチューブを長くすればするほど到達時間に差が生じるので質量分解能が高くなるという特徴があるが、装置の大きさから物理的制限が生じるので、市販されている装置のフライトチューブは一般的に数m以内である。Orbitrapはイオンを回転、振動運動させることでより長い距離を飛行させることになり、より高い質量分解能を得ることができる。運動会の競技に例えると、TOFは直線の50m走で、Orbitrapはトラックを何週も走る長距離走と言える。たとえば質量差の小さい二つのイオンがあった場合、振幅運動を1往復しただけでは質量分離できなかったとしても、10往復、20往復しているうちに徐々に差が広がり、二つのイオンを分離できるようになる。上市当時のOrbitrapは加速電圧が3.5kVであったので、 m/z 500の1価イオン ($1.602 \times 10^{-19}C$) を例として計算すると飛行速度は約37km/sとなる。この運動は誘導電流として記録されない回転運動も含まれており、実際に記録される振動運動の速度はその3割程度の12km/s程度である。LC-MSとして十分なデータポイントが確保できる0.1

秒間の信号を記録したとしても、1.2kmの飛行距離があることになる。

2.2 C-trapの仕組み

C-trapは湾曲させた四重極の両端にエンドキャップレンズを配置した構造をしており、内部には窒素ガスが導入されている。イオンを貯留する間は、一般的な四重極と同様に高周波 (RF) 電圧が印加され、Orbitrapに導入するイオンの貯留と冷却 (初期運動エネルギーの分布をできる限り小さくするための動作)、Orbitrapへのパケットの射出の機能を担っている。内部にはイオンの冷却に使用する窒素ガスが導入されており、このガスは同時に衝突誘起開裂 (CID) の場合にも利用される。四重極両端に設置されたエンドキャップレンズによりイオンをC-trap内にトラップしている。イオンが規定量に達するまでイオンを溜め続け、規定値に達したときに四重極のRF電圧の印加を停止し、四重極ロッドに直流電圧を印加することでOrbitrap方向にイオンが射出する。射出されたイオンは複数のレンズを経由してOrbitrapに移送される。C-trapの湾曲した電極構造はイオンを小さなパケットとして収束させるためであり、このパケットの大きさが質量分解能に影響する。C-trapは電子移動解離 (ETD) 法を用いる際の反応場としても利用されるほか、質量校正用の内標準物質を混合する場合としても用いられる。

2.3 Electrodynamic squeezingの仕組み

Electrodynamic squeezingとはイオンがOrbitrapに入ったタイミングと同期して中心電極の電圧をゆっくりと上げる仕組みのことである。Orbitrap内に質量が異なる複数のイオンがある場合、それぞれのイオン電荷が

空間電化効果により干渉し、周波数のずれを引き起こし、結果的に質量分解能や質量確度、分析精度の低下として現れる。イオンの入射前は中心電極の電圧を低く設定し、入射と同時にゆっくりと上げることによって、低質量のイオンの r を小さく、高質量イオンの r を大きくし、軌道を少しでも遠ざけることでイオン同士の干渉を最低限に抑えることができる。通常、数十 μs 程度の時間を掛けて電圧を上げている。

2.4 Auto Gain Control (AGC) の仕組み

AGC は、Orbitrap の開発当時、すでにイオントラップ質量分析計で実績を上げていた機能である。イオントラップはトラップ内のイオン量が多くなるとイオンの空間電荷によって質量分解能、質量確度が低下する。これを回避するためにはトラップ内のイオンの総量が常に一定となるように調節する必要があるが、液体クロマトグラフなどを接続して分析する場合には装置に入ってくるイオン量が常に変動し、調節は困難である。そこで、分析データを計測する直前にイオン量を計測するためだけの短時間の測定を実行し、適切なイオン量となる時間 (Ion Injection Time) をリアルタイムに計算、調節しながら分析する機能である。この AGC 機能を Orbitrap にも組み込み、Orbitrap の質量分解能、質量確度、精度を保障している。上市当初の装置は前段にリニアイオントラップ、後段に Orbitrap のハイブリッドシステムであったので、プリスキャンはリニアイオントラップの検出器を用いて実行された (図 2 参照)。後に上市される Orbitrap シングル質量分析計や、四重極とのハイブリッドシステムではイオンを計測するための専用の検出器を搭載し、イオン量を計測している。

2.5 Enhanced FT の仕組み (2011 年～)

この機能は 2011 年以降に上市された装置に搭載されている機能である。Orbitrap は記録された信号をフーリエ変換によって処理しており、記録されたデータ長に比例して分解能が向上する。一般的に周波数成分の信号をフーリエ変換によって処理するときは周波数成分の始点は定義できないため、 \cos 波と \sin 波の合成波として処理される。結果として記録された信号の半分が実数、半分が虚数に費やされ、解析データとして使用しているのは、この実数部分だけである。Enhanced FT は Orbitrap 内でイオンが周回運動を開始する始点を定義し、 \cos 波として処理を実行することで、記録した信号の大半を実数部分の計算に利用するための機能である。これには C-Trap からのイオン射出と Orbitrap の Electrodynamic squeezing の開始時間、信号記録開始時間を高い精度で同期させる必要があった。この機能の採用によって同じ信号記録時間でほぼ倍の質量分解能となった。

2.6 高電場、超高電場 Orbitrap の開発 (2011 年～)

2.1, 2.5 で解説したとおり、Orbitrap はフーリエ変換質量分析計の特徴を有しており、その分解能は記録された信号の情報量に依存して向上する。信号記録時間を長くすることは情報量を増やす方法の一つであるが、同じ記録時間であっても高い周波数で Orbitrap を動作させることで分解能は向上させることができる。このためには二つの方法があり、加速電圧を高くするか、Orbitrap を小さくするか、である。加速電圧は上市当時の 3.5 kV から現在は 5 kV と高くなり、Orbitrap の直径は 30 mm から 20 mm へと小型化された。2011 年以降、これらのどちらか、または両方の改良が加えられ、質量分解能が向上した。

2.7 Orbitrap の定量性の向上 (2011 年～)

Orbitrap が上市された当時、その用途の多くは定性分析であり、定量分析の主流はトリプル四重極質量分析計による選択反応モニタリング (SRM: Selected Reaction Monitoring) 法であった。SRM 法は MS/MS (mass spectrometry/mass spectrometry) 法を応用した分析法であり、定量分析において高い選択性が得られることが実証されているが、事前にプリカーサーイオンやプロダクトイオン、コリジョンエネルギーの条件設定が必要であるため、操作が複雑であるほか、事前に条件設定していない試料成分の情報が全く得られない。そこで、事前に定量分析の対象成分が定まっていないプロテオミクスやメタボロミクスなど差異解析が主となる分析で Orbitrap の高い質量分解能を利用して、MS/MS 法を用いずにイオンの信号強度だけで定量分析、差異解析を行う検討がなされた。有用な結果が得られることがわかり、研究が進むにつれてより高い定量性が求められるようになったため、誘導電流を記録している A/D コンバータを 14 bit から 16 bit とし、信号強度をより正確に検出できるよう改良を行った。

3 最新の Orbitrap 機器と応用分析事例

2011 年以降に開発された技術を取り入れた最新の超高電場 Orbitrap は、分解能は 50 万 (信号記録時間 1 秒) という高い分解能で、質量差 0.0018 Da のイオンをベースライン分離する能力がある (図 3)。

しかし、Orbitrap は質量分析部であって、プロテオミクスなどのアプリケーションで要求される様々な開裂手法を行うには別のデバイスを接続する必要がある。図 4 は Orbitrap に MS/MS 実行時のプリカーサーイオン選択を担う四重極、イオンを開裂させる HCD (Higher energy collisional dissociation) コリジョンセル、CID (Collision Induced Dissociation) による多段階 MS/MS の実行と電子移動解離 (ETD: Electron Transfer Dissociation) を行うデュアルリニアイオントラップを接続

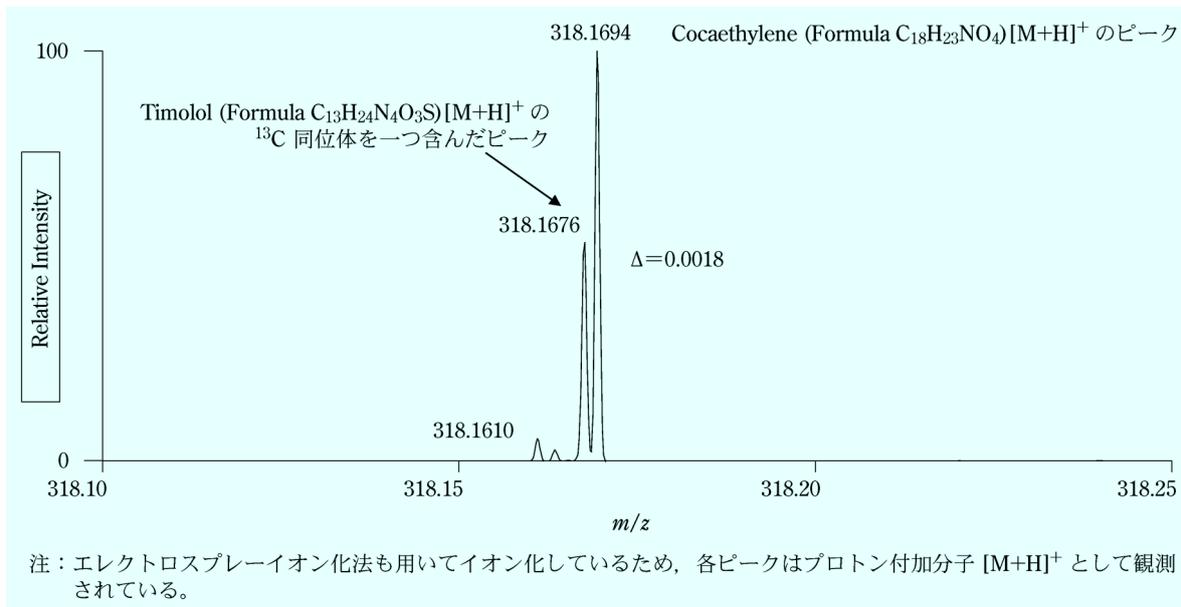


図3 分解能 50 万のスペクトルの一例

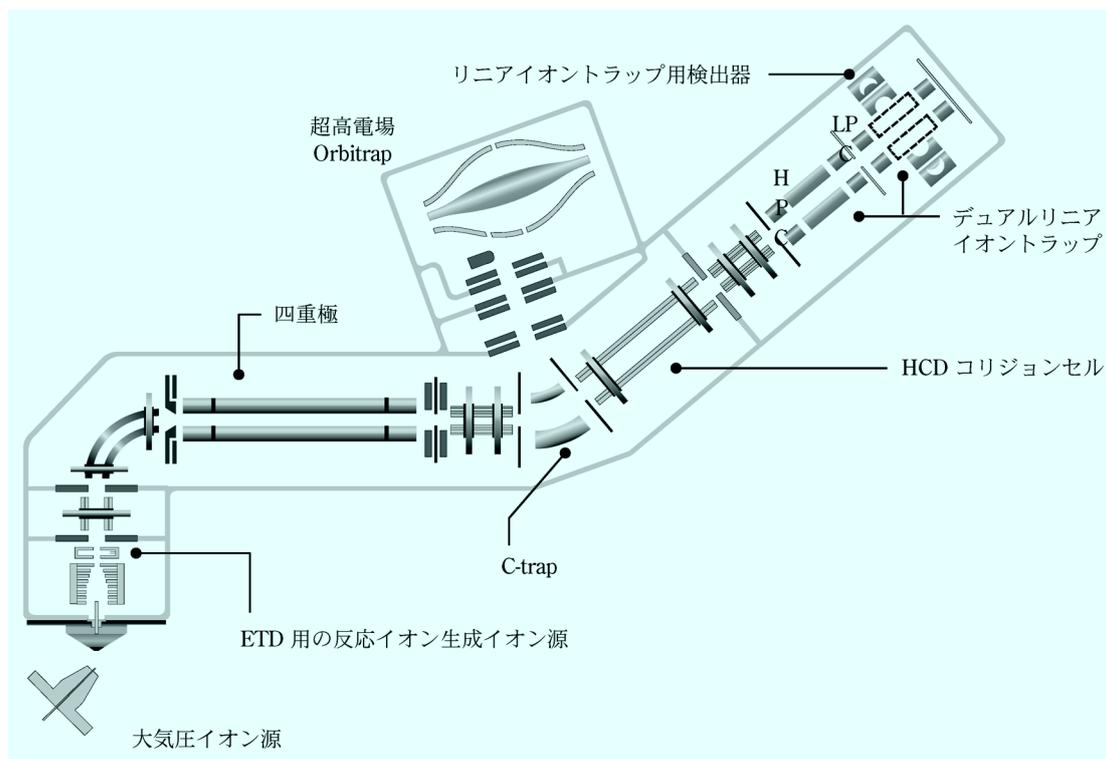


図4 最新の Orbitrap の装置概略 (Thermo Fisher Scientific の許可を得て転載)

した装置である。HCD コリジョンセルは開裂時に低質量側のカットオフがない四重極型コリジョンセルで、多くの情報が含まれる MS/MS スペクトルが得られる特徴を持つ。デュアルリニアイオントラップで行う CID はプリカーサーイオンの 1/4 以下のイオンがトラップできないカットオフがあるが、多段階の MS/MS を実行できるため、化合物の詳細は構造解析に適した手法である。ETD は分子量の大きなタンパク質を切断できる

ほか、リン酸化ペプチドや糖ペプチドなどの翻訳後修飾位置の同定に適した手法である。最先端研究では、これら複数の開裂手法の特徴を使い分けながら、研究が進められている。

3.1 応用分析事例

Orbitrap は質量分析計の中では新しい検出器であり、これまで生化学を中心に多くの研究者に利用されて

きた。本稿では今後の展望として、Christell Briois らによる Orbitrap 質量分析計を用いたユニークで画期的な研究を展望として紹介する⁴⁾。彼らが行ったのは Orbitrap を宇宙探査機に搭載し、レーザーアブレーションオービトラップ質量分析法を用いて、宇宙で試料採取後、その場で速やかに分析及び解析を行うという研究方法である。分析内容は惑星の年代などの指標となる同位体比分析と有機物同定である。例えば地球上では、隕石や地質上のジルコニウムの同位体をレーザーアブレーションマルチコレクター誘導結合プラズマ質量分析計などを用いて精度よく同位体比分析を行い、地質の年代決定や推定を行う研究が数多く報告されている。使用されている質量分析計は、低質量元素（リチウム）から高質量元素（ウラン）までほとんどの無機元素の同位体比分析に極めて高精度な結果をもたらすが、装置自体も大型で現実的に宇宙探査機に搭載するのは難しい。一方、Orbitrap 自体の重量は 200 g 前後であり、実際の装置はおおよそ 2 kg ほどの重量にしかならないうえ、その分解能により元素の同位体だけでなく“複雑な有機化合物の分離が可能”という点において優れた手法といえる。

更に、産学連携で“Cosmorbitrap”というプロジェクト名で 2009 年に発足した驚きの試みがある。プロジェクトの目的の一つは、地上のテスト機と宇宙探査機に設置された小型の分析計が同等の分析性能を発揮するか否かを検討するものである。プロジェクトの報告⁵⁾では、レーザーアブレーションオービトラップ質量分析法において、主要な元素や有機分子が分解能 120000 以上で質量分離して観測され、質量誤差は 3.2 ppm 以内であった。また、同位体比分析の精度は 1.0 % (2σ) と良好な定量結果が得られた。このプロジェクトの目標は主に火星表面の微粉塵などの分析である。多くの惑星の中で、火星が研究対象惑星となった理由としては、火星表面は、数 m に及ぶ厚さの微粉塵で覆われており、その試料のジルコニウムなどの同位体比分析や有機化合物を同定し解析することで、時代別の環境や地形を研究する有力な情報を得ることができる。探査機に分析計を搭載せず、試料を持ち帰る方法もあるが、火星までの往復には数年が必要であり、もし追加の分析が必要な場合に分析

計が現地にあれば速やかに対応できる。

Cosmorbitrap のプロジェクトでは今後、無人での円滑操作と完全オートメーションはもとより、さらなる小型化、測定時間の短縮、更なるダイナミックレンジの改良が検討される。この研究は参考文献において表記してあるので、ぜひ目を通していただきたい。

謝辞 本稿の翻訳作業に協力頂いた窪田雅之氏（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）に感謝する。

文 献

- 1) K. H. Kingdon : *Phys. Rev.*, **21**, 408 (1923).
- 2) A. Makarov : *Anal. Chem.*, **72** 1156 (2000).
- 3) M. Scigelova, A. A. Makarov : “*Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry in Encyclopedia of Analytical Chemistry*”, (2006), (John Wiley & Sons, Ltd., New York).
- 4) C. Briois, et al. : *Planetary and Space Sci.*, **131**, 33 (2016).
- 5) R. Arevalo, et al. : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **32**, 1875 (2018).

ムーリング トーマス

(Thomas MÖHRING)



Thermo Fisher Scientific Bremen GmbH,
サーモ フィッシャー サイエンティフィック株式会社 ドイツ ブレーメン (Hanna-Kunath str 11, 28199 Bremen, Germany ハンナクナート 11, ブレーメン, 28199, ドイツ)。Institute for Chemistry and Biology of the Marine Environment (ICBM).
Dr: Organic Geochemistry/Analytical Chemistry。《現在の研究テーマ》臭素化残留有機化学物質による環境汚染の原因と経路の解明等。《趣味》トライアスロン、家族との時間。

E-mail : thomas.moehring@thermofisher.com

ヴィンセント 知子 (Tomoko Vincent)



Thermo Fisher Scientific Bremen GmbH,
サーモ フィッシャー サイエンティフィック株式会社 ドイツ ブレーメン (Hanna-Kunath str 11, 28199 Bremen, Germany)。《現在の研究テーマ》ICP-MS を用いた半導体および高純度試薬中の超微量元素の分析手法とハードウェアの開発。

E-mail : tomoko.vincent@thermofisher.com