

# 質 量 分 析

吉 野 健 一

## 1 はじめに

入門講座「分析機器の正しい使い方」は、本誌2017年1月号連載開始時の紹介に記されているように、測定原理を理解しなくても装置を使用できる「装置のブラックボックス化」が進んでいる中で、装置の使い分けや正確な測定値を得るために必要な基礎知識、適切な試料前処理法などを分析機器・測定分野別に解説するための連載企画である。今回の測定分野である「質量分析」においても、質量分析計の性能や制御解析用ソフトウェアの向上に伴い、優れたマスペクトルを容易に得ることが可能になった。しかし、電気的に中性の分子に電荷を持たせるイオン化のプロセスを避けられない質量分析では、いくら質量分解能が高い質量分析計を用いて測定したとしても、イオン化されない分子の質量を測定することはできない。優れた分析結果を得るために最も大切なことは、試料中の分子がイオン源で“気持ちよく”イオン化する状態の試料を質量分析計に導入することである。イオン化された場合でも、試料中のすべての分子が同じプロセスでイオン化されるわけではないので、マスペクトルに表示される数値を均等に扱うことができない。測定したマスペクトルから正確な測定値を得るためには、イオンの種類や価数を判断し、同位体の存在や $m/z$ と質量の違いを正確に理解することが求められる。本講座ではこれらの点に焦点を絞り、初学者向けに解説する。

## 2 試料の前処理

質量分析は、試料中の分子をイオン化し、イオンの質量と電荷に基づいて分離し検出する分析法である。電気的に中性の分子に電荷を持たせて気相のイオンを生成させる装置がイオン源であるが、イオン源に導入された試料中のすべての分子がイオン化されるわけではない。イオン化効率は分子の性質やイオン化の条件によって異なり、試料中に複数種の分子が混在している場合、イオン化効率が低い分子や存在量の少ない分子のイオン化が阻

害される。イオン化されにくい分子をイオン化させるために、たとえばエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization : ESI) であればスプレー電圧やキャピラリー電圧 (装置によって呼称が異なる) を大幅に上げる操作や、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption ionization : MALDI) であれば照射するレーザーの強度を大幅に増加させる操作を行っても、結果が向上することはほとんどない<sup>1)</sup>。

イオン化効率の低い分子や微量成分を安定的にイオン化させるためには、試料分子の濃度を上げることに加え試料分子以外の塩類や夾雑成分 (マトリックス) を除去することが求められる。そのためにはイオン源導入前に試料の前処理を施すことが必要となる。質量分析では試料分子がイオン化されなければ、事実上、試料中に存在しない場合と同じ結果になる。試料の前処理は分析の成否に大きく影響する。

試料に含まれる化合物の種類が多い場合、一度の分析でより多くの成分を検出するためには、液体クロマトグラフィー (liquid chromatography : LC) 等の各種クロマトグラフィーを利用してイオン源に導入する前に質量分離とは異なる分離原理で試料をあらかじめ分離することが望ましい。たとえば、多数のペプチド成分が含まれるプロテオミクス用の試料では、微量成分やイオン化効率が低いペプチドにとって大量に存在する他のペプチド成分がイオン化を阻害する夾雑物となる。LCを利用して同時にイオン源に導入されるペプチドの種類を減少させることによって検出できるペプチドの種類の総数が増大する。また前処理で除去しきれなかった夾雑成分 (マトリックス) の影響を減少させる効果もある。

試料分子のイオン化はイオン源における試料分子の絶対量ではなく濃度に影響されることから、LCを利用する場合は可能な限り細い流路系で内径の小さなカラムを用いて分離を行ったほうが微量成分の検出が可能になる。試料の損失に対しても配慮が必要となるので、カラムへの吸着による損失をより少なくするためにもレジジ量の少ないカラムを用いることが望ましい。

Appropriate Usage of Analytical Instruments—Mass Spectrometry.

### 3 試料導入量

ほとんどの分析機器と同様、質量分析計にも分析に供する試料量には適量がある。適した試料量は、試料導入方法、イオン化法、質量分離の方法、また試料の化学的性質によって異なるので、一般論として適量を述べることはできないが、適量を超えた試料量を導入した場合、まともな測定結果が得られないだけでなく、イオン源や装置内部を汚染させ、以後の分析に支障をきたすおそれがある。最悪のケースでは真空を解除して装置内部の洗浄が必要になる場合もある。クロマトグラフィーを用いて試料を導入した場合、著しいキャリーオーバーに悩まされることになる。

装置や化合物に応じた適量は、それぞれの分析の現場で経験的にわかっているため、初学者の場合は経験者から適量を学ぶことが必要である。適量が不明な場合は、希釈シリーズを用意し、少量の試料から分析を試み、適切なイオン量が検出できるまで段階的に量を増やし分析を試みる。イオン化が困難な化合物もあるので測定例を文献等で事前に調べることも大切である<sup>1)</sup>。

### 4 質量校正

正確な測定値を得るためには測定前にあらかじめ質量が既知の校正用化合物を測定して質量校正を行う必要がある。校正用化合物はイオン化法や装置によって異なるが、各装置には常時使用している校正用化合物があるので、それを適量用いて校正作業を行う。手順どおりに進めたつもりでも質量校正が正しく行われていないこともあるので、作業後に同じ試料を用いて通常の測定を行い、正しい測定値が得られることを確認することが望ましい。筆者はこの後さらに校正用化合物とは異なる既知試料を測定し、分析システムに問題がないことを確認している。クロマトグラフィーを用いて試料導入を行う場合は、質量分析計以外の分析機器の状態も測定結果に影響することから、分析システム全体が順調に稼働していることの確認も兼ねている。たとえば、ペプチドを分析する場合は、ウシ血清アルブミンのトリプシン消化物を分析し、ペプチドの分離状態や保持時間、イオン強度等を確認してから未知試料の分析を始めている。未知試料の測定結果になんらかの不具合があった場合、問題が試料にあるのか、分析システムにあるのかを明確にさせるため、筆者はこの作業を測定終了直前にも実施している。

### 5 マススペクトルから正確な測定値を知るための基礎知識

#### 5.1 マススペクトルに表示された数値≠測定質量

正確な測定値を得るために最も重要なことは、測定結果であるマススペクトルを正しく理解することである。質量分析では電子天秤とは異なりマススペクトルに表示

された数値がそのまま試料分子の質量の測定値にはならない。同じ分子に由来するイオンでも、イオンの種類や価数が異なれば測定値として得られる  $m/z$  の値が異なるため、イオンの種類と価数を判断し、観測された  $m/z$  の値から測定質量を換算しなければならない。近年はデータベース検索ソフト等で処理した二次的なデータから測定結果を判断する頻度が高くなった。取得した大量のマススペクトルすべてを確認する必要はないが、重要な結論につながるデータに関しては一次的な生データであるマススペクトルに戻ってソフトウェアが導き出した結果を確認することが望ましい。

#### 5.2 $m/z$

質量分析の一次的な測定結果であるマススペクトルの横軸から直接読み取ることのできる測定値は  $m/z$  (エム・オーバー・ズィー) である。 $m/z$  は「イオンの質量を統一原子質量単位 (=ダルトン) で割って得られた無次元量をさらにイオンの電荷数の絶対値で割って得られる無次元量」と定義されている<sup>2)~4)</sup>。質量は kg や Da, u などの単位を有する有次元の物理量であるのに対し、 $m/z$  は単位表記が必要ない無次元の物理量である。質量分析ではマススペクトルに表示される無次元量の  $m/z$  の値から、Da もしくは u の単位を有する有次元の質量の値に換算する。

あるメーカーのソフトウェアはマススペクトルの横軸ラベルに“Mass ( $m/z$ )”と表記し  $m/z$  を質量の単位のように扱っている。しかし  $m/z$  は物理量の名称であり単位ではない。また  $m/z$  は質量電荷比 (mass-to-charge ratio) の記号だと信じられているが、電荷と電荷数の定義は異なるので“ $m/z$ =質量電荷比”は誤った固定概念である<sup>5)~7)</sup>。したがって“mass/charge”の横軸ラベルも誤記である。

マススペクトル (質量スペクトル) と称されるが、原則としてマススペクトルの横軸の数値は  $m/z$  の値で、質量ではない。ただし、価数の異なる複数の多価イオンピークとして検出された生体高分子の ESI マススペクトルから分子 (中性種) の質量に変換したデコンボリューションマススペクトルの場合は横軸の数値は質量である。“ $m/z$ , Da”と表記するソフトウェアもあるがこれも誤記である。Da は不要で、マススペクトルに表示された数値に Da をつければ必ず測定質量になるわけではない。

質量分析で得られた数値を表す際、 $m/z$ 、質量 (mass)、質量数 (mass number)、質量電荷比 (mass-to-charge ratio)、分子量 (molecular weight) の用語が用いられる。しかし、この 5 種類の用語は同義語ではなく、同じ化合物の質量、 $m/z$ 、質量数、分子量、質量電荷比の数値は必ずしも同じではない。質量分析の結果を説明する際に質量数、質量電荷比、分子量の用語が用いられる場合、その多くは誤用である<sup>5)~12)</sup>。質量分

析計に備わったソフトウェア自体に誤用があり紛らわしいが、分析結果を正確に伝えるためには、測定値の正確さとともに用語の正確さも必要である。

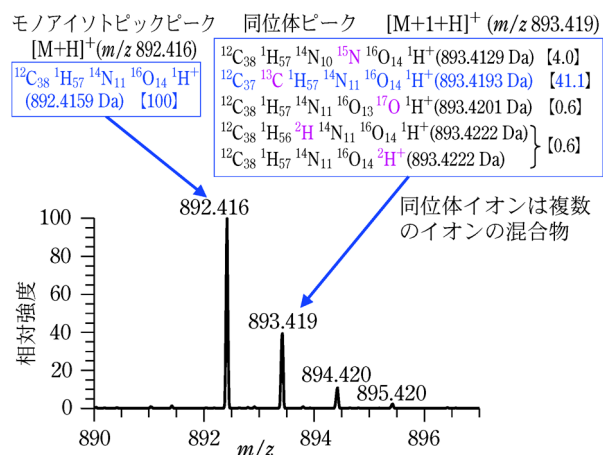
### 5.3 モノアイソトピック質量

質量は一つ一つの分子が有する固有の物理量である。有機化合物を構成する主たる元素 C, H, N, O には質量が異なる同位体が存在する。質量分析では一つ一つのイオンの質量に基づいて分離されるので、同じ組成式をもつ化合物であっても同位体組成の異なる分子が含まれており、試薬瓶から取り出した純度 100 % の有機化合物を測定しても同位体組成の異なる分子に由来する複数のイオンピークがマスペクトル上に観測される。

それぞれのピークから測定値が得られるが、通常は最も低質量側のモノアイソトピックピークと呼ばれるピークの測定値が利用される (図 1)。この測定値 (実験値) と比較する計算値は、各元素において天然存在度が最大の同位体の質量を用いて計算したモノアイソトピック質量であり、分子量 (相対分子質量) ではない。C, H, N, O の場合、天然存在比が最大の同位体は、各元素の最も低質量の安定同位体である  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  なので、これらの同位体のみで構成される分子に由来するイオンが最も低質量側のピークとして観測される。

### 5.4 同位体ピークは混合物

C, H, N, O から構成される分子を測定した場合、モノアイソトピックピークの高質量側にもピークが観測される。1 価イオンの場合モノアイソトピックピークから  $m/z$  が約 1 大きな位置に、2 価イオンであれば約 0.5 大きな位置に観測されるピーク ( $M+1$ ) は C 原子の一つが  $^{13}\text{C}$  である分子、H 原子の一つが  $^2\text{H}$  である分子、N



フーリエ変換オービトラップ質量分析計によって測定。四角内には同位体組成に続けて、( ) 内に計算精密質量、[ ] 内にはモノアイソトピックピークの強度を 100 とした場合の相対強度 (計算値) を示した。

図 1 Spermatophyte activating peptide I (GFDLNGGGVG) の ESI マスペクトル

原子の一つが  $^{15}\text{N}$  である分子、O 原子の一つが  $^{17}\text{O}$  である分子のいずれかである (図 1)。それぞれの分子の質量は等しくないが、現在の質量分析計でこれら 4 種類の分子を分離することは難しく、分離されることなく一本のピークとして観測されている。このため、モノアイソトピックピークの測定値に対するモノアイソトピック質量のように、この同位体ピークの測定値と正確に比較できる計算値を求めることは難しい。 $^{13}\text{C}$  の同位体存在度が 1.07 % であるのに対し、 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  の存在度は 0.0115 %, 0.364 %, 0.038 %<sup>13)</sup> と小さいので、 $M+1$  のピークは C 原子の一つが  $^{13}\text{C}$  の分子の割合が高い。そのためなんらかの理由で最も低分子側のピークの測定値を利用できない場合は、同位体ピークの測定値を利用する。その場合測定値と比較する計算値は組成を明記したうえ  $^{13}\text{C}$  の同位体を含んだ計算質量を用いれば事実上問題ない。

### 5.5 質量分析では分子量を測定できない

分子量は分子を構成する各原子の原子量と原子数の積の総和である。分子量を算出するために用いる原子量は、同位体の存在度を重率としてかけた、元素を構成する各同位体の質量の加重平均値である。したがって平均値である原子量から算出される分子量も平均値である。

試料分子の質量と装置の質量分解能にも依存するが、マスペクトルに出現する各ピークの測定値は同位体組成の異なる各分子の値であり分子全体の平均値ではない。

図 2 に塩化水素の電子イオン化 (electron ionization: EI) マスペクトルを示す。塩素原子には質量が 34.969 Da と 36.966 Da の 2 種類の安定同位体が存在し、その存在度は 0.7576 と 0.2424 である<sup>13)</sup>。これらの数値から加重平均値を計算すると  $34.969 \times 0.7576 + 36.966 \times 0.2424 = 35.454$  となり、塩素の原子量は 4 桁表記で 35.45 と定義されている<sup>14)</sup>。塩化水素 (分子量 36.46) の EI マスペクトルを測定すると  $m/z$  35.98 と 37.98 にピークが観測されるが、分子量の値に相当する 36.46 の位置にピークは現れない。モノアイソトピック質量を測定していながらこれまで「質量分析によって分子量を測定する」という表現が使われてきたが誤りであ

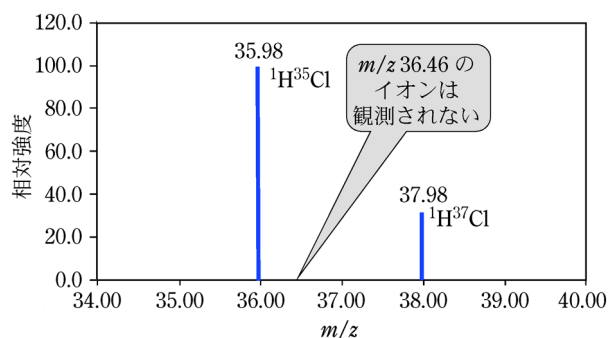


図 2 塩化水素の EI マスペクトル



る。塩素や臭素を含まない低分子有機化合物の場合、モノアイソトピック質量と分子量の値の差が小さいので有効桁数が少なかった時代には混同しても数値的な問題が生じなかった。しかし、現在では高分子有機化合物のモノアイソトピック質量をかなり正確に測定できる。その測定値と分子量を比較しても一致することはない。分子量の有効桁数を増やした数値が精密質量だと誤解されているが、有効桁数ではなく根本的な概念が異なっている。

## 5.6 具体的な測定値の表記例

図1のマスペクトルを利用して、各概念に対応した数値の表し方を具体的に説明する。

- ① このマスペクトルに表示されている各ピークの  $m/z$  の値の差は約1である。このことから観測されたイオンが1価イオンであることが分かる。
- ② ESI マスペクトルであることから、観測されたイオンを1価のプロトン付加分子  $[M+H]^+$  と考える。
- ③ モノアイソトピックピークの  $m/z$  は 892.416 である。1価イオンの場合、 $m/z$  の値と Da もしくは u の単位で表記した質量の値は数値的には同じになるが、無次元量である  $m/z$  の値として表記する場合、単位表記は必要ない。
- ④ この測定値と価数からモノアイソトピックピークとして検出されたイオンの質量の測定値は 892.416 Da である。
- ⑤ 892.416 Da はイオン（1価のプロトン付加分子）の測定質量である。試料分子の測定質量はイオンの測定質量からプロトンの質量 1.007 Da を減じることによって得る。891.409 Da が試料分子の測定質量となる。この測定値は  $^{12}\text{C}_{38} \text{ } ^1\text{H}_{57} \text{ } ^{14}\text{N}_{11} \text{ } ^{16}\text{O}_{14}$  のモノアイソトピック質量の計算値と一致する。 $\text{C}_{38} \text{H}_{57} \text{N}_{11} \text{O}_{14}$  の分子量は 891.925 であり、モノアイソトピック質量と分子量の値には 0.5 以上の差がある。精密質量のレベルで表記せずに小数点1桁目までで表記しても測定質量の数値と分子量は同じにならない。

## 5.7 イオンの種類

質量分析計で直接測定している質量は分子の質量ではなく、イオンの質量である。同じ分子からでも、イオン化法や試料調製法、溶媒等の測定条件によって異なるイオンが生じる。正イオンを測定する場合、EI では主に分子イオンが観測されるが、MALDI や ESI などのソフトイオン化法ではプロトン付加分子以外にも、ナトリウムイオン付加分子、カリウムイオン付加分子、アンモニウムイオン付加分子など、複数のカチオン付加分子が観測されることもある。同じ分子であっても付加するカチオンの種類によって、イオンの質量が異なるので、観測された  $m/z$  から分子の質量を換算する際には、観測されたイオンの種類を判別する必要がある。多価イオン

の場合には、 $[M+H^++Na^+]^{2+}$  のように異なるカチオンが付加する場合もある。ESI、大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization: APCI)、MALDI で観測されるイオン種の例や判別法については高橋、川畑による本誌の解説を参照されたい<sup>1)</sup>。

## 6 質量分解能とマスペクトル

### 6.1 質量分解能

マスペクトルの横軸  $m/z$  にしたがって出現するピークがどの程度細かく分離されたのかを示す測定結果の質を評価するための指標を質量分解度 (mass resolution) と言い、特定の質量分解度の値を得ることができる質量分析計の能力を評価するための指標を質量分解能 (mass resolving power) と言う。

質量分解能 ( $R$ ) 1000 とは  $m/z$  1000 のピークと  $m/z$  1001 のピークを分離できる能力を意味する。質量分解能 (質量分解度) の定義方法は2種類存在する (図3)。一つは「10 % 谷による定義」で、強度が同じ2本のピークの重なった部分の谷の高さがピークの高さの10 % となるように分離できた場合、2本のピークの  $m/z$  値  $m_1$ ,  $m_2$  から質量分解能 ( $R$ ) は  $R=m_1/(m_2-m_1)$  として定義される<sup>2)~4)</sup>。この定義は主に磁場セクター型質量分析計の質量分解能を表す際に使用される。

もう一つは「半値幅 (full width of half maximum: FWHM) による定義」で、現在使用されているほとんどの質量分析計の質量分解能を表す際に使用されている。ピークの  $m/z$  の値  $m$  とピークの半分の高さにおける幅 (半値幅)  $\Delta m$  から質量分解能 ( $R$ ) は  $R=m/\Delta m$  として定義される<sup>2)~4)</sup>。質量分解能 1000 (FWHM) で同じ強度の  $m/z$  1000 と 1001 のピークを分離させた場合、ピークの半分の高さで二つのピークが重なる。 $m/z$  1000 のピークが  $m/z$  1001 のピークと完全にベースラインで分離する場合、ベースラインにおけるピークの幅は1以下でなければならない。ベースラインの幅が1のときの半値幅は0.5であり、完全にベースラインで分離させるためには  $1000/0.5=2000$  (FWHM) の質量分解能が必要となる。

リフレクトロンを備えた飛行時間型質量分析計やフーリエ変換質量分析計など質量分解能が数万を超える装置

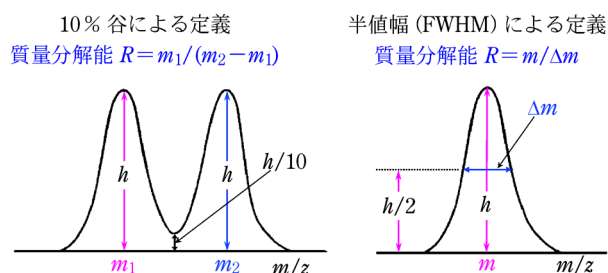


図3 質量分解能 (質量分解度) の2種類の定義方法

が高分解能質量分析計と呼ばれている。一方、四重極、三次元イオントラップ、リニアイオントラップなどの質量分析部の質量分解能は数千程度である。それでも分子量 1000 以下の化合物であれば 1 Da の質量の差は識別できることから、この程度の質量分解能は単位質量（ユニットマス）分解能と呼ばれており、事実上低分解能を意味する。

## 6・2 質量分解度の違いによるピーク分離の差

図 4 に質量分解度の違いによるピーク分離度の差を示す。分子量 2592.731 のペプチドを測定した場合、質量分解度 10000 ではベースライン上でピーク分離されており、モノアイソトピックピークの測定値  $m/z$  2592.265 を得ることができる（図 4A）。質量分解度 5000 ではベースライン上で分離されていないが、モノアイソトピックピークの測定値  $m/z$  2592.265 を得ることができる（図 4B）。しかし、数千程度の低分解度でこのペプチドを測定した場合、ピークが重なりショルダーとして表示されたり（図 4C）、一本のブロードなピークとして表示されたりする（図 4D）。このような測定結果ではモノアイソトピックピークの測定値を読み取ることはできない。

図 4D のようにピークが完全に重なってしまい、一本のブロードなピークとして表示される場合、ピークの重心の  $m/z$  値から換算する質量は平均質量である。この場合、モノアイソトピック質量ではなく平均質量の計算

値と比較し測定結果を評価する必要がある。

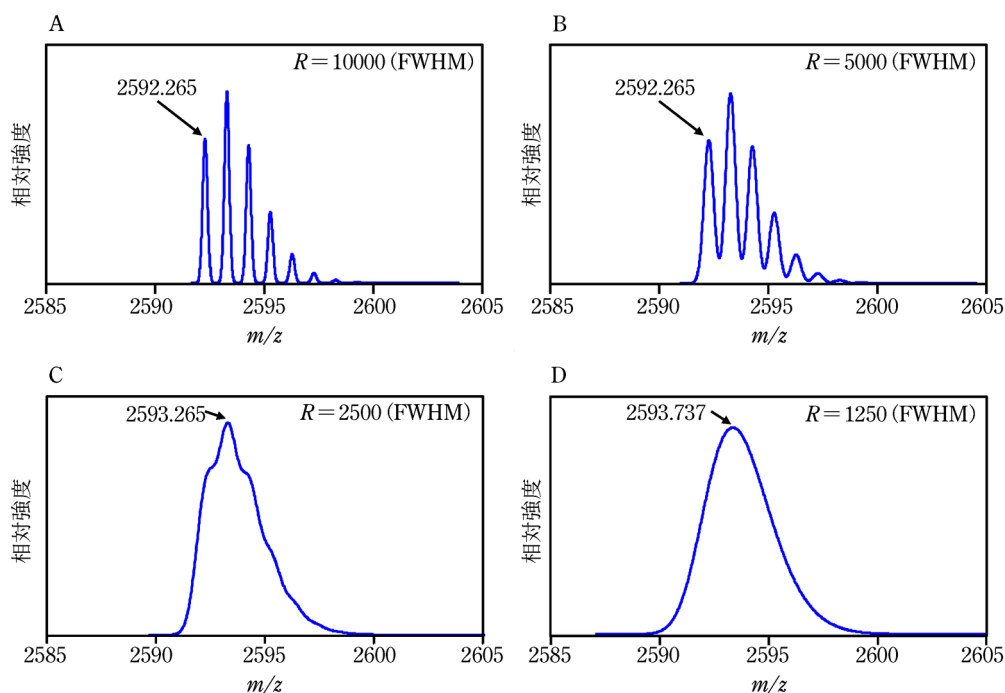
## 6・3 バーグラフ表示とプロファイル表示

測定の生データを連続的な信号としてプロットするマスペクトルをプロファイル表示マスペクトルと呼ぶ。一方、連続的な信号を定められたアルゴリズムでノーマライズしイオン強度を棒の高さとして表すマスペクトルをバーグラフ表示マスペクトルと呼ぶ（図 5）。低分解能質量分析計を用いる場合バーグラフ表示で記録するケースが多い。バーグラフ表示は、データの容量が小さく処理時間を短縮できるが、ピーク分離の情報が欠如しイオンの価数の判別ができない。そのため、表示された数値をモノアイソトピックピークの測定値として扱うことの是非を判断できないケースも多い。

## 6・4 1 価イオンの実測例

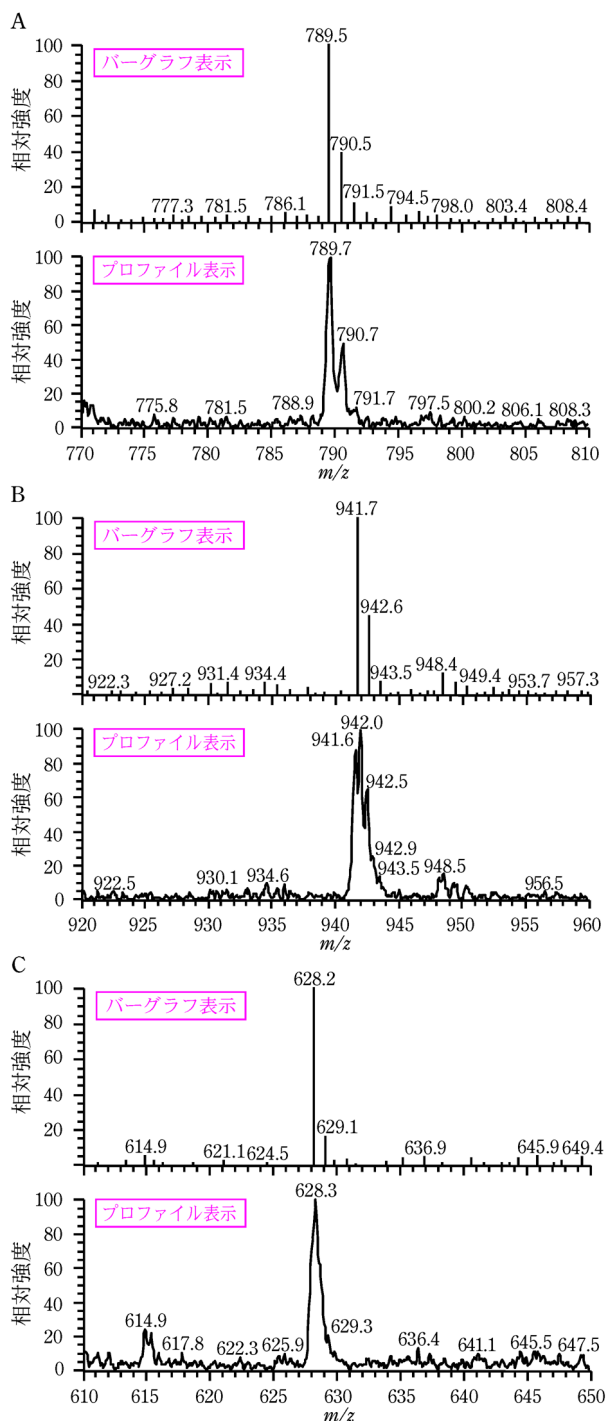
低分解能質量分析計を用いてウシ血清アルブミンのトリプシン消化物を測定した際に得られたデータを用いて上記の問題を具体的に解説する。

図 5A 下に示したプロファイル表示のマスペクトルではピーク分離も確認でき、観測されたイオンが 1 価イオンであると判断できる。バーグラフ表示とプロファイル表示で示された  $m/z$  789.5 および 789.7 の測定値から求められるこの分子の測定質量はそれぞれ 788.5 Da と 788.7 Da である。このペプチドのモノアイソトピック質量の計算値は 788.5 Da で、バーグラフ表示の測定



ヒト Regulatory-associated protein of mTOR (RPTOR\_HUMAN, Q8N122) の lysyl endopeptidase 消化断片 GVHIHQAGGSPASSTSSSLTNDVAK [元素組成  $C_{107}H_{174}N_{34}O_{41}$ ] 1 価プロトン付加分子の計算マスペクトル。  $m/z$  2592 における質量分解度として計算した。

図 4 質量分解度の差によるピーク分離の違い



(A)：アミノ酸配列 LVTDLTK [元素組成  $C_{35}H_{64}N_8O_{12}$ ]，1 価プロトン付加分子  
(B)：アミノ酸配列 RP(Carboxymethyl-C)FSALTPDETYVPK [元素組成  $C_{84}H_{128}N_{20}O_{27}S_1$ ]，2 価プロトン付加分子  
(C)：(B) と同じペプチド由来の 3 価プロトン付加分子

図 5 低分解能質量分析計によって測定したバーグラフ表示（セントロイドアクイジション）マススペクトルとプロファイル表示（プロファイルアクイジション）マススペクトルの比較（三次元イオントラップ質量分析計を用いて牛血清アルブミンのトリプシン消化物を分析した際に得られたマススペクトル）

値と一致する。プロファイル表示の測定値 789.7 Da は計算値と 0.2 Da の差で、誤差は 253 ppm である。分子量 1000 程度以下の化合物であれば、低分解能質量分析

計で取得したマススペクトルであってもピーク分離は問題なく、測定値をモノアイソトピック質量として扱うことができ、誤差もそれほど大きくない。

## 6.5 2 価イオンの実測例

図 5B、C は同じペプチドが 2 価イオン (B) 3 価イオン (C) として観測されたマススペクトルで、このペプチドのモノアイソトピック質量は 1880.9 Da、平均質量は 1882.1 Da である。

図 5B 下のプロファイル表示のマススペクトルでは同位体イオンのピーク分離を確認でき、観測されているイオンが 2 価イオンであると判断できる。2 価のプロトン付加分子と仮定すると低質量側のピークの測定値  $m/z$  941.6 から求められる分子の測定質量は 1881.2 Da となる。この測定質量は平均質量よりもモノアイソトピック質量に近似しており（誤差 159 ppm）、 $m/z$  941.6 のピークはモノアイソトピックピークであることが裏付けられる。

図 5B 上のバーグラフ表示のマススペクトルだけで価数の判断はできないが、2 価イオンとして測定値を評価する。 $m/z$  941.7 の測定値から求められる分子の測定質量 1881.4 Da は平均質量よりもモノアイソトピック質量の計算値に近い値（誤差 266 ppm）である。

## 6.6 3 価イオンの実測例

3 価イオンになるとピークが重なりプロファイル表示でも価数の判断ができなくなる（図 5C）。以下 3 価のプロトン付加分子と仮定し結果を評価する。バーグラフ表示の測定値  $m/z$  628.2、プロファイル表示の測定値  $m/z$  628.3 から得られる分子の測定質量はそれぞれ 1881.6 Da と 1881.9 Da である。いずれの測定値もモノアイソトピック質量よりも平均質量の計算値（1882.1 Da）に近い。平均質量の計算値との誤差はバーグラフ表示が -266 ppm、プロファイル表示が -159 ppm であり、1 価や 2 価イオンから得られる測定質量とモノアイソトピック質量との誤差（絶対値）と同程度であった。

## 6.7 バーグラフ表示の注意点

低分解能質量分析計を用いた測定ではバーグラフ表示のマススペクトルでデータを取得するが多いが、その場合 ESI など多価イオンが観測されるイオン化法を用いた分析ではイオンの価数を判断することはできない。イオンの  $m/z$  から測定質量を換算する場合、既知の試料であれば価数を計算できるが、未知試料の場合は複数の価数を想定する必要がある。

3 価以上の場合、得られる測定値はモノアイソトピック質量ではなく平均質量の測定値である可能性が高い。ピークリストを作成してデータベース検索を行う場合、通常測定値はモノアイソトピック質量の計算値と比較さ

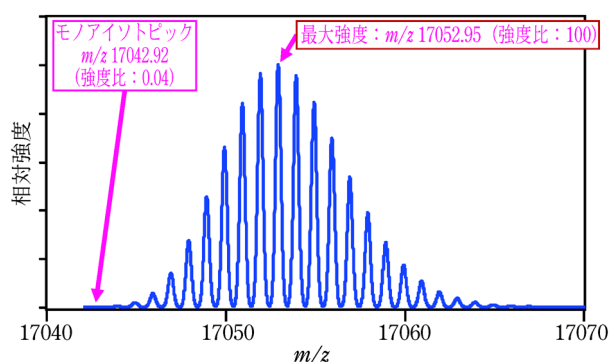
れる。低分解能質量分析計を用いた場合、測定値のピークリストにはモノアイソトピック質量と平均質量の値が混在している可能性があることを念頭に置いてほしい。低分解能質量分析計を用いた測定で測定値と計算値との誤差が大きくなる原因は、横軸  $m/z$  の正確さの低さもさることながら、ピーク分離が悪いことによって結果的に平均質量の測定値をモノアイソトピック質量の計算値と比較していることも一因となっている。

## 7 高分解度マスペクトルの問題点

ヒトミオグロビンを質量分解度 50000 (FWHM) で測定した場合のマスペクトルを図 6 に示す。分子量 17000 を超える高分子でも同位体ピークどうしがほぼベースラインレベルで分離している。質量分解度の高い優れたマスペクトルのように思えるが、実はこのデータから正確な測定値を得ることは難しい。

有機化合物の場合、分子量が大きくなればなるほど分子を構成する C 原子のすべてが  $^{12}\text{C}$  である分子の割合が減少する。ヒトミオグロビンの場合、計算上  $^{13}\text{C}$  を 10 個含んだ分子が最も多くなり、この分子由来の同位体イオンピークが最大強度となる<sup>15)</sup>。このピークの強度を 100 とした場合、モノアイソトピックピークの強度比は 0.04 に過ぎず、これを検出し、正確な  $m/z$  の値を得ることは困難である。最大強度ピークの値を読み取り、計算値と比較することも可能であるが、最大強度ピークと前後のピークの強度比の差は小さく、実測の最大強度ピークが計算上の最大強度ピークと一致しないことも多い。誤ったピークを選んだ場合、少なくとも測定質量に約 1 Da の誤差が生じる。ミオグロビンの場合 1 Da は 59 ppm の誤差に相当する。質量分解能 50000 の質量分析計でこれほど大きな誤差は生じない。

このようなケースでは、波形処理を行って同位体ピークをまとめて一本のピークとし、そのピークの重心の値を測定値とした場合のほうが正確である。ただしこの測



N 末端 Met を除いた未修飾のヒトミオグロビンの元素組成  $\text{C}_{769}\text{H}_{1216}\text{N}_{209}\text{O}_{221}\text{S}_4$  を入力、 $m/z$  1,000 における質量分解度 50,000 (FWHM) で 17 価イオンのスペクトルを計算し、1 価イオンに変換した。

図 6 ヒトミオグロビンの計算マスペクトル

定値は平均質量の値である。ESI マスペクトルの場合、さらにデコンボリューションを行うことによって価数の異なる複数のピークからより正確な測定値を求めることができる。

## 8 測定値の有効桁数

質量分析で計測された測定質量の正確さ、すなわち計算質量との一致度を mass accuracy (質量確度または質量真度) と呼ぶが、制御解析用ソフトウェアは装置の mass accuracy を考慮して  $m/z$  の数値を表記しているわけでない。たとえば、リニアイオントラップ・フーリエ変換オービトラップ質量分析計の場合、リニアイオントラップ質量分析部で測定したマスペクトルとフーリエ変換オービトラップ質量分析部で測定したマスペクトルとでは、mass accuracy が異なる。それにもかかわらず、測定値を表記する際、いずれのマスペクトルから得られたデータであってもソフトウェアが表記するとおり小数点四桁目までを測定結果として表記する初学者がいる。測定値である以上有効桁数という概念が必要であり、これを無視すると逆に不正確な値となる。四重極やリニアイオントラップ等の質量分析部で得られたマスペクトルであれば、 $m/z$  の値で小数点以下一桁目までが科学的に意味のある数値である。誤差 3 ppm のフーリエ変換オービトラップ質量分析部で得られたマスペクトルであれば、 $m/z$  800 のピークの場合、 $\pm 0.0024$  の誤差を含むので、小数点以下三桁目までが意味のある数値となる。測定に用いた質量分析計の mass accuracy を確認し、それを反映した有効桁数を用いて測定値を表すことが正確な表記方法である。

## 9 おわりに

質量分析のデータの解釈を難しくしている最大の原因は、質量分析と呼びながら現状は  $m/z$  分析であり、マスペクトルに表記された数値をそのまま試料分子の測定質量の値として表記できない点である。ソフトイオン化法が開発されたことにより質量分析の応用範囲が拡大したが、 $m/z$  から質量に換算するためにはイオンの価数や種類の判別が必要となった。質量の小さい電子だけが増減し、専ら 1 価イオンが生成する EI が主に使用され、測定値の有効桁数が少ない頃の固定概念がいまだに残っており、多くの部分で齟齬が生じている。質量分析計がスマートになった分、我々利用者もスマートにならなければならない。初学者には分かりづらい点もあるが、一つ一つの概念についての基本を理解し、整理して考えれば決して難しいことではない。本講座が、優れたマスペクトルを測定し、正確な測定値を得たいと考える初学者の一助になることを願う。



## 文 献

- 1) 高橋 豊, 川畑慎一郎: ぶんせき, **2007**, 328 (2007).
- 2) 内藤康秀, 吉野健一編: “マスマスベクトロメトリー関係用語集”, (2009), (日本質量分析学会・国際文献印刷社).
- 3) 日本分析化学会編: “分析化学用語辞典”, (2011), (オーム社).
- 4) K. K. Murray, R. K. Boyd, M. N. Eberlin, G. J. Langley, L. Li, Y. Naito: *Pure Appl. Chem.*, **85**, 1515 (2013).
- 5) 吉野健一: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 175 (2006).
- 6) 吉野健一: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 219 (2006).
- 7) 吉野健一: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 51 (2007).
- 8) 吉野健一: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 33 (2006).
- 9) 吉野健一: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **56**, 21 (2008).
- 10) 吉野健一: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **56**, 173 (2008).
- 11) 吉野健一: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **56**, 209 (2008).
- 12) 吉野健一: 生物工学, **91**, 464 (2013).
- 13) J. R. De Laeter, J. K. Böhlke, P. De Bièvre, H. Hidaka, H. S. Peiser, K. J. R. Rosman, P. D. P. Taylor: *Pure Appl. Chem.*, **75**, 683 (2003).
- 14) 日本化学会原子量専門委員会: “4 桁の原子量表 (2015)” および “元素の同位体組成表”, <http://www.chemistry.or.jp/activity/doc/atomictable2015.pdf>. (2017 年 5 月 7 日著者最終確認)
- 15) Molecular Weight Calculator (<http://www.alchemistmatt.com/mwtwin.html>), Ver. 6.50. (2017 年 5 月 7 日著者最終確認)



吉野健一 (Ken-ichi YOSHINO)

神戸大学バイオシグナル総合研究センター (〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1)。  
金沢大学大学院自然科学研究科博士後期課程修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》質量分析によるタンパク質翻訳後修飾解析法, 質量分析用語の標準化。《主な著書》“分析化学用語辞典” (オーム社)。  
《趣味》登山, サイクリング, 音楽, 旅行, 映画鑑賞, 日本標準時子午線に関わる文化の研究。

E-mail: kyoshino@kobe-u.ac.jp

## 原 稿 募 集

ロータリー欄の原稿を募集しています

### 内 容

談話室: 分析化学, 分析方法・技術, 本会事業 (会誌, 各種会合など) に関する提案, 意見, 質問などを自由な立場で記述したもの。

インフォメーション: 支部関係行事, 研究懇談会, 国際会議, 分析化学に関連する各種会合の報告, 分析化学に関するニュースなどを簡潔にまとめたもの。

掲示板: 分析化学に関連する他学協会, 国公立機関の主催する講習会, シンポジウムなどの予告・お知らせを要約したもの。

### 執筆上の注意

1) 原稿量は 1200~2400 字 (但し, 掲示板は

400 字) とします。2) 図・文献は, 原則として使用しないでください。3) 表は, 必要最小限にとどめてください。4) インフォメーションは要点のみを記述してください。5) 談話室は, 自由投稿欄ですので, 積極的発言を大いに歓迎します。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記をお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社) 日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

〔電話: 03-3490-3537〕