

LC/MS の網羅分析への使用事例

高橋 豊

1 LC/MS における網羅分析

網羅分析は、複雑なサンプルに含まれるさまざまな成分を漏れなく高精度で解析する手法である。液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS) において網羅性を考える時には、試料中の成分を網羅的に分析するという側面以外に、MS 装置に導入された成分を如何に効率良くイオン化するか、また生成したイオンを如何に効率良く検出器まで導くか、と言う側面も考える必要がある。

本稿は、液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS) を用いた網羅分析に関して、主に技術的な内容について解説する。最初に、試料中の成分を LC で網羅的に分離する技術について、次いで ESI によるイオン化について、質量分析部に導入されたイオンが質量分析の種類や測定モードによってその後段に通過する (検出器に到達する) 効率が違ってくることについて、最後に網羅的な MS/MS 技術について、の順に解説する。

液体クロマトグラフィーには、順相・逆相・吸着・サイズ排除・イオン交換・イオンクロマトグラフィーなど様々な分離モードがあり、真に「複雑なサンプルに含まれるさまざまな成分を漏れなく」分離分析するためには、これら複数の分離モードを適宜に使い分ける必要があるだろう。

2 LC で試料中の成分を網羅的に分離する技術

LC/MS に用いられるのは、ほとんどが逆相液体クロマトグラフィー (reversed phase liquid chromatography, RPLC) である。RPLC が LC/MS に用いられるのは、通常の HPLC では用いられる不揮発性緩衝液は使用出来ないが、カラムの種類やアプリケーションが充実しており、汎用性の広さが主な理由であろう。一方で、網羅分析という観点からは、一つの分離モードではやはり限界があり、二つの分離モードを組み合わせた二次元液体クロマトグラフィー (2-dimensional liquid chromatography, 2D-LC) にメリットがある。2D-LC を用いた LC/MS には、以下の 3 種類の方法がある。

2D-LC を用いた LC/MS には、以下の 3 種類の方法がある。

2・1 ハートカット 2D-LC/MS

一次元目のクロマトグラムで着目するピークを一つ選択し、その溶出液をサンプルループに捕集、バルブを切り替えて二次元目のカラムで再度分離して、MS に導入する方法である。

2・2 マルチハートカット 2D-LC/MS

一次元目のクロマトグラムで複数のピークを選択し、その溶出液をピークごとに複数のサンプルループに捕集、バルブを切り替えて順次二次元目のカラムで再度分離して、MS に導入する方法である。選択するピークと同数のサンプルループを準備する必要があり、2・1 に比べてシステムが複雑になる。また、二次元目の分離が複数回行われるため、分析時間が長くなる。

2・3 Comprehensive 2D-LC/MS

一次元目 (1D) カラムからの溶出液を、オンラインですべて二次元目 (2D) カラムに導入して分析する方法である。一般的に、Comprehensive 2D-LC と呼ばれており、今回のテーマである「網羅分析」に合致するのは、この方法であろう。装置イメージを図 1 に示す。

試料は一次元目の溶離液を送液する 1D ポンプの後段に備えられたインジェクターから、1D カラムに注入される。1D カラムからの溶出液は、一定時間片方のサンプルループ (ループ A) に捕集される。例えば 1D ポンプの移動相流量が 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ でサンプルループの容量が 100 μL の場合には、捕集時間は 2 分間である。サンプルループ A に捕集された 1D カラムの溶出液は、二次元目のポンプである 2D ポンプから送液される溶離液によって 2D カラムに送液されて再度分離される。この間に、1D カラムの溶出液はもう一方のサンプルループ B に捕集される。2D カラムの分離には高速のグラジエント溶離が用いられ、平衡化まで含めた分析時間を捕集時間 (2 分間) より短くすることで、ループ B に捕集している間にループ A に捕集した溶出液の測定を完了させ

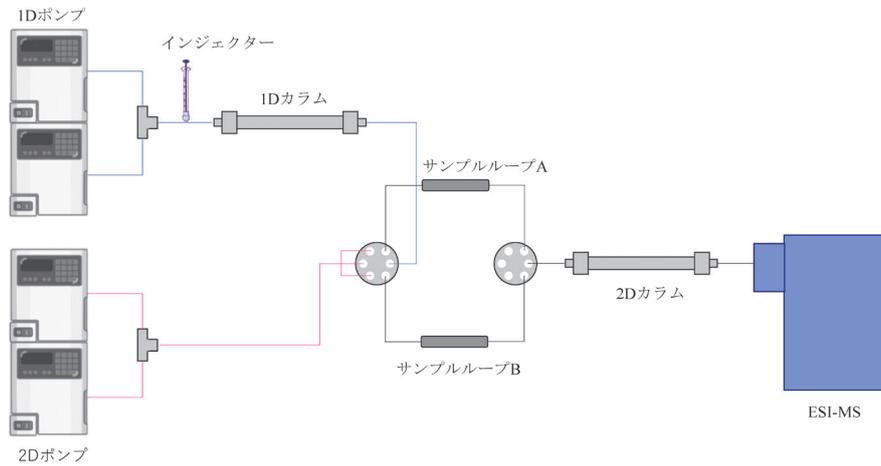


図1 Comprehensive 2D-LC/MS 装置の概略図

ることができ、2ループへの捕集と溶出液の測定を交互に繰り返すことで、1Dカラムの溶出液をすべて2Dカラムで再分離しMSで測定可能であり、網羅的なLC/MSが実施される。

1Dカラムと2Dカラムは異なる分離モードであることが多く、2Dカラムはほとんどの場合逆相(C18カラム)である。1Dカラムは、2Dの逆相カラムへの注入のしやすさを考えると、(有機溶媒比率の少ない)水系移動相が都合良く、その観点からはイオン交換カラムが適している。何故なら、逆相LCにおいては、カラムに注入する試料の溶媒に多くの有機溶媒が含まれていると、試料中の成分がカラムに保持され難いためである。1Dに親水性相互作用クロマトグラフィー(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)カラムを用いても、2Dの逆相とは異なる分離モードにはなるが、HILICは有機溶媒の多い移動相条件を用いるため、2Dの逆相カラムに注入するには適しているとは言い難い。勿論、1D, 2D共に逆相カラムを用いる場合もある。

3 ESIによるイオン化

エレクトロスプレーイオン化(electrospray ionization, ESI)¹⁾は、大気圧でイオンを生成する大気圧イオン化法の一つで、現在LC/MSで汎用されている。電気伝導性の液体に高電圧を印加すると高度に帯電した液滴が生成する現象をエレクトロスプレーと言い、この現象をMSのイオン化に応用したのがESIである。ESIの概略を図2に示す。

キャピラリーの近傍には対向電極が配置されており、両者の間に高電圧を印加すると、キャピラリーの先端から帯電液滴が生成する。図2の様に高電圧の作用のみで帯電液滴を生成させ得る液体の導入量は、最大で数 $\mu\text{L}/\text{min}$ オーダーである。帯電液滴のままではMS装置に導入出来ないため、加熱・脱溶媒することで帯電液滴からイオンを取り出し、MS装置に導入する。ESI-MSとして使用する場合、対向電極には細孔が設けられてお

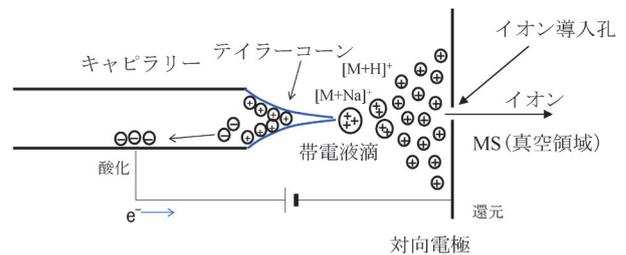


図2 ESIの概略

り、質量分析部への入口となる。

3・1 一般的なLC/MS装置に用いられるESI

一般的なLC/MSに用いられる移動相流量は、おおむね $200\sim 500\ \mu\text{L}/\text{min}$ である。前述した、高電圧の作用だけで帯電液滴を生成し得る流量より遥かに多いため、一般的なLC/MS装置に用いられるESIは、窒素ガスの圧力で液滴の生成を補助する機構を備えている。その概略を図3に示す。

図3に示すESIでは、液滴の生成を補助するために

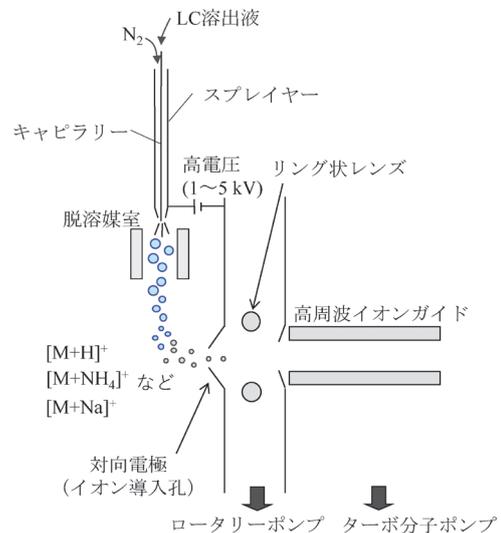


図3 一般的なESIの概略図

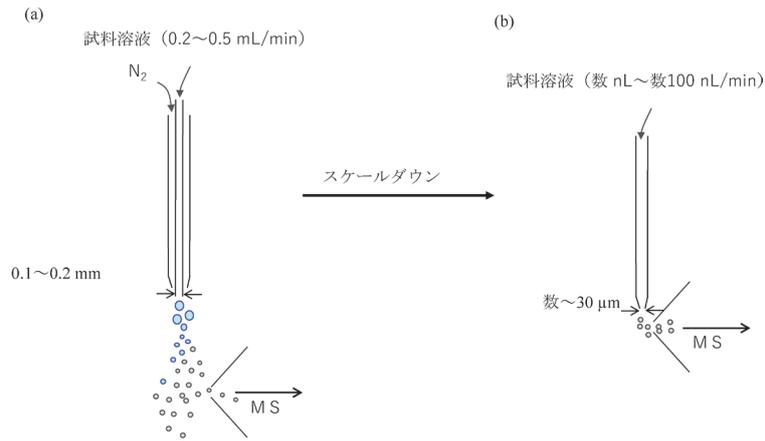


図4 (a) 一般的な ESI と (b) ナノ ESI の比較図

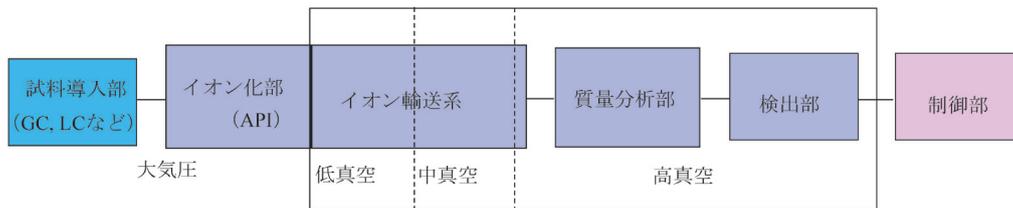


図5 質量分析計の構成

窒素ガスの圧力によって液体を噴霧している。キャピラリー先端の内径は、メーカーや機種にもよるがおおむね 0.1~0.2 mm である。その様な状況において生成する帯電液滴は、サイズが大きく電荷密度は小さい状態となる。この状態の液滴からイオンを取り出す効率（イオン化効率）は低く、MS 装置に導入された試料成分（分子）を効率良くイオン化しているとは言い難い。つまり、イオン化の網羅性は低いと言える。

一方、キャピラリーの内径、液体の導入量、キャピラリー先端と対向電極との距離、の三つをそれぞれ小さくすることで、電荷密度が高くサイズの小さい帯電液滴を生成させることが出来る。この様な ESI をナノ ESI と言い、通常の ESI と比較して劇的に感度を向上させることが出来る²⁾³⁾。イオン源に導入された試料成分（分子）をイオンに変換する効率（イオン化効率）が高く、イオン化に対する網羅性が高い方法と言える。一般的な ESI とナノ ESI の比較を図 4 に示す。

4 質量分析部

LC/MS における網羅分析を考える時、何が「網羅的」なのか？ については色々な観点があると思う。その一つとして、MS 装置のイオン源で生成したイオンを、如何に効率良く（網羅的に）MS の検出器まで導くか、が挙げられる。MS 装置の構成は、一般的には図 5 の様に示される。

この中で質量分析部は、イオンを m/z に応じて分離する役割を果たす、MS 装置の心臓部と言える。質量分

析部には、四重極 (Q)、三連四重極 (QqQ)、イオントラップ (IT)、飛行時間 (TOF)、Orbitrap など様々な種類があり、それぞれの m/z 分離の原理から、イオンを検出器まで導く効率（透過率）が異なる。ここでは、Q と TOF に関して、測定モードの違いなども踏まえてイオンの透過率（イオン源で生成したイオンを如何に効率良く網羅的に利用できるか）について解説する。

3・1 四重極質量分析部 (quadrupole mass analyzer, Q)

Q は図 6 に示す様に、内側に双極子面をもつ 4 本の電極から構成される。対角線上の 2 本の電極には、それぞれ正/負の直流電圧と高周波交流電圧が印加される。

図 7 に示す様に、両電圧の比を一定に保ちながら連続走査（スキャン）すると、イオンは m/z の小さい方から順次 Q を通過して検出器に到達し、マススペクトルを取得することができる（スキャン測定）。Q の質量分解能は、測定可能な全 m/z 範囲において同位体ピー

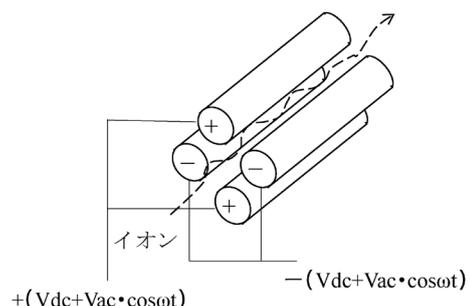


図6 四重極質量分析部の概略図

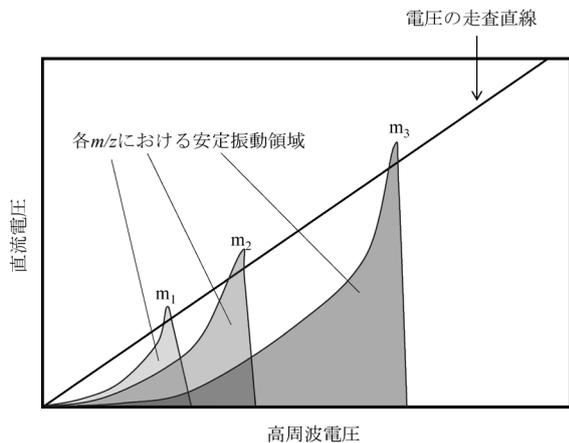


図7 四重極質量分析部における電圧走査

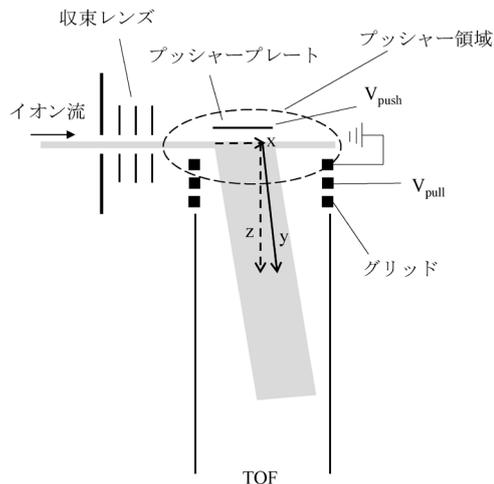


図8 OA技術の概略図

クが分離できる程度である。このような質量分解能の場合、イオンは m/z 1ごとに Q を通過する。つまり、ある m/z のイオンが Q を通過する瞬間、他のイオンは Q を通過することが出来ないということである。例えば m/z 範囲を 1~500、スキャンスピードを 500 ms に設定してスキャン測定を行うと、一つのイオンが Q を通過する時の時間は約 1 ms となる。この条件である一つのイオンに着目すると、 Q の透過率は 1/500 (0.2%) となる。

一方、 Q では直流電圧と高周波交流電圧の比を一定に保ちながら、スキャンではなく段階的に変化させ、特定のイオンの強度変化をモニターする「選択イオンモニタリング (selected ion monitoring, SIM)」と言う測定法がある (SIM 測定)。例えば 10 個のイオンを上と同じ 500 ms のサイクルタイムで SIM 測定を行うとすると、一つのイオンあたりの Q の通過時間は 50 ms になるので、スキャン測定と単純に比較すると、約 50 倍の感度向上が期待出来る。イオン源で生成したイオンを、より効率良く検出器まで届けることが出来るということになる。

Q を用いた LC/MS 装置は、定性分析より定量分析で多用されている。前述した様にスキャン測定におけるイオン透過率が低いためにスペクトル感度が低いことと、質量分解能が低いために定性解析能力が低いこと、が主な理由である。

3.2 飛行時間質量分析部 (time-of-flight mass analyzer, TOF)

TOF は、パルス的に加速させたイオンを自由領域で飛行させ、イオンの m/z によって飛行時間が異なることを利用してイオンを m/z に応じて分離する技術である。様々な m/z のイオンを一斉に加速させる必要があるため、パルス的にイオンが生成する (マトリックス支援) レーザー脱離イオン化との組合せで最初に実用化された。その後直交加速 (orthogonal acceleration, OA)

の技術開発によって、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) などの連続イオン化との組合せが可能になり、LC/MS 装置に応用されるようになった。市販の LC-TOF-MS に用いられている一般的な OA 技術の概略を図 8 に示す。

イオン源から連続的に流入するイオンを、プッシャー領域において垂直方向に加速電圧を印加して加速させることで、様々な m/z のイオンをパルス的に TOF に打ち込むことが出来る。プッシャー領域に流入してくるイオン量に対する、TOF に打ち込むイオン量の割合を Duty cycle と言う。生成したイオンを網羅的に検出することは、Duty Cycle が 100% であることを意味する。しかし、実際には 100% の Duty Cycle を得るのは技術的には困難であり、市販されている一般的な直交加速技術を用いた LC-TOF-MS では、測定 m/z 範囲にもよるが、Duty Cycle は 20% 以下と言う報告がある²⁾。Duty Cycle を如何に大きくして検出感度を高めるか、と言う課題に対して様々な工夫がなされている。

その代表例は、TOF のプッシャー領域の手前でイオンを一瞬トラップし、それをイオンパケットとしてプッシャー領域に向かってパルス的にリリースし、イオンパケットがプッシャー領域に到達するタイミングで直交方向に加速電圧を印加する技術である。LC-QTOF-MS の場合には、四重極コリジョンセルの出口にトラップ電極を配置することで、このような工夫が可能になる。この種の技術を搭載している市販装置では、90% 以上の Duty Cycle を実現している。

4 MS/MS (プロダクトイオン分析) の測定法

MS/MS とは、簡単に言えば質量分析を 2 回行うことである。MS/MS には、広義では 5 種類の方法が知られているが、ここでは定性分析に最もよく用いられるプロダクトイオン分析の測定法について述べる。

MS/MS には、2 台の MS 装置を連結した MS/MS 装

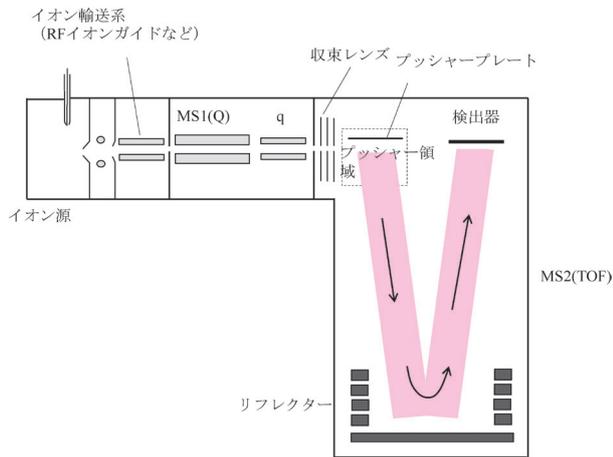


図9 QTOF-MSの概略図

置を用いる方法（空間的MS/MS）と、1台のMS装置で行う方法（時間的MS/MS）がある。プロダクトイオン分析は、すべてのMS/MS装置で実行可能である。

比較的新しいプロダクトイオン分析の方法として、データ依存的取得法（data dependent acquisition, DDA）とデータ非依存的取得法（data independent acquisition, DIA）があり、四重極-飛行時間質量分析計（quadrupole time-of-flight mass spectrometer, QTOF-MS）や四重極-Orbitrap 質量分析計（quadrupole Orbitrap mass spectrometer, Q-Orbitrap-MS）などの高分解能MS/MS装置で主に用いられている。ここではQTOF-MSを例にとり、DDAとDIAについて紹介する。QTOF-MSの概略を図9に示す。

QTOF-MSによるプロダクトイオン分析は、特定のプリカーサーイオンをMS1（Q）で選択、後段のコリジョンセル（q）でガスを衝突させるなどしてフラグメンテーションを起こさせ、断片化したプロダクトイオンをMS2（TOF）で m/z ごとに分離してプロダクトイオンスペクトルを得る。プリカーサーイオンの m/z を設定するには、分析者自身で入力する方法とシステムが自動で設定する方法があり、後者にDDAとDIAがある。

4.1 DDA³⁾

DDAでは、イオン強度の閾値^{しきい}をあらかじめ測定パラメーターとして設定し、LC/MS/MSでマススペクトルを測定中にその閾値を超えるイオンが検出された場合、そのイオンを自動的にプリカーサーイオンとしてQで選択し、MS/MSが実行されプロダクトイオンスペクトルが取得される。分析者自身がプリカーサーイオンを設定する必要がなく、1回の測定でマススペクトルと比較的強度の高いイオンのプロダクトイオンスペクトルを取得できる。一つのマススペクトルに対して複数のイオンが設定した閾値以上の強度になることは多々あり、何個のプリカーサーイオンを選択するかを設定出来る。この数を多く設定すると、MS/MSを行っている間に次の成

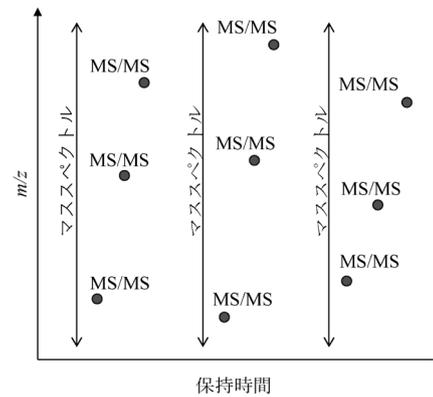


図10 DDAにおけるデータ取得イメージ

分がカラムから溶出してきた、検出されないリスクが発生する。ノンターゲット分析で、出来るだけ多くのイオンのMS/MSを行いたい場合、この方法では網羅性が低いと言える。DDAにおけるデータ取得イメージを図10に示す。

4.2 DIA⁴⁾

上記のDDAの問題を解決し、網羅的にMS/MSを実施出来る測定法がDIAである。DIAは、Qで選択するイオンの m/z 幅を広く設定し、混合状態のプリカーサーイオン群のMS/MSを行い、混合状態のプロダクトイオンスペクトルを取得する方法である。（例えば、マススペクトルの測定 m/z 範囲を100~1000とし、プリカーサーイオンの m/z 幅を100に設定、スペクトル取込スピードをそれぞれ0.1秒とすれば、1サイクルの時間は1秒となる。100の m/z 範囲に入るイオンがすべてプリカーサーイオンになるため、デコンボリューションによってプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせを紐づける必要がある。DIAで取得されるデータの質は、デコンボリューションの機能に依るところが大きい。プリカーサーイオンの m/z 幅を狭くすれば良いが、MS/MSの回数が増えるためにスペクトル取込スピードを速くする必要がある。最近では、1秒間に200回以上

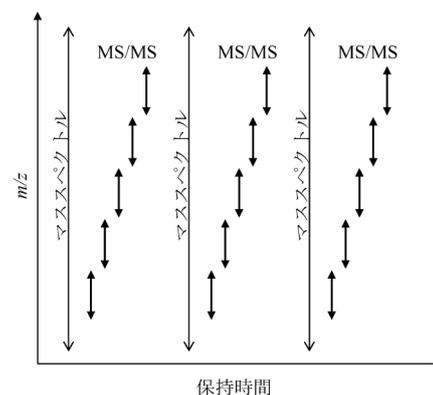


図11 DIAにおけるデータ取得イメージ

の MS/MS を実行可能で且つ高感度な装置が登場し、プリカーサーイオンの m/z 幅を 5 程度まで狭めて且つ十分なデータポイントを確保できるようになってきた。プロテオミクスを中心に、DIA が汎用的になってきたと思われる。DIA におけるデータ取得イメージを図 11 に示す。

5 おわりに

LC/MS の網羅分析について、2D-LC/MS、イオンを効率良く利用する為の LC-TOFMS における新しいイオン導入技術、網羅的な MS/MS の技術など、主に分析技術について記載した。何か 1 つでも、読者の皆様のお役に立てる情報が含まれていれば幸いである。

文 献

- 1) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse : *Science*, **246**, 64 (1989).
- 2) T. Tamagaki : *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **65**, 11 (2017).
- 3) M. S. Wilm, M. Mann : *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*,

136, 167 (1994).

- 4) R. Lou, W. Shui : *Mol. Cell. Proteomic*, **23** (2), 1 (2024).
- 5) A. Michalski, J. Cox, M. Mann : *Journal of Proteome Research*, **10**, 1785 (2011).
- 6) L. C. Gillet, P. Navarro, S. Tate, H. Röst, N. Selevsek, L. Reiter, R. Bonner, R. Aebersold : *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, O111.016717 (2012).



高橋 豊 (TAKAHASHI Yutaka)

浜松医科大学/株式会社プレッパーズ/エムエス・ソリューションズ株式会社 (〒431-3192 静岡県浜松市中央区半田山 1-20-1 浜松医科大学細胞分子解剖学講座)。群馬大学大学院修士。博士 (工学)。LC/MS 分析士五段。《現在の研究テーマ》DESI をベースとする質量分析イメージング用新規イオン化法の開発。《主な著書》“LC/MS 定量分析入門”, (情報機構)。《趣味》ランニング, テニス, スキー, ソフトボール, ソフトバレーボール, サッカー審判。
E-mail : tyutaka@sitsuyobunsekiya.com

『ぶんせき』再録集 vol. 1 出版のお知らせ

ぶんせき誌の過去記事の有効利用の一環として、『ぶんせき』再録集 vol. 1 が出版されました。2011 年から 2020 年まで、10 年間分の〈ミニファイル〉の記事が詰まっています。

下記 10 章からなり、それぞれ 12 から 14 の話題が集められています。

1. 実験器具に用いられる素材の特徴, 2. 分析がかかわる資格, 3. 顕微鏡と画像データ処理, 4. 最新の web 文献検索データベース, 5. ポータブル型分析装置, 6. 分析化学と材料物性, 7. 分析化学者のための多変量解析入門, 8. 土壌分析, 9. サンプリング, 10. 前処理に必要な器具や装置の正しい使用法。

本書はアマゾンオンデマンド出版サービスを利用して出版した書籍ですので、書店には並びません。アマゾンサイトからのネット注文のみとなりますので、ご注意ください。詳しくは「ぶんせき」誌ホームページをご確認ください。