

液体クロマトグラフィー質量分析

Liquid Chromatograph Mass Spectrometry

# LC-MSの基礎ガイド





# 目次

<b>第1章 LC-MSの基礎</b>	2
LC、MSおよびLC-MSの基礎	2
GC-MSとの違い	4
LC-MSの応用分野	5
<b>第2章 LC-MSインターフェイス</b>	6
LC-MSの基本構成	6
LC-MSインターフェイス	8
エレクトロスプレーイオン化 (ESI)	8
大気圧化学イオン化 (APCI)	10
ESIおよびAPCIの限定要因	11
LC-MSに適合する移動相	12
<b>第3章 MSの原理</b>	13
質量分離部の基礎	13
扇形磁場型	14
四重極 (Q) 型	15
イオントラップ (IT) 型	16
飛行時間 (TOF) 型	17
質量分離部の特長	18
<b>第4章 MS/MSの基礎</b>	19
なぜMS/MSが必要なのか	19
MS/MSシステムのタイプおよび主要な特徴	21
タンデム四重極 (Q/Q) 型	21
四重極・飛行時間 (Q/TOF) 型	22
各種MS/MSシステムの比較	23

# 第1章 LC-MSの基礎

ここでは『LC-MSの基礎ガイド』の最初の章として、LCおよびMSの基本原理を解説します。代表的なLCテクニックを説明しますが、LC-MSでは、逆相、順相、HILICなどが利用されます。次にイオン化および分析法を比較説明します。感度に優れ、高精度の質量測定、および安定したパフォーマンスを特長とするLC-MSは、臨床、バイオ医薬品、食品安全および環境など、多くの分野で重要な分析機器として広範に利用されています。

## LC、MSおよびLC-MSの基礎

液体クロマトグラフィー (LC) は分離分析法の1つであり、これを1900年代に最初に実証したのはロシアの植物学者ミハイル・ツヴェットでした。LCによる試料の成分分離は、分析種の保持力が固定相と移動相で異なるという原理に基づいています。図1にはカラム内で分離される分析種の様子を示しました。

LCの分離モードは複数存在します。表1に、代表的なLC分離モードの分離機構を示しました。近年のHPLCは、より微小な粒径およびより高い圧力に対応することで効率性を向上させた超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) も利用されています。

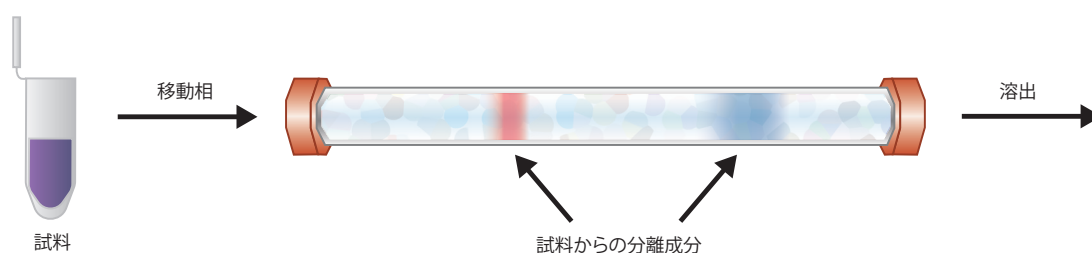


図1 LCの原理。試料(紫色)がLCカラムに注入されると、保持力の違いにより2つの分析種バンドとして分離され(赤色と青色)カラムから溶出する。

表1 LCにおける各種分離モード

分離モード	分離機構	一般的な用途例
逆相クロマトグラフィー	逆相クロマトグラフィーでは、非極性の固定相と、極性のある移動相が用いられます。ここでは「親和性のあるもの同士は引き合う」という原理、つまり各分子が非極性な固定相と極性のある移動相のどちらと優先的に引き合うかによって、試料が分離されます。たとえば非極性分子であれば、極性のある移動相よりも非極性な固定相の方でより保持されやすい性質を示します。その結果これらは、極性分子よりも遅く溶出することになります。	低分子量 (MW) 化合物
順相クロマトグラフィー	順相クロマトグラフィーでは、極性のある固定相と非極性の移動相が用いられます。非極性分子に対して極性分子がより強く保持されます。その結果、非極性分子は最初に溶出することになります。	ステロイドホルモン、 リン脂質、単糖類、 トコフェロール
親水性相互作用 クロマトグラフィー (HILIC)	HILICの原理は順相クロマトグラフィーと同様です。主要な相違点は、水を有機移動相に加えることで、強く保持された極性分子を効率的に分離して溶出させることです。	極性化合物
イオン交換クロマトグラフィー	イオン交換クロマトグラフィーによる荷電種(イオン)分析種は、対電荷を有する固定相と静電的な相互作用により分離します。	タンパク質、アミノ酸、 ヌクレオチド、 無機イオン
サイズ排除 クロマトグラフィー (SEC)	SEC用のカラムには多孔性の粒子が充てんされています。多様なサイズの試料がカラムに流入する際に、小型の分子ほど低速で移動しますが、これは細孔の深部まで浸透するためです。これに対して大型の分子は高速で移動しますが、これは浸透する深度がそれほど大きくないためです。そのため、大型の分子ほどカラムからの溶出が早くなり、その結果として分子のサイズによる試料の分離が効果的に行われます。	タンパク質、 合成高分子ポリマー

LCによる分離後の成分検出は、紫外・可視吸光度、蛍光、屈折率、光散乱など、分析種の光学的特性を用いて行われます。図2に示したのは、LCで用いられる各種の検出器です。分析種が検出器を通過する際には、光学的性質の変化(増加や減少)を観察し記録されます。

クロマトグラムの保持時間に基づいて物質を同定し、ピーク面積など強度に基づいて定量します。LCクロマトグラム(図3の赤)として示したのは、光学的検出器で得られるクロマトグラムの典型的な例です。LCと光学的検出との組み合わせは、クロマトグラフィーで分離された分析種を正確に定量できます。しかし、複数の成分がほぼ同時に溶出する場合、個々の成分を正確に定量することは困難です。

これに対して質量分析計(MS)は、分析種をイオン化し、生じたイオンの質量電荷比( $m/z$ )の違いを利用し分離した個々のイオン強度を測定します。マススペクトルは、この結果( $m/z$ 値に対する相対的なイオン強度)をグラフにしたもので、分離分析の間、一定の時間間隔でマススペクトルを取得しつづけます(図3の青色)。マススペクトルは分析種により違いが表れることから、定性情報として利用されます。MSの長所は、(分析種のイオン化を行うことができれば)他の検出器に比べ高い感度と高い選択性が得られることです。

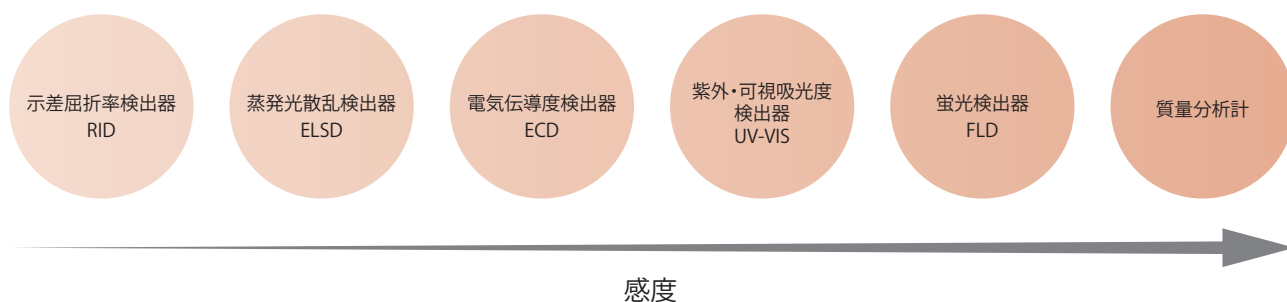


図2 LCで用いられる主な検出器

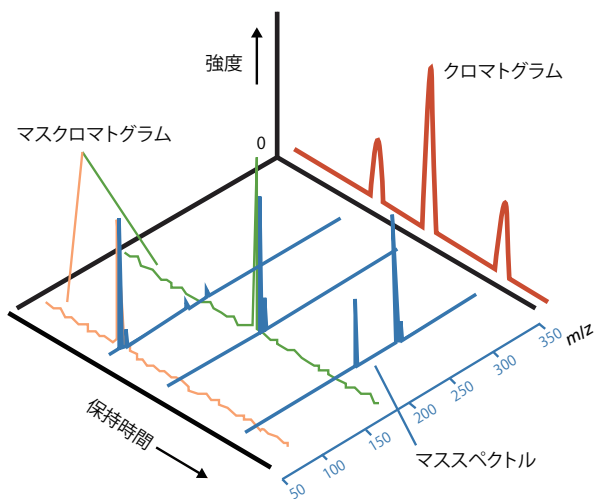
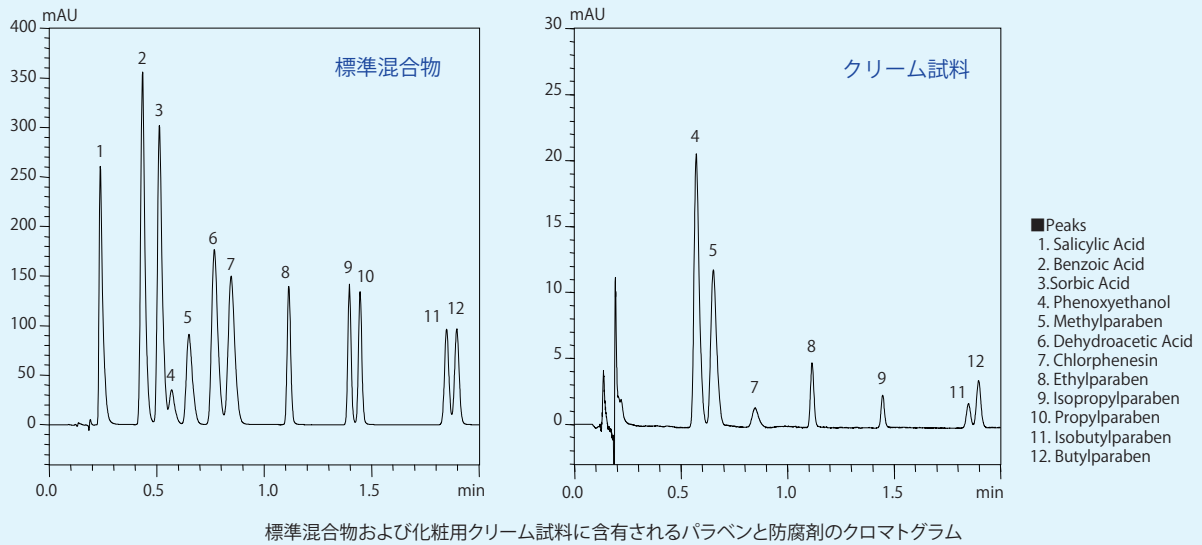


図3 LC-MSデータのイメージ:  
クロマトグラム(赤)とマスクロマトグラム(オレンジ、緑)およびマススペクトル(青)

高分解能で高圧耐性を有するNexera UHPLCシステムを用いた化粧品中防腐剤の超高速分析



### GC-MSとの違い

GCは分析種をガス状態で分離します。移動相にはヘリウムや水素が、固定相には充填カラムも用いられますが、キャピラリーの内面を化学修飾した中空カラム（通常、キャピラリーカラムと呼ばれる）を使用します。GCによって分離された分析種は、直接質量分析計に導入され、電子イオン化(EI)によりイオン化され質量分析されます。EIによるマススペクトルは、非常に再現性が高いこと、分子イオンだけでなく程よくフラグメントイオンを与えることから、マススペクトルとの一致度により分析種を定性・同定することができます(ライブラリー検索による定性・同定)。EIでイオン化するには、分析種をガス状にする必要があるため、揮発性に乏しい分析種や熱に不安定な分析種の質量分析を行うことができません。逆にGCで分析できる分析種のほとんどは質量分析できます(図4)。

LCは分析種を液体状態で分離するため、GCでは分析できない不揮発性、熱に不安定な分析種を分析することができます。し

かし、LC溶離液(液体)を質量分析計に直接導入することは困難で、LC-MSの実用化はエレクトロプレーイオン化(ESI)の開発を待たねばなりません。ESIは極性化合物を静電噴霧し、大気圧下で移動相溶媒を除去し、分析種のイオンだけを質量分析計内に導入することで、安定な質量分析(検出)を可能にしました。大気圧化学イオン化(APCI)や大気圧光イオン化(APPI)も大気圧下でイオン化し、LCの移動相溶媒を除去したのちに質量分析を行うため、これらを総称して大気圧イオン化法と呼ぶことがあります。詳細については第2章で解説します。

これらのイオン化はEIに比べソフトなイオン化であるため、分子量に関する情報は得られますが、フラグメントイオンが観察されにくいという特徴があります(EIによるマススペクトルに比べ、構造情報が少ない)。

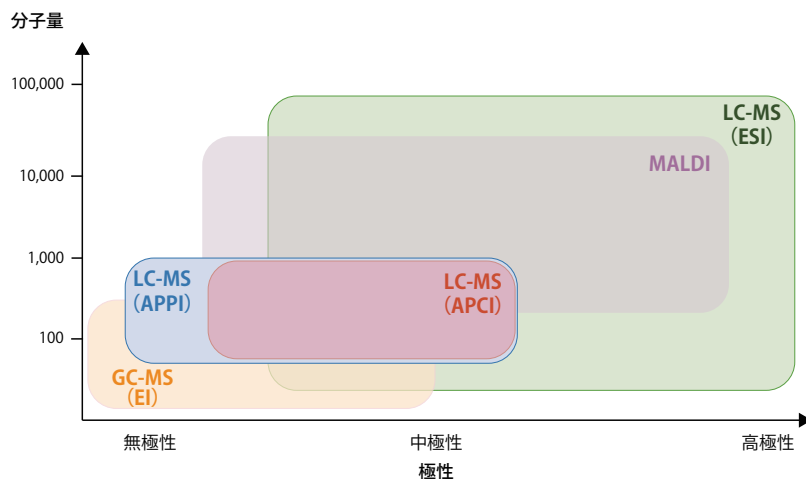


図4 代表的なイオン化法とその適用範囲

## LC-MSの応用分野

定性的および定量的な分析能力に秀でたLC-MSは、分析関連の市場と産業からの厳格な要求に応えられる手法として、広範に使用されています。LC-MSの利用分野は、医薬品、バイオ医薬品、法医学、産業、食品、環境セクターなど多岐にわたっています。臨床研究の分野では、全血、血漿、血清、尿中の薬物、ビタミンおよびミネラルの分析などに利用されています。その他の利用分野

には、メタボロミクス、プロテオミクス、ゲノミクスの研究もあります。生物薬剤分野でのLC-MSの利用は、抗体医薬品のキャラクターリゼーションとバイオアナリシスを可能にしています。食品分野や環境分野でもLC-MSは広範に利用されており、有効成分の分析、残留農薬など有害物質の分析だけでなく環境中のPPCP（医薬品・パーソナルケア製品）の分析にも利用されています。



## 第2章 LC-MSインターフェイス

第2章では、LC-MSの基本構成について説明します。LC-MSは、LC分離システムと質量分析計、それらを連結するLC-MSインターフェイスで構成されています。LC-MSインターフェイスは、液体中の分析種を脱溶媒と同時に分析種のイオンを気相へ取り出さなければなりません。そのためLC-MSインターフェイスの使用においていくつかの制限があります。従って、LCからLC-MSへのメソッド移管では、移動相の適合性や流速などを考慮する必要があります。この章では、LC-MSインターフェイスの詳細および使用時に注意すべきパラメーターについて解説します。

### LC-MSの基本構成

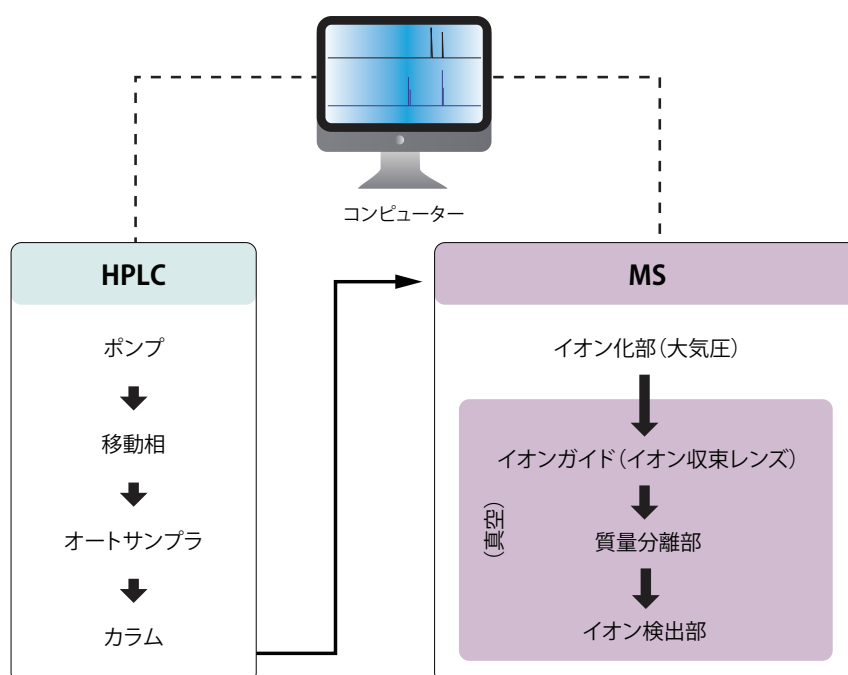


図5 LC-MSの基本構成

#### LCの基本構成:

- ① **ポンプ** — 液体移動相の送液
- ② **オートサンブラ** — 検体試料を注入
- ③ **カラム** — 検体試料中の成分を分離
- ④ **検出器** — 分離された成分の検出

#### LC-MSの基本構成:

- ① LC部
- ② 成分のイオン化および液体移動相の除去 (LC-MSインターフェイス、イオン化部)
- ③ 質量電荷比 ( $m/z$ ) の違いに応じてイオンを分離する (質量分離部)
- ④ 分離したイオンを検出する (イオン検出部)

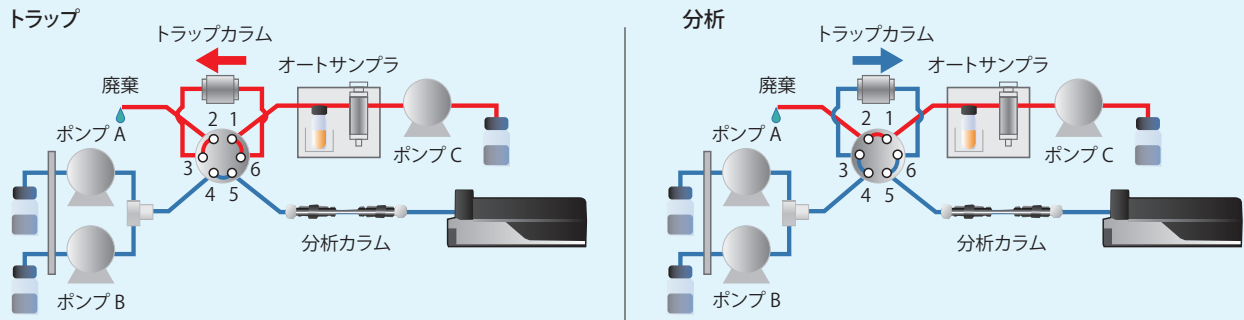


MSで一般的な検出器は、二次電子増倍管です。検出器に到達したイオンの量は信号強度に変換され、コンピューターに出力されます。MSのイオンガイド、質量分離部、およびイオン検出部は、すべて真空中に格納されます。

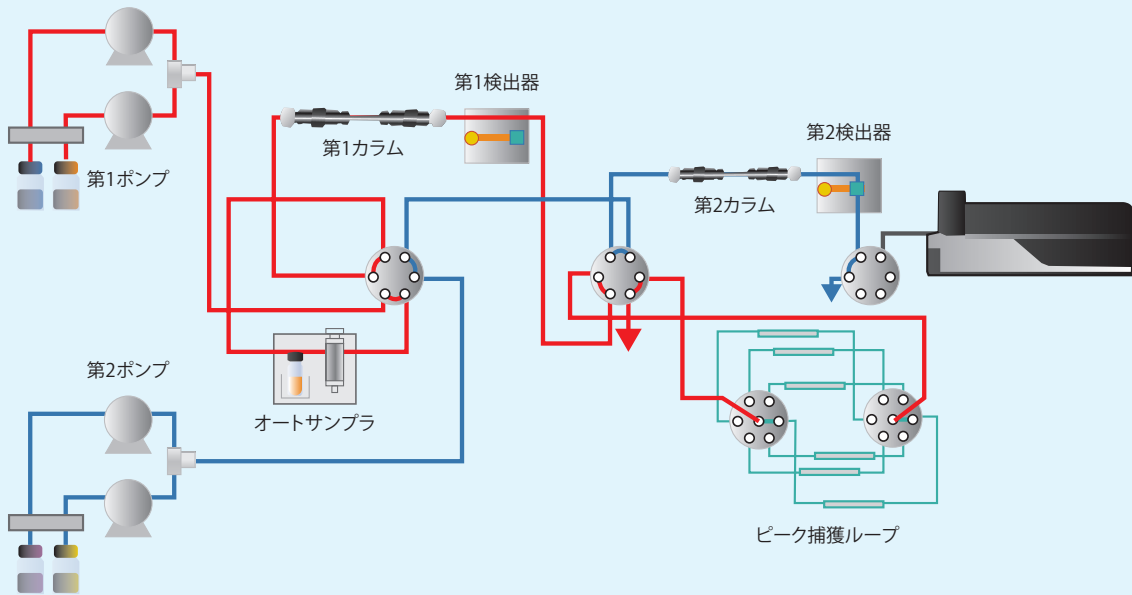
通常LCで利用されるカラムは1種類ですが、複数のカラム分離を組み合わせると2次元(2D) LCを利用すれば1D LCで、より高い選択性が得られます。

## 2次元LC-MSシステム

### 大量注入・ハートカット 2次元LC-MSシステム



### トラップフリー 2次元LC-MSシステム



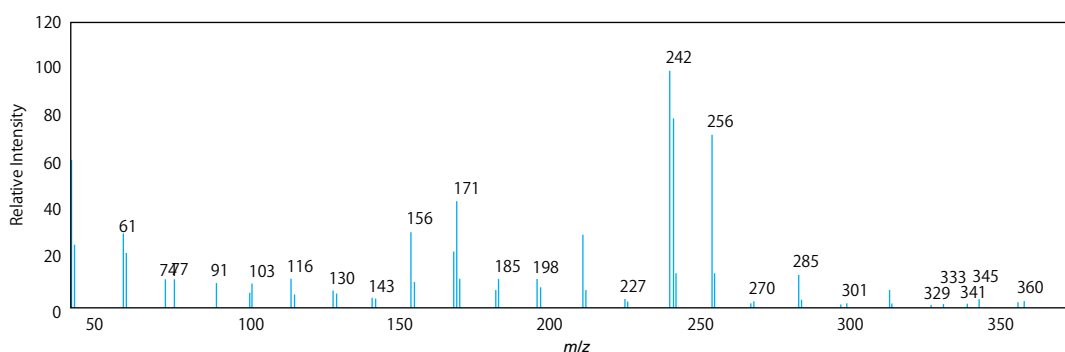
## LC-MSインターフェイス

マススペクトルはイオン化法により変わります。図6には(A) EIによるマススペクトルと(B) ESIによるマススペクトルを示しました。GC-MSでよく用いられるEIは、真空内でガス状の試料に電子線を衝突させることによりイオン化を行います(分子イオン;  $M^+$  を生成)。分子イオンはラジカルカチオン(奇数電子のイオン)で不安定なため、分子イオンの生成と同時に開裂が起こります。そのためEIのマススペクトルでは、分子イオンとその開裂によるいくつかのフラグメントイオンが観察されます。一方、LC-MSでよく用いられESIは、分析種のイオン性・極性を利用してイオン化するため、“EIに比べてソフトなイオン化法”と呼

ばれます。よって観察される、プロトン化分子( $M+H^+$ )、ナトリウムイオン付加型分子( $M+Na^+$ )などはラジカルイオンではないので、フラグメンテーションはあまり起こりません。主に分子量に関する情報が得られます。

LC-MSで利用されるイオン化は、大気圧下で行っています。イオン化すると同時にLCの溶離液を除去し質量分離部には分析種のイオンのみを導入するように工夫されています。大気圧下でイオン化するものとして、ESIのほか大気圧化学イオン化(APCI)などがあります。

(A) EIによるマススペクトル



(B) ESIによるマススペクトル

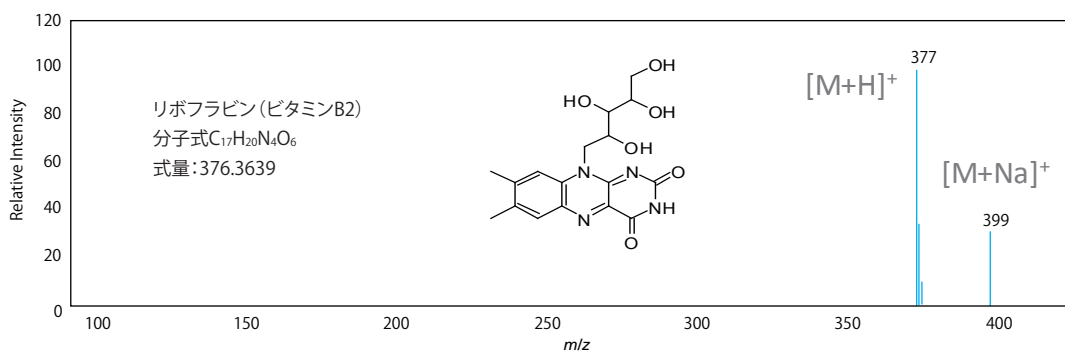


図6 (A) 電子イオン化(EI)と(B) エレクトロスプレーイオン化(ESI)によるリボフラビンのマススペクトル

## エレクトロスプレーイオン化(ESI)

ESIのイオン化機構は以下の通りです。試料溶液を $\pm 3\sim 5$  kVの高電圧を印加したキャピラリーを通過させることで帯電液滴を生成させます(エレクトロスプレー現象)。この状態では分析種のイオンはまだ液滴内に存在しています。帯電液滴は大気圧下で脱溶媒され小さな液滴へと変化します。液滴内に存在する分析種のイオン同士の反発により液滴の分裂したり、分析種のイオン気相へと放出されます(イオン蒸発現象)。気相に放出された分析種のイオンを高真空に導入して質量分析を行います。エレクトロスプレ

ー現象を利用した本来のESIでは数 $\mu$ L/min程度の試料溶液が限界ですが、現在のESIは、霧化ガスを併用することで数百 $\mu$ L/min程度の試料溶液に対応することができます。

ESIは、高極性、難揮発性、熱的不安定性化合物の溶液内での性質をうまく利用してイオン化しています。観察されるイオン種は、正イオンではプロトン化分子( $M+H^+$ )、アンモニウムイオン付加型分子( $M+NH_4^+$ )、負イオンでは脱プロトン分子( $M-H^-$ )、塩素イオン付加型分子( $M+Cl^-$ )など観察されます。

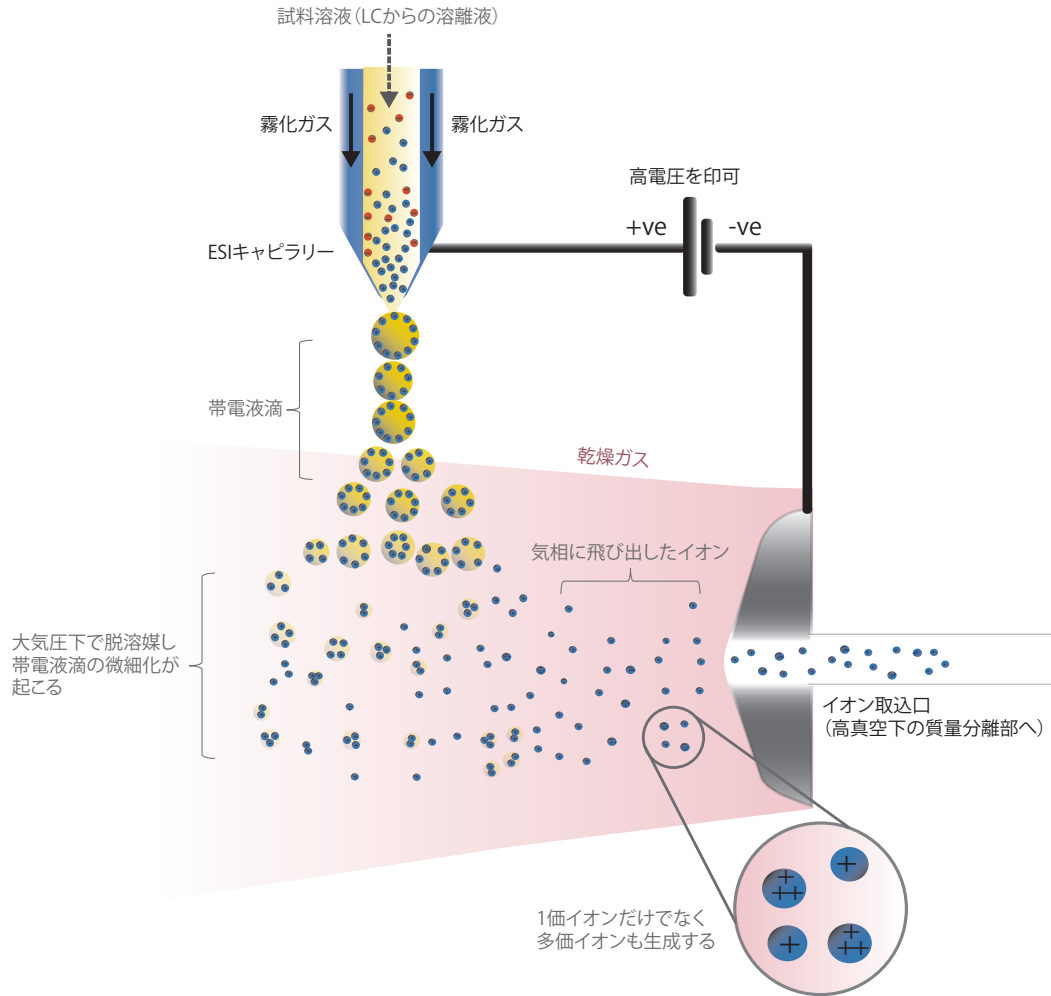


図7 ESIイオン化機構の模式図

ESIは、化合物の性質により多数の電荷を持つイオン（多価イオン）を生成することがあります。図8はミオグロビンの正イオンESIマスペクトルです。単一成分でこのように複数のイオンを与えるのは、 $m/z$ の $z$ である電荷が異なるためです。

電荷 ( $z$ ) が大きくなれば  $m/z$  は小さくなるので、質量分析計の測定範囲を超える大きな質量 ( $m$ ) の化合物であっても、多価イオンが生成すれば分析できます。多価イオンの分布は、溶液のpHに依存します。

多価イオンが観察されるこのマスペクトルから、化合物の分子量 ( $m$ ) を求めることができます。デコンボリューションソフトを用

いれば、分析種の分子量は16951.3と計算されます。また、隣接するイオンピークの  $m/z$  が分かれば簡単な計算でも求めることができます。例えば  $m/z$  1131.1 (A) と 1211.8 (B) に注目すると、Aの価数は、 $B/(B-A)$  で求めることができます。 $1211.8/(1211.8-1131.1) \approx 15.0$  なので、 $m/z$  1131.1は15価のイオンです。プロトンが15個付加して生成したイオンと考えると、この分子量は  $1131.1 \times 15 - 15 = 16951.5$  と算出できます。デコンボリューションソフトでは、すべての隣接するイオンピークの計算を行い、イオン強度に応じて重みづけをして計算結果を出しています。

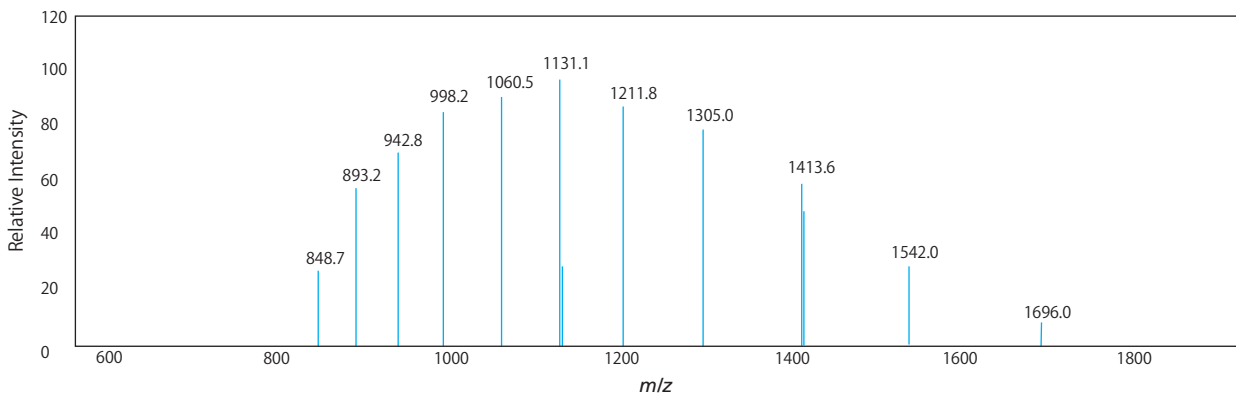


図8 ミオグロビンのESIによるマスペクトル10価 ( $m/z$  1696.0) から20価 ( $m/z$  848.7) のイオンが観察される

## 大気圧化学イオン化 (APCI)

APCIは、化学イオン化(イオン - 分子反応)を利用したイオン化法です。試料溶液(LCからの溶離液)を窒素ガスで噴霧します。噴霧された領域はヒータで加熱されているので、ここで溶媒の気化が行われます。窒素ガスおよび気化した溶媒(水、メタノールなど)はコロナ放電によりイオン化され反応イオン(例えば、 $\text{H}_3\text{O}^+$ )として働きます。この時、気化した分析種が存在し、反応イオンよりプロトン親和力が大きければ、反応イオンからイオンを受け取り自らがイオン化されます。大気圧化学イオン化は、分析種が気

化しやすいこと、反応イオン化からプロトンを受け取ることができる程度の極性をもつ化合物をイオン化することができます。APCIと構造的にはよく似ていますが、コロナ放電の代わりにクリプトンランプを用いた大気圧光イオン化 (APPI) というイオン化法もあります。光エネルギーにより気化した分析種の分子イオンを生成することもできますが、近傍には溶媒など多く存在するため、化学イオン化を利用したイオン化法ともいえます。

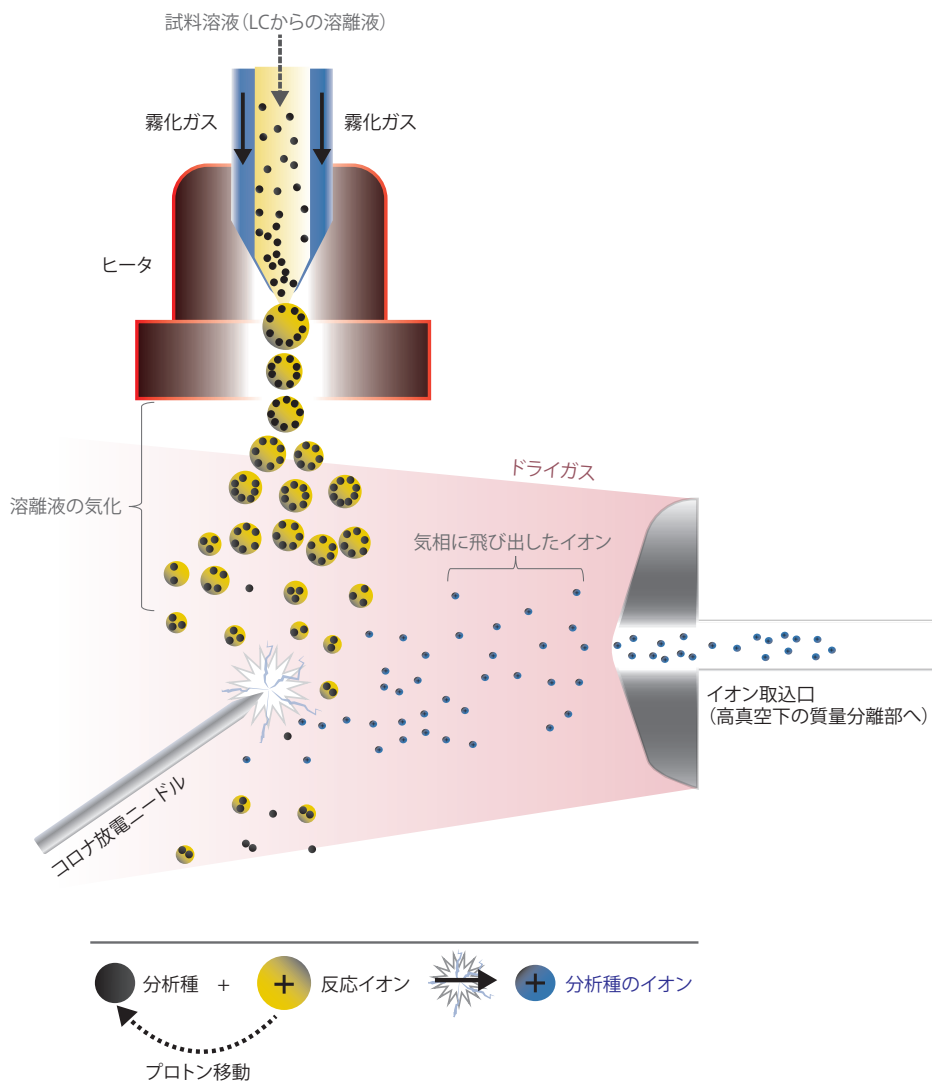


図9 APCIのイオン化機構

## ESIおよびAPCIの限定要因

ESIおよびAPCIで限定要因を以下に示します。

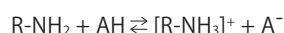
- 溶離液の流速
- 溶離液の性質 (タイプ、pH、用いる添加剤など)
- 分析種の特長 (揮発性、熱安定性、荷電種の形成能など)

ESIでは溶離液の流速に留意しなければいけません。大気圧下での脱溶媒 (微細液滴化) を行いやすくするには、流速は低いほうが適しています。そのため、LC-MSでは、内径2 mm程度のセミマイクロカラムが使用されます。この内径のカラムの場合、HPLC分析では0.2-0.3 mL/min、UHPLC分析では0.4-0.6 mL/minの流速で用いることが可能です。もっとも、流速が大きくなると脱溶媒が難しくなるので、ほとんどのESIは、加熱乾燥ガスやヒータを利用した脱溶媒を補助する機能を持っています (帯電液滴の微細化)。ESIでは帯電液滴の微細化だけでなく、帯電液滴の生成 (分析種のイオン性・極性) に留意する必要があります。

ESIはアミノ基やカルボキシ基を有する極性化合物のイオン化に適しています。アミノ基を有する塩基性化合物は、式1のように、分子型とイオン型の平衡状態で存在します。この割合は溶液のpHに依存し、分子型とイオン型の濃度が等しい時のpHがpKaです。これよりpHが低ければ平衡は右に (イオン型が増加)、これより高ければ平衡は左に (分子型が増加) 傾きます。ESIによるイ

オン化は分子型よりイオン型の濃度が増加したほうが効率よく行うことができます。ただし、これはイオン化という観点での理論なので、実際のLC-MS分析ではLCによる分離のしやすさ (逆相系カラムを使用した場合、分子型の方が良好な分離を行うことができる) の観点で考える必要があります。

式1:



APCIは、イオン-分子反応を利用しているため、熱的に安定で揮発性を持った分析種のイオン化ができます。分析種はイオン-分子反応で、反応イオンからプロトンを奪いとる力がなければイオン化できません。その指標がプロトン親和力です。この大きさによりイオン化の効率が変わります。

表2に、ESI、APCIの概要をまとめました。

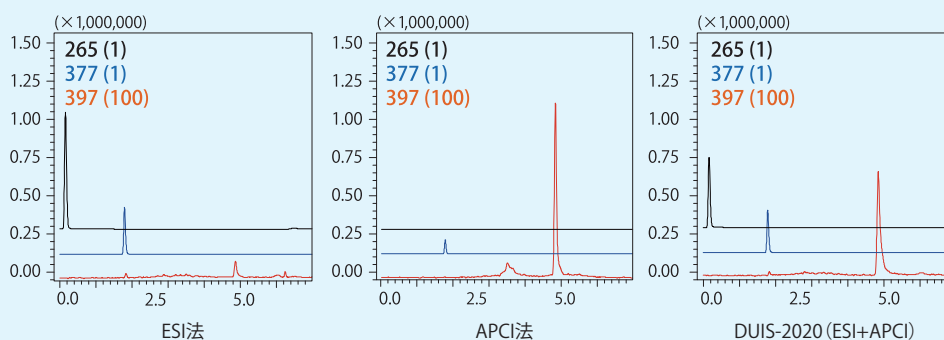
すべての化合物をイオン化できるイオン化法は存在しません。極性や特長が異なる多成分分析が求められる場合は、複数の分析を行う必要があります。分析とメソッド開発のトータル時間を短縮し、ラボでの効率と結果の信頼性を向上させるべく島津が開発したのが、ESIとAPCIの同時使用を可能にするデュアルイオンソース (DUIS) です。

表2 ESIおよびAPCIの概略

APIテクニック	ESI	APCI
イオン化プロセス	エレクトロスプレーにより、溶媒中のイオン群を気相へ移動	コロナ放電により、気相中でイオン化を実施
生成されるイオン群のタイプ	一価イオン 多価イオン	一価イオン
分析種の揮発性	揮発性は不要	ある程度の揮発性が必要
分析種の安定性	熱安定性は不要熱不安定性でも可能	熱安定性が必要

## ESIとAPCIの両モードに同時対応するデュアルイオンソース DUIS-2020 (Technical Report No.35 C146-2057)

### MSクロマトグラム



[Technical Report ダウンロードサイト](#)

## LC-MSに適合する移動相

高真空を必要とするMSを結合するには、LC溶離液から、溶媒可能な限り除去し(イオン化された)分析種のみを質量分離部に導入できるようにLC溶離液を選択しなければいけません。大気圧イオン化法(ESI、APCIなど)は、LCの溶離液としてよく利用されるりん酸緩衝液やクエン酸緩衝液などの不揮発性溶離液を利用することができません。LCで不揮発性移動相を使用している場合、分析条件を変更しなければなりません(溶離液の変更、LC分離モードの変更など)。

ESIやAPCI(LC-MSインターフェイス)に適した溶離液を表3にまとめました。逆相系でもちいられる水、メタノール、アセトニトリルなどはLC-MSインターフェイスに適した溶媒です。LC分離またはイオン化に影響するpH調整が必要である場合、揮発性のある酢酸やギ酸、それらのアンモニウム塩を使用することができます(あまり高い塩濃度を使用することはできないので、緩衝液としての効果はあまり期待できません)。

逆相系の分離モードでは疎水性が弱い化合物は保持うまく分析できないため、イオンペア試薬を利用することがあります。LCで利用するイオンペア試薬は不揮発性なので、揮発性を高めるためアルキル鎖をフッ素で置換した比較的鎖長の短いLC-MS用のイオンペア試薬を用いることができます。

溶離液に制限があるため分離挙動を変更するためには、アルキル鎖長の異なるカラムを利用したり、HILICを利用するのが一般的です。

表3 LC-MSインターフェイスに適した移動相

<b>基本的な移動相溶媒</b>
a) アルコール類(メタノール、エタノール、プロパノールなど) b) アセトニトリル c) 水(必要な場合はpH調整)
<b>pH調整試薬(揮発性<math>\leq</math>10 mM)</b>
<b>酸</b> a) 酢酸 b) ギ酸 c) トリフルオロ酢酸塩(TFA)
<b>塩基</b> d) アンモニア水 e) 酢酸アンモニウム f) ギ酸アンモニウム
<b>相対的に揮発性の高いイオン対試</b>
<b>塩基性化合物の保持用</b> a) ペルフルオロ炭酸塩、C2~C8
<b>酸性化合物の保持用</b> b) ジブチルアミン c) トリエチルアミン(TEA)

## LCMSにおける分析上の留意点やノウハウ

## 第3章 MSの原理

質量分離部は各種のタイプが存在します。この章では質量分離部の原理と重要な特色について解説します。

### 質量分離部の基礎

質量分析では、静電場などを利用してイオン ( $m/z$ ) を識別します。質量分離に先立ち、イオンを収束させることが重要です。図10に島津のイオン光学系を示しました。イオン源で生じたイオン群を収束させ、非イオン性粒子の除去などは高感度分析を可能にします。

1900年初め、イギリスの物理学者J.J.Thomsonは、イオンを電場と

磁場によって屈曲させることで正イオンの質量と電荷の比を測定し、ネオンに質量の異なる同位体が存在することを発見しました。これが質量分析の始まりです。この原理をもとに扇形磁場型質量分析計が開発されました。ここでは扇形磁場型、四重極型、飛行時間型の質量分離部について簡単に紹介します。

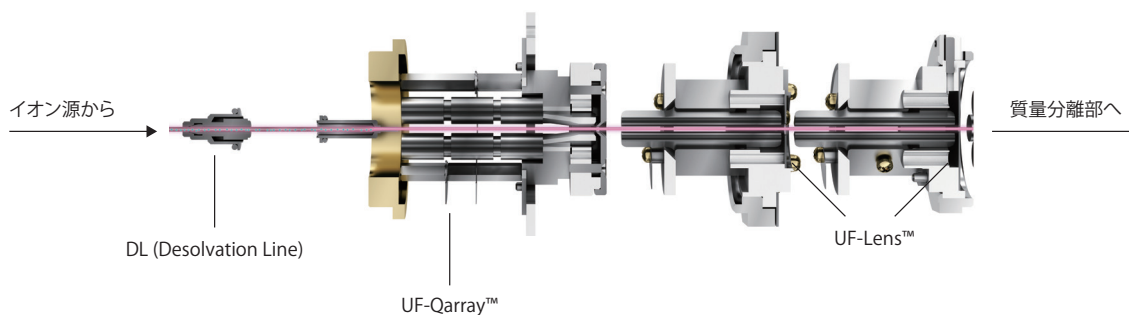


図10 島津製イオン光学系の模式図(イオンガイドなど)

イオン収束力を向上させたRFイオンガイドUF-Qarrayの開発 (Technical Report C146-2178)

島津の高周波四重極イオンガイド (Qarray) の詳細をご確認ください。

イオンの収束を強化し、汚染を最小化する設計がなされています。

[Technical Report ダウンロードサイト](#)

## 扇形磁場型

これは扇形磁場を用いることで質量 ( $m/z$ ) の分離を行います (図 11)。イオン源で生成したイオンを加速させ、扇形磁場に導入します。磁界に導入されたイオン (電流) はフレミングの左手の法則に従い力を受けイオンの進行方向が曲げられます。この程度は

$m/z$  に応じて異なり、小さいイオン (電荷が同じ場合) ほど大きく偏向します。磁場の強度を走査することで、小さいイオンから大きいイオンへと順番に検出器に送りこみ、各々のイオン強度を記録します。

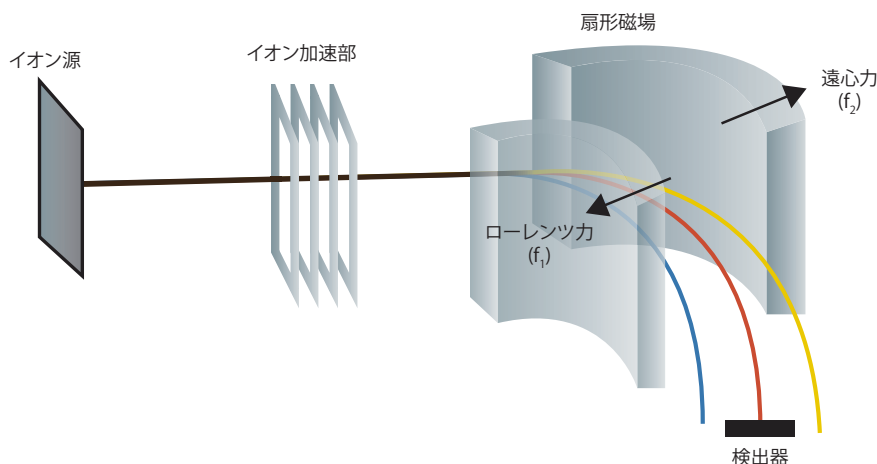


図11 扇形磁場型質量分離部の模式図

式2:

$$f_1 = Bzev$$

式3:

$$f_2 = \frac{mv^2}{r}$$

式4:

$$f_1 = f_2 = Bzev = \frac{mv^2}{r}$$

式5:

$$KE_{ion} = \frac{1}{2} mv^2 = zeV$$

式6:

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2r^2}{2V}$$

$B$ : 磁束密度

$z$ : イオンの電荷

$e$ : 電気素量

$v$ : イオンの速度

$m$ : イオンの質量

$r$ : 経路の半径

$V$ : イオン群に印加される加速電圧

イオン群には磁場によるローレンツ力 ( $f_1$ ) が作用し、その大きさは式2で計算されます。イオンの進行方向が変化する際には式3で計算される遠心力 ( $f_2$ ) が作用します。磁場領域を通り抜けた後のイオン群は検出器に到達しますが、そこまでの経路は特定の半径 ( $r$ ) の曲線を延長したものになり、この曲線の半径は  $f_1$  と  $f_2$  が均衡するという条件で定まります (式4)。また電圧  $V$  で加速されたイオン群の運動エネルギーは式5で示されます。式4と5からイオンの速度 ( $v$ ) を消去して整理した結果が式6です。イオンの加速電圧  $V$  を一定にして磁束  $B$  を変化させると (あるいは  $B$  を一定にして  $V$  を変化させる)、半径  $r$  の経路上に配置された特定の検出器によって任意の質量  $m$  の検出がされます (同一電荷のもの)。

実際には、イオン検出器は1つだけ使用し、加速電圧 ( $V$ ) と曲線経路の半径 ( $r$ ) は一定にしたまま、磁束密度 ( $B$ ) を走査させます。その結果、質量 ( $m$ ) の異なるイオン群は、磁場中ですべて同一の経路をたどって、次々に検出器に到達することになります。こうした磁場の走査を1回行うごとに、1つのマススペクトルが得られます。こうした意味から扇形磁場型の質量分析部は、イオンの伝達と走査のモードで機能すると表現できます。

現在では、扇形磁場 (方向収束) だけでなく、電場 (エネルギー収束) を組み合わせた二重収束型質量分析計をこの範疇に入れることがあります。二重収束型質量分析計は、より高い質量分解能を有するため、精密質量測定を行うことができます。



## 四重極(Q)型

これは4個の円柱状(内側が双曲面)の金属ロッドが中心軸から等距離となるよう配置された四重極(Quadrupole)電場を用い質量分離を行います(図12)。四重極には直流(D.C.)と高周波の交流または無線周波数(RF)の両方を印加することで、ターゲットとする $m/z$ を持つイオン群のみが四重極を通過して検出器に到達できるようにします。検出器に到達したイオンの量は信号に変換され、コンピューターに出力されます。生成したイオンはz方向に加速されますが(図12の緑色矢印)、その際に印加されるのは数十ボルト程度の比較的弱い電圧です。これらのイオン群は小さい開口部(スキマー)を通り抜けて四重

極に進入します。同じ極性の電圧が対角線位置にあるロッドに印加され、逆の極性の電圧が隣接位置にあるロッドに印加されます。これにより四重極内部には、高速に相を変化する電場が形成されます。

こうしてxおよびy方向に周期的に変動する電場をイオン群が通過します。四重極への印加を一定のパラメーターで行うことで、 $m/z$ が特定の範囲内にあるイオン群のみが安定振動を維持し、検出器まで到達します(図12の実線)。対照的に $m/z$ 値がそうした範囲外のイオン群は振動が不安定化し、四重極と衝突するかシステム外へ飛散して検出部には到達しません(図12の破線)。

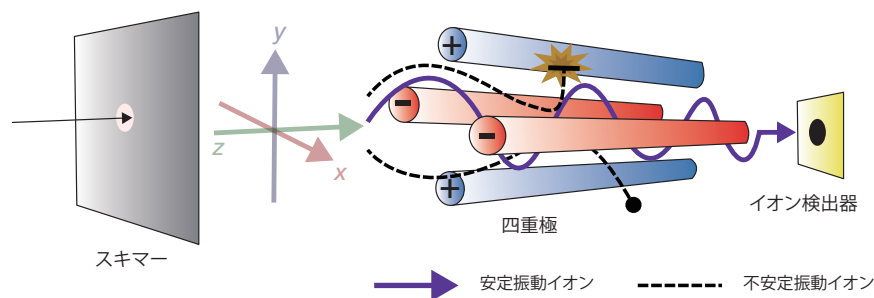


図12 四重極(Q)型質量分離部の模式図

四重極型質量分離部を通過して検出器に到達できるかどうかは図13に示すイオン安定領域図に従います。質量が異なる $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ が安定振動して検出器に到達するには、各々青、赤、黄で示した領域内の条件でなければいけません。今、図に示した走査線(1)のように、直流電圧(y軸)と高周波交流電圧(x軸)を変化させると、走査線が各々の領域を通過する

ときのみ、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ のイオンだけを検出器に到達させます(スキャンモード)。また、操作線上の一点に電場条件を固定すれば、特定のイオンだけを四重極ロッド内を通過させることができます(選択イオンモニタリングモード)。図14には各々測定モードの模式図を示します。

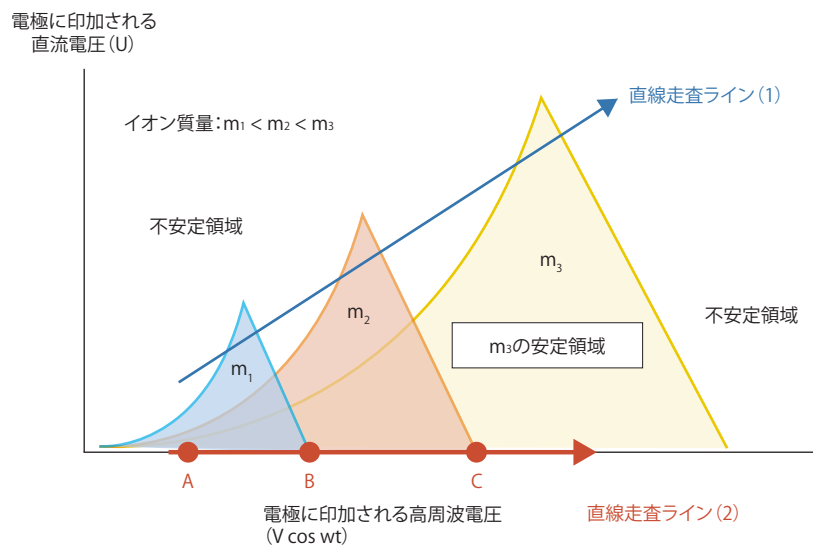


図13 四重極型質量分離部のイオン安定領域図

スキャンモードでは、 $m_1$ のイオンを測定しているときはそれ以外のイオンは四重極ロッド外へ排除されます。同様に異なるイオンを測定しているときは $m_1$ が排除されます。マススペクトルを得ためには仕方ありませんが、もし $m_1$ だけ(複数イオンでも可)を観察したいのであれば、電場条件を固定したほうが、 $m_1$ のロスが少ないので分析には有利です。また、スキャン測定にはマススペクトルを得るために電場走査である程度の時間が必要ですが、選択イオンモニタリングモードでは、それより短い時間で十分で

す。つまり選択イオンモニタリングモードは、選択的クロマトグラムを得るのに都合のよい分析モードです。

四重極型はシンプルかつコンパクトであることから比較的低い真空度( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  Pa程度)で動作することができます。高い真空を必要とする大型の質量分離部より、クロマトグラフとの連結に向いている質量分離部です。また、高速に動作できる(走査速度は最大15,000 Da/s)ので、クロマトグラムの作成にも適しています。

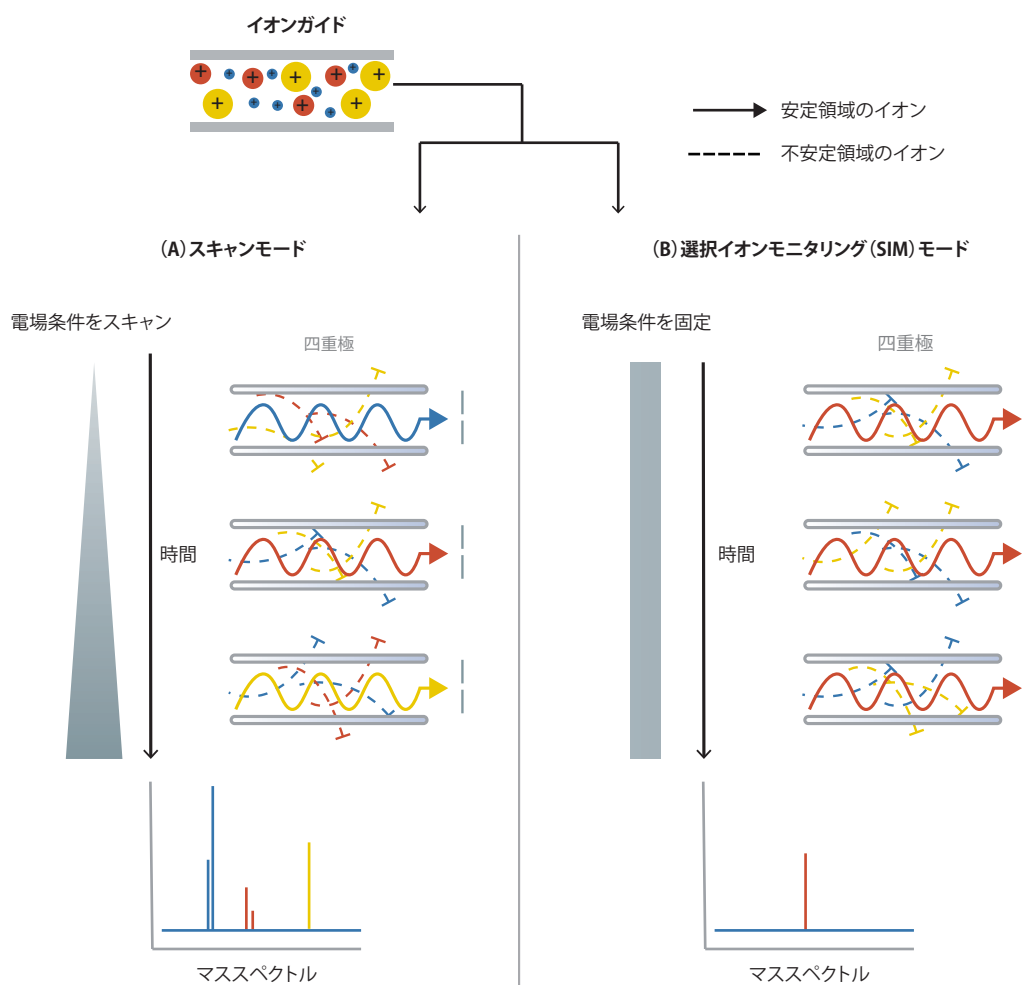


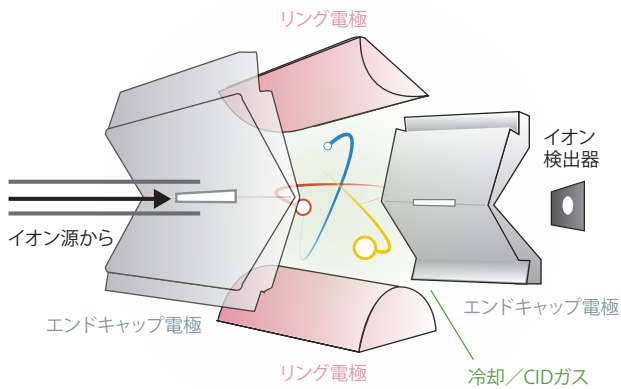
図14 四重極(Q)型質量分離部による測定モードの模式図

### イオントラップ(IT)型

イオントラップ型質量分離部は、四重極型質量分離部と同じ原理を利用していますが、電極の形状および電場条件の走査方法を変えることで異なる性質を持った質量分離部です。一对の対向する四重極ロッドをドーナツ形状に変形させたリング電極(1個)と、残る四重極ロッドでリング電極を挟むようにエンドキャップ電極(2個)で構成されています(図15)。イオントラップ質量分離部の断面図は四重極型ロッドと同じ双曲面状をしています。イオンは、一方のエンドキャップ電極から導入され、質量分離やイオンは他方のエンドキャップ電極からイオン検出部へ移動します。イオントラップ型質量分離部は、図13のX軸状に電場条件を走査します。電場条件Aの場合、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ は安定振動をしているの

でIT内にトラップされます。電場条件Bを超えると $m_1$ は不安定振動するためIT外に放出され、イオン検出部でその量を測定します。同様に電場条件Cを超えると $m_2$ が放出され、その量を測定します。このようにすべてのイオンをいったんトラップしたあとで、それぞれのイオン量を測定するのがイオントラップ型質量分離部です。(トラップできるイオン量は少ないですが)四重極型に比べイオンをロスしないので、スキャン測定(=定性分析)に向いています。しかし、選択イオンモニタリングモードを持たないので、LC-MSによる定量分析には四重極型の方が向いているといわれています。

(A) 安定したイオン振動



(B) 振動の不安定化によるイオン群の放電

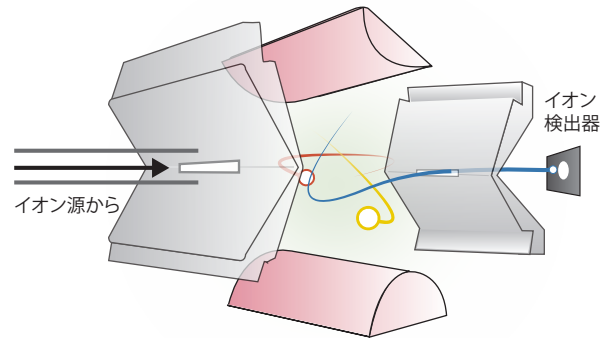


図15 イオントラップ(IT)型質量分離部の模式図

### 飛行時間(TOF)型

生成したイオンを加速して、無電界領域(フライトチューブ)に導入します。イオンの飛行速度は、質量( $m/z$ )が小さいほうが早く、大きいほうが遅くなります。従って、イオンがフライトチューブの末端に設置されたイオン検出部へ到達する時間により、イオンの $m/z$ を識別することができます。フライトチューブを直線的に利用するTOFをリニアモード、リフレクトロンを用いフライトチューブ内の折り返し的に利用するTOFをリフレクトロンモード(図16)と呼びます。

式7に示したように、飛行時間( $t$ )は $m/z$ の平方根に比例するため、一定の飛行距離( $l$ )を移動するイオン群の間でも $m/z$ が小さいものの方が大きいものより先に検出器に到達します。つまり、

その他のパラメーターがすべて一定であれば、飛行時間( $t$ )から $m/z$ を求めることができます。飛行時間型質量分離部は測定時間を長くすればより大きなイオンを検出することが理論上可能です。生体や合成高分子など大きなイオンの分析に適しています。

式7:

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

- $t$ : 飛行時間
- $m$ : イオンの質量
- $v$ : イオンの速度
- $z$ : イオンの電荷
- $e$ : 電気素量
- $V$ : 加速電圧
- $L$ : 飛行距離

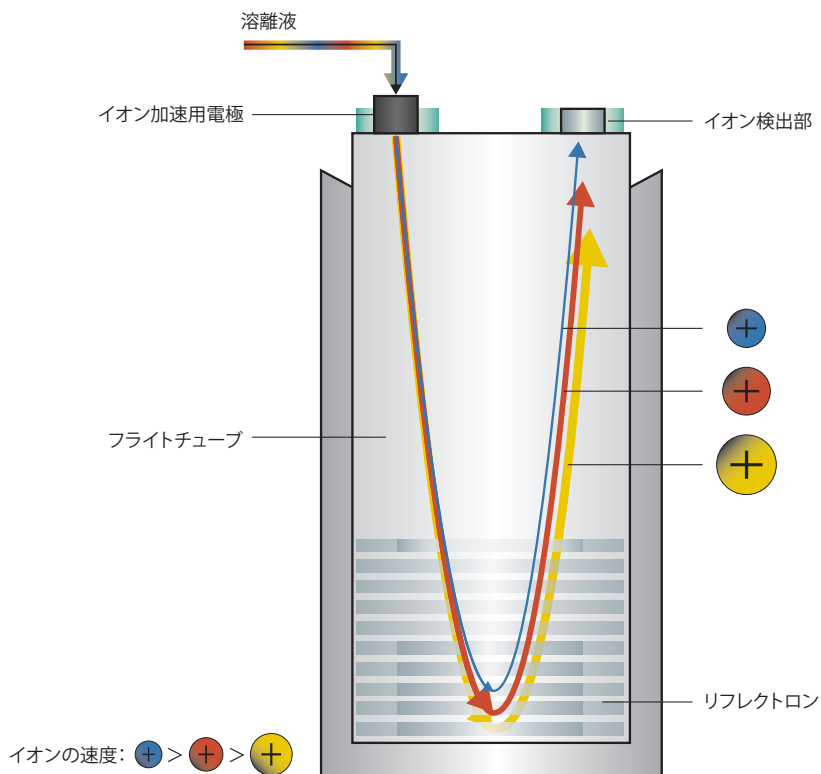


図16 飛行時間(TOF)型質量分離部の模式図

## 質量分離部の特長

表4に、各種質量分離部の主な特長と制限事項をまとめました。

表4 各種質量分離部の特長と制限事項

質量分離部	説明	特長	制限事項
磁場型	イオン透過方式 スキャンおよびSIM	<ul style="list-style-type: none"> <li>高い分解能(二重収束の場合)</li> <li>広いダイナミックレンジ(SIMの場合)</li> <li>高い再現性・感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>大型=高速分析に不向き</li> <li>高真空が必要=LC-MSに不向き</li> </ul>
四重極型	イオン透過方式 スキャンおよびSIM	<ul style="list-style-type: none"> <li>小型</li> <li>低真空で稼働</li> <li>高速分析に対応</li> <li>広いダイナミックレンジ(SIM測定時)</li> <li>高い再現性・感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>分解能が低い</li> </ul>
イオントラップ型	イオン捕獲方式 スキャン	<ul style="list-style-type: none"> <li>小型</li> <li>スキャン感度が四重極より高い</li> <li>高い再現性・感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>トラップ容積が小さい =ダイナミックレンジが狭い</li> <li>分解能が低い</li> <li>SIM測定ができない</li> </ul>
飛行時間型	時間測定 スキャン(無電場領域の飛行 時間をはかっているため、実 際にはスキャンしていない)	<ul style="list-style-type: none"> <li>スキャン感度が高い</li> <li>高い分解能</li> <li>質量範囲が広い</li> <li>高速分析に対応</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>フライトチューブの長さが分解能と 関係=大型</li> <li>広範囲なマススペクトル取得する のが苦手</li> </ul>

## 第4章 MS/MSの基礎

第4章では、代表的な主なMS/MSについて解説します。

### なぜMS/MSが必要なのか

本来、MSはマススペクトルを測定することで、分析種の定性を行うための分析手法です。しかし、LC-MSで利用できる大気圧イオン化法 (ESI、APCIなど) は、主に分子量情報を示すイオンしか観察できません。そこで、第1質量分離部 (MS1) で特定の質量を選択し、そのイオンを強制的に開裂させ生成したイオンを第2質量分離部 (MS2) で測定する方法が用いられます。MS1で選択したイオンをプリカーサイオンと呼びます。プリカーサイオンを開裂させる手法はいろいろありますが、代表的な手法としてアルゴンガスなどを衝突させることでイオンを開裂させる手法 (衝突誘起解離; CID) が広く用いられます。CIDなどにより開裂したイオン群を、MS2で測定しMS/MSスペクトルを得ます。生成したイオン群

をプロダクトイオン、得られたマススペクトルをプロダクトイオン (マス) スペクトルと呼びます。この手法は分析種の定性に必要なので、すべてのMS/MS装置で測定できます (図17)。

この構造情報は定性にも利用できます。例えば同じ $m/z$ のプリカーサイオンであっても、構造が異なれば異なる $m/z$ のプロダクトイオンを与える可能性があります。もし、異なる $m/z$ のプロダクトイオンを与えるのであれば、両者は明確に区別できます。より高い選択的検出が可能になります。類似化合物の区別だけでなく、一般的なノイズもプリカーサイオンの $m/z$ とプロダクトイオンの $m/z$ の2つの閾門を通過するのはできないので、ノイズを大幅にカットすることができます。

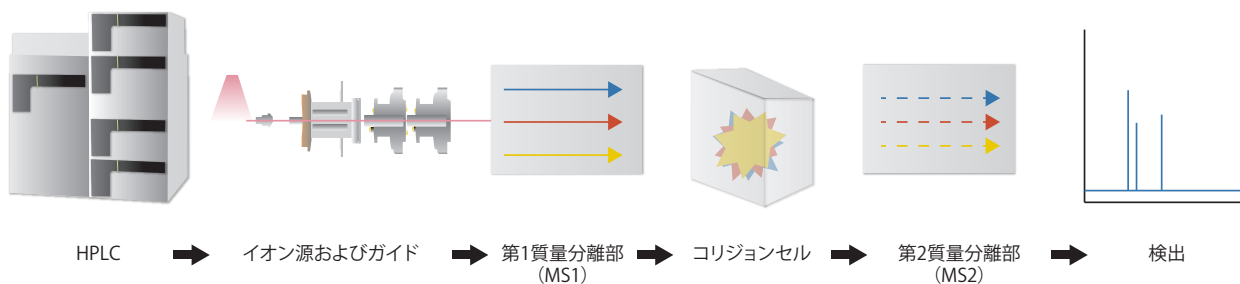


図17 LC-MS/MSの基本的な構成

CIDによるフラグメンテーションは、コリジョンエネルギーを変えることでより多くの情報を得ることができます。コリジョンエネルギーをあげることで、フラグメンテーションが進行します。有益な

構造情報を得るために適したコリジョンエネルギーは、分析種に依存するので十分に検討する必要があります。

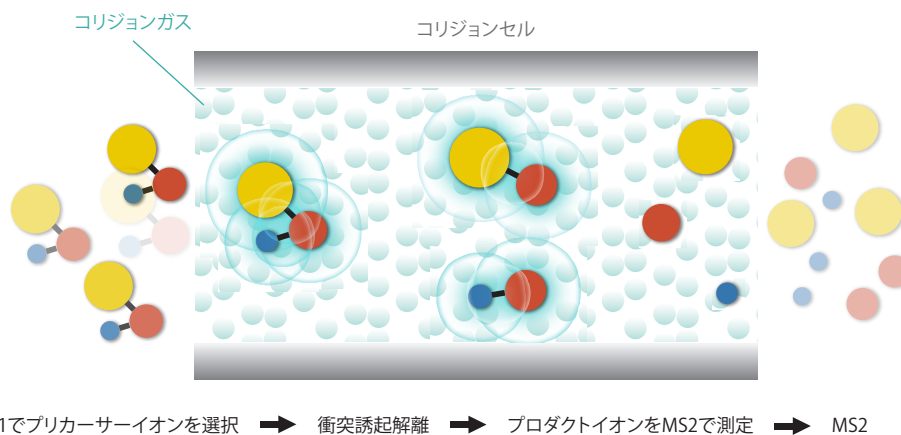


図18 MS/MSシステムの衝突セル内部で生じるCIDの模式図

タンデム四重極 (Q/Q) 型のMS/MSシステムは、MS1およびMS2に、スキャンまたはSIMモードを組み合わせることで、より多様な測定を行うことができます (図19)。

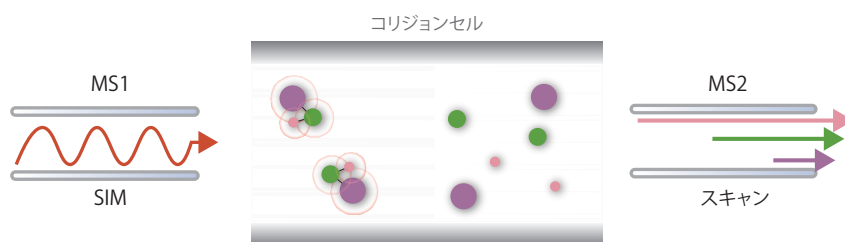
特記すべき分析手法は、MS1 (SIM) で特定のイオン (プリカーサーイオン) を選択し、コリジョンセルでの開裂により生成した特定のイオン (プロダクトイオン) をMS2 (SIM) で分析する手法です。この手法をMRM (多重反応モニタリング) と言います\*。MRMを用いると、たとえ同じ $m/z$ のイオンであっても、構造が異

なる分析種はCIDにより異なるプロダクトイオンが生成する可能性があります。プリカーサーイオンとプロダクトイオンの組合せによりイオンを検出するので、非常に選択性の高いクロマトグラムを得ることができます。分析種が多い場合や血液や食品など複雑なマトリックスが分析を妨害する場合、MRM分析モードは非常に有効です。

\*SRM (選択反応モニタリング) と呼ぶこともあります。ここではMRMと表します。

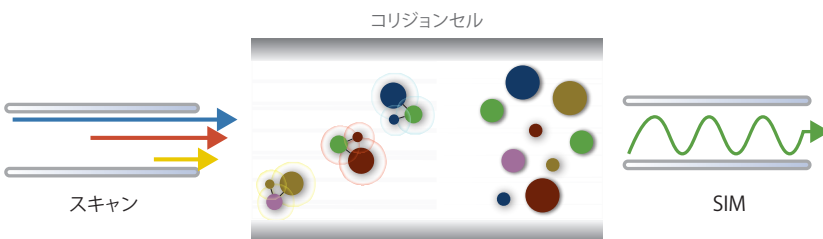
#### (A) プロダクトイオンスキャンモード

MS1でプリカーサーイオンの $m/z$ を固定し、CIDで生成したプロダクトイオン群をMS2で測定します。分析種の構造情報を得る基本的な分析です。



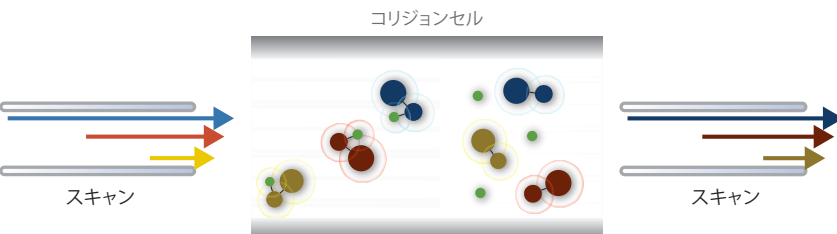
#### (B) プリカーサーイオンスキャンモード

CIDで生成したプロダクトイオンが、MS2で設定した $m/z$ である場合、MS1の $m/z$ に基いたマススペクトルを表示させます。重要なプロダクトイオンを与えるプリカーサーイオンの検出およびその $m/z$ 情報を得るために使用します。



#### (C) ニュートラルロススキャンモード

MS1およびMS2を一定の差を保って連動走査させます。プロダクトイオンから一定の質量ロス (ニュートラルロス) によるフラグメンテーションが起こった場合にイオン量が記録されます。同様のフラグメンテーションを起こす成分を見つけ出すのに有効です。



#### (D) 多重反応モニタリング (MRM) モード

分析種に応じた、プリカーサーイオンの $m/z$ とプロダクトイオンの $m/z$ をMS1とMS2に設定することで、より選択性の高いイオン検出ができます。LC-MSによる高感度分析に極めて有用な測定モード。

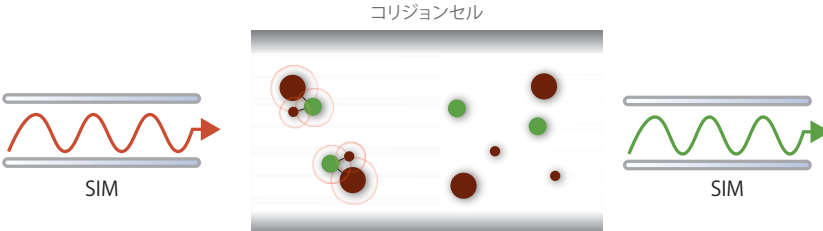


図19 Q/Q型質量分離部の測定モード

## MS/MSシステムのタイプおよび主要な特徴

MS/MSを構成する質量分離部の組合せはさまざまありますが、主にQ/Q、Q/TOF (IT/TOF) が利用されています。前者のように同じ形式の質量分離部を連結したものをタンデムMS、後者のよう

に異なる形式の質量分離部を連結したものをハイブリッドMSとすることがあります。

表5 タンデムMSとハイブリッドMS

タンデムMS	タンデム四重極 (Q/Q) 型 タンデム飛行時間 (TOF/TOF) 型
ハイブリッドMS	四重極・飛行時間 (Q/TOF) 型 イオントラップ・飛行時間 (IT/TOF) 型 四重極イオンサイクロトロン共鳴 (Q/ICR) 型

### タンデム四重極 (Q/Q) 型

四重極—コリジョンセル—四重極の配置の質量分離部です。図19に示した測定モードをすべて利用することができます。MRM分析モードは高い感度と高い選択性があるので、定量分析によく

利用されます。比較的装置サイズも小さいため、必要な真空度も低くLCとの連結 (LC-MS) に最適な装置とされています。

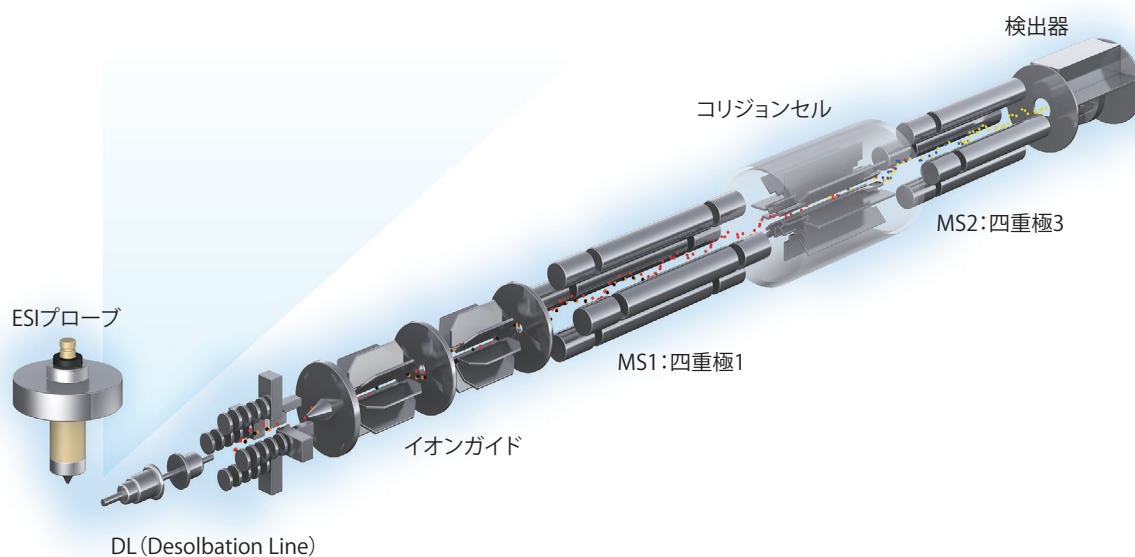


図20 タンデム四重極 (Q/Q) 型質量分析計の構成

### 四重極・飛行時間 (Q/TOF) 型

四重極—コリジョンセル—飛行時間の質量分離部です。MS2をTOFにすることで、高分解能のマススペクトルを得ることができます。イオンの精密質量から、詳細にプロダクトイオンを解析することができます。これにより構成元素の組成を知ることができます。(LCを利用しないまたはLCで分離できなかった)混合成分の分析でも、MS1(Q)で特定のイオンを選べば、各々のプロダクトイオンスペクトルを取得することが可能です。たんぱく質の酵素

消化物を混合物のまま、MS1でペプチド断片を選び、プロダクトイオンマススペクトルを測定することで、たんぱく質を同定するなど定性分析に威力を発揮します。

四重極の代わりにイオントラップを用いたIT/TOFもほぼ同様の用途で利用されます。図22にはIT/TOF質量分析計の模式図を示します。ITはそれ自体でシーケンシャルなプロダクトイオン測定できるので、より詳細な構造解析に向いているといわれています。

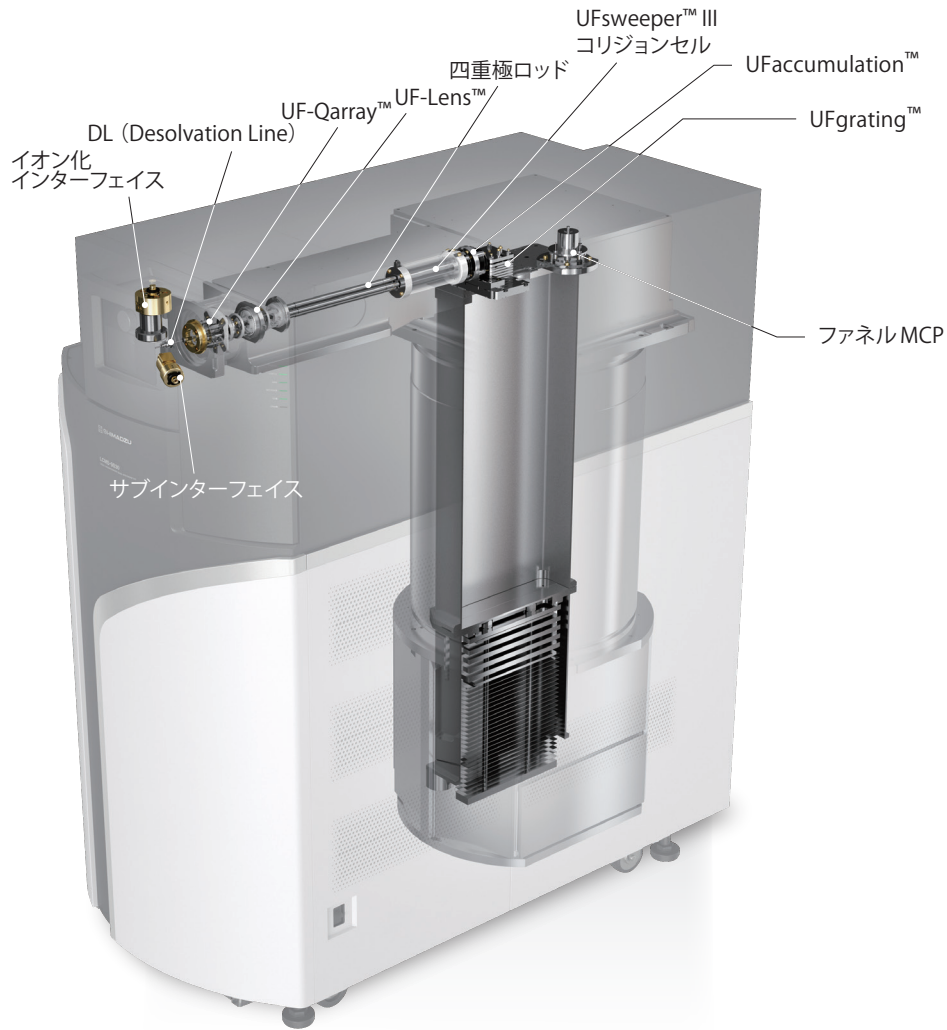


図21 四重極・飛行時間 (Q/TOF) 型質量分析計の構成

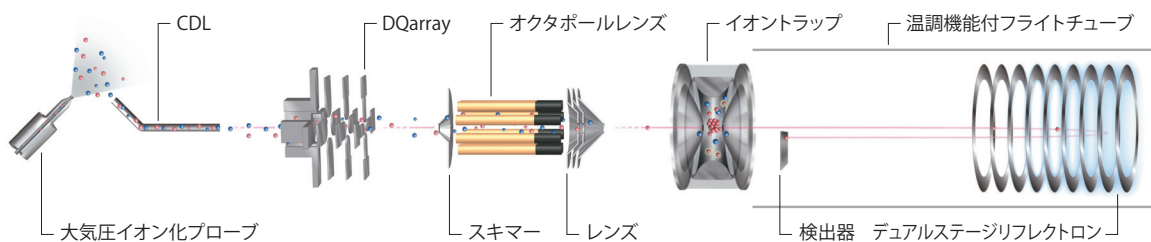


図22 イオントラップ・飛行時間 (IT/TOF) 型質量分析計の構成



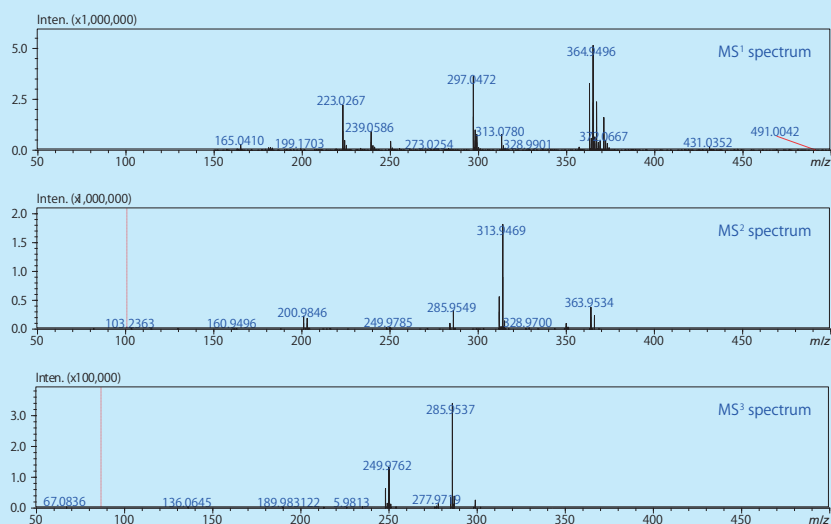
## 各種MS/MSシステムの比較

ここまでの節ではいくつかのMS/MSシステムを取り上げ、それらの主要な特長を解説しました。各種の要件を検討すれば分かるように、すべての用途や分析をカバーできる万能なMSやMS/MSなどは存在しません。個々の装置には固有の特長と制限事項があ

るので、それぞれの長所と短所を理解した上で取捨選択を行い、各自のニーズに最も適したシステムを選び出す必要があります。ここではMS/MSシステムの特長を示します(表6)。

表6 MS/MSシステムの比較(Q/Q、Q/TOF(IT/TOF))

MS/MSシステム	特長	制限事項	用途
Q/Q	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 最高の感度(MRM)</li> <li>• 広い検出ダイナミックレンジ</li> <li>• 低いコスト</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 低い質量分解度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 定量分析(MRM)</li> <li>• ターゲットを定めた分析</li> </ul>
Q/TOF (IT/TOF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 高い質量分解度</li> <li>• 広い質量範囲</li> <li>• 中程度の検出ダイナミックレンジ</li> <li>• 高い感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TQ MS MRMモードより低い感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 定性分析</li> <li>• 構造解明</li> <li>• シークエンシング</li> </ul>



Tetrachlorobisphenol AのMS<sup>n</sup>スペクトル

LCMS-IT-TOFを用いた内分泌かく乱物質スペクトルライブラリの開発 (Technical Report C146-2212)

[Technical Report ダウンロードサイト](#)

## 略語

APCI	大気圧化学イオン化
API	大気圧イオン化
APPI	大気圧光イオン化
CID	衝突誘起解離
EI	電子イオン化
ESI	エレクトロスプレーイオン化
HILIC	親水性相互作用液体クロマトグラフィー
IT	イオントラップ
IT/TOF	イオントラップ・飛行時間
MRM	多重反応モニタリング
MS	質量分析
Q/Q	タンデム四重極
Q/TOF	四重極・飛行時間
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
SIM	選択イオンモニタリング
TOF	飛行時間
UHPLC	超高速液体クロマトグラフィー



LCMS、Qarray、UF-Lens、UFSweeper、UFaccumulation、UFgratingは、株式会社島津製作所の商標です。

本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

# 株式会社 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

東京支社 101-8448 東京都千代田区神田錦町1丁目3  
(03) 3219-(官公庁担当)5631・(大学担当)5616・(会社担当)5685

関西支社 530-0012 大阪市北区芝田1丁目1-4 阪急ターミナルビル14階  
(06) 6373-(官公庁・大学担当)6541・(会社担当)6556

札幌支店 060-0807 札幌市北区北七条西2丁目8-1 札幌北ビル9階 (011)700-6605

東北支店 980-0021 仙台市青葉区中央2丁目9-27 プライムスクエア広瀬通12階 (022)221-6231

郡山営業所 963-8877 郡山市堂前町6-7 郡山フコク生命ビル2階 (024)939-3790

つくば支店 305-0031 つくば市吾妻3丁目17-1  
(029)851-(官公庁・大学担当)8511・(会社担当)8515

北関東支店 330-0843 さいたま市大宮区吉敷町1-41 明治安田生命大宮吉敷町ビル8階  
(048)646-(官公庁・大学担当)0095・(会社担当)0081

横浜支店 220-0004 横浜市西区北幸2丁目8-29 東武横浜第3ビル7階  
(045)311-(官公庁・大学担当)4106・(会社担当)4615

静岡支店 422-8062 静岡市駿河区稲川12丁目1-1 伊伝静岡駅南ビル2階 (054)285-0124

名古屋支店 450-0001 名古屋市中村区那古野1丁目47-1 名古屋国際センタービル19階  
(052)565-(官公庁・大学担当)7521・(会社担当)7531

京都支店 604-8445 京都市中京区西ノ京徳大寺町1  
(075)823-(官公庁・大学担当)1604・(会社担当)1603

神戸支店 650-0033 神戸市中央区江戸町9-3 栄光ビル9階 (078)331-9665

岡山営業所 700-0826 岡山市北区磨屋町3-10 岡山ニューシティビル6階 (086)221-2511

四国支店 760-0017 高松市番町1丁目6-1 高松NKビル9階 (087)823-6623

広島支店 730-0036 広島市中区袋町4-25 明治安田生命広島ビル15階 (082)248-4312

九州支店 812-0039 福岡市博多区冷泉町4-20 島津博多ビル4階  
(092)283-(官公庁・大学担当)3332・(会社担当)3334

島津コールセンター（操作・分析に関する電話相談窓口） ☎ 0120-131691  
IP電話等：(075)813-1691

<https://www.an.shimadzu.co.jp/>