

質量分析におけるイオン化法の重要性

角田 省二・長澤由美子・福崎英一郎*

筆者らの研究室では主にメタボロミクス技術をベースに研究を行なっている。メタボロミクスとは生体内の代謝物の網羅的分析・解析に基づく研究分野として知られており、実用植物や実用微生物にも適用可能な唯一のオーム科学である。メタボロミクスで用いられる試料の分析方法としては、ガスクロマトグラフィー (gas chromatography, GC) や液体クロマトグラフィー (liquid chromatography, LC) などの分離機器と質量分析計 (mass spectrometry, MS) を組み合わせて分析を行うことが多い。試料はGCやLCなどで分離後、MSへ導入され検出器でイオンを検出することにより測定されるのだが、この際目的の試料中の化合物をイオン化することが必要となる。測定者は、種類も多く原理も多様なイオン化法から化合物の物理的、化学的特性により適した方法を選択しなければならない。またメタボロミクスのような未精製試料を用いる場合、マトリクス効果によるイオンの感度や再現性が著しく低下する問題もあるため、試料の状態に応じて最適なイオン化法を選択することが重要となってくる。

そこで本稿では、質量分析に使われている要素技術の中で基本的な技術であり、目的に応じてさまざまな方法が用いられているイオン化方法について紹介したい。

試料の性質はさまざま

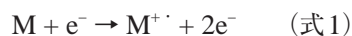
試料の性質は多岐にわたることは簡単に想像できる。そのため分析する試料に応じていかに効率よくイオン化させるかが重要となる。最適な条件で、最適なイオン化を選択できなければイオンを測定することが困難になる。そのため測定者は分析を行う前に、試料の情報を加味した上で最適なイオン化法を選択する必要がある。

本節では、試料の観点からイオン化法を選択として、代表的なイオン化である電子イオン化法 (electron ionization, EI) と電子スプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) を中心に掘り下げたい。ちなみにEI法は電子衝撃イオン化法 (electron impact ionization) とも表記される場合がある。ここでは日本質量分析学会の推奨に従い、電子イオン化法 (electron ionization, EI) と表記する¹⁾。

試料に応じたイオン化法の選択 分析を行う前に測定者は、あらかじめ分析する試料量や物性などを把握した上で適切なイオン化を選択する必要がある²⁾。

高濃度の試料を一度に大量導入すれば、感度もその分向上する。しかし、試料が過剰量導入されることで、ピーク強度が検出限界を超えてしまうサチュレーションを起こす。逆に試料濃度が極端に低い場合は、イオン化される試料の量が少なく検出感度が低くなってしまう。そのため、測定者は試料の濃度設定に十分注意を払う必要がある。また、試料に含まれる「どの化合物」を検出を行いたいかで最適なイオン化法を選択する必要がある。対象化合物が無機物か有機物なのか、有機物の中でも、核酸、ペプチドを含むタンパク質、脂質、複合糖質などさまざまな性質の化合物が存在するため、イオン化法も分析対象ごとに最適な方法を選択する必要がある (表1)。

EI法は、分子量が1000程度以下の低分子量の試料で揮発性が高い試料や常温で気体の試料に用いられる。これら分子に電子ビームを衝突させることでイオン化が行われ、正イオン分子が生成される (式1)。そのため、一般的に負イオン分析は行われない。



ESI法では、分子量が10万程度以下の全分子量領域で測定が可能であり、試料を含む帯電液滴の生成・乾燥 (脱溶媒) によりイオン化が行われる。溶媒によりさまざまなイオンが生成されるため、正負イオンの測定が可

表1. イオン化法を選ぶ目安³⁾

	EI法 (GC/MS)		ESI法 (LC/MS)	
	正	負	正	負
無機化合物	○	—	○	○
低質量有機化合物	○	—	○	○
ポリマー	○	—	○	○
脂質	○*	—	○	○
糖	○*	—	○	○
核酸	—	—	—	○
ペプチド	—	—	○	○
タンパク質	—	—	○	—

*誘導体化により測定可能

能となる。測定に必要な試料量も数pmolオーダー以下なので、生体由来の微量な試料に対してもとても有効である。

このように試料に応じて最適なイオン化法を選択することはとても重要である。

EI法とESI法

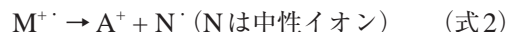
EI法はイオン化のメカニズムから、「陶器製の皿の山を金槌で叩き、粉々になった欠片を集めて構造を推定する」と表現されるように、フラグメントと呼ばれる分子イオンが分解したものがピークとして分子イオンよりも低質量側に検出される。測定している化合物が既知化合物である場合は、フラグメントが規則的に起きるため、構造解析上の有用な情報をスペクトルから得ることができる。

対してESI法はJohn B. Fenn博士らが開発し⁴⁾、電子を付加してイオン化させることから「象のように大きな分子のための“翼”」の役割を果たすと表現され、フラグメント形式もEI法に比べるとソフトである⁵⁾。したがって、同じ試料を用いてもEI法とESI法では異なるフラグメント情報が手に入る事がわかるだろう。

本節では、イオン化メカニズムや特長などを比較して解説したい。

EI法とESI法のイオン化メカニズム EI法の対象化合物は分子量1000程度以下の低分子量の試料や揮発性が高い試料や常温で気体の試料に適用される。EI法によるイオン化メカニズムは(図1)に示した通りである。フィラメントから放出される熱電子が試料分子(M)と衝突し、熱電子が持つエネルギー(一般的には70 eV)により分子から電子が引きぬかれることでイオン化される(式1)。自己のイオン化エネルギーよりも過剰なエネルギーをイオン化の際に受け取った場合、そのエ

ネルギーにより分子イオンはイオンソース内で分子構造に依存した開裂が引き起こされる(式2)。



これをフラグメンテーションといい、試料分子の構造情報を有するフラグメントイオンが生じ、分子構造の解析に活用される。この時すべての M^{+} がフラグメント化されるわけではないので、実際測定者が得られる情報としては M^{+} と A^{+} のマスペクトルである。しかしEI法は極性分子や高分子量分子の分析が困難という問題があった⁶⁾。この問題を解決したのがESI法である。

ESI法は大気圧条件下で動作するイオン化法で、主に無機化合物、低分子有機化合物、脂質、糖など分子量が10万程度以下の全分子量領域で測定可能で、生体関連物質や難揮発性物質の測定も可能である。ESI法によるイオン化メカニズムは(図2)に示した通りである。ESI法は大きく分けて、「帯電液滴の生成、帯電液滴の乾燥(脱溶媒)、質量分析計への導入」で成り立っている。帯電液滴の生成では、液体状態の試料に対して高電圧を印加し、ネブライザーガスとともに電氣的にスプレーさせる。溶媒気化により液滴半径が小さくなり、電荷密度の上昇とともに電氣的反発によりクーロン爆発を繰り返し起こしながら微細粒子化し、最終的には電子が試料に付加されてイオン化が達成される。このとき、生成されるイオンは付加イオンと呼ばれる。LC/MSのように大量の溶媒とともに試料が導入される場合、質量分析計に導入される帯電液滴は多く、そして粒径も大きくなる。その結果、気化熱により温度が低下し、液滴の脱溶媒効率も低下し、試料イオン導入が困難となる。そこで帯電液滴の乾燥として、イオンが導入される前に高温で加熱することで、脱溶媒効率を上げている。こうしてイオン化された試料は質量分析計に導入されるが、ESI法では大気圧

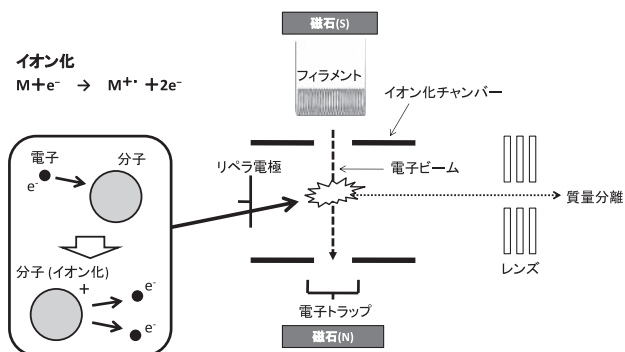


図1. EI法スキーム。フィラメントから放出される電子ビームが分子と衝突することで電子が引きぬかれ、分子イオンが生成される。

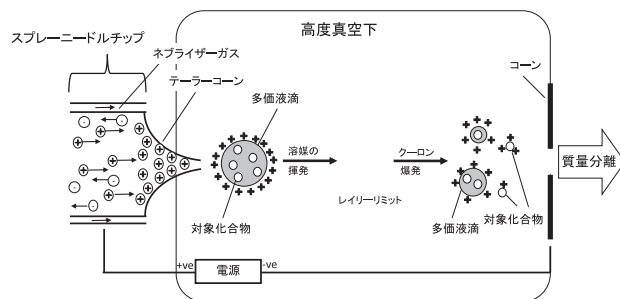


図2. ESI法スキーム。試料を含む溶媒は、スプレーニードルチップから高電圧を印加され、ネブライザーガスによりスプレーされる。このあと溶媒気化と電氣的反発によるクーロン爆発により微細粒子化し、最終的に電子が試料に付加される。

条件下から高真空中の分析系まで効率よく導入する必要があるため、大気圧部から分析部まで複数のセクションを用意し、それぞれの真空度を徐々に上げていくシステムとなっている。

EI法とESI法の特長 EI法とESI法はともに、分子をイオン化させるための手法であるがそのメカニズムの違いにより得られるイオンも異なる。

EI法では(式1, 2) から主に正イオンが生成されるため、負イオン分析は行われない。対してESI法は分子種の極性、溶媒の特性、アルカリ金属イオンなどの不純物の有無などにより多様な付加イオン種が生成する(表2)。

EI法でイオン化された分子はフラグメント化されるが、この時ある種の元素(Cl, Brなど)はそれらの同位体のスペクトルパターンによりその存在を検出することができる。そのため質量スペクトルにおけるフラグメントイオンのシグナルを基にして、分子の構造を推定することが可能である。もし構造を決定したい場合は、推定される化合物の標準品を同じ条件でイオン化し、同じフラグメントが得られるか検証を行う必要がある。

ESI法は表2にまとめたようにさまざまな付加イオン種が生成される。その中でもっとも特徴的なのが多価イオン生成である。多価イオンとは複数の電荷を持つ分子である。一価のイオンでは測定範囲を超えるような高分子でも、多価イオンが生成されることで測定が可能となる。マススペクトルは縦軸にイオン強度、横軸には質量(m)ではなく質量/電荷数比(m/z)で示されるため、ESI法により多価イオンが生じると、電荷数(z)が増加し、 m/z が小さくなる。その結果、通常では質量分析の測定範囲を超えてしまうような高分子も測定が可能になる。しかし、ESI法はEI法のようにフラグメントイオンはまったく検出されないか、あるいは強度が非常に

小さいため、分子の構造解析を行うためにはMS/MS機能を持つ質量分析計が必要となる。

EI法とESI法の問題点 EI法は加熱時にイオン化しない分子、高分子、金属錯体などに対しては適用不可能であり、また熱に不安定な分子に対しては適用不可能である。これを解決する方法として誘導体化がある。分子を誘導体化することで、修飾基を保護することで安定性を付与し、また難揮発性化合物も揮発しやすい性質を与えることが可能となる。ESI法はスプレーする際に用いる移動相に不揮発性塩が含まれていると、目詰りや極端なイオン化効率の低下を引き起こす。ナトリウムやカリウムなどの不揮発性塩が大量に存在すると、電荷の大半がそれら金属イオン生成に消費され、金属付加イオンがプロトンと混合した状態で検出されてしまう。また、EI法と異なり大量の溶媒とともに試料がイオン化されるためマトリクス効果の影響を受けやすい問題がある。マトリクス効果とは、試料に含まれる夾雑物が目的成分と共溶出し、成分のイオン化に影響を与える現象のことである。この効果として代表的なものとして、分子のイオン化が抑制されてしまう「イオン化サプレッション」⁸⁾、逆にイオン化が亢進される「イオン化エンハンスメント」⁹⁾がある。このマトリクス効果を回避するために試料の前処理を行なわれる。一般的に、夾雑物を除去するために固相カラムなどを用いて試料の精製を行う方法が挙げられる。忘れてならないのはESI法ではイオン化効率が分析対象化合物により大きく異なるため、大きなシグナルが得られたからといって多量に含まれるとは限らない。また逆も然りである。したがって、ESI法で厳密に定量するためには、安定同位体で標識した標準物質を用いて分析系全体を標準化する必要がある。

APCI法とAPPI法

上述してきたようにESI法は適用範囲が広く利用されているが、より低極性向けとして、大気圧化学イオン化法(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)と大気圧光イオン化法(atmospheric pressure photoionization, APPI)がある⁵⁾。

ESI法とAPCI法をどう使い分けるか 水やメタノールに溶解しにくくクロロホルムやヘキサンなどの低極性溶媒に対して溶ける脂溶性の高い化合物や溶液中でイオン化しない化合物の試料は、ESI法でインフュージョン分析してもイオン源がないためイオン化されにくい。その場合、APCI法を利用することを考えてほしい。

しかし、ESI法と同様の大気圧でのイオン化法であるが、イオン化の直前に加熱されることから熱に不安定な

表2. ESI法で観測される付加イオン⁷⁾

移動相溶媒	生成しやすい付加イオン
正イオン検出 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] ⁺ , [M+H+N(CH ₂ CH ₃) ₃] ⁺
負イオン検出 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 ₃ COO] ⁻
含ギ酸	[H-H] ⁻ , [M-HCOO] ⁻
含トリフロロ酢酸	[H-H] ⁻ , [M-CF ₃ COO] ⁻

試料は分解してしまう恐れがある。そこで、イオン化法を検討する手順としては、ESI法はAPCI法と比較して高感度の場合が多く、広範な物質をイオン化できる傾向があることから、まずはESI法でのイオン化を試みた後に、APCI法でのイオン化を検討することが妥当である。

比較的新しいイオン化法 APPI法は、比較的最近になり開発されたイオン化法である¹¹⁾。APCI法とほぼ同じインターフェースが用いられる。相違点は、液滴噴霧後コロナ放電領域に導入し移動相溶媒との化学イオン化にてイオン化を行わず、光によりイオン化することである。特徴は、電子イオン化とは異なり、光のエネルギーがイオン化の閾値に達したところでイオン化確率がステップ型で立ち上がるため、イオンのフラグメント化が抑制される。その結果、主にプリカーサーイオンが観測されるため、質量スペクトルの解釈がしやすい。またAPCI法と比較して、マトリクス効果が小さいという報告もあることから、生体試料中の医薬品を微量定量するために有用であると考えられている¹²⁾。

ただし、APPI法もAPCI法と同様にイオン化に先立って試料を揮発させ気相へ導く必要がある。配糖体や核酸誘導体といった揮発性の低い試料は感度が得られにくい。ため、化合物の物理化学的性質には注意していただきたい¹³⁾。

試料測定ワークフロー

これまで代表的なイオン化法について述べてきたが最後に、実際に試料を測定する際、どのような手順で分析の最適化を行っているのか。LC/MSで分析を行う場合を例として挙げたいと思う。分析条件の最適化は、イオン化法の選択、MS測定条件の最適化およびLC測定条件の最適化の3ステップからなる。

測定したい試料やその試料に含まれていると思われる各標準試薬を分析する場合、シリンジポンプを用いて試料溶液を直接MSに導入するインフュージョンによるイオンソースの最適化を行い、最大感度が得られる条件を求める。この際、試料の性質に合わせて各種イオン化法を試し条件を決定する。次に、測定したい化合物が検出できる条件が固まったら、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を用いて、イオンスプレー電圧、イオ

ンソース温度、ガス流量などの最適条件を求める。この一連の作業をした最後にカラムの選択や試料前処理方法を検討し、試料測定を開始できる。オペレーター任せで測定をしているとデータが最適な条件で分析されているのか、気が付かないこともあるのではないだろうか。一度も測定したことがない方は、測定することを強くお勧めする。

おわりに

本稿で取り上げたイオン化法は、ほとんどの読者にとっては基礎的な内容であったかもしれない。しかし、実用性に重きをおかれるためにイオン化法の機構は解明されずにいるものが多く、その原理解明は重要な研究課題の一つである。また、ライフサイエンスに基づく医薬品の開発、植物改良などにおいて、分子レベルでの情報は不可欠となっている。とりわけ、分子量情報を与える質量分析法の役割は今後計り知れないほど大きいため、新しいイオン化の開発も進められている。これを機に、いまいちどイオン化法に関心を持っていただければ幸いである。

文 献

- 1) 日本質量分析学会用語委員会編：マスマススペクトロメトリー関係用語集, p.38 (2009).
- 2) 志田保夫ら：これならわかるマスマススペクトロメトリー, p.66, 化学同人 (2005).
- 3) 志田保夫ら：これならわかるマスマススペクトロメトリー, p.26, 化学同人 (2005).
- 4) John, B. F. *et al.*: *Science*, **246**, 64 (1989).
- 5) John, B. F.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 3871 (2003).
- 6) Yamashita, M. and Fenn, J. B.: *J. Phy. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
- 7) 高橋 豊, 川畑慎一郎：ぶんせき, **7**, 328 (2007).
- 8) Villagrasa, M. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1157**, 108 (2007).
- 9) Mallet, C. R. *et al.*: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 49 (2004).
- 10) Lossing, F. P. and Tanaka, I.: *J. Chem. Phys.*, **25**, 1031 (1956).
- 11) Masuda, Y. *et al.*: *J. Chromatogr. B*, **853**, 70 (2007).
- 12) Cai, Y. *et al.*: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1717 (2005).
- 13) Matsuda, K.: *YAKUGAKU ZASSHI*, **129**, 993 (2009).