実験技術講座

質量分析法の最新技術

Time of Flight型質量分析計

建田 潮^{1,*}, 笠松隆志^{2,**}, 瀧浪欣彦^{3,***}, 佐藤貴弥^{4,****}

¹株式会社エービー・サイエックス

²アジレント・テクノロジー株式会社

³ブルカー・ダルトニクス株式会社

⁴日本電子株式会社

(2016年12月28日受理)

Time of flight mass spectrometer (TOF-MS)

Ushio TAKEDA,¹ Takashi KASAMATSU,² Yoshihiko TAKINAMI³ and Takaya SATOH⁴

¹AB Sciex, Toyosaki, Kita-ku, Osaka 531-0072, Japan

²Agilent Technologies Japan, Ltd., 9-1 Takakuramachi, Hachioji, Tokyo 192-8510, Japan

³Bruker Daltonics K.K., Moriya-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-0022, Japan

⁴JEOL Ltd., Musashino, Akishima-shi, Tokyo 196-8558, Japan

Keywords: TOF-MS, Q-TOF, 多重周回型, らせん軌道型.

1. 飛行時間 (Time of Flight: TOF) 型 質量分析計の原理

質量分析計とは、化合物をイオン化し、そのイオンの運動を測定することにより、質量を測定する装置である。質量を分離分析する部分を質量分離部と呼び、様々な種類の装置が市販されている。そのなかで、TOF型と呼ばれる質量分離部は高い分解能や広い適用分子量範囲によって、広範な化合物の分析に用いられる。TOF-MSは、その名前の通り一定距離をイオンが飛ぶ時間を計測する。イオン化部で生

成されたイオンは、グリッド電極と対向電極の電位差を利用してアクセラレータで加速され、高真空のフライトチューブ (Drift region: イオン飛行部) に導入される。複数のイオンは同時に加速され、それぞれの質量に応じた速さでフライトチューブ内を直線状に飛行し、検出器に到達する。この時の飛行している時間を計測し、イオンの m/z を算出する (図1)。一定飛行距離において、 m/z の小さなイオンは早く検出器に到達し、 m/z の大きなイオンはゆっくりと検出器に到達する。到達時間は図中の式であらわされ、取り込み時間を長くするほど、大きなイオンについて m/z を測定することができる。理論的には飛行時間と m/z の平方根は比例関係にあるが、実際においては、いくつかの質量既知の化合物を用いて質量校正を行い、測定することが主となっている。

(建田 潮)

2. TOF-MSの特徴

一定飛行距離を飛行する時間からイオンの m/z を算出することから、飛行距離が長ければ長いほど高い分解能が得られる。しかしながら、フライトチューブを長くすることは装置

* 〒531-0072 大阪市北区豊崎3-19-3

E-mail: ushio.takeda@sciex.com

** 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

E-mail: takashi.kasamatsu@agilent.com

*** 〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9

E-mail: yoshihiko.takinami@bruker.com

**** 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2

E-mail: taksatoh@jeol.co.jp

© 日本農薬学会

図1. TOFの原理.

図2. リフレクトロン.

の大型化、高真空を保つことのむずかしさなどから限界がある。そのため、しばしばリフレクトロンと呼ばれるイオンの飛行する向きを変える仕組みが採用されている（図2）。リフレクトロンは、一般的には電極板を何枚も重ねた構造を持っており、その中で向きを変え、イオンを収束させる¹⁾。また、MALDI法などにおいてはイオンが初めに持っている運動エネルギーが異なり、そのことが原因で高い分解能が出ない場合がある。リフレクトロンを利用することによって同一 m/z のイオンを同一飛行時間で検出器に到達させることができるようになる²⁾。

TOF-MS型の装置において、フライトチューブの金属が温度変化などによって伸縮すると、飛行時間にズレが出て質量精度を落とす原因になる。そのため、フライトチューブの温度調整は非常に重要になる。

TOF-MSはその高い分解能、高い質量精度、同位体比率により、未知の化合物などの組成式の推定に使用されている（図3）。また、メタボロームのスクリーニング解析や、タンパク質やポリマーのような高分子量の化合物の分子量測定などにも使用されている。

（建田 潮）

3. GC/Q-TOFのハードウェア紹介

3.1. GC/Q-TOFの構成

GC/Q-TOFは質量分析計の前段階の試料分離にガスクロマトグラフを使用し、飛行時間型質量分析計の前に四重極とコリジョンセルを配した構成となっている（図4）。2つの質量分析計を持っているため、その組み合わせによって2種類の分析を行うことができる。

3.2. TOFモード

Q1で全イオンを通過させ、コリジョンエネルギーを0Vとして測定を行う。この方法では通常のGC-TOF-MSと同様の分析が可能となる。分子量に関連するイオンの精密質量や同位体比を得ることによって組成推定や、特徴的なイオンの精密質量マスキングクロマトグラムをモニターすることによって、特定の化合物を選択的に検出、定量するような目的で主に使用される。

3.3. Q-TOFモード

Q1で特定のイオンのみを通過させて選択し、適当なコリ

図3. 組成式の推定.

図4. GC/Q-TOFの構成.

ジョンエネルギーで開裂させ、生成したプロダクトイオンをTOF-MSで質量分離して検出する。この方法ではプロダクトイオンの精密質量を知ることができ、これらを解析することによって分子の詳細構造を知ることができる。また、TOFモードの測定だけでは選択的に検出できない場合に、Q-TOFモードを使うことによって目的成分をより選択的に検出することもできる。これは、残留農薬分析においてSIMで選択性が得られない化合物をSRMでより選択的に検出するといったものと似たようなことであるが、Q-TOFモードでは設定した範囲のプロダクトイオンをすべてモニターするため、どちらかというとトリプル四重極MSにおけるプロダクトイオンスキャンに近いイメージである。

3.4. リムーバブルイオン源

通常、GC-MSでの分析はおもに電子イオン化(EI)で行われるが、EIは非常に強いイオン化のため分子量情報を与えるイオンが観測しにくいことが多くある。そこで、精密質量と同位体組成により組成を決定する場合にはソフトなイオン化により分子量関連のイオンを得る必要がある(EIでも分子イオンが観測されないわけではないが、EI単独では分子イオンと判断するのが困難なことが多いので、そのような場合には他の方法も使って分子イオンであるという確証を得る必要がある)。ソフトなイオン化の代表としては化学イオン化(CI)があるが、通常イオン化を変更する場合にはイオン源を変更する必要がある。イオン化を変更する際の一番の難点は質量分析計の真空を解除してイオン源を交換したのちに再び真空状態にすることであり、これによって結果を得るまでに多くの時間を要することとなることがしばしばある。リムーバブルイオン源ではイオン源の搭載されているイオン化室の外側に真空インターロックで仕切られたイオン源を交換するための場所があり、そこを介して真空を解除することなくイオン源を交換できる。

3.5. ダイナミックレンジの拡張

TOF-MSで定量をする場合にはダイナミックレンジの狭さが時々問題になる。これはTOF-MSのイオン信号に対応する数GHzのサンプリングレートを持つアナログ/デジタル変換器(ADC)のダイナミックレンジによるものである。図5は検出器からのシグナルをデジタルに変換する経路を2系統にして、インターリーブ効果によって倍のサンプリングレートにすることにより質量精度の向上を得る技術の概要である。両方のアンプリファイアを同じゲインに設定すれば、

どちらのADCからも同条件のシグナルが得られるため、各ADCの倍のサンプリングレートでデータが得られたことになる。しかし、これではダイナミックレンジの拡張は行われない。そこで、片方のアンプリファイア、たとえばアンプリファイア-2のゲインを1/10~1/15に設定して測定を行えば、仮にADC-1の方で飽和が起きても、10倍程度までならばADC-2の方で飽和せずシグナルを得ることができ、高濃度側での直線性が悪い場合などに対応ができる。この場合は、どちらかのADCで変換されたシグナルは捨てることになるので、実行のサンプリングレートは両方のアンプリファイアのゲインが同一の場合の半分になり、質量分解能は多少犠牲になるが、実際には大部分の場合影響のない範囲で測定が可

能である。

(笠松隆志)

4. 高分子領域の分析

4.1. MALDI-TOF型質量分析計による高分子領域の分析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)-飛行時間 (TOF) 型質量分析計 (図6-A) は、MALDIによるパルスイオン化と、パルス加速によるTOF型質量分離部とから成り立っており、リフレクタや遅延引き出し等の実装による高分解能化により1990年代前半に実用化された装置構成であり、タンパク質や合成高分子の分析に広く用いられてきた。様々な質量分析計が利用可能な現在においても、分子質量数万を超える低価数のイオンが検出でき、HPLC等の分離手段を適用せずとも構成分子種のプロファイリングを高感度で分析することができるばかりでなく、理論上測定可能質量に上限がないことや、インソース分解 (In-Source Decay, ISD) によるNおよびC末端アミノ酸配列の解析が可能³⁾であるなど、この形式の装置ならではの長所も備えており、質量分析計として高分子領域の分析に欠かすことができない装置であると言える。

しかしながらMALDI-TOF型質量分析計を用いて高分子領域の分析を実施するには、いまだ大きな問題が残されている。最大の問題は、数万以上の質量域において、文字どおり「質量分析」という意味において、正確で実用に耐える適切なキャリブント (質量校正用サンプル) が存在しないということである。

機器の形式にかかわらず、質量分析においてはキャリブントを用いて適切に質量校正を実施することが必須であり、質量1万程度以下の領域については様々なキャリブントが質量分析計メーカーや試薬会社等から提供されている。しかし、それを超える質量の測定については、残念ながら適切なキャリブントがなく、代用品としてタンパク質混合物等が提供されているにすぎない。

図5. 2つの2GHz ADCのインターリーブによるサンプリングと2つのADCを用いたシグナル変換の概要。

図6. 機器構成概略図。

A: MALDI-TOF型質量分析計, B: OA-TOF型質量分析計, C: Q-TOF型質量分析計。

例えば、特定のタンパク質をキャリブ란トの1つとして使用することを考えた場合、厳密に質量較正を実施しようとすると、観測されたイオンピークが、そのタンパク質のどのバリエーションで、どのような化学修飾を持つかが正確に特定できていなければならない、さらには、塩や付着水が正確にどれだけ含まれるかを特定できている必要がある。残念ながら、これらの条件を満たすサンプルは市販されておらず、リコンビナントタンパク質を精製したとしても上記の条件を満足するのは、非常に困難であると言わざるを得ないのが現状である。

ただし、これは正確に精密に質量を決定しようとした場合に問題になることであり、キャリブ란トと質量較正による限界を認識して分析を行えば、実用上有用な情報が得られる。例えば、タンパク質同定手法として広く用いられているペプチド・マス・フィンガープリンティング法⁴⁾や、プロテイン・プロファイリングの手法による微生物分離同定法⁵⁾、また、質量150万におよぶ合成高分子の直接分析⁶⁾等は、その端的な例と言える。

新聞らが開発した多重周回飛行時間型質量分析計 MULTUM-S II⁷⁾は、perfect focusingの閉じた周回軌道を周回するイオンを観測する形式であるため、現在市販されて入手可能な質量分析計としては唯一、外挿による質量較正が可能となっており、この問題を回避できる可能性を持つが、別項でも述べられているとおり、MULTUM-S IIでは周回遅れの問題が発生するため、広い質量範囲を一度に測定することが難しい。

4.2. 垂直加速 (OA) 飛行時間 (TOF) 型質量分析計による高分子領域の分析

垂直加速飛行時間 (OA-TOF) 型質量分析計 (図6-B) はイオンの入射軸に対して垂直方向にパルス加速を行い飛行時間で分離する形式の質量分析計であり、多くの場合は連続イオン化であるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) と組み合わされて利用されることが多い。

ESIによるイオン化では、1価のイオンだけでなく多価イオンも生成することが知られており、特にタンパク質のように、容易にプロトン化あるいは脱プロトン化する官能基を分子内に多く持つ分子種では、主として多価イオンが生成する。多価イオンが観測できる場合には、高質量化合物であっても低 m/z 領域で観測されることから、先述のキャリブ란トの問題が発生しない可能性を示しており、MALDI-TOF型質量分析計に比較して、高分子量化合物の質量分析における高い質量精度が特徴と言える。

例えば、約150kDaのIgGや抗体医薬等において、変性条件での測定では、 m/z 3,000程度を最強ピークとして、 m/z 2,000程度から m/z 4,000程度 (75価程度~35価程度) にかけて広く分布する価数違いの多価イオンが広く分布すること

がよく知られている。観測された一連の多価イオンの m/z から1価イオンあるいは0価の中性分子の質量を計算で求めることで、元の分子種の質量を正確に決定することが可能となる。

このことは、 m/z 1,000~5,000の範囲を正確に質量較正しておけば、観測された多価イオンの m/z を正確に測定できることを示しており、先述のような適切なキャリブ란トが入手できないという問題は発生しない。

この形式の質量分析計から派生した装置として、Q-TOF型質量分析計 (図6-C) を挙げることができるが、TOF型質量分離部の前段の四重極 (Q) の特徴や性能によって、高効率でイオンを観測できる m/z 領域が規定されてしまうため、測定サンプルの特徴や質量をよく理解して選択・使用する必要がある。

4.3. TOF型質量分析計による高分子領域の測定

現在では様々な質量分離部を持つ質量分析計が販売されており、装置スペックで分解能が50万、あるいは100万という質量分析計も市販されている。TOF型質量分離部は、それらの装置に比べると分解能は低いと言わざるを得ないが、高分子量域の測定においては、必ずしもそれらの装置に劣っているとは言えない。

TOF型質量分離部は観測する m/z が高くなっても一般に大きな分解能の低下はなく、パルス加速後のイオンは互いに離れていくためイオン同士の相互作用による分解能低下の懸念もない。また、イオンを限られた容量の空間にトラップする必要もないことから、スペースチャージやそれに伴うダイナミックレンジ低下の懸念もない。

また、以前のTOF型質量分析計で問題であったダイナミックレンジの問題も、10bitの検出器が一般化するにつれて解消されてきたと言える。

このように、TOF型質量分析計は高質量領域の質量分析に比較的親和性が高いものと考えられるが、質量分離部の分解能が高くなり、分解能4万を超える装置が市販されている現在では、また新たな課題が出始めている。

質量分離部の分解能が低い場合、タンパク質等の高分子では同位体ピークの分離ができず、平均質量のみの測定となり、従来は専ら、この平均質量による議論がなされてきた。

それに対して、質量分離部の分解能が高くなり、同位体ピークが明瞭に分離できるようになると、個々の同位体ピークの m/z は正確に測定できるようになるものの、平均質量を求めるには、観測された同位体由来のイオンピーク群の重心点を求める等の処理が必要となる。また、質量分析の分野では議論されてきた話題ではあるが、100アミノ酸残基程度以上のタンパク質、あるいは分子量1万程度を超える高分子化合物では、モノアイソトピックイオンの存在量が非常に少ないため、モノアイソトピックイオンの観測が非常に困難であ

る等の問題が発生する。

McLaffertyらのグループは、この問題に対して考察を試み、タンパク質の高分解能ESI質量分析において、観測された同位体分布に基づくモノアイソトピック質量の特定とイオンピークの同定法を提案^{8,9)}した。すでに一部のメーカーでは、その方法に基づいてタンパク質の解析機能を提供しており、この課題についても解消されつつある。

(瀧浪欣彦)

5. 多重周回質量分析計

5.1. 飛行時間型質量分析計の分解能向上には

飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) は、一般的にリニア TOF-MS、リフレクトロン TOF-MS が普及しているが、近年多重周回 TOF-MS が製品化され利用が進みつつある。TOF-MS は、同じパルス電圧で加速したイオンの速度がイオンの m/z に依存することを利用して質量分離を行う。イオン源から一定距離の検出器までの飛行時間は、イオンの m/z の平方根に比例する。同じ m/z をもつイオン群 (イオンパケットと呼ぶ) の空間的な広がりを検出器位置で十分に小さく抑えられれば、飛行距離 (飛行時間) が長いほど質量分解能を向上させることができる。リニア TOF-MS はイオン源で生成したイオンを直線軌道で飛行させる最もシンプルなイオン光学系を採用している。現在でも、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) をイオン源とする TOF-MS において分子量数万を超える 1 価イオンの高感度分析ができる装置として欠かせない存在である。リフレクトロン TOF-MS は 1973 年に Mamyrin らによって開発され¹⁰⁾、TOF-MS の中でもっとも普及しているイオン光学系である。反射電場を使った往復軌道による飛行距離の延長と、運動エ

ネルギー収束性により検出器位置でイオンパケットを小さくできるため、リニア TOF-MS と比較して質量分解能が劇的に向上している。基本コンセプトは長らく変わらないが、電源精度、機械加工精度、検出器・データ収集系的高速化などに伴い年々性能が向上している。一方、リニア TOF-MS、リフレクトロン TOF-MS の飛行距離の延長は装置の大型化を伴うため物理的に難しい。そこで限られた空間の中で検出器位置でのイオンパケットの広がりを抑える工夫をしながらも、飛行距離を伸ばすことができるイオン光学系として多重周回型 TOF-MS やらせん軌道型 TOF-MS が開発された。

5.2. 多重周回飛行時間質量分析計

限られた空間内で長い飛行距離を得るために、イオンを閉じた周回軌道を複数周回させるイオン光学系を採用したのが、多重周回 TOF-MS である。図 7 には多重周回型 TOF-MS の一例として MULTUM の概略図を示す¹¹⁾。このイオン光学系は、1 周回の始点と終点でイオンパケットの大きさが変化しない perfect focusing という特徴をもつため、多重周回させて飛行距離を延長してもイオンパケットが広がらず質量分解能が向上する。多重周回 TOF-MS の課題は、周回を重ねると質量の小さいイオン (速度が大きい) が質量の大きいイオン (速度が小さい) を周回遅れにしてしまうことである。周回遅れが発生すると質量の小さい順からイオンが検出器に到達しないため、マススペクトルを作成することができない。これを回避するためイオンゲートで多重周回 TOF-MS に入射する質量範囲を限定する工夫がされている。そのため、同時に幅広い質量範囲のマススペクトルの取得は難しいが、対象を絞った分析に向いている。またその最大の特長は、小型でありながら高質量分解能を達成できることか

図7. 多重周回型TOFMS "MULTUM"の概略図。

図8. 多重周回型TOFMSを用いたTOF-TOFの概略図。

ら、可搬型など移動手段に載せたオンサイト観測にも期待される¹²⁾。

5.3. らせん軌道飛行時間質量分析計

多重周回TOF-MSの追い越しの課題を解決するために開発されたのが、らせん軌道TOF-MSである。図8にらせん軌道TOF-MSを第1MSに配したタンデム飛行時間質量分析計(TOF-TOF)の概略図を示す¹³⁾。らせん軌道は、多重周回TOF-MSの周回軌道を1周回ごとに周回面と垂直方向にずらすことで実現している。1周回2.1 mの8の字軌道を8周回させることで質量分解能が向上している。本イオン光学系は、MALDIイオン源との接続での利用が進んでいるが、そのメリットを次に示す。(i) MALDIはクロマトなどの分離手段とオンラインで接続できないため、複雑な混合物の分析には、より高い質量分解能が求められる。(ii) 従来、マトリックス化合物の妨害により困難であった、低分子量域の分析にも有利である。(iii) ポストソース分解(PSD)により生成したイオンを排除でき、ベースライン付のノイズ量が少ない。これらの特長は、近年普及してきたマスマイミゼーションでも必要な性能である。有機化合物の構造解析には精密質量測定と同時にタンデム質量分析計によるプロダクトイオンスペクトルの取得による構造解析も重要である。TOF-TOFは、高エ

ネルギー衝突誘起解離(HE-CID)を利用した構造解析が可能な数少ない装置である。HE-CIDは開裂経路が多く、情報が豊富な開裂手法である反面、プロダクトイオンスペクトルが複雑になりがちである。これを解決する方法の1つとして、第1MSにプリカーサイオンのモノアイソトピックイオンだけを選択できるらせん軌道TOFMSを配するイオン光学系の利用が考えられる。プリカーサイオンのモノアイソトピックピークのみ開裂させると、フラグメントイオンもモノアイソトピックイオンのみが観測される。つまり1つの開裂経路につき1つのピークが観測されるため、開裂経路が多く情報量が多いHE-CIDの解析も容易になる。

(佐藤貴弥)

引用文献

- 1) B. A. Mamyrin: *Int. J. Mass Spectrom.* **206**, 251–266 (2001).
- 2) 田中耕一, 吉野健一, 内藤康秀, 豊田岐聡: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **56**, 49–54 (2008).
- 3) D. Suckau and A. Resemann: *Anal. Chem.* **75**, 5817–5824 (2003).
- 4) M. Mann, P. Højrup and P. Roepstorff: *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 338–345 (1993); W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley and C. Watanabe: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5011–5115 (1993) など。

- 5) T. C. Cain, D. M. Lubman, W. J. Weber Jr. and A. Vertes: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1026–1030 (1994); K. J. Welham, M. A. Domin, D. Eoin Scannell, E. Cohen and D. S. Ashton: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 176–180 (1998).
- 6) E. Carbonnelle, C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J. Berretti, A. Ferroni, L. Gutmann and X. Nassif: *Clin. Biochem.* **44**, 104–109 (2011) など.
- 7) D. C. Schriemer and L. Li: *Anal. Chem.* **68**, 2721–2725 (1996).
- 8) S. Shimma, H. Nagao, J. Aoki, K. Takahashi, S. Miki and M. Toyoda: *Anal. Chem.* **82**, 8456–8463 (2010).
- 9) M. W. Senko, S. C. Beu and F. W. McLafferty: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, 229–233 (1995); D. M. Horn, R. A. Zubarev and F. W. McLafferty: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 320–332 (2000).
- 10) B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk and V. A. Zagulin: *Sov. Phys. JETP* **37**, 45–48 (1973).
- 11) M. Toyoda, M. Ishihara, S. Yamaguchi, H. Ito, T. Matsuo, R. Reinhard and H. Rosenbauer: *J. Mass Spectrom.* **35**, 163–167 (2000).
- 12) 新聞秀一, 豊田岐聡: *ぶんせき* **2013**, 731–737 (2013).
- 13) T. Satoh, T. Sato, A. Kubo and J. Tamura: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 797–803 (2011).

略 歴

建田 潮 (たけだ うしお)

最終学歴: 鳥取大学大学院農学研究科修士課程修了

主な職歴: 株式会社プロトセラ, 株式会社エービー・サイエックス

笠松隆志 (かさまつ たかし)

最終学歴: 横浜国立大学大学院工学研究科物質工学専攻 博士課程後期修了

主な職歴: バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド, アジレント・テクノロジー株式会社

瀧浪欣彦 (たきなみ よしひこ)

最終学歴: 大阪大学薬学部製薬化学科卒業

主な職歴: 塩野義製薬株式会社, ブルカー・ダルトニクス株式会社

佐藤貴弥 (さとう たかや)

最終学歴: 大阪大学大学院理学研究科 博士後期過程終了

主な職歴: 2002年日本電子株式会社入社. 飛行時間質量分析計の開発を経て, 現在アプリケーション部に所属.