



マススペクトロメトリー初歩の初歩

東邦大学薬学部 高山光男

はじめに

これからマススペクトロメトリーをはじめようとしている人が応用まで進むにはそれなりの基礎体力をつける必要があります。サイエンスが専門分化の一途をたどっているのに対し、マススペクトロメトリーは、医学、薬学、化学はいうに及ばず、生物、環境、宇宙といった広範な分野をカバーするハイブリッドサイエンスの色彩をますます濃く

しています。その研究対象が、原子、分子、クラスターなどの粒子を扱うものであれば、それらの質量をプローブにしてマススペクトロメトリーの目が現象をとらえます。ハイブリッドサイエンスであるマススペクトロメトリーの目を養うために、ここでは簡単なマススペクトルやイラストを用いてマススペクトロメトリーの初歩の初歩を学びます。

文中、\$マークを付した語は“マススペクトロメトリー関係用語集”に記載されていますので参考にしてください。

目次

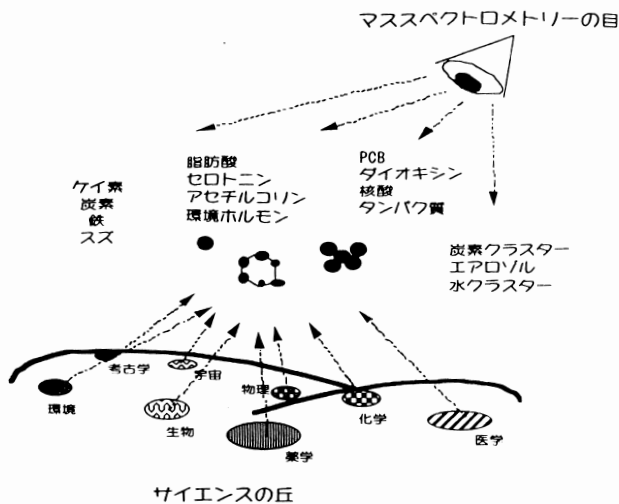
1. マススペクトロメトリー概観
 - 1.1 マススペクトロメトリーとは
 - 1.2 マススペクトルが得られるまで
 - 1.3 マススペクトルから何がわかるか
 - 1.4 マススペクトロメトリーのための試料の質
 - 1.5 マススペクトロメトリーのための試料の量
 2. マススペクトルの簡単な読み方
 - 2.1 横軸、縦軸、分子量関連イオン、フラグメントイオン、バックグラウンドイオン
 - 2.2 主イオンと同位体イオン
 - 2.3 元素の数と同位体ピークの強度：イオウの場合
 - 2.4 元素の数と同位体ピークの強度：フラーレンC₆₀の場合
 - 2.5 分子量の大小と同位体ピークパターン
 - 2.6 ハロゲンを含む化合物の同位体ピークパターン
 - 2.7 整数質量と精密質量
 - 2.8 モノアイソトピック質量と平均質量
 - 2.9 平均質量とそのいろいろな呼び方
 - 2.10 各種元素の天然同位体存在度と質量
 3. イオン化法
 - 3.1 マススペクトロメトリーにおけるイオン化とは
 - 3.2 試料の性質に合わせて選ぶイオン化法
 - 3.3 いろいろなイオン化法
 - 3.3.1 エレクトロスプレーイオン化 (ESI)
 - 3.3.2 マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)
 - 3.3.3 高速原子衝撃 (FAB)
 - 3.3.4 大気圧化学イオン化 (APCI)
 - 3.3.5 化学イオン化 (CI)
 - 3.3.6 電子イオン化 (EI)
 - 3.4 イオン化デバイスから見たイオン化法の選択
 - 3.5 イオン化法とマススペクトルの特徴
 - 3.6 いろいろな分子量関連イオン
 - 3.7 ハードイオン化法による多価イオンの生成
 - 3.8 ソフトイオン化法による多価イオンの生成
 - 3.9 熱不安定・構造不安定化合物の分子量関連イオンを得るために
 - 3.10 各種イオン化法とガスクロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィーとの相性
4. 質量分離法
 - 4.1 いろいろな質量分離法と質量関係式
 - 4.1.1 四重極質量分析計 (QMS)
 - 4.1.2 イオントラップ質量分析計 (ITMS)
 - 4.1.3 二重収束質量分析計
 - 4.1.4 飛行時間質量分析計 (TOF-MS)
 - 4.1.5 イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (ICR-MS)
 - 4.2 質量分解能—低分解マススペクトルと高分解マススペクトル—
 - 4.3 目的に合わせて選ぶ質量分離法
 5. フラグメンテーション
 - 5.1 フラグメンテーションとは
 - 5.2 フラグメンテーションの解析
 - 5.3 フラグメンテーションの証拠—メタステーブルピーク—
 - 5.4 フラグメンテーションを制御する—内部エネルギーをどう変えるか—
 - 5.5 強制的に起こすフラグメンテーション—衝突誘起解離法—
 6. 参考文献
 7. さらに勉強するための参考図書

1. マススペクトロメトリー概観

1.1 マススペクトロメトリーとは

マススペクトロメトリー^{\$}は、原子、分子、クラスターなどの粒子を気体状のイオン^{\$}にして真空中で運動させ、それらイオンを質量電荷比 (m/z)^{\$} に応じて分離・検出します。粒子の質量^{\$}は単なる数値としてしか記録されませ

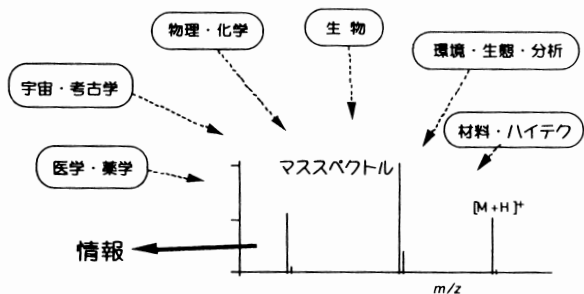
んが、反応論と組み合わせればある反応が進行したか否かを判断できますし、分子認識化学と組み合わせれば相互作用が起こるか否かを判断できますし、構造化学との組み合わせではフラグメントイオンの質量から部分構造の情報を獲得できますし、質量は目的に応じた情報を探索するプローブとしての意味をもちます。マススペクトロメトリーは、粒子の質量をプローブにして科学上のさまざまな問題



に挑戦する学問ともいえます。

本来、イオンが安定に存在できるのは、その周囲を反対電荷の原子や分子に取り囲まれた中性の液体や固体の中ですが、マスペクトロメトリーでは、原子や小さな有機分子はもちろん DNA やタンパク質でも気体状のイオンにして気相中に取り出してしまいます。これをマスペクトロメトリーにおけるイオン化[§]といいます。イオンは、正あるいは負の電荷をもった荷電粒子です。電界中におかれればクーロンの法則に従って力を受けて運動し、運動しながら磁界中に入ればその運動方向を曲げられます。こうした電磁気力によってイオンの運動を自由に操るのが、マスペクトロメトリーの醍醐味ともいえます。

マスペクトロメトリーは、原子、分子、クラスターなどミクロな粒子を相手とし、医学、薬学、考古学、天文学、生態学、化学、物理学はいうに及ばず、動物学、植物学から環境やハイテクの分野まで、ありとあらゆる周辺領域と関連するハイブリッドサイエンスです。ミクロな粒子の質量をプローブにして、科学上のさまざまな問題に挑戦し解決への道を探るとき、その糸口となるのがマスペクトル[§]です。その中には、基本的な分子量情報だけでなく、分子構造や元素の数や種類などのミクロな情報から隕石や化石の年代といったマクロスケールの情報まで幅広く隠されているのです。

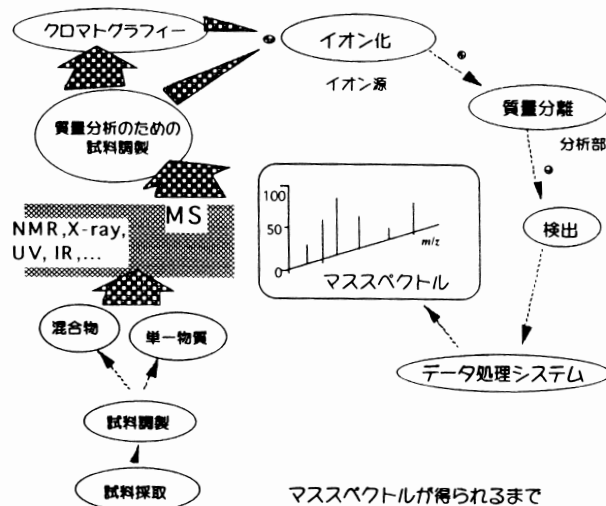


1.2 マスペクトルが得られるまで

動植物の組織や反応容器から採取・分離精製された単一物質の試料あるいは混合物試料は、イオン源[§]に結合したクロマトグラフィーの種類、あるいは使用するイオン化法に応じてさらに試料調製されます。目的に応じた試料調製

はイオン化と並んで最も大事なプロセスです。このためには、試料の性質はもちろん各種イオン化法の簡単な原理や特徴も理解しておく必要があります。装置が高度に完成された現在では、機器の操作よりも試料調製の方が得られるマスペクトルの質に直接影響します。

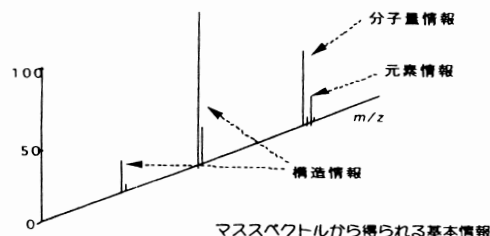
イオン源に導入された試料は、その試料の性質に適したイオン化法を用いて気体状のイオンになります。ここで試料に適したイオン化法を選択しておかないと、イオン化の段階で試料分子の分解が起こったりあるいはイオン化自体が起こらず、必要なマスペクトルが得られなくなります。こうして生成したイオンは真空中で加速され、運動しながら分析部に導かれ、その m/z 値に応じて分離されます。質量分離されたイオンは、検出器で電気信号に変換されパーソナルコンピューターなどのデータシステムによって処理され、マスペクトルや再構成イオンクロマトグラム[§]として表示あるいはプリントアウトされます。



1.3 マスペクトルから何がわかるか

単一成分の試料のマスペクトルを解析すると、以下の三つの基本的な情報が得られます。

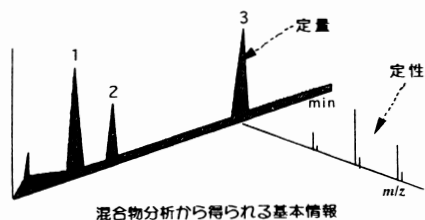
1. 分子量関連イオン[§] から分子の質量 (分子量情報)
2. フラグメントイオン[§] から分子の構造 (構造情報)
3. 同位体イオン[§] の高さパターンから構成元素の種類と数 (元素情報)



また、混合物のマスペクトルは分離装置としての各種クロマトグラフィーと結合して得られます。得られたクロマトグラムの各ピークからは各成分の定量が可能となり、各ピークに対応するマスペクトルからは先に挙げた三つの基本情報が得られ定性が可能となります。

1. 混合物試料の成分の定性

2. 混合物試料の成分の定量



1.4 マススペクトロメトリーのための試料の質

マススペクトロメトリーでは量より質!

マススペクトロメトリーでは、固体や液体試料中の1個1個の原子や分子をイオンにして気相中へ取り出して分析するため、気化やイオン化に影響を与える試料の質が分析の成否あるいは結果の良否を決めます。試料が不純物を含むとき、分析結果あるいはマススペクトルに与える影響には次のようなものがあります。

1. 不純物の存在が気化やイオン化を妨害し十分なイオン生成量が得られない
2. 不純物がイオン化しやすい場合、目的試料由来のイオン生成が抑制される
3. マススペクトルに不純物ピークが現れ解析を妨害する

試料量が十分であっても、質の悪い試料からは質の悪いスペクトルしか得られないのがマススペクトロメトリーの特徴です。

試料調製に努力!

マススペクトロメトリーに要求される試料の純度には、何%以上でなければならないといった基準はありません。しかし、精製が不十分な場合、上に述べたような悪影響を考慮しておく必要があります。一般に、試料調製には高度な分離・精製技術が要求されますが、特に以下の操作を日常的な目標にしておくといよいでしょう。

1. 単一物質では結晶化を試みる
2. 生体成分では無機系緩衝剤などの除去
3. 主としてナトリウムを対象とした脱塩操作

生体系などから採取された混合物試料を扱うときには、リン酸バッファーや金属イオンなどの無機緩衝剤成分の除去が分析の成否のキーポイントになります。特にナトリウムは、混合物、単一物質を問わず高極性化合物の試料調製中に混入しやすいので、脱塩あるいはイオン交換操作もマススペクトロメトリーのための試料調製に欠かせません。試料調製は、質量分析装置[§]の操作や性能以上に注意が必要です。

1.5 マススペクトロメトリーのための試料の量

マススペクトロメトリーは微量分析法!

マススペクトロメトリーは微量分析を特長とし、一般にはナノモル(10^{-9} mol)からピコモル(10^{-12} mol)の試料量があれば分子量情報や構造情報が得られます。場合によっては、フェムトモル(10^{-15} mol)からアトモル(10^{-18} mol)の試料量でも必要な情報が得られることもあります。実際、アトモルでの分析を可能にしているエレクトロスブ

レーイオン化[§]法を使えば、60万個のタンパク質分子があれば分子量情報を得ることも可能です。

- 1アトモルの試料には、約600,000個の分子が含まれる。

必要試料量は試料の性質とイオン化法に依存!

マススペクトルを得るために1アトモルの試料量が必要として、実際にはそのうちの数%以下がイオンになり、さらにその数%以下が検出器に達するに過ぎません。したがって、60万個の試料分子をイオン源に導入し、そのうちの数百個の分子がイオンとして検出器に達すればマススペクトルが得られることになります。

マススペクトロメトリーに必要な試料量は、その試料のイオンになりやすさと使用するイオン化法に大きく依存します。試料量を試料濃度として N で表し、イオンになりやすさをイオン化確率として W で表せば、イオン化室[§]でのイオンの生成効率 Y は簡単には次のような積で表すことができます:

$$Y = \text{イオン化確率 } W \times \text{試料濃度 } N$$

この式は、試料濃度 N が低くても試料がイオン化しやすい(イオン化確率が高い)性質をもてば高感度分析が可能であることを示しています。例えば、試料分子が大きな電子親和力[§]やプロトン親和力[§]をもつときには、それぞれ負の分子イオン[§] M^{-} やプロトン化分子[§] $[M+H]^+$ が生成しやすくなります。結果としてこれらのイオン種に対するイオン化確率は高くなり、高感度での分析が期待できます。こうした性質をもつ試料分子には、 M^{-} を生成しやすいイオン化法(例えば、負イオン化学イオン化[§]法)を選ぶか、または $[M+H]^+$ を生成しやすいイオン化法(例えば、正イオン化学イオン化[§]法や高速原子衝撃法[§])を選ぶべきよいことになります。試料の性質に合わせてイオン化法を選択するという意味がこういったところにも現れています。

2. マススペクトルの簡単な読み方

2.1 横軸、縦軸、分子量関連イオン、フラグメントイオン、バックグラウンドイオン

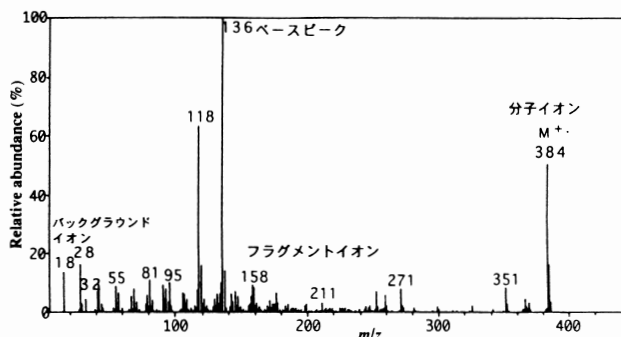


図1 ビタミンD₃の電子イオン化マススペクトル

ビタミンD₃の固体試料をイオン源で加熱気化させ、電子イオン化[§]法でイオン化すると上のマススペクトルが得られます。イオン源では正イオン[§]と負イオン[§]の両方が生成しますが、これは正イオンのみを検出したものです。

マススペクトルの横軸は、生成したイオンの質量電荷比

(m/z)を表し、縦軸は各イオンの生成量または存在量に対応しイオンの相対存在量[§]または相対強度[§]といい、%で表示します。相対存在量100%のイオンのピークをベースピーク[§]といいます。

上のマスペクトル中、最も高質量側に出現している m/z 384 のピークは、ビタミン D₃ の分子量情報を与えるので一般には分子量関連イオン[§]といいます。特に中性分子 M から電子1個が失われて生成したものを分子イオン[§]といい M⁺ で表します。M⁺ の+は正電荷を、•は不対電子を意味します。

分子イオンより低質量側に出現しているピーク群をフラグメントイオン[§]といい、分子イオンからの分解生成物です。分子イオンは試料分子の分子量情報を、フラグメントイオンは構造情報を提供します。

マスペクトルの左隅に出現している、 m/z 18, 28, 32 のピークは、試料導入なしでもイオン源に微量に存在している水蒸気 H₂O と空気成分 N₂ と O₂ などに由来し、それらの分子イオンで、バックグラウンドイオンといいます。

2.2 主イオンと同位体イオン

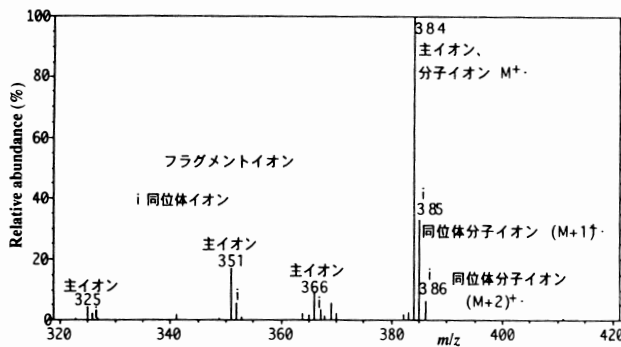


図2 ビタミン D₃ の分子イオン付近の電子イオン化マスペクトル

ビタミン D₃ のマスペクトルの分子イオンの近傍には、低いピーク群が隣接して現れます。低質量側の m/z 383 と m/z 382 は分子イオンから水素原子が1個あるいは2個脱離して生成したフラグメントイオンです。高質量側の m/z 385 と m/z 386 のピークは炭素や酸素の同位体[§]に由来するので同位体イオン[§]といいます。分子イオンおよびフラグメントイオンにおいて、天然同位体存在度が最大の同位体から成るピークを主イオン[§]といいます。

上のマスペクトルの m/z 384, 385, 386 のピークはいずれも分子イオンといますが、習慣上 m/z 384 の主イオンだけを分子イオン M⁺ といい、この分子イオンに隣接する同位体イオンを特に同位体分子イオン[§]といいます(この呼び名に準じると、 m/z 384 は主分子イオンになります)。ビタミン D₃ の主分子イオンと同位体分子イオンの主な元素組成は次のようです。

主分子イオン M⁺ m/z 384: $^{12}\text{C}_{27}^{1}\text{H}_{44}^{16}\text{O}$

同位体分子イオン (M+1)⁺ m/z 385:

$^{12}\text{C}_{26}^{13}\text{C}^1\text{H}_{44}^{16}\text{O}$ (^{13}C が1個の影響)

同位体分子イオン (M+2)⁺ m/z 386:

$^{12}\text{C}^{2513}\text{C}_2^1\text{H}_{44}^{16}\text{O}$ (^{13}C が2個の影響)

および

$^{12}\text{C}_{27}^{1}\text{H}_{44}^{18}\text{O}$ (^{18}O の影響)

ビタミン D₃ の (M+)⁺ の強度に影響するのは主として天然同位体存在度が1.10%の ^{13}C 、(M+2)⁺ の強度に影響するのは ^{13}C が2個含まれる場合と天然同位体存在度が0.20%の ^{18}O ですが、正確には、他の同位体 ^2H などの存在度も考慮しなければなりません。

2.3 元素の数と同位体ピークの強度: イオウの場合

主イオンに対する同位体イオンのピーク強度は、試料分子に含まれる元素の数に比例します。その際、天然同位体存在度の比が比例係数になります。

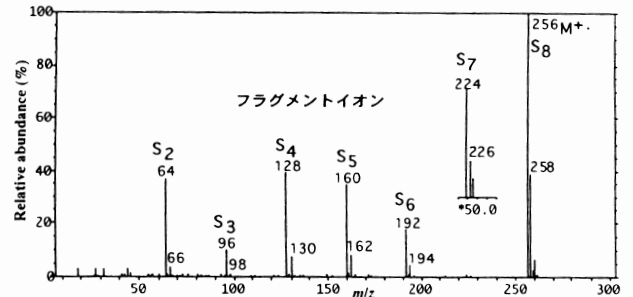


図3 イオウ分子の電子イオン化マスペクトル

イオウ分子 S₈ のマスペクトルには、主イオンである分子イオン m/z 256 およびフラグメントイオン m/z 224, 192, 160, 128, 96, 64 が出現すると同時に、各ピークの右側に同位体イオン m/z 258, 226, 194, 162, 130, 98, 66 が現れます。これら同位体イオンはイオウ原子の同位体 ^{34}S に由来します。主イオンに対する各同位体イオンのピーク強度は、イオウ原子の数が2個、3個、4個と増すに従い分子内に ^{32}S を含む確率も2倍、3倍、4倍と高くなるため、イオウ原子の数に比例して高くなります。このことは次の表からもわかります。

表1

イオウ原子の数 n	主イオン m の強度 (m/z)	同位体イオン $m+2$ の強度 (m/z)
2	100 (64)	9.86 (66)
3	100 (96)	14.0 (98)
4	100 (128)	19.3 (130)
5	100 (160)	23.1 (162)
6	100 (192)	27.3 (194)
7	100 (224)	34.1 (226)
8	100 (256)	38.8 (258)

この表の各強度は上のマスペクトルから求めた実験値で、理論的には以下の比例関係からピーク強度比が求められます。

$$\begin{aligned} & (S_n \text{ の同位体イオンピーク強度}) / \\ & (S_n \text{ の主イオンピーク強度}) \\ & = [(^{34}\text{S} \text{ の天然同位体存在度 } 4.21\%) / \\ & (^{32}\text{S} \text{ の天然同位体存在度 } 95.02\%)] \\ & \times n \end{aligned}$$

2.4 元素の数と同位体ピークの強度: フラーレン C₆₀ の場合

主イオン M⁺ には, 同位体イオン (M+)⁺, (M+2)⁺, (M+3)⁺, (M+4)⁺ などが付随して現れます. そして, 分子を構成する元素の数が増すほど主同位体以外の同位体が分子中に含まれる確率が増すため, 各同位体イオンのピーク強度も高くなります. 簡単な例として, 炭素原子のみからなる分子 C₆₀ の主分子イオンと同位体分子イオンのピーク強度比を求めてみます. ¹²C の天然同位体存在度を a, ¹³C の存在度を b, 元素の数を n=60 として, (a+b)ⁿ の二項式を展開すると展開式の各項がピーク強度に対応します.

$$(a+b)^{60} = a^{60} + 60a^{59}b + 1770a^{58}b^2 + 34220a^{57}b^3 + 487635a^{56}b^4 + \dots$$

右辺第1項が M⁺ の強度に, 第2項が (M+1)⁺ の強度に, 第3項が (M+2)⁺ の強度に, というように各同位体イオンのピーク強度が求められます.

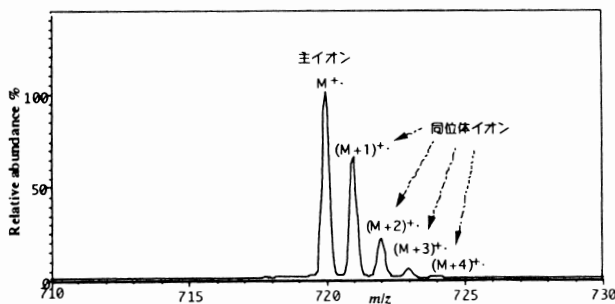


図4 フラーレン分子 C₆₀ の分子イオン付近の電子イオン化マスペクトル

上のマスペクトルの各ピークの面積を高さで直せば, 通常の棒グラフ状のマスペクトルが得られます. 主分子イオン M⁺ の強度を 100 としたときの各同位体分子イオンの強さを, 上の展開式から得た理論値と上の図に物差しをあてて得た実験値とを比較すると以下のような表になります. 実験値がやや大きめですが, これは装置のノイズの影響や読みとり誤差に由来するものと考えられますし, 同位体イオンを検出する専用の装置でないことも原因です.

表2

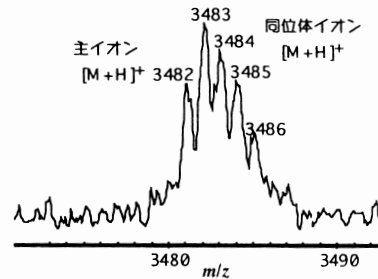
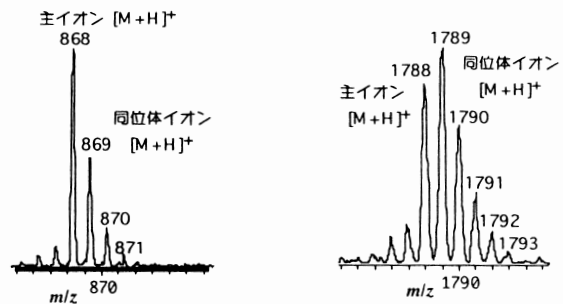
	M ⁺	(M+1) ⁺	(M+2) ⁺	(M+3) ⁺	(M+4) ⁺
理論値	100	66.7	21.9	4.71	0.75
実験値	100	66.8	22.9	5.40	1.10

2.5 分子量の大小と同位体ピークパターン

分子を構成する元素の数が増すと主イオンより同位体イオンのピークの方が高くなります. 分子量[§] が数千から数万の高分子では, 1 個の分子中に ¹³C が複数含まれる確率が高くなり, 同位体ピークパターンは幅広い釣り鐘状となり, 主イオンとしての分子イオン M⁺ やプロトン化分子 [M+H]⁺ のピークは相対的に低くなります.

以下には, ペプチド分子を例にして分子量が約2倍, 3倍に増すと同位体ピークパターンがどのように変化するかを示します. 左上のスペクトルはプロトン化分子 [M+H]⁺ のモノアイソトピック質量[§] が 868.4793 u (C₄₀H₆₂N₁₃O₉)

のダイノルフィン A フラグメント 1-7, 右上は 1788.0383 u (C₈₁H₁₃₉N₂₂O₂₃) の CD4 フラグメント 37-53, 下は 3481.6235 u (C₁₅₃H₂₂₆O₄₉N₄₃S) のグルカゴンのマスペクトルです. 分子量が大きくなるほど同位体イオンのピーク強度も数も増し, 主イオンの [M+H]⁺ より高くなることがわかります.



2.6 ハロゲンを含む化合物の同位体ピークパターン

塩素または臭素を含む化合物のマスペクトルは特徴的な同位体ピークパターンを示すため, そのパターンからハロゲン元素の種類と数が推定できます. 塩素化合物では, 塩素の数が 1, 2, 3 個と増すと, 主イオンと同位体イオンのピーク強度の比 M⁺: (M+2)⁺ が, およそ 3:1, 3:2, 3:3

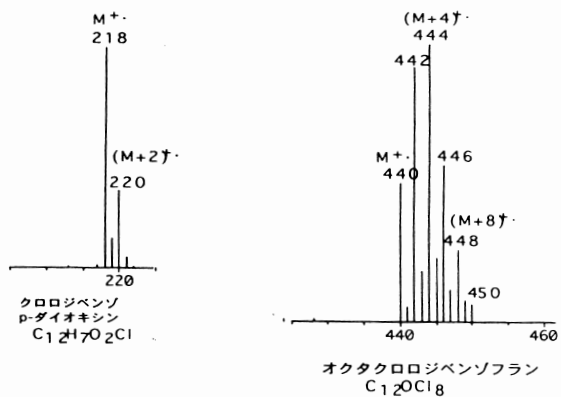


表3

試料	分子量関連イオン	元素組成	整数質量	精密質量	質量差 δm
オクタクロ ジベンゾフラン	M^{++}	$C_{12}OCl_8$	440	439.7457	-0.2543
イオウ分子	M^{++}	S_8	256	255.7766	-0.2234
パラプロモ アセトアニリド	M^{++}	C_8H_8NOBr	213	212.9789	-0.0211
フラレーン	M^{++}	C_{60}	720	720	± 0
クロロジベンゾ <i>p</i> -ダイオキシシン	M^{++}	$C_{12}H_7O_2Cl$	218	218.0135	+0.0135
ビタミンD ₃	M^{++}	$C_{27}H_{44}O$	384	384.3392	+0.3392
ダイノルフィンA1-7	$(M+H)^+$	$C_{40}H_{62}N_{13}O_9$	868	868.4793	+0.4793
CD4 37-53	$(M+H)^+$	$C_{81}H_{139}N_{22}O_{23}$	1787	1788.0383	+1.0383
グルカゴン	$(M+H)^+$	$C_{153}H_{226}N_{43}O_{49}S$	3480	3481.6235	+1.6235

のような強度比になります。臭素化合物では、臭素の数、1, 2, 3 個と増すと、 $M^+:(M+2)^+$ が、およそ 1:1, 1:2, 1:3 の強度比になります。水銀、亜鉛、スズなども特有の同位体から成るために、その同位体イオンのパターンから存在を予測することができます。

2.7 整数質量と精密質量

これまで例示したマススペクトルは、質量の表示が整数でした。整数質量[§]には、

$$^{12}C=12, ^1H=1, ^{14}N=14, ^{16}O=16, ^{35}Cl=35$$

などの原子量の整数値を用いますが、各元素の実際の質量は整数ではありません。炭素同位体¹²Cの質量を12 uとおくと、いくつかの主同位体[§]は以下のような精密な値を持ちます。

$$^1H=1.00782504, ^{14}N=14.0030740,$$

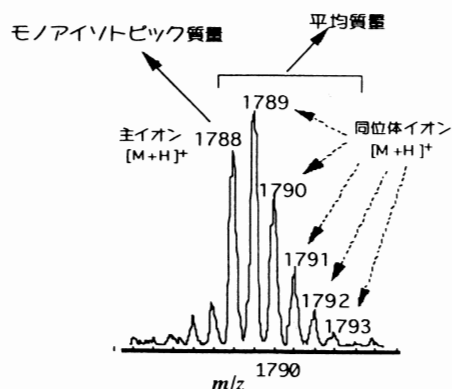
$$^{16}O=15.9949146, ^{35}Cl=34.9688527$$

このため、分子イオン M^{++} やプロトン化分子 $[M+H]^+$ の精密質量は、元素の数や構成元素の種類によって整数質量から外れます。簡単には、水素原子の数が増すほど質量差はプラス方向に、酸素、硫黄、ハロゲンの数が増すほどマイナス方向に外れます。主イオンの整数質量と精密質量が、元素の数や構成元素の種類によってどのように異なるかいくつかの例を以下に示します。質量差 δm は次のように定義しています。

$$\text{質量差 } \delta m = \text{精密質量} - \text{整数質量}$$

2.8 モノアイソトピック質量と平均質量

2.5 と 2.7 で例示したペプチドの一つは、プロトン化分子 $[M+H]^+$ の主イオンの整数質量が 1787 u の値をもちま



す。このプロトン化ペプチドの元素組成は $C_{81}H_{139}N_{22}O_{23}$ ですが、各構成元素が主同位体[§]のみからなる分子の精密質量をモノアイソトピック質量[§]といいます。モノアイソトピック質量は、主イオンの精密質量に一致します。

$[M+H]^+$ のモノアイソトピック質量:

$$^{12}C_{81}^{1}H_{139}^{14}N_{22}^{16}O_{23}=1788.0383 \text{ u}$$

上の図の質量表示では、モノアイソトピック質量の小数点以下を切り捨てて整数表示していますので、2.7 で述べたいわゆる整数質量ではありません。モノアイソトピック質量の表示には、用いた主同位体を指定すると理解しやすくなります。

上の図のモノアイソトピック質量で表したプロトン化分子 m/z 1788 よりも高質量側の同位体イオンの各ピークの強度を重みとした質量の平均値を、平均質量[§]といいます。平均質量の計算には各元素の原子量[§]が使用され、ここでの場合のプロトン化分子の平均質量は次のようです。

$$[M+H]^+ \text{ の平均質量: } C_{81}H_{139}N_{22}O_{23}=1789.1048 \text{ u}$$

同位体イオンのピークまで考慮した平均質量であるため、モノアイソトピック質量より質量の重心が高質量側へ移動し、質量の値において 1 u 以上大きくなっています。

2.9 平均質量とそのいろいろな呼び方

マススペクトル中の各イオンのピークが主イオンと同位体イオンとに分離して観測されるときには、各ピークの質量は、整数質量、精密質量、モノアイソトピック質量によって表されます。しかし、分子量が数千から数万に及ぶ化合物では、質量分離装置の性能上、各同位体イオンのピークは分離せず、全体が本の釣り鐘状のブロードなピークとして現れることがあります。2.5 で例示したように、分子量が大きくなるにつれ各ピークの分離は悪くなると同時に、全体に釣り鐘状のパターンに近づきます。そのようなブロードなピークの表示には平均質量を使います。

ある分子の平均質量は、各構成元素の原子量を使って得られます。平均質量には、意味は同じですが次のようないくつかの異なる呼び方があります。

1. 分子量[§]
2. 相対分子質量[§]
3. 平均分子量[§]

平均質量は実際には原子量の値から求められますが、同

位体イオンのピーク強度を重みとして平均するという操作がどういふことなのか以下に具体例を示します。おおまかには次のように計算できます。分子量関連イオン付近に n 本の同位体ピークが現れるとき、 i 番目のピークの精密質量を m_i 、その強度を a_i とすると、平均質量は次のような積の和によって求められます。

$$\text{平均質量} = a_1 m_1 + a_2 m_2 + \dots + a_i m_i + \dots + a_n m_n (\sum_i a_i = 1)$$

例えば、2.8 に示したペプチドのプロトン化分子の平均質量を各同位体ピークの高さから求めてみます。まず、2.10 の原子量の値から求めると次の値を得ます。

原子量表から求めた $[M+H]^+$ の平均質量: 1789.1048 u

次に上の式を使って求めてみます。まず各ピークの高さ a は、実際のマスペクトルから m/z 1788, 1789, 1790, 1791, 1792, 1793 の順に 0.2751, 0.3302, 0.2122, 0.1117, 0.051, 0.0197 となります。しかし、各ピークの精密質量は元素組成を指定しなければ計算できません。モノアイソトピック質量は 1788.0383 u ですが、1789 以降のピークは ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O などの影響があり、各ピークは精密質量の異なる数本のピークからなります。ここでは簡単に、1789, 1790, 1791, 1792, 1793 のピークにはそれぞれ ^{13}C が、1, 2, 3, 4, 5 個含まれると仮定しますと、各ピークの精密質量はそれぞれ、1789.0417u, 1790.0450u, 1791.0484u, 1792.0518 u, 1793.0551 u となり、上の式から平均質量を求めると下の値のようになります。

マスペクトルから求めた $[M+H]^+$ の平均質量:

1789.2564 u

読みとり誤差や上の仮定のため、原子量表から求めた値とは多少異なりますが、原理的にはこうして平均質量が求められます。

2.10 各種元素の天然同位体存在度と質量

試料分子の質量を計算する際、平均質量を計算するには各元素の原子量を用い、整数質量を計算するには各元素の整数質量を用い、精密質量を計算するには各元素の精密質量を用います。以下には、有機化合物によく含まれる元素の天然同位体存在度と各同位体の質量の値を示します。各数値は、国立天文台編“理科年表”丸善(1998)から抜粋しました。

3. イオン化法

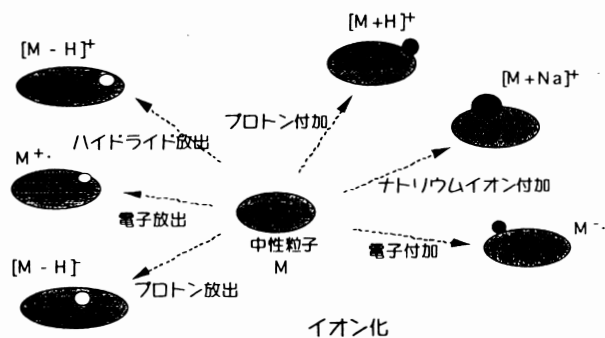
3.1 マスペクトロメトリーにおけるイオン化とは

マスペクトロメトリーにおけるイオン化とは、結晶や液体状態にある試料の原子や分子を一つ一つのイオンとして気相中に取り出すことです。イオン化そのものは、1 個 1 個の中性粒子 M (原子, 分子, クラスター[§] など) にプロトン H^+ , ナトリウムイオン Na^+ , 電子 e^- が付加したり、中性粒子からプロトン H^+ , 電子 e^- , ハイドライド H^- が放出されたりして、荷電粒子が生成することを指します。

また、凝縮相にある試料分子を一つ一つのイオンとして

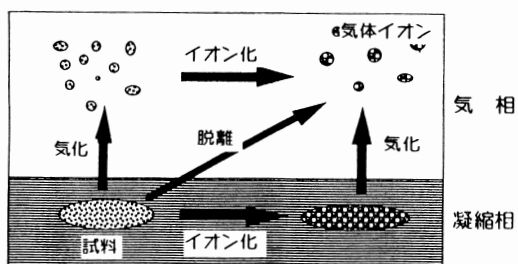
表 4 各種元素の天然同位体存在度と質量

元素	原子量	同位体(天然同位体存在度 %)	整数質量	精密質量
H	1.00794	^1H (99.985)	1	1.007825
		^2H (0.015)	2	2.014102
C	12.0107	^{12}C (98.90)	12	12
		^{13}C (1.10)	13	13.003355
N	14.00674	^{14}N (99.634)	14	14.003074
		^{15}N (0.366)	15	15.000109
O	15.9994	^{16}O (99.762)	16	15.994915
		^{18}O (0.200)	18	17.999160
F	18.998403	^{19}F (100)	19	18.998403
Na	22.989770	^{23}Na (100)	23	22.989768
Si	28.0855	^{28}Si (92.23)	28	27.976927
		^{29}Si (4.67)	29	28.976495
		^{30}Si (3.10)	30	29.973771
P	30.973761	^{31}P (100)	31	30.973762
S	32.066	^{32}S (95.02)	32	31.972071
		^{33}S (0.75)	33	32.971458
		^{34}S (4.21)	34	33.967867
Cl	35.4527	^{35}Cl (75.77)	35	34.968853
		^{37}Cl (24.23)	37	36.965903
K	39.0983	^{39}K (93.26)	39	38.963707
		^{41}K (6.73)	41	40.961825
Fe	55.845	^{56}Fe (91.72)	56	55.93494
Zn	65.39	^{64}Zn (48.6)	64	63.92914
		^{66}Zn (27.9)	66	65.92603
		^{68}Zn (18.8)	68	67.92485
Br	79.904	^{79}Br (50.69)	79	78.91834
		^{81}Br (49.31)	81	80.91629
Sn	118.710	^{116}Sn (14.53)	116	115.90175
		^{118}Sn (24.23)	118	117.90161
		^{120}Sn (32.59)	120	119.90220
I	126.90447	^{127}I (100)	127	126.90447



気相中に取り出すオーバーオールイオン化過程は、大きく分けて次の三つに分類されます。

1. 気化 → イオン化
2. イオン化 → 気化
3. 脱離



3.2 試料の性質に合わせて選ぶイオン化法

各種イオン化法は、自然科学の発展に伴い次々と現れてくる多様な性質を持った有機化合物に対し、それらを分解することなしに気体状のイオンを生成させるために開発されてきたものです。新しいイオン化法の出現は、それ自身で独立に進められてきたのではなく、むしろ有機化学者、天然物化学者、分析化学者、生化学者たちの強い要求が生み出した結果ともいえます。彼らが合成し抽出する新規化合物はその性質においても新規であるため、その性質に合ったイオン化法を開発し選択することにより、初めて正しい分子量情報が得られることとなります。イオン化法の選択と関連してマスペクトロメトリーにおいて注意しなければならない試料の性質は、以下の三つにまとめられます。

1. 熱的に不安定

熱的に不安定とは、イオン化に先だって試料を加熱気化したり、別の加熱操作を要するときに、熱分解や熱異性化を起こしてしまう化合物の性質を指します。こうした化合物には、加熱を要しないイオン化法を用います。

2. 構造的に不安定

構造的に不安定とは、加熱しなくても、ほんの少しのエネルギーによりそれ自身の性質として脱水反応や官能基の脱離反応を起こしてしまう化合物の性質を指します。イオン化の前あるいはイオン化と同時に、それ自身の性質として化学反応を起こしてしまう性質も含まれます。こうした化合物には、熱電子やレーザー光の照射、高速原子による衝撃などのイオン化法は避けるべきです。

3. 分子量の大きさ

分子量の大きさは、生体高分子のように熱不安定であることに加え、イオン化法それ自身の性質としてイオン化可能な分子量範囲に制限があることを意味します。

以上の基本的な性質のほかに、試料調製やイオン化そのものに影響する物理化学的性質や熱化学的性質があります。溶媒や液体マトリックスとの溶解性と関連して

- 親水性/疎水性、

イオン化しやすさと関連して

- プロトン親和力[§](塩基性)/プロトン放出能(酸性)
- イオン化エネルギー[§]/電子親和力[§]、

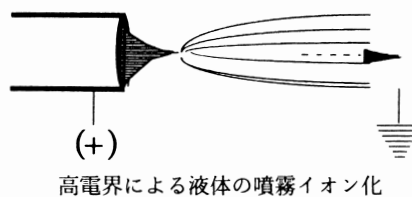
さらに気化しやすさと関連して

- 融点/沸点/分解点

などが挙げられます。有機化合物の種類と性質がさまざまであるように、それらに応じたイオン化法にもさまざまなタイプがありますので、試料の性質に関する情報があればあるほどイオン化法との相性を事前に知り、イオン化法の選択が容易になります。

3.3 いろいろなイオン化法

3.3.1 エレクトロスプレーイオン化 (ESI)[§] 液体クロマトグラフィーなどのキャピラリー先端から流出する試料溶液に数 kV の高電界を印加し、溶液中の試料分子を正負のイオンに電荷分離しながら噴霧し、イオンを蒸発させる方法です。キャピラリー先端に (+) 電荷をかけると正イオンが噴霧蒸発し、(-) 電荷をかけると負イオンが噴霧蒸発します。プロトンやナトリウムイオンが複数付加した正の多価イオン[§]やプロトンを複数放出した負の多価イオンを生成するのが特徴です。エネルギーや粒子による衝撃、試料分子の直接的な加熱がないので最もソフトなイオン化法の一つです。また、イオン化可能な分子量範囲も化合物によって 100 万にも及ぶほか、熱不安定、構造不安定な高極性小分子にも適しています。溶媒中の不純物微量成分も検出してしまいイオン化過程は無機系緩衝剤の影響を強く受けるので、試料調製には最も注意が必要です。

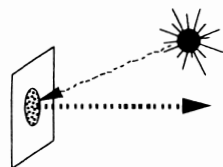


高電界による液体の噴霧イオン化

3.3.2 マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)[§]

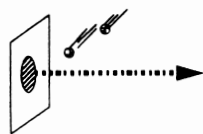
試料を過剰の安息香酸や金属の粉末(マトリックス[§])に混ぜ、均質に調製された結晶試料を金属板などへ塗布し、そこへレーザー光を照射することで試料イオン(主としてプロトン化分子 $[M+H]^+$ と脱プロトン化分子 $[M-H]^-$)を脱離させる手法です。加熱を伴わないので熱不安定な化合物に適しますが、レーザー照射による分解も起こるので、構造不安定な化合物には制限があります。ソフトイオン化法ですが、分解生成物やフラグメントイオンも観測されるのでハードイオン化の特徴も併せもちます。イオン化可能な分子量範囲は化合物により 100 万にも及びます。数ピコモルの試料でもイオンを観測でき、操

作も比較的簡便なのが特長です。



結晶試料へのレーザー照射によるイオン脱離

3.3.3 高速原子衝撃 (FAB)[§] 試料をグリセリンなどの粘濁性の有機化合物 (マトリックス) に混ぜ、均質に調製された溶液試料を金属板などへ塗布し、そこへ高速のキセノンやアルゴン原子で衝撃することにより試料イオン (主としてプロトン化分子 $[M+H]^+$ と脱プロトン化分子 $[M-H]^-$) を脱離させる手法です。加熱を伴わないので熱不安定な化合物に適しますが、原子衝撃による分解も起こるので、構造不安定な化合物には制限があります。ソフトイオン化ですが、分解生成物やフラグメントイオンも観測されるのでハードイオン化の特徴も併せもちます。MALDI に比較して、分析には約 1000 倍量の試料 (数ナノモル) が必要です。イオン化可能な分子量範囲は 5000 程度に限られますが、従来 EI 法や CI 法で測定していた揮発性低極性化合物から難揮発性高極性化合物まで比較的広範囲な性質の有機化合物に適用可能で、フラグメントイオンも観測されることから構造解析にも適します。



高速原子衝撃による液体試料からのイオン脱離

3.3.4 大気圧化学イオン化 (APCI)[§] 液体クロマトグラフィーなどのキャピラリー先端から流出する試料溶液を加熱噴霧し、針電極によるコロナ放電を使いイオン分子反応を起こさせ、試料イオン (主としてプロトン化分子 $[M+H]^+$) を生成させる手法です。キャピラリー先端は、噴霧のために 200~300°C に加熱されるため、熱不安定な化合物は脱水反応などを生じることもあります。ESI に比べ比較的極性の化合物に適用可能ですが、多価イオンを生成しにくい実用上のイオン化可能な分子量範囲は 1000 程度が目安となります。



液体の加熱噴霧とコロナ放電イオン化

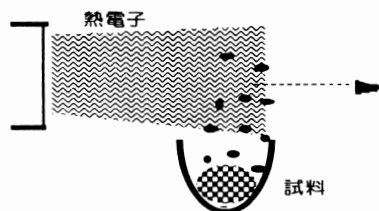
3.3.5 化学イオン化 (CI)[§] ガラス管中などに置かれた試料を加熱気化させ気体分子とし、別の場所で電子イオン化[§] によって生成させた反応イオン[§] と気相中でイオン分子反応[§] を起こさせ、試料イオン (主としてプロトン化分子 $[M+H]^+$) を生成させる手法です。試料を加熱気化させますので、熱不安定な化合物には適しません。熱には安定

だが構造不安定で、電子イオン化法において脱水などの分解反応を生じる化合物には、プロトン化分子 $[M+H]^+$ (一般に分子イオン M^{++} より安定) を生成するので有効な場合があります。イオン化可能な分子量範囲は安定に気化しさえすれば制限はありませんが、実用的には 1000 程度が目安となります。ハロゲンなどの電子親和力の大きな官能基を有する化合物では、負イオン測定において高感度が期待されるため、GC/MS 装置として微量定量分析に適しています。



反応イオンと試料分子との気相反応によるイオン化

3.3.6 電子イオン化 (EI)[§] ガラス管中などに置かれた試料を加熱気化させ気体分子とし、レニウムやタングステンフィラメントから発生した熱電子によって衝撃し、試料イオン (主として分子イオン M^+) を生成させる手法です。試料の加熱気化を必要とするので熱不安定な化合物には適さず、電子線照射は分解やフラグメンテーションを促進するので構造不安定な化合物にも適しません。一般には多数のフラグメントイオンの出現が構造解析を助ける特長をもちます。イオン化可能な分子量範囲は、実用的には 1000 程度が目安です。



熱電子による試料分子のイオン化

3.4 イオン化デバイスから見たイオン化法の選択

試料の性質に合ったイオン化法を選択するには、各イオン化法に使われているデバイスを知ると理解しやすくなります。デバイスとは、特定の目的のために作製された装置 (例えばイオン源) を構成する主要な部品または方法のことです。試料分子を分解させやすいハードデバイスには、

1. 加熱
2. エネルギー照射
3. 粒子衝撃

があります。一方、試料分子の分解を抑えるソフトデバイスには、以下のようなものがあります。

1. 高電界
2. イオン分子反応
3. 噴霧
4. マトリックス

以上のデバイスと各イオン化法の関係をまとめると以下ようになります。

♥マークは、分子を破壊せずソフトにイオン化するデバ

表5

	ソフトデバイス			ハードデバイス		
	高電界	イオン分子反応	噴霧	マトリックス	加熱	エネルギー照射 粒子衝撃
ESI	♥		♥			
MALDI				♥		★
FAB				♥		★
APCI		♥	♥		★	
CI		♥			★	
EI					★	★

イスを表し、熱分解や分解反応を避けたいときに選択します。★マークは、分子を破壊する傾向のあるデバイスなので、試料が熱的にも構造的にも安定なときに選択します。熱分解や分解反応を生じさせるものをハードイオン化法といい、主にハードデバイスからなります。逆に加熱やエネルギー照射によって分子に破壊的なストレスを与えないものをソフトイオン化法といい、主にソフトデバイスからなります。試料分子がどのようなデバイスに対して不安定性を示すのか、あらかじめ試料の性質を知っておくことがその試料に適したイオン化法を選択するのに役立ちます。

3.5 イオン化法とマススペクトルの特徴

3.4の表において、♥マークのソフトデバイスを使用するイオン化法は、 $[M+H]^+$ などの分子量関連イオンのピークを与えますが、フラグメントイオンは生成しにくい傾向があります。一方、★マークのハードデバイスを使用するイオン化法では、ときには分子量関連イオンが観測されなくなりますが、フラグメントイオンを多く生成するため構造解析には有効です。電子イオン化法、化学イオン化法、

高速原子衝撃法によるメチルステアレートのマススペクトルを比較すると、以下に示すように各イオン化法の特徴がよく現れています。

メチルステアレートは加熱に対して安定な性質をもち、さらに電子衝撃に対しても安定です。上の3種類のマススペクトルの中で最も構造情報に富むのは電子イオン化によるものです。分子量関連イオンはもちろんのこと、この化合物の同定に欠かせないフラグメントイオン m/z 74 と m/z 87 も生成しているからです。上の3種類のイオン化法の中で最もソフトなのは高速原子衝撃法と思われがちですが、ソフトとかハードとかは一概にいえるものではなく化合物により様相は異なります。その化合物がどのようなデバイスまたはストレスに対して分解の感受性を示すかによって、イオン化法のハードさもソフトさもその意味する

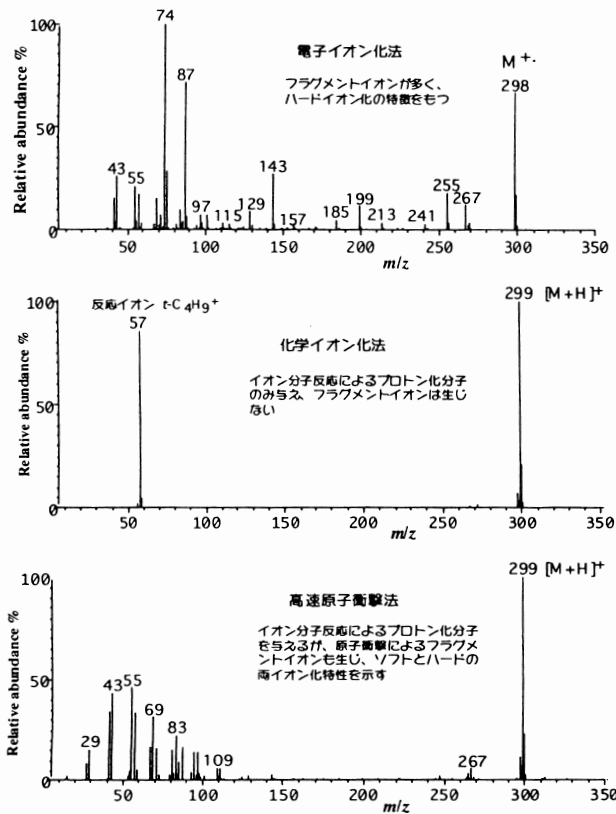
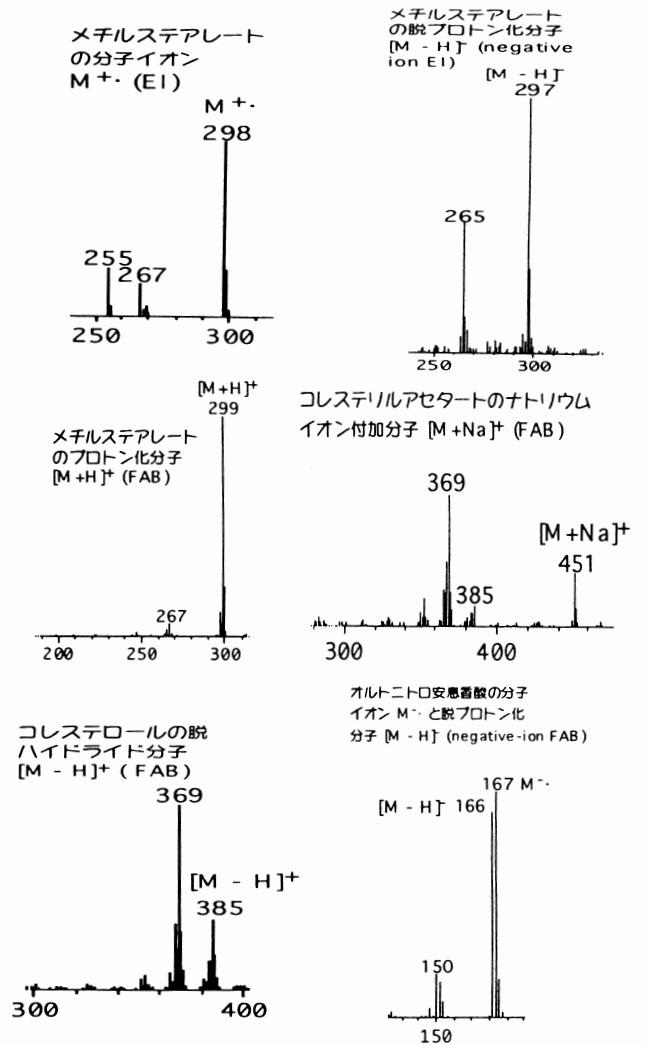


図5 異なるイオン化法によるメチルステアレートのマススペクトル



ところが違うのです。メチルステアレートは熱的にも構造的にも安定です。こうした化合物には、電子衝撃のようなエネルギー照射デバイスと高速原子衝撃のような粒子衝撃デバイスは構造を破壊するように作用し、フラグメントイオンを生成させることとなります。化合物によっては、高速原子衝撃法の方が化学イオン化法よりもハードイオン化法であると考えておく方が良いでしょう。

3.6 いろいろな分子量関連イオン

分子量情報の獲得に直接役立つイオンを分子量関連イオン⁵といいます。生成する分子量関連イオンは、使用するイオン化法や試料の性質に依存しますが、以下にはいろいろな分子量関連イオンを例示します。(前図)

3.7 ハードイオン化法による多価イオンの生成

EIなどのハードイオン化法を使いMに与えるエネルギーが大きいと、電子が複数個放出されることがあります。そうした場合、 M^{2+} 、 M^{3+} 、 M^{4+} のような多価イオンが観測されます。マススペクトル中での多価イオンの観測される位置は、横軸の m/z に従い、1価イオンの質量Mに対して $M/2$ 、 $M/3$ 、 $M/4$ のように z が大きくなるほど低質量側へシフトします。多価イオンの主イオンと同位体イオンのピーク間隔は、 z が増すに従い $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ と狭くなります。最もハードなイオン化法、気相高速原子衝撃法によってフラレン C_{60} をイオン化したときのマススペクトルは典型的な多価イオンを与えます。

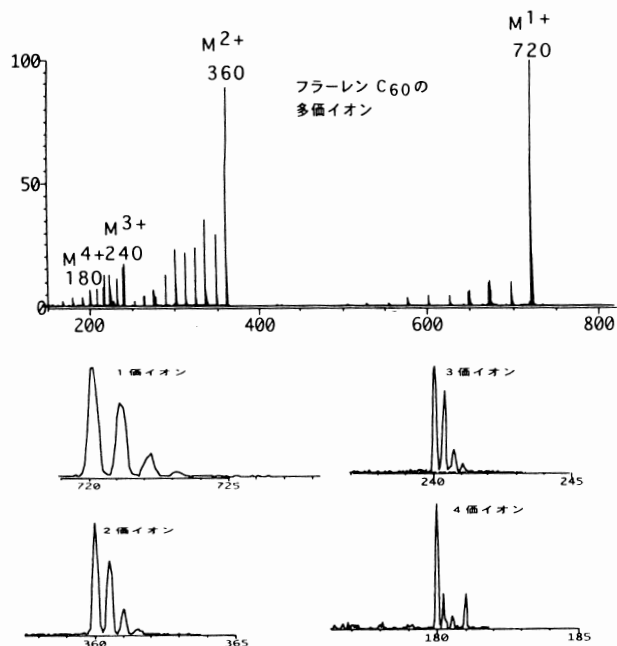
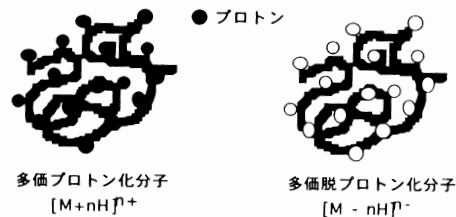


図6 フラーレンのマススペクトルに出現する多価分子イオンと各多価分子イオンの主イオンと同位体イオンとのピーク間隔の違い

3.8 ソフトイオン化法による多価イオンの生成

エレクトロスプレーイオン化法では、中性分子Mに複数個の H^+ や Na^+ が付加した多価プロトン化分子 $[M+nH]^+$ や $[M+nNa]^+$ が生成します。または、Mから複数個の H^+ が脱離した多価脱プロトン化分子 $[M-nH]^+$ が生成します。特に、タンパク質などの生体高分子では、プ

ロトンを受容したり放出しうる官能基が多数存在するため、30価($z=30$)、40価($z=40$)、50価($z=50$)といった大きな価数の多価イオンが生成します。



下には、典型的な多価イオンのピークパターンとしてカルボニックアンヒドラーゼII(平均質量29023.5 u)のESIマススペクトルを示します。

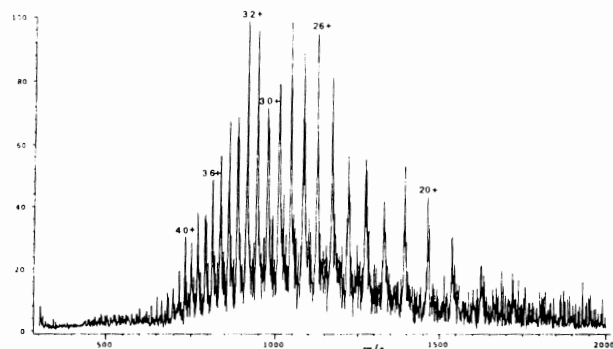
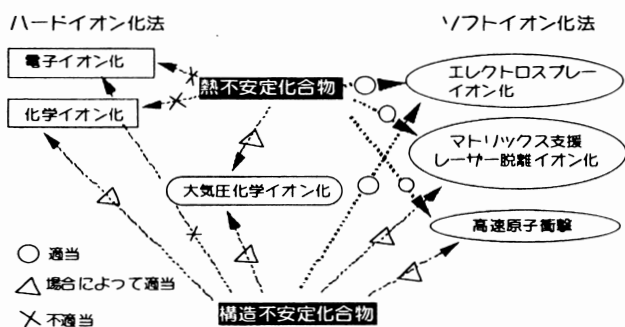


図7 カルボニックアンヒドラーゼIIのESIマススペクトル

3.9 熱不安定・構造不安定化合物の分子量関連イオンを得るために

熱不安定な化合物のために 熱不安定な化合物は、EIやCIにおいて試料を加熱気化する際、気化する前に熱分解を起こし褐色に変色したり炭化することもあります。APCIでは、溶液試料を加熱することで試料と溶媒が反応したり、噴霧前に脱水反応などの分解反応を起こすこともあります。熱不安定な化合物を安定にイオン化するには、加熱デバイスを用いないイオン化法(ESI, MALDI, FAB)が奨められます。

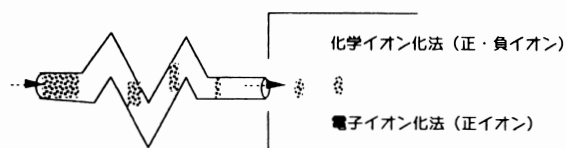
構造不安定な化合物のために 構造不安定な化合物は、加熱なしでも脱水素、脱水、脱メチルなど分解反応を起こしやすい性質をもちます。そうした化合物の中には、EIによって M^{+} を生成すると同時に分解するものもあります。一般に $[M+H]^+$ は M^{+} に比べて安定なので、構造不安定な化合物にはEIよりも $[M+H]^+$ を生成しやすいCIやAPCIが奨められます。しかし、EIでも過剰量の試料を導入するとCIと類似の現象が起こり(自己CI)、 M^{+} を生成しなくても $[M+H]^+$ を生成することがあります。MALDIとFABは、エネルギー照射と粒子衝撃が分子に破壊的な効果を及ぼすため、構造不安定な化合物は著しい分解を起こします。しかし、金属イオンとの結合能のある化合物ではNaClやKClを微量添加すると安定な付加イオン $[M+Na]^+$ や $[M+K]^+$ を生成するので、金属の添加が有効性を発揮します。微量で構造不安定な化合物をできるだけ安定にイオン化するには、最初からESIを選択することが望ましいといえます。



3.10 各種イオン化法とガスクロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィーとの相性

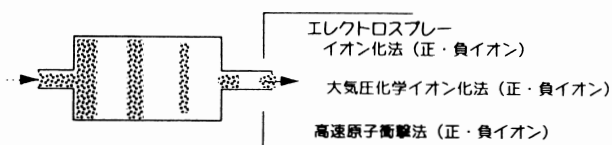
混合物の分析には、各種クロマトグラフと質量分析装置とを結合したハイフネーテッドマススペクトロメトリー[§]が用いられます。クロマトグラフから分離・流出した各成分は、まずイオン源に導かれてイオン化されます。このとき、流出する試料の形態が気体が液体かによって、それに適したイオン化法を選択する必要があります。

ガスクロマトグラフから流出する試料は気体状態なので、気体分子をイオン化する化学イオン化法と電子イオン化法が適します。化学イオン化法では、試料の性質により正イオンも負イオンも生成するため、どちらのイオンもよく検出に用いられます。電子イオン化法では、正イオンの検出が主となります。



ガスクロマトグラフィーと相性のよいイオン化法

液体クロマトグラフから流出する試料は溶液なので、液体試料を噴霧してイオンを生成させるエレクトロスプレーイオン化法と大気圧化学イオン化法、および溶液試料からイオンを脱離させる高速原子衝撃法が適しています。いずれのイオン化法でも、試料の性質によって正イオンも負イオンも生成するので、いずれか感度の高いイオンを選択するとよいでしょう。



液体クロマトグラフィーと相性のよいイオン化法

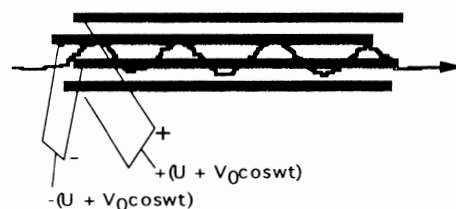
4. 質量分離法

4.1 いろいろな質量分離法と質量関係式

4.1.1 四重極質量分析計(QMS) 四重極質量分析計[§]は別名マスフィルターとも呼ばれ、特定の質量電荷比(m/z)をもったイオンのみを通過させます。 V_0/U —一定の条件で高周波交流電圧 V_0 を走査すると、異なる m/z 値をもったイオンを通過させることができ、質量分離が可能に

なります。 m/z は、簡単には C を定数として次のような比例関係で表せます。

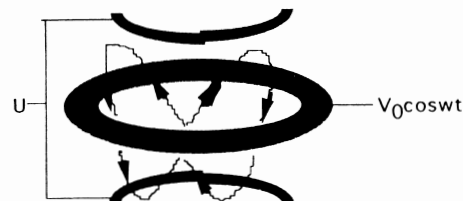
$$m/z = C \cdot V_0$$



直流電圧 U と高周波電圧 $V_0 \cos wt$ の印加によって、4本のポール電極内に生じた高周波電界の中を振動しながら通り抜けるイオン

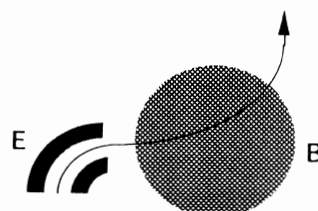
4.1.2 イオントラップ質量分析計(ITMS) イオントラップ[§]は、四重極マスフィルターの電極を両端で曲げ閉じた構造をしています。したがってイオンの運動も閉じていて、振動しながら閉じた軌道を運動し続けます。イオンの m/z 値が小さいほど低い高周波交流電圧 V_0 でも大きな軌道を描き、限界以上の電圧では高周波電界から飛び出してしまう。この現象を利用し、 V_0 を走査しながら m/z 値の小さい順にイオンを電極の外へ放出して検出します。この場合も、 m/z は、 C を定数として次のような比例関係で表せます。

$$m/z = C \cdot V_0$$



高周波電圧 $V_0 \cos wt$ の印加によって、リング電極と上下のエンドキャップ電極内に生じた閉じた高周波電界の中にトラップされ閉軌道を描くイオン

4.1.3 二重収束質量分析計 二重収束質量分析計[§]は、基本的には磁場の磁束密度 B を走査することによって、イオンをその m/z 値に応じて分離する方式の装置です。磁束密度を走査することにより、特定の m/z 値をもつイオンを検出器のある方向位置に収束させます。磁場による質量分離はイオンの運動エネルギーが一定ということを前提にしていますが、実際にはさまざまな理由によってイオン源から射出されたイオンの運動エネルギーはばらついています。このエネルギーのばらつきを収束させる目的で、磁場のほかに電場も組み合わせているので二重収束といいま



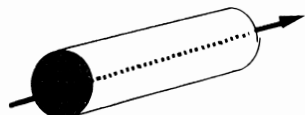
扇形電場中の電界 E によって運動エネルギーの収束を受け、磁束密度 B の磁場によって運動方向を曲げられるイオン

す。イオン加速電圧[§]や装置に固有の値を定数 C で表せば、 m/z は次のような関係で表せます。

$$m/z = C \cdot B^2$$

4.1.4 飛行時間質量分析計 (TOF-MS) 飛行時間質量分析計[§]は、その名の示すとおり、イオンを真空の飛行管中で運動させ、検出器に到達するまでの時間 Δt を計測することによって、イオンをその m/z 値に応じて分離する方式の装置です。イオン加速電圧や飛行管の長さを一定とし定数 C で表せば、 m/z は次のような関係で表せます。

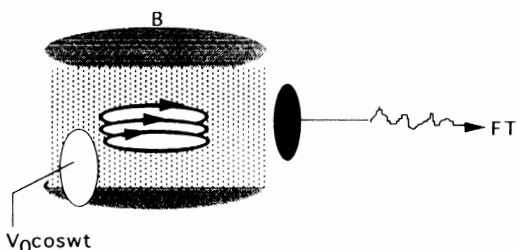
$$m/z = C \cdot (\Delta t)^2$$



真空の飛行管中を運動するイオン

4.1.5 イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (ICR-MS) イオンサイクロトロン共鳴質量分析計[§]は、一様磁場中でサイクロトロン運動するイオンの回転周波数 w が、そのイオンの m/z 値に反比例することを利用して、 w のサイクロトロン運動をしているイオンに外部から高周波電圧 $V_0 \cos wt$ を印加すると、 w は一定のまま共鳴励起されイオンの回転半径が増し、同時に誘導電流が発生します。 w を高速で走査することにより、さまざまな周波数成分の誘導電流が流れるため、それをフーリエ変換 (FT)[§]すればマススペクトルが得られます。この場合の m/z は、 C を定数として次のように表すことができます。

$$m/z = C/w$$



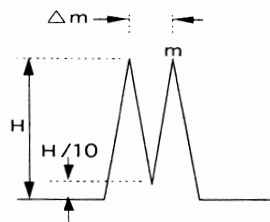
磁束密度 B の磁場中で w の回転周波数をもって回転・螺旋運動するイオン

4.2 質量分解能—低分解マススペクトルと高分解マススペクトル—

マススペクトロメトリーにおける質量分離とは、真空中を運動する 1 個 1 個の気相イオンを、その m/z 値に応じて分離することです。その際、異なる m/z 値のイオンピークを分離する装置の性能を質量分解能[§]といます。簡単には、 m/z 1000 と 1001 のピークを分離できるときに、質量分解能は 1000 であるといいますが、正確には二つの定義の仕方があります。

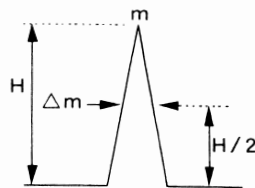
10% 谷による定義 同じ高さ H をもつ質量 m と $m - \Delta m$ の 2 本のピークが、 $H/10$ の高さの谷によって分離される時、その質量分解能 R は次のように与えられます。

$$R = m/\Delta m$$



半値幅による定義 質量 m の 1 価イオンの 1 本のピークが半値幅 Δm をもつとき、その質量分解能 R は次のように与えられます。

$$R = m/\Delta m$$



次には具体例として、標準物質のウルトラマーク 1621 の m/z 978 付近の FAB マススペクトルを示します。上からそれぞれ、質量分解能を 500, 1000, 2000 に設定したときのスペクトルです。

質量分解能 $R = 10000$ 程度以上の装置を高分解能質量分析計[§]といい、これによって得たマススペクトルを高分解マススペクトル[§]といます。また、 $R = 1000$ 程度以下の装置を低分解能質量分析計[§]といい、これによって得たマススペクトルを低分解マススペクトル[§]といます。低分解

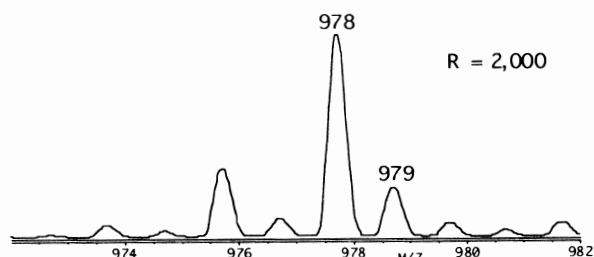
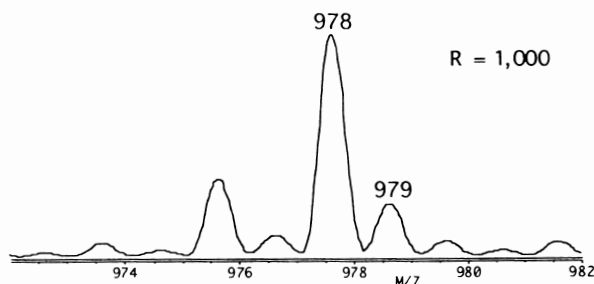
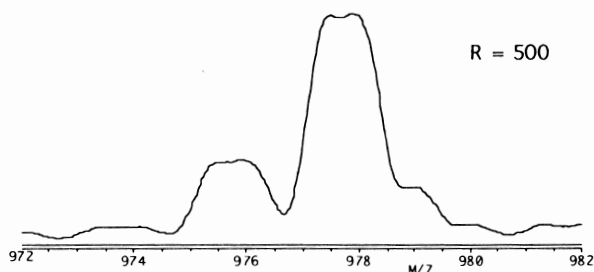


図 8 二重収束質量分析計による異なる質量分解能でのピーク分離の比較

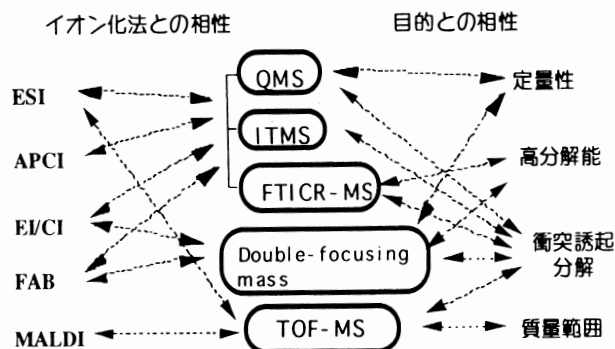
マススペクトルと高分解マススペクトルは、単にピークが分離するしただけでなく、各ピークの質量の値をどれだけ精密に決定できるか、その精度も区別の対象になります。すなわち、高分解マススペクトルを得るための高分解能質量分析計には、質量分解能が高いことのほかに、各ピークの質量決定精度も高い（ミリ原子質量単位[§]まで決定できる）ことが要求されます。

4.3 目的に合わせて選ぶ質量分離法

イオン化法は試料の性質に合わせて選択しますが、質量分離法はどちらかといえば測定の実目的や使用するイオン化法に合わせて選択します。選択するうえで考慮すべきいくつかの項目を挙げてみます。

1. 計測可能な質量範囲
2. 高分解能
3. 定量性
4. 衝突誘起解離[§]
5. イオン化法との相性

イオン化法と同様、質量分離のための装置の性能も日進月歩の威勢で止まるところを知らないので、上のすべての項目を満足する装置が現れる可能性もあります。以下には、質量分離法とイオン化法との相性、および目的との相性を示します。これらの相性は大きざっぱなものですから参考程度にしてください。



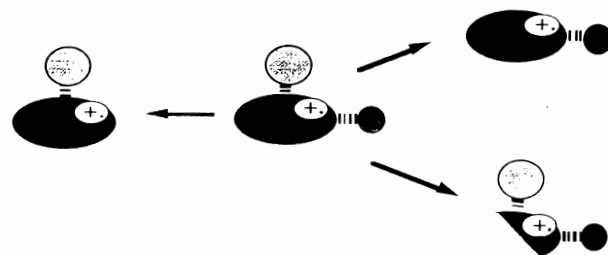
質量分離法を選択では、高分解能測定や各種クロマトグラフィーと組み合わせた定量測定の可能性も求められますが、最近では同時に簡便性も求められ、これらは互いに相反する要求になることが多いものです。したがって、扱う試料の性質や計測の目的を明確にしたうえで、それに最も適した装置を選択していくことが必要です。

5. フラグメンテーション

5.1 フラグメンテーションとは

マススペクトロメトリーにおけるフラグメンテーション[§]とは、イオンの断片化のことです。例えば、有機化合物の分子量関連イオンにおいて、化学結合の開裂[§]によってその分子量関連イオンの m/z 値より小さい m/z 値をもつフラグメントイオンを生成する反応のことをいいます。フラグメンテーションの起こる原因は、主に中性分子をイオン化する際、分子量関連イオンに内部エネルギー[§]が蓄積されるためです。内部エネルギーは、分子あるいはイオンに振動エネルギーと回転エネルギーの形で蓄積されま

す。



フラグメンテーションはイオンの断片化

正電荷+と不対電子•からなる分子イオン M^+ のフラグメンテーションでは、正電荷を保持しているフラグメントイオンだけがマススペクトル中に観測されます。上図のように、分子イオンが、正電荷をもつ母核と小さな官能基からなる化学構造をもつ場合、フラグメンテーションは、中性官能基の脱離や母核自身の分解を伴って起こります。

フラグメンテーションは、正電荷や不対電子がその近くの共有結合電子を引きつけ、化学結合を不安定化することが引き金になって起こります。したがって、一般には二つのタイプのフラグメンテーションが多く起こります。

1. 不対電子誘導型
2. 電荷誘導型

5.2 フラグメンテーションの解析

1.3 で述べたように、1枚のマススペクトルから分子量情報、構造情報、元素情報などを引き出すのがマススペクトルの解析です。一方、フラグメンテーションの解析はマススペクトルの解析の一つに含まれますが、その特徴は、フラグメントイオンの生成する過程を合理的に説明すること

といえます。したがって、フラグメントイオンのピーク[§]が出現しているマススペクトルだけが解析の対象になります。しかし、フラグメンテーションの解析には1枚のマススペクトルだけでは限界があり、以下 5.3, 5.4, 5.5 で述べるような種々の手法が必要になります。

以下には、 C_8H_9NO の元素組成をもつアセトアニリドを、70 eV[§] の電子エネルギー[§] の熱電子によってイオン化したときの電子イオン化マススペクトルを示します。有機化合物のイオン化エネルギー[§] は大体 10 eV 程度ですから、70 eV の電子でイオン化しますと、電子のエネルギーは分子中の1個の電子を放出させ、分子イオン M^+

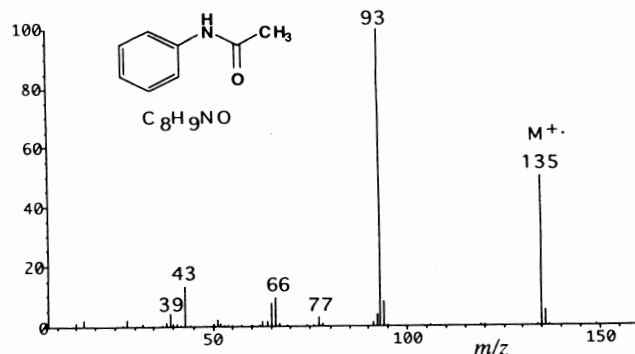
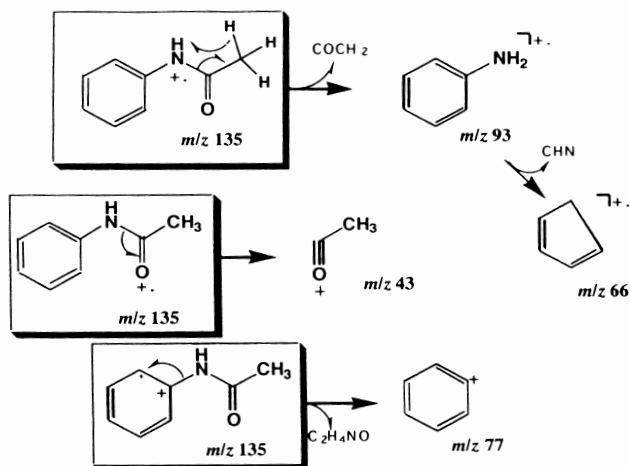


図9 アセトアニリドの電子イオン化マススペクトル

を生成(イオン化)させるだけでなく、分子イオンに過剰の内部エネルギーを与えることとなります。分子イオンに蓄積された内部エネルギーは化学結合の開裂に利用されます。上のマススペクトル中、 m/z 93, 77, 66, 43 などのフラグメントイオンは、そうした過剰の内部エネルギーによって、分子イオンから直接あるいは逐次的に生成したものです。

アセトアニリドの電子イオン化マススペクトルのフラグメンテーションを解析した例を下に示します。分子イオン $M^{+\cdot}$ に対する解析は、電荷と不対電子の位置を局在化した構造を仮定してから考察すると議論が進めやすくなります。分子から1個の電子が放出される際、酸素原子や窒素原子などの非共有電子対の n 電子が最も放出されやすく、次いでベンゼン環などの π 電子、共有結合の σ 電子の順になります。以下には、電荷の位置が異なる3種類の分子イオン (m/z 135) を仮定し、各フラグメントイオンを説明してみました。いずれも一段階目は不対電子誘導型によって説明され、うち一つは水素転移を伴っています。



5.3 フラグメンテーションの証拠—メタステーブルピーク

フラグメンテーションを解析する際、経験を重ねますと5.2で行ったような単なる数値合わせでも実用に足ることが多くなります。しかし、フラグメンテーションの経路を確実なものにするためには、証拠を提示しなければなりません。例えば、質量 m_1 のイオンが m_2 のフラグメントイオンと質量 n_2 の中性フラグメントに開裂する反応を考えてみます。

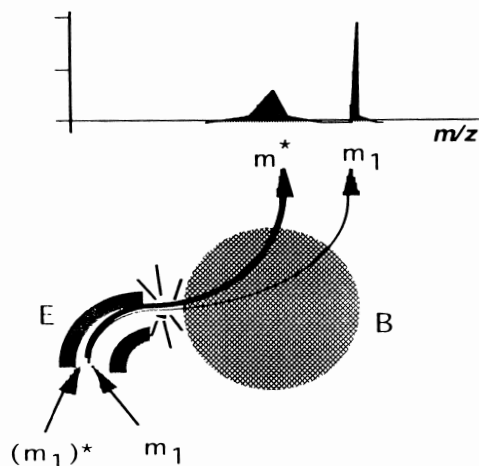
$$m_1 \Rightarrow m_2 + n_2$$

このフラグメンテーションの証拠は、メタステーブルピーク[§]を検出することによって得られます。メタステーブルピークは、メタステーブルイオン[§] (m_1)^{*} が飛行中に分析部[§] で開裂し、そのフラグメントイオン m_2 がマススペクトル中の m^* の位置に現れたピークです。 m^* は次の関係で表せます。

$$m^* = (m_2)^2 / m_1$$

二重収束質量分析計では、電場と磁場間の第二フィールドフリー領域[§] においてメタステーブルイオン分解[§] を起こしたメタステーブルイオン (m_1)^{*} が、 m^* の質量位置

に収束しマススペクトル中に観測されます。



メタステーブルピークは、その強度が著しく弱いうえ、通常のフラグメントイオンより幅広い形状で出現するため、その検出には棒グラフに変換する前のアナログ型の検出が必要です。2.4と2.5で示したマススペクトルがアナログ型またはプロフィール型といわれるものです。

3.5に示したメチルステアレート[§]の電子イオン化マススペクトルには、分子イオン $M^{+\cdot}$ (m/z 298) から生成した特徴的なフラグメントイオン m/z 74 がベースピークとして現れます。このイオンは、分子イオンからのマクラファティ転移[§] によって生成したものです。このフラグメンテーションの証拠は、対応するメタステーブルピークを検出することによって得られます。次のマススペクトルには、分子イオンから m/z 74 のほかに、 m/z 75 のフラグメントイオンも生成している証拠が得られています。後者は二重水素転移を伴って生成します。以下にはフラグメンテーションの過程も示しておきます。一般に、転移反応を伴うフラグメンテーションでは、そうでないフラグメン

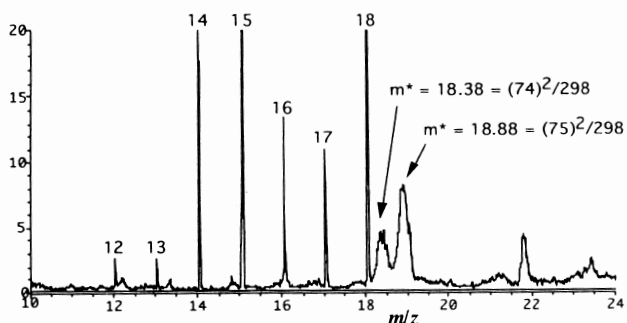
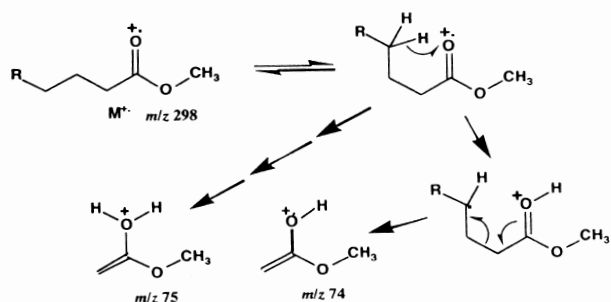


図10 メチルステアレートの電子イオン化マススペクトルの低質量領域に出現するメタステーブルピーク

レーションよりもメタステーブルピークが強く出現する傾向があります。

5.4 フラグメンテーションを制御する—内部エネルギーをどう変えるか—

フラグメンテーションを制御する、すなわち分子量関連イオンの開裂や生成したフラグメントイオンがさらに開裂するその程度を変えるには、原理的には各イオンのもつ内部エネルギーを変えることです。いくつかの方法を以下に記します。

電子イオン化法において電子エネルギーを変える 電子イオン化法における熱電子のエネルギーは、通常 10 eV から 70 eV 程度まで可変になっています。このエネルギーを E_e とおき、試料分子のイオン化エネルギーを $IE(M)$ としますと、分子イオンの内部エネルギーになりうる過剰な最大のエネルギー ΔE は次のように与えられます。

$$\Delta E = E_e - IE(M)$$

ΔE の正値が大きいほど、生成した分子イオンに多くの内部エネルギーが蓄積される確率が増し、フラグメンテーションの程度（フラグメントイオンのピーク強度とフラグメントイオンのピーク数）も増します。以下には、5.2 で示したアセトアニリドを 20 eV と 12 eV で測定した電子イオン化マスペクトルを示します。先に示した 70 eV のパターンと比較してみてください。

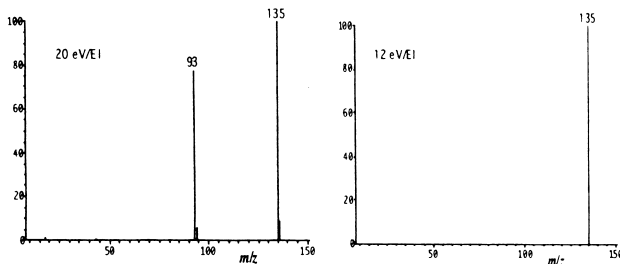
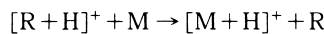


図 11 電子エネルギー 20 eV と 12 eV におけるアセトアニリドの電子イオン化マスペクトル

化学イオン化法において試薬ガスを変える 化学イオン化法では、まずメタンやイソブタンなどの試薬ガス[§] R を電子イオン化によってイオン化し、イオン化のための反応イオン[§] $[R+H]^+$ を生成させます。正イオン測定の場合、通常、反応イオンから試料分子 M へのプロトン移動反応が起こります。



このとき生成したプロトン化分子 $[M+H]^+$ がフラグメンテーションを起こすには、このプロトン移動反応の反応熱 ΔH (発熱反応では負の値をもつ) が内部エネルギーとして $[M+H]^+$ に蓄積されなければなりません。そして、この反応熱の負値 $-\Delta H$ が大きいほど $[M+H]^+$ の内部エネルギーは大きくなり、フラグメンテーションを起こしやすくなります。このときの $[M+H]^+$ の内部エネルギーの大きさを評価するエネルギー ΔE は次のように与えられます。

$$\Delta E = PA(M) - PA(R)$$

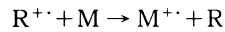
ここで、 $PA(M)$ と $PA(B)$ はそれぞれ試料分子のプロトン親和力と試薬ガスのプロトン親和力です。フラグメンテー

ションの程度（フラグメントイオンのピーク強度とフラグメントイオンの数）を増すには、 ΔE の正値を大きくする、すなわち、プロトン親和力の小さな試薬ガスを使えばよいことになります。よく使われる試薬ガスとそのプロトン親和力の値 (kJ/mol) を以下に示します。

メタン CH ₄	551
水蒸気 OH ₂	697
メタノール OH ₃	761
イソブタン iso-C ₄ H ₁₀	824
(イソブテンのプロトン親和力)*	
アンモニア NH ₃	854

* 試薬ガスイソブタンから生成する反応イオンが試料分子にプロトンを与えると、イソブタンには戻らずイソブテンになります。

電荷交換イオン化法において試薬ガスを変える 電荷交換イオン化[§] は化学イオン化の一つと考えられ、試薬ガスに主として希ガスを用い、正イオン測定では正電荷の交換反応を行わせる方法です。



この方法では、まず電子イオン化によって試薬ガス R のイオン R^{+} を生成させ、次いで試料の気体分子と反応させます。この反応は、試料分子のイオン化エネルギー $IE(M)$ が、試薬ガスのイオン化エネルギー $IE(R)$ より小さいときに起こります。電荷交換イオン化の場合には、イオン化エネルギーの代わりに反応イオン R^{+} の再結合エネルギー $RE(R^{+})$ という量を使いますが、その数値は R のイオン化エネルギーと同じです。生成した分子イオンの内部エネルギーに寄与する過剰な最大エネルギー ΔE は次のように与えられます。

$$\Delta E = RE(R^{+}) - IE(M)$$

生成した分子イオンのフラグメンテーションの程度を増すには、 ΔE の正値を大きくする、すなわち、再結合エネルギーの大きな試薬ガスイオンを使えばよいことになります。よく使われる反応イオンとその再結合エネルギーの値 (eV) を以下に示します。

ヘリウムイオン He⁺ 24.6

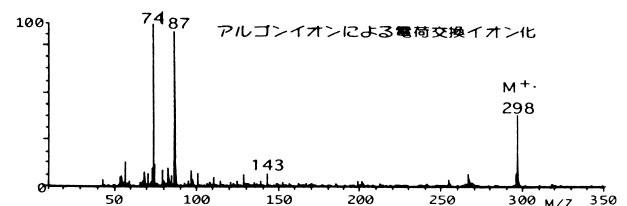
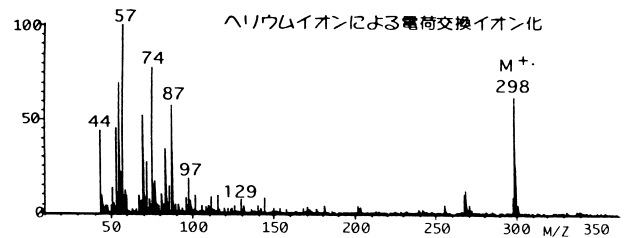


図 12 ヘリウムイオンとアルゴンイオンによるメチルステアレートの電荷交換イオン化マスペクトル

アルゴンイオン Ar⁺ 15.8, 15.9

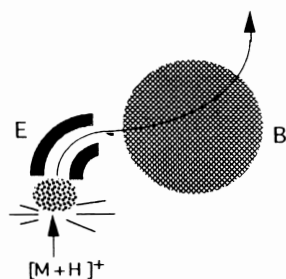
キセノンイオン Xe⁺ 12.1, 13.4

以下には、ヘリウムイオンとアルゴンイオンによるメチルステアレート[§]の電荷交換イオン化マススペクトルを示します。脂肪酸メチルエステルのイオン化エネルギーは10.5 eVの程度なので、生成した分子イオンの内部エネルギーは、ヘリウムイオンの場合約14 eV、アルゴンイオンの場合約5 eVとなります。過剰エネルギーが大きくなるヘリウムイオンによるスペクトルの方が、多くのフラグメントイオンが生成していることがわかります。

5.5 強制的に起こすフラグメンテーション—衝突誘起解離法—

昨今のソフトイオン化法の隆盛は、不安定な分子でも安定にイオン化することを可能にし、[M+H]⁺や[M+Na]⁺などの比較的安定な分子量関連イオンを生成させる一方で、フラグメントイオンには乏しいマススペクトルを与える傾向があります。分子イオンM⁺のように奇数個の電子からなり、不対電子をもついわゆる開殻イオンは比較的不安定で、フラグメンテーションを起こしやすい傾向があります。一方、偶数電子からなる[M+H]⁺や[M+Na]⁺などの閉殻イオンは比較的安定である上、ソフトイオン化法によって生成するため内部エネルギーには乏しいのが特徴です。このため、ソフトイオン化法で生成した分子量関連イオンを強制的に分解させフラグメントイオンを生成させる方法が必要です。

衝突誘起解離(CID)[§]法は、イオン化室[§]で生成した[M+H]⁺や[M+Na]⁺などの前駆イオン[§]を数十eV~数千eVの運動エネルギーをもつように加速し、希ガスHe, Ar, Xeや気体分子O₂, N₂などのターゲットガス[§]と衝突させ、強制的にフラグメンテーションを起こさせる方法です。例えば、正配置[§]の二重収束質量分析計を1台使用した場合、イオン化室と電場の中の第一フィールドフリー領域[§]にターゲットガスを入れた衝突セル[§]を置き、ここで衝突による解離を起こさせ、生成したフラグメントイオン(生成イオン[§])をリンク走査[§]によって検出します(下図参照)。



1台の質量分析装置による衝突誘起解離の実験

また、2台の質量分析計を直列に結合したタンデム質量分析計[§]を使う衝突誘起解離の実験では、1台目のMS₁によって前駆イオンを高い質量分解能で選択できるため、分子イオンM⁺とプロトン化分子[M+H]⁺に由来するフラグメントイオンを特異的に検出できるというメリットがあります。

以下には、二重収束質量分析計を2台結合したタンデム質量分析計を使ったときの、メチルステアレート[§]の分子イオンM⁺とプロトン化分子[M+H]⁺の衝突誘起解離(CID)スペクトルを示します。いずれも10 keVの運動エネルギーをもつ前駆イオンをMS₁とMS₂の間でヘリウムガスと衝突させて得たスペクトルです。[M+H]⁺を生成する通常のFABマススペクトルではフラグメントイオンが少ないのに対し(3.5参照)、[M+H]⁺からの衝突誘起解離では生成するイオンに富み、構造解析に有用であることがわかります。

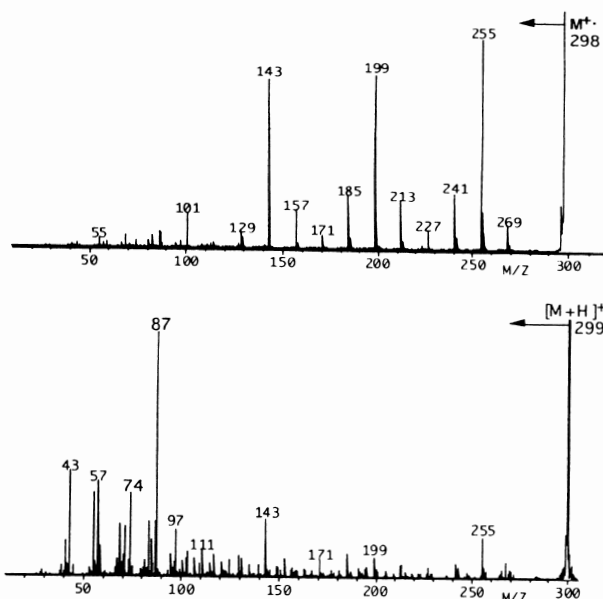
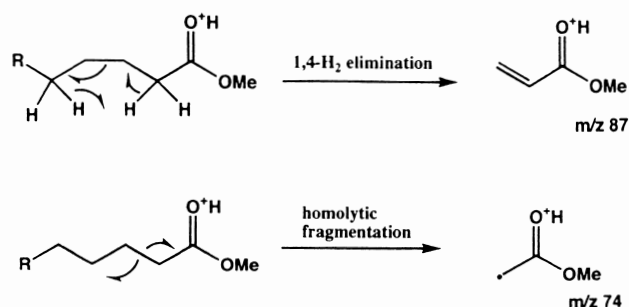


図13 メチルステアレート[§]の分子イオンM⁺とプロトン化分子[M+H]⁺の衝突誘起解離スペクトル

プロトン化分子[M+H]⁺のCIDスペクトル中、m/z 87と74はいわゆる高エネルギー衝突[§]の衝突誘起解離によって生成したイオンで、まさに強制的に起こさせたフラグメンテーションから生成したものです。この過程は以下に示すようなチャージリモートフラグメンテーションによって説明されます。メチルステアレートでは、これら特徴的な生成イオンは化学構造を強く反映し、有用な構造情報を提供しています。



高エネルギー衝突誘起解離による生成イオン

6. 参考文献

本稿は、第25回BMSコンファレンスの入門編で使用した講演要旨に基づいています。高山光男、マススペクトロメトリー初歩

の初歩, 第25回BMSコンファレンス講演要旨集, 三重(1998) 181.

- 2.10 の原子量と同位体存在度の表: 国立天文台編, 理科年表, 丸善(1998).
- 3.4 の表: 高山光男, 分子にやさしい最新のイオン化法, ファルマシア, 33, 1001(1997).
- 3.7 のスペクトル: 1. M. Takayama and H. Shinohara, *Org. Mass Spectrom.*, 28, 61(1993); 2. M. Takayama, *Fullerene Science & Technology*, 1, 411(1993).
- 5.3 のスペクトル: M. Takayama, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 144, 199(1995).
- 5.4 の電荷交換イオン化マスマスペクトル: M. Takayama, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 152, 1(1996).
- 5.5 のスペクトル: 1. M. Takayama, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 46, 139(1998); 2. M. Takayama, in *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, p. 102, Orlando, Florida(1998).

7. さらに勉強するための参考図書

1. J. B. Lambert ほか著, 務台 潔・小林啓二訳, 有機化合物の構造解析(下), 東京化学同人, 東京(1979). マスマスペクトロメトリーの物理化学および物理有機化学的基礎が詳しく述べられています.
2. 中田尚男著, 有機マスマスペクトロメトリー入門, 講談社サイエンティフィック, 東京(1981). マスマスペクトロメトリーの基礎がわかりやすく書かれていて, 題名のとおり入門者向けの好著です.
3. 田島 進・飛田成史著, 物質の質量から何がわかるか, 裳

華房, 東京(1991). マスマスペクトロメトリー読本ともいえる教養書. むずかしい内容をやさしく読めるよう配慮されています.

4. J. R. Chapman 著, 土屋正彦ほか訳, 有機質量分析法, 丸善-Wiley, 東京(1995). 最新のイオン化法や装置を実用的な立場から解説していますが, 技術的で程度はやや高くなっています.
5. 丹羽利充編, 最新のマスマスペクトロメトリー, 化学同人, 京都(1995). 生化学・医学への応用を目的に編集されていますが, 高度な応用領域への実際がわかりやすく記述されていて入門者にも向く好著です.
6. 原田健一・岡 尚男編, LC/MSの実際—天然物の分離と構造決定, 講談社サイエンティフィック, 東京(1996). 液体クロマトグラフィーとマスマスペクトロメトリーの各概論および結合の実際が詳しく記述されています. 天然物の構造決定への応用を指向した実用書で, やや進んだ専門家向けです.
7. 上野民夫・平山和雄・原田健一編, バイオロジカルマスマスペクトロメトリー, 現代化学増刊31 東京化学同人, 東京(1997). 最新のマスマスペクトロメトリーを基礎から応用まで概観できるよう編集されています. 内容はやや進んだ専門家向けで, 生体関連物質への応用に多くが割かれています.
8. 日本質量分析学会用語小委員会編, マスマスペクトロメトリー関係用語集, 国際文献印刷社, 東京(1998). マスマスペクトロメトリーに関する専門用語をまとめた初めての日本語の用語集です. 単なる用語の羅列ではなく簡単な説明が加えられた小事典にもなっています.