液体クロマトグラフ直結質量分析装置
（HITACHI M-1200形 LC/MS）

大学院薬学研究科　病態・生体情報学講座　入江徹美；内線 4168

§１　はじめに

液体クロマトグラフ直結質量分析計 (LC/MS) は、LC 単独では分離困難な成分を高感度・高選択的に分離定量し、未知成分の分子量や構造情報（定性情報）をリアルタイムで取得できる装置である。[1] LC/MS の出現により、ガスクロマトグラフ直結質量分析計 (GC/MS) では分離分析が困難であった多くの不揮発性化合物の測定が可能となった。さらに最近、LC と MS を結び付けるインターフェイスとして大気圧下で試料を霧化、イオン化するソフトイオン化法が開発され、その応用範囲は急速に拡大しつつある。

大気圧イオン化法には、エレクトロスプレイイオン化法 (Electrospray Ionization, ESI) と大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Chemical Ionization, APCI) がある。ESI 法はイオン性化合物、高極性化合物、ペプチド類や分子量数万以上の蛋白質類など高分子化合物を高感度にイオン化できる。一方、APCI 法はステロイド類や脂肪酸類など比較的低極性化合物から糖類などの極性化合物まで適用範囲の広さでは他の LC/MS インターフェースを凌駕するが、高極性化合物の測定は不得手である。このように、両イオン化法は互いに相補的な応用分野を持ち、同じく大気圧下でイオン化を行うので、相互切り替えが容易である。

§２　原理

2-1. ESI 法の原理

ESI 法は加熱や粒子衝撃／エネルギー照射といった分子レベルでの破壊操作を伴わないため、ペプチド・蛋白質類など生体高分子に有効な最もソフトなイオン化法の一つである。ESI 法では、溶液中のイオン種がその周囲の溶媒分子を振り解きながら真空中へ取り出されることでイオン化が起こる。

一般に、溶液中で溶媒和されている溶質分子は、溶媒と溶質との相対的なプロトン受容能、溶質の塩基性部位または酸性部位の数に応じて、正負イオン対を形成する。LC から供給されるキャピラリー内の試料溶液の電荷密度は均一であるが、キャピラリー先端またはその近傍に高電界を印加すると、イオン対は空間的に分離する (Fig. 1)。キャピラリー先端部で電荷分離が起こると、溶液中に正イオンに富む部分と負イオンに富む部分が生じ、電荷密度は不均一となる。電荷分離した溶液は、反対電荷の対抗電極へクーロン引力で引き寄せられ、さらに同軸方向への圧搾空気流によって破断霧化する。その際、温められた気体雰囲気により微小液滴表面から溶媒が蒸発し、その半径が Rayleigh

極限 (液滴状態を維持している表面張力による凝集力が、液滴中の過剰電荷によるクーロン反発力に等しくなる) に達すると、自発的なイオン種の蒸発や液滴の分裂が起こる。イオン種の蒸発は、Rayleigh 極限に達する前にも起こり、また極限半径より小さな液滴では表面張力は逆に液滴を押しつぶすように作用するので、イオン蒸発や分裂はさらに加速される。このように、ESI 法の原理は高電界による溶液の正負イオン分離と噴霧による自発的なイオン蒸発にある。

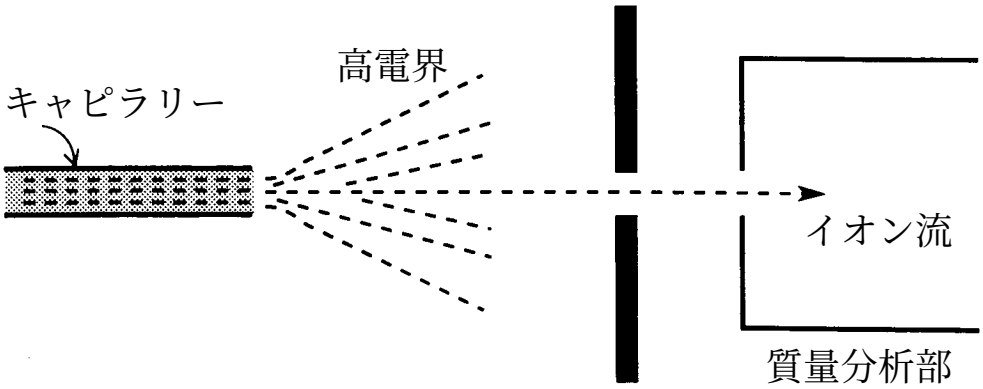

Fig. 1

2-2. APCI 法の原理

APCI 法では、加熱キャピラリー先端からの噴霧気化とコロナ放電用の高電圧電極先端でのイオン化が、別々に起こる (Fig. 2)。気化には高電界を用いない代わりに試料溶液の加熱噴霧を要するため、溶液中での熱分解が懸念される化合物に不向きである。その際、脱溶媒和による気化熱のため試料分子の熱分解は抑えられるが、ある程度の熱振

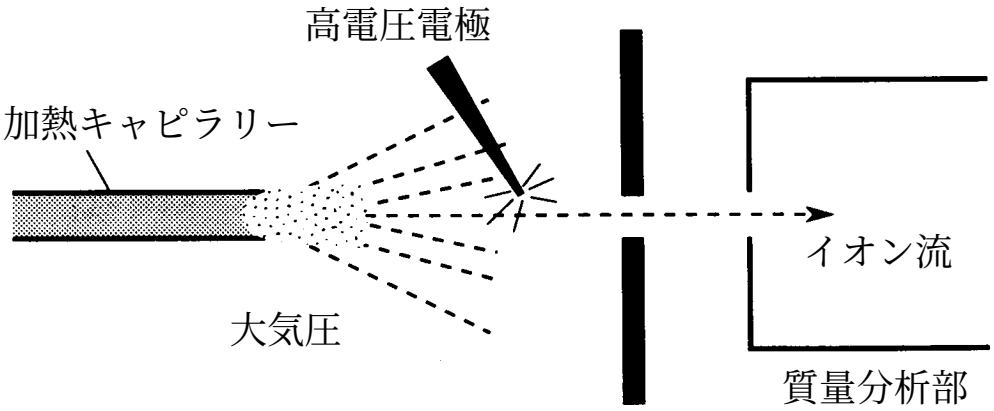

Fig. 2

動励起は避けられない。また、試料溶液はキャピラリー先端から噴霧されると同時に、さらなる微粒子化（脱溶媒）のために加熱ガス雰囲気中を通過するが、ESI 法のようなイオン蒸発や顕著な多価イオン生成は期待できない。APCI 法は、比較的低分子量 (~1000 Da) で低極性から中極性化合物の分析に適し、ESI 法に比べてフラグメント情報に富む。

§３　操作方法

M-1200H 形 LC/MS システムの操作方法を以下に概説する。

3-1.　起動前の確認項目

(1)　本体操作パネル

・EVAC スイッチが ON になっており、EVAC の READY ランプが点灯している。

・ターボ分子ポンプ (TMP) の PS と NORMAL が点灯している。ERROR ランプが点灯しているときは、RESET スイッチを押す。

・VACUUM ランプが 5 目盛点灯している (VACUUM が 5 未満の時はクリーニングする)。

(2)　N_2 ガスボンベ

・残圧が 5 kgf/cm^2 以上である (5 kgf/cm^2 未満の場合は交換してから使用すること）。

・ESI を使用する時は、N_2 ボンベの元栓を開き、ゲージの圧力が、3~5 kgf/cm^2 になるように調圧バルブを調整する。

3-2. 起動操作

(1)　コンピュータのスイッチを ON にする。約 1 分で初期画面が表示される。

(2)　本体操作パネルのAPI、RF スイッチを ON にする。

(3)　キーボードの Num Lock キーと Caps Lock キーを押す。

(4)　HIT mass-LC/MS のアイコンをダブルクリックする。

※　30分ほどでイオン源の温度が安定する。

(5)　ファイルを開き、測定条件を設定する。

(6)　LC ポンプの流速を設定後、ポンプのスイッチを ON にする。

(7)　N_2 GAS Controller のレバーを ON にし、Controller の圧力を 1.8 kgf/cm^2 に調整する (ESI モードのみ)。

(8)　設定温度まで上昇したことを確認後、コンピュータと本体を接続し、本体操作パネルの NEEDLE スイッチを ON にする。

(9)　試料を注入する。

3-3. 停止操作

(1)　本体操作パネルの NEEDLE スイッチを OFF にし、コンピュータと本体とのコネクトをはずす。

(2)　本体操作パネルの API、RF スイッチを OFF にする。

(3) 測定終了後から最低 15 分ほど移動相を流してから LC ポンプを止める (ESI モードの場合は N_2 GAS Controller のレバーを OFF にする)。
(4) マウスを右クリックし、続いて、Shut down をクリックする。
(5) 終了メッセージが表示されたら (Shut down has completed ~)、コンピュータのスイッチを OFF にする。
(6) N_2 ボンベの元栓を閉める。

3-4. クリーニング（通常、測定終了後行う）

(1) 確認事項
・LC ポンプの停止
・N_2 ボンベの元栓を開く (3~5 kgf/cm^2) 。
・N_2 GAS Controller を OFF にする
(2) EVAC スイッチを OFF にする。
※ 約 15 分で N_2 ガスパージ弁が開き、N_2 ガスパージが行われる (N_2 PURGE ランプが点灯)。約 15 分で N_2 ガスパージが完了し、自動的に N_2 ガスパージ弁が閉じる。AIR ランプが点灯し、VACUUM ランプがすべて点灯する。
(3) MS 本体側のインターフェイス、Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE を外す。
(4) Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE のクリーニング
・裏側のくぼみにメタノールを数滴たらし、ワイヤー (0.2) を通し、細孔内の汚れをこすり落とす。
・メタノールを含ませたガーゼで Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE の表と裏の両面を拭く。
(5) Aperture 2 のクリーニング（MS 本体に接続したまま）
・ メタノールを含ませたガーゼで表面を拭く。
・ ワイヤー (0.1) を通し、細孔内の汚れをこすり落とす。
(6) インターフェイス、Aperture 1、および INTERMEDIATE APERTURE を取り付ける。
(7) EVAC スイッチを ON にする。
(8) WAIT ランプが消えたことを確認し (約 20 分後)、N_2 ボンベの元栓を閉める。

§4　装置の仕様・付属設備

M-1200H 形 LC/MS システムの仕様および付属設備を以下に示す。

(1) 仕様

LC 部機種	: HITACHI L-6200 形インテリジェントポンプ
MS 部機種	: HITACHI M-1200 形 LC/MS システム
測定範囲	: m/z 10~2000
ﾏｽﾏｰｶ精度	: m/z 10~800, ±0.3 amu
	m/z 801~1200, ±0.4 amu

(2) 付属設備

パソコン　　: HEWLETT PACKARD Vectra 486/33U
OS　　: IBM OS/2 Version 2.0
プリンタ　　: HEWLETT PACKARD レーザジェット III P プリンタ
外部記憶装置　: 日本ﾊﾟｰｿﾅﾙｺﾝﾋﾟｭｰﾀ JP3230E 光磁気ディスクサブシステム

§5　利用上の注意事項

① 疎水性や粘性が高い試料など配管につまりやすい試料を測定した後は必ずクリーニングを行い、既知のサンプル (PPG や PEG など) を用いて感度の確認を行う。
② 測定中 VACUUM メーターが 5 を示していても、思うような感度が得られない場合、測定を中断してクリーニングを行うと感度が回復することがある。
③ 水分が多い、あるいは不揮発性成分 (リン酸など) を含む移動相は使用しない (スクロールポンプの故障の原因となる)。
④ N_2 ガスの残量が少なくなった場合は直ちに測定を中断し、ガス交換を行う。
⑤ データがある程度増えてきたらハードの容量に限りがあるため、ハードの残りの容量を確認しながら、データは付属の光磁気ディスクサブシステム (MO) などに移動させる。
⑥ N_2 PURGE ランプが点灯している時に、第一細孔から第二細孔までの差動排気部は外さない (分析部にごみなどを吸い込むため)。
⑦ クリーニング時以外は EVAC スイッチは OFF にしない (EVAC スイッチを OFF にするときは必ず N_2 ガスの元栓を開く)。
⑧ EVAC スイッチを ON にした後、ERROR ランプが点灯しブザーが鳴ったら、直ちに RESET を押し EVAC スイッチを OFF にし N_2 ガスの元栓を開く。

§6　応用例

Fig. 3-A は、水/メタノール/酢酸混合溶液中 (49/49/2、pH 3.0) における遺伝子組換えヒト成長ホルモン (hGH、分子量: 22 kDa、等電点: 5.0) の ESI-MS スペクトルを示す。hGH の多価イオンは平均荷電数 14.8 の対称性分布を示した。一方、分岐環状オリゴ糖マルトシル-β-シクロデキストリン (G2-β-CyD) 存在下では hGH 由来の多価イオン分布は高電荷側へシフトした (平均荷電数: 15.8、Fig. 3-B)。さらに、hGH とG2-β-CyD のモル比 1:1 および 1:2 複合体あるいは付加物に相当するピークが観察された。この結果を他のスペクトル法 (蛍光、円二色性、NMR など) により得られた結果と総合すると、G2-β-CyD は hGH の比較的表面付近に位置する疎水性アミノ酸残基と相互作用することによって、本蛋白質分子内の疎水相互作用を弱め、高次構造をフレキシブルにすることが示唆される。[2)]

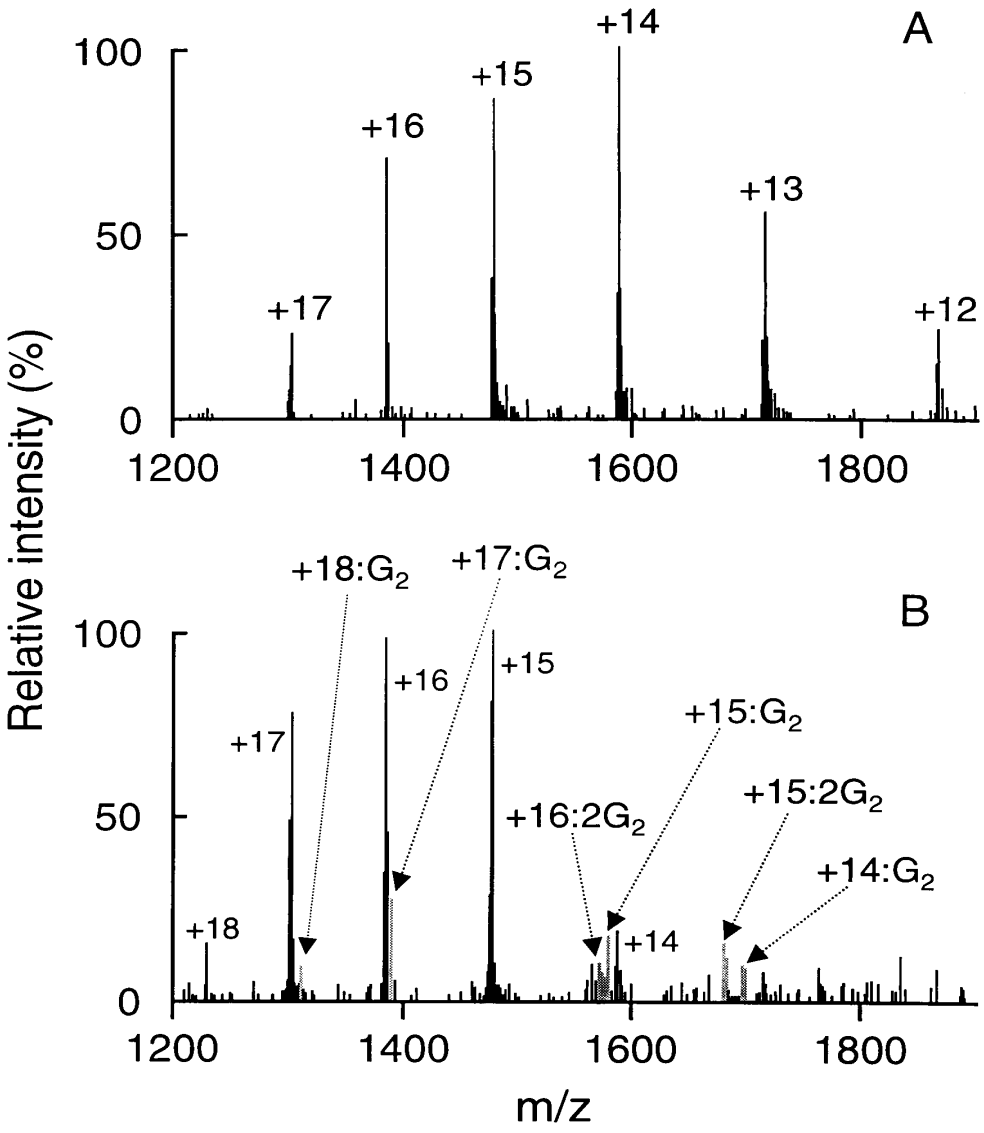

Fig. 3

§７　おわりに

大気圧イオン化法の出現により LC/MS の応用範囲は飛躍的に拡大し、医薬、農薬、工業材料など広領域での利用が実用レベルに到達した。取り扱いは、**§3**. に述べたように比較的簡単であるが、移動相溶媒の選択、キャピラリーや細孔の汚れの防止などに特に留意してご利用いただきたい。本装置が多くの研究者に活用され、研究の進展に役立つことを期待したい。

参考文献

1. 上野民夫・平山和雄・原田健一編「バイオロジカルマススペクトロメトリー」 (東京化学同人、1997)
2. 田尻慎一朗、田原僚子、時廣啓市、入江徹美、上釜兼人: 第 15 回シクロデキストリンシンポジウム講演要旨集、35-36 (1997).