

液体クロマトグラフィー 質量分析(LC/MS) 応用コース

日本電子
松浦健二
TEL 042-542-5502
kmatuura@jeol.co.jp

1

質量分析から得られる情報

1. **分子量**
2. 同位体の存在(元素分析)
3. 分子組成
4. 構造情報(置換基)
5. クロマト情報

4

講義内容(応用コース)

- ・質量分析のこと
- ・測定の準備
- ・質量校正
- ・スペクトル解析
- ・試料導入(フロー注入)
- ・クロマト情報、移動相溶媒
- ・バックグラウンド成分
- ・質問事項
- ・まとめ

2

マスペクトルを得る過程

- ・前処理
- ・試料導入(GC, LCなど)
- ・イオン化 ESI, EI, FAB.....
- ・イオンの分離 TOFMS, 磁場型、四重極
- ・イオンの検出
- ・イオン電流を変換
- ・マスペクトル

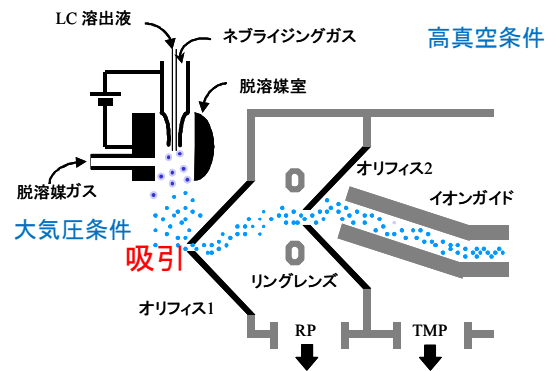
5

質量の取り扱い

ステアリン酸メチルエステル: $C_{19}H_{38}O_2$
 Nominal mass : 298 (質量数から計算)
 Monoisotopic mass: 298.2872 (同位体質量から計算)
 Averaged mass: 298.5114 (原子量から計算)
 アンジオテンシン I : $C_{62}H_{89}O_{14}N_{17}$
 Nominal mass : 1295
 Monoisotopic mass: 1295.6775
 Averaged mass: 1296.4942
 グルカゴン : $C_{153}H_{224}O_{50}N_{42}S$
 Nominal mass : 3480
 Monoisotopic mass: 3481.600
 Averaged mass: 3483.605

3

T100LC ESIインターフェース



6

ESI測定条件

流量: 0.2mL/min以下
ニードル電圧: 2500V
脱溶媒室温度: 250°C
オリフィス1電圧: 50~200V
分子量の大きさに比例
ピーク管電圧: 300~2000V

7

質量校正物質の基準

質量校正: 質量を計測するものさし

$$m = ct^2 \quad \text{質量と時間の対応付け}$$

1. 移動相溶媒に溶ける。イオン源を汚染しない
2. 高質量まで検出される
3. 目的物質と質量の重なりがない
4. 正(+), 負(-)イオンスペクトルを与える

10

測定計画: より良いスペクトルを得るために

- ・分析目的の明確化
分子量決定、精密質量測定(元素分析)
定量
- ・イオン化の選択(ESI, APCI, CSI)
- ・質量校正
- ・前処理
試料の特性(溶媒、気化性)、濃縮
- ・試料導入(HPLC、フロー注入)
- ・装置の保守

8

ESI,APCI用質量校正物質

- ・平均分子量の異なるポリエチレングリコール



PEG200、400、600、1000、1540

正イオン $(44n+18)\text{H}$ とか $(44n+18)\text{Na}$

- ・YOKUDELNA(TFANa)、ギ酸ナトリウム(HCOONa)

正イオン $159+136n$ $91+68n$

負イオン $113+136n$ $45+68n$

11

試料の特性、クロマト情報

極性が大きい、小さい

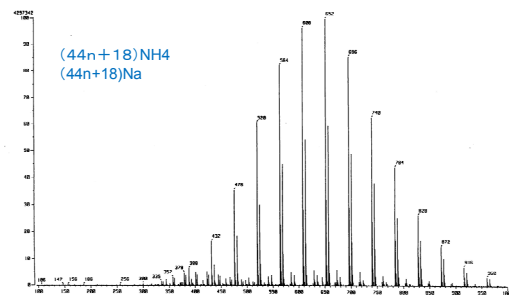
親水性、疎水性

ODSカラムの場合

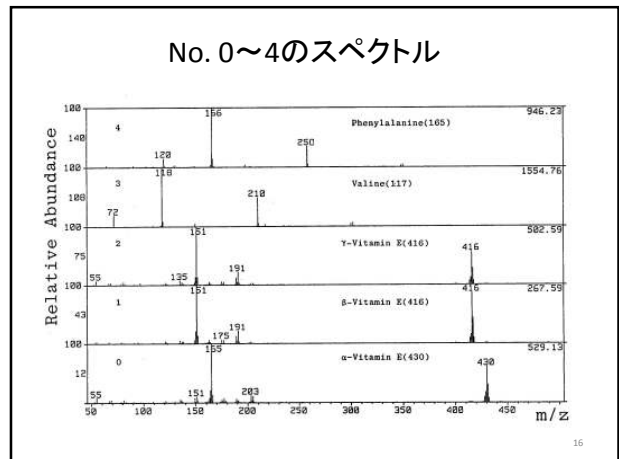
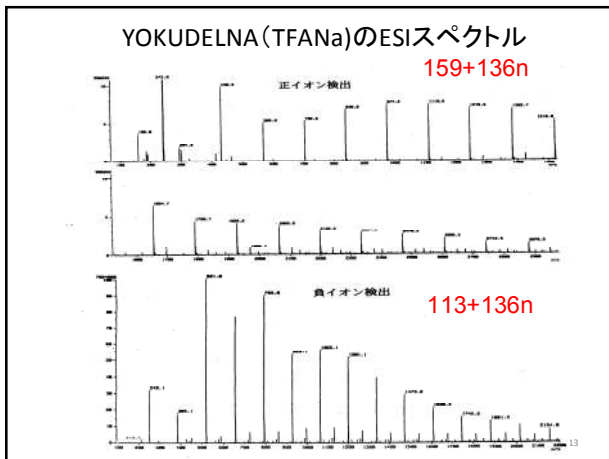
同族体であれば分子量順に溶出
二重結合(2u)、水酸基(16u)の違い
メチル基(14u)、アセチル基(42u)

9

PEG600のESIスペクトル

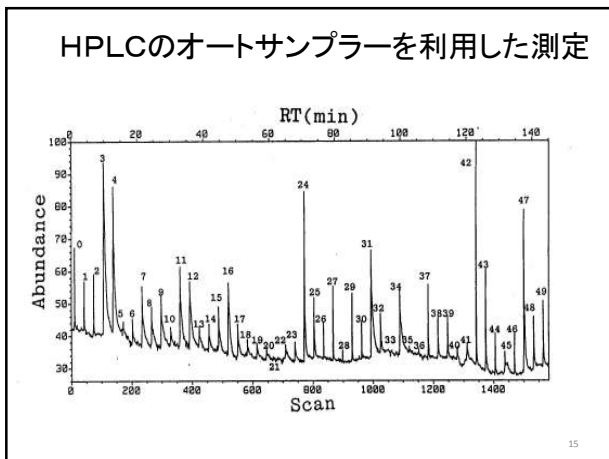
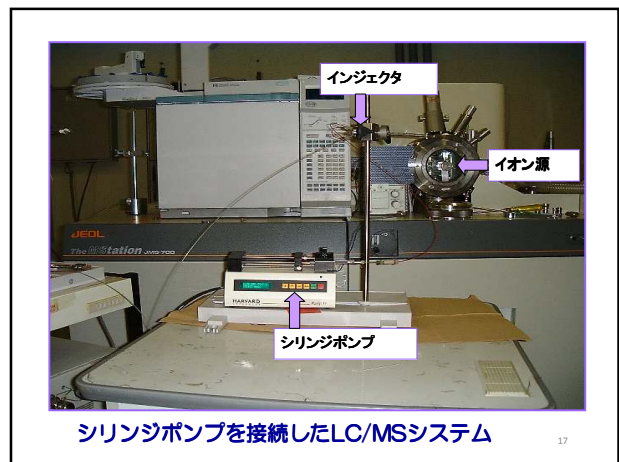


12

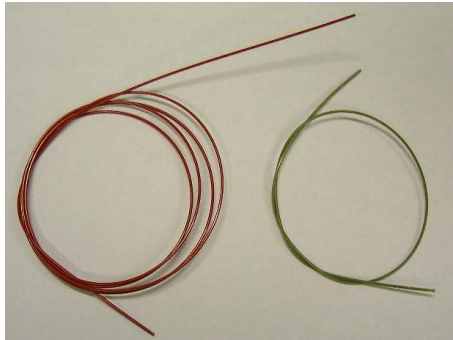


フロー注入

- カラムなしで一定流量条件下で試料を導入する。
- 短時間に溶出するのでスペクトルの評価
- 移動相条件の検討
- 自動測定、処理が可
- インヒュージョン導入:
マイクロシリンジに試料を採り、導入
試料濃度が高まり、検出感度が増加

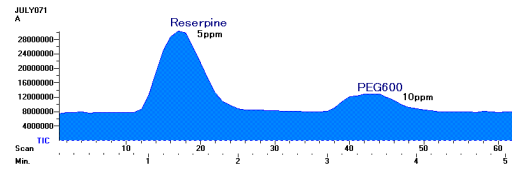


PEEKチューブ



19

ESIによる精密質量測定



標準品(PEG600)と試料(レセルピン)のTIC

～測定条件～

装置: 日本電子製MS700V
 加速電圧: 5KV リング電圧: 50V
 溶媒: MeOH 流量: 50 μ l/min
 脱溶媒室温度: 200 $^{\circ}$ C

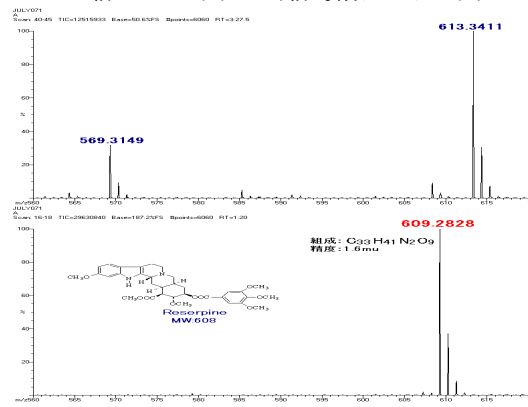
22

注射器



20

上段: PEGスペクトル 下段: 試料(レセルピン)スペクトル



クロマトグッズ



21

スペクトル解析

1. 分子量
2. 同位体の存在(元素分析)
3. 分子組成
4. 構造情報(置換基)
5. クロマト情報

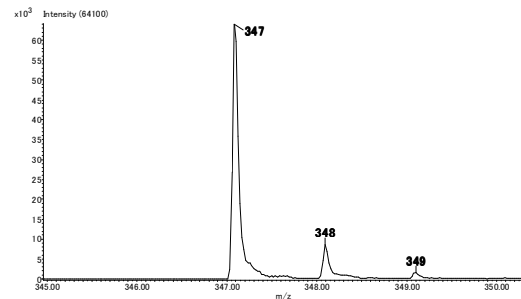
24

溶媒や試料の分子量関連イオン

- M^+ 、 $(2M+H)^+$ 、 $(3M+H)^+$
- 溶媒付加イオン
- $(M+Na)^+$ 、 $(M+NH_4)^+$ 、 $(M+K)^+$
- $(M+2H)^{2+}$ 、 $(M+3H)^{3+}$
- M^- 、 $(2M-H)^-$ 、 $(3M-H)^-$
- $(M+Cl)^-$ 、 $(M+CH_3CO)^-$
- $(M-2H)^{2-}$ 、 $(M-3H)^{3-}$

これらのイオンは非常に安定。
分子量情報を読む操作(翻訳): スペクトル解析²⁵

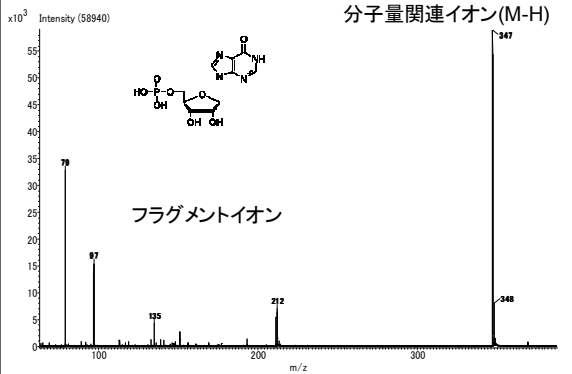
分子量イオンの同位体に注目



28

イノシン酸の負イオンESIスペクトル

分子量関連イオン(M-H)



26

- 348、349、350は同位体ピーク

• 塩素、臭素、硫黄元素は含まない

$$M+1/M = 1.1n \%$$

$$348/347 = 12.7\% \quad n = 12.7/1.1 = 11.5$$

• 炭素数 およそ11個を含む成分

29

イノシン酸のスペクトル情報

分子量の決定

• 347 (M-H)

分子量348で偶数の値

- 窒素数は偶数個となる
- 奇数であれば窒素数は奇数となる

27

同位体スペクトル

スペクトルから元素の存在が判明:

塩素、臭素、イオウ、ケイ素

難しい元素: フッ素、リン(同位体が無い)

$C_xH_yN_zO_n$

$$M+1/M = 1.1x + 0.36z(\%)$$

$$M+2/M = (1.1x)^2/200 + 0.2n(\%)$$

同位体比を計測することにより

炭素数が推測

30

精密質量からの元素分析

CHNO元素から成る質量の小数点以下の値は？

水素の数を反映

H:1.0078

C:12.0000

N:14.0031

O:15.9949

水素の端数は7.8muと大きい
小数点以下の端数は水素数を反映

31

多価イオンスペクトル

- 正イオン検出
(M+H)⁺
(M+2H)²⁺ 半分の位置(m₂)に出現
(M+nH)ⁿ⁺ 1/nの位置(m_n)に出現
M= n(m - H)

34

精密質量からの解析

イノシン酸 C₁₀H₁₃N₄O₈P

(M-H) 347.0392

- 分子量348と偶数であるので窒素数は0か偶数個存在
- 小数点以下の端数 0.0392と小さい
 $39.2/7.8=5$
5個の水素の存在に相当する。
不飽和度(二重結合数)が大きい物質
- 分子量を14で割る(14はCH₂、Nに相当、Oは近似)
 $348/14=24.8$

32

多価イオンスペクトル

- 負イオン検出
(M-H)⁻
(M-2H)²⁻ 半分の位置(m₂)に出現
(M-nH)ⁿ⁻ 1/nの位置(m_n)に出現
M= n(m + H)

35

同族物質に対する質量差

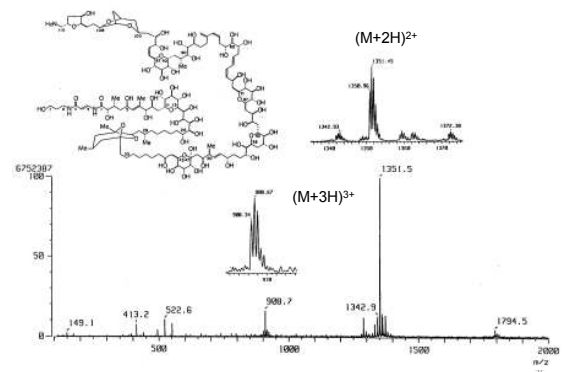
水酸基: 15.9949 -5.1mu

二重結合: 2.0156 +15.6mu

メチレンCH₂: 14.0156 +15.6mu

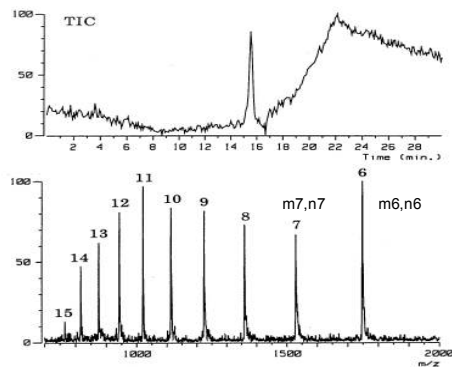
33

多価イオンスペクトル



35

チトクローム(MW12000)のESIスペクトル



移動相溶媒の選択

- ・精製水
- ・アセトニトリル
- ・メタノール
- ・エタノール
- ・テトラヒドロフラン(THF)
- ・アセトン

溶出力: アセトニトリル > メタノール

価数の計算

$$n7 = m6 / (m7 - m6)$$

$$n6 = m7 (m7 - m6)$$

$$M = n6(m6 - 1), \quad n7(m7 - 1)$$

有機溶媒の性質

	分子量	沸点	毒性
アセトニトリル	41	81.6°C	高い
メタノール	32	64.7°C	高い
エタノール	46	78.3°C	低い

引火性があり注意。有害。 **エタノールは無害**

移動相溶媒の選択

イオン化に影響を与えない溶媒、緩衝液を利用

- ・水(水道水、精製水、超純水)
- ・グレード(1級、特級、HPLC用)
- ・脱気の必要性
- ・移動相の作成・保管

アセトニトリルの効用

- ・カラム圧が低い(カラム長を長くできる: 分離向上)
- ・低波長域にUV吸収がない: 高感度
- ・分離が良い.....>何故?

LC/MSではメタノールが多用

- ・沸点が64.7°Cと低く、ESIでは脱溶媒がスムーズ
- ・溶出力が低く、高い溶媒組成で溶出
例えば50%アセトニトリル→70%メタノール

アセトニトリル: APCI時、電極の劣化
メタノール、エタノールは高いカラム圧
エタノールは安全
アセトン: 高い溶出力
THF: 困ったときのTHF
APCIでは重合化し、スキマー表面汚染

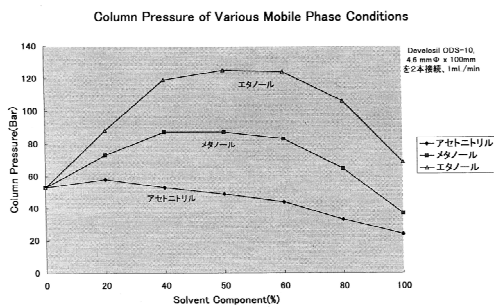
43

代表的な移動相

・トリフルオロ酢酸	pH2.0
・塩酸	2.0
・パーフルオロ酪酸	2.0
・n-ジブチルアミン酢酸	5.0
・エタノールアミン	12.0
・酢酸(pH4.0)、ギ酸(pH3.0)	
・酢酸アンモニウム	7.0
・アンモニア	8.5

46

溶媒組成とカラム圧力



44

塩濃度

高濃度の緩衝液はイオン化に影響を与える
TFA、塩酸は良くない(代わりにギ酸)

最適濃度: 10mM、0.1%以下

- ・DBA-酢酸は負イオン検出でOK。
正イオン検出では130に強いバックを与える
- ・TFAは正イオン検出でOK。
負イオン検出で113に強いバックを与える

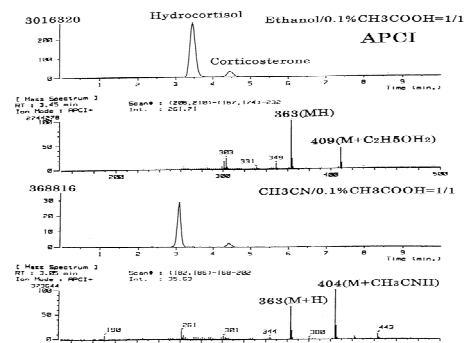
47

緩衝液の利用

- ・酸の添加
 $\text{RCOOH} \rightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{RCOOH}$
- ・イオン対
 $\text{RCOONa} + \text{CH}_3\text{COONH}_4 \rightarrow \text{RCOONH}_4 + \text{CH}_3\text{COONa}$
- $\text{RNH}_2 + \text{CF}_3\text{COOH} \rightarrow \text{RNH}_2 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$

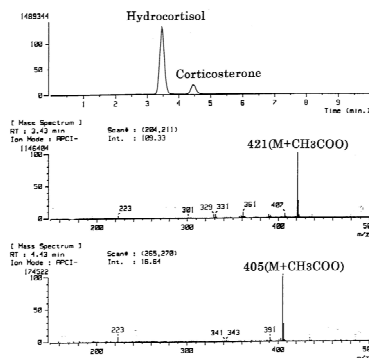
45

HCとCのAPCIスペクトル



48

HCとCの負イオンAPCIスペクトル



49

夾雑物、バックグラウンドピーク

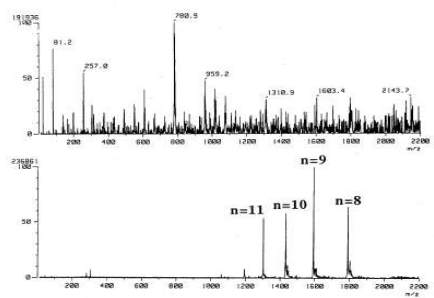
- ・未知成分として捕らえることがある。
- ・スペクトルに影響を与える

- 緩衝液、メモリー
- 可塑剤(フタル酸エステル: 308, 413)
- シリコンゴム、
- 石鹼、洗剤などの界面活性剤
- ポリプロピレン容器

52

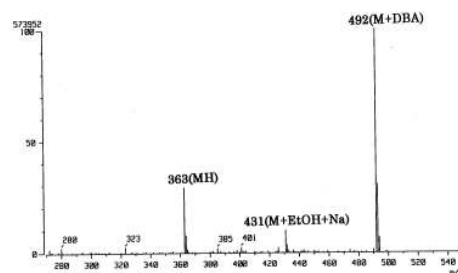
脱塩(リゾチームの例)

試料中に塩類が多量に混在し、スペクトルに影響



50

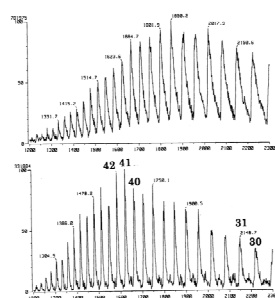
移動相DBAのメモリー



53

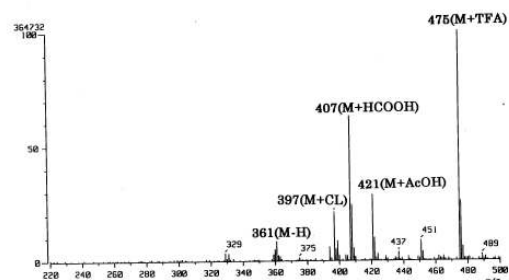
BSA(MW66500)のESI

上段: フロー注入
下段: LC/MS



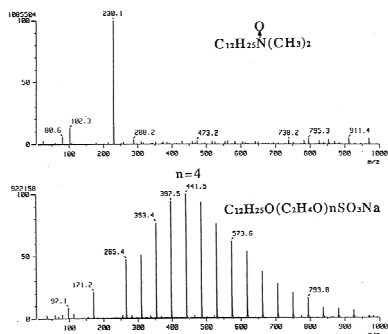
51

酸のメモリー



54

台所洗剤(界面活性剤)スペクトル



55

ポリプロピレン容器

オレイン酸アミド (MW: 281)

エレカ酸アミド (MW: 337)

ガラス容器を使用

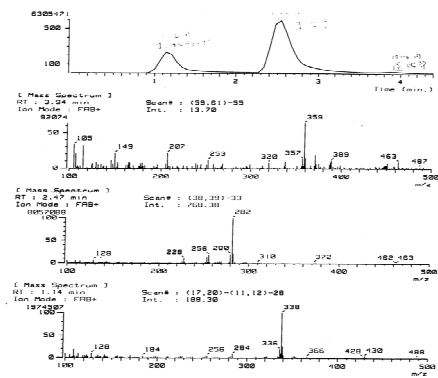
58

ポリプロピレン容器



56

ポリプロピレン容器からのバック



59

ガラス容器



57

生体成分から溶出

- UV吸収が小さく、クロマトグラムでは見逃される。
- LC/MSでは強く検出される
- アミノ酸
- 胆汁酸、その抱合体
- ポリエチレングリコール
- リン脂質

60

保守、安全性

- ・管理者の指示に従い使用すること
- ・作業記録をつける
- ・移動溶媒はメタノールやアセトニトリルは可燃性がある。有毒。取り扱いには注意
- ・使用後は、マイクロシリンジ、カラムなどメタノールで洗浄し、後から使用する人に迷惑をかけるない

61

まとめ

質量分析とは……

質量を計測

m, (m+1), (m+2)の同位体の存在を理解

溶解性とか気化性などの試料情報

スペクトルを解析(読む、翻訳)することができる
不明なところがあれば、研究生や指導教官と討議

64

質問

1. ネガティブモードでの測定で注意事項
2. DNA測定: 酢酸アンモニウム/メタノール=4/1の溶液としている。この比率を変えることによりピーク強度を高めることができるか。

62

回答

1. 条件はポジティブモードの設定値でOK
イオン量が少ないのでMCP電圧を高める
チューニングは255などのピークを使用
2. DNAはリン酸塩となっているために、塩を脱離することが重要。移動相としてアンモニア水とメタノール=1/1の条件で測定している。
メタノール濃度を挙げることにより強度は上がる

63