HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ESI-MSインヒュージョンモードによる混合物の測定テクニック
Author(s)	渡部, 賢二
Description	北海道大学農学部技術部職員研修(第5回) 研究・技術発表
Citation	北海道大学農学部技術部研究・技術報告, 4, 3-9
Issue Date	1997-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35322
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_p3-9.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

<研究・技術発表>

ＥＳＩ－ＭＳインヒュージョンモードによる混合物の測定テクニック

ＧＣ－ＭＳ・ＮＭＲ測定室　渡部　賢二（作物・分析系　共同利用班）

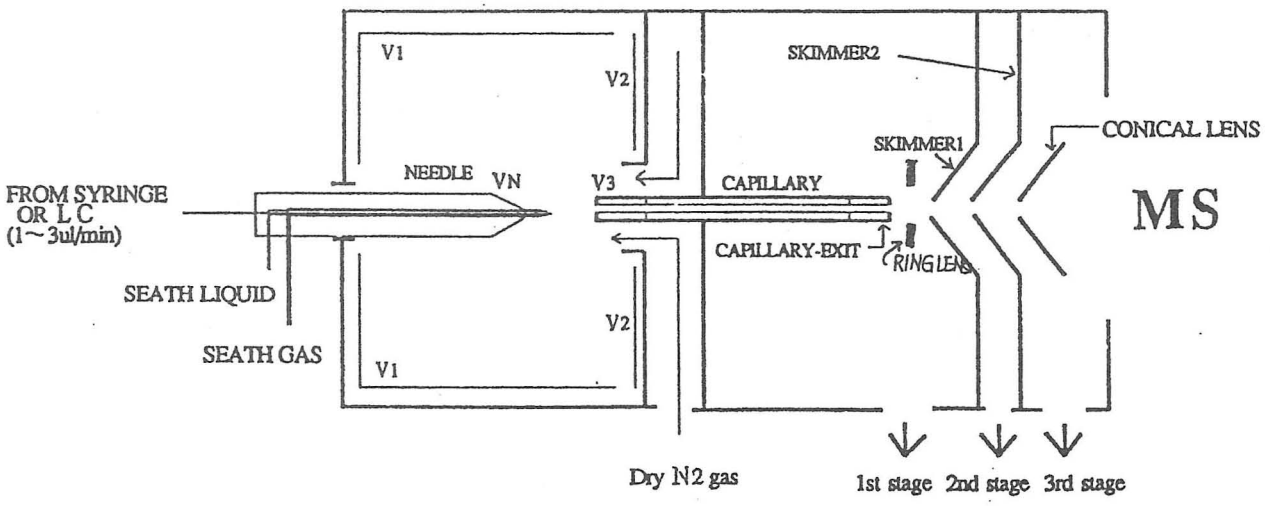
１．はじめに

ＥＳＩ－ＭＳ（Electrospray Ionization Mass Spectrometry）は質量分析計による有機化合物測定法のひとつで、近年、磁場型質量分析計に取り付けられ、低分子量化合物は元よりペプチドやタンパク等の高分子量化合物の分子量決定精度の向上が注目されている。

メタノールや水に溶解した試料を強電界大気中に噴霧することによってイオン化が起きるが、シリンジポンプと呼ばれる機器を使ってマイクロシリンジ内の試料溶液を一定流量ＥＳＩイオン源（図－１）のニードル（ＮＥＥＤＬＥ）部に送液する方法がインヒュージョンモードと呼ばれる方法である。

ＥＳＩ－ＭＳの測定は条件設定が難しいとしばしば聞くが、その難点のひとつに混合物や不純物（可塑剤等）を含む試料を測定したときに、一方の物質にフォーカスが合ってしまい、極端に存在比が違ったデータや目的物質でないデータを打ち出してしまったりする危険性が上げられる。特に、未知物質のときには注意が必要になってくる。

ここで、フォーカスが一方に合ってしまうということは、逆に分離能力があるということにならないだろうかと考え、２～３の物質で試したところ、証明できる結果を得ることができたので、その混合物測定のテクニックを報告する。



図－１　ESIイオン源の概略図

2．測定試料名と測定方法

測定試料名

測定①　ビタミンＢ1とビタミンＢ12の混合物（混合比は分からない）

測定②　ステアリン酸メチルと庶糖の混合物（混合比は分からない）

測定③　ステアリン酸メチルとブドウ糖の混合物（モル比で３：１）

測定方法

測定①②③ともに、混合物のいずれかの分子イオン関連ピークをオシロスコープで捕らえ、それが最大強度になるように各種フォーカス系を合わせた後、ＥＳＩイオン源内のフォーカス系のひとつであるリングレンズ（ＲＩＮＧ　ＬＥＮＳ　図－１）のツマミをゼロ側（左側）に４５度位回転して戻し、１スキャン毎に２度位づつツマミを右側に手動で回転した。

《例　測定③の場合》

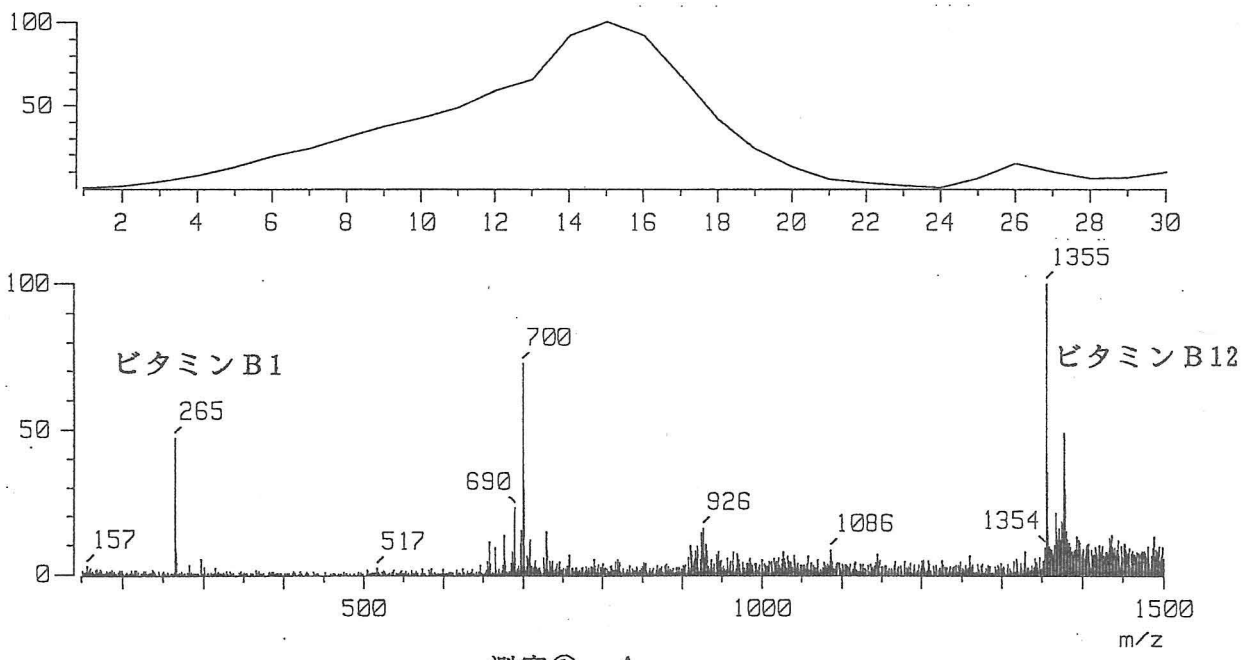
試料：メタノール1μlあたりステアリン酸メチル30pmol、ブドウ糖10pmol

流量：1μl/min. NEEDLE：+2700V CAP：-1500V CAPILLARY-SKIMMER：0V

CH-H：107° C　ガス　：不使用

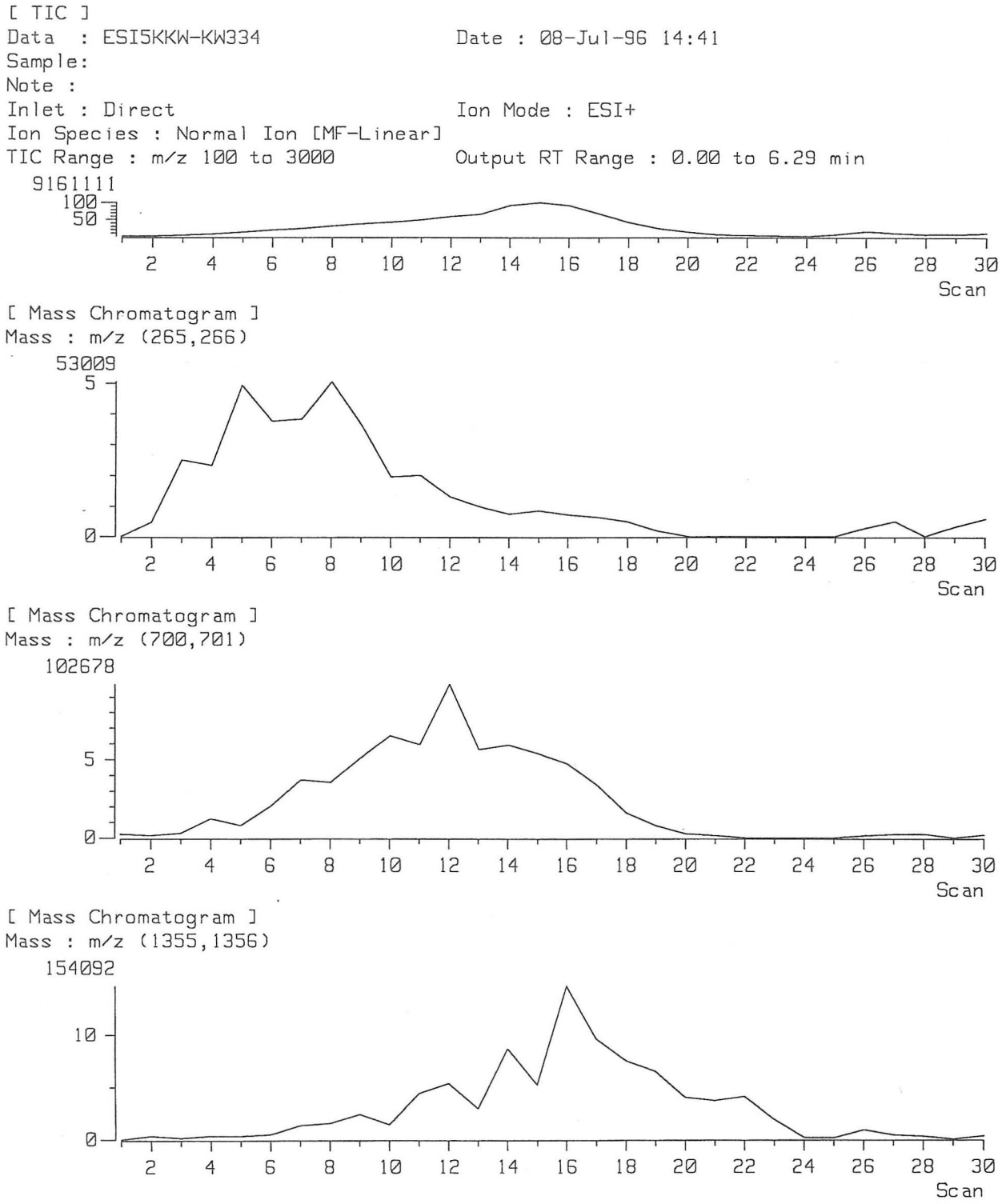
3．結果

測定①－Ａは上記測定法に従ってビタミンＢ1とビタミンＢ12の混合物を測定したときの結果である。上段がＴＩＣ（トータル　イオン　クロマトグラム）で、縦軸が全イオンの強度、横軸がスキャン番号を表している。下段は全スキャンを積算し平均化したマススペクトルである。m/z２６５がビタミンＢ1の塩が取れたピーク、m/z１３５５がビタミンＢ12のピーク、m/z７００は多分ビタミンＢ12の一部が分解した物のピークと思われる（試薬を水に溶かして室温に長い期間放置していたことと、以前に測定したときにはm/z７００は僅かしか出ていなかった）。



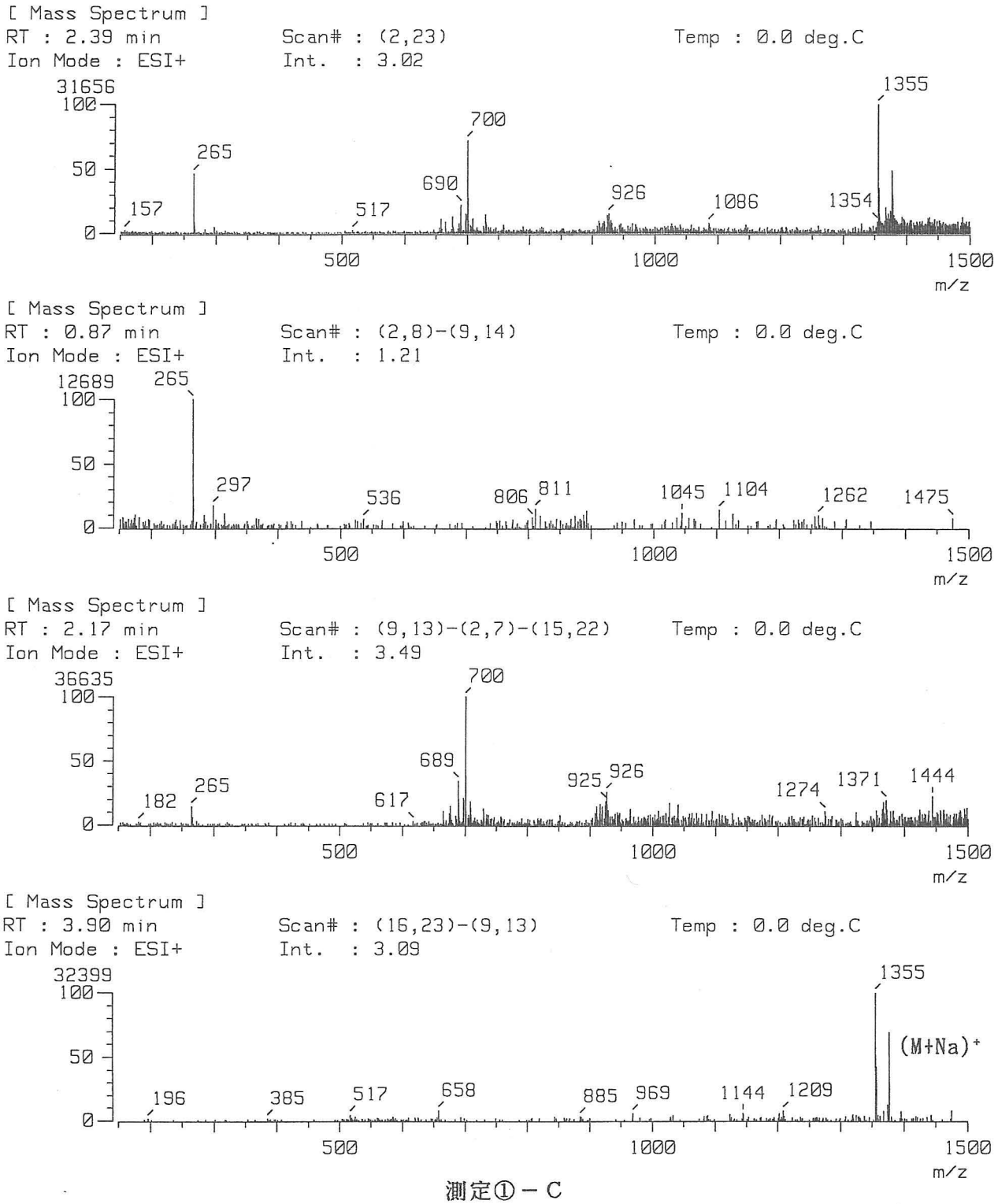
測定①－Ａ

測定①－Ｂはこの測定方法の分離能力を証明するものである。最上段がＴＩＣ、２段目がm/z２６５の存在位置と量を示すマスクロマトグラム、同じく３段目がm/z７００の、４段目がm/z１３５５のマスクロマトグラムである。m/z２６５、７００、１３５５の存在するピークの位置が異なるのが分かる。



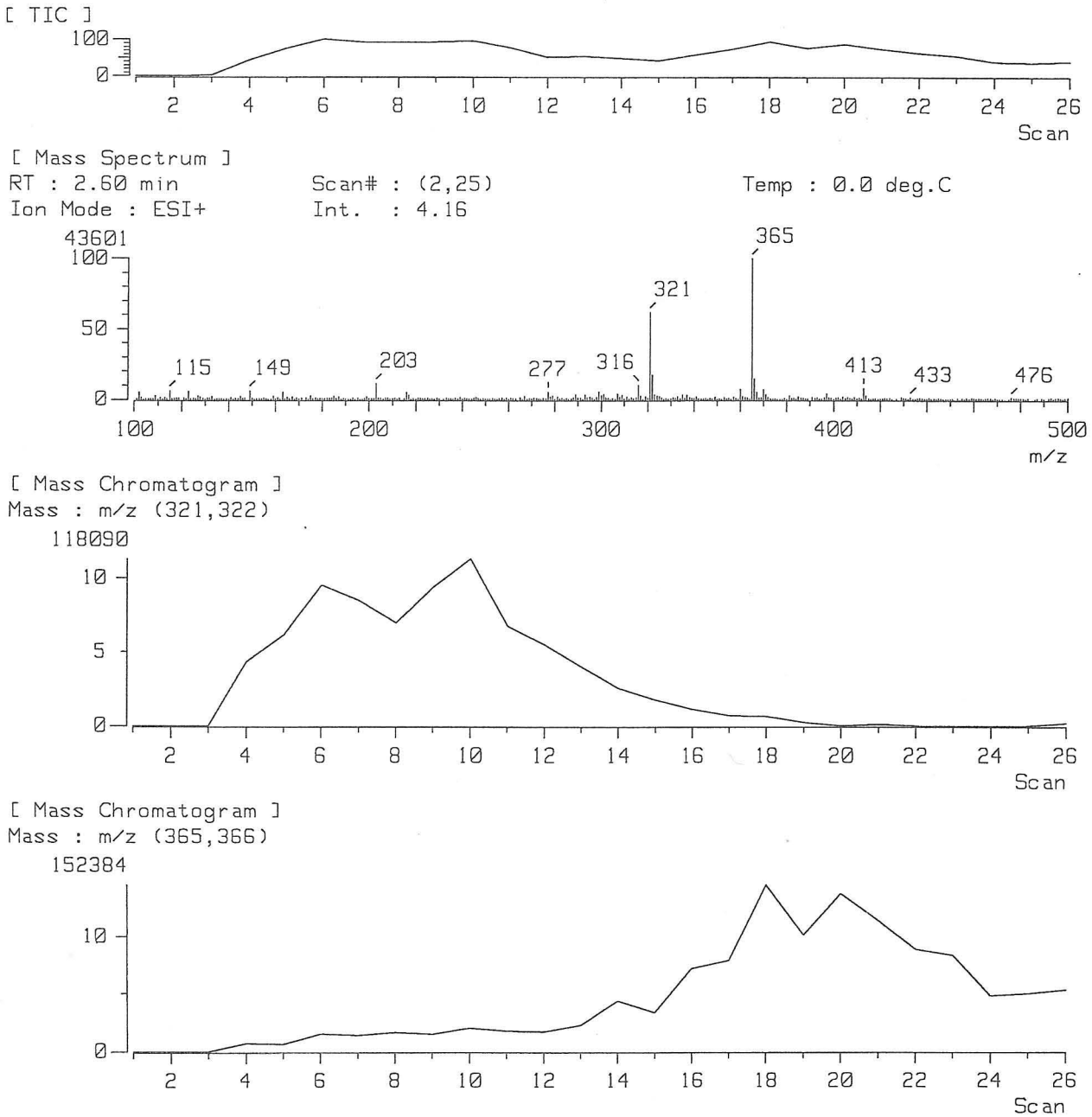
測定①－Ｂ

測定①－Ｃは、測定①－Ｂの各々の山の左右をバックグランドとして引き、分離能力があると言えるマススペクトルが得られるか試みたものである。最上段が全スキャンを積算平均化したもの、２段目がm/z２６５の山の右側を引いたもの、３段目がm/z７００の山の左右を引いたもの、４段目がm/z１３５５の山の左側を引いたものである。結果は３成分とも単独のマススペクトルが得られた。



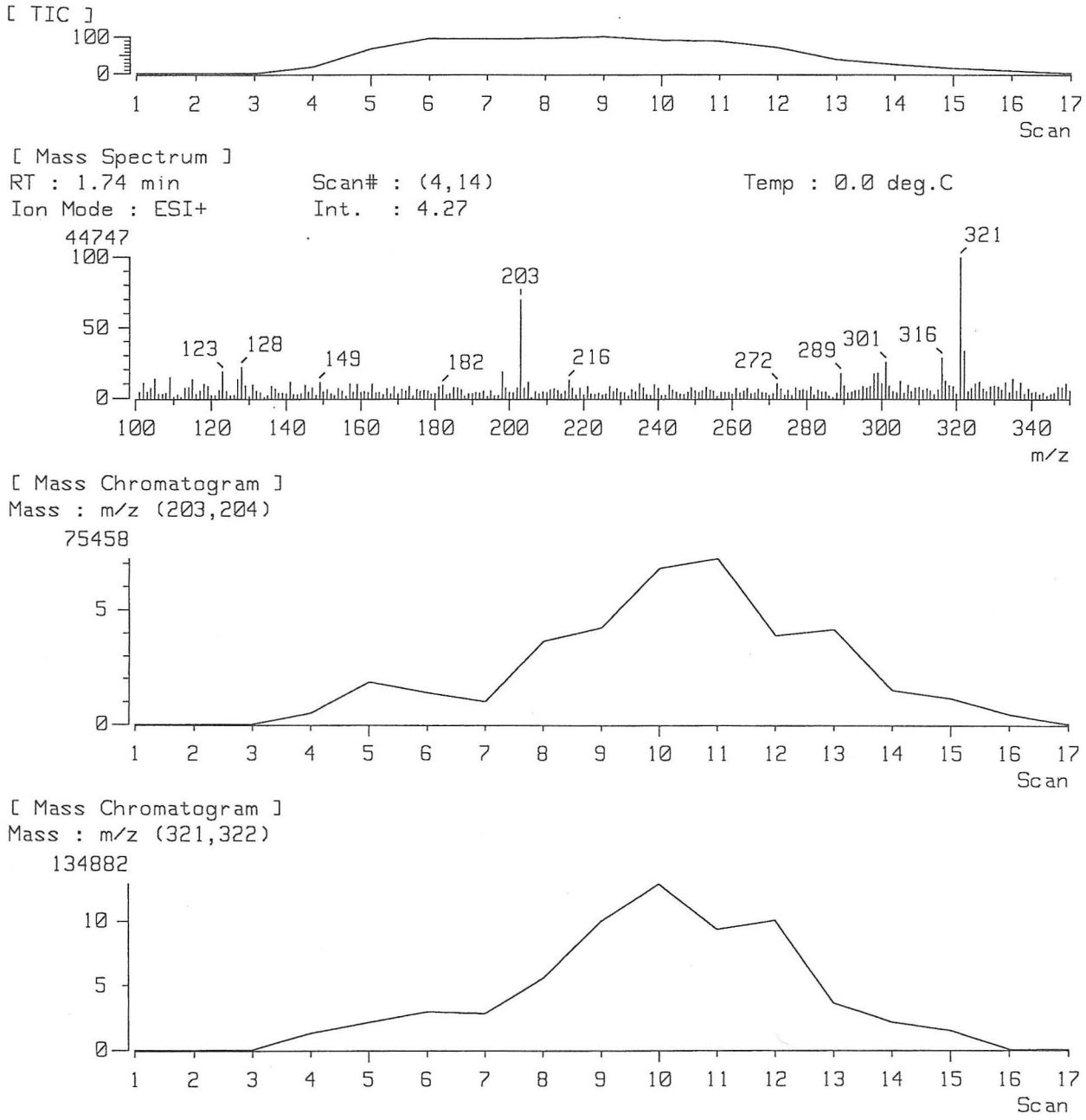
測定①－Ｃ

測定②は同様の方法でステアリン酸メチルと庶糖の混合物を測定した結果である。最上段がＴＩＣ、２段目が全スキャンを積算平均化したマススペクトル（庶糖にNa^+が多く混入していたためと思われ、どちらも分子にナトリウムが付加したクラスターイオンで出ている）、３段目がm/z３２１の存在位置と量を示すマスクロマトグラム、４段目が同じくm/z３６５のマスクロマトグラムである。分子量が接近しているにもかかわらず、存在を示す山の位置がはっきり異なる。ここで、ＥＳＩイオン源内でイオン化した分子イオン等の軌道を左右するのは分子量だけではないのではなかろうかと考えられる。ステアリン酸メチルと庶糖では分子量が近いが極性がかなり違う。この極性の差が分子量の差に加わって軌道の差になっているのではなかろうか。例えば、ニードル（図－１）を出た後ステアリン酸メチルは早くイオン化し電気的制御を受けるのに対し、庶糖は遅れてイオン化するため制御を受けるのも遅れ、軌道の差ができると考えると合点がいく。



測定②

測定③は同様の方法でステアリン酸メチルとブドウ糖の混合物を測定した結果である。最上段がＴＩＣ、２段目が全スキャンを積算平均化したマススペクトル（ナトリウムが付加したクラスターイオンで出ているが、混合比の割合になっていないのはイオン化効率の差と思われる）、３段目がm/z２０３の存在する位置と量を示すマスクロマトグラム、４段目がm/z３２１の存在位置と量を示すマスクロマトグラムである。ブドウ糖に比べてステアリン酸メチルの方が分子量が大きいのに、存在を示す山の位置はほとんど同じかやや早めになっている。この場合のように、混合物でも分子量の大きい方の極性が小さい場合は分離が困難になってくる。逆に、測定②のように分子量の大きい方の極性が大きい場合は良く分離する。



測定③

４．要約

ＥＳＩ－ＭＳ測定法の難点である混合物の一方にフォーカスが合ってしまう現象を逆に分離能力があると考え、２～３の測定を試みた。測定技法はフォーカス系のひとつであるリングレンズを規則正しく変化させることである。得られたデータにより、物質の分子量の差に加えて極性の差がイオンの軌道の差となって分離に関与していると想定された。分子量の大きい方の極性が大きい場合は良く分離し、分子量の大きい方の極性が小さい場合には分離しにくい。又、分離の有無にかかわらず、この方法により、一方を見逃したり存在比が極端に違うデータを打ち出してしまう危険性がなくなると言える。

手動でリングレンズのツマミを回転したが、メーカ側がこの方法を採用して自動可変制御もできるように改良してくれたなら、もう少しきれいなクロマトグラムが得られると思うのと、ＥＳＩ－ＭＳの基本的測定マニュアルのひとつに加えれると考える。