

機器分析分野における研究支援に関する報告

沢田 義治

研究推進・社会連携機構 科学研究基盤センター 機器分析分野

機器分析分野では、岐阜大学の共同利用施設である大型分析器とその周辺機器を 70 種類以上所有し、管理運営を行っている。

現在、教員 2 名、技術職員技術補佐員各 1 名の 4 人体制に加え、各学部の協力員の方々と共に、当分野の管理運営、導入機器の検討、並びに、現存機器のメンテナンス、使用方法の説明、使用者からの相談への対応、安全教育等を行っている。

今回、当分野の質量分析装置(MS)の 4 機種について、その詳細、並びに、起きた事象、改良や各種測定等について報告する。

Key Words: 機器分析, 質量分析装置(MS)

1. はじめに

研究推進・社会連携機構 科学研究基盤センター 機器分析分野は昭和 55 年学内共同岐阜大学情報・計測センターとして設置され、昭和 58 年に計測センターに改組、平成 9 年に省令化に伴い機器分析センターとして新たに発足した。平成 15 年度に大学内の各センターを統合し、生命科学総合実験センター機器分析分野として再スタートした。平成 17 年 4 月に生命科学総合研究支援センターに、昨年度 4 月に現在の研究推進・社会連携機構 科学研究基盤センターに改称された。

今回、当分野より現在の研究支援体制と研究支援について紹介する。

2. 研究支援体制

機器分析分野は柳戸地区、医学地区の 2 地区に分かれており、平成 26 年 9 月、柳戸地区の機器類は旧機

器分析棟より総合研究棟Ⅱ 1 階(工学部 F 棟の東)へ移転を完了している。

当分野では、70 種類以上の大型精密分析機器と付随する機器を、教員 2 名、技術職員 1 名、技術補佐員 1 名の 4 人体制で、全学の学部より選ばれた協力員の方々と共に、維持・管理している。(Table. 1)

柳戸地区では大型精密分析機器等を 8 つの部屋に分けて配置している。

機器分析室1; 質量分析装置

機器分析室2; 核磁気共鳴装置

機器分析室3; 分光機器等

機器分析室4, 5; 透過型電子顕微鏡

機器分析室6; 走型電子顕微鏡等

機器分析室7; X 線分析機器等

機器分析室8; テラヘルツ分光

1. 機器一覧

【柳戸地区】		H31.4 現在	
品 名	納入年度	規 格	
1. 大型電子顕微鏡・デジタル顕微鏡 大型電子顕微鏡 (TEM) 大型電子顕微鏡 (TEM) STEM, EDX 付 ガラスナイフ作製器 # 超ミクロトーム 真空蒸着装置 イオンスバクター、カーボンコーター ネオオスミウムコーター ディンブルグライNDER イオンミリング装置 精密イオンポリッシング装置 超音波ディスクカッター ダイヤモンドワイヤソー スバクター カーボンコーター 電界放出走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) EDX 付 走査型電子顕微鏡 (N-SEM) 高分解能電界放出走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) エネルギー分散型 X 線分析装置 デジタルマイクロスコープ	H21 年度 # S60 年度 H9 年度 # S59 年度 H18 年度 H17 年度 H5 年度 H19 年度 H21 年度 H22 年度 H14 年度 H15 年度 H19 年度 H26 年度 H22 年度 H25 年度	日立製作所 H-7000 日本電子 JEM-2100, 堀場 EX-220 三菱科学 メッサーC ライカ ガラスナイフメーカー EM KMR ライカ ULTRACUT-UCT 日立製作所 HUS-5GB 日立製作所 E-102, E-201 メイワフォーシス NE-01044 ガタン MODEL 656 N 日立製作所 E-3500 形 ガタン MODEL 691 ガタン MODEL 601 # メイワフォーシス DWS3242 # メイワフォーシス SC200 # メイワフォーシス CADE-EHS 日立製作所 S-4300, 堀場製作所 EX-220 日立製作所 S-3000N 日立製作所 S-4800 堀場製作所 EMAX EX-250 X-act ライカマイクロシステムズ DVM5000 日立ハイテクサイエンス 大型ユニット AFM5400L 環境制御ユニット AFM3300E	
3. 走査型 X 線光電子分光分析装置 (XPS/ESCA)	H19 年度	デルバック・ファイ Quanterta SXM-GS	
4. 高分解能質量分析装置 (MS)	H13 年度 H15 年度 # # H23 年度 H26 年度 H15 年度 H26 年度	日本電子 GC-Mate II 日本電子 JMS-700 日本電子 AMSUN200 (K9) 日本電子 JMS-T100LP 島津製作所 AXIMA-Resonance アジレント 1100 MS-52011LC 島津製作所 LC-20ADnano	
5. フーリエ変換核磁気共鳴装置 (FT-NMR) 内訳: 500 MHz 固体測定補助装置 400 MHz 600 MHz	H14 年度 H18 年度 # #	日本電子 JNM ECA500 日本電子 JNM-93030CPM 日本電子 JNM ECX400P 日本電子 JNM ECA600	
6. 電子スピン共鳴装置 (ESR)	H14 年度	日本電子 JES FA100	
7. 誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) マイクロ波分析前処理装置	H20 年度 H30 年度	ジョバンイボン ULTIMA2 (堀場製作所) CEM ジャパン MARS6	
8. 波長分散型蛍光 X 線分析装置 (XRF) ビード作成装置 粉砕機	H23 年度 # #	Bruker AXS S8 TIGER 1kW Katanax K1 Prime Electric Fluxer 伊藤製作所 MC-4A	
9. 有機微量元素分析システム (OEA) 有機微量元素分析装置 オートサンブラー 硫黄分析ユニット	H23 年度 # # #	J-Science・Lab JM10 J-Science・Lab JMA102 J-Science・Lab JMSU10	
10. 超高速現象解析システム 内訳: 超高速撮影装置 汎用超高速撮影装置 超高速赤外線カメラ 汎用赤外線カメラ パルスジェネレータ	H10 年度 H23 年度 H23 年度 H10 年度 # H23 年度	NAC FS501 島津製作所 HyperVision HPV-2A NAC MEMECAM GX-8 FLIR SC7500TEC ニコン LAIRD 3ASH NAC DG-535	
11. 紫外可視分光光度計 (UV-Vis) フーリエ変換型紫外分光光度計 (FT-IR) 顕微・反射型紫外分光光度計 (顕微 IR) In Situ フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) 旋光計	H22 年度 H22 年度 H14 年度 H15 年度 H22 年度	パーキンエルママー A950 パーキンエルママー Spectrum100 日本分光 460Plus メトラワー・トレド ReactIR 4000 日本分光 P-2300	
12. 円二色性分散計 (CD)	H13 年度	日本分光 J-820P	
13. フォトリソリソグレーション分析システム 蛍光寿命測定装置 (Tau) 絶対 PL 量子収率測定装置 (QY) 分光蛍光光度計 (FL)	H23 年度 # # #	浜松トニクス Quantaurus-Tau 浜松トニクス Quantaurus-QY 日本分光 FP-8600	
14. テラヘルツイメージングシステム フェムト秒ファイバーレーザー テラヘルツ分光走査型顕微鏡	H17 年度 H19 年度 H14 年度	アイシン精機 フェムトライト BS-60-Y5 オザワ THz-TDS 日本分光 NRS-1000	
15. 顕微レーザーラマン分光システム	H15 年度 # #	エスアイアイ EXSTAR-6000 Series DSC6300, DSC6100, TG-DTA6300 TMA/SS6100, TMA/SS6300	
17. 粒子解析システム フロー式粒子像分析装置 粒子径・ゼータ電位・分子量測定装置	H22 年度 # #	マルバーン FPIA-3000 マルバーン Zetasizer Nano ZS	
18. 粘弾性解析システム レオメーター 動的粘弾性測定装置	H22 年度 # #	TA・インスツルメント AR-GII KG TA・インスツルメント DMA Q800 KG	
19. 物質微細構造解析システム X 線マイクロ CT スキャン X 線回折装置	H22 年度 H30 年度	Bruker SKYSCAN1172-GU リガク SmartLab (9 kW)	
20. その他 超音波洗浄器 マイクロ天秤	H7 年度 H19 年度	マルバーン 220 ザルトリウス MC5	

* 新たな全学の機器共用システムの分析装置として、機器分析室 7 に設置。

【医学地区】		H31.4 現在	
品 名	納入年度	規 格	
1. 核磁気共鳴分光装置 (NMR) 内訳: 800MHz 600MHz	H21 年度 #	Bruker Biospin AVANCE III 800 Bruker Biospin AVANCE III 600	
2. 超高速 X 線回折装置	H17 年度	Rigaku FR-E SuperBright	
3. 電子スピン共鳴装置 (ESR)	H21 年度	Bruker Biospin EMDmicro	

Table.1 機器分析分野管理の分析機器 1)

3. 研究支援：質量分析装置 (MS) を用いた測定

当分野では 2. で挙げたように、多くの精密分析機器を管理運営しているが、今回はその内の 1 つ、質量分析装置 (MS) を事例に挙げる。

MS は物質の分子量を計測する装置であるが、構成として大きくイオン化部と検出部に分かれており、いずれの部位も高真空中で運用されている。これは特に検出部において、イオンの進路上に他の分子が存在するとイオンが散乱され、感度が下がってしまうためである。

MS の対象となる物質は、炭素、水素、酸素、窒素、フッ素、硫黄、ケイ素のほか種々の金属元素を含むことが多い。また、その分子量は数百から数千である。

当分野では推奨する試料濃度を設定している。例えば、JMS 700 では濃度 1.0 mg / ml のサンプルを 1.0 μ l インジェクトすることを推奨している。これは分子量 500 の物質を使用した場合、2 nmol をイオン化部に導入する計算だが、装置が新しくなるほど検出感度が高くなる傾向にある。最近の装置は pmol (ピコモル)、fmol (フェムトモル) のオーダーにて検出が可能であるため、本装置の使用にあたっては、コンタミしないよう、より細心の注意が必要である。

検出部における計測法は磁場、電場、4 重極、飛行時間型 (TOF) などがあり、当分野においてもこの 4 種類の検出方法にて測定が可能である。

イオン源において試料をイオン化する方法は様々あり、電子衝撃イオン化法、化学イオン化法、高速原子衝撃法、電子スプレーイオン化法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法などがある。以下に、当分野における MS のイオン化について説明する。

・電子衝撃イオン化法 (EI: electron ionization or electron impact)

分子に直接、電子を当ててイオン化する、最も古いイオン化法である。

測定する分子量は 1000 程度までで、多くのデータが蓄積されており、利用しやすいデータベースがある。フラグメンテーションを起こしやすく、気化しやすい試料にしか適応できないといった特徴がある。

・化学イオン化法 (CI: chemical ionization)

分子に帯電したガス(CH_5^+ , NH_4^+ など)を当てるイオン化法で分子量は 1000 程度までを対象とする。

特徴として、装置が簡潔で、電子衝撃イオン化法 (EI) よりも分子が少し壊れにくく、ジクロロメタン(CH_2Cl_2) を使用することで発生する塩化物イオン(Cl^-) により陰イオンも検出可能であることが挙げられる。ただし、電子衝撃イオン化法 (EI) 同様に、気化しやすい試料にしか適応できない。

・高速原子衝撃法 (FAB: fast atom bombardment)

マトリックスと混合した分子にイオン化したアルゴンガス (Ar^+) やキセノンガス (Xe^+) を当てるイオン化法で、分子量は 3000 程度までを対象とする。揮発性の低い試料や熱に不安定な試料も測定可能であり、数ナノモル程度で測定できる。

特徴として、マトリックスを使用するため、マトリックス分子のピークも検出され、気化しやすい試料にしか使用できないことが挙げられる。

・電子スプレーイオン化法 (ESI: electrospray ionization)

分子の試料溶液に電圧をかけつつ微細なエアロゾルを作り、溶媒が蒸発することでイオン化する。対象とする分子量は 100,000 程度までであり、試料を溶解させる溶媒は水/メタノール (MeOH) / アセトニトリル (CH_3CN) / テトラヒドロフラン (THF) などの混合溶媒を使用する。

小さなペプチドや糖オリゴマーなども測定可能であるが、多価イオンが生成するので測定範囲以上のイオンでも検出できる。金属錯体などの不安定化合物も条件によっては測定も可能である。

・マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization)

有機化合物をマトリックスと混合して混晶を作り、イオン化レーザーを当てる。マトリックスがレーザーにより熱励起されイオン化されたマトリックスとサンプルが反応してイオンを生成する。分子量は 1,000,000 程度まで対応する。汎用性が最も高く、低分子から高分子化合物まで測定可能である。タンパク質の測定ができるマトリックスに含まれるナトリウムイオン (Na^+) などが結合した $[\text{M} +$

$\text{Na}]^+$ としてイオン化合物が検出されることがある。

・DART 法: (direct analysis in real time)

電極からの放電でヘリウム (He) をイオン化、次いで空気中の水がイオン化され、サンプルをイオン化する。このためイオン源は真空条件下ではない。特徴として固体・液体・気体のサンプルを直接分析可能である。TLC 上のスポットを直接分析できるし、生体組織などを直接分析することも可能である。

当分野における使用頻度は飛行時間型 (TOF) が高い傾向にある。また、当分野の質量分析装置は、日本電子製の JMS-700, GC-mate II, JMS-K9, JMS-T100LP (Accu TOF), と島津製作所製の AXIMA-Resonance がある。その組み合わせとしてイオン源と検出器の組み合わせは以下の様な構成となっている (Fig. 1)。

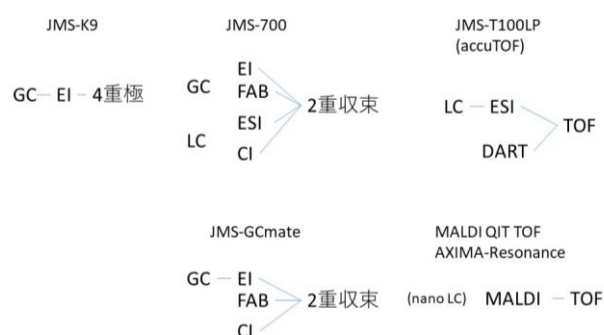


Fig. 1 当分野 MS のイオン源検出器の組み合わせ

ここで、起こりうるトラブルとして、当分野で実際にあった事例をご紹介したい。

JMS-K9 では GC が繋がっており、常に GC の注入口からサンプルが導入される。この注入口にはガラスのライナーがはいっており、使用していくと徐々に汚染される。このライナーを洗浄する際にポリプロピレン (PP) 製の洗浄瓶に入ったエタノールを使用したことがあった。洗浄後、この装置を使用したユーザーからバックグラウンドに可塑剤のピークが検出される旨、報告があった。報告により、前述の経緯がわかったので、ライナーを新しいものに交換してカラム内を洗浄したところ、バックグラウンドのピークは検出されなくなった。MS は感度の高い測定であるため、使用する洗浄用の溶媒の管理に気をつけ

なければならない。

JMS-T100LP (accu TOF) では、ネブライザーが詰まり、試料溶液が流れないトラブルがよく起こる。その都度、詰まりを解消してユーザーに使用いただくのだが、何が原因で詰まりが起こるのか調査を行った。詰まり物を回収し走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察を行ったところ、非常に細かい繊維状の物質であることが判った (Fig. 2)。このことから、試料溶液をあらかじめろ過しておくことは非常に重要である。

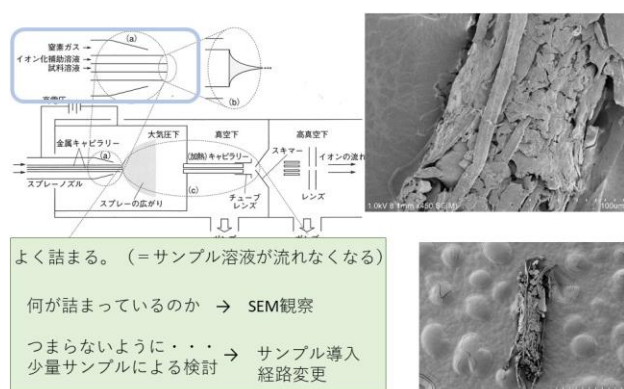


Fig. 2 JMS-T100LP (accu TOF) の詰まり

一方で、測定用サンプルが詰まってしまうと実験に支障が出てくるが、1回のサンプル導入量を少なくして分析できれば使用量も抑え、かつ詰まるリスクを下げることができる。これまでのサンプルの導入方法は、試料溶液をシリンジに入れシリンジポンプにより大量にネブライザーへ導入してきているが (pulse injection 方式)、この経路途中にレオダイン社製サンプルインジェクターを挿入した。これはシリンジポンプによりシリンジから溶媒のみを送液し、レオダインインジェクターを介してマイクロシリンジにより試料溶液を数 μl 導入する方法である (infusion 方式)。

この方式に従い、標準物質であるレセルピンを 2~6 μl 程度導入すると、タイムラグはあるもののイオンピーク $m/z = 609$ が出現した (Fig. 3)。

現在、本導入システムを利用した MS 測定を公開しているが、詰まりの頻度についてどれだけ改善するかの追跡調査を行なっているところである。

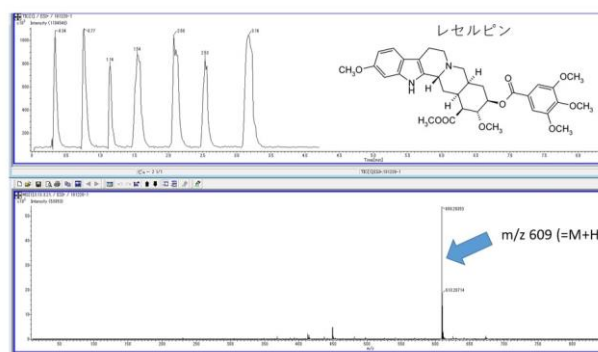


Fig. 3 infusion 方式による MS 測定の結果

当分野の Accu TOF ではイオン源として ESI と DART が選択できる。DART のイオン化については前に述べたとおりであるが、サンプリングしやすいという特徴がある。

そこで今回、サンプルとして紅茶数種類とコーヒーからの抽出液を用い、それぞれのデータを比較することとした。紅茶やコーヒーには共にカフェインが入っており、記憶力や運動持続力を向上させる効果や疲労回復作用があるとされている。また、コーヒーはダイエット効果があるとされるクロロゲン酸を、紅茶は抗菌・抗ウイルス効果のあるテアフラビン含有している。

測定に用いたサンプルは以下の通りである。

- ① 紅茶 a; ダージリンティー
- ② 紅茶 b; アップルティー
- ③ 紅茶 c; レモンティー (海外製)
- ④ コーヒー

商品の規定されている方法にて紅茶各種とコーヒーを抽出し、accuTOF (DART) を使用して、得られた飲料をそのまま測定したマスペクトロメトリーを Fig. 4 に示す。

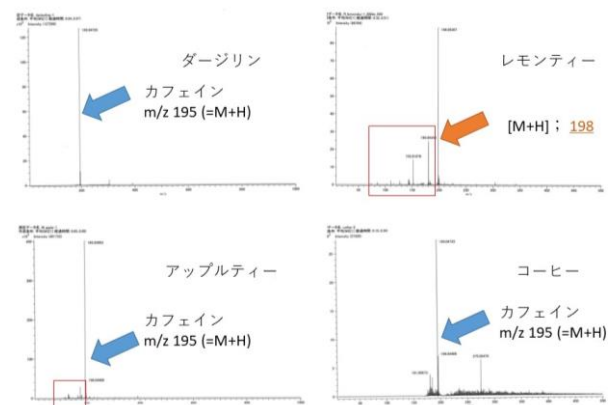


Fig. 4 accuTOF (DART) による測定結果

各々のデータを比較すると、紅茶に比べコーヒーではメインピークを除いて出現したピークの数が非常に多い。これは焙煎の過程における熱の影響により種々の反応が起きたため、それらの分散したピークが検出されているのではないかと考えられる。

紅茶 a, b, コーヒーではカフェイン ($[M+H]^+$; 195) が検出できた。紅茶 c ではカフェインは検出されずそれとは違うメインピーク ($[M+H]^+$; 198) が検出された。紅茶 c の茶葉を見てみるとよく見られる茶色ではなく、黄色ないし白っぽい色をしていた。そのため、レモンティーをとして調製する際に紅茶からカフェインが除かれるか変質し、そのピークを検出できなかったと考えられる。

紅茶 a に比べ紅茶 b, c では軽い分子が検出されているが、紅茶 b, c はフレーバーティーであるから、添加された香り成分由来のピークが検出されたものと考えられる。

今回の4種類のサンプルのうち 3 種類において、カフェインを検出することができたが、先に挙げたような生理活性物質であるクロロゲン酸やテアフラ빈は検出されなかった。

紅茶 c においてカフェインを検出できなかったことについて、今回用いたサンプルとカフェインの水消しによる $^1\text{H-NMR}$ を測定し、結果を Fig. 5 に示した。

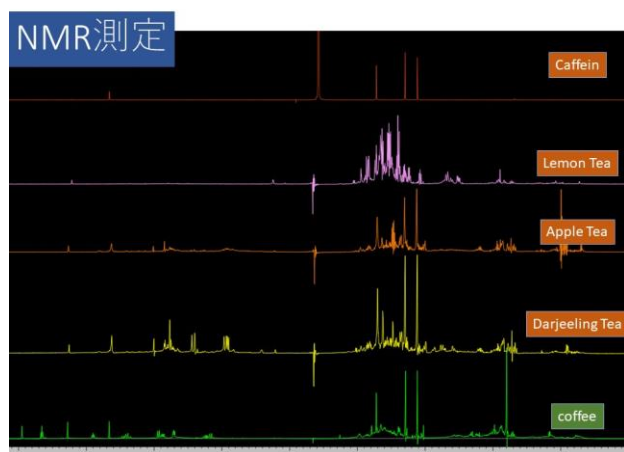


Fig. 5 各種サンプルの水消 $^1\text{H-NMR}$ 測定結果

紅茶 c だけがカフェインや他のサンプルにあるカフェインのピークが見られず、また、紅茶 a, b とはピークパ

ターンが異なることから、紅茶 c はいわゆる紅茶葉を用いた製品ではないかもしれない。

ここまで抽出物として紅茶やコーヒーに含まれるカフェインなどについて検出の可否を述べたが、純粋なカフェインとクロロゲン酸のイオン化法を変えて MS 測定した結果について示したい。

まず、カフェインを JMS700, イオン化方法に EI を用いて測定した結果を Fig. 6 に示す。

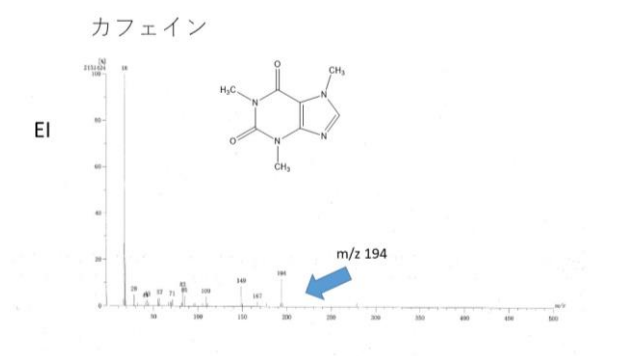


Fig. 6 カフェインの MS 測定 (EI) の結果

カフェインの m/z ; 194 が検出されているが、EI はハードなイオン化方法であるために 3 つのメチル基がはずれたフラグメント m/z ; 149 や、C-N 2 重結合部分が切断されたフラグメント m/z ; 167 などが検出されている。このカフェインは高分解能 MS を測定すると、計算精密質量の値に対し 0.6 mmu の誤差にて検出できた。

Accu TOF を用いてイオン源を ESI と DART を用いて測定したところ、ESI では検出できず DART では $[M+H]^+$; 195 を検出した。

同様に、クロロゲン酸を JMS 700, イオン化に EI を用いて測定した。各種条件を検討したが、この条件ではクロロゲン酸が分解してしまい目的とするピークは検出できず様々なピークが出現した (Fig. 7)。

クロロゲン酸

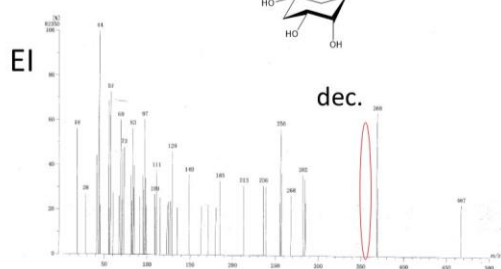


Fig. 7 クロロゲン酸の MS 測定 (EI) の結果

そこで, Accu TOF を用いて, イオン源を ESI と DART として測定したところ, ESI では $[M+Na]^+$; 377, DART では $[M+H]^+$; 355 のピークが得られた. 高分解能 MS においては理論値との誤差はそれぞれ 2.7, 0.7 mmu で検出することができた (Fig. 8).

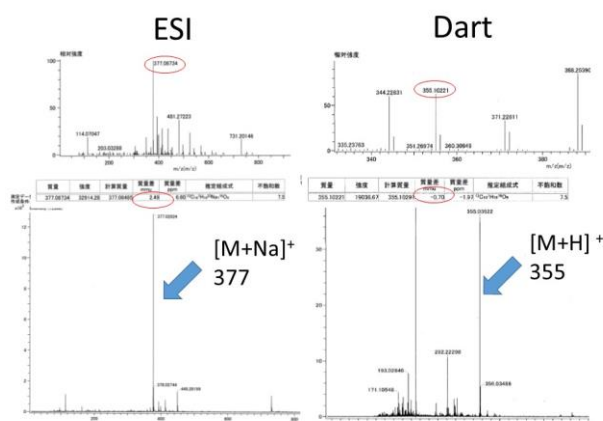


Fig. 8 クロロゲン酸の MS 測定 (ESI, DART) の結果

このように, MS の測定においてイオン化法を選択することは非常に重要なことである.

以上, 当分野の質量分析装置 (MS) について紹介した.

謝辞

本発表をするにあたりサンプルの供与をしてくださった応用生物科学部の柳瀬笑子准教授, 専門を活かした職務遂行をご指示いただいた当分析分野の木内一壽分野長, 本稿の作成を支えてくださった岐阜大学研究推進・社会連携機構科学研究基盤センター機器分析分

野のスタッフに, この場をお借りして深謝致します.

参考文献・参考書籍等

- 1) 岐阜大学生命科学総合研究支援センター年報 第 15 号 p.109-191.
- 2) Jurgen H. Gross, Mass Spectrometry (日本質量分析学会出版委員会...訳)
- 3) 志田 保夫ら, これならわかるマスペクトロメリー (化学同人)
- 4) 泉 美治ら, 機器分析のてびき (化学同人)