

Orbitrap質量分析計の装置と性能

坂本 茂

(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社・SIDアプリケーション部)

はじめに

Alexander Makarovによって開発されたOrbitrapは、高周波や強磁場を必要としない、新しい原理に基づくイオントラップ型質量分析計である。主な特長としては、高い分解能（最大10万）と安定した質量精度が挙げられる。この2つの特長により、複雑なマトリックス中のターゲット化合物であっても、より迅速に、より確実に検出・同定することが可能になった。2005年に販売開始して以来、薬物代謝、不純物分析、天然物、メタボロミクスやプロテオミクスなど幅広いアプリケーション分野に用いられるようになり、現在日本での納入実績は100台を超えるようになった。本発表では、（1）Orbitrapの原理、（2）Orbitrapを搭載する質量分析計と（3）アプリケーション例についてご紹介する。

2. Orbitrapの原理

Makarovにより開発されたOrbitrapは、図1に示されるように、中心電極の半径およびz軸から外部電極までの距離がz座標に依存する特殊な形状をしている。Orbitrapの断面図を図1に示す。この特徴的な形状によって生ずるポテンシャルは

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left\{ z^2 - r^2/2 + R_m^2 \cdot \ln(r/R_m) \right\}$$

(式1)

となる。ここでkは曲率、Rmは質量mのイオンの固有軌道半径である。式1より、z軸方向の振動数 ω_z は以下の式で求められる。qは電荷を示し、kは定数である。

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/q}} \quad (\text{式2})$$

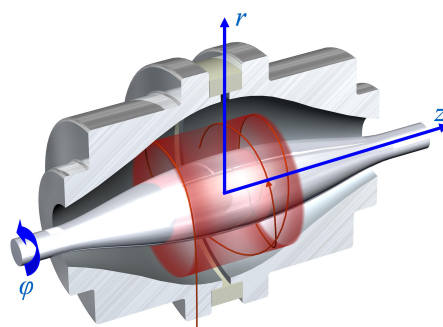


図1. Orbitrap質量分析計の断面図

イオンのz軸方向の運動はrおよび ϕ に独立な調和振動として記述され、z軸方向の振動数からイオンのm/z値を導出することができる。

Orbitrapの外部電極はz=0の位置で分割されており、従って個々の電極にはz軸方向に一定の振動数で運動するイオンにより正弦波のイメージ電流が発生する（図2）。複数のイオンがOrbitrap内部に存在する場合には、それぞれのイオンに対応する正弦波が重ね合わさった信号が検出される。高速フーリエ変換を施すことにより、信号を個々の周波数成分に分解し、マススペクトルが得られる。Orbitrapの質量分析計としての特長である高分解能・高質量精度は、このエネルギー非依存の

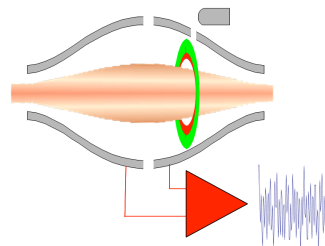


図2. イメージ電流の検出

原理に因るものである。

このOrbitrapを実際のLC-MSのシステムとして応用するためには、Orbitrapに送り込まれるイオンは一個の分子ではなく、集団（パケット）であり、かつイオンの種類も単一ではないことを考慮しなければならない。

イオンパケットは m/z 値に応じた軌道半径で回転するリングを中心電極の周囲に形成する。高い質量精度を得るためには、イオンパケットは軸方向にコヒーレントな振動を行う必要がある。イオンの入射位置を $z=0$ から離れた位置に設定することにより、イオンが固有の軌道に到達するまでに、Orbitrap内部のポテンシャル $U(r,z)$ によって軸方向・径方向に電気力学的に圧縮され（Electrodynamic Squeezing）、パケットのサイズを十分に小さくできる。

また同時にOrbitrapの前段にはイオンを貯蔵・冷却するための装置が必要である。現在商用化されているシステムでは、共通してC-Trap（C-shaped ion trap）を採用している。C-Trapは双曲面の内壁を持つ弧状のロッドで構成される四重極である。窒素ガスを封入しており、C-Trapの内部に入射したイオンはガス分子との衝突によってエネルギーを失い、トラップ内部に貯蔵されたイオ

ンは、パルスによって収束され、Orbitrapに送り込まれる。

3. Orbitrap質量分析計を搭載するシステムのご紹介

2010年現在、従来型のリニアイオントラップ型質量分析計LTQ XLとのハイブリッドシステムであるLTQ Orbitrap XL/Discovery、デュアルリニアイオントラップ型質量分析計LTQ VelosとのハイブリッドシステムであるLTQ Orbitrap Velosとベンチトップ型システムであるExactiveの3タイプの質量分析計を販売している。

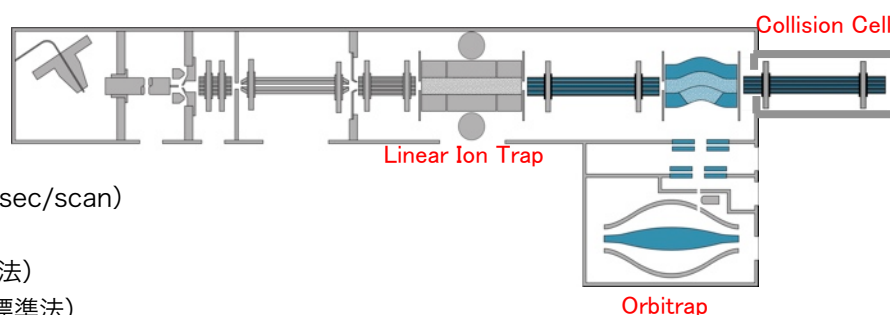
ハイブリッドシステムでは、前段のリニアイオントラップによる多段階MS/MSで開裂を起こし、Orbitrapでプロダクトイオンを検出することが可能である。このハイブリッドシステムは、主に構造解析を行う、代謝物分析、不純物分析やプロテオミクスなどのアプリケーションに用いられるようになった。

一方ベンチトップ型システムであるExactiveでは、有機合成品の組成解析や薬毒物などのスクリーニング分析、代謝物の定量分析などに用いられている。このように、Orbitrap質量分析計の用途は主に定性分析にフォーカスしていたが、この数年は、高分解能・精密質量を利用した定量分析やスクリーニング分析にも拡大している。

以下に、それぞれのシステムの装置図などを示す。



図3. LTQ Orbitrap XL（左）とExactive（右）の装置の写真



分解能：60,000 @ m/z 400（1 sec/scan）

最大分解能：100,000

質量精度：3 ppm以内（外部標準法）

2 ppm以内（内部標準法）

質量範囲： m/z 50-2000と200-4000の切り替え

MS/MS：リニアイオントラップによるCID MS/MSⁿ（最大10回）

コリジョンセルによるHCD MS/MS

図4. LTQ Orbitrap XLの装置図と主なスペック

分解能
100,000 (1 スキャン/秒)
10,000 (10 スキャン/秒)

質量精度
5 ppm (外部標準法)

感度
500 fg Buspirone (S/N > 10:1)

ダイナミックレンジ
>4,000

スキャンスピード
最大 10スキャン/秒

質量範囲
m/z 50 - 4000

極性スイッチング
1ポジティブ&1ネガティブスキャンが
ポジティブ・ネガティブスキャン 1サイクル < 1.2 秒 (分解能 50,000モードの時)

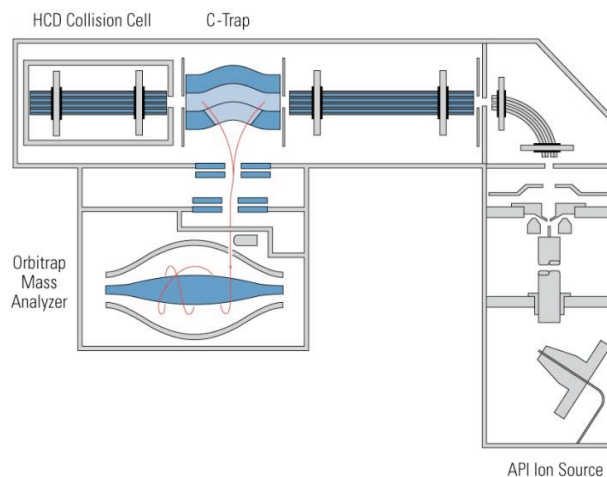


図5. Exactiveの装置図と主なスペック

4. アプリケーション例のご紹介

4-1 残留農薬のスクリーニング

高分解能・精密質量 (HR/AM) を利用したスクリーニング分析が近年盛んに行われるようになっていく。低濃度の残留農薬を検出するには、一般的にはトリプル四重極型質量分析計を用いたSRM (Selected Reaction Monitoring) 法が用いられている。しかしながら対象の農薬が数百成分の場合、数百ものSRMメソッド (定量イオンと確認イオン) を作成する必要があるため、メソッド作成に長い時間を費やすことが多かった。一方高分解能マススペクトルでは、MS/MSもすることなく、ターゲットの化合物とマトリックスを分離し、検出することが可能である。図6に、質量差

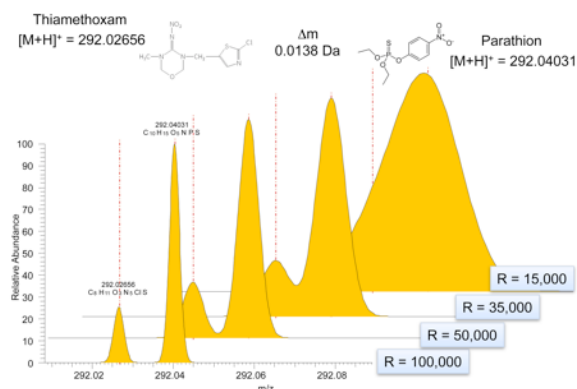


図6. 分解能を変えたときの、2つのピークのシミュレーション

13 mDaの2つの農薬 (ThiamethoxamとParathionが1 : 3の割合で混合) が同時に観測されたときの分解能とマススペクトルの分離について示す。このようにアイソバリックなピークであっても、高分解能マススペクトルならお互いのピークをベースラインで分離し、それぞれ少ない質量誤差で検出することが可能である。

図7に、馬の餌に添加した農薬標準物質のスクリーニングの結果を示す。TOFMSと同等の分解能 (15,000) では、Pirimicarbの質量誤差が6.5 ppmであり、疑わしい結果であった。そこで分解能を80,000まで上げ測定したところ、マトリックス由来のイオン種とPirimicarbの2種類のイオンが観測され、Pirimicarbを0.32 ppmという良好な質量誤差で検出することができた。このようにアイソバリックなイオンが存在する場合、十分な分解

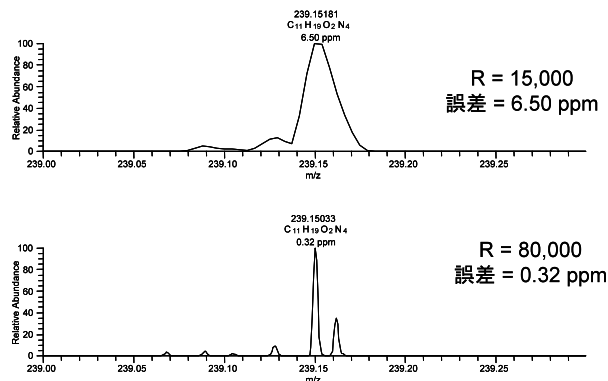


図7. 分解能15,000と80,000のときのマススペクトルの比較

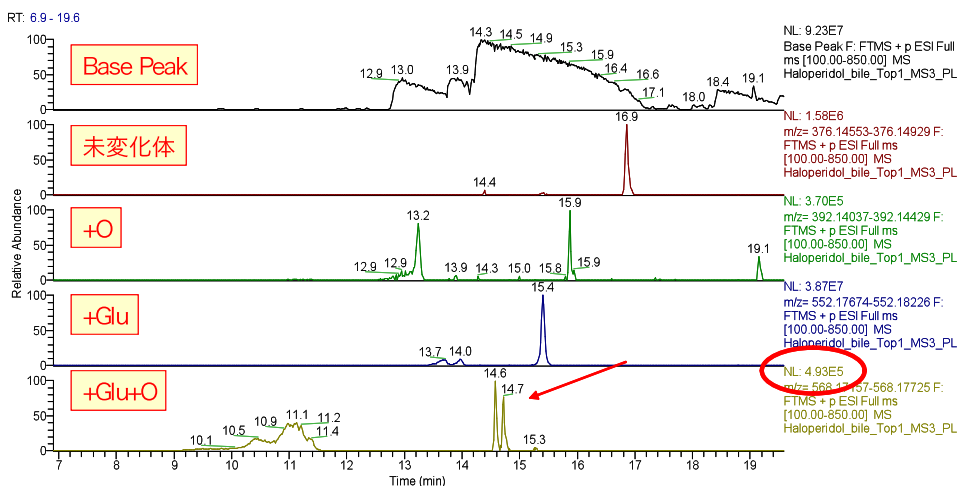


図8. 胆汁中のHalopridol代謝物の高分解能EIC

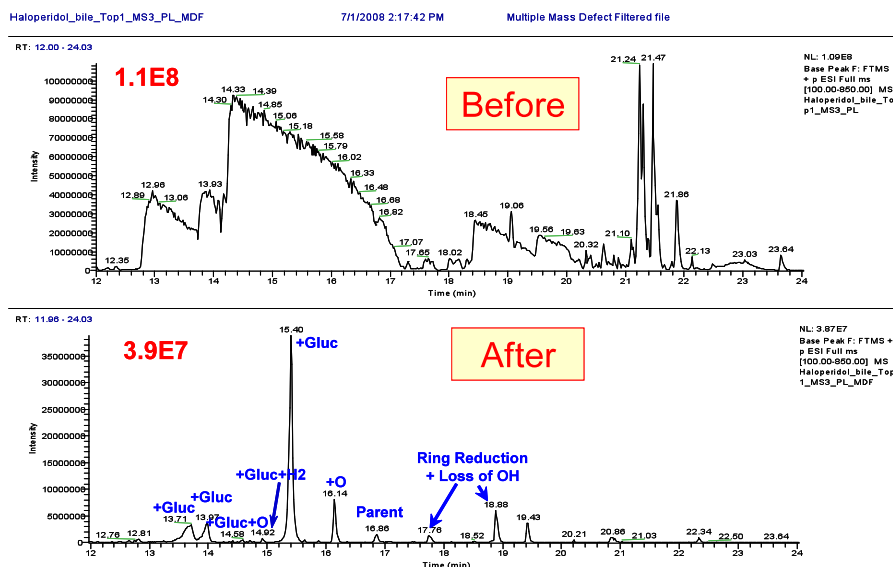


図9. MDF処理前後のクロマトグラムの比較

能のない装置による測定では、質量誤差が大きくなることからわかる。一方Orbitrapの高分解能マススペクトルでは、複雑なマトリックスであっても正しい結果を得ることが可能である。また他にも、薬物代謝や薬毒物スクリーニングなどにもOrbitrapは有用である。

4-2 薬物代謝物の探索

従来イオントラップMSなどで薬物代謝を探索する方法としては、Data DependentMS/MSスペクトルを取得し、未変化体のMS/MSスペクトルの類似性から代謝物を探索する手法が主流であった。しかしながら胆汁などイオン強度の高いマトリックスの場合、1回のLC-MS測定で必ずしも代謝物のData Dependnet MS/MSスペクトルを取得できるとは限らなかった。そこでOrbitrapでは、HR/AMマススペクトルから探索する方法を推奨している。まず予想される代謝物 (expected metabolite) に関しては、それぞれのEIC

(Extracted Ion Chromatogram) のマストレランスを ± 5 ppmに設定することにより、容易に探索することが可能である。図8に、胆汁中のHalopridol代謝物の高分解能EICを示す。このように微量な未変化体+Glucuronidation+Oxidation代謝物もMS/MSすることなく、HR/AMマススペクトルのみから2成分探索することができた。

一方、予想もしなかった代謝物 (unexpected metabolite) に関しては、Mass Defect Filtering法が有用である。これは、未変化体と代謝物の整数値が異なっても、小数点第1位以下はほとんど変わらないという普遍的事実を利用し、取得されたデータから未変化体の小数点以下が異なるイオンを排除し、小数点以下が近接するイオンのみを残す手法である。このMDFを用いることにより、胆汁のようなマトリックスのイオン強度が高い場合であっても、マトリックス由来のピークを排除することができ、明瞭なクロマトグラムを取得することができる。さらに予想もしなかった代謝物なども、HR/AMマススペクトルのみから探索する

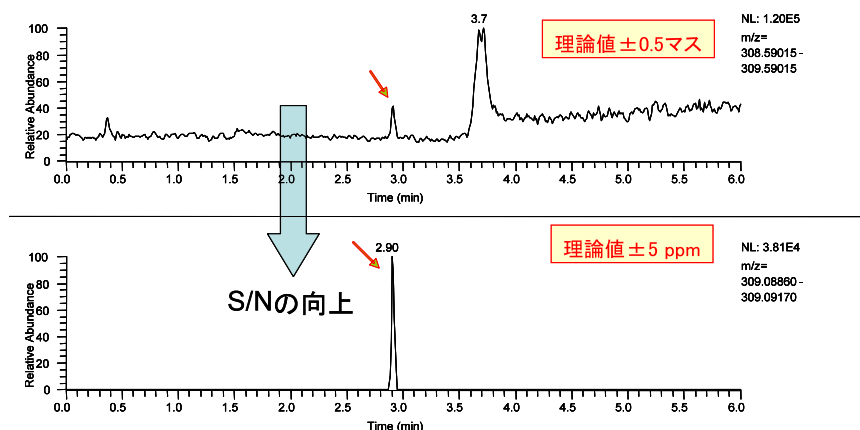


図10. マストレランスの比較：0.5 Da（上）と5 ppm（下）

ことが可能である。

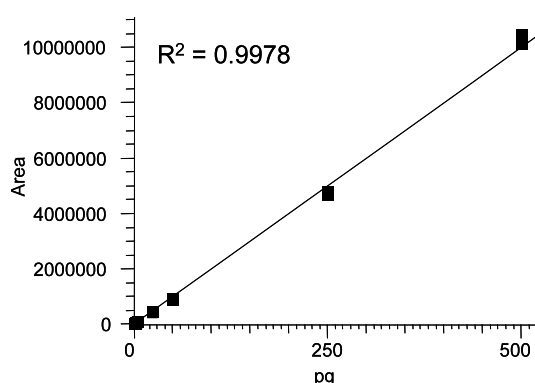


図11. Alprazolamの検量線

4-3 HR/AMマスペクトルによる定量分析法

トリプル四重極質量分析計を用いて定量分析を行う場合、MS/MSを行うSRM測定により、夾雑イオンに対する選択性の向上を図る。しかしながら、以下の場合に、トリプル四重極質量分析計による高感度分析が困難な場合がある。

(1) MS/MSしても開裂が起きにくい場合

(2) 夾雑イオンの組成とは異なるが、SRMトランジションのm/z（整数値）が全く同じ場合

一方Orbitrap質量分析計は、TOFMSに比べ、分解能も高く、また質量精度も非常に安定している。さらに広いダイナミックレンジを有しているため、高分解能設定でフルマスペクトルさえ取得していれば、僅かな質量差で近接するアイソバリックイオンとベースラインで分離することが可能である。具体的には、マストレランスが ± 5 ppmの高分解能EIC（Extract Ion Chromatogram）を解析することで高感度定量分析を実現可能なことが判明した。一例として、

AlprazolamのEICを図10に示す。このように微量成分であっても、Alprazolamのピークを確実に検出することができる。さらにこの高分解能EICを用いて検量線を作成したところ、良好な直線性（ $R^2=0.9978$ ）を得ることができた。図11に、HR/AMマスペクトルで取得したAlprazolamの検量線を示す。このように本手法は、薬物動態研究などの定量・定性同時分析にも応用できると期待できる。

4-4 メタボロミクス分析

近年、ある植物特有成分の探索や2群間のサンプル成分の相対定量など、LC-MSとソフトウェアを用いたメタボロミクス研究が盛んに行われている。一方ターゲットとするその代謝物は、濃度領域が幅広くかつ複雑なマトリックス中の微量成分であることが多く、一般的に高分離測定が可能なu-HPLCと高分解能質量分析計であるFTMSが必須と考えられている。さらにごくわずかな違いなどを容易に探索するため、さまざまなソフトウェアが開発されてきた。そこで我々は、差異解析ソフトウェアであるSIEVEと電場型FTMSであるLTQ

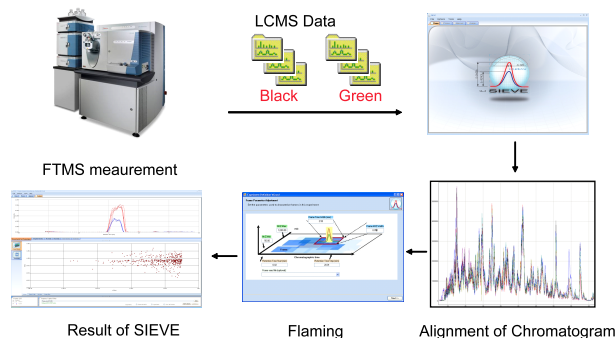


図12. 差異解析ソフトウェアSIEVEによる解析のワークフロー

Orbitrapを用いて、緑茶と紅茶の測定結果を比較し、緑茶成分特有の成分の探索および構造解析を行ったので、そのワークフローについて、図12で紹介する。

まずそれぞれのサンプルについてfull scanマスペクトルを取得する。その後これらのデータをSIEVEへ転送し、解析をスタートさせる。SIEVEでは独自アルゴリズムにより、LC-MS実験における溶出時間のずれを補正する。溶出時間とm/zで定義されたフレームを作成し、同じフレームのイオン強度を比較し、横軸に差異判定の信頼性を示すp値と縦軸に成分の強度比で定義された結果を視覚的に表示することができる。さらにSIEVEでは、代謝物データベースとオンラインで接続されており、Orbitrapで取得された精密質量測定の結果から、その代謝物の同定も行うことが可能である。さらにHR/AMマスペクトルにより、複雑な成分中の微量成分などを、確実に検出でき、組成を決定することができる。このように、差異解析ソフトウェアSIEVEとOrbitrapを組み合わせることにより、サンプル間の成分の違いを検出できるだけでなく、量的な変動（相対定量）も行うことが可能である。

4-5 2種類のMS/MS法を用いた製剤中の不純物分析

LTQ Orbitrapでは、リニアイオントラップで行うCID法とコリジョンセルで行うHCD法の2種類のMS/MS法を行うことができる。それぞれのMS/MS法のメリットなどを図13に示す。CIDでは、プリカーサーイオンのみにコリジョンエネルギーを与えるため、1次開裂のみしか起きないというメリットがある。また最大10回までの多段階MS/MSが可能のため、部分構造、官能基、劣化部位や抱

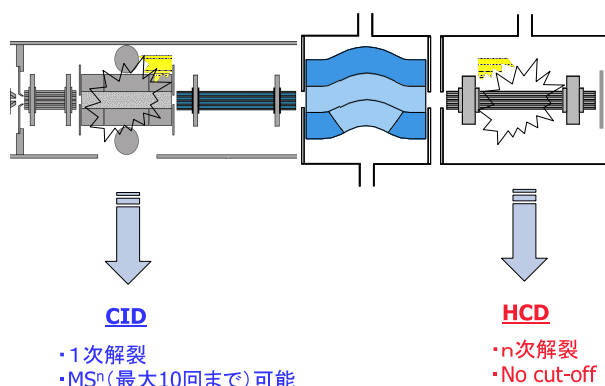


図13. CIDとHCDの開裂について

合体の解析に有効である。一方HCDでは、与えるコリジョンエネルギーに応じて、観測されるプロダクトイオンも変わり、広いマスレンジにおいて多数のプロダクトイオンを観測することができる。またLTQ Orbitrapではこの2つのMS/MS法を同時に行うことも可能である。図14に、1度のLC-MS測定で取得したErythromycin A OximeのFTMSスペクトル（Scan Event 1）、HCDMS/MS（SE 2）とCID MSⁿスペクトル（SE3と4）を示す。

CID MSⁿスペクトルでは、部分構造がそれぞれ解離したプロダクトイオンが観測され、どのような構造を有しているかどうか、解析するのに有効であった。一方HCDMS/MSスペクトルでは、CIDではニュートラルロスとして観測された構造のプロダクトイオンを観測し、CIDとは違う情報を取得することができた。そこで濃度1 mg/mLの溶液を用いてLC-MS測定を行ったところ、17種類の不純物を観測した。しかしながらOxime部位に劣化が起こった場合、CID MSⁿでは主成分と同様な開裂パターンを示さなかった。一方この不純物はHCD MS/MSスペクトルからその劣化部位を解析することができた。このように、劣化部位の状態に依存して、開裂方式が変わる場合、2種類のMS/MS法を用いて解析を行うことができるLTQ Orbitrapは、不純物分析に有用な質量分析計であると考えられる。

4-6 デュアルリニアイオントラップと

Orbitrapの平行検出による、ショットガンプロテオミクス分析

2009年に発表・販売開始したLTQ Orbitrap

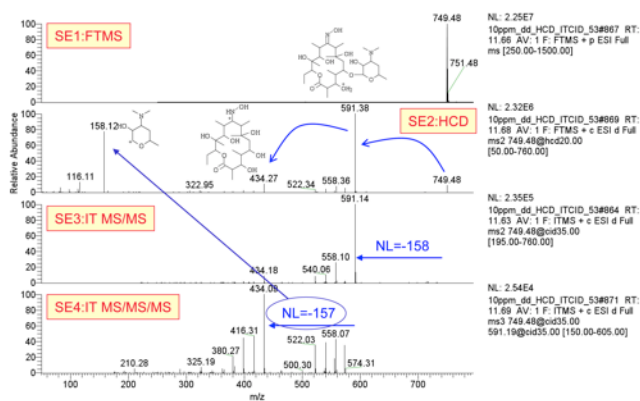


図14. Erythromycin A OximeのCIDとHCD MS/MSスペクトル

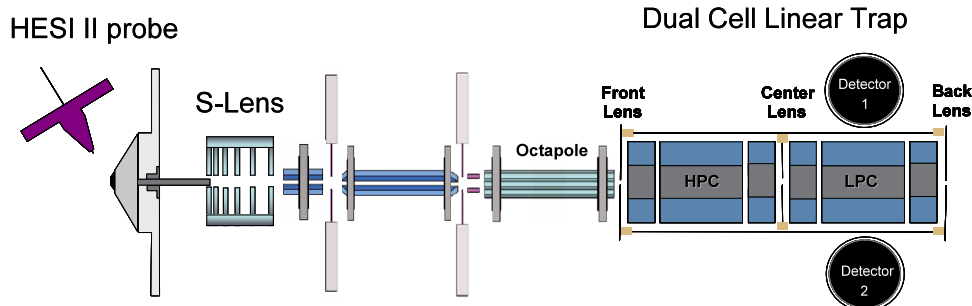


図15. LTQ Velosの装置図

High Pressure Cell (HPC)

- Trapping効率の向上 (Fill timeを短縮)
- LODを改善
- CID効率及びMSⁿ感度の向上

5.0×10^{-3} Torr He

Low Pressure Cell (LPC)

- スキャン速度の向上
- 分解能の向上

3.5×10^{-4} Torr He

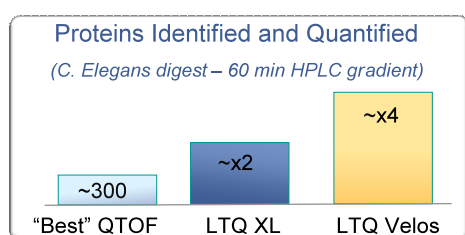
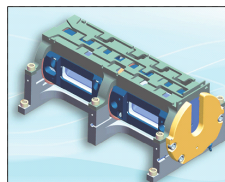


図16. タンパク質のカバー率の比較

Velosは、前段にデュアルリニアイオントラップ質量分析計 (LTQ Velos : 図15) とOrbitrapのハイブリッド質量分析計である。2つのリニアイオントラップの構造はまったく同じであるが、それぞれダンピングガスとして用いているヘリウムの圧力を、前段のトラップは高く、後段のトラップは低く設定している。このヘリウムの圧力により、前段のリニアイオントラップではトラップ効率および開裂の効率を向上し、また後段のリニアイオントラップではスキャンスピードおよび分解能を向上している。

さらにLTQ Orbitrapシリーズの特長として、Orbitrapでフルマスペクトルを取得しながら同時に前段のリニアイオントラップでそれらのData

Dependent MS/MSスペクトルを取得する、パラレル検出法がある。本手法を用いることにより、ショットガンプロテオミクス分野において、1つの検出器を用いるQTOF系質量分析計に比べ、MS/MSスペクトルの取得数も多く、高いタンパク質カバー率を取得することが可能である。さらにこのLTQ Orbitrap Velosでは、1.6秒という短い時間に、分解能10万のマスペクトルを取得しながら、8枚のMS/MSスペクトルを取得することが可能である。このようにLTQ Orbitrap Velosを用いると、HR/AMマスペクトルにより、複雑なマトリックス中のペプチドを少ない質量誤差で検出でき、さらにたくさんのMS/MSスペクトルを取得することができるので、QTOFMSよりも高いタンパク質カバー率を与える。

4-7 Data Dependent Decision Treeによる、タンパク質大規模分析

LTQ Orbitrap Velos ETDシステム (図17) では、価数の低いペプチドの開裂に有用なCID法、TMTなどの同位体ラベルを用いた相対的定量・定性分析などに有用なHCD法、そして翻訳後修飾部

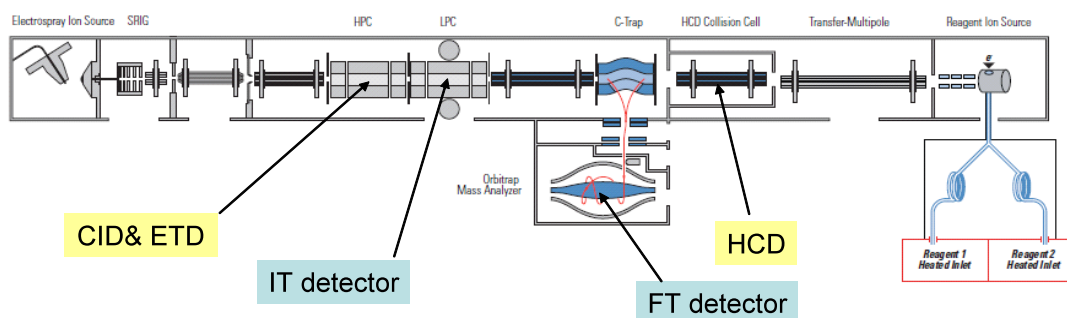
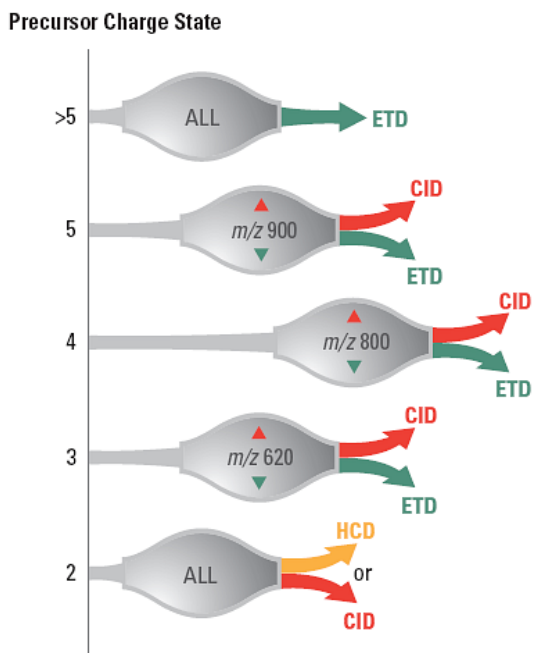


図17. LTQ Orbitrap Velos ETDの装置



Example of a Data Dependent Decision Tree.

図 1 8. Data Dependent Decision Tree

位や価数が高く分子量の大きいペプチドの開裂に有用なETD (Electron Transfer Dissociation) の3つのMS/MS法を、一度のLCMS測定で行うことが可能である。

さらにHR/AMマスペクトルを取得しながら、同時に価数判別も行い、自動的に最適なMS/MS法を選択し、効率的なMS/MSを行いながらタンパク質のカバー率を向上させるData Dependent Decision Tree法を行うことが可能である。

5. まとめ

Orbitrap質量分析計は販売開始してからたった5年しか経過していないが、その間Lock Mass法の開発、HCDコリジョンセル、ETD、デュアルリニアイオントラップとの接続や、ベンチトップ型システムなどへ展開してきた。さらに各アプリケーションに対応したソフトウェアの開発も進み、低分子から高分子までの定性分析だけでなく、定量分析など幅広いアプリケーションに応用できるシステムとなった。今後HR/AM質量分析計のスタンダードとして、更に幅広い分野における応用が期待される。