Couplling of a Liquid Separation Tool and a Mass Spectrometer Through Sonic Spray Ionization

メタデータ	言語: eng
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 平林, 由紀子
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16243

氏　　名	平　林　由紀子
生　年　月　日	
本　　籍	長野県
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	博乙第178号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	論文博士（学位規則第4条第2項）
学位授与の題目	Coupling of a Liquid Separation Tool and a Mass Spectrometer Through Sonic Spray Ionization（ソニックスプレーイオン化法を用いた液体分離手段と質量分析計の結合）
論 文 審 査 委 員	（ 主　査 ）安藤　敏夫 （ 副　査 ）河田　脩二，坂本　浩，松本　健，伊佐　公男

学 位 論 文 要 旨

The author has developed techniques to couple a liquid separation tool, e.g., a liquid chromatograph (LC) and capillary electrophoresis (CE), with a mass spectrometer (MS) using sonic spray ionization (SSI) developed by the author's group. The efficiency of negative ion formation in SSI was increased by adding three percent of ammonia to the sample solution. In SSI, a sample solution is sprayed from a sample-introduction capillary with a high-speed gas flow coaxial to the capillary and ions are formed at atmospheric pressure and room temperature. Various kinds of organic compounds are readily ionized by SSI. However, since the solution flow rates in SSI range from 10 to 100 μL/min, they did not match the range of solution flow rates of commonly used separation tools (the conventional LC: 1000 μL/min or higher, the semi-micro LC: 100 to 200 μL/min, CE: ~0.1 μL/min).

Coupling with an LC was achieved by reducing the density of solvent molecules in the sprayed gas; ions in a sprayed gas that contains a high density of solvent molecules associate with the solvent molecules and become large clusters and droplets due to adiabatic expansion when they are introduced into the vacuum region of a mass spectrometer. For semi-micro LC/MS, the density of solvent molecules in the spray was reduced by increasing the gas-flow rate used to spray the solution. For conventional LC/MS, in which the solution flow rate is much higher, the solvent density was reduced by diffusing the sprayed gas with a multi-hole plate that did not have a hole coaxial to the sampling orifice but had small holes around the central region of the plate. In the CE/MS interface, the solution in the capillary was pumped by the pressure difference between the two ends of the capillary due to the high-speed gas flow coaxial to the capillary. This pumping significantly affected CE separation. To avoid this and to couple CE and MS, a buffer reservoir was added between the sample-introduction capillary of the ion source and the electrophoresis capillary. These techniques enable the use of valuable analytical tools for liquid mixtures.

はじめに

近年、様々な分野で使用されている液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)及びキャピラリー電気泳動/質量分析計(CE/MS)は、微量物質の分離分析手段として非常に有効である。しかし、測定対象物質、溶液条件、または溶液流量により LC 等液体分離手段と質量分析計を結合するインターフェイス(イオン化法)を使い分けねばならないという問題があった。例えば、熱に安定な揮発性物質を分析する場合には大気圧化学イオン化法(APCI)[1]が使用されるが、熱不安定な不揮発性物質は APCI では分析できないため、エレクトロスプレー法(ESI)[2]が使用される。従って、両物質

が混在している場合、一つのイオン化法で一斉に分析することは不可能である。またESIでは、CEの移動相に一般的に用いられている不揮発性バッファを含む溶液の使用が困難である。これらのイオン化法では、正と負のイオンが生成可能であるが、負イオンを生成するためにはインターフェイスに負の高電圧を印加する必要がある。そのため電子が大気中に飛び出し、放電破壊を起こす危険があるという問題もあった。

著者らが開発した新しいイオン化法であるソニックスプレー法(SSI)[3,4]では、試料溶液が流れているキャピラリーの周囲に高速のガスを同軸上に流し、試料溶液を噴霧するだけでイオンが生成できる。熱安定性及び熱不安定性物質、揮発性及び不揮発性物質等、殆どの有機物の分析が可能であるため、多種類の物質を一斉に分析することが可能である。また、不揮発性バッファを含む溶液も使用できる。しかし適用可能な溶液流量の範囲が 10～100μL/min と狭く、さらにこの範囲は一般に使用されている液体分離手段の流量範囲(汎用 LC; 1000μL/min～、セミミクロ LC;100～200μL/min、CE; ～0.1μL/min)と異なっているため、実際にこれらのインターフェイスとして使用することが難しかった。また、他のイオン化法では確認されている負イオンの生成が、ソニックスプレー法では未だ確認されていなかった。そこで本研究では、ソニックスプレー法で負イオンを生成できることを確認し、さらに本方法を用いて液体分離手段と質量分析計を結合する技術を開発した。

ソニックスプレー法

ソニックスプレー法の概念図を図1に示す。ポンプ等により石英キャピラリーに導入された試料溶液は、キャピラリーに沿って流れるガスにより噴霧される。噴霧されたガス中には帯電液滴が生成され、帯電液滴から1価または2価のイオンが生成される。この方法では、生成されるイオン量はガスの速度に依存する。図2にイオンの強度とガス流量の関係を示す。この時の溶液流量は30μL/min である。ガスの速度がほぼ音速(ガス流量 3L/min)のときにイオン強度が最大となる。この理由は、生成される帯電液滴のサイズが音速付近で最小になるからである。API では、生成される帯電液滴が微細な程、脱溶媒しやすくイオン化効率が高くなる。帯電液滴のサイズはガスの速度が高くなるに従い小さくなるが、音速を超えると衝撃波が発生し、液滴同志が凝集する。そのため液滴サイズが大きくなり、イオン強度が下がる。

SSI では、イオン生成は液滴中の電荷の偏りに由来する。SSI では溶液を接地しておくので、音速のガスで溶液を噴霧すると、最初に電気的に中性な液滴が生成される。次に、液滴の表面に負の電荷が集まり、その下に正の電荷が集まる電気二重層が形成される。この液滴の表面がガス流によって剥がされ、プラスとマイナスに帯電した微細な帯電液滴が形成される。この噴霧ガスの中の正と負の電荷量は等しいので、噴霧ガス全体としては中性である。この帯電液滴から溶媒分子が脱離し、正と負のイオンが同量生成されると考えられる。

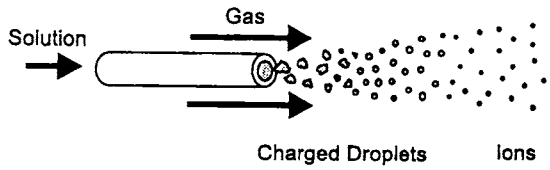

Figure 1 Sonic spray ionization.

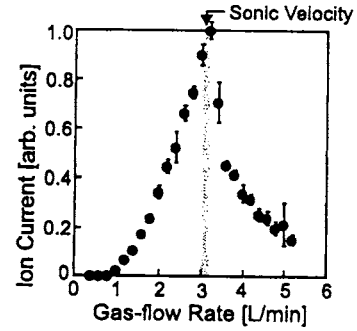

Figure 2 Ion intensity of doubly-protonated gramicidin-S molecules (m/z=571) from a 1-μM solution as a function of the gas-flow rate. The solution flow rate was 30μL/min.

さらにキャピラリーの周囲に電極を配置し、この電極に電圧を印加すると、キャピラリー内の溶液に電場が与えられ、印加電圧とは逆の極性の電荷が溶液表面に誘起される。そのため、最初に生成される液滴は電圧と逆極性に帯電している。従って、電圧と逆極性の帯電液滴の電荷密度を高めることができ、印加電圧と逆極性のイオンの生成効率が高められる。この方法により、価数が3以上の多価イオンを生成することが可能となり、タンパク質等の巨大分子の分析も可能である [5]。

ソニックスプレー法による負イオン生成

負イオンは一般に、弱い電子親和力で電子と結合しているため不安定で、正イオンに比べて感度が低い。さらに従来法(ESI)で負イオンを生成する場合、溶液が流れる金属キャピラリーに負の高電圧を印加するため、キャピラリー先端から大気中に電子が飛び出し、放電破壊を起こす危険性があった。これまでにソニックスプレー法では、イオン源に+1～2kV の比較的低い正電圧を印加することにより、大気中でも放電破壊を起こすことなく負に帯電した液滴が生成されることが確認されていた。しかし、質量分析計を用いた負イオン生成の確認はなされていなかった。そこで、四重極質量分析計を用いて実際に負イオンを測定し、さらに負イオンの分析条件を検討した。

装置構成を図3に示す。試料溶液は、シリンジポンプにより石英キャピラリーに導入される。キャピラリー先端は、イオン源のオリフィスに挿入されている。イオン源に導入された窒素ガスはキャピラリーに沿って流れ、オリフィスから大気中に流出するときに試料溶液を噴霧する。
負イオンを測定する場合は、イオン源に+2.0kV の電圧を印加する。イオン源と溶液は石英キャピラリーによって絶縁されているため、試料溶液には直接電圧は印加されず、電界のみが印加される。

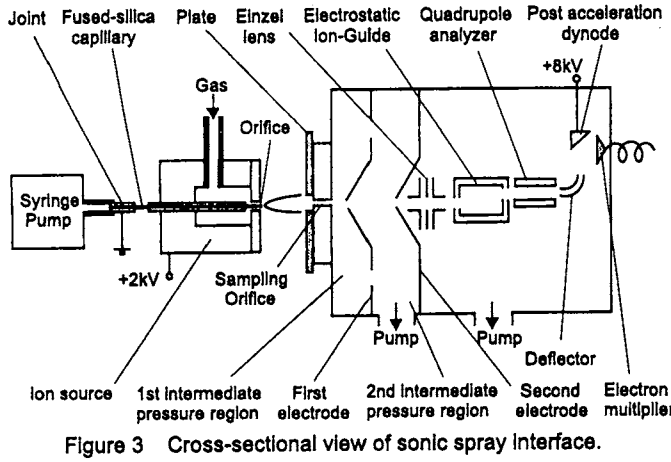

Figure 3 Cross-sectional view of sonic spray interface.

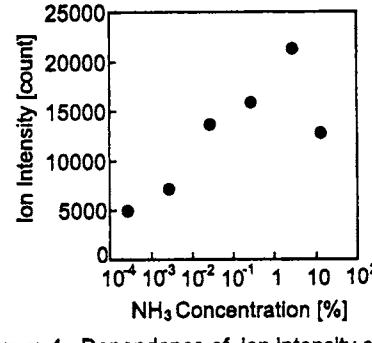

Figure 4 Dependence of ion intensity of glutamic acid ion (m/z=146) on concentration of ammonia adding the solutions. Glutamic acid concentration was 100 μM.

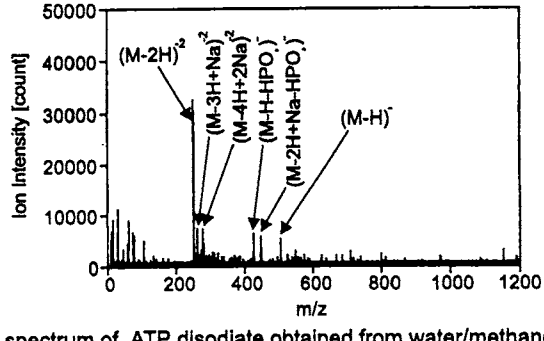

Figure 5 Mass spectrum of ATP disodiate obtained from water/methanol/ammonia solution (49/50/1%, v/v/v) at a solution flow rate of 30 μL/min. The solution concentrations were 100 μM.

負イオンは正イオンより生成効率が低いため、メタノール水溶液に試料を溶かしただけでは十分な感度が得られなかった。正イオン測定の場合、試料溶液に揮発性の酢酸を添加し、溶媒の気化を促進することによりイオンの生成効率が高められるが、負イオンの場合は効果がなかった。この原因は、酢酸は非常に強く検出される負イオンになるので、試料イオンの電荷を奪いイオン化を阻害するためと考えられる。そこで、揮発性であり、負イオンとして検出されないアンモニアを添加したところ、イオン強度が高まることが確認できた。さらに、図4に示すように、アンモニア濃度が約3％のときに最もイオン生成効率が高いことがわかった。この溶液条件を用いることにより、濃度100μMのヌクレオチド(ATP)の負イオンの測定に成功した(図5)。

ソニックスプレー法によるセミミクロＬＣと質量分析計の結合

近年、農薬等の高感度分離分析法として、LC/MSが期待されている。農薬には多くの種類があり、性質も異なるので、SSIはインターフェイスとして有利である。しかし、最適な溶液流量は30μL/minで、セミミクロLCの流量である100 ～ 200μL/minでは十分なイオン強度が得られなかった。この理由として、二つの原因が考えられる。一つは、セミミクロLCの流量では、噴霧ガス中の溶媒分子密度が高いので帯電液滴が蒸発し難い上、このガスが真空である質量分析計内に取り込まれると、断熱膨張により冷却され溶媒分子と試料イオンが凝集してしまうためである。もう一つは、多量の帯電液滴が当たるためサンプリングオリフィスが冷え、帯電液滴の脱溶媒が妨げられることである。そこで、溶液流量に対するガス流量の割合を増やすことにより溶媒分子密度を下げることを試みた。溶液流量200μL/minにおけるイオン強度とガス流量の関係を図6に示す。イオン強度は約6L/minで最大となった。本来、SSIでは音速(ガス流量 3L/min)でイオン化効率が最大となる。しかし溶液流量が高い場合、ガス流量3L/minでは溶媒密度が高すぎるため、大気中でできたイオンは真空中に取り込まれると凝集してしまう。そのため、イオン化効率は下がっているが溶媒密度が十分に低い6L/minでイオン強度が最大になっていると考えられる。さらに、この溶液流量においてサンプリングオリフィスの温度変化を測定し、50Wのヒーターで加熱すると最適な温度(120℃)に保てることを見出した。この条件を用いたセミミクロLC/MSにより上水基準項目に記載されている農薬の混合溶液(シマジン、チウラム、チオベンカーブ)の分離分析を試みた。図7に結果を示す。熱不安定性であるため他の農薬と同時に分析できなかったチウラムも含め、50pmolレベルでの一斉分析に成功した。また、1 pmolから1 nmolの間でシマジンのリニアーな検量線が得られ、定量性も確認できた。以上の結果から、SSIはセミミクロLC/MSのインターフェイスとして有効であることが確認できた。

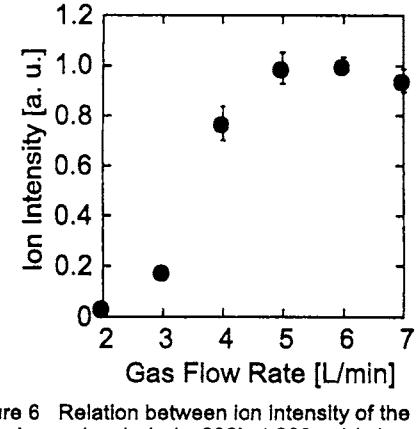

Figure 6 Relation between ion intensity of the protonated simazine molecule (m/z=202) at 200-μL/min solution flow rate and nitrogen gas flow rate.
Simazine concentration was 1 μM.

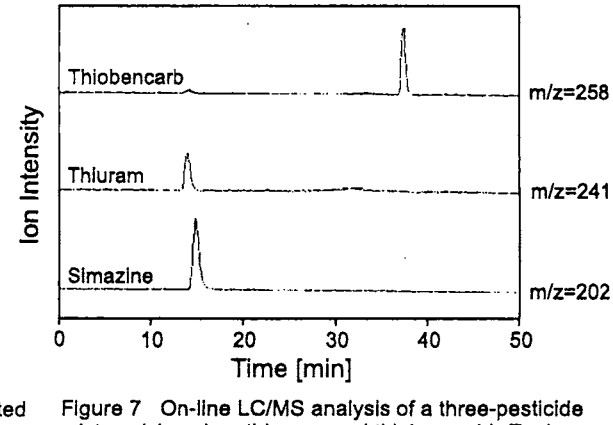

Figure 7 On-line LC/MS analysis of a three-pesticide mixture (simazine, thiuram, and thiobencarb). Each component represents 50 pmol.

汎用ＬＣ対応ソニックスプレーインターフェイス

SSI では、音速程度のガスで溶液を噴霧することにより、１または２価のイオンが生成される。さらに、試料溶液に電界を印加することにより、３価以上の多価イオンが生成されるので、タンパク質等の巨大分子の測定も可能である。しかし、広く使用されている汎用 LC の溶液流量(1 mL/min 以上)では、イオンの検出感度が非常に低いため使用することができなかった。

イオン検出感度が低い原因は、以下のよう考えられる。流量が 1 mL/min 程度になると、噴霧ガス中の溶媒分子密度が高くなり、特にスプレーの中心軸付近での溶媒分子密度が非常に高くなる。SSI インターフェイスは、キャピラリーとサンプリングオリフィスの中心軸が一致するよう配置されるので、溶媒分子密度が高いガスが質量分析計内に取り込まれる。噴霧ガスが真空の質量分析計内に取り込まれると断熱膨張により冷却されるため、溶媒分子密度が高い場合は溶媒分子が凝集する。従って、大気中で試料イオンが生成されても、質量分析計内で溶媒分子と凝集してしまうため検出感度が低くなる。特に、多価イオンでこの問題が顕著である。溶液流量が 30 μ L/min と比較的低い場合、3L/min で噴霧されたスプレーの中心部分がそのまま取り込まれても凝集は起こらない。溶液流量 200 μ L/min のときに 3 L/min のガス流で噴霧した場合、中心付近の溶媒分子密度は溶液流量 30 μ L/min の場合より高いため、凝集が起こった。そのため、さらに高速の(約 6L/min)ガス流で溶液を噴霧し、溶媒分子密度を下げる必要があった。溶液流量 1 mL/min の場合、溶媒分子密度が非常に高いため、ガスのみで密度を下げるのは困難である。そこで、質量分析計のサンプリングオリフィスの前面に、図８に示したマルチホールプレートを設置した。このプレートは、サンプリングオリフィスと同軸上には穴が無く、その周囲に円状に並んだ小孔が開いている。このプレートでスプレーの中心付近を拡散し、質量分析計に導入されるガスの溶媒分子密度を下げることにより、溶液流量 1 mL/min においても測定が可能になった。このとき、ガス流により液滴密度を下げる必要がないため、ガス速度がほぼ音速でイオン強度が最大となった。さらに、溶液流量 1 mL/min において、チトクロームＣの１１から１６価の多価イオンを検出できた(図９)。汎用 LC の流量で１０価以上の多価が検出されたのは、本研究が初めてである。以上により、SSI はセミミクロ流量から汎用流量までの幅広い範囲で使用可能なインターフェイスであることが示された。

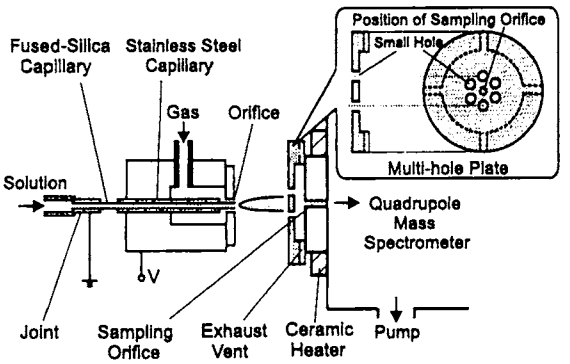

Figure 8 Cross-sectional view of the improved sonic spray interface involved elevation and cross-sectional view of the multi-hole plate.

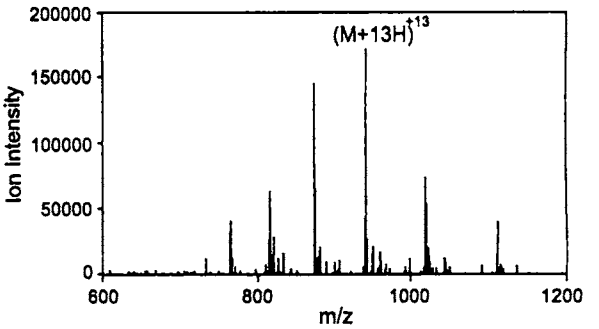

Figure 9 Mass spectrum from a 47.5:47.5:5 methanol/water/acetic acid solution of cytochrome-c obtained using the improved sonic spray interface at a solution-flow rate of 1 mL/min. The solution concentration was 1 μM.

ＣＥ／ＭＳ用ソニックスプレーインターフェイス

ソニックスプレーイオン化法(SSI)では、ガスのみで溶液を噴霧するため、電気伝導度の高い溶液も噴霧できる。従って、溶液条件の制約が少ないため、CE/MS のインターフェイスにも適している。しかし、高速ガス流によりキャピラリー先端付近の圧力が低下するため、他端との間に圧力差が生じ、キャピラリー内の溶液が吸引される。そのため、LC/MS 用インターフェイスをそのまま CE/MS に使用した場合、吸引により CE の分離能が低下する可能性があった。

この吸引を抑制するため、電気泳動キャピラリーと試料導入キャピラリーの間にバッファリザ

ーバを設置した。図１０に構成を示す。バッファリザーバ内の溶液が試料導入キャピラリーに吸引されるので、電気泳動キャピラリー内の溶液の吸引を抑制できる。このインターフェイスにより、分離能を落さずにCE分離が可能になった。

一方、CE/MSでは、リン酸のような不揮発性バッファを分離の移動相に用いることが困難だった。通常のCE/MSのインターフェイスには静電噴霧によるESIが用いられているので、電気伝導度が高いリン酸溶液では噴霧が不安定になるからである。ソニックスプレーでは、ガスにより溶液を噴霧するので、どのような溶液でも安定に噴霧できる。しかし、リン酸を含む試料溶液は、リン酸を含まない試料溶液よりも得られるイオン強度が低いという問題がある。これは、不揮発性物質であるリン酸が試料溶液に混入すると、溶媒分子の蒸発が阻害されてイオン化効率が下がるためである。そこで、バッファリザーバに酢酸溶液を満たし、移動相に揮発性物質を添加することにより、イオン強度を向上させることができた。図１１にその結果を示す。図１１(a)は両リザーバとも15mMリン酸バッファを満たし、(b)は移動相リザーバには15mMリン酸バッファ、バッファリザーバには15mM酢酸溶液を満たした。両方に2 pmolのグラミシジンＳを導入し、二価イオンに相当するm/z=571をモニターした結果、(a)２２分後(b)２１分後にイオンが検出された。図１１(b)のピークのS/Nは、図１１(a)の約１００倍だった。これは、酢酸のような揮発性物質が混入されていると、酢酸が脱離するとき溶媒分子も一緒に脱離するので液滴の蒸発が促進され、イオン生成効率の低下を防ぐことができるためである。

以上の結果から、SSIインターフェイスは、分離条件に制約のないCE/MSを可能にすることが分かった。さらに、バッファリザーバには酢酸以外の溶液を満たすことも可能であるので、CE-SSI/MSは様々な分野での応用が期待できる。

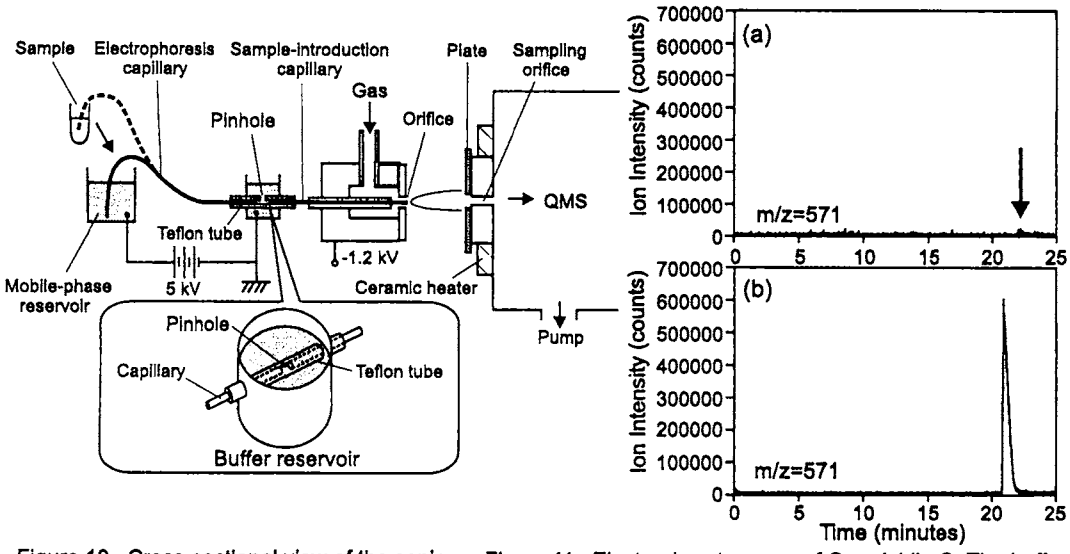

Figure 10 Cross-sectional view of the sonic spray interface for CE/MS, with a close-up of the buffer reservoir.

Figure 11 Electrophoretograms of Gramicidin-S. The buffer reservoir and the mobile-phase reservoir were filled with (a) a 15-mMphosphate buffer (pH 6.3) in water/methanol (50/50%, v/v), or (b) a 15-mM phosphate buffer and a 15-mM acetic-acid solution (42/50/8% water/methanol/acetic acid, pH 1.4). The injected sample was 2 pmol. The electrophoresis capillary was 40 cm long and 5 kV was applied between the two reservoirs.

まとめ

ソニックスプレー法を用いて汎用 LC、セミミクロ LC、及び CE と質量分析計を結合する技術を確立した。また、これまで確認できていなかったソニックスプレー法による負イオン生成も確認できた。本研究により、殆どの有機物が分析できるので応用範囲が広く、さらに溶液条件の制約が殆どないので液体分離手段の性能を落さない LC/MS 及び CE/MS が可能になった。ソニック

スプレー法を用いた LC/MS 及び CE/MS は、液体試料の分析法として高いポテンシャルを持つので、医療、環境、脳科学等の広い分野での応用が期待できる。なお、本研究で開発された技術の一部は、1997 年 8 月に発売された日立製 LC/MS M-8000 に採用された。

References

[1] H. Kambara, *Anal. Chem.*, **54**, 143 (1982).

[2] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984)

[3] A. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi, *Anal. Chem.*, **66**, 4557 (1994).

[4] A. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi, *Anal. Chem.*, **67**, 2878 (1995).

[5] A. Hirabayashi, Y. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1703 (1996)

学位論文審査結果の要旨

平成 11 年 1 月 13 日に理学部物理会議室に於いて，平林由紀子の学位申請に対し，口頭発表及び質疑応答を 90 分間にわたり行い，別記５名の審査委員が審査した。

液相分離手段と質量分析計との結合においてイオン化技術は必須である。申請者の属するグループが既に開発したソニックスプレー法と呼ばれるイオン化技術はいくつかの点でこれまでの方法に比べて優れている。本学位論文で述べられた申請者自身の一連の研究で，この優れたソニックスプレー法を液体クロマトグラフ/質量分析 (LC/MS) 及びキャピラリー電気泳動/質量分析 (CE/MS) といった複合分析に適応するためのインターフェイス技術の開発が行われた。また，実際の分析方法の確立，いくつかの分離分析が行われ，これまでの方法では困難であった分析が可能であることが示された。

まず申請者は，ソニックスプレー法による負イオン測定法を確立した。元来，負イオンは正イオンよりも不安定で測定が難しいが，ソニックスプレー法でも負イオンの強度が低かった。申請者は，試料溶液に３％のアンモニアを添加するとイオン強度が著しく増大することを見出し，この方法により数種のヌクレオチドの質量分析に成功した。次に，申請者は，ソニックスプレー法を介した LC・MS の結合法の開発を行った。高い溶液流量で分離を行う LC と結合させると，MS の感度が著しく低下し測定不可能であった。試料イオンとともに多量の溶媒分子が真空の質量分析装置内に取り込まれ断熱膨張により冷却され，イオンと溶媒分子が凝集することが原因であることが見出された。そこでマルチホールプレートをデザインし，それにより溶媒分子を拡散させ密度を下げてから質量分析装置に取り込むことにより凝集を防ぐ方法を考案した。この方法により，溶液流量 1 mL/min においてタンパク質の多価イオンを測定することに世界で初めて成功した。また，従来の LC/MS では分析不可能であった農薬 (チウラム) を含む農薬混合溶液の LC/MS の一斉分析にも成功した。最後に申請者は，ソニックスプレー法を介した CE・MS の結合法を開発した。ソニックスプレー法では高速ガスが CE のキャプラリー内の溶液を吸引するため，CE 分解能が低下してしまう。そこで CE のキャピラリーと溶液噴霧用キャピラリーの間にリザーバを設置し，リザーバ内の溶液を吸引させて CE 分離能の低下を防ぐ方法を考案した。また，リザーバに酢酸溶液を満たすことにより感度を向上させる方法を見出した。これにより，従来の CE/MS では使用困難であったリン酸バッファを分離液に用いることを可能にすると同時に，感度を従来の 100 倍向上させることに成功した。

以上，学位論文の研究内容はレベルが高く，*Analytical Chemistry* 等の欧文誌に掲載された一連の論文も一流の仕事と評価できる。よって，本学位申請に対し，審査委員全員一致して博士 (理学) の学位を授与できるものと判断し，合格と判定した。