



コールドスプレー質量分析法の開発

山口 健太郎

はじめに

近年の分析科学の発展は目を見張るものがある。中でも質量分析の分野は多くの新しいイオン化法が提案され、進展が著しい。特に、質量分析の生体分子への応用では、フェン教授や田中フェローがノーベル賞を受賞したことが記憶に新しく、これらの研究開発は質量分析発展の追い風となってこの領域の研究者を刺激し、さらなる新展開への気運が高まっている。

ここでは、この追い風に乗って最近認知されつつあるコールドスプレーイオン化の開発を中心に、質量分析開発研究の一端を紹介する。コールドスプレー質量分析¹⁾²⁾は不安定な分子を分析する手法であり、溶液中の動態解析に適している³⁾。当初、遷移金属の自己組織化により構築される超分子化合物の溶液での構造解析を目的として開発されたが、最近では生体分子系にも応用され、これらの非共有結合性相互作用に基づく分子種の溶液動態解析への利用が始まっている。このイオン化法はエレクトロスプレーイオン化 (ESI)⁴⁾に代表されるスプレーイオン化の一種であり、LC-MSのインターフェース開発と密接に関連している。本稿では、LC-MSを含む周辺技術を含めたイオン化法の開発研究に触れ、着想に至った経緯やその展開について述べる。

偶然と必然

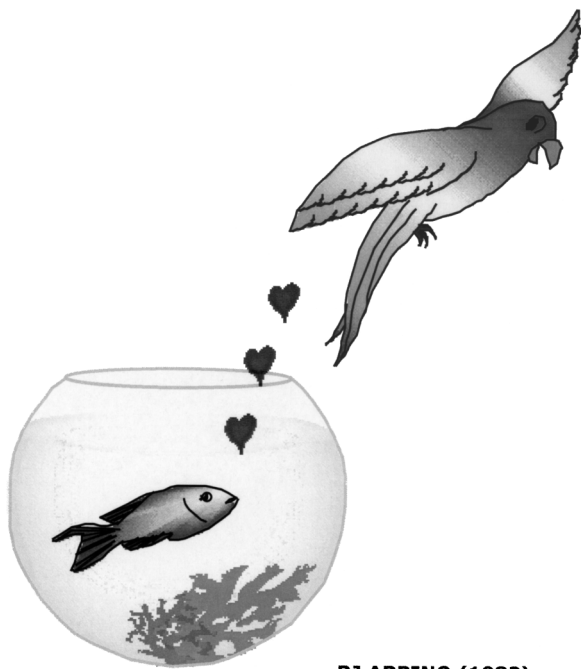
多くの著明な発見において偶然の関与が存在すると伝えられている。しかし、必ずしもそれだけではなく、いずれの場合にもなんらかの必然性があると筆者は考えており、この偶然が支配する大発見伝説には元来懐疑的であった。質量分析におけるイオン化法の開発にも偶然が関与する例が多い。一例として、スプレーイオン化法の一つであるサーモスプレー⁵⁾の開発に関するものがある。高温のスプレーを用いるサーモスプレーイオン化法は、はじめは電子銃により作り出される電子ビームを用いた電子イオン化方式をとっていた。しかし、あるとき偶然測定中にフィラメント電流を遮断してしまったのにイオンが生成され続けることに気づき、この新しいイオン化法の研究が進展したと言われている。ここで取り上げるコールドスプレーイオン化においても、同様の展開を目の当たりにしている。従来のESIを低温で測定する実験を行っているときに、ニードル電圧

を0Vにしてもイオン生成が止まらないことが偶然発見された。これにより、ESIとは別のイオン化機構の関与が浮かび上がった。このようなことから、最近偶然の関与について考え直すようになった。しかし、多くのトライアルが基本的に必要であることには変わらない。ある程度このような好ましい偶然を期待しつつ実験を続けることが大切である。

高速液体クロマトグラフィーとMSの連結

筆者は長く高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC-MS)のインターフェースの開発に携わってきた。クロマトグラフィーと質量分析の結合による分析の発想はGC-MSから始まったと考えられる。多量のキャリアーガスを用いるGCと高真空下で機能する質量分析装置の連結は、当初大きな困難を伴うものであった。これを解決したのがジェットセパレーターである。GCのキャリアーガス除去・濃縮に比べ、LCで多用される水などの揮発性の低い極性溶媒を分離・濃縮することはいっそう困難である。LCとMSの連結を考えるには、これらの非両立性を充分に理解しておく必要がある。LCは6000 psi (=421.9 kgf/cm²)以上の高圧溶媒中で分離を行うのに対し、質量分析は10⁻⁵ Pa以下の高真空中で分析を行うものである。これら二つの装置を連結し、オンラインで分析を行うことの困難さは容易に想像できよう。小川のせせらぎに住む魚が水辺を訪れる小鳥に恋をするようなものである。この喩えは、かつてACSのセミナーで用いられたテキストに記載されたものであるが、このLCとMSの連結の難しさを端的に表現している(図1)。

具体的にこの非両立性を挙げると次のようになる。すなわち、①LCは液相を取り扱うのに対してMSは気相である。②LCは通常室温で用いるがMSのイオン化では加熱され100~300℃となる。③LCではほとんどすべての溶媒を用いることができるが、MSでは次の事項が要請される。すなわち、すべての溶媒やバッファーに対応し、イオン対等を許容し、揮発性を問わないこと。さらに、毎分2ml程度までの流量に対応できる、という大変過酷な仕様である。さらにガス状態で毎分20ml以下のイオン源導入量であること。また、イオン化法はEIとCIを主として用い、CIガスは種々選択可能であること。さらに、フルスキャンおよび選択イオン検出に対応し、ノイズを抑えるため不純物の混入は極力避けること。さらに、正負両イオンに対応し、検出感度は1ng以下、そして、10⁴以上のダ



RJ ARPINO (1982)

図1 LC-MS Coupling

イナミックレンジを有する等である。MSは大変高感度な分析法であり、原理的には100個のイオンがあれば検出することができる。さらに200 ngの試料があれば全質量領域のスペクトルを得ることができる。これらに基づき種々のLC-MSインターフェースが設計され、あるものは実用化されてきた。

筆者は、中でもスプレー式インターフェースに興味をもち、DLI (direct liquid introduction)⁶⁾やTSP (thermo spray) およびESI (electrospray) について検討した。既に紹介したように、TSPは熱、そしてESIは電界によりスプレーからイオンを生成する手法である。これに対して、コールドスプレー(CSI)は基本的には熱、電界を必要とせず、スプレーを冷却し溶媒を積極的に利用したソフトなイオン化法である。高温(TSP)や高電界(ESI)などの比較的過激なイオン化に対してDLIによるイオン化はよりソフトであり、微量の導入液を冷却することによって陰イオンの付加体を容易に観測できることを、すでに筆者らは確認していた。これらの開発がCSI開発の背景にある。CSIによれば不安定な溶液試料の質量分析が可能となり、さらに溶液中の平衡状態や不安定で単寿命の反応中間体を直接検出できる可能性が出てきた。図1に示した非両立性の問題を解決するために、溶媒を除去するのではなく、積極的にこれを利用している。つまり、CSIの開発は観測しにくい不安定分子種を、溶媒を伴ったまま安定したイオン化を行う手法の実現への発想の転換に基づいている(図2)。

コールドスプレーの発見

発見の偶然性について述べたが、CSIは最初から狙って作ったものではなかった。不安定な有機金属錯体の分析を目的として、導入系を含めたESI全体の冷却を最初に計画した。これは不安定な分子を冷却したLCカラムで精製し、さらにイン

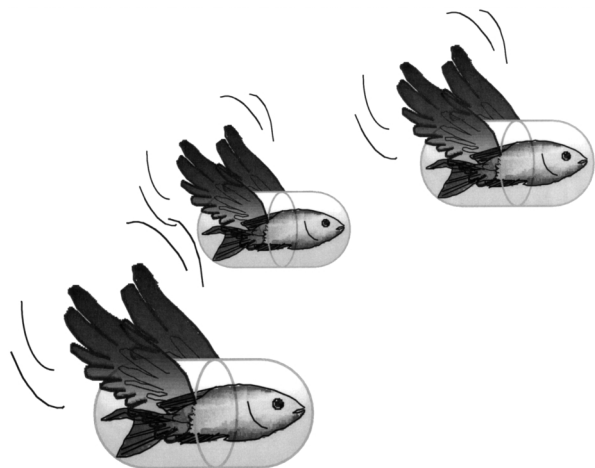


図2 Dream of flying fishbowl

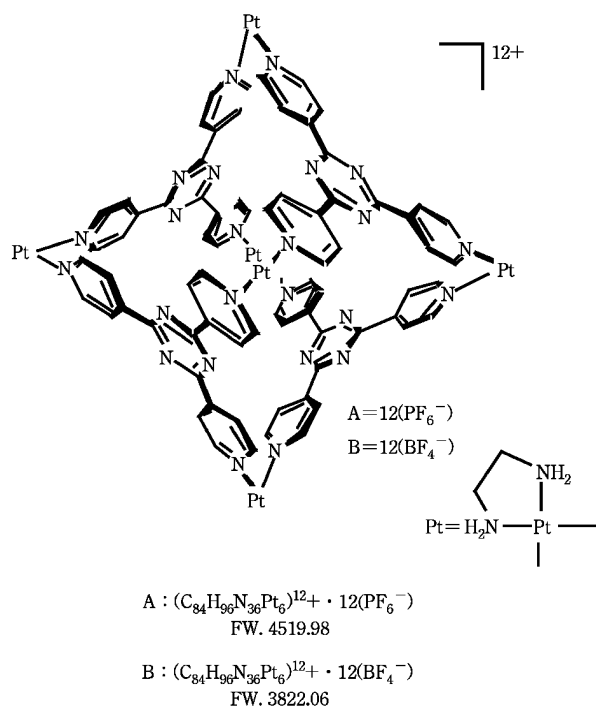


図3 10成分より構築されたカゴ型Pt錯体

ジェクターを冷却する溶液不安定分子のLC分析法の話聞いたからである。筆者らはまず導入シリンジ、次に送液チューブの順に冷却してみた。しかし、顕著な効果が見られなかったので、最後にスプレーを冷却することにした。この場合、脱溶媒部分も同時に冷却した。ESIでスプレー等を冷やすと溶媒除去が進行せず、したがってイオンが生成しないばかりか、大量の溶液が主イオン源に直接導入されることになる。この無謀な試みにスタッフは反対した。しかし、実験してみると溶媒であるアセトニトリルが多数被験分子に付加した明確なイオンピークが観測されたのである。

10成分(metal=6, ligand=4)より構築された超分子化合物であるカゴ型Pt錯体(A)(図3)⁷⁾のアセトニトリル(AN)溶液(0.1 mM)を用いて、ESI-MSスペクトルおよびCSI-MSスペクトルの比較を行った結果を示す(図4)。従来の

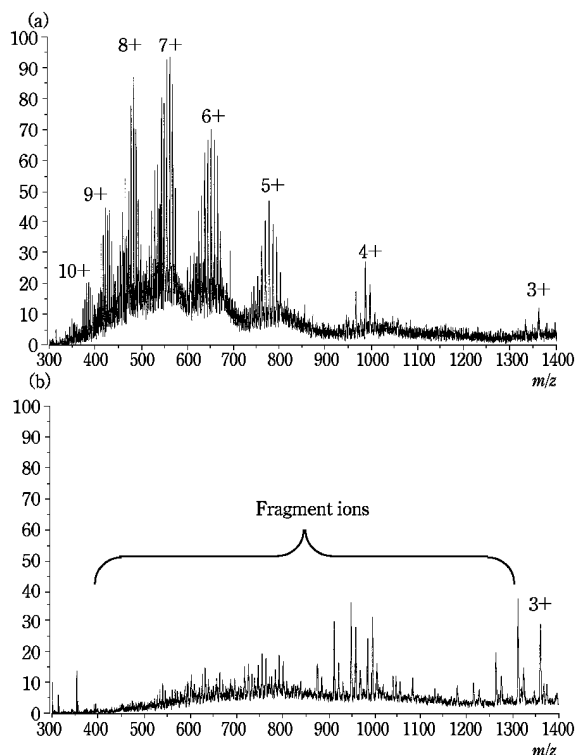


図4 カゴ型Pt錯体(A)のCSI(a)およびESI(b)マスペクトル

ESI-MS スペクトルでは、イオン化時に加熱(脱溶媒チャンパー温度: 200°C)を行うため熱分解が生じ、観測されたほとんどのイオンが合理的に帰属することができない分解物由来のイオンであったと報告されている(図4b)。一方、脱溶媒チャンパー温度を室温以下に、またスプレー温度を-20°Cに調節してイオン化を行ったCSI-MS スペクトルでは、溶媒分子が多数付加した3価から10価までの分子イオン, $[A-x(PF_6)+yAN]^{x+}$ ($x=3-10, y=0-21$)を明確に観測している。またこのとき分解物のイオンは全く観測されていない(図4a)。さらに、観測された溶媒の数は価数が増えるに従って増えることから、Ptイオンに溶媒分子が直接配位していることが考えられる。このように、比較的不安定な自己集合錯体のイオン化法として、この手法が有効であることがわかった。

筆者らは、この手法をelectrosprayに倣ってcoldsprayと呼ぶことにした。後にelectroは接頭語なので一語として成立するが、coldは形容詞なのでcold-sprayとするよう学会からアドバイスされた。とにかくスプレーを直接冷やすと溶液中の様子が見えてくるのがわかった。当時このイオン化機構がわからぬまま専門誌に投稿したが、ESIのチューニングを外した状態ではないかとか、不安定な種まで検出できるとシグナルが複雑になり解釈が困難になる等の意見があった。ESIでは溶媒との相互作用を熱などを利用して断ち切るによりシグナルを単純化し、高感度を得ている。しかし、MSは元来感度の高い分析手法である。このため、分解能さえ保証されれば溶液試料の真の姿を捕らえることのメリットは大きい。筆者らは常にこのように反論した。しかし、この手法を普及させるためにはイオン化機構に関する考察がぜひとも必要であった。

イオン化の理論と実際

コールドスプレーのイオン化機構はESIに類似する点も多いが、基本的に溶媒を濃縮しないので、クーロン爆発等の過程は経ないと考えている。ESIにしても、その機構は完全に解明されていないと筆者は認識している。いずれにしても、CSI、ESIともに複数の過程が関与する可能性があると考えられる。

CSIの機構の特徴として、溶媒和によるイオン解離を挙げることができる。この種のイオン解離が冷却により促進されることに気付いたのは、応用実験がかなり進んでからのことである。例えば、水を冷やすと誘電率が增大する。溶媒ごとに差はあるが、一般に同様の性質を示す。これは冷却することにより分子運動が抑えられ、ダイポールがお互いに接近し整列するようになるためである。つまり、スプレーを冷却すると試料溶液の誘電率が上昇し、溶媒和によるイオン解離が促進される。

分極率(P)、比誘電率(ϵ_0)、誘電率(ϵ_p)、電場(E)の関係は次式で表すことができる。

$$P = \epsilon_0(\epsilon_p - 1)E \dots \dots \dots (\text{eq. 1})$$

また、誘電率(ϵ_p)は絶対温度 T に反比例する(θ : 定数)。

$$\epsilon_p = \epsilon_0 e^{-T/\theta} \dots \dots \dots (\text{eq. 2})$$

それゆえ冷却すると誘電率(ϵ_p)が上昇し、分極(P)が促進されるため、CSI条件下でイオンが観測されやすくなる。従って、熱に対して不安定な化合物でも、溶媒和を積極的にイオン化に用いることができれば、イオン化時に分解することなく安定したイオンが観測できると考えられる。

むしろ、このほかの過程の関与も考慮する必要があるが、当時はこれがイオン化の大部分を占めると考えていた。しかし、実際にはなかなか思うようにイオンが生成できない場合も多い。誘電率増大がイオン解離を促進することは事実であるが、これだけではイオン化できないこともある。そこでイオン化を助けるために、イオン化促進試薬を導入することにした。ESIにおいてこのような考え方はすでに報告されているが、CSIではかなり性質の異なる添加試薬を用いた⁸⁾。例えば、グアニジン等の塩基性物質や高沸点のアミド類である。ESIではプロトンーションを促進するため酸を加えたり、溶媒の揮発性を高める工夫をするが、これと全く逆の性質を持つイオン化促進物質がCSIにおいては有用であった。現在、筆者の研究室では試料それぞれの性質に適したイオン化の条件を調べる実験を行っている。このようにCSIでは、仮定されるイオン化機構に基づき試行錯誤を繰り返しながら測定条件を最適化する必要がある。

溶液連鎖構造の観測

CSI-MSを用いて実際に分析を行って驚いたことが多々ある。最も印象に残るのは、水や生体基本分子の分析例である。水は液体状態でも、分子間水素結合によるクラスターを形成していることが知られており、すでに質量分析法を用いた研究が広くなされている⁹⁾。実際に、溶液中での水素結合等の弱い相互作用を観測することのできるCSI法を用いることにより、酸や塩基を加えることなく、 H^+ が一つ付加した270量

体以上の大規模な H₂O クラスターを観測することができた (図5)。

このように、水のクラスターイオンを低温条件で観測できる利点を生かして、アミノ酸、糖類、脂質および核酸等の生体基本分子の CSI-MS 測定を行った。図6にデオキシアデノシン (dA) の CSI (a) および ESI マスペクトル (b) を示す。スペクトルに示すように、1 mM 程度の濃度で溶液中でのクラスター構造を検出した。筆者らは、これを溶液連鎖構造または連鎖会合体と呼び、これは分子自身の水素結合等の弱い相互作用による規則的な連鎖の存在を示唆すると判断した。同条件でスプレーを 100°C 以上に加熱する従来の ESI では、2 量体を検出するのみで連鎖構造は全く観測されない。この事実は他のヌクレオシド (dC, dG, dT) でも同様であり、さらに RNA や多くのアミノ酸、および単糖類や脂質などでも明確に観測されることがわかった。

さらに、この会合体は環境により大きさを変えることが CSI-MS 測定により明らかとなった。ヌクレオシドの例ではデオキシグアノシン (dG) がこの現象を顕著に示した¹⁰⁾。すなわち、dG に Na⁺ などのアルカリイオンを加えると、瞬時に Na を核とした 4 量体クラスターへと変化する (図7)。このことは、細胞や生命の寿命に関連すると言われている染色体終端部に位置するテロメア構造であるグアニンカルテット (G-quartet) として既に知られている¹¹⁾。また、アミノ酸でも同様の結果が得られた。

L-プロリンは、通常 CSI マスペクトルにおいて大きな溶液連鎖構造を示すが、各種アルカリ金属イオンを加えると、小さくまとまったクラスターを形成する¹²⁾。これらのクラスター (メタクラスター) を単位会合体と称し、これら会合状態の些細な環境変化に対応した形態の激変は、生命機能に関連する重要な事象であると位置づけている。CSI-MS は、これらのダイナミックな変化をリアルタイムで溶液中観測できる。これらの実験を行っている頃、CSI-MS 装置はまだ筆者しか持たず、したがって研究の独自性という点で多いに満足できるものであった。だれも見ることのできないものを見るためには、そのための道具作りが欠かせない。このことは、近年欠けているとされる独創性に富む基盤研究につながるものである。

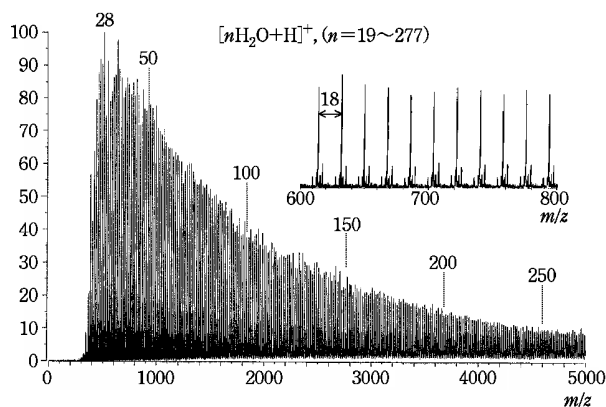


図5 水の CSI-MS スペクトル

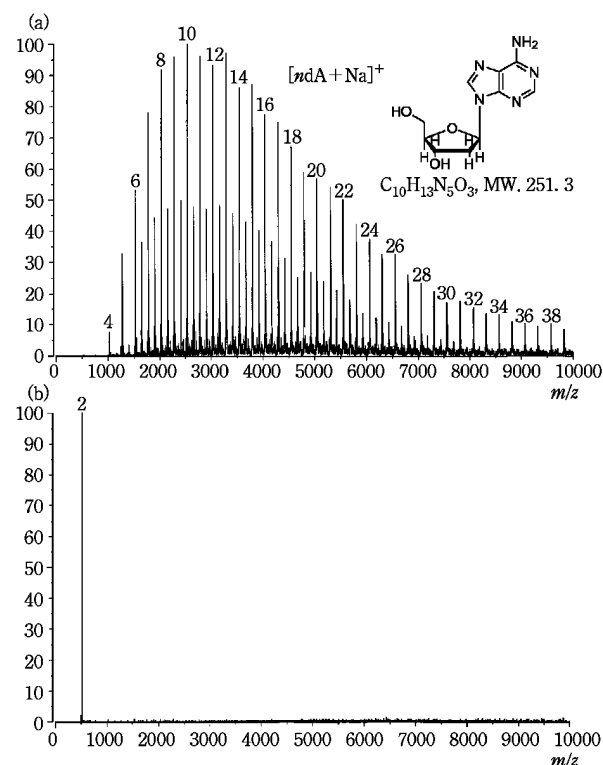


図6 デオキシアデノシン (dA) の CSI (a) および ESI (b) マスペクトル

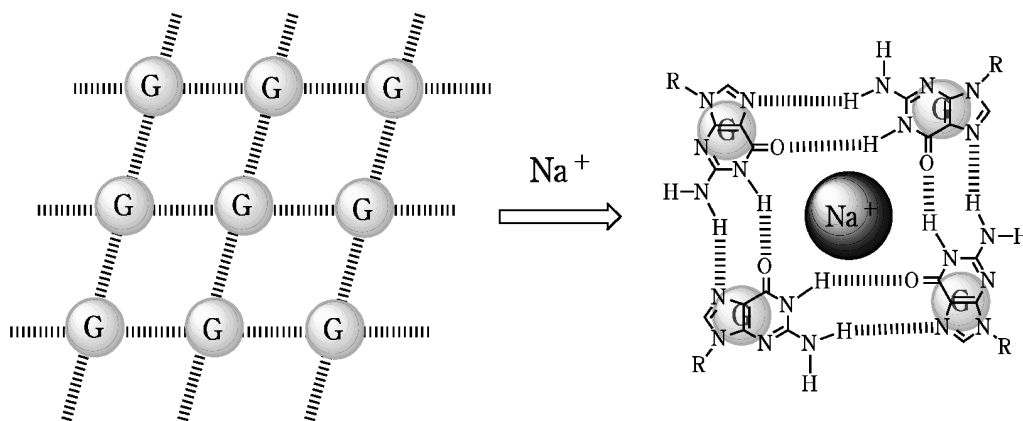


図7 連鎖会合体から単位会合体 (G-カルテット) への構造変換

おわりに

最近の機器分析は、不安定種の動的過程をより高感度で検出することや、非クロマトグラフィー依存型の分析・解析を指向している。CSIはこれに合致していると考えられる。溶液中の不安定な種をソフトにイオン化することができるため、これを連続的に行えば動的過程を解析することも可能である。一方、分子イメージングや single cell analysis は、分離することなく効率良く解析を行う例として挙げることができよう。このように、CSIは新しい分析科学の流れに沿って開発されており、今後の展開が期待される。冒頭に述べた魚と小鳥の例に見るように、独創的な手法の開発には発想の転換が必要である。図2に示したカプセルに収まった魚からCSI過程で生成する巨大な1価イオンが連想される。筆者らは、ただ一つのNa⁺が付加することによりイオン化した25000 Daを超える連鎖会合体を、種々の生体基本分子において検出している。このような質量電荷比が数万におよぶイオンの安定性は従来論じられていない。事実これらには特徴があり、例えばタンデムMSでは容易に電荷を失い検出されないデメリットがある。また、慣性質量が大きいため直交スプレーではイオンを直角方向へ取り出すことができないこともわかっている。しかし、この技術は不安定で大きな分子、例えばリポソームを一挙にイオン化することや、さらに発展させて1細胞をそのままイオン化する可能性を示唆している。

本稿では、相容れないLCとMSのカップリング法の検討を通じて、筆者らの発想法や開発研究の展開における思考過程について述べた。先端研究には、装置開発が重要な役割を果たすことは明らかである。役に立つ道具を作ることは、分析科学者の大きな使命の一つであると考えられる。

文 献

- 1) S. Sakamoto, M. Fujita, K. Kim, K. Yamaguchi: *Tetrahedron*, **56**, 955 (2000).
- 2) K. Yamaguchi: *J. Mass Spectrom.*, **38**, 473 (2003).
- 3) Y. Yamanoi, Y. Sakamoto, T. Kusakawa, M. Fujita, S. Sakamoto, K. Yamaguchi: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 980 (2001).
- 4) J. B. Fenn, M. Mann, K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse: *Science*, **246**, 64 (1989).
- 5) J. J. Carmody, C. R. Blakely, M. L. Vestal: *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5931 (1980).
- 6) R. C. Willoughby, R. F. Browner: *Anal. Chem.*, **56**, 2626 (1984).
- 7) M. Fujita, D. Oguro, M. Miyazawa, H. Oka, K. Yamaguchi, K. Ogura: *Nature*, **378**, 469 (1995).
- 8) S. Sakamoto, M. Yoshizawa, T. Kusakawa, M. Fujita, K. Yamaguchi: *Organic Letters*, **3**(11), 1601 (2001).
- 9) S.-W. Lee, H. Cox, W. A. Goddard III, J. L. Beauchamp: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9201 (2000).
- 10) S. Sakamoto, K. Nakatani, I. Saito, K. Yamaguchi: *Chem. Commun.*, **2003**: 788.
- 11) K. Nakatani, S. Hagihara, S. Sando, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, C. Maesawa, I. Saito: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 662 (2003).
- 12) M. Kunimura, S. Sakamoto, K. Yamaguchi: *Org. Lett.*, **4**, 347 (2002).



山口健太郎 (Kentaro YAMAGUCHI)

千葉大学分析センター (〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33)。薬学博士(東京大学)。<現在の研究テーマ>不安定有機化合物の構造解析。<主な著書>“高性能液体クロマトグラフィー”(分担執筆)(廣川書店)。

E-mail: yamaguchi@cac.chiba-u.ac.jp

原 稿 募 集

創案と開発欄の原稿を募集しています

内容: 新しい分析方法・技術を創案したときの着想, 新しい発見のきっかけ, 新装置開発上の苦心と問題点解決の経緯などを述べたもの。但し, 他誌に未発表のものに限ります。

執筆上の注意: 1) 会員の研究活動, 技術の展開に参考になるよう, 体験をなるべく具体的に述べる。物語風でもよい。2) 従来の分析方法や装置の問題点に触れ, 記事中の創案や開発の意義, すなわち主題の背景を分かりやすく説明する。3) 図や表, 当時のスケッチなどを用いて理解しやす

くすることが望ましい。4) 原稿は図表を含めて4000~8000字(図・表は1枚500字に換算)とする。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。採用分については規定の原稿料をお支払いします。原稿の送付先・問い合わせは下記へ。

〒141-0031 東京都品川区五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(株)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[電話: 03-3490-3537]