

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750067

研究課題名(和文) 超大気圧における生体分子イオンの生成および運送の研究開発

研究課題名(英文) Generation and transportation of biomolecules ions under super atmospheric pressure

研究代表者

チェン リー チュイン (CHEN, Lee Chuin)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：40585577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析は、化学における不可欠な分析法である。質量分析するために試料分子を帯電させる必要があり、そのためイオン源は、質量分析計における重要な一部である。従来方式では、高真空下あるいは大気圧下でイオン化は行われる。我々は、イオン源の圧力を大気圧以上に増加させることにより、イオン化効率の改善は可能であることを確認した。この概念に基づいて、より高感度、そして従来法で実現できない、新規イオン源を開発した。その結果、プロテオーム解析にとって重要な水溶媒の分析は簡便かつ高感度になった。これらの研究結果は質量分析法の改善に貢献できるだけでなく、他の分野、例えば新しい薄膜作成法としての応用も可能である。

研究成果の概要(英文)：Mass spectrometry is an indispensable tool for life science development and to mass analyze the sample, analyte molecules need to be electrically charged and the ion source is an important key part in a mass spectrometer. Conventional methods ionize the sample either under a high vacuum, or under atmospheric pressure. During this research work, we had verified that it is possible to improve the performance of ionization by increasing the ion source pressure greater than the atmospheric pressure. Based on this concept, we have developed a series of novel ionization sources that not only perform better, but also offer novel applications that cannot be achieved by the conventional methods. For example, we are able to handle the analysis aqueous solution easily with high sensitivity, and this is important for proteomic study. These research outcomes not only improve the performance of mass spectrometry, but also offer new application in other area like thin film deposition.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：高圧イオン源 エレクトロスプレー 質量分析 超大気圧 水溶媒 タンパク質 コロナー放電

1. 研究開始当初の背景

質量分析は、分析化学、生物化学、ライフサイエンスにおける不可欠なツールであり、他の分析手法で得られないサンプル構成、定量などの情報を提供している。試料を質量分析するために、サンプルの分子を帯電させなければならないので、イオン源は、質量分析計における重要な一部である。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)、エレクトロスプレー・イオン化(ESI)および大気圧化学イオン化(APCI)のような従来方式では、イオン化が高真空あるいは大気圧の下で行われる。イオン源の気圧は、イオンの生成およびイオンの運送に重要である。ただし現時点では、大気圧以上の圧力範囲でのイオン化の基礎研究がまた徹底的に行われてなかった。

2. 研究の目的

質量分析におけるイオン化技術が数多く存在するが、すべての試料に対応する万能のイオン化法が存在しない。例えば、タンパク質及びペプチドのような巨大生体分子をイオン化するためには、エレクトロスプレーイオン化(ESI)を使わなければならない。ESIは、金属の毛細管に試料液を通して、高電圧を印加することで溶媒が電気噴霧され、生成した水滴が大気下で蒸発し、気相分子イオンが帯電水滴から釈放される、というイオン化法である。現時点、ほとんどのESIの研究は大気圧下で行われる。本研究は、生体サンプルをより高感度で分析するために、一気圧より高い超大気圧イオン源を用いて、従来のESI法の改良、及び基礎研究を目的としている。

3. 研究の方法

エレクトロスプレー及びナノエレクトロスプレー毛細管を用いた超大気圧イオン源を製作し、特製イオン導入チューブを用いたイオン源を市販リアイオントラップ質量分析計へ装着した(図1)。メカニカルブースターポンプを用いて、質量分析計の排気速度を調整し、イオン源の圧力が大気圧を超えても質量分析計の真空度を200 Paぐらいに一定にした。超大気圧の環境で起きた電気噴霧の様子を顕微鏡システムで観察し、イオン化の評価実験を行った(図2)。

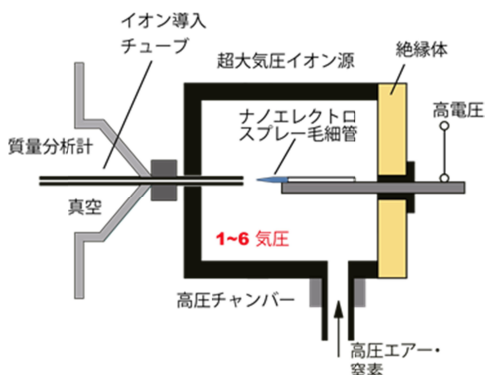


図1. 超高気圧イオン源の構造

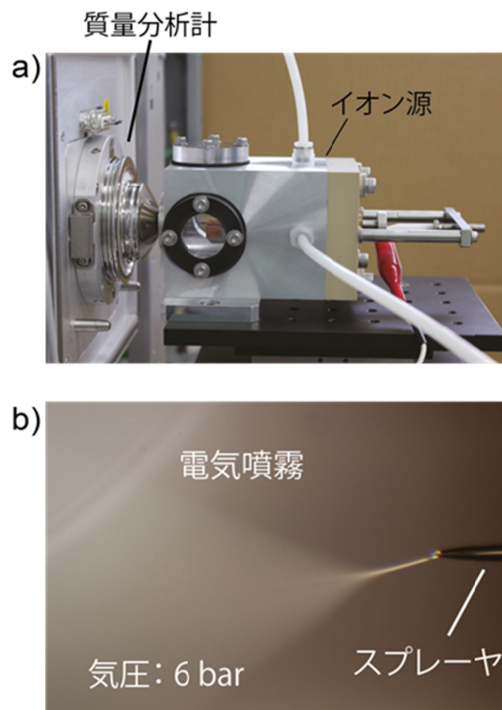


図2 a)大気圧イオン源と質量分析計の結合 b) 6気圧の下で行われた電気噴霧

4. 研究成果

超大気圧下では、絶縁破壊がより高電圧側に移行するのに対し、エレクトロスプレーの開始電圧は環境圧力に依存しないことを確認し、従来型のエレクトロスプレーイオン化法で困難であった水溶媒サンプルの分析に対して、コロナ放電等の擾乱なしに、正イオンモードおよび負イオンモードのいずれにおいても、高感度に質量分析が実現することを実証した(図3)。この概念に基づいて、より高感度、そして従来法で実現できない、下記の新規イオン源を開発した。

(1) 従来のナノエレクトロスプレーの性能を向上した高圧ナノエレクトロスプレーイオン化(ナノESI)は非常に微細なキャピラリー(毛細管)を使うことで溶液の流量が数十nL/minのレベルに維持される。ナノESIのイオン化効率 は従来のESIより高く、純粋な水溶液にも有機溶媒を加えずに適用する。しかし、大気圧下で行われた水溶液の分析について、特に負イオンモードの場合、イオン源で発生した電気放電のため、検出信号の安定性や測定の再現性が常に保証されない。この放電問題は、SF6やCO2等のガスをイオン源に充填することによって、ある程度に解決できる。放電を起こさせるための開始電位は周りのガス圧力の上昇と共に増加する。我々はこの原理を利用し、作動ガスとして空気又は窒素を用いて、正と負の両方のイオンモードで安定した高圧エレクトロスプレーイオン源を開発した。

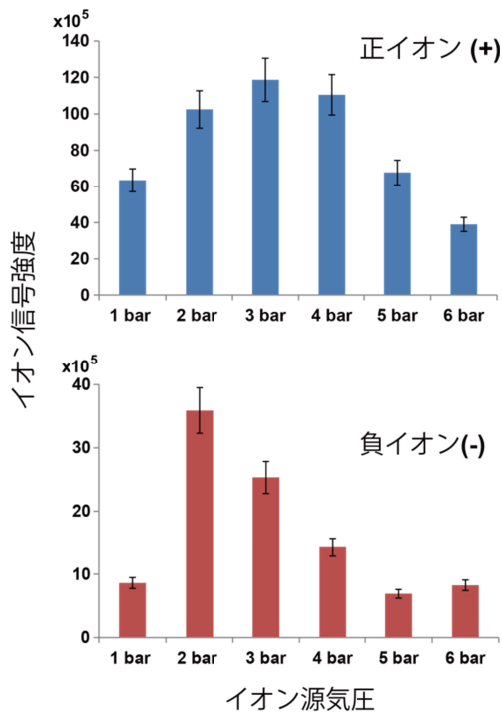


図 3. ESI イオン化法による水溶液中のシトクロム c イオン信号の強度とイオン源の気圧の依存性

本研究は、水溶液中の試料の分析を基準にして、従来の大気圧ナノエレクトロスプレーと超大気圧でナノエレクトロスプレーの比較実験を行った。この比較実験には同じイオン源チャンバーが使用され、イオン源の圧力は 1 気圧から 6 気圧まで調整することができた。質量分析計の真空を維持するためプスターポンプを真空系に追加した。プスターポンプの排気速度を調整することで第一作動排気部の圧力をイオン源圧力が可変されても一定に保った。高圧ナノ ESI は 2 ~ 3 気圧で最適化され、従来の大気圧ナノ ESI と比較してイオン信号強度の 3~5 倍の改善を示した(図 3)。そしてイオン信号の安定性と再現性も大幅に改善された。

(2) プラスチックピペットを用いた nL/min レベルのエレクトロスプレーの開発：ナノエレクトロスプレーの溶液流量は、通常、100 nL/min 以下であり、それを実現するには金属膜を用いた内径 10 μm 以下のガラスキャピラリーが使用されるのは一般的である。我々はナノ ESI ガラスキャピラリーと比べ、内径が相当大きい使い捨てのプラスチックピペットチップを用いて、超大気圧の下で、一分間わずか ~ 10 nL のエレクトロスプレー噴霧とイオン化を実現した。このピペットチップの内径は 0.1 mm であり、もともとはゲル電気泳動におけるサンプルを採取するための消耗品である。このプラスチックピペットチップの内径及び外径はナノ ESI キャピラリーよりはるかに大きかったが、そのナノレベルの流量は、超大気圧下でエレクト

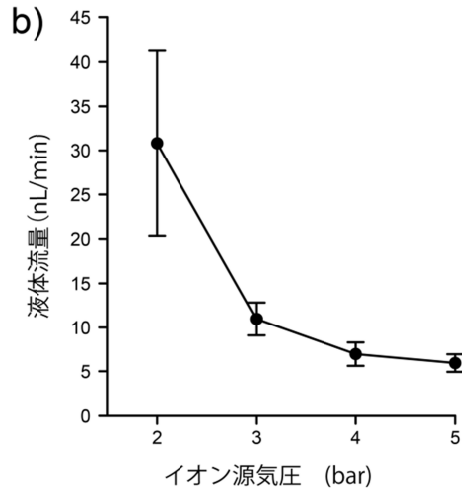
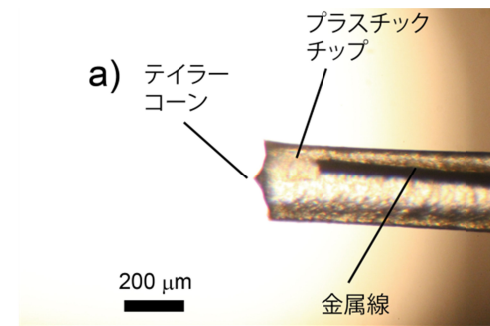


図 4a) 樹脂ピペットチップを用いた nL/min レベルのエレクトロスプレー。高電界により液体コーン(テイラーコーン)が形成 b) イオン源の気圧を用いてエレクトロスプレーの流量が 10nL/min のレンジに制御できる

ロスプレーを行うことにより維持することができた。

詳しいメカニズムはまた確認してないが、高気圧の雰囲気の中で放電が起き難いため水溶液に対して安定なエレクトロスプレーが得られるのは原因の一つと考えられる。このコストの低いチップを使用しても、高価なナノ ESI 源のように高感度な測定が可能であり、特性もほぼ同じであった。液体流量が非常に低いのため、少量の試料液を使っても長時間持続するイオン信号が得られた。より低い流量の下で電気噴霧された初期液滴のサイズがより小さくなった。通常、疎水性化合物の入った試料溶液に対し親水性を持った分子の検出が困難であるが、より小さい初期帯電水滴のおかげでイオン化の抑制効果が大副に減少した。通常、細いガラス毛细管から作製したナノ ESI キャピラリーの先端には目詰まり問題が発生しやすいが、本手法のプラスチックの内径がガラス毛细管より大きいため、目詰まりトラブルがほとんど起きなかった。その結果、相対的に「汚い」生体サンプルの取り扱いも容易になった。

これらの研究結果および新しいイオン化法は質量分析法の改善及び進歩に貢献できるだけでなく、他の分野、例えば新しい薄膜作成法としての応用も可能である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Lee Chuin Chen, Md. Matiur Rahman, Kenzo Hiraoka, Super-Atmospheric Pressure Ion Sources: Application and Coupling to API Mass Spectrometer, Super-Atmospheric Pressure Ion Sources: Application and Coupling to API Mass Spectrometer, 査読有, 巻3, 2014, S0024.

DOI: 10.1039/C3AN01635H

Md. Matiur Rahman, Kenzo Hiraoka, Lee Chuin Chen, Realizing nano electrospray ionization using disposable pipette tips under super atmospheric pressure, Analyst, 査読有, 巻139, 2014, 610-617.

DOI: 10.1039/C3AN01635H

Md. Matiur Rahman, Mridul Kanti Mandal, Kenzo Hiraoka, Lee Chuin Chen, High pressure nanoelectrospray ionization mass spectrometry for analysis of aqueous solutions, Analyst, 査読有, 巻138, 2013, 6316-6322.

DOI: 10.1039/C3AN00699A

Lee Chuin Chen, Md. Matiur Rahman, Kenzo Hiraoka, Super-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, Journal of Mass Spectrometry, 査読有, 巻48, 2013, 392-398.

DOI: 10.1002/jms.3173

Md. Matiur Rahman, Lee Chuin Chen, Kenzo Hiraoka, Development of high-pressure probe electrospray ionization for aqueous solution, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 査読有, 巻27, 2013, 68-74.

DOI: 10.1002/rcm.6427

[学会発表](計 2 件)

Lee Chuin Chen, Md. Matiur Rahman, 平岡賢三、高気圧エレクトロスプレー及びナノエレクトロスプレーイオン化法、第61回質量分析総合討論会、つくば国際会議場エポカル、2013年9月10~12日

Lee Chuin Chen, Matiur M Rahman, Mridul Kanti Mandal, Kenzo Hiraoka, Development of High Pressure Ion Sources with Operating Pressure Higher Than Atmospheric, 19th International Mass Spectrometry Conference, Kyoto, 国立京都国際会館(京都市), 2012年09月15日~2012年09月21日

6. 研究組織

(1)研究代表者

チェン リーチュイン (CHEN, Lee Chuin)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 40585577