

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03076

研究課題名(和文) 超大気圧イオン化法を用いた新たな高速質量分析手法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel ultra-fast analytical method using super-atmospheric pressure ionization mass spectrometry

研究代表者

チェン リーチュイン (CHEN, Lee Chuin)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：40585577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：液体クロマトグラフィー分析の動作温度を上げることで分離効率と速度が向上するという現象とその原理はよく知られているが、従来の方法では溶媒の蒸発と沸騰の原因で、最高動作温度は約90度に制限されている。我々は高圧エレクトロスプレーイオン源を用いて新しい高温キャピラリー液体クロマトグラフィー質量分析システムを開発した。大気圧より高い高圧イオン源を用いることで、溶媒の沸騰問題が解決され、イオン化の安定性と分析の動作温度が160度まで向上した。耐熱のカーボンカラムと樹脂系カラムは高温高速分析に適することが分かった。開発したシステムを用いて、タンパク質の高速LC-MS分析が可能であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液体クロマトグラフィー質量(LC-MS)分析は精密検査、タンパク質分析などによく利用されている。新しい高圧ESIを用いて、動作温度100度以上の高温キャピラリーLC-MSは初めて本研究で開発されて、低流量の動作でも速度の促進が実証できた。今後の研究の進展により、従来法では相当時間がかかるタンパク質解析などの分析速度と効率を大幅に上げることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Operating the analytical column at a high temperature increases the efficiency and speed of the liquid chromatography (LC) due to the reduced viscosity and an increase of solute diffusion speed. However, the maximum temperature of the conventional method is limited by the boiling of the mobile phase to ~90 C. We have developed in this project a novel analytical system that combined the high temperature-LC (HT-LC) with mass spectrometry (MS) via high-pressure electrospray ionization (HP-ESI). The direct coupling of HP-ESI to HT-LC operated at > 100 C was made possible by using the ion source as the pressure regulator. For a given solution flow rate, the analytical time was significantly shortened by increasing the LC column to 160 C. HT-LC-ESI-MS using pure water as the mobile phase with a capillary column was also found to be possible. Carbon and polymer columns were found to be suitable for the HT-LC-ESI-MS of pharmaceuticals and biomolecules such as peptides and proteins.

研究分野：質量分析

キーワード：質量分析 化学分析 高速液体クロマトグラフィー エレクトロスプレーイオン化 超大気圧イオン源

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 液体クロマトグラフィー (LC) は分析カラムを用いて混合試料の成分を分析する技術である。溶かした混合試料は移動相 (液体) で移動され、カラムの中に保持される固定相との相互作用によって分離される。薬品分析、精密検査などによく使われている液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) は LC で分離した化合物を更に質量電荷比 (m/z) に分離して分析する技術である。質量分析するために、液体試料を帯電させるのは大気圧静電噴霧 (エレクトロスプレー) イオン化 (ESI) が最も有効な方法として使用されている。近年、微量なサンプルに適するキャピラリーカラムが汎用され、低流量動作で高感度なキャピラリー LC-MS はタンパク質の解析に使われ始めている。

(2) 高温により、物質と固定相の相互作用は促進され、更に移動相の粘性が減って、理論的に、一定の送液圧力で高速かつ高効率の分離ができる (文献1)。但し、従来の大気圧 LC-MS では、移動相とカラムの温度は液体の沸騰によって、最高温が約 90 度に制限される。カラムの出口に流路の内径が通常より小さい流量制限器を用いて、カラムの内圧を上げて、カラム内の沸騰を抑えることができるが、内圧が移動相の流量、粘性及び温度に変化され、一定の数値に保たれない。そしてカラムとイオン源の間に移動相の冷却機構も設ける必要がある。結果的に不要な体積が増えて、分析の分解能が犠牲となる。低流量のキャピラリーカラムには一般の流量制限器は適していない。当初では高温 LC の利点を LC-MS 分析に発揮することがまだできていなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、我々が開発した高圧エレクトロスプレーイオン化法 (高圧 ESI) と高温液体クロマトグラフィー技術を融合し、カラム温度が 100 度を越えても、安定かつ高感度な LC-MS が可能になる新しい分析システムを目指して開発を進めてきた。中心となったイオン源の圧力は一気圧より高いので、流量制限器と冷却機構を使わずに、高温の試料溶液と移動相を液相の状態に維持することができた。

(2) 提案したシステムの開発には高感度のキャピラリーカラムを基にして、イオン源と関連接続部位の最適化、適するカラムの種類及び材質の確認、試料調整及び測定条件の最適化、関連技術のノウハウが必要であった。

3. 研究の方法

市販の液体クロマトグラフィー送液・注入システムと大気圧質量分析計に直接搭載できる高圧エレクトロスプレーイオン源の設計・製作を行った。送液と試料注入には島津製作所製 ultra-HPLC システム (Shimadzu Nexera) を用いて、質量分析計は大気圧イオン化対応のサーモフィッシュ製オルビトラップを用いた。分析に使ったキャピラリーカラムの動作温度が常温から 200 度まで精密に制御できる加熱装置を作製した。イオン源の耐圧は 30 気圧以上、最高温度が 250 度以上に安全作動できるように設計・製作した。本研究では市販の耐熱のカーボンカラム (Thermo 社製 graphitic carbon) と樹脂系カラム (ProSwift RP-4H) を使用した。検証実験に、薬剤、ペチド、タンパク質などを用いた。高圧エレクトロスプレーの電流はピコアンプメータで計測し、噴霧の状態は長作動距離顕微鏡と波長 512nm のレーザーで観測した。

4. 研究成果

(1) 高圧エレクトロスプレー様子を観察できるイオン源 (図1) を用いて高温 LC-MS の基礎検証実験を行い、分析の速度が向上することが確認できた。また、耐熱の石英窓を用いて、100 度以上の高温エレクトロスプレーの安定動作を確認できた。最初の検討実験では、内径 1mm の炭素のカラムを用いた。薬剤の分析に必要な時間が高温動作により短縮することが分かった (図2)。試薬は 1: sulfaguanidine, 2: sulfathiazole, 3: sulfamerazine, 4: sulfamonomethoxine を使用した。横軸は保持時間、縦軸はイオン強度を表す。ここで使用した移動相はもっとも一般的なものであり、有毒な有機溶媒、アセトニトル (ACN) が含まれている。

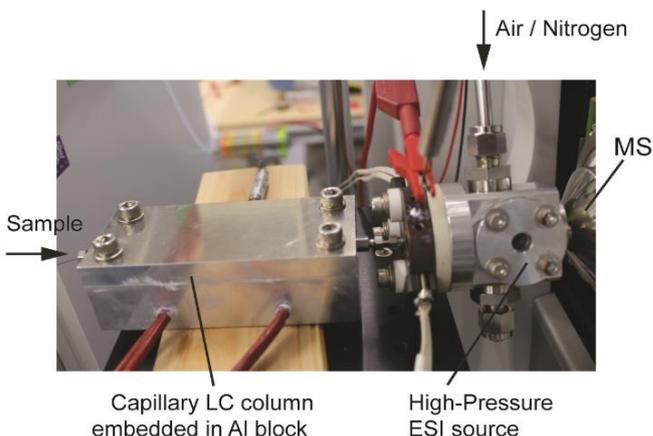


図1. 基礎検討実験用に作成した高圧イオン源と LC 加熱部。文献2より許可を得て転載。

(2) 水を 100 度以上に加熱すると、有機化合物が水に溶けやすくなり、高温の水は有機溶媒の質を持つことがよく知られている。この現象を利用して、十分な高温動作の下で、環境負荷のない純水を使用しても従来の移動相に匹敵する分析効果が得られることが分かった。

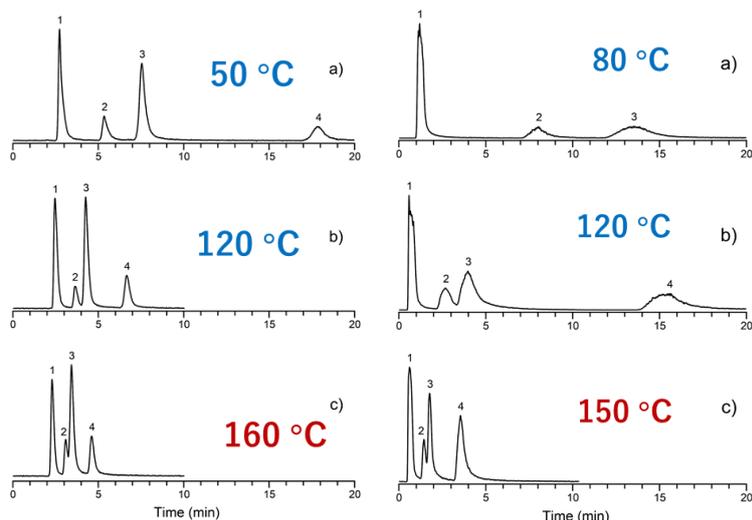


図 2. 高温 LC-ESI-MS の動作温度の効果。試料：1: sulfaguanidine, 2: sulfathiazole, 3: sulfamerazine, 4: sulfamonomethoxine. 移動相: 50 % v/v ACN. 文献 2 より許可を得て転載。

図 3. 高温の純水を移動相として用いたキャピラリー LC-MS。試料：図 2 と同じ。移動相: 純水。文献 2 より許可を得て転載。

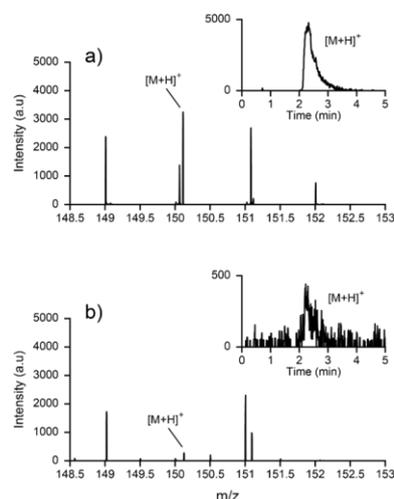


図 4. a) 高温キャピラリー LC-MS を用いて人の尿中から覚せい剤の検出。b) 従来の LC-MS を用いた場合。100 fmol のメタンフェタミンを模擬サンプルとして使用した。文献 2 より許可を得て転載。

た (図 3)。ここでは内径 0.1mm のキャピラリー炭素カラムを用いた。図 4 は尿中から覚せい剤の検出を示す。高温キャピラリー LC-MS は従来法より感度が大幅に向上したことが分かった (図 4a)。人の尿中に 100 fmol のメタンフェタミンを添加して模擬サンプルとして使った。

(3) 図 1 ~ 図 4 の高圧 ESI イオン源は市販の質量分析計のイオン採取部に直接に接続したものである。高圧により真空排気ポンプの負担が増えて、補助ポンプの増設が必要になった。質量分析計を改造せずに使えるように、そしてランニングコストを低減するために、排気負荷の低い小型の高圧イオン源を製作した。イオン源の出口は漏斗の形状を持ったため、イオンと帯電液滴の透過率が向上した。簡易な設計で精密の機械加工が可能であり (図 6)、キャピラリーカラムに直接に繋ぐことで (図 7)、不要な流路の体積が低減できた。イオン化部の 5 圧力が bar まで変化しても、質量分析計の真空中に影響が殆ど生じ無かった。改良したイオン源のもう一つの特徴はその高電圧の配置は、従来通りのモード (図 5a) とエミッター接地モード (図 5b) で操作ができて、用途にあわせて選択できる。両方のモードとも同じ性能を持っていた。

(4) 小型高圧イオン源を用いて、高温操作でタンパク質の LC-MS 分析が加速されたことが確認できた (図 8) 高分子のタンパク質に対して、炭素のカラムより樹脂系カラムの方が高温 LC-MS に適することが分かった。図 8a の測定に 1: angiotensin I, 2: insulin, 3: ubiquitin, と 4: cytochrome c を試料として使用した。図 8b の測定に 1: ubiquitin, 2: cytochrome c, 3: myoglobin, 4: beta-lactoglobulin を試料として使用した。タンパク質の LC 分離には、高い電気伝導性を持つ 0.1% のトリフルオロ酢酸 (TFA) が移動相とし最も適しているが、従来の高電圧配置で、ESI エミッター側から LC 装置への電流漏れが発生し、噴霧の安定性とイオン化の効率に悪い影響が生じた。エミッターを接地にすることで、電流漏れの問題が回避できて、従来の高電圧配置法より安定かつ高感度の測定が出来た。

(5) 従来の大気圧 ESI では表面張力の高い水溶媒試料に対し、放電の影響で安定性と感度が低かった、開発した高圧イオン源を用いたことで、放電のない安定な噴霧ができ、より高感度の質量分析測定が可能であることが確認できた (図 9)。図 9a に 0.1% の TFA、図 9b に 0.1% のギ酸水溶液を用いた。試料は 100 nM の myoglobin を用いた。比較用の大気圧 ESI では、噴霧の安定性を促進するネブライザーガスを用いたが、高圧 ESI イオン源を用いた方がイオン強度が十倍以上高いことが分かった。

(6) 図 10 は従来のイオン源の高電圧配置モードと新しいエミッターを接地モードの性能比較を示す。100nM のタンパク質 myoglobin の検出に対し、従来法では電流漏れの原因で、不要な酸化還元現象が起きて、本当の成分ではない酸化ピークが現れた (図 10a)。myoglobin の酸化ピークを赤字 i & ii で示す。エミッターを接地する新しい方法を用いることで、誤報の原因となる酸化還元現象を回避することができた。開発した新規 LC-MS 手法は迅速タンパク質解析の応用へ展開できると考えられる。

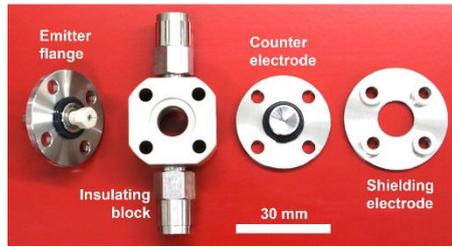
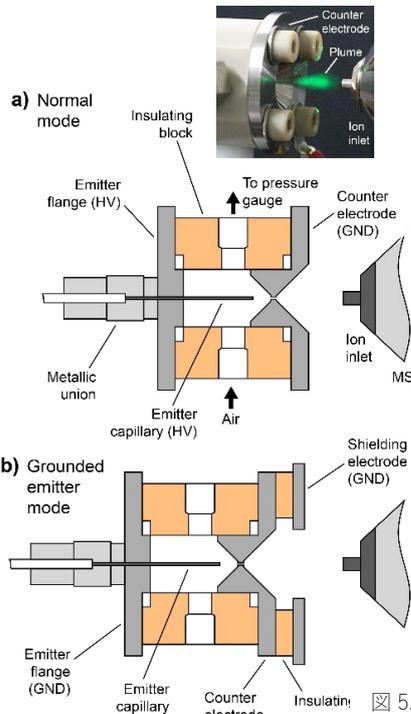


図 6. 簡易高圧エレクトロスプレーイオン源の部品。文献 3 より許可を得て転載。

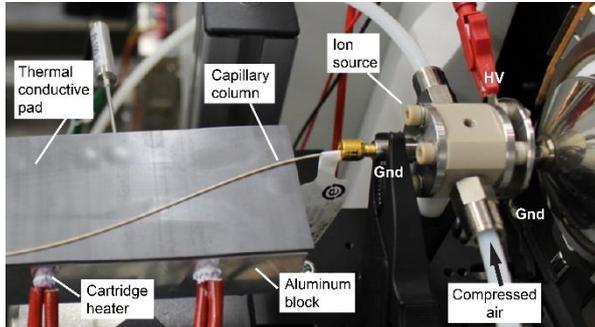


図 7. 樹脂キャピラリーカラムを用いた高温 LC-MS の構成。文献 3 より許可を得て転載。

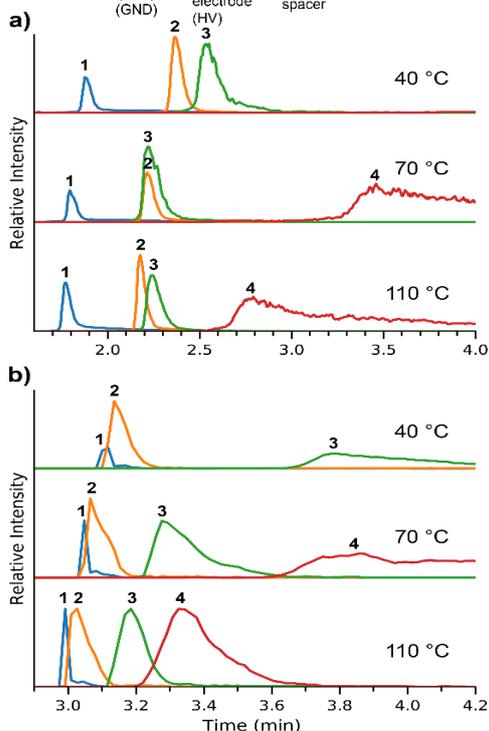


図 8. 樹脂キャピラリーカラムを用いてタンパク質の高温 LC-MS 分析。文献 3 より許可を得て転載。

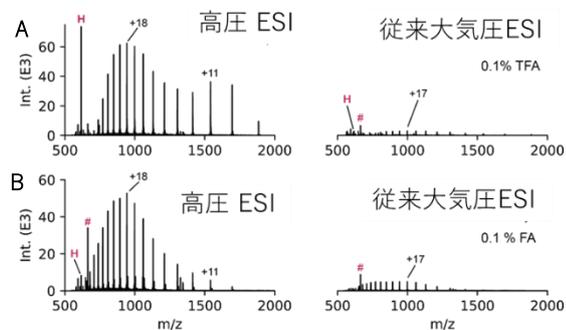


図 9. 開発した高圧 ESI と従来の手法の比較。文献 4 より許可を得て転載。

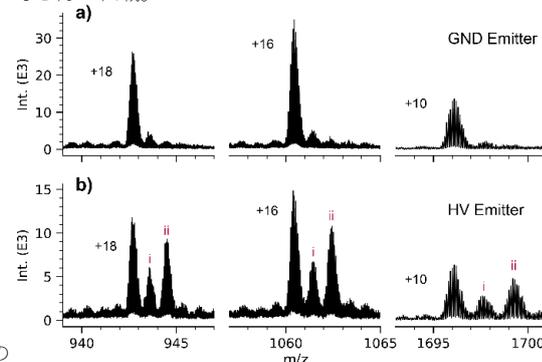


図 10. ESI の高電圧配置モードの比較。文献 4 より許可を得て転載。

<引用文献>

- ① L. C. Chen, High-Temperature Liquid Chromatography and the Hyphenation with Mass Spectrometry Using High-Pressure Electrospray Ionization, *Mass Spectrom.* vol 8, S0079-S0079, (2019)
- ② L. C. Chen, T. Naito, S. Ninomiya, K. Hiraoka, Hyphenation of high-temperature liquid chromatography with high-pressure electrospray ionization for subcritical water LC-ESI-MS, *Analyst*, vol 143, 5552-5558, (2018)
- ③ L. C. Chen, A Plug-and-Play High-Pressure ESI Source with an Emitter at Ground Potential and Its Application to High-Temperature Capillary LC-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol 31, 1015-1018, (2020)
- ④ L. C. Chen, High-pressure ESI-MS made easy using a plug-and-play ion source and its application to highly conductive aqueous solutions, *J. Mass Spectrom.* In Press. 10.1002/jms.4583.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chen Lee Chuin	4. 巻 -
2. 論文標題 High-pressure ESI-MS made easy using a plug-and-play ion source and its application to highly conductive aqueous solutions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jms.4583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Lee Chuin	4. 巻 31
2. 論文標題 A Plug-and-Play High-Pressure ESI Source with an Emitter at Ground Potential and Its Application to High-Temperature Capillary LC-MS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Society for Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jasms.0c00052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura Kentaro, Yamada Yuki, Ninomiya Satoshi, Chung Wen Yuan, Chang Yu-Ting, Dennison Ashley Robert, Hiraoka Kenzo, Takeda Sen, Chen Lee Chuin	4. 巻 172
2. 論文標題 Real-time analysis of living animals and rapid screening of human fluid samples using remote sampling electrospray ionization mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 372 ~ 378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2019.04.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Lee Chuin	4. 巻 8
2. 論文標題 High-Temperature Liquid Chromatography and the Hyphenation with Mass Spectrometry Using High-Pressure Electrospray Ionization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 S0079 ~ S0079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5702/massspectrometry.S0079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Lee Chuin, Naito Tsubasa, Ninomiya Satoshi, Hiraoka Kenzo	4. 巻 143
2. 論文標題 Hyphenation of high-temperature liquid chromatography with high-pressure electrospray ionization for subcritical water LC-ESI-MS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 5552 ~ 5558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8AN01113C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Tianyu, Kitada Atsushi, Seki Yusuke, Fukami Kazuhiro, Usmanov Dilshadbek T., Chen Lee Chuin, Hiraoka Kenzo, Murase Kuniaki	4. 巻 165
2. 論文標題 Identification of Copper(II)Lactate Complexes in Cu ₂ O Electrodeposition Baths: Deprotonation of the -Hydroxyl Group in Highly Concentrated Alkaline Solution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of The Electrochemical Society	6. 最初と最後の頁 D444 ~ D451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1149/2.0831810jes	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Kentaro, Yamada Yuki, Ninomiya Satoshi, Chung Wen Yuan, Chang Yu-Ting, Dennison Ashley Robert, Hiraoka Kenzo, Takeda Sen, Chen Lee Chuin	4. 巻 172
2. 論文標題 Real-time analysis of living animals and rapid screening of human fluid samples using remote sampling electrospray ionization mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 372 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2019.04.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee Chuin Chen, Satoru Tsutsui, Tsubasa Naito, Satoshi Ninomiya, Kenzo Hiraoka	4. 巻 53
2. 論文標題 Electrospray ionization source with a rear extractor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 400-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jms.4072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Md MatiurRahman, Lee Chuin Chen	4. 巻 1021
2. 論文標題 Analytical characteristics of nano-electrospray operated under super-atmospheric pressure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 78-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2018.03.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 チェンリーチュイン
2. 発表標題 高压エレクトロスプレイオン源を用いた高温キャピラリー液体クロマトグラフィー質量分析
3. 学会等名 第10回 日本質量分析学会中部談話会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee Chuin Chen
2. 発表標題 Application of high pressure ESI in high temperature liquid chromatography MS
3. 学会等名 8th Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference 2020, Macau (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Lee Chuin Chen
2. 発表標題 A high-pressure ESI source with emitter at ground potential: Applied to high-temperature capillary LC-MS
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Lee Chuin Chen
2. 発表標題 Hyphenation of High-Temperature Capillary Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 チェン リーチュイン
2. 発表標題 Subcritical water ESI-MS for green analytical chemistry
3. 学会等名 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018 Asia-Oceania Human Proteome 合同大会(国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者総覧 http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/337/0033630/profile.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考