

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03077

研究課題名(和文) 二次元同時分離手法のための多重通信技術を活用した並列導入型質量分析法の開発

研究課題名(英文) Development of multiplex MS utilizing frequency-division multiplexing for simultaneous 2D separation

研究代表者

北川 慎也 (Kitagawa, Shinya)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50335080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、液体クロマトグラフィー(LC)と電気泳動が直交する二次元同時分離手法と組み合わせることが可能な新規並列導入型MSの開発を行った。通信工学で用いられる周波数分割多重化法を応用し、MSに複数チャネルの試料を導入するためのインターフェイス、適切な周波数でクロマトグラムを変調するためのイオンゲート、そしてデータ処理方法を開発し、一台のMSに2台のLCを接続した同時分析に成功した。開発した手法を発展させて、最大6並列導入が可能な並列導入型MSの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、オミクス研究に代表される「“系”全体の解析」に基づいた研究の重要性が増しており、複雑な試料成分を分離するための二つの分離機構を組み合わせる二次元分離質量分析法(MS)の開発が強く求められている。本研究では、迅速な二次元分離が可能である直交型電気クロマトグラフィーと組み合わせることができる、「並列導入型MS」の開発を行った。これにより、網羅的分析が不可欠である生体関連分野の研究を効率よく進めることが可能になる。また、並列導入型MSは複数台の液体クロマトグラフ(LC)と組み合わせることで、産学問わず多くの分野に低コストで高効率なLC-MS分析を提供できるようになる。

研究成果の概要(英文)：In this study, a novel multiplex MS was developed for combining with a simultaneous 2D separation method, where orthogonal chromatographic and electrophoretic separation is performed simultaneously. Frequency-division multiplexing, used in communication engineering, was utilized in the novel multiplex MS. We developed a new interface for parallel injections, ion gate for the chromatogram modulation, and a signal processing protocol. Consequently, 6 channel simultaneous analyses was successfully achieved.

研究分野：分析化学

キーワード：質量分析 液体クロマトグラフィー 周波数分割多重化 並列分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、オミクス研究に代表される「“系”全体の解析」に基づいた研究の重要性が増している。そのため、多成分を網羅的かつ迅速に分析する技術が必要とされている。多種多様な成分の網羅的分析には、二次元ゲル電気泳動(2D-GE)や二次元液体クロマトグラフィー(2D-LC)のような、二つの分離機構を組み合わせる分離手法が必要とされることが多い。また、網羅的解析では検出法に質量分析(MS)を用いることが一般的である。そのため迅速な二次元分離—質量分析手法の開発が強く求められている。

(2) 従来の二次元分離手法では、一次元目の分離の後に二次元目の分離が行われる。すなわち、一次元目と二次元目の分離が独立して行われおり、分離の長時間化が避けられない。これに対して、申請者は、平板型固定相上で、LC分離と、それに直交する電気泳動分離が同時に行われる「Orthogonal Electrochromatography (OEC)」と称する手法の開発を行った (*Chromatography*, 2016, 37, 73-78.)。

OECは迅速な二次元分離が可能であるが、MSとの接続において問題が生じる。すなわち、二次元同時分離では並列検出が必要であり、例えば固定相出口での流れが8分画されている場合、並列検出のためには8台のMSが必要となる。しかし、これは現実的な方法ではなく、OEC-MSの実現には、一台のMSで複数の試料流れ(ch)を並列分析可能である「並列導入型質量分析法」の開発が必須となる。

(3) また、並列導入型MSにはOECではなく複数台のLC(nLC)を接続してもよい(nLC-IMS)。産業界におけるLC-MS(LC-MS/MS)を用いたルーチン分析の需要は、日々増大している。しかし、多くの企業においては、多量の検体の分析に対応するため(例えば品質管理)、高価なLC-MSを複数台導入し運用することは困難である。一方、nLC-IMSは低コストで高効率なLC-MS分析を提供できる装置となりうる。産業応用においても並列導入型MSの開発の重要性は高いといえる。

2. 研究の目的

(1) 申請者はこの課題を解決するために、通信工学の分野では「混在信号から個別の信号を抽出する方法」が確立されていることに着目し、MSに対して複数試料を並列導入した際に観測される混在信号から特定の流れ(ch)に由来する情報を抽出することが可能である並列導入型質量分析法を着想した。具体的には、各流れ(ch)から溶出される溶液をMSへ並列的に導入する際に、「各chに個別の識別信号(周波数情報)を付与」し、MSで観測される混在信号から「識別信号(周波数)を手がかりにフーリエ変換(FT)及び逆フーリエ変換(RFT)を用いて任意のchに関するMS信号を抽出する」手法を開発した(特許第6362161号)(Fig. 1参照)。

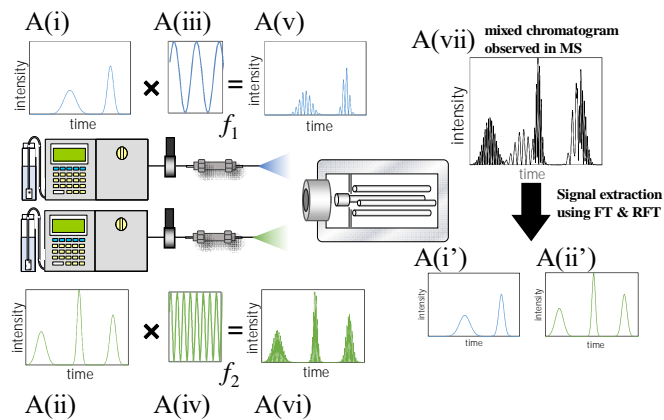


Fig. 1 周波数分割多重化に基づく並列導入型質量分析の概要

(2) 基礎検討として二台のLCと一台のMSを組み合わせた2LC-IMSの開発を行っており、実際に2系統の混在信号から各LCのクロマトグラムの抽出に成功している。しかしながら複数のLCを用いた際には、それぞれの分析結果に干渉が生じることが明らかになった。そこで本研究では、「干渉が生じにくい並列導入用インターフェイスの作成とその性能評価」と「MSへの並列導入数の増大」を目的として開発研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 周波数分割多重化法を利用する並列導入型質量分析法開発の基礎検討として、まずは2系統のイオン源をMSへ並列導入する方法開発を行い、今後の並列導入を行う際の干渉を低減されるために不可欠な知見を得ることを目的として研究を行った。具体的には、並列導入を行うための新規インターフェイスの開発と、本手法の根幹である変調方法についての検討を行った。なお、今回の検討では、安定な結果を得るためにOECとMSの接続ではなく、複数台のLCを一台のMSに接続した条件(もしくは試料溶液の直接導入)での検討を行った。

(2) 並列導入数の増大を行うにあたり、まずは必要とされるシステムの要件を、仮想信号を用いて検討した。次いでそれを実装するための、インターフェイス開発・変調システムの改善を行っ

た。

4. 研究成果

(1) これまでの研究から、MS に設けられた単一の試料導入孔に対して複数のイオン源を設置した場合、著しい物理的干渉が生じることが判明している。この問題を解決するためには、イオン源間距離を大きくすることが望ましい。そこで、複数の試料導入孔を有する Y 字型インターフェイスを開発した。管径・管長について検討を行い、問題なく並列導入を行うことが出来るインターフェイスの開発を行った。

(2) 開発した Y 字型インターフェイスに対して、これまで用いていたチョッパーによる物理的遮蔽による周波数情報付与を行った。一系統の試料導入(1LC-1MS)に対して変調を行った場合、FT および RFT によるクロマトグラムの復元は問題なく行うことができた (Fig. 2)。しかしながら、復元クロマトグラムの信号強度が、本来の信号強度よりも低下するという問題が生じた。これを解決するため、変調クロマトグラムの FT により得られたパワースペクトルの積算信号情報から強度補正を行う手法も併せて開発した。

(3) 1LC-1MS では問題なく測定が行うことが出来たため、二系統の試料導入(2LC-1MS)を試みた。しかしながら、この場合は明確な干渉の発生が確認された。干渉の原因について詳細に検討した結果、チョッパー型の周波数情報付与システムでは、試料導入時に用いている窒素気流の流れが遮られるため Y 字型インターフェイス内に局所的圧力変動が生じ、これが干渉を引き起こしていることが明らかとなった。

(4) 圧力変動の伴わない周波数情報付与システムとして、新たに電圧印加による静電遮蔽について検討を行った。Y 字型インターフェイスの先端にそれぞれ円筒型電極を設置し、それぞれの電極に対して固有の周波数で高電圧を印加することが出来る変調回路を作成・接続し、イオンゲート型周波数情報付与システムを開発した(Fig. 3)。

まず、イオンゲートを用いて識別信号が印加できるかどうかを確認するために、1つのLCを単一のMSに接続した1LC-1MS系で実験を行った。得られたクロマトグラムより識別信号が印加されていることが確認できた。さらに、FT および RFT によるクロマトグラムの復元は問題なく行うことが出来ることを確認した。

イオンゲートを用いる1LC-1MSにおいて、周波数情報の付与およびFT/RFTによる信号復元が問題なく可能であったことから、2LC-1MS系で実験を行った。測定結果と解析結果をFig. 4に示す。二つのLCには同じ試料を2minずらしてインジェクトを行った。またLC1, LC2にはそれぞれ0.38 Hz, 0.71 Hzの周波数情報(識別信号)を付与した。Fig. 4(i)中の緑丸で示したピークはLC1由来のピーク、青丸で示したピークはLC2由来のピークである。(i)をFTしてえられるパワースペクトルが(ii)である。低周波領域(<0.2 Hz) 0.38 Hz, 0.71 Hzの3か所にシグナルが観測されており、周波数空間で信号分離が行われていることが確認された。Fig. 4(ii)の0.38 Hz, 0.71 Hzの領域の信号を抽出し、逆フ

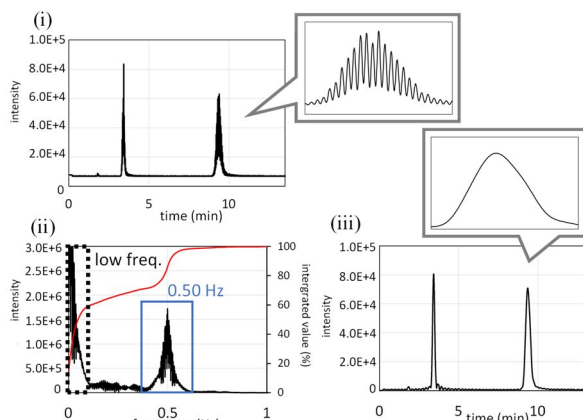


Fig. 2 チョッパー型変調システムを用いた1LC-1MS測定における(i)変調クロマトグラム、(ii)パワースペクトル、および(iii)復元クロマトグラム

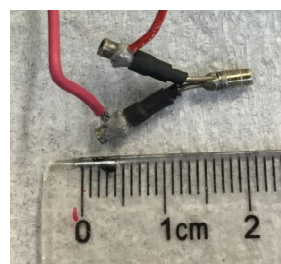


Fig. 3 2系統同時分析用円筒型電極付きY字型インターフェイス

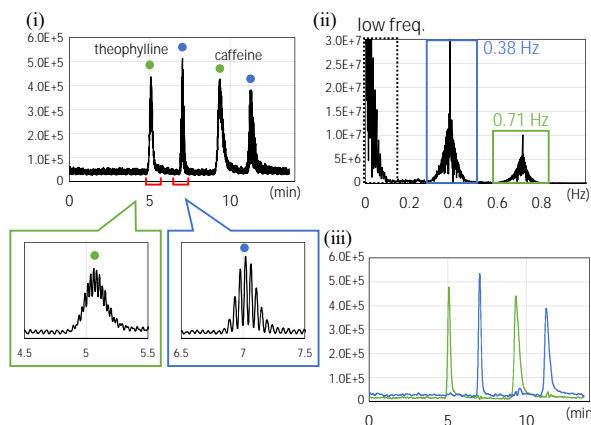


Fig. 4 円筒型電極付きY字型インターフェイスを用いた測定結果。(i)変調クロマトグラム、(ii)パワースペクトル、(iii)復元クロマトグラム

ーリエ変換を用いて復元処理を行ったところ、各クロマトグラムの復元信号を得ることに成功した (Fig.4 (iii))。チョッパー型信号付与システムとは異なり、抽出・復元クロマトグラムでは、それぞれの LC 由来のピークのみが観測され、この実験系では干渉が生じない結果を得ることに成功した。

(5) Figure 4 で示した 2LC-IMS の結果では各 LC 由来のピークのオーバーラップがない条件で測定を行っている。しかしながら、実際の実験系ではオーバーラップが生じることは避けられない。理論的にはオーバーラップがあっても問題が生じないことは確認済みであるが、実際の実験系におけるオーバーラップ条件においても信号分離・復元が可能であることを示すため、Fig. 4 とは異なり、試料注入を同時に行いピークの完全なるオーバーラップが生じる条件での測定を行った。得られた混合クロマトグラムに対して、FT/RFT 処理を行ったところ、周波数空間での信号分離、およびクロマトグラムの復元ができることを確認した。

(6) これまでの検討で 2LC-IMS では、混合クロマトグラムからの信号分離・クロマトグラムの復元に成功している。並列導入数の増大のための基礎検討として、4 並列導入について検討を行った。2 並列型では Y 字型インターフェイスを用いている。4 並列導入に対しては、ダブル Y 字型インターフェイスと 4-1 型インターフェイスを試作し、評価を行ったところ 4-1 型インターフェイスの方が安定的な試料導入が得られやすいことが明らかとなった。

(7) 実際に 4-1 型インターフェイスを用いる実験を行う前に、多重度増大の基礎となる印加周波数に関する検討を行った。理論段数 50 000 および 200 000 の仮想クロマトグラムに正弦波を印加した仮想変調クロマトグラムに対して FT 処理を行ったところ、周波数空間上で、それぞれ 2.5 Hz、5.0 Hz の信号バンドを与えた。この理論段数が高く分離性能の良いクロマトグラムの方が周波数空間ブロードな信号を与える挙動は、理論的にも妥当である。仮に、理論段数 200 000 段の混合クロマトグラムを周波数空間で干渉なく信号分離を行うために必要とされる最大周波数は、4 ch, 6 ch, 8 ch 同時分析でそれぞれ 20 Hz, 30 Hz, 40 Hz であることが判った。

(8) 上述の 2LC-IMS 測定に用いたシステムを用いて、印加周波数 0.45 ~ 1.0 Hz での周波数印加を行ったところ、周波数の増大の伴い、付与される識別信号強度の低下が起きることが明らかになった。すなわち変調効率の低下が起きることが判った。変調を行うための装置の電気回路を新たに見直し改良を行ったところ、最大 35 Hz 程度の識別信号の付与を行うことができるシステムの開発に成功した (Fig. 5)。なお、印加周波数を 35 Hz よりも大きくすると、FT によるパワースペクトル上に、印加周波数以外の周波数帯にもシグナルが観測されることが判った。検討の結果、この限界は MS でのデータ取得のためのサンプリングレートと関連しており、適切な信号分離を行うには最大変調周波数の 5 倍程度のサンプリングレートが必要であることを見出した。

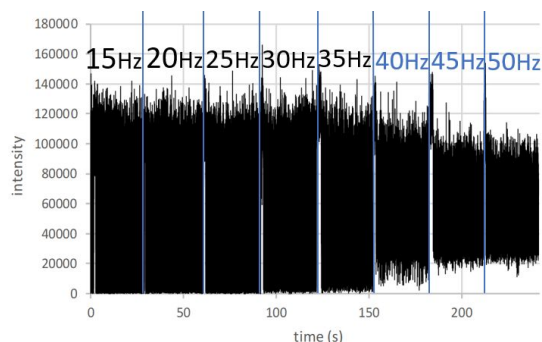


Fig. 5 種々の印加周波数における変調状態の変化

(9) 新たに作成した 4 系統インターフェイスを用いて実験を行った。異なる周波数の識別信号が付与された 4 種信号は、フーリエ変換 (FT) により得られるパワースペクトル上で、4 つの信号に分離された。さらに新たに 6 系統インターフェイス (6-1 型) を作成し実験を行った。この系においても、6 種の信号分離に成功した。しかしながら、低い周波数を印加した場合は、印加周波数の奇数倍数の周波数帯にもシグナルが観測された。今回の実験では、変調のための制御信号として矩形波 (パルス波) を用いている。周波数が大きくなると制御信号自体は矩形波であるが、実際に MS で観測される波形は「歪み」により矩形波ではなくなる。そのため、高い変調周波数を印加した場合は、高調波は観測されない。しかしながら、低周波数の変調信号では矩形波の情報が保持され、高調波が観測されたと考えられる。低周波数帯 ~ 高周波数帯を用いる実験系においては、適切な信号分離を行うため、制御信号を矩形波ではなく正弦波にする必要性が示唆された。

(10) 別途、LC-LC 間の干渉に関する検討として、インターフェイス内での電荷移動に由来する干渉の有無について調べたところ、電荷移動干渉は存在しないことが明らかになった。このことから、付加させるイオンを別種とすることで一つの試料導入孔に 2 サンプルの同時導入を行う

ことが可能となる可能性が高いことを見出した。すなわち、6系統インターフェイスを用いることで最大12系統の試料の同時分析が実現できる可能性がある。

(11) 以上の通り、新たに提案する周波数分割多重化に基づく並列導入型質量分析法の開発を行った。2LC-1MS システムではオーバーラップしたピークも含めて並列分析に成功している。また、さらなる多重度増大を目的として検討を行った結果、最大6系統までの並列分離に成功している。一つの試料導入孔に付加イオンの異なる試料を同時に導入することで、最大12系統の試料の同時分析の可能性が示唆された。

並列分析の可能な MS の開発は、二次元同時分離分析手法の検出器としての利用だけではなく、複数の LC の並列分離による分析効率の向上に有効である。今後は、MS/MS 法への展開を行い、オミクスにおけるディファレンシャル解析の迅速化などにも応用してゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kishi Hiroka, Kumazaki Takashi, Kitagawa Shinya, Ohtani Hajime	4. 巻 144
2. 論文標題 Frequency division multiplex HPLC-MS for simultaneous analyses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 2922 ~ 2928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C8AN02352B	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 Kitagawa Shinya, Kishi Hiroka, Takashima Kotaro, Ohtani Hajime	4. 巻 68
2. 論文標題 Development of Frequency Division Multiplex LC-MS for Simultaneous Analyses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 13 ~ 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5702/massspec.19-103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 岸 博香, 熊崎高士, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 多検体同時分析のための周波数分割多重化法を用いたnLC-1MSの開発
3. 学会等名 第二回材料科学フロンティアシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸 博香, 熊崎高士, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 多検体同時検出のための周波数分割多重化法を用いた並列液体クロマトグラフ質量分析計の開発
3. 学会等名 第36回分析化学中部夏期セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Kishi, T. Kumazaki, S. Kitagawa, H. Ohtani
2. 発表標題 Combination of multiple LC and one MS for simultaneous analyses of plural samples based on frequency division multiplexing
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北川慎也, 岸 博香, 大谷 肇
2. 発表標題 多検体同時分析を目的とした周波数分割多重化法を用いたnLC-1MSの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Kishi, T. Kumasaki, S. Kitagawa, H. Ohtani
2. 発表標題 Frequency division multiplexing in LC-MS for simultaneous analyses of plural samples
3. 学会等名 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2017-Jeju) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸 博香, 熊崎高士, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を用いた同時検出型 nLC-1MS のためのインターフェイスの開発
3. 学会等名 第48回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸 博香, 熊崎高士, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 同時分析型マルチプレックス LC-MS のための周波数分割多重化法の開発
3. 学会等名 第28回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Kishi, S. Kitagawa, H. Ohtani
2. 発表標題 Frequency division multiplex LC-MS for simultaneous analyses of plural samples
3. 学会等名 2nd FRIMS International Symposium on Frontier Materials (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Kishi, T. Kumazaki, S. Kitagawa, H. Ohtani
2. 発表標題 A Novel Multiplex LC-MS Based on Frequency Division Multiplexing for Simultaneous Analyses of Plural Samples
3. 学会等名 25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Kishi, T. Kumazaki, S. Kitagawa, H. Ohtani
2. 発表標題 Frequency division multiplex LC-MS for simultaneous analyses of plural samples
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北川慎也, 岸 博香, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を用いる同時分析型マルチプレックス LC-MSの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸 博香, 熊崎高士, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 多検体同時検出のための周波数分割多重化法を用いた新規マルチプレックス LC-MS の開発
3. 学会等名 第48回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸 博香, 熊崎高士, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を用いた同時検出型マルチプレックスLC-MSの開発
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高島広太郎, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化LC-MSのためのイオンゲート型4chインレットの開発
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第18回高山フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北川慎也
2. 発表標題 周波数分割多重化法に基づく複数試料並列導入型質量分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会中部支部創立60周年記念講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多検体同時検出のための周波数分割多重化LC-MSの開発
2. 発表標題 北川慎也, 岸 博香, 熊崎高士, 大谷 肇
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 北川慎也
2. 発表標題 イオンモビリティースペクトロメトリーを用いる合成高分子分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 先田 廉, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を用いたLC-MSの多重度の増大に関する研究
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第19回高山フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 札谷実穂, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 多検体同時検出のための周波数分割多重化LC-MSの開発：定量精度に関する検討
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第19回高山フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kitagawa, H. Kishi, H. Ohtani
2. 発表標題 Development of Frequency Division Multiplex HPLC-MS for Simultaneous Analyses
3. 学会等名 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2019 Kyoto) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Sakita, H. Kishi, S. Kitagawa, H. Ohtani
2. 発表標題 Study for Enhancing Multiplicity in Frequency Division Multiplex HPLC-MS
3. 学会等名 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2019 Kyoto) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 札谷実穂, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化LC-MSにおけるLC間の干渉に関する基礎検討
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 先田 廉, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化 HPLC-MS の多重度増大に関する研究 : 6HPLC-1MS の開発
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 北川慎也, 先田 廉, 岸 博香, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化LC-MSの多重度増大に関する研究
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 先田 廉, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を用いた HPLC-MS における多重度増大に関する研究 : 6HPLC-1MSの開発
3. 学会等名 第27回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Web Site http://cec.ach.nitech.ac.jp/researches/kitagawa/kitagawa_files/kitagawa_FDMLCMS.html</p> <p>新聞記事 "液体クロマトグラフィー 質量分析法の高効率化", 北川慎也, 化学工業日報, 2019年9月18日, 8-9.</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
連携研究者	大谷 肇 (Ohtani Hajime) (50176921)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (13903)	
連携研究者	岡本 英二 (Okamoto Eiji) (10358963)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903)	