

(様式5)

学 位 論 文 要 旨

平成 29 年 8 月 28 日

学位申請者
杉村 夏彦 印

学位論文題目

質量分析におけるイオン化法の評価：試料適応性と付加イオン選択性

学位論文の要旨

1. 研究背景

質量分析では測定対象分子に電荷を与えイオンとし、イオンの運動として質量電荷比を計測している。この試料をイオン化させる装置をイオン化部あるいはイオン源と呼称しており、様々な方式が存在する。

質量分析の歴史はイオン化法開発の歴史でもある。質量分析装置が実用化された当初、対象は容易に熱気化する小さな分子であり、主に電子イオン化法が用いられてきた。しかし熱気化できる分子の大きさには限界があり、加えて電子イオン化法には付与するエネルギーの大きさから測定対象分子が開裂するフラグメンテーションという問題が存在した。これに対して1970年代には化学イオン化法が発明され、フラグメンテーションに対して解決が試みられた。つづいて1980年代にFast Atom Bombardment (FAB)が開発されたことにより、フラグメンテーションの問題が解決され、さらに測定対象となる分子量(MW)も大きく拡大した。現在ではさまざまなイオン化法が開発され、あらゆる化合物に対応可能であり、数百 kDa にも達する巨大たんぱく質を破壊することなく質量分析することも可能となっている。特に近年では大気中で試料をイオン化させる手法の開発が盛んであり、イオン化法の選択肢はますます増加している。

質量分析の実践において、実験者はまず数あるイオン化法から試料に適切なイオン化法を選択しなくてはならない。しかし、一般的なイオン化法選択法はいまだ確立されていない。特に十分な経験のない実験者が初見で試料に適切なイオン化法を選択することは容易ではない。

また、Direct Analysis in Real Time (DART)・Electrospray Ionization (ESI)などのイオン化法では付加イオンが生成するが、何が観測されるかについては明確に示されていない。多くの場合、書籍等ではポジティブモードにおけるプロトン付加イオンの生成について解説されている。しかし実際にはプロトン以外のカチオン付加したイオンも多く観測される。このプロトン以外の付加イオンの生成については十分に説明されておらず予測が困難であり、観測すべき質量電荷比に混乱を生じさせている。また、高分解能質量分析による元素組成の決定においても本来測定対象とする分子に含まれていない元素が付与されるため、これら付加イオンの妥当性は検討されるべきものである。

このようにイオン化法の試料適応性・付加イオンの選択性は質量分析の実践において重要な課題であるが、十分な情報が存在しないのが実情である。本研究はこの問題に対し、実測データを基に具体的な情報・指針の提供を試みるものである。

2. 研究方法

本研究では研究利用への同意の下、2012年6月から2013年3月にかけて早稲田大学物性計測センターラボが提供する受託高分解能質量分析サービスに提出された試料を収集し、約600件の試料ライブラリを構築した。さらに同試料ライブラリについて構造式情報を基本とするデータベースを建造した。本研究ではこれらを retrospective approach (回顧的手法)により解析

することで、イオン化法の試料適応性および付加イオン選択性を検証し、さらに公共質量分析データベースの情報、量子化学計算を応用し考察を加えた。

イオン化法試料適応性については、DART・ESI・FABを用いて試料ライブラリを測定し試料適応性を極性-分子量による2次元チャートとして評価した。

付加イオン選択性については、メタノールを移動相としたESIについてプロトン/ナトリウム選択性、ヘリウムを用いたDARTについてプロトン/アンモニウム選択性を評価した。

3. 結果と考察

・イオン化法試料適応性

従来から極性と分子量を用いたイオン化法試料適応性チャートが多数作成されている。しかしこれらは創作であり、これまで実験結果に基づいて作成されたチャートは見つけることができなかった。本研究では構造式から簡便に分子上の窒素・酸素と窒素・酸素に直接結合する水素の表面積の総和を算出する topological Polar Surface Area (tPSA)を採用し、これを極性としてDART・ESI・FABの3イオン化法について極性-分子量によるイオン化法試料適応性チャートを作成した(Figure 1)。その結果、FABの試料検出率が最も高く98.6%、DARTとESIは僅かに低くそれぞれ96.3%、96.4%という試料検出率を示した。特にESIは低極性(tPSA < 60)かつ低分子量(MW < 400)の化合物、DARTは分子量800以上の重い化合物を不得手とする特徴を示した。これはこれまで随所で見られた創作によるイオン化法試料適応性チャートと一致する傾向である。これまでの創作と本研究で得られた結果の最も大きな相違としては、実際にはDART・ESI・FAB各イオン化法適応範囲の重なりが大きく、全体の92%に達する化合物がすべてのイオン化法で観察されたことがあげられる。このためFigure 1ではイオン化法の試料適応性は未検出(ND)となった試料により表現した。Figure 1は実測結果に基づいて作成された初めての極性-分子量2次元イオン化法試料適応性チャートである。

また、日本質量分析学会が公認する公共公開質量分析データベースであるMassBank(<http://www.massbank.jp/>)を用いた電子イオン化法・化学イオン化法・大気圧下化学イオン化法・ESIに対する同様の解析では、データベースのエントリーに大きく依存しイオン化法適応範囲の限界を表現することはできなかった。しかし、各イオン化法の実績としては十分に評価できるものであった。

・ESI付加イオン選択性

本研究の結果、メタノールを移動相としたESIにおいて有効試料数540件中83.0%においてナトリウム付加イオンが、11.1%においてプロトン付加イオンが検出され、5.9%においてはナトリウム付加イオンとプロトン付加イオンが同時に観察された。この結果からメタノールを移動相としたESIにおいて主に観察されるのはナトリウム付加イオンであり、書籍等で中心的に紹介されているプロトン付加イオンはむしろ少数であることが示された。極性としてtPSAを指標としてさらなる解析を行ったところ、ESIにおける付加イオン選択性は試料の元素組成と相関があることが導かれた。tPSA値とナトリウム付加イオン選択性には正の相関がみられ、さらにtPSAは元素組成中の酸素数と強い相関があることが示された。結論としてESIにおける付加イオン選択性は「元素組成中に酸素を含む化合物はナトリウム付加イオン、酸素を含まず窒素を含む化合物はプロトン付加イオンとして検出される」というNitrogen-Oxygen rule (NO rule)を導くことに成功した。さらに異なるサンプルセット、他のESIを用いた検証からもNO ruleは正確にESI付加イオンを予測することが可能であることが示された。本研究によりメタノールを移動相としたESIにおいてはナトリウム付加イオンが一般的であることが示され、高分解能質量分析においても観察されたプロトンないしナトリウムの付加イオンの妥当性を説明することが可能になった。

・DART付加イオン選択性

本研究の結果、有効検体数558件中、82.2%においてプロトン付加イオンが、47.0%においてアンモニウム付加イオンが検出され、その両方が検出された化合物は28.2%であった。DARTにおいては通常プロトン付加体の生成について説明されるが、アンモニウム付加体も約半数で観測され一般的な付加イオンであることが示された。付加イオン選択性と試料の元素組成に注目するとプロトン付加イオンのみが検出された試料群では窒素数1・酸素数0の化合物が最も多いのに対し、アンモニウム付加イオンのみが検出された試料群については窒素数0・酸素数3の化合物が最も多く、付加イオン選択性と元素組成中の窒素数・酸素数との相関が得られた(Figure 2)。さらにモデル化合物を用いた測定と量子化学計算による解析から、アンモニウム

付加イオンとして検出される化合物は、アンモニウム付加イオンがプロトン付加イオンに対し著しく安定であるという結果が得られた。これらの結果を受けてプロトン付加イオンあるいはアンモニア付加イオンのみが検出された試料群から窒素原子あるいは酸素原子を1つだけ含み遷移元素を含まない化合物を抽出し、アンモニウム付加・プロトン付加について量子化学計算を用いて熱化学的に解析した。その結果、元素組成中の酸素はアンモニウム付加を安定化させ、アンモニウム付加イオンとして検出される化合物は特に安定であることを見出した。

また、量子化学計算の質量分析への応用として *p*-ベンゾキノンおよびフェノールの質量分析におけるフラグメンテーションについて Nudged Elastic Band (NEB) 法によるエネルギー最小経路探索の簡便化を示した。エネルギー最小経路に含まれる遷移状態 (TS) の算出は非常に困難であり、高度な技術を要求するが、NEB 法を用いれば初期座標と終座標のみの情報から TS に極めて近い構造を簡便に得ることが示された。

以上のように本研究では、DART・ESI・FAB について極性-分子量によるイオン化法試料適応性チャートを初めて実測に基づいて作成した。

また、ESI および DART について観測された付加イオンを統計的に示し、その付加イオン選択性について元素組成中の窒素・酸素が重要であることを明らかにした。

これらの結果は質量分析実務経験を体系化したものあり、質量分析の実践においてこれまで引用可能文献がなかった部分を補完するものである。

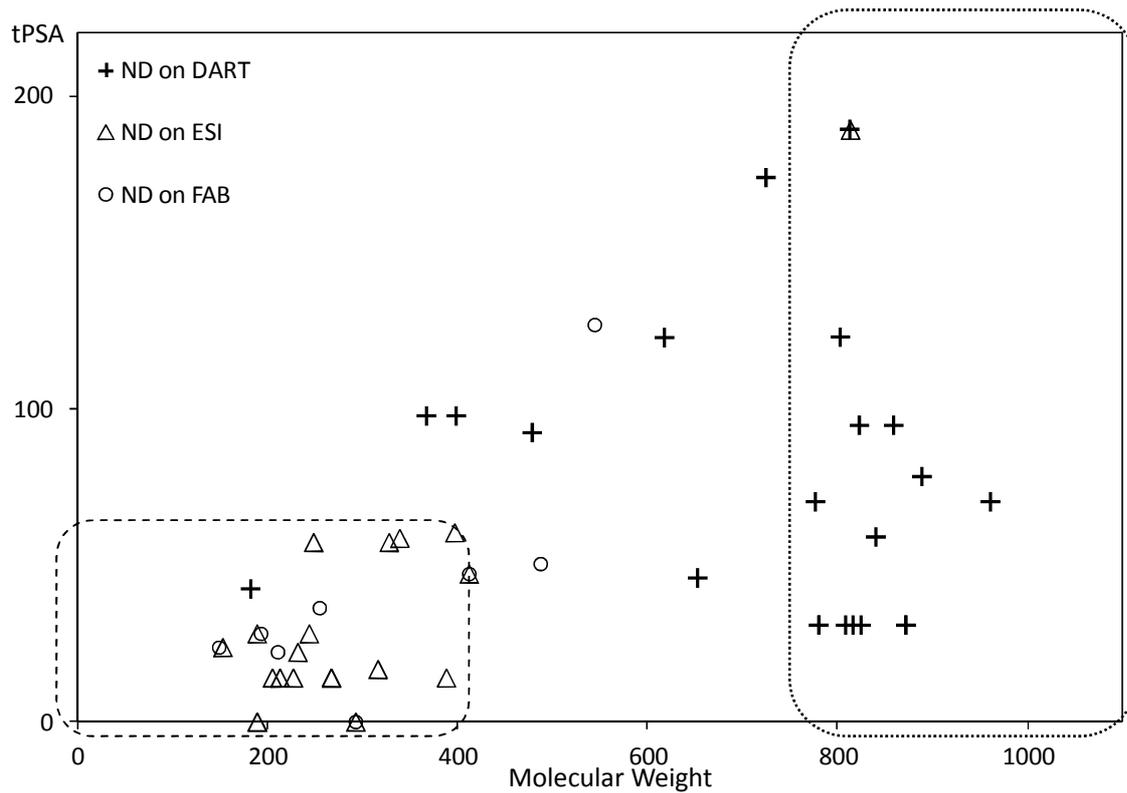


Figure 1 DART・ESI・FABの試料適応性

全体の92%に達する試料がすべてのイオン化法で観測された。そのため各イオン化法の試料適応性を未検出(ND)となった試料で示した。ESIは低極性(tPSA < 60)・低分子量(MW < 400), DARTは高分子量(MW > 800)の化合物を苦手とすることが示された。

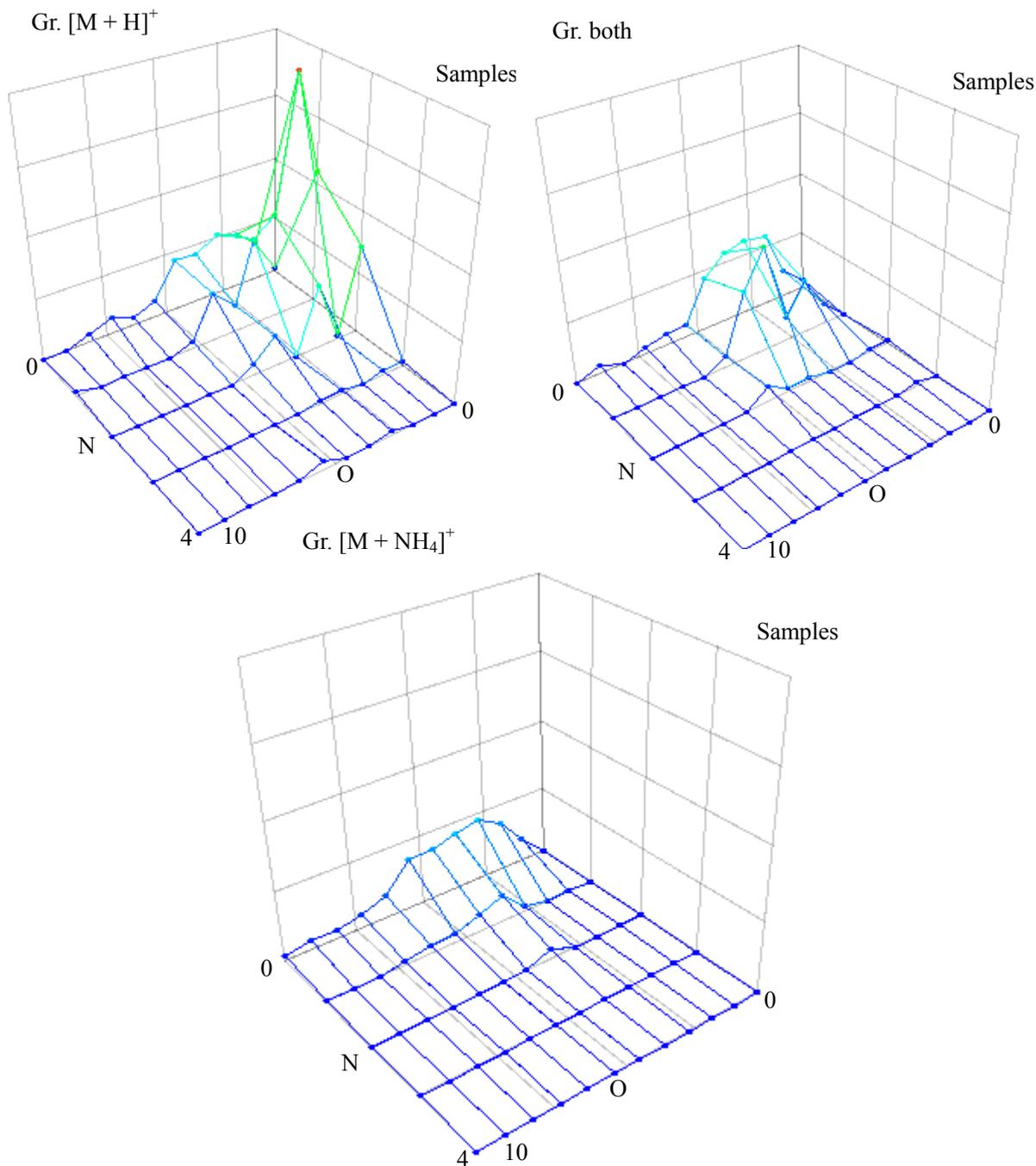


Figure 2 DARTにおいて観測された付加イオンと試料の元素組成

プロトン付加イオンのみ(Gr. $[M + H]^+$)、アンモニウム付加イオンのみ(Gr. $[M + NH_4]^+$)、その両方(Gr. both)が観測された試料群の窒素・酸素における元素組成分布. プロトン付加イオンが観測された試料群は窒素数が大きく酸素数が小さい化合物が多く、アンモニウム付加イオンのみが観測された試料群では窒素数が小さく酸素数が大きい化合物が多い.

備考

1. 要旨は4000字程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA4版 上質紙を使用すること。