

脱離エレクトロスプレーイオン化質量分析用イオン源の試作と 迅速分析への応用

Optimization of a Home-Built Desorption Electrospray Ionization Source and Its Application in Rapid Analysis

芳本有史¹・元木翔一¹・森脇悠介¹・川崎英也¹・荒川隆一^{1,2*}
 Arifumi YOSHIMOTO,¹ Shoichi MOTOKI,¹ Yusuke MORIWAKI,¹
 Hideya KAWASAKI,¹ and Ryuichi ARAKAWA^{1,2*}

¹ 関西大学化学生命工学部化学・物質工学科 Department of Chemistry and Materials Engineering,
Kansai University, Suita, OSAKA, JAPAN

² 関西大学産学連携研究推進事業 Research Center for Business Academia Collaboration, Kansai
University, Suita, OSAKA, JAPAN

High-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) is the most useful tool for qualitative and quantitative chemical analysis in the life sciences. However, sample preparation and LC separation demand an extraordinary amount of time and effort. Desorption electrospray ionization (DESI) and direct analysis in real time (DART) techniques that obtain mass spectra of samples without difficulty have been developed in recent years. We connected a home-built DESI ion source to an existing mass spectrometer and examined its performance. In this paper, we report the application of DESI to thin-layer chromatography (TLC)/DESI-MS in rapid analysis of medicines in serum and concentrated analysis with a solid-phase extraction disk.

(Received December 22, 2008; Accepted January 29, 2009)

1. 序論

液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography/mass spectrometry; LC/MS) は医薬、薬学、臨床化学などの生命科学における定性・定量分析の最も有用なツールである。LC/MS で主に使用されているエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization; ESI)¹⁾ や大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization; APCI)²⁾ は分析前に試料を適当な溶媒に溶解させて、不純物の除去、濃縮操作などの前処理法が必要であるために簡便性に難点がある。最近、これらの問題を解決する手法として、大気圧下で簡単に試料の質量スペクトルが得られる新しいイオン化法、direct analysis in real time (DART) 法^{3)~5)} や脱離エレクトロスプレーイオン化法 (desorption electrospray ionization; DESI)^{6)~8)} が開発された。DART は、窒素ガスなどを放電させて活性な励起

化学種を生成させ、それを高温ガスとともに測定対象物に吹きかけてイオン化する方法である。DESI は Cooks らによって 2004 年に初めて報告された⁶⁾。DESI は、大気圧下において ESI で生成したプロトン付加溶媒を試料の表面にスプレーすることにより、試料を脱離イオン化する方法である。すなわち、スプレー溶媒で試料分子を溶解して、プロトン移動により試料分子をイオン化する。ESI のように固体試料を溶媒に溶解させる必要がないので、試料の前処理を最低限に抑えることができる。

さらに、DESI の ESI スプレー部はプロトン付加のためのプロトン源の装置としてとらえることができるので、多様な応用が考えられる。たとえば、Shiea のグループが開発したエレクトロスプレー支援レーザー脱離イオン化法 (electrospray-assisted laser desorption ionization; ELDI)^{9), 10)} は、通常のマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) と DESI を結合したイオン化法である。MALDI 法においては、目的イオン以外に多量の中性分子が脱離するので、この中性分子に大気圧下で ESI スプレー溶媒を照射してイオン化することにより感度の向上を図るものである。また、Van Berkel らは、薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography; TLC) と質量分析法を組み合わせ

* Correspondence to: Ryuichi ARAKAWA, Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, JAPAN, e-mail: arak@ipcku.kansai-u.ac.jp
 荒川隆一, 関西大学化学生命工学部化学・物質工学科,
 〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35

た TLC/DESI-MS を開発し, aspirin, acetaminophen や caffeine の測定を行い, TLC/DESI-MS の有用性を示した¹¹⁾. DESI-MS は簡便に試料の測定を行うことが可能で, 医薬品や環境汚染物質, 違法ドラッグなどのさまざまな分析に利用されている^{12)~15)}. また, 質量分析によるイメージングの応用への試みもなされている¹⁶⁾.

本報では, まず DESI イオン源を試作して, 既存の質量分析装置と連結しその性能を調べた. DESI のイオン化効率は, 試料の形状や試料プレートの材質によって大きく変化する. 今回, 試料の形状はほぼ一定である. 試料プレートの材質を変えたときに, 試料と ESI スプレー部の空間配置, スプレー溶媒と窒素ガスの流速の影響など DESI の最適条件を決定したので, 読者が DESI イオン源を作製するときの参考になれば幸いである. また, DESI の応用として, TLC/DESI-MS を用いた簡便な分析法, 血清中の薬物成分の前処理を省いた直接検出法および固相抽出ディスクを用いた濃縮分析法について報告する.

2. 実験

2.1 試料

ローダミン 6G は東京化成工業(東京, 日本)から, アンギオテンシン I, テストステロン, ベラパミル塩酸塩, プロプラノロール塩酸塩, イミプラミン塩酸塩, クレアチニン, メタノール (high-performance liquid chromatography; HPLC 用), アセトニトリル (HPLC 用), ギ酸 (試薬特

級), 酢酸エチル (有機合成用), TLC プレート (シリカゲル 70F254 プレート) は和光純薬工業(大阪, 日本)から, perfluorooctane sulfonate (PFOS) カリウム塩はジョンソン・マッセイ・ジャパン(東京, 日本)から, ヒト血清はコスマバイオ(東京, 日本)から購入した. polytetrafluoroethylene (PTFE) プレート (厚さ: 1.0 mm) はアズワン(大阪, 日本)から, 固相抽出ディスク (ENVITM-18DSK 47 mm) はシグマアルドリッヂャパン(東京, 日本)から購入した. 超純水は蒸留水製造装置 (RFD250NB, ADVANTEC, 東京, 日本) で精製した.

2.2 装置

Fig. 1 は, 試作した DESI イオン源を四重極質量分析計 (TSQ 7000, ThermoFisher Scientific, カリフォルニア, 米国) に取り付けた DESI-MS の模式図である. スウェジロック 1/16 ユニオン・ティーを用いて, ESI スプレー用の二重管を作製した(拡大図). DESI のスプレー溶液は, 二重管の内側シリカキャピラリー (内径 50 μm , 外径 150 μm) 中を流れ, 外側のシリカキャピラリー (内径 250 μm , 外径 350 μm) には, ネブライザ窒素ガスが流れる. 内側のシリカキャピラリー先端は外側のキャピラリーより 0.5~1.0 mm ほど飛び出している.

帶電溶媒が噴霧される針先と試料プレートとの位置関係をそれぞれ距離 d_1 , d_2 , 角度 α で表す (Fig. 1). DESI は, 大気圧下でエレクトロスプレーした溶媒を固体表面上の試料に衝突させることで試料をイオン化する. 長さ 200 mm

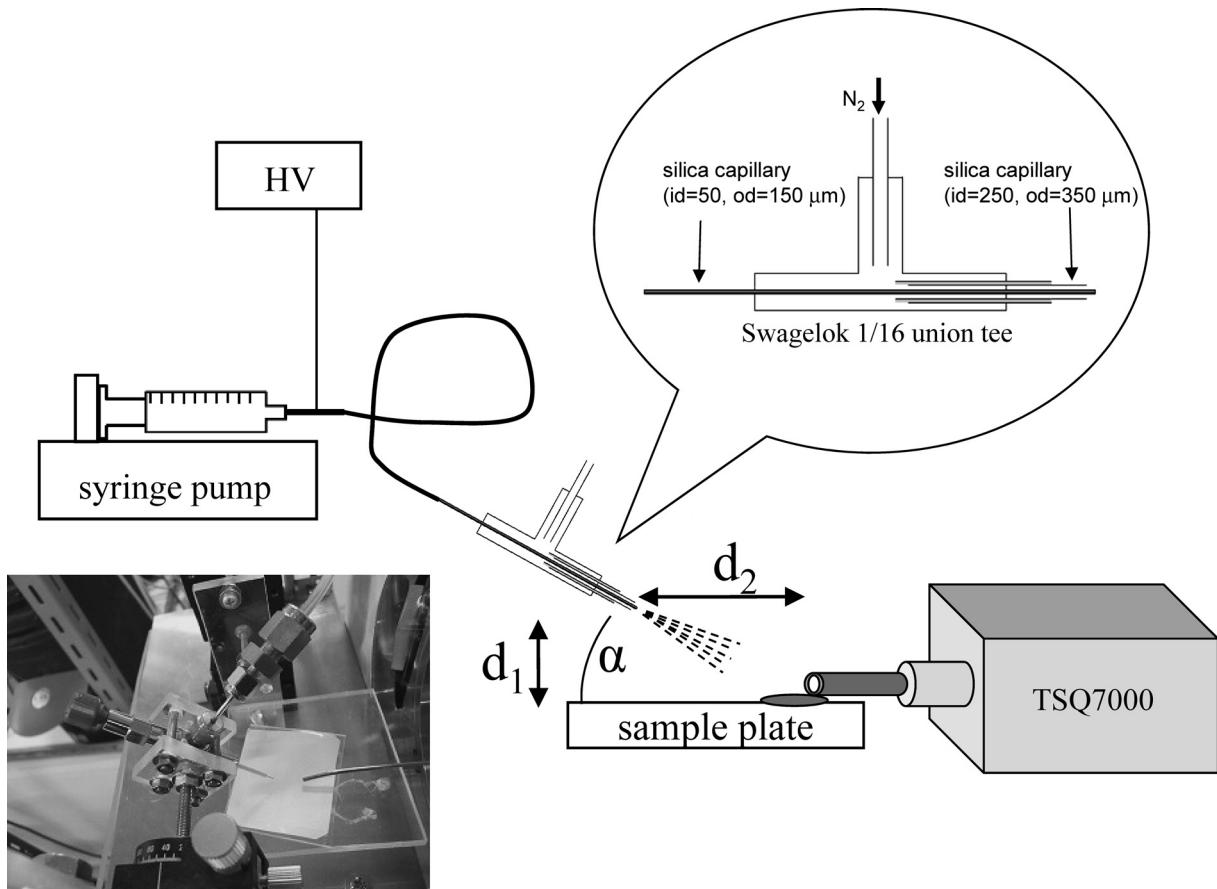


Fig. 1. Scheme of a DESI ion source and its parameters α , d_1 , and d_2 .

の 1/16 ステンレスパイプを通して、生成したイオンを質量分析計に導入した。

シリソジの針にエレクトロスプレーのための高電圧 (high-voltage; HV) を印加した。ESI スプレーの位置パラメーター d_1, d_2, α は測定しながら変化させることができる。試料プレートも同様に 1/16 導入パイプに対して平面 2 次元的に移動できるようになっている。

2.3 TLC/DESI-MS

薬物成分であるベラパミル、プロプラノロールおよびイミプラミンそれぞれの塩酸塩の等モル混合溶液を試料溶液とした。酢酸エチル/メタノール/ギ酸/水 (=40/20/6/3) を展開溶媒として、シリカゲル TLC プレートでその試料溶液を展開した。その TLC 展開プレートを TLC の原点から溶媒フロントまで 1/16 導入パイプに対して直角方向に 8 mm/min の速度で移動させながら、SIM (selected ion monitoring) モード (m/z 281, 455, 260 をモニター) で DESI-MS を行った。

2.4 血清中の薬物成分の直接分析

上記 3 種類の薬物成分の等モル塩酸塩をヒト血清中に添加したものを血清試料、等モル塩酸塩を水に溶かしたものを標準試料とする。標準試料は PTFE プレートと TLC プレートの上に塗布し、血清試料は TLC プレートの上に塗布し乾燥させたのち DESI-MS の測定を行った。血清試料は、タンパク除去などの前処理を行わず TLC プレート上にそのまま塗布し測定を行った。また、同様の実験を代謝産物であるクレアチニンに対しても行った。

2.5 固相抽出ディスクを用いた濃縮分析

濃縮の程度が目視でも確認できるように、モデル化合物として色素化合物のローダミン 6G を用いた。メタノールを用いて固相抽出ディスクのコンディショニングを行ったのち、水で希釈したローダミン 6G を流しディスクに保持させた。そして、ローダミン 6G が吸着しているそのディスクを試料プレートとして、直接 DESI-MS の測定を行った。同様に、環境化学物質である有機フッ素化合物 PFOS についても実験を行った。

3. 結果および考察

3.1 DESI 装置の最適化

DESI の装置パラメーターとして、窒素ガスの流速、使用するスプレー溶媒とその流速、スプレー溶媒に印加する

高電圧などがある。これらは DESI のイオン化効率に強く影響を及ぼすため、ローダミン 6G を用いてその最適化を図った。イオン強度は、試料プレートを動かさず 12 秒間、積算したものを 1 回の測定とした。測定回数は、各項目につき 4 回行い、その平均値を比較した。DESI の装置パラメーターは Table 1 に示した。ジオメトリーのパラメーター α, d_1, d_2 (Fig. 1) は、試料プレートによって異なる。

(a) スプレー溶媒の流速と窒素ガスの流速の影響

PTFE プレートを用いて、スプレー溶媒はメタノール、スプレーの高電圧は +4 kV に固定し、窒素ガスの流速を 350~1,250 mL/min の範囲で、スプレー溶媒の流速を 0.5~5.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の範囲で変化させてイオン強度の最適化を検討した。Fig. 2a は、窒素の流速が 800 mL/min のとき、スプレーするメタノールの流速とイオン強度の関係を示す。Fig. 2b は、スプレー流速が 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ のとき、窒素ガスの流速とイオン強度の関係を示す。PTFE プレートの場合は、窒素ガスの流速 800 mL/min とスプレーの流速 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の組み合わせが DESI イオン化の最適条件であった。

(b) スプレー電圧と溶媒の種類

Fig. 2c は、PTFE プレートを用いて、スプレー溶媒にメタノールを用い、スプレー電圧とローダミン 6G のイオン強度の関係を調べたものである。スプレー電圧を印加しなくてもイオン強度がゼロにならないのは、ソニックスプレーの機構によって¹⁷⁾、帯電微小液滴が生成するからであると考えられる。その理由は、クレアチニンの場合もスプレー電圧を印加しなくともローダミン 6G と同様に、クレアチニン由来の $[\text{M}+\text{H}]^+$ を検出することができたからである。スプレー電圧が 6 kV のとき、ローダミン 6G のイオン強度が最も大きかったが、放電を避けるために 4 kV を採用した。

Fig. 2d は、スプレー電圧が 4 kV でのスプレー溶媒の効果を調べたものである。その結果、有機溶媒: 水 = 1:1 の混合溶媒より有機溶媒のみを用いたほうがイオン強度が強いことがわかった。なお、アセトニトリルのみを用いたとき、ローダミン 6G の検出限界は 50 fmol (0.05 μM の溶液を 1 μL 滴下、S/N=3) である。

(c) スプレー溶媒の pH の効果

PTFE プレートを用いて、スプレー溶媒はメタノール、試料は男性ホルモンの一種であるテストステロンを用い

Table 1. Optimal Parameters in the DESI Operation

Parameter		Optimal setting	
Sample plate	PTFE	TLC plate	Solid phase extraction disk
Electrospray voltage	4 kV	4 kV	4 kV
Electrospray solvent	Acetonitrile	Acetonitrile	Methanol
Electrospray flow rate	2 $\mu\text{L}/\text{min}$	10 $\mu\text{L}/\text{min}$	10 $\mu\text{L}/\text{min}$
Nebulizing gas flow rate	800 mL/min	1,100 mL/min	1,250 mL/min
Heated capillary temperature	250°C	250°C	250°C
Tip-to-sample distance (d_1 in Fig. 1)	1.5 mm	0.4 mm	1.2 mm
Capillary inlet-to-tip distance (d_2)	3.5 mm	2.5 mm	5.5 mm
Incident angle (α)	50°	50°	46°

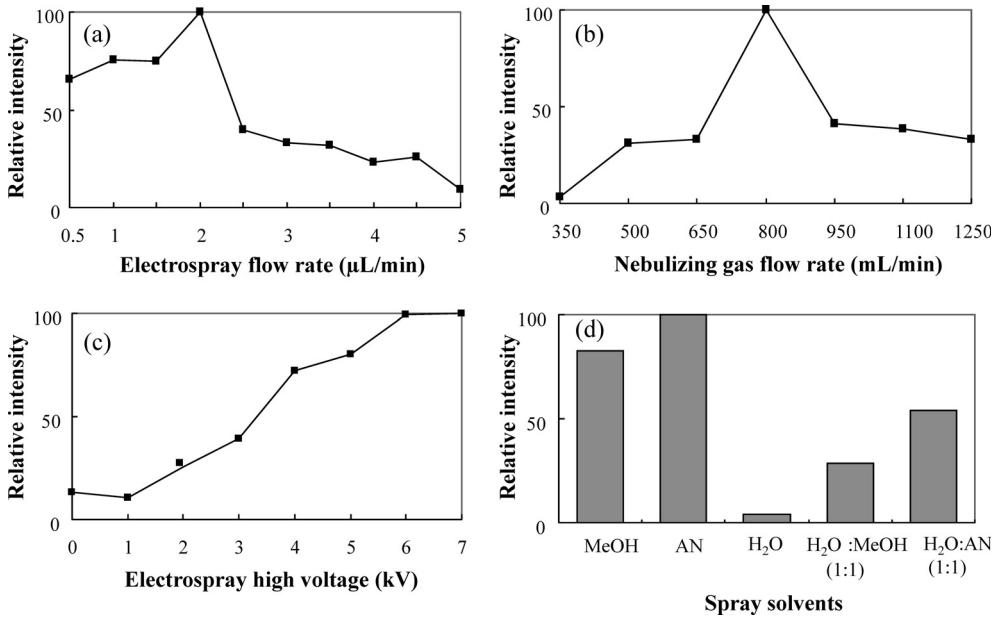


Fig. 2. Ion intensities *vs.* (a) electrospray flow rate, (b) nebulizing gas flow rate, (c) electrospray high voltage, and (d) types of spray solvents.

て、pHの効果を調べた。メタノールのみでは DESI-MS によって、テストステロンのイオンを検出することができなかった。その理由は、テストステロンはプロトン親和性が小さいからと思われる。そこで、メタノールにギ酸を 0.1~2.0% 添加すると、ギ酸の濃度が高いほどテストステロンのプロトン付加分子のイオン強度が増加した。したがって、プロトン親和性の低い試料に対しては、ESI と同様に酸を添加する必要がある。

(d) 試料プレートの材質

試料をのせるプレートの材質がイオン化効率に及ぼす影響を調べた。ローダミン 6G は非常にイオン化されやすいので、イオン化効率の差異が観測できなかった。そこで、試料にはペプチドであるアンギオテンシン I を用いた。プレートには絶縁体である PTFE, ガラス, polymethyl methacrylate (PMMA), TLC, そして電気伝導性のシリコンウェハー, ステンレスを用いた。

PTFE, ガラス, PMMA のプレートを用いたとき, m/z 1,296 に一価のプロトン付加分子, m/z 649 に二価のプロトン付加分子を検出し、その中で PTFE を用いたときが最もイオン強度が強かった。PTFE は疎水性が強いので、アンギオテンシン I 水溶液を 1 μL 滴下・乾燥したときの面積が約 3 mm^2 と最小であった。そのために、PTFE のイオン強度が最も大きかったと思われる。電気伝導性のシリコンウェハーとステンレスを用いたときは、試料イオンを検出することができなかった。その理由は、スプレーで生成した帯電微小液滴が電気伝導性のプレートに衝突することで中性化するためであると考えられる。したがって、DESI-MS には絶縁体のプレートが良いことがわかった。

TLC プレートを用いたとき、PTFE の最適条件ではアンギオテンシン I のイオン強度は弱く、良好なスペクトルは得られなかった。そこでスプレー流速を PTFE の最適

条件である 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ から 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ に増加させると、イオン強度が著しく強くなった。その理由は、TLC プレートは PTFE プレートに比べてスプレー溶媒に対するぬれ性が小さいので、溶媒がプレート上に蓄積しないためと考えられる。また流速以外の最適条件も PTFE プレートの場合と異なっていた。Cooks ら⁷⁾は、プレートの材質と試料によって DESI 装置の最適条件が変化するので、測定ごとに最適化を行う必要があると報告している。しかし、今回使用した試料においては、DESI の最適化を行う必要はなかった。Table 1 に使用した試料プレートの最適条件を示す。

3.2 TLC/DESI-MS

3 種類の薬物の標準試料 (12 pmol) を分離した TLC プレートに UV (ultraviolet) ランプを照射すると、分離した三つのスポットを目視することができたので、そのスポットの中心部を直接 DESI-MS に供した。その結果、それぞれの薬物成分のプロトンおよびナトリウムイオン付加分子 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$) が検出できた。また、薬物量を 1 pmol に減らすと、UV ランプ照射による目視ではイミプラミンのスポットしか確認できなかった。そこで、TLC サンプルのプレートを 8 mm/min の速度で動かし、原点から溶媒フロントまで SIM モードで DESI-MS の測定を行った。Fig. 3 のクロマトグラムの横軸は、スタートからの時間を表し、TLC の展開距離に相当する。Fig. 3a~c は、クロマトピーク位置でのマススペクトルで、それぞれの薬物成分のプロトン付加分子を観測している。その結果、目視では確認できないスポットの薬物量 (1 pmol) でも十分に検出することができるので、簡便な TLC の検出器として利用できることがわかる。

3.3 血清中の薬物成分の直接分析

Fig. 4 は、TLC と PTFE プレートを用いたときの標準

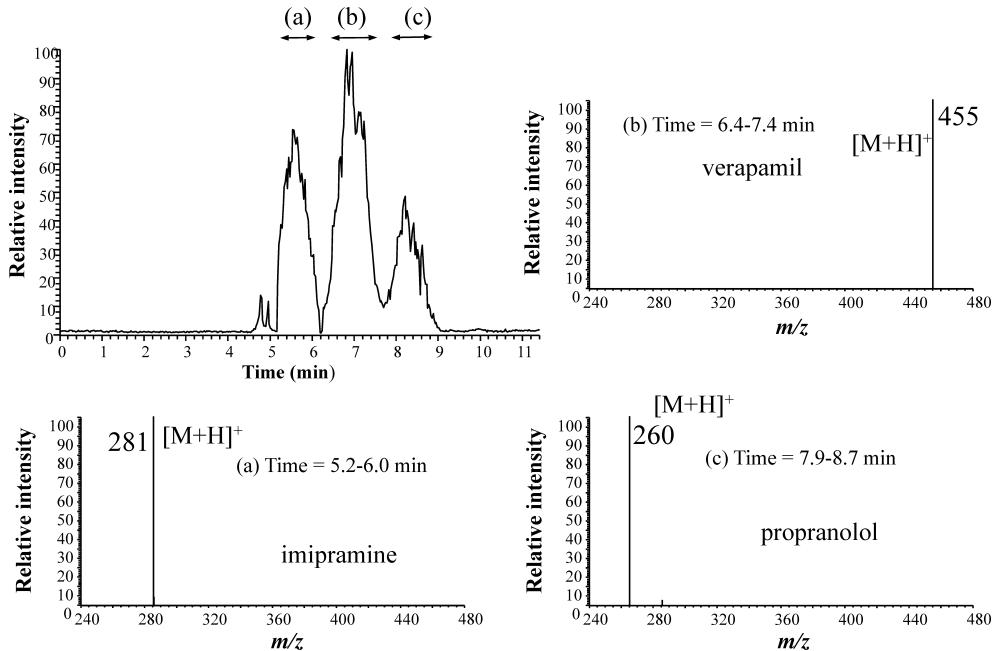


Fig. 3. SIM chromatogram and mass spectra of the developed TLC plate.

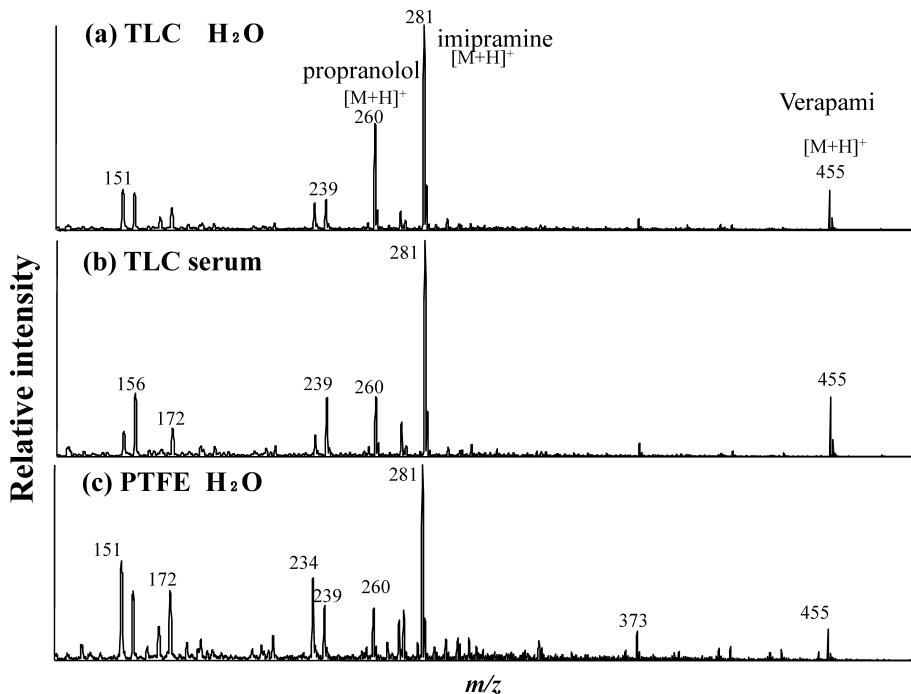


Fig. 4. DESI-MS spectra of the sample mixture of propranolol, imipramine, and verapamil obtained using TLC plates (a) in water and (b) in serum without preparation; and using a PTFE plate (c) in water.

試料 (1 mM) と TLC プレートを用いたときの血清試料の DESI-マススペクトルである。血清試料は、PTFE プレート上で乾燥・凝固し PTFE に吸着しないので、DESI で用いる窒素ガスにより血清試料が飛散するために測定が困難であった。標準試料において PTFE プレートより TLC プレートのほうが各薬物成分のイオン強度は強かった。また、血清試料と標準試料を比較すると、イオン強度の違いはあまり見られなかった。すなわち、TLC プレートを用いると、タンパク質除去などの前処理を行わずに血清中の薬

物を DESI-MS で検出することが可能であり、今回における血清中の薬物成分の検出限界は、イミプラミン塩酸塩について約 5 pmol ($10 \mu\text{M}$ の溶液を $0.5 \mu\text{L}$ 滴下, $S/N=3$) であった。また、血清中のクレアチニン (1 mM) について、同様に DESI-MS を行った結果、クレアチニン由来の $[\text{M}+\text{H}]^+$ を検出することが可能であった (Fig. 5)。

3.4 固相抽出ディスクを用いた濃縮分析

ローダミン 6G を ESI-MS や DESI-MS では検出することが困難であった濃度 (500 pM) に調製し、この水溶液

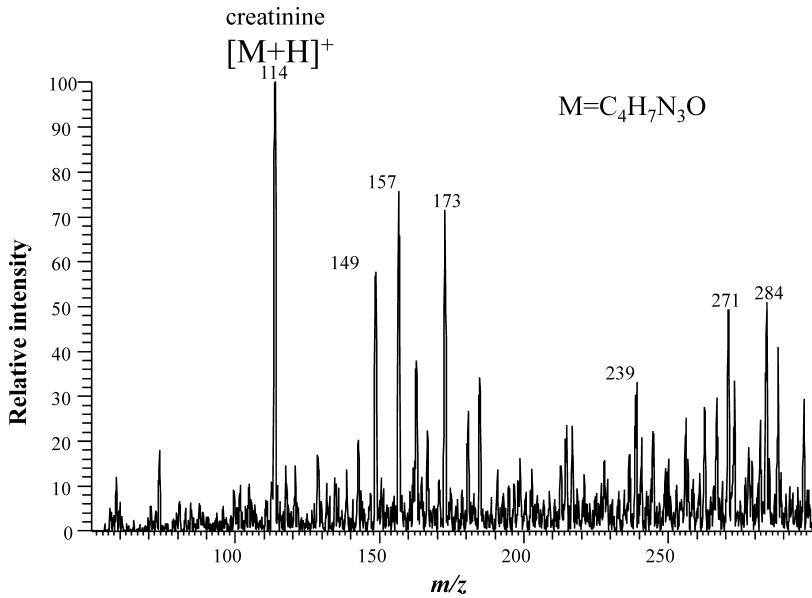


Fig. 5. DESI-MS spectrum of creatinine in serum without preparation obtained using TLC plates.

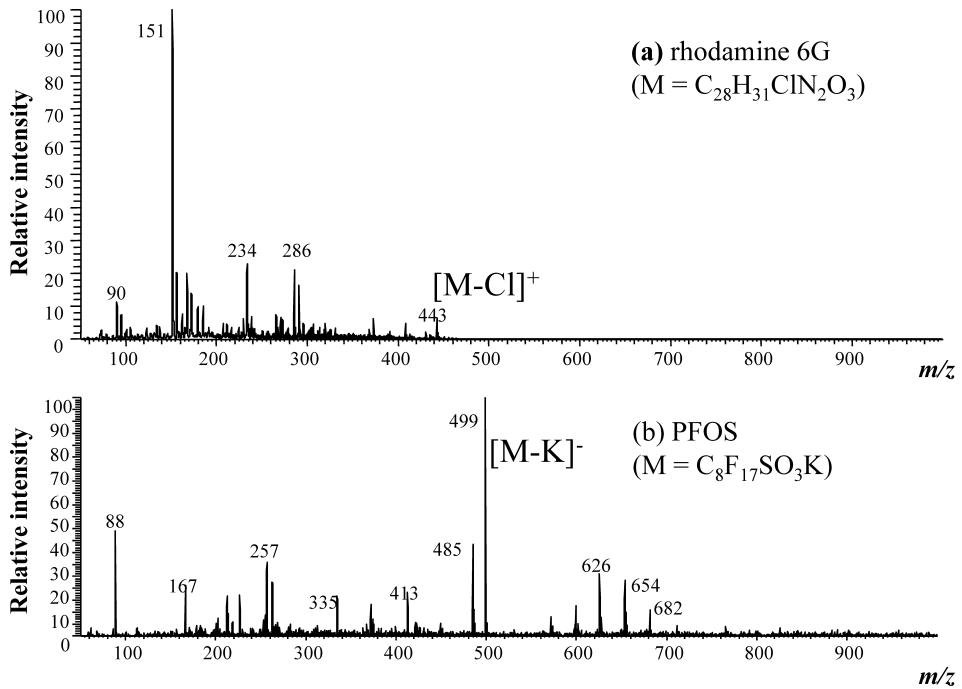


Fig. 6. Direct DESI-MS spectra of (a) rhodamine 6G, (b) PFOS trapped in a solid-phase extraction disk.

500 mL を面積 8.5 cm² の固相抽出ディスクに通液し空気乾燥したのち、その固相抽出ディスクを直接 DESI-MSを行った。その結果、ローダミン 6G (29 pmol/cm²) を検出することができた (Fig. 6a)。さらに PFOS カリウム塩を検出不可能であった濃度 (1 nM) に調整し、その水溶液 500 mL を用いて負イオンモードで DESI-MSを行った結果、PFOS (58 pmol/cm²) を検出することが可能であった (Fig. 6b)。このような迅速・簡便な濃縮手法が DESI-MS に適用できることがわかった。

4. 結 論

PTFE プレートを用いて DESI イオン化の各種測定パラメーターの最適化を行った。プレートの材質によってその最適条件が大きく異なり、絶縁体である PTFE と TLC のプレートが良い性能を示した。今回の試料では、試料による DESI 装置の最適化の必要はなかった。

3種類の薬物を含む標準試料 (各 1 pmol) の TLC/DESI-マススペクトルから、それぞれのイオンを同定することができた。目視で確認することが困難な試料に対して、DESI-MS は TLC の有効な検出法であることがわかった。

た。また、TLC プレートを用いたとき、血清中の薬物成分を前処理なしに直接 DESI-MS で分析することができ、そのときの検出限界は 5 pmol であった。これは、LC/ESI-MS による検出限界 (100 fmol) に比べて約 50 倍大きい。しかし、この方法はわずらわしい前処理や LC 分離に要する時間を必要としないので、臨床分析の有用な手法になりうるだろう。固相抽出ディスクは 100 mL/min の送液が可能であるので、迅速な濃縮と夾雑物の除去が可能である。固相抽出ディスクの直接 DESI-MS は、環境分析への応用が期待できる。

謝 辞 本研究は、基盤研究 (B) (19350045) の援助を受けて一部実施しました。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.*, **9**, 37 (1990).
- 2) R. Erwin, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 841 (2003).
- 3) R. B. Cody, J. A. Laramee, and H. D. Durst, *Anal. Chem.*, **77**, 2297 (2005).
- 4) C. Petucci, J. Diffendal, D. Kaufman, B. Mekonnen, G. Terefenko, and B. Musselman, *Anal. Chem.*, **79**, 5064 (2007).
- 5) G. Morlock and Y. Ueda, *J. Chromatogr. A*, **1143**, 243 (2007).
- 6) Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, and R. G. Cooks, *Science*, **306**, 471 (2004).
- 7) Z. Takats, J. M. Wiseman, and R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.*, **40**, 1261 (2005).
- 8) H. Chen, N. N. Talaty, Z. Takats, and R. G. Cooks, *Anal. Chem.*, **77**, 6915 (2005).
- 9) J. Shiea, M. Huang, H. Hsu, C. Lee, C. Yuan, I. Beech, and J. Sunner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 3701 (2005).
- 10) S. Lin, M. Huang, H. Chang, and J. Shiea, *Anal. Chem.*, **79**, 8789 (2007).
- 11) G. J. Van Berkel, M. J. Ford, and M. A. Deibel, *Anal. Chem.*, **77**, 1207 (2005).
- 12) J. M. Wells, M. J. Roth, A. D. Keil, J. W. Grossenbacher, D. R. Justes, G. E. Patterson, and D. J. Barket, Jr., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**, 1419 (2008).
- 13) L. Nyadong, S. Late, M. D. Green, V. R. De Jesus, P. N. Newton, and F. M. Fernández, *Anal. Chem.*, **79**, 2150 (2007).
- 14) L. Nyadong, S. Late, M. D. Green, A. Banga, and F. M. Fernández, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**, 380 (2008).
- 15) G. Huang, H. Chen, X. Zhang, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, *Anal. Chem.*, **79**, 8327 (2007).
- 16) D. R. Ifa, J. M. Wiseman, Q. Song, and R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.*, **259**, 8 (2007).
- 17) Z. Takats, S. C. Nanita, R. G. Cooks, G. Schlosser, and K. Vekey, *Anal. Chem.*, **75**, 1514 (2003).

Keywords: DESI, TLC, Solid-phase extraction disk, Serum sample