

ポリエチレングリコールの DIOS マススペクトルにおける カチオン化剤の影響

Effects of Cationizing Agents on DIOS Mass Spectra of Poly(ethylene glycol)s

奥野昌二¹, 福尾剛志², 荒川隆一^{2*}

Shoji OKUNO¹, Tsuyoshi FUKUO², and Ryuichi ARAKAWA^{2*}

¹ 科学技術振興機構和田プロジェクト Wada Project Laboratory, Japan Science and Technology Agency, Izumi, JAPAN

² 関西大学工学部応用化学科 Department of Applied Chemistry, Kansai University, Suita, JAPAN

Desorption/ionization on silicon (DIOS)-mass spectrometry of poly(ethylene glycol)s (PEG) were investigated using binary mixtures of NaI and other alkali metal iodides (LiI, KI, RbI, and CsI). A linear correlation was found between the relative ion intensities and the concentration ratios of the alkali metal ions. The smaller size metal ion adducts of PEG molecules were observed more intensively in the spectra. These results suggest that the interaction between PEG molecules and cationizing agents is important for the cationization of PEG molecules in DIOS.

(Received June 29, 2005; Accepted August 1, 2005)

1. 序 論

合成高分子の構造解析のためには、主として核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance; NMR) や赤外分光法 (infrared spectrometry; IR) が用いられてきた。IR や NMR では、合成高分子の全体の平均的な構造情報は得やすいが、繰返し単位の数や末端基が異なり複雑に存在する一つの成分を詳細に解析することはできない。しかしながら、合成高分子の物性をより高度に理解するには、IR や NMR で得られないこれらの構造情報についても知る必要がある。質量分析 (mass spectrometry; MS) では、試料分子をイオン化し、質量電荷比 (m/z) を測定することにより、個々の成分の構造情報を得ることが可能となる。

最近、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) 法^{1), 2)} やマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) 法^{3), 4)} が開発され、従来のイオン化法では測定できなかった不安定な物質や高分子量の物質の質量分析が可能となった。合成高分子についても、これらのイオン化法

を用いた多くの報告がある^{5)~8)}。MALDI 法は、ESI 法と比べて測定可能な m/z の範囲が広い、夾雑物の影響が少ない、ハイスループット分析に適しているという特長がある。さらに、MALDI 法では主として一価イオンとして検出されるのに対して、ESI 法では多価イオンとして検出されやすくスペクトルが複雑になる。したがって、分子量分布が広い合成高分子の場合、MALDI 法の方が有利である。

MALDI 法では、溶媒の選択、マトリックスの選択、マトリックスと試料の混合比などの試料調製の条件がマススペクトルに大きく影響する。ペプチドやタンパク質など生体高分子の測定ではプロトン化分子として検出されやすいのに対して、合成高分子の測定では金属イオン付加体として検出されやすい場合が多く、カチオン化剤の選択が重要である^{9)~13)}。Rashidzadeh らは、LiCl と CsCl の等モル混合物をカチオン化剤に用いて、poly(ethylene glycol) (PEG) の MALDI-MS を行い、Li 付加と Cs 付加の試料イオンの相対強度がマトリックスの種類に依存することを報告した¹²⁾。また、Kéki らは、Na イオンと他のアルカリ金属イオンの濃度比が異なる混合物をカチオン化剤に用いて、PEG の MALDI-MS を行った¹³⁾。Na イオン付加体と他の金属イオン付加体の相対強度は、試料調製の際に混合した金属イオンのモル比と直線関係が見られ、直線の傾きにより各金属イオンの付加のしやすさを評価した。

DIOS (desorption/ionization on silicon) では、マト

* Correspondence to: Ryuichi ARAKAWA, Department of Applied Chemistry, Kansai University, 3-3-35 Yamatecho, Suita, Osaka 564-8680, JAPAN, e-mail: arak@ipcku.kansai-u.ac.jp
荒川隆一, 関西大学工学部応用化学科, 〒564-8680 吹田市山手町 3-3-35

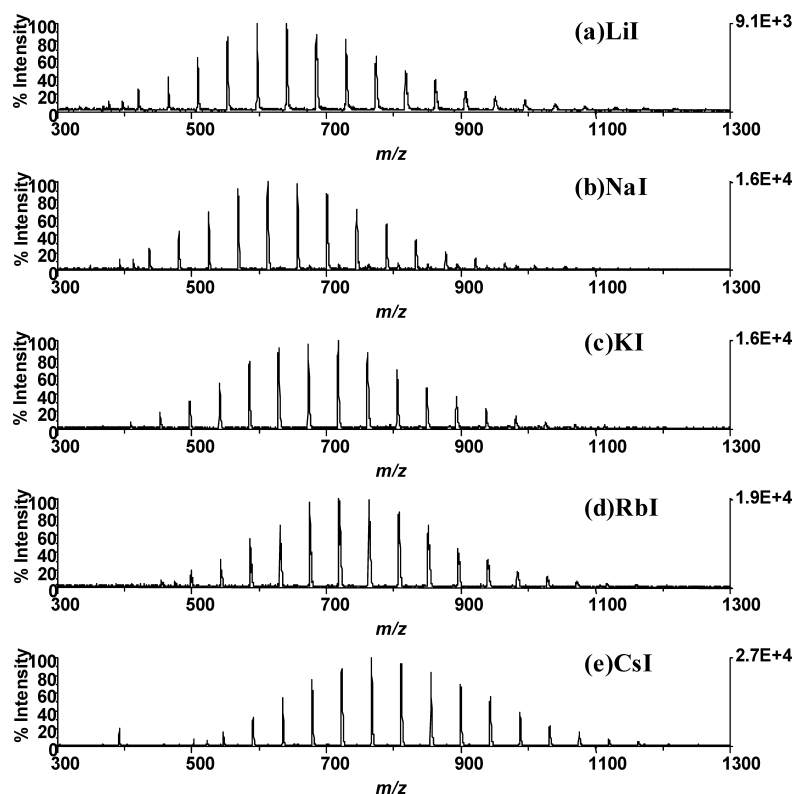


Fig. 1. DIOS mass spectra of PEG600, (a) cationizing agent LiI, (b) NaI, (c) KI, (d) RbI, and (e) CsI.

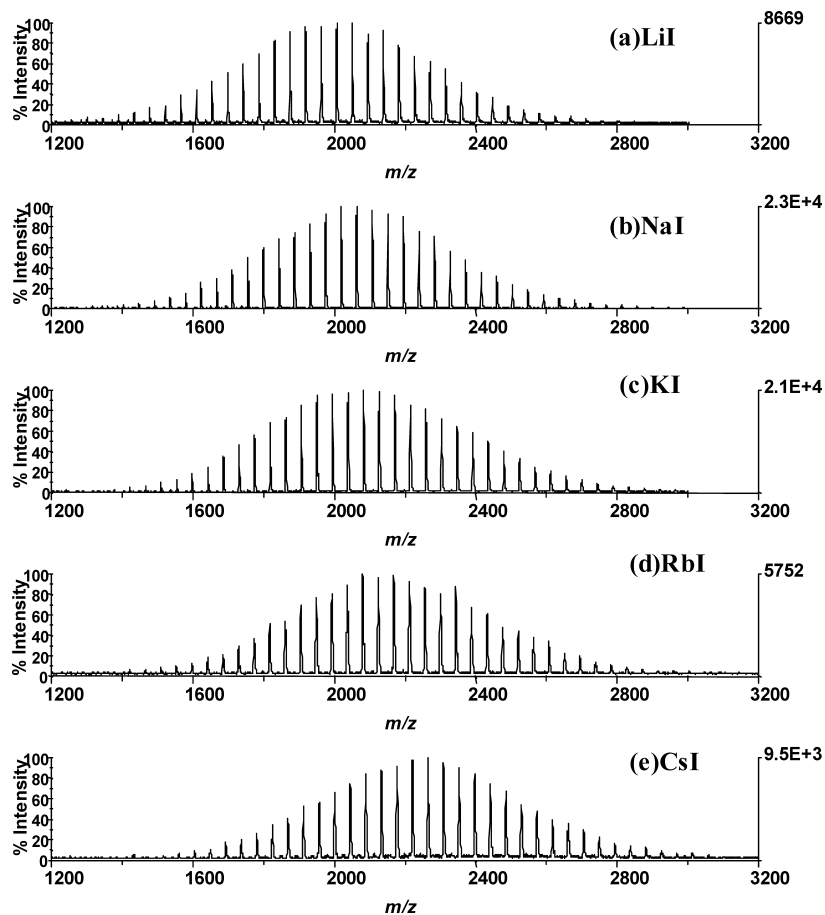


Fig. 2. DIOS mass spectra of PEG2000, (a) cationizing agent LiI, (b) NaI, (c) KI, (d) RbI, and (e) CsI.

リックス分子を用いることなく試料のソフトイオン化が可能であり¹⁴⁾、これまで、有機化合物、ペプチド、合成高分子のマススペクトルが報告されている^{14)~20)}。DIOS-MSでは、イオン化において、マトリックスの影響がなく、試料分子と金属イオンの関係が重要である。本研究では、異なる2種類のアルカリ金属イオンの混合物をカチオン化剤として用い、PEGのDIOS-MSにおけるカチオン化剤の影響について調べた。

2. 実験

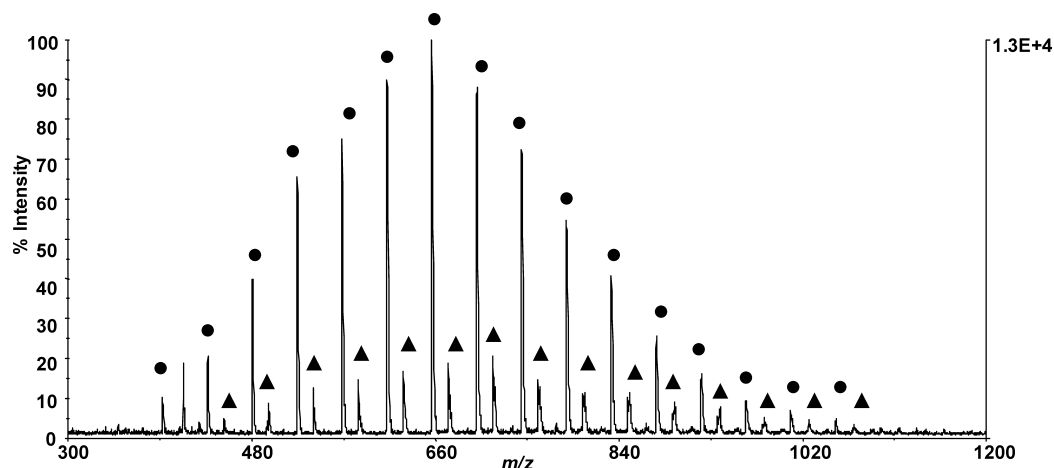
2.1 試薬

メタノール、ヨウ化リチウム (LiI)、ヨウ化ナトリウム (NaI)、ヨウ化カリウム (KI)、ヨウ化セシウム (CsI)、ポリエチレングリコール (PEG)、インシュリン (ヒト) は、Wako Pure Chemicals 社 (Osaka, Japan) から購入した。 α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (CHCA) は Aldrich 社 (Milwaukee, WI, USA)、ヨウ化ルビジウム (RbI) は Alfa

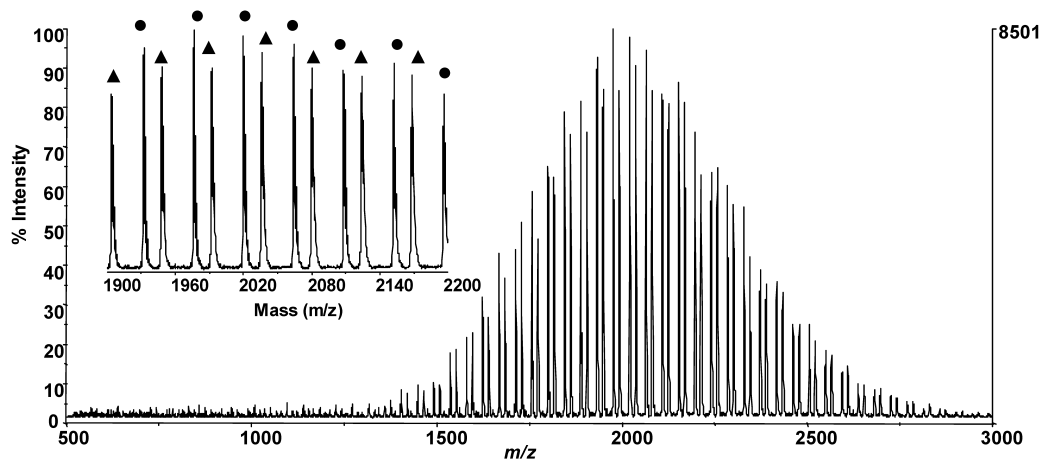
Aesar Research Chemicals 社 (Karlsruhe, Germany)、アンギオテンシン I は Bachem AG 社 (Bubendorf, Switzerland) のものを用いた。

2.2 質量分析

溶媒にメタノールを用い、NaI と他のアルカリ金属ヨウ化物塩 (LiI, KI, RbI, CsI) を合計の濃度が 5×10^{-2} M になるように混合比を変えて調製した。この金属イオン溶液を用いて、PEG600 および PEG2000 をそれぞれ 0.33 mg/mL, 1 mg/mL 溶解した。カチオン化剤は試料に対して約 100 倍モル存在し、試料分子に対してカチオン化剤が大過剰に存在する。試料溶液 $0.4 \mu\text{L}$ を Waters 社 (San Diego, CA, USA) 製の DIOS チップ上に滴下し、室温で乾燥させた。シリコンウエハーは、0.5 mm の厚みがあるので、純正のサンプルプレートと同形で、シリコンウエハーの厚さだけを削ったステンレス板を作製し、その上に導電性両面テープを用いて DIOS チップを貼り付けて装置内に導入した。マススペクトルは、Voyager DE Pro 飛行時間型質量



(a) PEG600



(b) PEG2000

Fig. 3. DIOS mass spectra of poly(ethylene glycol)s at $[K^+]/[Na^+]=4$, (a) PEG600 and (b) PEG2000. Symbols \bullet and \blacktriangle represent the Na^+ and the K^+ adducts, respectively.

分析計 (Applied Biosystems 社 (Foster City, CA, USA) 製) を用いてリニア正イオンモードで測定した。異なる試料スポットを用いて、同じ条件の測定を 4 回行った。マスマスペクトルは、200 回レーザー照射して積算したスペクトルを用いた。質量校正は、PEG600 の測定では CHCA のプロトン化分子 (m/z 190.2) とアンギオテンシン I のプロトン化分子 (m/z 1297.5) を、PEG2000 の測定ではアンギオテンシン I のプロトン化分子とインシュリン (ヒト) のプロトン化分子 (m/z 5808.4) を外部標準として用いて行った。

3. 結果と考察

カチオン化剤に LiI, NaI, KI, RbI, CsI を用いて、PEG 600 および PEG2000 の DIOS-MS を行った。PEG600 および PEG2000 のマスマスペクトルを Fig. 1 および 2 に示した。PEG600 および PEG2000 の平均分子量は、それぞれ約 600 および約 2000 である。マスマスペクトルから求めた試料の数平均分子量は、 Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ を用いた場合 PEG600 で 669, 659, 664, 671, 655 の値が得られ、PEG2000 では 2070, 2085, 2121, 2081, 2114 の値が得られた。用いた金属イオンによる差は $\pm 1\%$ 程度であった。質量分析では、分子量の違いによるイオン化効率の差やマスマディスクリミネーションの影響のために、平均分子量の厳密な評価は困難であるが、DIOS-MS により PEG の概略的な平均分子量についての情報を得ることが可能であることがわかった。

カチオン化剤に、NaI と他の 1 種類のアルカリ金属ヨウ化物塩 (LiI, KI, RbI, CsI) の混合物を用いた。LiI と NaI の組合せでは NaI/LiI のモル比が 1~8, その他の組合せでは MI (M: K, Rb, Cs)/NaI のモル比が 1~8 になるように混合した。Fig. 3 に $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$ が 4 の場合の PEG600 および PEG2000 のマスマスペクトルを示した。いずれの場合も、加えた 2 種類の金属イオンが付加した分子量関連イオンが検出できた。等モル量の金属イオンの混合物を用いた測定では、いずれの場合もイオン半径の小さい金属イオンの付加体が大幅に強く検出できた。全 m/z 領域にわたって各金属イオン付加体の分子量関連イオンのピーク面積を合計し、ピーク面積の比率と試料調製の際に混合した金属イオンの濃度比をプロットした。LiI と NaI の組合せでは、 Li^+ に対する Na^+ の濃度を変化させ、NaI とその他のアルカリ金属ヨウ化物塩 (MI) の組合せでは Na^+ に対する M^+ の濃度を変化させた。Fig. 4 に LiI と NaI および NaI と KI の組合せの結果を示した。PEG の MALDI-MS において報告されているように¹³⁾, DIOS-MS においても金属付加イオンの強度の比率と試料調製の際に混合した金属イオン濃度のモル比には良好な直線関係が見られた。Kéki らは MALDI 法による PEG の測定で、この直線の傾きにより各金属イオン付加体の検出のされやすさを評価した¹³⁾。DIOS マスマスペクトルから得た直線の傾きはいずれの場合も 1 より大幅に小さく、特に Rb^+ や Cs^+ を用いた場合傾きが小さかった (Table 1)。分子量が低い PEG600

の測定のほうがこの傾向が強くなり、イオン半径が大きい金属イオンが低分子量の PEG に付加しにくいことがわかる。このことは、イオン半径の小さな金属イオン付加体が検出されやすいことを示している。Kéki らの DHB をマトリックスに用いた MALDI の結果では、各金属イオン付加体の検出のされやすさは、PEG4000 において $\text{K}^+ > \text{Cs}^+ \sim \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$, PEG6000 において $\text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ であった¹³⁾。MALDI-MS における各金属イオン付加体の検出されやすさは用いたマトリックスに依存することが報告されている^{12), 21)}。酸素原子は、イオン半径の小さい金属イオンと強く結合する²²⁾。MALDI 法では、金属イ

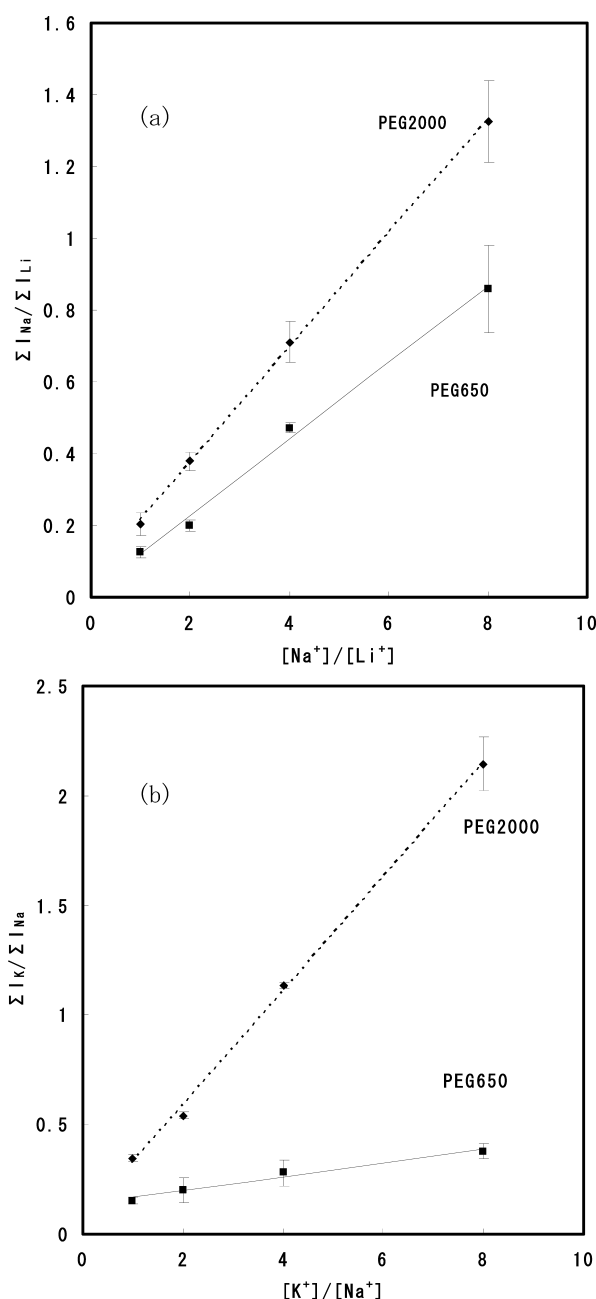


Fig. 4. The plots of the relative peak intensity of the cation adducts vs. molar ratio of the cationizing agents in DIOS mass spectra of PEGs using binary mixtures of NaI and other alkali metal iodides (a) NaI/LiI and (b) KI/NaI.

Table 1. The Slope of the Relative Peak Intensity of the Cation Adducts *vs.* Molar Ratio of the Cationizing Agents in DIOS Mass Spectra of PEGs Using Binary Mixtures of NaI and the other Alkali Metal Iodides

Cationizing agent	PEG2000	PEG600
LiI ^{a)}	0.16	0.11
KI ^{b)}	0.26	0.03
RbI ^{b)}	0.08	0.04
CsI ^{b)}	0.04	0.02

^{a)} The values indicate the ratio of $[\text{Na}^+]/[\text{Li}^+]$.

^{b)} The values indicate the ratio of $[\text{M}^+]/[\text{Na}^+]$, where M is K, Rb, or Cs.

オンと試料分子の関係以外にマトリックス分子の影響が大きいものに対して、DIOS法では、金属イオンとPEG分子の相互作用がカチオン化のしやすさに大きく影響していると考えられる。

4. 結 論

本研究では、Naイオンとその他のアルカリ金属イオンの混合物をカチオン化剤に用いて、PEGのDIOS-MSを行った。各金属イオンが付加した試料の相対強度は、試料調製の際に混合した金属イオンのモル比と直線関係にあった。直線の傾きからイオン半径の小さい金属イオンが付加した試料が検出されやすいことがわかった。

謝 辞 本研究は、平成16年度関西大学学術研究助成基金（共同研究）の支援を受けて行われ、ここに感謝いたします。

文 献

- 1) C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamasita, and J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, **57**, 675 (1985).
- 2) R. B. Cole, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry," Wiley, New York (1997).

- 3) M. Karas, and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 4) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 5) G. Montaudo and R. P. Lattimer (eds.), "Mass Spectrometry of Polymers," CRC, Boca Raton (2001).
- 6) S. D. Hanton, *Chem. Rev.*, **101**, 527 (2001).
- 7) S. F. Macha and P. A. Limbach, *Curr. Opin. Solid State and Material Science*, **6**, 213 (2002).
- 8) R. M. Murgasova and D. M. Hercules, *Int. J. Mass Spectrom.*, **226**, 151 (2003).
- 9) D. Dogruel, R. W. Nelson, and P. Williams, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 801 (1996).
- 10) H. Rashidzadeh and B. Guo, *Anal. Chem.*, **70**, 131 (1998).
- 11) H. Togashi, *Chem. Lett.*, 704 (2000).
- 12) H. Rashidzadeh, Y. Wang, and B. Guo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 439 (2000).
- 13) S. Kéki, L. S. Szilágyi, G. Deák, and M. Zsuga, *J. Mass Spectrom.*, **37**, 1074 (2002).
- 14) J. Wei, J. M. Buriak, and G. Siuzdak, *Nature*, **399**, 243 (1999).
- 15) Z. Shen, J. J. Thomas, C. Averbuj, K. M. Broo, M. Engelhard, J. E. Crowell, M. G. Finn, and G. Siuzdak, *Anal. Chem.*, **73**, 612 (2001).
- 16) R. A. Kruse, S. S. Rubankhin, E. V. Romanova, P. W. Bohn, and J. W. Sweedler, *J. Mass Spectrom.*, **36**, 1317 (2001).
- 17) W. G. Lewis, Z. Shen, M. G. Finn, and G. Siuzdak, *Int. J. Mass Spectrom.*, **226**, 107 (2003).
- 18) R. Arakawa, Y. Shimomae, H. Morikawa, K. Ohara, and S. Okuno, *J. Mass Spectrom.*, **18**, 961 (2004).
- 19) S. Okuno, Y. Shimomae, K. Ohara, H. Fujiwara, J. Ohyama, M. Ohmoto, Y. Wada, and R. Arakawa, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **52**, 142 (2004).
- 20) S. Okuno, Y. Wada, and R. Arakawa, *Int. J. Mass Spectrom.*, **241**, 43 (2005).
- 21) J. Zhang and R. Zenobi, *J. Mass Spectrom.*, **39**, 808 (2004).
- 22) I. Dzidiz and P. Kebarle, *J. Phys. Chem.*, **74**, 1466 (1970).

Keywords: Cationizing agent, Poly(ethylene glycol), Desorption/ionization on silicon (DIOS), Alkali metal selectivity