

質量分析による溶液内イオン平衡の観測

中 田 隆 二*

1. はじめに

最初に質量分析法 (MS: Mass spectrometry) の歴史と現状について簡単に眺めてみよう。1912年 J.J. Thomson (英国) によって最初の質量分析装置が作られて以来、同位体の存在や自然界に存在する元素の精密質量、そして同位体存在比の決定と、原子を対象として発展した MS も、その後のイオン化法の発展に伴い、対象が原子から分子に広がり、今やごく微量のサンプル量 (フェムトモルオーダー) を使って、分子量数百~数十万の幅広い質量測定が可能となるまで進歩してきた。さらに最近では分子量測定に留まらず、MS/MS* を使って、複雑な物質の構造を調べる手法としても利用されている。[*2台の質量分析計を直列に結合し、1台目の装置のイオン化室で生成したイオン種のうちの一つを前駆イオンとして選択し、2台目の装置で、その前駆イオンの分解から生じるプロダクトイオンを検出する方法。イオントラップ法を使うと MS/MS を繰り返し行う MSⁿ 測定も可能。]

MS は、原子量測定による新元素発見、同位体比測定による遺物の年代・産地の決定や過去の水温決定、物質の確認 (天然物や新規合成物の確認、星間物質等の確認、生命誕生関連物質の確認など)、環境分析 (GC-MS による有機塩素化合物、LC-MS によるフタル酸エステル等の外因性内分泌攪乱物質、そして ICP-MS による重金属等の各種環境汚染物質の定量)、

犯罪関係の分析 (麻薬・覚醒剤の検出、ドーピング検査、爆発物の検出等)、診療等に関わる実分析 (患者の呼気分析や新生児の血液を使った先天性代謝異常の診断や遺伝子診断等) に広く利用されている。田中耕一と J.B. Fenn (米国) の2002年ノーベル化学賞受賞は、新しいイオン化法の開発が、生体高分子分析に大きな武器となった点を評価されたものであり、ライフサイエンス分野での MS の役割に対する期待は今後も大きい。バイオや環境と並んで、最近耳にするのが犯罪防止、とりわけテロ対策である。特に米国で起きた 9.11 同時多発テロ以降は、各国とも、テロ対策が重要な課題となっており、広く使われているイオンモビリティスペクトロメトリー* 検出器に代わる爆発物検出器として、より小型で安価な迅速・高感度な検出法としての小型質量分析計の開発が望まれている。[*大気圧下でβ線源等によりイオン化された化学物質の、電位勾配下における移動度、ion mobility が、その大きさや形状に依存することを利用した分離・定量法]

本稿では、イオン種の溶液内挙動を観察するための手段としての、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) MS 利用について紹介する。その前に、MS の特性を把握するために、MS で主要な働きを担うイオン化と質量分離について触れておこう。

*福井大学教育地域科学部理数教育講座教授

第198回京都化学者クラブ例会 (平成18年12月2日) 講演

2. イオン化と質量分離部

質量分析計は、イオン化部・質量分離部・検出部に大別することができる。質量分離部には、四重極 (Q) 型、四重極イオントラップ (QIT) 型、飛行時間 (TOF) 型、二重収束 (sector BE or EB) 型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FT-ICR) 型といった種類がある。二重収束型や FT-ICR 型は高分解測定に利用されるが、装置の分解能を上げ、ミリ質量単位程度の精度で測定できれば、分子量の端数を計算することによって、やや複雑な化合物の元素組成を推定することも可能になる。一方、質量分析法のイオン化法としては、電子イオン化 (EI)、化学イオン化 (CI)、電界脱離 (FD) イオン化に加えて、高速原子衝撃 (FAB) イオン化、ESI、光イオン化などのソフトなイオン化法が開発されており、EI や CI の対象となった低分子有機化合物に限らず、有機金属化合物や高分子化合物の質量スペクトル測定も可能となっている。レーザーを使った光イオン化は LDI と呼ばれ、その一つがマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) である。グリセリン等をマトリックスとして使用する FAB イオン化同様、MALDI においてもマトリックス由来のピークが見られるため、マトリックスを使用しない方法、例えばシリコン基板上に直接試料を保持し、パルスレーザー照射によってイオン化する DIOS (desorption/ionization on silicon) と呼ばれる手法が報告されている [1]。また、ESI では分解されて観測することのできない溶液中不安定化合物 (例えば、金属錯体・超分子、反応中間体、ホスト・ゲスト化合物、各種会合体、水の構造、DNA 等の生体分子) を、化合物の原型を損なわないよう、冷却した窒素ガスを用いてスプレーイオン化して測定するコールドスプレーイオン化 (CSI) 法

も開発され、グリニャール試薬や特異的構造を持つ各種自己集合錯体の構造解析が行われている [2]。イオン化法開発の歴史はまさに MS の歴史でもあり、現在でもよりソフトでイオン化効率のよい方法を目指して精力的な研究が進められている。

3. ESI-MS とその利用法

ESI を中心とする、液体を利用したイオン化法が完成するまでの歴史を振り返ると、18世紀の Abbe'Nollet による水の電場噴霧実験に始まり、多くの興味ある自然現象や実験が関係していることがわかる [3]。溶液試料を対象とする ESI-MS の発展は、プロトン付加による多価イオンが生成し易いという特徴もあり、熱的に不安定で蒸気圧の小さい天然高分子化合物等の分析に大きな力となった。また、装置の汎用化に伴い、無機・有機を問わず、溶液内反応中間体の検出にも常用されるようになり、装置を常備した研究室では、今や紫外可視吸収スペクトル測定とまでは言わないまでも、NMR 測定と同じような感覚で、質量スペクトル測定が行われている。フロー系を接続すれば、反応溶液を、大気に触れること無しに分析計に導入できる点も ESI-MS の利点といえる。例えば、荒川らは、フロー系を利用して、Ru 錯体の光照射による配位子置換反応生成物や、電解酸化反応生成物を直接 ESI-MS に導き、迅速検出できることを報告している [4,5]。

ESI を利用する際に留意すべき点として、検出される物質は溶液内のイオン種 (あるいは中性であっても、プロトン解離やイオン付加によってイオン化し易い物質) に限られる点、そして ESI 時に電気化学的酸化還元が起こりうる点が挙げられる。前者については、従来 GC や LC で利用されてきた、誘導体化が一つの解決法と

なる。後者については、分析対象の酸化還元特性に配慮した上で、測定やデータ解析を行う必要がある。例えば Berkel et al. は、非イオン性のアルコール類を電解酸化されやすいフェロセン化合物で誘導体化することにより、ESI 時にイオン化して選択的に検出する手法を報告している [6]。

筆者らも溶液内各種反応を ESI-MS で追跡する試みの一つとして、古くから水試料中のリン酸イオンの定量法として知られている「モリブデンブルー法」で生成するヘテロポリ酸化学種の同定を検討している。一般に、「モリブデンブルー法」では、モリブデン酸イオンに酒石酸アンチモンを共存させ、アスコルビン酸を還元剤とすることによって青色の還元型モリブドリン酸錯体を迅速に生成させ、その吸光度からリン酸イオンを定量している。しかしながら、アンチモンの役割も含め、還元型モリブドリン酸錯体中に含まれるアンチモンの量や還元電子数については明確になっていない。二重収束型 ESI-MS を使って高分解測定を行うことにより、その組成や電荷数が直接求められることが期待される [7]。

4. 溶液内平衡定数の見積もり

溶液内に存在する複数のイオン間に平衡関係が成り立つ場合、ESI-MS によって、それらのイオンの量的関係を求めることができれば、平衡定数もまた、求めることが可能となるはずである。しかしながら、ESI における脱溶媒和過程で、溶液内平衡が変化するため、質量スペクトルを解釈する際には注意する必要がある。質量スペクトルに及ぼす pH や溶媒の影響、分析対象となる物質濃度や共存塩濃度の影響に関して、いくつかの報告がある [8]。また、脱溶媒和過程で、イオンの疎水性が影響するため、イ

オンによってイオン化効率が異なることも報告されている [9]。試料溶液の噴霧ネブライザーガスの流量やニードル電圧、脱溶媒和過程における温度も影響する。筆者らも、脱溶媒和時の温度上昇に伴ってイオン対生成が増大する点に配慮し、溶液内平衡の定量的観察をする際には、加温せずに測定を試みている。とはいえ、対象とする平衡系や測定条件の選択によっては、期待される結果を得ることもできる。Ross et al. は、イオン対生成に及ぼすいくつかの有機配位子と金属イオンとの間の溶液内錯生成平衡に関して検討し、特に Cu^{2+} と 8-ヒドロキシキノリン (Hox) との反応においては、pH 変化に伴う $\text{Cu}(\text{ox})^+$ や $\text{Cu}(\text{ox})_2$ の存在割合の変化が、平衡計算による予測値と、ESI-MS 測定で得られた実験値との間で比較的よく一致することを報告している [10]。また、Kempen and Brodbelt は、ESI-MS を利用してクラウンエーテルとアルカリ金属イオンとの間の錯生成定数を求めている [11]。彼らは、物質間のイオン化効率の違いを補償するために、定数が既知の参照物質を共存させて測定を行い、目的物質の定数を算出している。

筆者らも、スルホフタレイン系 pH 指示薬 (H_2ind) の第二解離平衡、 $\text{Hind}^- \text{ind}^{2-} + \text{H}^+$ が、アニオン間の平衡である点に着目して、ESI-MS による平衡定数の決定を試みた [12]。詳細は省くが、この場合も、解離定数が比較的近い参照物質を共存させることによって、目的物質の解離定数を求めることができた。結論から言えば、ESI-MS で溶液内イオン平衡を観察する際には、先述したように、様々な要因が影響するので、それらを補償し、定量的な結果を得るための工夫として、目的物質と同程度の平衡定数を示す参照物質を共存させて測定することが必要である。

ところで、平衡定数とは反応前後の自由エネルギー差に対応するため、結合エネルギーの差とも関係する。従って、結合エネルギーを直接見積もることによって平衡定数を予測することも可能となるはずである。この種の結合エネルギーを求めるための手法としてMSを使うことも可能である。例えば、Cooks et al.によって提案された“kinetic method”と呼ばれる手法では、MS/MSを使うことによって、多くの化合物に対して、例えば塩基性の尺度としてのプロトン親和力 (PA: proton affinity) を求めることができる[13,14]。具体的に説明すると、 M_1 と M_2 間の PA の差、 $\Delta\epsilon$ を求める際には、まず第1 MS において、前駆体として $[M_1+H+M_2]^+$ なるイオンを選択した後、不活性ガスを衝突させて部分的に解離させ（これを衝突活性化分解、CAD という）、第2 MS で質量スペクトル (CAD スペクトル) を測定する。そこで検出された2つのイオン、 $[M_1+H]^+$ と $[M_2+H]^+$ の強度比、 Int_1/Int_2 と、 $\Delta\epsilon$ との間には、 $\ln(Int_1/Int_2) = \Delta\epsilon/RT$ が成り立つので、基準となる物質 M_1 の PA を与えてやれば、 M_1 と M_2 、 M_2 と M_3 ……と順次組合せを変えながらMS/MS測定を行うことによって全ての M_i に対して PA が求められることになる。ただし、得られた PA は真空中での値であって、溶液中での PA 値とは異なる。一方、真空中という溶媒の影響を無視できる条件下であるため、量子力学的計算で見積もられた理論値と比較することによって、安定構造が推測できるという利点がある。他にもCADスペクトルを使うと、分子間あるいは分子内の結合に関していろいろな情報を得ることができる。例えば、最近筆者らは、MS/MS法により、いくつかの擬ロタキサン化合物*のCADスペクトルを測定し、生成定数の違いを定性的にはあるが

明らかにした[15]。[*大環状の分子が作るリングの穴を棒状の分子が貫通した構造により新しい分子となった分子集合体の一種] NMR測定によって得られた溶液内でのデータと比較検討するためには、より定量的なデータを取得する必要がある、今後の課題となっている。

参考文献

- [1] J. Wei, J.M. Buriak and G. Siuzdak, *Nature*, **399**, 243 (1999).
- [2] 清 悦久, 敷井和彰, 坂本 茂, 國村美希, 小林達次, 関 宏子, 田代 充, 藤田 誠, 山口健太郎, *分析化学*, **53**, 457 (2004).
- [3] 能美 隆, *質量分析*, **44**, 105 (1996).
- [4] R. Arakawa, S. Tachiyashiki and T. Matsuo, *Anal. Chem.*, **67**, 4133 (1995).
- [5] R. Arakawa, T. Abura, T. Fukuo, H. Horiguchi and G. Matsubayashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 1519 (1999).
- [6] G.J. Van Berkel, J.M.E. Quirke, R.A. Tigani, A.S. Dilley and T.R. Covey, *Anal. Chem.*, **70**, 1544 (1998).
- [7] 中田隆二, 金谷佳美, 青山絹代, *分析化学第57年会講演要旨集*, 242 (2007).
- [8] G. Wang and R.B. Cole, in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, R.B. Cole Ed., Wiley: New York, 1997, Chapter 4.
- [9] P. Kebarle and Y. Ho, in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, R.B. Cole Ed., Wiley: New York, 1997, Chapter 1.
- [10] A.R.S. Ross, M.G. Ikononou, J.A.J. Thompson and K.J. Orians, *Anal. Chem.*, **70**, 2225 (1998).
- [11] E.C. Kempen and J.S. Brodbelt, *ibid.*, **72**, 5411 (2000).
- [12] 中田隆二, 菅原英淑, 青山絹代, 伊佐公

- 男, 分析化学第55年会講演要旨集, 351 (2005).
- [13] S.A. McLuckey, D. Cameron R.G. Cooks, *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 1313 (1981).
- [14] R.G. Cooks and T.L. Kruger, *ibid.*, **99**, 1279 (1977).
- [15] Y. Tokunaga, M. Yoshioka, T. Nakamura, T. Goda, R. Nakata, S. Kakuchi and Y. Shimomura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 1377 (2007).