合成高分子の質量分析の動向

この2, 3年で質量分析 (MS) による合成高分子の研究報告が飛躍的に増大し、NMR と同様に重要な技術として認知されるようになった。ここでは ESI- と MALDI-MS による繰返し単位と末端基の同定、鎖状と環状構造の識別、共重合体の組成分析などについて述べる。さらに、最近の話題の技術である難溶性ポリマーの測定、マトリックスフリーレーザー脱離イオン化について紹介する。

荒川 隆一

1. はじめに

最近、質量分析 (MS) の生命科学分野への展開が急速に拡大している。その理由は、少量の試料 (pmol オーダー) で、数分程度の短い時間で物質の同定が可能のためである。また、測定の自動化が容易で、試料のハイスループット処理ができる特徴がある。さらに、合成高分子や金属錯体などバイオ関連以外の高分子量物質への応用も広がっている。他の分析法に比べて MS の有利な点は分子量が正確に決定できることである。質量差の小さな分子が混在していてもその詳細な情報が得ることができる。

近年、MS の質量範囲は拡大し 50 kDa 以上のスペクトルが得られ、たとえ混合物であってもその分子量測定が可能になった^{1)~3)}。これらスペクトルはポリマー鎖そのもののイオンを示すので、単一オリゴマーやポリマーの構造を同定することができる。したがって、MS が NMR と同じように合成高分子の分析に必要となり、ルーチン分析の革新的技術として認知されるようになった^{4)~7)}。平均的な情報を与える NMR に比べて、MS は各オリゴマー自身の質量情報を与えるので、化学構造の決定的な情報を与えるだけでなく、ポリマー鎖中の異種構造や異常構造の同定が可能である。このことはポリマー分析において非常に重要な点である。ポリマー合成過程における生成物の同定が可能となり、繰返し単位、末端基、キャップ試薬、付加物の構造を決定することができる。また、鎖状と環状構造の違い、

共重合体の組成とシーケンスの推定、ポリマーの分子量分布の測定に有効である。

2. 高分子のイオン化法

ソフトなイオン化法として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^{8), 9)} やエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) 法¹⁰⁾ がそれぞれ Tanaka と Fenn によって開発され、高分子量物質や非共有結合性の弱い力で結合した複合体のイオン化が可能になった。とくにタンパク質、DNA、糖鎖などの生体高分子の MS には必須のイオン化法である。その実用化に対して 2002 年のノーベル化学賞が彼らに授与された。MALDI では 1, 2 価のイオンがおもに生成するので分子量分布をもつ合成高分子の測定には非常に都合が良い。一方、ESI はもっともソフトなイオン化法であり、フラグメントイオンの少ないスペクトルを与えるので、LC-MS のインターフェイスとして利用される。しかし、多価イオンが生成するために合成高分子のスペクトルが複雑になる欠点をもつ。

3. ESI-MS

3.1 カチオン化剤

ほとんどの合成高分子は酸・塩基の官能基をもっていないので、生体ポリマーのように酸・塩基平衡に基づくプロトン化、脱プロトン化イオンの生成が困難である。したがって、合成高分子の MS では、金属塩 (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cu^+ , Ag^+ , ...) を添加し、その金属付加イオンとして検出する。分子量 3,000 のトリオールタイプのポリプロピレングリコール (PPG) の ESI スペクトルに対するカチオン化剤 NaI の効果を図 1 に示す¹¹⁾。NaI を添加しない場合、2

ARAKAWA, Ryuichi 関西大学工学部応用化学科 (564-8680 吹田市山手町 3-3-35)・教授、理学博士。1976年 大阪大学大学院理学研究科博士課程修了 専門は質量分析学。E-mail: arak@ipcku.kansai-u.ac.jp

Current Trends in Mass Spectrometry of Synthetic Polymers

図1 トリオールタイプPPGのESIスペクトルに対するカチオン化剤NaIの濃度効果
(a) 0, (b) 0.01, (c) 0.05, (d) 0.1, (e) 0.5 mM.

～4 価の Na^+ 付加イオンが検出され、添加量の増加とともに3 価以上の付加イオンが強く検出された。0.5 mM 加えた場合には、3～6 価のイオンとして検出された。環状あるいは末端が $-\text{CH}=\text{CH}_2$ である成分が検出された。

3.2 ESI スペクトル

合成高分子の中には、重合過程や加熱処理過程において環状副生成物を生成することがある。分子イオンの質量数を調べることで、環状オリゴマーの存在を比較的簡単に確認することが可能である^{12)～14)}。ポリジチアンは、同位体の存在比率が大きいS原子を含むために、分子イオンを同定することが困難になる。開環重合法によって得られたポリジチアンは、カテナン構造をとっている可能性があるのも興味をもたれている。ESI スペクトル(図2)からポリジチアンが環状構造を有することが報告された¹⁵⁾。HPLCで分離した低分子量のポリジチアンにAgTFAを加えたとき、繰返し120 Daの間隔で重合度 $n=5\sim 14$ の Ag^+ 付加イオンが検出された。 $n=12$ ($m/z=1,550$) のピーク付近の同位体分布の解析から環状以外の鎖状ポリマーが混在していないことを示した。末端基としてベンジルチル基を有する鎖状ポリジチアンのスペクトルには、鎖状と環状ポリマー(70%)が混在していることが確認された。これはback biting reactionによって環状ポリマーが生成したものと思われる。

4. MALDI-MS

4.1 試料の調製

MALDI スペクトルの感度、選択性と質量分解能は、試料調製に強く影響されることがよく知られている。まず、適切なマトリックスを選ぶことがもっとも重要である。調製法の基本は、マトリックス(M)、試料(A)とカチオン化

図2 環状(a)と鎖状(b)ポリジチアンの正イオンESIスペクトル
黒丸は同位体分布の計算値を表す。

剤(C)を混合した溶液を用いるdried droplet法である。その試料溶液をターゲット台にのせて結晶化させるとき、試料の分離が起こる危険がある。分離が起こると同じスポット内で異なる位置にレーザーを照射したとき、ピーク強度および質量精度のずれが生じる。そのために、この方法は溶媒に十分可溶でないポリマーの分析に適用できないので、新しい調製法の開発が必要である。

ポリエーテルイミド、ポリイミド、芳香族ポリアミド、ポリ-9,9-ジフェニルフルオレン、多環芳香族炭化水素などの難溶性ポリマーに対して、MとAの混合粉末をサンプ

ル台に固定する“solvent-free”法が開発された。芳香族ポリアミドである Nomex [poly(*m*-phenyleneisophthalamide)] とマトリックスを回転ボールミル中、液体窒素温度でかくはん粉末化した。その MALDI スペクトルは、238 Da の繰返し単位の環状オリゴマーを示し、M/A/C の混合比に強く依存することがわかった¹⁶⁾。さらに驚いたことに、ポリエチレン (PE) の MALDI スペクトルが得られるようになった。試料とコバルト、銅、ニッケル、鉄の金属粉末を混合し、AgNO₃ をカチオン化剤として 5,000 Da までの PE が分析された¹⁷⁾。さらに、PE やポリプロピレン (PP) のようなポリオレフィン誘導体を MALDI スペクトルが得られた。狭い分布の PE の末端ビニル基と臭素を反応させて生成したブロモ化ポリマーとトリフェニルホスフィンとを反応させた後に MALDI 測定が行われている。

4.2 マトリックスフリーレーザー脱離イオン化

マトリックスの分子量は約 300 Da 程度なので、レーザー照射によってマトリックス関連イオンが $m/z < 500$ 領域に強く観測される。そのために、目的イオンのピークと重なり合う可能性がある。そこで、分子量が大きいマトリックス 10,15,20-テトラキス(ペンタフルオロフェニル)ポルフィリン (F20TPP) (MW 975) を用いて、低質量領域におけるマトリックスピークの影響を回避できることが報告された¹⁸⁾。

Siuzdak らは電解エッチング法によりナノメートルサイズ孔のポーラスシリコン板を作製し、その上で試料にレーザー光を当てるとマトリックスフリーでレーザー脱離イオン化 (Desorption/Ionization on Silicon; DIOS) できることを見いだした¹⁹⁾。図 3 はマトリックスとして α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) あるいは F20TPP を用いた MALDI と DIOS によるポリエステルスペクトルの比較である²⁰⁾。CHCA において、ポリエステルイオン (○印) が強いイオン強度で検出された。しかし、マトリックス関連イオン (△印) のイオン強度も大きいため、ポリエステルの低分子量部分の解析が困難である。F20TPP を用いた場合は、 m/z 975 と 822 以外のフラグメントイオンは観測されず、試料イオンが強く検出できた。DIOS スペクトルには妨害するイオンがほとんどなく、良好なスペクトルが得られた。DIOS はきょう雑物イオンが少ないので、目的の親イオンだけを選択できるために、より正確な post source-decay (PSD) スペクトルによる構造解析が可能となる。

4.3 SEC/MALDI-MS

MALDI-MS はポリマー分析のための重要な技術であり、分子量分布、繰返し単位、その構造や末端基の情報を与えてくれる。しかしながら、そのポリマーが狭い分子量

図 3 ポリエステル (MW 600) の MALDI と DIOS スペクトル
(a) CHCA, (b) F20TPP, (c) DIOS. ○印はポリエステルイオン, △印はマトリックス関連イオンを表す。

分布をもつときのみ、マススペクトルから得られる分子量と従来の方法から得られる分子量が一致することがわかっている¹⁾。分散度 (D) が 1.10 ~ 1.20 のポリマーでは、MALDI スペクトルから信頼できる分子量を得ることが困難である。この問題を克服するためにオフラインの SEC-MALDI-MS が導入される。 $D < 1.03$ 以下のポリマーに分画してから MALDI 測定を行う。それぞれ分画した部分のスペクトルから得られる絶対分子量を用いて、SEC 校正曲線が得られる¹⁾。同時に SEC 分画部の MALDI スペクトルから、異なる分子量のポリマーの構造や末端基が同定できる。また SEC 分画部をオフライン分取するもうひとつの利点は、MS だけでなく NMR の試料として使えることで

ある。

4.4 共重合体および光分解物の分析

共重合体のマススペクトルはホモポリマーのものよりずっと複雑である。各オリゴマーのピークを識別するためには、質量分解能が10,000以上の装置が必要である。CO/Styrene/4-Methylstyrene terpolymer²¹⁾、エチレン/CO(E-CO)共重合体²²⁾のMALDIスペクトルからオリゴマーの組成と構造が決定された。

光照射を受けたナイロン6 (Ny6) フィルムのスペクトルから、反応生成物の豊富な構造情報が得られた²³⁾。元のNy6中には3つの型の構造体しか存在しないが、光照射によって40以上の異なる型のオリゴマー酸化体が検出され、それらの酸化過程が明らかになった。その他、Poly (butylene succinate)、ポリエーテルイミドの光酸化が報告され²⁴⁾、ポリマー分解の研究の新展開が期待できる。

5. おわりに

ここ数年、MALDI-MS装置の性能と操作の向上、低価格化が進むにつれて合成高分子への応用が拡大した。さらに、飛行時間型 (TOF) やフーリエ変換型 (FT) 質量分析計の分解能は、10,000以上あるので複雑な組成のポリマーの分析や末端構造や環状構造の解析が容易になり、とくにMS/MSを利用した構造解析の需要が増大するだろう。MSは特集号のタイトルになっている環状ポリマーを同定する有効な手法である。目的のポリマーが鎖状であるとする、末端基が最低の分子量であっても環状構造と比較して質量に2 Daの差が生じる。そこでHPLCで分離した低分子量のオリゴマーのMALDIまたはESIスペクトルから、容易に繰返し単位の整数倍か否かを確認することができる。しかし、たとえ整数倍であっても、たとえば末端が $-\text{CH}=\text{CH}_2$ の鎖状構造の可能性があるので、環状と鎖状構造の識別はMS/MSおよびNMRの情報が必要になる。

合成高分子の良好なスペクトルを容易に得るための“solvent-free”や“マトリックスフリー”のMALDI技術は、今後さらに発展する可能性がある。各種の分離技術 (SEC, SFC (supercritical-fluid chromatography), IMS

(ion mobility spectrometry) と組み合わせたオンラインMSが注目されている。とくに、LC-MSはポリマーの生成・分解反応の研究に今後ますます利用されるだろう。

文 献

- 1) G. Montaudo, R. P. Lattimer, Eds.: "Mass Spectrometry of Polymers," CRC Press, Boca Raton, FL, 2002
- 2) P. M. Peacock, C. N. McEwen: *Anal. Chem.*, **76**, 3417 (2004)
- 3) H. Pasch, W. Schrepp: "MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers," Springer-Verlag, Berlin, 2003
- 4) M. W. F. Nielen: *Mass Spectrom. Rev.*, **18**, 309 (1999)
- 5) R. Murgasova, D. M. Hercules: *Int. J. Mass Spectrom.*, **226**, 151 (2003)
- 6) 荒川隆一, 奥野昌二: ふんせき, **9**, 502 (2002)
- 7) 荒川隆一, 奥野昌二, 和田芳直: 質量分析, **52**, 33 (2004)
- 8) M. Karas, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988)
- 9) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida: *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988)
- 10) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse: *Science*, **246**, 64 (1989)
- 11) S. Okuno, M. Ohmoto and R. Arakawa: *Eur. J. Mass Spectrom.*, **9**, 97 (2003)
- 12) J. B. Williams, A. I. Gusev, D. M. Hercules: *Macromolecules*, **30**, 3781 (1997)
- 13) J. Barton, T. J. Kemp, A. Buzy, K. R. Jennings, A. V. Cunliffe: *Polymer*, **38**, 1957 (1997)
- 14) B. Antelmann, M. H. Chisholm, S. S. Iyer, J. C. Huffman, D. Navarro-Llobet, M. Pagel, W. J. Simonsick, Jr., W. Zhong: *Macromolecules*, **34**, 3159 (2001)
- 15) R. Arakawa, T. Watanabe, T. Fukuo, K. Endo: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **38**, 4430 (2000)
- 16) A. P. Gies, W. K. Nonidez: *Anal. Chem.*, **76**, 1991 (2004)
- 17) T. Yalcin, W. E. Wallace, C. M. Guttman, L. Li: *Anal. Chem.*, **74**, 4750 (2002)
- 18) F. O. Ayorinde, P. Hambright, T. N. Porter, Q. L. Keith: *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, **13**, 2474 (1999)
- 19) J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak: *Nature*, **399**, 243 (1999)
- 20) R. Arakawa, Y. Shimomae, H. Morikawa, K. Ohara, S. Okuno: *J. Mass Spectrom.*, **18**, 961 (2004)
- 21) B. Milani, A. Scarel, J. Durand, G. Mestroni, R. Seraglia, C. Carfagna, B. Binotti: *Macromolecules*, **36**, 6295 (2003)
- 22) F. J. Cox, K. Qian, A. O. Patil, M. V. Johnston: *Macromolecules*, **36**, 8544 (2003)
- 23) S. Carroccio, C. Puglisi, G. Montaudo: *Macromolecules*, **36**, 7499 (2003)
- 24) S. Carroccio, P. Rizzarelli, C. Puglisi, G. Montaudo: *Macromolecules*, **37**, 6576 (2004)