合成高分子の測定で用いられる MALDI マトリックス

Matrix Reagents Used for Synthetic Polymer Analysis

佐藤浩昭

Hiroaki SATO

国立研究開発法人産業技術総合研究所 環境管理研究部門

(Received July 15, 2016; Accepted July 20, 2016)

1. はじめに

高分子材料はあらゆる分野で利用されており、目的とする用途に応じてさまざまな繰り返し単位（モノマー単位）を有する高分子材料が工業的に合成されている。合成高分子は重合度や末端基構造などが異なる高分子鎖の集合体であり、高分子材料の機能や特性を評価するために、それらの分子構造の詳細な解析が行われている。合成高分子のキャラクタリゼーションには、核磁気共鳴分光法（NMR）、赤外吸収分光法（IR）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、熱分解ガスクロマトグラフィー（Py-GC）などとともに MALDI-MS が利用されている。MALDI-MS を用いたキャラクタリゼーションでは、観測質量に基づくモノマー単位や末端基などの化学構造の決定だけでなく、ピーク強度分布に基づく共重合組成や平均分子量および分子量分布の定量的な解析も必要となる。そのため、分子構造の違いによる脱離／イオン化の効率の違いをできるだけ抑制するために、適切なマトリックスの選択および試料スポットの調製が重要となる。合成高分子の MALDI-MS 測定については成書^{1),2)}、解説³⁾および総説⁴⁾を参照していただきたい。本稿では、合成高分子の測定で用いられるマトリックスの種類および特徴と試料調製における注意点を概説する。

2. マトリックスの種類と試料調製の概要

合成高分子の MALDI-MS 測定では、試料と混和性が高いマトリックスを選択し、その共通溶媒を用いて試料／マトリックス混合結晶を調製することが通常である。合成高分子は、ポリエチレングリコール（PEG）などの水溶性高分子からポリスチレン（PS）などの疎水性高分子まで多岐にわたるため、試料に応じた適切なマトリックスを選択することが重要である。表1に、合成高分子の MALDI-MS でよく用いられるマトリックスの例を示す。

一般的なマトリックス選定の指針として、ポリエステル、ポリエーテル、ポリ(メタ)アクリレートなどのように、高分子鎖中に酸素原子を含む合成高分子の測定では、2,5-ジヒドロキシ安息香酸（DHB）、2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン（THAP）、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸（CHCA）、*trans*-3-インドールアクリル酸（IAA）などの極性マトリックスがよく用いられる。これらのイオン化では、さらにヨウ化ナトリウム（NaI）やトリフルオロ酢酸ナトリウム（NaTFA）などのアルカリ金属塩をカチオン化剤として微量添加して、 $[M+Na]^+$ などを観測する。一方、ポリスチレンなどの芳香族系高分子のように高分子鎖中に不飽和結合を有する合成高分子の測定では、ジスノールや DCTB などのマトリックスがよく用いられる。これらのイオン化では、さらにトリフルオロ酢酸銀（AgTFA）や硝酸銀などの銀塩をカチオン化剤として微量添加して、 $[M+Ag]^+$ を観測する。そのほかにも銅塩を添加することもある。

いずれの場合でも、大まかな指針としては、試料1 mg/mL、マトリックス10 mg/mL、カチオン化剤1 mg/mLを目安に共通溶媒にそれぞれ溶解し、試料溶液-マトリックス溶液-カチオン化剤溶液=1:10:1 (v/v/v)で混合して、0.5~1 μ L程度を試料ターゲットに塗布する。カチオン化剤溶液は、あらかじめ試料ターゲットに塗布しておいてもよい。

これらはあくまでも代表例であり、あらゆる合成高分子の測定に適したユニバーサルなマトリックスは存在しないため、現在の新しいマトリックスの探索や合成が試みられている。最適なマトリックスの選択や試料調製法の最適化は、文献などを参考にしながら、試行錯誤的に行う必要がある。

3. 合成高分子の測定におけるマトリックスに関する注意点

3.1 マトリックスの純度

マトリックスの選択は MALDI-MS 測定を行ううえで最も重要であるが、試薬のグレードを検討した事例は少な

表1. 合成高分子のMALDI-MS測定で用いられる主なマトリックス剤

名称 (略称)	構造式	特徴
2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) $C_7H_6O_4$ (MW 154.1)		極性高分子のイオン化に適しており、ポリエステルやポリエーテルなどの測定で汎用される。
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) $C_{10}H_7NO_3$ (MW 189.2)		極性高分子のイオン化に適しており、ポリエステルやポリエーテルなどの測定で汎用される。
2,4,6-Trihydroxy acetophenone (THAP) $C_8H_8O_4$ (MW 168.1)		強酸性のDHBでは分解が引き起こされる恐れがある極性高分子の測定で用いられる。
1,8-Dihydroxy-9-[10H]-anthracenone (ジスラノール) $C_{14}H_{10}O_3$ (MW 226.2)		非極性高分子のイオン化に適しており、芳香族炭化水素系高分子の測定で汎用される。
<i>trans</i> -2-[3-(4- <i>tert</i> -Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene] malononitrile (DCTB) $C_{17}H_{18}N_2$ (MW 250.3)		非極性高分子のイオン化に適している。低いレーザー光エネルギーでイオン化できるため、不安定な構造をもつ試料の測定にも用いられる。
<i>trans</i> -3-Indoleacrylic acid (IAA) $C_{11}H_9NO_2$ (MW 187.2)		メタクリル酸系高分子のイオン化に用いられる。

図1. 異なるメーカーから入手したジスラノールのマスペクトル。

い。マトリックスは各試薬メーカーから市販されているが、試薬によっては不純物が多く含まれていることがある。ここでは、合成高分子のMALDI-MS測定で汎用されるジスラノールを例に、試薬グレードの違いによる影響を

説明する⁵⁾。

図1は、異なるメーカーから購入したジスラノールのマスペクトルを比較して示したものである。ジスラノールは本来黄色であり、試薬 (d) が黄色であったが、試薬

(a)～(c) は赤褐色であった。ここではジスラノールの分子イオン (M^+)、プロトン付加分子 ($[M+H]^+$)、ナトリウムカチオン付加分子 ($[M+Na]^+$) などの本来観測されるべきピークに加え、試薬 (a)～(c) では、ジスラノールの重合体あるいはクラスターイオンのピークが顕著に観測された。これらの由来を確認するためにサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で分析を行ったところ、ジスラノールの溶出ピークよりも高分子量側で赤褐色の成分が溶出した。この画分の MALDI-MS 測定から、これらは dithranol brown (dianthrone)⁶⁾ や anthralin brown⁷⁾ と呼ばれるジスラノールの重合体であることがわかった。これらの成分は、もともと試薬中に存在していた不純物であり、 m/z 1000 を超える領域でも妨害ピークとなり得るため注意を要する。そのほかにも、DCTB や IAA⁸⁾ などマトリックスの重合体が生じやすい。最近では、各試薬メーカーから高純度マトリックスが販売されているので、多少高価であっても高純度品を用いるほうがよいであろう。

3.2 マトリックスおよびカチオン化剤に由来するバックグラウンドピーク

合成高分子の測定に限ったことではないが、マトリックスに由来するバックグラウンドピークは、しばしば測定やデータ解析の妨げになる。上述のマトリックスの重合体に由来するピークだけではなく、レーザー照射によって生じるマトリックスの分解物のクラスターイオンが高質量領域まで発生することも珍しくない。一例として、DCTB を用いて観測されるクラスターイオンの妨害について説明する。DCTB は低いレーザー光強度でさまざまな合成高分子を脱離イオン化でき、他のマトリックスでは分解が起こりやすいフラーレン誘導体や有機金属錯体のイオン化にも適していることから、合成高分子の MALDI-MS 測定で使用が広がりつつあるマトリックスである。このマトリックスは、ラジカルを生じやすいので M^+ イオンの生成に適している一方で、かなり強いバックグラウンドピークも生じる。

図2は、DCTB マトリックスを用いて観測されたエチレン酢酸ビニル共重合体 (EVA) のマスペクトルの例である。EVA は太陽光発電モジュールの封止材などで用いられる合成高分子であり、その劣化解析が重要である^{9), 10)}。筆者らが知る限り、EVA の MALDI マスペクトルは著者らの報告^{9), 10)}のみであり、われわれの検討では DCTB が最も高強度で EVA のピークが観測できるマトリックスであった。しかし、観測した質量領域全体にわたって DCTB 由来のクラスターイオンが観測されており、これらを抑制することはできなかった。この測定では、 m/z 1000～1100 付近に DCTB の重合体 (4 量体) に関連する強いピークに加えて、図2の拡大図に示すように、ブロードな DCTB のクラスターイオンが約 1 Da 間隔で観測されている。この測定では、らせん軌道型の高分解能飛行時間型質量分析計を用いたため、クラスターイオンと試料由来のピークを分離検出することができたが、通常の測定装置ではこれらのピークが重複して正確な質量を決定することが困難にな

図2. DCTB を用いて観測された EVA のマスペクトル。
(a) SEC で分取した低分子量成分のマスペクトルの全体図、(b) 部分拡大図。

る。こうしたバックグラウンドピークを抑制することは困難であり、試料由来のピーク強度が十分でないときは、別のマトリックスを試すか、試料量を増やすなどの検討を行う必要がある。

合成高分子の MALDI-MS 測定では、マトリックス由来のバックグラウンドピークに加えて、カチオン化剤として加えた金属塩に由来するクラスターイオンも妨害の原因となる。特に、芳香族系ポリマーの測定で用いられる銀塩は、DHB などの酸性マトリックスと組み合わせると、 m/z 数千以上の高質量領域まで銀クラスターに由来するバックグラウンドピークが観測されることがある¹¹⁾。銀クラスターイオンは ^{107}Ag と ^{109}Ag の組み合わせにより生じる非常にブロードな同位体分布をもつため、試料由来のピークと重複して解析が困難となる。また、 $[M+Na]^+$ を生成させるために用いられるヨウ化ナトリウム (NaI) も、用いる溶媒やマトリックスとの組み合わせによっては $[(NaI)_n+Na]^+$ や $[(NaI)_n+I]^-$ のクラスターイオンが生じることがある。図3は、DCTB マトリックスと NaI の組み合わせによって観測された NaI クラスターのマスペクトルである。銀クラスターと異なり、NaI クラスターは同位体分布をもたないので、キャリブレーション用の内部標準として用いることができ、特に適当な標準物質が入手しにくい負イオンモードでのキャリブレーションに適している。

3.3 マトリックス結晶の形状

合成高分子の測定では 1 カ所から継続してピークが観測

図3. DCTBとNaIの組み合わせで観測されるNaIクラスターのマスペクトル。
(a) 正イオンモード, (b) 負イオンモード。

図4. マトリックス結晶の電子顕微鏡画像 (50倍)。
(a) 乾燥したTHF溶液から析出させたDHBマトリックス結晶, (b) 吸湿したTHF溶液から析出させたDHBマトリックス結晶, (c) DCTBマトリックスの薄膜状結晶, (d) ピペットチップの先端で攪拌しながら析出させたDCTBマトリックス結晶。

されることはまれであり、測定装置のラスター機能を利用してレーザー光の照射位置を変えながらマスペクトルの積算を行う。したがって、できるだけ均一で微細な結晶を調製することが重要である。このような結晶を得るためには、アセトンやテトラヒドロフラン (THF) のように揮発性が高い有機溶媒を用いるとよい。図4aに、THF溶液から析出させたDHBマトリックス結晶の低倍率電子顕微鏡画像を示す。ここで、DHBのように水に溶解性をもつマトリックスを用いるときは注意を要する。マトリックスあるいは試料を溶解している溶媒が吸湿していると、有機溶媒が先に揮発し、残存した水にDHBが濃縮されて、図4bのような不均一な針状結晶が生じる。湿度が高い環境で試料調製を行うとこのような不均一な結晶が生じやすく、良

質なマスペクトルを観測することが困難になる。このような場合は、再度THFなどの揮発性が高い乾燥した有機溶媒を1 μ L程度塗布して、速やかに再結晶させると均一な結晶を得ることができる。

均一な結晶を調製しても、必ずしも良好なマスペクトルが得られるとは限らない。図4cは、DCTBマトリックスのTHF溶液 (20 mg/mL) を1 μ L塗布して得た結晶の写真である。一見、良好なマトリックス結晶が得られているように思われるが、実はこの結晶は平滑なフィルム状の結晶であり、この表面にレーザー光を照射しても高感度なマスペクトルを得ることはできない。しかし、結晶が析出する前にピペットチップの先端で攪拌しながら結晶を析出させる、いわゆる crash-crystal 法で調製すると、図4dのように不均一な結晶のように見えても低いレーザー光強度で高感度にマスペクトルを観測することができる。

このようにマトリックス結晶の調製には、用いる溶媒や結晶の析出方法にも注意を要する。

4. ま と め

合成高分子は非常に多くの種類があり、同じ名称でも分子量分布や末端基構造などが異なると溶媒への溶解性などが異なることが多いため、一義的に最適な試料調製条件を決定することはできない。ここでは合成高分子のMALDI-MS測定で用いられる代表的なマトリックスと、試料/マトリックス混合結晶を調製するうえでのいくつかの注意点を紹介した。このようにMALDI-MSの試料調製法はノウハウのかたまりであり、最適な方法を見つけるには試行錯誤が必要である。ただし、ある程度の傾向はあるので、文献調査や学会等での情報収集を合わせて行いながら、測定の経験を積むことが重要であろう。

文 献

- 1) 佐藤浩昭, 大谷 肇, “高分子分析ハンドブック”, 日本分析化学会高分子分析研究懇談会 (編), 朝倉書店, 東京

- (2008), 4.6 章, p. 238.
- 2) 佐藤浩昭, “実用プラスチック分析”, 西岡利勝, 寶崎達也編, オーム社, 東京 (2011), 3.6 章, p. 221.
- 3) 佐藤浩昭, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 261 (2007).
- 4) 佐藤浩昭, *ぶんせき*, 345, (2013).
- 5) 佐藤浩昭, 中村清香, 第19回高分子分析討論会講演要旨集, (2014), p. 119.
- 6) W. Wiegand, E. Plumier, K. K. Mayer, U. Runne, W. Schultz-Amling, J. Rosmarinowski, G. J. Safar, and K. D. Kubka, *Arch. Dermatol. Res.*, **277**, 153 (1985).
- 7) P. J. Hayden and C. F. Chignell, *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 231 (1993).
- 8) M. W. F. Nielen, *Mass Spectrom. Rev.*, **18**, 309 (1999).
- 9) T. Fouquet, S. Nakamura, and H. Sato, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **30**, 973 (2016).
- 10) T. Fouquet, H. Aizawa, and H. Sato, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **30** (2016) in press.
- 11) S. F. Macha, P. A. Limbach, S. D. Hanton, and K. G. Owens, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 732 (2001).