[シンポジウム：キャピラリー電気泳動法と質量分析法]

オンラインキャピラリー電気泳動—質量分析法

大塚 浩二・寺部 茂

SUMMARY

A brief review of interfaces for on-line coupling of capillary electrophoresis (CE) and mass spectrometry (MS) is presented. To enable the CE-MS system, electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) were introduced as MS interfaces for connecting with CE instruments, while the partial-filling method was developed to suppress the introduction of non-volatile components or additives in CE buffers as well as ionic species such as ionic micelles into the MS interface. Strategy for the coupling of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and MS is also discussed. Examples of CE-MS are briefly shown.

Key words: capillary electrophoresis, mass spectrometry, CE-MS, MEKC-MS.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) は高性能分離分析法として幅広い分野において注目され、応用研究もさかんに行われている。市販されている CE 装置では、検出法として主に紫外吸光 (UV) 検出が利用されているが、濃度感度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に比べて低いという欠点が指摘されている。これはオンカラム検出を行うためセル部分の光路長が短いことに起因する問題で、バブルセルや Z 型セルを用いることによって光路長を増大させ検出感度の向上を図る手法も開発されている。高感度検出法としてレーザー励起蛍光 (LIF) 検出の利用も検討され装置も市販されているが、適用できる試料範囲が狭いことが欠点である。また、UV や LIF 検出では得られる定性情報の少ないことも難点である。

近年、CE の新しい検出法として質量分析法 (MS) の利用が注目され、CE と MS とのオンライン直接結合 (CE-MS) に関する研究がさかんに行われるようになっていく。CE-MS では試料の構造に関する情報が得られ、また場合によっては高感度検出も期待できるため、CE の主要な検出法として確立されることが望まれている。

本稿では、CE-MS におけるイオン化法、泳動液 (分離溶液)・添加剤の選択、およびいくつかの応用例について

現状を概観する。

イオン化法

1. エレクトロスプレーイオン化 (ESI)

通常 CE-MS においてはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いて試料のイオン化が行われる。Smith ら¹⁾により ESI をインターフェースとする CE-MS に関する最初の論文が発表されたのは 1987 年のことであった。ESI は分離キャピラリーからの溶液を数 kV の電場中で噴霧してイオン化させる緩和なイオン化法であり、試料分子は一般に多価イオンとして検出される。CE では泳動液の流量は $\mu\text{l}/\text{min}$ よりも少なく、インターフェースに導入される試料量については MS との整合性は高い。半面、市販の ESI インターフェースは本来、HPLC と MS との結合 (LC-MS) 用に開発されたものであり、CE から供給される微量の泳動液だけでは安定に噴霧することができない。そのため、シース (sheath) 溶液をノズルの直前で供給して液量を増加させ安定なスプレーが得られるようにされている。シース溶液は ESI そのもののためだけではなく、電気泳動のための電極とキャピラリー内の泳動液 (分離溶液) との間の電氣的導通を保つ役割をも担っている。

また、ESI において噴霧ガスを併用するイオンスプレー型インターフェースは特に LC-MS 用として普及してい

On-line capillary electrophoresis—Mass spectrometry.

Koji Otsuka, Shigeru Terabe; 姫路工業大学理学部

Correspondence address: Koji Otsuka, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297, Japan.

第 49 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

る。LC-MS をベースとする CE-MS 装置の場合には、イオンプレーの利用が一般的である。

最近では、数 μm 程度の内径のキャピラリーを噴霧ノズルとして用いるナノエレクトロスプレーも注目されており、噴霧液滴の微小化による感度向上や、シース溶液を用いない ESI としても期待されている。

CE-ESI-MS では、CE の泳動液中に不揮発性化合物が存在するとイオン化効率の低下や MS シグナル強度の減少、バックグラウンドノイズの増大など MS 検出に対して悪影響を及ぼすことが多い。したがって、一般に CE において多用されているリン酸塩やホウ酸塩の緩衝液を使用することは困難であるとされ、ギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウムなどが利用されている。シース溶液には水-メタノール混合溶液に少量のギ酸や酢酸を添加した溶液が用いられることが多い。

2. 大気圧化学イオン化 (APCI)

LC-MS において普及している大気圧化学イオン化法 (APCI) の CE-MS への適用も検討されている。Takada ら^{2,3)} によって開発された CE 用 APCI インターフェースは LC-MS 用のインターフェースを改良したものであり、ステンレス鋼製の ESI プロブにより CE からの泳動液を噴霧した後、脱溶媒室で溶媒をある程度気化させ、続いて針電極によるコロナ放電によってイオン・分子反応を生じさせ試料をイオン化する構造となっている。イオン化は、コロナ放電によってシース溶液に用いられているメタノールなどの極性溶媒が一次イオン化され、これが試料分子とイオン・分子反応を繰り返し起こすことにより試料分子をイオン化するという過程で起こる。なお、イオン化の後、電圧 (ドリフト電圧) 印加による分子衝突で試料イオンに付加した溶媒など不要な付加分子を脱離させる。

CE-APCI-MS では、そのイオン化の特性から不揮発性物質の影響を受けにくく、それらの存在下でも良好なイオン化効率、MS 検出感度が得られることが明らかとなっている。シース溶液にはメタノールを使用することが多い。

CE-MS における添加剤の利用

1. CE-ESI-MS

CE における分離選択性を改善・調節するために、一般に種々の添加剤が利用されている。添加剤の中には不揮発性物質が多数存在するが、それら不揮発性化合物が ESI-MS に導入された場合、イオン化効率が低下し、著しい感度低下の要因となる可能性が指摘されている。また、高濃度の電解質が存在する場合にもイオン化効率の低下が起こる。したがって、上述のように CE で使用できる緩衝液成分に制限があり、またミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) における硫酸ドデシルナトリウム (SDS) などの低分子量イオン性界面活性剤の利用も困難とされている。

このような添加剤を CE-ESI-MS で使用する際には、添加剤が MS へ導入されるのを抑制する手法が必要となる。その一つの手法に、部分注入法 (Partial-Filling; PF 法) がある⁴⁾。PF 法では、分離キャピラリーの一部に添加剤を含む溶液のゾーンを形成し、試料がそのゾーンを通過する際に分離が行われる。その後、添加剤を含むゾーンを追い越した試料だけがキャピラリーから出た時点で高電圧の印加を止め、添加剤ゾーンがキャピラリーから排出されるのを防ぐ。PF 法は電気泳動移動度の小さいミセルを用いる MEKC には適した方法であり、特に非イオン性ミセルを用いた系では良好な結果が得られた⁵⁾。ペプチドの分析例を Fig. 1 に示す。一方、SDS などイオン性ミセルを利用

Fig. 1. Single-ion electropherograms (A) and mass spectra (B) of three neurotensin derivatives obtained by PF-CE-ESI-MS using sucrose monododecanoate⁵⁾.

Running buffer, 30 mM ammonium formate-formic acid (pH 3.0); micellar zone, 100 mM sucrose monododecanoate in the running buffer filled at 50 mbar for 15 min; capillary, 50 μm i.d., 150 μm o.d. $\times$ 100 cm; CE applied voltage, 17 kV; electrospray voltage, 3 kV; sheath liquid flow, water-methanol-formic acid (50: 50: 1, v/v/v) at 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.

用した場合にはミセルゾーンの拡がりが激しく、結果としてミセルを含まないゾーンが狭くなって分離範囲が限定され、期待されたほどの分離効率は得られなかった⁶⁾が、条件設定によっては MEKC-MS を実現することが可能となる。

2. CE-APCI-MS

APCI-MS では不揮発性成分や電解質の影響を受けにくいことから、種々の添加剤を用いる CE との接続を行っても、多くの場合には十分検出が可能である。実際、緩衝液成分にリン酸塩やホウ酸塩を用い、さらに SDS ミセルを含む泳動溶液を直接 MS に導入しても、例えばカフェインなどカゼン成分を検出することが可能であった⁷⁾。

3. MEKC-MS

中性物質を CE によって分析することができる MEKC は、幅広い分野で応用されており、当然 MEKC-MS に対する要求も高い⁸⁾。単純に MEKC を ESI-MS に直接結合させても十分な検出感度を得ることは不可能に近いが、上述のように、PF 法を使用することによりミセルが MS に導入されるのを抑制するか、インターフェースに APCI を用いることによって、MEKC-MS を構築することが可能である。PF 法と APCI とを組み合わせた PF-SDS-MEKC-APCI-MS による分離例⁶⁾を Fig. 2 に示す。また、MEKC の擬似固定相として高分子量界面活性剤 (HMMS) を用いることによって、MEKC-ESI-MS が可能であることが報告されている⁹⁾。ここでは HMMS とし、アクリル酸ブチル-メタクリル酸ブチル-メタクリル

酸共重合体ナトリウム塩 (BBMA) を使用した。

CE-MS の応用

すでに CE-MS に関する応用例はいくつか報告されている。CE-MS の一つの重要な応用として、通常 CE で使用されている UV 検出器では感度が不十分な化合物を検出することがあげられる。例えば、界面活性剤の分析において、SDS 中にわずかに含まれる硫酸デシルナトリウムや硫酸テトラデシルナトリウムを高感度に検出することが可能であった¹⁰⁾。

また、中性・塩基性シクロデキストリン (CD) 誘導体やタンパク質をキラル識別剤として用いる CE による光学異性体の分離では、電気浸透流を抑制し PF 法を用いることによって、これらキラル識別剤が MS に導入されることなく酸性ラセミ化合物の分析が可能であった¹¹⁾。

これまで ESI-MS では、上述のように不揮発性化合物の存在はイオン化効率・MS 検出感度の低下を引き起こすとされ、それらを含む CE 泳動溶液を直接 MS に導入することは不可能とされてきた。しかしながら、CD 誘導体をキラル識別剤とするキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) で除草剤成分鏡像体を分離し直接 ESI-MS に接続して検出する、CD-CZE-ESI-MS によって不斉分離・検出が可能であることが示された (Fig. 3)¹²⁾。

また、MEKC-APCI-MS では、ESI ではイオン化されにくい検出できなかったフタル酸エステル混合物の分離・検出が可能であった⁷⁾。

Fig. 2. UV signal (A) and selected ion chromatograms (B) for caffeine and ethenzamide obtained by on-line PF-MEKC-MS⁶⁾.

Sample concentration, 0.5 mg/ml; run buffer, 20 mM ammonium acetate (pH 10); surfactant zone, 25 mM SDS in the run buffer; zone injection, 200 mbar for 1 min; sample injection, 50 mbar for 6 s; capillary, 50 μ m i.d. $\times$ 100 cm, UV detection at 65 cm; inlet voltage, 18 kV; electrospray, 3 kV.

Fig. 3. Enantioseparation of herbicide components by CD-CZE-ESI-MS with trimethyl- β -CD (TM- β -CD)¹²⁾.

Separation solution, 20 mM TM- β -CD in 50 mM ammonium acetate (pH 4.6); capillary, 50 μ m i.d., 375 μ m o.d. $\times$ 980 mm; total applied voltage, 27.5 kV (net voltage across the capillary, 30.5 kV); current, 16 μ A; sample concentration, *ca.* 10^{-4} M each in acetonitrile; ESI voltage, -3 kV; sheath liquid, methanol-water-formic acid (50 : 50 : 1, v/v/v) at 2.0 μ l/min.

おわりに

本稿では CE-MS におけるイオン化法と添加剤の利用を中心に CE-MS の現状をごく簡単に概観した。MS は CE の新しい検出法として期待されており、対象試料によっては従来の吸光度検出に比べてより高い検出感度を実現することも可能である。しかしながら、シース溶液・噴霧ガス利用やノズルの形状・大きさを含めた ESI インターフェースの構造に関する検討、新しいイオン化法の開発、CE における添加剤の制限緩和、適用試料範囲の拡大など、CE-MS において解決すべき問題はまだまだ多く、今後さらに検討を進めていく必要がある。CE-MS の最近の進歩については別稿¹³⁾にまとめられているので参照していただきたい。

本研究を行うにあたりご協力いただいた Pim G. Muijselaar 博士、肥塚清浩氏、横井雅樹氏、尾崎祐人博士（カネカテクノロジーサーチ）、ならびに田中喜秀博士（日本ベリリンガーインゲルハイム）に深謝いたします。本研究の一部は文部省科学研究費補助金により実施されたものです。

文 献

- 1) Olivares JA, Nguyen NT, Yonker CR, Smith RD. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* 1987; 59: 1230-2.
- 2) Takada Y, Sakairi M, Koizumi H. Online combination of micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry using an electrospray-chemical ionization interface. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1995; 9: 488-90.
- 3) Takada Y, Sakairi M, Koizumi H. Atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Anal Chem*

- 1995; 67: 1474-6.
- 4) Tanaka Y, Terabe S. Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases. *J Chromatogr A* 1995; 694: 277-84.
- 5) Koezuka K, Ozaki H, Matsubara N, Terabe S. Separation and detection of closely related peptides by micellar electrokinetic chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry using the partial filling technique. *J Chromatogr B* 1997; 689: 3-11.
- 6) Muijselaar PG, Otsuka K, Terabe S. Online coupling of partial-filling micellar electrokinetic chromatography with mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1998; 802: 3-15.
- 7) Yokoi M, Otsuka K, Terabe S. unpublished data.
- 8) Otsuka K, Terabe S. Recent developments in MEKC-MS. *Analisis* 1998; 26: M 44-M 47.
- 9) Ozaki H, Itou N, Terabe S, Takada Y, Sakairi M, Koizumi H. Micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry using a high-molecular-mass surfactant: On-line coupling with an electrospray ionization interface. *J Chromatogr A* 1995; 716: 69-79.
- 10) 田中喜秀, 岸本康弘, 大塚浩二, 寺部 茂. キャピラリー電気泳動/質量分析法による界面活性剤の分析. *分析化学* 1998; 47: 563-9.
- 11) Tanaka Y, Kishimoto Y, Terabe S. Separation of acidic enantiomers by capillary electrophoresis-mass spectrometry employing a partial filling technique. *J Chromatogr A* 1998; 802: 83-8.
- 12) Otsuka K, Smith CJ, Grainger J, Barr JR, Patterson Jr DG, Tanaka N, Terabe S. Stereoselective separation and detection of phenoxy acid herbicide enantiomers by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1998; 817: 75-81.
- 13) 尾崎祐人, 大塚浩二, 寺部 茂. キャピラリー電気泳動/質量分析. *ぶんせき* 1999; 161-70.