

ノート

MALDI ToF-MS を用いた高分子化合物の分子量測定

赤崎 哲也, 山崎 幸彦, 熊沢 勉*

A Direct Molecular Weight determination of synthetic polymer
using a MALDI-TOF Mass Spectrometer

Tetsuya AKASAKI, Yukihiko YAMAZAKI, Tsutomu KUMAZAWA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271-0076 Japan

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI ToF-MS) introduced in 1988 is able to determine higher molecular weight of polymers (for example, protein, oligosaccharides, oligonucleotides, and synthetic polymers) than conventional mass spectrometry.

On the other hand, Gel Permeation Chromatography, which is another commonly used method for polymer molecular-weight determination, is a relative method and relies on whether molecular shape of standard may or may not be similar to that of the polymer under investigation.

In this paper, we report the details of information on polyethylene glycol (PEG), PEG-derivative, and so on, which is obtained by MALDI ToF-MS, and we compare these results with those obtained by conventional Gel Permeation chromatography. This report will prove that MALDI ToF-MS gives new useful information on the molecular structure of samples, and so on.

1. 緒 言

高分子化合物の分子量測定には、光散乱法、粘度法、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC 法) 等の様々な測定方法が存在する。当所でも採用している GPC 法は、高速液体クロマトグラフィーの一種であり、その分離機構は、分子サイズに基づいて構成成分を分離するものである。このため、高分子化合物の分子量測定において広く普及している。しかしながら、GPC 法は、測定原理上、検量線として使用できる標準試料として、分子量分布幅の狭く、かつ分子構造が同一、または近似のものが必要であり、標準試料として利用できる試料が、ポリエチレングリコール及びポリスチレンしかない現状では、多種多様な分析試料の正確な分子量を測定することはできない。また、移動層として用いる溶媒、カラム特性等、いくらかの制限される要素を有するものも事実である。

一方、最近、合成高分子化合物の分子量測定の分野にも浸透してきたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) と飛行時間型質量分析計 (Time of Flight Mass Spectrometry) の組み合わせである

MALDI ToF-MS は、従来の質量分析法に比べて試料をソフトにイオン化できると共に、高分子領域まで分子量を測定することができるため、高分子化合物の分子量及び分子量分布幅を直接測定することができる。

ここでは、MALDI-ToF マススペクトルから得られる様々な情報、及びゲル・パーミエーション・クロマトグラム上のピークと MALDI-ToF マススペクトルとの関係等を報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

Polyethylene Glycol 数種 (和光純薬)
Polypropylene Glycol 数種 (和光純薬)
SUC-3400 (PEG-disuccinate, Mw.3400) (創和科学)
NH₂-3400 CP (PEG-bis-amine, Mw.3400) (創和科学)
SUBSTANCE P (Fw.1347.6) (SIGMA)
ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE (Fw.2465.7) (SIGMA)

* 大蔵省関税中央分析所 〒271-0076 千葉県松戸市岩瀬 531

2.2 装置及び測定条件

2.2.1.1 ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（非水系）

装置：リサイクル分取 HPLC (LC-20 型；日本分析工業株式会社)

フラクションコレクタ (AS-20 型；日本分析工業株式会社)

検出器：RI

オープン温度：25 ± 3

カラム：JAIGEL-2 HF (日本分析工業株式会社) × 4

移動層：クロロホルム (関東化学)

流量：3.5 ml / min

注入量：3.0 ml

2.2.1.2 ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（水系）

装置：LC-6 AD (島津製作所株式会社)

検出器：RI

オープン温度：40

カラム：TSK- 2500 (東ソー株式会社)

移動層：水

流量：0.5 ml/min

注入量：10 µl

2.2.2 飛行時間型質量分析計

装置：Laser ToF LT-1000 (Scientific Analysis Instrument Ltd.,)

イオン化法：マトリックス支援レーザー脱離 (MALDI)

マトリックス：DHB (2, 5-Dihydroxybenzoic Acid) (東京化成)

Sinapinic Acid (東京化成)

2.2.3 二重収束磁場型質量分析計

装置：JMS-700 AM (JEOL)

イオン化法：高速原子衝撃 (FAB；ポジティブモード)

加速電圧：7.0 kV

FAB エネルギー：5 kV

衝撃粒子：Xe

分解能：1000

マトリックス：m-Nitrobenzyl Alcohol (東京化成)

2.3 実験方法

2.3.1 GPC 法

移動層にクロロホルムを用いた系では、分取用カラム (JAIGEL-2 HF (20 mm ID × 300 mm)) を 4 本連結し、クロロホルムを溶媒として、検量線作成用標準試料の濃度を 1 % に調製した後、毎回 3 ml を注入して検量線を作成した。他の試料についても同様の測定条件で測定を行い、検量線から試料の分子量を概算した。

移動層に水を用いた系では、分離用カラム (TSK- 2500 (7.8 mm ID × 300 mm)) を使用し、水を溶媒として、検量線作成用標準試料の濃度を 0.1 % に調製した後、毎回 10 µl を注入して検量線を作成した。他の試料についても同様の測定条件で測定を行い、検量線から試料の分子量を概算した。

2.3.2 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI ToF-MS)

2.3.2.1 キャリブレーション

分子量測定に先立って、2 種類の合成ペプチド (SUBSTANCE P (分子量 1347.6) 及び ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE (分子量 2465.7)) を外部標準物質として選択し、マトリックスにはシナピン酸を用いてシステムのキャリブレーションを行った。

2.3.2.2 試料調製 (ポリエチレングリコール及びポリエチレングリコール誘導体)

標準ポリエチレングリコールを水に溶かし、濃度 10 mg / ml になるように調製した溶液 1 ml と、DHB を混合溶媒 (エタノール：水 = 9 : 1) に溶かし、濃度 10 mg/ml に調製した溶液 9 ml を混合したものを試料板上のスポットした後、アスピレーターで溶媒を揮散させ、再結晶させた。ポリエチレングリコール誘導体についても、同様の方法で試料調製を行なった。

2.3.2.3 試料調製 (ポリプロピレングリコール)

標準ポリプロピレングリコール及び DHB をそれぞれ THF に溶かし、濃度 10 mg/ml に調製した後、ポリプロピレングリコール溶液：DHB 溶液 = 1 : 9 で混合し、試料板上にスポットする。その後、アスピレーターで溶媒を揮散させ、再結晶させた。

3. 結果及び考察

3.1 MALDI ToF-MS による高分子化合物の分子量の測定とマス・スペクトルから得られる情報についての考察

キャリブレーションに用いた 2 種類の合成ポリペプチドの MALDI-ToF マススペクトルを Fig. 1 に、ポリエチレングリコール (平均分子量 (光散乱法：メーカー値) 400, 1000, 2000, 3000) の MALDI-ToF マススペクトルを Fig. 2 に示す。ポリエチレングリコールの MALDI-ToF マススペクトルは、ある程度の分子量分布幅を有する正規分布を示す。また、ポリエチレングリコールの MALDI-ToF マススペクトルでは、ピーク間隔がおおよそ $m/z44$ 、比較のために測定したポリプロピレングリコールの MALDI-ToF マススペクトルでは、ピーク間隔がおおよそ $m/z58$ であり、それぞれの構成モノマー・ユニットの分子量を反映する (Fig. 3)。

平均分子量 1000 のポリエチレングリコールの MALDI-ToF マススペクトル及び FAB マススペクトルを Fig. 4 に示す。また、両者のマススペクトル中の各ピークについて帰属した結果を Table 1 に示す。この結果より、MALDI-ToF マススペクトル中の一連の強いピーク群は、ポリエチレングリコールの分子イオンにカリウムが付加したものであり、弱いピーク群は、ポリエチレングリコールの分子イオンにナトリウムが付加したものであることが分かった。FAB マススペクトルでは、ポリエチレングリコールの高分子量領域においては、 $(M + H)^+$ に一致したが、これは、一般的に高分子領域になるに従い、同位体元素

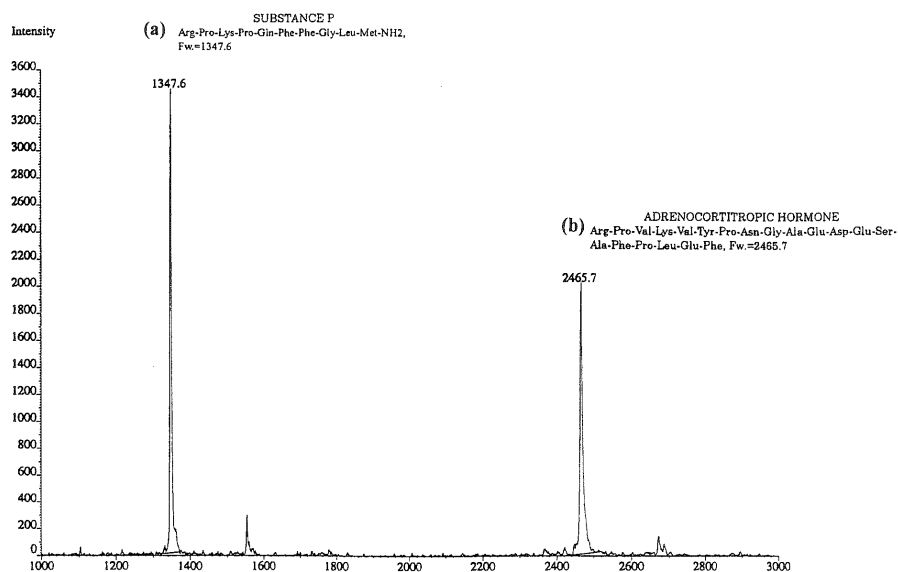


Fig.1 MALDI-ToF mass spectrum of (a) SURSTANCE P, (b) ADRENOCORTITROPIC HORMONE, for Calibration of Time of Flight Mass Spectrometer

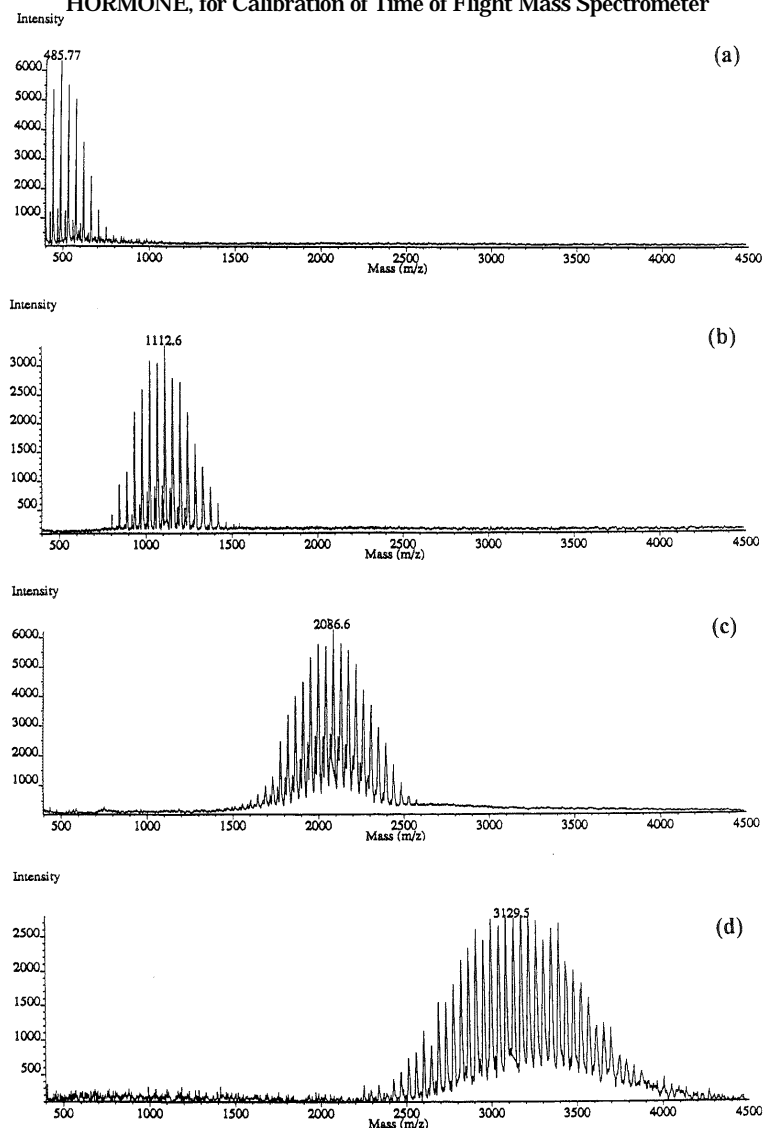


Fig.2 MALDI-ToF mass spectra of (a) Polyethylene Glycol 400, (b) Polyethylene Glycol #1000, (c) Polyethylene Glycol #2000, (d) Polyethylene Glycol 4000 (Average M.w. 3000)

MALDI ToF-MS を用いた高分子化合物の分子量測定

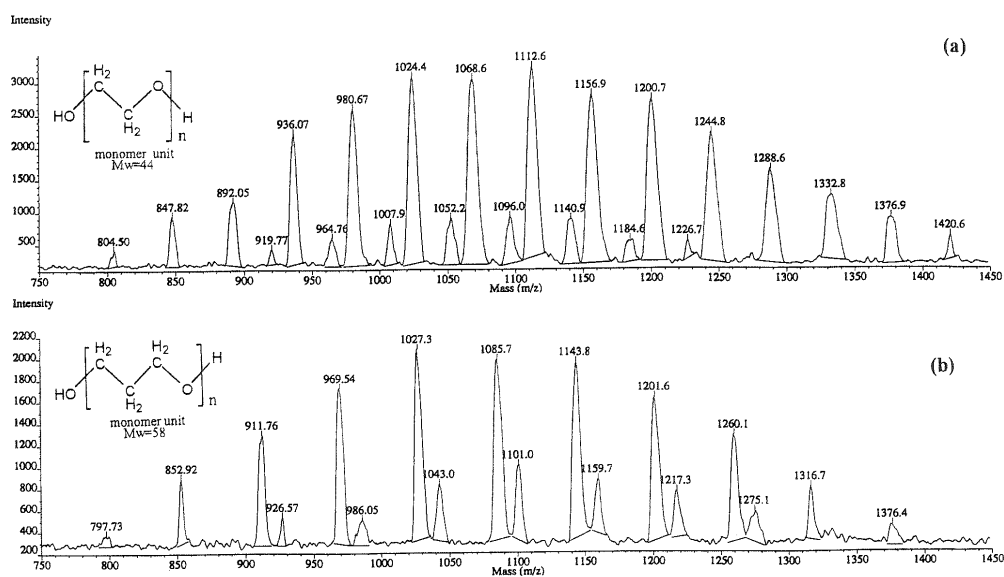


Fig.3 MALDI-ToF mass spectra of (a) Polyethylene Glycol #1000, (b) Polypropylene Glycol #1000

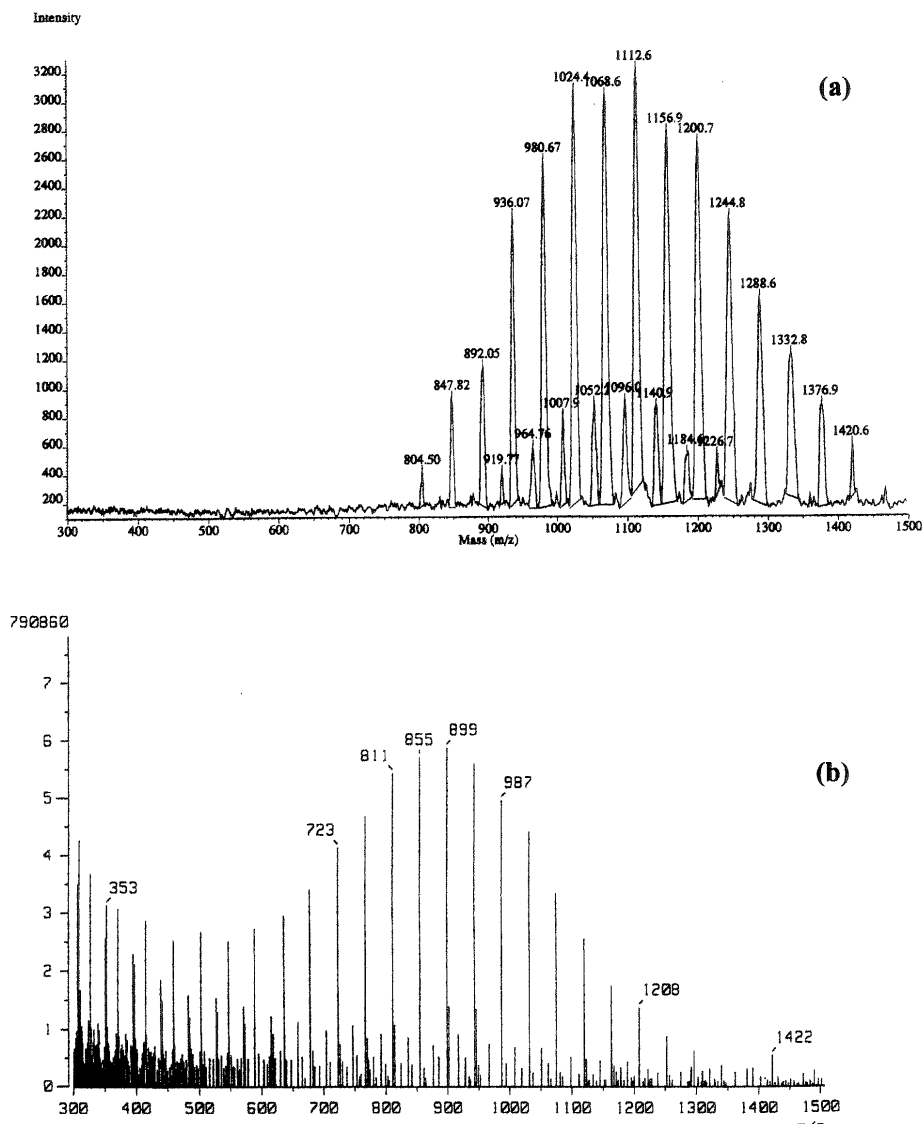


Fig.4 Two types of mass spectrum of Polyethylene Glycol #1000, (a) MALDI-ToF mass spectrum, (b) positive ion FAB mass spectrum

Table1. Assignment of MALDI data and FAB data

[H-(CH ₂ CH ₂ O) _n -OH]								
n	Molecular Formula	M	(M+H) ⁺	(M+Na) ⁺	(M+K) ⁺	MALDI		FAB ⁺
						(Groups of weak peak)	(Groups of strong peak)	
11	C ₂₂ H ₄₆ O ₁₂	502.29690	503.30673	525.28871	541.26261			503
12	C ₂₄ H ₅₀ O ₁₃	546.32511	547.33294	569.31492	585.28882			547
13	C ₂₆ H ₅₄ O ₁₄	590.35133	591.35915	613.34114	629.31504			589
14	C ₂₈ H ₅₈ O ₁₅	634.37754	635.38536	657.36735	673.34125			636
15	C ₃₀ H ₆₂ O ₁₆	678.40375	679.41158	701.39356	717.36746			678
16	C ₃₂ H ₆₆ O ₁₇	722.42996	723.43779	745.41977	761.39367			723
17	C ₃₄ H ₇₀ O ₁₈	766.45618	767.46400	789.44590	805.41989		804.50	767
18	C ₃₆ H ₇₄ O ₁₉	810.48239	811.49021	833.47220	849.44610		847.82	811
19	C ₃₈ H ₇₈ O ₂₀	854.50860	855.51643	877.49841	893.47231		892.05	855
20	C ₄₀ H ₈₂ O ₂₁	898.53481	899.54264	921.52482	937.49852	919.77	936.07	899
21	C ₄₂ H ₈₆ O ₂₂	942.56103	943.56885	965.55084	981.52474	964.76	980.67	943
22	C ₄₄ H ₉₀ O ₂₃	986.58724	987.59506	1009.57705	1025.55095	1007.90	1024.40	987
23	C ₄₆ H ₉₄ O ₂₄	1030.61345	1031.62128	1053.60326	1069.57716	1052.20	1068.80	1032
24	C ₄₈ H ₉₈ O ₂₅	1074.63966	1075.64749	1097.62947	1113.60337	1096.00	1112.80	1075
25	C ₅₀ H ₁₀₂ O ₂₆	1118.66588	1119.67370	1141.65569	1157.62959	1140.90	1156.90	1120
26	C ₅₂ H ₁₀₆ O ₂₇	1162.69209	1163.69991	1185.68190	1201.65580	1184.80	1200.70	1163
27	C ₅₄ H ₁₁₀ O ₂₈	1206.71830	1207.72613	1229.70811	1245.68201	1226.70	1244.80	1208
28	C ₅₆ H ₁₁₄ O ₂₉	1250.74451	1251.75234	1273.73432	1289.70822		1288.80	1252
29	C ₅₈ H ₁₁₈ O ₃₀	1294.77073	1295.77855	1317.76054	1333.73444		1332.80	1296
30	C ₆₀ H ₁₂₂ O ₃₁	1338.79694	1339.80476	1361.78675	1377.76085		1376.90	
31	C ₆₂ H ₁₂₆ O ₃₂	1382.82315	1383.83098	1405.81296	1421.78686		1420.80	
32	C ₆₄ H ₁₃₀ O ₃₃	1426.84936	1427.85719	1449.83917	1465.81307			

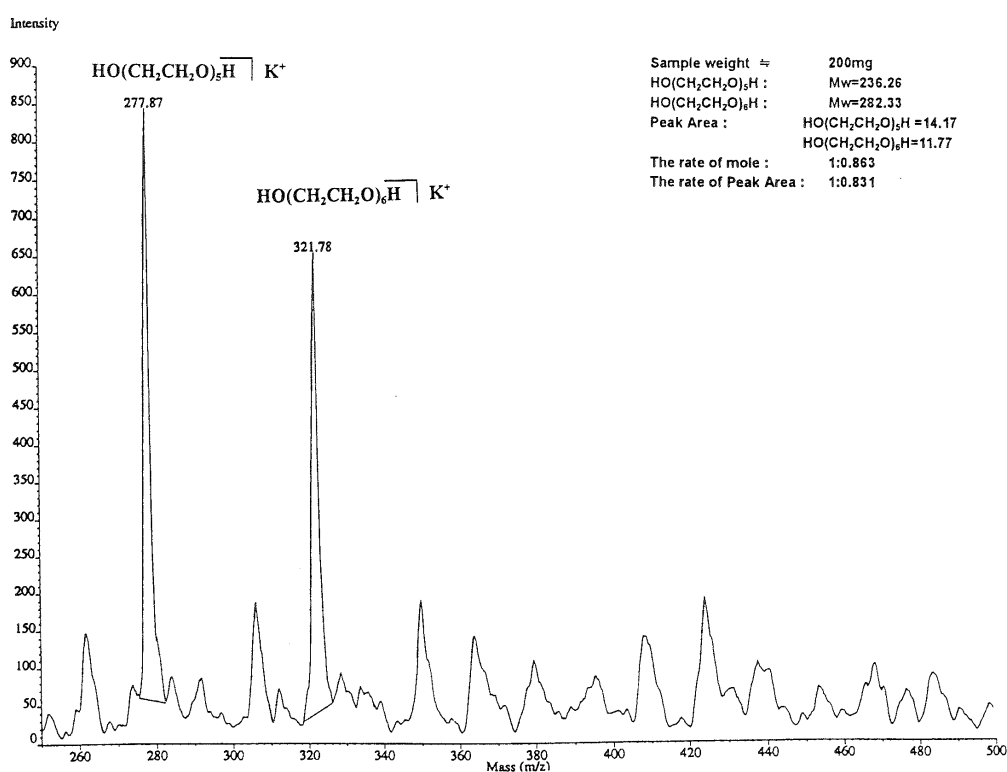


Fig.5 Relationship of the rate of Peak Area and the rate of mole on MALDI- ToF mass

(例えば ^{13}C 等)の影響により、+1 マスシフトするために見かけ上 $(\text{M} + \text{H})^+$ として観測されるためである。また、FAB 法では、MALDI 法に比べて正規分布の頂点が低分子量側にシフトし、更にフラグメンテーションの影響から低分子量域にピークが集中して現れ、分子量分布の判別が困難なものとなった。

次に MALDI-ToF マススペクトルにおける試料濃度とピーク面積の関係性を調べるため、2 種類のオリゴエチレングリコール (ペンタエチレングリコール及びヘキサメチレングリコール) をほぼ同一重量秤取り、水を溶媒として完溶させた後、DHB をマトリックスとしてイオン化させたところ、MALDI-ToF マススペクトル (Fig. 5) 中の各々のピーク面積比は、ほぼモル比に近い値を示す。

3.2 ゲル・パーミエーション・クロマトグラム上のピークについての溶出量と分子量分布の変化

標準ポリエチレングリコール #1000 (平均分子量 1000) についての GPC ピークを細かく分画し、各々の画分の MALDI-ToF マススペクトルを Fig. 6 に示す。ポリエチレングリコー

ル #1000 は、GPC において単一のピークを示すが、ピークの画分を MALDI ToF-MS で観測すると、溶出量の増加に伴いポリエチレングリコールの分子量が、高分子量領域から低分子量領域に推移していることが分かる。また、クロマトグラムのピーク頂上の分子量は、MALDI-ToF マススペクトルの正規分布頂点付近の分子量とほぼ一致し、催の異なる平均分子量のポリエチレングリコールについても、同様の結果が得られた。

この結果から、ポリエチレングリコールの場合、MALDI-ToF マススペクトルの正規分布頂点付近の分子量が、クロマトグラムのピーク頂上の分子量に相当するものと推定される。

3.3 ポリエチレングリコール誘導体の分子量測定

3.3.1 GPC 法における測定濃度の検討

非水系 GPC において、標準ポリエチレングリコール #1000 (平均分子量 1000) を 15mg, 30mg, 60mg, 150mg 注入した時のクロマトグラム、および水系 GPC において、標準ポリエチレングリコールを $5 \times 10^{-3}\text{mg}$, $1 \times 10^{-2}\text{mg}$, $2 \times 10^{-2}\text{mg}$, $5 \times 10^{-2}\text{mg}$ 注入した時のクロマトグラムを Fig. 7 に示す。

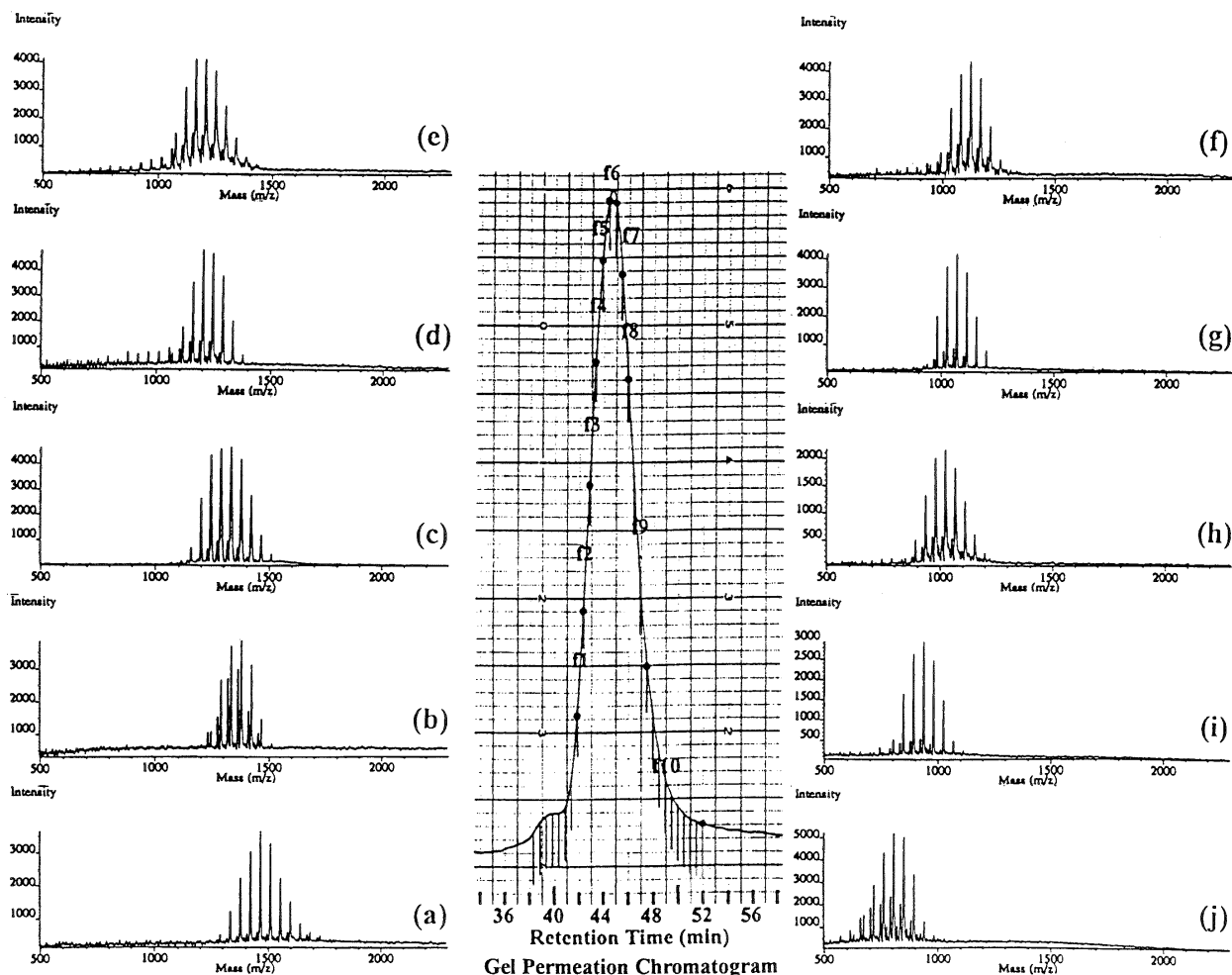


Fig.6 MALDI-ToF mass spectra of fractions : (a) f1, (b) f2, (c) f3, (d) f4, (e) f5, (f) f6, (g) f7, (h) f8, (i) f9, (j) f10, and Gel Permeation Chromatogram of Polyethylene Glycol #1000 (chloroform system)

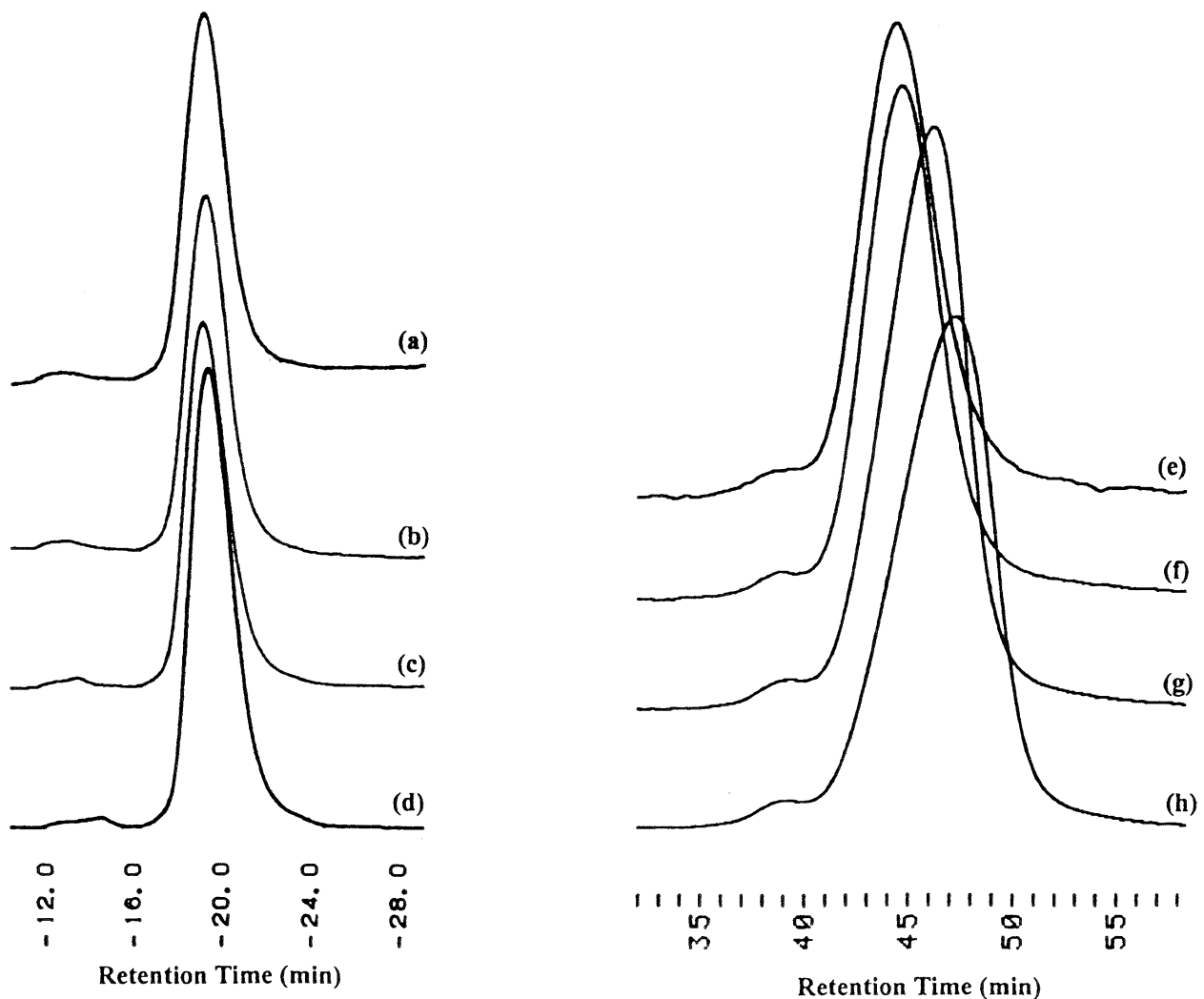


Fig.7 Concentration dependence of Polyethylene Glycol #1000

- (a)injection volume 5×10^{-3} mg, water system (b)injection volume 1×10^{-2} mg, water system
 (c)injection volume 2×10^{-2} mg, water system (d)injection volume 5×10^{-2} mg, water system
 (e)injection volume 15mg, chloroform system (f)injection volume 30mg, chloroform system
 (g)injection volume 60mg, chloroform system (h)injection volume 150mg, chloroform system

いずれの場合においても、試料注入量が増加するに従い、クロマトグラム上のピークのリテンションタイムは遅くなっている。このため、以後の検量線作成及び試料の測定に際して、非水系 GPC では、注入量を 30mg、水系 GPC では、注入量を 1×10^{-2} mg一定とした。なお、検量線作成に用いた標準ポリエチレングリコールの分子量としては、それぞれの MALDI-ToF マススペクトルの正規分布頂点の質量数から、カリウムの質量数 39 を差し引いた値を用いた。

3.3.2 GPC 及び MALDI ToF-MS によるポリエチレングリコール誘導体の分子量測定・検討

測定に用いた 2 種類のポリエチレングリコール誘導体を Fig. 8 に示す。また、これらのポリエチレングリコール誘導体のゲル・パーミエーション・クロマトグラムを Fig. 9 に、それぞれの MALDI-ToF マススペクトルを Fig.10 に示す。また、上

記において作成したポリエチレングリコールの検量線に各々の誘導体の溶出時間及び MALDI ToF-MS で得られた各々の誘導体の分子量をプロットしたものを Fig.11 ~ 12 に示す。

上記の結果から、PEG-disuccinate については、移動層に水を用いた GPC の条件においては、GPC により作成した検量線から算出した概算値では、分子量 10000 程度、MALDI-ToF マススペクトルにおける測定値では、分子量 2800 ~ 4200 程度の分子量分布幅を有し、Fig.13 に示す様な分子間水素結合による影響からか、GPC による概算値は、実際の分子量に対して、2 ~ 3 倍程度の値を示した。移動層にクロロホルムを用いた GPC の条件においては、カラムとの吸着の影響からか、GPC による概算値は、実際の分子量よりもかなり低い値を示した。PEG-bisamine については、移動層に水を用いた GPC の条件においては、カラムへの吸着のためピークを検出できなかったが、移動

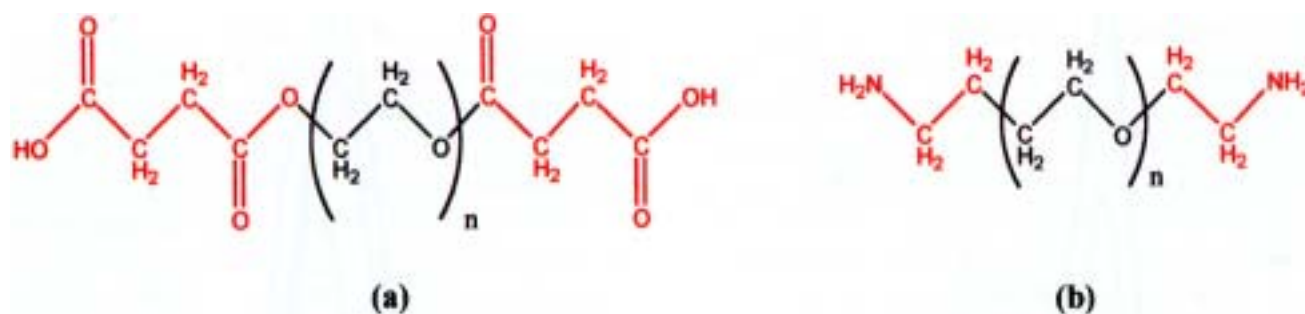


Fig.8 Structures of two polyethylene glycol derivative, (a) Polyethylene glycol-disuccinate, (b) Polyethylene glycol-bis- amine

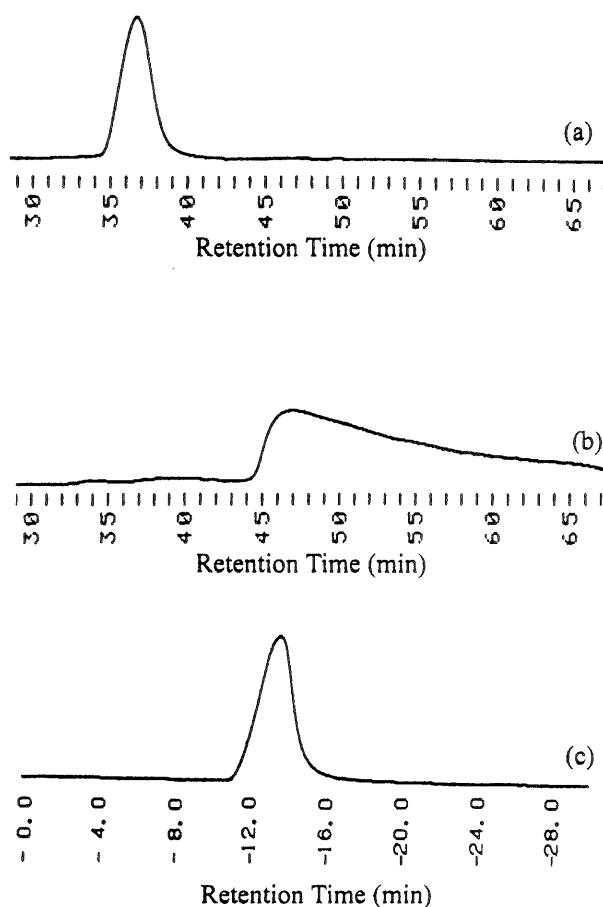


Fig.9 Gel Permeation Chromatograms of (a) Polyethylene glycol-disuccinate (mobile phase : chloroform), (b) Polyethylene Glycol-bis-amine (mobile phase : chloroform), (c) Polyethylene glycol-disuccinate (mobile phase : water)

層にクロロホルムを用いた GPC の条件においては, GPC による概算値と MALDI ToF-MS の測定値は, 比較的近い値を示した。

4 . 要 約

近年, 合成高分子化合物の分子量測定の分野にも浸透してきたマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI ToF-MS) は, 従来のイオン化に比べて, 非常にソフトなイオン化法であることが知られている。このため, イオン化

の過程におけるフラグメンテーションが大幅に制限され, 分子イオン (親イオン) の分子量を観測するのが容易である。

実際にポリエチレングリコールを MALDI 法によりイオン化すると, $[M + Na]^+$ 及び $[M + K]^+$ のイオンを生成すると共に, 正規分布を示すマス・スペクトルを形成し, この正規分布を頂点の質量数は, ゲル・パーミエーションクロマトグラフィーのピーク頂点にほぼ一致する。また, ピーク間隔は, 構成モノマー・ユニットの分子量を反映するため, ポリマーの種類を推定するための手掛かりにもなる。

これに対して, 従来からの高分子化合物の分子量測定におい

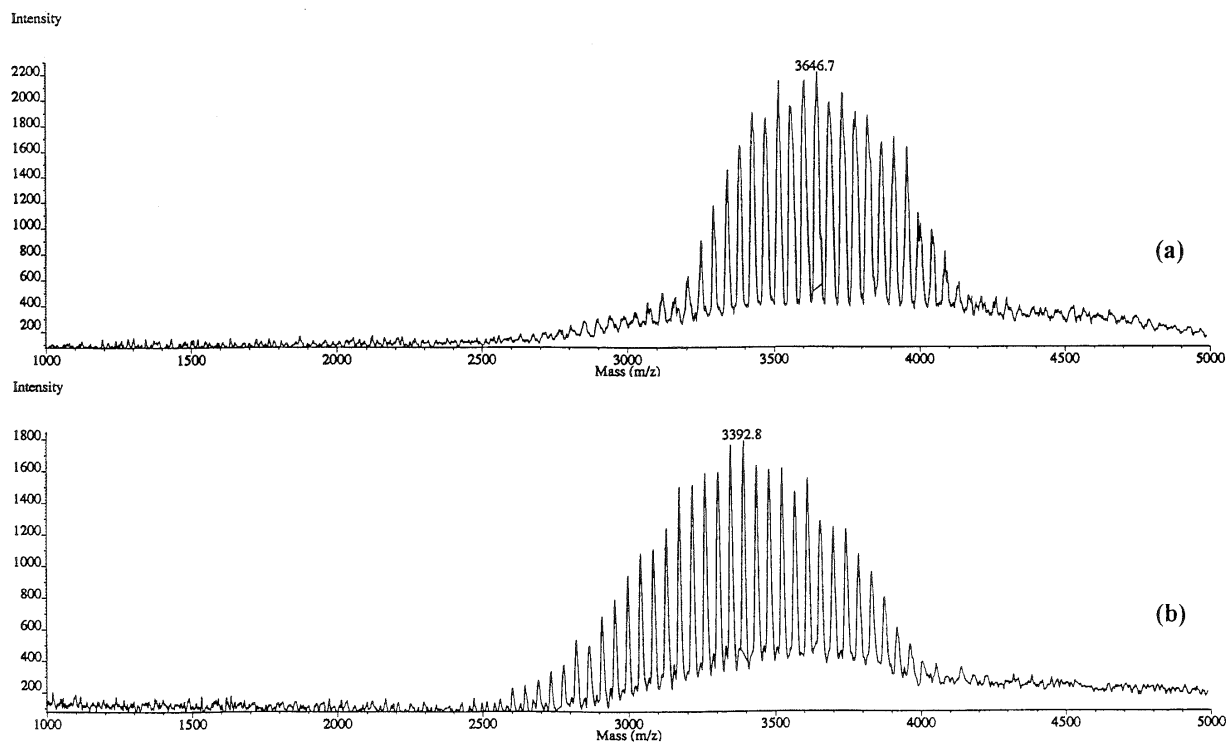


Fig.10 MALDI-ToF mass spectra of (a) Polyethylene Glycol-disuccinate, (b) Polyethylene Glycol-bis-amine

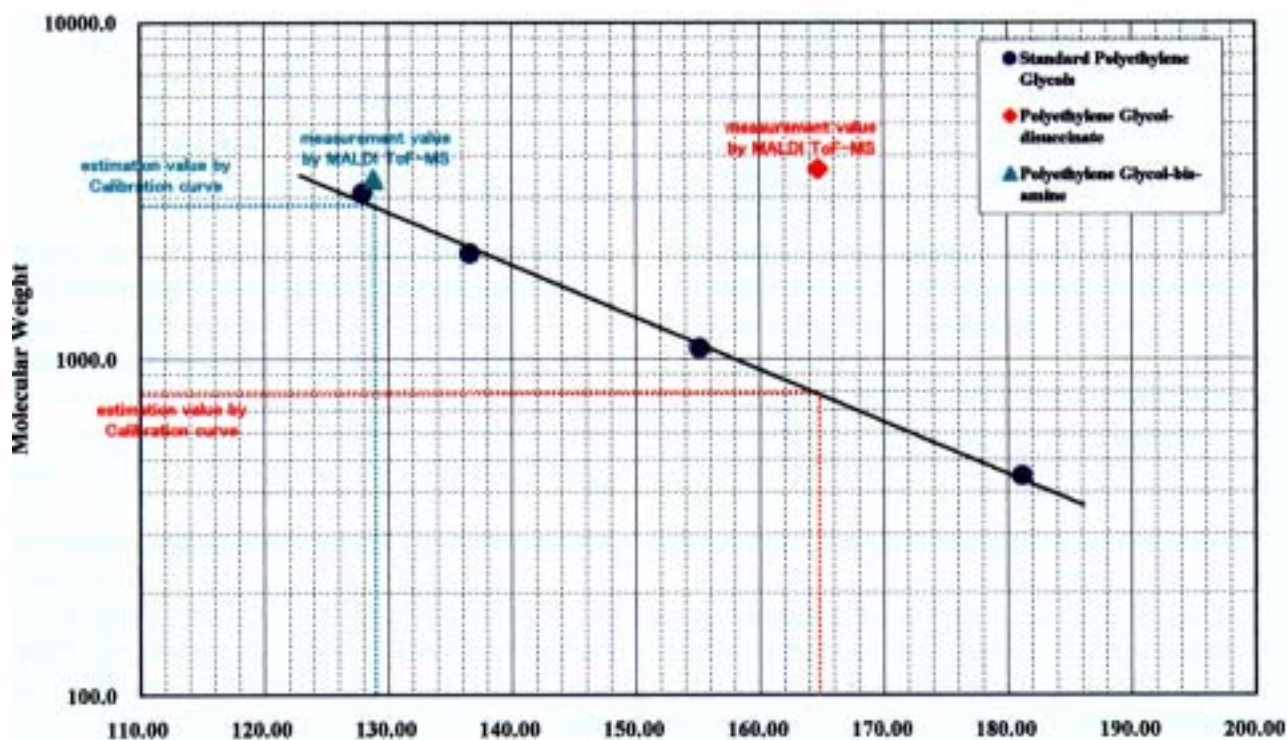


Fig.11 Comparison between molecular weight by MALDI ToF-MS and by Calibration curve from Gel Permeation Chromatogram (Chloroform system)

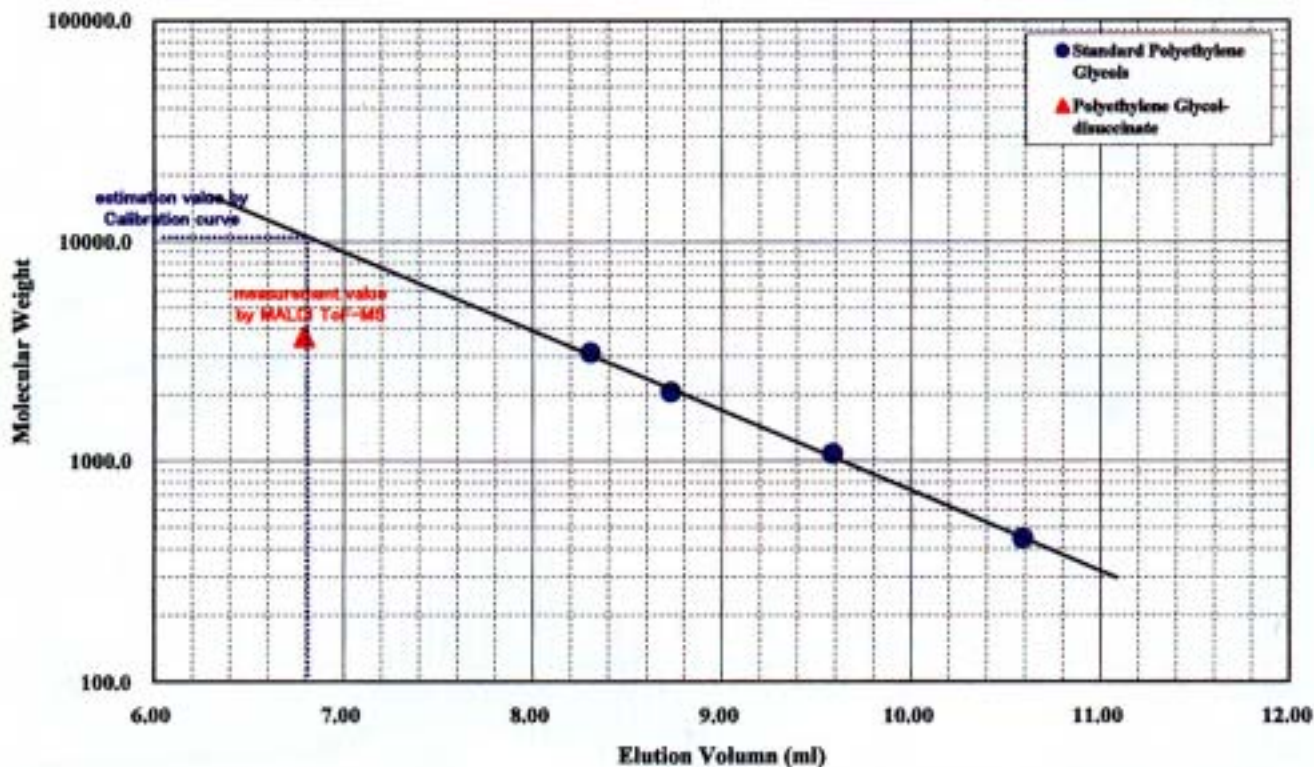


Fig.12 Comparison between molecular weight by MALDI ToF-MS and by Calibration curve from Gel Permeation Chromatography (water system)

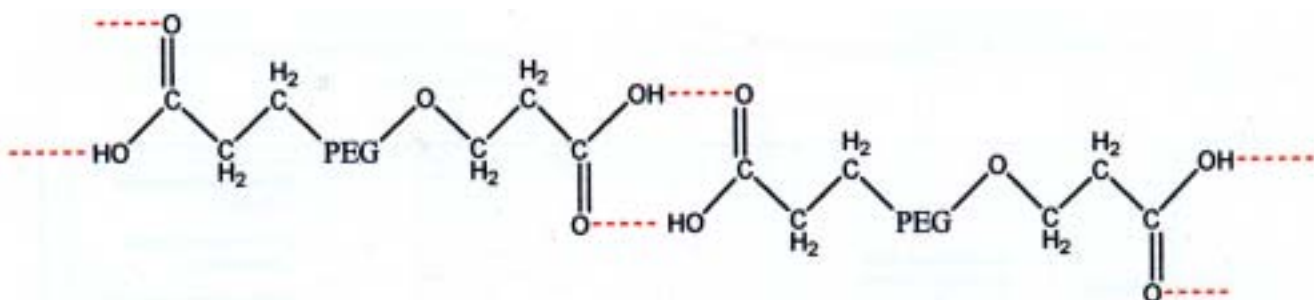


Fig.13 Molecular model of Polyethylene glycol-disuccinate in water

て用いられていた GPC 法は、今回の報告で述べたように、高分子化合物の末端が修飾されただけでも、カラム、移動層等の条件によっては、真の分子量を測定することができないため注意が必要である。

最後に MALDI ToF-MS は、生化学の分野においては、数 10

万の質量数を有するヌクレチドの測定等、多くの報告がなされている反面、合成高分子化合物についての報告例は、まだ少ない。しかし将来的に、有用なマトリックスが開発され、合成高分子化合物の分析において、従来の測定法で得られる情報以外の新たな知見が得られることを期待する。

文 献

- 1) Domenico Garrozo, Giuseppe Impallomeni, Emanuela Spina and Luisa Sturiale ; Rapid Commun. Mass Spectrom, Vol.9, 937-941(1995)
- 2) Christopher F. Llenes and Rebecca M.O'Malley ; Rapid Commun. Mass Spectrom, Vol.6, 564-570(1992)
- 3) Tao He, Daniele Fabris and Catherine Fenselau ; J. Mass Spectrom. Soc. Jpn, Vol.46, 1, 1998
- 4) 斎藤一仁 ; 出光技報 (出光興産株式会社, Vol.41, 2, 1998)
- 5) 丹羽利克 ; “最新のマススペクトロメトリー 生化学・医学への応用” 化学同人 (1995)
- 6) 関川義明, 藤田桂一 ; 本誌 17, 41-46(1977)
- 7) 武内次夫, 森定雄 ; “ゲルパーミエーションクロマトグラフィー” 丸善株式会社 (1976)
- 8) 武内次夫, 森定雄 ; “ゲルパーミエーションクロマトグラフィー<基礎編>及び<応用編>” 講談社 (1972)