

氏名	韓 忠保
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	医工農博甲第123号
学位授与年月日	令和5年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	博士課程工学専攻 エネルギー物質科学コース
学位論文題目	Fundamental Study of Electrospray Ionization Using Atmospheric Pressure and High-Pressure Ion Sources (大気圧及び高圧イオン源を用いたエレクトロスプレーイオン化の基礎研究)
論文審査委員	主査 准教授 チェン リーチュイン 教授 矢野 浩司 教授 二宮 啓 准教授 宇野 和行 教授 桑原 哲夫 准教授 浮田 芳昭

学位論文内容の要旨

本論分は、質量分析における大気圧及び超大気圧エレクトロスプレーイオン源の基礎研究及び新規応用に関連する。第1章では、質量分析、エレクトロスプレーの原理、先行研究等を述べた。従来のナノエレクトロスプレーイオン源では、内径～1マイクロメートル以下の細いキャピラリーを用いなければならない。

第2章では、高圧イオン源を用いて、内径0.4 mmのキャピラリーから生成される高い伝導率を持つ水溶液のエレクトロスプレーを行った。イオン源を加圧することにより、放電を回避することが出来た。非常に安定したテイラーコーンは、「真のナノエレクトロスプレー」特性を示す静水圧に近い状態に調整することができた。エレクトロスプレー電流と流量関係を表すスケーリング則は、放電のない条件下で nL/min の流速領域まで有効であることがわかった。流速と初期液滴のサイズおよび生成したイオン種は、スプレー電流を瞬間流速の指標として制御することができた

第3章では、ESI高電圧(HV)の精密走査により、数百 pL/min から～100nL/min の範囲で連続的に流速を変化させるオフラインナノ ESI 質量分析を行った。このシステムは、タンパク質の平均電荷状態の制御、混合物の定量分析、試料の脱塩に適用することが

わかった。さらに、高い伝導率を持つ緩衝液を用い、低流速を調整することにより、タンパク質の酸化現象を始めて観察した。この現象を利用し、オゾン、H₂O₂、紫外線活性化などの酸化試薬を使わずに、同じ ESI エミッターで nanoESI-MS 分析と同時に酸化的修飾を行うことができた。

第4章では低流速の時に発生した酸化現象を調べた。この酸化現象は、テイラーコーン先端または最初に生成された帯電液滴の電場が約 1.3 V/nm に達すると起こると推測した。酸化イオン信号は流速の変化に瞬時に反応し、酸化が高度に局在していることを示している。同位体標識法を用いて、酸化現象における酸素原子は主に気相に由来することが分かった。強い電場によって形成された反応性酸素原子によって、液体表面に集まった試料が直接酸化される経路が示唆された。

定常コーンジェットモード下のエレクトロスプレーは非常に安定しているが、流量、表面張力、静電的変数の変化により、動作状態が他の脈動モードやマルチジェットモードに移行する可能性がある。第5章では、エミッタ電圧補正のためのエラー信号を決定するために、スプレー電流とテイラーコーンの頂角を使用した簡単なフィードバック制御システムを開発した。このシステムは、オンラインおよびオフラインのエレクトロスプレーの外部摂動に対してコーンジェットモード操作をロックするために適用される。フィードバック制御を用いた ESI-MS は、エミュレートされた外乱に影響されにくく、長期的に安定したイオン信号の取得が可能であることが実証された。

第6章では、無電極噴霧器から逆極性の荷電液体噴流を同時に発生させるために、バイポーラ ESI ソースを開発した。噴霧器は2つのエミッターで構成されている。噴霧器と液体供給システムはすべて絶縁体でできているため、一般的なエレクトロスプレー・エミッターでは液体と電極の界面で起こる電気化学反応を完全に排除することができる。バイポーラ ESI を、電気化学的に誘導される酸化/還元を伴わないタンパク質とメタロセンの質量分析に応用することが実証された。

第7章では、イオン導入管の狭い流路内でのエレクトロスプレーイオン化について検討した。内径 0.5mm と 0.6mm のイオン導入管に、外径 0.2mm の溶融シリカ製の絶縁エミッタキャピラリーを挿入し、荷電液滴をすべて吸引した。噴霧状態を観察するために、入口付近に2つの横穴を設けた特注のイオン導入管を使用した。1~4 μ L/min の流量下で安定した動作は、エミッタの縁の周りに2つ以上のテイラーコーンを固定したマルチコーンジェットモードであることがわかった。インレットキャピラリーの数ミリメートル外側で操作される典型的なコーンジェットおよびマルチジェットモードとの比較では、タンパク質標準のシグナル増強が示された。

論文審査結果の要旨

本学位論文の審査は、提出論文の内容、口頭発表、および口頭試問の質疑応答に基づき、6名の審査員（主査：チェン准教授、審査委員：矢野教授、二宮教授、桑原教授、宇野准教授、浮田准教授）によって行われた。

本論文は新しい大気圧及び高圧イオン源を用いてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) の物理的特性、イオン化の性能を評価し、その結果を基に、新規応用の確立を目的としている。大気圧エレクトロスプレーに関して、2つの新手法を開発し、その特性評価を行った。一つ目は質量分析計のイオン導入管の中でエレクトロスプレーイオン化を行い、生成したイオンを最大限に質量分析計の真空に導入する手法である。イオン導入管の両端に観察用の穴が加工されて、エレクトロスプレーの状態、安定性はレーザと顕微鏡で評価することができ、その特性を *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* vol. 32, pp. 1821-1828 に報告した。2つ目はエレクトロスプレーのスプレーヤーに電極を使わない、バイポーラ ESI という新規イオン源である。噴霧側に電気化学反応が起きないため、その反応による検体の酸化を防ぐことができた。その特殊のエレクトロスプレーの電気的特性、とイオン化の性能を評価し、その結果を *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* vol. 34, pp. 728-736 に報告した。

高圧イオン源に関しては、大気圧より高い圧力下における気体の絶縁性が高くなったため、表面張力の高い純水溶媒を使っても、放電を起こさず、安定のエレクトロスプレーを得ることができる。その超大気圧のエレクトロスプレーの物理的特性、スプレー電流及び流量の変化によって生成したイオンの種類、電荷、イオン強度の評価を行った。そして、流速がスプレーヤーに依存しないことを確認し、通常より大きいキャピラリーを用いても、流速が数 nL/min のナノエレクトロスプレーを実現した。その結果を *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* vol. 33, pp. 491-498 に報告した。エレクトロスプレーの流速と生成したタンパク質イオンの平均電荷を調査し、結果を *Int. J. Mass Spectrom.* vol. 476, pp. 116845 にまとめた。

上記の高圧イオン源では、スプレーヤー高電圧を手動で調整し、スプレー電流を制御する。より高精度で電流と流量を調整するために、コンピューター制御を用いて、スプレーヤー電圧を制御した。電圧は 1V/step の精度で上下の走査を行い、0.5 nL/min 以下となる最低流量の検出ができて、その極限に近い流量で発生したイオン化の特徴を評価し、その結果を *Anal. Chem.* vol. 94, pp. 16015-16022 に報告した。さらに、高い電気伝導度を持つ水溶液を用い、流量を精密に制御することによって、オンデマンドでペプチドとタンパク質の酸化修飾が可能であることを明らかにした。スプレーヤー出口に形成する液体円錐

形 (Taylor cone) 先端の液面に発生した電場強度が 1 V/nm 以上になると、その酸化現象が起きることを判明し、それらの結果を Chemical Science, vol 14, pp. 4506-4515 に報告した。

大気圧及び高圧エレクトロスプレーのスプレーに印加する電圧は一般では一定の値になっている。しかし、噴霧の時に、送液の流速変動、電気伝導度と表面張力の変動、またはスプレー付近の電場変動によって、噴霧の具合が変わり、安定な Cone-jet モードから不安定な Pulsation モードになる可能性がある。顕微鏡観察で、スプレーの先端に形成する液体円錐形の角度は、流体的変動により変わることを判明した。その角度をフィードバック制御信号として利用し、電圧の自動調整で、流体の変量変動によるエレクトロスプレーの変化を補正することが可能であることを明らかにした。そのフィードバック制御システムを大気圧及び高圧エレクトロスプレーイオン源に応用し、その性能を評価をし、長時間でイオン源を操作しても、安定なイオン信号が得ることが分かった。その結果を Anal. Chem. vol. 95, pp. 10744-10751 に報告した。

申請者は上記の研究結果を纏まった論文内容を 45 分ほどで英語で発表を行った。発表後、質量分析の基礎、エレクトロスプレーイオンの特性、ESI のイオン化原理、空間電荷効果、電気化学反応、実験に使用したタンパク質の構造、質量電荷比、電荷の表記、実験結果の再現性、スプレー電流と流量の関係、強い電場による酸化現象に関する質問があり、満足のいく回答があった。発表スライドの数ヶ所における誤字の指摘もあり、その場で訂正を行った。

質疑応答が終了した後、審査委員による合否判定の審議を行なった。審査会では、本論文の内容が査読付き論文 7 編 (別紙 3) で掲載されていることを確認した。申請者の論文が博士論文として価値があり、博士の学位を得るにふさわしい資格を有していると判断され、最終試験に合格との結論を得た。