

Pulsed Extraction(遅延引き出し)法とは？

Pulsed Extraction(以下PEと略す)法とは、「イオンの引き出し時点を、イオンが発生した時点と同時にではなく、多少遅らせてから行う方法」です。これをTOFMSに採用することにより、通常 質量分解能が向上します。

この方法の基本形は既に1955年に報告されており、島津製作所では LD-TOFMS(製品名:LAMS-50K)を開発していた1980年代(中央研究所での基礎研究)に改良案を基に実験を行い、特許も出願しています。その後の1990年代に各社から類似の方法が発表され、現在では「遅延引き出し法」がMALDI-TOFMSでの標準採用法となっています。

本解説書では、TOFMSの原理説明から、PE法にて分解能が向上できる理由を導き出します。

1. 飛行時間型質量分析法(Time-Of-Flight Mass Spectrometry)TOFMSの原理概略

図1に示されるように、様々の大きさの正イオンがサンプルスライドSample Slide上で発生した、とします。サンプルスライドと接地Ground間には V_0 の電位差があるので、イオンは図1の右方向に引き出されます。引き出し完了後の各々のイオン速度 v は、エネルギー保存の法則[式(1)]より求められます。

$$qV_0 = \frac{1}{2}Mv^2 \quad \text{--- 式(1)} \quad \therefore v = \sqrt{\frac{2V_0q}{M}} \quad \text{--- 式(2)}$$

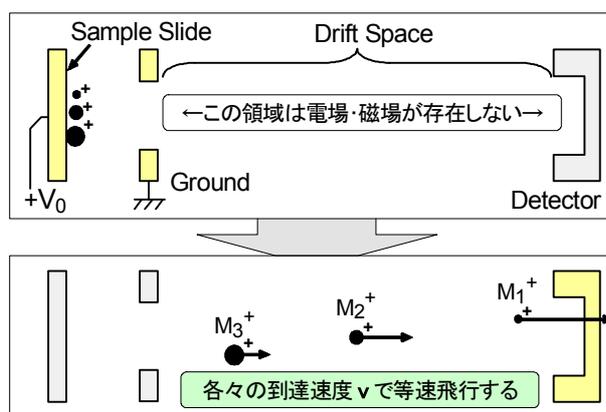
q : イオン電荷 M : イオン質量 v : イオン速度 V_0 : 電位差

ここで V_0 は どのイオンに対しても一定であるから、 M/q 値が小さいイオン(図1では M_1^+)ほど 高速でドリフト空間Drift Spaceを飛行し、検出器Detectorに到達します(加速領域“Sample Slide” - “Ground”間の現象は無視)。

この様に、 M/q 値の違いによりイオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う方法を、「飛行時間型質量分析法」(TOFMS)と呼びます。

補足) 上記式を $q=ze$ (z :イオン電荷数)・ e (素電荷)、 $M=m \cdot u$ (統一原子質量単位)と変形すると、実質的に“ m/z ”が導き出されます。

素電荷 e : 1.602×10^{-19} C (電子1個の電荷量に等しい) 統一原子質量単位 u : ^{12}C 原子の質量の $1/12$ (1.6605×10^{-27} kg)



M_1, M_2, M_3 の電荷量は同一 重量: $M_1 < M_2 < M_3$

図1 Time-Of-Flight Mass Spectrometry (TOFMS)

2. TOFMSで分解能を向上するための基本原理

上記のTOFMSで、特に分解能を向上させるための主な前提条件を、ここで列記します。

a. イオンの初期エネルギーを同一(ゼロ)にする

図1では、イオンが初期エネルギーを全く持たない(静止した)状態でイオンが発生したと仮定しています。イオンが初期エネルギー ε を持つ場合は、位置エネルギー zV_0 以外のエネルギーを持つことになり(式(1),(2)で $V_0 \rightarrow V_0 + \varepsilon$ になる)、 m/z 値が同一のイオンでも速度は同一とはならず、飛行時間にばらつきができてしまいます。

b. イオンの発生(引き出し)時間幅を短くする

TOFMSは時間軸上でイオンの大きさごとに分離しますので、イオン発生時間幅が狭くなるほど分解能が高くなります。

c. イオンの発生位置を限定する

引き出す前のイオンが図1のイオン飛行軸方向に広がりを持つ場合、 m/z 値が同一であるイオンが検出器へ到着する時間は、(たとえ引き出しエネルギーが同一でも)分布を持ってしまいます。

3. Pulsed Extraction(PE)法の基本原理 --- なぜ質量分解能を向上できるのか？

分解能を左右する要因のうち、a., b. に対して改善を行えるのが PE法です。なお MALDIではレーザーを集光させた領域(〜 $\phi 100\mu\text{m}$)のみがイオン化されるため、通常 c. を考慮する必要はありません。以下に、PE法で分解能が改善される理由を PE法を用いない従来のContinuous Extraction(以下CEと略す)法(一定の引き出し電圧を常に加える)と比較しながら解説します。

d. エネルギー収束 ← イオンの引き出しエネルギーを同一にする --- 図2参照

まず、イオン源でイオンが発生したときには、加速電圧が加わらないようにしておきます(図2最上段左側)。

--- Sample Slideと Extraction Ringには 同一電圧 V_0 が印加されているため、発生イオンからみれば(初期エネルギー以外の)新たな加速力は発生しないことになります。

この状態では、発生したイオンの内 初期エネルギーの大きいもの(初速度大)(図2の●)の方が、イオン発生位置から遠ざかって行きます。イオン発生から一定時間経過(10nsec~数100nsec)後に、イオン発生位置に近い方がより高い加速電圧が加わるよう(傾斜電場)にしてイオンを引き出す(図2の2段目左側)と、

○: 初期エネルギーの小さいイオン → 加速電圧が高い ●: 初期エネルギーの大きいイオン → 加速電圧が低い

すなわち、引き出しの時点で両者が同一の運動エネルギーを得る(同一速度になる)ことになり、 m/z 値が同一のイオンなら初期エネルギーの大小にかかわらず同時に検出器に到達するため、分解能の高い測定が行えることとなります。

--- 初期位置の分布の寄与を相殺するため、初期エネルギーの小さい(または0)のイオンに より高い加速を加える場合もあります。

これに対し、従来のCE法(図2右側)では、どのイオンも同一の加速電圧となり、初期エネルギーの大きなイオン(初速度の速いイオン)ほど先に検出器に到達してしまうため、分解能は低くなってしまいます。

e. 発生時間収束 ← イオンの引き出し時間幅を短くする --- 図3参照

MALDIでは、通常半値幅:数nsecのレーザを用いてイオン化を行います。イオンの発生時間がこれと同一レベルならば、TOFMS(時間軸でイオンを分離)の分解能を損なわずに高分解能の測定が行えます。

--- これがLaser Desorption(直接イオン化)方法で分解能が高くなりやすい原因の1つです。

しかし 特にレーザ強度が高い場合等は、レーザ照射完了後もイオンが発生し続ける(図3の○)傾向があり、CE法(図3右側)では、イオン発生 即 引き出されるため、この発生時間幅に比例して分解能が低下することになります。

この様な状態に対応し、イオン発生が完了後(図3の2段目左側)に全イオンの引き出しを同時に行えば(イオン発生から一定時間経過後に加速電圧を印加すれば)、分解能を低下させずに測定できることとなります。

4. Pulsed Extraction(PE)法の実際 --- その特長と欠点

TOFMS基本原理(図1)通りに動作するLinear Modeでは d,e 両方の効果が期待できるため、PE法を用いない場合(分解能:数百~1,000)に比べ、PE法を用いれば大幅な分解能向上(2倍~5倍)が得られます。イオンを折り返すReflectron Modeでは既にエネルギー収束を行っているため、PE法を採用する効果は相対的に少なくなります(概して分解能絶対値は Linear Modeより高くなる)。--- 「なぜReflectron Modeでは分解能が向上できるのか?」参照

また、Linear ModeでPE法を用いても、(同一質量範囲で)Reflectron Modeより分解能を高くすることは困難です。

--- 通常、質量が5kDaを越えるイオンは短寿命であり、(最後までイオンとして存在したもののみ検出する)Reflectron Modeでは測定困難となります。また、10kDaを越える領域では、Reflectron Modeでも 1 Daごとの分離が困難となり、見た目の分離能がLinear Modeと大差がなくなってきます。

PE法を用いることによる欠点も多数存在します。以下に主な欠点を列記します。

i. 測定時間がかかる・試料を消耗する

遅延時間をどの値に設定すべきかは、測定対象試料(イオン化の容易さ/質量),Matrix,不純物,レーザ強度,etc. によって左右されるため、最適値を見つけたすために時間と試料を浪費する場合があります。

ii. Mass Calibrationが煩雑

最適な遅延時間が見つかったとしても、その測定結果個々に対して適切な質量較正Mass Calibration(内部標準)を行わなければ、折角の高分解能測定データが十分生かせません。

iii. 全ての質量域を同時に高分解能で測定できない

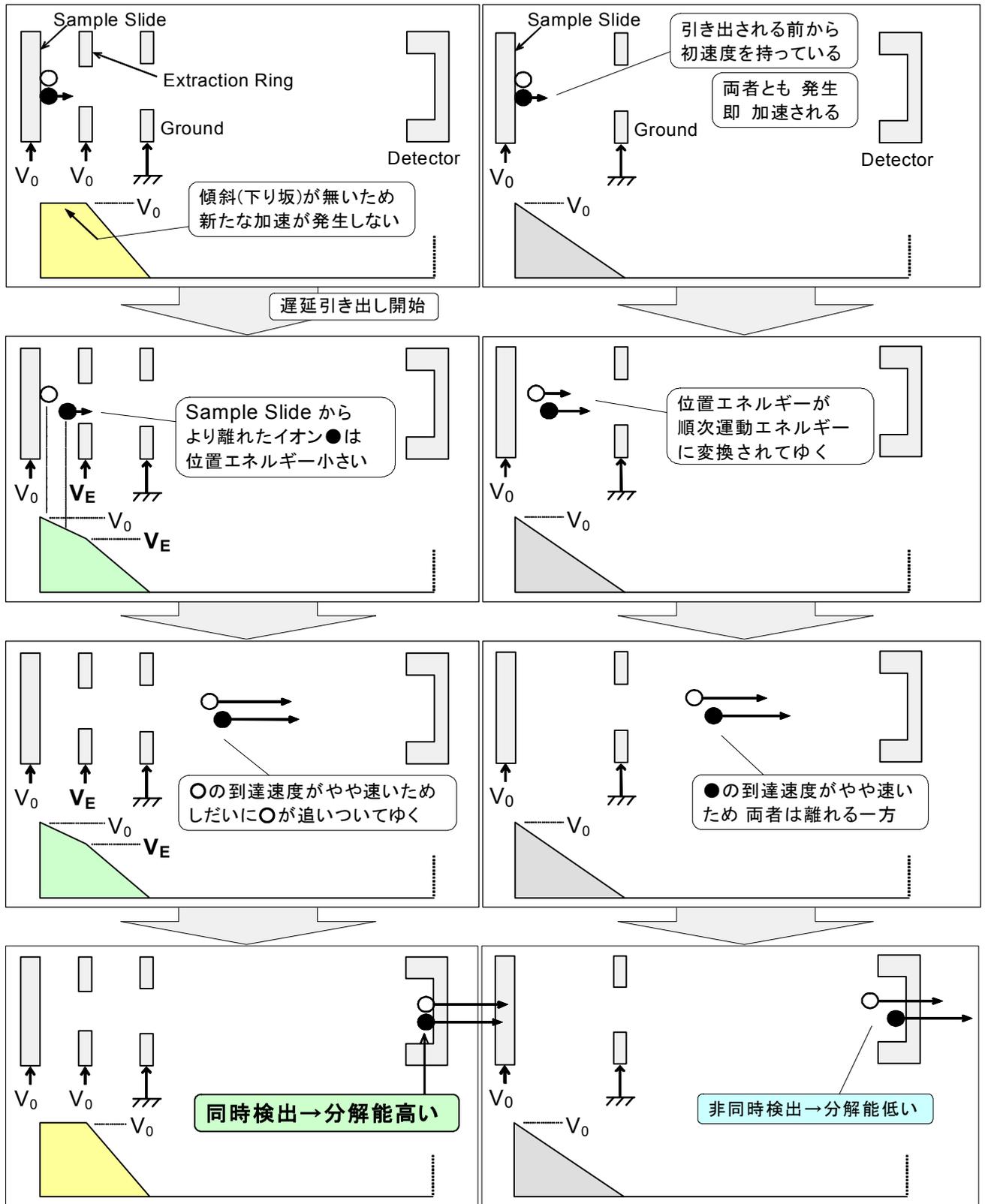
PE法でFocusが合うのは、注目している質量域のみです。それ以外は CE法より低分解能になる場合もあります。また、高分解能測定を活用するためには、時間分解能の高い測定装置が必須となります。

時間分解能を高くすることは、単位時間当たりの測定点数を多く取ることにもなり、データ量の増大を招きます。

iv. 感度が低下する(場合もある)

通常、Focus効果によって同種イオン到達時間が収束されるためピーク幅が狭くなり、波高値増加(S/N向上)が期待できますが、逆に 引き出し遅延時間内に短寿命イオンが分解したり 発生したイオンが分散してしまうことによって、イオンが検出器に到達できなくなったり(感度低下) 分解イオンを検出する危険性(ゴーストピーク出現)に注意を払う必要があります。

以上の様な問題点があるため、特にルーチン分析等にPE法を全面採用する場合、注意を払う必要があります。



< Pulsed Extraction法の場合 >

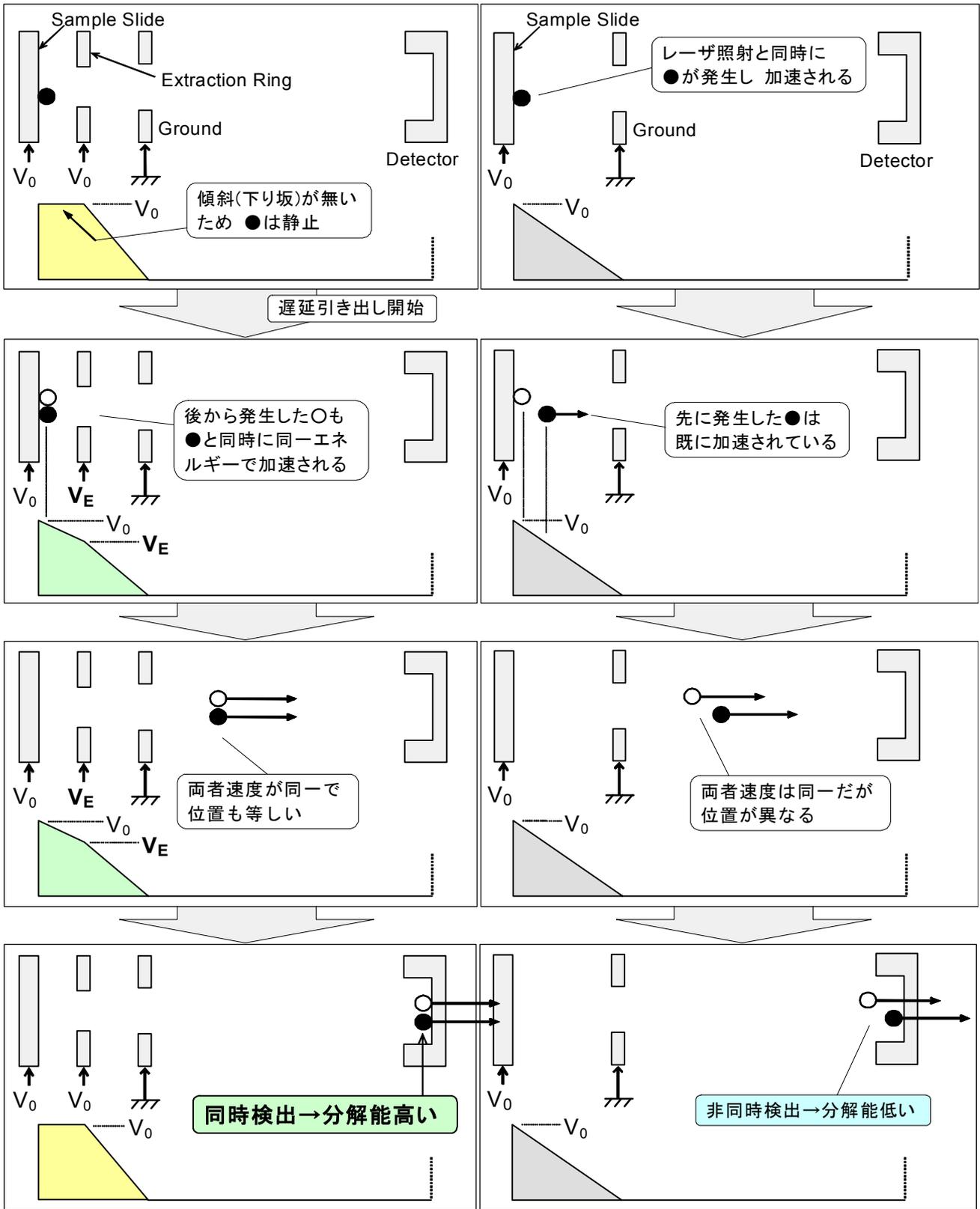
< Continuous Extraction法の場合 >

○: 初期エネルギー = 0 のイオン ●: 初期エネルギー > 0 のイオン

両イオンは同時(レーザー照射時)に発生したものとす。両イオンの m/z 値は同一とする。

各状態図の下段は、各時点におけるイオン飛行軸上の電位の高さを表している。

図2 初期エネルギーの異なるイオンを測定する場合における PE法, CE法の比較



<Pulsed Extraction法の場合>

<Continuous Extraction法の場合>

●: レーザ照射と同時に発生したイオン ○: レーザ照射から遅れて発生したイオン
両イオンの初期エネルギーは同一(=0)とする。両イオンの m/z 値は同一とする。

各状態図の下段は、各時点におけるイオン飛行軸上の電位の高さを表している。

図3 発生時間の異なるイオンを測定する場合における PE法, CE法の比較