

なぜ Reflectron Modeで MS/MSが可能なのか？

島津グループで現在販売しているMALDI MS装置の中で、AXIMA-**C**onfidence、-**P**erformanceは MS/MSが行えます。MS/MS Modeでは、(通常 Linear/Reflectron Modeでは得られない)構造情報を入力することが可能です。

本解説書では、従来型Reflectronと AXIMA-**C**onfidence、-**P**erformanceにて採用しているCurved Field Reflectronとを比較しながら、分解イオンがReflectron Modeにて測定される機構の説明を行います。

1. PSD (Post Source Decay) Ionとは？

MALDI法は ソフトイオン化法(化合物分子を分解させずにイオン化)の一種ですが、この方法で生成したイオンでも、検出器に到達するまでに分解する場合があります。これを、プロダクトイオンProduct Ion(メタステーブルイオン)と呼びます。特に、イオン源Ion Source以降で分解したイオンを、Post Source Decay (PSD) Ionと呼びます。

PSD Ionの発生を促進させるためには、イオンの内部エネルギーを高める(Laser Powerを上げる/適切なMatrixを用いる)方法などがあります。また、不活性ガス等の粒子と衝突させてProduct Ionを生成させる方法をCollision-Induced Dissociation(CID)と呼びます。AXIMA-**P**erformanceでは、High Energy CIDも可能です。

2. 従来型ReflectronでのPSD Ion検出 --- 従来方法でMS/MSを行うときの困難点

図1は、従来型ReflectronでPSD Ionが発生した場合を表しています。ここでは模式的に 分解前プリカーサイオンPrecursor Ionを黒い全丸●で表し、それがそれぞれ3/4, 1/2, 1/4の大きさのProduct Ionに分解した場合を想定しています。図1下左図は電位の高さを坂道で表しています。

従来Reflectronでは、図1に示されるように 収束できる(分解能を高められる)ノイオンを検出器に正しく導ける領域Effective Areaが、Precursor Ion付近(加速と等しい高さ付近)しかありません。 Product Ionの方は途中でエネルギーを失ったため、Reflectronの坂道を途中までしか登れず、Effective Areaに入ることができません。従って、得られるスペクトルは、図1右下のようにPrecursor Ionのみ分解能が高く、その他は 良くても分解能の大幅に悪いピークか、悪ければイオン軌道がずれているために検出できないということになります。

参) 「なぜReflectron Modeで分解能が向上できるのか？」 <3.振り子の等時性>の解説に当てはめて説明すると、分解したIonは、途中でイオンの m/z 値が小さく(弦が短く)なったため、TOFも短く(周期が短く)なります。理想的な振り子であれば、弦が短くなっても 振幅の違いにかかわらず 各々の周期で同一周期の振動が行えることとなりますが、従来のReflectronでは、元のイオンの m/z 値(弦の長さ)付近でしか収束できないこととなります。

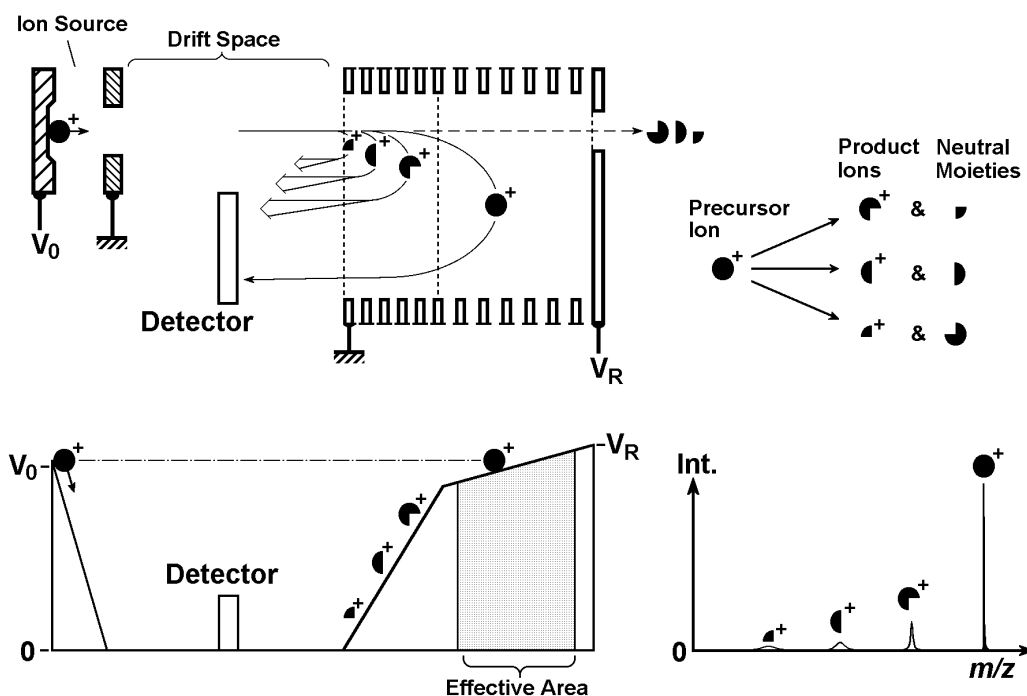


図1 従来型Reflectron 通常モードでのイオン検出

従って、このようなProduct Ionも有効に検出するためには、それぞれのイオンエネルギーに合わせたReflectron電圧に設定して測定を繰り返し、それぞれの有効な部分をつなぎ合わせてスペクトルを再構成する必要があります。

図2に示されるように、例えばIon Sourceで20kVで加速した場合、Reflectron電圧を20kV(厳密には $[20+\alpha]$ kV)に設定する(図2右最上段)と、図1と同様Precursor Ionは測定できますが、その他全ては無効になります。15KVに設定する(図2右二段目)と、大きさ3/4のProduct Ionが測定できます。この場合、Precursor Ionは20KeVのエネルギーを持っているので、Reflectronを通り抜けて検出できず、1/2,1/4のイオンは活用できません。同様に、10KVにすると1/2イオンのみ、5KVにすると1/4イオンのみ活用できます。

実際の測定では、全てのProduct Ionを測定するために 10回~20回にわけて各収束範囲を測定することになり、分解していないイオンを測定するMS Modeよりも1ケタ以上多いサンプルを消費してしまうことになります。

さらなる問題点は、Product Ion測定時に各ピークの m/z 値が後ろへずれることです。Reflectron電圧を減少させたために飛行時間が伸びてしまう、当然の帰結です。従ってスペクトルを再構成するためには、伸びてしまった m/z 軸を調節し 各々のセグメントで Mass Calibrationを行い 順々につなぎ合わせる等の特別のソフトウェアが必要となります。もちろん、Reflectron電圧を精度高く繰り返し変化させなければなりません。

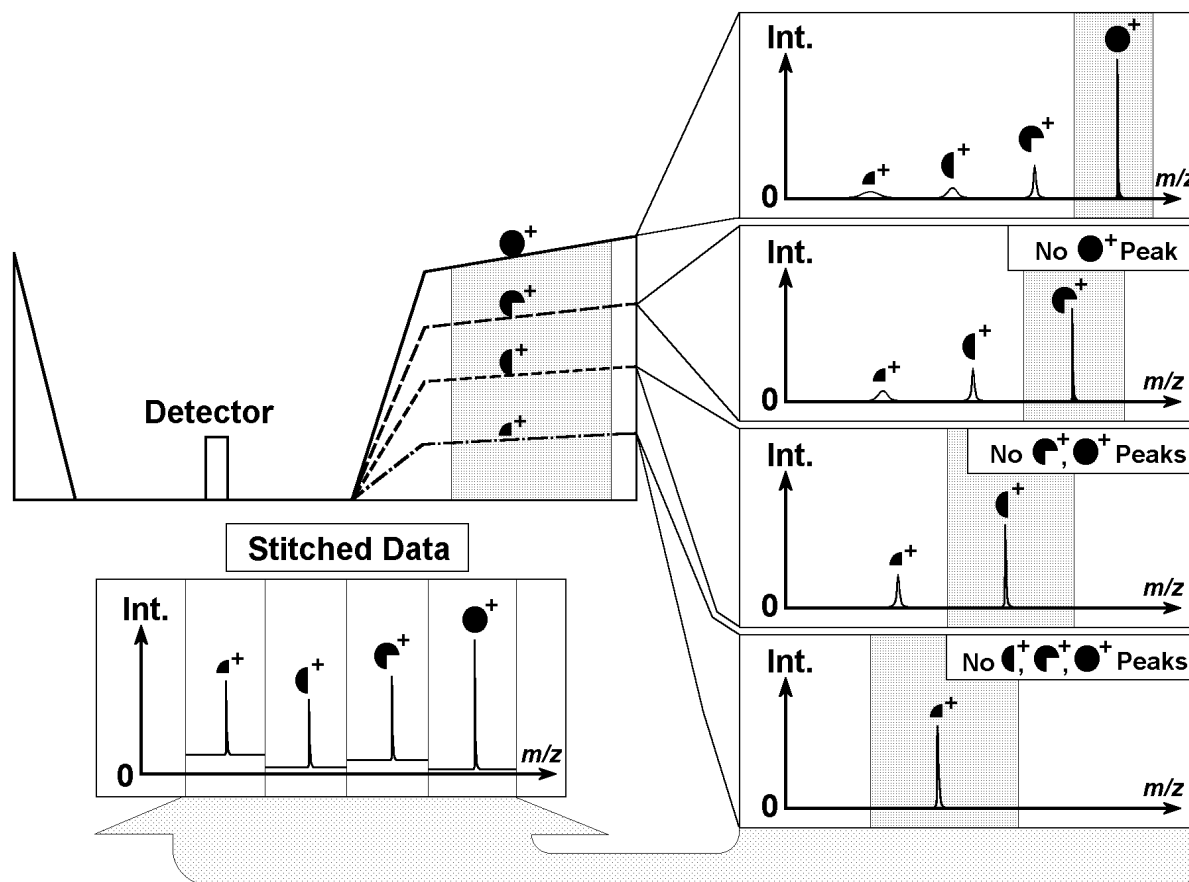


図2 従来型Reflectronでの PSD Ion 検出・測定

3. Curved Field ReflectronでのPSD Ion検出 --- 新方法でMS/MSを行うときの利点

'Curved Field Reflectron'とは、Johns Hopkins大学(USA) Robert J. Cotter教授によって発明されました。図3に示されるように、収束可能な領域が Precursor Ionを始め全Product Ionを含んでいます。従って、これを用いると、全てのイオンを収束させた状態で一度に検出できます。すなわち PSDマススペクトルを得るために、Reflectron電圧を変化させて何度も測定し サンプルを浪費したり スペクトルをつなぎ合わせたり 収束できないイオンを捨てたりすることがありません。

いわば、「レーザー照射1回で全範囲のPSDマススペクトルが得られる」原理の上からも感度の高い方法です。

参) 「なぜReflectron Modeで分解能が向上できるのか？」 <3.振子等の等時性>の解説に当てはめて説明すると、Curved Field Reflectronは、分解したイオン(弦が短く)でも、振幅の違いにかかわらず 各々の周期で同一周期の振動が行えることとなります。さらに Curved Field Reflectronは、「直線近似」ではなく、より広い範囲で単振動が実現できる「曲線近似」を行っているため、従来のリフレクトロンより分解能が高くなります。

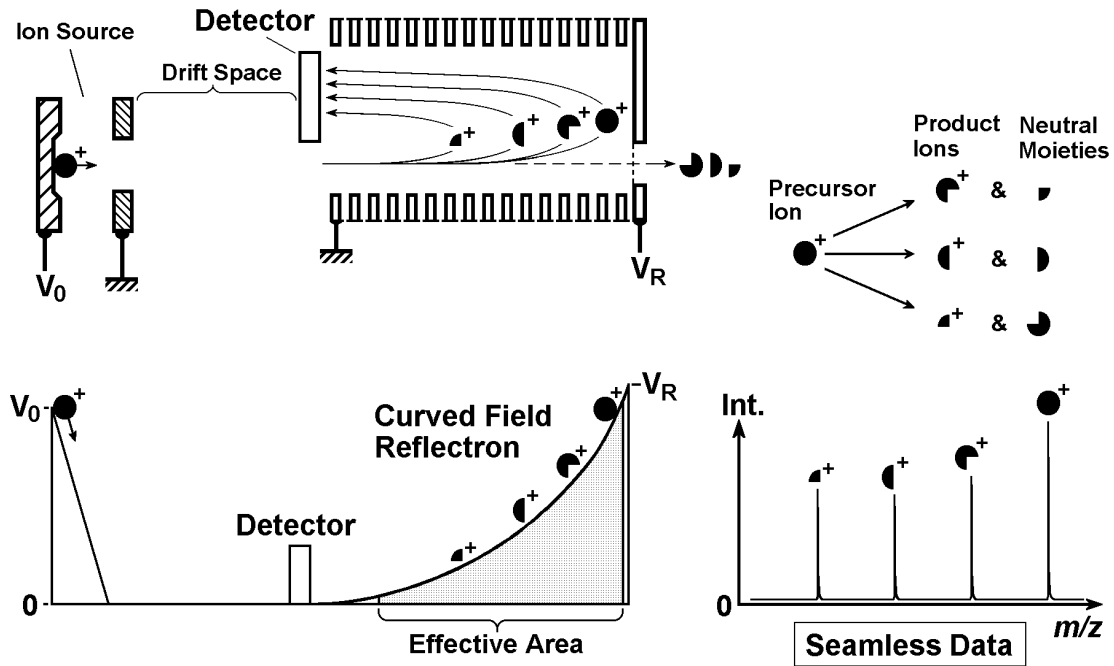


図3 Curved Field Reflectorでの PSD Ion 検出・測定

4. Curved Field Reflectorを採用した AXIMA-Confidence, -Performance

図4が、Curved Field Reflectorを採用したMS/MS装置KOMPACT MALDI IVの概略図です。

--- AXIMA-Confidence, -Performanceも Curved Field Reflectorを採用しています。特にMS/MSは、MALDI IVより大幅に性能を向上させています。

PSD測定を行うときは、注目しているイオンPrecursor Ionを選出しなければなりませんので、Deflector電圧を高速にスイッチングし、特定のイオン群だけをReflectronに入射させることになります。Reflectronに入射するまでが1段目のMS、Reflectronに入射後が2段目のMSに相当します。

すなわち、KOMPACT MALDI IVは、Curved Field Reflectorを採用することにより、従来のReflectron装置とほぼ同一の構成でありながら、Deflectorに印加する電圧を変更するだけでMS,MS/MS両方の情報を得ることができることになります。

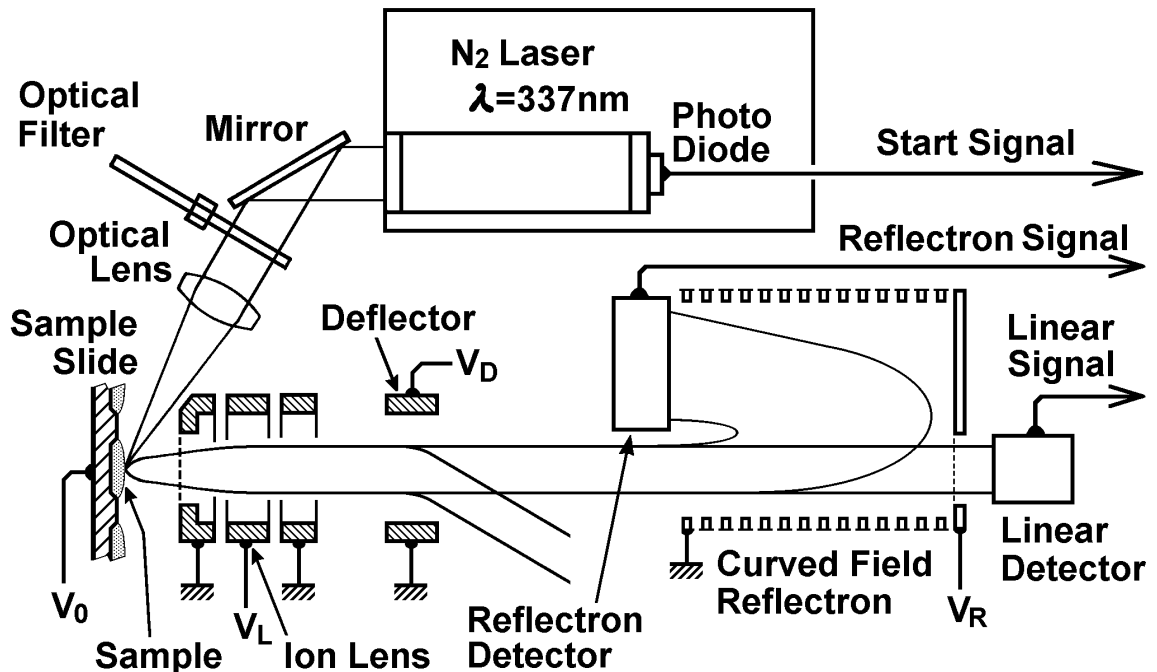


図4 Curved Field Reflectorを採用した KOMPACT MALDI IV

5. KOMPACT MALDI IVによる MS & MS/MS測定例

図5は、KOMPACT MALDI IVにて、ペプチドの一種Renin Substrate(M.W.:1645.95)を測定した一例です。

上図が Reflectron(MS) Mode、すなわち、恒にDeflector電圧 $V_D=0$ かつ Reflectron電圧 V_R を印加した場合であり、試料分子の $[M+H]^+$ イオンの他に、Matrixイオン群や不純物イオンが観測されています。

下図が PSD(MS/MS) Modeです。すなわち、 $[M+H]^+$ イオンがDeflectorを通過する時のみ $V_D=0$ とし、それ以外のイオンは $|V_D|>0$ として偏向させ、Reflectronに入射させないようにした場合です。強大なPrecursor Ion $[M+H]^+$ 以外に、多数のProduct Ionが測定されています。a?,b?,c?は、ペプチドのSequenceを表すイオン群であり、左端には、組成を表すImmonium Ion群も観測されています。

参) $[M+H]^+$ イオンが、たとえイオン源以降のDrift Space(電場・磁場が存在しない空間)で分解しても、イオン源で加速が完了しているため、分解しないPrecursor Ion $[M+H]^+$ と同一の速度で同時にDeflectorを通過します。従って、MS/MS Modeにて 特定Precursor Ionを選択すると、それから生成したProduct IonであるPSD Ion群も同時に選択されることになります。なお、Product Ion生成量を増大させる方法としてMS/MS Modeでは 1. Laser Power増加、2. (CHCA等の)Hot Matrix使用、3. Collision Gas導入 (AXIMA-PerformanceでのCID Mode) 等があります。

MS/MS Modeでも、全ての範囲を同時に測定しているため、つなぎ目のないスペクトルとなっています。

また、同時に測定できるということは、同一条件で発生したイオンを測定することであり、全てのPSD Ionを定量性・再現性を保ちながら測定できることになります。

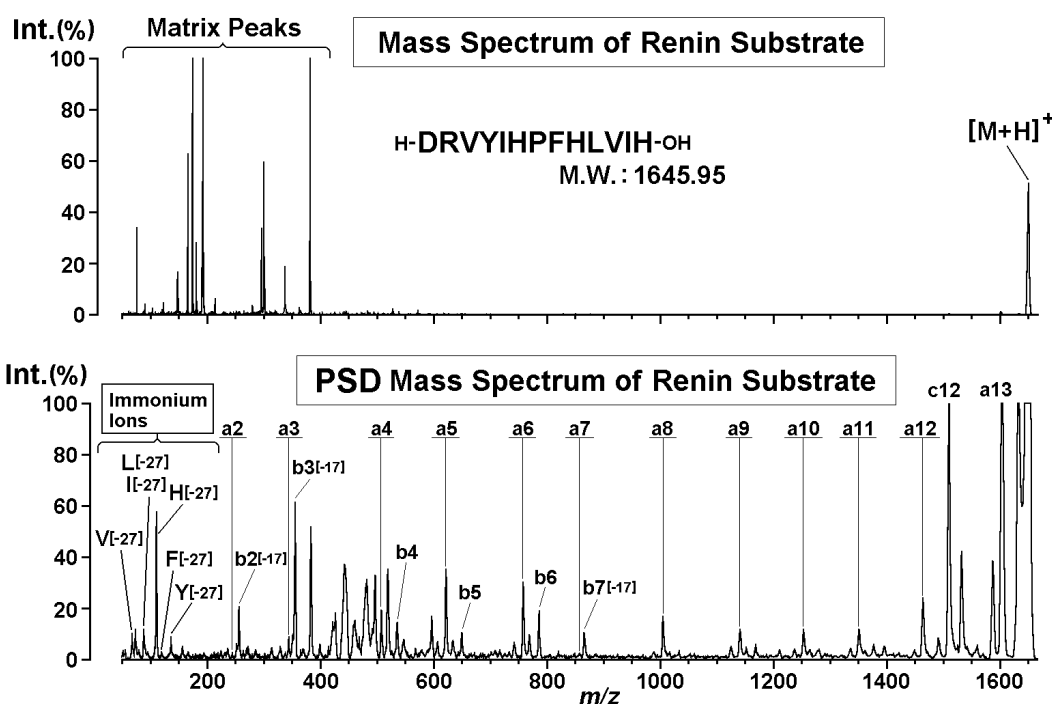


図5 Renin Substrateの MS 及び PSD Data

表1 Curved Field Reflectron/従来型 Reflectron 特徴比較表

	感度	測定時間	測定の容易さ	定量性・再現性	コスト
Curved Field Reflectron	○高い	○短い(スキャン不要)	○容易	○高い	○安い
従来型Reflectron	×低い	×長い(スキャン必須)	×複雑	×低い	×高い

< TOFMS 参考文献 >

1. B.A.Mamyrin, et al., Sov.Phys.JEPT, Vol.37, p45-** (1973)
2. 吉田佳一, 田中耕一, 井戸豊, 秋田智史, 吉田多見男, 質量分析 Vol.36, No.2, p49-58 (1988)
3. T.J.Cornish, et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., Vol.7, p1037-1040 (1993)
4. 早川滋雄, 質量分析 Vol.41, No.3, p121-158 (1993)