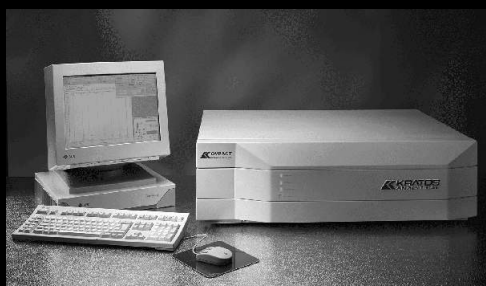
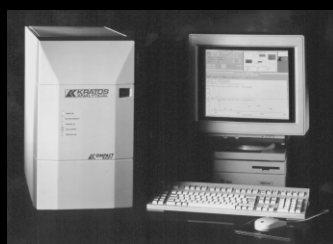


MALDI-MS Technical Reports



1992年発売 KOMPACT MALDI II/III
1995年発売 KOMPACT MALDI IV



1994年発売
KOMPACT MALDI I

”MALDI-MS Technical Report No. 01 - 06”の初版は、10数年前の1990年代に発行されました。

当時 弊社では Kratos社製卓上型装置”KOMPACT MALDIシリーズ”を販売しており、質量分析専門家の方々にも 製品特長をご納得いただくための資料として用意いたしました。MALDIやTOFMSの理解を深めるための教科書としても活用していただきました。

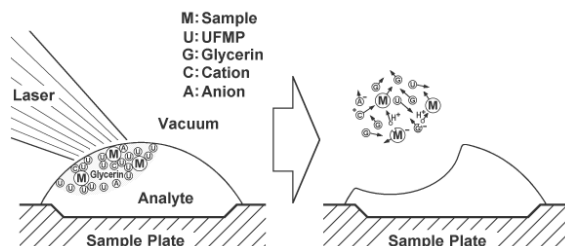
今回、初版当初の目的をできる限り温存しながら、最新の技術を反映した内容に更新すると共に、No.07以降を新たに付け加えました。

MALDIやTOFMSの原理を理解する”入門書”としてもご活用ください。

なお ご意見・ご感想等がございましたら、お手数ですが弊社の営業 または技術担当者までお知らせください。

<<http://www.shimadzu.co.jp>>

Rev. 3.0 : 30/September/2010



1985年 Soft Laser Desorption 発明



1988年発売 LAMS-50K



2000年発売
AXIMA-CFR



2002年発売
AXIMA-QIT
2009年発売
AXIMA-Resonance



2006年発売 AXIMA-TOF²
2008年発売 AXIMA-Performance

MALDI-MS Technical Report No. **01**

なぜ Reflectron Modeでは 分解能が向上できるのか？

MALDI-MS Technical Report No. **02**

Pulsed Extraction(遅延引き出し)法とは？

MALDI-MS Technical Report No. **03**

なぜ Reflectron Modeで MS/MSが可能なのか？

MALDI-MS Technical Report No. **04**

Neutral Detection Modeで 何がわかるのか？

MALDI-MS Technical Report No. **05**

MALDI-TOFMS用の検出器として 何が適切か？

MALDI-MS Technical Report No. **06**

Inorganic Matrix とは何か？ どんな特徴があるのか？

MALDI-MS Technical Report No. **07**

MALDIとLI/LDの違いは何か？

MALDI-MS Technical Report No. **08**

島津が発明したMALDI Matrixは？

MALDI-MS Technical Report No. **09**

Quadrupole Ion Trapとは何か？ どんな特徴があるのか？

MALDI-MS Technical Report No. **10**

TOF-MS用の測定回路として何が適切か？

なぜ Reflectron Modeでは分解能が向上できるのか？

島津グループで販売しているMALDI-MS装置の中で、AXIMA-**C**onfidence、-**P**erformance、-**R**esonanceは Reflectron Modeを標準採用しています。通常、Reflectron Modeは Linear Modeと比較し、質量分解能・精度の高い測定が行えます。

本解説書では、Time-Of-Flight Mass Spectrometry TOFMS(Linear Mode)基本原理から出発し、Reflectron Mode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、様々な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。

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

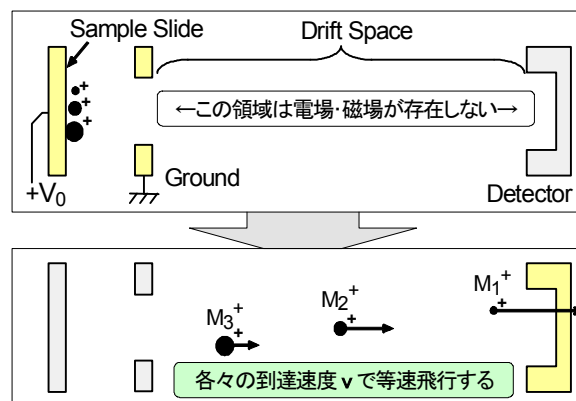
q : イオン電荷 M : イオン質量 v : イオン速度 V_0 : 電位差

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 $q=z$ (イオン電荷数) $\cdot e$ (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の実際 --- Linear Modeの欠点

上記原理説明で紹介したTOFMSは、イオンを直線飛行させるだけの最も基本的なものであり、リアモードLinear Modeと呼ばれています。 m/z 値が同一のイオン全てが 式(2)の速度で同時に検出器に到達できれば、無限大の分解能で測定できます。

--- 式(2)は、全てのイオンが初期エネルギーを持たない(静止した)状態でイオンが発生したと仮定しています。

--- TOFMSで分解能を低下させないためには、さらに「発生位置・時間が限定されている」という必要条件が課せられます。(狭義の)パルスレーザーイオン化では、レーザー光の照射時間が 1-10 nsecであり、レーザー光が収束された領域($\sim \phi 100 \mu\text{m}$)のみがイオン化されるため、通常、この必要条件を満足しているといえます。

しかし、MALDI法の様にレーザー光照射によって(間接的に)イオン化する場合、(数10eV分に相当する)初速度を持ったイオンが発生し易い傾向があります。この初期エネルギー ε が一定していない(分布をもつ)ため m/z 値が同一でも速度 v は同一とはならず(式(1)、(2)で $V_0 \rightarrow V_0 + \varepsilon$ になる)、飛行時間にばらつきができることにより、分解能の低い測定結果しか得られないことになります。

3. 振り子の等時性 --- Reflectron Modeの原理説明導入部

図2に示されるように、振り子の重りには重力 G が働いており、振幅角が θ の時に、 $G \cdot \sin\theta$ の大きさで振れの中心に引き戻す力が働きます。振れ角 θ が小さい($\theta \approx 0$)場合、 $G \cdot \sin\theta \approx G \cdot \theta$ となります。

従って、振り子には「振幅角 θ に比例した原点に引き戻す力が働く」ことになり、単振動が行われることとなります。

すなわち、「振り子は、振幅・重りの重さが異なっても、弦の長さ・重力が等しければ周期が等しい」こととなります。ただし、厳密な意味でこれが成立するためには、上記条件「振幅が微小である」($\Delta\theta \approx 0$)あるいは「振幅の差が微小である」(振れ角 θ が $\theta + \Delta\theta$ に変化しただけの場合)が課せられます。

この「振り子の等時性」をTOFMSに当てはめたのが「Reflectron Mode」です。

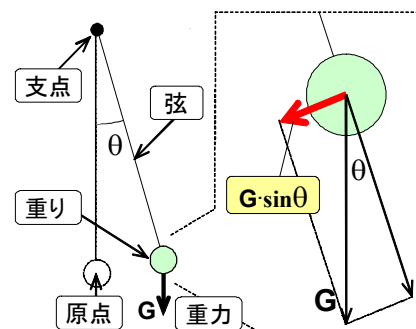


図2 振り子の単振動

4. TOFMSでエネルギー収束を行う方法 --- なぜReflectronで分解能を向上できるのか？

図3に示されるように、加速が完了した(Drift Spaceに到達した)ときの速度は、Linear/Reflectronいずれのモードでも、同じ大きさのイオンでありながら、初速度のあるイオン●の方が初速度のないイオン○より速くなります。

Linear Mode(図3左側)では、その状態のまま検出器に到達するため、分解能の低い測定結果となります。

Reflectron Mode(図3右側)では、引き出し部の下り坂とは逆に、登り坂を形成する**Ion Reflector***を設けています。このReflectron Modeでも、Reflectorにイオンが入射するまで(Ion Source&Drift Space)は、初速度のあるイオン●の方が飛行時間が短く(速度が速く)なります。しかし、Reflectron内では、初速度のあるイオン●の方が[運動エネルギー]=0になるまで坂道をより長く登らなければならない、飛行時間が長くなります。

*) Ion Reflectorは、図3右上に示されるように、通常、リング状の電極(図3は断面図)を並べ、最後尾に V_R を印加し、抵抗分割で各電極に電圧を印加させ、内部に適切な電場が発生するようにしています。図3の場合、電場が漏れたり乱れたりしないように、Gridを設けています。

Reflectron Modeとは、恒に[TOF(Ion Source)+TOF(Drift Space)+TOF(Reflector)=Constant]が成立する、すなわち **m/z 値が同一であるイオンの全飛行時間がエネルギーの大小によらずに等しくなるようにできる、質量分解能を高められるモード**です。この様に、エネルギー収束が行えるIon Reflectorは、これまで数多く考案されています。いわば、坂道の形態は多種類あります。--- 参考文献参照

図3の場合、「緩やかな坂道」*部位でエネルギー収束を行っています。エネルギーが分散しているのは、 V_0 近傍のみであり、この付近のみ収束すればよく、それ以外は急坂でも構わないこととなります。また、この領域での傾きは一定となっています。図2にて、振りが最下点近傍でのみ振動した場合に直線近似($G \cdot \sin\theta \approx G \cdot \theta$)できた条件を、図3では、いわば、 V_0 の近傍に置き換えて当てはめていることとなります(通常、 $|V_0| \gg \varepsilon$ であるため)。すなわち、前ページ<振り子の等時性>の表現に当てはめれば、「Reflectron Modeでは、イオンの初期エネルギー ε が異なっても、イオンの大きさ・電荷量が等しければ飛行時間が等しい」と表現できます。

**) 全範囲にわたってエネルギー収束を行うためには、全ての坂道に渡って(直線近似を行う)「緩やかな坂道」にする必要があり、極めて長大なReflectorとなってしまいます。

また、Linear ModeよりもReflectron Modeの方が一般に飛行時間が長くなります。従って、 m/z 値が近接しているイオンどうしの間隔が広がることとなります。これが、Reflectron Modeで分解能が高くなる もう一つの理由です。

以上の理由により、Linear Modeでは質量分解能: 数百~数千 であったものが、Reflectron Modeでは質量分解能: 数千~数万 に大幅に改善できます。

5. Linear Mode vs. Reflectron Mode --- 両モードを如何に使い分ければよいのか？

Linear Modeにも利点があります。

[飛行時間, 強度] の関係を計測/記録する回路/コンピュータは、測定範囲(データ量)が限られています。測定を行う飛行時間範囲が同一ならば、**Linear Modeの方が広い質量範囲を測定できます**。逆に同一質量範囲ならば、**Linear Modeの方が測定データ点数が少なく済みます**。

イオン源で生成したイオンにも、寿命があります。特に高質量イオンは分解し易く、Drift Spaceを飛行している間にも分解してしまいます。Reflectron Modeの場合、最後までイオンとして存在したものしか(元のイオンとして)検出することができません。Linear Modeは、途中(Drift Space)で分解したイオン***や中性粒子も 分解しない元のイオンと同一速度で同一時刻に検出器に到達できます。すなわち、**Linear Modeは感度の高い測定が行えます**。

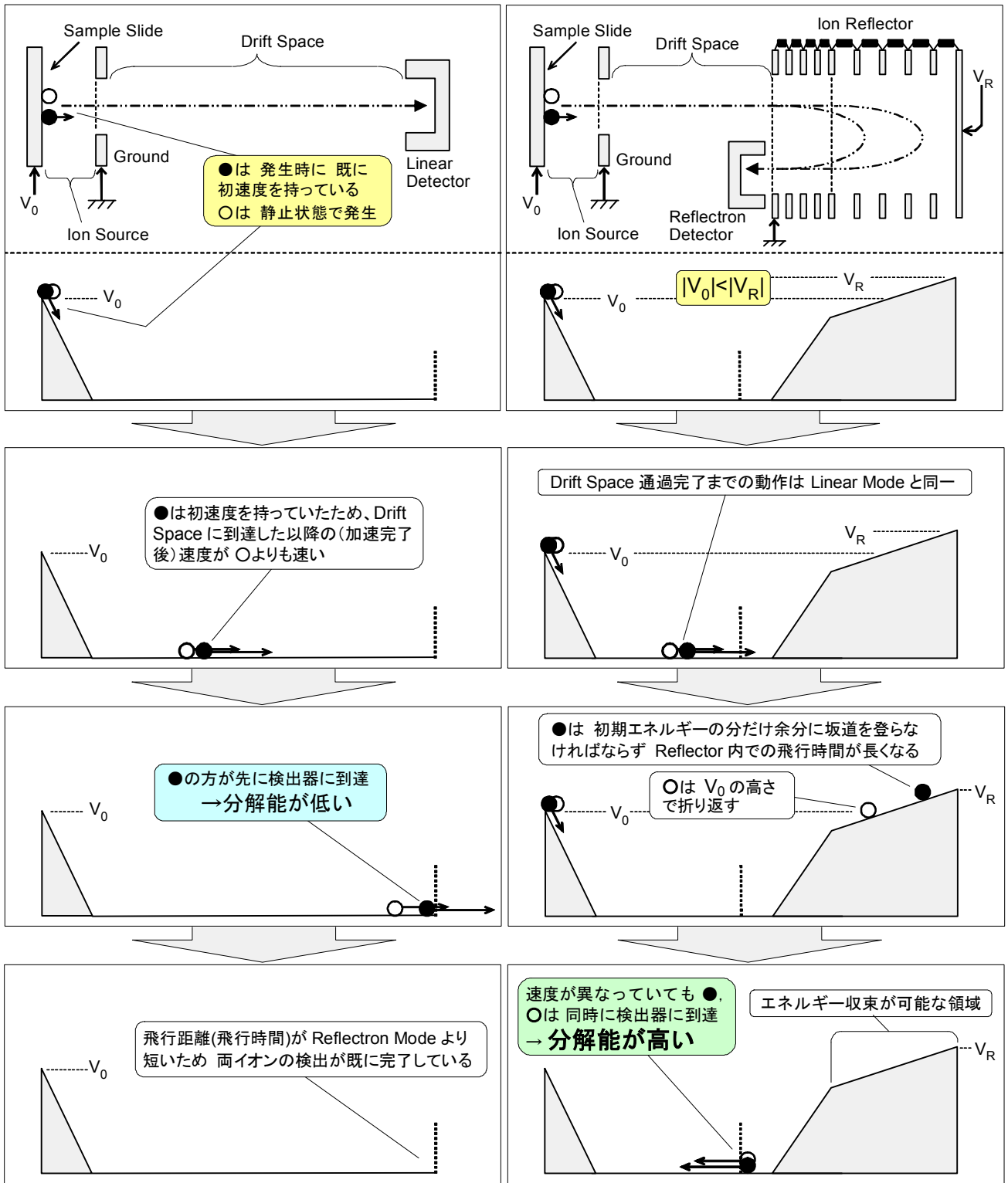
***) Ion Source以降で分解したイオンをPost Source Decay (PSD) Ionと呼びます。これらのイオンを収束させ検出器へ導くことが可能であれば、MS/MS測定が行えることとなります。

--- 「なぜReflectron ModeでMS/MSが可能なのか？」<3.Curved Field ReflectronでのPSD Ion検出>参照

実際のMALDI試料測定で比較した場合、Reflectron Modeでも数10kDa程度のイオンの測定が可能ですが、通常、この領域ではLinear Modeより大幅な分解能向上が期待できず、しかも感度が1ケタ以上低下する場合があります。個々のイオンの寿命もまちまちであり、Linear Modeと比較すると強度分布に差異がでる場合もあります。

一般に、TOFMSが最も得意とし期待もされる特長は、感度の高さ・質量範囲の広さであると言えます。

従って、特に未知(試料量?・分子量?・安定度?・純品or混合物?)の物質を測定する場合は、まず、Linear Modeで測定すべきであると言えます。



<Linear Modeの場合>

<Reflectron Mode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。

最上段図の上図は、Linear Mode/Reflectron Modeの電気・機械的な構造を表している。

最上段図の下図から以降は、イオン飛行軸上の電位の高度と 各時点におけるイオンの飛行状態を表している。

図3 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 Linear/Reflectronの比較

表1 Linear Mode/Reflectron Mode 特徴比較表

	感度	質量範囲	定量性・再現性	質量分解能	質量精度	MS/MS
Linear Mode	○高い	○広い	○高い	×低い	×低い	×不可
Reflectron Mode	×低い	×狭い	×低い	○高い	○高い	○可能****

図4は、卓上型KOMPACT MALDI III の装置概略図です。Deflectorに印加する電圧 V_D を変更するだけで Linear Mode、Reflectron Modeの切り替えが行える装置です。

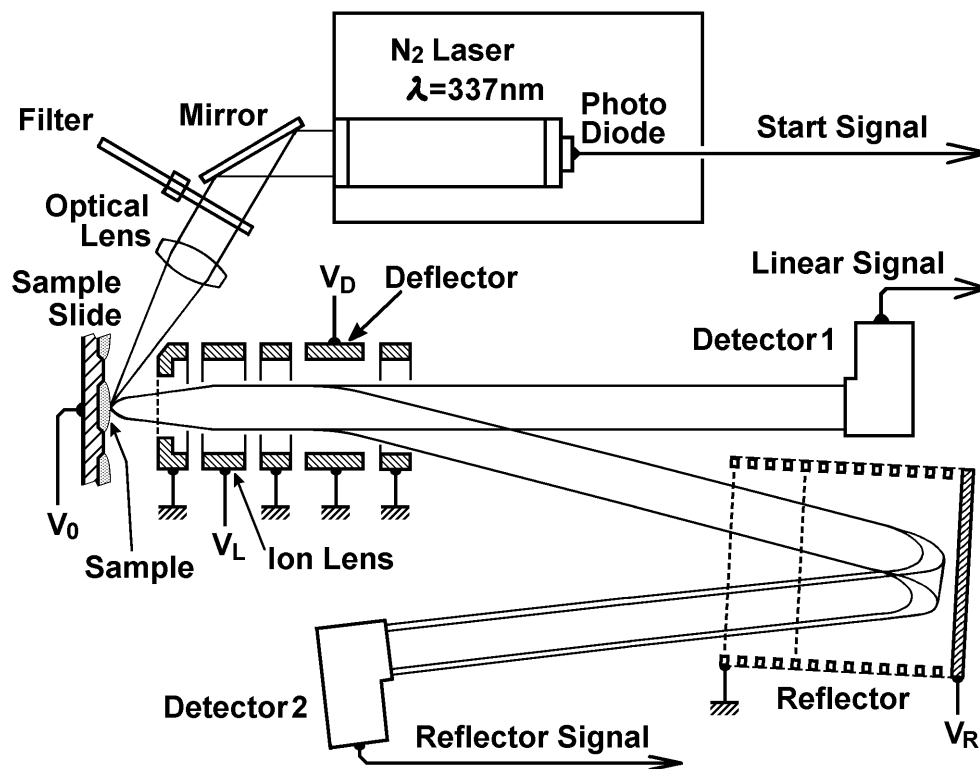


図4 Shimadzu/KRATOS
KOMPACT MALDI III MALDI-TOFMS

****) 「なぜReflectron ModeでMS/MSが可能なのか？」
<3.Curved Field ReflectronでのPSD Ion検出>参照



< 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)

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。

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

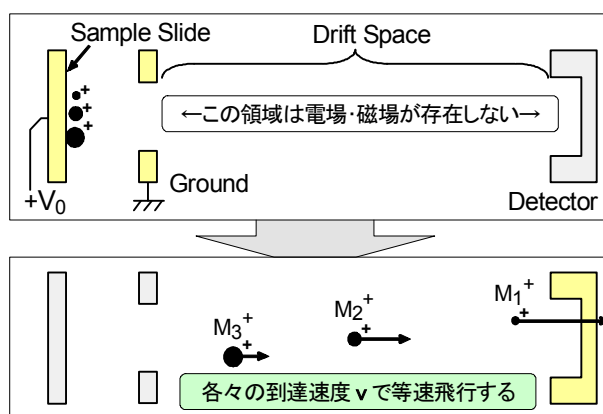
q : イオン電荷 M : イオン質量 v : イオン速度 V_0 : 電位差

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

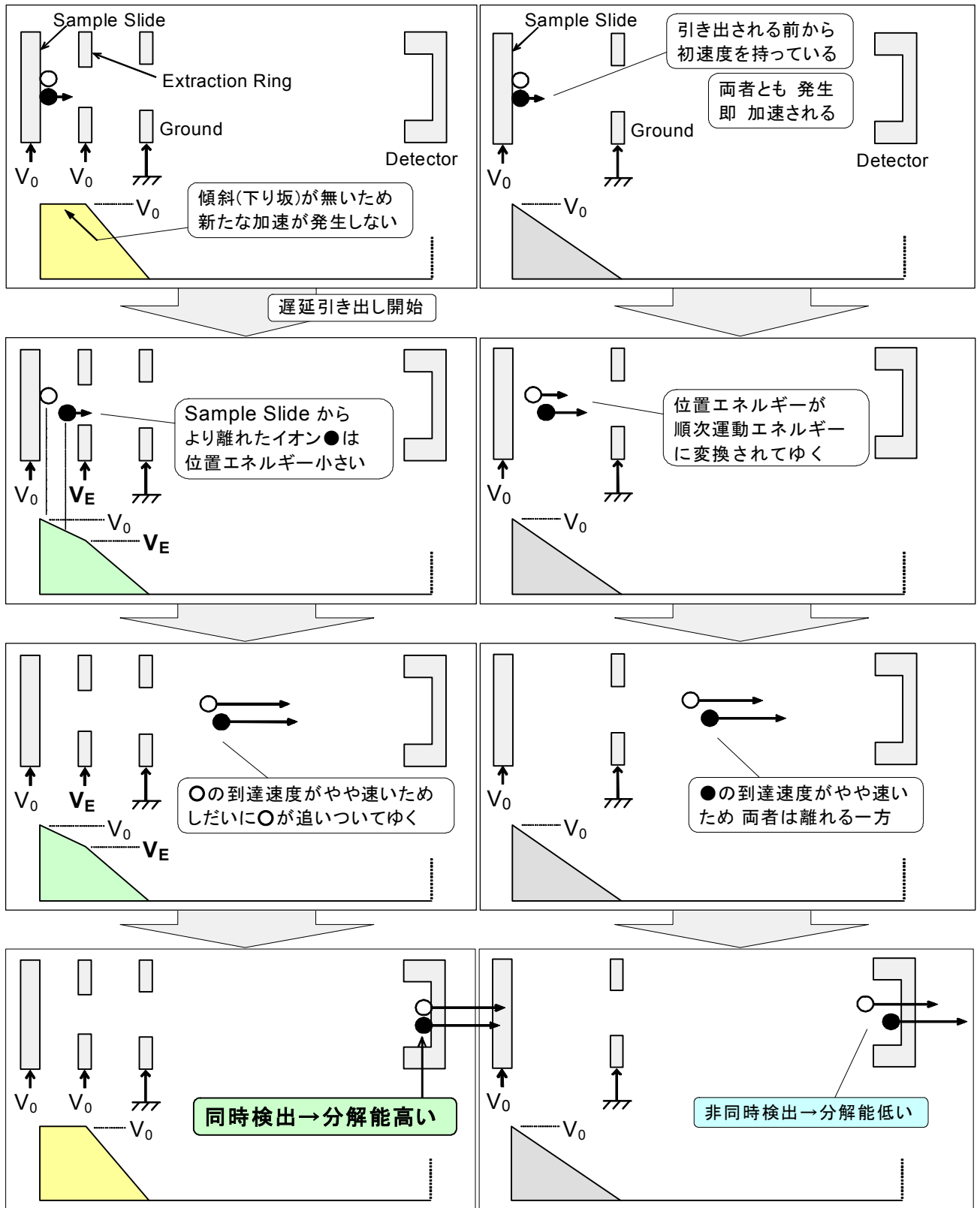
PE法でFocusが合うのは、注目している質量域のみです。それ以外は CE法より低分解能になる場合もあります。また、高分解能測定を活用するためには、時間分解能の高い測定装置が必須となります。

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 >

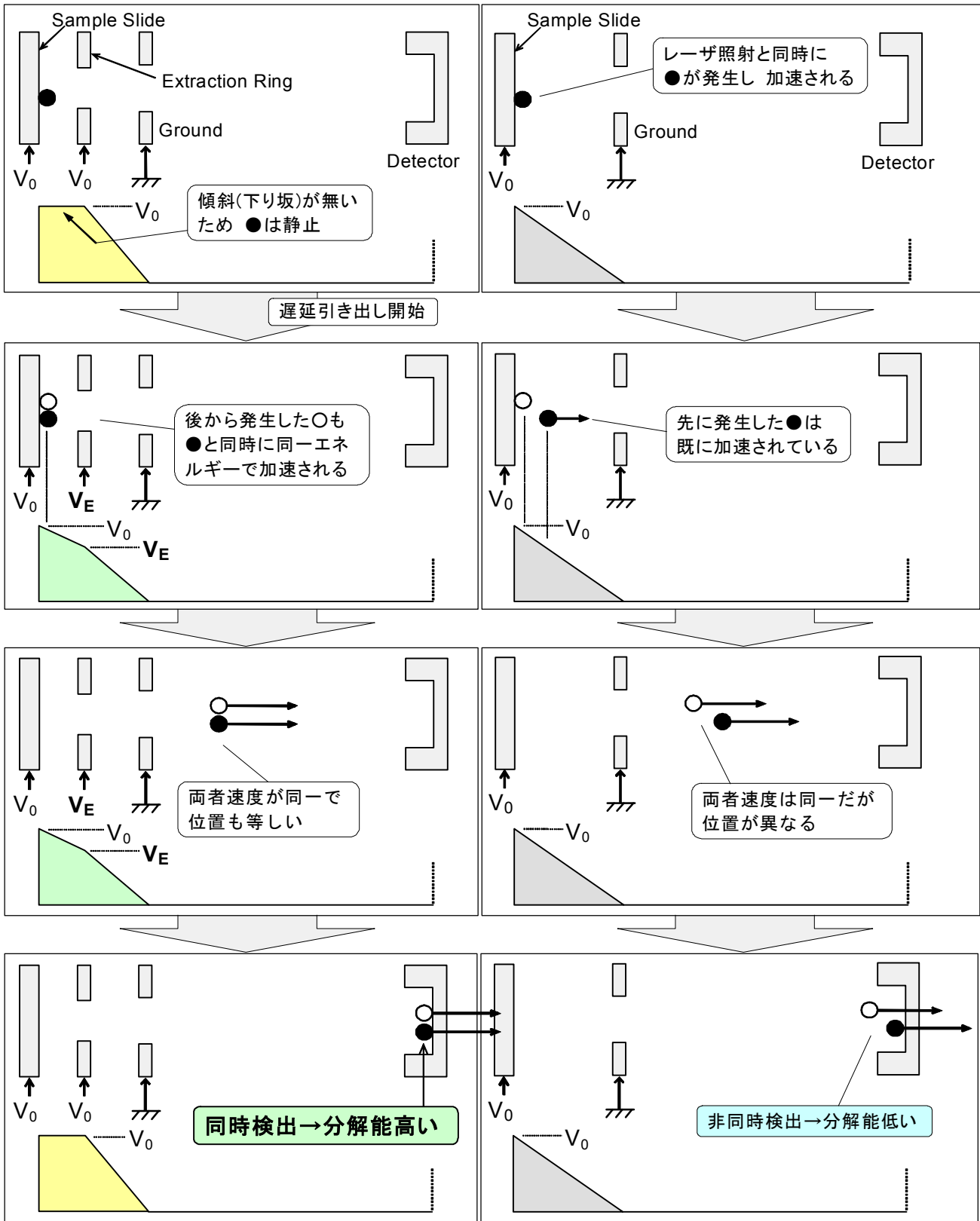
< Continuous Extraction法の場合 >

○: 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

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。

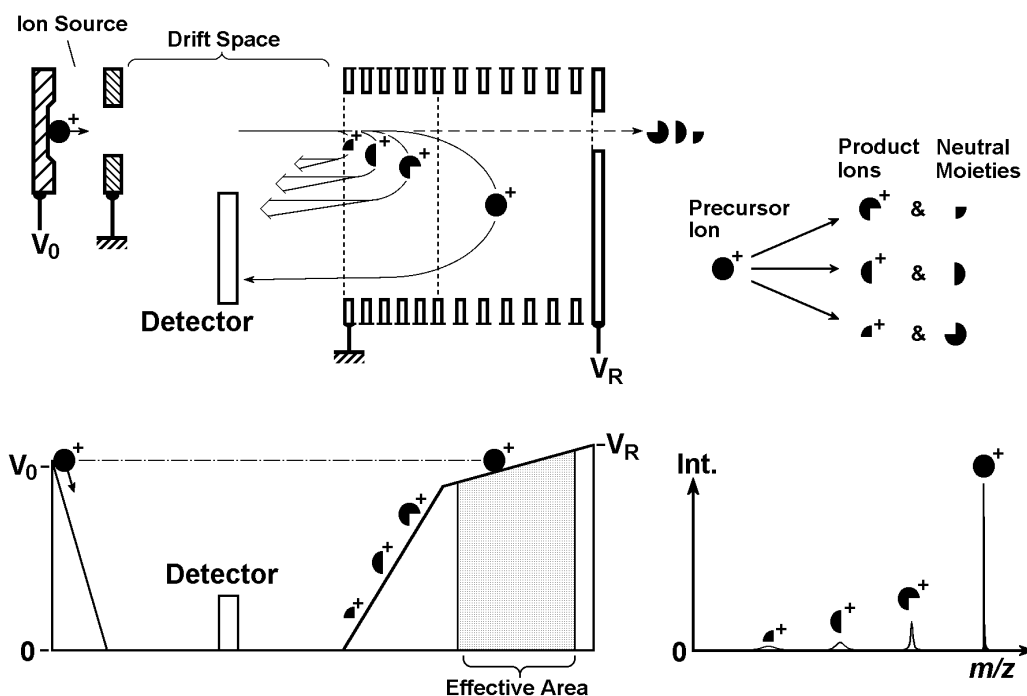


図1 従来型Reflectron 通常モードでのイオン検出

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。

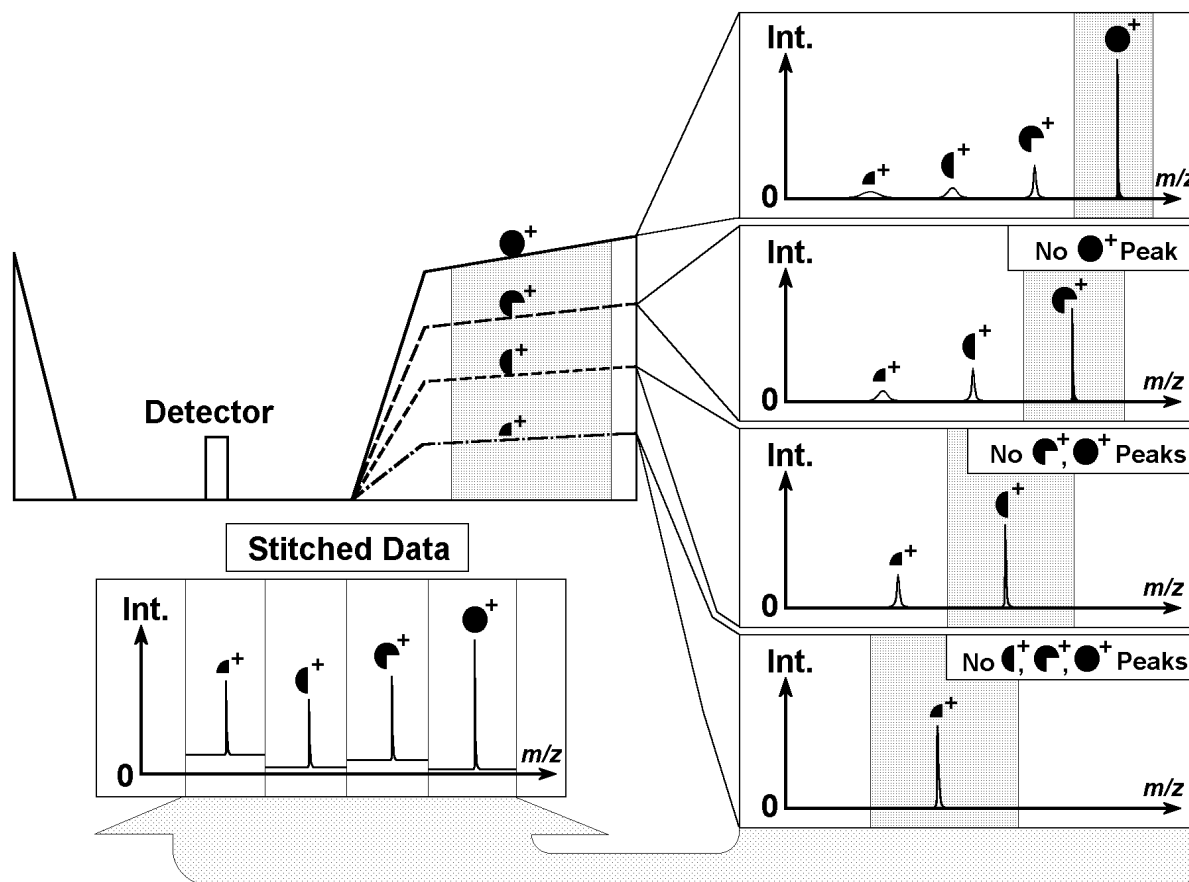


図2 従来型Reflectronでの PSD Ion 検出・測定

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になります。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。

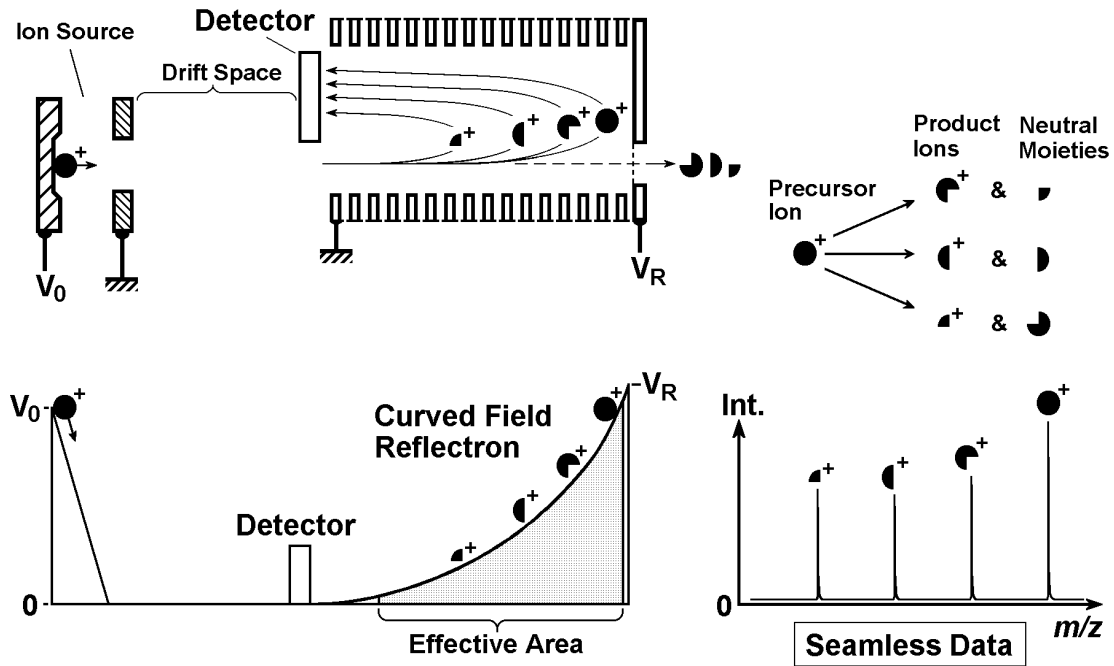


図3 Curved Field Reflectorでの PSD Ion 検出・測定

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。

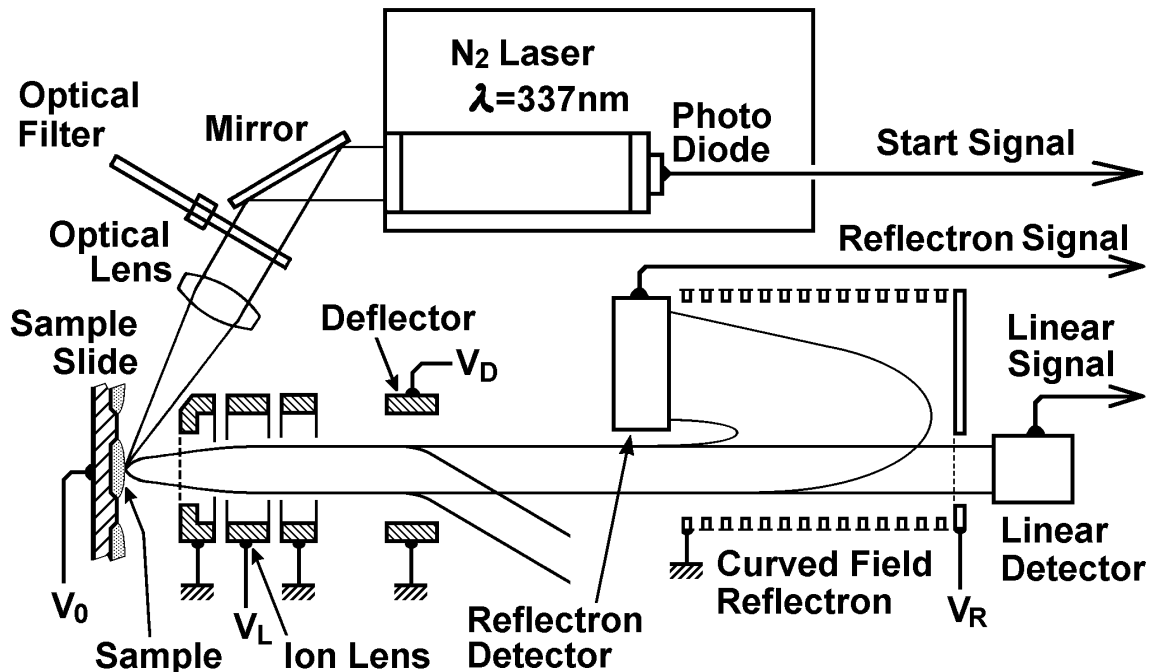


図4 Curved Field Reflectorを採用した KOMPACT MALDI IV

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。

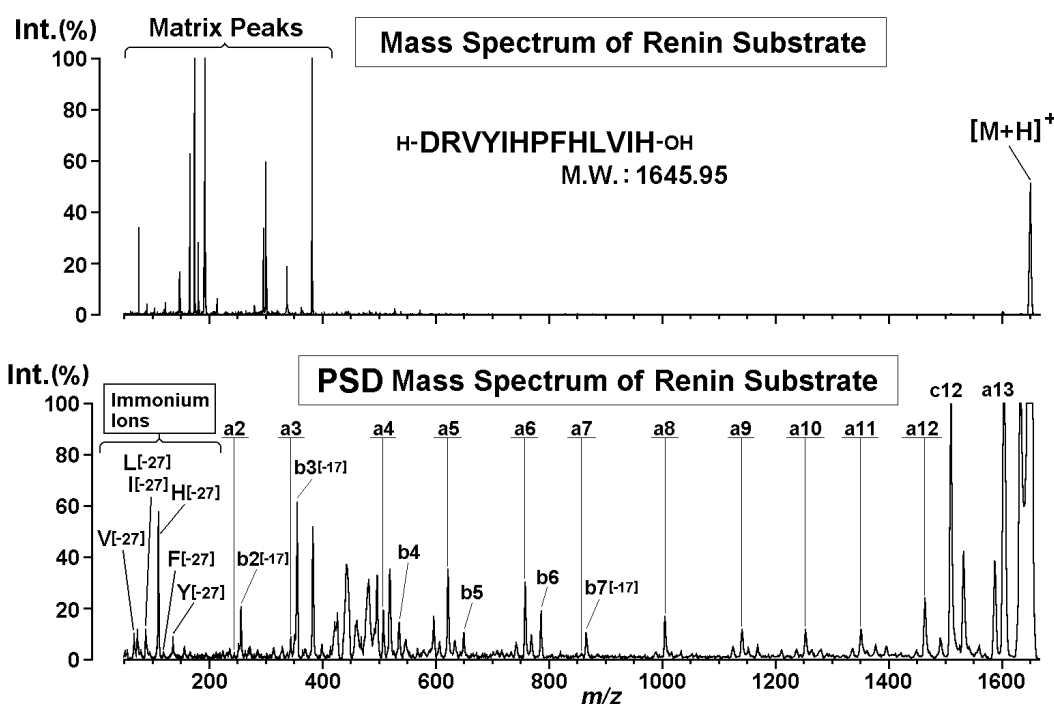


図5 Renin Substrateの MS 及び PSD Data

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)

Neutral Detection Modeで何がわかるのか？

島津グループで現在販売している装置の中で、AXIMA-Confidcnce, -Performanceは **中性粒子検出モード** Neutral Detection Modeを活用できます。通常 このモードでは、構造情報の1つである**生成イオン(不)安定度情報入手**が可能です。

本解説書では、他の測定モードと比較しながら 中性粒子検出モードの特徴説明を行います。

1. Linear, Reflectron, Neutral Detection and MS/MS Modes

図1は、4つのModeを比較するために簡略化した KOMPACT MALDI IV 模式図です。-- AXIMA-Performanceも同様

いずれのModeでも、Sample Slide上で発生したイオン群(\bullet^+ , \square^+ , \bigcirc^+)は、全て同一の位置エネルギー eV_0 を得ます。これが運動エネルギーに変換された(引き出し電極を通過した)とき、軽いイオン(\bullet^+)は重いイオン(\bigcirc^+)より速度が速くなるため、先に検出器に到達し、時間軸上でイオンの大きさごとに分離ができます。

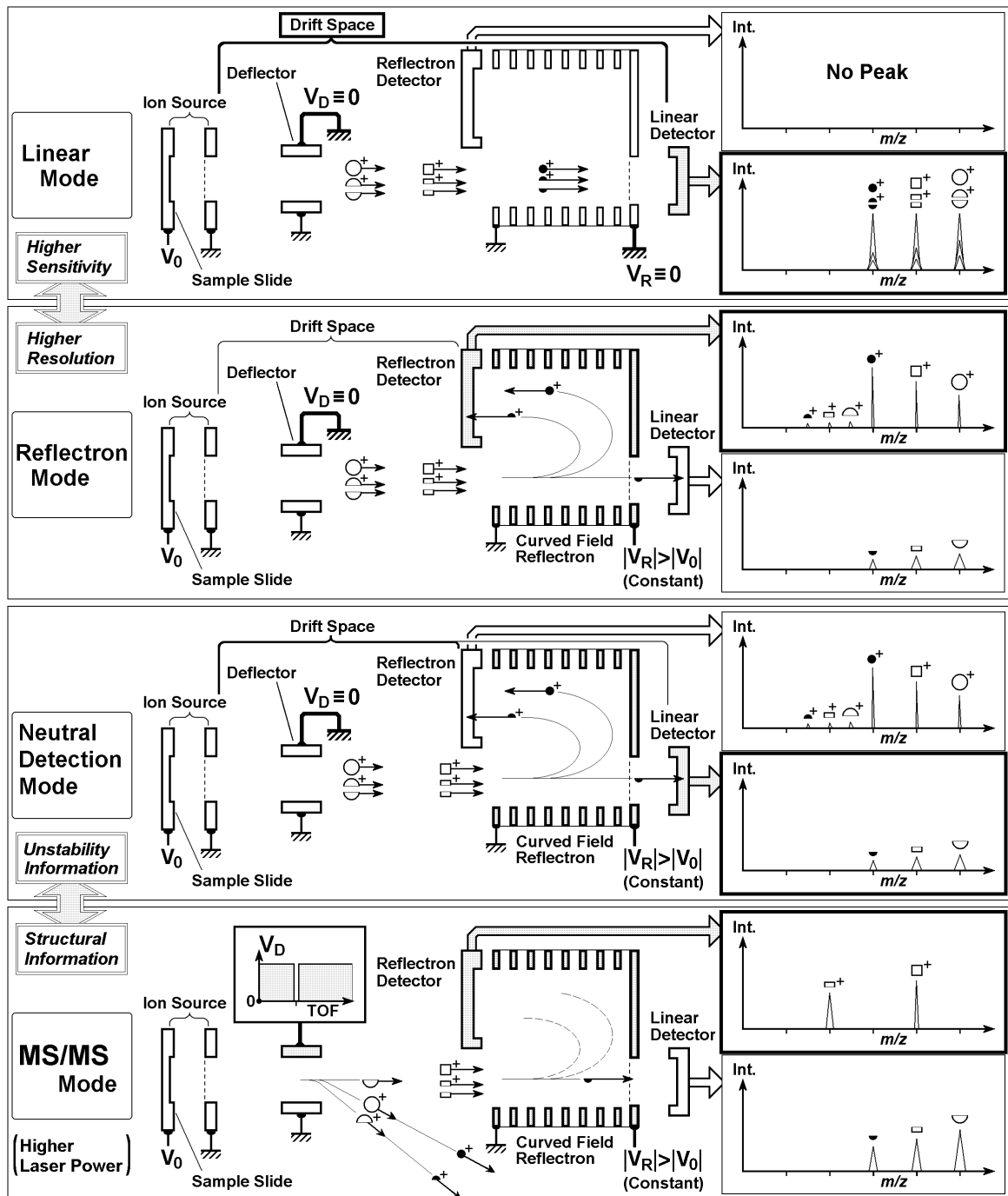


図1 KOMPACT MALDI IV 4つのモードでのイオン検出

Ion Sourceで発生したイオンが Ion Source以降で分解することを、Post Source Decay(PSD)と呼びます。

Linear Mode(図1 最上段)では、 $V_D=0$, $V_R=0$ に設定しているため、Ion Source以降が全てDrift Space*となります。この領域で分解したイオン・中性粒子も 分解しないイオンと速度が(ほとんど)同一のため、同時に検出器に到達します。従って、高感度測定が可能です。しかし、これでは初期エネルギーの分布を相殺できないため、分解能が低くなります。

*) 他の質量分析法では、この空間に電場・磁場を用いてスキャンを行います。検出器に到達するまでイオンとして生存したもの (\bullet^+ , \square^+ , \circ^+)しか検出できないため、感度が低下します。

Reflectron Mode(図1 二段目)では、 $V_D=0$, $|V_R| > |V_0|$ に設定します。このとき、分解したものも含めた全てのイオンはエネルギー収束が行われ、折り返してReflectron Detectorに到達します。従って、分解能の高いスペクトルが得られますが、PSDの度合いが高いイオン種ほど感度が低下します。

--- 「なぜReflectron Modeでは分解能が向上できるのか？」<4. TOFMSでエネルギー収束を行う方法>参照

Neutral Detection Mode(図1 三段目)では、Reflectron Modeと同一の電圧設定とします。このとき、イオンが分解した時に生成する中性粒子のみが直線飛行し、Linear Detector**に到達します。なお、PSDの度合いの高い(不安定な)イオン種ほど中性粒子が多く生成します。

**) KOMPACT MALDI IV 及び AXIMA-Confidence, -Performanceでは、Neutral Detection Mode専用の測定回路と、中性粒子でも十分な感度のある(改)SEM検出器を設けているため、Reflectron信号との同時測定が行えます。

MS/MS Mode(図1 最下段)では、レーザ強度を増大させる等の手法を用いて、積極的にPSDイオン量を増加させ、特定のイオン(ここでは \square^+)が偏向板を通過するときのみ $V_D=0$ とします。このとき、特定のイオンから生成したPSDイオン(ここでは代表として半分の質量となった場合のみ表示)も同時に偏向板を通過するため、Reflectron Detectorにて そのイオンに関する内部構造を表すスペクトルが得られます。Reflectron Modeと異なるのは、特定のイオンのみReflectronに導くことであり、Reflectronに入る前までが1段目のMS、Reflectron内が2段目のMSとなっています。

--- 「なぜReflectronでMS/MSが可能なのか？」<3. Curved Field ReflectronでのPSD Ion検出>参照

2. 4つのモード比較測定例

図2は、環状ペプチドの一種Gramicidin Sを、これら4つのModeを用いて測定したスペクトル例です。4つのスペクトルを比較することにより、例えばMatrix由来のイオンよりも試料分子のイオンの方が不安定であることや、試料分子の質量 及び アミノ酸シーケンスの情報が得られます。

特に**Neutral Detection Mode**では、イオン生成後の不安定度を表しています。従って、例えば、共有・非共有・イオン結合の強さを比較することにより、それらの(立体)構造の不安定度(Potential)を推定すること等ができます。

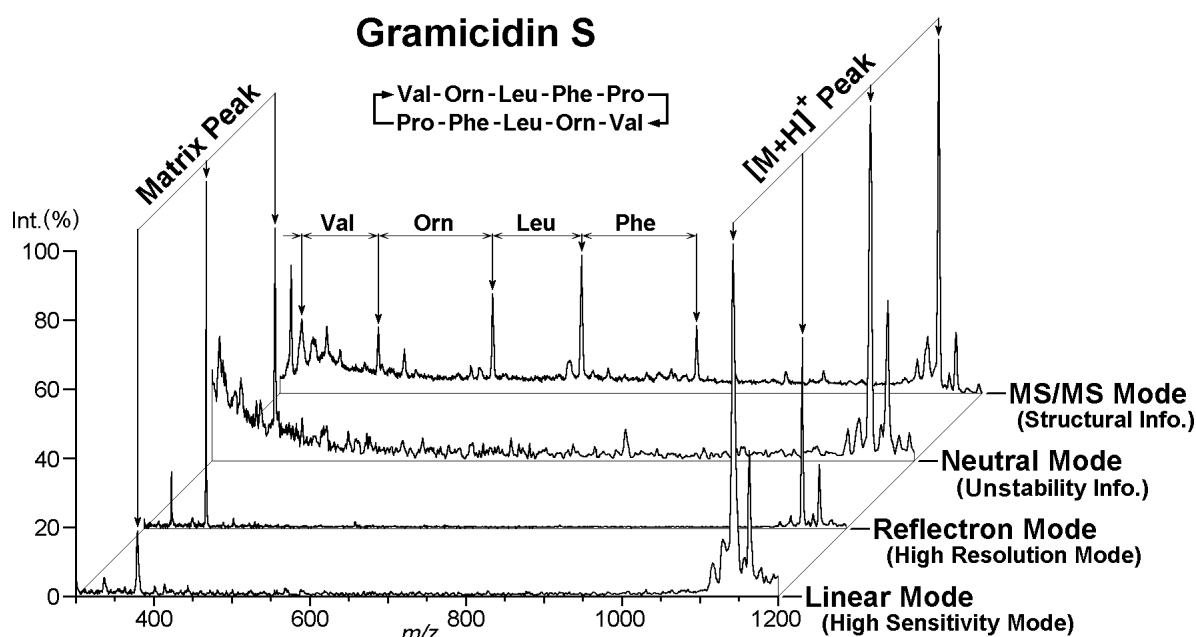


図2 Gramicidin S 4つのMode測定比較

MALDI-TOFMS用の検出器として何が適切か？

Shimadzu/KRATOSでは、TOFMSの検出器として二次電子増倍器SEM・マイクロチャンネルプレートMCP いずれかを採用しています。本解説書では、MCPと改良型SEMを比較しながら、用途の違いを説明します。

1. Micro Channel Plate (MCP)

図1は、マイクロチャンネルプレートMicro Channel Plate (MCP)の模式図です。

MCPは、内壁が抵抗体かつ二次電子放出体である内径 $\phi 10\text{-}20\mu\text{m}$ の極細ガラス管を多数束ね固着させたものを、垂直方向に薄く(約1mm)スライスした構造となっています。すなわち、各々の細管が独立した二次電子増倍器となっています。

ある閾値以上の運動エネルギーをもって入射した粒子が壁面に衝突すると、1個以上の二次電子を放出します。プレートの表面・裏面間には電位差が設けられており、発生した電子が(図1下方に)加速され 再度壁面に衝突し、複数個の電子を放出します。この「衝突」→「電子放出」を繰り返すことにより、電子の発生個数はネズミ算的に増加します。最終的にAnodeに入射する電子は、1個の粒子の入射に対し 電子 10^4 個程度に増倍されることになります。通常この増倍率ではMSに不十分であり、通常は2枚重ねて $10^6\sim 10^8$ 程度に増倍させます。

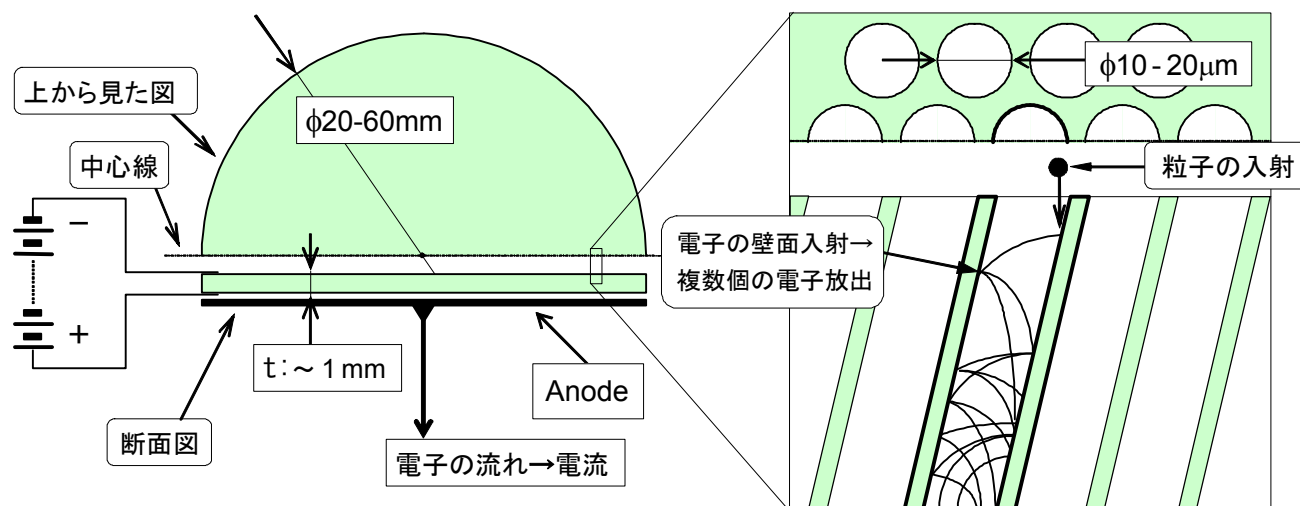


図1 MCPでの (荷電)粒子検出・増倍

TOFMSでは、 m/z 値が等しいイオンでも イオン飛行軸に垂直な方向にある程度の広がりを持って飛行しています。図1左に示されるようにMCPはイオンを検出する平面が比較的広く取れかつ入射位置の違いによる飛行時間差が極めて少ないので、特に高分解能TOFMSに適した検出器として多くの装置に採用されています。また、Anodeをマトリックス状に多分割すれば位置情報も入手できるため、Imagingへの応用も考えられます。

しかし、多量のイオン入射に対し飽和しやすいという欠点が存在します。これは、パイプの内径が細いため、1個の粒子入射でも内部が放出電子でいっぱいになってしまうことと、検出器自身のインピーダンス(抵抗値)が他の検出器より1桁程度高く(数100M Ω)、電子の補給が追いつかないためです。ダイナミックレンジも3桁程度しか取れません。

さらに、パイプの内径が細いため 内部に残留ガスがトラップされやすく、特に真空排気に配慮する必要があります。活性表面の劣化も速く、SEMの様に空気中での保存は行えません。

2. 改良型Secondary Electron Multiplier (SEM)

図2は、Shimadzu/KRATOSと検出器メーカーが共同で開発したTOFMS用二次電子増倍器SEMの模式図です。

図1と同様に、運動エネルギーを持ったイオン・中性粒子は、TOF質量分離部を通過後 改良型SEMに入射し"1st Dynode"の表面に衝突します。この特殊な金属表面は、ある閾値以上の運動エネルギーを持った粒子(荷電粒子である必要性無し)が衝突すると、1個以上の電子を放出します。"1st Dynode"⇄"2nd Dynode"間の電位差で、電子が "2nd Dynode"に向かって加速され 衝突します。"2nd Dynode"以降は、MCPと同様に 電子の「入射」→「放出」を十数回繰り返すことにより、1個の粒子の入射に対し 電子 $10^6\sim 10^8$ 個に増倍されることになります。MCPと大きく異なるのは、「入射」・「放出」面が連続的でないことです。

一般にSEM検出器は、電子が通過できる断面が数mm四方もあり、検出器のインピーダンスも数10MΩ程度であるため、極めて飽和しにくい構造といえます。さらにこの改良型SEMは、従来のSEMと異なり比較的広い検出平面Planeをもつため、飛行軸方向に広がったイオンも検出することができます。

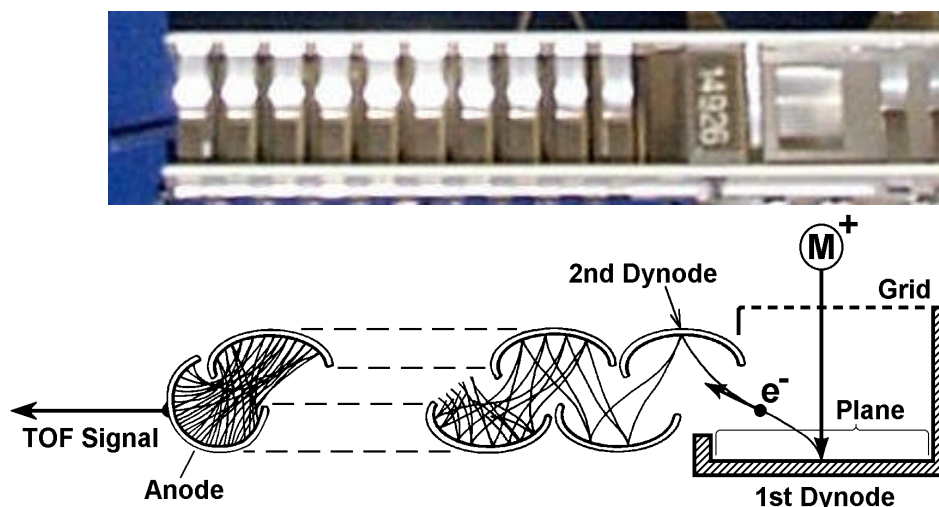


図2 改良型SEMによる(荷電)粒子検出・増倍

3. MCPとSEM どちらが良いか？

表1は、改良型SEMとMCPの特徴を比較した一例です。結論からいえば「用途・目的に応じて使い分ける必要がある」となります。例えば、特に高い質量分解能を求められイオンが広がり易いReflectron ModeではMCPが適切ですが、扱うイオン量も多く耐久性・安価・汎用性を求められるLinear Mode(専用)機には、改良型SEMが適切となります。

表1 改良型SEM/MCP 特徴比較表

	質量分解能	受光面分解能	飽和耐久度	寿命・耐環境性	ダイナミックレンジ	価格
MCP	◎極めて高い	○容易(Anode分割)	×低い	×不良	×狭い	×高価
(改)SEM	○高い	×困難	○高い	○良好	○広い(暗電流小)	○安価

4. 改良型SEMIによる低質量領域測定例

図3は、改良型SEM検出器採用の卓上型KOMPACT MALDI IIIにてAdenosineを測定した一例です。MatrixとしてSinapinic Acid(SA)を用い、強大Matrix Peak群(m/z : 207はInt.100%より大幅超過)直後の検出ではありますが、[Adenosine+H]⁺は感度低下(Ion Suppression)が認められない状態で測定されています。すなわち、低質量(m/z <1,000)イオンも容易に測定できます。

MCP使用の場合は、(低質量側)高強度イオンを検出器に入射させないIon Deflectorが不可欠になります。

このことから、特に広範囲イオンを網羅的に測る必要性の高いLinear Mode測定では、改良型SEM採用が望ましいことが裏づけられます。

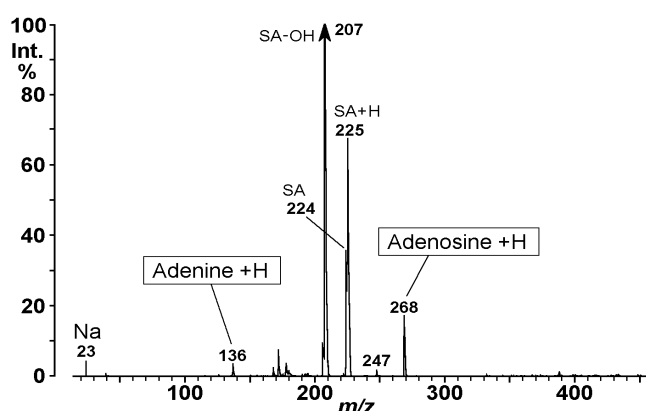


図3 改良型SEMIによる低質量領域測定例

< 参考文献 >

C.L.Just and C.D.Hanson, Rapid Commun.Mass Spectrom., Vol.7, p502-506, (1993)

Inorganic Matrix とは何か？ どんな特徴があるのか？

島津製作所では、1980年代初頭からレーザーイオン化TOFMSの研究を行ってまいりました。その成果の1つとして「無機化合物マトリックス」を開発し、さらにグリセリンを添加することにより 当時としては画期的な質量10万の測定を可能としました¹。これが、Sinapinic Acidを始めとする有機化合物系マトリックス開発のきっかけとなったことは、専門家の方々の間でよく知られています。

それ以来、世界中のMALDI研究者の多大な努力により 測定可能な化合物の種類も大幅に増加したため、「元祖」マトリックスの存在意義は薄れつつあると思われていました。しかし、現在でも「完璧な」マトリックスは存在しません。一方、近年 Desorption / Ionization on porous Silicon (DIOS)に代表される「Matrixlessイオン化」も注目され始めています。

本解説書では、特に低質量域で 有機化合物系では達成困難な特長(例:低バックグラウンド)を持つ「無機化合物マトリックス」の概略についてご紹介します。ここに記述されている原理は、DIOSイオン化機構にも共通する部分が多くあります。

1. 瞬時高温イオン化理論

MALDI法のイオン化過程に対する考察は、世界中の多くの方々がこれまで様々なモデルや仮説を採用して行われていますが、1つの理論で全ての現象を説明できるような決定打・網羅的なものは、いまだ提唱されていないようです。単純化すると「熱イオン化か光イオン化か?」「固相でのイオン化か気相でのイオン化か?」等の争点があります³。

ここでは、特に無機化合物マトリックスによる脱離過程を説明できる「瞬時高温イオン化理論」について簡略に説明します。

化合物「AB」が加熱された場合、下記の式(1)[気化Evaporationの場合]、式(2)[分解Decompositionの場合]で表される2つの反応が考えられます。なお K_V, K_D は、アレニウスArrheniusの式(3)で表される速度定数であり、対数表示の式(4)に変形して表示できます。



$$K = F \exp(-E/RT) \text{ ---- (3)}$$



$$K: \text{速度定数} \quad F: \text{頻度因子} \quad E: \text{活性化エネルギー}$$

$$R: \text{気体定数} \quad T: \text{絶対温度}$$

$$\therefore \ln K_V = \ln F_V - E_V/RT, \quad \ln K_D = \ln F_D - E_D/RT \text{ ----(4)}$$

揮発性が高く熱的にも安定な化合物は、比較的低温でも気化が容易であり、図1-1の様に 低温(室温程度)でも気化速度 K_V が優勢となります。熱的不安定かつ不揮発性化合物は、低温では分解速度 K_D が勝っています。言い換えれば、気化に必要な活性化エネルギー E_V が 分解エネルギー E_D より高いために揮発が困難ということであり、 $E_V > E_D$ が成立します。しかし、この関係があるため、図1-2の様に 速度定数 $K_V > K_D$ が成立する温度領域は必ず存在することになり、その様な高温では気化の方が促進されることとなります^{2,3}。

この理論をイオン化に適応すると、「不揮発性・熱的不安定な化合物でも分解させずにイオンを発生させるためには、できる限り高温でイオン化する」ことであり、「分解反応が主である低温を できる限り経験させない」ことも望めます。すなわち、ゆっくり昇温させるのではなく「急速加熱条件で高温に到達させる」ことが必要条件となります。

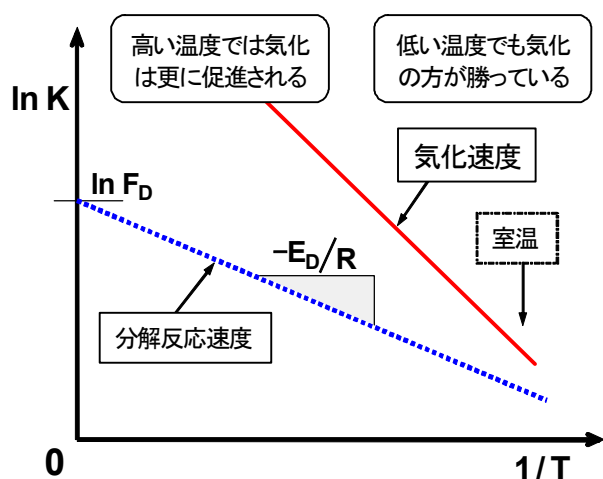


図1-1 揮発性化合物の場合の速度定数

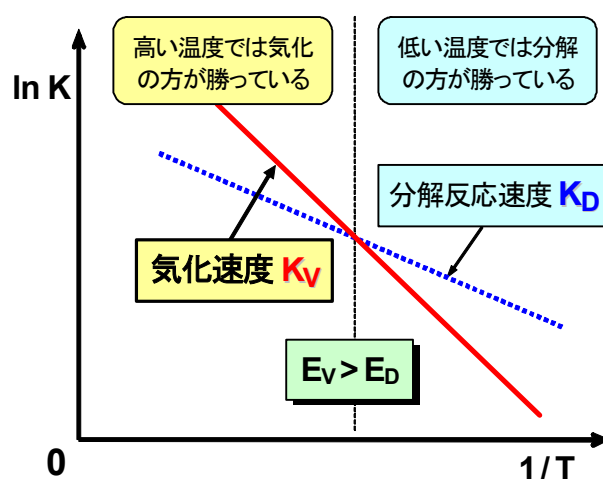


図1-2 不揮発性化合物の場合の速度定数

2. Ultra Fine Metal Powder (UFMP)の特徴

金属超微粉末Ultra Fine Metal Powder (UFMP)とは、文字通り極めて微細(ϕ 5~100nm)な金属の粉末です。通常の 一かたまりとなった(バルク)金属の多くは 金属光沢色を持っており、少なくともいずれかの波長(帯域)を高効率で反射します。これに対しUFMPは、光の波長と粒径が同程度となり主に乱反射が大量発生するため、図2に示されるように波長に余り影響されず 粒径が小さくなるほど**光吸収率が高**くなります。しかも粒径が小さいため、単位重量当たりの**表面積も増加**します。UFMPは個々の粒子がほぼ独立しているため、図3右に示される様に 熱が散逸し難く、実用上 **比熱が低**く(熱し易)くなります。

また 表1に示される様に、有機化合物系マトリックスやアルカリ金属とは異なり、UFMP用金属は 融点・沸点が高いため溶解や酸化が起こり難く、それらにより熱が奪われたり**マトリックス自身のイオンが発生することが少**くなると考えられます。更にUFMPは 例えば表面酸化膜形成等により、**化学的に安定な構造**(無機化合物)になっていると考えられ、有機化合物系マトリックスの様にプロトンのやり取りは行えませんが、試料・マトリックスとの結合・分解反応は極めて発生し難くなります。

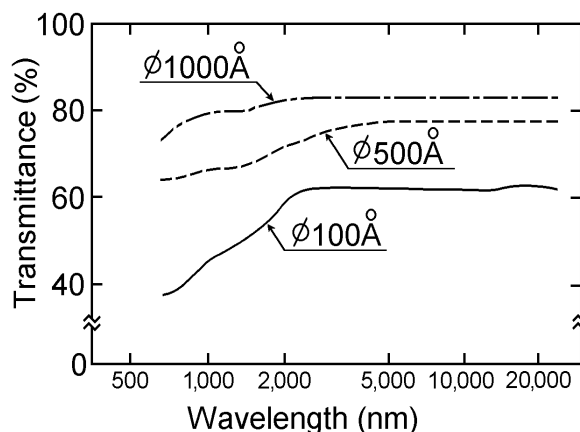


図2 UFMP(Ni)の各粒径における光透過度

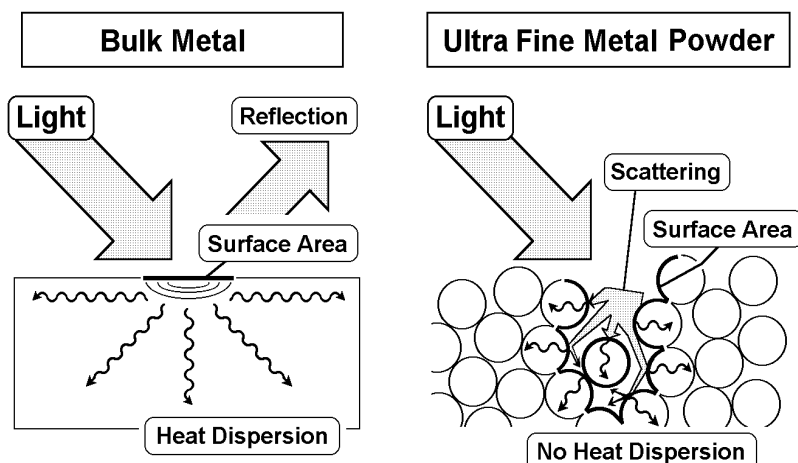


図3 レーザ光照射時におけるバルク金属とUFMPの差異

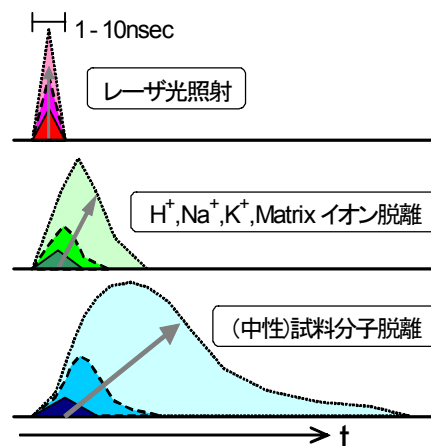


図4 MALDI法における脱離過程

したがって、図6に示される様に、この無機化合物マトリックスと試料との混合物にレーザー光を照射した場合、マトリックスはレーザー光を吸収し比熱が低いため容易に高温に達しますが、沸点が高いため、それ自身がイオンとして脱離することが余り起こりません。また、表面積が広いいため近傍に存在する試料に容易に熱エネルギーを与えることができます^{4,5}。

-COOH、-NH₂のように プロトンを受け渡す機能が存在しないため、図5に示されるようなプロトン付加・脱離イオン発生は促進されませんが、不純物として存在あるいは積極的に添加されたカチオンが同時に脱離することにより、試料分子のカチオン付加分子の生成が促進されます。しかも、急速加熱のため、試料自身の分解反応も抑制されます。

表1 各マトリックスにおける融点及び沸点

		融点(°C)	沸点(°C)
有機化合物系マトリックス	Sinapinic Acid	203 - 205 *	-----
	2,5-Dihydroxybenzoic Acid	205 *	-----
	p-Nitroaniline	149 - 151 *	260 *
無機化合物マトリックス	Co **	1,494	2,747
	Ni **	1,455	2,731
	Cu **	1,085	2,580
	Ag **	962	2,710
アルカリ金属	Na **	97.8	881
	K **	63.5	766

* : Aldrichカタログより ** : いずれも金属バルク状態での値

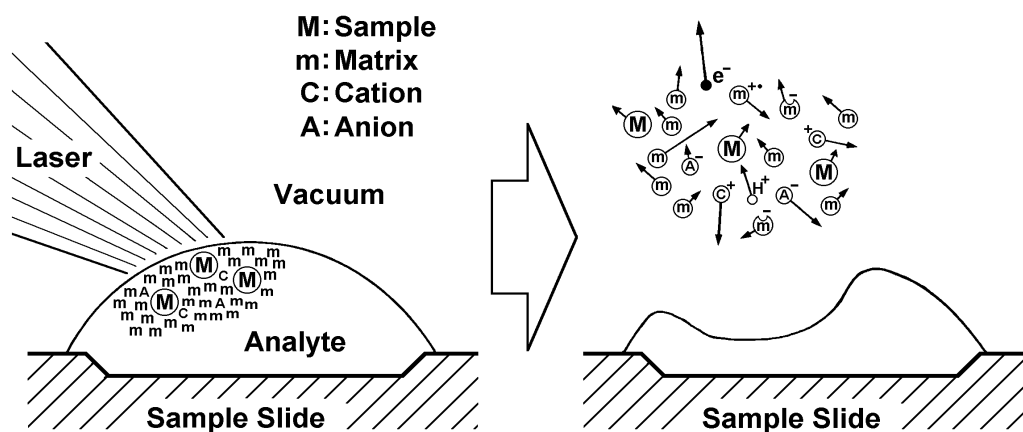


図5 有機化合物系マトリックスを用いたMALDI法における脱離過程

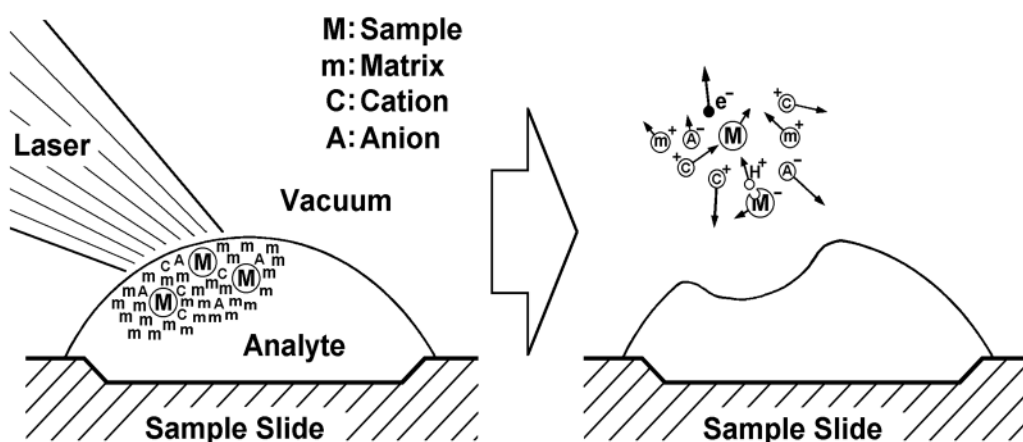


図6 無機化合物マトリックスを用いたMALDI法における脱離過程

3. 測定例と特徴比較

図7(a)は、有機化合物系マトリックスの代表例DHB(2,5-Dihydroxybenzoic acid)で単糖Xyloseを測定した一例です。 $m/z=100-500$ 領域には、マトリックス由来と考えられるピークが多数測定されています。試料であるXyloseのカチオン付加分子は、比較的低強度であり、未知物質を測定しているという前提条件ならば、同定が容易とはいえません。これに対し、図7(b)は、無機化合物マトリックスを用いた場合であり、 $m/z=100-500$ 領域には試料分子に由来するイオンしか測定されていません。

また、図8は、無機化合物マトリックスを用いてアミノ酸Arginineを測定した一例です。Arginineは、それ自身がプロトン供給体となり得るため、プロトン付加分子も測定されています。

注：図7, 8は KOMPACT MALDI I で測定しているため、現在販売している装置よりも質量分解能が極めて低くなっています

表2 有機化合物系マトリックス／無機化合物マトリックス 特徴比較表

	バックグラウンド	解析の容易さ	質量(化合物)範囲	$[M+H]^+$	$[M+Cation]^+$
有機化合物系Matrix	× 高く多種類	△ 困難な場合有り	○ 中質量から高質量域	◎ 促進	○ 促進
無機化合物Matrix	◎ 極めて低い	◎ 容易	△ 主に低質量域	△ 微弱	◎ 大幅促進

	感度	化学活性	吸収可能波長	室温・自然光での安定性
有機化合物系Matrix	○ 一般に高い	× 高い	△ 化合物特有の帯域有り	△ 冷蔵・遮光保存すべきもの有
無機化合物Matrix	△ 低い	◎ 極めて低い	◎ ほぼ全域	◎ 極めて安定(長期保存可)

参) 有機化合物系Matrixは多種類あります。上記特長は、それら全てに共通するわけではありません。特に質量(化合物)範囲は、1種類のMatrixで全てをカバーできるわけではありません。

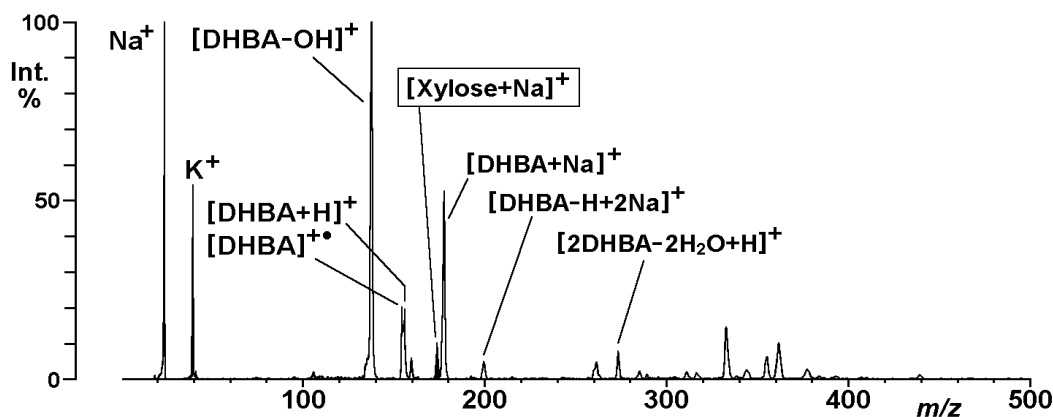


図7(a) 有機化合物系マトリックスDHBAを用いた場合のXyloseのマスペクトル

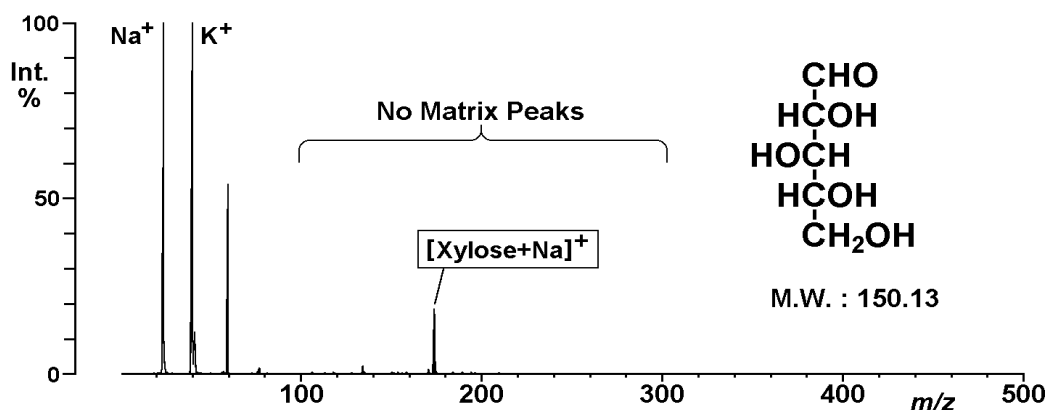


図7(b) 無機化合物マトリックスを用いた場合のXyloseのマスペクトル

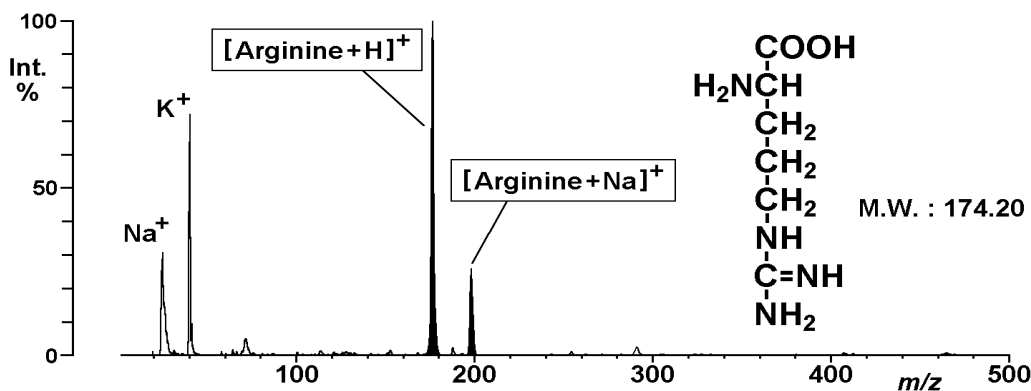


図8 無機化合物マトリックスを用いた場合のArginineのマスペクトル

< 参考文献 >

1. K.Tanaka, H.Waki, Y.Ido, S.Akita, Y.Yoshida and T.Yoshida, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 151(1988)
2. R.J.Beuhler, E.Flanigan, L.J.Greene and L.Friedman, J. Am. Chem. Soc., 12, 3990(1974)
3. G.J.Q. van der Peyl, K.Isa, J.Haverkamp and P.G.Kistemaker, Organic Mass Spectrometry, 16, 416(1981)
4. F.G.Hopwood, et.al, Rapid Commun. Mass Spectrom., 8, 881 (1994)
5. D.S.Cornett, T.D.Lee and J.F.Mahoney, Rapid Commun. Mass Spectrom., 8, 996 (1994)

[危険性に対する注意 !]

近年、ナノテクノロジーの発展に伴い「超微粉末」が専門家以外からも大いに注目されていますが、同時にその**危険性の有無**にも関心が寄せられています。例えば、「超微粉末」を呼吸器官を通して吸入したり 皮膚等から吸収することによる **健康への影響**が未知数のため、使用の際には十分な**事前調査と細心の注意**が必要です。

MALDIとLI/LDの違いは何か？

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization (MALDI)は、Electro-Spray Ionization (ESI)と並び 極めて広範囲の化合物をソフトにイオン化する手法であり、質量分析におけるイオン化法の2大手法として幅広く用いられていますが、その発明から20年以上経過した現在でも、そのメカニズムが十分に解明されていません。Matrixと呼ばれる化合物と試料・不純物が複雑に混合した中にレーザー光エネルギーが一瞬(数ns)の間だけ極所に注入され、多種多様な化学反応・物理現象が発生するため、最新の理論やシミュレーション技術を用いても全容を解明することが困難だからです。

本解説書では、理論面での詳細・厳密な説明は行いません。よりシンプルな(狭義の)レーザーイオン化から説き起こすことにより、**MALDIを活用していただくための基礎的なガイダンス**となるようにまとめました。

1. Laser Ionization (LI) レーザイオン化とは？

(狭義の)レーザーイオン化とは、試料にレーザー光を照射し 試料イオンを生成させる方法であり、光イオン化の一種です。1光子吸収でイオン化する場合を「1光子イオン化」、複数個吸収する場合を「多光子イオン化」と言います。光イオン化の場合は、気相でもイオン化が可能となります。通常、化合物から電子electronやプロトンprotonが取り去られることにより、イオンが生成されます。

MALDIと異なりLIは、基本的にレーザー光が照射されている時間のみのイオン化であるため、時間分解能が高くなります(本説図2、「Pulsed Extractionとは？」図2参照)。

レーザー光は波長が単一であり、複数の化合物の中から特定の化合物のみに光エネルギーを吸収させ(例: MALDIの場合のMatrix)イオン化することも可能です。

2. Laser Desorption (LD) レーザ脱離とは？

レーザー脱離とは、固体・液体試料にレーザー光を照射し、試料を気相に脱離(ガス化)させる方法です。狭義の脱離にはイオン化を含みませんが、広義では含みますので、曖昧さを避けるために LDI (Laser Desorption / Ionization)と表記する場合があります。なお、レーザー照射により固体試料を多量に加熱・溶解・蒸発させる方法 を、Laser Ablationとも呼んでいます。

図1は、LD(LI)による 固体・液体試料の脱離機構を模式化した図です。試料自身がレーザー光エネルギーを吸収するため 単純な機構であり、試料由来以外の不必要なイオン等の発生危険性が低い手法です。しかし、試料自身の内部エネルギーが高くなるため、試料分子が分解する危険性が高くなります。また、積極的に電荷を与える機構を含んでいないため、一般論としてイオン化効率が低い傾向があります。

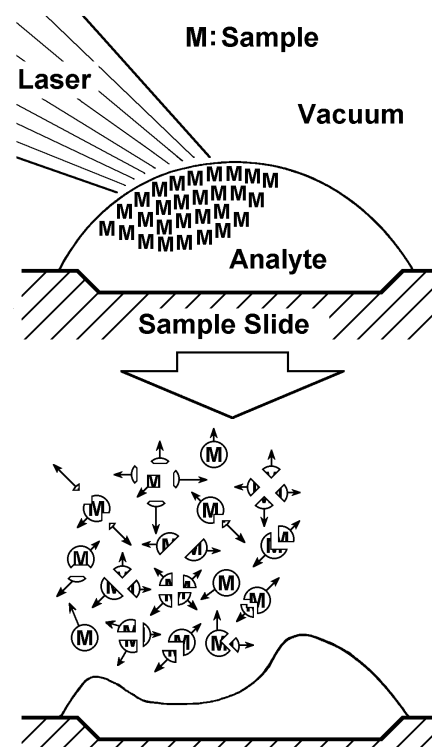
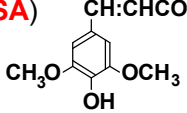
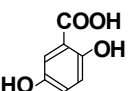



図1 LD法による気相への試料脱離

3. Matrix マトリックスとは？

表1 代表的な有機化合物系マトリックス 特徴比較表

MALDI用の代表的なMatrix	Sinapinic Acid (SA) CH:CHCOOH 	2,5-Dihydroxy Benzoic Acid (DHBA) COOH OH 	α-Cyano-4-Hydroxy Cinnamic Acid (CHCA) CH:C(CN)COOH OH 
Molar Absorptivity (337nm)	14,000	5,600 [吸光度低い]	28,000 [吸光度高い] [∴ 少ないレーザー光量で脱離]
等電点 Isoelectric Point	6.20 (ほぼ中性) [∴ 正負両イオン生成容易]	3.76 (酸性)[H ⁺ を供給] [∴ 主に試料正イオン生成促進]	4.08 (酸性)[H ⁺ を供給] [∴ 主に試料正イオン生成促進]
親水？疎水？	疎水性 (Hydrophobic)	親水性 (Hydrophilic)	疎水性 (Hydrophobic)

(MALDIにおける)マトリックスとは何か？ 厳密な定義は定まっていますが、実質的に「レーザー光を吸収し、試料のイオン化を促進する(有機)化合物」と表記できます。MALDIで多用されている窒素レーザー(λ=337nm)に適したMatrixの中で、代表的な3種類

の特徴を表1に示します。ベンゼン骨格がレーザー光を吸収し、-COOH (カルボキシル基)がH⁺ (proton) 供給体となります。-OH (水酸基)は親水性を高める役割を果たしています。これら官能基の相対位置や数によって、Isoelectric Point (等電点)やHydrophobicity (親水性)が影響されます。

4. Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization (MALDI) マトリックス支援レーザー脱離イオン化とは？

MALDIとは、前記したMatrixを用い、レーザー光照射により試料を(分解させずに)イオン化する方法です。

図3に示されるように、試料とMatrixを(均一に)混合した(共晶)部位に凸レンズで集光した(パルス)レーザー光を照射*すると、主にMatrixがレーザー光を吸収し、急激に加熱され、試料はMatrixと共に強制的に(真空中に)脱離させられます。

このとき、試料に対し電子のやり取りがあればラジカル正/負イオンに(1)、Matrix等とプロトンH⁺ (proton)を受け/渡すればプロトン付加/脱離イオンに(2)、不純物として含まれていた(積極的に添加された)カチオン/アニオン(Cation/Anion)が付加すればカチオン/アニオン付加イオンに(3)(主に糖鎖やポリマーのイオン化に適応)、Matrix自身が付加すればマトリックス付加イオンに(4)なります。

MALDIは(ESIと異なり)大部分が1価イオンとして生成されますが、酸性度・アルカリ性度が高い場合(例:CHCAの使用)や、電荷が複数個付加し易くなる高分子化合物試料などは、多価イオン(n≠1)も生成し易くなります。

- (1) $M \rightarrow M^{\cdot+} + e^-$ ----- ラジカル正イオン発生
 $M + e^- \rightarrow M^{\cdot-}$ ----- ラジカル負イオン発生
- (2) $M + nH^+ \rightarrow [M+nH]^n$ ----- **プロトン付加**した(多価)イオン発生
 $M - nH^+ \rightarrow [M-nH]^n$ ----- **プロトン脱離**した(多価)イオン発生
- (3) $M + nC^+ \rightarrow [M+nC]^n$ ----- **カチオン付加**した(多価)イオン発生
 $M + nA^- \rightarrow [M+nA]^n$ ----- アニオン付加した(多価)イオン発生
- (4) $M + m + H^+ / C^+ \rightarrow [M+m+H/C]^+$ --マトリックス付加した 正イオン発生
 $M + m - H^+ \rightarrow [M+m-H]^-$ ----- マトリックス付加した 負イオン発生
- C⁺: カチオン、A⁻: アニオン、M: サンプル分子、e⁻: エレクトロン
 m: マトリックス分子、H⁺: プロトン、n: 自然数

参) 試料に電離容易な官能基(例:-COOH, -PO₄H)がある場合、Cation (Na⁺, K⁺, ...) / Anion (Cl⁻, ...) の存在量とProton濃度との兼ね合いで、[M-nH+(n+1)C]⁺に類するイオンが生成される場合があります。

*: レーザー光は1~100μm程度に絞って照射されるため、生体試料等のMapping / Imagingにも活用できます。しかし、局所での混合具合・表面状態等にイオン化が影響されることや、全部をイオン化していないこと(定量性の低さ)に注意する必要があります。

MALDIは、(LI/LDと異なり)Matrixから試料へのエネルギー・電荷の受け渡しが不可欠であり、固体の場合は「試料とMatrixの均一な混合結晶」作成が必要条件となります。そのためには、例えば 親水/疎水性度や化合物形状等に関し、試料とMatrixの親和性が高いことが効率を高めることとなります。

通常MALDIはソフトなイオン化が求められます。すなわち 理想的には、少なくとも(イオン化に必要な部位以外の)共有結合を破壊せず(酸化・還元を行わず) 不必要な化合物の付加が発生せず、脱離した試料分子全てが(単一種類の)電荷を持つべきである、となります。

こぼれ話: MALDIとSoft Laser Desorption (SLD)の違いは？

MALDIはドイツのHillenkamp, Karas両博士によって1985年に発明されました。文字通り、添加した(有機)化合物の支援によってイオン化する手法です。発当初は、ペプチド等の低・中分子量のイオン化促進効果が確認されていました。これに対しSoft Laser Desorption (SLD)とは、文字通り「レーザー光を用い 温和に脱離(イオン化)する概念・方法の総称」である、と考えられます。すなわち、MALDI, SELDI, DIOS等を含んでいる、と解釈できます。

参照) ノーベル賞公式Webサイト<<http://nobelprize.org/>> 2002年受賞理由説明

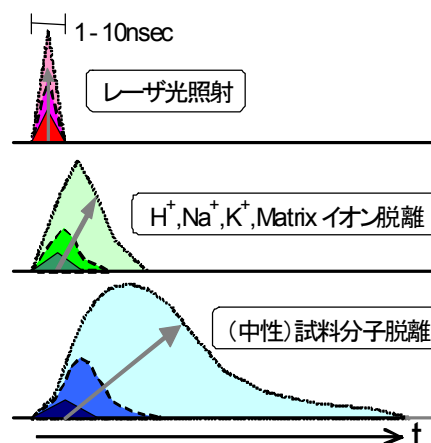


図2 MALDI法における脱離過程

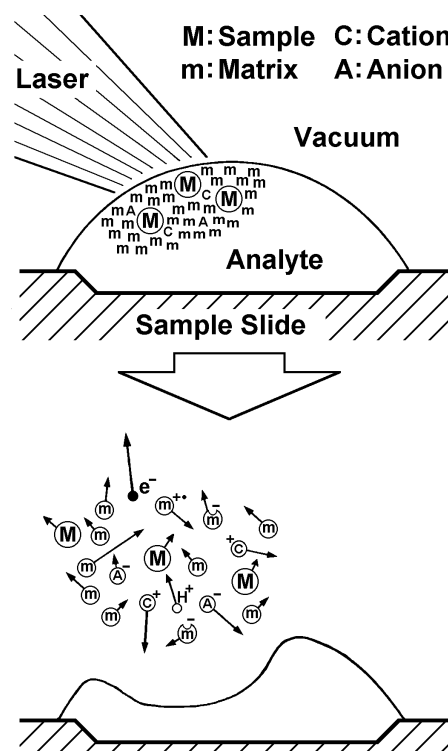


図3 MALDI法による固体または液体試料の気相への脱離

島津が発明したMALDI Matrixは？

島津製作所では、1980年代初頭からレーザーイオン化TOFMSの研究を行ってまいりました。その成果の1つとして「無機化合物マトリックス」を開発し、さらにグリセリンを添加することにより 当時としては画期的な $m/z > 100,000$ の測定を可能としました。

質量分析を行うためには、前処理・イオン化・イオン分離・検出・測定・解析(後処理)等が必要です。**質量分析は化合物の「重さ」を量るのではなく、化合物をイオン化した後の m/z 値を計測**します。この観点より、イオン化が最も重要であると判断できます。

MALDIの歴史は、より広範囲の化合物をイオン化するための新規Matrixの開発の歴史、とも言えます。島津グループでも社内外のグループと**共同で**、これまで様々な**Matrixの新規開発・新機能発見**を行ってまいりました。本解説書では、その中の5つに関して概略を紹介します。

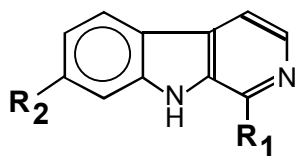
1. *nor*-Harmame

MALDIにおいて、Matrixからの脱離エネルギーと電荷を試料分子が受け取る効果的な手法の1つは、両者を良好に混合させることです。そのためには、**両者が同一溶媒に(良好に)溶ける**ことが必要です。

β -Carbolineの一種である*nor*-Harmame(図1上)は、純水等に対する溶解度は極めて低いですが、その他通常MALDIに汎用される溶媒(例: TFA(100%), AcOH, Me/EtOH, CH₃CN, Acetone, THF)のみならず、Toluene, CHCl₃, CH₂Cl₂にも容易に溶解できるので、合成高分子や脂質等にも適用が期待できます¹。

さらに*nor*-Harmameは 強力なProton Acceptorとなるので、中性糖鎖(例: 図2のMaltosyl- β -Cyclodextrin)からでも[M-H]⁻を生成可能です。これらの性質より、主に負イオン(例: 硫酸化糖鎖²)測定に活用されています。

正負両イオン測定・多種類溶媒に溶解等の特長から、「*nor*-Harmame は Universal な Matrix」と言えます。



	R ₁	R ₂
<i>nor</i> -harmame	H	H
Harmame	Me	H
Harmine	Me	MeO
Harmol	Me	HO

図1 β -Carbolines

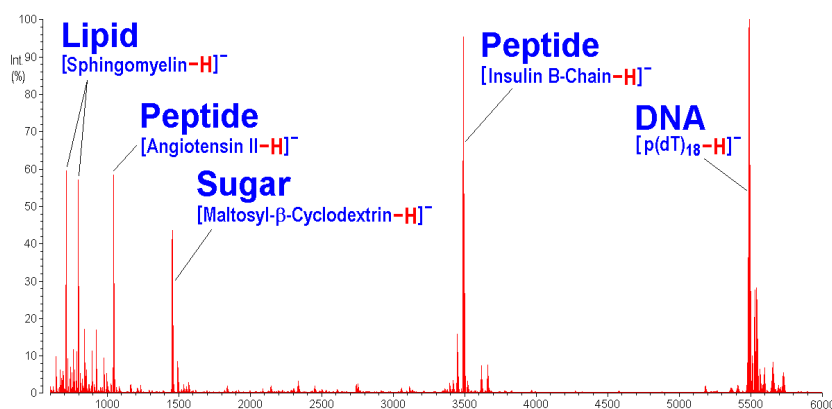
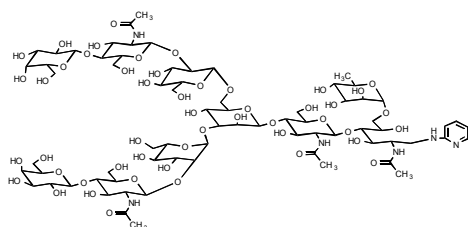


図2 *nor*-Harmameを用いた 脂質・ペプチド・糖鎖・DNA混合物測定

2. DHBA for PA-derivatized Oligosaccharides



DHBAは、ペプチド・糖鎖・(有極性)ポリマー等を代表とした極めて広範囲の化合物測定に用いられており、「試料分子(M)関連イオン」として[M+H]⁺/[M-H]⁻, [M+Cation]⁺/[M+Anion]⁻生成促進が知られています。質量分析で分子量情報を得るためには、このような化学反応以外の発生は避けるべきですが、例えばPA(Pyridyl Amine)化糖鎖を測定した場合、特に[M+H]⁺(図3左)に異常な強度分布(正常[理論分布]は図3右)が得られます。これは、PAの2重結合の一部が還元したため(図4)と考えられます。

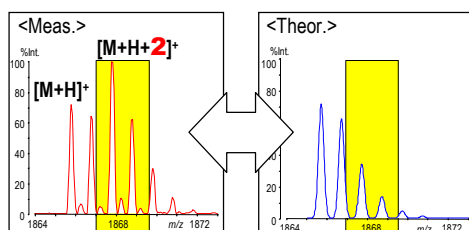


図3 DHBA使用時PA化糖鎖測定例

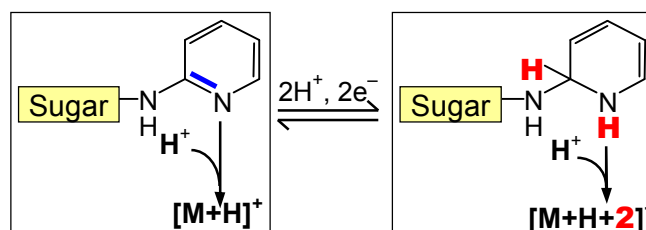


図4 PA還元機構(仮説)

通常、生体由来の糖鎖は分岐構造を持っており、MSⁿ測定を用いても全ての構造情報を入手することは困難です。図5は、PA化糖鎖の[M+H]⁺(上)、[M+H+2]⁺(下)に対するMS/MS測定(AXIMA-ResonanceのPrec.Ion高分離能を活用)であり、大部分は"+2u"分ずれていますが、m/z: 528, 690は同一になっています。これは、PAを含まないProduct Ionです。すなわち、還元イオンの生成という欠点を、同位体ラベルが自然に発生したと見なすことにより、構造情報の入手に活用した例と言えます³。

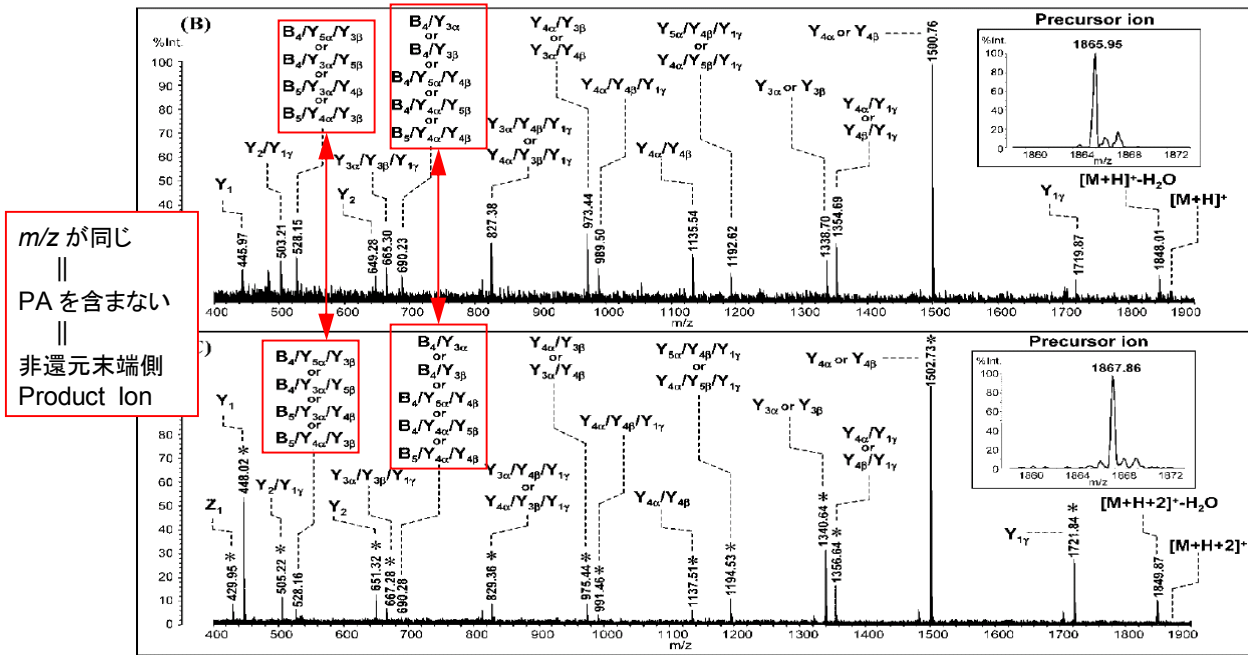


図5 PA化糖鎖[M+H]⁺(上)、[M+H+2]⁺(下) MS/MS測定例

3. 1,5-DAN for Disulfide Peptide

1,5-Diaminonaphthalene (DAN)は、構造を見ても明らかに酸化剤ですが、窒素レーザー照射時には還元剤になり、Disulfide (S-S)結合を還元するため本来の分子量情報が得られない等の欠点(図6)が指摘されていました⁴。また、Peptide Mass Fingerprint手法等で酵素消化ペプチド混合物を測定する場合は、前処理としてS-S結合を還元しますので、結合の組み合わせ情報は失われています。

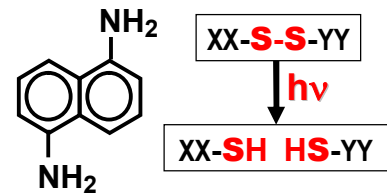


図6 DANのDisulfide結合還元機構

これに対し、例えば図6の様に S-S結合2箇所を有するペプチドに対し DANを用いると、MS測定で未還元・還元1箇所・2箇所還元のピークが得られました。これをそれぞれMS/MSすることにより、Peptide Sequence情報(図7右上)のみならず、S-S結合の組み合わせ すなわちDisulfide Mappingが行えました(図7右下)。

これ以外にも、DANを用いることによりHeme結合位置の推定・リン酸化ペプチドの高効率測定・ISD法と組み合わせたより長いSequence情報の入手(Top-Down Proteomicsへの応用)等にも一部成功しています⁵。

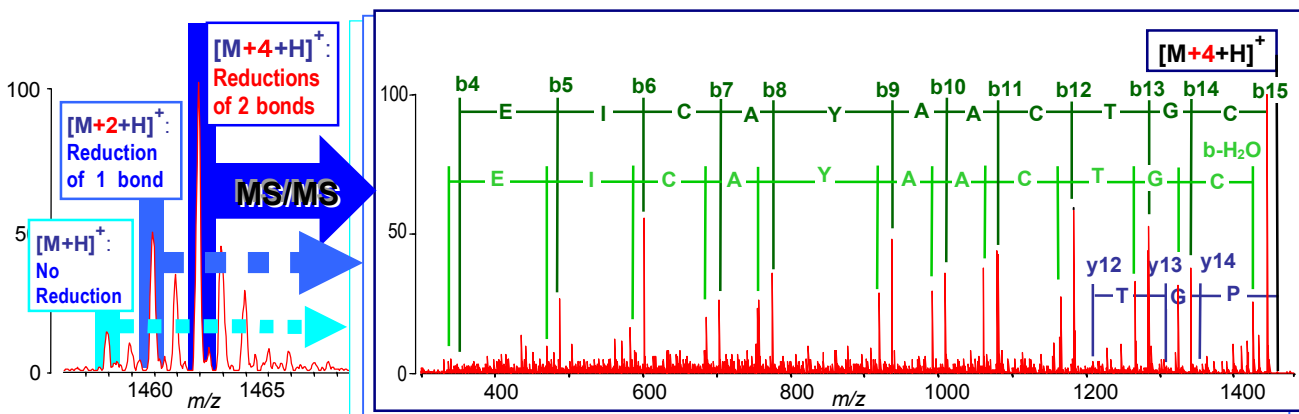


図7 DANによるS-S結合含有ペプチド一部還元MSスペクトル(左上) MS/MSスペクトル(右上)とDisulfide Mapping結果(右横)



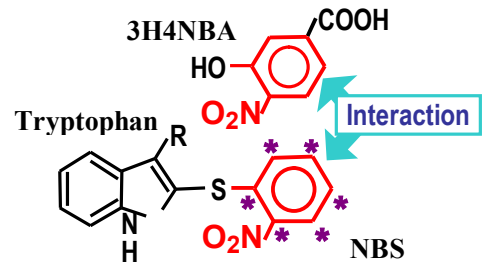
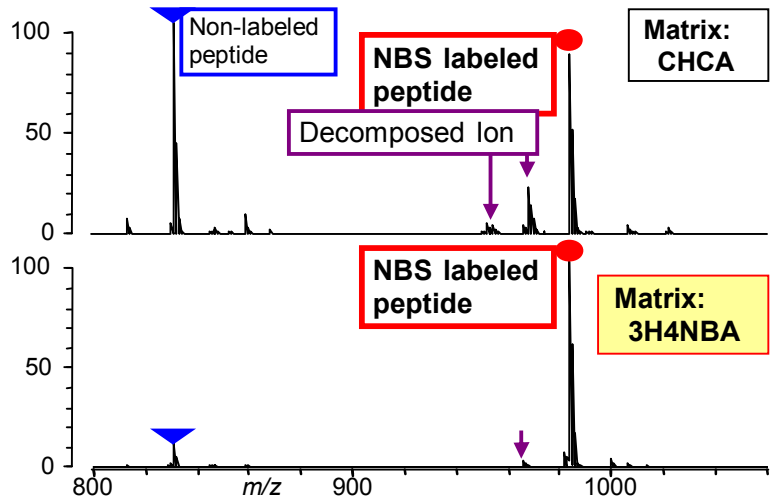
4. 3H4NBA for NBS Labelled Peptide

NBS試薬(2-nitrobenzenesulfonyl chloride; NBSCl)は、Tryptophanを同位体Isotopeラベル化し、タンパク質等を(相対)定量分析する方法として注目されています。しかし、従来Matrix(例: CHCA, DHBA)を用いた場合 NBSラベル化Peptideのイオン化では、分解反応や感度低下等の欠点が見受けられました。

これに対し3H4NBA(図8)をMatrixとして用いると、図9に例示される様に分解反応が抑制され NBSラベル化されていないペプチドよりも感度が高くなります。この理由としては、NBSと3H4NBAの構造が類似しており、NBSラベル化されたペプチドと3H4NBAが混合容易となり、その他のペプチドを「イオン化領域」から排除し、結果としてNBSラベル化Peptideが測定容易になったと考えられます。この特長により、混合物中에서도(ラベル化以外を取り除く処理を行わずに)定量分析が行い易くなります。

このNBS法(試薬キットは2005年よりWorldwideで市販中)を用いて、既に大腸⁷・肝臓⁸・乳⁹・腎臓¹⁰・肺¹¹等の(糖)タンパク質が比較検討され、ガンのマーカー候補等が多数見つけ出されています。

図9 NBSラベル化・非ラベル化ペプチド混合物に対し CHCAと3H4NBAをMatrixとしたMS測定比較例



*: ¹²C (Light) または ¹³C (Heavy)

図8 NBSラベル化ペプチドと3H4NBA

5. Liquid Matrix (G₂CHCA, G₃CA) for Oligosaccharide and Glycopeptide Analyses

DHBAは、現在 特に糖鎖一般の測定には1st Choice Matrixとされていますが、(ペプチド測定と比較)感度・ソフトなイオン化度が不十分と見なされる場合もあり、しかも不均一な結晶化により再現性・定量性不良やイオン化容易なHot Spot検索に労力を要する等の問題点が指摘されていました。

これに対し、イオン液体の一種である液体Matrix^{12,13}は、[真空中でも液状保持]・[蒸気圧≒0]等の特長を有し、これまでG₂CHCA等が開発されてきましたが、感度は不十分と見なされていました。

島津では、液体Matrixが適度の表面張力を有する特徴に注目し、希釈した液体Matrix溶液と試料溶液を混合乾燥することにより液滴が凝集し、実質的な感度と再現性・均一性を向上させることが出来ました(図12,13)。

特に島津が開発したG₃CA(1,1,3,3-tetramethyl guanidine p-クマル酸塩)は、不安定な硫酸化糖鎖でも1fmolでMS/MS可能であり、他の糖鎖(例: PA化糖鎖・シアル化糖鎖・中性糖鎖)でもDHBAを凌駕する感度が得られています。

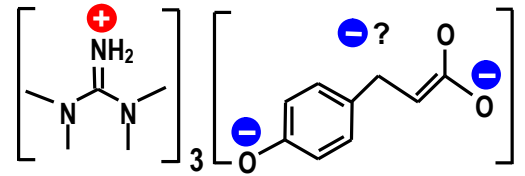


図10 G₃CA推定構造

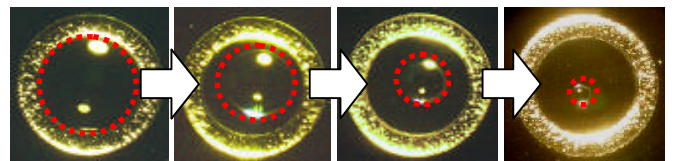
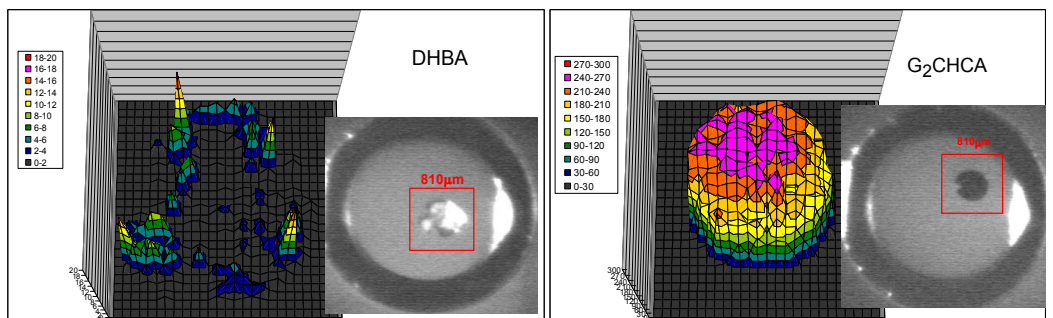


図11 液体Matrix溶液+試料溶液の乾燥フォーカス経過

図12 イオン強度分布比較

DHBAはHot Spotが存在し不均一であるのに対し、G₂CHCAは極めて均一に分子イオンが測定可能



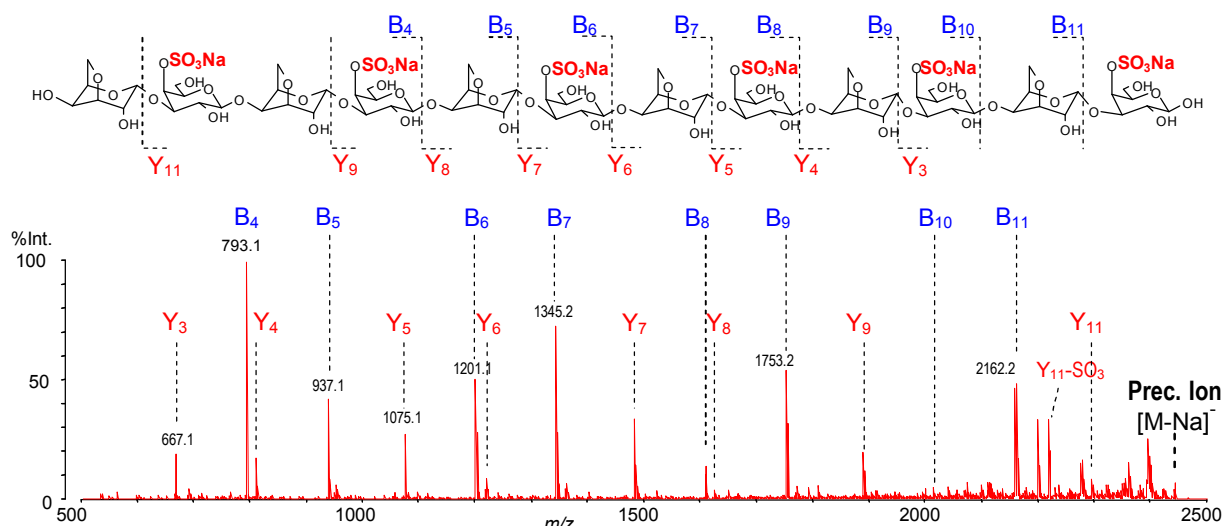


図13 6硫酸化糖鎖の構造と 1fmol MS/MS測定例 (Matrix: G₂CHCA)

さらに、糖タンパク質Ribonuclease B酵素消化混合物に対し液体Matrixを試用したところ、感度の大幅な向上が得られました(図14)。

糖タンパク質酵素消化混合物に含まれるpeptideは糖peptideよりもproton親和力が高い傾向があります。通常のMatrixには、-COOH等のproton供給官能基がついており、DHBA等の従来Matrixでは、peptideの方が優先的にイオン化される傾向がありました。液体Matrixは、図10に例示される通り **Proton供給能力が抑制**されており、しかも液体Matrixと糖peptideが混合容易であるために、糖peptideが相対的に感度を高めた、と推定できます。

これらの測定結果より、液体Matrixを用いることで糖鎖付加を中心とした**翻訳後修飾PTM解析**応用への展開が期待できるといえます。

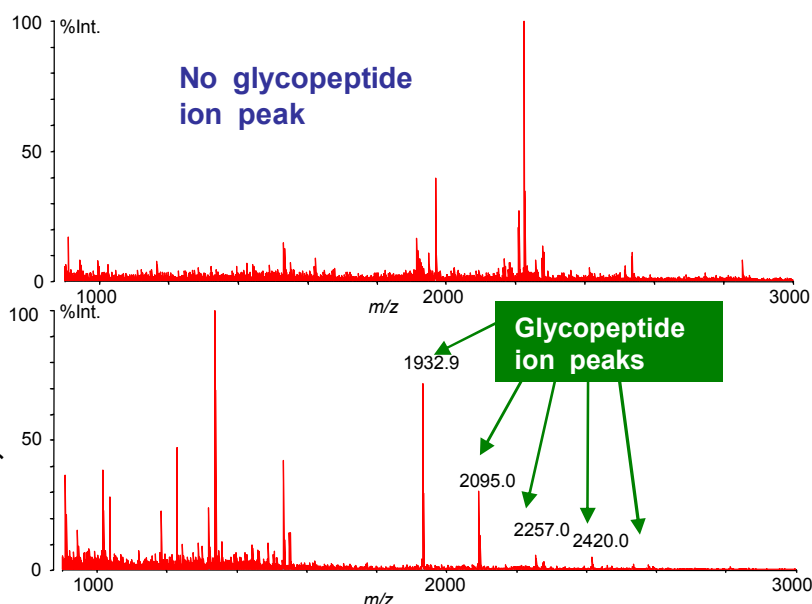


図14 RNase B 酵素消化混合物測定例 DHBA(上)/G₃CA(下)

< 参考文献 >

1. K.Tanaka, H.Nonami, Y.Fukuyama, R.Erra-Balsells, *48th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS1998) WP222
2. M.Barboza, V.Duschak, Y.Fukuyama, H.Nonami, R.Erra-Balsells, et.al., *FEBS J.*, Vol.272 p3803 (2005)
3. S.Sekiya, Y.Yamaguchi, K.Kato, K.Tanaka, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, Vol.19, p3607 (2005)
4. Y.Fukuyama, S.Iwamoto, K.Tanaka, *J. Mass Spectrom.*, Vol.41, p191 (2006)
5. Y.Fukuyama, K.Tanaka, *54th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS2006) WP469
6. E.Matsuo, C.Toda, M.Watanabe, N.Ojima, S.Izumi, K.Tanaka, S.Tsunasawa, O.Nishimura, *Proteomics*, Vol.6, p2042 (2006)
7. M.Watanabe, I.Takemasa, N.Nishimura, T.Matsubara, S.Yoshioka, M.Miyake, K.Nagai, M.Monden, O.Nishimura, *54th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS2006) MP624
8. 竹政伊知朗・永野浩昭・吉岡慎一・丸橋繁・宮本敦史・武田裕・堂野恵三・渡辺真・西村紀・永井克也・松原謙一・門田守人 第64回 日本癌学会学術総会 S16-2 (2005)
9. K.Ou, H.Jikuya, T.Ichikawa, H. Kuyama, E.Matsuo, O.Nishimura, et.al., *J. Proteome Res.*, Vol.5, p2194 (2006)
10. T.Masuda, N.Okamura, K.Suganuma, H.Tanaka, M.Watanabe, E.Matsuo, S.Tsunasawa, A.Gotoh, T.Shirakawa, S.Terao, K.Okumura, O.Nishimura, *54th Ann. Conf. Mass Spectrom.* (ASMS2006) WP557
11. 植田幸嗣・醍醐弥太郎・片桐豊雅・入江新司・佐藤孝明・中村祐輔 第65回 日本癌学会学術総会 O-256 (2006)
12. N.L.Tatiana, et al., *Anal. Chem.*, Vol.79, p1604 (2007)
13. Y.Fukuyama, S.Nakaya, Y.Yamazaki, K.Tanaka, *Anal. Chem.* Vol. 80, p2171 (2008)

Quadrupole Ion Trap とは何か？ どんな特徴があるのか？

質量分析分野では、ここ10数年の間に イオンを一時的に溜め込む(Trapする)手法が次々に考案・改良されています。例えば、Quadrupole Ion Trap (QIT), Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR), Linear Ion Trap, Orbitrap,...。本論では、歴史の最も古いQITに対し、その厳密な原理・複雑な数式を出来る限り使わずに、分かり易く説明します。

1. QITの構造

図1は、質量分析に使用されていたQIT(軸対称回転体)の手前1/4周分を切り取り、中身を見えるようにした、ディスプレイ用モデルです(高さ10cm弱)。

3つの電極(下から お碗を伏せた形のEnd-Cap Electrode (Bottom), ドーナツ状のRing Electrode, 下部電極とMirror ImageになるEnd-Cap Electrode (Top))から構成されており、黄色透明で円筒状の絶縁物が挿入されています。

回転対称軸を含む断面(図1から更に1/4周分を切り取った)で見ると、内側表面が双曲線を形成した4つの電極で出来ていると見なされるので、3次元四重極型イオントラップ(3-Dimensional Quadrupole Ion Trap: 3-D QIT) 略してQITと名づけられています。

イオンはEnd-Cap Electrode (Bottom)の頂上に空けられた小さい穴から導入され、一旦QIT内で溜め込まれた後、End-Cap Electrode (Top)回転対称(z)軸上の穴から引き出され、質量分離が実行されます。

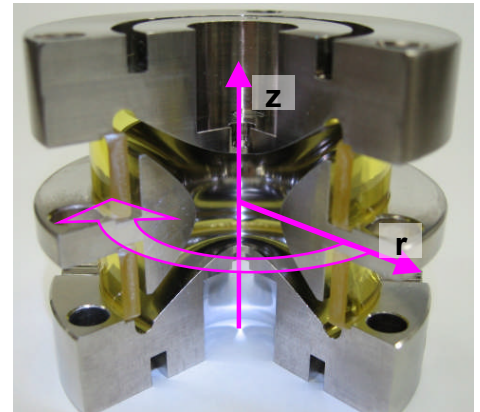


図1 QIT Display Model

2. なぜイオンをTrapできるのか？

イオンは電荷を持っているので、逆極性(正イオンの場合 負の電位)の方向へ引き寄せられます。また、小さいながらも重さを持っているので、重力で次第に落ちて行きます(重力は電荷による引力よりも数桁小さいので通常は無視)。質量分析は真空中で行いますが、完全な真空ではなく、薄いながらもイオン以外の粒子が共存する($10^{-6} \sim 10^{-1}$ Pa*)ので、それとの衝突により軌道が歪められたり弾き飛ばされる場合があります。このような悪条件の中でもイオンを空中で保持Trapできる方法の1つが、QITです。

QITでは、イオンをTrapするため、図1上下のEnd-Cap Electrodeは接地(0V)し、Ring Electrodeに高周波RF**電圧(10kHz~1 MHz)を加えます。電極が理想的な回転双曲面(式(1))である場合、イオンは式(3)で表される運動を行います。

$$\text{回転双曲面: } \pm \frac{r^2}{r_0^2} \mp \frac{z^2}{z_0^2} = 1, \quad 2z_0^2 = r_0^2 \quad \text{--- 式(1)}$$

$$\text{空間内電位: } \phi_0 = U + V \cos \Omega t \quad \text{として}$$

$$\phi = \frac{\phi_0}{2r_0^2}(r^2 - 2z^2) + \frac{\phi_0}{2} \quad \text{--- 式(2)}$$

運動方程式:

$$\frac{d^2 z}{dt^2} - \frac{4e}{mr_0^2}(U + V \cos \Omega t)z = 0$$

$$\frac{d^2 r}{dt^2} + \frac{2e}{mr_0^2}(U + V \cos \Omega t)r = 0 \quad \text{--- 式(3)}$$

m : イオン質量 r_0 : リング電極内径 e : イオン電荷

U : 駆動電圧DC成分 V : 駆動波形AC成分 Ω : 角周波数

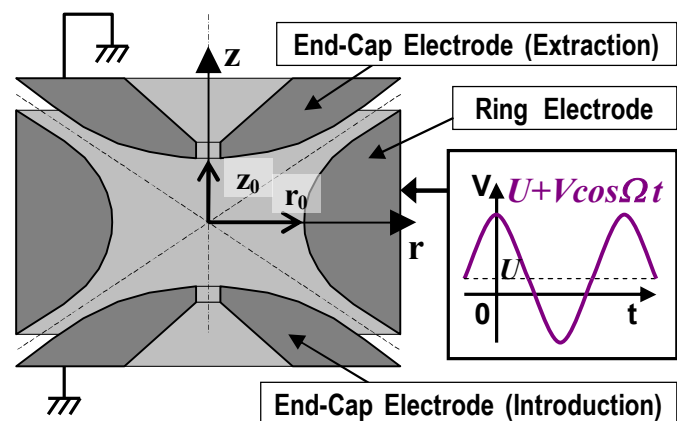


図2 QIT断面と印加電圧の概略図

上記の「複雑な式を用いずに、直感的に分かる説明」を以下に示します。ここでは、正イオンを溜め込む場合を想定します。

Ring Electrodeに正電圧が印加されている時間帯(図3-1)は、Ring Electrodeに反発して上下のEnd-Cap Electrodeに押しやられます。また、Ring Electrodeに負電圧が印加されている時間帯(図3-2)は、Ring Electrodeに吸い寄せられます。イオンがいずれの電極にも衝突しないタイミングで(高速に)電圧を切り替える、すなわち高周波RF(高)電圧を印加することによって、イオンを(真)空中に保持することができます。

* Pa(Pascal): 圧力の単位 標準大気圧 = 101,325 Pa = 1013.25 hPa

** RF(Radio Frequency): 使用する高周波が、放射電波Radio周波数Frequencyになるため、RFと呼ばれています

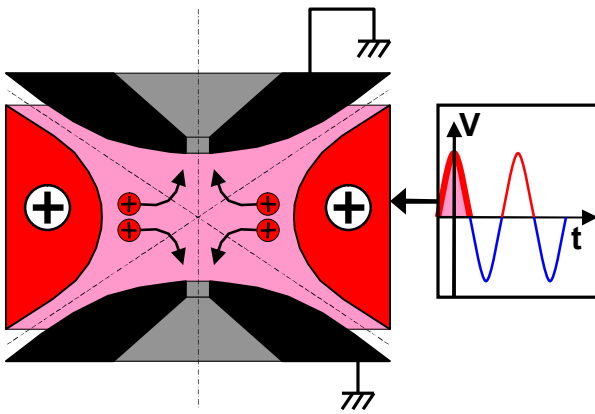


図3-1 Ring電極に正電圧印加時の正イオン挙動

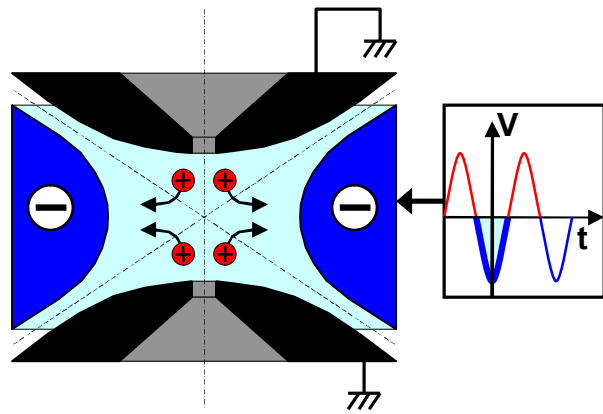


図3-2 Ring電極に負電圧印加時の正イオン挙動

この様に高周波電圧を印加することにより、QIT内にはイオンを保持する(時間平均的な)Potentialが形成されることになります。これをPseudo Potential擬似ポテンシャル(電位の壁)と名付けています。

高周波を印加し続ける限り、イオンはQIT内で各々の振幅を維持しながら(複合的な)単振動(振り子運動に相当する振る舞い)を続けますが、QIT内にHe等の(モーメントムが)小さく希薄($10^{-4} \sim 10^{-2}$ Pa)な不活性ガスを導入すると、(ガスとの断続的・ソフトな衝突を繰り返し)イオンの持つ運動エネルギーがガスに分け与えられ(続け)、イオンは擬似ポテンシャルの底に落ちていく、すなわち、様々な m/z 値を持つイオンが冷却され、QITの中心に集まって行きます。

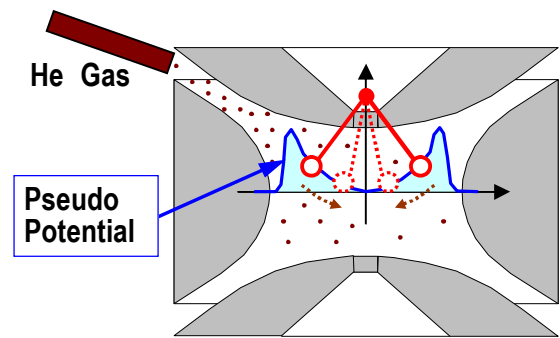


図4 Pseudo PotentialとHeによる Ion Cooling

3. なぜ特定の m/z イオンのみをQIT内に残せるのか？

イオンは電荷を持っているので、特定の周波数(電気的な振動)に共振して振動します。ここではイオンをモデル化し、図4に習って振り子に置き換えて考えると、[イオンの m/z の違い] → [弦の長さの違い]、となります。

[m/z 値が小さい/大きい] → [弦の長さが短く/長く 共振周波数が高い/低い]

共振周波数の異なる振り子が多種類、水平の弦に繋がれ、それに高周波(RF)が与えられている、となります(図5参照)。この高周波振動は最も弦の短い振り子における共振周波数よりも高くているため、全ての振り子は微細な振動は受けますが、共振して振幅を大幅に増加させることはありません。

注) QITでは通常、 H^+ 、 Li^+ イオンを捕捉できません。共振周波数が極めて高く、Ring電極に加えるRF周波数を超えるため、電極表面に衝突する等のために、(長時間の)捕捉が不可能となるからです。この現象を Low Mass Cut-Offと呼びます。

この水平の弦に、残したい振り子以外が共振する振動(周波数)を重畳させます。すると、残したい振り子(図5の5つの振り子の内で真ん中)以外は全て振幅を増大させます。

QIT内のイオンでは、残したいイオン以外が全て擬似ポテンシャルの壁を越えてQIT内から排除されます。実際のQITでは、End-Cap電極上下に位相が180度異なる合成波形を加えて、特定 m/z イオン以外を排除します(図6)。

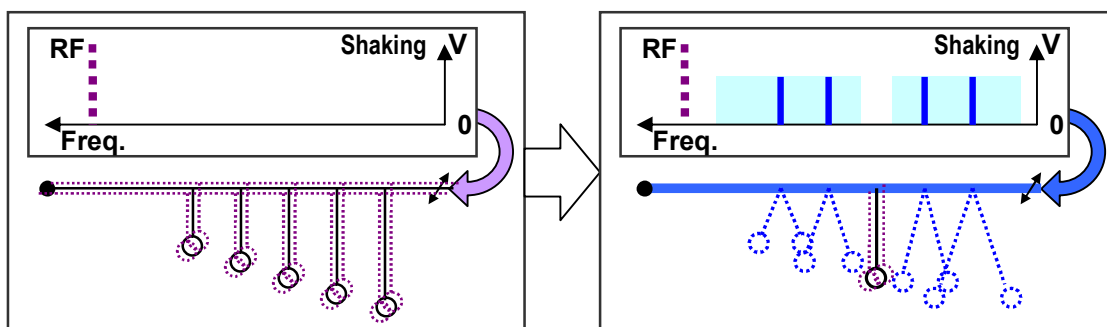


図5 高周波印加のみの状態(左)と 共振周波数相乗時の状態(右)

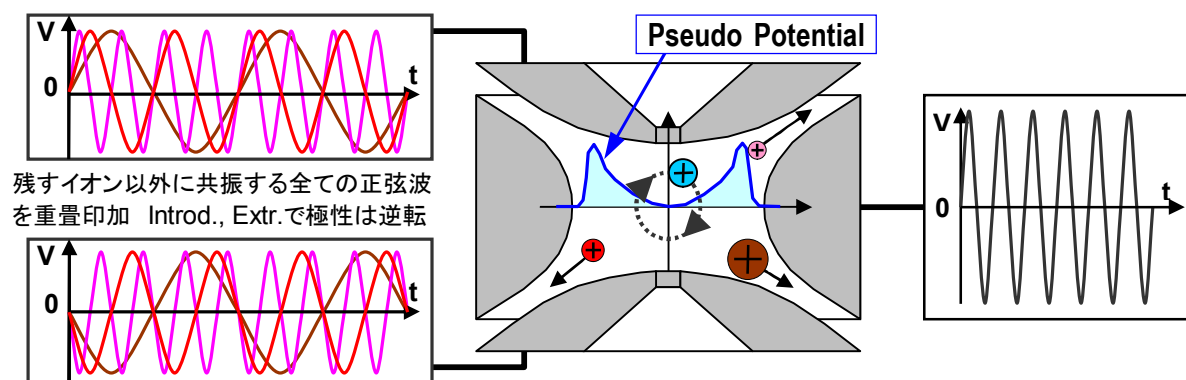


図6 Ring電極からの高周波RF印加(右)と 両End-Cap電極からの共振周波数重畳印加(左)

4. なぜQITで MS/MS(/MS...) MSⁿ が可能なのか？

前段では、MS/MS(/MS...)に不可欠な最初の手順である、分解すべきイオンPrecursor Ionを選び それ以外の不要なイオンを排除する方法の解説でした。本段では、選出後に残ったイオンを分解させる手順を解説します。

前段では、残すべきイオンに共振する以外の周波数を両End-Cap電極に加えましたが、分解イオンProduct Ionを発生させるためには、残したイオンに共振する周波数を印加し、イオンの運動を活発にします。同時に、QIT内にAr,Kr,Xe等の(モーメントムが)大きい希薄($10^{-3} \sim 10^{-2}$ Pa)な不活性ガスを導入すると、このガスと衝突して分解イオンを発生させることができます。分解生成したイオンは、元のイオンとは異なる共振周波数を持つ(1価イオンならば高周波側にShiftする)ため、それ以上活性化されず、同時に存在するHeガスによって冷却されます。

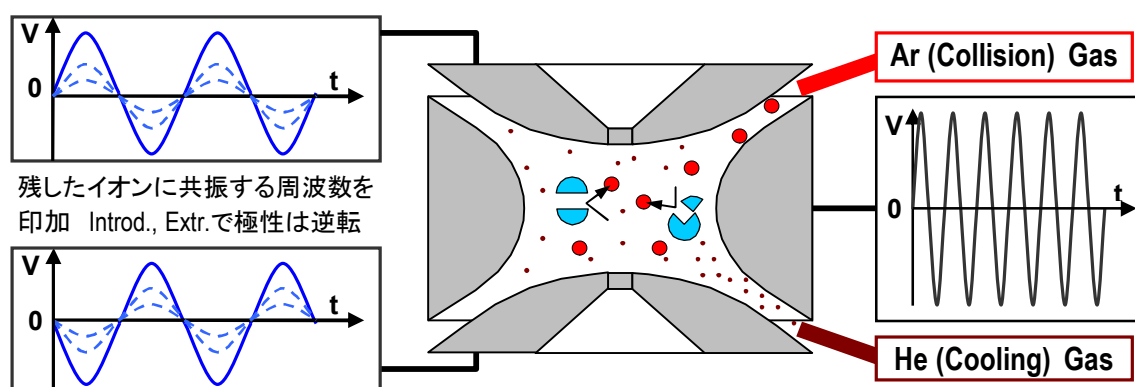


図7 分解イオンProduct Ion生成と 冷却 Ion Cooling

この様にして生成させたイオンを上部から順次排出し検出すれば、MS/MSスペクトルの測定になります。MSⁿを行うためには、

イオン導入 → イオン初期冷却 → 不要イオン排除 → 分解イオン生成 → イオン冷却 → イオン排出によるスペクトル測定
 中間の、不要イオン排除 → 分解イオン生成 → イオン冷却 を (n-1)回繰り返せば良い(MS測定の場合はスキップする)こととなります。MSⁿを行うことにより、化合物の内部構造を(詳細に)知ることができます。

5. QITとTOF-MSの利点を組み合わせた MALDI/ESI-QIT-TOF-MS

上記概略説明の通り、QIT-MS (排出イオンをスキャン測定)はMSⁿ測定可能を最大の特徴としていますが、質量範囲・分解能・精度・測定速度、etc.はTOF-MSが勝っています(表1 参照)。

表1 QIT-MS と TOF-MS 特徴比較表

	実質的な質量範囲	分解能FWHM	質量精度 ppm	感度	測定速度	Prec.Resol	MS/MS	MS ⁿ
QIT-MS	△ m/z: ~5,000	△ ~5,000	△ 50 - 200	○	△	◎	◎	◎
TOF-MS	◎ m/z: ~500,000	○ > 10,000	○ 2 - 50	○	◎	△	○	×

QITの利点とTOF-MSの利点を組み合わせた装置が製品として発売されています。MALDIイオン化用が(製品名)AXIMA-QIT/Resonance、ESIイオン化用が(製品名)LCMS-IT-TOFです。

両装置では、MALDI/ESIイオンをQITに導入後、MS測定時にはイオン冷却のみQIT内で行い、 MS^n 測定時にはProduct Ion生成・冷却も含めてQIT内で行い、その後のスペクトル測定はTOF-MSで行うことにより、質量範囲・分解能・精度・速度を高性能に、かつ MS^n 測定をも可能にしています。



図8 AXIMA-QIT™ (内部を半透明表示)

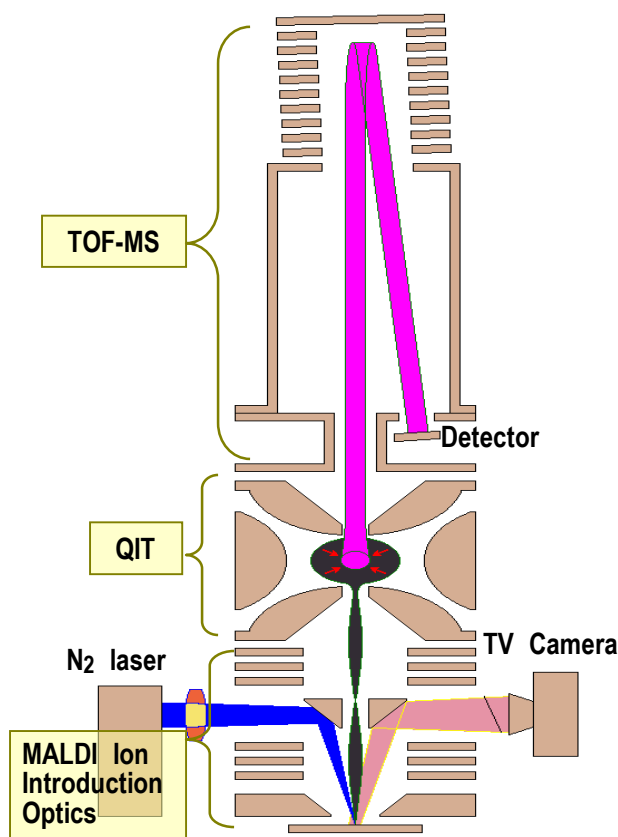


図9 AXIMA-QIT/Resonance™ 概略図

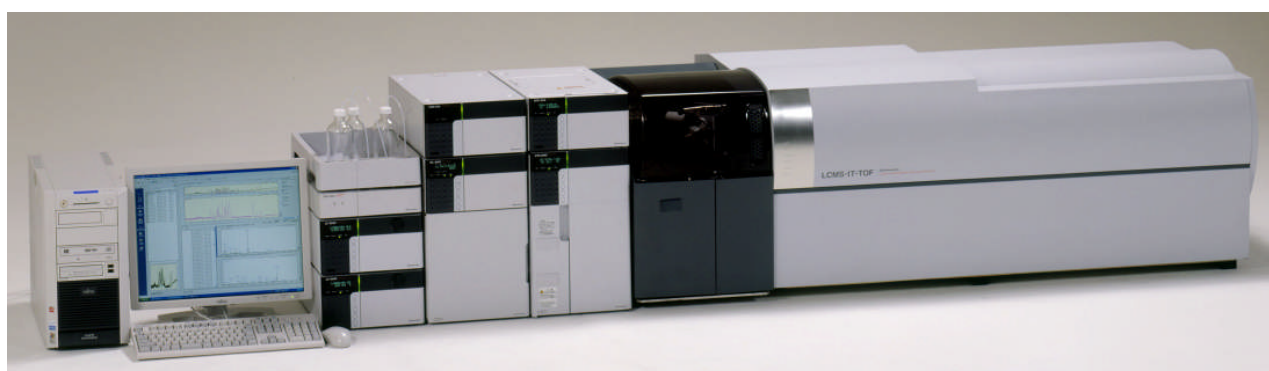


図10 LC-ESI-QIT-TOFMS System (黒いカバー部分を含む右側が[製品名]LCMS-IT-TOF)

こぼれ話: Paul Trapとは? Ion Trapとは?

本Technical Reportで紹介したQITは 正式な学術名ですが、**Paul** Trapとも呼ばれています。QITの原理を発明したのが、Wolfgang Paul (1989年ノーベル物理学賞受賞)だからです。

また、従来 QITを単にイオントラップIon Trap (IT)と称する場合がありますが、序文にあるように、最近、イオンをトラップする手法が多種類生まれてきたため、他のトラップ手法と区別するために、QITと記述することが推奨されています。

TOF-MS用の測定回路として何が適切か？

飛行時間型質量分析法Time-of-Flight (TOF) MSは、MALDI法と直接接続されたMSとしてだけでなく、(QIT-, QqQ-等との) Hybrid型の最終段MSとしても多種多様な開発が行われ、最近では、従来の広範囲・高感度・高速測定特長のみならず 高精度化 (m/z Error: 1~5ppm)・高分解能化 ($m/\Delta m$: 10,000~1,000,000)が達成されています。

質量分析では、概して下記の手順を辿って計測・解析が行われます。



すなわちTOFMSの高性能化には、(近年のElectronics技術の急速発展に伴う)測定回路の高性能化が不可欠であった、と言えます。本解説書では、LDI (Laser Desorption/Ionization)-TOFMSとして20年以上前(1980年代)に開発され ソフトレーザ脱離法発見のツールとなったLAMS-50K前後のTOF-MS技術歴史を解説することにより、現在・未来 TOF-MS用の測定回路として何が適切か？を概説します。

こぼれ話: TOF とは 何の頭文字？

1980年代当時までは、質量分析装置と言えば 扇型の電場・磁場を用いた大型装置Sector型や四重極型が主流であり、「TOFMSは個々の研究室で手軽に作れるが 性能は低い」と見なされていました。TOFはTime-of-Flightの頭文字です。しかし当時、MS専門家にも十分知られておらず、「TOFは何の頭文字？」「??」「それはToy of F(Physicist(物理学者のおモチャ)だ」といったジョークが話されていました。しかし、現在では、「Tool of Future(未来のための道具)」とも呼べる状況になっています。

1. TOFの時間軸スケールは？

最も単純なLinear型のTOF-MSで、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。イオンが速度 v でドリフト空間Drift Space距離 L を飛行するのに要する(検出器に到達する)時間 t は以下の式で表されます。

$$qV_0 = \frac{1}{2}Mv^2 \quad \text{-- 式(1)} \quad v = \sqrt{\frac{2V_0q}{M}} \quad \text{-- 式(2)} \quad t = \frac{L}{v} = L \cdot \sqrt{\frac{M}{2V_0q}} = L \cdot \sqrt{\frac{u}{2V_0e}} \cdot m/z \quad \text{-- 式(3)}$$

q : イオン電荷 (= z (イオン電荷数) $\cdot e$ (素電荷: 1.602×10^{-19} C)) M : イオン質量 (= $m \cdot u$ (統一原子質量単位: 1.6605×10^{-27} kg))
 v : イオン速度 V_0 : 電位差 L : 飛行距離

通常のMALDI-TOFMS装置定数($V_0=20$ [kV], $L=1$ [m])を式(3)に代入すると、各 m/z イオンの飛行時間 t は下記の様になり、極めて短時間に測定が終了することが分かります。その上、例えば $m/z=1,000$ 付近の $1u$ 飛行時間差が 10 ns以下となり、かつ m/z が大きくなるほど $1u$ 分のTOF時間間隔は狭まるので、極めて時間分解能の高い測定回路が必須であることが明らかです。

$V_0=20$ [kV], $L=1$ [m]の場合の各 m/z における飛行時間 t

<div style="border: 1px solid red; padding: 5px; width: fit-content;"> m/z 値が 100 倍になっても TOF 値は 10 倍になるだけ </div>	$m/z = 1,000 \rightarrow t = 16,097.5$ [ns]	<div style="border: 1px solid blue; padding: 5px; width: fit-content;"> $m/z: 1,000 \rightarrow 1,001$ の時間変化 (~8ns) よりも $m/z: 100,000 \rightarrow 100,001$ の時間変化が少ない (~0.8ns) </div>
	$m/z = 1,001 \rightarrow t = 16,105.5$ [ns]	
	$m/z = 100,000 \rightarrow t = 160,974.8$ [ns]	
	$m/z = 100,001 \rightarrow t = 160,975.6$ [ns]	

2. 1980年代のTOFMS測定技術

1980年代当時、Analog波形をDigital情報として記録するAnalog-to-Digital Convertor (ADC)市販技術は、おおよそ下記の性能でした。

- * 時間分解能: 10 ns (100MHz Digitizer)
- * 強度分解能(1回測定): 8bits (256)
- * 記録範囲: 8k Word長(8,192) ($t = 0 - 81,910$ nsに相当)
- * 積算方法: ソフトウェアを用いて逐次積算

すなわち、TOF-MSスペクトル記録のためには 全ての面において性能が大幅に不足していると思なされ、これが高性能TOF-MSを実現するための足かせになっていました。この様な問題点を解決するために開発されたのが LAMS-50Kです。

3. Multi-Stop TDCとは？

(当時の)ADCでは実現できない時間分解能を達成できる方法の1つが、Time-to-Digital Conversion (TDC)法です。

MALDI-TOFMSの場合、Pulse Laser光をPhoto Diode等で検出してStart信号とし、イオン検出器が電気信号に変換したイオン到達時刻をStop信号にします。TDC法は、この間を精度高く(最近の時間分解能: 10ps~1ns)計測し Digital値に変換します。

TDC法を概説する前に、TOF検出器からの出力波形の状態を概説します。

イオンが到達する時刻がたとえ一瞬(時間幅=0)であっても、電気信号に変換され伝送される間に波形が「鈍る」ため、ピークは大きなり小なり幅を持ち、波高値も異なります(図2「元の信号」参照)。これを一定の閾値Thresholdに到達した時間(Leading Edge Triggering: LET法)で検出すると、通常、ピークが到達した時刻を正確に測ったことになりません。この問題点を解決する方法の1つがCFD(Constant Fraction Discriminator)法です。

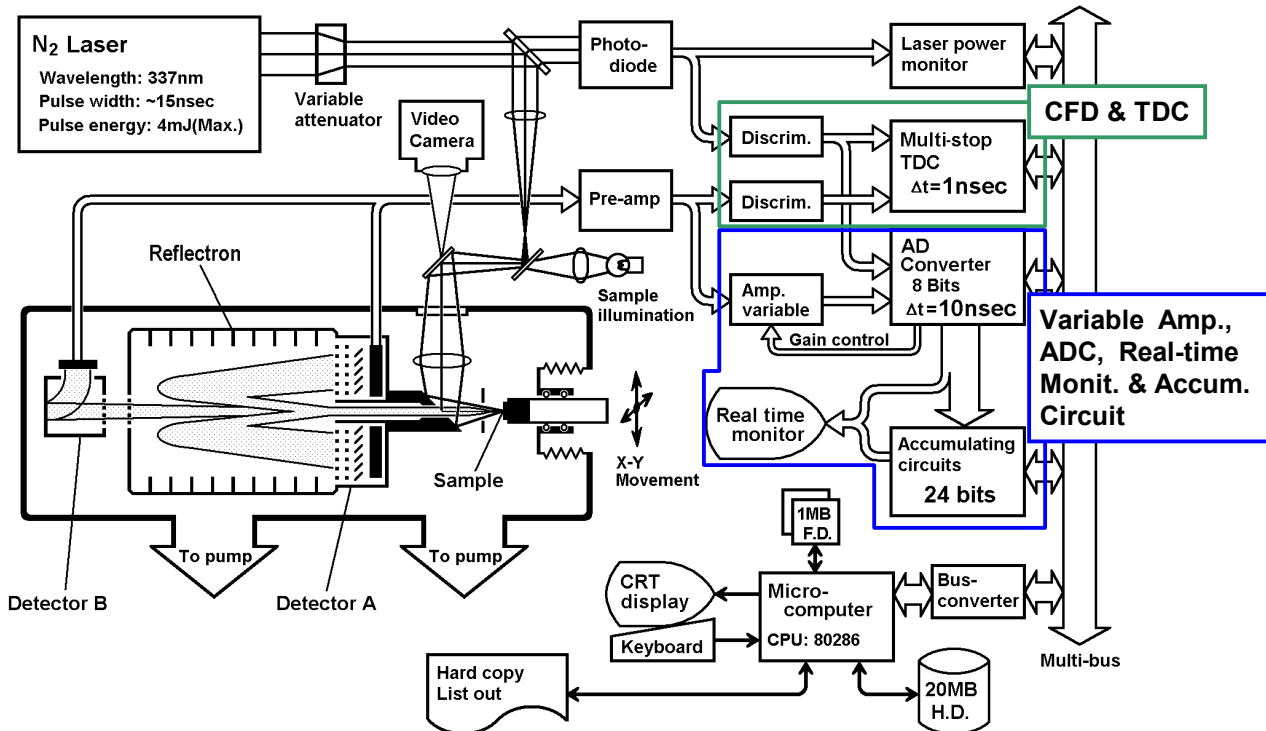


図1 LAMS-50K (LDI-TOFMS) Block Diagram (1985)

CFD法では、減衰波形(通常10~20%)と遅延反転波形を足し合わせ Zero Crossing Timeを検出すれば、波高値に影響されずにピーク到達時刻が計測できます。TDC法では、通常CFD法に類する波形前処理を必要とします。この様にして、Peak波高値の一定割合に達した時刻を正確に求めます。

参) CFD法は正確なTimingを取り出す優れた方法ですが、Noiseに影響されやすい傾向があるため、通常は別途「LET法でも検出」された場合のみに最終判断として「検出された」とする(論理)回路が用いられています。

通常 質量分析では、同時に多数種類のイオンを検出するため、CFDから出力されたStop信号は、数十~数千個になります。特にTOFMSでは m/z 範囲が広がります。LAMS-50Kでは、最大256個のMulti-Stop検出を可能とし、かつ測定するTime-Windowを最大8個設定可能とすることにより、(MA)LDI-TOFMSに適した広範囲 m/z ・高時間分解能測定を可能としました。

(多数回)測定結果は、図3の様に個々のピーク強度情報は失われたピーク到達時間分布を表すヒストグラムになります。個々のピーク幅の情報も失われるため、通常のADC法よりも見た目の分解能が向上します。

参) CFD・TDC法は、上記の様に正確なTimingを算出するために一定の時間Dead Time(LAMS-50Kの場合 43ns)を要します。このため、特に同位体分布を持つMSスペクトル測定など、強度・定量情報を厳密に求める場合には注意を必要とします。

参) 上記問題点があるため、TDC法は、主にイオンが離散的に到達する測定系(現在ではQ(qQ)-TOFMSタイプ)に適しています。

なお、TDC法は最も時間分解能の高い測定方法の1つであるため、現在でも素粒子現象の観測等に多用されています。

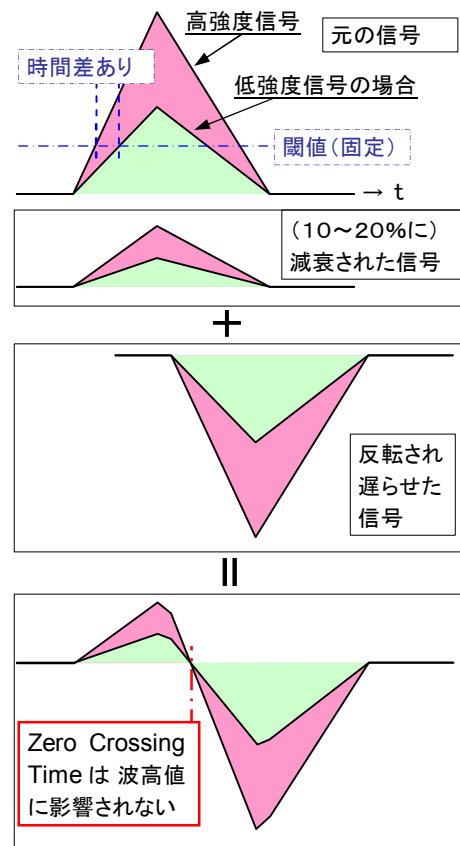


図2 CFD原理説明

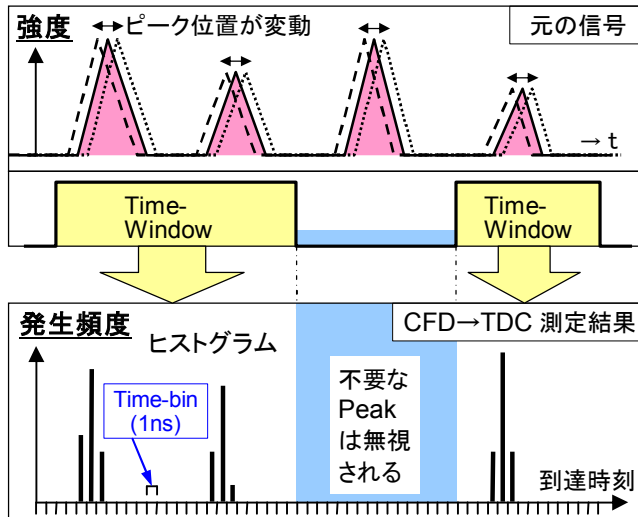


図3 Multi-Stop TDC 測定結果例

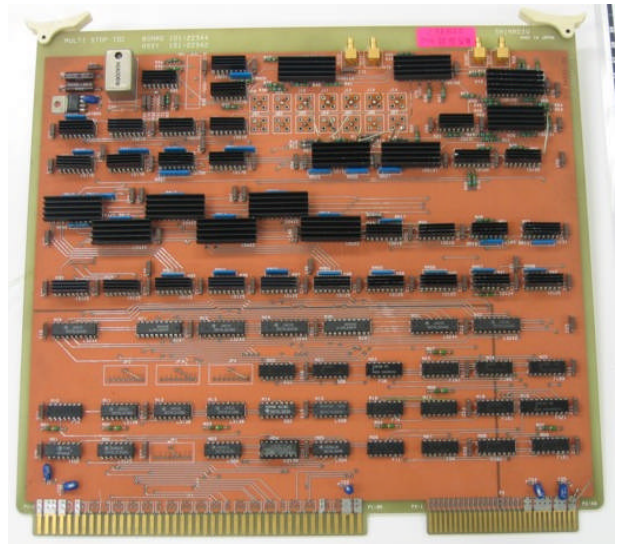


図4 Multi-Stop TDC 回路基板 (1985年製)

4. 高速ハード積算回路を含むADC

特に近年の質量分析装置に対し、広いDynamic Range(波形が歪められずに定量測定可能な範囲)とThroughput(単位時間に測定可能な試料数)の高さが求められています。TOFMSでは、通常1回測定では十分なS/N比と定量性が得られないため、数十～数百回のスペクトル積算を行いますので、測定速度とS/N比向上を両立させることは困難です。

1980年代当時の市販(卓上型)コンピュータの処理スピードは、現在に比べ1桁以上遅かったため、LAMS-50Kでは(Pipe-Line手法を採用した)専用の積算回路を開発し、8bit, 8k Wordの測定データを最速1kHzで(ハードウェアで)直接積算することを可能にしました。

更に、TOF信号入力側に増幅率可変アンプ(増幅率: x1, x2, x4, x8) Variable Amplifierを挿入(ソフトウェアで増幅率制御可能)し、かつ最大8個のTime-Windowを設定可能とし、広いTOF範囲の中から測定したい範囲を選び、個々の範囲に適切な増幅率(感度)を設定可能としました。更に、刻々と変化するTOFスペクトルをReal-TimeでMonitorする機能も付加しました。

これらの設定により、(当時の技術としては限界があった)縦軸・横軸の制限を極力緩和することが可能となりました。

参) 図5の基板上に引き回されている白い線は、同軸ケーブルです。

基板表面の銅薄膜による配線では、複数同時に送受信すべき信号Channel全てに対し、引き回しの道のりやインピーダンスを同一に保つことは困難であり、Cross-Talk(信号が漏れ出す/入る問題点)も発生する可能性があります。信号が外に漏れず、かつ8 Channel信号全てを同時に、歪みが極力少ない状態で伝送させるために、同軸ケーブルが用いられました。同様の手法は、TDC回路にも用いられています。当時、遅延時間を正確に発生させる(安価な)Deviceはありませんでした。TDCでは、Delay Time: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7[ns] 8種類($\Delta t=1\text{ns} \times 8$ 個のTime-bin)を生成させるため、(図4の裏側に)1ns \div 300mm(最大 \sim 2100mm)の同軸ケーブルを取り付けています。

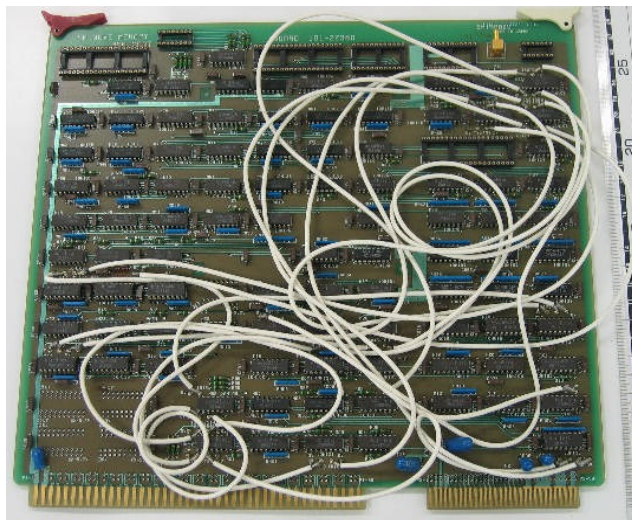


図5 100MHz ADC回路基板 (1985年製)

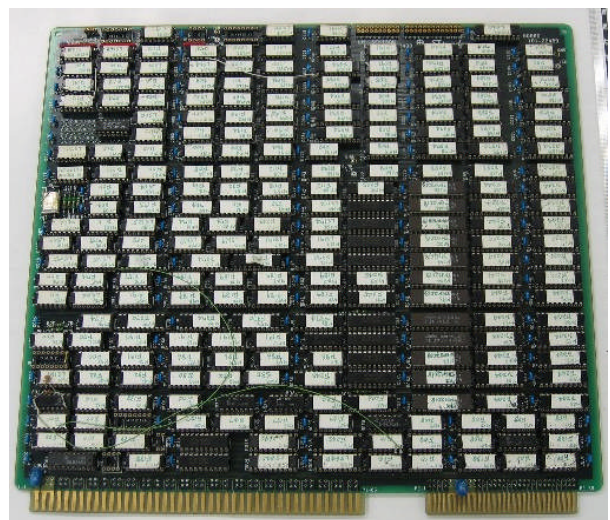


図6 1kHz 積算回路基板 (1985年製)

5. 2000年代のTOFMS測定技術

1980年代から2000年代になり、Electronics技術の発展に伴ってTOF測定能力も概して1桁以上向上しました。特にADC時間分解能と記憶容量の大幅な向上により、現在では大部分のTOF測定がADCで行われています。現在のおおよその性能は、以下の通りです。

- * 時間分解能: 0.25~1ns (4GHz~1GHz Digitizer)
- * 強度分解能(1回測定): 8bit~12bit (256~4,096)
- * 記録範囲(最大): 1M Word長
- * 積算方法: ハードウェア・ソフトウェアを用いて積算

図7は、元々Analog波形(点線で表示)であったTOFスペクトルが、時間と強度の分解能が各々2倍になった場合に波形再現性がどれだけ向上するか? シミュレーション結果を示しています。

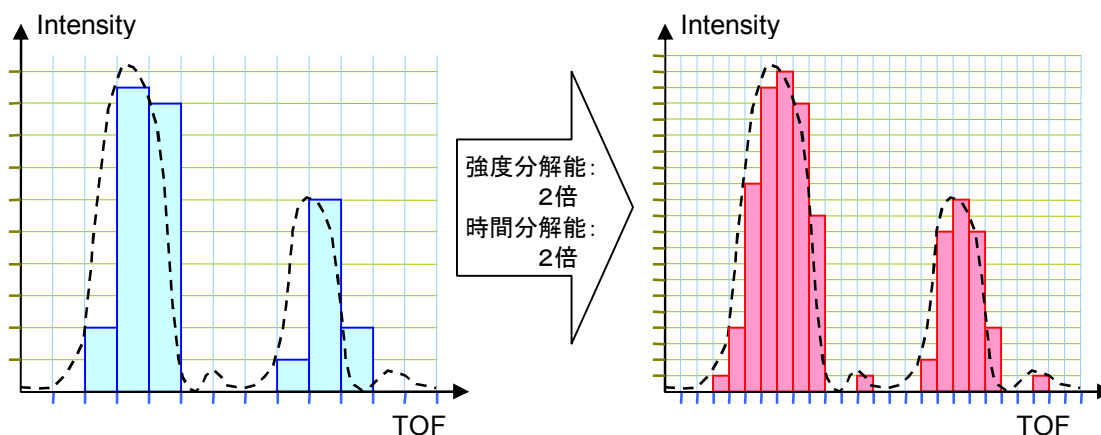


図7 時間・強度分解能増大(各々2倍化)に伴うアナログ波形再現性の変化

6. 測定回路の性能向上のみで 高精度測定が可能?

現在、一部の製品に限られますが、TOFMSでも m/z 精度(Max.): 数ppm* が達成されています。

通常、MS装置に用いられている金属は ステンレスやアルミニウムであり、各々の293K(20°C)での熱(線)膨張率(式(3)ではLの膨張率)は、下記の様になります。

18-8系ステンレス: 14.7 ppm*/deg, アルミニウム(ジュラルミン系): 21.6 ppm*/deg --- 理科年表より

式(3)の関係より、Lの膨張→ TOFの遅延→ m/z のずれ(誤差)になり、On-line測定で求められる長時間高精度性能を確保するためには、温度を一定に保つなどの特別な工夫が必要です。

*ppmとは: pert per millionの略。100万分の1(10^{-6})を意味する。濃度・存在比の単位として一般に知られているが、ここでは(真値からの)誤差や物理量の変化を表す単位として用いている。

図8は、LC-ESI-QIT-TOFMS(製品名: LCMS-IT-TOF)の断面模式図です。この装置では、温度変化によるTOFMS部伸縮とTOFMS用高圧電源の出力値変動を抑制するため、装置の温度調整(内部温度を一定に保つ)を行っています。これにより、 MS^n 全てのモードに渡って 数ppmの質量精度を達成しています。

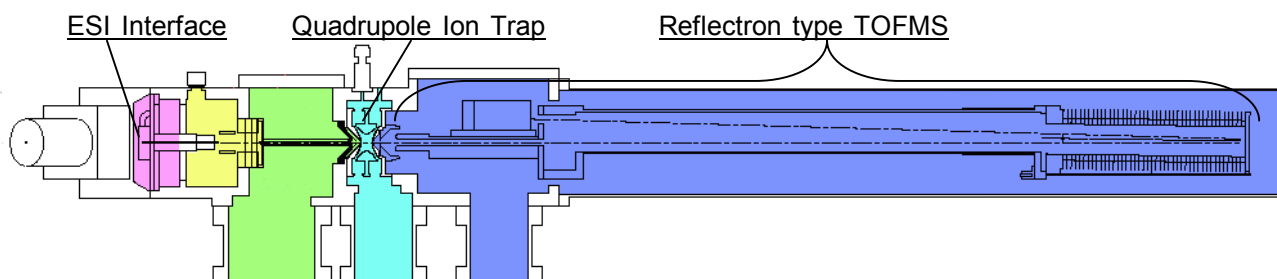


図8 LC-ESI-QIT-TOFMS 断面模式図

< 参考文献 >

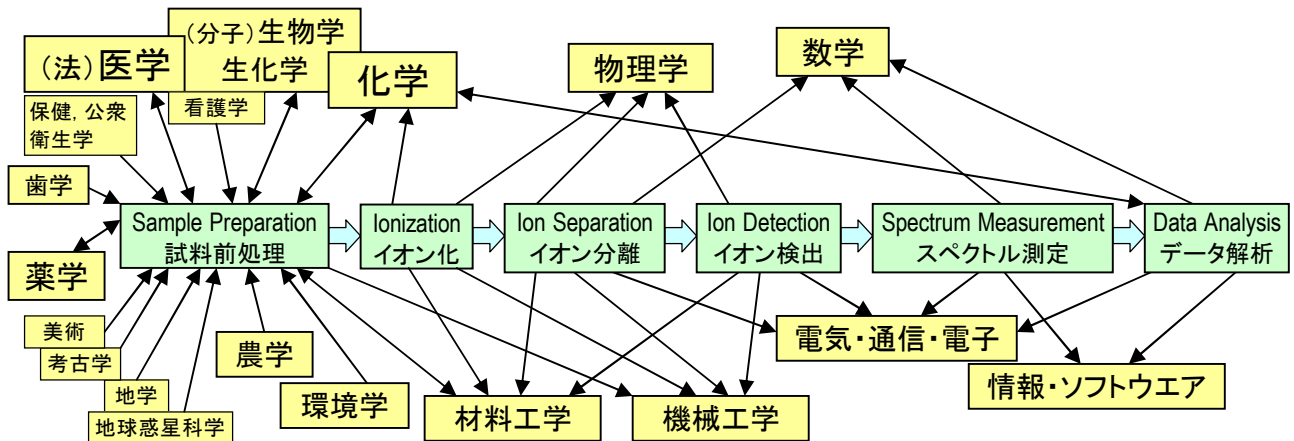
1. 秋田, 田中, 井戸, 吉田, 吉田, 質量分析連合討論会予稿集, 1B-2 (1987)

質量分析学に関して

質量分析には様々な手法がありますが、一般化すると下記の薄緑色で示される手順に従って進行します。そして、それらに関連する学術を 日本学術会議における専門分野分け等を参考に、できる限り列記してみました。

質量分析で扱う分析対象物・カテゴリーは、(タンパク質・糖質・脂質・核酸・代謝関連等)生物由来物質、疾病診断、薬物乱用・ドーピングの有無確認や検死、天然物/合成薬品の薬効や不純物の有無確認、金属・半導体・セラミック・無機化合物・プラスチック・ナノテクノロジー・新素材等の化学(工業)合成品の検査、(隕石・化石・文化財等の)年代由来・真贋測定、土壌・上下水道・大気汚染度合い診断、等々、極めて広範囲に渡っています。

本”MALDI-MS Technical Report No.01 - 10”における個々の具体的記述からも明らかな様に、**質量分析は極めて多くの学術分野との相互理解と協力があって初めて成立する**、と言えます。また逆に、**質量分析は学術分野の発展に幅広く貢献できる**、とも言えます。



質量分析に限らず**分析**(・計測)を行うことは、概して「(肉眼では)見えない物を見るようにする」ことであり、例えば **世界で初めての現象を観察**できることは、**独創・創造を生み出す**ための大きな手助けになる、と解釈できます。人類の長年に及ぶ努力により様々なことが解明され、それに伴い学術分野も多種多様になりましたが、例えば生命の複雑なメカニズムの解明は始まったばかりであり、いまだに**広大な未開拓領域が残されている**と言えます。

分析を行う過程・結果から または 分析装置の開発を行うことにより、発見・発明や 新規の学術分野・**異分野融合**を生み出すことに 少なからず役立てられてきたことは数多くの歴史的事実によっても証明されており、**質量分析学**の進展が 今後さらに期待されている、と言えます。

注：本”MALDI-MS Technical Reports”は、2007年時点で日本質量分析学会が推奨する専門用語定義に準拠して作成いたしましたが、専門家以外の方にも理解しやすいように、一部ではありますが、あえて一般用語を用いて解説した部位がありますことをご了承ください。

MALDI-MS *Technical Reports*

⊕ 島津製作所

田中耕一記念 質量分析研究所 / 田中最先端研究所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

TEL(075)823-1482 / FAX(075)823-3218