赤外自由電子レーザーによるMALDI-TOF質量分析法

内藤 康秀, 佐々木 理江, 部谷 学, 栗津 邦男

大阪大学大学院 工学研究科自由電子レーザー研究施設 光量子プロセス工学講座
(〒573-0128 大阪府枚方市津田山手2-9-5)

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry with an Infrared Free-Electron Laser

Yasuhide NAITO, Rie SASAKI, Manabu HEYA, and Kunio AWAZU

Department of Photon Processing Engineering, Institute of Free Electron Laser,
Graduate School of Engineering, Osaka University,
2-9-5 Tsuda-Yamate, Hirakata, Osaka 573-0128

(Received December 3, 2002)

A use of a free-electron laser (FEL) as the source of selective vibrational excitation was examined for infrared matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (IR-MALDI-TOFMS). A polycrystalline mixture of fumaric acid / potassium chloride was exposed to FEL macropulses (15 μ s). To make comparison, a pulse TEA-CO₂ laser was also employed for the light source of IR-MALDI-TOFMS. In the present study, both the FEL and CO₂ lasers were tuned at 10.2 μ m. Preliminary results and novel findings are reported. The ability of ionization in the mid-infrared wavelength was evidenced by the mass spectrometric detection of fumaric acid ions. Contrastive absence and presence of low m/z peaks in the TOFMS spectra imply that a softer situation of desorption-ionization was achieved by exposure to the FEL than that to the CO₂ laser. A novel ionization process via absorption of a single micropulse was suggested to be possible.

Key Words: Free-electron laser (FEL), Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), Time of flight mass spectrometry (TOFMS)

1. はじめに

現在、質量分析は蛋白質やDNAといった巨大分子まで測定対象にしており、遺伝子発現系の大規模解析(プロテオミクス)や一塩基多形(SNPs)の検出器として幅広く利用されるようになった。さらに抗体反応を利用した各種の分離・検出法(アフィニティメンブレン, アフィニティカラム, 表面プラズモン共鳴免疫センサなど)と効果的に組み合わせる技法(ハイフネーテッド質量分析法)の進歩により、生体分子を単なる有機分子としてではなく、生化学、生物学上の機能を備えた分子としても扱えるようになりつつある。生体組織は、他の分子や外的刺激(光, 電子, 電磁場, 熱など)との相互作用を通じて特有の機能を示す。こうした問題に対する質量分析利用の先端にあるものは、従来の構造解析を基本としながらも、さらに高次情報を得ようとする生体組織の機能解析であり、これからの医療診断, バイオテクノロジーの分野において必須である¹⁾。

生体分子の質量分析を可能にした重要な技術として、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)²⁾やマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)³⁾が挙げられる。特にMALDIは極微量の試料をイオン化できるので、微量検体

の蛋白質や各種バイオマーカーを検出, 同定する際に不可欠である。MALDIでは、レーザー光を吸収する化合物(マトリックス)の溶液と微量の試料溶液を混合し、試料板にのせて乾燥させた後、レーザーパルス照射する。このときマトリックスがレーザー光の過剰エネルギーを吸収し、かつ試料分子間の凝集力を弱めるように作用するので、蛋白質などの熱的に不安定な試料分子も分解することなく、マトリックス分子とともに脱離、イオン化される。MALDIにおけるイオン化プロセスの重要なパラメーターとして、(1)照射するレーザー光の波長、(2)マトリックス分子の化学的、物理的性質が挙げられる。最も多く使用されているレーザーの波長は紫外線領域であるが(UV-MALDI)、赤外線レーザーを利用するIR-MALDIは、生体組織の極めて有望な分析技術につながる可能性を持っている。なぜなら、蛋白質を構成している分子は赤外波長域に非常に強い振動吸収係数を有し、これを利用することで選択的に、かつ高効率に生体組織の質量分析を行えるからである。

電磁波の中でも、特に中赤外部の光線が物質に衝突すると、その波長に対応して分子中の特定原子あるいは原子団は光子を吸収して振動運動が励起され、その結果、赤外線吸収スペクトル中の吸収された位置(波長)が特定原

子や原子団の存在を示すこととなる。したがって、赤外線波長とこれを吸収する原子や原子団の関係をいれば、生体分子のような複雑な有機化合物でも構造を解明する手がかりが得られる⁴⁾。赤外分光法と同様、質量分析においてもイオン化やフラグメンテーションなどの過程を介して、選択的振動励起により特定の分子構造を反映した質量スペクトルを取得できる。さらに、質量分析は精度や分解能の点で他の分光法より優れており、構造解析の決め手となり得る。IR-MALDIにおける赤外遷移の役割を解明し、選択的振動励起をイオン化の過程に取り込むことができれば、分子構造特異的に生成するイオンの質量分析によって、試料分子の質量と同時に高次構造情報も高感度で得られるようになるであろう。

IR-MALDIはUV-MALDIの開発当初から既に、CO₂レーザーなどを光源に用いて試みられてきた^{5,6)}。Er-YAGレーザー(2.94 μm)はMALDIプロセスに最適なレーザーパルス幅(数十ナノ秒)とパルス強度を有し、IR-MALDIの有望な光源として実用化されつつある^{7,8)}。この波長域で有効に作用するマトリックス候補化合物も、グリセロールなど数多く見出されている。IR-MALDIはフォトン1個あたりのエネルギーが小さいので、UV-MALDIよりもさらにソフトなイオン化を実現すると期待され、高分子量の蛋白質や二本鎖DNAの質量スペクトルがIR-MALDIによって得られている^{7,8)}。

一方、IR-MALDIの機構は未解明の部分が多く、マトリックスの役割がUV-MALDIとは異なる可能性も指摘されている⁹⁾。UV-MALDIで用いられるマトリックスはいずれも、UVレーザー光の波長を非常に強く吸収する発色団を持つ化合物であり、マトリックスが光熱変換の担い手になっている。すなわち、マトリックス分子はUVレーザー光を共鳴吸収し、励起した電子状態が振動モードに緩和する過程で、気化が短時間のうちに進行し分子団が脱離する。これに対し、IR-MALDIで有効と認められたマトリックスには、IRレーザー光の波長に強い吸収を持たない化合物(コハク酸など)も多く存在し、これらの化合物では波長吸収特性よりも潜熱や親水性などの性質がマトリックスとしての作用に寄与していると考えられる。またUV-MALDIでは、UVレーザー光がマトリックス結晶の表層付近で吸収されて照射部位の表層部のみ脱離するので、試料上の同一スポットを繰り返し照射してイオン信号を積算できる。IR-MALDIでは、IRレーザー光がマトリックス深部にまで到達し、照射部位の試料が単発のレーザーパルスで根こそぎ脱離するので、同一照射スポットからイオン信号を続けて得ることができない。しかも、このような傾向の強いマトリックスのみが、IR-MALDIにおいて良好な質量スペクトルを与えている。したがってIR-MALDIでは、積算平均化による信号雑音比の改善は難しく、試料の消耗が激しいため感度はUV-MALDIに劣る。また同時に、従来行われているIR-MALDIの機構ではマトリックス分子振動の共鳴励起が充分に利用されていないと推察できる。

† <http://www.bioptric.de/index2.htm>

†† http://www.spektrum-laser.de/sp_hp/dt_seiten/eryag.html

固定波長のIRレーザー光源を用いてIR-MALDIにおける振動励起の効果を探ろうとすると、マトリックス化合物の種類を変えて調査することになるが、この場合は化合物の他の性質も影響するため、赤外吸収特性自体の効果を明らかにすることは難しい。そこで、本研究では発振波長を連続的かつ任意に選択できる自由電子レーザー(FEL)¹⁰⁾を用いることで、これまで適切なレーザー光源が少なかった中赤外域での選択的振動励起を用いた質量分析法の検討を行った。本研究の狙いは、IR-MALDIプロセスにおける振動励起の役割を評価できる実験システムを構築することにある。本研究で用いたFELは周期45 ns、パルス幅5 psのマイクロパルス列が15 μs 幅のマクロパルス構成する、特異なパルス時間構造を有する。このようなFELパルスの照射によるイオン生成の可能性を検証することが当面の課題となる。MALDIにおけるイオン生成に適したレーザーパルス幅は、100 ps~200 nsであると認識されている。FELはマイクロパルス、マクロパルス共に、この条件には当てはまらない。そこで、実用上の目標としては蛋白質などの高分子の分析であるが、ここでは結晶性を有する比較的単純な有機分子で、IR-MALDIのマトリックスとしても用いられているフマル酸について検討を行った。通常のMALDI測定においてもマトリックス化合物の分子量関連イオンが観測されるように、フマル酸はマトリックスとして作用すると同時に分子量関連イオンを与えると考えられるので、IR-MALDIプロセスの評価が行える。また、同じく中赤外域のレーザー光源として100 nsのパルス幅を持つTEA-CO₂レーザーを用いた場合との比較も行った。IR-MALDIでの同一波長におけるパルス幅の影響を調べた研究としては、3 μm の波長帯で数種類のレーザー光源を用いて75~185 nsの範囲で調査が行われているが¹¹⁾、本研究のようにパルス幅が大きく隔たるものを比較した例はなく、この点においても興味深い。

波長可変レーザーによるIR-MALDIの研究では、これまでにOPO(光パラメトリック発振器)を用いて1.5~4.0 μm の波長域を検討した例がある¹²⁾。また、Vanderbilt大学のグループは、FELを用いてポリアクリルアミドゲル中に拡散させたペプチドのレーザー脱離イオン化に成功している¹³⁾。その際に5.5~6.3 μm の波長域が検討され、ポリアクリルアミドゲルおよび水の赤外吸収波長に一致する5.9 μm が最適な照射波長であることを見出している。FELを用いたレーザー脱離イオン化質量分析は、これまでVanderbilt大学の例のみであり¹³⁻¹⁵⁾、マイクロパルス周期350 ps、マイクロパルス幅1 ps、マイクロパルス強度 $6.3 \times 10^9 \text{ W/cm}^2$ 、マクロパルス幅100 nsの条件で照射が行われている。この条件と比較すると、本研究でのFEL照射実験結果にはマイクロパルスの効果がより強調されるといえる。

2. 飛行時間型(TOF)質量分析

TOF質量分析は、電場で加速されたイオンが一定距離を慣性運動する時間の差を利用した質量分析法である¹⁶⁾。

加速電圧 V で初速度を得た質量電荷比 m/z のイオンが距離 L を飛行する時間 T は次式で表される。

$$T = L\sqrt{um(2eV)^{-1}} \quad (\text{in S.I. units}) \quad (1)$$

ここで、 u は原子質量単位(1.66×10^{-27} kg), e は素電荷量(1.6×10^{-19} C)である。加速領域を一斉に飛び出したイオンの一群は、場の存在しない領域(field free region)である飛行管内を慣性運動する間に(1)式にしたがい質量分離され、飛行管の終端に配置した検出器に到達する。その結果、イオンの質量電荷比ごとに異なる時刻にイオン信号が検出される。このイオン信号量を時系列的に計測することにより質量(電荷比)スペクトルが得られる。(1)式から L が長いほど T の差が大きくなり質量分解能が良くなると推測できる。

TOF質量分析の動作はパルスモードであり、飛行管に入射するイオンはパルス化されている必要がある。したがって、同じくパルスモードで動作しイオンをパルス状に生成するMALDIとは、非常に相性良く組み合わせできる。また、TOF質量分析ではイオンを高電圧で加速するので、脱離イオンの速度分布が大きくなるMALDIに対してもインターフェイスが容易である。MALDIによって生成される高質量のイオンを分析する方法として、理論上の質量上限が存在しないTOF質量分析は最適である。MALDI-TOF質量分析計は質量分析法で最も成功した装置構成の一つである。

実際のTOF質量分析計は、飛行管の終端に検出器を配置したりニアモード構成の他に、飛行管の終端にイオンミラーを設け、飛行管の始端にも検出器を配置して飛行管内でイオンを往復させて検出する、リフレクトロンモード構成も備えている¹⁷⁾。リフレクトロンモードでは、飛行管の長さが制限されている場合でもイオンの飛行距離を長く設定でき、かつ、イオンミラー領域がイオンの運動量分散を補正するので、分解能が改善される。またニアモードでは、構造不安定なイオンが加速領域を出てから飛行中に分解して生成する破片イオン(フラグメントイオン)は、分解前とは並進速度が変化しないため同時に検出されて識別できないが、リフレクトロンモードではフラグメントイオンがイオンミラー領域を通過する際に、再加速により質量に応じた速度を獲得するため、飛行管の復路で質量分離される。これを試料分子の構造解析に利用した手法が、ポストソース分解法(PSD)として実用化されている¹⁸⁾。リフレクトロンモードのイオンミラー領域には、高速のイオンほど深く進入できる。高質量のイオンほど低速になるので、イオンミラーの浅い部分で追い返されるため収束効果が得られ難くなり、分解能は改善しなくなる。したがって、リフレクトロンモードの実用上の質量上限は10 kDa程度である。

また特にMALDI用の技法として、加速領域における遅延引き出し法(delayed extraction)も実用化されている^{19,20)}。遅延引き出し法では、試料プレートの近傍(1~2 mm)に配置したグリッドに正電圧を印加して、プレート領域に逆バイアス電場を発生させた状態でレーザー照射する。パルスレーザーの照射時刻からしばらく遅れて、

グリッド電圧をパルス状に下げるにより、プレート領域から正イオンが引き出される。これにより、質量分解能とイオン信号量(感度)が著しく向上する。この機構として、(1)マトリックス分子と試料分子の気化によって生じた混合状態内のイオン-分子反応が長く継続することにより、化学イオン化が促進してイオン生成量が増加する、(2)正イオンとともに生成する負イオンや電子の拡散が逆バイアス電場により促進されることにより、再結合反応が抑制されてイオン信号量が増加する(3)イオンが衝突を繰り返すことにより、脱離生成による大きな速度分布が緩和されて運動量分散が小さくなり、分解能が向上する、(4)全イオンがパルス電圧によって同時に引き出されるので時間分散が小さくなり、分解能が向上する、などが考えられる。最適な遅延時間は試料の分子量に依存するが、およそ数百ナノ秒程度である。

3. 方法

3.1 照射サンプル

CO₂レーザーとFELの照射対象試料には、中赤外波長域のマトリックス候補化合物として知られているフマル酸(MW=116, C₄H₄O₄)に塩化カリウムを加えたものを用いた。塩化カリウムには、カリウムイオン付加によりフマル酸分子が凝縮相で電荷を獲得する効果も期待しているが、アルカリハライド添加はこのような効果によるイオン化促進剤として、核酸や蛋白質を対象にしたIR-MALDI質量分析では良く使われる手法であり、実際の測定条件を再現する意図がある。また、カリウムイオン検出により、TOFスペクトルの質量軸校正ができることも期待した。フマル酸溶液(溶媒:メタノール10 mmol/l)と塩化カリウム溶液(溶媒:水10 mmol/l)を1:1の割合で混合した溶液10 μ lをアルミニウム試料板上に滴下し、室温中にてメタノールを蒸発させることにより、フマル酸と塩化カリウムの混合物の薄膜を作成した。

3.2 照射実験系

レーザー発振器として、Lumonics Hull製TEA-CO₂レーザー装置(XL-750 TS)と大阪大学FEL装置を用いた。CO₂レーザーはパルス幅100 nsec, パルス周期2 Hzである。FELはマイクロパルスの幅が5 ps, ミクロパルス周期45 ns, マクロパルス幅が15 μ s, マクロパルス周期が10 Hzである。レーザー波長はCO₂レーザー, FELともに10.2 μ mに設定した。

照射実験系の構成をFig. 1に示す。レーザー光はイオン源に取り付けたZnSeウィンドウを通して試料に照射した。イオン源に入射する直前に、CO₂レーザーとFELのビームをそれぞれR=1.5, 2.5 mの凹面金コートミラーで集光し、試料板上でそれぞれ約0.35, 3.1 $\times 10^{-4}$ cm²の照射スポットを実現した。このときの各照射条件をTable 1にまとめた。

TOF質量分析計はニアモード測定用とリフレクトロンモード測定用に、それぞれ直径40 mmと18 mmのMCP検出器(R. M. Jordan製)を装備している。装置内の真空はター

Fig. 1 TOF mass spectrometer for both the free-electron laser and CO₂ laser.

Table 1 Laser exposure conditions.

	CO ₂ laser	FEL
Wavelength (μm)		10.2
Repetition ratio (Hz)	2.0	10
Pulse width	100 ns	Macropulse: 15 μm Micropulse: 5 ps
Average laser power P_{ave} (W)	0.3	0.03
Exposed area S (cm ²)	0.35	3.1×10^{-4}
Pulse energy P_E (J/pulse)	0.15	Macropulse: 3×10^{-3} Micropulse: 9×10^{-6}
Fluence F (J/cm ²)	0.4	Macropulse: 10 Micropulse: 3×10^{-2}
Intensity I (W/cm ²)	4×10^6	6×10^9 (Micropulse)

ボ分子ポンプ排気系により $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Pa の基本圧力に維持した。飛行管の長さは 1.0 m である。リフレクトロンモードでは擬安定イオンが飛行中に分解した場合、イオンミラーで再加速されたフラグメントイオンはシフトしたピークとして検出されるので、TOF スペクトルの解釈が困難になる。またリフレクトロンモードでは、調整が必要なパラメータとして偏向電極の印加電圧、イオンミラーのリペラー電圧およびミラーレシオが新たに加わるが、それらを最適化してもリニアモードの半分程度の感度しか得られない。そこで本研究ではリニアモードによる TOF 質量分析を行なった。生成されたイオンはパルス遅延引き出し法により抽出した²¹⁾。接地した飛行管と抽出電極の間に与えた 1.0 kV の電位差によって飛行管に加速され、飛行管内を等速運動した後、リニアモード用の MCP 検出器に到達する。このときのイオンの飛行距離は 1.0 m である。MCP 検出器には二次電子加速用に 2.1 kV (CO₂ レーザー照射実験の場合) または 3.0 kV (FEL 照射実験の場合) を印加した。MCP 検出器からのイオン信号をプリアンプとファーストタイミングアンプで増幅し、Tektronix 製デジタルオシロスコープで計測、記録した。各 TOF スペクトルはレーザーパルス (FEL の場合はマクロパルス) 200 ショット分を積算したものである。CO₂ レーザー照射では、スペクトル積算によるピークの伸長を確認しながら、数

ショット毎に試料板を動かして照射スポットを移動させた。FEL 照射では、同一スポットの照射を 50 ショット程度続けることができた。

4. 実験結果

4.1 CO₂ レーザー照射実験結果

Fig. 2 に CO₂ レーザー照射実験結果を示す。スペクトルの横軸 (イオンの質量電荷比 m/z) は、(1) 式を用いてイオンの飛行時間を換算して得ている。

Fig. 2 には、フマル酸由来と考えられるピークが $m/z = 117$ の位置に見出される。これは中性のフマル酸の分子量 116 Da よりも 1 質量単位大きく、フマル酸分子にプロトンが 1 個付加したイオンとして検出されたと考えられる。また、試料板の材質であるアルミニウムよりさらに低質量側に多数のピークが現れている。

4.2 FEL 照射実験結果

Fig. 3 に FEL 照射実験結果を示す。CO₂ レーザー照射実験結果と同様に、測定したイオンの飛行時間から質量電荷比 m/z を換算している。Fig. 3 には、フマル酸由来と考えられるピークが $m/z = 110$ に見出される。これは中性のフマル酸の分子量より 6 質量単位小さい。この差は主として測定誤差によるものと考えられるが、その由来については

Fig. 2 TOF mass spectrum of fumaric acid with potassium chloride using linear mode (CO₂ Laser: 10.2 μm, laser power: 0.3 W, fluence: 0.4 J/cm²).

Fig. 3 TOF mass spectrum of fumaric acid with potassium chloride using linear mode (FEL: 10.2 μm, laser power: 30 mW, micropulse fluence: 30 mJ/cm²).

次節で詳しく述べる。また、CO₂レーザー照射実験結果と対照的に、FEL照射実験では低質量側のピークはほとんど現れていない。

5. 考 察

波長10.2 μmのCO₂レーザーまたはFELをフマル酸に照射した際の、生成イオンのTOF質量スペクトルを比較することにより、イオン化用レーザー光源としての両者の違いについて考察できる。CO₂レーザー照射実験で現れた低質量域の多数のピークは、レーザー照射によってフマル酸分子が分解し、破片イオン(レーザー誘起フラグメントイオン)が生成したことを示していると考えられる。CO₂レーザーの照射フルエンスは0.4 J/cm²と計算され、多くのIR-MALDI実験で確認されているイオン化のしきい値(0.1~0.2 J/cm²)を上回っている。また、パルス強度は4 × 10⁶ W/cm²と計算され、吸光度におけるBeerの法則が成立する条件(< 10⁷ W/cm²)²²⁾を満たしている。したがって、IR-MALDIのレーザー照射条件としては妥当であり、フマル酸の分子量関連イオンを観測するに至っている。しかし、多数のフラグメントイオンが出現しており、イオン化と競合する分解過程が存在したことを示唆している。フラグメントイオンが非特異的な開裂で生じていることから、これらは10.2 μm 光の吸収による選択的振動励起で生成したのではなく、熱分解、もしくは衝撃波や急激な気化にともなう高応力過程によって生成している可能性が高い。特に後者の可能性については、フラグメントイオンが高速のブルームから脱離することになるので、初速度が増大して質量決定できないほど低質量側にシフトしたピークとして観測されたと解釈できる。CO₂レーザーを用いたIR-MALDIでは、今回の照射条件、すなわち通常のIR-MALDIの照射条件下において分子の非特異的な分解は避けられず、それゆえに選択的振動励起の評価と活用は難しいと結論できる。

一方、FEL照射実験では、CO₂レーザー照射実験で観測されたような低質量域のフラグメントイオンピークは現れていない。FELを用いたIR-MALDIでは、マクロパルスの照射フルエンスよりもマイクロパルスのピーク強度が重要な因子になると報告されている。マイクロパルスのピーク強度を計算すると6 × 10⁹ W/cm²になるが、この値はVanderbilt大学のFEL照射実験で用いられている条件6.3 × 10⁹ W/cm²とほぼ同等である¹³⁾。したがってマイクロパルスによりイオン生成するならば、妥当な照射条件になっていると考えられる。マクロパルスの照射フルエンスは10 J/cm²と計算される。FELマクロパルスの照射フルエンスはCO₂レーザーに比べて1桁以上大きいにもかかわらず、非特異的な分解は生じていない。これはマクロパルスがマイクロパルストレインから成る、FELのパルス時間構造を反映していることに他ならない。すなわち、本研究におけるFEL照射ではマイクロパルスがイオン化プロセスに重要な作用をしていると推測できる。さらに、Vanderbilt大学のFEL照射実験における照射フルエンスは0.4~8 J/cm²であり、当研究で用いられた値より低いにもかかわらず、

多数の低質量フラグメントイオンが観測されていることは特筆に値する。彼らの利用したFELのマイクロパルス周期は350 psと短いため、マイクロパルスの連続としてのマクロパルスの効果がより強く現れたと解釈できる。Vanderbilt大学のFELマクロパルス幅は5 μmであるが、ポッケルセル²³⁾により100~1000 nsに切り出したマクロパルスを用いて照射実験が行われている。その結果、140 nsを超えるマクロパルス幅では質量スペクトルが得られていない。このパルス幅ではマクロパルス全体のエネルギーが過剰になるためと推察される。本研究は、マイクロ秒オーダーのマクロパルス照射によりTOF質量スペクトルを取得した最初の事例である。

粗い議論になるが、マイクロパルスが連続することによる効果について考察してみる。照射部位における熱的エネルギー散逸過程の時間スケールは、マイクロ秒からミリ秒のオーダーと考えられるので、マイクロパルス周期45 nsに比べると充分長く、局所加熱条件が成立していると考えられる。したがって、照射部位周辺の分子が熱分解しているとは考え難い。このことはVanderbilt大学のFEL照射実験(マイクロパルス周期350 ps)においても同様である。照射部位に発生する内部応力の緩和過程は数ナノ秒の時間スケールで進行すると考えられ、マイクロパルス周期よりも短時間か同程度なので、マイクロパルスの繰り返しにより照射部位に応力が蓄積する可能性は低い。これに対し、Vanderbilt大学のFELではマイクロパルス周期が短いため、照射部位の応力が開放される前に次々とマイクロパルスが到来することになる。したがって、連続したマイクロパルスによって応力が蓄積される条件になっており、高応力状態下での分子分解の可能性とともに、“stress confinement”モデルに沿ったイオン化プロセス¹⁵⁾の可能性も指摘できる。すなわち、Vanderbilt大学のFEL照射実験では、マイクロパルストレインとしてのマクロパルスがイオン化機構に寄与するのに対し、本研究のFEL照射実験結果は単発のマイクロパルスによる現象を反映し、マイクロパルストレインの寄与は小さいといえる。

Fig. 3に示したように、FEL照射においてフマル酸由来のピークは検出できたが、これをプロトン付加イオンなどの分子量関連イオンとみなした場合、測定した質量電荷比($m/z = 110$)はかなり大きな誤差を与えることになる。その原因として、FELのマクロパルス幅がCO₂レーザーに比べて100倍も長いので、イオン生成のタイミングは大きな分散を持つことになり、TOF光学系によるイオン群の時間収束が不十分になって、飛行時間の測定誤差が拡大したと考えられる。本研究のTOF光学系は、遅延電圧パルスにより生成イオンの引き出しを行っているが、遅延引き出し法では運動量分散の補正効果は絶大であるものの、時間分散、空間分散の補正効果は小さい。同様のことはリフレクトロンモードにおけるイオンミラーについてもいえる。結晶性マトリックスを用いたIR-MALDIで得られるTOFスペクトルのピーク幅は、照射レーザーのパルス幅よりも常に狭く、レーザーのパルス幅を変えてもピーク幅はあまり大きく変化しない¹¹⁾。このことは、多くのIR-MALDI実験で、単発パルス照射によるバルクアブレー

ションが観測されていることから理解できる。しかし、本研究のFEL照射実験で得られたTOFスペクトルは、マクロパルス幅に対応するようにピーク幅が広がっている。これは、個々のマイクロパルスによりイオンが生成している証拠とも見て取れる。また、TOF質量スペクトルを取得した際に、同一スポットを多数回FEL照射して信号を積算できている。このことは、ピコ秒のマイクロパルスによる、バルクアブレーションをともなわない、そしておそらくは振動モードの直接励起による新しいIR-MALDI機構の可能性を示唆している。

$m/z = 110$ の位置でのピーク検出が誤差によるものではなく、フマル酸分子が局所的に解離したフラグメントイオン由来と考えることもできる。現時点でのスペクトル分解能では、検出されたフラグメントの構造について定量的に断言することはできない。しかし $m/z = 110$ は、フマル酸分子から-COOHが脱離して K^+ イオン付加した際の質量と一致し、FEL照射によってこのようなアルカリ付加フラグメントイオンが生成した可能性もある。その場合、波長 $10.2\ \mu\text{m}$ のFEL照射は $C=C$ 結合が切断されたフラグメントイオンを高選択的に生成できたことになる。もしこれが事実であれば、質量分析を用いた分子構造解析において、FELによる選択的振動励起が極めて有用であることを実証するものであり、このピークの同定についてはさらに慎重に検証を続ける必要がある。

6. 総括

波長 $10.2\ \mu\text{m}$ の CO_2 レーザーおよび中赤外自由電子レーザーを用いて質量分析を行い、非常にプリミティブな結果であるが、中赤外域の波長で生成するイオンのTOF質量スペクトルを取得できた。FEL照射では、照射エネルギー密度が極めて高いにもかかわらず、低質量域にフラグメントイオンのピークが現れなかった。このことからFEL照射は CO_2 レーザー照射よりもソフトなイオン化であることが確認できた。 CO_2 レーザーを用いたIR-MALDIでは分子の非特異的な分解は避けられず、選択的振動励起の評価と活用は難しいと結論できる。マイクロ秒オーダーのマクロパルス照射によるTOF質量スペクトルを、世界で初めて取得できた。本研究のFEL照射実験結果は単発のマイクロパルスによる現象を反映し、ピコ秒のマイクロパルスによる、バルクアブレーションをともなわない新しいIR-MALDI機構の可能性を示唆している。

今回得られたTOF質量スペクトルの分解能は極めて低く、精度の高い議論は行えない。そこで、遅延引き出しの最適化を含めたTOF光学系の再検討に着手している²¹⁾。また、マクロパルスから切り出した数発のマイクロパルスによるFEL照射実験も計画している。TOF質量分析の分解能を改善することにより、IR-MALDIプロセスにおける振

動励起の役割を評価する実験システムが構築できるとの見通しが得られた。

選択的振動励起を効果的に利用するIR-MALDIの技法を確立し、FELの波長可変性を用いて試料を選択的かつソフトにイオン化して質量分析を行うことができるようになれば、複雑な蛋白質の構造解析などにもFELの適応範囲が広がると期待できる。

7. 謝辞

自由電子レーザー発振にご尽力いただいております三菱電機システムサービス隈昭一氏ならびに田中幹朗氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 上野 民夫, 平山 和雄, 原田 健一: バイオロジカルマスマスペクトロメトリー (東京化学同人, 1997) p. 3.
- 2) C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, and J. B. Fenn: *Anal. Chem.* **57** (1985) 675.
- 3) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2** (1988) 151.
- 4) 堀口 博: 赤外吸光図説総覧 (三共出版株式会社, 1993) p. 2.
- 5) A. Overberg, M. Karas, U. Bahr, R. Kaufmann, and F. Hillenkamp: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4** (1990) 293.
- 6) A. Overberg, M. Karas, and F. Hillenkamp: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5** (1991) 128.
- 7) S. Niu, W. Zang, and B. T. Chait: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9** (1998) 1.
- 8) S. Berkenkamp, F. Kirpekar, and F. Hillenkamp: *Science* **281** (1998) 260.
- 9) V. L. Talrose, M. D. Person, R. M. Whittal, F. C. Walls, A. L. Burlingame, and M. A. Baldwin: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** (1999) 2191.
- 10) 栗津 邦男, 永井 昭夫, 曾沢 勝夫: レーザー研究 **26** (1998) 369.
- 11) C. Menzel, K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, and F. Hillenkamp: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13** (2002) 975.
- 12) K. L. Caldwell, D. R. McGarity, and K. K. Murray: *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 1374.
- 13) M. B.-Knorr, D. R. Ermer, K. E. Schriver, and R. F. Haglund: *J. Mass Spectrom.* **37** (2002) 254.
- 14) R. Cramer, F. Hillenkamp, and R. F. Haglund: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7** (1996) 1187.
- 15) R. Cramer, R. F. Haglund, and F. Hillenkamp: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **169/170** (1997) 51.
- 16) W. C. Wiley and I. H. McLaren: *Rev. Sci. Instrum.* **26** (1955) 1150.
- 17) B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, and V. A. Zagulin: *Sov. Phys. JETP* **37** (1973) 45.
- 18) X. Tang, W. Ens, K. G. Standing, and J. B. Westmore: *Anal. Chem.* **60** (1988) 1791.
- 19) S. M. Colby, T. B. King, and J. P. Reilly: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8** (1994) 865.
- 20) R. S. Brown and J. J. Lennon: *Anal. Chem.* **67** (1995) 1998.
- 21) Y. Naito, R. Sasaki, M. Heya, and K. Awazu: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* (2002) submitted.
- 22) C. Menzel, K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, and F. Hillenkamp: *Int. J. Mass Spectrom.* **207** (2001) 73.
- 23) K. Becker, B. Johnson, and G. Edwards: *Rev. Sci. Instrum.* **65** (1994) 1496.