マルチターンタンデム飛行時間型質量分析計におけるリン脂質のチャージリモートフラグメンテーション

Charge-Remote Fragmentation of Phospholipids in a Multi-Turn Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometer “MULTUM-TOF/TOF”

新聞秀一^{1*}・長尾博文²・豊田岐聡¹

Shuichi SHIMMA,^{1*} Hirofumi NAGAO,² and Michisato TOYODA¹

¹ 大阪大学大学院理学研究科物理学専攻 *Department of Physics, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, OSAKA, JAPAN*

² 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 *Division of Sustainable Energy and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, OSAKA, JAPAN*

High-energy collision-induced dissociation (CID) provides characteristic structural information about interesting molecules, which cannot be obtained by low energy CID. High-energy CID is available using magnetic sector or time-of-flight (TOF) type mass spectrometers. In our laboratory, a multi-turn tandem TOF mass spectrometer (MULTUM-TOF/TOF) has been developed that has a multi-turn TOF mass spectrometer (MULTUM) as the first stage and a quadratic-field ion mirror as the second stage. MULTUM-TOF/TOF enables obtaining high-energy CID spectra with high resolving power for precursor ion selection. Furthermore, the signal-to-noise (S/N) ratio of the product ion mass spectrum is dramatically improved by increasing the number of cycles, because fragment ions caused by post-source decay are eliminated. The improved S/N ratio facilitates the recognition of signal peaks that have low intensity. In this paper, we performed the structural analysis of lysophosphatidylcholine (LPC) (18:1) using MULTUM-TOF/TOF. We obtained ions derived not only from a dissociation of the polar headgroup but also from charge-remote fragmentation generated by a high-energy CID process. Here, charge-remote fragmentation is the cleavage of a long-chain alkyl in a fatty acid moiety. Therefore, the position of the double bonds was successfully determined. The characteristics of product ion mass spectra obtained from sodiated and protonated LPC were also investigated.

(Received June 1, 2007; Accepted July 4, 2007)

1. はじめに

大阪大学で開発されたマルチターン飛行時間型質量分析計 (MULTUM) は、イオンを同一飛行空間で複数回周回させることが可能な飛行時間型質量分析計である。直線型の飛行時間型質量分析計とは異なり、長い飛行距離を得て高い質量分解能を達成することが可能である。これまでに、「MULTUM Linear plus」^{1), 2)}、「MULTUM II」^{3), 4)}などが製作された。その性能として MULTUM Linear plus では電子イオン化イオン源を用いて ¹⁴N₂-¹²C¹⁶O のダブルレットで質量分解能 35 万を達成し⁵⁾、MULTUM II では同じ

く電子イオン化イオン源を用いて、N₂ で質量分解能 25 万を達成している⁶⁾。また MULTUM II では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) を用いて、アンギオテンシン I (*m/z* 1296.7) で質量分解能 7 万程度を達成している⁷⁾。

近年、2 台の飛行時間型質量分析計を連ねたタンデム飛行時間型質量分析計が広く用いられるようになってきているが^{8)~10)}、われわれの研究室では MULTUM を搭載したマルチターンタンデム飛行時間型質量分析計「MULTUM-TOF/TOF」を開発した^{11), 12)}。この質量分析計は、MALDI イオン源を有し、一段目の質量分析計 (MS1) として MULTUM を、二段目の質量分析計 (MS2) として二次曲線場イオンミラー¹³⁾を搭載している。MULTUM-TOF/TOF の第一の利点として、周回を重ねるごとに同位体ピーク間隔が広がることで、非常に高い分離能でモノアイソトープピークを選択することが可能である。さらに、MS2 として採用した二次曲線場イオンミラーは、衝突前

* Correspondence to: Shuichi SHIMMA, *Department of Physics, Graduate School of Science, Osaka University, Machikaneyama 1-1, Toyonaka, Osaka 560-0043, JAPAN*, e-mail: shuichi@mass.phys.sci.osaka-u.ac.jp
新聞秀一, 大阪大学大学院理学研究科物理学専攻, 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

後に減速および再加速をせず一度にすべての質量範囲のプロダクトイオンを高い分解能で観測可能である。すなわち、MULTUM-TOF/TOF では、イオン源において 20 kV で加速されたイオンは、減速されずにそのまま衝突室でガスと衝突するので高エネルギー衝突誘起解離 (collision-induced dissociation: CID) によるタンデム質量分析 (tandem mass spectrometry: MS/MS) が可能となる¹²⁾。第二の利点として、多重周回によりポストソース分解 (post-source decay: PSD) 由来イオンを排除することが可能となる。なぜなら、多重周回中に起きた PSD 由来イオンは、エネルギーが異なるために扇形電場を通過できない。したがって、PSD 由来イオンは周回することができず、検出器に到達しないからである。また、PSD が起きた場所は特定できないことから、イオンミラーにおける不完全な時間収束によって、検出されるピークの幅が広がるうえ、ノイズレベルの増加にもつながる。したがって、PSD 成分を排除することは、スペクトルの質を向上させることにつながる。

本論文では、MULTUM-TOF/TOF 装置の概略について説明した後、上で述べた装置の特徴を活かしたアプリケーションとして、リゾリン脂質を用いたチャージリモートフラグメンテーションについて解析した結果を報告する。チャージリモートフラグメンテーションとは、高エネルギー CID 特有の解離現象であり、電荷のある位置から遠く離れた化学結合が開裂する現象を指す^{14)~16)}。具体的な例では、脂肪酸などに見られる長鎖アルキル基と電荷を局在させるような官能基の両方を有する化合物において、その構造を反映した規則的な開裂イオン群がプロダクトイオンスペクトル内に観測されるため不飽和結合の位置決定が可能となる。

2. 装置概要

MULTUM-TOF/TOF の装置概略図を Fig. 1(a) に示す。以下では、MULTUM と二次曲線場イオンミラーについてそれぞれ概略を述べる。

2.1 マルチターン飛行時間型質量分析計 (MS1)

MS1 として用いられている MULTUM を収納する真空容器のサイズは 40 cm × 45 cm × 20 cm である。MULTUM II のイオン光学系を採用し、Fig. 1(a) に示すように 4 個のトロイダル電場のみで構成されている。イオン光学系の細かいパラメータは文献ですでに報告済みである⁵⁾。分析部に配された四つのセクター電極は円筒であるが、マツダプレート¹⁷⁾を用いてトロイダル電場を形成している。トロイダル電場の半径は 50 mm で偏向角は 157.1°、周回部の飛行距離は 1.308 m である。Fig. 1(b) に示す写真において、四隅に配されたセクター電極間および中央部分はすべて自由空間であり、イオン収束のための電極などは入っていない。

この装置での測定は、Fig. 2 に示したブロックダイアグラムの要領で行われる。まず、イオン源に近い入射側の電場の電圧 (Sector IV) だけをオフにしておき、イオン

Fig. 1. (a) Schematic drawing of MULTUM-TOF/TOF; (b) photograph of MULTUM; and (c) photograph of quadratic-field ion mirror.

Fig. 2. Block diagram of the timing control system. When the voltage applied to Sectors I and IV is turned on, ions fly in the closed orbit (asterisk).

が入射できる状態にしておく。イオン入射後、検出器に近い側の電場の電圧 (Sector I) がオンになればイオンは周回軌道に入り周回が始まる。イオンが周回軌道に入り、Sector IV へ戻ってくるまでに、Sector IV の電圧をオンにすれば、MULTUM 内のイオンは閉空間を飛行することになる。周回数の調節は、Fig. 2 に示した星印の時間を調節することにより可能となる。希望する周回数だけ回した後に、Sector I の電圧をオフにすれば、周回した後のイオンをミラー側へ出射することが可能である。Sector I とミラーの間には、イオンゲートと衝突室が配置されている。イオンゲートは、10 mm 四方の正方形プレートが 2

枚平行に配置されている。プレート間の距離は 10 mm であり、一方のプレートは常にグランドになっている。他方のプレートへは +1 kV の電圧が印加されており、Fig. 2 のダイアグラムに示すように、イオン選択の際は印加されている電圧をパルス状（幅：～500 ns）にグランドに落とすことでイオンは衝突室へ導かれる。衝突室は、できる限りガスが質量分析部へ流出することを防ぐために、入射部と出射部のアパーチャーの直径は 1 mm になっている。

2.2 二次曲線場イオンミラー (MS2)

リフレクトロン（イオンミラー）は、イオンの運動エネルギーのばらつきを収束させ質量分解能を向上させるために考案された¹⁸⁾。当時考案されたリフレクトロンは、線形電場を用いた一段リフレクトロンと二段リフレクトロンである。これらのリフレクトロンでのエネルギー収束を満たす条件は、イオンの進入深度がある特定の値の場合、すなわちイオンのエネルギーがある値をもつ場合にしか満たさない。したがって、線形電場をもつリフレクトロンを MS2 に採用した場合、プロダクトイオンの質量を測定する際にすべての質量領域を一度に検出することは不可能である。なぜなら、プロダクトイオンの運動エネルギー U_i は、プリカーサイオンの運動エネルギーと質量をそれぞれ U_p , m_p とし、プロダクトイオンの質量を m_i とすると、

$$U_i = \frac{m_i}{m_p} U_p \quad (1)$$

で表され、プロダクトイオンがもつ運動エネルギーの範囲は非常に幅広くなるからである。この場合、リフレクトロンに印加する電圧を段階的に変化させて測定を行わなければ、全質量範囲を高い分解能で測定することができない。このような測定上の問題点を回避するために、プリカーサイオンを衝突室に導入する前に減速させたり、あらかじめ低い加速電圧で衝突室に導入させたりする。そして、衝突後、再加速する手法がとられるが、これらの方法では衝突エネルギーが低くなる。線形場を用いた場合の問題点を解決する方法として、リフレクトロン内の電場を二次曲線場にする方法がある^{19), 20)}。二次曲線場において、ポテンシャルはイオンの進行方向を z とすると以下の式で与えられる。

$$U(z) = \frac{k}{2} (z-a)^2 + C \quad (2)$$

ここで k と C は定数である。また、 a は z 軸上でポテンシャルが最小になる位置を表している。式 (2) で表されるポテンシャルが与えられたとき、そのポテンシャル中で運動する質量 m のイオンの運動方程式は、

$$\frac{d^2z}{dt^2} = -\frac{q}{m} k(z-a) \quad (3)$$

で与えられる。ここで q はイオンの総電荷を表す。 $q/m > 0$, $k > 0$ の条件で、式 (3) を解くと、その解は、

$$z(t) = a + (z_0 - a) \cos \omega t + \left(\frac{2V_0}{k} \right) \sin \omega t \quad (4)$$

で表される。ここで、 ω は振動数を表し、

$$\omega = \sqrt{\frac{q}{m}} k \quad (5)$$

で与えられる。また、 z_0 は初期状態のイオンの座標を表し、 V_0 はイオンの加速電圧を表している。式 (5) より振動の周期 T_n は、

$$T_n = \left(\frac{\pi}{\omega} \right) n, \quad n = 1, 2, 3 \dots \quad (6)$$

で与えられることから、二次曲線場内でのイオンの運動は、イオンの運動エネルギーによらないことがわかる。MULTUM-TOF/TOF の MS2 では、二次曲線場を実現するために、Fig. 1(c) に示すように多数の電極 (33 枚) を用い、電極間隔と電極間の印加電圧を調節することで二次曲線場（最大値 25 kV）を実現している¹²⁾。

3. 実験

3.1 試薬

本実験で用いた試薬である 3-アミノキノリン、 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) アンギオテンシン I、リゾフォスファチジルコリン (1-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine: LPC (18:1)) は Sigma-Aldrich 社より購入した。溶媒として用いたメタノールは和光純薬工業 (株) より購入した。また、炭酸水素ナトリウムは関東化学 (株) より購入した。

3.2 試料

本研究ではイオン化に、固体マトリックスではなく、液体マトリックスを用いた。粘性をもつ液体マトリックス表面において、単一のレーザー照射箇所より一定の強度でイオンが生成されることが知られている²¹⁾。液体マトリックスは、100% メタノールで作成した α -CHCA の飽和溶液の上清 150 μ L に対し 35 mg の 3-アミノキノリンを溶解させることで作製した。LPC (18:1) は溶媒を 100% メタノールとし、50 pmol/ μ L の濃度になるように調整した。試料と液体マトリックスは等量混合しサンプルプレート上へ 3 μ L 滴下した。滴下後 10 分程度室温で放置した後、イオン源に導入した。また、ナトリウムイオン付加の LPC (18:1) を解析する際には、液体マトリックスに炭酸水素ナトリウムを 10 mM の終濃度になるように添加した。

3.3 質量スペクトルの取得

質量スペクトルの測定は、ポジティブモードにて測定を行った。イオンの加速電圧は 20 kV とした。レーザー照射後、1.7 μ s 後に Fig. 1 に示した extraction grid へ -1.2 kV のパルス電圧を印加しイオンを引き出した。プロダクトイオンスペクトルを取得するために、衝突ガスとして He ガスを用いた。衝突室へのガス導入はニードルバルブにより流量調整を行った。プリカーサイオンおよびプロダクトイオンの飛行時間は、デジタルオシロスコープ (LC564DL, LeCroy Japan) を用いて記録した。プロダクトイオンの質量較正は、標準試料であるアンギオテンシン I のプロダクトイオンスペクトル内の a -系列フラグメントイオンを用いて行った。すべてのスペクトルは 3,000 スペクトル分積算した。

4. 結果および考察

4.1 ナトリウムイオン付加 LPC (18:1) のチャージリモートフラグメンテーション

これまでに報告されている四重極型質量分析装置などによる低エネルギー CID を用いたリン脂質の構造解析では、プロダクトイオンスペクトルから多くの構造情報を得るために、ナトリウムやリチウムなどのアルカリ金属を添加したうえで解析を行う^{22)~24)}。ここでは、これまでの手法と同様、マトリックスに炭酸水素ナトリウムを添加して測定を行った結果について述べる。Fig. 3 は、プリカーサイオン ($[M+Na]^+$: 544.5) を MULTUM 内で周回させなかった場合 (リニアモード) に得られるプロダクトイオンスペクトルである。Fig. 3(a) は 20 keV の衝突エネルギーによる CID スペクトルである。Fig. 3(b) は対照実験として、衝突室内へ衝突ガスを導入せずを得た PSD によるスペクトルである。両者を比較すると m/z 86, 104, および 147 が低い m/z 領域に共通して検出されている。これらは Fig. 4(a)~(c) に示した構造に由来するピークである。特に Fig. 4(c) はアルカリ金属を添加した際に顕著に現れるピークとして知られており、その生成過程は Scheme 1(b) に示されている²⁴⁾。さらに、 m/z 300 以上においては、 m/z 339, 361 と 485 が検出されている。これらは、Scheme 1(a) に示したトリメチルアミンの脱離に由来するピークと sn -1 の α 水素の寄与によって生成される Scheme 1(b) および 1(c) の構造に由来するピークであり、上述したピーク同様、アルカリ金属添加の際に顕著に現れるピークである。ここで特に m/z 485, すなわちトリメチルアミン脱離に由来するピークが非常に大きな強度で観測されている。

Scheme 1 に示したように、本研究で用いた試料は、 sn -2 の脂肪酸が水酸基に置き換わっている。これは、 sn -2 の α 水素が存在せず、 sn -1 の α 水素のみが存在することを意味している。この sn -1 の α 水素は安定であることが知られており、トリメチルアミン脱離後の反応が進みにくくなるために、 m/z 485 が非常に強い強度で観測されている²⁴⁾。

これら共通したピークが検出されている一方で、Fig. 3(a) ではさらに多くのピークが検出されている様子がわかる。Fig. 3(c) と Fig. 3(d) に m/z 270~450 の範囲を拡大した CID スペクトルと PSD スペクトルを示した。Fig. 3(c) には、Fig. 3(d) では検出されていない非常に多くのピークが検出されている。これらのピークは 14 u の質量差であることから、チャージリモートフラグメンテーションによって脂肪酸のアルキル基末端からアルカンが脱離して生じたピークであると考えられる。特にリン脂質の場合には、Scheme 2 に示すように、親水部に電荷が固定されることにより水素の 1,4-脱離が引き起こされていると考えられる²⁵⁾。得られたスペクトルを本研究で用いた試料の構造に当てはめると、トリメチルアミンが脱離しやすいということから、Fig. 4(d) に示した構造が得られていることがわかる²⁶⁾。さらに Fig. 3(c) でアスタリスクをつけたピークである m/z 334, 348, および 390 は、Fig. 4(e) が示すようにトリメチルアミンが脱離していない状態でチャージリモートフラグメンテーションが起きたことを示すピークであると考えられる。

Fig. 4(d) に示したピークが生成される過程として、チャージリモートフラグメンテーションが起きた後にトリメチルアミンが脱離する過程とトリメチルアミンが脱離した後にチャージリモートフラグメンテーションが起きる可

Fig. 3. Product ion spectra of Na adduct of LPC (18:1) without circulation of precursor ions in the MULTUM (linear mode). All isotopes of LPC were included: (a) High-energy CID spectrum; (b) PSD spectrum; (c) mass range m/z 270–450 of (a); and (d) mass range 270–450 of (b). The product ion derived from charge-remote fragmentation with no loss of trimethylamine is represented by an asterisk.

Fig. 4. Structural information of product ions: (a) m/z 86; (b) m/z 104; (c) m/z 147; (d) charge-remote fragmentation from m/z 485 (without trimethylamine); and (e) charge-remote fragmentation from m/z 544 (with trimethylamine).

能性が考えられる。前者については、トリメチルアミンの窒素がもつ電荷によって引き起こされたチャージリモートフラグメンテーションである。一方、後者では、リン酸の近傍に固定されたナトリウムイオンの電荷によってチャージリモートフラグメンテーションが引き起こされていると考えられる。しかし、マトリックス中に加えたナトリウムイオンが電荷の固定源となって、チャージリモートフラグメンテーションが起きるかどうかは自明ではない。そのような過程が可能であることを確認するには、 m/z 485 のプロダクトイオンスペクトル、すなわち MS^3 に相当するスペクトルを取得すればよい。しかしながら、タンデム飛行時間型質量分析装置では、直接 MS^3 を取得することは不可能である。したがって、本研究では、インソース分解 (in-source decay: ISD) によって得られた m/z 485 をプリカーサイオンとして、プロダクトイオンスペクトルを取

得し、 MS^3 と等価な情報を得た (Fig. 5)。Fig. 5 のスペクトルは周回をさせずに取得したプロダクトイオンスペクトルである。 m/z 147 のピークが強い強度で検出されているが、ダブルアスタリスクで示した通りに、Fig. 4(b) で見られたトリメチルアミン部由来のピークである m/z 104 は全く検出されなかった。この結果は、トリメチルアミンはすでに脱離しており、プリカーサイオンには含まれていないことを示している。 m/z 270~450 を拡大したスペクトルを挿入図として示す。拡大されたスペクトルにおいてアスタリスクを付したピークはチャージリモートフラグメンテーション由来のピークである。この結果より、ナトリウムイオンが電荷の固定源となるチャージリモートフラグメンテーションも起きていることが確認された。しかしながら、 m/z 289.5 と 331.5 の間に Fig. 3(c) で検出されていた m/z 303 と 317 はピークとして検出できなかった。

Fig. 3 の結果から、われわれは周回させずに得た CID スペクトル内にチャージリモートフラグメンテーション由来のピークが検出されることを確認した。しかし、Fig. 3(d) に示した PSD スペクトルで m/z 339 や m/z 440 近傍に見られる PSD 由来ピークは、Fig. 3(c) の CID スペクトルにも混入している。さらに本論文の導入部でも述べたが、PSD は、プロダクトイオンスペクトルのノイズレベルをも増加させる。これらの要因によって、 m/z 441 のように PSD 由来ピークに埋もれたり、ノイズレベルの増加により検出されることが期待されるピークが検出されないケースが出てきてしまう。

この問題を解決するために、プリカーサイオンを MULTUM 内で多重周回させた後に CID スペクトルを得た。8 周回後に得た CID スペクトルと PSD スペクトルを Fig. 6(a) と 6(b) にそれぞれ示す。Fig. 6(b) に見られる m/z 86, 104, および 485 のピークは周回後の直線部分での PSD 由来成分、もしくは質量分析計内部の残留ガスとの衝突によって生成したと考えられる。しかし、Fig. 6(b) では Fig. 3(b) と比較して、大部分の PSD 由来成分は消失しノイズレベルが顕著に減少していることがわかる。Fig. 6(c) と 6(d) に、それぞれ m/z 270~450 の領域を拡大した CID および PSD スペクトルを示した。Fig. 6(d) が示す

Scheme 1

Scheme 2

Fig. 5. High-energy CID spectrum of m/z 485 derived from ISD. This spectrum was obtained in linear mode. The product ion derived from charge-remote fragmentation is represented by an asterisk. The double asterisk indicates that fragment ion at m/z 104 was not observed.

ように、この領域の PSD 由来成分は周回により完全に消失している。PSD 由来成分が消失した結果、CID スペクト

ルにおいてノイズが低減し、チャージリモートフラグメンテーション由来のピークが明確に検出できるようになっている。周回させることにより m/z 413 および 427 のピークが新たに検出可能となり、 m/z 441 は PSD 成分が消失したために明瞭な単一のピークとして検出されている。

以上より、LPC のナトリウムイオン付加体においてチャージリモートフラグメンテーションを確認できた。チャージリモートフラグメンテーションにより二重結合位置を推定する際には、ビニル位での解離が起きにくいために、連続した 14 u の質量差の途中に 54 u の質量差を含むというパターンの違いを利用する¹⁴⁾。しかしながら、アルカリ金属を添加した場合、トリメチルアミンがある場合とない場合のチャージリモートフラグメンテーション由来ピークの両方が混入するため、54 u の質量差を見つけることが非常に困難になる。今回の例では m/z 331 と 385 の間に二重結合があるが、スペクトル上ではその間に非常に強い強度をもつピーク (m/z 334, 339, および 348) が混入しているため、構造が未知の場合、解析において注意を要する。

4.2 プロトン付加 LPC (18:1) のチャージリモートフラグメンテーション

前項で述べたとおり、アルカリ金属イオンが付加したフォスホコリンを有する場合、2 種類のチャージリモートフラグメンテーション由来のピークが混在し、規則的なピークパターンが崩れるために二重結合の位置特定が困難になる。一方、プロトン付加では、Scheme 3(a) に示すように、プロダクトイオンスペクトルに m/z 184 のフォスホコリンが検出されることが、低エネルギー CID における主過程として知られている。したがって、アルカリ金

Fig. 6. Product ion spectra of Na adduct of LPC (18:1) from monoisotopic peak after 8 cycles of precursor ions in the MULTUM. Monoisotopic ion has been isolated: (a) High-energy CID spectrum; (b) PSD spectrum; (c) mass range m/z 270–450 of (a); and (d) mass range 270–450 of (b). The peak not observed in linear mode is represented by an asterisk.

Scheme 3

属イオン付加の場合として Scheme 1 に示した 2 段階の解離とは異なり、プロトン付加体の解離過程は非常に単純である。このような理由から、プロトン付加体においては、トリメチルアミンが脱離しない状態でチャージリモートフラグメンテーションを起こすことが可能であると期待される。

まず、チャージリモートフラグメンテーションが起きているかを確認するために、プロトン付加体のプリカーサイオン ($[M+H]^+$: 522.4) を周回させずにプロダクトイオンスペクトルを取得した。Fig. 7(a) は CID によるプロダクトイオンスペクトルであり、Fig. 7(b) は PSD によるプロダクトイオンスペクトルである。いずれのスペクトルもプリカーサイオンならびにフォスホコリン由来 (m/z 184) のピーク強度が非常に強い。 m/z 86 および 104 は、それぞれ Fig. 4(a) および 4(b) に示した構造に由来するピークである。また m/z 166 は、Scheme 3(a) に示したフォスホコリンより H_2O が脱離したピークであると考えられる。さらに m/z 258 と m/z 339 が Fig. 7(a) と 7(b) で共通して検出されている。このうち m/z 258 は、LPC (18:1) の脂肪酸がケテンの形で脱離したピーク、すなわち $[M+$

$H-C_{16}H_{31}CH=C=O]^+$ に相当するピークである。また、脂肪酸部が遊離した m/z 240 ($[M+H-C_{17}H_{33}COOH]^+$) のピークも検出されることが期待されるが、今回の実験では当該ピーク強度はノイズレベル以下であり検出できなかった。

Fig. 7(a) において m/z 300 以上に強度は小さいが顕著なピーク群が検出されている。 m/z 270 以上を拡大した CID および PSD スペクトルを Fig. 7(c) と Fig. 7(d) にそれぞれ示す。Fig. 7(c) の CID スペクトルにおいて 14 u の質量差をもつピーク群が明瞭に検出されていることがわかる。さらに、 m/z 368 から m/z 422 で 54 u の質量差をもつピークが見える。これは、二重結合の位置を表している。この結果をサポートするように m/z 422 より 1 u 大きい m/z 423 のラジカルイオンも検出されている。このピークは、二重結合の末端側のアリル位で C-C 結合が単純開裂して生成すると考えられている¹⁴⁾。各ピークが表す構造を Fig. 8 に示したが、すべてのチャージリモート由来ピークが検出されなかった。Fig. 7(d) が示すように m/z 450 以上で PSD 由来による幅の広いピーク ($m/z \sim 480$) が検出されているのをはじめ、ノイズレベルが増加していることがわかる。この PSD 成分によって m/z 436 以上のチャージリモートフラグメンテーション由来ピークが検出されなくなっていると考えられる。

PSD 成分を排除し、すべてのチャージリモートフラグメンテーション由来ピークが検出できるかを確認するために、ナトリウムイオン付加体で行った実験と同様、イオンを MULTUM 内で周回させた後、モノアイソトープピークをプリカーサイオンとして CID を行った。Fig. 9(a) および Fig. 9(b) は、それぞれ MULTUM 内で 20 周回させ

Fig. 7. Product ion mass spectra of protonated LPC (18:1) without circulation of precursor ions in the MULTUM. All isotopes of LPC are included: (a) High-energy CID spectrum; (b) PSD spectrum; (c) mass range m/z 270–525 of (a); and (d) mass range 270–525 of (b).

Fig. 8. Structural information of product ions derived from charge-remote fragmentation of protonated LPC (18:1).

た後に得た CID および PSD スペクトルである。Fig. 9(b) の m/z 104 と m/z 184 は、ナトリウムイオン付加体の結果での考察と同様、周回後の直線部分での PSD もしくは残留ガスとの衝突によって生成したと考えられるが、周回により大多数の PSD 成分は消失している。Fig. 9(c) に m/z 270 以上を拡大した CID スペクトルを示す。Fig. 7(c) では検出されていなかったピークをアスタリスクで表してある。また Fig. 9(c) の挿入図に示すように、二重結合位置を表す m/z 422 と m/z 423 のピークも明確に得られている。さらに、チャージリモートフラグメンテーション由来の領域を PSD スペクトルと比較した結果を Fig. 9(d) と 9(e) に示す。周回することでより明確なピークとして検出されていることがわかる。単一の構造からチャージリモートフラグメンテーションが起きていることから、解析はナトリウムイオン付加体と比べ非常に容易になっていることがわかる。

ここで、Fig. 9(d) の挿入図に示すようにチャージリモートフラグメンテーション由来のピークである m/z 340 の

近傍に m/z 339 のピークが検出されている。 m/z 339 は、Scheme 3(b) に示す m/z 184 のフォスフォコリンが生成された後の電荷をもたない部位にプロトンを提供した構造に相当すると考えられる。構造としては Scheme 1(c) による生成物と全く同じであるが、生成過程は異なると考えられる。なぜなら、トリメチルアミンの脱離に相当する m/z 463 ($[M+H-59]^+$) のピークがプロダクトイオンスペクトル内に検出されていないからである。Scheme 3(b) に相当する構造は、一般的に低エネルギー CID では検出されないピークであり、プロトン付加においてその生成過程はこれまで報告されていない^{15), 24)}。したがって、高エネルギー CID 特有の解離過程の存在を示唆していると考えられる。今後重水素置換を行ったリン脂質などを用いた実験により、どの部位から電荷を得ているのか詳細に解析するべきであると考えている。

5. まとめ

本論文では、われわれの研究室で開発された MULTUM-TOF/TOF を用いて、高エネルギー CID による LPC (18:1) の構造解析結果を報告した。高エネルギー CID において特有の解離であるチャージリモートフラグメンテーションにより、低エネルギー CID では得られない脂肪酸の詳細な構造情報を得ることができた。ナトリウムイオン付加体とプロトン付加体の間でプロダクトイオンスペクトルを検討した結果、より単純な解離機構をもつプロトン付加体において、チャージリモートフラグメンテーションの解析が容易になることを示した。また、MULTUM において多重周回させることで、PSD 由来成分を排除しシグナルノイズ比が向上した結果、ピークが明

Fig. 9. Product ion spectra of protonated LPC (18:1) after 20 cycles of precursor ions in the MULTUM. Monoisotopic ion has been isolated: (a) High-energy CID spectrum; (b) PSD spectrum; and (c) mass range m/z 270–525 of (a). Comparison between CID spectrum and PSD spectrum shown in (d) mass range 270–380 and (e) mass range 430–510. The peak not observed in linear mode is represented by an asterisk.

瞭に観測可能となった。プロトン付加体での解析の結果、チャージリモートフラグメンテーション以外にも高エネルギー CID 特有の解離機構を示唆するピークが得られた。今後、高エネルギー CID での解離機構をさらに詳細に検討する予定である。

謝 辞 本研究は、文部科学省科学研究費補助金平成16～18年若手研究 (A) (16685008) および科学研究費補助金 (特別研究員奨励費) (181755) によりました。

文 献

- M. Toyoda, D. Okumura, S. Yamaguchi, M. Ishihara, I. Katakuse, and T. Matsuo, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **48**, 312 (2000).
- M. Toyoda, M. Ishihara, S. Yamaguchi, H. Ito, T. Matsuo, R. Roll, and H. Rosenbauer, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 163 (2000).
- D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara, and I. Katakuse, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 349 (2003).
- D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara, and I. Katakuse, *Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. A*, **519**, 331 (2004).
- M. Toyoda, D. Okumura, M. Ishihara, and I. Katakuse, *J. Mass Spectrom.*, **38**, 1125 (2003).
- D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara, and I. Katakuse, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **11**, 261 (2005).
- D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara, and I. Katakuse, *J. Mass Spectrom.*, **39**, 86 (2004).
- A. L. Yergey, J. R. Coorsen, P. S. Backlund, Jr., P. S. Blank, G. A. Humphrey, J. Zimmerberg, J. M. Campbell, and M. L. Vestal, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, 784 (2002).
- K. F. Medzihradsky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal, and A. L. Burlingame, *Anal. Chem.*, **72**, 552 (2000).
- D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, and A. Holle, *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 952 (2003).
- M. Toyoda, A. E. Giannakopoulos, A. W. Colburn, and P. J. Derrick, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **11**, 181 (2005).
- M. Toyoda, A. E. Giannakopoulos, A. W. Colburn, and P. J. Derrick, *Rev. Sci. Instrum.*, **78**, 07410 (2007).
- A. E. Giannakopoulos, B. Thomas, A. W. Colburn, D. J. Reynolds, E. N. Raptakis, A. A. Makarov, and P. J. Derrick, *Rev. Sci. Instrum.*, **73**, 2115 (2002).
- N. Akimoto, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **46**, 228 (1998).
- R. C. Murphy, J. Fiedler, and J. Hevko, *Chem. Rev.*, **101**, 479 (2001).
- J. Adams, *Mass Spectrom. Rev.*, **9**, 141 (1990).
- H. Matsuda and Y. Fujita, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **16**, 395 (1975).
- R. J. Cotter, W. Griffith, and C. Jelinek, *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* (in press).
- A. A. Makarov, E. N. Raptakis, and P. J. Derrick, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **146/147**, 165 (1995).
- B. A. Mamyrin, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **131**, 1 (1994).
- V. S. Kumar Kolli and R. Orlando, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 923 (1996).
- X. Han and R. W. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 6 (1995).
- P. Domingues, M. R. M. Domingues, F. M. L. Amado, and A. J. Ferrer-Correia, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 799 (2001).
- F. F. Hsu and J. Turk, *J. Am. Soc., Mass Spectrom.*, **14**, 352 (2003).
- N. J. Jensen, K. B. Tomer, and M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1863 (1985).
- O. Belgacem, A. Bowdler, I. Brookhouse, F. L. Brancia, and E. Raptakis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 1653 (2006).

Keywords: Charge-remote fragmentation, Multi-turn time-of-flight, Quadratic-field ion mirror, High energy CID, Lysophosphatidylcholine