

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19860093  
研究課題名（和文） 電場勾配型高精度TOF-MS装置の開発  
研究課題名（英文） Development of the accurate TOF-MS with the strong gradient electrical field acceleration  
研究代表者  
全 伸幸（NOBUYUKI ZEN）  
独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・特別研究員  
研究者番号：20455439

研究成果の概要：本研究において提案された電場勾配型イオン加速法は、飛行時間型質量分析装置のイオン加速部において、イオンの加速方向とは逆勾配の高電場を生成し、イオンの初期エネルギーおよび初期位置を強制的に揃えてやり、あるタイミングで高電圧パルスを発生させてイオンを加速することにより、高い質量分析精度を目指したものである。逆勾配の高電場をパルス的に発生させておき、加速の高電圧が印加された後、パルス的に減衰させる必要のあることが分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,030,000	0	1,030,000
2008年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,330,000	90,000	1,420,000

研究分野：電気電子工学

科研費の分科・細目：計測工学（5106）

キーワード：質量分析、TOF-MS、高電圧パルス、静電場シミュレーション、遅延引き出し法

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質など生体分子の高感度同定を可能にする計測手法として、飛行時間型質量分析法（TOF-MS: Time Of Flight - Mass Spectrometry）が注目されている。TOF-MSの動作原理は非常に単純である。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization）

やエレクトロスプレーイオン化法（ESI: Electro Spray Ionization）などによって生体分子は電荷を持ち、高電圧を印加されることによって加速され、自由飛行を開始する。マイクロチャンネルプレート（MCP: Micro-Channel Plate）などのタイミング検出器に到達するまでの時間から、生体分子イオンの質量電荷比 ( $m/z$ ) が割り出される。式

(1) は TOF-MS の基本式であり、イオンの質量電荷比 ( $m/z$ ) が飛行時間 ( $t$ ) の 2 乗に比例していることが分かる。ここで、 $e$  は単位電荷、 $u$  は原子質量単位、 $V$  は加速電圧、 $L$  はイオンの飛行距離 (飛行管の長さ) である。

$$m/z = (2eV/uL^2) \times t^2 \quad (1)$$

飛行時間が長い分子ほど質量電荷比は大きいということになる。原理的には飛行管の長さを延長すれば質量に検出上限は無く、実際に分子量数百～数百万の幅広い質量に対応した測定が可能であることが TOF-MS の最大の特徴である。

ところが TOF-MS の質量分解能は、二重収束質量分析計と比べると見劣りがする。イオン化の過程において、イオンの初期エネルギーのばらつきが無視できないほど大きいためである。式 (1) を飛行時間  $t$  について解くと、 $t = L(mu / 2ZeV)^{1/2}$  となるが、イオンに初期エネルギー  $U$  がある場合のイオンの飛行時間  $t'$  は、 $t' = L\{mu / 2(ZeV + U)\}^{1/2}$  となる。 $eV \gg U$  として 1 次近似を行うと、 $t / dt = 2eV / dU$  が得られる。一方、式 (1) から質量分解能  $R$  は  $R = m / dm = t / 2dt$  であるから、TOF-MS の質量分解能とイオンの初期エネルギーのばらつきの関係は次のようになる。

$$R = eV / dU \quad (2)$$

すなわち、いかにイオンの初期エネルギーのばらつきを抑制するかが、TOF-MS の最高分解能を規定する鍵となる。

最近の TOF-MS はイオン反射装置であるリフレクトロンを装備したものが多く、飛行距離を伸ばすと共にイオンの運動エネルギー誤差を相殺し、より高精度の分析が可能となっている。また、MALDI TOF-MS においては、マトリクスにレーザーを当てた直後の数十～数百 ns 間は加速電圧を印加せず、その後一斉に加速する遅延引き出し法 (DE: Delayed Extraction) でも初速度のばらつきを抑える事が可能である。いずれの方法においても 3～4 倍以上の質量分解能の向上が確認されており、イオンの初期エネルギーを揃えることの重要性を理解できる。

## 2. 研究の目的

元来、イオンの初期エネルギーのばらつきを抑制する方法としては、リフレクトロン法もしくは DE 法が用いられてきたが、本研究は、両法とは異なるコンセプトに基づいた手法を創出するものである。イオンの加速方向と逆勾配の高電場を印加することによって、イオンの初期エネルギーおよび初期位置を揃えることを実現し、その数 ns 程度の短時間後に高電場勾配を逆転させ、検出部に向かってイオンを一気に加速させるという手法である。

本研究は、広い質量範囲にわたって高い質

量分解能を有する質量分析装置の実現を目指したものである。TOF-MS が他の質量分析装置と比べて最も特徴的な点は、数百万という大きな質量の生体分子までもを検出できる点にあるが、本研究はその特性を活かしつつ、二重収束質量分析計に匹敵する高い質量分解能を有する TOF-MS 装置を目指したものである。プロテオミクス研究が対象としている生体分子は事実上無数にあり、特に大きな質量を持つ生体分子の構造・機能の解明が急務である。本研究によって提案される、電場勾配型イオン加速部を有する TOF-MS 装置が達成できる最高質量分解能、およびにその高い質量分解能を保ったまま測定可能な質量範囲を明らかにすることができたのならば、プロテオミクス研究にとどまらず、医療・薬品開発など幅広い分野に多大なインパクトを与えることができるものと期待される。

## 3. 研究の方法

電場勾配型イオン加速法の模式図を図 1 に示す。加速部は 3 枚の電極から成り、1 段目の Push Plate には 7777 V の高電圧パルス、2 段目の Grid 1 には 7000 V の高電圧パルスが印加され、3 段目の Grid 2 には 6222 V の直流高電圧が印加される。飛行管電位は 0 V に保たれる。イオン化された生体分子は、Push Plate と Grid 1 の電圧が 0 V である間に Push Plate と Grid 1 の間に流れ込み、Push Plate と Grid 1 の電位が上昇すると、イオンは飛行管に向かって加速され、自由飛行を行う。ここで、Push Plate と Grid 1 の電位が Grid 2 の電位である 6222 V を超えて初めて加速されるのであって、それまではイオンは Push Plate と Grid 1 の間に滞留されることになる。言うなれば、Grid 2 はイオンに対する防波堤としての役割を果たしており、侵入時のイオンのエネルギーと空間的位置を揃えることが出来るという意味合いから、先述の遅延引き出し法と同様の効果が得られると期待できる。

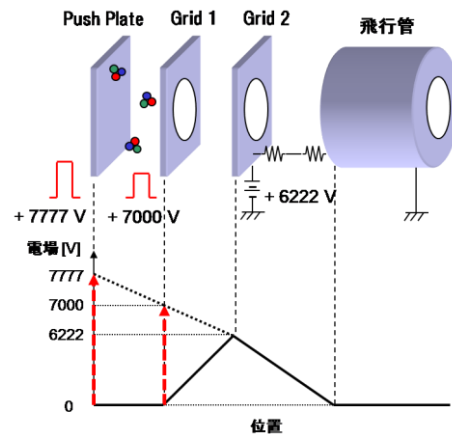


図 1. 電場勾配型イオン加速法の模式図

ただし、当該装置の元々の電位配置は異なっており、飛行管電位に負の高電圧-7000 Vが印加されており、Grid 2 に負の直流電圧-777 V、Grid 1 は 0 V であり、Push Plate のみに 777 V の電圧パルスが印加されていた。電場勾配型イオン加速法を実現するためには、先述のように飛行管電位を 0 V にし、Grid 2 に直流の高電圧を印加して Grid 1-2 間にポテンシャルの谷を形成させてやる必要があった。これらの電位配置の変更によって、飛行イオンの軌道に変化がないことを確かめるため、本研究では SIMION (Techscience Ltd.) を用いてイオン軌道のシミュレーションを行った。図 2 (a) は、元々の電位配置 (Push Plate: 777 V、Grid 1: 0 V、Grid 2: -777 V、飛行管: -7777 V) に対して、リゾチーム (分子量 14351 Da) の 10 価イオンを飛行させたときのシミュレーション結果である。図中左上の加速部から射出されたリゾチームイオンが右下のリフレクトロン部で反射され、検出器まで到達している様子が見られる。質量分解能としては  $R = 1229$  という値が得られた。一方、図 2 (b) は、実際にリゾチームを飛行させたときに得られた質量スペクトルである。最も強いピークが  $m/z = 1431$  に現れており、10 価のリゾチームイオンである。質量分解能としては  $R = 1406$  という値が得られており、シミュレーションと大差の無い値となっている。

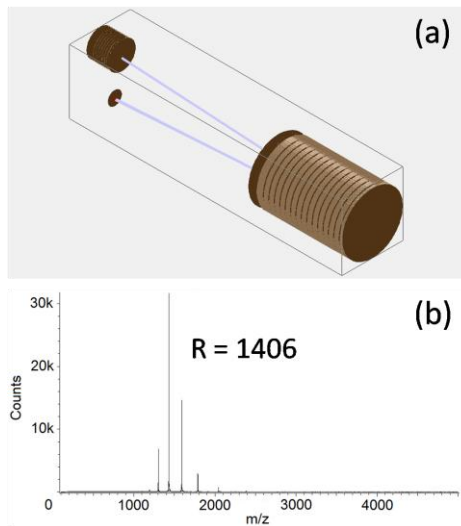


図 2. (a)イオン軌道シミュレーションの結果 (b)実験から得られたリゾチームの質量スペクトル

電位配置を変更して (Push Plate: 7777 V、Grid 1: 7000 V、Grid 2: 6222 V、飛行管: 0 V)、10 価のリゾチームイオンの軌道シミュレーションを行った。シミュレーション結果は図 2 (a)と同様になり、質量分解能は  $R = 1185$

となった。若干、質量分解能が劣化するという結果になったが、電位配置前後でイオンの軌道に変化が無いことを確認できた。

図 3 (a) は、Push Plate に印加する出力 7777 V の高電圧パルスである。当該パルスは、高圧プローブ (PPE20KV, 岩通計測株) を用いて測定した。立ち上がり時間 100 ns の高速応答を実現している。一方、立下り時間は 150  $\mu\text{s}$  であるが、リゾチームの飛行時間が 60  $\mu\text{s}$  程度であることを考えると、イオンの加速に悪影響が懸念される。そこで、パルス回路に改造を施し、図 3 (b) のように 30  $\mu\text{s}$  で立ち下がる高電圧パルスを得た。図 4 は、Push Plate に印加する電圧を 777 V から、改造後の高電圧パルス発生器を用いて 7777 V にポテンシャルリフトを行ったときのアンジオテンシン I (分子量 1296 Da) の質量スペクトルである。アンジオテンシン I の 3 価のスペクトルを拡大して表示してある。飛行時間がずれているのは、改造後に質量校正を行っていないためである。当該高電圧パルス発生器を用いることによって、カウント数が増大し、質量分解能も若干向上していることが確認できた。

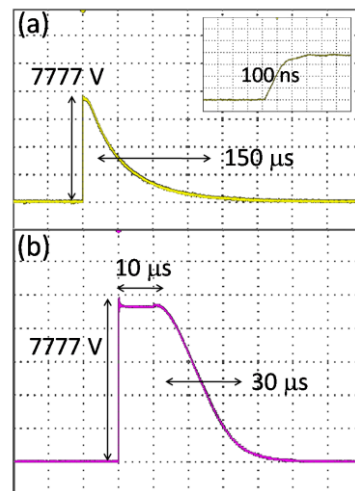


図 3. (a)改造前と (b)改造後の 7777 V 高電圧パルス。(挿入図) パルスの立ち上がり時間は 100 ns 程度である。

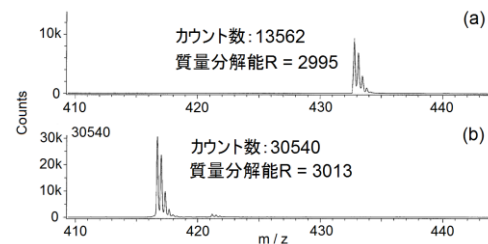


図 4. Push Plate の電位を (a)777 V から (b)7777 V にポテンシャルリフトしたときのアンジオテンシン I の質量スペクトル

図4 (b)はポテンシャルリフトを行ったときに得られたスペクトルであるが、そのときの電位配置は、Push Plate: 7777 V、Grid 1: 7000 V、Grid 2: 0 V、飛行管: 0Vであった。本来、電場勾配型イオン加速法を実現するためには、Grid 2に6222 V DCの高電圧を印加しておく必要があるが、そうすると実際には飛行するイオンの数が劇的に減少してしまう。Grid 2の電位を変化させていったときのアンジオテンシン Iのカウント数と質量分解能を表1にまとめた。

表1. Grid 2の電位とカウント数の関係

Grid 2 電位	カウント数	質量分解能
0 V	40930	3673
1000 V	27219	3764
2000 V	8716	4773
3000 V	1646	4361

Grid 2の電位を上げるに従って、カウント数が劇的に減少することが確認できる。質量分解能は一時的に向上しているが、単なる統計的有利性によるものと思われる。現在のところ、カウント数が激減する理由として、Grid 2を高電位に保持しているため、分子イオンが加速部に侵入できなくなっていることが考えられる。電場勾配型イオン加速法を実現するためには、Grid 2に高電圧を印加し、Push Plate-Grid 1間にイオンを滞留させておくことが必須である。解決策としては、Grid 2の電位もパルス的に駆動させてやるのが考えられる。Grid 2の電位が0 Vである間は、分子イオンは連続的にPush Plate-Grid 1間に流入して行くので、加速する直前にGrid 2の電位を上昇させてイオンの初期エネルギーおよび初期位置を揃えてやり、Push PlateとGrid 1の電位を上昇させてイオンの飛行を行った後、Grid 2の電位を下降させて0 Vにしてやれば、イオンは再びPush Plate-Grid 1間に流入することができる。加速直前にGrid 2の電位を上昇させると、Push Plate-Grid 1間に滞留していたイオンが加速部から漏れ出てしまうと危惧されるが、イオンの侵入口にはアパーチャーが設置されており、一度加速部に侵入したイオンが漏れ出ることとはほとんど無い。電場勾配型イオン加速法を実現するためには、高電圧をパルス的に発生させる高速半導体スイッチ(80万円程度)がもう1台必要である。

#### 4. 研究成果

蛋白質などの生体分子の高感度同定を可能にしており、多分野に渡って広く用いられている TOF-MS 装置について、より高い質量決定精度を実現するため、電場勾配型イオン加速法を提案した。当該手法は、イオンの加速方向と逆勾配の高電場を印加することに

より、イオンの初期エネルギーおよび初期位置を強制的に揃えてやり、短時間後に高電場勾配を逆転させ、検出器に向かってイオンを一気に加速飛行させるという手法である。MALDI TOF-MSにおいて既に実用化されている遅延引き出し法が質量分解能の向上に貢献していることから、当該手法の有用性が理解できる。本研究により得られた成果は以下の通りである。

(1) 電場勾配型イオン加速法を実現するためには、加速電位のポテンシャルリフトを行う必要があるが、イオン軌道シミュレータを用い、電位配置変更の前後でイオンの軌道に変化がないことを確認した。

(2) イオン加速に対する影響を抑えるため、高電圧パルス素早く下降させる必要があったが、パルス回路に改造を施し、立下り時間を1/5に縮小させた。当該改造により、良好な質量スペクトルが得られることを確認した。

(3) 電場勾配型イオン加速法を実現するためには、イオンに対する防波堤としての役割を持つ Grid 2 電位もパルス的に駆動させてやる必要があることが分かった。生体分子イオンが Push Plate-Grid 1 間に流入した後、Grid 2の電位をパルス的に上昇させてイオンの初期エネルギーおよび初期位置を揃えてやり、イオンが加速飛行すると、Grid 2の電位を再び0 Vまで下降させてやれば良い。

TOF-MSは食品検査、薬剤開発、犯罪捜査など、利用分野が多岐に渡っており、枚挙に暇がない。本研究において電場勾配型イオン加速法の有用性を定量的に評価するには至らなかったが、実現させるための道筋を得た。当該手法は、国内外を問わず、精密計測分野にインパクトを与え得ると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

全 伸幸 (NOBUYUKI ZEN)

独立行政法人産業技術総合研究所・

計測フロンティア研究部門・特別研究員

研究者番号: 20455439

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者