

九州大学中央分析センター

センター
ニュース

34

平成 3 年 9 月

目 次

分析機器解説シリーズ (3 3)	2
レーザー蒸発法と多光子イオン化法の組み合わせによる 生体試料の質量分析センター	
中央分析センター (筑紫地区) 装置利用経費表	11
中央分析センター工学分室 (箱崎地区) 装置利用経費表	12
お知らせ	13

分析機器解説シリーズ (33)

レーザー蒸発法と多光子イオン化法の組み合わせ による生体試料の質量分析

機能物質科学研究所 関 谷 博

【序】種々のイオン化法と質量分析計を組み合わせることによって、大質量の分子の分析が試みられてきた。質量数の大きな分子は、一般的に蒸気圧が低いために試料を高温に加熱しないと高濃度が得られない。しかしながら、高温に熱すると、特に生体試料はしばしば分解してしまう。試料の熱分解を防ぎながら試料を蒸発させることが、多くの分子に質量分析法を適用するためには不可欠の条件である。大分子量の試料を蒸発させイオン化させる方法には、(1)高速原子衝撃 (fast atom electron bombardment ; FAB), (2)分子二次イオン質量分析 (secondary ion mass spectrometry ; SIMS), (3) ^{252}Cf プラズマ脱離 (plasma desorption ; ^{252}Cf -PD), (4)直接レーザー脱離 (laser desorption ; LD) などの種々の方法がある。これらのイオン化法については、日本語の詳しい解説書が出版されている。筆者が現在留学中のミュンヘン工科大学物理化学研究所の Schlag と Grotemeyer らのグループは、固体試料やマトリックス状態の試料に赤外レーザー (CO_2 レーザー、波長 $10.6\ \mu\text{m}$) またはUVレーザー (YAG レーザー、波長 $266\ \text{nm}$) をパルス照射し、大質量の分子を分解させることなしに蒸発させ、これを多光子イオン化させることによってイオンを高感度で検出することに成功している。光イオン化法として多光子イオン化法を用いると、特定の分子を選択的にイオン化できるとともに、イオンのフラグメンテーションの度合を制御できるので、高感度分析だけでなく、分子の構造決定にも適用が可能である。Grotemeyer らはレーザー蒸発法と多光子イオン化分光法を結合させたイオン化法を LEIM - MUPI (laser evaporation of intact molecules - multiphoton ionization) と呼んでいる。ここでは LEIM - MUPI 法の原理と応用例について紹介したい。

【装置】図1に装置図を示す。装置は希ガス (He または Ar) を噴出させるノズル部、試料マウント、試料を気化させるレーザー、気化した分子をイオン化させるUV レーザー、時間飛行型 (TOF) 質量分析計から成っている。図2には典型的な実験条件を示した。パルスノズルから Ar ガスが噴出され、レーザー光によって試料が蒸発される。この場合、電気的に中性の親分子だけが蒸発することが望ましいが、中性のフラグメントが生じることを避けることは困難である。蒸発した分子は希ガスと混合する過程で並進、振動、回転エネルギーが冷却される。分子が特に低温に冷却されている噴流の中心部を取り出すためにはスキマーを用いる。スキマーを通過した分子は、UV レーザーによって多光子イオン化される。分子イオンは電場によって加速され、逆電場によって反射された後、チャンネルプレートによって検出される。電気信号はデジタル化

された後、コンピューター処理される。パルスレーザーの繰り返し周波数は2 - 5Hz であり、レーザーの集光位置などの装置の最適条件を見いだした後は、わずか数分で測定が完了する。

質量分析計としては、四重極質量分析計、イオンサイクロトロン共鳴質量分析計、TOF 質量分析計があるが、TOF 質量分析計は質量分解能が特に優れているので、Schlag 研究室では全ての装置に TOF 質量分析計が用いられている。

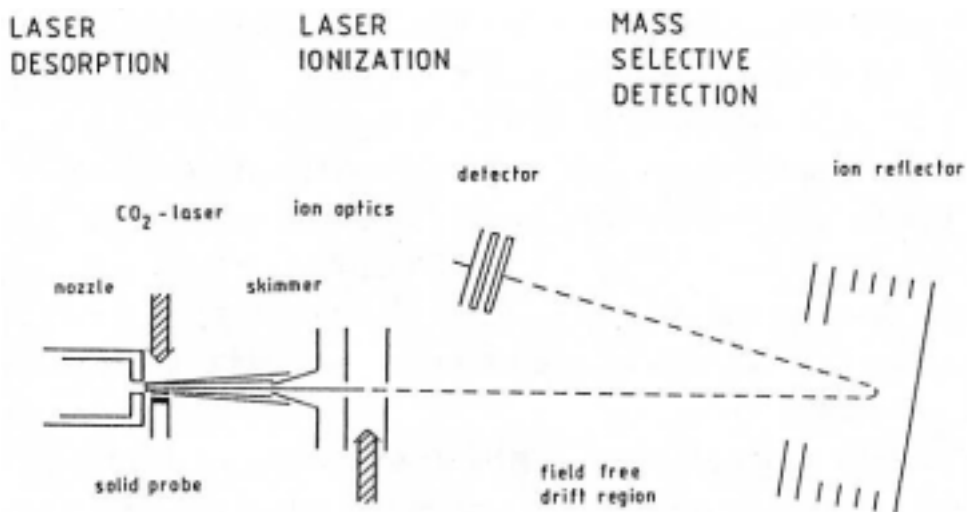


図1 レーザー蒸発 - 多光子イオン化質量分析計の装置図

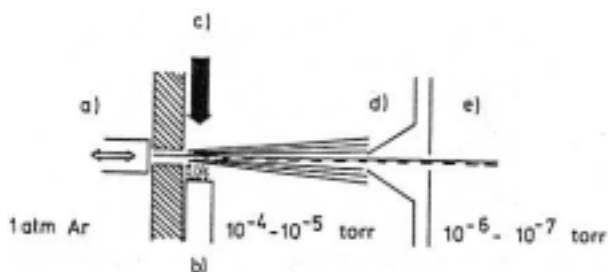


図2 典型的な実験条件、(a)パルスノズル；(b)試料マウント；
(c)IR レーザービーム；(d)スキマー；(e)イオン源

【多光子イオン化の原理】

レーザー蒸発法の生体試料への応用は Kistemaker らによってなされているので、Grotemeyer らの研究の特徴は、レーザーによる蒸発とイオン化を同時に行わずに、Schlag 研究室において長年に渡って開発されてきた多光子イオン化 (MUPI) 分光法をレーザー蒸発法と組み合わせた点にあるといえる。

MUPI の原理を図 3a に示す。高エネルギーの光を用いる直接イオン化と異なり、MUPI においては分子の中間的な励起状態を経てイオン化が進行する。この過程は次のようにまとめられる。

- (1) 分子の発色団が光子を吸収する。
- (2) 光子のエネルギーの和が分子のイオン化エネルギーを越える。
- (3) 電子的中間状態の寿命はポンピングの過程で分子が解離するほど長くはない。

多光子励起の有利な点は分子を段階的に活性化できる点である。一般的には、分子が光を吸収する確率は非常に小さい。しかし、分子の電子状態のエネルギー差に光子のエネルギーが一致する場合には確率が著しく増加する。図 3b、3c、3d は分子の励起状態において光イオン化を妨げるプロセスである。3b は蛍光による励起状態の減衰、3c は項間交差による減衰、3d は中性分子の解離を示している。

図 4 に MUPI における 3 種類の異なった吸収の過程を示している。A)、B) は実在の中間状態を経てイオン化が生じる場合、C) は仮想の中間状態を経てイオン化が生じる場合である。C) の場合はかなり強い光を用いなければならない。

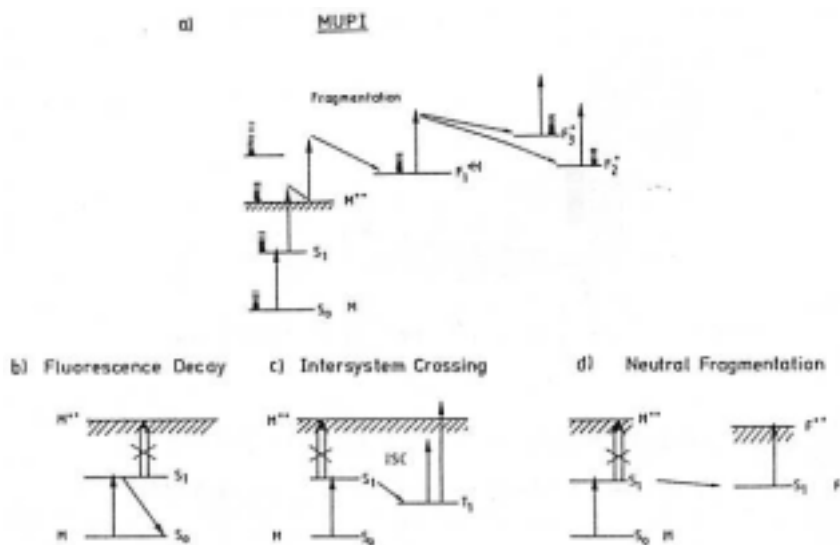


図 3 (a) 多光子イオン化とフラグメントの生成； (b) 蛍光がイオン化を妨げる場合；
 (c) 項間交差 (S₁ から T₁ への無輻射過程) がイオン化を妨げる場合； (d) 励起状態 S₁ における親分子の解離がイオン化を妨げる場合

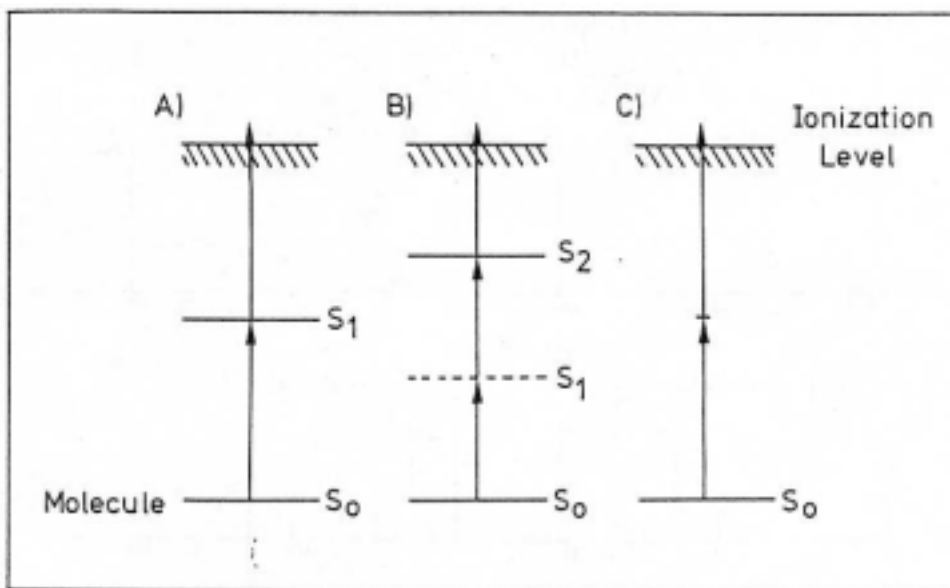


図4 多光子イオン化における吸収のスキーム。A、Bにおいては実在の準位が中間状態であるが、Cにおいては仮想の中間状態を経てイオン化が生じる。

【測定例】

(1) トリプトファン (tryptophan)

図5に2920 nmのレーザー光によるトリプトファンのMUPPIマスペクトルを示した。UVレーザーの強度が非常に弱い ($I = 5 \times 10^4 \text{ W/cm}^2$) 場合 (A) には、親分子イオンのみが観測されている。レーザー強度が増加するにつれてフラグメントイオンの数と強度が増加する。図5Fは70eVの電子衝撃によるスペクトルである。図5Fでは親分子イオンの強度が非常に小さい。電子衝撃によるスペクトルはレーザー強度が非常に大きい場合 (E) のスペクトルに類似している。このように、レーザー多光子イオン化を用いると、イオン化レーザーの強度を変化させることによってフラグメンテーションの度合を制御できる。

(2) N - アセチル - アンギオテンシン - (N - acetyl-angiotensin-)

図6にFAB、 ^{252}Cf - PDとMUPPIによるマスペクトルを示した。FABと ^{252}Cf - PDにおいてはプロトンが親分子イオン(1338質量単位)に付加したバンドが強く観測されている。 ^{252}Cf - PDによるイオン化においては、フラグメントの強度が弱い。一方FABによるスペクトルにおいては、多くのフラグメントが観測されているが、イオン化効率を上げるために用いた

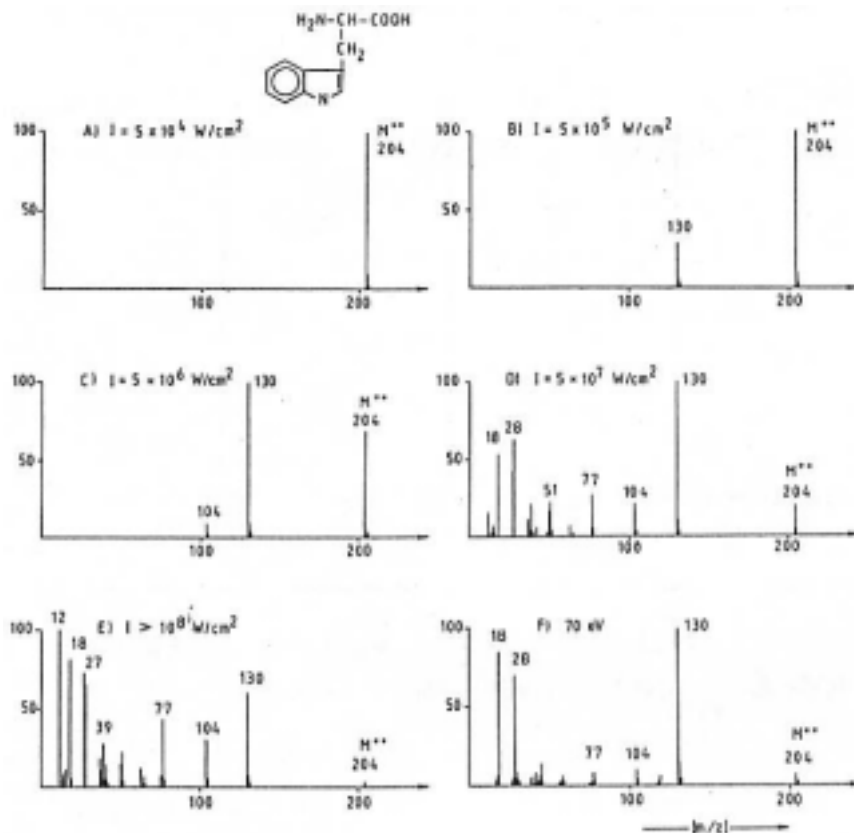


図5 トリプトファンの多光子イオン化マススペクトル、AからEの順にイオン化レーザーの強度を増大させている。Fは電子衝撃イオン化によるマススペクトルである。

マトリックスの影響によるバンドが多く出現し重なりあっている。これに対して、MUPi スペクトルにおいては、構造決定に必要なフラグメントが適当に観測されている。

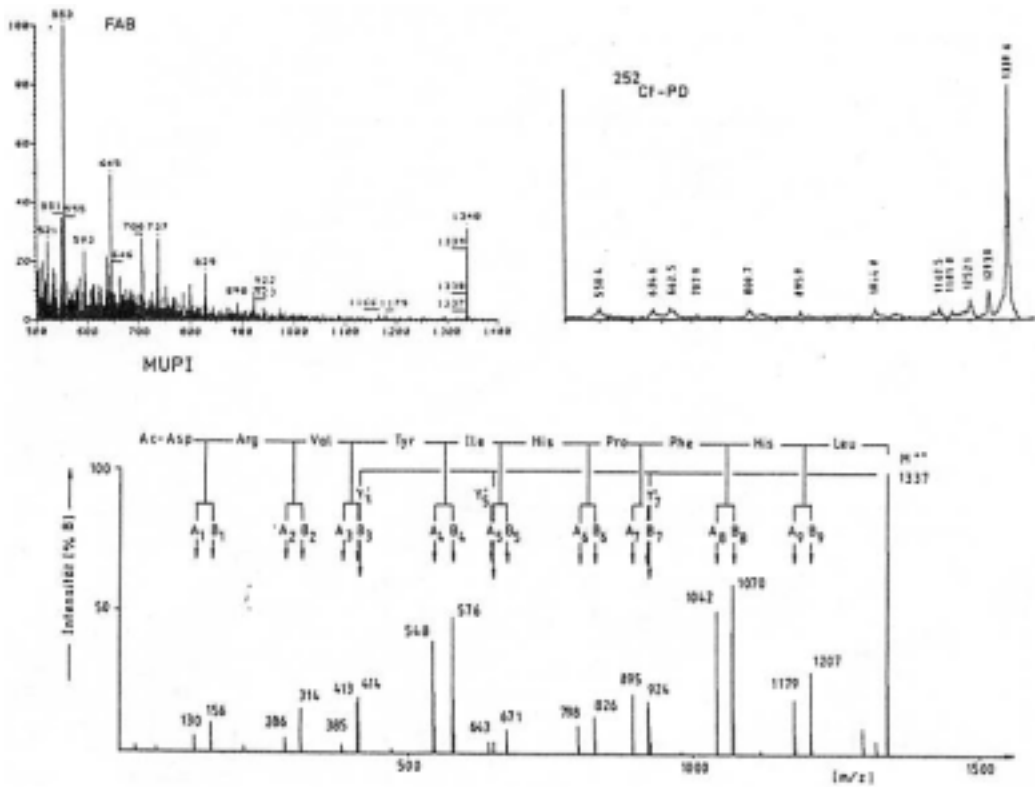


図6 N - アセチル - アンギオテンシン - のマススペクトル ;
FAB、²⁵²Cf - PD と MUPI の比較

(3) 図7にペンタガストリン (pentagastrin) ペプチドのMUPI マススペクトルを示した。レーザー強度が弱い場合には、質量767の親分子イオンが非常に強く観測されている。レーザー強度が強い場合には、ペプチド鎖のN末端から開裂したYイオンが最も強く観測される。また、多くのフラグメントが観測されている。これらのフラグメントはペプチド結合と深く関係している。Roepstorffらの提唱により、N末端のフラグメントの場合にはA、B、C、C末端のフラグメントの場合には、X、Y、Zと表示されている(スキーム)。AタイプとBタイプのフラグメントは、質量604、586、489、358、172、および101に観測されている。これらのイオンのシークエンスの他にA、Bタイプと対になるY'フラグメントが質量数666と410に観測されている。

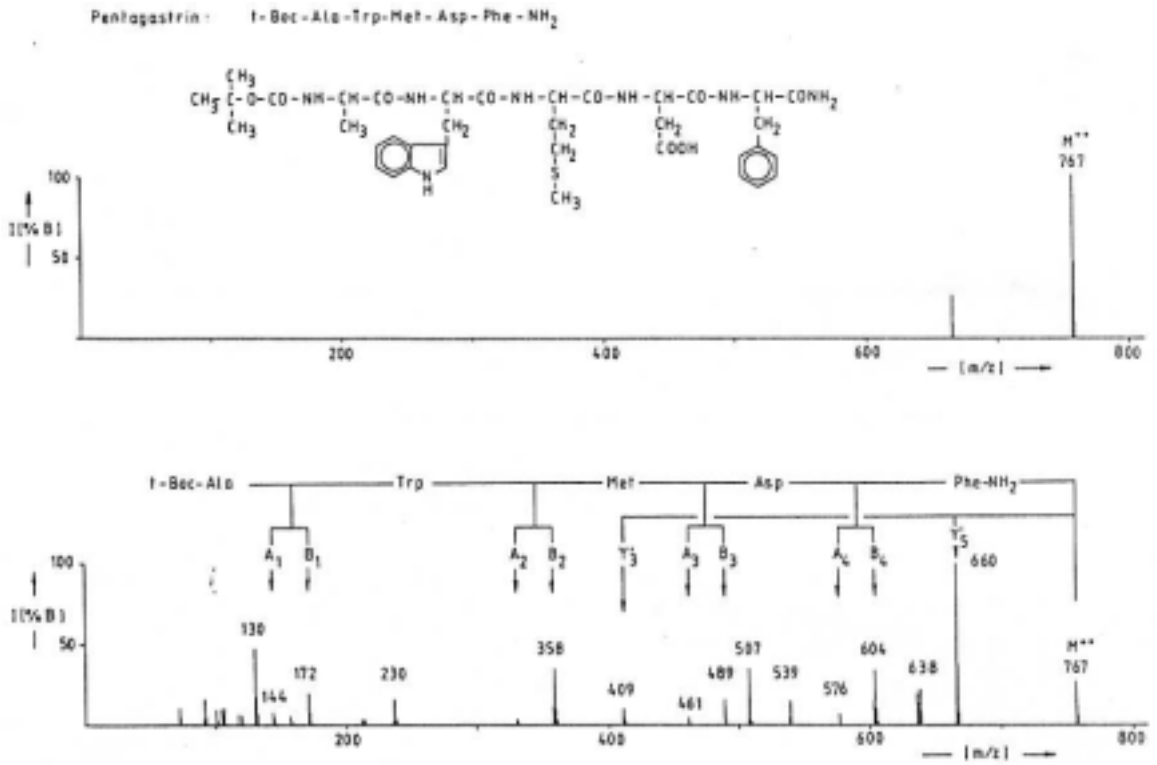
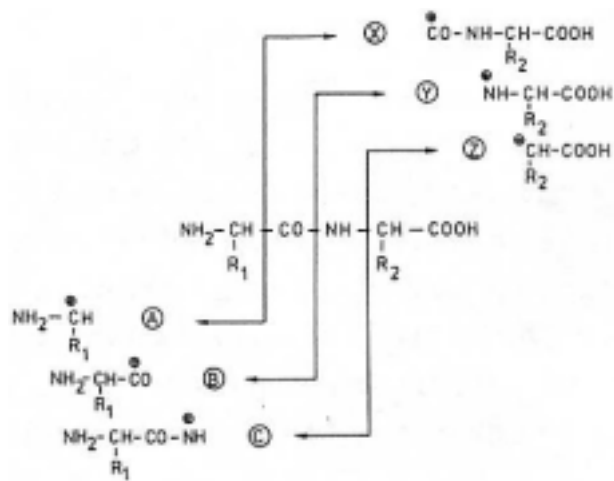


図7 ペンタガストリンのMUII マススペクトル



スキーム

(4) 図8にサブスタンスP (substance P) を幾分強いレーザー強度で多光子イオン化した場合のスペクトルを示す。ここでは、フェニルアラニンの π 遷移を勃起するように 2681 のレーザー光を用いてイオン化している。図8においては、(Bn)⁺タイプのアシリウム (acylium) イオンの完全な組が観測されている。これらのバンドからシーケンスが明白に推定された。また、アンギオテンシンの場合と同様にアシルイミニウム (acyliminium) イオン (An)⁺ が観測されている。(Bn)⁺ と (An)⁺ シーケンスの質量差は 28 であるので、帰属の正しさが確認できる。10 の位置のアミノ酸がロイシンではなくイソロイシンであることは、質量 1171 のアシリミニウムイオンから質量 42 を除いた質量 1129 のフラグメントが観測されていることに基づいている。

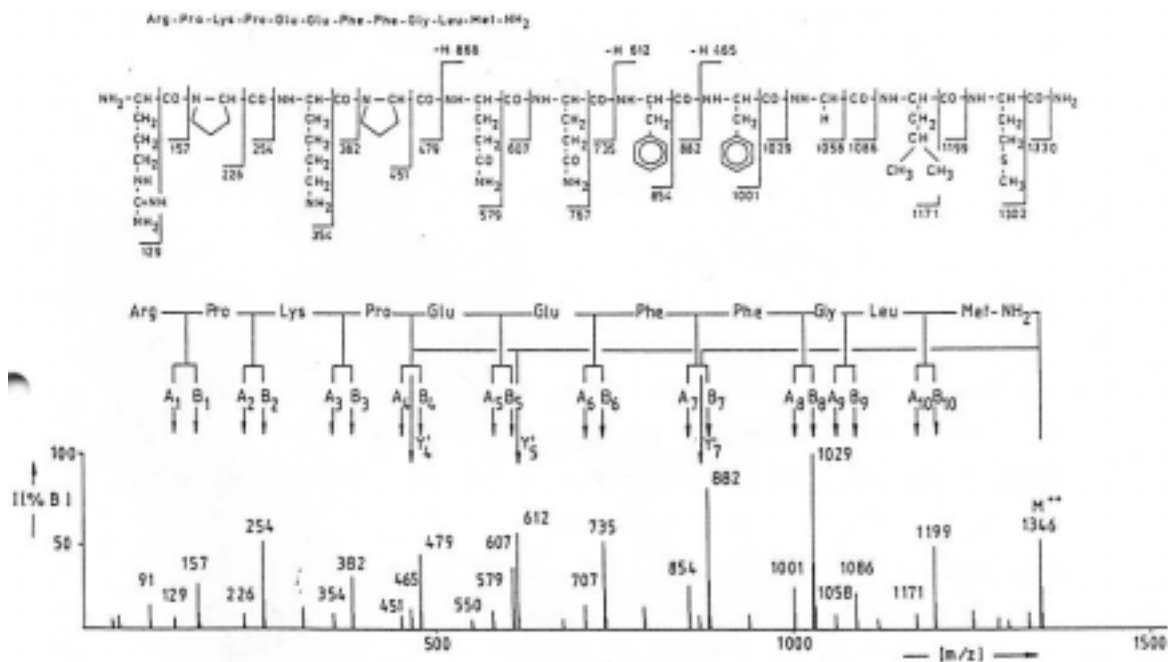


図8 substance P の MUPI マススペクトル

【ま と め】

レーザー蒸発法と多光子イオン化法を組み合わせた質量分析法 (LEIM - MUPI) の原理と生体試料への応用について簡単に紹介した。生化学、医学、薬学、工業的目的のために、種々の質量分析法が開発されている。より大きな質量の分子を分析できるかどうかという点において、現時点では LEIM - MUPI 法よりもすぐれたイオン化法が考案されている。LEIM - MUPI を他のイオン化法と比較した場合、すでに述べたように、LEIM - MUPI の特徴は励起波長を変えることによって分子を選択的に励起できる点と、レーザー強度を変化させることによって、フラグメント化の度合を制御できる点にある。後者の特徴は試料の構造決定にとって極めて重要である。LEIM - MUPI 法をどれだけ大きな質量の分子に適用できるかについては、TOF 質量分析計を用いる場合には理論的には限界はない。現在、LEIM - MUPI 法で検出できる最大質量は 6000 程度である。レーザーパルスの時間幅を小さくし、チャンネルトロン of 応答時間を短くすることによって、更に大きな分子への適用が可能と考えられる。Grote Meyer のグループでは、イオン化用の UV レーザーをナノ (10^{-9}) 秒からフェムト (10^{-14}) に代えることによって、装置の性能の飛躍的向上を目指している。近い将来、質量数が数万を越える生体分子が観測されることが期待される。

最後に、LEIM - MUPI が、あらゆる分子に適用できる訳ではないことを述べておきたい。レーザーによって蒸発しにくい試料が多く存在する。赤外レーザーや UV レーザーによる蒸発の機構については十分解明されていない。今後、LEIM - MUPI 法をより多くの試料に適用するためには、蒸発の機構を解明することによって、試料に応じて適切な光源を見いだすことが重要と考えられる。

文 献

- 1) J. Grote Meyer, E. W. Schlag, *Angew, Chem. Int. Ed. Engl.*, 27, 447 (1988)
- 2) J. Grote Meyer, E. W. Schlag, *Acc. Chem. Res.*, 22, 399 (1989)
- 3) 土屋正彦、大橋 守、上野民夫編 “質量分析法の新展開” 現代化学・増刊 15, 東京化学同人 (1988)
- 4) H. R. Morris 編, P. G. Kistemaker, G. J. Q. Van der Peijl, J. Haverkamp, “Soft Ionization Biological Mass Spectrometry”, Heydon, London (1981)

中央分析センター（筑紫地区）装置利用経費表

No.	装置名	利用経費(円)				備考
		A		B		
		1件当り	1時間当り	1件当り	1時間当り	
1	*エスカスキャンニングオージェ表面分析装置	4,000	3,000			件数 + 時間
2	走査電子顕微鏡	2,000		1,000		+ 200 円/写真 1 枚
3	蛍光 X 線分析装置			1,000		
4	エネルギー分散型 X 線回折計	2,000		1,000		件数又は日
5	* 4 軸型自動 X 線回折計	10,000				1 日
6	島津 X 線回折計			500		
7	集中法粉末 X 線回折計	2,000	2,000	1,000	1,000	
8	Weissenberg カメラ	2,000		1,000		
9	X 線小角散乱装置			4,000		
10	* 質量分析計 (JEOL-OISG-2 型)					LM の解析は m/e 1500 データ解析の場合は以下の 経費を加算 2,000 円/ピーク 2,000 円/ピーク 5,000 円/ピーク
		(1) LM(m/e < 800)		5,000		
		(2) LM(m/e 800)		10,000		
		(3) GC-LM		8,000		
		(4) HM		8,000		
		(5) GC-HM		15,000		
11	電子スピン共鳴装置	1,500		500		
12	* 超伝導核磁気共鳴装置	2,000	6,000			1 件は 20 分以内。 20 分増すごとに 2,000 円追加
13	核磁気共鳴吸収装置 (JNM-PHX60 型)			500		
14	* 核磁気共鳴吸収装置 (JNM-FX-100 型)		3,000			試料は依頼者が調整
15	* 多核種用 FT 型 NMR (JNM-FX-100 型)		3,000			試料は依頼者が調整
16	自記分光光度計			500		
17	赤外分光光度計 (IR-440 型)			500		チャート 1 枚
18	赤外分光光度計 (5670 型)			700		チャート 1 枚
19	回折格子遠赤外分光光度計			500		
20	分光蛍光光度計				300	
21	フーリエ変換赤外分光時計			5,000		+ 100 円/チャート
22	* 原子吸光・炎光発光・分光分析装置		1,200			原子吸光は光源が限られる
23	* C, H, N 元素分析計	550 900 350				C, H C, H, N N
24	* 電子式精密自動天秤	300				
25	超高压物性測定装置			10,000	1,000	1 件は 2 週間以内
26	示差走査熱量計			1,000	500	標準型
				1,500	1,000	低温型
27	双子型恒温壁熱量計				800	
28	メスバウアー分光分析装置			5,000		件数又は日
29	誘電率測定装置				1,000	
30	汎用型滴定記録装置			500		
31	雰囲気中液体急冷装置			5,000		ノズル持参
32						
33	* 単結晶育成炉	10,000				1 日
34	高周波 2 極スパッタ装置	2,000		1,000		
35	動的粘弾性測定装置			1,000		+ 液体室素実費
36	ラバープレス	1,000		500		1 回
37	* 水銀圧入式ポロシメーター	1,000				
39	熱分析装置			500		

- (1) 上記経費表中、A 欄は担当オペレーターに依頼、B 欄は依頼者が装置を利用した場合の経費を示します。
(2) 上記経費表中の * 印は、担当オペレーターが操作する装置で依頼者は操作できません。
(3) 利用時間は 1 時間単位で計算します。

中央分析センター工学分室（箱崎地区）

装置利用経費表（その1）

No.	装置名	利用経費(円)				備考
		A		B		
		1件当り	1時間当り	1件当り	1時間当り	
1	核磁気共鳴吸収装置(R-24B)	1,000			700	
2	*核磁気共鳴吸収装置(R-600)	2,000				
3	核磁気共鳴吸収装置(R-90H)	1,000		700		
4	*超伝導核磁気共鳴吸収装置 (JNM-GSX400)	2,000				基本料金 2,000円 温度変化1点につき400円加算 長時間測定 3,500円
5	*超伝導核磁気共鳴吸収装置 (Bruker AC-250P)	2,000				長時間測定 3,500円 温度変化400円/点(高温) 1,000円/点(低温)
6	ガスクロマトグラフ質量分析計	3,000		1,000		チャート2m以上の場合は A:1,000円/m, B:500円/mを加算
7	高速液体クロマトグラフ				400	
8	X線回折計	1,500	1,500		500	
9	X線発生装置	1,500	1,500		500	
10	走査型電子顕微鏡(MSM-6)	2,000		1,000		200円/写真1枚
11	走査型電子顕微鏡(ABT-32) (WET-SEM)	2,000			1,000	フィルム代は別料金
12	超高分解能走査型電子顕微鏡	20,000				
13	*透過型電子顕微鏡	4,000				
14	*イオンコーティング装置		200			
15	イオンコーティング装置			200		
16	*イオンシニング装置	2,000				
17	フーリエ変換赤外分光光度計	1,500		500		Nujol法 KBr法 溶液法 ATR法 注1件についての 測定時間が1時間を 超える場合は1時間 につき1件とみなし て件数を加算する
		2,500		1,000		
18	二波長分光光度計		500		250	
19	分光けい光光度計	700			300	
20	レーザーラマン分光光度計	1,500			1,000	
21	円二色分散計				500	
22	誘導結合プラズマ質量分析装置					料金はセンターへお尋ね下さい
23	原子吸光分析装置	200		100		基本経費500円を加算 検量線作成500円/件
24	*発光分析装置	1,000				
25	熱天秤(TG-30)	1,000			500	
26	示差熱分析装置(DTA-30)	1,000			500	
27	示差走査熱量計	1,000			500	
28	双子型恒温壁熱量計	3,000			2,000	
29	金属中水素分析装置	600		300		校正 A:1,000円/回 B:600円/回
30	シンクログラフ				100	
31	シンクログラフ				100	チャート1m当り1時間 シンクロットは利用者負担
32	マイクロフォトメーター			50		チャート100円/mを加算
33	表面張力測定装置		600		300	
34	インピーダンス測定装置				100	
35	光透過式粒度分布測定器	1,000			500	
36	表面積測定装置	1,000			500	
37	精密天秤	300			100	

中央分析センター工学分室（箱崎地区）
装置利用経費表（その2）

No.	装 置 名	利 用 経 費 (円)				備 考
		A		B		
		1件当り	1時間当り	1件当り	1時間当り	
38	プラズマデポジション装置				1,000	
39	ガラスキャピラリー作成装置				1,000	単位時間は4時間とする
40	金属顕微鏡				100	フィルムは各自持参
41	電気炉				150	

- (1) 上記経費表中、A欄は担当オペレーターに依頼、B欄は依頼者が装置を利用した場合の経費を示します。
(2) 上記経費表中の*印は、担当オペレーターが操作する装置で依頼者は操作できません。
(3) 利用時間は1時間単位で計算します。

お知らせ

1) 平成3年度一般設備費として、微粒子径測定解析システムが認められました。これは光散乱光度計とレーザー粒径解析システムとからなり、溶媒中に分散された最小3nmから最大100μmまでの広い範囲にわたる微粒子径の測定並びその分布解析、さらに微粒子構成成分の分子量測定およびその分散解析を行う装置です。システムは筑紫地区に11月に設置予定です。

2) 平成3年度教育研究学内特別経費として、材料強度試験機（島津オートグラフ AG-50KN E型）が認められました。

本装置は3日に中央分析センター工学分室（箱崎地区）に設置予定です。

3) ICP-MS用標準溶液について

分析センターでは、下記の3種の標準溶液を用意しています。必要な方はセンター工学分室事務室（内線 箱崎5973）までご連絡下さい。

元 素 数 : 31 元素

Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Cs, Fe, Ga, Hg,
In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, V, Zn, Th, U

濃 度 : 10ppm 均一

ベース溶液 : 5% HNO₃

元 素 数 : 13 元素

B, C, Ge, Mo, Nb, P, S, Si, Ta, Ti, W, Zr, Re

濃 度 : 10ppm 均一

ベース溶液 : H₂O / trace HF

元 素 数 : 10 元素

Au, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Sn, Te, Hf, Sb

濃 度 : 10ppm 均一

ベース溶液 : 10% HCl