

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法における 脱離・イオン化機構の解明研究

(首都大院・理工) ○山口惣大, 藤野竜也, 伊永隆史

【緒言】近年, マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI 法) は飛躍的な発展を遂げ, 現在最も高分子領域まで測定可能なイオン化法として, タンパク質解析や合成高分子の構造解析などに広く普及している。この MALDI 法のメカニズムとしては, レーザー照射後の系の温度上昇に伴い, 試料の脱離・イオン化が起こるとされており, これまで機構解明へ向け多くの研究が成されてきた。例えば, H. Ehring らの研究によれば有効なマトリックスは, 吸収した励起エネルギーの大部分を無輻射過程により緩和し, そのエネルギー散逸過程が脱離・イオン化機構に重要であるとしている[1]。しかし, 確立した機構モデルは未だ構築されておらず, さらには光励起後, どのようなダイナミクスにより熱が放出され, かつイオン化が起きるのかという実際の分子の時間スケールでの考察及びマススペクトルとの関連の議論をしていく研究はこれまで皆無であった。本研究では MALDI 機構解明を目的とし, 光励起後のマトリックス結晶の挙動の観測, 及び MALDI-TOF-MS スペクトルとの比較により脱離・イオン化機構の考察を行った。

【実験】マトリックス試料として, MALDI 法で典型的に用いられる THAP (2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン), CHCA (α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸), SA (シナピン酸), DHBA (2,5-ジヒドロキシ安息香酸), DAN (1,5-ジアミノナフタレン) を選出した。これらマトリックスの励起後の温度を見積もるため, ピコ秒チタンサファイア再生増幅システム (Spectra-Physics Spitfire, 2 ps, 1 kHz) からの倍波 (405 nm) 及び三倍波 (270 nm) を励起光として用い, マトリックス結晶からの近赤外発光 (0.6–1.6 μm) を分光後, 赤外線ディテクター (InGaAs) により観測した。同時に, マトリックス結晶の光励起後の蛍光緩和過程をフェムト秒アップコンバージョン法によって観測した。励起光は, Ti:Sapphire レーザー (Coherent Mira, 80 fs, 76 MHz) の倍波 (400 nm) を用い, 蛍光波長 520 nm で測定した。これら実験結果との比較考察のため, MALDI 法によるマススペクトルを本研究室で作成した飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) により測定した。測定試料は, MALDI 法質量校正物質として汎用される Substance P (分子量 1347.6) を用い, 励起光としては, Nd:YAG レーザー (NewWave Polaris ST, 4 ns, 10 Hz) の四倍波 (266 nm) を使用し, それぞれのマトリックスとの混晶に対し質量分析を行った。

【結果・考察】近年, レーザー照射後のマトリックス試料の温度上昇を, そこから発生する赤外光強度を観測することで見積もる試みが行われている[2]。これによると, マトリックス結晶の光励起後, 近赤外領域 (0.9–1.7 μm) の発光を黒体輻射発光とし, その強度から温度を見積もった結果, 約 1100 K までの温度上昇が観測された。この結果に加え本研究により得られた近赤外領域の発光スペクトルを解析する事で, 発光強度からのみの議論よりも詳細な考察が可能となると考えられる。近赤外発光スペクトル測定結果を図 1 に示す。観測されたスペクトルが黒体輻射発光によるものならば, 励起光波長及び励起光エネルギーの差によってその形状に変化が生じるはずである。しかし, スペクトルに変化は観測されなかった。この事から観測されたスペクトルは何らかの電子状態からの発光であると考えられ, 黒体輻射発光と仮定した議論はできないと結論した。

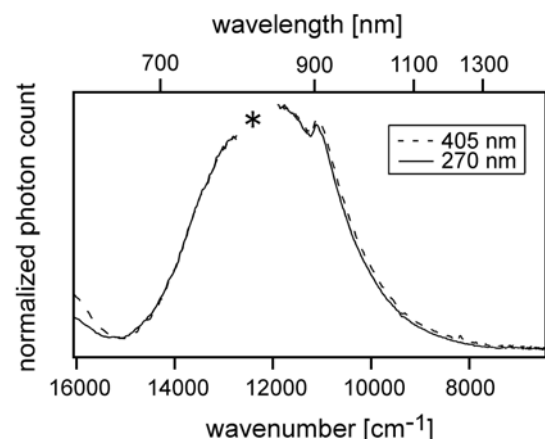


図1. THAP 結晶からの近赤外発光スペクトル
(励起光: 270 nm, 405 nm)

(* : Super Notch Filter により散乱光カット)

次に、マトリックス結晶の光励起後の蛍光緩和過程をフェムト秒アップコンバージョン法によって観測した。その結果、すべてのマトリックスが二成分による良いフィッティングを示した。THAP及び DAN の時間分解蛍光測定結果を図2に示す。観測された二成分は、それぞれ自由励起子と自己束縛励起子による緩和成分であると考えられ、自由励起子は結晶の二量化に伴い格子振動を誘起し自己束縛を起こす。この事から、自由励起子の緩和時間は、格子振動の誘起割合を反映していると考えられる。自由励起子からの発光寿命は、DAN < THAP < CHCA < SA < DHBA の順に観測された事から、この順に振動モードを強く誘起すると考えられる。

これら結果との比較考察のため、上記マトリックスを用い MALDI-TOF-MS 測定を行った。結果を図3に示す。異なるマトリックスを用いることで、それぞれ特徴的なマススペクトルが観測された。マトリックスイオン強度及び分子関連イオン強度のレーザーパワーに対する変化を図4に示す。選出したマトリックス中で、特に速い電子励起状態の緩和過程が観測された DAN 及び THAP を用いたマススペクトルにおいて最も強くマトリックスイオンが検出された。一方、分子関連イオンにおいては THAP, CHCA をそれぞれ用いた場合において順に強く検出された。

以上、電子励起状態の緩和時間と観測されたマトリックスイオン及び分子関連イオンにある程度の相関が得られたことから、マトリックス結晶の振動の誘起割合が脱離・イオン化機構において重要な要因になっている事が示唆される。つまり、MALDI 法の脱離・イオン化機構において、マトリックス結晶は光励起後、結晶の二量化に伴う非常に速い電子緩和 (< 10 ps) によって格子振動を誘起し、その後のエネルギー緩和過程において、エネルギー移動、脱離・イオン化といった一連の初期過程が起こっていると考えられる。また現在、それぞれのマトリックス結晶において時間分解ラマン測定を行っており、この結果により詳細なメカニズムの議論が可能になると考えている。

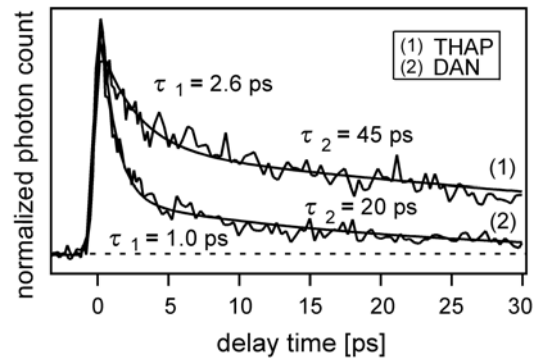


図2. THAP, DAN の時間分解蛍光測定結果

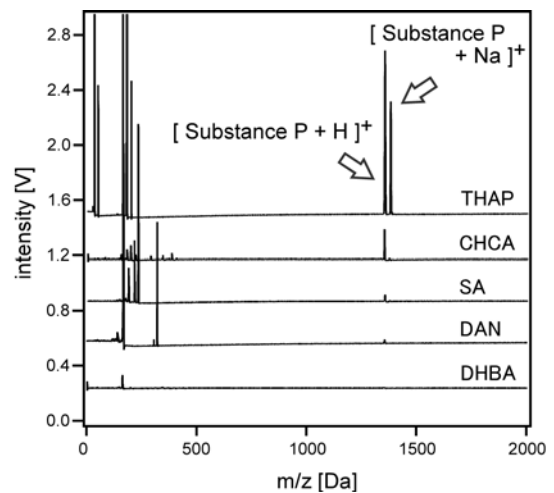


図3. MALDI-TOF-MS 測定結果
(測定試料: Substance P)
(pulse energy: 50 μJ)

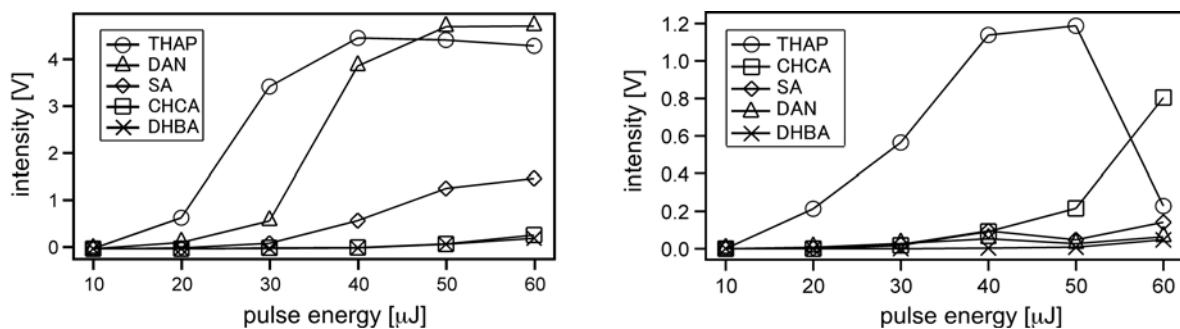


図4. レーザーパワーに対するイオン強度変化 (左図: マトリックスイオン, 右図: 分子関連イオン)

【参考文献】

- [1] H. Ehring and B. U. R. Sundqvist, *J. Mass Spectrom.* **30**, 1303 (1995)
- [2] Renato Zenobi et al., *J. Phys. Chem. A.* **108**, 2405-2410 (2004)