

ゼオライト内包マトリクスを用いた MALDI 法

(首都大院・理工¹、東工大資源研²) ○藤野竜也¹、小森雄介¹、嶋寿²、山下健一¹、杉浦健一¹、野村淳子²、橋本健朗¹

【序】マトリクス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析法は、試料を壊さずソフトにイオン化できるため、重要な分析手法の一つとなっている。MALDI 法は近年生体試料分析においてその重要性が増しているが、生体試料中に含まれるアルカリ金属イオンの付加によりプロトン付加体のイオン強度が激減するという問題点がある。また用いるマトリクス分子の解裂により約 500Da 以下の領域は解析が困難であり、低分子量試料には不得手という問題点がある。これらの問題点の解決のため我々はゼオライトに注目し研究を行った。ゼオライトは結晶性アルミノ珪酸塩でありナノサイズの空間と珪素-酸素-アルミの橋型構造による強いブレンステッド酸性水酸基を持つ。我々はゼオライト細孔内にマトリクス分子を吸着させ、これを新たに MALDI 用のマトリクスとして用いた。これによりマトリクス分子の解裂反応が抑制され MALDI 法を低分子量試料に適用できることが示されただけでなく、試料分子(ペプチド)のプロトン付加体のピーク強度が著しく増大する結果を得たので報告する。

【実験】典型的な有機マトリクス分子の一つである 2,4,6 トリヒドロキシアセトフェノン (THAP) をゼオライト表面に二種類の方法にて導入した。①無水溶媒に溶かした THAP を、排気処理を施したゼオライト(HM20, HY5.6)に導入した。②排気処理を施さないゼオライトと THAP を乳鉢中で混合させた。これら二種類の方法にて用意されたものを“ゼオライトマトリクス”としてモデルペプチドの MALDI 質量分析を行った。ゼオライトと THAP の吸着構造は拡散反射測定、in-situ の FT-IR 測定と量子化学計算により決定した。またゼオライトマトリクスによるプロトン化の過程を THAP 分子の励起状態量子化学計算により考察した。

【結果と考察】初めに排気処理を施したゼオライトに THAP を導入したゼオライトマトリクス(THAP/HM20(e))の拡散反射スペクトルを観測した。比較として固体の THAP の拡散反射スペクトル及び溶液中での THAP 分子の吸収スペクトルも測定したところ、ゼオライトマトリクス(THAP/HM20(e))の拡散反射スペクトルは溶液中での THAP 分子の吸収スペクトルと似ており、このことから THAP 分子はゼオライト細孔中に単分散された形で存在していることが分かった。

次にゼオライトマトリクスの in-situ の FT-IR 測定を行った結果を図 1 に示した。THAP の吸着により $\sim 3000\text{cm}^{-1}$ 付近に非常にブロードなピークが現れ、これは THAP と水素結合したゼオライトの酸性水酸基と帰属した。量子化学計算によると分子内水素結合を形成している THAP の水酸基(OH(3))

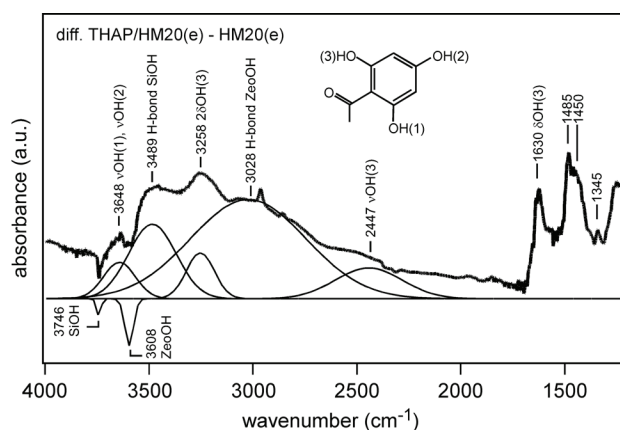


図 1 ゼオライトマトリクス(THAP/HM20(e))の in-situ FT-IR スペクトル

が吸着サイトであり、その伸縮振動は $\sim 2450\text{ cm}^{-1}$ 付近に観測されているピークに帰属された。図2にモデルペプチド(SubP)のMALDIマススペクトルを示した。ゼオライトマトリクス(THAP/HM20(e))を用いた場合500Da以下の領域では従来のマススペクトル(図2(a))と比較して、THAPにプロトンが付加したピークのみが観測され、フラグメントピークやアルカリ金属イオンが付加したピークは一切観測されなかった(図2(b))。同様に試料ピークもプロトン化したペプチドのみが観測された。さらにはペプチドのピーク強度が約7倍増加した。このような傾向は他の方法により調製したゼオライトマトリクスを用いた場合でも観測された。図2(c)に排気処理を施さずゼオライトとTHAPの混合によって調製したゼオライトマトリクス(THAP/HM20(ne))を用いて測定したペプチドのMALDIマススペクトルを示した。それによると排気処理の場合と同様にプロトン化したTHAP及びペプチドのピークのみが観測されたが、その強度はTHAPで2倍、ペプチドに関しては2.2倍まで増強した。FT-IR測定により確認したところ、排気処理をしないゼオライトの表面は大気中の水分子で覆われている。以上の結果はゼオライト表面上に存在する水分子がTHAPとペプチドのプロトン化を触媒していることを示していると考えられる。これらの実験結果を踏まえてプロトン化の経路を励起状態の量子化学計算により考察した(図3)。

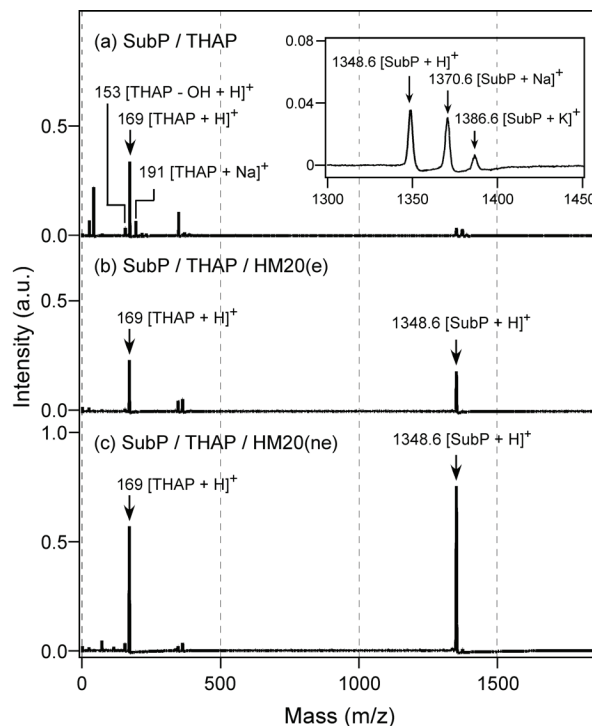


図2 ゼオライトマトリクスを用いたペプチドのMALDIマススペクトル

それによると排気処理の場合と同様にプロトン化したTHAP及びペプチドのピークのみが観測されたが、その強度はTHAPで2倍、ペプチドに関しては2.2倍まで増強した。FT-IR測定により確認したところ、排気処理をしないゼオライトの表面は大気中の水分子で覆われている。以上の結果はゼオライト表面上に存在する水分子がTHAPとペプチドのプロトン化を触媒していることを示していると考えられる。これらの実験結果を踏まえてプロトン化の経路を励起状態の量子化学計算により考察した(図3)。

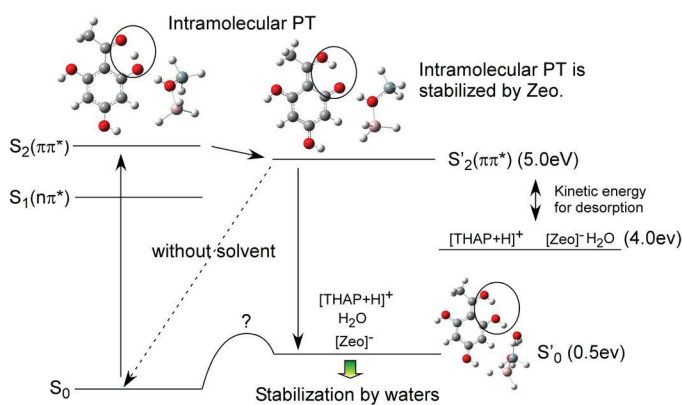


図3 プロトン化のメカニズム

励起速度の計算から本実験の条件下ではTHAPは約18.25nsに一回励起されることが分かり、多光子過程によるイオン生成[THAP]⁺の後、プロトンが付加するというメカニズムは否定される。生成した錯体は関与する水分子の数が増えることによって安定化が進む。従って図2のスペクトルの強度の違いは安定化に関与する水分子の数の違いと理解される。