

マトリクス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法における

脱離イオン化過程の再考察

(首都大院理工) 村上和雅, 藤野竜也, 松本淳, 城丸春夫, 橋本健朗

Mechanisms in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

(Tokyo Metropolitan University) Kazumasa Murakami, Tatsuya Fujino, Jun Matsumoto, Haruo Shiromaru, Kenro Hashimoto

【序】ペプチドやタンパク等生体関連物質に代表される難揮発性分子のイオン化法として、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)がある。MALDI法は主に飛行時間型の質量分析装置と組み合わせられ、分子量を観測する手法として幅広く利用されているが、生体関連分子を気相中に生成させて分光等の基礎研究を行う上でも極めて有効な手法となる。MALDI法にはイオン化と脱離といった重要な二つのプロセスがある。イオン化に関しては、(1)マトリクス分子の多光子イオン化が重要とする Ehring らによる光化学イオン化モデル、(2)エレクトロスプレーイオン化法と同様の過程でイオン化が行われるとする Karas らによるクラスターイオン化モデル、(3)マトリクスと試料の混合の過程でプロトンが移動した錯体が形成されるとする Chang らによる偽プロトン移動モデルが提案されている¹⁾。しかしながら、このように広く知られているモデルのすべてが、マスペクトルだけをもとに議論を行っているため、化学的根拠に乏しい。また一般的に用いられているマトリクス分子について、なぜこのマトリクスが機能するのか、という根本的な問いには答えられていない。一方、脱離過程に関しては特定のモデルはこれまで無く、照射レーザーによって蓄えられた熱による膨張や揮発といったイメージが一般に認識されているにとどまっていたが、最近我々が行った MALDI 法を模擬したモデル系での研究により、結晶中に生じる励起子の消滅に伴う振動エネルギーの伝搬が、脱離に関与していることが理解された²⁾。

今回我々は、MALDI法の脱離イオン化のメカニズムを、マトリクス分子の構造、電子励起、試料分子の役割、振動エネルギーの伝搬といった考え方から再考察を行ったので報告する。

【実験】2,4,6 トリヒドロキシアセトフェノン(THAP)、ジヒドロキシ安息香酸(DHBA)、及び水酸基の位置の違う誘導体をマトリクスとして用い、モデルペプチドのプロトン付加イオンを観測した。マトリクスと試料それぞれを体積比7:3のアセトニトリル-水混合溶媒に溶解し、59.5 mM、72.4 μ Mの溶液を調整した。マトリクス及び試料溶液を1 μ Lづつ測りとり、ステンレス基板上に滴下し溶媒を揮発させ、混合結晶を得た。結晶からのイオンの測定には市販の質量分析装置(waters, 337 nm)及び、二光波のナノ秒ポンプ・プローブ質量分析法が可能な自作の質量分析装置(266 nm, 1064 nm)を用いた。

【結果と考察】各種マトリクス分子における誘導体を用いた実験から、分子内水素結合を持つ σ -OH 基の存在がマトリクスのイオン化には必須であることが分かった(図1)。プロトン供与基

と受容基を分子内に持つ分子(A)は、電子励起状態において分子内プロトン移動反応(A*→T*)を起こすことが知られている³⁾。アセチルサリチル酸等、分子内水素結合を持つ分子の気相における研究では、分子内電荷分離した T 状態は、電子基底状態で安定に存在できず、バリアレスに T→A と緩和することが知られている。しかしながら実際の MALDI 質量スペクトル上では、電子基底状態の[matrix+H]⁺イオンが観測されているため、分子内電荷分離した状態を安定化させる機構が必要である。

我々は、電子基底状態において[matrix+H]⁺イオンの存在を安定化させるものとして試料分子の存在に注目した。近赤外光ポンプ、紫外光プローブのナノ秒時間分解質量分析法を行った結果、ペプチドなど双極子モーメントの値が大きい試料を用いた場合には近赤外励起によるプロトン付加

体のピーク増強が確認されたが、無極性試料を用いた場合では、試料のピーク自体が観測されなかった。これは、MALDI 法が主に試料とする難揮発性分子の持つ大きな双極子モーメントにより、マトリクス分子及びプロトン化したマトリクス分子の存在が電子基底状態で安定化されることを意味していると考えた。またプロトン付加体を生成するためのプロトン源は溶媒分子であることを、重水を用いた実験より確認してある。

これまでに行った脱離過程の考察も含めると、MALDI 過程の詳細を以下のように考察することができた。(1) レーザーの励起波長に吸光係数を持ち、試料に対し存在量が圧倒的に多いマトリクス分子が励起光を吸収する。(2) マトリクス結晶中を自由励起子が伝搬する(<5ps)。その後、双極子モーメントの値が大きい試料近傍に存在し、試料により安定化されているマトリクス分子に励起が局在化する。(4) 試料近傍のマトリクス分子内で電子励起状態分子内プロトン移動が起き、分子内電荷分離を起こしたマトリクスに溶媒からプロトンが供給される。(5) 電子緩和により生じた振動余剰エネルギーによりマトリクス - 試料間のバリアを越え試料にプロトンが付加する。(~3ps)。(6) 最初の光励起によって生じた (マトリクスのイオン化に関与しない) 励起子が消滅することによって生じる振動エネルギーが MALDI 結晶中を伝搬し、マトリクス - 試料間の振動が多量子励起され、脱離が行われる(~100ps)。

【参考文献】 1) Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27, 427., Karas, M.; Glückmann, M.; Schafer, J. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 1., Chang, W. C.; Huang, L. C. L.; Wang, Y.-S.; Peng, W.-P.; Chang, H. C.; Hsu, N. Y.; Yang, W. B.; Chen, C. H. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 582, 1. 2) Minegishi Y.; Morimoto D.; Matsumoto J.; Shiromaru H.; Hashimoto K., Fujino T. *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116, 3059. 3) Douhal A.; Lahmani F.; Zewail A.H. *Chem. Phys.* **1996**, 478, 477.

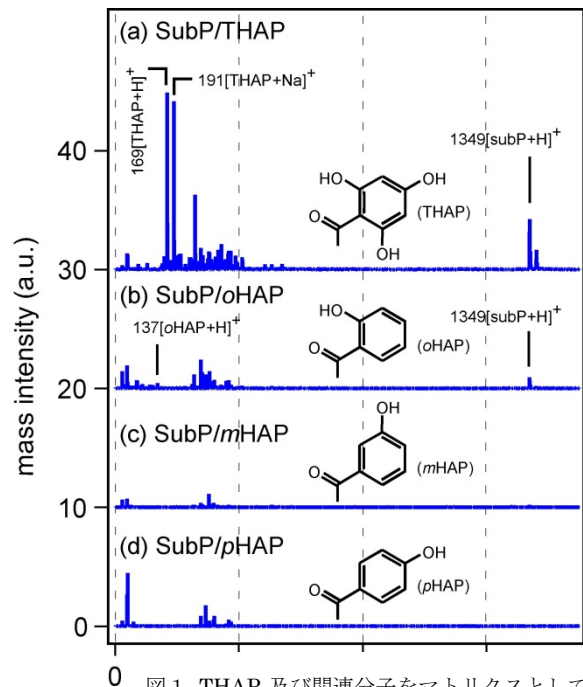


図1 THAP 及び関連分子をマトリクスとして用いた際のペプチドのマススペクトル