

1P019

フェムト秒レーザーイオン化による MALDI プルーム中の中性種の検出

(新潟薬科大学¹, 新潟大学²) ○城田起郎^{1,2}, 彦坂泰正², 副島浩一², 星名賢之助¹

Detection of neutral species in the MALDI plume by femtosecond laser ionization

(Niigata Univ. Pharmacy & Appl. Life Sciences¹, Niigata Univ.²) ○Tatsuro Shirota^{1,2},
Yasumasa Hikosaka², Kouichi Soejima², Kennosuke Hoshina¹

【序】MALDI-TOF-MS法は、タンパク質に代表される大質量数の不揮発性分子をレーザー照射により非破壊的に気化・イオン化し、その質量を特定する高感度分析手法である。MALDI法では、試料分子(A)とマトリックス剤(M)を混合結晶化させ、UV ナノ秒レーザー光を照射することでプロトン化された試料[A+H]⁺をイオン信号を得る。この[A+H]⁺生成は、プロトン化マトリックス[M+H]⁺から試料Aへのプロトン移動が主たる過程であると考えられているが、信号強度を定量的に評価する方法が確立されていない点が、分析手法としてのMALDI法における現在の課題でもある。

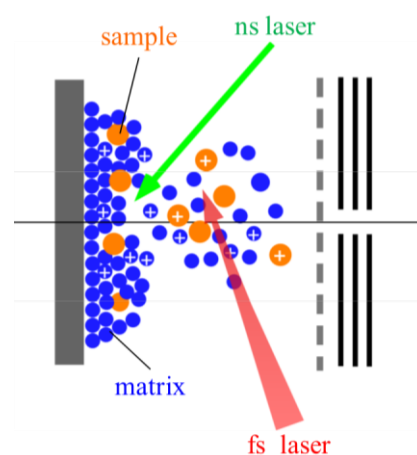
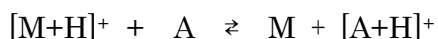


図1：実験概略図

これまで我々のグループでは、試料濃度とMALDI信号強度を結びつけるために(1)式に基づいたアミノ酸のMALDI信号の評価を行ってきた[1].

$$\ln \frac{AH^+}{MH^+} = \ln \left(\frac{A}{M} \right) - \frac{GB(M) - GB(A)}{RT} \dots \quad (1)$$

ここで、GB(M)とGB(A)は、それぞれMとAの気相塩基性度、Tはプルーム中の温度を表し、レーザー蒸発注(プルーム)内で進行するプロトン移動過程、



が熱平衡状態に達していると仮定することにより導出される。ここで、(1)式において、中性分子の濃度比A/Mが実験的には決まらなが、レーザー脱離された分子のうち、イオン化される割合は $10^{-5} \sim 10^{-3}$ と見積られている[2]ことに基づき、A/Mを試料調製時の初濃度比(A/M)₀で近似する、すなわち(A/M) ≈ (A/M)₀と置き換えることで、低濃度におけるMALDI信号が(1)式に従うことが実証された[1]。しかし、高濃度領域では、多くのアミノ酸で(1)式におけるln(A/M)₀とln(AH⁺/MH⁺)の線形関係が負の方向へずれることが見出された。その要因として、(a) (A/M) ≈ (A/M)₀の近似が適用できない、(b) プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に達していないこと、が指摘されていた。そこで本研究では、この2つのうち(a)の可能性を検証することを目的に、プルーム内中性分子種比A/Mを実験的に求めること

を目指した。そのために、図1概念図に示すように MALDI プルーム内にフェムト秒レーザーを照射し、プルーム内の中性分子を断片化抑制したイオン化検出を試みた。

【実験】独自の MALDI-TOF-MS システムを製作し、MALDI プルーム中へのレーザー照射を可能とした、試料には phenylalanine (Phe), マトリックス剤 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)を用いた。MALDI 用ナノ秒レーザーには YAG レーザーの第三高調波 (355 nm, 10 ns) を用い、これに同期したフェムト秒レーザー (800nm, 100fs, 10Hz, 0.8mJ/pulse, $1 \times 10^{14} \text{W/cm}^2$) を約 $20 \mu\text{s}$ の遅延時間をおいて MALDI プルーム (試料から約 2 mm) に集光し、生成したイオン種を TOF スペクトルとして検出した。

【結果と考察】図2は、ナノ秒レーザー照射 ($t = 0$) により MALDI 過程を誘起し、さらに MALDI プルーム中へのフェムト秒レーザー照射 ($t = 20 \mu\text{s}$) をした結果得られたスペクトルである。TOF が $20 \mu\text{s}$ までは、通常の MALDI スペクトルに相当し、プロトン化信号である $[\text{DHB}+\text{H}]^+$ (155)、 $[\text{Phe}+\text{H}]^+$ (166) が検出された。TOF が $20 \mu\text{s}$ 以降の強い信号が MALDI プルーム中へのフェムト秒レーザー照射により生成したイオン種の信号である。 H^+ 、 C^{2+} 、 C^+ などの低質量側の強いピーク群は、試料が DHB のみでも観測されることから、DHB のフェムト秒レーザーイオン化に伴うフラグメントイオンである。30 μs 以降に着目すると、分子イオンである DHB^+ (154)は明確に観測されたが、 Phe^+ (165)の信号は非常に弱く定量的な評価には使えない。その代わりに、Phe の側鎖である R^+ ($=\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^+$) (91) がはっきりと観測された。そこで、中性分子種比の指標として、 R^+/DHB^+ を採用した。図3は、試料混合比 Phe/DHB に対して観測した中性分子種比 R^+/DHB^+ を両対数プロットしたものである。関係は、 $(\text{Phe}/\text{DHB})_0$ 比が高い領域においても一定であり、 $(A/M) \approx (A/M)_0$ の近似は適用できる。すなわち、高濃度領域における (1) 式からの逸脱は、序で述べた(a)が主要因ではなく、プルームが熱平衡状態に達していないことが示唆され、それは $(A/M)_0$ の増加に伴う結晶の不均一さに由来するものと考えられる。

[1] Tsuge,Hoshina,Bull.Chem.Soc.Jpn.83, 1188(2010). [2] Kraus,Chem.Rev.103,395(2003).

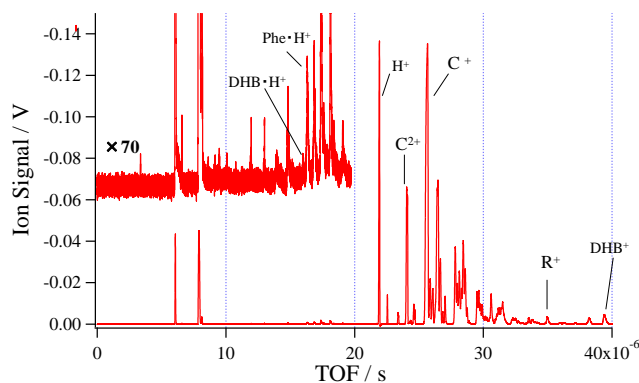


図2 : Phe-DHB 混合結晶の MALDI-TOF スペクトル

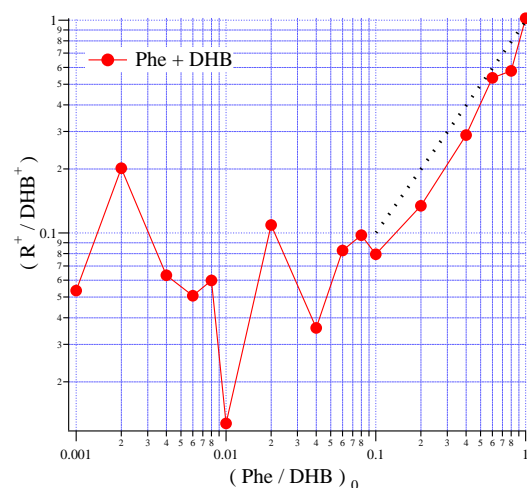


図3 : 試料混合比Phe / DHBに対する観測した中性分子種比 $\text{R}^+ / \text{DHB}^+$ の両対数プロット