

近赤外フェムト秒レーザーイオン化を用いた
MALDI イオン生成機構に関する研究

氏名 城田 起郎

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程
環境科学専攻

目 次

第 1 章 序論	1
1-1 MALDI 法における現状と課題	1
1-2 MALDI 機構の解釈と定量	2
1-3 プロトン移動反応の熱平衡を仮定したモデル	6
参考文献	11
第 2 章 MALDI プルーム中の中性分子種の検出	15
2-1 概要	15
2-2 MALDI-fs MS 装置の開発	16
2-2-1 MALDI-fs-MS 装置	16
2-2-2 レーザー光源	17
2-2-3 MALDI 混合結晶の作製	18
2-3 MALDI/MALDI-fs スペクトル	19
2-4 MALDI プルームの膨張速度	25
2-5 MALDI プルーム中の中性分子種比	28
2-5-1 中性分子種比の評価	28
2-5-2 fs laser 照射タイミングによる変化	28
2-5-3 脱離レーザーショット数による変化	29
2-5-4 混合結晶からの脱離効率	33
参考文献	38
第 3 章 準熱平衡を仮定した MALDI モデル構築と数値シミュレーション	39
3-1 概要	39
3-2 数値シミュレーション	40
3-2-1 熱平衡モデル	40
3-2-1 準熱平衡モデル	41
3-3 MALDI 信号強度比の再現によるパラメーター値の決定	42
3-4 パラメーター値の評価	48
3-4-1 MALDI プルーム中のイオン種	48
3-4-2 実効温度	54
3-4-3 熱平衡到達度	56
参考文献	67
第 4 章 結論	69
参考文献	71
本研究に関する掲載論文	72
謝辞	73

第1章 序論

1-1 MALDI 法における現状と課題

2000 年代前半に、ヒトゲノム計画により、ヒトゲノムの塩基配列は全て解読されたが、これは塩基配列が決定されたに過ぎず、総合的に生命活動の仕組みを解明するためには、遺伝子の機能だけでなくタンパク質等の構造や機能を明らかにする必要がある。タンパク質の構造や機能を対象とした研究のことをプロテオーム解析と呼ぶが、この研究においては、タンパク質の質量を同定することは重要である。タンパク質を対象とした質量分析を行う場合には、試料を気化しイオン化することが必要である。一方で、タンパク質などの生体分子は、不揮発性で熱的に不安定な高分子であるため、イオン化には高いエネルギーが必要であり、試料に直接レーザーを照射しイオン化させるレーザー脱離イオン化法(Laser Desorption Ionization : LDI)を用いると、気化したとしても分解してしまう。これにより、従来 LDI 法は、タンパク質のイオン化には不向きであるとされていた。ところが、1980 年代後半に、田中氏らは、グリセロールとコバルトの混合物をレーザーによるエネルギーの緩衝材としてタンパク質と混合しレーザー照射することで、タンパク質を壊さずに脱離イオン化できることを報告した[1.1]。また、これとほぼ同時期に、Karas らによって、マトリックス剤と呼ばれる低分子化合物をエネルギー緩衝材としてタンパク質等と混合し、試料を壊さずレーザー脱離イオン化させる手法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization : MALDI) 法が報告された[1.2]。MALDI 法によりイオン化された試料は、飛行時間型質量分析計(Time-of-Flight Mass Spectrometer : TOF-MS)と組み合わせて用いることで、発生したイオンを高感度に検出できる。この手法は MALDI-MS 法と呼ばれている。MALDI-MS 法の利点には、①熱に不安定な不揮発性高分子をソフトにイオン化検出できること、②測定可能な質量範囲が広いこと、③測定が迅速であること、④主に一価イオンが生成する為、解析作業が容易であること、などが挙げられる。生体

由来試料は、純度が低く極微量しか得られない試料が多いことから、MALDI-MS 法は、現在においても広く用いられており、特に生命科学分野への寄与は大きい。一方、MALDI-MS 法は、不揮発性高分子などの定性分析手法としては確立しているが、開発されてから 25 年以上経過した現在においても、そのイオン生成メカニズムの全貌は未だ明確に解明されておらず、定量分析手法としての使用は困難である。この原因として、MALDI 過程が凝集相から気相への相転移とそれに伴う反応過程を含んでいることが挙げられる。MALDI 法の「イオン生成メカニズムの解明」は、「定量分析の実現」と同意義ではないが、「定量分析の実現」のための通過点であるため、イオン生成メカニズムが解明されていない現在においては、MALDI 信号強度と試料濃度を結びつける高精度な定量分析は、時期尚早であると著者は考えている。仮に、MALDI 法を用いた定量分析手法が確立すれば、MALDI 法の利点である迅速さや試料の純度に対する許容範囲の広さ、感度の高さを活かして、新たなフィールドでの応用が見込める。また、イオン生成メカニズムが解明されることにより、試料イオンの生成効率が高いマトリックス剤の開発にも寄与する可能性がある。これにより、現在の手法では検出できない生体由来試料に含まれる極微量の未知のタンパク質等を発見できる可能性があり、未知のタンパク質の発見により、病気のメカニズム解明や、これに伴う医薬品の開発など、定性分析の面においても、さらなる発展が期待できる。よって、MALDI 法におけるイオン生成メカニズムを解明することには重要な意義がある。

1-2 MALDI 機構の解釈と定量

MALDI 法は、試料基盤上に、試料(A)と光吸収性のマトリックス剤(M)の混合結晶を作製し、結晶に紫外レーザー光を照射する。このとき、マトリックス剤は、効率的に紫外レーザー光を吸収し、レーザー光の光エネルギーは熱エネルギーへと変換され、結晶の温度は急激に上昇し、結晶中のマトリックス剤や試料は非破壊的に脱離され、MALDI

ブルームと呼ばれる高密度蒸発注を形成する。この過程において、結晶中の試料は、マトリックス剤とともに非破壊的にイオン化され、主にプロトン化試料 AH^+ 、脱プロトン化試料 $(A-H)^-$ として検出される。また、マトリックス剤も試料と同様にプロトン化マトリックス MH^+ 、脱プロトン化マトリックス $(M-H)^-$ として検出される。

マトリックス剤のイオン生成過程については、主に次の(I)～(IV)のような見解が提唱されている。

(I) Autoprotolysis

次式のように、2 つのマトリックス剤同士のプロトンの授受により、マトリックスイオンが生成するという見解である[1.3]。

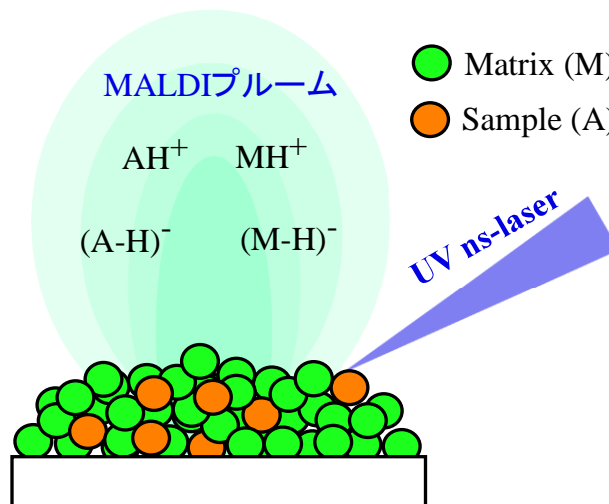


図 1-1 : MALDI 法による試料のイオン化



上記の反応は、混合結晶の固相表面上の極性液体中で起こることを支持している polar fluid model が提唱されているが、このモデルは、Autoprotolysis の一部とみなすことができる[1.4, 1.5]。

(II) Performed ion emission

マトリックス剤や試料の一部が溶液中で既にイオン種 MH^+ 、 $(M-H)^-$ 、 AH^+ 、 $(A-H)^-$ として存在しており、溶媒蒸発後も混合結晶中にイオン種が残っており、レーザー照射により、そのまま放出されるという見解である[1.3, 1.6]。結果的に、Autoprotolysis の一部とみなすこともできる。

(III) Exciton pooling

レーザー照射により、固相の混合結晶中に与えられた光子エネルギーが蓄積され、

3 つ以上の励起子が、特定のマトリックス分子に局在化し、マトリックス分子が励起、イオン化され M^+ を生成し、その後、 MH^+ が生成されるという見解である[1.7, 1.8]。一方で、Ni らのグループは、時間分解蛍光測定により、マトリックス剤の 2,5-DHB と THAP に波長 355nm のレーザー光を照射した場合のそれぞれの励起状態寿命とレーザー強度の関係を調べた。この実験により、2,5-DHB の励起状態寿命は、レーザー強度の増加とともに減少するが、THAP の励起状態寿命は、レーザー強度の影響を受けないことがわかった。これにより、マトリックス剤によっては、 MH^+ の生成に Exciton pooling がほとんど関与していないことが示され、この見解には、疑問が投げかけられている[1.9]。

(IV) Multiphoton ionization

マトリックス剤が多光子吸収することで M^+ が生成され、その後 MH^+ が生成される可能性がある[1.3, 1.10, 1.11]。現在汎用されているマトリックス剤の多くのイオン化エネルギーは、単体の場合 8 eV 以上である。よって、波長 337 nm のレーザー光の 1 光子のエネルギーは、3.68 eV であるため、マトリックスイオン M^+ を生成させるには、最低 3 光子以上の吸収が必要である[1.11]。しかしながら、例えば、汎用されているマトリックス剤である 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) のイオン化エネルギーは、単体では、8.05 eV であるが、2 量体の場合は、7.22 eV、4 量体の場合は、6.76 eV となり、クラスターを形成すると低下することから、2 光子の吸収で M^+ が発生しているという主張もある[1.12, 1.13]。

以上のように、 MH^+ の生成過程は確定できる実験的証拠がなく、さまざまな議論があるが、いずれにしても MH^+ が何らかの過程で生成していることには疑う余地がない。

次に、一般に MALDI 法において試料の同定に用いる AH^+ の MALDI イオン生成メカニズムに関する主なモデルについて述べる。

① Proton Transfer Model

MALDI 混合結晶へのレーザー光照射により、結晶が昇温・脱離し、MALDI プルーム

が形成される。この MALDI プルーム内で、反応(1-1)により、2 つ又は 2 量体のマトリックス剤から、 MH^+ 、 $(\text{M}-\text{H})^-$ が生成する。その後、生成した MH^+ 、 $(\text{M}-\text{H})^-$ とプルーム中の中性分子種 A のプロトン移動反応(1-2)、(1-3)により、 AH^+ 、 $(\text{A}-\text{H})^-$ が生成されるというモデルである[1.3, 1.11]。

MH^+ 、 $(\text{M}-\text{H})^-$ が生成される過程は一次イオン化過程、 AH^+ 、 $(\text{A}-\text{H})^-$ が生成される過程は、二次イオン化過程と呼ばれている。このモデルは、現在においても広く支持されており、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達していると仮定するモデル（熱平衡モデル）に基づいた検証が行われている。

② Lucky Survivor Model

一般的に試料調製の際にトリフルオロ酢酸(TFA) 等の酸を添加するが、この酸により(II)で述べた *performed ion* が MALDI 混合結晶中に生成される可能性がある。この *performed ion* が、レーザー照射により混合結晶から周囲のマトリックス分子とともに脱離する。その際に、正の *performed ion* の周辺には負イオンや電子が存在するため、正の *performed ion* は、これらと衝突すると中性化してしまう。この Lucky Survivor Model とは、正の *performed ion* から周囲のマトリックス分子が全て脱離し AH^+ が生成し、周辺の負イオンや電子と衝突せずに検出器に到達するというモデルである[1.14]。

③ Coupled Physical and Chemical Dynamics (CPCD) Model

Exciton pooling などの光化学過程とレーザー脱離による光物理過程を考慮し、MALDI 過程に含まれるあらゆるパラメーターを用いて、イオン生成等を再現するものである[1.15]。そして、速度論的に、経時的な M^+ や MH^+ 、 AH^+ の生成を数値シミュレーションする。

一見、上記の反応は、MALDI イオン生成メカニズムを合理的に説明しているように見えるが、これらの反応が、固相、液相、気相のどこで起こっているのか、その他の反応の影響はないのか、そもそも MH^+ はどのように生成されているのか等さまざまな議

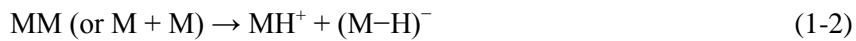
論があり、未だレーザー照射からイオン検出までの一連の過程を合理的に説明できるものはない。しかしながら、 AH^+ 、 $(A-H)^-$ の生成過程には、さまざまな議論があるものの、マトリックス剤と試料の熱的プロトン移動反応である平衡反応が、主過程であるという認識が多く研究者によって受け入れられ、プロトン移動反応の熱平衡状態を仮定する熱平衡モデルに基づいた MH^+ と AH^+ の MALDI-MS 信号の相対的な強度関係について調べられている。

次の 1-3 でプロトン移動反応の熱平衡を仮定したモデル（熱平衡モデル）について詳しく述べる。

1-3 プロトン移動反応の熱平衡を仮定したモデル

MALDI 過程におけるイオン生成、すなわちプロトン化試料 AH^+ および脱プロトン化試料 $(A-H)^-$ は、熱平衡モデルの場合、1 次イオン化過程（マトリックス剤のイオン化）、2 次イオン化過程（試料のイオン化）の 2 段階で生成する[1.3, 1.11]。

1 次イオン化過程では、エネルギーの高いマトリックスの二量体または 2 つのマトリックス分子から MH^+ および $(M-H)^-$ が生成される。



2 次イオン化過程では、 MH^+ および $(M-H)^-$ から、以下のプロトン移動反応によって AH^+ および $(A-H)^-$ が生成する。



上記の MALDI プルーム中で起こるプロトン移動反応が熱平衡状態に到達すると仮定すると、反応 (1-3) と反応(1-4)の平衡定数 K_+ および K_- は、それぞれ次のように表現できる。

$$K_+ = \frac{[M]_e [AH^+]_e}{[A]_e [MH^+]_e} = e^{-\frac{\Delta G_+^\circ}{RT}} \quad (1-5)$$

$$K_- = \frac{[M]_e [(A-H)^-]_e}{[A]_e [(M-H)^-]_e} = e^{-\frac{\Delta G_-^\circ}{RT}} \quad (1-6)$$

ここで、下付きの e は、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達し、 T が MALDI プルームの実効温度であるときの MALDI プルーム中の各分子種、イオン種の量を表す。 ΔG_+° および ΔG_-° は、それぞれ反応(1-3)、(1-4)の標準ギブズ自由エネルギー変化である。

$$\Delta G_+^\circ = G_B^\circ(M) - G_B^\circ(A) \quad (1-7)$$

$$\Delta G_-^\circ = -G_A^\circ(M) + G_A^\circ(A) \quad (1-8)$$

ここで、 $G_B^\circ(M)$ 、 $G_B^\circ(A)$ は、標準状態における M 、 A の気相塩基性度(Gas phase basicity : G_B°)であり、 $G_A^\circ(M)$ 、 $G_A^\circ(A)$ は、標準状態における M 、 A の気相酸性度(Gas phase acidity : G_A°)である。気相塩基性度とは、次の反応(1-9)、(1-10)の試料やマトリックス剤へのプロトン付加反応の進行のギブズエネルギー変化を示す指標であり、気相酸性度とは、次の反応(1-11)、(1-12)の試料やマトリックス剤の脱プロトン化反応の進行のギブズエネルギー変化を示す指標である。



(1-5)～(1-8)式より、次式を導出することができる。

$$\ln \frac{[AH^+]_e}{[MH^+]_e} = \ln \frac{[A]_e}{[M]_e} - \frac{\Delta G_+^\circ}{RT} \quad (1-13)$$

$$\ln \frac{[(A-H)^-]_e}{[(M-H)^-]_e} = \ln \frac{[A]_e}{[M]_e} - \frac{\Delta G_-^\circ}{RT} \quad (1-14)$$

(1-13)式、(1-14)式により、熱平衡モデルでは、プルーム中の中性分子種比 $[A]_e/[M]_e$ と、MALDI 信号強度比 $[AH^+]_e/[MH^+]_e$ の両対数は、傾き 1 の比例関係であることがわかる。しかしながら、 $[A]_e/[M]_e$ は、中性分子種であるため、通常の MALDI 法では観測できない。そこで、(i)混合結晶からプルーム中への脱離効率が A と M で同じであること、(ii)プルーム中の中性分子種量に対して、イオン種量が極わずかである という 2 点を仮定すると、 $[A]_e/[M]_e$ を $[A]_0/[M]_0$ に置き換える近似が適用でき、(1-13)式、(1-14)式は次式のように表現できる。

$$\ln \frac{[AH^+]_e}{[MH^+]_e} = \ln \frac{[A]_0}{[M]_0} - \frac{\Delta G_+^\circ}{RT} \quad (1-15)$$

$$\ln \frac{[(A-H)^-]_e}{[(M-H)^-]_e} = \ln \frac{[A]_0}{[M]_0} - \frac{\Delta G_-^\circ}{RT} \quad (1-16)$$

(ii)については、先行研究で、広く実証されている[1.16-1.21]が、詳細は第3章で記述する。

これにより、MALDI 信号強度比 $[AH^+]_e/[MH^+]_e$ 、 $[(A-H)^-]_e/[(M-H)^-]_e$ と、A と M の初濃度混合比 $[A]_0/[M]_0$ の対数プロットは、傾き 1 の比例関係となり、切片は、A と M の気相塩基性度、気相酸性度およびブルーム中の温度 T に依存する値であることがわかる。気相塩基性度については、Kinsel らにより、5 種類のアミノ酸(Gly, Ala, Val, Ile, Phe) の MALDI 測定において、 AH^+ のイオン収量がアミノ酸の G_B° に依存することが報告されている[1.22]。また、西風らは、20 種類のアミノ酸の MALDI 法において、アミノ酸のプロトン親和力 (PA) と信号強度の関係について調べ、MALDI 信号強度は、リシンを除いてアミノ酸の PA の増加に対して線形に増加することを報告している[1.23]。その後、柘植・星名は、20 種類のアミノ酸/マトリックス剤 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid:CHCA、2,5-dihydroxybenzoic acid:DHB) 混合結晶を用いて、アミノ酸とマトリックス剤の様々な混合比 $[A]_0/[M]_0$ における MALDI-MS 信号を測定し、アミノ酸の気相塩基性度と MALDI 信号強度に正の相関があることを報告している[1.24]。これらの研究からも、熱平衡モデルを用いて MALDI 信号強度を解釈する際には、気相塩基性度、気相酸性度を考慮しなければならないことがわかる。

プロトン移動反応の熱平衡状態を仮定する熱平衡モデルに基づいた MH^+ と AH^+ の MALDI-MS 信号の相対的な強度関係については、複数の研究グループにより調べられている。その中で Kim らのグループは、MALDI 信号の再現性の悪さは、レーザーショット毎の MALDI ブルーム中の温度が異なるためであるとする立場で、 $(M-H_2O)H^+$ と MH^+ の強度比から見積もった、ブルーム中の温度に基づいた温度選別 MALDI スペクトルにより、信号の精度を向上させる手法を提案した[1.25]。彼らは、この手法により、ペプチド/(CHCA、DHB)結晶を用いて、(1-15)式に基づき、試料/マトリックス剤の初濃

度混合比 $[A]_0/[M]_0$ に対する MALDI 信号強度比 $[AH^+]/[MH^+]$ の関係を調べたところ、 $[A]_0/[M]_0=10^{-2}$ までの領域では、 $[A]_0/[M]_0$ と $[AH^+]/[MH^+]$ は比例関係になると報告した [1.26]。しかし、その後、Kim らのグループは、同様の手法を用いて、さらに高い $[A]_0/[M]_0$ 領域に対する MALDI 信号強度比 $[AH^+]/[MH^+]$ の関係を調べたところ、高 $[A]_0/[M]_0$ 領域では、(1-15)式の比例関係から逸脱する領域があることがわかった。そこで、マトリックス剤のみで作製された結晶で測定した MH^+ 信号強度を 100 % とし、試料が混合された混合結晶の MH^+ 信号強度の割合、すなわち、マトリックス抑制効果を調べたところ、マトリックス抑制効果が 70 % 未満の場合には、(1-15)式に基づいた $[A]_0/[M]_0$ と $[AH^+]/[MH^+]$ の比例関係が成立すると報告されている [1.27]。また、柘植・星名は、(1-15)式に基づき、系統的にアミノ酸の MALDI 信号を測定し、 $[A]_0/[M]_0$ に対する $[AH^+]/[MH^+]$ の振舞いを熱平衡モデルで再現しようと試みた。しかしながら、低 $(A/M)_0$ 領域での $[AH^+]/[MH^+]$ の振舞いは、熱平衡モデルに基づき再現できたが、高 $(A/M)_0$ 比領域での $[AH^+]/[MH^+]$ の振舞いは、熱平衡モデルで予想された振舞いより $[AH^+]/[MH^+]$ の振舞いが低い値となり再現できなかった [1.24]。

この原因として

- ① MALDI 混合結晶から MALDI プルーム中への M と A の脱離効率が異なる
- ② MALDI プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していない
- ③ MALDI プルーム中の分子種分布が不均一である

ことが挙げられた。特に①の原因は、通常の MALDI 装置では、MALDI プルーム中の中性分子種を直接検出することができない為、実験的に検証することは困難である。実験的にプルーム中の中性分子種比を求めるためには、何らかの手法でプルーム中の中性分子種をソフトにイオン化し検出する必要がある。一方、フェムト秒レーザー照射によるイオン化は、分子が内部エネルギーを蓄積する過程よりもイオン化する過程が優先されるために、サイズの大きな分子でも比較的断片化を抑制しイオン化できる、ソフトイ

オン化特性が知られている[1.28]。そこで、本研究では、近赤外フェムト秒レーザーの非共鳴多光子イオン化による断片化抑制特性を利用し、MALDI プルーム中の中性分子種のイオン化検出を目的とした MALDI-fs MS 装置の開発を行った。そして、開発した装置により初めて実験的に明らかとなるプルーム中の中性分子種比が裏付けられ、かつ新たなパラメータを取り入れた MALDI 素反応過程のモデルである「準熱平衡モデル」を構築し、MALDI 信号強度比を定量的に解釈することに成功した。

参考文献

- [1.1] Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Protein and polymeranalyses up to $m/z = 100,000$ by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151-153.
- [1.2] Karas M, Hillenkamp F, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299-2301.
- [1.3] Zenobi R, Knochenmuss R, Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, 17, 337-366.
- [1.4] Chen X, Carroll JA, Beavis RC, Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 885-891.
- [1.5] Nis S, Zhang W, Chait BT, Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 1-7.
- [1.6] Liao PC, Allison J, Enhanced detection of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry through the use of charge-localized derivatives, *J. Mass Spectrom.* **1995**, 30, 511-512.
- [1.7] Mukamel S, Abramavicius D, Many-body approaches for simulating coherent nonlinear spectroscopies of electronic and vibrational excitons, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2073-2098.
- [1.8] Knochenmuss R, A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization, *J. Mass Spectrom.* **2002**, 37, 867-877.
- [1.9] Lin HY, Song B, Lu IC, Hsu KT, Liao CY, et al, Is energy pooling necessary in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization?, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2014**, 28, 77-82.

- [1.10] Land CM, Kinsel GR, Investigation of the mechanism of intracluster proton transfer from sinapinic acid to biomolecular analytes, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, 9, 1060-1067.
- [1.11] Knochenmuss R, Ion formation mechanisms in UV-MALDI, *Analyst.* **2006**, 131, 966-986.
- [1.12] Kinsel GR, Knochenmuss R, Setz P, Land CM, Goh SK, et al, Ionization energy reductions in small 2,5-dihydroxybenzoic acid-proline clusters, *J. Mass Spectrom.* **2002**, 37, 1131-1140.
- [1.13] Liu BH, Charkin OP, Klemenko N, Chen CW, Wang YS, Initial ionization reaction in matrix-assisted laser desorption/ionization, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 10853-10859.
- [1.14] Karas M, Gluckmann M, Schafer J, Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors, *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 1-12.
- [1.15] Knochenmuss R, The Coupled Physical and Chemical Dynamics Model of MALDI, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2016**, 9, 365-385.
- [1.16] Ens W, Mao Y, Mayer F, Standing KG, Properties of Matrix-Assisted Laser Desorption Measurements with a Time-to-Digital Converter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, 5, 117-123.
- [1.17] Mowry CD, Johnston MV, Simultaneous Detection of Ions and Neutrals Produced by Matrix-Assisted Laser Desorption, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 569-575.
- [1.18] Quist AW, Huth-Fehre T, Sundqvist BUR, Total Yield Measurements in Matrix-Assisted Laser Desorption Using a Quartz Crystal Microbalance. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 149-154.

- [1.19] Puretzky AA, Geohegan DB, Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 286, 425-432.
- [1.20] Tsai MT, Lee S, Lu IC, Chu KY, Liang CW, et al, Ion-to-Neutral Ratio of 2,5-dihydroxybenzoic acid in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, 27, 955-963.
- [1.21] Lu IC, Chu KY, Lin CY, Wu SY, Dyakov YA, Ion-to-Neutral Ratios and Thermal Proton Transfer in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, 26, 1242-1251.
- [1.22] Kinsel GR, Yao D, Yassin FH, Marynick DS, Equilibrium Conditions in Laser-desorbed Plumes: Thermodynamic Properties of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and Protonation of Amino Acids, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2006**, 12, 359-367.
- [1.23] Nishikaze T, Takayama M, Cooperative Effect of Factors Governing Molecular Ion Yields in Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 376-382.
- [1.24] Tsuge M, Hoshina K, Investigation of Protonation Efficiency for Amino Acids in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, 83, 1188-1192.
- [1.25] Bae YJ, Park KM, Kim MS, Reproducibility of Temperature-Selected Mass Spectra in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization of Peptides, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 7107-7111.
- [1.26] Park KM, Bae YJ, Ahn SH, Kim MS, A Simple Method for Quantification of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 10332-10337

- [1.27] Ahn SH, Bae YJ, Moon JH, Kim MS, Matrix Suppression as a Guideline for reliable Quantification of peptides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 8796-8801
- [1.28] Dewitt MJ, Levis RJ, Near-Infrared Femtosecond Photoionization/Dissociation of Cyclic Aromatic Hydrocarbons, *J. Chem. Phys.* **1995**, 102, 8670-8673

第2章 MALDI プルーム中の中性分子種の検出

2-1 概要

プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達したと仮定した熱平衡モデルにおいては、MALDI 信号強度比 $[AH^+]/[MH^+]$ と MALDI プルーム中の中性分子種比 $[A]/[M]$ は比例関係となり、いかなる $[A]/[M]$ においても比例定数は同じ、すなわち、これらの両対数プロットは直線関係となる。しかしながら、先行研究では、プルーム中のイオン種量は、中性分子種量に対して非常に少ないことから、通常の MALDI-MS 法では実験的に求めることができない中性分子種比 $[A]/[M]$ を、調製時の試料/マトリックス剤混合比 $[A]_0/[M]_0$ で置き換え、MALDI 信号強度比 $[AH^+]/[MH^+]$ と $[A]_0/[M]_0$ の関係の解釈を試みている。それによると、低 $[A]_0/[M]_0$ 領域では、熱平衡モデルが適用できるが、高 $[A]_0/[M]_0$ 領域では、 $\ln[AH^+]/[MH^+]$ と $\ln[A]_0/[M]_0$ が比例関係とはならず、熱平衡モデルに従っていないことがわかった。この原因の一つとして、MALDI 混合結晶からプルーム中への脱離効率が M と A で異なる可能性が挙げられた。通常の MALDI-MS 法では、MALDI プルーム中の大部分を占める中性分子種が検出されないため、中性分子種の組成が不明である。もし、混合結晶からプルームへの脱離効率が M と A で異なれば、中性分子種比 $[A]/[M]$ を調製時の試料/マトリックス剤混合比 $[A]_0/[M]_0$ で置き換える近似は適用できない。

そこで、本章では、混合結晶からプルームへの脱離効率を実験的に明らかにするために、 $[A]_0/[M]_0 = 2 \times 10^{-4} \sim 1$ ($[M]_0 = 50 \text{ mM}$ 固定) の範囲で調製した Phe/DHB 混合結晶、Ala/DHB 混合結晶について、近赤外フェムト秒レーザーイオン化を用いて、プルーム中の中性分子種を多光子イオン化することにより、 $[A]/[M]$ と $[A]_0/[M]_0$ の関係を調べた。

その結果、前述の低 $[A]_0/[M]_0$ 領域から高 $[A]_0/[M]_0$ 領域に対応する $10^{-1} \leq [A]_0/[M]_0 \leq 10^0$ の範囲において、Phe/DHB では、 $[A]/[M]$ と $[A]_0/[M]_0$ の両対数プロットの傾きが0.93(3)、Ala/DHB では1.08(8)となり、高 $[A]_0/[M]_0$ 領域においても $[A]/[M]$ と $[A]_0/[M]_0$ で置き換え

が可能であることがわかった。

これにより、先行研究において、高 $[A]_0/[M]_0$ 比領域で、 $\ln[AH^+]/[MH^+]$ と $\ln[A]_0/[M]_0$ が比例関係にならなかった原因は、混合結晶からプルームへの M と A の脱離効率に起因するものではなく、MALDI プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していないこと、MALDI プルーム中の分子種分布が不均一であることのいずれか又は両者であることがわかった。

2-2 MALDI-fs-MS 装置の開発

2-2-1 MALDI-fs MS 装置

図 2-2-1 に、本研究において設計・製作した MALDI-fs MS 装置の概略図を示す。本装置は、メインチェンバー部とリフレクトロン型 TOF 部からなっている。メインチェンバー部には、MALDI 過程の誘起用と MALDI プルーム中の中性分子種のイオン化用の 2 種類のレーザー入射ポートが備えられている。メイ

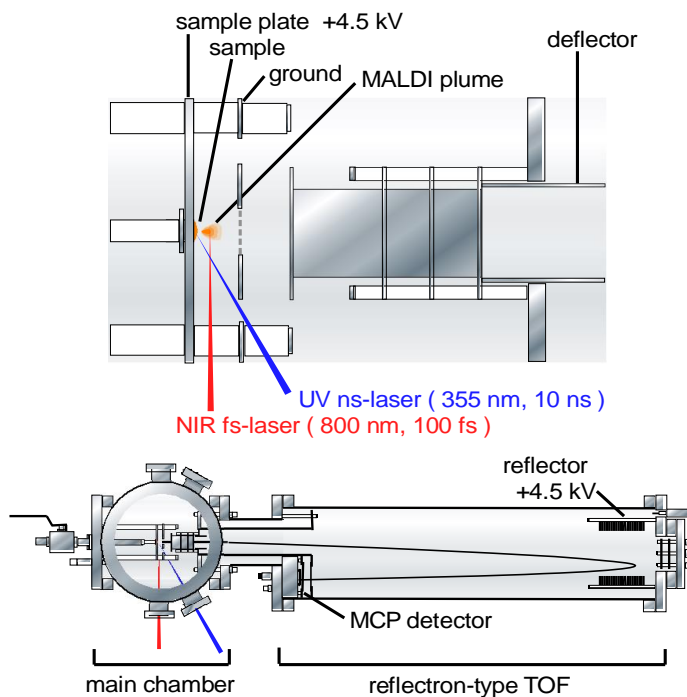


図 2-2-1 : MALDI-fs-MS 装置

ンチェンバー部は、ターボ分子ポンプ（大阪真空 TG450, 450 L/s）, TOF 管部は、ターボ分子ポンプ（大阪真空 TG220, 220 L/s）で排気し、メインチェンバー部と TOF 管部それぞれの真空度を 5×10^{-5} Pa、 1×10^{-5} Pa 以下に保持した。MALDI 混合結晶は、直径 0.25 インチ、高さ 0.375 インチのステンレス製の円柱状の MALDI ペレット上に作製し、サンプル基盤に設置する。サンプル基盤は、+4.5 kV の電圧を印加し、ground までの距離

は、0.5 インチであるため、電場強度は、約 1.77×10^5 V/m に設定されている。レーザー照射により発生したイオンは、この電場により TOF 軸方向に加速される。加速されたイオンは、電場 0 V のドリフト領域に入り、236 V に印加された偏向板によって、TOF 軸に対して垂直方向にも加速された後、慣性の法則に従って等速飛行し、+4.5 kV の電圧を印加されたリフレクトロンに到達する。イオンは、初期運動エネルギーをもっており、初期運動エネルギーが大きいイオンほど、リフレクトロンの深部まで到達する。リフレクトロン型 TOF は、イオンの進行方向を反転させることにより、イオンの初期運動エネルギーのばらつきを収束させることができるため、リニア型 TOF と比較して、分解能が向上する。リフレクトロンにより反転したイオンは、質量電荷比(m/z)の小さいものから順にマイクロチャンネルプレート(MCP)に到達し、イオン信号に変換され、オシロスコープ上でデジタルデータ (250 MS/s) に変換される。このデジタルデータは、LabView(National Instrument 社)を用いて独自に開発したプログラムにより、1 ショットずつ PC に転送した。得られた 1 ショットデータは、PC にインストールされた Igor pro 5.0(Hulinks 社)上の独自に開発したプログラムにより積算し MALDI-fs-TOF スペクトルを得た。オシロスコープのトリガは、ns laser のミラーからの散乱光をフォトダイオードで感知した信号を用いた。このフォトダイオードは、fs laser のミラーからの反射光も感知していたが、ns laser 由来の信号の方が強く検出される位置に設置したため、必ず、ns laser 由来の信号でトリガがかかるよう、トリガレベルを、ns laser 由来の信号が検出でき、かつ、fs laser 由来の信号を検出しないレベルに設定した。

2-2-2 レーザー光源

MALDI過程誘起用光源には、Nd:YAG レーザー(ns laser) の第3高調波(波長 355 nm、パルス幅 10 ns、繰り返し周波数 10 Hz、レーザー強度< 1 mJ/pulse、Quanta-Ray INDI、Spectra-Physics 社)を用いた。また、MALDI プルーム中の中性分子種のイオン化用光

源には、再生増幅 Ti:Sapphire レーザー (fs laser) (波長 800 nm、パルス幅 ~100 fs、繰り返し周波数 10 Hz、レーザー強度 < 1 mJ/pulse, BM-Industries Co.) を用いた。マトリックス剤と試料の結晶化に伴うバラつきによる影響を最小限に抑えるため、ns laser 光は、MALDI 混合結晶から 40 cm 離れた位置に設置した集光レンズ($f = 500$ mm)で緩やかに集光し、レーザーの照射範囲を広くした。また、MALDI 過程誘起用入射ポートから試料基盤に対して、 30° の入射角で MALDI 混合結晶にレーザーを照射したため、レーザースポットサイズは、 2×4 mm の楕円形となり、1 パルスあたりのレーザー強度は、約 130 J/m^2 と見積もられた。一方、fs laser 光は、MALDI プルーム中の中性分子種のイオン化用入射ポートから試料基盤に対して平行に入射し、集光レンズ($f = 250$ mm)で試料基盤から TOF 軸方向に約 2 mm の位置に集光し、ns laser 照射により脱離した MALDI プルームの中性分子種をイオン化した。

ns laser と fs laser は同期しており、レーザー照射のタイミングを設定するパルスジェネレーターにより、遅延時間を制御した。

2-2-3 MALDI 混合結晶の作製

試料には、phenylalanine (Phe), alanine (Ala) を、マトリックス剤には、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 溶媒には、超純水を使用した。これらは、全て Wako Pure Chemical Industries から購入した。DHB は、超純水で $50 \mu\text{mol/ml}$ に、Phe, Ala は、それぞれ超純水で $0.01 \sim 50 \mu\text{mol/ml}$ に調製した。MALDI 混合結晶は dried-droplet 法 [2.1] を用いて MALDI ペレットに Phe 水溶液、Ala 水溶液を $10 \mu\text{l}$ ずつ、DHB 水溶液を $10 \mu\text{l}$ ずつ試料基盤に滴下し、室温 22°C で自然乾燥させ作製した。また、MALDI 混合結晶は、 $[(\text{Phe}, \text{Ala})]_0/[\text{DHB}]_0 = 2 \times 10^{-4} \sim 1$ の範囲で 13 種類作製した。試料及びマトリックス剤の滴下量は、通常の MALDI 混合結晶では、 $1 \mu\text{l}$ ずつであるのに対して、本研究では滴下量を多く設定しているが、これは、MALDI 混合結晶の厚さを通常より

大きくすることで、ns laser 光の連続照射により、MALDI 混合結晶が完全に脱離されるまでの照射回数を増やし、MALDI ペレットのステンレス部に レーザー光が照射されることによりステンレス表面から発生する電子などの影響を受けにくくするためである。

2-3 MALDI/MALDI-fs スペクトル

図 2-3-1 に本装置を用いて得られた MALDI/MALDI-fs-TOF スペクトルを示す。測定は、同一濃度の MALDI 混合結晶を 4 つずつ作製し、それぞれの得られたデータを 250 ショット積算したものである。

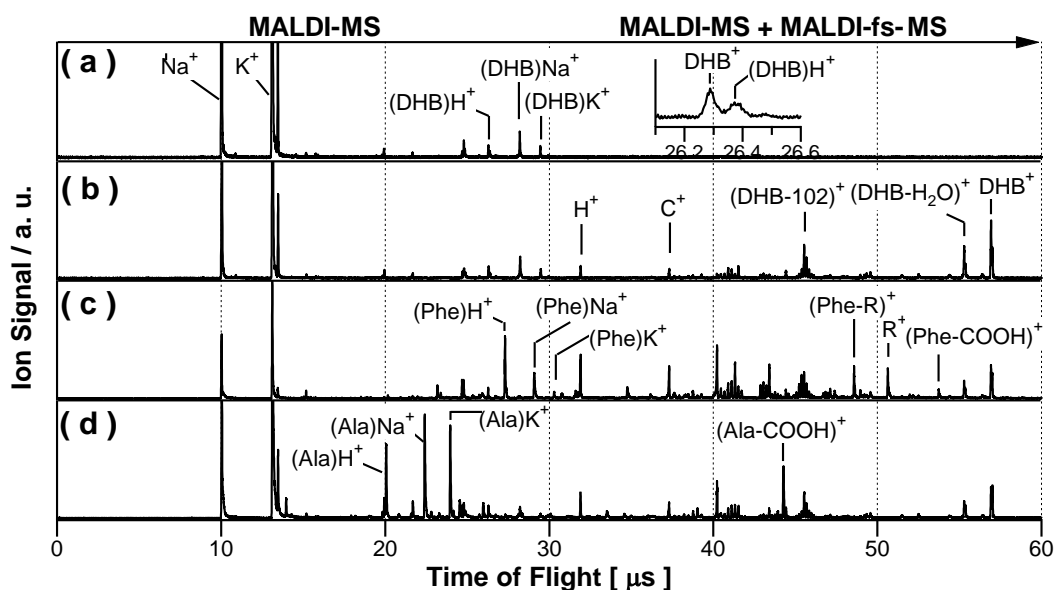


図 2-3-1 : MALDI/MALDI-fs TOF スペクトル

(a)DHB 結晶の MALDI TOF スペクトル、(b)～(d)は、DHB 結晶、Phe/DHB 混合結晶、Ala/DHB 混合結晶の MALDI/MALDI-fs TOF スペクトル

図 2-3-1(a) は、UV ns laser 照射のみで得られた DHB 結晶の MALDI TOF スペクトルである。このスペクトルからは、DHB の典型的な MALDI 信号である $(\text{DHB})\text{H}^+$ (m/z 155) のほか、 $(\text{DHB})^+$ (m/z 154)、カチオン由来イオンである Na^+ (m/z 23), K^+ (m/z 39), $(\text{DHB})\text{Na}^+$

(m/z 177)、(DHB) K^+ (m/z 193) など信号が観測された。図 2-3-1(b)-(d)は、ns laser 照射 30 μs 後に fs laser を照射して得られた MALDI/MALDI-fs-TOF スペクトルであり、ns laser と fs laser の遅延時間が 30 μs に設定されている。これは、MALDI-fs 信号が最も強くなる遅延時間に最適化したのではなく、MALDI 信号と MALDI-fs 信号が、ほとんど重ならない遅延時間を設定している。図 2-3-1(b) は、DHB 結晶の MALDI/MALDI-fs TOF スペクトルである。TOF が 30 μs 以前のスペクトルは、MALDI TOF スペクトルであり、図 2-4-1(a)と同じスペクトルパターンが得られ、TOF が 30 μs 以降のスペクトルは、MALDI/MALDI-fs TOF スペクトルであり、プルーム中の中性分子種 DHB がフェムト秒レーザーイオン化され、 DHB^+ (m/z 154)、 $(DHB-H_2O)^+$ (m/z 136)、 $C_4H_4^+$ (m/z 52) などのイオンが観測された。これらのイオンは、DHB に由来したフラグメントであるため、プルーム中の中性分子種 DHB に比例しており、中性分子種 DHB の量の参照シグナルとすることができる。また、低質量側には、 H^+ (m/z 1)、 C^+ (m/z 12)などのイオンも観測された。図 2-3-1(c)、(d) は、それぞれ Phe/DHB, Ala/DHB 混合結晶の MALDI/MALDI-fs TOF スペクトルである。図 2-3-1(c)の MALDI 領域では、 $(Phe)H^+$ (m/z 166)、(d)の MALDI 領域では、 $(Ala)H^+$ (m/z 90)が観測され、通常の MALDI 過程が進行していることがわかる。また、図 2-3-1(a) で観測された Na^+ (m/z 23)、 K^+ (m/z 39)、 $(DHB)Na^+$ (m/z 177)、 $(DHB)K^+$ (m/z 193)に加えて、図 2-4-1(c) では、 $(Phe)Na^+$ (m/z 188)、 $(Phe)K^+$ (m/z 204)、図 2-3-1(d) では、 $(Ala)Na^+$ (m/z 112)、 $(Ala)K^+$ (m/z 128)などのカチオン由来イオン信号が観測された。MALDI-fs 領域では、図 2-3-1(b)で観測されたプルーム中の中性分子種 DHB のフラグメントに加え、図 2-3-1(c) では、 $(Phe-COOH)^+$ (m/z 120)、 R^+ (m/z 91)、 $(Phe-R)^+$ (m/z 74) などが、図 2-3-1(d) では、 $(Ala-COOH)^+$ (m/z 120) などが観測された。(ここで、R は側鎖 $C_6H_5CH_2$ のことを示す。) DHB の場合と同様に、これらのフラグメントについても、プルーム中の中性分子種に比例しているため、中性分子種 Phe, Ala の量の参照シグナルとすることができる。中性分子種 Phe, Ala 由来の主なフラグメントは、Svec らのグルー

ブによって行われた電子イオン化法を用いた中性分子種 **Phe, Ala** などのアミノ酸のイオン化の実験において得られた質量スペクトルにおいても観測されている[2.2]。

さらに、これらのフラグメントは、**Greenwood** らのグループによって行われた、タンタル(**Ta**) 箔上に **Phe, Ala** などのアミノ酸粉末をのせ、タンタル箔の下部から、**UV ns** レーザーを照射し、レーザーの衝撃波によりアミノ酸を脱離させ、脱離したアミノ酸に **fs laser** を照射する方法 (**LIAD-fs** 法) によってイオン化検出した質量スペクトルにおいても観測されている[2.3, 2.4]。

MALDI プルーム中へのフェムト秒レーザー照射により、中性分子種に由来する数多くのフラグメントイオンが観測されているが、これは、フェムト秒レーザーによる多光子イオン化が深く関わっている。多光子イオン化とは、分子がイオン

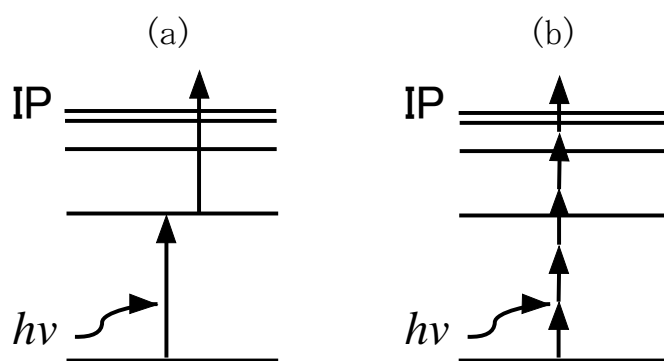


図 2-3-2 : 多光子イオン化

(a) 共鳴多光子イオン化(REMPI)

(b) 非共鳴多光子イオン化(NREMPI)

化ポテンシャル (**IP**) を下回るエネルギーをもった光子を複数吸収しイオン化する現象であり、共鳴多光子イオン化(**REMPI**)と非共鳴多光子イオン化(**NREMPI**)に分類される。共鳴多光子イオン化は、図 2-3-2(a)に示すように、電子エネルギー準位間のエネルギー差と 1 光子分のエネルギーが同じ場合に、エネルギー準位を経由し複数の光子を吸収しイオン化する現象である。一方、非共鳴多光子イオン化は、図 2-3-2(b)に示すように、電子エネルギー準位間のエネルギー差と 1 光子分のエネルギーが異なる場合で、エネルギー準位を経由せずに複数の光子を吸収しイオン化する現象である。この非共鳴多光子イオン化は、フェムト秒レーザーなどの高強度パルスレーザーを集光し照射すると、単位時間・単位面積あたりの光子数が多くなるために見られる現象である。そのため、フ

フェムト秒レーザーを用いると、非共鳴多光子イオン化特性により、フラグメンテーションを抑えた分子のイオン化が可能となるため、対象分子に特有のフラグメントイオンや分子イオンを発生させることができる。

図 2-3-3 は、Phe/DHB を試料として、試料混合比 $[Phe]_0/[DHB]_0$ を、上から順に $1 \sim 4 \times 10^{-4}$ に変化させて測定した(a) MALDI MS, (b) MALDI-fs MS スペクトルである。これらのスペクトルは、1 回分のデータの縦軸をそれぞれ、MALDI MS の場合、MALDI-fs MS の場合、ともに DHB^+ で規格化し、規格化したデータ 4 回分を平均したものである。また、図 2-3-4 は、Ala/DHB を試料として、試料混合比 $[Ala]_0/[DHB]_0$ を、上から順に $1 \sim 4 \times 10^{-4}$ に変化させて測定した(a) MALDI MS, (b) MALDI-fs MS スペクトルである。これらのスペクトルは、MALDI MS の場合 DHB^+ で、MALDI-fs MS の場合 $C_4H_4^+$ で規格化し、図 2-4-3 と同様に、規格化した 4 回分のデータを平均したものである。MALDI MS スペクトルでは、 $[A]_0/[M]_0$ が増加するにしたがって、 $(Phe)H^+$ 、 $(Ala)H^+$ は増加し、 $(DHB)H^+$ は減少している。これは、 $[A]_0/[M]_0$ が増加するにしたがって、プルーム内の $(DHB)H^+$ と中性分子種の Phe、Ala の衝突確率が上昇したためであると考えられる。また、MALDI-fs MS スペクトルでは、 $[A]_0/[M]_0$ が増加するにしたがって、中性分子種の Phe からのフラグメントである $(Phe-74)^+$ 、Ala からのフラグメントである $(Ala-COOH)^+$ のフラグメントは、中性分子種の DHB からのフラグメントである DHB^+ や $C_4H_4^+$ に対して増加している。なお、fs laser イオン化の実験で、 $(DHB)H^+$ が観測されているが、これは、星名らのグループにより報告されたカルボン酸 2 量体を対象とした fs laser イオン化の実験で、 $(DHB)H^+$ が観測されることが分かっていることから、少なくとも MALDI-fs MS で観測された $(DHB)H^+$ は、 $(DHB)_2$ のイオン化に由来したフラグメントが含まれていると考えられる[2.5]。

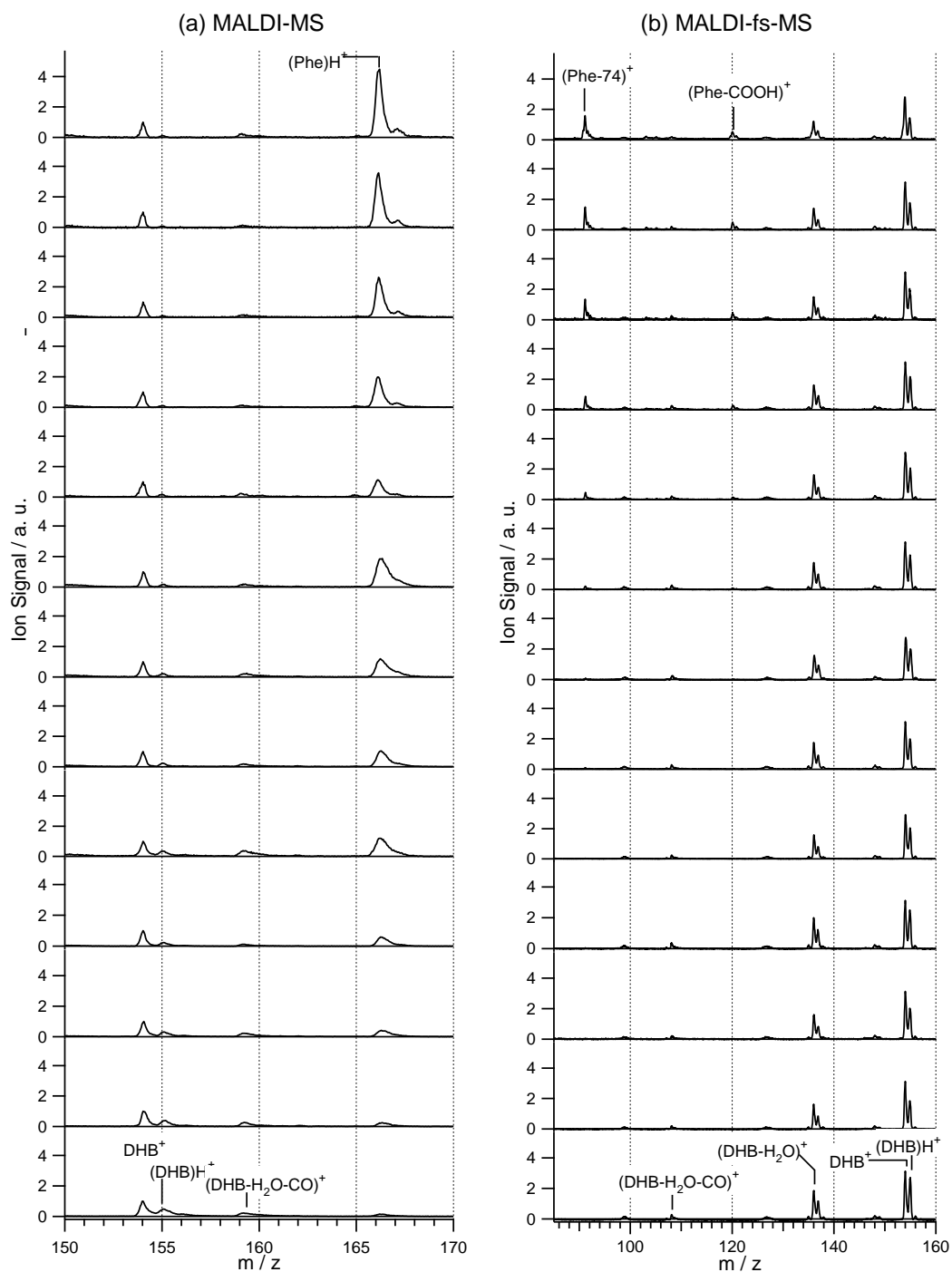


図 2-3-3 : Phe/DHB 混合結晶の MALDI-MS、MALDI-fs-MS スペクトル
 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.04, 0.02, 0.01, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0004$
 (上から順)

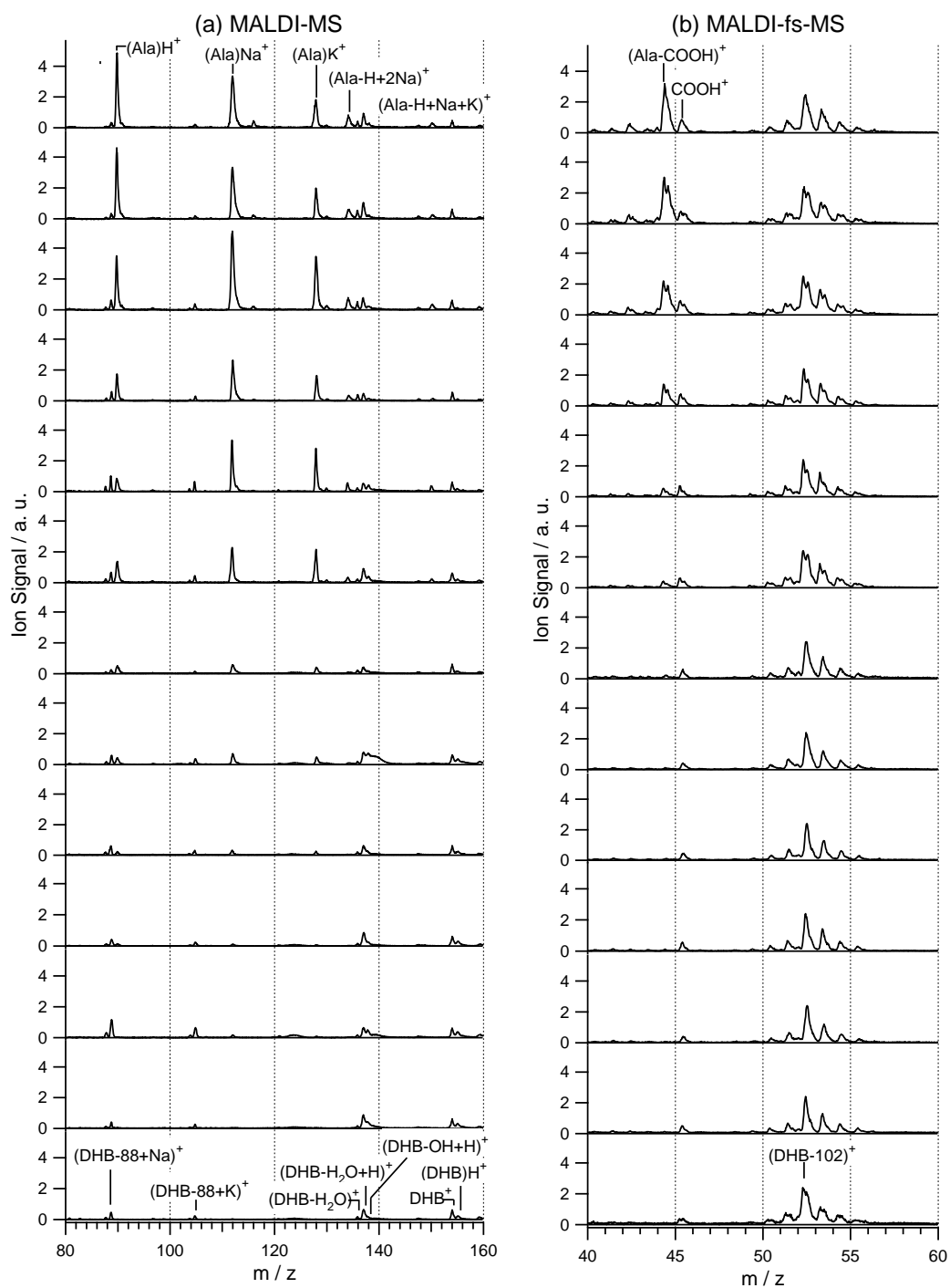


図 2-3-4 : Ala/DHB 混合結晶の MALDI-MS、MALDI-fs-MS スペクトル
 $[Ala]_0/[DHB]_0 = 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.04, 0.02, 0.01, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0004$
 (上から順)

2-4 MALDI プルームの膨張速度

図 2-4-1 に $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=0.6$ の混合結晶を用いて、ns laser と fs laser 照射の遅延時間を $0.5 \sim 40 \mu\text{s}$ の条件で測定した MALDI/MALDI-fs TOF スペクトルを示す。 $40 \mu\text{s}$ から $5 \mu\text{s}$ の間では、遅延時間が長くなるにしたがって、フェムト秒レーザーイオン化由来のフラグメントが減少している。これは、遅延時間が長くなるにしたがって、MALDI プルームが断熱膨張し、プルームの密度が低下していることに起因している。一方で、遅延時間が $5 \mu\text{s}$ から短くなるにしたがって、フェムト秒レーザーイオン化由来のフラグメントは減少し、 $0.5 \mu\text{s}$ では、ほとんど観測されなかった。これは、fs laser の集光地点が、サンプル基盤から約 2mm の位置に設定されており、ns laser 照射 $0.5 \mu\text{s}$ 後には、fs laser の照射地点に MALDI プルームが到達していないことを示している。これにより、MALDI プルームは、ns laser 照射約 $1 \mu\text{s}$ 後に、サンプル基盤から約 2mm の地点に到達し始めることがわかり、プルームの膨張速度は、約 $1000 \sim 2000 \text{ m/s}$ 程度であることがわかった。プルームの膨張速度については、1995 年に Kaufmann らのグループにより、可動式の TOF を用いて、 337 nm の窒素レーザー照射によって、substance P/2,5-DHB 混合結晶から生じたイオンの速度分布が実験的に求められている。この結果によると、substance P (試料) /2,5-DHB 混合結晶から生じたプルーム中の DHB 単体の初速度は、 $1500 \sim 2000 \text{ m/s}$ 、2 量体の初速度は、 $1200 \sim 1400 \text{ m/s}$ 程度、substance P の初速度は、 $900 \sim 1200 \text{ m/s}$ 程度であるが、DHB のみの結晶の場合には、DHB 単体の初速度には、 900 m/s 程度と 1400 m/s 程度の 2 つの速度成分が存在していると報告されている[2.6]。MALDI-fs TOF スペクトルから得られた速度は、初めにサンプル基盤から約 2mm の地点に到達した中性分子種を測定しているため、速い成分の DHB から順に観測される実験手法のため、値は妥当であると考えられる。なお、Kaufmann らグループの実験では、substance P の導入により、DHB 単体の 900 m/s 程度の成分が観測されなかったことから、DHB 単体の 900 m/s 程度の成分と substance P の間でプロトン移動反応が

起こっていることが示唆されたことも着目すべき点である。DHB 以外のマトリックス剤を使用してプルーフ中の成分を観測した実験としては、1991 年に Becker らのグループによって、266 nm の Nd:YAG レーザー照射により gramicidin S (試料) /FA (マトリックス剤) 混合結晶から脱離したプルーフを、118 nm の真空紫外光によりポストイオン化した実験が挙げられる。この実験から、gramicidin S の初速度は、350 m/s 程度、FA の初速度は、500 m/s 程度であったが、FA の初速度分布は、2000 m/s 程度まで広がっていることがわかった[2.7]。また、1999 年に Luk'yanchuk らのグループによって、248 nm の KrF レーザーにより、色素標識した DeoxyribonucleaseI (試料) /3-HPA (マトリックス剤) 混合結晶から脱離したプルーフを 308 nm の XeCl レーザー照射することで、3-HPA の蛍光を観測した実験が報告されている。この実験では、3-HPA のプルーフは、20 μ s 後に試料基盤から約 2 cm 程度まで膨張していることから、3-HPA のプルーフ速度は、1000 m/s 程度であることがわかる[2.8]。このように、MALDI プルーフの膨張速度は、マトリックス剤や試料の種類により異なるが、おおよそ 500~2000 m/s 程度の範囲であり、質量が大きい試料ほど脱離速度が遅くなると考えられる。

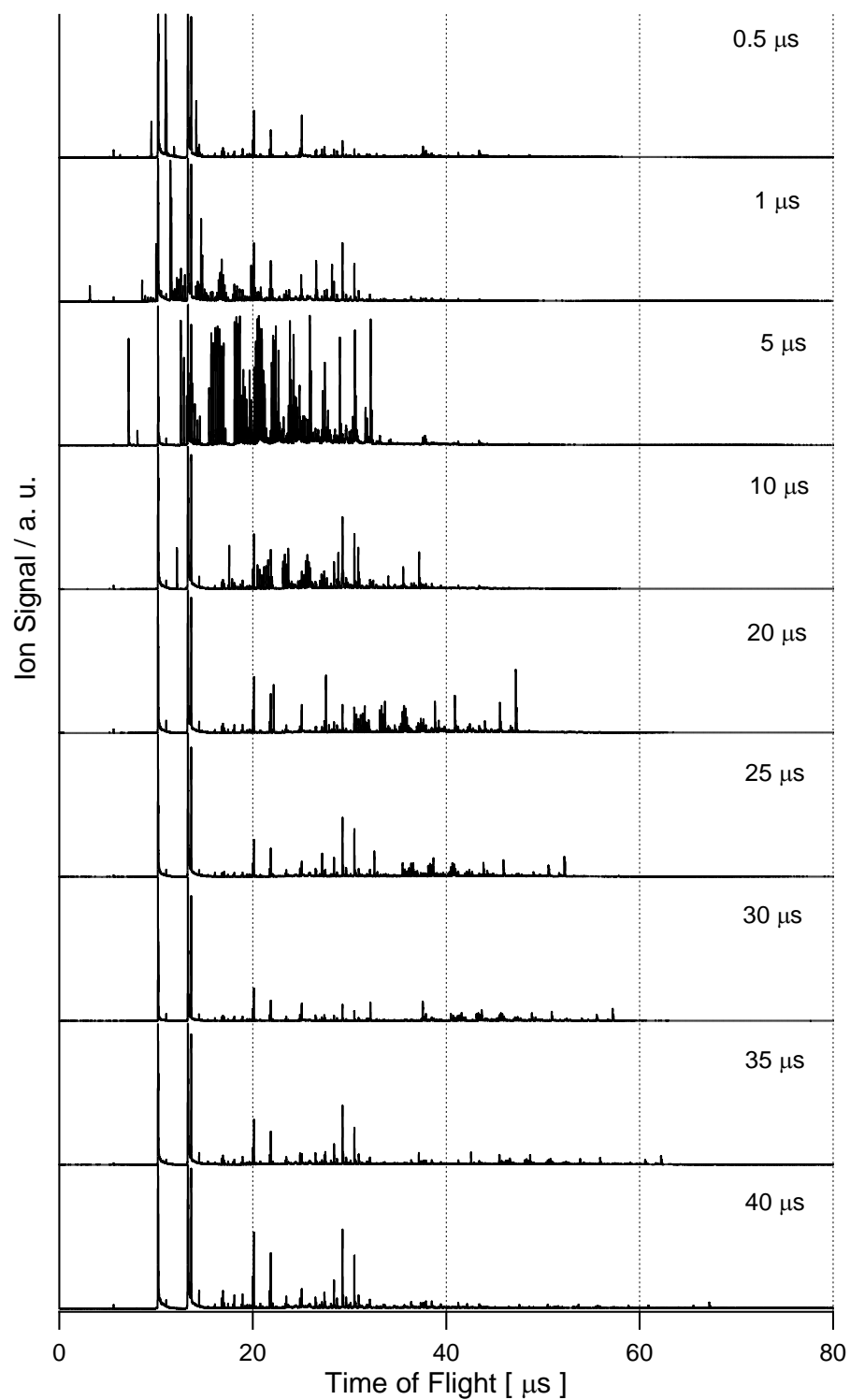


図 2-4-1 : ns laser と fs laser 照射の遅延時間による
MALDI/MALDI-fs TOF スペクトルの変化
([Phe]₀/[DHB]₀=0.6、遅延時間変化 0.5~40 μs)

2-5 MALDI プルーム中の中性分子種比

2-5-1 中性分子種比の評価

Phe/DHB 混合結晶から生成した MALDI プルーム中に fs laser を照射し観測されたフラグメント $(\text{Phe-74})^+$ と DHB^+ は、プルーム中の中性分子種 $[\text{Phe}]_p$ や $[\text{DHB}]_p$ に由来するフラグメントであるため、次の式が成立する。

$$[(\text{Phe-74})^+] = \alpha_1 I^{n_1} [\text{Phe}]_p \quad (2-1)$$

$$[\text{DHB}^+] = \beta_1 I^{m_1} [\text{DHB}]_p \quad (2-2)$$

ここで、 I はレーザー強度、 n_1 は $(\text{Phe-74})^+$ 、 m_1 は $(\text{DHB})^+$ のイオン化およびその後のフラグメンテーションに必要な光子数であり、 α_1 は $(\text{Phe-74})^+$ 、 β_1 は $(\text{DHB})^+$ の解離イオン化確率および検出効率に関連する比例定数である。また、(2-1)、(2-2)式より、次の(2-3)式が成立する。

$$\ln \frac{[(\text{Phe-74})^+]}{[\text{DHB}^+]} = \ln \frac{[\text{Phe}]_p}{[\text{DHB}]_p} + \left[\ln \frac{\alpha_1}{\beta_1} + (n_1 - m_1) \ln I \right] \quad (2-3)$$

(2-3)式により、プルーム中の中性分子種比 $[\text{Phe}]_p/[\text{DHB}]_p$ は、フェムト秒レーザー照射により観測されたフラグメント強度比 $(\text{Phe-74})^+/\text{DHB}^+$ と比例関係にあることが分かる。したがって、 $[\text{Phe}]_p/[\text{DHB}]_p$ と $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ の関係は、 $(\text{Phe-74})^+/\text{DHB}^+$ と $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ の関係で表すことができる。

2-5-2 fs laser 照射タイミングによる変化

図 2-5-1(a)に、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=0.6$ の混合結晶における、ns laser と fs laser 照射の遅延時間による中性分子種由来信号 $(\text{Phe-74})^+$ 、 DHB^+ の信号強度変化を示す。 $(\text{Phe-74})^+$ 、 DHB^+ の信号強度は、遅延時間が長くなるにしたがって低下しているが、これは、前述のとおり、遅延時間が長くなるにしたがって、MALDI プルームが断熱膨張し、プルームの密度が低下していることに起因している。また、図 2-5-1(b)に、これらの強度比 $(\text{Phe-74})^+/\text{DHB}^+$ を示す。これにより、中性分子種由来するフラグメントイオン強度比は、

ns laser と fs laser 照射の遅延時間の影響を受けないことがわかった。よって、後述する実験の解析は、MALDI TOF と MALDI-fs TOF スペクトルがほとんど重ならず、かつ、中性分子種への fs laser 照射により生じたフラグメントがしっかりと観測される遅延時間である $30\ \mu\text{s}$ に設定し行った。

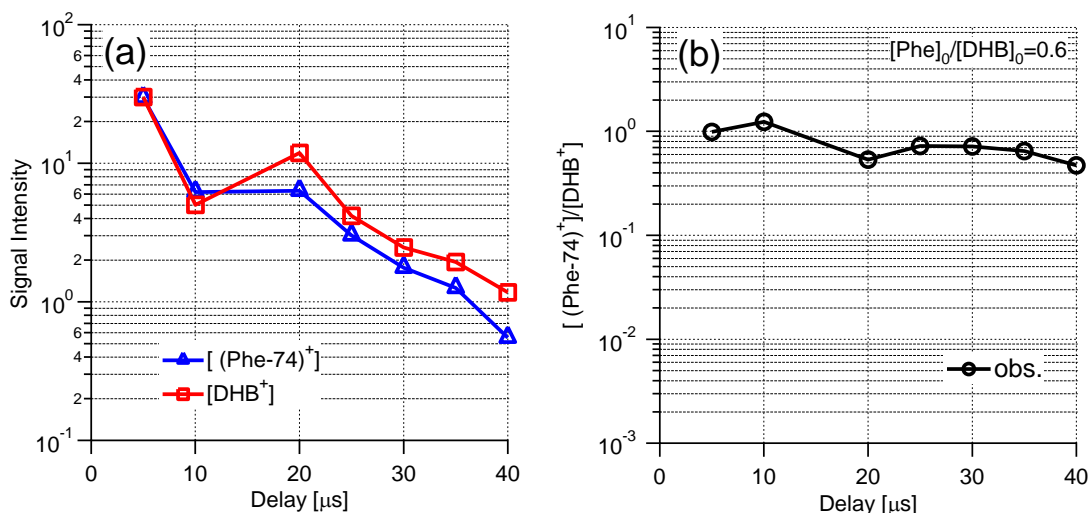


図 2-5-1 : ns laser と fs laser 照射の遅延時間による中性分子種由来信号の強度変化
 $([\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=0.6, \text{遅延時間変化 } 0.5\sim40\ \mu\text{s})$

2-5-3 脱離レーザーショット数による変化

図 2-5-2 に、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=1, 0.4, 0.04$ の混合結晶における、レーザーショット数 0 ～2000 ショット中の 250 ショット毎の中性分子種由来信号 $(\text{Phe-74})^+$ 、 DHB^+ の強度変化を示す。これにより、レーザーショット数が増加するにしたがって、両者の信号強度は、どちらも減少傾向を示したが、 DHB^+ の信号強度は、 $(\text{Phe-74})^+$ の信号強度と比較し、信号の減少量が多いため、 $(\text{Phe-74})^+/\text{DHB}^+$ 比は、ゆるやかに増加していた。これにより、混合結晶からの Phe、DHB の脱離効率、Phe と比較して高く、レーザーショット数によって異なることがわかった。図 2-5-3 に、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=1, 0.4, 0.04$ の混合結晶における、レーザーショット数 0～250 ショット中の 50 ショット毎の中性分子種由

来信号(Phe-74^+)、 DHB^+ の強度変化を示す。50 ショット毎積算の場合にも、前述の 250 ショット毎の中性分子種由来信号(Phe-74^+)、 DHB^+ の強度変化と同様に、レーザーショット数が増加するにしたがって(Phe-74^+)/ DHB^+ 比は、わずかに増加していた。一方で、後述する試料/マトリックス剤比 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ と MALDI プルーム中の中性分子種比 $[\text{A}]_p/[\text{M}]_p$ の評価は、(1-15)式にしたがって対数で行うため、0～250 ショットまでの変化量であれば、対数プロットでは、ほとんど無視できる変化量である為、0～250 ショットまでのデータを積算し解析に用いることとした。

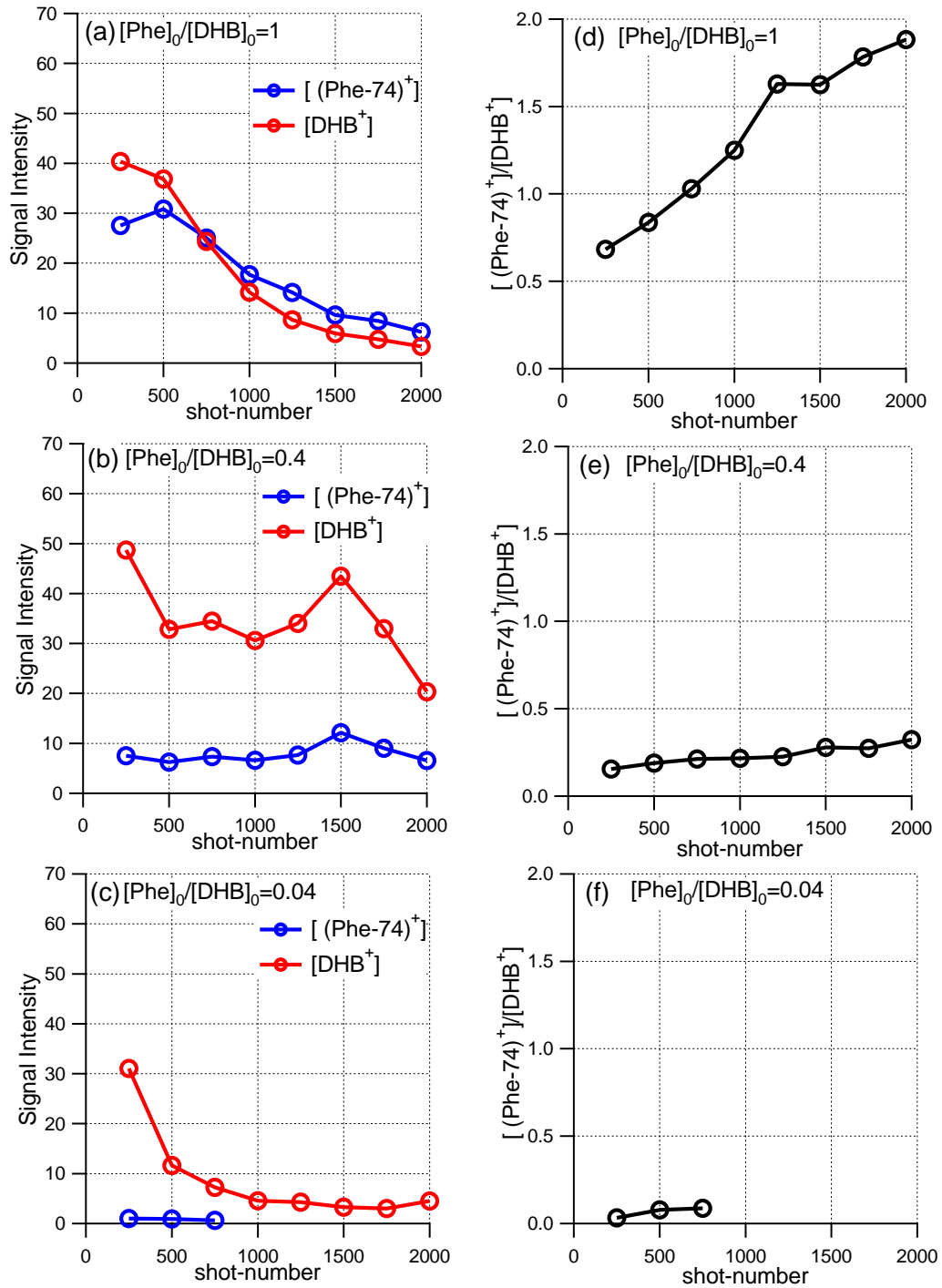


図 2-5-2 : レーザーショット数による $[(\text{Phe-74})^+]/[\text{DHB}^+]$ 比の変化、
 $([\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=1、0.4、0.04、\text{レーザーショット積算数:250 ショット})$

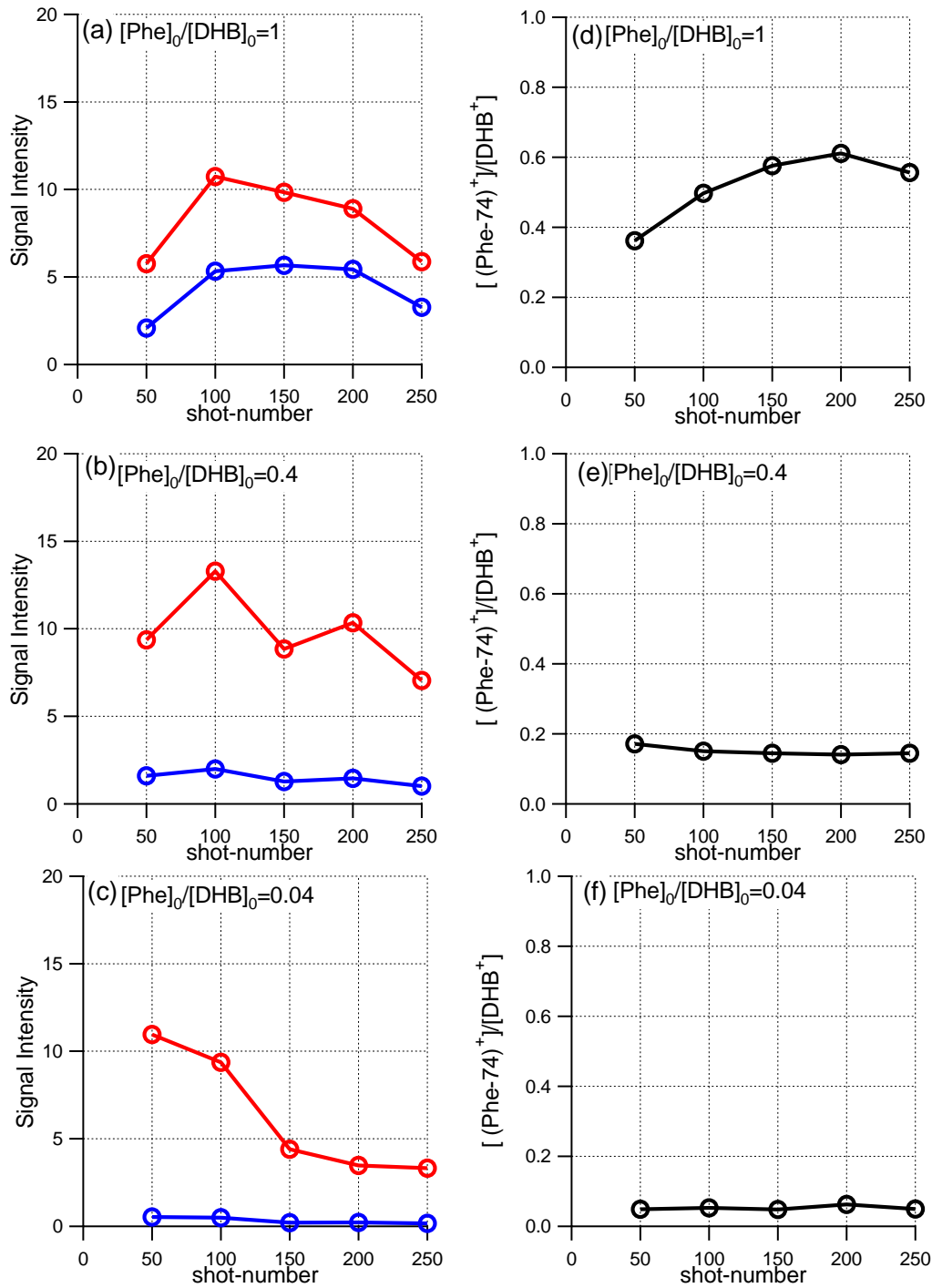


図 2-5-3 : レーザーショット数による[Phe-74]⁺/[DHB]⁺ 比の変化、
([Phe]₀/[DHB]₀=1、0.4、0.04、レーザーショット積算数: 50 ショット)

2-5-4 混合結晶からの脱離効率

図 2-5-4(a) は、試料混合比 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ を関数として、250 ショット積算した MALDI-fs MS から得られたフラグメントの信号強度比 $[(\text{Phe-74})^+]/[\text{DHB}^+]$ の 4 回分の測定データを平均した値の対数プロットである。

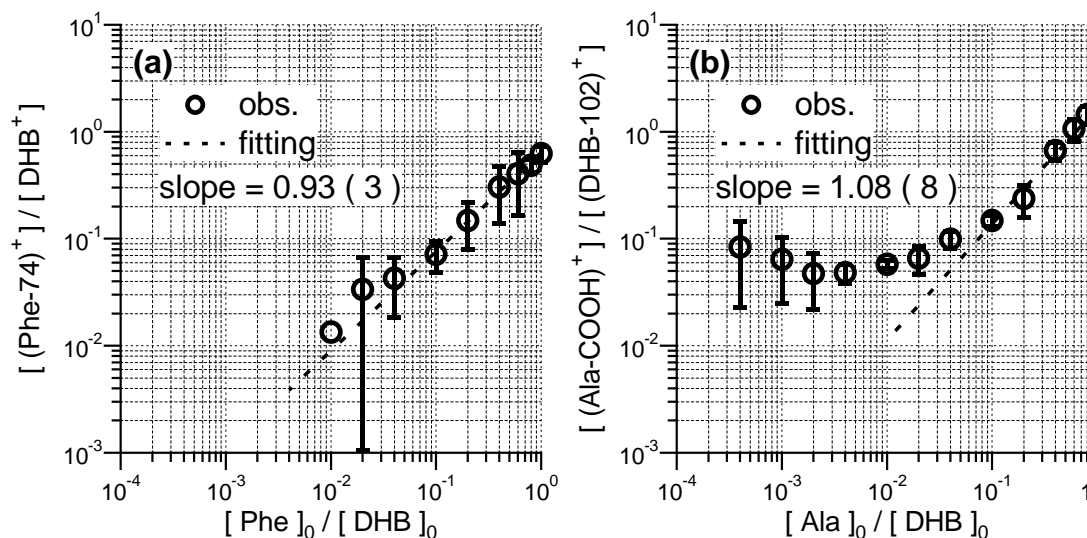


図 2-5-4 : $[\text{Phe,Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比の変化に対する中性分子種由来信号強度比
(a) $[(\text{Phe-74})^+]/[\text{DHB}^+]$ 比、(b) $[(\text{Ala-COOH})^+]/[(\text{DHB-102})^+]$ 比

このプロットを $10^{-1} \leq [\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0 \leq 10^0$ の範囲でフィッティングしたところ、傾きが、 $0.93(3)$ となり、 $\ln[(\text{Phe-74})^+]/[\text{DHB}^+]$ と $\ln[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ の関係は、傾きがおおよそ 1 の比例関係であることがわかる。これは、高 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比の領域であっても、Phe と DHB が均一に脱離することを意味しており、高 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比領域であっても、 $[\text{Phe}]_p/[\text{DHB}]_p$ は、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ で近似できるということがわかった。同様に、Ala/DHB 混合結晶から生成した MALDI プルーム中に fs laser を照射し観測されたフラグメント $(\text{Ala-COOH})^+$ と DHB^+ は、プルーム中の中性分子種 $[\text{Ala}]_p$ や $[\text{DHB}]_p$ に由来するフラグメントであるため、次の式が成立する。

$$[(\text{Ala-COOH})^+] = \alpha_2 I'^{n_2} [\text{Ala}]_p \quad (2-4)$$

ここで、 I はレーザー強度、 n_2 は(Ala-COOH)⁺のイオン化およびその後のフラグメンテーションに必要な光子数であり、 α_2 は(Ala-COOH)⁺の解離イオン化確率および検出効率に関連する比例定数である。よって、(2-2)、(2-4)式より、次の(2-5)式が成立する。

$$\ln \frac{[(\text{Ala-COOH})^+]}{[\text{DHB}^+]} = \ln \frac{[\text{Ala}]_p}{[\text{DHB}]_p} + \left[\ln \frac{\alpha_2}{\beta_1} + (n_2 - m_1) \ln I \right] \quad (2-5)$$

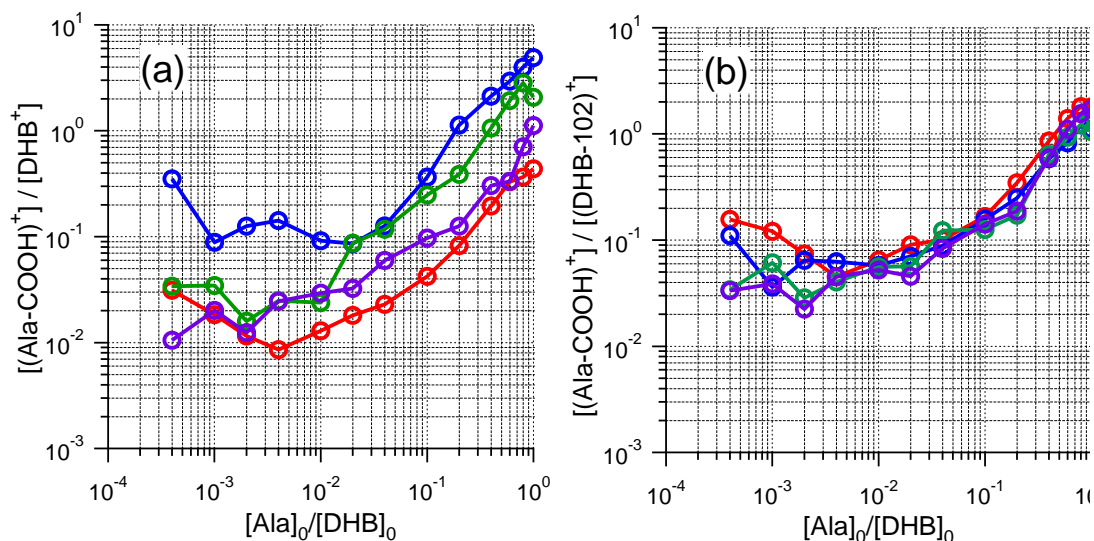


図 2-5-5 : 1 回測定毎の $[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比の変化に対する中性分子種由来信号強度比
(a) $[(\text{Ala-COOH})^+]/[\text{DHB}^+]$ 比、(b) $[(\text{Ala-COOH})^+]/[(\text{DHB-102})^+]$ 比

図 2-5-5(a) は、(2-5)式に従って、試料混合比 $[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ を関数として、4 回分の 250 ショット積算した測定データのそれぞれの MALDI-fs MS 測定から得られたフラグメントの信号強度比 $[(\text{Ala-COOH})^+]/[\text{DHB}^+]$ を平均した値を対数プロットしたものである。この対数プロットでは、 $10^{-1} \leq [\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0 \leq 10^0$ の範囲において、 $\ln[(\text{Ala-COOH})^+]/[\text{DHB}^+]$ と $\ln[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ の関係は、傾きがおおよそ 1 の比例関係であることがわかる。しかしながら、4 回分のそれぞれのデータの切片は異なっている。これは、(Ala-COOH)⁺のイオン化およびその後のフラグメンテーションに必要な光子数 n_2 と DHB⁺のイオン化およびその後のフラグメンテーションに必要な光子数 m_1 が異なり、(2-5)式の切片に $(n_2 - m_1) \ln I$ だけ差が生じているためであると考えられる。仮に、 $n_2 \neq m_1$ であっても、フェムト秒レーザー強度が同じであれば、 $(n_2 - m_1) \ln I$ の差は生じな

いが、本研究で使用しているフェムト秒レーザーは、測定日毎に温度、湿度等の条件が異なり、レーザー出力が影響を受けるため、測定日毎にレーザー強度を一定に合わせる事が難しい。よって、試料とマトリックス剤のフラグメントのイオン化等に必要な光子数が同じであるフラグメントで、 $\ln[A]_p/[M]_p$ と $\ln[A]_0/[M]_0$ の関係を求めた方が正確な測定ができる。

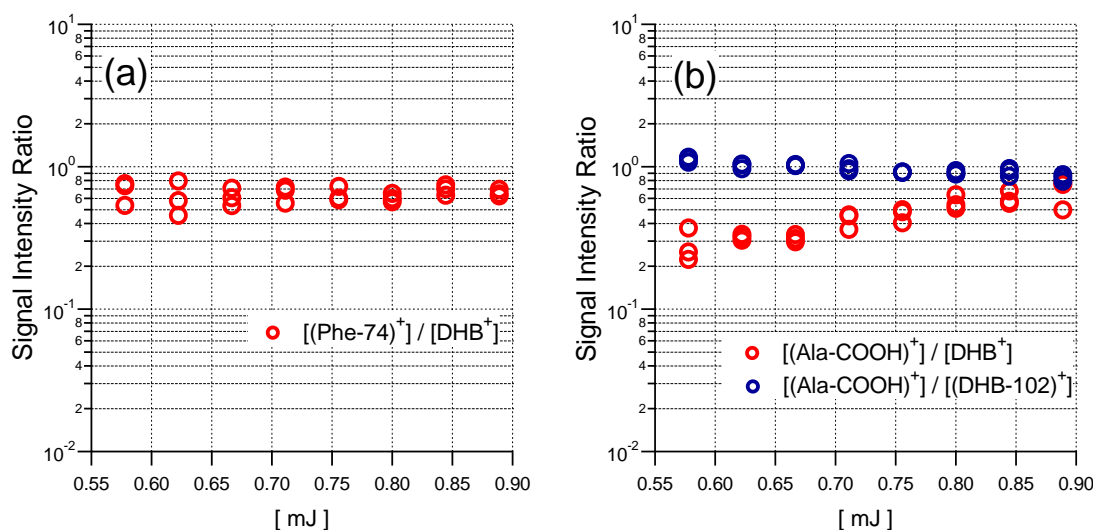


図 2-5-6 : MALDI プルーム中の中性分子種のレーザー強度依存性 :
(a) $[\text{Phe-74}]^+ / [\text{DHB}]^+$ 、(b) $\bigcirc [\text{Ala-COOH}]^+ / [\text{DHB}]^+$ 、 $\bigcirc [\text{Ala-COOH}]^+ / [\text{DHB-102}]^+$

図 2-5-6(a)、(b)に、Phe、Ala のフラグメントと DHB のフラグメント比のレーザー強度依存性を測定した結果を示す。ほぼ同一レーザー強度ごとに 3 回ずつ測定を行っている。図 2-5-6(a)は、 $[\text{Phe-74}]^+ / [\text{DHB}]^+$ 比、図 2-5-6(b)の \bigcirc は、 $[(\text{Ala-COOH})^+]/[\text{DHB}]^+$ 比のレーザー強度依存性を示している。この結果から、レーザー強度 0.55~0.9 mJ の範囲では $[\text{Phe-74}]^+ / [\text{DHB}]^+$ 比は、一定値でありレーザー強度に依存しないが、 $[(\text{Ala-COOH})^+]/[\text{DHB}]^+$ 比は、レーザー強度が強くなるにしたがって高くなる傾向があった。これは、 $(\text{Phe-74})^+$ と DHB^+ のイオン化等に必要な光子数は同じであるが、 $(\text{Ala-COOH})^+$ と DHB^+ のイオン化等に必要な光子数は異なっていることを示している。

また、 $[(\text{Ala-COOH})]^+ / [\text{DHB}]^+$ 比は、レーザー強度が強くなるにしたがって高くなる傾向があったことから、正の相関があったため、 $(n_2 - m_1) > 0$ であるため、 DHB^+ のイオン化等に必要な光子数より、 $(\text{Ala-COOH})^+$ のイオン化等に必要な光子数の方が多いことがわかった。これにより、 $(\text{Ala-COOH})^+$ のイオン化等に必要な光子数と同じ光子数でイオン化等する DHB に由来するフラグメントを調査した。図 2-5-6(b) の \bigcirc は、 $[(\text{Ala-COOH})]^+ / [(\text{DHB-102})]^+$ 比のレーザー強度依存性を示している。この結果から、 $[(\text{Ala-COOH})]^+ / [(\text{DHB-102})]^+$ 比は、 $[(\text{Ala-COOH})]^+ / [\text{DHB}]^+$ 比の場合と異なり、レーザー強度 0.55~0.9 mJ の範囲で、一定値となり、レーザー強度に依存していない。よって、 $(\text{Ala-COOH})^+$ と $(\text{DHB-102})^+$ のイオン化等に必要な光子数は同じであることがわかった。 $(\text{DHB-102})^+$ も、プルーフ中の $[\text{DHB}]_p$ に由来するフラグメントであるため、次の式が成立する。

$$[(\text{DHB-102})^+] = \beta_2 I^{m_2} [\text{DHB}]_p \quad (2-6)$$

ここで、 I はレーザー強度、 m_2 は $(\text{DHB-102})^+$ のイオン化およびその後のフラグメンテーションに必要な光子数であり、 β_2 は $(\text{DHB-102})^+$ の解離イオン化確率および検出効率に関連する比例定数である。よって、(2-4)、(2-6) 式より、次の(2-7) 式が成立する。

$$\ln \frac{[(\text{Ala-COOH})^+]}{[(\text{DHB-102})^+]} = \ln \frac{[\text{Ala}]_p}{[\text{DHB}]_p} + \left[\ln \frac{\alpha_2}{\beta_2} + (n_2 - m_2) \ln I \right] \quad (2-7)$$

図 2-5-5(b) に、上記の(2-7) 式に従って、試料混合比 $[\text{Ala}]_0 / [\text{DHB}]_0$ を関数として、4 回分の測定データのそれぞれの MALDI-fs MS 測定から得られたフラグメントの信号強度比 $[(\text{Ala-COOH})^+] / [(\text{DHB-102})^+]$ の対数プロットを示した。この結果から、 $10^{-1} \leq [\text{Ala}]_0 / [\text{DHB}]_0 \leq 10^0$ の範囲において、 $\ln[(\text{Ala-COOH})^+] / \ln[(\text{DHB-102})^+]$ と $\ln[\text{Ala}]_0 / [\text{DHB}]_0$ の関係は、傾きがおおよそ 1 の比例関係であり、図 2-5-5(a) の $[(\text{Ala-COOH})^+] / [\text{DHB}]^+$ の場合と異なり、 $(\text{Ala-COOH})^+$ と $(\text{DHB-102})^+$ のイオン化等に必要な光子数は同じであるため、4 回分それぞれのデータの切片もほぼ同じであることがわかる。図 2-5-4(b) は、試料混合比 $[\text{Ala}]_0 / [\text{DHB}]_0$ を関数として、MALDI-fs MS から得られたフラグメントの信号強度

比 $[(\text{Ala-COOH})^+]/[\text{DHB}^+]$ の4回分の測定データの平均値の対数プロットである。このプロットを $10^{-1} \leq [\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0 \leq 10^0$ の範囲でフィッティングしたところ、傾きが、1.08(8)となり、 $\ln[(\text{Ala-COOH})^+/\text{DHB}^+]$ と $\ln[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ の関係は、比例関係であることがわかった。これにより、Phe/DHB、Ala/DHB 混合結晶の両方で、低 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 領域だけでなく高 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 領域においても、混合結晶からブルームへのMとAの脱離効率は同じであり、高 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 領域においても、中性分子種比 $[\text{A}]/[\text{M}]$ を調製時の試料/マトリックス剤混合比 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ で置き換える近似は適用できることがわかった。

以上により、先行研究において、熱平衡モデルに基づいて、高 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 比領域におけるMALDI信号強度比の振舞いが再現できなかった原因は、少なくともMALDI混合結晶からMALDIブルーム中へのMとAの脱離効率に起因するものではないことが明らかとなった。

参考文献

- [2.1] Karas M, Bahr U, Gieβmann U, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *Mass. Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 335-357
- [2.2] Junk G, Svec H, The Mass Spectra of the α -Amino Acids, *J. Am. Chem.Soc.* **1963**, *85*, 839-845.
- [2.3] Calvert C R, Belshaw L, Duffy M J, Kelly O, King RB, et al, LIAD-fs Scheme for Studies of Ultrafast Laser Interactions with Gas Phase Biomolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 6289-6297.
- [2.4] Duffy M J, Kelly O, Calvert CR, King RB, Belshaw L, et al, Fragmentation of Neutral Amino acids and Small Peptides by Intense, Femtosecond Laser Pulses. *J. Am. Soc. Mass spectrom.* **2013**, *24*, 1366-1375.
- [2.5] Amada M, Sato Y, Tsuge M, Hoshina K, Near-Infrared Femtosecond Laser Ionization of the Acetic Acid Dimer, *Chem. Phys. Lett.* **2015**, *624*, 24-28
- [2.6] Bokelmann V, Spengler B, Kaufmann R, Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization, *Eur. Mass. Spectrom.* **1995**, *1*, 81-93.
- [2.7] Huth-Fehre T, Becker CH, Energetics of Gramicidin S After UV Laser Desorption From a Ferulic Acid Matrix, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 378-382.
- [2.8] Puretzky AA, Geohegan DB, Hurst GB, Buchanan MV, Luk'yanchuk BS, Imaging of Vapor Plumes Produced by Matrix Assisted Laser Desorption: A Plume Sharpening Effect. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 444-447.

第3章 準熱平衡を仮定した MALDI モデル構築と数値シミュレーション

3-1 概要

前述の MALDI プルーム中の中性分子種への fs laser 照射による実験により、MALDI 混合結晶からプルームへの M と A の脱離効率と同じであり、高 $[A]_0/[M]_0$ 比領域においても、中性分子種比は、 $[A]_0/[M]_0$ 比で近似できることがわかった。これにより、先行研究において、高 $[A]_0/[M]_0$ 比領域で、MALDI 信号強度比 $[AH^+]/[MH^+]$ と $[A]_0/[M]_0$ 比の関係が比例関係とならなかった原因は、MALDI プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していないこと、MALDI プルーム中の分子種分布が不均一であることのいずれか又は両者であることがわかった。そこで、本研究では、MALDI プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達しているか否かを明らかにするため、先行研究において用いられた熱平衡モデルに、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達しないことを考慮に入れたパラメーターである反応到達度 b_+ 、 b_- を導入した準熱平衡モデルに基づくシミュレーションにより、MALDI 信号強度比の再現を試みた。準熱平衡モデルは、マトリックス剤のイオン化効率 a 、MALDI プルーム中の実効的な温度 T 、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達しないことを考慮に入れたパラメーターである反応到達度 b に依存しており、 $a = 10^{-2} \sim 10^{-8}$ 、 $T = 800 \sim 1300 \text{ K}$ 、 $b = 0.05 \sim 1$ と仮定し、 $[M] = 1$ 、 $[A] = 1 \sim 1 \times 10^{-4}$ と仮定した。また、試料とマトリックス剤の気相塩基性度 (Gas phase basicity : G_B°) と気相酸性度 (Gas phase acidity : G_A°) は、文献値を用いた。Phe/DHB、Ala/DHB 混合結晶を用いた場合の実験値と準熱平衡モデルに基づいたシミュレーション値の最小二乗フィッティングの結果から、マトリックス剤のイオン化効率 a は、 $a \leq 10^{-5}$ 、プルーム中の正イオン側のプロトン移動反応の熱平衡状態への到達度 b_+ は、 $b_+ = 0.95-0.98$ 、プロトン移動反応が進行している際のプルームの実効温度 T は、 $T = 1100-1200 \text{ K}$ であることがわかった。この結果から、MALDI プルーム中のプロトン移動反応は、熱平衡状態に到達していないことがわかった。また、MALDI プルーム中の

イオン種量は、中性分子種量と比較して非常に少なく、プルーフ中の実効温度により、プロトン移動反応は、インソース分解が起こる時間よりも早い時間で終了していることがわかった。これにより、先行研究において、熱平衡モデルに基づいて、高 $[A]_0/[M]_0$ 比領域における MALDI 信号強度比の振舞いが再現できなかった原因には、MALDI プルーフ中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していないことが含まれることがわかった。

3-2 数値シミュレーション

3-2-1 熱平衡モデル

熱平衡モデルシミュレーションでは、反応(1-2)により、MALDI 結晶から脱離したマトリックス $[M]_0$ から生成した正負マトリックスイオンの初期値 $[MH^+]_0$ と $[(M-H)^-]_0$ の $[M]_0$ に対する割合を表すパラメーター、マトリックス剤のイオン化効率 a を導入した。

$$[MH^+]_0 = [(M-H)^-]_0 = a[M]_0 \quad (3-1)$$

次に、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達したと仮定すると、(1-5)、(1-6)式における中性分子種、イオン種の相対量は、次のように表現できる。

$$[M]_e = [M]_0 + [AH^+]_e + [(A-H)^-]_e - [MH^+]_0 - [(M-H)^-]_0 \quad (3-2)$$

$$[A]_e = [A]_0 - [AH^+]_e - [(A-H)^-]_e \quad (3-3)$$

$$[MH^+]_e = a[M]_0 - [AH^+]_e \quad (3-4)$$

$$[(M-H)^-]_e = a[M]_0 - [(A-H)^-]_e \quad (3-5)$$

(3-2)～(3-5)式を(1-5)、(1-6)式に代入すると、(3-6)、(3-7)式が得られる。

$$K_+ = \frac{(1-2a)[M]_0 + [AH^+]_e + [(A-H)^-]_e}{[A]_0 - [AH^+]_e - [(A-H)^-]_e} \frac{[AH^+]_e}{a[M]_0 - [AH^+]_e} \quad (3-6)$$

$$K_- = \frac{(1-2a)[M]_0 + [AH^+]_e + [(A-H)^-]_e}{[A]_0 - [AH^+]_e - [(A-H)^-]_e} \frac{[(A-H)^-]_e}{a[M]_0 - [(A-H)^-]_e} \quad (3-7)$$

K_+ 、 K_- の値は、(1-5)、(1-6)式により、 ΔG_+° 、 ΔG_-° および T が決定することで得られる。 ΔG_+° 、 ΔG_-° は定数であるため、 a 、 T の値を仮定すると、(3-6)、(3-7)式により、まず、仮定した a 、 T に対応する $[AH^+]_e$ 、 $[(A-H)^-]_e$ の値が得られる。次に(3-2)～(3-5)式により、得られた $[AH^+]_e$ 、 $[(A-H)^-]_e$ の値から、 $[M]_e$ 、 $[A]_e$ 、 $[MH^+]_e$ 、 $[(M-H)^-]_e$ の値が得られる。

しかしながら、これらの熱平衡モデルシミュレーションから得られた値は、プルーフ中のプロトン移動反応が完全に熱平衡状態に到達した場合の値である。

3-2-1 準熱平衡モデル

前項 3-2-1 では、MALDI プルーフ中のプロトン移動反応が、熱平衡状態に到達していることを仮定した熱平衡モデルシミュレーションを記述した。仮に、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達する前に MALDI プルーフが膨張し、プルーフ中の分子種が無衝突状態になった場合、プロトン移動反応は、熱平衡状態には到達しないことになる。この場合には、前項の(1-15)、(1-16)式で、MALDI 信号を再現することはできない。そこで、本項では、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達しないことを考慮に入れたパラメーターである反応到達度 b_+ 、 b_- を導入した準熱平衡モデルシミュレーションについて記述する。プルーフ中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していない場合のプルーフ中の分子種 $[M]_b$ 、 $[A]_b$ 、イオン種 $[AH^+]_b$ 、 $[(A-H)^-]_b$ 、 $[MH^+]_b$ 、 $[(M-H)^-]_b$ は、正イオン側のプロトン移動反応(1-3)の反応到達度 b_+ ($0 \leq b_+ \leq 1$)、負イオン側のプロトン移動反応(1-4)の反応到達度 b_- ($0 \leq b_- \leq 1$) を用いると、到達していない場合の、 $[M]_b$ 、 $[A]_b$ 、 $[AH^+]_b$ 、 $[(A-H)^-]_b$ 、 $[MH^+]_b$ 、 $[(M-H)^-]_b$ は、(3-6)、(3-7)式で求めた $[AH^+]_e$ 、 $[(A-H)^-]_e$ の値を用いて、次のように表現することができる。

$$[M]_b = [M]_0 + b_+[AH^+]_e + b_-[(A-H)^-]_e - [MH^+]_0 - [(M-H)^-]_0 \quad (3-8)$$

$$[A]_b = [A]_0 - [AH^+]_e - [(A-H)^-]_e \quad (3-9)$$

$$[AH^+]_b = b_+[AH^+]_e \quad (3-10)$$

$$[(A-H)^-]_b = b_-[(A-H)^-]_e \quad (3-11)$$

$$[MH^+]_b = a[M]_0 - b_+[AH^+]_e \quad (3-12)$$

$$[(M-H)^-]_b = a[M]_0 - b_-[(A-H)^-]_e \quad (3-13)$$

従って、(3-8)～(3-13)式と(3-1)式より、(1-15)、(1-16)式は、次式のように表現することができる。

$$Q_+ = \frac{(1-2a)[M]_0 + b_+[AH^+]_e + b_-[(A-H)^-]_e}{[A]_0 - b_+[AH^+]_e - b_-[(A-H)^-]_e} \frac{b_+[AH^+]_e}{a[M]_0 - b_+[AH^+]_e} \quad (3-25)$$

$$Q_- = \frac{(1-2a)[M]_0 + b_+[AH^+]_e + b_-[(A-H)^-]_e}{[A]_0 - b_+[AH^+]_e - b_-[(A-H)^-]_e} \frac{b_-[(A-H)^-]_e}{a[M]_0 - b_-[(A-H)^-]_e} \quad (3-26)$$

ここで、 Q_+ および Q_- は反応商である。

よって、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達していない場合の $[M]_b$ 、 $[A]_b$ 、 $[AH^+]_b$ 、 $[(A-H)^-]_b$ 、 $[MH^+]_b$ 、 $[(M-H)^-]_b$ の関係は、次式のように表現できる。

$$\ln \frac{[AH^+]_b}{[MH^+]_b} = \ln \frac{[A]_b}{[M]_b} + \ln Q_+ \quad (3-27)$$

$$\ln \frac{[(A-H)^-]_b}{[(M-H)^-]_b} = \ln \frac{[A]_b}{[M]_b} + \ln Q_- \quad (3-28)$$

これらにより、 T 、 a 、 b の値を仮定することで得られたシミュレーション値と実験値を比較することにより、 T 、 a 、 b の値の最適値を求めることができる。準熱平衡モデルでは、混合結晶から脱離したマトリックス剤の全量から、生成された MH^+ 、 $(M-H)^-$ の割合を表す変数 a を用いたため、仮に、前述の複数の過程で MH^+ 、 $(M-H)^-$ が生成されていてもモデルへの影響は a に含まれている。また、仮に、前述のようにレーザー照射前の混合結晶中に **performed ion** が含まれ、 AH^+ 、 $(A-H)^-$ を生成させる過程があったとしても、これらがブルーム中のプロトン移動反応に含まれていれば、本研究で用いたモデルでは、反応到達度 b という変数に含まれる。

3-3 MALDI 信号強度比の再現によるパラメーター値の決定

前述のとおり、準熱平衡モデルは、マトリックス剤のイオン化効率 a 、MALDIブルーム中の実効的な温度 T 、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達しないことを考慮に入れたパラメーターである反応到達度 b の3つに依存しており、それぞれ、 $a = 10^{-2} \sim 10^{-8}$ 、

$T = 800 \sim 1300 \text{ K}$, $b = 0.05 \sim 1$ と仮定し、 $[M]$ と $[A]$ の濃度は、 $[M] = 1$, $[A] = 1 \sim 1 \times 10^{-4}$ とした。また、試料とマトリックス剤の気相酸性度(Gas phase acidity : G_A°)と気相塩基性度(Gas phase basicity : G_B°)は、文献値を用いて、 $G_A^\circ(\text{Phe}) = 1379.0 \text{ kJ/mol}$ [3.1]、 $G_A^\circ(\text{Ala}) = 1398.5 \text{ kJ/mol}$ [3.1]、 $G_A^\circ(\text{DHB}) = 1329.4 \text{ kJ/mol}$ [3.2]、 $G_B^\circ(\text{Phe}) = 887.4 \text{ kJ/mol}$ [3.3]、 $G_B^\circ(\text{Ala}) = 863.6 \text{ kJ/mol}$ [3.3]、 $G_B^\circ(\text{DHB}) = 822 \text{ kJ/mol}$ [3.4] とした。数値シミュレーションは、(3-25)、(3-26)式に基づき、計算ソフトcalkingを用いて、各試料混合比 $[A]_0/[DHB]_0$ に対する $[\text{AH}^+]_e$ 、 $[(\text{A-H})^-]_e$ の値を計算した。 $[\text{AH}^+]_e$ 、 $[(\text{A-H})^-]_e$ の値から、(3-10)、(3-11)式により、 $b = 0.05 \sim 0.99$ の場合の各値を求めた。その後、数値シミュレーションにより算出された値と実験値を最小二乗フィッティングし、準熱平衡モデルに基づくシミュレーションのパラメーター値、 a 、 T 、 b を決定した。図3-3-1(a) は、図2-5-4(a)で解析したスペクトルと同じスペクトルから得られた $(\text{Phe})\text{H}^+$ と $(\text{DHB})\text{H}^+$ の信号強度の合計を一定として規格化し、試料混合比 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ に対して、 $(\text{Phe})\text{H}^+$ 、 $(\text{DHB})\text{H}^+$ 信号強度を対数プロットした図である。

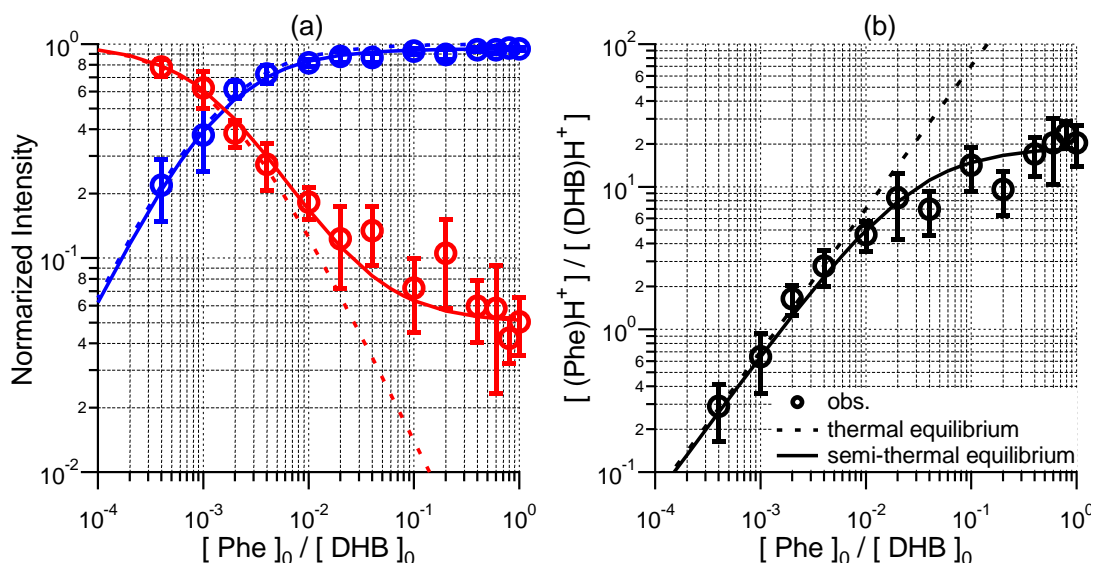


図 3-3-1 : Phe/DHB 混合結晶における $[A]_0/[M]_0$ に対する MALDI 信号強度変化

- (a) $\circ [PheH^+]$ (実験値), $\circ [DHBH^+]$ (実験値), $- [PheH^+]$ ($b=0.95, T=1200K$),
 $- [PheH^+]$ ($a=10^{-5}, b=0.95, T=1200K$), $- - [PheH^+]$ ($a=10^{-5}, b=1, T=1200K$),
 $- - [DHBH^+]$ ($a=10^{-5}, b=1, T=1200K$)
- (b) $\circ [PheH^+]/[DHBH^+]$, $- [PheH^+]$ ($a=10^{-5}, b=0.95, T=1200K$),
 $- - [PheH^+]$ ($a=10^{-5}, b=1, T=1200K$)

この図から、 $[Phe]_0/[DHB]_0$ 比が増加するにしたがって、 $(Phe)H^+$ 信号強度は増加し、 $(DHB)H^+$ 信号強度は減少していることがわかる。これは、 $[Phe]_0/[DHB]_0$ 比が上昇するにしたがって、 $(DHB)H^+$ からプルーム中の中性分子種 Phe へのプロトン移動反応が進行していることを示している。また、図 3-3-1(b)は、試料混合比 $[Phe]_0/[DHB]_0$ に対して、図 3-3-1(a) の MALDI 信号強度比 $(Phe)H^+/(DHB)H^+$ を対数プロットした図である。仮に、プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達している場合、試料混合比 $[Phe]_0/[DHB]_0$ と MALDI 信号強度比 $(Phe)H^+/(DHB)H^+$ は比例関係となるはずであるが、今回の実験結果では、高 $[Phe]_0/[DHB]_0$ 比領域において、MALDI 信号強度比 $(Phe)H^+/(DHB)H^+$ は比例関係とならず、ある一定値に収束している。これは、プルーム中のプロトン移動反応が、熱平衡状態に到達していないことを示しており、最小二乗フィッティングの結果、準熱平衡モデルに基づいたシミュレーションの条件が、 $a = 10^{-5}$

$\sim 10^{-8}$ 、 $b_+ = 0.95$ 、 $T = 1200\text{ K}$ の場合に、シミュレーション値と実験値の差が最小となった。また、 $a=10^{-5}\sim 10^{-8}$ の場合には、最小二乗法における残差の二乗和にほとんど差がなかった。

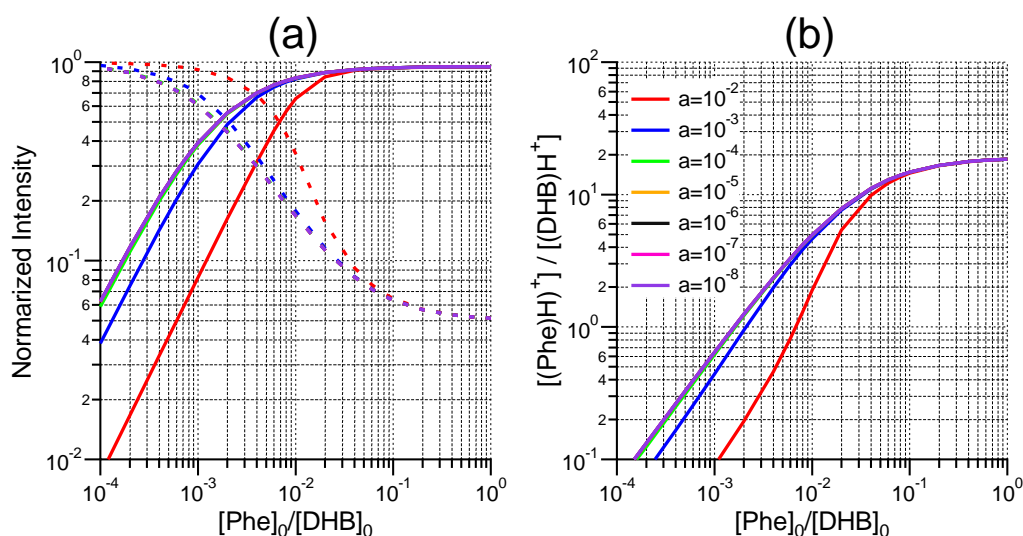


図 3-3-2 : Phe/DHB 混合結晶における a の変化($10^{-2}\sim 10^{-8}$)に対する MALDI 信号強度の変化($b=0.95, T=1200\text{ K}$)
(a) $[\text{PheH}^+]$ (実線)、 $[\text{DHBH}^+]$ (破線) (b) $[\text{PheH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ (実線)

図 3-3-2 に、 a を $10^{-2}\sim 10^{-8}$ に設定した場合の Phe/DHB 混合結晶における $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ に対する MALDI 信号強度変化のシミュレーション結果を示す。この図により、 a が小さい場合には、MALDI 信号強度比への寄与は、ほとんどないことがわかる。これは、 a が大きい値の場合には、 MH^+ の初期量が多いと中性分子種の A と反応せずに検出される MH^+ 量が相対的に多くなるが、 a が小さい場合には、 MH^+ に対する A の量が多いため、反応せずに検出される MH^+ 量が少なくなるためであると考えられる。よって、 a については上限値のみを決定し、 $a \leq 10^{-5}$ とした。図 3-3-3(a) は、図 2-5-1(b) で解析したスペクトルと同じスペクトルから得られた $(\text{Ala})\text{H}^+$ と $(\text{DHB})\text{H}^+$ の信号強度の合計を一定として規格化し、試料混合比 $[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ に対して $(\text{Ala})\text{H}^+$ 、 $(\text{DHB})\text{H}^+$ 信号強度を対数プロットした図である。Phe/DHB の場合と同様に、 $[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比が増加するにしたがって、

(Ala)H⁺ 信号強度は増加し、(DHB)H⁺ は減少しており、(DHB)H⁺ からプルーム中の中性分子種 Ala へのプロトン移動反応が進行していることがわかる。

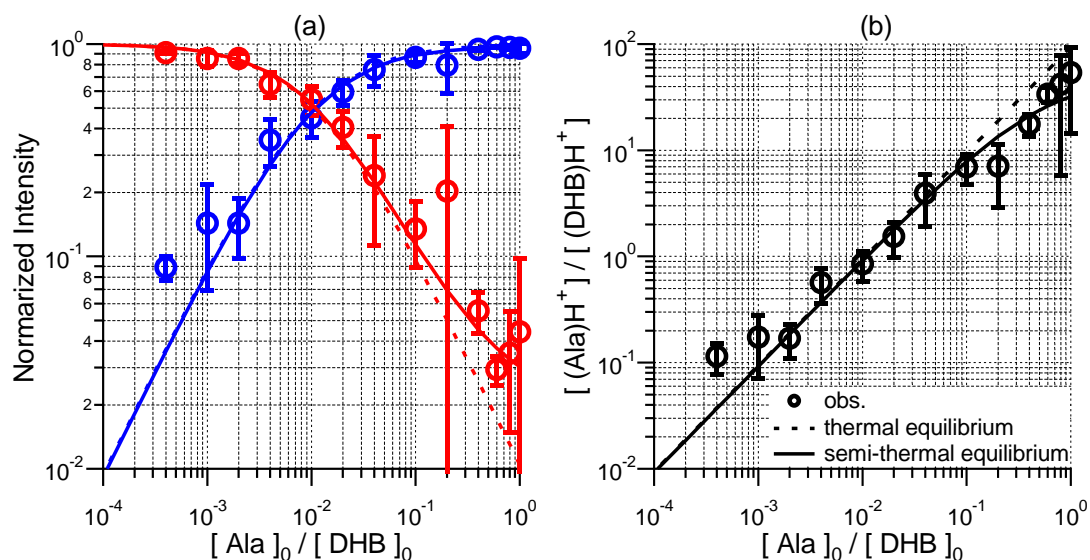


図 3-3-3 : Ala/DHB 混合結晶における $[A]_0/[M]_0$ に対する MALDI 信号強度変化
 (a) $\circ [AlaH^+]$ (実験値), $\circ [DHBH^+]$ (実験値), $- [AlaH^+]$ ($b=0.98, T=1100K$),
 (b) $- [AlaH^+]$ ($a=10^{-5}, b=0.98, T=1100K$), $- - [AlaH^+]$ ($a=10^{-5}, b=1, T=1100K$),
 $- - - [DHBH^+]$ ($a=10^{-5}, b=1, T=1100K$)

また、図 3-3-3(b)は、試料混合比 $[Ala]_0/[DHB]_0$ に対して、図 3-3-3(a) の MALDI 信号強度比 $(Ala)H^+/(DHB)H^+$ を対数プロットした図である。最小二乗フィッティングの結果、シミュレーションの条件が、 $a = 10^{-5} \sim 10^{-8}$ 、 $b_+ = 0.98$ 、 $T = 1100 K$ の場合に、シミュレーション値と実験値の差が最小となった。また、 $a = 10^{-5} \sim 10^{-8}$ の場合には、最小二乗法における残差の二乗和にほとんど差がなかった。図 3-3-4 に、 a を $10^{-2} \sim 10^{-8}$ に設定した場合の Ala/DHB 混合結晶における $[A]_0/[M]_0$ に対する MALDI 信号強度変化のシミュレーション結果を示す。

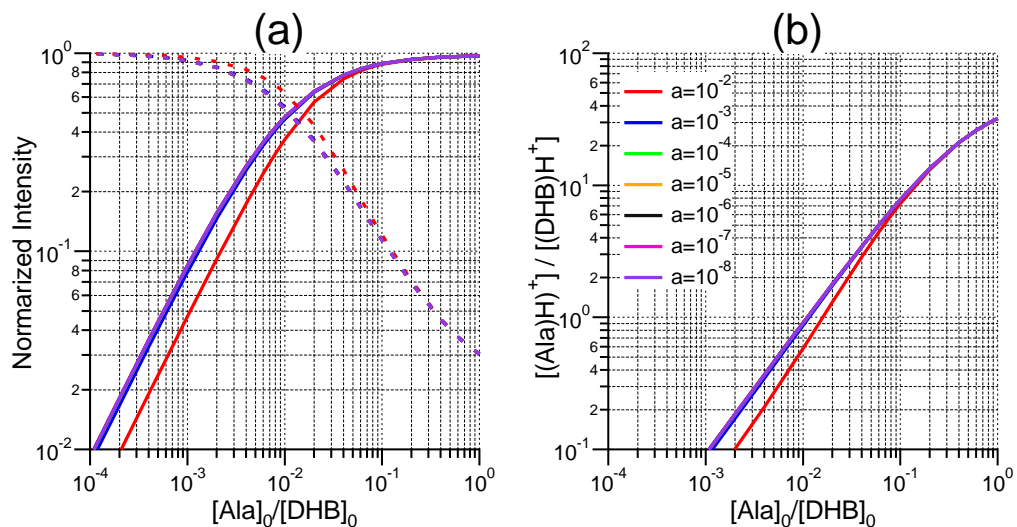


図 3-3-4 : Ala/DHB 混合結晶における a の変化($10^{-2} \sim 10^{-8}$)に対する
MALDI 信号強度の変化($b=0.98, T=1100K$)
(a) $[AlaH^+]$ (実線)、 $[DHBH^+]$ (破線) (b) $[AlaH^+]/[DHBH^+]$ (実線)

この図により、Ala/DHB の場合においても、Phe/DHB の場合と同様に、 a が小さい場合には、MALDI 信号強度比への寄与は、ほとんどないことがわかる。よって、 a については上限値のみを決定し、 $a \leq 10^{-5}$ とした。これにより、Phe/DHB、Ala/DHB どちらの場合においても、MALDI プルーム中のプロトン移動反応は、熱平衡状態に到達する前に、MALDI プルームが膨張し、プルーム中の分子種が無衝突状態になっていることが考えられた。

以上より、先行研究において、熱平衡モデルに基づいて、高 $[A]_0/[M]_0$ 比領域における MALDI 信号強度比の振舞いが再現できなかった原因は、MALDI プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していないことに起因するものであることが明らかとなった。

3-4 パラメーター値の評価

前項 3-3 の図 3-3-1、図 3-3-3 で示したように、準熱平衡モデルに基づいたシミュレーションと実験値の最小二乗フィッティングの結果から、中性分子種 M に対するプロトン化、脱プロトン化マトリックスの割合 a は、 $a \leq 10^{-5}$ 、プルーム中の正イオン側のプロトン移動反応の熱平衡状態への到達度 b_+ は、 $b_+ = 0.95-0.98$ 、プロトン移動反応が進行している際のプルームの実効温度 T は、 $T = 1100-1200\text{ K}$ であることがわかった。

本項では、以下、3-4-1～3-4-3 で、得られたパラメーター値の妥当性を考察する。

3-4-1 MALDI プルーム中のイオン種

MALDI プルーム中におけるマトリックスの中性分子種に対するプロトン化、脱プロトン化マトリックスの割合は、プロトン化、脱プロトン化試料の生成量に影響する為、過去に様々な手法で調べられている。

DHB 以外のマトリックス剤を使用して行われた研究としては、1991 年に Standing らのグループによって、insulin/SA 系の MALDI 混合結晶に 308 nm の紫外レーザー光 ($2 \times 10^6\text{ [W/cm}^2\text{]}$) を照射し、レーザーショットあたりの除去された中性分子を測定する実験が行われ、insulin のイオン-中性分子種比は、 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ であると報告されている[3.5]。その後、1993 年に、Johnston らのグループによって、248 nm の紫外レーザー光 ($2 \times 10^5\text{ [W/cm}^2\text{]}$) を照射して生成した MALDI プルームに、128.1 nm の VUV レーザー光 (9.67 [eV]) を照射し、dipentylamine/FA 系、dipentylamine/SA 系の dipentylamine、マトリックス剤のそれぞれのイオン-中性分子種比を求める実験が行われている[3.6]。この研究では、dipentylamine のイオン-中性分子種比は、 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ であり、マトリックス剤のイオン-中性分子種比は、これよりも小さいと報告されている。また、1994 年には、Sundqvist らのグループによって、石英結晶を用いた微量天秤 (QCM) で、355 nm の紫外レーザーにより、脱離した中性分子種量を測定する実験が行われ、FA のイオン-中性分子種比

は、 10^{-5} 未満であると報告されており[3.7]、1998 年には、Geohegan らのグループによって、193 nm の VUV レーザー光照射により脱離した 3-hydroxypicolinic acid のブルームに、308 nm の紫外レーザー光を照射することで、レーザー誘起蛍光 (LIF) を観測する方法で、3-hydroxypicolinic acid のイオン-中性分子種比は、 10^{-5} 程度であると報告されている[3.8]。

一方、DHB を使用して行われた研究としては、2013 年に Ni らのグループによって、355 nm の紫外レーザー光照射により MALDI 混合結晶から脱離した中性分子種を、設置角度を変更できる四重極質量分析計を使用して測定する実験が行われている[3.9]。この研究により、レーザー強度が、 $40 [J/m^2]$ の場合に、DHB のイオン-中性分子種比の上限値は、 4×10^{-9} 、 $250 [J/m^2]$ の場合には、 3×10^{-7} であることがわかり、レーザー強度によってイオン-中性分子種比が変化していることが示されている。また、DHB のイオン-中性分子種比の上限値は、DHB のみで作製された結晶にレーザー照射した場合、試料と DHB の混合結晶に照射した場合、どちらにおいても、DHB のイオン-中性分子種比の上限値は、変わらないことが示された。しかしながら、試料のイオン-中性分子種比は、bradykinin/DHB 系では、bradykinin : DHB = 1:10000 の場合には、 $6 \times 10^{-3} \sim 8 \times 10^{-3}$ (レーザー強度 : $96.7 [J/m^2]$)、bradykinin : DHB = 1:1000 の場合には、 $1 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-4}$ (レーザー強度 : $116 [J/m^2]$) となり、同じ試料でも、試料混合比 $[A]_0/[DHB]_0$ により、イオン-中性分子種比が異なることが示されている。さらに、tryptophan : DHB = 1:1000 の場合には、 $1 \times 10^{-5} \sim 9 \times 10^{-4}$ (レーザー強度 : $96.7 [J/m^2]$)、glycine : DHB = 1:50 の場合には、 $2 \times 10^{-8} \sim 9 \times 10^{-7}$ (レーザー強度 : $115 [J/m^2]$) となり、試料のイオン-中性分子種比は、試料濃度だけではなく、試料種類自体にも大きく影響することが示された。その後、2015 年に Ni らのグループは、DHB と DHB 以外のマトリックス剤(CHCA、SA、FA) についても同様の手法で、イオン-中性分子種比を求めている[3.10]。その結果、DHB、SA、FA のイオン-中性分子種比の実験値の上限値は、レーザー強度が、 $\sim 250 [J/m^2]$ の場合に、

9×10^{-7} 未満であるのに対して、CHCA のイオン-中性分子種比の実験値の上限値は、レーザー強度が、 $\sim 100 \text{ [J/m}^2\text{]}$ の場合で、 8×10^{-6} となり、同様の条件の DHB、SA、FA のイオン-中性分子種比より 3 桁ほど高い値となることが示された。しかしながら、CHCA の場合においても、MALDI プルーム中の中性分子種に対する割合は、極めて小さいことがわかる。

本研究で用いた準熱平衡モデルに基づいたシミュレーションにおいても、試料、マトリックス剤、それぞれのイオン-中性分子種比を求めることができる。

図 3-4-1 に、前述の Phe/DHB の実験値とシミュレーション値の最小二乗フィッティングにより導き出されたパラメーターの最適値、 $b = 0.95$ 、 $T = 1200 \text{ K}$ を用いて、MALDI 過程の 1 次イオン化過程におけるマトリックス剤のイオン化効率 a を、 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ に設定した場合の、試料混合比 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ に対する、Phe、DHB、それぞれのイオン-中性分子種比のシミュレーション値の変化を示す。このシミュレーションにより、DHB のイオン-中性分子種比は、 $a = 10^{-5}$ の場合に $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 、 $a = 10^{-6}$ の場合に $10^{-6} \sim 10^{-8}$ 、 $a = 10^{-7}$ の場合に $10^{-7} \sim 10^{-9}$ 、 $a = 10^{-8}$ の場合に $10^{-8} \sim 10^{-10}$ となることがわかった。この結果は、前述の Ni らのグループによって示された DHB のイオン-中性分子種比と比較しても妥当な値である。また、DHB のイオン-中性分子種比は、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比が増加するにしたがって、減少傾向を示している。これは、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比が増加すると、1 次イオン化過程で生成した $(\text{DHB})\text{H}^+$ と、プルーム中における中性分子種の Phe との衝突確率が上昇し、 $(\text{DHB})\text{H}^+$ から中性分子種 Phe へのプロトン移動反応が進行し、 $(\text{DHB})\text{H}^+$ のイオン量が減少するためである。

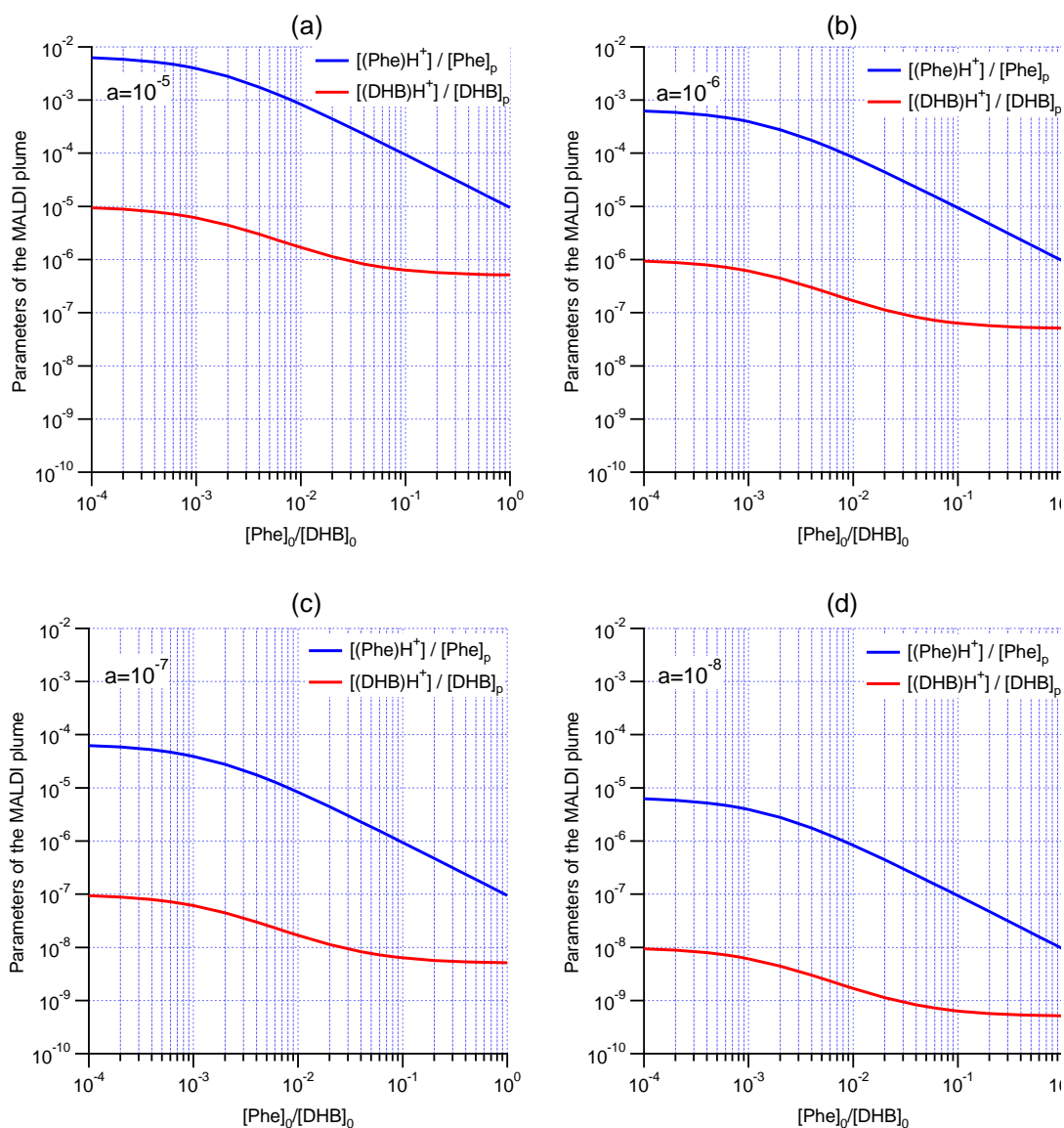


図 3-4-1 : $[(\text{Phe})\text{H}^+]/[\text{Phe}]_p$, $[(\text{DHB})\text{H}^+]/[\text{DHB}]_p$ vs $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ プロット
 における M のイオン化効率による影響 ($b=0.95$, $T=1200\text{K}$)
 (a) $a=10^{-5}$ 、(b) $a=10^{-6}$ 、(c) $a=10^{-7}$ 、(d) $a=10^{-8}$

一方、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比が減少すると、 $(\text{DHB})\text{H}^+$ と plume 中における中性分子種 Phe との衝突確率が減少するため、 $(\text{DHB})\text{H}^+$ の初期イオン量は、中性分子種 Phe との反応後の $(\text{DHB})\text{H}^+$ のイオン量と比較し、ほとんど差がなくなる。よって、例えば、図 3-4-1(a) ~ (d) においては、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0 = 10^{-4}$ の場合、 a をどの値に設定しても設定した a と、おおよそ同じ値になっている。一方、 Phe のイオン-中性分子種比は、 $a = 10^{-5}$ の場合に

$10^{-2} \sim 10^{-5}$ 、 $a = 10^{-6}$ の場合に $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 、 $a = 10^{-7}$ の場合に $10^{-4} \sim 10^{-7}$ 、 $a = 10^{-8}$ の場合に $10^{-5} \sim 10^{-8}$ となり、DHB のイオン-中性分子種比と比較し変化量が大きいことがわかった。
 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比が増加するにしたがって、プルーム中の Phe と $(\text{DHB})\text{H}^+$ との衝突確率が上昇し、 $(\text{DHB})\text{H}^+$ から Phe へのプロトン移動反応が進行し、 $(\text{Phe})\text{H}^+$ のイオン量が増加する。よって、一見、Phe のイオン-中性分子種比は、増加傾向を示すと予想されるが、シミュレーションでは、DHB のイオン-中性分子種比と同様に減少傾向を示している。これは、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比が増加すると、 $(\text{Phe})\text{H}^+$ のイオン量は増加しているが、プルーム中のイオン量は、中性分子種量に対して極めて小さいため、 $(\text{Phe})\text{H}^+$ のイオン量の増加量は、 $[\text{Phe}]_0$ の増加量と比較し小さくなるため、結果として、Phe のイオン-中性分子種比は、 $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比が増加するにしたがって、減少傾向を示していると考えられる。

図 3-4-2 に、前述の Phe/DHB の場合と同様に、Ala/DHB の実験値とシミュレーション値の最小二乗フィッティングにより導き出されたパラメーターの最適値、 $b = 0.98$ 、 $T = 1100 \text{ K}$ を用いて、試料混合比 $[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ に対する、Ala、DHB、それぞれのイオン-中性分子種比のシミュレーション値の変化を示す。このシミュレーションにより、DHB のイオン-中性分子種比は、 $a = 10^{-5}$ の場合に $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 、 $a = 10^{-6}$ の場合に $10^{-6} \sim 10^{-8}$ 、 $a = 10^{-7}$ の場合に $10^{-7} \sim 10^{-9}$ 、 $a = 10^{-8}$ の場合に $10^{-8} \sim 10^{-10}$ となり、Phe/DHB の場合と大きく変わらないことがわかった。

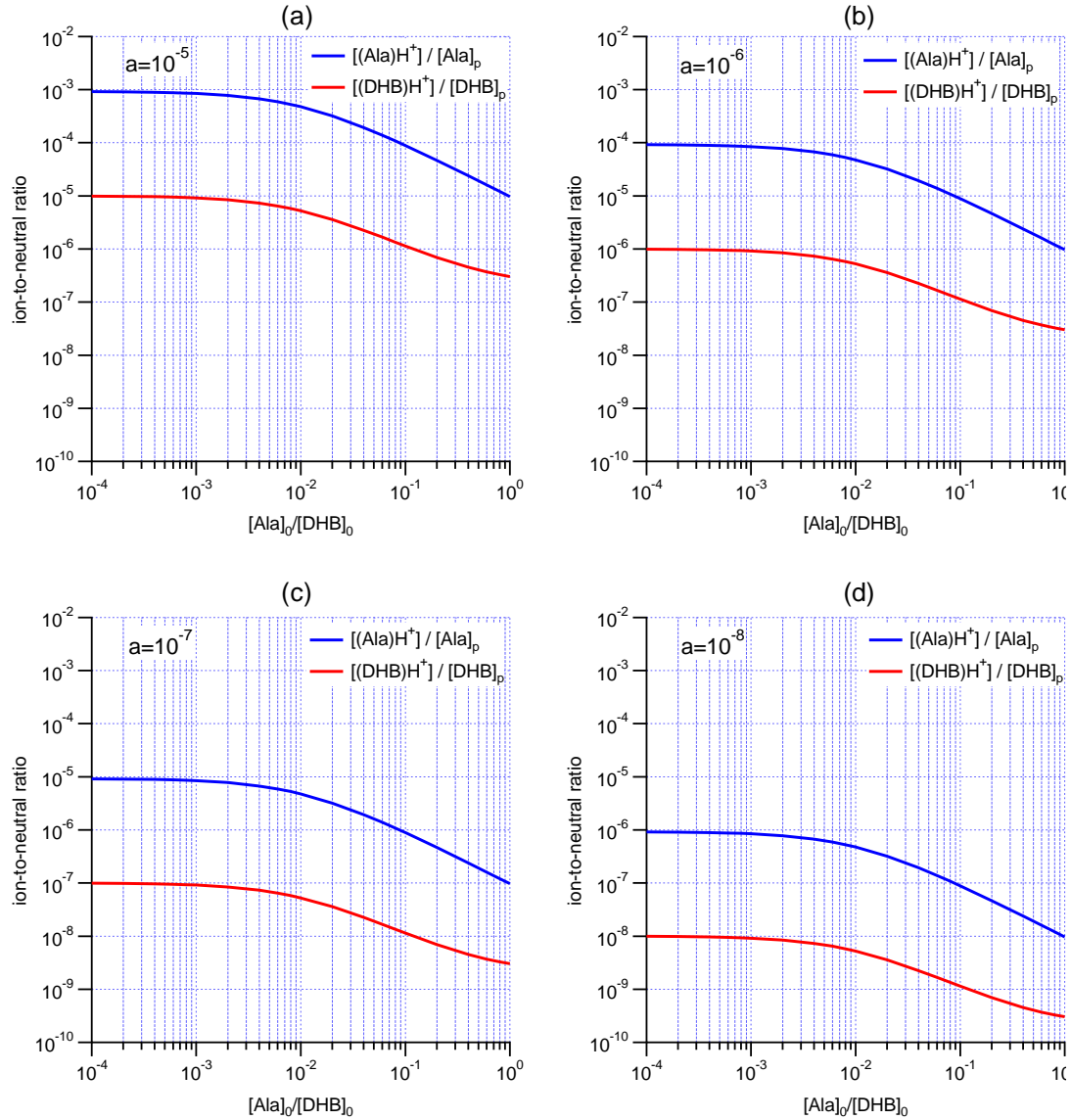


図 3-4-2 : $[(\text{Ala})\text{H}^+]/[\text{Ala}]_p$, $[(\text{DHB})\text{H}^+]/[\text{DHB}]_p$ vs $[\text{Ala}]_0/[\text{DHB}]_0$ プロット
 における M のイオン化効率による影響 ($b=0.98$, $T=1100\text{K}$)
 (a) $a=10^{-5}$ 、(b) $a=10^{-6}$ 、(c) $a=10^{-7}$ 、(d) $a=10^{-8}$

一方、Ala のイオン-中性分子種比は、 $a = 10^{-5}$ の場合に $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 、 $a = 10^{-6}$ の場合に $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 、 $a = 10^{-7}$ の場合に $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 、 $a = 10^{-8}$ の場合に $10^{-6} \sim 10^{-8}$ となった。これにより、Phe/DHB の場合の Phe のイオン-中性分子種比の変化量と比較して、Ala のイオン-中性分子種比の変化量は小さくなることがわかった。熱平衡モデルにおいては、(1-15) 式により、試料とマトリックス剤の標準ギブズ自由エネルギーの差 ΔG_+° が大きいほど、

$[\text{AH}^+]$ の生成量は少なくなる。したがって、Phe の ΔG_+° は-65.4、Ala の ΔG_+° は-41.6 であり、Phe の ΔG_+° と比較し Ala の ΔG_+° の方が大きいことから、同じ $[\text{A}]_0/[\text{DHB}]_0$ 比では、 $(\text{Ala})\text{H}^+$ の生成量が、 $(\text{Phe})\text{H}^+$ の生成量より少なくなるため、Phe のイオン-中性分子種比の変化量と比較して、Ala のイオン-中性分子種比の変化量は、小さくなっていると考えられる。

3-4-2 実効温度

プルーム中の温度は、レーザー照射直後から断熱膨張して広がり続けるため経時的に変化している。よって、本研究で求められた温度は、プルーム中のプロトン移動反応が終了した時点の実効的なプルーム中の温度を指している。図 3-4-3、3-4-4 に、 a の値を 10^{-5} 、 b の値を 0.95 に仮定し、 T の値を 800~1300 K に変化させた場合の Phe/DHB、Ala/DHB 混合結晶における MALDI 信号強度のシミュレーション値の変化を示す。

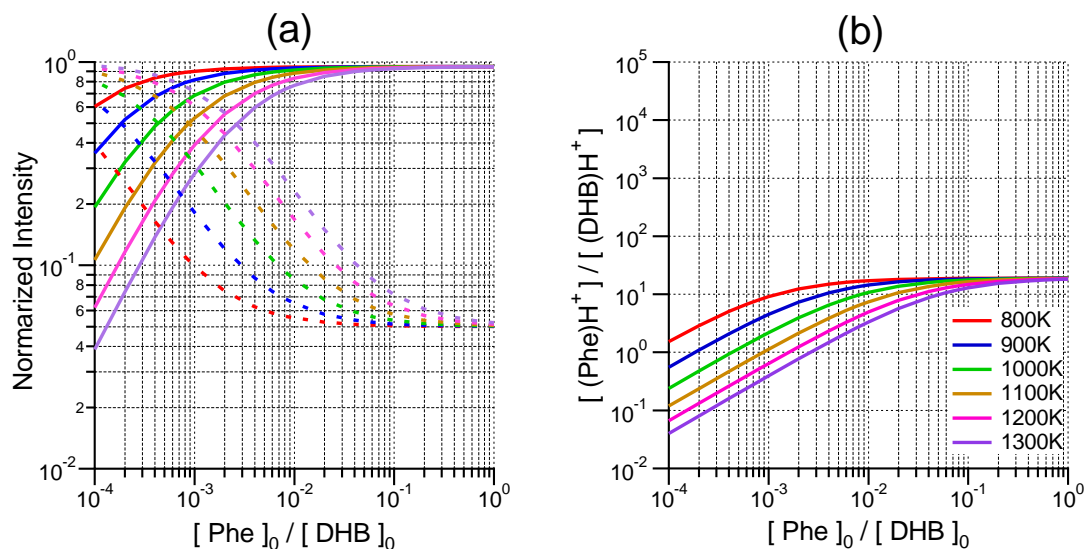


図 3-4-3 : Phe/DHB 混合結晶における T の変化(800~1300K)に対する MALDI 信号強度の変化($a=10^{-5}$, $b=0.95$)
 (a) $[\text{PheH}^+]$ (実線)、 $[\text{DHBH}^+]$ (破線) (b) $[\text{PheH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ (実線)

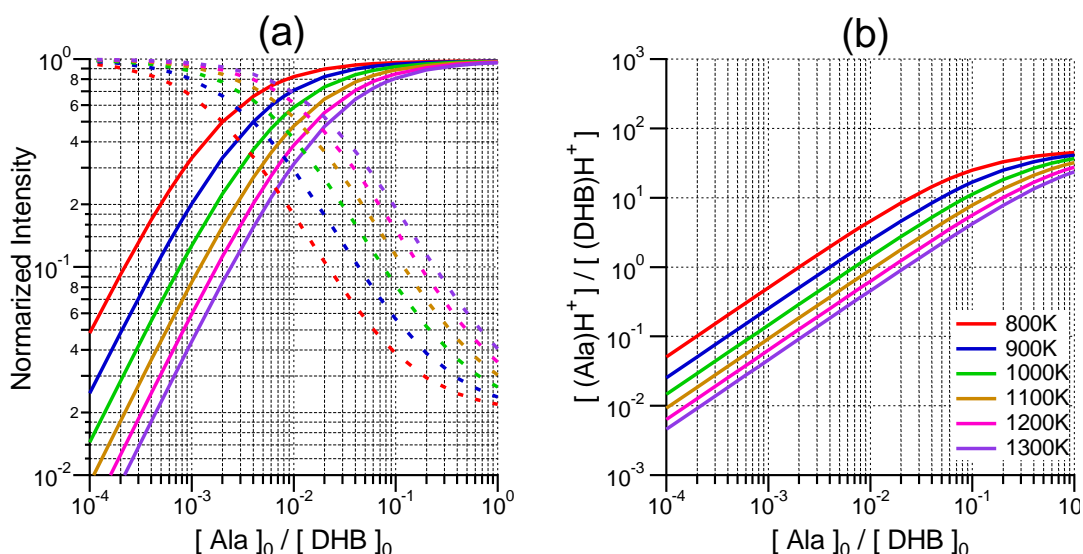


図 3-4-4 : Ala/DHB 混合結晶における T の変化(800~1300K)に対する MALDI 信号強度の変化($a=10^{-5}, b=0.98$)
 (a) $[\text{AlaH}^+]$ (実線)、 $[\text{DHBH}^+]$ (破線) (b) $[\text{AlaH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ (実線)

このシミュレーションにより、プルーム中の温度 T が上昇すると、 AH^+ 信号は、 MH^+ 信号と比較し相対的に低くなり、 $[\text{AH}^+]/[\text{MH}^+]$ 比は低下することがわかった。また、実効温度による影響は、高 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 領域では、 $[\text{AH}^+]/[\text{MH}^+]$ 比はほとんど影響せず、低 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 領域の方で大きく影響することがわかった。

よって、熱平衡モデルにおいて、 T は、 AH^+ の生成量に影響する為、過去に様々な手法で値が報告されている。

Kim らのグループによると、MALDI プルーム中の温度変化は、 $[\text{MH}^+]$ が生成される初期プルーム中の実効温度(T_{ve}) → インソース分解が起こっている際のプルーム中の実効温度(T_{early}) → プルームの断熱膨張が完了した際のプルーム中の温度(T_{late}) に区分されている[3.11]。ここで、インソース分解とは、イオン化と同時にあるいはイオン化直後にイオン化室で起こるフラグメンテーションのことを指している。一方、ポストソース分解とは、生成したイオンが、ドリフト領域で、イオン自身の過剰な内部エネルギーや残留ガスとの衝突によって起こるフラグメンテーションのことを指している。DHB の

T_{early} 、 T_{late} は、フラグメンテーションのパターンから決定された内部エネルギーに基づいて、 $T_{\text{early}} = 785\text{-}1000\text{ K}$ [3.12-3.14]、 $T_{\text{early}} = 400\text{-}430\text{ K}$ の範囲にあると報告されている [3.13-3.15]。

先行研究では、プルーム中のプロトン移動反応は、 T_{early} 、で起こっているという報告もあるが、今回の実験結果 $1100\text{-}1200\text{ K}$ からは、 T_{early} より前に進行していることが考えられる。

3-4-3 熱平衡到達度

ここで示しているプルーム中のプロトン移動反応の熱平衡到達度 b_+ 、 b_- の値は、プルーム中の温度と同様に、プロトン移動反応が終了した時点の実効的な値を指している。本研究により、熱平衡到達度 b_+ の値は、 $b_+ = 0.95\text{-}0.98$ であることがわかった。これにより、MALDI プルーム中のプロトン移動反応が、熱平衡状態に到達する前に、MALDI プルームが膨張し、プルーム中の分子種が無衝突状態になっていると考えられる。図 3-4-5 に、Phe/DHB 混合結晶、Ala/DHB 混合結晶における熱平衡到達度の変化に対する MALDI 信号強度比の変化を示す。

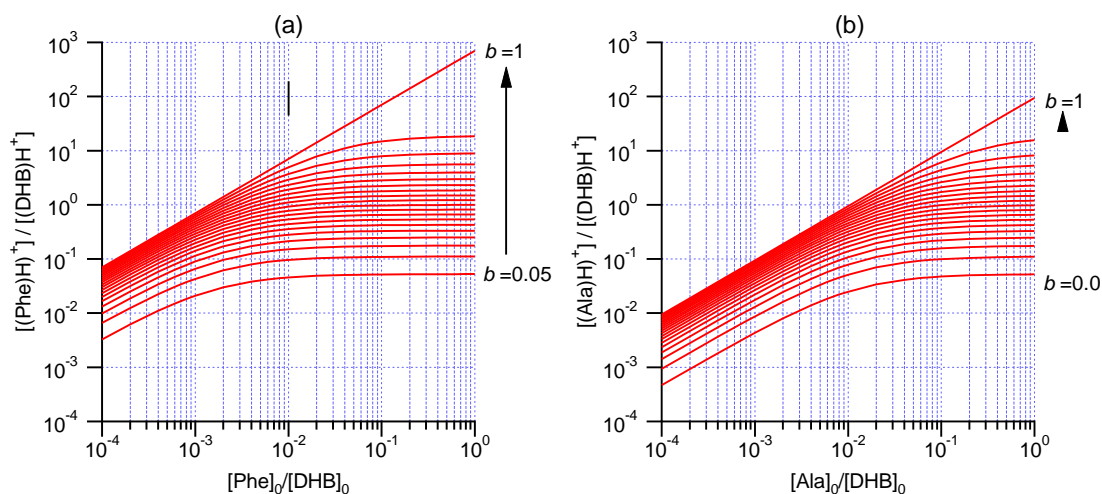


図 3-4-5：熱平衡到達度 b の変化に対する MALDI 信号強度比の変化

(a) $[\text{PheH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ ($a=10^{-5}$, $T=1200\text{K}$, $b=0.05\sim 1$: b は 0.05 間隔で表示)

(b) $[\text{AlaH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ ($a=10^{-5}$, $T=1100\text{K}$, $b=0.05\sim 1$: b は 0.05 間隔で表示)

これらの図により、熱平衡到達度は、高 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 比領域では、 $[\text{AH}^+]/[\text{MH}^+]$ 比に大きく影響するが、低 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 比領域では、影響が小さいことがわかった。これは、図 3-4-3, 図 3-4-4 で示した MALDI プルーム中の実効温度による影響とは逆の振舞いである。よって、 $[\text{AH}^+]/[\text{MH}^+]$ は、高 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 領域においては、熱平衡到達度の影響を強く受け、低 $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 比領域においては、MALDI プルーム中の実効温度の影響を強く受けることがわかった。また、熱平衡到達度は、さまざまなファクターによる影響を受けていると考えられる。熱平衡到達度に影響を与えるファクターとしては、例えば、(i)レーザー強度とレーザースポットサイズ、(ii)吸収断面積、(iii)プルーム中の密度と膨張速度、(iv) $[\text{A}]_0/[\text{M}]_0$ 比、(v)結晶の不均一性、(vi)TOF の加速領域での遅延引出しの有無、(vii) レーザーショット回数による影響、(viii) プロトン移動反応以外の反応による影響などが挙げられる。以下に詳細を記述する。

(i)レーザー強度とレーザースポットサイズ

レーザー強度は、MALDI プルーム中の実効温度 T に影響する。Phe/DHB, Ala/DHB の

それぞれの ΔG_+° は、-65.4、-41.6 であり負の値であるため、(1-5)、(1-6)式により、プルーム中の温度 T が高くなると、プルーム中のプロトン移動反応の反応速度が小さくなる。反応速度が小さくなると、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達する時間が長くなるため、レーザー照射からプルーム中の分子種が無衝突状態になるまで時間によっては、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達しないままイオン種が検出される可能性が高くなる。よって、プルーム中の温度 T の変化は、到達度に影響することになる。また、レーザースポットサイズは、レーザーの集光点からの距離に影響する為、全体のレーザー強度が同じ場合でも、レーザー照射地点とレーザーの集光点の距離が小さいほど、単位面積当たりのレーザー強度が高くなり、熱平衡到達度に影響を与える。

今回の実験では、レーザー照射地点とレーザーの集光点の距離を離れたため、レーザースポットサイズが、2 mm×4 mm と、典型的なレーザースポットサイズが 100 μm × 100 μm であるのに対して非常に大きく、単位面積当たりのレーザー強度が比較的に低いいため、典型的な MALDI 法を用いた場合より、反応速度が遅くなり、レーザー照射からプルーム中のプロトン移動反応が終了するまでの時間によっては、熱平衡到達度は低くなる可能性がある。

(ii) 吸収断面積

吸収断面積は、分子が光を吸収する際の尺度であり、吸収断面積が高ければ光の吸収効率が上がるため、MALDI プルームの温度 T が高くなる。よって、(i)と同様に、MALDI プルームの温度 T が高くなれば、プルーム中のプロトン移動反応の反応速度が速くなるため、吸収断面積は、熱平衡到達度に影響を与える因子である。

(iii) プルーム中の密度と膨張速度

プルームの膨張速度が上昇すると、プルーム中の密度は減少する。また、プルーム中の密度が減少すると、プルーム中の分子種、イオン種の衝突確率は小さくなる為、 $[\text{AH}^+]$ の生成量が減少し、熱平衡到達度が下がる。したがって、初期プルームの密度と比較し

て後期プルームの密度は低いため、プルーム中の密度は、経時的に変化しており、結果的に、到達度も経時的に変化していることがわかる。

(iv) $[A]_0/[M]_0$

プルームの膨張速度が $[A]_0/[M]_0$ の影響を受けないと仮定すると、 $[A]_0$ に対して $[M]_0$ が多い場合、MALDI プルーム中における $[M]_0$ から生成される MH^+ と中性分子種 A の衝突確率が減少するため、熱平衡到達度が低くなる。一方、 $[M]_0$ に対して $[A]_0$ が多い場合、MALDI プルーム中における MH^+ と A の衝突確率が増加するため、熱平衡到達度が高くなる。よって、 $[A]_0/[M]_0$ は熱平衡到達度に影響を与える因子である。また、マトリックス剤は、試料と比較し光の吸収効率が高いので、高 $[A]_0/[M]_0$ 領域では、低 $[A]_0/[M]_0$ 領域と比較し、単位面積当たりのマトリックス剤の割合が少なくなるため、温度 T が低くなる。よって、マトリックス剤や試料の組み合わせによって、温度 T は異なり、結果として熱平衡到達度は厳密には異なることが考えられる。

(v) 結晶の不均一性

結晶中のある領域に対するマトリックス剤と試料の混合比を $[A]_1/[M]_1$ ($A_1 < A_0$, $M_1 < M_0$) とおくと、MALDI 混合結晶中マトリックス剤と試料が均一に分布していない場合には、① $[A]_1/[M]_1 > [A]_0/[M]_0$ 、② $[A]_1/[M]_1 < [A]_0/[M]_0$ の 2 種類の領域が複数存在しているはずである。①の場合、 $[M]_1$ から生成される MH^+ の生成量は、 $[M]_0$ から生成される MH^+ の生成量より少ないが、 $[M]_1$ に対して $[A]_1$ が多く、MALDI プルーム中における MH^+ と A の衝突確率が上昇する為、この領域では、 $[A]_0/[M]_0$ 比の場合の到達度と比較して、 $[A]_1/[M]_1$ の熱平衡到達度は高くなる。一方、②の場合も、 $[M]_1$ から生成される MH^+ の生成量は、 $[M]_0$ から生成される MH^+ の生成量より少ないが、 $[M]_1$ に対して $[A]_1$ も少ない為、MALDI プルーム中における MH^+ と A の衝突確率は減少する為、この領域では、 $[A]_0/[M]_0$ 比の場合の到達度と比較して、 $[A]_1/[M]_1$ の熱平衡到達度は低くなる。全体としての熱平衡到達度は、①、②の足し合わせで決定するため、結晶の不均一性は、熱平衡

到達度に影響することになる。

図 3-4-6 は、Phe/DHB 混合結晶が均一である場合と、① $0.9[\text{Phe}]_0/0.1[\text{DHB}]_0$ と、② $0.1[\text{Phe}]_0/0.9[\text{DHB}]_0$ の 2 種類の領域が 1 カ所ずつ存在している不均一な混合結晶の MALDI 信号強度の $[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0$ に対する変化を、 $b = 1$ 、 $a = 10^{-5}$ と仮定し、シミュレーションしたものである。

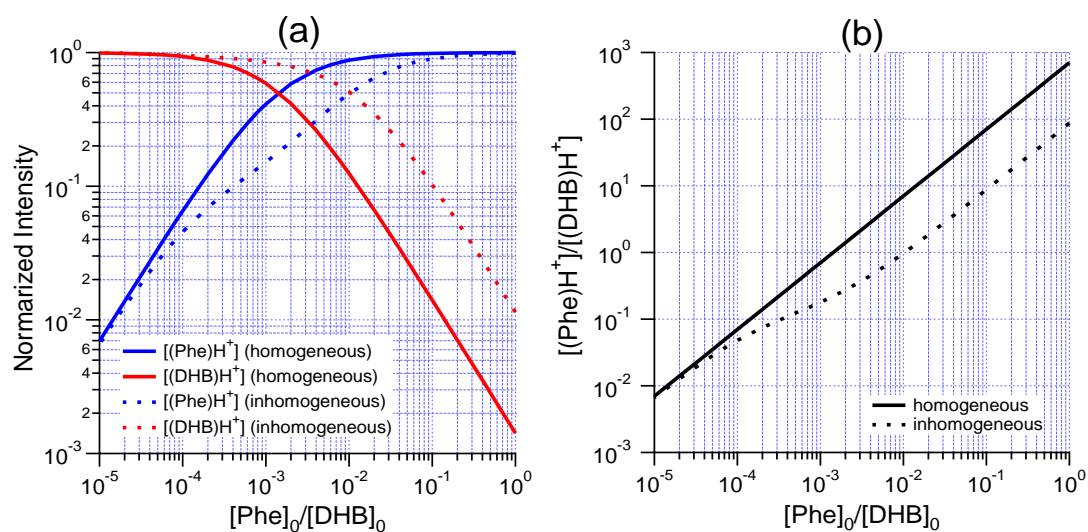


図 3-4-6 : Phe/DHB 混合結晶の不均一性による MALDI 信号強度比の影響
(実線) 均一結晶、(破線) 不均一結晶($0.9[\text{Phe}]_0/0.1[\text{DHB}]_0+0.1[\text{Phe}]_0/0.9[\text{DHB}]_0$)

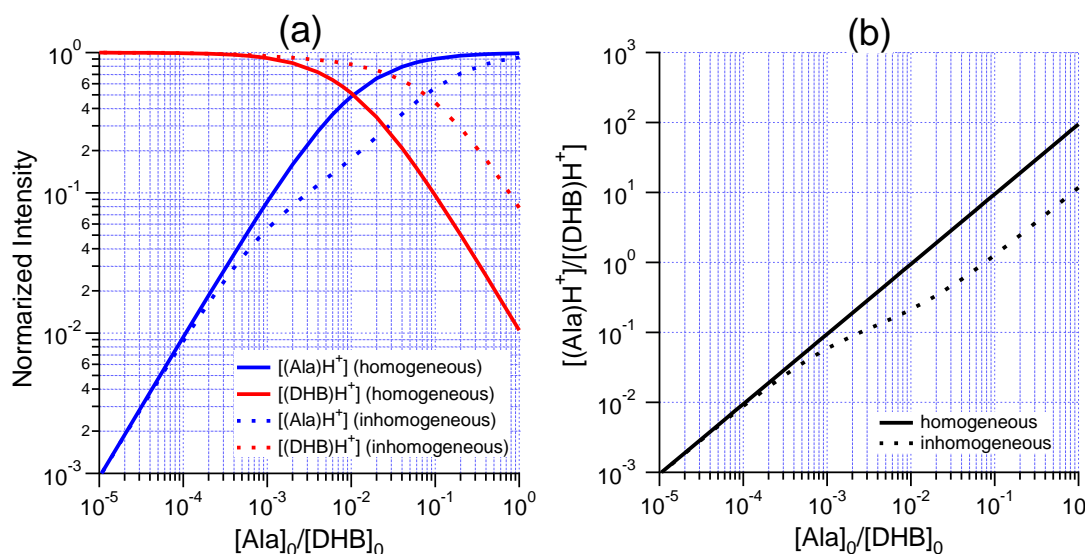


図 3-4-7 : Ala/DHB 結晶の不均一性による MALDI 信号強度比の影響
(実線) 均一結晶、(破線) 不均一結晶($0.9[Ala]_0/0.1[DHB]_0+0.1[Ala]_0/0.9[DHB]_0$)

また、図 3-4-7 は、図 3-4-6 と同様の条件で、Ala/DHB 混合結晶が均一である場合と不均一な場合を仮定して、シミュレーションしたものである。この結果から、不均一な混合結晶は、均一な混合結晶と比較して、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達していても、 AH^+ の生成量が低く、 $DHBH^+$ の生成量は高くなることがわかった。これは、相対的に、①の場合には、 AH^+ と反応せずに検出されない中性分子種 A が増え、②の場合には、中性分子種 A と反応せずに検出される $DHBH^+$ が増えるためであると考えられる。よって、全体としては、混合結晶が不均一な場合には、均一な場合と比較して、反応到達度が低くなり、 $[A]_0/[DHB]_0$ 比が高い領域ほど、 $DHBH^+$ と反応せずに検出されない中性分子種 A が増えるため、熱平衡到達度は結晶状態の影響を大きく受けることがわかった。

(vi)遅延引出しによる影響

図 3-4-8 に、 $[Phe]_0/[DHB]_0 = 0.6$ の混合結晶を用いて、レーザーの照射時間から遅れて TOF の加速電場を印加した場合（遅延引出し法）の MALDI 信号強度比の変化を示す。

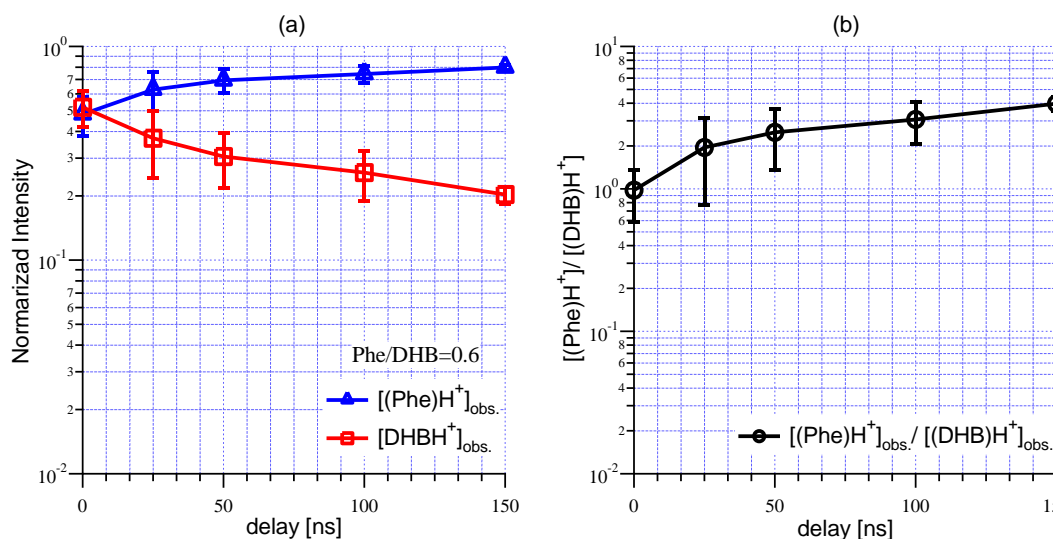


図 3-4-8：遅延引出し法による MALDI 信号強度比の変化

遅延時間の範囲は、0～150 ns に設定して行った。本装置では、遅延時間が 150 ns 以上の場合には、プルーム密度が低下し、信号がほとんど観測できなかった。この結果により、遅延時間が長くなるにしたがって、 PheH^+ 信号強度は高くなり、 DHBH^+ 信号強度は低くなり、遅延引出しを行った場合には、 $[\text{PheH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ が高くなり、熱平衡到達度が高くなることがわかった。これは、レーザーの照射時点で TOF の加速電場を印加していた場合、プルーム中で発生したイオンは、直ちに加速しプルームの外へ出て、プロトン移動反応には関与しなくなる。一方、遅延引出しを行った場合には、レーザー照射から TOF の加速電場が印加されるまでの間、イオンが発生しても、イオンは加速されないため、プルーム中に留まりやすくなり、遅延引出しを行っていない場合と比較し、発生したイオン種のプロトン移動反応への関与時間が長くなる。よって、プロトン移動反応への関与時間が長くなると、 AH^+ の生成量は増加するため、遅延引出しを行った場合は、行っていない場合と比較して、熱平衡到達度が高くなったと考えられる。

(vii) レーザーショット回数による影響

図 3-4-9(a) に Phe/DHB 混合結晶、図 3-4-9(b) に Ala/DHB 混合結晶におけるレーザーショット回数による MALDI 信号強度比の変化を示す。

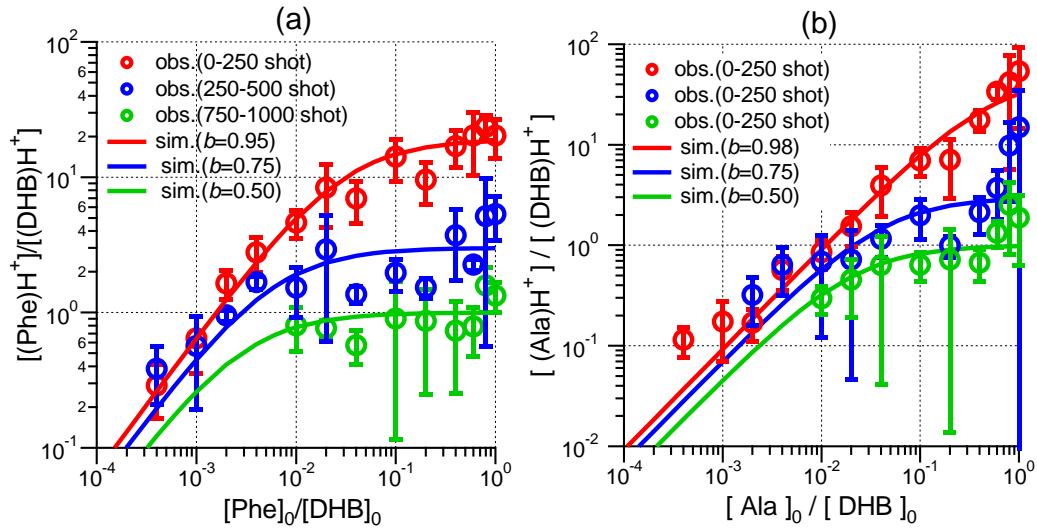


図 3-4-9：レーザーショット回数による熱平衡到達度の変化

(a) $[\text{PheH}^+]/[(\text{DHB})\text{H}^+]$ (b) $[\text{AlaH}^+]/[(\text{DHB})\text{H}^+]$

obs：実験値、sim：シミュレーション値 (Phe/DHB： $a=10^{-5}$, $T=1200\text{ K}$ 、
Ala/DHB： $a=10^{-5}$, $T=1100\text{ K}$)

この図により、積算数は、同じ 250 ショットでも、レーザーショット回数が増えると、熱平衡到達度が下がっていることがわかる。よって、レーザーショット回数は、熱平衡到達度に影響することが明らかとなった。

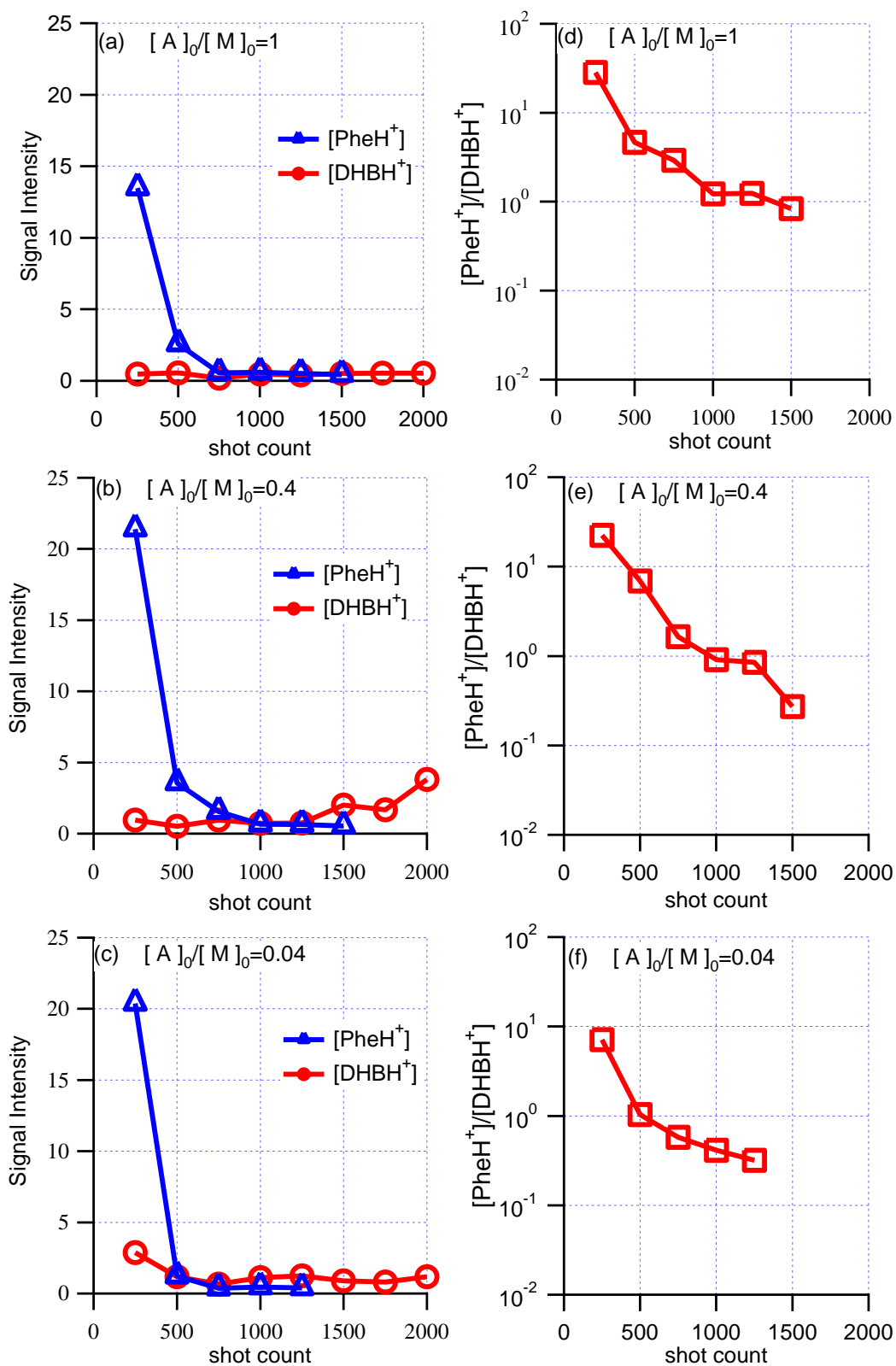


図 3-4-10 : レーザーショット回数による $[\text{PheH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ 比の変化、
 ($[\text{Phe}]_0/[\text{DHB}]_0=1, 0.4, 0.04$ 、レーザーショット積算数:250 ショット)

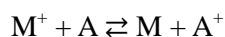
また、図 3-4-10 にレーザーショット回数による $[\text{PheH}^+]/[\text{DHBH}^+]$ の変化を示す。この図により、 $[\text{PheH}^+]$ 信号は、 $[\text{DHBH}^+]$ 信号と比較して、レーザーショット回数が増加するにしたがって急激に減少していることがわかる。この傾向は、結晶が不均一になった場合と同じ傾向であることから、図 3-4-9 で、レーザーショット回数が多くなると、熱平衡到達度が下がった原因の一つとして、レーザーショット毎に MALDI 結晶が溶融・凝固を繰り返すことで、徐々に結晶の不均一さが大きくなったことに起因することが挙げられる。

(viii) プロトン移動反応以外の反応による影響

正イオン側のプロトン移動反応に関与する分子種は、 MH^+ 、 A 、 AH^+ 、 M であるが、これらに関与するプロトン移動反応以外の反応があった場合には、生成量の増減や、プロトン移動反応の反応時間の長さによって、 MH^+ に対する AH^+ の割合が変化し、熱平衡到達度に影響を与えることが考えられる。

以下に、考え得る主な反応について記述する。

① 電荷移動反応



この反応は、プルーフ中の中性分子種 A 、 M の量に影響を及ぼす可能性がある。実際、DHB の MS スペクトル上には、 DHBH^+ のほか DHB^+ が生成されることが広く知られており、今回の実験においても観測されている。しかしながら、前述のとおり、プルーフ中の中性分子種は、イオン種よりはるかに多いため、この反応による影響は無視できるほど小さいことが予想される。

② カチオン化イオン (MNa^+ 、 MK^+ 、 ANa^+ 、 AK^+) による反応

カチオン化イオンの生成機構は、明らかになっていないが、MALDI 法においては通常検出されることは広く知られており、今回の実験においても観測されている。しかしながら、金属カチオンの付加反応・移動反応は、プロトン移動反応と並行し

て進行しており、Jover J.らにより $G_B^\circ(M)$ 、 $G_B^\circ(A)$ は、カチオン化のギブズエネルギー変化量と比較して、はるかに大きいことが報告されている[3.16]。したがって、金属カチオンの付加反応・移動反応よりも、プロトン移動反応の方が優位に進行する為、影響は小さいか、影響があっても熱平衡到達度に含まれる。

③ 試料間のプロトン移動反応



AH^+ 、 $(A-H)^-$ は、試料のみに紫外レーザー光を照射しても、生成されない、または、試料によっては生成される可能性があっても、マトリックス剤と混合した場合と比較して生成量は低い。よって、 AH^+ 、 $(A-H)^-$ は、主に次式のように、マトリックス剤と試料間のプロトン移動反応によって生成されているとされている。仮に、このような過程があったとしても、これらのイオンによる影響は小さく、影響がある場合でも、準熱平衡モデルでは、熱平衡到達度に含まれる。

以上により、準熱平衡モデルでは、プロトン移動反応以外の過程で生成されたイオンや、結晶の不均一さ、プルーム密度、レーザー強度など、あらゆるパラメータによる影響を、 b 、 T に含むことができ、MALDI イオン化メカニズムを定量的に解釈する上で有用なアプローチとなり得ることが明らかとなった。しかしながら、本モデルでは、負イオン側のプロトン移動反応を考慮しているにもかかわらず、本装置では、正イオン側のイオン信号のみを検出しているため、 $[A]_0/[M]_0$ の変化に対する負イオン側の MALDI 信号強度比の振舞いが不明である。よって、正イオン及び負イオン側の信号を同時に検出できる dual-polarity time-of flight mass spectrometer (DTOFMS) [3.17]等によって、プルーム中のプロトン移動反応に係る MH^+ 、 $(M-H)^-$ 、 AH^+ 、 $(A-H)^-$ の4つの信号を同時に検出し、準熱平衡モデルとの一致を確かめる必要がある。

参考文献

- [3.1] O'Hair RA J, Bowie JH, Gronert S, Gas Phase Acidities of the α Amino Acids, *Int. J. Mass Spectrom.* **1992**, *117*, 23-36.
- [3.2] Breuker K, Knochenmuss R, Zenobi R, Gas-Phase Basicities of Deprotonated Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrix Molecules, *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *184*, 25-38.
- [3.3] Harrison AG, The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino acids and Peptides, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 201-217.
- [3.4] Mormann M, Bashir S, Derrick PJ, Kuck D, Gas-Phase Basicities of the Isomeric Dihydroxybenzoic Acids and Gas-Phase Acidities of Their Radical Cations, *J. Am. Soc. Mass spectrom.* **2000**, *11*, 544-552.
- [3.5] Ens W, Mao Y, Mayer F, Standing KG, Properties of Matrix-Assisted Laser Desorption Measurements with a Time-to-Digital Converter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 117-123.
- [3.6] Mowry CD, Johnston MV, Simultaneous Detection of Ions and Neutrals Produced by Matrix-Assisted Laser Desorption, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 569-575.
- [3.7] Quist AW, Huth-Fehre T, Sundqvist BUR, Total Yield Measurements in Matrix-Assisted Laser Desorption Using a Quartz Crystal Microbalance. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 149-154.
- [3.8] Puretzky AA, Geohegan DB, Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *286*, 425-432.
- [3.9] Tsai MT, Lee S, Lu IC, Chu KY, Liang CW, et al, Ion-to-Neutral Ratio of 2,5-dihydroxybenzoic acid in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 955-963.

- [3.10] Lu IC, Chu KY, Lin CY, Wu SY, Dyakov YA, Ion-to-Neutral Ratios and Thermal Proton Transfer in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26*, 1242-1251.
- [3.11] Bae YJ, Kim MS, A Thermal Mechanism of Ion Formation in MALDI, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2015**, *8*, 41-60.
- [3.12] Gabelica V, Schulz E, Karas M, Internal Energy Build-Up in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *J. Mass. Spectrom.* **2004**, *39*, 579-593.
- [3.13] Yoon SH, Moon JH, Kim MS, A Comparative Study of In- and Post-Source Decays of Peptide and Preformed Ions in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: Effective Temperature and Matrix Effect. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1876-1883.
- [3.14] Bae YJ, Moon JH, Kim MS, Expansion Cooling in the Matrix Plume is Under-Recognized in MALDI Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 1070-1078.
- [3.15] Moon JH, Yoon SH, Kim MS, Temperature of Peptide Ions Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization and Their Dissociation Kinetic Parameters, *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 2071-2076.
- [3.16] Jover J, Bosque R, Sales J, A Comparison of the Binding Affinity of the Common Amino Acids with Different Metal Cations, *Dalton Trans* **2008**, *45*, 6441-6453.
- [3.17] Tsai ST, Chen CW, Huang LCL, Huang MC, Chen CH et al, Simultaneous Mass Analysis of Positive and Negative Ions Using a Dual-Polarity Time-of Flight Mass Spectrometer, *Anal. Chem.* **2008**, *78*, 7729-7734

第4章 結論

本研究では、MALDI 混合結晶へのレーザー照射により発生した MALDI プルームに、近赤外フェムト秒レーザーを照射することにより、通常の MALDI 信号と MALDI プルーム中の中性分子種に由来する信号を検出することができる MALDI-fs MS 装置を開発した。本装置を用いて、(Phe,Ala)/DHB 混合結晶の混合比 $[A]_0/[M]_0$ の変化に対するプルーム中の中性分子種比の変化を調べたところ、 $[A]_0/[M]_0$ が低い領域だけでなく高い領域においても、これらの比例関係は成立しており、マトリックス剤と試料の MALDI 混合結晶からプルーム中への脱離効率は同じであることがわかった。これにより、通常の MALDI-MS 法では検出できない中性分子種比 $[A]/[M]$ は、 $[A]_0/[M]_0$ で近似を適用できることがわかった。また、プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していることを仮定したモデルに、新たに熱平衡状態に到達していない場合のパラメータである熱平衡到達度 b を取り入れた準熱平衡モデルを構築し、 $[A]_0/[M]_0$ の変化に対する MALDI 信号強度比 AH^+/MH^+ の振舞いの再現を試みた。これにより、プルーム中のプロトン移動反応は、熱平衡状態に到達していないことがわかった。この原因としては、紫外レーザー照射直後からプルームは断熱膨張しており、プロトン移動反応が熱平衡状態に到達する前に、プルーム中の分子種が無衝突状態になったためであると考えられた。熱平衡モデルに基づく MALDI 信号強度比の再現を目指した複数の先行研究において、 $[A]_0/[M]_0$ の高い領域において MALDI 信号強度比が再現されないことが報告されている [4.1,4.2]が、この原因として、

- ① MALDI 混合結晶から MALDI プルーム中への M と A の脱離効率が異なる。
- ② MALDI プルーム中のプロトン移動反応が熱平衡状態に到達していない。
- ③ MALDI プルーム中の分子種分布が不均一である。

ことが挙げられていた。この原因は、本研究の結果により、①ではなく、②と③、又は②のみであることが明らかとなった。

MALDI イオン生成メカニズムが複雑な過程であることは明らかであり、さまざまなイオン生成モデルが提唱されているが、本研究で新たに構築した準熱平衡モデルは、 MH^+ 、 $(M-H)^-$ 、 AH^+ 、 $(A-H)^-$ の 4 つの信号に着目し、仮に複数の過程でこれらが生成していても、これらがプルーフ中のプロトン移動反応に含まれていれば、パラメータであるマトリックス剤のイオン化効率 a 、プルーフ中の温度 T 、熱平衡到達度 b に含まれるという立場をとっており、比較的に取り扱いやすいモデルであり、MALDI イオン化メカニズムを定量的に解釈する上で有用なアプローチとなり得る。

今後、本研究で用いた MALDI-fs MS 法や準熱平衡モデルが MALDI イオン生成メカニズムの解明に一層寄与することを期待する。

参考文献

- [4.1] Tsuge M, Hoshina K, Investigation of Protonation Efficiency for Amino Acids in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, 83, 1188-1192.
- [4.2] Ahn SH, Bae YJ, Moon JH, Kim MS, Matrix Suppression as a Guideline for reliable Quantification of peptides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 8796-8801

本研究に関する掲載論文

- [1] Shirota T, Tsuge M, Hikosaka Y, Soejima K, Hoshina K, Detection of Neutral Species in the MALDI Plume Using Femtosecond Laser Ionization: Quantitative Analysis of MALDI-MS Signals Based on a Semiequilibrium Proton Transfer Model, *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121*, 31-39.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、新潟大学 副島 浩一教授には、研究の遂行、論文執筆など全般にわたり多大な御指導・御助言賜り、深く感謝申し上げます。また、新潟薬科大学 星名 賢之助 教授には、基礎的事項から研究の細部にわたり終始御指導・御助言賜り、深く感謝申し上げます。富山大学 彦坂 泰正 教授には、随時有益な御指導と御助言をいただいた上、放射光施設での実験に参加させていただくなど貴重な経験をさせていただき、深く感謝申し上げます。台湾交通大学 柘植 雅士 博士には、研究の遂行や論文投稿にあたり、有益な御助言・御指導賜り深く感謝申し上げます。新潟大学 湯川 靖彦 教授ならびに新潟大学 松岡 史郎 教授には、論文審査にあたり御指導賜り深く感謝申し上げます。大学院入学にあたっては、勤務先である 学校法人 新潟科学技術学園には、ご理解と熱いご支援を賜り深く感謝申し上げます。さらに、新潟薬科大学職員の皆様には、業務等でご迷惑をおかけしたにもかかわらず特段の御配慮を賜り厚く御礼申し上げます。また、日頃よりご協力いただいた、新潟大学環境原子物理学研究室の皆様、新潟薬科大学薬品物理化学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。最後に、日々の研究を生活面で支えてくれた家族に心から感謝いたします。このほか、多くの皆様に御指導、御鞭撻を賜りましたこと、ここに厚く御礼申し上げます。