

# マトリックス支援レーザー脱離イオン化のメカニズム

内藤 康秀

## Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

Yasuhide NAITO

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) is one of the most prevailing “soft” ionization techniques, which generates gas-phase ions of labile molecules in the condensed phase with a less extent of fragmentation. The development of MALDI, together with electrospray ionization (ESI) which is the other representative soft ionization method, shared the 2002 Chemistry Nobel Prize which awarded for the development of soft ionization methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules. The underlying mechanism of MALDI has an extremely complex nature involving optical, mechanical, thermodynamical and physicochemical properties, and is not yet completely explored. This article gives expository comments on the MALDI mechanism, whose comprehensive picture has begun to emerge through a number of fundamental studies.

**Key words:** mass spectrometry, MALDI, desorption, ionization, mechanism

分析種<sup>\*1</sup>のイオン化にともなう断片化 (fragmentation) の度合いが低いソフトイオン化法は、質量分析のバイオ分野への応用において特に重要な技術である。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) は、エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization; ESI) とならんで現在最も普及しているソフトイオン化法であり、質量分析を利用したバイオ研究に著しい発展をもたらした。田中らによる MALDI の発明<sup>1)</sup> と Fenn らによる ESI の発明は、2002 年のノーベル化学賞の荣誉に浴している。

MALDI ではプレート上の凝縮相の分析種-マトリックス混合試料にレーザーを照射してイオン化を行う。この操作は真空中で行われるのが一般的である。基本的に MALDI では、試料中にモル比過剰に存在するマトリックス分子が脱離イオン化過程の全体にわたって主要な働きをしているとき、分析種分子がマトリックス分子との同時脱離によって壊れることなく気相イオンとして取り出される。マトリックス分子の主要な働きとは、(1) 分析種の分子同士を引き離して凝集力を弱める希釈作用、(2) レーザーがもた

らす光エネルギーの吸収と緩和、(3) プロトン授受による分析種分子への電荷付与、である。したがって、分析種とマトリックスの組み合わせを適切に選ぶことがきわめて重要であり、マトリックスの開発に関して多くの研究がなされているが、そのほとんどは試行錯誤的に進められた。代表的なマトリックスである 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid; 2,5-DHB) や  $\alpha$ -シアノ桂皮酸 ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid;  $\alpha$ -CHCA) なども経験的に探索された化合物である。試料の真空蒸気圧は十分低いことが求められるため、乾燥状態で微結晶状の試料を形成する結晶性マトリックス化合物が多用されているが、液状の分析種-マトリックス混合試料を形成する液体マトリックス<sup>2,3)</sup> や、分析種とマトリックスの混合粉末を加圧成形したペレット状の試料<sup>4)</sup> を用いることもある。

MALDI に用いられる最も一般的なレーザーは、マトリックスの紫外 (ultra violet; UV) 吸収極大付近の波長で 1~10 ns のパルス幅を出力する UV パルスレーザーであり、ほとんどすべての市販 MALDI 質量分析計は窒素レーザー (波長 337 nm) あるいは三倍高調波 Nd:YAG レー

光産業創成大学院大学光産業創成研究所光医療・健康分野 (〒431-1202 浜松市西区呉松町 1955-1) E-mail: naito@gpi.ac.jp

\*1 試料中の分析対象となる化学種; analyte.

ザー（波長 355 nm）を採用している。しかし、特殊なマトリックスを使用する場合など、ある条件下では他の発振波長との組み合わせが優れている場合がある。例えば、四倍高調波 Nd:YAG レーザー（波長 266 nm）のみに対して作用するマトリックスと分析種の組み合わせ<sup>5)</sup>もあれば、壊れやすい巨大分子の測定では豊富な種類のマトリックスを適用できる IR (infrared) レーザーを用いた MALDI (IR-MALDI)<sup>6,7)</sup> や、UV と IR のレーザーの同時照射<sup>8)</sup> がより優れていることもある。以下では、MALDI の主流である窒素レーザーあるいは三倍高調波 Nd:YAG レーザーと結晶性マトリックスを併用した一般的な UV-MALDI のみを扱い、特に断りのない限りこれを MALDI と表記する。

本解説では、MALDI が生体分子のような壊れやすい高分子をどうして壊さずにイオン化できるのか、そのメカニズムを中心に議論する。MALDI のメカニズムは非常に錯綜しており、まだ完全には解明されていない。しかし、これまでの多くの研究によって次第にその全体像が明らかになりつつある。MALDI における脱離過程とイオン化過程は、マトリックスを含めた試料の物性とレーザーの照射パラメーターに強く依存して、互いに連動しながらきわめて短い時間スケールの中でほぼ同時に進行する。ここでは理解を容易にするため、脱離過程とイオン化過程を個別に議論しているが、本質的に両者は切り離して扱えないことを念頭に置く必要がある。

なお、本解説は MALDI の実験手法や装置の解説を目的としていないので、MALDI 測定の実践の情報が必要な読者は関連書籍<sup>9,10)</sup>を参考にさせていただきたい。

## 1. MALDI における脱離過程

脱離過程には、光学的現象や力学的現象に加えて、相転移やイオン化に関わる熱動学的過程や物理化学的過程が複雑に入り組んでいる<sup>11,12)</sup>。図 1 は脱離過程を単純化して図示している。適正なレーザー照射条件下の脱離過程は熱的作用が支配的であるが、それは以下に詳しく述べるように熱的非平衡中で進行する。

### 1.1 レーザー照射条件と照射される物質側の条件

MALDI で適正な測定結果を得るためには、レーザー照射条件（表 1）と照射される物質側の条件を整える必要がある。例えばレーザーのパルス幅は、分析種の分子が熱分解しない程度に短くしなければならない。いいかえると、脱離過程の時間スケールを熱分解反応の時間スケールよりも短くする必要がある。標準的に用いられるレーザーのパルス幅は数ナノ秒のオーダーであるが、より短いパルス幅での MALDI で実質的な改善の効果は得られていない<sup>13)</sup>。

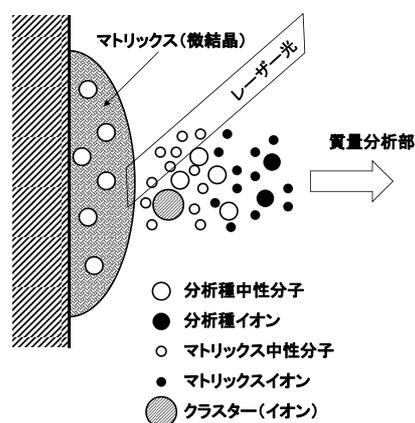


図 1 MALDI における脱離過程のイメージ。プレート上の試料では、分析種の分子がマトリックス微結晶中に分散している。UV パルスレーザー照射により、試料表面近くのごく浅い層からマトリックスの中性分子、マトリックス関連イオン、クラスターなどが放出し、これらとともに分析種分子やイオンが取り出される。通常、この過程は真空中で実現される。

表 1 MALDI における標準的なレーザー照射条件。

発振波長	337 nm (窒素レーザー)
	355 nm (三倍高調波 Nd:YAG レーザー)
光子エネルギー	3.68 eV (窒素レーザー)
	3.49 eV (三倍高調波 Nd:YAG レーザー)
繰り返し周波数	1~20 Hz (窒素レーザー)
	10~1000 Hz (三倍高調波 Nd:YAG レーザー)
パルス幅	1~10 ns
パルスエネルギー	1~10 μJ
ピークパワー (1/e <sup>2</sup> 定義)	1×10 <sup>2</sup> ~5×10 <sup>3</sup> W
集光径 (直径)	20~200 μm
フルエンス	30~600 J m <sup>-2</sup>
照射強度	1×10 <sup>6</sup> ~5×10 <sup>7</sup> W cm <sup>-2</sup>

発振波長とマトリックスの吸収波長帯との一致は、試料中の高エネルギー密度状態を達成するための重要な指標になる。マトリックスとして良好な物質は、溶液での測定でレーザー光に対して 2000~20000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> のモル吸光係数を示す。結晶化したマトリックスでも同程度の吸光特性があると仮定した場合、レーザー光は結晶表層の 20~200 nm の厚さで吸収される。代表的なマトリックスである共役芳香族化合物は、数 10 nm の比較的広い幅の吸収波長帯を有し、適用可能なレーザーの選択が容易である。その多くは吸収波長帯のピークが 300~350 nm の範囲にあり、窒素レーザーや三倍高調波 Nd:YAG レーザーとの相性が優れている。最も普及している 2,5-DHB や桂皮酸誘導体 (α-CHCA やシナピン酸など) もこの化合物グループに属する。三倍高調波 Nd:YAG レーザーは、3-ヒドロキシピコリン酸などの数種類の重要なマトリックスによる光吸収

が窒素レーザーよりも劣るという弱点がある。

生体分子による波長 300 nm 以上での UV 吸収は、分子内に発色団をもつクロム c などのわずかな例外を除いて無視できるほど弱く、MALDI で生体分子が直接に光分解する可能性は排除できる。MALDI の分析種 / マトリックスモル比は非常に低い (例えばペプチドを分析する場合、最適とされる分析種 / マトリックスモル比は  $5 \times 10^{-2} \sim 10^{-8}$  である) ため、凝縮相試料の物理化学的特性はマトリックスだけの結晶と基本的に同一であると考えることができる。

脱離が活発になる昇華点の低さは、分析種の熱分解を抑制する観点から重要な物質側条件であり、長い共役電子系をもつ化合物がマトリックスに適さない理由のひとつになっている。共役電子系が伸びると吸収波長帯は長波長側にシフトし、可視光レーザーによる励起が可能になるが、その一方で分子間結合力が增大して昇華点が上昇するためである。

## 1.2 エネルギーの吸収と緩和

励起過程の最初の段階は、共鳴光吸収による第一励起一重項 ( $S_1$ ) の状態密度の増大から始まる。この段階で光子の過剰エネルギーの一部は、フランク-コンドン原理によって低い振動エネルギー準位の  $S_1$  励起状態への遷移を通して熱エネルギーに転換される。 $S_1$  励起状態の緩和経路として、蛍光発光、項間交差などの無輻射過程、二光子吸収によるイオン化、光化学反応などもあるが、 $S_1$  励起状態に蓄えられたエネルギーの大部分は、分子内振動と分子間格子振動に配分され熱に転換する。 $S_1$  励起状態の緩和時定数は蛍光発光測定から  $10^{-10}$  秒のオーダーと推測され、MALDI の標準的なレーザーパルス幅よりも短い<sup>14)</sup>。

凝縮相の熱伝導による熱緩和時間は次式で与えられる。

$$\tau_{th} = \rho c_p \delta^2 / (a \lambda_{th}) \quad (1)$$

ここで物質の密度、比熱、熱伝導度はそれぞれ  $\rho$ ,  $c_p$ ,  $\lambda_{th}$  で、レーザー光の侵入深さを  $\delta$  で表している。また、 $a$  は照射されるマトリックス結晶のサイズや形状を反映した係数で、例えば大きな結晶ほど小さな値となるが、大体 1~4 の範囲にある。標準的なマトリックスの物性値を適用してこの式から計算される熱緩和時間は数 10 ns であり、MALDI の標準的なレーザーパルス幅よりも若干長い。このことと、 $S_1$  励起状態の短い緩和時定数から、次のような状況が考察される。マトリックス結晶に吸収された光子のエネルギーは急速に熱に転換するが、それに比して熱伝導

による照射領域外へのエネルギーの散逸はゆっくりしているので、レーザーパルスのエネルギーを吸収した直後の照射領域はレーザー侵入深さにわたって比較的均一な温度分布になっている。

レーザーによる加熱は物質の急激な膨張をもたらす。その結果として物質内に応力が発生する (光音響効果)。音響エネルギーの緩和の時間スケールは、励起媒質中の応力波の伝播時間で決定し、近似的に励起深さ (レーザー侵入深さ)  $\delta$  と媒質中の音速  $v_s$  の比で与えられる。その値は標準的な MALDI の条件下で数 10 ピコ秒オーダーであり、音響エネルギーは伝搬によって急速に消失するため、応力波の振幅は考慮に値するほど大きくならないと考えられている。しかし、レーザー侵入深さが大きくなる IR-MALDI では、光音響効果による応力波は重要な役割を担うと考えられる<sup>15)</sup>。

レーザーフルエンスのイオン検出閾値<sup>\*2</sup>は、マトリックスの吸光度やレーザー照射スポットの直径に依存して数  $10 \sim$  数  $100 \text{ J m}^{-2}$  の範囲であるが<sup>16)</sup>、この値を標準的な照射スポット径 ( $100 \sim 200 \mu\text{m}$ ) の場合における単位体積当たりのエネルギー密度に換算すると、マトリックスの種類によらず約  $1 \times 10^9 \text{ J m}^{-3}$  でほぼ一定となる。これは昇華のエンタルピー変化とほぼ等しく、エネルギー論的には照射領域の気化が可能な値である。このエネルギー密度は熱平衡に達したときの数 100 K の温度上昇に相当するが、脱離過程における熱的非平衡状態では結晶格子温度はさらに高くなると考えられる。しかし、マトリックスの結晶格子温度が瞬間的に上昇しても、格子振動と分析種の分子内振動の周波数のずれが障壁となって熱平衡への進行が遅れるので<sup>17)</sup>、ただちに分析種が強く分子内励起されることはない。また、分析種分子は膨張するプルーム<sup>\*3</sup>での蒸発冷却と衝突によってさらに緩和される。

コバルトや TiN などのナノ粒子をグリセロールなどの媒質中に懸濁させたマトリックスもまれに使用されるが、そのレーザー光吸収は通常のマトリックスとは大きく異なる<sup>1,18)</sup>。材料をミクロンオーダーの粒子にしたときの光学的性質や熱力学的性質は連続体材料の場合とほとんど変わらないが、粒径 100 nm 程度以下のナノ粒子では表面プラズモン励起などの表面効果による特性の変化が現れる。その結果、連続体ではあまり光吸収しない材料でも非常に高い吸光度を示すようになる。ナノ粒子懸濁液マトリックスを用いた場合、高い加熱速度により瞬間的な温度は 10000

<sup>\*2</sup> 分析種のイオンが信号雑音比 (SN 比) 2 : 1 程度で検出されるときフルエンス。

<sup>\*3</sup> 試料上のレーザー照射箇所からの高速ガス放出; plume。

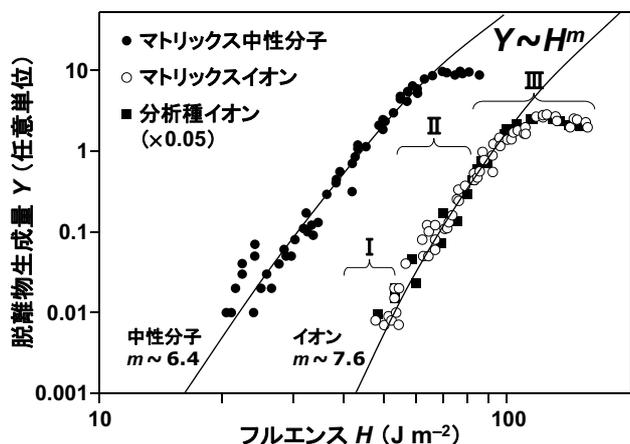


図2 レーザーフルエンスと脱離物生成量との関係。フルエンスをパラメーターにして MALDI 生成物の信号量を質量分析計で測定している。中性分子については脱離後にポストイオン化法（光イオン化）によりイオンにすることで測定できる。図中の I はイオン検出閾値近傍で穏やかな昇華が支配的なフルエンス領域、II は活発な脱離によりフルエンスのべき乗に比例してイオン生成量が急増する、MALDI で一般的に用いられるフルエンス領域、III は極度の過熱によりアブレーションが起きているフルエンス領域を示す。（文献 16 より許可を得て一部改変し転載。©Elsevier, 1995）

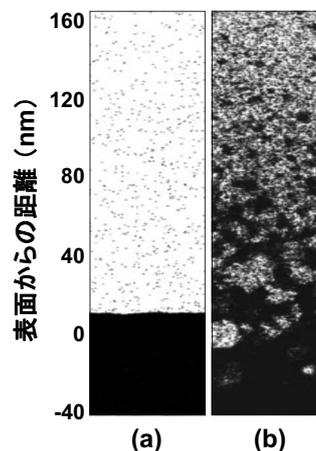


図3 分子動力学計算による脱離現象のシミュレーション結果。試料表面から -40~160 nm の空間内におけるレーザー照射直後の物質分布スナップショットであり、(a) と (b) はそれぞれ図2の領域 I（閾値近傍の低フルエンス領域）と領域 III（極度の高フルエンス領域）における状態に相当している。（文献 20 より許可を得て一部改変し転載。©American Chemical Society, 2003）

K のオーダーに達する<sup>18)</sup>。

### 1.3 物質の放出

レーザーフルエンスと脱離物（イオンと中性分子）の生成量との関係を図2に示す。フルエンスがイオン検出閾値より低い場合でも、照射領域から多数の中性分子が放出されることが、ポストイオン化法<sup>4)</sup>を用いた研究で明らかになっている<sup>16)</sup>。

イオン検出閾値近傍の低いレーザーフルエンスでは、試料表面が1層ずつ昇華する脱離現象が支配的である<sup>12)</sup>。レーザーパルス幅の期間中に脱離が始まり、気化熱により冷却されるためレーザーパルス幅の期間後は脱離が急速に終息する。このフルエンス領域での脱離成分は分子が主体であるが、小さなクラスターの放出も認められる<sup>19)</sup>。したがって、膨張するブルームにはクラスターもある程度の割合で存在すると考えられる。微視的スケールでこのような脱離現象のスナップショットを捉えた実験はないが、各フルエンス領域における脱離の挙動は分子動力学計算によるシミュレーション結果（図3）で精緻に再現されている<sup>20)</sup>。

分子の脱離反応速度は近似的にアレニウスの式で与えられる。放出される物質の全量が最高温度での脱離反応速度に比例することを考慮すると、ナノ秒オーダーのレーザー照射による脱離分子の生成量は次式で表すことができる<sup>16)</sup>。

$$Y \approx P(A) \exp \left[ -E_a / \{k_B(T_0 + BF)\} \right] \quad (2)$$

ここで  $Y$  は脱離分子の生成量、 $E_a$  は脱離過程の活性化エネルギー、 $T_0$  は試料温度の初期値、 $F$  はレーザーフルエンス、 $B$  はレーザーパルスのエネルギーが試料温度（格子温度）に転換する効率、 $k_B$  はボルツマン定数、 $P(A)$  は各種の非温度依存性の因子をまとめた係数を表している。脱離分子の生成量は照射スポット径に強く依存するが<sup>16)</sup>、その依存性は  $P(A)$  に含まれる。

脱離反応速度とレーザーパルスエネルギー吸収が不均衡になる高フルエンス領域では、極度の過熱により爆発的な相転移が起こる<sup>21)</sup>。この現象（アブレーション；ablation）は分子の脱離とともに多量のクラスター放出を伴い<sup>19)</sup>、急激な試料の消費とイオン源の圧力上昇（真空度の低下）をもたらす。一般的な MALDI 質量分析計はバックグラウンド真空度を  $10^{-4}$  Pa 以下に維持する必要があるため、有効なフルエンスは真空度が低下しない範囲に制限され、イオン検出閾値の2~3倍が上限となる。また、高フルエンス領域では分析種の断片化が顕著になるため、マススペクトルの質が低下する。

通常の MALDI 測定は照射スポット径 50~200  $\mu\text{m}$  の範囲で行われる。数ミクロンのレーザー集光径を達成することも技術的に困難ではないが、照射スポット径が減少するとイオン検出閾値は非線形に増大し、レーザー侵入深さの増大とアブレーションが引き起こされるので、測定には適さなくなる。

<sup>4)</sup> レーザー照射で脱離した中性種を別のレーザーでイオン化する実験法。

## 1.4 プルームの膨張

標準的な照射スポット径 (100  $\mu\text{m}$ ) のイオン検出閾値では、レーザー 1 パルスあたりに深さ数 10 nm (単分子層で数 10 層分) までの体積が脱離する。大量の脱離分子は気相中に放出されてからプルームとして膨張する間も頻繁に分子間衝突する。これらの衝突はプルーム膨張に影響し、軸方向 (イオン引き出し方向) に伸びたプルームを形成する。マトリックス中性分子のプルーム軸方向速度の平均値と分布の幅はともに  $500 \text{ m s}^{-1}$  程度であり<sup>12)</sup>、イオンはさらに高速で  $1000 \text{ m s}^{-1}$  程度に達するので<sup>22, 23)</sup>、基本的にイオンは膨張するプルームの前方に偏在している。プルーム軸方向に垂直な方向の速度成分はプルーム温度と密接な関係があり、軸方向速度よりも低速かつ質量依存性が大きい<sup>22)</sup>。併走するマトリックス分子と分析種分子との間の多重衝突は、互いの軸方向速度が同程度になるまで分析種分子を加速する<sup>23)</sup>。その結果、高質量の分析種分子の平均運動エネルギーは数 eV に達し、また運動エネルギー分布の幅も数 eV 程度になる。分析種分子が獲得する大きな運動エネルギー分布は MALDI 質量分析計の性能を制限する要因となる。

膨張するプルーム内で分子同士が頻繁に衝突する過程は、プルーム全体の熱エネルギーによって制御される熱化学的過程でもあり、その中では熱平衡状態では進行しないような熱化学反応も起こりうる。フルエンスが非常に低い場合は、イオンや他の脱離生成物が乏しくプルーム内での衝突が少ないため、熱化学的過程はエネルギー論よりも分子速度論によって制御される。また、熱化学的過程の始状態 (固体のマトリックス-分析種混合相) と終状態 (気相) では反応環境が全く異なるため、熱化学反応のエネルギー論の性質は熱化学的過程の進行に伴って大きく変化することにも留意する必要がある<sup>24, 25)</sup>。

プルーム膨張の特性はフルエンスによって変化するが、膨張するプルーム内での衝突は分析種分子の内部エネルギーを緩和することはあっても、運動エネルギーの緩和には寄与しない。そこで衝突冷却 (collisional cooling) によって内部エネルギーと運動エネルギーの両方を緩和する工夫が考案されている。高圧力型 MALDI イオン源は約 100 Pa から  $10^5$  Pa (大気圧) で動作し<sup>26)</sup>、バックグラウンドガスとの衝突により急速な熱平衡化がもたらされ、プルーム膨張の特性が通常の MALDI イオン源とは大きく異なる。高圧力型 MALDI イオン源では分析種分子の運動が衝突冷却によって安定化し、MALDI 質量分析計の性能向上やさまざまなタイプの質量分析部との接続を可能にする効果が得られる。

## 2. MALDI におけるイオン化過程

MALDI で検出される分析種イオンはプロトン付加分子 (protonated molecule;  $[\text{A}+\text{Na}]^+$ ) など、断片化されていない分子の 1 価イオンが主体である。分析種やマトリックスの種類、あるいは試料の純度に応じて、ナトリウムイオン付加分子  $[\text{A}+\text{H}]^+$  やカリウムイオン付加分子  $[\text{A}+\text{K}]^+$  も検出される。質量 10000 Da を超えるたんぱくなどの高分子の測定では多価プロトン付加分子 (multiply protonated molecule;  $[\text{A}+n\text{H}]^{n+}$ ,  $n = 2, 3, \dots$ ) も検出される。

分析種のイオン化経路は、分析種とマトリックスのプロトン親和力 (proton affinities; PAs) や気相酸性 (gas phase acidities; GPAs) や気相塩基性 (gas phase basicities; GPBs) などの物理的・化学的な性質に依存する。マトリックスはイオン化過程においてプロトンの供与体や受容体などとして重要な役割を担っている。マトリックス関連化学種の一次イオン化反応と、それらマトリックス関連化学種と分析種との間の二次イオン化反応は、互いに連動しており完全には分割できないが、両者を個別に考察することは現象の理解に役立つ。また、脱離生成物には分子の二量体や多量体、あるいは小さなクラスターも含まれ、これらが反応種になりえることも考慮する必要がある。(例えば、マトリックス分子多量体からのプロトン移動は、単量体からよりもエネルギー的に有利であると考えられている<sup>25)</sup>。)

### 2.1 一次イオン化反応

MALDI で検出されるマトリックス関連化学種のイオンは、マトリックス分子のラジカルイオン  $\text{M}^{\bullet+}$ 、プロトン付加分子  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、およびその脱水イオン  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  などである。一次イオン化反応はマトリックス関連イオンを生成するが、検出されるマトリックス関連イオンには二次イオン化反応の生成物もある程度含まれている。

一次イオン化反応として考えられる各種の反応経路を表 2 に整理した。窒素レーザーの光子エネルギーは 3.68 eV であり、三倍高調波 Nd:YAG レーザーの光子エネルギーは 3.49 eV であるのに対して、マトリックス分子単量体のイオン化エネルギー (IEs) は約 8 eV であり、凝縮相のマトリックスは溶媒効果により IEs がわずかに減少することを考慮しても、エネルギー収支を成り立たせるには光子 2 個分でも足りない。

まず考えられるのは、共鳴二光子吸収で得られる第二励起一重項 ( $\text{S}_2$ ) 状態を経由する一次イオン化経路 (表 2 の反応式 (3)) であるが、MALDI で用いられる標準的なフルエンス ( $100 \text{ J m}^{-2}$ , 表 1 参照) は、十分な  $\text{S}_2$  状態密度を得るには低すぎる。

表2 MALDIにおける一次イオン化反応.

反応の分類	反応式	文献
多光子イオン化	$M+n \times h\nu \rightarrow M^{*+}+e^{-}$ (3)	27
エネルギー蓄積 (一重項対消滅)	$M+h\nu \rightarrow M^{*}$ $M^{*}+M^{*} \rightarrow M^{**}+M$ (4) $M^{**} \rightarrow M^{*+}+e^{-}$	14
励起状態からのプロトン移動 (ESPT)	$M+h\nu \rightarrow M^{*}$ $M^{*}+M \rightarrow [M+H]^{+}+[M-H]^{-}$ (5a) $M^{*}+A \rightarrow [A+H]^{+}+[M-H]^{-}$ (5b)	28
基底状態からのプロトン移動	$M+M \rightarrow [M+H]^{+}+[M-H]^{-}$ (6a) $M+A \rightarrow [A+H]^{+}+[M-H]^{-}$ (6b) $M+A \rightarrow [A-H]^{-}+[M+H]^{+}$ (6c)	28
熱イオン化	$M+M \rightarrow M^{*+}+M^{*-}$ (7a) $M \rightarrow M^{*+}+e^{-}$ (7b)	18

記号 M はマトリックス分子, A は分析種分子,  $M^{*+}$  はラジカルイオン,  $M^{*}$  は第一励起状態,  $M^{**}$  は第二励起状態を示す.

隣接する励起分子間,あるいは2つの励起子<sup>\*5</sup>の間でのエネルギー蓄積は,最も可能性の高い一次イオン化経路である(表2の反応式(4)).一重項対消滅(singlet-singlet annihilation)と称される過程では,片方の分子の第一励起一重項( $S_1$ )状態は $S_2$ 状態に励起され,もう一方の分子の $S_1$ 状態は基底状態に緩和する<sup>14)</sup>.この過程によるエネルギー蓄積は3個以上の分子が関与する多中心性過程としても起こりえるが,それもイオン化のエネルギー論的要件の緩和に寄与すると考えられる.

一般的なマトリックス化合物の $S_1$ 状態の寿命は,固体中では約 $10^{-10}$  sしかないが,孤立した単量体の分子では数ナノ秒以上に延びる.したがって一次イオン化反応は,レーザーパルスの期間より後のブルーム膨張中にも起こりえる.一重項状態から(より寿命の長い)三重項状態への項間交差も,一次イオン化の時間スケール延長に寄与すると考えられる.

励起状態あるいは基底状態のマトリックス中性分子からのプロトン移動反応も,理論的には一次イオン化経路になりうる<sup>28)</sup>.多くのマトリックス化合物が該当する芳香族アミンやフェノール類などの有機化合物には電子励起状態で気相酸性を強めるものが少なくなく,これらについては励起状態からのプロトン移動(excited state proton transfer; ESPT,表2の反応式(5a,b))の可能性が考えられる.ESPTの可能性に対する疑問点は,化合物のESPT活性とマトリックス適性の間に重大な不一致がみられることで,すなわちマトリックスとして良好でありながら溶液中でESPT不活性を明瞭に示す化合物があることや,高い

ESPT活性を示した化合物の多くがマトリックスとして全く機能しないことである.

一方,基底状態のマトリックス中性分子間のプロトン移動(表2の反応式(6a))には数1000 Kの反応温度が必要であり,この経路は熱エネルギーの蓄積を考慮してもボルツマン分布の高温側の端の部分の寄与としてわずかにしか起こりえない.また,マトリックス中性分子から分析種分子への直接プロトン移動(表2の反応式(6b,c))もありうるが,同様に必要な反応温度が高すぎるため,イオン生成量全体の中での寄与を完全に排除できないにしても,重要なイオン化経路とは考えにくい.

熱イオン化(表2の反応式(7a,b))も非常に高い反応温度を必要とするが,ナノ粒子懸濁液マトリックスを用いたレーザー脱離イオン化では,最高温度が10000 K以上にも達するので,熱イオン化が主要なイオン化経路になりうる.その場合,グリセロールなどの懸濁用溶媒は二次イオン化反応での反応種として補助的な役割を担う.

凝縮相の試料中ですでにイオン化している成分(プリフォームドイオン; preformed ion)が脱離によって取り出されるという機構も考えられる.しかし,イオン性の化合物や金属錯体の分析を例外にして,凝縮相中の化学的状態がMALDIマススペクトルに反映されることはない.また,負電荷のプリフォームドイオンが検出されることもほとんどない.したがって大抵の場合,プリフォームドイオンの脱離はほとんどないか,仮に存在したとしてもブルーム中での二次的な反応によって覆い隠されていると考えられる.

\*5 固体中の移動性電子正孔対; exciton.

表3 MALDIにおける二次イオン化反応.

反応の種類	反応式	文献
プロトン移動	$[M+H]^+ + A \rightarrow M + [A+H]^+$ (8a)	11, 25, 29
	$[M-H]^- + A \rightarrow M + [A-H]^-$ (8b)	
	$M^{*+} + A \rightarrow [M-H]^* + [A+H]^+$ (8c)	
カチオン付加	$A + \text{Cation}^+ \rightarrow [A+\text{Cation}]^+$ (9a)	11, 30
	$A + [M+\text{Cation}]^+ \rightarrow [A+\text{Cation}]^+ + M$ (9b)	
電子移動	$M^{*+} + A \rightarrow M + A^{*+}$ (10)	31
クラスターイオン化モデル	$\{[A+nH]^{n+} + (n-1)\text{Anion}^- + mM\}$ $\rightarrow [A+H]^+ + (n-1)[\text{Anion}+H] + mM$ (11a)	24, 32
	$\{[A-nH]^{n-} + (n+1)[\text{Base}+H]^+ + mM\}$ $\rightarrow [A+H]^+ + (n+1)\text{Base} + mM$ (11b)	
	$\{[A+nH]^{n+} + (n+1)\text{Anion}^- + mM\}$ $\rightarrow [A-H]^- + (n+1)[\text{Anion}+H] + mM$ (11c)	
	$\{[A-nH]^{n-} + (n-1)[\text{Base}+H]^+ + mM\}$ $\rightarrow [A-H]^- + (n-1)\text{Base} + mM$ (11d)	

記号  $[M-H]^*$  は脱プロトン中性ラジカル分子, Cation はカチオン, Anion はアニオン, Base は塩基, { } はクラスターを示す. クラスターイオン化モデルについては1価イオンを生成する反応式のみを示した.

エネルギー蓄積反応(表2の反応式(4))が主要な一次イオン化経路であることは多くの実験結果が支持しており, マトリックス分子のラジカルイオンが顕著に検出されることもエネルギー蓄積反応によって説明できる.

## 2.2 二次イオン化反応

イオンの検出閾値は中性分子よりも2~3倍高い<sup>16)</sup>. また, イオンの生成量のフルエンス依存性は中性分子よりも大きい. これらは二次イオン化反応の存在を示唆している. 分析種/マトリックスモル比が適切で十分な検出感度がある場合, マトリックスイオンと分析種イオンは同じ閾値で検出され, それぞれの生成量の変化についても同じフルエンス依存性を示す<sup>16)</sup>. イオン生成量/中性分子生成量の比として定義したイオン化率は, マトリックスについては $10^{-5} \sim 10^{-3}$ の範囲と見積られるが, 分析種については二次イオン化反応に適した条件下でより高くなる傾向があり,  $10^{-3}$ 以上に達することもある.

二次イオン化反応として考えられる各種の反応経路を表3に整理した. 大抵の場合, 分析種とマトリックス化合物のPAsの差が大きいため, マトリックスのプロトン付加分子あるいはプロトン付加多量体から分析種中性分子へのプロトン移動(表3の反応式(8a, b, c))は, エネルギー論的に主要な二次イオン化経路と考えられる<sup>11, 25, 29)</sup>. 負イオンを生成する場合, 分析種中性分子からのプロトン脱離のエネルギー論的な起こりやすさは, 分析種の脱プロトン分子(deprotonated molecule;  $[A-H]^-$ )とマトリックス負イオンとのGPBsの差によって決まる. GPBsの差はPAsの差よりも小さく, 脱プロトン分子の生成量はプロトン付加

分子に比べて低くなることが多い.

多糖や合成ポリマーなどの分析種は, マトリックスからのプロトン移動が優勢になるほどPAsが高くないので, カチオン付加分子(cationized molecule)として検出されやすい(表3の反応式(9a, b))<sup>11, 30)</sup>. 付加するカチオンはおもにナトリウムイオンやカリウムイオンであるが, これらのアルカリ金属カチオンは実験室環境中の不純物としてありふれた存在だからである. ジトラノールなどのカチオン親和力が特に低いマトリックスの使用により, 分析種のカチオン付加分子の生成量が増加することがある. 反応式(9a)は便宜上, 二次イオン化反応に分類しているが, プルーム中に存在する金属カチオンと分析種の直接的反応であり, したがってマトリックスの一次イオン化反応が関与しないイオン化経路である. また, 反応式(9b)はマトリックス-金属カチオン複合体からのカチオン引き抜き反応である. 多糖や合成ポリマーなどの化合物でも気相酸性が比較的高い場合(例えばグリカンなど)は脱プロトン分子として検出されやすくなる. その場合は脱プロトン分子にカチオンが付加した $[A+(n+1)\text{Cation}-nH]^+$ が優先的に検出されることもある.

二次イオン化反応の例外的な場合として, マトリックスから分析種への電子移動による分析種のラジカルイオン $A^{*+}$ の生成(表3の反応式(10))が考えられる.

## 2.3 多価イオンの生成とクラスターイオン化モデル

MALDIの代表的な特徴である1価イオンの現れやすさは, 二次イオン化反応によって説明できる<sup>11)</sup>. 低分子の場合, すでに(プロトン付加によって)電荷を獲得した分子

への2個目のプロトン移動は、クーロン斥力によって妨げられる。また、 $\text{Cu}^{2+}$ や $\text{Zn}^{2+}$ などの2価の金属イオンが付加して多価イオンを生成する場合でも、二次反応による多価イオンの電荷減少 (charge reduction) がエネルギー論的に起こりやすいので、1価イオンとして検出されるようになる<sup>11)</sup>。

質量 10000 Da を超える高分子では、かなりの割合で多価プロトン付加分子  $[\text{A}+n\text{H}]^{n+}$  または多価脱プロトン分子 (multiply deprotonated molecule;  $[\text{A}-n\text{H}]^{n-}$ ,  $n=2, 3, \dots$ ) が生成することは珍しくない。分子サイズが大きくなるにつれて、分子内で電荷を有することができる部位の数は増大するとともに、各電荷部位は互いに離れて独立性を高める。その結果、多価イオンのクーロンエネルギー (分子内外に作用するクーロン斥力) は低くなり、可能な電荷数の上限は増大する。膨張するブルーム内での高頻度の衝突も、多価イオンが大きなクーロン障壁を乗り越えて電荷を獲得する助けになると考えられる。質量約 150 kDa のモノクローナル抗体などの非常に巨大な分子では、5 価までの多価イオンがかなりの強度で生成する。

ESI は多価イオンを容易に生成するが、その過程では高電荷数の帯電液滴の形成が重要な役割を担っている。MALDI でもこれと同様に、多価のクラスターイオンを経由したイオン生成の経路を考えることができる。これまでに述べてきた脱離物の大部分を占める分子の単量体が主体となってイオン化過程が進行するという考え方 (イオン分子反応モデル) とは別に、クラスターイオンの脱離と分解を主要なイオン化過程と捉える考え方が、クラスターイオン化モデル (表 3 の反応式 (11a, b, c, d)) として提案されている<sup>24,32)</sup>。クラスターイオン化モデルはいくつかの重要な事実を明快に説明できる。ESI は極限的な高電界が帯電液滴の電荷分離過程を促進するので多価イオンの生成に有利であるのに対し、MALDI にはこのような作用がないので、多価クラスターイオンの電荷減少が起こりやすい。クラスターから最終的に生成するイオンの価数はクラスターに含まれる正負イオンの統計的分布によって決まるが、それは ESI よりも相対的にかなり低くなり、実際の MALDI マススペクトルとよく一致する。

### 3. MALDI におけるイオンの断片化

MALDI は“ソフトイオン化法”であるが、イオンの断片化と無縁ではない。例えば、生成したイオンがイオン源の電界で加速される際に、ブルーム成分との高エネルギー衝突がイオンの断片化を誘起することがある。また、イオンに内部エネルギーとして配分される過剰エネルギーは、

ある程度の単分子分解 (unimolecular dissociation) を必然的にもたらす。イオン断片化の多くは即時に起こるのではなく、脱離後に断片化が起こるまでのタイムスケールに幅があるため、準安定イオン分解 (metastable ion decay) とよばれることが多い。準安定イオン分解は化学的ノイズの主要因になる。

準安定イオン分解はその発生のタイミングにより、MALDI 質量分析計のさまざまな場所で起こりうる。イオン源を離脱した後に起こる準安定イオン分解は、一般にポストソース分解 (post-source decay; PSD) とよばれる<sup>33)</sup>。準安定イオン分解に対応していない MALDI 質量分析計では、断片化イオンは判別不可能なピーク (化学的ノイズ) として検出される。したがって、多くの MALDI 質量分析計では準安定イオン分解の影響を排除する工夫がされている。一方、準安定イオン分解による断片化生成物のマススペクトルを取得して、分析種分子の構造解析に用いる場合もある。

分析種やマトリックスの種類、およびイオン引き出しの条件によって準安定イオン分解の度合いは異なる。マトリックスは断片化反応の度合いにより、断片化を促進する“熱い”マトリックスと、断片化を抑制する“冷たい”マトリックスに分類される。マススペクトルで準安定イオン分解の生成物が占める割合は、冷たいマトリックスを使用する標準的なペプチド測定の場合の数% から、熱いマトリックスを使用してシアル酸含有糖ペプチドを測定した場合のほぼ 100% の範囲に及ぶ。

飛行時間型 (time-of-flight; TOF) 質量分析計では、イオンが飛行している時間の大部分は TOF 飛行管のドリフト領域で費やされるため、準安定イオン分解は大抵この領域で発生する。その場合に断片化イオンは前駆イオンと同じ並進運動速度をもつため、きわめて断片化しやすい化合物 (オリゴヌクレオチドやシアル酸含有多糖など) でも測定が可能である。準安定イオン分解で生成した断片化イオンの分析は、リフレクトロン (reflectron) などの付加的な電界を用いた TOF 質量分析計では可能である。これによって分析種の構造情報を得るのが PSD 解析の原理である。

MALDI イオン源内で発生するインソース分解 (in-source decay; ISD) は、PSD とは全く異なる断片化生成物のマススペクトルパターンを与える<sup>34,35)</sup>。また、ISD では主要な断片化過程が単分子分解とは限らない。脱離と同時の断片化や、脱離よりわずかに (<500 ns) 遅れて起こる ISD では、断片化イオンに対してそれが断片化によって現れたのか、あるいは試料調製の過程で分解したのか、あるいは試料中に元から存在していたのかを判別できないこと

もある。MALDI 質量分析計の設計では断片化が重要な要素として考慮される。

MALDI のメカニズムの概要について述べた。これまでの多くの基礎的研究により現象の詳細やメカニズムに作用する主要な因子が明らかにされてきたが、分析種やマトリックスの種類、レーザー照射条件などの測定条件によって様相は大きく異なり、補助的に作用する因子あるいは影響がほとんどないと考えられていた因子が、条件によっては主要な役割を担うこともある。MALDI の現象は多様であり、単一のモデルに当てはめて理解することはできない。また、なぜ脱離イオンの初期速度は脱離中性分子より大きいのか、なぜ試料励起領域のアスペクト比が低いのに軸偏向したブルームが発生するのかなど、本質に関わる多くの謎が残されている。メカニズムの全容解明には、諸条件を系統的に変えて現象を丹念に調査し続ける必要がある。これは質量分析の基礎研究分野における最も挑戦的な課題であるとともに、実用面でもきわめて重要である。まだ MALDI の潜在能力のごく一部しか利用できていないと考えられるからである。MALDI は新しいマトリックスや試料調製法の考案により適用範囲を拡大してきたが、イオン生成効率はほとんど変わっていない。MALDI で放出される物質の大部分は中性であり、消費される物質総量からイオンとして利用できるのは 0.01% 程度しかない。MALDI メカニズムの解明はイオン生成効率の画期的な改善に役立つと期待される。また、本号でも紹介されている投影型の質量イメージングの開発に関連して、MALDI メカニズムの研究の重要性はさらに高まっている。

## 文 献

- 1) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida: "Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2** (1988) 151-153.
- 2) E. T. Sze, T. W. Chan and G. Wang: "Formation of matrix solutions for use in matrix-assisted laser desorption/ionization of biomolecules," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9** (1998) 166-174.
- 3) R. Cramer and S. Corless: "Liquid ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for automated proteomic analysis," *Proteomics*, **5** (2005) 360-370.
- 4) S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H. J. Räder and K. Müllen: "New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: A universal solvent-free sample preparation," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15** (2001) 1364-1373.
- 5) M. Karas and F. Hillenkamp: "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons," *Anal. Chem.*, **60** (1988) 2299-2301.
- 6) R. Cramer, W. J. Richter, E. Stimson and A. L. Burlingame: "Analysis of phospho- and glycopolypeptides with infrared matrix-assisted laser desorption and ionization," *Anal. Chem.*, **70** (1998) 4939-4944.
- 7) K. Dreisewerd, A. Rohlffing, B. Spottke, C. Urbanke and W. Henkel: "Characterization of whole fibril-forming collagen proteins of types I, III and V from fetal calf skin by infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry," *Anal. Chem.*, **76** (2004) 3482-3491.
- 8) Y. Naito, S. Yoshihashi-Suzuki, K. Ishii, T. Kanai and K. Awazu: "Matrix-assisted laser desorption/ionization of protein samples containing a denaturant at high concentration using a mid-infrared free-electron laser (MIR-FEL)," *Int. J. Mass Spectrom.*, **241** (2005) 49-56.
- 9) 志田保夫, 笠間健嗣, 黒野 定, 高山光男, 高橋利枝: これならわかるマスマスプロトメトリー (化学同人, 京都, 2001) pp. 86-90.
- 10) J. H. Gross (日本質量分析学会出版委員会訳): マスマスプロトメトリー (丸善, 東京, 2007) pp. 451-483.
- 11) R. Zenobi and R. Knochenmuss: "Ion formation in MALDI mass spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, **17** (1998) 337-366.
- 12) K. Dreisewerd: "The desorption process in MALDI," *Chem. Rev.*, **103** (2003) 395-426.
- 13) P. Demirev, A. Westman, C. T. Rimann, P. Hakansson, D. Barofsky, B. U. R. Sundqvist, Y. D. Chen, W. Seibt and K. Siegbahn: "Matrix-assisted laser desorption with ultra-short laser pulses," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6** (1992) 187-191.
- 14) H. C. Lüdemann, R. W. Redmond and F. Hillenkamp: "Singlet-singlet annihilation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization studies by fluorescence spectroscopy," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16** (2002) 1287-1294.
- 15) A. Rohlffing, C. Menzel, L. M. Kukreja, F. Hillenkamp and K. Dreisewerd: "Photoacoustic analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization processes with pulsed infrared lasers," *J. Phys. Chem. B*, **107** (2003) 12275-12286.
- 16) K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas and F. Hillenkamp: "Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **141** (1995) 127-148.
- 17) A. Vertes, R. Gijbels and R. D. Levine: "Homogeneous bottleneck model of the matrix-assisted ultraviolet laser desorption of large molecules," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **4** (1990) 228-233.
- 18) M. Schürenberg, K. Dreisewerd and F. Hillenkamp: "Laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides and proteins with particle suspension matrixes," *Anal. Chem.*, **71** (1999) 221-229.
- 19) L. V. Zhigilei and B. J. Garrison: "Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes," *J. Appl. Phys.*, **88** (2000) 1281-1298.
- 20) L. V. Zhigilei, E. Leveugle, B. J. Garisson, Y. G. Yingling and M. I. Zeifman: "Computer simulations of laser ablation of molecular substrates," *Chem. Rev.*, **103** (2003) 321-348.
- 21) A. Vogel and V. Venugopalan: "Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues," *Chem. Rev.*, **103** (2003) 577-644.
- 22) A. A. Puzosky and D. B. Geoghegan: "Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid MALDI-matrix plumes," *Chem. Phys. Lett.*, **286** (1998) 425-432.
- 23) S. Berkenkamp, C. Menzel, F. Hillenkamp and K. Dreisewerd: "Measurements of mean initial velocities of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13** (2002) 209-220.
- 24) M. Karas, M. Glückmann and J. Schäfer: "Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular

- ions are the lucky survivors," *J. Mass Spectrom.*, **35** (2000) 1-12.
- 25) K. Breuker, R. Knochenmuss, J. Zhang, A. Stortelder and R. Zenobi: "Thermodynamic control of final ion distributions in MALDI: in-plume proton transfer reactions," *Int. J. Mass Spectrom.*, **226** (2003) 211-222.
- 26) V. V. Laiko, M. A. Baldwin and A. L. Burlingame: "Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry," *Anal. Chem.*, **72** (2000) 652-657.
- 27) H. Ehring, M. Karas and F. Hillenkamp: "Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry," *Org. Mass Spectrom.*, **27** (1992) 472-479.
- 28) M. Gimion-Kinsel, L. M. Preston-Schaffter, G. R. Kinsel and D. H. Russel: "Effects of matrix structure/acidity on ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry," *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 2534-2540.
- 29) M. Mormann, S. Bashir, P. J. Derrick and D. Kuck: "Gas-phase basicities of the isomeric dihydroxybenzoic acids and gas-phase acidities of their radical cations," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11** (2000) 544-552.
- 30) R. Knochenmuss, E. Lehmann and R. Zenobi: "Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization," *Eur. Mass Spectrom.*, **4** (1998) 421-426.
- 31) D. A. Allwood, P. E. Dyer and R. W. Dreyfus: "Ionization modeling of matrix molecules in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11** (1997) 499-503.
- 32) M. Karas and R. Krüger: "Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism," *Chem. Rev.*, **103** (2003) 427-439.
- 33) B. Spengler, D. Kirsch and R. Kaufmann: "Fundamental aspects of postsorce decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. Residual gas effects," *J. Phys. Chem.*, **96** (1992) 9678-9684.
- 34) D. C. Reiber, T. A. Grover and R. S. Brown: "Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching," *Anal. Chem.*, **70** (1998) 673-683.
- 35) D. Suckau and A. Resemann: "T<sup>3</sup>-sequencing: targeted characterization of the N- and C-termini of undigested proteins by mass spectrometry," *Anal. Chem.*, **75** (2003) 5817-5824.

(2013年7月8日受稿)