

積は、自由に広がる液滴から生じる結晶よりはるかに小さい。この方法では、検出限界が改善されることに加えて、ターゲット上で正確に定義された位置に結晶ができるので、スポットの自動検出が容易になる。

### 11.4.2 標準的な試料調製

測定試料は何らかの溶媒に少なくとも約  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  の濃度で溶解する必要がある。もしマトリックス剤を用いるなら、飽和溶液あるいは約  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  の濃度となるようにマトリックス剤を溶解する。次に、試料溶液とマトリックス溶液を混合する。良い MALDI マススペクトルを得るためには、通常、マトリックス剤と試料のモル比を  $1000 : 1 \sim 100\,000 : 1$  の範囲に入るように調製する<sup>16,17,54</sup>。この範囲内であれば、良好な S/N と、フラグメンテーションを抑制したマススペクトルを得ることができる。非常に高い試料濃度では、“マトリックス効果”が減少し、観測されるマススペクトルは LDI マススペクトルと類似するようになる。試料濃度が低すぎるときには、十分なイオンを生成させるためにさらにレーザー照射を加える必要がある<sup>48</sup>。しかし、適切に調製すれば、マトリックス剤と試料分子のモル比が  $10^8 : 1$  でも良好な結果が得られる。試料分子とマトリックス剤の間の相溶性が十分に高いことも必要である<sup>102</sup>。

**試料消費** 分子量 ( $M_r$ ) が約 200 の典型的な MALDI マトリックスを仮定すると、適切な溶媒中にマトリックスを  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  で溶解すると濃度は  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  であり、 $5 \times 10^{-8} \text{ mol } \mu\text{L}^{-1}$  となる。 $M_r$  が約 2000 の平均的なペプチドは、 $0.01 \text{ mg mL}^{-1}$  で溶解すると、 $5 \times 10^{-12} \text{ mol } \mu\text{L}^{-1}$  ( $5 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ) になる。マトリックス剤溶液を試料溶液と  $1 : 1$  (v/v) で混合すると、ターゲット上でマトリックス剤と試料のモル比は  $10\,000 : 1$  となる。MALDI ターゲット上で 1 スポットあたり  $1 \mu\text{L}$  をピペットで滴下する (図 11.13) と、1 スポットあたり  $2.5 \text{ pmol}$  の試料量に相応する。実際には、ペプチドの MALDI-TOF-MS では、この量の  $1/1000$  まで適用範囲を広げることができる。すなわち、ルーチン的にスポットあたり数 fmol のペプチドで有用なマススペクトルの取得が実現でき、このときのマトリックス剤と試料のモル比は  $10\,000\,000 : 1$  に相当する。

結晶化の過程は、LDI および MALDI 試料調製において決め手となるパラメーターである<sup>54,111,112</sup>。通常の結晶化法は液滴乾燥法 (dried droplet preparation) とよばれる。この方法では、比較的大きな結晶が得られる。とくに水溶液からゆっくりと揮発させる場合にそうなるが、残念ながら大きな結晶ではショット間の再現性と質量精度が損なわれる。

そのため、できるだけ均質に分布した微結晶の薄層を調製することが望ましい<sup>111,113</sup>。薄層法 (thin layer technique) とよばれる方法では、HCHA のアセトン溶液を用いて薄膜を調製し、マトリックス剤を再溶解させないようにしながらその上に試料溶液を加える<sup>114,115</sup>。このような薄層を形成させるには、(1) アセトンのような揮発性の高い溶媒を用いる、(2) ターゲットを穏やかに加熱するかドライヤーで温和に送風することによって溶媒を強制的に揮発させる、あるいは (3) 研磨したターゲットを用いる、などの方法を用いると良い。この薄層法は、MALDI における試料調製法に大きなインパクトを与えた<sup>114,116</sup>。

さらに、あらかじめ製膜しておいた異なる種類のマトリックス層の上に分析種を製膜させるために、(ナノ) エレクトロスプレー成膜が利用できる。あらかじめ調製したマトリックス層の上に試料溶液を成膜する MALDI 試料調製法は、一般にサンドイッチ法 (sandwich method) とよばれる。マトリックス剤の基層は、標準的な液滴乾燥法または薄層法のいずれかによって調製する。ペプチドの (ナノ) エレクトロスプレー製膜では、たとえば、 $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  溶液を (ナノ) エレクトロスプレーのキャピラリーから固体のマトリックス層上に噴霧する。従来のエレクトロスプレーよりもナノエレクトロスプレーが有利な点は、非常に小さな液滴が形成され、それが乾燥粒子としてターゲットに到達するので、マトリックス表面が濡れて再溶解しないことである<sup>45</sup>。

### 11.4.3 カチオン化

中性の試料分子にカチオンを効果的に付加させるために、金属イオン、とくに $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、および $\text{Ag}^+$ などの1価のイオンを、マトリックス剤と試料の混合溶液に加えることがある<sup>117)</sup>。これは、たとえばオリゴ糖とアルカリ金属イオンの組合せのように、ある種の金属イオンに対して高い親和性をもつ試料分子に有利である<sup>6)</sup>。特定のカチオンを添加すると、その付加イオンを優勢に生成させることができる。たとえばカリウム塩を添加すると、他の種類のアルカリ金属イオン付加イオンよりも $[\text{M}+\text{K}]^+$ イオンが強く観測される(図11.14)。

極性基をもたない炭化水素<sup>118)</sup>、ポリエチレン<sup>119,120)</sup>、あるいはポリスチレン(11.6.6項の例を参照)<sup>121~125)</sup>などから $[\text{M}+\text{metal}]^+$ イオンを生成させるためには、 $\text{Ag}^+$ (トリフルオロ酢酸銀あるいはトリフルオロメタン硫酸銀として)、 $\text{Cu}^+$ 、あるいは他の1+酸化状態の遷移金属イオン<sup>121,122)</sup>がよく用いられる。

#### $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ はどこにでも存在する

ナトリウムとカリウムはどこにでも存在しており、ある程度アルカリ金属イオンと親和性がある分析種には対応する付加イオンが生成する<sup>126)</sup>。したがって、これらの典型的な質量の違いに留意しておくこと。たとえば $[\text{M}+\text{H}]^+$ に対する $[\text{M}+\text{Na}]^+$ と $[\text{M}+\text{K}]^+$ の+22uおよび+16uのように、よく現れるピーク質量差を探せば、真の分子質量が明らかになる。 $\text{Li}^+$ または $\text{Ag}^+$ などの他のカチオンは、それらの同位体パターンによって容易に同定できる。

精密質量データがあれば、気になるピーク対の質量差 $\Delta(m/z)$ 値を用いて $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 、あるいはほかによく現れるカチオン化された生成物を間違いなく決定することができる。これは、同位体間の特

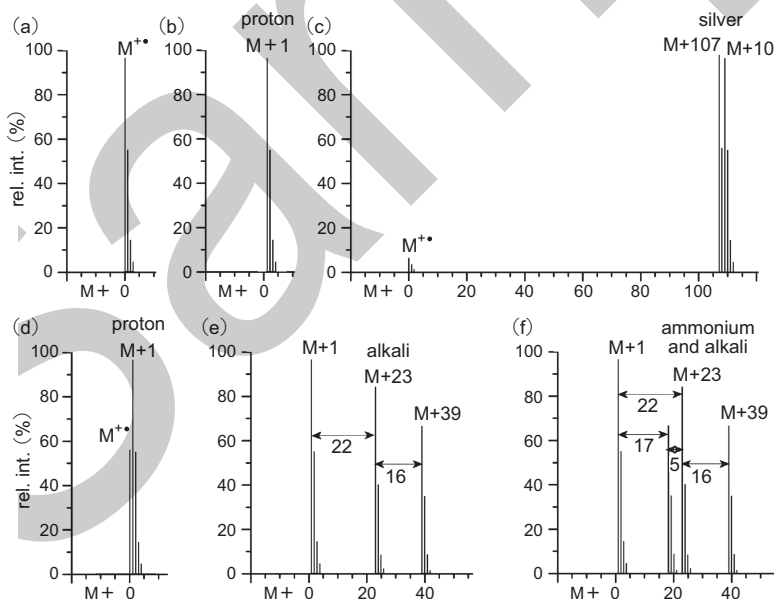


図 11.14 分子質量に関連するマスペクトル信号の現れ方

(a) 分子イオンの生成, (b) プロトン付加, (c) 銀カチオン付加, (d) 分子イオンとプロトン付加分子の共存, (e) プロトン付加とアルカリ金属イオン付加の共存, (f) プロトン付加とアンモニウムイオン付加とアルカリ金属イオン付加の共存. 各イオン種の相対量は大きく変動することがある. 横軸はMを基準にM+Xをノミナル質量で表した値に相当し, より現実に近い値に近づけるために仮想的な同位体パターンも描かれている.

表 11.3 よくあるカチオン付加などの識別に利用できる特徴的な質量差

イオン種の組合せ	$\Delta m/u$
$M^{+\bullet}$ vs. $^{13}C-M^{+\bullet}$	1.0033
$M^{+\bullet}$ vs. $[M+H]^+$	1.0078
$[M+H]^+$ vs. $[M+NH_4]^+$	17.0265
$[M+H]^+$ vs. $[M+Na]^+$	21.9819
$[M+H]^+$ vs. $[M+K]^+$	37.9559
$[M+Na]^+$ vs. $[M+K]^+$	15.9739
$[M+H]^+$ vs. $[M+O+H]^+$	15.9949

微的な質量差  $\Delta(m/z)$  (表 3.3 参照) によって特定の元素の存在を検証した方法<sup>127)</sup> と同じである。この識別で頻出するイオンの組合せを表 11.3 にまとめる。

#### 11.4.4 カチオン化およびカチオン除去の必要性

構造中に酸性水素をもつ試料はアルカリ金属イオンと交換して、 $[M-H+K]$  や  $[M-2H+2Na]$  などの中性の塩を形成する。その結果、1 種類の分析種から  $[M-2H+Na]^-$ ,  $[M-2H+K]^-$ ,  $[M-3H+Na+K]^-$  など、何種類ものイオンが生成するため、それぞれのイオン種ごとの存在量は相対的に少なくなり、ピーク強度がかなり弱くなる。幸いにして、MALDI では 1 価のイオンのみを考慮すればよい。

**複数のカチオン交換という難題** オリゴヌクレオチドは、このタイプの化合物の重要な代表例である。それらの極性が極めて大きくポリアニオン性の性質というだけで分析が非常に困難である。さらに、リン酸残基を介して結合しているヌクレオシドの数だけアルカリ金属イオンと交換可能な酸性水素がある。たとえば、オリゴヌクレオチド 11 量体の 1 価イオンは、理論的に  $[M-H]^-$ ,  $[M-2H+Na]^-$  から  $[M-10H+9Na]^-$  まで現れる可能性があるし、 $K^+$  や  $NH_4^+$  イオンともこの交換スキームを繰り返すことができる。さらに、 $[M-6H+3Na+2K]^-$  のような交換したカチオン種が複数混ざった生成物を考慮する必要がある。このように、水素-金属が交換すると数多くのピークが生じるので、ピーク分離が不十分かつピーク強度が微弱となり、マススペクトルのベースラインが若干ブロードに盛り上がったコブが現れるだけで、解析できるような有用な信号の生成は完全に抑制されてしまう<sup>128)</sup>。オリゴヌクレオチドのマススペクトル分析は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) によっても行われるが、それらの配列決定もこのような状況で扱われる (12.6.4 項参照)。

ターゲット上での洗浄は、MALDI 試料スポットに含まれるアルカリ金属イオンの量を低減するために、単純ではあるが非常に効果的なアプローチである<sup>129,130)</sup>。この目的のために、0.1~1% のギ酸またはトリフルオロ酢酸を含有する 2~5  $\mu\text{L}$  のアルカリ金属イオンを含まない水を結晶層の上に滴下し、数秒後にマイクロタイターピペットで除去するか、または加圧空気を噴射して吹き飛ばす。酸性溶媒の使用は、カルボン酸マトリックス剤を用いた場合に試料スポットの結晶の溶解を防ぐ効果がある。

試料調製に先立って、アルカリ金属イオンをアンモニウムに置換するために陽イオン交換樹脂を添加してもよい (図 11.15)<sup>30)</sup>。十分な効果を得るには、ターゲット金属表面上のアルカリ金属イオン汚染物を捕えるために、陽イオン交換ビーズをターゲット上にも保持することが重要である。レーザーが陽イオン交換ビーズに当たると、有用なシグナルは得られない。さらに、レーザーショットにより、ビーズが表面から脱落する可能性があるため、イオン源汚染のリスクがある。

ほかにも、サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography : SEC) または標準  $C_{18}$  逆相クロマトグラフィーの固定相材料をマイクロピペットチップの先端に充填して、小型カラムとして使用する