

先端物性測定実習I

質量分析2 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI - Ion Trap)

- 前期(月曜4限～6限)
- 担当: 高山・野々瀬・高橋

国際総合科学部・物質科学コース3年生専門教養科目・前期
のうち、野々瀬担当分のオンライン講義資料
(日程表、レジメ、講義スライド、講義ビデオ録画 等)を
下記のURLから適宜ダウンロードしてください。

<http://cluster.sci.yokohama-cu.ac.jp/online%20lecture.html>

- ◆ 「先端物性測定実習I・質量分析2・エレクトロスプレーイオン化法」
- ◆ 「先端物性測定講義I」
 - ◇「質量分析1・質量分析概論」 担当教員:高山光男 先生
 - ◇「質量分析2・真空と質量分析装置」担当教員:野々瀬真司
- ◆ 「分子構造化学」

成績

1. オンライン出席
2. オンラインレポート

まず、下記のURLにアクセスして、本日分の
「先端物性測定実習I・出席確認・小テスト 2020.05.18」

https://forms.office.com/Pages/ResponsePage.aspx?id=Zm1jvv7LuEGJXO5cvYvHVcLAfBAjfaxKi5qQjcv_qfZUOUUzS0JJVURYMDIUSFNORK45MENWVEpaTS4u

に学籍番号・氏名を入力してください。

エレクトロスプレーイオン化法の原理

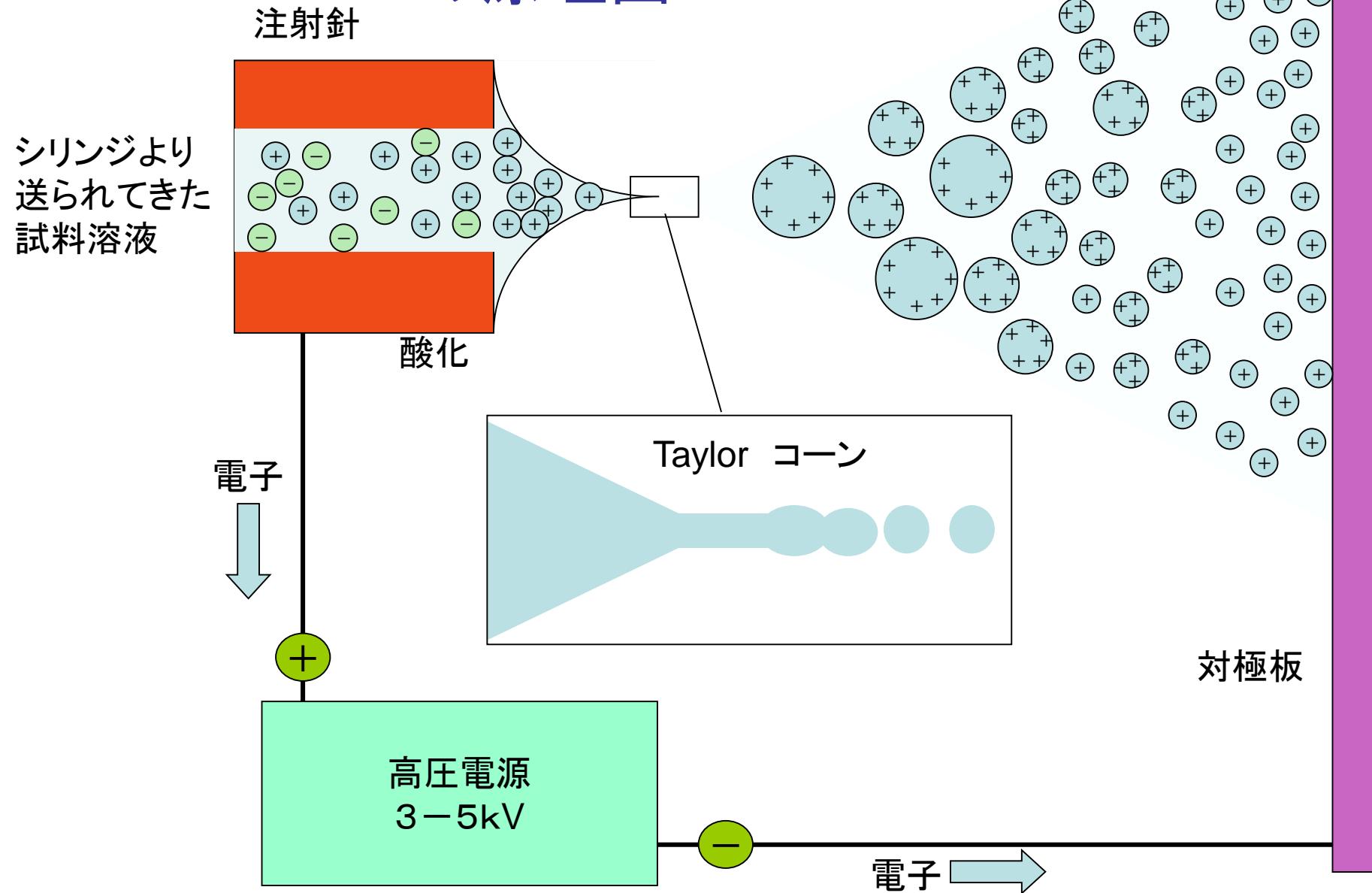
エレクトロスプレーイオン化法(ESI)とは、
生体分子・有機分子を非破壊的に、
溶液中から真空中へ導入するソフトなイオン化法である。
大きな分子量を持ち、不揮発性で電荷を帯びる分子の
質量分析にはきわめて有用である。

•シリンジポンプによって、流量5~20 $\mu\text{l}/\text{min}$ で
希薄溶液が注射針に送られる。

•注射針には周囲の電極に対して
3~5kVの電位が印加される。

•注射針先端に大きな電場勾配が生じ、
静電気力が表面張力に打ち勝って、
溶液が荷電液滴となって大気中に放出される。

エレクトロスプレーイオノ化法 の原理図

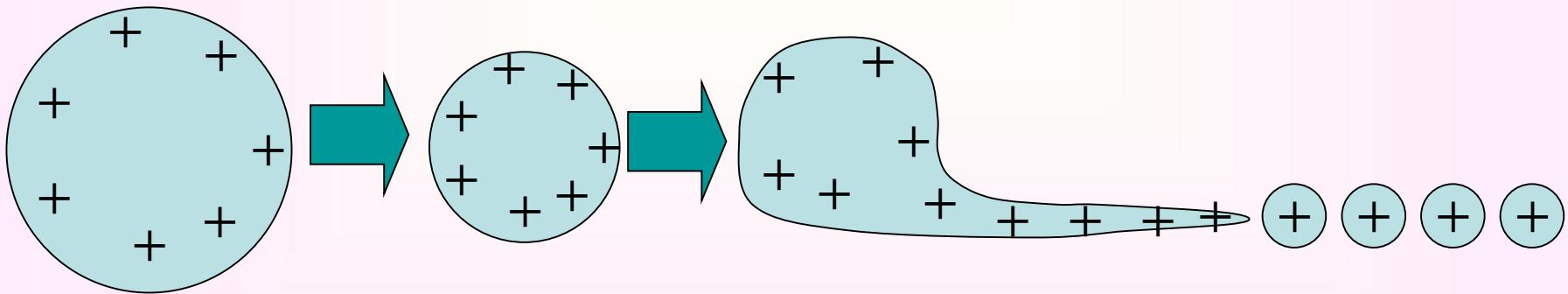


荷電液滴から孤立分子イオンの生成

・液滴表面から溶媒分子が蒸発。

・溶媒の蒸発に伴って液滴のサイズが減少し
液滴表面の電荷密度が増大。

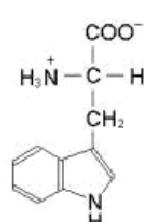
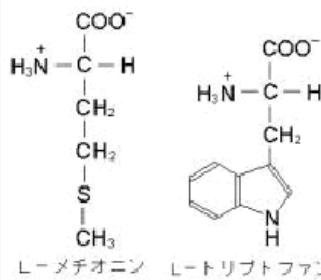
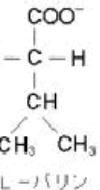
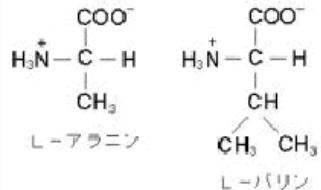
・静電反発力が表面張力よりも大きくなると、
荷電液滴はより小さなサイズの液滴にクーロン分裂。



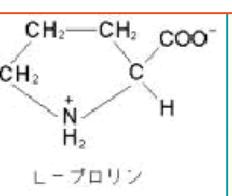
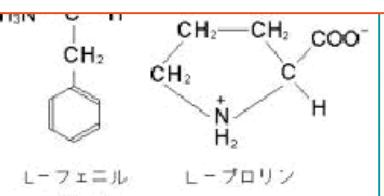
・このような分裂過程が繰り返される。
最後には孤立した分子イオンが生成される。

蛋白質は20種類のアミノ酸から構成される

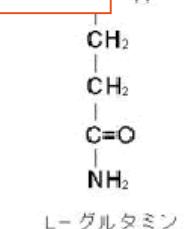
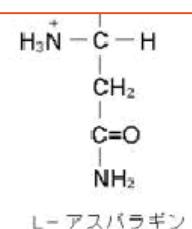
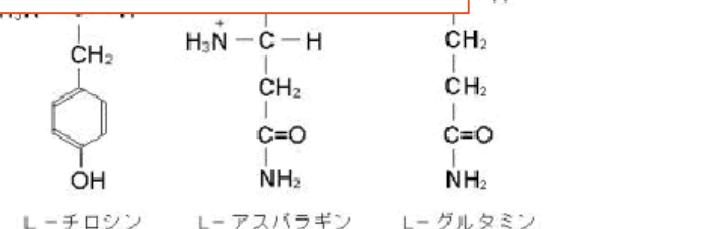
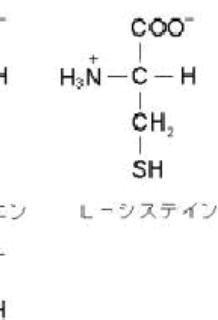
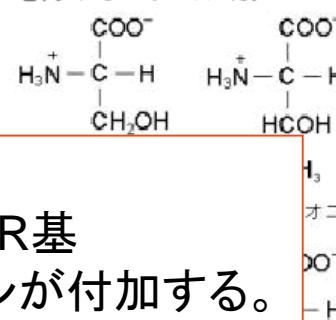
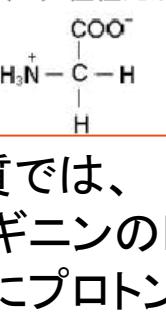
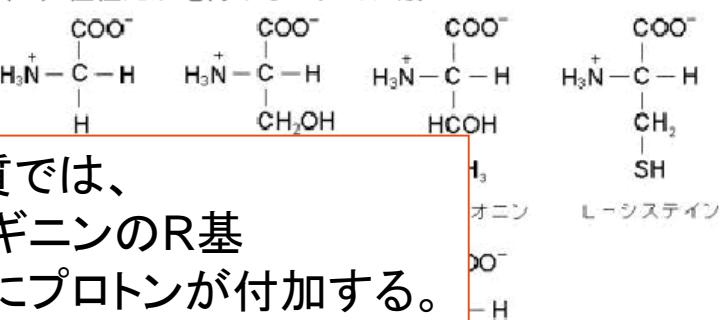
(1) 非極性即ち疎水性アミノ酸



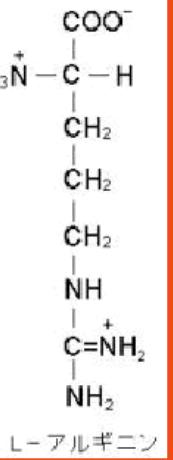
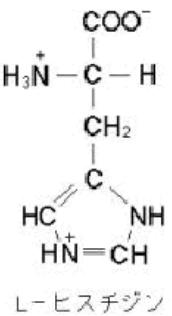
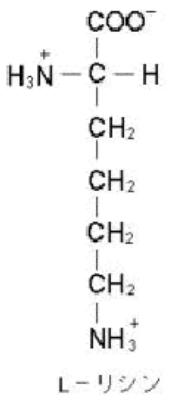
酸性溶液中にある蛋白質では、
リシン、ヒスチジン、アルギニンのR基
およびN-末端のアミノ基にプロトンが付加する。



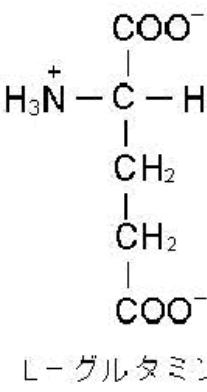
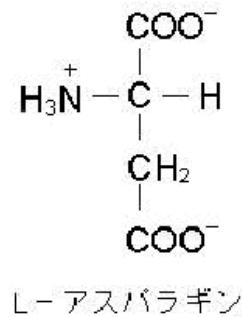
(2) 極性だが電荷のないアミノ酸



(3) 正電荷を有するR基をもつアミノ酸

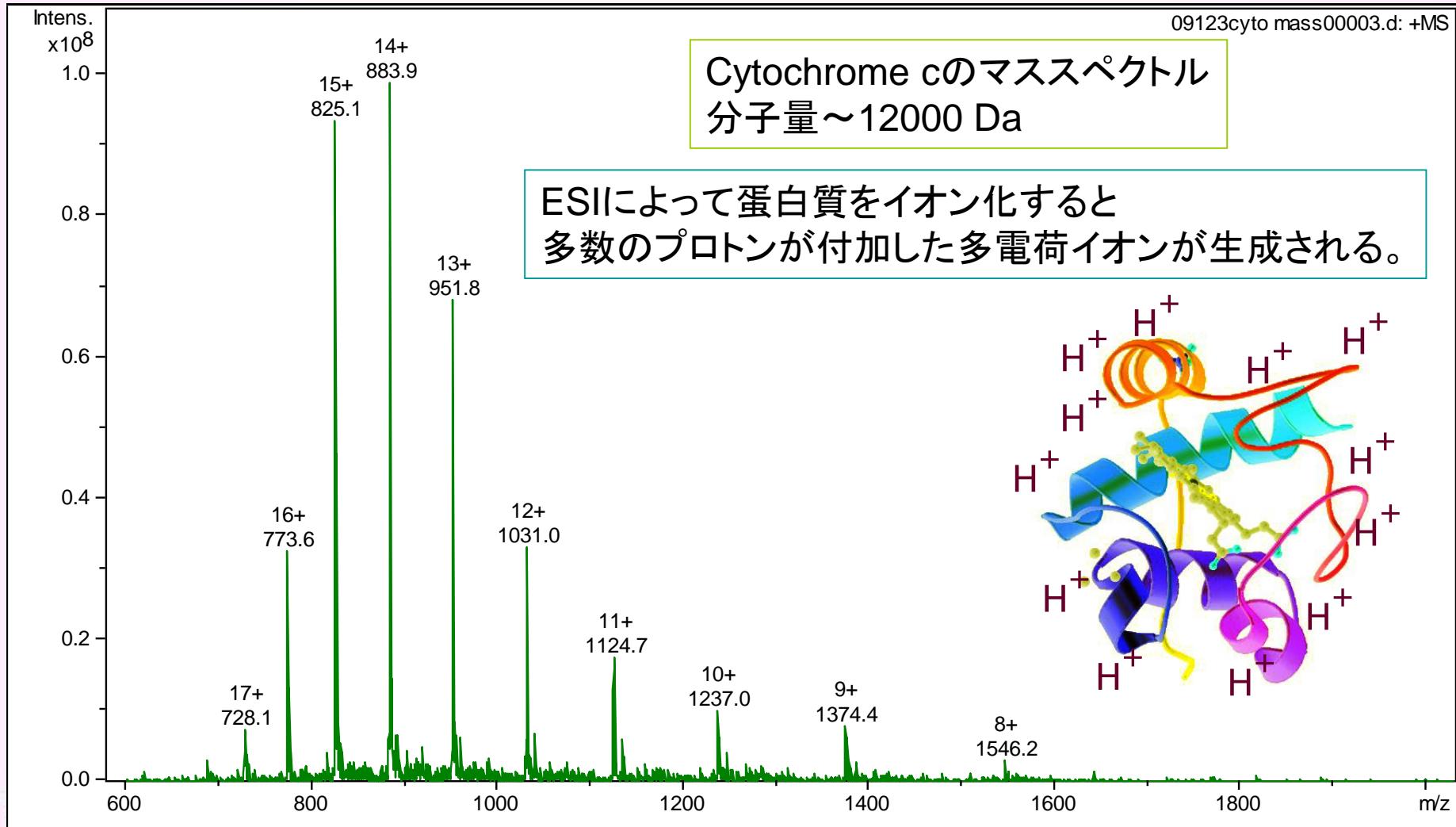


(4) 負電荷を有するR基をもつアミノ酸



蛋白質多電荷イオンの質量分析

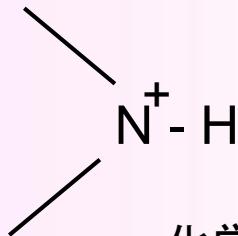
エレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用いた質量分析装置を用いて、蛋白質多電荷イオンのマススペクトルを測定する。



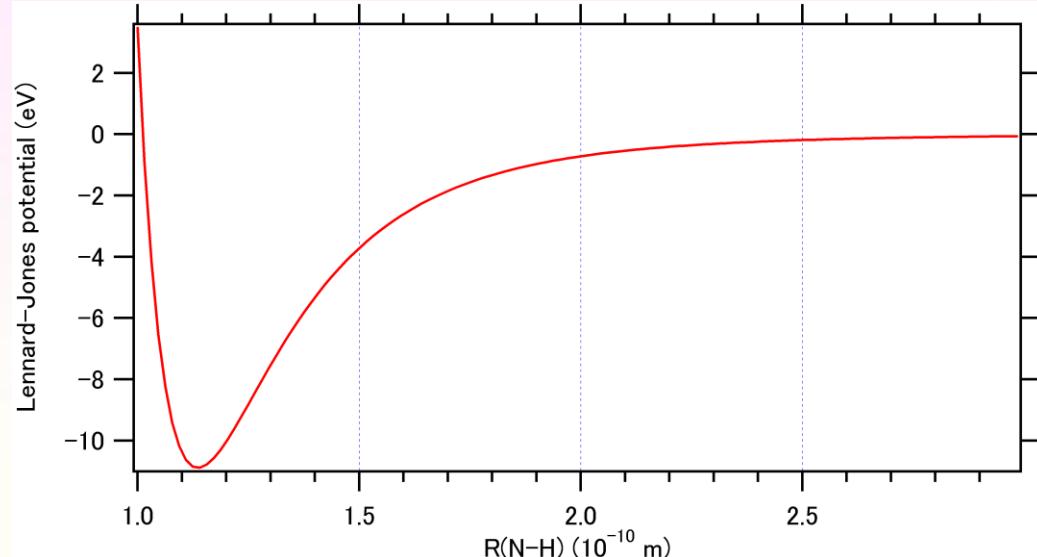
N-H結合をレナード-ジョーンズ・ポテンシャルと仮定すると、次の式であらわされる。

ここで、 r はN原子とH原子との間の距離(核間距離)である。

$$U_{\text{Lenard-Jones}} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$



化学結合は近距離力



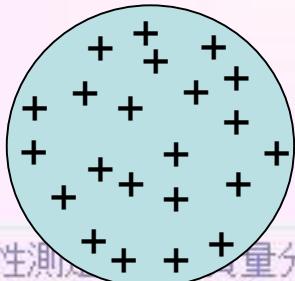
蛋白質多電荷イオンの構造を球だと仮定する。

半径 a の球の内部に電荷 Ze が一様に分布しているとする。

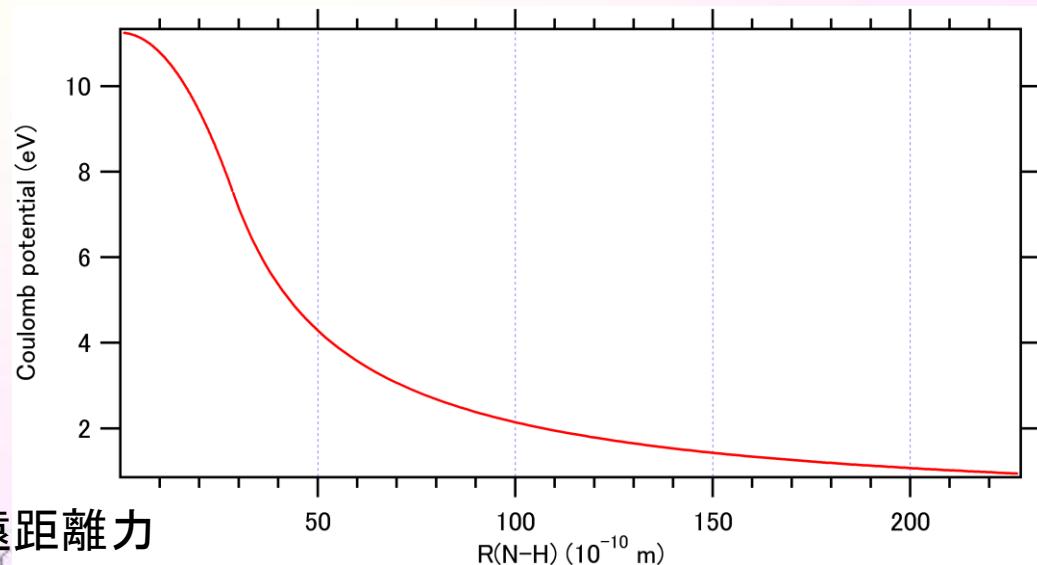
その場合のクーロンポテンシャルは、次の式であらわされる。

$$U_{\text{Coulomb}} = \frac{Ze^2}{4\pi\epsilon_0 r} (r \geq a)$$

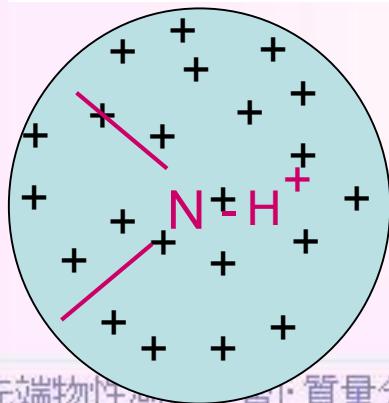
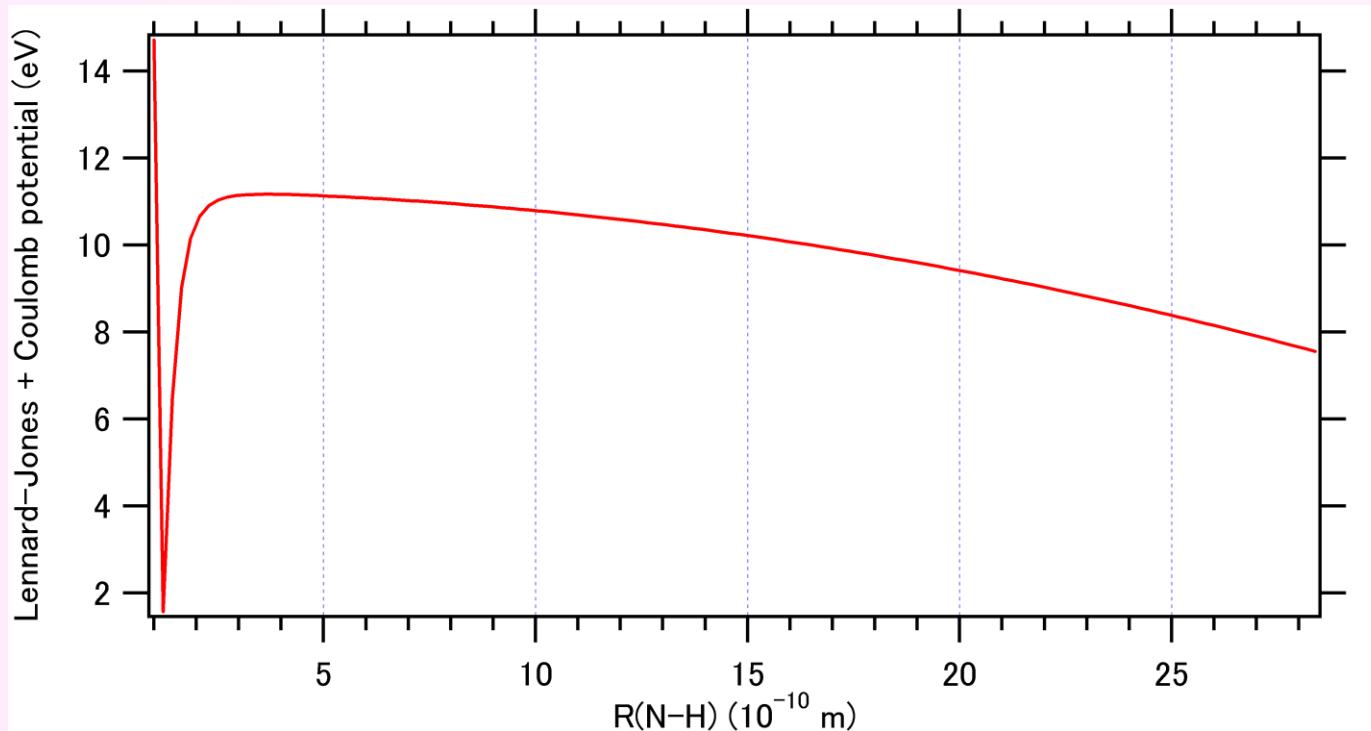
$$U_{\text{Coulomb}} = \frac{Ze^2}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{1}{2a} \cdot \left(3 - \frac{r^2}{a^2} \right) (r \leq a)$$



クーロン力は遠距離力



N-H結合のレナード-ジョーンズ・ポテンシャルと
蛋白質内の電荷によるクーロンポテンシャルを
足し合わせたもの

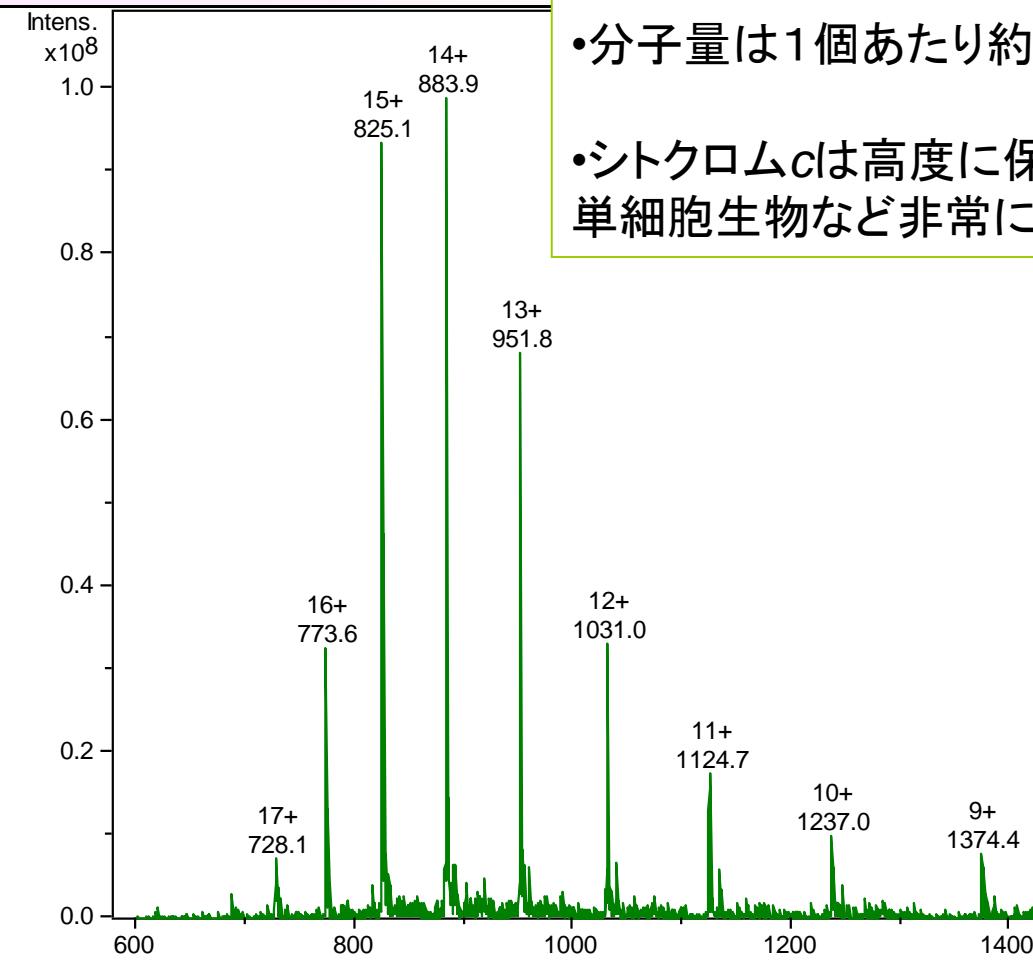


Cytochrome c とは・・

・シトクロムc(cytochrome c)は、ミトコンドリアの内膜に弱く結合しているヘム蛋白質の一種である。ミトコンドリア内で電子伝達系の構成要素を成す。

・分子量は1個あたり約12,000 Daである。

・シトクロムcは高度に保存されたタンパク質で、動物、植物、単細胞生物など非常に多様な生物で確認されている。



Chain Sequence of Cytochrome c

Basic Residues;

Lysine;K, Arginine;R, Histidine;H

104 residues

GDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPN
LHGLFGRKTGQAPGFTYTDANKNKGITWKEET
LMEYLENPKKYIPGTKMIFAGIKKKTEREDLIA
YLKKATNE

実習に用いる試料

アンジオテンシン I (angiotensin I)

試料濃度 1~10μg/ml 溶媒 メタノール + 純水(1%) + 酢酸(0.1~1%)

アンジオテンシン (angiotensin) はポリペプチドの一種で、昇圧作用を持つ生理活性物質である。アンジオテンシンにはI~IVの4種がある。心臓収縮力を高め、細動脈を収縮させることで血圧を上昇させる。

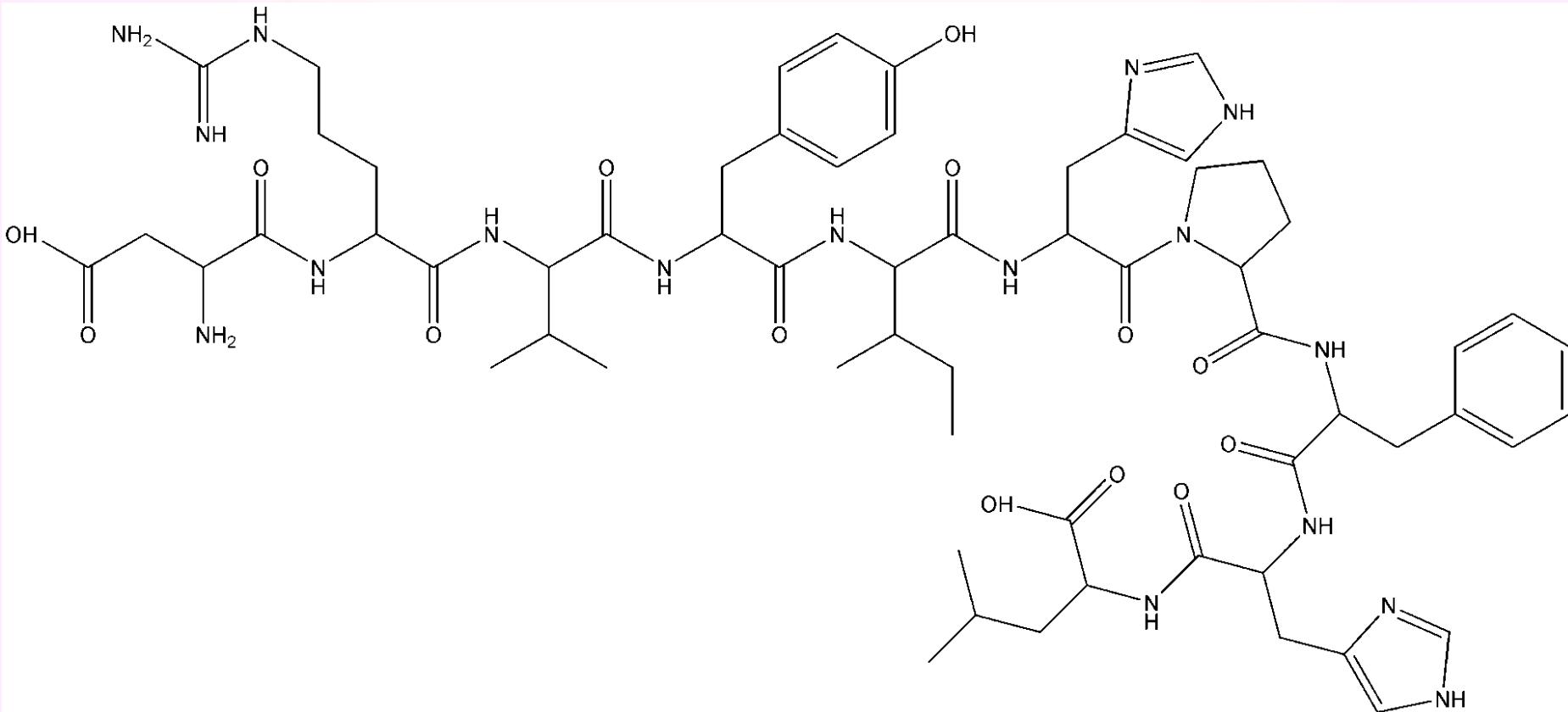
Angiotensin Iのアミノ酸配列

3文字表記； Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH

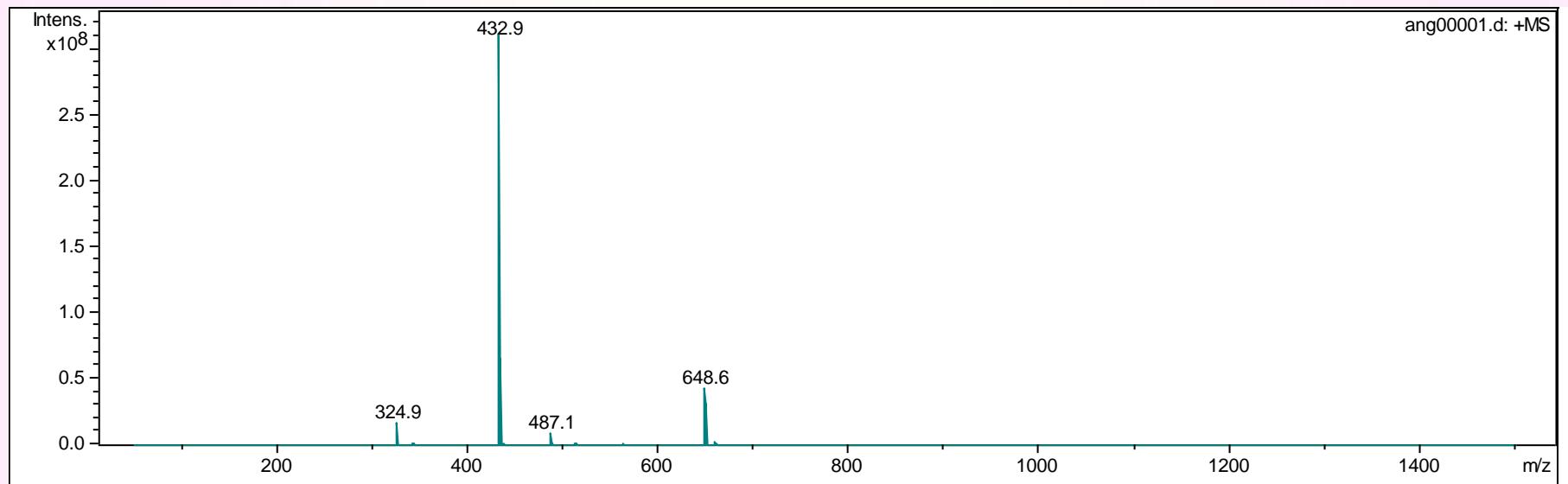
1文字表記；DRVYIHPFHL

分子量； 1296.48 Da

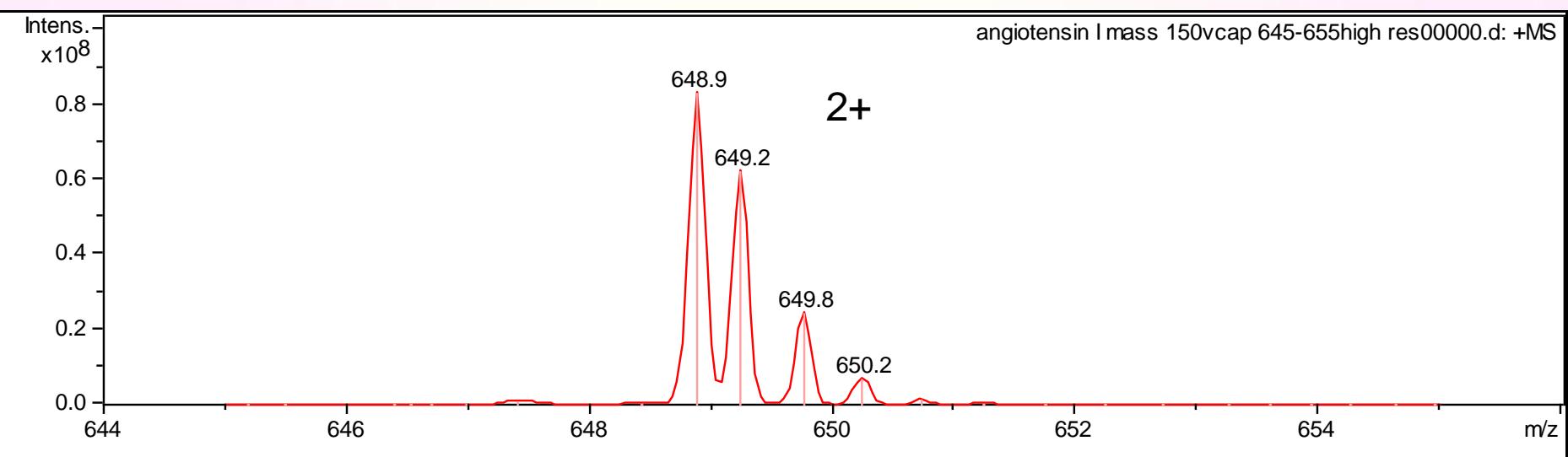
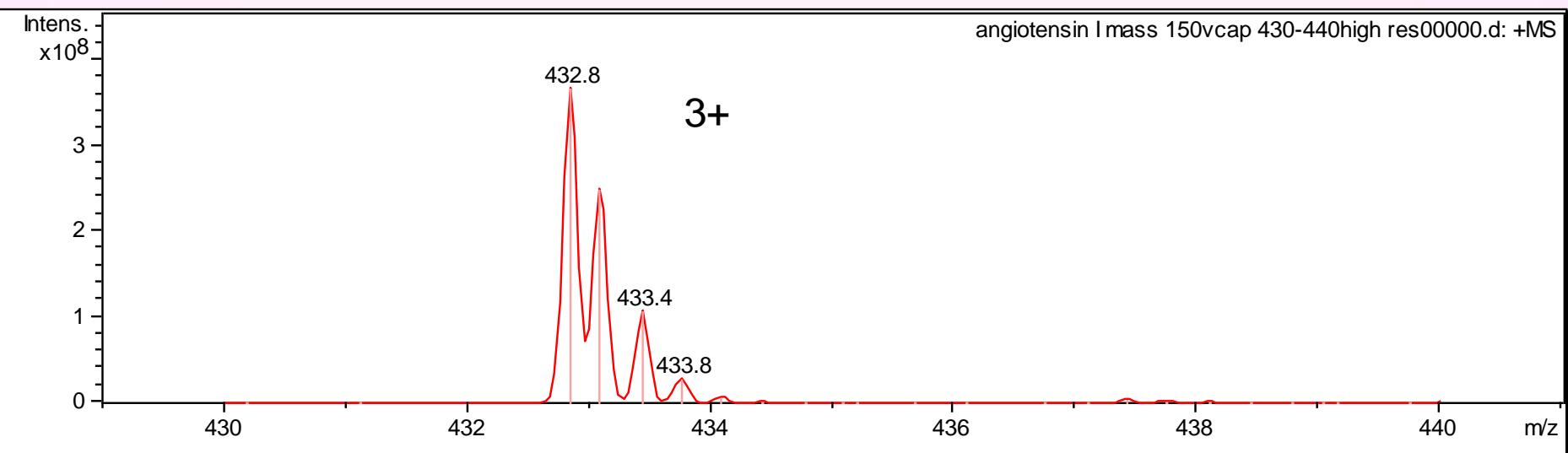
Angiotensin I の分子構造



Angiotensin のマススペクトル



Angiotensin I ($z=2,3$) ^{13}C 同位体分布



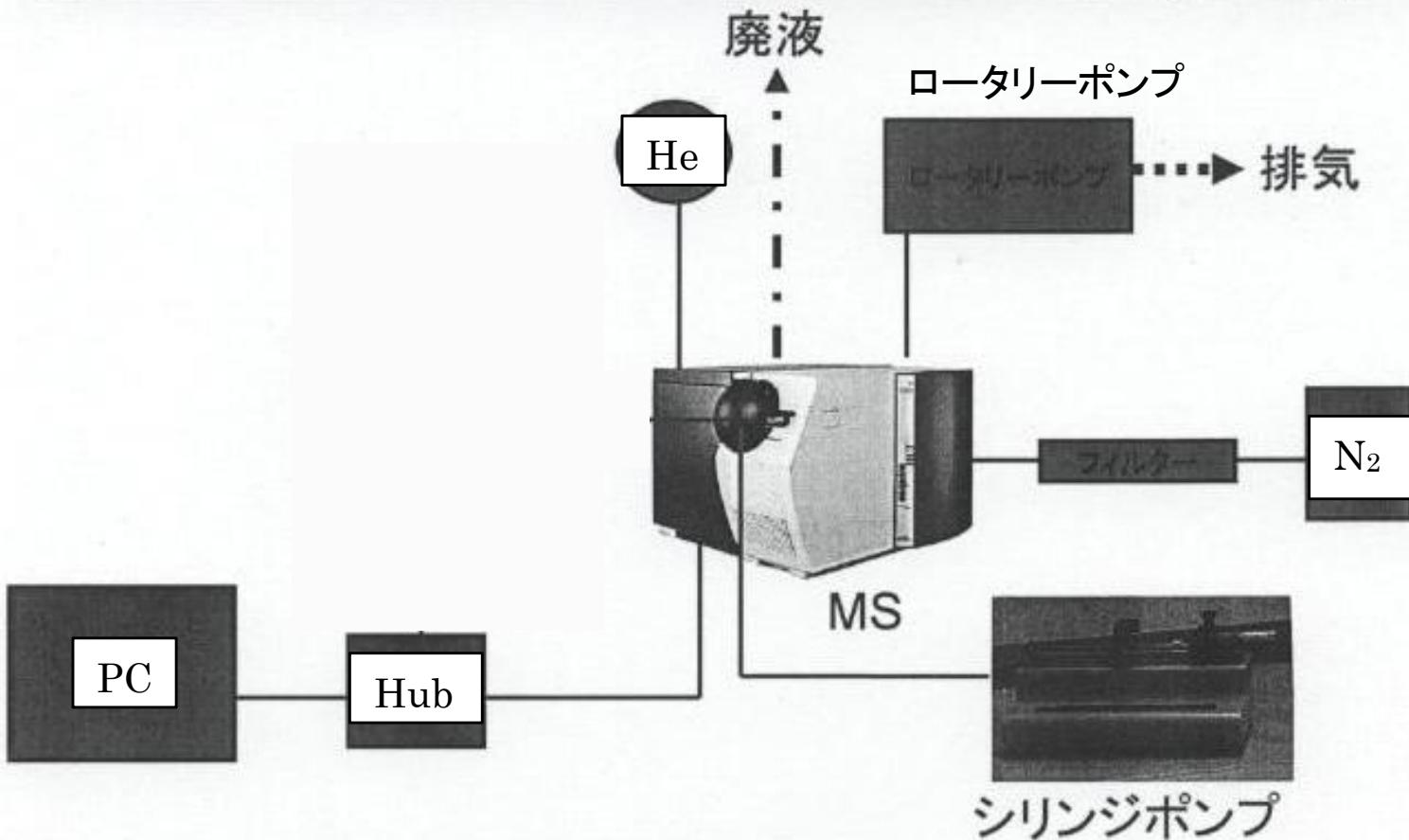
エレクトロスプレーイオントラップ型質量分析装置 Bruker-Daltonics, HCT-ETD II

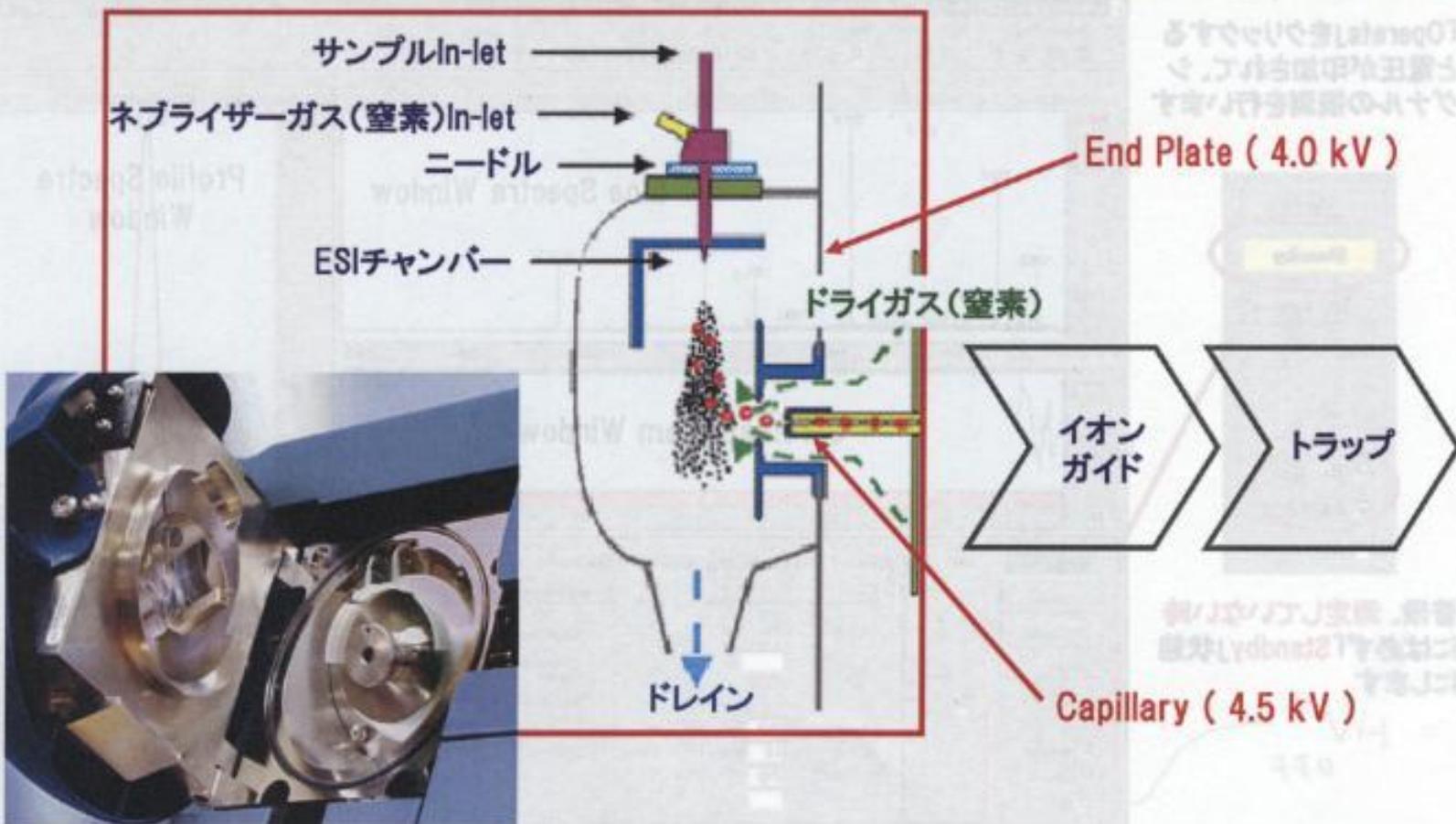


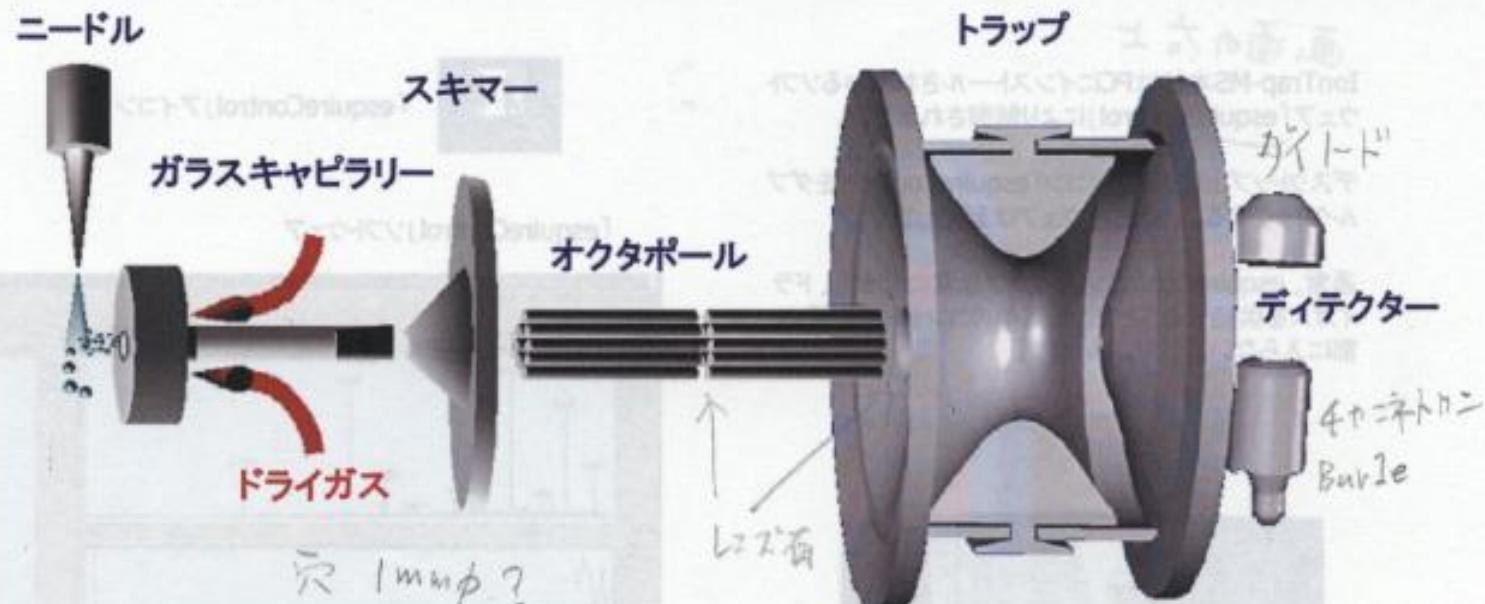
MS構成関係図

**BRUKER
DALTONICS**

HCT Training : Ion Trap MS





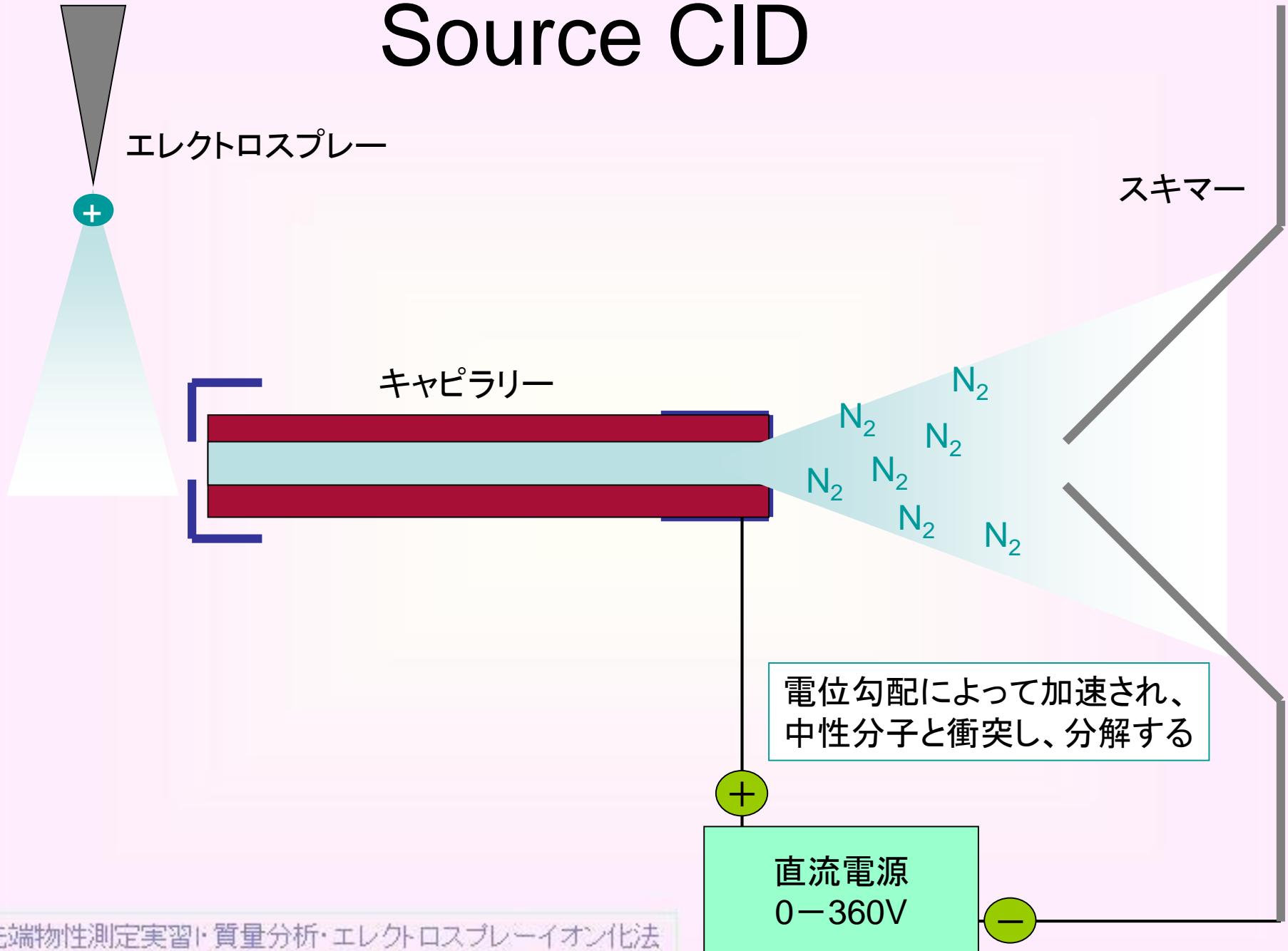


イオン源

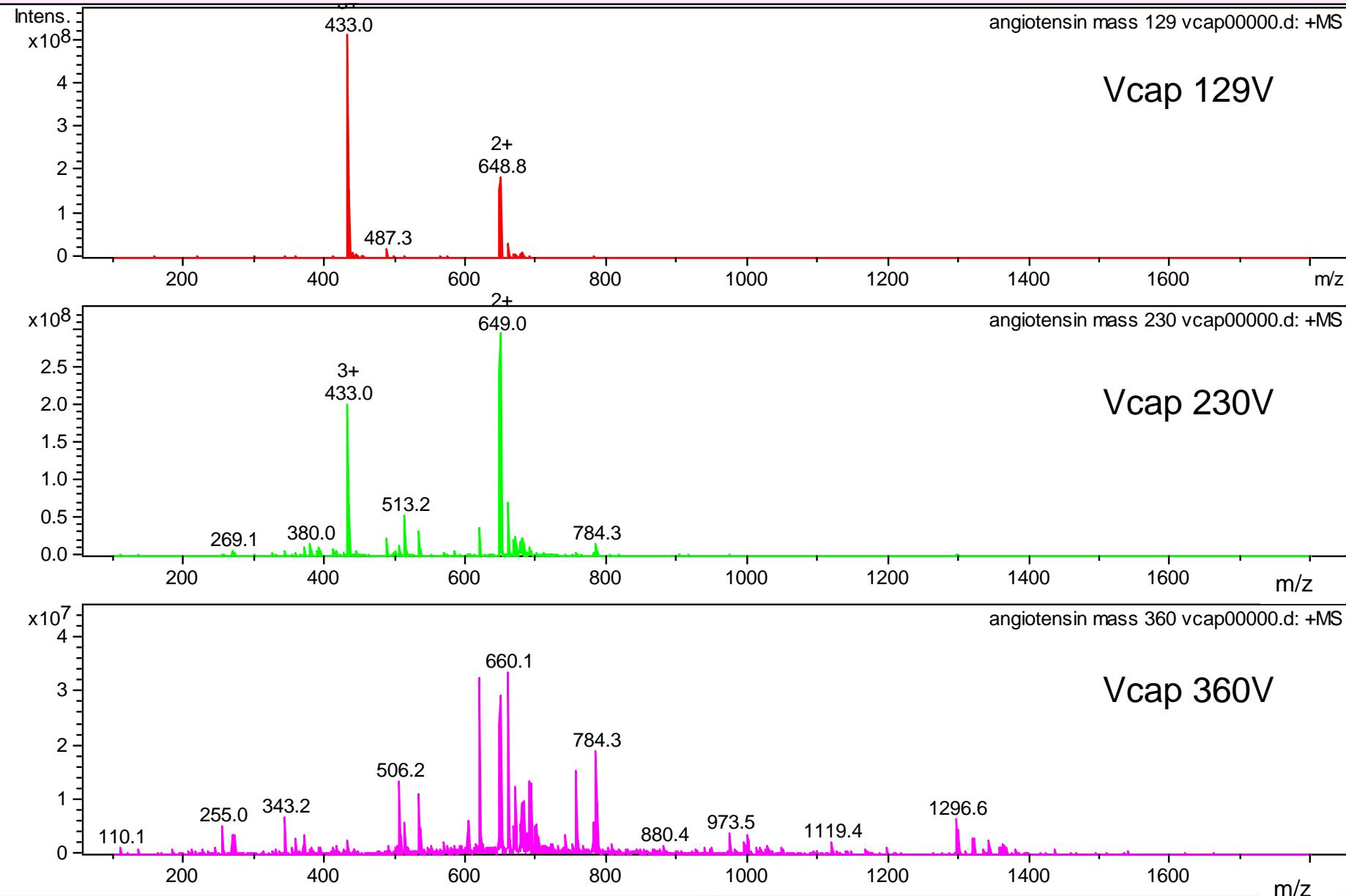
イオンガイド

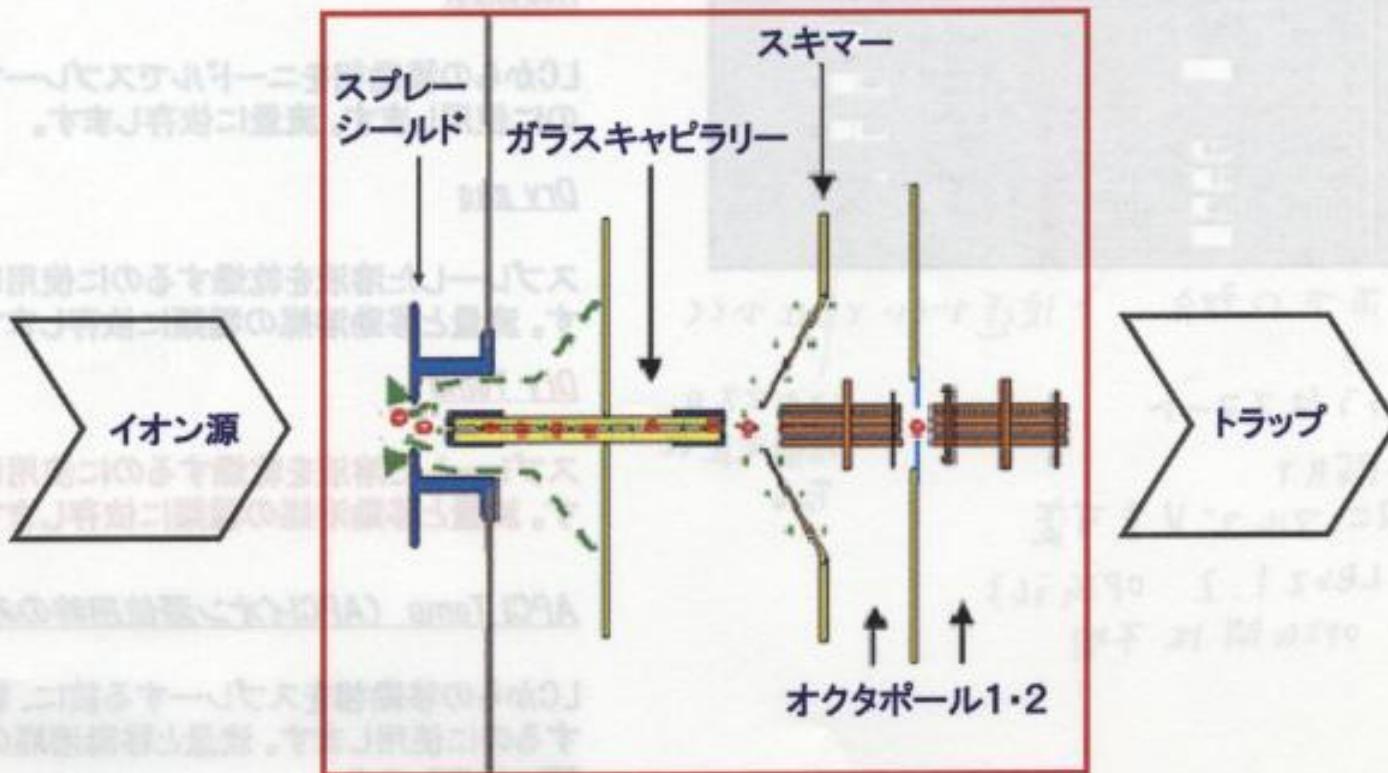
トラップ
検出器

Source CID

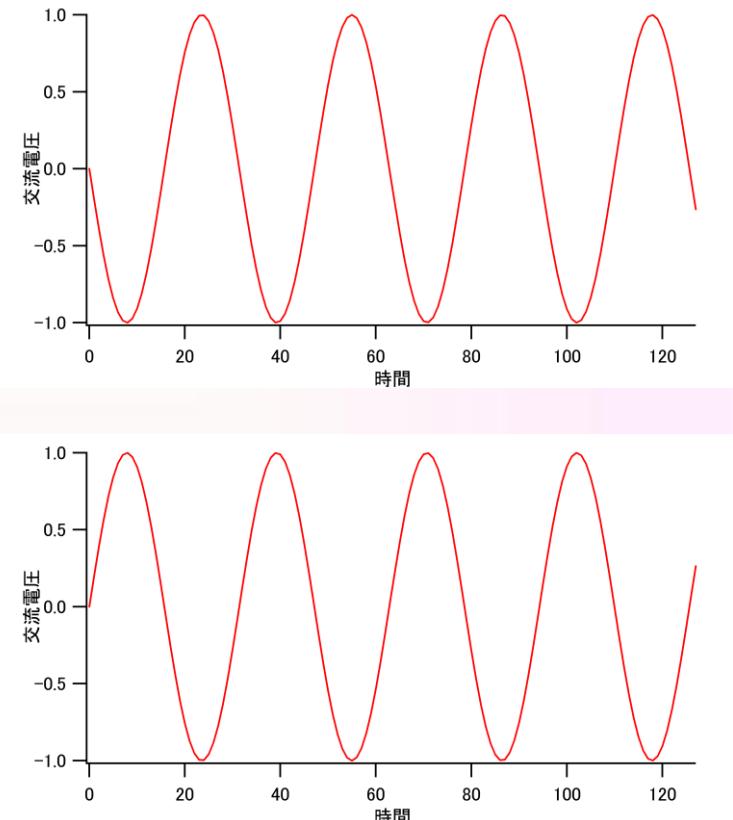
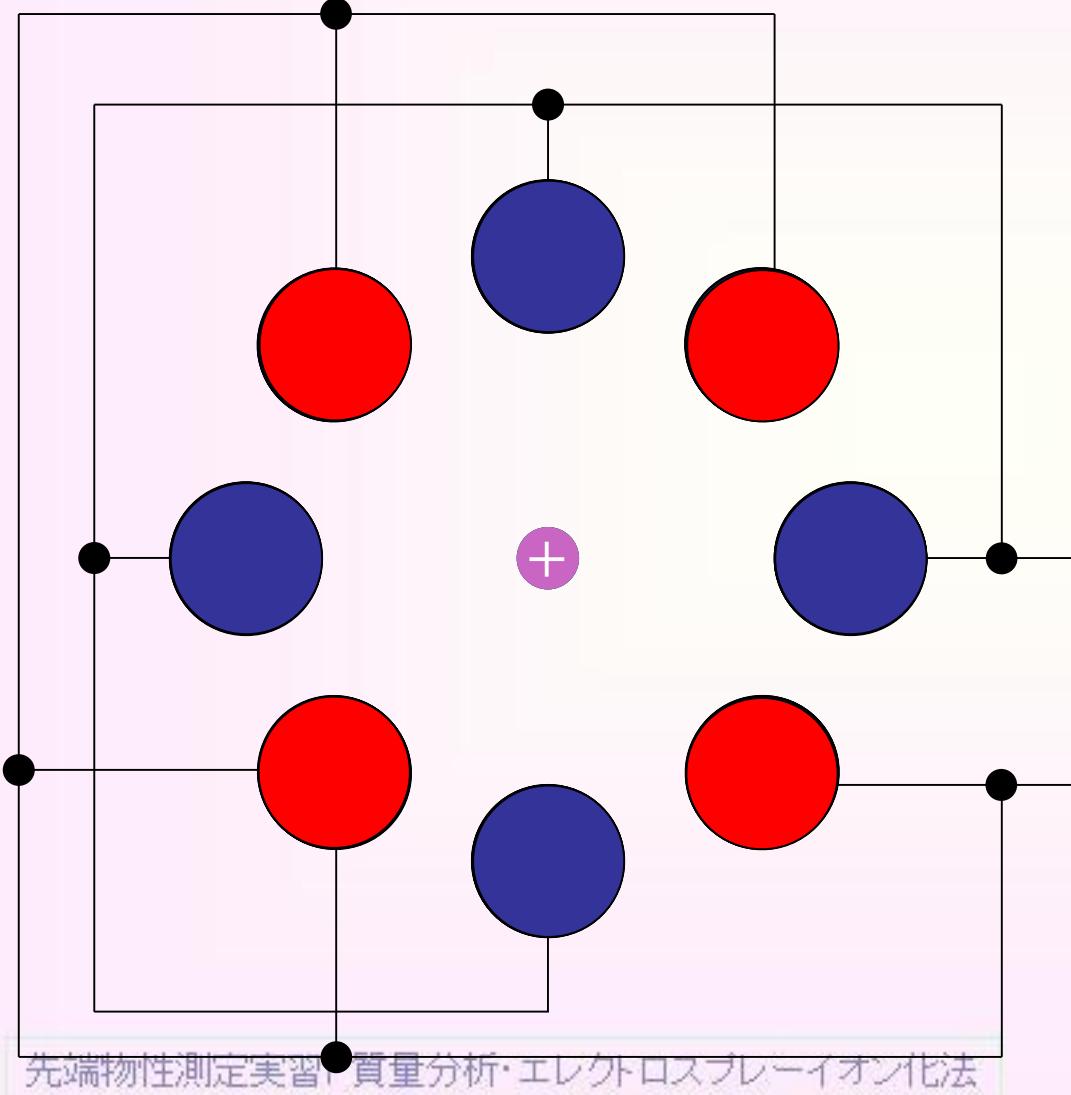


Angiotensin I キャピラリー電圧依存性(スキマー電圧40V)





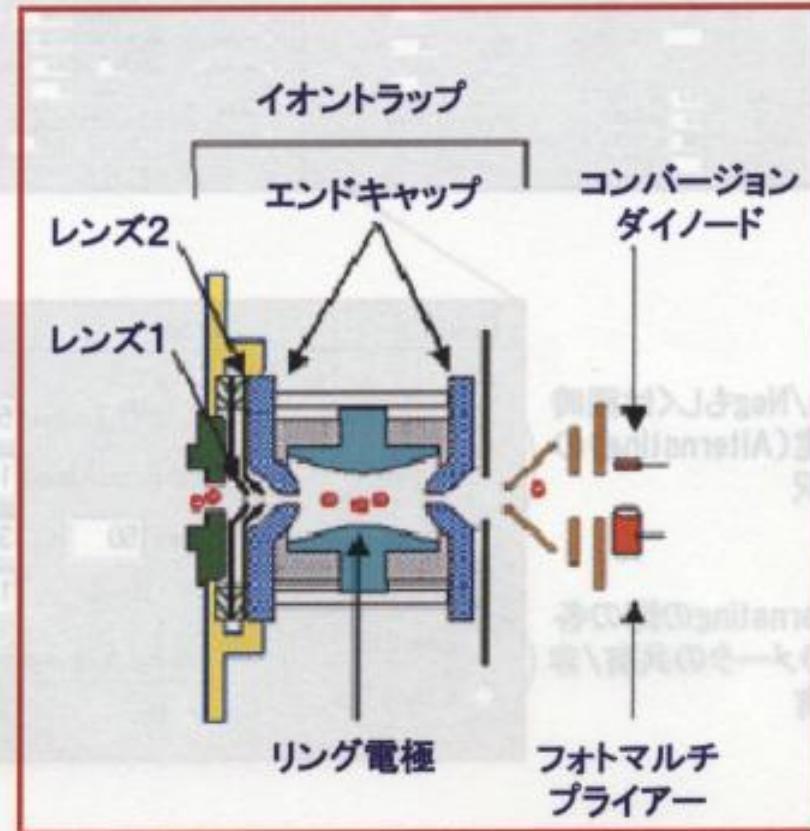
Octapole Ion Guide



イオントラップ

**BRUKER
DALTONICS®**

HCT Training : Ion Trap MS

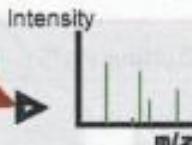
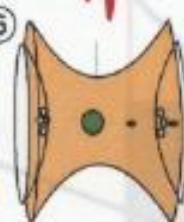
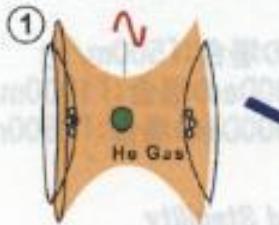


イオントラップから検出 (MS測定)

BRUKER
DALTONICS

HCT Training : Ion Trap MS

Accumulation



Detection

質量の増加に伴いRFを増加させることで、イオンをトラップから追い出し、これが検出されることで、マススペクトル(MS)を描きます。

ICC 付にカレントコントロール
イオンが多すぎたり少なすぎたりする
TRAP中の

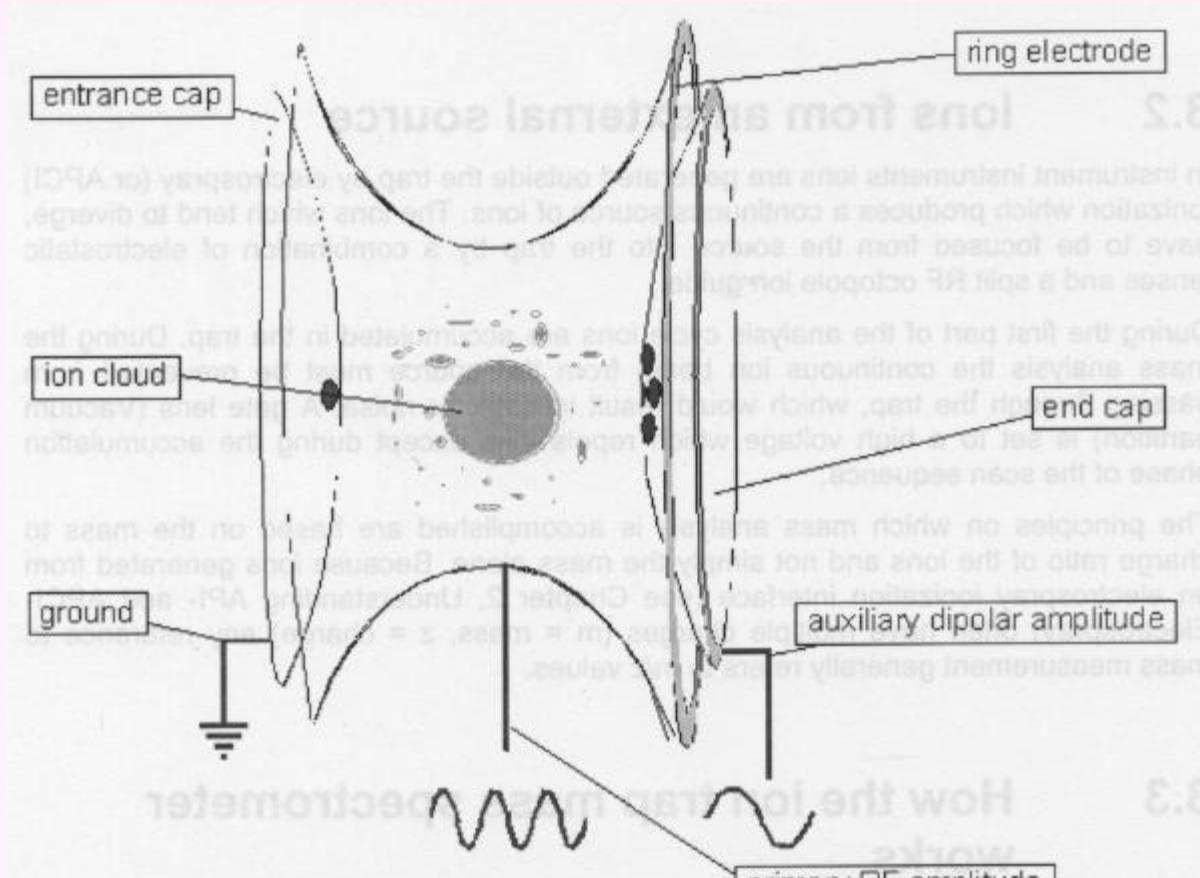
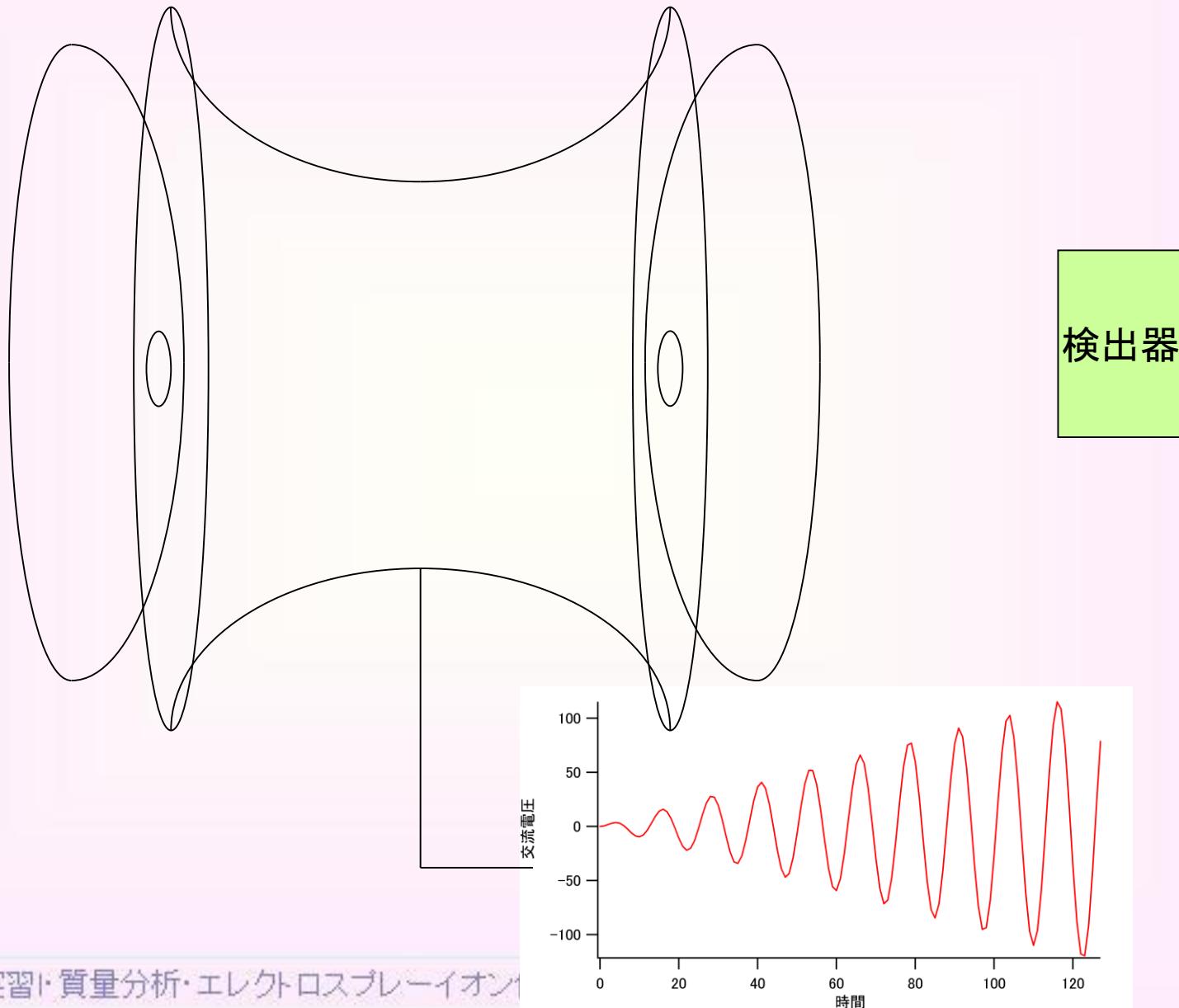


Figure 3-2 The ion trap geometry

Quadrupole Ion Trap



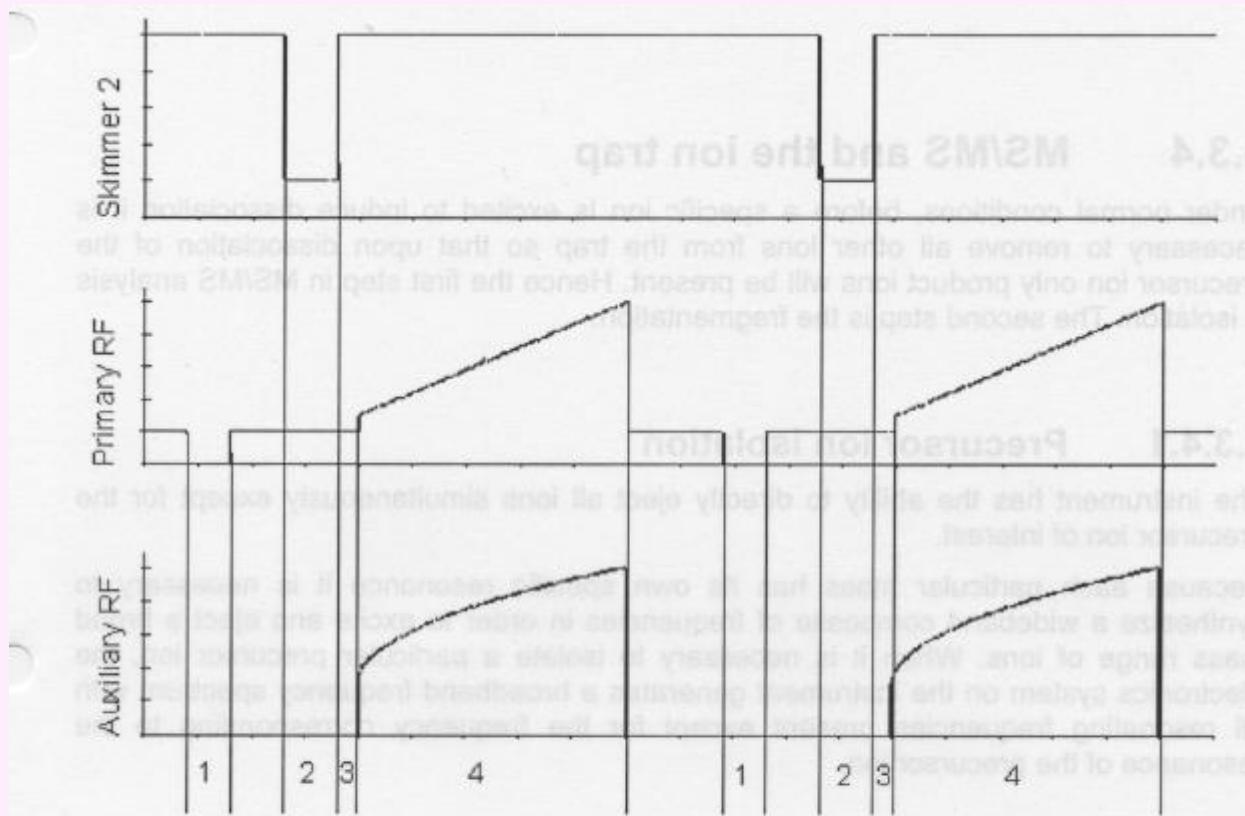


Figure 3-5 The important scan segments for an MS scan

- 1 Clear Trap
- 2 Accumulation Time
- 3 Scan Delay
- 4 Mass Analysis

【参考文献】

1. これならわかるマススペクトロメトリー
志田保夫 [ほか] 著 化学同人
図書館配架場所 433.2||17
2. マススペクトロメトリーってなあに
日本質量分析学会出版委員会編
日本質量分析学会
図書館配架場所 433.2||18
3. 現代質量分析学
高山光男 [ほか] 著 化学同人
図書館配架場所 433.2||21
4. タンパク質入門
高山光男 著 内田老鶴圃
図書館配架場所 464.2||58, 428||55

※ 図書館から借りた書籍は、みんなで仲良く利用すること。

次の班が利用できるように、課題が終わったら即座に図書館に返却すること。

野々瀬研究室、高山研究室にて、これらの書籍を居室で読むことはできるが、貸し出しは許可しない。

小テスト

問1.

Angiotensin Iのアミノ酸配列は、3文字表記では
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH
となる。アミノ酸配列の1文字表記を示しなさい。

下記のURLにアクセスして、本日分の
「先端物性測定実習I・出席確認・小テスト 2020.05.18」

https://forms.office.com/Pages/ResponsePage.aspx?id=Zmljvv7LuEGJXO5cvYvHVcLAfBAjfaxKi5qQjcv_qfZUOUUzS0JVURYMDIUSFNORk45MENWVEpaTS4u

に問1.の解答を入力してください。

ヒント

アミノ酸略号

和名	英名	略号		和名	英名	略号	
		3文字	1文字			3文字	1文字
アラニン	Alanine	Ala	A	ロイシン	Leucine	Leu	L
アルギニン (B)	Arginine	Arg	R	リシン (B)	Lysine	Lys	K
アスパラギン	Asparagine	Asn	N	メチオニン	Methionine	Met	M
アスパラギン酸 (A)	Aspartic Acid	Asp	D	フェニルアラニン	Phenylalanine	Phe	F
システイン	Cysteine	Cys	C	プロリン	Proline	Pro	P
グルタミン	Glutamine	Gln	Q	セリン	Serine	Ser	S
グルタミン酸 (A)	Glutamic Acid	Glu	E	トレオニン	Threonine	Thr	T
グリシン	Glycine	Gly	G	トリプトファン	Tryptophan	Trp	W
ヒスチジン (B)	Histidine	His	H	チロシン	Tyrosine	Tyr	Y
イソロイシン	Isoleucine	Ile	I	バリン	Valine	Val	V

注：表中 (A) : 酸性アミノ酸、(B) : 塩基性アミノ酸

<https://www.nacalai.co.jp/information/trivia2/10.html>

問1. 解答

Angiotensin Iのアミノ酸配列は、3文字表記では
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH
となる。アミノ酸配列の1文字表記を下記に示す。

DRVYIHPFHL

終わり

御静聴を
どうも有り難うございました。

来週のオンライン実習を
楽しみしていて下さい。