
先端物性測定実習 I
質量分析(MS) I
マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)
MALDI-TOFMS

2020年度 前期(月曜4限～6限)

担当:高山・野々瀬・高橋

ロボットやAIに負けない人材になるために！

ロボット：決められた作業を延々とやり続けられる

単純作業は、初期投資をしてでもロボット化した方がコストパフォーマンスは高い

AI: Artificial Intelligence、人工知能

大量のデータ(教師データ)から規則性やルールを学習し、与えられた課題に対して推論や回答、情報の合成などを行う機械学習を基礎とする(IT用語辞典より引用)。

教師データ = 正解データ → 多くの人が正解を導き出せる

**教師データが大量に存在しない
少数の人しか判断できない課題**



**考える
イメージする**

この講義 & 実習で学ぶこと

- マススペクトルから何が分かるか？
- マススペクトルの解釈
- 原子、分子の質量
- 同位体
- MALDI-TOFMSの動作原理

キーワード

分子質量、相対分子質量、 m/z 、同位体、イオン種

質量分析の応用範囲

1. 天然物化学／有機合成化学

- ・分子質量の確認、構造解析

2. 生化学／医学／薬学／法医学など

- ・生体分子(タンパク質、核酸、糖、糖脂質など)の分析
- ・イムノアッセイ
- ・臨床診断の一助(先天性代謝異常など)
- ・ドーピングテスト(長野オリンピック1998年)
- ・薬物動態
- ・毒物、薬物等の同定(地下鉄サリン事件1995年、毒物カレー事件1998年)

3. 環境分析

- ・農薬、ダイオキシンなどの定量、モニタリング

4. 製品管理

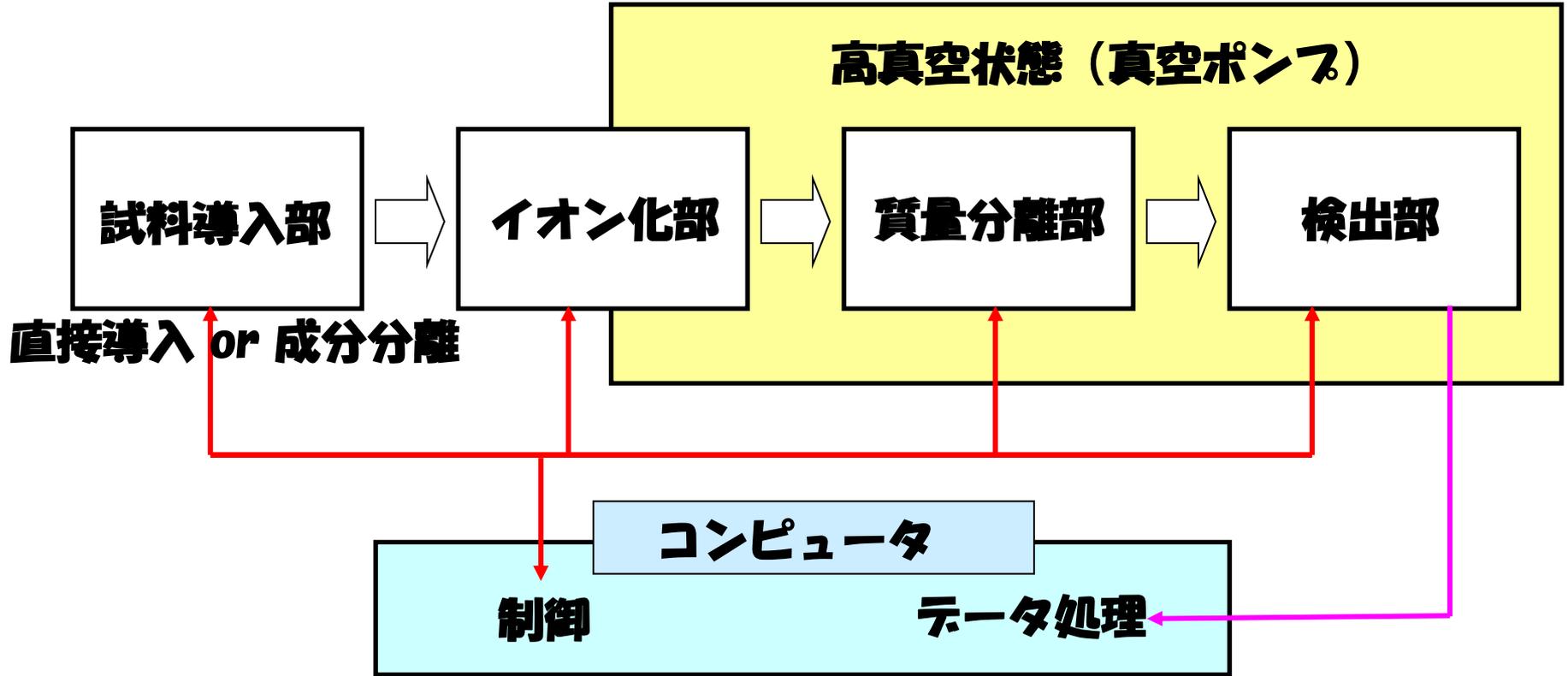
- ・不純物分析など

5. その他

合成高分子化学(添加剤)、材料分析、石油化学…

…など

質量分析計の概略



どんな化合物を分析するか

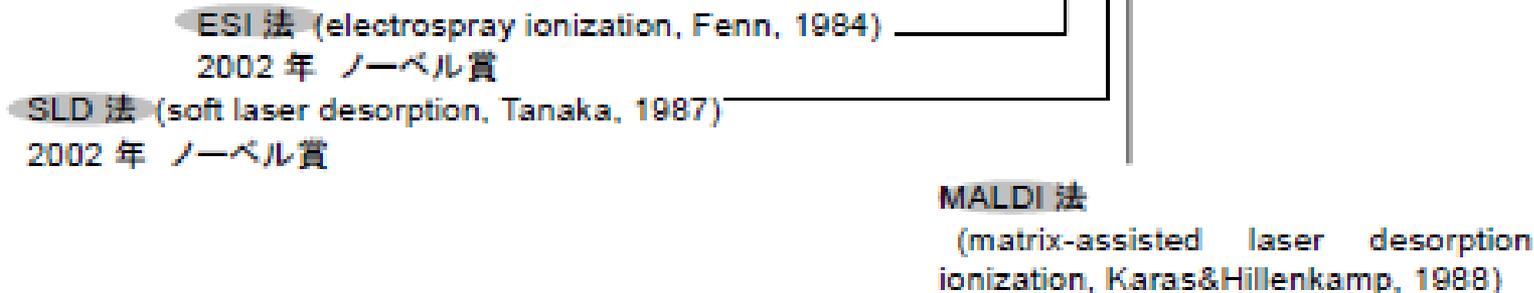
→ イオン源を選択
(ESI, APCI, APPI)

分析の目的は何か

→ 分析計の選択
(Q, QqQ, IT, (Q-)TOF, FT)

質量分析計におけるイオン化の発展

1920 1950 1960 1960 1970 1980 1990 2000



EI 法 (electron ionization, Dempster, 1921)

FI 法 (electric field ionization, Muller, 1953)

LD 法 (laser desorption, Honig, Woolston, 1963)

CI 法 (chemical ionization, Field & Munson, 1965)

FD 法 (field desorption ionization, Beckey, 1969)

DCI 法 (direct chemical ionization, McLafferty, 1973)

ACPI 法 (atmospheric pressure chemical ionization, Horing, 1973)

EHD 法 (electrohydrodynamic ionization, Evans, 1974)

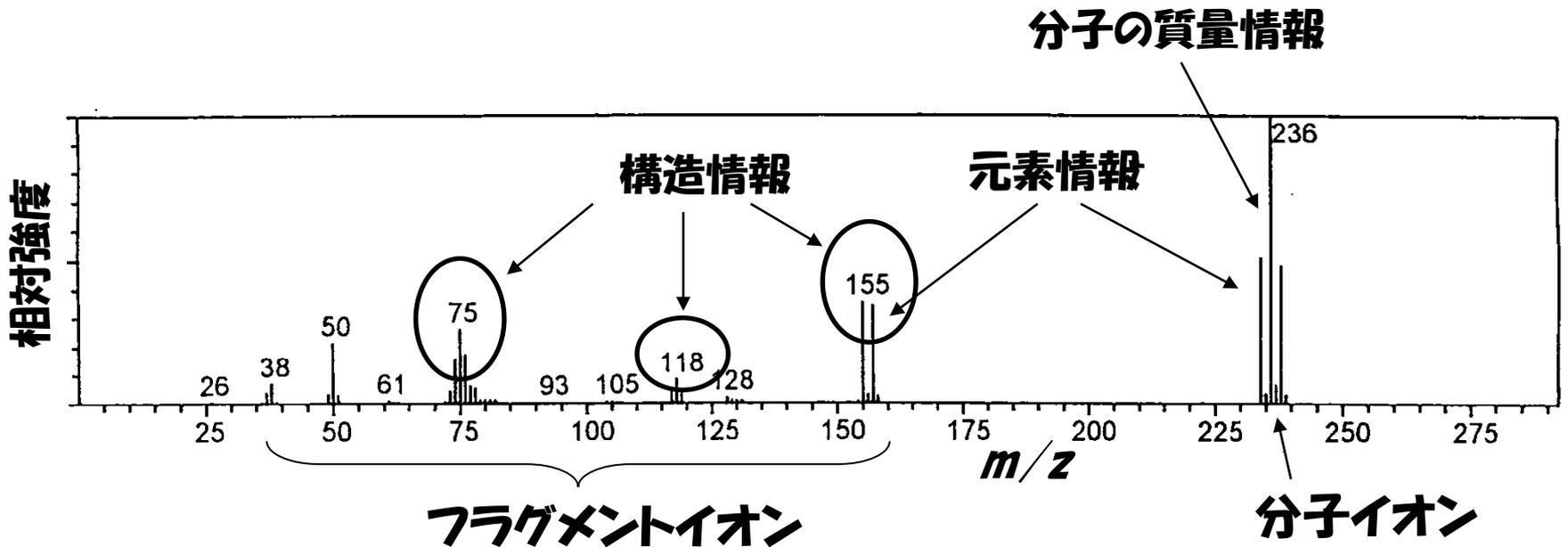
PD 法 (plasma desorption, Macfarlane, 1974)

TSI 法 (Thermospray ionization, 1980)

FAB 法 (fast atom bombardment, Barber, 1981)

マススペクトルから何がわかる？

- 分子イオンのピークから分子の質量（通常、相対分子質量情報ではない）
- フラグメントイオンのピークから分子の構造（部分構造情報）
- 同位体イオンピークの高さから構成元素の種類と数（元素情報）
精密質量からイオン組成式



MSで扱う質量

ノミナル質量(Nominal mass) ↔ 質量数

各元素について、天然存在比が最大の同位体(主同位体)の質量に最も近い整数値を用いて計算した質量 = 原子では質量数(陽子と中性子の和)と同じ値

(例) $^{12}\text{C}=12$, $^1\text{H}=1$, $^{16}\text{O}=16$, $^{14}\text{N}=14$, $^{35}\text{Cl}=35$ など



モノアイソトピック質量(Monoisotopic mass)

分子を構成する各元素の主同位体の質量を用いて計算した精密質量

精密質量(Exact mass)

炭素同位体 ^{12}C の質量を基準値として 12.000000u(or Da) とし、単一同位体で構成された分子やイオンの質量を、ミリダルトン以下まで計算した質量。

(例) $^1\text{H}=1.007825$, $^{16}\text{O}=15.994917$, $^{14}\text{N}=14.003074$, $^{35}\text{Cl}=34.968853$ など

統一原子質量単位

質量の単位 ⇒ SI単位では kg

統一原子質量単位 ⇒ ^{12}C の質量の $1/12$
単位は Da または u

SI単位では
 1.66×10^{-27} kg



原子・分子の質量 と 相対原子質量・相対分子質量

質量分析で測定される質量は個々の原子あるいは分子などの質量であり、原子の天然同位体存在比を考慮した**相対原子質量**や**相対分子質量**とは異なる。

原子質量： 統一原子質量単位で表した、同位体毎の質量

(例) $^{12}\text{C} = 12.000\dots$, $^1\text{H} = 1.0078$, $^{16}\text{O} = 15.9949$, $^{14}\text{N} = 14.0031$ など

相対原子質量： 原子量ともいう。

炭素原子 ^{12}C の質量の $1/12$ に対する、ある元素の一原子あたりの平均質量の比で表される無次元量。ある元素の相対原子質量は、その元素の同位体の質量に、各同位体の存在比を重率として掛けて求めた平均値。

(例) $\text{C} = 12.011$, $\text{H} = 1.008$, $\text{O} = 15.999$, $\text{N} = 14.007$ など

分子質量： 分子を構成する原子の質量の和

相対分子質量： 分子量ともいう。

炭素原子 ^{12}C の質量の $1/12$ に対する、ある化合物の一分子あたりの平均質量の比で表される無次元量。ある分子の相対分子質量は、その分子を構成する総ての元素の相対原子質量 (原子量) の和に等しい。

$$m/z$$

イオンの質量を統一原子質量単位で割り、
さらにイオンの電荷数で割って得られる無次元量

(日本質量分析学会 マススペクトロメトリー関係用語集より)

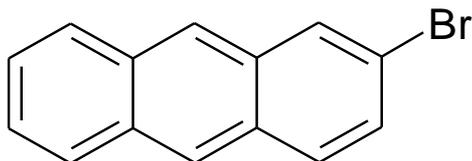
m = イオンの質量を統一原子質量単位で割った値 \neq イオンの質量

一価イオンの場合、統一原子質量単位で表した
質量の値と m/z の値は一致する

(m/z の定義とその使用法について、JMSSJ, 54(5), 217 (2006).)

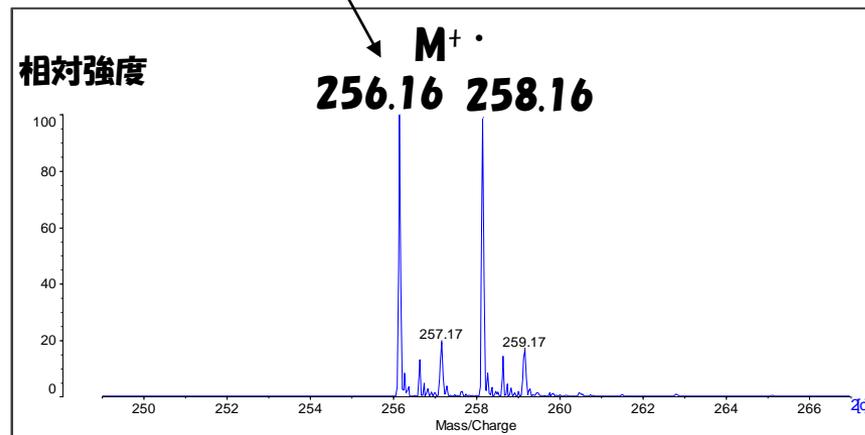
マスペクトルから得られる分子質量情報

2-ブromoアントラセン



$C_{14}H_9Br$
ノナル質量 **256**
モノアイソトピック質量 **255.9888**
相対分子質量 (分子量) **257.1298**

モノアイソトピックピーク

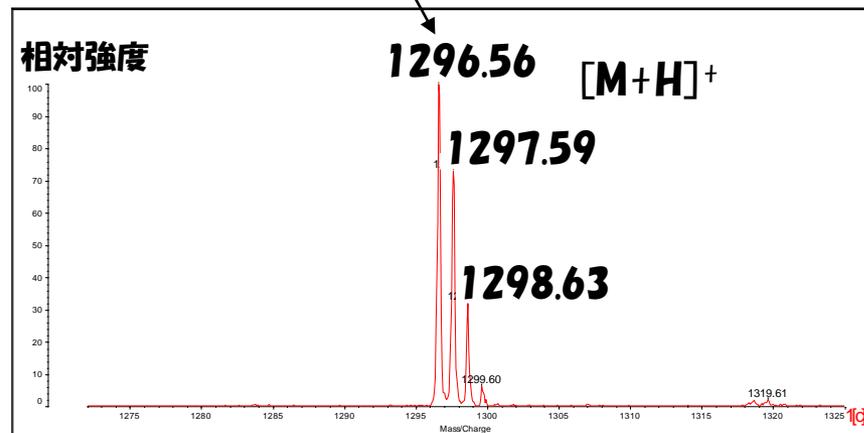


アンジオテンシン-I

$NH_2 - Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His -$
 $Pro - Phe - His - Leu - COOH$

$C_{62}H_{89}N_{17}O_{14}$
ノナル質量 **1295**
モノアイソトピック質量 **1295.6775**
相対分子質量 (分子量) **1296.4987**

モノアイソトピックピーク



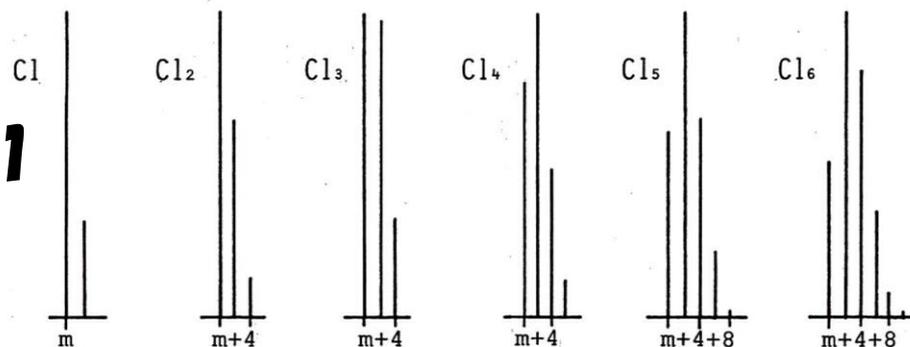
同位体の天然存在比

原子番号	元素記号	質量数	質量	天然存在比(%)	原子量
1	H	<u>1</u>	1.007825	<u>99.9885</u>	1.00794
		2	2.014102	0.0115	
6	C	<u>12</u>	12	<u>98.93</u>	12.0107
		13	13.00336	1.07	
7	N	<u>14</u>	14.00307	<u>99.632</u>	14.0067
		15	15.00011	0.368	
8	O	<u>16</u>	15.99492	<u>99.757</u>	15.9994
		17	16.99913	0.038	
		18	17.99916	0.205	
16	S	<u>32</u>	31.97207	<u>94.93</u>	32.065
		33	32.97146	0.76	
		34	33.96787	4.29	
		36	35.96708	0.02	
17	Cl	<u>35</u>	34.98665	<u>75.78</u>	35.453
		37	36.9659	24.22	
35	Br	<u>79</u>	78.91834	<u>50.69</u>	79.904
		81	80.91629	49.31	

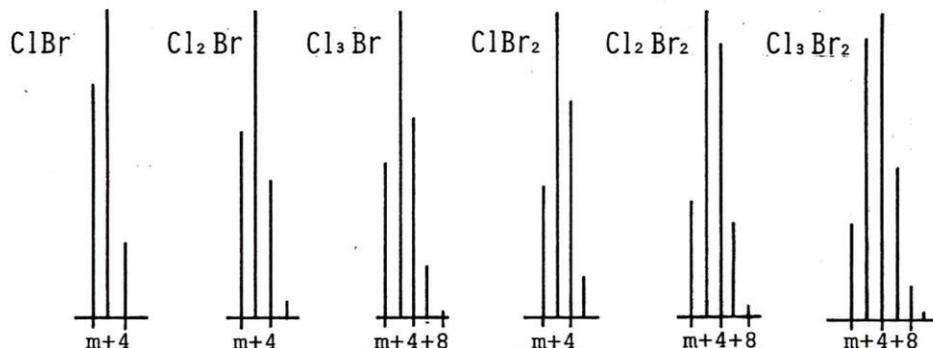
塩素Clと臭素Brの同位体パターン

塩素Clのみ

$$^{35}\text{Cl} / ^{37}\text{Cl} = 3 / 1$$

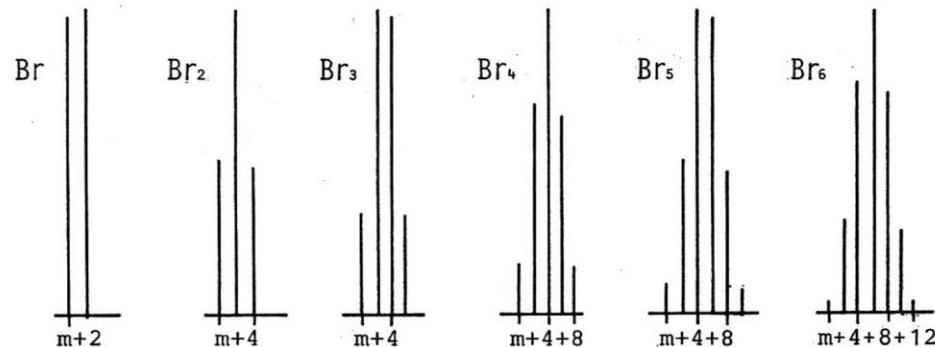


塩素Clと臭素Br
の組み合わせ



臭素Brのみ

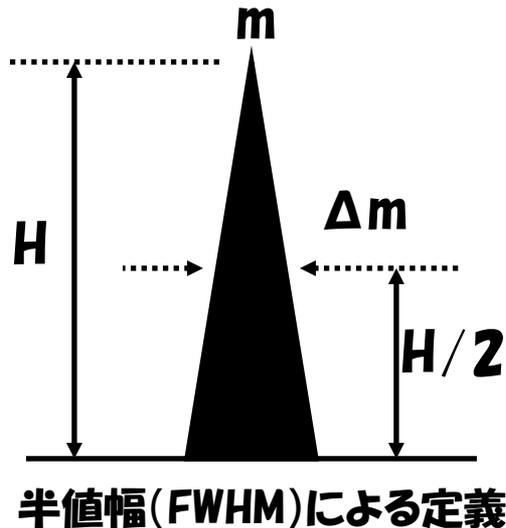
$$^{79}\text{Br} / ^{81}\text{Br} = 1 / 1$$



質量分解能

互いに異なる質量のイオンのピークを分離するための質量分析計の性能のこと。

質量分解能によって、イオンの m/z 値をどれ位正確に測れるかが決まる。
質量分解能が高いほど、近接する m/z 値のイオンを分離することができる。



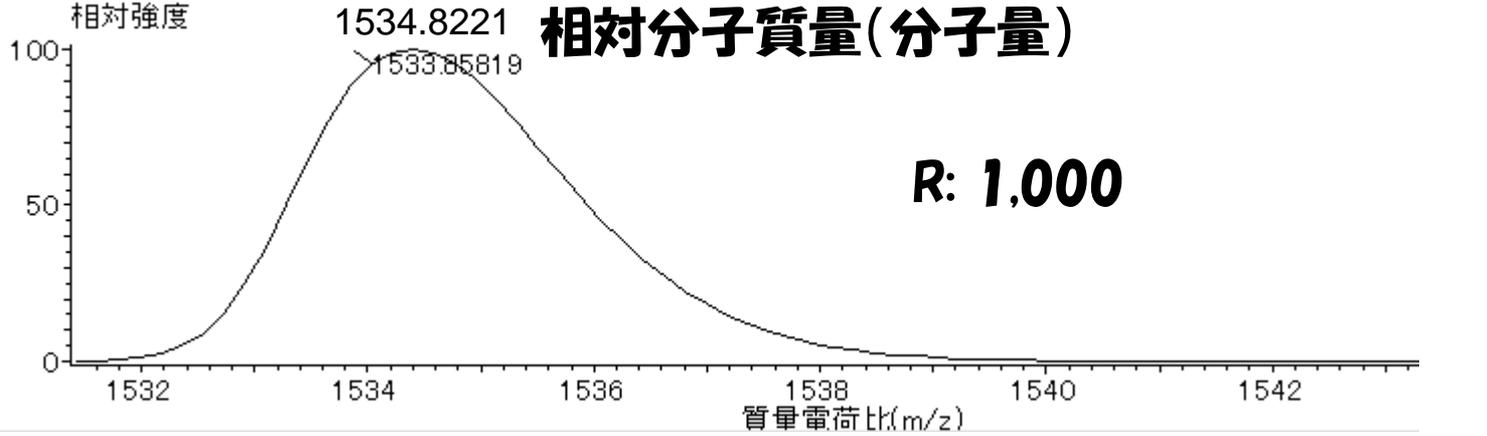
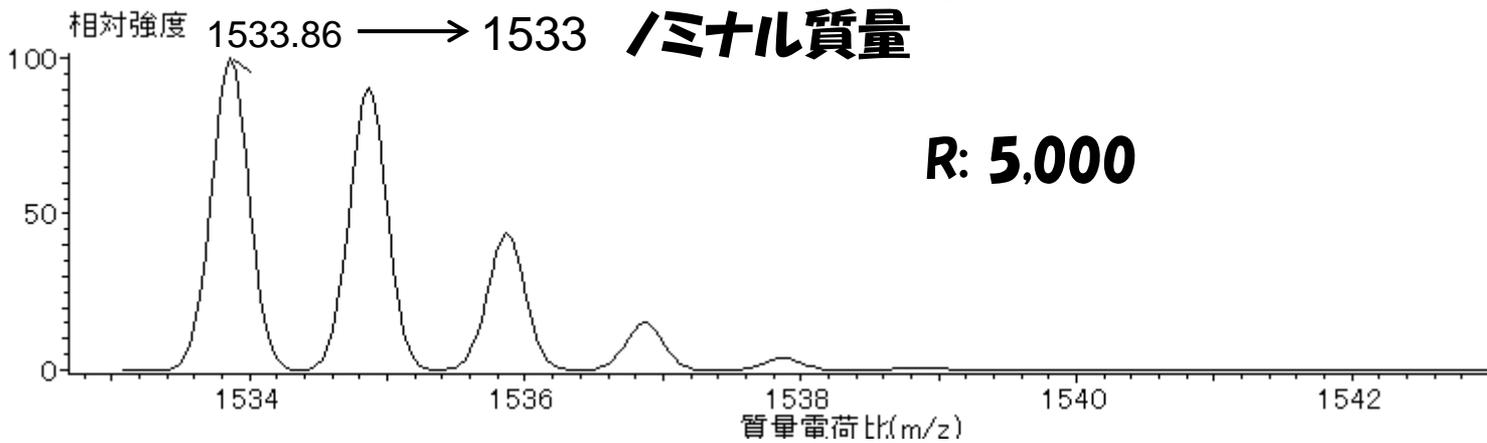
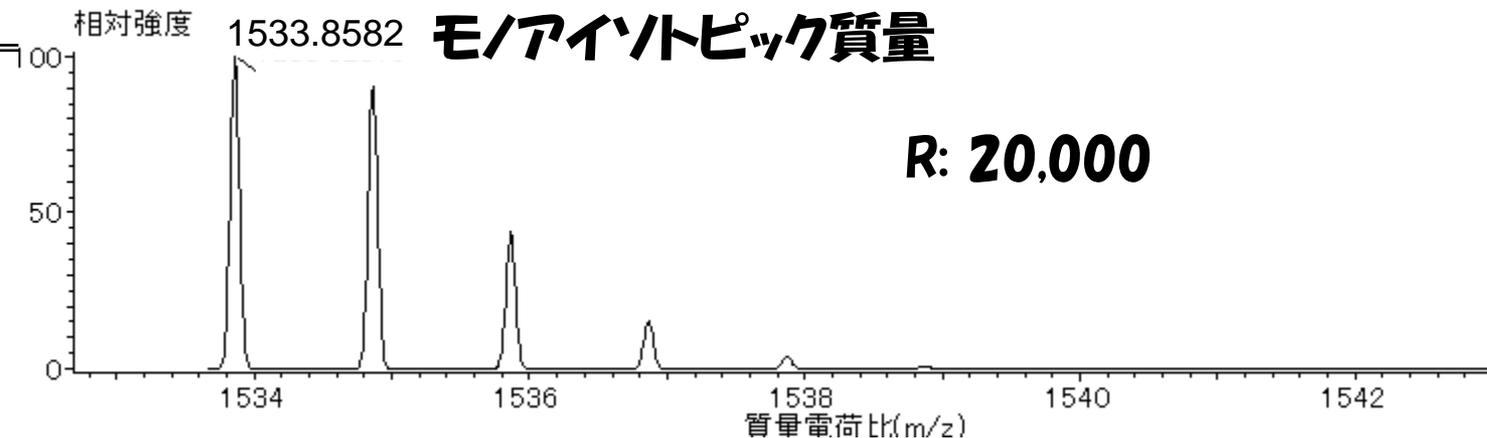
m/z 1,000と1,001を
半値幅で分離できる



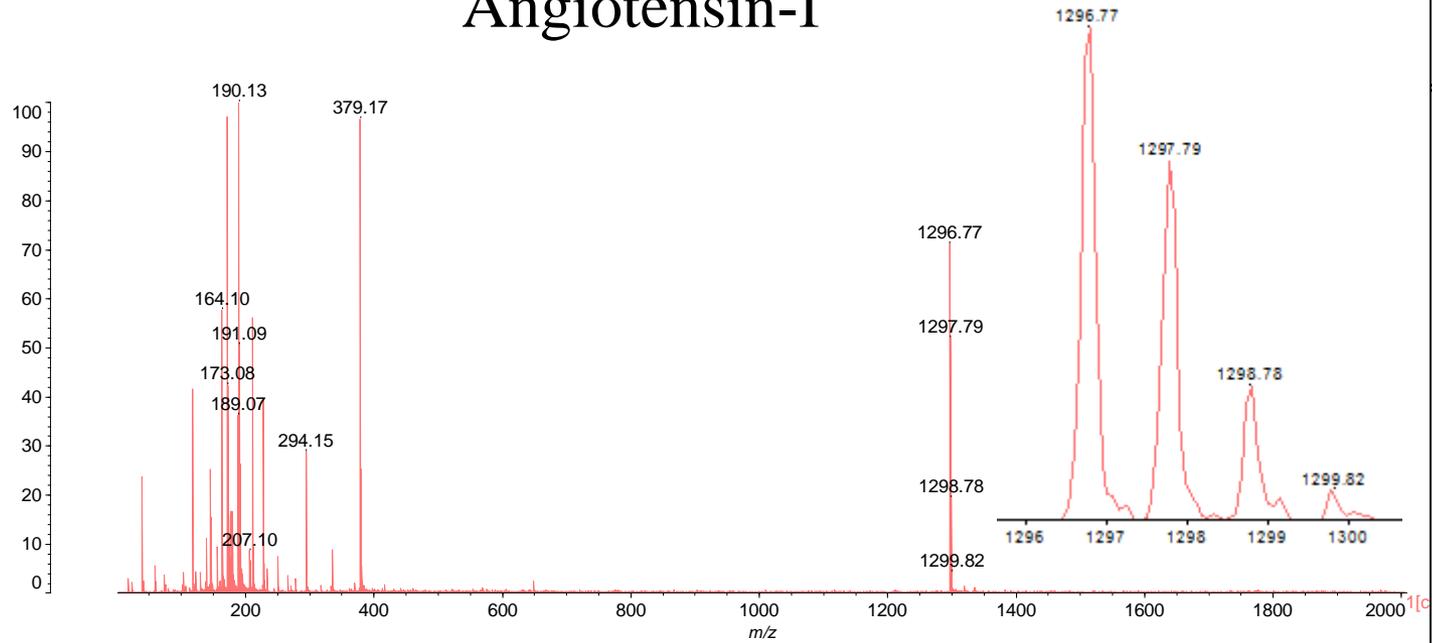
分解能 1,000

$$\text{質量分解能}(R) = m / \Delta m$$

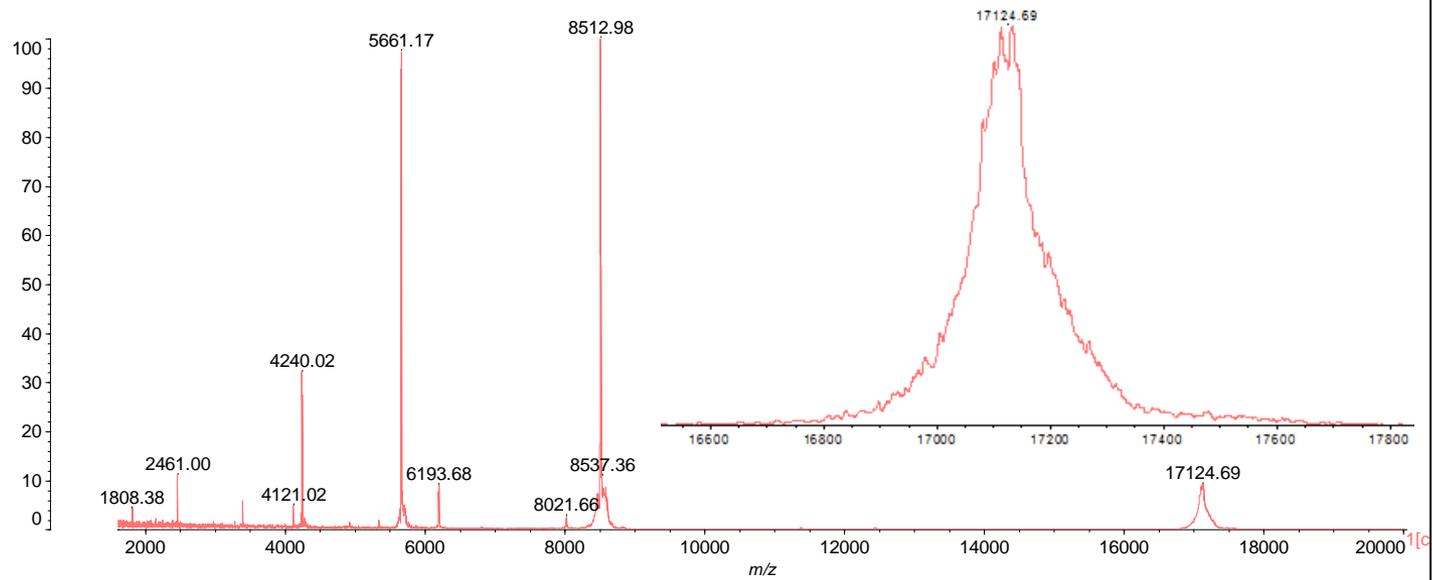
質量分解能、同位体分離、分子の質量、相対分子質量



Angiotensin-I



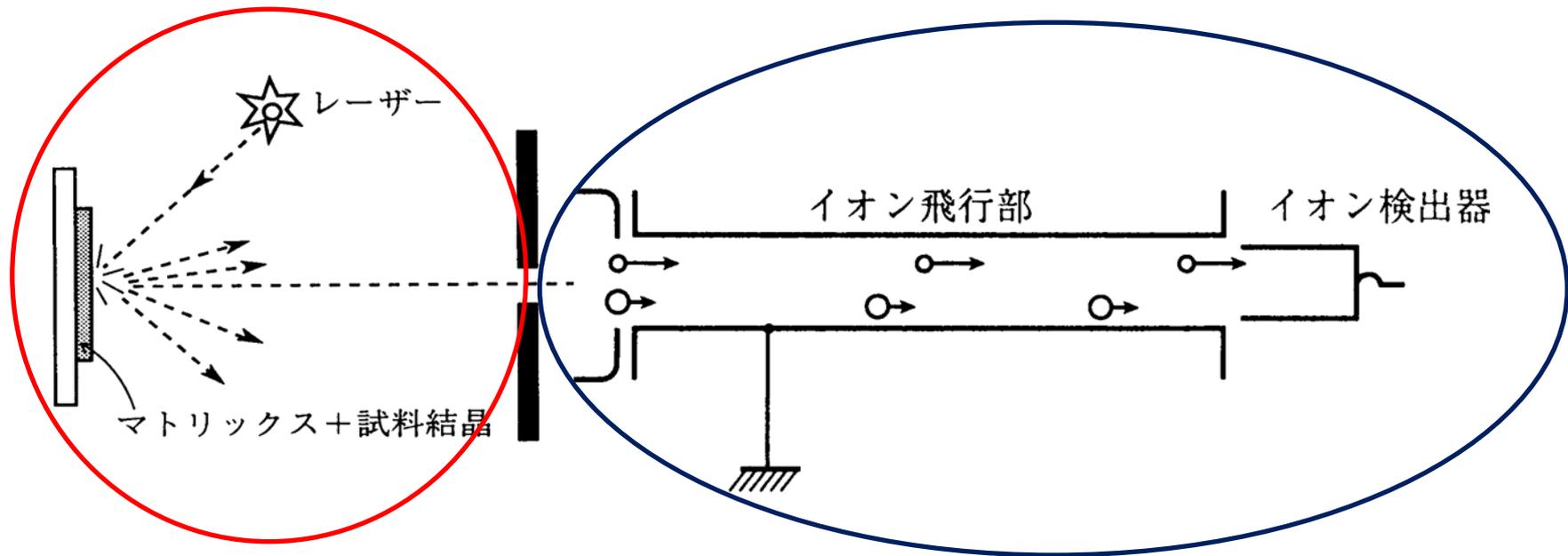
Myoglobin



MALDI-TOFMS

イオン化部: MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

試料とマトリックス(イオン化促進剤)を混合してレーザー光線を照射
→ 試料分子を、イオンとして固相から真空中に放出させる



質量分析部: TOFMS (Time-Of-Flight MS)

軽いイオンは速く、重いイオンは遅く飛行する
→ 飛行時間からイオンの m/z を逆算できる

イオン化と質量分析計の組み合わせ

イオン化

質量分析計

連続イオン化

ESI (Electrospray Ionization),
EI (Electron Ionization) など

パルスイオン化

**MALDI (Matrix Assisted
Laser Desorption Ionization) など**

電圧スキャン

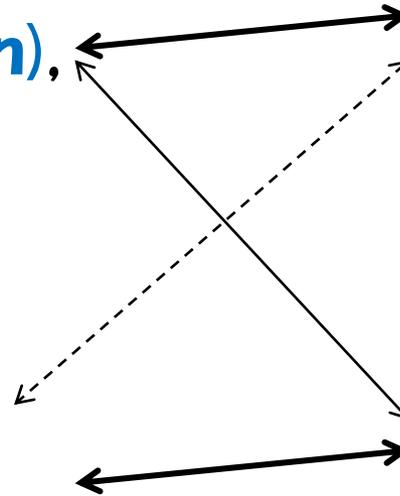
四重極型

磁場型

イオントラップ型

一斉検出

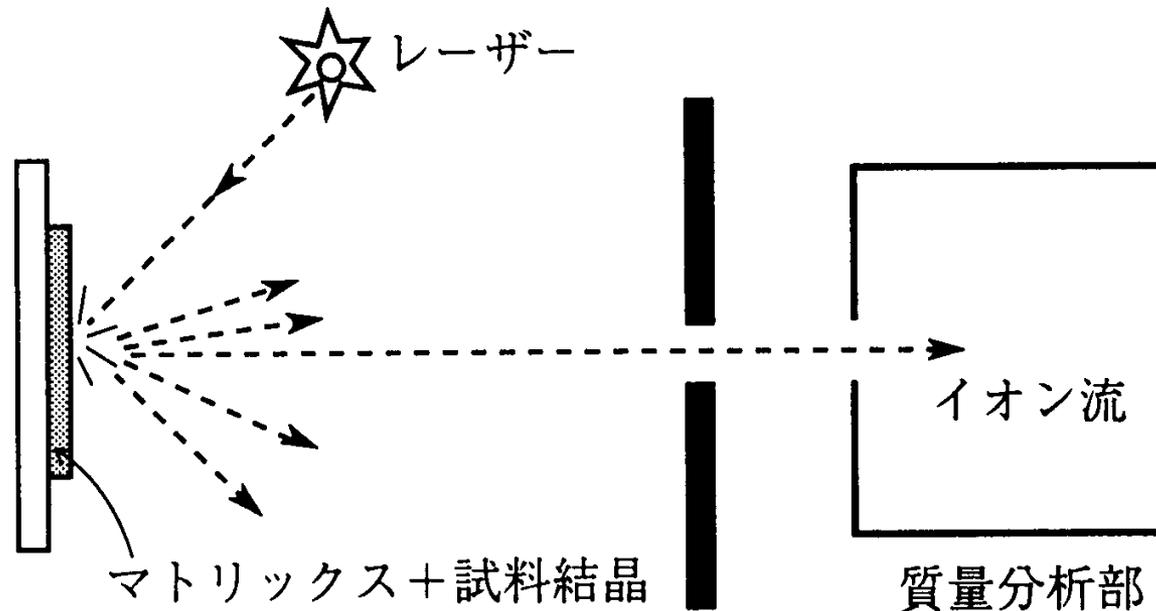
飛行時間型



マトリックス支援レーザー脱離イオン化

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI

- 広範な質量の物質をイオン化できる(分子量1~1,000,000)
- 試料調製が簡便
- × HPLCとのオンライン結合には不利 →ESI(Electrospray Ionization)のほうが適切



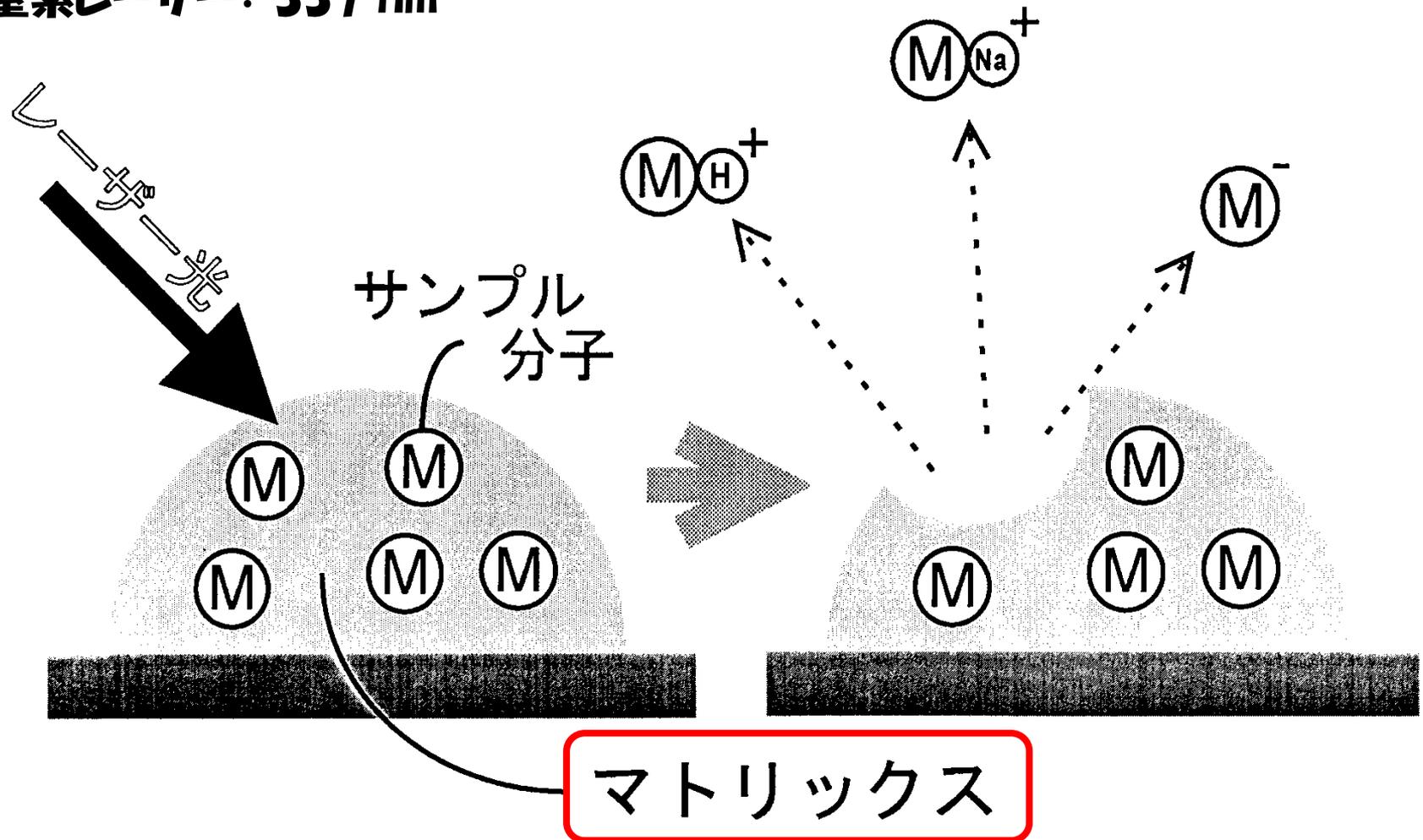
図は「バイオリジカルマススペクトロメトリー」(東京化学同人)より抜粋

イオン化: MALDI

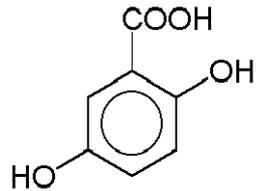
Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization

マトリックス支援レーザー脱離イオン化

窒素レーザー: 337 nm

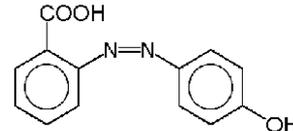


マトリックスの選択



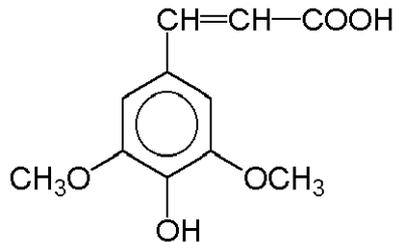
DHB
2,5-dihydroxybenzoic acid

合成高分子 ・ 低分子有機化合物 ・ 糖類



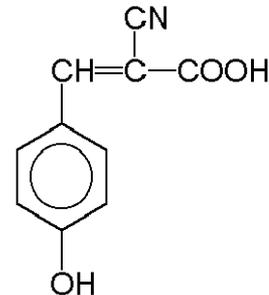
HABA
2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid

合成高分子 ・ 低分子有機化合物



SA
sinapinic acid

タンパク ・ ペプチド



CHCA
 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

ペプチド混合物

マトリックスの役割

➤ **目的成分のイオン化を補助する**

レーザー光のエネルギーは最初にマトリックスに吸収され、その後マトリックスから目的成分に受け渡される

➤ **目的成分の光分解を抑制する**

レーザー光はマトリックス層により吸収され、目的分子には直接当たらない

マトリックスなしで測定可能な物質もある

☆ 照射光の波長に対して吸収をもつ

☆ 強固な分子構造を持つ

MALDI/MSで得られるイオン種

➤ マトリックス使用時

- ✓ 励起マトリックス分子 \leftrightarrow 試料分子のプロトン移動によりイオンが生成

正イオン検出： $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、負イオン検出： $[M-H]^-$
(呼び方：プロトン付加分子、ナトリウム付加イオン、脱プロトン分子)

➤ マトリックス未使用時

- ✓ 試料分子自体が励起されて電子脱離によるイオン化、あるいは励起試料分子同士のプロトン移動

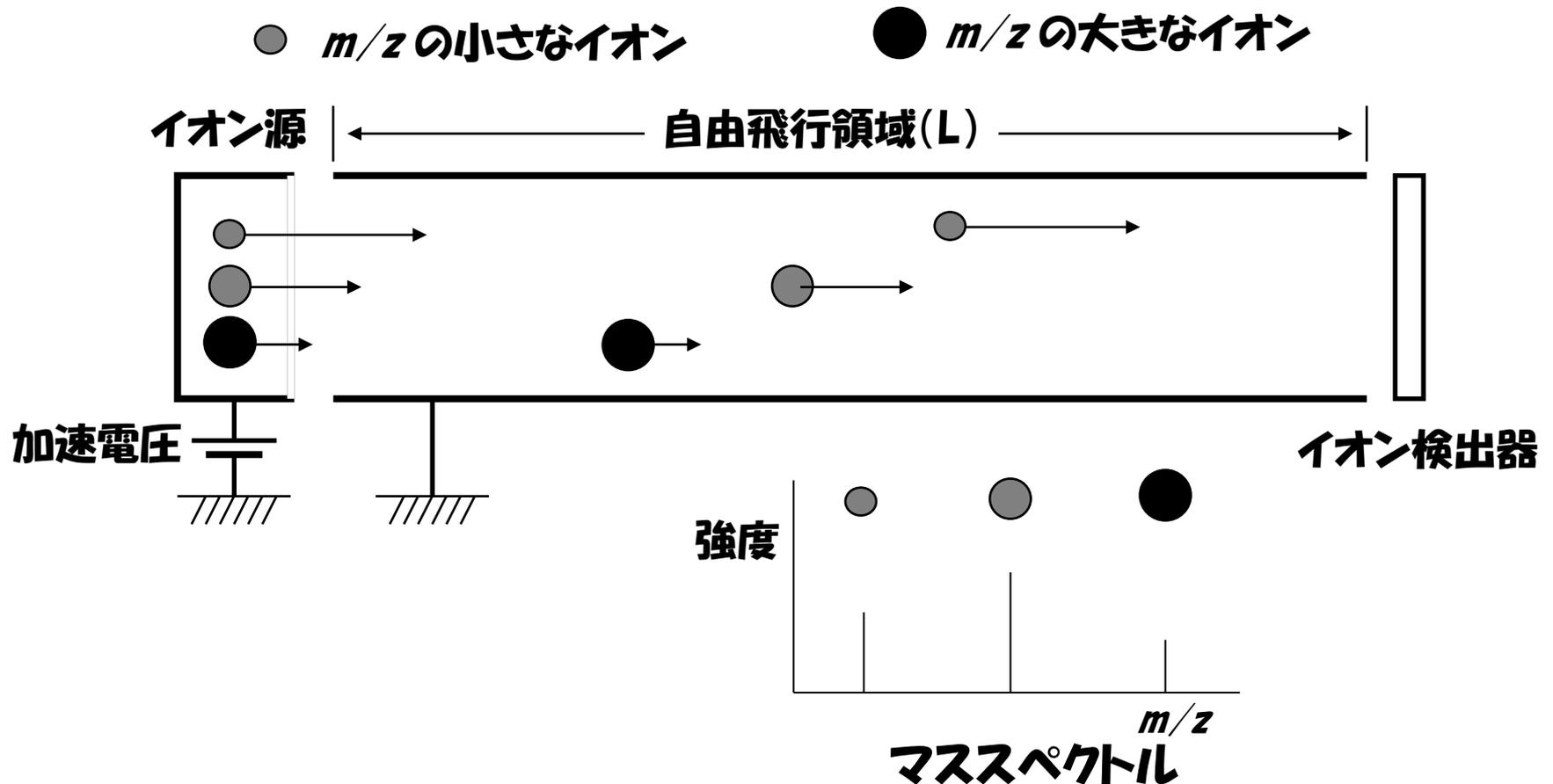
正イオン検出： M^+ 、 $[M+H]^+$ 、負イオン検出： $[M-H]^-$

➤ その他

- ✓ フラグメントイオン、クラスターイオンなど

飛行時間質量分析計

Time-of-Flight Mass Spectrometer, TOFMS



m/z

質量校正

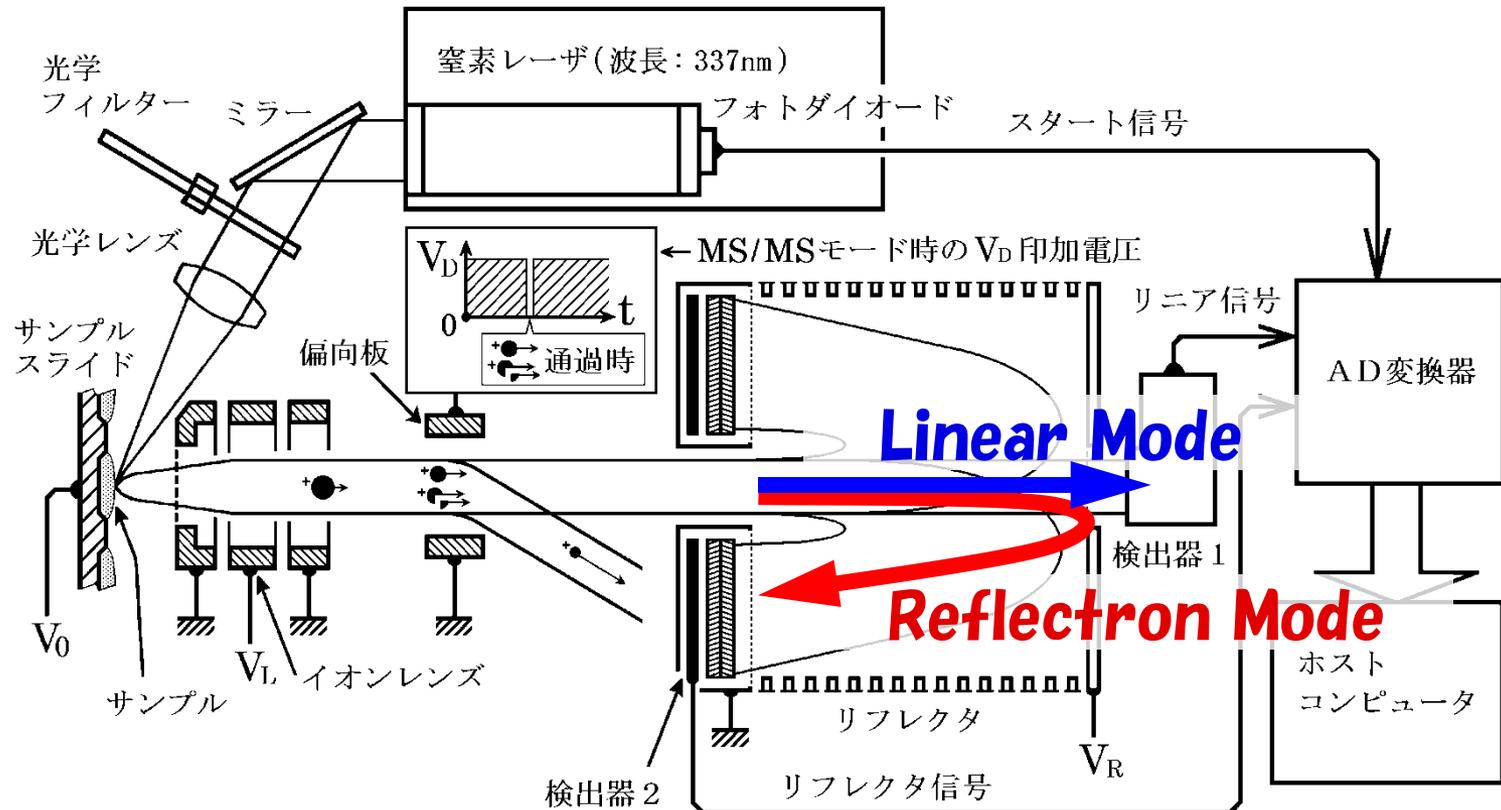


飛行時間

電圧

周波数

市販MALDI-TOFMSの構成

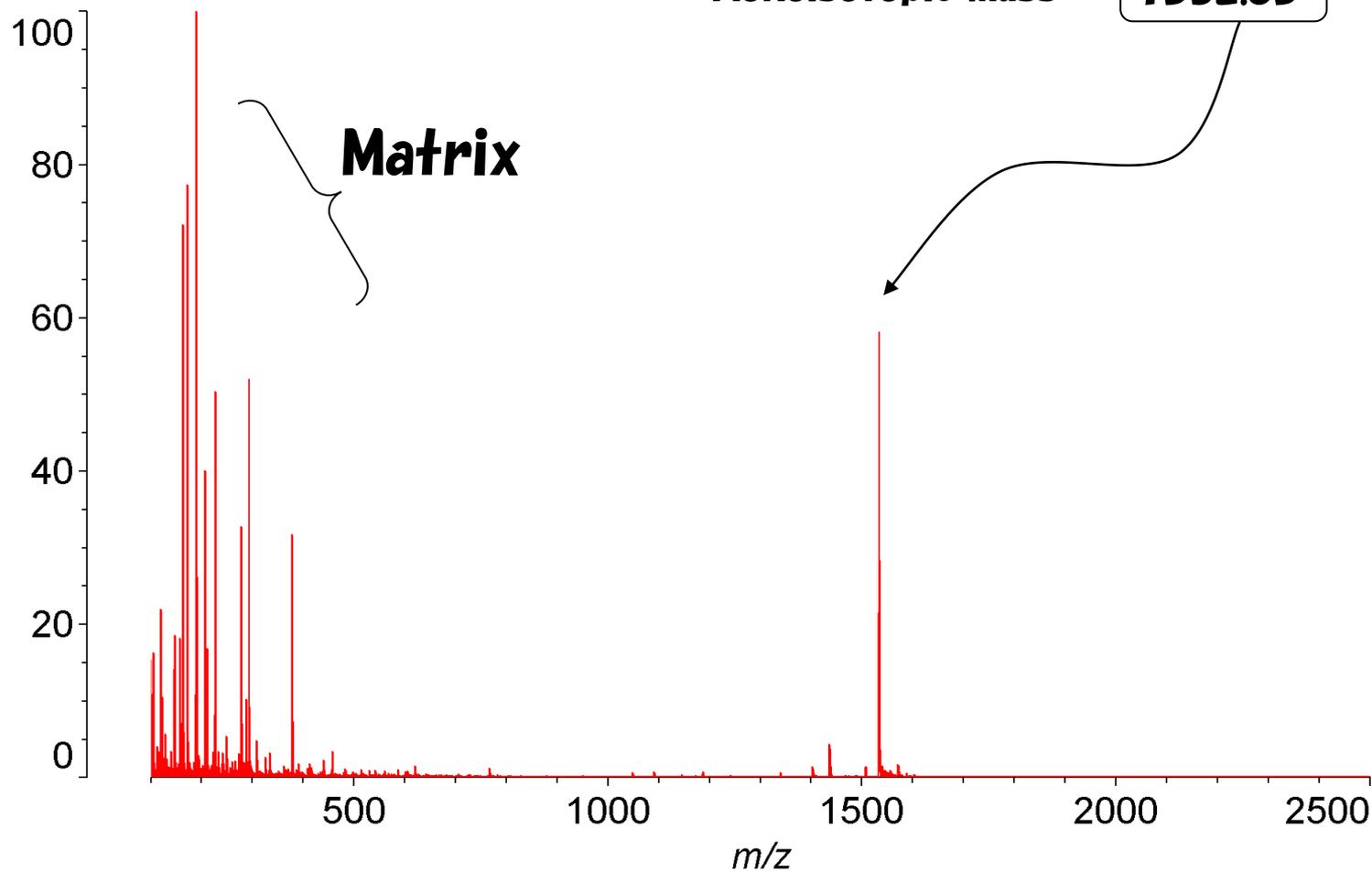


MALDI-TOFMS測定結果の例

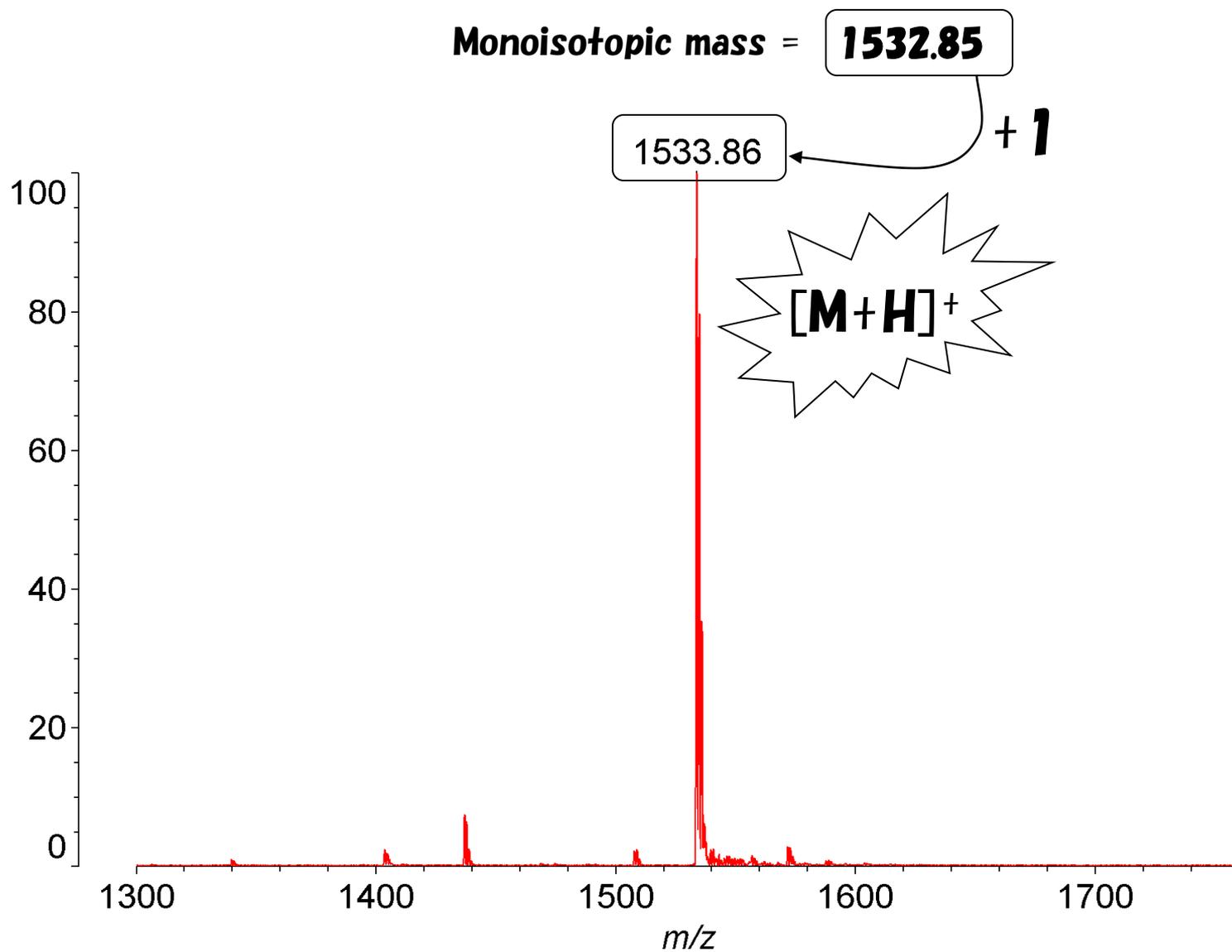
Sample: Peptide P14R

Elemental Composition = $C_{76}H_{112}N_{18}O_{16}$

Monoisotopic mass = **1532.85**

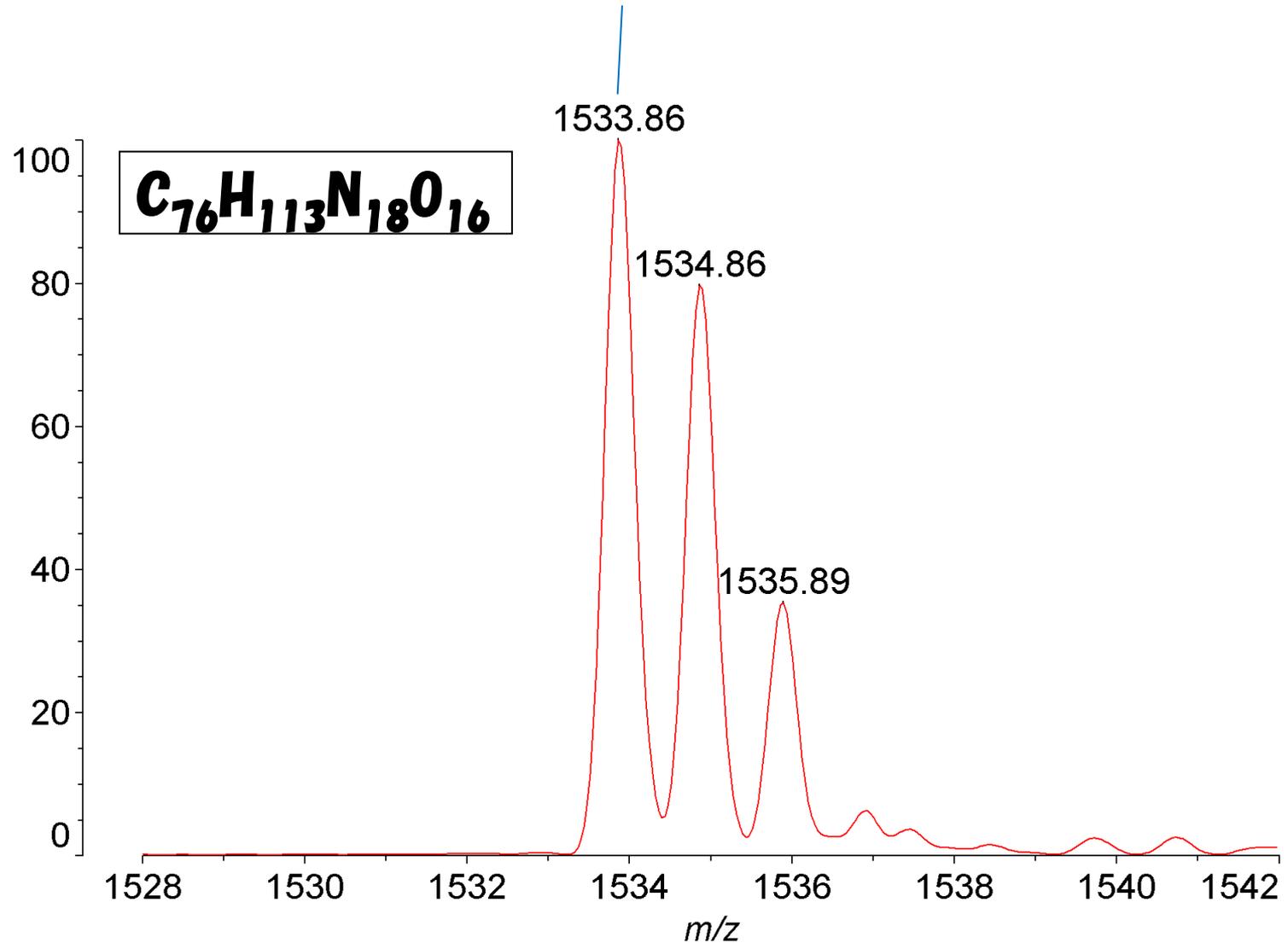


測定結果の解釈 (1)ピークの m/z 値 \neq 分子質量

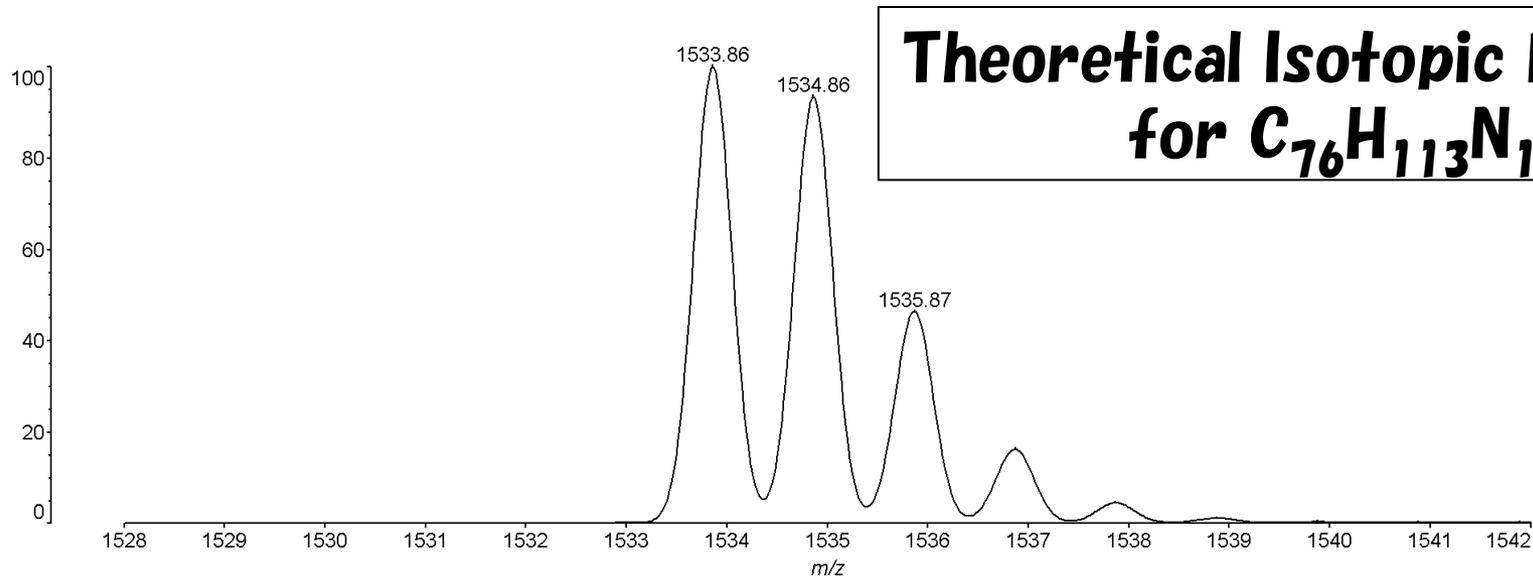


測定結果の解釈 (2) 同位体の存在

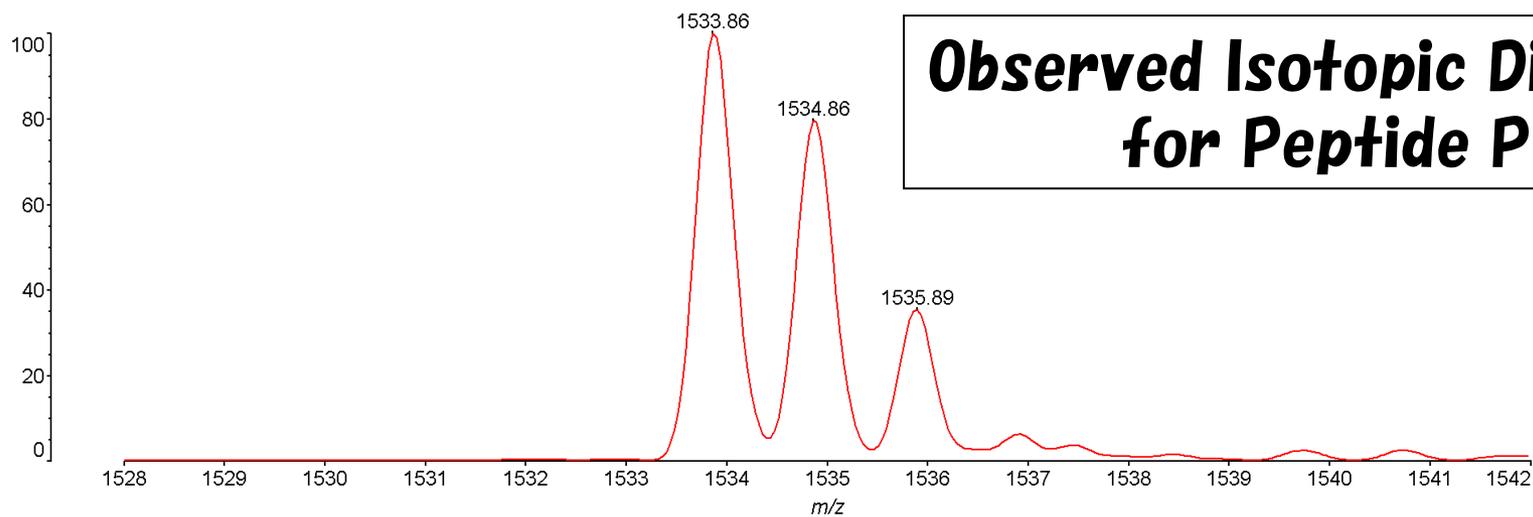
モノアイソトピックピーク



測定結果の解釈 (3) 同位体分布パターン



**Theoretical Isotopic Distribution
for $C_{76}H_{113}N_{18}O_{16}$**



**Observed Isotopic Distribution
for Peptide P14R**

MALDI-TOFMS測定の手順

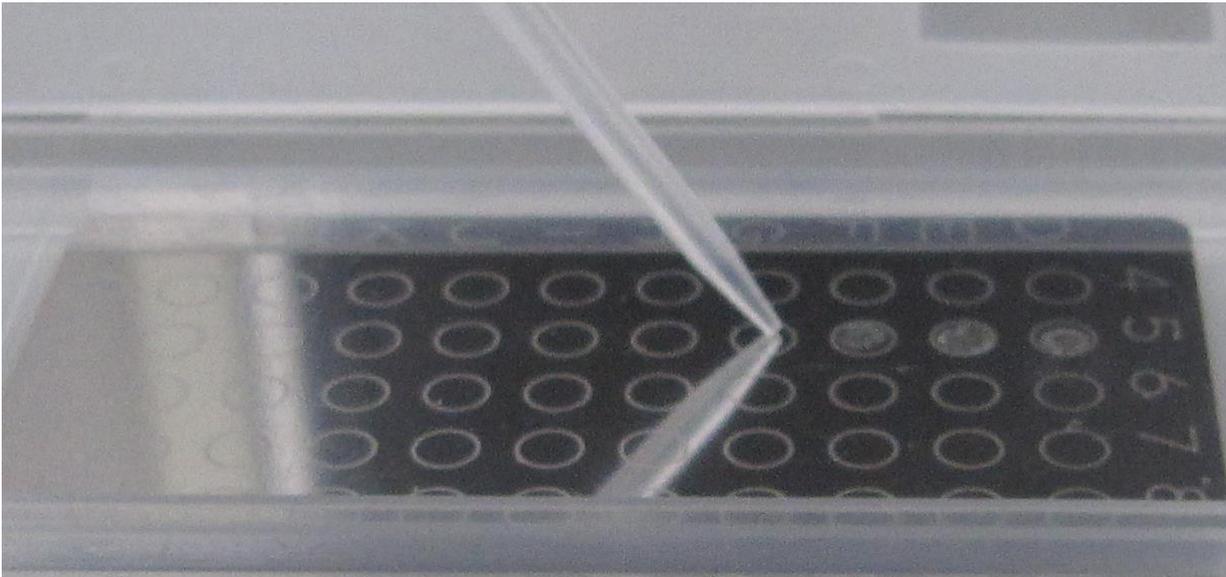
【試料調製】

1. 試料溶液を準備する

- 溶媒は揮発性であること
e.g. water, acetonitrile, methanol, chloroform, etc
- 濃度は 100 fmol/μL ~ 1 nmol/μL
最適濃度は物質によって大幅に変動する

2. 検体をプレートに搭載する

- 試料溶液とマトリックス溶液とをエッペンチューブ内で混合して、サンプルプレートに滴下
- 搭載量: 1 μL (マイクロピペッタを使用)



MALDI-TOFMS測定の手順(続き)

【測定】

3. フレートを装置にセットし、真空排気開始

- 圧力表示が 1×10^{-3} Pa以下になれば測定可能

4. 測定条件の設定

- Positive or Negative
- Linear or Reflectron
- 'Stand-by' → 'Operate' (加速用電源・検出器用電源・レーザー発振管などがONになる)
- 積算回数, ラスタリング方法 (通常は $0.5\text{mm} \times 0.5\text{mm}$ の範囲内で100回)
- 照射開始位置をカメラウィンドウで確認
- レーザー強度の初期値を設定 (50くらいからスタートして徐々に上げる。最大180)

【最適測定条件の探索】

5. レーザー強度を随時調節

- 注目ポイント① イオン強度
 - ✓ 積算後のイオン強度が $10\text{mV} \sim 200\text{mV}$ の範囲内であれば上出来
(1shotごとのイオン強度は、できるだけデジタルサイザの上限 $2,000\text{mV}$ を超えないよう)
- 注目ポイント② ピーク形状
 - ✓ レーザー照射位置によってはピーク形状が歪むことがある → 別の位置で再度試みる
- 注目ポイント③ cationization / fragmentation / oligomerization
 - ✓ 予想分子量ではないピークが検出されることがある → 想定内なら解析に差し支えない

exp.1 [DHB]

Molecular Information:

[IUPAC name] 2,5-Dihydroxybenzoic acid

[Abbreviation] DHB, DHBA, Gentisic acid

[Molecular Formula] _____

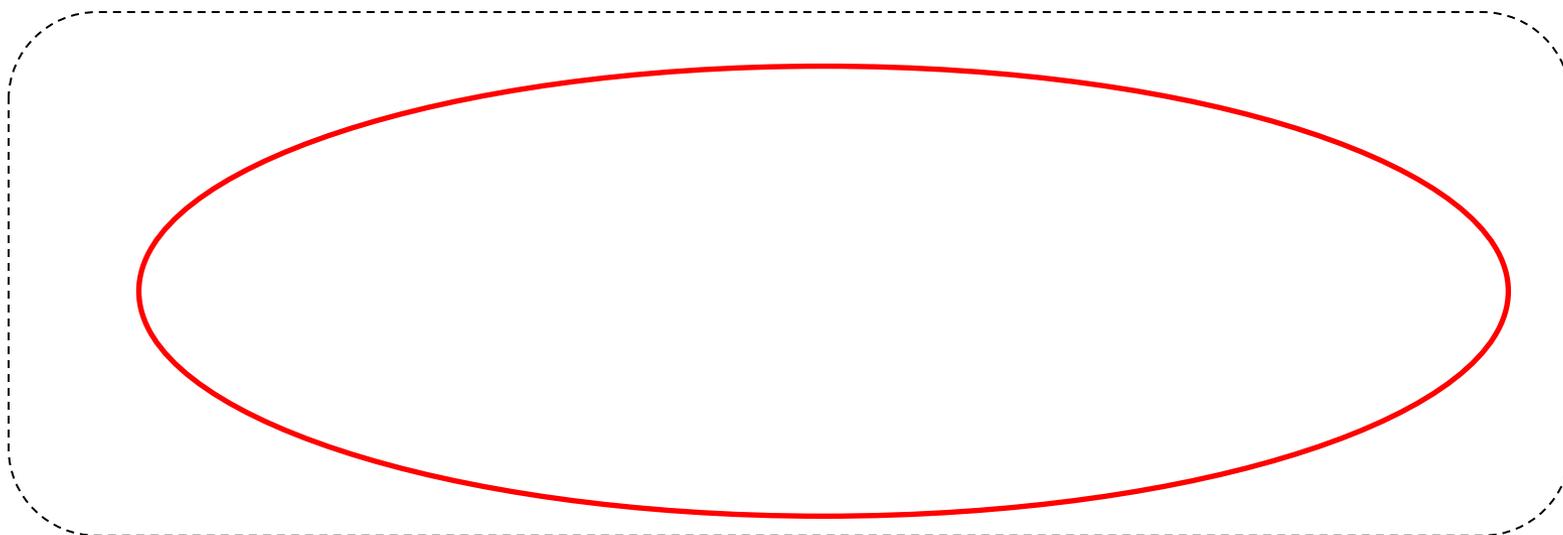
[Formula Weight] as molecule: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as $[M+H]^+$: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as $[M+Na]^+$: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

小数点以下4桁まで

[Molecular Structure]



[CHCA]

Molecular Information:

[IUPAC name] α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid

[Abbreviation] CHCA, HCCA

[Molecular Formula] _____

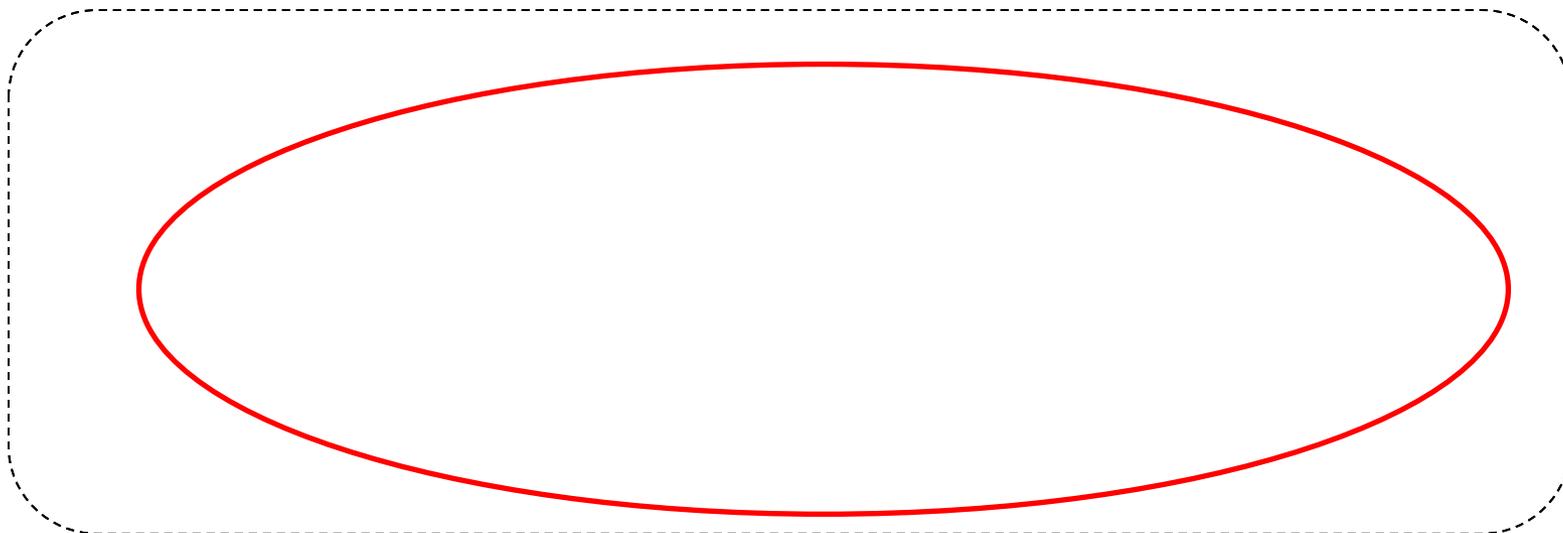
[Formula Weight] as molecule: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as $[M+H]^+$: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as $[M+Na]^+$: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

小数点以下4桁まで

[Molecular Structure]



exp.2 [Copper Metal Surface]

Molecular Information:

[IUPAC name] Copper

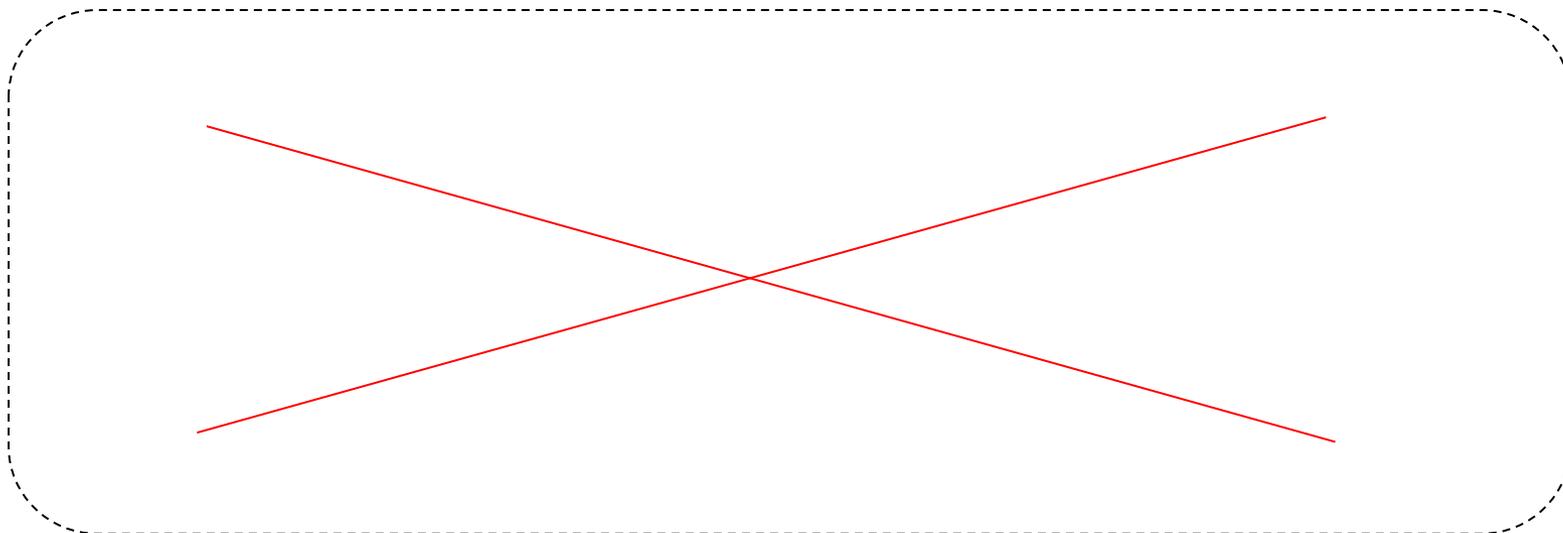
[Abbreviation] Cu

[Molecular Formula]

[Formula Weight] as molecule: (average) / (monoisotopic)

小数点以下4桁まで

[Molecular Structure]



exp.3 [Anthracene]

Molecular Information:

[IUPAC name] Anthracene

[Abbreviation] -

[Molecular Formula] _____

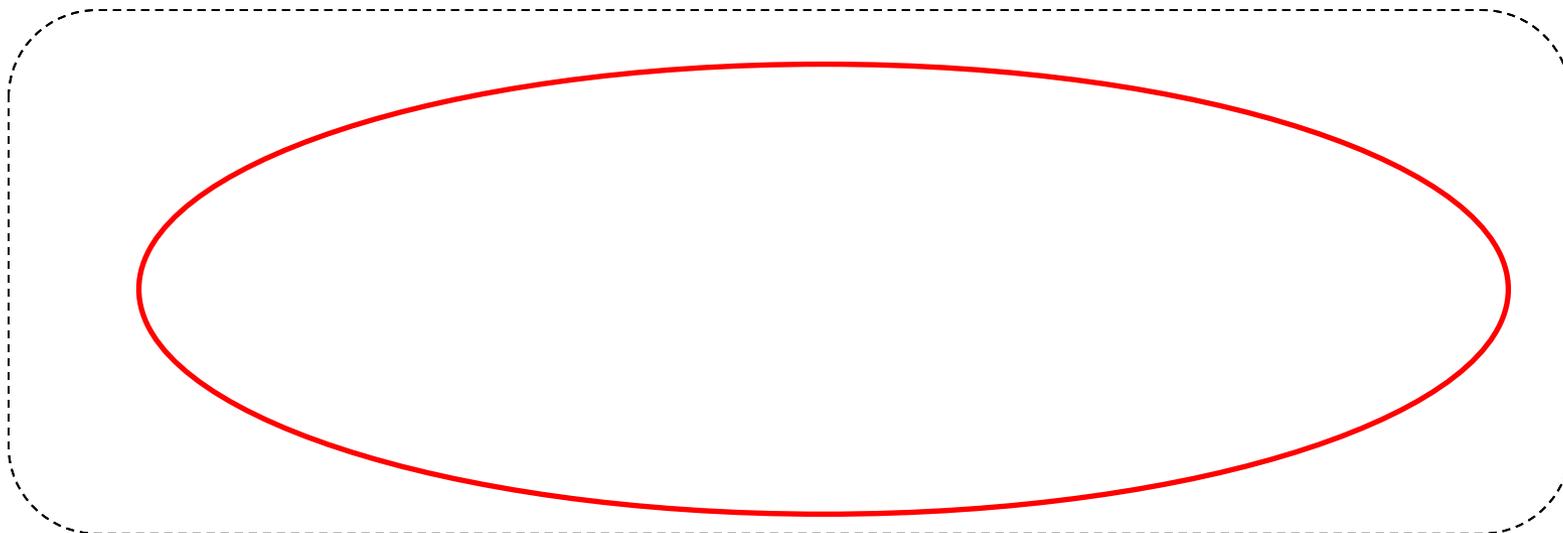
[Formula Weight] as molecule: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as $[M+H]^+$: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as $[M+Na]^+$: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

小数点以下4桁まで

[Molecular Structure]



exp.4 [Br-Anthracene]

Molecular Information:

[IUPAC name] 2-Bromoanthracene

[Abbreviation] -

[Molecular Formula] _____

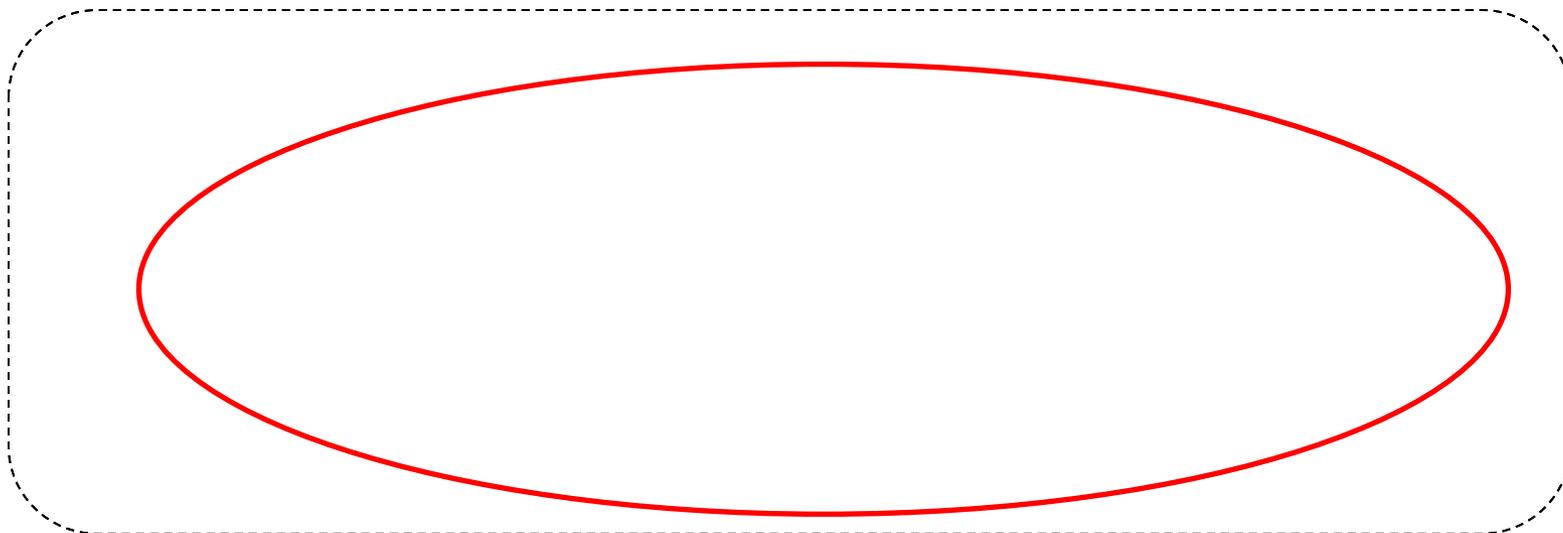
[Formula Weight] as molecule: _____(average) / _____(monoisotopic)

as [M+H]⁺: _____(average) / _____(monoisotopic)

as [M+Na]⁺: _____(average) / _____(monoisotopic)

小数点以下4桁まで

[Molecular Structure]



exp.7 [赤マジック成分]

Molecular Information:

[IUPAC name] Rhodamine 6G

[Abbreviation] -

[Molecular Formula] _____

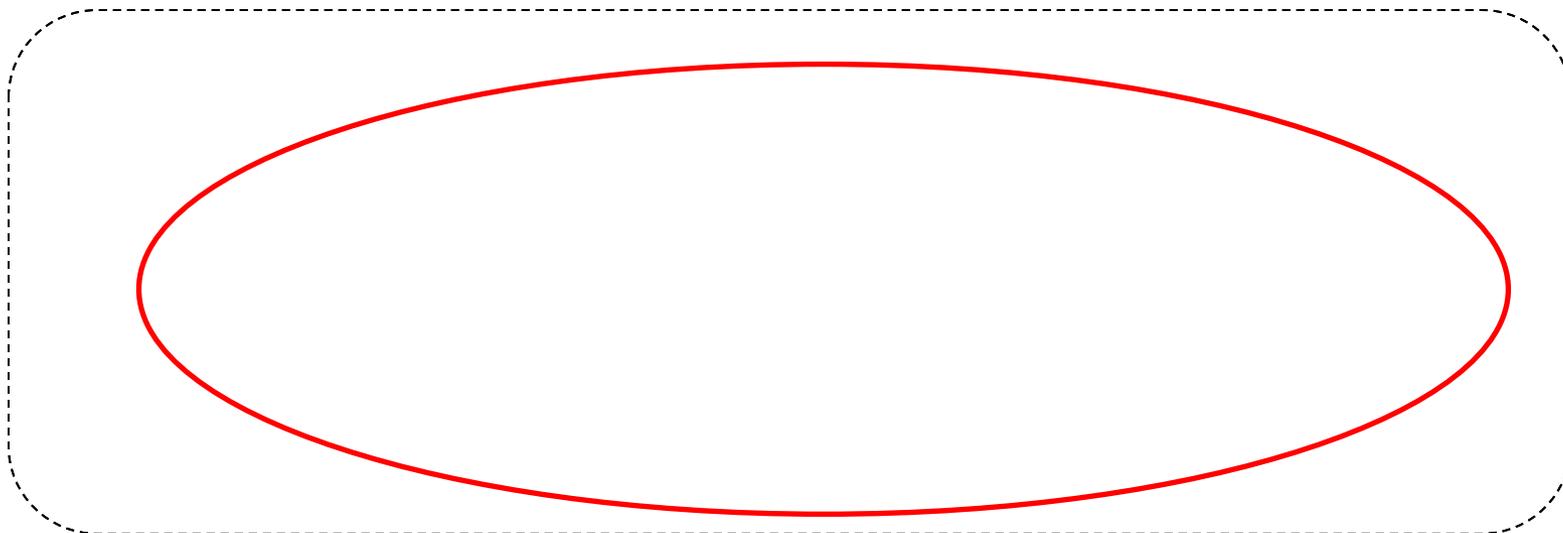
[Formula Weight] as molecule: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as [M+H]⁺: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

as [M+Na]⁺: _____ (average) / _____ (monoisotopic)

小数点以下4桁まで

[Molecular Structure]



E-mail: g200952d@yokohama-cu.ac.jp
tyutaka@ms-solutions.jp

エムエス・ソリューションズ(株)Web

<http://www.ms-solutions.jp/>

(株)プレッパーズ Web

<https://sites.google.com/site/preppers001/home>

Facebook:

<http://facebook.com/Yutaka.Ironman.Takahashi>

Twitter: yutaka_ironman