

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)

- 2011年度 前期(月曜3限～5限)
- 担当:高山・野々瀬・高橋

エレクトロスプレーイオン化法の原理

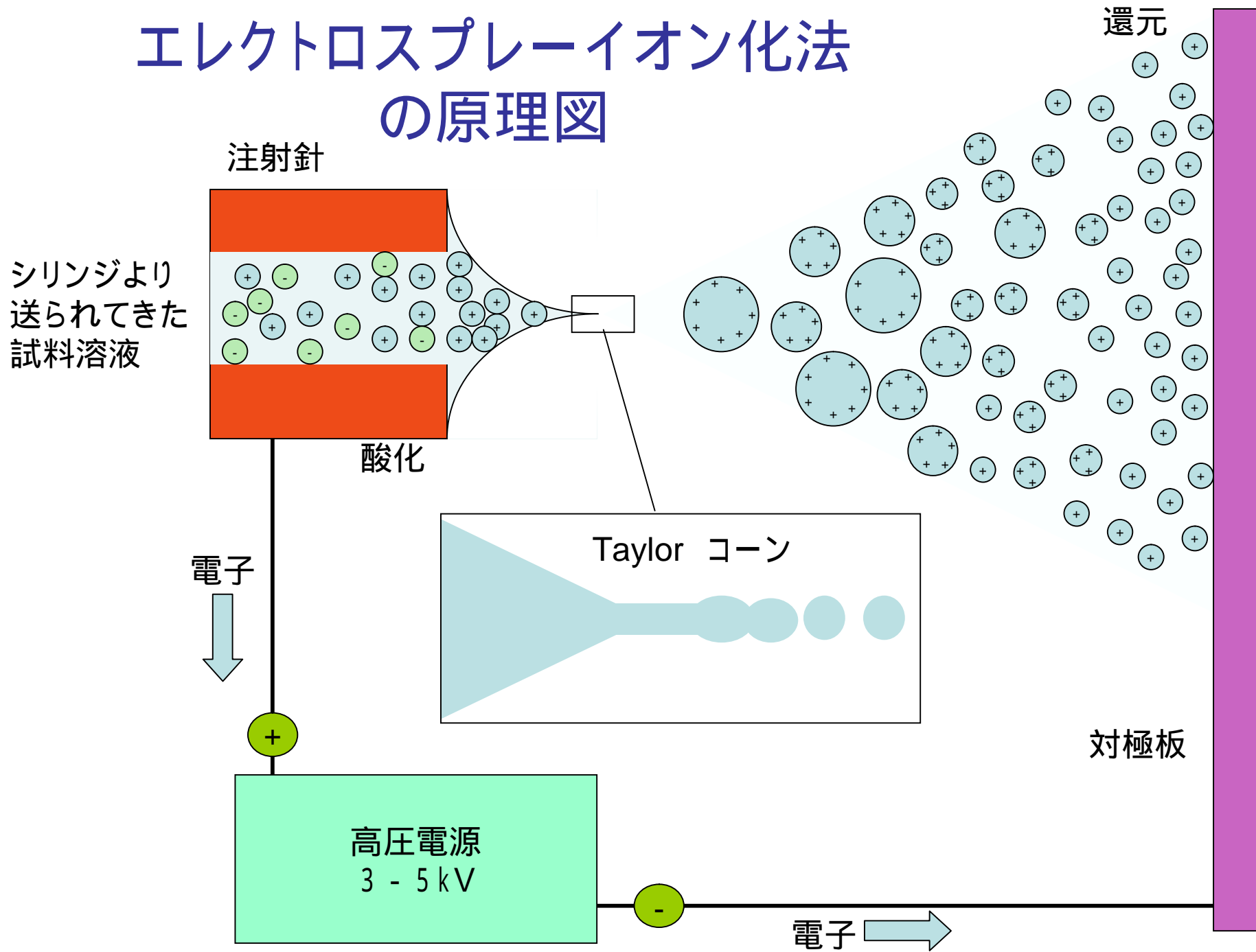
エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) とは、生体分子・有機分子を非破壊的に、溶液中から真空中へ導入するソフトなイオン化法である。大きな分子量を持ち、不揮発性で電荷を帯びる分子の質量分析にはきわめて有用である。

- シリンジポンプによって、流量 $5 \sim 20 \mu\text{l}/\text{min}$ 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 $3 \sim 5\text{kV}$ 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ン化法の原理図

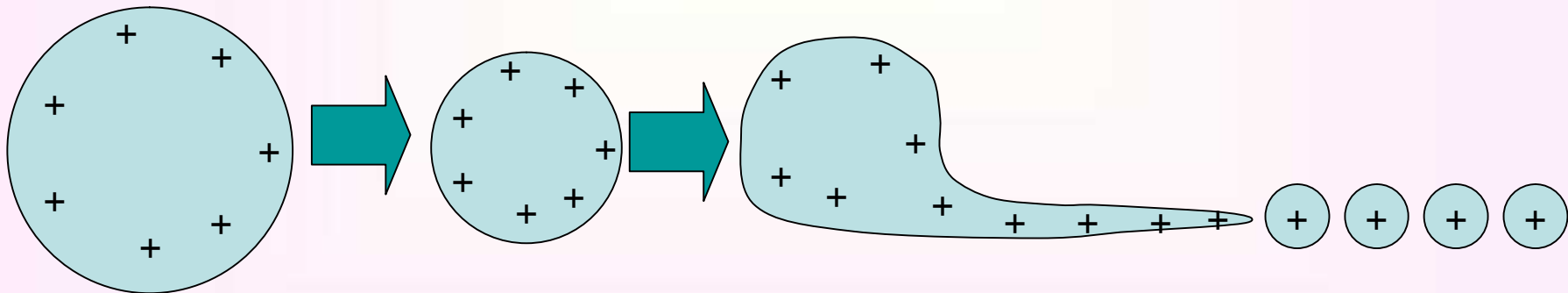


荷電液滴から孤立分子イオンの生成

•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。

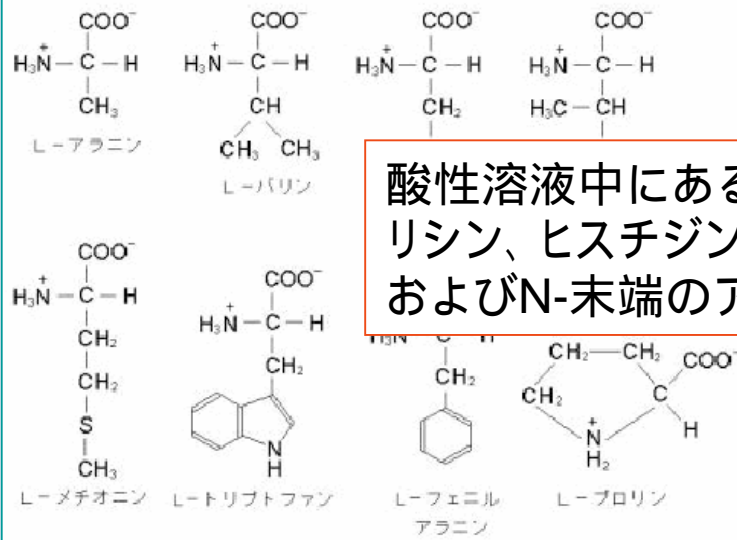
•静電反発力が表面張力よりも大きくなると、
荷電液滴はより小さなサイズの液滴にクーロン分裂。



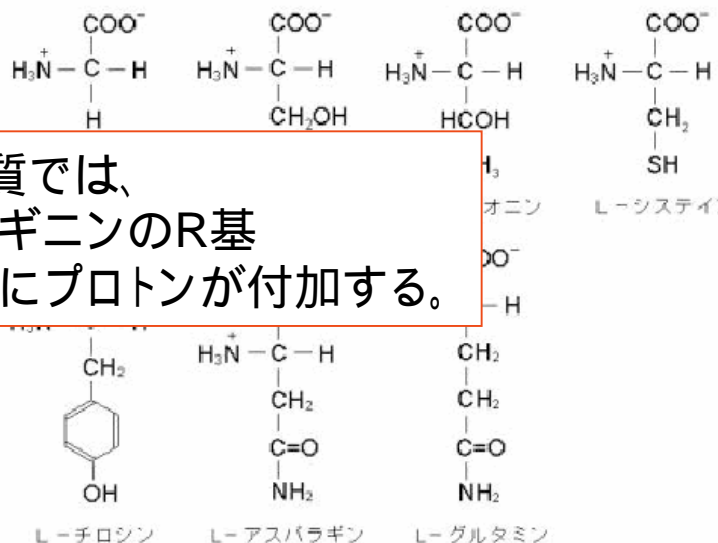
•このような分裂過程が繰り返される。
最後には孤立した分子イオンが生成される。

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

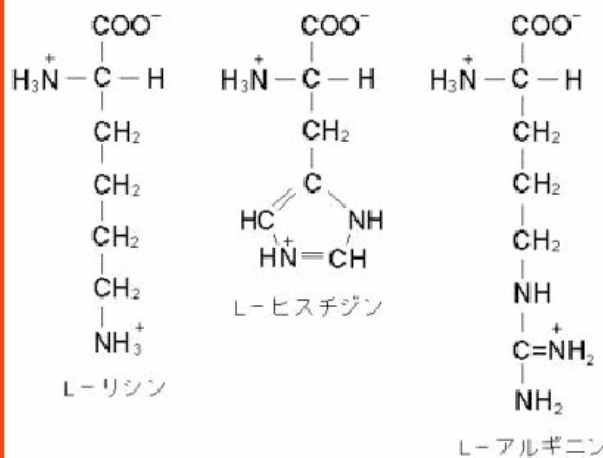


(2) 極性だが電荷のないアミノ酸

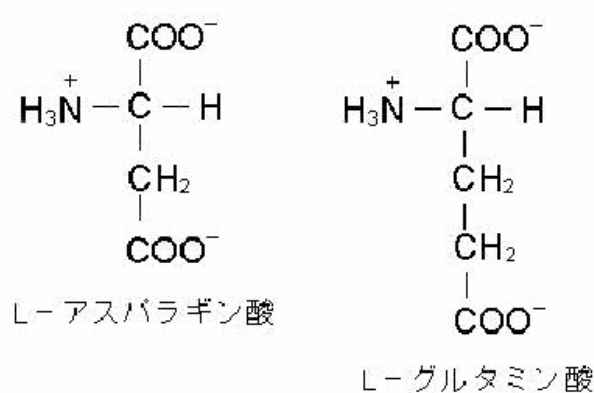


酸性溶液中にある蛋白質では、
リシン、ヒスチジン、アルギニンのR基
およびN-末端のアミノ基にプロトンが付加する。

(3) 正電荷を有するR基をもつアミノ酸

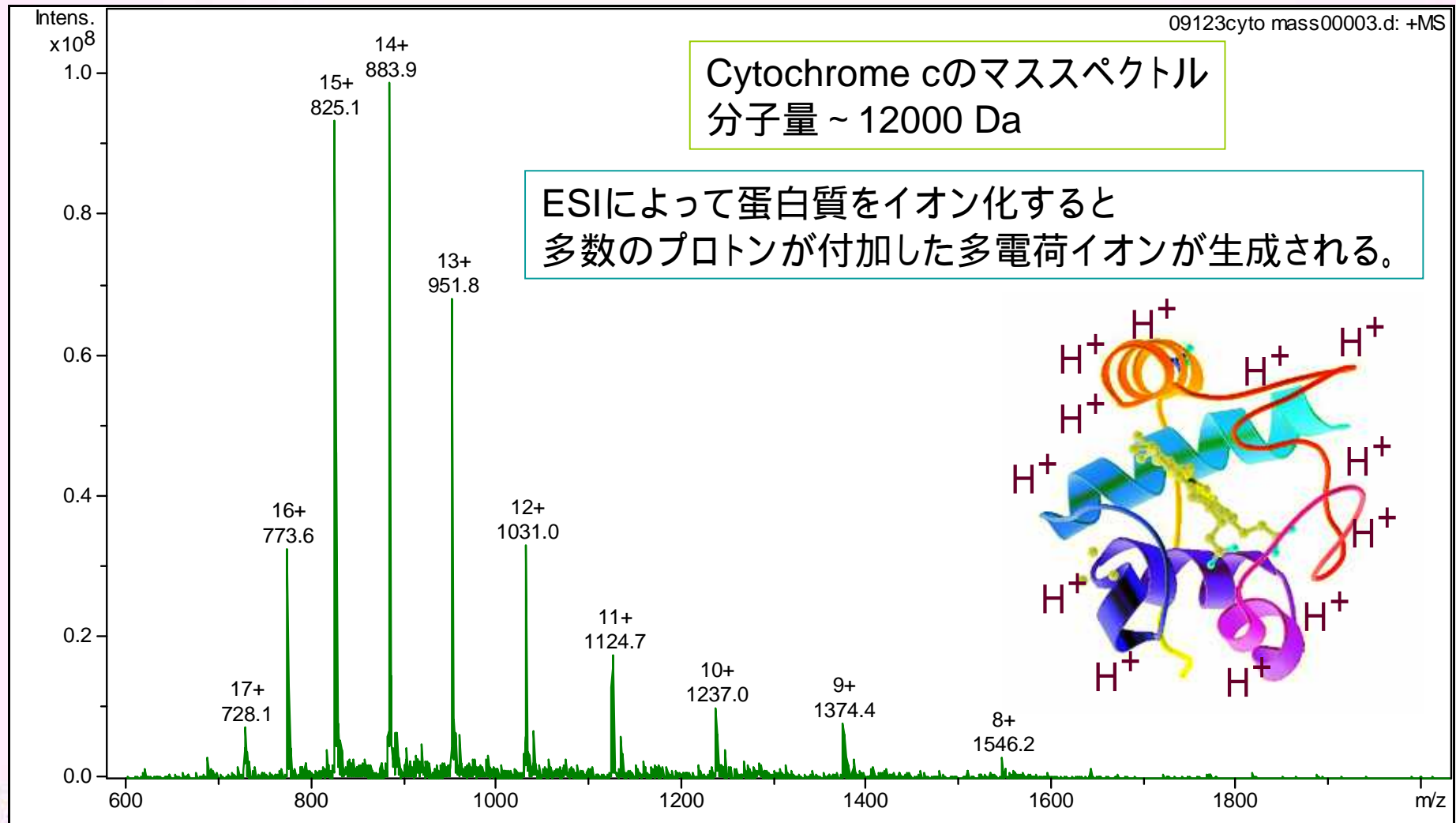


(4) 負電荷を有するR基をもつアミノ酸



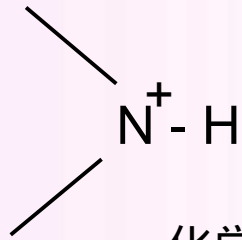
蛋白質多電荷イオンの質量分析

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。

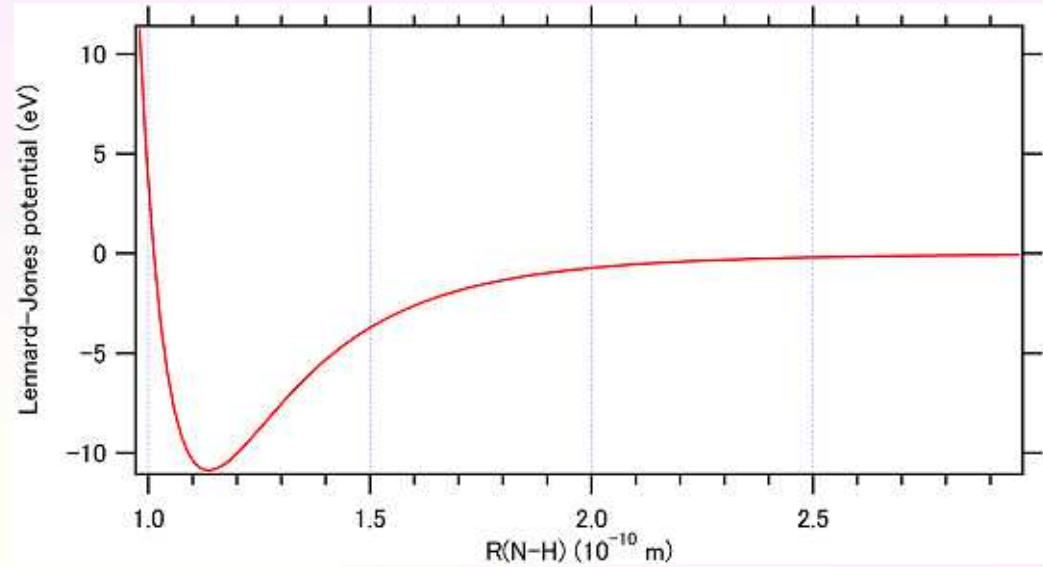


N-H結合をレナード-ジョーンズ・ポテンシャルと仮定すると、次の式であらわされる。
 ここで、 r はN原子とH原子との間の距離(核間距離)である。

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



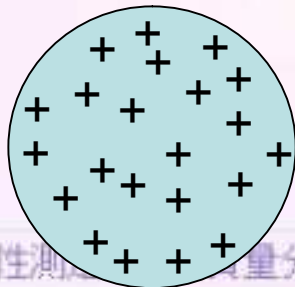
化学結合は近距離力



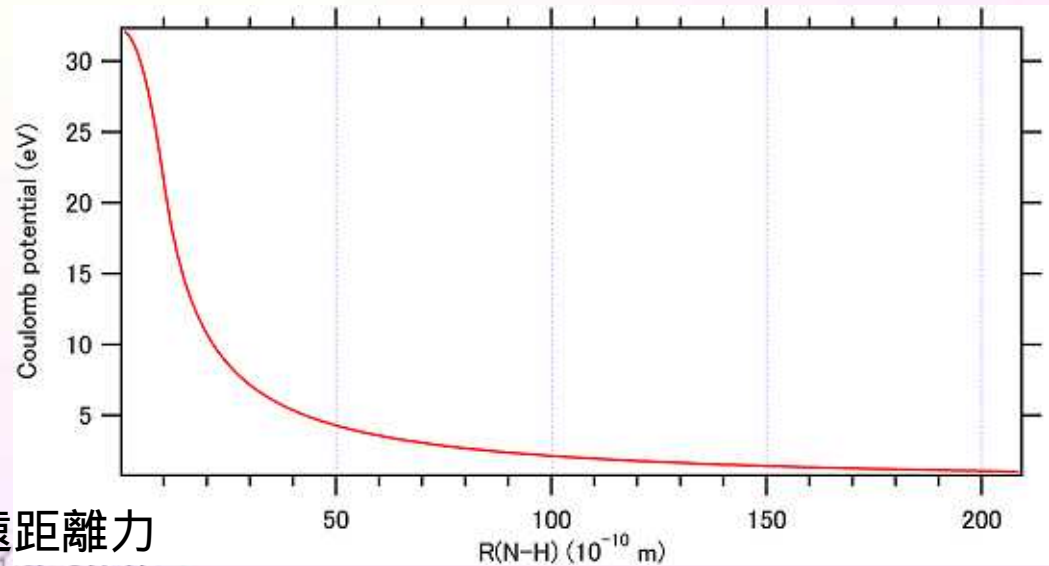
蛋白質多電荷イオンの構造を球だと仮定する。
 半径 a の球の内部に電荷 Ze が一様に分布しているとする。
 その場合のクーロンポテンシャルは、次の式であらわされる。

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

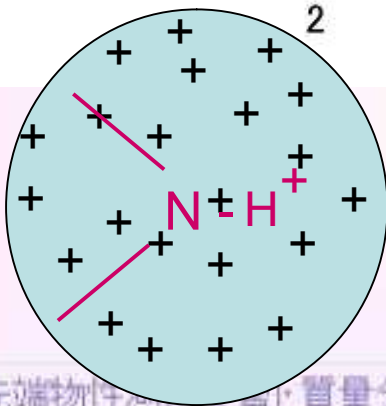
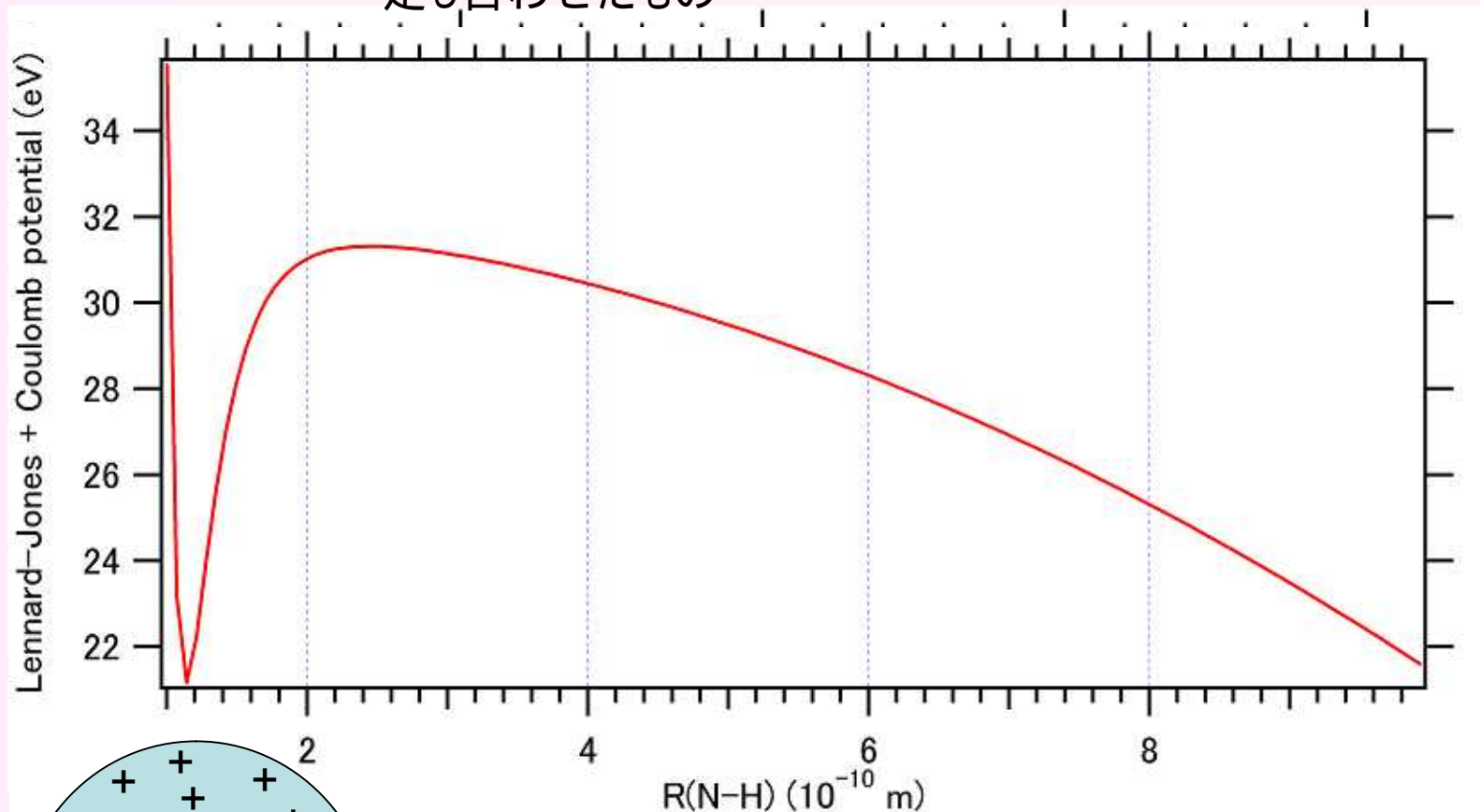
$$U_{\text{Coulomb}} = \frac{Ze^2}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{1}{2a} \cdot \left(3 - \frac{r^2}{a^2} \right) \quad (r \leq a)$$



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

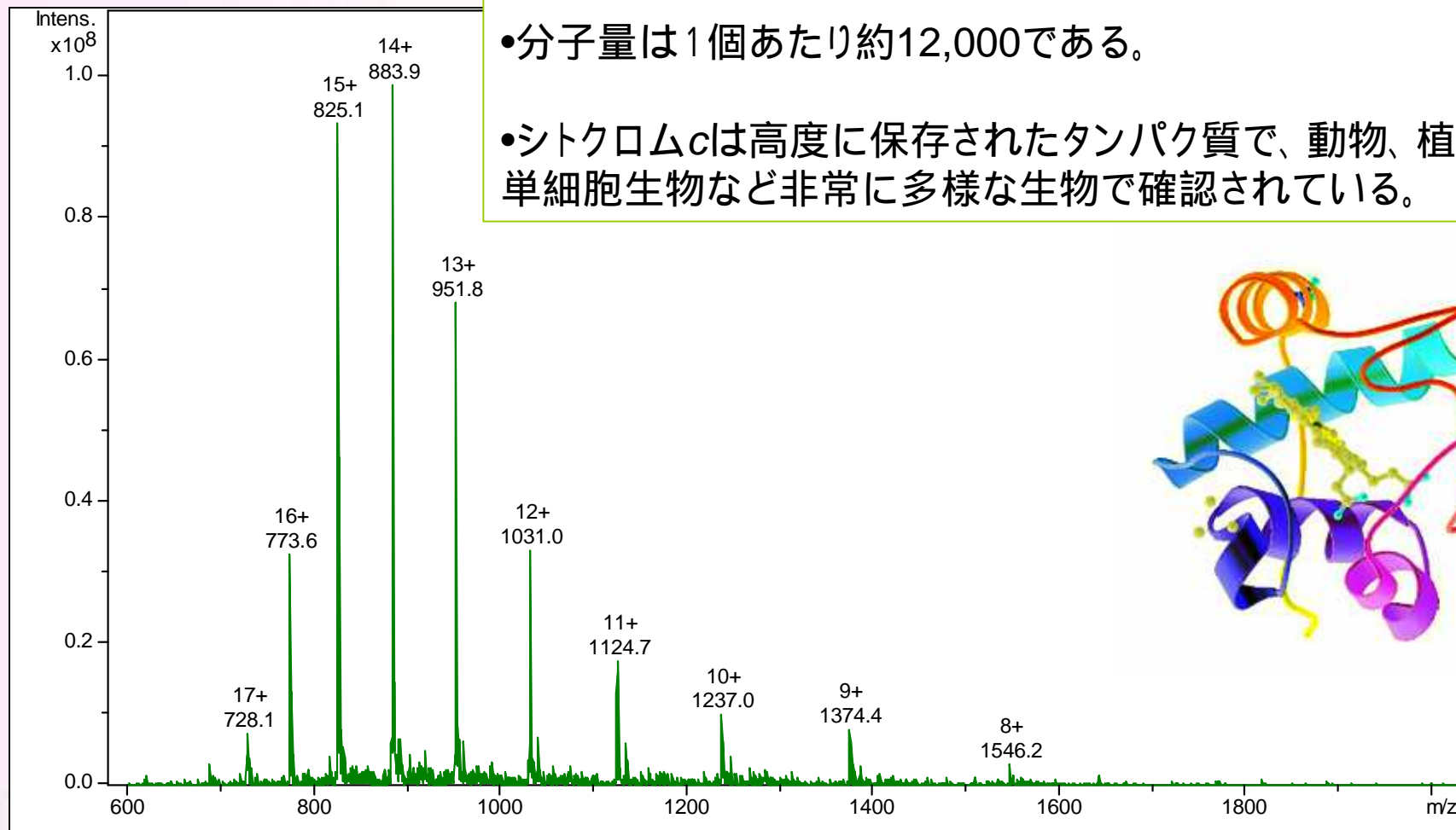


Cytochrome c とは・・・

•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

GDVEKGGKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPN
LHGLFGRKTGQAPGFTYTDANKNKGITWKEET
LMEYLENPKKYIPGTMIFAGIKKKTEREDLIA
YLLKATNE

実習に用いる試料

- 蛋白質

 - ミオグロビン (myoglobin)

 - リゾチーム (lysozyme)

 - リゾチーム [S-S結合の解離したもの]

- ペプチド

 - アンジオテンシン I (angiotensin I)

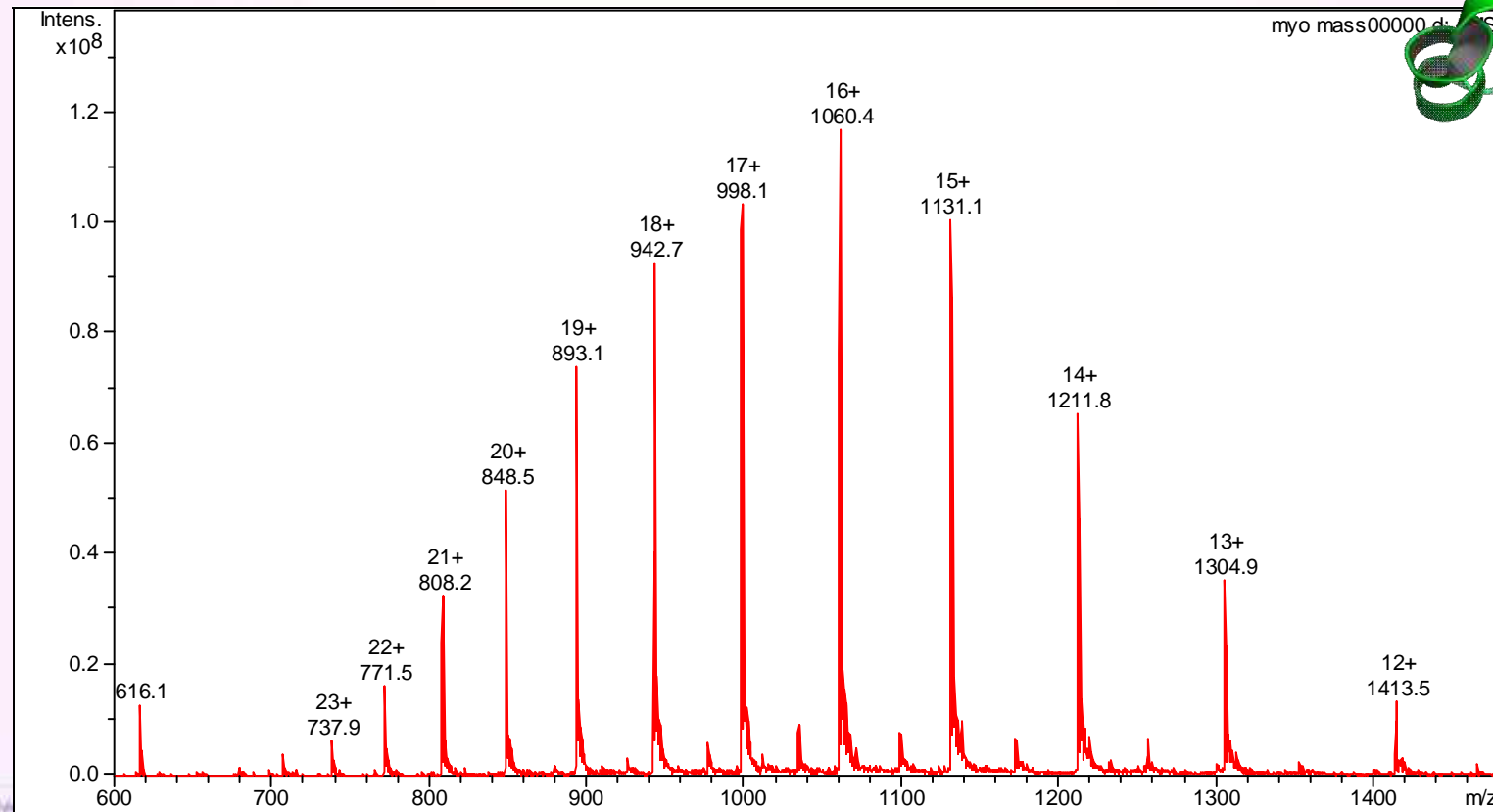
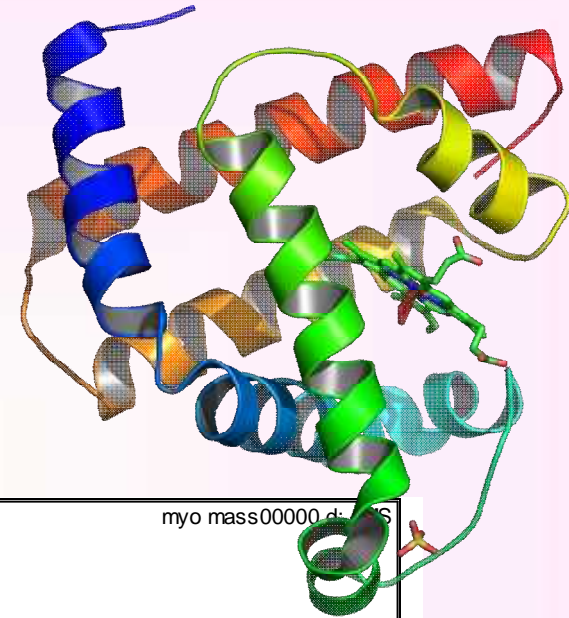
- 試料溶液

 - 試料濃度 1 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$

 - 溶媒 メタノール + 純水(1%) + 酢酸(0.1 ~ 1%)

Myoglobin とは...

- ミオグロビン (myoglobin) とは筋肉中において酸素分子を代謝に必要な時まで貯蔵する色素タンパク質。
- 1本のポリペプチド鎖と1分子のヘムからなる。
- 分子量は1個あたり約17,000である。



Chain Sequence of Myoglobin

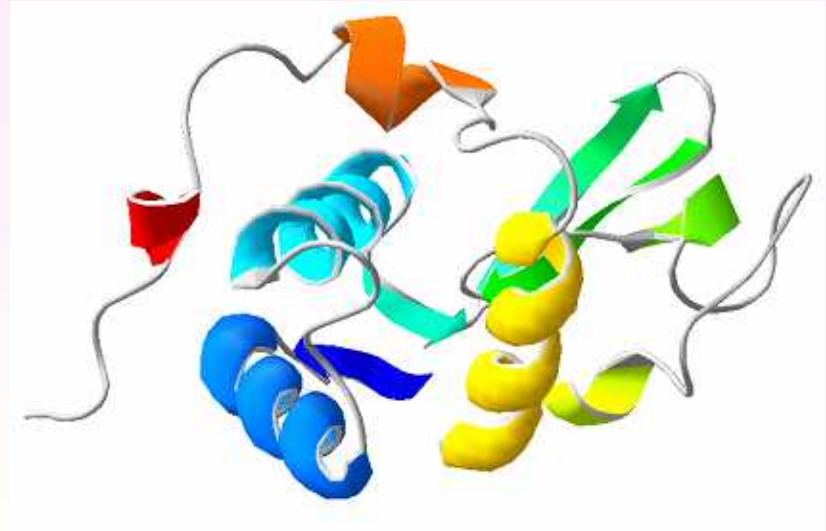
Basic Residues;

Lysine;K, Arginine;R, Histidine;H

153 residues

GLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAGHGQEVLI~~R~~LFTG
HPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASEDLKKHGTVVLTAL
GGILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISDAI
IHVLH~~S~~KHPGDFGADAQGAMTKALELFRNDIAAKYK
ELGFQG

Lysozymeとは・・・



- リゾチーム (Lysozyme) とは、真正細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素である。ヒトの場合涙や鼻汁、母乳などに含まれている。工業的には卵白から抽出したリゾチームが食品や医薬品に応用されている。
- 分子量は ~ 14000amu。
- 酸性アミノ酸 (Asp7、Glu2) に対して塩基性アミノ酸 (Arg11、Lys6) の数が多いことと分子量の割にS-S結合が多いことが特徴である。
- 食品添加物としては日持ちを向上させるために用いられる。
- 塩化リゾチーム (リゾチーム塩酸塩) は、グリコサミノグリカンを分解作用があるとして日本でも医薬品として広く用いられている。

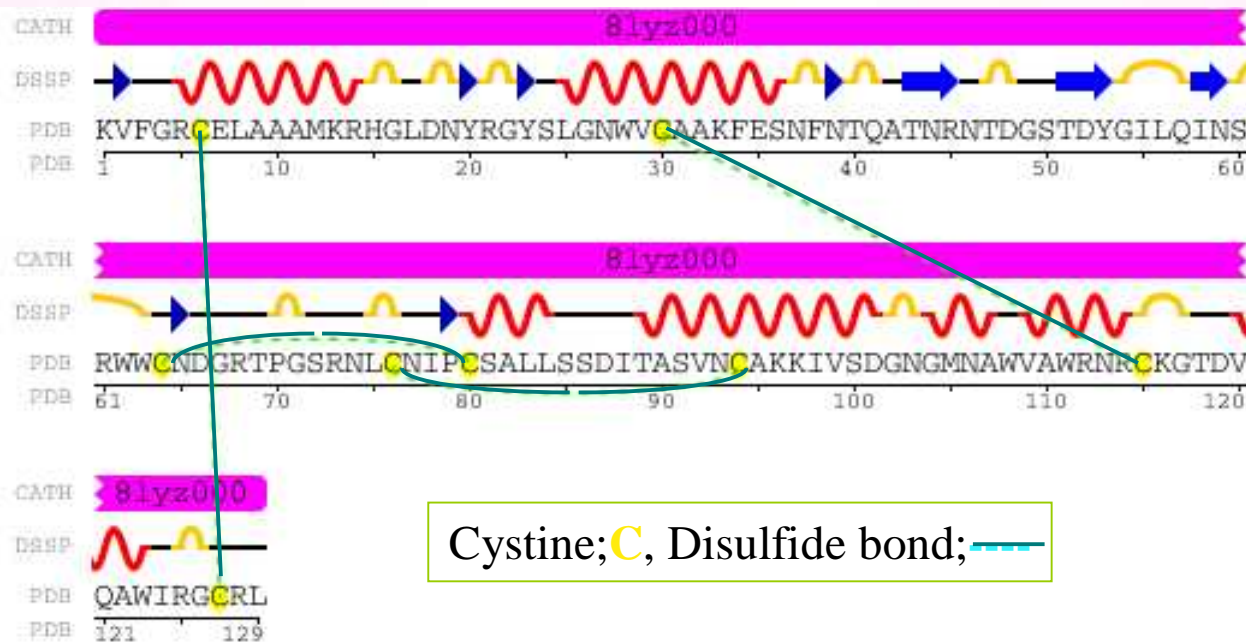
Lysozymeの1次構造

Length; 129 residues

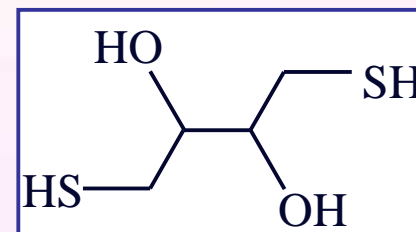
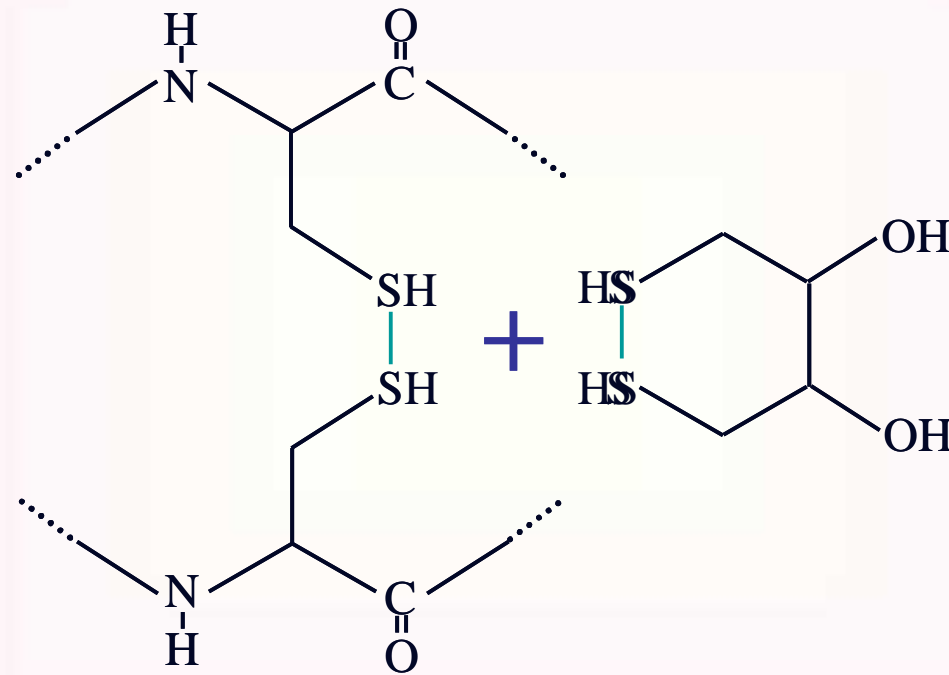
Secondary structure;

41% helical (7 helices; 54 residues)

10% beta sheet (9 strands; 14 residues)

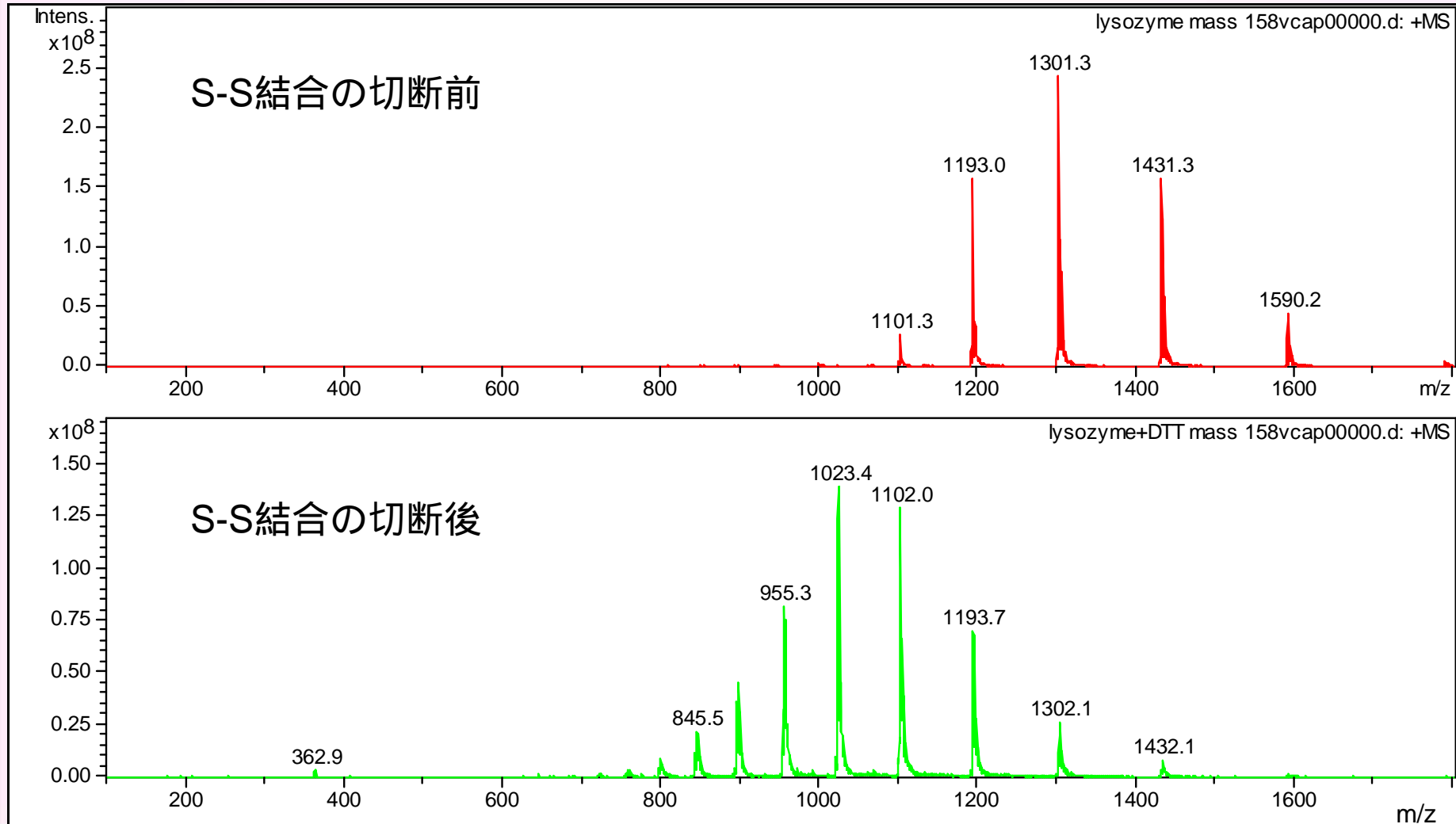


Reduction of S-S bonds with DTT

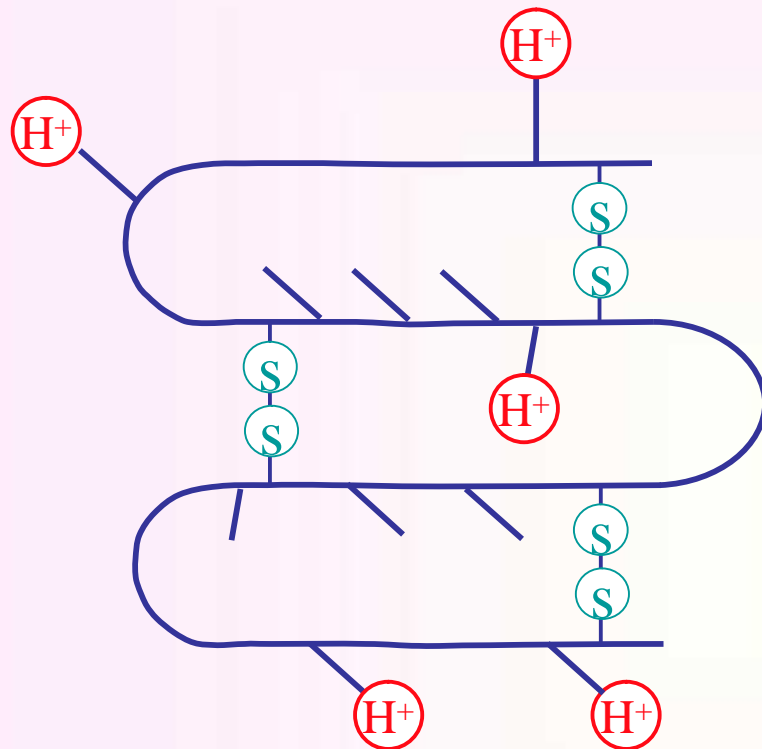


Dithiothreitol(DTT)

Lysozymeのマスマスペクトル

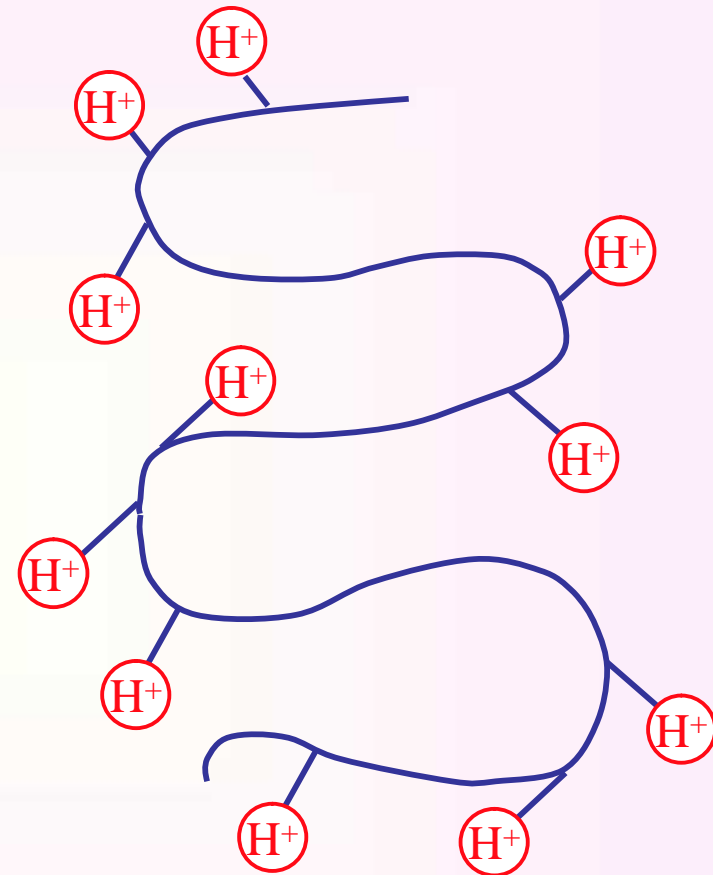


Disulfide-intact lysozyme



S-S結合によって構造が固定されている
内部のサイトにH⁺が付着できない
H⁺間のクーロン反発が大きい

Disulfide-reduced lysozyme



構造が柔軟
内部のサイトにもH⁺が付着できる
H⁺間のクーロン反発が小さい

Angiotensin のマススペクトル

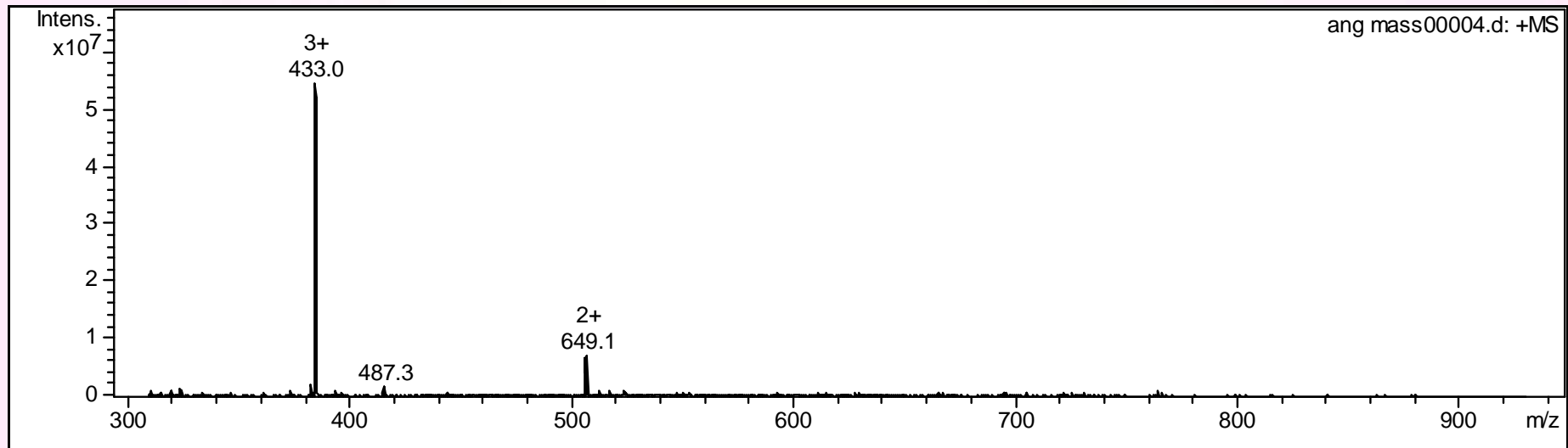
アンジオテンシン (angiotensin) はポリペプチドの一種で、昇圧作用を持つ生理活性物質。

アンジオテンシン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。

アンジオテンシンIの1次構造

Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - His - Leu - OH

分子量 ~ 1300amu。



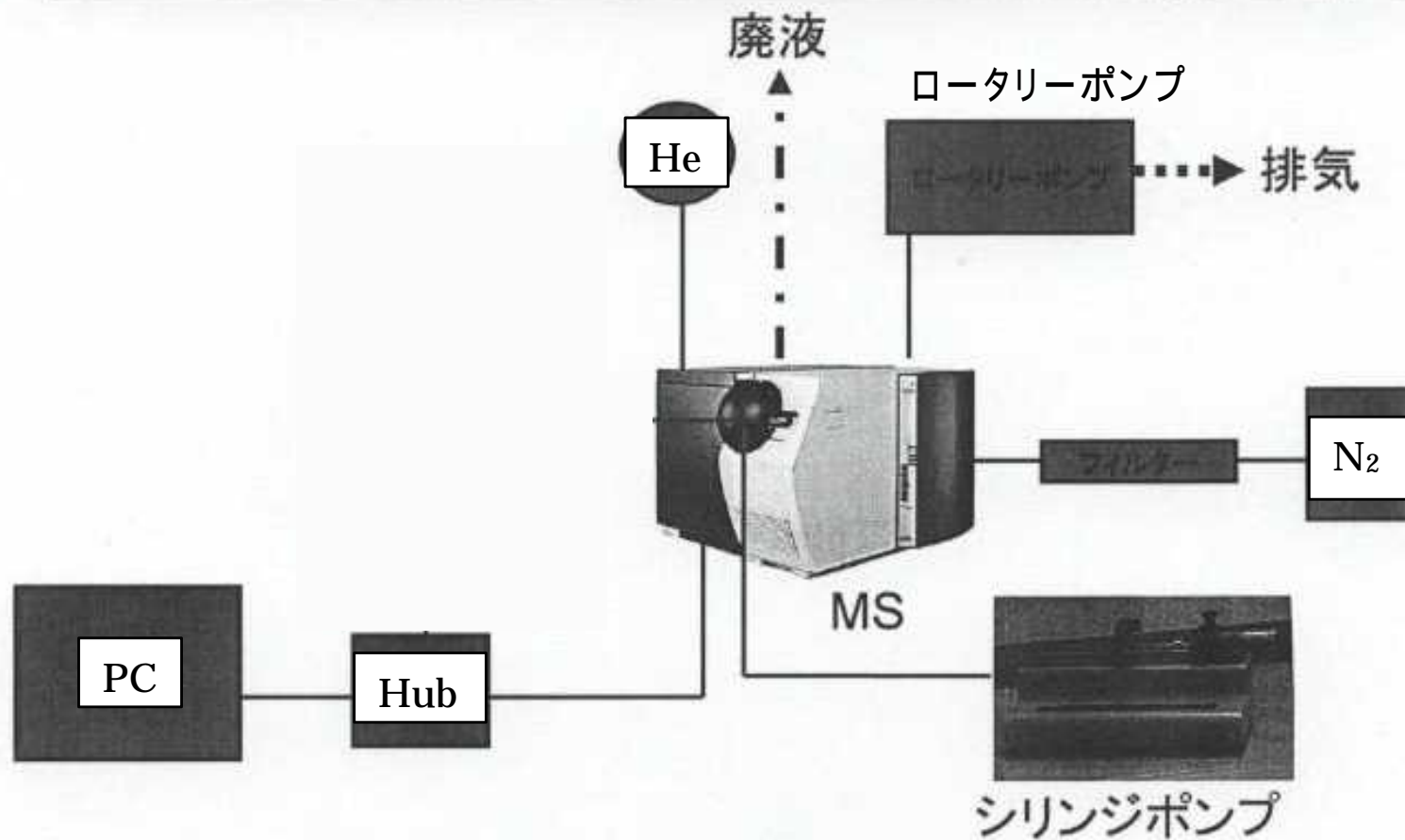
エレクトロスプレーイオントラップ型質量分析装置 Bruker-Daltonics, HCT-ETD II



MS構成関係図

**BRUKER
DALTONICS**

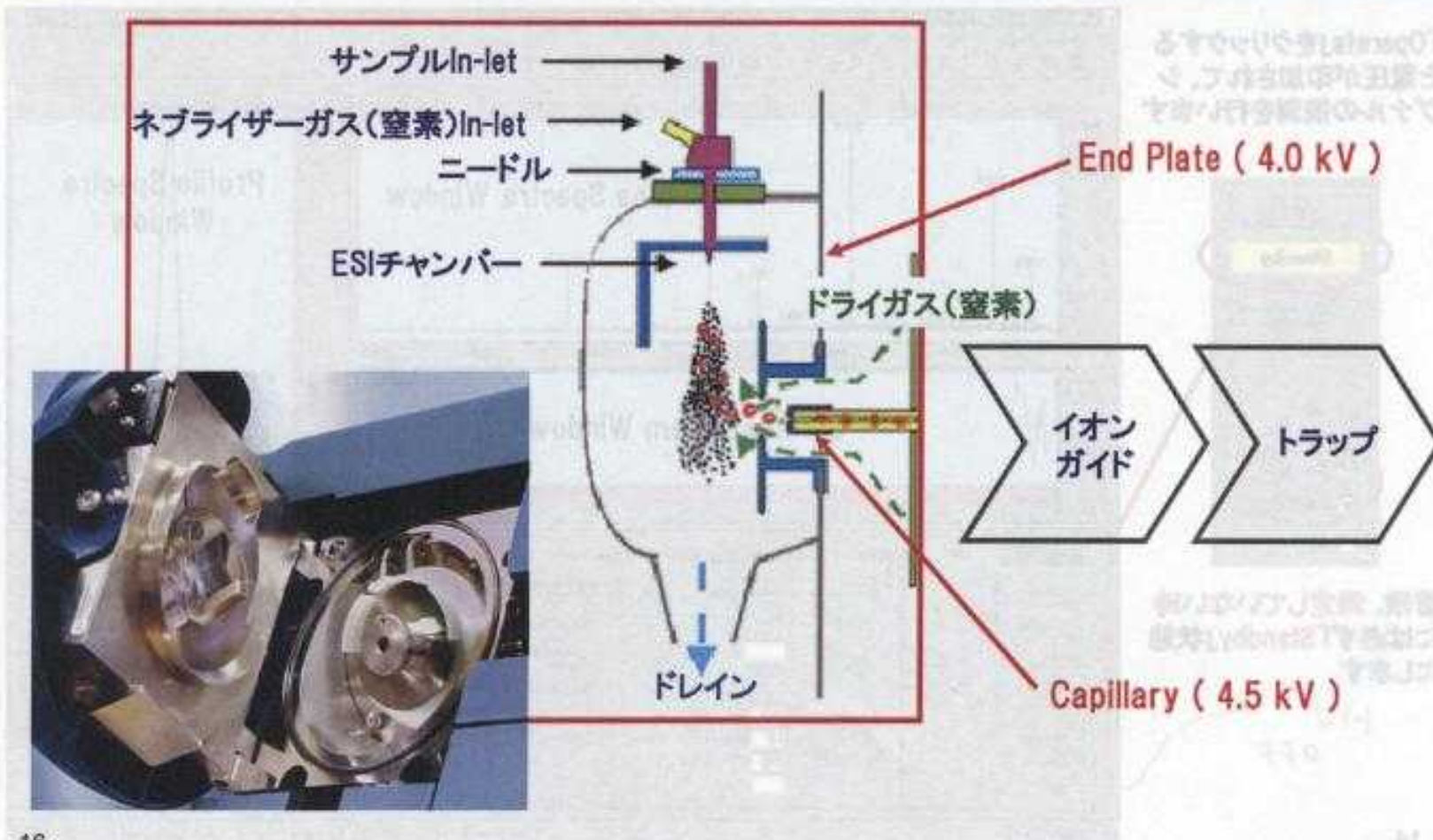
HCT Training : Ion Trap MS



標準 ESI イオン源

**BRUKER
DALTONICS**

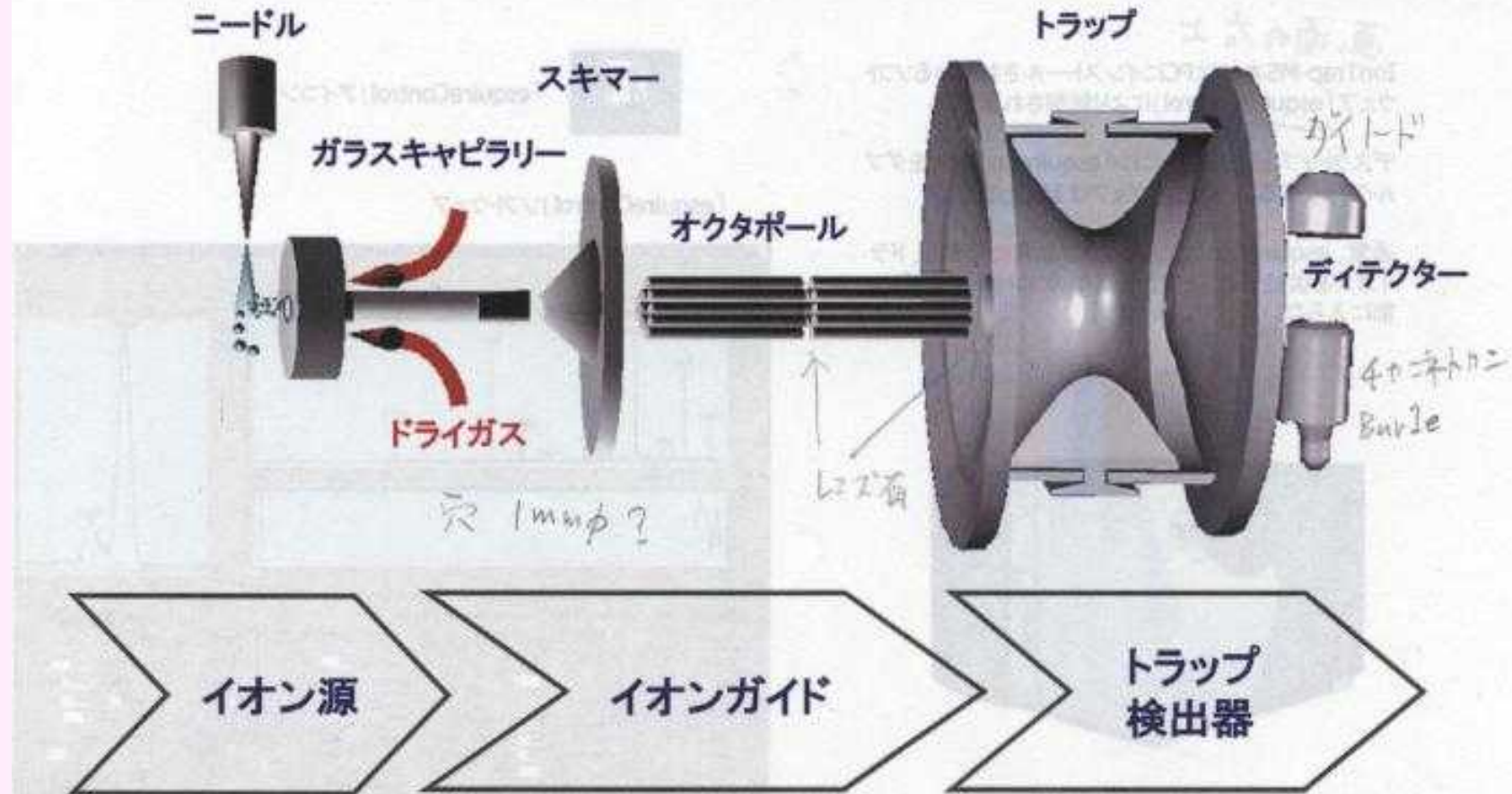
HCT Training ; Ion Trap MS



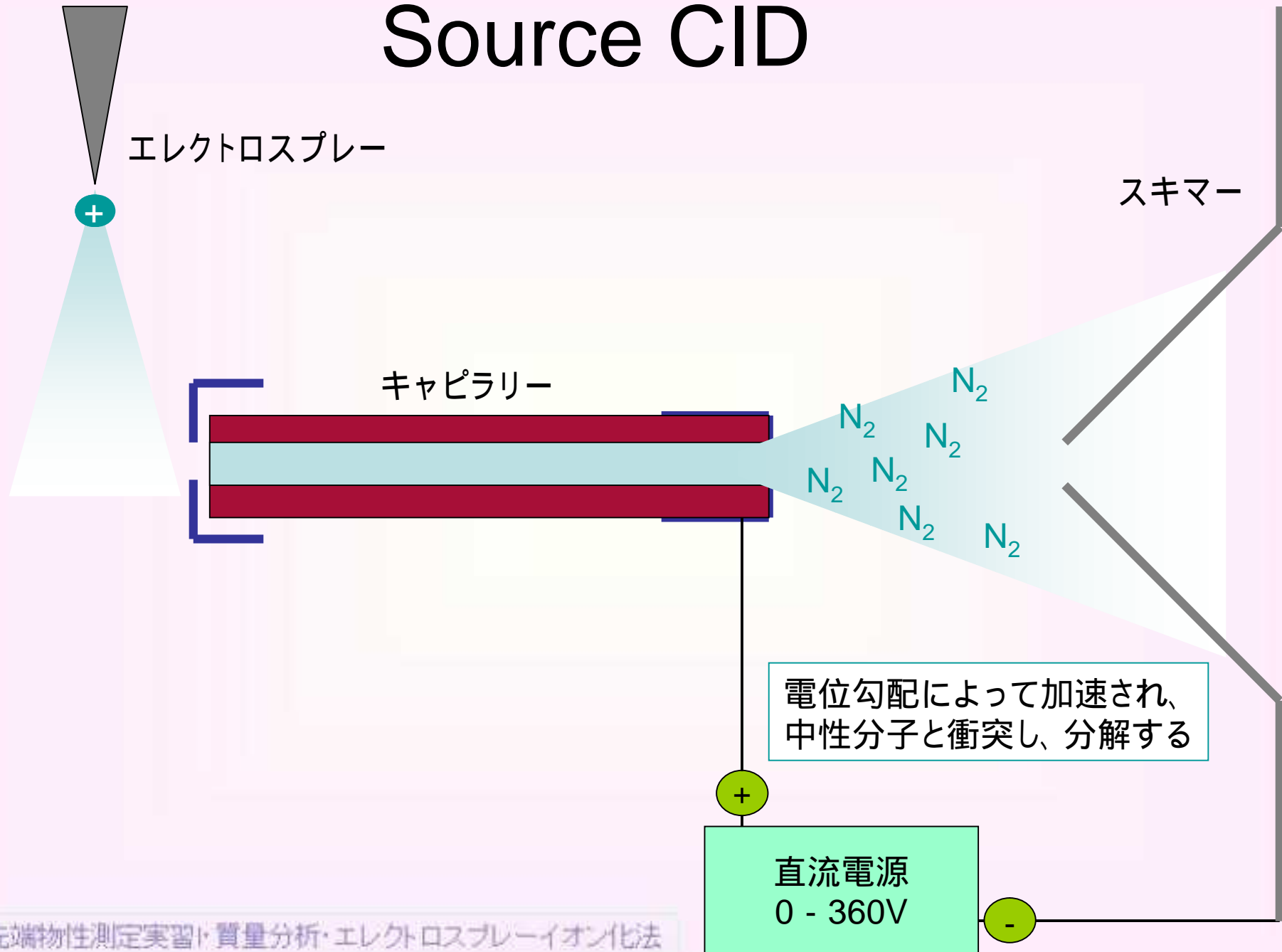
IonTrap-MS概略図

BRUKER
DALTONICS

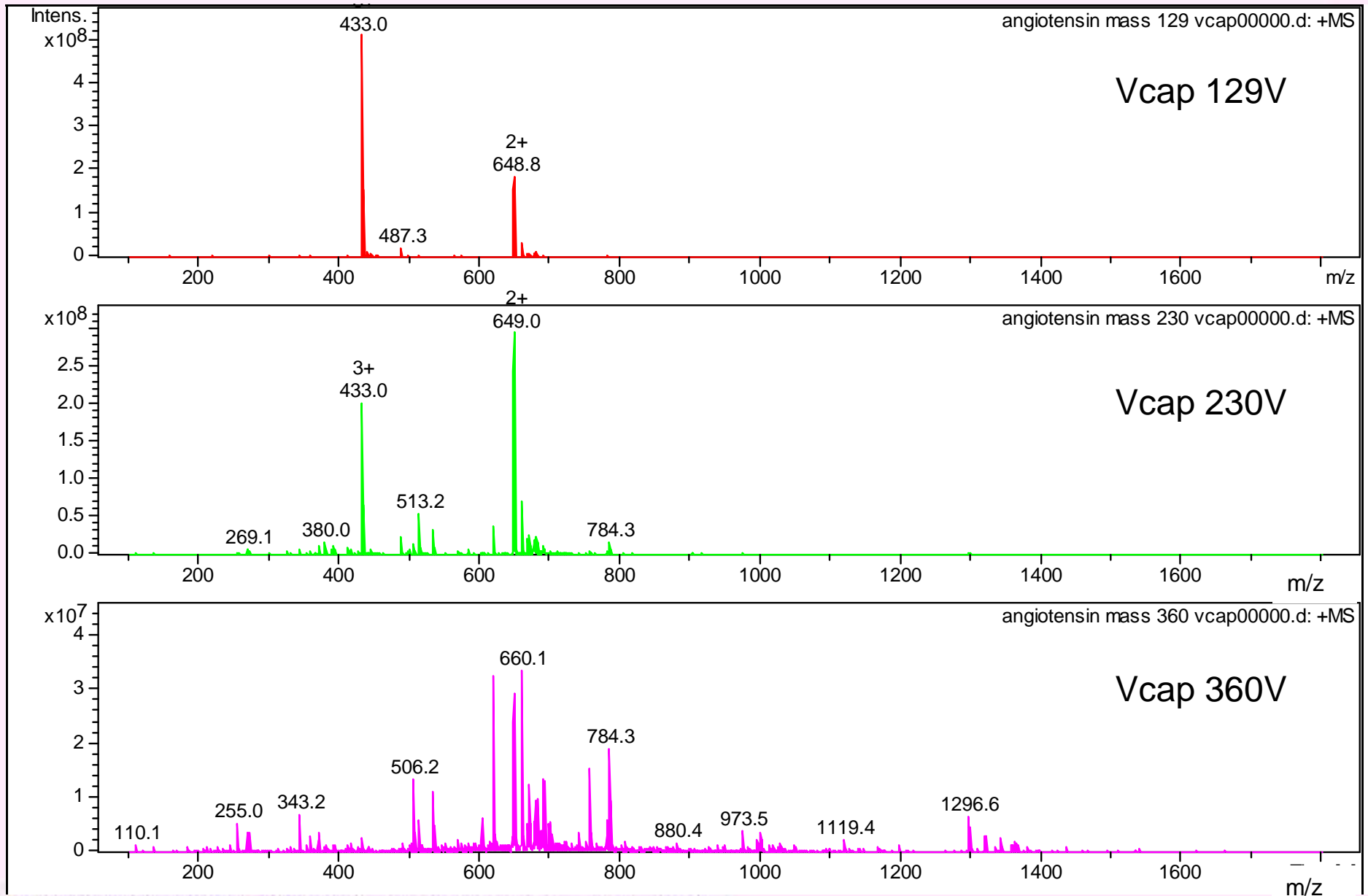
HCT Training : Ion Trap MS



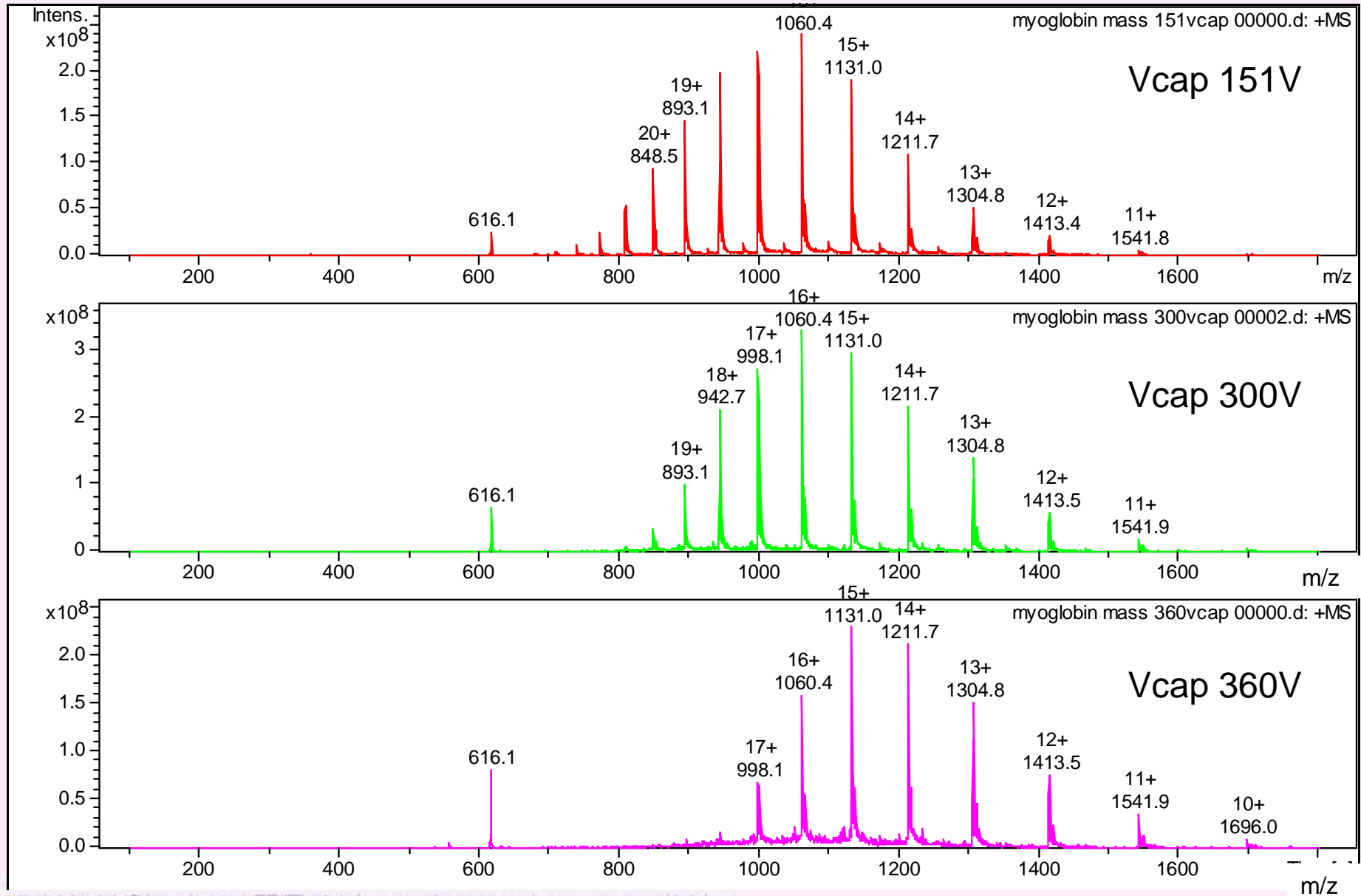
Source CID



Angiotensin I キャピラリー電圧依存性 (スキマー電圧40V)



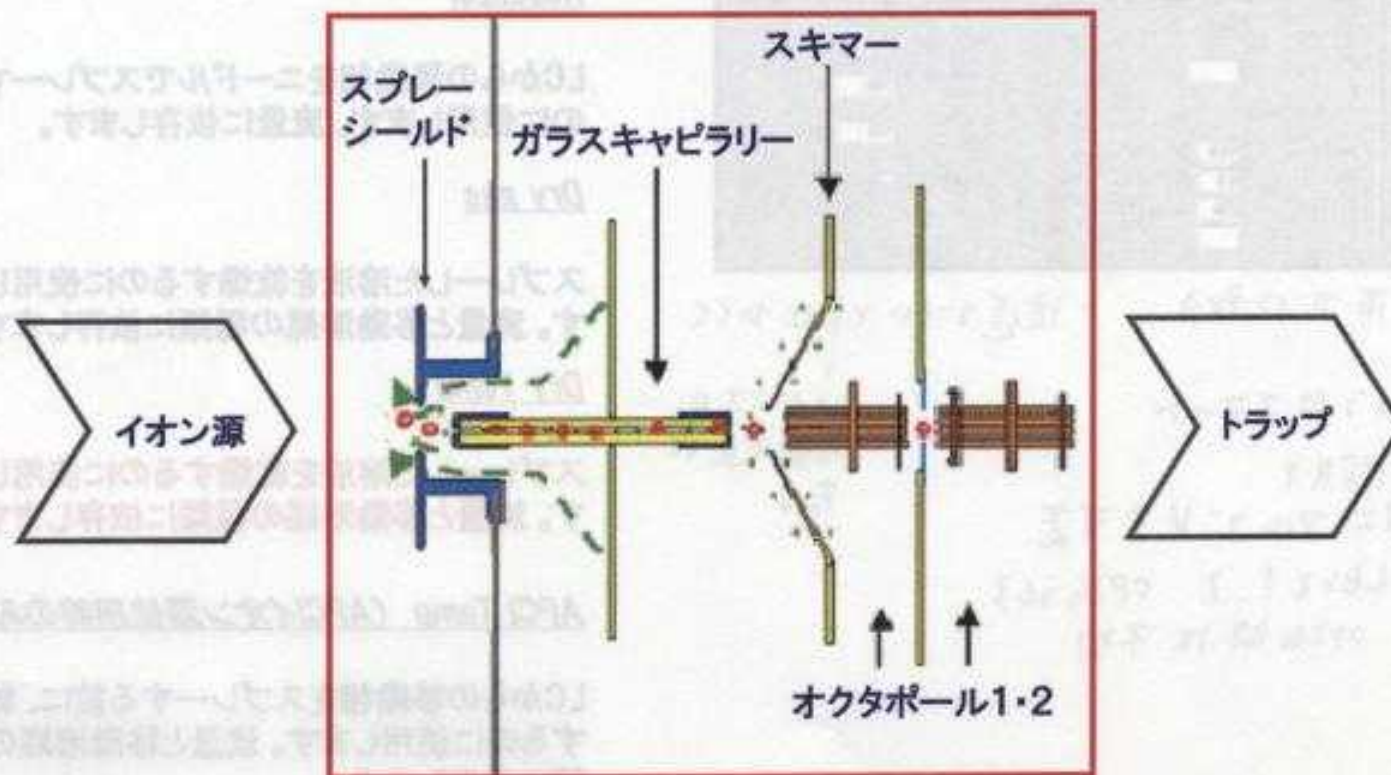
Myoglobin キャピラリー電圧依存性 (スキマー電圧40V)



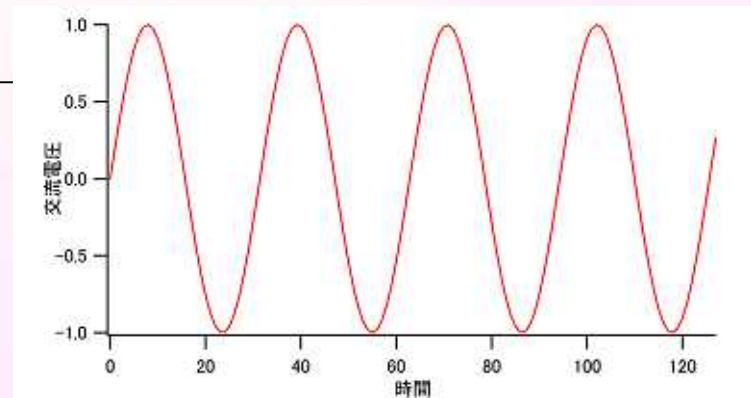
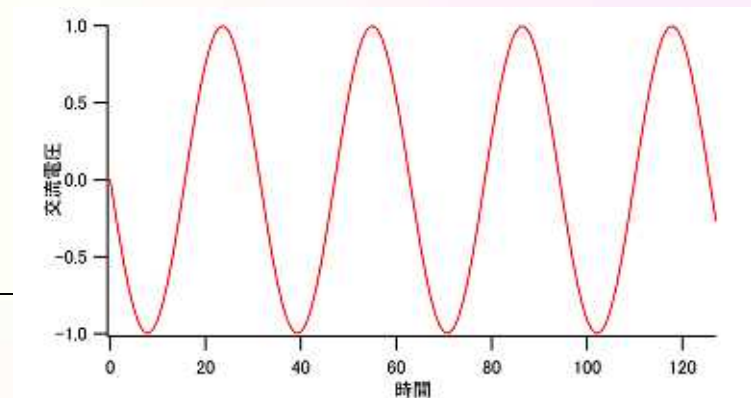
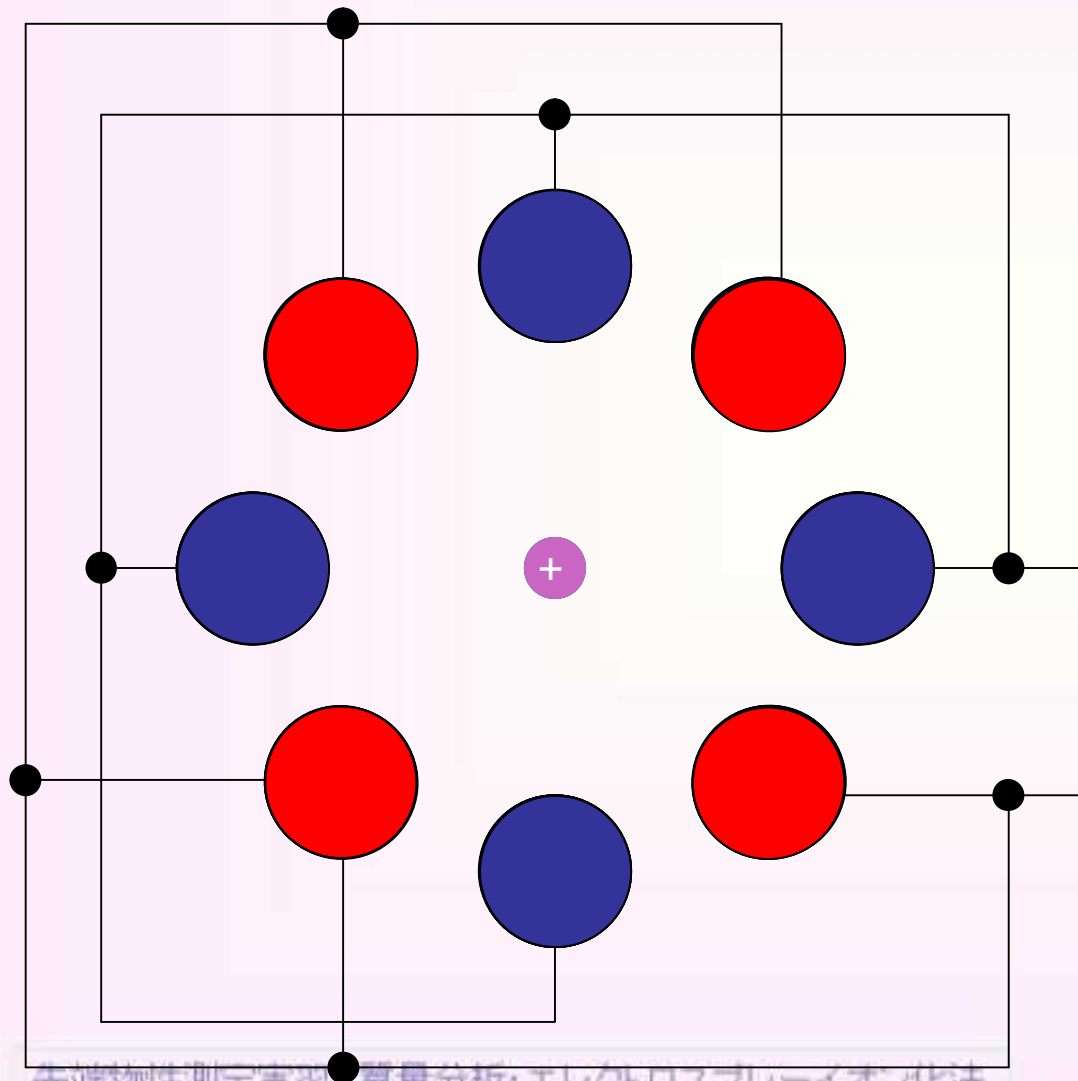
イオンガイド

**BRUKER
DALTONICS**

HCT Training : Ion Trap MS



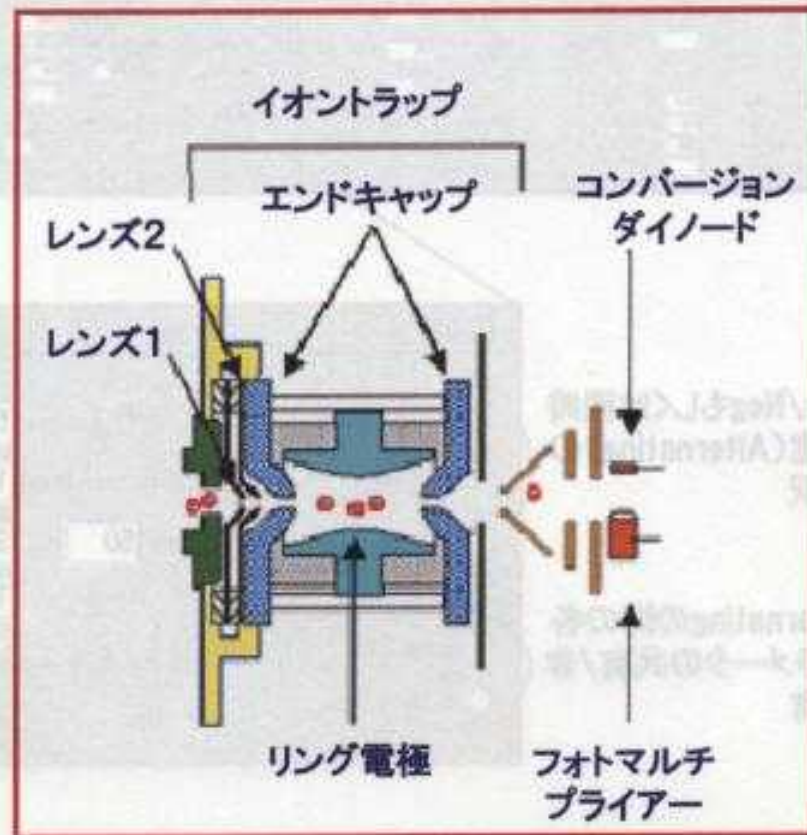
Octapole Ion Guide



イオンラップ

**BRUKER
DALTONICS**

HCT Training : Ion Trap MS

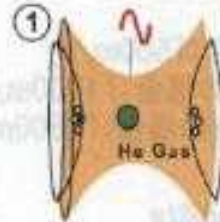


イオントラップから検出 (MS測定)

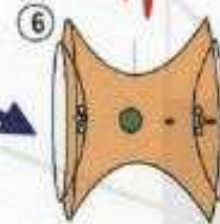
BRUKER
DALTONICS

HCT Training : Ion Trap MS

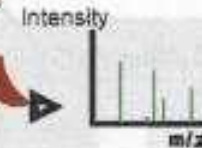
Accumulation



Trap内部にイオンを獲得し、イオンを電場(RF)にてトラップします



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。

ICL イオンカレントコントロール
イオンが蓄積できないように
TRAP中の

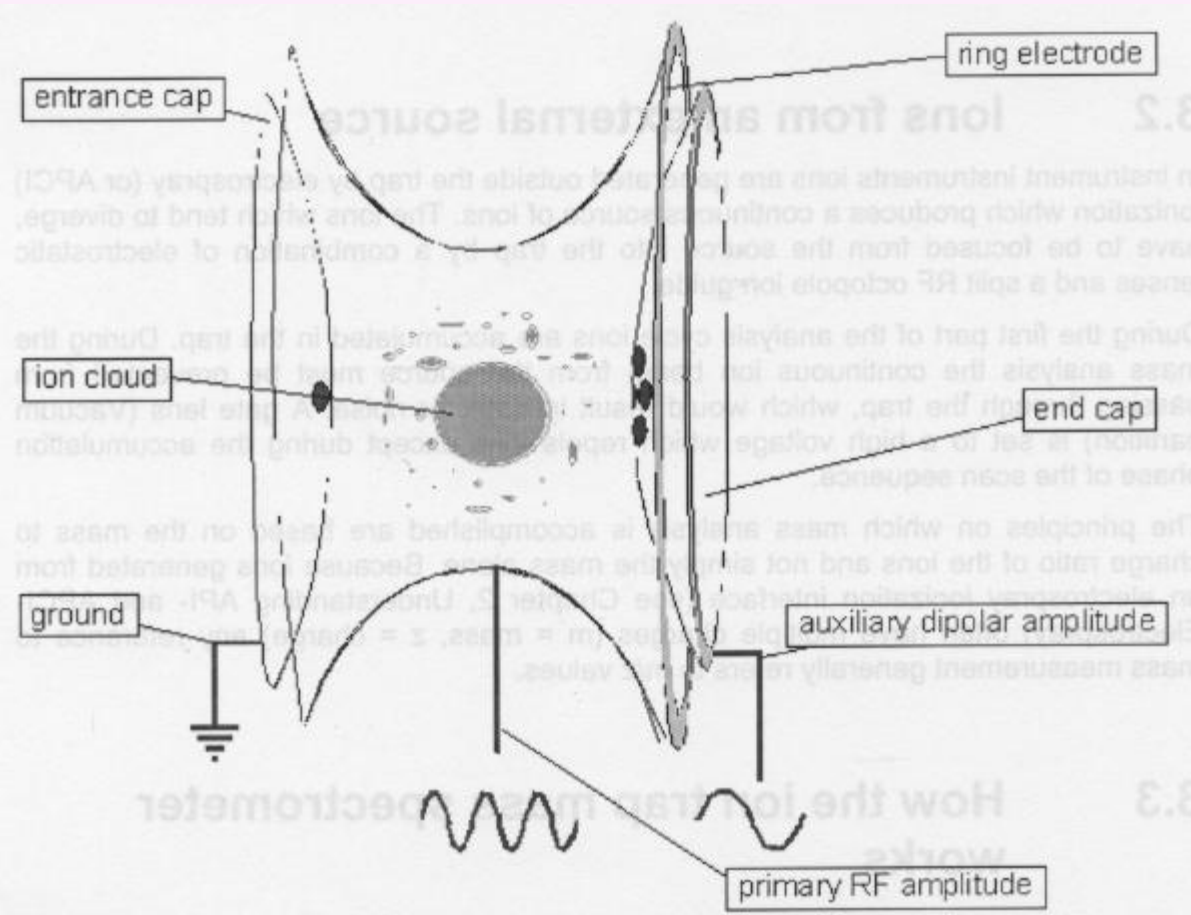
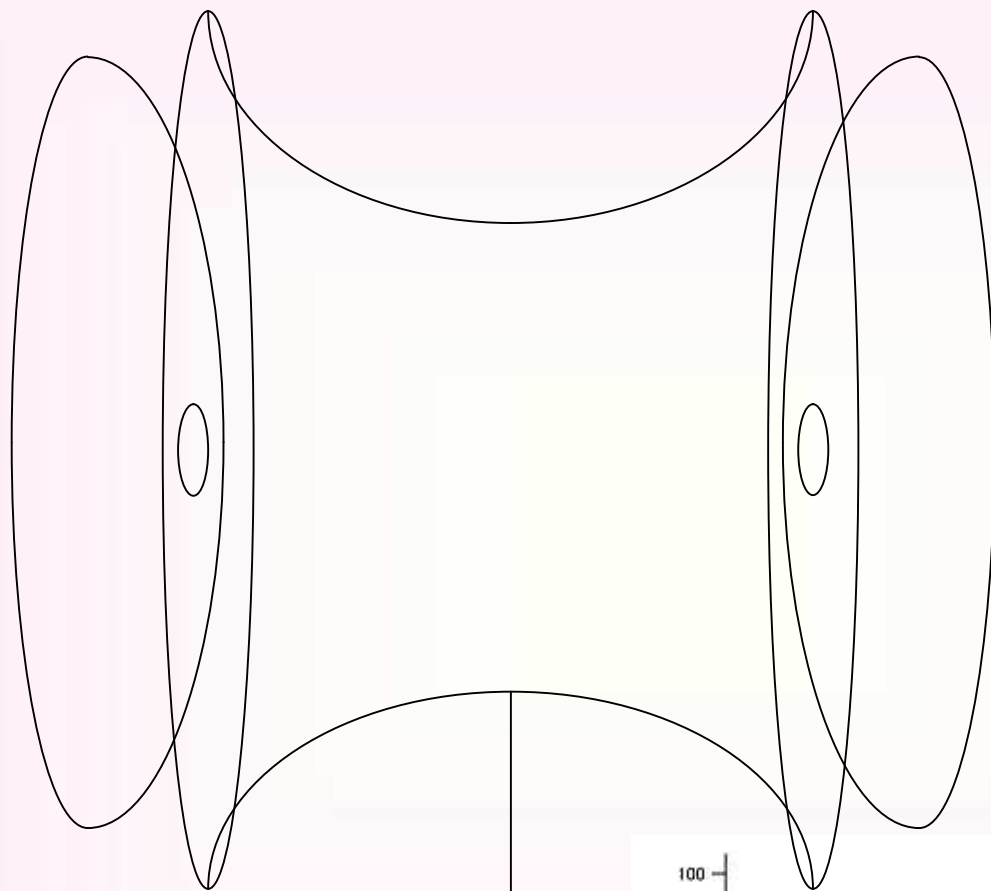
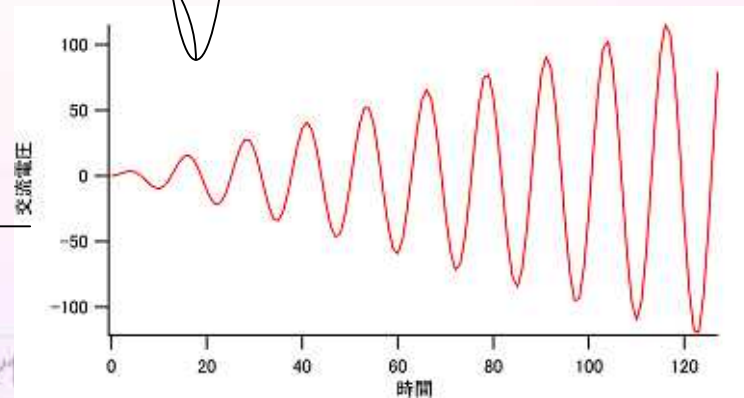


Figure 3-2 The ion trap geometry

Quadrupole Ion Trap



検出器



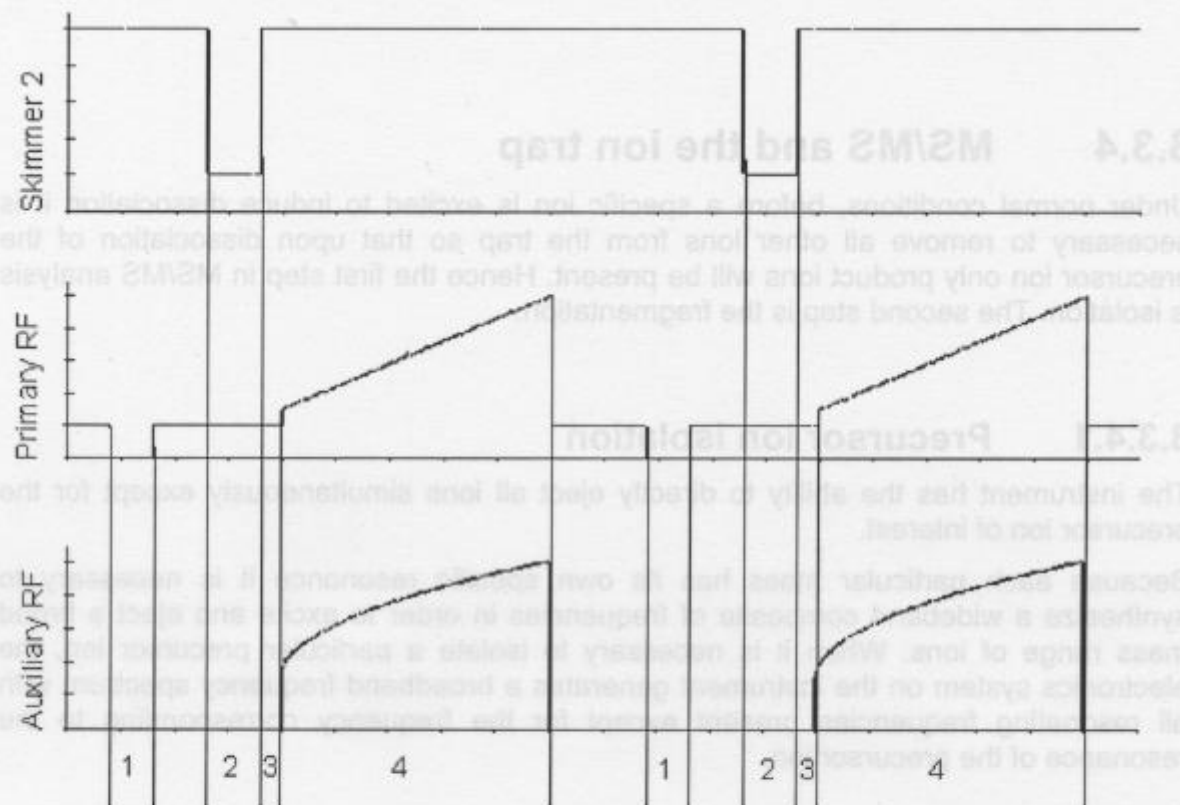
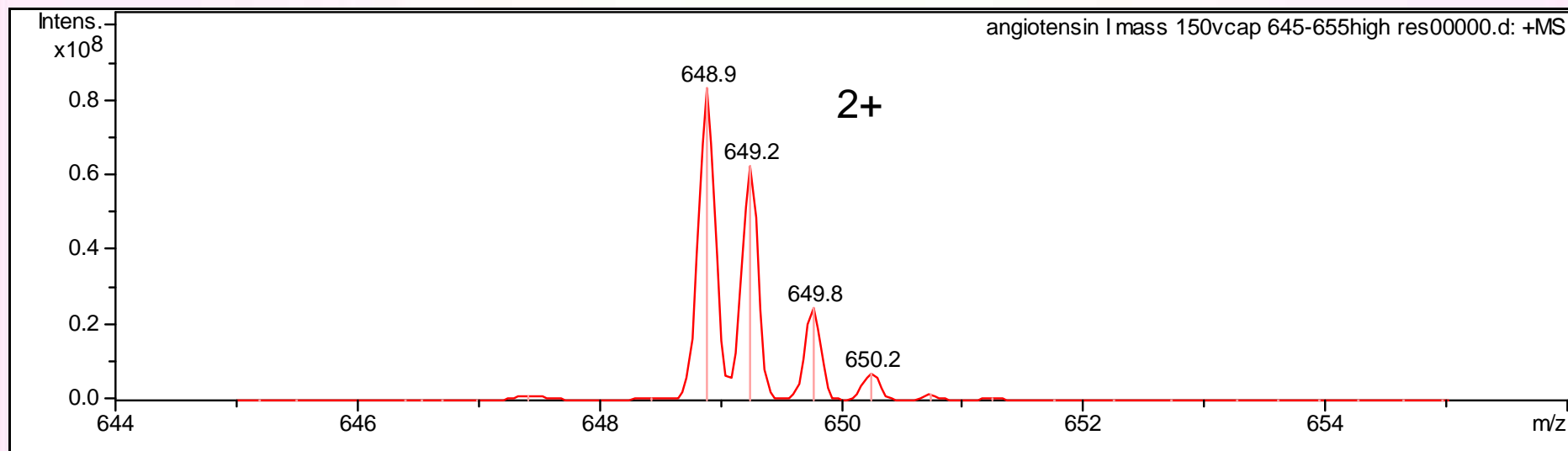
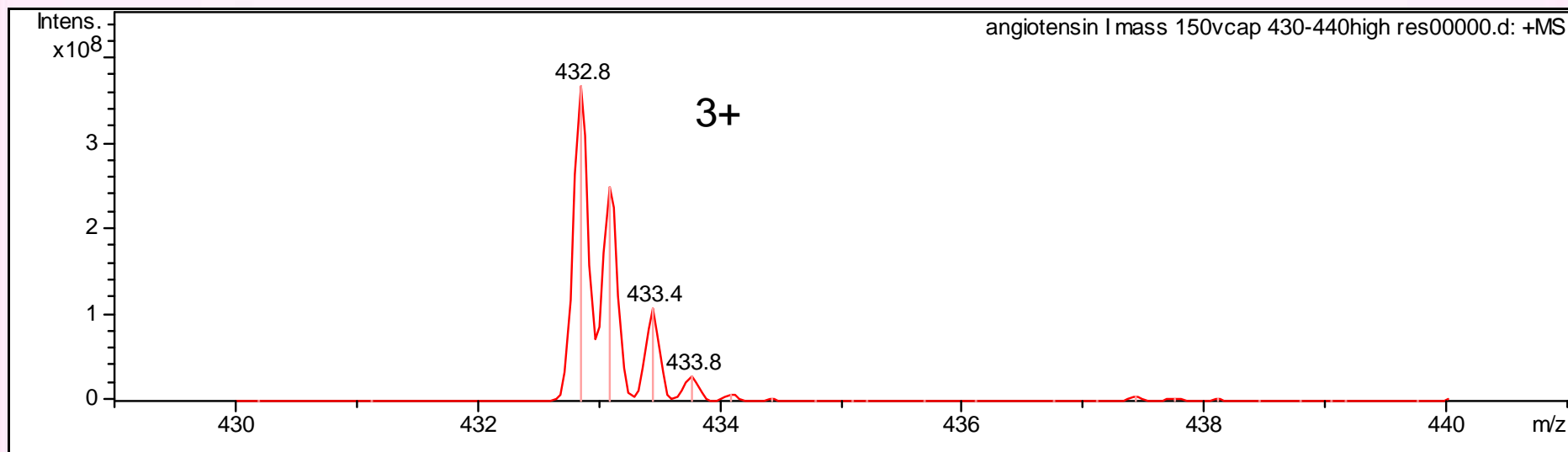


Figure 3-5 The important scan segments for an MS scan

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

Angiotensin I ($z=2,3$) ^{13}C 同位体分布



【参考文献】

1. これならわかるマスマ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. マスマ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

レポートの課題

・Angiotensin I

1. ESI法によってangiotensin Iをイオン化すると、2個あるいは3個のプロトンが付加した多電荷イオンが生成する。一方、MALDI法によってイオン化すると、主として1価のイオンのみが生成する。これはなぜか。

その理由について考察しなさい。

1. 試料分子中にプロトンが付加できるサイトは合計何カ所あるか。また、それはどこか。
2. ガラスキャピラリー末端とスキマーとの間の電位勾配を大きくすると、イオンが電位勾配によってより大きく加速され、
中性分子との衝突エネルギーが増大する。その結果、イオンの分解反応が促進される。
これによって、マススペクトルにどのような変化が観測されているだろうか。簡単に述べなさい。

・Myoglobin

1. 得られたマススペクトルからMyoglobinの分子量を推定しなさい。
2. ガラスキャピラリー末端とスキマーとの間の電位勾配を大きくすると、電荷数の小さいイオンの生成が促進される。その理由について述べなさい。

Lysozyme

1. Lysozymeには4箇所のS-S結合が存在する。DTTによってS-S結合を切断すると、電荷数のより大きな多電荷イオンが観測される。その理由について考察しなさい。
1. Lysozymeの分子量は約14000ダルトン程度である。得られたマススペクトルから分子量を推定しなさい。
2. S-S結合の切断前と切断後のマススペクトルにおいて、同じ電荷数(と思われる)イオンの分子量を比較すると、僅かにS-S結合切断後の場合の分子量が大きい。これはなぜか。理由を述べなさい。

終わり

御静聴を
どうも有り難うございました。

次回からの実習を
楽しみしてして下さい。