

# LC/MSで得られるマススペクトルと低エネルギー CIDによるフラグメンテーション解析 初～中級編

エムエス・ソリューションズ(株)代表取締役

(株)フレックス 代表取締役社長

横浜市立大学非常勤講師

浜松医科大学国際マスイメージングセンター特任研究員

質量分析コンサルタント

高橋 豊

# 演者プロフィール

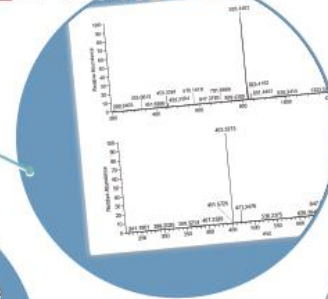
- **87-90年 群馬高専、群馬大学&大学院で有機イオンの分解機構を研究**
- **90年 日本電子(株)入社、LC/MS 応用研究、装置開発**
- **2010年6月 日本電子(株)退職**
- **2010年8月 エムエス・ソリューションズ(株)設立 代表取締役**
- **2019年2月 (株)フレパース設立 代表取締役社長**
  
- **専門:LC-MS関連装置開発、マススペクトル解析、LC/MSメソッド開発**
  
- **資格:日本分析化学会認証 LC/MS分析士五段、LC分析士二段**
  
- **趣味: ウルトラマラソン、トライアスロン(アイアンマンレース)、スキー(全日本スキー連盟指導員)、ソフトボール、テニス、サッカー審判員(JFA3級)**

質量分析に関するコンサルティング、技術指導、セミナー、LC/MS用脱塩チューブ開発

## 質量分析の問題解決を強かにサポート

技術者が現場に出向き分析からデータ解析までを代行いたします。貴社の試料に関する作業上のアドバイスなど、将来的な運用への引き継ぎのご要望にも対応いたします。

### 分析代行



LC/MS の条件設定やデータの解析でお困りではありませんか？ コンサルタントが現場に出向き、一緒に問題を分析、解決策をご提案します。LC/MS 装置や各種ソフトウェアの選定などについても、貴社の視点に立ってお手伝いいたします。

### コンサルティング



専用の周辺機器があったらよいのに、といったご不満をお持ちではありませんか？ 大手のメーカーさんでは対応できない、一点もののカスタム品についても、受注開発を請け負います。



### カスタム品開発

ソルナックチューブ



ソルナックカートリッジ

e-SALNAC

### ソルナック

特許申請中のソルナックチューブをはじめとするオンライン脱塩製品。  
●リン酸塩緩衝液を用いたオンライン LC/MS 分析  
●TFA によるイオン化阻害の改善  
●Na,K などの付加イオン削減

### ソルナックを使用した受託分析

ソルナックを貴社の LC/MS に接続して行います。

### 受託分析

LC/MS を中心に、リーズナブルな価格で分析を請け負います。

### インハウスセミナーへの講師派遣

初心者向けの質量分析の基礎原理から上級者向けの分析上のノウハウまで、ご希望いただいた内容でセミナーを行います。



事業開始：2010年8月

### コンサルティング・技術指導等実績

- ・医薬基盤研究所
- ・国立医薬品食品衛生研究所
- ・早稲田大学理工学部
- ・ENEOS株式会社
- ・味の素株式会社 他30機関以上

事業開始：2019年4月 質量分析イメージング、LC/MSの受託事業

「不老不死を目指した知財を世に出す」  
それが弊社のミッションです。



発起人、代表取締役会長  
瀬藤光利

私たちは超高齢化社会に備え(フレック)して、老化や老化関連疾患の予防、診断、治療の研究を進めています。まずはその中で培われた質量分析とイメージングをコアにした生体分子の同定、観察、操作の技術を世の中に還元しつつ、いずれはよりヒトに直結した技術や製品を世に出して行くことが我々のミッションです。

「質の高い質量分析データを提供する」  
それが私たちの想いです



取締役社長 高橋 豊

近年、IMSやLC/MSに用いられる質量分析計の発展には目覚ましいものがあります。様々なアプリケーションに対応した専用ソフトも次々と開発され、誰でも簡単に分析結果を取得できるようになりました。しかし、装置やソフトに任せて得られた結果が正しいとは限りません。私達は、生データをしっかり確認し、信頼性の高いデータを提供します。

### イメージング質量分析 の受託事業

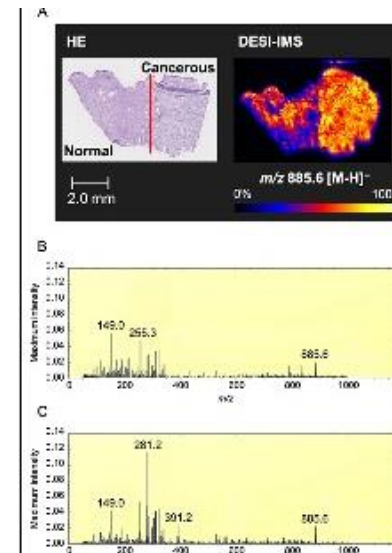
#### 使用装置

#### MALDI

Bluker Solarix (FT-ICRMS)  
Ultraflex (TOFMS)  
Shimadzu IMScope (TOFMS)

#### DESI

Waters Xevo QTOF  
Xevo TQ-XS



K. Tamura, M. Horikawa, S. Sato, H. Miyake and M. Setou, *Oncotarget*. 2019; 10:1688-1703

### LC/MS受託事業

#### 使用装置

Bluker Solarix (FT-ICRMS)  
Waters Synapt  
Xevo TQ-XS

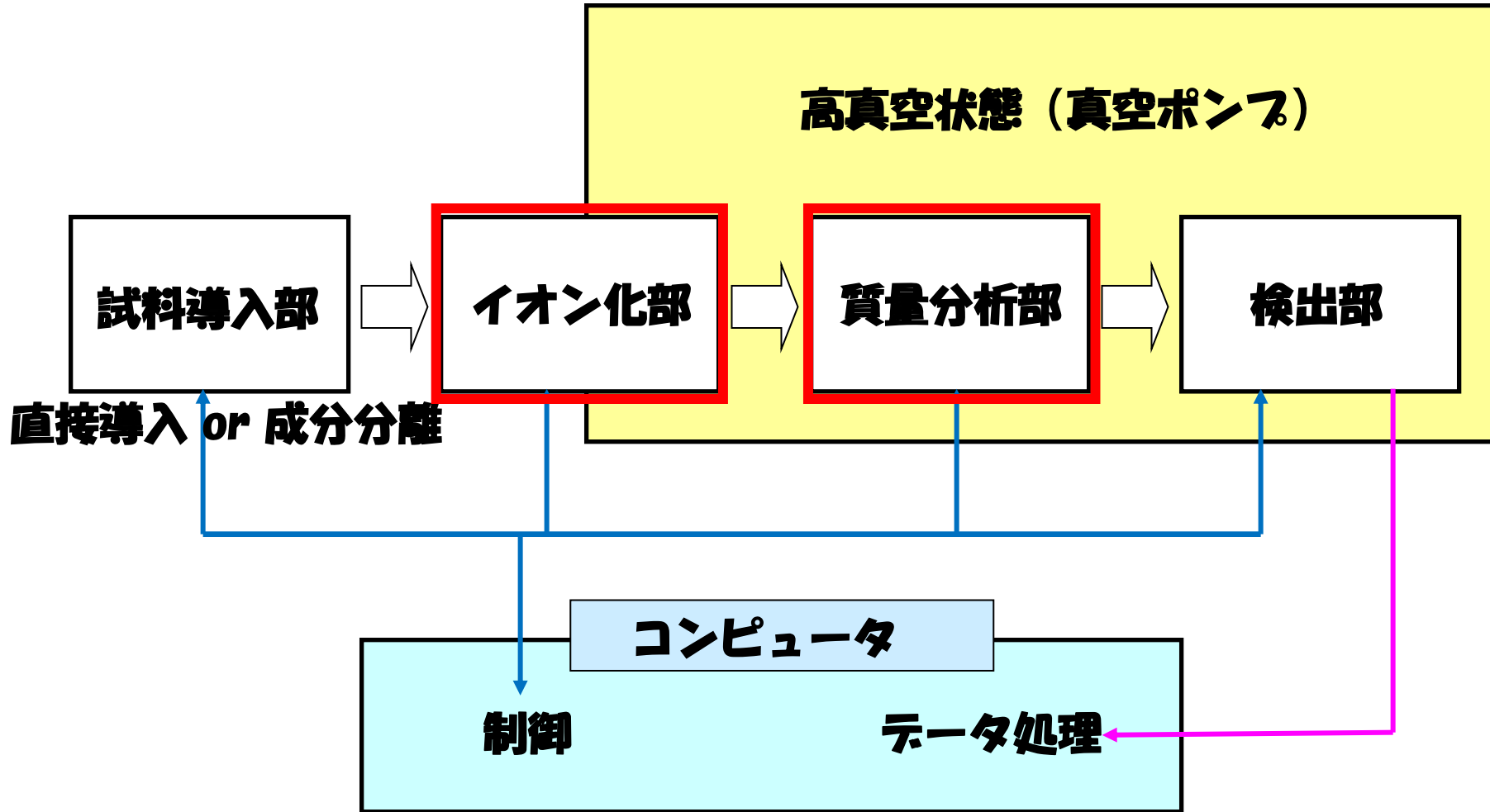
# セミナー内容

- 1. 質量分析の基礎、マススペクトルから得られる情報**
- 2. LC/MSにより得られるマススペクトルの読み方**
  - 2-1. イオン化法と生成するイオン種**
  - 2-2. イオン種の解釈と分子質量の推測**
- 3. 低エネルギーCIDによるフラグメンテーション解析の初歩**
- 4. マススペクトル解析における注意点**
  - 4-1. 夾雑ピークの見極め**
  - 4-2. 如何にして正しい $m/z$ 値を得るか(高分解能質量分析計)**
  - 4-3. マススペクトル取得モードについて**

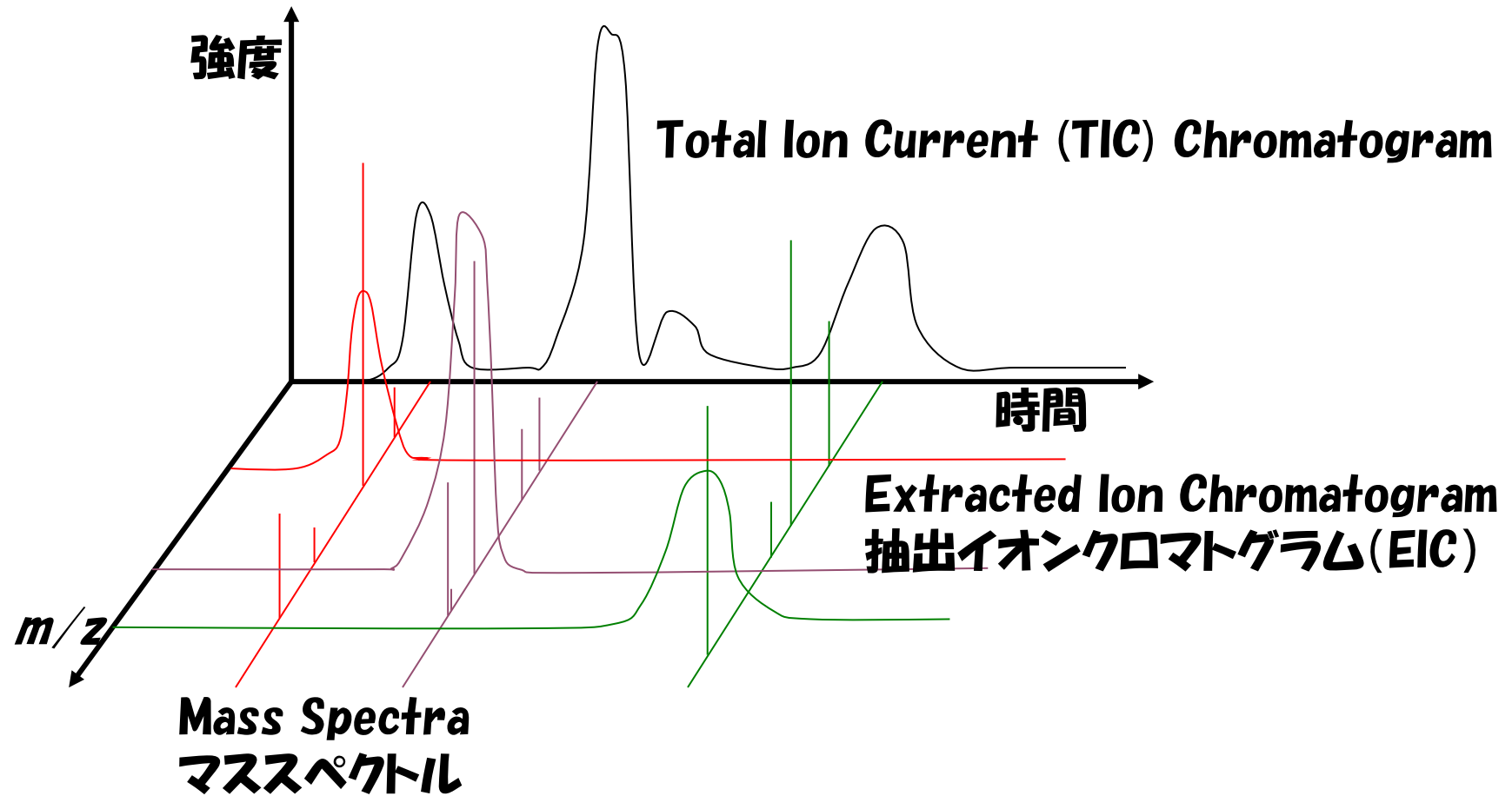
# **1. 質量分析の基礎**

## **マススペクトルから得られる情報**

# 質量分析計の概略



# GC/MS, LC/MSで得られるデータ





# 質量分析 = イオン(気相)の質量( $m/z$ )を測ること

- どうやってイオンの質量を測る？



- 質量分析計を使ってマススペクトルを測定

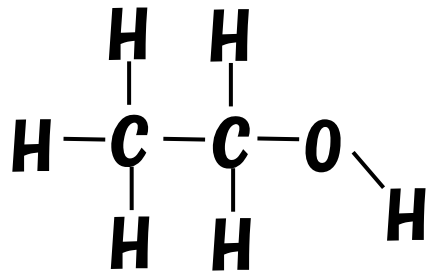
||

エチルアルコール分子を質量分析(EI/MS)すると？

原子や分子をイオン化



質量を計測

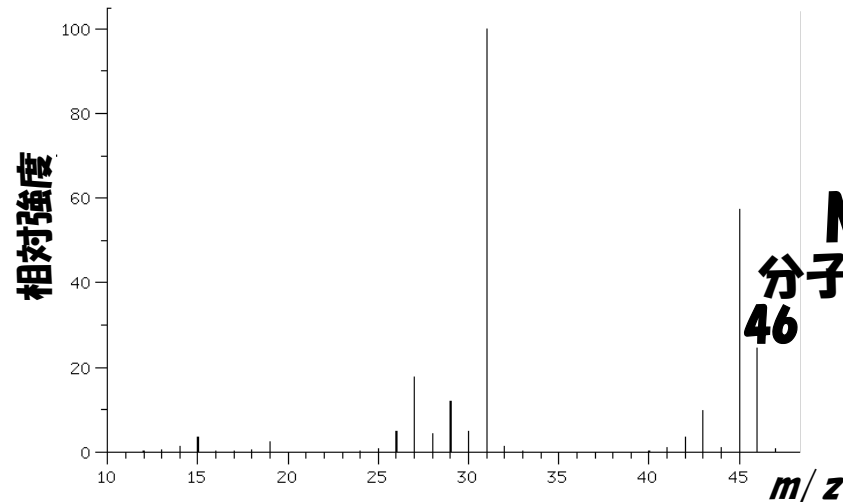


質量: 約46

元の分子の  
質量を推測

分子から電子  
が1つ脱離し  
たイオン

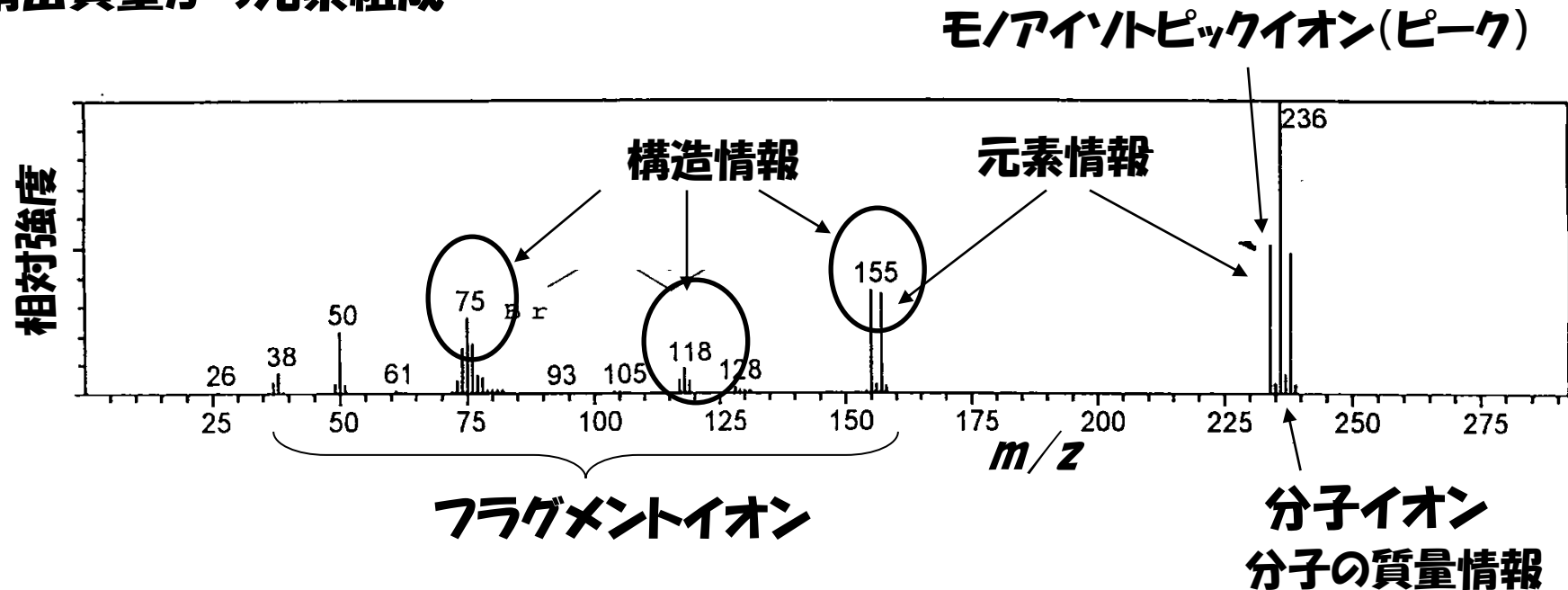
$M^+$   
分子イオン  
46



エチルアルコールのEIマススペクトル

# マススペクトルから何が解る(推測できる)?

- 分子イオンや分子質量関連イオンの  $m/z$  値から 分子の質量  
(分子の構造を保持したイオン) ↙ 多くの場合分子量ではない!
- フラグメントイオンの  $m/z$  値から分子の部分構造
- 同位体イオンピークの高さから構成元素の種類と数  
精密質量から元素組成



# 質量分析におけるイオン化とは？

電子励起によるイオン化

EI, LD, (FD, APCI)

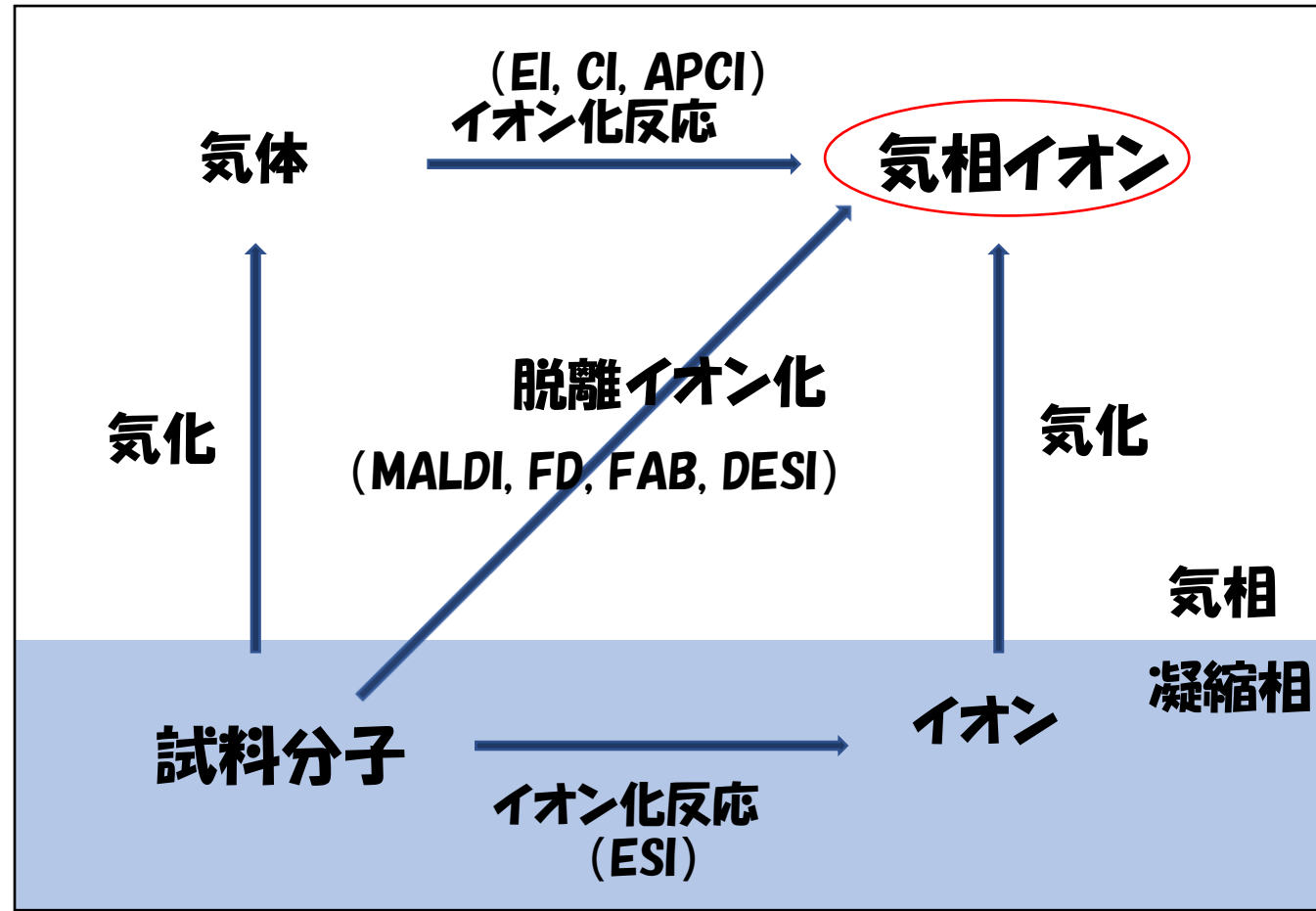
$M^{\cdot+}$ が生成

プロトン移動によるイオン化

CI, FD, FAB, ESI, APCI, MALD

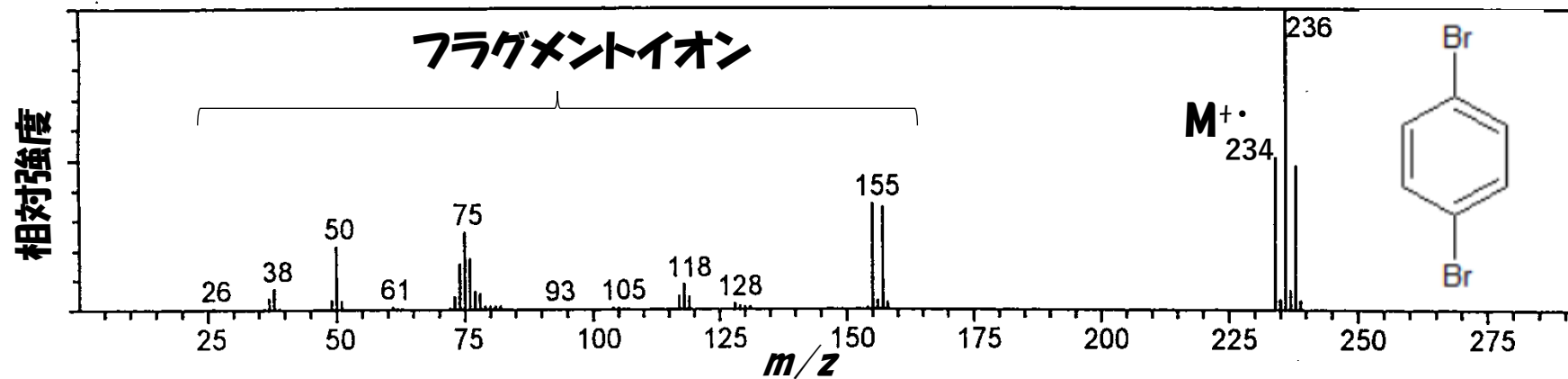
$[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ などが生成

イオン化法と生成しやすい  
イオン種との関係

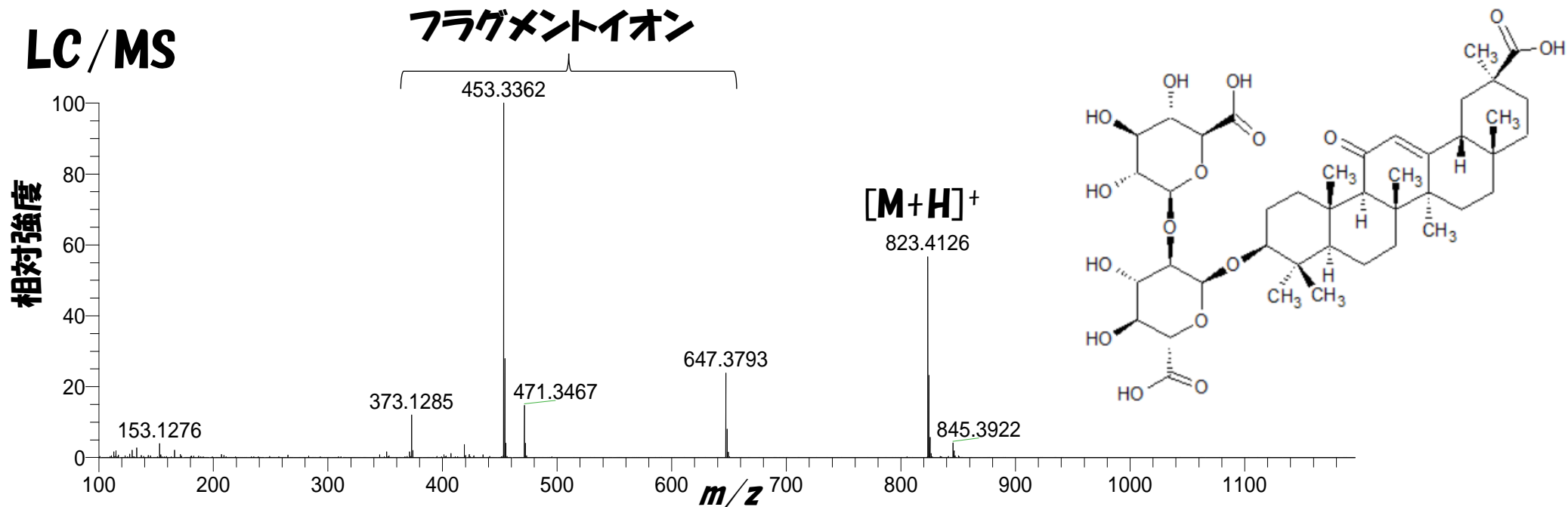


# マススペクトル例

## GC/MS



## LC/MS

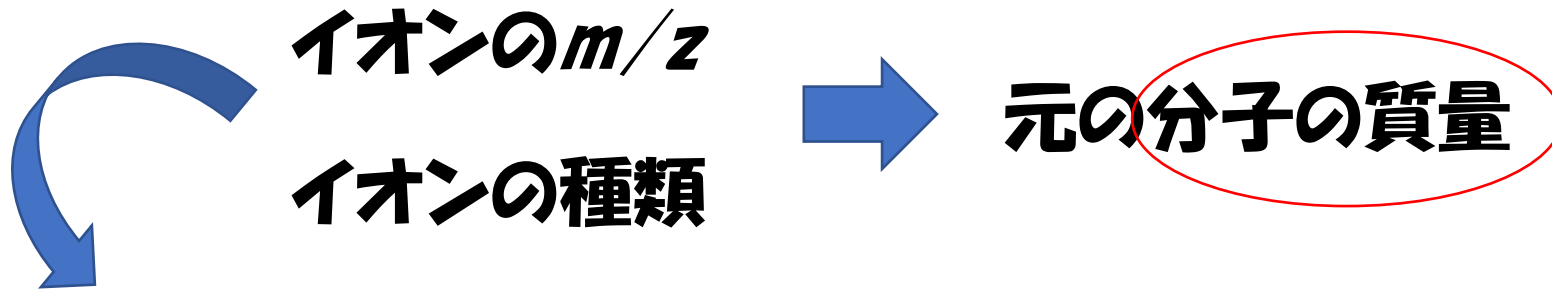


# マススペクトルから分子の質量を推測するには？

マススペクトルの横軸 =  $m/z$

$m$ : イオンの質量を統一原子質量単位で除した値  $\equiv$  イオンの質量

$z$ : イオンの電荷数



結合が開裂せずに生成したイオンであること！

分子イオン ( $M^{+\cdot}$ )、分子質量関連イオン ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  など)

# マススペクトルの横軸 $m/z$ とは

質量分析で扱う質量は、統一原子質量単位が基本

$m$ : イオンの質量を統一原子質量単位で割った値

$z$ : イオンの電荷数

$m/z$

$m$ と $z$ はイタリックで表記  
無次元量

$z$ が1(1価イオン)の時、 $m/z$ はイオンの質量に等しくなる

# 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 ⇒  $^{12}\text{C}$ の質量の $1/12$   
記号は Da または u

SI単位では  
 $1.66 \times 10^{-27}$  kg



# 原子・分子の質量 と 原子量・分子量

質量分析で測定される質量は個々(同位体を区別した)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原子量や分子量とは異なる。

**原子量:** 相対原子質量(Relative atomic mass)ともいう。

炭素原子  $^{12}\text{C}$  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。ある元素の原子量は、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

**分子量:** 相対分子質量(Relative molecular mass)ともいう。


炭素原子  $^{12}\text{C}$  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。ある分子の分子量は、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。

原子量 & 分子量 = 相対値 → 単位をもたない



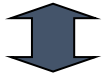
# ノミナル質量(整数質量)と精密質量

陽子と中性子の数の和  
**質量数(mass number)**

ノミナル質量(nominal mass) 

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


(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

測定精密質量  
**(accurate mass)**

計算精密質量(exact mass) 

炭素同位体 $^{12}\text{C}$ の質量を基準値として $12.000000\text{u(or Da)}$ 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。

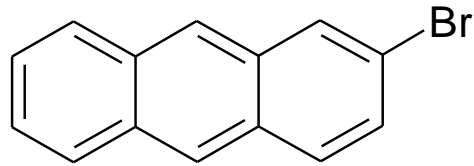
(例)  $^1\text{H}=1.007825$ ,  $^{16}\text{O}=15.994917$ ,  $^{14}\text{N}=14.003074$ ,  $^{35}\text{Cl}=34.968853$  など

# 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	1	1.007825	99.9885	1.00794
		2	2.014102	0.0115	
6	C	12	12	98.93	12.0107
		13	13.00336	1.07	
7	N	14	14.00307	99.632	14.0067
		15	15.00011	0.368	
8	O	16	15.99492	99.757	15.9994
		17	16.99913	0.038	
		18	17.99916	0.205	
16	S	32	31.97207	94.93	32.065
		33	32.97146	0.76	
		34	33.96787	4.29	
		36	35.96708	0.02	
17	Cl	35	34.98665	75.78	35.453
		37	36.9659	24.22	
35	Br	79	78.91834	50.69	79.904
		81	80.91629	49.31	

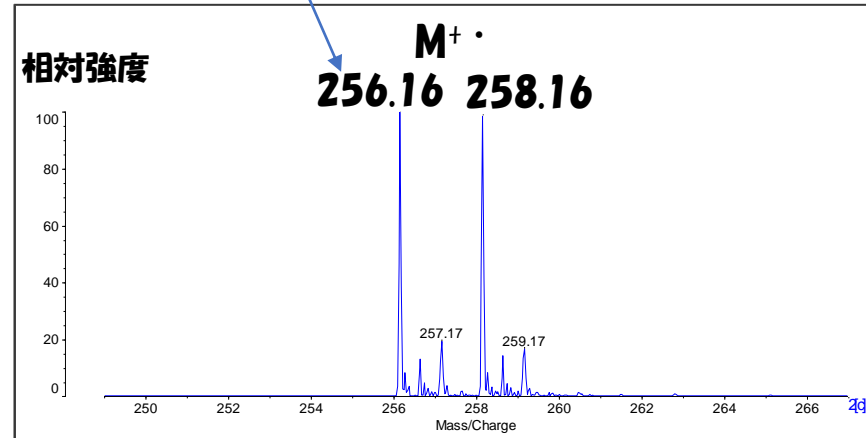
# マススペクトルから得られる分子質量情報

## 2-ブロモアントラセン



**C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Br**  
ノミナル質量 **256**  
モノアイソトピック質量 **255.9888**  
分子量 (相対分子質量) **257.1298**

## モノアイソトピックイオン

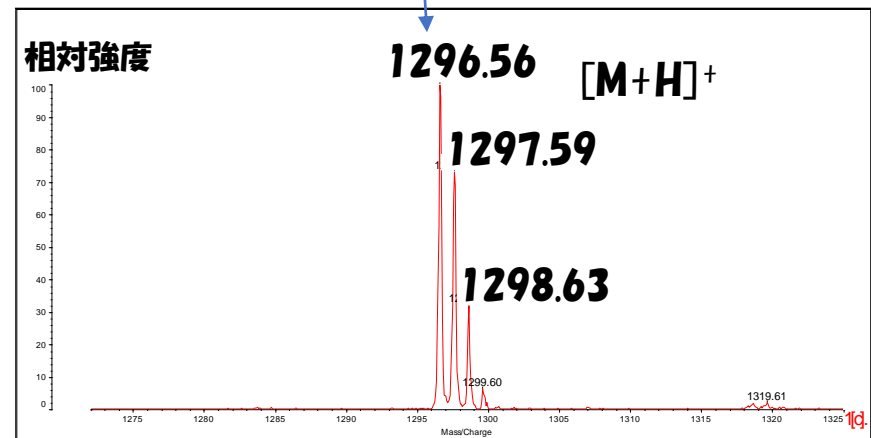


## アンジオテンシン-I

NH<sub>2</sub> - Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His -  
Pro - Phe - His - Leu - COOH

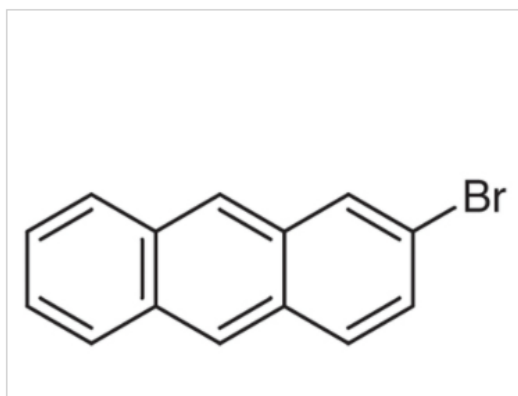
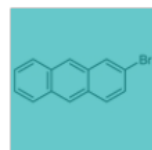
**C<sub>62</sub>H<sub>89</sub>N<sub>17</sub>O<sub>14</sub>**  
ノミナル質量 **1295**  
モノアイソトピック質量 **1295.6775**  
分子量 (相対分子質量) **1296.4987**

## モノアイソトピックイオン



CAS RN: 7321-27-9 | 製品コード: B2616

2-Bromoanthracene



純度 (試験方法) : &gt;97.0%(GC)

別名:  
2-ブロモアントラセン

ドキュメント:

[SDS](#) | [規格表](#) | [試験成績書・各種証明書検索](#) | [分析チャート](#)

## 基本情報

## 規格値・物性値

## 法規情報

## 利用例

製品コード

B2616

純度 (試験方法)

&gt;97.0%(GC)

分子式・分子量

C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Br = 257.13

物理的状態 (20℃)

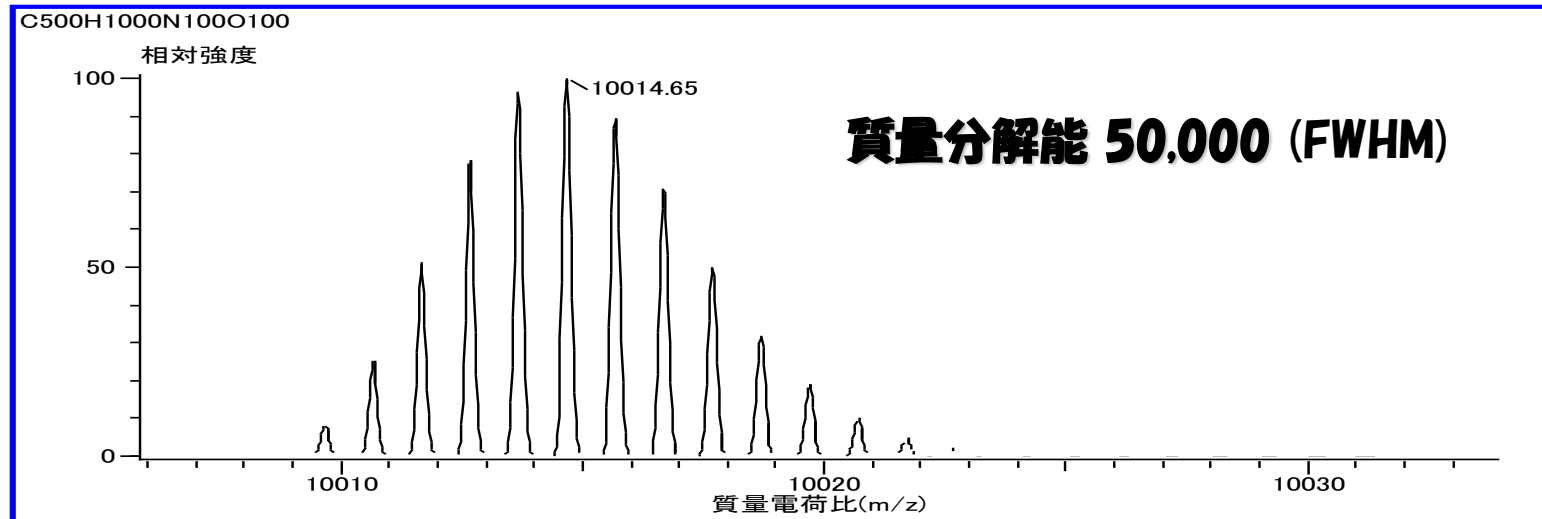
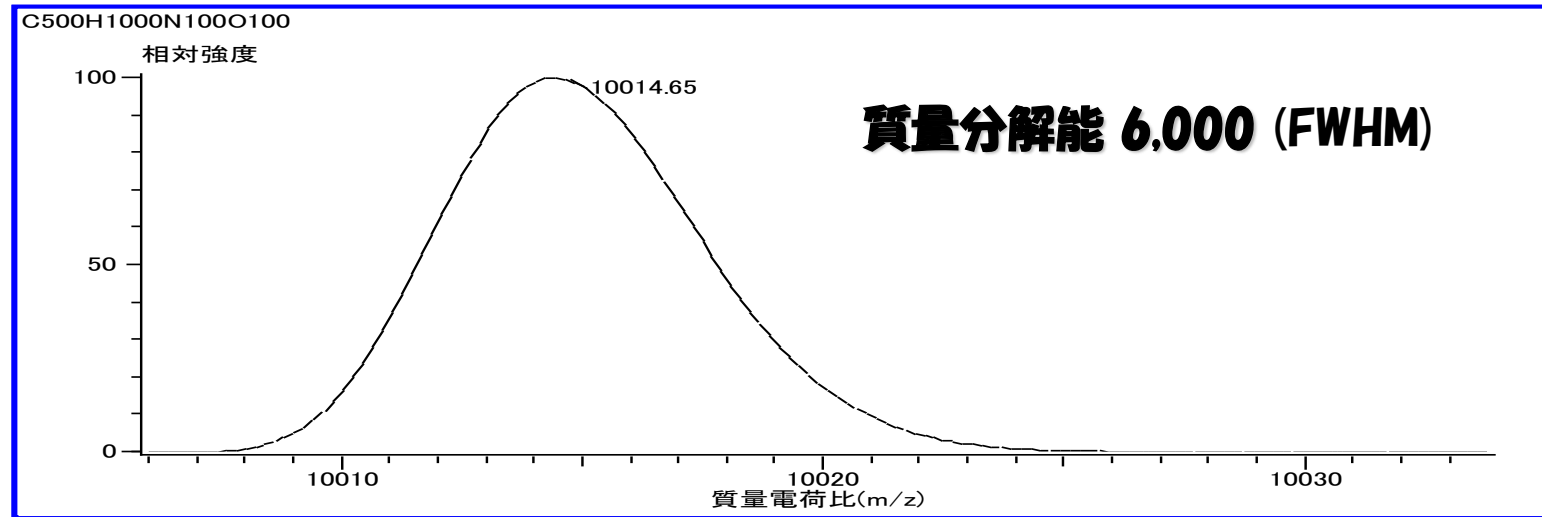
固体

CAS RN

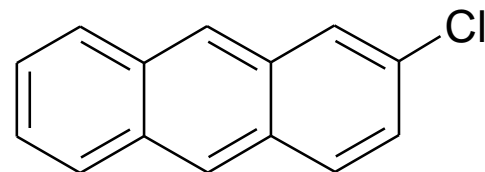
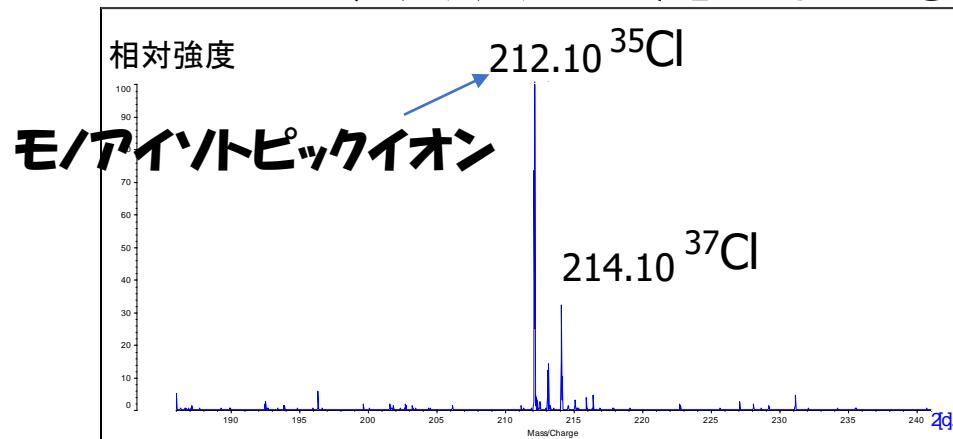
7321-27-9

# 質量分解能と分子質量・相対分子質量

分子量約10,000の物質を質量分解能6,000と50,000のMS装置で分析したら...

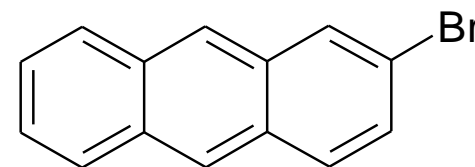
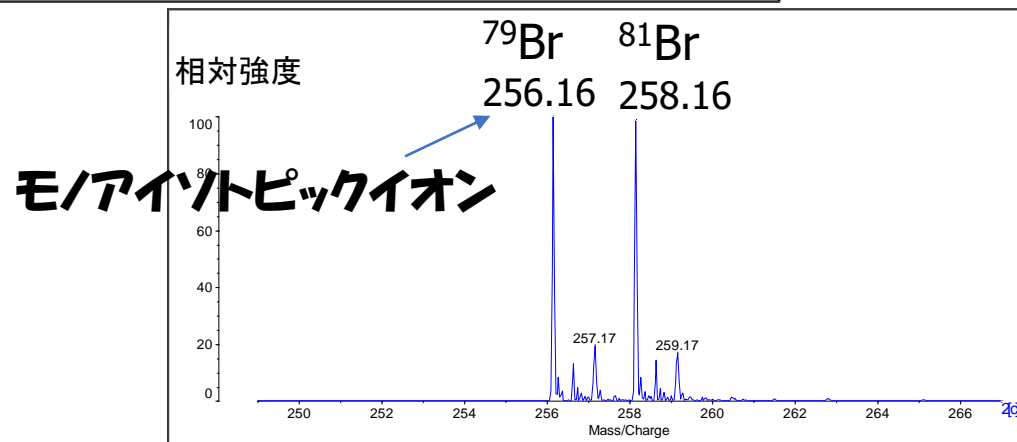


# マススペクトルにおける同位体パターン



$C_{14}H_9Cl$

モノアイソトピック質量 212.0393



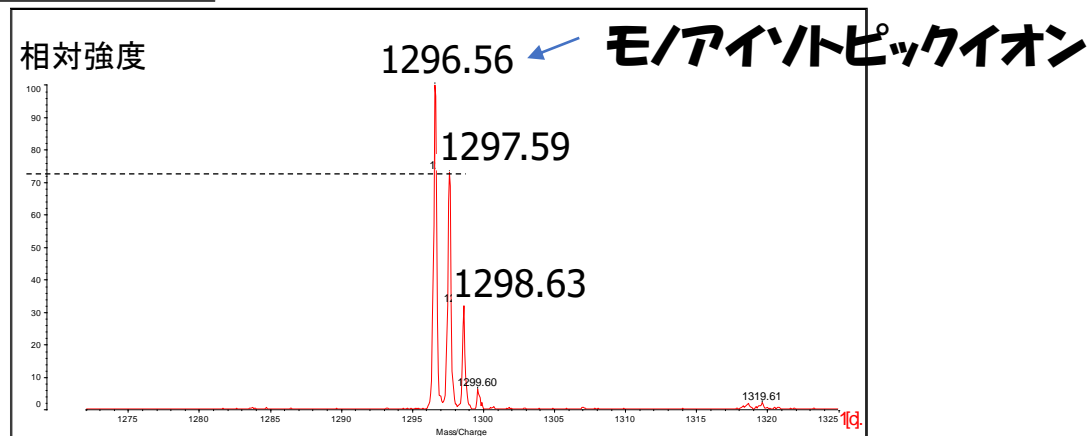
$C_{14}H_9Br$

モノアイソトピック質量 255.9888

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

$C_{62}H_{89}N_{17}O_{14}$

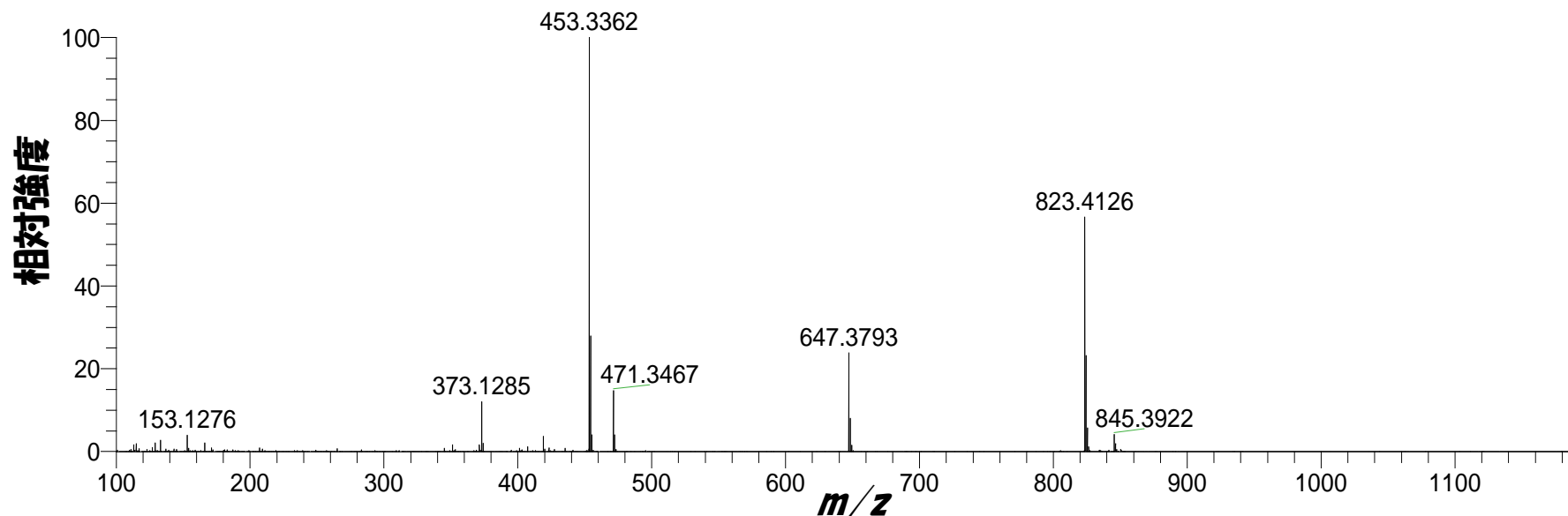
モノアイソトピック質量 1295.6775



# 間違い易い用語-1

・質量、相対分子質量(分子量)、質量数、 $m/z$

例えば、このマススペクトルで観測されているイオンを説明するのに...



質量数 823.4126 のイオン →×

分子量 823.4126 のイオン →×

質量 823.4126 のイオン →△

$m/z$  823.4126 のイオン →○

$Z=1$ である事を明言すれば

↳ 質量 823.4126 のイオン →○

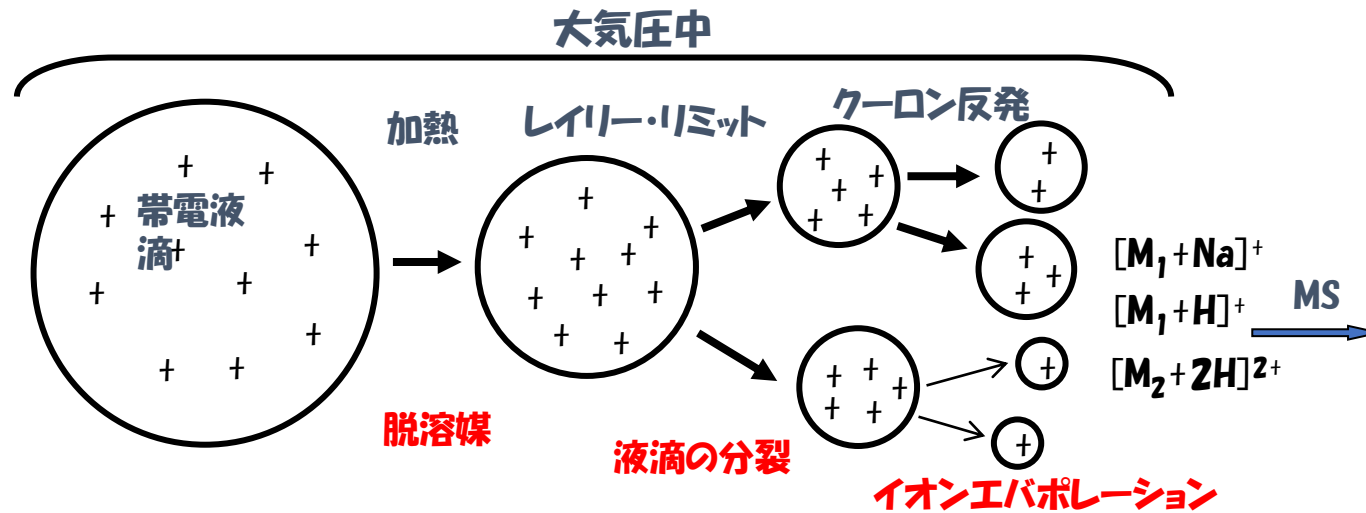
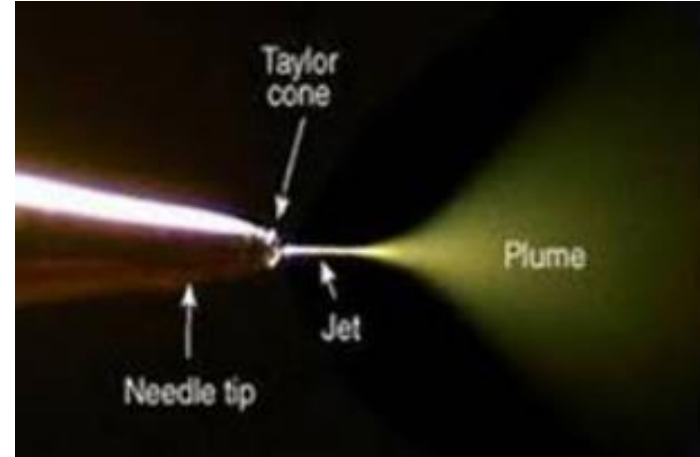
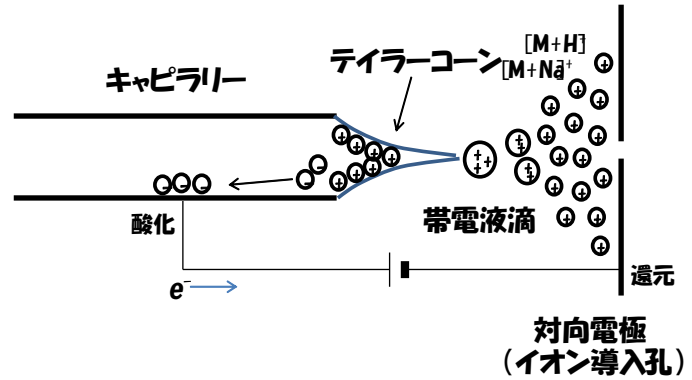
## **2. LC/MSにより得られるマススペクトルの読み方**

### **2-1. イオン化法と生成するイオン種**

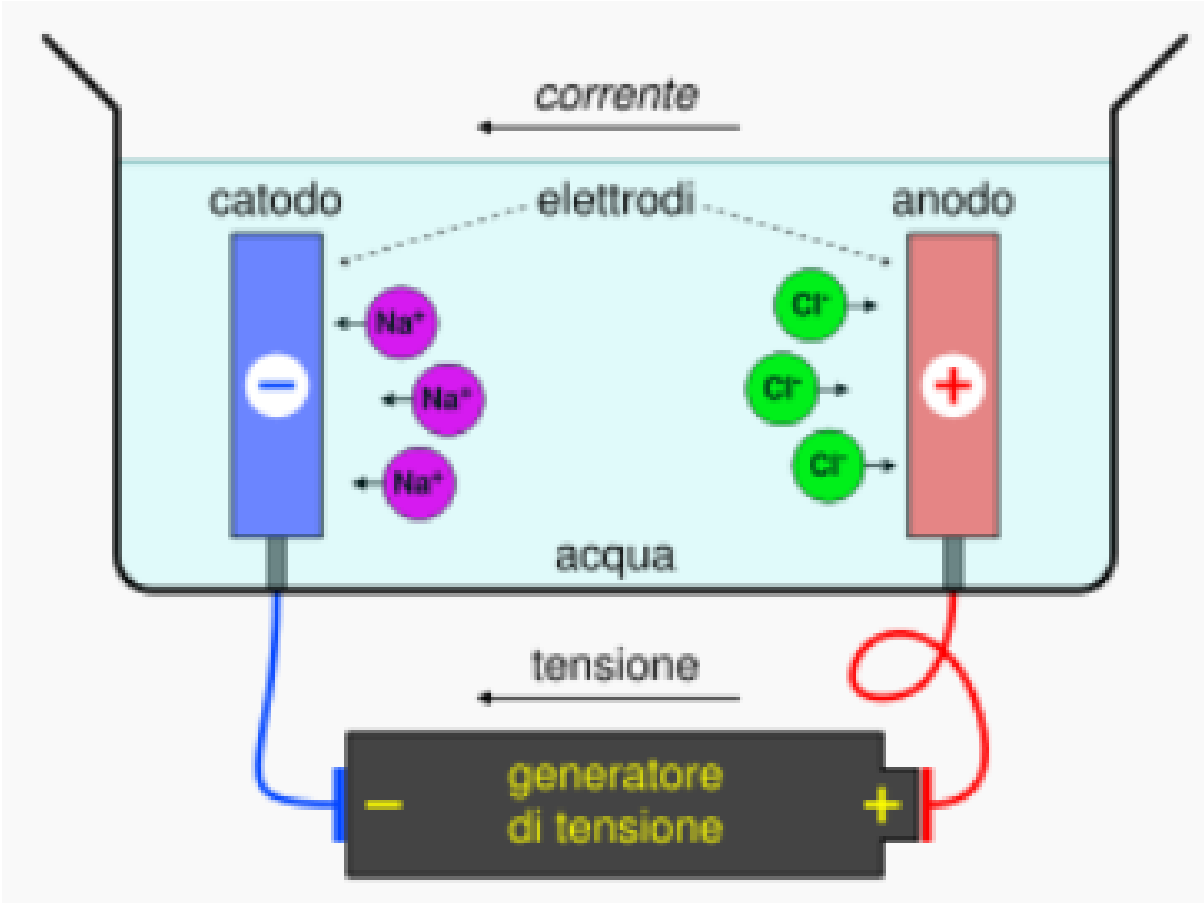
### **2-2. イオン種の解釈と分子質量の推測**



# エレクトロスプレーイオン化(ESI)



# 電氣分解

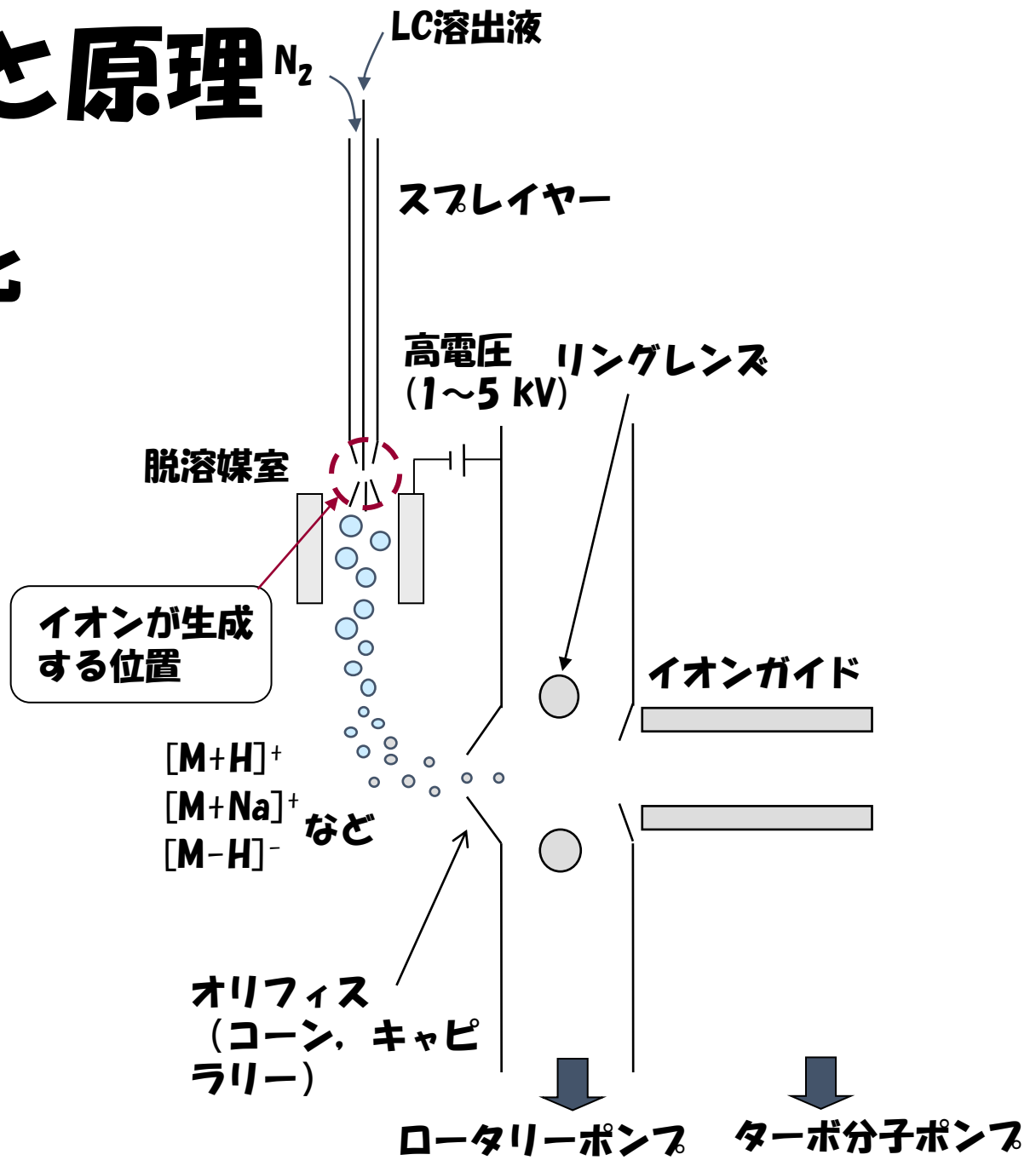


# ESIの構造と原理

## 液相でのイオン化

高電界による静電噴霧 +  
ガス圧による噴霧 → 帯電  
液滴の生成 → 加熱・脱溶  
媒 → イオン蒸発

適する移動相流量：  
0.2 mL/min



# APCIの構造と原理

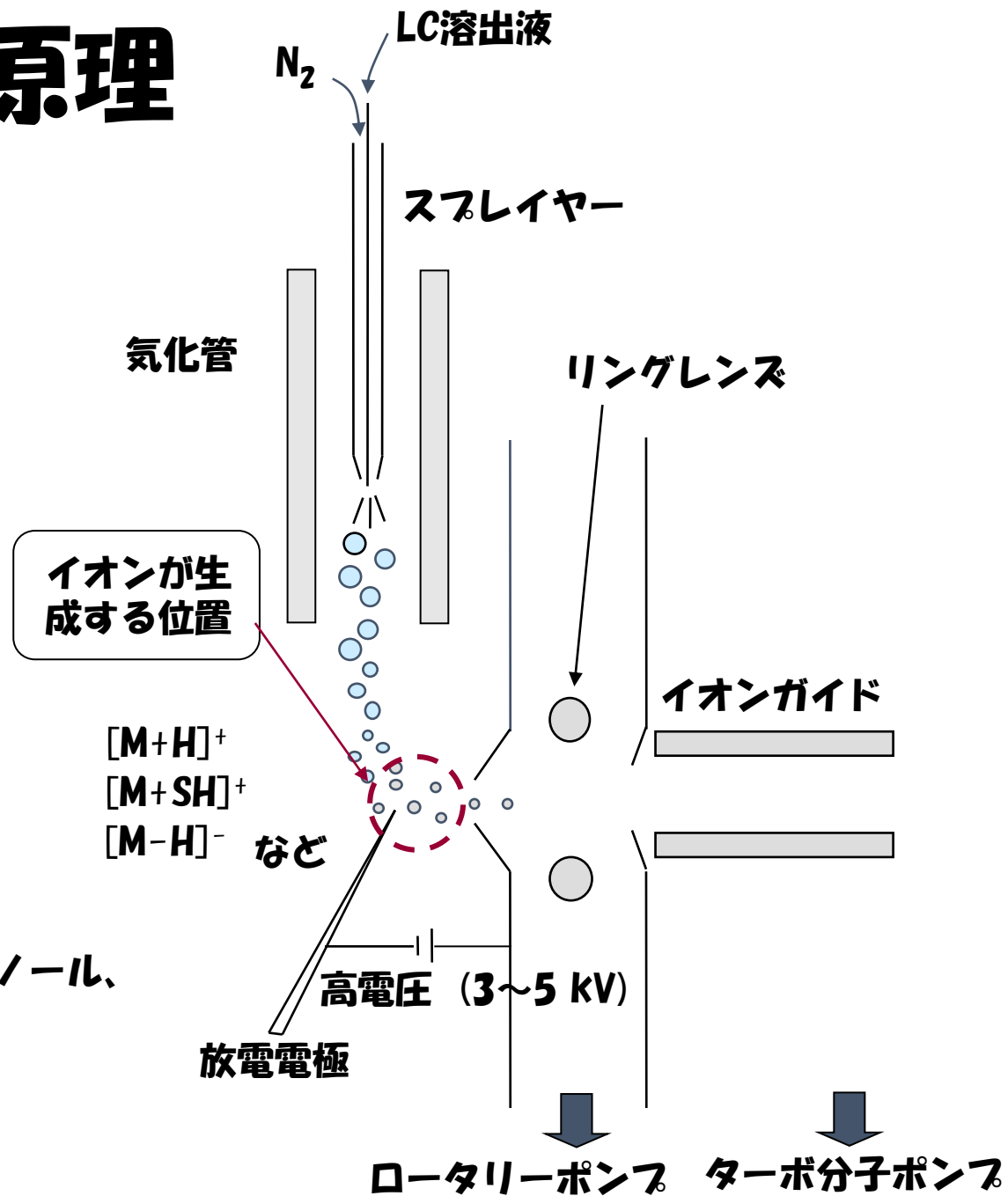
## 気相でのイオン化

高圧ガスによる噴霧 → 加熱・  
気化 → コロナ放電 → 溶媒分  
子イオンの生成

→ 溶媒イオンと試料分子の衝  
突 → 試料イオン生成

適する移動相流量：  
**1 mL/min**

SH：プロトン化した溶媒分子（メタノール、  
アセトニトリルなど）



# ESI or APCI

ESI: 液相でのイオン化 → 溶液中での電荷分離

極性溶媒が必要 → 極性化合物に適していると言われている  
低極性溶媒が主の場合、20%程度の極性溶媒が必要

必要最低条件:  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ などの付加  
 $H^+$ の脱離、 $Cl^-$ などの付加

これらに關与する官能基をもつ

窒素には $H^+$ が付加し易く、酸素には $Na^+$ ,  $NH_4^+$ が付加し易い。

APCI: 気相でのイオン化 → 気相単分子でのプロトン移動、電子脱離

加熱・気化が必要 → 気相単分子、反応試薬としての移動相溶媒

必要最低条件: 脱溶媒温度で熱分解しないこと

イオン化のエネルギー APCI > ESI

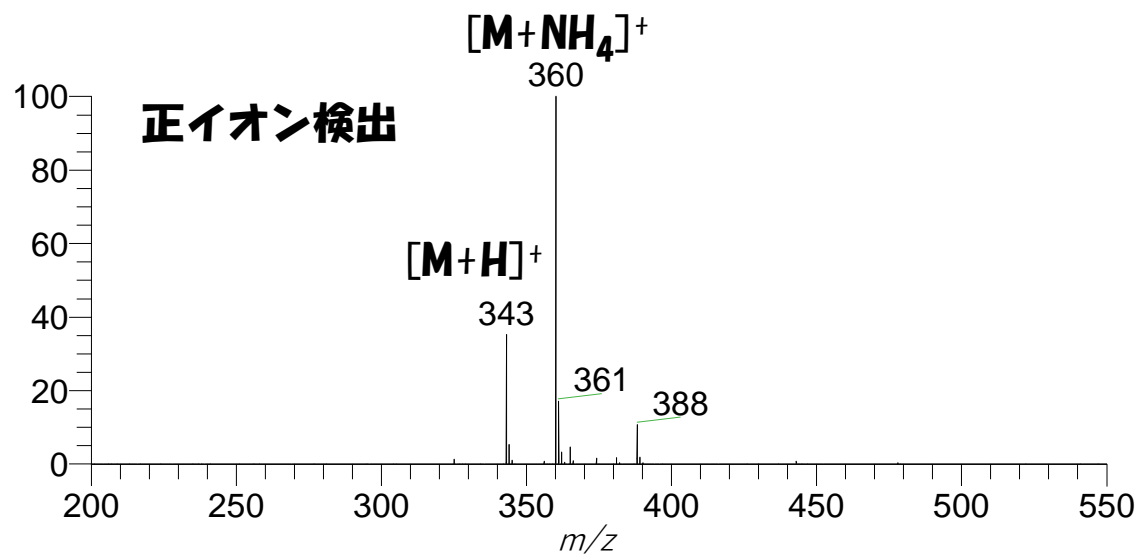
非共有電子対をもつ元素

# ESI, APCI(LC / MS)で観測されやすいイオン種

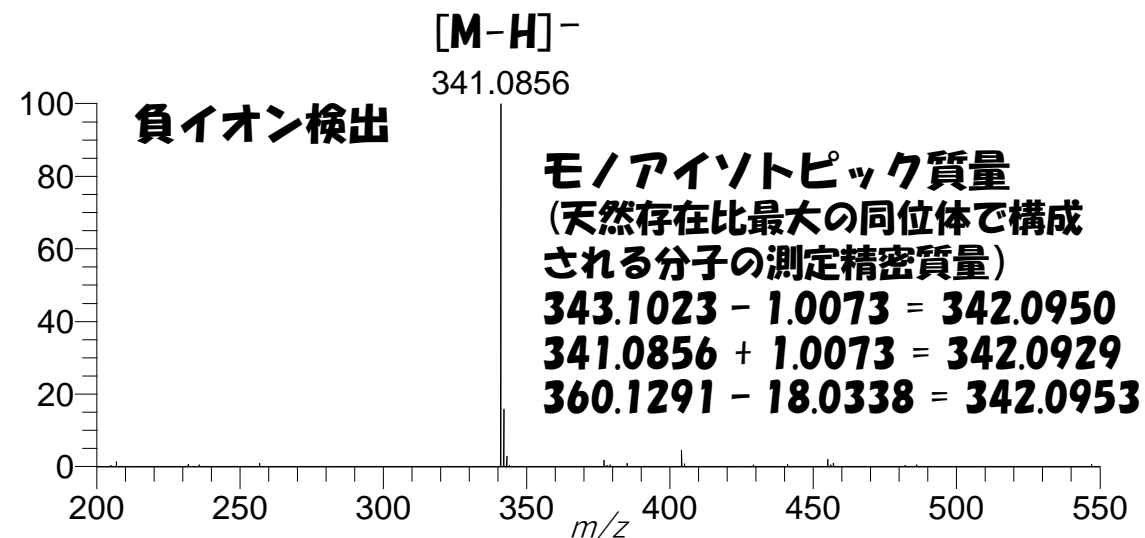
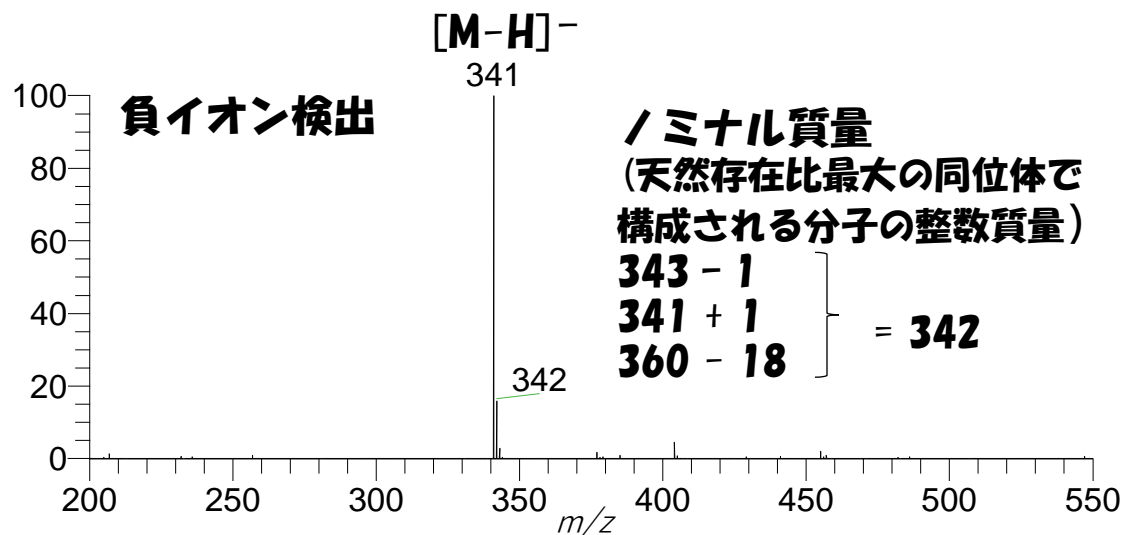
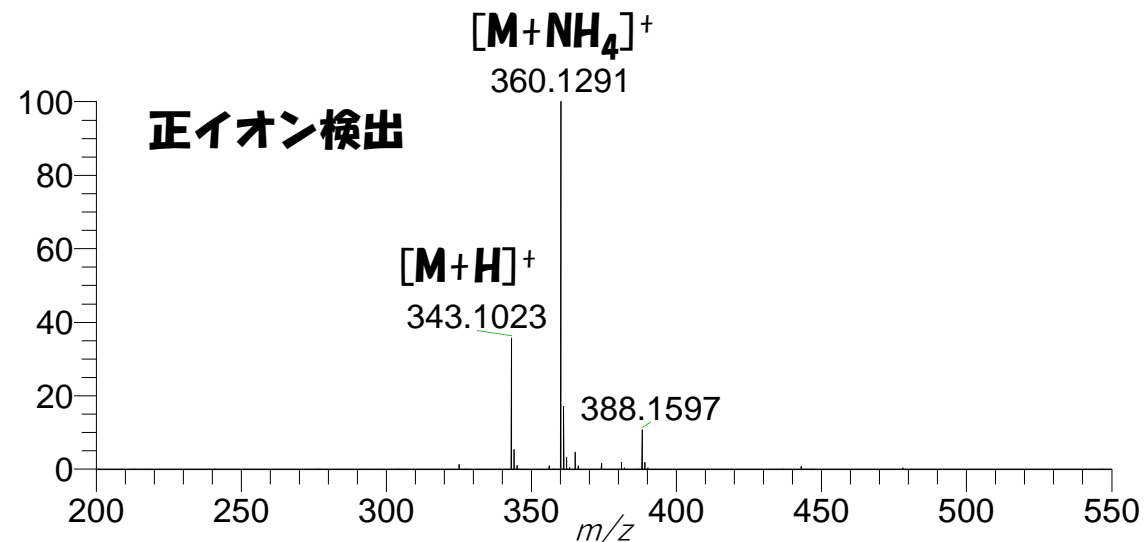
- ソフトイオン化
- プロトン付加分子 ( $[M+H]^+$ )、脱プロトン分子 ( $[M-H]^-$ )
- 溶媒、不純物の付加イオン
  - $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+H+Solv]^+$ ,  $[M+Cl]^-$ ,
- ESIでは多価イオン ( $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ )
- クラスターイオン ( $[2M+H]^+$ ,  $[3M+Na]^+$  ...)

# LC/MSのマススペクトルから得られる分子質量情報

## 低分解能質量分析計



## 高分解能質量分析計



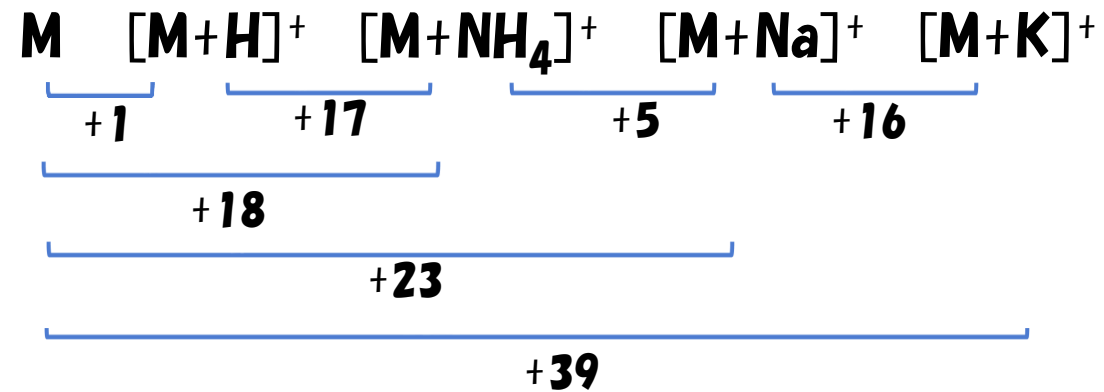
# 移動相溶媒と生成し易い付加イオン

イオン化法	極性	移動相溶媒	生成し易い付加イオン
ESI	+	メタノール	$[M + H]^+$ , $[M + Na]^+$ , $[M + K]^+$
	+	アセトニトリル	$[M + H]^+$ , $[M + NH_4]^+$ , $[M + Na]^+$
	+	含酢酸アンモニウム	$[M + H]^+$ , $[M + NH_4]^+$
APCI	+	メタノール	$[M + H]^+$ , $[M + H + CH_3OH]^+$
	+	アセトニトリル	$[M + H]^+$ , $[M + H + CH_3CN]^+$
	+	含酢酸アンモニウム	$[M + H]^+$ , $[M + NH_4]^+$
ESI	-	酸を含まない系	$[M - H]^-$ , $[M + Cl]^-$
	-	含酢酸, 酢酸アンモニウム	$[M - H]^-$ , $[M + Cl]^-$ , $[M + CH_3COO]^-$
	-	含ギ酸	$[M - H]^-$ , $[M + HCOO]^-$
	-	含酢酸アンモニウム	$[M - H]^-$ , $[M + CH_3COO]^-$
APCI	-	酸を含まない系	$[M - H]^-$ , $[M + Cl]^-$
	-	含酢酸, 酢酸アンモニウム	$[M - H]^-$ , $[M + CH_3COO]^-$
	-	含ギ酸	$[M - H]^-$ , $[M + HCOO]^-$
	-	含酢酸アンモニウム	$[M - H]^-$ , $[M + CH_3COO]^-$

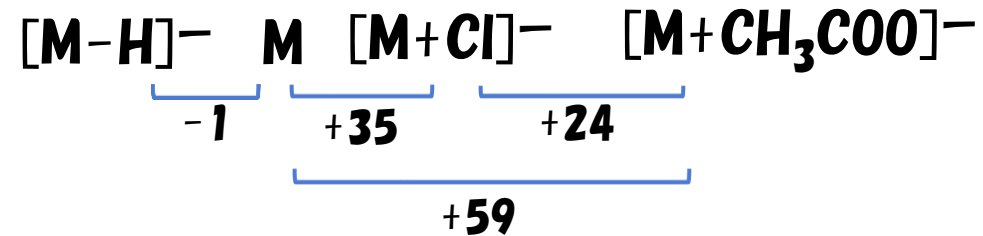


# ESIで生成し易いイオン種と質量( $m/z$ )差

## 正イオン



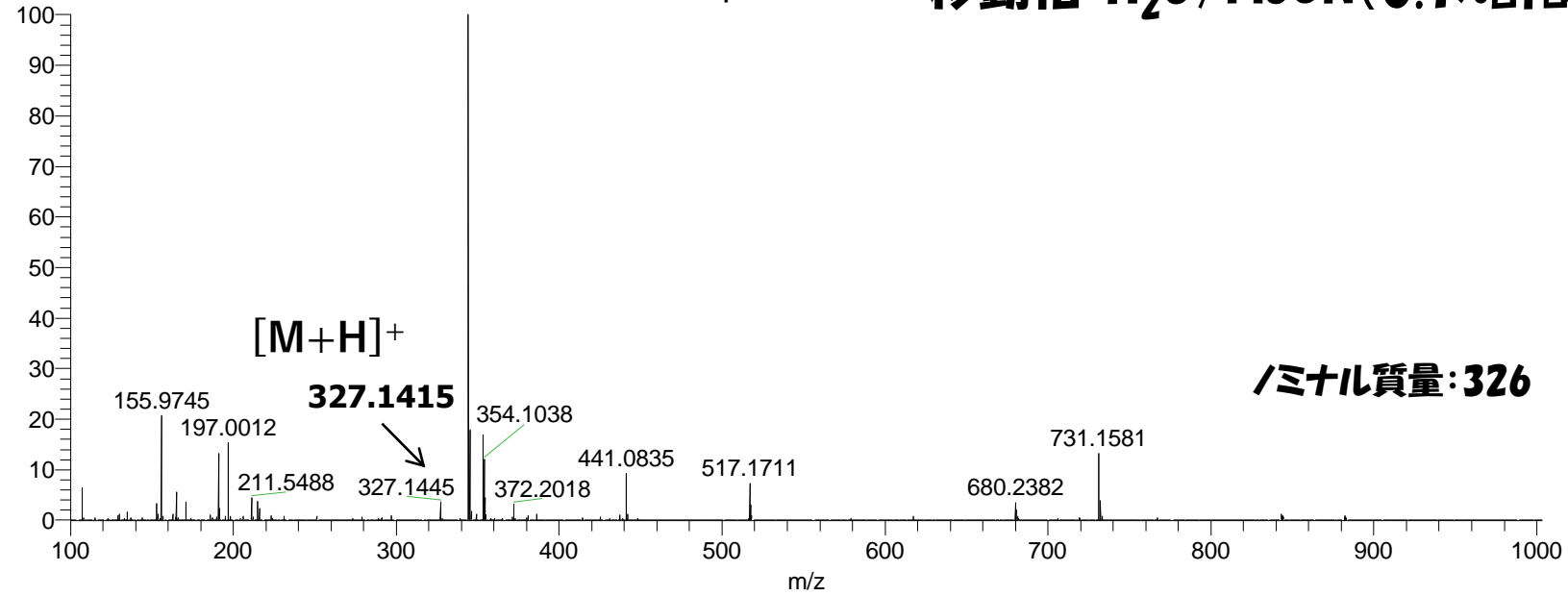
## 負イオン



# 正イオンESI

344.1715 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

移動相:H<sub>2</sub>O/MeCN(0.1%酢酸)



ノミナル質量:326

# 負イオンESI

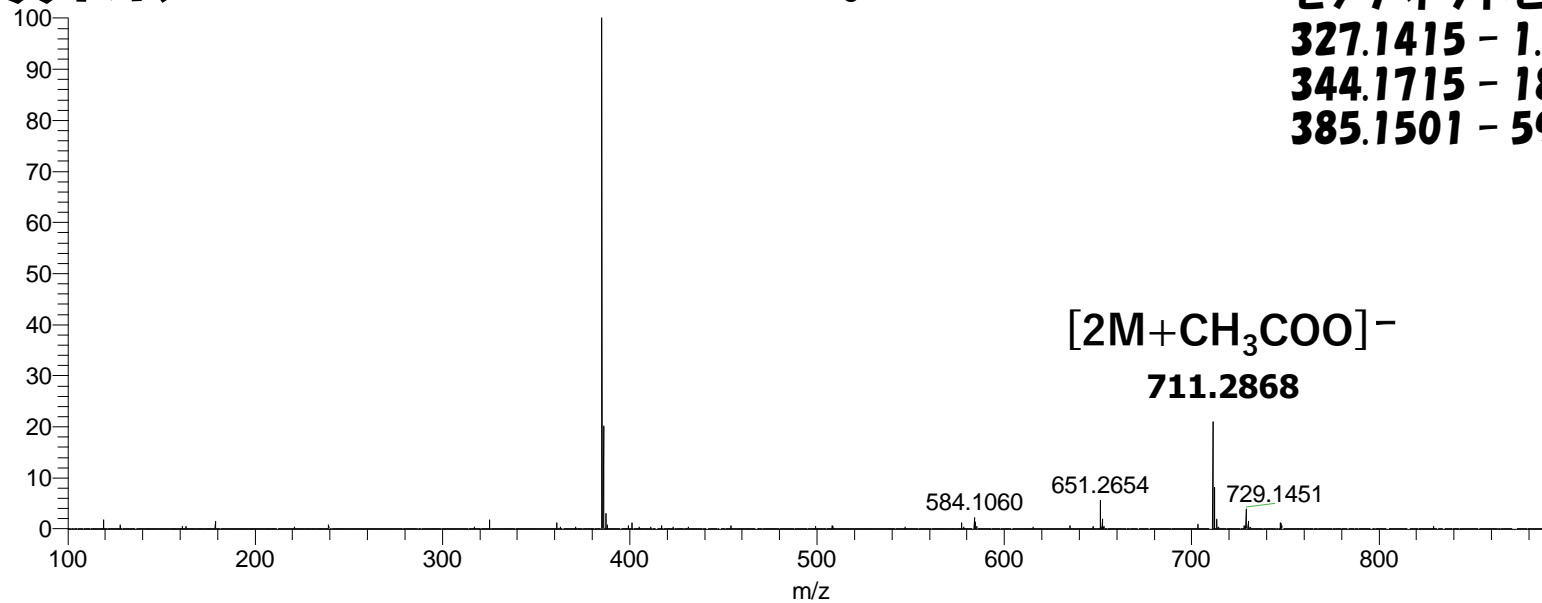
385.1501 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>

モノアイソトピック質量

327.1415 - 1.0073 = 326.1342

344.1715 - 18.0338 = 326.1377

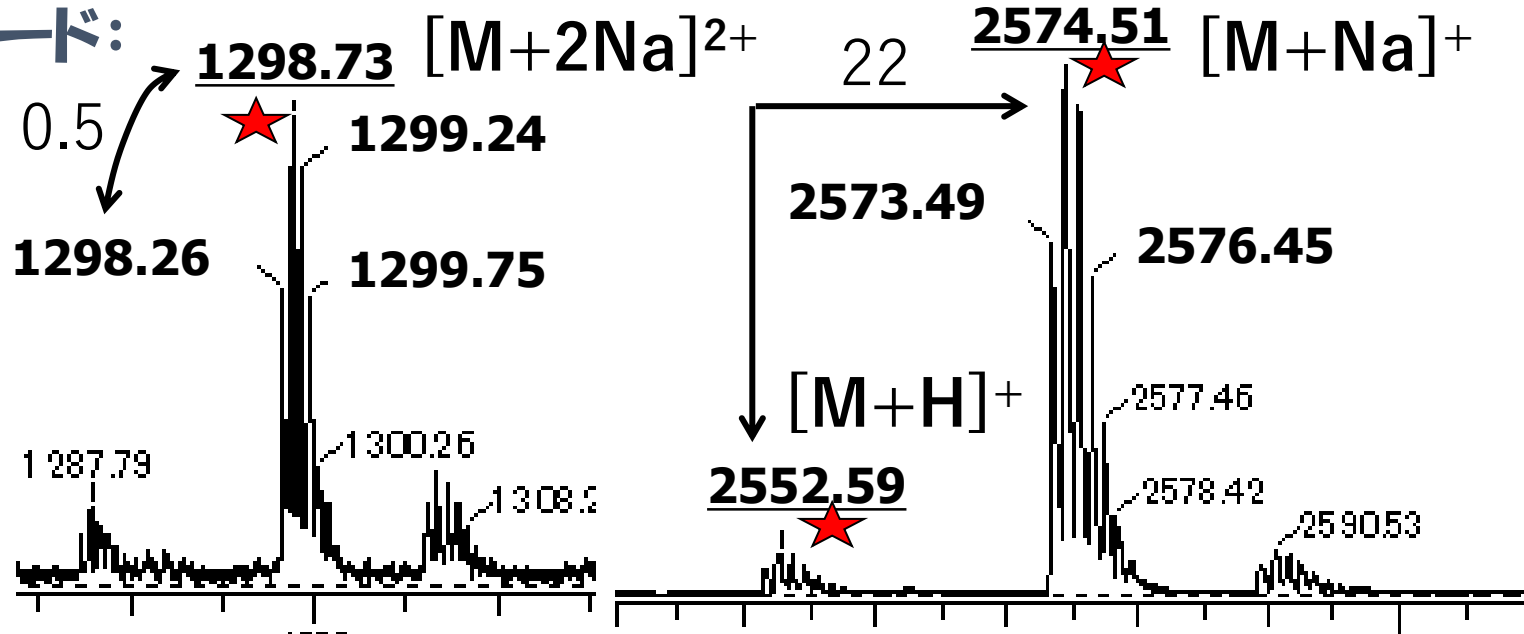
385.1501 - 59.0128 = 326.1373



[2M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>

711.2868

イオン化モード:  
ESI+



試料: ペプチド

分子質量

モノアイソトピック質量:

相対分子質量:

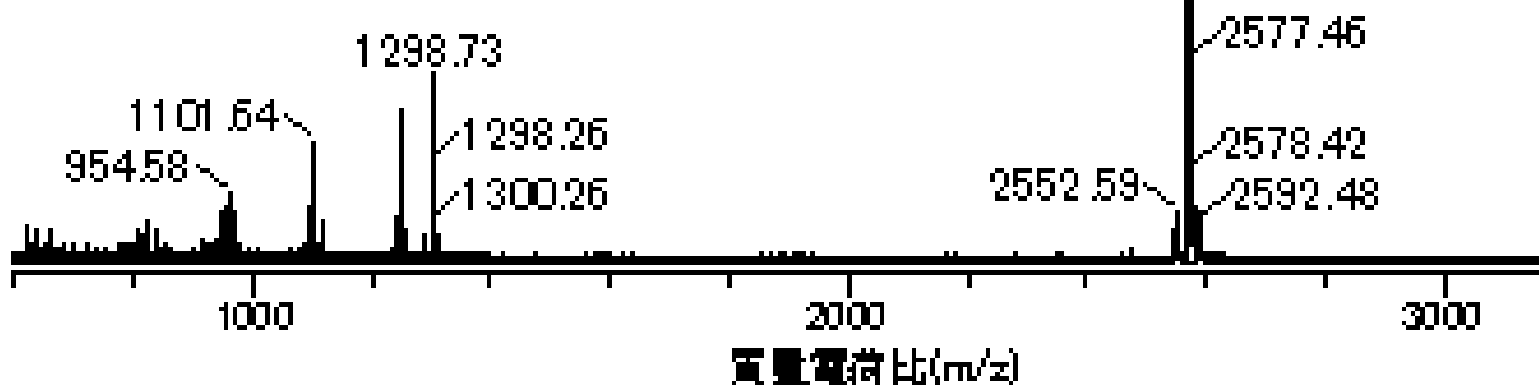
約2550.6

約2552.1

原子質量

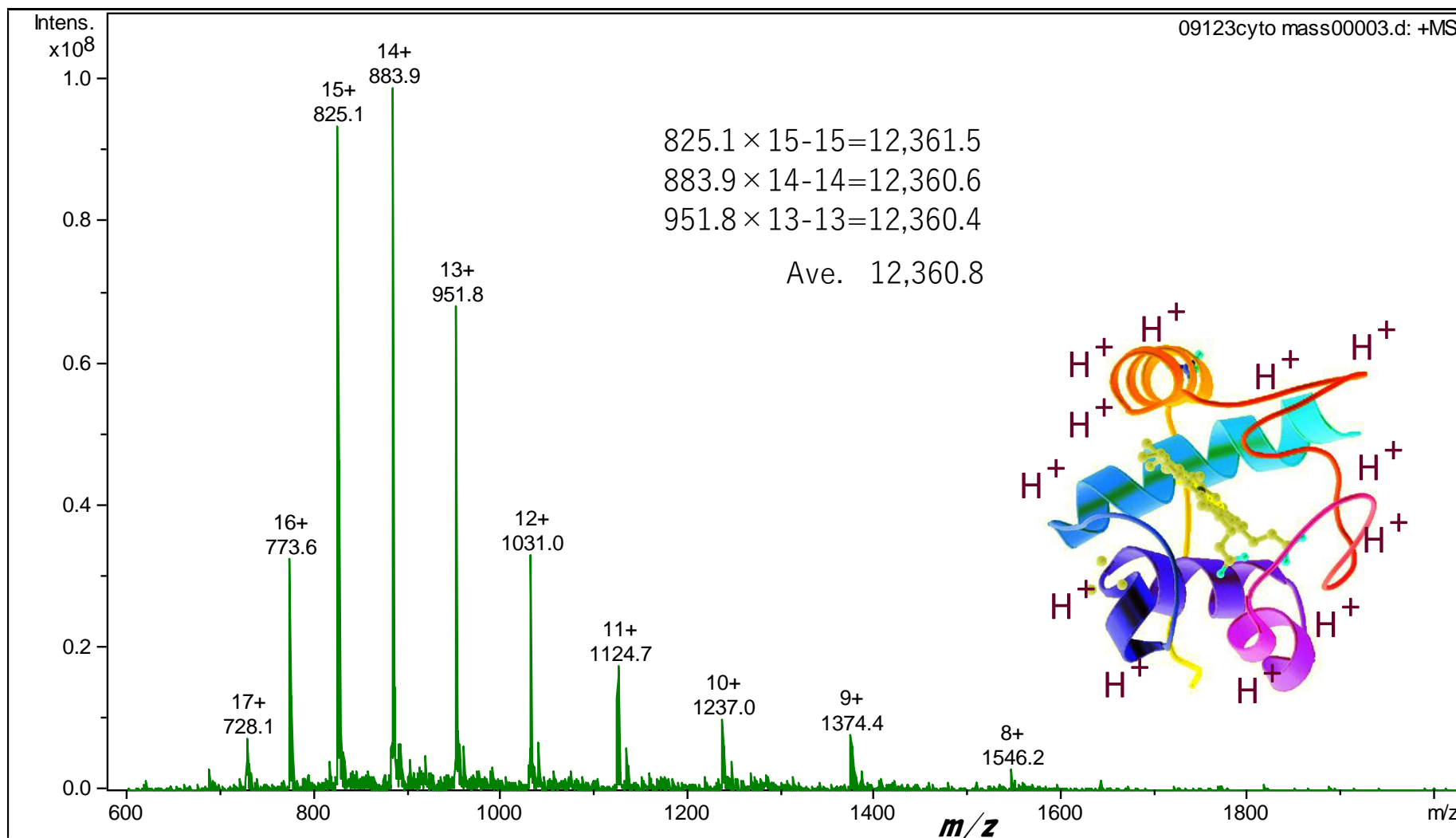
H: 1

Na: 23



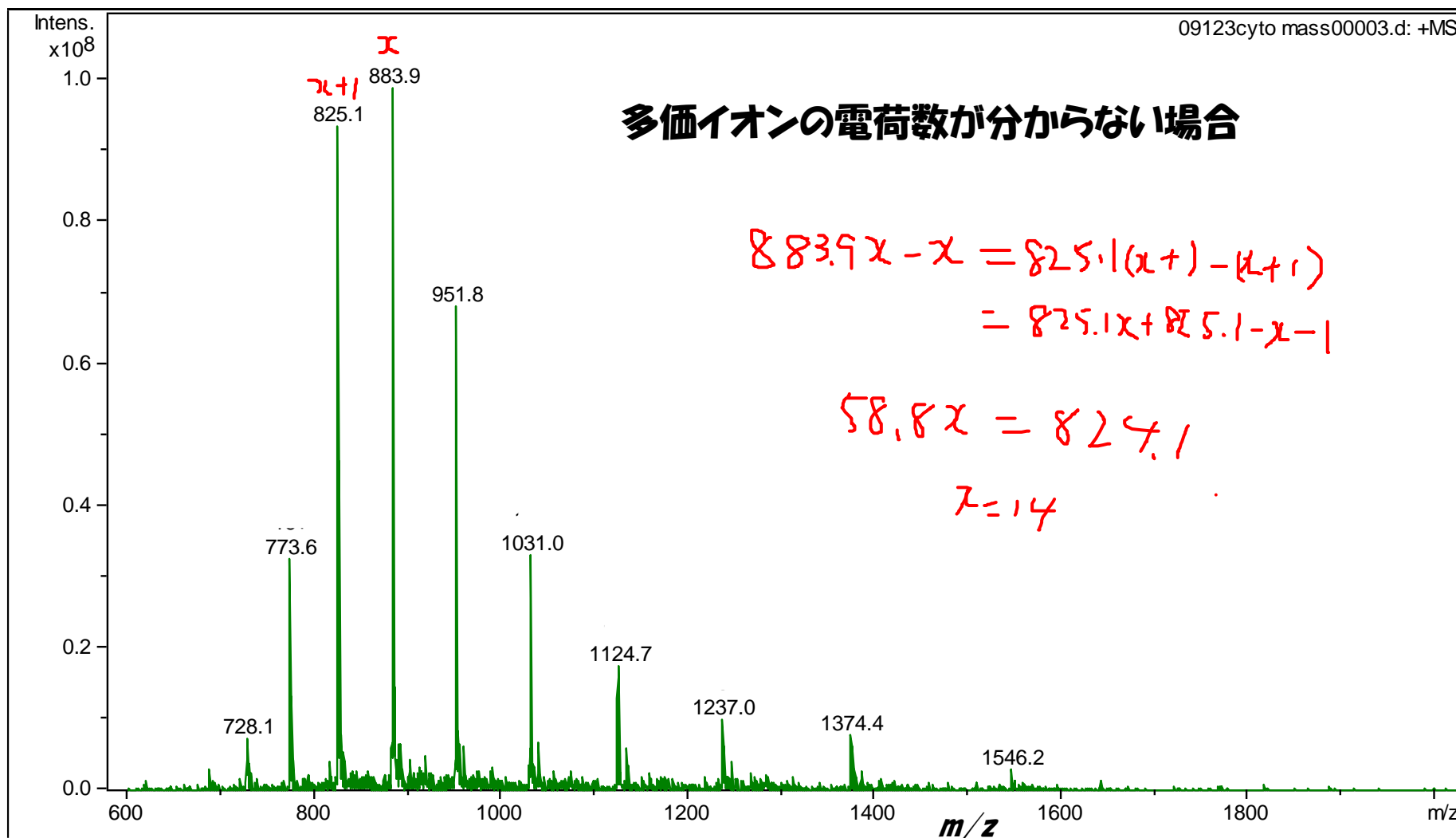
# タンパク質のマスマスペクトル

## 多価イオンスペクトルからの分子量(分子質量)計算



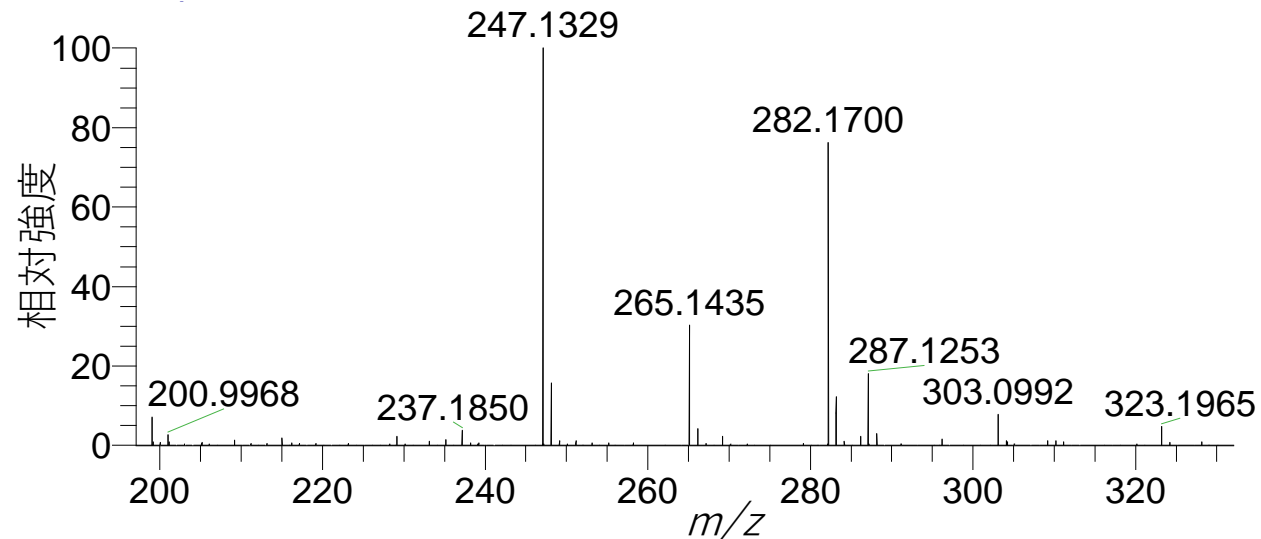
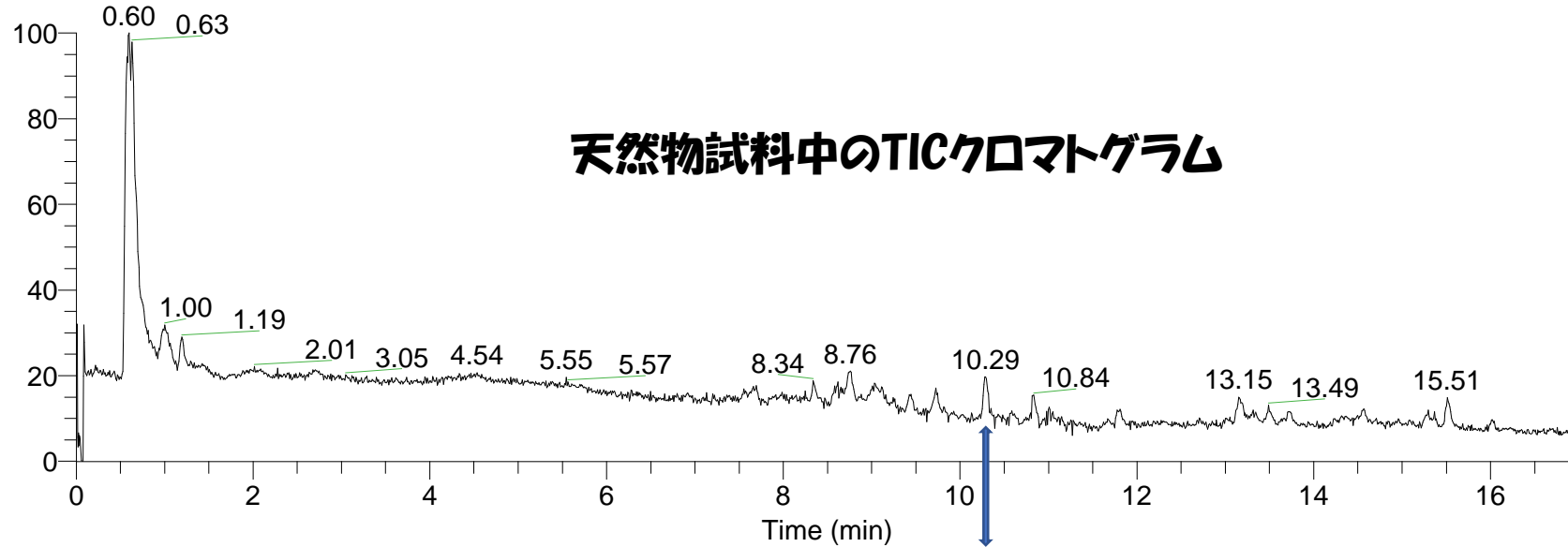
# タンパク質のマスマスペクトル

## 多価イオンスペクトルからの分子量(分子質量)計算



# LC/MSのマスをスペクトルを読む

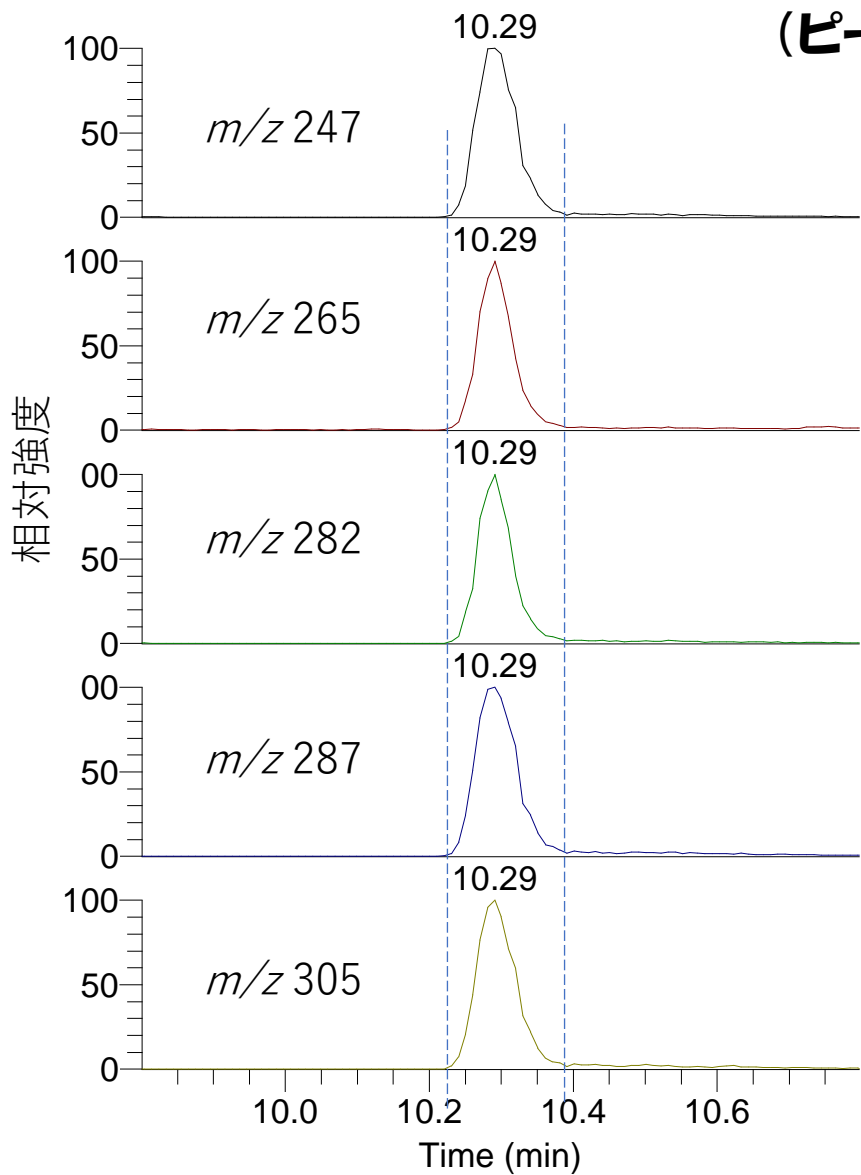
RT: 0.00 - 17.00



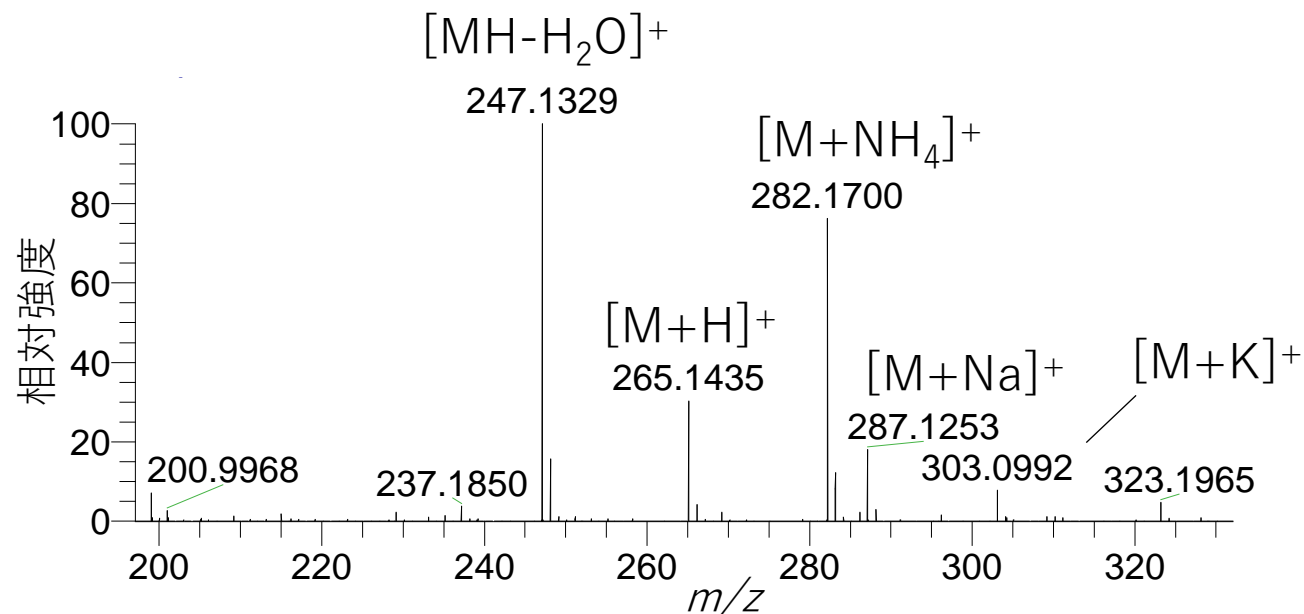
# LC/MSのマスペクトルを読む

抽出イオンクロマトグラム(EIC)

複数のイオンが観測されている時、それらが同一成分か否かを確認  
(ピークトップ、ピークの立上り・立下りの位置、ピーク形状の同一性)



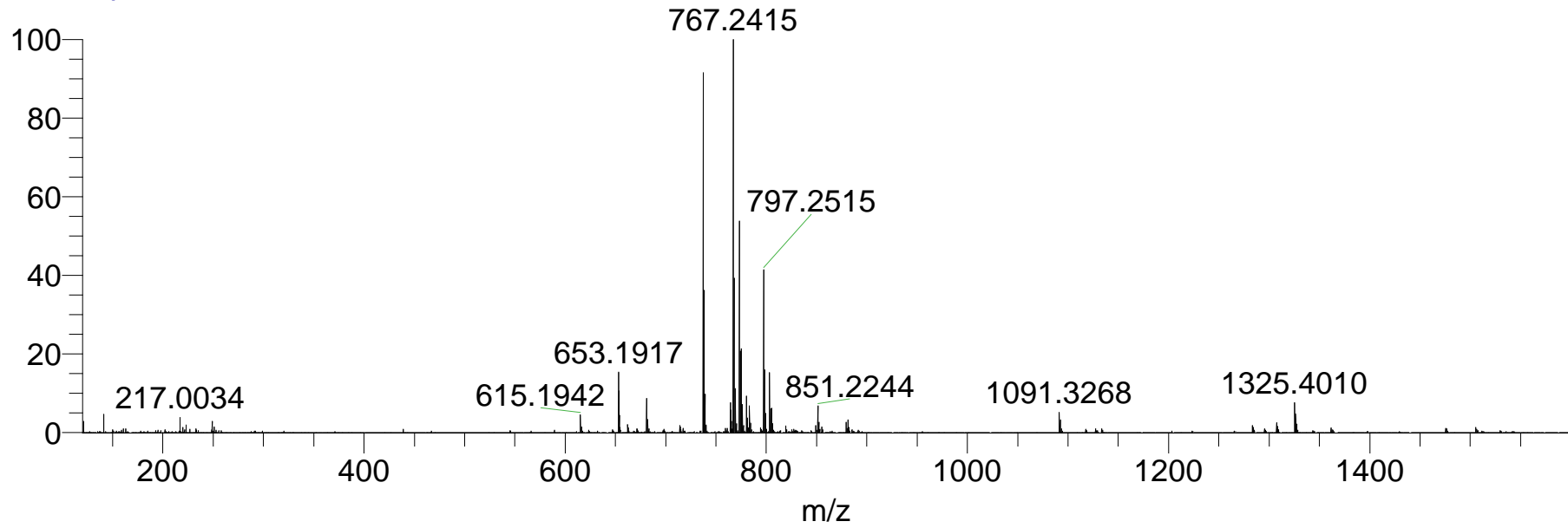
イオン種の推測



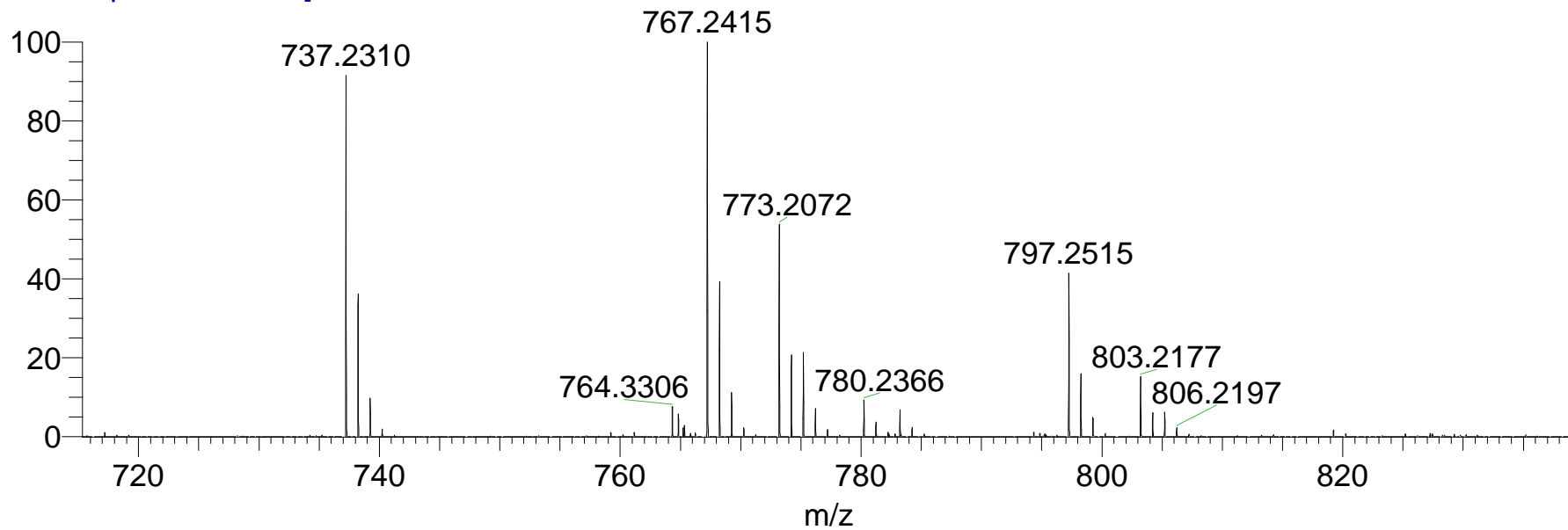
保持時間10.3分のマスペクトル(ESI+)

# 生薬成分のマスマスペクトル(ESI-)

T: FTMS - p ESI Full ms [120.]

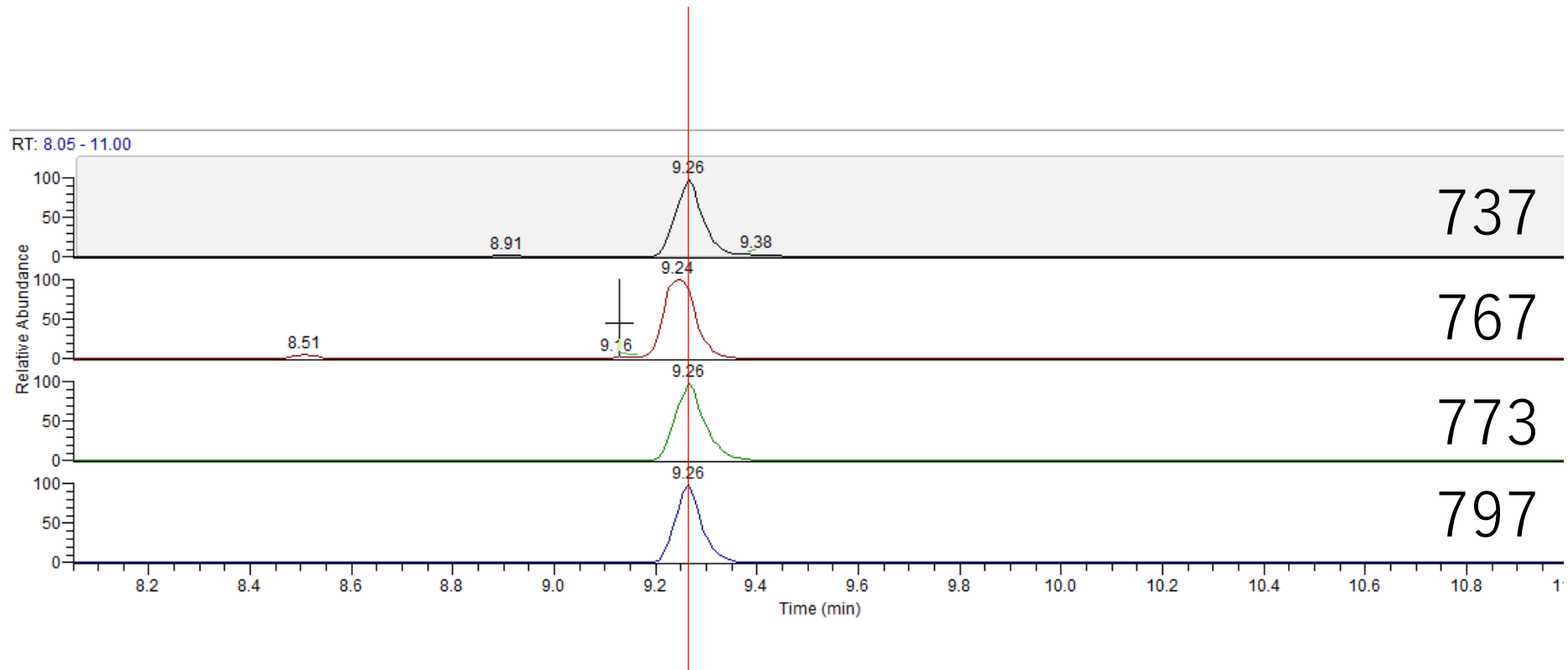


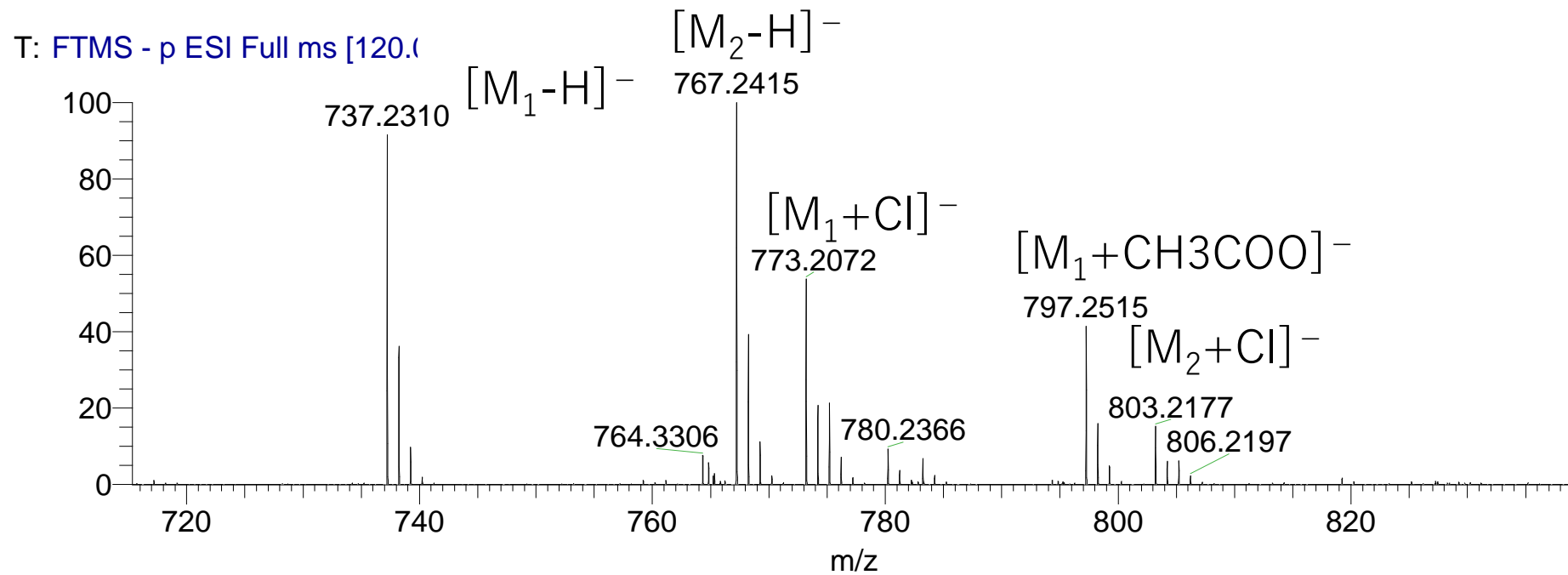
T: FTMS - p ESI Full ms [120.]



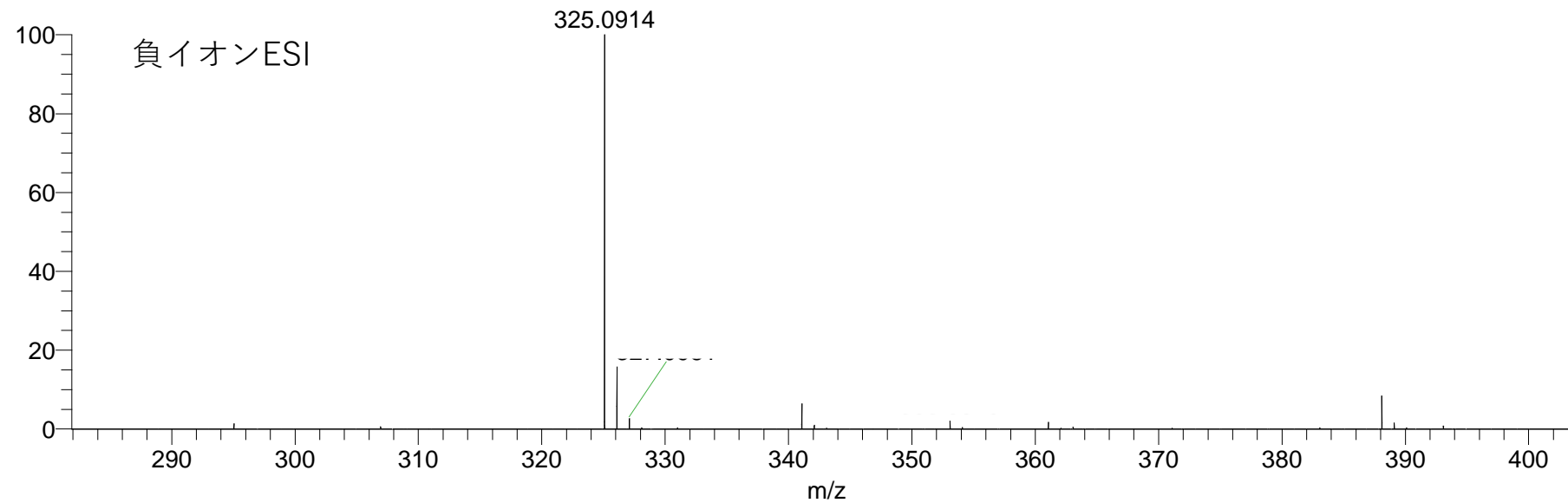
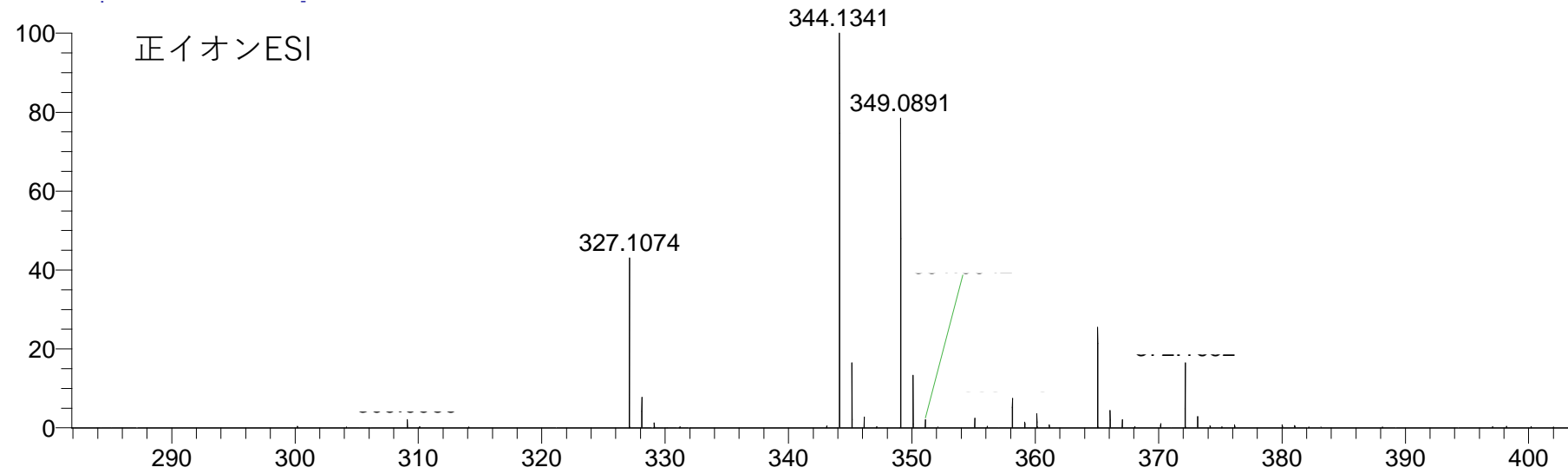


# 抽出イオンクロマトグラムで確認





宿題：以下の2つのマススペクトルは、ある天然物成分の正イオンESIと負イオンESIによるマススペクトルです。ラベルの付いているピークのイオン種を帰属し、この成分の測定精密質量を計算してください。プロトンの質量は1.0073とする。



### **3. 低エネルギーCIDによるフラグメンテーション 解析の初歩**

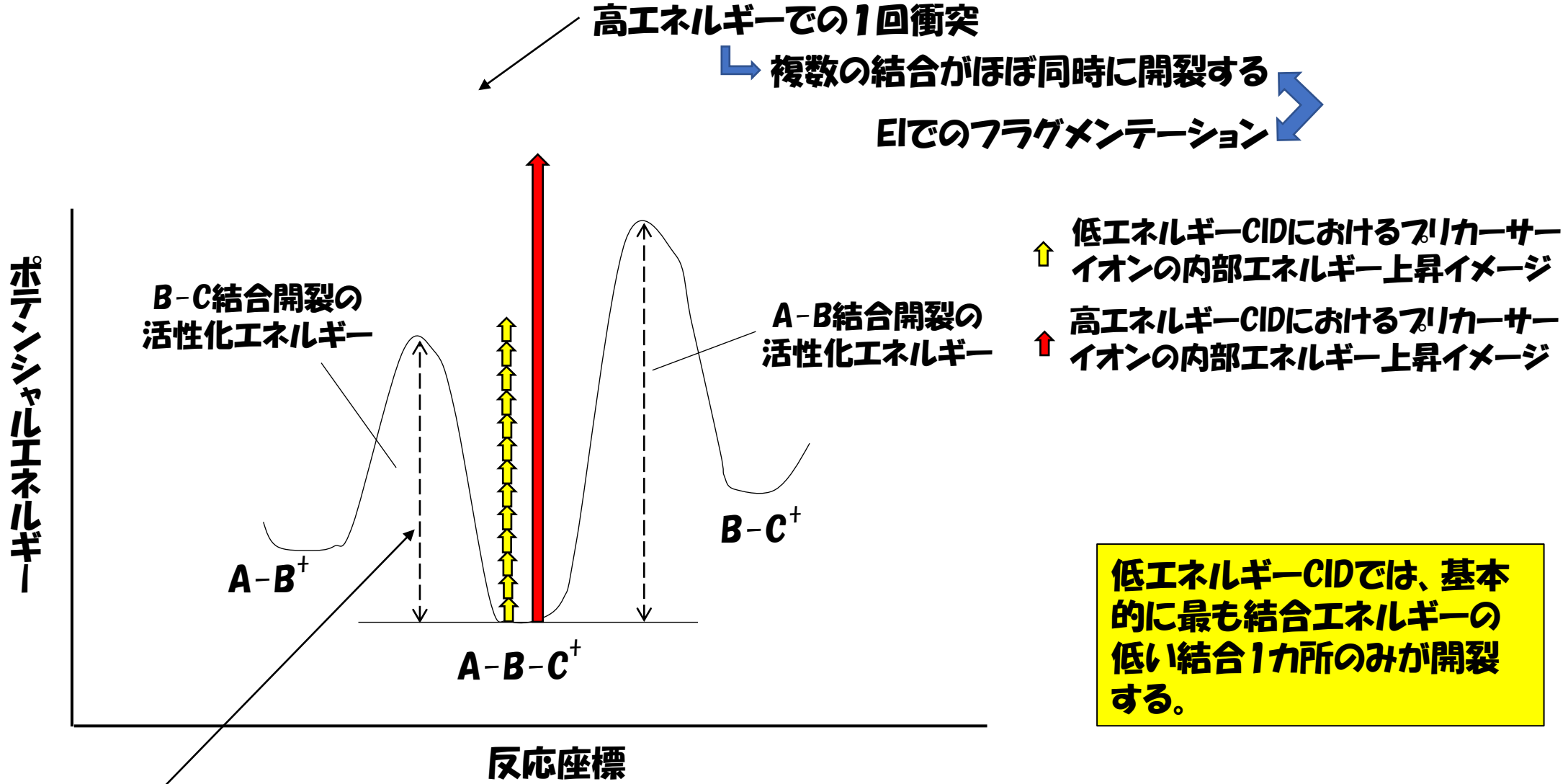
# フラグメンテーション

イオン化室で生成した分子量関連イオンがその $m/z$  値より小さな $m/z$  値のイオンに断片化すること。  
フラグメンテーションは気相で起こる一種の化学反応であり、イオンに蓄積された内部エネルギーにより起こる。

イオンが安定 = 内部エネルギーが小さい  
→ フラグメントイオンは生成しにくい

イオンが不安定 = 内部エネルギーが大きい  
→ フラグメントイオンが生成しやすい

# フラグメンテーションの考え方



低エネルギーでの多段階衝突 → 最も切れやすい(結合エネルギーの低い)結合が優先的に開裂する

**LC/MS/MSで用いられているCID → 低エネルギー**



**プリカーサーイオンからプロダクトイオンへの変換効率が高い**



**高感度**

**LC/MSで生成するイオン → 偶数電子イオン**

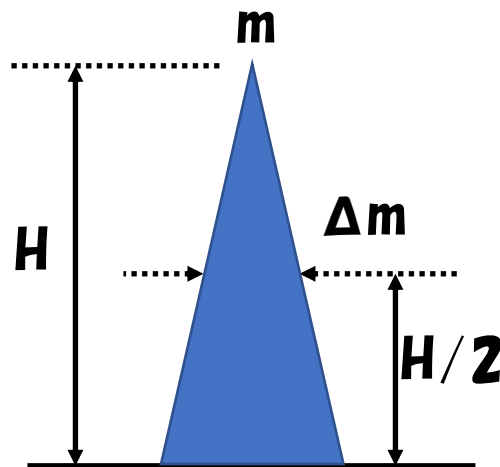
# 質量分解能とマススペクトル

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。

質量分解能が高いと、近い $m/z$ のイオンを分離できる。

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。

高質量分解能質量分析計 → イオンの $m/z$ 値を正確に測れる



半値幅(FWHM)による定義  
質量分解能( $R$ ) =  $m / \Delta m$

$m/z$  1,000と1,001を  
半値幅で分離できる

↓  
分解能 1,000

元素組成からモノアイソトピック  
質量は一義的に決まる

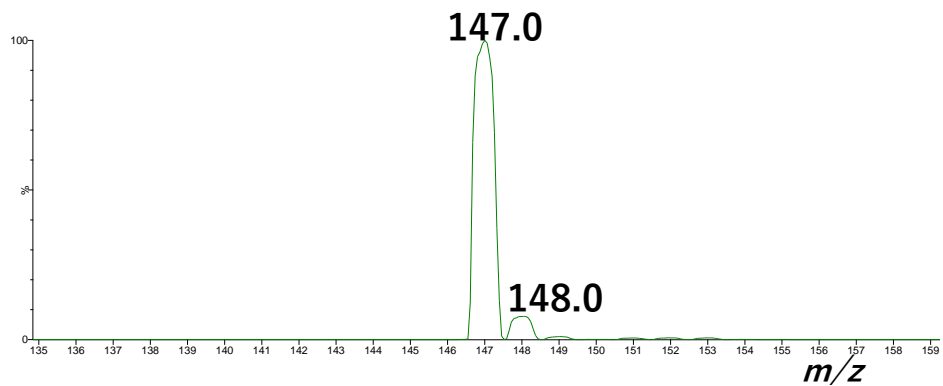
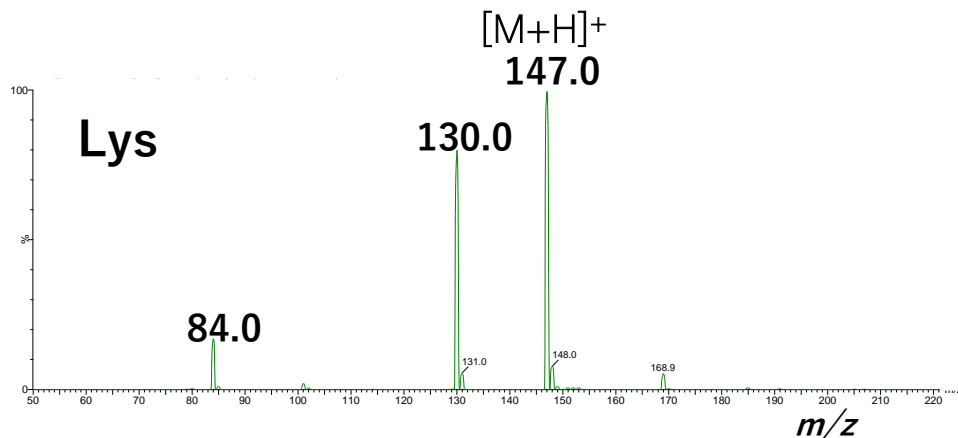
高質量分解能マススペクトル

↓  
組成推定

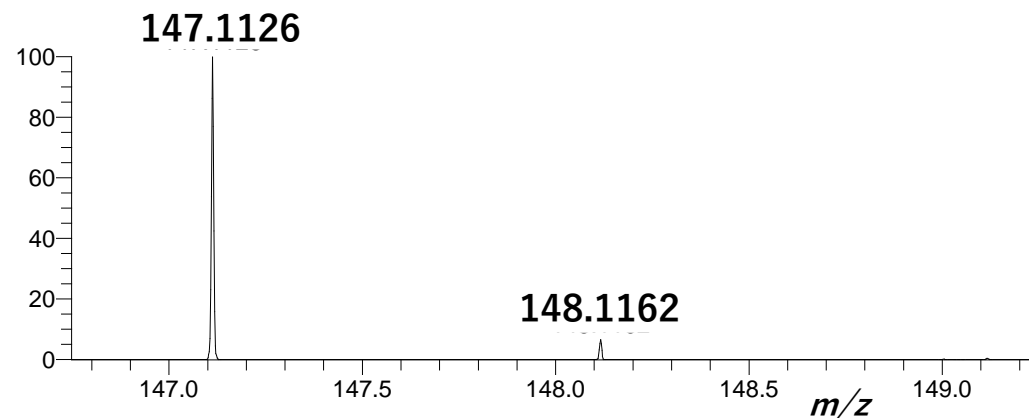
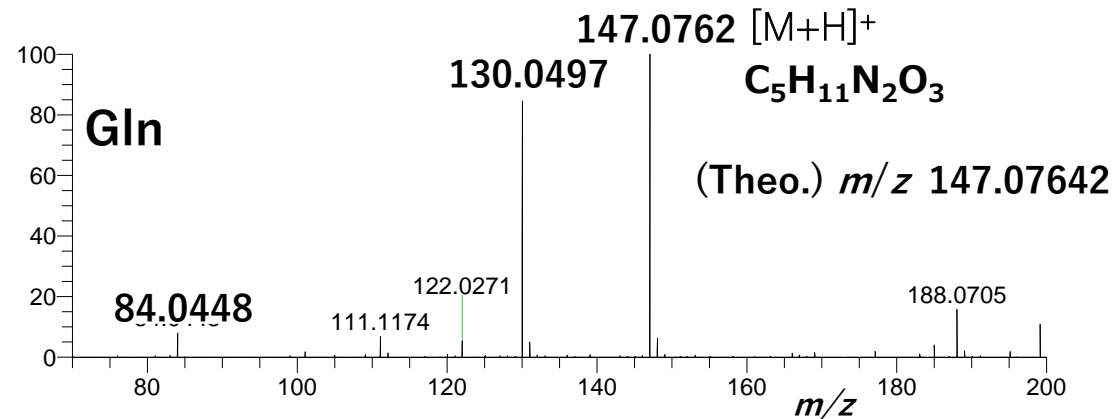
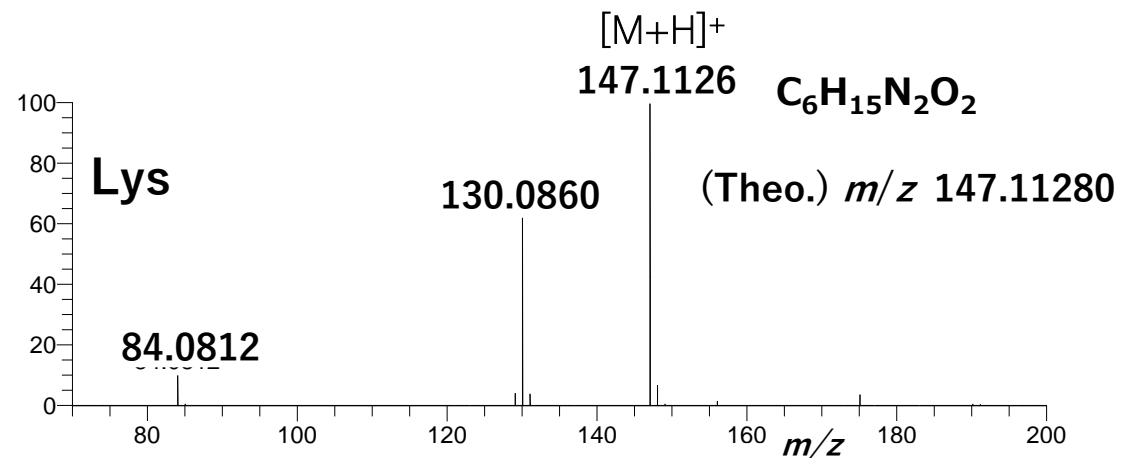


# 質量分解能とマススペクトル

## 低質量分解能(四重極MS)



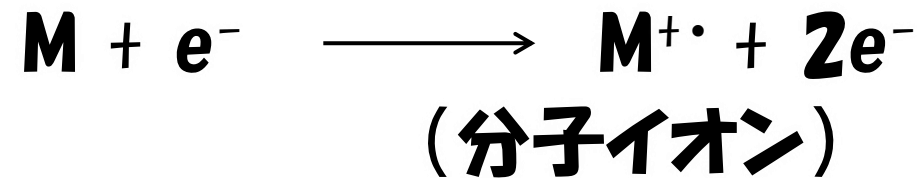
## 高質量分解能(Orbitrap MS)



# 奇数電子イオンと偶数電子イオン

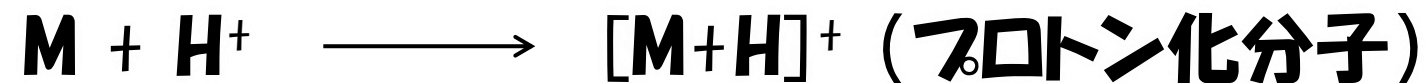
電子イオン化 (EI: Electron Ionization)

⇒ 奇数電子イオン



エレクトロスプレーイオン化 (ESI: Electrospray Ionization)、大気圧化学イオン化 (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization)、など

⇒ 偶数電子イオン



# 偶数電子イオンのフラグメンテーション

ESI や APCI によるイオン化

⇒ 低エネルギーによるソフトイオン化

生成するイオン種 { 正イオン:  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  等の付加  
負イオン: 主として  $H^+$  の脱離

偶数電子イオン = 安定

↳ フラグメンテーションが起こりにくい

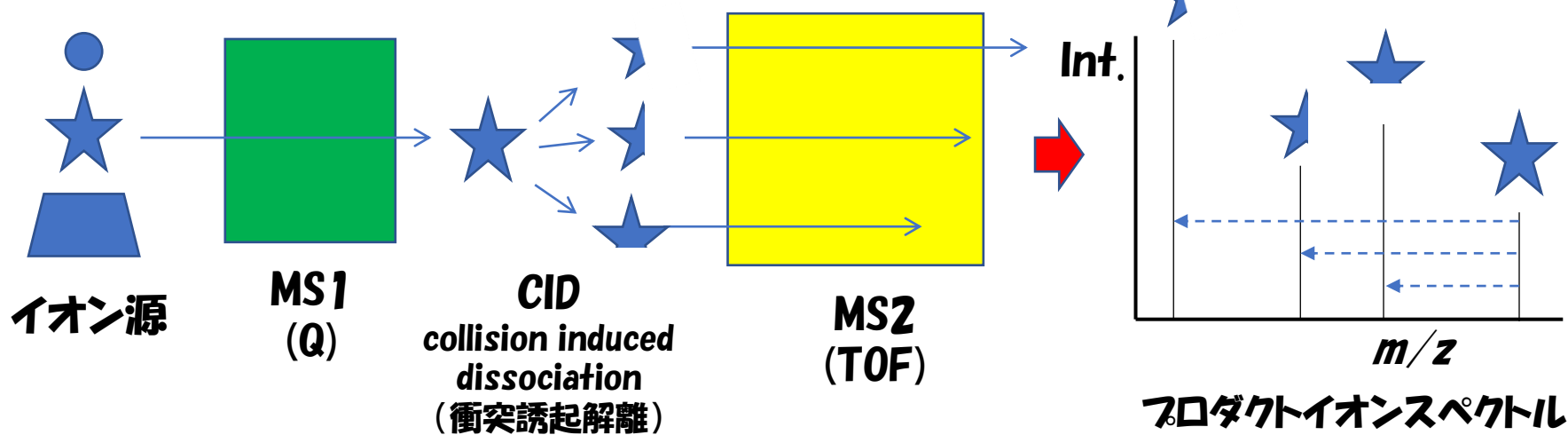
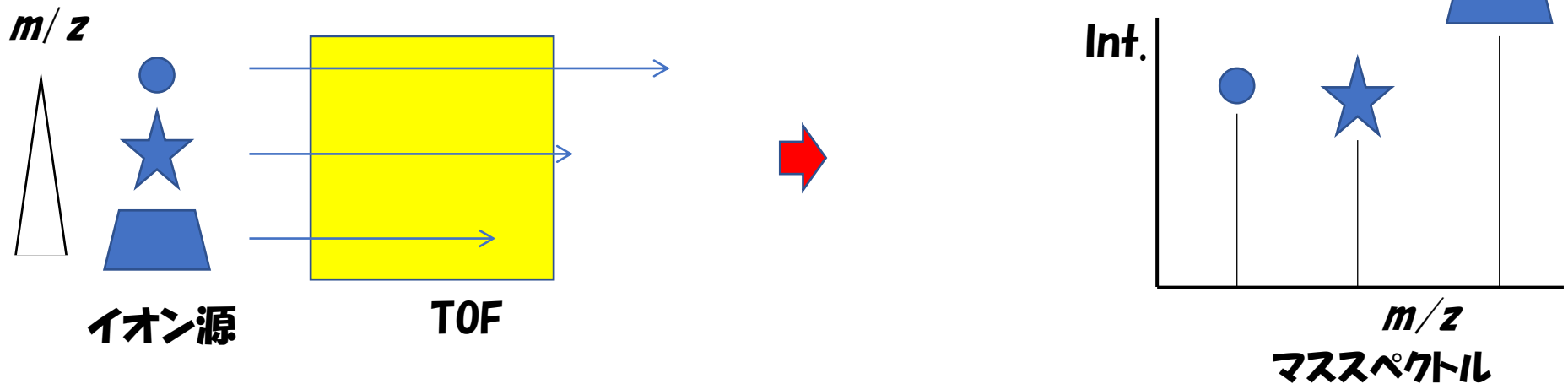
CID (Collision Induced Dissociation) 等による強制開裂

構造解析: タンデム質量分析計を用いる方法が主流

QqQ, Ion-Trap, Q-TOF, IT-TOF, FT-ICR, Orbi-trap

# 通常のマススペクトルとMS/MSにより得られるマススペクトル(フラグメントイオンマススペクトル)

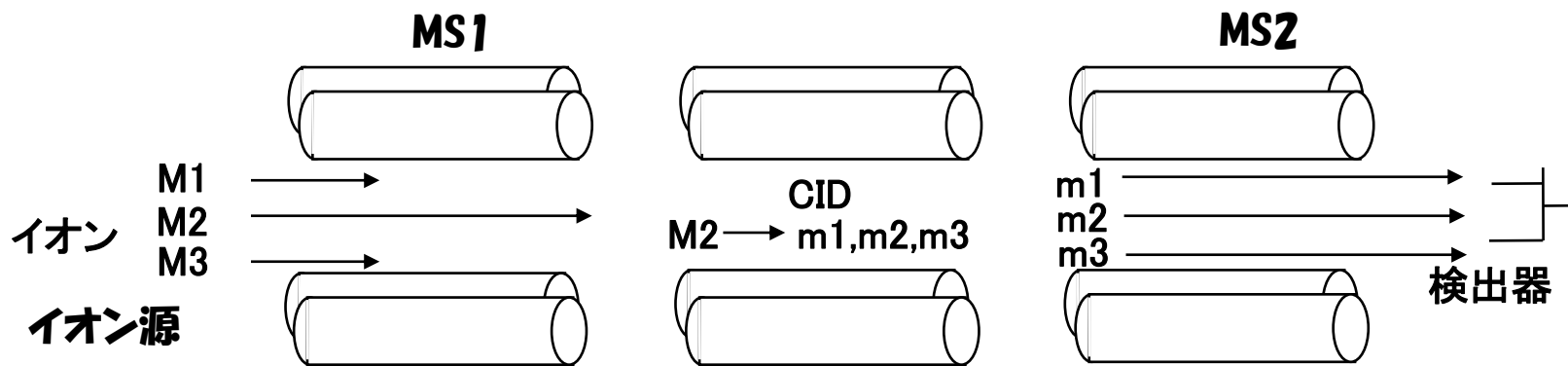
(TOF-MSとQ-TOF-MSの違い)



# MS / MSの種類

MS/MS: 一段目の質量分析においてプリカーサーイオン(前駆イオン)を選択し、イオンを解離させた後に二段目の質量分析でそのフラグメントイオンの $m/z$ 分離を行い検出する技法、およびそれらの結果を利用する研究分野。タンデム質量分析と同義語。

マスペクトロメトリー関係用語集第四版より

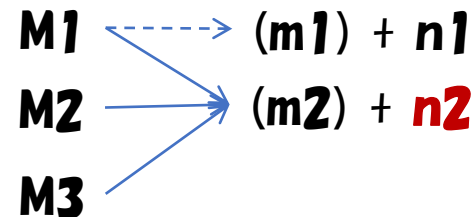
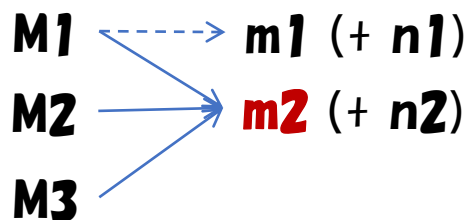
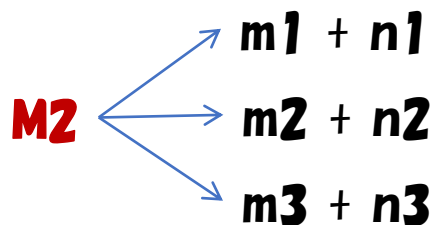


特定イオンを選択

イオンの分解

生成イオンの分離・検出

CID: Collision Induced Dissociation 衝突誘起解離



フラグメントイオン分析(スクリーン)

選択反応モニタリング(SRM)

プリカーサーイオンスクリーン

コンスタントニュートラルロススクリーン  
 (コンスタントニュートラルマスゲインスクリーン)

# 間違い易い用語-2

## スキャン、スキャンスピード

**スキャン**: マススペクトルを取得するための電圧掃引のこと

**スキャンスピード**: 1枚のマススペクトルを取得するために電圧掃引する時間

これらの用語が使えるのは... ⇒ 電圧掃引型の質量分析部のみ

四重極、イオンラップ、セクター ⇒ OK

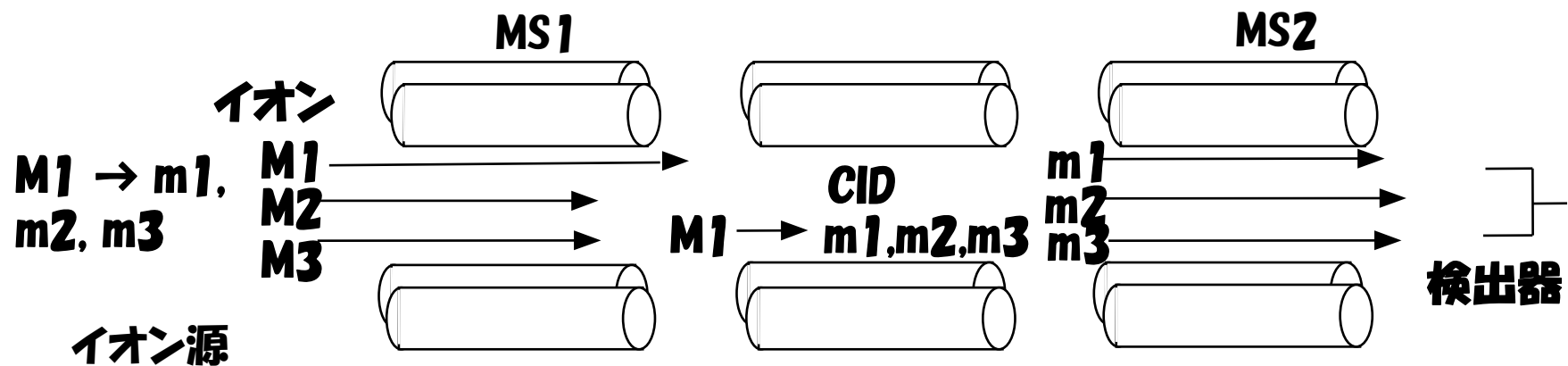
Orbitrap, ICR ⇒ 限りなく×に近い△

TOF ⇒ 完全に×

**原理的に正しくない用語は使わない方が良い!**

# フラグメントイオンとフロダクトイオン

**フラグメントイオン:** 質量分析計内でのフラグメンテーションによって生成したイオン



**フロダクトイオン:** MS1で選択されたイオンからCID等によるフラグメンテーションによって生成したイオン

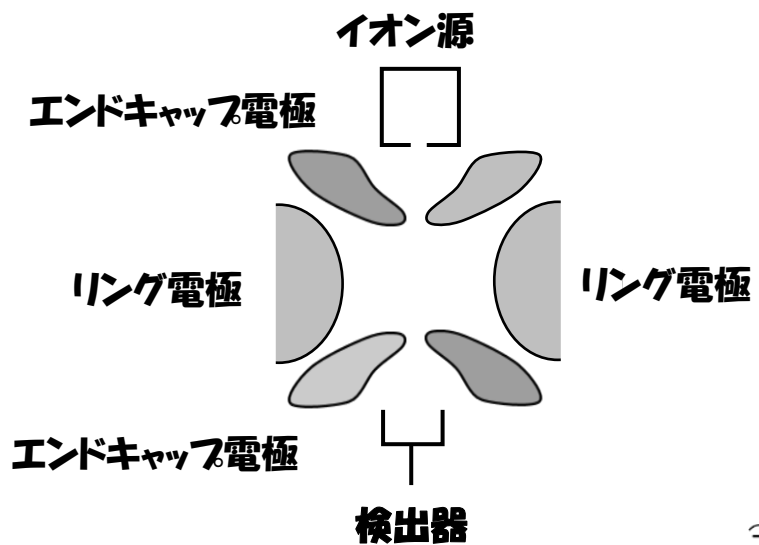
# MS/MS可能な質量分離部

- 三連四重極 (QqQ) ← 定量分析
- イオントラップ (IT)
- 4-Sector
- TOF/TOF } 高エネルギーCID
- ハイブリッドタンデム (MS/MS) ← 定性分析
  - Q-TOF
  - Q-Orbitrap

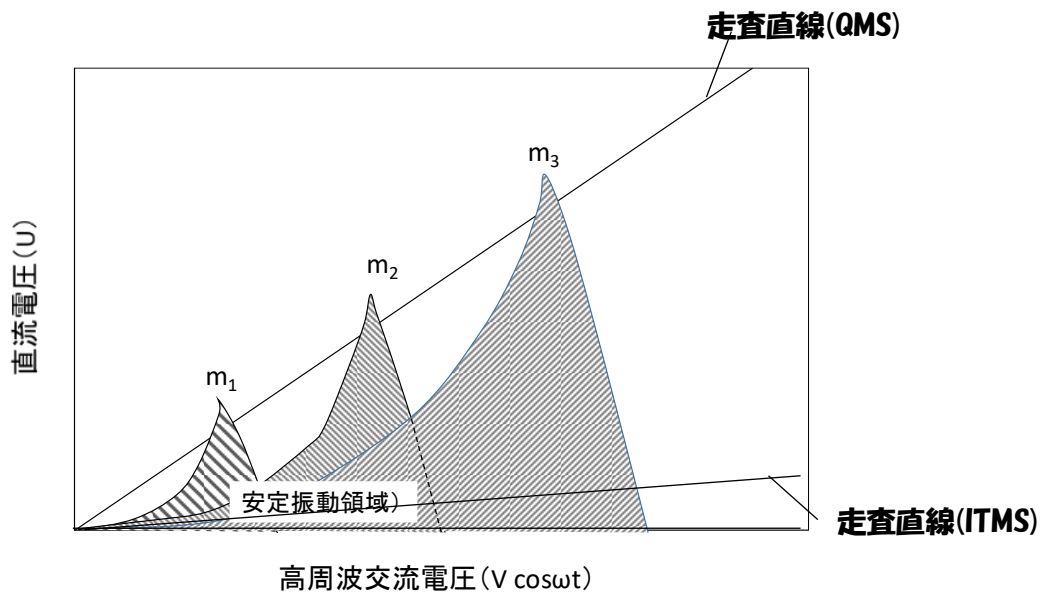
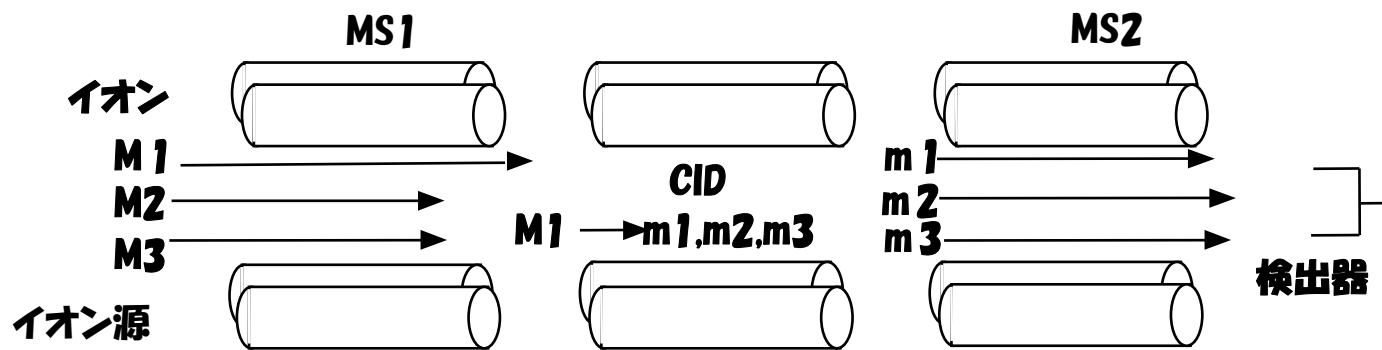


# 低分解能MS/MS装置

## イオンラップ質量分析計

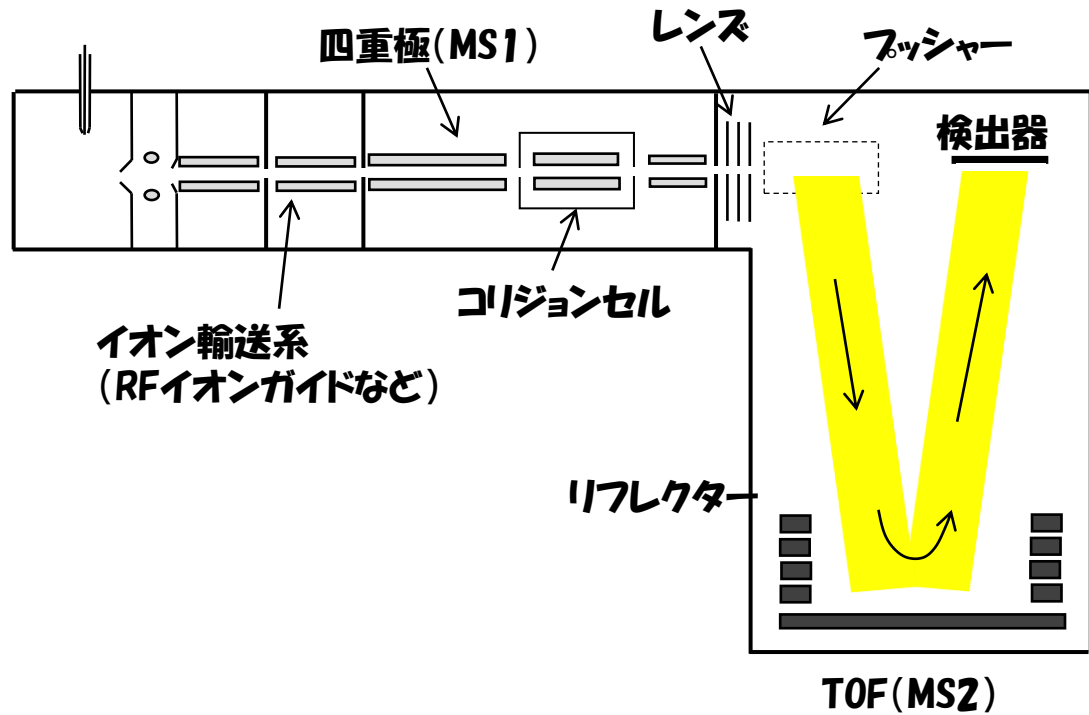


## 三連四重極質量分析計

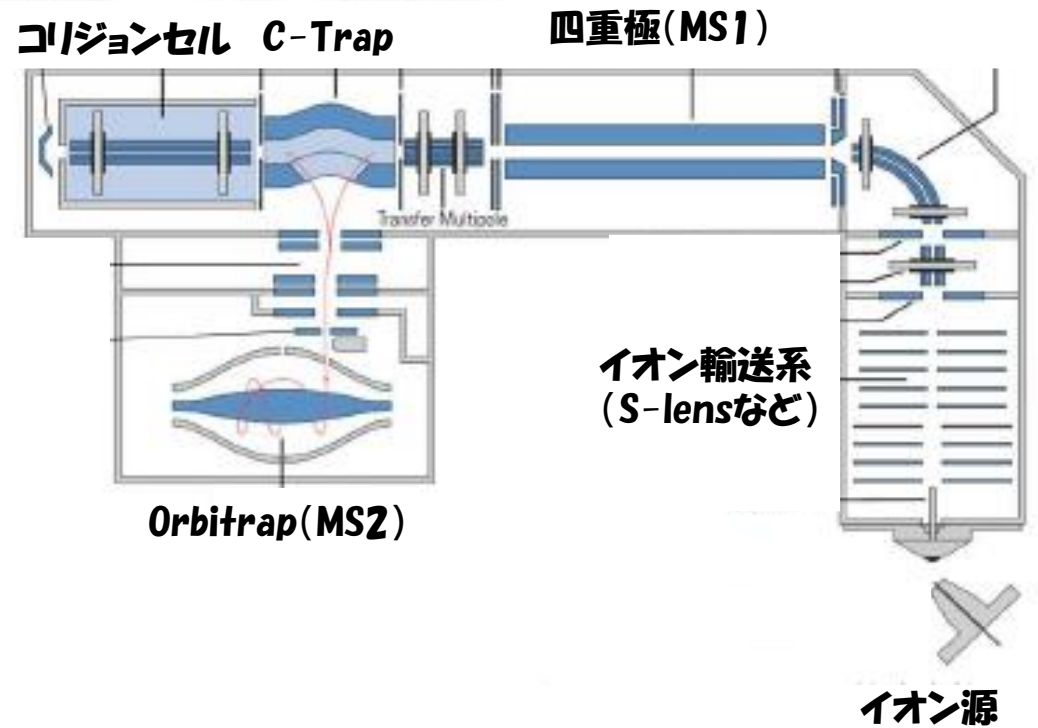


# 高分解能MS/MS装置

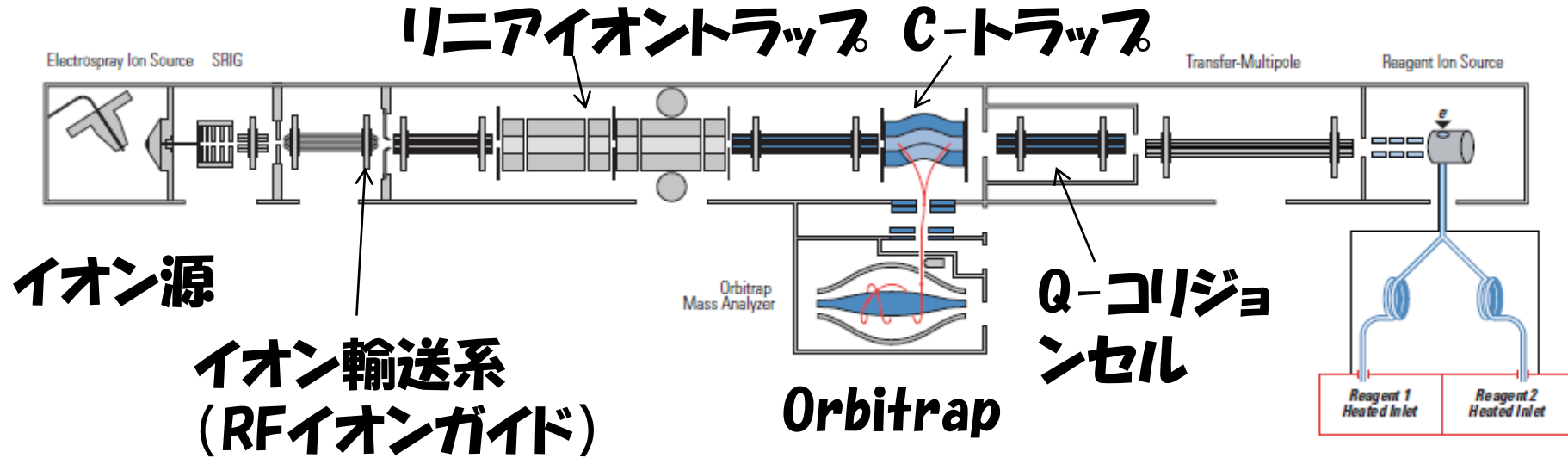
## 四重極-飛行時間質量分析計



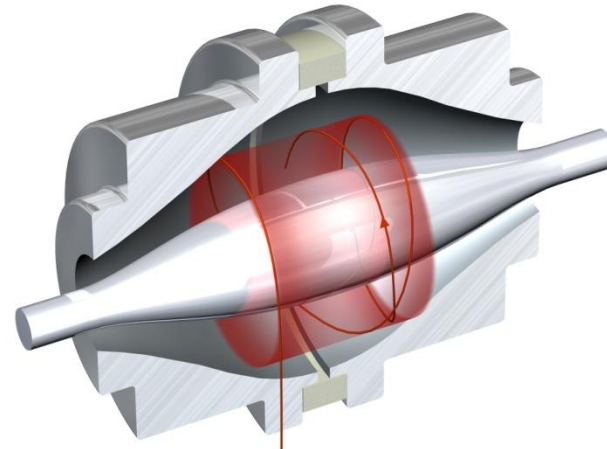
## 四重極-オービトラップ質量分析計



# LTQ Orbitrap XL



- フロダクトイオンスペクトル (MS<sub>n</sub>、リニアイオントラップとQによる多段階開裂)
- 精密質量 ⇒ 組成推定



# 偶数電子イオンの低エネルギーCIDによる フラグメンテーション解析

定性分析のみならず 定量分析でも重要

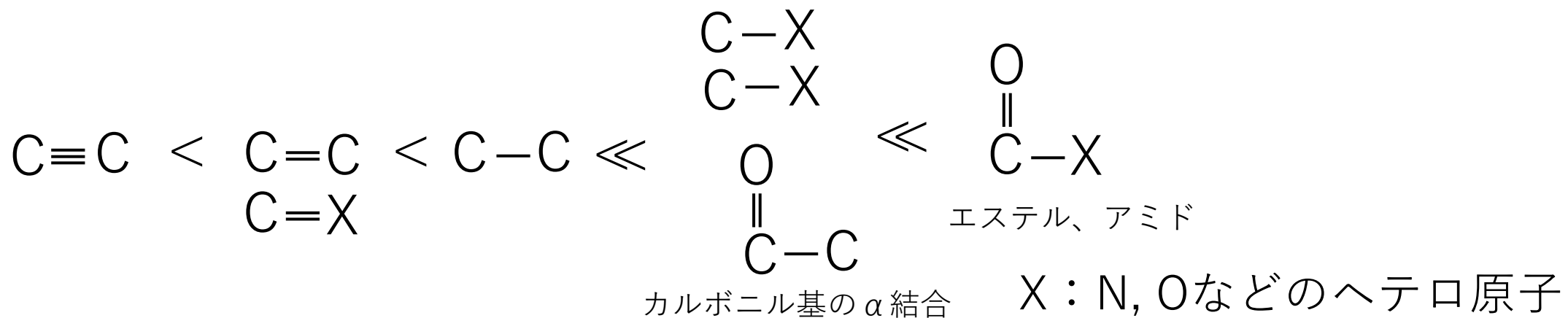


構造推定  
構造確認  
同定



SRMトランジション

# 結合の開裂し易さ



X: N, Oなどのヘテロ原子

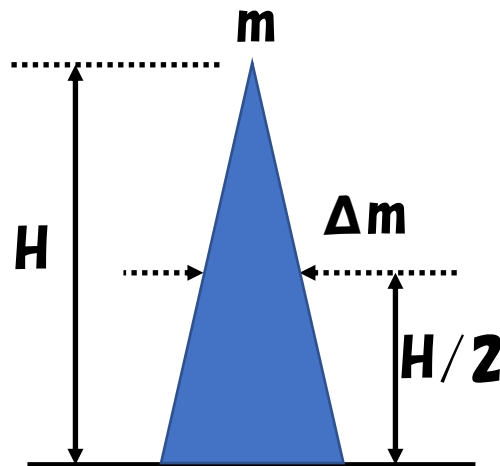
# 質量分解能とマススペクトル

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。

質量分解能が高いと、近い $m/z$ のイオンを分離できる。

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。

高質量分解能質量分析計 → イオンの $m/z$ 値を正確に測れる



半値幅(FWHM)による定義  
質量分解能( $R$ ) =  $m / \Delta m$

$m/z$  1,000と1,001を  
半値幅で分離できる

↓  
分解能 1,000

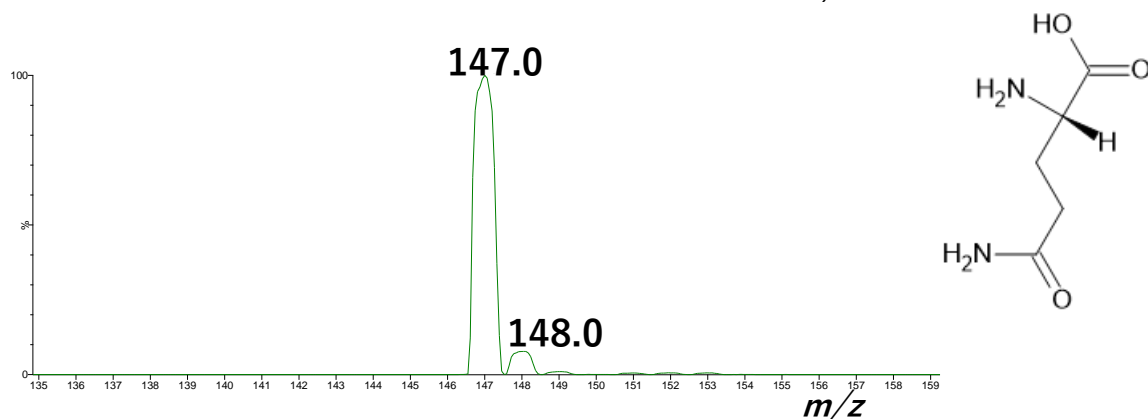
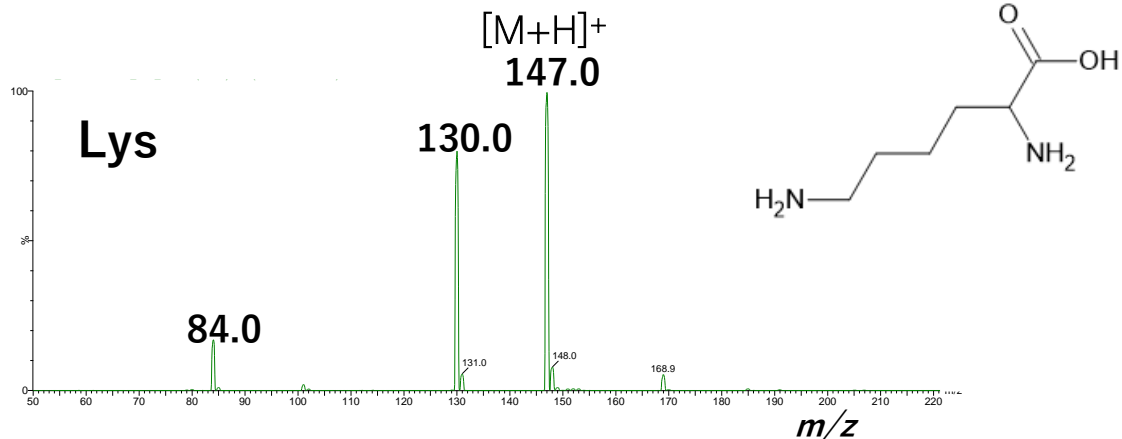
元素組成からモノアイソトピック  
質量は一義的に決まる

高質量分解能マススペクトル

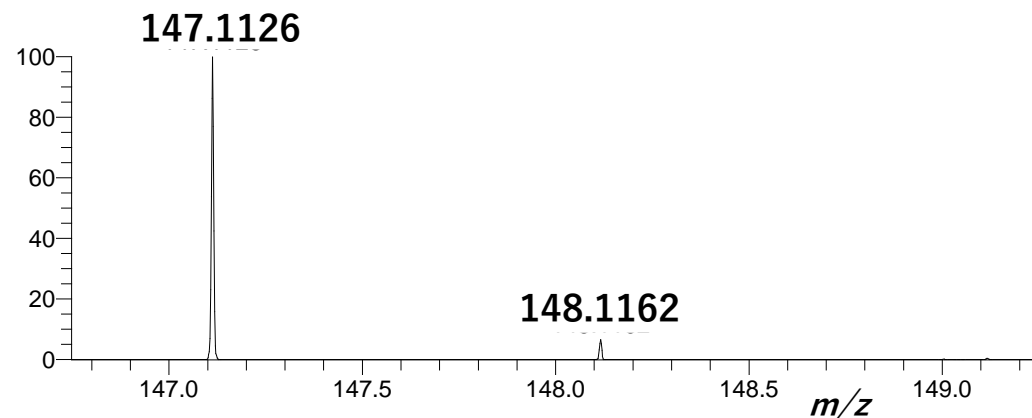
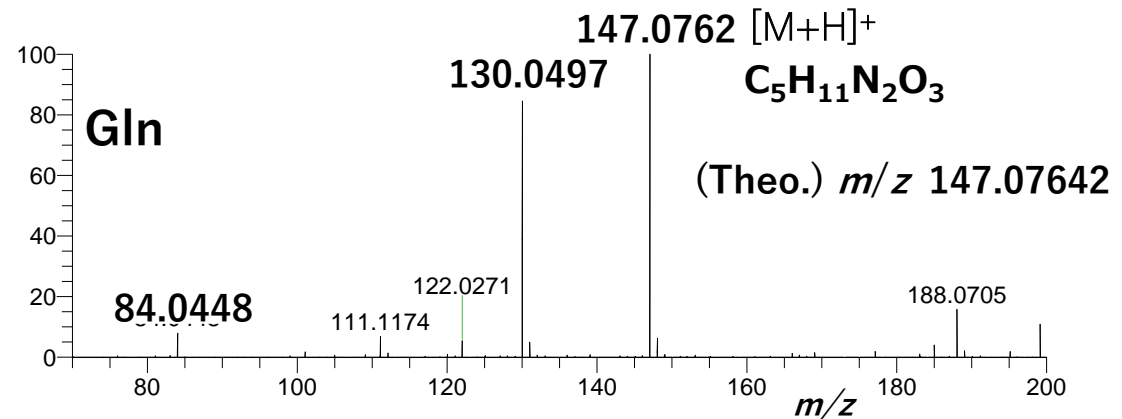
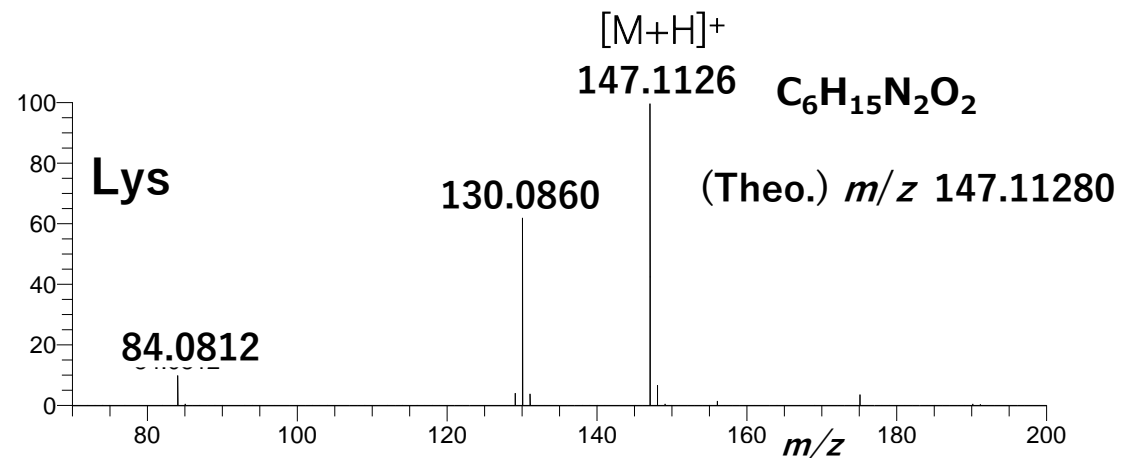
↓  
組成推定

# 質量分解能とマススペクトル

## 低質量分解能(四重極MS)

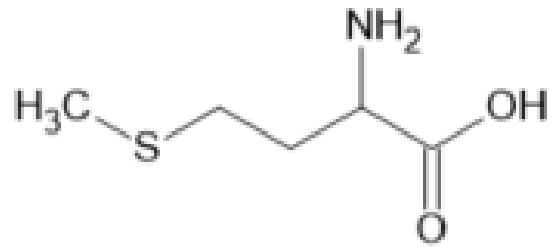


## 高質量分解能(Orbitrap MS)

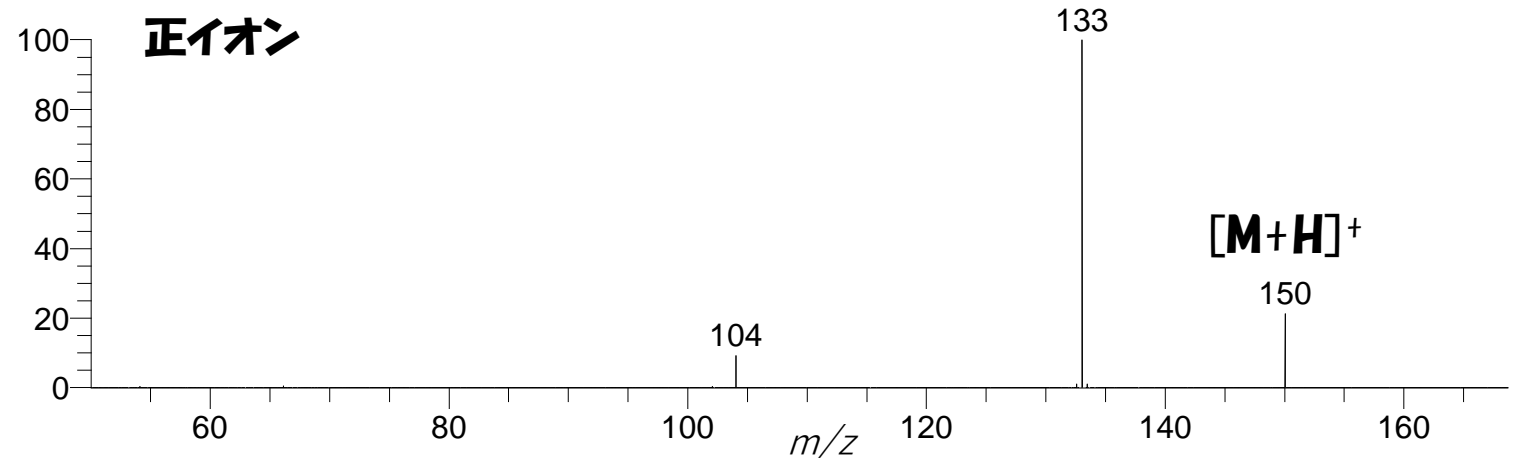


# フロダクトイオンの構造への帰属

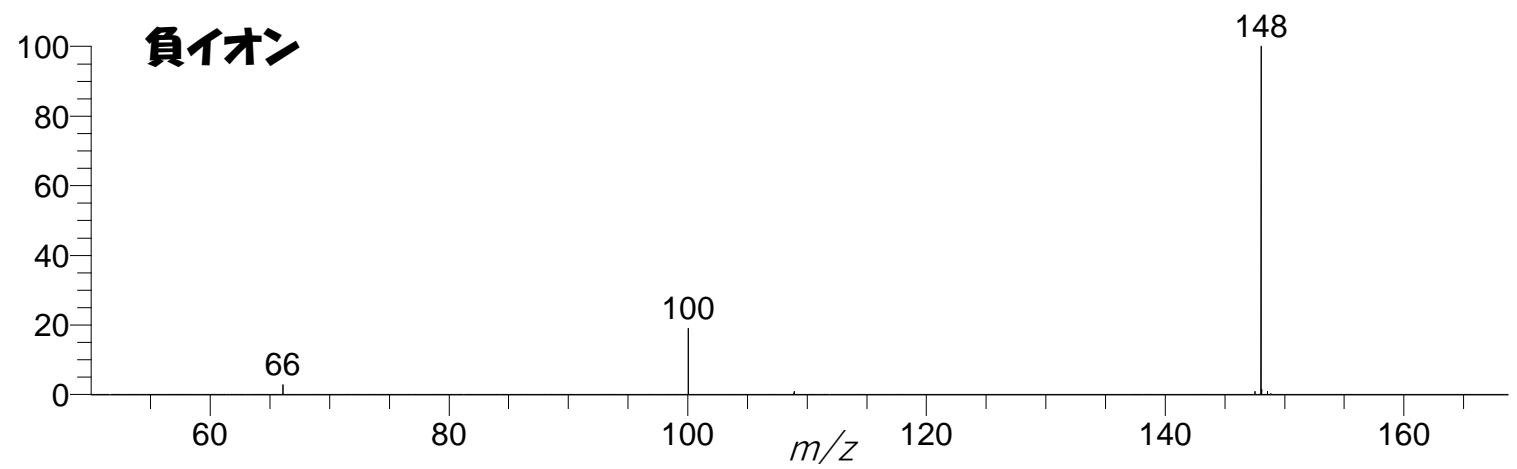
## メチオニン、低分解能



### 正イオン



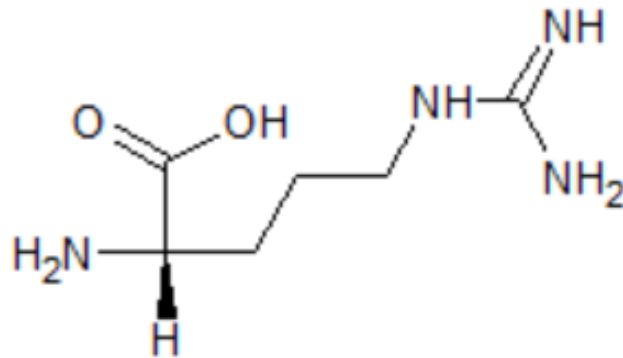
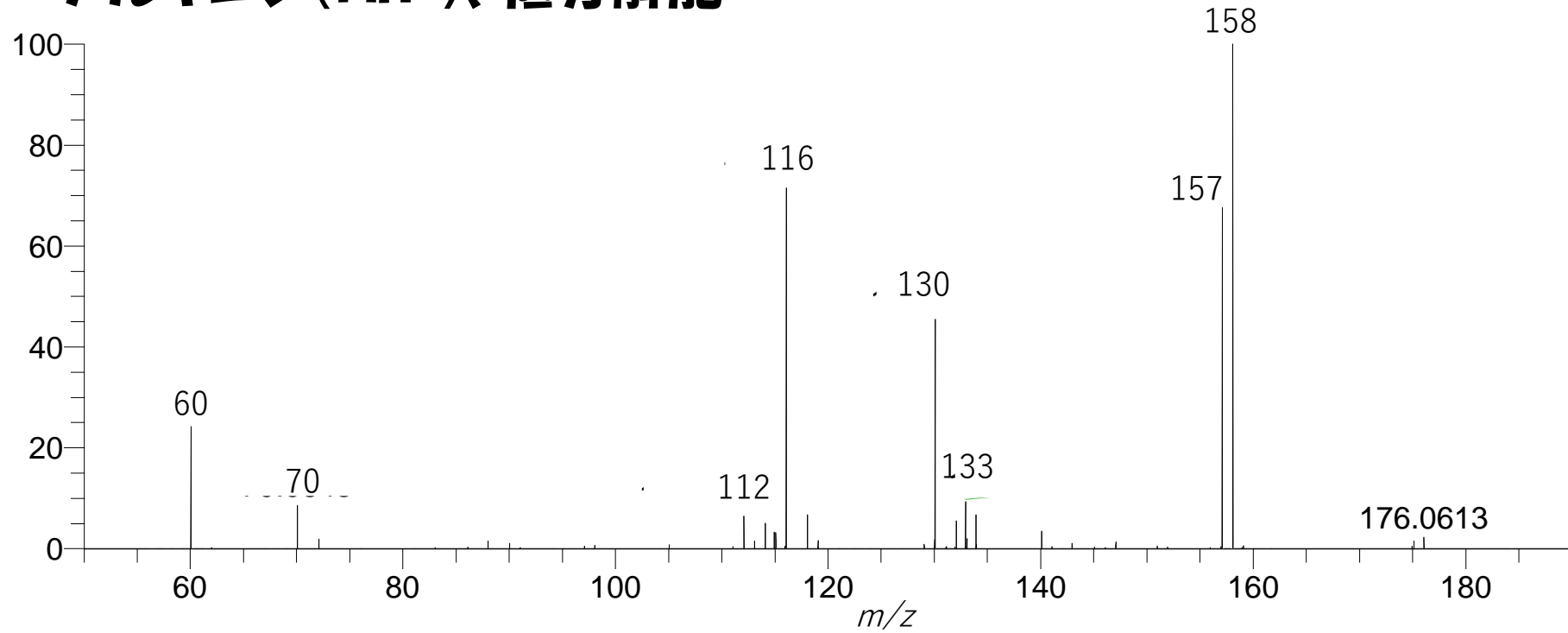
### 負イオン





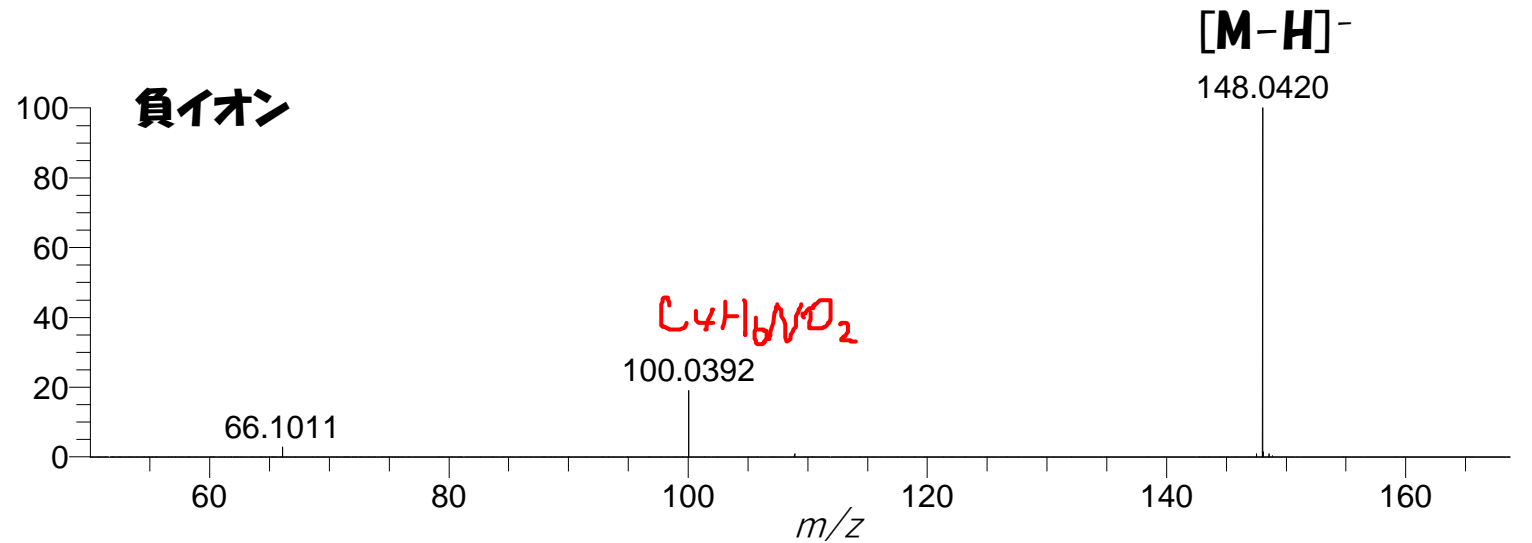
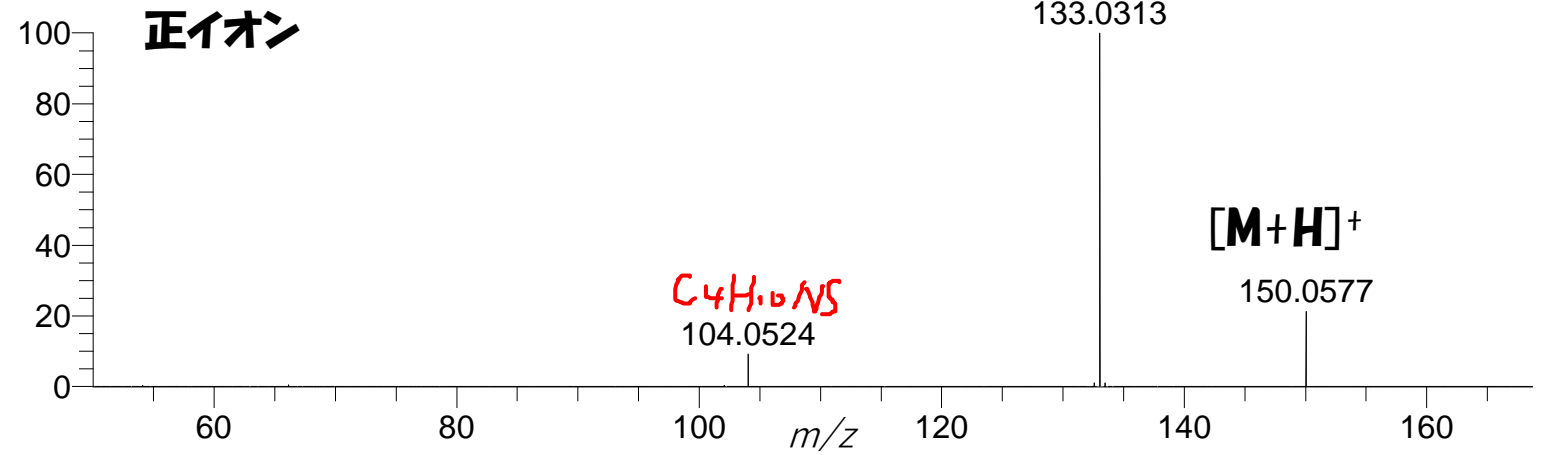
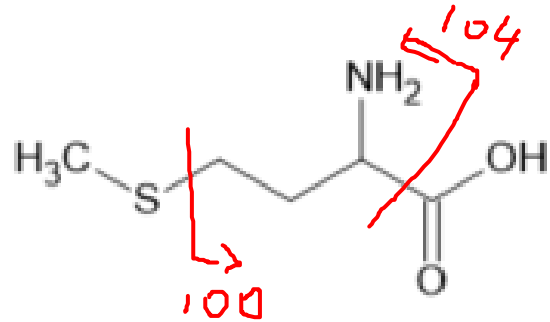
# フラグメントイオンの構造への帰属

## アルギニン(MH<sup>+</sup>)、低分解能



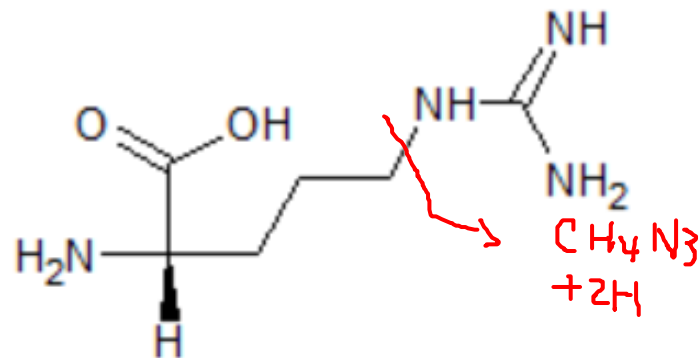
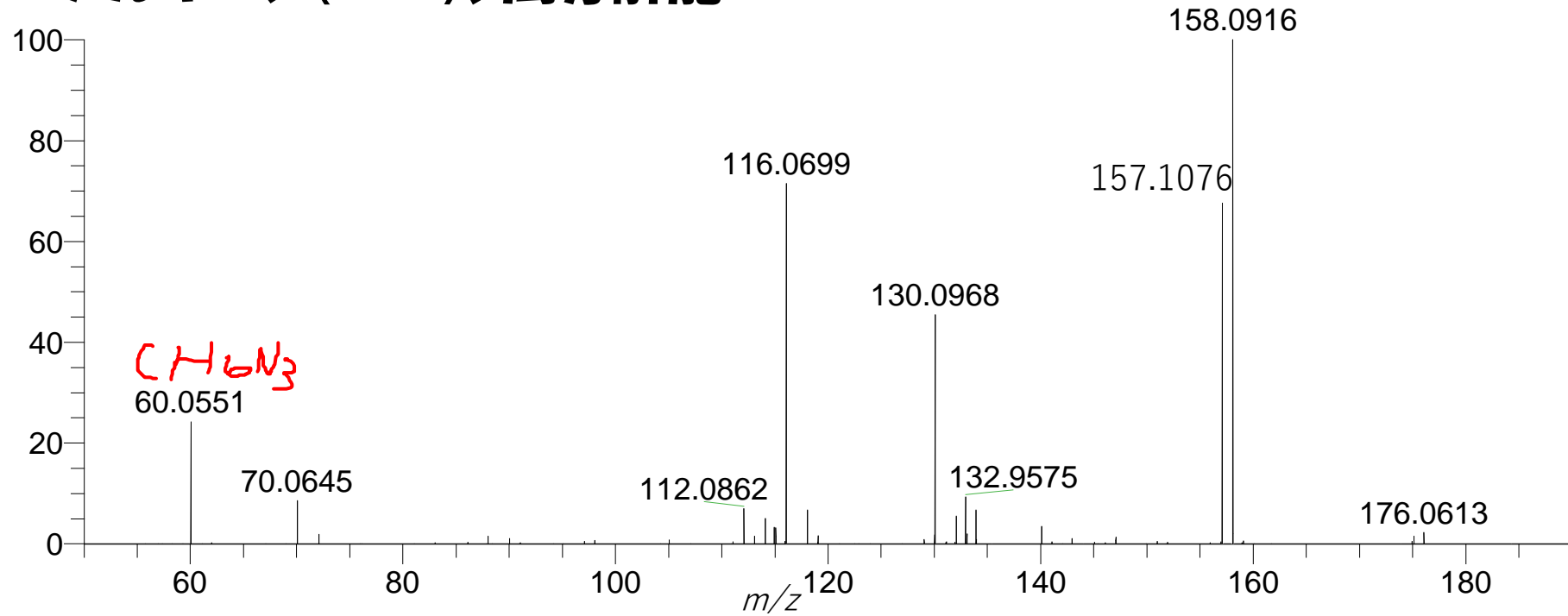
# フラグメントイオンの構造への帰属

メチオニン、高分解能



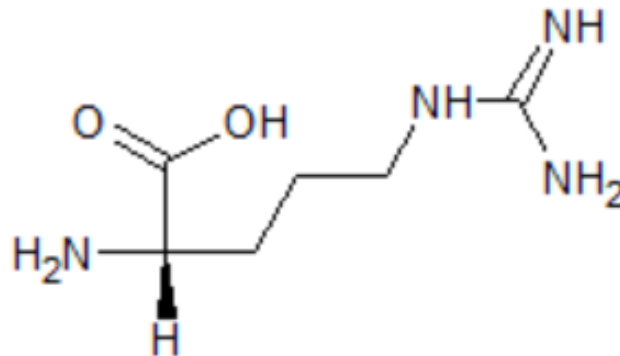
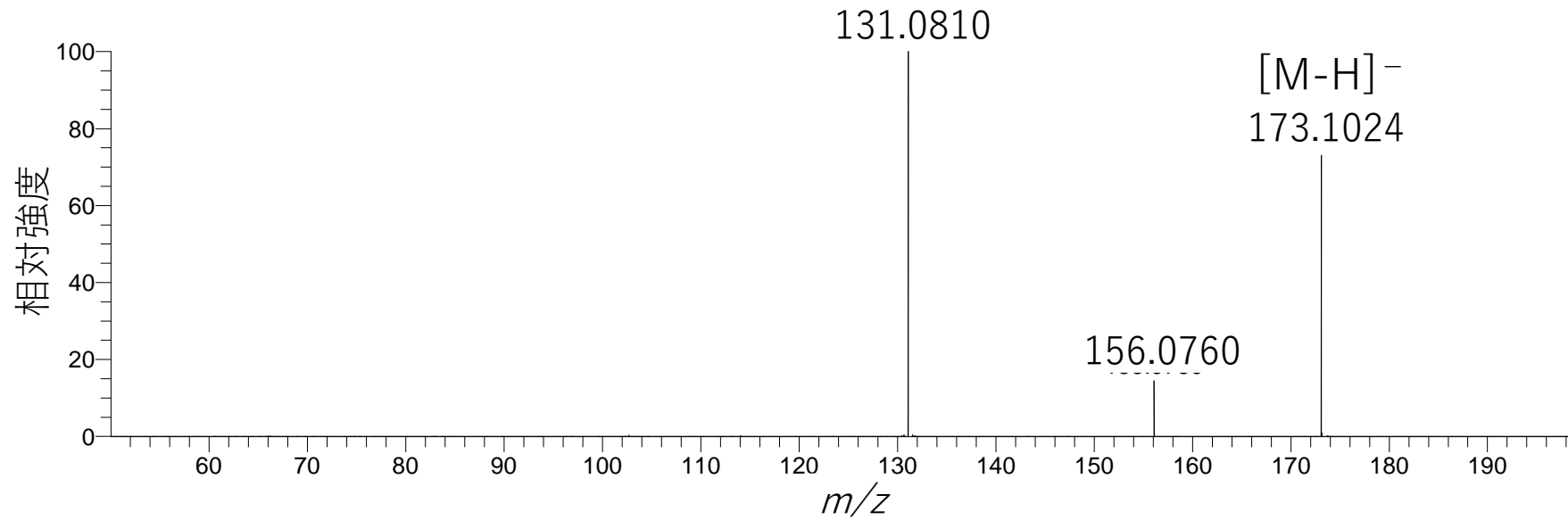
# フラグメントイオンの構造への帰属

## アルギニン(MH<sup>+</sup>)、高分解能



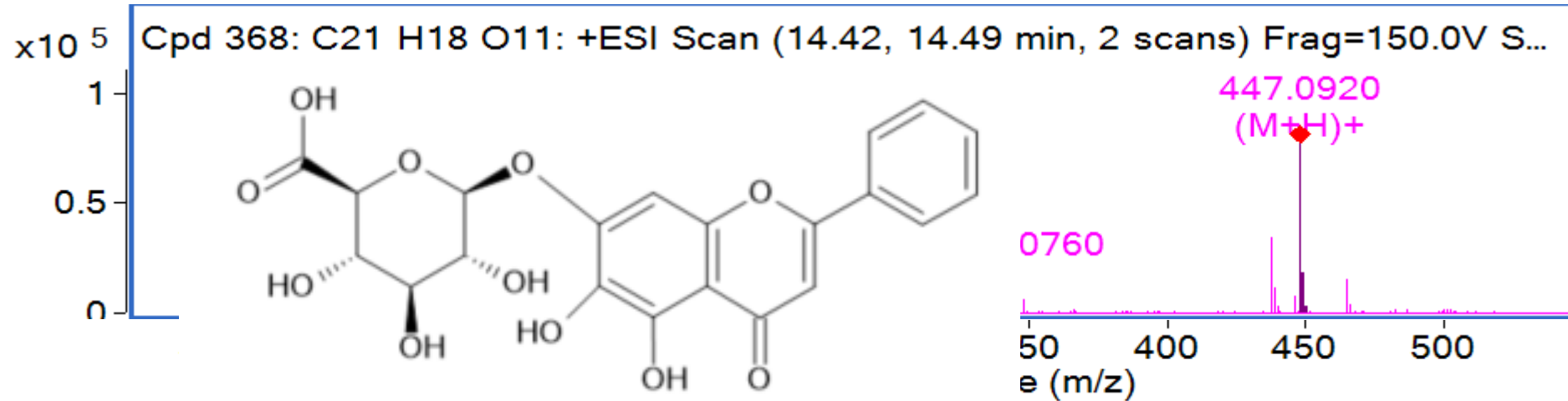
# フラダクトイオンの構造への帰属

## アルギニン([M-H]<sup>-</sup>)

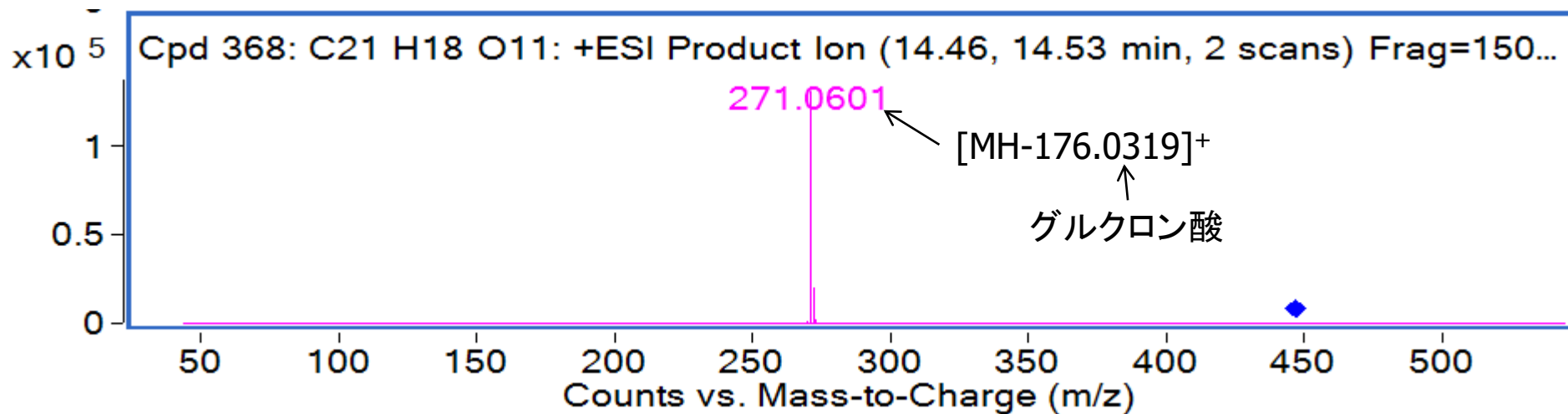


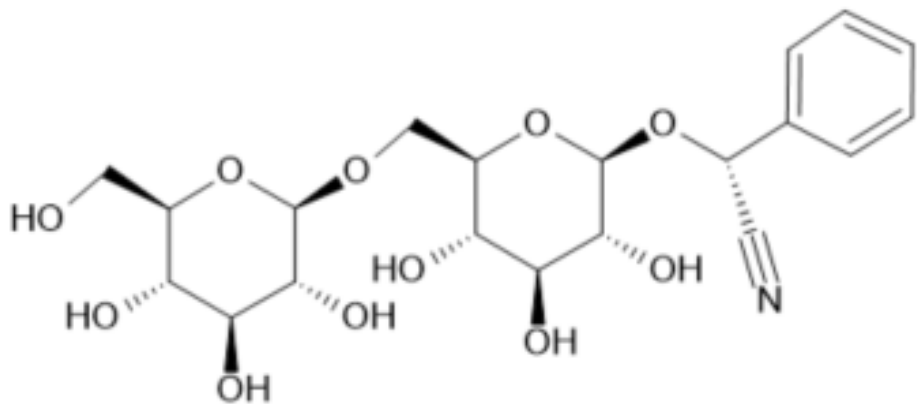
# マスペクトル

(Agilent6540)

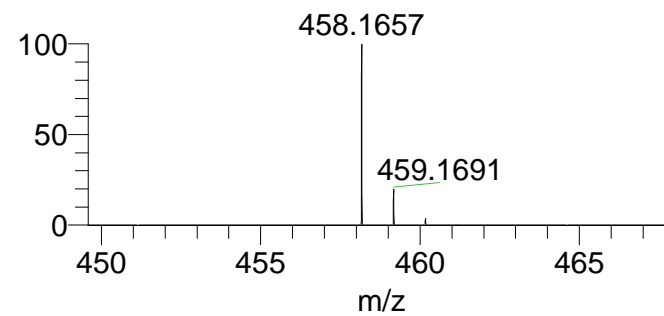
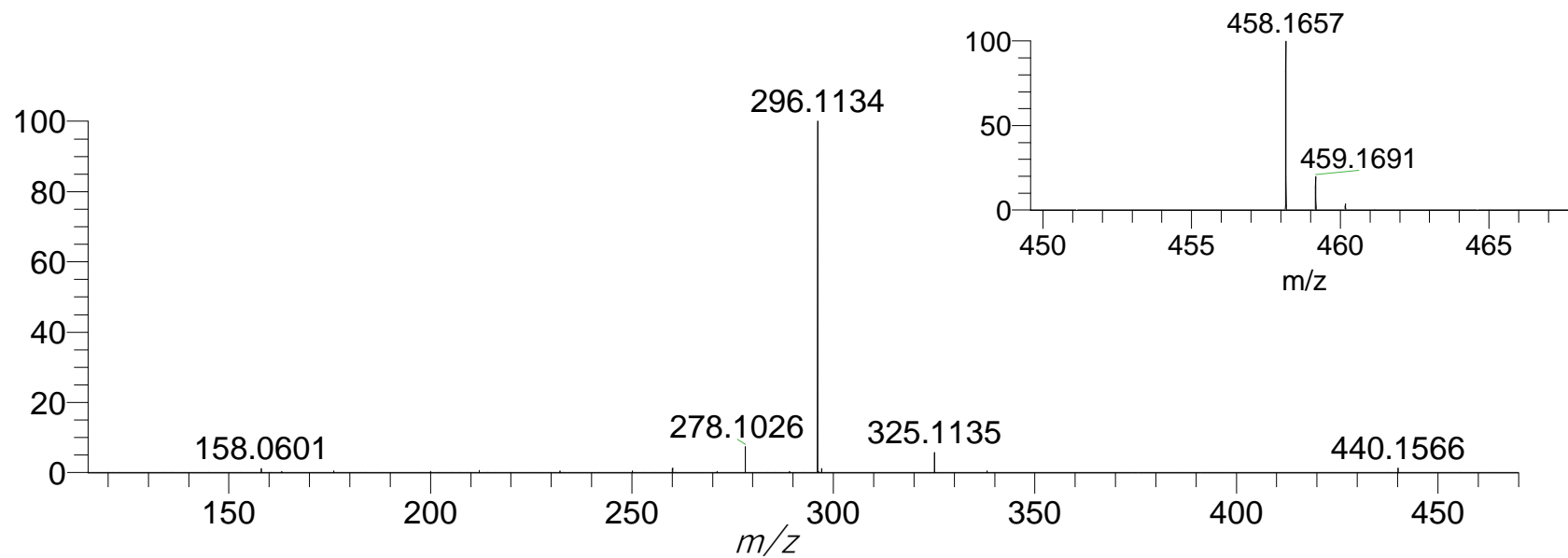
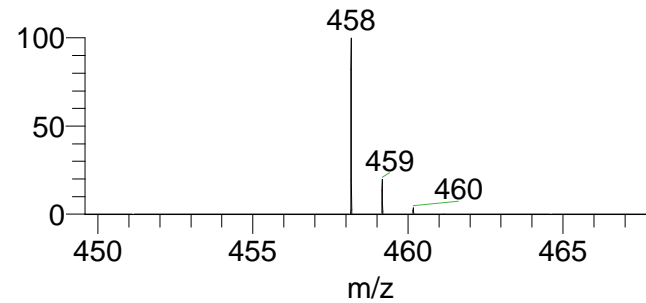
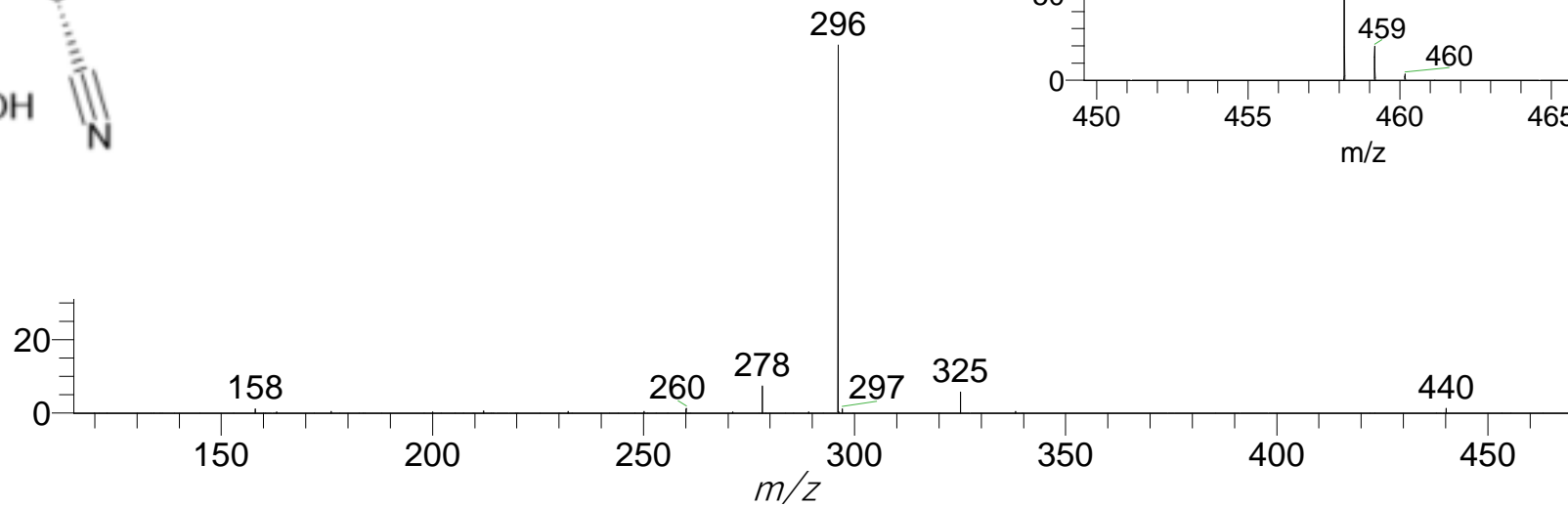


## *m/z* 447イオンのフラグメントイオンスペクトル(MS/MS)





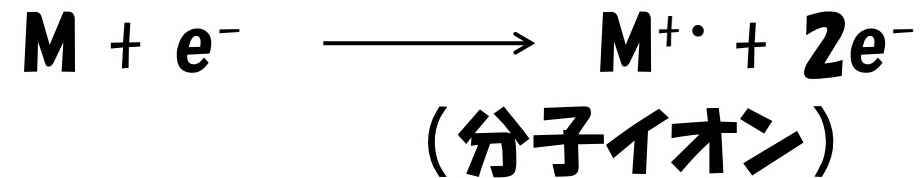
$C_{20}H_{27}NO_{11}$



# 奇数電子イオンと偶数電子イオン

電子イオン化 (EI: Electron Ionization)

⇒ 奇数電子イオン



エレクトロスプレーイオン化 (ESI: Electrospray Ionization)、大気圧化学イオン化 (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization)、など

⇒ 偶数電子イオン



# 偶数電子イオンのフラグメンテーション

ESI や APCI によるイオン化

⇒ 低エネルギーによるソフトイオン化

生成するイオン種 { 正イオン:  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  等の付加  
負イオン: 主として  $H^+$  の脱離

偶数電子イオン = 安定

↳ フラグメンテーションが起こりにくい

CID (Collision Induced Dissociation) 等による強制開裂

構造解析: タンデム質量分析計を用いる方法が主流

QqQ, Ion-Trap, Q-TOF, IT-TOF, FT-ICR, Orbi-trap

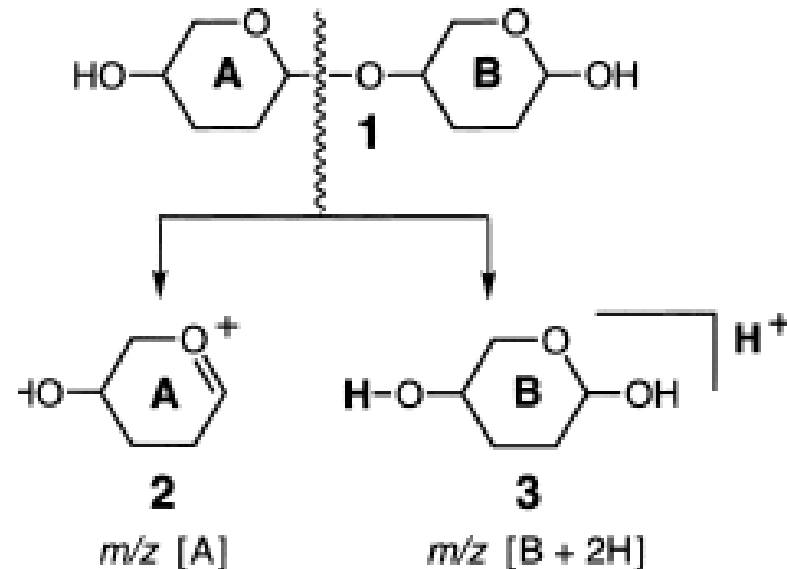


# 有機偶数電子イオンのフラグメンテーションにおけるマスシフト則

H. Nakata, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 50(4), 173-188 (2002).

フラグメントイオンの元の構造からの水素付加、脱離 ⇒ 経験則

前提条件: フラグメントイオンの構造は有機化学的に安定





# 代表的なフラグメントイオン

イオン	脱離する中性フラグメント	化合物の種類
M - 1	<u>H</u> ·	アルデヒド類
M - 2	<u>H<sub>2</sub></u>	ポリオール類
M - 15	<u>CH<sub>3</sub></u>	
M - 16	O·, NH <sub>2</sub> ·	N-オキシド、アミド
M - 17	OH·	
M - 18	<u>H<sub>2</sub>O</u>	アルコール、ポリオール
M - 26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	
M - 27	HCN	
M - 28	<u>CO</u> , C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	キノン、エチルエステル
M - 29	CHO, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ·	
M - 30	<u>CH<sub>2</sub>O</u> , NO·	
M - 31	<u>CH<sub>3</sub>O</u> ·	含メトキシ基
M - 32	<u>CH<sub>3</sub>OH</u>	含メトキシ基
M - 42	<u>CH<sub>2</sub>CO</u> , C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	
M - 43	<u>CH<sub>3</sub>CO</u> ·	アセテート
M - 44	<u>CO<sub>2</sub></u>	カルボン酸
M - 45	COOH·	カルボン酸
M - 46	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, NO <sub>2</sub> ·	

# 偶数電子イオンのフラグメンテーションにおけるマスシフト

	Mass shift <sup>a)</sup>			
	Positive ions		Negative ions	
One-bond cleavage				
C-C cleavage	①	0	①	-2
C-Z cleavage <sup>b)</sup>				
Z not included in fragment ions	②	0	②	-2
Z included in fragment ions	③	+2	③	0
Two-bond cleavage	④	+1 <sup>c)</sup>	④	-1 <sup>d)</sup>

<sup>a)</sup> For instance, +2 means that the corresponding ion will appear 2 mass units higher than expected from the structural formula.

<sup>b)</sup> Z stands for any heteroatom such as nitrogen, oxygen, etc.

<sup>c)</sup> +3 if the two bonds are both C-Z and if the resulting fragment ion contains both Zs.

<sup>d)</sup> +1 if the two bonds are both C-Z and if the resulting fragment ion contains both Zs.

# 例) $[M+H]^+$ ( $m/z$ 644)のフラグメンテーション

Table 10. Bond Cleavages in a Compound<sup>27)</sup>

Cleavage	Calculated mass	Mass shift <sup>a)</sup>	Observed peak ( $m/z$ ) <sup>b)</sup>
10a	367	② 0	367
10b	260	② 0	260
10c	130	② 0	130
10d	383	③ +2	385
10e	276	③ +2	278
10f	146	③ +2	148

<sup>a)</sup> The number in a circle, such as ② and ③, indicates the corresponding item in Table 2.

<sup>b)</sup> Other peaks were also observed and are assigned as follows:  $m/z$  644 ( $MH^+$ ),  $m/z$  349 ( $367 - H_2O$ ),  $m/z$  331 ( $349 - H_2O$ ),  $m/z$  242 ( $260 - H_2O$ ),  $m/z$  113 ( $130 - NH_3$ ).

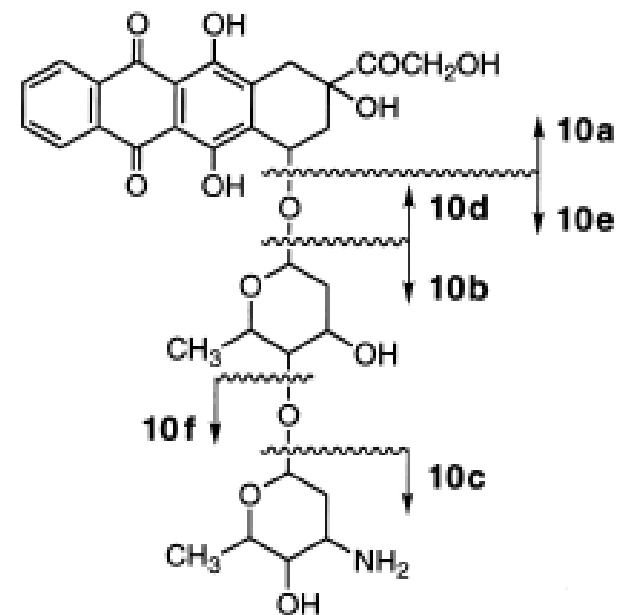
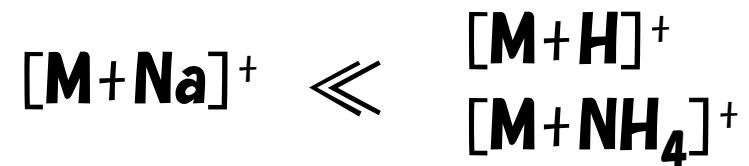


Fig. 10. Bond cleavages in a compound.

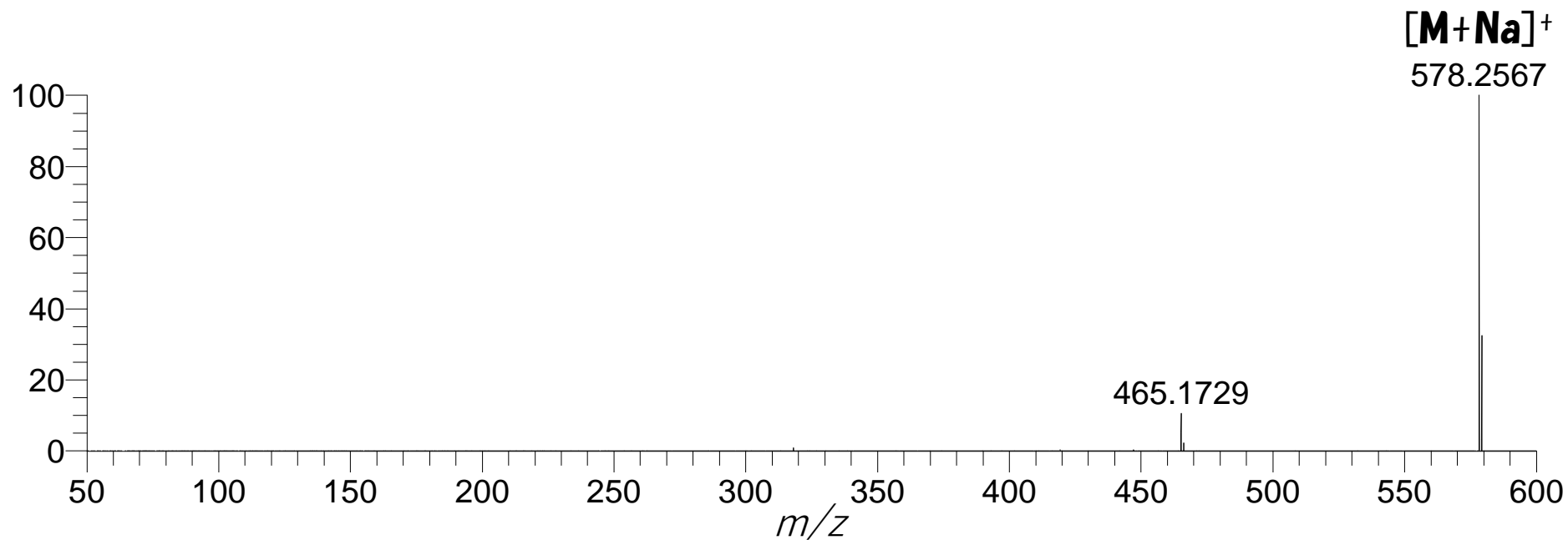
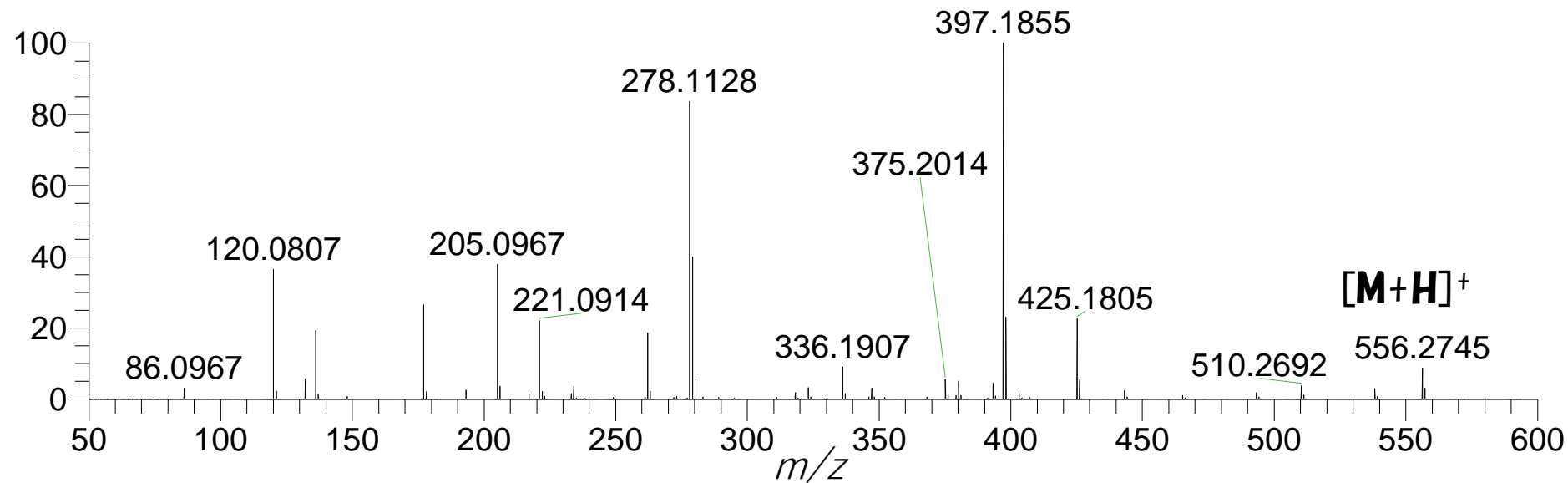
# イオン種によるフラグメンテーションの起こり易さ

一般論として

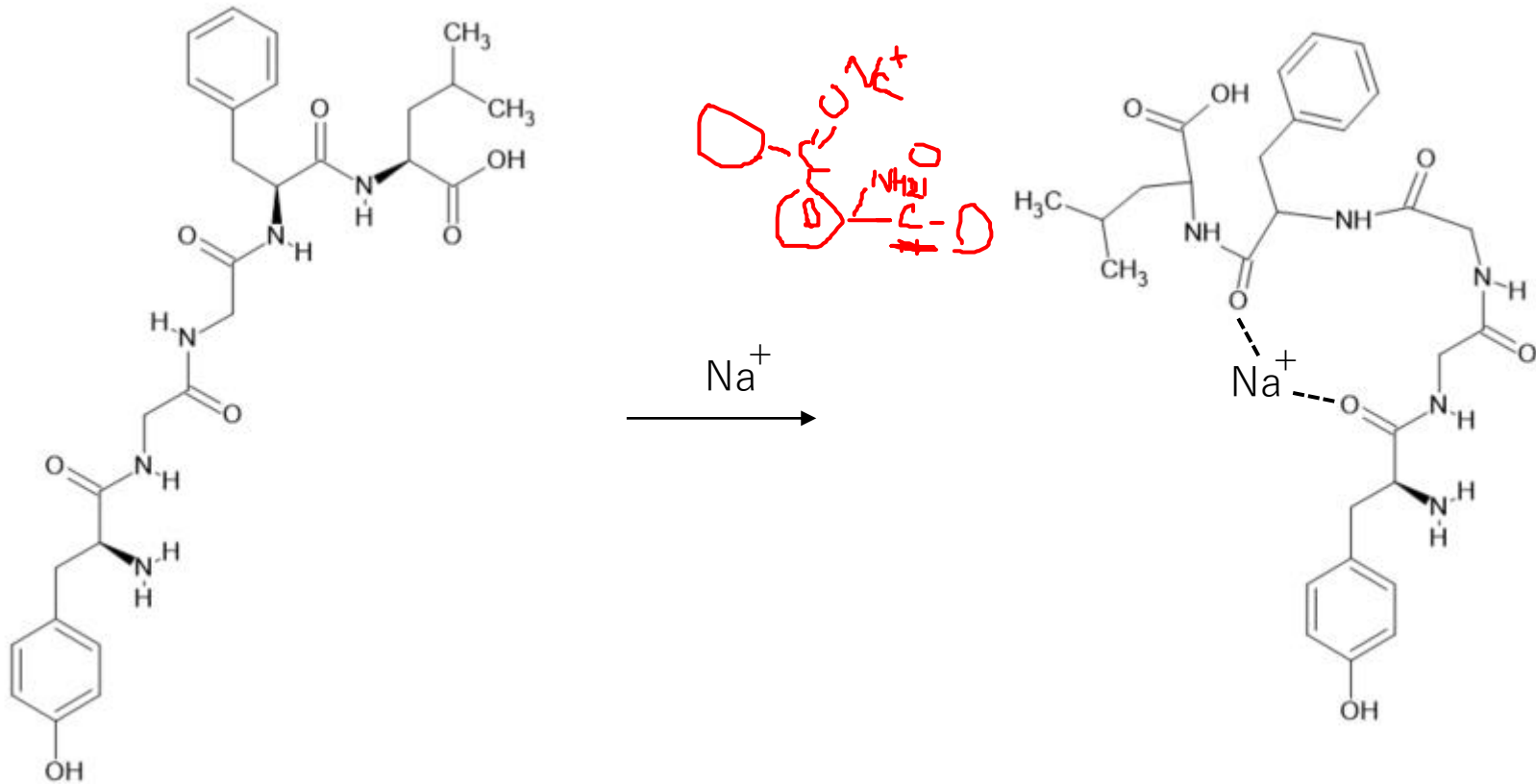


ただし、分析種の構造に依存する

# [M+Na]<sup>+</sup>がフラグメンテーションを起こし難い例



# 何故[M+Na]<sup>+</sup>がフラグメンテーションを起こくくなる場合があるのか？





## **4. マススペクトル解析における注意点**

**4-1. 夾雑ピークの見極め**

**4-2. 如何にして正しい $m/z$ 値を得るか(高分解能質量分析計)**

**4-3. マススペクトル取得モードについて**

## 4. マススペクトル解析における注意点

### 4-1. 夾雑ピークの見極め

4-2. 如何にして正しい $m/z$ 値を得るか(高分解能質量分析計)

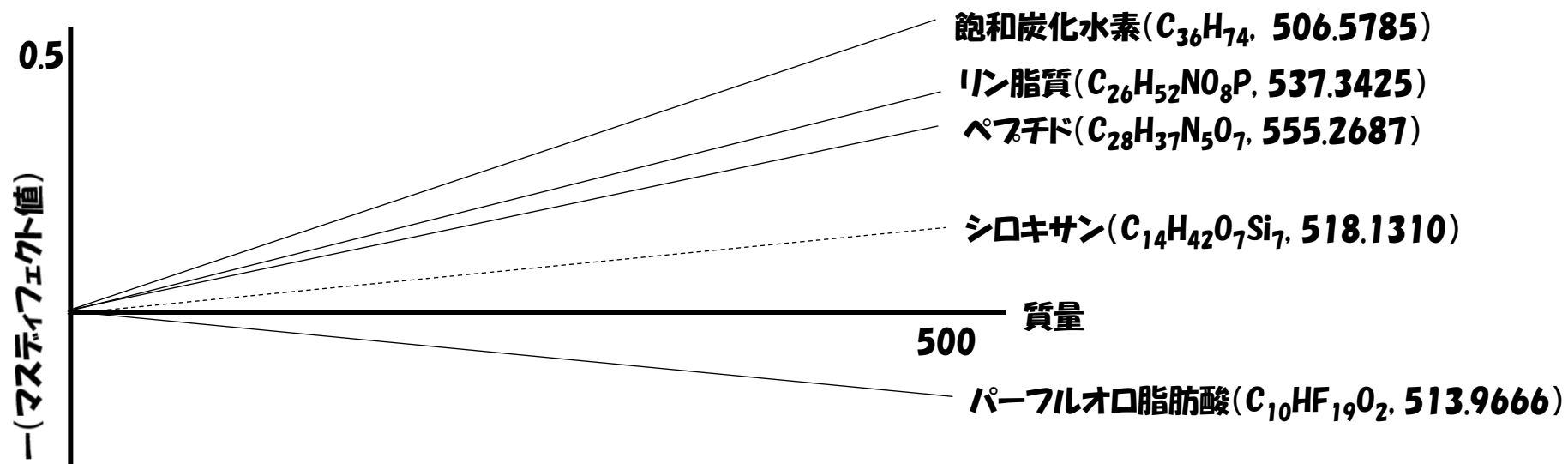
4-3. マススペクトル取得モードについて

# マステイフェクト値

分子のノミナル質量からモノアイソトピック質量を差し引いた値

例) ベンゼン  $C_6H_6$ , ノミナル質量 78, モノアイソトピック質量 78.046950

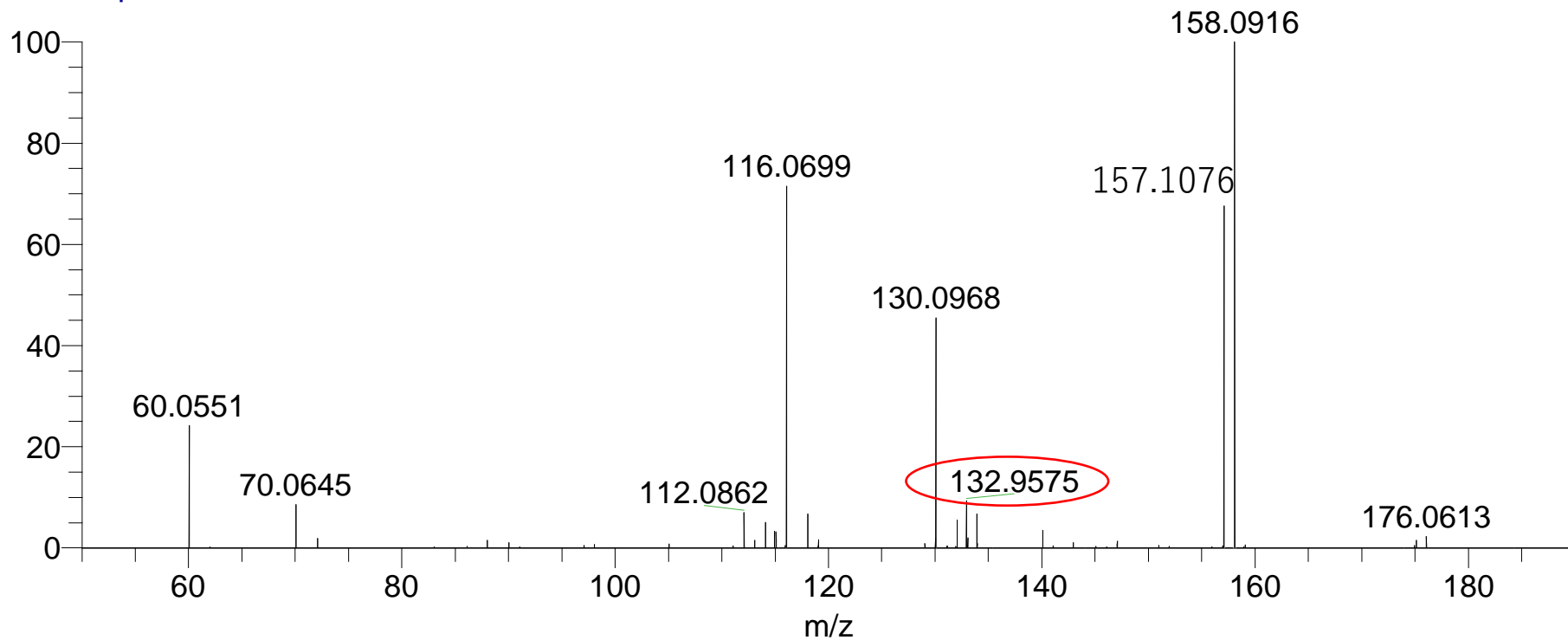
マステイフェクト値 -0.046950



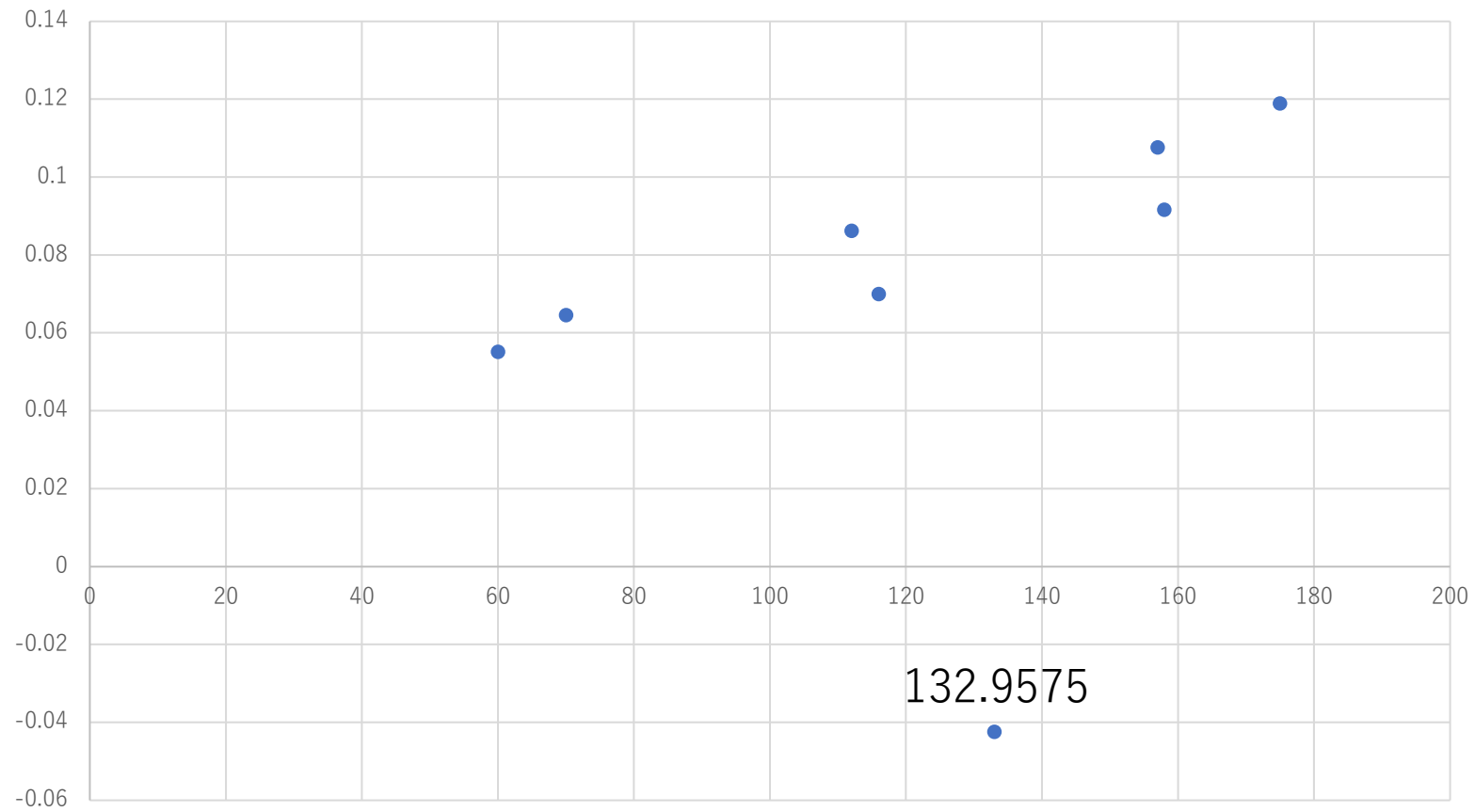
# アルギニン(MH<sup>+</sup>)のフラグメントイオンスペクトル

NL: 1.01E5

T: FTMS + p ESI d Full ms2 175.1

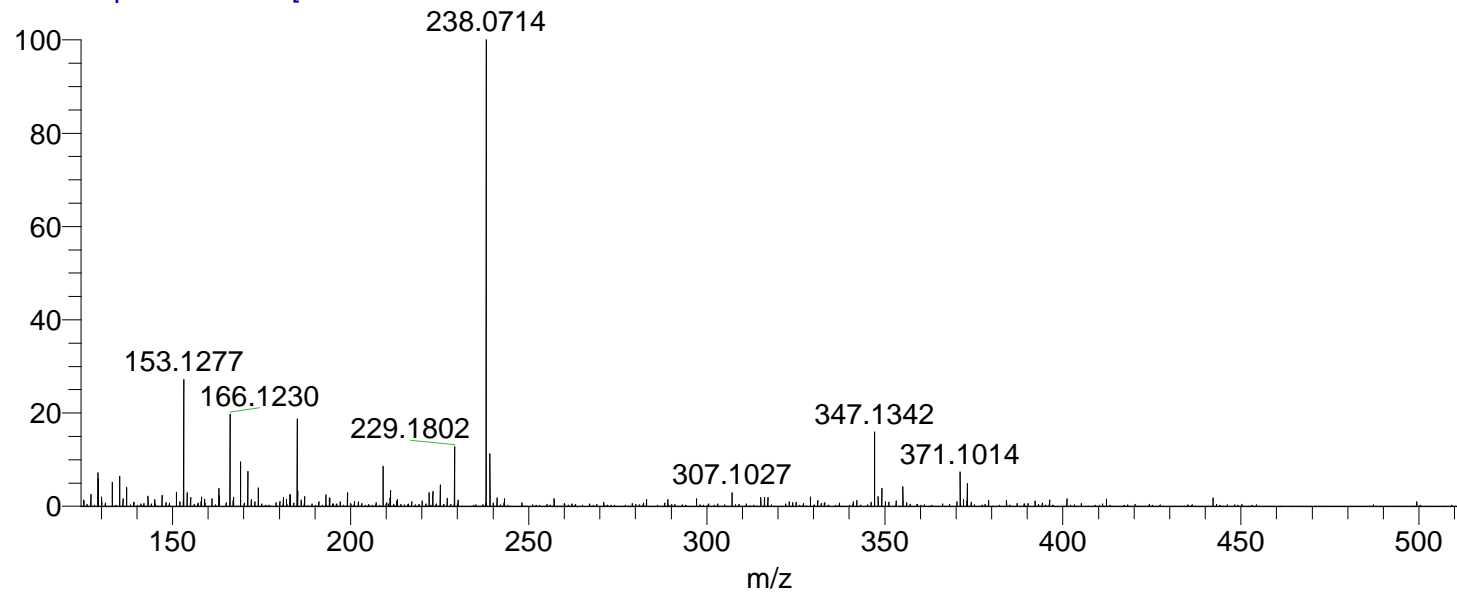


# イオンの $m/z$ 値と小数点以下の数値



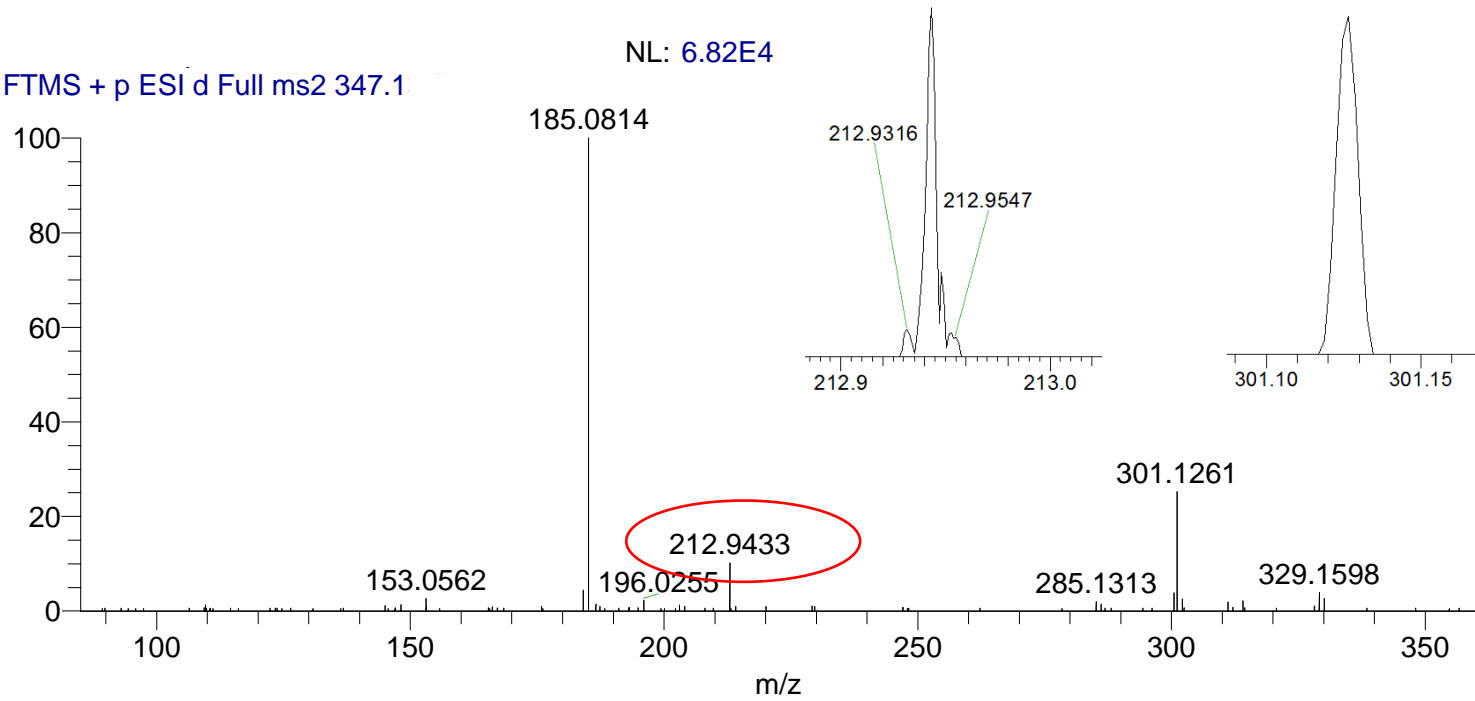
NL: 4.15E6

T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2

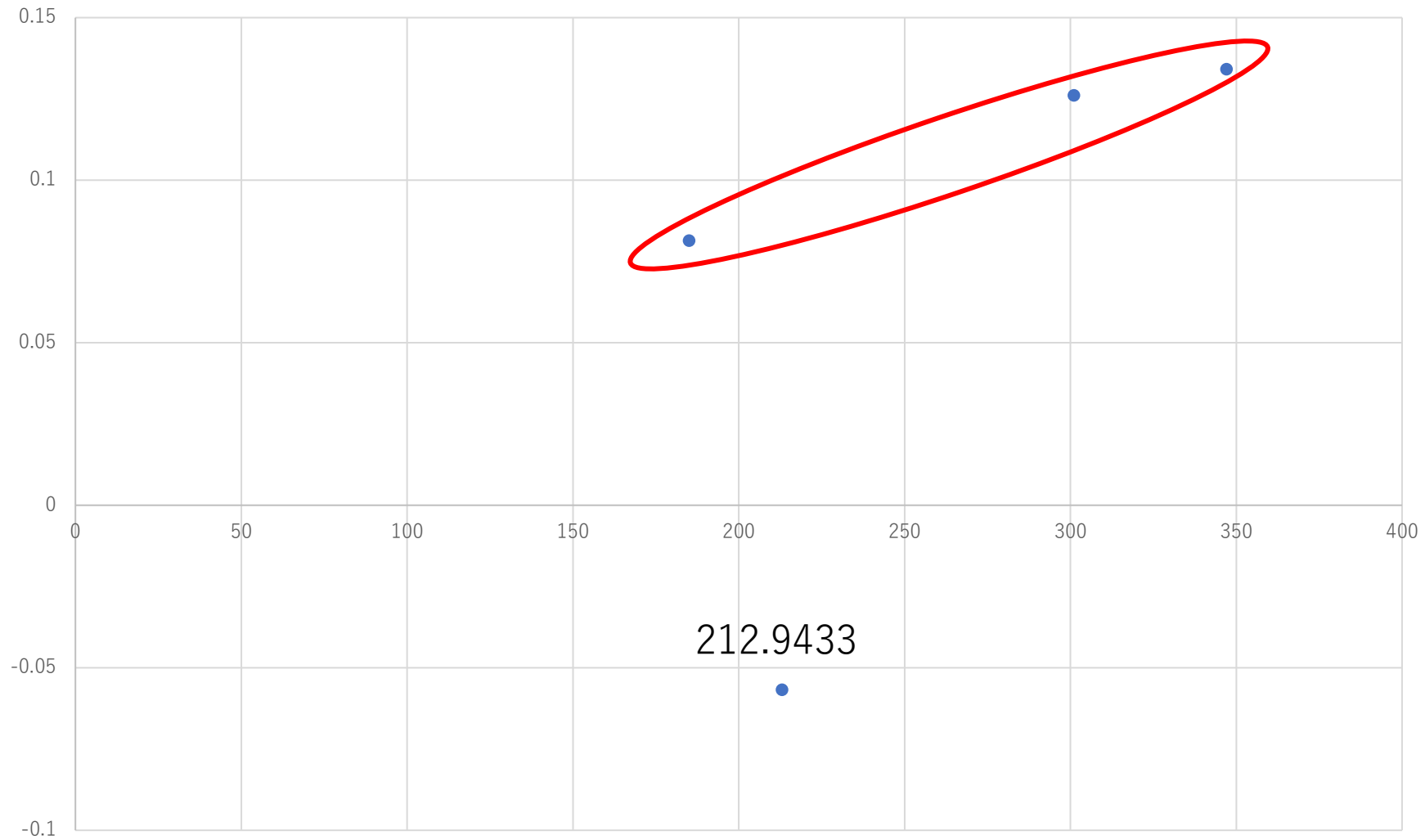


NL: 6.82E4

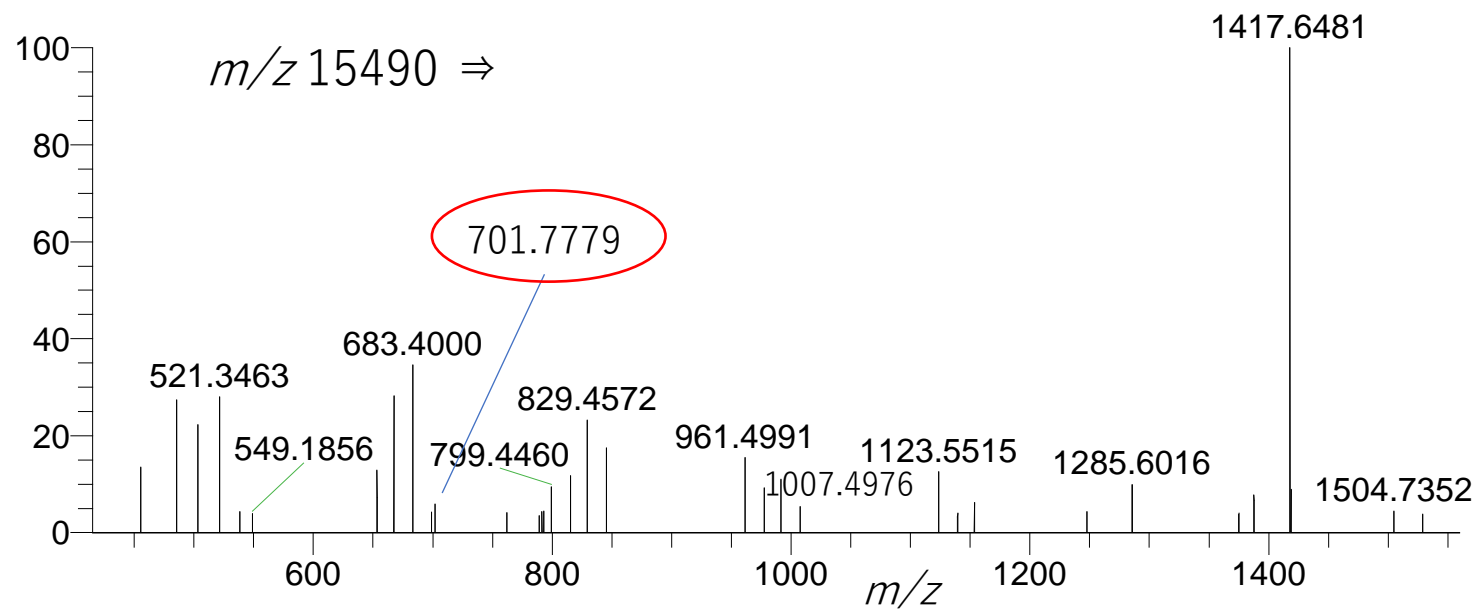
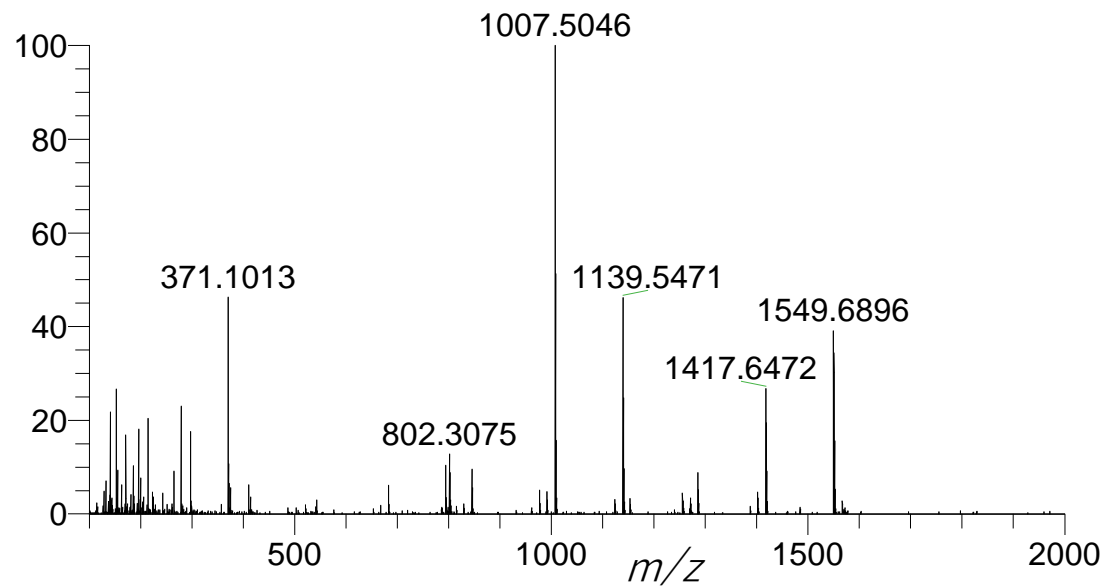
T: FTMS + p ESI d Full ms2 347.1



# イオンの $m/z$ 値と小数点以下の数値

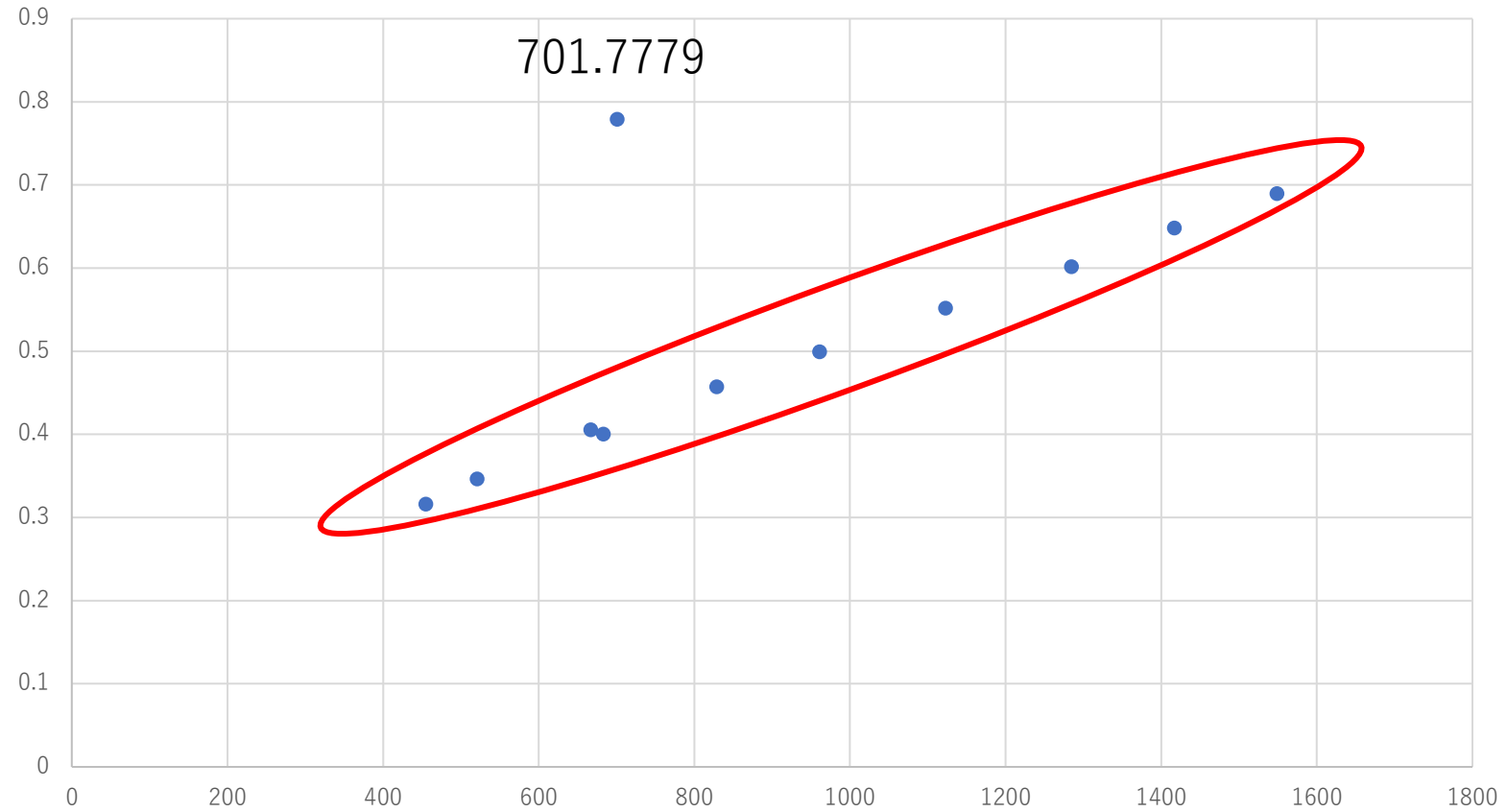


# フロダクトイオンスペクトルにおける夾雑ピーク例-3





# イオンの $m/z$ 値と小数点以下の数値



## 4. マススペクトル解析における注意点

4-1. 夾雑ピークの見極め

4-2. 如何にして正しい $m/z$ 値を得るか(高分解能質量分析計)

4-3. マススペクトル取得モードについて

# 装置の特性を理解する-1

## m/z 値の確度と精度

Thermo Q-Exactive

Tryptophan,  $C_{11}H_{12}N_2O_2$

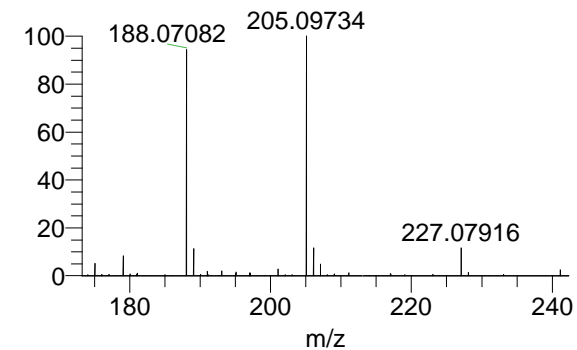
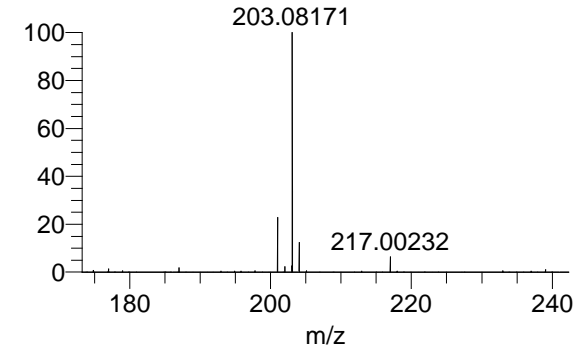
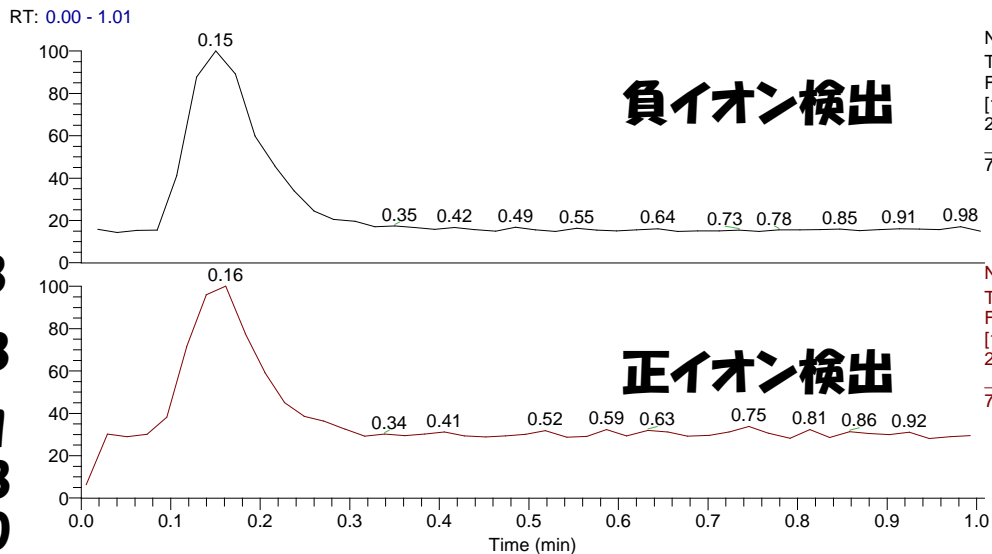
Monoisotopic mass **204.08988**

$[M-H]^-$  **203.08258**

$[M+H-NH_3]^+$  **188.07061**

$[M+H]^+$  **205.09718**

$[M+Na]^+$  **227.07910**

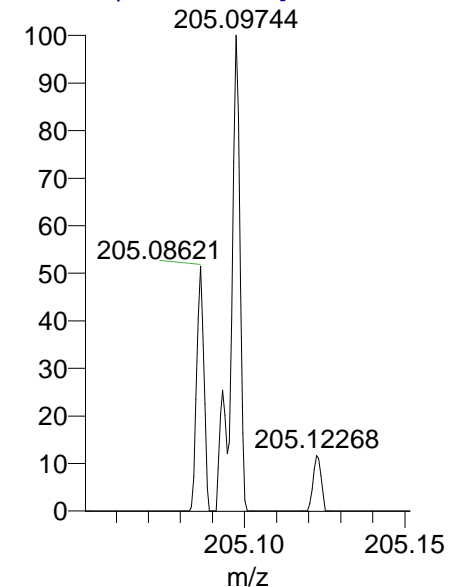


Intensity	Obs. m/z	Error (ppm)
1.10E+08	203.08170	-4.3
2.49E+08	203.08171	-4.3
2.90E+08	203.08171	-4.3
2.78E+08	203.08174	-4.1
1.82E+08	203.08170	-4.3
1.24E+08	203.08170	-4.3
7.52E+07	203.08173	-4.2
8.16E+06	203.08167	-4.5
9.01E+05	203.08173	-4.2
4.91E+05	203.08167	-4.5

Intensity	Obs. m/z	Error (ppm)
4.46E+07	188.07082	1.1
1.97E+08	188.07076	0.8
2.96E+08	188.07079	1.0
3.07E+08	188.07082	1.1
1.06E+08	188.07083	1.2
1.11E+07	188.07083	1.2
2.78E+06	188.07085	1.3
1.47E+06	188.0708	1.0
9.99E+05	188.07086	1.3
6.32E+05	188.07079	1.0

Intensity	Obs. m/z	Error (ppm)
4.13E+07	205.09737	1.0
1.99E+08	205.09727	0.5
2.89E+08	205.09731	0.7
3.25E+08	205.09734	0.9
1.59E+08	205.09744	1.4
5.78E+07	205.0974	1.2
8.17E+06	205.09741	1.2
2.60E+06	205.09744	1.4
7.41E+05	205.09749	1.6
5.84E+05	205.09744	1.4

T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-15



# 装置の特性を理解する-2

## $m/z$ 値の確度と精度

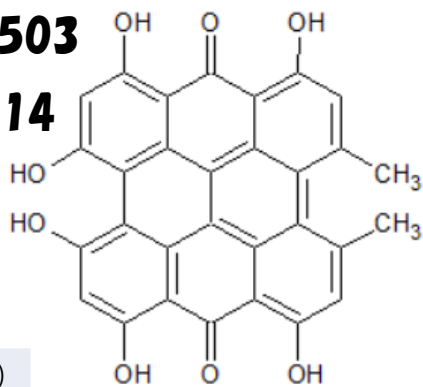
### Thermo LTQ-Orbitrap XL

Hypericin,  $C_{28}H_{34}O_{15}$

Monoisotopic mass **504.084503**

$[M-H]^-$

**503.07614**



Intensity	Obs. $m/z$	Error (ppm)
4.99E+06	503.07617	0.1
4.44E+07	503.07593	-0.4
6.62E+07	503.07593	-0.4
1.53E+07	503.07651	0.7
2.40E+06	503.07617	0.1
1.14E+06	503.0759	-0.5
9.00E+05	503.07602	-0.2
8.86E+05	503.07617	0.1
8.10E+04	503.07532	-1.6
5.09E+04	503.0759	-0.5

(QTOF)

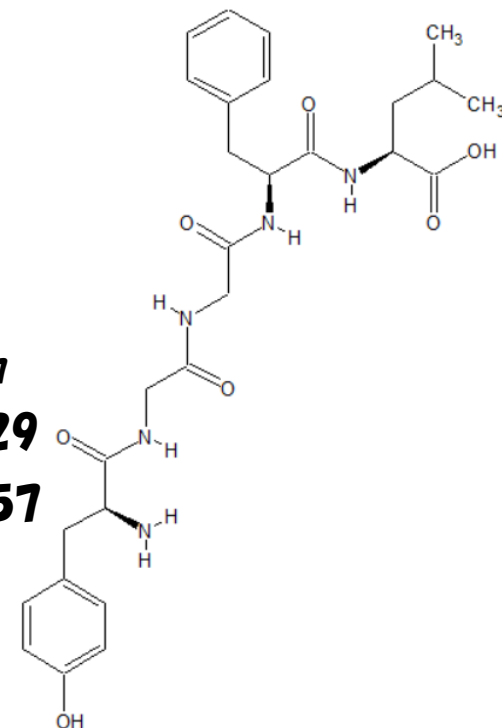
### Waters Synapt G2-XS

Leucin-Enkephalin,  $C_{28}H_{37}N_5O_7$

Monoisotopic mass **555.26929**

$[M+H]^+$

**556.27657**

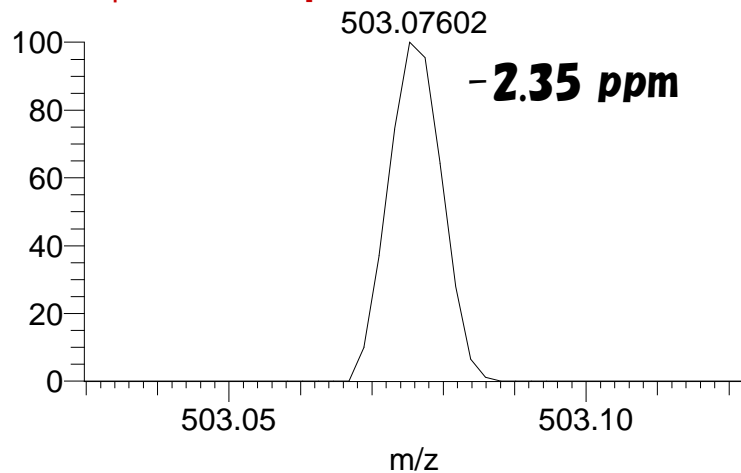


Intensity (Profile)	Intensity (Centroid)	Obs. $m/z$ (Profile)	Centroid $m/z$	Error (ppm)
659	2.44E+03	556.2758	556.2766	0.05
4.00E+03	1.43E+04	556.2758	556.2773	1.31
2.06E+04	6.54E+04	556.2758	556.2775	1.67
1.14E+05	3.16E+05	556.2758	556.2784	3.29
1.58E+05	4.21E+05	556.2758	556.2787	3.83
1.26E+05	3.49E+05	556.2758	556.2783	3.11
3.28E+04	1.03E+05	556.2758	556.2783	3.11
1.25E+04	4.15E+04	556.2758	556.2782	2.93
4.70E+03	1.61E+04	556.2758	556.2793	4.91
990	3.65E+03	556.2758	556.2798	5.81

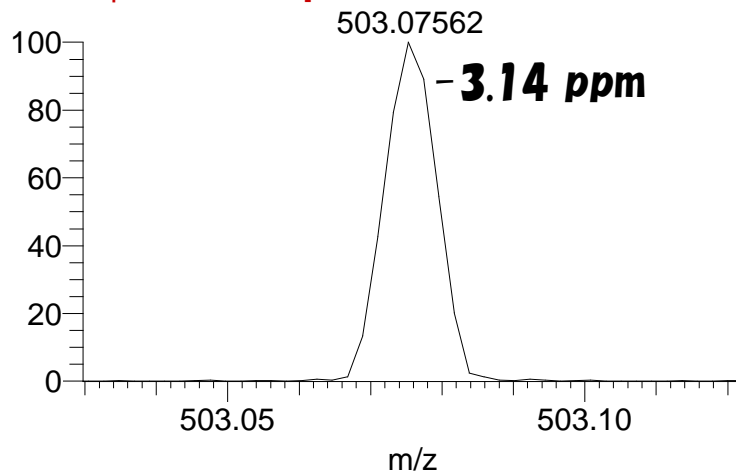
# データポイント毎のピークプロファイルと $m/z$ 値(同一LC/MSデータ)

Thermo LTQ-Orbitrap XL

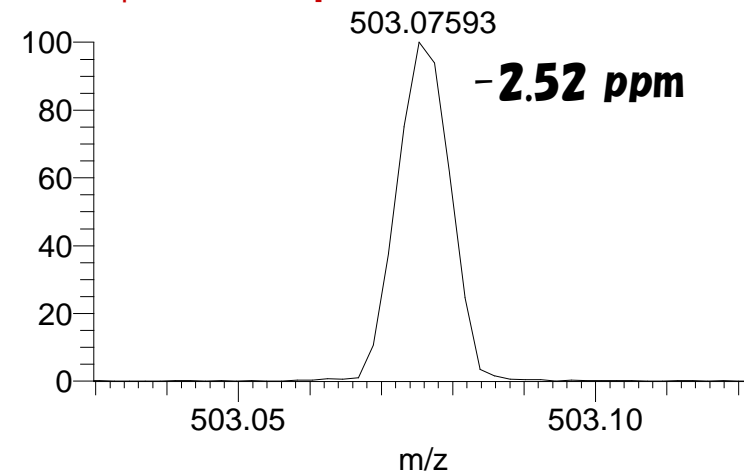
20161107\_std1 #3141 RT: 38.77 AV: 1 NL: 6.75E5  
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



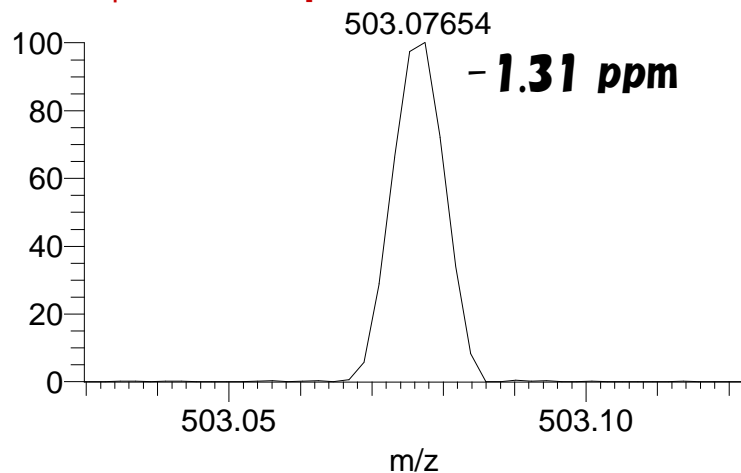
20161107\_std1 #3149 RT: 38.87 AV: 1 NL: 3.38E7  
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



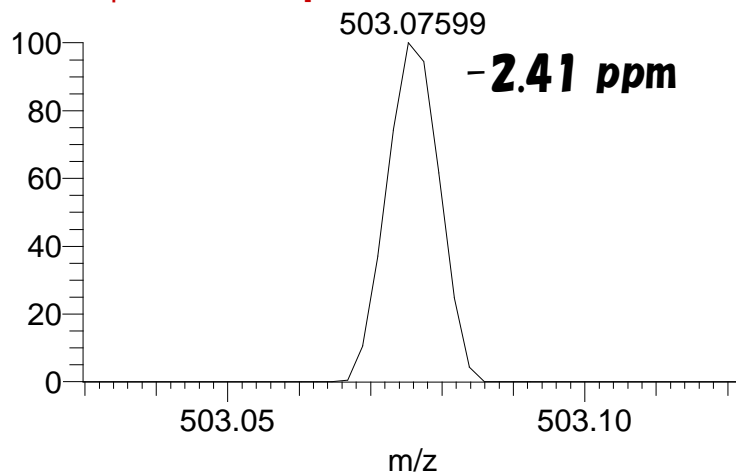
20161107\_std1 #3181 RT: 39.25 AV: 1 NL: 6.62E7  
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



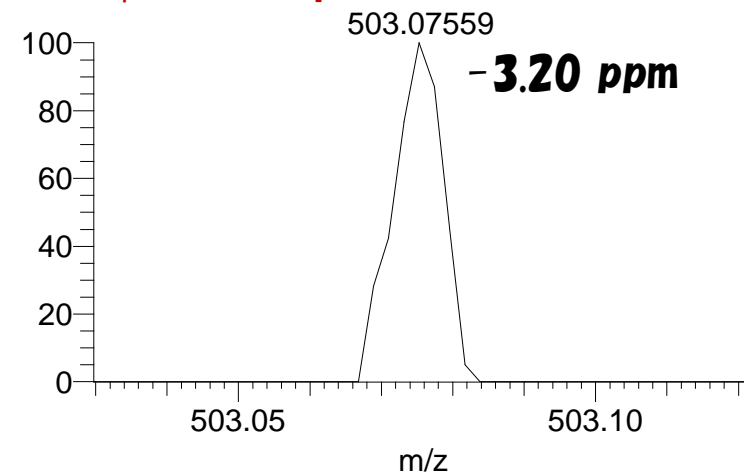
20161107\_std1 #3187 RT: 39.33 AV: 1 NL: 6.17E7  
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



20161107\_std1 #3559 RT: 43.92 AV: 1 NL: 1.88E5  
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



20161107\_std1 #3613 RT: 44.59 AV: 1 NL: 4.46E4  
F: FTMS - p ESI Full ms [10]

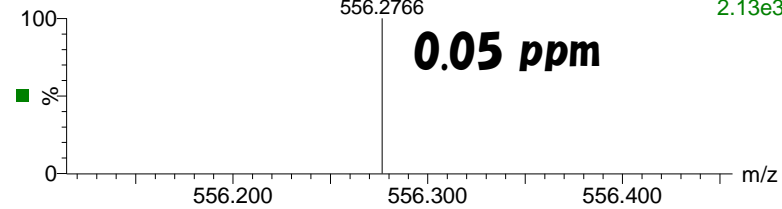


# データポイント毎のピークプロファイルとピーク検出結果(同一LC/MSデータ)

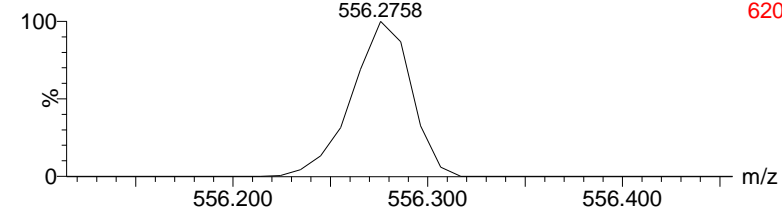
## Waters Synapt G2-XS

Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1025 (9.059) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 2.13e3

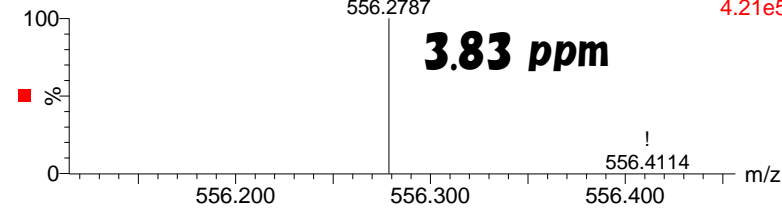


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1025 (9.059) 1: TOF MS ES+ 620

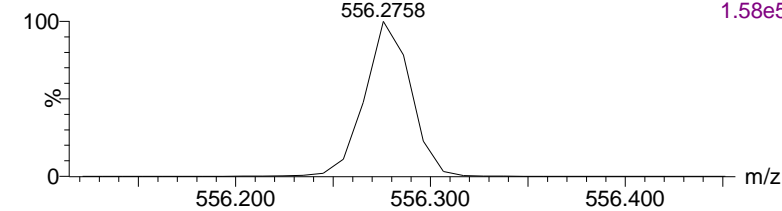


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1031 (9.112) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 4.21e5

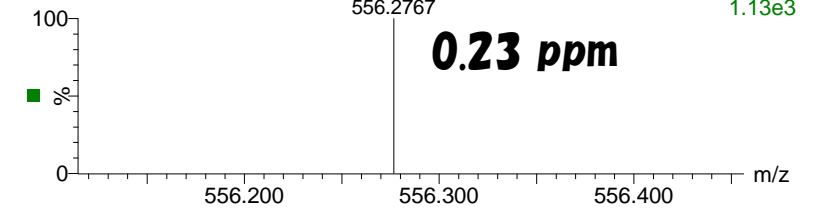


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1031 (9.112) 1: TOF MS ES+ 1.58e5

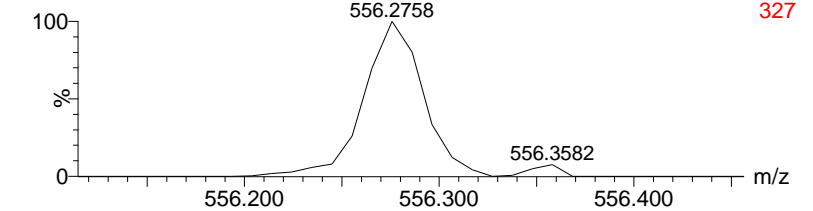


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1060 (9.365) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.13e3

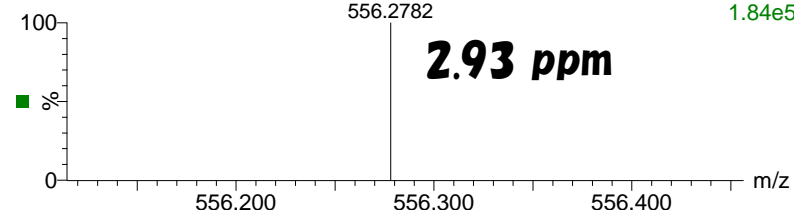


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1060 (9.365) 1: TOF MS ES+ 327

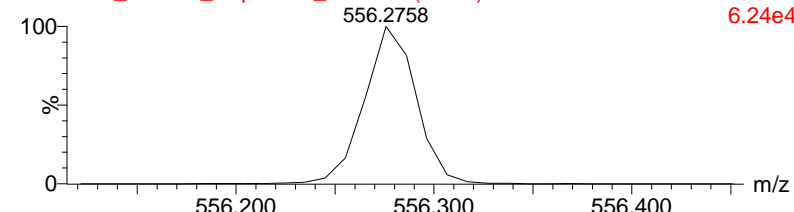


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1028 (9.086) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.84e5

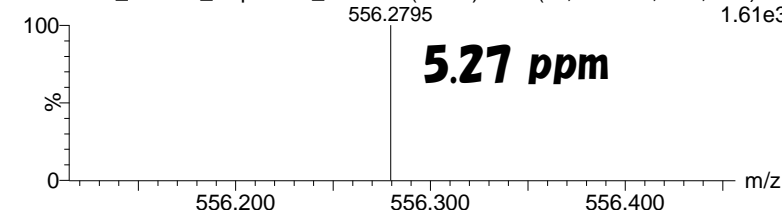


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1028 (9.086) 1: TOF MS ES+ 6.24e4

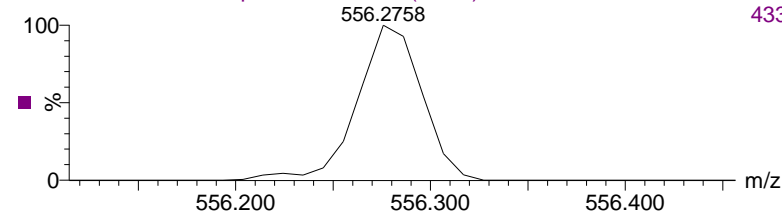


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1056 (9.330) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.61e3

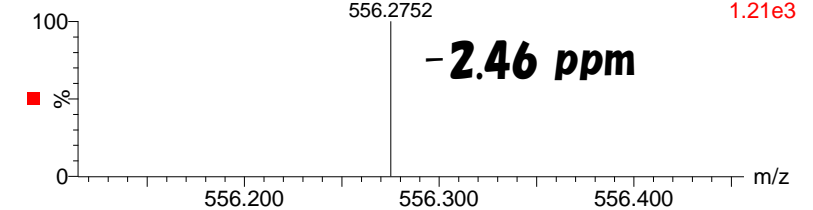


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1056 (9.330) 1: TOF MS ES+ 433

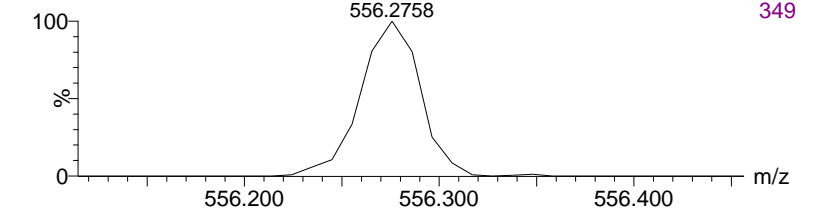


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1062 (9.383) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.21e3



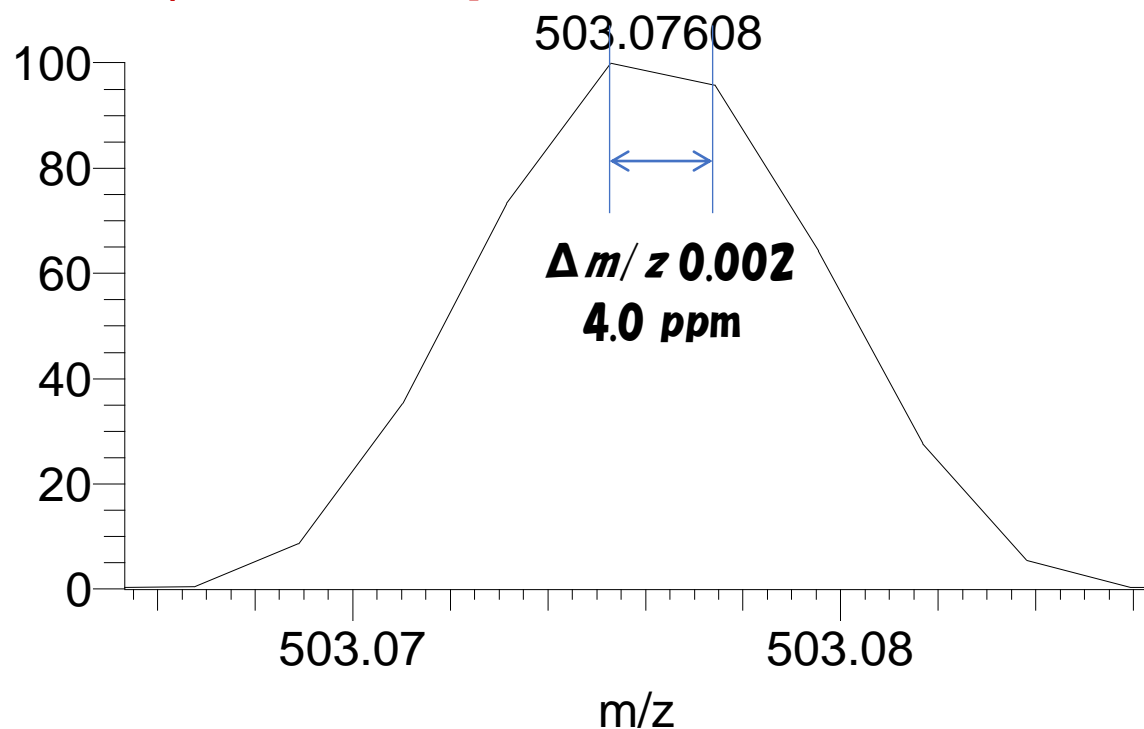
20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1062 (9.383) 1: TOF MS ES+ 349



# プロファイルスペクトルにおけるサンプリングポイントの比較

## Thermo LTQ-Orbitrap XL

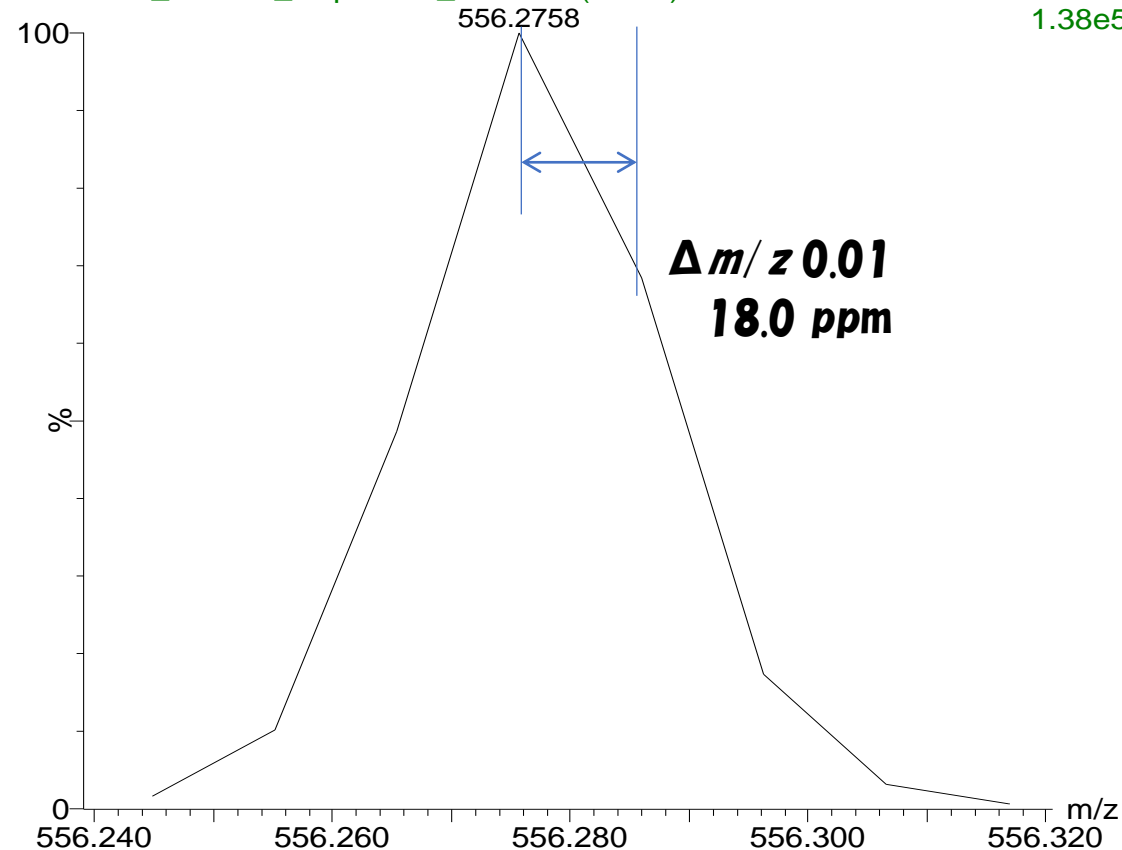
20161107\_std1 #3183 RT: 39.28 AV: 1 NL: 6.49E7  
F: FTMS - p ESI Full ms [100]



## Waters Synapt G2-XS

Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL  
20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_10 1036 (9.155)

1: TOF MS ES+  
1.38e5

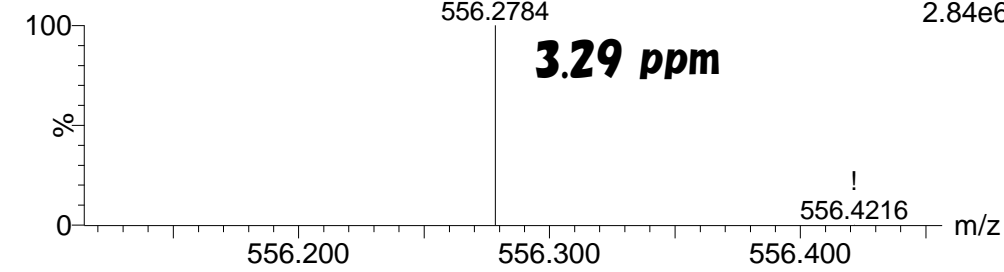


# 積算スペクトルのピークプロファイルとピーク検出結果(異LC/MSデータ)

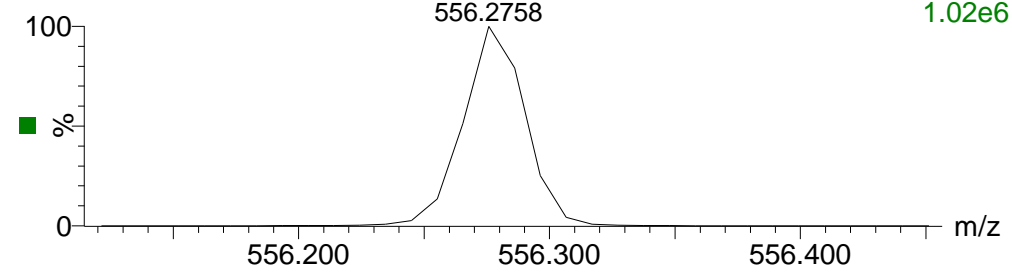
Waters Synapt G2-XS

Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1031 (9.112) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.84e6

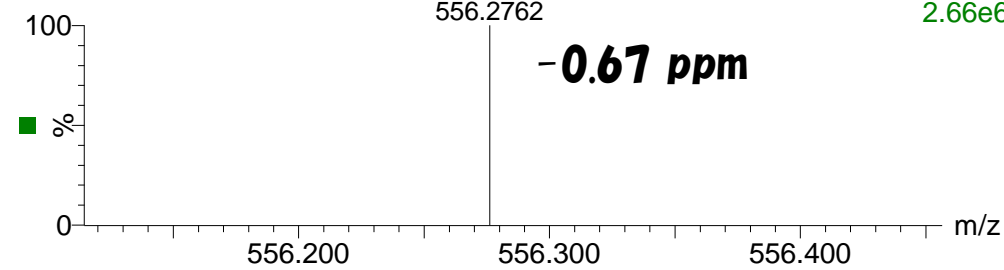


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_01 1031 (9.112) Cm (1028:1037)

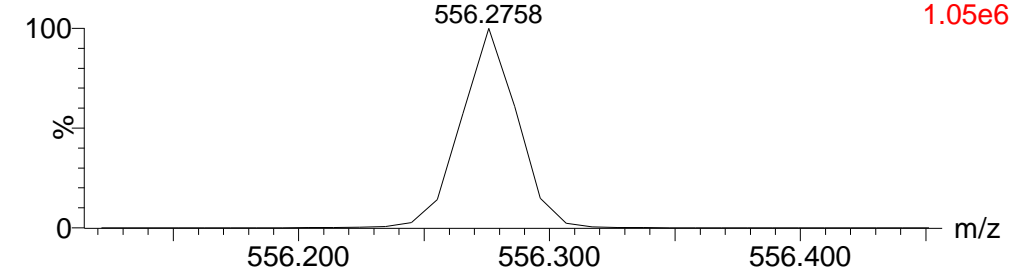


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_02 1039 (9.181) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.66e6

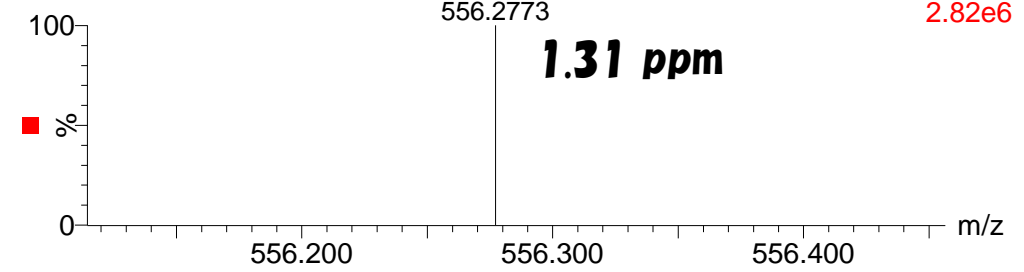


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_02 1039 (9.181) Cm (1036:1044)

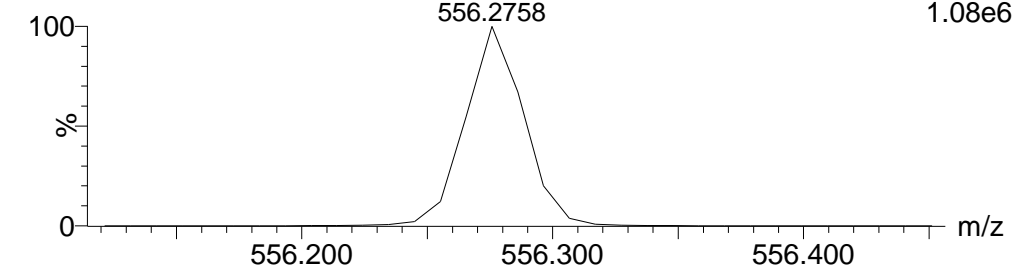


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_03 1041 (9.199) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.82e6

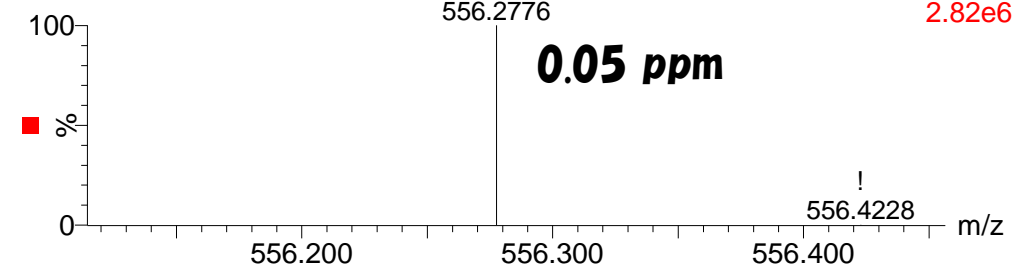


20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_03 1041 (9.199) Cm (1037:1047)

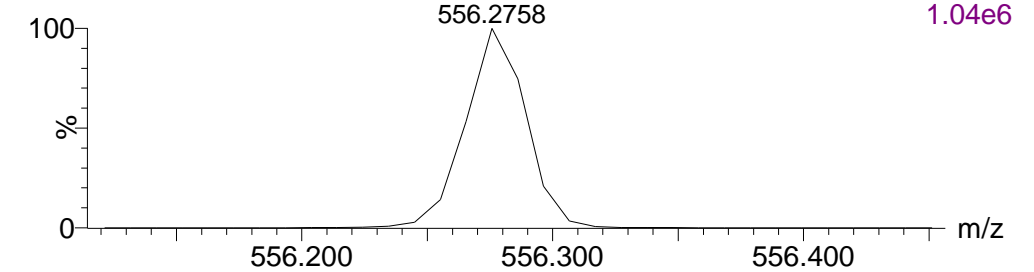


Leu-Enk, 2 ppm/H<sub>2</sub>O, 10uL

20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_04 1037 (9.164) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.82e6



20200402\_LE-Pos\_ReproChk\_04 1037 (9.164) Cm (1033:1044)





# 積算スペクトルのピーク検出結果再現性

Intensity (Profile)	Intensity (Centroid)	Obs. $m/z$ (Profile)	Centroid $m/z$	Error (ppm)
1.02E+06	2.84E+06	556.2758	556.2784	3.29
1.05E+06	2.66E+06	556.2758	556.2762	-0.67
1.08E+06	2.82E+06	556.2758	556.2773	1.31
1.04E+06	2.82E+06	556.2758	556.2776	1.85
1.05E+06	2.68E+06	556.2758	556.2789	4.19
1.05E+06	2.66E+06	556.2758	556.2784	3.29
1.04E+06	2.70E+06	556.2773	556.2773	1.31
1.01E+06	2.65E+06	556.2758	556.2778	2.21
1.02E+06	2.80E+06	556.2758	556.2778	2.21
1.10E+06	2.81E+06	556.2758	556.2773	1.31

## **4. マススペクトル解析における注意点**

4-1. 夾雑ピークの見極め

4-2. 如何にして正しい $m/z$ 値を得るか(高分解能質量分析計)

4-3. マススペクトル取得モードについて

# MS Method (Waters, QTOF) スペクトル取込み条件設定画面

Acquisition TOF MS Trap CE Control Transfer CE Control

Da range

Acquire TOF MS over the range

Low Mass 100 Da

High Mass 1000 Da

Scanning Conditions

Scan Time 1 sec

Data Format Continuum

Instrument conditions

Override Cone Voltage value specified in tune file

Cone Voltage 40 V

Ramp the Cone Voltage during the scan

Initial Voltage 40 V

Final Voltage 40 V

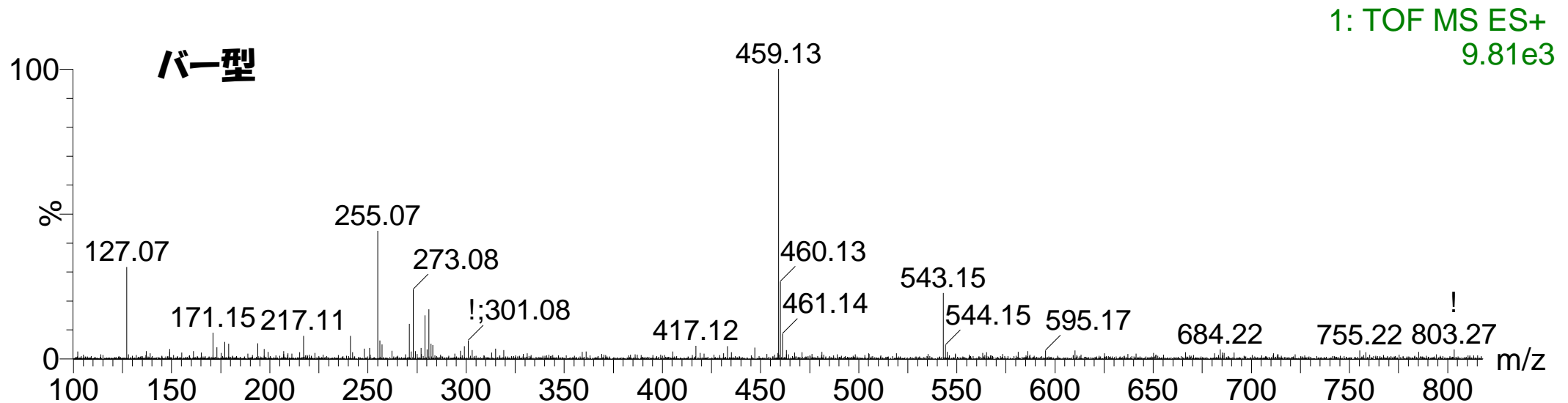
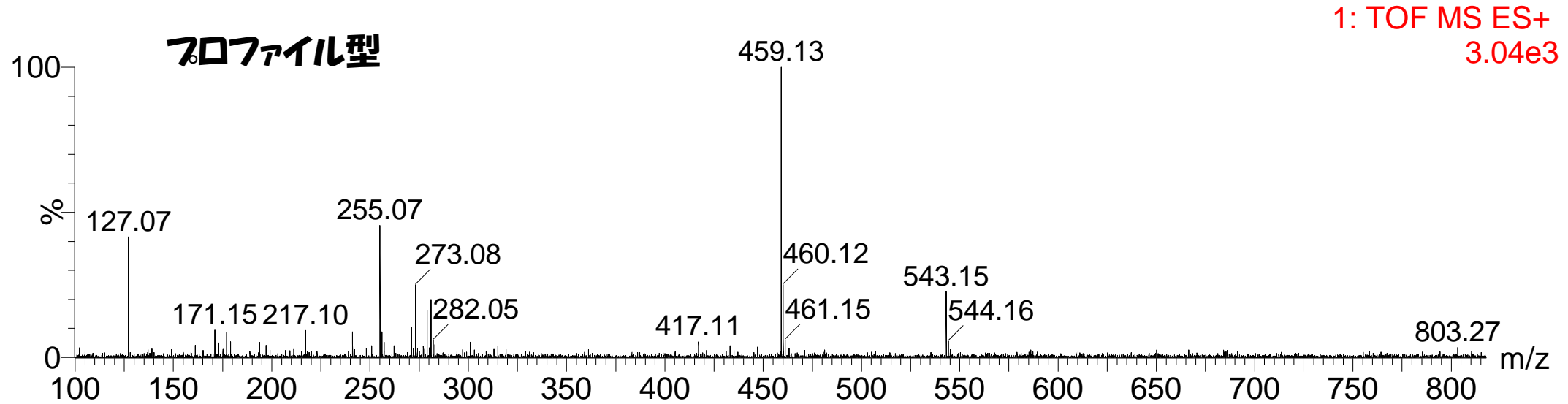
## Continuum = Profile

イオンプロファイルの波形を保持  
した形式のマススペクトルを取り込む  
方法  
いわゆる生データ

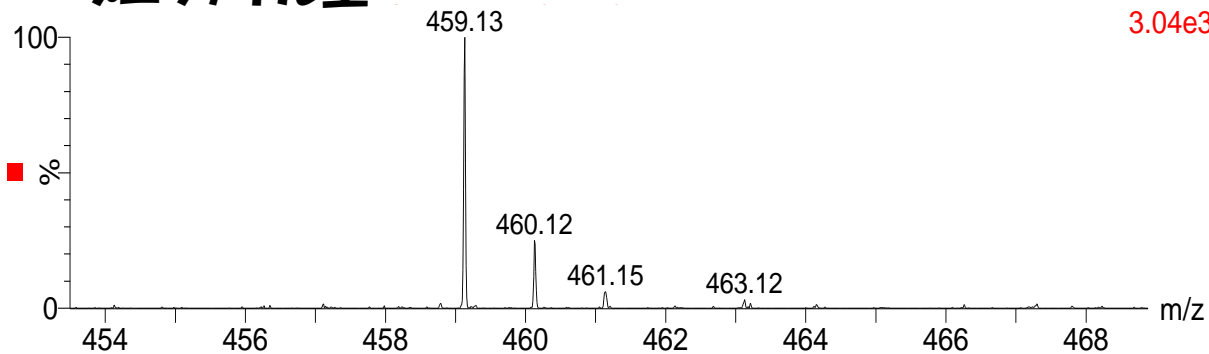
## Centroid = Bar

マススペクトルをデータ処理システムに  
取り込む際に、プロファイルのスペクトルを  
ピーク検出して、バー型にしてから取り込む  
方法  
加工されたスペクトル

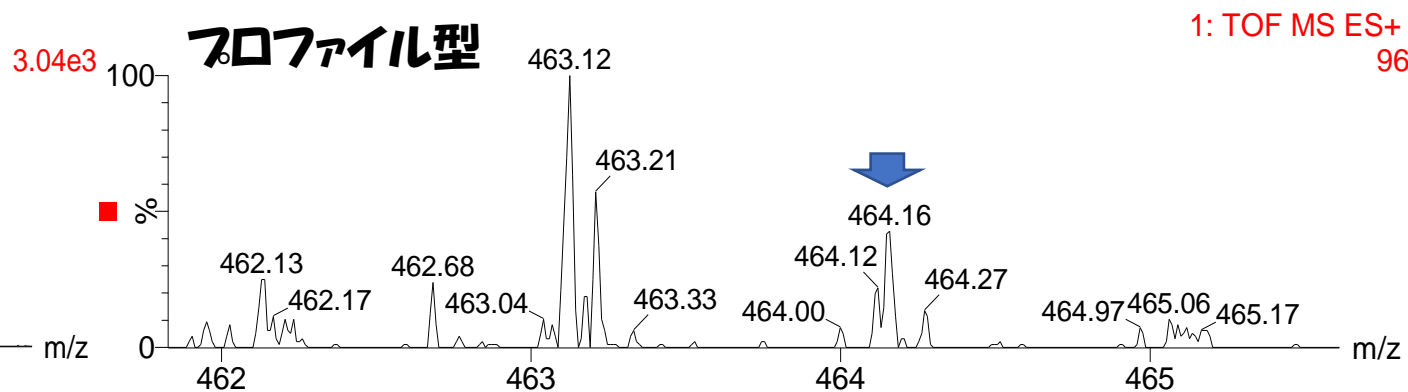
# フロファイル型スペクトルとバー型スペクトル



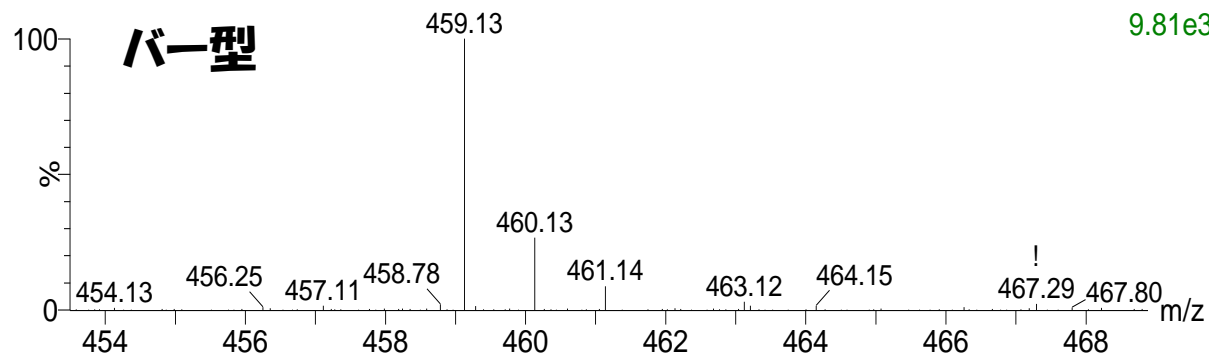
### フロファイル型



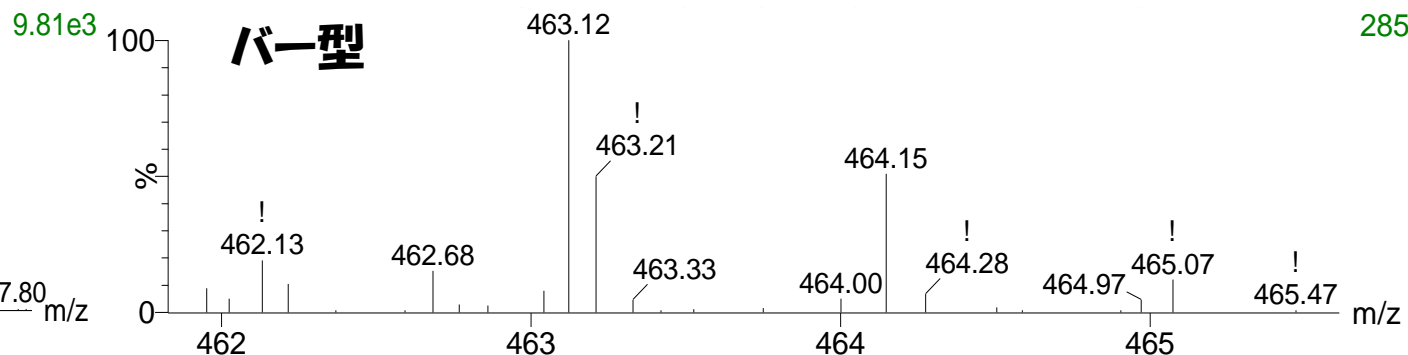
### フロファイル型



### バー型



### バー型



# プロファイル型スペクトルとバー型スペクトルの利点と欠点

## プロファイル型スペクトル

- 利点
  - ピーク形状を確認できる
  - ピークとノイズの判別ができる
  - 質量分解度を確認できる
- 欠点
  - データ容量が大きくなる(質量分解能が高い程大きくなる)

## バー型スペクトル

- 利点
  - データ容量が小さい
- 利点
  - ピーク形状が確認できない(ピーク検出の良し悪しが判断できない)
  - ピークとノイズの判別ができない(ノイズをピーク検出してしまう可能性がある)
  - 質量分解度を確認できない(データの良し悪しが判断できない)

**最近ではPCの性能が良いので、バー型スペクトルで取り込むメリットはない!**



LC / MS  
定量分析入門  
(2021)

高橋 豊 著

**2021年5月発刊**

**定量分析入門であるが、本セミナーの内容(マススペクトルから得られる情報、イオン化、フラグメンテーションなど)も含まれる**

**著者紹介割引あり(20% OFF)**

**購入希望者は高橋まで!**

**[tyutaka@sitsuryobunsekiya.com](mailto:tyutaka@sitsuryobunsekiya.com)**