

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 中～上級編

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
- 2011年4月 横浜市立大学非常勤講師
- 2019年2月 (株)フレッパース設立 代表取締役社長
- 2019年4月 浜松医科大学特任研究員

- 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

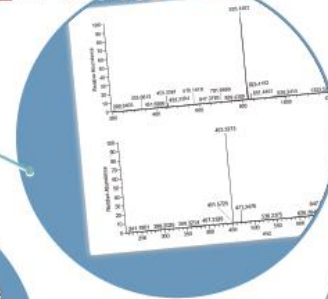
- 趣味: ウルトラマラソン、トライアスロン(アイアンマンレース)、スキー(全日本スキー連盟指導員)、ソフトボール、テニス、サッカー審判員(JFA3級)

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、質量分析関連装置開発

「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

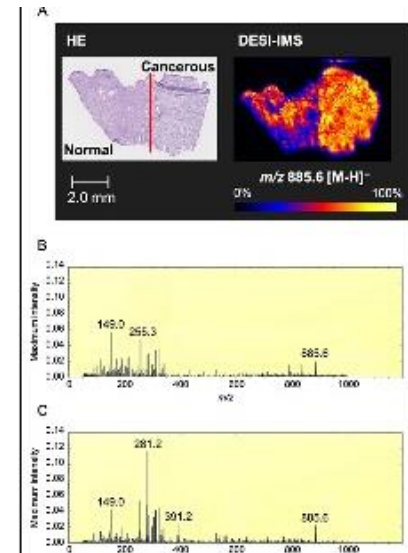
使用装置

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. 1-1, 1-2のおさらい

1-1. マススペクトルから得られる情報

1-2. LC/MSにより得られるマススペクトルの読み方

1-3. 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

2. マススペクトル解析における注意点

2-1. 夾雑ピークの見極め(マスディフェクト値の利用)

2-2. 如何にして正しい m/z 値を得るか(高分解能質量分析計)

2-3. マススペクトル取得モードについて

3. 低エネルギーCIDによるフラグメンテーション解析、上級編

1. 7-1, 7-2のおさらい

1-1. マススペクトルから得られる情報

1-2. LC/MSIにより得られるマススペクトルの読み方

1-3. 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

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

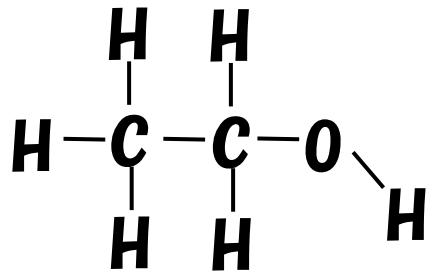
||

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

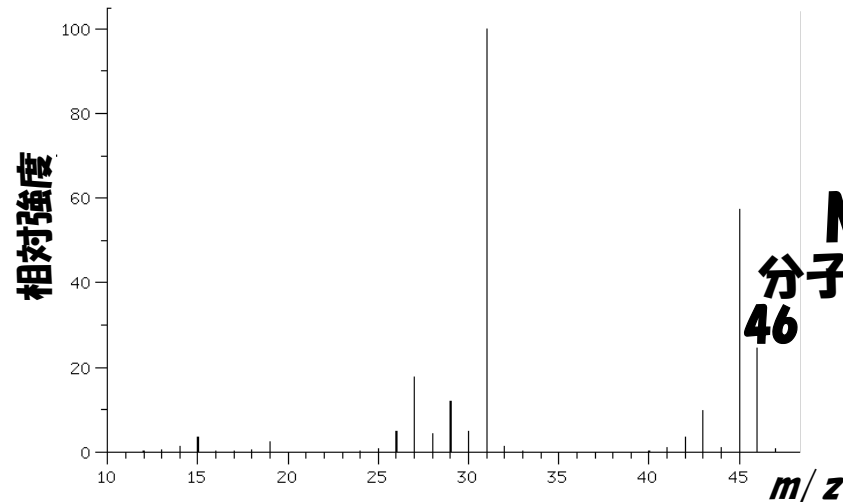


質量: 約46

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

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)

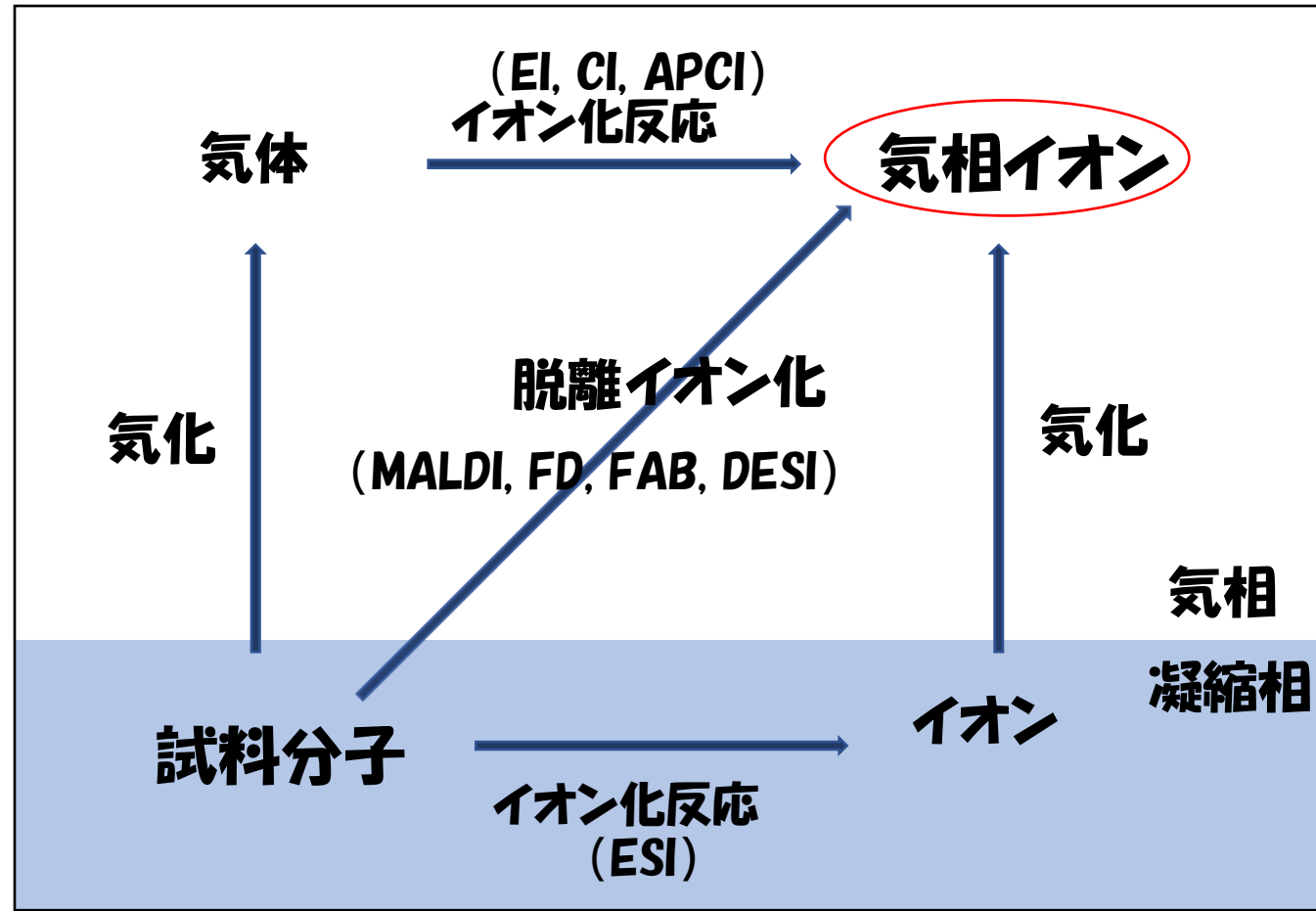
$M^{\cdot+}$ が生成

プロトン移動によるイオン化

CI, FD, FAB, ESI, APCI, MALD

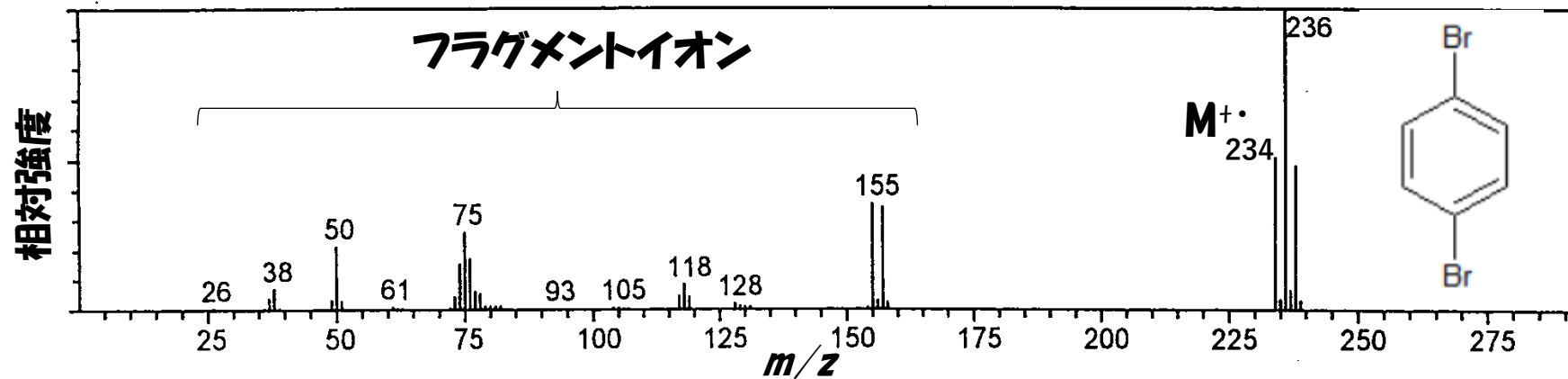
$[M+H]^+$, $[M-H]^-$ などが生成

イオン化法と生成しやすい
イオン種との関係

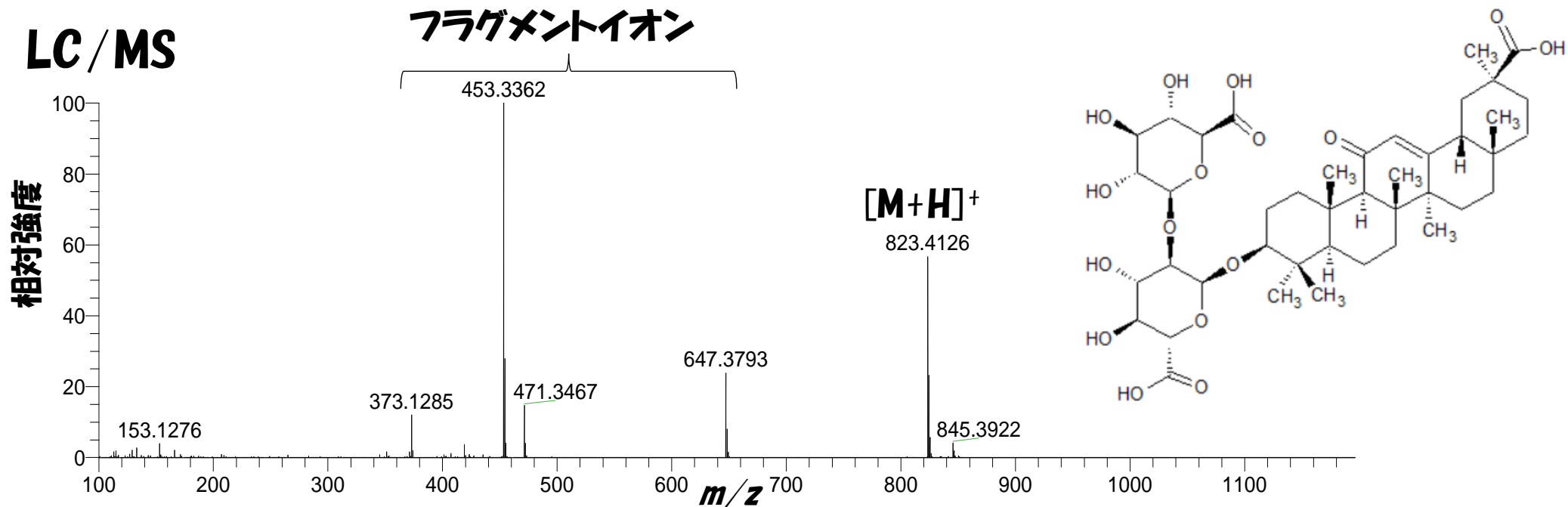


マススペクトル例

GC/MS



LC/MS

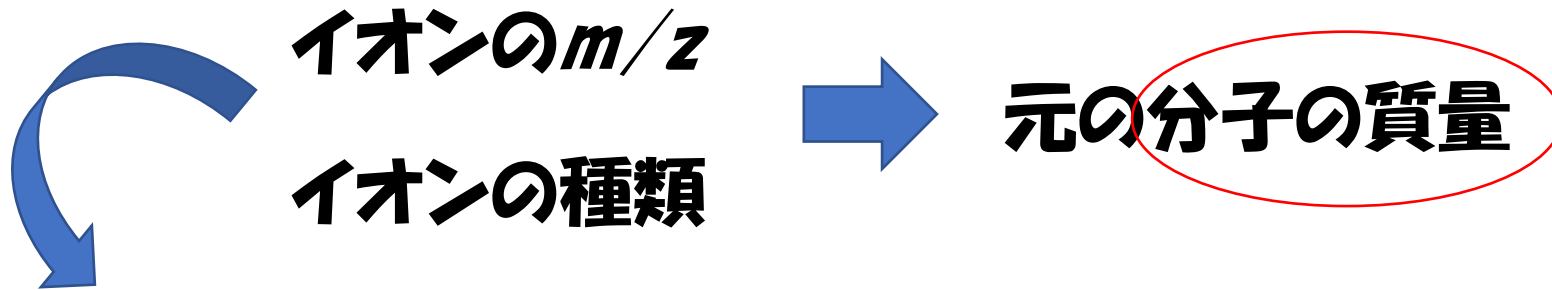


マススペクトルから分子の質量を推測するには？

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

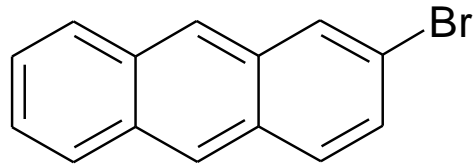


結合が開裂せずに生成したイオンであること！

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

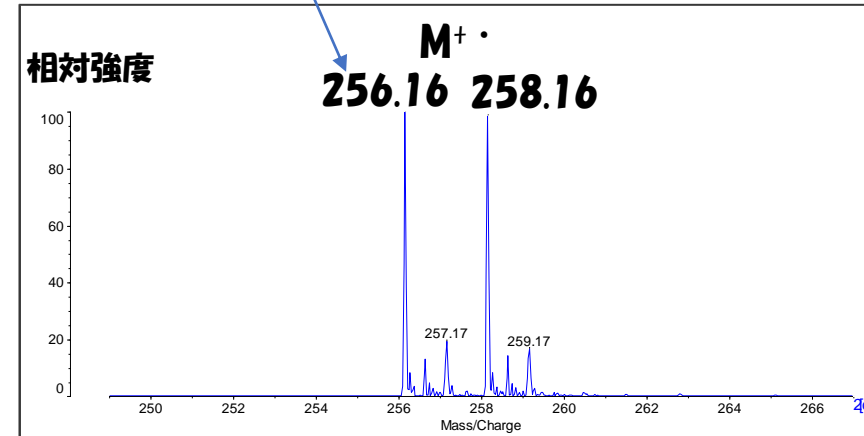
マスペクトルから得られる分子質量情報

2-ブロモアントラセン



$C_{14}H_9Br$
ノナル質量 **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

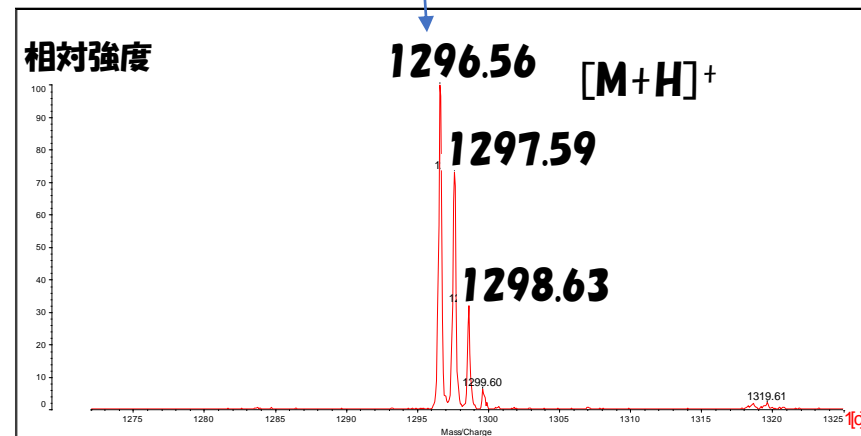


アンジオテンシン-I

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

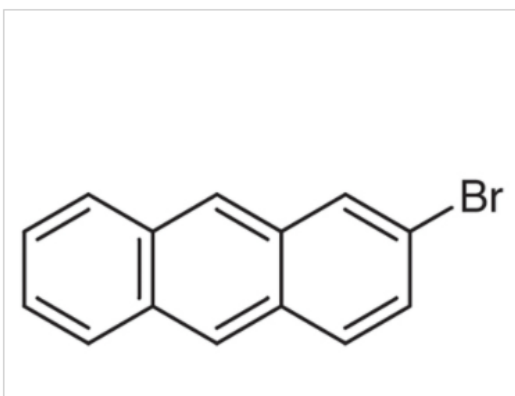
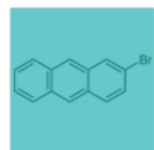
$C_{62}H_{89}N_{17}O_{14}$
ノナル質量 **1295**
モノアイソトピック質量 **1295.6775**
分子量 (相対分子質量) **1296.4987**

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) : >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)

>97.0%(GC)

分子式・分子量

C₁₄H₉Br = 257.13

物理的状態 (20℃)

固体

CAS RN

7321-27-9

1. 7-1, 7-2のおさらい

1-1. マススペクトルから得られる情報

1-2. LC/MSにより得られるマススペクトルの読み方

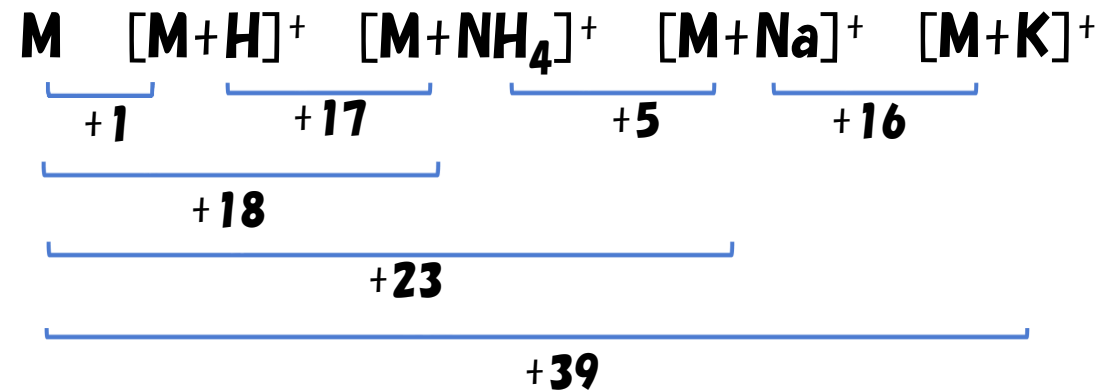
1-3. 低エネルギーCIDによるフラグメンテーション解析、初～中級編

ESI, APCI(LC / MS)で観測されやすいイオン種

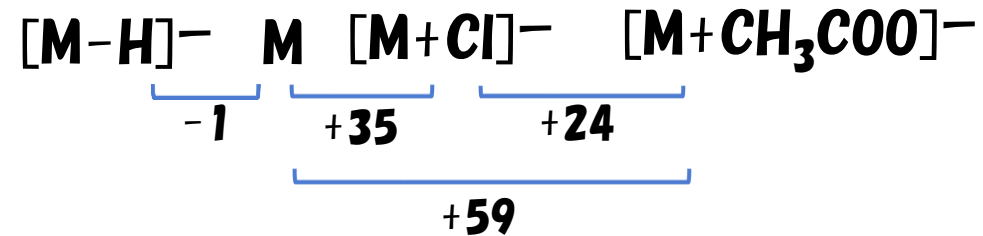
- ソフトイオン化
- プロトン付加分子 ($[M+H]^+$)、脱プロトン分子 ($[M-H]^-$)
- 溶媒、不純物の付加イオン
 - $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+H+Solv]^+$, $[M+Cl]^-$,
- ESIでは多価イオン ($[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$)
- クラスターイオン ($[2M+H]^+$, $[3M+Na]^+$...)

ESIで生成し易いイオン種と質量(m/z)差

正イオン

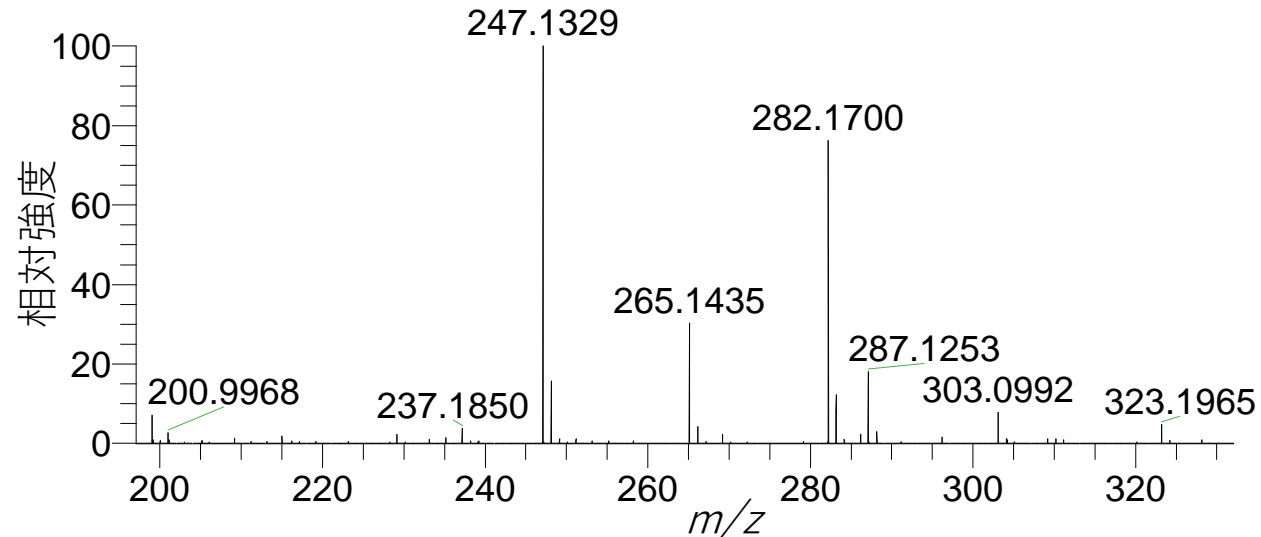
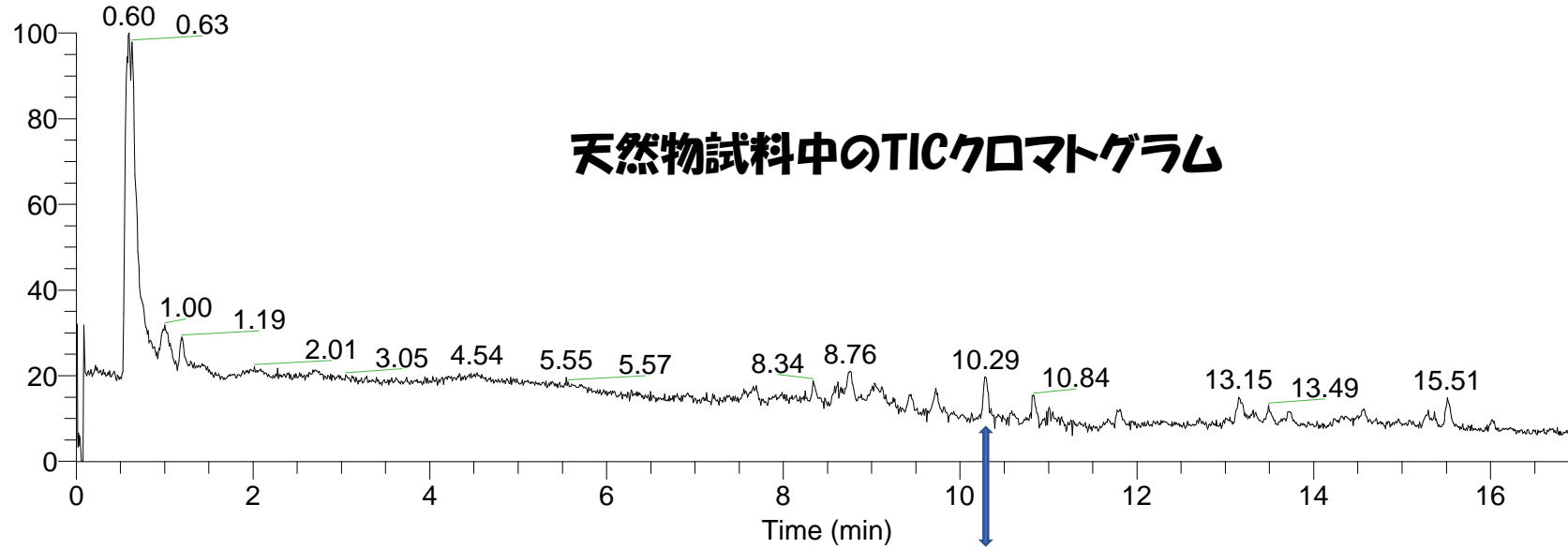


負イオン



LC/MSのマスをスペクトルを読む

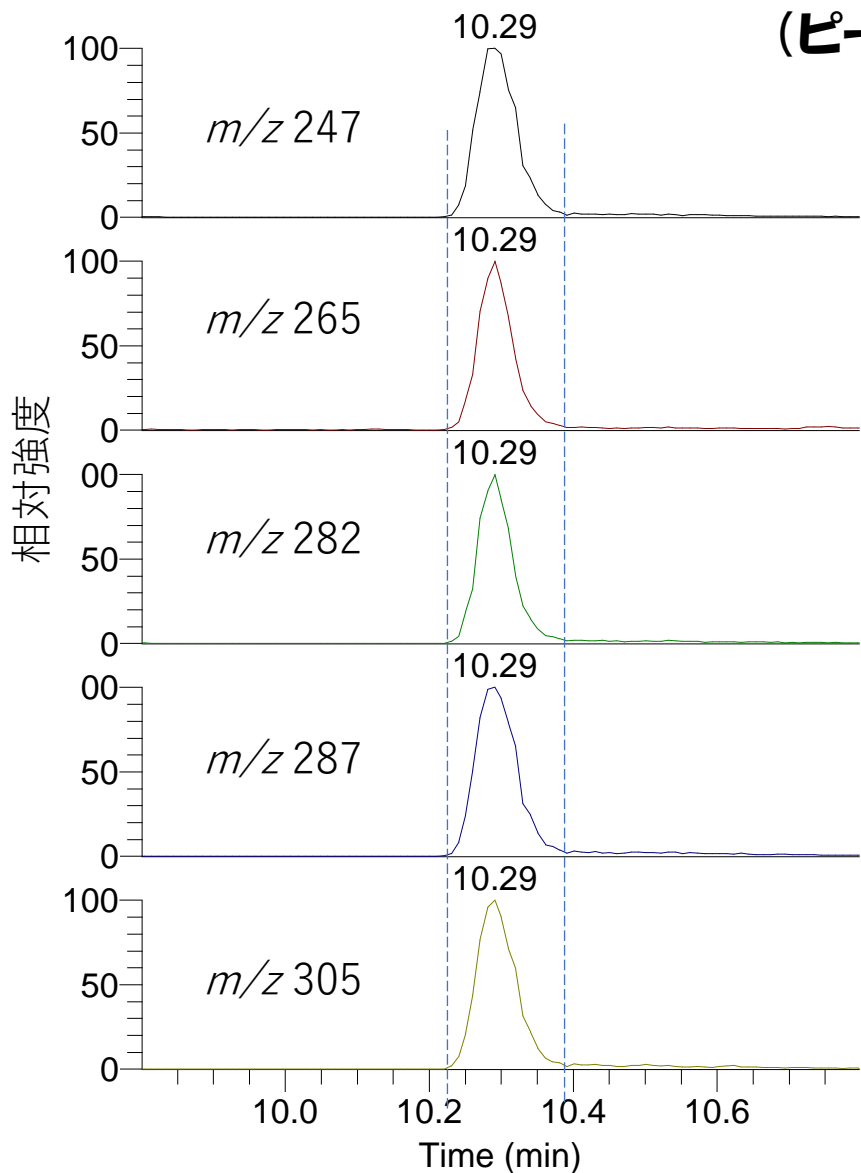
RT: 0.00 - 17.00



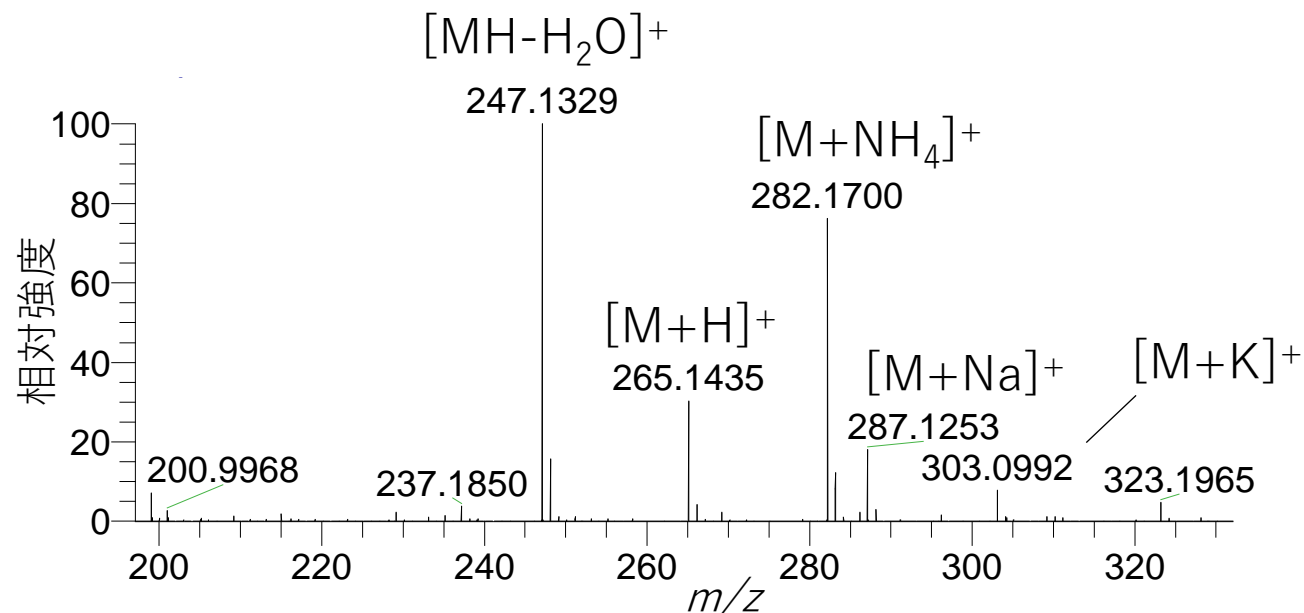
LC/MSのマスペクトルを読む

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+)

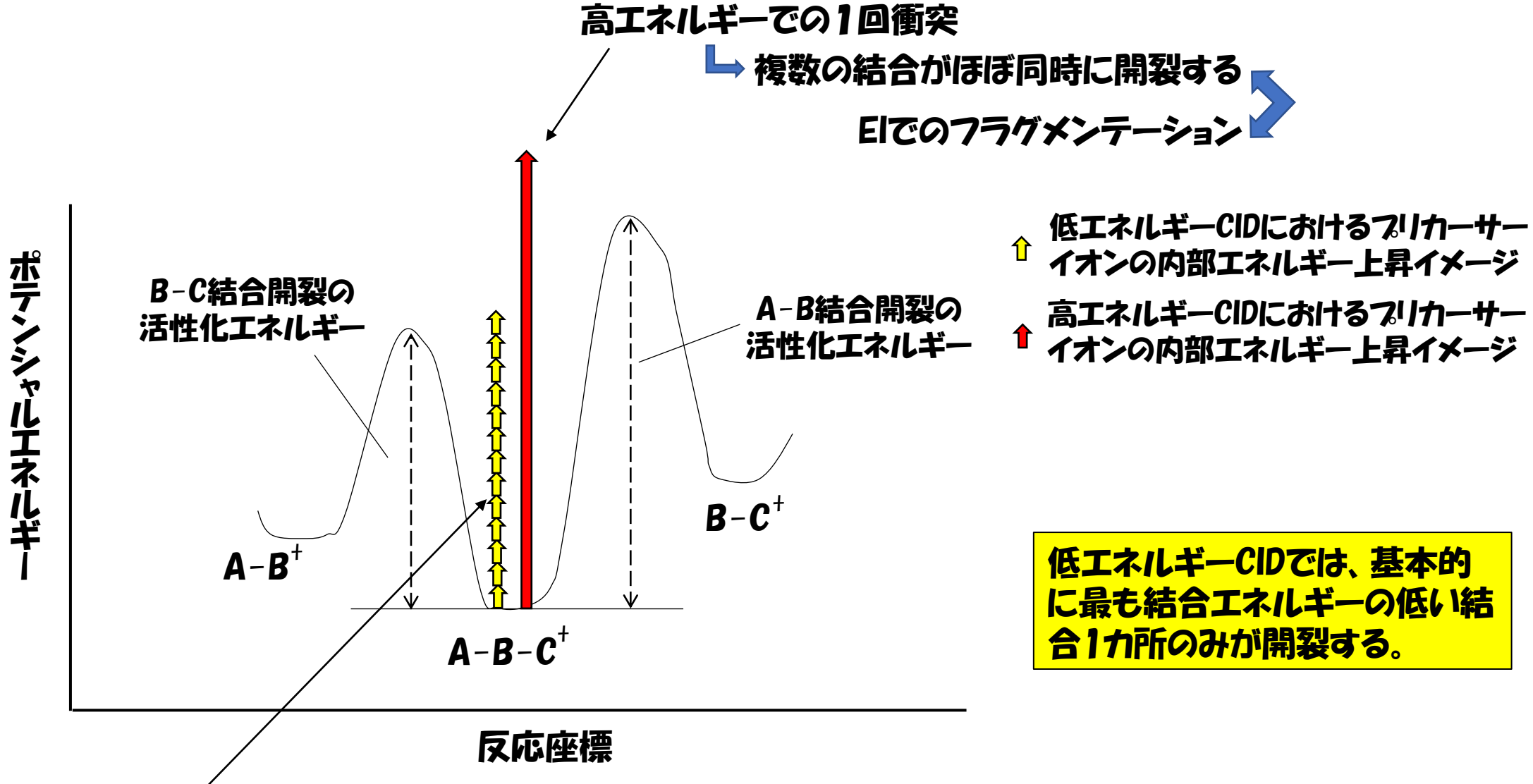
1. 7-1, 7-2のおさらい

1-1. マススペクトルから得られる情報

1-2. LC/MSIにより得られるマススペクトルの読み方

1-3. 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

フラグメンテーションの考え方

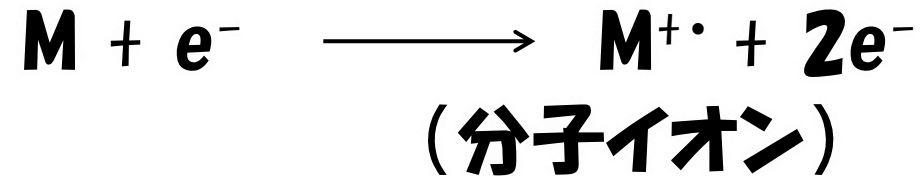


低エネルギーでの多段階衝突 → 最も切れやすい(結合エネルギーの低い)結合が優先的に開裂する

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



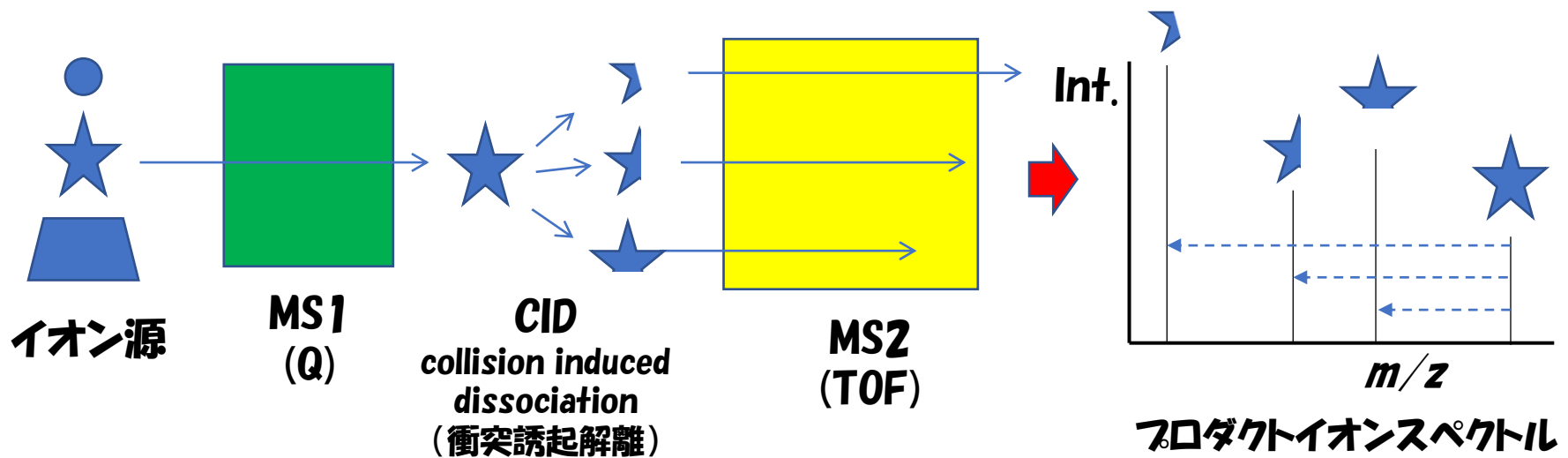
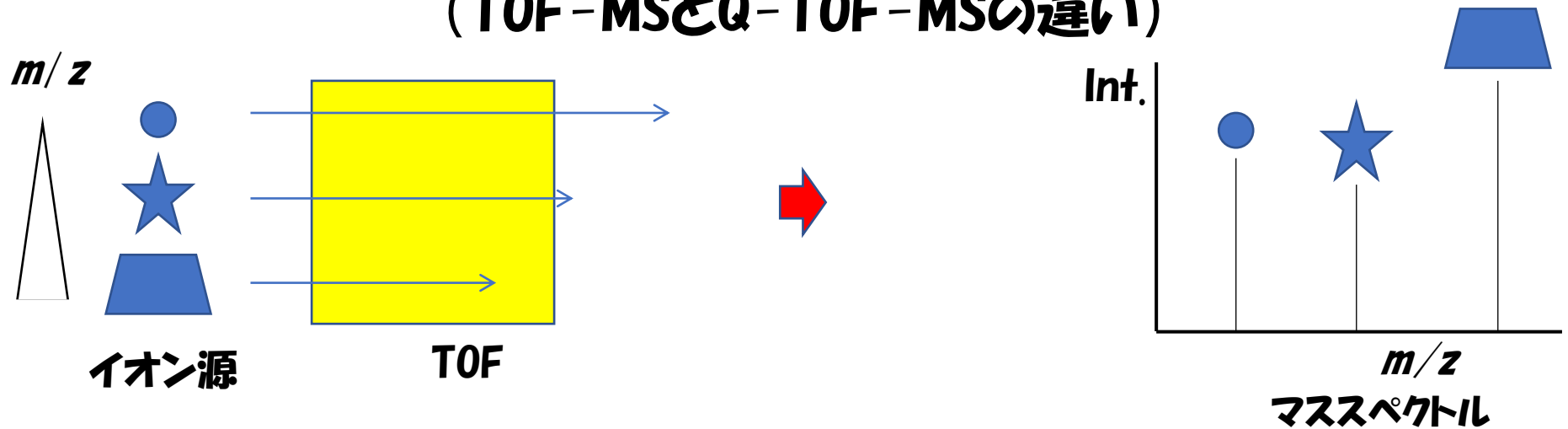
エレクトロスプレーイオン化 (ESI: Electrospray Ionization)、大気圧化学イオン化 (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization)、など

⇒ 偶数電子イオン



通常のマススペクトルとMS/MS(フラグメントイオン分析)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)



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

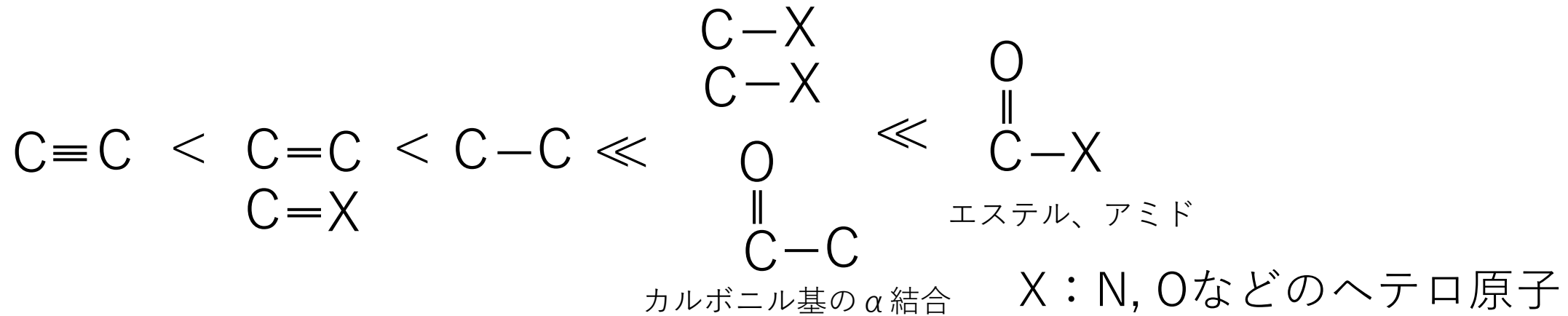


構造推定
構造確認
同定



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

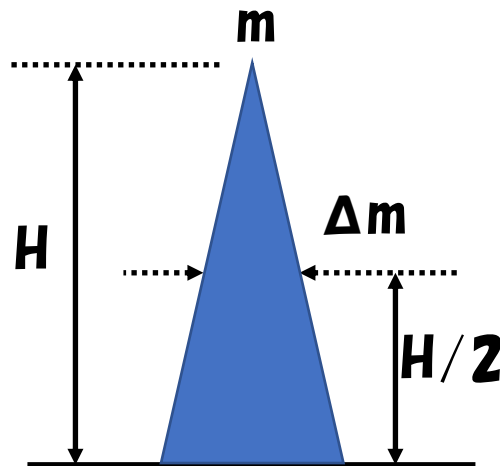
質量分解能とマススペクトル

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

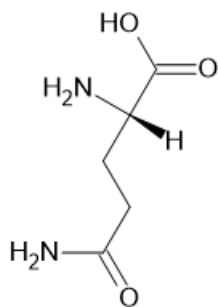
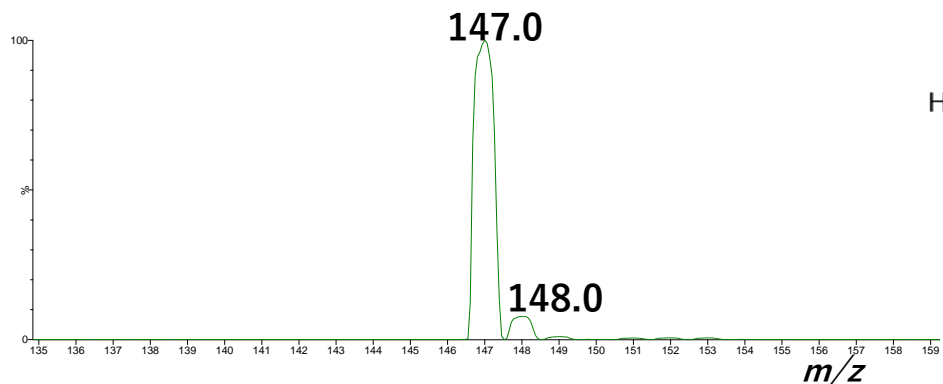
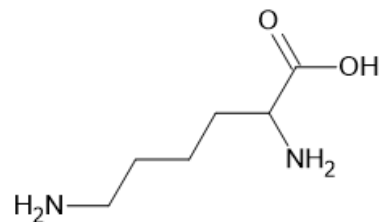
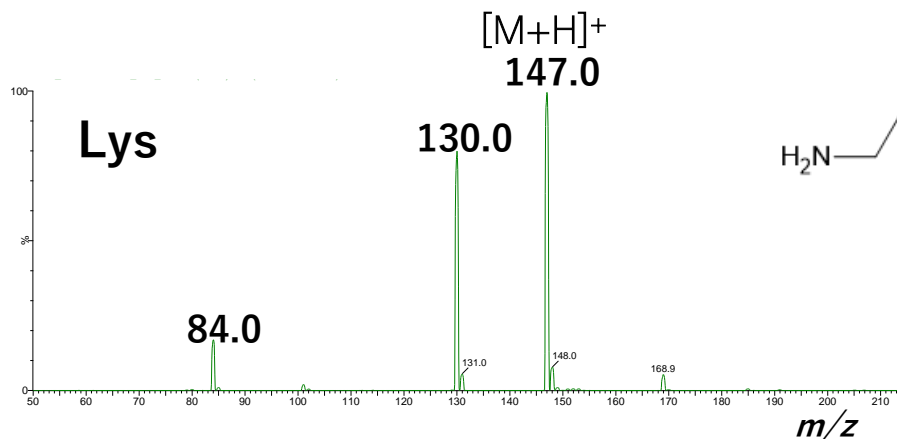
元素組成からモノアイソトピック
質量は一義的に決まる

高質量分解能マススペクトル

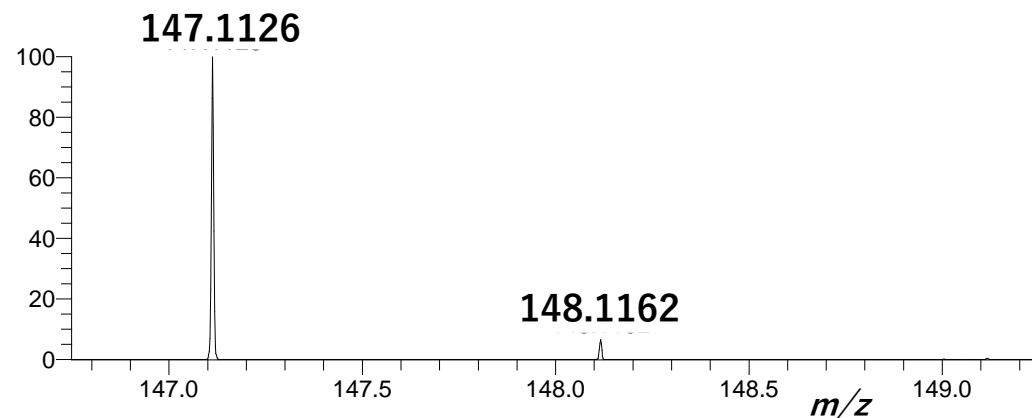
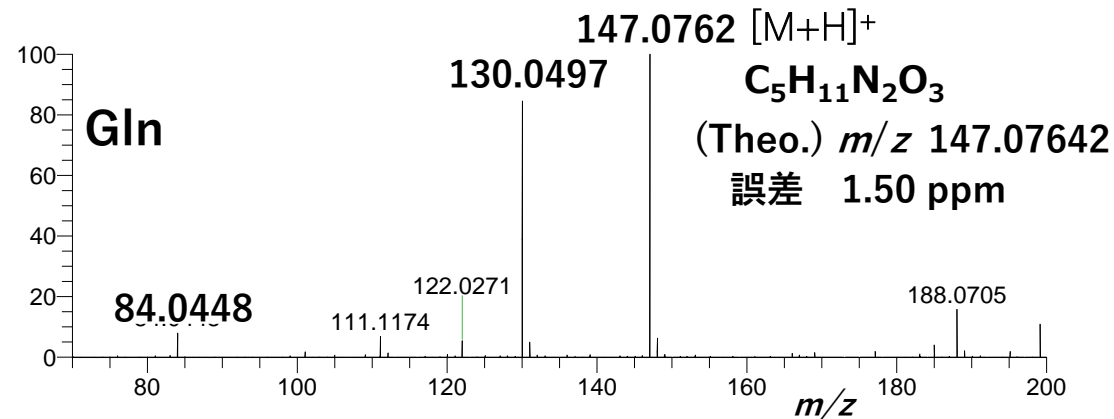
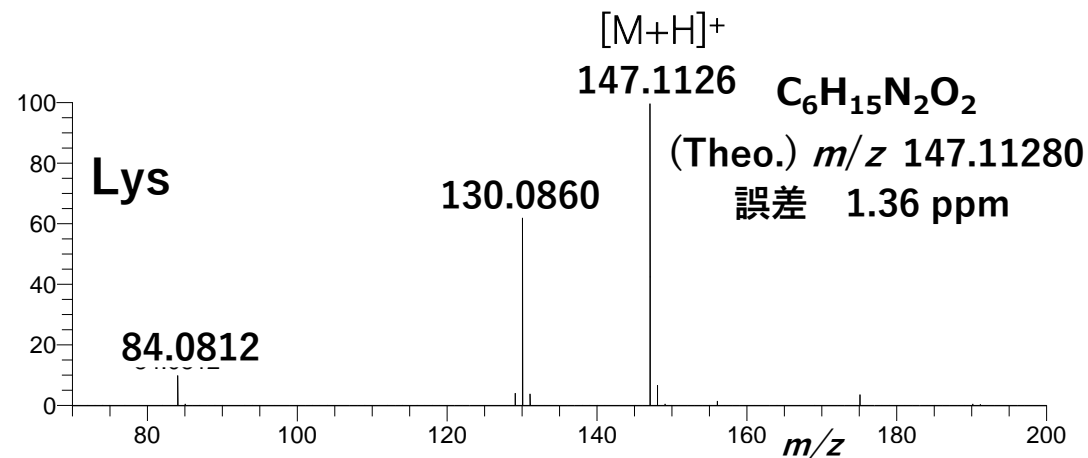
↓
組成推定

質量分解能とマススペクトル

低質量分解能(四重極MS)

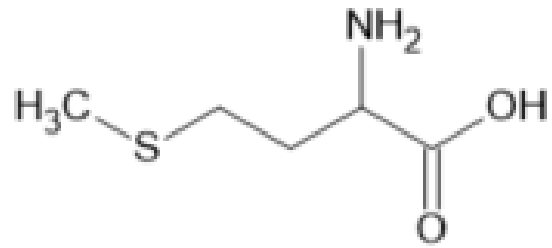


高質量分解能(Orbitrap MS)

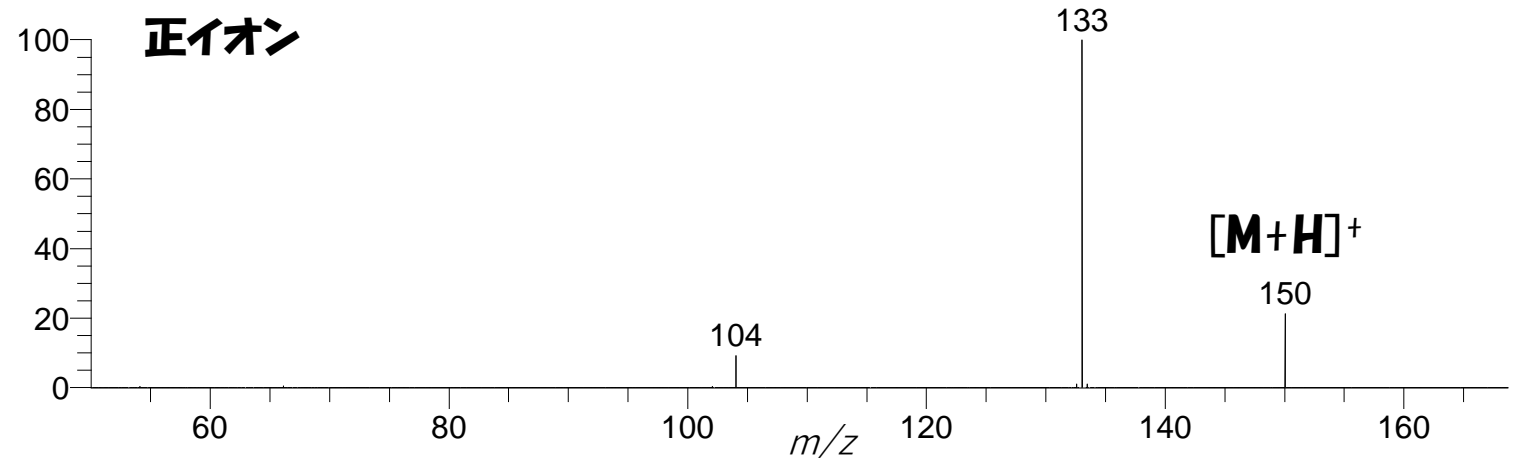


フロダクトイオンの構造への帰属

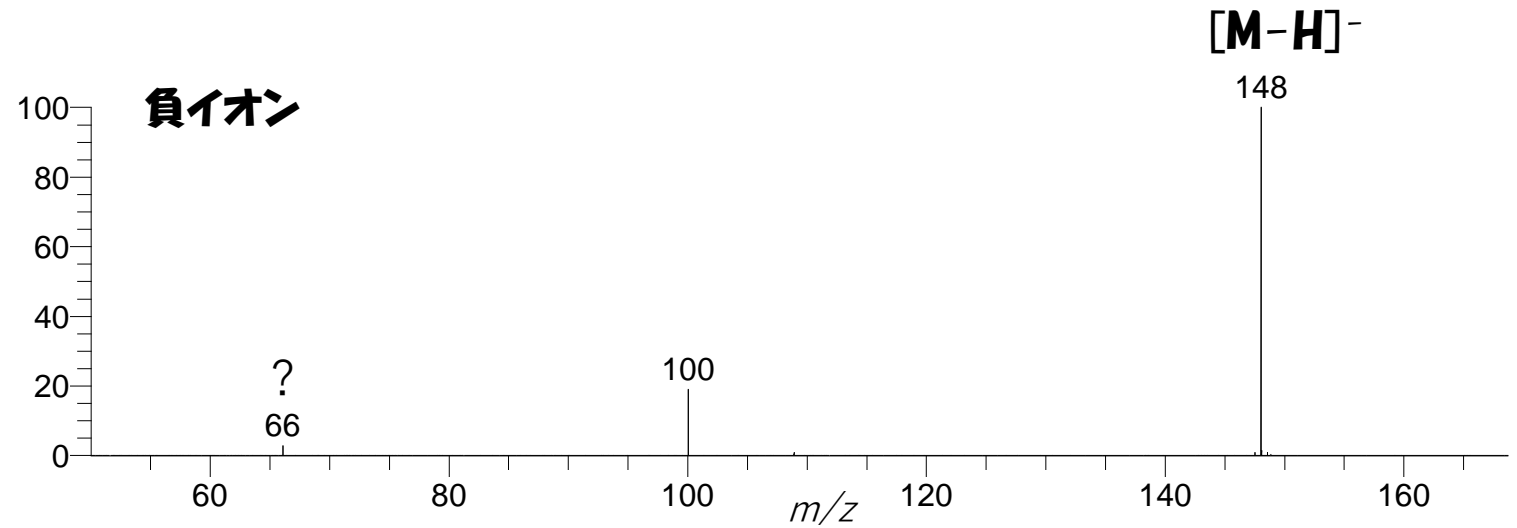
メチオニン、低分解能



正イオン

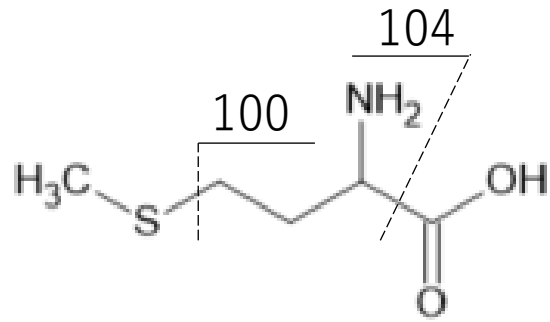
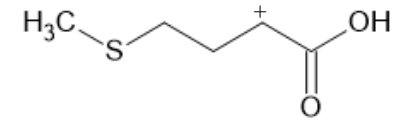


負イオン



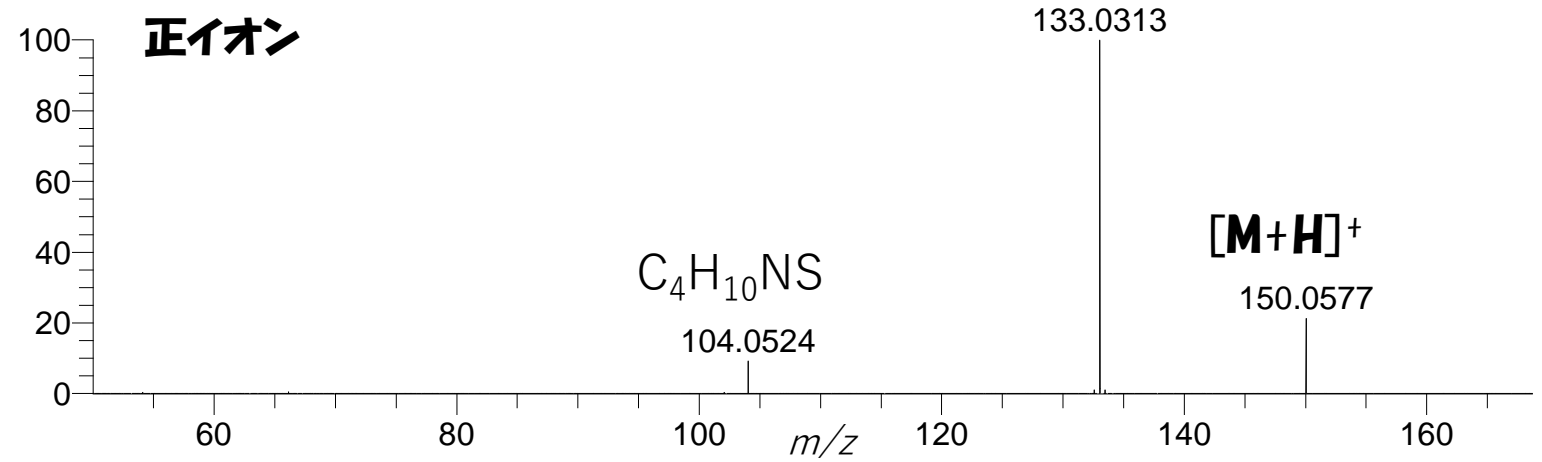
フロダクトイオンの構造への帰属

メチオニン、高分解能

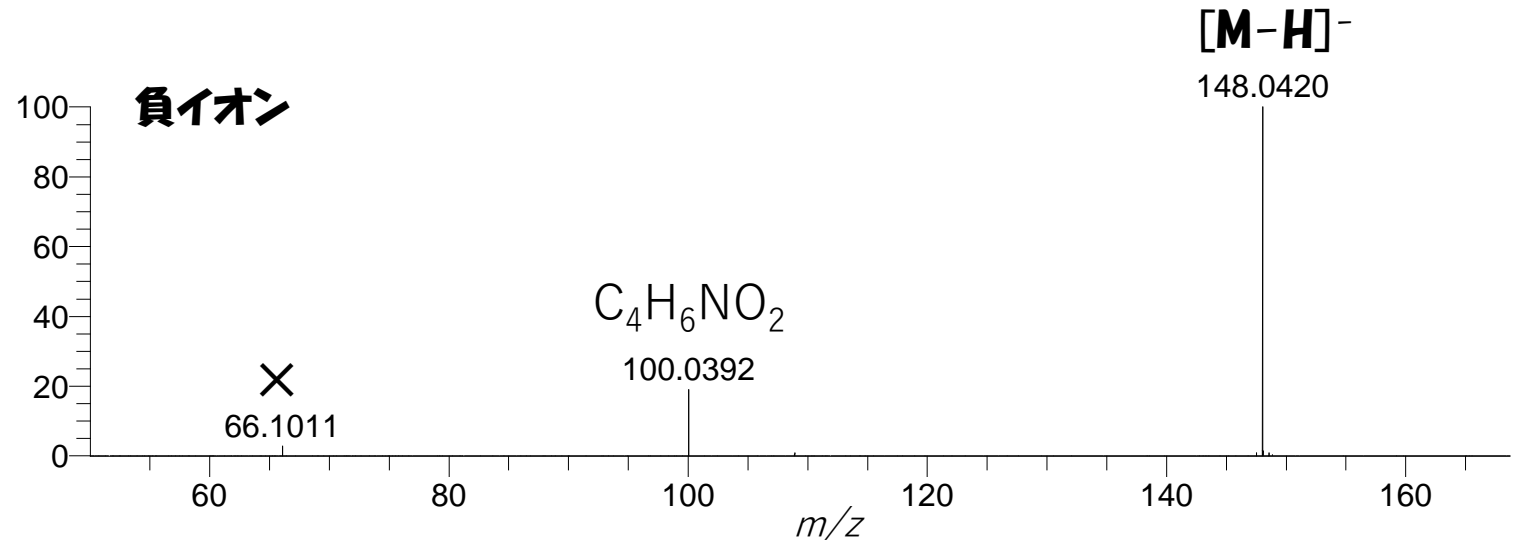


↑
詳細はp. 62, 63で

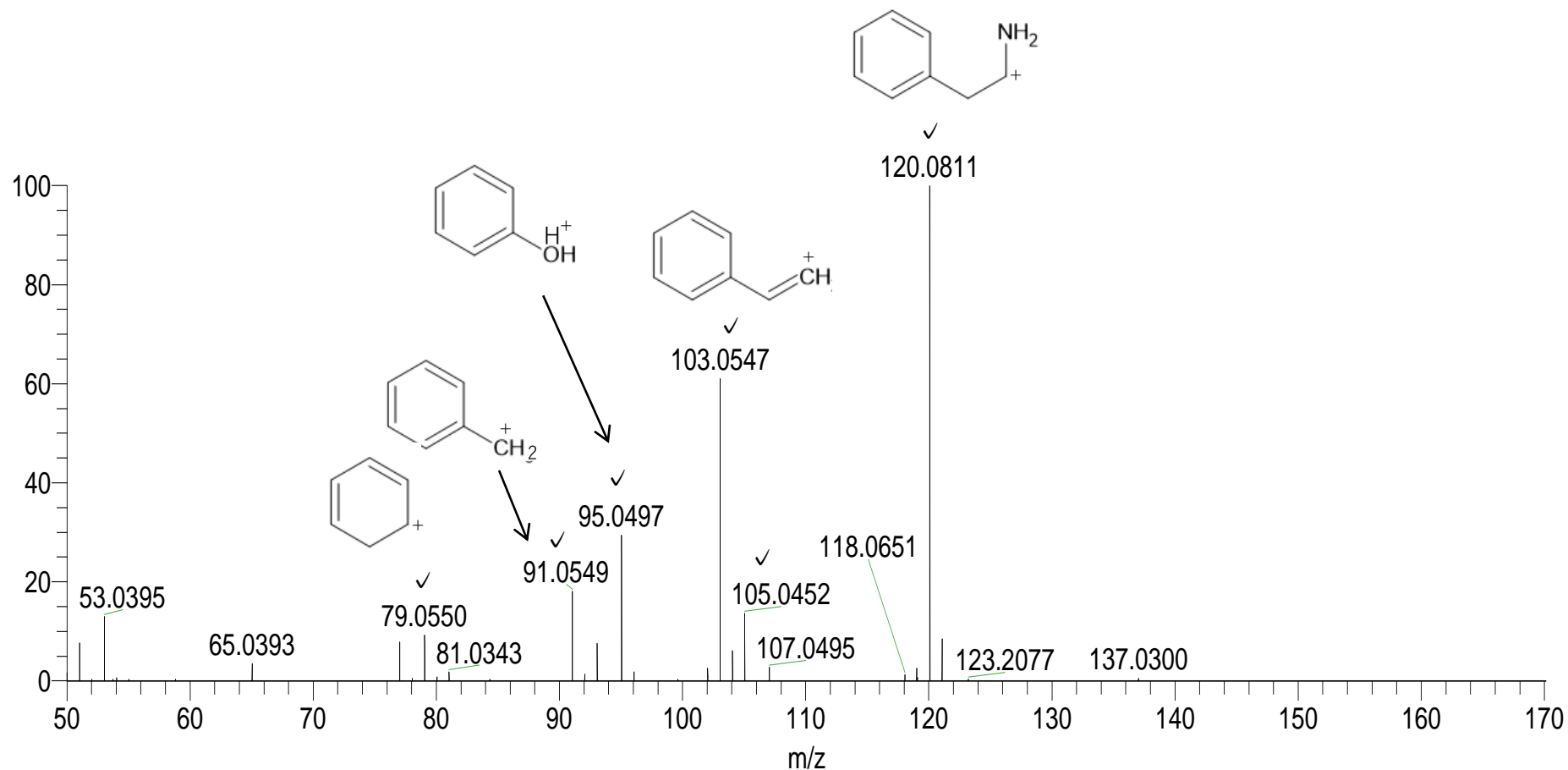
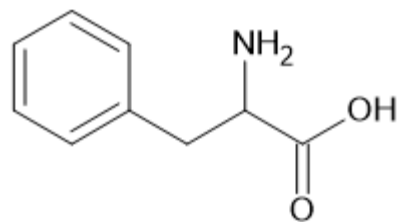
正イオン



負イオン



宿題:これは、フェニルアラニンの[M+H]⁺ (m/z 166)からのプロダクトイオンスペクトルです。
✓のついているプロダクトイオンを、下の構造に対して帰属してください。



m/z 105.0452は✓を付けていましたが、改めて組成推定をしたら有意なイオンではない可能性が高い事が分かったので、解析から外しました。

2. マススペクトル解析における注意点

2-1. 夾雑ピークの見極め(マスティフェクト値の利用)

2-2. 如何にして正しい m/z 値を得るか(高分解能質量分析計)

2-3. マススペクトル取得モードについて

2. マススペクトル解析における注意点

2-1. 夾雑ピークの見極め(マスティフェクト値の利用)

2-2. 如何にして正しい m/z 値を得るか(高分解能質量分析計)

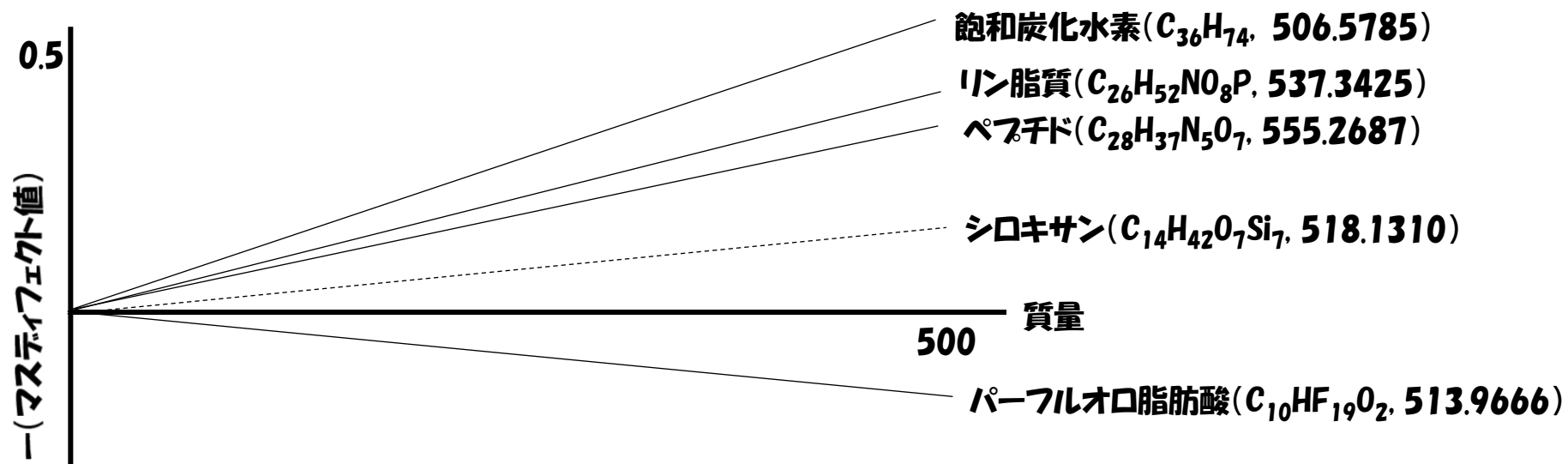
2-3. マススペクトル取得モードについて

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

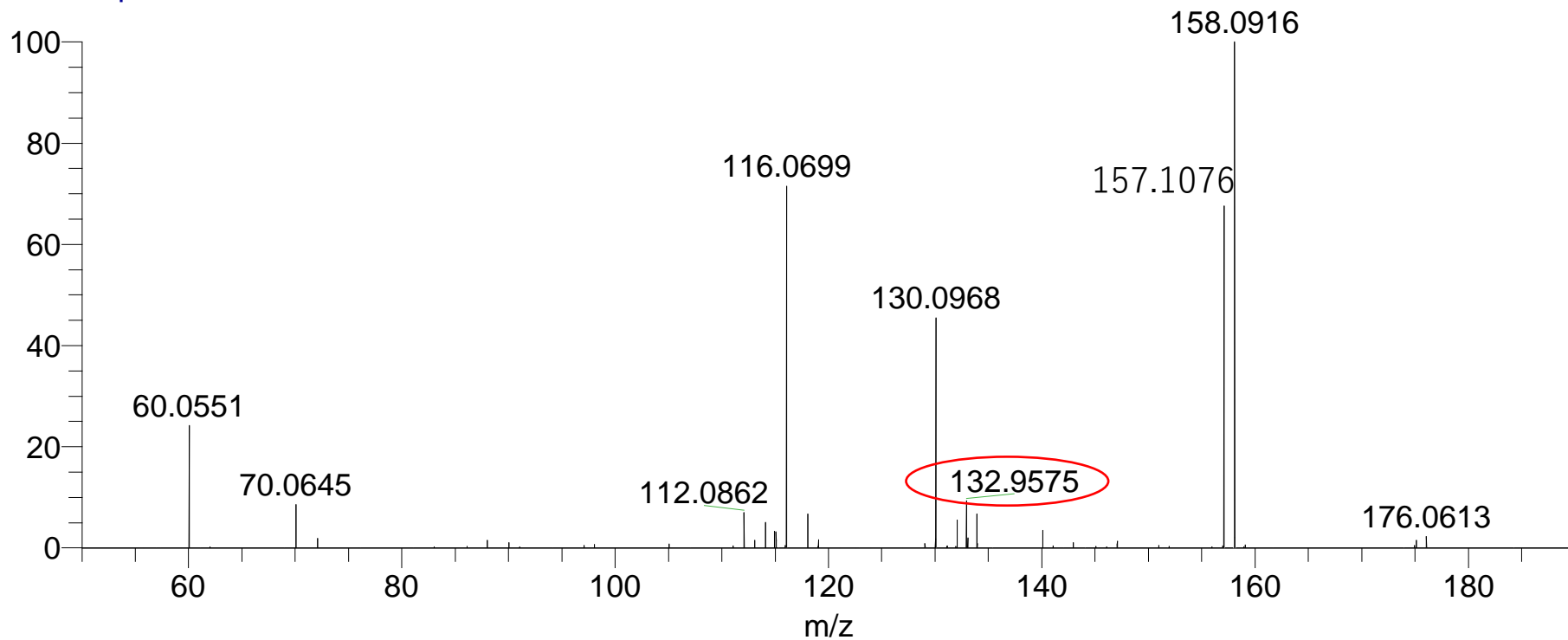
マステイフェクト値 -0.046950



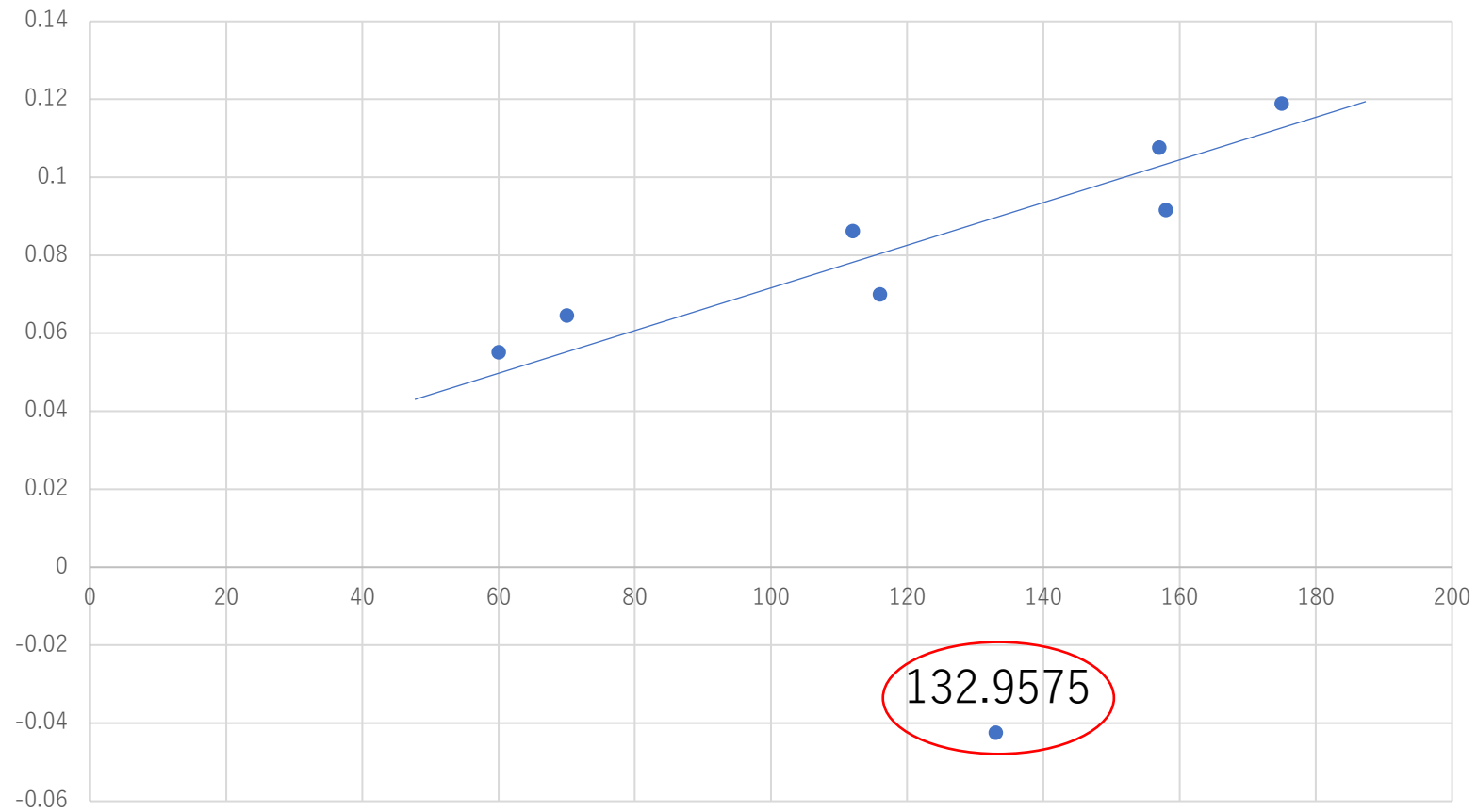
アルギニン(MH⁺)のフラグメントイオンスペクトル

NL: 1.01E5

T: FTMS + p ESI d Full ms2 175.1

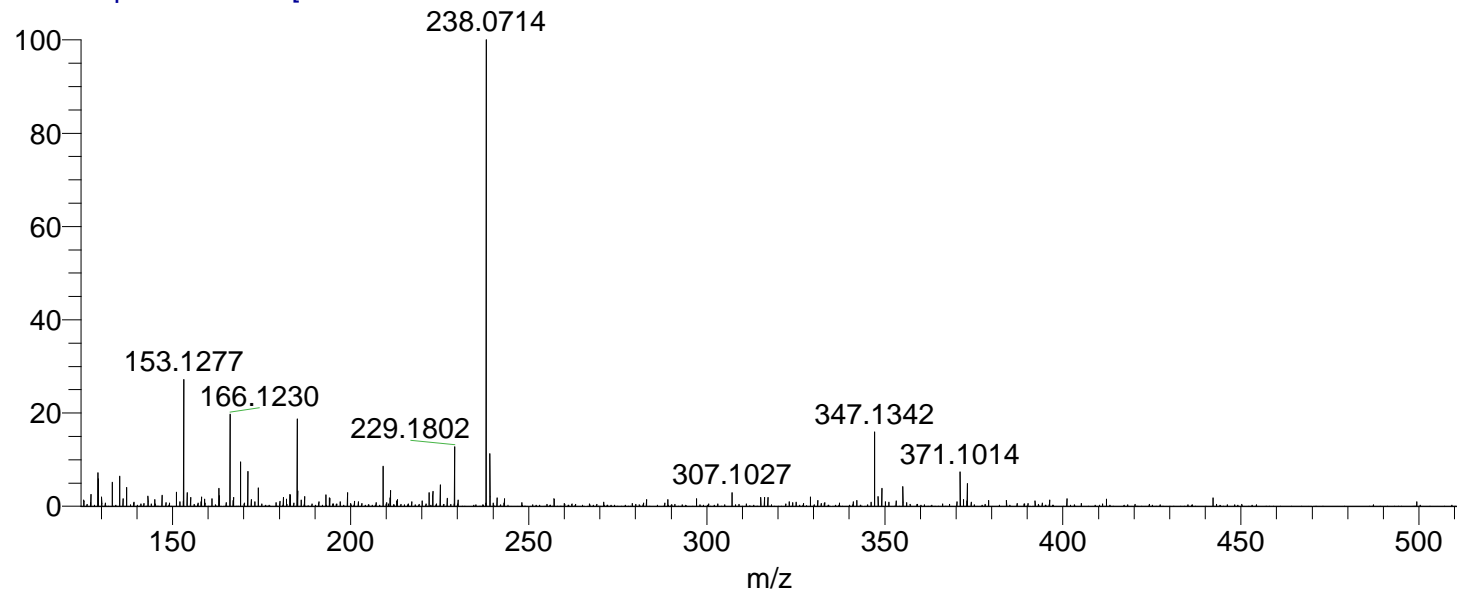


イオンの m/z 値と小数点以下の数値



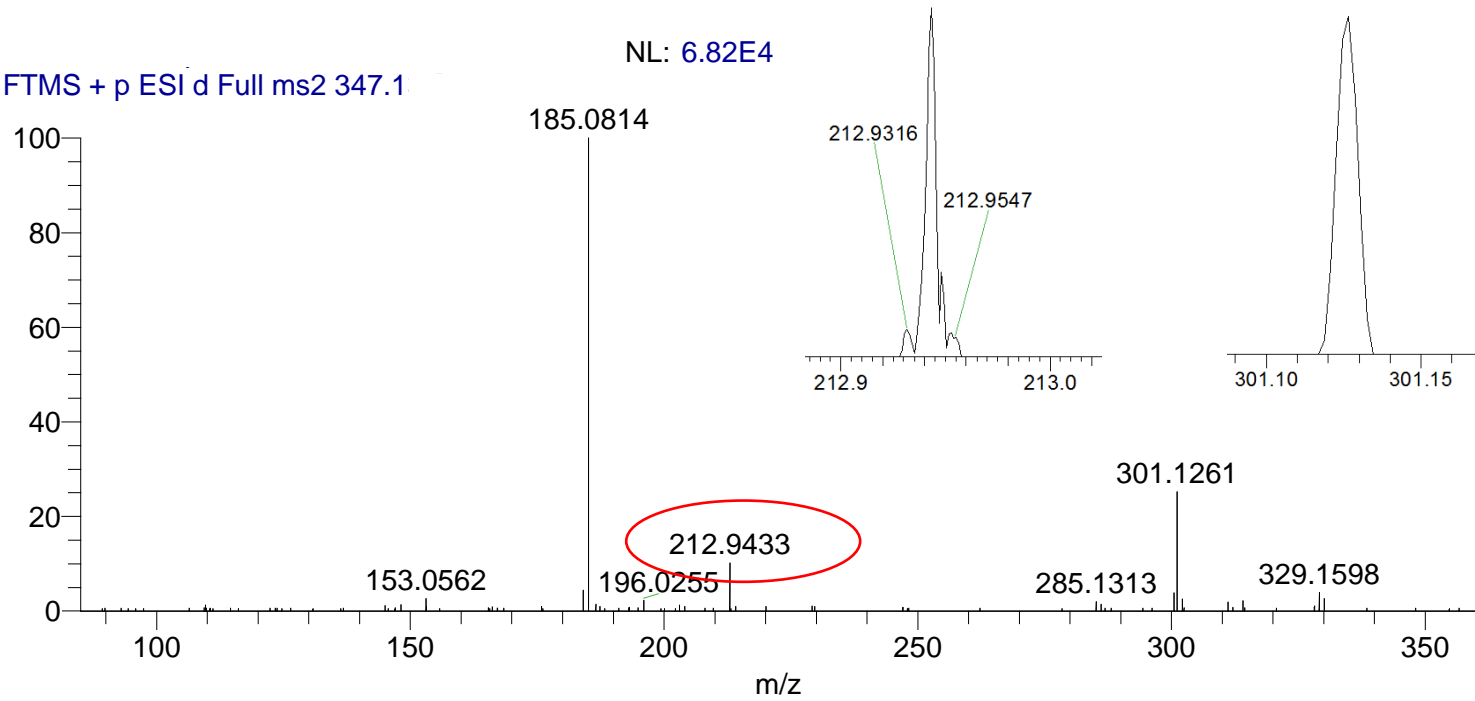
NL: 4.15E6

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

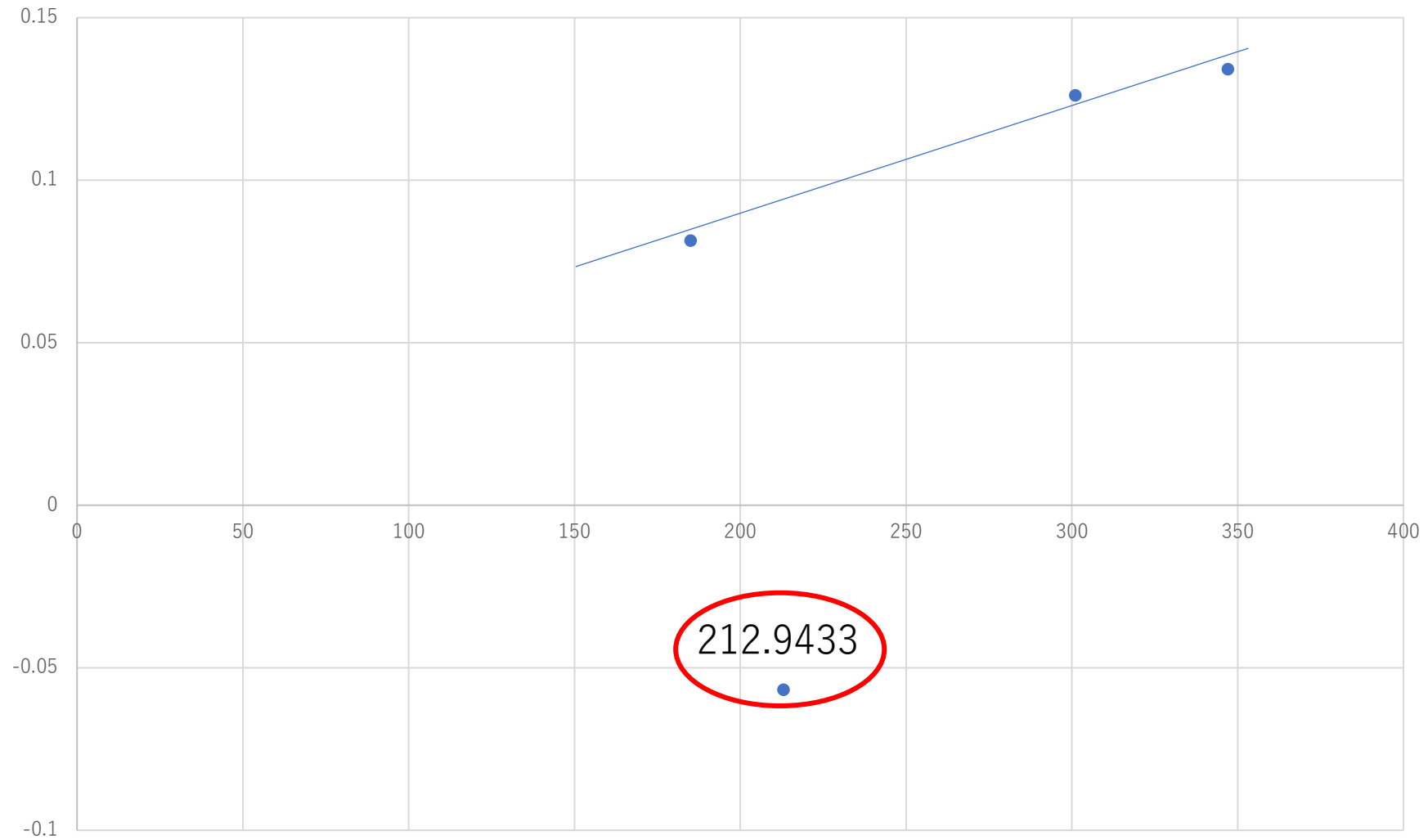


NL: 6.82E4

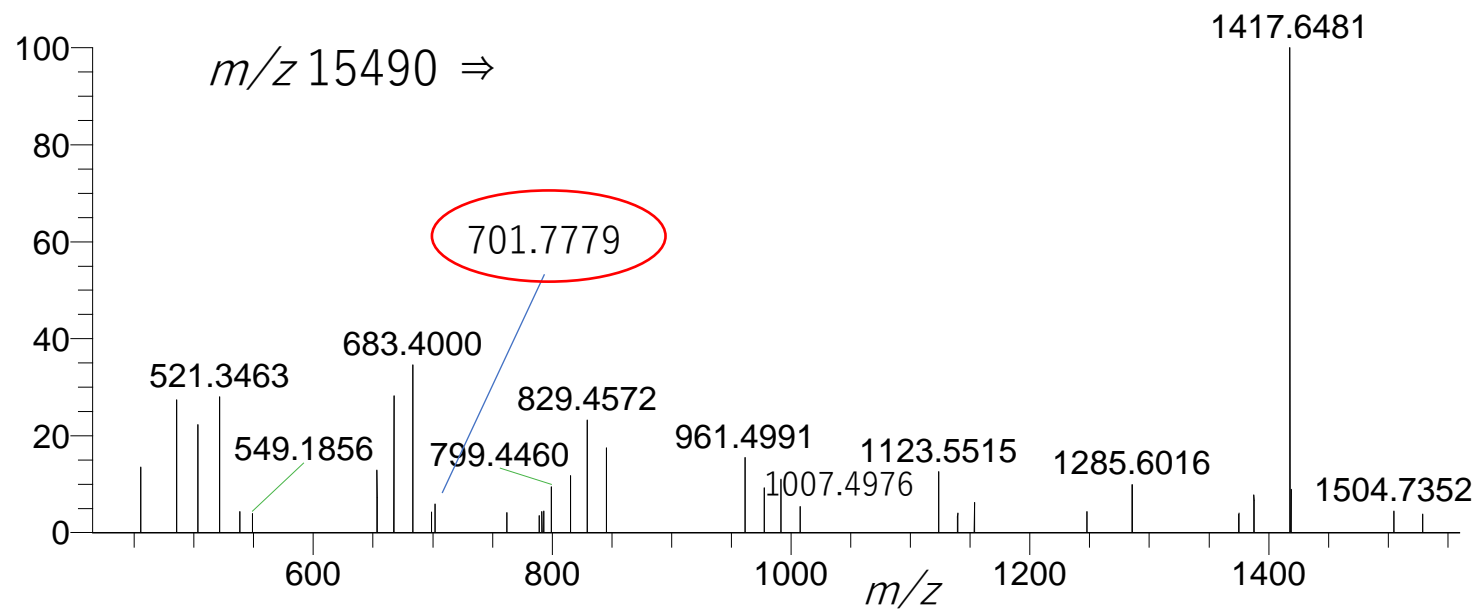
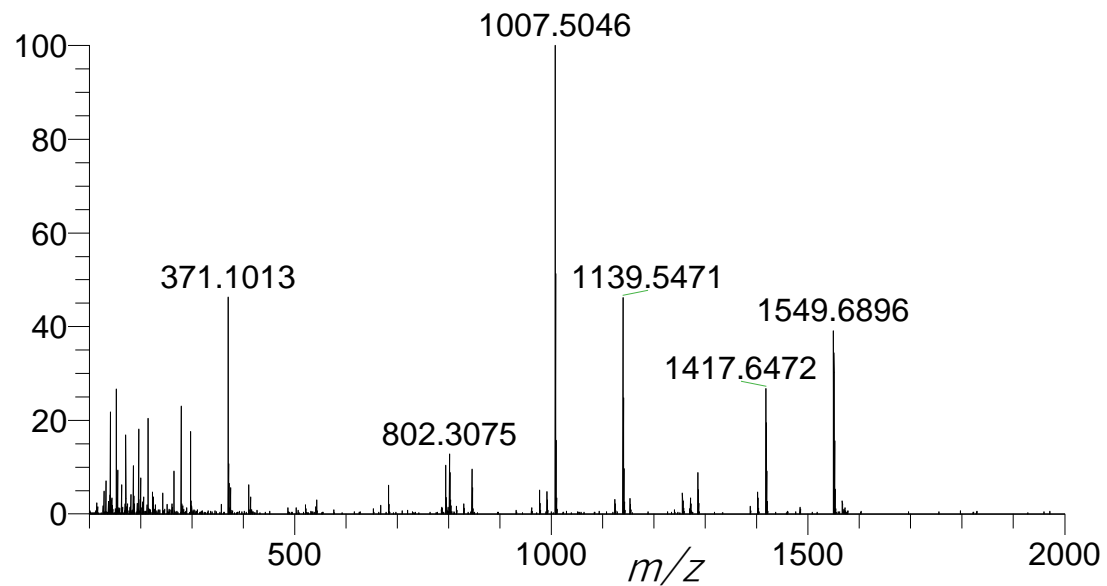
T: FTMS + p ESI d Full ms2 347.1



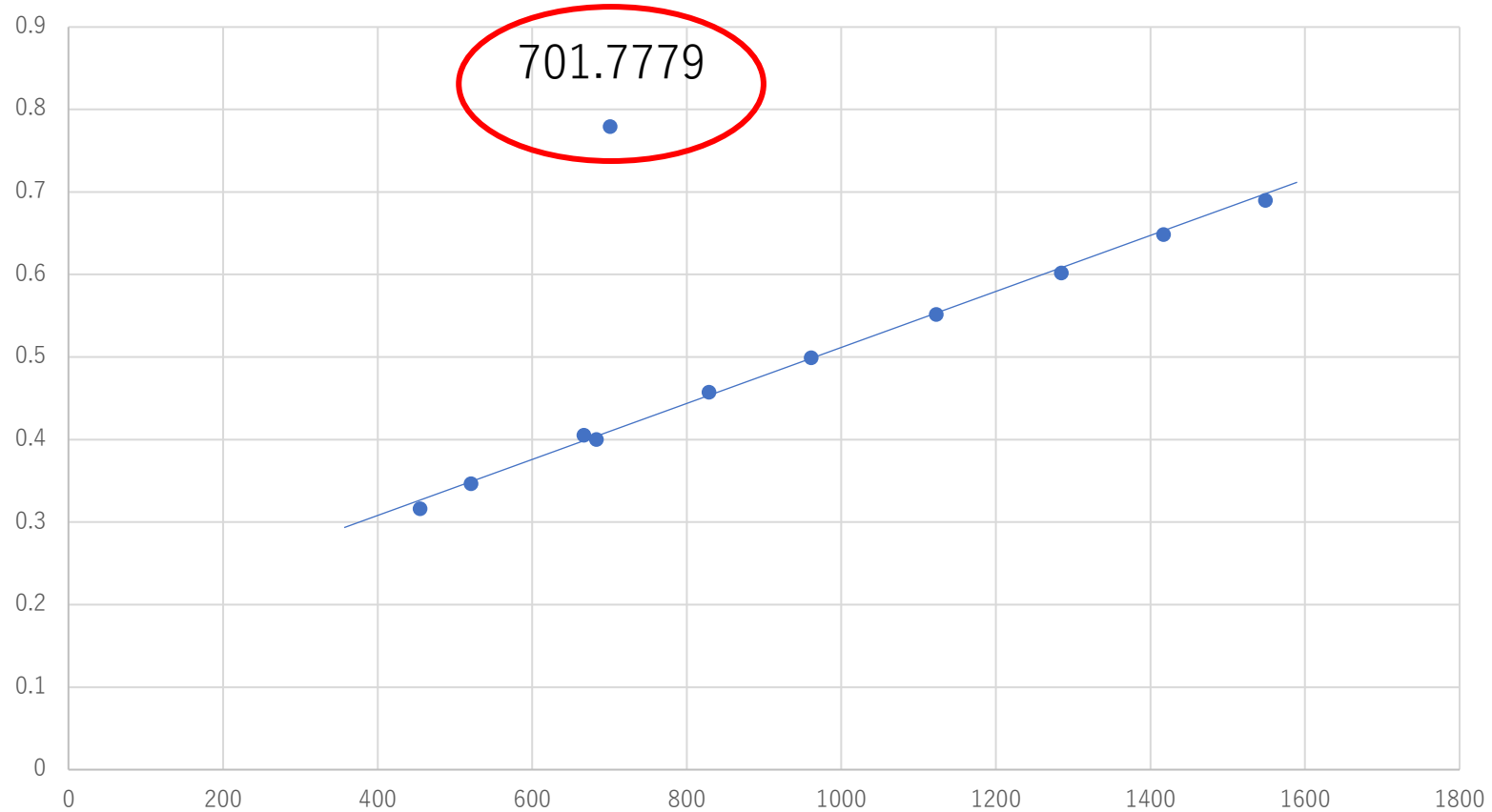
イオンの m/z 値と小数点以下の数値



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



2. マススペクトル解析における注意点

2-1. 夾雑ピークの見極め(マスティフェクト値の利用)

2-2. 如何にして正しい m/z 値を得るか(高分解能質量分析計)

2-3. 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, $C_{11}H_{12}N_2O_2$

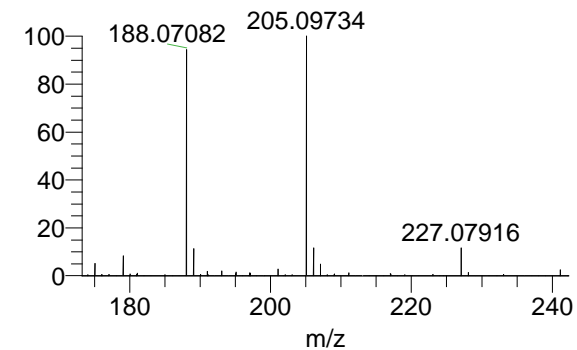
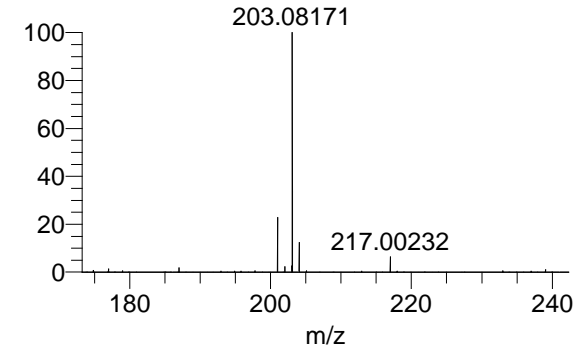
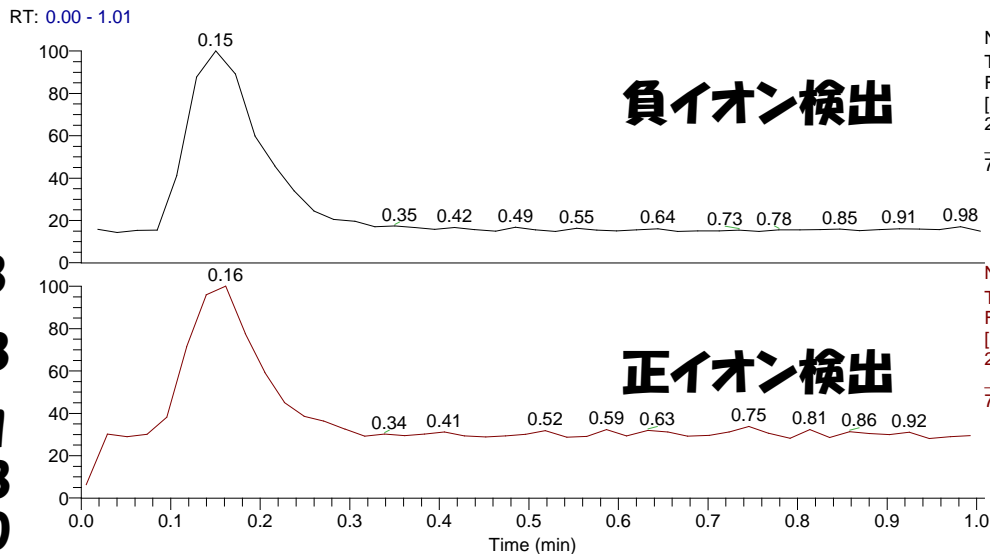
Monoisotopic mass **204.08988**

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

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

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

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

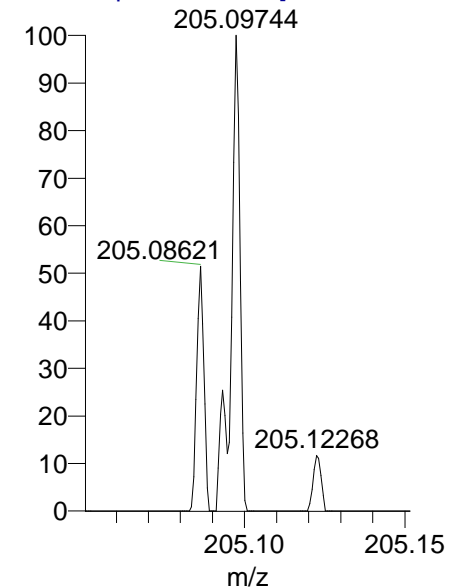


Intensity	Obs. m/z	Error (ppm)
1.10E+08	203.08170	-4.3
2.49E+08	203.08171	-4.3
2.90E+08	203.08171	-4.3
2.78E+08	203.08174	-4.1
1.82E+08	203.08170	-4.3
1.24E+08	203.08170	-4.3
7.52E+07	203.08173	-4.2
8.16E+06	203.08167	-4.5
9.01E+05	203.08173	-4.2
4.91E+05	203.08167	-4.5

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

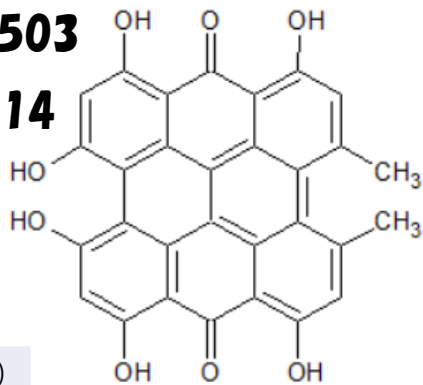
Thermo LTQ-Orbitrap XL

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)

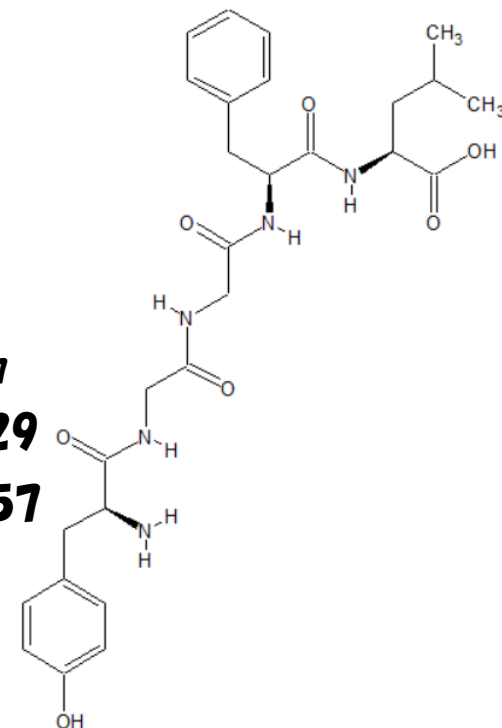
Waters Synapt G2-XS

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

Monoisotopic mass **555.26929**

$[M+H]^+$

556.27657

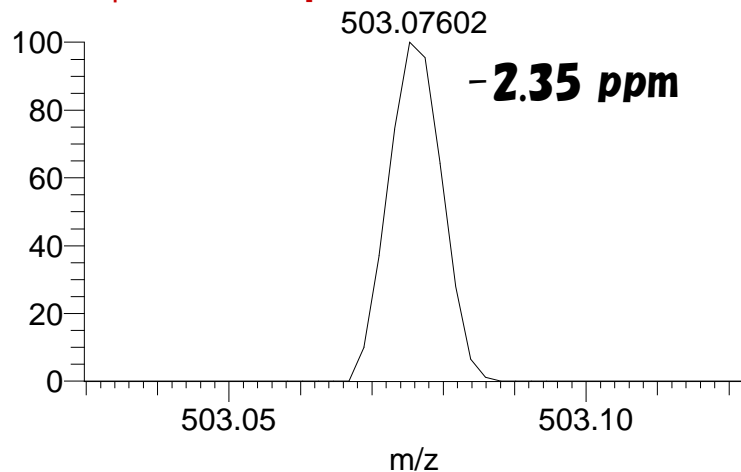


Intensity (Profile)	Intensity (Centroid)	Obs. m/z (Profile)	Centroid m/z	Error (ppm)
659	2.44E+03	556.2758	556.2766	0.05
4.00E+03	1.43E+04	556.2758	556.2773	1.31
2.06E+04	6.54E+04	556.2758	556.2775	1.67
1.14E+05	3.16E+05	556.2758	556.2784	3.29
1.58E+05	4.21E+05	556.2758	556.2787	3.83
1.26E+05	3.49E+05	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

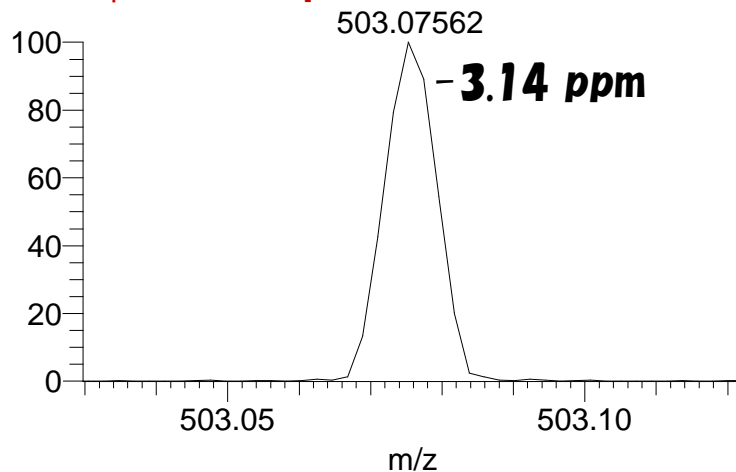
データポイント毎のピークプロファイルと m/z 値(同一LC/MSデータ)

Thermo LTQ-Orbitrap XL

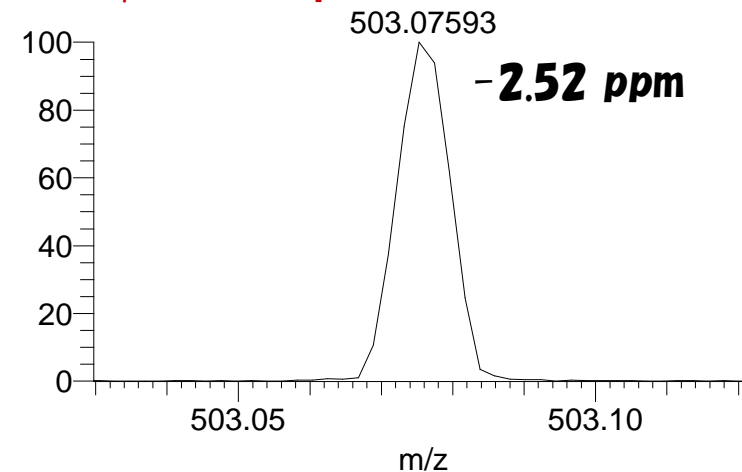
20161107_std1 #3141 RT: 38.77 AV: 1 NL: 6.75E5
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



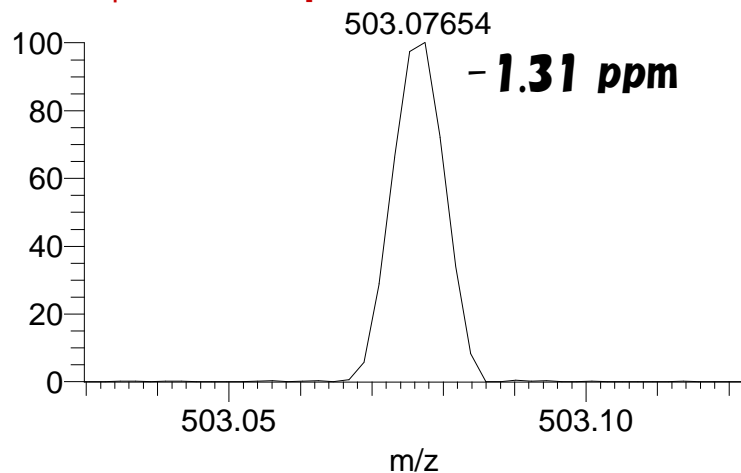
20161107_std1 #3149 RT: 38.87 AV: 1 NL: 3.38E7
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



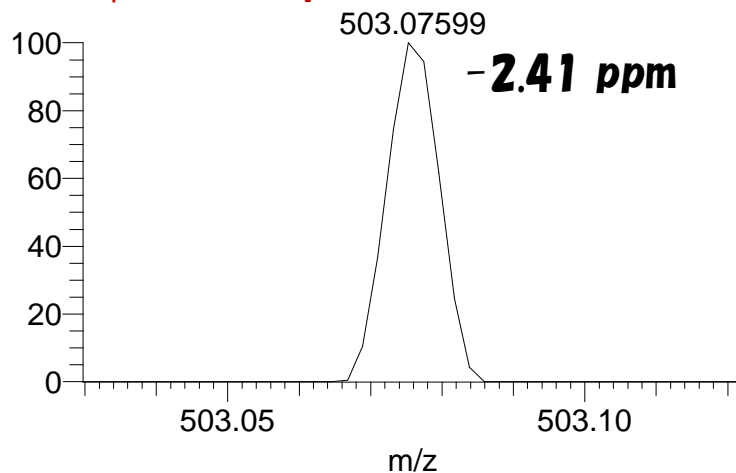
20161107_std1 #3181 RT: 39.25 AV: 1 NL: 6.62E7
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



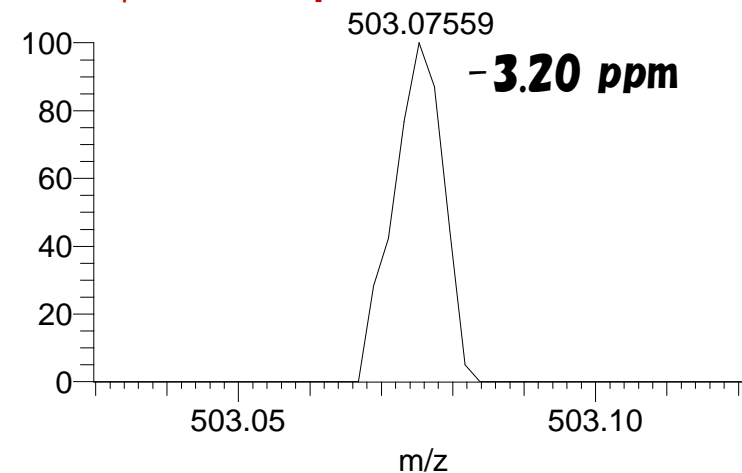
20161107_std1 #3187 RT: 39.33 AV: 1 NL: 6.17E7
F: FTMS - p ESI Full ms [10]



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]

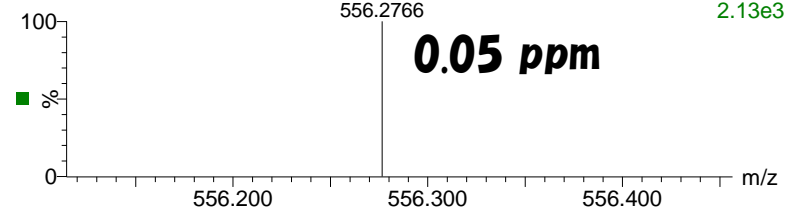


データポイント毎のピークプロファイルとピーク検出結果(同一LC/MSデータ)

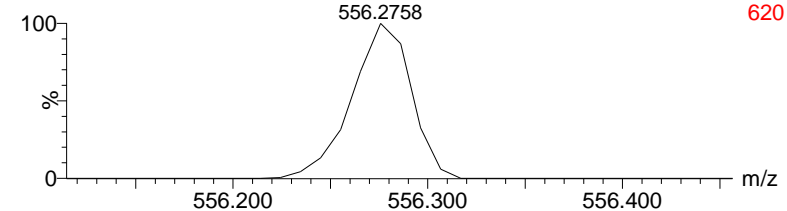
Waters Synapt G2-XS

Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1025 (9.059) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 2.13e3

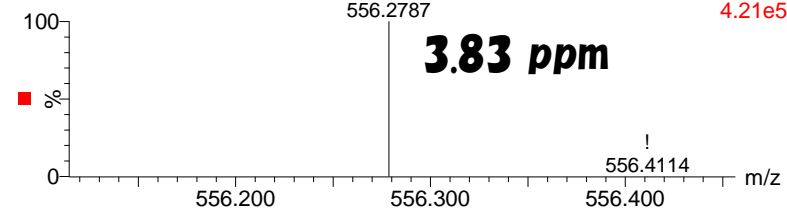


20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1025 (9.059) 1: TOF MS ES+ 620

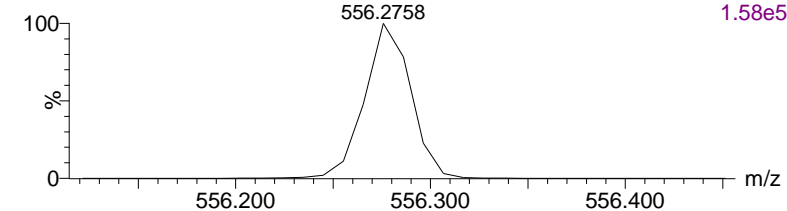


Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1031 (9.112) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 4.21e5

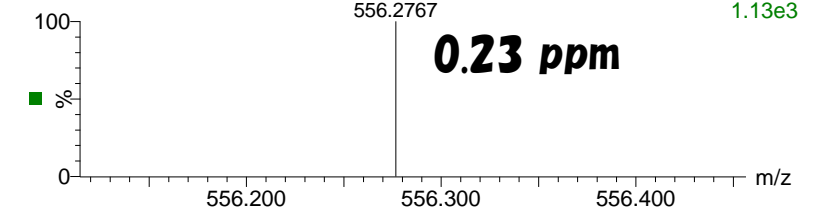


20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1031 (9.112) 1: TOF MS ES+ 1.58e5

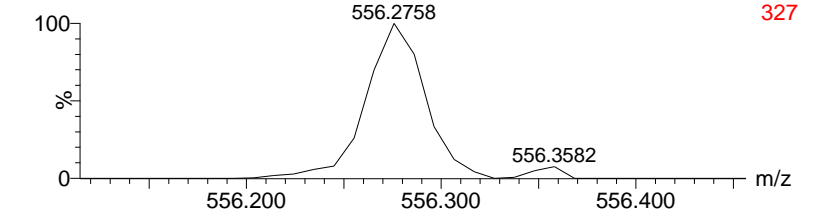


Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1060 (9.365) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.13e3

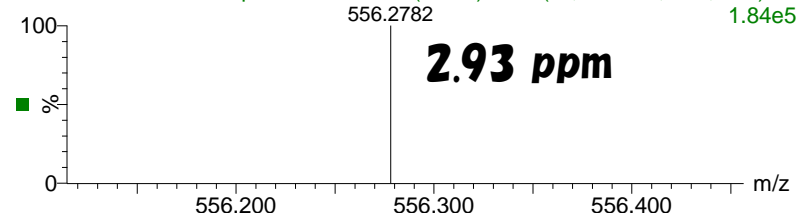


20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1060 (9.365) 1: TOF MS ES+ 327

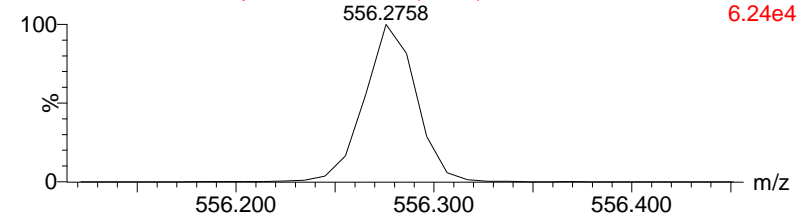


Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1028 (9.086) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.84e5

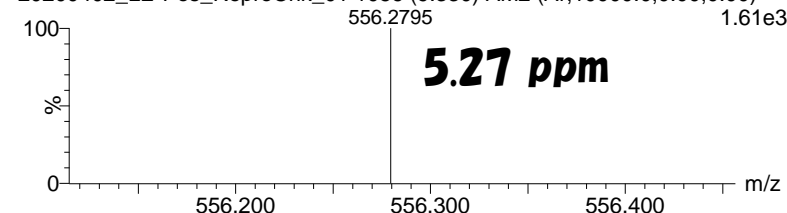


20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1028 (9.086) 1: TOF MS ES+ 6.24e4

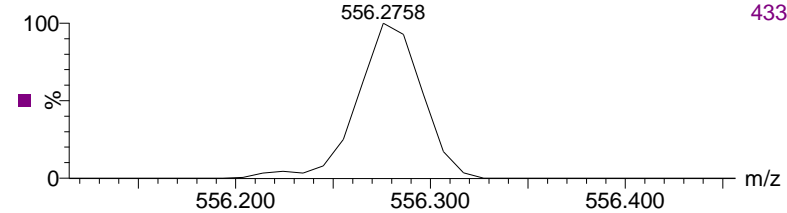


Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1056 (9.330) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.61e3

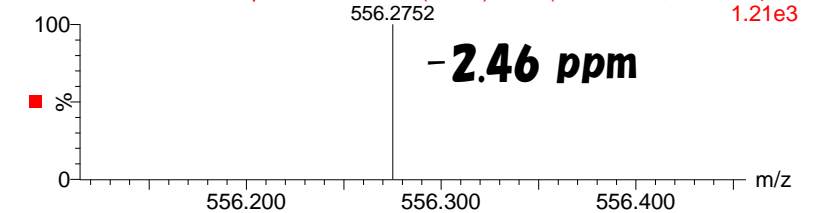


20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1056 (9.330) 1: TOF MS ES+ 433

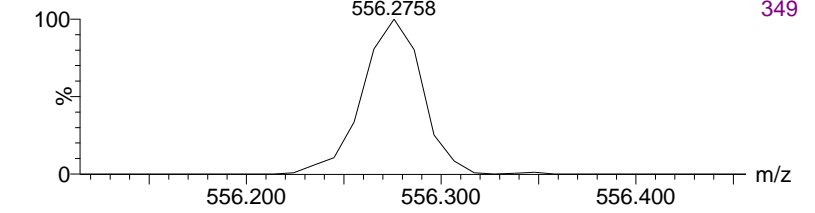


Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1062 (9.383) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00) 1.21e3



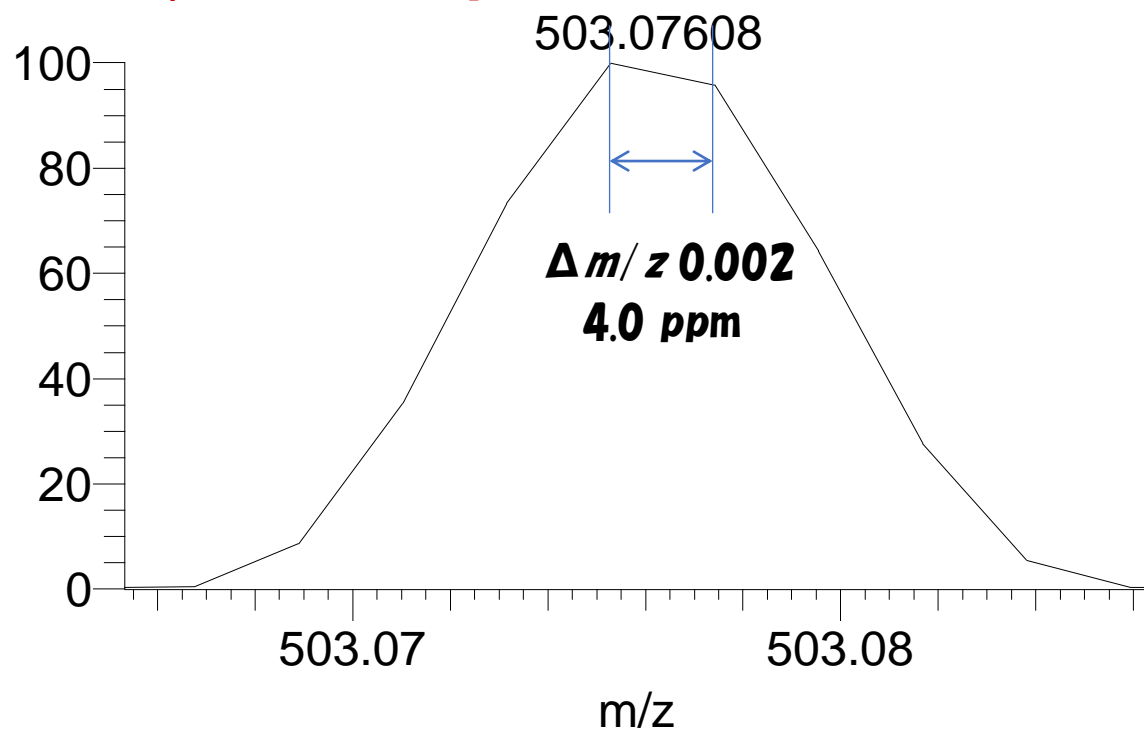
20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1062 (9.383) 1: TOF MS ES+ 349



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

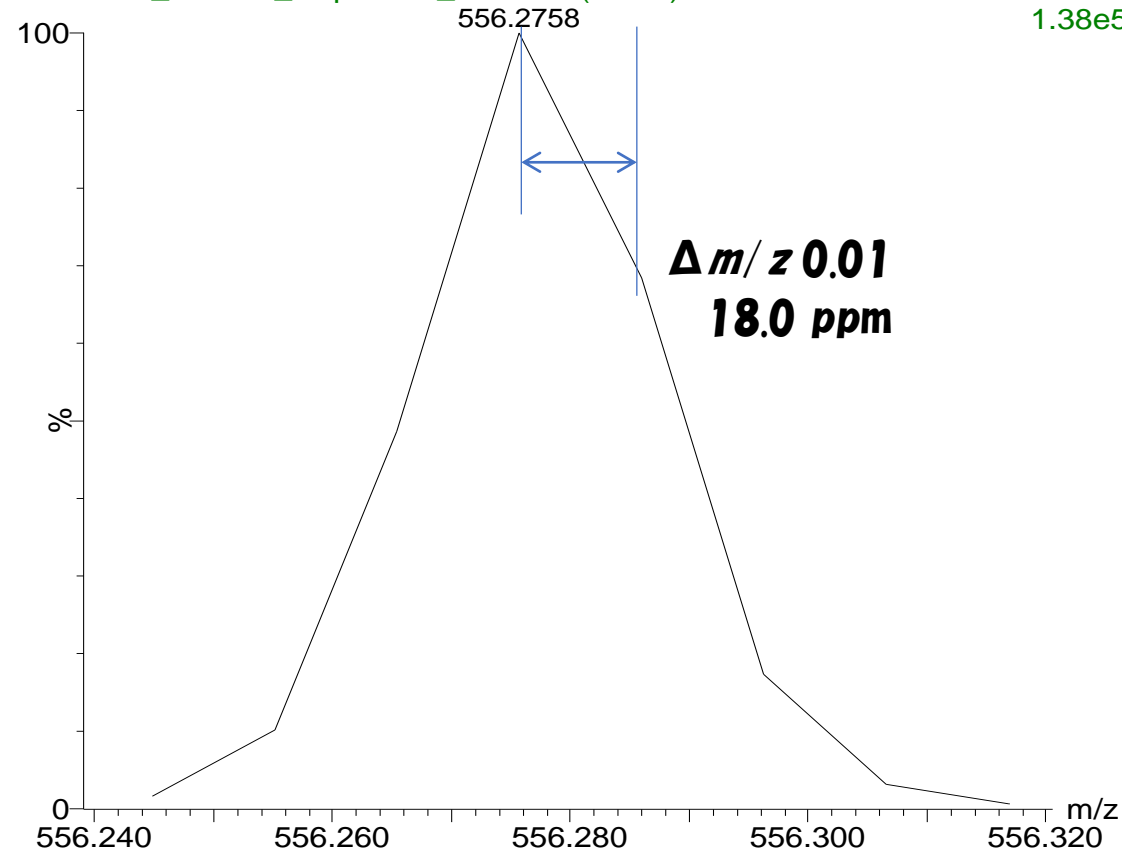
20161107_std1 #3183 RT: 39.28 AV: 1 NL: 6.49E7
F: FTMS - p ESI Full ms [100]



Waters Synapt G2-XS

Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL
20200402_LE-Pos_ReproChk_10 1036 (9.155)

1: TOF MS ES+
1.38e5

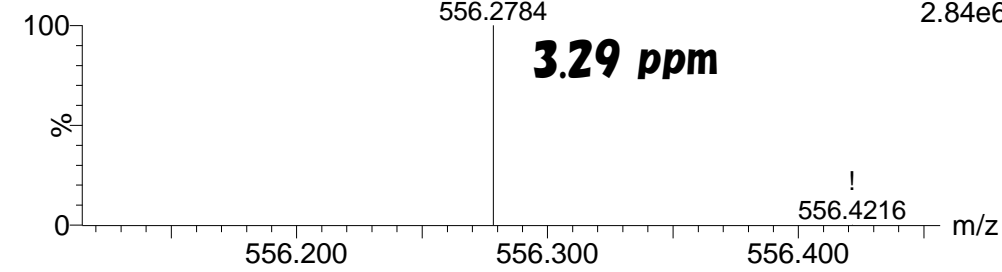


積算スペクトルのピークプロファイルとピーク検出結果(異LC/MSデータ)

Waters Synapt G2-XS

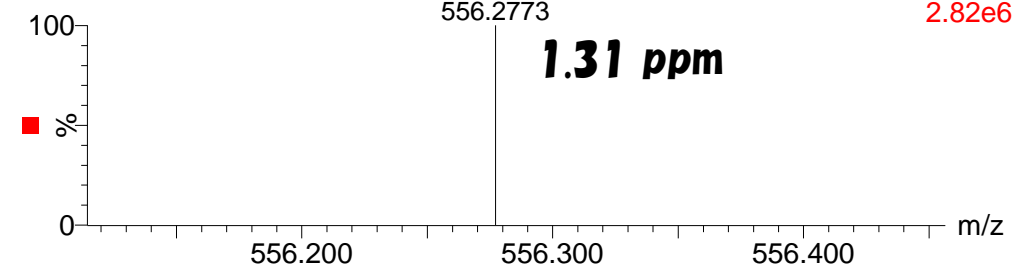
Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1031 (9.112) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.84e6

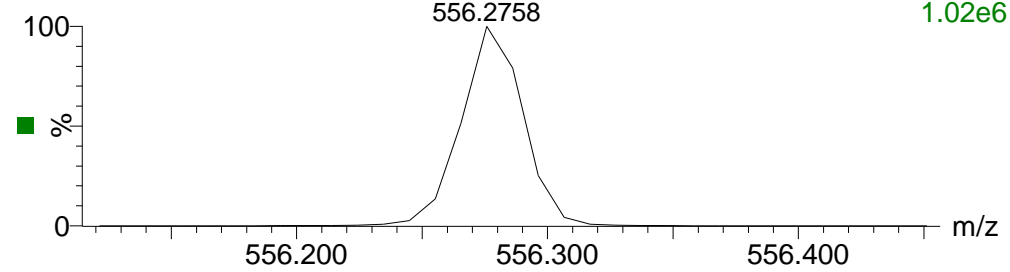


Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

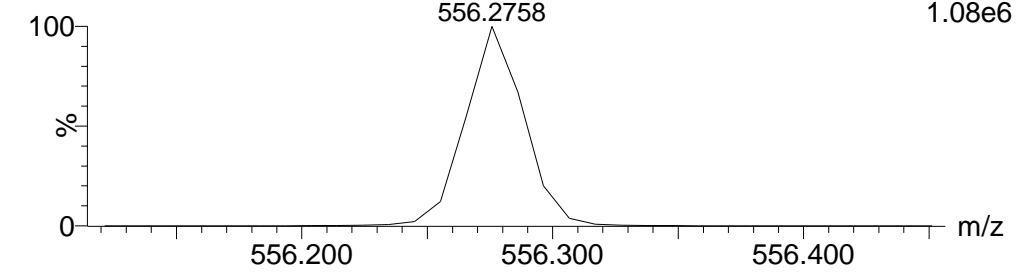
20200402_LE-Pos_ReproChk_03 1041 (9.199) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.82e6



20200402_LE-Pos_ReproChk_01 1031 (9.112) Cm (1028:1037)

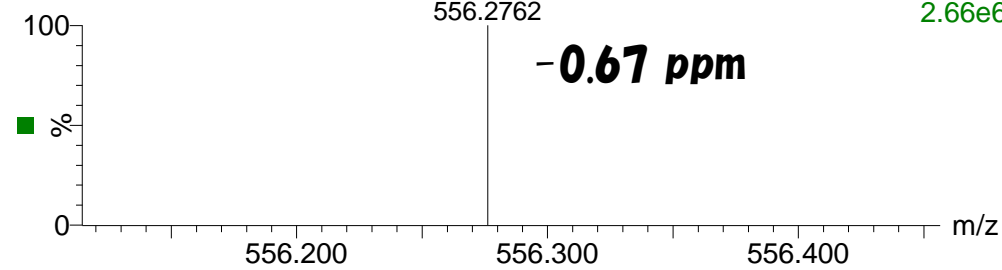


20200402_LE-Pos_ReproChk_03 1041 (9.199) Cm (1037:1047)



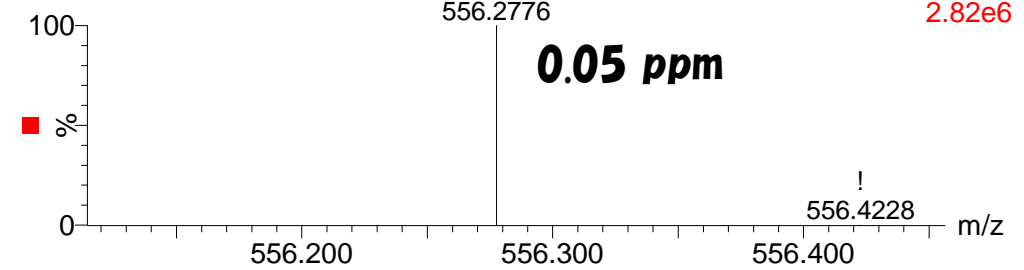
Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

20200402_LE-Pos_ReproChk_02 1039 (9.181) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.66e6

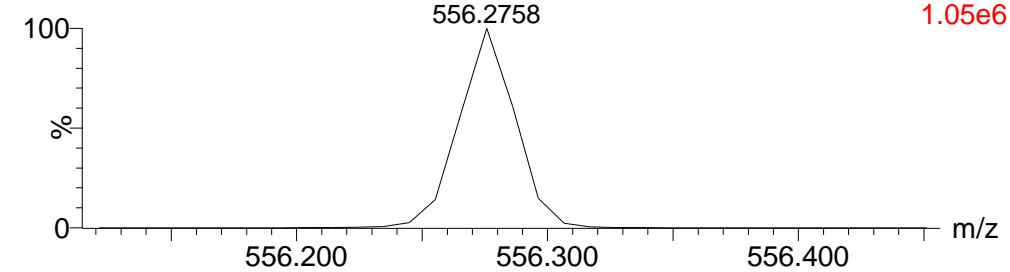


Leu-Enk, 2 ppm/H₂O, 10uL

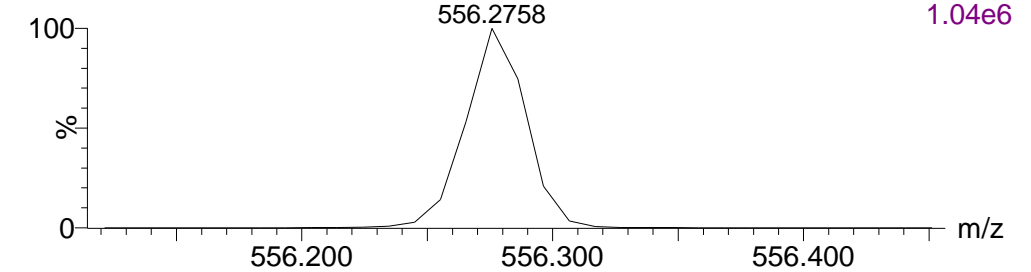
20200402_LE-Pos_ReproChk_04 1037 (9.164) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); Cr 2.82e6



20200402_LE-Pos_ReproChk_02 1039 (9.181) Cm (1036:1044)



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

2. マススペクトル解析における注意点

2-1. 夾雑ピークの見極め(マスディフェクト値の利用)

2-2. 如何にして正しい m/z 値を得るか(高分解能質量分析計)

2-3. 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

The screenshot displays the 'TOF MS' tab in the software interface. It is divided into three sections: 'Da range', 'Scanning Conditions', and 'Instrument conditions'.
- **Da range:** 'Acquire TOF MS over the range' with 'Low Mass' set to 100 Da and 'High Mass' set to 1000 Da.
- **Scanning Conditions:** 'Scan Time' is 1 sec, and 'Data Format' is set to 'Continuum' (with 'Centroid' also visible in the dropdown menu).
- **Instrument conditions:** Includes checkboxes for 'Override Cone Voltage value specified in tune file' and 'Ramp the Cone Voltage during the scan'. 'Cone Voltage' is 40 V, and 'Initial Voltage' and 'Final Voltage' are both 40 V.

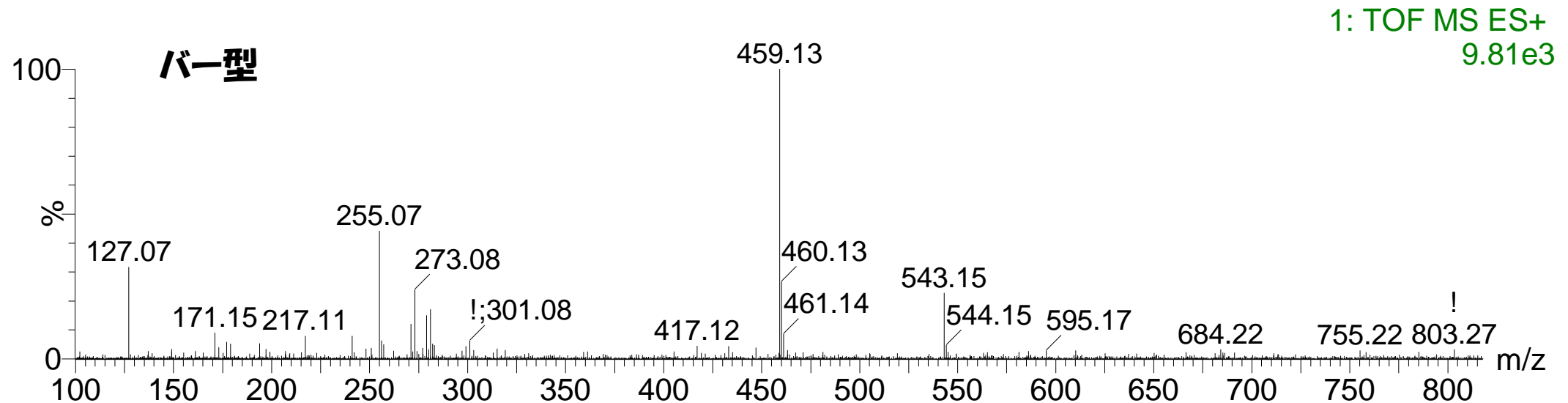
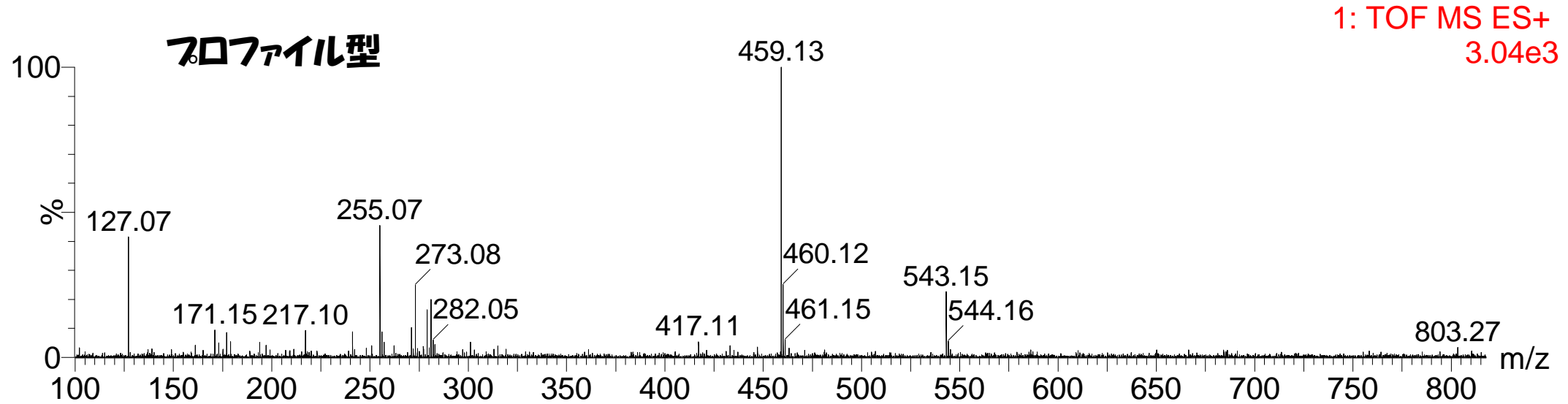
Continuum = Profile

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

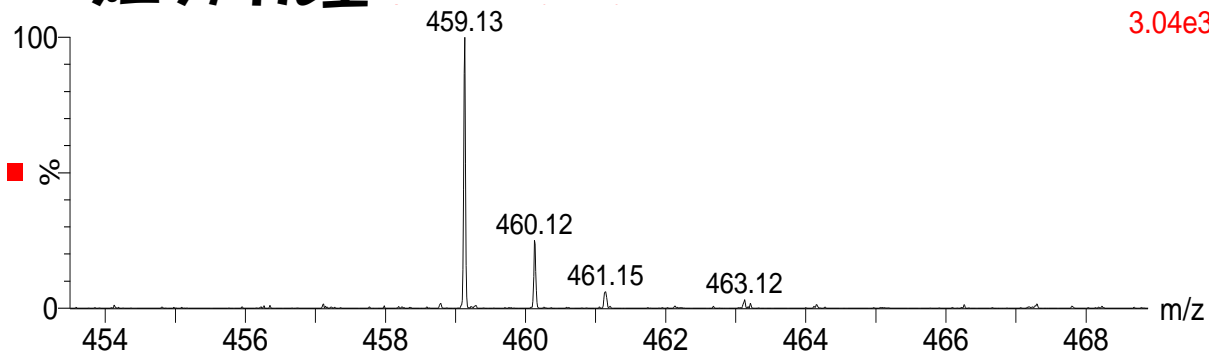
Centroid = Bar

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

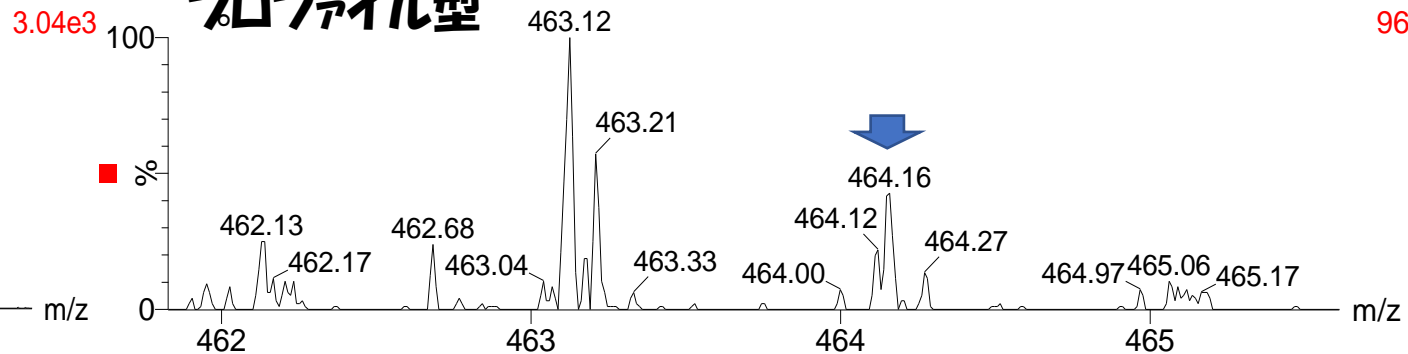
プロファイル型スペクトルとバー型スペクトル



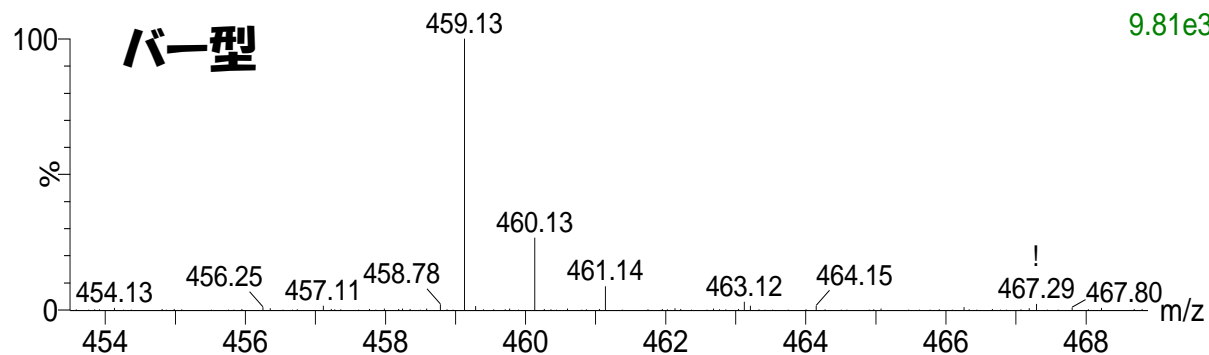
プロファイル型



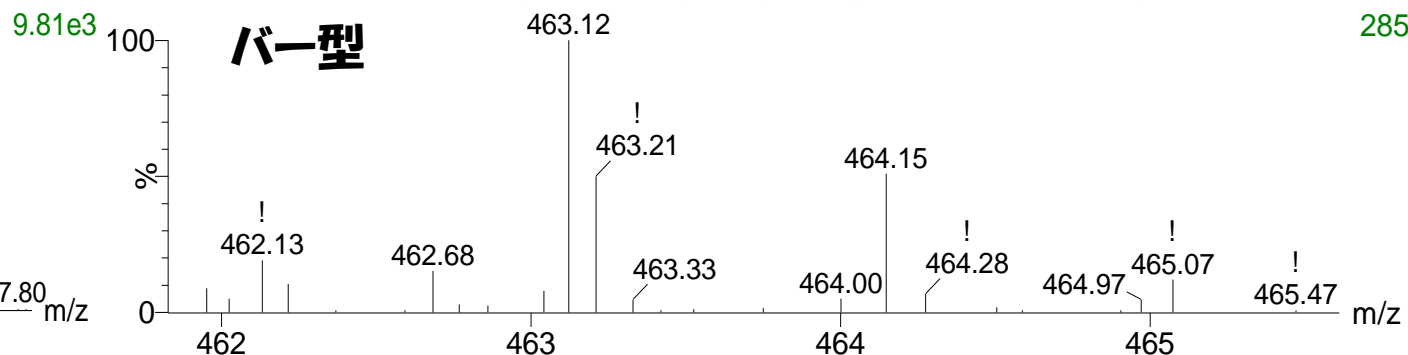
プロファイル型



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！

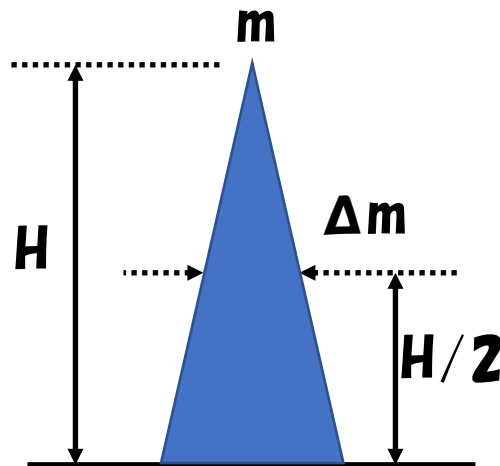
質量分解能とマススペクトル

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

正確な m/z 値 (精密質量) からイオンの 元素組成を推定

- イオンの構成元素組成 \Rightarrow 精密質量は一義的に決まる
例: Reserpine ($C_{33}H_{40}N_2O_9$) $[M+H]^+ \Rightarrow m/z$ 609.28066
- 測定によって得られた質量 \Rightarrow 構成元素組成を推定
609.28066 \Rightarrow C?H?N?O?

Elemental composition search on mass 609.28

$m/z = 604.28 - 614.28$

m/z	Theo. Mass	Delta (mmu)	RDB equiv.	Composition
609.28066	609.28066	0.00	14.5	C ₃₃ H ₄₁ O ₉ N ₂
	609.27982	0.84	2.5	C ₁₇ H ₄₁ O ₁₄ N ₁₀
	609.28199	-1.33	19.5	C ₃₄ H ₃₇ O ₅ N ₆
	609.28251	-1.85	1.5	C ₂₁ H ₄₅ O ₁₆ N ₄
	609.27881	1.85	27.5	C ₄₅ H ₃₇ O ₂
	609.28333	-2.67	24.5	C ₃₅ H ₃₃ O ₁₀ N ₁₀
	609.27797	2.69	15.5	C ₂₉ H ₃₇ O ₇ N ₈

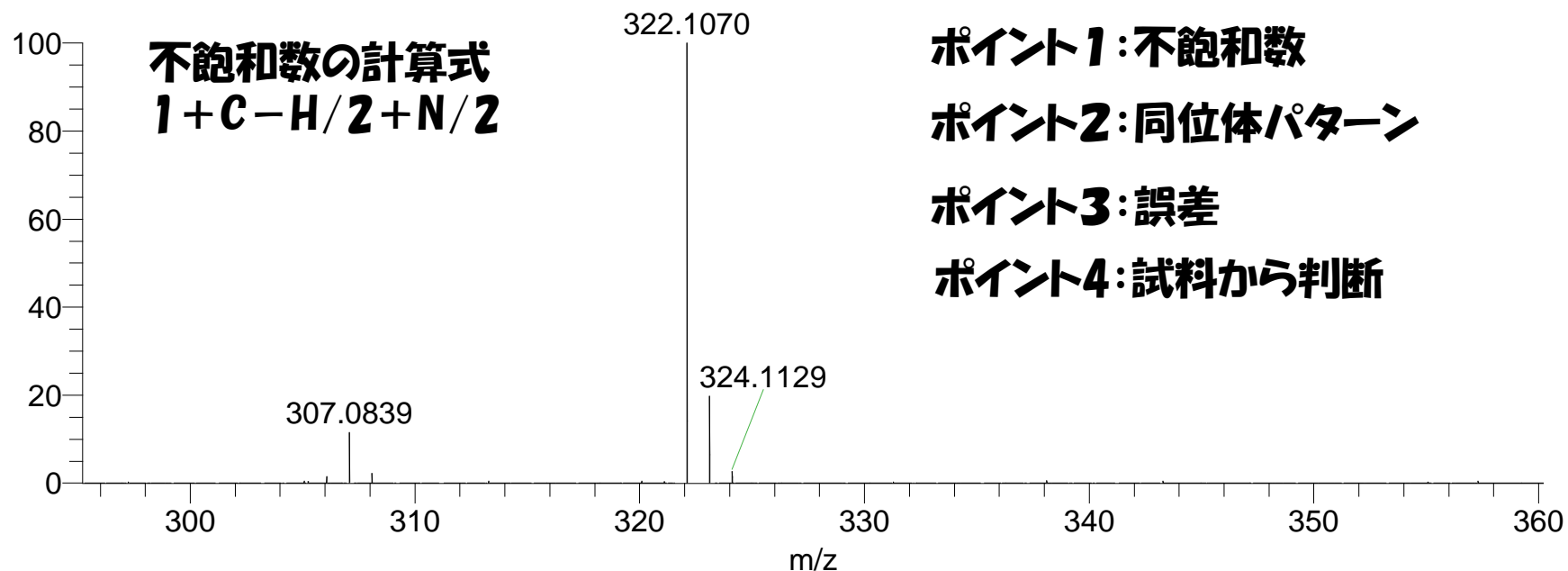
質量許容誤差: 1 ppm

質量許容誤差: 2 ppm

質量許容誤差: 5 ppm

* C: 0-50, H: 10-00, N: 0-10, O: 0-20の範囲で推定

複数の候補から如何に正解を選ぶか！？



m/z	Theo. Mass	Delta (mmu)	RDB equiv.	Composition
322.1072	322.1074	-0.18	12.5	C19 H16 O4 N
	322.1065	0.65	0.5	C3 H16 O9 N9
	322.1079	-0.69	0.0	C5 H18 O10 N6
	322.1060	1.16	13.0	C17 H14 O3 N4
	322.1087	-1.52	17.5	C20 H12 N5

間違い易い用語-1

質量精度と質量確度(真度)

用語集参照

質量精度 2 ppm以内などとカタログに書いてある

質量精度が高い → イオンの実測 m/z 値の繰り返し再現性が高い

質量確度が高い → イオンの実測 m/z 値が真値に近い

例: Reserpine ($C_{33}H_{40}N_2O_9$) $[M+H]^+ \Rightarrow m/z$ 609.2807

実測値 m/z 609.2802 真値との誤差 0.82 ppm $\left(\frac{609.2807 - 609.2802}{609} \times 1,000,000 \right)$

↑ 質量確度が高い

10回連続測定の実測 m/z 値

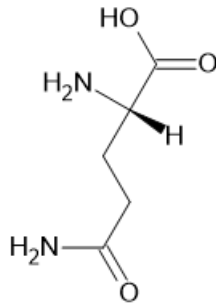
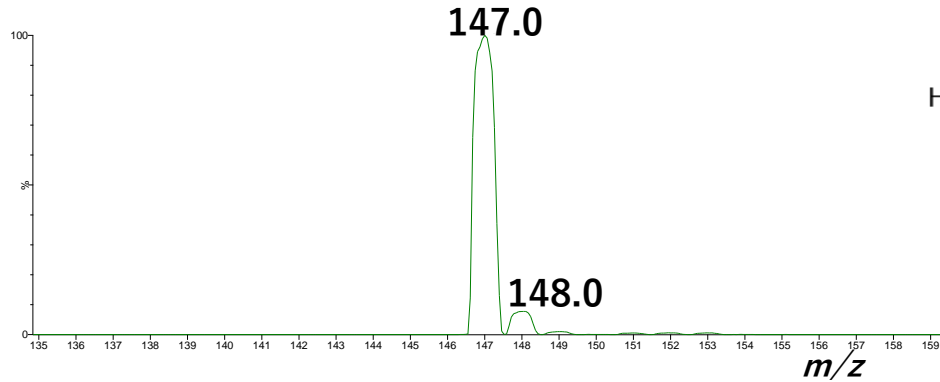
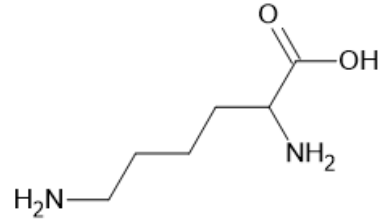
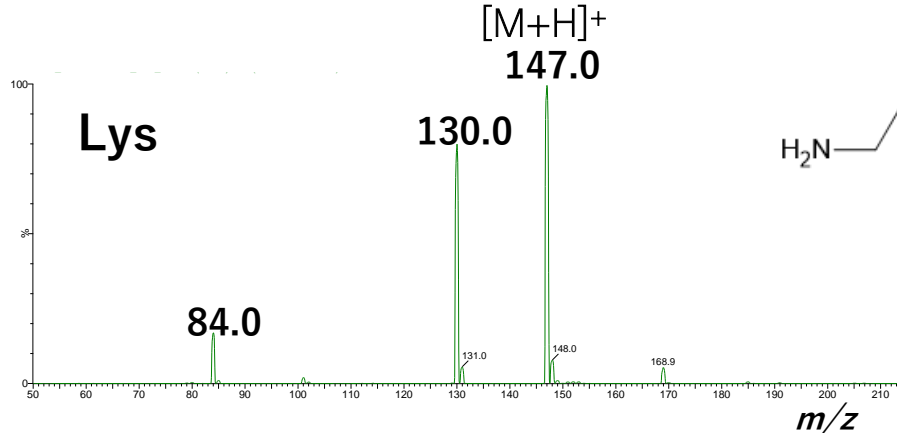
609.2710, 609.2707, 609.2708, 609.2712, 609.2713, 609.2708, 609.2710, 609.2712, 609.2707, 609.2711

平均 609.2711 真値との誤差 15.7 ppm ← 質量確度は低い

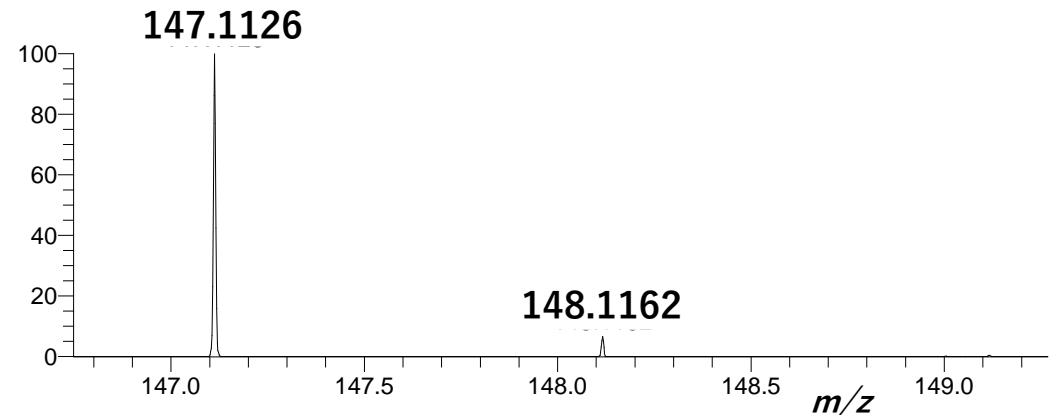
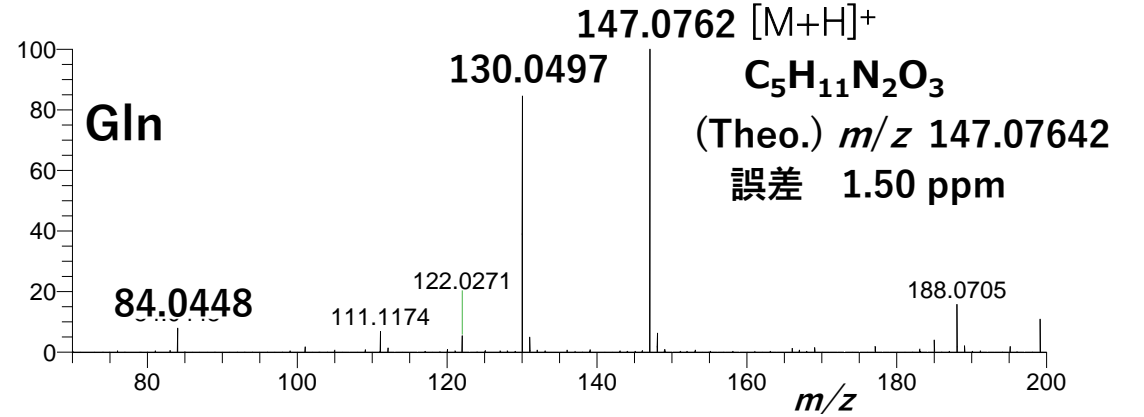
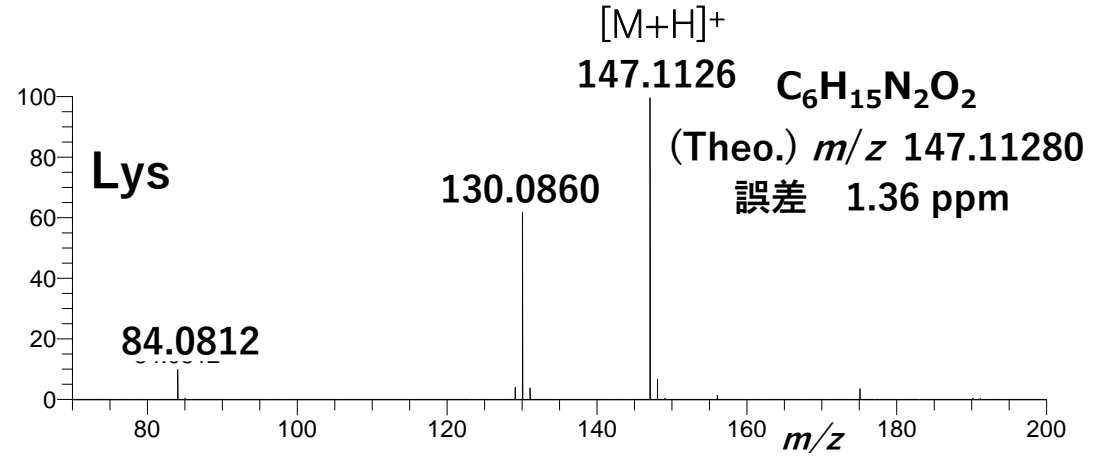
10回測定値の誤差 0.95 ppm ← 質量精度は高い
(CV=0.000034 %)

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)

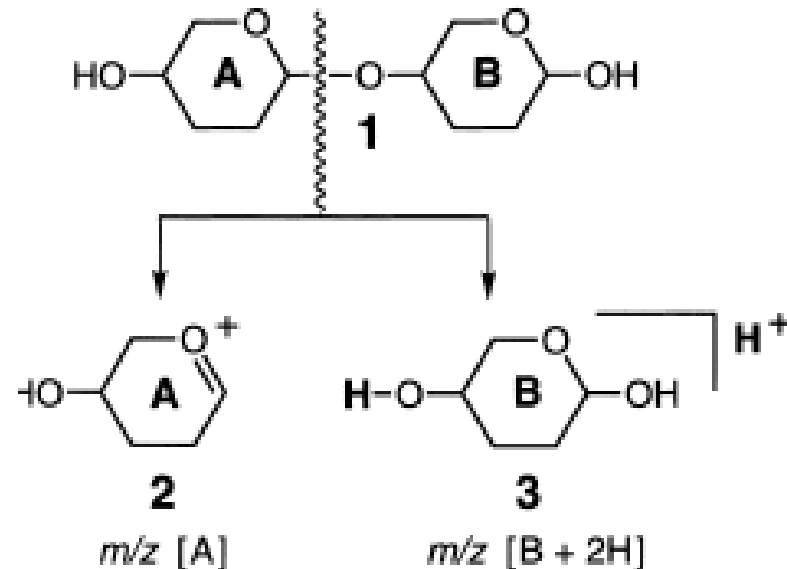


有機偶数電子イオンのフラグメンテーションにおけるマスシフト則

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>H₂</u>	ポリオール類
M - 15	<u>CH₃</u>	
M - 16	O·, NH ₂ ·	N-オキシド、アミド
M - 17	OH·	
M - 18	<u>H₂O</u>	アルコール、ポリオール
M - 26	C ₂ H ₂	
M - 27	HCN	
M - 28	<u>CO</u> , C ₂ H ₄	キノン、エチルエステル
M - 29	CHO, C ₂ H ₅ ·	
M - 30	<u>CH₂O</u> , NO·	
M - 31	<u>CH₃O</u> ·	含メトキシ基
M - 32	<u>CH₃OH</u>	含メトキシ基
M - 42	<u>CH₂CO</u> , C ₃ H ₅	
M - 43	<u>CH₃CO</u> ·	アセテート
M - 44	<u>CO₂</u>	カルボン酸
M - 45	COOH·	カルボン酸
M - 46	C ₂ H ₅ OH, NO ₂ ·	

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 ^{a)}			
	Positive ions		Negative ions	
One-bond cleavage				
C-C cleavage	①	0	①	-2
C-Z cleavage ^{b)}				
Z not included in fragment ions	②	0	②	-2
Z included in fragment ions	③	+2	③	0
Two-bond cleavage	④	+1 ^{c)}	④	-1 ^{d)}

^{a)} For instance, +2 means that the corresponding ion will appear 2 mass units higher than expected from the structural formula.

^{b)} Z stands for any heteroatom such as nitrogen, oxygen, etc.

^{c)} +3 if the two bonds are both C-Z and if the resulting fragment ion contains both Zs.

^{d)} +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 Compound²⁷⁾

Cleavage	Calculated mass	Mass shift ^{a)}	Observed peak (m/z) ^{b)}
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

^{a)} The number in a circle, such as ② and ③, indicates the corresponding item in Table 2.

^{b)} 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 ($130 - NH_3$).

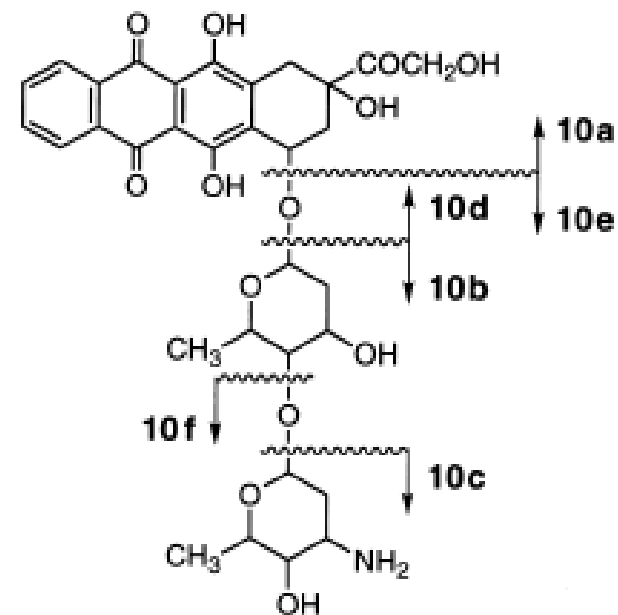


Fig. 10. Bond cleavages in a compound.

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の考え方

イオンの安定性 \longleftrightarrow 水素の付加 or 脱離

水素はどこからくるのか？

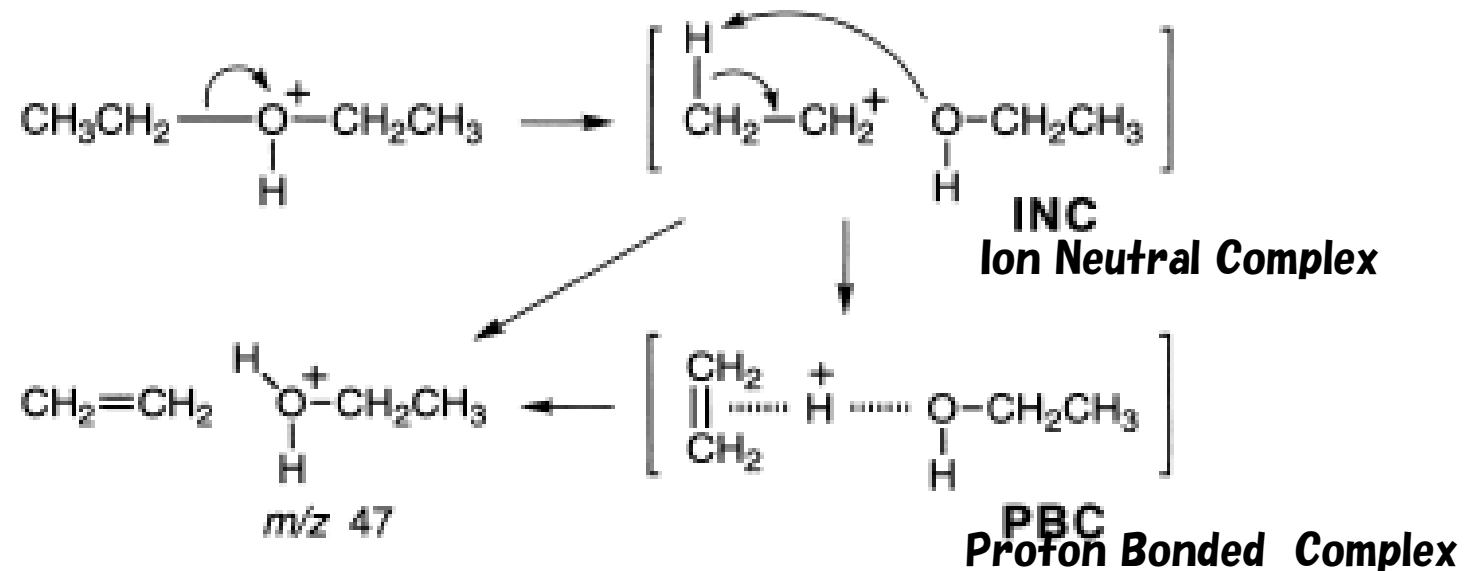
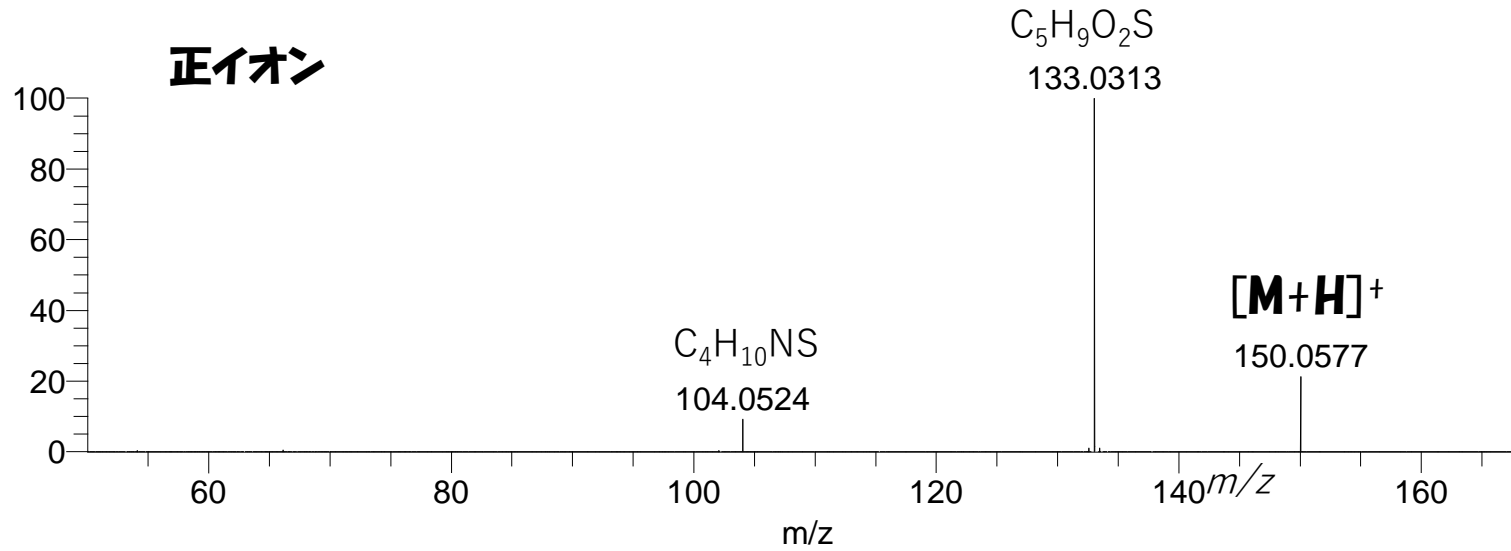


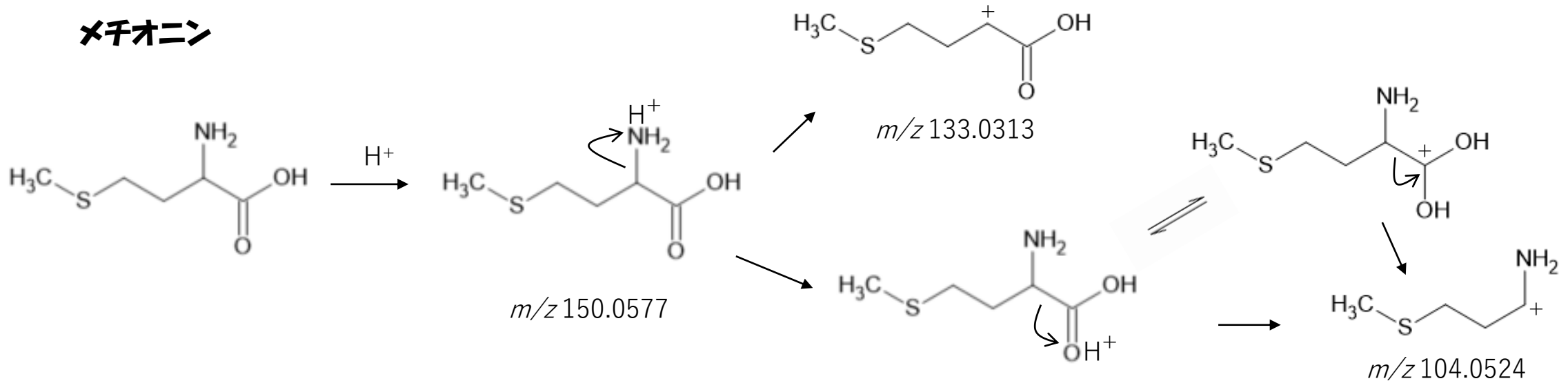
Fig. 15. A fragmentation of protonated diethyl ether.

電荷位置、電荷移動、電子の動き、転位反応、マスシフト則などを考慮した解析

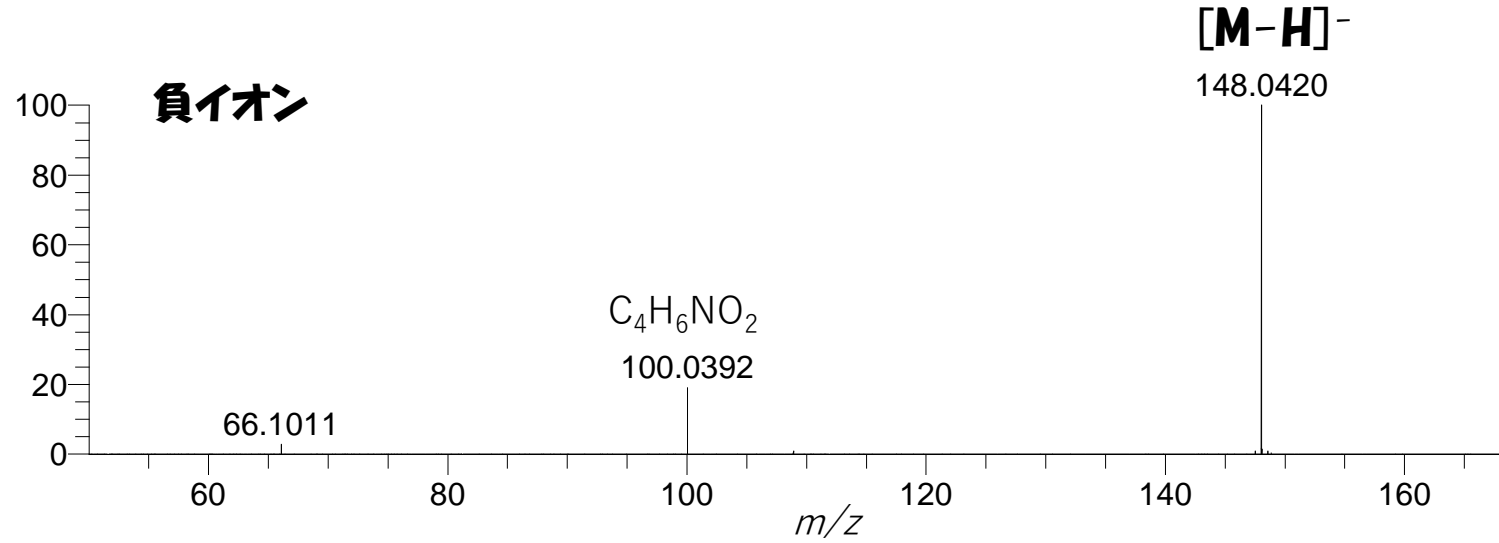
正イオン: 正電荷に向かって電子が動く事によって結合が開裂する



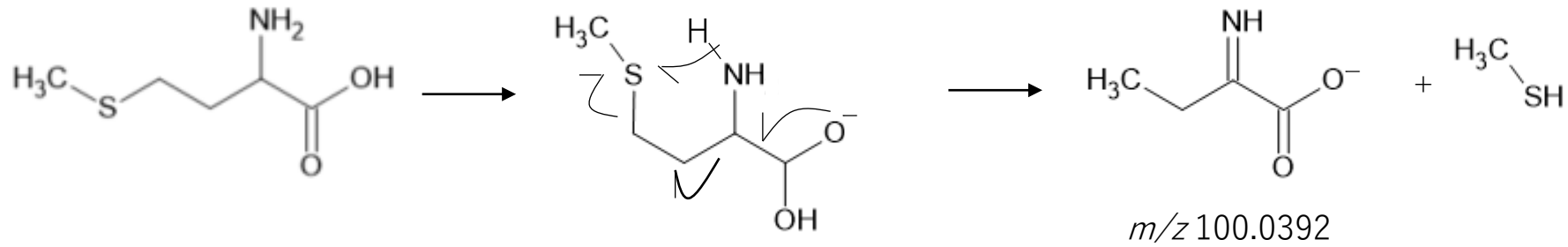
メチオニン



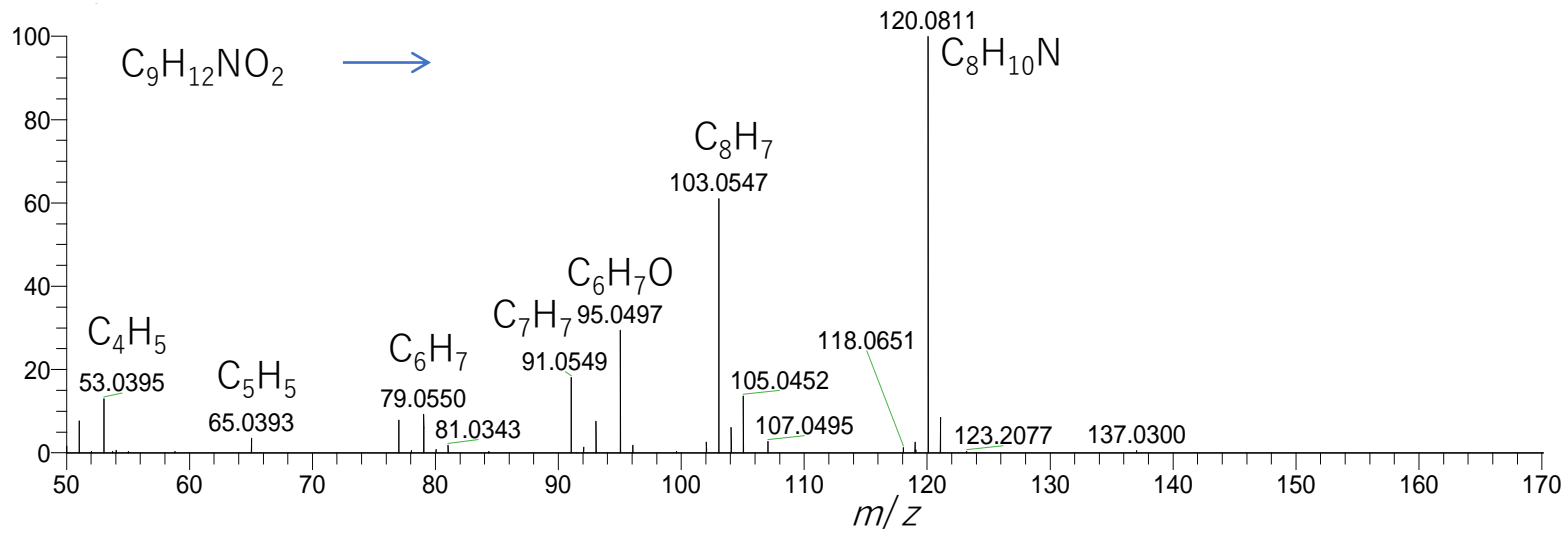
負イオン: 負電荷の電子が動く事によって結合が開裂する



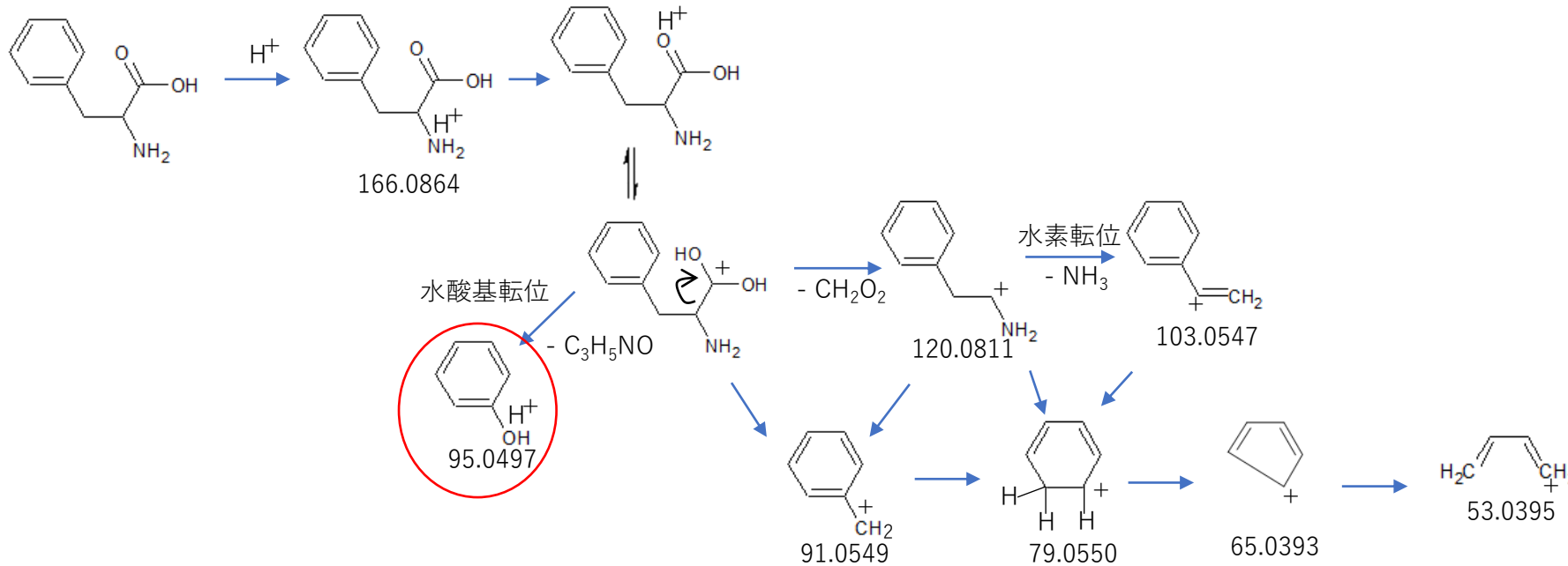
水素転位を伴う開裂



フェニルアラニンの[M+H]⁺ (m/z 166)からのフラグメントイオンスペクトル



フェニルアラニンの推定フラグメンテーション



LC / MS (/ MS)による未知化合物の構造推定

高分解能LC / MS / MS

高分解能フラグメントイオンスペクトルの取得&解析

高分解能フラグメントイオンスペクトル解析の実際

未知化合物の構造推定

⇒ 高分解能フラグメントイオンスペクトルから、(本当に)未知化合物の構造を組み立てるのは困難
(ほぼ不可能)



In silico フラグメンテーション解析支援ツールの利用

MS-FINDER

http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-FINDER/index.html

プログラムをダウンロードして使用、フリーツール

MetFrag

<https://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta/>

Web上でオンライン使用、フリーツール

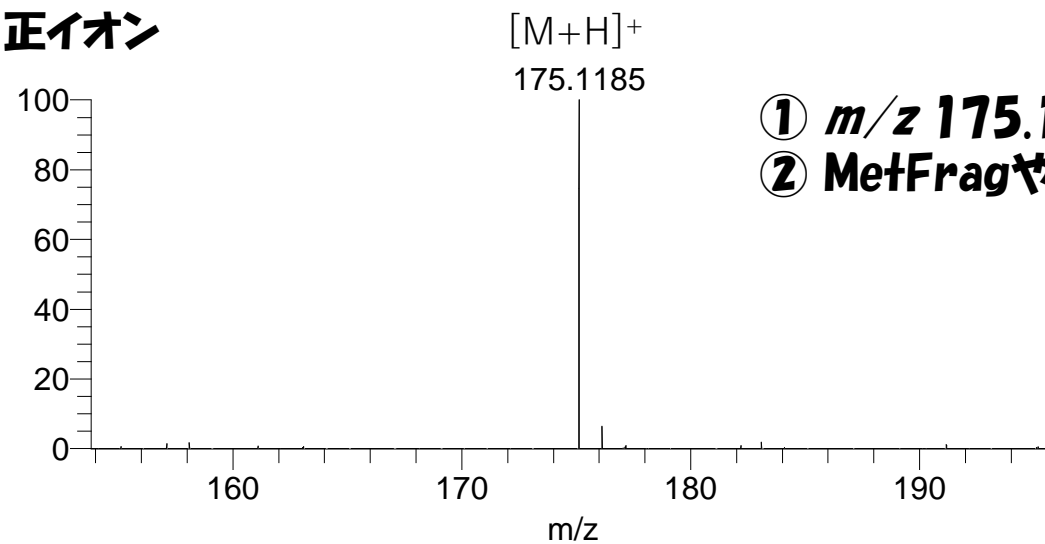
・有機化合物データベースに登録されている化合物の構造から、生成し易いフラグメントイオンを予測して仮想のフラグメントイオンスペクトルを生成する。

・実測のフラグメントイオンスペクトルと仮想のフラグメントイオンスペクトルを比較し、一致度の高い化合物を教えてくれる。

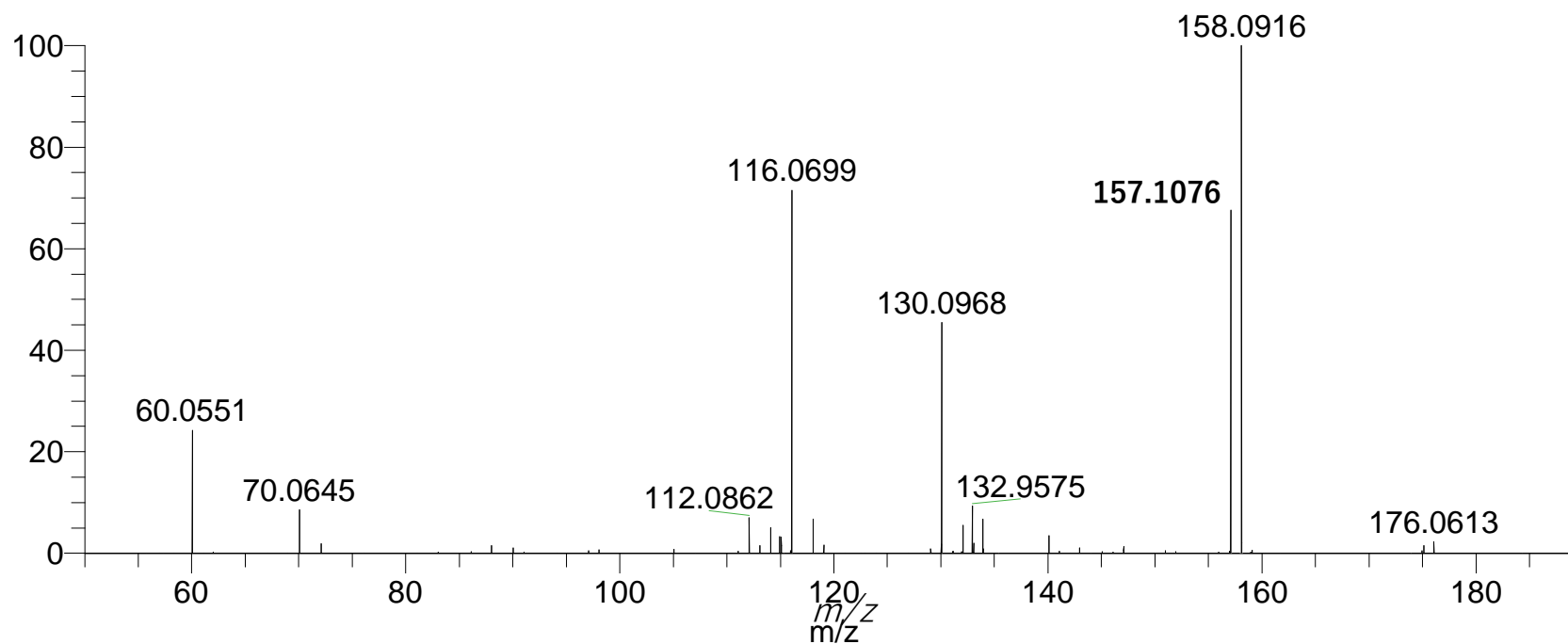
・高分解能MS/MSにより得られたフラグメントイオンスペクトルが基本。

構造推定 実践編: ツールを使って解析してみよう!

正イオン

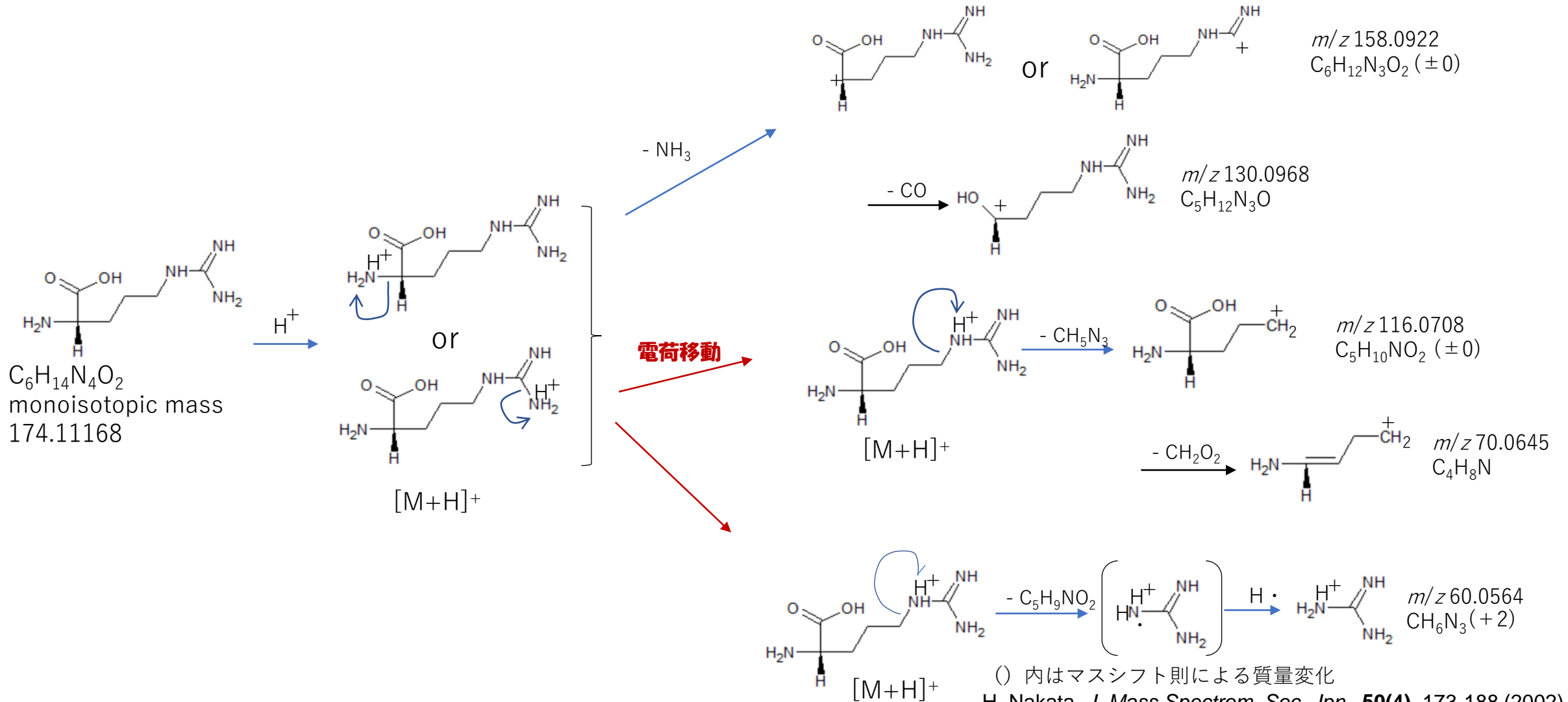


- ① m/z 175.1185の組成推定
- ② MetFragやMS-FINDERを用いて解析

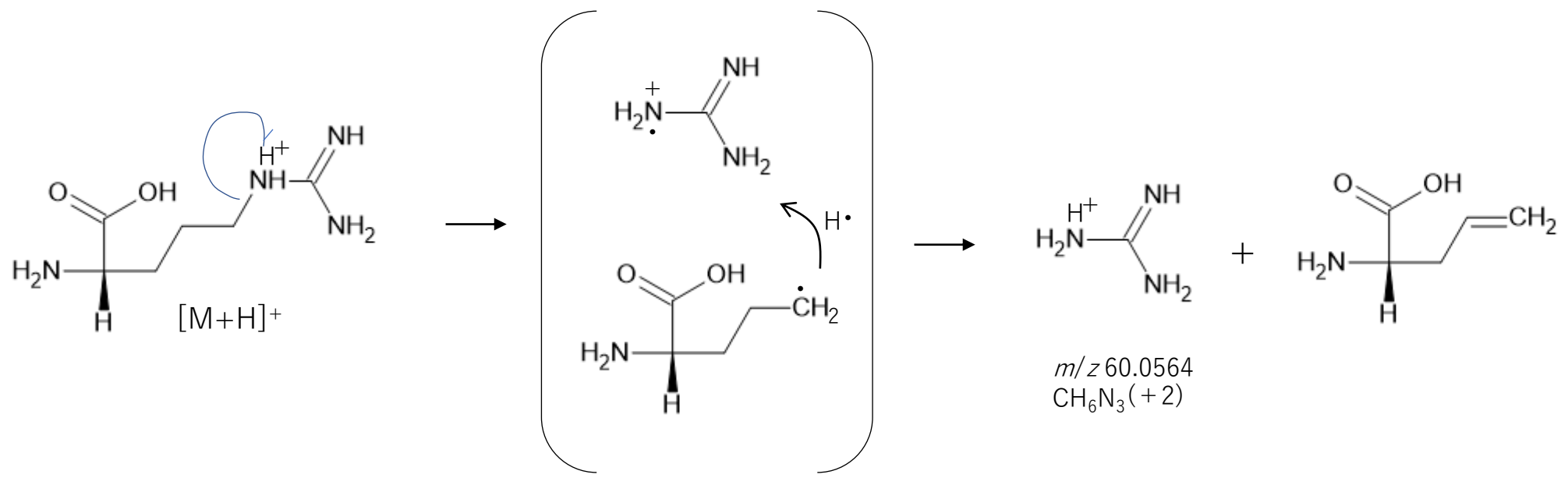


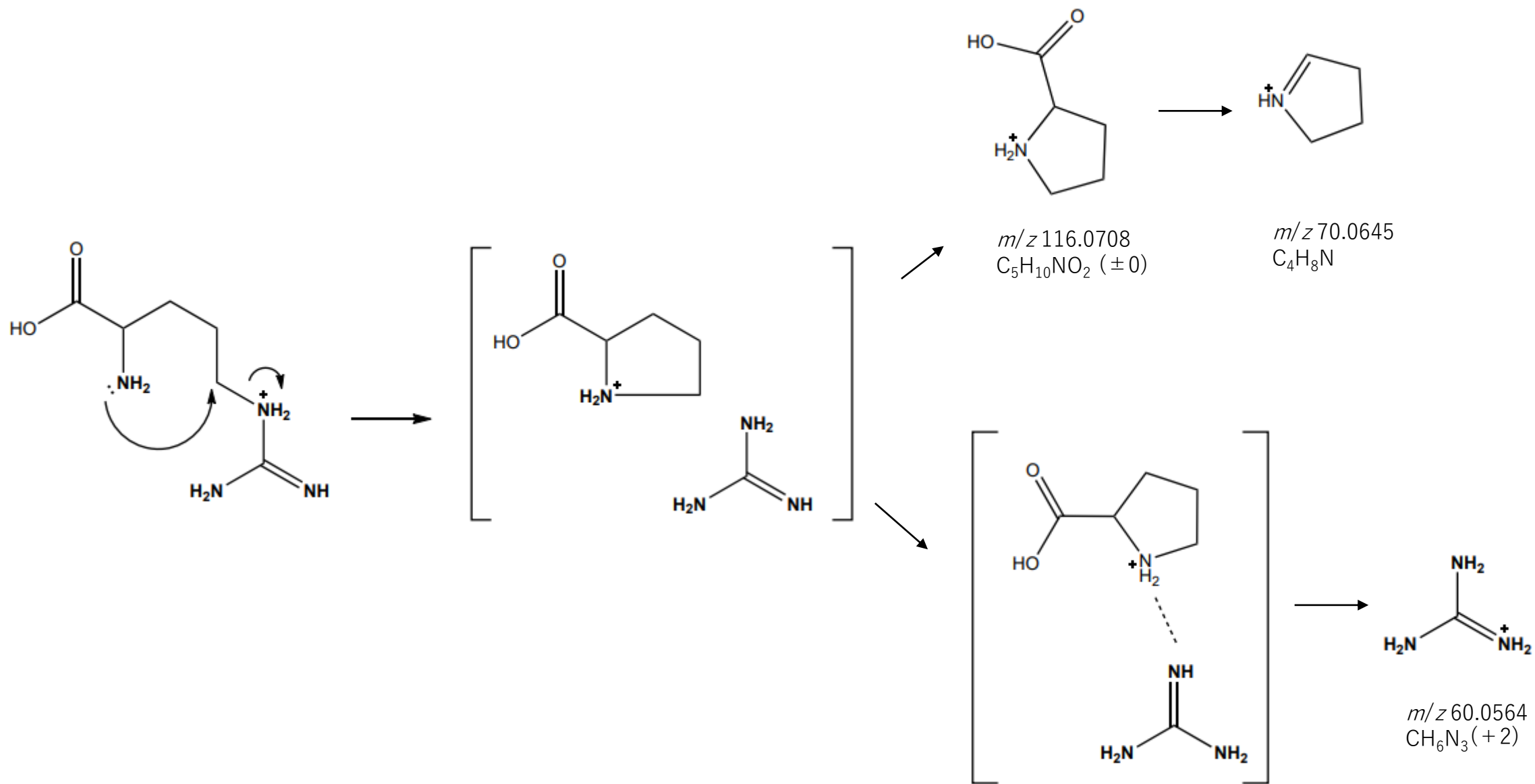
高分解能フラダクトイオンスペクトル解析の基礎

電荷位置、電荷移動、電子の動き、転位反応、マスシフト則などを考慮し、
フラダクトイオンスペクトルが推定構造に矛盾しないか検証する



() 内はマスシフト則による質量変化
H. Nakata, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50(4)**, 173-188 (2002).







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