

マスペクトル解析

高 橋 豊

1 はじめに

質量分析 (mass spectrometry, MS) は、原子や分子の質量を知ることができる機器分析法である。数ある機器分析の中で、高感度と高選択性を両立する特長をもつ。それらの特長のために、MS は、医学・薬学・環境・化学工業・有機合成化学、など様々な分野において定性・定量の両分析に多用されている。

しかし、MS は元々定性分析のための方法であり、データ解析と言う観点からも、定性分析の方が解説すべき事項が多い。よって本稿では、定性分析を中心に解説することとする。

2 MS による定性

MS は気相イオンを分析する方法であり、測定試料に含まれる分析種は、何らかの方法で気相イオンに変換することで質量分析が可能である。MS のイオン化法は、分析種の様々な物理化学的性質に対応する為に、市販装置に搭載されているだけでも現在 10 種類以上存在し、イオン化法と生成し易いイオン種との間には密接な関係がある。

著者らは MS のデータ (マスペクトル) から、分析種の質量を知る (推測する) ことが出来る。マスペクトルは横軸 m/z 、縦軸強度で表される二次元チャートである。 m/z の m はイオンの質量を統一原子質量単位で割った値、 z はイオンの電荷数である。エム&スラッシュ&ゼットをイタリック体で表記し、「エム・オーバー・ジー」と発音する。

MS による定性において、最初のステップは多くの場合分析種の質量を推測することである。マスペクトルから分析種の質量を推測する為には、分析種分子が壊れずに生成したイオンの m/z 値と、そのイオン種の情報が必要であり、どの様なイオン種が生成し易いかは、イオン化法によって異なる。

ところで、MS から得られる最も重要な情報は分子の質量情報であるが、これを分子量と勘違いされている

ケースが散見される。マスペクトルからは、分子の質量情報の他に、分子を構成する原子の同位体に関する情報や、分子の部分構造に関する情報も得られる。

ここでは先ず、マスペクトルから得られる情報として、分子の質量と分子量の違いについて、および同位体に関する情報について解説し、次いでガスクロマトグラフィー質量分析 (gas chromatography mass spectrometry, GC/MS) において用いられる電子イオン化 (electron ionization, EI) や化学イオン化 (chemical ionization, CI)、液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS) に用いられる代表的なイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) に関して、マスペクトルから分析種分子の質量を推測する方法について述べる。

2・1 マスペクトルから得られる情報

2・1・1 分子の質量と分子量について

分子の質量と分子量は、それぞれ分子を構成する原子の質量と原子量の和である。元素には同位体が存在し、原子の質量とは同位体毎の質量を指す。水素の同位体を例にとると、天然存在比最大 (99.9885 %) の同位体である ^1H 原子の質量は 1.007825 Da であり、天然存在比 0.0115 % の ^2H 原子の質量は 2.014102 Da である。そして水素の原子量は、 ^1H と ^2H の質量に各同位体の天然存在比を重率として掛けて求めた加重平均値の統一原子質量単位に対する比であり、1.0079 となる。MS で用いる質量の単位は統一原子質量単位であり、記号は Da もしくは u で表す。原子量や分子量には単位はない。有機化合物を構成する主な元素には同位体が存在し、それぞれの原子質量・同位体の天然存在比・原子量などを表 1 に示す。

低分子においては、分子を構成する各元素が天然存在比最大の同位体である場合の分子の存在確率が最も高く、その分子の質量を整数で計算した場合はノミナル質量、精密質量で計算した場合はモノアイソトピック質量と言う。

それでは、分子の質量と分子量の違いを、実際の例で見よう。

表1 主な元素の質量と天然存在比

原子番号	元素記号	質量数	質量	天然存在比 (%)	原子量
1	H	1	1.008	99.989	1.008
		2	2.014	0.012	
6	C	12	12	98.93	12.011
		13	13.003	1.07	
7	N	14	14.003	99.632	14.007
		15	15.000	0.368	
8	O	16	15.995	99.757	15.999
		17	16.999	0.038	
		18	17.999	0.205	
16	S	32	31.972	94.93	32.065
		33	32.971	0.76	
		34	33.968	4.29	
		36	35.967	0.02	
17	Cl	35	34.987	75.78	35.453
		37	36.966	24.22	
35	Br	79	78.918	50.69	79.904
		81	80.916	49.31	

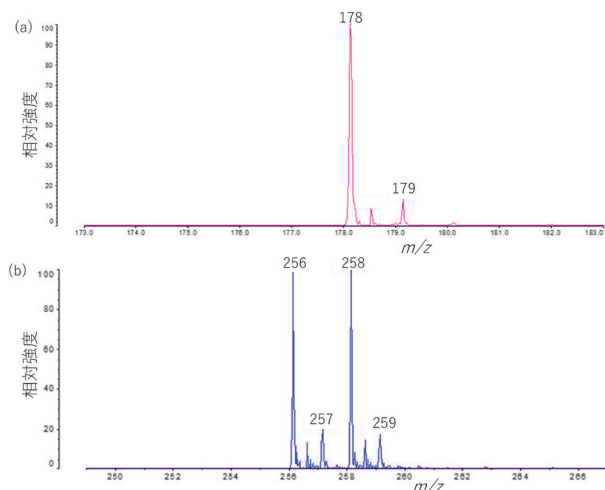


図1 (a) アントラセンと (b) ブロモアントラセンの正イオンLDIマスペクトル

アントラセンとブロモアントラセンの、レーザー脱離イオン化 (laser desorption ionization, LDI) により得られたマスペクトルを図1に示す。LDIについては解説を省略するが、この例では2・2・1で解説するEI同様、分子イオンが生成している。アントラセン ($C_{14}H_{10}$) のノミナル質量は178 Da、モノアイソトピック質量は178.07825 Da、分子量は178.229であり、3者の数値にそれ程大きな違いは無い。アントラセンの水素の一つが臭素に置き換わったブロモアントラセン ($C_{14}H_9Br$) の場合、ノミナル質量は256 Da、モノアイソトピック質量は255.9887 Da、分子量は257.125であり、ノミナル質量あるいはモノアイソトピック質量と分子量との間に

は、1以上の違いが生じる。

図1 (a) においては m/z 178 イオンがメインピークとして観測されている。これは、CとHがすべて天然存在比細動の同位体 (^{12}C , 1H) で構成されるアントラセンの分子イオンである。また、 m/z 179 イオンが相対強度約15%で観測されている。これは、アントラセンに含まれる14個の炭素の中の1個が ^{13}C に置き換わったアントラセンの分子イオンである (2H を1個含む分子も混在している)。

図1 (b) においては m/z 256 イオンと m/z 258 イオンがほぼ同じ強度で観測されている。この両イオンの m/z 差は、臭素の二つの同位体 ^{79}Br と ^{81}Br の質量差に相当する。つまり、 m/z 256 は ^{79}Br を含むプロモアントラセンの、 m/z 258 は ^{81}Br を含むプロモアントラセンの分子イオンである。

図1 (a) の m/z 178 イオンと m/z 179 イオン、および図1 (b) の m/z 256 イオンと m/z 258 イオン、これらは夫々分子を構成する原子の一つが異なっており、異なる質量をもつ分子由来のイオンと言うことになる。

m/z 178 イオンに対する m/z 179 イオン、および m/z 256 イオンに対する m/z 258 イオンは同位体イオン (ピーク) と呼ばれ、低分子で同位体イオンが分離されている限りにおいては、マスペクトルから得られるのは、分子の質量情報であることが分かる。

2・2 マスペクトルから得られる元素の情報

ここでは、図1を用いてマスペクトルから得られる分子を構成する元素の情報について解説する。それは、同位体ピークの強度比を見ることで判断出来る。

図1 (a) において、 m/z 178 イオン (モノアイソトピックピーク) 強度を100%とした時の+1 (m/z 179 イオン) の相対強度から、分子に含まれる凡その炭素数を知ることが出来る。それは、表1より ^{13}C の天然存在比が1.07%、 2H のそれが0.0115%であることに依る。天然存在比最大の同位体 (^{12}C , 1H) に対して+1の質量をもつ同位体の天然存在比が約100倍違うため、 m/z 179 イオンに寄与するのはほとんどが ^{13}C である。そして、その天然存在比が約1.07%であるために、 m/z 179 イオンの相対強度を1.1で割った値が、アントラセンに含まれる凡その炭素数となる。これは、他の元素 (酸素や窒素) を含む分子に関しても当てはまる。図2にロイシン・エンケファリン ($C_{28}H_{37}N_5O_7$, モノアイソトピック質量555.2693 Da) の正イオンエレクトロスプレー (ESI) により得られたマスペクトルを示す。ESIについては2・2で解説するのでここでは省略するが、プロトン付加分子が観測されている。 m/z 556.2760 イオンがモノアイソトピックピーク、 m/z 557.2789 イオンが主として ^{13}C を1一つ含む同位体ピークである。

図2より、目視で m/z 557.2789 イオンの相対強度を

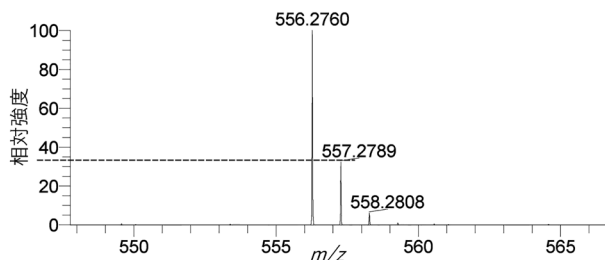


図2 ロイシンエンケファリンの正イオン ESI マススペクトル

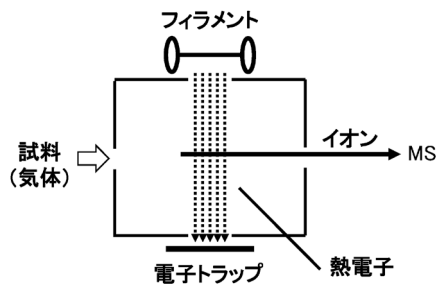


図3 EI のイオン源の概略

読むと 33 %, 1.1 で割ると 30 となり, ロイシン・エンケファリンの炭素数 28 にかなり近い. この差を近いと見るか遠いとするかは意見が分かれるところではあるが, そもそも m/z 557.2789 イオンには ^{13}C 以外にも ^2H , ^{15}N , ^{17}O も含まれている. また, 測定誤差や目視における誤差も含まれる. 全く未知の分析種を構造推定する場合, 「炭素が大体何個あるか」と言う情報は, 実際のところ非常に重要である.

図 1 (b) の m/z 256 イオンと m/z 258 イオンの強度比は, 臭素の二つの同位体 ^{79}Br と ^{81}Br の天然存在比を反映している. よって, この様に質量が二つ違いのイオンがほぼ同強度で観測された場合, そのマススペクトルが単一種の分子から得られたものであるなら, その分子には臭素が一つ含まれていることが分かる.

2.2 分子の質量を推測する

2.2.1 EI や CI の場合

EI は, 現在市販の MS 装置に搭載されている数あるイオン化法の中で, 最も伝統的なものの一つである. EI のイオン源の概略を図 3 に示す.

EI は, 加熱によって気化された分子に対して, 通常 70 eV の熱電子線を照射し, 分子から電子を一つ弾き飛ばすことで正イオンを生成させる方法である. イオン化は真空中で行われ, 分子が壊れずに電子を一つ放出して生成したイオンは分子イオンと呼ばれ, M^+ と表記される. ここで M は分子を示す. EI によって得られたアセトンのマススペクトルを図 4 に示す.

アセトンの分子式は $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ であり, ノミナル質量は 58 Da である. ノミナル質量とは, “分子を構成する各元素の天然存在比が最大の同位体の質量に最も近い整数値を用いて計算したイオンまたは分子の質量” と定義されている²⁾. 図 4 で観測されている m/z 58 は, アセトンのノミナル質量に等しく, これはアセトンの分子イオンであることが分かる. 分子イオンの質量は, 厳密には元の分子より電子 1 個分少ないが, 電子 1 個の質量は約 0.0005 Da であり, イオンの m/z 値が整数や小数点以下 2 桁までで表示されているマススペクトルにおいては, 電子の質量は無視出来る. 図 4 においては, m/z 43, 15 のイオンも観測されており, これらはフラグメン

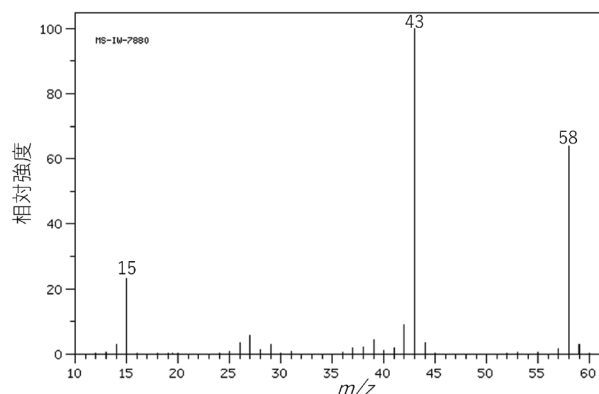


図4 アセトンの EI マススペクトル¹⁾

トイオンと呼ばれる断片化したイオンである. 質量分析計の内部でイオンが開裂して断片化する現象を, フラグメンテーションと呼ぶ.

EI で用いられる熱電子のエネルギーは通常 70 eV であり, これは多くの有機分子のイオン化ポテンシャル (10 eV 程度) より著しく高いため, 多くの物質で分子イオンのみならずフラグメントイオンが生成する. また, 分子イオンが全く観測されない場合もある. 図 5 にその例を示す.

EI により得られたマススペクトルで分子イオンが観測される場合, それは当然最も大きな m/z 値を示す. 図 5 (a) では, m/z 320 に低強度のピークが確認できるが, これが分子イオンか否かははっきりしない. また, 図 5 (b) では, m/z 441 イオンが明瞭に観測されている. これは分子イオンであると判断しがちであるが, 結論から言うとこれは分子イオンではなくフラグメントイオンである.

図 5 に示したのはほんの一例であるが, 分析種が未知の場合, EI マススペクトルから分子の質量を判断することは, 極めて困難である. 分子イオンが観測されているか否か判断が出来ないことが多いためである. その場合, CI などのソフトイオン化を併用することが有用である. CI は GC/MS に用いられる代表的なソフトイオン化であり, 多くの場合分子を壊さずにイオン化することが可能である. 図 5 で示した 2 種類の分子の, CI によるマススペクトルを図 6 に示す. CI は, メタン・

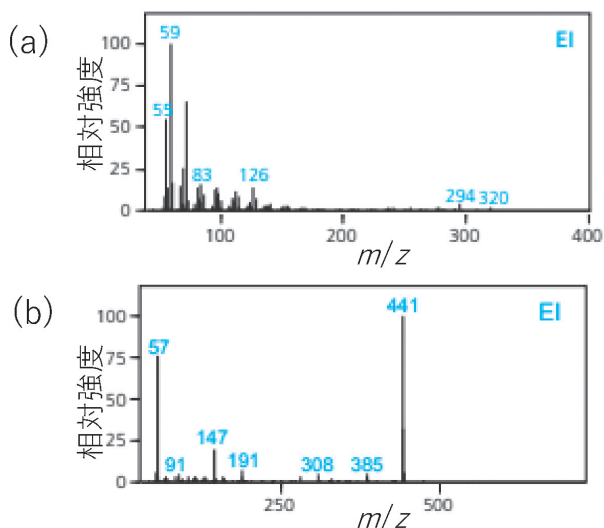


図5 分子イオンが観測されていないEIマスペクトル例
(a) エルカ酸アミドと (b) イルガホス 168 のEIマスペクトル
(資料ご提供：株式会社島津製作所)

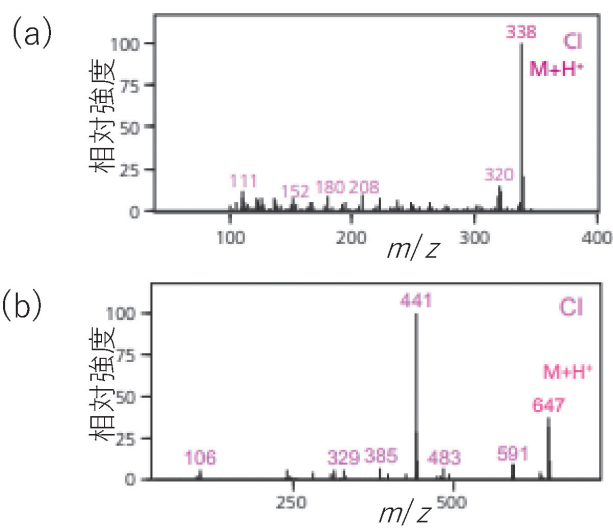


図6 (a) エルカ酸アミドと (b) イルガホス 168 のCIマスペクトル
(資料ご提供：株式会社島津製作所)

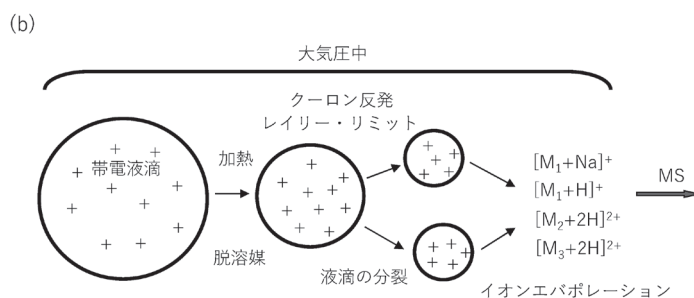
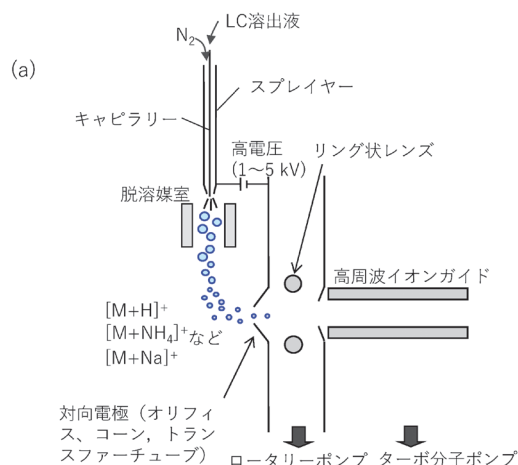


図7 (a) 市販のESIのイオン源概略と (b) ESIにおけるイオン生成イメージ

イソブタン・アンモニアなどの試薬ガスから生成したイオンと分析種分子との気相化学反応によって、分析種分子をイオン化させる方法であり、試薬ガスの種類による多くの場合プロトン付加分子 ($[M+H]^+$) が生成する。図6に示す例では両分子共にプロトン付加分子が観測されており、元の分子の質量を知ることができる。

2・2・2 ESI の場合

ESI は、現在 LC/MS で最も汎用されているイオン化法である。LC/MS で分析可能な物質は、GC/MS より圧倒的に多いため、ESI 以外に、分析種の物理化学的性質に応じて、大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) や大気圧光イオン化 (atmospheric pressure photo ionization, APPI) も用いられる。しかし、生成しやすいイオン種に大きな差異はないため、ここでは ESI についてのみ解説する。

対向電極を近傍に置いた金属製のキャピラリーに電気伝導性の液体を流し、両者に高電圧を印加するとキャピラリーの先端から高度に帯電した液滴が生成する。これがエレクトロスプレーの原理であり、帯電液滴を加熱・脱溶媒して単一のイオンを生成させると質量分析が可能になる。市販の ESI のイオン源の概略と ESI におけるイオン生成イメージを図7に示す。

ESI の分析対象となる分子の多くは中性であり、正イオン検出ではプロトン (H^+) やナトリウムイオン (Na^+)、アンモニウムイオン (NH_4^+) などが付加することで正イオンとなる。分子が ESI によってイオン化するためには、分子内にプロトンなどが付加する場所が必要であり、酸素原子や窒素原子などの非共有電子対がそれにあたる。また、二重結合にも付加することがある。

負イオン検出では、分子からプロトンが脱離、あるいは分子にギ酸イオン ($HCOO^-$ 、移動相にギ酸が添加さ

表2 イオン化モード、移動相溶媒、生成し易いイオン種の関係

イオン化法	極性	移動相溶媒	生成し易いイオン種
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, 酢酸アンモニウムなど	$[M-H]^-$, $[M+CH_3COO]^-$
	-	含ギ酸	$[M-H]^-$, $[M+HCOO]^-$
	-	含酢酸アンモニウム	$[M-H]^-$, $[M+CH_3COO]^-$
APCI	-	酸を含まない系	
	-	含酢酸, 酢酸アンモニウム	$[M-H]^-$, $[M+CH_3COO]^-$
	-	含ギ酸	
	-	含酢酸アンモニウム	$[M-H]^-$, $[M+CH_3COO]^-$

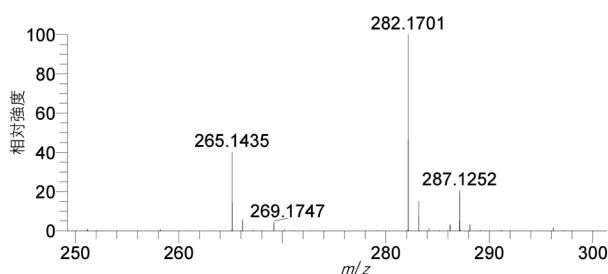


図8 正イオン ESI により得られるマスペクトル例

れている場合)や塩素イオン (Cl^-) が付加したイオンが生成し易い。

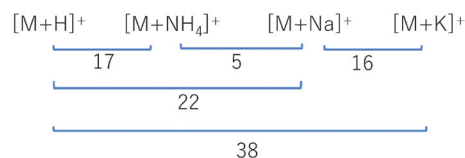
生成し易いイオン種は、イオン化法・極性・移動相溶媒(添加剤)に密接に関係している。ESI と APCI おいて生成し易いイオン種の一覧を表2に示す³⁾。

ESI によって得られるマスペクトルにおいては、一つの分子であっても複数の付加イオンが観測されることが多々あり、分子の質量を推測するためにはイオン種を正しく判断する必要がある。幾つかの例を見てみよう。

図8に示すマスペクトルは、正イオン ESI で得られた単一分子由来のものである。複数の付加イオンが観測されている典型的な例で、一見複雑そうであるが、複数の付加イオンが観測されているからこそイオン種を限定でき、元の分子の質量を推測することが出来る。着目するのは、 m/z 265, 282, 287 各イオンの m/z 差である。これは高分解能質量分析計で測定されたデータであるため、小数点以下4桁まで表示されているが、 m/z 差についてはまずは整数で考える。265 と 282 の差が17、そして282 と 287 の差が5、更に265 と 287 の差が22である。異なるイオン種と質量差(1個イオンの場合は m/z 差)の関係を、図9に示す。

図9を参考に図8のマスペクトルを解析すると、

正イオン



負イオン

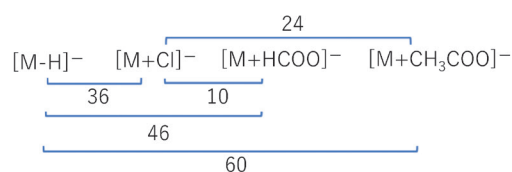


図9 ESI において生成し易いイオン種と整数質量差

m/z 265, 282, 287 の各イオンは、それぞれ $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, と推測することが出来る。そして、高分解能マスペクトルの場合には、各イオンの m/z 差を小数点以下まで確認すれば、より確実に付加イオンを帰属出来る。そして、元の分子の質量を計算するには、各イオンの m/z 値より付加しているイオンの質量を差し引けば良い。

図8は、単一の分子に対して複数の付加イオンが観測されているため、イオン種の帰属が容易である。次に、もう少し難しい例を見てみよう。ある天然物試料中成分の、正負両イオン検出 ESI によるマスペクトルを図10に示す。移動相には、0.1 % 酢酸を添加した水とアセトニトリルを用いた。図10(a)において、 m/z 344.1715 イオンがメインピークとして観測されており、それ以外には高強度なイオンは観測されていない。このように、主として観測されているイオンが一つの場合、イオン種の帰属は非常に困難である。溶媒等の条件にも依るが、 $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ のうちの何れのイオンも生成し易いからである。この場合、正

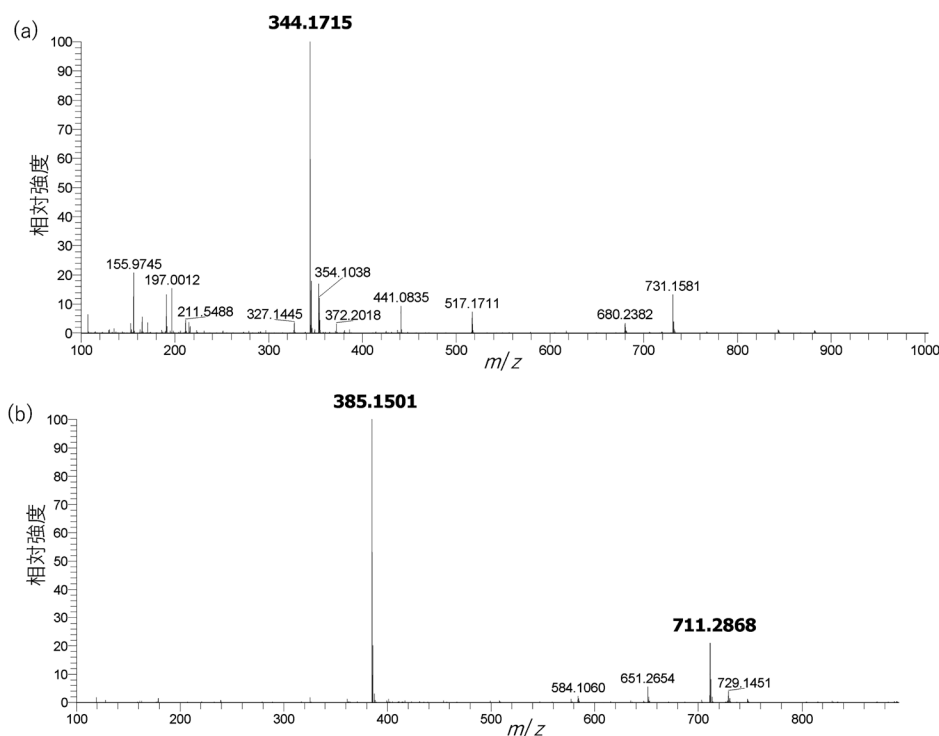


図 10 同一分子の (a) 正イオン検出および (b) 負イオン検出によるマスペクトル

イオン検出のマスペクトルのみから判断することはせず、負イオン検出によるマスペクトルを併せて解析すると良い。図 10 (b) においては、 m/z 385.1501 と 711.2868 に顕著なイオンが検出されている。711 は 385 の 2 倍に近い数値なので、 m/z 711.2868 が 2 量体由来のイオンと仮定して解析を進める。もし m/z 385.1501 イオンが $[M-H]^-$ であるなら、分子質量は 386.1574 Da となり、2 量体イオン ($[2M-H]^-$) の m/z 値は 771.3075 になるはずで、マスペクトルと一致しない。このマスペクトルは、移動相に酢酸を添加して得られているため、 m/z 385.1501 イオンを $[M+CH_3COO]^-$ であると仮定すると、分子質量は 326.1367 Da、そして $[2M+CH_3COO]^-$ の m/z 値は 711.2868 となり実測値と一致する。このことから、図 10 (a) で観測されている m/z 344.1715 イオンは $[M+NH_4]^+$ として帰属することが出来る。

GC/MS における定性：EI マスペクトルのライブラリー検索による解析

EI により得られた数十万にも及ぶマスペクトルは、古くからライブラリーデータベースとして登録されており、GC/MS における定性は、このデータベースを用いた検索が主な手段である。簡便且つ有用ではあるが、類縁化合物は似たようなスペクトルになるため、分子イオンが観測されていないマスペクトルを検索すると、違う物質がヒットすることがあるため、注意が必要である。ライブラリーサーチを過信するのは禁物である。

2・4 LC/MS における定性：MS/MS によるプロダクトイオンマスペクトルの解析、構造推定および精密質量からの分子式推定

2・4・1 マスペクトルからの構造推定

LC/MS に用いられる ESI, APCI, APPI 等のイオン化法は、いずれもソフトイオン化であるため、多くの分子でフラグメントイオンは生成されない。そのため、構造情報を得るために、MS/MS が用いられる。MS/MS には、プロダクトイオン分析・プリカーサーイオンスキャン・コンスタントニュートラルロススキャン・コンスタントニュートラルマスゲインスキャン・選択反応モニタリングの 5 種類があり、構造推定に用いられるのはほとんどの場合プロダクトイオン分析である。プロダクトイオン分析とは、タンデム質量分析計を用いて行う分析であり、1 台目の質量分析部で注目するイオンを選択し、コリジョンセルに導入して希ガスなどと衝突させて断片化し（フラグメンテーション）、2 台目の質量分析部でその断片化イオンのマスペクトルを取得する方法である。特定のイオン（プリカーサーイオン）から生成したイオン（プロダクトイオン）を観測するため、プリカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z （質量）差から、元の分子の構造推定を行うことが出来る。或る物質の正イオン ESI & 高分解能 MS/MS により得られたマスペクトルと、 $[M+H]^+$ (m/z 166 イオン) のプロダクトイオンマスペクトルを図 11 に示す。

図 11 (a) においては、 m/z 166.0856 イオンがメインピークとして観測されており、他には非常に小さなピークが三つ観測されている。正イオン ESI によるマスペ

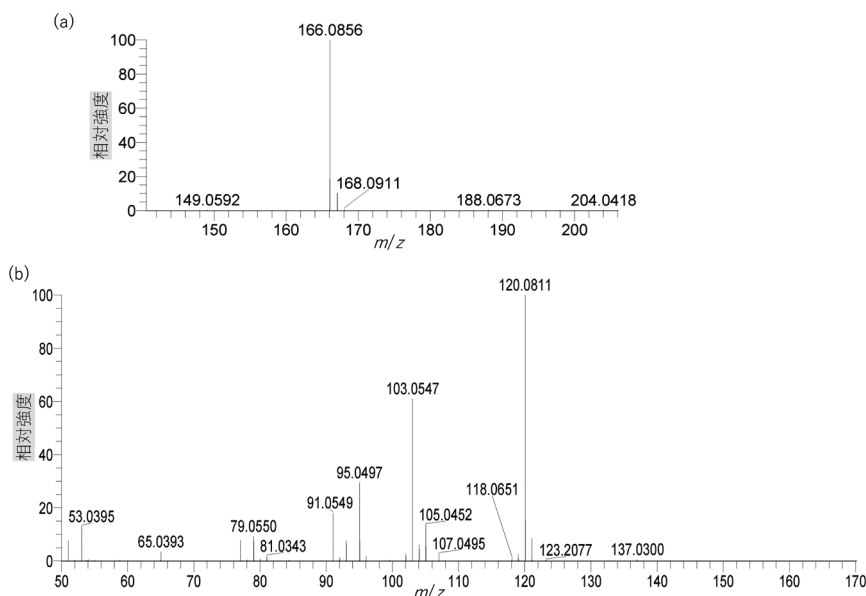


図 11 フェニルアラニンの正イオン ESI による (a) マススペクトルと (b) m/z 166 イオンのプロダクトイオンスペクトル

クトルでピークが 1 本しか検出されていない場合、イオン種の帰属は、図 10 (a) の例で示したように、実は結構難しい。今回のケースでは、わずかに検出されている m/z 188.0673 イオンとの m/z 差が 21.9817 であり、これはナトリウムイオンとプロトンの質量差に相当する。また、両イオンの m/z 値を用いて抽出イオンクロマトグラムを作成したところ、同じ保持時間にピークが確認された。よって、 m/z 166.0856 イオンは $[M+H]^+$ 、 m/z 188.0673 イオンは $[M+Na]^+$ として帰属することが出来た。分析種が未知の場合、この“イオン種の同定”は必須なので、“正イオン検出だから $[M+H]^+$ だろう”などに見切り発車をせず、他のイオン種を探す、負イオン検出のデータを確認する、などの対策を講じることを推奨する。

次に、 m/z 166.0856 イオンおよびプロダクトイオンスペクトルに観測されている主なイオンの分子式推定を行う。精密質量から分子式を推定するには、装置に付属のソフトウェアを使用する場合が多いと思うが、Web 上のフリーで使えるツールもある。

イオン種の帰属をせずに、直接分子式推定を行い、その結果でイオン種を帰属することも可能ではあるが、必ずしも装置のスペック通りの質量精度が得られているとは限らないため、余り推奨は出来ない。また、マススペクトルの解析ソフトで、イオン種を判断してくれる機能をもつものもあるが、ソフトに 100 % 頼るのではなく、自分で解析できる方が良い。

$[M+H]^+$ である m/z 166.0856 イオンおよびプロダクトイオンとして主に検出されている m/z 120.0811, 103.0547, 91.0549 の各イオンの分子式はそれぞれ、 $C_9H_{12}NO_2$, $C_8H_{10}N$, C_8H_7 , C_7H_7 として推測される。各イ

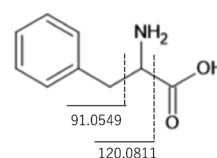


図 12 フェニルアラニンの構造と主なプロダクトイオンの帰属

オンの分子式の差異を見ると、 m/z 166.0856 イオンから m/z 120.0811 イオンが生成する過程では CH_2O_2 が脱離し、 m/z 120.0811 イオンと m/z 103.0547 イオンの差は NH_3 の脱離に相当する。また C_7H_7 はベンジル基の存在を示している。ベンジル基を元にして構造を組み立てると、図 12 に示すフェニルアラニンであると考えられる。

質量分解能が低く MS/MS 可能な装置（三連四重極質量分析計やイオントラップ（ポールトラップ）質量分析計）においては、検出されるイオンの m/z 値は通常整数あるいは小数点以下一桁程度の精度で得られる。この場合、上記のような分子式の推測は出来ないため、構造推測で出来ることはかなり限定される。未知試料中の成分の構造解析には、高分解能 LC/MS/MS の使用が強く推奨される。

2.4.2 電荷の位置や電子の動き、転位反応などを考慮した構造妥当性の確認

図 12 に示したようなプロダクトイオンを推定構造に対して帰属した後、更に詳細に構造妥当性を確認するには、電荷の位置や電子の動き、また転位反応などを考慮する方法がある。この方法で、上記フェニルアラニンの構造に対して主なプロダクトイオンを帰属した例を図

13に示す。この構造で最もプロトンが付加し易い（プロトン親和力が最も高い）のは、アミノ基の窒素である。共有結合（単結合）は2個の電子から成り、電子は負の電荷をもつため、共有結合の電子が正電荷に向かって移動することで結合の開裂が起こる。同じ単結合であっても、結合の両側の元素の種類や環境によって、結合の開裂し易さ（結合エネルギー）は異なる。

カルボニル基の α 位は開裂し易いことが知られており、その結合の電子一つがアミノ基の正電荷に移動することで結合の開裂が起こる。この際、電子が一つだけ移動すると、電荷をもつ側とともたない側の両方にラジカルが残ることになるが、これらはエネルギー的に不安定であるため、ベンゼン環の隣の炭素に結合している水素が転位すれば、図13に示すような安定した構造となり、 m/z 120.0811 イオンが生成すると考えられる。更に、プロトンが付加したアミノ基に対して隣の結合の電子が2個移動すれば、中性のアミノ酸として脱離して m/z

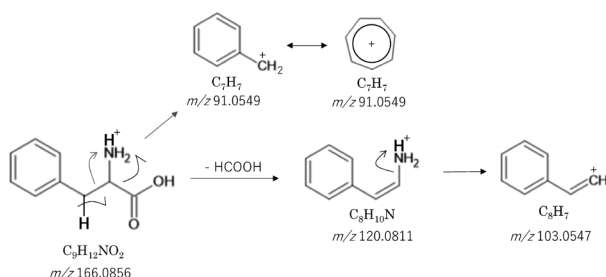


図13 フェニルアラニンの推定フラグメンテーション

103.0547 イオンが生成する。一方、カルボニル基の β 位のC-C結合の開裂によってベンジルイオンが生成する。ベンジルイオンは可逆的にトロピリウムイオンに異性化することが知られている。

このように、電荷（プロトン）位置や電子の動きを考慮してプロダクトイオンを帰属することは、推定構造が妥当であるかどうかの判断に役立つと考えられる。

2・4・3 高分解能 MS/MS により得られたプロダクトイオンスペクトルの解析支援ツールの利用

図11に示す2種類のマスペクトルから分子構造を推定することは、ある程度マスペクトル解析の経験があれば、それ程難しくはない。分子が小さいこと、構造が単純であること、プロダクトイオンが構造を推測するために十分に検出されていること、が理由である。一方、もっと分子が大きくなる、構造が複雑になる、構造を推測できるだけの十分なプロダクトイオンが検出されていない、などの条件になると、如何に豊富なマスペクトル解析の経験があろうと、未知物質の構造を推測することは困難である。また、マスペクトルから未知物質の構造を組み立てるソフトウェアも、現在のところ存在しない。

では、そのような場合にはどうすれば良いか？ 筆者は無償で利用可能な解析支援ツールを使用しているので、紹介する。それは、以下のような機能を有する。

- ① プリカーサーイオン ($[M+H]^+$ や $[M+NH_4]^+$ など) の m/z 値とイオン種 (および m/z 値から

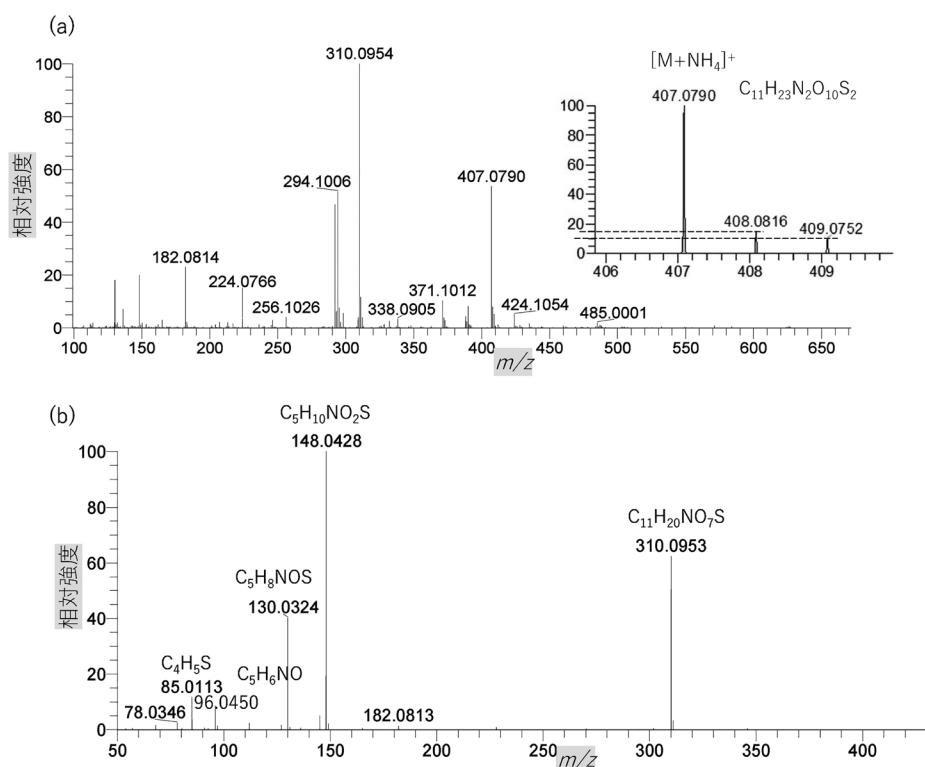


図14 花卉抽出液中の或る成分の正イオン ESI による (a) マスペクトルと (b) m/z 407 イオンのプロダクトイオンスペクトル

推測した分子式), プロダクトイオンスペクトルで観測されたイオンの m/z 値と強度, 検索する際の質量幅, の各情報を入力する.

- ② 入力した情報を元に, インターネット上で閲覧可能な有機化合物データベースに検索をかけ, 該当する物質をピックアップする.
- ③ ピックアップされた物質の構造に対して, 開裂しやすい結合を切断した仮想のプロダクトイオンスペクトルを In-Silico で生成する.
- ④ ③で生成した仮想スペクトルと①で入力したプロダクトイオンスペクトル情報を比較し, 近い順に物質がリストされる.

この機能をもつツールとして, 筆者は MS-FINDER⁴⁾ と MetFrag⁵⁾ を利用している. 両者は検索するデータベースが異なるため, 測定試料に応じてどちらが良いか使い分けている. 両方使う場合も多い. MS-FINDER を用いて未知成分の構造推定を行った例を紹介する.

道端で採取した紫色の花弁の抽出液を高分解能 LC/MSMS で測定し, 検出された未知成分の正イオン検出 ESI マススペクトルと, プロダクトイオンスペクトルを図 14 に示す.

マススペクトルで観測されている m/z 407.0790 イオンは, 同じ保持時間の負イオンマススペクトル (図 15) において m/z 388.0342 イオン ($[M-H]^-$) が検出されていることから, $[M+NH_4]^+$ であると帰属できる.

m/z 407.0790 (モノアイソトピックピーク) に対する +2 の同位体ピークの相対強度を見ると, 約 10 % である. このことから, この成分分子には硫黄が二つ含まれていると推測される. それは, 硫黄元素の天然存在比最大の同位体 ^{32}S に対して 2 番目の天然存在比を示す ^{34}S が約 4 % であることに依る. 図 15 (b) に示すプロダクトイオンスペクトルにおいて, m/z 96.9586 イオンが

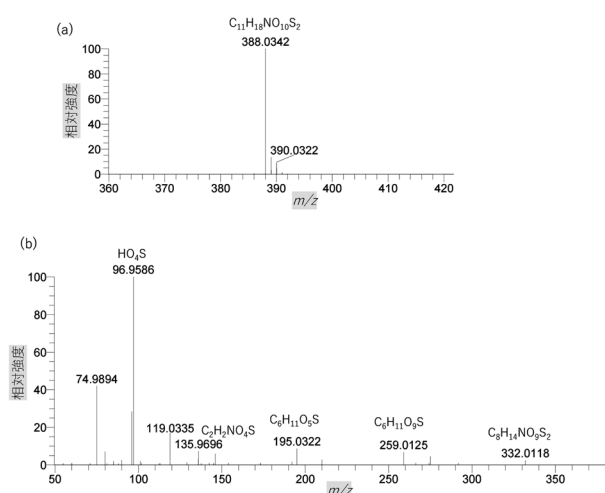


図 15 花弁抽出液中の或る成分の負イオン ESI による (a) マススペクトルと (b) m/z 388 イオンのプロダクトイオンスペクトル

観測されており, これは硫酸基 (HSO_4^-) の存在を示す典型的なイオンである. また, m/z 195.0322 イオンの分子式は $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{S}$ と推測でき, これはヘキソースと S が結合した状態の部分構造を示している. 図 14 (b) および図 15 (b) に示す様に, 正イオン/負イオンともに主なプロダクトイオンの分子式は推測出来たが, これらの情報を基に分子の構造を組み立てることは, 実際には簡単ではない. 有機化学の知識があればやって出来ないことはないが, 費用対効果を考えれば現実的ではない. そこで, 現実的な方法として, 筆者は前述した解析支援ツールを使用している. 図 14 に示した情報から MS-FINDER で解析した結果を図 16 に示す.

その結果, 図 17 に示すプロゴイトリンという物質がヒットした. 推測したように, 硫酸基およびヘキソースに S が結合した状態の部分構造をもっている. このことから, この成分はプロゴイトリンである可能性が高いが, 更に他の正負両プロダクトイオンを構造に対して帰属することで, 構造の妥当性を検証した. その結果を, 図 18 と 19 に示す.

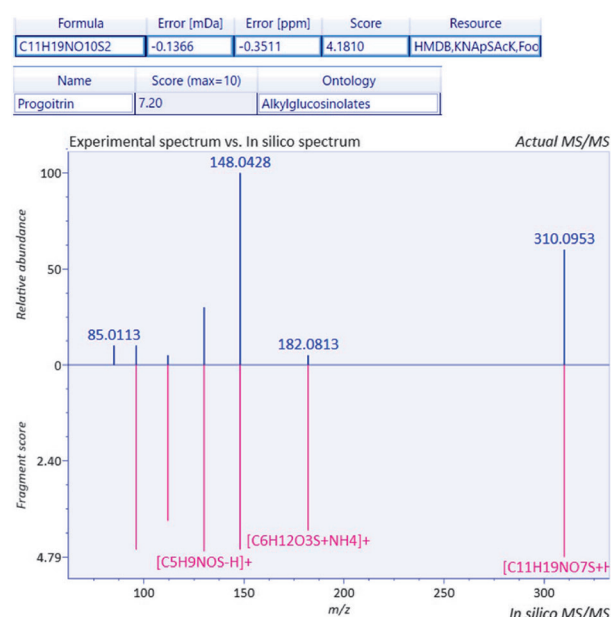


図 16 図 14 のデータを MS-FINDER によって解析した結果

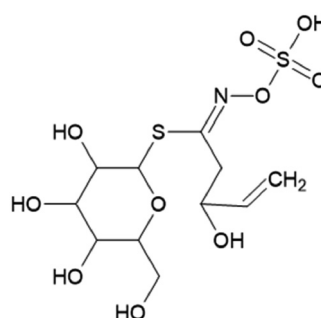


図 17 MS-FINDER の解析によって得られた候補物質の構造

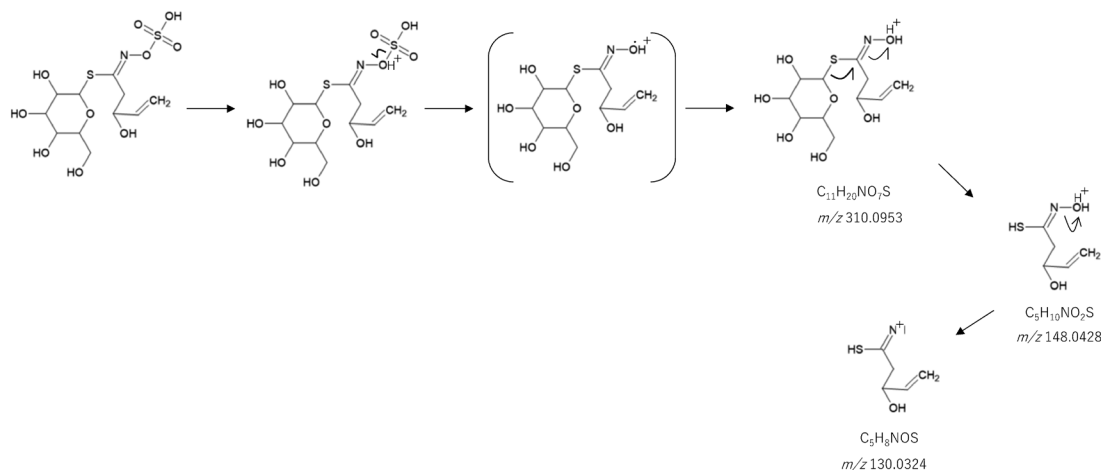


図 18 プロゴイトリンの正イオンにおける推定フラグメンテーション

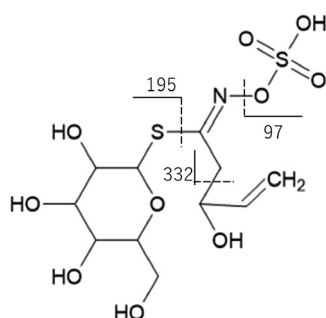


図 19 プロゴイトリンの構造に対する負のプロダクトイオンの帰属

図 18 で構造中に示した矢印は電子の動きを表しており、片矢印は一つの電子、両矢印は二つの電子が動くことを意味している。分子が正イオン ESI においてイオン化の際、付加するアンモニウムイオンやプロトンの位置は、それぞれの親和力に依存する。それぞれ窒素や酸素など非共有電子対をもつ元素や二重結合に付加することが可能で、プロトンは窒素にアンモニウムイオンは酸素に付加し易いという報告がある⁶⁾。プロトンの位置は分子内の何処か 1 か所に局在化している訳では無く、特に LC/MS/MS では低エネルギー衝突誘起解離 (collision induces dissociation, CID) の過程で移動すると考えられる。例えば図 18 の例においては、イオン化の際の電荷の位置は窒素であり、最初の m/z 310.0953 イオンが生成するフラグメンテーションの時に隣の酸素に移動すると考えられる。ここで、酸素と硫黄の間の結合の電子が一つ動いて開裂すると、ラジカルカチオンが生成するが、これは構造的に不安定であるため、脱離する中性フラグメントから水素を引き抜くことで m/z 310.0953 イオンとして安定化すると考えられる。

負イオンに関しては電子の動きまで推測することが困難だったため、主なプロダクトイオンを構造に対して帰属するに留めた。

図 18 において、実際のプロダクトイオンスペクトルが取得された際のプリカーサーイオンは $[M+NH_4]^+$ であったが、経験的にアンモニウムイオンがプロダクトイオンに残ることはほとんどないため、ここではプロトン付加として示している。

原子-原子間の電子が正電荷に向かって動くことによって結合が開裂する訳だが、一つ動くか二つ動くかは、フラグメンテーションの結果生成するイオンと中性フラグメントの両方の安定性に依ると考えて良い。例えば m/z 148.0428 イオンから中性の水分子が脱離することに寄って m/z 130.0324 イオンが生成すると考えられるが、これはプロダクトイオンと中性フラグメントの両方が安定で、典型的な例である。1 級のアミノ基にプロトンが付加してアンモニアとして脱離するフラグメンテーションも同様で、アミノ酸ではこの反応が頻繁に観測される。図 13 の m/z 120.0811 イオンから m/z 103.0547 イオンが生成する反応は、これにあたる。

このように、未知成分を高分解能 LC/MS/MS で測定して得られたマススペクトルから構造推定する場合、解析ツールを用いてデータベースから候補物質をピックアップし、フラグメンテーションに関する基礎知識を用いてプロダクトイオンと候補物質の構造との妥当性を確認する、という流れが現実的且つ有用であると考えられる。

3 ビッグデータ解析

質量分析計の性能や機能向上、および新たな分析法の開発によって、分析法としての MS の進歩は留まるところを知らない。様々な分野において MS の重要性が認識され、分析の検体数は増加の一途をたどっている。それと共に市場からの分析高速化の要求は高まり、データ取込や転送の高速化が進み、MS により得られるデータサイズは年々増加傾向にある。膨大な検体数を高速に分析した結果吐き出される、所謂ビッグデータを如何にして解析するか。それは、最近の MS における重要な課題の

一つである。比較的大きなデータを解析する方法として、主成分分析による差異解析と質量分析イメージングの解析例を紹介する。

3.1 主成分分析による差異解析

類似の複数の試料を GC/MS や LC/MS で測定し、そのデータを、主成分分析を用いることで試料間の差異を解析する方法は、材料・食品・化粧品・生化学など様々な分野で多用されている。ここでは同じウリ科の植物であるキュウリとゴーヤ（外側の皮部分と内側の綿部分）

を同濃度になるように水/メタノール混液で抽出し、高分解能 LC/MS (MS) で測定、その3データを Signpost MS (ライフィクス) を用いて解析した。

まず、3 試料の全イオンクロマトグラム (total ion chromatogram, TIC) を図 20 に示す。

ゴーヤの2 試料は良く似ており、キュウリは異なるパターンを示すことが目視で確認できる。しかし、細かい違いまで目視でデータを確認するのは事実上不可能なので、主成分分析を用いて差異解析を行うのが常套手段である。Signpost MS を用いた解析結果を図 21 に示す。

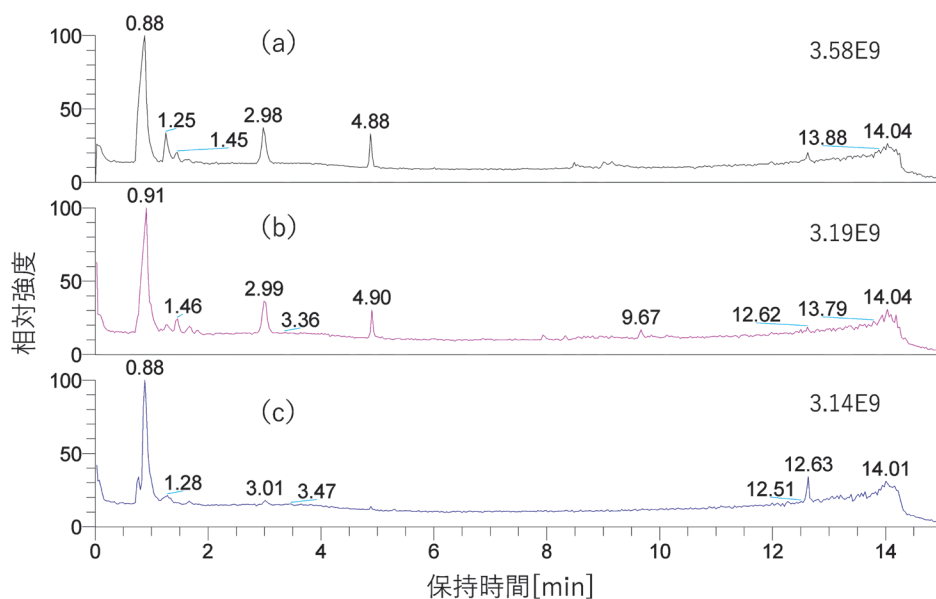


図 20 全イオンクロマトグラム：(a) ゴーヤ（内側）、(b) ゴーヤ（外側）、(c) キュウリ

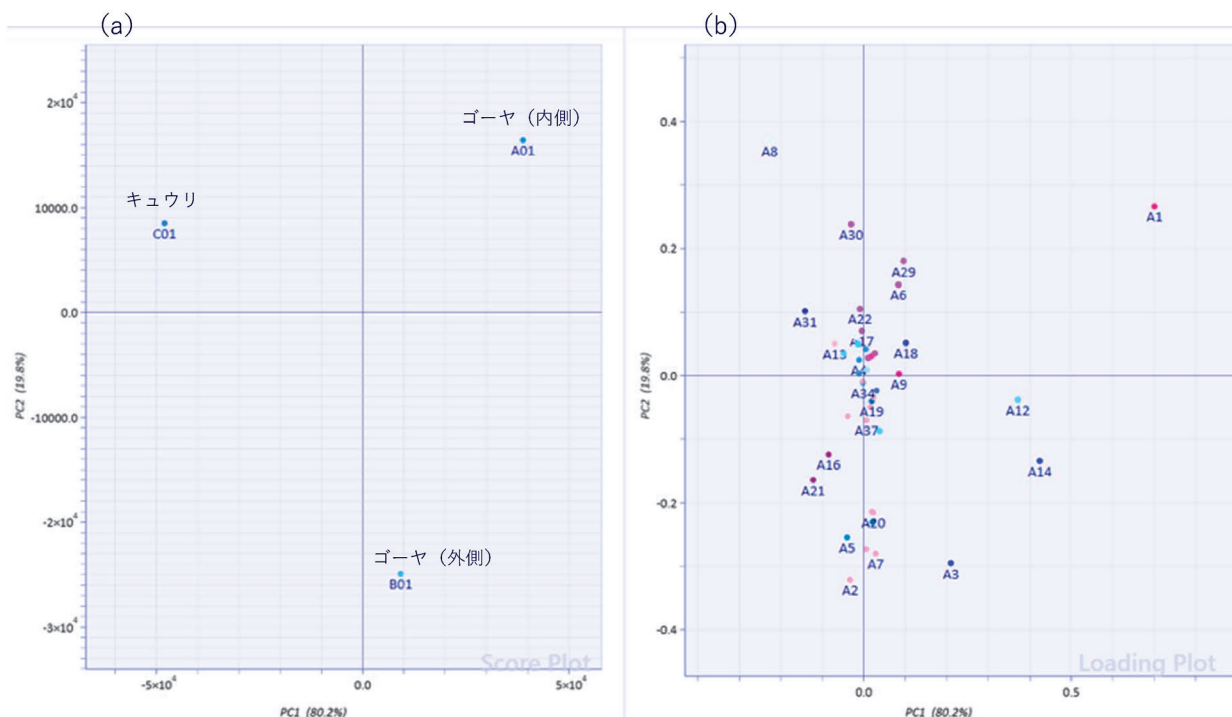


図 21 主成分分析結果，(a) スコアプロット，(b) ローディングプロット

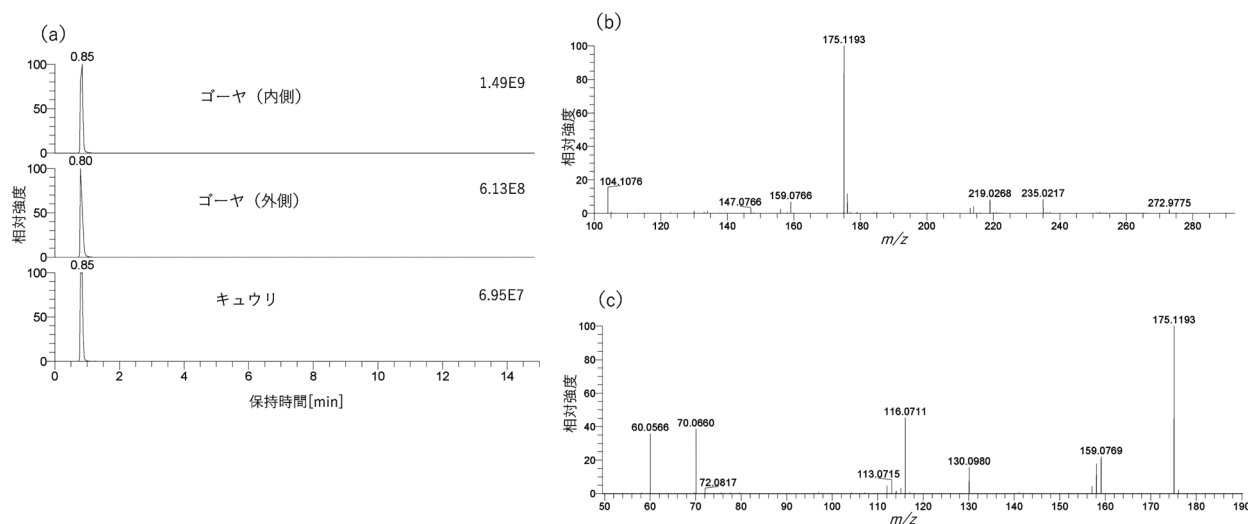


図 22 (a) m/z 175 イオンの EIC, (b) 保持時間 0.85 分のマスペクトル, (c) m/z 175 のプロダクトイオンスペクトル

TIC ではゴーヤの内側と外側のパターンは似ていたが、図 21 (a) のスコアプロットでは、3 試料は寄与率の高い PC1 の軸上ではっきり分離されている。アライメントの結果を確認すると、3 試料で顕著な強度の差異があるイオンの一つとして m/z 175.1191 が挙げられた。その抽出イオンクロマトグラム (extracted ion chromatogram, EIC)、マスペクトル、 m/z 175 イオンをプリカーサーとしたプロダクトイオンスペクトルを図 22 に示す。

図 22 (a) の各 EIC 強度は、ゴーヤ (内側) とキュウリで 10 倍以上、ゴーヤの内側と外側でも 2 倍程度の有意な差異を示している。主成分分析の結果差異があるとソフトが認識する場合、どの程度の強度差を差異とするかはソフトによって異なるが、経験上測定誤差の範囲でも差異があると認識されることが多い。またその強度情報が、正確なピーク検出によって得られていないこともしばしば起こる。そのため、筆者はソフトの解析結果に頼らず、必ず図 22 の様に EIC でピーク強度を確認するようにしている。 m/z 175.1193 イオンの分子式推定の結果およびプロダクトイオンスペクトルの MS-FINDER

による解析結果から、この成分はアミノ酸の一つであるアルギニンであることが分かった。

3・2 質量分析イメージング

質量分析イメージング (mass spectrometry imaging, MSI) は、平面上の試料に対して直径数 μm ~ 100 μm の微小領域から試料表面に存在する分子のイオンを発生させてマスペクトルを測定し、イオンの発生位置を少しずつ変えながら二次元的に万遍なく繰り返すことで、イオンの m/z 情報から試料中の分子の分布情報を可視化する技術である。試料の大きさと空間分解能にも依るが、測定は通常数十分から長い時には 24 時間以上にも及ぶことがあり、データサイズは膨大になる。MSI は MS の典型的なビッグデータ解析の一つである。

3・1 で示したゴーヤとキュウリについて、MSI 用の新しい転写プレート (浜松ホトニクス) を使ってそれぞれの輪切り断面を転写し、DESI-QTOFMS (Waters) により分析したデータを図 23 に示す。ターゲットのイオンは m/z 175.1192 (アルギニンの $[\text{M}+\text{H}]^+$) で、キュウリよりゴーヤで強く、またゴーヤの中では内側で強くシ



図 23 m/z 175.1192 イオンの MSI 画像

ゲナルが観測されている。これは、2・1 で示した LC/MS の結果と一致している。

4 おわりに

マススペクトルから得られる分子の質量情報や分子を構成する元素に関する情報について解説した。また、GC/MS や LC/MS により得られるマススペクトル、および低エネルギー CID MS/MS により得られるプロダクトイオンスペクトルを解析し、未知成分の定性分析などを行う方法について解説した。本稿が、質量分析を扱う研究者や技術者の皆様のお役に立てれば幸いである。

文 献

- 1) SDBSWeb : <https://sdb.sdb.aist.go.jp>, (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2023 年 10 月 27 日)。
- 2) 日本質量分析学会用語委員会編, “マススペクトロメトリー関係用語集第 4 版 (WWW 版)”, 65 (2020)。
- 3) 高橋 豊, 川畑慎一郎: ぶんせき (*Bunseki*), **2007**, 332。
- 4) H. Tsugawa, T. Kind, R. Nakabayashi, D. Yukihiro, W.

Tanaka, T. Cajka, K. Saito, O. Fiehn, M. Arita : *Anal. Chem.*, **88** (16), 7946 (2016)。

〈<https://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta/>〉, (accessed 2023.10.27)。

- 6) N. Sugimura, A. Furuya, T. Yatsu, Y. Igarashi, R. Aoyama, C. Izutani, Y. Yamamoto, T. Shibue : *Eur. J. Mass Spectrom.*, **23**, 4 (2017)。



高橋 豊 (TAKAHASHI Yutaka)

エムエス・ソリューションズ株式会社/株式会社プレッパーズ/浜松医科大学。(〒187-0035 東京都小平市小川西町 2-18-13 (エムエス・ソリューションズ株式会社)). 群馬大学大学院工学系研究科博士課程前期。博士 (工学), LC/MS 分析士五段, 液体クロマトグラフィー分析士二段。《現在の研究テーマ》DESI をベースとする質量分析イメージング用新規イオン化法の開発。《主な著書》“LC/MS 定量分析入門”, (情報機構)。《趣味》ランニング, スキー, テニス, ソフトボール, ソフトバレーボール, サッカー審判。

E-mail : tyutaka@sitsuryobunsekiya.com

会 員 の 拡 充 に 御 協 力 を !!

本会では、個人 (正会員 : 会費年額 9,000 円 + 入会金 1,000 円, 学生会員 : 年額 4,500 円) 及び団体会員 (維持会員 : 年額 1 口 79,800 円, 特別会員 : 年額 30,000 円, 公益会員 : 年額 28,800 円) の拡充を行っております。分析化学を業務としている会社や分析化学関係の仕事に従事している人などがお知り合いにおられましたら、ぜひ本会への入会を御勧誘くださるようお願い致します。

入会の手続きなどの詳細につきまして、本会ホームページ (<https://www.jsac.jp>) の入会案内をご覧ください。下記会員係までお問い合わせください。

◇〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ 304 号 (公社)日本分析化学会会員係

[電話 : 03-3490-3351, FAX : 03-3490-3572, E-mail : memb@jsac.or.jp]