

同位体比による分子組成決定の試み

— QMS で分子組成が決められるか —

岩崎 夕子 (昭光サイエンティフィック株式会社)
Yongdong Wang (Cerno Bioscience)

1. はじめに

質量分析は石油化合物のような低分子から歴史が始まり、最近では分子量数十万のタンパク質の分析まで可能になって来た。低分子の解析作業はほぼ終わり、近年タンパク質のような高分子の解析がメインになってきたようである。しかし、世間を騒がす事件では麻薬覚せい剤に限らずトリカブト事件、和歌山の毒カレー事件のように低分子毒化合物や、合成麻薬などのように過去に測定例のないものやまったく未知のものを調べることが求められることが突然あらわれる。このようなとき分析機器としての質量分析計は高感度で分離分析が可能な有力な分析機器の一つである。

低分子の場合過去の経験からほぼ分子量やスペクトル解析により源物質の特定を行うことも可能であるが、装置が汎用化し取り扱う人間もベテランだけとはいえない状況になって来ている。従来質量分析による分子の特定は精密質量測定により行われ、装置開発も分解能追従に開発されて来ているように思われる。つまり横軸の精度追従である。確かにこの方法は分子特定に十分な情報を与え、スペクトル解析に重要な情報を与えて来た。

一方このように横軸追従の歴史のなかに縦軸、つまり同位比精度の重要性が置き去りにされて来たのではないだろうか。分解能が向上した現在、横軸だけでなく縦軸の精度を加えることによりさらに精度を増すことができないだろうか？

原理と具体例を提出して経験者の意見を伺いたいと思い、開発したソフトウェアについて発表させていただく。

近年のコンピュータ技術の発展でソフトウェアを利用することにより得られた情報の精度をさらに上げることが可能になった。ぼんやりしたものから使える情報を引き出し、分析の高速、簡素化が可能になる技術は様々な分野で活用されている。防犯カメラの解像度を上げる技術や音声解析、白黒写真からカラー写真への修正などもその例である。

ここで「MS 解析＋ソフトウェア (MassWorks)」の手法を提案し、QMS での精密質量測定が正しいか、提唱する。

2. MassWorks の理論

「ハードウェアによる精密質量とライブラリーでは使いきれない情報への注目」

2-1. 理論的と実際の MS スペクトル

ある化合物の組成と各元素の精密質量と同位体存在比を全て正確に描いた MS スペクトルを描くと、モノアイソトピックピーク M につづき、M+1、M+2 と小さな同位体ピークが得られさらに M+3 などの小さい同位体ピークが得られる。これら全ての同位体イオンピークの高さの比は同位体存在比と一致する。これを理論的なスペクトルと呼ぶことにする。

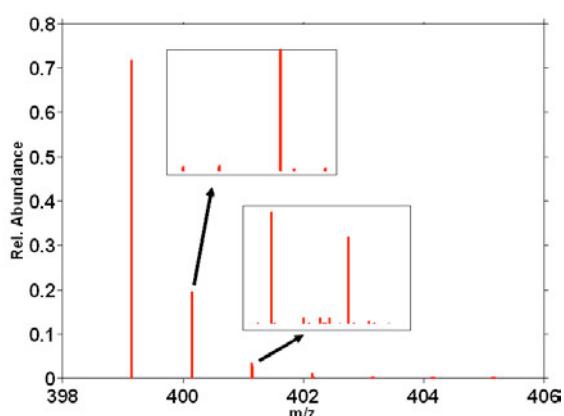


図1. 理論的なスペクトル

一方、一般的に低分解能 MS で使用されている実際のスペクトルは、検出されたイオンを連続的に捉えた山状のスペクトル(プロファイルスペクトル)の頂点の位置を棒で表したスペクトル(セントロイドスペクトル)である。棒の高さはその山の頂点の高さである。解析にはモノアイソトピックピークの位置のみが使われ、その精度はピーク幅が広いほど低いとされている。同位体ピークはセントロイド化する過程で一定強度ないものは無視される。残ったものも、その高さと同位体存在比の関係はほとんど一致しない。

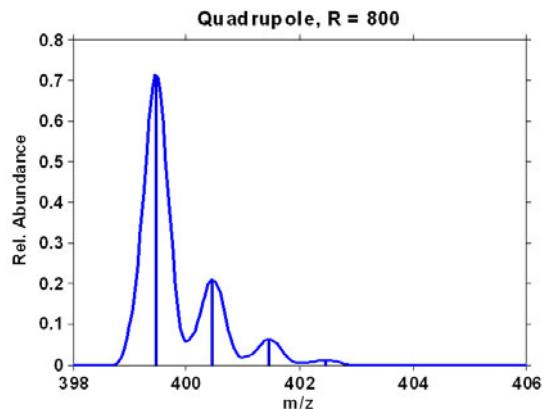


図2. 低分解能 MS で使用される実際のスペクトル

2-2. プロファイルスペクトルへの注目

ある有機合成に携わる研究者がどうしても精密質量で識別できない 399 のイオンに出会った。

TOF では膨大な候補が出てしまい、FT-ICR で識別を試みたが、誤差率 100 PPB の精度の基でも 5 つの候補から絞込みができなかった。

表1. 精密質量で区別できなかった化合物

Formula	Mono Isotope(Da)
C25H23N2O5S	399.15311
C4F19N16OF2NaP	399.15311
C20H27N2FNaP2	399.15312
C9H33N6O3S2P2	399.15308
C10H27N10OS3	399.15314

ここで、もとのデータに立ち戻ってみると。5 つの候補化合物のスペクトルをとり比較してみると、同位体の高さに明らかな差が出ている。さらにスペクトルを拡大し、各元素由来のピークをみると、それぞれの元素の高さと組成式内の数が一致し、同位体比が精度良く捉えられていることがわかる。

この差を確認するため、他の装置で測定したスペクトルと比較してみた。同じ試料で QMS のプロファイルスペクトルを比較してみると、同位体ピークの高さやピークの立ち上がりに差があることがわかる。つまりセントロイド化することにより失われてしまう情報が明らかである。

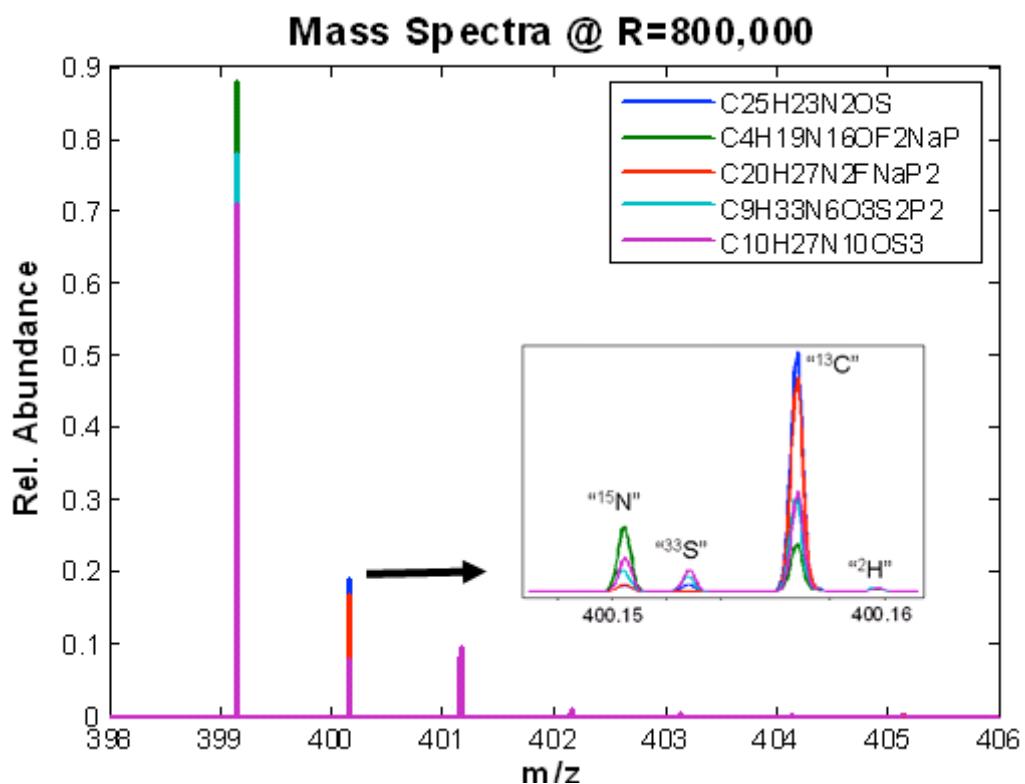


図3. FT-ICR での候補化合物の MS スペクトルと同位体ピーク

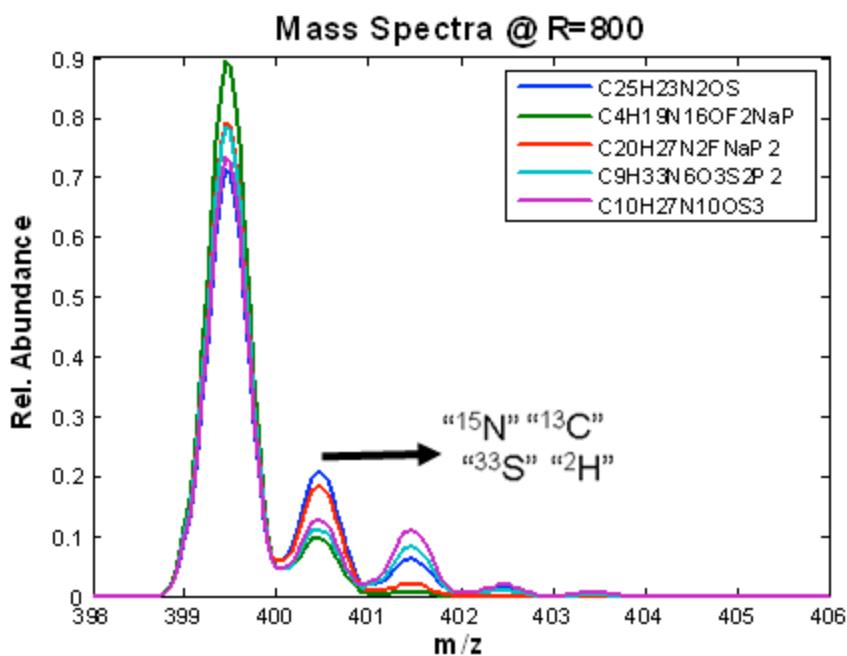


図4. QMS での候補化合物の MS スペクトルと同位体ピーク

2-3. プロファイルスペクトルの校正(数式化)

プロファイルスペクトルの形は MS のタイプにより様々で装置により不規則なゆがみを持つ。この状態ではプロファイルスペクトルからある組成式との一致具合を読み取ることは難しい。

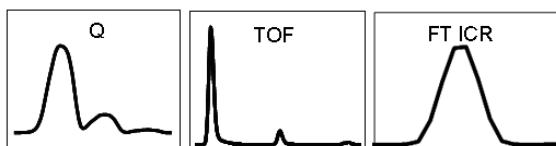


図5. 様々なプロファイルスペクトルの形

理論的なピークの形、すなわち正規分布を理論的な MS スペクトルの全てのピークに当てはめたものを理論的なプロファイルスペクトルとした。これにより全ての組成式について理論的なプロファイルスペクトルが描ける。つまりデータベースを必要としない訳である。

QMS のプロファイルスペクトルの校正は組成式既知のイオンで行う。実測のスペクトルとその化合物の理論的スペクトルを同程度の半値幅で描いたもの比較し、そのずれ幅を校正関数で捉える。この校正関数を未知イオンに適応させ校正する。我々の実験では質量のずれが無視できるスキャン範囲は 質量 50 前後であり、さらに対称イオンを挟むことにより精度が上がる事が確認された。

2-4. 校正用サンプルを必要としない校正

低分解能の MS に対し、高分解能 MS はモノアイソトピックピークがベースライン分離されている。このことを利用し、ある化合物のモノアイソトピックピークと同等の半値幅の正規分布と比較することで、校正関数が得られる。これを他の同位体ピークに反映させて理論的スペクトルに校正する。すなわち校正用に組成式が既知のイオンピークが必要無く、解析対象のイオンピーク自体で校正することができる。

3. MassWorks の効果

3-1. MS 値 (横軸) の精度向上

正規分布化された QMS のピークは頂点の位置の精度が約 2 衍 (± 0.5 から ± 0.005) 向上し、小数点以下の質量の違いを区別することが可能である。

3-2. 同位体を利用した組成式検索

同位体をプロファイルスペクトル形状として捉えて、理論的なスペクトルの一一致度を正確に測り、数字で表すことが出来る。QMS でも組成式検索が実現し、TOF-MS では判断要素が増えるため、より信頼性のある検索が可能になる。

3-3. 重なるスペクトルの解析

MS スペクトルでは化合物により M-H、M+H、M+2H などのイオンが生成し、分子イオン由来の同位体ピークと重なることがある。理論的なスペクトルは組成式により描けるため、複数のイオンが重る理論的なスペクトルも描くことができる。この機能を利用することにより M-H や M+H などのイオンと重なったときの分子 (M) の解析をすることが可能である。

3-4. クロマト抽出への応用 (AMPXIC)

生態系や環境系など複雑なクロマトグラムを解析しなければいけない分野では、クロマトグラムから MS スペクトルが指定された質量の範囲に一定強度ある点のみを抽出するという XIC という機能がある。理論的なスペクトルをこれに応用させ、より精度を向上させたクロマト抽出が可能になる。AMPXIC (Accurate Mass Profile Extracted Ion Chromatogram) と名づけられたこの機能について紹介する。

3-5. 最新高分解能MSへの応用

最新高分解能質量分析計を用いて得た結果と、MassWorksを加えたときの結果を比較した。

以上、具体的な測定例と理論値の比較をした結果を述べる。

4. おわりに

追記として近年、事件がらみの物質について調べた結果、分子量が同じ分子でこのような物質群が検出された。精密質量による特定も重要であるが、QMSのような汎用装置で同位体比の比較により物質の特定ができたらさらにQMSの重要度が増すのではないだろうか？

以下に分子量が同じ物質の例を挙げてみた。

(1) 分子量141の分子量を持つ物質

- ・メタミドホス（農薬・殺虫剤）：C₂H₈NO₂PS
- ・カレンズAOI（光硬剤）：C₆H₇NO₃
- ・ACMO（コーティング剤）：C₇H₁₁NO₂
- ・ヨウ化メチル（殺虫剤）：CH₃I
- ・p-フルオロニトロベンゼン（医薬・農薬・液晶用材料）：C₆H₄NO₂F
- ・3,3,5,5-テトラメチル-1-ピロリン-N-オキシド（スピントラップ剤）：C₈H₁₄NO

(2) 分子量183の分子量を持つ物質

- ・アセフェート（農薬・殺虫剤）：C₄H₁₀NO₃PS
- ・サッカリント（甘味料）：C₇H₅NO₃S

- ・アドレナリン（ホルモン）：C₉H₁₃NO₃
- ・塩化カドミウム（顔料・塗料）：CdCl₂
- ・酢酸亜鉛：(CH₃COO)₂Zn
- ・ジメチルアミンサリチル酸塩（医薬・有機合成原料）：(CH₃)₂NH·C₇H₆O₃

(3) 分子量126の分子量を持つ物質

- ・メラミン（樹脂原料）：C₃H₃N₆
- ・マルトール（食品添加物）：C₆H₆O₃
- ・亜硫酸ナトリウム（酸化防止剤）：Na₂SO₃
- ・塩化オキサリル（有機合成反応剤）：C₂O₂Cl₂

謝辞

今回の発表にあたり、データの提供および様々なご指導を頂きました東京薬科大学 志田保夫先生に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 志田保夫、笠間健嗣、黒野定、高山光男、高橋利枝、「これならわかるマススペクトロメトリー」、化学同人
- 2) Gu, M., Wang, Y., Zhao, X., Gu, Z., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 764-770.
- 3) Erve, J., Gu, M., Wang, Y., DeMaio, W., Talaat, R., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 2058-2069.
- 4) <http://www.cernobioscience.com/resources.html>
- 5) <http://www.shoko-sc.co.jp/pc/synthesis/index.html>