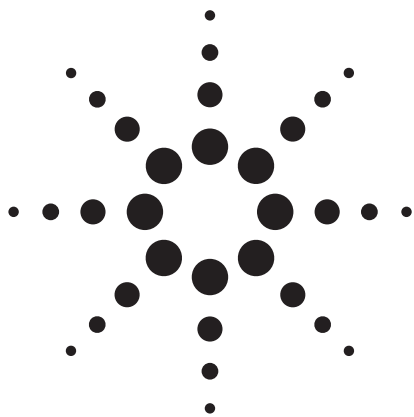
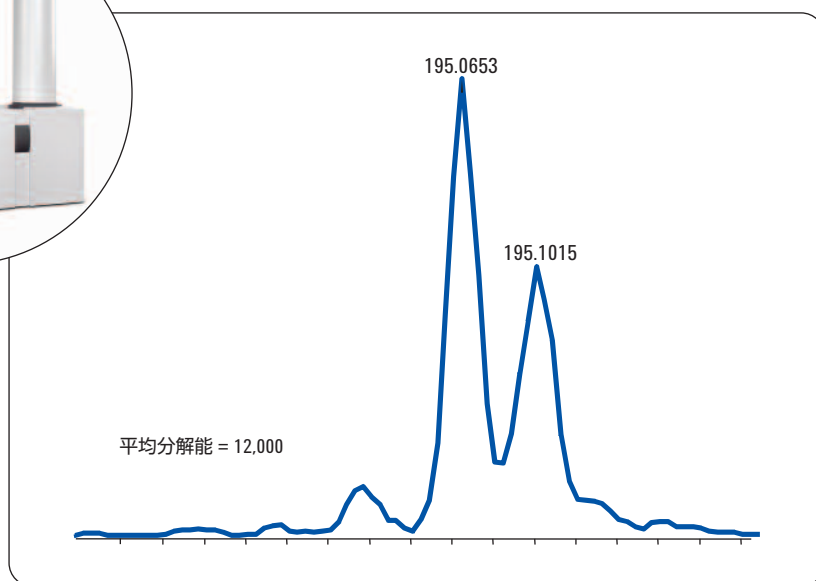




複雑なサンプルの 精密質量測定における分解能の影響

アプリケーション

Doug McIntyre
Pat Perkins
Edgar Nägele



概要

このアプリケーションノートでは、以下のことを説明します。

- Agilent 6520 Accurate-Mass 四重極飛行時間型 (Q-TOF) LC/MS および Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS の性能
- Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS および Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS のダイナミックレンジと質量分解能の向上
- 両システムにおける高度な精密質量測定と化学式計算
- サンプル測定結果における性能向上の影響

Agilent 機器

- 1200 シリーズ Rapid Resolution LC システム
- 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS
- 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS

アプリケーション範囲

- 製薬業界
- 法医学分析
- 環境分析
- 食品分析



Agilent Technologies

はじめに

質量分析では、分解能およびダイナミックレンジと質量精度とのあいだに直接的な相関関係はありません。たとえば、合成化合物の確認分析を実施する場合、200,000を超える分解能を備えたフーリエ変換 (FT) 質量分析計の質量精度は、分解能 10,000 程度の飛行時間型 (TOF) 分析機器に比べて、わずか 2 倍向上するにすぎません。

Agilent TOF と Q-TOF の最新機種では、分解能が 2 倍から 3 倍向上していますが、純粋化合物分析では質量精度はさほど向上しません。しかし、複雑な混合物の場合は、大きく異なります。この実験では、化合物の各プロダクトイオンがきわめて近い (<50 mDa で分離) 複雑な混合物の分析において、TOF および Q-TOF システムの分解能とダイナミックレンジの向上が質量精度に与える影響を説明します。

実験手法

使用機器

以下を搭載した Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC システム：

- Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ SL とデガッサ
- サーモスタットを備えた Agilent 1200 シリーズ高性能オートサンブラ SL (ALS SL)
- Agilent 1200 シリーズカラムコンパートメント (TCC)
- Agilent 1200 シリーズダイオードアレイ検出器 SL (DAD SL)
- Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS または Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS
- カラム 1: Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 x 30 mm、粒子径 3.5 μm
- カラム 2: Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 x 150 mm、粒子径 1.8 μm

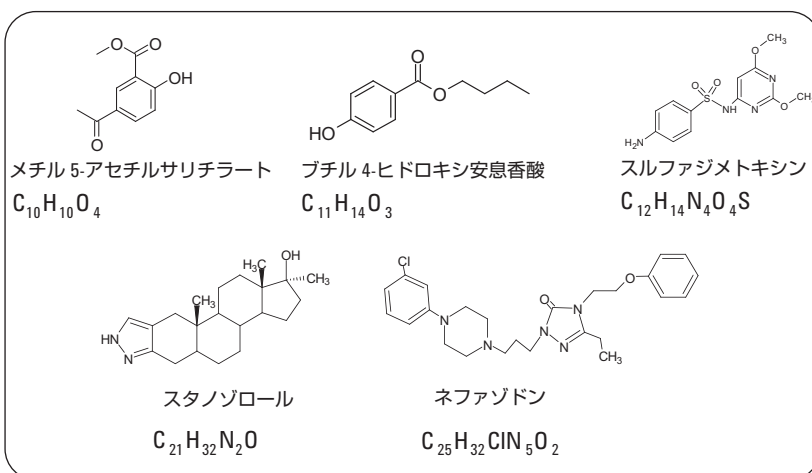


図 1
テスト化合物の構造と化学式

サンプル

メチル 5-アセチルサリチラート (MAS)、ブチル 4-ヒドロキシ安息香酸 (BP)、スルファジメトキシシン、ネファゾドンのテスト化合物を Sigma-Aldrich から購入し、メタノール中で 1 mg/mL の原液を調製しました。スタノゾロールは Alltech から 1 mg/mL のメタノール溶液として購入しました。サンプルは水で 10~30 ng/μL に希釈しました。ネファゾドンについては、2 ng/mL~100 μg/mL の希釈溶液を作成しました (注入量は 1 μL)。化合物の構造を図 1 に示しています。

LC TOF 条件

以下の条件で HPLC 分析を実施しました。

- 溶媒 A：水 + 0.1 % ギ酸 (FA)
- 溶媒 B：メタノール + 0.1 % FA
- 流量：0.5 mL/min、90 % B で 1 分間アイソクラティック
- TCC 温度：45 °C

Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS を以下の測定パラメータで使用しました。

- イオン源：エレクトロスプレー (ESI)、正モード、参照質量溶液にデュアルスプレーを使用
- 乾燥ガス：300 °C で 10 L/min
- ネブライザー：45 psi
- マスレンジ：100~1000
- スキャン：3 spectra/sec
- フラグメンター電圧：125 V
- スキマー電圧：60 V
- キャピラリー電圧：4000 V
- 機器状態：1、2、4 GHz で 1700 m/z

LC Q-TOF 条件

以下の条件で HPLC 分析を実施しました。

- 溶媒 A：水 + 0.1 % FA
- 溶媒 B：アセトニトリル + 0.1 % FA
- 流量：0.5 mL/min
- グラジエント 1：カラム 1 を用いて 4 分で 20 % B から 60 % B、TCC は 45 °C (この条件は、スタノゾロール分析に使用しました)
- グラジエント 2：カラム 2 を用いて 15 分で 5 % B から 75 % B、TCC は 60 °C (この条件は、ネファゾドンの代謝物を同定する別の実験に使用しました²⁾)

Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS を以下の測定パラメータで使しました。

- イオン源：ESI、正モード、参照質量溶液にデュアルスプレーを使用
- 乾燥ガス：300 °C で 10 L/min
- ネブライザー：45 psi
- マスレンジ：80~1000 (MS および MS/MS)
- スキャン：両モードで 3 spectra/sec
- フラグメンター電圧：200 V
- スキマー電圧：60 V
- キャピラリ電圧：4000 V
- 衝突エネルギー：35 V (スルファジメトキシン) または 55 V (スタノゾロール)
- 分離幅を中 (m/z) に設定したターゲット MS/MS モードで操作
- 機器状態：1、2、4 GHz で 1700 m/z

結果と考察

機器の分解能

TOF 機器で観察される分解能は、アナライザの実際の分解能と、必要な速度でシグナルに反応してアウトプットする検出器回路の能力に左右されます。Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS と Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS はいずれも、1 GHz デジタル処理を用いていた旧機種よりも反応の速い増幅回路を使っています。さらに、1、2、4 GHz のいずれかで検出器アウトプットをデジタル処理する機能も備えています。この新しいシグナル処理については、すでに説明しています。¹

4 GHz では、アナライザは通常、 m/z 118 で 10,000 以上、 m/z 1522 で 20,000 以上の分解能を示します。デジタル処理速度が分解能に与える影響を表 1 に示しています。

この表からは、1 GHz でデジタル処理する場合、低 m/z でのデータサンプリング能力が低くなり、分解能が機器の能力よりも大幅に低くなるのが明らかに見てとれます。1 GHz というサンプリング速度の場合、1 ナノ秒につき 1 サンプルが処理されます。したがって、ピーク幅 1 ナノ秒の 118 m/z のピークでは、1 サンプルが処理されます。実際、1 GHz の場合、 m/z 118 の分解能は約 4000 と測定されています。

この実験では、デジタル処理速度を 1 GHz から 4 GHz に変えたことで分解能が 2 倍から 3 倍向上していますが、純サンプルを分析する場合には、質量精度はそれほど大きく向上しません。分子量 100~800 の化合物における通常の質量精度は、1~2 ppm です。10 ppm 以上の質量エラーが見られたサンプルでは、別の化合物から生じた整数として同一のイオンが、測定に明らかな影響を及ぼしていました。このこと

m/z	到達時間 (nsec)	ΔM (mDa)	Δt (nsec)	FWHM の サンプル数、 1 GHz	FWHM の サンプル数、 4 GHz
118	20,000	12	1	1	4
1522	69,211	76	1.7	1.7	6.8

表 1
例として示した m/z 値におけるデルタ質量とデルタ時間、およびアナログデジタルコンバータ (ADC) のサンプリング速度とサンプル数の関係。FWHM = 質量ピークの半値幅

から、分解能が向上すれば、複雑な混合物における質量測定の精度が向上し、その結果、MS および MS/MS データでより正確な分子式を生成できるようになると言えます。

TOF モードの分解能と精度

1 GHz と 4 GHz のデジタル処理について、TOF モードにおける質量エラーを比較するテストを実施しました。MAS と BP の分子量の差は 36 mDa です。この 2 つの化合物を 128:1~1:1 の比率で混合し、化合物がクロマトグラフィ分離されないように移動相組成を調節しました。1 GHz のデータについて、各サンプルにおける MAS の質量エラーを計算しました。結果を表 2 に示しています。

希釈比	質量エラー (ppm)
128:1	2.89
64:1	3.25
32:1	5.09
16:1	10.13
8:1	17.13
4:1	33.17
2:1	64.06
1:1	120.51

表 2
各 MAS/BP 比における MAS 質量エラー、デジタル処理速度 1 GHz

4 GHz では、観察された $[M+H]^+$ イオンが完全に分離され、いずれの化合物でも質量精度は 1 ppm 以下となりました。アジレントの分子式ジェネレータを各イオンに適用したところ、いずれのケースでも正確な分子式がベストマッチしました。さらに、狭い m/z 幅でのイオンクロマトグラムの抽出により、2つの化合物が 0.5 秒間隔で溶出していることが確認されました。結果を図 2 および 3 に示しています。

機器のダイナミックレンジ

マススペクトルの採取におけるもう 1 つの重要な要素が、スキャン間およびスキャン内における質量分析計のダイナミックレンジです。ダイナミックレンジが向上すれば、濃度の高い他のマトリックス成分が存在している場合でも、存在量の少ない化合物を検出することが可能になります。

スキャン間ダイナミックレンジの例として、濃度の異なる薬剤ネファゾンを Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS で測定しました²。オンカラム濃度 2 pg の検出下限 (LOD) で検出を開始し、オンカラム濃度 100 ng で検出器が飽和しはじめたときに終了しました (図4)。測定した質量をもとに、分子式を算出しました。すべての濃度で、質量エラーは 2 ppm 未満という比較的低い値に収まりました。

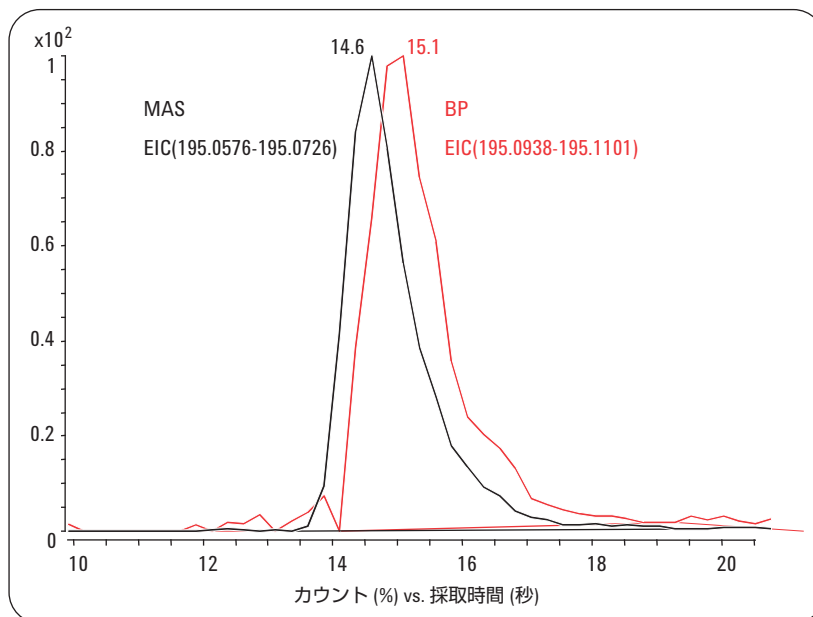


図 2
4 GHz のデジタル処理速度で採取した MAS および BP の抽出イオンクロマトグラム (EIC)

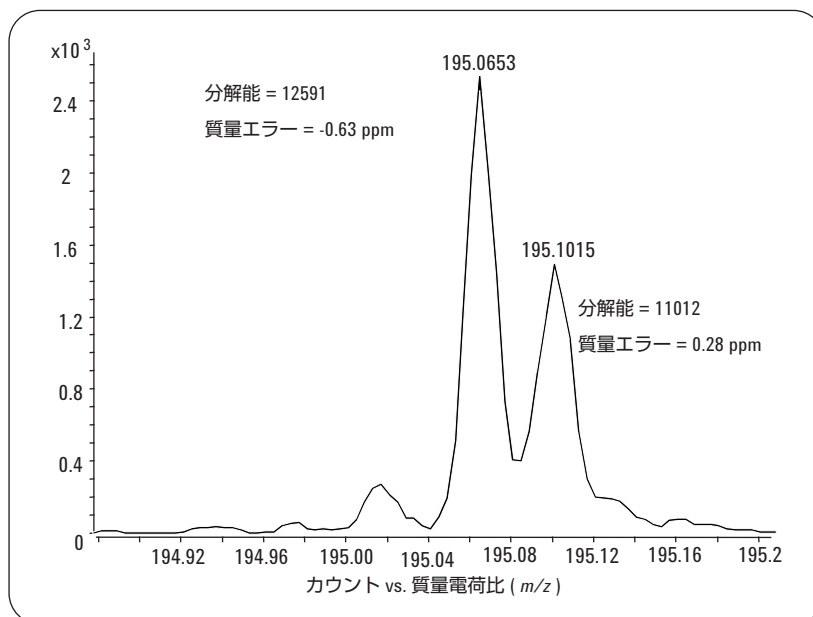


図 3
4 GHz のデジタル処理速度における MAS および BP の $[M+H]^+$ イオン、分解能と質量エラーを表示

スキャン内ダイナミックレンジの例として、ナイアシンアミドが濃度 10 ng/μL で大量に存在する条件下において、濃度 500 fg/μL のエリスロマイシンを測定しました (図 5)。この分析では、スキャン内ダイナミックレンジが 4.36 桁であることが示されています。また、いずれの化合物についても、精密質量測定精度は 1 ppm 未満です。

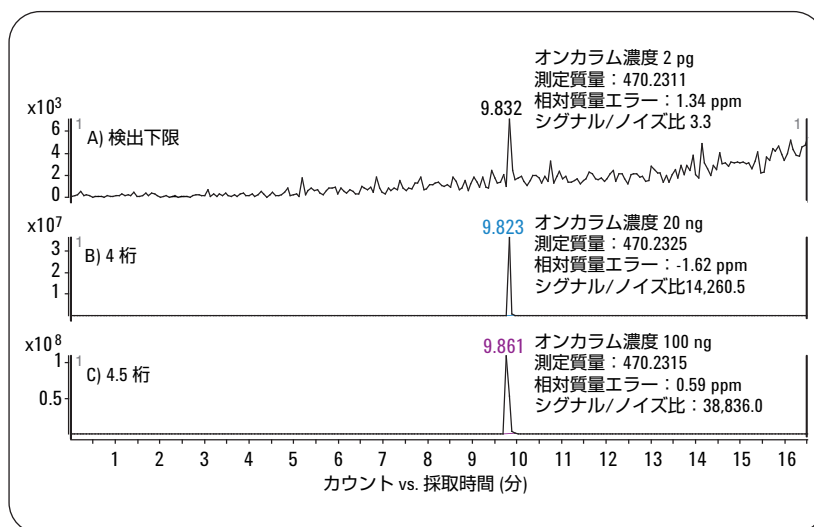


図 4
Q-TOF で分析したネファゾドンのダイナミックレンジ、4.5桁、質量エラー 2 ppm 未満。ネファゾドンの分子式 $[M+H]^+ = C_{25}H_{33}N_5O_2Cl$ 。計算質量 $m/z = 470.2317$ 。グラジエント 2 を用いて分離。

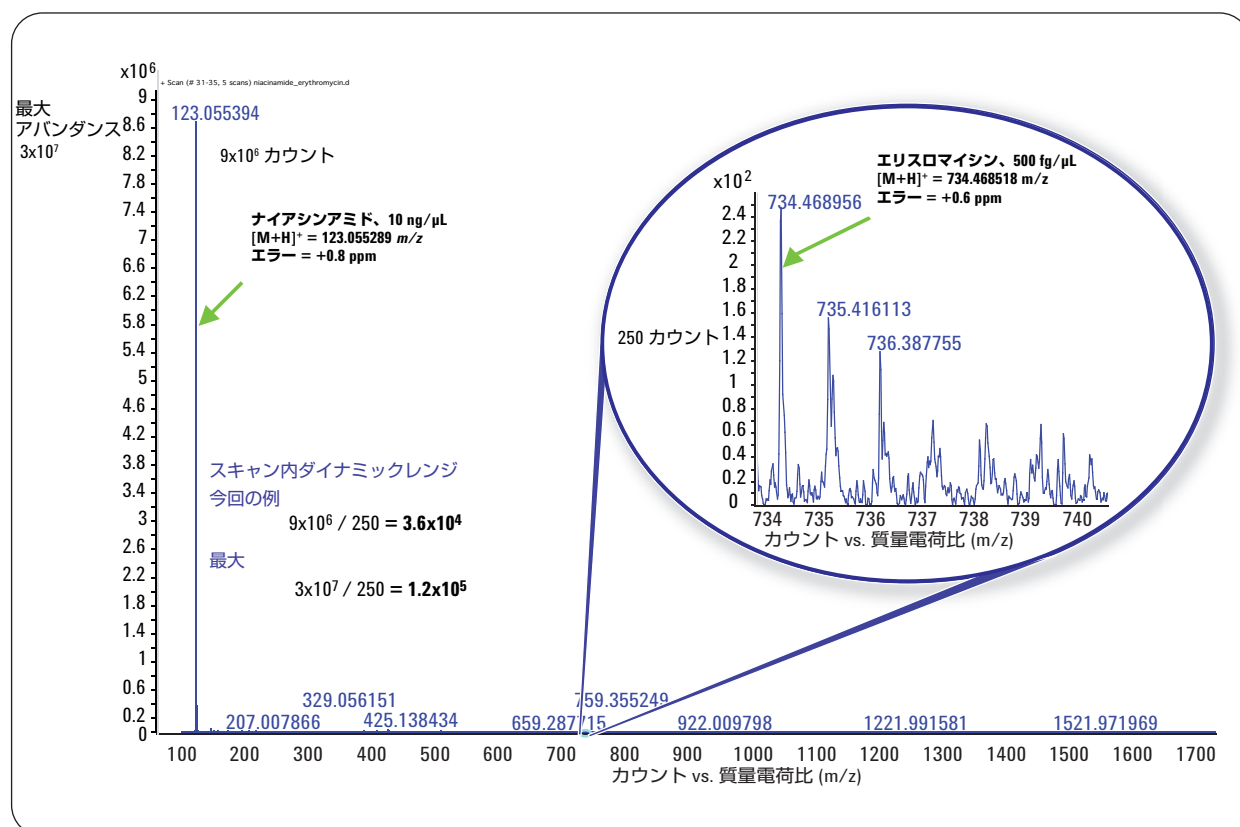


図 5
最大 5 桁のスキャン内ダイナミックレンジの精密質量測定

MS/MS モードの分解能と質量精度

Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS では、質量精度 5 ppm 以下の MS/MS データを生成することが可能です。この機能は、不純物や代謝物の構造の確認において大きな威力を発揮します²。整数として同一でも分子式の異なるフラグメントイオンを識別する必要がある場合には、分解能が重要となります。スルファジメトキシシンとスタノゾロールは、いずれもそうしたフラグメントを生成します。

スルファジメトキシシンは多くのサルファ剤と同じく、MS/MS で分析する場合、 m/z 156 でフラグメントが観察されます。Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS を用いた分析により、156 のフラグメントを詳細に検証すると、実際に 65.4 mDa で 2 種類のフラグメントイオンが分離されていることがわかります。1 GHz のデジタル処理速度でも、この 2 つのフラグメントイオンは十分に分解されるため、いずれのフラグメントについても精密質量分析を実施することが可能です。図 6 に、1、2、4 GHz で採取した m/z 156 におけるイオンの MS/MS スペクトルの拡大図を示しています。

スタノゾロールは、フラグメンテーションにより複数のイオン対を生成します (m/z 95、119、135、147、161 など)。イオン対の分子量の差はいずれも 25 mDa です (図 7)。このように差が小さい場合、質量の値を正しく測定するためには、4 GHz のデジタル処理速度が必要となります。図 8 に、 m/z 95

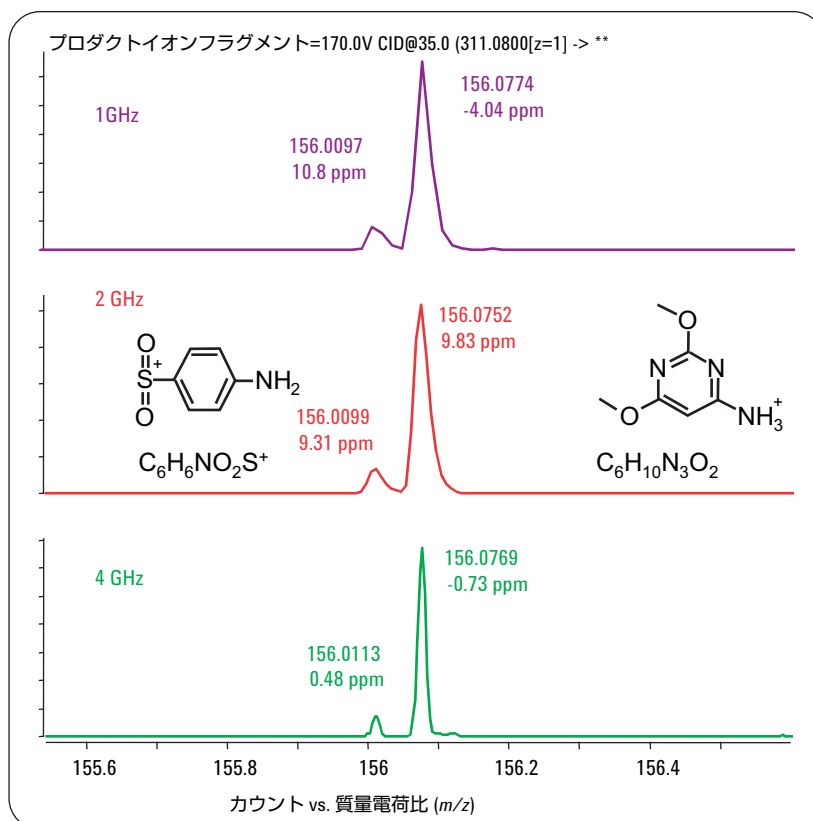


図 6
 m/z 156 におけるスルファジメトキシシンフラグメントのデジタル処理速度と質量エラーの関係

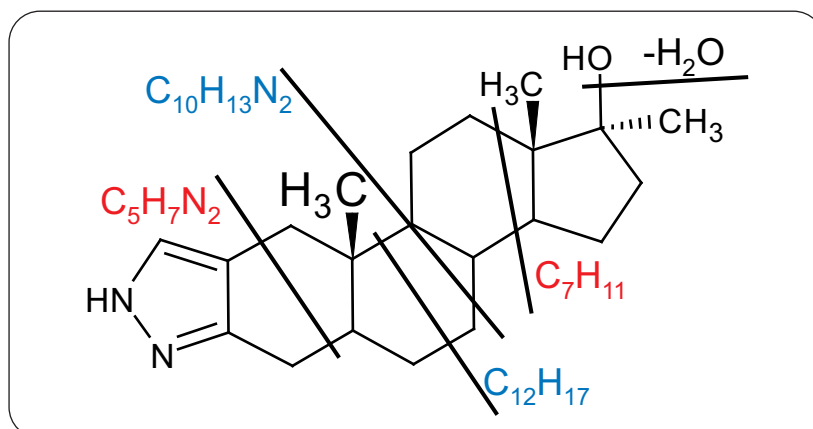


図 7
 m/z 95 (赤) および m/z 161 (青) のイオンにおけるスタノゾロールのフラグメンテーション

におけるフラグメントの分析結果を示しています。15,000前後という通常の分解能により4 GHzで採取したMS/MSスペクトルに、アジレントの分子式ジェネレータを適用したところ、表3に示す分子式が得られました。絶対質量エラーの幅がおおむね1 mDa未満で、プリカーサイオンの分子式と一致していることから、表3の分子式は信頼性の高いものと言えます。

結論

本研究では、以下のことが示されました。

- TOF 質量分析計の分解能が向上すれば、整数として同一の不純物を分析する場合に、質量精度が向上する。
- ダイナミックレンジが向上すれば、スキャン間およびスキャン内のいずれについても、高濃度および低濃度化合物の精密質量測定が可能になる。
- MS/MS データの分解能が向上すれば、精密質量の帰属や分子式情報の信頼性が高まり、構造同定が容易になる。

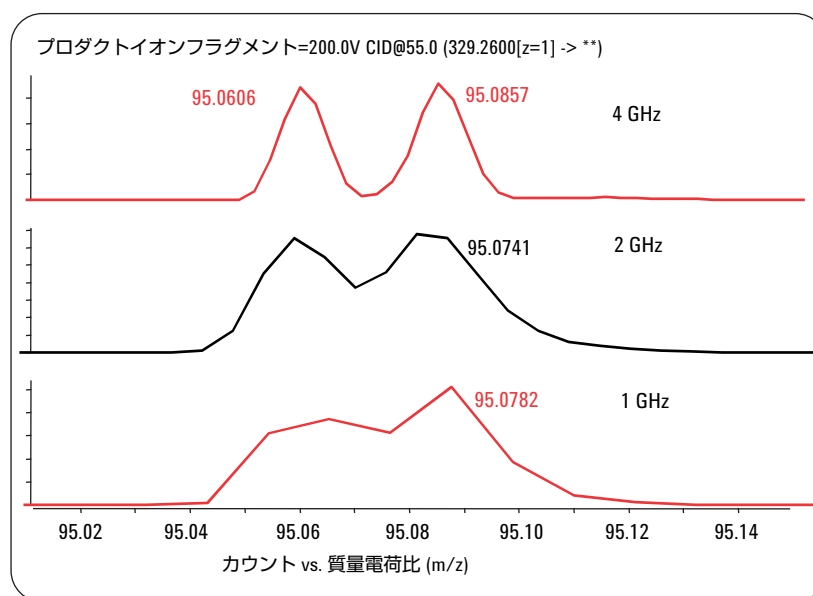


図 8
m/z 95 におけるスタノゾロールのプロダクトイオン

測定値 m/z	計算値 m/z	差 (mDa)	差 (ppm)	分子式	喪失質量	喪失 分子式	アバン ダンス
95.06151	95.06037	-1.13	-11.93	C ₅ H ₇ N ₂	234.19837	C ₁₆ H ₂₆ O	3495
95.08624	95.08553	-0.72	-7.53	C ₇ H ₁₁	234.17321	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	3337
119.06040	119.06037	-0.02	-0.18	C ₇ H ₇ N ₂	210.19837	C ₁₄ H ₂₆ O	357
119.08578	119.08553	-0.26	-2.15	C ₉ H ₁₁	210.17321	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O	1990
135.09166	135.09167	0.02	0.11	C ₈ H ₁₁ N ₂	194.16707	C ₁₃ H ₂₂ O	628
135.11642	135.11683	0.41	3.05	C ₁₀ H ₁₅	194.14191	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O	389
147.09201	147.09167	-0.33	-2.28	C ₉ H ₁₁ N ₂	182.16707	C ₁₂ H ₂₂ O	376
147.11785	147.11683	-1.02	-6.96	C ₁₁ H ₁₅	182.14191	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O	301
161.10823	161.10732	-0.90	-5.60	C ₁₀ H ₁₃ N ₂	168.15142	C ₁₁ H ₂₀ O	112
161.13242	161.13248	0.05	0.32	C ₁₂ H ₁₇	168.12626	C ₉ H ₁₆ N ₂ O	190

表 3
m/z 95、119、135、147、161 におけるスタノゾロールのフラグメントイオンの分子式候補

参考文献

- Hidalgo, A. J., Fjeldsted, J. C. and Frazer, W., "The Application of High Speed Oscilloscope Analog-to-Digital Converters to Time-of-Flight Mass Spectrometry," *Proceedings 54th ASMS Conference, MPE 076, 2007.*
- Nä gele, E., "Improving performance, data and results through expanded dynamic range and higher mass resolution," *Agilent Technologies Application Note, publication number 5989-8528EN, 2008.*

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っていません。

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社

© 2008 Agilent Technologies, Inc.
Published November 1, 2008
Publication Number 5989-9215JAJP



Agilent Technologies