

## 液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 [LC-(Q)TOF/MS]

### による定性分析のご案内

液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計[LC-(Q)TOF/MS]を導入しました。

maXis impact[ブルカー・ダルトニクス株式会社製]



#### 主な性能

- ・質量範囲 50-3,000 m/z (～10,000 分子量)
- ・分解能 最大 40,000
- ・精度 RMS ERROR 1ppm 以下 (内標法)  
RMS ERROR 2ppm 以下 (外標法)

TOF/MS (飛行時間型質量分析計)は、加速させたイオンを飛行時間によって分離し、その飛行時間を測定することにより分子質量を高い分解能で精密に測定することが可能です。

更に当機には TOF/MS の前に四重極及び四重極イオンガイドが設けられ、トリプル四重極の機能も備えており、未知物質の構造解析のために有用なフラグメントイオンや分子イオンにおける精密質量データの収集が可能です。

これらのデータから、主に物質の同定・構造解析等の問題や課題に関して、当機がお役に立つ可能性がございます。また、他にも選択性の高い定量分析、不純物の同定等他の試験目的での使用にも期待が出来ます。

## 期待される LC-(Q)TOF/MS の活用方法の例

### 物質の構造推定・定性分析

精密質量数及びフラグメントイオン情報から組成式の推定や、更に NMR(構造情報)及び IR(官能基情報)と合わせて物質の構造推定に役立ちます。

- ・ 精密質量数測定
- ・ 主成分及びその不純物・副生成物
- ・ 差分析で出現する物質  
対照品と差のある物質の組成式(構造)推定
- ・ 異物検査・変色原因の調査  
異物検査及び変色原因調査における補助的手法
- ・ アミノ酸・ペプチド  
ペプチドの分子量推定
- ・ 有機酸・糖 (オリゴ糖まで)・プリン体塩基・色素・添加物・界面活性剤

### お問い合わせ

試験の目的や成分の情報をご記入の上、メールでお問合せください。

### 物質の構造推定・定性分析

LC-(Q)TOF/MS の測定では、NMR や FT-IR 等の分光法を組み合わせることで、未知物質の化学構造をより詳細に調べることが可能です。

以下に、未知物質の構造推定の手順一例を、未知物質 A(白色粉末)の解析例に基づいて紹介します。

## 1 LC-(Q)TOF/MS による組成式の推定

LC-(Q)TOF/MS では、高い分解能での精密な質量測定が可能のため、精度の高い組成式情報を得ることができます。未知物質 A を適切な溶媒に溶解させ、LC-(Q)TOF/MS に注入し、次のマススペクトルを得ました。

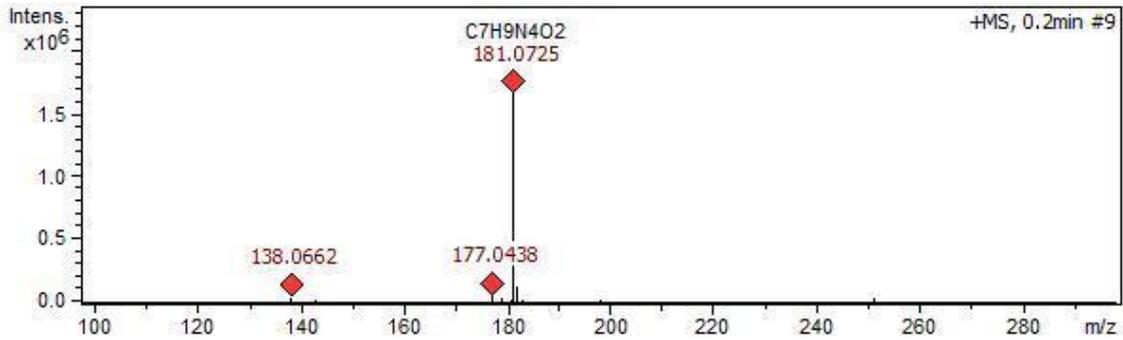


図-1 未知物質 A のマススペクトル

精密質量数：m/z 181.0725 から、プロトン付加推定組成式は  $C_7H_9N_4O_2$  と考えられ、未知物質 A の組成式は  $C_7H_8N_4O_2$  と推定されました。

## 2 核磁気共鳴スペクトル(NMR)の測定

### ●水素核一次元 NMR( $^1\text{H}$ -NMR)

有機化合物の主要構成元素である水素の核情報を調べる測定法です。また、NMR 測定法の中では最も高感度であるため、短時間かつ少量の試料で測定を行うことが可能です。このことから、未知物質の推定に限らず、あらゆる局面において最初に試みられる手法です。

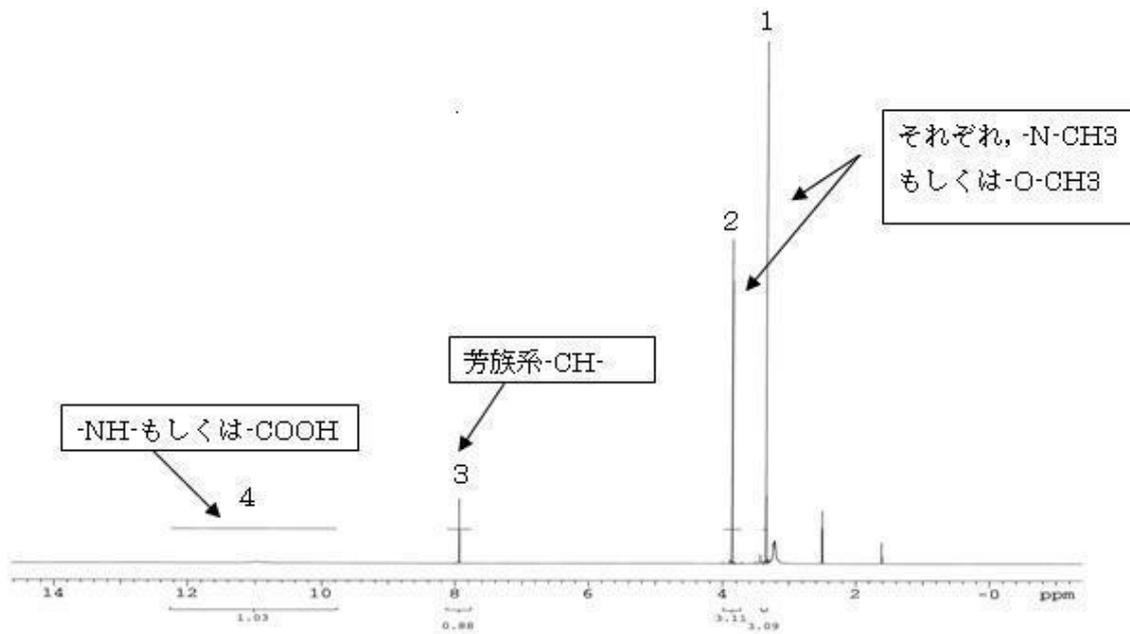


図-2 未知物質 A の  $^1\text{H}$ -NMR

$^1\text{H}$ -NMR のスペクトルには未知物質 A に由来する 4 本のシグナル(1~4)を認めました。解析した結果、未知物質 A の 8 個の水素は、それぞれメチル基(1)、メチル基(2)、メチン基(3)及びヘテロ原子に結合した水素(4)由来であると推察しました。

●炭素核一次元 NMR( $^{13}\text{C}$ -NMR)

有機化合物の主要構成元素である炭素の核情報を調べる測定法です。 $^{13}\text{C}$ -NMR の相対感度は $^1\text{H}$ -NMR の約 6000 分の 1 であることから、測定には多くのサンプルを必要とし、さらに測定時間も長くなります。一方で、分解能は $^1\text{H}$ -NMR よりも高いことから、類似の化学構造の物質の識別等に活用される測定法です。未知物質の構造解析では $^1\text{H}$ -NMR とともに無くてはならない方法です。

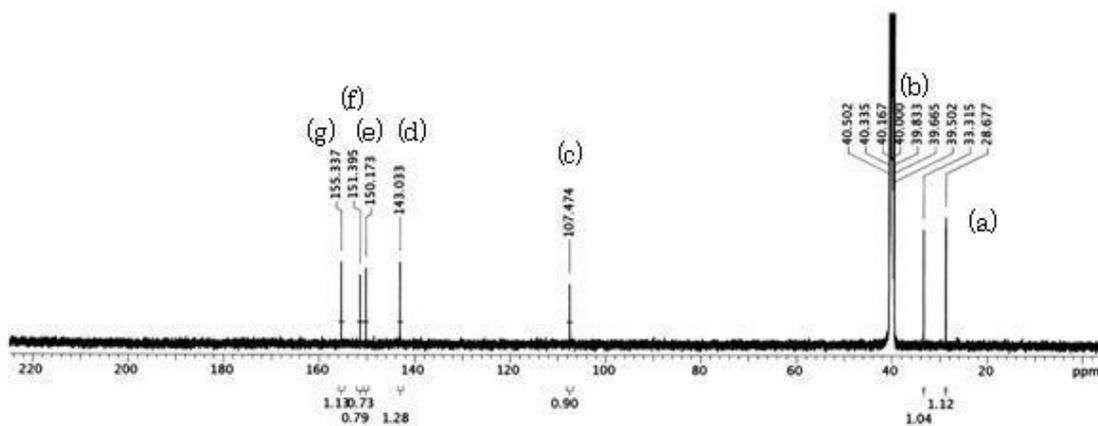


図-3 未知物質 A の  $^{13}\text{C}$ -NMR

$^{13}\text{C}$ -NMR 上には 7 本のシグナルが認められ、組成式の炭素数と一致しました。 $^1\text{H}$ -NMR の情報から(a)及び(b)はメチル基の炭素核とわかります。また、その位置から いずれも  $-\text{N}\cdot\text{CH}_3$  であると推察しました。(c)~(g)の 5 つのシグナルは芳香族や複素環等の不飽和二重結合の炭素核によるものと推察しました。

## ●二次元 NMR

一次元測定で得られた個々の水素核もしくは炭素核について、主に水素核-水素核や水素核-炭素核の結合を調べる手法です。個々の官能基から化学構造を組み立てる際に威力を発揮します。多くのバリエーションがあり、用途に応じて使い分けます。

### 【二次元 NMR の一例(HMQC)】

HMQC は直接結合している水素核-炭素核を確認する測定法です。相関(赤丸)が見える場合、その相関に対応(矢印)する水素核と炭素核が直接結合していることがわかります。

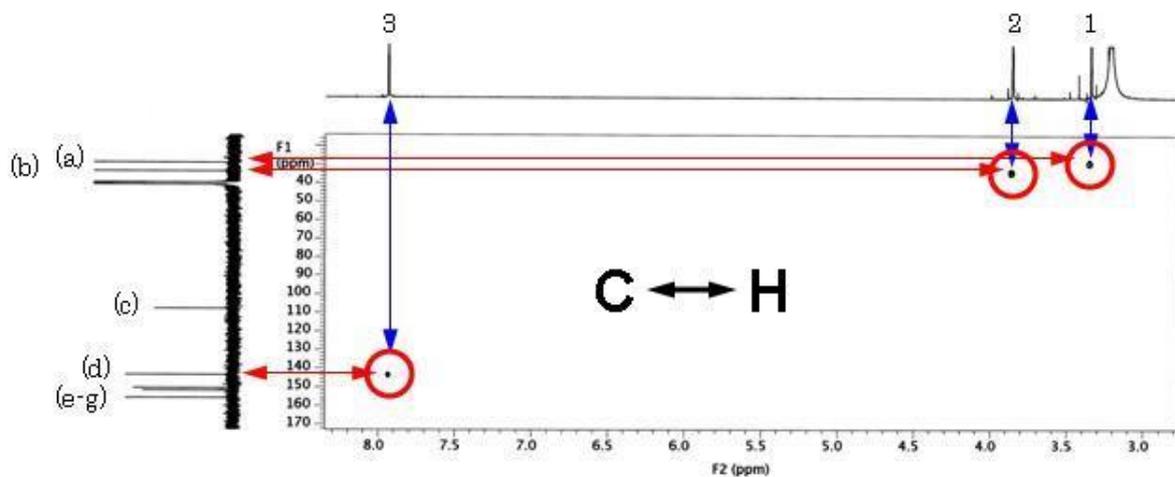


図-4 未知物質 A の二次元 NMR の一例(HMQC)

HMQC では、1-(a)、2-(b)及び3-(d)が直接結合している水素核-炭素核であることがわかりました。また、残りの4つの炭素核のシグナル(c, e, f 及び g)には相関が見られないことから、これらは四級炭素であることがわかります。

**【二次元 NMR の一例(HMBC)】**

HMBC は HMQC と同様に水素核-炭素核の相関を調べる手法ですが、HMQC が直接の結合を調べるのに対し、HMBC は 2~3 つの結合を介した相関を調べる手法であり、構造を組み立てていく局面で、非常に重要な測定方法となっています。

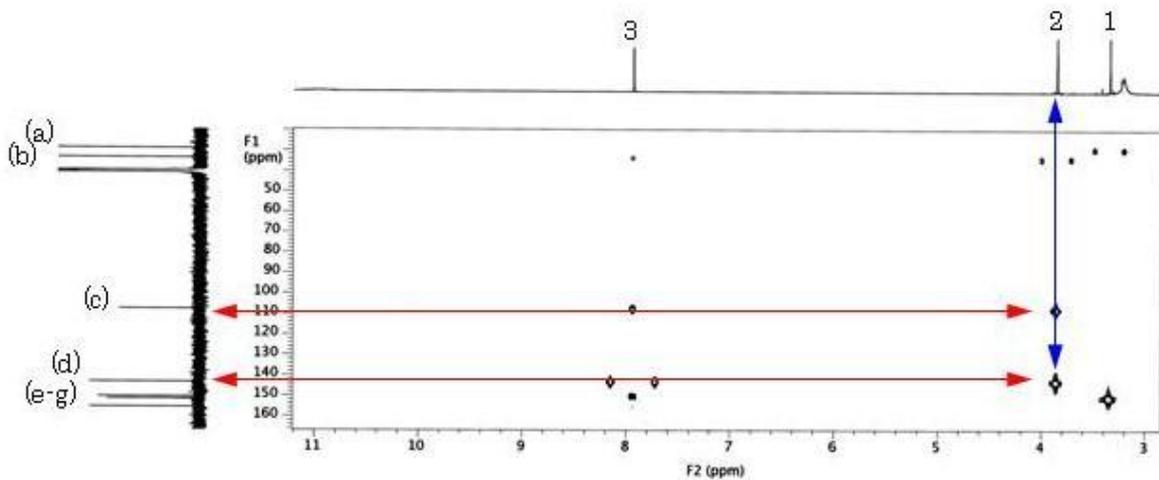


図-5 未知物質 A の二次元 NMR の一例(HMBC)

HMBC では、 $-N-CH_3$  由来の水素核のシグナル 2 から  $-CH-$  由来の炭素核のシグナル(d)及び四級炭素のシグナル(c)への相関が見られました。このことから以下のような構造のつながりがあることがわかります。

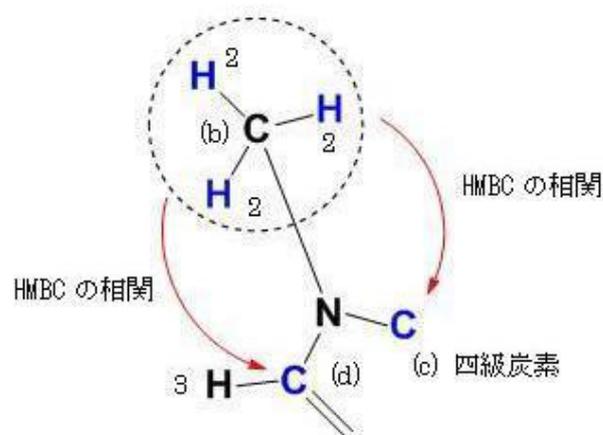


図-6 HMBC 解析の例

各 NMR スペクトルの解析結果から、未知物質 A が以下の部分構造を持つものと推察しました。未だ帰属できていない原子核は、水素核 1 個、酸素核 2 個及び窒素核 1 個です。

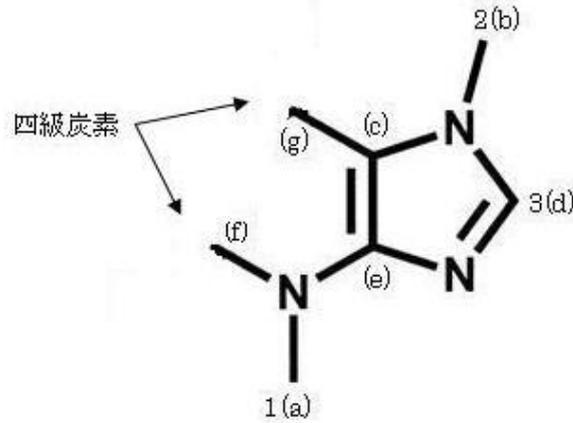


図-7 未知物質 A の部分構造

### 3 赤外吸収スペクトル(IR)の測定

赤外吸収スペクトルは物質の官能基の情報を調べる測定法です。NMR では水素及び炭素核以外の原子核については情報を得にくい場合がありますが、IR を測定することで得られる官能基の情報は、NMR では測定困難な原子核の情報を補完することが可能です。ここでは、酸素を含む官能基の情報を得るために IR を測定しました。

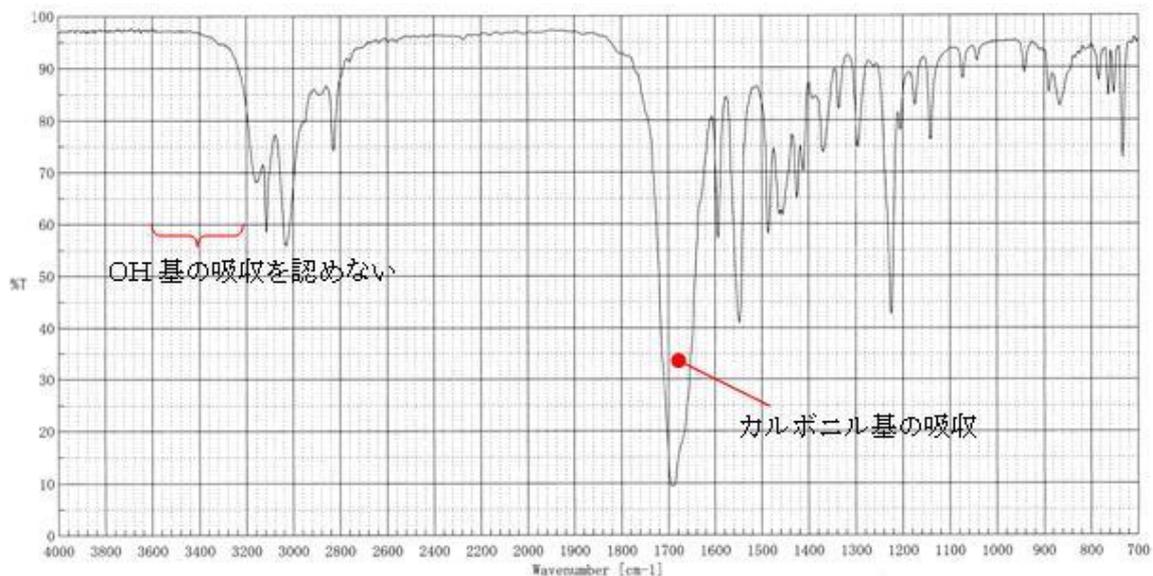


図-8 未知物質 A の赤外吸収スペクトル

IR スペクトルからはカルボニル基が存在し、水酸基は存在しないこと、さらには、カルボニル基はカルボン酸ではないことがわかりました。

NMR による部分構造と IR の解析結果に基づいて推定を行った結果、未知物質 A は以下の化学構造であるものと考えられました。

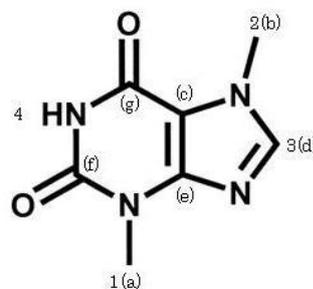


図-9 未知物質 A の推定構造

#### 4 マスフラグメントによる推定構造の検証

再度 LC-(Q)TOF/MS を用いて, 推定構造の妥当性をマスフラグメントのパターンに基づいて検証しました。

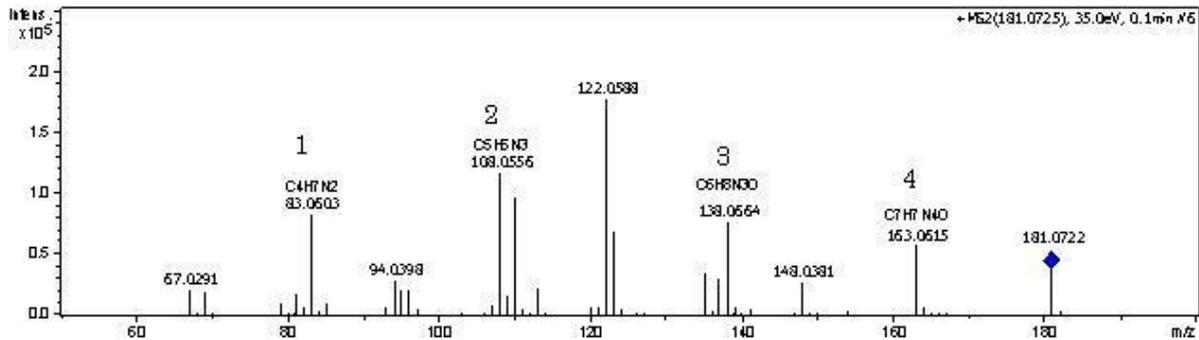


図-10 未知物質 A のマスフラグメントグラム

LC-(Q)TOF/MS では, フラグメンテーションにより生成したフラグメントイオンを確認することができます。フラグメントパターンは物質に特徴的であることから, 構造推定への有力な情報が得られます。フラグメントイオンピーク 1~4 が見られたことにより, 図-9 の化学構造の妥当性が確認されました。

以上の結果より, 未知物質 A はテオブロミンであると推定されました。