

東京工科大学

博士学位論文

質量分析におけるイオン化法の評価：
試料適応性と付加イオン選択性

平成 29 年 9 月

杉村夏彦

略語一覽

APCI: Atomic Pressure Chemical Ionization
APPI: Atomic Pressure Photo Ionization
ASAP: Atmospheric Solid Analysis Probe
CI: Chemical Ionization
CID: Collision Induced Dissociation
DAPPI: Desorption Atmospheric Pressure Photo-Ionization
DART: Direct Analysis in Real Time
DESI: Desorption ElectroSpray Ionization
DFT: Density Functional Theory
EI: Electro Ionization
ESI: Electrospray Ionization
FAB: Fast Atom Bombardment
FWHM: Full Width at Half Maximum
HRMS: High-Resolution Mass Spectrometry
IRC: intrinsic Reaction Coordinates
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization
MeOH: Methanol
MEP: Minimum Energy Path
MIKES: Mass analyzed Ion Kinetic Energy Spectroscopy
MS: Mass Spectrometer
MW: Molecular Weight
NBA: 3-NitroBenzyl Alcohol
ND: No Detected
NEB: Nudged Elastic Band
ppm: parts per million
PSA: Polar Surface Area
STQN: Synchronous Transit-guided Quasi-Newton
TOF: Time of Flight
tPSA: topological Polar Surface Area
TS: Transition State

目 次

略語一覧	1
第 1 章 諸言	
第 1 節 諸言	4
第 2 節 質量分析装置	7
第 2 章 極性-分子量によるイオン化法試料適応性評価	
第 1 節 諸言	14
第 2 節 試料ライブラリおよびデータベースの構築	17
第 3 節 試料ライブラリの極性評価	19
第 4 節 約 600 件の実測値に基づいた試料適応性評価	26
第 5 節 公開データベースを用いたイオン化法実績評価	32
第 6 節 結語	36
第 3 章 ESI における付加イオン選択性	
第 1 節 諸言	38
第 2 節 実験方法	39
第 3 節 結果と考察	41
第 4 節 結語	48

第4章	DARTにおける付加イオン選択性	
第1節	諸言	49
第2節	実験方法	50
第3節	結果と考察	51
第4節	結語	59
第5章	質量分析への量子化学計算の応用	
第1節	諸言	60
第2節	実験方法	61
第3節	結果と考察	62
第4節	結語	70
第6章	総括	71
	参考文献	73

第1章 諸言

第1節 諸言

質量分析は分子の質量，すなわち分子量を測定するもっとも基本的な化学分析の一つである．分子量は分子構造決定において元素組成に関する重要な情報を提供し，拡散等分子の運動に関して参考となる情報ともなり，あるいは重合物においては重合度そのものについての情報を提供する極めて重要な情報である．また安定同位体を用いた同位体ラベル実験は反応機構解析，薬物動態など追跡に極めて有効な手法であり，検出にはやはり質量分析が重要な役割を果たす．また，地球惑星科学分野あるいは年代測定¹⁾においても同位体比は重要な情報をもたらすため，同位体分析に特化した質量分析計が利用されている．²⁾ また，近年では医療・生物分野での応用も進んでおり，タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム・プロテオミクス，³⁻⁵⁾ 代謝の全体像を把握するメタボローム，⁶⁻⁸⁾ 各種病態バイオマーカーが開発されており，^{9, 10)} これらの分野においても質量分析は不可欠な分析手法となっている．

また質量分析は強力かつ有効であるため，科学技術のみならず我々の日常生活においても食品添加物・残留農薬の検出，¹¹⁻¹³⁾ 違法薬物捜査，^{14, 15)} 空港での保安検査等における爆発物の検出¹⁶⁾など，食および生活安全の一翼を担っており，現在においてもその重要性はさらに増している．

現在の質量分析は Sir Joseph John Thomson(英 1856-1940)による陽極線管実験に端を発する．¹⁷⁾ この実験では測定対象となる原子をイオン化し電圧をかけて加速，そして磁場をもちいて褶曲させる．Thomsonはこの実験により²⁰Neと²²Neを2種類の偏向放物線として分離することに成功した．その後，Thomsonの助手であった Francis William Astonによってこの実験手法に改良が加えられ，荷電粒子を加速し電場・磁場を用いて偏向するという現在のセクター型質量分析装置の原型が作られた．¹⁸⁾ 1922年，Astonはこの質量分析装置の開発等の業績に関してノーベル賞を受賞している．その後，質量分析装置は，飛行時間型，四重極型，フーリエ変換型などの方式が開発され，現在では分析化学のみならず，合成化学における生成物の確認は言うまでもなく，生物分野・環境分野など質量分析の専門家以外にも広く使う一般的な分析装置として普及するに至った．

この質量分析装置開発の歴史はイオン化法開発の歴史でもある．質量分析装置が普及し始めた1950年代から1960年代かけては電子イオン化法(Electro Ionization: EI)¹⁹⁾が主流であった．EIは熱気化させた試料に電子線を放射することでイオン化させるものであり，ガスクロマトグラフィーとの相性がよく，当初から組み合わせられガスクロマトグラフ-質量分析装置として利用されてきた．²⁰⁾ しかし，EIによるイオン化は試料の熱気

化に依存するためおのずと分子量に限界があり、特に気化しにくい高極性化合物も不得手であった。また、EI は化合物に与えるエネルギーの高さからフラグメンテーションをとめない、²¹⁾ 分子関連イオンを検出することが困難であることも多い。EI はこれまで多くの知見が蓄積されており、フラグメントに関するデータベースなども構築されている²²⁾ことから現在においても重要なイオン化法であることに変わりはないが、フラグメンテーションを誘発する、適応範囲に限界があるという問題の解決が試みられてきた。まず1970年代には化学イオン化法 (Chemical Ionization: CI)²³⁾が開発され、フラグメンテーションに対して解決が試みられた。続いて1980年代には Berbor により高速原子衝突法 (Fast Atom Bombardment: FAB)が開発され²⁴⁻²⁶⁾適応範囲が拡大し、さらにフラグメンテーション問題も解決された。1990年代には Fenn・山下らによってエレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray Ionization: ESI)²⁷⁻²⁸⁾が実用化された事により、生体分子を含む巨体分子にまで質量分析の適応範囲を広げるに至った。さらに田中らによってマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization: MALDI)が開発されたことにより数百 kDa にもなる巨大タンパク質全体の質量をも測定することも可能となった。²⁹⁻³³⁾ 加えて2000年代には Direct Analysis in Real Time (DART),^{34, 35)} Desorption Atmospheric Photo-Ionization (DAPPI),³⁶⁾ Desorption ElectroSpray Ionization (DESI),³⁷⁾ Atmospheric Solid Analysis Probe (ASAP)³⁸⁾をはじめとする、多くの大気圧下イオン化法が開発されている。³⁹⁾

質量分析ではこれら多種多様なイオン化法から試料に対して適切なイオン化法を選択しなくてはならない。試料に対して不適切なイオン化法を選択すると著しく観測対象のイオン強度が低い、あるいは全く検出されないという事態が起こりえる。数多くのイオン化法から測定対象に適したイオン化法を選択することは、質量分析の実践において「はじめの一步」である。しかしながら現状ではイオン化法選択において指針といえるものはなく、経験者に依存している状況が長く続いている。⁴⁰⁾

また、イオン化時に付加イオンの生成を伴うイオン化法は少なくない。多くの場合これらの付加イオンは一種ではなく複数の種類が観測される。特にマスペクトルが複雑な場合、測定対象とする化合物の検出強度が弱い場合、測定対象分子の分子量が未知の場合、付加イオン予測は重要となる。加えて、質量分析から元素組成推定を行う高分解能質量分析 (High-Resolution Mass Spectrometry: HRMS)⁴¹⁾においては、本来測定対象分子に含まれない原子が加わるため付加イオンは明確かつ合理的に説明されるべきものであるといえる。

そこで本研究では各イオン化法の試料適応性評価を行い客観的な試料適応特性を表現することを試みるとともに、付加イオン選択性を解明する事を目標とした。その手段として大量の測定データから retrospective (:回顧的)に解析を行うこと加えて量子化学計

算による考察を行い，質量分析に関する経験的知識の体系化・数値化を指向する．より具体的には業務で経験した約 600 件の HRMS 測定をライブラリ化し，そこから得られるイオン化法試料適応性，付加イオン選択性に関する知見を抽出することを試みる．第 2 章においては試料ライブラリを用いた DART・ESI・FAB の試料適応性評価および公共データベースを用いた EI・CI・大気圧下化学イオン化法 (Atomic Pressure Chemical Ionization: APCI)⁴²⁾・ESI イオン化法の実績評価を行った．第 3 章においては同様に試料ライブラリを用いた ESI における付加イオン，プロトン・ナトリウム選択性評価および予測を行った．第 4 章においては同じく試料ライブラリを用いた DART におけるプロトン付加イオン・アンモニウム付加イオン選択性評価を行った．第 5 章においては量子化学計算の質量分析への応用としてフラグメンテーションにおける最小エネルギー経路の算出について述べる．

本研究は実務において経験した需要に基づいて行われたものである．⁴³⁾ 本研究が質量分析の実務・実践教育にとって有益な情報となることを目指す．

第2節 質量分析装置

本節では本研究で対象とした質量分析装置に関する一般的な機構および原理について述べる。

質量分析装置は大きくイオン化部と質量分析部に分けることができる (Figure 1)。導入された試料はイオン化部 (イオン源) で正あるいは負の電荷を帯びたイオンとなり、質量分析部に導入される。質量分析部ではイオンの質量を電荷に対する運動の差として分離・計測する。イオン化部、質量分析部ともに様々な方式が用いられるが、いずれ場合においても質量分析部では質量をイオンの運動として計測するため内部は高真空 (10^{-4} ~ 10^{-8} Pa 程度) に維持されている。

質量分析装置が普及した当初、質量分析部には磁場あるいは磁場と電場を利用するセクター型が主流であった。⁴⁴⁾ この方式ではイオン化部から導入されたイオンを加速器で電圧により加速し、つづいて磁場および電場により褶曲させイオンの運動量として質量分離する方式である (Figure 2)。加速電圧: v で質量: m 、電荷: z のイオンが飛行経路に対して垂直に設置された磁場: B を通過する際、水平方向にローレンツ力と遠心力が発生し、半径 r の円軌道上を等速運動する。この時、質量電荷比を $m/z = r^2 B^2 / 2v$ として示すことができる。実際の装置では磁場に加えて電場を用いて二重収束型とすることで分解能を向上させている事が多く、磁場あるいは電場もしくはその両方を掃引しマススペクトルを得る。このセクター型質量分析装置は質量分解能が高く、スリットによる調整が可能で汎用性が高い。しかし、高い分解能を得るには数メートルにおよぶ長大なイオン飛行経路を確保する必要があるため大型となり設置可能な施設に限られる。現在ではセクター型は経済的な理由からも他の方式の質量分析装置への置換が進んでおり、新規導入は難しくなりつつある。⁴⁵⁾ 本研究ではセクター型質量分析装置として JMS-SX102A (日本電子 (株)、東京)、JMS-BU25 (日本電子 (株)、東京) を使用した。

現在、主流の質量分析装置の1つとして飛行時間 (time-of-flight: TOF) 型があげられる。⁴⁶⁾ TOF 型の原理は極めて簡潔であり、加速器でパルス状に加速した試料イオンが検出器まで飛行するのに要した時間を計測する (Figure 3)。TOF では質量: m 、電荷: z のイオンが加速電圧: v で距離: l を飛行する時間を t とした場合、 $m/z = 2vt^2/l^2$ として質量電荷比を表現することができる。TOF 型ではイオンミラーとして作用するリフレクトロン (リフレクタ) を装備する装置があり、リフレクトロンが飛行長を倍増させると同時に運動の広がりによる飛行時間の広がり収束させる効果を持つため質量分解能を大きく向上させることができる。⁴⁷⁾ TOF は比較的小型で高い分解能を発揮する質量分析装置であり、本研究で使用した JMS-T100CS (日本電子 (株)、東京) はリフレクトロンを装備し飛行距離約 2m の飛行管を有する分解能約 6000 (Full Width at Half Maximum: FWHM) の TOFMS である。

近年注目されている質量分析装置としてイオントラップ型の検出器の一種である Orbitrap があげられる。^{48,49)} 2005 年に Thermo Fisher Scientific から発売され、その特徴は極めて正確(誤差 3 ppm 以内)であり、分解能 100,000 (FWHM) を超える超高分解能質量分析が可能なことである。Makarov らにより開発された Orbitrap は紡錘型の電極とハウジングにより構成されており、導入されたイオンは中心の紡錘型電極を周回しながら同時に紡錘型電極の長軸方向に往復運動を行う (Figure 4)。この往復運動により発生する正弦波をフーリエ変換することにより質量電荷比を導出するものである。本研究では Orbitrap 型検出器を有する Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) を DART および ESI と組み合わせて使用した。Orbitrap では分解能とスキャンレートがトレードオフの関係にあり、最大性能である分解能 140,000 (FWHM) ではスキャンレートは 1.5 Hz にまで低下する。また、イオンを長時間飛行させるため 10^{-8} Pa 程度の極めて高い真空度を要求する。

このように質量分析部は様々な方式があるが装置導入時に仕様が決定されるため、利用者が創意工夫する余地は多くないと言える。質量分析装置ではいずれの方式においても質量電荷比をイオンの運動として計測しているため、まずは試料をイオン化する必要がある、より重要とされるのはイオン化部である。

イオン化部においても様々な方式が実用化されている。本節では本研究で使用した Direct Analysis in Real Time (DART)・Electrospray Ionization (ESI)・Fast Atom Bombardment (FAB) についてその原理を簡潔に解説する。DART・ESI・FAB のうち歴史的に最も古くから実用化されていたのは FAB である (Figure 5)。²⁴⁻²⁶⁾ FAB では物理的な衝撃を吸収しイオン化を促進するマトリックスと呼ばれる粘調な液体化合物が用いられる。具体的には 3-ニトリルベンジルアルコール (NBA)、試料が水溶性の場合にはグリセロール等がマトリックスとして用いられることが多い。真空中でマトリックスに溶解された試料が塗布されたターゲットに加速器から打ち出した原子(多くの場合キセノン (Xe) が用いられる)を高速で衝突させる。その際にマトリックスと共にイオン化した試料を質量分析部で分析する。FAB は測定対象をフラグメンテーションさせないソフトイオン化法とされ、多くの場合プロトン付加イオン ($[M+H]^+$) を生成する。実際にはセクター型質量分析装置に搭載されることが多く、実質的にそれ以外の方式と組み合わせられることはあまりない。

また現在最も普及しているイオン化法が ESI である。^{27, 28)} ESI では数 kV (2~4kV 程度) の電圧のかかったノズルから試料溶液を噴霧し、大気圧下において試料を含む液滴から溶媒分子が蒸発し、最終的に付加イオンとして電荷を有した試料イオンが生成する (Figure 6)。イオン生成の過程としてイオン蒸発モデル・帯電残渣モデル等が提唱されており、試料が中性分子であれば多くの場合付加イオンが生成する。ESI は試料適応性が高いとされており、通常の有機化合物から生体高分子まで幅広い実績がある。

DART は 2005 年に発売された新しいタイプのイオン化法である。^{34, 35)} その機構は簡素

であり、媒体として通常はヘリウムを用いる。DART に導入されたヘリウムは流路上に設置された電極において電圧が印加され準励起状態(高い内部エネルギーを有してはいるがイオン化していない状態)となる。さらに試料を気化するための熱(～550℃)が与えられ、ノズル先端から放出される。ここまでにイオン化したヘリウムはグリッド電極で除去されるため、つまり DART イオン源先端からは準励起状態の熱ヘリウムが放出される(Figure 7)。大気中に放出された準励起状態の熱ヘリウムはその熱により試料分子を気化し、さらに高い内部エネルギーにより大気中の水分子をイオン化し、最終的にイオン化した水分子が試料をイオン化させるというイオン化機構をもつ(Figure 8)。DART は市販されていることから導入しやすく、最も普及している大気圧下イオン化法(Ambient ionization method)の一種と言える。近年、この Ambient ionization の開発が盛んであり、2000 年代以降も多数のイオン化法が開発されている。³⁹⁾

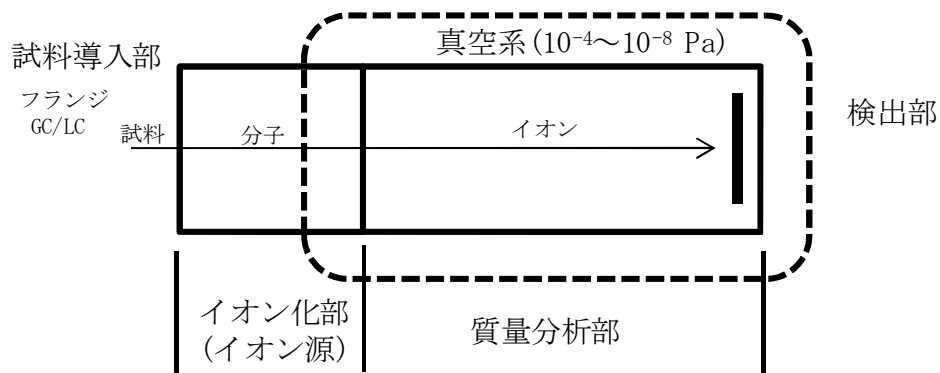


Figure 1 質量分析装置構成概略図

質量分析装置はイオン化部と質量分析部に分けられる。質量分析部は真空中に保たれており、イオン化部でイオン化した試料分子の運動として質量電荷比を計測する。

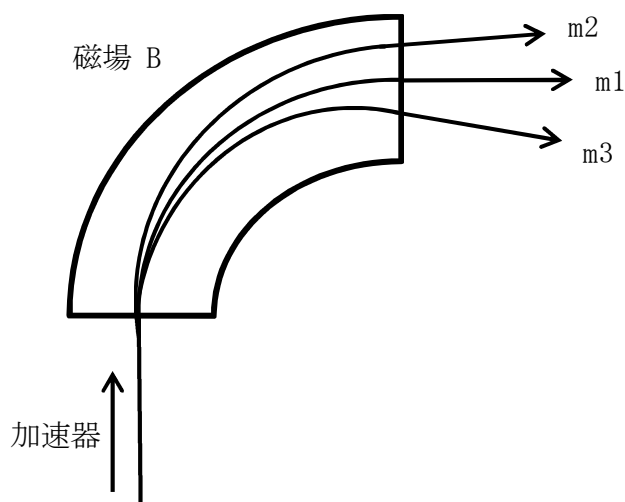


Figure 2 セクター型質量分析装置

セクター型質量分析装置においては加速したイオンを垂直磁場中で生じるローレンツ力により分離する。実際には電場を併用した二重収束型として設計されることが多く、スリットと組み合わせられ位置情報を持たない検出器が用いられる。

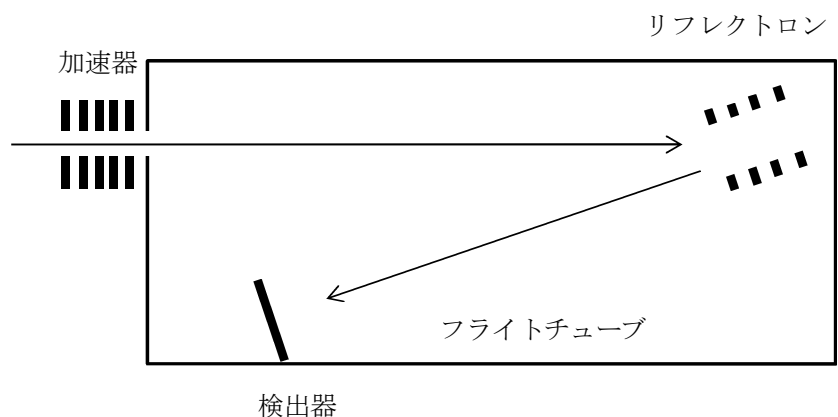


Figure 3 Time-Of-Flight 型質量分析装置

TOF 型質量分析装置ではパルス状に加速されたイオンの検出器までの飛行時間を計測する。リフレクトロンを装備するものは飛行するイオンを折り返すことによりイオン光路長を倍増し同時に運動の広がり収束させる効果があり分解能を向上させる。

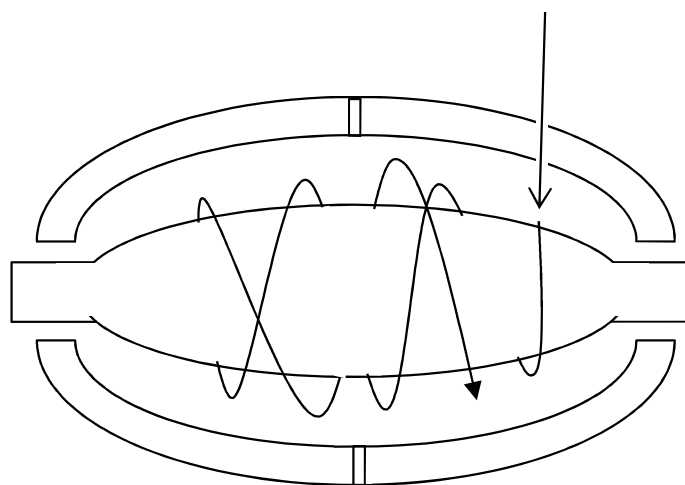


Figure 4 Orbitrap 型検出器

Orbitrap では導入されたイオンはスピンドル様の電極を周回すると同時に長軸方向へ往復運動する。比較的長時間(～1s)イオンを飛行させるため超高真空(10^{-8} Pa 程度)が要求される。

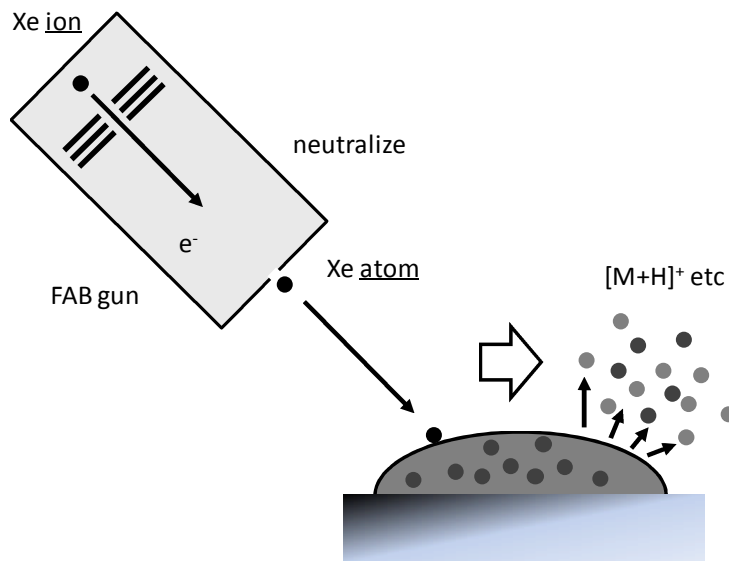


Figure 5 Fast Atom Bombardment (FAB)

FAB では真空中で 3-NBA・グリセロールなど低揮発性の液体マトリックスに分散した試料を原子衝突によるエネルギーを用いてマトリックスと同時にイオン化する。ソフトイオン化法とされており付加イオンを生成することが多い。

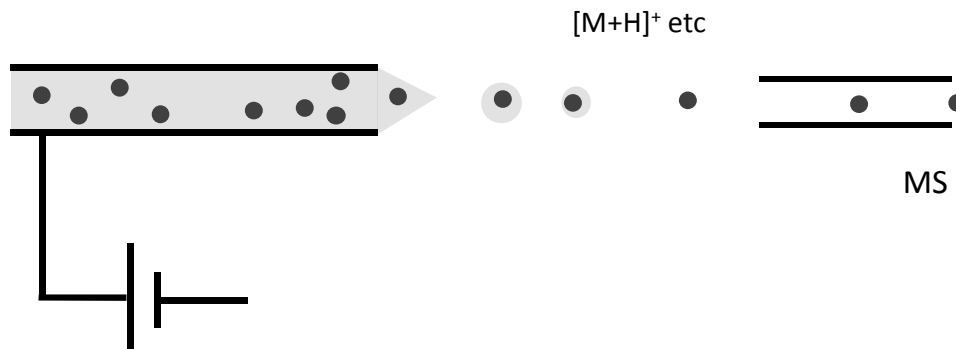


Figure 6 Electro spray Ionization (ESI)

ESI では電圧をかけたノズルから試料溶液をスプレーすることによりイオン化する。生成した試料を含む液滴から溶媒分子が蒸発することにより、最終的に試料イオンを生成する。

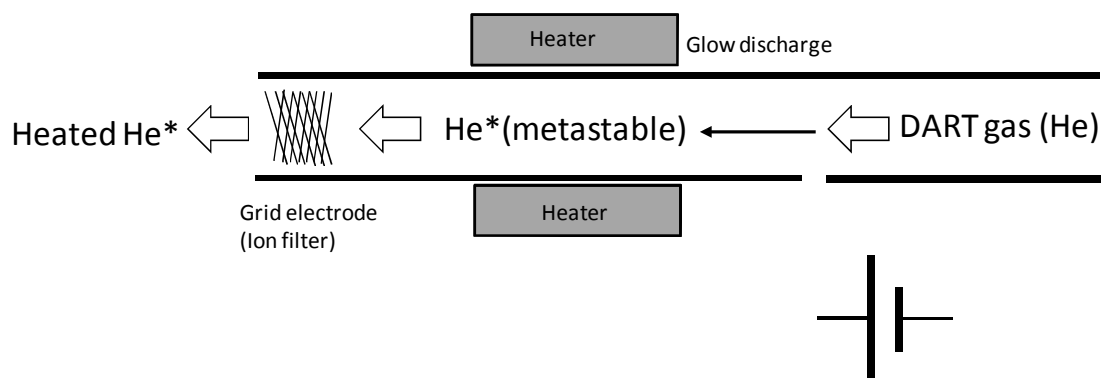
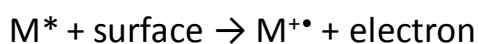
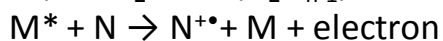
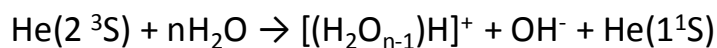


Figure 7 Direct Analysis in Real Time (DART)

DART の機構自体は簡潔であり, DART ガスを準励起状態にする放電ニードル, 加熱ヒータ, イオン化したガスを除去するグリッド電極から構成される. ノズル先端からは加熱された準励起状態の DART ガスを放出する.



Cody, R. B., *Analytical Chemistry* **2005**, 77 (8), 2297-2302.



J.H. Gross, *Mass Spectrometry* Second Edition.

Springer, Heidelberg (2010), p. 642.

Figure 8 He - DART によるイオン化機構

ヘリウムを用いた DART ではいずれにしても大気中の水分が試料のイオン化に関係していると考えられている^{34, 50}. イオン化の過程において複数の化学種が関係し電荷を交換するため APCI の一種であるとも考えられる.

第2章 極性-分子量によるイオン化法試料適応性評価

第1節 諸言

質量分析においてイオン化は必要不可欠な行程であり、試料に対して適切なイオン化法を選択することは質量分析の「第一歩」である。しかし、試料に対して不適切なイオン化法を選択してしまうと著しく検出強度が低い、あるいはまったく検出されないという事態も起こり得る。イオン化法選択は質量分析の成否に関わる極めて重要な問題である。

質量分析が一般的な化学分析となった現在、質量分析に供される試料は多種多様であり、有機合成であれば多くは分子量にして数百まで中性の有機化合物であり、高分子であれば分子量にして数千から数万、生体関連試料では糖・核酸・ペプチド・たんぱく質と多岐に渡り分子量においては数十万に達することもある。また、金属を含む錯体や配位結合を持つ化合物などイオン化法選択に注意を要する化合物が試料となることも少なくない。対してイオン化法の選択肢も増えつつあり、近年では様々な大気圧イオン化法が開発されている。実験者はこれら多数のイオン化法のから試料に対して適切なイオン化法を選択しなくてはならないが、現在のところ明確なイオン化法選択の指針はない。⁴⁰⁾

質量分析におけるイオン化では従来から分子量とともに極性もまた重要な要素であると考えられており⁵¹⁾、イオン化法試料適応性として極性と分子量を用いた2次元チャートが用いられてきた。一般に低分子量化合物は熱気化しやすくガスクロマトグラフィー質量分析法²⁰⁾を含めEIとの組み合わせが多く、分子量が大きくなると単純な熱気化が困難になりESI、たんぱく質などさらに巨大な分子にはMALDIが用いられることが多い。その中間の分子量ではAPCI、DAPPI、FABなどのイオン化法が用いられる。Maurerらは著作の中でクロマトグラフィーと質量分析装置の接続部、すなわちイオン化法との相性について分子量・極性との二次元チャートとして表現している(Figure 9)。⁵²⁾この図によれば低分子量・低極性化合物はEI、それよりもやや極性の高いものについてはParticle Beam(ここではすなわちFAB)、さらに高極性・高分子量領域ではAPCI、ESIが有効である事を示している。この極性-分子量による2次元のイオン化法適応性の表現はメーカーの紹介資料など随所で様々なバリエーションを見ることができる。特に、*Anal. Bioanal. Chem.*, **378**(4), 2004. においては表紙として、またその引用として教科書⁵³⁾でも登用されていることから概ね受け入れられているものであると考えられる。

このようには幅広く用いられ受け入れられている極性-分子量によるイオン化法試料適応2次元チャートであるが、実測データに基づいて作成されたチャートはこれまで確認することが出来なかった。つまり広く普及しているこの極性-分子量による2次元イオン化法適応性チャートはすべて想像図であると考えられ、作成者によっても差異が観察される。⁵¹⁻⁵⁴⁾ また、これらの極性-分子量による2次元イオン化法適応性チャートを実際

に利用することも困難である。まず、これらイオン化法適応性チャートの多くは数字の記載がないものが多い。さらに極性については数字のみならず、ほとんどの場合無単位である。

そこで本章では約 600 件の受託 HRMS 測定試料を利用し、大量の実測結果から DART・ESI・FAB について客観的なイオン化法の試料適応性を評価することとした。特に極性-分子量によるイオン化法試料適応性チャートを測定結果に基づいて作成し、イオン化法選択の指標として提供することを試みる。加えて公共データベースの解析から EI・CI・APCI・ESI の測定実績の可視化を試みることとした。

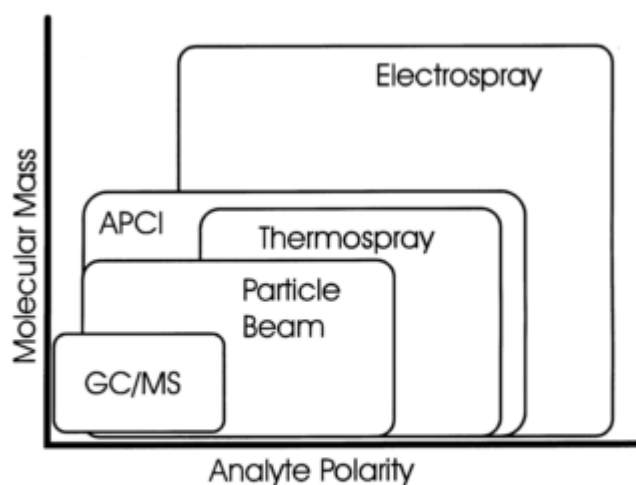


Fig. 1. Relation of the molecular mass range and the polarity of analytes analyzable by GC-MS and different LC-MS interface techniques.

Figure 9 極性-分子量による2次元イオン化法試料適応性チャート

極性分子量による2次元イオン化法試料適応性チャートの典型例.⁵²⁾ この他にも随所で様々なバリエーションが見られるが、これまで実測に基づいて作成された例は発見することができなかった。多くのものは無数字無単位であり、実際にこのチャートを利用してイオン化法を選択することは難しい。調査した限りでは H. H. Maurer. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1998**, 713, 3. が最も古い。 Copyright Elsevier B.V.

第2節 試料ライブラリおよびデータベースの構築

本研究では早稲田大学・物性計測センターラボで提供している HRMS 測定サービスに提供された受託試料を利用した。⁴³⁾ 試料は 2012 年 6 月から 2013 年 3 月まで期間中収集され、測定までガラス試料管中-20 °C で保存した。試料には構造式・分子式・分子量・精密質量情報が添付されており、これらは測定結果と共にケモインフォマティクスツールである ChemFinder standard version 9.0 (CabbridgeSoft Corporation, Cambridge, MA) を用いて建造したデータベースに集積した。

これらの試料は早稲田大学内の幅広い研究分野から提出されており、天然物・生理活性物質・合成物・保護基を含む合成中間体・(遷移金属を含む)配位化合物・オリゴマ等、多様な化合物から構成されている。なお、これらの試料および試料に関する情報は測定依頼研究室より構造式を公開しないという条件下で本研究への利用が許諾されている。同期間に収集された試料総数・データエントリ総数は 611 件であった。これら試料はすべて ESI-TOFMS(一部 FAB-sector MS)を用いて申告された精密質量に対して質量誤差 5 ppm 以内で HRMS が測定されたものであり、元素組成についての信頼性は高い。ただし、-20 °C での保存中に分解した試料、DART・ESI・FAB すべてのイオン化法で未検出(not detected: ND)となった試料、あるいはポジティブモードでは ND でありネガティブモードで測定した試料、合計 23 件は有効試料から除外した。最終的な有効試料数は 588 件であり、炭素・水素・窒素・酸素の分子式平均は $C_{22.48}H_{27.29}N_{0.79}O_{3.05}$ (MW 357.37) であった。次に Figure 10 に分子量分布をヒストグラムとして示す。このヒストグラムから、得られた試料群は分子量 300 付近を頂点とし、分子量 150 から分子量 1000 に広く分布していることがよみとれる。また、分子量分布の重心(すなわち平均分子量)は分子量 384.47 であり、CHNO 分子量平均 MW357.37 との差分が炭素・水素・窒素・酸素以外の原子、すなわち硫黄・リン・ケイ素・ハロゲン・その他遷移金属元素などのヘテロ原子の貢献であると考えられる。以降、本試料ライブラリを in-house 高分解能質量分析試料ライブラリと呼ぶものとする。

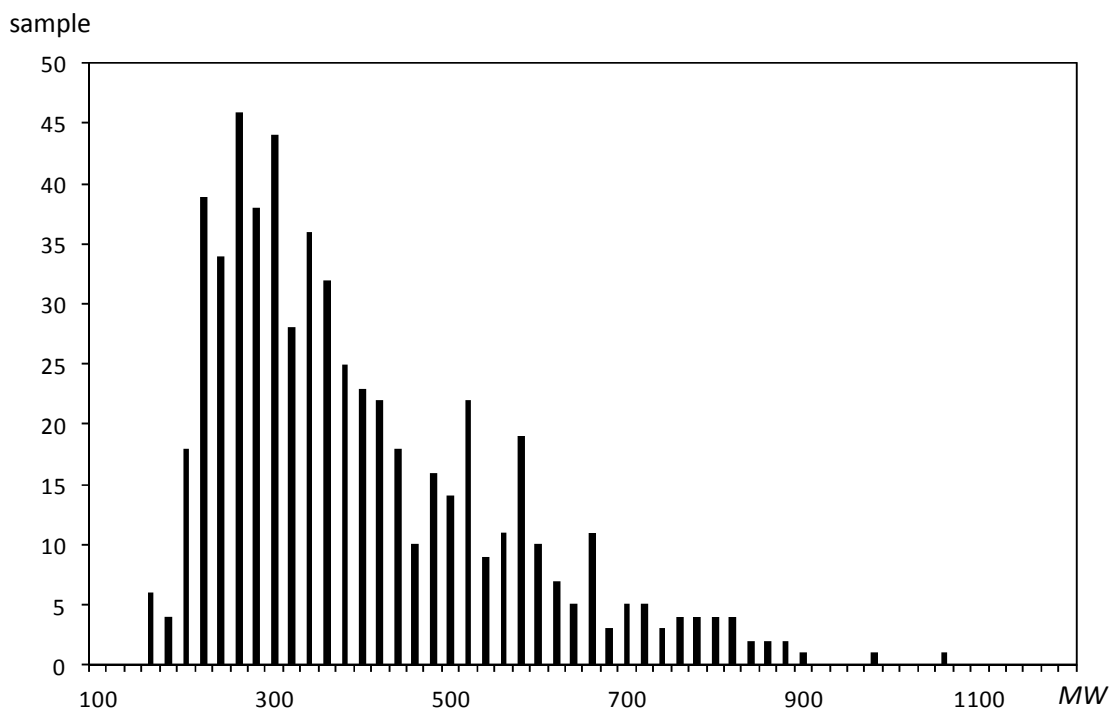


Figure 10 本研究で用いられた in-house 高分解能質量分析試料ライブラリの分子量分布

in-house 高分解能質量分析試料ライブラリは有効試料数 588, 平均分子量 384.47 であり, 分子量 150 から分子量 1000 におよぶ幅広い質量分布を示した.⁷²⁾ Reproduced from N. Sugimura et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 91 (2015). Copyright SAGE Publishing 2015.

第3節 試料ライブラリの極性評価

化学において極性とは双極子モーメントとして定義されており⁵⁵⁾、分子の双極子モーメントを求めること自体は量子化学計算(分子軌道法)を用いれば難しいことではない。しかし、量子化学計算は時間を要する手法であり、質量分析におけるイオン化法選択のために量子化学計算を行うのは現実的ではない。一例としてクロロプケアナニン($C_{33}H_{35}ClO_{11}$, MW643.085)(Figure 11)⁵⁶⁾の密度汎関数理論(Density Functional Theory: DFT)計算について示す。プログラムに Gaussian 09⁵⁷⁾、密度汎関数として B3LYP⁵⁸⁻⁶¹⁾、基底関数として 6-31G(d)⁶²⁾を用いて、科学技術振興機構(JST) J-GLOBAL(<http://jglobal.jst.go.jp/>)に収録された原子座標を初期座標として構造最適化を行うと、Xeon E5-2687W V3 3.4GHz (intel)を用いた場合で約 24 時間を要した。Gaussian 09 では単ノード内でのメモリ共有型並列計算が可能であり、計算に供する core 数を指定することが可能である。Xeon E5-2687W V3 は 8 core であるため 1 CPU = 8 core での並列計算を行うと約 4 時間 17 分まで計算時間を短縮することができる。しかし計算時間短縮に要する計算資源は等比級数的に増加するため、2 CPU に相当する 16 core を投入しても 2 時間 40 分までしか短縮されない(Figure 12)。一般的な高性能計算機ではノードあたり 2 CPU 搭載であるため、メモリ非共有型マルチノード並列計算を行わない限り 16 core 並列計算に要する 2 時間 40 分がシングルノード並列計算の事実上の限界である。しかし、質量分析をおこなう実験者にとって 2 時間を超える計算時間は短い時間ではない。クロロプケアナニンの場合、量子化学計算による双極子モーメントを算出する時間があれば複数のイオン化法による質量分析実験が十分に可能であり、イオン化法を事前に検討するという行為そのものの優位性が失われる。

また、双極子モーメントが質量分析におけるイオン化で用いられる極性として妥当であるかという問題がある。例としてエチルベンゼンと *p*-ベンゾキノンという 2 つの化合物を考える。エチルベンゼンは水素と炭素のみから構成されており、*p*-ベンゾキノンには水素・炭素に加え 2 つのカルボニル基を有しているため炭素・水素に加え酸素が追加される。同じく Gaussian 09 を用いて B3LYP/6-31G(d,p) レベルで双極子モーメント計算をすると、エチルベンゼンは炭素水素のみから構成されるため 0.4591 debye という非常に小さい値を示すが、*p*-ベンゾキノンはさらに小さく 0.0000 debye となる(Figure 13)。これは、カルボニルが局所的に高い双極子モーメントをもつものの、幾何学的に分子の対象性が高いため局所的な双極子モーメントを相殺し、結果として分子全体としては極めて低い値となっていることを意味している。しかし、この 2 つの化合物の逆相系高速液体クロマトグラフィーを考えると、エチルベンゼンのほうが担体を修飾しているアルキル鎖との相互作用が強くリテンションタイムが長い、あるいは *p*-ベンゾキノンのほうが極性溶媒への溶解性が高くリテンションタイムが短いことは容易に推測できる。双極子

モーメントは分子全体の電荷の偏りを表す数字であり、付加イオン生成に重要な局所的な電荷の偏りを表現できていないことが理解できる。

一方、簡易な極性の表現が使われている分野もある。例えば、薬物動態学においては Lipinski's rule of five という法則が知られている (Figure 14)。⁶³⁾ これは経口投与した薬剤の生物学的利用能 (bioavailability) を予測する経験的な法則である。一般的に経口投与した薬剤は受動的に消化管の粘膜を通過し血管に取り込まれ、全身へと分布していく。この際、消化管粘膜細胞の細胞膜を通過するには低分子量・低極性である必要がある。Lipinski's rule of five のうち Log *P* はオクタノール/水の分配係数であり実験的に求められる極性そのものであるが⁶⁴⁾、水素結合供与体数・水素結合受容体数は構造式上から数える事ができる極性の指標として用いられている。

本研究ではこれから質量分析を行う化合物について迅速に極性を求める必要があり、また大量の試料ライブラリについて極性を求めるため、迅速性・簡便性の高い極性の表現が求められる。そこで試料ライブラリを用いた実験については極性として topological Polar Surface Area (tPSA) を採用した。⁶⁵⁾ tPSA は主として薬物動態学で用いられている極性の表現である Polar Surface Area (PSA) を構造式から求めるものである (Figure 15)。PSA は分子モデルを構築、最適化した後、分子モデル上の窒素・酸素および窒素・酸素に直接結合した水素の合計表面積 (\AA^2) を求めたものであり、溶解性・caco-2 細胞を用いた細胞膜透過試験などと相関が求められている。^{66,67)} tPSA では部分構造の PSA をパラメータ化し部分構造の合計として PSA を算出するものであり、分子モデリング・最適化計算・表面積の算出・立体異性体の考慮が不要となる。このため tPSA は高速計算が可能であり、実用性が高い。本研究では ChemFinder による構造式情報を含むデータベースを建造しているため、実際の tPSA 算出には ChemFinder からシームレスに利用できる ChemDraw 9.0 (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA)⁶⁸⁾ を用いた。tPSA 算出に用いた窒素・酸素を含む部分構造のパラメータを Table 1 にまとめる。例として caffeine の tPSA 算出を Figure 16 に示す。Caffeine は 2 つのカルボニル (tPSA = 22.3)、3 つの 3 級窒素 (tPSA = 2.7)、二重結合と単結合を持つ窒素 (tPSA = 11.3) を持つため、分子全体では tPSA = 22.3 + 22.3 + 11.3 + 2.7 + 2.7 = 64.0 (\AA^2) と算出される。

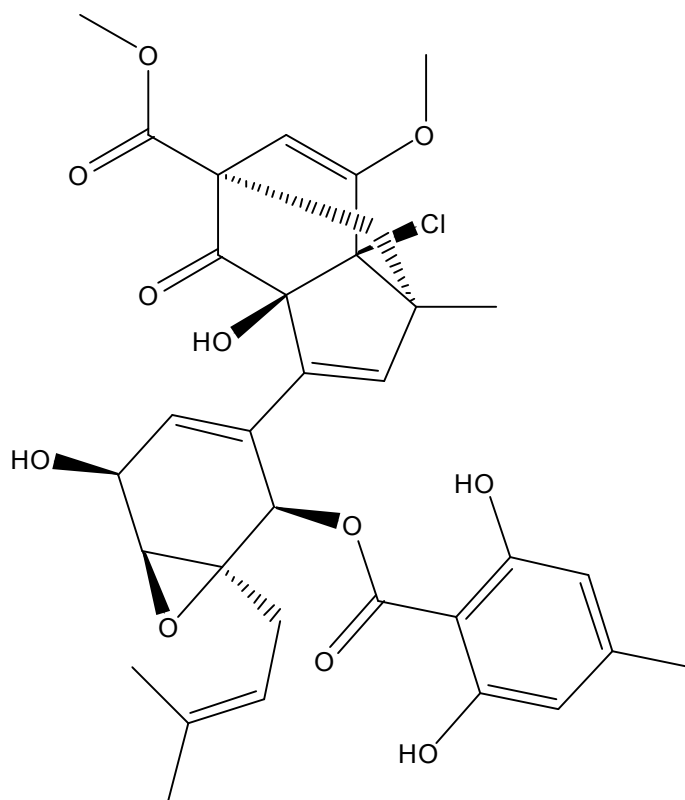


Figure 11 Chloropupukeananin

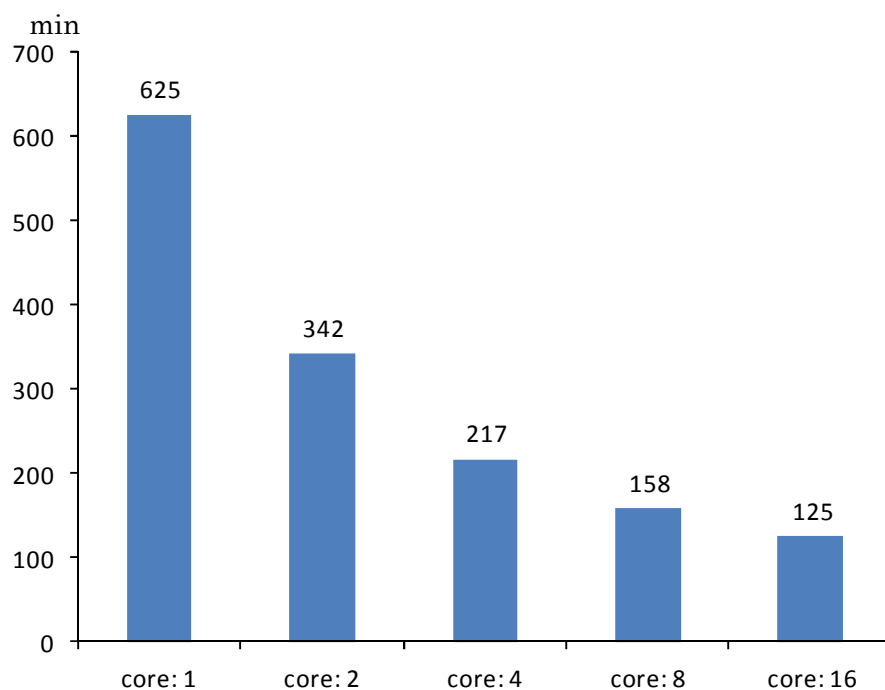


Figure 12 Chloropupukeananin の構造最適化計算に要する時間

Gaussian 09 による B3LYP/6-31G(d) レベルでの Chloropupukeananin の構造最適化計算を例とした Xeon E5-2687W v2 3.4GHz (intel) によるメモリ共有型並列計算にみられる量子化学計算の高速化. 2CPU: 16core を用いることで 625 min を 125 min (1/5) まで短縮することができるが, 必要とする計算資源は等比級数的に増加する. また事実上 16 core 並列は単ノードでの最大並列数であり, 現実的にこれ以上の高速化は望めない.

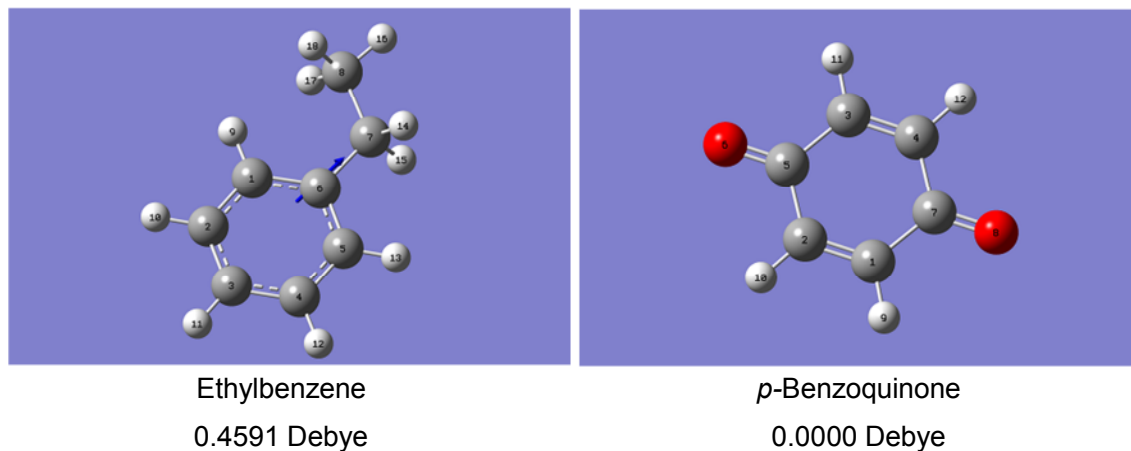


Figure 13 双極子モーメントの計算例

Gaussian09 を用いて B3LYP/6-31G(d,p) レベルで算出した双極子モーメントを分子モデル上に矢印で示す。炭素と水素からなる Ethylbenzene では非常に小さいながらも 0.4591 Debye という値を示すが、p-Benzoquinone ではカルボニルの強い双極子モーメントが分子の高い対称性のため相殺され、分子全体としては非常に小さな値となる。

Lipinski's rule of five

Hydrogen bond donor(-OH,-NH) < 5

Hydrogen bond acceptor < 10

Molecular weight < 500

Log *P* < 5

Figure 14 Lipinski's rule of five

Oral bioavailability の予測に利用される経験則。5 あるいは 5 倍数が多いため、Lipinski's rule of five と呼ばれる。⁶³⁾このように双極子モーメント以外の「極性」の表現も実際に利用されている。CA Lipinski, *Adv. Drug Del. Rev.* 1997, 23, 3

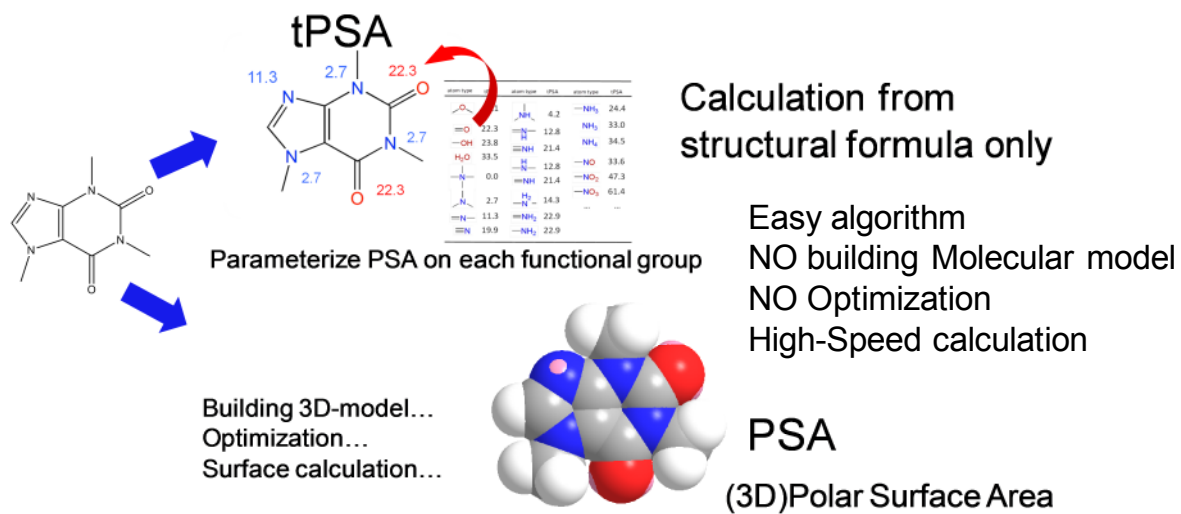
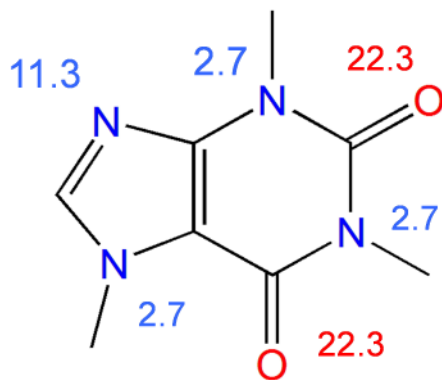


Figure 15 tPSA による PSA の高速計算

tPSA では窒素・酸素を含む官能基の PSA をパラメータ化することで分子モデルを構築することなく、構造式から高速に PSA を算出することを可能にしている。







$$\text{tPSA} = 22.3 + 22.3 + 11.3 + 2.7 + 2.7 + 2.7 = 64.0(\text{\AA}^2)$$

Figure 16 tPSA 算出例 (caffeine)

tPSA は Table 1 に示された窒素・酸素を含む官能基の部分 tPSA の合計として算出される。

Table 1 本研究で使した部分構造 tPSA パラメータ

atom type	tPSA	atom type	tPSA	atom type	tPSA
	14.1		4.2	$-\text{NH}_3$	24.4
$=\text{O}$	22.3	$=\text{N}-\text{H}$	12.8	NH_3	33.0
$-\text{OH}$	23.8	$\equiv\text{NH}$	21.4	NH_4	34.5
H_2O	33.5	$-\text{N}-\text{H}$	12.8	$-\text{NO}$	33.6
	0.0	$=\text{NH}$	21.4	$-\text{NO}_2$	47.3
	2.7	$-\text{N}-\text{H}_2$	14.3	$-\text{NO}_3$	61.4
$=\text{N}-$	11.3	$=\text{NH}_2$	22.9
$\equiv\text{N}$	19.9	$-\text{NH}_2$	22.9		

第4節 約600件の実測値に基づいた試料適応性評価

本節では、DART・ESI・FAB について、実験結果に基づいてイオン化法試料適応性特性評価を行った。初の実験結果に基づく極性-分子量によるイオン化法試料適応性チャートの作成を試みる。

○実験方法

DART・ESI・FAB を用いて in-house 高分解能質量分析試料ライブラリを測定し、未検出(ND)となった試料を比較した。本稿における実験は以下のイオン化法・質量分析装置を用いて、測定はすべてポジティブモードで実施した。

・DART - orbitrap MS:

Exactive Plus(Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)を付属標準 ESI にて較正した後、イオン源を DART-SVP(IonSense, Saugus, MA)に換装した。DART ガスにはヘリウムを採用し、その温度を 350°C, あるいは 500°Cとした。試料が固体で提供された場合には少量のクロロホルム(和光純薬(株), 大阪)に溶解し、溶液試料はそのままヘマトクリット毛細管(エルマ販売(株), 東京)に吸引させて DART ガス流に接触させた。分解能を 70,000(full width at half maximum: FWHM) @ m/z 200 に設定し、質量誤差 5ppm 以内で分子関連イオンピークを検出した。

・ESI - TOF MS:

JMS-T100CS(日本電子(株), 東京)と付属 ESI イオン源を使用した。その際のイオン化電圧を 2kV とし、分解能は全域で約 6,000(FWHM)とされる。試料溶液は高速液体クロマトグラフィー用ポンプ: LC-10ADVP((株)島津製作所, 京都)と 7725i 型インジェクタ(Rheodyne, Rohnest Park, CA)を用いたフローインジェクション系を用いて導入した。試料はメタノール(MeOH)(和光純薬(株), 大阪)溶液とし、移動相として MeOH を流速 0.2 mL min^{-1} で送液しイオン源に導入した。その際、試料濃度をドリフト較正用内部標準物質: 0.03%トリフルオロ酢酸ナトリウム⁶⁹⁾ 90%メタノール水溶液 5 μL と同程度のイオン強度に調整した。質量誤差が 5ppm 以内である分子関連イオンピークを検出した。

・FAB-sector MS

JMS-SX102A(日本電子(株), 東京)および JMS-BU25(日本電子(株), 東京)を用いた。加速電圧をそれぞれ 10kV, 2.5kV とし、キセノンを FAB ガス, 3-ニトリルベンジルアルコール(NBA)(東京化成工業(株), 東京)あるいはグリセロール(東京化成工業(株), 東京)をマトリックスとして使用した。いくつかの試料においては $[\text{M} + \text{Na}]^+$ を誘導するためヨウ

化ナトリウム(関東化学工業(株), 東京)溶液を添加した. FAB-sector MS においては整数質量のみ測定した.

- in-house 高分解能質量分析試料ライブラリ

第 2 章第 2 節で作成した試料ライブラリを用いた. 本ライブラリに含まれる試料はすべて測定依頼者より本研究への使用許諾が得られている.

○結果と考察

- 検出イオンと試料検出率

DART についてはプロトン付加イオン($[M + H]^+$)あるいはアンモニウム付加イオン($[M + NH_4]^+$)⁷⁰, ESI については $[M + H]^+$ あるいはナトリウム付加イオン($[M + Na]^+$), FAB については主として $[M + H]^+$ 一部ヨウ化ナトリウムを添加したものについては $[M + Na]^+$ を検出した.

試料検出率は FAB が最も高く, 98.6%であり 588 試料中 580 試料の検出に成功した. DART および FAB の試料検出率は FAB に対して僅かに低く, それぞれ 96.3%と 96.4%という値を示した(Table 2). また試料ライブラリの 92.0%の化合物は DART, ESI, FAB すべてのイオン化法で検出されたことが示された.

- 極性-分子量チャートによるイオン化法試料適応性評価

第 2 章第 2 節 Figure 10 に示した in-house 高分解能質量分析試料ライブラリについて, 提供された構造式をもとに tPSA(第 2 章第 3 節参照)を算出した. Figure 17 に x 軸を分子量, y 軸を tPSA としたライブラリの極性-分子量分布を示す. ライブラリは質量と同様に広い極性分布を持つことがよみとれ, ライブラリの平均 tPSA は 62.14 と算出された. tPSA を用いることにより大量の化合物の極性分布を短時間で評価することが可能であることが示された.

次に, Figure 17 に示した in-house 高分解能質量分析試料ライブラリの tPSA-MW プロットをもちいて DART, ESI, FAB それぞれのイオン化法試料適応性評価を行った. ただし大部分の化合物はすべてイオン化法で検出されたため除外し, 各イオン化法で未検出(Not Detected: ND)となったものについてプロットした(Figure 18). この結果によると試料検出率において DART と ESI は拮抗した値を示しているが, ND となった試料の特性は全く異なることがよみとれる. DART において ND となった化合物は MW > 800 に集中している. 対症的に ESI においては MW < 400, tPSA < 60 の低分子量・低極性領域に ND が集中していた. 試料群を MW > 800 に限定(全体の 97.1%)すると DART の試料検出率は FAB と同程度(98.3% vs. 98.6%)となり, さらに試料群を MW > 600 に限定(全体の 87.4%)すると DART は最も高い試料検出率(99.3%)を示す(Table 2). このことから DART は低分子を得意としており, 高分子量化合物を苦手としている特性がよみとれる. DART はそのイオ

ン化機構から APCI の一種であると考えられる。APCI では試料の気化は熱に依存しており、DART においても DART ガス(準励起状態ヘリウム)流の温度に依存すると考えられる。本実験において DART ガス温度 350° C では ND であったが、500° C では観測可能であった試料が散見された。一般的に分子量が大きくなれば化合物は気化しにくくなると考えられ、これはイオンの検出が化合物の気化に依存したと考えられる。DART においては分子量の大きい化合物は熱気化しない、あるいは気化する以前に熱分解されるため不利であると考えられる。

一方、ESI で ND となった試料数は DART のそれと近いものの、その特性は全く異なり、低分子量・低極性に集中している。ESI では試料分子はイオン化の過程においてプロトンあるいはナトリウムの付加を受ける。これらの付加反応は分子表面上の極性領域で生じると考えられるため、ESI において極性面積の少ない化合物は ND となりやすいと推測される。しかしながら、tPSA < 60, MW < 400 の領域であっても ESI で検出される化合物は多い。Kruve らは $[M + Na]^+$ の形成にはキレート形成が重要であるとしており⁷¹⁾、安定な付加イオン形成に関わる高次構造の影響も考えられる。

また、本実験では FAB がもっとも高い試料検出率を示した明確な理由を見つけることはできなかった。DART および ESI が大気中でイオン化を行ういわゆる ambient ion source であるのに対し、FAB は真空中でイオン化するという点で本質的に異なり、この差異が重要であると考えられる。

本研究により作成された各イオン化法で ND となった試料の tPSA-MW による 2 次元プロットは、初めて実際のデータに基づいて作成された極性-分子量イオン化法試料適応性チャートでもある。⁷²⁾ これまでの想像図⁵¹⁻⁵⁴⁾ と大きく異なるのは、91.7%にものぼる試料の大半がすべてのイオン化法で観測されたため、本研究では各イオン化法の特性が不向きな領域として表現されていることである。またこの極性-分子量イオン源適応性チャートは初めての実用可能な数値・単位が記載されたイオン化法選択チャートでもある。第 2 章第 3 節で述べたように tPSA は簡易で迅速に極性計算が可能であり、測定対象の極性を事前に検証することが可能である。

実践的に重要な情報は DART と ESI の苦手とする領域が重なっていないことである。これは DART と ESI が相補的に利用できることを示しており、この 2 つのイオン化法を有していれば Figure 17 の領域内であればほぼすべての試料が分析可能であることを示している。

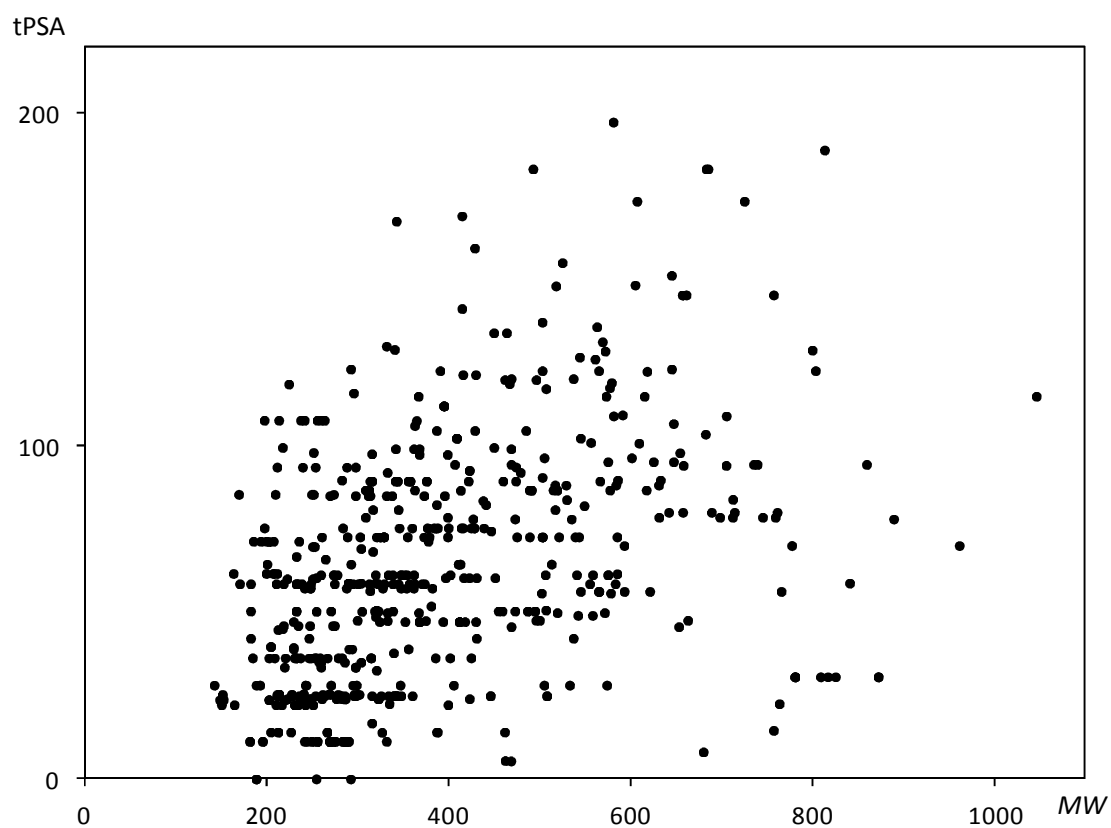


Figure 17 in-house 高分解能質量分析試料ライブラリの極性-分子量分布図

第2章第2節で作成した in-house 高分解能質量分析試料ライブラリの 588 試料について、極性に tPSA を用いて極性-分子量分布図を作成した。分子量は 150 から 1000 程度まで、tPSA は 0 から 200 まで幅広く分布した。⁷²⁾ Reproduced from N. Sugimura et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 91 (2015). Copyright SAGE Publishing 2015.

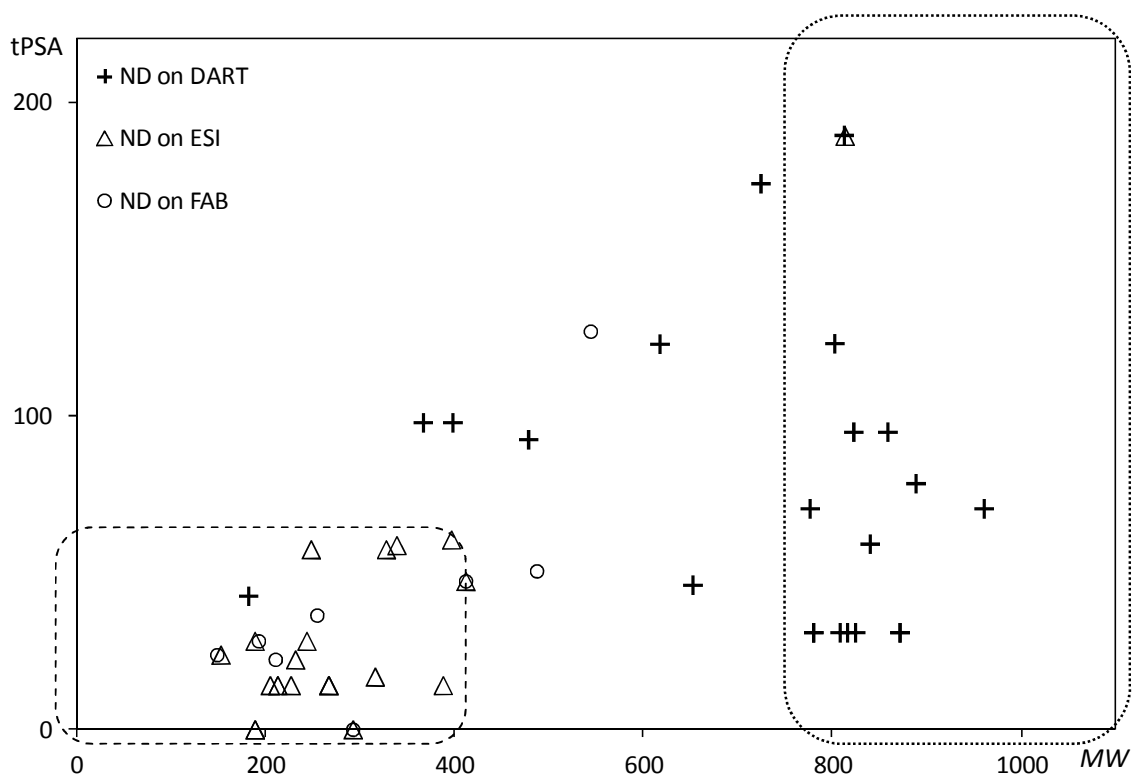


Figure 18 各イオン化法におけるND試料分布

Figure 17 のプロットからすべてのイオン化法で検出された試料を除き、DART・ESI・FABでNDとなった試料のみをプロットした。これにより、MW > 800 にDARTでNDとなった試料が、tPSA < 60, MW < 400 にESIでNDとなった試料が分布していることがよみとれた。本図は初めて実際の測定結果に基づいて作成された極性-分子量2次元イオン化法試料適応性チャートであり、加えて単位・数値も記入されていることから初めてのイオン化法選択実用可能なチャートでもある。また、DARTの苦手とする領域とESIの苦手とする領域は重なっておらず、この2つのイオン化法は相補的に利用できることも示している。⁷²⁾ Reproduced from N. Sugimura et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 91 (2015). Copyright SAGE Publishing 2015.

Table 2 各質量領域での試料検出率(%)

Ion source	MW range		
	Over all	MW < 800	MW < 600
DART	96.3	98.3	99.3
ESI	96.4	96.5	96.3
FAB	98.6	98.6	98.5

第5節 公開データベースを用いたイオン化法実績評価

第2章第4節では in-house 高分解能質量分析試料ライブラリを用いた実測結果から、DART・ESI・FAB の試料適応性について tPSA を極性とした極性-分子量 2次元イオン化法試料適応性チャートとして表現することに成功した。

本節ではさらにこの retrospective な手法を拡張し、実際に質量分析を行うことなく公開データベースの情報から同様にイオン化法試料適応性を導くナレッジベース解析を試みた。イオン化法には現在の主流である ESI に加え、DART に相当する APCI, さらに分子量・極性の小さい分子に適応されていると考えられる EI および CI を選択し、その実績を比較した。

○実験方法

・データベース

日本質量分析学会の公式質量分析データベース: mass bank (<http://www.massbank.jp/>)⁷³⁾ を利用した。EI (entry: 10575) ・ CI (entry: 750) ・ APCI (entry: 550) ・ ESI (entry: 4093) の各イオン化法のエントリーからランダムに 200 エントリーを抽出した。加えて各イオン化法のエントリー中から分子量の大きい 50 エントリーを抽出し、各イオン化法 250 エントリー、合計 1000 エントリーを抽出した。

・極性評価

本章では議論を単純化するため極性として定義されている双極子モーメントを用いることとした。

上記で抽出した 1000 エントリーに対し、SMILES 表記で示された構造情報から Chem3D (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA) を用いて分子モデルを構築した。この分子モデルに対して Gaussian 09 を用いて PM6⁷⁴⁾ をハミルトニアンとした半経験的分子軌道法による構造最適化を行い双極子モーメント (Debye) を算出した。

○結果と考察

・公開データベース: MassBank

世界初のマスマスペクトル公共データベースであり、2008 年より日本質量分析学会の公式データベースとして採用されている。分散型データベースであり、国内外様々な研究組織からイオン化法、質量分析装置、測定方法別にマスマスペクトルが収録されており、インターネットを介して公開されている。2015 年 2 月 27 日時点で 41092 件のエントリーがあり、第2章第2節で建造した in-house 高分解能質量分析試料ライブラリに対してデータ数が多いこと、MS/MS 解析データが利用可能であること、(自施設で保有していない)

様々なイオン化法・質量分析装置のデータが得られることが特徴であると言える。しかし、その一方では同一のイオン化法・装置であっても測定施設・実験者が異なり、必ずしも実験条件が一致していない。

対して、第2章第2節で建造した in-house 高分解能質量分析試料ライブラリは単一の実験施設で得られ、実験条件が同一であり、実験者も限られることから極めて質の高い均一なデータベース・ライブラリであると評価することができる。加えて、約 600 件というエン트리数も単一の実験施設から得られた実験数としては多いと評価できる。

各イオン化法についてのエン트리数を比較すると、EI については 10575 件と極めて多く、最初に実用化され最も長く使われてきたという歴史的な背景が考えられる。一方では ESI は 90 年代に普及した比較的新しいイオン化法であるにもかかわらず 4093 件のエンントリーがあり、実績の多いイオン化法であることが理解できる。CI と APCI に関しては共に 1000 件に満たないエンントリー数であり、特に CI については現在あまり選択されることのないイオン化法でもあり、今後エンントリー数が増えると予測するのは難しい。APCI については DART をはじめ今後普及することも考えられるが、ESI ほどの実績を期待するのは難しい。いずれの場合においても 200 件のランダム抽出+分子量の大きい 50 エントリーは現実的な抽出数であると考えられる。

・極性-分子量による各イオン化法の試料適応性

Figure 19 に極性に双極子モーメントを用いた極性-分子量 2 次元試料適応性チャートを color density graph として示す。

EI において高密度領域(赤色)は MW120-220, 1.2-3.6 Debye, 低密度領域(黄色)は MW48-1350, 0.0-10.6 Debye を示した。CI においては高密度領域が MW80-280, 0-2.9 Debye, 低密度領域は MW70-1360, 0-12.6 Debye, APCI においては中密度領域が MW190-340, 3.0-6.0 Debye, 低密度領域が 0.2-17.3 Debye に分布した。ESI において中密度領域は MW180-240, 3.8-5.0 Debye, 低密度領域が MW83-900, 0.2-17.3 Debye, 全体としては MW65-1830, 0.4-30.0 Debye に広く分布している。

Figure 19 は印象に基いて描かれた想像図⁵⁰⁻⁵⁴⁾ではなく実際の測定に基いて作成されたものである。実際に EI・CI においては低分子量・低極性領域に集中しており、それに対し APCI・ESI は分子量・極性ともに大きな値まで分布している。しかしながら MassBank には APCI において MW1000 以上のエンントリーはなく、ESI においても MW2000 以上のエンントリーがない。アクリル酸メチルの測定例では APCI で MW1500 以上、ESI では MW2000 以上の測定例もあり⁷⁵⁾、これらの値がイオンとの試料適応限界ではない。つまり、Figure 19 に見られる結果は MassBank が元来有している試料分布に強く依存している。

第2章第4節においては同一試料群を用いて直接的にイオン化法試料適応性比較を行

った。そのため各イオン化法の試料適応性を明確に比較することが可能であった。しかし、本節においては各イオン化法ごとに異なる試料群を測定している。さらに各エントリーともイオン化法試料適応の限界を見極める目的はなく、予め試料に対して適切と考えられるイオン化法を選択していると考えるのが自然である。このため、Figure 18には各イオン化法の適応限界は示されておらず、イオン化法試料適応実績として評価されるべきものであると考える。

しかしながら、それでもなお各イオン化法の実績が提示されているため、イオン化法選択の参考とはなり得るものである。各イオン化法のオーバーラップが大きいという第2章第4節の結果を踏まえると「より好ましいイオン化法を選択」には適していると考えられる。

以上のから本節の公開データベースの情報をを用いるナレッジベース手法では各イオン化法の実績を示す事にとどまるが、イオン化法選択の参考なりうる情報を提供したと言える。⁷⁶⁾

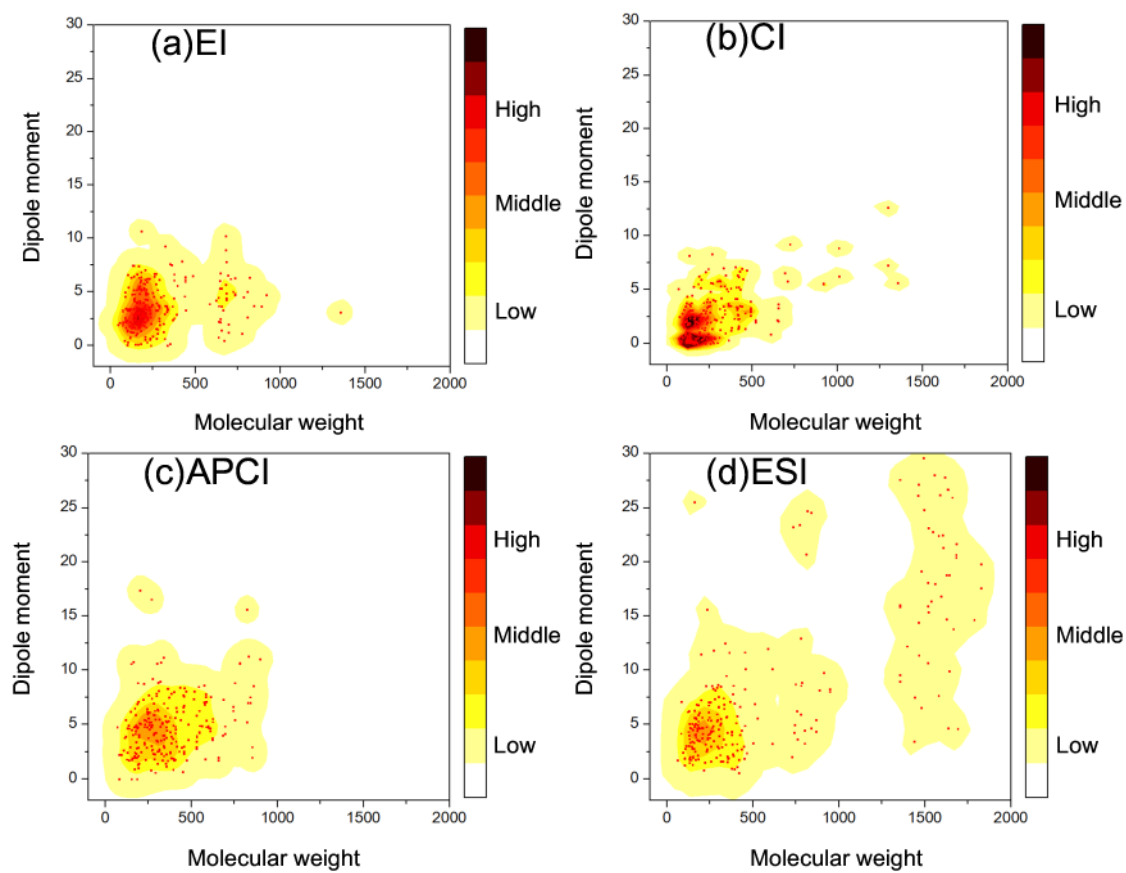


Figure 19 MassBankに見られる各イオン化法の試料適応性

EI (a), CI (b), APCI (c), ESI (d) 各イオン化法についてランダムに 200 エントリー+分子量の大きい 50 エントリー(合計 1000 エントリー)についての双極子モーメントを極性とした極性-分子量プロット. ⁷⁶⁾

第6節 結語

本章では2つの手法を用いてイオン化法の試料適応性を評価した。第4節においては約600件の試料をDART・ESI・FABにより測定し、第5節においてはEI・CI・APCI・ESIについて公共データベースのエントリーについて解析した。その結果、第4節においては各イオン化法の試料適応性をNDがみられる領域として、第5節においては各イオン化法の実績としてイオン化法試料適応性を表現することができた。これまでも第2章第1節 Figure 9 にみられるような極性-分子量による2次元イオン化法試料適応性チャートは随所で見られたが、実測に基いて作成されたものはなくこれらはすべて想像図であった。それらに対し本研究で得られた2つの極性-分子量による2次元イオン化法試料適応性チャートは一線を期すものであり、共に実際の測定結果に基づき数字・単位の記載された実用に堪えるものである。ただし、その性格は異なり、第4節で作成されたものは各イオン化法が不得手とする領域を示し、第5節で作成されたものは各イオン化法の実績を示すものである。

DART・ESI・FABのイオン化法試料適応性については、FABが著しく高い試料検出率(>98%)を示した。DARTおよびESIはFABに対してわずかに低い試料検出率(>96%)を示した。588件の試料中539試料(91.7%)はDART・ESI・FABすべてのイオン化法で検出されたことから、各イオン化法の試料適応特性はNDとなった試料として現れ、DARTは分子量の大きい(MW > 800)領域を、ESIは分子量が小さく(MW < 400)極性の低い領域(tPSA < 60)を不得手とすることが明らかになった。また、FABは高い試料検出率に加え、個液・濃度・溶媒不問であり、さらにキャリアオーバーが少ないというハンドリング特性からも第一選択肢として初心者にも推奨されるイオン化法である。しかし、FABはセクター型質量分析器と組み合わせられることが多く、経済性・装置体積から新設・維持が難しいのが実情である。このような場合では標準的なイオン化法であるESIにバックアップとしてDARTを用意しておくことで、in-house高分解能質量分析試料ライブラリに含まれる領域であればほぼすべての化合物のイオン化が可能であることを示している。⁷²⁾

MassBankのエントリーから抽出したEI・CI・APCI・ESIの実績については、既に測定が行われた時点で実験者によって適切なイオン化法についての判断がなされていると考えるべきであり、各イオン化法の実績であることに加え実験者の判断が含まれていると考えることができる。実験者の判断を抽出したことは画期的であり、自ら実験をすることなく熟練者の思考を模倣する可能性を持つ⁷⁶⁾。

また第5節においては極性として双極子モーメントを、第4節においては第3節で検討した結果tPSAを採用した。双極子モーメントは、極性という用語本来の定義ではある。しかし、双極子モーメントを得るには分子モデルを構築し分子軌道計算あるいは分子力学計算を用いて構造最適化した後に算出する必要があるため、煩雑であり時間的にも要

求が高い。加えて、分子の対称性の影響を受けるため付加イオンを形成するのに十分な部分的極性を有していたとしても過小評価される可能性は否めない。また、 $\log P$ は実効性の高い極性ではあるが、実験的に求める必要がある。tPSAは構造式から極めて単純なアルゴリズムにより算出されるが、付加イオンを形成する潜在的な極性表面積を求めることが可能である。質量分析におけるイオン化についてtPSAは第4節において機能していることから実用的であると言える。

第3章 ESI における付加イオン選択性

第1節 諸言

Electrospray Ionization (ESI)^{27, 28)}は90年代に普及した比較的新しいイオン化法であるにもかかわらず、第2章第5節で示したデータベースのエントリー数にもみられるとおり、現在最も普及したイオン化法の一つとなっている。さらに液体クロマトグラフィーと質量分析装置とのインターフェイスとしても優れており、メタボローム・ケミカルバイオロジーなど生命科学分野では最も利用されているイオン化法の一つである。³⁻⁸⁾

ESI におけるイオン化は帯電残渣モデル・イオン蒸発モデルなどが提唱されているが、いずれの場合にもプロトン・アルカリ金属・アンモニウム等のカチオン付加した付加イオンが生成するとされている。^{27, 28, 77-81)} 書籍には主にプロトン付加イオン($[M + H]^+$)の生成について詳細に解説されており、実際に $[M + H]^+$ が観察される場合もある。^{77, 81)} しかし、プロトン以外の付加イオンが観測されることも多く、書籍等ではそれらの生成についてはあまり紹介されていないため、初心者の混乱を招く要因となっている。また、高分解能質量分析(HRMS)を測定する場合にも、本来の組成に元素が追加されるため付加イオンは合理的に説明されなくてはならない。メタノール(MeOH)を移動相とした ESI の場合、 $[M + H]^+$ に加えてナトリウム付加イオン($[M + Na]^+$)も多く観察される。 $[M + H]^+$ ・ $[M + Na]^+$ それぞれの検出強度に関する研究例はあるものの^{71, 81)}、これまで ESI 付加イオン選択性自体について研究された例はない。

そこで本章では MeOH を移動相とした ESI における付加イオン選択性を明確にし、付加イオン予測法を開発することとした。特に HRMS 測定における付加イオン情報の引用可能文献の提供を指向した。

第2節 実験方法

本研究では2つの独立した実験を行った。実験AではMeOHを移動相としたESI-TOFMSにおける付加イオン選択性を解析し、ESI付加イオン予測法を開発した。実験Bにおいては複数のESI-MS、実験Aとは異なるサンプルセットを用いてESI付加イオン予測法を検証した。本項における測定は全てポジティブモードで実施した。

• ESI - TOFMS (実験A・実験B)

JMS-T100CS(日本電子(株), 東京)とニードル電圧を2kVに設定した標準ESIイオン源(:直交系ジオメトリー)を使用した。超音波照射脱気処理を施したMeOH(和光純薬(株), 大阪)を移動相とし、LC-10ADVP((株)島津製作所, 京都)ポンプと7725i型インジェクタ(Rheodyne, Rohnest Park, CA)を用いたフローインジェクション系を用いて0.2mL min⁻¹でイオン源に導入した。試料はMeOH溶液とし、その際の濃度をドリフト較正用内部標準物質: 0.03%トリフルオロ酢酸ナトリウム⁶⁹⁾ 90% MeOH水溶液 5μLと同程度のシグナル強度(0.1-20 μM相当, 1-5 μL)に調整した。インジェクション時間は1.8-3 sec.程に相当し、水の最終濃度は5-8%と見積もられる。質量誤差5ppm以内にある[M+H]⁺・[M+Na]⁺を検出した。パルスインターバルは53μs, 飛行管長リフレクトロンを含み約2m, 分解能は全域で約6,000(HWHM)とされる。

• ESI - Orbitrap MS (実験B)

Exactive Plus (Thermo Fisher scientific, Fair Lawn, NJ)とアングル系ジオメトリーを持つ標準ESIイオン源を用いた。装置は付属較正プロトコールにて較正の後、ニードル電圧を3.8kVとし、分解能をm/z 200で70000(FWHM)とした。その際のスキャン速度は3Hzに相当する。試料はT-100CSでの測定と同程度のMeOH溶液とし、7725i型インジェクタとLC-20ADpV((株)島津製作所, 京都)ポンプを用いたフローインジェクション系により導入した。移動相として超音波照射脱気処理を施したMeOH, その送液速度を0.2mL min⁻¹とし、インレット・キャピラリー温度を320°Cとした。

• in-house 高分解能質量分析試料ライブラリ

実験Aでは第2章第2節で建造した試料ライブラリ(611件)から、ESIでNDだったエントリー、付加イオン以外の分子関連イオン(M⁺等)が検出されたエントリーを除いた540試料を母数とした。

実験Bにおいては、in-house 高分解能質量分析試料ライブラリと同様に2013年12月から2014年8月の期間中に早稲田大学・物性計測センターラボで受託したHRMS試料を用いた。同期間中、319件のHRMS測定が行われた。この内、後述する元素組成中に少な

くとも 1 つ以上の窒素原子あるいは酸素原子を含む 298 試料を母数とし, ESI - TOFMS, ESI - Orbitrap MS を用いて同日中に測定した.

これらの試料はすべて構造情報を非公開とする条件の下, 測定依頼者より本研究への使用許諾が得られている.

第3節 結果と考察

・実験 A

2012年6月から2013年3月までの期間中、ポジティブモードのESI - TOFMSにより540試料において付加イオンが観察された。611件中71件はネガティブモードで測定、ESI - TOFMSでNDあるいは付加イオンを生じないため本実験からは除外した。540試料のうち、480件は $[M + Na]^+$ として、92件は $[M + H]^+$ として、32件についてはその両方が検出された(Figure 20)。また、ナトリウム・プロトン以外の付加イオン(カリウム、アンモニウム等)は検出されなかった。

これら540件の試料について、検出されたイオンを第2章第3節で述べたtPSAを用いて極性-分子量プロットとして示す(Figure 21)。この結果から、tPSAが高い領域では $[M + Na]^+$ が優位に、低い領域では $[M + H]^+$ が優位に検出されることが示された。実際にtPSA > 80となる領域では96.0%において $[M + Na]^+$ が検出されており、 $[M + H]^+$ の検出率は0.6%、その両方が検出された試料は3.0%となった。対象的に $[M + H]^+$ はtPSA = 20, MW = 250付近の分子量・極性が共に小さい領域に集中した。

検出されたイオンとtPSAとの相関を明確にするためFigure 22に各tPSA領域で検出された付加イオンを帯グラフで示す。この結果から、大部分の $[M + H]^+$ はtPSA < 30の領域に集中していることがわかる。tPSAは分子上の窒素・酸素と窒素・酸素と直接結合している水素の表面積(\AA)の総和であり、このtPSA = 30\AA^2 の表面積は窒素ないし酸素を含む官能基1つあるいは2つに相当する。またtPSAは元素組成中の窒素あるいは酸素数の関数として捉えることができるため、Figure 21のプロットを窒素数($N = 0, N = 1, N > 1$)・酸素数($O = 0, O = 1, O > 1$)により再プロットした(Figure 23)。その結果、窒素数においては明確な相関は得られなかった(Figure 23(a))が、 $[M + H]^+$ が集中していた領域では $N = 1$ が多く見られた。それに対し、酸素数ではtPSAとの強い正の相関が得られた(Figure 23(b))。0 = 0の化合物はtPSA = 0-15, 0 = 1はtPSA = 15-30, 0 > 1はtPSA > 30に多く分布しており、窒素数酸素数それぞれの平均tPSAは $N = 0$ 72.0; $N = 1$ 55.0; $N > 1$ 65.9; $O = 0$ 17.4; $O = 1$ 26.7; $O > 1$ 77.0となり、tPSAは酸素原子の数に強く依存していることが理解できる。また、この結果から $[M + H]^+$ は0 = 0の化合物が集中する領域に多く分布していることがよみとれる。つまり、 $[M + H]^+$ として観測された化合物は元素組成中に窒素原子を含み、かつ酸素原子を含まない化合物であると推測される。この推測に基づいて元素組成を解析すると、 $[M + H]^+$ として観測された化合物の94.3%(50/53)が元素組成に窒素を含み酸素を含まない化合物であった。また、 $[M + Na]^+$ として観測された化合物の97.1%(472/486)が元素組成に酸素を含む化合物であった。

すなわち、MeOHと移動相としたESIにおける付加イオン選択性は「元素組成中に酸素を含む化合物は $[M + Na]^+$ として、元素組成中に酸素を含まず窒素を含む化合物は $[M + H]^+$

として観測される」と結論付けられる。これを Nitrogen-Oxygen rule (NO rule) と命名した。

・実験 B

続いて実験 A で導いた NO rule について異なるサンプルセット・複数の質量分析計で検証した。2013 年 12 月から 2014 年 8 月にかけて収集した受託 HRMS 試料 319 件のうち少なくとも 1 つ以上の窒素原子あるいは酸素原子を持つ 298 試料を母数とした。また実験 A で使用した ESI-TOFMS に加え、ESI のニードルジオメトリー、イオン寿命の全く異なる ESI - Orbitrap MS を加えた。

まず 298 化合物を NO rule に基づき、元素組成中に酸素を含む化合物 ($O \geq 1$): 281, 酸素を含まず窒素を含む化合物 ($N \geq 1, O = 0$): 17 にグルーピングした。ESI - Orbitrap MS においては全て化合物を検出することに成功したが、ESI - TOFMS においては 18 化合物が ND となった (Table 3)。 $N \geq 1, O = 0$ の化合物群については ESI - TOMS, ESI - Orbitrap MS とともにすべて試料において $[M + H]^+$ を検出した。また、一部において $[M + Na]^+$ も同時に検出した (Table 4)。 $O \geq 1$ の化合物群においては、ESI - TOMS では 92.4 % (246/263) の化合物の $[M + Na]^+$ が検出され、ESI - Orbitrap MS では 94.7 % の試料で $[M + Na]^+$ が検出された (Table 5)。

この結果から異なるサンプル群であっても NO rule は強く保存されていることが確認された。加えて、イオン寿命・ESI ニードルジオメトリーの全く異なる ESI - Orbitrap MS においても NO rule は正確に検出イオンを予測できた。ただし、 $[M + H]^+$ ・ $[M + Na]^+$ を同時に検出する場合を考慮すれば ESI - Orbitrap MS に対して ESI - TOFMS がより強く NO rule に従っており、これらは測定条件に依存すると考えられる。特に ESI - TOFMS においては CF_3COONa を内部標準物質として加えており、通常の ESI よりも Na^+ 濃度が高いと考えられる。また、直交型の ESI ニードルジオメトリーは感度面では不利であるため、イオン強度の弱いピークについては検出されにくい。この NO rule の本質は「分子上の窒素原子は H^+ を好み、酸素原子は Na^+ を好む」ということであるが、測定条件によっては多少のバイアスを生じるものと考えられる。今回見られた窒素と酸素の関係はいずれの定義にもよらないが酸・塩基の概念に近く、将来的にさらなる考察が期待できる。

All samples: 611

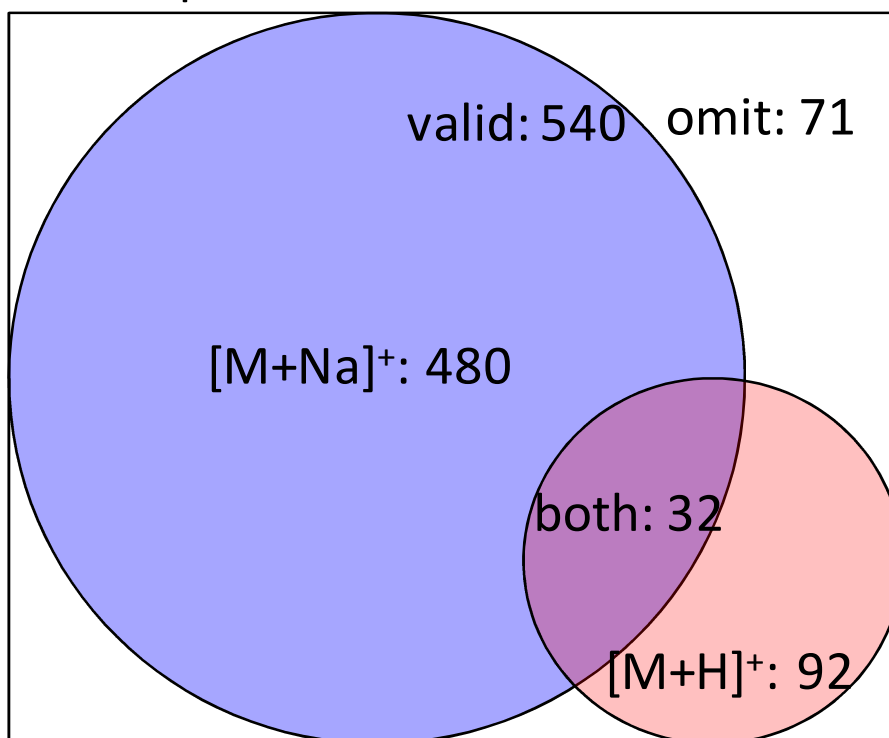


Figure 20 ESI - TOFMS で観察された付加イオン

本研究では第2章第2節で建造したライブラリ:611件中, ESIにおいて付加イオンを伴って検出された540試料を有効とした. 83.0%(448/540)は $[M + Na]^+$, 11.1%(60/540)は $[M + H]^+$, 5.9%(32/540)はその両方が検出された.⁸²⁾ Reproduced from N. Sugimura et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 725 (2015). Copyright SAGE Publishing 2015.

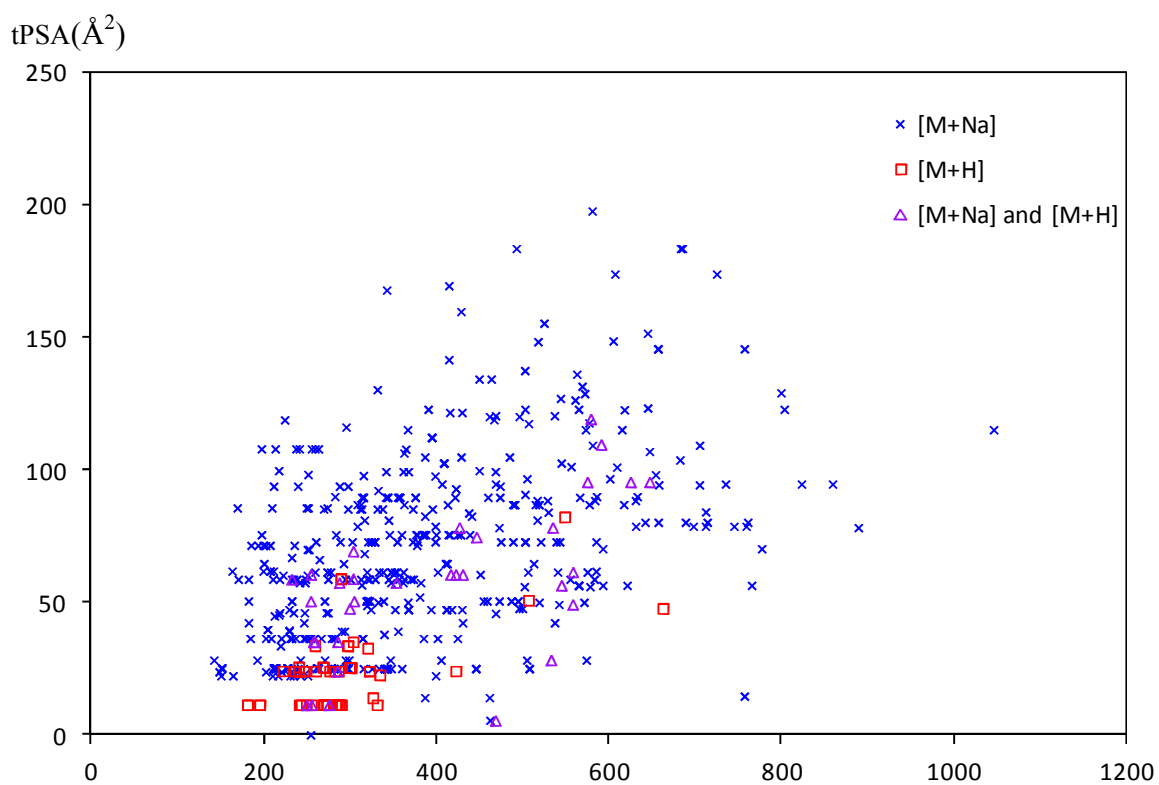


Figure 21 極性 - 分子量プロットにおける観測イオン分布

[M + H]⁺は tPSA = 20, 分子量 = 250 付近の領域に集中しているのに対して高 tPSA および高分子量領域では[M + Na]⁺が優位に観察された.⁸²⁾ Reproduced from N. Sugimura et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 725 (2015). Copyright SAGE Publishing 2015.

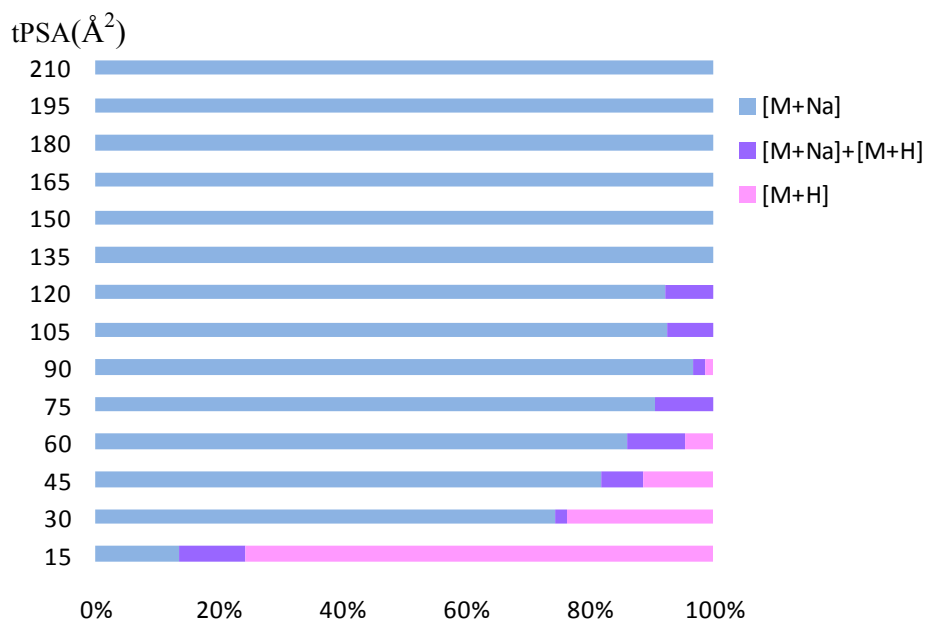


Fig. 22 各 tPSA 領域における付加イオン選択性

tPSA < 30 の領域では[M + H]⁺が優勢であるのに対し，[M + Na]⁺の選択性は tPSA とともに上昇しており，強い相関を示している．[M + Na]⁺選択性は tPSA とも強く相関している．⁸²⁾ Reproduced from N. Sugimura et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 725 (2015). Copyright SAGE Publishing 2015.

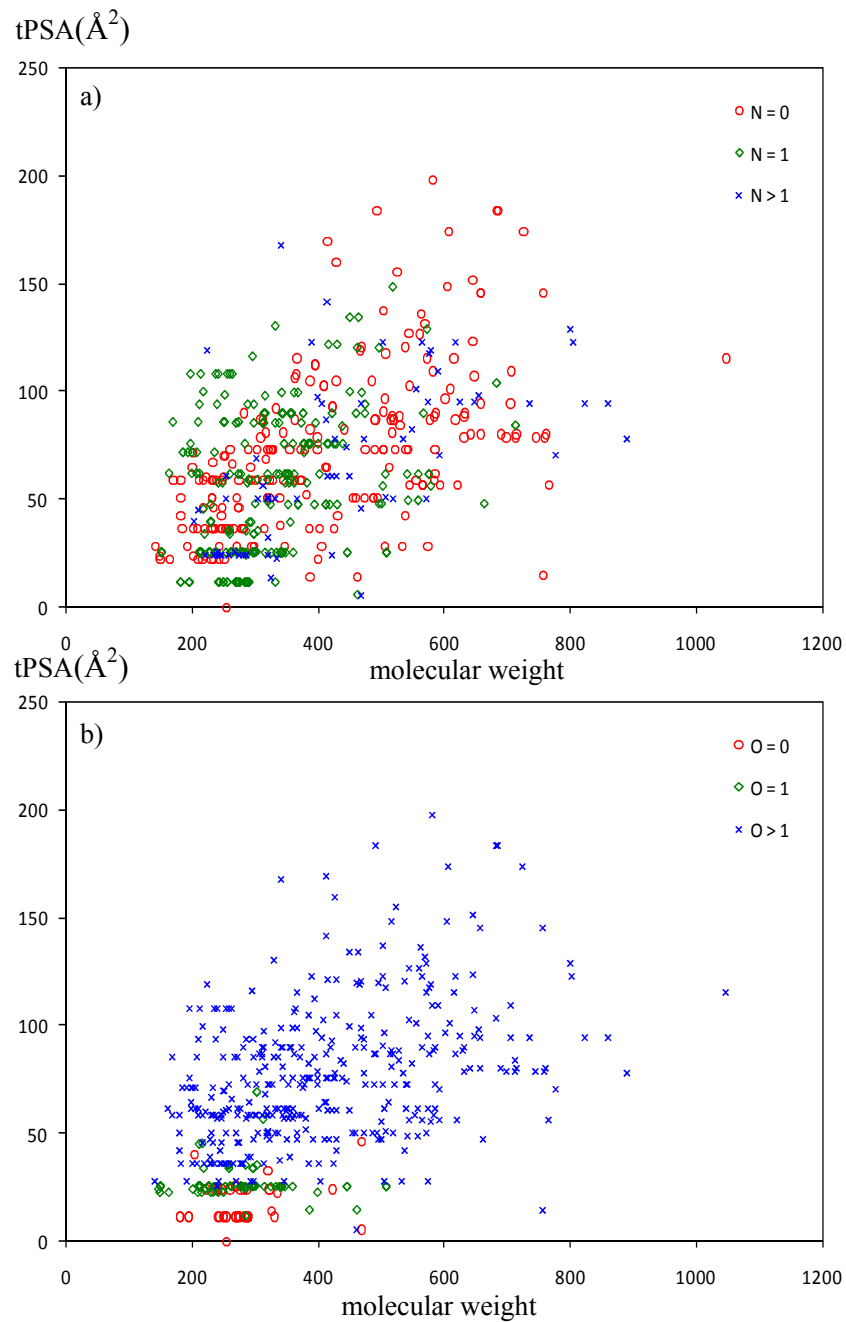


Figure 23 tPSA - 分子量プロット見られる窒素数・酸素数

元素組成中に含まれる窒素数・酸素数を用いて Figure 21 を再プロットした. a) 窒素数は明確な相関を示していないが $[M + H]^+$ が多く検出される領域には $N = 1$ が集中する. b) 酸素数については tPSA と明確な相関を示し, tPSA の上昇に伴い酸素数も上昇している.

⁸²⁾ Reproduced from N. Sugimura et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 725 (2015).
Copyright SAGE Publishing 2015.

Table 3 ESI - TOFMS, ESI - Orbitrap MS における試料検出数

sample group	number of samples	detected samples	
		JMS-T100CS	Exactive Plus
$N \geq 1, O = 0$	17	17	17
$O \geq 1$	281	263	281

Table 4 $N \geq 1, O = 0$ において検出されたイオンと検出数

detected ion(s)	JMS-T100CS	Exactive Plus
[M + H]	14(82.4%)	12(70.6%)
[M + H] and [M +Na]	3(17.6%)	5(29.4%)

Table 5 $O \geq 1$ において検出されたイオンと検出数

detected ion(s)	JMS-T100CS	Exactive Plus
[M + Na]	223(84.8%)	225(80.1%)
[M + H] and [M +Na]	20(7.6%)	41(14.6%)

第4節 結語

2 台の ESI - MS と 540 + 298 化合物を用いて検証した結果, MeOH を移動相とした ESI では元素組成中に酸素を含む化合物は $[M + Na]^+$ として, 元素組成中に酸素を含まず窒素を含む化合物は $[M + H]^+$ として検出される, という法則を導くことに成功し, これを Nitrogen-Oxygen rule (NO rule) と命名した.⁸²⁾ この NO rule は極めて正確に ESI における付加イオンを予測することが可能であり, 本質的には分子上の窒素は H^+ 付加を受け, 酸素は Na^+ 付加を受けることを意味している.

NO rule の発見は付加イオンの解釈に有効であり, HRMS における推定元素組成の妥当性を担保するものである. また, Na 付加イオン検出の頻度を示し, 一般的な付加イオンであることを示した.

この MeOH を移動相とした ESI における付加イオン選択性はこれまで統計的に論じられたことはなく, また $[M + Na]^+$ と $[M + H]^+$ の検出頻度についても議論されたことはなかった. 窒素と酸素に関する元素組成から付加イオンが決定されるという簡潔な法則ではあるが, 新規性の高い結果となった.

第4章 DARTにおける付加イオン選択性

第1節 諸言

近年、質量分析装置におけるイオン化法として大気圧下でイオン化する ambient ion source の開発が活発である。³⁹⁾ なかでも Direct Analysis in Real Time (DART)^{34, 35)} は 2005 年に Cody らによって開発されて以来、その汎用性、簡便性、市販されているという入手性の高さから急速に普及しており、食品¹¹⁻¹³⁾、安全保障¹⁶⁾、法科学^{14, 15)}、薬学^{76, 77)} など様々な分野で応用されている。第2章第4節では、この DART は ESI と相補的な試料適応性を示し、ESI と DART の組み合わせることにより、ほとんどの化合物をイオン化することが可能である事を示した。⁷²⁾ これは、高い試料検出率もつ FAB が入手困難となる中、質量分析関係者、特に高分解能質量分析 (HRMS) 測定を行う施設にとっては福音となる情報である。特に ESI は HRMS に用いるイオン化法として第3章において付加イオンの選択性も検討されている。

しかし、これまで DART については付加イオン選択性が検討されていない。ヘリウム (He) を用いた DART ではイオン化では準励起状態の He が生成し、これが大気中の水分をイオン化、さらに DART gas によって熱気化された試料がイオン化された水によってイオン化されると考えられている。^{34, 35, 50)} 最終的に $[M + H]^+$ を生成するが、実際には $[M + H]^+$ 以外の分子関連イオンを観察することもある。具体的にはポジティブモードの DART ではアンモニウム付加イオン ($[M + NH_4]^+$) を頻繁に観測する。⁷⁰⁾ 特にイオン強度が安定しにくい DART の実践においては観測すべきイオンを明確にする必要がある。また DART を HRMS 測定のイオン化法として利用することを想定した場合、付加イオンは合理的に説明されなくてはならない。⁸⁵⁾ 特にアンモニウムが付加する場合は有機化合物の主要構成元素である水素数・窒素数に変化を与えるため厳密に説明がなされなくてはならないと言える。

そこで本章では第2章第2節で建造した in-house 高分解能質量分析試料ライブラリを用いて DART 付加イオン選択性を検証した。

第2節 実験方法

本章の実験では試料ライブラリとして約 600 件の試料を DART で測定し、その付加イオンを検証した。実験は以下の条件で行った。

- DART - orbitrap MS:

Exactive Plus(Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)を付属標準 ESI にて較正した後、イオン源を DART-SVP(IonSense, Saugus, MA)に換装した。DART ガスには He を採用し、その温度を 350°C、350°Cで対象試料イオンを検出できなかった場合には 500°Cとした。固体試料は少量のクロロホルム(和光純薬(株), 大阪)に溶解し、溶液・液体試料はそのままヘマトクリット毛細管(エルマ販売(株), 東京)に吸引させて DART ガス流に接触させた。分解能を 70,000(HWHM) @ m/z 200 に設定し、質量誤差 5ppm 以内で分子関連イオンピークを検出した。

- in-house 高分解能質量分析試料ライブラリ

第2章第2節で建造した in-house 高分解能質量分析試料ライブラリ⁷²⁾(有効試料数 588/611 件)中、DART で ND となった試料、付加イオンを生成しなかった試料を除き 566 試料を母数とした。これらの試料はすべて構造情報を公開しないという条件の下、測定依頼者より本研究への使用許諾が得られている。

- モデル化合物

3-アミノキノリン(和光純薬工業(株)・大阪)および非医療用 edaravone^{87, 81)}(和光純薬工業(株)・大阪)、L-(-)メントール(東京化成工業(株)・東京)は購入して使用した。

- 量子化学計算

量子化学計算には Gaussian 09⁵⁷⁾を使用し、密度汎関数として B3LYP⁵⁸⁻⁶¹⁾、基底関数としてすべての元素に 6-31G(d,p)⁶²⁾を使用した。構造最適化計算の後、振動計算を行い収束と虚振動を含まない事を確認した。

第3節 結果と考察

・ DART において観察された付加イオン

第2章第2節で建造した試料ライブラリ(:有効数 588)中, 本章での実験においてポジティブモードの DART で検出できた試料数は 566 件であった. 主たる付加イオンはプロトンあるいはアンモニウムであったが, 8 試料は M^+ あるいはその他の分子関連イオンとして検出され, 付加イオン選択性を検証する本実験の目的からは外れるため除外した. 最終的な効試料数を 558 件とした.

558 試料中 82.8 % (462/558) では $[M + H]^+$ が, 47.0 % (262/558) では $[M + NH_4]^+$ が検出され, 28.2 % (166/558) ではその両方が観測された. $[M + NH_4]^+$ は全体の約半数で検出され, DART においては希ではなくむしろ一般的な付加イオンであると言える.

本研究では, 試料群を $[M + H]^+$ のみが検出されたグループ (Gr. $[M + H]^+$): 296, $[M + NH_4]^+$ のみが検出されたグループ (Gr. $[M + NH_4]^+$): 96, その両方が観察されたグループ (Gr. both): 166 に分類した (Figure 24).

・ 極性による評価

Gr. $[M + H]^+$: 296, Gr. $[M + NH_4]^+$: 96, Gr. both: 166 それぞれについて, 第2章第3節で導いた tPSA を用いて極性-分子量プロットに示す (Figure 25). tPSA, 分子量ともに Gr. $[M + H]^+$ < Gr. both < Gr. $[M + NH_4]^+$ という傾向を示したが, 明確ではなく, 第3章で示した ESI 付加イオン選択性評価 (Figure 21)⁸²⁾ に対しオーバーラップが極めて大きい. このことから極性および分子量は DART における付加イオン選択性の支配的な要因ではないことがよみとれる. しかしながら DART における Gr. $[M + H]^+$ は ESI における $[M + H]^+$ の領域を含んでおり一定の相関が認められる. これらの結果は DART における付加イオン選択性は, ESI における付加イオン選択性のように単純に元素組成に依存しているわけではないこと示唆しているものと考えられる.

・ 元素組成による評価

第3章の ESI における付加イオン選択性においては元素組成中の窒素・酸素が重要な役割を果たした.⁸²⁾ 本章においても同様に炭素 (C)・水素 (H)・窒素 (N)・酸素 (O) の主要 4 元素の平均組成, および分子量・tPSA の平均を比較した (Table 6). その結果から, $[M + NH_4]^+$ の選択性は分子量・tPSA・酸素数と相関があり, 窒素数とは逆相関が見受けられる. tPSA すなわち潜在的なイオン付加領域面積が分子量・酸素数とともに上昇することは自然なことであると考えられるが, 窒素数に関しては逆傾向にある. Figure 25 に各グループにおける窒素数・酸素数・試料数の 3次元プロットを示す. Gr. $[M + H]^+$ については窒素数 1 が最も多く比較的高窒素・低酸素領域に集中している. それに対して Gr. $[M + NH_4]^+$

では窒素 0 が稜線を形成し高酸素数まで分布を広げている。Gr. both はその中間の特性を示していると考えられる。これらのことから DART における付加イオン選択性についても、ESI と同様に元素組成中の窒素・酸素に相関があると考えられる。

・モデル化合物による評価

元素組成中の窒素・酸素の効果をさらに解析するため、モデル化合物を用いた DART-MS 測定・密度汎関数理論(DFT)を用いた量子化学計算を実施した。DART において $[M + NH_4]^+$ を検出する化合物としてメントール、 $[M + H]^+$ を検出する化合物として 3-アミノキノリン、その両方を検出する化合物としてエダラボンを選択した(Table 7)。いずれのモデル化合物においても計算上では $[M + NH_4]^+$ の形成が安定である結果が示されたが、しかし、明確なエネルギー差: $E(d) = | E([M + NH_4]_{\text{satble}}^+) - (E([M + H]^+) + E(NH_3)) |$ あるいは $E(d) = | E([M + NH_4]_{\text{satble}}^+) - E([M + NH_4]^+) |$ が算出された。 $[M + NH_4]^+$ が検出された場合、 $E(d)$ は極めて大きく $38.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ を示し、 $[M + H]^+$ が検出された場合には最も安定な $[M + H]^+$ と $[M + NH_4]_{\text{satble}}^+$ との $E(d)$ は $21.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ 程度ある。両方のイオンが観察された場合、最も安定な $[M + H]^+$ と $[M + NH_4]_{\text{satble}}^+$ との $E(d)$ もその中間となり $30.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ となった。また、エダラボンにおいては三級窒素へのアンモニウム付加体は安定構造を得ることができなかった。つまり、アンモニウム付加体とプロトン付加体とのエネルギー差が DART における付加イオン選択性に影響していると考えられる。

・アンモニウム親和力およびプロトン親和力による評価

モデル化合物の測定と DFT 計算から、最も安定な $[M + NH_4]^+$ と最も安定な $[M + H]^+$ とのエネルギー差と観測されるイオンに影響があることが示唆された。この結果に基づき、Gr. $[M + H]^+$ と Gr. $[M + NH_4]^+$ から代表的な化合物を抽出し、それぞれ付加イオンについて DFT 計算を行った。計算資源の制限からイオン付加サイトに関する議論を単純化する必要があり、それぞれのグループから窒素あるいは酸素原子を 1 つだけ含み、遷移元素を含まない化合物を抽出したところ、Gr. $[M + H]^+$ から 40, Gr. $[M + NH_4]^+$ から 5, 合計 45 化合物が抽出された。Gr. $[M + H]^+$ においては 80.0%(32/40) が元素組成中に窒素を含む化合物であり、20.0%(8/40) が酸素を含む化合物であった。それに対し、Gr. $[M + NH_4]^+$ においては抽出された 5 化合物すべてが組成中に酸素を含む化合物であった。これら 45 化合物に対して $E(d) = | E([M + NH_4]_{\text{satble}}^+) - (E([M + H]^+) + E(NH_3)) |$ を算出したところ明確な傾向が観察された(Figure 27)。組成中に酸素原子を含む化合物は窒素原子を含む化合物に対し、 $E(d)$ が大きい(Figure 27(b))。加えて、 $[M + NH_4]^+$ を観測した化合物は $E(d)$ が極めて大きく 40 kcal mol^{-1} を超える(Figure 27(a))。対して $[M + H]^+$ として観測された化合物の $E(d)$ は $16 - 34 \text{ kcal mol}^{-1}$ に分布している。さらに組成中に酸素原子を含んで $[M + H]^+$ として観測された化合物は $28 - 34 \text{ kcal mol}^{-1}$ に分布しており、これは $[M + NH_4]^+$ として観測された化合物と元素組成中に窒素を含んだ化合物の中間に位置する。

また、分子サイズと $E(d)$ に相関は見られなかった。エーテル構造などは大きい $E(d)$ を持つが傾向も観察された。過去に我々が報告した水のイオン化を伴わないアルゴンを用いた DART において観察された H/D 交換⁸⁹⁾、プロトンアフィニティと $[M + H]^+$ ・ $[M + NH_4]^+$ 選択性に関する実験結果⁹⁰⁾からも大気中のアンモニアと DART において形成される付加イオンは密接な関係にあると考えられ、今回得られた知見は DART における付加イオン選択性はアンモニウム付加体とプロトン付加体のエネルギー差に起因することを示している。

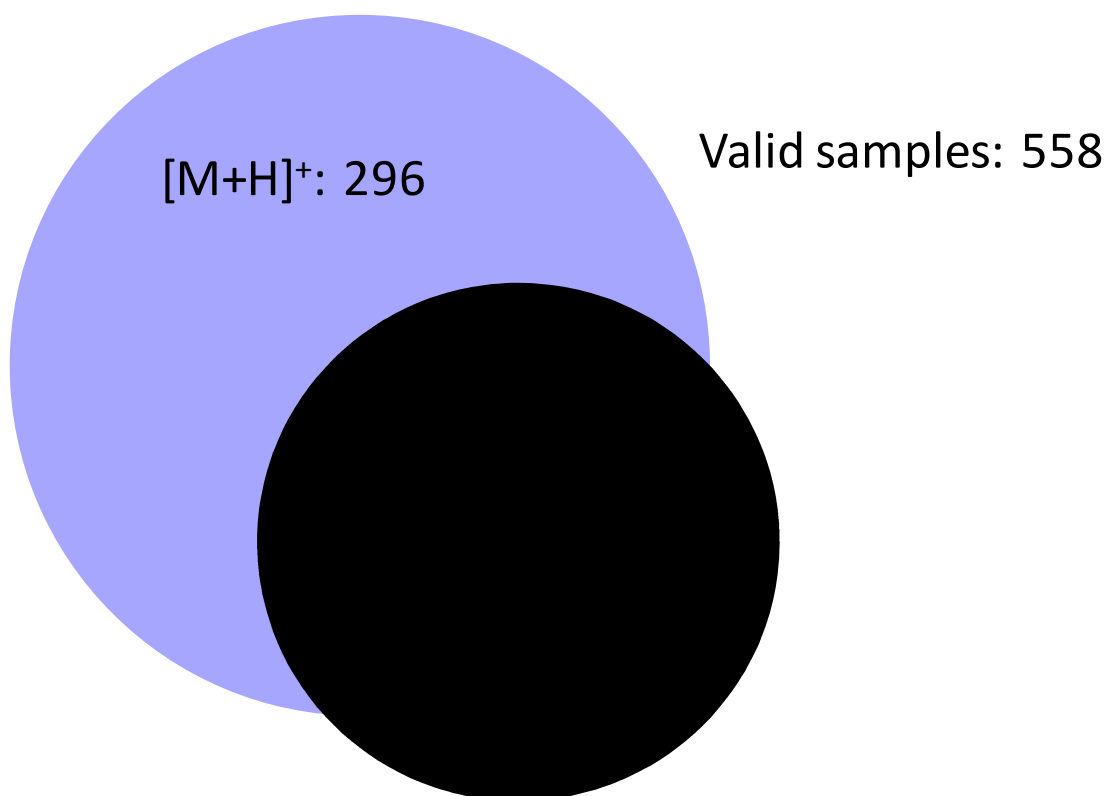


Figure 24 in-house 高分解能質量分析試料ライブラリにおいて観察された DART 付加イオン

大多数 (82.8%) の化合物において $[M + H]^+$ が検出され、 $[M + NH_4]^+$ は約半数 (47.0%) において観測された。DART においてアンモニウムは特殊な付加イオンではなく、一般的であると言える。⁸⁶⁾ 本試料群を Gr. $[M + H]^+$, Gr. $[M + NH_4]^+$, Gr. both の 3 つのグループに分けてさらなる解析を行った。

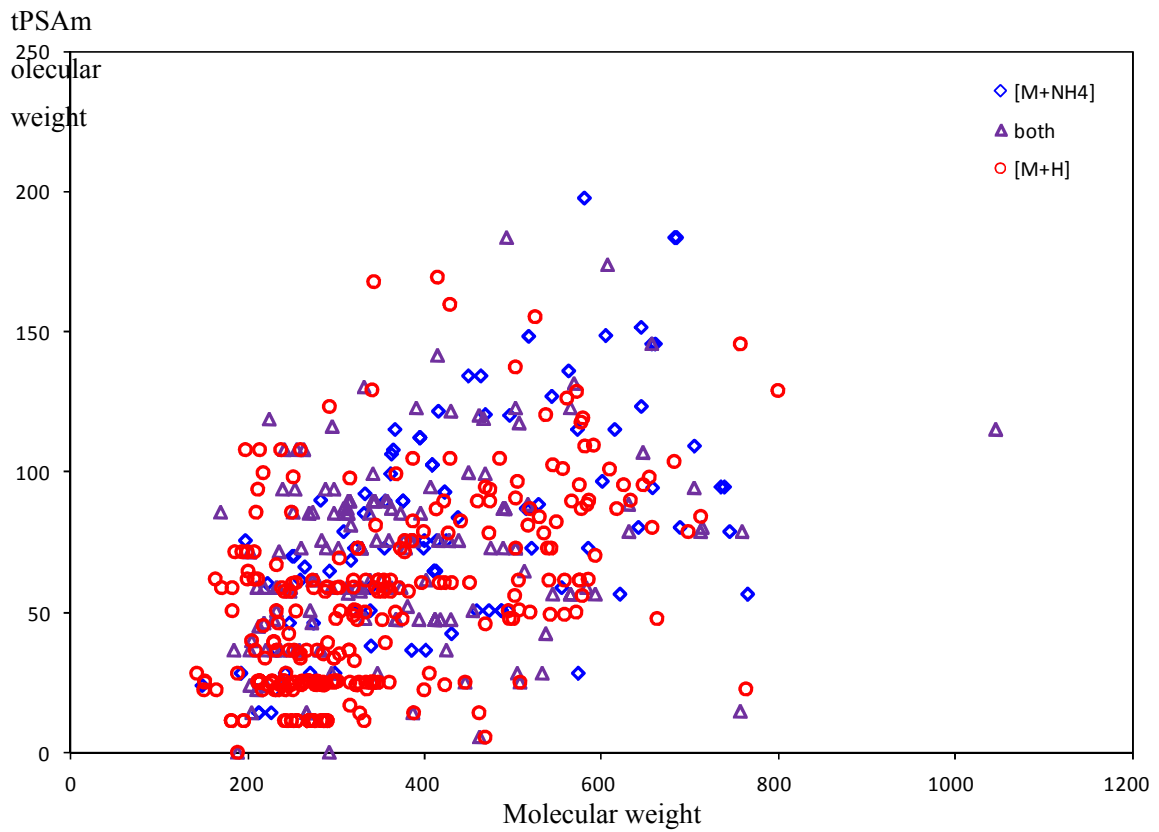


Figure 25 極性-分子量プロットに示された DART 付加イオン選択性

DART において観察された付加イオンを tPSA を極性として用いた極性-分子量 2 次元プロットとして示した.⁸⁶⁾ tPSA・分子量ともに大まかに Gr. [M + H]⁺ < Gr. both < Gr. [M + NH₄]⁺ という傾向を示したが、オーバーラップが大きくこれ以上の解析は難しい。

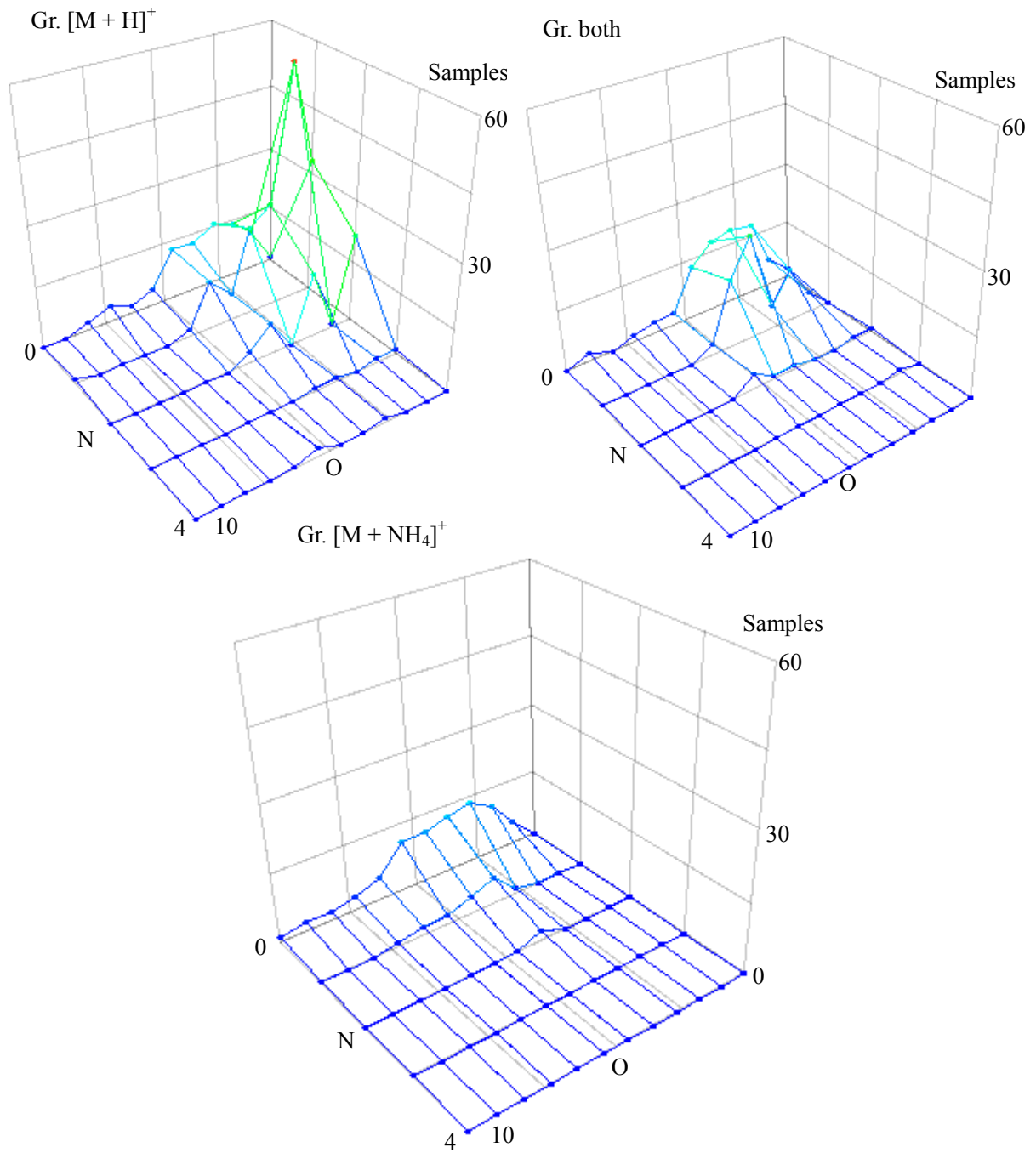


Figure 26 各グループにおける元素組成分布

Gr. $[M + H]^+$ においては $N = 1, O = 0$ が最も多いのに対し, Gr. $[M + NH_4]^+$ においては $N = 0, O > 1$ が最も多い. Gr. both はその中間の多く分布していることが見受けられる. ⁸⁶⁾

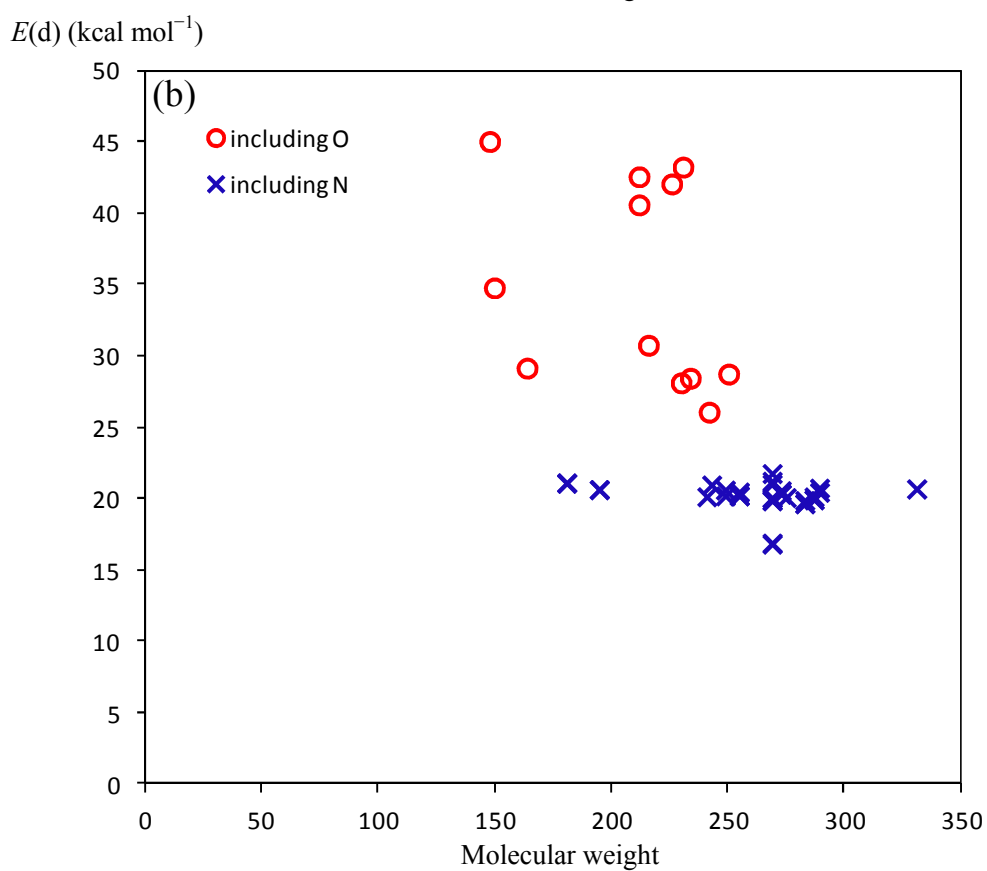
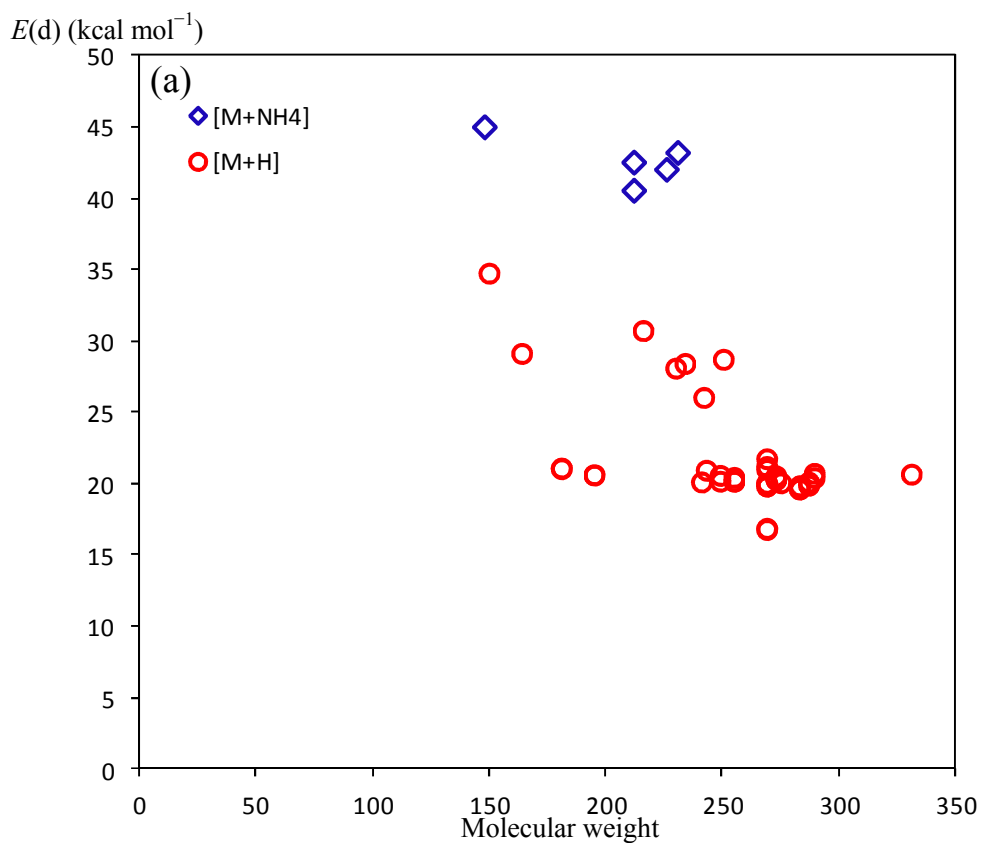


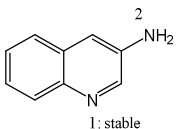
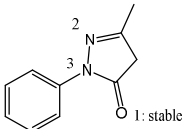
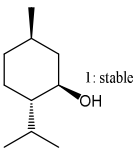
Figure 27 [M + NH₄]⁺と[M + H]⁺に見られるエネルギー差

B3LYP/6-31G(d,p) レベルの DFT 計算によって求めた $E(d) = | E([M + NH_4]^+) - (E([M + H]^+) + E(NH_3))$. Gr. $[M + H]^+$ ・Gr. $[M + NH_4]^+$ から元素組成中に遷移金属を持たず、窒素あるいは酸素原子 1 つを持つ化合物を抽出したところ, Gr. $[M + H]^+$ からは 40 化合物, Gr. $[M + NH_4]^+$ からは 5 化合物が選出された. (a) Gr. $[M + NH_4]^+$ として検出された化合物について注目すると $E(d)$ は 40 kcal mol⁻¹を超えた. (b)加えて, 酸素原子をもつ化合物の $E(d)$ は窒素原子をもつ化合物の $E(d)$ より大きく, $E(d) > 28$ kcal mol⁻¹に広く分布する. 対して窒素原子を含む化合物の $E(d)$ は 16-24 kcal mol⁻¹にとどまる.⁸⁶⁾

Table 6 各グループにおける平均元素組成

detected ion	sample	MW	tPSA	C	H	N	O
$[M+H]^+$	296	346.64	51.40	21.03	24.40	0.96	2.30
both	166	374.37	69.06	21.13	26.54	0.54	3.64
$[M+NH_4]^+$	96	435.46	92.43	24.86	32.83	0.21	4.57
overall	558	370.17	61.99	21.72	26.49	0.70	3.09

Table 7 各モデル化合物における付加位置とエネルギー差

compound	detected	position	adduct	$E(d)$ kcal mol ⁻¹
 1: stable	$[M+H]^+$	1	H	21.55
			NH ₄	0
		2	H	46.97
			NH ₄	18.55
 1: stable	$[M+H]^+$ and $[M+NH_4]^+$	1	H	30.59
			NH ₄	0
		2	H	31.57
			NH ₄	4.90
		3	H	37.00
			NH ₄	-
 1: stable	$[M+NH_4]^+$		H	38.61
			NH ₄	0

第4節 結語

モデル化合物を用いた付加イオン観測と DFT 計算, in-house 高分解能質量分析試料ライブラリ中の 558 試料についての DART 付加イオンの検証および選出した化合物の DFT 計算の結果, DART における付加イオン選択性は $[M + \text{NH}_4]^+$ と $[M + \text{H}]^+ + \text{NH}_3$ とのエネルギー差と相関することが示された.⁸⁶⁾ $[M + \text{NH}_4]^+$ は $[M + \text{H}]^+$ に対して極端に安定 (ex: $E(d) > A35 \text{ kcal mol}^{-1}$) な場合に観測されることが示された. また, $[M + \text{NH}_4]^+$ の安定化には元素組成中の酸素原子が関与しており, 分子中の酸素はアンモニウム付加を安定化させる効果を持つが, $[M + \text{NH}_4]^+$ を検出させるほどアンモニウム付加を安定させることができるのは一部であることが示された

これらの結果は, DART - MS の実践において探索すべき質量電荷比を明確にするものである. さらに DART を用いた HRMS 測定時における付加イオンの妥当性判断にも貢献するものである.

第5章 質量分析への量子化学計算の応用

第1節 諸言

第3章では、元素組成から ESI における付加イオン選択性を導くことに成功した。⁸²⁾ 一方、第4章、DART における付加イオン選択性は、大まかな傾向は示したものの単純な元素組成のみから導くことは困難であった。⁸⁶⁾ しかし、このような状況下でもモデル化合物と量子化学計算を活用し熱力学的な解析を加えることにより本質的な付加イオン選択性を導くことに成功した。このように量子化学計算は質量分析においても強力な解析手段となりうる手法である。安価に潤沢な計算資源が利用できるようになったことは計算化学が実用的な技術となることに大きく貢献しており、一昔前の中型計算機に匹敵する 100 Gflops 程度の計算資源が 10 万円程度の費用で購入できるようになった。現在では量子化学計算により、現実的な費用・時間で現実的な精度の物性予測が可能となっている。

本章では質量分析への量子化学計算の応用として、Nudged Elastic Band (NEB) 法⁹¹⁻⁹⁴⁾ によるフラグメンテーション解析を試みた。フラグメンテーション解析は気相イオン化学のみならず近年の生体分子解析においても重要な役割を果たしており、特にプロテオーム・メタボロームの重要な手法となっている。⁹⁵⁻⁹⁷⁾ 量子化学計算はフラグメンテーション経路探索においても重要な役割を果たしており、活性化エネルギーを意味する遷移状態 (Transition State: TS) は量子化学計算によってのみ形状を可視化することができる。しかし、この TS を求めるには TS、あるいはそれに極めて近い候補構造がなければ実質的に計算することは不可能であり、高度な技術を必要とする。このように TS を含む最小エネルギー経路 (Minimum energy path: MEP) 探索は技術的難易度の高い計算であるが、NEB 法を応用すれば、初期座標および終座標の入力のみから TS に近似した構造を含む最小エネルギー経路 (minimum energy pass: MEP) を算出することが可能である。NEB 法では開始座標から終座標に向けて原子を移動させ、任意の中間座標 (15~25 程度) 作成する。作成した中間座標を反応方向と直交方向にポテンシャル曲面に沿って最適化する (Figure 28)。

本章では反応としてキノンとフェノールを用いた。キノンは生体に関して重要な部分構造であり、⁹⁸⁾ 既に質量分析におけるフラグメンテーション機構が解明されている。^{99, 100)} 芳香族ケトンでは競争的に一酸化炭素が脱離することが知られており^{101, 102)}、律速段階として気相でのケト-エノール互変異性が生じることが知られている。¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾

第2節 実験方法

量子化学計算には Gaussian 09⁵⁷⁾を用いた. 明記のない限りすべての原子に対して DFT として B3LYP,⁵⁸⁻⁶¹⁾ 基底関数には 6-31G(d)⁶²⁾を用いた. NEB 計算には Reaction Plus Pro¹⁰⁶⁾を使用し, その際の補完座標数を 25 とした.

TS の探索には Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton (STQN)法¹⁰⁷⁾を用いて最適化の後, 振動計算を実行し虚振動数を確認した. さらに固有反応座標 (Intrinsic Reaction Coordinates: IRC) 計算^{108, 109)}を行い, 反応開始・終了座標に戻ることを確認した.

第3節 結果と考察

・ *p*-ベンゾキノンおよびフェノールからの中性一酸化炭素脱離における MEP 計算

カチオン種の *p*-ベンゾキノンから中性一酸化炭素(CO)フラグメントが脱離する気相反応(Figure 29)について最適化開始座標・終了座標間と補完座標を 25 とした NEB 計算のポテンシャルエネルギーを示す(Figure 30). NEB 計算では開始座標と終座標のみから MEP が求められ, 本反応からは 1 つ中間体と 2 つの鞍点(saddle point)を得た. この 2 つの鞍点は TS となり得るものであり, 通常, 初期座標および終了座標のみからの STQN 計算では得ることができないものである.

続いて NEB 計算により得られた中間体を終了座標および開始座標とした詳細な NEB 計算を行い, 連結した. 合計 50 座標からなる, エネルギープロファイルと分子構造変化を示す(Figure 31). このエネルギープロファイルでは 2 つのエネルギー障壁があり, それぞれ 5 員環形成(TS 1)と CO 基の脱離(TS 2)からなる. 5 員環形成に伴うエネルギー障壁は約 1.6 eV (36.9 kcal mol⁻¹)と見積もられ, 続く CO 脱離のエネルギー障壁は 0.6 eV (13.8 kcal mol⁻¹)程度と見積もられた. つづいてこの 2 つの鞍点が TS となりうるかを検証するため Gaussian 09 を用いて振動計算を行ったところ, 虚振動は 1 つであり TS に近い構造であると推測された. このように NEB 計算から初期座標と終了座標のみの入力でも TS に近い構造が得られることが示された.

さらに NEB 計算で得られた鞍点の座標を利用しコンベンショナルな TS 探索法である STQN 計算による TS 探索を行った. 理論上, NEB 計算では正確に TS が求められる保証はないが, STQN 法を用いることにより確実に TS を求める事ができる (table 8). その結果, TS 1・TS 2 共に STQN 法ではわずかに NEB 計算より低い値を得た. この STQN 法により求められた TS 1・TS 2 から IRC 計算を行った結果を Figure 32 に示す. Figure 31 と Figure 31 を比較すると NEB 計算は MEP を正確に再現しており, STQN 計算および IRC 計算の組み合わせは正確に MEP を導くのにに対して, NEB 計算では簡便・高速に MEP を導くことができる.

次にフェノールイオンからの CO 基脱離について NEB 計算を適応した. このフェノールイオンからの CO 基脱離においては律速段階として気相中でケト-エノール互変異性が生じることが明らかにされている. この律速段階は実験的に Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Spectroscopy (MIKES)法で 3.0-3.2 eV (66.64-73.82 kcal mol⁻¹), ¹⁰³ Collision Induced Dissociation (CID)法では 2.89-3.17 eV (65.95-73.10 kcal mol⁻¹)⁹⁸)と見積もられている. また, 量子化学計算では様々な手法を用いて 2.86-3.34 eV (65.95-77.02 kcal mol⁻¹)と算出されている (Table 9). ^{101, 102} Le らはこの CO 基脱離に関して 4 段階で進行すると報告しており, ¹⁰⁵ NEB 計算においても 4 段階で進行することが確認された (Figure 33). ケト-エノール互変異性については NEB 計算では 3.00 eV (69.18 kcal mol⁻¹)と見積

もられ, Table 9 に示す実験値・計算値とよく一致した. NEB 法での更なる利点として, これらフラグメンテーション反応中での電荷の推移を可視化できることがあげられる. 同じく Figure 33 に主要な原子の Mulliken charge と反応過程を示す. 反応初期のケト-エノール互変異性では脱離する炭素(C(1))の Mulliken charge は 0.5 程度程度であるが, 最終的には CO としてほぼ 0 となる.

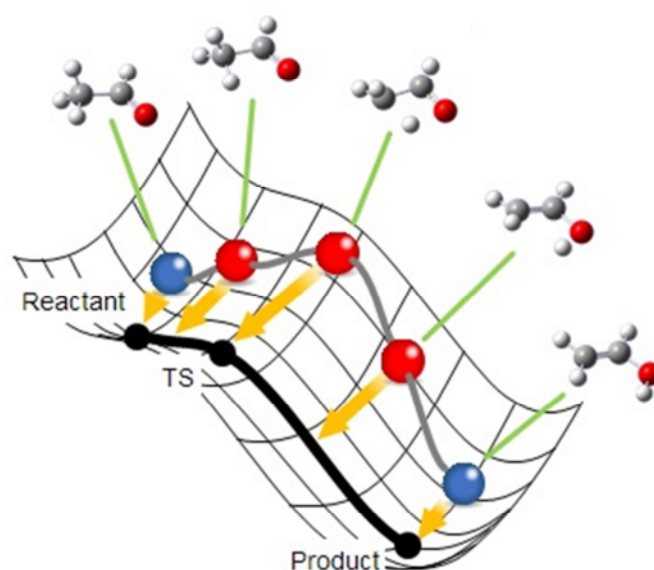


Figure 28 Nudged Elastic Band 法の概念図

NEB 法では, まず開始座標と終了座標を直線的に移動する中間座標を作成し, ポテンシャル曲面に沿って最適化する. 例えると, 尾根を超えてロープを投げ 1 方向にのみ正の傾きを持ちその他の方向には負の傾きを持つ鞍点を探索する. これにより効率的に MEP を求めることができる. ¹⁰⁶⁾

出展: http://www.hpc.co.jp/chem/react1_feature_3.html Copyright HPC Systems Inc.

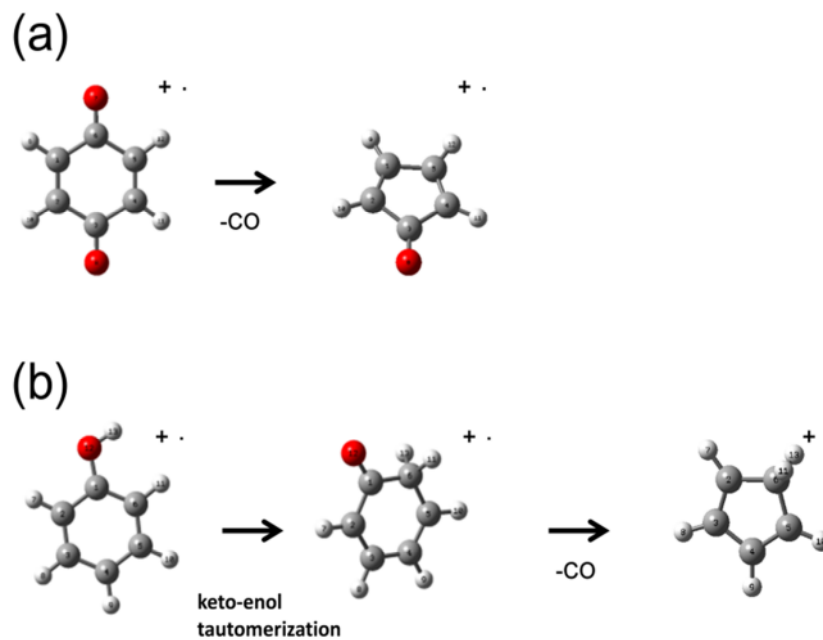


Figure 29 *p*-ベンゾキノンおよびフェノールからの CO 脱離

P-ベンゾキノン，フェノールのフラグメンテーションにおいては過去の研究から一酸化炭素が中性フラグメントとして脱離することが明らかにされている．フェノールにおいては気相イオン化学の研究から反応初期にケトエノール互変異性を生じ，これが律速段階となる．¹¹⁰⁾

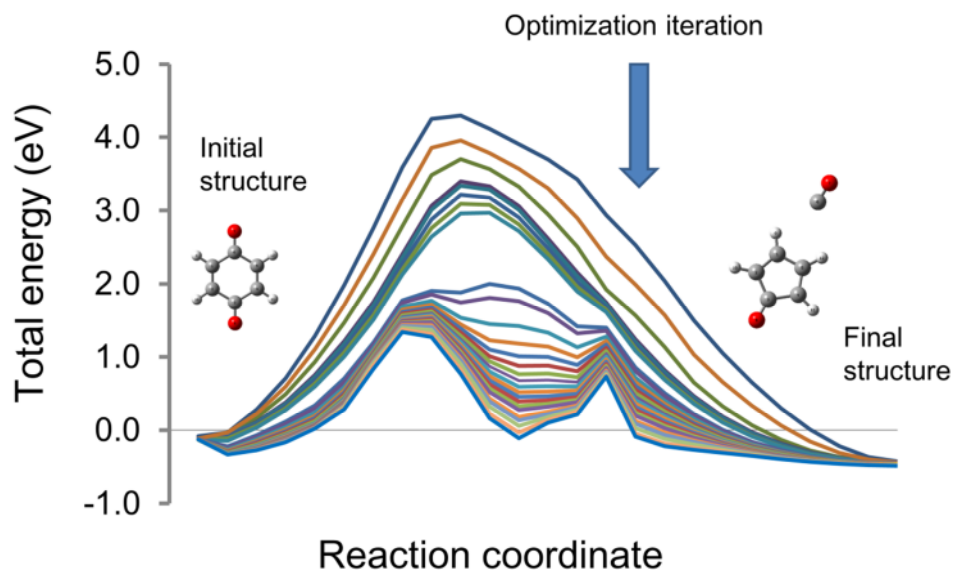


Figure 30 NEB 法による *p*-ベンゾキノンから CO 脱離の MEP

Figure 28 に示した NEB 法を用いた最適化による *p*-ベンゾキノンから CO 脱離におけるエネルギー推移. 最適化開始当初では反応として異常に高いエネルギーを示すが, 最適化を繰り返すことにより現実的な値を示す. 本反応では, 開始座標と終了座標の間に 2 つの鞍点: エネルギー障壁と安定な中間座標が存在することが明らかになった.¹¹⁰⁾

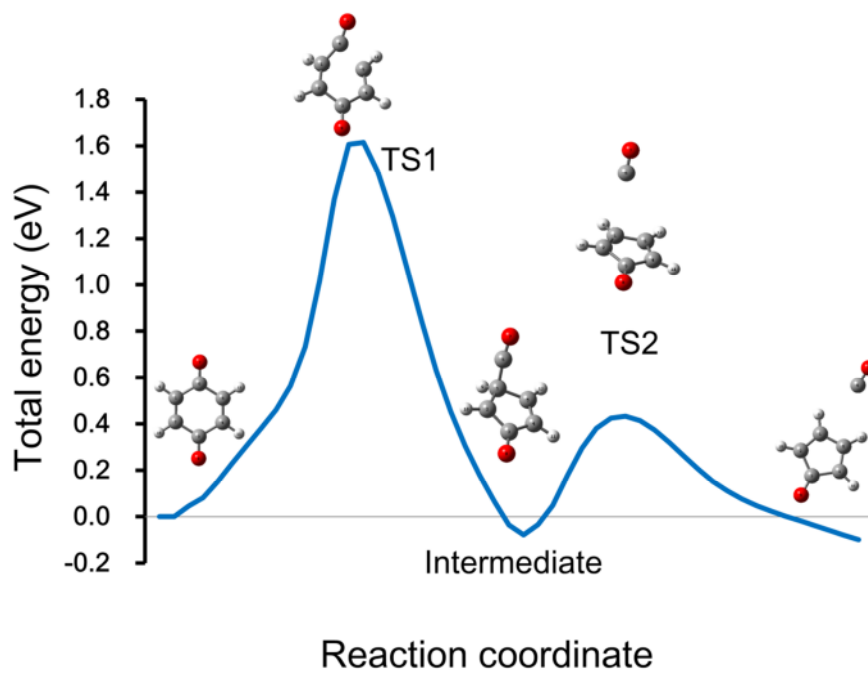


Figure 31 NEB 法によるエネルギープロファイル

合計 50 座標による NEB 法によるエネルギープロファイル. STQN 法・IRC 計算など高度な計算技術を用いることなく, 簡便にエネルギープロファイルを作成する事ができる. ¹¹⁰⁾

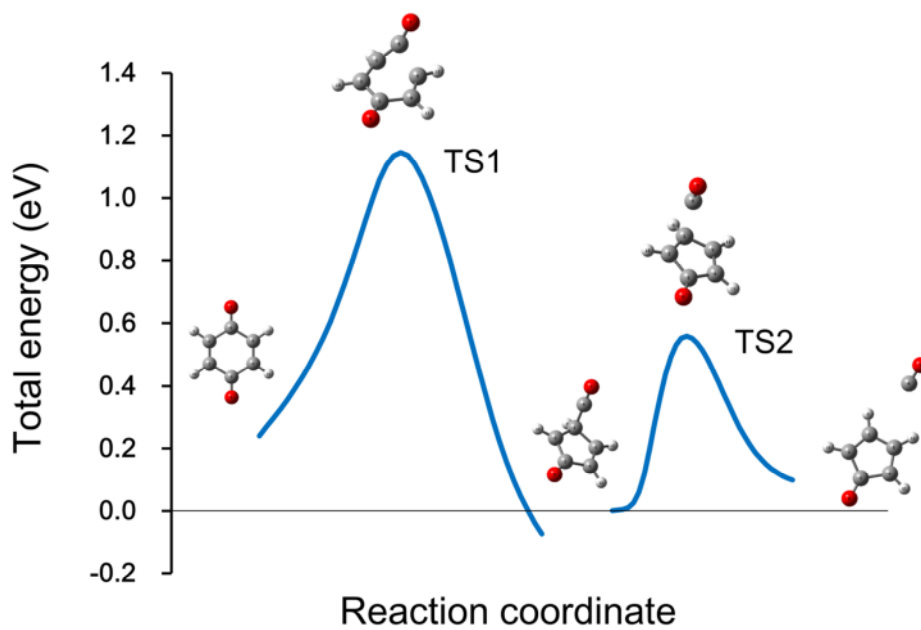


Figure 32 STQN 法および IRC 計算によるエネルギープロファイル

従来法によるエネルギープロファイル. TS に関しては正確に求めることができ, NEB に対して低い値が求められているものの技術的な要求が高い. 本計算では Figure 31 で求めた NEB 方による鞍点の分子構造を利用することにより, 比較的平易に求める事ができた. ¹¹⁰⁾

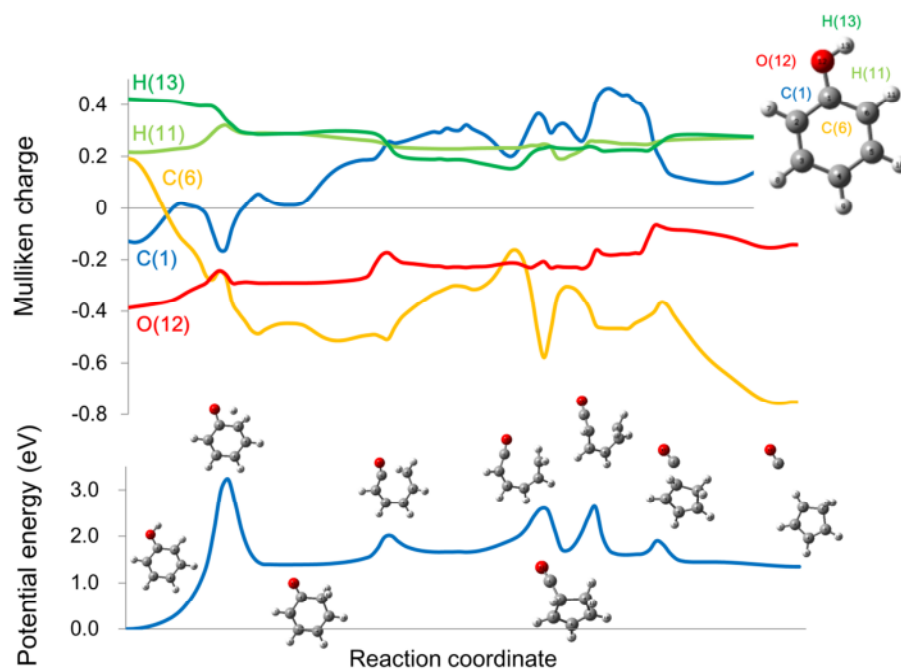


Figure 33 NEB 法によるフェノールからの CO 脱離

フェノールから CO が脱離する過程においてはケト-エノール互変異性が律速段階となることが知られており，NEB 法においてもこれが再現された．中間座標から Mulliken charge として電荷の局在も求めることも可能であり，最終的に CO は無電荷で脱離する．¹¹⁰⁾

Table 8 *p*-ベンゾキノンの CO 脱離における TS の零点エネルギー

Method	TS 1	TS 2
NEB	1.50 eV	0.68 eV
STQN	145 eV	0.60 eV

Table 9 各種法で求められたフェノールにおける

ケト-エノール互変異性に要するエネルギー¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾

Relative energy (eV)	Method
3.00	NEB B3LYP/6-31G(d)
3.0-3.2	MIKES
2.89-3.17	Threshold CID
3.34	MP2(full)/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31G(d)
2.87	B3LYP/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-31G(d)
3.29	MP2(full)/6-311++G(2d,2p)//MP2(full)/6-31G(d)
3.01	B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-311++G(d,p)
2.86	B3LYP/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-311++G(d,p)

第4節 結語

NEB法を用いることにより初期座標と終了座標のみから簡易にMEPを算出することが可能であり、潜在的にTSに近いエネルギー障壁を求めることができた。さらにSTQN法およびIRC計算を併用することにより効率的に完全なエネルギープロファイルを作成することが可能であった。¹¹⁰⁾

量子化学計算は質量分析においても強力な解析ツールであり、フラグメンテーション、付加イオンの形成などイオン化における諸現象の解析に有効である。特にNEB計算は初期座標および終了座標のみから反応機構の推定、エネルギー概算が可能であり今後の応用が期待される。

第6章 総括

本研究では質量分析におけるイオン化法の特徴について約 600 件の測定結果を retrospective approach (回顧的手法)により解析し明らかにした。

これまでイオン化法試料適応性の説明には極性-分子量による 2 次元チャートが用いられてきたが、それらは実験結果に基づいておらず想像図に過ぎなかった。本研究では tPSA を採用することにより簡便に化合物の極性をあらわすことが可能であることを示し、DART・ESI・FAB について試料適応性を極性-分子量 2 次元チャートとして具現化した。⁷²⁾ これは初めて実測に基いて作成された実用可能なイオン化法試料適応性チャートである。また、公共データベース MassBank の解析からは EI・CI・APCI・ESI について、エントリーに依存し各イオン化法の実績を示すチャートを得ることができた。⁷⁶⁾

付加イオン選択性について、本研究は元素組成中の窒素・酸素が影響をおよぼすことを明らかにした。

メタノールを移動相とした ESI においては、プロトン以上にナトリウムが高頻度に観測される付加イオンである事を明らかにした。さらにその付加イオン選択性は、Nitrogen - Oxygen rule (： 元素組成中に酸素を含む化合物はナトリウム付加，元素組成中に酸素を含まず窒素を含む化合物はプロトン付加イオンを観測する)という単純な法則に支配され、予測可能であることを示した。⁸²⁾

DART においては、アンモニウム付加イオンが約半数で観測される一般的な付加イオンであることを明らかにした。さらにモデル化合物・量子化学計算を用いた解析により元素組成中の窒素原子はプロトン付加イオンを形成し、酸素原子はアンモニウム付加イオンの安定に寄与していることを明らかにした。⁸⁶⁾ また量子化学計算の質量分析への応用として NEB 法により遷移状態を含むフラグメンテーションにおけるエネルギー最小経路計算の簡便化を示した。¹¹⁰⁾

イオン化法試料適応性および付加イオン選択性は質量分析初心者が実践教育を受けるに際に疑問を感じる部分である。しかしながら統計的な蓄積、適切な引用可能文献が存在しなかった部分でもある。この点において本研究は不足している情報を補完し、質量分析の発展に貢献したと考えられる。本研究が成功した背景には、日常的に注意深く実務が行われてきたこと、測定依頼者の協力が得られたこと、量子化学計算を利用することで数値的な議論を可能にしたこと、ケモインフォマティクスを活用したことが挙げられる。また、受託分析試料に対して retrospective approach を実践した意義も大きく、このことは機械学習等への応用の可能性を示すものである。今後は質量分析のみならず本研究と同様の手法が採用されていく可能性が考えられる。さらに NMR の化学シフト予測に量子化学計算が用いられる¹¹¹⁻¹¹³⁾ように、さらなる量子化学計算の高速化は網羅的な計算を可能にし、質量分析においてもフラグメンテーション解析¹¹²⁾、付加イオン予測等に活用される潜在的な可能性を示唆している。

本研究は実験実務者が日常的に経験している分析経験を集積し統計的に解析することにより、分析実務経験を体系化したものであるとも言える。今後も実務経験を継承する手法について開発が期待される。

参考文献

1. Nier, A. O.; Gulbransen, E. A., Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *J Am Chem Soc* **1939**, *61*, 697-698.
2. Shackleton, N. J., High-Precision Isotopic Analysis of Oxygen and Carbon in Carbon Dioxide. *J Sci Instrum* **1965**, *42* (9), 689-+.
3. Henzel, W. J.; Billeci, T. M.; Stults, J. T.; Wong, S. C.; Grimley, C.; Watanabe, C., Identifying Proteins from 2-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide-Fragments in Protein-Sequence Databases. *P Natl Acad Sci USA* **1993**, *90* (11), 5011-5015.
4. Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R., An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database. *J Am Soc Mass Spectr* **1994**, *5* (11), 976-989.
5. Mann, M.; Wilm, M., Error Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags. *Analytical Chemistry* **1994**, *66* (24), 4390-4399.
6. Brugger, B.; Erben, G.; Sandhoff, R.; Wieland, F. T.; Lehmann, W. D., Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *P Natl Acad Sci USA* **1997**, *94* (6), 2339-2344.
7. Fiehn, O.; Kopka, J.; Dormann, P.; Altmann, T.; Trethewey, R. N.; Willmitzer, L., Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* **2000**, *18* (11), 1157-1161.
8. Buchholz, A.; Hurlebaus, J.; Wandrey, C.; Takors, R., Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng* **2002**, *19* (1), 5-15.
9. Anhalt, J. P.; Fenselau, C., Identification of Bacteria Using Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1975**, *47* (2), 219-225.
10. Millington, D. S.; Kodo, N.; Norwood, D. L.; Roe, C. R., Tandem Mass-Spectrometry - a New Method for Acylcarnitine Profiling with Potential for Neonatal Screening for Inborn-Errors of Metabolism. *J Inherit Metab Dis* **1990**, *13* (3), 321-324.
11. Pavlovich, M. J.; Dunn, E. E.; Hall, A. B., Chemometric brand differentiation of commercial spices using direct analysis in real time mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2016**, *30* (9), 1123-30.
12. Rajchl, A.; Prchalova, J.; Kruzik, V.; Sevcik, R.; Cizkova, H., Evaluation of ice-tea quality by DART-TOF/MS. *J Mass Spectrom* **2015**, *50* (11), 1214-21.
13. Ackerman, L. K.; Noonan, G. O.; Begley, T. H., Assessing direct analysis in real-time-mass spectrometry (DART-MS) for the rapid identification of additives in food packaging. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2009**, *26* (12), 1611-8.

14. Murakami, T.; Iwamuro, Y.; Ishimaru, R.; Chinaka, S.; Sugimura, N.; Takayama, N., Differentiation of AB-FUBINACA positional isomers by the abundance of product ions using electron ionization-triple quadrupole mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2016**, *51* (11), 1016-1022.
15. Lesiak, A. D.; Musah, R. A., Application of ambient ionization high resolution mass spectrometry to determination of the botanical provenance of the constituents of psychoactive drug mixtures. *Forensic Sci Int* **2016**, *266*, 271-80.
16. Bridoux, M. C.; Schwarzenberg, A.; Schramm, S.; Cole, R. B., Combined use of direct analysis in real-time/Orbitrap mass spectrometry and micro-Raman spectroscopy for the comprehensive characterization of real explosive samples. *Anal Bioanal Chem* **2016**, *408* (21), 5677-87.
17. Thomson, J. J., Rays of positive electricity. *Philos Mag* **1910**, *20* (115-20), 752-767.
18. Aston, F. W., A positive ray spectrograph. *Philos Mag* **1919**, *38* (228), 707-714.
19. Tate, J. T.; Smith, P. T., Ionization potentials and probabilities for the formation of multiply charged ions in the alkali vapors and in krypton and xenon. *Phys Rev* **1934**, *46* (9), 0773-0776.
20. Gohlke, R. S., Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography. *Analytical Chemistry* **1959**, *31* (4), 535-541
21. J.H. Gross, Mass Spectrometry Second Edition. Springer, Heidelberg, p. 249 **2010**.
22. McLafferty, F. W., Mass Spectrometric Analysis - Broad Applicability to Chemical Research. *Analytical Chemistry* **1956**, *28* (3), 306-316.
23. Munson, M. S. B.; Field, F. H., Chemical Ionization Mass Spectrometry .I. General Introduction. *J Am Chem Soc* **1966**, *88* (12), 2621-&.
24. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N., Fast Atom Bombardment of Solids as an Ion-Source in Mass-Spectrometry. *Nature* **1981**, *293* (5830), 270-275.
25. Barber, M.; Bordoli, R. S.; Elliott, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N., Fast Atom Bombardment Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1982**, *54* (4), A645-&.
26. Morris, H. R.; Panico, M.; Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A., Fast Atom Bombardment - a New Mass-Spectrometric Method for Peptide Sequence-Analysis. *Biochem Bioph Res Co* **1981**, *101* (2), 623-631.
27. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **1989**, *246* (4926), 64-71.
28. Yamashita, M.; Fenn, J. B., Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *J Phys Chem-US* **1984**, *88* (20), 4451-4459.
29. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Protein and polymer Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1988**, *8* (2), 151-153.

30. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds. *Int J Mass Spectrom* **1987**, *78*, 53–68.
31. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, *60* (20), 2299–2301.
32. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet-Laser Desorption Mass-Spectrometry of Organic-Molecules. *Analytical Chemistry* **1985**, *57* (14), 2935–2939.
33. Shinohara, R.; Yamada, T.; Schade, B.; Bottcher, C.; Sato, T.; Sugimura, N.; Shibue, T.; Komatsu, T., Structural Insights into a Hemoglobin-Albumin Cluster in Aqueous Medium. *J Phys Chem Lett* **2017**, *8* (4), 819–824.
34. Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D., Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (8), 2297–2302.
35. Gross, J. H., Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406* (1), 63–80.
36. Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Arvola, V.; Kotiaho, T.; Ketola, R. A.; Franssila, S.; Kauppila, T. J.; Kostiaainen, R., Desorption atmospheric pressure photoionization. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (20), 7867–7872.
37. Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G., Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* **2004**, *306* (5695), 471–473.
38. McEwen, C. N.; McKay, R. G.; Larsen, B. S., Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (23), 7826–7831.
39. Monge, M. E.; Harris, G. A.; Dwivedi, P.; Fernandez, F. M., Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. *Chem Rev* **2013**, *113* (4), 2269–308.
40. 日本質量分析学会, マススペクトロメトリーってなあに, p18 (2001).
41. Aiken, A. C.; DeCarlo, P. F.; Jimenez, J. L., Elemental analysis of organic species with electron ionization high-resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (21), 8350–8358.
42. Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N., New Picogram Detection System Based on a Mass-Spectrometer with an External Ionization Source at Atmospheric-Pressure. *Analytical Chemistry* **1973**, *45* (6), 936–943.
43. Izutani, C.; Fukagawa, D.; Miyasita, M.; Ito, M.; Sugimura, N.; Aoyama, R.; Gotoh, T.; Shibue, T.; Igarashi, Y.; Oshio, H., The Materials Characterization Central Laboratory: An

- Open-Ended Laboratory Program for Fourth-Year Undergraduate and Graduate Students. *Journal of Chemical Education* **2016**, *93* (9), 1667–1670.
44. Brunnee, C., 50 Years of MAT in Bremen. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1997**, *2*, 694–707.
 45. J.H. Gross, *Mass Spectrometry* Second Edition. Springer, Heidelberg (2010), p. 144.
 46. Stephens, W. E., A Pulsed Mass Spectrometer With Time Dispersion. *Phys Rev* **1946**, *69* 691.
 47. Mamyrin, B. A., Laser Assisted Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Proc.* **1994**, *131*. 1–19
 48. Makarov, A., Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal Chem* **2000**, *72* (6), 1156–1162.
 49. Hu, Q.; Noll, J. R.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* **2005**, *40* (4), 430–443.
 50. J.H. Gross, *Mass Spectrometry* Second Edition. Springer, Heidelberg (2010), p. 642.
 51. Forcisi, S.; Moritz, F.; Kanawati, B.; Tziotis, D.; Lehmann, R.; Schmitt-Kopplin, P., Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1292*, 51–65.
 52. Maurer, H. H., Liquid chromatography mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B* **1998**, *713* (1), 3–25.
 53. J.H. Gross, *Mass Spectrometry* Second Edition. Springer, Heidelberg (2010), p. 602
 54. Rosenberg, E., The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000* (1–2), 841–889.
 55. 大木道則編, *化学辞典 第1版第2刷*, 東京化学同人(1994), p. 354.
 56. Liu, L.; Liu, S. C.; Jiang, L. H.; Chen, X. L.; Guo, L. D.; Che, Y. S., Chloropupukeananin, the first chlorinated pupukeanane derivative, and its precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Org Lett* **2008**, *10* (7), 1397–1400.
 57. *Gaussian 09, Revision D.01*, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian,

- Inc., Wallingford CT, 2009.
58. Becke, A. D., Density - functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (7), 5648-5652.
 59. Becke, A. D.; Roussel, M. R., Exchange holes in inhomogeneous systems: A coordinate-space model. *Physical Review A* **1989**, *39* (8), 3761-3767.
 60. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **1988**, *37* (2), 785-789.
 61. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J., Ab-Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular-Dichroism Spectra Using Density-Functional Force-Fields. *J Phys Chem-Us* **1994**, *98* (45), 11623-11627.
 62. Francl, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Gordon, M. S.; DeFrees, D. J.; Pople, J. A., Self - consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization - type basis set for second - row elements. *The Journal of Chemical Physics* **1982**, *77* (7), 3654-3665.
 63. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* **1997**, *23* (1-3), 3-25.
 64. Fujita, T.; Hansch, C.; Iwasa, J., New Substituent Constant Pi Derived from Partition Coefficients. *J Am Chem Soc* **1964**, *86* (23), 5175-&.
 65. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P., Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* **2000**, *43* (20), 3714-3717.
 66. Palm, K.; Stenberg, P.; Luthman, K.; Artursson, P., Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharmaceut Res* **1997**, *14* (5), 568-571.
 67. Clark, D. E., Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J Pharm Sci* **1999**, *88* (8), 815-821.
 68. Cousins, K. R., ChemDraw Ultra 9.0. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (11), 4115-4116.
 69. Moini, M.; Jones, B. L.; Rogers, R. M.; Jiang, L. F., Sodium trifluoroacetate as a tune/calibration compound for positive- and negative-ion electrospray ionization mass spectrometry in the mass range of 100-4000 Da. *J Am Soc Mass Spectr* **1998**, *9* (9), 977-980.
 70. Chernetsova, E. S.; Ovcharov, M. V.; Zatonskii, G. V.; Abramovich, R. A.; Revelskii, I. A., Clafication of the composition of [M+18]⁺ ions in DART mass spectra of polyethylene glycol using high-resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* **2011**, *66* (13), 1348-1351.
 71. Kruve, A.; Kaupmees, K.; Liigand, J.; Oss, M.; Leito, I., Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *J Mass Spectrom* **2013**, *48* (6), 695-702.

72. **Sugimura, N.**; Furuya, A.; Yatsu, T.; Shibue, T., Comparison of the applicability of mass spectrometer ion sources using a polarity- molecular weight scattergram with a 600 sample in-house chemical library. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* **2015**, *21* (2), 91-6.
73. Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T., MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom* **2010**, *45* (7), 703-14.
74. Stewart, J. J. P., Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model* **2007**, *13* (12), 1173-1213.
75. Altuntas, E.; Krieg, A.; Baumgaertel, A.; Crecelius, A. C.; Schubert, U. S., ESI, APCI, and MALDI tandem mass spectrometry of poly(methyl acrylate)s: A comparison study for the structural characterization of polymers synthesized via CRP techniques and the software application to analyze MS/MS data. *J Polym Sci Pol Chem* **2013**, *51* (7), 1595-1605.
76. **Sugimura, N.**; Igarashi, Y.; Aoyama, R.; Shibue, T., Representation of the coverage of mass spectrometry ionization methods in two-dimensional plots of molecular weight and polarity or dipole moment. *Journal of Mass Spectrometry* **2016**, *51* (8), 583-585.
77. J.H. Gross, *Mass Spectrometry* Second Edition. Springer, Heidelberg (2010), p. 578.
78. Kostianinen, R.; Kauppila, T. J., Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* (4), 685-99.
79. Cech, N. B.; Enke, C. G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev* **2001**, *20* (6), 362-87.
80. Enke, C. G., A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Analytical Chemistry* **1997**, *69* (23), 4885-4893.
81. Oss, M.; Krueve, A.; Herodes, K.; Leito, I., Electrospray ionization efficiency scale of organic compounds. *Anal Chem* **2010**, *82* (7), 2865-72.
82. **Sugimura, N.**; Furuya, A.; Yatsu, T.; Shibue, T., Prediction of adducts on positive mode electrospray ionization mass spectrometry: proton/sodium selectivity in methanol solutions. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* **2015**, *21* (5), 725-31.
83. Wang, L.; Zeng, S.; Qu, H., Effects of ion source operating parameters on direct analysis in real time of 18 active components from traditional Chinese medicine. *J Pharm Biomed Anal* **2016**, *121*, 30-8.
84. Lesiak, A. D.; Musah, R. A., Application of ambient ionization high resolution mass spectrometry to determination of the botanical provenance of the constituents of psychoactive drug mixtures. *Forensic Sci Int* **2016**, *266*, 271-80.

85. Duvivier, W. F.; van Putten, M. R.; van Beek, T. A.; Nielen, M. W., (Un)targeted Scanning of Locks of Hair for Drugs of Abuse by Direct Analysis in Real Time-High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2016**, *88* (4), 2489-96.
86. Sugimura, N.; Furuya, A.; Yatsu, T.; Igarshi, Y.; Aoyama, R.; Yamamoto, Y.; Shibue, T. Observed adducts on positive mode direct analysis in real time mass spectrometry - Proton / ammonium adduct selectivities of 600-sample in-house chemical library. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* **2017**, *23* (1), 4-10.
87. Fujisawa, A.; Yamamoto, Y., Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxyxynitrite to produce predominantly 4-NO-edaravone. *Redox Rep* **2016**, *21* (3), 98-103.
88. Yamamoto, Y.; Kuwahara, T.; Watanabe, K.; Watanabe, K., Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. *Redox Report* **1996**, *2* (5), 333-338.
89. Sugimura, N.; Furuya, A.; Yatsu, T.; Shibue, T., Mechanism of the Gas-Phase Hydrogen/Deuterium Exchange Associated with Positive Ion Direct Analysis in Real Time (DART), *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn* **2014**, *62* (1), 1-4
90. Sugimura, N.; Furuya, A.; Yatsu, T.; Shibue, T., Formation of Ammonium Ion Adduct Molecules in Positive Direct Analysis in Real Time (DART) Ionization Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn* **2014**, *62* (3), 25-27
91. Bohner, M. U.; Zeman, J.; Smiatek, J.; Arnold, A.; Kastner, J., Nudged-elastic band used to find reaction coordinates based on the free energy. *J Chem Phys* **2014**, *140* (7).
92. Henkelman, G.; Jonsson, H., Improved tangent estimate in the nudged elastic band method for finding minimum energy paths and saddle points. *J Chem Phys* **2000**, *113* (22), 9978-9985.
93. Henkelman, G.; Uberuaga, B. P.; Jonsson, H., A climbing image nudged elastic band method for finding saddle points and minimum energy paths. *J Chem Phys* **2000**, *113* (22), 9901-9904.
94. Zarkevich, N. A.; Johnson, D. D., Nudged-elastic band method with two climbing images: Finding transition states in complex energy landscapes. *J Chem Phys* **2015**, *142* (2).
95. Nesvizhskii, A. I.; Keller, A.; Kolker, E.; Aebersold, R., A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (17), 4646-4658.
96. Hufsky, F.; Scheubert, K.; Bocker, S., Computational mass spectrometry for small-molecule fragmentation. *Trac-Trend Anal Chem* **2014**, *53*, 41-48.
97. Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P., Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33* (3), 432-455.
98. Monks, T. J.; Hanzlik, R. P.; Cohen, G. M.; Ross, D.; Graham, D. G., Quinone Chemistry and Toxicity. *Toxicol Appl Pharm* **1992**, *112* (1), 2-16.

99. J.H. Gross, *Mass Spectrometry* Second Edition. Springer, Heidelberg (2010), p. 313.
100. Stensen, W. G.; Jensen, E., Structural Determination of 1,4-Naphthoquinones by Mass-Spectrometry Mass-Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30* (8), 1126-1132.
101. Vessecchi, R.; Carollo, C. A.; Lopes, J. N. C.; Crotti, A. E. M.; Lopes, N. P.; Galembeck, S. E., Gas-phase dissociation of 1,4-naphthoquinone derivative anions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44* (8), 1224-1233.
102. Vessecchi, R.; Emery, F. S.; Lopes, N. P.; Galembeck, S. E., Electronic structure and gas-phase chemistry of protonated alpha- and beta-quinonoid compounds: a mass spectrometry and computational study. *Rapid Commun Mass Sp* **2013**, *27* (7), 816-824.
103. Russell, D. H.; Gross, M. L.; Nibbering, N. M. M., Keto-Enol Tautomerism of Gas-Phase Ions - Structure of Reactive C₆H₆O Radical Cations. *J Am Chem Soc* **1978**, *100* (19), 6133-6137.
104. Muntean, F.; Heumann, L.; Armentrout, P. B., Modeling kinetic shifts in threshold collision-induced dissociation. Case study: Dichlorobenzene cation dissociation. *J Chem Phys* **2002**, *116* (13), 5593-5602.
105. Le, H. T.; Flammang, R.; Gerbaux, P.; Bouchoux, G.; Nguyen, M. T., Ionized phenol and its isomers in the gas phase. *J Phys Chem A* **2001**, *105* (51), 11582-11592.
106. HPC Systems Inc. Reaction Plus Software was used to obtain the reaction mechanism, wwwhpc.co.jp/ (accessed 10 March 2017)
107. Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Schlegel, H. B.; Frisch, M. J., Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17* (1), 49-56.
108. Gonzalez, C.; Schlegel, H. B., An Improved Algorithm for Reaction-Path Following. *J Chem Phys* **1989**, *90* (4), 2154-2161.
109. Fukui, K., The Path of Chemical-Reactions - the Irc Approach. *Accounts Chem Res* **1981**, *14* (12), 363-368.
110. Sugimura, N.; Igarashi, Y.; Aoyama, R.; Shibue, T., Nudged elastic band method and density functional theory calculation for finding a local minimum energy pathway of p-benzoquinone and phenol fragmentation in mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* **2017**, *23* (1), 40-44.
111. Lodewyk, M. W.; Siebert, M. R.; Tantillo, D. J., Computational prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry. *Chem Rev* **2012**, *112* (3), 1839-62.
112. Sugimura, N.; Yatsu, T.; Igarashi, Y.; Shibue, T., Alkoxysiloxane Oligomer as Reference of Density Functional Theory Calculation for Si-²⁹NMR Sol-Gel Chemistry. *Bunseki Kagaku* **2015**, *64* (5), 379-383.

113. Sugimura, N. ; Furuya, A. ; Yatsu, T. ; Shibue, T., Application of Density Functional Theory (DFT) and Empirical Scaling to Practical Prediction of C-13-NMR of (-)-Napyradiomycin A1. *Bunseki Kagaku* **2015**, *64* (2), 147-150.

謝 辞

本論文作成にあたり東京工科大学応用生物学部・山本順寛教授のご指導ご鞭撻をいただきました。山本先生には1998年に東京大学先端科学技術研究センターにて卒業研究(学士)のご指導をいただいて以来長きにわたりご指導ご助言をいただきました。ここに心より厚く御礼を申し上げます。

副査である今村亨教授・浦瀬太郎教授・遠藤泰志教授・山下俊教授には査読と本学位論文作成にあたりご助言をいただきました。御礼申し上げます。

本研究に関して山垣亮博士をはじめ日本質量分析学会・イオン反応研究会の皆様には多くの発表の機会をいただきました。このイオン反応研究会での発表が研究成果を論文とする契機となりました。感謝申し上げます。

本研究遂行において早稲田大学物性計測センターラボ・渋谷俊道博士のご指導がなければ本研究が完成することはありませんでした。また、渋谷博士には開発環境への助言、論文執筆への指導、発表など広範囲にわたりご助言をいただきました。ここに厚く御礼を申し上げます。

投稿論文共著者である早稲田大学物性計測センターラボ、古屋麻美氏・谷津貴広氏・五十嵐陽子氏・青山礼子氏・泉谷知里氏のご協力に感謝し、早稲田大学・物性計測センターラボ関係者各位にここに御礼申し上げます。

最後に本研究は早稲田大学物性計測センターラボ・受託高分解能質量分析サービス利用者各位の試料提供ならびに研究利用許可なし遂行することはできませんでした。利用者の皆様の研究開発活動へのご理解とご協力に厚く御礼を申し上げます。

2017年9月 杉村夏彦