

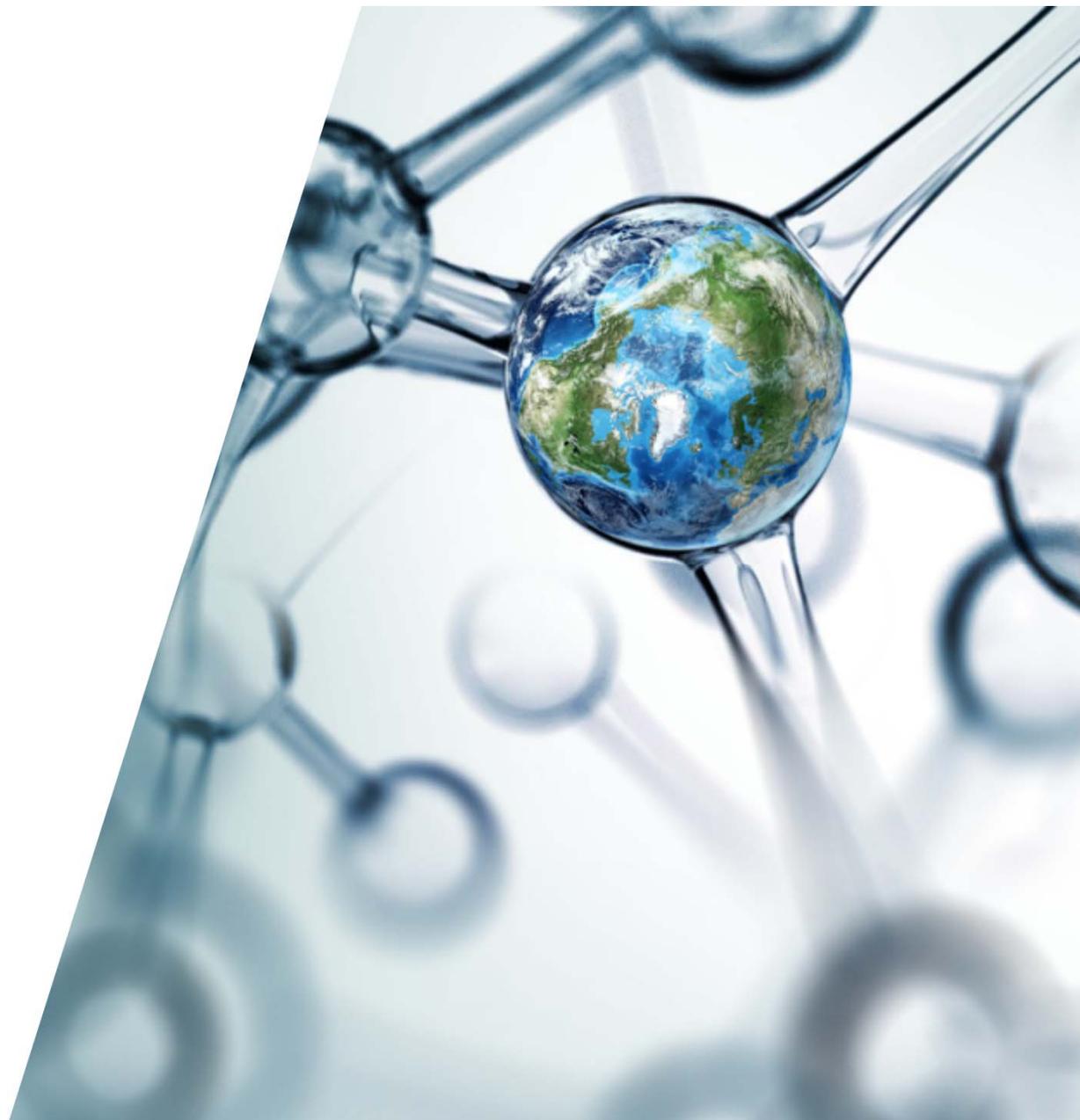
Orbitrap™テクノロジーを用いた メタボロミクス

フーリエ変換型質量分析計とは？

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

CMD C&MSアプリケーション 石橋 愛実

 The world leader in serving science



本日の内容について

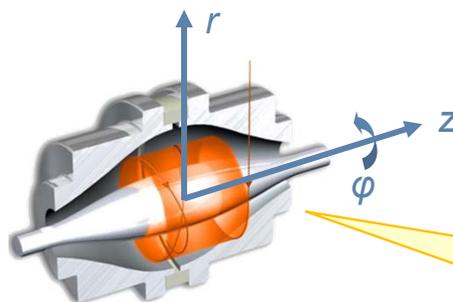
- 1 Orbitrap™の原理
- 2 精密質量データ解析の基礎
- 3 メタボロミクス分析のご紹介
- 4 ソフトウェアを用いたアプリケーション紹介

Orbitrapとは？

- 従来、超伝導マグネットを使用したFT-MSでしか達成できなかった高質量精度、高分解能スペクトルを取得可能にした**電場型FT-MS**



開発者



超対数的な電位分布:
“理想的なKingdon型イオントラップ”

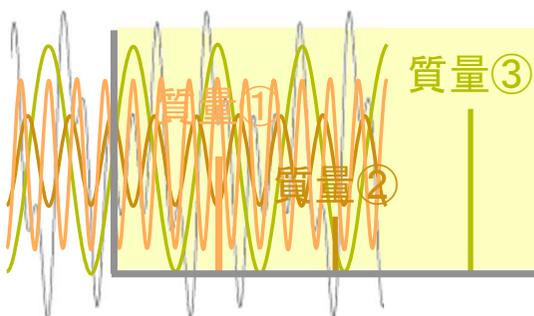
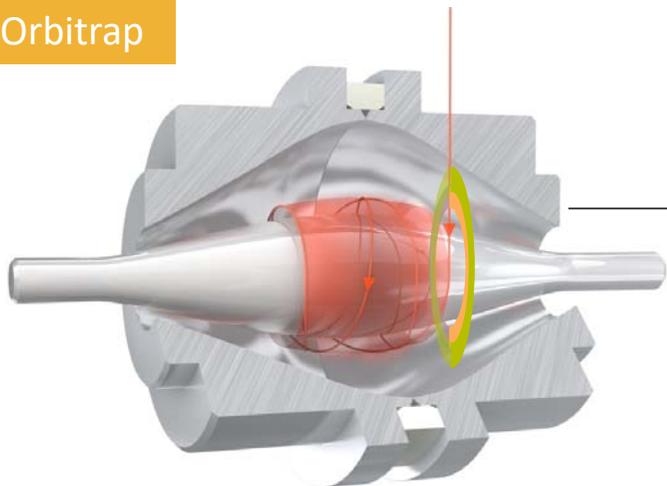
電場型FT-MSなので
超伝導マグネットが不要！

- 高質量精度**（質量精度 $<3\text{ppm}$ 、外部標準法）
例えば… $m/z=200$ のイオンを観測した場合、
質量誤差 $3\text{ppm} = 0.000003 \times 200 = 0.0006 \text{ Da}$
- 高分解能**
例えば… $m/z=200$ のイオンを観測した場合、分解能70,000では
 m/z の差が約**0.006Da**しかない近接したイオン同士を完全に分離できる

Makarov A. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1156-1162.

オービトラップの検出原理

Orbitrap



- 誘導電流を周波数として記録
- 周波数をフーリエ変換で分解
- 各周波数 = 各質量成分 (m/z)

超高分解能

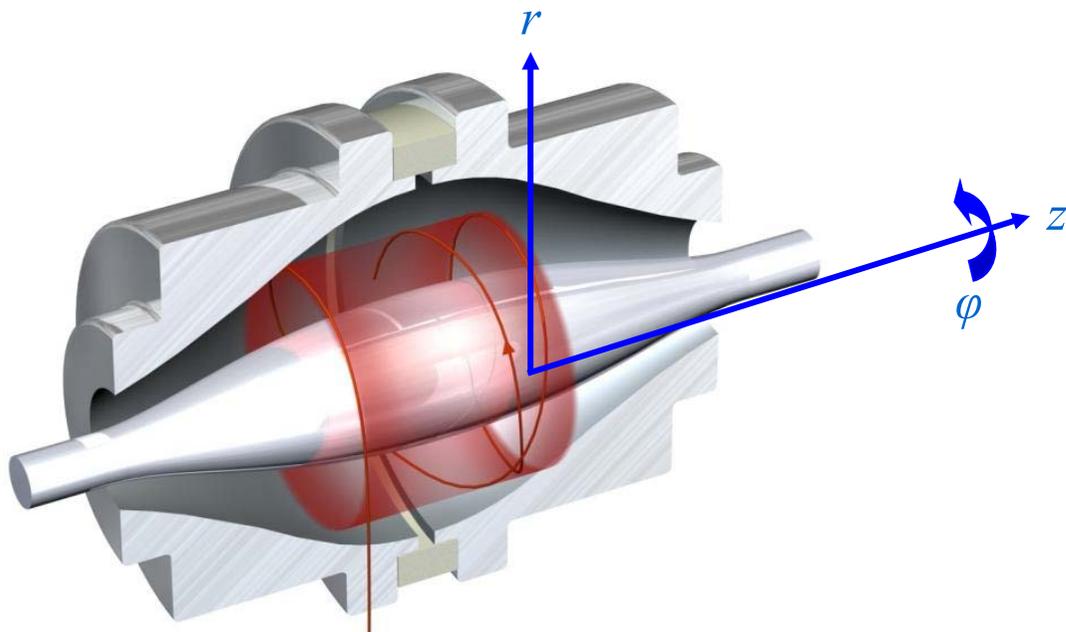
誰にでも精密質量

高質なデータ(積算不必要)

Orbitrapでのイオンの軌道

Characteristic frequencies:

- 回転運動の周波数 ω_ϕ
- 軌道半径 r の周波数 ω_r
- 中心電極の軸方向の周波数 ω_z



$$U(r, z) = \frac{k}{2} \cdot \left\{ z^2 - r^2 / 2 + R_m^2 \cdot \ln(r / R_m) \right\}$$

R: 中心電極から対局電極までの距離

R_m : イオンの軌道半径

k: 定数

M: 質量

q: 電荷量

Orbitrap の特殊な形状により, 軸方向の振動運動速度 (v) は軌道半径 R_m の変数ではなくなり, m/q のみの変数となる

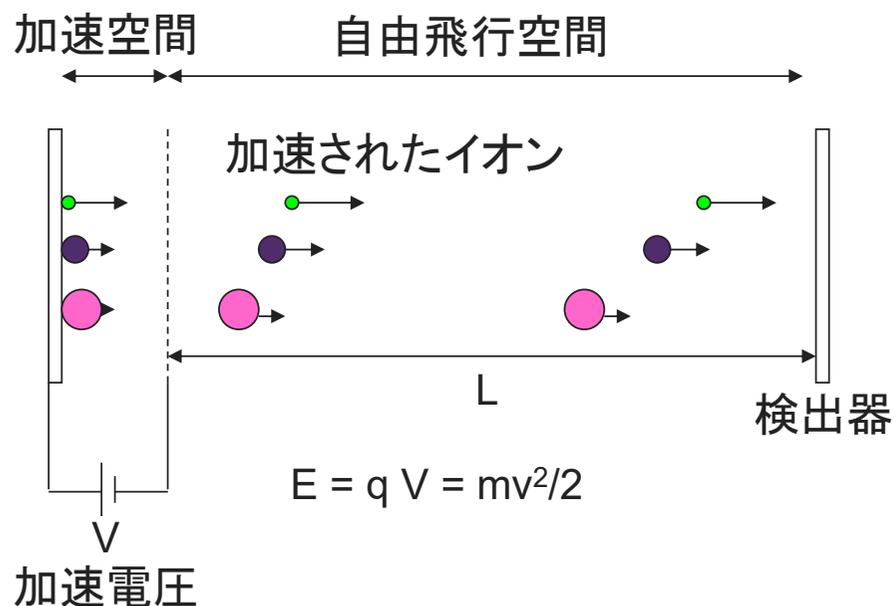
$$\omega_\phi = \frac{\omega_z}{\sqrt{2}} \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 1}$$

$$\omega_r = \omega_z \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 2}$$

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/q}}$$

m/z が小さいほど大きな数値, すなわち高い周波数となる

飛行時間型質量分析計 リニア型



イオンを一定の電圧(V)で加速したときのエネルギー、質量と速度の関係は
 $E = qV = mv^2/2$ (エネルギー保存則)

$$v = \sqrt{2qV/m}$$

$$\therefore T = L/v = \frac{L}{\sqrt{m/2qV}}$$

(E:運動エネルギー、V:電圧、m:質量、v:イオンの速度)

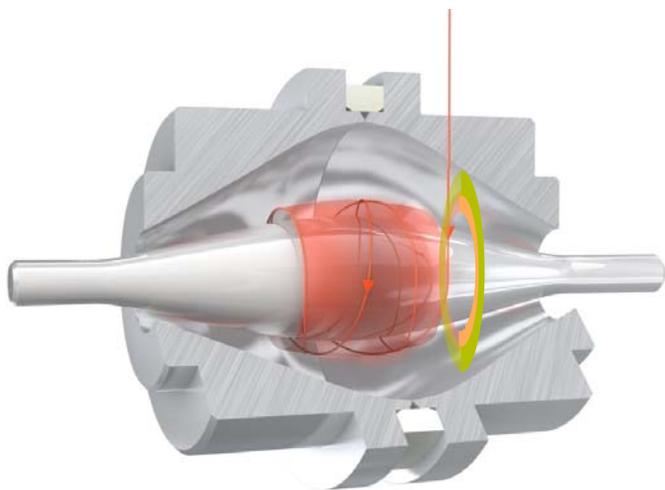
質量が大きいものほどゆっくり飛ぶ= 分解能が高い
 フライトチューブを長くすれば、分解能が高くなる。
 市販の装置のフライトチューブは数m
 反射型(リフレクター型)というタイプもある。

Tof とOrbitrap の原理は実は似ている

Tof-MS イオンが一定の距離を移動するのに要する時間を利用

Orbitrap イオンが一定時間に周回運動(距離に換算可能)する際に発生する電流の周波数を利用

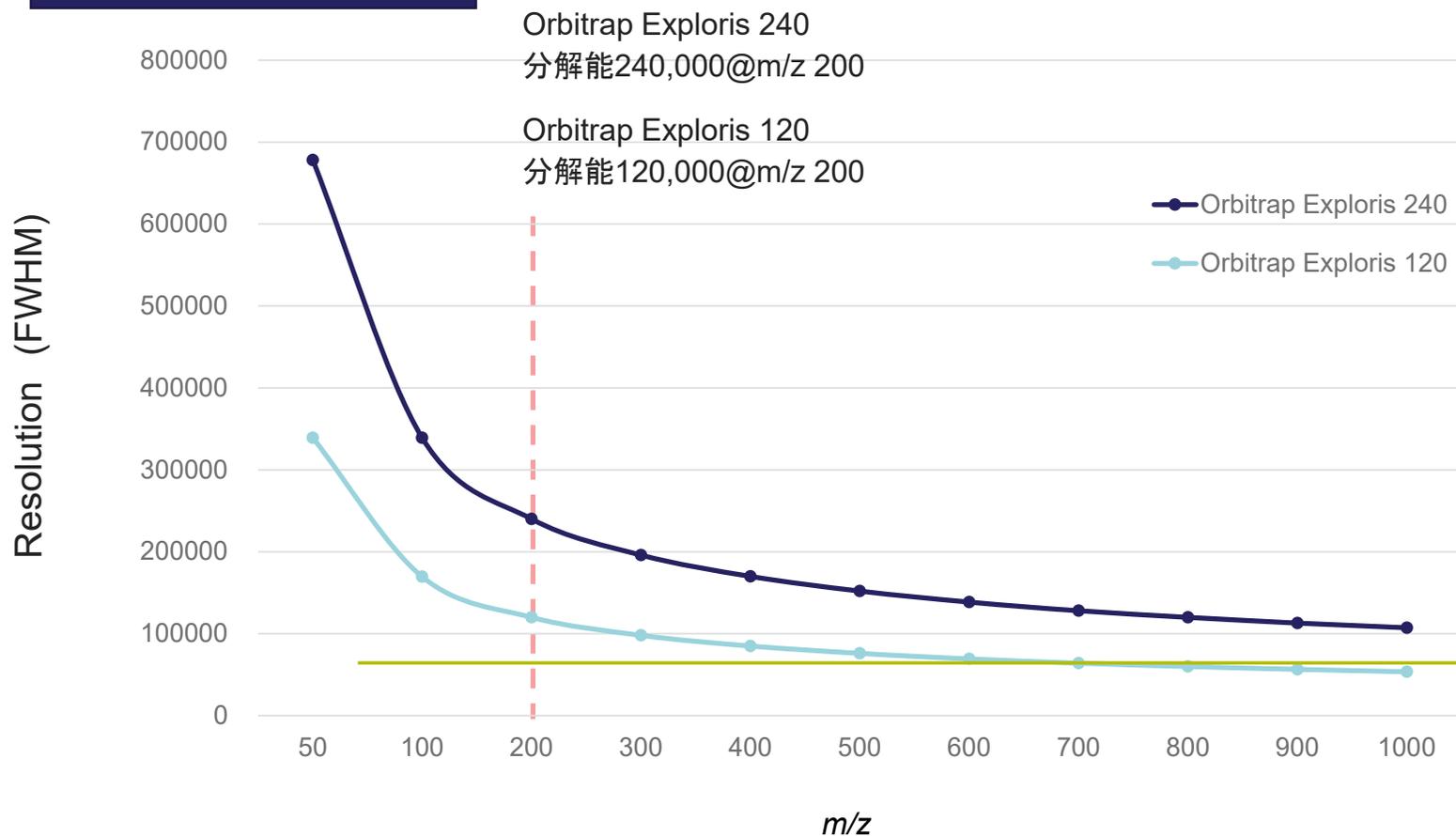
Orbitrap はイオンを回転、振動運動させることでより長い距離を飛行させる。



加速電圧が3.5 kV の場合、 m/z 500 の1価イオン($1.602 \times 10^{-19} \text{C}$)を例で計算すると飛行速度は約37 km/s となる。周波数情報として採用されない運動も含まれているので実際に記録される振動運動の速度はその3割程度となり、12 km/s 程度である。

質量分解能: Orbitrap

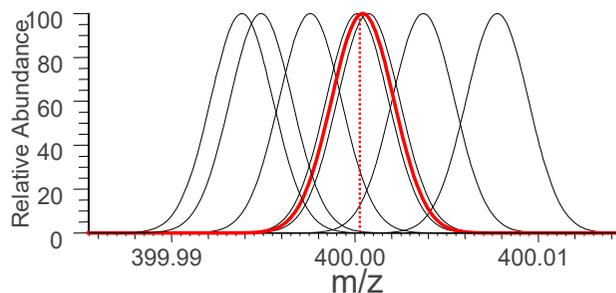
m/zにおける質量分解能



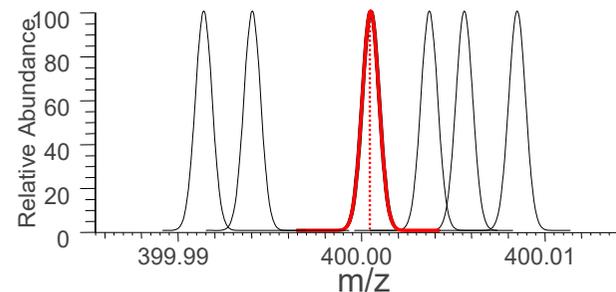
Tof の分解能
メーカーによって基準とする
m/z、分解能が異なるが
およそ30000~80000ぐらい。

分解能 ≠ 質量精度

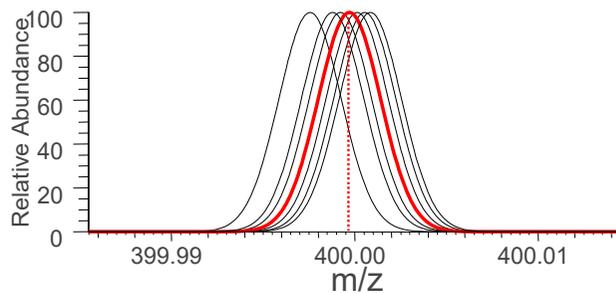
低分解能 質量精度悪



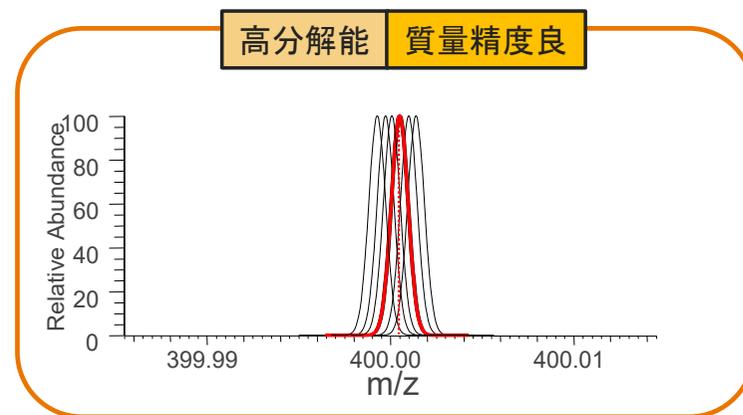
高分解能 質量精度悪



低分解能 質量精度良



高分解能 質量精度良



分解能&質量精度ともに高性能に取得できるのがOrbitrap

Thermo Scientific™ Exploris

Orbitrap Exploris 240 の装置性能

- **分解能@m/z 200 (スキャン速度)**

15,000	(22スキャン/秒)
30,000	(12スキャン/秒)
45,000	(10スキャン/秒)
60,000	(7スキャン/秒)
120,000	(3スキャン/秒)
180,000	(2スキャン/秒)
240,000	(1.5スキャン/秒)

- **質量精度**

3 ppm以内 (外部標準法)
1 ppm以内 (内部標準法)
sub 1ppm以内(EASY-IC)

- **感度**

200 fg reserpine (S/N比 100:1): MS/MS
200 fg reserpine (S/N比 250:1): SIM

- **測定質量範囲**

m/z 40-6,000
*BioPharma オプション(m/z 40- 8,000)

- **ポジネガスイッチング**

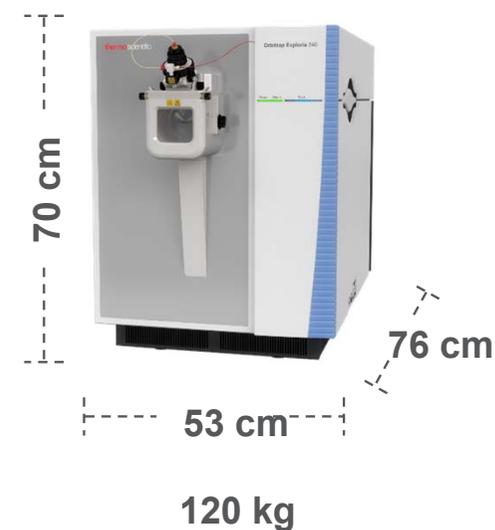
1サイクル(1ポジティブ & 1ネガティブ)が700 ms以内
(設定分解能60,000, Full Scanの時)

- **マイルドトラッピングモード**

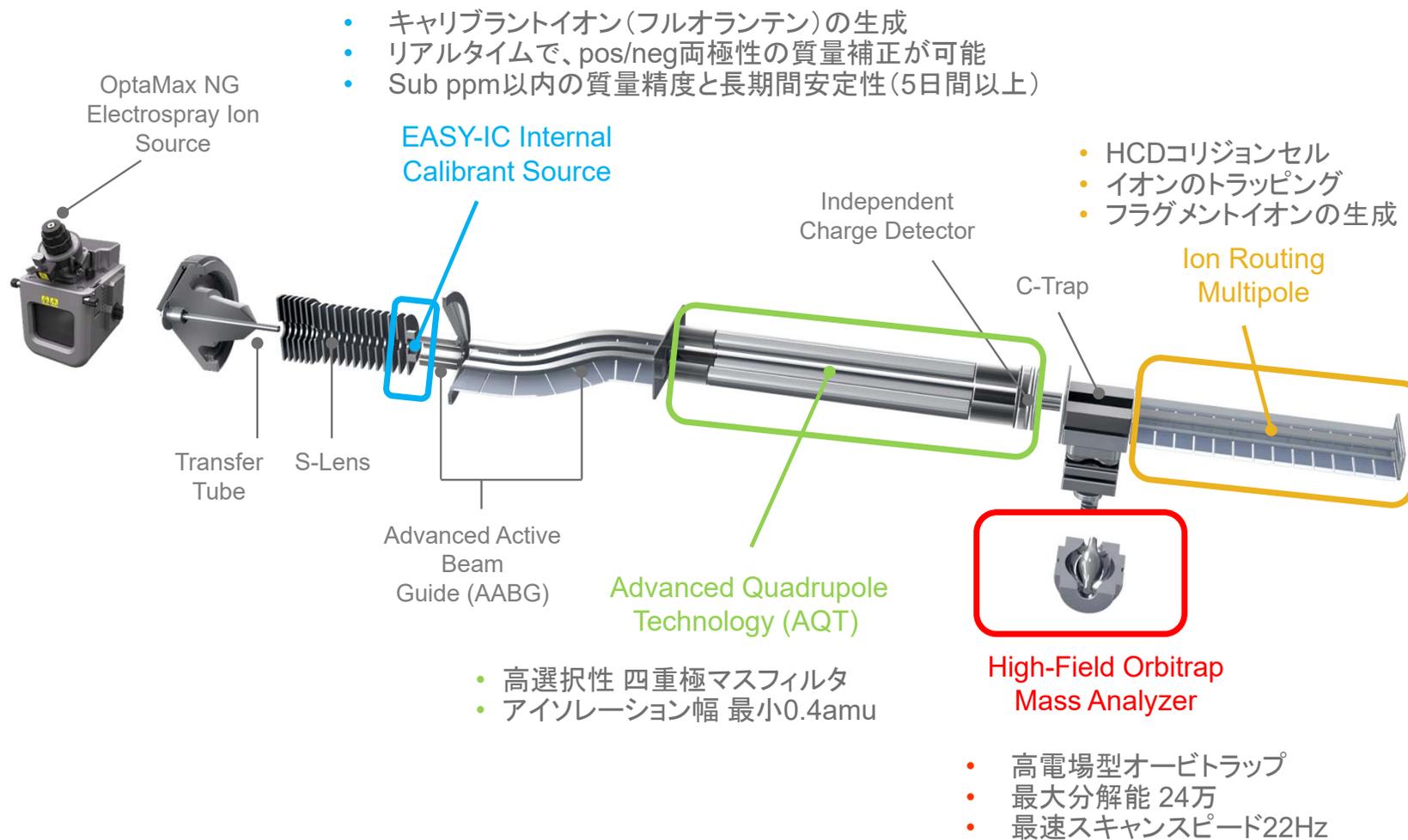
- **AcquireX機能**

- **オプション**

FAIMS Pro Duo
BioPharma option

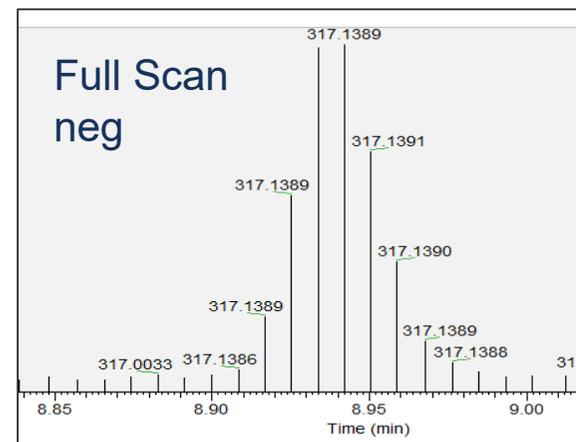
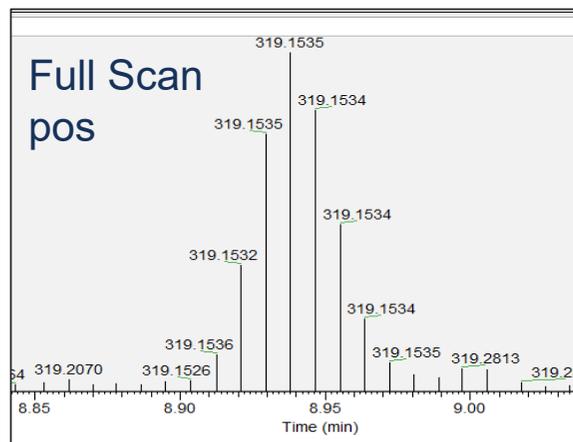


Orbitrap Exploris 240の装置構成



Excellent Scan-to-Scan Mass Accuracy

Positive / Negative
同時測定



Mass Accuracy **[M+H]⁺ Zearalenone** across the peak

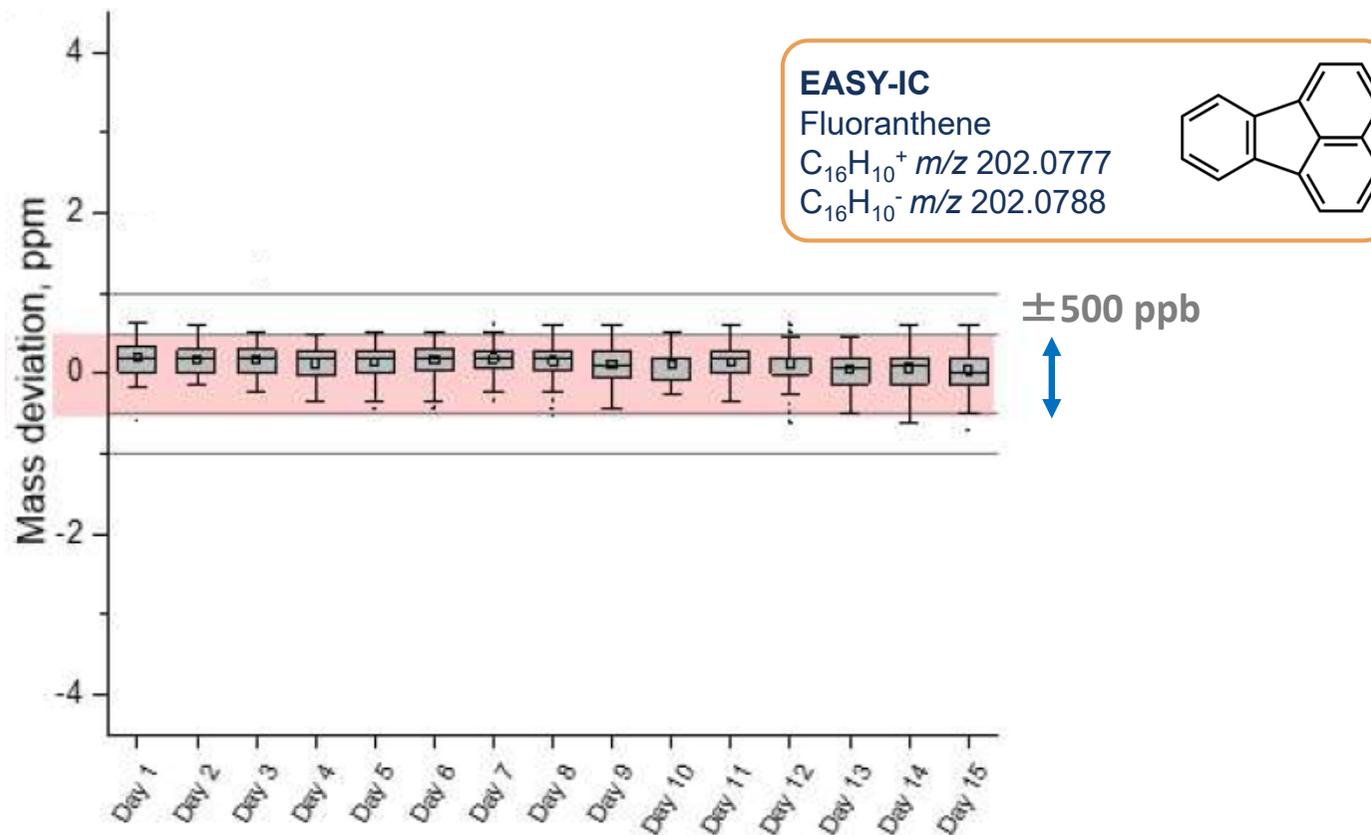
Scan	Exact mass	Observed mass	Delta ppm
1	319.1536	319.1526	-3.13
2	319.1536	319.1536	0.00
3	319.1536	319.1532	-1.25
4	319.1536	319.1535	-0.31
5	319.1536	319.1535	-0.31
6	319.1536	319.1534	-0.63
7	319.1536	319.1534	-0.63
8	319.1536	319.1534	-0.63
9	319.1536	319.1535	-0.31
Average			-0.80

Mass Accuracy **[M-H]⁻ Zearalenone** across the peak

Scan	Exact mass	Observed mass	Delta ppm
1	317.139	317.1386	-1.26
2	317.139	317.1389	-0.32
3	317.139	317.1389	-0.32
4	317.139	317.139	0.00
5	317.139	317.1389	-0.32
6	317.139	317.1391	0.32
7	317.139	317.139	0.00
8	317.139	317.1389	-0.32
9	317.139	317.1388	-0.63
Average			-0.32

EASY-ICを使用すると..さらに安定した質量精度

- LC-MSの分析条件に依存せず、ポジティブ・ネガティブの両方の補正が可能
- EASY-ICを使用する事でさらに安定した質量精度を長期間維持する事が可能



本日

1

Orbitrap™の原理

2

精密質量データ解析の基礎

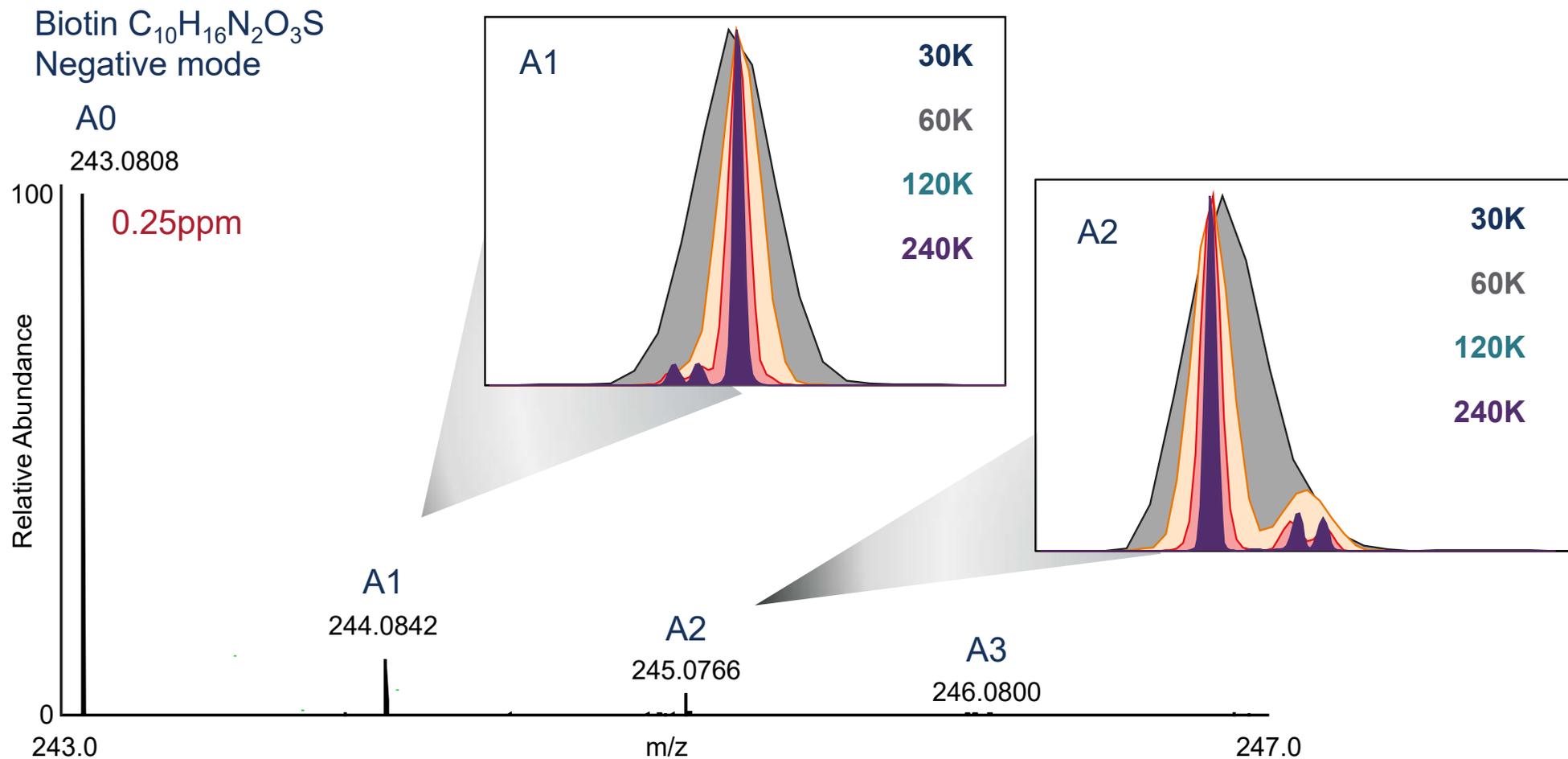
3

メタボロミクス分析のご紹介

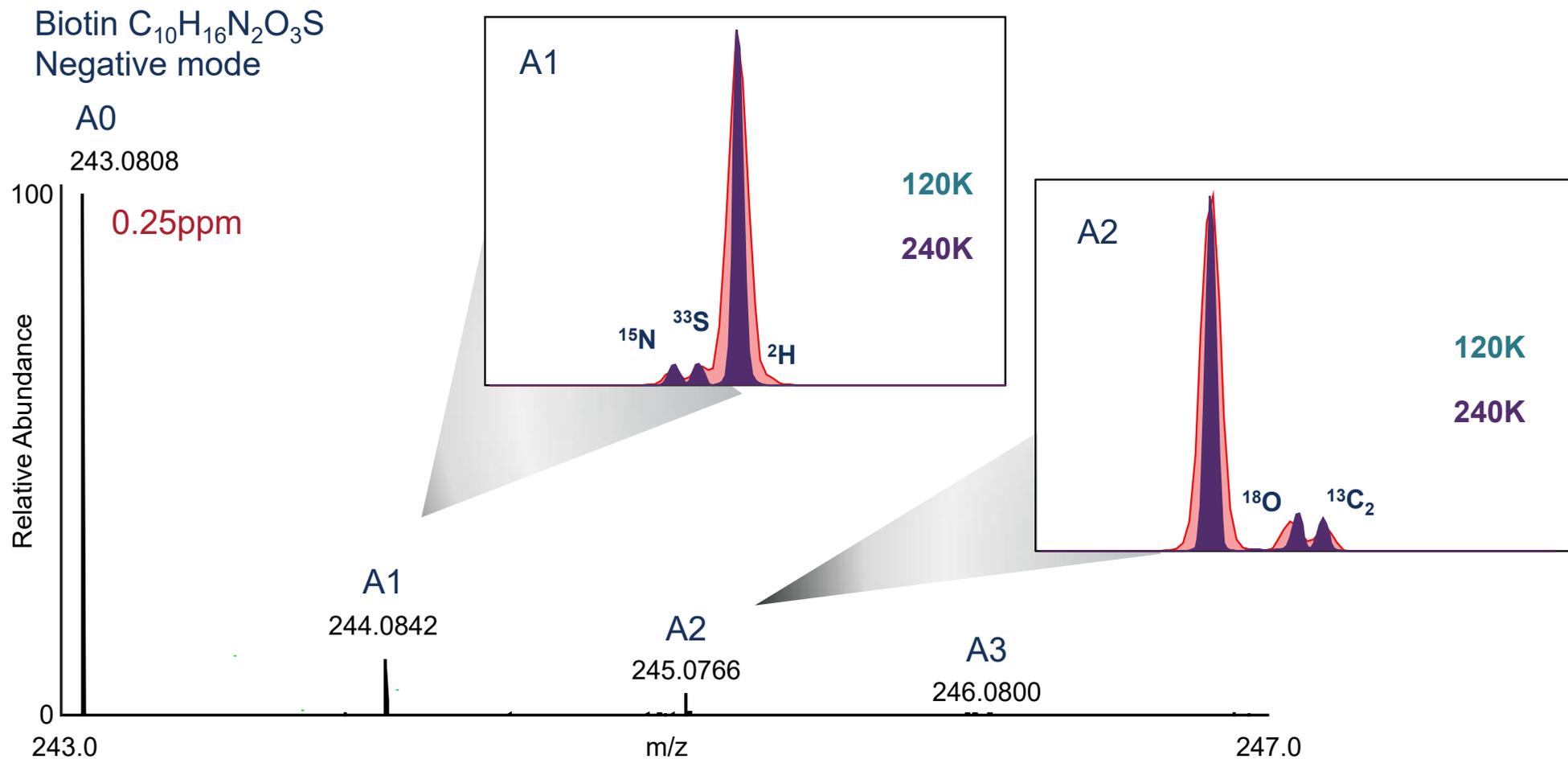
4

ソフトウェアを用いたアプリケーション紹介

高質量分解能による詳細な同位体パターンの決定



高質量分解能による詳細な同位体パターンの決定



スルファメトキサゾール

C₁₀H₁₁N₃O₃S

8mix_100ppb_03 #1245 RT: 6.86 AV: 1 NL: 7.51E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.0000-1000.0000]

Elemental composition search on mass 254.06

m/z = 249.06-259.06

Isotope	Min	Max
N-14	0	10
O-16	0	15
C-12	0	30
H-1	0	60
S-32	0	1

Charge 1

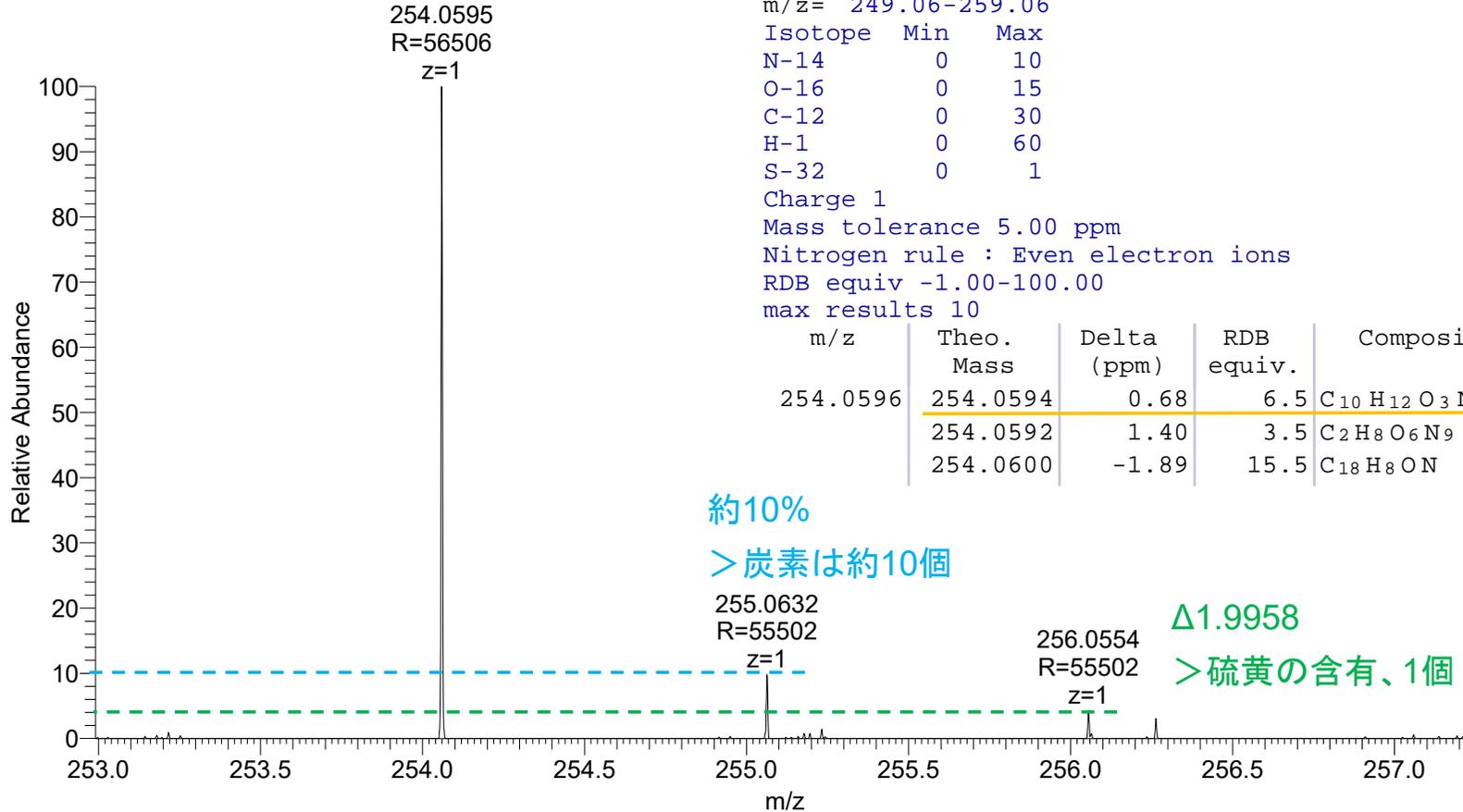
Mass tolerance 5.00 ppm

Nitrogen rule : Even electron ions

RDB equiv -1.00-100.00

max results 10

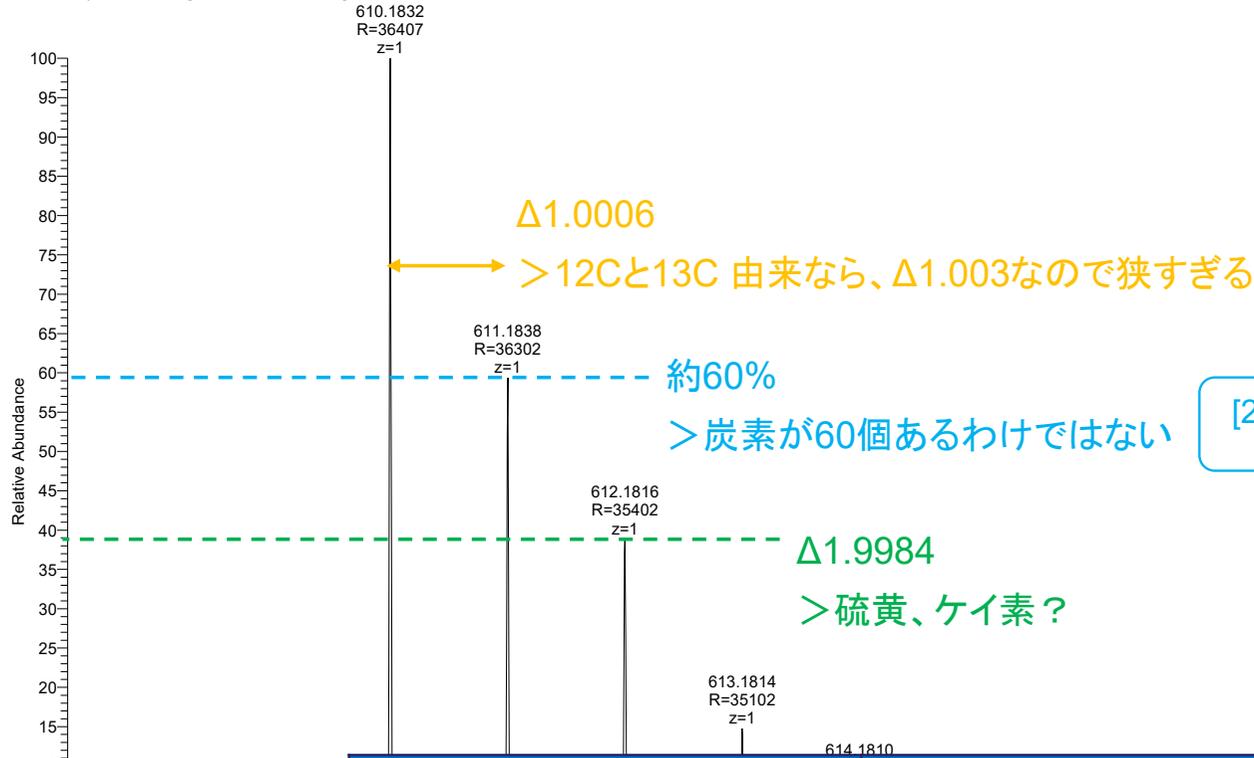
m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
254.0596	254.0594	0.68	6.5	C ₁₀ H ₁₂ O ₃ N ₃ S
	254.0592	1.40	3.5	C ₂ H ₈ O ₆ N ₉
	254.0600	-1.89	15.5	C ₁₈ H ₈ ON



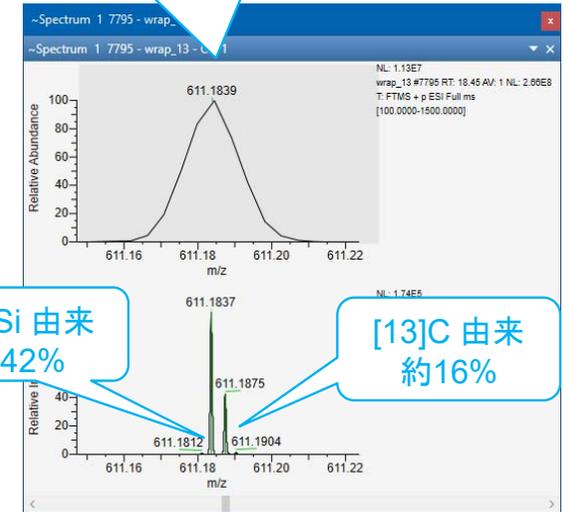
ポリシロキサン

C₁₆H₄₈O₈Si₈ アンモニウムアダクトイオン

wrap_10 #7601 RT: 18.42 AV: 1 NL: 2.43E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1500.0000]



実測のピークは
下段の合成で高さ約60%



M			M+1			M+2		
元素	質量	存在比%	元素	存在比%	Δm_d	元素	存在比%	Δm_d
²⁸ Si	27.9769	100	²⁹ Si	5.078%	0.9996	³⁰ Si	3.347%	1.9968

1 Orbitrap™の原理

2 精密質量データ解析の基礎

3 メタボロミクス分析のご紹介

4 ソフトウェアを用いたアプリケーション紹介

分析を始めるにあたって

◆情報収集

- ◆ 測定事例(論文, アプリケーションノート等)
- ◆ 化合物情報(構造, 組成式)
- ◆ 前処理情報



Antimicrobial Agents
and Chemotherapy



Untargeted Metabolomics To Ascertain Antibiotic Modes of Action

Isabel M. Vincent,^a David E. Ehmann,^{b*} Scott
University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom^a, Astra

Deciphering the mode of action (MOA) of
Metabolomics offers a potentially rapid and
ated through changes in metabolism. Meta
Here, we present data from an untargeted li
eight compounds: 1-[3-fluoro-4-(5-methyl-
clobutylmethoxy)-5'-deoxyadenosine, tricl
(CCCP), 5-chloro-
blind to the compo
fosmidomycin, acy
cell wall metabolite
inated spectral out
carrier CCCP, have
tions to two comp
lome were seen ove
the analysis of drug

Amino acid metabolism is altered in adolescents with NAFLD - an untargeted, high resolution metabolomics study

Ran Jin, PhD^{1,*}, Sophia Banton, MS, MPH^{2,*}, ViLinh T. Tran, PhD², Juna V. Konomi, PhD¹,
Shuzhao Li, PhD², Dean P. Jones, PhD², and Miriam B. Vos, MD, MSPH¹

¹Division of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, School of Medicine, Emory

Am J Physiol Endocrinol Metab 311: E471–E479, 2016.
First published June 28, 2016; doi:10.1152/ajpendo.00134.2016.

Boyles et al. *Particle and Fibre Toxicology* (2016) 13:49
DOI 10.1186/s12989-016-0160-6

Particle and Fibre Toxicology

RESEARCH

Open Access

Copper oxide nanoparticle toxicity profiling using untargeted metabolomics

Matthew S. P. Boyles^{1†}, Christina Ranninger^{2†}, Roland Reischl², Marc Rurik^{3,4}, Richard Tessadri⁵,
Oliver Kohlbacher^{3,4,6,7,8}, Albert Duschl^{1*} and Christian G. Huber^{2*}

Abstract

Novel insights into development of diabetic bladder disorder provided by metabolomic analysis of the rat nondiabetic and diabetic detrusor and urothelial layer

Yi Wang,¹ Gary G. Deng,² and Kelvin P. Davies^{1,3}

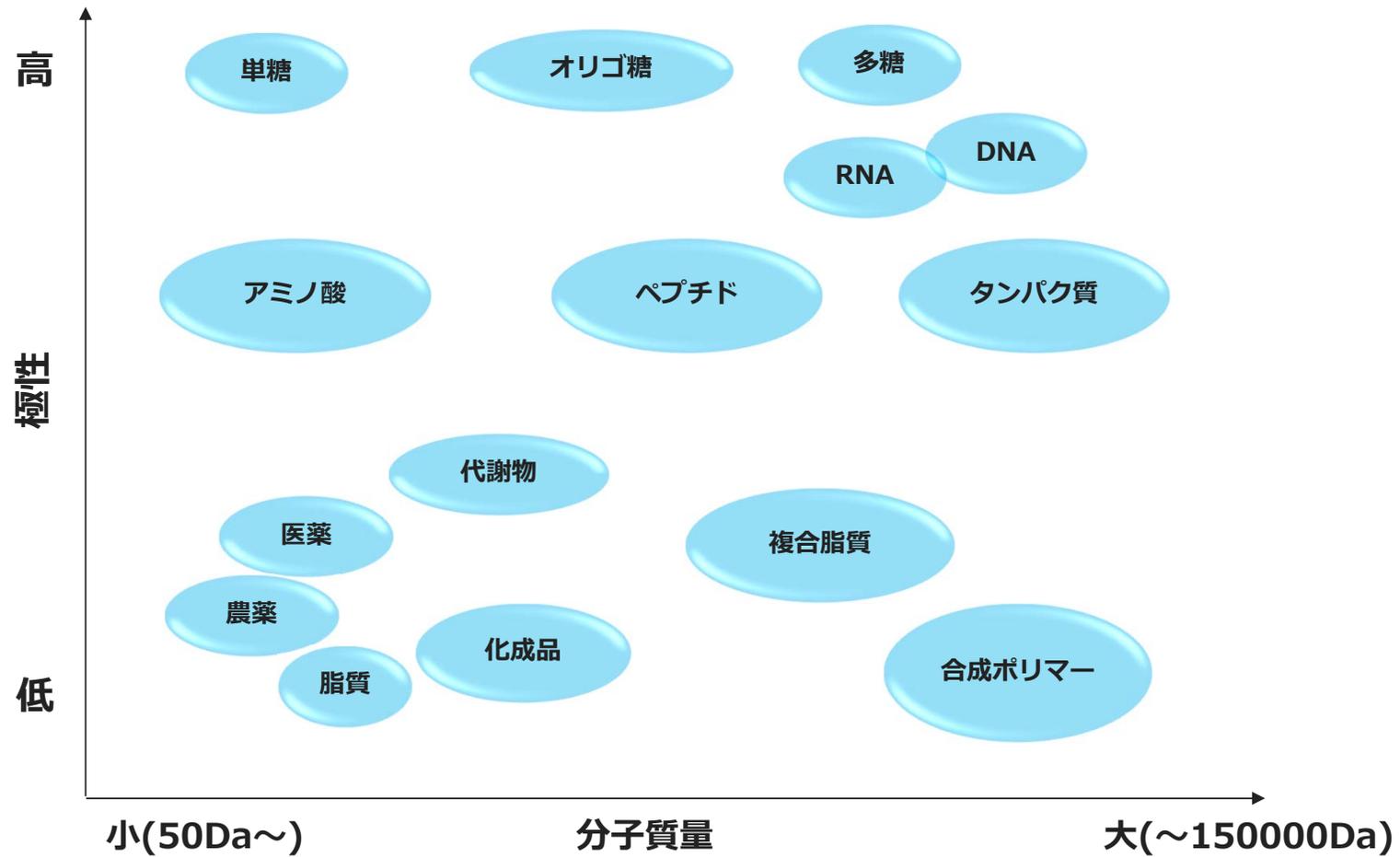
¹Department of Urology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York; ²Endocrine/Cardiovascular Research, Lilly
Research Laboratories, Indianapolis, Indiana; and ³Department of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of
Medicine, Bronx, New York

Submitted 5 April 2016; accepted in final form 23 June 2016

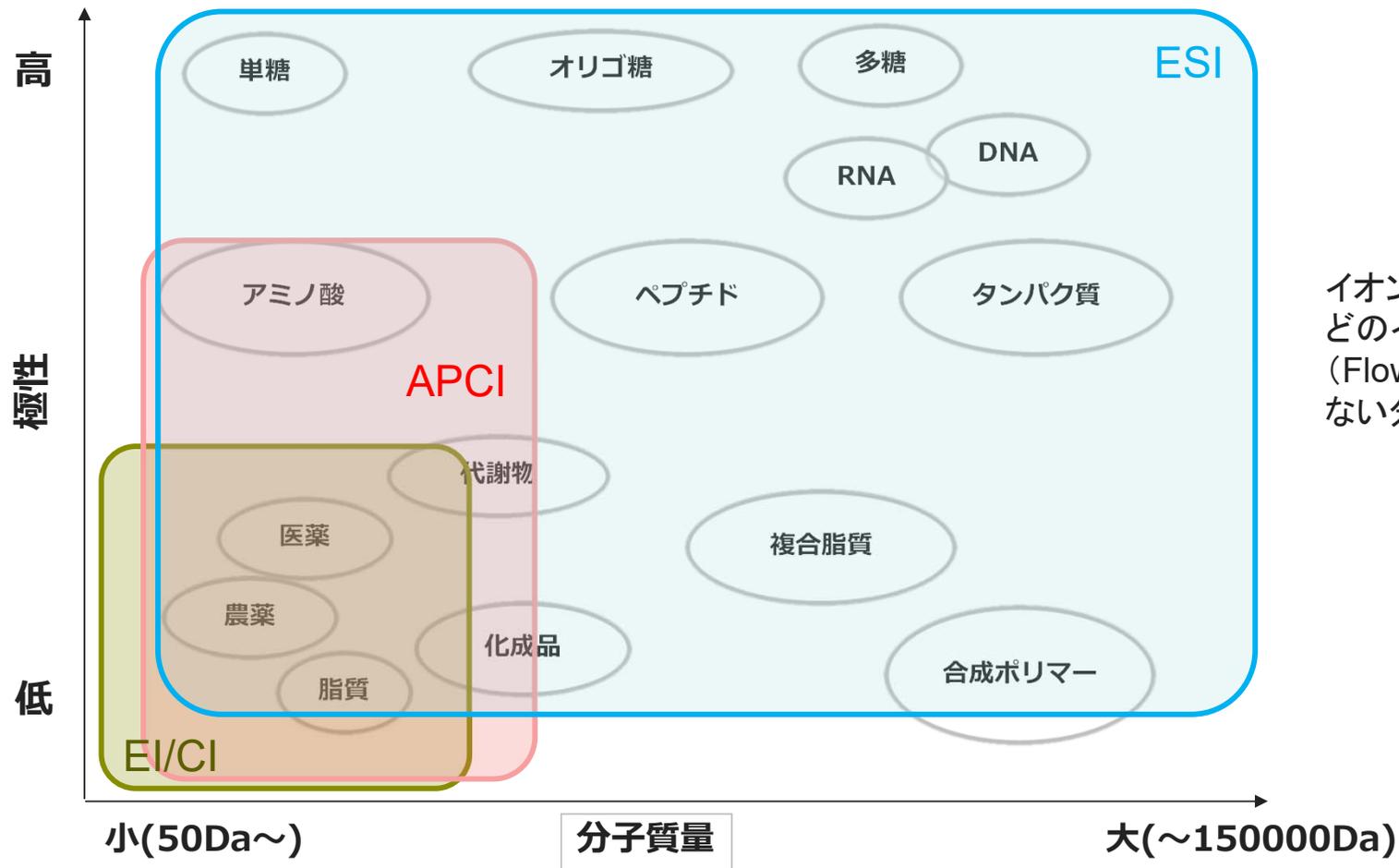
Wang Y, Deng GG, Davies KP. Novel insights into development
of diabetic bladder disorder provided by metabolomic analysis of the
rat nondiabetic and diabetic detrusor and urothelial layer. *Am J
Physiol Endocrinol Metab* 311: E471–E479, 2016. First published
June 28, 2016; doi:10.1152/ajpendo.00134.2016.—There are at present
no published studies providing a global overview of changes in
bladder metabolism resulting from diabetes. Such studies have the
potential to provide mechanistic insight into the development of
diabetic bladder disorder (DBD). In the present study, we compared
the metabolome of detrusor and urothelial layer in a 1-mo streptozoto-

bladder differ; the detrusor determines the tone of the bladder,
whereas the urothelial layer serves both as a barrier and in a
regulatory role of detrusor tone. The differing roles of these
tissues in bladder function are reflected by different pathophysio-
logical responses to diabetes. The involvement of detrusor in
DBD has been attributed to several mechanisms that affect
regulation and development of smooth muscle tone; these
include increased muscarinic receptor density (31, 32),
overstretch-induced hypertrophy, increased calcium sensiti-
vity, or increased calcium channel activity (24), alteration

LC/MSで分析される化合物(イメージ)

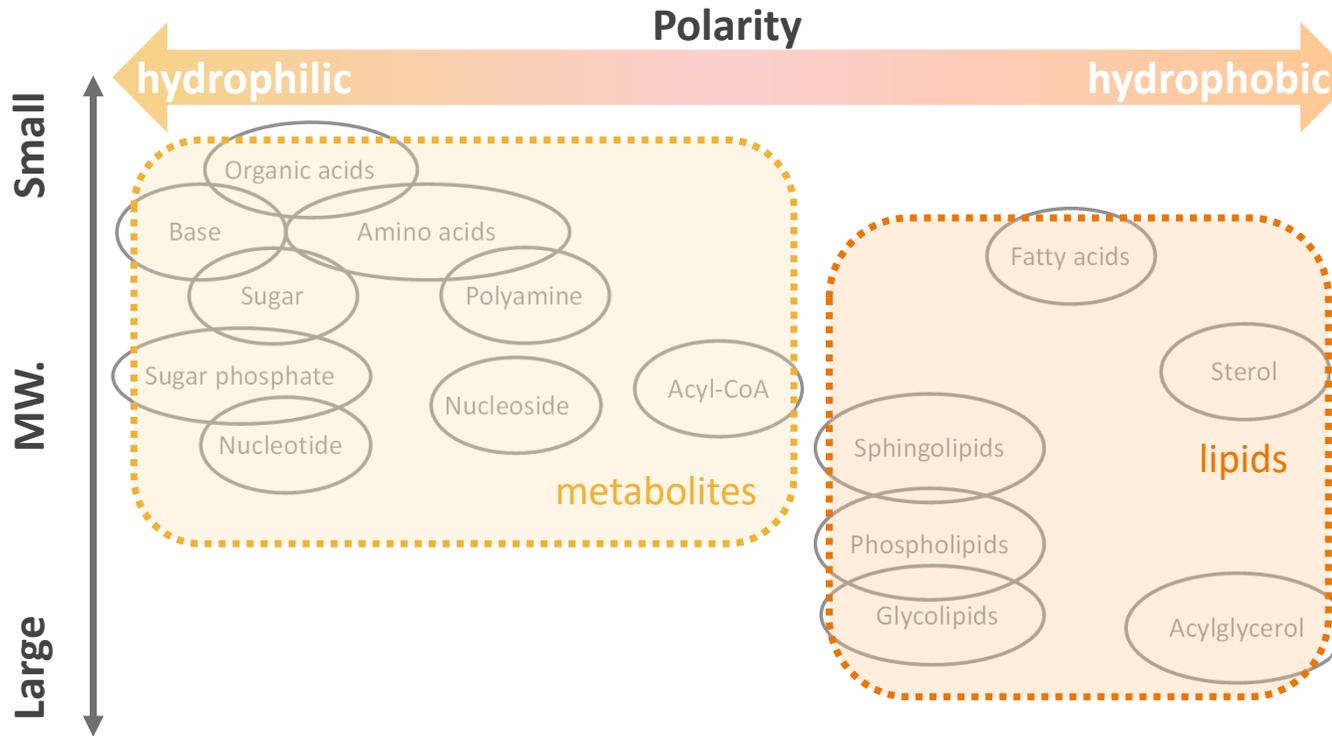


LC/MSで分析される化合物(イメージ)



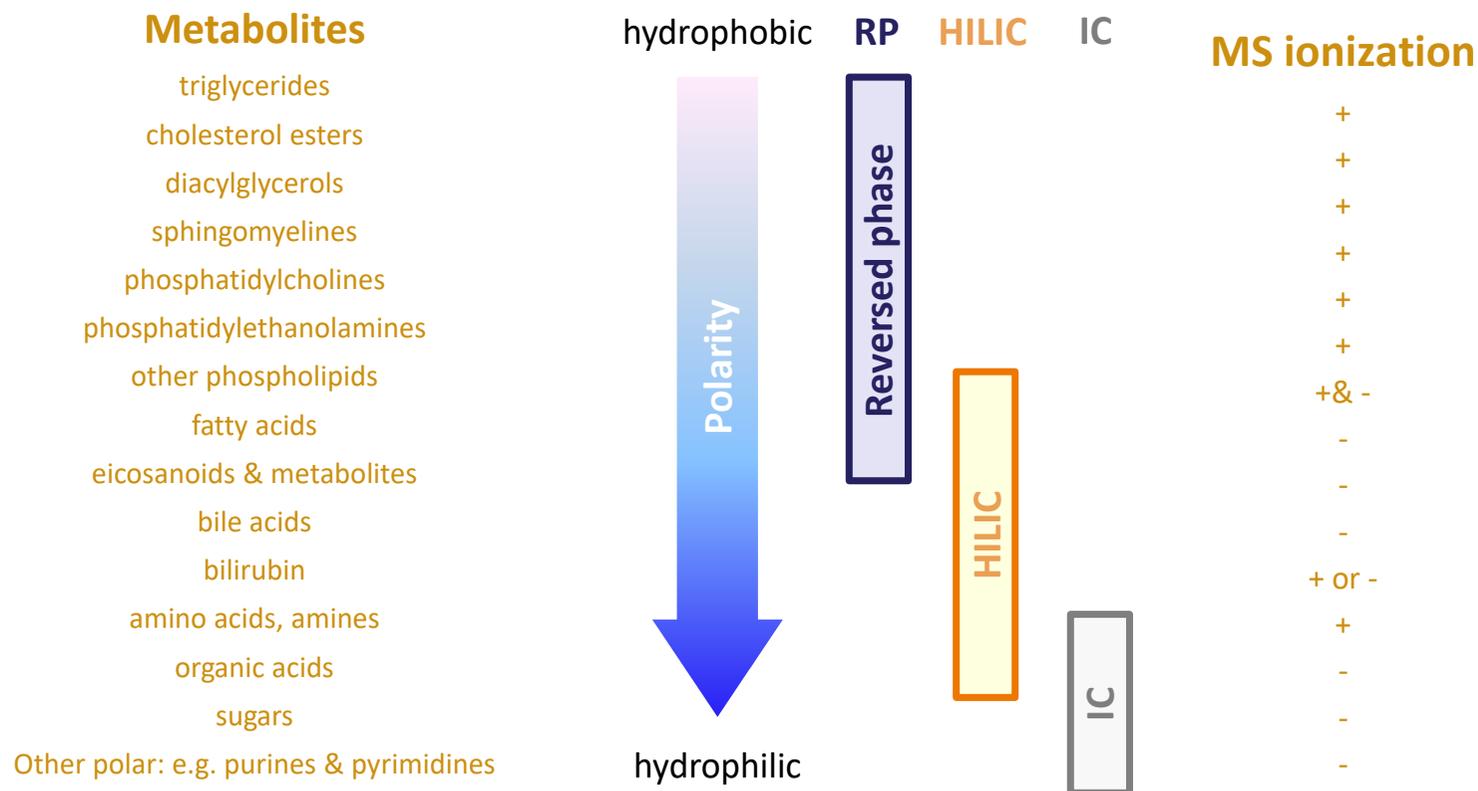
イオン化するかどうか、
どのイオン化が適しているかは、FIA
(Flow Injection Analysis、カラムを使わ
ない分析)で確認することが可能です。

メタボロミクスがターゲットとする低分子



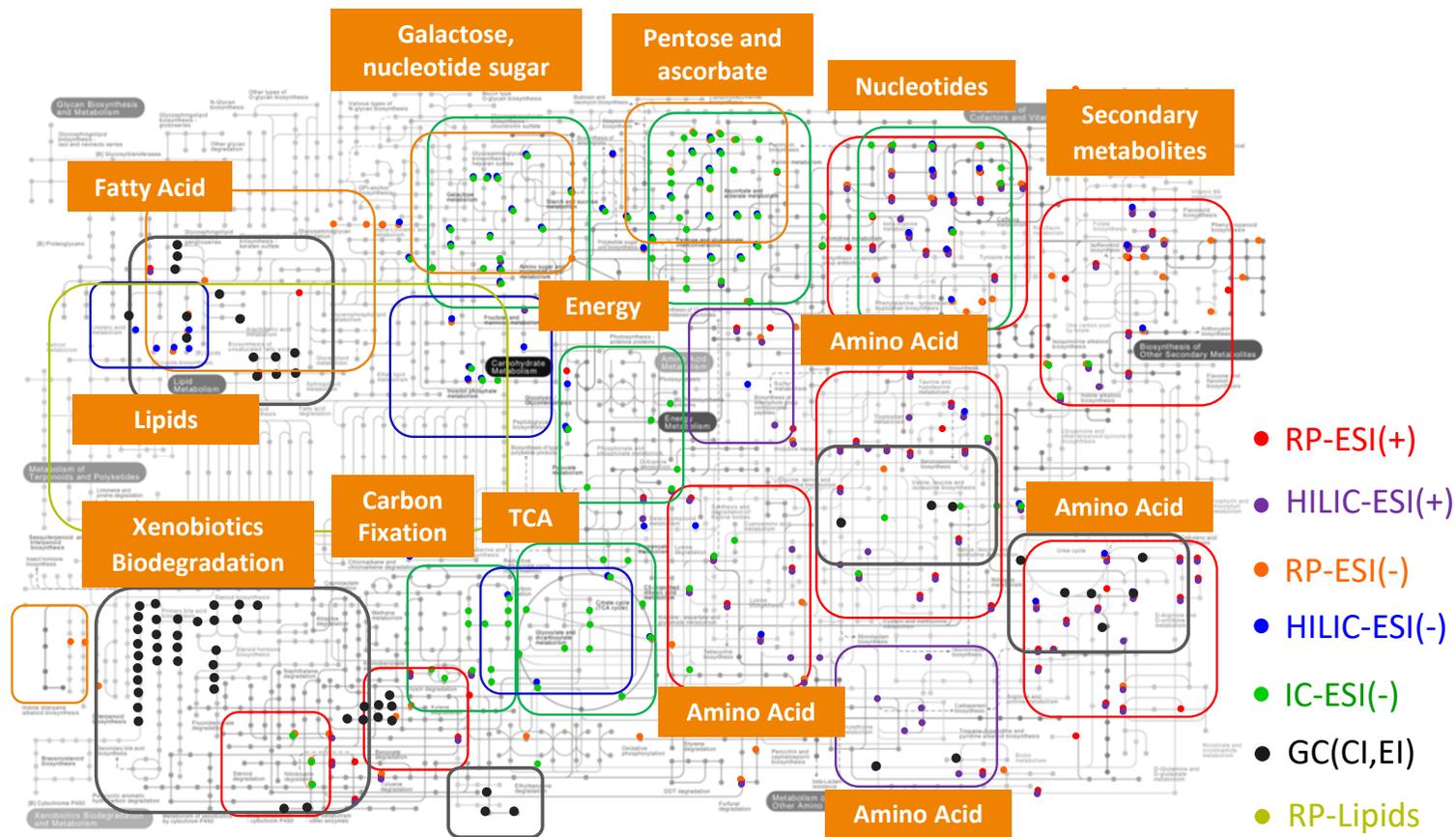
物理化学的特性が多様 同重体・異性体が多種多様に存在

メタボロミクスがターゲットとする低分子



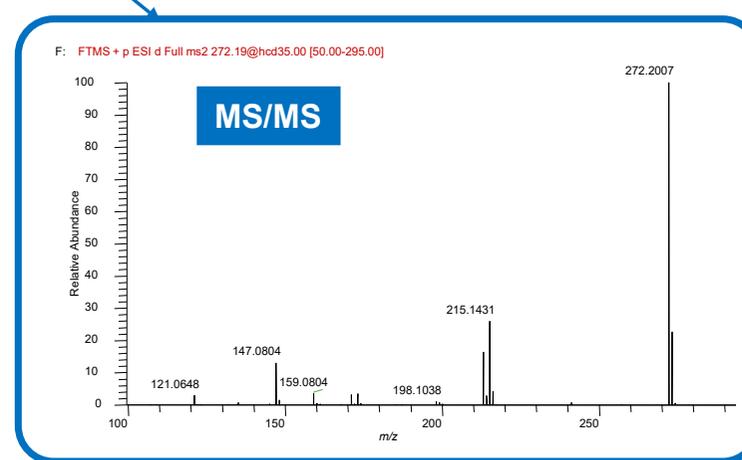
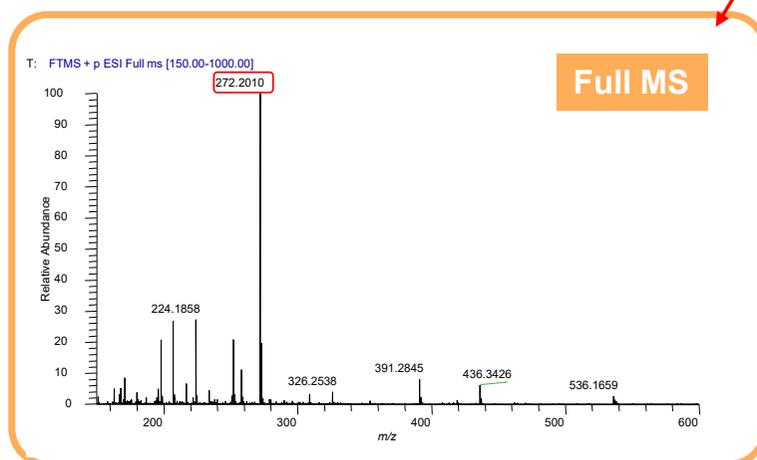
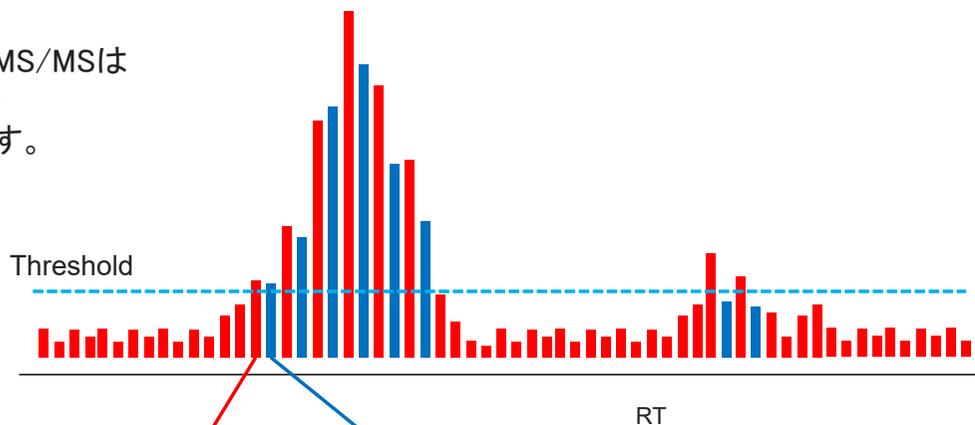
測定対象化合物の特性を把握した測定条件の選択が重要

さまざまな分離法で多様なメタボロームのカバレッジを高める



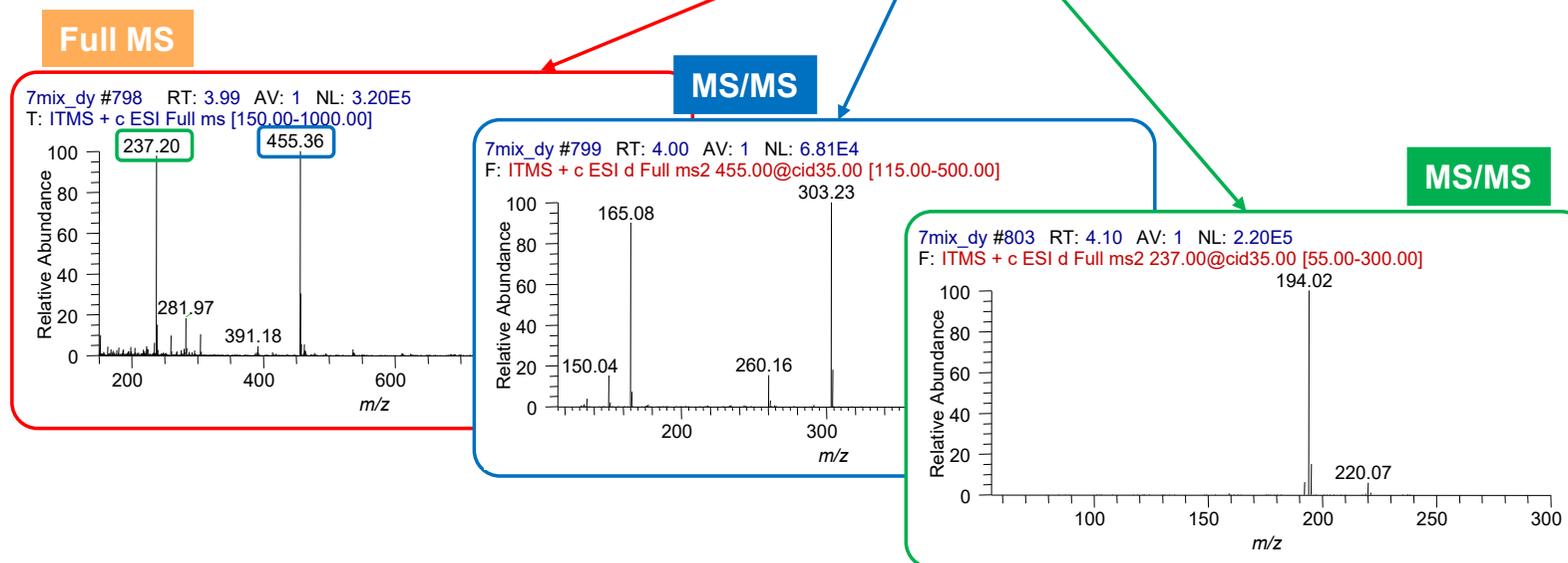
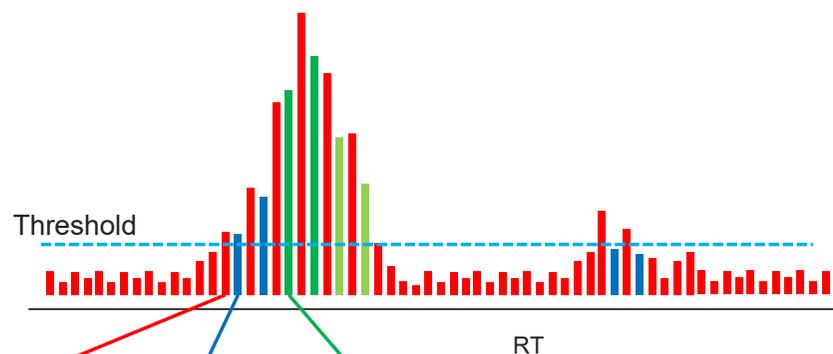
定性分析の基本はData Dependent Analysis

フルスキャンとデータディペンデントMS/MSは
しきい値以上の強度を持つピークの
MS/MSを網羅的に取得する方法です。



Dynamic Exclusion の使用

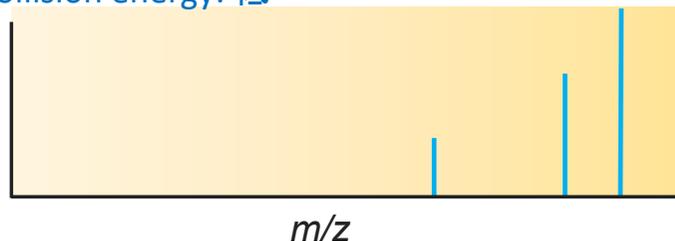
データディペンデントMS/MS に追加する機能。
フルスキャンのデータに従い、しきい値以上のピークについてMS/MSを行います。
MS/MSを行ったプリカーサーイオンを記録して、順次、新規のプリカーサーイオンを選択し、多くのイオンからのMS/MSを取得します。



Steppedコリジョンエネルギー～定性分析に有効な機能～

- 四重極でのコリジョンを採用している装置では必ずコリジョンエネルギーの最適化が必要になります
- Explorisシリーズに搭載しているStepped コリジョンエネルギーを使用する事で、適正なコリジョンエネルギーが不明な未知成分であっても低 m/z から高 m/z まで幅広く、多くの構造情報を一度に取得することが可能です。

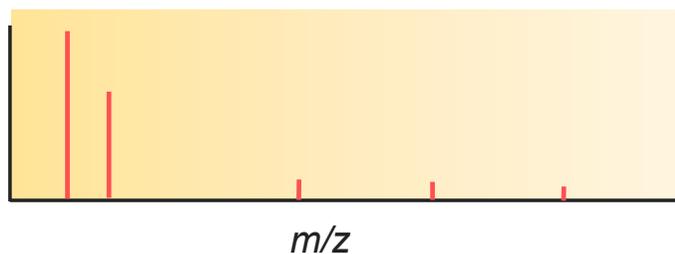
Collision energy: 低



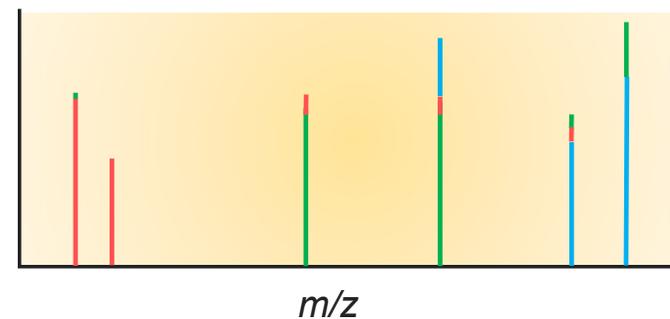
Collision energy : 中



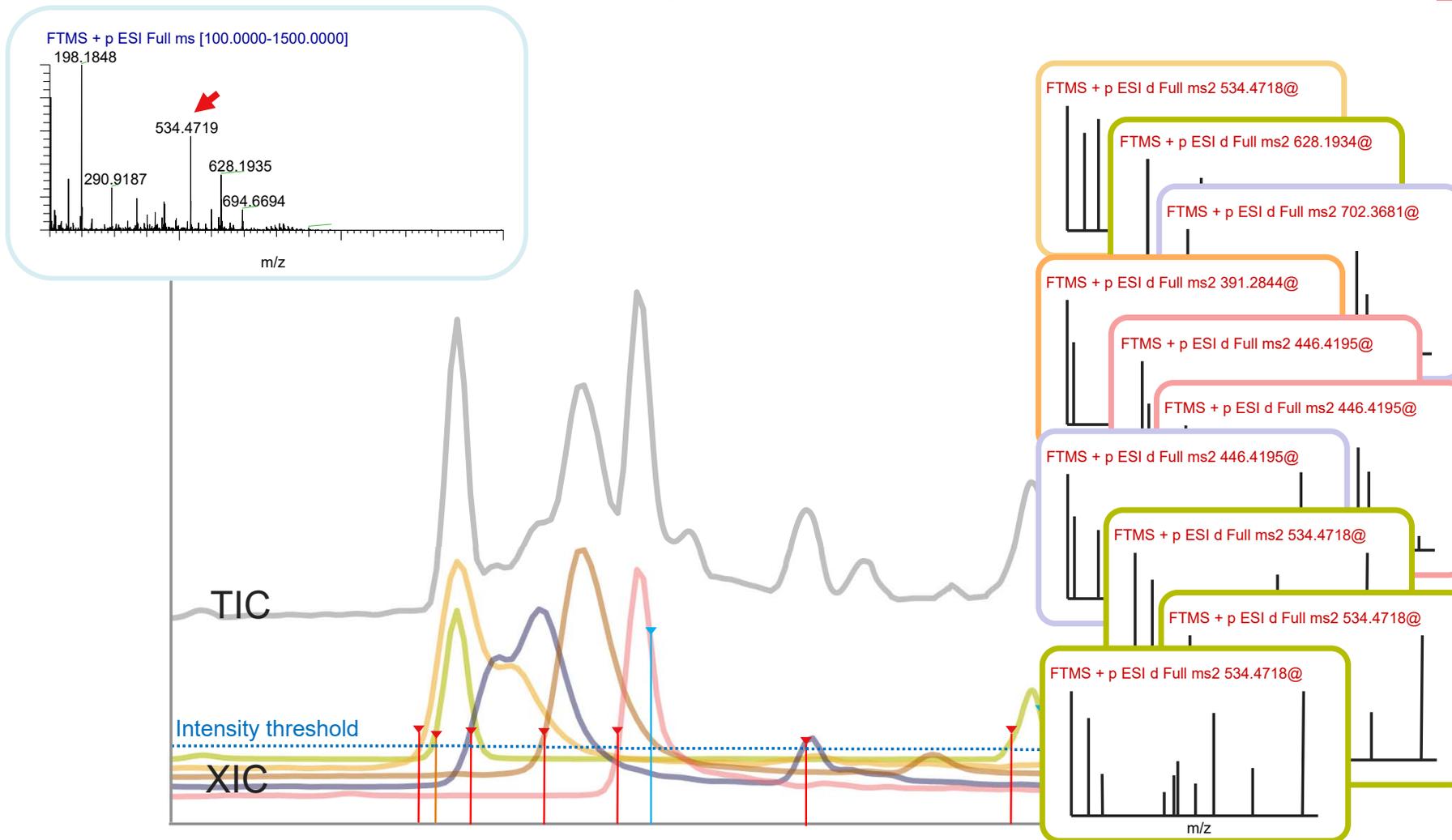
Collision energy: 高



Stepped Collisionを使用したMS/MSスペクトル
3種のエネルギーのフラグメントイオンを混合して検出

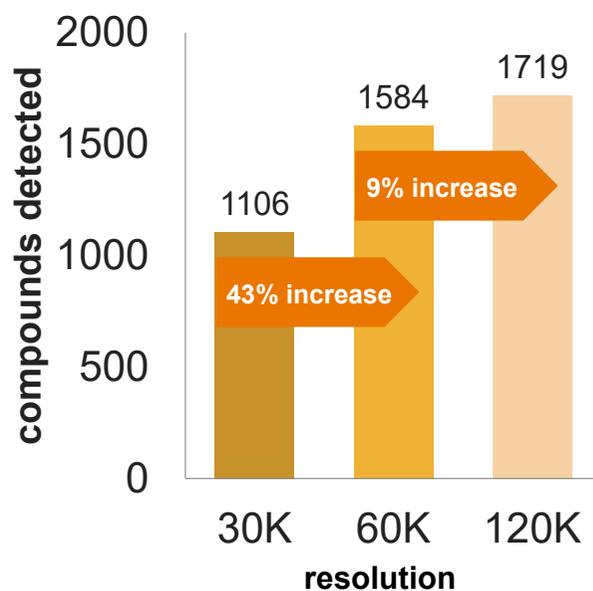


Data Dependent Analysis & Dynamic Exclusion

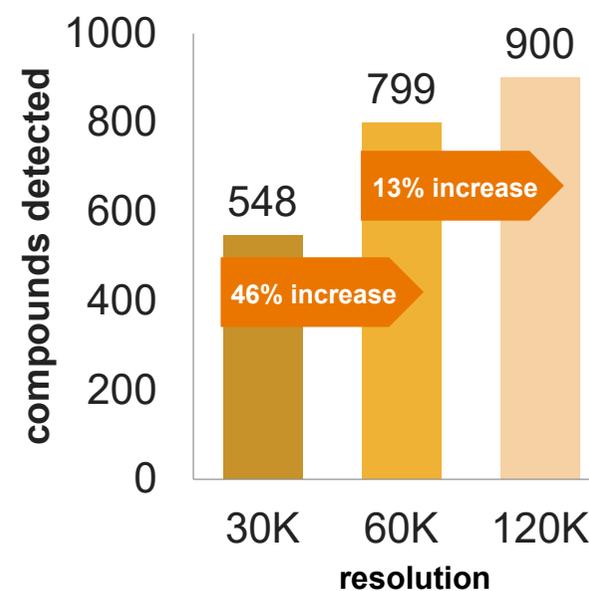


高分解能の効果: メタボロームカバレッジの向上

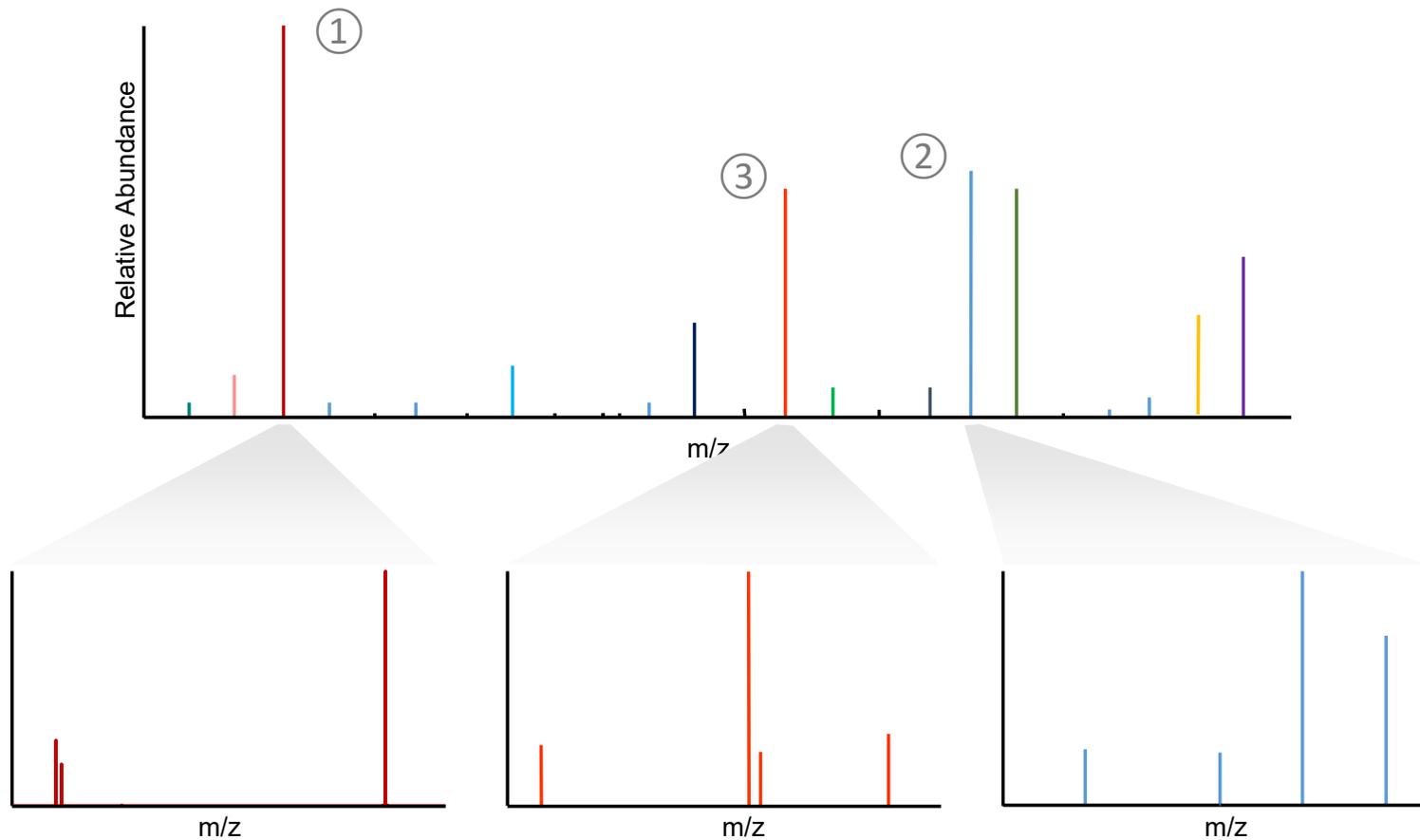
ヒト血漿中代謝物ピーク数
(positive mode)



ヒト血漿中代謝物ピーク数
(negative mode)

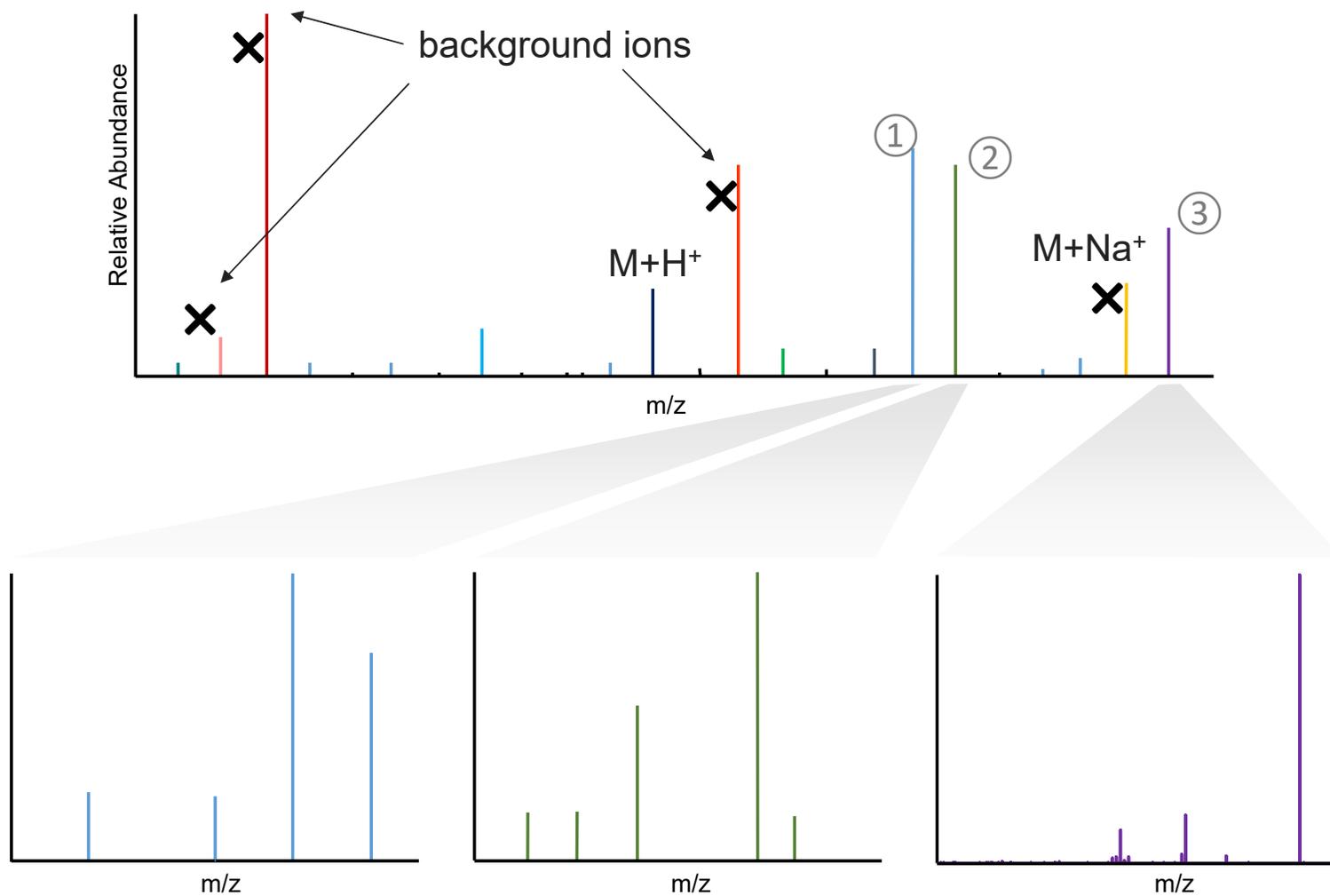


従来のMS/MS取得法 : Data-Dependent Acquisition (DDA)

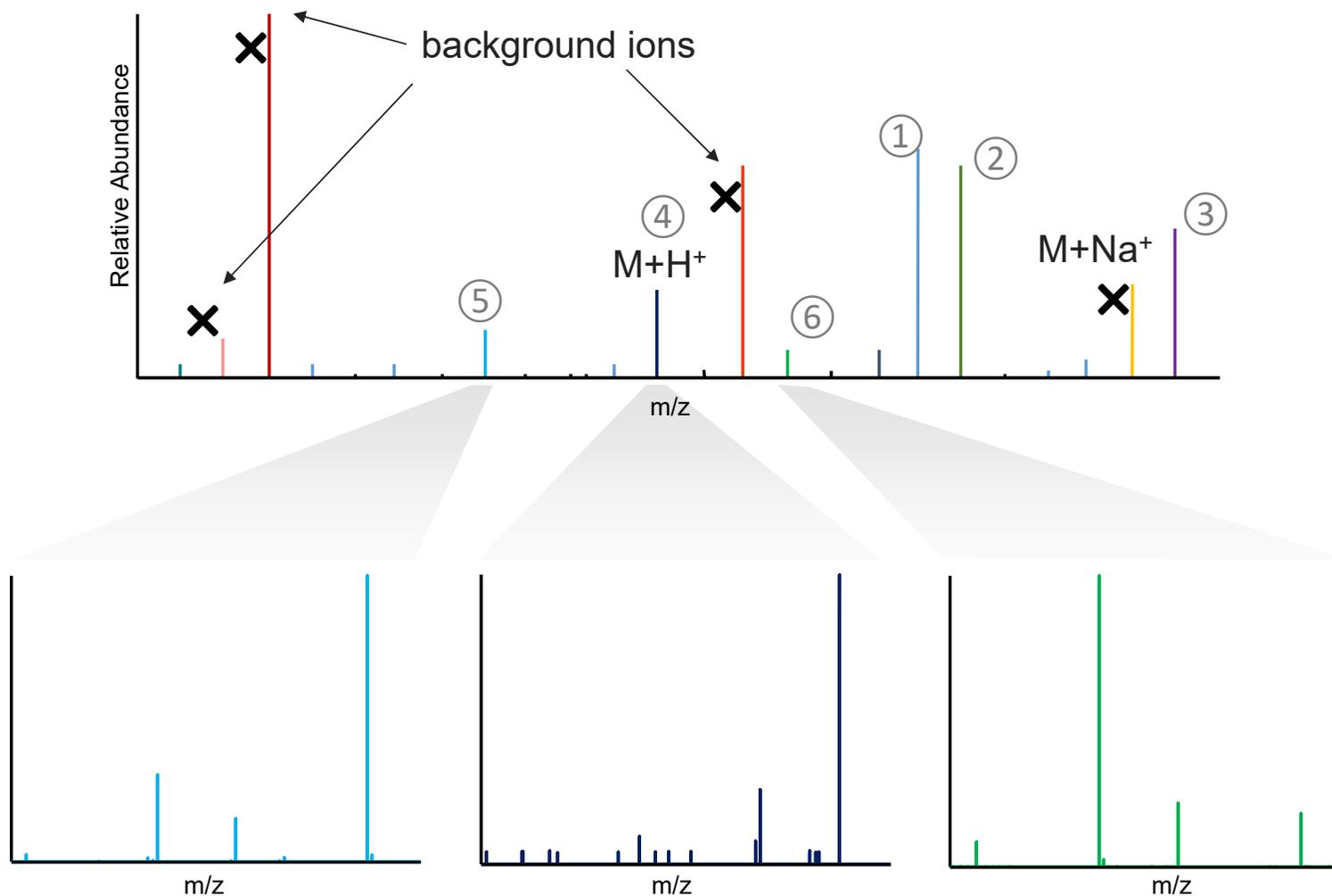


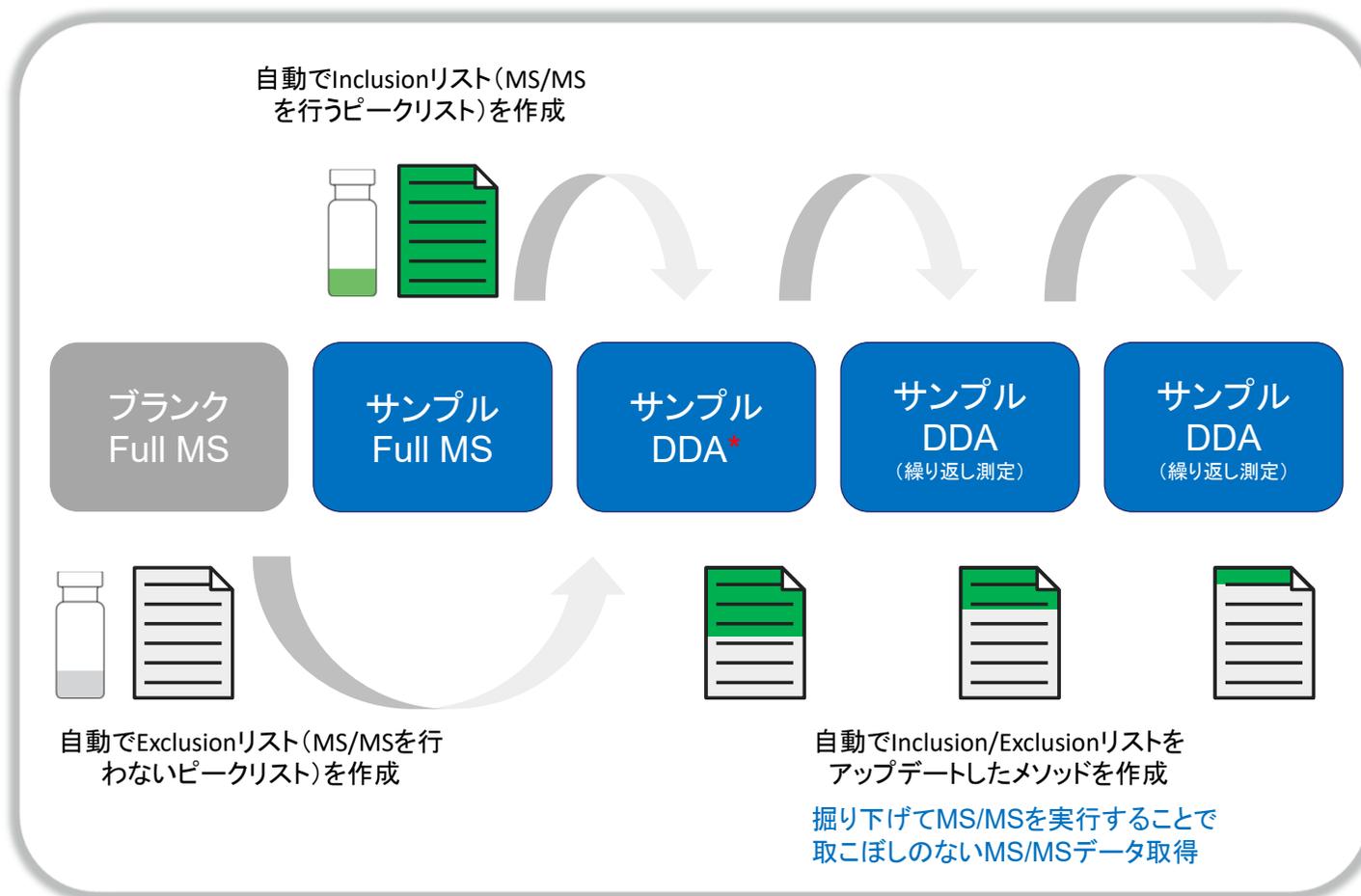
強度の大きいシグナルから順番にMS/MSを取得
すべてのMS/MSを取得できない

本来あるべきインテリジェントなMS/MS取得法



本来あるべきインテリジェントなMS/MS取得法



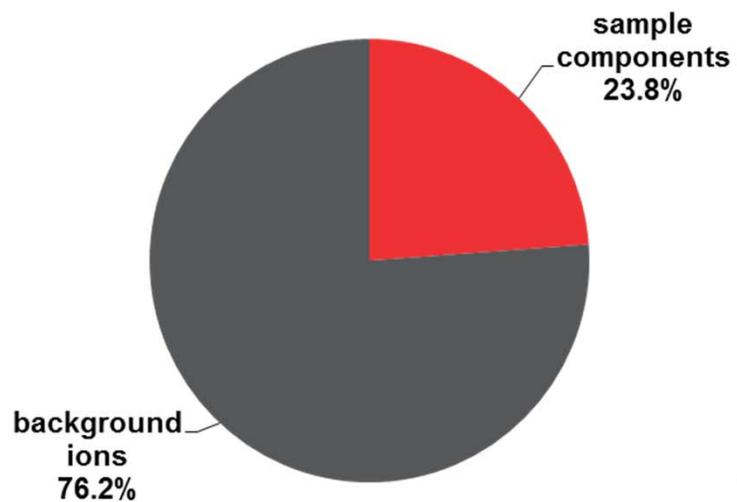


*DDA : data-dependent acquisition

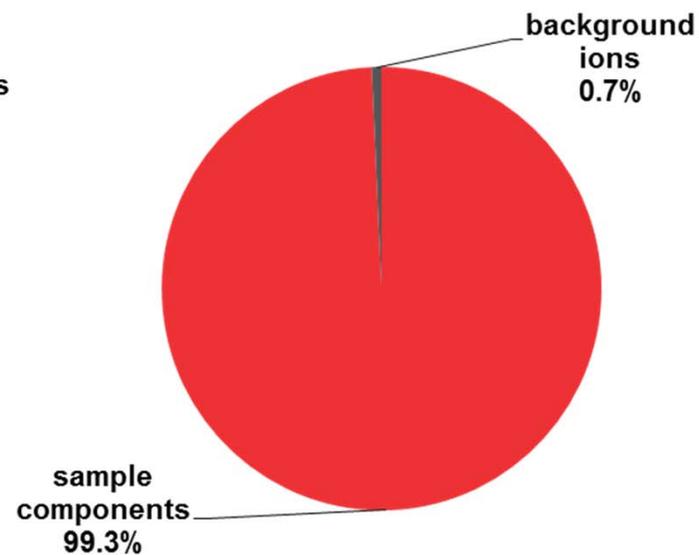
AcquireXで取得される有用なMS/MS

不要なデータを減らし、情報価値あるデータを収集

Traditional DDA



AcquireX

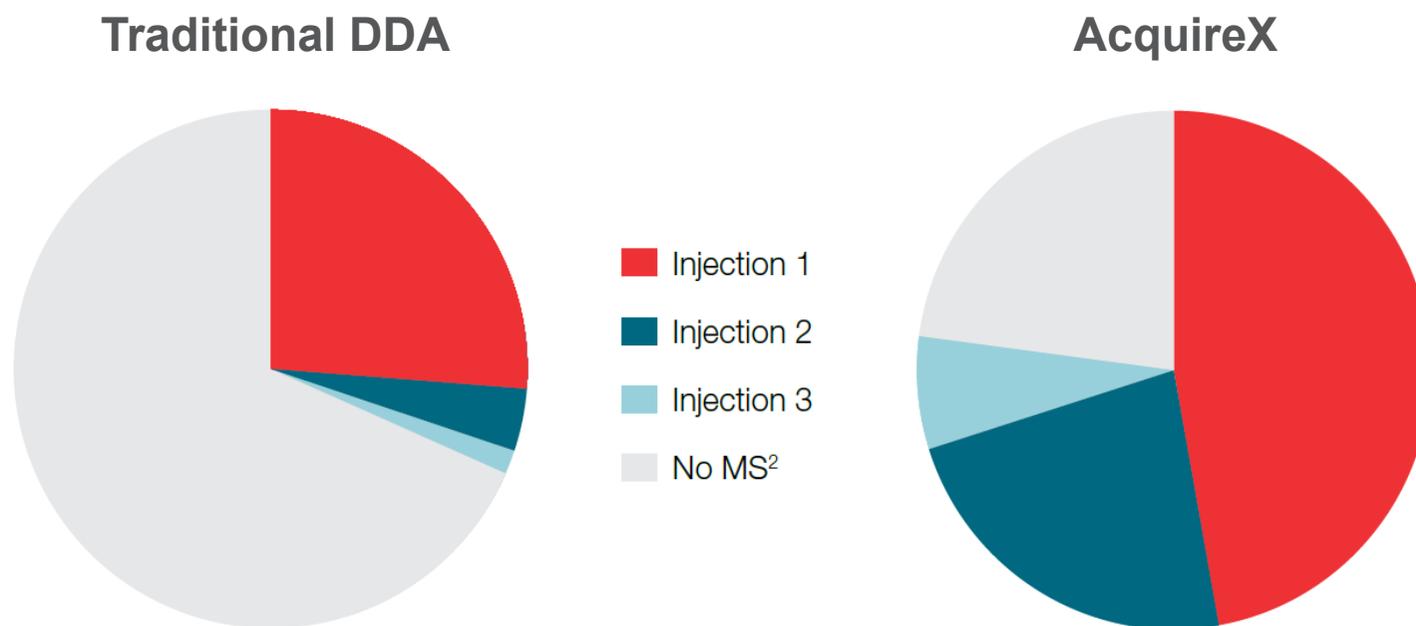


Human plasma (NIST SRM1950), C18, 15min gradient

AcquireXでサンプル由来のさまざまな成分のMS/MSをカバー

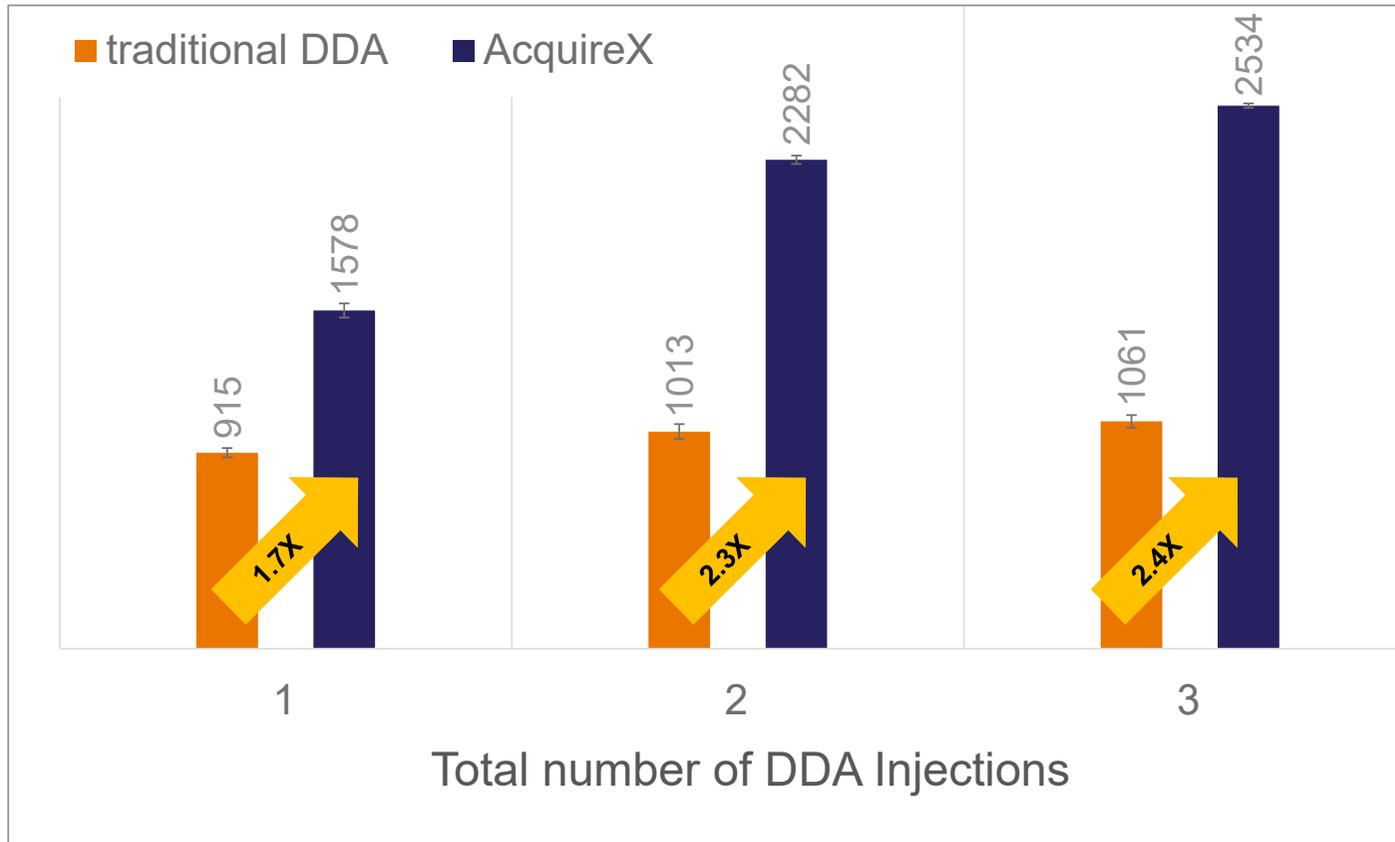
繰り返し測定では、さらに微量成分まで掘り下げてMS/MSを取得可能

Number of compounds with fragmentation spectra



Human plasma (NIST SRM1950), C18, 15min gradient

AcquireXでサンプル由来のさまざまな成分のMS/MSをカバー



Human plasma (NIST SRM1950), C18, 15min gradient

1 Orbitrap™の原理

2 精密質量データ解析の基礎

3 定性分析ノウハウのご紹介

4 ソフトウェアを用いたアプリケーション紹介

低分子の解析について



FreeStyle

- ◆スペクトル解析
- ◆クロマトグラム解析
- ◆条件検討など基本のデータ確認
- ◆ライブラリサーチ

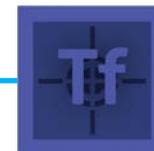


Compound Discoverer

- ◆網羅解析
- ◆差分解析、変量解析
- ◆化合物ID、データベース検索



その他の解析用ソフトウェア



定量ソフトウェア



低分子構造解析支援
ソフトウェア

FreeStyle 1.8

スペクトル、クロマトグラム解析デフォルトソフトウェア



質量分析計の基本の解析に使用するソフトウェア

使いやすいユーザーインターフェース

MSおよびMS2データを用いた元素組成の算出と信頼性を高めるための同位体シミュレーション

HRAMデータインテリジェンス

(データを取得するために使用したMSシステムの質量精度にしたがって、データを表示)

mzCloud mass spectral library search

オンラインmzCloud質量スペクトルライブラリでのスペクトルサーチ
(インターネットへの接続が必要、データベースはライセンスフリー)

mzVault & NIST mass spectral library search

ローカルスペクトルライブラリmzVaultまたはNISTでのスペクトルサーチ
カスタムライブラリはユーザーが作成可能

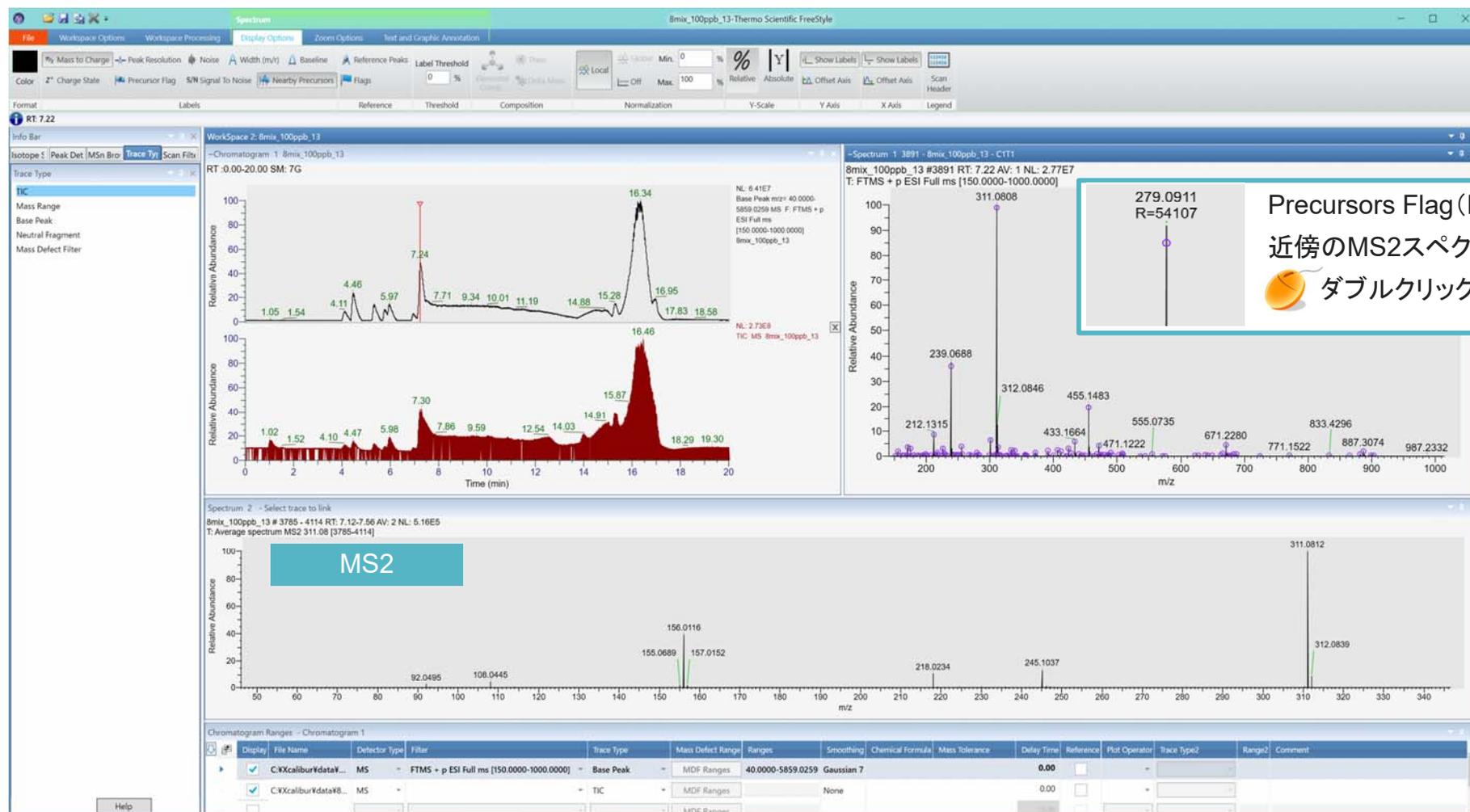
使いやすいユーザーインターフェース

The screenshot displays the ThermoFisher FreeStyle software interface. The main window shows a Total Ion Chromatogram (TIC) with several peaks labeled with retention times: 1.05, 2.90, 4.11, 4.46, 5.97, 7.24, 7.84, 9.34, 10.38, 11.48, 15.28, 16.34, 16.95, and 17.83. A zoomed-in mass spectrum for the peak at 7.24 minutes is shown below it, with a base peak at m/z 311.0823. To the right, another mass spectrum is displayed for peak #3896 at RT 7.23 AV, showing a base peak at m/z 311.0807. A 'Default Options Configuration' dialog box is open in the bottom right corner, showing settings for Mass Precision, Peak Detection, and other parameters. The dialog box has a 'Revert to factory default values' button and 'Save', 'Cancel', and 'Help' buttons at the bottom.

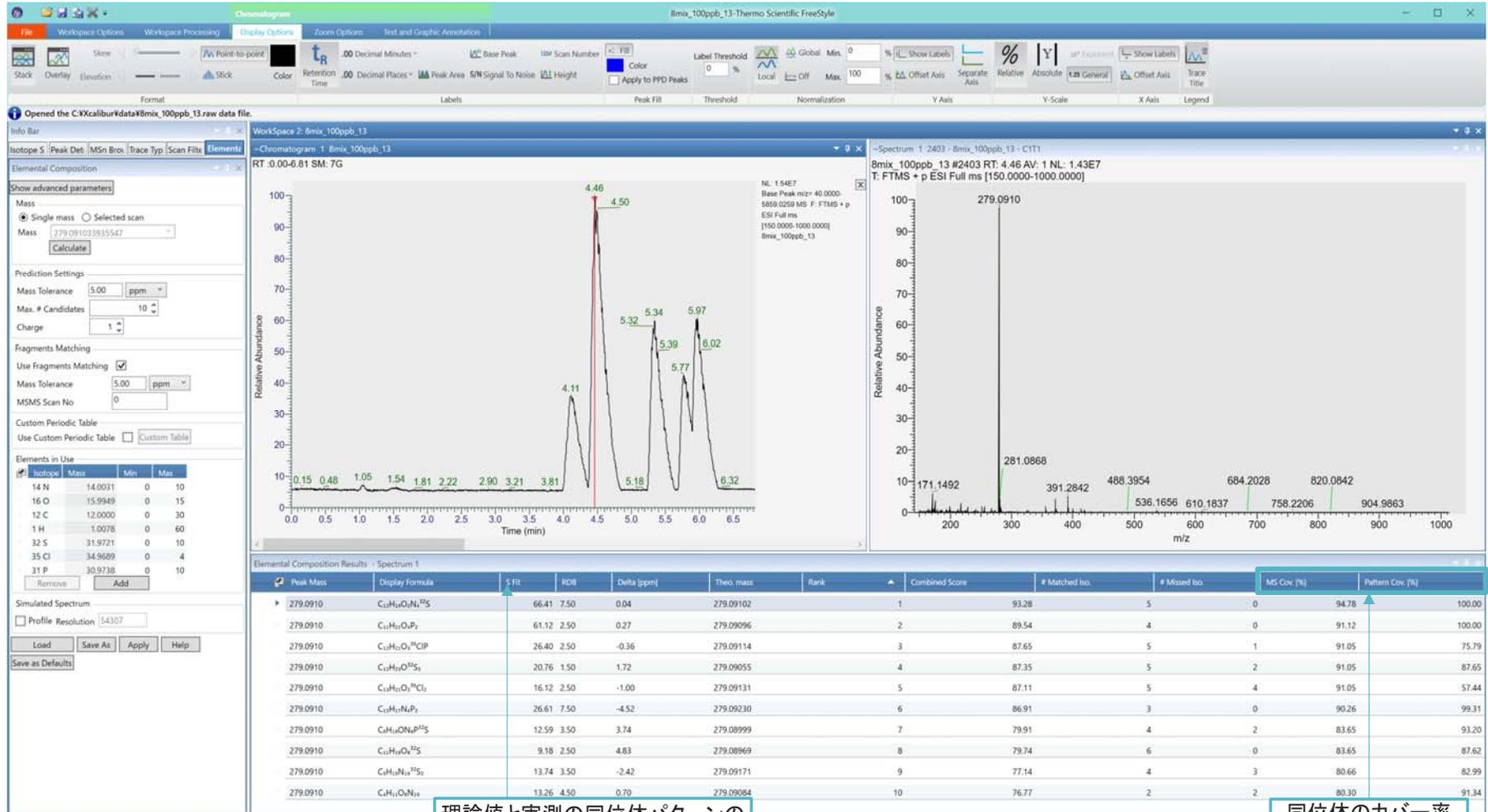
ダブルクリックでマスクロマトグラムの作成
トレース段数の制限なし

データを読み取り、設定を自動で選択

簡単な操作でフルスキャンからMS2へ



同位体を加味した組成解析



理論値と実測の同位体パターンの類似度をスコア化

同位体のカバー率
実測すべて(左)
理論値に対して(右)

実測分解能にあった同位体シミュレーション



MS2フラグメント情報を利用した組成の演算

Elemental Composition Results - Spectrum 1

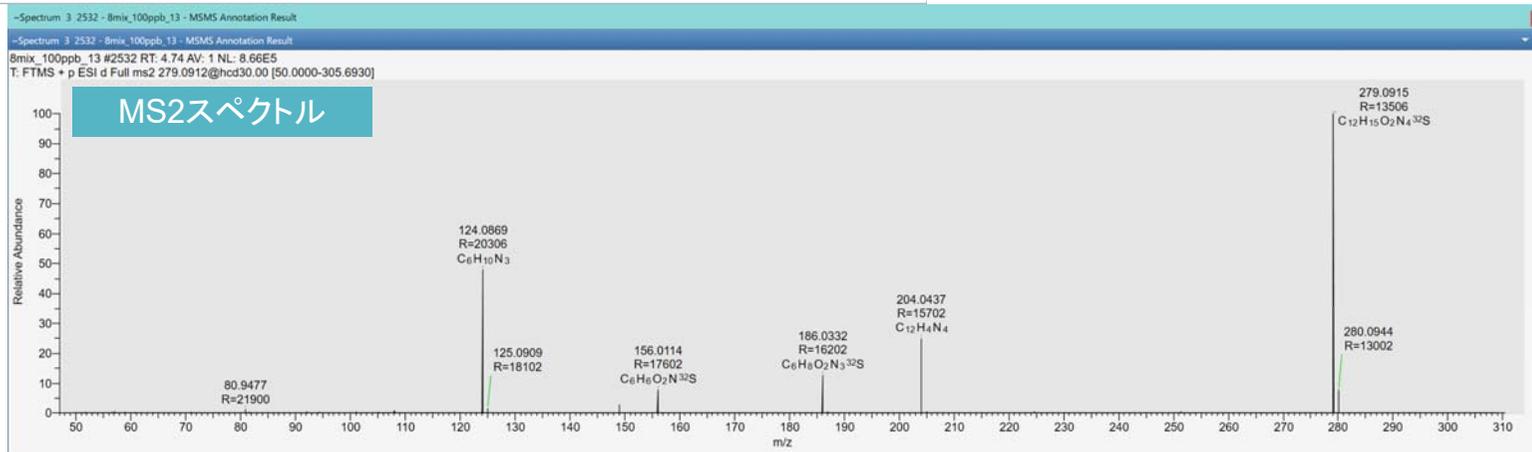
Peak Mass	Display Formula	S Fit	RDB	Delta [ppm]	Theo. mass	Rank	Combined Score	# Matched Iso.	# Missed Iso.	MS Cov. [%]	Pattern Cov. [%]	MSMS Cov. [%]	MSMS Shift Measure	MSMS Matched Peaks
279.0910	C ₁₂ H ₁₅ O ₂ N ₄ ³² S	66.41	7.50	0.04	279.09102	1	93.28	5	0	94.78	100.00	93.28	86.43	8

Fragment	Mass
C ₆ H ₆	57.0699
C ₆ H ₈ N	92.0495
C ₆ H ₈ ON	108.0444
C ₆ H ₈ N ₂	124.0869
C ₆ H ₈ O ₂ N ³² S	156.0114
C ₆ H ₈ O ₂ N ₂ ³² S	186.0332
C ₁₂ H ₄ N ₄	204.0437
C ₁₂ H ₁₅ O ₂ N ₄ ³² S	279.0915

各フラグメントの情報

Peak Mass	Display Formula	S Fit	RDB	Delta [ppm]	Theo. mass	Rank	Combined Score	# Matched Iso.	# Missed Iso.	MS Cov. [%]	Pattern Cov. [%]	MSMS Cov. [%]	MSMS Shift Measure	MSMS Matched Peaks
279.0910	C ₁₁ H ₂₁ O ₂ P ₂	61.12	2.50	0.27	279.09096	2	87.54	4	0	91.12	100.00	49.54	60.73	3
279.0910	C ₁₂ H ₂₁ N ₄ P ₂	26.61	7.50	-4.52	279.09230	3	86.73	3	0	90.26	99.31	83.35	62.05	5
279.0910	C ₁₂ H ₂₁ O ₂ ³² ClP	26.40	2.50	-0.36	279.09114	4	85.74	5	1	91.05	75.79	49.54	60.84	3
279.0910	C ₁₂ H ₂₃ O ³² S ₂	20.76	1.50	1.72	279.09055	5	85.39	5	2	91.05	87.65	48.18	59.91	2
279.0910	C ₁₂ H ₂₃ O ₂ ³² Cl ₂	16.12	2.50	-1.00	279.09131	6	85.16	5	4	91.05	57.44	48.18	59.91	2
279.0910	C ₈ H ₁₆ ON ₄ P ³² S	12.59	3.50	3.74	279.08999	7	77.12	4	2	83.65	93.20	23.97	4.81	4
279.0910	C ₁₁ H ₁₉ O ₄ ³² S	9.18	2.50	4.83	279.08969	8	75.75	6	0	83.65	87.62	0.00	0.00	0
279.0910	C ₈ H ₁₄ N ₆ ³² S ₂	13.74	3.50	-2.42	279.09171	9	75.69	4	3	80.66	82.99	48.18	59.88	2
279.0910	C ₁₂ H ₁₁ N ₂	11.89	16.50	-2.30	279.09167	10	75.58	4	0	80.30	80.60	54.33	64.96	4

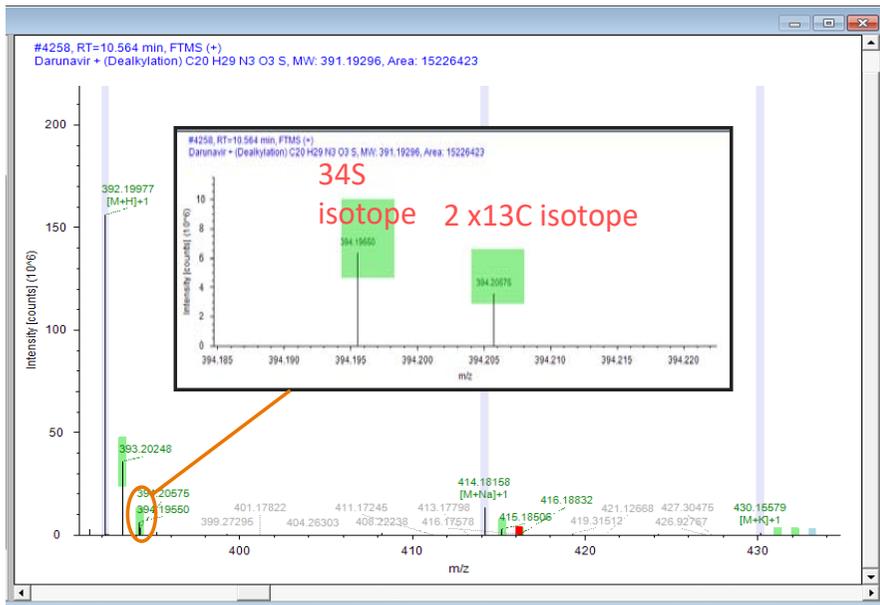
MS2のカバー率をスコア化
MS2の本数
理論値との整合性で判断



確度の高い組成解析

TrueComposition™ algorithm

- 精密質量
 - 同位体パターン
 - MS/MSカバレッジ
- を考慮した確度の高い組成解析



DisplayFormula	Rank	DeltaPPM	RDB	CombinedFit
C ₁₁ H ₁₈ O ⁷⁵ As ³⁵ Cl ₂ F ₄	1	1.25	0.50	51.37
C ₁₁ H ₁₁ O ₃ N ₄ ³⁵ Cl ₂ F ₂ ³² S	2	-1.38	6.50	32.31
C ₁₀ H ₁₅ O ₇ ³⁵ Cl ₂ F ₂ ³² S	3	2.08	1.50	31.69
C ₉ H ₁₄ O ₁₁ ³⁵ Cl ₂ F	4	-1.43	1.50	30.75
C ₉ H ₁₉ ON ₂ ³⁵ Cl ₂ F ¹²⁷ I	5	-2.97	-0.50	28.54
C ₈ H ₉ O ₂ N ₄ ³⁵ Cl ₂ F ₄	6	1.43	3.50	24.40
C ₁₂ H ₁₈ N ₂ ³⁵ Cl ₂ ¹²⁷ I	7	-0.02	3.50	42.76
C ₁₄ H ₇ N ₂ ³⁵ Cl ₂ F ₆	8	0.30	8.50	37.61

Rank 2

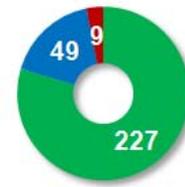
Full Scan

DisplayFormula	Rank	DeltaPPM	RDB	CombinedFit
C ₁₁ H ₁₁ O ₃ N ₄ ³⁵ Cl ₂ F ₂ ³² S	1	-1.38	6.50	32.31
C ₁₀ H ₁₅ O ₇ ³⁵ Cl ₂ F ₂ ³² S	2	2.08	1.50	31.69
C ₁₁ H ₁₈ O ⁷⁵ As ³⁵ Cl ₂ F ₄	3	1.25	0.50	51.37
C ₈ H ₉ O ₂ N ₄ ³⁵ Cl ₂ F ₄	5	-1.43	1.50	30.75
C ₉ H ₁₉ ON ₂ ³⁵ Cl ₂ F ¹²⁷ I	6	-2.97	-0.50	28.54
C ₁₁ H ₉ O ₄ N ₄ ³⁵ Cl ₂ F ₃	7	4.38	7.50	20.21
C ₁₁ H ₁₉ O ₂ ³⁵ Cl ₂ F ₂ ³² S ₃	8	-0.16	0.50	28.86

Rank 1

Full Scan + MS/MS

Full Scan
(previous version, CD2.0)



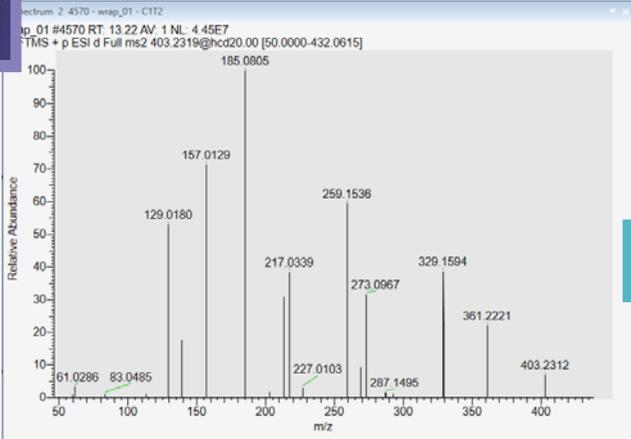
Full Scan+MS/MS
(new version, CD2.1)



■ As Rank 1
■ As Rank 2-10
■ Below Rank 10

Direct Infusions, 285 Compounds
Max. Composition: H180 C80 N30 O30 S5 P2 Cl4 Br3 B I4 As F20
Mass Range: 80 - 900

Free Styleからオンラインスペクトルデータベース



MS2データからオンラインスペクトルライブラリへ

4570 - wrap_01 - C1T2

Home About Features Partners Contact Log in

Spectrum search result 1

Query Library record Structure C₂₀H₃₄O₆

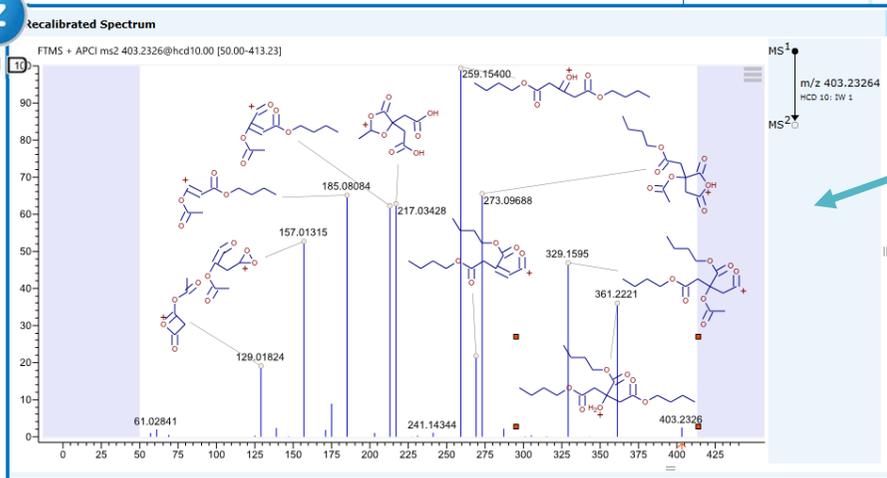
Hit: 1 Best Match: 95.6
Reference No: 2663
Citroflex A-4
Monois. Mass: 402.22537

Thermo
Thermo
Thermo

1/21 FT HCD 10 NCE, 10 eV MS2 403.23 1/21

Spectra compare

Library Metadata



フラグメント構造情報まで

<https://www.mzcloud.org>

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Advanced Mass Spectral Database

Server location: US

search for compound Search

Home About Features Training Database Partners Contact

The new mzCloud™ spectral library is now available. Log in with either Google or Facebook to access the new mzCloud.
The new mzCloud™ supports Firefox and Chrome.

Enter Database

New mzCloud

Legacy mzCloud (Silverlight)

Check new browser compatibility page.

Search for Compounds by Name or ID

Search

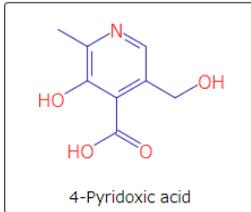
Announcing the New mzCloud
(learn more)

20,122 (+44) compounds <small>(+ added in the last 14 days)</small>	27,731 (+44) trees	9,341,233 (+62,551) spectra	707,074 QM models	view more statistics
---	-----------------------	--------------------------------	----------------------	--------------------------------------

データベースを参照するには、GoogleアカウントもしくはFacebookアカウントによるSign upが必要です。

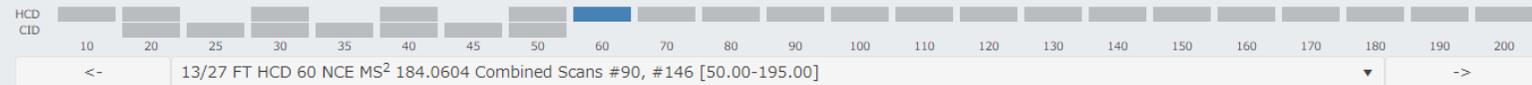
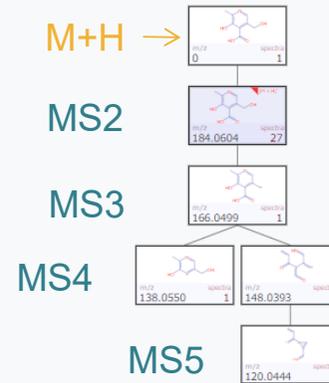
イオントラップMSnとコリジョンセルのMS2を登録

4-Pyridoxic acid



Compound Tags
Tree Tags
mzCloud Recalibrated
Ion Activation
Ion Species
CID,HCD
Polarity
Ionization Method Positive
ESI
MSn level
5

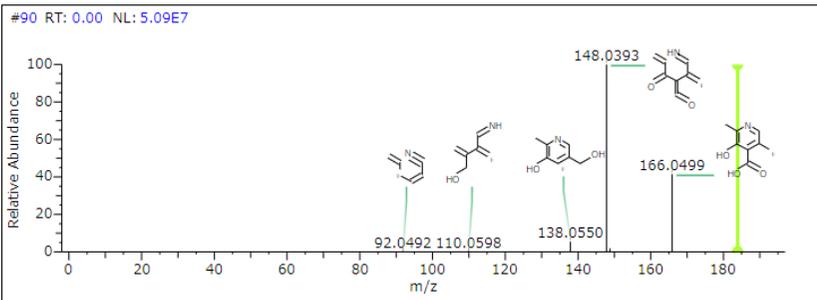
Spectral Tree Compound Metadata Tree Metadata Linked File&Tree Metadata



FT HCD 60 NCE MS² 184.0604 Combined Scans #90, #146 [50.00-195.00]

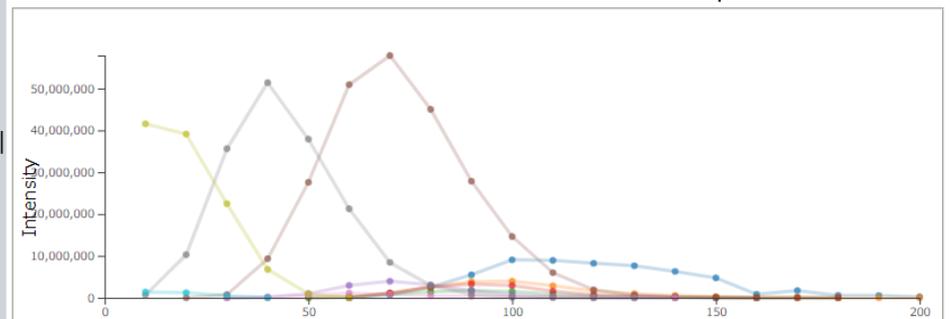
Copy Reset Absolute Show Annotation

MS1 184.0604
HCD:60 IW:3
MS2

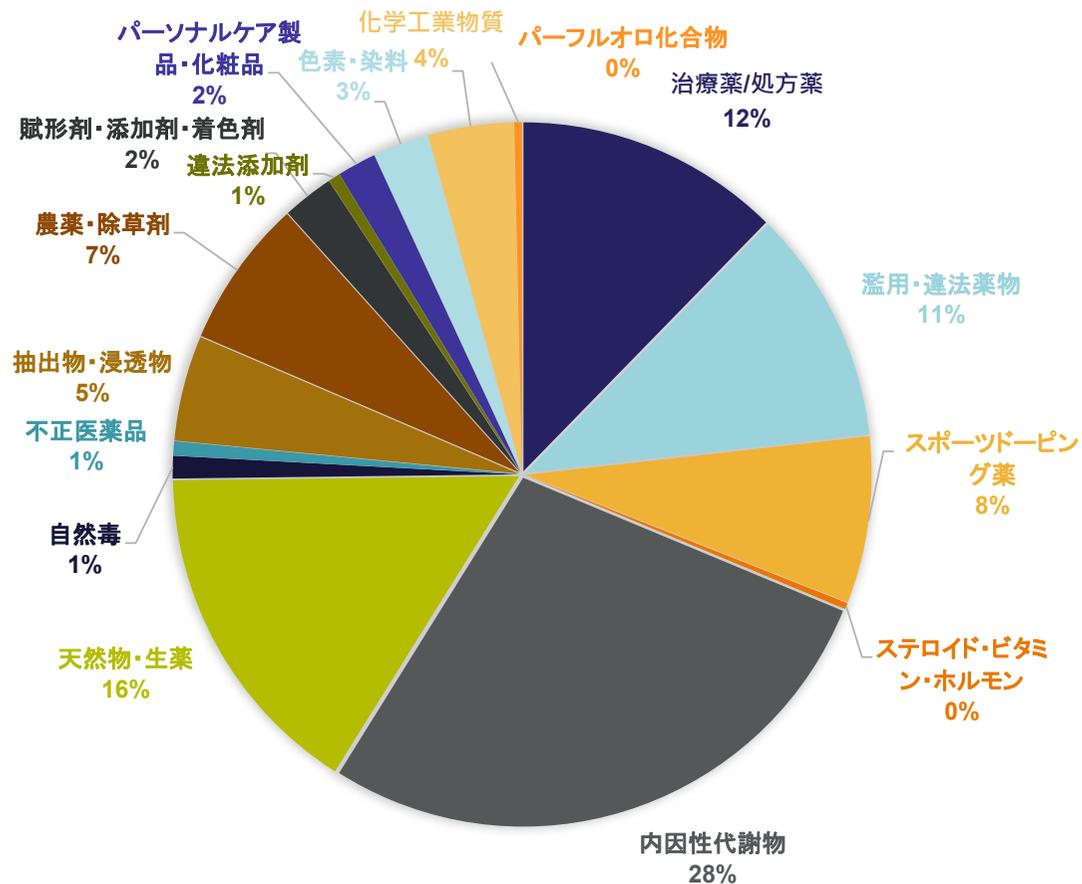


BreakDown Curves

CID HCD Absolute Relative



Compound Class 詳細



分類	化合物数	%
治療薬/処方薬	1,371	12%
濫用・違法薬物	1,185	10%
スポーツドーピング薬	846	7%
ステロイド・ビタミン・ホルモン	31	0%
内因性代謝物	3,724	32%
天然物・生薬	1,740	15%
自然毒	114	1%
不正医薬品	72	1%
抽出物・浸透物	549	5%
農薬・除草剤	756	6%
賦形剤・添加剤・着色剤	269	2%
違法添加剤	61	1%
パーソナルケア製品・化粧品	199	2%
色素・染料	291	2%
化学工業物質	437	4%
パーフルオロ化合物	40	0%
Nanomaterials	0	0%
*Total	11,685	

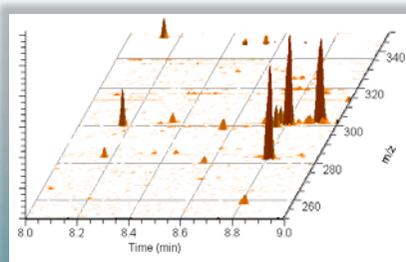
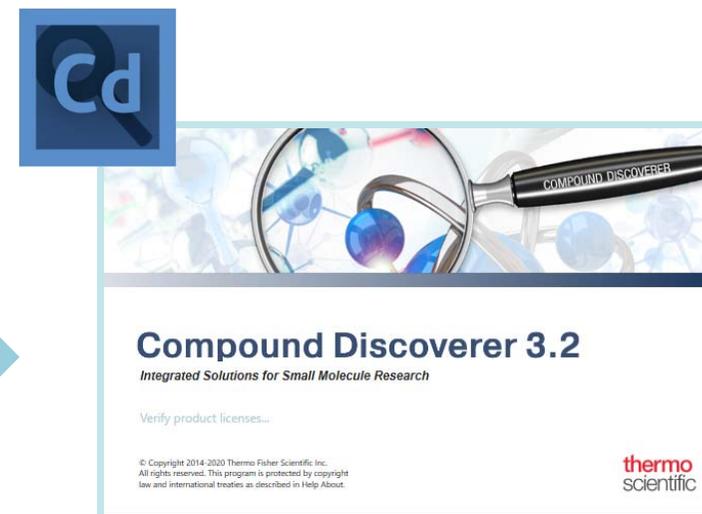
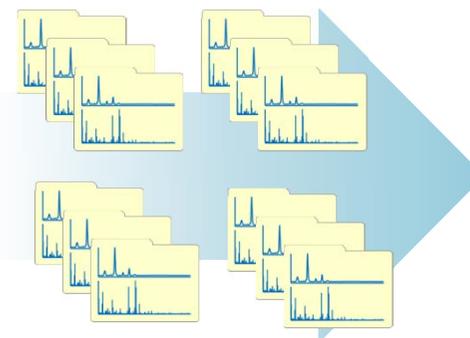
Reference Library に登録のある化合物に限定

Compound Discoverer

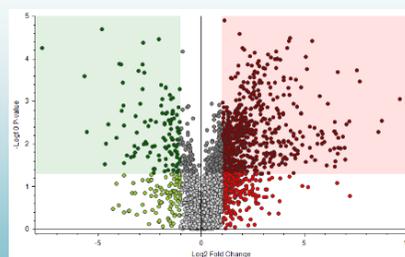
ThermoFisher
SCIENTIFIC



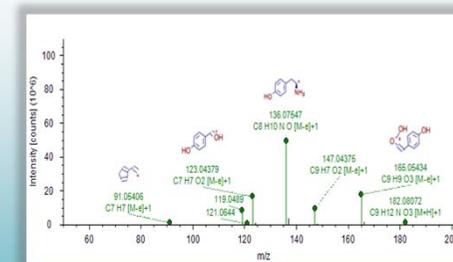
Fullscan/dd-msn
(Pos / Neg)



ピーク検出



統計解析



化合物同定

Compound Discovererの網羅的解析のワークフロー

MSのデータを選択する

ピーキングしたピークのリテンションタイムのアライメントをする

ピークリストを作成する

全データからしきい値以上のピークをピーキングする
m/zとRTの情報からアダクトイオンのグルーピングを行う
ブランクデータの差し引き

化合物名の同定、探索

m/zもしくは分子組成から
組成式の算出

MS2スペクトルからmzCloudのサーチ

MS2スペクトルからmzValutのサーチ

Mass List からのサーチ

Chemspiderのサーチ

mzLogic の構造の妥当性評価

Molecular Networksの作成

変量解析

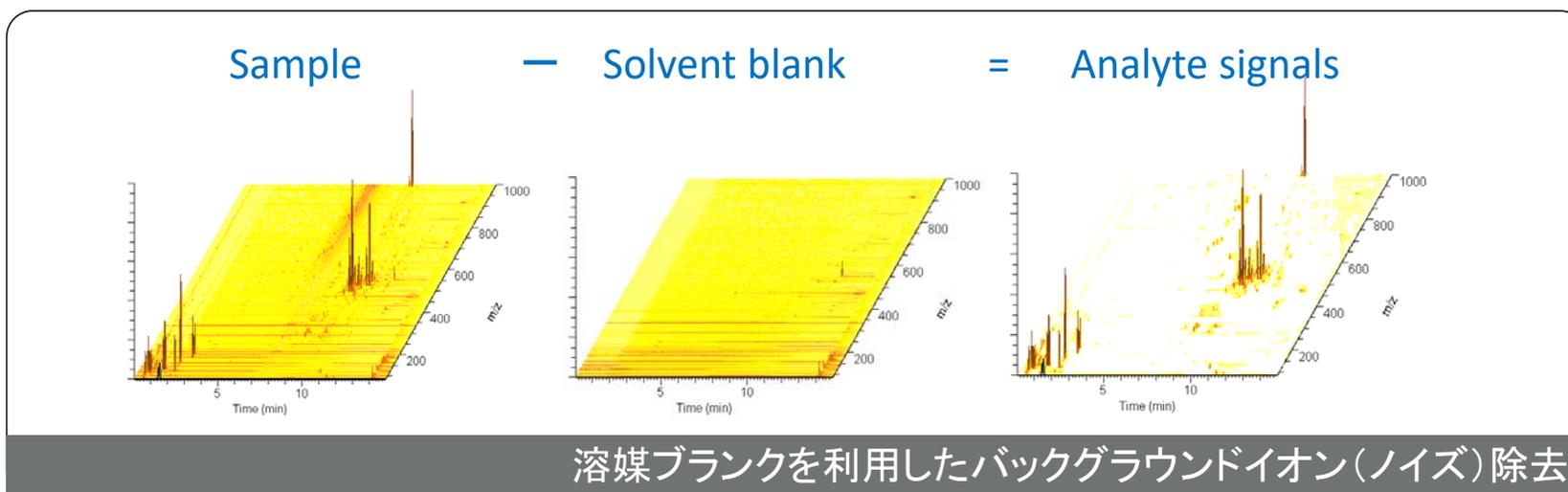
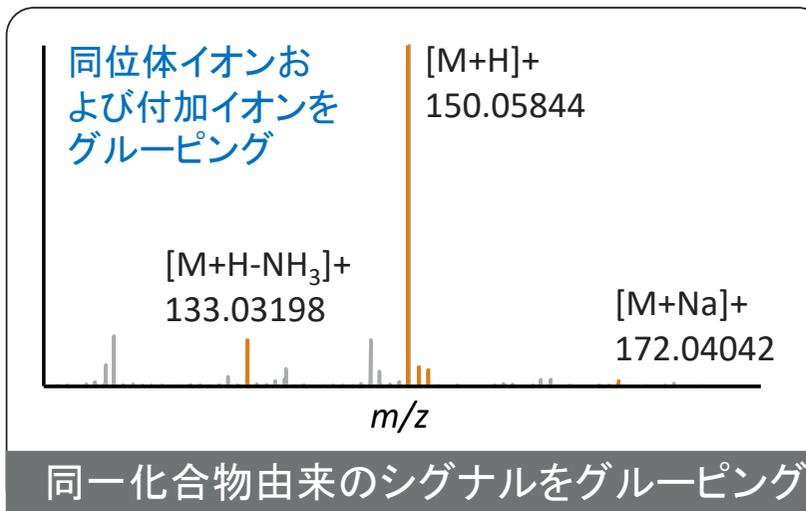
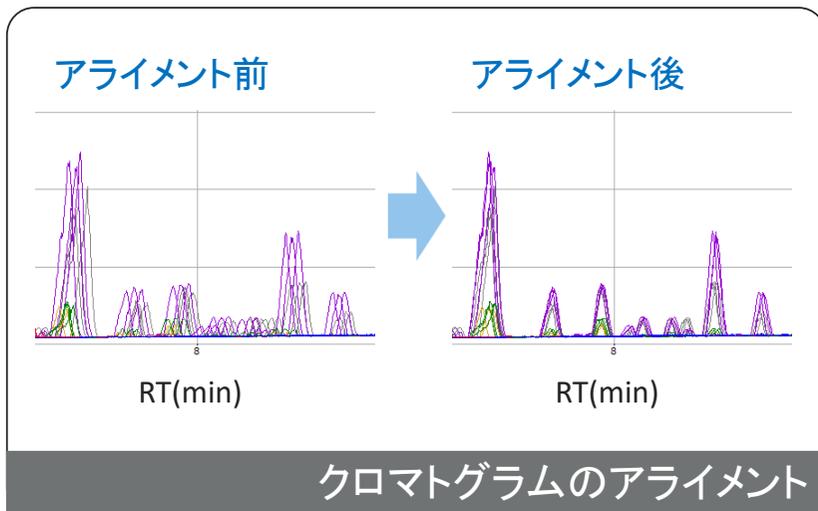
PCAプロットの作成

ボルケーノプロットの作成

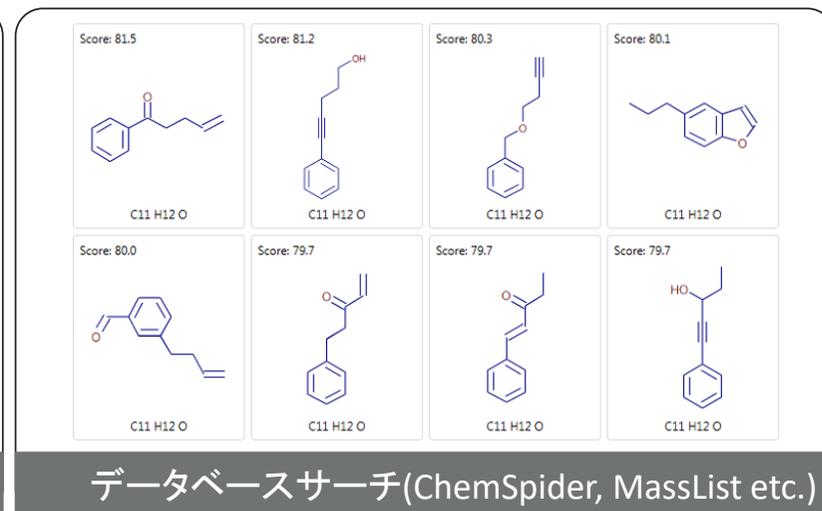
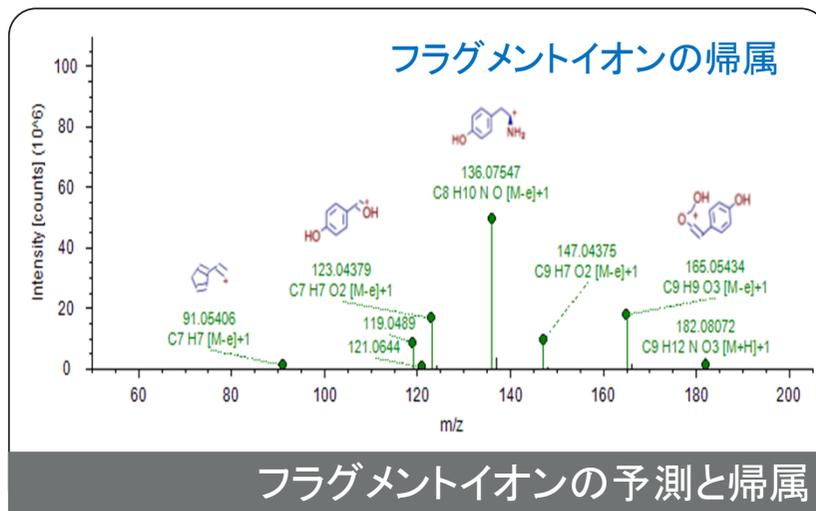
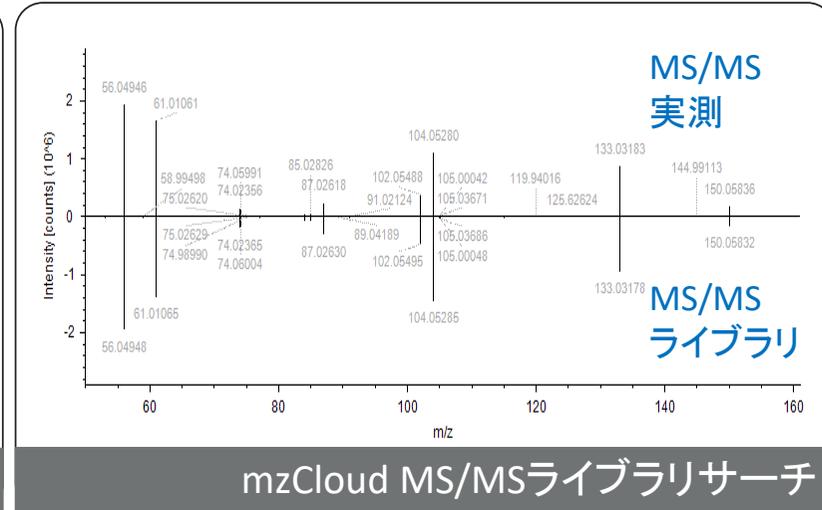
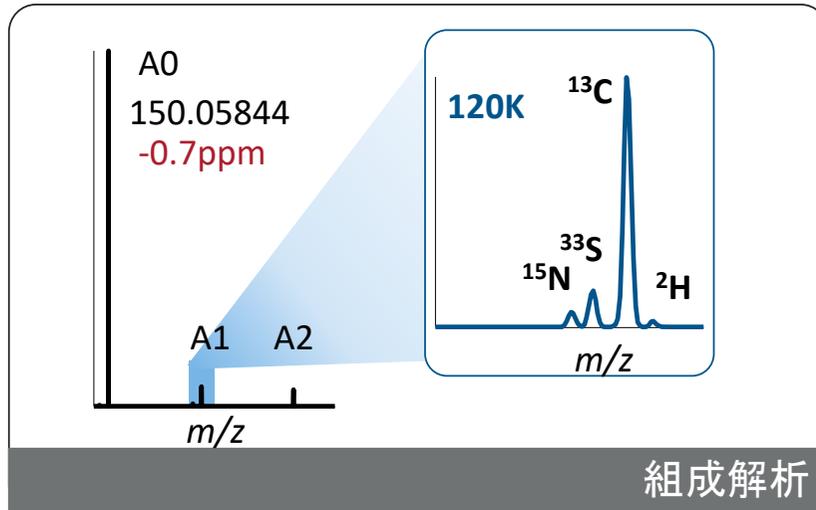
PLS-DAプロットの作成

Hierarchical cluster の作成

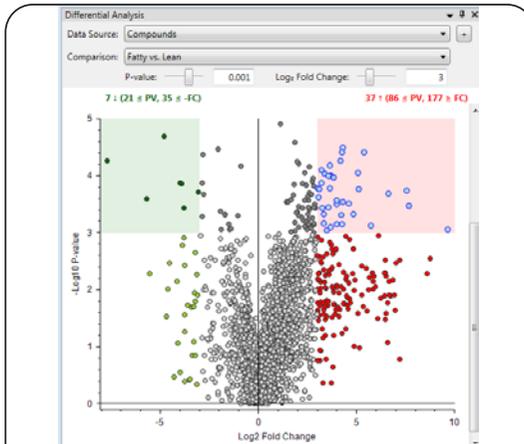
ピーク検出について



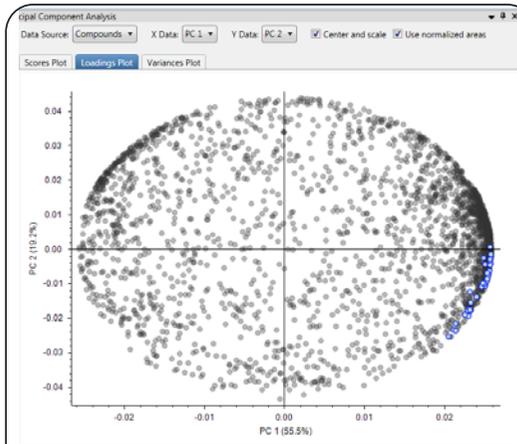
化合物同定について



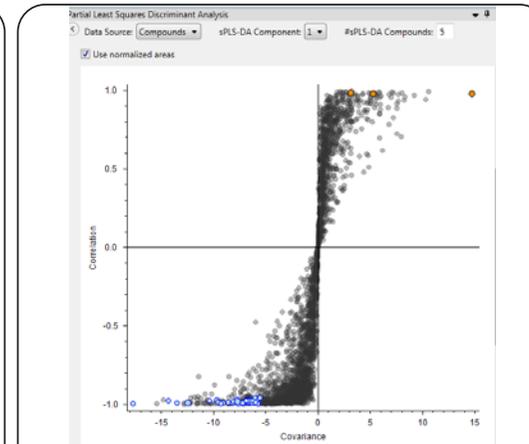
統計解析



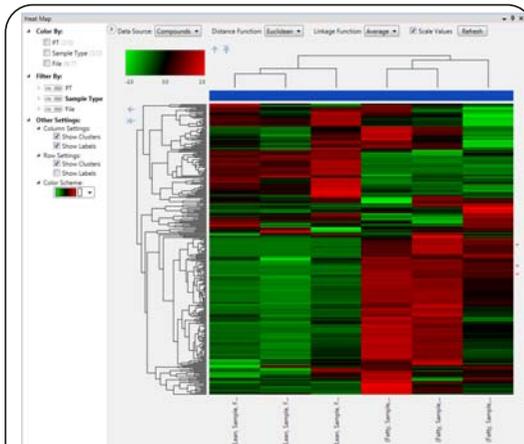
Volcano plot



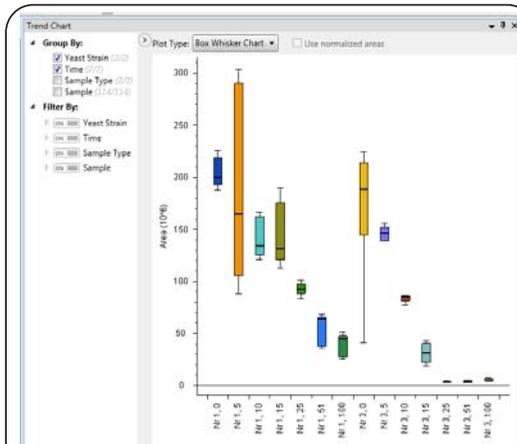
PCA



PLS-DA



Heat map



Whisker plot

全ての統計解析は、解析結果
テーブルとリンクしており、成分
のフィルタリングが統計解析に
反映

化合物同定に使用できる探索機能

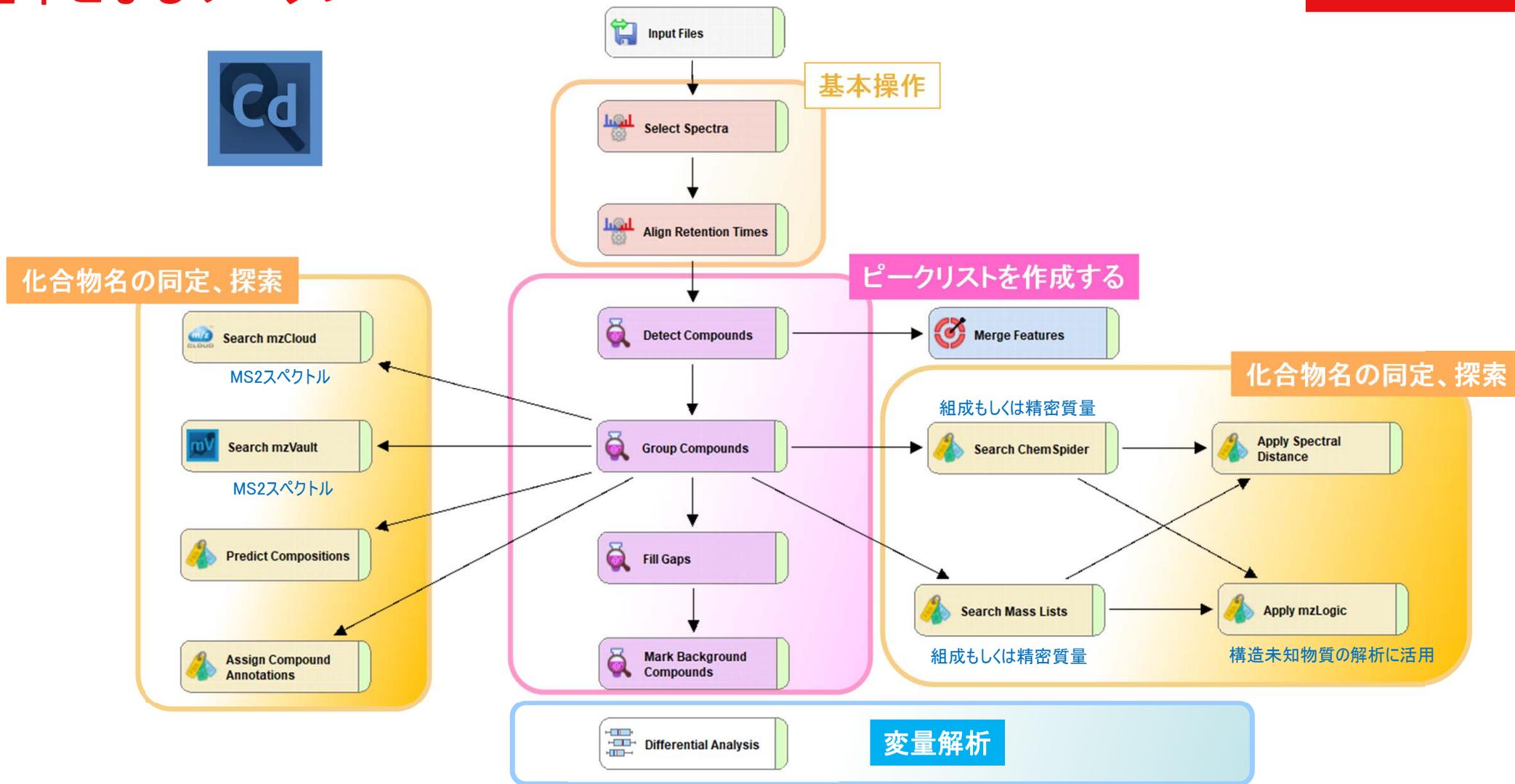
名称	インターネットへの接続	検索対象・検索項目	詳細
Search mzCloud	 必要	MS/MSスペクトルの検索	Orbitrapでデータ取得したMSnデータベース mzCloudを活用 https://www.mzcloud.org/
Search mzVault		MS/MSスペクトルの検索	mzCloud のローカル版データベース(Compound Discovererに含まれる) お客様サイドで作成できるカスタムデータベース Compound Discoverer の解析結果からも作成可能
Search Mass List		フルスキャン(& RT)	テキスト形式のデータベース 最小項目は化合物名と組成式、さらにリテンションタイム、CASなども項目として使用可能 基本は精密質量からの探索(情報を入力すれば、リテンションタイムも追加可能)
Search Chemspider	必要	フルスキャン	フルスキャンの精密質量もしくは組成を用いた化合物構造式データベースサイト Chemspider でのサーチ
Apply mzLogic	必要	フラグメント情報から構造の妥当性を検討する	mzCloud のフラグメント情報を利用して、フラグメントの組成と化合物の部分構造の一致度から可能性の高い化合物構造をスコア化してランキングする
Pattern Scoring		フルスキャンスペクトル	塩素、臭素、硫黄(硫黄については分子量によっては分解能に依存)の同位体パターンを検出する。
Compound Class		MS/MSスペクトルの検索	フラグメント情報をデータベース化し、そのフラグメントイオンを有する成分を検出する フラグメントイオンのライブラリはカスタマーサイドで作成
Search Neutral Losses		MS/MSスペクトルの検索	ニュートラルロス情報をデータベース化し、そのニュートラルロスを有する成分を判定 一般的なニュートラルロスのデータベースは登録済み、不足分はエディターで作成可能。

表中、下4段の機能は構造解析もしくは構造情報をもとにした未知ピーク(類縁体、分解物など)の探索に用います。

各データベースの特徴

データベース名	アイコン	提供	タイプ	ネット環境	特徴	特記事項
mzCloud		Thermo	スペクトルデータベース	○	編集不可 スペクトル、化合物名、組成、構造、etc. 化合物数約18,500個 E&L 549 個を含む	溶出時間の情報はない
mzVault		Thermo	スペクトルデータベース		編集不可 スペクトル、化合物名、組成、構造、etc.	溶出時間の情報はない
mzVault			スペクトルデータベース		ユーザーが構築 測定データ、解析結果から作成可能 化合物名、組成式、スペクトル、 溶出時間など	標準品などをを用いた 分析結果が必要 溶出時間はなくても機能するが、 情報があれば溶出時間を 考慮した精査できる
Chemspider		Web Site	構造式データベース	○	編集不可、データベースサイトの選択は可能	フルスキャンの 分子量情報を利用
Mass List		Thermo	テキスト		プレインストールのデータベース Endogenous Metabolites database 4400 compounds.massList 4400化合物	内因性代謝物のデータベース 溶出時間の情報はない
Mass List			テキスト		ユーザーが構築 化合物名、組成式が最小限の入力項目 CAS、などのテキスト情報 (複数の項目を設けられる) 溶出時間、構造式	溶出時間は なくても機能するが、情報があれば、 分子量情報とRTから精査できる 組成が判明していないと 登録ができない

基本となるワークフロー

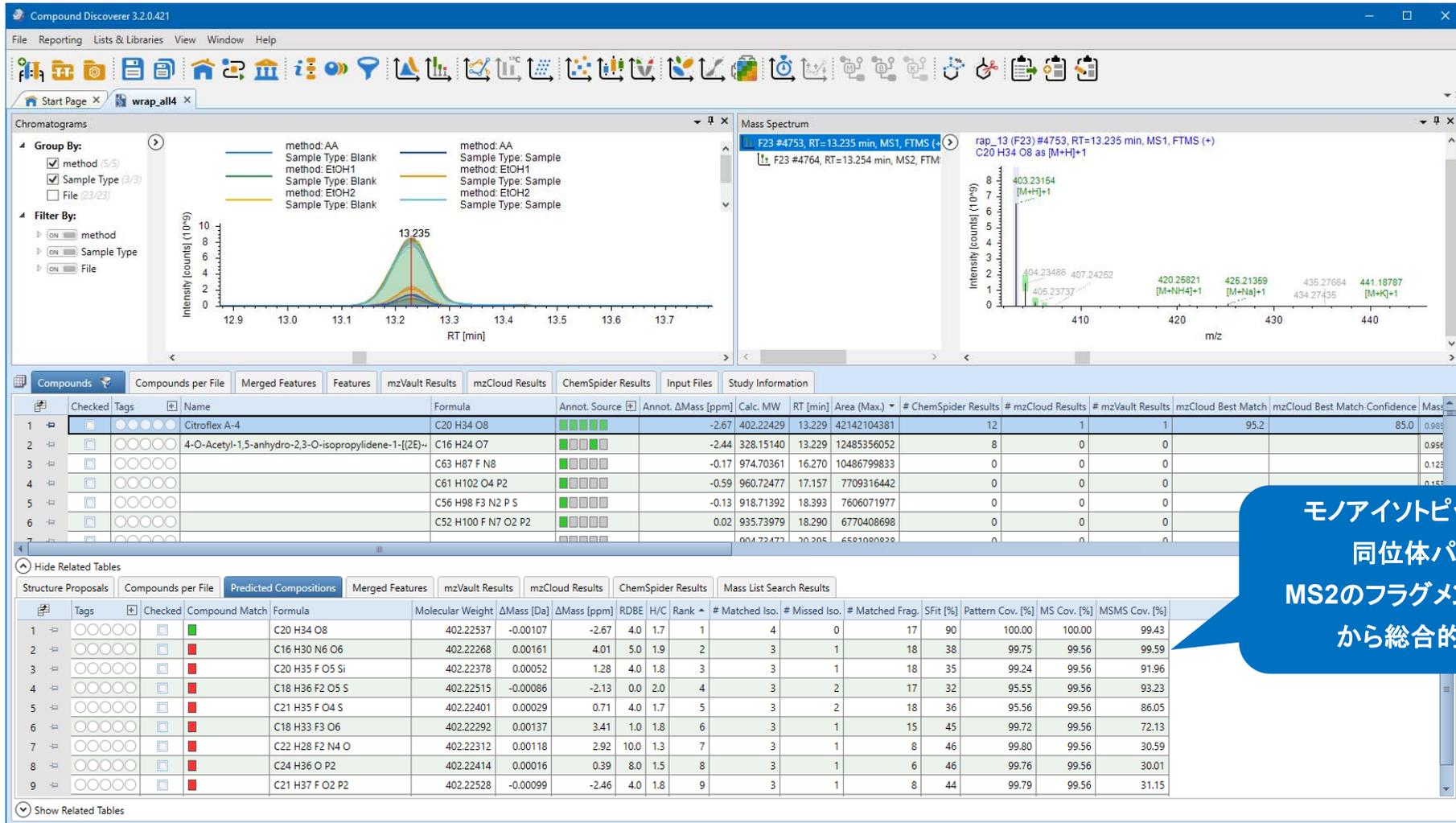


Compound Discovererの結果表示

The screenshot displays the Compound Discoverer 3.2.0.358 interface. At the top, there are menu options (File, Reporting, Lists & Libraries, View, Window, Help) and a toolbar with various icons. Below the toolbar, there are tabs for 'Start Page', 'Lists & Libraries', and several data files like 'ratex_all', 'oil3', 'plant3', and 'wrap_all'. The main window is divided into several panels:

- Chromatograms:** Shows a Total Ion Chromatogram (TIC) with a peak at 13.235 minutes. A callout 'クロマトグラム' points to this plot.
- Mass Spectrum:** Shows the mass spectrum for the peak at 13.235 minutes. The base peak is at m/z 403.23154. Other significant peaks are labeled. A callout 'MS2スペクトル' points to this plot.
- Results Table:** A table with columns for 'Checked', 'Tags', 'Name', 'Formula', 'Annot. Source', 'Annot. ΔMass [ppm]', 'Calc. MW', 'RT [min]', 'Area (Max.)', 'Group Areas', 'mzCloud Best Match', 'mzVault Best Match', and 'Mass List Matches'. A callout '検索結果から化合物名' points to the 'Name' column.
- Callouts:**
 - 'スペクトル' points to the mass spectrum plot.
 - 'MS2スペクトル' points to the mass spectrum plot.
 - 'スペクトルライブラリの照合スコア' points to the 'Mass List Matches' column in the table.
 - 'マスの照合結果' points to the 'mzCloud Best Match' and 'mzVault Best Match' columns.
 - '各データのピーク面積' points to the 'Area (Max.)' column.
 - '組成式' points to the 'Formula' column.
 - '詳細情報確認' points to the 'Checked' column.

組成の算出



モノイソトピックの質量
同位体パターン
MS2のフラグメントカバー率
から総合的に判断

mzCloudライブラリとの照合

The screenshot displays the Compound Discoverer 3.2.0.358 interface. The top section shows a chromatogram with a major peak at 13.235 minutes. The right section shows a mass spectrum with a base peak at m/z 185.08046. Below these plots is a table of search results for Citroflex A-4.

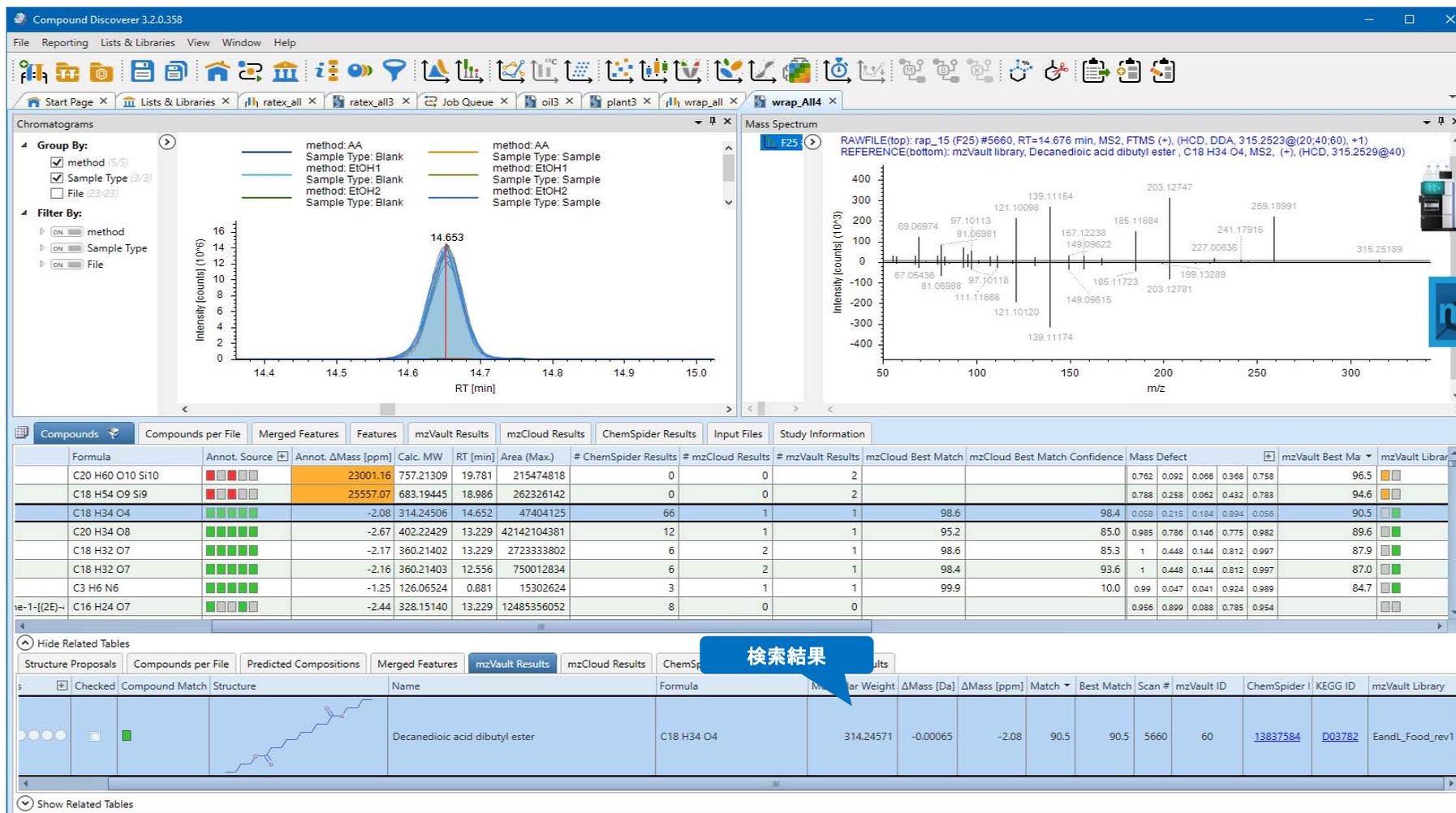
Checked	Tags	Name	Formula	Annot. Source	Annot. ΔMass [p]	Annot. ΔMass [l]	Calc. MW	RT [min]	Area (Max.)	Group Areas	mzCloud Be	mzVault Best	Mass List	# ChemSpider Re
<input checked="" type="checkbox"/>	●●●●●	Citroflex A-4	C20 H34 O8	Green	-2.67	-0.00107	402.22429	13.229	42142104381	5.13e9 8.34e9 3.91e10 4.20e10 3.16e9	95.2	89.6	Green	12
<input checked="" type="checkbox"/>	○●●●○	4-O-Acetyl-1,5-anhydro-2,3-O-isopropylidene-β-D-glucopyranose	C16 H24 O7	Green	-2.44	-0.00080	328.15140	13.229	12485356052	1.31e9 2.20e9 1.12e10 1.21e10 7.73e8				8
<input checked="" type="checkbox"/>	○●●●○	C63 H87 F N8	C63 H87 F N8	Green	-0.17	-0.00017	974.70361	16.270	10486799833	1.70e5 2.29e5 8.71e9 1.03e10 5.21e6				0
<input checked="" type="checkbox"/>	○●●●○	C61 H102 O4 P2	C61 H102 O4 P2	Green	-0.59	-0.00056	960.72477	17.157	7709316442	2.76e6 3.80e6 6.94e9 7.59e9 7.43e6				0
<input checked="" type="checkbox"/>	○●●●○	C56 H98 F3 N2 P S	C56 H98 F3 N2 P S	Green	-0.13	-0.00012	918.71392	18.393	7606071977	3.85e5 5.09e5 6.92e9 7.48e9 1.21e7				0
<input checked="" type="checkbox"/>	○●●●○	C52 H100 F N7 O2 P2	C52 H100 F N7 O2 P2	Green	0.02	0.00002	935.73979	18.290	6770408698	1.12e5 2.14e5 3.22e8 1.03e9 4.50e5				0

Tags	Checked	Compound Match	Structure	Name	Formula	Molecular Weight	ΔMass [Da]	ΔMass [ppm]	Confidence	Match	Best Match	Scan #	mzCloud ID	KEGG ID
●●●●●	<input checked="" type="checkbox"/>	Green		Citroflex A-4	C20 H34 O8	402.22537	-0.00107	-2.67	85.0	95.2	95.2	4764	Reference-2663	

詳細情報確認

検索結果

mzVaultの探索



標準品を用いてラボで取得したデータから作成したmzVault ライブラリを使用

Mass List

Result Filters

Compounds

- AND
- Background is false
- Group CV [%] is less than 20.00 in any sample group
- Mass List Matches has at least status Single match found in massfile test1

フィルタ機能でMass Listでヒットしたピークを抽出

Intensity [c] vs RT [min]

Mass Spectrum

Intensity [counts] (10%) vs m/z

Mass List に一致した成分分子量もしくは組成から判定

検索結果

構造情報をStructure Proposalsへ転送してフラグメント予測

Checked	Tags	Name	Formula	Annot. Source	Annot. ΔMass [p]	Calc. MW	RT [min]	Area (Max.)	Group Areas	mzCloud Be	mzVault Bes	Mass List	# ChemSpider Re
1		Citroflex A-4	C20 H34 O8		-2.67	402.22429	13.229	42142104381	5.13e9 8.34e9 3.91e10 4.20e10 3.16e9	95.2	89.6		12
2		2,3-Diacetoxypropyl laurate	C19 H34 O6		-2.70	358.23457	14.358	3559316923	2.15e7 4.42e7 3.16e9 3.47e9 9.87e5				7
3		Tributyl citrate	C18 H32 O7		-2.17	360.21402	13.229	2723333802	2.77e8 4.87e8 2.55e9 2.70e9 1.64e8	98.6	87.9		6
4		1,2-Ethanediylbis(oxy-2,1-ethanediyl	C34 H50 O8		-2.03	586.34938	12.908	2478919958	1.66e7 5.99e7 2.31e9 2.43e9 1.47e7				1
5		Dilauryl 3,3'-thiodipropionate	C30 H58 O4 S		-1.54	514.40479	19.003	826349620	4.14e5 3.23e5 7.88e8 8.00e8 5.64e5				2
		Citroflex 4	C18 H32 O7		-2.16	360.21403	12.556	750012834	8.88e7 2.97e8 5.77e8 7.37e8 1.44e8	98.4	87.0		6

Structure Proposals	Compounds per File	Predicted Compositions	Merged Features	mzVault Results	mzCloud Results	ChemSpider Results	Mass List Search Results					
Tags	Compound Match	Structure	Name	Formula	Molecular Weight	ΔMass [Da]	ΔMass [ppm]	Reference List Name	mzLogic Score	SFit [%]	CAS	type
1		<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)OCCOC(=O)CCCCCCCC</chem>	2,3-Diacetoxypropyl laurate	C19 H34 O6	358.23554	-0.00097	-2.70	test1	31.8	90	30899-62	

Fragment Ion Search FISH

Structure Proposals	Compounds per File	Predicted Compositions	Merged Features	mzVault Results	mzCloud Results	ChemSpider Results	Mass List Search Results	
Tags	Compound Match	Structure	Name	Formula	Molecular Weight	Δ Mass [Da]	Δ Mass [ppm]	Reference List Name
1			2,3-Diacetoxypropyl laurate	C ₁₉ H ₃₄ O ₆	358.23554	-0.00097	-2.70	test1



- Copy With Headers Ctrl+C
- Copy
- Copy Structure ▶
- Clear Selection
- Cell Selection Mode
- Enable Column Fixing
- Collapse All Column Headers
- Expand All Column Headers
- Add Tag ▶
- Remove Tag ▶
- Set Tags...
- Remove All Tags in All Tables
- Go to Same Item in Main Table
- Use as Compound Annotation
- Add to Structure Proposals
- Add to Structure Proposals and Apply FISH Scoring
- Export ▶

Structure Proposals へ転送して
フラグメントを推測

Fragment Ion Search FISHのパラメータ

Specify FISH Scoring Settings ✕

Annotate full spectrum tree

Use general rules

Use fragmentation libraries

Allow aromatic cleavage

5 Max. Depth

High accuracy mass tolerance: mmu

Low accuracy mass tolerance: Da

S/N threshold:

Fragment Ion Search FISH

Compound Discoverer 3.2.0.358

File Reporting Lists & Libraries View Window Help

Start Page Lists & Libraries ratex_all ratex_all3 Job Queue oil3 plant3 wrap_All3

Chromatograms

Group By: method (5/5) Sample Type (3/3) File (23/23)

Filter By: method Sample Type File

method: AA Sample Type: Blank
method: EtOH1 Sample Type: Sample
method: EtOH2 Sample Type: Sample
method: EtOH2 Sample Type: Sample

Intensity (counts) (10⁶)

RT [min]

Mass Spectrum

F23 #5365, RT=14.341 min, MS1, FTMS (+)
F23 #5376, RT=14.361 min, MS2, FTMS (+)
F23 #5375, RT=14.359 min, MS1, FTMS (+)

rap_13 (F23) #5376, RT=14.361 min, MS2, FTMS (+), (HCD, DDA, 376.2685@(12;20;28), +1)
2,3-Diacetoxypropyl laurate, C19 H34 O6
FISH Coverage: 5 Matched, 2 Unmatched, 8 Skipped

Intensity (counts) (10⁴)

m/z

予想フラグメントを帰属

159.06490
C7 H11 O4 [M-e]+1

299.22119
C17 H31 O4 [M-e]+1

183.17393
C12 H23 O [M-e]+1

376.2690

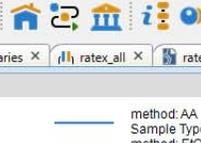
57.03350
C3 H5 O [M-e]+1

Compounds

Checked	Tags	Name	Formula	Annot. Source	Annot. ΔMass [p]	Annot. ΔMass	Calc. MW	RT [min]	Area (Max.)	Group Areas	mzCloud Be	mzVault Best	Mass List	# ChemSpider Re
1		Citroflex A-4	C20 H34 O8		-2.67	-0.00107	402.22429	13.229	42142104381	5.13e9 8.34e9 3.91e10 4.20e10 3.16e9	95.2	89.6		12
2		2,3-Diacetoxypropyl laurate	C19 H34 O6		-2.70	-0.00097	358.23457	14.358	3559316923	2.15e7 4.42e7 3.18e9 3.47e9 9.87e5				7
3		Tributyl citrate	C18 H32 O7		-2.17	-0.00078	360.21402	13.229	2723333802	2.77e8 4.87e8 2.55e9 2.70e9 1.64e8	98.6	87.9		6
		1,2-Ethanediybis(oxy-2,1-ethanediy	C34 H50 O8		-2.03	-0.00119	586.34938	12.908	2478919958	1.65e7 5.99e7 2.31e9 2.43e9 1.47e7				1
		Dilauryl 3,3'-thiodipropionate	C30 H58 O4 S		-1.54	-0.00079	514.40479	19.003	826349620	4.14e5 3.23e5 7.88e8 8.00e8 5.64e5				2
		Citroflex 4	C18 H32 O7		-2.16	-0.00078	360.21403	12.556	750012834	8.88e7 2.97e8 5.77e8 7.37e8 1.44e8	98.4	87.0		6

化合物情報を複数ストックして比較ができる

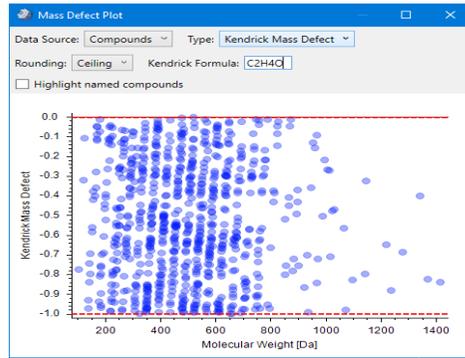
Structure Proposals

Checked	Tags	Structure	Name	Formula	Molecular Weight	FISH Coverage	Comments
1			2,3-Diacetoxypropyl laurate	C19 H34 O6	358.23554	71.43	

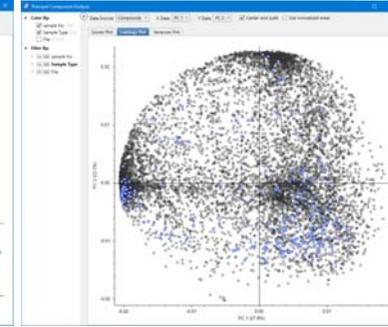
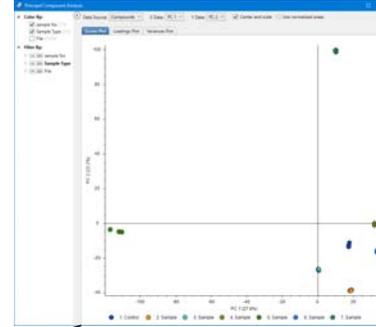
フラグメントの照合率をスコアとして表示

Show Related Tables

変量解析のプロット



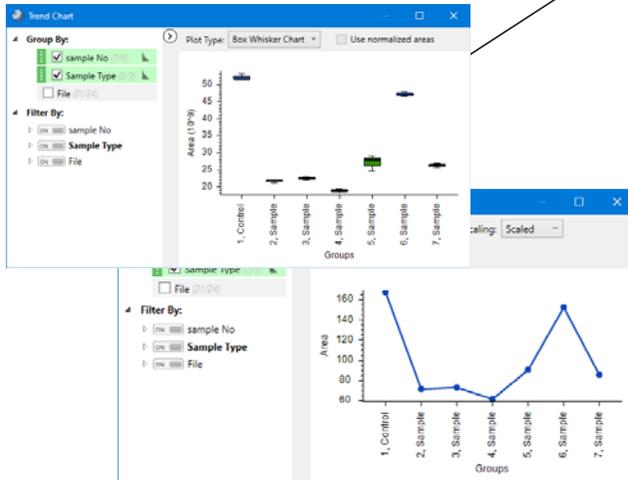
Mass Defect prot



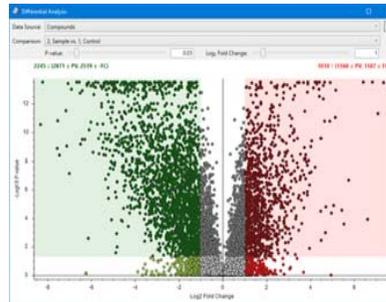
PCA&ローディング



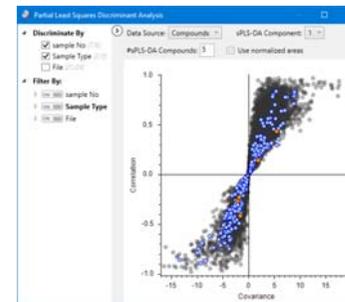
Trend チャート



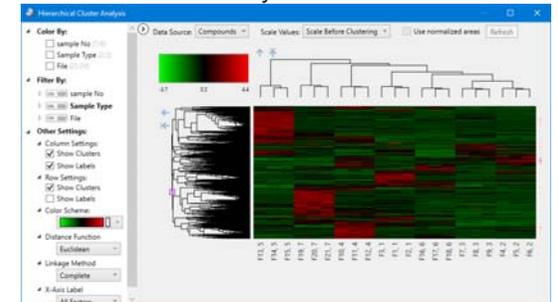
ボルケーノプロット



PLS-DA

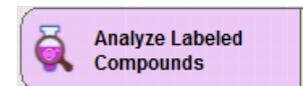


Hierarchical Cluster analysis

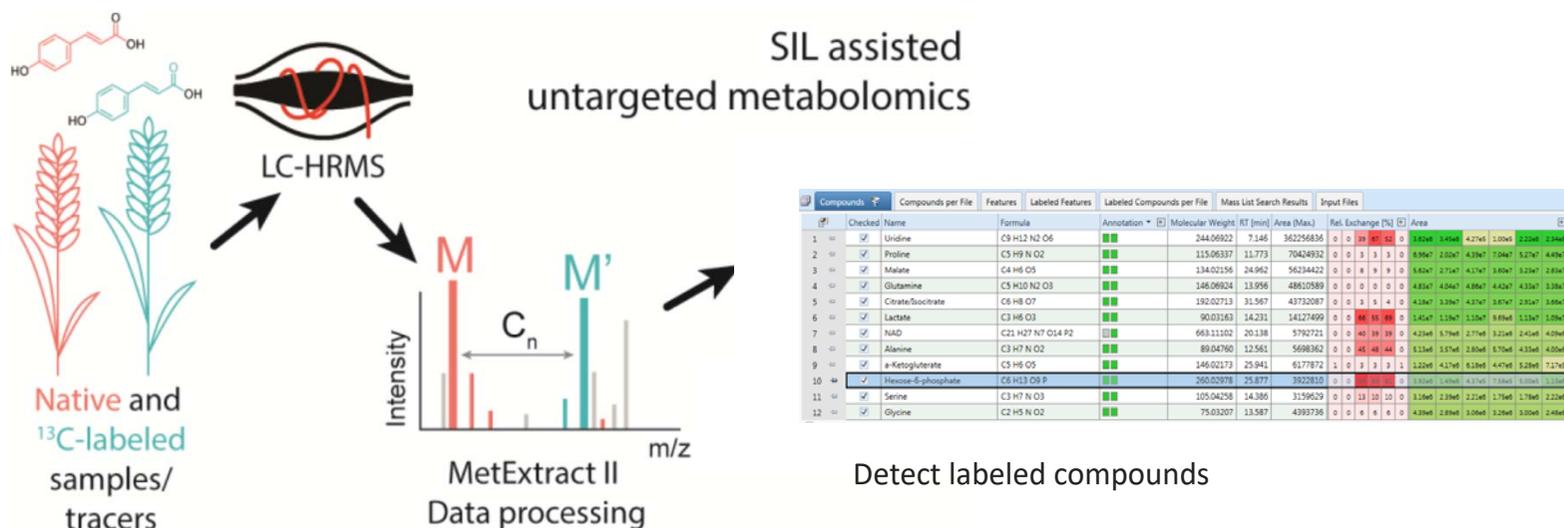


Pathway map レポート機能

Stable Isotope Labeling (“metabolic flux analysis”)



¹³Cなどの安定同位体で標識したサンプルから標識割合を計算する機能が追加され代謝フラックス解析が可能となりました。また、Compound Discovererの化合物同定機能を利用することで、**ノンターゲット**での解析が可能です。



modified from Bueschl et. al. Analytical Chemistry 2017

代謝フラックス解析の概要

Stable Isotope Labeling (“metabolic flux analysis”)



Parameters of 'Analyze Labeled Compounds'

Show Advanced Parameters

1. Label Settings	
Label Element	[13]C
Max. Exchange	25
Source Efficiency [%]	100
2. Pattern Analysis	
Mass Tolerance [ppm]	5 ppm
Intensity Tolerance [%]	30
Intensity Threshold [%]	0.1
SN Threshold	3
3. General Settings	
Hide Unprocessed	True

設定は使用した安定同位体を入力するだけ
入力は1種類のみ[13]Cや15[N]など

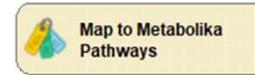
Study Definition		Input Files		Samples	Analysis Results	Grouping & Ratios	Workflows
Error	Sample	File	Sample Identifier			Sample Type	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	S1	F1	20150226_HeLa_24_NH2_NEG_12C_Glc_1_07			Sample	
	S2	F2	20150226_HeLa_24_NH2_NEG_12C_Glc_3_13			Sample	
	S6	F6	20150226_HeLa_24hr_NH2_NEG_12C_Glc_2_11			Sample	
	S3	F3	20150226_HeLa_24_NH2_NEG_13C_Glc_1_06			Labeled	
	S4	F4	20150226_HeLa_24_NH2_NEG_13C_Glc_2_09			Labeled	
	S5	F5	20150226_HeLa_24_NH2_NEG_13C_Glc_3_14			Labeled	

リファレンスサンプル
(ノンラベル)

ラベルサンプル

¹³C SIL data courtesy of Gary Patti, Washington University

Metabolika Pathways



Metabolika Pathwayではパスウェイを追加・編修する事も可能です。また、パスウェイ上に質量分析データ(面積値やフラックス解析結果)を表示する事が可能です。

