ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 11, No. 1, 1998
Printed in the Republic of Korea

= 해 설 =

텐뎀 질량 분석기의 원리와 장치(II)

명승운 · 김택제*
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터
*경기대학교 화학과

Principle and Instruments of Tandem Mass Spectrometry

Seung-Woon Myung and Taek-Jae Kim*
Doping Control Center, Korea Institute of Science & Technology, Seoul 136-791, Korea
**Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon, Kyonggi 440-760, Korea*

텐뎀 질량 분석기의 응용

텐뎀 질량 분석기(MS/MS)를 사용하여 기본적인 화학 정보를 얻기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. MS/MS를 이용한 대부분의 화학적인 연구 실험은 크게 세가지 부류로 나눌 수가 있는데 이온의 구조, 반응 메카니즘, 열 화학 등이다. 첫째 기체상에서 이온들의 구조를 결정하는데 이때는 수 KeV 충돌 에너지의 CID 방법과 더불어 photoexcitation과 같은 새로운 활성화 방법을 연결해서 사용한다. 두 번째 응용으로는 반응 메카니즘을 설명하는 것이다. 이 경우는 동위원소가 부착된 이온의 dissociation을 비교함으로써 단일 분자나 이분자 반응에 대해서 유용하다. 세 번째로는 기체상으로부터 열화학적(thermochemical) 정보를 얻는데 이용된다. 이들 데이타는 에너지 손실(energy loss), 운동에너지 방출(kinetic energy release), 토막 이온의 상대적 세기 등을 측정함으로써 얻어진다. 위에서 언급한 기본적인 화학 정보 외에 목표한 성분 분석, 복잡한 혼합물 분석, 일반적인 구조 분석에 대한 응용이 있는데 이들에 대한 MS/MS의 응용예를 소개하고자 한다. 환경 응용(environmental applications), 생 유기물 구조 분석(bioorganic structural analysis), 산업 화학 물질(industrial products), 식품(food)과 향료(flavor) 분석, 법 화학(forensic chemistry), 석유 화학(petroleum), 지구 화학(geochemistry), 농업(agriculture), 공정분야(process control) 등의 여러 분야에서 이용되고 있는데 이에 대한 예를 소개하고자 한다. 이들 응용 분야에 대한 대표적인 예를 제시하고자 한다.

1. 법 화학(forensic chemistry) 응용[1]

Fig. 1은 quaternary cation octanoylcarnitine을 CID 생성 이온(Product ion scan) 스펙트럼이며, *Scheme* 1에 토막화 과정이 나타나 있다. 이 생성 이온 스펙트럼의 전형적인 특징은 동위 원소 질량이 없다는 것인데 이는 선택된 선구 이온(m/z 288)이 주 동위원소 ^{12}C, ^{1}H, ^{14}N, ^{16}O등 만을 포함하고 있기 때문이다. 낮은 선구 이온 운동에너지(2 eV)에서 만들어진 토막 이온들은 구조적인 정보를 주고 있으며, 이 스펙트럼을 해석하면 다른 주사 방법들이 다른 지방산을 가진 carnitine conjugate들을 선택적으로 검출하는데 유용하게 될 것이라는 암시를 준다. 체액 내에

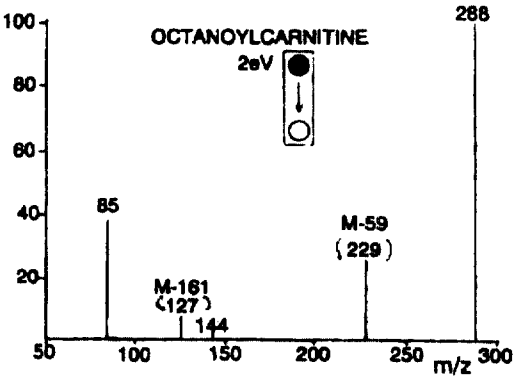
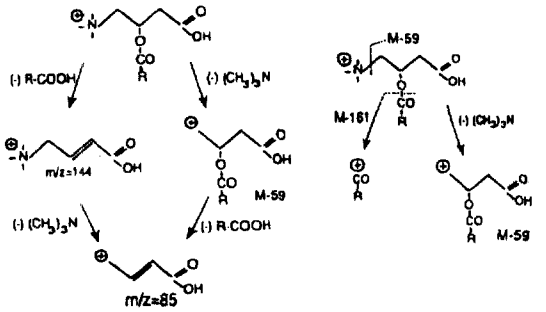


Fig. 1. Product ion mass spectrum of the octanoylcarnitine cation.



Scheme 1. Fragmentation scheme of acylcarnitines, as deduced from the product ion spectra of octanoylcarnitine and other carnitine conjugates.

서 carnitine conjugate의 존재는 여러 가지 대사 질병의 진단에 중요하며 carnitine 자체는 이들 질병들 중의 몇 가지를 치료하는 약물로도 사용된다.[2]

Scheme 1에서 m/z 144나 85의 선구 이온 주사는 이 기능적 관련 있는 화합물들의 전체를 검출하기 위해 좋은 후보 이온들인데 이는 지방산에는 이들 이온을 가지고 있지 않기 때문이다. 토막 이온 m/z 229(59 손실)와 m/z 127(161 손실)은 지방산 고리에 포함되어 있는 이온들이므로 모든 carnitine conjugate를 검출하기 위한 선구 이온 주사에 적절한 이온이 아니다. 하지만 이들 토막화에서 손실된 neutral species는 완전한 carnitine moiety인 161 Da이나 carnitine moiety의 일부분인 59 Da을 포함하고 있으므로 59 Da나 161 Da의 중성 손실 주사(neutral loss scan)는 모든 carnitine conjugate를 선택적으로 검출하기에 충분하다.

Fig. 2에서 왼쪽은 acylcarnitine을 포함하고 있는 생체 시료의 FAB 질량 스펙트럼이며 오른쪽은 같은

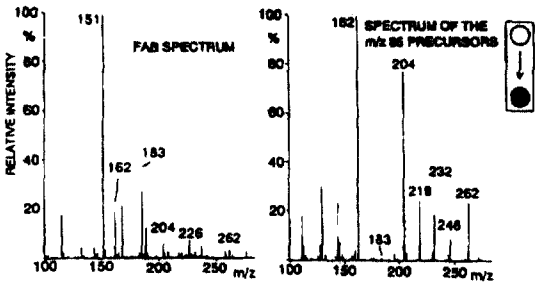


Fig. 2. Left: FAB mass spectrum of a biological sample containing acylcarnitines. Right: precursor scan of m/z 85 for the same sample, showing m/z 162, free carnitine: m/z 204, acylcarnitine; m/z 218, propionylcarnitine, etc.

시료에 대한 m/z 85에 대한 선구 이온 주사에 대한 스펙트럼인데 m/z 162는 free carnitine이며 m/z 204는 acylcarnitine, m/z 218은 propionylcarnitine은 나타낸다. 검출된 conjugate에 대하여 생성 이온 주사를 해주면 각 화합물들에 대한 개개의 스펙트럼을 얻을 수 있다. 이 예는 선구 이온 주사와 중성 손실 주사가 주어진 계열에 속하고 있는 화합물들을 선택적으로 검출하는 방법론을 설명해주는 예이다. 물질의 양이나 시간적 제약이 따르면 할 수 없지만 크로마토그래피에 의한 분리와 결합해서 사용될 수도 있다. 이런 종류의 텐뎀 질량분석기 실험은 약동학 연구에 있어서 선택된 화합물을 관찰해서 결정하는 제약업에서 널리 사용되고 있다.

혼합물 내에 존재하는 화합물들을 검출하기 위해서 사용되는 MS/MS 법은 signal-to-noise ratio를 현저하게 증가시켜 준다. 이에 대한 예가 *Fig.* 3에 나타나 있다.[3]

위쪽의 스펙트럼은 bile acid의 생리학적 시료의 FAB 질량 스펙트럼이다. bile acid들 중에는 sulphate

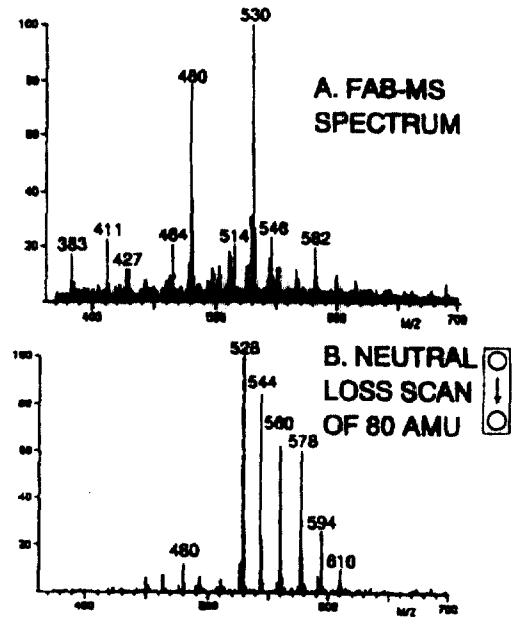


Fig. 3. Top: FAB mass spectrum of a mixture of bile acids extracted from a physiological sample. Bottom: selective detection of the sulphated bile acids by the neutral loss scan of 80 Da(SO_3). This spectrum displays compounds completely buried in the chemical noise of the FAB spectrum.

된 것들이 있으며 담즙 폐쇄증(biliary atresia)를 진단하기 위해서는 그들을 선택적으로 검출하는 것이 중요하다. 음 이온 모드에서 sulphated bile acid는 SO_3(80 Da)를 잃는데, 이에 대한 중성 손실 주사(neutral loss scan)에 해당하는 스펙트럼이 *Fig.* 3의 아래 그림이다. FAB 질량 스펙트럼의 화학적 잡음(chemical noise)에 파묻혔던 suphated bile acid가 m/z 560, 578, 594, 610에서 깨끗하게 검출되었다. 이는 선택적 검출이 바탕에 있는 대부분의 성분들에 적용되는 것이 아니기 때문에 바탕을 충분히 감소시켰기 때문이다. 이와 같이 MS/MS 실험의 Total ion current가 일반적인 질량 스펙트럼에 비해 감소하기는 하지만 복잡한 혼합물을 분석할 때는 선택된 성분들에 대한 검출 한계는 크게 증가시킬 수 있다는 것을 볼 수 있다.

2. 환경에 대한 응용(Environmental Applications)

Fig. 4은 phthalate로부터 형성된$(M+H)^+$ 이온의 충돌-유도에 대한 선구 이온 주사의 결과로써 이 딸 이온은 dimethyl phthalate를 제외한 대부분의 phthalate 구조를 가지 화합물의 특징이며 이 선택된 딸 이온의 선구 이온 주사에 대한 MS/MS 스펙트럼은 화합물로써 존재하는 phthalate의 protonated molecules의 질량을 의미한다. *Fig.* 4의 a)는 산업 퇴적물의 시료에서 m/z 149의 선구 이온 주사 MS/MS 스펙트럼이다. m/z 223, 279, 313, 391 이온들은 각각 diethyl-, dibutyl-, butylbenzyl-, di-n-octylphthalate 또는 di-2-ethylhexylphthalate의 protonated molecule들이며, 각 화합물들은 침전물에서 1-5 ppm 농도로 존재한 것들이다.

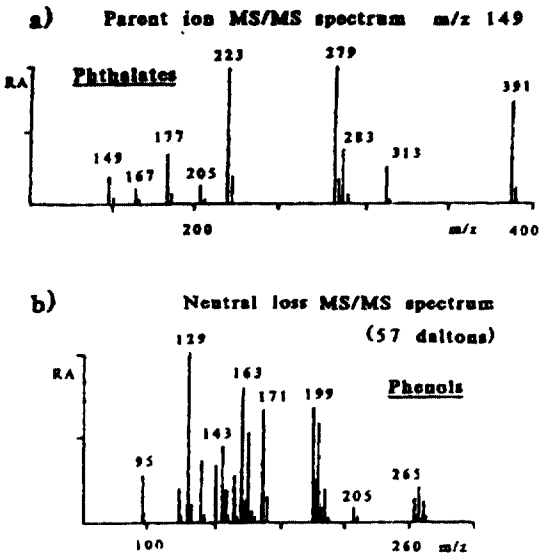


Fig. 4. a) Parent ion MS/MS spectrum of the characteristic ion at m/z 149, highlighting all phthalates in a complex mixture. b) Neutral loss (57 Da) MS/MS spectrum to characteristize carbamate derivatives of phenol in a complex mixture.

중성 손실(57 Da) 주사에 대한 스펙트럼이 *Fig.* 4의 b)에 있다. 동결 건조된 시료에서 페놀류는 carbamate를 형성하기 위해서 methyl isocyanate로 처리된다. 낮은 에너지 CID에서 carbamate는 57 Da(methyl isocyanate, CH_3NCO)의 손실과 phenol의 재생에 의해서 확인된다. 그러므로 중성 손실(57 Da) 주사법에 의한 스펙트럼은 phthalate를 분석했던 같은 산업 퇴적물 시료에 존재하는 복잡한 혼합물 내에 존재하는 phenol을 직접 확인 가능케 한다. 스펙트럼에서 관찰된 signal들은 각각 phenol(m/z 95), dimethyl phenol(m/z 123), chlorophenol(m/z 129), chloromethylphenol (m/z 143), dichlorophenol(m/z 163), trichlorophenol(m/z 197), pentachlorophenol(m/z 265)의 protonated molecule을 나타낸다. 그리고 염소 동위원소비가 중성 손실 MS/MS 스펙트럼에서 관찰되며, 57 Da의 손실에는 염소 원자가 포함되어 있지 않기 때문에 어미 이온에 있는 염소의 수를 직접 알 수 있다.

3. 천연물에 대한 응용(Natural products applications)

천연물 분석은 복잡한 혼합물의 분리가 필요하므로 전통적으로 GC/MS와 LC/MS의 결합 기법이 이용되어 왔다. 천연물 연구에 있어서 MS/MS의 기여는 크게 3가지 분야이다. 첫째는 천연물 내에서 발견되는 성분들의 구조 결정과 이성질체의 구별이며, 둘째는 혼합물 내에서 목표 성분을 찾아내는 것이며 마지막으로는 천연물로부터 성분들의 계열에 대한 정보를 알아내는 것, 예를 들면 alkaloid류의 분포를 찾는 것들이다. *Fig.* 5에는 high-collision-energy(BE)와 low-collision energy(QQQ) MS/MS를 이용하여 posorospermum febrifugum[4]내에서 xanthones의 존재를 연구한 결과이다. Antitumor 성질을 가진 여러 가지 화

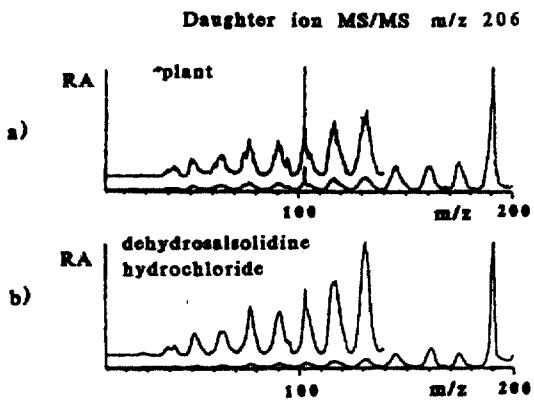


Fig. 5. a) Daughter ion MS/MS spectrum of m/z 206 found in the spectrum obtained directly from plant material. b) The spectrum obtained from m/z 206 of the standard sample (dehydrosolidine) synthesized as the hydrochloride salt.

합물이 이 식물의 추출물에서 규명되었으나 그들 중에서 최소한 한 개는 분리 과정과 농축 과정에서의 가상 물질로 생각되어졌다. 선구 이온 주사법으로 식물 내에서 밝혀진 거의 모든 성분을 확인하였고 불순물의 존재도 확인하였다.

Fig. 6과 *Fig.* 7은 각각 BE 기기와 다중 사중극자

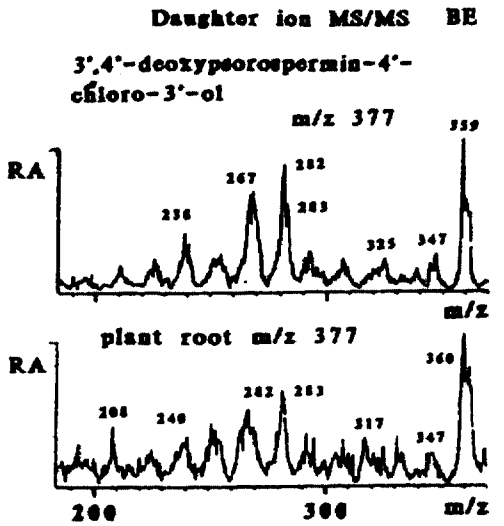


Fig. 6. Daughter ion MS/MS spectrum of the protonated molecule at m/z 377 of authentic 3',4'-deoxypsorospermin-4'-chloro-3'-ol compared with the daughter ion MS/MS spectrum of the ion at m/z 377 obtained directly from the plant root material. Data were measured on a BE instrument at high collision energy.

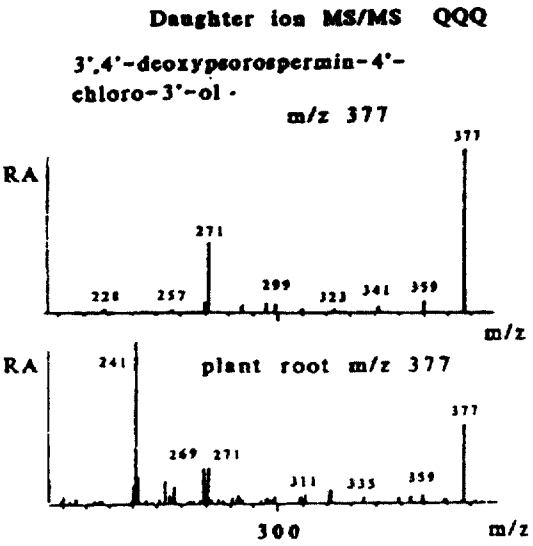


Fig. 7. Daughter ion MS/MS spectrum of the protonated molecule at m/z 377 of authentic 3',4'-deoxypsorospermin-4'-chloro-3'-ol compared with the daughter ion MS/MS spectrum of the ion at m/z 377 obtained directly from the plant root material. Data were measured on a QQQ instrument at low collision energy.

기기를 사용해서 m/z 377의 어미 이온을 선택하여 얻은 선구 이온 스펙트럼이다.

각 경우에 식물의 뿌리로 부터 추출한 것에 대한 선구 이온 주사 결과와 합성한 시료(3', 4'-deoxypsorspermin-4'-chloro-3'-ol)을 비교해 놓았는데 저 충돌 에너지에 의한 데이타와 스펙트럼이 다름을 알 수 있어서 불순물로 판정되었다. 즉 BE로부터 얻은 결과는 불순물이 많이 존재해서 가공의 피이크가 나타난 것이다.

4. 산업 물질에 응용(Industrial Products Applications)

폴리머의 분석은 매우 힘든 작업이다. 폴리머 혼합물내에서 성분들의 분자량 분포는 폴리머의 물리적 성질을 정하는데 사용되어 왔지만 이에 대한 응용은 폴리머 시료로부터 특성적인 이온을 생성하는 어떤 이온화 방법을 선택하는가가 중요하다. 또한 폴리머화 반응은 합성상으로 정교한 것이 아니므로 혼합물에 포함된, 구조의 다양성이나 화합물의 구조를 결정하는 것이 중요하다. Craig와 Derrick[5]는 장 탈착(field desorption) 질량분석기의 MS/MS 기법을 사용하여 polystyrene을 분석했다. *Fig.* 8은 두 polys-

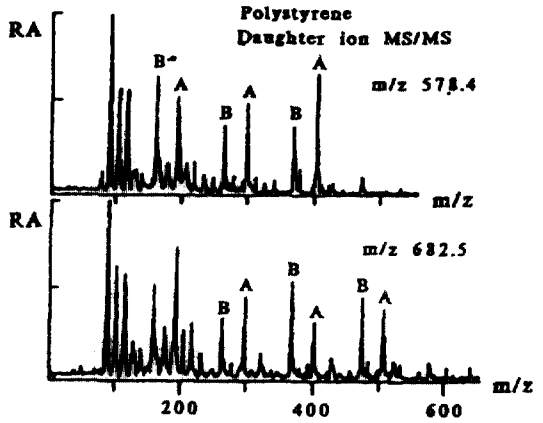
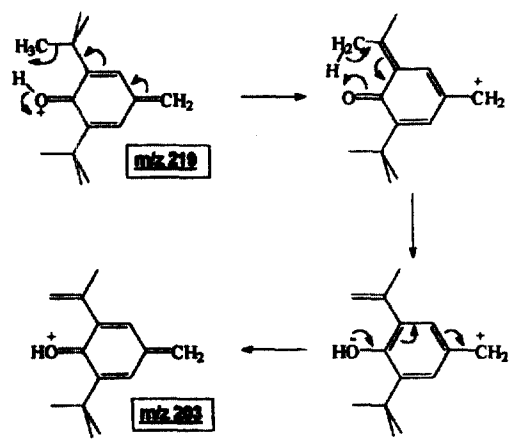


Fig. 8. Daughter ion MS/MS spectra (BE instrument) of molecular ions of polystyrene at m/z 578.4 (top) and m/z 682.5 (bottom). The parent ions were formed by field desorption. Ions in the A series are represented by the formula m/z=104n+91, where n is the number of repeat units of polystyrene and 104 is the mass of $C_7H_6CH_2$. Ions in the B series are represented by the formula m/z=104n+57.

tyrene 분자 이온인 m/z 578(위)과 m/z 682 이온에 대한 선구 이온 주사법에 의한 MS/MS 스펙트럼인데 어미 이온은 장-탈착에 의해 얻어졌다. A계열에 대한 이온들은 m/z=104n+91 공식으로 나타내지며 여기에서 n은 polystyrene의 반복단위 수이며 104는 $C_7H_6CH_2$이며 B계열의 이온은 m/z=104n+57 공식으로 나타낸다.

다른 예로써 Jackson등[6]은 폴리머 첨가제인 Irganox를 MS/MS/MS 기법으로 분석했다. 고 에너지 CID 실험을 통하여 분자 이온은 폴리머 첨가제의 부



Scheme 2. Generation of m/z 203 for Irganox compounds.

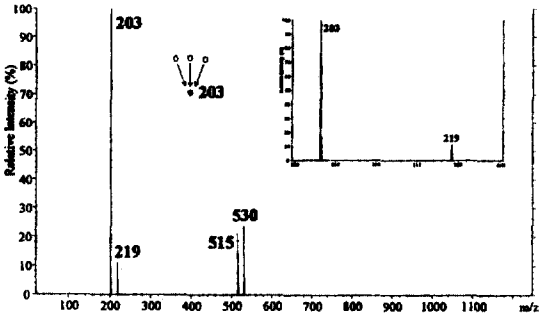


Fig. 9. Precursor ion spectrum of m/z 203 from the product ion spectrum of Irganox 1076.

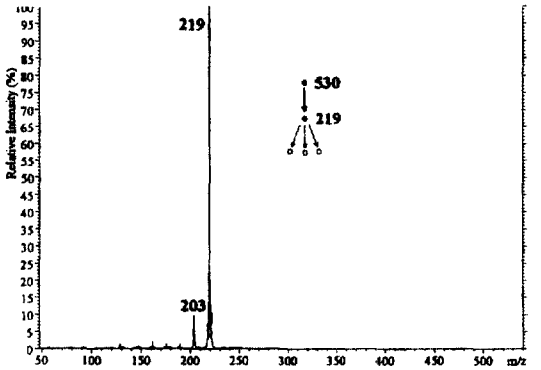


Fig. 10. Second generation product ion spectrum of Irganox 1076, m/z 530→m/z 219→products.

류를 특성짓는 토막 이온을 형성하였다. m/z 219과 203에서 관찰된 토막 이온들은 2,6-di-tert-butyl-4-R-phenol type 구조를 가진 폴리머 첨가제인 Irganox 부류와 관계가 있다. 또한 선구 이온 주사법으로 낮은 에너지 조건하에서 폴리머 첨가제의 구조 규명에 이용되어 왔지만 여기에서는 고 에너지 조건에서 선구 이온과 MS/MS/MS 스펙트럼을 생성할 수 있었다. *Scheme* 2은 Irganox compound에서 m/z 203이 나타나는 경로이며 *Fig.* 9는 Irganox 1076의 생성 이온 스펙트럼으로 부터 생성된 m/z 203에 대한 선구 이온 스펙트럼이며 *Fig.* 10은 Irganox 1076의 2차 생성 이온 스펙트럼(m/z 530→m/z 219→products)이다.

5. 식품 및 향료에 대한 응용(Foods and Flavor Applications)

식품과 향료 분석에 있어서 GC/MS 방법은 많이 사용되고 있다. 기체 크로마토그래피는 휘발성 성분들

을 분리해서 확인하는데 필수적이다. 많은 휘발성 식품들은 같은 계열의 화합물로 구성되어있으며 질량 스펙트럼도 매우 유사하다. 이러한 경우에는 기체 크로마토그래피에 의한 분리가 필수적이다. 한편, 식품의 많은 부분들이 당, 아미노산, 페놀류, 지질 등과 같은 극성 물질(비 휘발성)로 구성되어 있다. 이들 비 휘발성 물질들은 직접 기체 크로마토그래피로 분리하기 힘들기 때문에 유도체화를 만들든지 LC/MS로 분석하게 된다. 반면에 MS/MS는 덜 이용되어 왔다. 최근에는 MS/MS 사용이 늘고 있는데 이 분야에서 이용되고 있다. 한편 텐뎀 질량 분석법에서는 일반적인 GC/MS 방법에 비하여 시료의 양이 덜 필요하다는 장점도 있다. 또한 휘발성 성분의 경우 시료 전처리 과정에서 손실되는 경우가 많지만 MS/MS법에서는 시료 전처리 과정이 줄어들고 오염의 기회가 줄어든다는 장점이 있다. Davis와 Cooks[7]는 텐뎀 질량분석기를 사용하여 nutmeg의 성분을 연구하였다. *Fig.* 11은 authentic 4-allyl-2,5-dimethoxyphenol의 m/z 195에 대한 선구 이온 스펙트럼

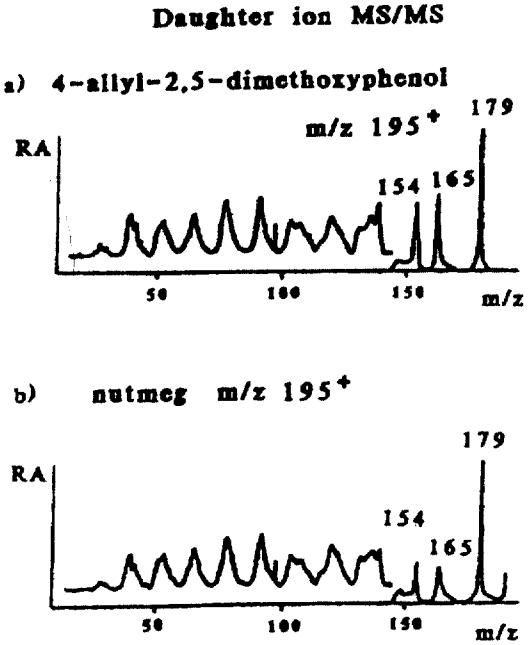


Fig. 11. a) Daughter ion MS/MS spectrum(BE instrument) of the parent ion at m/z 195 generated from authentic 4-allyl-2,5-dimethoxyphenol by chemical ionization compared to b) the daughter ion MS/MS spectrum of the m/z 195 ion created directly from a sample of nutmeg.

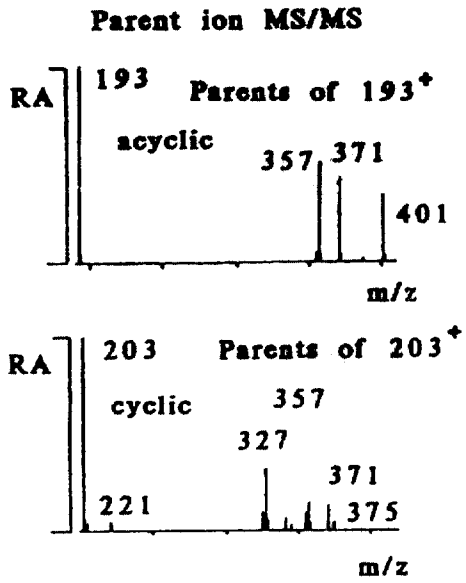


Fig. 12. Parent ion MS/MS spectra for the characteristic daughter ions of the acyclic and cyclic forms of the diphenylpropanoids. The overlap of parent ion masses in theses in these two parent ion MS/MS spectra show that the ions at those masses are a mixture of the cyclic and acyclic forms of the compound.

(a)과 nutmeg 시료로 부터 얻은 스펙트럼에 대한 비교 결과인데 nutmeg에 이 물질이 존재한다고 확인하기에 충분하도록 비슷하다. m/z 97.5에서 뾰족한 피이크는 charge-stripping반응의 결과이며 이는 질소와 산소 원자가 포함된 화합물들의 특징이며 이 경우에는 고 에너지 충돌의 결과로써 단일 하전된 195^{+}와 이중 하전된 195^{+2}의 산화 산물이며 선구 이온 주사의 결과는 정확하게 일치하지는 않지만 거의 유사하다. nutmeg는 cyclic과 acyclic형태의 diphenylpropanoid를 포함하고있다고 알려져 있다. acyclic은 m/z 193에서 cyclic은 m/z 203에서 특징적인 딸 이온에 해당하는 토막을 형성한다.

Davis와 Cooks는 선구 이온 주사법으로 diphenylpropanoid의 계열을 갖고 있는 어미 이온에 대한 전체 nutmeg 혼합물을 검사하였다. *Fig.* 12는 두 개의 딸 이온에 대한 실험 결과인데 m/z 357, 371, 387, 401의 어미 이온들이 acyclic diphenylpropanoid를 가르킨다. Cyclic 형태는 m/z 327, 355, 357, 371, 375에서 어미 이온을 나타냈으며 공통 어미 이온은 m/z 355, 357, 371이다.

6. 결 론

탠뎀 질량 분석기는 고가의 장비로써 사용상의 전문성과 다양한 기법을 개발하면 각종 분석 분야 즉, 구조 유추, 같은 계열의 성분분석, 이온-분자 반응의 분석과 연구에 대한 질량 분석기의 위력이 더욱 크게 증가될 것이다.

참 고 문 헌

1. E. de Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, *Spectrometrie de Masse*. Masson, Paris 1994.
2. E. de Hoffmann, R. Libert, J. P. Draye, F. Van Hoof, in proceedings of the 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, 1988, pp. 399-400.
3. R. Libert, D. Hermans, J. P. Druaye, F. Van Hoof, E. Sokal and E. de Hoffmann, Clin. Chem. *37*, 2102 (1991).
4. Pachuta, R. R.; Coks, R. G.; Cassady, J. M.; Cong, P. Z.; Mc Cloud, T. M.; Chang, C. -j. J. Nat. Prod. *49*, 472(1986).
5. Craig, A. G.; Derrick, P. J. J. Am, Chem. Soc. *107*, 6707(1985).
6. Jackson, T. T.; Scrivens, J. H.; Yates, H. T.; Jennings, R. C. K.; Jennings, K. R. Proceedings of the 44th MSMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Portland, 1996, pp. 1274.
7. Davis, D. V.; Cooks, R. G. J. Agric. Food Chem. *30*, 495(1982).