

LC/CE-QTOFと多変量解析の可能性

アジレント・テクノロジー(株) 野上知花・前田斉嘉・澤田浩和



目的

CE/MSはLC/MSと異なる分離特性を示すことから、近年注目を集めている分析手法である。イオン性化合物の分離はLC/MSでは分離が不十分である例が多く、実試料分析においてはマトリクスによるイオン化阻害の影響を受けることがある。しかしながら、CE/MSは中性物質の分離は得意としないため、測定対象によってCE/MS或いはLC/MSを選択するように、分離場を切り換えることが有効とされる。

また、近年の傾向として、測定対象化合物が限定された分析(ターゲット分析)のみならず、測定対象を限定しない網羅的な検出を目的とした分析(非ターゲット分析)を飛行時間型タイプの質量分析計(TOF, QTOF)で行うという手法も盛んに試みられている。ここで得られる膨大な実験データを、多変量解析という統計的手法を適用することで、複数検体において差異を特徴付けている成分の探索を行うことが可能となる。また、データベース検索やQTOFのMS/MS機能を組み合わせることにより、未知成分の定性情報をより得ることが期待できる。

本検討では、上で挙げた分離分析(LC/CE-QTOFシステム)と多変量解析の手法を合わせて、基礎的な評価を行うことを目的とした。今回の検討は、次の2つを主とした。①モデル試料を用いてLC/QTOFとCE/QTOFの分離特性を確認する、②CE/QTOFを用いて得られた実験データに多変量解析を適用し、その応用性について検討する。

実験

CE/QTOF及びLC/QTOFで用いた分析条件を表1と2に示す。

表1 CE/QTOFの測定条件

<CE Condition>	
Capillary	: fused silica capillary (i.d. 50 µm*100cm)
Buffer	: 1M Formic acid
Capillary Temp.	: 20 °C
Voltage	: +30kV
Injection	: 50mbar*30sec
Sheath flow rate	: 8 uL/min

表2 LC/QTOFの測定条件

<LC Condition>	
Column	: ZORBAX SB-Aq 2.1×50mm, 1.8 µm
Mobile phase	: A:0.1% Formic acid, B:CAN %B 5%(0)-30%(7)-80%(8)-80%(9 min.)
Column Temp.	: 40 °C
Sample volume	: 1 µl
Flow rate	: 0.2mL/min

<MS Conditions>	
Mass spectrometer	: Agilent 6520 LC-QTOF
Ionization	: ESI-Pos
Nebulizer gas	: 10psi (345 kPa)
Dry gas	: 10L/min at 350 °C
Fragmentor	: 100v
Sheath flow	: Methanol/Water=1/1 (v/v) with reference mass

<MS Conditions>	
Mass spectrometer	: Agilent 6520 LC-QTOF
Ionization	: ESI-Pos
Nebulizer gas	: 55psi
Dry gas	: 11L/min at 350 °C
Fragmentor	: 110v

結果及び考察

緑茶中のカテキン類・アミノ酸分析におけるLC/QTOFとCE/QTOFの比較

CE/QTOFとLC/QTOFのモデル試料として、市販緑茶飲料を用いた。緑茶AIに含まれるアミノ酸やカテキン類、カフェインを分析後ターゲットとしてマスクロマトグラム/マスエレクトロフェログラムを抽出し、それぞれの分離特性を比較した(図1と2)。アミノ酸はCE/QTOFで、カテキン類・カフェインはLC/QTOFでそれぞれ良好な分離を示した。このように測定対象が限定されたターゲット分析を行う場合は、もっとも良好な分離を示す分析システム・分離条件を選択し相補的に用いるのが望ましいと考えられる。また、測定対象が限定されない非ターゲット分析を行う場合は、分離挙動が全く異なる分離場を使うことにより、測定可能な分析対象の幅を容易に広げることが出来るため効果が大きいと期待される。

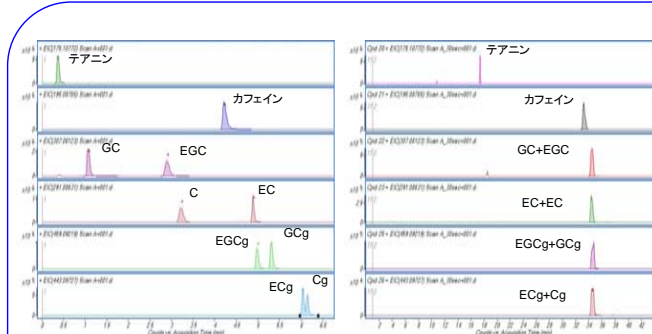


図.1 緑茶A中のカテキン類及びカフェインのマスクロマトグラム/エレクトロフェログラム(左:LC/QTOF、右:CE/QTOF)

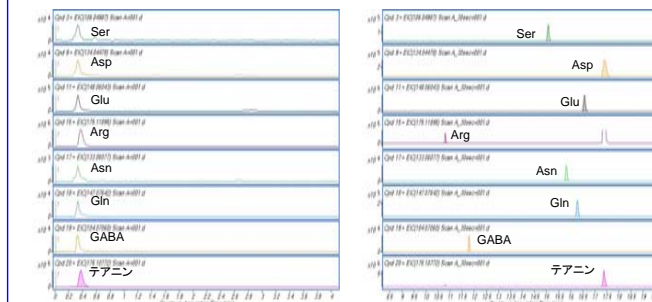


図.2 緑茶A中のアミノ酸のマスクロマトグラム/エレクトロフェログラム(左:LC/QTOF、右:CE/QTOF)

データ変換(Molecular Feature Extraction(MFE))

LC/CE-QTOFデータを多検体比較が可能な多変量解析GeneSpringMSソフトウェアで処理可能な形式に変換した。MassHunter定性ソフトウェアのMFE機能を利用し、ピーク抽出及びデコンボリューションを行った。これにより、精密質量・時間の2つで定義され、強度情報を持つ化合物のリストが作成される。図3にCE/QTOF結果で得られたトータルイオンエレクトロフェログラムとピーク抽出結果の例を示す。これにより既知成分だけでなく、未知成分についても解析可能となる。

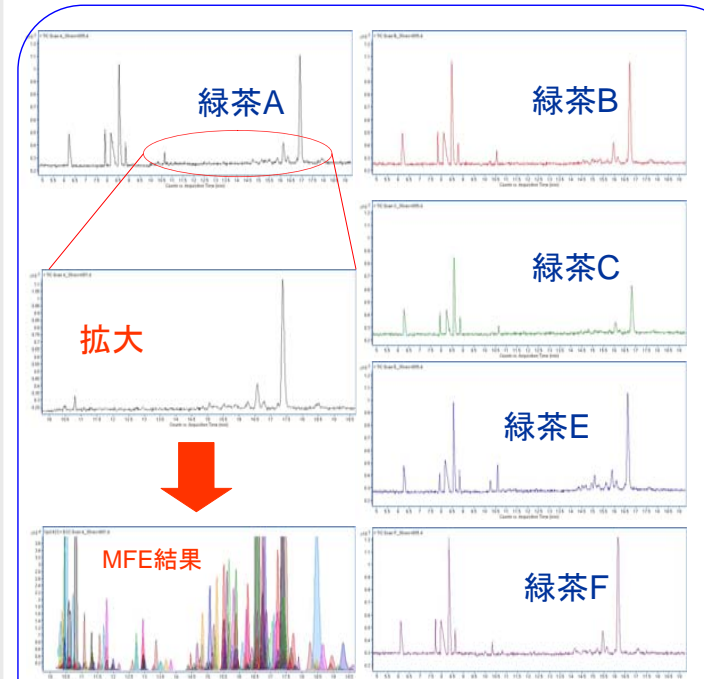


図.3 市販緑茶飲料のトータルイオンエレクトロフェログラムとMFE抽出結果の例(CE/QTOF結果)

多変量解析による特異的ピークの抽出

CE/QTOF (試料5種、繰り返し分析5回、全25実験データ) 及び LC/QTOF (試料5種、繰り返し分析4回、全20実験データ) 結果をそれぞれMFEアルゴリズムにより変換して多変量解析を行った。

全ての銘柄に共通して存在する成分に絞込み、ツリークラスタリング及び主成分(PCA)解析を行った(図4)。CE/QTOF結果からは、茶Eにおいて顕著な強度を示す成分が確認された(赤点線)。一方、LC/QTOF結果からは、茶A及びBが他の3種に比べ高い強度を示す成分が数多く確認された(青点線)。

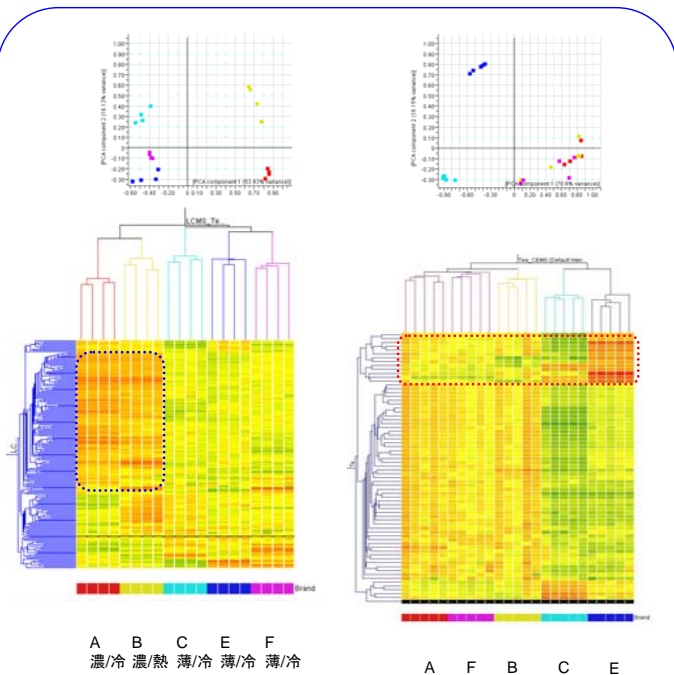


図4 GeneSpringMSによるPCA解析結果及びツリークラスタリング結果(市販緑茶飲料5種)(左:LC/QTOF、右:CE/QTOF)

赤点線の成分について組成推定およびMetlin代謝物データベース検索を行ったところ、グアノシン・ピペコリン酸・ヒステジン・グアニン・アデノシン等であることが推察された。これらは高級茶に多く含まれるというアミノ酸以外の旨味成分であった。

また、茶AとBは他の3種に比べ茶抽出濃度が高い製品であり、AとBはコールド製品とホット製品の違いという試料の背景を考えると、本検討は単純な銘柄比較への適用であったが、成分間の強度変動や試料間の類似性の全体像を把握するこの手法は、目的にあわせた実験デザインを構築することにより、より柔軟で多様な解析が出来ると期待される。

CE/QTOFによるグルタチオン製剤中の不純物分析

グルタチオン原末中の不純物をCE/QTOFで分析した。グルタチオン中の不純物分析は、European Pharmacopoeia (E.P.) 収載の分析ではCE単体による試験(図5)が紹介されている。不純物の閾値などの指定がある一方で、E.P.において不純物として化合物名が明示されている成分は4種にとどまる。今回は、供給メーカーが異なる3種、うち1種については製造ロット違い3点を用意し、計5点の試料を用意した。E.P. 収載の条件を参考に、グルタチオン濃度として2%水溶液をそれぞれ試料とし分析を行った。

MFEによりピーク抽出を行った後、多変量解析ソフトウェアにより解析を行った。メーカー間の差が顕著に示されるよう解析手順でツリークラスタリングを行った(図6)。メーカーの差を特徴付ける構成要素のひとつとして求められた成分について、マスエレクトロフェログラムのピークを確認し(図7)、MS/MS分析を行った。MS/MSスペクトル結果に対し、Molecular Formula Generationアルゴリズムにより組成推定を行った(図8)。

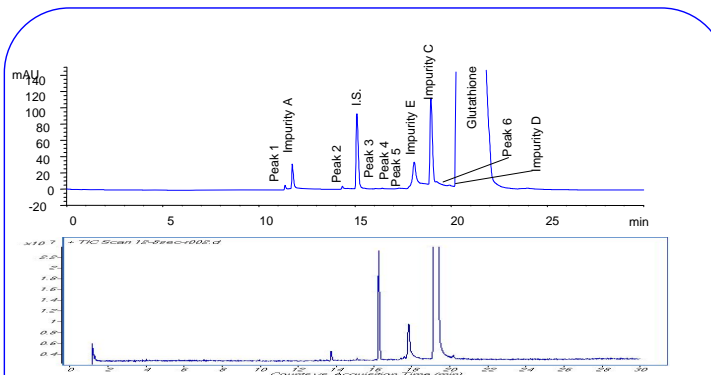


図5 グルタチオンの不純物分析(上:CE、下CE/QTOF)

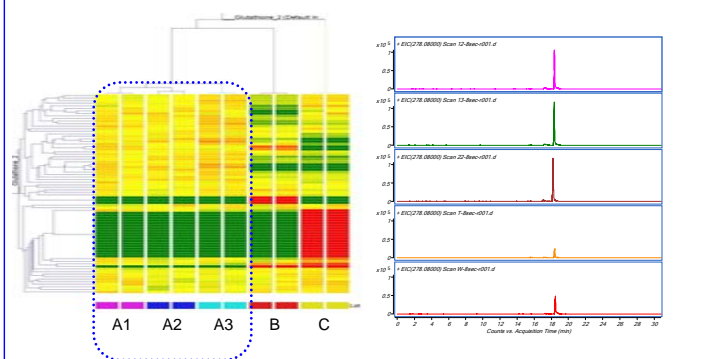


図6 ツリークラスタリング

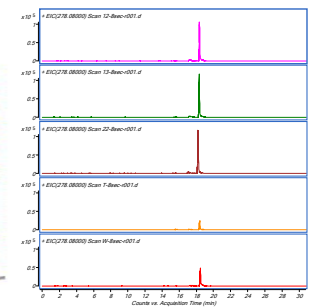


図7 マスエレクトロフェログラム (m/z= 278.06-278.10)

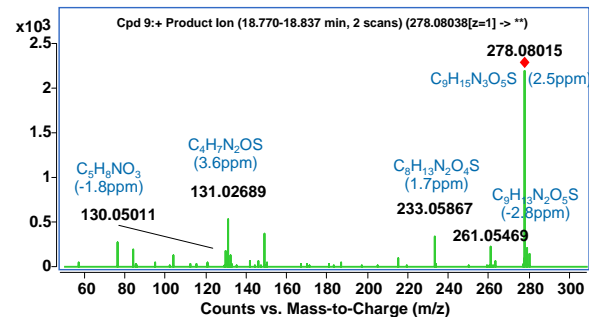


図8 m/z=278.08038のMS/MSスペクトル

結論

- ① 分離原理の異なる分析装置を使い分けて分析
- ② 飛行時間型質量分析計とデータデコンボリューションの利用による、既知/未知成分の網羅的検出
- ③ 複雑で膨大な分析データを効率的に処理できる多変量解析

以上の3点の手法の組み合わせが食品研究開発や品質管理へ応用できることが示された。

今後は、更なる分析対象の拡張を狙い、本法をGC/MS、ICP/MSにも適用させて評価を行う予定である。