

LC/TOF-MS による Tween 80 (ポリソルベート 80) の分析



Authors

林 慶子
林 明生
瀬崎 浩史

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

Tween80 は非イオン性界面活性剤で、アルキル及びエチレンオキシドの重合度にバリエーションがあるため、数千の構造の可能性があります。

Tween80 のような複雑な組成を持つ混合試料の LC/MS 分析では多数のピークが溶出するため、TIC から自力で特徴的な化合物の探索を行うには多大な労力を要するうえ、差異を可視化することが困難です。

Agilent MassHunter Qualitative ソフトウェアで Molecular Feature Extraction (MFE) を行うと、多数のピークを自動で抽出することが可能です。また、Mass Profiler ソフトウェアにより、試料間の差異を容易に可視化できます。

本アプリケーションノートでは、Tween 80 を LC/MS で分離・検出する分析条件を構築し、二つのブランドの Tween 80 に含まれる分子種の差異を解析しました。

また、Mass Profiler Professional ソフトウェアを使用し、ケンドリックマスディフェクト (KMD) プロットを作成した。KMD プロットを作成することにより繰り返し構造を持つ混合試料の解析を簡便に行うことが可能になりました。

Key words : Tween80 (ポリソルベート 80)、LC/TOF-MS、Mass Profiler、Mass Profiler Professional

システム

Agilent 1260 Infinity II Prime LC
1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7104B)
1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129A)
ICCオプション付き
6230 Accurate-Mass TOF (G6230BA)
MassHunter workstation B10.00
Agilent MassHunter Mass Profiler B08.00
Agilent Mass Profiler Professional 15.0

分析対象

異なるブランド/グレードのTween 80を50%エタノール水溶液で10倍希釈し試料としました。
二種類の試料をブランドA及びブランドBとしました。

分析条件

表2. HPLC条件

HPLC	RP
カラム	Agilent InfinityLab, Poroshell EC-C18, 3.0x100 mm, 1.9 μm (PN:695675-302)
移動相A	10 mM酢酸アンモニウム
移動相B	アセトニトリル
移動相C	IPA/アセトン=1/1
流速	0.4 mL/min
注入量	0.2 μL
カラム温度	30°C
分析時間 (ポストタイム)	30分 (5分)

表3. グラジエント条件

min	%B	%C
0	20	40
20	30	60

表4. LC/MS条件

TOF	
イオン源	Dual AJS ESI
ガス温度	300°C
ガス流量	8 L/min
ネブライザ	50 psi
シースガス	350°C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリ電圧	3500V
ノズル電圧	1000V
フラグメンター電圧	120V

結果

図1に各試料のTICを示しました。多数のピークが含まれているため、TICのパターンで確認してもイオンや強度を個別に確認することができません。
そこで、MassHunter Qualitative AnalysisでMolecular Feature Extraction (MFE)を行うと、TICに含まれている大量のマスペクトルからピークを抽出します。抽出されたCompound chromatogramの重ね書きを図2に示しました。TICでは判別しにくかった各ピークの強度が比較しやすくなり、二つのブランドの組成の違いがより可視化されました。

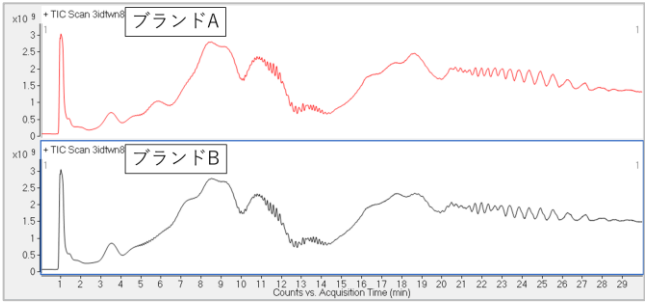


図1. 各試料のTIC (赤：ブランドA、黒：ブランドB)

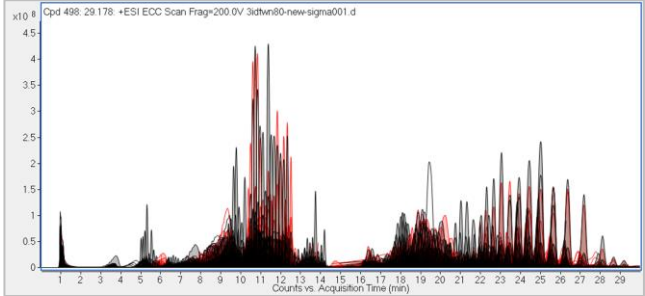


図2. 各試料のCompound chromatogram重ね書き (赤：ブランドA、黒：ブランドB)

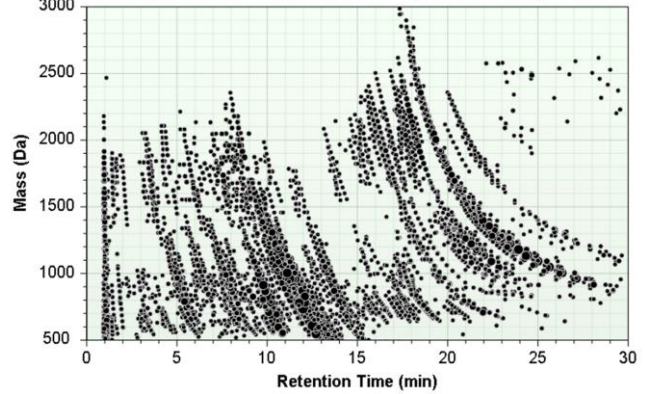


図3. Mass ProfilerによるMass vs RTプロット (ブランドA)

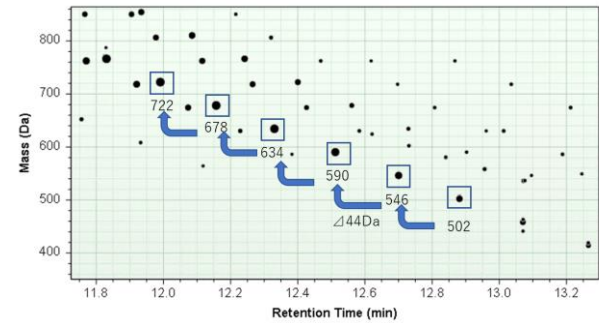
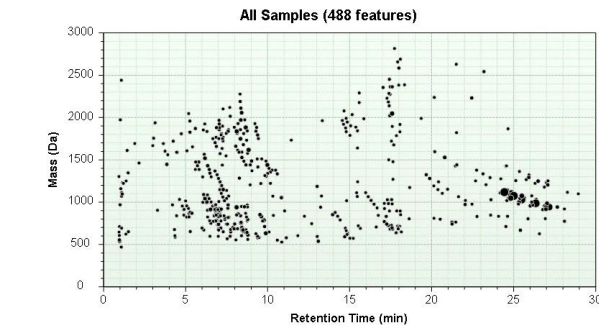


図4. 図3のRT11.8-13.2分、Mass(Da)350-850の拡大



ブランドAにユニークなピークのMass vs RTプロット
Mass Profilerソフトウェアでの解析を行いました。図3にMass vs RTプロットを示しました。横軸に溶出時間、縦軸に分子量をプロットしているため、Compound chromatogramの重ね書きでは可視化されにくい分子量情報をプロットすることが可能でした。

図4にプロットの一部を拡大しました。四角で示した各プロットの分子量の差は44 Daでした。エチレンオキシドの分子量が44 Daであることから、これらは同様の構造を持つ化合物群であると推察されます。

精密質量に基づく組成推定を行うためにMass Profilerからターゲットのピークを選択し、IDブラウザーでピークの組成推定を行いました。組成推定の結果、組成差異はC2H4Oとなり、44 Daはエチレンオキシドの重合度の違いであることが明らかになりました。

Formula	Mass	RT	Polarity	Diff (MFG, mDa)	ID Source	Label
C30 H58 O8	546.4137	12.699	Positive	-0.54	MFG	Cpd 5: C30 H58 O8; 12.699

Best	Name	Formula	Score	Mass	Mass (DB)	Mass (MFG)	Diff (ppm)
		C30 H58 O8	98.77	546.4137		546.4132	-1

Species	Ion Formula	m/z	Height	Score (MFG)	Score (MS)	Score (mass)
(M+H)+	C30 H59 O8	547.421	492393.8	98.77	98.77	98.85
(M+NH4)+	C30 H62 N O8	564.44	1918624	87.74	87.74	99.42

図6. Mass546のスポットの組成推定結果 (C30H58O8)

Formula	Mass	RT	Polarity
C30 H58 O8	546.4137	12.699	Positive
C32 H62 O9	590.4389	12.511	Positive
C34 H66 O10	634.4654	12.337	Positive
C36 H70 O11	678.4895	12.156	Positive
C38 H74 O12	722.5168	11.99	Positive

図7. 546から722の組成推定結果

次に、Mass Profiler Professionalソフトウェアでケンドリックマスディフェクト (KMD) プロットを作成しました。この時、繰り返し単位となる化学組成をC2H4Oとしました。図8に示したKMDプロット上で化合物のスポットを選択すると、緑で示したように同様の繰り返し構造を持つスポットがハイライトされるため、Tween 80などの多数の組成を持つ混合試料を容易に解析可能でした。

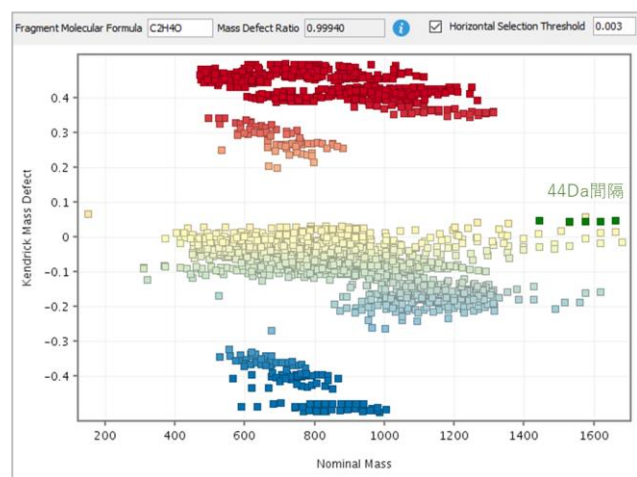


図8. KMDプロット
(緑で示した部分が共通の繰り返し構造を持つスポット)

まとめ

Tween 80を分離・検出するLC/MSメソッドを構築し、異なるブランドから購入した試料を分析しました。

多数の化合物を含むTween 80などの試料ではTICを比較しても詳細な比較を行うことが困難です。Molecular Feature Extractionを行うことにより、自動的に多数のピークを抽出し、抽出クロマトグラムを作成することができるため、TICで可視化できない差異を観測することが可能でした。

抽出クロマトグラムでは分子量情報を含む比較が困難なためMass ProfilerソフトウェアでMass vs RTプロットを作成し、多数のピークを有する試料の特性解析やサンプル間の差異解析が可能であることを示しました。

KMDプロットにより、多数のピークの中の共通の繰り返し構造を持つピーク群を簡単に可視化し、多数のスポットから興味のある群を容易に確認することができました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報は、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

LC-MS-201907HK-001