

高分解能 GC/Q-TOF によりヘンプオイル中で 同定された化合物に基づく天然物の精密質量 ライブラリ

著者

Sofia Nieto and
Matthew Curtis
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、ヘンプ CBD オイルの包括的な GC × GC データに基づく、GC/Q-TOF MS の精密質量天然物ライブラリの作成について説明します。包括的な GC × GC 手法を用いて複雑なマトリックスをクロマトグラフィーにより分離することで、一次元 (1D) GC 分離を用いた場合よりも優れた結果を得ることができました。ライブラリがヘンプ CBD オイルサンプルから直接構築されたため、化合物を正確に同定して明瞭なスペクトルを抽出するには、GC × GC 手法が必要でした。この研究では、GC/Q-TOF 電子イオン化 (EI) 天然物スペクトルライブラリを用いた、ターゲット/ノントargetスクリーニングワークフローの例を示します。

はじめに

ヘンプオイルや CBD オイルを直接製品として使用したり、その他の製品に取り入れたりすることは、世界中の多くの分野で人気が高まっています。ヘンプ植物（大麻）は、特に織物繊維や建築資材などのさまざまな用途に使用されてきた、非常に豊富な天然資源です。^{1,2} ヘンプから生成される潜在的な生物活性化学物質のグループとしては、カンナビノイド、テルペン、フラボノイドなどがあります。³ ヘンプおよびヘンプ製品の化学分析における重要な方向性の 1 つは、さまざまなヘンプ株の化学組成を調査し、特定の化学的特性を持つ化合物を特定することです。

ヘンプ由来の濃縮 CBD オイルは複雑なサンプルであり、通常はシンプルな 1D 構成で 350 ~ 560 個の分離ピークが生成されます。このため、個々の化合物をクロマトグラフィーにより分離するには、包括的な GC × GC 手法が適しています。高分解能精密質量 GC/MS は、より正確な化合物同定に適しています。このアプリケーションノートでは、Agilent 7250 GC/Q-TOF を用いて、これらのサンプルタイプのリテンションインデックス (RI) ベースの EI 精密質量ライブラリを作成する方法を説明します。目的は、全体的なデータ分析時間を短縮し、このサンプルタイプ固有の化合物をより正確に同定できるようにすることです。

実験方法

サンプルと抽出

この研究で使用したサンプルには、犬用のおやつに使用される 5 種類のヘンプ CBD オイルが含まれていました。

データ取り込みとデータ処理

高分解能 7250 GC/Q-TOF MS を用いて、CBD オイルサンプルと大麻抽出物を分析しました。サンプルは、1D GC と、Zoex ZX2 サーマルモジュレータ (図 1) と Agilent 7890B GC を用いた包括的な GC × GC 構成で分離しました。Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート 30 m カラムを使用して、1D GC データを取り込みました。GC × GC 構成では、1 次カラムとして Agilent DB-5ms ウルトライナート 30 m カラム、2 次カラムとして 2.8 m Agilent J&W DB-HeavyWAX を組み合わせて使用しました。データは EI モード、70 eV で取り込みました。データ取り込みパラメータの詳細は、表 1 を参照してください。化合物の同定とライブラリ収集のため、RI をアルカンラダーに基づいて計算しました。

Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.2 の Agilent Unknowns Analysis ソフトウェアツール、および Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア 10 と GC Image GC × GC ソフトウェア 2.9 を用いて GC/Q-TOF データを処理しました。化合物の初期同定には、NIST 17 ライブラリと NIST 20 ライブラリを使用しました。

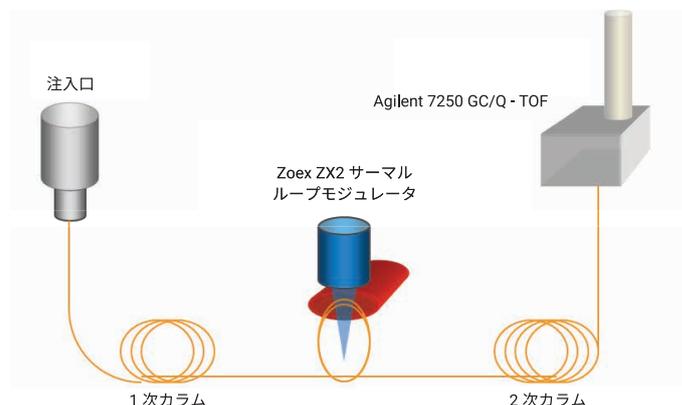


図 1. Zoex ZX2 サーマルモジュレータの構成図

表 1. データ取り込みパラメータ

GC および MS 条件	2D	1D
MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF	
GC	Agilent 7890B GC	
注入口	マルチモード注入口、4 mm Agilent ウルトライナートライナ、シングルテーパライナ (ウール入り)	
注入口温度	280 °C	
注入量	1 µL	
カラム	1 次: Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート、30 m × 0.25 mm、0.25 µm	Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート、30 m × 0.25 mm、0.25 µm
	2 次: Agilent J&W DB-HeavyWAX、2.8 m × 100 µm、0.1 µm	-
オープン温度プログラム	60 °C で 5 分間、3 °C /min で 290 °C まで昇温、25 分間保持	60 °C で 5 分間、4 °C /min で 300 °C まで昇温、25 分間保持
キャリアガス	ヘリウム	
カラム流量	1 mL/min 定流量モード	
モジュレーションサイクル:	6 秒	-
低温噴流	13 L/min	-
高温噴流温度	300 °C	-
高温噴流時間	320 ms	-
トランスファライン温度	280 °C	
四重極温度	150 °C	
イオン源温度	200 °C	
イオン化エネルギー	70 eV	
イオン化電流	5 µA	
スペクトル採取レート	50 Hz	5 Hz
質量範囲	m/z 40 ~ 650	

結果と考察

天然物の精密質量ライブラリの作成

この研究の目的は、ヘンプ CBD オイルサンプルに基づいて精密質量の包括的なパーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) を作成し、標準的な 1D GC 構成で確実に高速スクリーニングできるようにすることです。これらの複雑なサンプルをクロマトグラフィーで適切に分離するため、包括的な GC × GC 構成を使用してデータを収集しました。1D 構成を使用して同じサンプルセットを分析し、精密質量ライブラリとスクリーニング手法を検証しました。

GC Image GC × GC ソフトウェアを用いて GC × GC データを視覚化し、NIST 17 ライブラリと NIST 20 ライブラリを用いて化合物を暫定的に同定しました。アルカンラダー C₈ ~ C₃₀ を用いて一次元目の Kovats RI を計算し、さらなる化合物同定に使用しました。2D プロットでは、各化合物種の明確な分離が見られます (図 2)。

2D リテンションタイム (RT) により化合物の化学的分類を確認することで、化合物の同定の信頼性が大幅に向上しました。

さらに、フラグメントイオンの精密質量と正確な同位体比を使用して可能性のある元素組成を減らすことで、CBD オイルサンプルの成分同定の信頼性を向上させました。化合物スペクトルの Fragment Formula Annotation は、MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアを用いて実行しました (図 3A)。個々のイオンの元素組成に基づいて m/z 測定値を理論値に自動変換してから、アノテーション付きスペクトルを PCDL にエクスポートしました (図 3)。異性体の明確な同定が不可能な場合は、化合物名の代わりにインデックス付き分子式を化合物に割り当てました。最新の PCDL には約 350 個の化合物スペクトルが含まれており、そのうち 260 個以上のエントリーに名前と構造が割り当てられています。

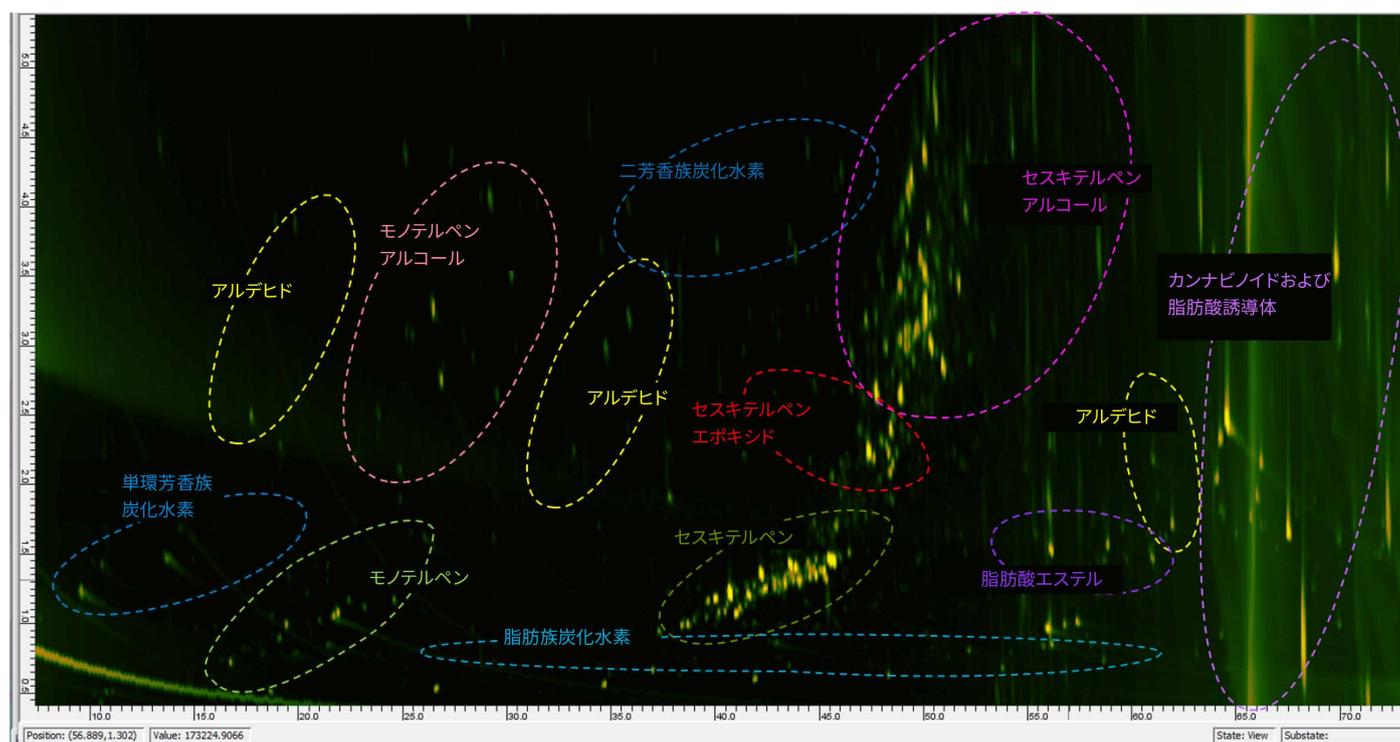


図 2. CBD オイルサンプルの GC × GC/Q-TOF クロマトグラム上の化合物種のマッピング

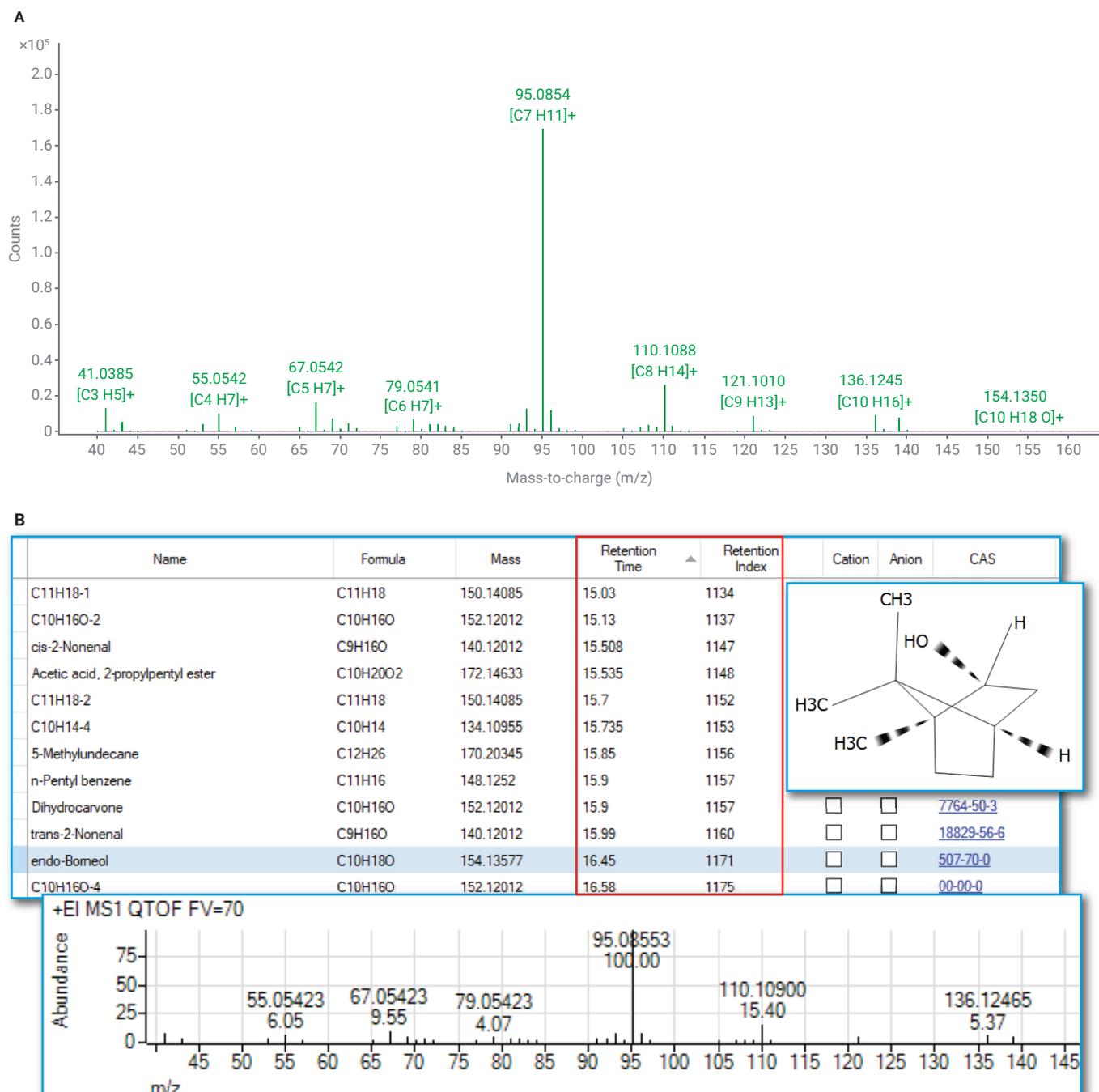


図 3. (A) スペクトルの Fragment Formula Annotation は、高品質な精密質量ライブラリの作成における重要なステップです。(B) ヘンプと天然物の PCDL には、リテンションタイムとリテンションインデックスの両方が含まれます。すべてのスペクトルに、フラグメントイオンの m/z 理論値が割り当てられています。

PCDL 内のさまざまな化合物種の内訳は、図 4 のとおりです。可能な場合は式を同定しています。PCDL に含まれるスペクトル全体の約半数は、モノテルペノイド、セスキテルペノイド、および各種アルコールです。

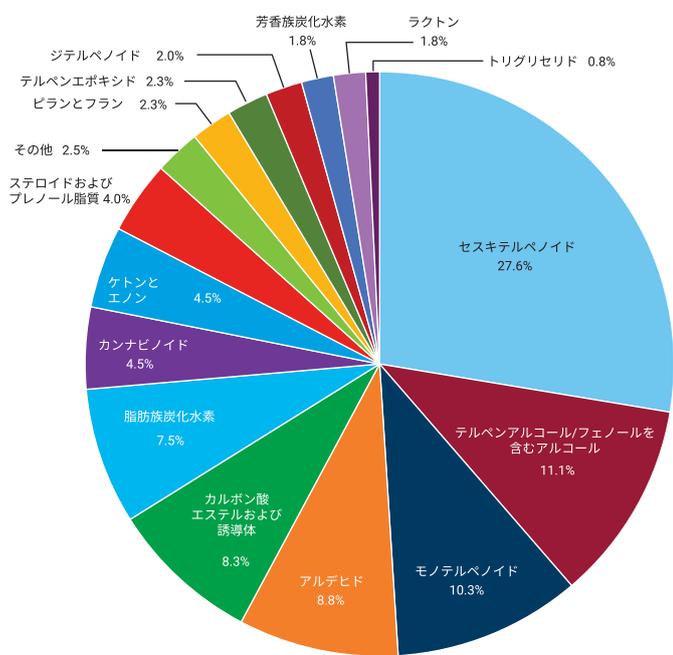


図 4. PCDL 内の化合物種

精密質量ライブラリを用いたターゲットおよびノンターゲットワークフロー

ターゲットとノンターゲットのいずれのワークフローも、天然物 PCDL と、ヘンプ CBD オイルサンプルから取り込んだ 1D GC/Q-TOF データを用いて評価しました。ノンターゲット分析は、Unknowns Analysis ソフトウェアを用いて実行しました (図 5)。精密質量用のデコンボリューションアルゴリズム (SureMass) を使用してマトリックスから個々の成分を分離し、新しい天然物 PCDL を使用して化合物を同定しました。特筆すべきは、1D と 2D の GC メソッド間でオープンプログラムが異なるにもかかわらず、成分およびヒット間の RI の差異が小さかった点です (図 5B)。

ターゲットスクリーニングは、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアで、GC スクリーナアルゴリズムを使用して実行しました (図 6)。このワークフローでは、標準物質も使用すれば、サスペクト化合物スクリーニングとターゲット定量が同時に容易に行えます。この方法のもう 1 つの利点は、化合物ごとに非常に柔軟にパラメータを設定できることです。各ワークフローのスクリーニング条件を個別に最適化し、偽陽性と偽陰性を最小限に減らしました。

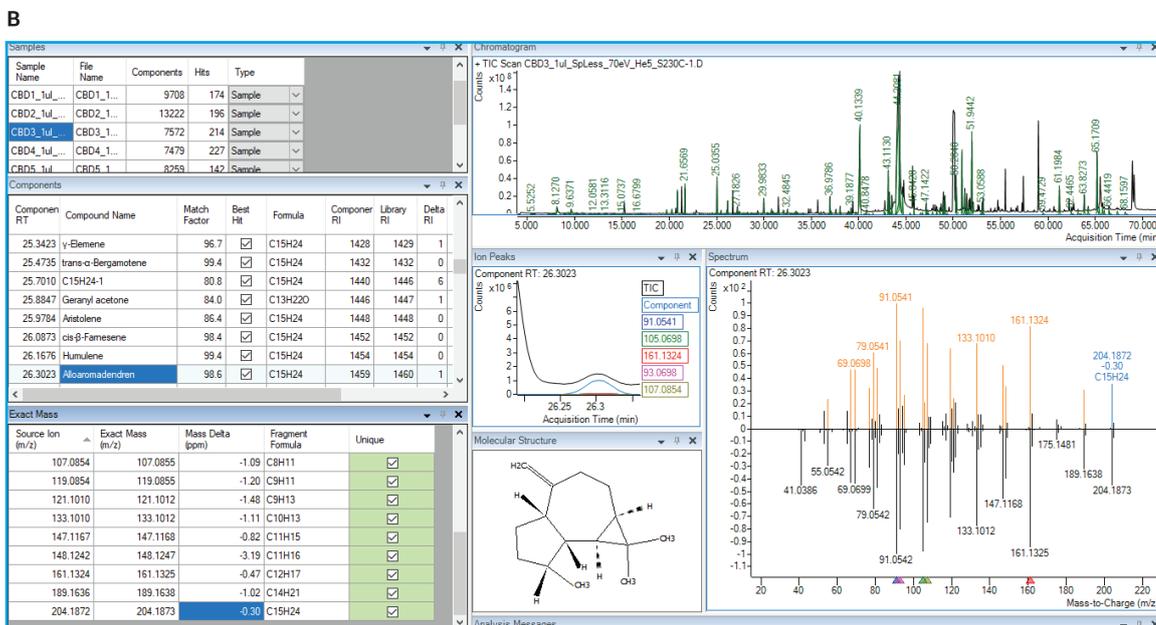
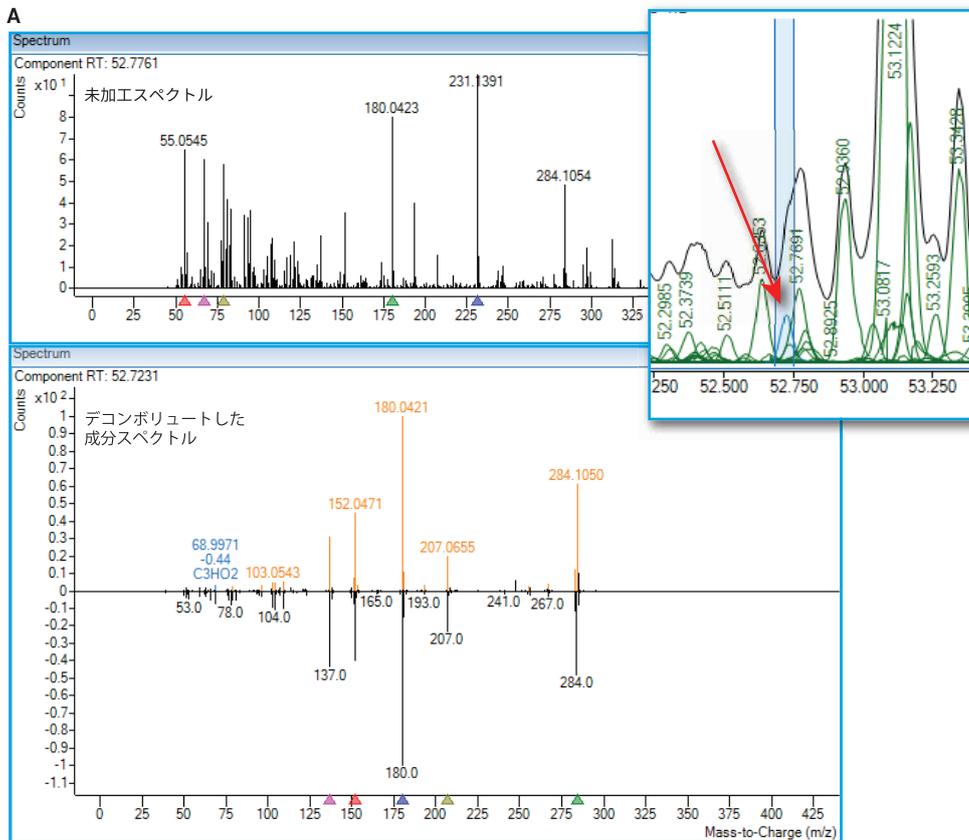


図 5. Agilent MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアでのノンターゲットスクリーニング。(A) SureMass は、単一成分スペクトルを効率的に抽出できる精密質量デコンボリュートアルゴリズムです。(B) ExactMass 機能では、スペクトル中の精密質量イオンがヒットの分子式のサブセットと一致するかどうかを検証できるため、偽陽性をなくすることができます。

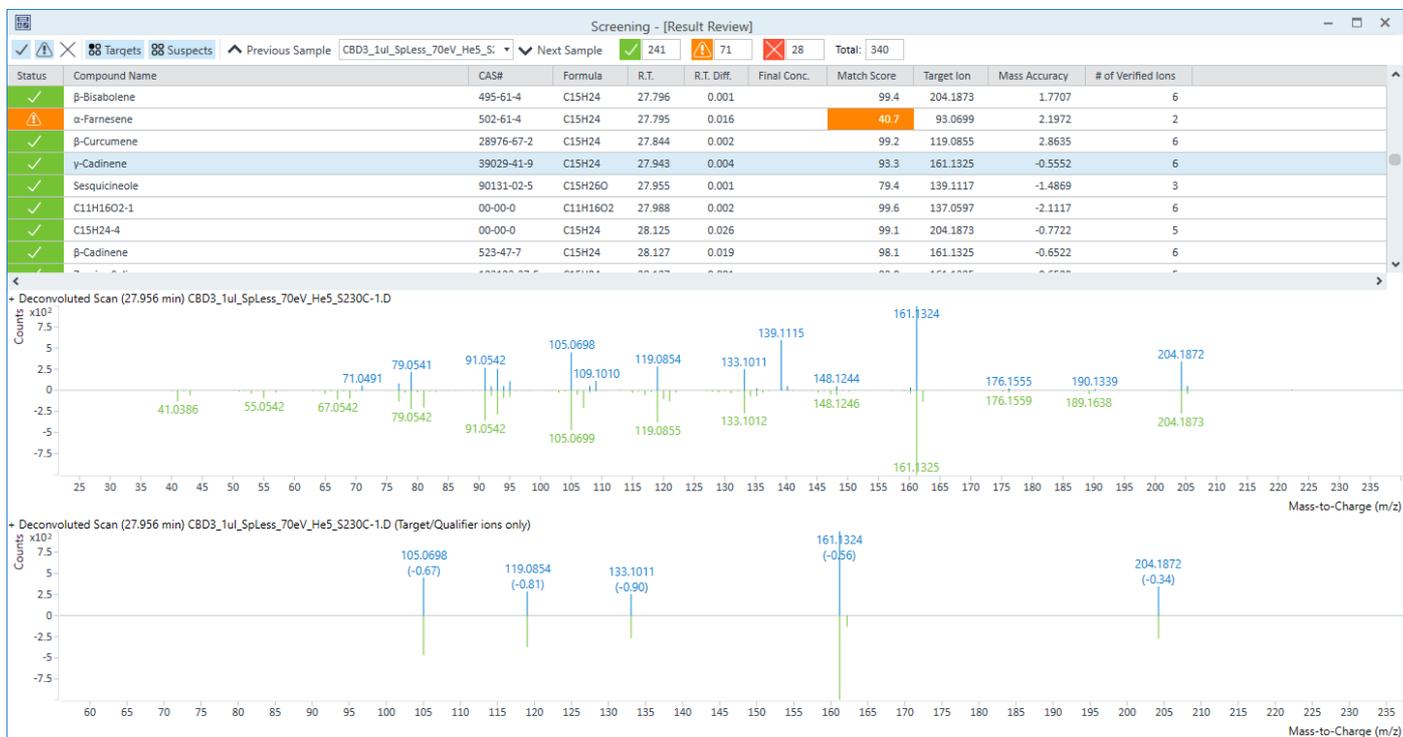


図 6. Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアのターゲットスクリーニング概要ウィンドウ

いずれの場合も、(マニュアル操作で検証して確認) 真のヒットのほとんどが、80 以上という高いライブラリー一致スコア (LMS) で検出されました (表 2 および 3)。ノンターゲット手法を使用した場合、LMS が 80 未満の真のヒットの数が、ターゲットスクリーニングと比べてかなり多くなっています。ターゲットスクリーニングを使用した場合には、真のヒットのほとんどの LMS が 90 を超えています。LMS 閾値は、スクリーニングメソッドにおける主要パラメータの 1 つです。このため、これら 2 つの手法の違いに注意し、アプリケーションごとに個別に最適化することが重要です。

全体的に、精密質量天然物 PCDL を用いたスクリーニングワークフローでは、ターゲットとノンターゲットのいずれの手法を用いても、同定される化合物の数にそれほど違いはありません (表 4)。そして、ターゲットスクリーニングのほうが、全サンプルで同定される真のヒット数が少し多くなります。

表 2. CBD オイルおよび大麻サンプル全体の、LMS によるノンターゲットスクリーニングで確認された化合物の割合

一致スコア	CBD1	CBD2	CBD3	CBD4	CBD5	CBD6	大麻抽出物
> 90	45.4	48.5	42.5	39.2	41.5	49.3	45.2
80 ~ 90	20.1	20.4	24.8	24.2	24.6	23.3	18.3
< 80	34.5	31.1	32.7	36.6	33.8	27.4	36.5

表 3. CBD オイルおよび大麻サンプル全体の、LMS によるターゲットスクリーニングで確認された化合物の割合

一致スコア	CBD1	CBD2	CBD3	CBD4	CBD5	CBD6	大麻抽出物
> 90	69.0	63.8	71.4	76.3	64.4	63.1	50.4
80 ~ 90	20.5	19.1	16.9	12.1	16.7	20.9	23.9
< 80	10.5	17.0	11.7	11.6	19.0	16.0	25.6

表 4. ターゲット/ノンターゲットスクリーニング手法で同定された真のヒット数の比較

ワークフロー / サンプル名	CBD1	CBD2	CBD3	CBD4	CBD5	CBD6	大麻抽出物
ターゲットスクリーニング	187	201	230	233	169	172	112
ノンターゲットスクリーニング	174	196	214	227	142	146	104

結論

このアプリケーションノートでは、GC × GC/Q-TOF MS で分析したヘンプ CBD オイルサンプルを用いた、大麻素材およびその他の天然物の新しい精密質量ライブラリの作成について説明しています。このライブラリは 1D GC/Q-TOF データで使用できるように設計されており、申請すれば無料で使用できます。ターゲット/ノンターゲットのいずれのワークフローもこの天然物 PCDL に対応しています。そして、ターゲットスクリーニング手法のほうがやや高感度です。

免責事項

アジレントの製品および溶液は、大麻の品質管理および安全性試験を目的とした、州/国の法律で許可されているラボでの使用を想定しています。

参考文献

1. Andre, C. M.; Hausman, J.; Guerriero, G. Cannabis Sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 19. DOI: 10.3389/fpls.2016.00019
2. Gallily, R.; Yekhtin, Z.; Hanus, L.O. The Anti-Inflammatory Properties of Terpenoids from Cannabis. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2018**, *3*(1), 282–290. DOI: 10.1089/can.2018.0014
3. Flores-Sanchez, I. J.; Verpoorte, R. Secondary Metabolism in Cannabis. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 615–639.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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、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。

DE00519179

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, November 2, 2022

5994-5468JAJP