

Accurate-Mass Q-TOF LC/MS および Molecular Structure Correlator ソフトウェアを使用した スクラロースの同定とフラグメント化

アプリケーションノート

食品および環境

著者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
Center for Environmental Mass
Spectrometry
Department of Environmental
Engineering
University of Colorado,
Boulder, CO 80309
Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808

概要

水中スクラロースの同定について、ポジティブとネガティブの両方のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) モードで使用した Accurate-Mass Q-TOF LC/MS および MS/MS を評価しました。シグナルとフラグメント化の経路を調べました。ポジティブまたはネガティブイオン ESI モードで Q-TOF LC/MS を使用したところ、スクラロースを感度よく検出することができました。ポジティブイオンモードで得られたシグナル強度は、全体としてネガティブイオンモードの約 2 倍になりました。

ポジティブイオンモードでは、スクラロースは m/z 419.0038 でナトリウム付加体 $[M+Na]^+$ として検出されました。精密質量 MS/MS 測定により、得られたナトリウム化フラグメント (m/z 221.0187 および m/z 238.9848) の構造が確認されました。ネガティブイオンモードでは、脱プロトン化分子が観察されました (m/z 395.0073 における $[M-H]^-$)。MS/MS によるフラグメント化の結果、1 つの特徴的なフラグメントイオンが得られました (m/z 359.0306)。Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェアを使用して、ネガティブおよびポジティブイオン MS/MS 分析のフラグメント化の経路を確認しました。MSC ソフトウェアがフラグメントイオンの構造の特性評価に役立つ有効なツールであることが証明されました。



Agilent Technologies

はじめに

スクラロースは強い甘味を持つ一方、ノンカロリーであり、生体内での蓄積が少なく毒性が低いという特性を持ちます。そのため、ダイエット用の人工甘味料として、世界中で使用されています。スクラロースは人の体内では代謝されないため、最終的に廃水および地表水中に留まります。現在の廃水処理技術はスクラロースに対応していないため、スクラロースは環境内のあらゆる場所に存在することとなり、これが大きな問題となっています。最近の研究により水域環境中のスクラロースの生物学的影響が明らかになり、スクラロースは毒性学上重大な結果をもたらすことが指摘されています [1]。このような理由により、飲料水、地下水、地表水、廃水、および水域環境に含まれるスクラロースの測定に対する関心が高まっています。

スクラロースは高い可溶性のために LC/MS での分析が容易です。3 つの塩素原子が含まれるため、MS で分析すると塩素固有の特徴を示します。スクラロースの分析について説明した多くの文献によると、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) を使用したネガティブイオンモードの LC/MS/MS が最も一般的なメソッドです。ただし、使用した MRM トランジションでは、精密質量と同じ信頼性で水中スクラロースを同定するには選択性が不十分です。他の多くの一般的な有機分子で見られるように塩素の損失を伴うため、このトランジションには識別力がありません。

このアプリケーションノートでは、水中スクラロースを明確に識別するために Agilent 6540 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムをポジティブとネガティブの両方の ESI モードで使用します。感度と Molecular Structure Correlator ソフトウェアの有効性を調べました。『Analytical Methodologies for the Detection of Sucralose in Water in Analytical Chemistry』 [2] の補足実験では、環境水サンプルに含まれるスクラロースの検出について Q-TOF LC/MS と LC/MS/MS を詳細に比較しています。

実験方法

実験手順の詳細な説明は、Analytical Chemistry で発表された補足記事に掲載されています [2]。

標準の前処理

スクラロースは Sigma-Aldrich (米国、ミズーリ州、セントルイス) から購入しました。スクラロース原液 (1,000 µg/mL) を水で溶解し、-18 °C で保管しました。この溶液をメタノールおよび水で希釈することにより標準溶液を調製しました。

使用機器

標準の分析にあたっては、Agilent 1290 Infinity バイナリ LC システムと、エレクトロスプレーイオン化に対応する Agilent Jet Stream 技術を備えた Agilent 6540 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムを組み合わせて使用しました。

HPLC には、一体型真空デガッサ (G4220A) およびオートサンブラ (G4226A) を備えたバイナリポンプを使用しました。HPLC パラメータを表 1 に示します。

表 1. HPLC パラメータ

機器	Agilent 1290 Infinity バイナリ LC システム
移動相	(A) アセトニトリル (B) 0.1 % ギ酸水溶液
グラジエント	初期移動相組成 : 10 % A 0 - 1.7 分 10 % A 1.7 - 10 分 100 % A
流量	0.4 mL/min
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 50 × 2.1 mm、粒子径 1.8 µm (p/n 959741-902)
カラム温度	25 °C
注入量	20 µL

30~1,000 m/z 範囲の Q-TOF MS の精密質量スペクトルを 2 GHz で記録しました。極性切り替えは使用せずに 2 回注入を行い、それぞれポジティブイオンモードとネガティブイオンモードでデータ採取を実施しました。MS/MS の実験もポジティブとネガティブの両方のイオンモードで行いました。Q-TOF MS および MS/MS パラメータを表 2 に示します。

表 2. Q-TOF MS および MS/MS パラメータ

機器	Agilent 6540 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS
イオン化モード	Agilent Jet Stream 技術によるポジティブおよびネガティブ ESI
質量範囲	30–1,000 m/z , 2 GHz
乾燥ガス温度	250 °C
乾燥ガス流量	10 L/min
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
ネブライザガス	45 psi
スキマ電圧	65 V
オクタポール RF	750 V
フラグメンタ	190 V
キャピラリ	3,500 V
ノズル	1,500 V (ネガティブモード) または 0 V (ポジティブモード)
MS/MS パラメータ	
ターゲット MS/MS	プリカーサ: ナトリウム化 (ポジティブイオン) および脱プロトン分子 (ネガティブイオン)
単離幅	中 (約 4 m/z)
コリジョンエネルギー	10、20、40 eV

内部参照質量が含まれる参照溶液 (m/z 121.0509 のプリン ($C_5H_4N_4$) およびポジティブイオンモードで m/z 922.0098、ネガティブイオンモードで m/z 119.0363 および 966.0007 (ギ酸付加体) の HP-921 [ヘキサス-($^1H, ^1H, ^3H$ -テトラフルオロ-ペンタキシ) ホスファゼン] ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$) を外部クォータナリポンプにより送り込みました。

質量精度の安定性を毎日確認し、値の誤差が 2 ppm を超えた時点で装置を再キャリブレーションしました。

データ解析

Accurate-Mass Q-TOF MS および MS/MS のデータを Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用して処理しました。Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェアを使用して、ネガティブおよびポジティブイオン MS/MS 分析のフラグメント化を確認しました。

結果と考察

Q-TOF LC/MS の結果

図 1 に、Q-TOF LC/MS を使用してスクラロース標準について得られたポジティブおよびネガティブイオン ESI 質量スペクトルを示します。ネガティブイオンモード (図 1A) では、スクラロース分子はプロトンを失い、精密質量 m/z 395.0073 (質量誤差 0.0 ppm) のベースピークを形成しました。 m/z 397.0045 および 399.0018 のイオンはスクラロースの C1-37 同位体に対応しています。

ポジティブイオンモード (図 1B) では、スクラロース分子にナトリウムイオンが付加され、測定精密質量が m/z 419.0040 のイオンが形成されました。測定質量は精密質量 m/z 419.0038 の 0.5 ppm 未満です。この場合はプロトン化分子は形成されませんでした。2 つの塩素同位体が m/z 421.0012 および 422.9988 で検出されました。

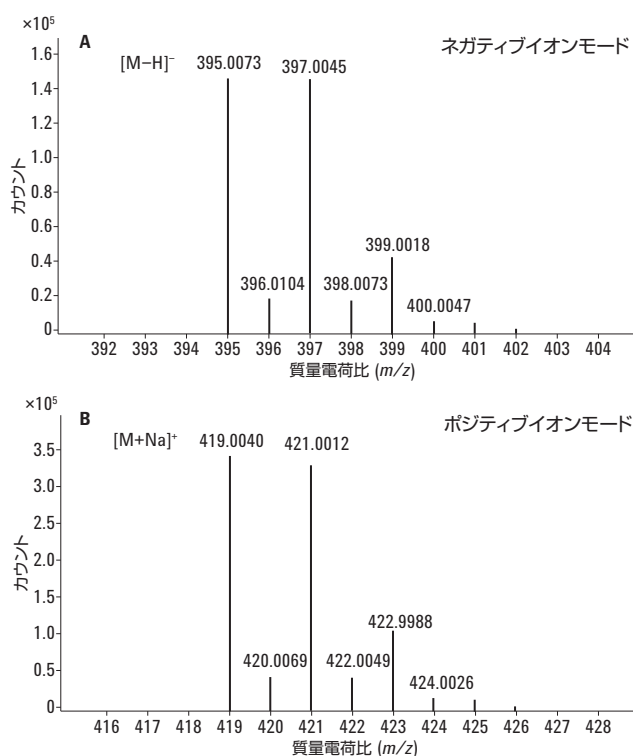


図 1. 測定精密質量を示す (A) ネガティブイオンモードおよび (B) ポジティブイオンモードでのスクラロースの Q-TOF LC/MS 分析の結果。ポジティブイオンモードでは、スクラロースは m/z 419.0040 でナトリウム付加体 $[M+Na]^+$ として検出されました。ネガティブイオンモードでは、脱プロトン化分子 $[M-H]^-$ が m/z 395.0073 で観察されました。

スクラロース分子には水素が多いため、必要に応じてプロトン移動が可能になり、帯電したナトリウムがニュートラルロスの対象となることがあります。このフラグメント化モードはナトリウムマイグレーションフラグメント化と呼ぶことができます。

図 2 に、ポジティブおよびネガティブ ESI Q-TOF LC/MS を使用してスクラロース標準から得られたシグナルの違いを示します。ポジティブイオンモードで得られたシグナル強度はネガティブイオンモードの約 2 倍になりました。ただし、バックグラウンドイオンの存在量が少ないため、S/N 比はネガティブイオンモードの方がわずかに良好でした。

図 3 に、Q-TOF MS/MS フラグメント化をスクラロースのナトリウム付加体に適用することで得られた精密質量スペクトルを示します (ポジティブイオンモード)。2 つの特徴的な質量、 m/z 221.0190 および 238.9853 が得られました。

MS/MS フラグメント化の推定経路

図 4 に、ネガティブおよびポジティブイオン MS/MS のフラグメント化の推定経路を示します。ポジティブイオンモードでは、ナトリウム付加スクラロースイオンは、それぞれがナトリウムイオンを保持する 2 つの糖類フラグメントに分割されます。このナトリウムイオンは分子のグルコース側またはフルクトース側に移行し、 m/z 221.0187 および 238.9848 のイオンを増加させます。ネガティブイオン分析では、HCl を失うことでスクラロースがフラグメント化し、 m/z 359.0306 のイオンが増加します。化学構造は、MSC ソフトウェアを使用し、Q-TOF による精密質量測定によって容易に確認できました。

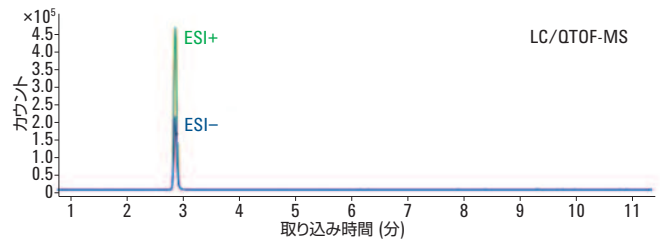


図 2. ポジティブイオンモードとネガティブイオンモードで得られたシグナル強度を比較したスクラロース標準の Q-TOF LC/MS 分析

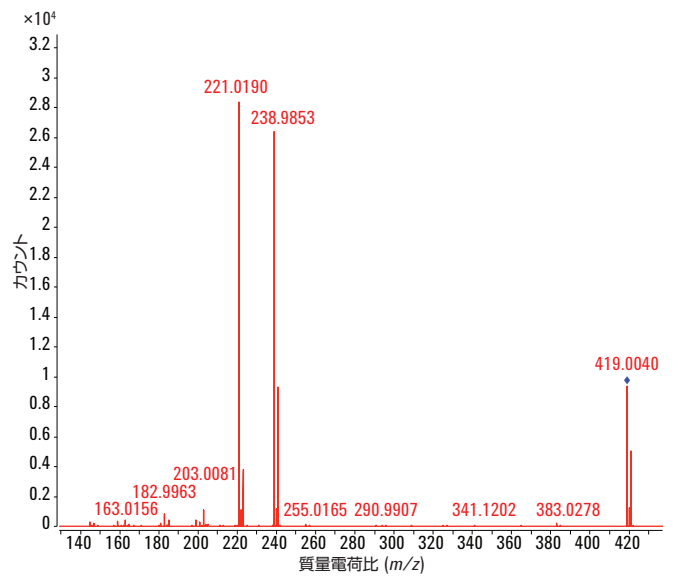


図 3. スクラロースのナトリウム付加体の精密質量 MS-MS スペクトル (ポジティブイオンモード)

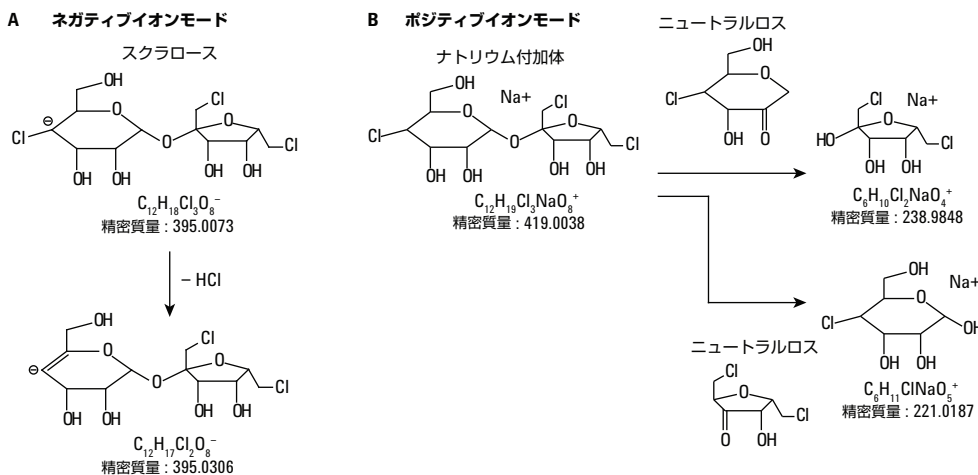


図 4. 精密質量を示すスクラロースのネガティブおよびポジティブイオン MS/MS のフラグメント化の推定経路

図 5 および 6 に示すように、フラグメント化の経路は MSC ソフトウェアを使用して調べました。このソフトウェアは、対象化合物の精密質量 MS/MS フラグメントイオンと、その化合物の 1 つまたは複数の推定分子構造を関連付けます。MSC は「体系的な結合開裂」アプローチを使用して、観察された各フラグメントイオンを推定構造に対応させます。

MSC ソフトウェアで入力するのは、精密質量 MS/MS フラグメントスペクトル、対象化合物の分子式、および候補となる分子構造です。ユーザーは分子式または構造を手で入力することも、精密質量 MS および MS/MS 情報を使用して MSC により計算された候補となる分子式からもっとも可能性が高い構造を選択することもできます。次に MSC は選択された式を使用し、1 つまたは複数の候補となる構造を .mol ファイル、.sdf ファイル、MassHunter 化合物データベース (PCD、PCDL)、または ChemSpider

(インターネット経由で) から検索し、構造の各候補と MS/MS スペクトルとの相関のレベルをスコアで示します。

現時点では MSC ソフトウェアではナトリウムイオンを扱っていないため、図 5 の中央の上の図に示すように、グルコース環上にナトリウムを持つスクラロースの構造を描く必要がありました。フラグメントイオンは右端に示しています。右端の表の青色でハイライトされた行は m/z 221.0189 の測定質量を示し、そのフラグメントイオンの推定構造に対応しています。

MSC ソフトウェアを使用して、フルクトース環上にナトリウムを持つスクラロースの構造も描られました (図 6)。右端のボックス内にあるスクラロース分子のハイライトされた部分は、 m/z 238.9852 のフラグメントイオンの推定構造だけを示しています (フラグメント構造の上にある表の青でハイライトされた行)。

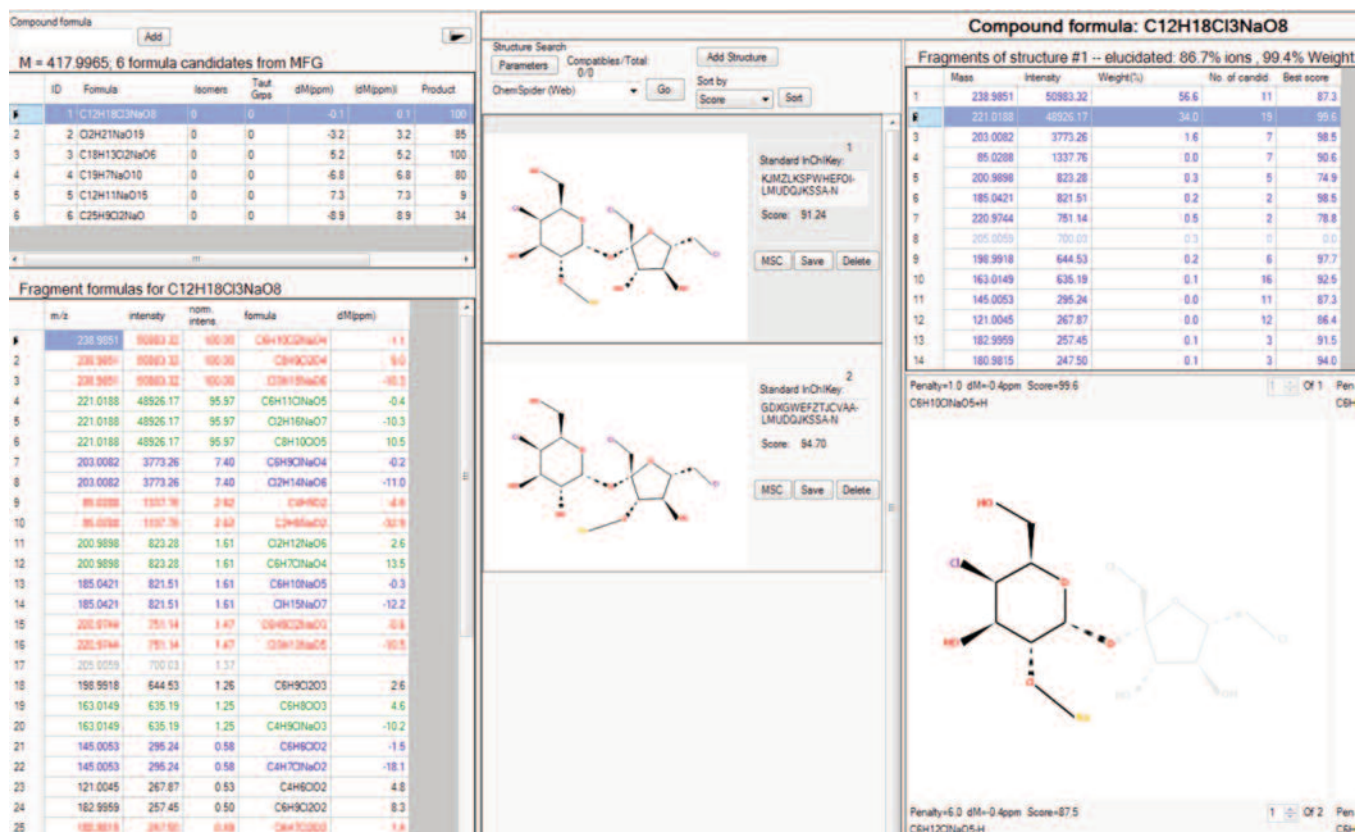


図 5. スクラロースのナトリウム分子のフラグメント (ナトリウムはグルコース環の上) を示す MSC 分析

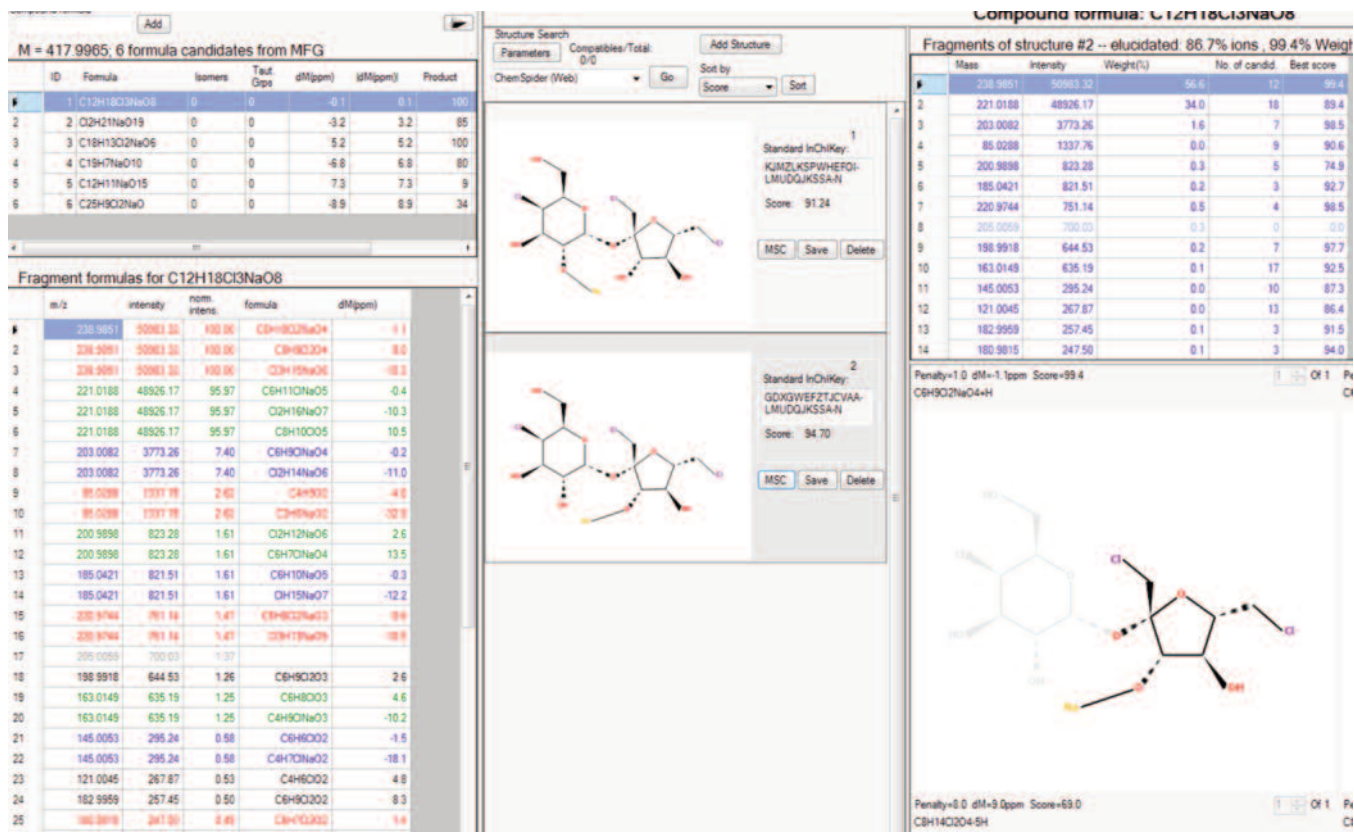


図 6. スクラロースのナトリウム化分子のフラグメント (ナトリウムはフルクトース環の上) を示す MSC 分析

図 7 はネガティブイオンモードのスクラロースの Q-TOF MS/MS スペクトルを示しています。m/z 359.0307 のイオンは HCl の損失を表しており、これがこの化合物の主要なフラグメントイオンです。m/z 231.9784 のイオンは再構成された複合的なスクラロースフラグメントです。

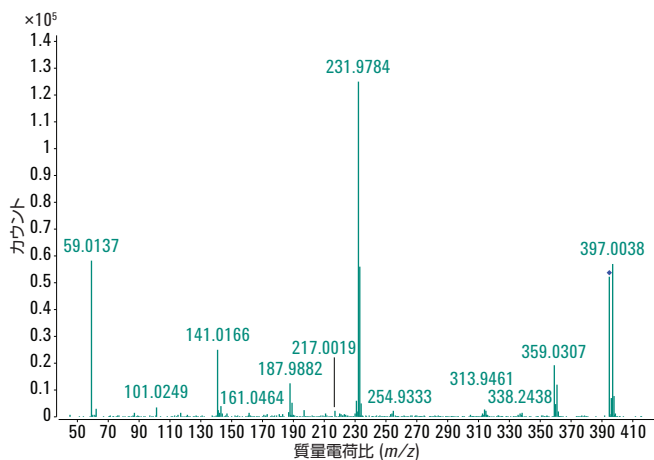


図 7. スクラロースの MS/MS スペクトル (ネガティブイオンモード)

図 8 に m/z 359.0307 のフラグメントイオンの MSC 分析を示します。いずれの構造も HCl の損失に対応しています。ChemSpider の多くの構造はスクラロースの構造と一致していますが、MSC ソフトウェアでスクラロースを最上位で一致させるには、これらの構造を互換性スコアではなく文献の参照数によってソートする必要があります (図 8 の赤い矢印)。

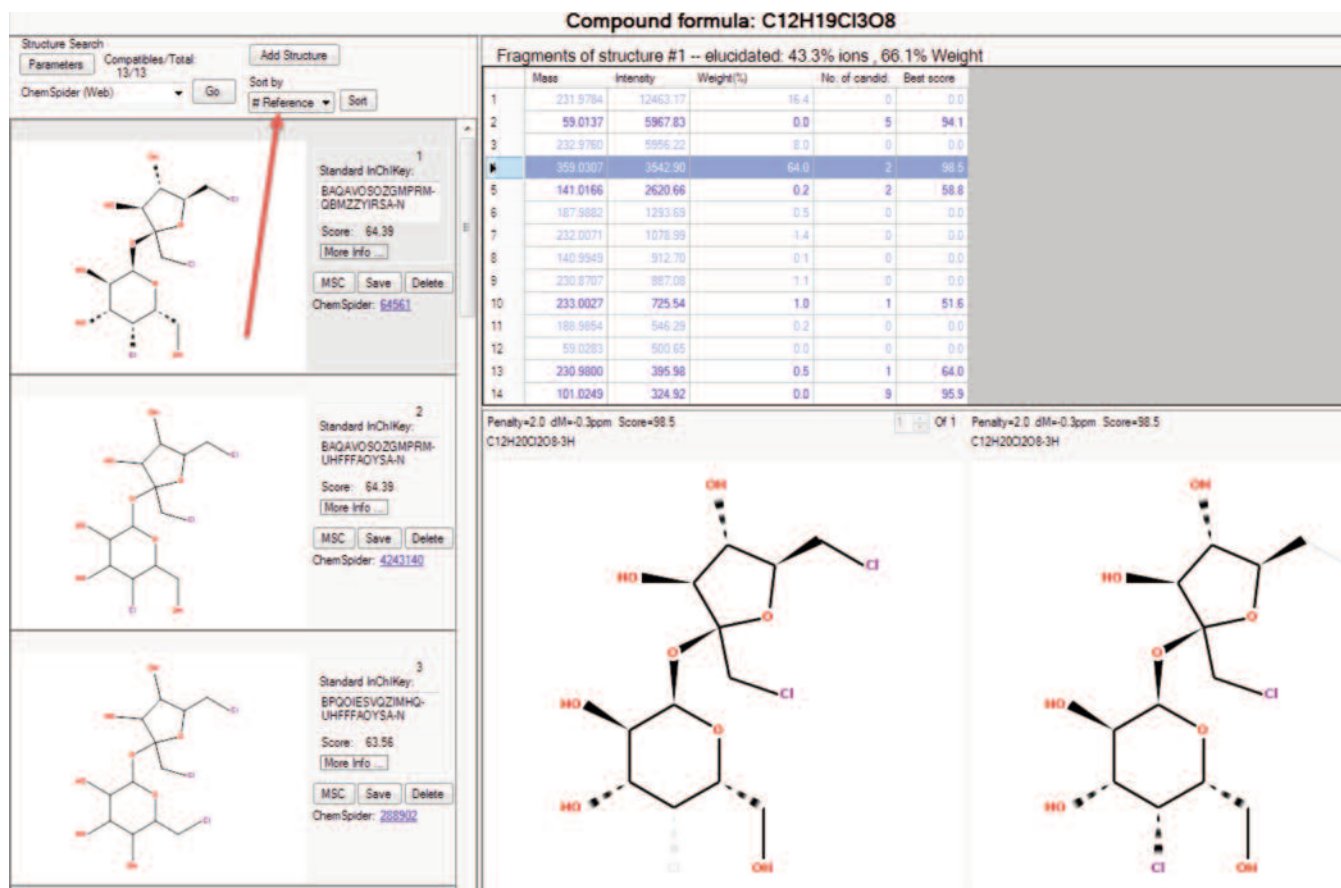


図 8. ネガティブイオンモードで得られた Q-TOF MS/MS スペクトルの MSC 分析。ChemSpider を検索すると、すべての構造のスコアは同じになります。参考文献の数 (# references) によるソートの結果、スクラロースが先頭 (最上部) に移動します (赤い矢印を参照)。

結論

ポジティブまたはネガティブ ESI モードで Q-TOF LC/MS を使用したところ、スクラロースの感度は良好でした。スクラロースはポジティブイオンモードで強いナトリウム付加体を形成し、ネガティブイオンモードでプロトンを容易に失います。ポジティブイオンモードで得られたシグナル強度は、全体としてネガティブイオンモードの約 2 倍になりました。水中スクラロース検出法の補足実験からわかるように、トリプル四重極 LC/MS MRM メソッドでは、感度はポジティブイオンモード (このアプリケーションノートで示した 2 つのトランジションを使用) の方がネガティブイオンモードよりも高くなりました [2]。

ナトリウム付加体の ESI 分析で一般に報告されている内容とは対照的に、ポジティブイオンモードで形成される強いナトリウム付加体は MS/MS によって容易にフラグメント化されました。生成される 2 つの特徴的な精密質量フラグメントを使用して、スクラロースを明確に同定することができました。MSC ソフトウェアは、フラグメントイオンの構造の特性評価に役立つ有効なツールです。

参考文献

1. A.K.E Wiklund, M. Breitholtz, B.E.Bengtsson, and M. Adolfsson-Erici "Sucralose – An ecotoxicological challenger?" *Chemosphere* 2012, **86**, 50–55.
2. I. Ferrer, J.A.Zweigenbaum, and E.M.Thurman "Analytical Methodologies for the Detection of Sucralose in Water" *Analytical Chemistry* 2013, **85**, 9581-9587.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Japan

March 6, 2014

5991-4066JAJP



Agilent Technologies