

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

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。



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

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 ℃ 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) およびオートサンプラ (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 <i>m/z</i> 、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 <i>m/z</i>)
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-ペントキシ) 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 0-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、0-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 CI-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 0-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、HCI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、0-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 0-TOF LC/MS 分析







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。右端の表の青色で八 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かれました(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)。

Compound formula Add M = 417 9965: 6 formula candidates from MEG						Compound formula: C12H18Cl3NaO8										
					Structure Search Compatibles/Total Add Structure		Fr	agments of s	tructure #1	elucidated:	86.7% ions	99.4% Weight				
141	417,0000,1	o ronnua	Carrolad	Taut	10	adaptive.	A COMPANY	Parameters 0/0	Sort by			Mass	Intensity	Weight(%)	No. of can	did Best score
	ID Fomula	-	loomers	Grps	dM(ppm)	(dM(ppm))	Product	ChemSpider (Web) •	Go Score	· Sot	1	238.9851	50983.32		56.6	11 87.3
	1 C12H18	30608	0	Ū	-0.1	0.1	100	-		1	. 8	221.0188	48926.17		34.0	19 99.6
2	2 O2H21N	laO19	0	0	-3.2	3.2	85				3	203.0082	3773.26		1.6	7 98.5
3	3 C18H130	D2NaO6	0	0	5.2	5.2	100	1.		Standard InChiKey	4	85.0288	1337.76		0.0	7 90.6
4	4 C19H7N	aO10	0	0	-6.8	6.8	80			KJMZLKSPWHEFOI-	5	200.9898	823.28		0.3	5 74.9
5	5 C12H11	NeO15	0	0	7.3	7.3	9	10000110-001		LMUDGJKSSA-N	6	185.0421	821.51		0.2	2 98.5
6	6 C25H9C	2NaO	0	0	-89	89	34			Score: 91.24	7	220.9744	751.14		0.5	2 78.8
									1.00		8	205.0059	700.03			0.0
4 I.									-	MSC Save Delete	9	198.9918	644.53		0.2	6 97.7
Era	amont form	dae for C	124190	2NoO2							10	163.0149	635.19		0.1	16 92.5
Fie	gment ionn	ulas iulio	1211100	SNaOo		- A.					11	145.0053	295.24		0.0	11 87.3
	m/2	intensity	intens.	formula	dt	t(ppm)					12	121.0045	267.87		0.0	12 86.4
	238 9851	90883.22	100.00	0641003	(hade)	- 11					13	182.9959	257.45		0.1	3 91.5
2	238.985	SOND 10	190.00	CBH	90204	80					14	180.9815	247.50		0.1	3 94.0
3	238.965	90MD 12	100.00	Cier I	51626	-98.2				Standard InChilder	Penal	ty=1.0 dM=-0.4pp	n Score=99.6			1 Of 1 Pen
4	221.0188	48926.17	95.97	C6H110	CINeO5	-0.4		· · · · ·		GDXGWEFZTJCVAA-	CEH1	00INa05+H				CEH
5	221.0188	48926.17	95.97	CI2H1	6NaO7	-10.3				LMUDQJKSSA-N	1.00					
6	221.0188	48926.17	95.97	CBH	10005	10.5				Score: \$4.70						
7	203.0082	3773.26	7.40	CEHS	CINeO4	-0.2			1							
8	203.0082	3773.26	7.40	CI2H1	4NeO6	-11.0	-		7.00	MSC Save Delete						
9	M 4100	1307.30	242	: 0	1000	144			~			180				
10	81.0758	1102.3	242	234	efait?	-02.9			100			1000	1			
11	200.9898	823.28	1.61	CI2H1	2NaO5	2.6										
12	200 9898	823.28	1.61	CEHT	CINaO4	13.5						d	~			
13	185.0421	821.51	1.61	C6H1	0NaO5	-0.3						Y				
14	185.0421	821.51	1.61	CH1	5NaO7	-12.2						- B				
15	200.0744	251.14	1.47	094903	25m00	-44						~	1.	A CONTRACTOR		
16	221.9744	781.14	1.47	105e1	Mail 6	-105						HEI	Y			
17	205 0059		1.37			1										
18	198.9918	644 53	1.26	CEH	90203	26							a			
19	163.0149	635.19	1.25	CEH	H8003	4.6										
20	163.0149	635.19	1.25	C4H90	ONeO3	-10.2										
21	145.0053	295.24	0.58	CE	H6CID2	-1.5										
22	145 0053	295.24	0.58	C4H7C	DNaO2	-18.1										
23	121.0045	267.87	0.53	CAN	H6CI02	4.8										
24	182 9959	257 45	0.50	CEH	901202	83					Penal	N=6.0 dM=-0.4mm	Score+875			1 - 012 Pan
25	100.0015	347.92	0.49	-084	toppd -	- 1.4					CEHI	20NaO5-H				CB

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

Add										Comp	bound for	mula: C12	HIS	CISNaC	8			
M = 417 9965 6 formula candidates from MEG						Structure Search Parameters Compr	atibles/Total:	Add Struct	ture	Fr	agments of s	structure #2	elucidated	86.7	% ions , 98	9.4% We	igi	
	ID Exercite		lanmara	Taut. dMinor	Vancei Mis	Product	Char Sadar (Mah)	- 60	Sort by			Mass	intensity	Weight(%)		No. of candid.	Best score	
	io Poinda		surriers.	Grps umppr	ny synappiny	rioduct	Chemispider (vied)	• 00	Score	 Sot 		238 9851	50563.32		56.6	12	99	а
	1 C12H180	J3NE08	0	0	41 (1 100					· 2	221.0188	48926.17		34.0	18	89	14
2	2 02H21N	8019	0	0	-3.2 1	2 85				1	3	203.0082	3773.26		1.6	7	98	15
3	3 C18H13C	12/1805	0	0	52 5	12 100				Standard InChiKey:	4	85.0288	1337.76		0.0	9	90	6
4	4 C19H7Na	8010	0	0	-5.8	8 80				KJMZLKSPWHEFOI- LMUDOJKSSA-N	5	200.9898	823.28		0.3	5	74	9
•	5 C12H11N	VaO15	0	0	73	3 9		100		Chopanaphra	6	185.0421	821.51		0.2	3	92	2
	6 C25H9CL	2NaO	0	0	-6.9 8	3 34				300re 91.24	7	220.9744	751.14		0.5	4	.98	5
									-		8	205 0059						
+			-				- T		-0	MSC Save Delete	9	198.9918	644.53		0.2	7	97	7
Fr	ament formu	las for C	12H18C	3NaO8				- 1			10	163.0149	635.19		0.1	17	92	15
-			nom.								17	145.0053	295.24		0.0	10	87	3
	8/2	intensity	intens.	formula	dM(ppm)						12	121.0045	267.87		0.0	13	86	4
	238 9851	50081.32	100.00	CD+10C25aO4	- 4						13	182.9959	257.45		0.1	3	91	5
2	238.9081	50083 12	100.00	CIP-80304	1	•					14	180.9815	247.50	-	0.1	3	94	0
3	238-5081	50983 10	100.00	C3H (5NyO)	-	1				Standard InChiKey	Pena	ty=1.0 dM=-1.1pp	m Score=99.4				Of 1	P
4	221.0188	48926.17	95.97	C6H11CINaO5	i -0.	4	- · ·			GDXGWEFZTJCVAA-	CEHS	CI2NeO4+H						0
5	221.0188	48926.17	95.97	CI2H16NaO7	-10.	3				LMUDQJKSSA-N								
6	221.0188	48926.17	95.97	C8H10C005	10.	5		-		Score: 94.70								
7	203.0082	3773.26	7.40	C6H9CINaO4	-0.	2		1.										
8	203.0082	3773.26	7.40	CI2H14NaO6	-11	0 *		7	0	MSC Save Delete								
9	81.0088	1007.18	2.62	C4+900	- 4		1	1			-							
10	81.0088	1201.16	242	03485400	202			-										
11	200 9898	823.28	1.61	CI2H12NaO6	2	6												
12	200 9898	823.28	1.61	C6H7CINeO4	13	5								0.				
13	185.0421	821.51	1.61	C6H10NaO5	-0	3												
14	185.0421	821.51	1.61	CH15Na07	-12	2									~			
15	200 9/44	781.14	1.41	CIHICIPACI										1	>	/		
16	200 10144	1911.14	1,47	23H19W09											1		·CI	
17	205 0069														_			
18	198 9918	644 53	1.26	C6H9Cl2O3	2	6)			
19	163.0149	635.19	1.25	CEHBOOS	4	6										Det		
20	163.0149	635.19	1.25	C4H9ONa03	-10	2												
21	145.0053	295.24	0.58	CEHECIO2	-1	5												
22	145 0053	295.24	0.58	C4H7CINeO2	-18	1												
23	121 0045	267.87	0.51	C4HBCID2														
24	182 9959	257.45	0.50	C6H90202	- 8	3							C					
25	THE REAL	341.50	1.41	(100000							Cevit	tyre o alles uppr	a poolekea 0				GI	0
**	-										Car	ACCOR DH						0

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 0-TOF MS/MS スペクトルを示しています。*m/z* 359.0307 のイオンは HCI 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* 231.9874 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 HCI 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 0-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

- A.K.E Wiklund, M. Breitholtz, B.E.Bengtsson, and M. Adolfsson-Erici "Sucralose – An ecotoxicological challenger?" *Chemosphere* 2012, **86**, 50–55.
- 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

