

アプリケーションノート

ハーブサンプルの定性分析における Xevo TQ-XS のサーベイスキャンの効率的な活用

Bheeshmacharyulu. S, Dilshad Pullancheri, Dr. Padmakar Wagh

日本ウォーターズ株式会社



本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

このアプリケーションブリーフでは、ハーブ抽出物のような複雑なサンプルの定性分析にかかる時間の効率と生産性を向上できることを実証しています。

はじめに

現在は、複雑なサンプルの研究を促進するための有効で選択性の高い分析法の開発が緊急に必要とされています。通常、複雑なサンプルには多様な成分の混合物が含まれており、同定および特性解析のための分離が非常に困難です。質量分析法は、未知化合物の同定、既知化合物の定量、および分子の構造的・化学的特性解析のためのパワフルな分析手法です。

ハーブ抽出物のような複雑なサンプルのタンデム四重極装置を用いる通常の定性分析には、複数回の注入が必要です。MS スキャンモードでサンプル分析を行ってから、プロダクトイオンモードで更に注入を行います。複雑なサンプルでは、プロダクトイオンの分析法の作成は手間のかかる作業です。プリカーサーイオンをそれぞれマニュアルで同定し、プリカーサーごとに個別のプロダクトスキャンを作成する必要があります。サーベイスキャンを使用することで、2回目の取り込みが不要になります。サーベイスキャンでは、様々なユーザー定義トリガーにより、あるスキャンから別のスキャンに自動切替ができます。MS および DS モードで ScanWave を活用して、より感度の高いサーベイスキャンを行うこともできます。



図 1. Xevo TQ-XS および ACQUITY UPLC I-Class Plus

実験方法

システム:	Xevo TQ-XS および ACQUITY UPLC I-Class/SM-FTN
カラム:	ACQUITY UPLC HSS T3、2.1×150 mm、1.8 μm
検出器:	ACQUITY UPLC PDA 検出器
流速:	0.4 mL/分
移動相 A:	0.05% 酢酸水溶液
移動相 B:	0.05% 酢酸メタノール溶液
カラム温度:	40 °C
サンプル注入量:	5 μL
サンプル濃度:	1 mg/mL
洗浄溶媒およびパージ溶媒:	1: 1 (水: アセトニトリル)
サンプリングレート:	10 ポイント/秒
波長:	210 - 400 nm

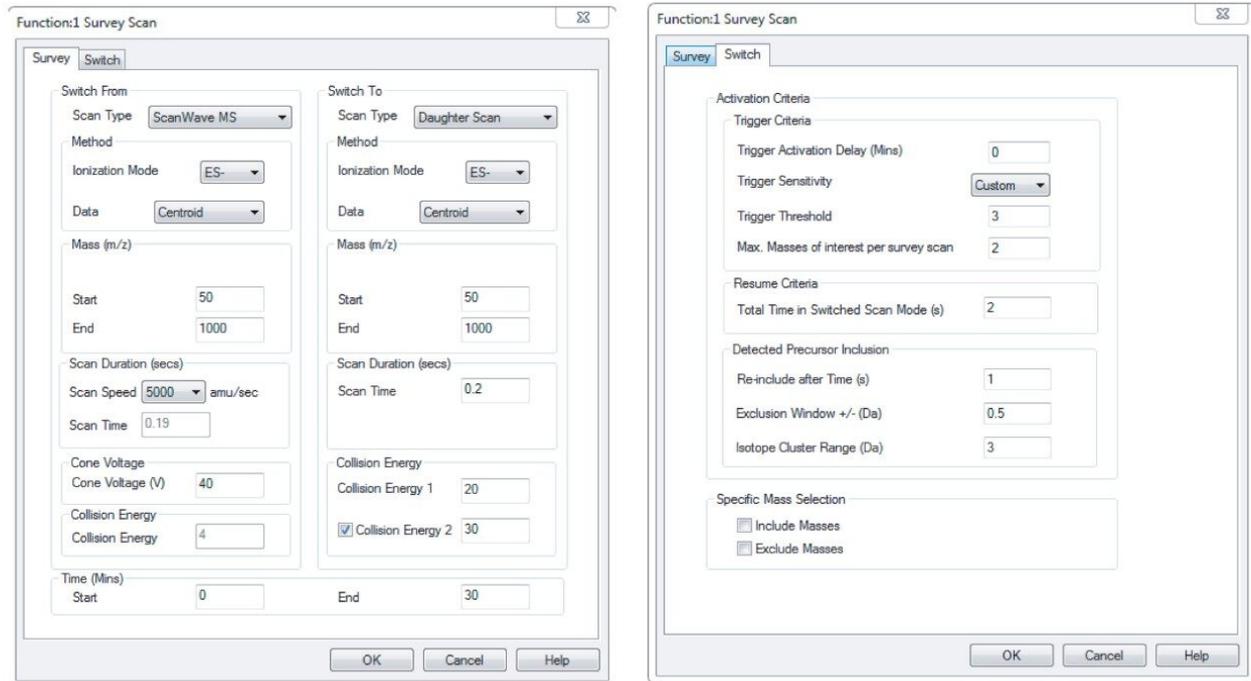
グラジエントプログラム:

Time (min)	Flow rate (mL/min)	M.P A%	M.P B%
0.00	0.300	90.0	10.0
10.50	0.300	78.0	22.0
19.00	0.300	50.0	50.0
23.00	0.300	10.0	90.0
25.00	0.300	5.0	95.0
26.50	0.300	90.0	10.0
30.00	0.300	90.0	10.0

MS メソッドのパラメーター:

Instrument parameters	ESI positive	ESI negative
Capillary (KV)	2.50	2.50
Cone voltage	40	40
Source temp. (°C)	150	150
Source offset	80	80
Desolvation temp. (°C)	450	450
Cone gas flow (L/Hr)	150	150
Desolvation gas flow (L/Hr)	1000	1000

MS サーベイスキャンパラメーター:



プリカーサーイオンとプロダクトイオンの数および強度を選択するためのサーベイスキャンの [Switch] (切り替え) タブの機能のパラメーター:

Trigger Activation Delay (Min) (トリガー有効化遅延 (分)) : 装置でスキャン間の切り替えが行われるまでの遅延 (分単位) を定義します。

Trigger Sensitivity (トリガー感度) : プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンを検出するために、切り替え先機能をトリガーするピーク高さを設定します。高、中、低を選択するか、またはカスタムを選択して、スレッシュホールド値を入力します。

Trigger Threshold (トリガースレッシュホールド) : プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンのレスポンスを検出するために、切り替え先機能をトリガーするカスタムスレッシュホールドを指定します。スレッシュホールドには 1 ~ 10 を設定できます。ここでは、1 = 3.3e4、2 = 6.6e4、3 = 1.0e5、4 = 3.3e5、5 = 6.6e5、6 = 1.0e6、7 = 3.3e6、8 = 6.6e6、9 = 1.0e7、10 = 3.3e7 です。

Max.Masses of interest per survey scan (サーベイスキャンごとの最大目的質量) : 切り替え前スキャンから検出する目的のピーク (プリカーサーおよびプロダクト) の最大数(最大 8)を選択します。このパラメーターの設定により、切り替えごとに装置で調査する質量の数を定義します。例えば、3つの質量の強度がスレッシュホールドを超える場合、2と設定すると、最も強度が高い2つの質量のみが装置をトリガーします。

Total Time in Switched Scan Mode(s) (切り替えスキャンモードの合計時間) : 切り替え先のスキャンモードで

費やす最小の合計時間を定義します。指定した時間の経過後、切り替え先機能は、再び切り替え前機能に戻ります。

Re-include after Time(s) (時間 (秒) 後の再包含) : 質量の切り替え後に、ソフトウェアが質量を除外する時間 (秒単位) を定義します。この時間の経過後、質量が再び含まれます。

Exclusion Window +/- (Da) (除外ウィンドウ +/- (Da)) : 質量が切り替えられる前に特定の質量の周辺でトリガーを除外するスパン (Da 単位) を定義します。

Isotope Cluster Range (Da) (同位体クラスター範囲(Da)) : 最後にトリガーされる質量の同位体でのトリガーを防ぐために、除外スパンが質量スケールを拡張する度合いを定義します。

結果および考察

Xevo TQ-XS によるハーブ抽出物の定性分析により、分析時間が短縮されて、従来の MS スキャンおよびプロダクトスキャンと比較して生産性が向上し、サーベイスキャンツールの有用性が実証されました。サーベイスキャンモードでは、複数回の分析で取り込まれた LC-MS および LC-MS/MS データと比較して、分析時間が大幅に短縮されています。

Total number of analytes (peaks) present in the herbal sample A	Analysis time for one sample	
	Survey scan mode	Conventional MS scan and daughter scan mode
29	30 minutes for ScanWave MS and daughters scan	30 minutes for MS scan and ~3 to 4 hours for daughter Scan method creation and analysis.

表 1. サーベイスキャン分析法および従来の MS スキャンおよびプロダクトスキャン分析法における生産性の計算。

ScanWave MS クロマトグラム

ハーブのサンプル分析で得られた ScanWave MS (MS フルスキャン) のクロマトグラムを図 2 に示します。このように、ScanWave MS クロマトグラムで 30 分の分析時間内に多数のピークが検出され、ScanWave プロダクトスキャン分析用に自動的に選択されました。

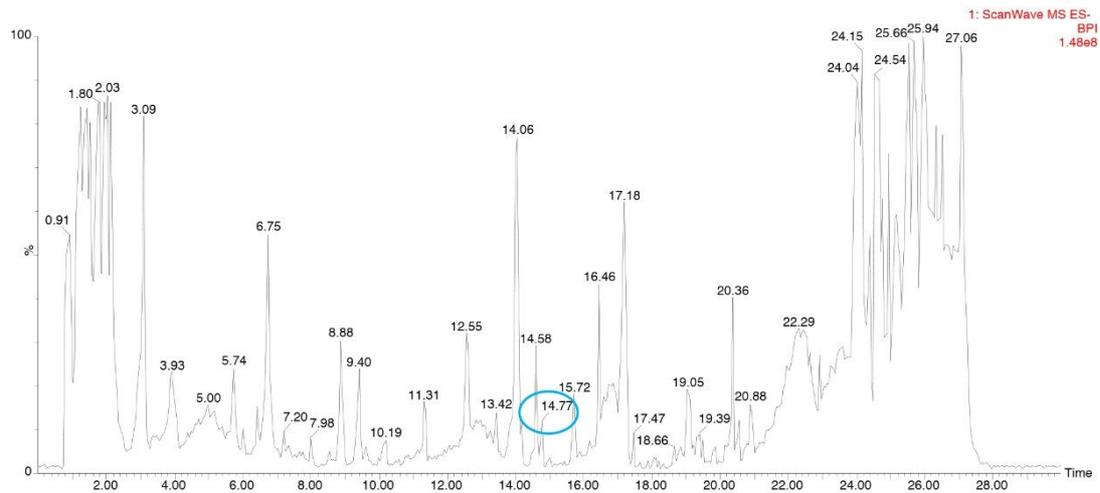


図 2. ハーブサンプルのサーベイスキャン (ScanWave MS) から得られたプリカーサーイオンのクロマトグラム。

Xevo TQ-XS 質量分析計の MS とプロダクトスキャンの間を素早く切り替えられる機能により、シャープな UPLC ピークが正しく定義できました。このアプローチでは、MS とプロダクトスキャンのデータが偏りなく収集され、ハーブサンプルの定性分析が可能になります。

ScanWave MS (MS フルスキャン) のスペクトルおよび ScanWave DS (MS/MS) スペクトルのピーク (RT 14.77 分) を図 3 に示します。ここで、トリガーされる感度基準に基づいてプリカーサーイオン m/z 592.86 が自動選択され、フラグメントイオン m/z 352.65、 m/z 382.73、 m/z 472.69、 m/z 502.89 がプロダクトイオンのスキャンスペクトルに表示されます。 m/z 592.86 は特徴的なフラグメントに基づき、ピセニンと同定されました。

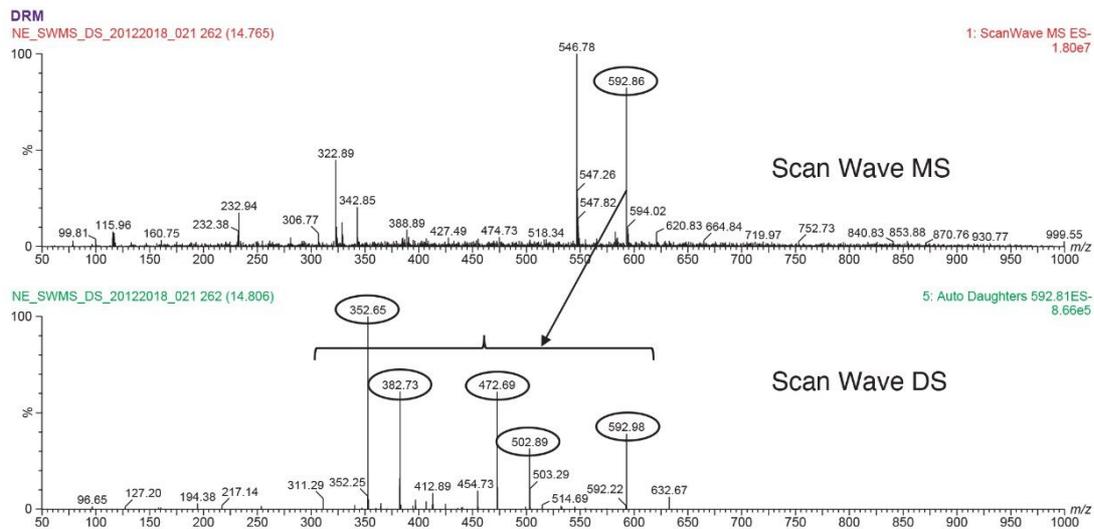


図 3. ハーブサンプルにおける定性分析でのサーベイスキャンの例。ピセニン (m/z 592.86) が当初の ScanWave MS サーベイ機能で RT 14.77 分にトリガーされてから、ScanWave DS モードに切り替えられています。

プリカーサー化合物ピセニン m/z 592.86 についての抽出イオンクロマトグラムが図 4 に示されており、ScanWave MS クロマトグラムの RT 14.77 分で溶出しています。

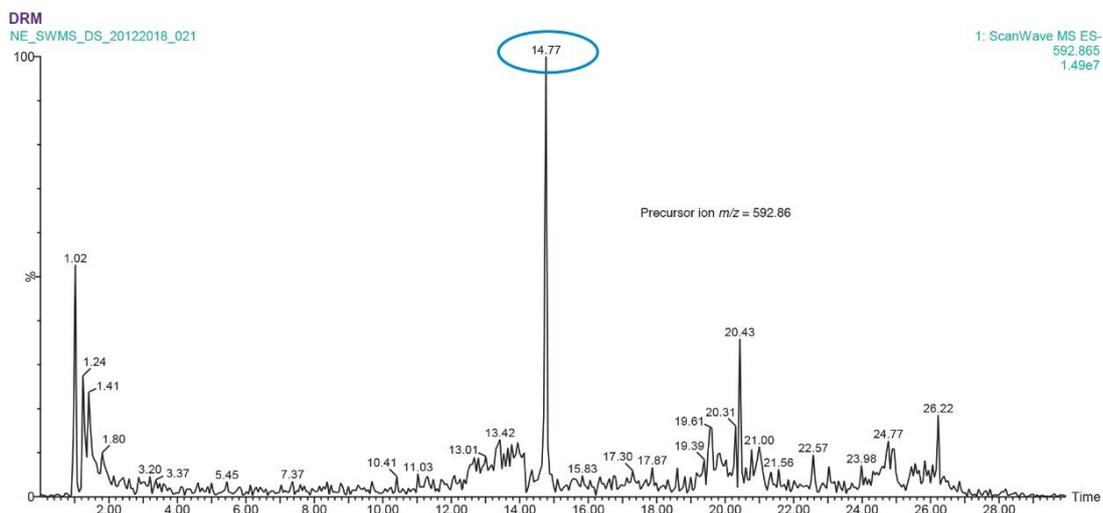


図 4. サーベイスキャン ScanWave MS から得られたプリカーサー (m/z 592.86) の抽出イオンクロマトグラム

図 5 には、 m/z 592.86 のフラグメントイオン m/z 502.89、 m/z 472.69、 m/z 382.72、 m/z 352.64 のプロダクトス

キャンスペクトルから抽出されたイオンクロマトグラムを示しています。

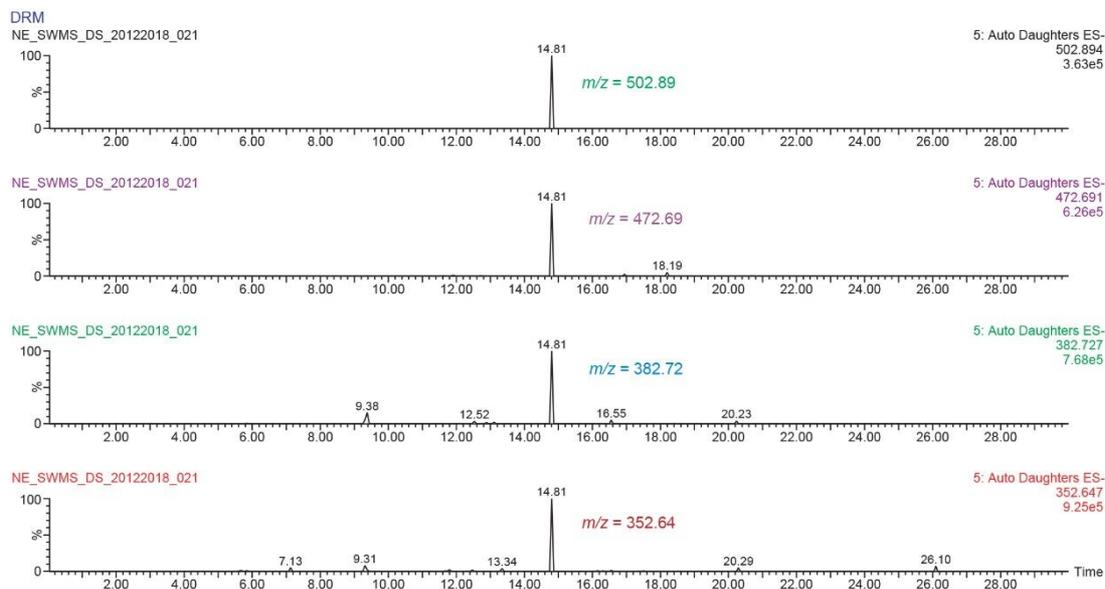


図 5. サーベイスキャン ScanWave DS による m/z 592.86 から抽出されたプロダクトイオン m/z 502.89、 m/z 472.69、 m/z 382.72、 m/z 352.64 のクロマトグラム

ピセニン (m/z 592.86) のフラグメントイオンと思われるものを図 6 に示します。

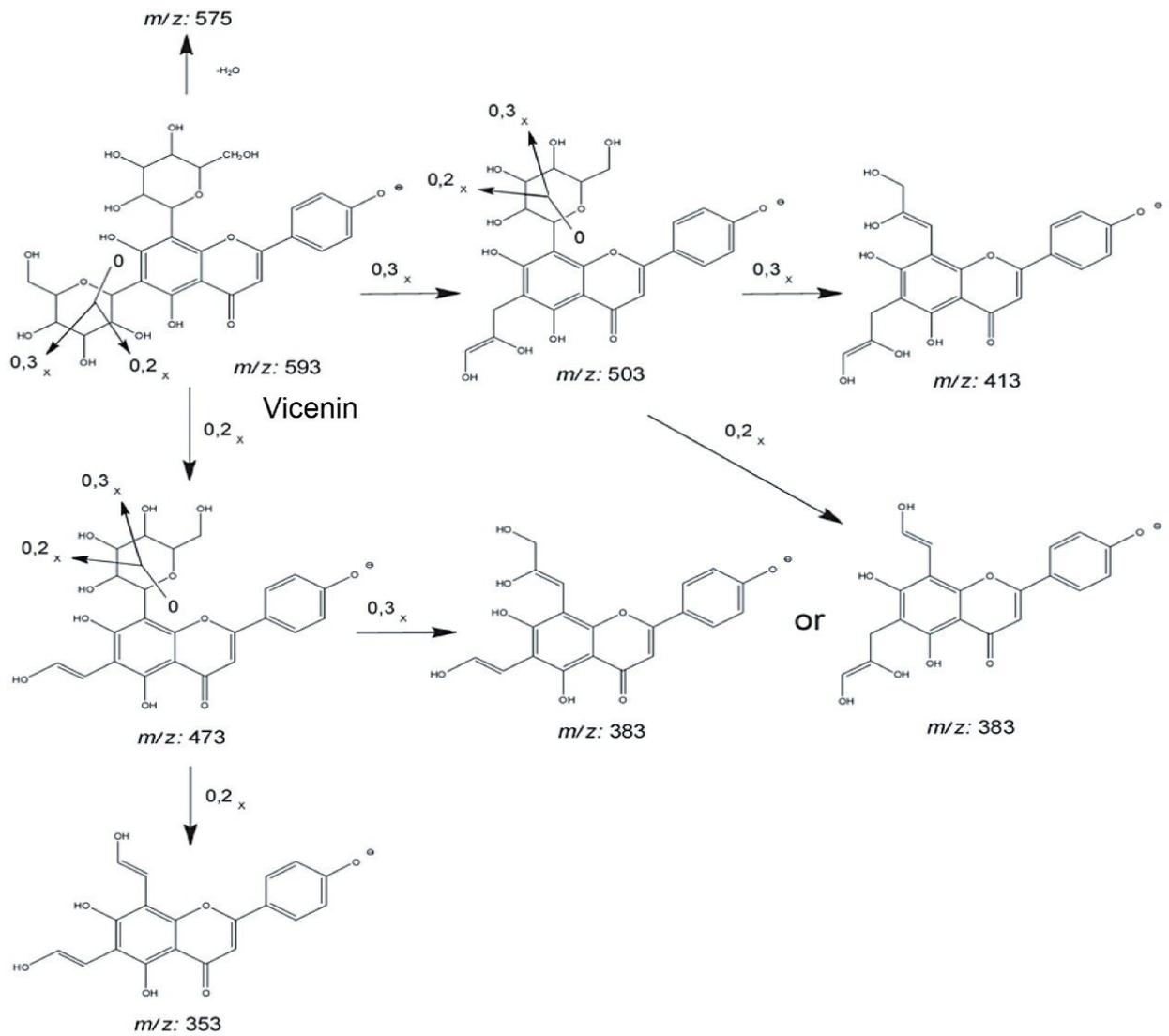


図 6. ビセニンのフラグメントイオン (推測)

表 2 では、ハーブのサンプルの定性分析にサーベイスキャンを用いた例を説明しています。シナピルアルデヒド、ビセニン、トランス-3'-イソペンタジエニル-3,5,4'-トリヒドロキシスチルベン (IPD) の異性体である 2,3,4-O-ジカフェオイルキナ酸、およびトランス-アラキジン-3 の分子が、プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンに基づいて同定されました。これらの既知化合物を確認するために、プロダクトイオンの文献調査を行ったところ、表 2 に示すように、得られたスペクトルと一致しました。

Compound	Mode	Parent ion	Daughter ion	Reference
Sinapaldehyde	+	207.02	146.95, 119.00	[1]
Vicenin	-	592.86	352.64, 382.7, 472.69, 502.89	[3]
Trans-3'-isopentadienyl-3,5,4'-trihydroxystilbene (IPD) isomer 2	-	294.61	182.1	[4]
3,4-O-Dicaffeoylquinic acid	-	516.46	192.82, 174.79, 354.97	[5]
Trans-arachidin-3	-	294.81	112.84, 194.98	[4]
4-OH-benzoic acid	-	136.8	91.69, 107.81	[6]

表 2. ハーブサンプルにおける定性分析で、サーベイスキャンを使用して同定されたプリカーサイオンおよびそれぞれのプロダクトイオン

結論

- Xevo TQ-XS の StepWave イオン輸送光学系の機能で、分析が困難なサンプルでも高い感度が達成されました。Xevo TQ-XS は ScanWave コリジョンセルテクノロジーを採用して高い MS/MS スペクトル性能（プロダクトイオンのスキャン）を実現し、1 回の注入（分析）で MS および MS/MS データの同時取り込みが簡単に行えます。
- Xevo TQ-XS の高速スキャン（最大 20000 Da/秒）により、サーベイスキャンを用いた実験で、ピーク上にわたって十分なポイントが得られ、この機能により、データ主導の実験が容易に行えます。また、MS および MS/MS のリアルタイム切り替えにより、1 回の注入でより多くの情報が取り込めます。これにより、実験を何度も行う必要がなくなり、構造の同定および未知化合物の判定プロセスを加速することができます。
- リアルタイムのデータ主導の切り替えを用いたタンデム四重極の定性アプリケーションにより、複数のサンプルの分析における取り込み時間が短縮され、複雑なサンプルにおける特性解析のためのデータ解釈にかかる時間が短縮できます。

参考文献

1. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. [Food Research International](https://www.sciencedirect.com/science/journal/09639969) <
<https://www.sciencedirect.com/science/journal/09639969>> .2016;87:60-67.

2. LC-MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia officinarum* Hance) rhizomes. [Industrial Crops and Products](https://www.sciencedirect.com/science/journal/09266690) <<https://www.sciencedirect.com/science/journal/09266690>> .2015;74:712-721.
3. LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS and GC-MS profiling of *Stachys parviflora* L. and evaluation of its biological activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.2019..
4. LC-MS/MS profiles and interrelationships between the anti-inflammatory activity, total phenolic content and antioxidant potential of Kalasin 2 cultivar peanut sprout crude extract.2018;239:569-578.
5. LC/ESI-MS/MS profiling. *Journal of Functional Foods*.2016;26:645-656.
6. LC-MS/MS method validation for the quantitative investigation of 37 fingerprint phytochemicals in *Achillea* species: A detailed examination of *A. coarctata* and *A. monocephala*. [J Pharm Biomed Anal.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29602084) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29602084>> 2018;154:413-424.
7. Marian Twohig, Andrew Aubin, Michael Jones, and Robert S. Plumb. Improving qualitative conformation using Xevo TQ MS with Survey Scanning.
8. Extraction, Isolation, and Characterization of Natural Products from Medicinal Plants (International Journal of Basic Sciences and Applied Computing (IJBSAC) ISSN: 2394-367X, Volume-2 Issue-6, December 2018).
9. Simplifying Qual/Quan Analysis in Discovery DMPK using UPLC and Xevo TQ MS.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC PDA 検出器 <<https://www.waters.com/514225>>

Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

720006932JA、2020年5月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.