多変量解析手法を用いたフレッシュ及び乾燥イチョウ葉含有成分のプロファイリング

目的

ACQUITY UPLC®/SYNAPT®G2 HDMS™/MarkerLynx™ XSを用いたフレッシュと乾燥のイチョウ葉含有成分の比較を通して、ノンターゲット分析のワークフローの流れをご紹介します。

背景

UPLC®/TOF-MSを用いた多変量解析手法は複雑なサンプルのグループパターン解析に用いられるだけでなく、生体サンプルにおいて薬剤投与の前後や疾患の発症前後における、内因性成分の変動解析を行うメタボロームにも適用されます。それ以外にも、複雑な多群のサンプル比較、例えば漢方(Traditional Chinese Medicine:TCM)分野においては、今まで課題の多かった同種の薬草の抽出物の収穫時期や産地、保存方法の違いによる含有成分のプロファイリングにもその技術は用いられ、適用範囲は非常に幅広くなっています。

このアプリケーションノートでは、フレッシュのイチョウ葉の抽出物と乾燥したイチョウ葉の抽出物の成分を網羅的に比較し、変動のあった成分(マーカー)を同定しました。

UPLC/TOFがもたらす高分離クロマトグラフィー、高分解能質量分析法、及び多変量解析手法を用いて、非常に複雑な生体や植物におけるプロファイリングを迅速に且つ包括的に行う事ができます。

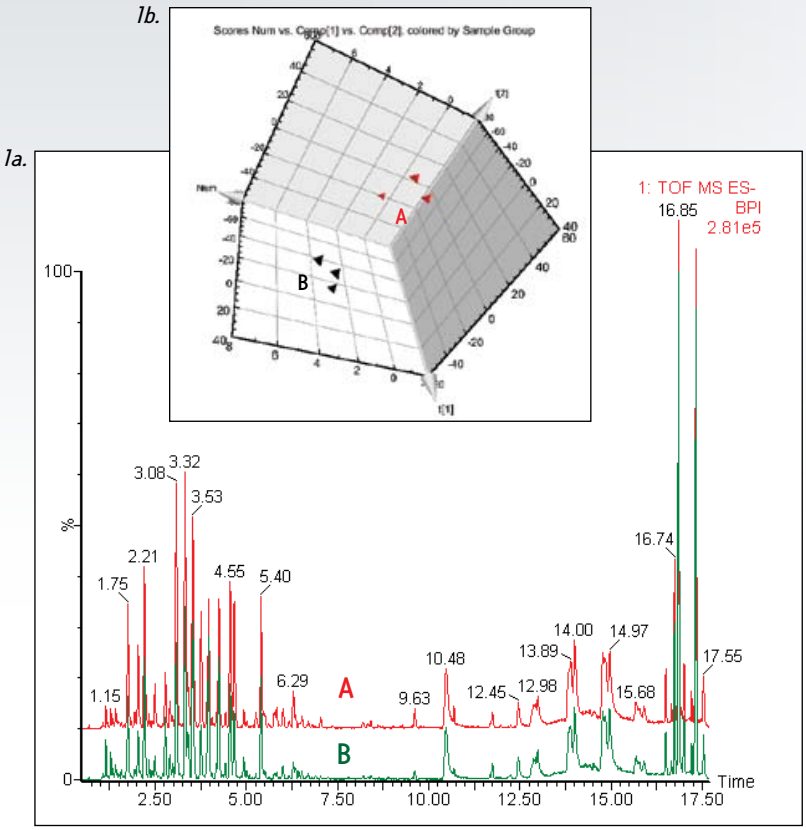

図1a. フレッシュ (A) と乾燥 (B) イチョウ葉のベースピークイオンクロマトグラム
図1b. フレッシュ (A 赤) と乾燥 (B 黒) イチョウ葉成分のPCA結果

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ソリューション

イチョウ葉は2009年に中国湖南省リウヤンで採取したものを使用しました。一般的な抽出手順を用いてLC/MS分析用サンプルを作成し、ACQUITY UPLC/SYNAPT G2 HDMSを用いて分析を行いました。カラムはACQUITY UPLC HSS T3 2.1x100 mmを、移動相は5 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 5.0)とメタノールを用いました。サンプルの分析時間は22分です。1サンプルにつきn=3以上、ネガティブモードで測定しました。データ取り込みはMS^{E}モードを使用しました。MS^{E}モードとは1回の測定で全ての検出されたピークのプレカーサーイオンとフラグメントイオンの質量情報だけでなく強度情報も同時に取得することのできる取り込み手法です。データ解析には多変量解析ソフトMarkerLynx XSアプリケーションマネージャを用いました。

図1にフレッシュ及び乾燥イチョウ葉のベースピークイオンクロマトグラムを示しました。このふたつのクロマトグラムの違いを視覚的に確認するのは非常に困難です。しかしMarkerLynx XSの主成分分析(PCA)では、フレッシュ(A 赤)と乾燥(B黒)を非常に明確にグループ分けする事ができます(図1b)。更に判別分析(OPLS-DA)のS-Plotを図2aに示しました。S-Plotの両端に存在するポイント(各ポイントが保持時間と*m/z*をペアとしたピーク)が最もグループ分けに寄与したマーカー候補と考えられます。

MS^{E}で取得したマーカー候補のプリカーサーイオンデータからデータベース検索を行い、化合物の同定を行う事ができます。更に同時に取得したフラグメントイオンデータから部分構造を帰属し、更なる同定を行う事ができます。図2bにはマーカー候補(*m/z* 755.1824)のトレンドプロットとChemSpiderデータベース検索より得られた候補化合物の構造式を示しました。図3にはフラグメントイオンデータを用いてフラグメントの帰属を行った結果を示します。フラグメントの帰属はMassFragment™ソフトウェアを用いて自動で行い、マーカー同定の効率化を実現しました。

2a. 2b.

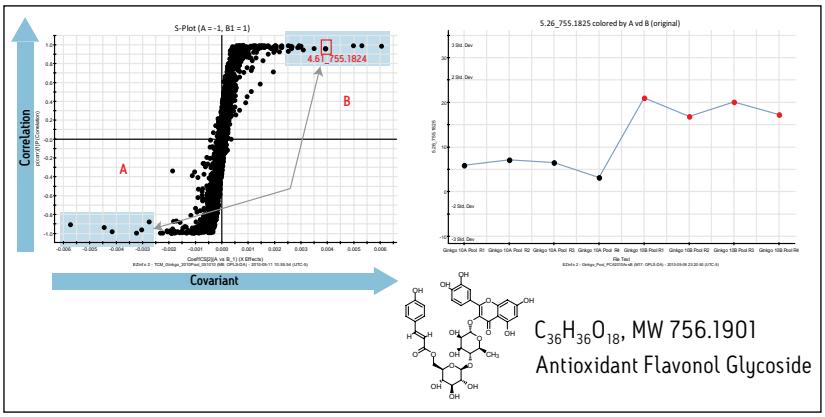

図2. 判別分析（OPLS-DA）を適用することで、サンプル中に検出された非常に多くのピークから簡単にマーカー成分の抽出と同定ができます。2a. OPLS-DA、Sプロット-各グループに寄与するマーカーを簡便に抽出することができます。（図中水色で表示）2b.マーカー成分4.55_755.1824（RT_m/z)のトレンドプロットと、データベース検索（ChemSpider Database)によって得られたマーカー化合物の推定構造式。（下図）

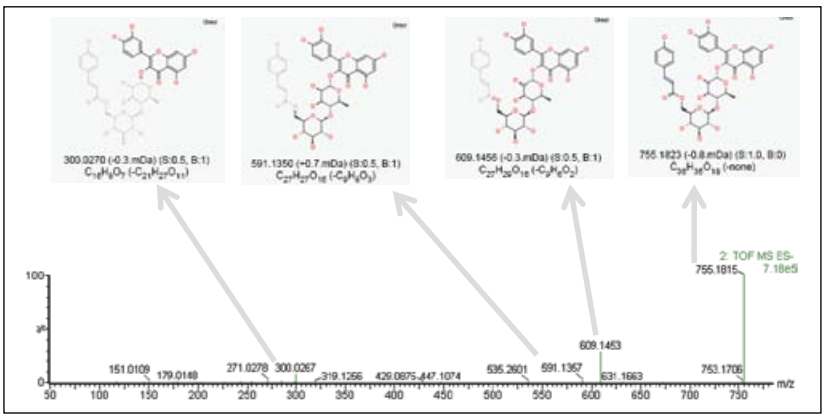

図3. MassFragmentソフトウェアを用いた、構造解析結果。高品質な精密質量測定は構造解析の簡便性と信頼性の向上には不可欠です。

まとめ

複雑なサンプル中のノンターゲットプロファイリングは非常に煩雑で困難な作業が含まれます。しかしACQUITY UPLC/SYNAPT G2 HDMS/MarkerLynx XSシステムを用いることにより作業の効率化を図ることが可能です。

UPLCの高分離とSYNAPT G2 HDMSの高分解能がもたらす精密質量データをMarkerLynx XSアプリケーションマネージャを用いて解析を行う事により、複雑なサンプル中のマーカー探索をより簡便且つ確実に行う事ができます。更にPCAやOPLS-DA手法を適用することにより更なるプロファイリングも実行することができ、プロファイリングのワークフローを簡易化することが可能です。

適用規格：JISQ9001:2008
登録番号：JMAQA-331 登録日：1999年05月31日
審査登録範囲：理科学機器（液体クロマトグラフ・質量分析装置・データ管理システム等）の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

Waters、ACQUITY UPLC、SYNAPT および UPLC は Waters Corporation の登録商標です。The Science of What's Possible、MarkerLynx および MassFragment は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2011 Waters Corporation. Produced in Japan. 2011年7月 720003489JA PDF