

標識反応と LC-MS/MS 法を活用した 微量成分の分析

キーワード：LC-MS/MS 分析、標識反応、微量分析

はじめに

本テクニカルシートでは、LC-MS 分析について、夾雑成分の多い試料を例に紹介します。

アルデヒドおよびケトン類は、食品、培養系、環境試料など幅広い分野において、品質の違いや反応・代謝の進行を反映する重要な指標成分です。これらの化合物は香気や劣化、代謝変動と密接に関係しており、ごく微量であっても評価結果に影響を及ぼす場合があります。

従来、アルデヒドおよびケトン類の分析には、揮発性成分の解析に適したガスクロマトグラフ (GC) が用いられてきました。しかし、すべてのアルデヒド/ケトン類が揮発性を有するわけではありません。また、熱に不安定な成分や、アルデヒド/ケトン類が複雑なマトリクス成分中に微量に存在する場合は、GC 系分析のみでは十分な評価が難しい場合があります。

このような課題に対し、アルデヒドおよびケトンが有するカルボニル基に選択的に反応する 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 標識 (図 1) と液体クロマトグラフ-質量分析 (LC-MS 分析) を組み合わせた手法が利用されており、非揮発性成分を含む多様なアルデヒド/ケトン類を対象とした検出が可能です。

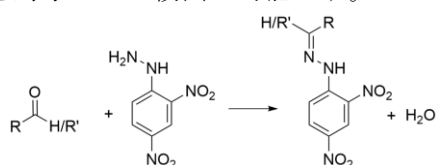


図 1 DNPH によるアルデヒド/ケトンの標識

試料調製

DNPH 標識は、サンプル希釈液 100 μL に、0.05% (w/v) DNPH を含むアセトニトリル-85%リン酸混合溶液 (9:1、v/v) 20 μL を加え、室温に 20 min 静置することで標識を行いました。

分析条件

LC による分離は、ODS カラム (Zorbax eclipse plus C18 2.1 \times 100mm 1.8 μm) を用い、溶離液 A: 5.0 mmol/L 酢酸アンモニウム pH 6.8、溶離液 B: メタノールによるグラジエント条件

で行いました。検出は、360 nm の吸光度もしくは四重極-飛行時間型質量分析装置 (Agilent 6530C Q-ToF MS) を使用しました。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (dual Agilent Jet Stream イオン源) を用い、Negative イオンモードで測定を行いました。

培養前後における培地成分の構造推定

Q-ToF MS は、高分解能かつ高質量精度での測定が可能な質量分析装置です。前駆イオンを選択して崩壊 (フラグメント化) させることで、化合物の構造情報を取得できます。この特性を活かし、検出された未知ピークの構造推定および化合物同定を行いました。

例として、酵母培養前後の培地成分の分析例を示します。サンプリングした培養前後の培地を DNPH 標識し、LC により分析した結果を図 2A に示します。培養後のサンプルでは、いくつかの新規ピークが検出されました。そのうち、ピーク α について MS 解析を行うと、 m/z 267.03658 が検出されました (図 2B)。

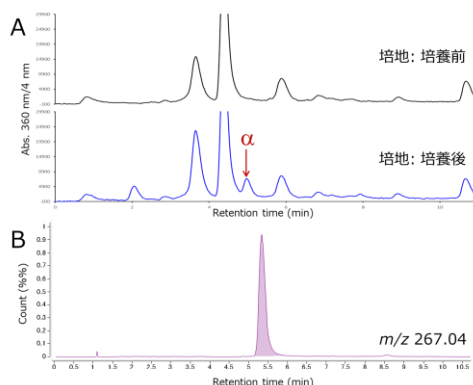


図 2 培養サンプルの分析結果

A: LC-吸光度検出による測定結果 B: ピーク α に相当する m/z の抽出イオンクロマトグラム

この $[\text{M}-\text{H}]^-$ イオンを前駆イオンとし、MS/MS 測定を行うと、図 3 に示すようなフラグメントイオンが得られました。これらの構造情報より、ピーク α は Pyruvate-DNPH と推定されました。また、標準品のフラグメンテーションとの一致により、化合物同定ができました (図 3)。

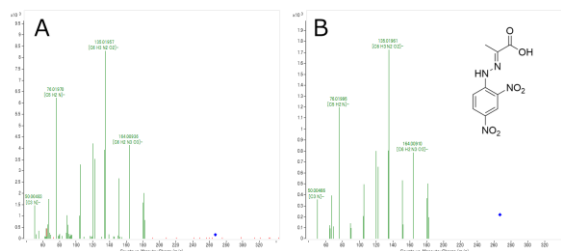


図3 検出ピークおよび標準品のMS/MS解析

A: ピークαで検出された[M-H]⁻イオン

(*m/z* 267.036) のMS/MS解析結果

B: Pyruvate-DNPH 標準品のMS/MS解析結果

フラグメントイオンを指標とした微量分析

本稿の例のように、タンデム型質量分析装置を用いたMS/MS測定では、前駆イオンの崩壊により生成されるフラグメントイオンを指標として追跡することで、微量成分の高選択的な検出や構造推定を行うことができます。このようなフラグメントイオンを用いた解析は、共存成分の影響を受けやすい複雑な試料中において、吸光度検出では捉えにくい成分変動の追跡に有効です。

DNPH標識体は、このようなMS/MS解析において、DNPH部分の崩壊に由来する特徴的なフラグメントイオンを生成するという特長を有しています(図4)。そこで、標識部分に特徴的なフラグメントイオンを指標として追跡することで、微量に存在するDNPH標識アルデヒド/ケトン類の検出や構造推定が可能となります。

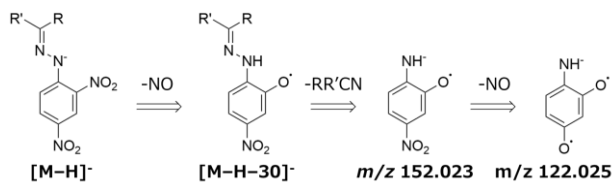


図4 DNPH標識体の推定フラグメンテーション

例として、コーヒー類の分析結果を示します。香気良品のコーヒー(I)、香気普通品のコーヒー(II)をサンプリングし、DNPH標識した後、LC分析を行いました。吸光度検出では著変が検出されませんでした(図5A)。そこで、*m/z* 122.025のフラグメントイオンを指標にMS/MS測定結果を追跡すると、変動するピークが検出されました(図5B)。ピークβおよびγについて、前項と同様の手順でMS、MS/MS解析および標準品との比較を行い、ピークβ: 3-Hydroxy-2-butanone-DNPH、ピークγ: 2-Hexanone-DNPHと同定されました。

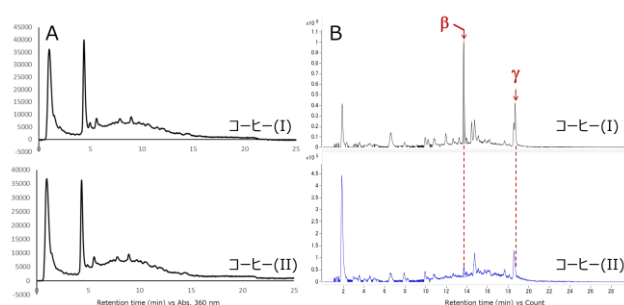


図5 コーヒー類のLCおよびLC-MS分析結果

DNPH標識したサンプルを吸光度(A)およびフラグメントイオン *m/z* 122.025 (B)により検出した結果

標準品を用いて検量線を作成した結果、いずれの化合物についても、0.05 ppb (5.0×10^{-5} mg/L)以上において良好な直線性が得られました(図6)。このように、LC/MS装置のフィルター機能を適切に使用することで、sub-ppbオーダーの低濃度域においても安定した検出・定量が可能です。

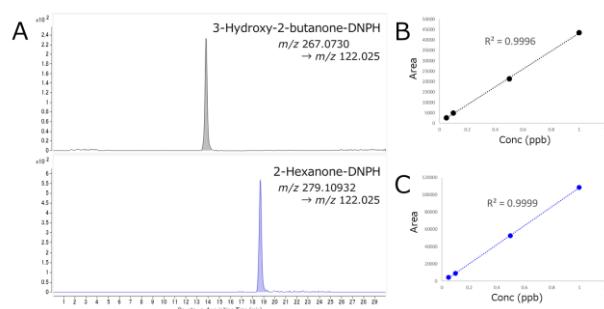


図6 標準品の測定結果

3-Hydroxy-2-butanone-DNPHおよび2-Hexanone-DNPHの*m/z*を前駆イオンに指定し、フラグメントイオンをモニターした抽出イオンクロマトグラム(A)。各化合物は0.1 ppb。検出された3-Hydroxy-2-butanone-DNPH(B)、2-Hexanone-DNPH(C)の面積値から作成した検量線

おわりに

標識反応とLC-MS/MS法を組み合わせることで、従来法では捉えにくかった微量成分についても、検出から同定、定量までを一貫して行える場合があります。また、本稿の例のように、MS/MS測定によって得られる前駆イオンおよびフラグメントイオンの情報を活用することで、特定成分の検出・探索や構造推定、微量定量にも対応できる場合があります。

森之宮センターには、本稿で用いたQ-ToF MSの他、様々な質量分析システムを保有しています。ぜひご活用ください。

※ テクニカルシートの内容の一部または全部を転載する場合には、前もって大阪技術研に連絡の上、了解を得てください。

発行日 2026年2月1日

作成者 環境技術研究部 環境材料・生物工学研究室 大橋 博之

Phone: 06-6963-8065 E-mail: hohashi@orist.jp