

## LCMS-IT-TOFによるフラボノイド類の精密質量分析

Accurate mass analysis of flavonoids by LCMS-IT-TOF

フラボノイド類はポリフェノールの一種で果物、野菜、穀物、種、木の實、及びワインや紅茶のような飲物に多く含まれています。香料や色素として古くから食品、化粧品に使われていましたが、人間にも抗酸化作用、ホルモン促進作用などの効力を与えることが近年明らかになり、様々な種類のポリフェノールが発見・抽出・開発され、医薬品、健康食品として多くの商品を生み出し、健康ブームを巻き起こしています。

生理活性のある微量のフラボノイド類を天然物から見つけ出し、単離・精製の後、構造決定するまでには多大な労力を必要としますが、LCMS-IT-TOFを用いた精密質量MS<sup>n</sup>測定では、単離・精製なしに高精度の分子量情報およびフラグメントイオンからの構造情報を得ることができます。また、既存のTOF型質量分析計はその多くが

内部標準法により高い質量精度を実現していましたが、LCMS-IT-TOFではBIE (Ballistic Ion Extraction, 特許US6380666, 他) や装置内部温度調節機構などの独自技術により、外部標準法で長時間安定した質量精度を得ることができます。

ここでは、みかんのメタノール抽出物をLCMS-IT-TOFで分析し、フラボノイド類の構造解析を行った結果をご紹介します。Fig.1にUVおよびMSクロマトグラムを示しました。オートMS/MS機能を用い、自動的にプリカーサーイオンを選択しながら、一度の分析でMS<sup>3</sup>まで測定を行いました。MS<sup>n</sup>のマスペクトルを解析することにより、配糖体の種類および数や位置、アグリコン部分の構造などを推定することができます。

K.Arakawa

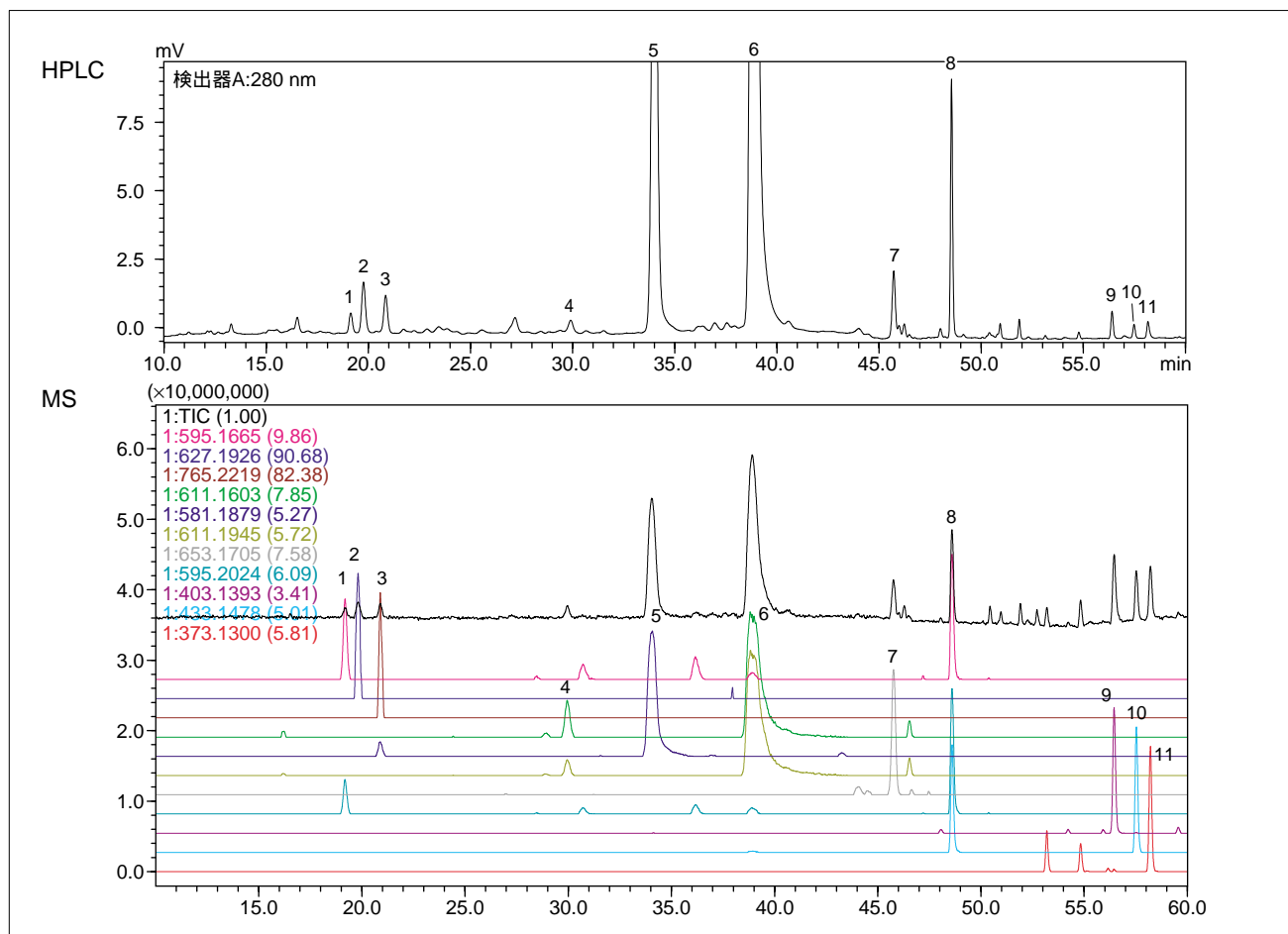


Fig.1 みかんのメタノール抽出物のHPLCおよびMSクロマトグラム  
HPLC & MS chromatograms of methanol extract of mandarin orange

Fig.2に主成分であるヘスペリジン（ピーク6）の構造，Fig.3にヘスペリジンのマススペクトルを示します。赤い1で示したm/z 611.1945がヘスペリジンのプロトン化分子  $M+H^+$  で、理論値はm/z 611.1976、質量精度は-5.1 ppmとなります。このm/z 611をプリカーサーイオンとして選択し、MS/MSスペクトルを採取しました。フラグメントイオンm/z 303、m/z 449とプリカーサーイ

オンm/z 611の差を取ると、308.1072および162.0532となり、これらの組成推定を行うと、それぞれ $C_{12}H_{20}O_9$ 、 $C_6H_{10}O_5$ と推定されました。これらの組成は、Fig.2に示した二糖部分、単糖部分の構造と一致します。次にm/z 303をプリカーサーイオンとして選択し、MS/MSスペクトルを採取しました。フラグメントイオンm/z 145、m/z 153、m/z 177の推定構造をFig.2に示しました。

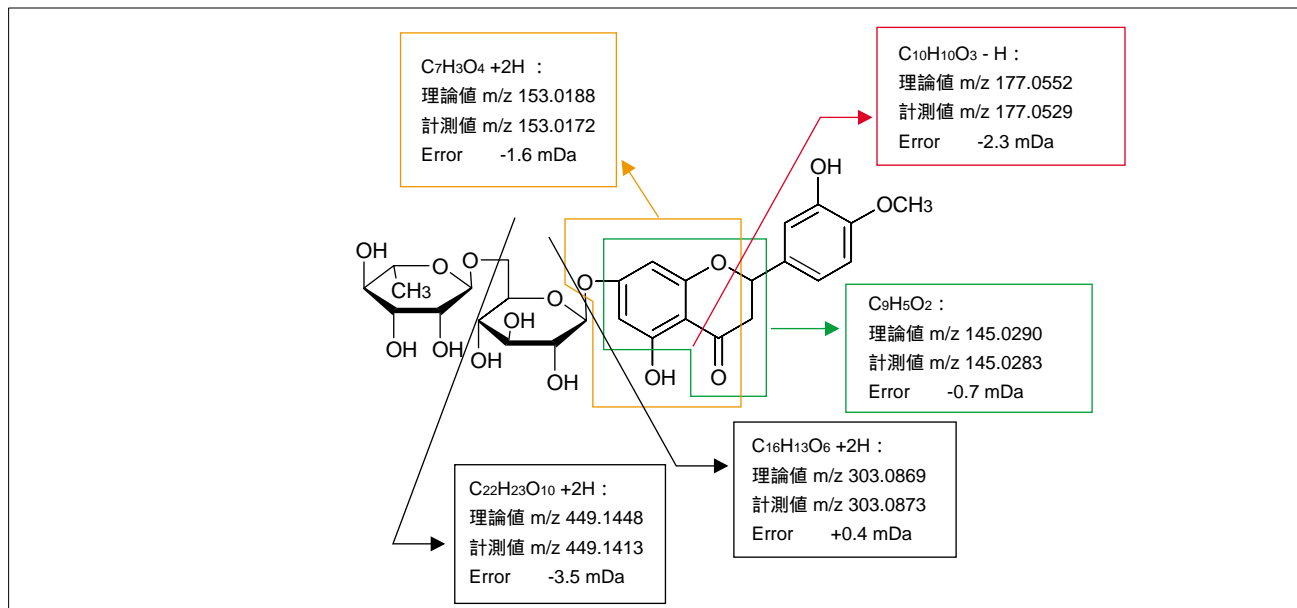


Fig.2 ヘスペリジンの構造式  
Structure of Hesperidin

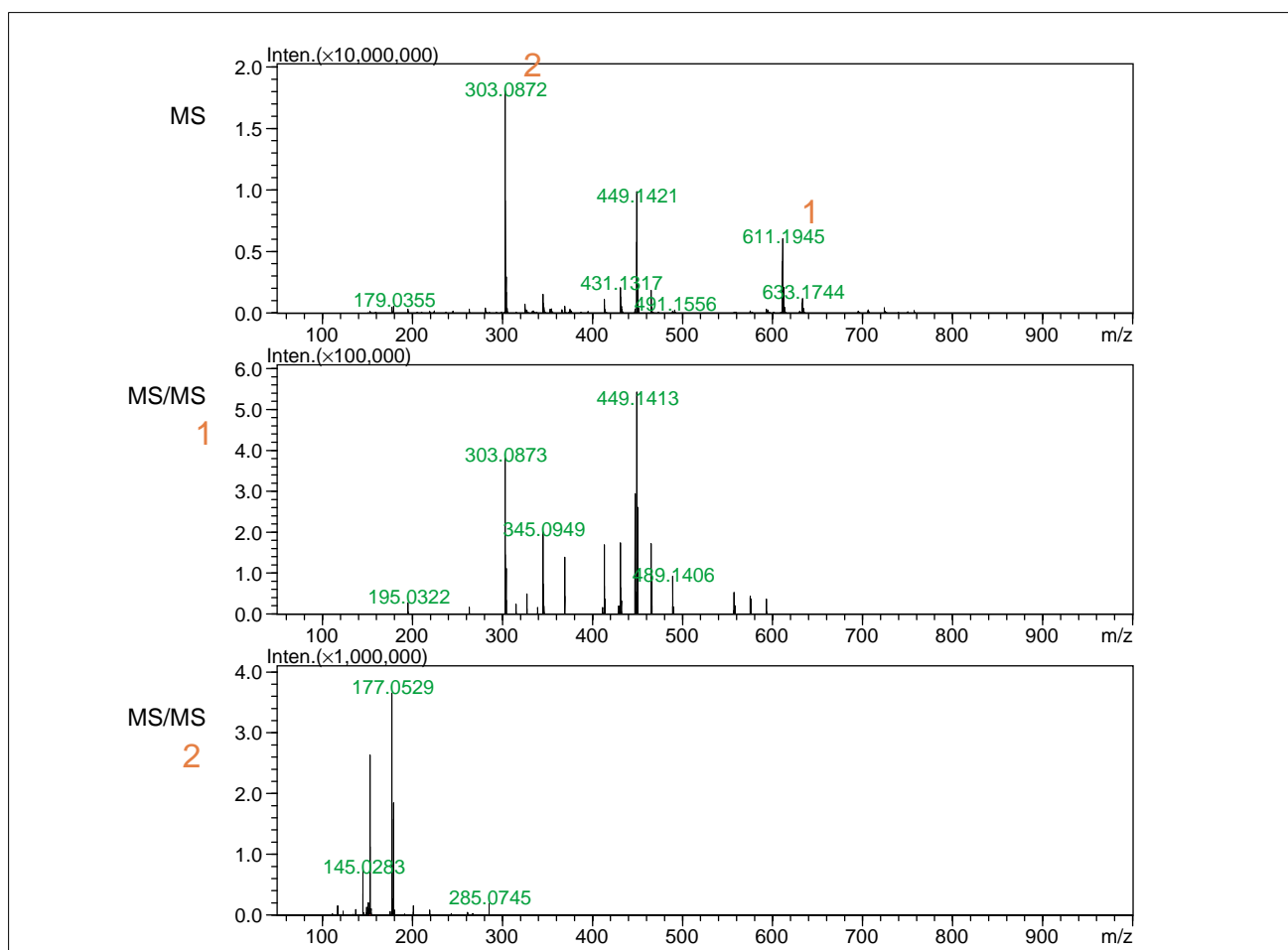


Fig.3 ヘスペリジンのマススペクトル  
Mass spectra of Hesperidin

Fig.5にピーク8のマススペクトルを示します。 Fig.3のヘスペリジンのマススペクトルと比較すると、主要なm/z 303, m/z 449と m/z 611からいずれも16質量少ないm/z 287, m/z 433と m/z 595が検出されており、ヘスペリジンのアグリコン部の-OHが-Hに置換した構造であることがわかります。赤い 1 で示したm/z 595.2024がデヒドロキシヘスペリジンのプロトン化

分子 [M+H]<sup>+</sup>で、この理論値はm/z 595.2027になり、質量精度は-0.5 ppmとなります。次にm/z 287をプリカーサーイオンとして選択し、MS/MSスペクトルを採取しました。ヘスペリジンのm/z 303のMS/MSスペクトルと比較してm/z 153は共通していますが、m/z 177から16質量小さいm/z 161が検出されていますので、ピーク8はFig.4に示す構造と推定できます。

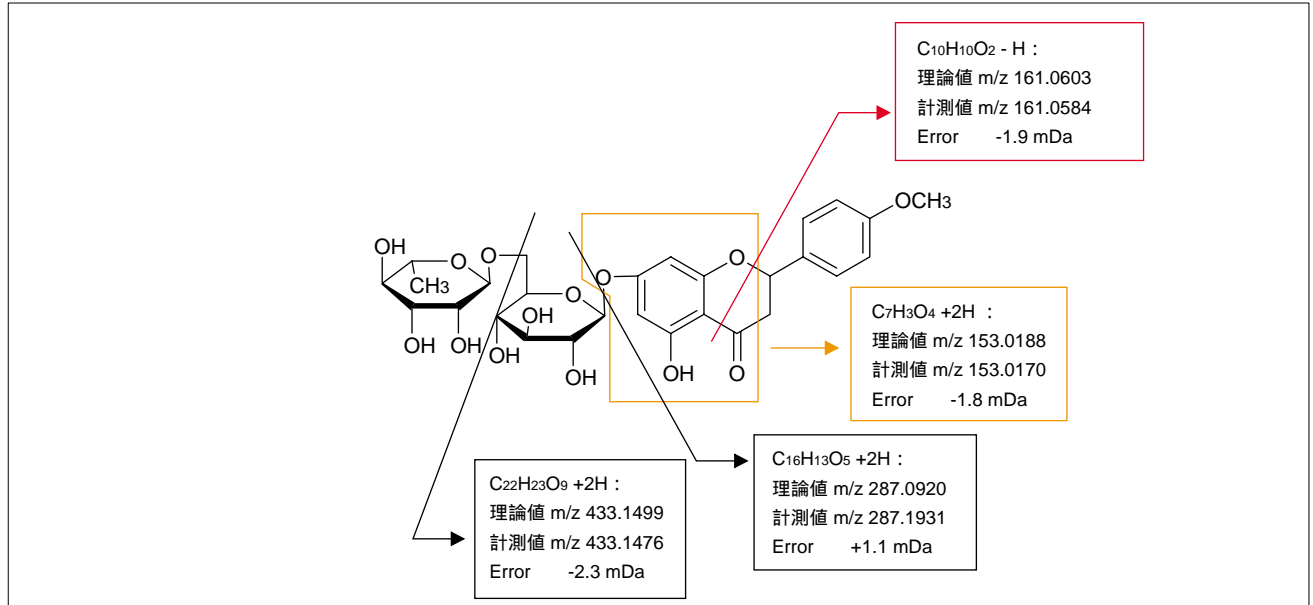


Fig.4 ピーク8 デヒドロキシヘスペリジンの構造式  
Structure of Dehydroxyhesperidin (peak 8)

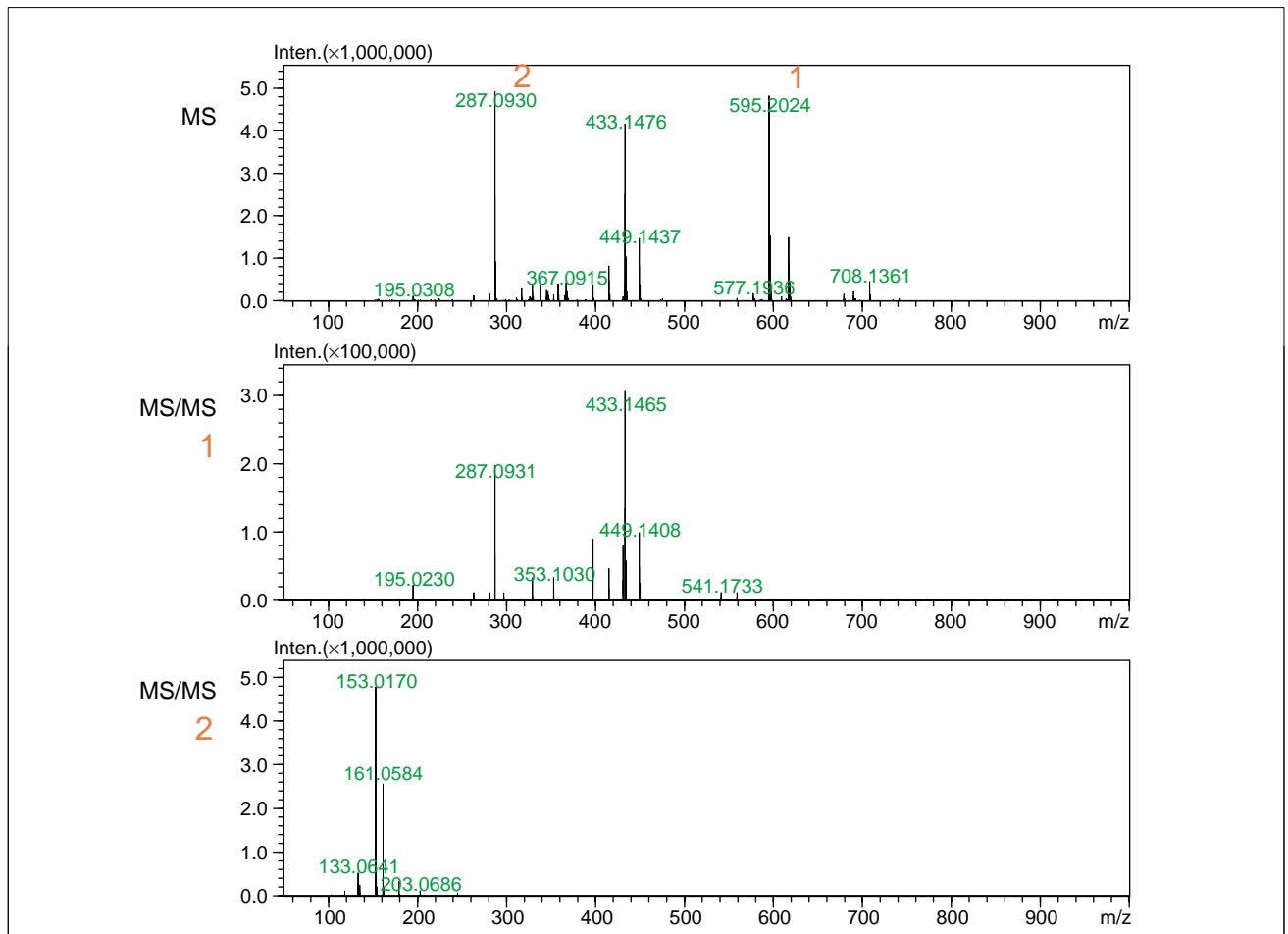


Fig.5 ピーク8 デヒドロキシヘスペリジンのマススペクトル  
Mass spectra of Dehydroxyhesperidin (peak 8)

Fig.6にピーク4のマススペクトルを示します。整数ではヘスペリジンと同じく分子量610の化合物ですが、プロトン化分子 [M+H]<sup>+</sup>の精密質量はm/z 611.1603とヘスペリジンとは30 mDa以上離れており、別の組成が考えられ

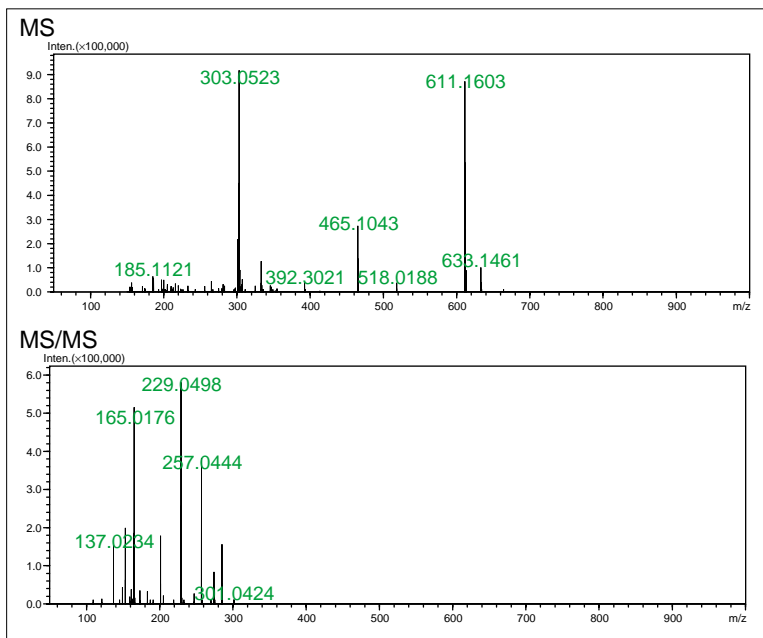


Fig.6 ピーク4のマススペクトル  
Mass spectra of peak 4

ます。組成推定ソフトウェアの検索結果からC<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>と推定でき、保持時間などからFig.7のルチンと同一とすることができました。

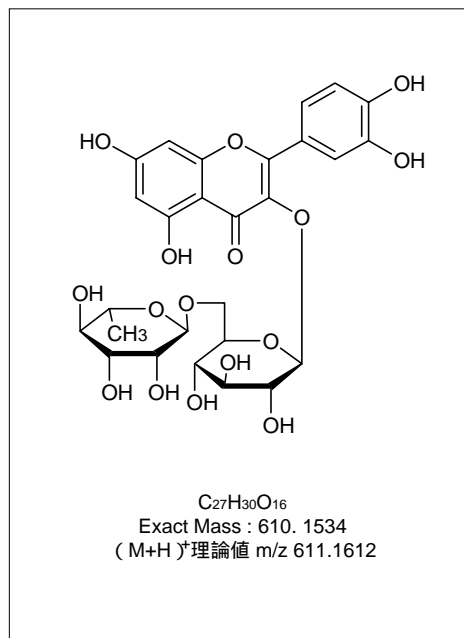


Fig.7 ピーク4 ルチンの構造  
Structure of Rutin (peak 4)

Table 1に各ピークの定性結果をまとめ、各ピークの分子量関連イオンの理論値と計測値を示しました。その誤

差は外部標準法でほぼ±5 ppm以内におさまるといった良い結果が得られています。

Table 1 定性結果  
Substances

保持時間 (min)	成分名	分子量	分子式	理論値 (M+H) <sup>+</sup> m/z	計測値 (M+H) <sup>+</sup> m/z	誤差 (ppm)
#1		594.1585	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.1663	595.1665	+0.34
#2	3'-ヒドロキシヘスペリジン	626.1847	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	627.1925	627.1926	+0.16
#3	ナリルチン-4'-D-Glu	742.2320	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	765.2218 (M+Na) <sup>+</sup>	765.2219 (M+Na) <sup>+</sup>	+0.13
#4	ルチン	610.1534	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	611.1612	611.1603	-1.47
#5	ナリルチン	580.1792	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	581.1870	581.1879	+1.55
#6	ヘスペリジン	610.1898	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	611.1976	611.1945	-5.07
#7		652.1640	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	653.1718	653.1705	-1.99
#8	5'-デヒドロキシヘスペリジン	594.1949	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	595.2027	595.2024	-0.50
#9	ノビレチン	402.1315	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	403.1393	403.1393	±0
#10	3,5,β,7,β,3',4'-ヘプタメトキシフラボン	432.1420	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	433.1499	433.1478	-4.85
#11	タンゲレチン	372.1209	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	373.1287	373.1300	+3.48

Table 2 分析条件  
Analytical conditions for LCMS-IT-TOF

Column	: Phenomenex Gemini 5u C18 110A (2.0 mmI.D. × 150 mmL.)	Column temperature	: 40 °C
Mobile phase A	: 0.1 % (w/v) acetic acid-water	Block Heater temperature	: 200 °C
Mobile phase B	: 0.1 % (w/v) acetic acid-acetonitrile	Drying gas pressure	: 0.1 MPa
Gradient program	: 0 % B (0 min) → 10 % B (5 min) → 20 % B (40 min) → 100 % B (75-90 min) → 0 % B (90.01-100 min)		
Flow rate	: 0.2 mL/min		
Injection volume	: 0.2 μL		
Probe voltage	: +4.5 kV (ESI-Positive mode)		
CDL temperature	: 200 °C		
Nebulizing gas flow	: 1.5 L/min		

 島津製作所 分析計測事業部 応用技術部

島津分析コールセンター

初版発行：2007年3月  
A改訂版発行：2007年6月  
●東京 ☎(03)3219-1691  
●京都 ☎(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は右に示す島津WEBで閲覧できます。

会員情報提供サービス「Shim-Solutions Club」にご登録下さい。  
<http://solutions.shimadzu.co.jp/>  
いろいろな情報提供サービスが受けられます。