

## UPLC イオンモビリティー飛行時間型質量分析を用いた、非常に複雑なカンキツ果汁サンプル中のフラボノイド異性体のプロファイリング

---

Michael McCullagh, Kieran J. Neeson, Antonietta Gledhill

Waters Corporation

---

### 要約

このアプリケーションノートでは、ACQUITY UPLC システムと SYNAPT G2-S 質量分析計を組み合わせ使用して、カンキツ果汁に含まれる成分を特異的かつ明確に同定します。

### アプリケーションのメリット

- イオンモビリティーによって得られる直交分離により、複雑なサンプルの分析が向上します。
- 2 ppm 以内の精密質量測定により、特定の元素組成に関する情報が得られ、信頼性の高い構造解析データが得られます。
- イオンモビリティー質量分析と UPLC の組み合わせにより、ピークキャパシティが 10 倍増加し、以前は観察されなかった異性体および配座異性体を一意的に同定することができます。
- 保持時間、プリカーサーイオンの精密質量測定、精密質量測定によるフラグメンテーションデータ、およびイオンモビリティー分離のドリフト時間に基づく同定ポイントが 1 回の分析で得られます。
- 分析のアプローチとして HDMS を利用することで、現行の果汁製品についてより深く理解できる可能性があります。

---

## はじめに

カンキツ果汁に含まれるフラボノイドが、その生物学および生理学の効果に対して、注目が集まっています。フラボノイドは、さまざまな薬理学的特性および生物学の特性を有する最大で最も広く存在するクラスの化合物の1つです。このような特性から、フラボノイドを含む多くの植物種を機能性食品や生薬として使用することができます。フラボノイド化合物のマーカーとしての役割は重要ですが、サンプルの複雑さのためにその同定は困難です。フラボノイドは、がん進行の防止、一部の慢性疾患のリスク低減、心血管疾患の予防、ならびに抗ウイルス作用、抗菌作用、抗炎症作用に関連しており、これらが果汁成分中のフラボノイド類に関心が寄せられる理由となっています。フラボノイドの一般的な供給源として、果物、野菜、穀類が挙げられます。これらの関連する健康上のメリットを考慮すると、食品の加工および調製がフラボノイド含量に及ぼす影響について、より深く理解する必要があります。したがって、果汁を摂取することによる効果をよりの確に把握するためには、果汁の主成分および微量成分のすべてをプロファイリングできることが不可欠です。また、外観や味など、消費者に影響を及ぼす可能性のある重要な要素も、製品の商品価値に影響します<sup>1</sup>。

フラボノイドのプロファイリングにおける HPLC-MS の使用がますます一般的になっています。このアプリケーションノートでは、Waters ACQUITY UPLC システムと SYNAPT G2-S 質量分析計を組み合わせ使用して、カンキツ果汁に含まれる成分を特異的かつ明確に同定します。高分解能質量分析 (HDMS) がカンキツ果汁製品のプロファイリングに利用されています。この手法には、複雑な混合物のプロファイリングにおいていくつかの独自の利点があります。これは、高分解能質量分析および高効率イオンモビリティに基づく測定および分離を組み合わせたものです。イオンモビリティ質量分析 (IMS) は、迅速な直交気相分離法であり、LC の時間枠内で別次元の分離が得られ、より高いイオン分解能と分析の特異性が得られます。化合物は、質量だけでなく、サイズ、形状、電荷に基づいて区別することができます。

---

## 実験方法

### サンプル前処理

みかん果汁のサンプルを 45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過しました。

### UPLC 条件

LC システム: ACQUITY UPLC

カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 150  $\times$

2.1 mm、1.7  $\mu$ m

カラム温度: 40 °C

流速: 0.4 mL/分

移動相: MeCN (B) : H<sub>2</sub>O (0.2%  
HCOOH) (A)

## グラジエント

時間 (分)	流速	%A	%B
初期条件	0.4	99	1
0.75	0.4	95	5
5	0.4	5	95
5.5	0.4	99	1

注入量: 10  $\mu$ L

## MS 条件

MS システム: SYNAPT G2-S

イオン化モード: ESI-, 2.7 kV

サンプルコーン電圧: 30 V

脱溶媒温度:	650 °C
レファレンス質量:	ロイシンエンケファリン、[M-H] <sup>-</sup> = 554.2615
取り込み範囲:	<i>m/z</i> 50 ~ 1200
取り込み速度:	5スペクトル/秒
コリジョンエネルギーランプ:	33 ~ 45 eV
分解能:	18,000 FWHM
IMS T-Wave の速度:	550 m/秒
IMS T-Wave のパルス高さ:	40 V

---

## 結果および考察

SYNAPT G2-S で UPLC-IMS/MS<sup>E</sup> 機能を使用して、みかん果汁の成分をネガティブイオン化モードのエレクトロスプレーでプロファイリングしました。IMS により、別次元の高速気相イオン分離が得られ、より高いイオン分解能および分析特異性が得られます。IMS は、「気相における電気泳動」と見なされてきました。プロファイリング試験が行われ、HDMS を使用するメリットが明確に示されています。図 1 に、未希釈のみかん果汁の分析において、従来のネガティブイオン化モードで得られたベースピーク強度 (BPI) クロマトグラムおよび *m/z* 609 の抽出質量クロマトグラムを示します。対応する精密質量スペクトルを図 2 に示します。精密質量スペクトルにより、元素組成 C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>O<sub>15</sub> (誤差 1.1 ppm) および C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub> (誤差 0.7 ppm) が得られました。得られた元素組成を用いて ChemSpider 検索を行ったところ、3.25 分のこの成分は、ヘスペレチン 7-O-ルチノシド (ヘスペリジン) である可能性が高いと考えられました。使用した条件において、*m/z* 301.0714 のピークは、イオン源でのフラグメンテーションに起因し、二糖類部分の喪失によって発生したものです。観察されたフラグメントおよび得られた精密質量/元素組成により、構造解析を行うことができました。

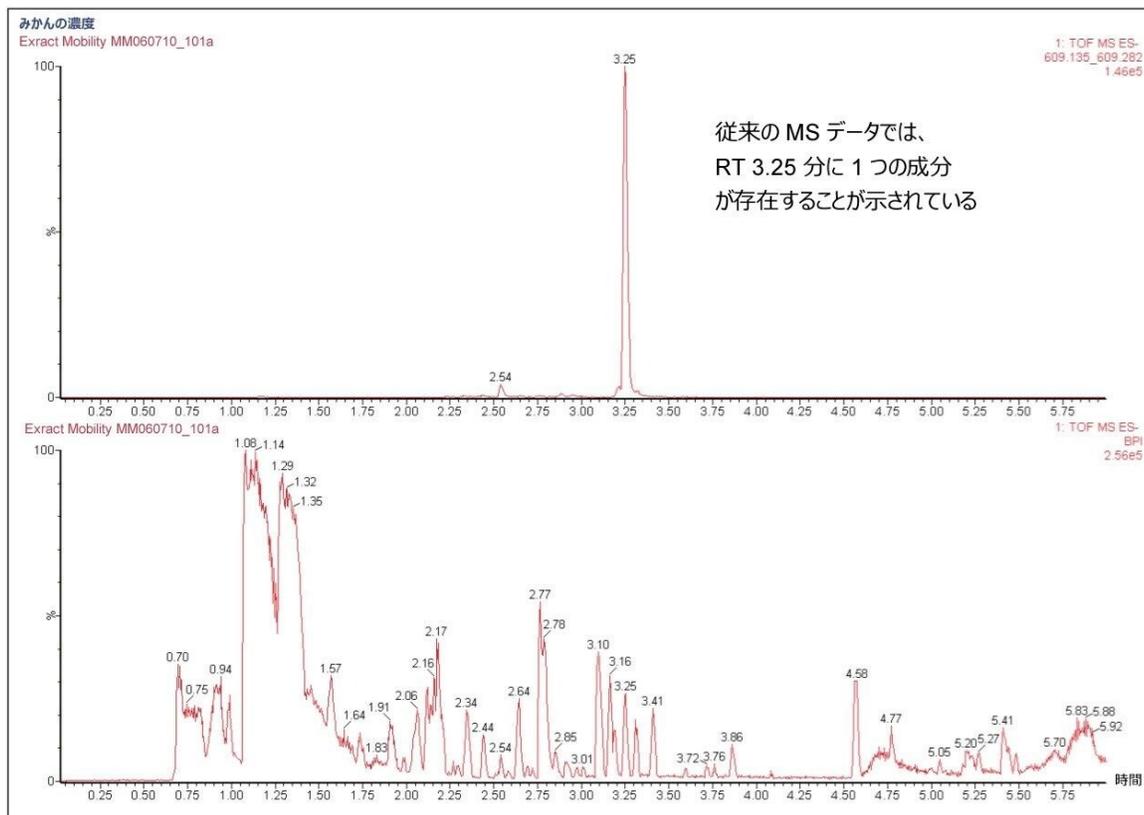


図 1.みかん果汁のネガティブイオンモードの分析で得られた BPI クロマトグラム、および  $m/z$  609 の抽出質量クロマトグラム。

このデータを MS<sup>E</sup> データビューアーで表示したところ、3.25 分の成分が、実際には 2 成分で構成されていることが分かりました。図 3 の MS<sup>E</sup> データビューアーでは、みかん果汁の BPI で検出されたピークを表示しており、モビリティデータにより、3.25 分に 2 つの成分が存在することが明らかになりました。プリカーサーイオンスペクトルとフラグメンテーションスペクトルは 2 つの異なるドリフト時間から生成されます。これらの同重体成分について得られたイオンモビリティ分離の結果の 3D データ表示を図 4 に示します。MS<sup>E</sup> データビューアーを使用すると、MS<sup>E</sup> 取り込みによって得られた時間アライメント済みの高エネルギースペクトルおよび低エネルギースペクトルをシームレスに表示することができます。さらに、モビリティ分離が得られている場合は、モビリティ分離およびそのスペクトルが利用できます。このソフトウェアにより、ドリフト時間は異なるが保持時間が同じ同重体成分を、ボタンをクリックするだけで視覚化することもできます。このフィルターを使用することにより、930 種の主要分析種と微量分析種からなる非常に複雑なサンプル中の 3.25 分のピークが、実際には 2 成分であることを瞬時に確認することができました。ドリフト時間 8.8 ms および 9.5 ms が観察され、成分の推定 T-Wave 衝突断面積 (CCS) はそれぞれ 164.6 Å<sup>2</sup> および 174.1

A2 と判定されました。

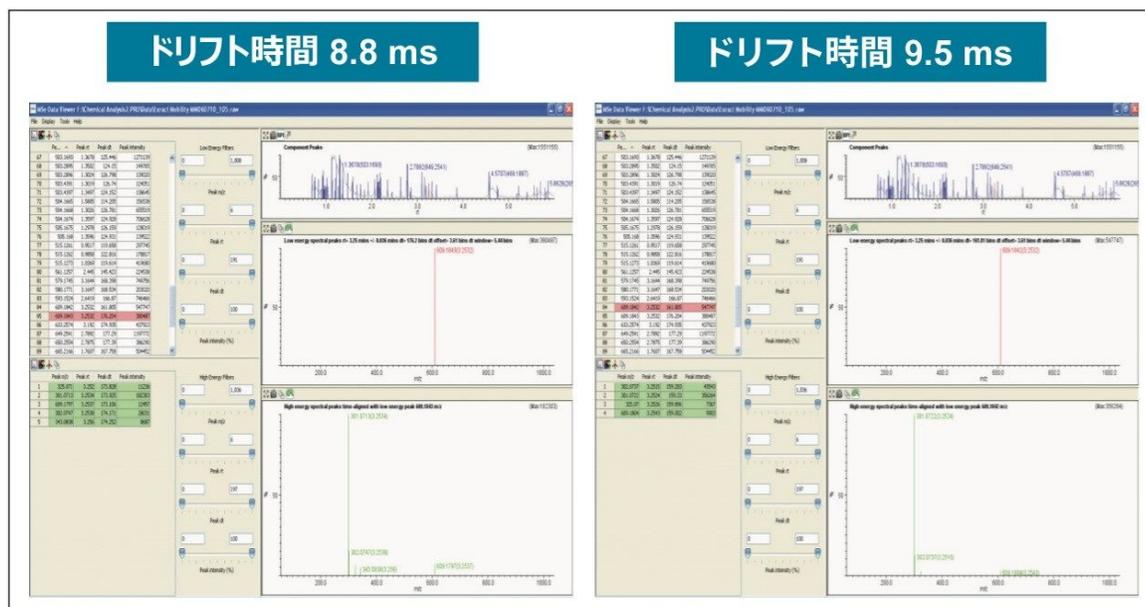


図 3.みかん果汁の BPI で検出されたピークを示す MS<sup>E</sup> データビューアー。モビリティデータから、3.25 分に 2 成分が存在することがわかります。

UPLC-IMS/MS<sup>E</sup> を行い、衝突誘起解離 (CID) フラグメンテーションを「Triwave」の「トランスファー」領域で行った結果、2 つの IMS 同重体成分の構造解析データが 3.25 分に得られました。モビリティ分離された同重体成分の MS<sup>E</sup> フラグメンテーションスペクトルを図 5 に示しています。これらは同じフラグメンテーションパターンを示しています。これらの条件下において、 $m/z$  463 にマイナーなフラグメントが観察されました。これは、 $m/z$  609 のプリカーサーイオンからラムノース糖単位が失われ、グルコース単位がさらに失われて  $m/z$  301 減少し、 $m/z$  301 のアグリコンが生成したと考えられます。得られたデータからは、ヘスペリジンの配座異性体が認められることが示されています。

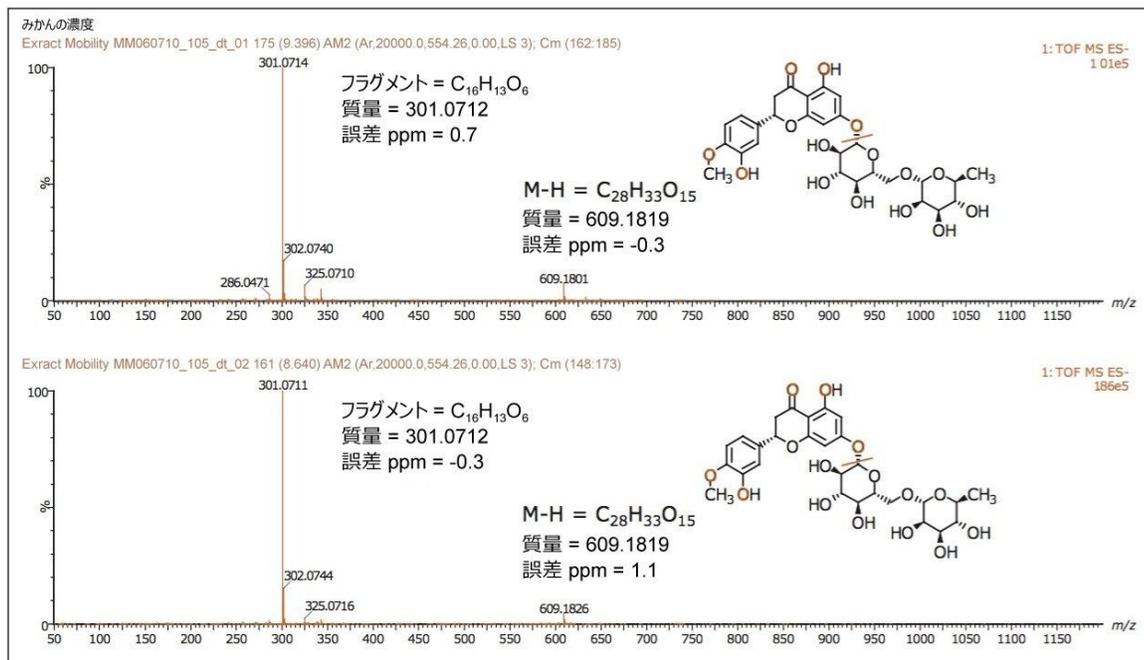


図 5.みかん果汁の分析において、3.25 分に存在すると判定されたモビリティー分離済み同重体成分の MS<sup>E</sup> フラグメンテーションスペクトル。

みかん果汁の分析で得られた従来のネガティブイオン化モードの  $m/z$  385 の抽出質量クロマトグラムが見られる別の例を図 6 に示します。対応する 3D モビリティーデータを図 7 に示します。従来の抽出質量クロマトグラムの最初の 2 つのピークは、4 種類の IMS 成分で構成されていました。得られた推定 T-wave CCS 値の例 (表 1) は、これらの値を使用して特徴的なプロファイリングデータがさらに得られることを示しています。

得られた結果は、IMS により、ピークキャパシティが増加して、より多くの成分を同定できることを示しています。IMS と MS<sup>E</sup> を組み合わせることで、モビリティー分離した成分を特異的かつ明確に同定することができます。

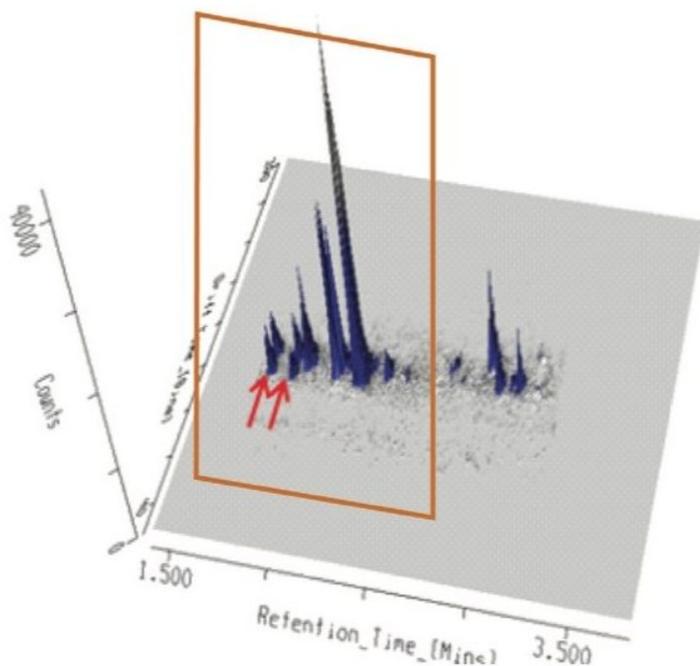


図 7.みかん果汁のネガティブイオンモードの分析で得られた  $m/z$  385 の抽出質量クロマトグラムの 3D モビリティデータの表示。1.77 分および 1.85 分のピークは、2 種類の IMS 成分で構成されています。

## 結論

- SYNAPT G2-S テクノロジーにより、UPLC-IMS/MS<sup>E</sup> を使用して、複雑なみかん果汁を徹底的に観察することができました。
- 2 ppm 以内の精密質量測定および得られる元素組成から、信頼性の高い構造解析が得られます。
- クロマトグラフィーにおいて共溶出するヘスペリジンの IMS 配座異性体について、個別の MS および MS<sup>E</sup> フラグメンテーションスペクトルが得られました。
- 保持時間、プリカーサーイオンの精密質量測定値、フラグメンテーションデータの精密質量測定値、イオンモビリティ分離を得ることで、ドリフト時間および T-Wave CCS 推定値を得ることができました。

- HDMS により、特異的かつ明確な同定を行うことができ、それによって複雑なサンプル中のフラボノイド異性体を明確に区別することができます。
- 多成分のフラグメンテーション試験においては、より特異的な情報と信頼性を同時に得ることができます。
- 複雑なサンプルの分析では、イオンモビリティによって得られるピークキャパシティの増加というメリットを享受することができます。
- MS<sup>E</sup> データビューアーにより、イオンモビリティデータのシームレスな解析および可視化が可能になります。
- この試験で使用したアプローチにより、工業生産果汁、しぼりたて果汁や様々な植物種など、現在の果汁製品についてより深い理解が得られるとともに、環境および混入物に関する試験に影響を及ぼすことができる可能性があります。さらには、今後の製品を向上させて健康上のメリットや商品価値を高める機会が得られます。

---

## 参考文献

1. Gattuso G\*, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules* 2007; 12(8): 1641-1673. \*Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Università di Messina, Messina, Italy.

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC システム <<https://www.waters.com/514207>>

720004462JA、2012 年 10 月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)