



複雑な天然抽出物に関する コンピュータを利用した分析

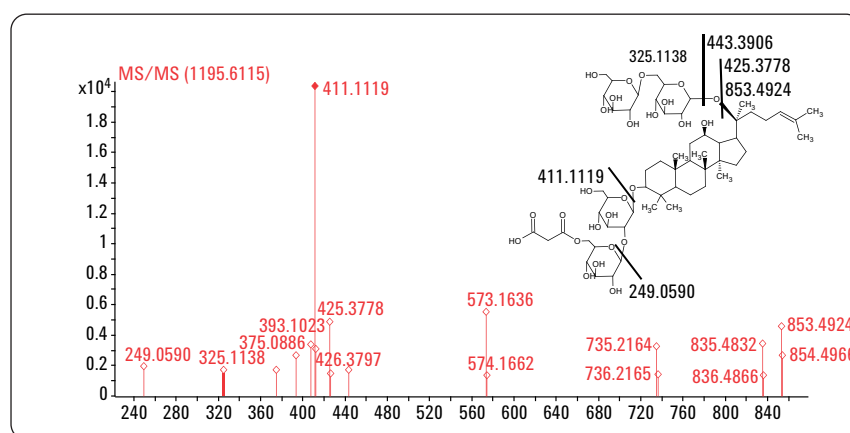
アジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアを用いた
Q-TOF 質量分析による既知化合物の検出および未知化合物の同定

アプリケーション

創薬

著者

Edgar Nägele
Agilent Technologies
Waldbronn, Germany



概要

本アプリケーションノートでは以下の事柄に関する実例を示します。

- 複雑な天然抽出物に含まれる既知の化合物および未知の新規化合物に関するコンピュータを利用した分析。
- アジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアの使用。このソフトウェアは、複雑なデータから化合物を特定するための分子特徴抽出 (MFE) アルゴリズムに加えて天然抽出物の分析アルゴリズムをいくつか追加実装したものです。
- Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムによる複雑な天然抽出物の成分分離。
- エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間 (Q-TOF) 測定方式の質量分析による正確な分子量の測定。
- 2 種類のチョウセンニンジン亜種から抽出した物質の比較データ分析。これにより、一方の亜種だけに含まれる化合物や 2 つの亜種で濃度の異なる化合物を特定します。



Agilent Technologies

はじめに

天然薬草の粗抽出物は、世界各地の古代文化によって有史以前から病気の治療に使用されていることが知られています。さまざまな病気に対する薬効が何百年にもわたる試行錯誤によって発見され、その医薬知識が代々受け継がれてきました。薬草に基づく漢方医学 (Traditional Chinese Medicine) は、こうした最適化の過程を通して効率的な処方確立されたことを示す良い例です。

こうした薬品は、異なる効能と相乗効果のある数百の化学物質からなる複雑な混合物であることが多いため、薬理効果をもたらしている特定の化合物を突き止めることは困難です。西洋医学では、天然由来の薬が潜在能力の高さから注目されています。しかし、西洋の医薬品の品質基準を満たすには、天然由来薬の成分に関する深い知識が要求されます。現在のワークフローでは、植物や薬草の複雑な抽出物の既知化合物の同定や新たな未知化合物の検出にコンピュータを利用できます。このワークフローは、複雑な MS データや MS/MS データとライブラリデータとの突き合わせによって既知の化合物を検出する作業や、コンピュータベースの特殊なアルゴリズムに基づいて新規化合物を同定するような作業から構成されます。

チョウセンニンジン (パナクス種) は 5000 年以上にわたって漢方薬として使用されているアジアの有名な薬草です。薬理作用のある主な化合物 (ジンセノシド類) はトリテルペンサポニン群であり、ここ 1 年のあいだに 80 種以上がエレクトロスプレー質量分析によって分離/解析されています¹。チョウセンニジンの根の抽出物などの複雑な天然抽出物を分析する際の理想的なメソッドは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) です²。複雑で似通ったジンセノシド類の構造決定には、精密質量測定、MS/MS、および MS_n によって構造を解明する最新式の LC/MS 装置が使用されています³。

本アプリケーションノートでは、複雑な天然抽出物から既知化合物の検出や未知化合物の同定にアジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアを利用したコンピュータ支援型ワークフローの実例を示します。チョウセンニジンの根の抽出物の成分を例として使用します。分析は、Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムによる精密な質量測定に基づくものです。

実験手法

機器

- Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システム、システム構成は、Agilent 1200 シリーズ バイナリポンプ SL (デガッサ付き)、Agilent 1200 シリーズの高速オートサンブラ SL (サーモスタット付き)、Agilent 1200 シリーズのカラムコンパートメント (TCC)、Agilent 1200 シリーズ ダイオードアレイ検出器 SL (DAD SL)
- Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システム (質量較正用のデュアルスプレーインターフェイスを装備)
- Agilent ZORBAX SB-C18 カラム、2.1 x 150 mm、1.8 μm
- Agilent MassHunter Workstation ソフトウェア、データの取り込みと分析に使用 (定性分析ソフトウェアは MetID)

サンプル前処理

チョウセンニジンの根の凍結乾燥粉末の 2 つのサンプル (それぞれ 1 g) を 10 mL のメタノールに溶かし、30 分間超音波処理してからろ過したものをそのまま分析に使用しました。使用したサンプルは次のものです。

- アジア産チョウセンニンジン (学名: パナクス・ジンセン)、韓国の ILHWA 社から購入
- 北米産チョウセンニンジン (学名: パナクス・キンケフォリウス)、ドイツのタウフキルヒエンの Sigma-Aldrich 社から購入

内標準溶液として用意したレセルピン (C₃₃H₄₀N₂O₉) (分子量 (MW) 608.2733) 濃度は 10 ng/mL です。この標準溶液に天然抽出物を 10:1 の比率で混ぜ、最終濃度 1 ng/mL のレセルピン溶液を作ります。10 μL の注入を行って、10 pg のレセルピンをカラムに送ります。

メソッド

LC 条件:

- 溶媒 A: 水 / 0.1 % のギ酸 (FA)
- 溶媒 B: アセトニトリル / 0.1 % のギ酸
- 流量: 0.5 mL/min
- グラジエント: 0 分 B の濃度 5 % から、1 分で B の濃度を 5 % に、30 分で B の濃度を 95 % に
- ストップタイム: 30 分
- ポストタイム: 15 分
- 注入量: 10 μL
- 温度制御オートサンブラの温度: 4 °C
- 自動ディレイボリュームリダクション: ON
- カラム温度: 50 °C
- DAD SL: 220 nm/4、リファレンス 360 nm/16
- フローセル: 2 μL (光路長 10 mm)

Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF

LC/MS システムの運転条件:

- イオン源: ポジティブモードのエレクトロスプレー (ESI) とリファレンス質量 (121.05087 m/z および 922.00980 m/z) 用のデュアルスプレー
- 乾燥ガス: 12 L/min
- 乾燥ガスの温度: 200 °C
- ネブライザガス圧: 60 psi
- スキャン範囲: 200–1300
- フラグメンタ電圧: 150 V
- スキマー電圧: 60 V
- キャピラリー電圧: 3000 V
- データ依存型 MS/MS: 2 MS および 2 MS/MS スペクトル /sec、MS/MS については、MS あたり 2 化合物、2 MS/MS スペクトルごとに 0.25 分間のプリカーサーイオンの自動排除

データ分析

データ分析の第1ステップでは、アジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアでアジア産チョウセンニンジン(パナクス・ジンセン)に関する Q-TOF 分析のデータファイルを開き、分子特徴抽出 (MFE) アルゴリズムに基づいて化合物情報を抽出します。分子特徴の抽出は、添加量の少ない化合物、レセルピンに合わせて最適化します。分子特徴が抽出されると、すべての MFE 化合物の抽出イオンクロマトグラム (EIC) が表示されます。この化合物データを、カスタマイズした Agilent METLIN Personal 代謝物データベースにある天然物のデータと比較します。このデータベースには、正確な質量とリテンションタイム情報が収められています。最後に、正確な質量に基づいて全化合物の分子式を計算します。

データ分析の第2ステップでは、サンプルに含まれる未知の化合物を詳しく調べて新たな天然化合物を同定します。同定作業にあたっては、まず、同じ元サンプルに含まれる大部分の天然化合物は既知化合物の誘導体であるため既知化合物との比較によって同定可能なものであるという推定を立てました。この推定に基づいて、既知化合物の1つをリファレンスとして使用し、同位体パターン、MS/MS フラグメンテーションパターン、および質量シフトの特徴の似通った化合物を残りの化合物から検索しました。こうした検索には、アジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアに実装されているアルゴリズムを使用します。

第3ステップでは、前に分析したサンプル(アジア産チョウセンニンジン、パナクス・ジンセン)と、このサンプルと関連性はあっても異なるサンプル(北米産チョウセンニンジン、パナクス・キンケフォリウス)との比較を行います。この比較では、新しいサンプルの含有化合物を次の3つのグループに分けました。

1) まったく新しい化合物

- 2) レスポンス(検出量)の増えた化合物
- 3) レスポンス(検出量)の減った化合物

その後、アジア産チョウセンニンジンに含有される特定の化合物をリファレンス化合物として使用し、北米産チョウセンニンジンにしか検出されなかった化合物群の中から、リファレンス化合物と関連性のある化合物を検索しました。

結果と考察

ステップ 1:

既知の化合物の同定

Agilent 1200シリーズRRLCシステムと、ZORBAX Rapid Resolutionハイスループット(RRHT)カラムを使用してアジア産チョウセンニンジン(パナクス・ジンセン)の根の抽出物の成分を分離した後、Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムで溶出化合物の精密な

質量測定を行いました。この高分解能 LC/MS 装置は、天然抽出物の主要成分および微量成分の分離に優れた性能を発揮しました。この分析から得たデータファイルのアジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアによる前述のデータ比較分析にかけます。データの比較には、Agilent METLIN Personal 代謝物データベースをカスタマイズしたデータベースを使用しました。このデータベースは、主要なジンセノシド化合物の正確な質量、リテンションタイム(RT)、および構造情報が含まれたものです。

図1に示すように、分析結果の表示パネルには、EIC(抽出イオンクロマトグラム)、ECC(抽出化合物クロマトグラム)、UVトレース、全抽出分子特徴の分子量、データベースとの比較による一致化合物が表示されます。この例では、既知の化合物、ジンセノシド Rb1 ($C_{54}H_{92}O_{23}$ 、MW = 1108.6029、RT = 16.447) が化合物

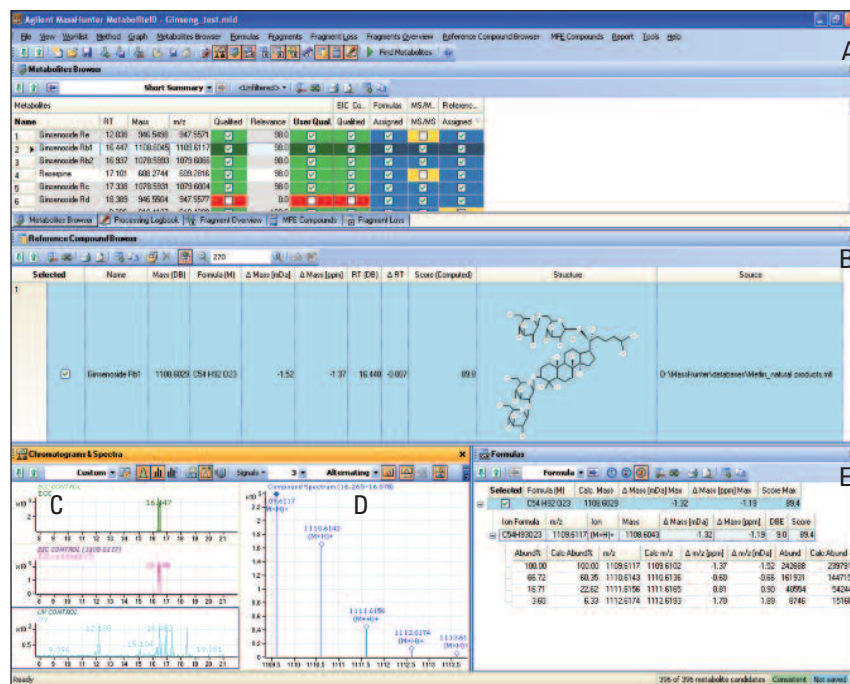


図1 A) 検索結果が一目で分かる一覧表。METLIN データベースの検索と他の検索条件によって絞り込まれた全化合物が一覧表示されます。B) 選択した化合物に関する詳細なデータベース検索結果。分子式、相対質量誤差、リテンションタイム、構造情報が表示されます。C) 詳細なクロマトグラム。選択した化合物の ECC および EIC、ならびに UV トレースが表示されます。D) 詳細な質量スペクトル。選択した化合物の同位体パターンが表示されます。E) 選択した化合物とその同位体パターンの分子式と質量精度の計算結果。

2 と一致しました。

プロトン付加した分子 (m/z 1109.6117) とその同位体パターン¹⁾の質量実測値に基づいて分子量を計算した結果、データベース内の分子式との質量差は -1.37 ppm という極めて僅少な値になることが確認されました。なお、この例では、データベース内の化合物とのリテンションタイムの差が -0.007 分になるものと計算されます。

ステップ 2: 未知化合物の詳細な分析

天然抽出物に含有される未知化合物については、すでに同定されている化合物に類似した化合物であると推定しました。たとえば、既知化合物と同じ化学族に属する物質やその誘導体などです。この比較分析には、同定済みの化合物、ジンセノシド Rb1 をリファレンスとして使用しました。

この比較に最初に使用した属性は、各化合物の同位体パターン¹⁾実測値です。この比較では、すべての同位体パターン¹⁾実測値をリファレンス化合物、ジンセノシド Rb1 ($C_{54}H_{92}O_{23}$ 、 $m/z = 1109.6108$ 、 $RT = 16.447$) の同位体パターン¹⁾計算値 (CIP) と照合しました。アジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアの同位体パターン¹⁾照合アルゴリズムでは、所定の一致スコアを上回るすべての化合物にマークが付けられます。そうした化合物のうちの 1 つが、分子量 1194.6034、リテンションタイム 16.612~16.890 分の化合物でした (図 2)。 $C_{57}H_{94}O_{26}$ という算出分子式が最も高い一致スコアを示し、質量差も 0.09 ppm と僅少です (図 3)。この未知化合物の質量は、リファレンス化合物に $C_3H_2O_3$ を加えた質量に相当します。

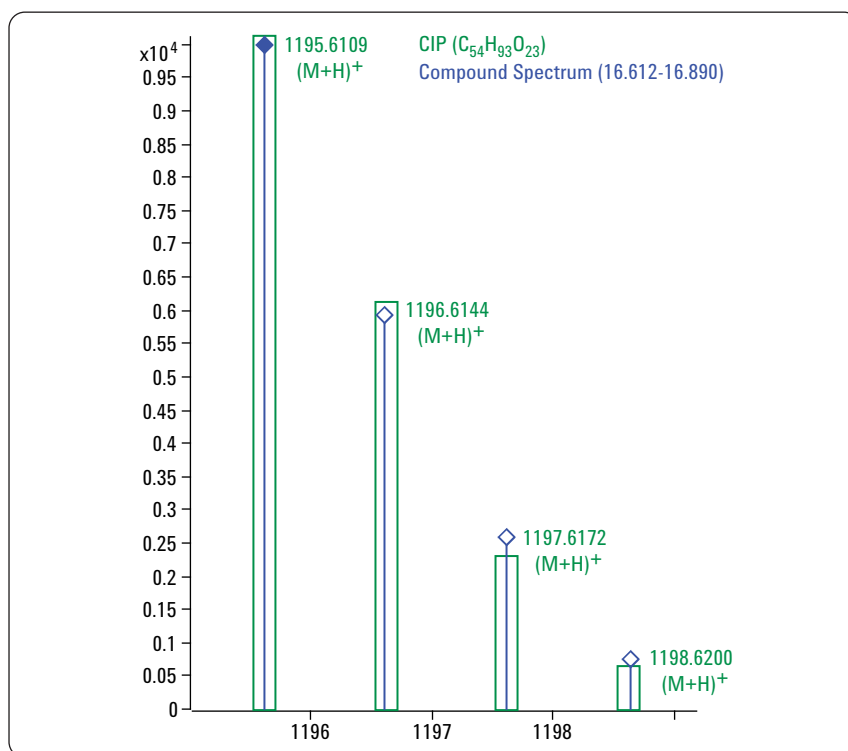


図 2 m/z 1195.6109 の化合物スペクトルの同位体パターン¹⁾実測値 (RT 16.612~16.890 分) とジンセノシド Rb1 の同位体パターン¹⁾計算値 (CIP、緑色の枠) との照合

Selected	Formula (M)	Calc. Mass	Δ Mass [mDa] Max	Δ Mass [ppm] Max	Score Max
<input checked="" type="checkbox"/>	C57H94O26	1194.6033	-0.10	-0.09	97.6

Ion Formula	m/z	Ion	Mass	Δ Mass [mDa]	Δ Mass [ppm]	DBE	Score
C57H95O26	1195.6109	[M+H] ⁺	1194.6034	-0.10	-0.09	11.0	97.6

Abund%	Calc Abund%	m/z	Calc m/z	Δ m/z [ppm]	Δ m/z [mDa]	Abund	Calc Abund
100.00	100.00	1195.6109	1195.6106	-0.28	-0.33	10115	9680
57.49	63.73	1196.6131	1196.6140	0.80	0.96	5815	6169
24.34	25.32	1197.6152	1197.6169	1.42	1.70	2462	2451
6.26	7.51	1198.6327	1198.6197	-10.88	-13.05	634	727

図 3 m/z 比 1195.6109 の化合物の算出分子式、同位体パターン¹⁾との一致、計算された絶対質量および質量差

類似化合物の検索条件に指定した 2 つ目の属性は MS/MS スペクトルです。化合物を絞り込むために、取得したすべての MS/MS スペクトルをリファレンス化合物、ジンセノシド Rb1 のスペクトルと比較しました (図 4)。このスペクトルの中から、類似化合物に特有なフラグメントが確認されました。確認されたフラグメントは典型的な糖成分で、主要なステロイド系に由来するものです。すべてのフラグメントについて、イオン組成式と質量精度を計算しました (表 1)。

この比較をマニュアルで行えるようにするために、フラグメントパターン照合アルゴリズムによって専用のフラグメント総括グラフが生成されます (図 5)。この総括グラフには、ジンセノシド Rb1 の MS/MS スペクトルと比較する形で、すべての化合物の MS/MS フラグメントが表示されます。フラグメント質量を X 軸に、その化合物のリテンションタイムを Y 軸にとったフラグメント質量のグラフが表示されます。フラグメント質量が比較化合物、ジンセノシド Rb1 に含まれるものと一致する化合物だけを選択しました。グラフ内でグレーの帯として示されているものがこれにあたります。m/z 325 という整数質量のフラグメントをもつ新規化合物を詳しく調べました。リテンションタイム 16.7 分の化合物には、この他にも、m/z 比 407、425、443 という整数質量の特有なフラグメントが見られました。

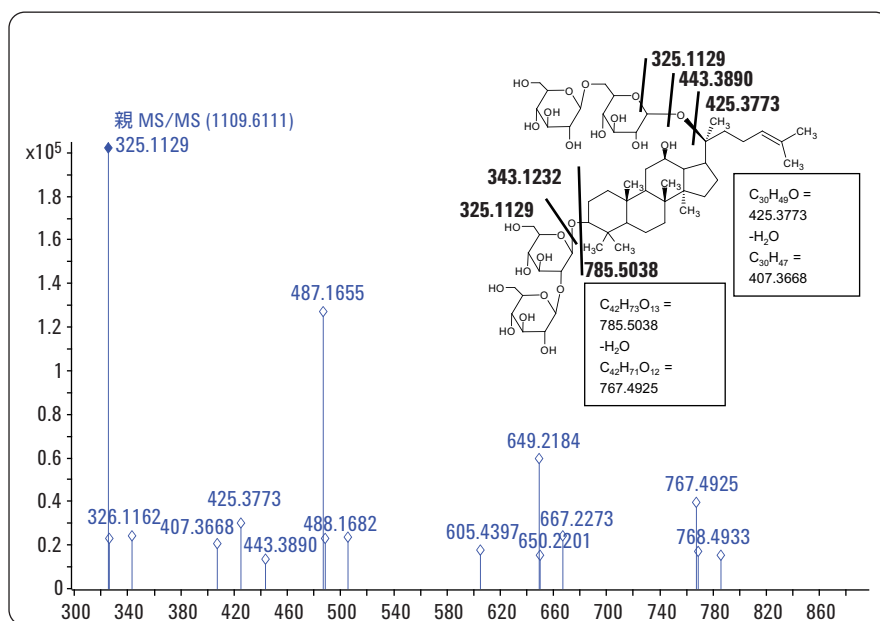


図 4 ジンセノシド Rb1 の MS/MS スペクトルとフラグメント解釈 (関連参照項目: 表 1)

m/z	イオン組成式	m/z の計算値	$\Delta m/z$ [mDa]	$\Delta m/z$ [ppm]	ニュートラルロス	ロス組成式	ロス質量
163.0596	C ₆ H ₁₁ O ₅	163.06010	0.48	2.92	946.5515	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	946.5501
325.1129	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀	325.11292	0.01	0.02	784.4982	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	784.4973
343.1232	C ₁₂ H ₂₃ O ₁₁	343.12349	0.24	0.71	766.4878	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	766.4867
407.3668	C ₃₀ H ₄₇	407.36723	0.45	1.10	702.2443	C ₂₄ H ₄₆ O ₂₃	702.2430
425.3773	C ₃₀ H ₄₉ O	425.37779	0.51	1.21	684.2338	C ₂₄ H ₄₄ O ₂₂	684.2324
443.3890	C ₃₀ H ₅₁ O ₂	443.38836	-0.69	-1.56	666.2220	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	666.2219
487.1655	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₅	487.16575	0.26	0.54	622.4456	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	622.4445
505.1757	C ₁₈ H ₃₃ O ₁₆	505.17631	0.65	1.30	604.4354	C ₃₆ H ₆₀ O ₇	604.4339
605.4397	C ₃₆ H ₆₁ O ₇	605.44118	1.50	2.48	504.1714	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504.1690
649.2184	C ₂₄ H ₄₁ O ₂₀	649.21857	0.16	0.24	460.3927	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	460.3916
667.2273	C ₂₄ H ₄₃ O ₂₁	667.22913	1.87	2.80	442.3838	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.3811
767.4925	C ₄₂ H ₇₁ O ₁₂	767.49400	1.53	1.99	342.1186	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.1162
785.5038	C ₄₂ H ₇₃ O ₁₃	785.50457	0.75	0.96	324.1073	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	324.1056
929.5454	C ₄₈ H ₈₁ O ₁₇	929.54683	1.43	1.54	180.0657	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634
1109.6118	C ₅₄ H ₉₃ O ₂₃	1109.61020	-1.32	-1.19			

表 1 ジンセノシド Rb1 の MS/MS フラグメント、算出組成式、および質量精度

リファレンス化合物、ジンセノシド Rb1 の MS/MS スペクトルと照らし合わせてこの化合物の MS/MS スペクトルを詳しく調べてみると、m/z 比 325.1138、407.3666、425.3778、および 443.3906 におけるフラグメントは、この化合物分子のグルコース部分とステロイド構造体のフラグメントであると解釈できることが分かりました (図 6)。

この段階で、全データセットからリファレンス化合物、ジンセノシド Rb1 の誘導体を検索しました。この検索では、組成式変化検索リストという形で親の分子式の変化形を検索対象に含めました。検索によって得られた化合物の質量および分子式がソフトウェアによって計算され、同定済みの化合物との照合が行われました。この方法により、m/z 比 1195.6109、リテンションタイム 16.7 の化合物は、ジンセノシド Rb1 のマロニル誘導体 (mRb1) であり、 $C_3H_2O_3$ 部分の異なるもの (質量差 86.0004) と解釈されました⁴。この追加情報により、MS/MS スペクトルに含まれる m/z 比 411.1119 および 249.0590 のフラグメントが解釈され、その構造が同定されました (図 6)。質量、分子式、親のニュートラルロス、質量精度、誘導体化による質量シフト、リファレンスの質量シフトなど、すべての MS/MS フラグメントに関する詳細な情報を表 2 に示します。

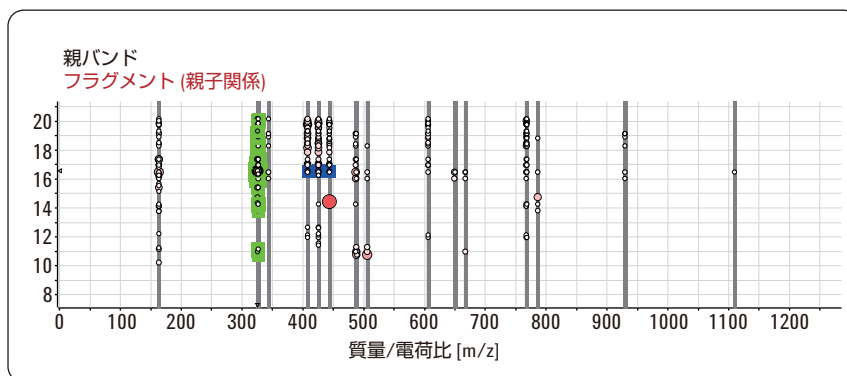


図 5 フラグメント総括グラフ。m/z 比 325 という整数質量のフラグメント (緑色で強調表示された部分) のある化合物を詳しく調べました。リテンションタイム 16.7 分の化合物には、この他にも、m/z 比 407、425、443 という整数質量の特有なフラグメント (青色で強調表示された部分) が見られます。

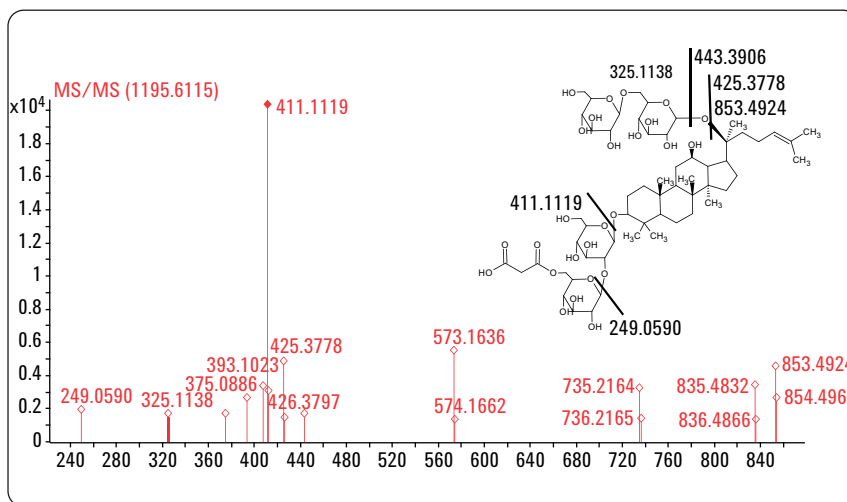


図 6 m/z 比 1195.6115、RT 16.7 分の化合物の MS/MS スペクトルと、これに基づいて算出された構造と解析された主要フラグメント

m/z	イオン組成式	m/z の計算値	$\Delta m/z$ [mDa]	$\Delta m/z$ [ppm]	ニュートラルロス	ロス組成式	ロス質量	FPM m/z	m/z** シフト	Δ [mDa]**	組成式シフト
127.1110	$C_8H_{15}O$	127.11174	0.74	5.80	1068.50045	$C_{49}H_{80}O_{25}$	1068.49887				
249.0590	$C_9H_{13}O_8$	249.06049	1.53	6.14	946.55249	$C_{48}H_{82}O_{18}$	946.55012				
325.1138	$C_{12}H_{21}O_{10}$	325.11292	-0.90	-2.77	870.49763	$C_{45}H_{74}O_{16}$	870.49769	325.1129		0.91	
375.0886	$C_{15}H_{19}O_{11}$	375.09219	3.57	9.53	820.52284	$C_{42}H_{76}O_{15}$	820.51842				
393.1023	$C_{15}H_{21}O_{12}$	393.10275	0.43	1.08	802.50912	$C_{42}H_{74}O_{14}$	802.50786				
407.3666	$C_{30}H_{47}$	407.36723	0.58	1.42	788.24480	$C_{27}H_{48}O_{26}$	788.24338	407.3668		0.13	
411.1119	$C_{15}H_{23}O_{13}$	411.11332	1.44	3.50	784.49957	$C_{42}H_{72}O_{13}$	784.49729	325.1129	86.0004	1.43	$C_3H_2O_3$
425.3778	$C_{30}H_{49}O$	425.37779	-0.05	-0.11	770.23361	$C_{27}H_{46}O_{25}$	770.23282	425.3773		0.56	
443.3906	$C_{30}H_{51}O_2$	443.38836	-2.25	-5.07	752.22085	$C_{27}H_{44}O_{24}$	752.22225	443.3890		1.56	
573.1636	$C_{27}H_{33}O_{18}$	573.16614	2.50	4.36	622.44781	$C_{36}H_{62}O_8$	622.44447	487.1655	86.0004	2.24	$C_3H_2O_3$
735.2164	$C_{27}H_{43}O_{23}$	735.21896	2.51	3.42	460.39500	$C_{30}H_{52}O_3$	460.39165	649.2184	86.0004	2.36	$C_3H_2O_3$
835.4832	$C_{45}H_{71}O_{14}$	835.48383	0.68	0.82	360.12830	$C_{12}H_{24}O_{12}$	360.12678				
853.4924	$C_{45}H_{73}O_{15}$	853.49440	2.02	2.37	342.11907	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.11621	767.4925	86.0004	0.49	$C_3H_2O_3$

*FPM = 元の (リファレンス) 化合物に含まれる類似フラグメントの m/z 値。**シフト m/z = 元の (リファレンス) 化合物にあるフラグメントと誘導体を含んだフラグメントとの質量差 = 誘導体化による質量シフト。*** Δ シフト [mDa] = [(FPM m/z + シフト m/z) - m/z] * 1000 = リファレンスの質量シフト。

表 2

ジンセノシド、Rb1 のマロニル誘導体 (mRb1) の MS/MS フラグメントとその詳細データ (質量、算出分子式、質量精度、親のニュートラルロス、誘導体化による質量シフト、リファレンスの質量シフト)

ステップ 3: 2 つのサンプルに含まれる成分の示差分析

天然抽出物の内容は、同族の植物であっても種によって異なる場合が多く、同じ種であっても生育環境によって異なったものになることがあります。チョウセンニンジンという植物には、成分の組成や濃度の異なるさまざまな亜種があります⁵。亜種や関連医薬品の識別は、LC/MS による各種ジエンセノシド類の内容や含有量の分析/定量によって可能になります⁶。

このような天然抽出物を調べる際には、調査対象の抽出物を十分に調査されている関連天然抽出物と比較する方法がとられます。この比較作業にはアジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアを利用することができます。この分子特徴抽出プログラムによって双方のサンプルデータファイルから一連の化合物を抽出し、双方の化合物群を比較します。化合物を次の 3 つのクラスに分けて比較を行います。

- 1) 新規化合物
- 2) どちらのサンプルにも存在するが、調査対象サンプルでレスポンス (検出量) の増えた化合物
- 3) どちらのサンプルにも存在するが、調査対象サンプルでレスポンス (検出量) の減った化合物。

この調査では、北米産チョウセンニンジン (パナクス・キンケフォリウス) を、前に調査したアジア産チョウセンニンジン (パナクス・ジンセン) の抽出物と比較しました。双方の化合物群のアライメントと標準化を行うために、レセルピンとジエンセノシド Rb1 (双方のサンプルに同量存在する化合物) を内標準として使用しました。

北米産チョウセンニンジンサンプルで量が増えた化合物の例としては、 m/z 801.5012 の化合物が挙げられます。この化合物は、アジア産チョウセンニンジンに対し 8.5 倍に増えています (図 7)。

北米産チョウセンニンジンサンプルとア

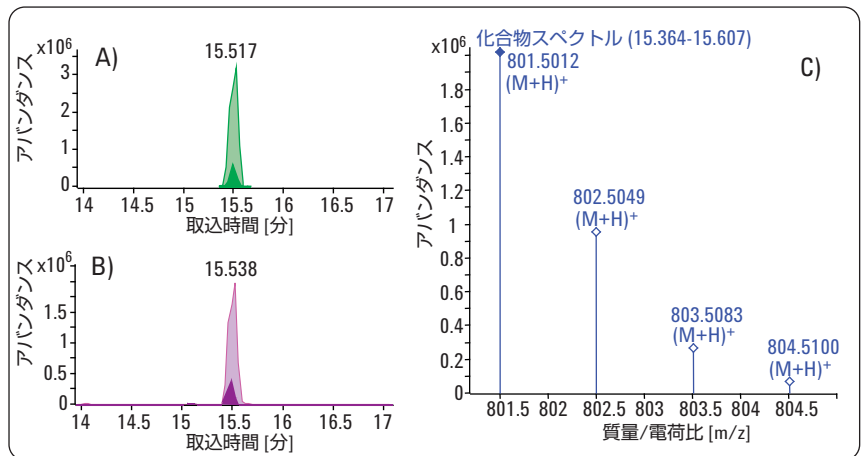


図 7 m/z 比 801.5012、RT 15.5 分の化合物に関するアジア産と北米産のチョウセンニンジン比較
A) 北米産チョウセンニンジンサンプルでレスポンスの増えた質量 800.4940 の化合物に関する抽出化合物クロマトグラム (ECC)
B) m/z 比 801.5012 の化合物に関する抽出イオンクロマトグラム (EIC)
C) m/z 比 801.5020 の化合物の同位体パターン

Selected	Formula (M)	Calc. Mass	Δ Mass [mDa] Max	Δ Mass [ppm] Max	Score Max
<input checked="" type="checkbox"/>	C42H72O14	800.4922	-1.78	-2.22	96.7

Ion Formula	m/z	Ion	Mass	Δ Mass [mDa]	Δ Mass [ppm]	DBE	Score
C42H73O14	801.5012	(M+H) ⁺	800.4940	-1.78	-2.22	7.0	96.7

Abund%	Calc Abund%	m/z	Calc m/z	Δ m/z [ppm]	Δ m/z [mDa]	Abund	Calc Abund
100.00	100.00	801.5012	801.4995	-2.19	-1.75	2044940	1996839
45.47	46.80	802.5049	802.5029	-2.48	-1.99	929787	934500
11.84	13.58	803.5083	803.5058	-3.15	-2.53	242157	271209
2.17	2.94	804.5100	804.5086	-1.74	-1.40	44377	58713

図 8 北米産チョウセンニンジンサンプルで 8.5 倍に増えた擬似ジエンセノシド化合物、F11 の質量の実測値/計算値、算出組成式、および算出質量誤差

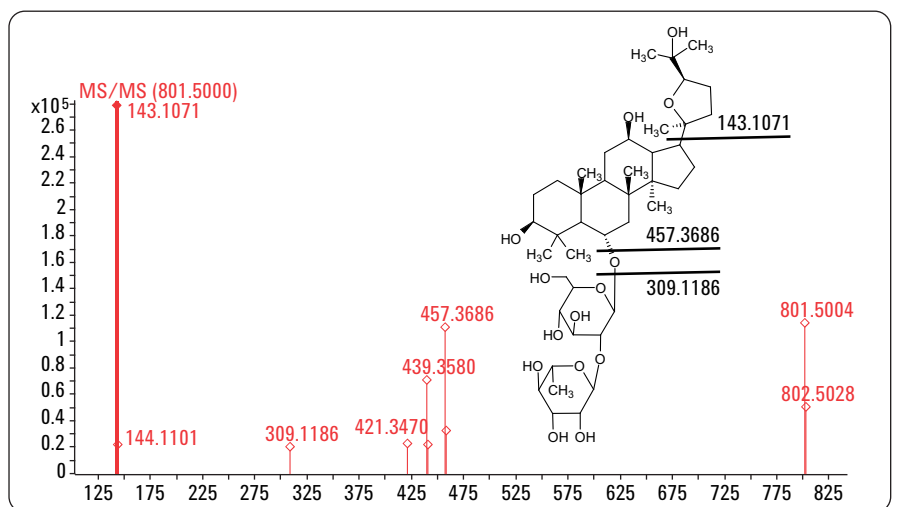


図 9 擬似ジエンセノシド、F11 の MS/MS スペクトルと構造解釈

ジア産チヨウセンニンジンの対照サンプルに関するそれぞれの抽出化合物クロマトグラム/抽出イオンクロマトグラム (ECC/EIC) を見比べれば、レスポンスの増加がはっきりと分かります (図 7)。m/z 比 801.5012 のこの化合物については、分子式が $C_{42}H_{72}O_{14}$ 、分子量が 800.4940、質量誤差が 2.22 ppm と計算されました。この分子式と分子量は、疑似ジンセノシド、F11の値と一致します (図 8)。MS/MS スペクトルで得られたフラグメントはこの化合物の構造と一致し (図 9)、こうしたフラグメントの分子式の計算結果から質量誤差は僅少であることが分かりました (表 3)。

結論

本アプリケーションノートは、極めて複雑な天然植物の抽出物に含まれる有機化合物の同定作業にソフトウェアを利用するワークフロー概念の実例を示すものです。ここでは、Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムを使用して極めて複雑なチヨウセンニンジンの抽出物を分析しました。データファイルの処理には、アジレント MassHunter Metabolite ID ソフトウェアを使用しました。ソフトウェア支援分析により、第 1 ステップではデータベース検索によって既知の化合物を同定しました。第 2 ステップでは、同定済みの化合物との類似性をソフトウェアで検索することにより未知の化合物を同定しました。この際、同位体パターン照合アルゴリズムと MS/MS フラグメントパターン照合アルゴリズムを使用しました。フラグメントパターン照合結果の解釈および精密質量測定に基づいた分子式計算により抽出物の主要成分であるジンセノシド類の複雑な構造を解明しました。第 3 ステップでは、解明済みのサンプルと別のチヨウセンニンジン種から得た新規サンプルを比較し、新規化合物と量が増えた化合物を特定しました。

m/z	イオン組成式	m/z の計算値	Δ m/z [mDa]	Δ m/z [ppm]	ニュートラルロス	ロス組成式	ロス質量
143.1071	$C_8H_{15}O_2$	143.10666	-0.44	-3.09	658.39290	$C_{34}H_{58}O_{12}$	658.39283
309.1186	$C_{12}H_{21}O_9$	309.11801	-0.58	-1.88	492.38141	$C_{30}H_{52}O_5$	492.38147
421.3470	$C_{30}H_{45}O$	421.34649	-0.49	-1.16	380.15302	$C_{12}H_{26}O_{13}$	380.15299
439.3580	$C_{30}H_{47}O_2$	439.35706	-0.94	-2.13	362.14200	$C_{12}H_{26}O_{12}$	362.14243
457.3686	$C_{30}H_{49}O_3$	457.36762	-0.99	-2.17	344.13138	$C_{12}H_{24}O_{11}$	344.13186
801.5004	$C_{42}H_{72}O_{14}$	801.49950	-0.92	-1.14			

表 3
疑似ジンセノシド、F11の MS/MS フラグメント質量と、これに基づいて算出された組成式と質量精度

References

1. Liu, S., Cui, M., Liu, Z., Song, F., Mob, W., "Structural analysis of saponins from medical herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15:133-144, **2004**.
2. Fuzzati, N., "Analysis methods of ginsenosides," *J. Chrom. B* 812:119-133, **2004**.
3. Wang, X., Sakuma, T., Asafu-Adjaye, E., Shiu, G. K., "Determination of ginsenosides in plant extracts from Panax ginseng and Panax quinquefolius L. by LC/MS/MS," *Anal. Chem.* 71:1579-1584, **1999**.
4. Kite, G. C., Howes, M. J. R., Leon, C. J., Simmonds, M. S. J., "Liquid chromatography/mass spectrometry of malonyl-ginsenosides in the authentication of ginseng," *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17:238-244, **2003**.
5. Li, W., Gu, C., Zhang, H., Awang, D. V. C., Fitzloff, J. F., Fong, H. H. S., van Breemen, R. B., "Use of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to distinguish Panax ginseng C. A. Meyer (Asian ginseng) and Panax quinquefolius L. (North American ginseng)," *Anal. Chem.* 72:5417-5422, **2000**.
6. Chan, T. D. W., But, P. P. H., Cheng, S. W., Kwok, I. M. Y., Lau, F. W., Xu, H. X., "Differentiation and authentication of Panax ginseng, Panax quinquefolius, and ginseng products by using HPLC/MS," *Anal. Chem.* 72:1281-1287, **2000**.

www.agilent.com/chem/jp

本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published January 1, 2009
Publication Number 5990-3234JAJP



Agilent Technologies