APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY TO THE IDENTIFICATION OF ANTHOCYANINS IN THAI BLACK RICE CULTIVARS

KITSADA PITIJA

MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
FEBRUARY 2009

APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY TO THE IDENTIFICATION OF ANTHOCYANINS IN THAI BLACK RICE CULTIVARS

KITSADA PITIJA

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN

PARTAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

IN CHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL

CHIANG MAI UNIVERSITY

FEBRUARY 2009

APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY TO THE IDENTIFICATION OF ANTHOCYANINS IN THAI BLACK RICE CULTIVARS

KITSADA PITIJA

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED

TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

IN CHEMISTRY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON

Dr. Apiwat Baramee

.....MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai

.....MEMBER

Dr. Prasat Kittakoop

13 February 2009

ACKNOWLEDMENTS

The author would like to express his heartfelt gratitude and appreciation to his supervisor, Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai, for his kind supervision and valuable guidance throughout this research work.

The author would like to express his sincere thanks to Dr. Apiwat Baramee and Dr. Prasat Kittakoop for their thoughtful advice and suggestion.

The author gratefully acknowledges the technique service rendered by Mr. Pisan Kitsawatpaiboon and Mrs. Saifon Uttip and useful suggestion.

The author also would like to take this opportunity to thank the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, for kindly providing him with laboratory and library facilities which have made this study possible.

I gratefully thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the Graduate School Chiang Mai University for financial supports.

The author is profoundly grateful to his family for their tender love, continual care and encouragement during his study in the M.Sc. program. Finally, the author thank to all of his friends in Rice Chemistry Research Group, the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University.

Kitsada Pitija

Thesis Title	Application of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry to the Identification of Anthocyanins in Thai Black Rice Cultivars
Author	Mr. Kitsada Pitija
Degree	Master of science (Chemistry)
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Sugunya Wongpornchai

ABSTRACT

The identification of compounds in a group of anthocyanins, which were accumulated in leaves and seed of the black rice cultivar Kumdoisakhet and BGMSN 11, was performed by the use of high performance liquid chromatography (HPLC) having photodiode array as detector together with those techniques employing HPLC combined with an electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and a tandem mass spectrometry (MS/MS).

At the first part of the study, bran of the black rice cultivar Khumdoisakhet was used as sample for the selection of a suitable solvent for extraction and for optimization of HPLC conditions for the separation of components in the crude rice bran extract, as well as the conditions of electrospray ionization in LC-MS technique. It was found that 0.5 % formic acid in methanol was the most appropriate solvent among methanol, methanol:dichloromethane (1:4 v/v), and isopropanol used for extraction of anthocyanins from the black rice bran. The optimum HPLC condition

employed Zorbax Eclipse plus C_{18} with a dimension of 4 × 100 mm and 3 μm particle sizes as a chromatographic column. The mobile phase consisted of methanol and 0.5% acetic acid in water at the ratio of 10:90 (v/v) with a flow rate of 0.4 ml/min. The optimized ESI condition resulted in the following parameters; fragmentor voltage 110 V, capillary voltage 3500 V, drying gas temperature 350 °C, drying gas flow 12 ml/min, and nebulizer pressure 30 psi. The informative product ion mass spectra useful for structural characterization of the black rice anthocyanins were obtained by performing collision induced dissociation (CID) with argon as a collision gas at energies of 15, 20 and 25 V.

Positions of anthocyanins in each HPLC profile of the crude rice sample extracts were determined by the use of data processing in reconstructed ion chromatogram mode monitoring at a specific ion mass corresponding to the characteristic or molecular ion of the anthocyanins of interest. These anthocyanins were confirmed by their UV-Vis spectra obtained by DAD. Structural characterization of the black rice anthocyanins was then performed by analyzing their ESI-MS and ESI-MS/MS spectra, which revealed the presence of ten anthocyanins, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside, peonidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, and peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, and the two tentatively identified anthocyanins; cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside, and cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside. Among these identified anthocyanins, cyanidin-3-*O*-

diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(p-coumaroly)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucosid, peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, and malvidin-3-*O*-(p-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, were found in leaves or seed of black rices for the first time by this study.

The relative contents of each anthocyanin in the extracts of leaves and seed of the two black rice cultivars at seven growth stages; seeding, tillering, booting, milk grain, dough grain, maturation, and post harvest, were determined by the use of LC-ESI-MS. Results revealed that the accumulation of anthocyanins in each part of the rice plant, leaf or seed, was dependent of their chemical structures with a number of sugar and acylate groups. Monoglycosidic anthocyanins such as cyanidin-3-*O*-glucoside and peonidin-3-*O*-glucoside were only found in seed of the black rice cultivar BGMSN 11 that has green leaves, but found in both leaves and seed of the cultivar Kumdoisakhet, of which its leaves are purple-black. Anthocyanins with two or three sugars or acylate groups tended to stay in the leaf part, generally their contents were highest in leaves at booting stage, except for peonidin-3-*O*-diglucoside and peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside that were found in both leaves and seed. Overall, there was no correlation among the structures of anthocyanins, their relative contents, and growth stages of both black rice cultivars.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การประยุกต์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรีและแทนเดมแมสสเปกโทรเมตรีในการระบุเอกลักษณ์ของแอนโทไซยานินในข้าวดำพันธุ์ไทย
ผู้เขียน	นาย กฤษดา ปีติจะ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สุกัญญา วงศ์พรชัย

บทคัดย่อ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารกลุ่มแอนโทรไซยานินที่สะสมในใบและเมล็ดข้าวสีดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดและบีจีเอ็มเอสเอ็ม ๑๑ ทำโดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีโฟโตไดโอดแอเรย์เป็นตัวตรวจวัด และเทคนิคคู่ควบระหว่างเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโท กราฟี (HPLC) และเทคนิคการแตกตัวเป็นไอออนด้วยไฟฟ้าของแมสสเปกโทรเมตรี (ESI-MS) และ แมสเปคโทรเมตรีแบบต่อเรียงกัน (MS/MS)

ในการศึกษาเบื้องต้นรำของข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดและสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการแยกสารสกัดหยาบของข้าวด้วย HPLC และสภาวะที่เหมาะสมของการแตกตัวเป็นไอออนด้วยไฟฟ้าวิเคราะห์ใน LC-MS พบว่าสารละลายของกรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.5 % ในเมทานอลให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีกว่า เมทานอล, เมทานอลผสมไดคลอโรมีเทน (1:4 โดยปริมาตร) และไอโซโพรพานอลในการสกัดแอนโทรไซยานินจากรำข้าว สภาวะที่เหมาะสมของการแยกด้วยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ Zorbax Eclipse plus

C_{18} ที่มีขนาด 3 × 100 มิลลิเมตร และขนาดอนุภาคเท่ากับ 3 ไมโครเมตร โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและสารสะลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5% ที่สัดส่วน 10:90 โดยปริมาตร และมีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะที่เหมาะสมของระบบการแตกตัวเป็นไอออนด้วยไฟฟ้าใช้ความต่างศักย์ในการแตกไอออน 110 โวลท์, ความต่างศักย์ที่ในหลอดแคปปิลลารี 3500 โวลท์, อุณหภูมิของแก๊ซร้อนที่ใช้ในการระเหยแห้ง 350 องศาเซลเซียส, อัตราการไหลของแก๊ซร้อนที่ใช้ในการระเหยแห้ง 12 ลิตรต่อนาทีและ ความดันของแก๊ซที่ใช้ในผลักของเหลวให้แตกตัวเป็นละอองแก๊ซ 30 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แมสสเปกตรัมของไอออนผลผลิตที่ให้ข้อมูลโครงสร้างทางเคมีหาได้จากการแตกไอออนหลักด้วยเทคนิคการแตกตัวแบบเหนี่ยวนำด้วยการชน (CID) ที่ใช้อาร์กอนเป็นแก๊สตัวชนและใช้พลังงานการชนเท่ากับ 15, 20 และ 25 อิเล็คตรอนโวลท์

ตำแหน่งของสารแอนโทรไซยานินบนโครมาโทแกรมของการแยกสารสกัดหยาบด้วย HPLC หาโดยการสร้างโครมาโทแกรมของไอออน ที่มีมวลที่สนใจซึ่งมีค่าเท่ากับมวลต่อประจุของไอออนที่เป็นลักษณะเฉพาะหรือไอออนโมเลกุลของสารแอนโทรไซยานิน ร่วมกับการยืนยันตำแหน่งดังกล่าวด้วย ยูวี-วิซิเบิ้ล สเปกตรัม ที่ได้จากตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอเรย์ การวิเคราะห์แมสสเปกตรัมปกติและแมสสเปกตรัมของไอออนผลผลิต ที่ตำแหน่งเวลารีเทนชันดังกล่าวในขั้นต่อมานำไปสู่การวินิจฉัยลักษณะเฉพาะของสารแอนโทรไซยานินในข้าวสีดำทั้งสองพันธุ์ได้จำนวน 10 โครงสร้าง ได้แก่ cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-rhamnoside, peonidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside, cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucoside, malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucoside, และ

peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside และสารประกอบแอนโทไซยานิน 2 โครงสร้างที่ยังไม่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้แน่นอนคือ cyanidin-3-*O*-xyloside glucoside และ cyanidin-3-*O*-xyloside-glucoside โดย cyanidin-3-*O*-diglucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroly)glucoside-5-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-(feruloyl)glucoside-5-*O*-glucoside, peonidin-3-*O*-diglucosid, peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside, และ malvidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-glucosiden ถูกพบในใบและเมล็ดของข้าวสีดำเป็นครั้งแรกในการศึกษานี้

การวิเคราะห์ปริมาณสัมพัทธ์ของสารแอนโทรไซยานินแต่ละตัวในสารสกัดของใบและเมล็ดข้าวสีดำทั้งสองพันธุ์ ที่เจ็ดระยะการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะที่เป็นต้นกล้า ระยะแตกกอ ระยะตั้งท้อง ระยะน้ำนม ระยะแป้งอ่อน ระยะแก่ของเมล็ด และระยะหลังการเก็บเกี่ยวด้วย LC-ESI-MS พบการสะสมของสารแอนโทรไซยานินในแต่ละส่วนของใบและเมล็ดของข้าวขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างทางเคมีกับจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลและหมู่อัลคิวเลต โดยแอนโทรไซยานินที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดียว ได้แก่ cyanidin-3-*O*-glucoside และ peonidin-3-*O*-glucoside พบเฉพาะในส่วนของเมล็ดของข้าวพันธุ์บีจีเอ็มเอสเอ็ม ๑๑ ซึ่งมีใบสีเขียว แต่พบทั้งในใบและเมล็ดของข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดซึ่งมีใบสีม่วงดำ ส่วนแอนโทรไซยานินที่มีน้ำตาลสองหรือสามโมเลกุลหรือหมู่อัลคิวเลตส่วนใหญ่พบเฉพาะในใบข้าว โดยเฉลี่ยแล้วมีปริมาณสูงที่ระยะตั้งท้อง ยกเว้น peonidin-3-*O*-diglucoside และ peonidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-xyloside ที่พบทั้งในส่วนของใบและเมล็ดข้าวโดยรวมแล้วไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของแอนโทรไซยานินปริมาณสัมพัทธ์และระยะการเจริญเติบโตของข้าวสีดำทั้งสองพันธุ์

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

MeCN	acetonitrile
C_{18}	octadecyl
°C	degree Celsius
CID	collision-induced dissociation
DCM	dichloromethane
ESI	electrospray ionization
eV	electron volt
FI	flow injection
G	gram
HPLC	high performance liquid chromatography
Kg	kilogram
kV	kilovolt
l	liter
LC	liquid chromatography
LC-ESI-MS	liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
MS	mass spectrometry
MS/MS	mass spectrometry-mass spectrometry
min	minute

ml	milliliter
m	meter
MW	molecular weight
m/z	mass-to-charge ratio
MeOH	methanol
mg	milligram
MCP	micro channel plate
nm	nanometer
PDA	photodiode array
ppm	part per million
psi	pound per square inch
Q-TOF	hybrid quadrupole time-of-flight
TICs	total ion chromatograms
TOF	time-of-flight
µl	micro liter
µm	micrometer
UV	ultraviolet
V	volt