

## 健康食品等に含有するポリフェノール類等の分析法の検討

大倉敏裕 大西美知代 青野 眞 武智拓郎

### Analytical Method for Simultaneous Determination of Polyphenols and Furanocoumarins in Health-promoting Food

Toshihiro OHKURA, Michiyo ONISHI, Makoto AONO, Takurou TAKECHI

An analytical method using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) equipped with electrospray ionization (ESI) was demonstrated for the determination of polyphenols, such as anthocyanins (5 compounds), flavanones (5 compounds), flavones (8 compounds), flavonols (6 compounds), isoflavones (6 compounds) and anthraquinones (3 compounds), and furanocoumarins (4 compounds) in so-called health-promoting food.

The HPLC eluted analytes within 26 min, and analytical cycle was 35 min by a sample.

The sample was crushed, powdered with mortar, extracted with methanol and subjected to LC/MS/MS without hydrolysis. The limit of quantification of developed method was 0.1-7.0 $\mu$ g/g(S/N=30) in sample. The recoveries of analytes ranged from 81 to 126%, and the variations in reproducibility ranged from 1.2 to 9.9% and were acceptable for quantitative analysis.

Keywords : polyphenols, furanocoumarins, health-promoting food, liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC/MS/MS

#### はじめに

近年の健康志向の高まりにより、「いわゆる健康食品」は多種多様な製品が市販され、その中には無承認無許可医薬品成分を含有するものがあり、それにより重篤な健康被害が発生している。また、医薬品成分ではないものの、健康に有用であるとして「機能性成分」と称するものを含有する製品も多数市販されており、通常の食品から摂取する量に比較して大量の成分を含有していると考えられる。これらの成分の一部には摂取量の上限が定められた化学物質(大豆イソフラボン)<sup>1)</sup>もあり、今後、過剰摂取等による健康被害が発生することも懸念される。

一方、いわゆるサプリメントとして補完・代替医療として

の期待が大きくなっている現状では、医薬品の服用と併行し摂取する人の割合が増加していると考えられ、医薬品との併用による相互作用が問題となっている<sup>2)</sup>。

これら健康食品等に含まれる化学物質は多種類にわたり、その多成分同時分析法を開発することにより、健康危機発生時等の迅速な原因究明を行う検査体制を確保することが可能となり、また、市販されている健康食品等に含まれる化学物質の量及び摂取量等の実態を調査し、消費者への健康影響を評価するための基礎資料とすることが可能と考える。

健康食品等の素材には様々なものが利用されており<sup>3)</sup>、その多くは植物由来のものである。これらにはポリフェノール類(フラボノイド、アントラキノン等)やカロテノイド等の多種類の成分が含まれており、これらの成分が健康に有用

であると標榜され多くの製品が市販されている。

これらの成分分析法については、果実、野菜等を対象とした方法が報告されており<sup>4-9)</sup>、その多くは配糖体を加水分解しアグリコンとして分析する方法や、吸光度により分析する方法等であり、操作が煩雑であったり、長時間を要するものである。

今回、健康食品のうち、錠剤、カプセル、粉末等の形態をなすものを試料とし、これらに含有する化学物質としてポリフェノール類であるフラボノイド(30化合物)、アントラキノン(3化合物)及び薬物との相互作用が報告されているフラノクマリン(4化合物)<sup>10,11)</sup>について、LC/MS/MS法による迅速な多成分同時分析法を検討したので、その結果を報告する。

## 材料と方法

### 1 装置

質量分析計付高速液体クロマトグラフ(LC/MS)

高速液体クロマトグラフはAlliance 2695(日本ウォーターズ株)を、質量分析計はQuattro micro API(日本ウォーターズ株)を使用した。

### 2 測定条件

測定条件を表1、表2に示した。

### 3 試薬・器具

対象化合物の標準品は和光純薬工業株、ナカライテスク株、ChromaDex, Inc., LKT Laboratories, Inc., Alfa Aesar, Cayman Chemical, MP Biomedicals のものを使用した。アセトニトリル及びメタノールはLC/MS用(関東化学株)を、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)は高速液体クロマトグラフィ用(関東化学株)を、ギ酸は生化学研究用特製試薬(ナカライテスク株)を使用した。ろ過にはPTFE製0.2 $\mu$ mシリンジレスフィルターMini-UniPrep(ワットマン)を使用した。HPLCカラムは, Ascentis Express C18 (2.1mm i.d.  $\times$  150mm, 2.7 $\mu$ m) (SUPELCO)を使用した。

標準液は、精秤した各標準品をメタノール又はDMFで適宜定容し、標準原液(50~100 $\mu$ g/mL)を調製後、DMFで適宜希釈し調製した。

精製水は逆浸透水(RO水)をMilli-Q Gradient-A10超純水製造装置(日本ミリポア株)により精製後使用した。

図1に各化合物の構造式を示した。

### 4 実験操作

試料を磁製乳鉢で粉碎・混和した後、200mgを精秤し、10mLのガラス製ねじ口遠濾管に入れ、内部標準物質のDMF溶液(5 $\mu$ g/mL flavonol)500 $\mu$ Lを加え混和し、5分間超音波処理をし、更に、メタノール4.5mLを加え混和し、再度5分間超音波処理をした後、3000回転/分で5分間遠心分離を行い、その上澄をPTFE製0.2 $\mu$ mシリンジレスフィルターでろ過し試験溶液とし、その2 $\mu$ LをLC/MS/MS分析に供した。

図2に実験操作を示した。

## 結果及び考察

### 1 MS/MS測定条件の検討

イオン化法はLC/MS測定において汎用されているエレクトロスプレーイオン化(ESI)を採用し、より選択性の高い定量分析が可能なMS/MS測定を行うこととした。

MS/MS測定における各化合物のプリカーサイオンを決定するため、フローインジェクション法によりポジティブモード及びネガティブモードでMSスペクトルを測定した。

なお、フローインジェクション法におけるキャリアーは0.1%(w/v)ギ酸を含むアセトニトリル/水(1/1)を0.04mL/min.で送液し、各化合物の10 $\mu$ g/mL標準液(メタノール又はDMF溶液)を1 $\mu$ L注入し、表3に示したMS条件で測定した。

図3に各化合物のMSスペクトルの一部を示した。

各化合物の分子量関連イオンはポジティブモードでは全ての化合物において検出され、アントシアニンはM<sup>+</sup>が、

表1 LC/MS/MS測定条件

column	Ascentis Express C18 (2.1mm i.d. $\times$ 150mm, 2.7 $\mu$ m) (SUPELCO)		
mobile phase	A : CH <sub>3</sub> CN    B : 0.5%-HCOOH in H <sub>2</sub> O    C : H <sub>2</sub> O A:B:C 15:20:65 (0 - 3min.) $\rightarrow$ 60:20:20 (13min.) $\rightarrow$ 76:10:14 (15 - 23min.) $\rightarrow$ 15:20:65 (23min.)		
flow rate	0.2mL/min	ion source temp.	120
column temp.	30	desolvation temp.	350
injection volume	2 $\mu$ L	desolvation gas flow rate	600L/hr
ionization mode	ESI(+)	cone gas flow rate	50L/hr
acquisition mode	MRM(MS/MS)	capillary voltage	3.2kV

その他は(M+H)<sup>+</sup>が観測された。ネガティブモードにおいては、アントシアニンは(M-2H)<sup>-</sup>や(M+16)<sup>-</sup>が観測されたがその強度は低く、また、フラノクマリンの

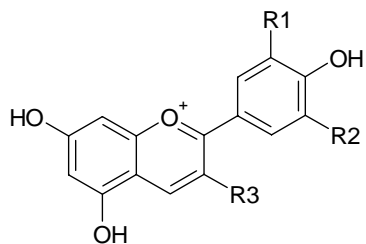
6,7-dihydroxy bergamottinは(M+HCOO)<sup>-</sup>が観測されたがその強度は低く、bergapten, isopimpinellin, bergamottinにおいては観測されなかった。

表2 MRM測定条件

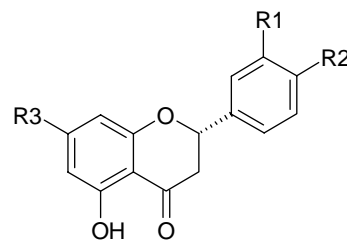
MRM function	Compound	ESI(+)				R.T (min.)
		cone (V)	collision (eV)	precursor (m/z)	product (m/z)	
1	cyanidin-3-glucoside	25	20	449.11	287.06	1.99
	petunidin-3-glucoside	30	20	479.12	317.07	1.96
	pelargonidin-3-glucoside	30	20	433.11	271.06	2.26
	peonidin-3-glucoside	30	20	463.12	301.07	2.37
	malvidin-3-glucoside	30	25	493.13	331.08	2.35
2	daidzin	20	25	417.12	255.07	3.63
	glycitin	20	20	447.13	285.08	3.97
	luteolin-3',7-diglucoside	45	40	611.16	287.06	4.49
3	vitexin	35	30	433.11	313.07	6.34
	rutin	20	15	611.16	303.05	6.04
	hyperoside	20	20	465.10	303.05	6.86
	genistin	20	15	433.11	271.06	8.10
4	astragalin	20	15	449.11	287.06	10.00
	quercitrin	20	15	449.11	303.05	10.07
	naringin	20	15	581.19	273.08	10.23
	cosmetin	20	15	433.11	271.06	10.37
	rhoifolin	20	15	579.17	271.06	10.23
	diosmin	35	50	609.18	301.07	10.40
	neohesperidin	20	20	611.20	303.08	10.55
	hesperidin	20	20	611.20	303.08	10.93
5	daidzein	50	25	255.07	199.08	12.10
	glycitein	45	30	285.08	270.05	12.42
	luteolin	55	35	287.06	153.02	12.65
	quercetin	50	40	303.05	153.02	12.75
6	genistein	40	25	271.06	243.07	13.88
	naringenin	20	25	273.08	153.02	13.93
	apigenin	55	30	271.06	153.02	13.86
	kaempferol	50	35	287.06	153.02	14.12
	hesperetin	20	15	303.08	177.02	14.36
7	bergapten	35	25	217.05	202.03	15.49
	isopimpinellin	40	25	247.06	217.01	15.51
	6,7-dihydroxy bergamottin	20	20	373.17	203.03	15.90
	rhein	45	20	285.04	241.05	16.49
	chrysin	35	30	255.07	153.02	16.72
	purpurin	35	25	257.04	187.04	17.30
	flavonol (I.S.)	35	30	239.07	165.06	18.64
	emodin	40	20	271.06	229.05	18.96
8	bergamottin	20	15	339.16	203.03	25.10

表3 MSスキャン測定条件

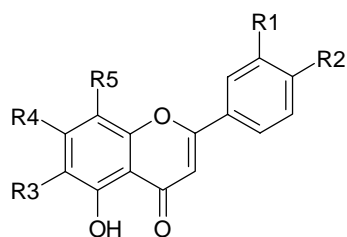
ionization mode	ESI(+)	ESI(-)
scan range (m/z)	100 ~ 700	100 ~ 700
ion source temp.	100	100
desolvation temp.	350	350
desolvation gs flow rate	600L/hr	600L/hr
cone gas flow rate	50L/hr	50L/hr
capillary voltage	3.2kV	3.0kV
cone voltage	25V	45V



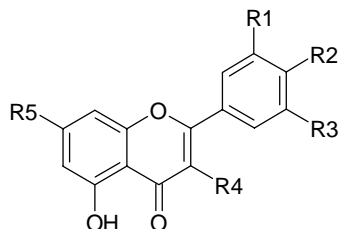
Anthocyanin	R1	R2	R3
<i>Cyanidin-3-glucoside</i>	OH	H	O-glucose
<i>Petunidin-3-glucoside</i>	OH	OCH <sub>3</sub>	O-glucose
<i>Pelargonidin-3-glucoside</i>	H	H	O-glucose
<i>Peonidin-3-glucoside</i>	OCH <sub>3</sub>	H	O-glucose
<i>Malvidin-3-glucoside</i>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	O-glucose



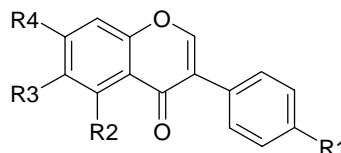
Flavanone	R1	R2	R3
<i>Hesperetin</i>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>Hesperidin</i>	OH	OCH <sub>3</sub>	O-rutinoside
<i>Naringenin</i>	H	OH	OH
<i>Naringin</i>	H	OH	O-neohesperidose
<i>Neohesperidin</i>	OH	OCH <sub>3</sub>	O-neohesperidose



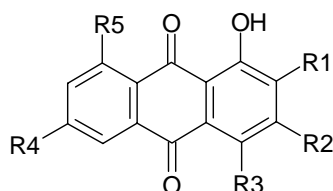
Flavone	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Apigenin</i>	H	OH	H	OH	H
<i>Vitexin</i>	H	OH	H	OH	glucose
<i>Cosmetin</i>	H	OH	H	O-glucose	H
<i>Chrysin</i>	H	H	H	OH	H
<i>Diosmin</i>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	O-rutinoside	H
<i>Luteolin</i>	OH	OH	H	OH	H
<i>Luteolin-3',7-diglucoside</i>	O-glucose	OH	H	O-glucose	H
<i>Rhoifolin</i>	H	OH	H	O-neohesperidose	H



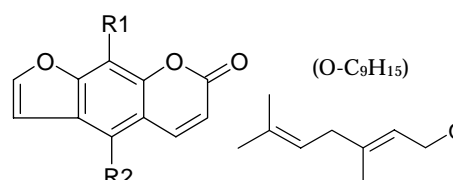
Flavonol	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Astragalin</i>	H	OH	H	O-glucose	OH
<i>Hyperoside</i>	OH	OH	H	O-galactose	OH
<i>Kaempferol</i>	H	OH	H	OH	OH
<i>Quercetin</i>	OH	OH	H	OH	OH
<i>Quercitrin</i>	OH	OH	H	O-rhamnose	OH
<i>Rutin</i>	OH	OH	H	O-rutinoside	OH



Isoflavone	R1	R2	R3	R4
<i>Daidzein</i>	OH	H	H	OH
<i>Genistein</i>	OH	OH	H	OH
<i>Glycitein</i>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>Daidzin</i>	OH	H	H	O-glucose
<i>Genistin</i>	OH	OH	H	O-glucose
<i>Glycitin</i>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	O-glucose



Anthraquinone	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Purpurin</i>	OH	H	OH	H	H
<i>Emodin</i>	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH
<i>Rhein</i>	H	COOH	H	H	OH



Furanocoumarin	R1	R2
<i>Bergapten</i>	H	OCH <sub>3</sub>
<i>Isopimpinellin</i>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<i>Bergamottin</i>	H	O-C <sub>9</sub> H <sub>15</sub>
<i>6,7-Dihydroxybergamottin</i>	H	O-C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> (OH) <sub>2</sub>

図1 ポリフェノール類等(37化合物)の構造

MS/MS測定におけるプリカーサイオンに分子量関連イオンを採用することとし、最も高いイオン強度を得るコーン電圧を検索し、さらに、各化合物のプロダクトイオンを決定するために、フローインジェクション法によりプロダクトイオンスキャン測定をした。

プリカーサイオンを開裂させるためのコリジョンエネルギー

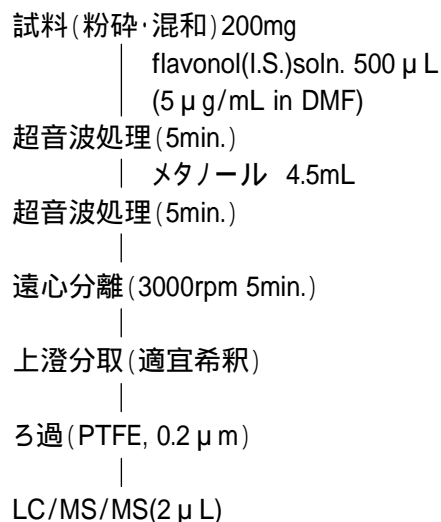


図2 実験操作

ギーを一定範囲で変化させ、強度の高いプロダクトイオンを得る条件について検討した結果、表4に示したようにESI(+)で37化合物、ESI(-)で34化合物についてMS/MS測定条件を決定した。

## 2 HPLC条件の検討

今回検討対象とした化合物は、フラボノイド等の配糖体及びアグリコンを含み、加水分解を行うことなく分析することから、そのHPLCによる分離には逆相系のカラムを用いた場合、移動相は高極性から低極性まで幅広く調整する必要がある。そこで、アセトニトリル/水系のグラジュエント溶出による条件について検討した。

その結果、移動相中のアセトニトリル濃度を15~76%まで変化させることで各化合物を分離し、26分以内に全ての化合物を溶出することができ、分析サイクルは35分であった。

各化合物の溶出時間は近接したものもあるが、MS/MS測定の選択性により、互いに影響することなく分離測定することができた。

また、逆相系カラムを用いたLC/MSにおいては多くの場合、ピーク形状の改善やESIにおけるプロトン供与体の目的で移動相にギ酸を添加するが、その最適濃度に

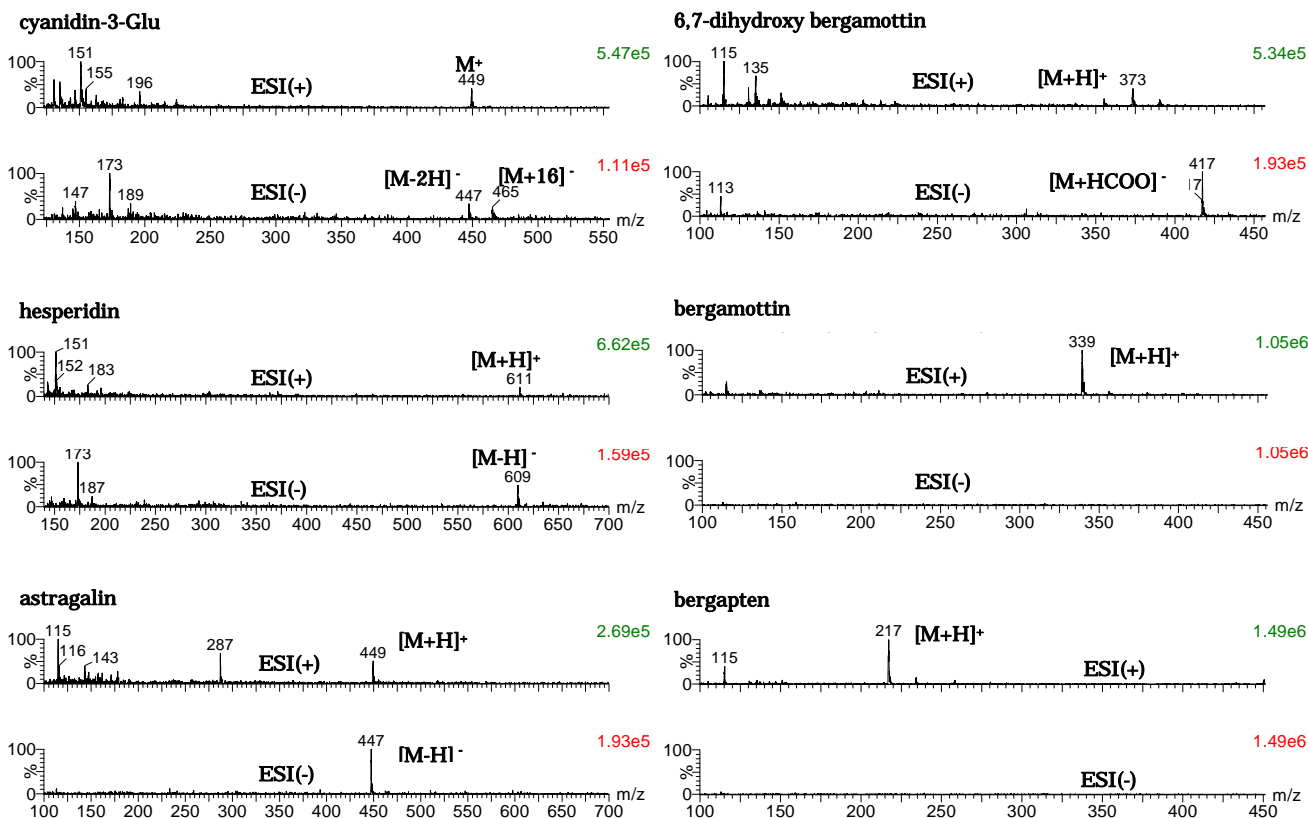


図3 ESI マススペクトル

ついて検討するため、移動相中のギ酸濃度を、0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2%(w/v)に調製し、LC/MS/MS測定を行った。

図4にギ酸濃度と各化合物の最大イオン強度を1としたときの相対イオン強度の関係を示した。

図5に各ギ酸濃度の移動相における pelargonidin-3-Glu, kaempferol, glyciteinのクロマトグラムを示した。

アントシアニンではギ酸を添加しない場合、ピーク割れや極端なイオン強度の低下をきたし、0.005%ではピーク割れはないもののテーリングを生じ、添加濃度を増すごとにイオン強度は減少するもののテーリングが改善し、0.1%において良好なピーク形状となった。(図5-(a))

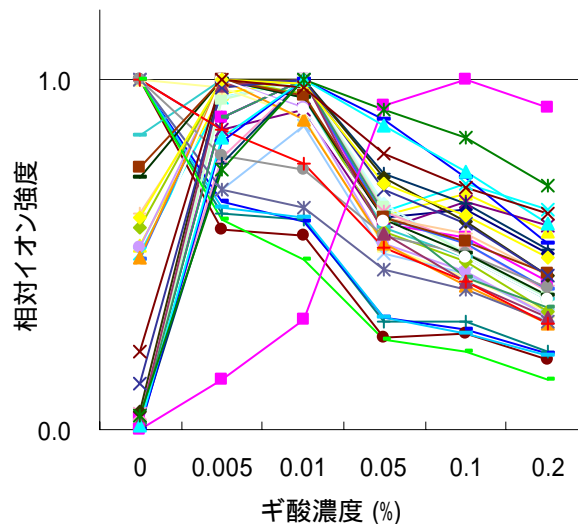


図4 LC/MS/MSクロマトグラムに対するギ酸濃度の影響 (1)

表4 MS/MS測定条件

	Compound	M.F.	ESI(+)				ESI(-)			
			cone (V)	collision (eV)	precursor (m/z)	product (m/z)	cone (V)	collision (eV)	precursor (m/z)	product (m/z)
Anthocyanin	cyanidin-3-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	25	20	449.11	287.06	50	25	447.09	285.04
	petunidin-3-glucoside	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	30	20	479.12	317.07	45	30	477.10	314.04
	pelargonidin-3-glucoside	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	30	20	433.11	271.06	40	20	431.10	269.04
	peonidin-3-glucoside	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	30	20	463.12	301.07	50	20	461.11	299.06
	malvidin-3-glucoside	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	30	25	493.13	331.08	55	20	491.12	329.07
Flavanone	hesperetin	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	20	15	303.08	177.02	40	25	301.07	164.01
	hesperidin	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	20	20	611.20	303.08	45	35	609.18	301.07
	naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	20	25	273.08	153.02	40	20	271.06	151.00
	naringin	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	20	15	581.19	273.08	45	30	579.17	271.06
	neohesperidin	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	20	20	611.20	303.08	45	35	609.18	301.07
Flavone	apigenin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	55	30	271.06	153.02	55	25	269.04	151.00
	vitexin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	35	30	433.11	313.07	45	25	431.10	311.06
	cosmetin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	20	15	433.11	271.06	55	35	431.10	268.04
	chrysin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	35	30	255.07	153.02	50	30	253.05	143.01
	diosmin	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	35	50	609.18	301.07	45	25	607.17	299.06
	luteolin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	55	35	287.06	153.02	55	30	285.04	133.03
	luteolin-3',7-diglucoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	45	40	611.16	287.06	55	40	609.15	285.04
rhoifolin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	20	15	579.17	271.06	55	35	577.16	269.04	
Flavonol	astragaln	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	20	15	449.11	287.06	45	25	447.09	284.03
	hyperoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	20	20	465.10	303.05	50	25	463.09	300.03
	kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	50	35	287.06	153.02	55	30	285.04	187.00
	quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	50	40	303.05	153.02	45	20	301.03	151.00
	quercitrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	20	15	449.11	303.05	45	30	447.09	300.03
	rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	20	15	611.16	303.05	55	35	609.15	300.03
Isoflavone	daidzein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	50	25	255.07	199.08	55	30	253.05	208.05
	genistein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	40	25	271.06	243.07	55	30	269.04	133.03
	glycitein	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	45	30	285.08	270.05	40	20	283.06	268.03
	daidzin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	20	25	417.12	255.07	50	25	415.10	252.04
	genistin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	20	15	433.11	271.06	50	25	431.10	268.03
	glycitin	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	20	20	447.13	285.08	50	30	445.10	282.05
Anthraquinone	purpurin	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	35	25	257.04	178.04	55	25	255.03	227.03
	emodin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	40	20	271.06	229.05	55	25	269.04	225.02
	rhein	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	45	20	285.04	241.05	25	20	283.02	239.03
Furanocoumarin	bergapten	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	35	25	217.05	202.03				
	isopimpinellin	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	40	25	247.06	217.01				
	bergamottin	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	20	15	339.16	203.03				
	6,7-dihydroxy bergamottin	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	20	20	373.17	203.03	20	20	417.15	201.02

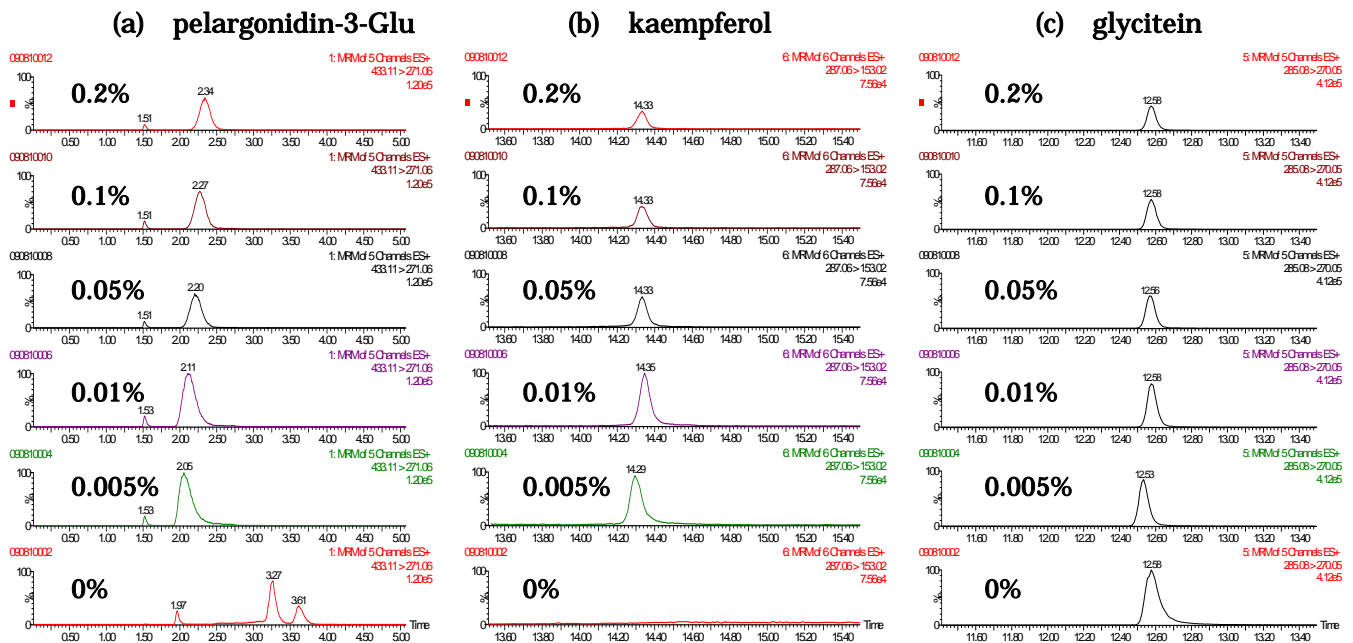


図5 LC/MS/MS クロマトグラムに対するギ酸濃度の影響 (2)

同様に, hesperetin, narigenin, luteolin, フラボノール(astragalginを除く), アントラキノン, bergamottin は, ギ酸無添加では極端にイオン強度が低下したが, ギ酸の添加により十分なイオン強度が得られ, また, テーリングの改善により良好なピーク形状となった. (図5-(b))

また, フラボンやイソフラボン, フラノクマリンはギ酸無添加においても十分なイオン強度が得られたが, テーリングの見られるものがあり, これらはギ酸添加濃度の増加により, イオン強度は減少するもののテーリングが改善し良好なピーク形状となった. (図5-(c))

以上のことから, 移動相中のギ酸濃度は, イオン強度, ピーク形状が共に良好な結果を得た0.1%(w/v)とすることとした.

### 3 LC/MS/MS測定条件の検討

MS/MS測定条件及びHPLC条件を検討した結果から, 多成分同時分析を行うためのLC/MS/MS測定条件を表2に示したとおり設定した.

MS/MS測定モードは, 多チャンネルの同時測定の効率を考慮しポジティブモードのみとし, また, 必要な測定感度や測定精度を確保するため同時に取り込むチャンネル数は8チャンネルまでとし, 各化合物の溶出時間によりグループ分けをした.

また, 測定精度を確保するため, 内部標準法による測定を行うこととし, 測定対象化合物と構造が類似している flavonol(3-hydroxyflavon)を内部標準物質として検討した.

### flavonol

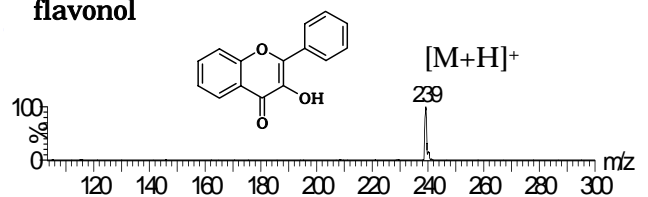


図6 内部標準物質の構造式及びMSスペクトル

HPLCにおいて, flavonolの溶出時間は他の化合物と重なることなく, また, ギ酸の添加によりテーリングは改善され, イオン強度, ピーク形状とも良好な結果が得られたことから, flavonolを内部標準物質とした.

図6にflavonolの構造式及びMSスペクトルを示した.

### 4 検量線

内部標準物質としてflavonol(500 $\mu$ g/L)を含む各化合物の混合標準液(10 ~ 1000 $\mu$ g/L)を調製し, flavonolに対するピーク面積比による検量線を作成し, 回帰分析により直線性を検討し, その結果を表5に示した.

決定係数( $r^2$ )は, quercetin, daidzein, glycitein, rheinを除き, 10 ~ 1000 $\mu$ g/Lの範囲で0.994 ~ 1.000であり, 良好な直線性を示した.

quercetin, rheinはイオン強度が低く, 定量下限値(S/N=30)は各々, 250 $\mu$ g/L, 100 $\mu$ g/Lであったが, 各々の濃度範囲において決定係数( $r^2$ )は0.993であり, 良好な直線性を示した.



daidzein, glyciteinは200 $\mu$ g/Lを超えるとイオン強度の低下がみられ、10～1000 $\mu$ g/Lの範囲で決定係数( $r^2$ )は0.978であった。

200 $\mu$ g/Lの混合標準液を繰返し測定した時の相対標準偏差は0.3～6.5%( $n=4$ )であり、良好な結果を示した。

また、各化合物の定量下限値( $S/N=30$ )は、2～250 $\mu$ g/Lであった。

各化合物の混合標準液(100 $\mu$ g/L)のLC/MS/MSクロマトグラムを図7に示した。

## 5 実試料の前処理方法の検討

対象試料は、錠剤、カプセル、粉末等の形態をなす健康食品とし、加水分解を行わない簡便、迅速な前処理方法について検討し、その結果を図2に示した。

測定精度を確保するために、内部標準物質を試料の前処理の際に添加し、また、抽出溶媒は各化合物の溶解性を考慮しDMF及びメタノールを使用した。

## 6 添加回収実験

実試料への適用と再現性を検討するため、数種類の植物の葉を混合し粉末状にした市販の健康食品に、添加量として0.2 $\mu$ g及び1 $\mu$ gとなるよう混合標準液を添加し、回収率を測定し、その結果を表6に、また、LC/MS/MSクロマトグラムを図8に示した。

回収率は、0.2 $\mu$ g添加では83.7～142.9%，1 $\mu$ g添加では81.2～126.0%であり、また、相対標準偏差は、0.2 $\mu$ g添加では2.5～34.3%，1 $\mu$ g添加では1.2～9.9%であった。

表5 検量線

Compound		conc. ( $\mu$ g/L)	$r^2$	RSD(%) (200 $\mu$ g/L) ( $n=4$ )	limit of quant. ( $\mu$ g/L) ( $S/N:30$ )
Anthocyanin	cyanidin-3-glucoside	10-1000	0.9994	1.4	5
	petunidin-3-glucoside	10-1000	0.9992	1.6	10
	pelargonidin-3-glucoside	10-1000	0.9983	1.3	7
	peonidin-3-glucoside	10-1000	0.9982	1.5	20
	malvidin-3-glucoside	10-1000	0.9988	2.8	30
Flavanone	hesperetin	10-1000	0.9999	2.3	6
	hesperidin	10-1000	1.0000	5.0	10
	naringenin	10-1000	0.9992	2.5	8
	naringin	10-1000	0.9998	1.2	40
	neohesperidin	10-1000	0.9998	3.4	25
Flavone	apigenin	10-1000	0.9994	1.6	5
	vitexin	10-1000	0.9998	4.4	30
	cosmetin	10-1000	0.9993	1.8	5
	chrysin	10-1000	0.9999	2.9	5
	diosmin	10-1000	0.9998	3.6	15
	luteolin	10-1000	0.9998	0.3	20
Flavonol	luteolin-3',7'-diglucoside	10-1000	0.9998	2.9	20
	rhoifolin	10-1000	0.9998	2.8	8
	astragaln	10-1000	0.9995	4.7	15
	hyperoside	10-1000	0.9982	5.2	50
	kaempferol	10-1000	0.9968	1.4	50
Isoflavone	quercetin	500-1000	0.9929	-	250
	quercitrin	10-1000	0.9971	4.6	50
	rutin	10-1000	0.9987	3.5	60
	daidzein	10-500	0.9876	2.1	3
Anthraquinone	genistein	10-1000	0.9995	3.6	15
	glycitein	10-200	0.9954	1.3	3
	daidzin	10-1000	0.9990	0.9	7
	genistin	10-1000	1.0000	2.0	10
	glycitin	10-1000	0.9999	1.1	6
Furanocoumarin	purpurin	10-1000	0.9945	5.9	100
	emodin	10-1000	0.9991	2.3	20
	rhein	50-1000	0.9926	2.4	100
	bergapten	10-1000	0.9989	1.7	2
Furanocoumarin	isopimpinellin	10-1000	0.9988	1.8	2
	bergamottin	10-1000	0.9988	2.4	2.0
	6,7-dihydroxy bergamottin	10-1000	0.9997	6.5	20

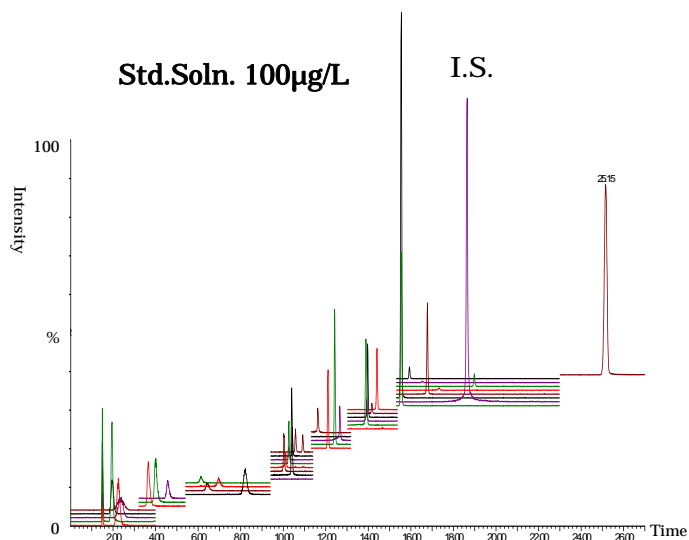


図7 標準液の LC/MS/MS クロマトグラム

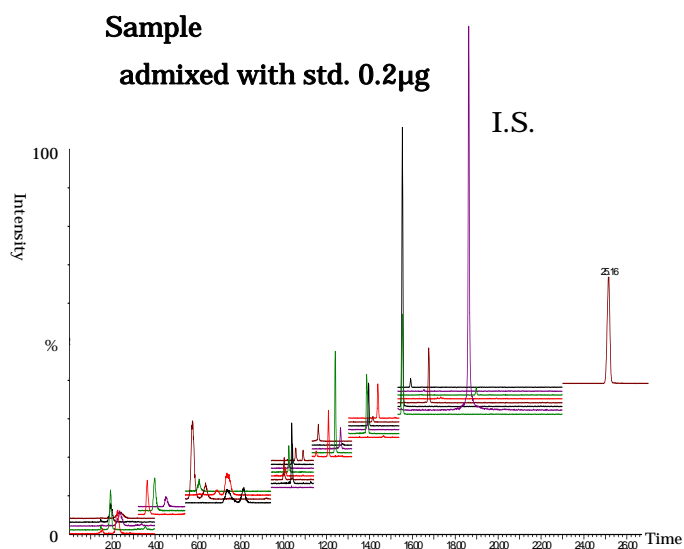


図8 添加試験における LC/MS/MS クロマトグラム



定量下限値の高いnaringinやvitexin, kaempferol, quercetin, アントラキノン等は, 0.2 $\mu$ g添加では回収率や相対標準偏差が高値を示したが, 1 $\mu$ g添加では良好な結果であった.

また, 試料中の定量下限値(S/N=30)は各々0.1 ~ 7.0 $\mu$ g/gであった.

## まとめ

健康食品等に含有するポリフェノール類及びフラノクマリン(37化合物)について, LC/MS/MSによる多成分同時分析法を検討した結果, 次のことが明らかとなった.

表6 実試料の添加回収率

		Sample:200mg				
Compound		0.2 $\mu$ g (n=6)		1 $\mu$ g (n=6)		limit of quant. ( $\mu$ g/g) (S/N:30)
		Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	
Anthocyanin	cyanidin-3-glucoside	83.7	5.1	81.2	2.6	0.3
	petunidin-3-glucoside	108.3	3.4	97.9	3.0	0.3
	pelargonidin-3-glucoside	93.0	3.1	90.9	2.8	0.3
	peonidin-3-glucoside	112.3	5.6	106.2	2.3	0.5
	malvidin-3-glucoside	113.6	2.9	107.6	3.4	0.8
Flavanone	hesperetin	102.8	3.4	97.6	2.7	0.3
	hesperidin	99.8	10.8	94.7	3.9	0.3
	naringenin	109.1	3.7	103.1	2.5	0.3
	naringin	99.0	13.5	92.6	4.8	1.0
	neohesperidin	96.0	6.0	93.7	4.7	0.5
Flavone	apigenin	127.2	2.5	114.4	2.6	0.1
	vitexin	134.8	9.8	115.1	5.1	0.8
	cosmetin	113.6	4.7	106.6	3.2	0.3
	chrysin	117.9	3.3	107.0	2.1	0.1
	diosmin	107.7	2.9	97.9	2.7	0.4
	luteolin	101.2	7.9	108.5	4.7	0.5
	luteolin-3',7-diglucoside	99.5	4.0	96.6	2.9	0.5
	rhoifolin	103.6	4.9	97.3	2.7	0.3
Flavonol	astragaln	108.3	7.2	99.8	2.7	0.4
	hyperoside	96.2	3.2	93.0	4.8	1.5
	kaempferol	92.8	12.4	104.0	2.1	1.5
	quercetin	105.6	28.8	126.0	8.9	7.0
	quercitrin	95.6	7.6	101.0	1.9	1.3
	rutin	135.2	7.5	106.5	2.9	1.3
Isoflavone	daizdein	127.0	2.6	103.5	1.9	0.1
	genistein	127.4	6.4	111.8	5.4	0.5
	glycitein	142.9	3.4	106.7	2.6	0.1
	daidzin	123.3	3.9	112.0	1.2	0.3
	genistin	108.5	5.3	100.9	2.3	0.3
Anthraquinone	glycitin	126.0	3.5	118.2	2.3	0.3
	purpurin	113.0	34.3	94.4	7.0	2.5
	emodin	112.9	12.6	103.7	4.3	0.5
Furanocoumarin	rhein	128.4	32.8	93.3	9.9	2.5
	bergapten	131.5	4.0	110.1	2.7	0.1
	isopimpinellin	141.7	2.5	122.0	1.9	0.1
	bergamottin	99.0	3.3	92.4	2.0	0.1
	6,7-dihydroxybergamottin	123.3	7.9	108.8	4.4	0.5

1 ESI(+)で37化合物, ESI(-)で34化合物について, 分子量関連イオンをプロダクトイオンとしたMS/MS測定が可能であった.

2 HPLCにおいて, ODSカラムを用い, ギ酸を0.1%(w/v)添加したアセトニトリル/水の移動相によるグラジュエント溶出で分析が可能であり, その分析サイクルは35分であった.

3 ESI(+)-LC/MS/MSにおいて, flavonolを内部標準物質とした内部標準法により, 37化合物の同時定量分析が可能となり, 各化合物の定量下限値(S/N=30)は2 ~ 250 $\mu$ g/Lであった.

4 錠剤, カプセル, 粉末等の形態をなす健康食品を対象に, 加水分解を行わない簡便, 迅速な前処理方法を開発した.

5 実試料への添加回収実験において, 各化合物の回収率は81 ~ 126%であり, また, その相対標準偏差は1.2 ~ 9.9%であり, 良好な結果であった.

6 試料における各化合物の定量下限値(S/N=30)は, 0.1 ~ 7.0 $\mu$ g/gであった.

## 文献

- 1) 内閣府食品安全委員会新開発食品専門調査会: “大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方”, (2006.5.11)
- 2) 内田信也 ほか: ぶんせき, 2007, 454
- 3) 独立行政法人国立健康・栄養研究所監訳: 健康食品データベース, (2007), (第一出版)
- 4) Merken H. M. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 48, 577-599 (2000)
- 5) Dugo P. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3987-3992 (2001)
- 6) Sakakibara H. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581 (2003)
- 7) Wu Q. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2763-2769 (2004)
- 8) Klejdus B. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5848-5852 (2005)
- 9) Harnly J. M. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9966-9977 (2006)
- 10) Schmiedlin-Ren P. et al: *Drug Metab. Dispos.*, 25, 1228-1233 (1997)
- 11) Paine M.F. et al: *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 1097-1105 (2006)