

LC/MS/MS による県産植物成分の定量

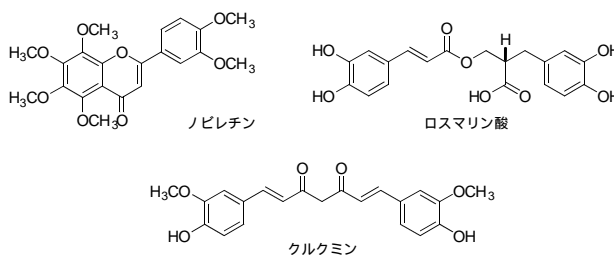
市場俊雄

工業技術センターでは地域結集型共同研究事業の一環として、植物（薬草類）を原料とする主な健康指向型製品中の含有成分分析を行う方法を検討している。平成15年度は沖縄の健康指向型飲料製品として市場に定着しているものの中から、シークァーサー、ウコン、クミスクチンを取り上げ、その中に含まれるノビレチン、クルクミン、ロスマリン酸を定性・定量する方法を検討し、LC/MS/MSにより分析する条件を確立した。

1 はじめに

近年、健康指向型製品の開発や品質管理において、その製品に含まれる原料植物由来成分の定性・定量への要望が高まってきている。そこで工業技術センターでは地域結集型共同研究事業の一環として、植物（薬草類）を原料とする主な健康指向型飲料中の含有成分の分析を行う方法を検討した。

健康指向型飲料は幾つかの薬草をブレンドした製品であることが多く、当然その製品中の成分は単独の原料を用いた製品に比べて複雑な混合物になるので、製品中の特定の成分を精度良く分析することは困難な場合が多い。そこで製品開発や品質管理において成分分析が利用できるよう、これらを精度良く分析する方法を検討した。平成15年度は沖縄の健康指向型飲料製品として市場に定着しているものの中から、シークァーサー、ウコン、クミスクチンを取り上げ、その中に含まれるノビレチン、クルクミン、ロスマリン酸を定性・定量する方法を検討し、LC/MS/MSにより分析する条件を確立した。



2 方法

2-1 MS測定条件

装置：Waters 高速液体クロマトグラフィー Alliance (送液部：2695、フォトダイオードアレイ検出器：2996、四重極型タンデム MS 検出器：ESCI プローブ 装着 QuattroMicro、データ処理：MassLynx)

イオン化効率を考慮しポンプから 0.1% ギ酸を 450 μ L/min で導入しながら、最適な条件を検索する目的でインフュージョンによる連続的なサンプル導入 (10 μ L/min) を行い、ESI のポジティブモードとネガティブモードで、それぞれ 15V から 64V の範囲で 7V おきにコーン電圧を変えてイオン化効率を検討した。注入するサンプル濃度は約 10ppm の 75% メタノール溶液を用いた。

また MS/MS に関するパラメータであるコリジョンエネルギーは最適イオン化モードとコーン電圧を用い、10eV から 45eV の範囲で 7eV おきに变化させて検討した。

クルクミンの標準試料は和光純薬から購入したものをを用い、ノビレチンとロスマリン酸はそれぞれシークァーサーとクミスクチンより単離精製し、センターで同定したサンプルを使用した。

2-2 LC/MS (LC/MS/MS) での HPLC 条件

ESI 条件でのイオン化効率を考慮し、溶出溶媒にはギ酸を添加して HPLC 分析を行った (表 1)。

装置：Waters 高速液体クロマトグラフィー Alliance (送液部：2695、フォトダイオードアレイ検出器：2996、四重極型タンデム MS 検出器：ESCI プローブ 装着 QuattroMicro、データ処理：MassLynx)

カラム：Waters Symmetry C18 (3.5 μ m、 ϕ 3.0mm \times 100mm)

試薬：アセトニトリル (関東化学、HPLC 用試薬)、ギ酸 (ナカライテスク、特級試薬)、超純水 (ADVANTEC 社の超純水製造装置による電気伝導度 5.5 μ S/m 以下の水)

MS 装置のコーン電圧とコリジョンエネルギー以外の条件は以下のとおりである。

イオン源温度：120

脱溶媒プレート：480

コーンガス流量：50L/min

脱溶媒プレートガス流量：800L/min

キャピラリ電圧：3.6kV
 コロナ電流：0.7μA
 イクストラクター電圧：MS 時 50V、MS/MS 時 2V
 RF 電圧：MS 時 0.5V、MS/MS 時 0.2V

表1 LC/MS(MS)の溶媒条件

	アセトリル	水	1%ギ酸
初期値	0%	95%	5%
1分	0%	95%	5%
19分	95%	0%	5%
23分	95%	0%	5%

3 結果と考察

3-1 クルクミン

ポジティブモード、ネガティブモード共にコーン電圧 22V で分子イオン $m/z369$ (M+1)または $m/z367$ (M-1)が最大となり最適条件であった。

この最適コーン電圧を用いて LC/MS/MS に利用できる適当なフラグメントイオンをプロダクトイオンスキャンモードで検索したところポジティブイオンモードでは $m/z145$ 、 $m/z177$ 、 $m/z285$ が (図1)、ネガティブモードでは $m/z149$ 、 $m/z219$ が (図2) 主要なフラグメントイオンであることが分かった。そこでこれらのイオンを与える最適なコリジョンエネルギーの検討を行った結果、ポジティブイオンモードでの $m/z369$ 145 がコリジョンエネルギー 31eV (図1の3段目)、 $m/z369$ 177 がコリジョンエネルギー 24eV (図1の4段目)、 $m/z369$ 285 がコリジョンエネルギー 17eV (図1の5段目)、ネガティブイオンモードでの $m/z367$ 149 がコリジョンエネルギー 17eV (図2の3段目) で最大となることから、LC/MS/MS による定量は MRM モードでコーン電圧 22V、コリジョンエネルギー 17、24、31eV が最適であると思われる。この条件で行った MRM 分析のクロマトグラムを図3に示した。

この結果、いずれの MRM も感度良くクルクミンを検出している。そこでそれぞれのクロマトピークの S/N 比を測定して見たところ、ポジティブモードの $m/z369$ 145 で S/N 比が 518 と最も良くなることから (図3の5段目) クルクミンの定量には、ESI ポジティブモードで、コーン電圧 22V、コリジョンエネルギー 31eV を使い、 $m/z369$ 145 の MRM 測定を行うのが良いということが分かった。

3-2 ノビレチン

ポジティブモードではコーン電圧 15V で分子イオン $m/z403$ (M+1)が最大となり最適条件であった。一

方、ネガティブモードでは分子イオン $m/z401$ (M-1)が観測されず、定量分析には不向きであることが分かった。

この最適コーン電圧 15V を用いて LC/MS/MS に利用できる適当なフラグメントイオンをプロダクトイオンスキャンモードで検索したところ $m/z153$ 、 $m/z171$ 、 $m/z177$ 、 $m/z325$ 、 $m/z341$ のイオンが主なプロダクトとして観測された (図4)。そこでこれらについてコリジョンエネルギーの検討を行った結果、コリジョンエネルギー 45eV の時 $m/z403$ 153 が、31eV の時 $m/z403$ 171 と $m/z403$ 177 と $m/z403$ 341 が、17eV の時 $m/z403$ 325 が最大となった (図4)。この条件で行った MRM 分析のクロマトグラムを図5に示した。

この結果、いずれの MRM も感度良くノビレチンを検出している。そこでそれぞれのクロマトピークの S/N 比を測定して見たところ、ポジティブモードの $m/z403$ 341 で最も S/N 比が良くなることから (図5の2段目) ノビレチンの定量には、ESI ポジティブモードで、コーン電圧 15V、コリジョンエネルギー 31eV を使い、 $m/z403$ 341 の MRM 測定を行うのが良いということが分かった。

3-3 ロスマリン酸

ポジティブモードではコーン電圧 36V で分子イオン $m/z361$ (M+1)が最大となり最適条件であった。一方、ネガティブモードではコーン電圧 29V で分子イオン $m/z359$ (M-1)が最大となることが分かった。

この最適コーン電圧を用いて LC/MS/MS に利用できる適当なフラグメントイオンをプロダクトイオンスキャンモードで検索したところポジティブモードでは $m/z135$ 、 $m/z163$ が (図6)、ネガティブモードでは $m/z161$ が (図7) 主要なプロダクトイオンとして観測された。そこでこれらについて最適コリジョンエネルギーの検討を行った結果、ポジティブイオンモードの $m/z361$ 135 がコリジョンエネルギー 38eV で (図6の2段目)、 $m/z361$ 163 がコリジョンエネルギー 17eV で (図6の5段目)、ネガティブモードの $m/z359$ 161 がコリジョンエネルギー 17eV で (図7の5段目) 最適となった。この条件で行った MRM 分析のクロマトグラムを図8に示した。

この結果、いずれの MRM も感度良くロスマリン酸を検出している。そこでそれぞれのクロマトピークの S/N 比を測定して見たところ、ネガティブイオンモードの $m/z359$ 161 で最も S/N 比が良くなることから (図8の2段目) ロスマリン酸の定量には、ESI ネガティブイオンモードで、コーン電圧 29V、コリ

ジョン電圧 29eV を用い、m/z359 161 の MRM 測定を行うのが良いということが分かった。

4 まとめ

今回、標準試料を用いクルクミン、ノビレチン、ロスマリン酸の LC/MS/MS による定量分析条件を検討した。前述したように、健康指向型食品として製品化されているものの多くは、原料の粉碎物や粗抽出物である場合が多く、その中の特定の成分を分析、特に定量するためには、分析にかけるサンプルの前

処理がカギを握っている場合が多い。この点では LC/MS/MS は非常に選択性に優れ、原料中の他の成分の干渉を受ける可能性が少ないことから、今回確立した条件を用いて特定の有効成分の定量が可能になると思われる。

平成 16 年度はこの条件を用い、市販の健康指向型飲料製品（ドリンク剤）を中心に粉末製品などに含まれる有効成分の定量を行い、その実用性を検証する予定である。

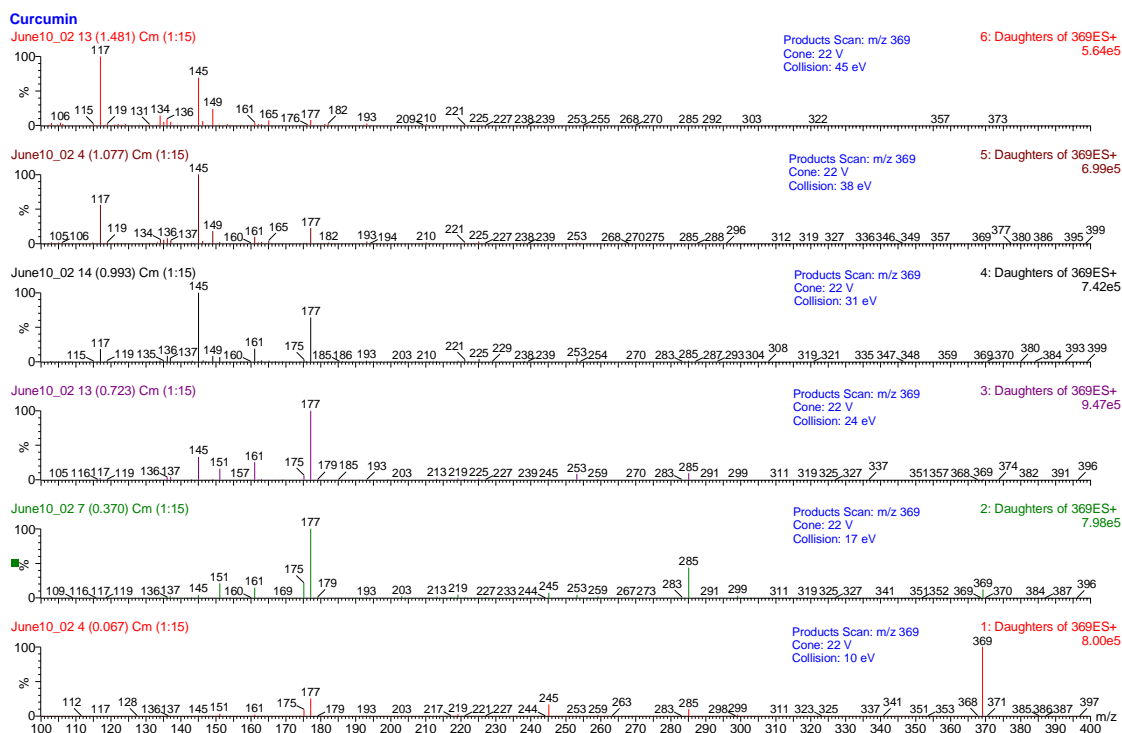


図 1 異なったコリジョンエネルギーで測定したクルクミンのポジティブモードでのプロダクトイオンキャンスペクトラ

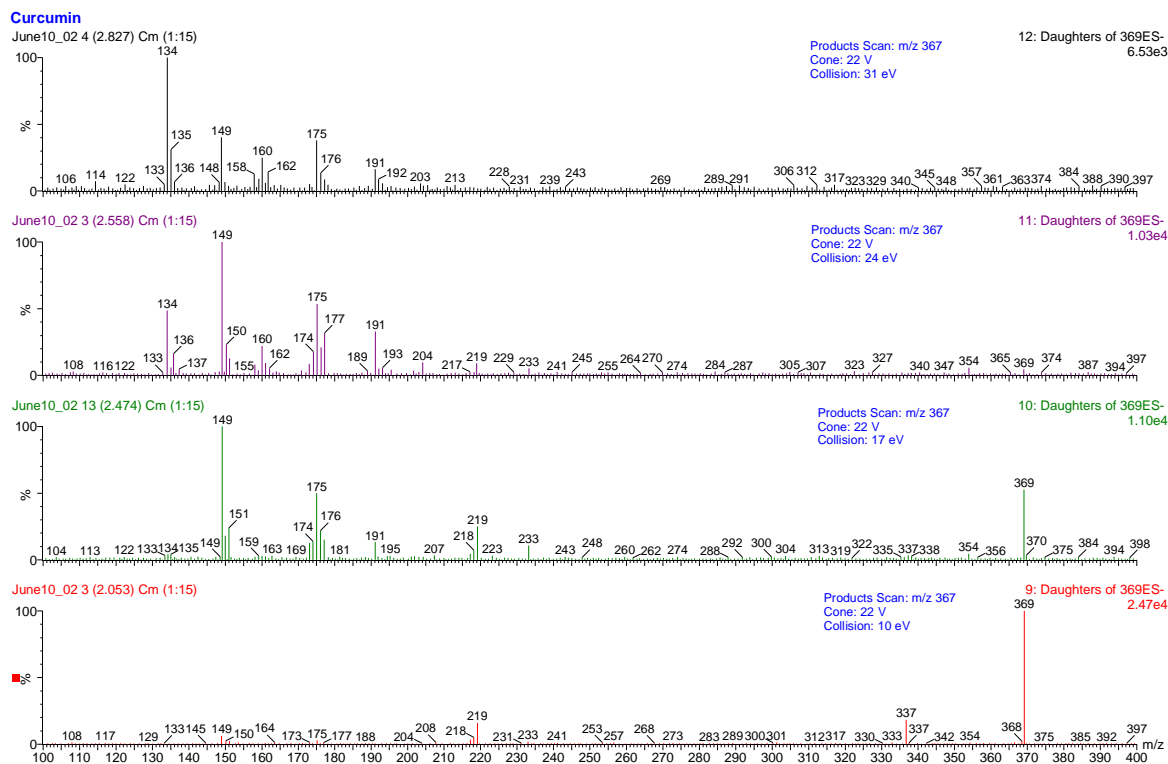


図2 異なるコリジョンエネルギーで測定したクルクミンの
ネガティブモードでのプロダクトイオンスキャンスペクトラ

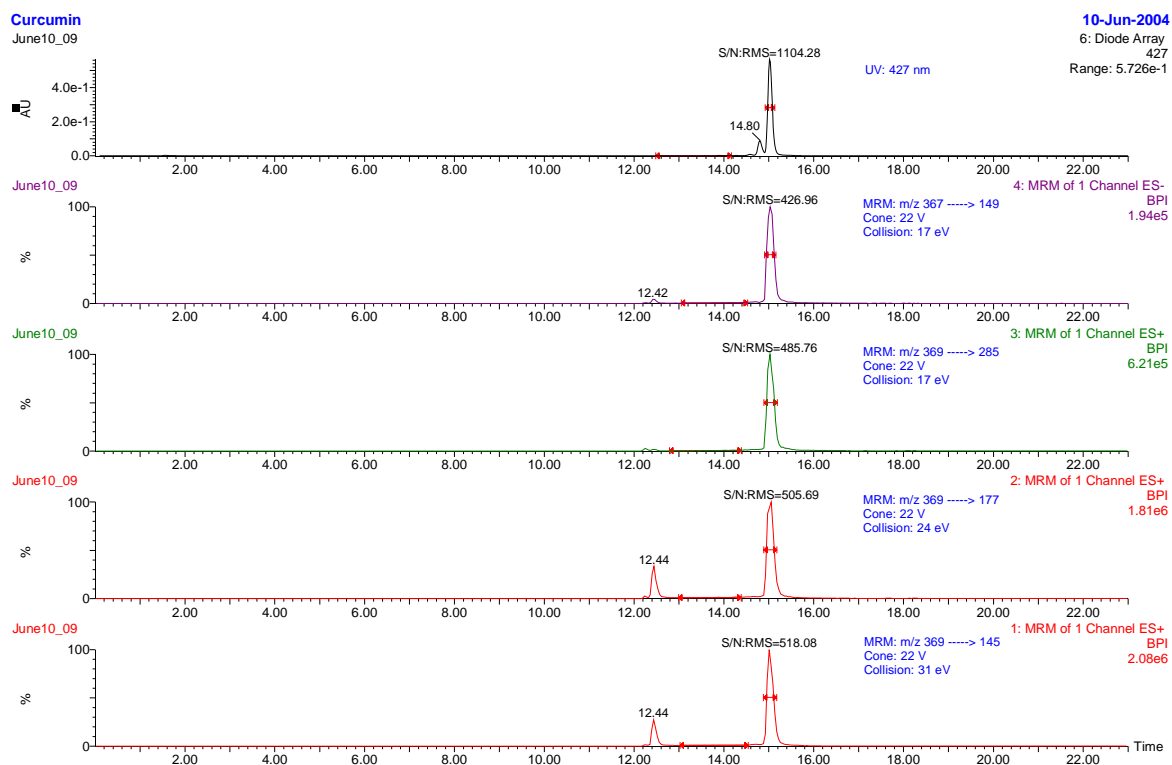


図3 クルクミンのUV-VISおよびMRM (LC/MS/MS) クロマトグラム

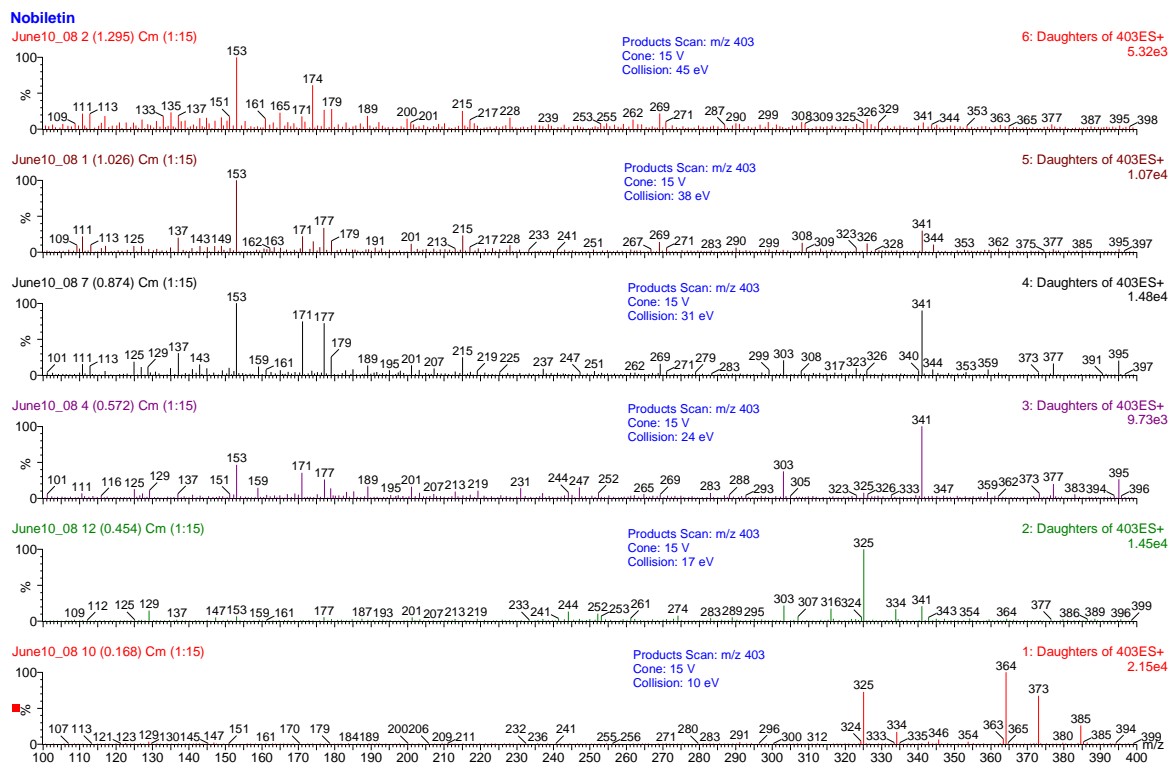


図4 異なったコリジョンエネルギーで測定したノビレチンの
ポジティブモードでのプロダクトイオンスキャンスペクトラ

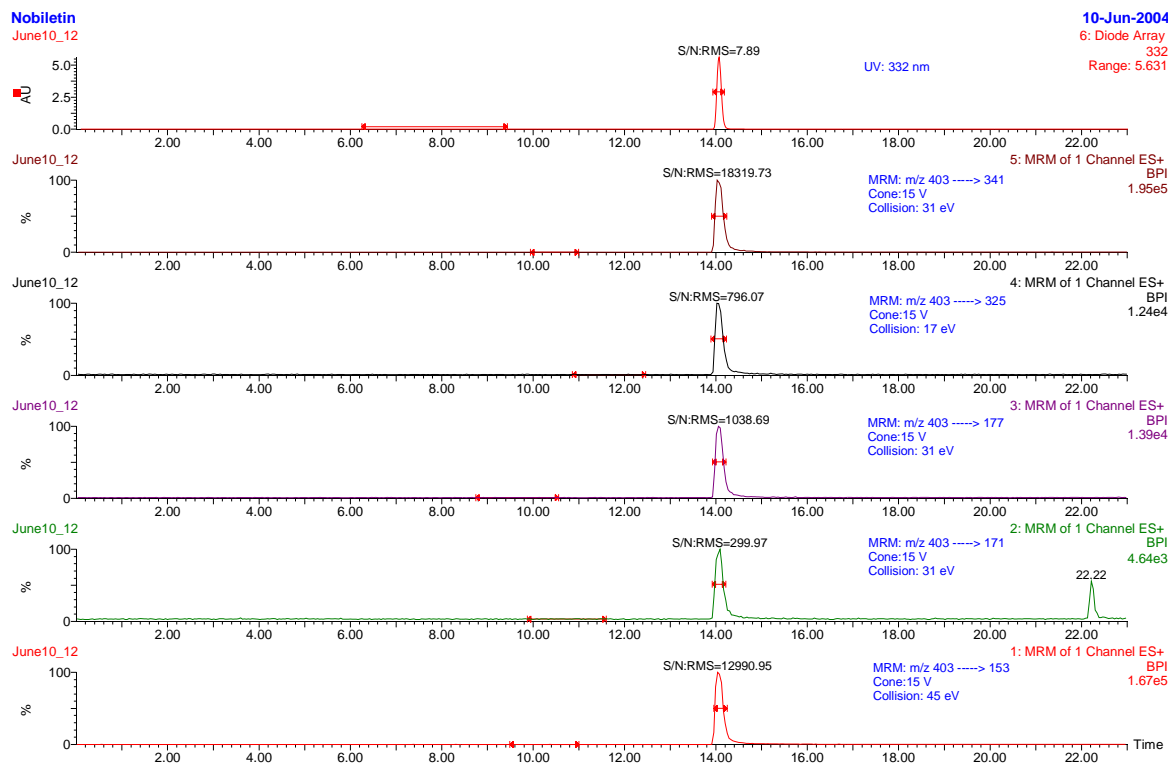


図5 ノビレチンのUV-VISおよびMRM (LC/MS/MS) クロマトグラム

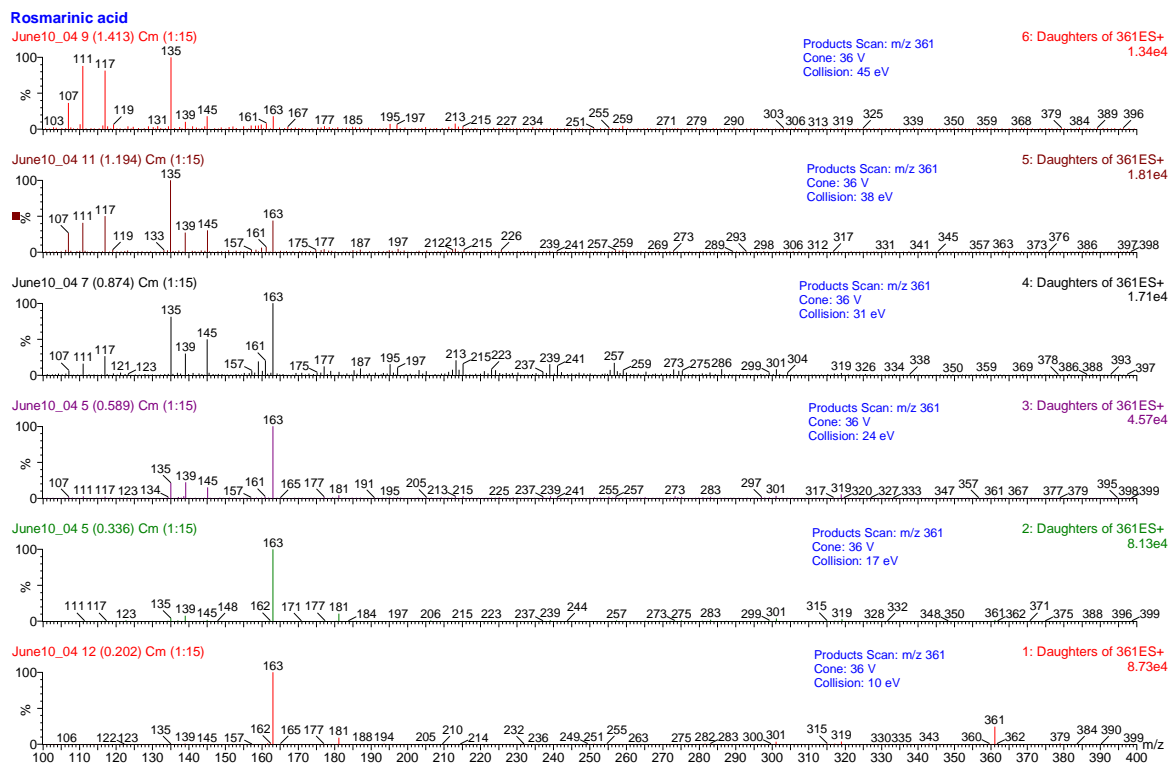


図6 異なったコリジョンエネルギーで測定したロスマリン酸の
ポジティブモードでのプロダクトイオンスキャンスペクトラ

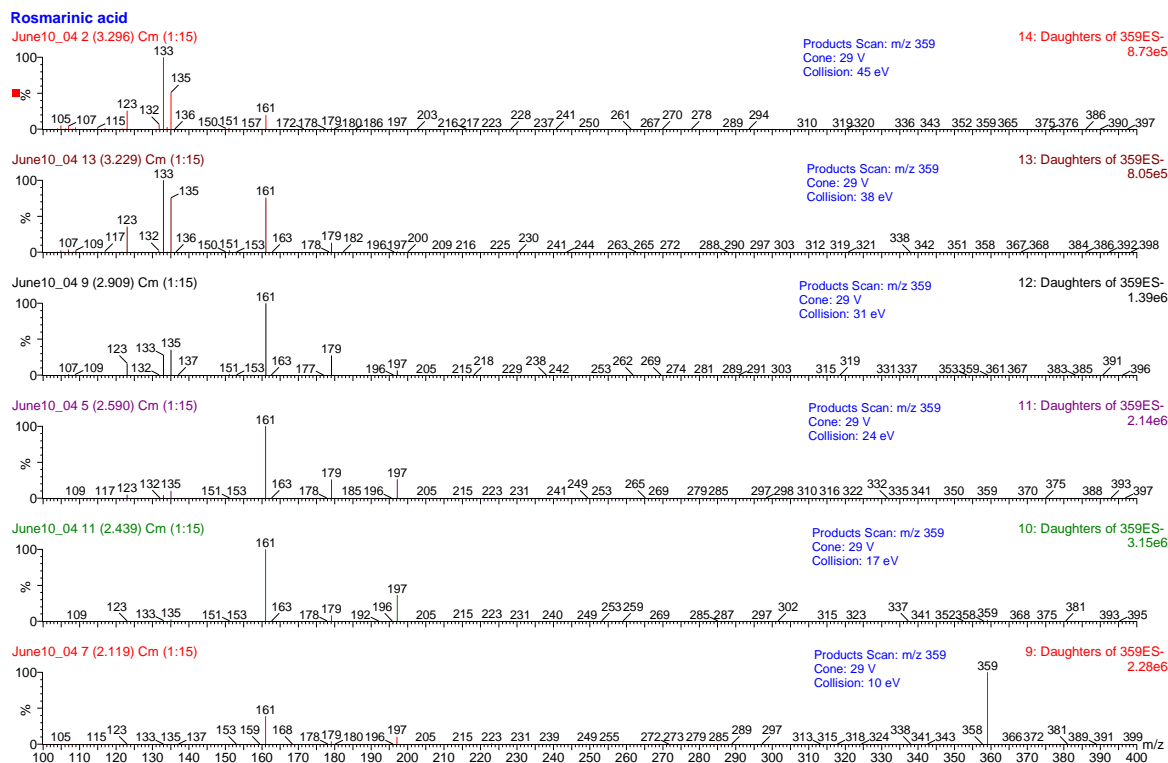


図7 異なったコリジョンエネルギーで測定したロスマリン酸の
ネガティブモードでのプロダクトイオンスキャンスペクトラ

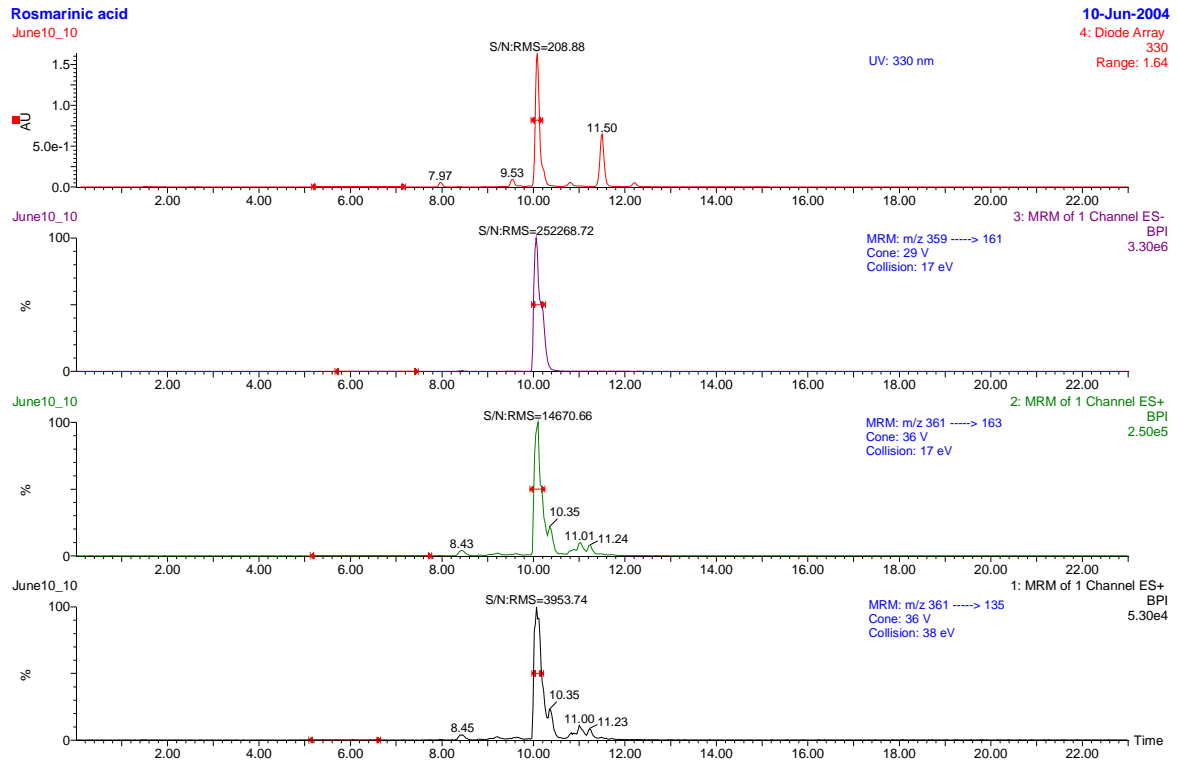


図8 ロスマリン酸の UV-VIS および MRM (LC/MS/MS) クロマトグラム

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。