

LC-MS/MSを用いた食品中の機能性成分のワイドターゲット分析

○市来 弥生¹⁾、木村俊之²⁾、小林 まなみ¹⁾

1) 株式会社島津製作所、2) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

◆背景・目的

ポリフェノールは分子内に複数のフェノール性水酸基を有する化合物群の総称で、野菜、果物、穀物、豆類などの食品や、茶やワインなどの飲料に広く含まれている。ポリフェノールは化学構造からフラボノール類、フラバノール類、アントシアニン類などのフラボノイドと、クロロゲン酸などのフェニルプロパノイドに分類される。これらは抗酸化作用をはじめ、抗炎症作用、生活習慣病予防、腸内環境改善などの生理活性を示すことが知られている。

本研究では、農作物中に含まれるポリフェノールなどの機能性成分160化合物（表1）を対象としたLC-MS/MSによるワイドターゲット分析法を開発し、農作物を対象に分析を行った¹⁾。

表1 分析対象成分

Quercetin	Daidzein	Naringenin chalcone	Caffeic Acid
Quercitrin	Glycitein	Isoliquiritigenin	p-Coumaric acid
Quercetin 3'-O-glucoside	Genistein	2,6'-Dihydroxy 4',4'-dimethoxydihydrochalcone	trans-Ferulic Acid
Hyperoside	Daidzin	2',6'-Dihydroxy 4'-methoxydihydrochalcone	Rosmarinic Acid
Quercetin 4'-O-glucoside	Glycitin	Butein	Vanillic acid
Quercetin 3,4'-O-diglucoside	Genistin	Phloretin	Syringic acid
Quercetin 7-O-glucoside	6''-O-Malonyldaidzin	Cyanidin	Cinnamic acid
Quercetin 3,3',4',7-tetramethyl ether	6''-O-Malonylgenistin	Cyanidin 3-O-glucoside	3-Caffeoylquinic acid
Kaempferol	6''-O-Acetyldaidzin	Cyanidin 3-O-rutinoside	4-Caffeoylquinic acid
Kaempferol 3-O-rutinoside	6''-O-Acetyldaidzin	Cyanidin 3-O-galactoside	5-Caffeoylquinic acid
Kaempferol 3-O-sambubioside	6''-O-Acetylgenistin	Cyanidin 3-O-arabinoside	3-Feruloylquinic acid
Kaempferol 3-O-rutinoside-7-rhamnoside	6''-O-Acetylgenistin	Cyanidin 3,5-diglucoside	4-Feruloylquinic acid
Astragaln	Biochanin A	Delphinidin	5-Feruloylquinic acid
Tiliroside	Formononetin	Delphinidin 3-O-glucoside	3,5-Dicaffeoylquinic acid
Myricetin	Puerarin	Delphinidin 3-O-rutinoside	4,5-Dicaffeoylquinic acid
Isorhamnetin	Neobavaisoflavone	Delphinidin 3,5-diglucoside	Gallic Acid
Isorhamnetin 3-O-β-D-glucoside	Apigenin	Delphinidin 3-O-galactoside	Ellagic Acid
Isorhamnetin 3-O-neohesperidoside	Apigenin 7-O-glucuronide	Delphinidin 3-O-galactoside	Strictinin
Isorhamnetin 3-O-rutinoside	Apigenin 7-O-glucoside	Pelargonidin	Piceatannol
Rutin	Apigenin 7-O-glucoside	Pelargonidin 3-O-glucoside	Astringin
Dihydrokaempferol	Apigenin 7-O-glucoside	Pelargonidin 3-O-rutinoside	Piceid
Fisetin	Luteolin	Malvidin 3-O-glucoside	Caffeine
Kaempferitrin	Luteolin 7-O-glucoside	Malvidin 3,5-diglucoside	Glucoraphanin
Kaempferide	5,7-Dimethoxyflavone	Petunidin 3-O-glucoside	Eritadenine
Myricitrin	3',4',5'-Trimethoxyflavone	Peonidin	Glabridin
Naringenin	Tangeretin	Peonidin 3-O-glucoside	Resveratrol
Naringin	Sinensetin	Peonidin 3-O-galactoside	Phlorizin
Naringin dihydrochalcone	Nobiletin	Peonidin 3-O-rutinoside	Synephrine
Narirutin	Galangin	Apigeninidin	L-Ergothioneine
Hesperetin	Baicalin	Catechin	Emodin
Hesperidin	Pinocembrin	Epicatechin	Oleanic acid
Neohesperidin	Vitexin	Gallocatechin	Catalpol
Neohesperidin dihydrochalcone	Isovitexin	Epigallocatechin	Theobromine
Didymin	Orientin	Catechin gallate	Trigonelline
Eriocitrin	Sakuranetin	Epicatechin gallate	Paeoniflorin
Naringenin 4',7-dimethyl ether	Saponarin	Gallocatechin gallate	Protocatechuic acid
Eriodictyol	Tricin	Epigallocatechin gallate	Hispidol
Taxifolin	Vicenin III	Epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl)gallate	Pterostilbene
Liquiritigenin	Wogonin	Epicatechin 3-O-(3-O-methyl)gallate	[² H ₄]-Naringenin (I.S.)
Liquiritin	Rhamnetin	Procyanidin B2	[¹³ C ₆]-Kaempferol (I.S.)

◆前処理

試料：トマト 8点（農研機構から提供）
ドライアイスを用いて凍結粉砕

抽出手順：

- 凍結粉砕したトマト0.25 gを遠沈管に量り取り、抽出溶媒20 mLを添加。
- 30分間振とう抽出。
- 10分間遠心分離。
- 上清を綿栓でろ過し、ろ液を25 mLに定容。
- 初期移動相で10倍、100倍、1000倍に希釈して、LC-MS/MSで分析。

◆分析条件

表2 分析条件

[HPLC conditions] Nexera™ X3	
Column :	Shim-pack Scepter™ (150 mm L. x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Mobile phase A :	0.1 % Formic acid - Water
Mobile phase B :	0.1 % Formic acid - Methanol
Gradient program :	B conc. 0% (0 - 2 min) - 95% (15 - 20 min) - 0% (20.01 - 25 min)
Flow rate :	0.3 mL/min
Column temperature :	40°C
Injection volume :	1 μL
[MS conditions] LCMS™-8060NX	
Ionization :	ESI (Positive, Negative)
Mode :	MRM
IonFocus voltage	+3.5 kV, -2.5 kV
Nebulizing gas flow :	3 L/min
Drying gas flow :	10 L/min
Heating gas flow :	10 L/min
DL temperature:	250°C
Block heater temperature:	400°C
Interface temperature :	300°C
Probe position :	+2 mm



◆混合標準液

アントシアニン類は酸性で安定のため、アントシアニン類とその他の化合物に分けて混合標準液を調製した。アントシアニン類以外の化合物はさらに4種類に分け、合計5種類の混合標準液を調製した。

◆結果

ポリフェノール類を中心とした160化合物のワイドターゲット分析を実施し、LabSolutions Insight™にて解析を行った。

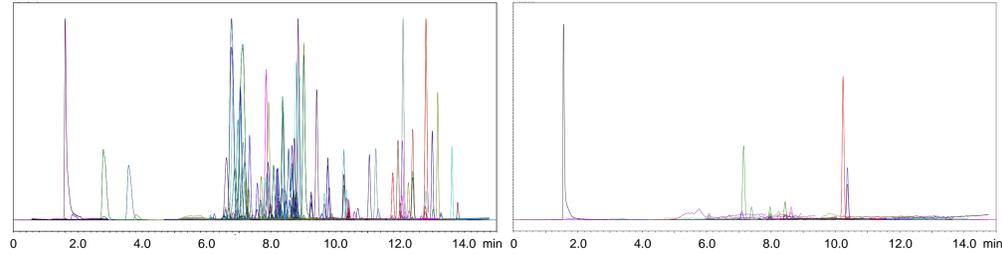


図1 標準品（左）およびトマト抽出物（右）のクロマトグラム

同一のMRMトランジションで、かつ保持時間が近似しているため混合標準液ではピークが一つとなり区別できない化合物が見られた（図2、表3）。これらはApigenin、Vitexin、アントシアニンのグルコース配糖体を標準品とし、それぞれ合算値で定量した。

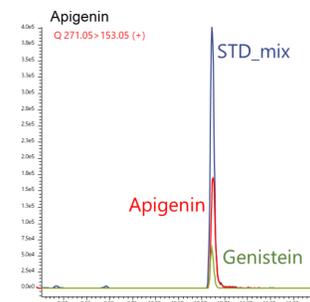


図2 ApigeninとGenisteinのクロマトグラム

表3 MRMトランジションと保持時間が同一のため区別できない化合物

Peonidin 3-O-glucoside ⇔ Peonidin 3-O-galactoside
Cyanidin 3-O-glucoside ⇔ Cyanidin 3-O-galactoside
Delphinidin 3-O-glucoside ⇔ Delphinidin 3-O-galactoside
Vitexin ⇔ Isovitexin
Apigenin ⇔ Genistein
5-Caffeoylquinic acid ⇔ 4-Caffeoylquinic acid *

*4-Caffeoylquinic acidのMRMでは区別可能

定量は[²H₄]-Naringenin を内部標準物質とした内部標準法を採用し、0.1 μM と0.5 μM の2点検量線から各成分の含有量を求めた。検出された成分の含有量を表4に示す。全てのトマトから5-Caffeoylquinic acid, Caffeic acid, Trigonellin, Rutinを検出した。

トマトGに特徴的な成分としてNaringenin chalconeを検出した（図3）。Naringenin chalconeはトマト果皮に多く含まれ、スギ花粉症患者を対象としたトマト果皮抽出物を経口摂取したヒト試験において有意にアレルギー症状を抑制するなどの機能性物質である²⁾。

表4 成分含有量（トマト）

化合物名	A	B	C	D	E	F	G	H
Naringenin	-	-	-	-	-	-	0.02	-
Naringenin chalcone	-	-	-	-	-	-	0.86	0.02
5-Caffeoylquinic acid	2.00	1.45	1.92	1.73	1.6	1.11	1.39	1.85
Caffeic acid	0.16	0.29	0.31	0.24	0.2	0.16	0.19	0.30
Trigonelline	3.75	3.44	2.6	3.37	3.73	2.82	2.36	3.34
Rutin	0.35	0.29	0.33	0.36	0.29	0.15	0.39	0.09

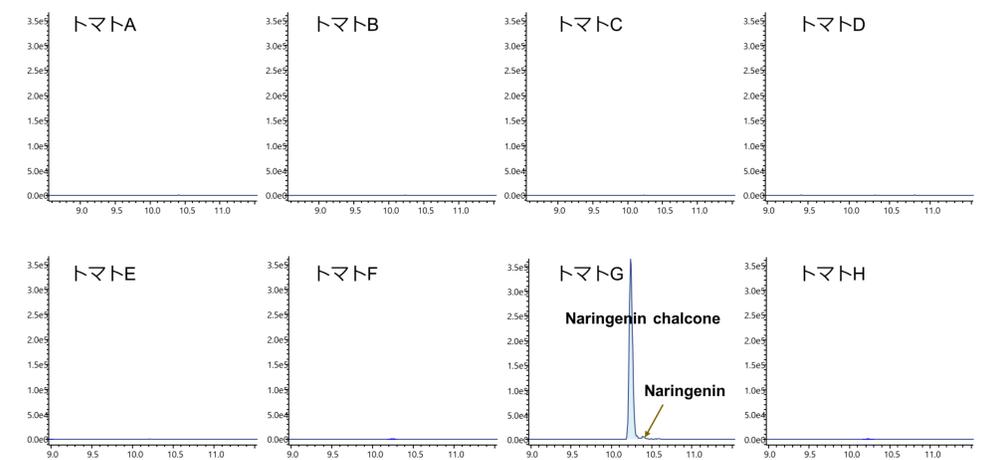


図3 トマト中Naringenin chalconeのクロマトグラム

◆まとめ

フラボノール類、フラバノン類、イソフラボン類、アントシアニン類、フラバノール類、クロロゲン酸、キナ酸、アルカロイド類などを含む160化合物のワイドターゲット分析法を開発した。

本分析法は多数のターゲット化合物を一度に分析し、定量値を算出することが可能であるため、多種多様な食品に含まれるポリフェノールをはじめとする機能性成分の分析法として有用であると考えられる。

<参考文献>

- 市来 ほか、島津評論、第81巻 第3・4号、109-114 (2024)
- Yoshimura M. et al, Allergol. Int., 56, 225-230 (2007)