

液体クロマトグラフィー/質量分析法による青汁粉末原料の分析

田中 聡司*, 西村 康彦*, 吉村仁太郎**, 岩崎 智子***, 山崎 幸彦*

Identification of leaf powders by liquid chromatography/mass spectrometry

Satoshi TANAKA*, Yasuhiko NISHIMURA*,
Shintaro YOSHIMURA***, Tomoko IWASAKI**** and Yukihiko YAMAZAKI*

*Yokohama Customs Laboratory

2-1-10, Shin-urashima-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-0031 Japan

**Present address: Yokohama Customs Onahama Customs Branch

19,Aza-funabikiba,Onahama,Iwaki,Fukushima 971-8101 Japan

***Present address: Yokohama Customs

1-1, Kaigandori, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa 231-8401 Japan

Various leaf powders are imported as raw materials for leaf extracts. In the Customs Tariff Schedule, leaf powders are classified by the species of leaves, and by whether mixed or not. The DNA-based method is commonly used for identifying the species of plants, but the analysis takes a long time. In this study, we examined the identification of leaf powders and mixtures of leaf powders using qualitative analysis of functional food ingredients in the leaves of young barley, mulberry and alfalfa by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Among the three kinds of leaf powders, saponarin, which is known as a functional food ingredient in young barley leaves, was only identified in the young barley leaves; 1-deoxynojirimycin, which is known as a functional food ingredient in mulberry leaves, was only identified in the mulberry leaves; and coumestrol, which is known as a functional food ingredient in alfalfa leaves, was only identified in the alfalfa leaves. In addition, saponarin, 1-deoxynojirimycin and coumestrol were identified in the mixture of three kinds of leaf powders within half a day. Thus, qualitative analysis of functional food ingredients in leaves by LC/MS is useful for rapid identification of leaf powders and mixtures.

1. 緒 言

近年、健康食品として販売されている青汁粉末の原料にするため、様々な種類の植物粉末が輸入されている。その関税分類については、植物の種や、複数の植物から成る混合物か否かによって税番及び税率が異なっており、大麦若葉の粉末は関税率表第1212.99-990（協定税率 3%）、桑葉の粉末は第 1211.90-999（協定税率 2.5%）、アルファルファの粉末は第 1214.90-090（基本税率無税）に分類される。さらにこれらを混合した物は第 2106.90-299（協定税率 15%）に分類され、税率格差が生じることから、植物粉末の種判別及び混合物か否かを判断する必要がある。

植物粉末の場合、形態学的方法による判別が困難であることから、DNA 分析を実施し、植物の種を特定してきたところである。一方、前述のとおり、混合物であった場合に、税率格差が大きい

ことから、分析の依頼に際し、輸入許可を保留した状態で分析依頼されることが多く、速やかな回答を求められているが、DNA 分析等に時間を要しており、特に高額非違となりうる植物粉末混合物の場合、さらに長時間を要する状況となっている。

現在、食用の植物については平成 3 年に特定保健用食品制度が導入されたことを受け、生体機能の調節や成人病予防の機能を持つ食品に係る非栄養成分である機能性成分について、食品メーカー、大学及び自治体において研究されている¹⁾。当該成分は、特定の種に多く含有するとされており、青汁粉末原料に使用される植物についても機能性成分が研究されている。大麦若葉についてはサポナリン、桑葉については1-デオキシノジリマイシン、そしてアルファルファについてはクメストロールが、それぞれの機能性成分として報告されている²⁾⁻⁸⁾。なお当該成分の含有量については、0.1%程度であると言われている。

* 横浜税関業務部 〒221-0031 横浜市神奈川区新浦島町 2-1-10

** 現在所属 横浜税関小名浜税関支署 〒971-8101 福島県いわき市小名浜字船引場 19

***現在所属 横浜税関調査部 〒231-8041 横浜市中区海岸通 1-1

機能性成分については、微量成分であり、また水溶性物質や難揮発性物質も多いことから、液体クロマトグラフィー/質量分析装置（以下、「LC/MS」と略記する。）での分析例が多い。LC/MSは、分離能力に優れたLCと定性能力に優れたMSを結合した装置であり、製薬・環境・食品・工業材料など、幅広い分野で広く普及しつつある分析機器である。今回の研究に用いる四重極飛行時間型検出器のLC/MSは、一般的なGC/MSと比べて高感度であり、精密質量及びMS/MSスペクトルを測定できることから、多数の夾雑成分を含む検体の微量成分分析に適している。

そこで本研究では、簡便な種判別方法として、LC/MSを用いて、植物の機能性成分が植物粉末の種判別の指標に使用できるかについて検討した。さらに複数の植物からなる混合粉末の場合についても検討した。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料（6種）

市販品5種：大麦若葉粉末、桑葉若葉粉末、桑葉茶、アルファルファ粉末、アルファルファキューブ（アルファルファをキューブ状に押し固めたもの）

輸入品1種：大麦若葉粉砕物

2.1.2 試薬

珪藻土カラム Chem Elut (Agilent)、2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール（以下、「BHT」と略記する。）（和光）、濃塩酸（和光、特級）、エタノール（和光、特級）、メタノール（和光、LC/MS用）、サポナリン（フナコシ）、クメストロール（和光）、1-デオキシノジリマイシン（和光）

2.2 分析装置及び条件

分析装置：Agilent 社製 6530Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

カラム：Agilent 社製 Eclipse Plus C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 μ m)

カラム温度：40°C

流速：0.2 mL/分

注入量：3 μ l

移動相：A 液 ギ酸/水/アセトニトリル=0.1:95:5

B 液 アセトニトリル

グラジエント：

条件1 B 液 0%(0-3 分) $\rightarrow$ 90%(15-30 分)

条件2 B 液 20%(0 分) $\rightarrow$ 30%(15 分) $\rightarrow$ 90%(25-40 分)

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモード

乾燥ガス温度：280°C

キャピラリー電圧：3500V

フラグメンター電圧：150V

検出器：四重極飛行時間型タンデム質量分析計

コリジョンガス：窒素

コリジョン電圧：10V、20V 及び 40V

2.3 実験

2.3.1 調製

2.3.1(1) 標準原液

サポナリン、クメストロール及び1-デオキシノジリマイシンをそれぞれ約0.5 mg 採取し、サポナリン及びクメストロールについてはメタノール1 ml、1-デオキシノジリマイシンについては20%メタノール水溶液1 ml に溶解したものを標準原液とした。

2.3.1(2) 標準溶液

当該標準原液を100倍希釈し、0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過したものを標準溶液とした（濃度：約5 μ g/ml）。

2.3.1(3) 抽出用試料

(A) 単一試料

試料（6種）について、粉末のものはそのまま使用し、粉末以外のものは、乳鉢又はグラインダーで粉末状としたもの。

(B) 3種類等量混合試料

大麦若葉粉末、桑葉若葉粉末及びアルファルファ粉末の3種類を等量混合したもの。

(C) 10%含有試料

(a) 大麦若葉 10%含有試料

大麦若葉粉末とアルファルファ粉末又は桑葉粉末とをそれぞれ1:9で混合したもの。

(b) 桑葉 10%含有試料

桑葉若葉粉末と大麦若葉粉末又はアルファルファ粉末とをそれぞれ1:9で混合したもの。

(c) アルファルファ 10%含有試料

アルファルファ粉末と大麦若葉粉末又は桑葉若葉粉末とをそれぞれ1:9で混合したもの。

2.3.1(4) 試料溶液

(A) 単一試料溶液

試料（6種）をそれぞれ50 mg ずつ3検体採取し、それぞれに20%メタノール水溶液、40%メタノール水溶液及び80%メタノール水溶液を加えて30分超音波処理を行い抽出した後、6200 rpm で10分間遠心分離し、その上清を0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過したものを単一試料溶液とした。

(B) 加水分解試料溶液

試料（6種）をそれぞれ500 mg 採取し、濃塩酸2 ml 及び0.06%BHT含有メタノール8 mlを加えて30分間超音波処理を行った後、3時間加熱還流して加水分解を行った。室温まで放冷後、6200 rpm で10分間遠心分離した。その上清を1 ml 採取し、水を加えて全量を9 ml としてよく混和した後、その全量をChem Elut に負荷した。5分間放置後、酢酸エチル12 ml で溶出し、さらに12 ml で溶出した。酢酸エチル溶出液を減圧濃縮後、メタノール2 ml に溶解して0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過したものを試料溶液とした。

(C) 3種類等量混合試料溶液

3種類等量混合試料を50 mg ずつ2検体採取し、それぞれに20%メタノール水溶液及び80%メタノール水溶液を加えて30分超音波処理を行い抽出した後、6200 rpm で10分間遠心分離し、その上清を0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過したものを3

種類等量混合試料溶液とした。

(D) 10%含有試料溶液

(a) 大麦若葉 10%含有試料溶液

大麦若葉 10%含有試料それぞれに 20%メタノール水溶液を加えて 30 分超音波処理を行い抽出した後、6200 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を 0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過したものを大麦若葉 10%含有試料溶液とした。

(b) 桑葉 10%含有試料溶液

桑葉 10%含有試料それぞれに 20%メタノール水溶液を加えて 30 分超音波処理を行い抽出した後、6200 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を 0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過したものを桑葉 10%含有試料溶液とした。

(c) アルファルファ 10%含有試料溶液

アルファルファ 10%含有試料それぞれに 80%メタノール水溶液を加えて 30 分超音波処理を行い抽出した後、6200 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を 0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過したものをアルファルファ 10%含有試料溶液とした。

2.3.2 LC/MS 分析

標準溶液、単一試料溶液及び加水分解試料溶液を 2.2 の条件で LC/MS 分析を行い、MS スペクトル及び MS/MS スペクトルを測定し、機能性成分であるサポナリン、1-デオキシノジリマイシン又はクメストロールが検出されるか否かを確認した。また、3 種類等量混合試料溶液及び 10%含有試料溶液については、2.2 の条件で LC/MS 分析を行い、機能性成分の $[M+H]^+$ イオンの m/z での Extract Ion Chromatogram (以下、「EIC」と略記する。)により、サポナリン、1-デオキシノジリマイシン又はクメストロールが検出されるか否かを確認した。溶離液については、1-デオキシノジリマイシン及びサポナリンを分離する条件 1 及びクメストロールを分離する条件 2 をグラジエント条件とした。

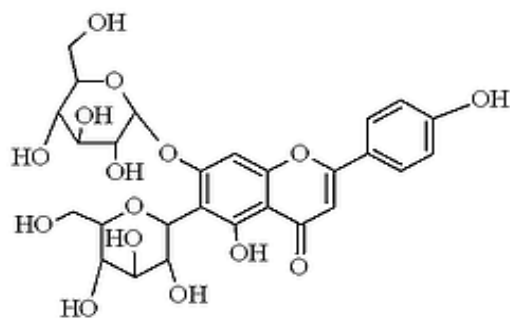
注) サポナリンは、通常ルトナリン及びその誘導体と共に抽出されることから、フラボノイド類の分離のため移動相をギ酸添加の 10%のアセトニトリル水溶液から開始し、グラジエント溶出させる方法が報告されている⁽⁹⁾⁻⁽¹²⁾。1-デオキシノジリマイシンは、一般的な C_{18} カラムでは保持されないことから、イオン交換カラムクロマトグラフィーや親水性相互作用クロマトグラフィーでの分離・溶出の方法が報告されている^{(4),(13)}が、この方法では、専用の分析機器が必要であることやカラム交換等のために時間が必要となる。しかし C_{18} カラムを使用した精密質量での EIC による検出の報告もあるため⁽⁵⁾、今回は C_{18} カラムにて検証した。クメストロールについては、イソフラボン類とともに抽出されるため、イソフラボン類を分離する条件が報告されている^{(7),(8)}。

3. 結果及び考察

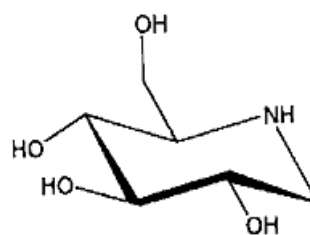
3.1 標準溶液の LC/MS 分析結果

各標準品の構造式を Fig.1 に示し、標準溶液で得られた結果を、Fig.2-4 に示す。どの成分もポジティブモードで感度よく測定可能であった。サポナリンは、分子量 594 であり、 $[M+H]^+$ イオン (m/z :595.166) が検出された。1-デオキシノジリマイシンは、分子量:163 であり、 $[M+H]^+$ イオン (m/z :164.092) が検出された。クメストロールは、分子量:268 であり、 $[M+H]^+$ イオン (m/z :269.045) が検出された。

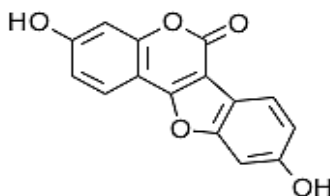
各成分における $[M+H]^+$ イオンの m/z をプリカーサーイオンとして選択した MS/MS スペクトルを取得したところ、各成分とも異なるスペクトルパターンを示した。以上の結果より、標準品については、MS スペクトル及び MS/MS スペクトルの両方にて識別可能であった。また MS/MS スペクトル取得条件のコリジョン電圧は、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの両方が確認できる条件が望ましいが、サポナリンについては 10V、1-デオキシノジリマイシン及びクメストロールは 20V が良好な結果が得られた。



Saponarin (MW: 594)



1-Deoxynojirimycin (MW: 163)



Coumestrol (MW: 268)

Fig.1 Chemical structure of saponarin, 1-deoxynojirimycin and coumestrol

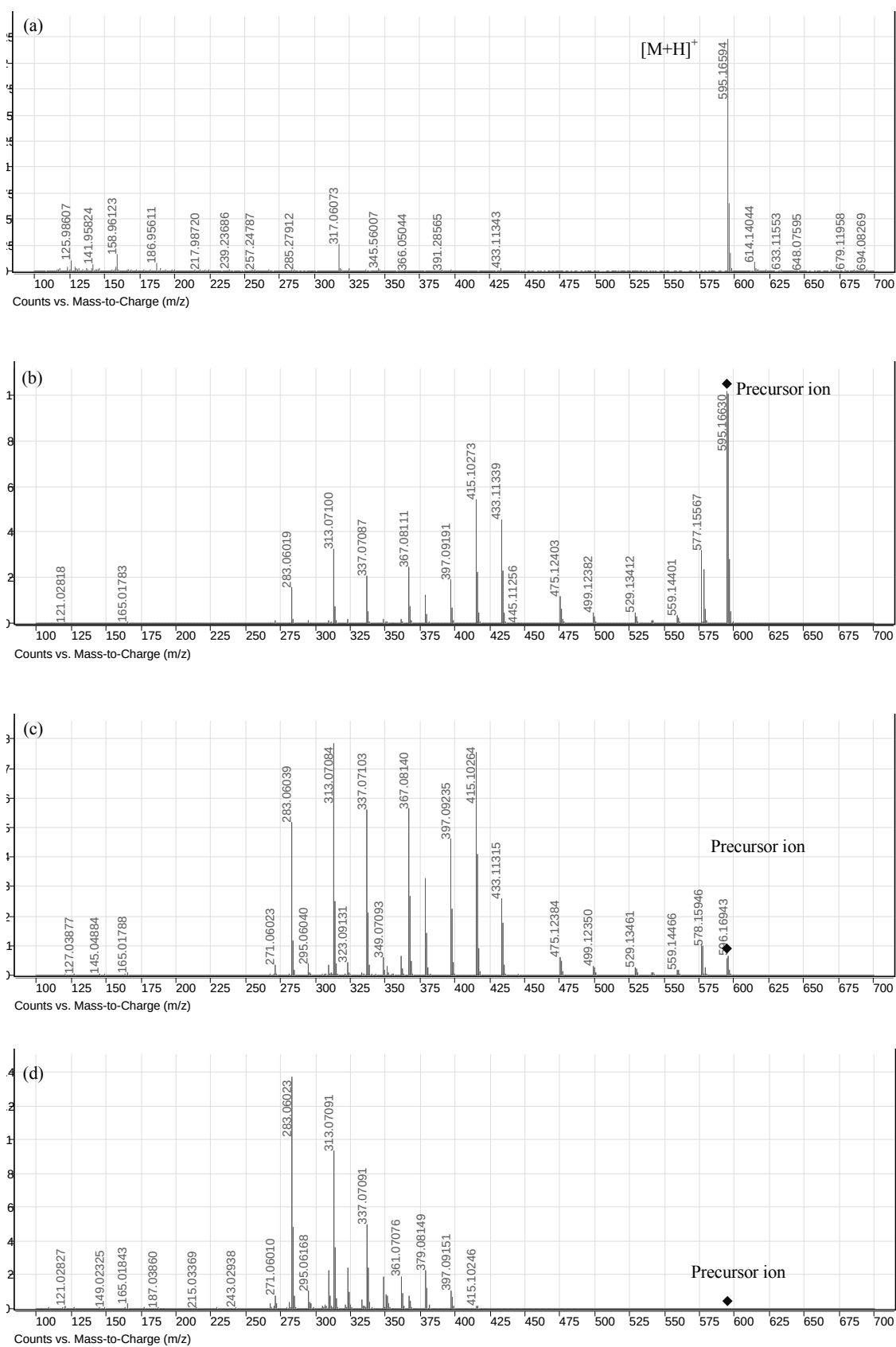


Fig.2 LC/MS analysis of saponarin

(a) MS spectra, (b) MS/MS spectra: collision energy is 10 eV, (c) MS/MS spectra: collision energy is 20 eV, (d) MS/MS spectra: collision energy is 40 eV

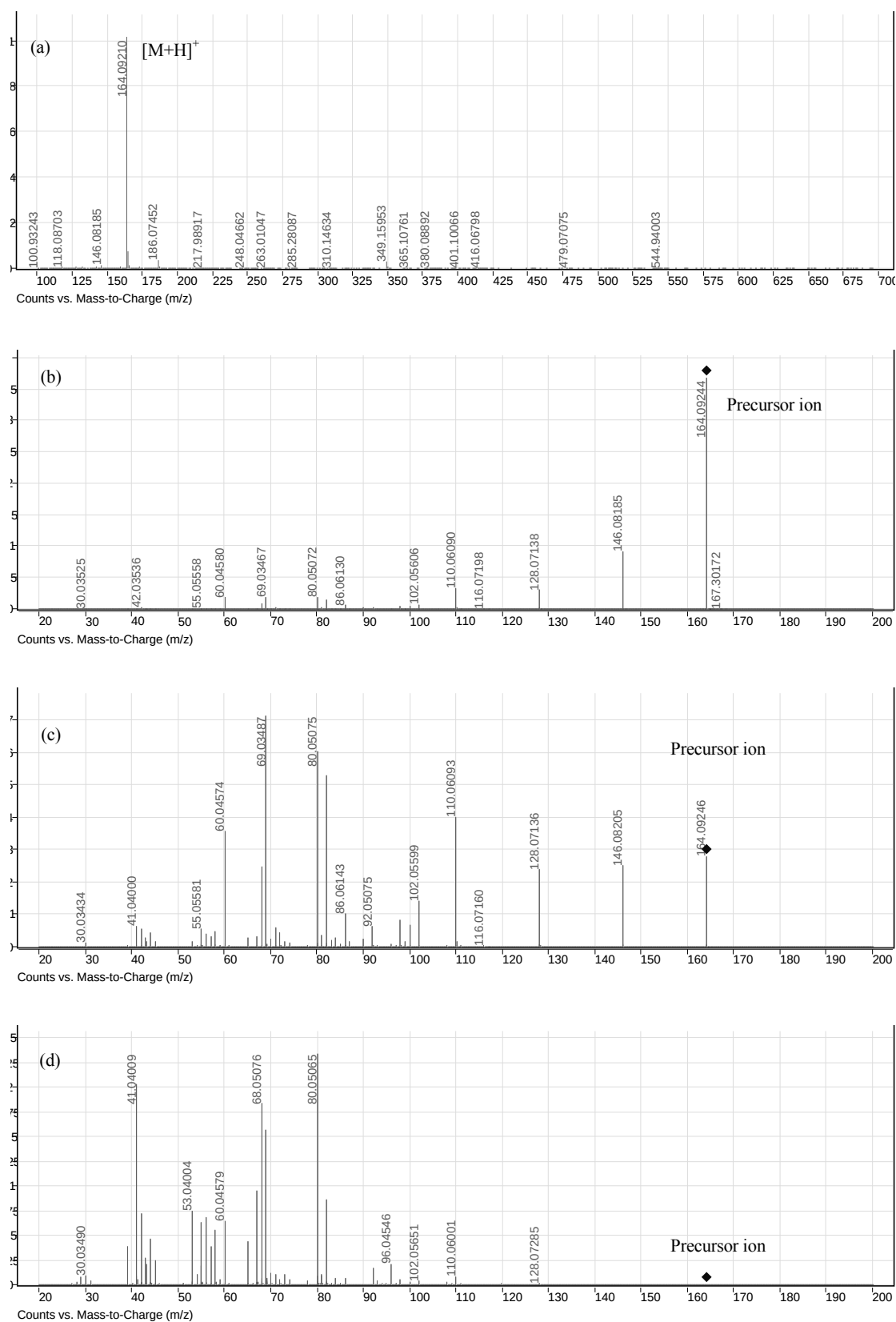


Fig.3 LC/MS analysis of 1-deoxynojirimycin

(a) MS spectra, (b) MS/MS spectra: collision energy is 10 eV, (c) MS/MS spectra: collision energy is 20 eV, (d) MS/MS spectra: collision energy is 40 eV

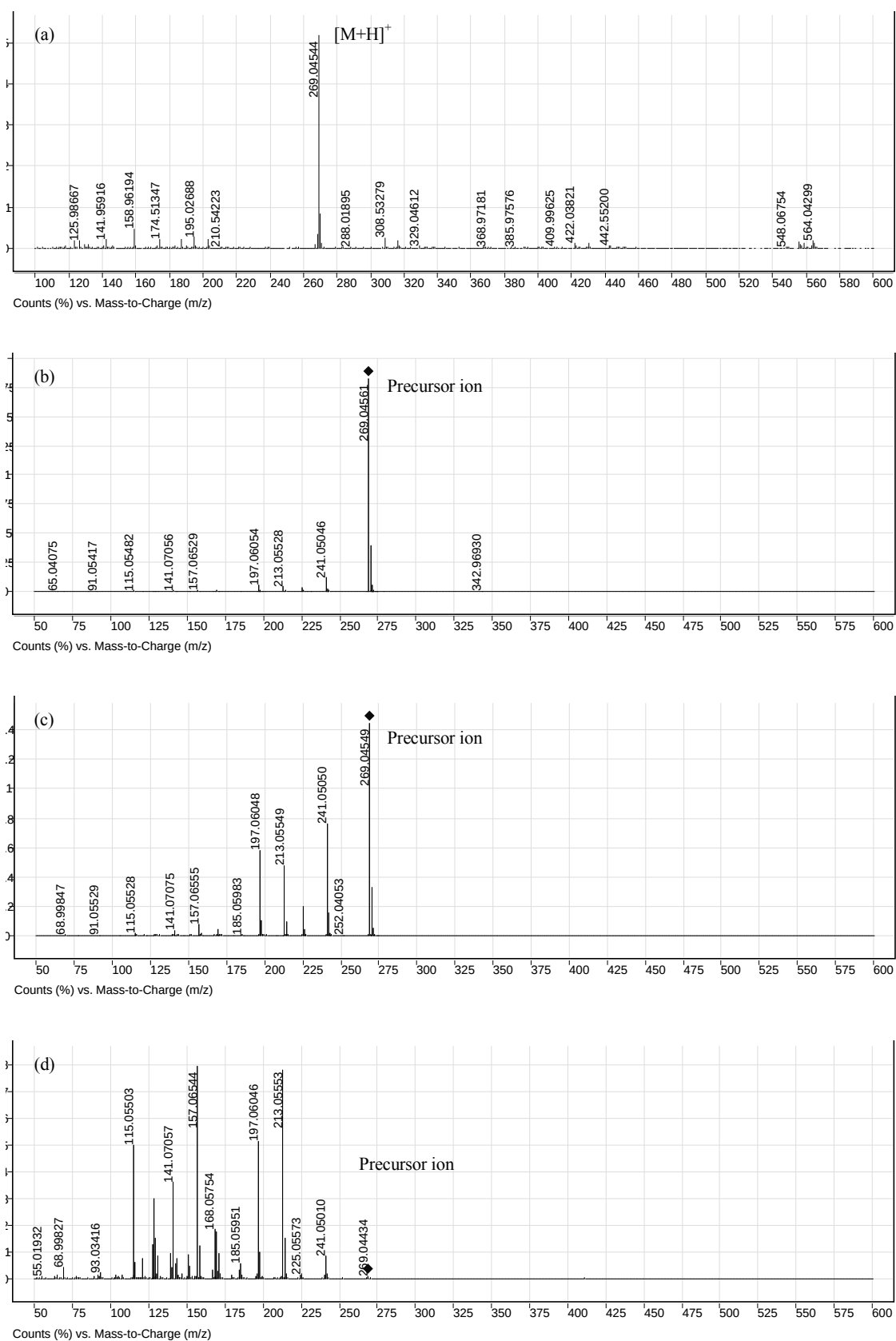


Fig.4 LC/MS analysis of coumestrol

(a) MS spectra, (b) MS/MS spectra: collision energy is 10 eV, (c) MS/MS spectra: collision energy is 20 eV, (d) MS/MS spectra: collision energy is 40 eV

3.2 試料溶液の LC/MS 分析結果

3.2.1 単一試料溶液

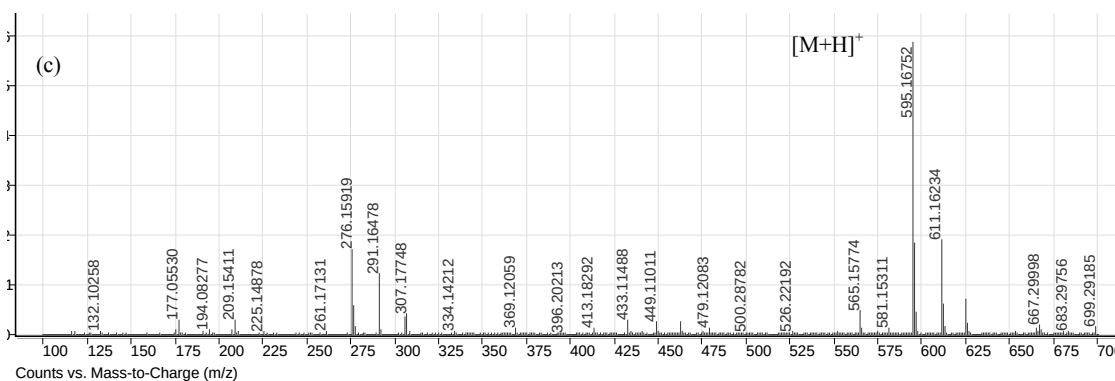
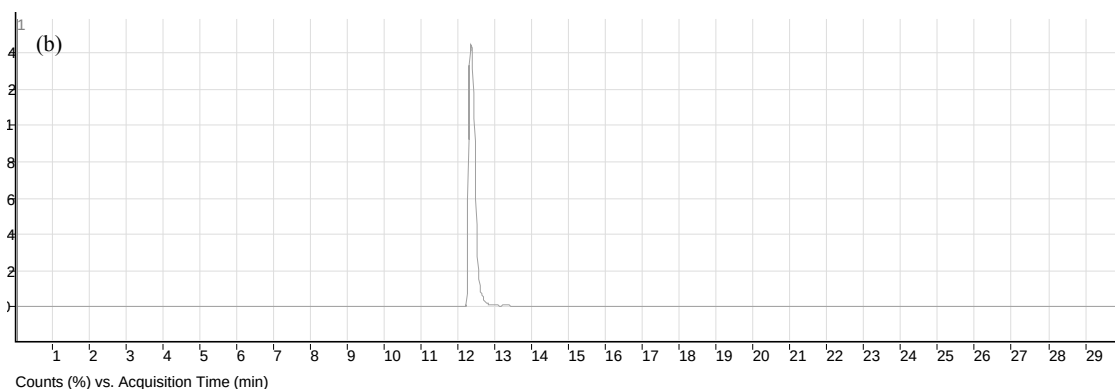
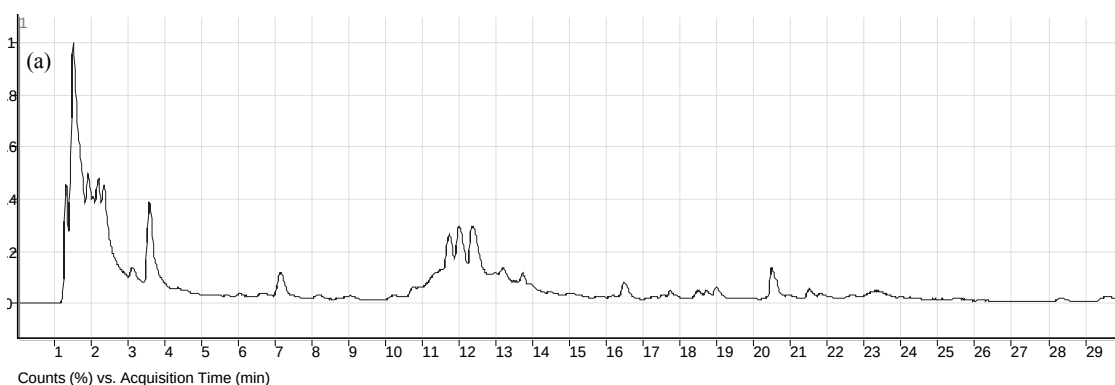
3.2.1(1) 大麦若葉粉末及び大麦若葉粉砕物からのサポナリンの検出方法の検討

サポナリン等フラボノイド類は、30～50%メタノール水溶液で抽出が行われていることから^{(3),(9),(10)} 大麦若葉粉末及び大麦若葉粉砕物の40%メタノール水溶液抽出物について、得られた結果を Fig.5 に示す。Total Ion Current Chromatogram (以下、「TIC」と略記する。)では、複数の成分が検出され、夾雑成分が多く判別不能であったが、サポナリンの $[M+H]^+$ イオンの m/z での EIC (595.17

±0.01) では、単一のピークとして12.5分に検出された。

当該ピークの MS スペクトルを見ると、サポナリン標準品の MS スペクトルとは異なり、 $[M+H]^+$: 595.166 以外のイオンも検出される (Fig.5(c))。そこで確認のために $[M+H]^+$ イオンの m/z :595.176 をプリカーサーイオンとして選択した MS/MS スペクトルを取得したところ、コリジョン電圧: 10V、20V 及び 40V で得られた標準のサポナリンと MS/MS スペクトルが一致した。

以上のことから、LC/MS 分析にて大麦若葉からサポナリンを検出することができた。



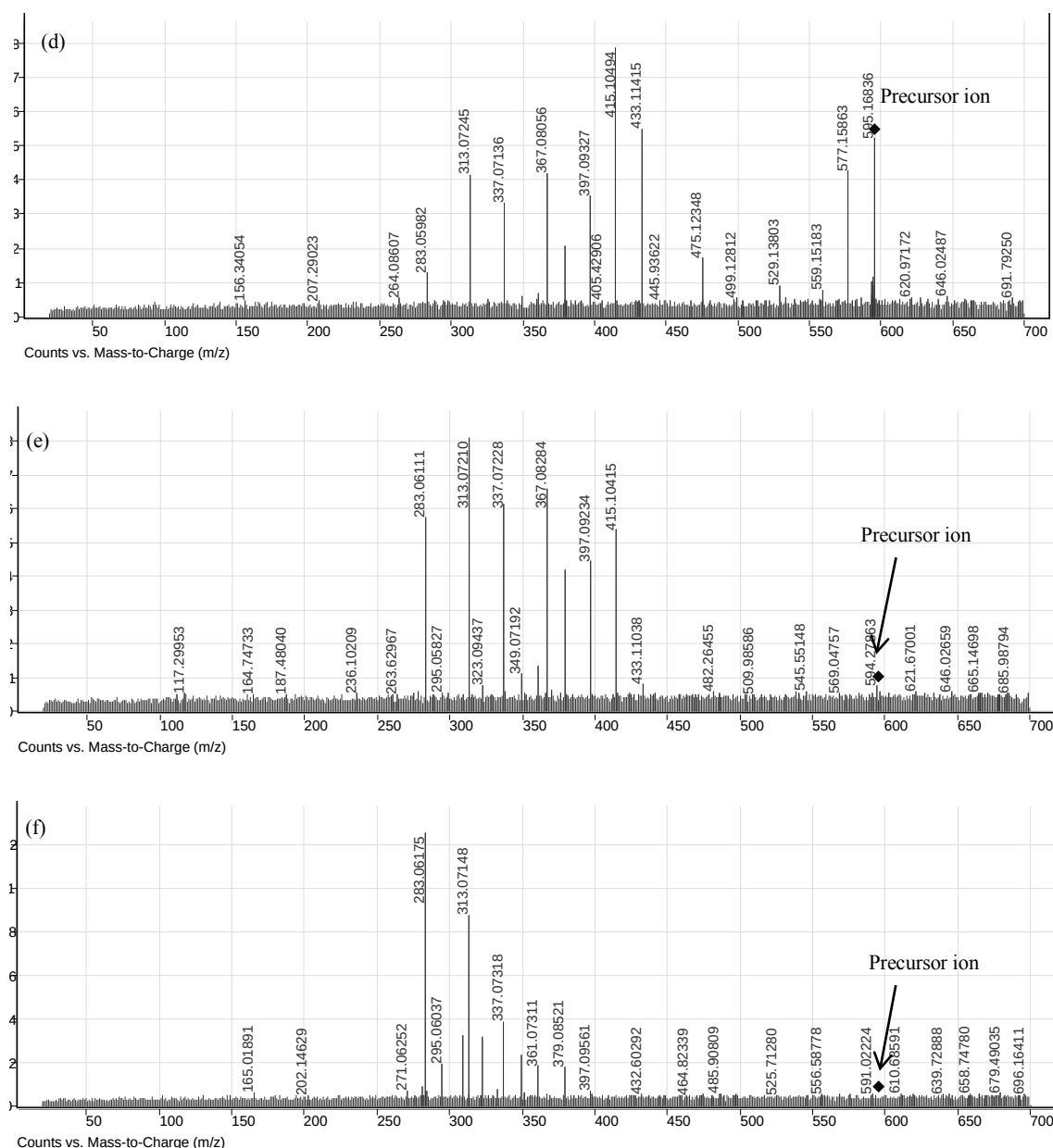


Fig.5 LC/MS analysis from 40% methanol extract of barley leaf powder. (The result for barley crushed leaf is the same; data not shown.)

(a) TIC, (b) EIC (595.166±0.01), (c) MS spectra of peak of EIC (595.166±0.01), (d) MS/MS spectra: collision energy is 10 eV, (e) MS/MS spectra: collision energy is 20 eV, (f) MS/MS spectra: collision energy is 40 eV.

なお今回検証した方法では、小数点以下二桁の範囲で EIC を行ったが、整数質量及び小数点以下一桁での EIC では、複数のピークが検出されている。これは、構造的に類似した植物からの抽出成分が多数存在し、整数レベルでは同一の分子量のものが存在すると思料される。

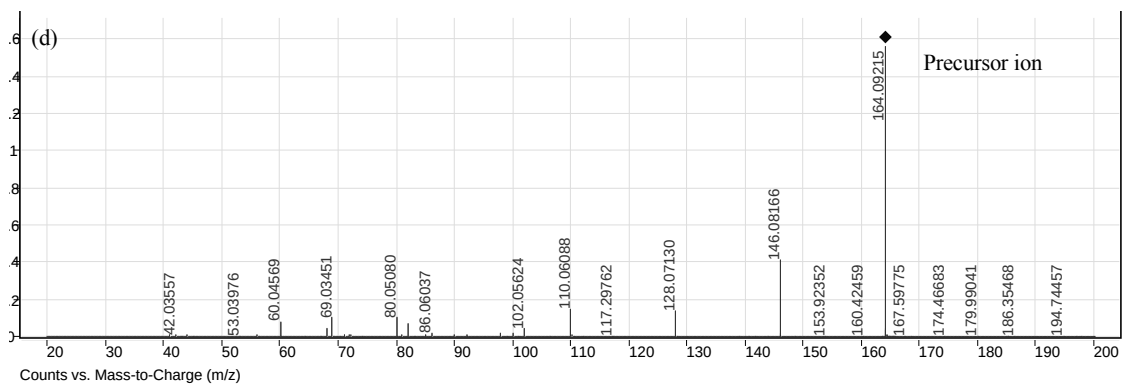
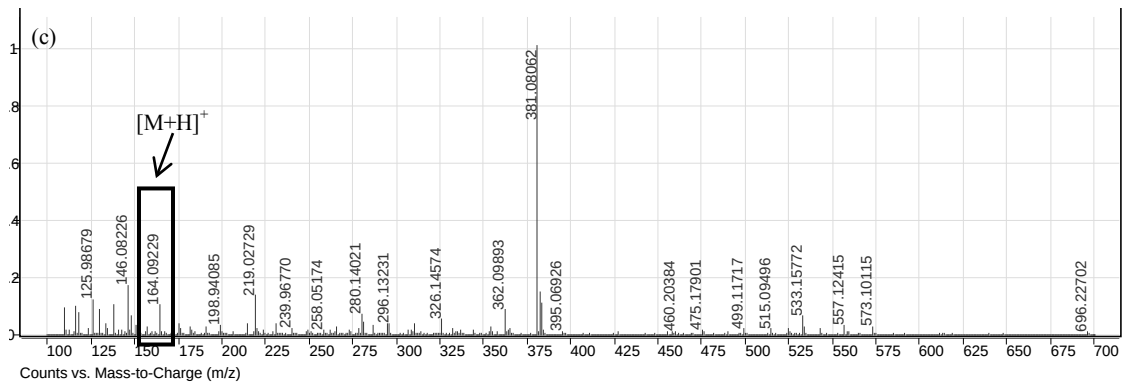
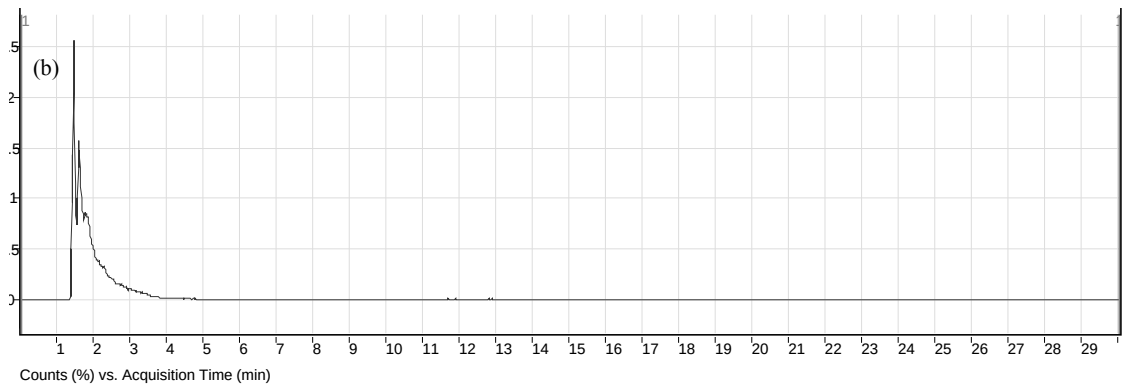
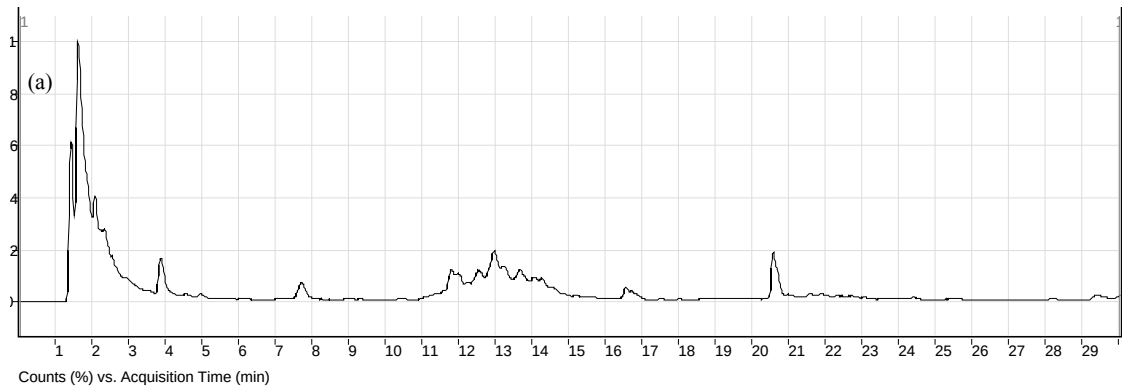
3.2.1(2) 桑葉若葉粉末及び桑葉茶からの 1-デオキシノジリマイシンの検出方法の検討

1-デオキシノジリマイシンは、水抽出が行われている^{4),5)}が、20%メタノール水溶液での抽出が良いとされることから、桑葉若葉粉末及び桑葉茶の 20%メタノール水溶液抽出物について、得られた結果を Fig.6 に示す。TIC では、大麦若葉と同様に複数の成分が検出され、夾雑成分が多く判別不能であったが、1-デオキシノ

ジリマイシンの $[M+H]^+$ イオンの m/z での EIC (164.09 ± 0.01) では、単一のピークとして 1.5 分に検出された。

当該ピークの MS スペクトルを見ると、1-デオキシノジリマイシン標準品の MS スペクトルとは異なり、 $[M+H]^+$ イオンが最大ピークとなっておらず、他のイオンが検出される (Fig.6(c))。そこで確認のために $[M+H]^+$ イオンの m/z : 164.092 をプリカーサーイオンとして選択した MS/MS スペクトルを取得したところ、コリジョン電圧: 10V、20V 及び 40V で得られた標準の 1-デオキシノジリマイシンと MS/MS スペクトルが一致した。

以上のことから、LC/MS 分析にて桑葉からは 1-デオキシノジリマイシンを検出することができた。



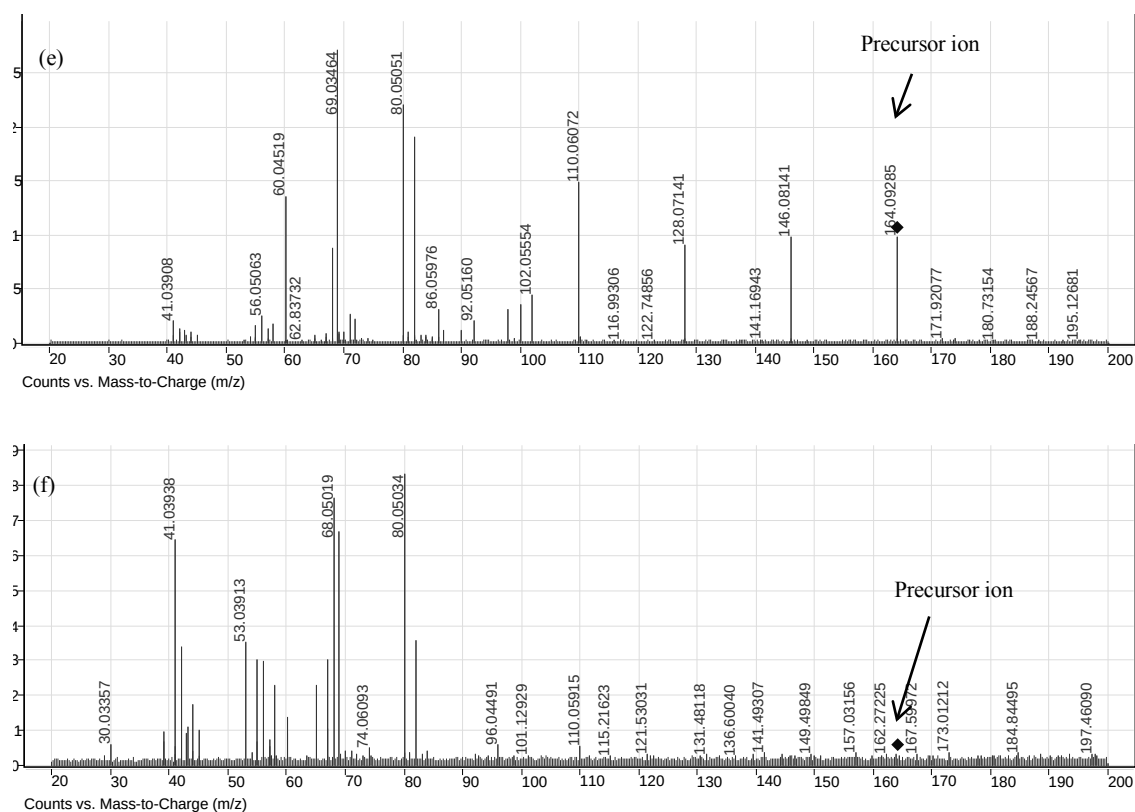


Fig.6 LC/MS analysis from 20% methanol extract of mulberry leaf powder. (The result for mulberry leaf tea is the same; data not shown.)

(a) TIC, (b) EIC (164.92±0.01), (c) MS spectra of peak of EIC (164.92±0.01), (d) MS/MS spectra: collision energy is 10 eV, (e) MS/MS spectra: collision energy is 20 eV, (f) MS/MS spectra: collision energy is 40 eV

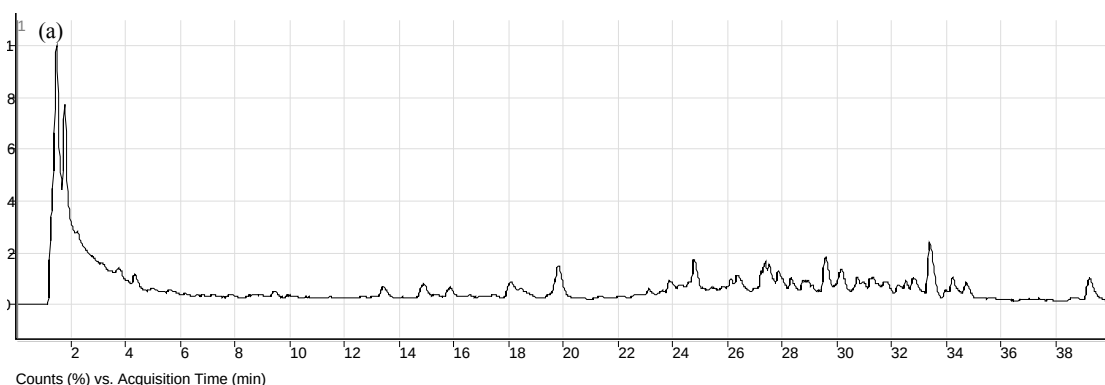
なおEICの1.5分のピークについては形状の乱れが見られるが、当該成分は、C18 カラムで保持されず、又、他の多くの極性成分と同様に溶出直後に検出されることからピーク形状の改善ができなかったものと思料される。

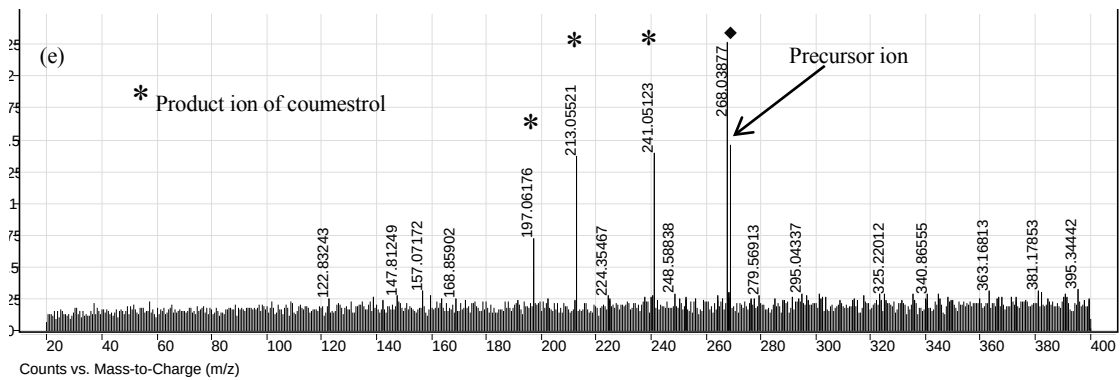
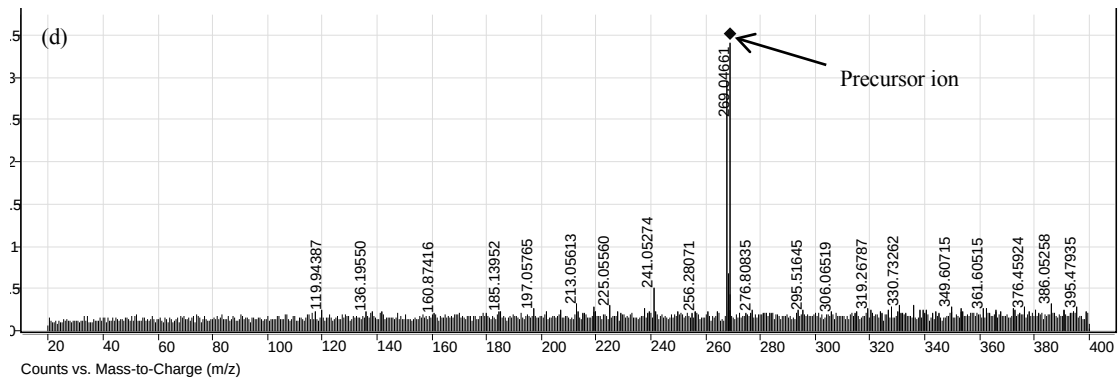
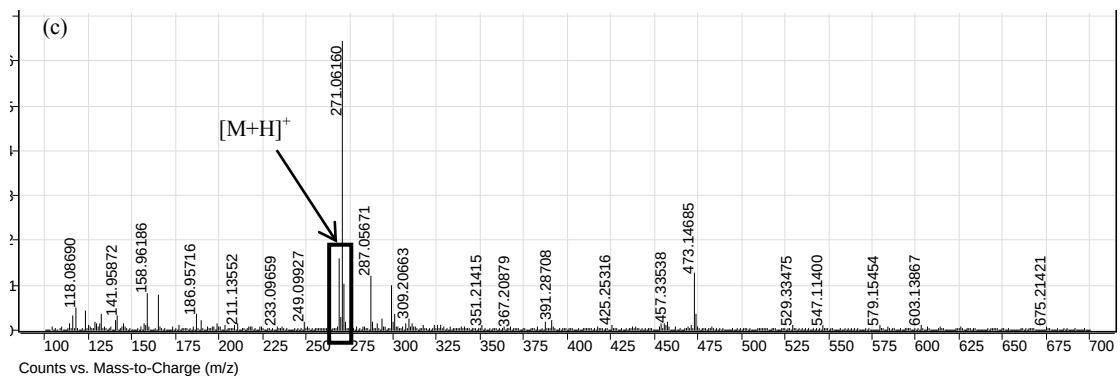
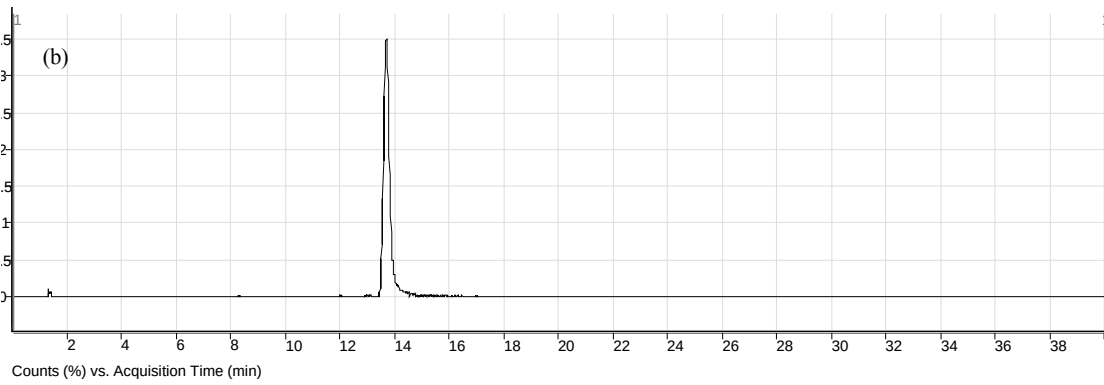
3.2.1(3) アルファルファ粉末及びアルファルファキューブからのクメストロールの検出方法の検討

クメストロール等イソフラボン類は、含水メタノール、特に80%メタノール水溶液で抽出が行われていることから⁽⁷⁾⁽⁸⁾、アルファルファ粉末及びアルファルファキューブの80%メタノール水溶液抽出物について得られた結果を、Fig.7に示す。TICでは、大麦若葉及び桑葉と同様に複数の成分が検出され、夾雑成分が多く判別不能であったが、クメストロールの[M+H]⁺イオンの m/z での EIC

(269.05±0.01)では、単一のピークとして13.5分に検出された。

当該ピークのMSスペクトルを見ると、クメストロール標準品のMSスペクトルとは異なり、[M+H]⁺イオンが最大ピークとなっておらず、他のイオンも検出された (Fig.7(c))。そこで確認のために[M+H]⁺イオンの m/z: 269.045 をプリカーサーイオンとして選択した MS/MS スペクトルを取得したところ、コリジョン電圧: 10V、20V 及び 40V で得られた標準のクメストロールと MS/MS スペクトルは完全には一致せず、標準品では見られないスペクトルも検出されたが、コリジョン電圧を変化させると、クメストロール標準品の MS/MS スペクトルと同様に特定の MS スペクトルのみが増減していることから、当該成分はクメストロールであると思料される。





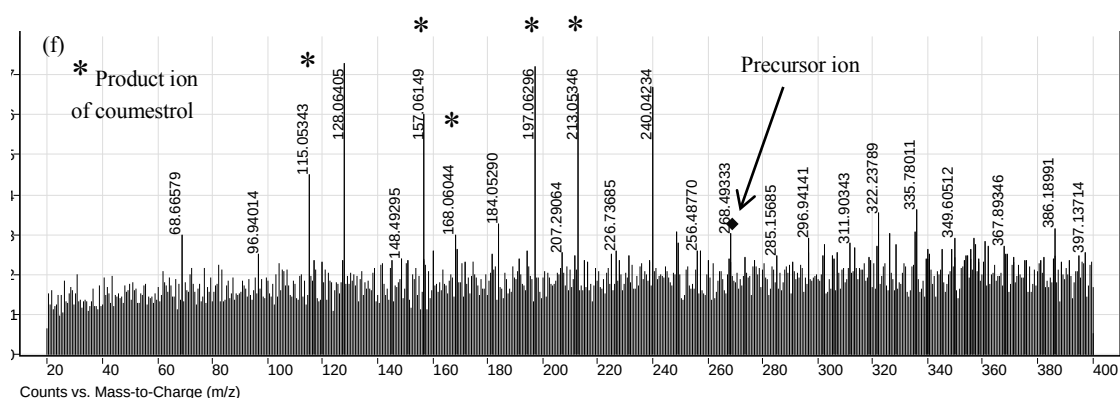


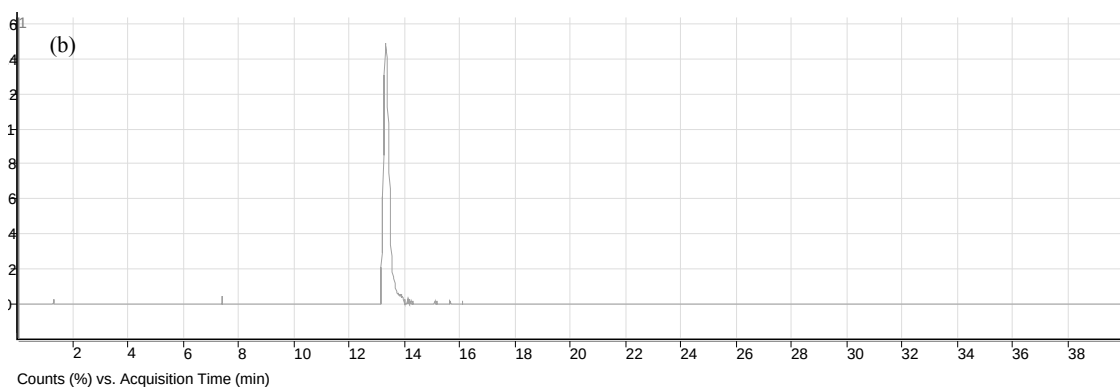
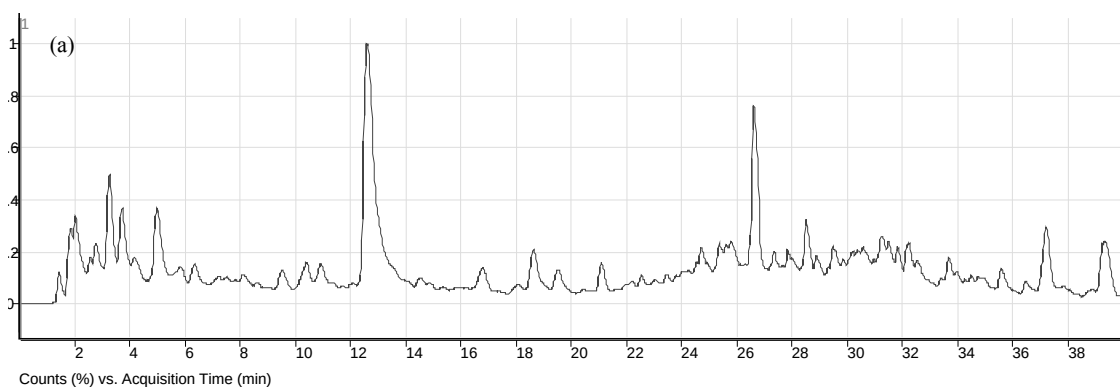
Fig. 7 LC/MS analysis from 80% extract of alfalfa leaf powder. (The result for alfalfa leaf cube is the same; data not shown.)

(a) TIC, (b) EIC (269.05±0.01), (c) MS spectra of peak of EIC (269.05±0.01), (d) MS/MS spectra: collision energy is 10 eV, (e) MS/MS spectra: collision energy is 20 eV, (f) MS/MS spectra: collision energy is 40 eV

次に加水分解試料溶液について、得られた結果を Fig.8 に示す。通常、クメストロールを含むイソフラボン類はそのほとんどが、配糖体として存在していることが知られているため、酸加水分解を行うことにより遊離体にする必要があるが、アルファルファの酸加水分解物から検出されるクメストロールについては、80%メ

タノール水溶液抽出物と比較して、ピーク高さにおいて有意な差は見られなかった (Fig.9)。

以上のことから、LC/MS 分析にてアルファルファからはクメストロールを検出可能であり、またアルファルファからは、加水分解の操作がなくても検出できることがわかった。



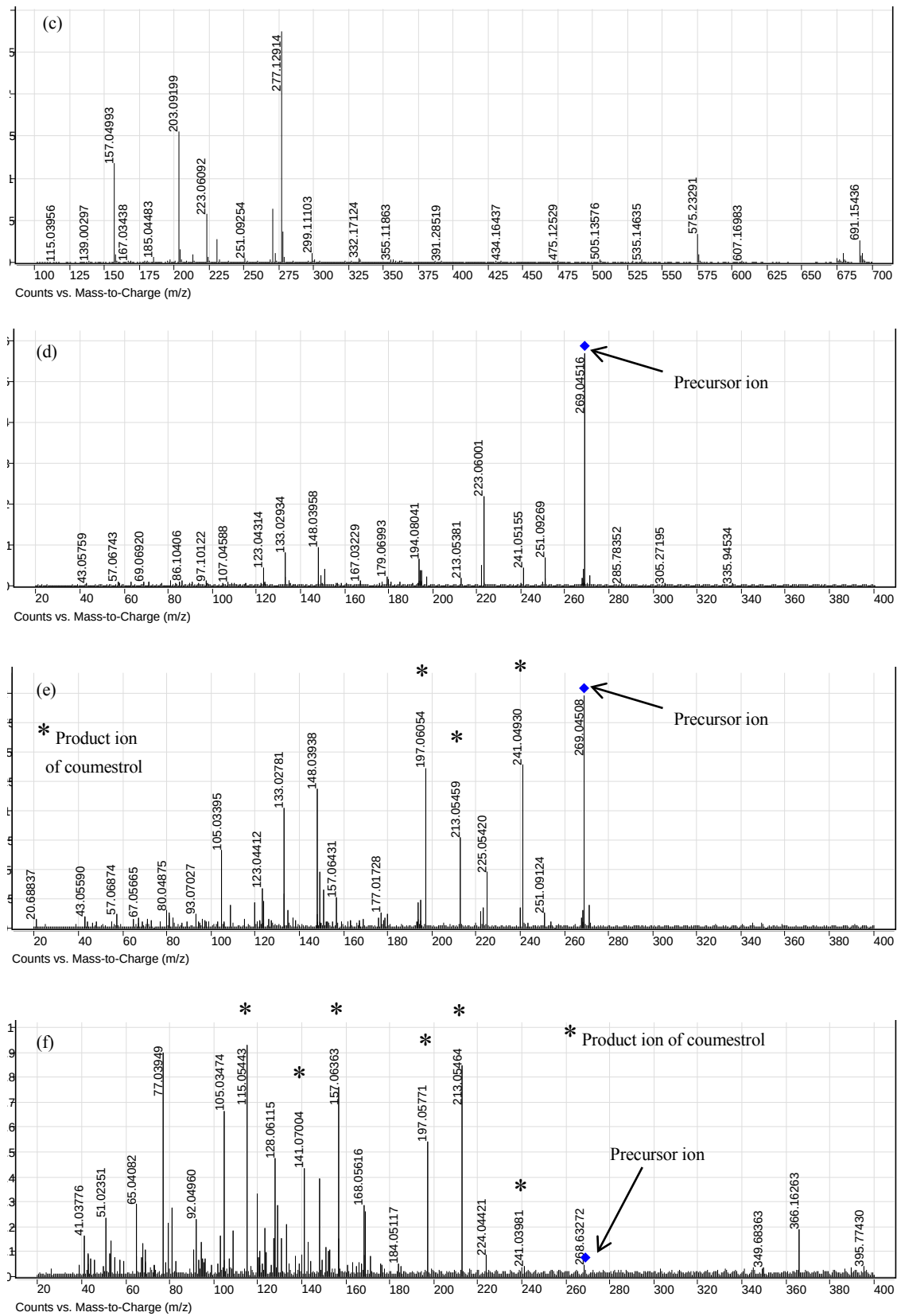


Fig.8 LC/MS analysis from extract of alfalfa leaf powder with hydrolysis. (The result for alfalfa leaf cube is the same; data not shown.)

(a) TIC, (b) EIC (269.05±0.01), (c) MS spectra of peak of EIC (269.05±0.01), (d) MS/MS spectra: collision energy is 10 eV, (e) MS/MS spectra: collision energy is 20 eV, (f) MS/MS spectra: collision energy is 40 eV

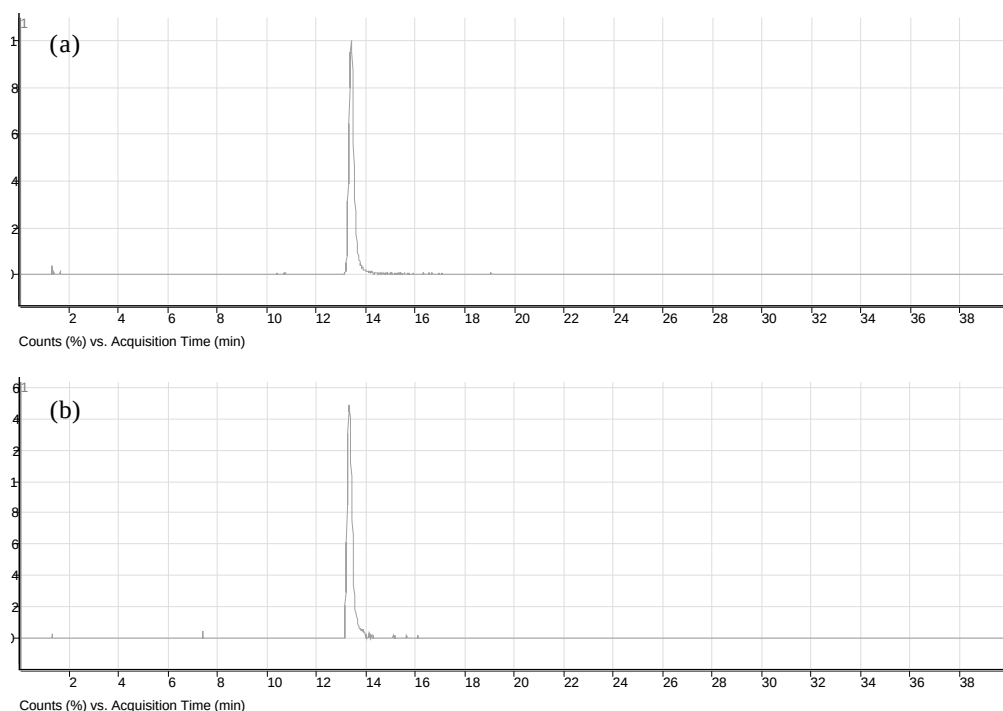


Fig.9 Comparison between extract of alfalfa leaf powder without hydrolysis and that of alfalfa leaf powder with hydrolysis. Each chromatogram is shown on the same scale.

(a) EIC (269.056 ± 0.01) from extract without hydrolysis, (b) EIC (269.05 ± 0.01) from extract with hydrolysis

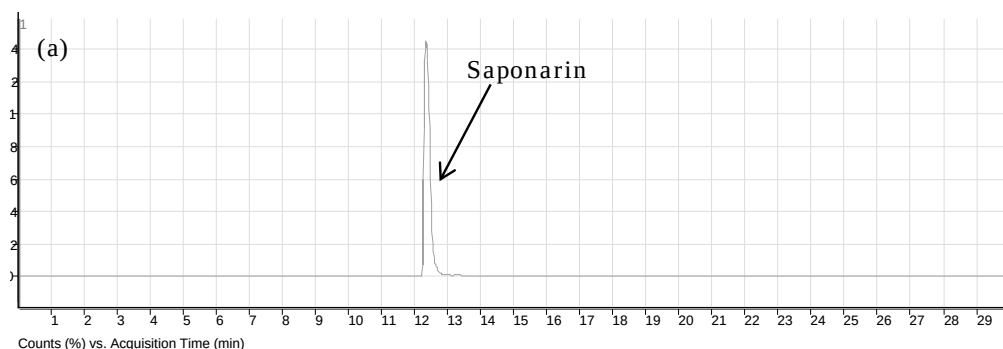
なおアルファルファ粉末及びアルファルファキューブについて、 $[M+H]^+$ イオンの m/z をプリカーサーイオンとして選択した MS/MS スペクトルとクメストロール標準品の MS/MS スペクトルと完全に一致していないが、その理由については、当該機器の m/z によるプリカーサーイオンの選択範囲の問題があげられる。当該機器の検出器は、四重極型と飛行時間型のタンデムであり、MS/MS スペクトル測定時は、四重極で特定の m/z のイオンだけを選択的に通過させ、コリジョンセルで破壊の上、飛行時間型検出器で質量を検出する。 m/z での選択範囲は、四重極での質量分解能によるが、当該機器の設定の下限値は $\pm 1.4 m/z$ であり、この範囲内のイオンをすべて通過させることとなる。Fig.7(c)を見ると、 $[M+H]^+$ イオンの m/z の ± 1.4 の範囲に他の質量数のイオンが確認されることから、この範囲にある他の質量数のイオンも選択され、

コリジョンセルで破壊及び検出されたことが原因と史料される。より正確な MS/MS スペクトルの取得には、試料の精製や LC での分離を改善し、 $[M+H]^+$ イオン ($m/z:269.045$) のスペクトル強度を上げる必要があると史料される。

3.2.1(4) 他の植物種からのサポナリンの検出

大麦若葉以外の各試料の 40%メタノール水溶液抽出物において、3.2.1(1)と同様の手法で、サポナリンからの検出を試みたが、大麦若葉以外は EIC (595.17 ± 0.01) にてピークが検出されなかった (Fig.10)。なお桑葉抽出物の EIC でサポナリンの保持時間に近いピークが検出されるが、MS/MS スペクトルを取得した結果、サポナリンと異なる成分であった。

以上のことから、サポナリンは大麦若葉からのみ検出されることがわかった。



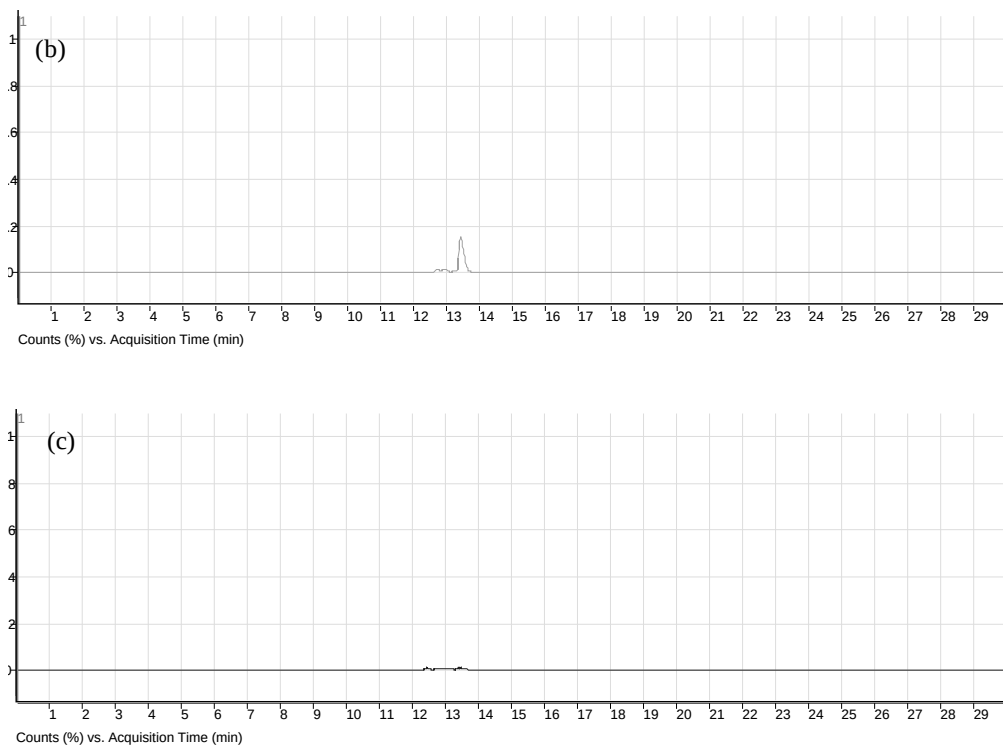


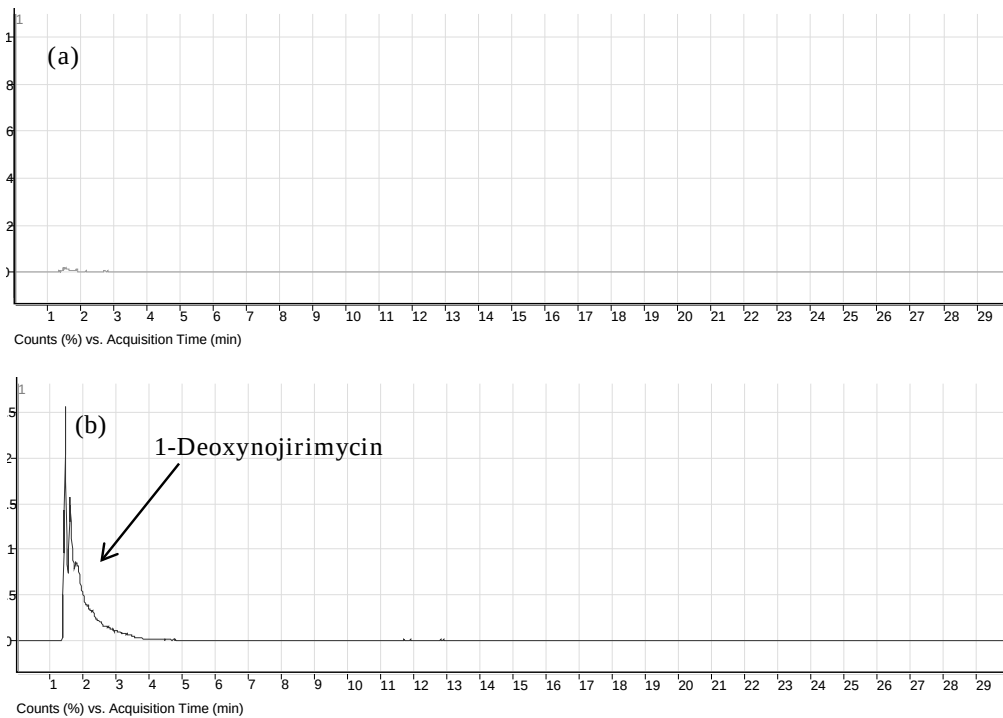
Fig.10 EIC (595.17±0.01) from 40% methanol extract of (a) barley leaf powder, (b) mulberry leaf powder, and (c) alfalfa leaf powder. Each chromatogram is shown on the same scale. The peak of chromatogram (b) is not saponarin because of the difference of MS/MS spectra (data not shown).

3.2.1(5) 他の植物種からの 1-デオキシノジリマイシンの検出

各試料の 20%メタノール水溶液抽出物において、3.2.1(2)と同様の手法で、1-デオキシノジリマイシンの検出を試みたが、桑葉以

外は EIC (164.09±0.01) にてピークが検出されなかった (Fig.11)。

以上のことから、1-デオキシノジリマイシンは桑葉からのみ検出されることがわかった。



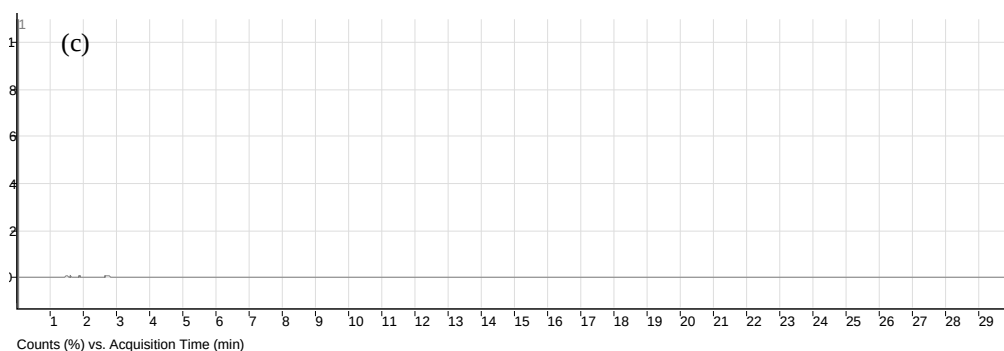


Fig.11 EIC (164.09 ± 0.01) from 20% methanol extract of (a) barley leaf powder, (b) mulberry leaf powder, and (c) alfalfa leaf powder. Each chromatogram is shown on the same scale.

3.2.1(6) 他の植物種からのクメストロールの検出

各試料の 80% メタノール水溶液抽出物及び加水分解試料溶液において、3.2.1(3)と同様の手法で、クメストロールの検出を試みたが、アルファルファ以外は、酸加水分解の有無にかかわらず、

EIC (269.05 ± 0.01) にてピークが検出されなかった (Fig.12)。

以上のことから、クメストロールはアルファルファからのみ検出されることがわかった。

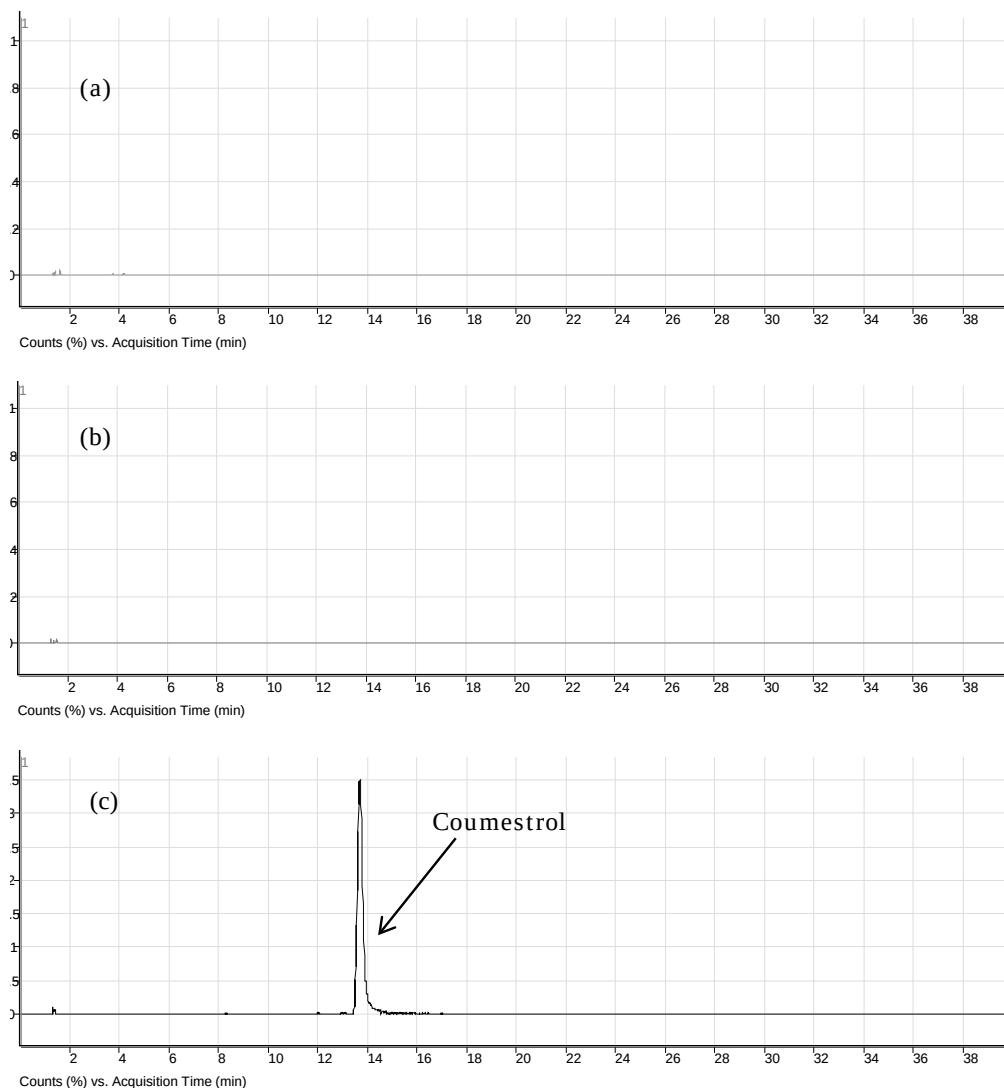


Fig.12 EIC (269.05 ± 0.01) from 80% methanol extract and extract with hydrolysis of (a) barley leaf powder, (b) mulberry leaf powder, and (c) alfalfa leaf powder. Each chromatogram is shown on the same scale. (The result for extract with hydrolysis is the same; data not shown.)

3.2.1(7) 1-デオキシノジリマイシン抽出条件でのサポナリンの検出

サポナリンは、水の割合の多い含水メタノールにて抽出可能であり、LC/MS 分析の溶離液の条件も 1-デオキシノジリマイシンと

同一としていることから、分析時間の短縮のため、1-デオキシノジリマイシンの検出に用いる 20%メタノール水溶液抽出物においてサポナリンの検出を試みたところ、サポナリンは検出可能であり、ピーク高さにおいても有意な差は見られなかった (Fig.13)。

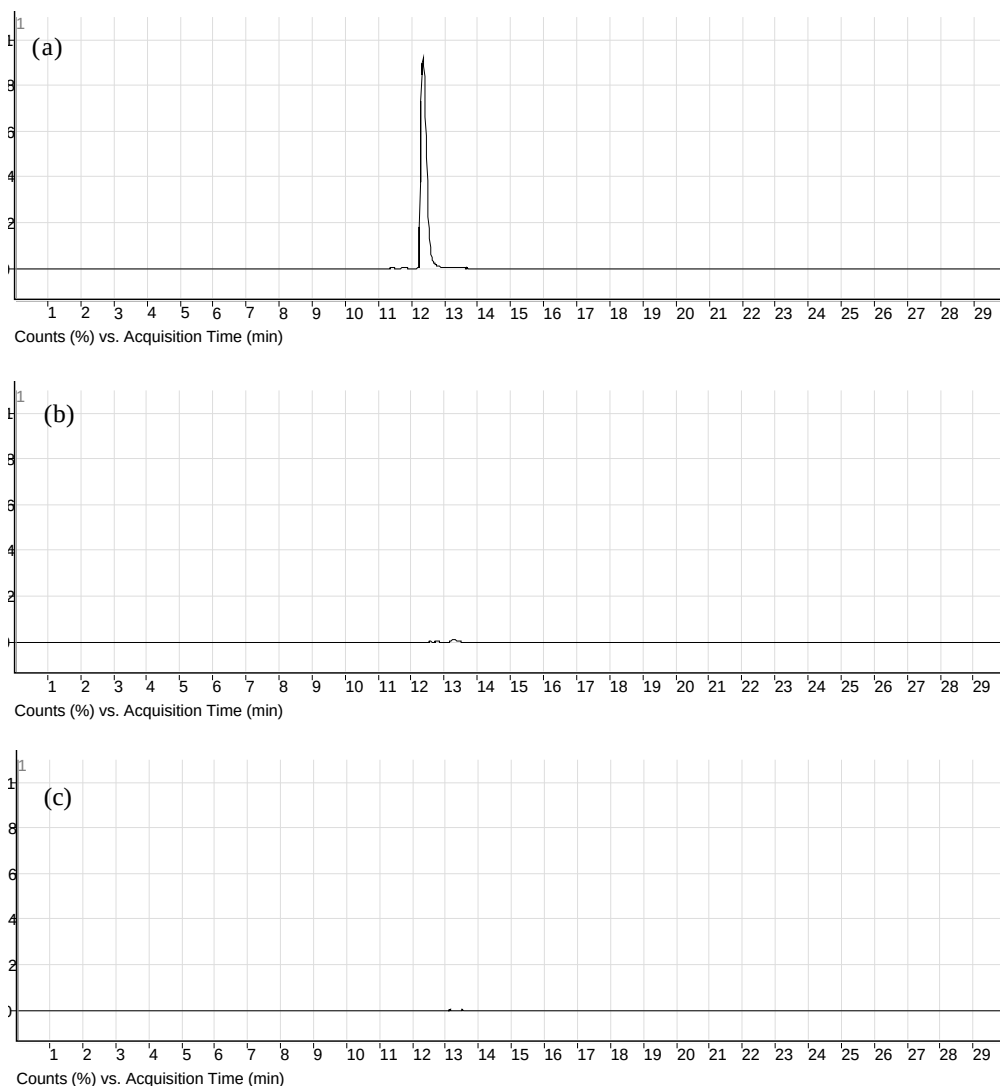


Fig.13 EIC (595.17±0.01) from 20% methanol extract of (a) barley leaf powder, (b) mulberry leaf powder, and (c) alfalfa leaf powder. Each chromatogram is shown on the same scale as Fig. 10.

3.2.1(8) 単一試料の種判別についての考察

今回検討した 3 種類の植物粉末のうち、サポナリンは大麦若葉のみから検出され、1-デオキシノジリマイシンは桑葉のみから検出され、クメストロールはアルファルファのみから検出された。このことから LC/MS 分析によりサポナリン、1-デオキシノジリマイシン及びクメストロールの検出を行うことで、大麦若葉、桑葉及びアルファルファの種判別が可能であるといえる。

また 3.2.1(4)、3.2.1(5)、3.2.1(6)及び 3.2.1(7)の結果から、種判別については、20%メタノール水溶液抽出物及び 80%メタノール水溶液抽出物についての LC/MS 分析結果の各成分の精密質量での EIC のみで判別可能であると思料されることから、混合試料を用

いた検討では、当該方法で行うこととした。

3.2.2 3 種類等量混合試料溶液

LC/MS 分析においては、夾雑成分によるマトリックス効果の影響で目的成分のイオン化効率に変化し、感度が低下したり上昇したりする現象が起こる。そこで混合による成分比が変わることによる影響の可否について確認する必要があることから、混合物試料での機能性成分の検出を試みた。得られた結果を Fig.14 に示す。各成分の $[M+H]^+$ イオンの m/z での EIC により、20%メタノール水溶液からはサポナリン及び 1-デオキシノジリマイシン、80%メタノール水溶液からはクメストロールが検出され、他の成分の妨害なく 3 成分とも検出可能であった。

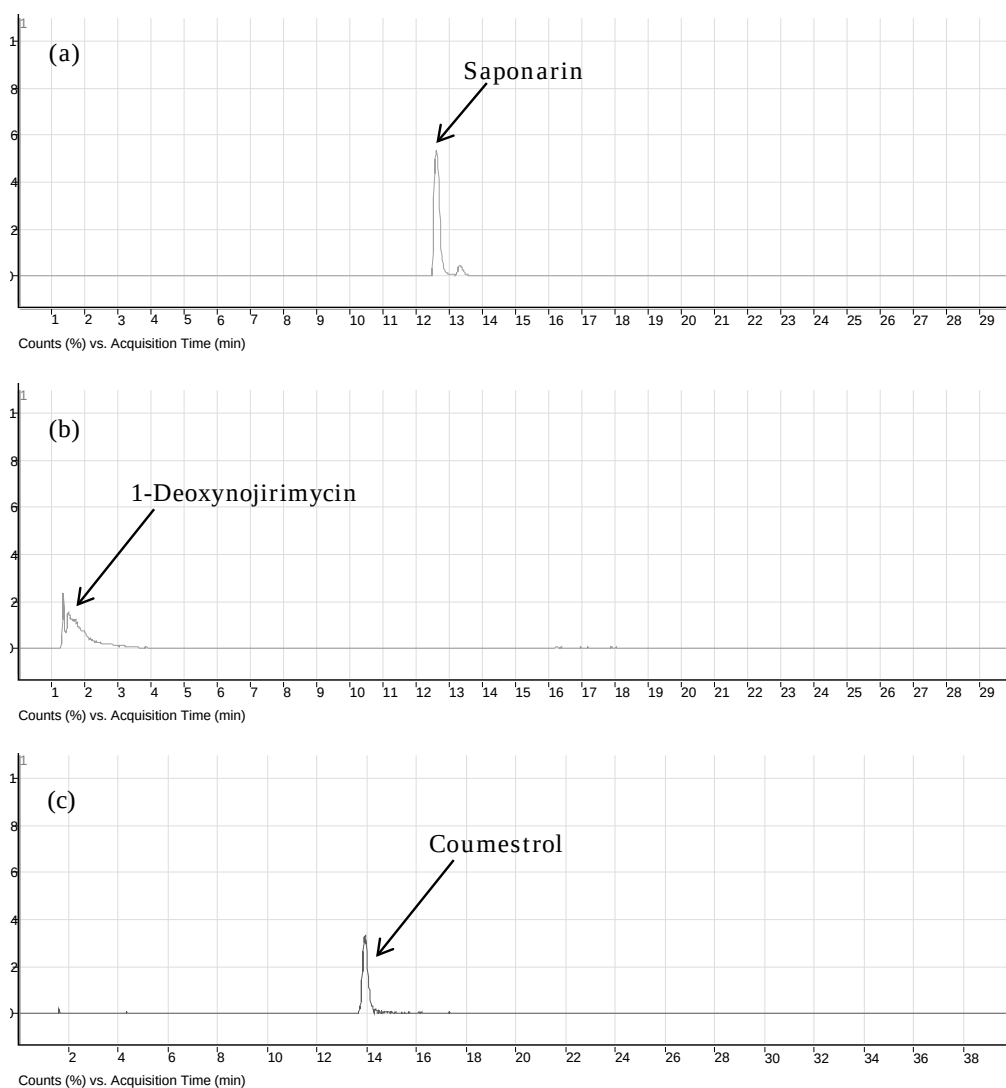


Fig.14 EIC from methanol extract of mixture of barley leaf powder, mulberry leaf powder and alfalfa leaf powder.

(a) EIC (595.17±0.01) from 20% methanol extract. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 10.

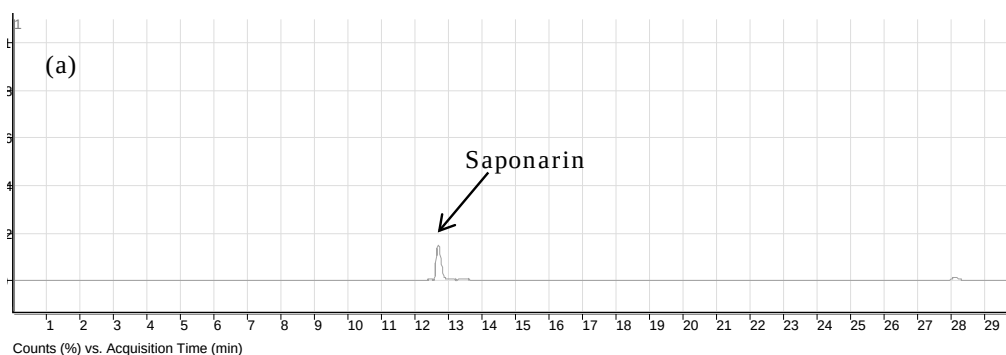
(b) EIC (164.09±0.01) from 20% methanol extract. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 11.

(c) EIC (269.05±0.01) from 80% methanol extract. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 12.

3.2.3 10%含有試料溶液

目的の植物の混合割合が低い場合においても、前述の成分が検出可能か否かを確認するため、大麦若葉 10%含有試料、桑葉 10%含有試料及びアルファルファ 10%含有試料について、得られた結果を Fig.15 に示す。各成分の $[M+H]^+$ イオンの m/z での EIC により、それぞれ単一ピークとして検出可能であった。

以上のことから、10%程度混合された植物の混合粉末についても LC/MS 分析にて特定の種が含有するかの判断が可能であった。なお 10%以下の混合比の混合物試料については、検証を行っていないが、目的とする機能性成分が検出されないとされる植物抽出物の LC/MS 分析結果と比較し、ピークの有無を確認する必要があると思料される。



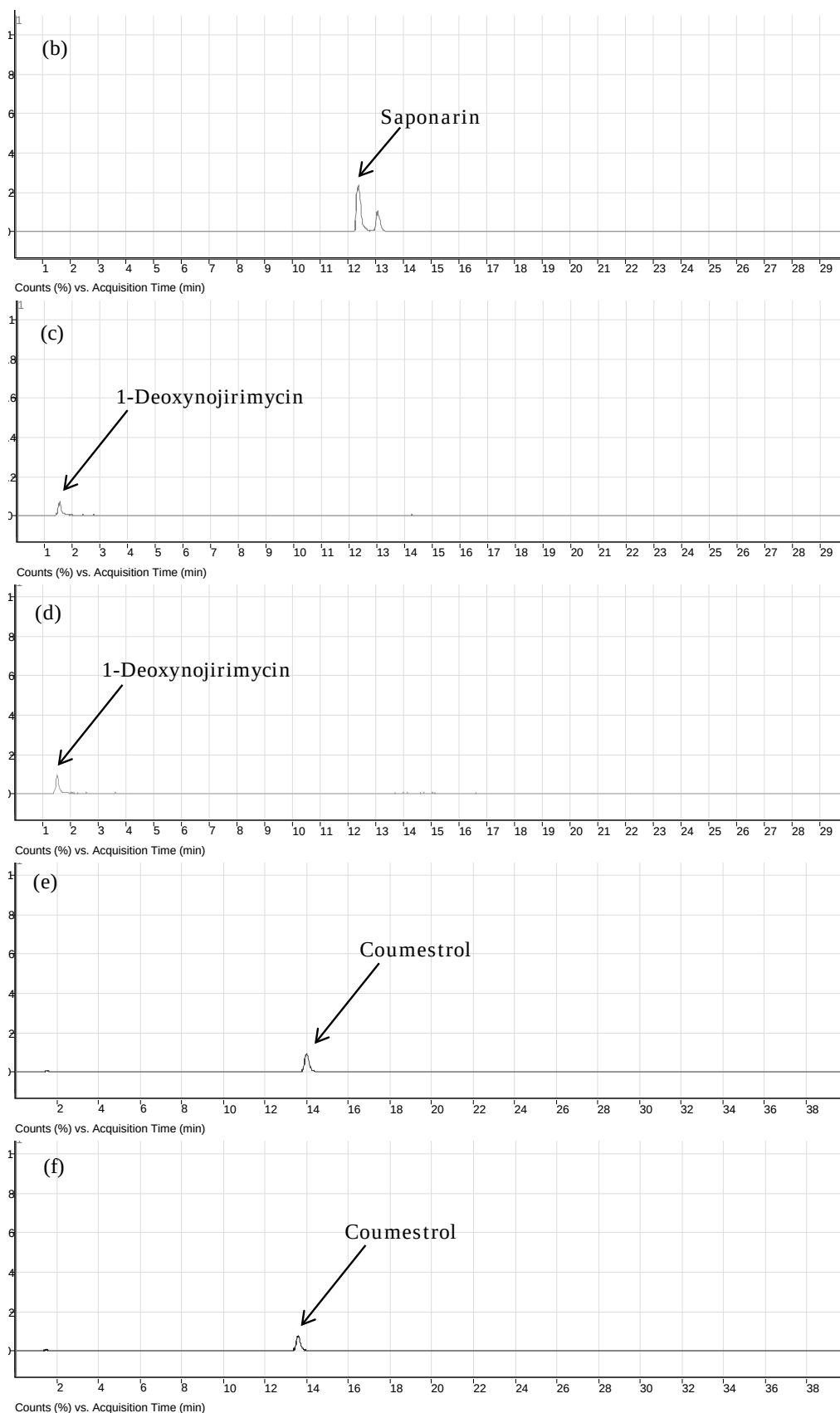


Fig.15 EIC from methanol extract of mixture of leaf powders.

- (a) EIC (595.17 ± 0.01) from 20% methanol extract of 10% mixture of barley leaf powder in alfalfa leaf powder. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 10.
- (b) EIC (595.17 ± 0.01) from 20% methanol extract of 10% mixture of barley leaf powder in mulberry leaf powder. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 10.
- (c) EIC (164.09 ± 0.01) from 20% methanol extract of 10% mixture of mulberry leaf powder in barley leaf powder. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 11.
- (d) EIC (164.09 ± 0.01) from 20% methanol extract of 10% mixture of mulberry leaf powder in alfalfa leaf powder. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 11.
- (e) EIC (269.05 ± 0.01) from 80% methanol extract of 10% mixture of alfalfa leaf powder in mulberry leaf powder. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 12.
- (f) EIC (269.05 ± 0.01) from 80% methanol extract of 10% mixture of alfalfa leaf powder in barley leaf powder. The chromatogram is shown on the same scale as Fig. 12.

3.3 種判別及び混合物か否かの判別についての考察

以上の結果から、LC/MS 分析によりサボナリン、1-デオキシノジリマイシン及びクメストロールの検出を行うことで、大麦若葉、桑葉及びアルファルファの種判別並びに混合物か否かの判別が可能であるといえる。また今回検証した方法では、試料採取、抽出作業及び LC/MS 分析について、半日程度で実施可能であり、スクリーニングとして有効であると考えられる。

3.4 LC/MS 分析での種判別の有効性

LC/MS による機能性成分の検出は、種判別に有効であったが、今回 3 種類の植物種間のみの比較であることを考慮する必要がある。青汁粉末原料については、今回 3 種類の植物の他にケール、ゴーヤ、明日葉、モロヘイヤ、アロエ等も使用されており、それぞれ各種に含まれる機能性成分について研究されているが、今回検討した 3 成分の含有の有無については不明である。また、サボナリンについては他の麦類植物、黒糖⁽⁹⁾及びアブラナ科の植物⁽¹⁰⁾にも含有され、1-デオキシノジリマイシンについては青花やツルクサに、クメストロールについてはクローバーや大豆等豆類植物にも含有されるとの報告もある^{(7),(8)}。

また、機能性成分分析は、特定保健用食品制度を受けて盛んに研究されているが、機能性成分については、健康増進法第 26 条に基づき特定保健用食品として許可を受けなければ、食品に表示できない成分であり、現状では、機能性成分は未だに定義もなく、統一的な分析法があるものも少ないことから、分析値に対する信頼性が課題となっている。さらに機能性成分は、いずれも天然成分であり、季節、産地、品種等により変動する可能性があることから、定量的に判断できないものである。

以上を踏まえると、今回の 3 種類の植物種の粉末として申告された場合にのみ、LC/MS 分析での機能性成分分析が可能であると考え、その迅速性を生かし、スクリーニング的な定性分析法として活用し、当該分析結果を踏まえて、DNA 分析を実施するのが望ましいと考える。

4. 要 約

植物の機能性成分に着目し、LC/MS 分析で当該成分の検出を試み、植物粉末の種判別の指標に使用できるかについて検討した。また複数の植物からなる混合粉末の場合についても検討した。その結果、LC/MS 分析から得られた TIC では夾雑成分が多く検出が困難であったが、精密質量での EIC 及び精密質量をプリカーサーイオンとした MS/MS スペクトルにより、植物種ごとに機能性成分が検出可能であった。また大麦若葉からはサボナリンのみ、桑葉からは 1-デオキシノジリマイシンのみ、アルファルファからはクメストロールのみが検出されたことから、LC/MS 分析による機能性成分の検出は種判別に有効であるとともに、混合物か否かの判断の指標にも使用できるとの結果となった。植物の種判別には一般的に DNA 分析が用いられるが、LC/MS 分析は半日程度で結果が得られるため、その迅速性を生かし、スクリーニング的な分析法として有効であるといえる。

(謝 辞)

本研究に当たって、試料の提供及び DNA にて種判別を実施した商品について情報提供していただいた関税中央分析所第 2 分析室の皆様へ厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) “とやまの特産物機能性成分データ集”，(2005)，(富山県食品研究所)
- 2) 萩原義秀，萩原英昭，上山秀夫：日本食品科学工学会誌，**48**, 10, 712 (2001)。
- 3) 上山秀夫，青塚康幸，大川雅史，小倉洋子，笠口桃江，帆足和憲，金城順英：日本食品科学工学会誌 **58**, 4, 170 (2011)
- 4) T.Yoshihashi, H.T.T.Do, P.Tungtrakul, S.Boonbumrung, K.Yamakiri: *Journal of Food Science*, **75**, 3, 246 (2010)
- 5) 上山修，高橋仁恵，木村紀久，吉野功，増渕隆，関口昭博，和田智史，清水浩二：群馬県立産業技術センター研究報告 (2011)
- 6) E.M.Bickoff, A.N.Booth, L.L.Lyman, A.L.Livingston, C.R.Thompson, F.Deeds: *Science*, **126**, 3280, 969 (1957)
- 7) Y.Nakamura, A.Kaiharu, K.Yoshii, Y.Tsumura, S.Ishimitsu, Y.Tonogai: *Journal of Health Science* **47**, 4, 394 (2001)
- 8) 高橋哲夫，斉藤明子，橋本論，佐藤千鶴子：北海道衛生研究所報 **52**, 29 (2002)
- 9) 萩貴之，前田剛希：沖縄県工業技術センター研究報告書：**10**, 7 (2008)
- 10) X.Deng, G.Gao, S.Zheng, F.Li: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **48**, 562 (2008)
- 11) K.R.Markham, K.A.Mitchell: *Zeitschrift für Naturforschung*, **58**, 53 (2003)
- 12) 伊藤裕才：ぶんせき，**1**, 18 (2013)
- 13) 株式会社東ソー ホームページ：“TSKgel TECHNICAL INFORMATION No.166 LC/MS による桑の葉抽出液中のデオキシノジリマイシンの分析”(http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/8DD1BD9E-0A12-4AE9-B16C-4B2E86BA6D63/0/TI166.pdf)