

液体クロマトグラフ質量分析計を用いた葉酸分析法の確立

Establishment of Folic Acid Analysis Method Using Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

梅林志浩

Yukihiro Umebayashi

食品開発研究所 農産食品・菓子グループ

健康維持成分として一般に認知されつつある葉酸であるが、栄養機能食品等の開発を目指す際に既存の分析法では操作が煩雑で時間が掛かるため多検体の分析には適さない。本研究では、近年注目される LC-MS を使用した葉酸分析法について基本分析条件を検討した結果、複数の葉酸類の同時検出が可能となった。

1. はじめに

葉酸は様々な農水産物に含まれており、県内産品では特にブロッコリーに多く（生鮮 100g 中 210 μ g）、他にネギ（同 100 μ g）、エリンギ（同 65 μ g）などが挙げられる。食品表示法に基づいて基準値以上の葉酸を含む農産物やその加工品には「栄養機能食品」の表記が可能であることから、他県ではそのような取り組みが進められており、商品差別化の有効な手段となっている。また、厚生労働省の「日本人の食事摂取基準」において、成人の 1 日摂取推奨量 240 μ g、妊婦では 480 μ g とされるなど葉酸は人の健康維持に必須の成分であり、一般にも認知されつつある。

しかし、栄養機能食品や機能性表示食品の開発を目指す際、対象成分の検体毎のばらつきが大きいため多検体を分析する必要があるが、既存の分析法（微生物法）は操作が煩雑あるとともに結果が判明するまでに最短でも 2 日を要するため多検体分析には適さない。代替法として近年注目されている分析法が「質量分析法」である。微生物法に比べ高価な分析装置を必要とする点はデメリットであるが微生物を利用しないためハイスループット分析が可能である。更に、検出感度が高いことや様々な分子構造をとる葉酸群を個別に分析できるなど、微生物法に比べ多くのメリットがある。

令和元年度に実施した実用化促進研究「ブロッコリーの健康成分を保持するための冷凍加工条件の最適化¹⁾」においても液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS)

によるブロッコリーの葉酸分析を試みたが、目的成分の検出に至らなかった。この点に関してはサンプル処理の方法等検証課題を残した。多くの食材において葉酸は訴求成分として有用であることから、引き続き LC-MS による葉酸分析法の確立及びノウハウの蓄積を目指して検討した。

2. 実験方法

2.1 試料調製法及び LC-MS 測定条件

ブロッコリーからの葉酸抽出に関しては Luo ら²⁾及び Shohag ら³⁾の方法を一部変更して行った。則ち、市販の生鮮ブロッコリーを抽出バッファ（1%アスコルビン酸、2%メルカプトエタノール含）中で加熱・粉碎し定容後、酵素処理（アミラーゼ、プロテアーゼ）を行い、続いて加熱によるプロテアーゼ不活化処理の後コンジューガーゼ処理（37 $^{\circ}$ C、2 時間）を行った。

得られた酵素処理液を固相抽出（Sep-Pak）により精製したものを LC-MS 分析サンプルとした。LC-MS は Waters 社製 Xevo G2-S Q-TOF を用いた。表 1 に LC-MS 分析条件を示す。

表 1 LC-MS 分析条件

カラム	BEH C18, 2.1 \times 75mm, 1.7 μ m
移動相	A:0.1%ギ酸溶液, B:アセトニトリル [A:90%(0min) \rightarrow 20%(8min) \rightarrow 90%(9min) \rightarrow 90%(15min)]
イオンモード	ポジティブ
キャピラリー電圧	1.0 kV

3. 結果と考察

3.1 LC-MSによる葉酸測定

図1に葉酸標準試薬を用いた LC-MS 分析結果を示す。本測定により、葉酸(PteGlu1)、メチル化テトラヒドロキシ葉酸(CH₃-H₄PteGlu) 及びホルミル化葉酸(CHO-PteGlu1)が検出された。

Ringling ら⁴⁾は、ブロッコリー中に最も多く含まれる葉酸はメチル化テトラヒドロキシ葉酸(約80%)であり、次いでホルミル化テトラヒドロキシ葉酸(CHO-H₄PteGlu)(約10%)と報告しているが、本試験ではホルミル化テトラヒドロキシ葉酸は検出されなかった。本試験ではホルミル化葉酸が検出されていることから、ホルミル化テトラヒドロキシ葉酸が今回のサンプル中に元々少なかったという可能性は低く、処理中にホルミル化葉酸が酸化型に変化した可能性が高いと考えられた。

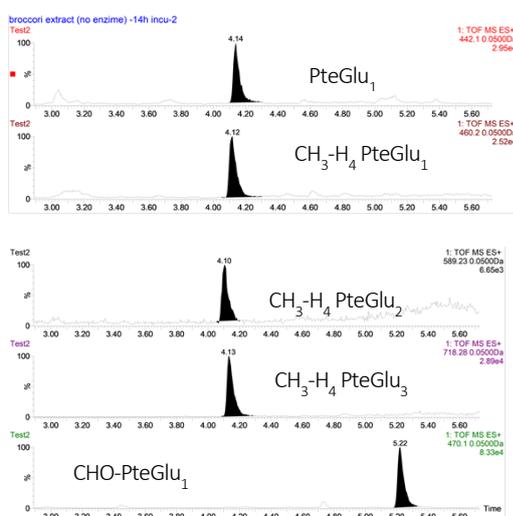


図1 LC-MSによる葉酸類の分析例

3.2 酵素処理効果の検証

続いて、コンジュガーゼ処理の効果を検証した。植物中の葉酸はグルタミン酸が複数結合した状態で存在し、Munyaka ら⁵⁾はブロッコリー中の葉酸のグルタミン酸付加数は1~7であると報告している。

本研究においてブロッコリー中の葉酸を定量する場合、グルタミン酸付加数が異なる全ての標準品を入手することは実用的でないため、酵素処理によりモノグルタミン酸付加体(PteGlu1等)の形で検出可能か検証

した。

図2はグルタミン酸4量体が付加した葉酸(PteGlu4)標準品をブタ腎臓コンジュガーゼ処理した際のLC-MSイオンクロマトグラムである。

本実験での酵素処理によって PteGlu4 (m/z 829.27) が減少し、PteGlu3 (m/z 700.22) 及び PteGlu2 (m/z 571.19) が増加することが確認された。

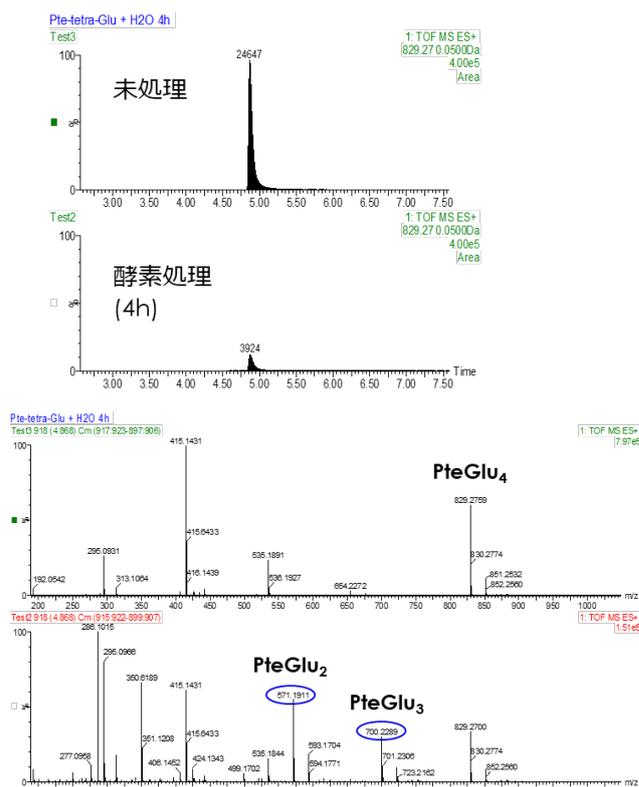


図2 標準品に対するコンジュガーゼ処理の効果検証

標準品において酵素処理の効果が認められたことから、次にブロッコリー抽出液を用いてターゲットをメチル化テトラヒドロキシ葉酸トリグルタミン酸付加体(CH₃-H₄PteGlu3)として同様の試験を行った。ただし酵素処理は14時間行った。

LC-MS 分析の結果を図3に示す。CH₃-H₄PteGlu3の減少及びCH₃-H₄PteGlu2の増加を確認できたがモノグルタミン酸付加体の増加は見られなかった。

本試験では標準品での試験結果と同様の傾向が見られたことから、ブロッコリー中の妨害物質の影響の可能性は低く、本試験で用いたコンジュガーゼの影響である可能性が高いことが示唆された。

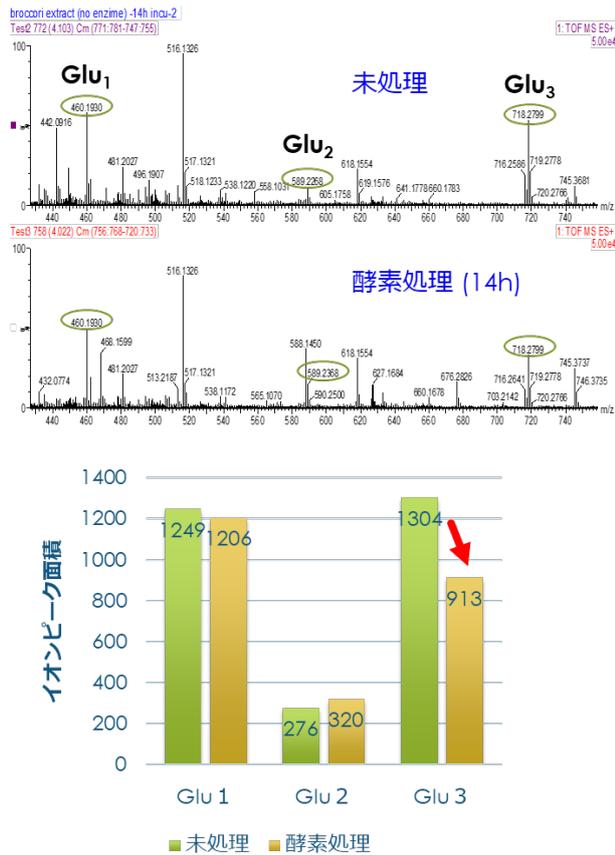


図3 ブロッコリー抽出液に対するコンジュガーゼ処理の効果検証

4. おわりに

本研究ではブロッコリーの抽出液を濃縮することにより高価な葉酸標準試薬を用いることなく複数の葉酸類をLC-MSにて検出することが可能となった。

これにより加熱処理等を行ったブロッコリー中の各種葉酸（メチル化葉酸、ホルミル化葉酸等）の残存率等を相対的に比較することが可能となった。

更に葉酸の定量評価を実現するため酵素処理条件を検討した結果、ブタコンジュガーゼによる葉酸付加グルタミン酸の脱離をLC-MSにより評価可能であることが確認された。

文献

- 1) 鳥取県産業技術センター研究報告 No.24 (2021).
- 2) Luo, S. et al.; Quantification of Total Folate, Folate Species and Polyglutamyl Folate Distribution in Winged Beans (*Psophocarus tetragonolobus* (L) DC) from Different Cultivars and Growth Stages by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *J Nutr Sci Vitaminol*, 63 (1), p.69-80 (2017).
- 3) Shohag M.J.I. et al.; A rapid method for sensitive profiling of folates from plant leaf by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometer, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1040, p.169-179 (2017).
- 4) Ringling, C. et al.; Origins of the difference between food folate analysis results obtained by LC-MS/MS and microbiological assays, *Anal Bioanal Chem*, 409 (7):p1815-1825 (2017).
- 5) Munyaka, A. W. et al.; Influence of thermal processing on hydrolysis and stability of folate poly-gamma-glutamates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), carrot (*Daucus carota*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*), *J Agric Food Chem*, 58 (7), p4230-40 (2010).