

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580147

研究課題名（和文） 生体試料分析を主目的としたアシル化アントシアニンの高感度 LC-MS/MS 分析

研究課題名（英文） High sensitive LC-MS/MS analysis of acylated anthocyanins for determination in bioanalytical samples

研究代表者

松藤 寛（MATSUFUJI HIROSHI）

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70287605

研究成果の概要（和文）：アントシアニンは優れた健康効果を示すが、分析中に壊れやすく、また高感度な分析法がないため、生体内での挙動については不明な点が多い。そこで、LC-MS/MS を用いた高感度な分析法を開発した。本法は 0.05 – 1 pmol の検出限界値を示し、HPLC の 100 倍以上の感度を示した。細胞培養液からは 70–140% の回収率を示したが、肝臓組織からの回収率は 0% であり、リン脂質などによる分析妨害が生じることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is well known that anthocyanins show excellent physiological functions. But it is unclear that anthocyanins play in living organisms, because they decompose easily in analysis, and there is no method to analyze anthocyanins high-sensitively in bioanalytical samples. Therefore, high sensitive LC-MS/MS analytical method of anthocyanins was developed. The limit of detection ranged from 0.05 to 1 pmol, resulted that the sensitivity was 100 times higher than those of HPLC. The recovery of anthocyanins from cell medium ranged from 70 to 140%. But the recovery from liver was 0%, suggested the interference by ion suppression as phospholipid and so on.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能、分析科学、アントシアニン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外でのアントシアニンの代謝・吸収の研究動向

食用色素であるアントシアニンの生理機能に関しては数多くの研究が *in vitro*、*in vivo* を問わずなされており、アントシアニンが生体内で何らかの生理作用を示すことは疑いのない事実と考えられている。最近の

LC-MS/MS などの分析装置の普及により、微量な濃度でアントシアニンの定量が可能となり、アントシアニンの体内への吸収量や臓器内分布に関する多くの研究が報告されてきている。結果として、アントシアニンの構造の違いによって吸収率は大きく異なること、アントシアニン類は他のフラボノイドと比較して、極めて吸収されにくいことが明ら

かにされている（フラボノイドの 1/100～1/1000）。一方、非アシル化アントシアニンの代謝・吸収に関する報告と比較すると、有機酸が結合したアシル化アントシアニンの代謝・吸収に関する報告は数少ない。しかし、これまではアシル化アントシアニンはそのままでは吸収されず、非アシル化体へと分解された後に吸収されると考えられていたが、いくつかのアシル化アントシアニンはそのままの形でラットやヒトにおいて吸収されることが明らかにされ、アシル化アントシアニンへの注目が集まってきている。

### (2) アントシアニンの分析法

アントシアニンの分析として、アントシアニンは、中性下では容易に分解・退色することから、抽出・精製・分析の際には必ず酸性下でその操作が行われる。塩酸、酢酸、ギ酸、TFA などの酸性溶媒を添加したメタノールやアセトニトリル (MeCN) などが使用されている。HPLC 分析においてはリン酸系の移動相が良好な分離を示すが、LC-MS や LC-MS/MS 分析においてリン酸は利用できないことから移動相として 0.1%～0.5%のギ酸または TFA を添加したメタノール/水系や MeCN/水系が用いられている。TFA はイオン化効率が低いためにギ酸が定量分析、高感度分析においては利用される。

一方、天然物からのアントシアニンの抽出中に構造変化が起きる、すなわち付加体の形成や一部の結合が開裂することが明らかにされ、本来天然中には存在しない構造がこれまでに報告されている可能性が指摘されている。それ故に、抽出溶媒や温度によって構造変化が起こっていないことを確認することが重要となってきた。

### (3) アントシアニン分析の問題点

このようなことから、アントシアニンの高感度分析は容易ではなく、さらにアシル化アントシアニンは市販されていないことから、非アシル化アントシアニンと比較して研究例が少ない。アントシアニンが生体影響を及ぼすことは疑いのない事実であるものの、吸収量が少ないにも関わらず、生体影響を示すことは不思議であり、「アントシアニンパラドックス」として知られている。一方で、高感度分析法がないために、生体影響観察時の投与量に疑問符がつき、結果的に吸収過程にも疑問符がつくため、高感度分析法の確立が求められている。

## 2. 研究の目的

著者らはアントシアニン標準品や赤ダイコン及び紫ダイコンを用いて、抽出溶媒や移動相溶媒がアントシアニンの化学的安定性に及ぼす影響を検討するとともに、

LC-MS/MS を用いて有色ダイコン中のアントシアニンの構造について検討してきた。この中で、HPLC 及び LC-MS/MS の最適分離条件について検討したところ、HPLC 分析で頻用されるリン酸を移動相とした系においては良好な分離を示すものの、LC-MS 分析で頻用されるギ酸 (0.1%) を移動相とする系においては、アントシアニン結合糖の数が 2 つ、3 つと増えるにしたがって、またトリグルコシドに有機酸が結合している有色ダイコンアシル化アントシアニンのピークはブロード化し、ピーク強度が極端に低下することが判明した (表 1)。従って、HPLC 分析中においてもアントシアニンの分解が起こる可能性が示唆された。ギ酸濃度を 0.5%に増加しても、0.1%TFA を用いても改善されず、TFA を 0.5%以上とすることにより、良好な分離が可能となり、LC-MS/MS 分析においてピーク成分 (赤ダイコン 16 成分、紫ダイコン 13 成分) を同定することができた。この結果は、これまで LC-MS を用いて報告されているアントシアニンの分析、特に微量分析を行っている生体内での分析・同定に関する論文については見直す必要があることを示唆する。

そこで、その分解・減少を抑える分析方法を確立すると共に、LC-MS/MS を用いたアシル化アントシアニンの高感度分析法を確立することを目的とした。

表1 抽出溶媒及びHPLC移動相溶媒がアントシアニン分離分析に及ぼす影響

Solvent for extraction	Anthocyanin standard				Red Radish	Purple Radish
	Anthocyanidin	Mono	Di	Tri		
① 0.5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	○	○	○	○	○	○
② MeOH/H <sub>2</sub> O/AcO (15/85/0.5)	x	○	○	○	○	○
③ MeCN/H <sub>2</sub> O/TFA (50/47/3)	○	○	○	○	○	○
④ 5%AcOH	x	○	○	○	○	○
⑤ 1%HCl / MeOH	○	○	○	○	x	x
⑥ (Me) <sub>2</sub> CO	x	x	x	x	x	x
⑦ 5%HCOOH	x	○	○	○	○	○

At room temperature for 16 hours

Mobile phase	Anthocyanin standard				Red Radish	Purple Radish
	Anthocyanidin	Mono	Di	Tri		
① 1.5%H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	○	○	○	○	○	○
② 1.5%H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 20%AcOH, 25%MeCN	○	○	○	○	○	○
③ 0.1%TFA MeCN(acidified)	○	○	△	x	x	x
④ 0.5%TFA MeCN(acidified)	○	△	△	x	x	x
⑤ 0.1%TFA MeCN(acidified)	○	△	△	x	x	x
⑥ 0.5%TFA MeCN(acidified)	○	○	○	○	○	○
⑦ 1.0%TFA MeCN(acidified)	○	○	○	○	○	○

## 3. 研究の方法

アントシアニン標準品は、市販または天然物より精製・単離したものを使用した。非配糖体 (Cy: Cyanidin, Pg: Pelargonidin, Pn: Peonidin)、モノ配糖体 (Cy3G, Pg3G, Pn3G, Cy3Gal, Pn3Gal, G: glucoside, Gal: galactoside)、ジ配糖体 (Cy3G5G, Cy3S, Cy3R, S: sophoroside, R: rutinoside)、トリ配糖体 (Cy3S5G, Pg3S5G, Pn3S5G)、アシル化体 (Cy3S5G-Caf, Pg3S5G-Caf, Caf: caffeoyl)。

HPLC 分析は、Waters 社製の Alliance 2690 を使用し、カラムは Waters 社製

X-Bridge C18 (5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm)を使用した。また、LC-MS/MSは Waters 社製 Quattro Premier を搭載した ACQUITY UPLC™ システム、カラムは Waters 社製 ACQUITY UPLC BEH RP18 (1.7 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 50 mm)を使用した。移動相溶媒は A 溶媒をギ酸または TFA 水溶液、B 溶媒をギ酸または TFA 含有 MeCN で、リニアグラジエントによる溶出を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 試料前処理の検討

生体試料中のアントシアニンの高感度分析法の確立を目的とし、まず分析前処理での安定性について検討した。すなわち、アントシアニン標準品の混合物を種々の濃度のギ酸 (0.1~30%) または TFA (0.1~15%) 含有 MeCN を溶出液とした ODS カートリッジ精製し、溶出液に対する安定性について検討した。結果として、高濃度の酸での溶出に比べ、低濃度での酸の溶出では全体的にピーク強度は低下し、低い回収率を示した。一方、高濃度の酸での溶出液を繰り返しロータリーエバポレーターにて濃縮すると、ピーク強度の低下並びに別ピークの出現 (成分の分解) が起こり、その現象は高濃度の酸の方が顕著であった。また、高濃度 TFA ではマロニル基が脱離することが判明した。従って、分析前処理においては、5~10%ギ酸を溶出液とし、濃縮操作をあまり施さない方がよいと考えられた。

##### (2) HPLC 分析中での安定性と感度

HPLC 分析中での安定性・感度を、非配糖体 (Cy, Pg, Pn)、モノ配糖体 (Cy3G, Pg3G, Pn3G, Cy3Gal, Pn3Gal)、ジ配糖体 (Cy3G5G, Cy3S, Cy3R)、トリ配糖体 (Cy3S5G, Pg3S5G, Pn3S5G) を用い、TFA 系移動相 (0.1%, 0.5%) とギ酸系移動相 (0.1%, 1%, 5%, 10%) を用いた HPLC で分析した。図に典型的なクロマトグラムの一例を示す。結果、非配糖体はどの移動相条件下でもシャープなピーク形状を示し、移動相の影響を受けなかった。しかし、

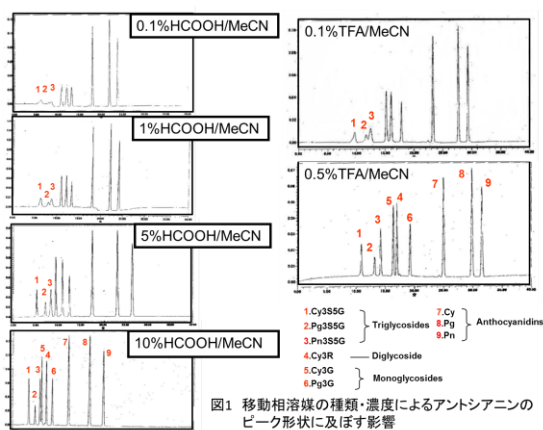


図1 移動相溶媒の種類・濃度によるアントシアニンのピーク形状に及ぼす影響

結合糖の構造、結合位置により若干の違いはあるが、移動相の酸の濃度が低下するにつれ、結合糖数が多いアントシアニンのピークはブロード化し、0.1%ギ酸を移動相とすると、トリ配糖体の分離・検出は困難であった。一方、ギ酸の濃度を 10% とすると、試験したすべてのアントシアニンのピークは極めて良好でシャープなピークを示した。

表 2 に各々の条件下で測定したときの検出限界値を示す (n=5)。ピーク形状からも推測されるように、非配糖体はどの移動相でも概ね同様の検出限界値を示したのに対し、配糖体は概ね結合糖数の増加に伴い感度は低下した。中でも LC-MS で頻用される 0.1%ギ酸条件下での感度は最高感度条件下 (10%ギ酸) に比べ、mol 換算でモノ配糖体で 1~2 倍、ジ配糖体で 2~3 倍、トリ配糖体で 4~5 倍低下した。一方、TFA、ギ酸の濃度が高くなると感度は向上し、10%ギ酸を移動相に用いたとき最もシャープなピークを示し、高感度な分析が可能であった。

しかし、既往の報告から生体試料からの分析を考慮すると、fmol オーダー (pg オーダー) の分析感度が必要であると推測されることから、次に LC-MS/MS 分析を試みた。

表2 ギ酸系及びTFA系移動相溶媒使用時のHPLCでの各種アントシアニンの検出限界値

	Anthocyanidins			Monoglycosides					Diglycosides			Triglycosides		
	Cy	Pg	Pn	Cy3G	Pg3G	Pn3G	Cy3Gal	Pn3Gal	Cy3S5G	Cy3S	Cy3R	Cy3S5G	Pg3S5G	Pn3S5G
0.1% HCOOH MeCN(acidified)	23	19	18	13	12	13	29	41	11	18	18	77	62	45
1% HCOOH MeCN(acidified)	18	16	15	10	11	10	23	29	10	10	11	54	31	26
5% HCOOH MeCN(acidified)	25	22	21	18	17	16	16	24	6.8	7.0	7.4	36	23	11
10% HCOOH MeCN(acidified)	27	25	24	11	11	11	15	25	6.5	6.1	6.9	15	10	13
0.1% TFA MeCN(acidified)	21	18	15	11	12	12	13	18	9.4	10	11	62	54	45
0.5% TFA MeCN(acidified)	28	25	24	13	13	11	15	20	8.1	10	11	38	33	25

limit of detection (pmol)

##### (3) LC-MS/MS 分析の条件検討

###### ① 移動相溶媒の検討

HPLC では、様々な移動相を検討できるものの、LC-MS/MS では MS 部分の汚染につながることから、使用できる移動相は制限される。まず、LC-MS 頻用されるギ酸を用い、その使用濃度を極力高めた 0.5%ギ酸を移動相として、各種アントシアニンの MRM (Multiple Reaction Monitoring) 分析を試みた。なお、MS/MS 条件を下記に示す。イオン化 ESI ポジティブ、キャピラリー電圧 4.5 kV、イオンソース 120°C、脱溶媒ガス 400°C、コーン電圧 19-94V、コリジョン電圧 19-60V、N<sub>2</sub> 脱溶媒ガス 800L/h、コーンガス 50L/h、コリジョンガス 0.3mL/min。Cy; 288>109, Cy3G; 450>288, Cy3R; 596>288, Cy3S; 612>288, Cy3G5G; 612>288, Cy3S5G; 774>288, Cy3S5G-Caf; 935>288, Pg; 272>121, Pg3S5G; 758>271, Pg3S5G-Caf; 920>271。

結合糖の数が1までのアントシアニン（非配糖体とモノ配糖体）は約1~10 pmolまで検出可能であったが、結合糖数が2以上になるとピークはブロード化し、約100 pmolまでの検出となった。さらに、混合物で分析するとピークが重なり全く定量できなかった。一方、0.5%TFAの移動相を用いると、ピーク形状はシャープとなり、すべてのアントシアニンを分離できたが、MSでの検出は定量限界値500~1000 pmolと低感度となった。TFAはイオン対形成のためにイオン化されにくく、結果的に感度低下を引き起こすことが知られており、当然の結果と考えられた。上記HPLCでの結果と比較して、LC-MS/MSでの分析の方が低感度となる結果であった。

## ② ポストカラム法

上記のように、0.5%ギ酸系移動相では感度は向上するが分離が悪く、0.5%TFA系移動相では高分離であるが感度が悪い。そこで、0.5%TFA系移動相でカラム分離を行い、その後0.5%ギ酸を混合するポストカラム法を検討した。種々の流量比で試みたが、定量限界値は100~200 pmol程度までしか感度向上しなかった。

## ③ 溶出条件の検討

これまでの検討、すなわち移動相組成や、TFAを移動相としたカラム分離後にギ酸溶媒を混合するポストカラム法など試みたが、良好な分離と感度向上条件は見いだせなかった。しかし、超高性能液体クロマトグラフィー(UPLC)による3分間と極めて短時間でのMeCN(5-100%)のグラジエント勾配にすることにより、ギ酸含有(0.5%)条件下でも、アントシアニンのシャープなピークが得られることが判明した(図2)。

また、最適なMS条件より0.05~1 pmol程度までの高感度な分析が可能となった。ただし、溶出時間が近接する化合物では、糖が脱離した分解物を同時に測定することは困難である場合が認められた。例えば、Cy3S5Gの3分子の糖が結合したアントシアニンでは、5位のGlc(グルコース)が脱離したCy3S、Glcが2分子脱離したCy3G、3分子脱離したCyなどが分解物として存在しても容易に分離検出できたが、Sof(ソフォロース)部分からGlcが1分子脱離したCy3G5Gはピークが重なりMRM分析でも区別することができなかった。

## ④ 細胞培養液および肝臓組織からの分析

高感度なLC-MS/MS分析条件が設定できたことから、細胞培養液並びに肝臓組織にアントシアニンを添加し、その回収試験を試みた。生体試料からの分析においては、目的成分を精製する前処理が必須である。そこで、

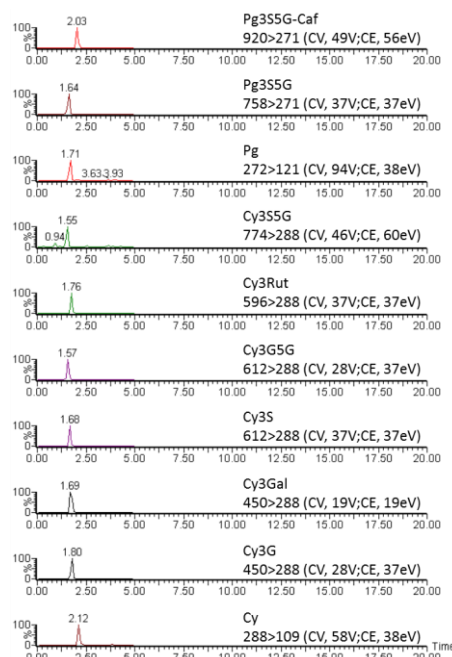


図2 最適条件下でのアントシアニンのLC-MS/MS分析

ODSカートリッジ固相抽出(Waters社製Sep-pak C18)を用いた10種アントシアニンの添加回収試験を試みた。細胞培養用培地としてRPMI1640(馬血清含有)を用い、ギ酸添加(終濃度0.5%)による酸性溶液とした後、アントシアニンを添加した。この試験液をODSカートリッジに負荷後、0.5%ギ酸含有メタノールで溶出した。N2ガス噴霧により、乾固後、移動相に溶解し、LC-MS/MSに供した。結果として、70~140%の回収率を示し、細胞培養液からの回収は可能であると考えられた。一方、入手しえた魚の肝臓(アマゴ)に同様の操作を施したところ、試料液は着色しているにもかかわらず、アントシアニンピークは全く観察されなかった(回収率0%)。リン脂質などのイオンサプレッサーの存在が示唆されたことから、生体試料への適用が報告されているリン脂質除去固相抽出カラム(スペルコ社製Hybrid SPE)を試みたが、アントシアニンも同時に除去されてしまい、回収・分析することはできなかった。加えて、アントシアニンを添加した肝臓組織は、抽出後も薄く着色していることが目視においても観察された。従って、肝臓組織からのアントシアニンの分析には、抽出条件並びに共存するイオンサプレッサーの除去が必須であり、更なる検討が必要であることが判明した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

① K. Yamagata, N. Tanaka, H. Matsufuji,

- M. Chino,  $\beta$ -carotene reverses the IL-1 $\beta$ -mediated reduction in paraoxanase-1 expression via induction of the CaMKKII pathway in human endothelial cells, *Microvascular Research*, 査読有, 84(3), 297-305 (2012). DOI: 10.1016/j.mvr.2012.06.007
- ② K. Yamagata, C. Tagawa, H. Matsufuji, M. Chino, Dietary apigenin regulates high glucose and hypoxic reoxygenation-induced reductions in apelin expression in human endothelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 査読有, 23, 929-936 (2012). DOI: 10.1016/j.jnutbio.2011.04.019
- ③ 松藤寛、大森潤一、後藤修一、千野誠、和田悦治、内田あゆみ、深堀勝謙、山形一雄、櫻井英敏、ゴマ若葉に含まれるポリフェノール成分のラジカル消去活性、*日本食品科学工学会誌*、査読有, 58(3), 88-96 (2011).
- ④ K. Yamagata, A. Miyashita, M. Chino, H. Matsufuji, Apigenin inhibits tumor necrosis alpha plus high glucose induced-LOX-1 expression in human endothelial cells, *Microvascular Research*, 査読有, 81(1), 60-67 (2011). DOI: 10.1016/j.mvr.2010.10.005
- ⑤ 松藤寛、千野誠、山形一雄、山崎壮、天然物酸化防止剤ローズマリー抽出物中の活性成分と活性寄与率、*日本食品化学学会誌*、査読有, 17(3), 164-170 (2010).

[学会発表] (計 10 件)

- ① 謝雅潔、田中紀子、鈴木成美、鈴木祥子、千野誠、松藤寛、田上幹樹、山形一雄、TNF $\alpha$  によるヒト血管内皮細胞の障害に対する GLP-1 と食品成分の予防作用の比較、*日本薬学会第 133 年会*、2013 年 3 月 27-30 日 (神奈川県、パシフィコ横浜)
- ② D.R. Griffith, M.C. Kido Soule, H. Matsufuji, T. I. Eglinton, E.B. Kujawinski, P.M. Gschwend, Free, conjugated, and halogenated estrogens in treated wastewater effluent, *ASLO 2013 Aquatic Sciences Meeting*, 17-22 Feb, 2013 (New Orleans, Louisiana, USA)
- ③ 松藤寛、東果奈、鹿島なつみ、丸山文月、千野誠、和田悦治、内田あゆみ、深堀勝謙、山形一雄：ゴマ若葉及びスプラウト中の抗酸化ポリフェノールについて、*日本食品科学工学会第 59 回大会*、2012 年 8 月 31 日 (札幌市、藤女子大学)
- ④ 松藤寛：アントシアニンの機能性と安定

- 性—高感度分析のチャレンジと問題点—、*植物色素研究会 23 回集会 (招待講演)*、2011 年 11 月 19 日 (都城市、南九州大学)
- ⑤ 松藤寛、森智代、秋山達哉、和田悦治、内田あゆみ、深堀勝謙、千野誠、山形一雄：ゴマ若葉ポリフェノールの生育中の含量変化と熱安定性、*日本食品科学工学会第 58 回大会*、2011 年 9 月 11 日 (仙台市、東北大学)
- ⑥ 松藤寛、丸山千明、高橋明日香、千野誠、山形一雄、山崎壮：高濃度ローズマリー抽出物の加熱により生成する分解物と遺伝毒性、*日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会*、2011 年 5 月 19~20 日 (東京ビックサイト)
- ⑦ 田中紀子、松藤寛、千野誠、山形一雄：ヒト血管内皮細胞における食品成分の HDL 様刺激作用、*日本薬学会第 131 年会*、2011 年 3 月 28-31 日 (静岡市、ツインメッセ静岡)
- ⑧ H. Matsufuji, Stability for extraction and analysis of acylated anthocyanins. *240<sup>th</sup> American Chemical Society National Meeting*, August 22-26, 2010 (Boston, USA).

[その他]  
ホームページ等  
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eisei/index.html>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
松藤 寛 (MATSUFUJI HIROSHI)  
日本大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号：70287605
- (2) 研究分担者  
( )  
研究者番号：
- (3) 連携研究者  
( )  
研究者番号：