

液体クロマトグラフィ／質量分析法による葉酸類の定量に関する研究

蒲生啓司・秋山真貴子
(高知大学教育学部理科教育講座化学)

Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Quantitative Analysis of Folic Acid Derivatives

Keiji GAMOH and Makiko AKIYAMA

Faculty of Education, Kochi University

Abstract: Liquid chromatography/mass spectrometric (LC/MS) analytical method of folic acid and the derivatives has been developed. Successful separation and detection of a mixture of puteroylglutamic (folic acid), puteroyldiglutamic, puteroyltriglutamic, dihydrofolic, tetrahydrofolic, 5-methyltetrahydrofolic and 5-folmyltetrahydrofolic acids have been performed by on an reversed-phase liquid chromatographic column and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Acetonitrile in 5% acetic acid was used as a mobile phase to separate the above folic acid derivatives within 10 min. The ESI interface was used in both positive and negative ionization mode for LC/MS. ESI produced reasonable signals from positive ions ($[M+H]^+$) of them. The effects of ionization parameters, source temperature, capillary voltage and cone voltage, on sensitivity and linearity were examined. Linear plots of peak area versus concentration were obtained over the ranges 0.5-100 μ M for folic, 1-100 μ M for puteroyldiglutamic and 0.2-100 μ M for puteroyltriglutamic acids for MS detection. The detection limits were observed as 570 μ g/L (calculated at S/N=4) for folic and puteroyldiglutamic acids and 140 μ g/L (calculated at S/N=3) for puteroyltriglutamic acid. The reproducibility of retention times and peak areas were 0.65-1.22% and 1.55-2.65%, respectively. The analytical method was applied to the determination of folic acid derivatives in spinatti using both column switching technique and solid-phase extraction method as sample pretreatments before sample injection to the analytical column.

キーワード：葉酸，エレクトロスプレーイオン化，液体クロマトグラフィ／質量分析 (LC/MS)，固相抽出。

Keywords : folic acid, electrospray ionization, LC/MS, solid-phase extraction.

1 緒言

成人における葉酸の基準値は，血清で 3～20ng/ml，赤血球で 200～800ng/ml (細胞)とされている。赤血球で見た場合，120ng/ml (細胞)以下になると造血機能の異常をきたし，巨赤芽球貧血，神経障害，腸機能不全などが起こる。葉酸が減少すると血清中の葉酸は急速に減少するが，赤血球中では 4 カ月まで変化はみられていない。葉酸欠乏がおこりやすい原因は，貯蔵機能に限界があること，成長期に多量に消費されることおよび摂取量があまり多くないことなどが挙げられる。葉酸が欠乏

すると巨赤芽球性貧血を引き起こすが、そのメカニズムは次のように説明されている¹⁾。すなわち、細胞が増殖（すなわち組織が傷を受けたり切除された時などに細胞が分裂し数を増やす）するためには、DNAの合成が必要であり、葉酸はこのDNAの重要な成分である核酸塩基（プリン塩基、ピリミジン塩基）を合成する酵素の補酵素になる。したがって葉酸欠乏症になると、通常、細胞の増殖が盛んに行われているところ、例えば骨髄中では細胞の増殖が障害され、血球成分の産生がうまくいかず貧血を起こすことになる。

葉酸は、その補酵素型であるテトラヒドロ葉酸(5,6,7,8-Tetrahydropteroyl-L-glutamic acid, THF)を始めテトラヒドロ葉酸誘導体が種々の生体内代謝、すなわち炭素原子の受け渡しの反応—炭素原子を葉酸の補酵素型がメチル基(-CH₃)やホルミル基(-CHO)の形で受け取ったり供与したりする反応—に關与する酵素の補酵素として働いている²⁾。葉酸の代謝上での重要な役割は、①核酸(DNAやRNA)の合成に必須なプリン塩基の合成、②DNAの合成に必要なピリジンヌクレオチドの1種であるチミジル酸(dTMP)の合成および③グリシン、セリンおよびメチオニンなどのアミノ酸代謝である。葉酸欠乏になると③のアミノ酸代謝が障害されるとともに、一番問題となるのは①と②の経路がうまく進まず、細胞分裂に必要なプリン塩基やチミジル酸などのDNAの素材の供給ができなくなってしまうことである。そうなれば生体内で分裂や増殖が通常行われている骨髄での細胞分裂に影響を与え、貧血という症状が出現してくる³⁾。葉酸の補酵素型は様々な物質に炭素原子を与えたり、もらったりすると共にその補酵素自身も他の反応に必要な補酵素に変換し、一定の葉酸補酵素型のバランスを維持している。したがって葉酸の流れがうまくいなくなると、葉酸補酵素型全体に影響を及ぼし、細胞の分裂や増殖がうまくいなくなる⁴⁾。

また、2000年12月29日の新聞記事(「妊娠前から葉酸を」)では、厚生省が、妊娠可能な年齢の女性に対して葉酸を摂取するように都道府県や全国の医療機関に要請したというものだった。その理由は、葉酸の摂取によって二分脊椎など先天異常の子を出産する危険性を減らすことができるからだという。日本では、妊娠可能な女性に対して葉酸の摂取を呼びかけるのは初めてのことだが、アメリカではすでに1991年に二分脊椎およびその他のNTD(神経管障害)児の再発を防止するためにCDC(Center for Disease Control Atlanta)から医学的ガイドラインが発表されている。その内容は以下のようなものである：

1. NTDの発生防止については、妊娠可能な婦人は葉酸を含む食品(緑黄色野菜など)や葉酸添加食品を食べ、葉酸塩(エステル)あるいは葉酸の摂取量を増加させる。
2. 妊娠を予定している婦人は、受胎計画時から妊娠第12週までの間、葉酸を1日あたり0.4mg摂取すべきである。
3. NTD再発防止については、NTD児を出産するリスクの高い婦人はカウンセリングを受けるべきである。そのうち、妊娠を希望している人には、妊娠第12週まで1日4mgないし5mgの葉酸が処方されるべきである。

これらは1993年にイギリスでも同じ内容の警告がなされている。またアメリカでは、1993年10月にFDA(Food and Drug Administration)によって葉酸を含む食品や補助食品にこのビタミンが先天性欠損の危険を減らすと表記することを認め、1998年からは穀類製品には140 μ g/100gの添加が法的に定められている。このような動きは、次のような報告から検討されたためである。胎児では血液中に5倍量の葉酸が存在し、これは、胎児における葉酸の要求量が増大していることを表している。よって、妊娠中に葉酸の摂取量が不足すると、胎児の発育に影響が起こるのである。動物においては妊娠中の葉酸欠乏によって、胎児に心血管系、泌尿生殖器などに異常が観察されている。

先天異常とは、出生前の個体の発生や発育の過程に起こった障害によってもたらされる修復しえない形態や機能のひずみである。特に妊娠初期に、母体が遺伝因子や環境因子の影響を受けると胎

児発育が阻害され、異常が引き起こされる。NTD も先天異常のひとつで、頭部および尾部神経管の閉鎖不全による中枢神経系の異常を総称したもので、重篤な外表奇形のひとつである。NTD 児の発生頻度は、初産では出生割合の1/1000だが、一度 NTD 児を出産した婦人での再発率は初産の10~20倍であるとされている。NTD の発生の原因は、古くは病害を受けたジャガイモの摂取が原因ではないかと疑われていたが、その後の研究により、発生率は社会経済階級と関係があることがわかった。実際に、社会経済階級の低い婦人では、葉酸、アスコルビン酸、リボフラミンやビタミン A のレベルが低くなっていた。特に NTD 児を出産した母親で赤血球の葉酸が減少していた。このようなことから NTD の発症が、栄養状態と関連があるらしいことが疫学研究によって示唆されている⁵⁻⁶）。

Smithells らは「一つあるいは複数のビタミンが NTD の因果関係に関与している。」という仮説をもとに、一連の介入研究を実施しており、既に1人以上の NTD 児を出産した婦人を対象に、総合ビタミン剤を用いて NTD の再発に対する影響を検討した。イギリス国内5センターでのコホート研究の結果では、ビタミン剤服用者454人の NTD 再発率が0.7%と、ビタミン剤非服用者519人の NTD 再発率4.7%に比較して著しく減少していた。一方南ウェールズ地区での調査では、妊娠前および妊娠初期に葉酸 4 mg/日を与えた婦人では NTD の再発は見られていない。これらの婦人の赤血球葉酸濃度は、服用者で738ng/ml と非服用者の278ng/ml に比べ高くなっていた。次に、NTD 児を出産したことがない婦人、あるいは NTD 発生率の低い北アメリカにおける婦人に対する葉酸の予防効果が検討されている。ニューイングランド地方でのコホート研究では、妊娠中に葉酸を含むビタミン剤を服用すると、NTD 発生率が0.9/1000と、非服用者の3.5/1000に比べ低下している。また、ボストンとトロントにおけるケース・コントロール研究でも、受胎前後から葉酸(0.4mg/日)を含むビタミン剤を服用すると、NTD 発生リスクは約60%低下している。イギリスの MRC (Medical Research Council) ビタミン研究グループは、欧州7カ国33センターにおいて、葉酸の NTD 予防結果を検討したところ、妊婦に葉酸を1日に0.4mg 服用させた結果、NTD 発生率は約1% (593人中6人)で、非服用者では約3.5% (602人中21人)であった。よって、葉酸摂取による予防効果は72%となる。その他にも、ハンガリーや西オーストラリアでも葉酸摂取による NTD の予防効果が認められている⁷⁻⁹）。

以上のことより、疫学研究の結果を総合的に判断すると、受胎前後における葉酸あるいは総合ビタミン剤の服用が、NTD の発生や再発の予防に有効であることが分かる。逆に言えば、妊娠中に葉酸が欠乏することによって、DNA 合成が阻害され、細胞分裂が活発に行われている胎児細胞に影響が出て、種々の形態異常が引き起こされているのではないかと仮説が成立つ。更に、葉酸が NTD 以外の先天異常の発生や再発防止にも効果があるのではないかと興味を持たれている。ハンガリーにおけるコホート研究によると、出産時における主要な先天異常(先天性水頭症、心血管系異常、牛眼、口蓋裂、口唇裂、ダウン症など)の発生率は、妊娠時にビタミン剤を服用している人と、ミネラル剤を服用していた人に比べて低下していた。アメリカのカリフォルニア先天異常モニタリングプログラムの調査では、先天異常の一種、口唇裂の予防にも高濃度の葉酸(10mg/日)を含んだ総合ビタミン剤が有効であることを報告している。しかし、生理的服用量(0.4mg)でも葉酸での予防効果は認められている。このように、受胎前後および胎生期における総合ビタミン剤、特に葉酸の服用は、NTD ばかりでなくその他の先天異常の発生を減少させることが示されている。NTD やその他の先天異常の発生および再発を防止するには、受胎前後にそれぞれ1日あたり0.4~4 mg の葉酸の摂取することが推奨されている。400 μ g/日摂取している婦人では、NTD の発生率が45%減少している。これは、予防医学的に重要な意義を持っており、出生前診断や選択的中絶に代わる一次的予防法である。西オーストラリアでも妊婦に0.5mg の葉酸摂取が推奨されており、

妊婦のNTD 予防に対する意識が変わってきているという。最近の調査では、計画的に妊娠した婦人の受胎前後の葉酸服用率は1993年には19.1%であったが、1995年には43.1%になっている。葉酸の摂取量と赤血球の葉酸レベルとの関係からみると、200 μg の摂取でもNTDの予防効果が期待される。しかし350 μg 以上摂取すると、心血管障害が懸念される血漿ホモシステイン量の増加を防ぐことができる。また650 μg 摂取した場合には、増加した血漿ホモシステイン量を正常にすることが可能である。我国でも、アメリカなどの欧米諸国に遅れはしたものの葉酸に対する認識が高くなりつつあるが、意識レベルが必ずしも高いとは言えない。それは一方で、葉酸を摂取することがサプリメント的に行われているためであり、日常の食品への関心、すなわち日常食する中で葉酸をどのように摂取するのかについての関心が薄いとも言える。

本研究は、食品中に含まれる葉酸の含有量測定に関する内容であるが、葉酸への関心と日常摂取を高める観点から、ほうれん草を用いた葉酸とその存在形態を明らかにする定量法についての提案である。

2 実験

2-1 試薬

標準試料として、folic acid (= pteroylglutamic acid, PteGlu), N⁵-formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutamic acid, および dihydropteroyl-L-glutamic acid, 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutamic acid は Sigma 製特級を、pteroyldi- γ -L-glutamic acid (PteGlu₂), pteroyltri- γ -L-glutamic acid (PteGlu₃)はいずれも和光純薬工業製特級を用いた。酢酸、酢酸アンモニウム、L-アスコルビン酸、2-メルカプトエタノール、アセトニトリルおよび25%アンモニア水はいずれも和光純薬工業製特級を用いた。抽出溶媒として、pH8.0に調整した20mM酢酸アンモニウム(10mMアスコルビン酸、0.2mMメルカプトエタノールを含む)を調製した。溶媒として用いた純水は、すべてMilli-Q純水製造システム(Millipore製)により精製したものを使用した。固相抽出用のカートリッジとして、OASIS, Sep-Pak Plus C18(いずれもWaters社製)およびBond Elut C18(Varian社製)を用いた。

2-2 装置および分析条件

遠心分離機にH-11NA(コクサン製)を用いた。LC部として、高速液体クロマトグラフ(日本分光製)、UV検出器UV-970、送液ポンプPU-980、データ処理装置クロマトバック(C-R4A)を使用。MS部として、VG Quattro II(micromass製)を使用。カラムとして、CAPCELL PAK C18(SHISEIDO製、2.0mmi.d.×250mmL.)を、移動相として5%酢酸水溶液を含む10%アセトニトリル水溶液を用いた。流量を0.18ml/minとした。

2-3 固相抽出法による分析試料の前処理

液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて試料の分析を行う前に、試料の形態やマトリックスあるいは濃度に依存して、抽出、溶解、ろ過および希釈等、試料に対する前処理が必要になることが多い¹⁰⁾。葉酸を定量する際に従来行われてきた前処理法として、Trienzyme処理やFolate conjugase処理などが行われてきたが、これらの方法では長時間を費やすために、その迅速性において改良が求められてきた¹¹⁾。ここでは、試料中の夾雑物を除くと同時に、極微量の葉酸を濃縮することを目的として、固相抽出法とカラムスイッチング法を前処理法として検討した。

固相抽出とは、「水溶液中の分析目的化合物、或いは望ましくない不純物を、高速液体クロマトグラフィーに用いられる充填剤等を含んだ固相抽出剤を用いて補足するか、或いは選択的に除去す

ること」である。固相抽出剤として要求される条件としては、①化学的に安定であること、②分析目的物質を迅速に抽出できること、③抽出した物質を迅速に溶離できること、④抽出容量が大きいことなどがあげられる。本研究では、分析用カラムと LC/MS のイオン源の汚染を防ぐことを重要視し、3段階の固相抽出を行った。3段階の固相抽出法とは、OASIS カートリッジおよび Sep-Pak Plus C18 カートリッジを用いて、試料中の葉酸を用手法的に固相抽出を行い、次に HPLC 分析時に、カラムスイッチング法を用いて、分析試料中の葉酸より保持時間の長い共存物質をプレカラムに保持させることによって、葉酸成分部分のみを分析カラムに導入するものである。こうした3段階の固相抽出法を併用することによって繰り返し分析が可能になり、また極微量である試料サンプル中の葉酸の濃度を濃縮することで定量できる検出下限を更に低くすることが可能になった。

2-3-1 食品からの葉酸の抽出および定量

葉酸の重要性への関心が高まってきていることは緒言でも述べたが、葉酸の存在形態は多様であり、体内での代謝機構の中においても何種類にも変化する。また、体内中においても天然物中においても、葉酸の含有量は非常に微量である。葉酸が生体に非常に重要であることが認識され始めた今、食品中や生体内中の葉酸濃度を知ることが望まれている¹²⁾。しかし、食品を定量の対象としたときには、天然物中には葉酸の形が monoglutamate の形をとるものや polyglutamate の形をとるものがあり、その存在量と共に存在形態を明確に把握する必要がある。液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法は、信頼性が高くその正確さも他の手法に比べて高いと言われているが、今までに LC/MS 法による葉酸の定量に関する報告はほとんどない¹³⁾。また、食品中の葉酸の定量を行う時にも、MS による分子構造情報が得られるので、Trienzyme 処理などの長時間を費やす前処理は必要ではなく、分析時間も大幅に短縮される。本研究では、食品中の葉酸を定量するために迅速かつ精度の高い分析法の確立を目指した。食品中の葉酸を定量する際、以前から最重要視されるのが葉酸を抽出する過程である。本研究ではまず、食品からの葉酸の抽出ということで、食品中の葉酸の多様な形態を想定し、抽出溶媒に還元剤 (10mM アスコルビン酸および0.2mM メルカプトエタノール) を混合することにした。これは、食品中に含まれる不安定な還元型葉酸の酸化防止を目的としたものである。すなわち、食品を対象とした時に、同じ食品でも、品種、季節や保存方法、調理方法およびその時間などによって異なり、コメの場合には、その部位によっても異なり、調理によって損失する葉酸化合物はほとんどが HCO-H₄ (ホルミルテトラヒドロ)葉酸誘導体である¹⁴⁾。また、一般に、野菜にはホルミル型葉酸が多く、魚や肉類には熱に比較的安定なメチル型葉酸が多い¹⁵⁾。したがって、抽出の過程においては還元剤の重要性が考えられる。また、葉酸を抽出するための加熱処理は、90℃で20分間とした。

ほうれん草の葉を秤量し、その10倍量の20mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH8.0, 0.2mM メルカプトエタノールおよび10mM アスコルビン酸を含む) を加え乳鉢で粉碎し、更に水浴中で20分間加熱処理を行う。その後、遠心分離処理 (3000rpm, 10分間) を行い、その上清を回収する。この試料中の不純物を除去する目的で、固相カートリッジを用いる抽出を行った。初めに OASIS カートリッジによって、①蒸留水、アセトニトリルおよび20mM 酢酸アンモニウム水溶液で固相カートリッジの平衡化を行う。②ほうれん草からの試料を固相カートリッジに負荷する。③20mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH8.0, 0.2mM メルカプトエタノールおよび10mM アスコルビン酸を含む) および2%アセトニトリル/20mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH8.0, 0.2mM メルカプトエタノールおよび10mM アスコルビン酸を含む) で洗浄する。④20%アセトニトリル/20mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH8.0, 0.2mM メルカプトエタノールおよび10mM アスコルビン酸を含む) で、カートリッジから葉酸を溶出させる。以上の操作を行った後、④から溶出した試料を15倍に希釈し、次

に Sep-Pak Plus C18 カートリッジを用いて上述の①～③の操作を行い、その後55%アセトニトリル/20mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH8.0, 0.2mM メルカプトエタノールおよび10mM アスコルビン酸を含む) で溶出させた。以上の過程を Fig.1 に示した。得られた溶出液を、カラムスイッチング法を設定した LC/MS に導入した。

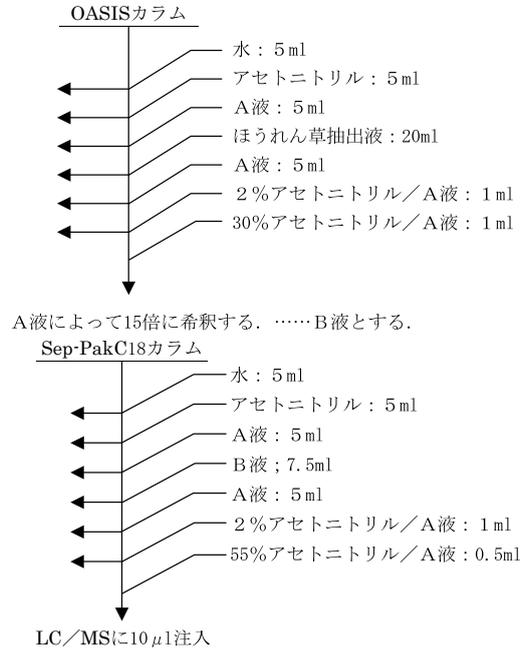


Fig.1 Flow chart of pretreatment for extraction of the folic acid derivatives using the solid-phase extraction cartridge.

前段でほうれん草から固相抽出した分析試料を、あらかじめ条件設定した LC/MS に10 μ l 注入し、クロマトグラムおよびマススペクトルを測定する。次に、あらかじめ作成した葉酸各種標準試料の検量線により、ほうれん草サンプル中の葉酸濃度を算出する。ここで用いる LC/MS システムのカラムスイッチングの設定は次の通りである：分析カラムの前に、前処理用のプレカラムを接続し、溶離液の流路を切り換えることにより、葉酸より保持時間の長い物質やイオン化しにくい試料中の共存物質を除去するというものである。今回実際に用いたシステム図を Fig.2 に示す¹⁶⁾。バルブをインの状態(すなわちプレカラムと分析カラムが連結されている状態)にしておき、インジェクターよりほうれん草サンプルを抽入する。ほうれん草サンプル中の葉酸、PteGlu₂、PteGlu₃ および一部の共存物質は、前処理カラムを通り、分析カラムに保持されるが、残りの物質は前処理カラムで保持させた状態である。分析試料を注入して2分後、カラムをアウトの状態(プレカラムと分析カラムが切り離されている状態)に切り替え、プレカラムに保持されている共存物質を除去する。その後、再びバルブをインの状態に切り替え、分析が行われている間に、プレカラムの洗浄および再生が行われ、次の分析に備える。Fig.3 にほうれん草中の葉酸定量に用いた前処理条件、分析条件を示した。

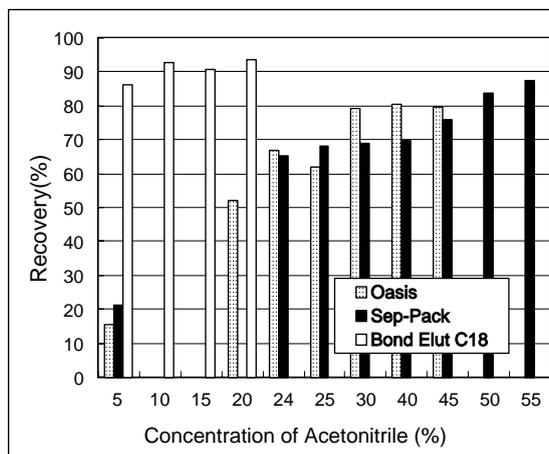


Fig. 2 Effect of concentration of acetonitrile on the three types of solid-phase extraction columns.

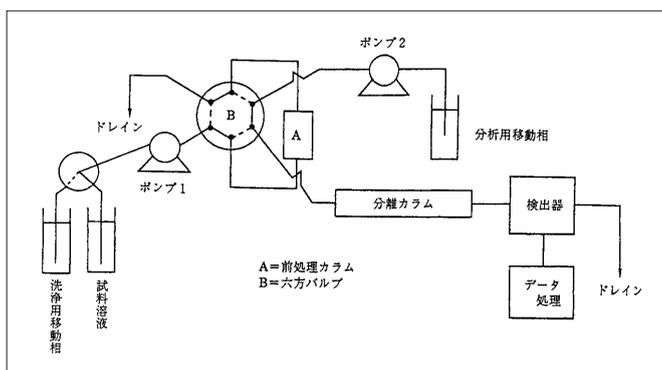


Fig. 3 Block diagram of the column switching technique for pretreatment of the folic acid extraction samples.

3 結果および考察

3-1 回収液の pH による葉酸の保持力の変化

固相抽出の際の抽出溶媒を検討するために、溶液の pH が葉酸 (folic acid) の回収にどのような影響を及ぼすのか調べた。そのために移動相を、① pH2.58の10%アセトニトリル/5%酢酸水溶液と、② pH5.02の10%アセトニトリル/20mM酢酸アンモニウム水溶液、③ pH7.91の10%アセトニトリル/20mM酢酸アンモニウム水溶液とそれぞれ pH を変化させて、葉酸の保持時間を測定した。その結果、pH2.58で t_R 7.34分、pH5.02で t_R 5.74分および pH7.91で t_R 2.76分であった。これにより、葉酸の保持時間が移動相の pH によって大きく変わってくる、すなわち移動相の pH が高いほど保持力は小さく、pH が低いほど保持力が大きくなることがわかった。以上の結果により、今回の固相抽出には pH8.0の20mM酢酸アンモニウム水溶液を使用した。

3-2 試料サンプルより葉酸を抽出するための固相抽出に用いるカラムの検討と回収液のアセトニトリル濃度の検討

分析試料から夾雑物を除去し、葉酸を抽出するために固相抽出用カートリッジが回収率に対してどのような影響を及ぼすのか検討した。今回用いたカートリッジは、① OASIS、② Sep-Pak Plus C18 カートリッジ、③ Bond Elut C18 である。この3種の固相抽出用カラムが回収溶媒中のアセトニトリル濃度によって、葉酸の回収率にどのような影響を及ぼすのかを検討した。その結果を Fig.4 に示した。横軸にアセトニトリル濃度、縦軸に葉酸の回収率を示した。図から分かるように、Bond Elut C18 では、アセトニトリル濃度が低濃度でも高い回収率が得られた。しかし、OASIS、Sep-Pak Plus C18 においては、アセトニトリル濃度が比較的高濃度での葉酸の回収率が高かった。これにより、Bond Elut C18 は相対的に疎水性が弱く、ほうれん草などの葉酸以外にも共存成分を多く含む試料に対して、分析カラムや LC/MS のイオン源を汚染すると思われる化合物さえも回収してしまうおそれがあるため、今回は OASIS と Sep-Pak Plus C18 を用いることにした。

■ LC conditions:

Pre-treatment column: Capcell Pak C18 UG120 (2mm × 20mm)

Mobile phase for washing: 80% Acetonitrile in water

Flow rate: 0.18 ml/min

Analytical column: Capcell Pak C18 UG120 (2mm × 250mm)

Mobile phase for analysis: 10% Acetonitrile in 5% acetic acid

Flow rate: 0.18 ml/min

■ Time course for column switching:

0-2 min: IN (line)

2-9 min: OUT (-----line)

9-14 min: IN (line)

Fig.4 Time course of the column switching technique and liquid chromatographic conditions for the analysis of folic acid derivatives.

次に回収液中のアセトニトリル濃度の検討であるが、OASIS カラムを用いた場合、アセトニトリル濃度が30~45%のときにはほとんど回収率の変化が見られなかった。よって、試料サンプル中から葉酸を回収する際に共存物質の流出を最小限におさえるため、回収液のアセトニトリル濃度は30%にすることにした。また、Sep-Pak Plus C18 においては回収液のアセトニトリル濃度を40~55%に上げていくに従い、葉酸の回収率に向上が見られたが、試料サンプル中から葉酸を回収する際の共存物質の流出も考えられるため、回収液のアセトニトリル濃度は55%にすることにした。本研究では、固相抽出法と LC/MS 法を併用することで、従来では前処理に長時間を費やしていた食品などの試料からの葉酸の定量において、短時間での分析が実現できるようになった。また、固相抽出法とカラムスイッチング法を併用することによって、食品などの試料からの葉酸を抽出する際に、保持時間の長い共存物質の除去ができ、その結果、分析カラムの劣化や MS のイオン源の劣化を最小限におさえることができるようになった。このことにより、連続分析が可能になり、また葉酸の定量精度が高い状態も維持が保つことができる。しかし、分析カラムの劣化や MS のイオン源の劣化を最小限に食い止めることができても、やはりすべての保持時間の長い共存物質の除去ができるわけではなく、やはり MS のイオン源の汚染は避けることができない。また、固相抽出による葉酸の回収率においても、まだまだ高い回収率を見込むことができると思われる。今後の課題とし

て、試料中の目的物以外の更なる除去と葉酸の回収率の向上が必要である。

3-3 食品中の葉酸の定量

3-3-1 標準試料の溶媒の検討

葉酸を pH7.0~9.0 に調整した 20mM 酢酸アンモニウム水溶液でそれぞれ溶解した。しかし、pH7.0 の 20mM 酢酸アンモニウムには溶解しきれず沈殿物が確認された。また溶解した pH8.0~9.0 の 20mM 酢酸アンモニウム水溶液に溶解した葉酸のクロマトグラムとマススペクトルからは大きな違いは見られず、いずれからも $m/z440$ の質量数が検出されたことから、本研究では、標準試料の溶媒として pH8.0~9.0 の 20mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いることとした。

3-3-2 LC/MS 法による質量分析計のイオン化モードと検出モードおよび葉酸の逆相分配モードにおける移動相条件の検討

LC/MS 法による質量分析計のイオン化モードの最適条件を検討するために、マスクロマトグラム法 (MS1) でのイオン化モードをポジティブモードとネガティブモードのそれぞれについて測定した (ただし、このときの移動相の pH を 8.0 とした)。その結果、ポジティブモードのときにはプロトン化分子関連正イオン $[M+H]^+$ の $m/z442$ は観察されなかったが、ネガティブモードの時には脱プロトン化分子関連負イオン $[M-H]^-$ の $m/z440$ が観察できた。したがってここではイオン化モードはネガティブモードが好ましいと思われた。しかし、クロマトグラムより脱プロトン化負イオン $[M-H]^-$ のピーク面積を測定したところかなり低く、検出限界も $44 \mu\text{g/ml}$ と、既に報告されている葉酸の定量法の検出感度に比べて悪いものであった。したがって、移動相を pH2.5 に下げて、あらためて MS の検出モードを検討した。その結果、ポジティブモードにはプロトン化分子関連正イオンの $[M+H]^+$ のシグナルが検出され、またその感度もネガティブモードと比べて格段に向上した。また、プテロイルジグルタミン酸 (PteGlu₂)、プテロイルトリグルタミン酸 (PteGlu₃) においても、ポジティブモードにおいてプロトン化分子関連正イオンとして検出できることがわかった。したがって、測定はポジティブイオン化モードで行った。これについて、移動相 pH による folic acid のクロマトグラムのピーク面積への影響を Fig.5 に示した。Fig.5 は、pH2.5, 7.0, 8.0 および 9.0 と変化させ、濃度 1 mM の folic acid のピーク面積を比較したものである。横軸に移動相の pH を、縦軸に葉酸の濃度を表示した。このグラフからわかるように移動相が pH2.5 のとき、すなわち 5% 酢酸水溶液のとき最大面積値を示す。よって移動相は、pH2.5 の 5% 酢酸水溶液を用い、溶出時間を考慮してアセトニトリル濃度を 10% とした。

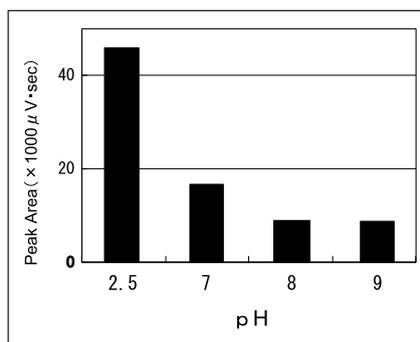


Fig.5 Effect of pH value in a mobile phase on the ion current of folic acid as the base peak. MS conditions: ESI-MS interface in the positive mode for pH2.5 and the negative mode for the pHs; source temperature, 70°C; capillary voltage, 3.5kV; cone voltage, 30V; Sample concentration, 10mM.

検出モードには、任意の質量数を選択しその質量数の時間変化を表示するマスクロマトグラム法 (MS 法) と、目的とする質量数のみを選択的に検出する選択イオン検出法 (SIM 法) がある。葉酸の MS 法によるピーク面積と SIM 法によるピーク面積の違いを Fig.6 に示した。横軸にはピーク面積を、縦軸には葉酸濃度を示している。グラフからわかるように、明らかに SIM による測定の方が検出感度が高いことから、検出モードとして SIM モードを選択した。

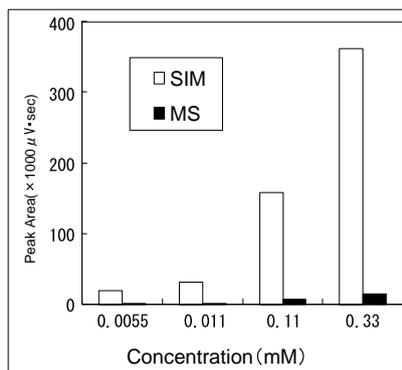


Fig.6 Comparison of the selected ion monitoring (SIM) with the total ion monitoring (MS) as the ion currents at the low level of the concentration of folic acid.

MS conditions: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70°C; capillary voltage, 3.5kV; cone voltage, 30V; Sample concentration, 10mM.

3-3-3 LC/MS における設定電圧の検討

LC/MS における設定電圧 (cone voltage) の違いによるプロトン化分子関連イオンのピーク面積の変化を観察した。葉酸試料各種 (folic acid=PteGlu, PteGlu₂, PteGlu₃) に対して, cone voltage を20~45V に変えてそのピーク面積を測定した。その結果を Fig.7 に示した。グラフは横軸に20~45V までの cone voltage の値を、縦軸にピーク面積を示している。その結果, folic acid, PteGlu₂ および PteGlu₃ において, それぞれ最適となる cone voltage の値に違いがあることがわかった。したがってここでは, folic acid, PteGlu₂ の検出感度から判断して, 設定電圧を30V として測定することとした。

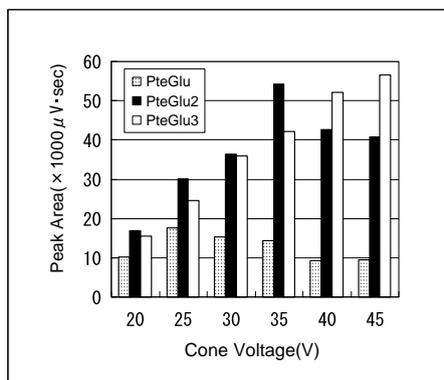


Fig.7 Effects of cone voltage on ion currents of the base peaks of the oxidized type folic acid derivatives.

MS conditions: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70°C; capillary voltage, 3.5kV; cone voltage, 30V; Sample concentration, 10mM.

3-3-4 葉酸化合物の LC/MS による分離の検討

葉酸は天然物中において様々な形態をとっていることは述べたが、ではそれぞれが LC/MS 法での分析においてどのように分離し、マススペクトル上どのようなスペクトルパターンを示すかを観察した。分析試料としては、還元型のジヒドロプテロイルグルタミン酸 (H_2 -葉酸)、5-ホルミルトetraヒドロプテロイルグルタミン酸 (5-CHO-葉酸)、5-メチルトetraヒドロプテロイルグルタミン酸 (5-Me-葉酸) および Tetraヒドロプテロイルグルタミン酸 (H_4 -葉酸) と、酸化型のプテロイルトリグルタミン酸 (PteGlu₃)、プテロイルジグルタミン酸 (PteGlu₂) およびプテロイルグルタミン酸 (folic acid) を用いた。酸化型および還元型葉酸の化学構造を Fig.8 に示した。

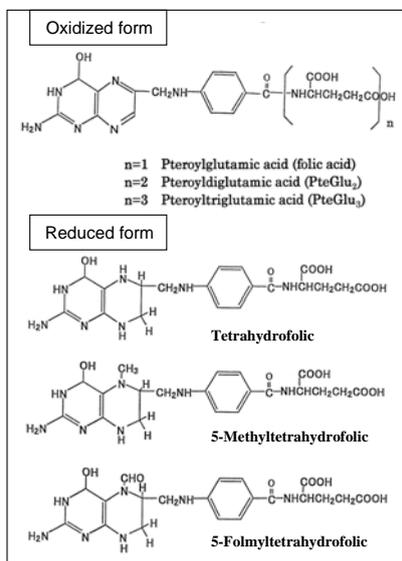


Fig.8 Chemical structures of folic acid derivatives: both oxidized form and reduced form.

その分離の様子（マスキロマトグラム）とマススペクトルを Fig.9 および Fig.10 に示した。Fig.9 に還元型葉酸を、Fig.10 には酸化型葉酸を示した。図からわかるように、保持時間が接近しているところもあるが、それぞれほとんど分離している。マススペクトル上は、いずれもプロトン化分子関連正イオン $[M+H]^+$ が見られた。また酸化型葉酸では、folic acid、PteGlu₂ および PteGlu₃ と、グルタミン酸の数が増えるにつれてその保持時間が短くなることがわかった。これはグルタミン酸残基の極性グループの存在によるものであり、逆相分配クロマトグラフィーにおいては、グルタミン酸が連なるに従って保持時間が短くなるといえる。

3-3-5 葉酸定量のための検量線および検出下限

カラムスイッチング法を設定した LC/MS 測定条件下で得られた典型的なクロマトグラムからは、folic acid は t_R 7.8分、PteGlu₂ は t_R 6.6分および PteGlu₃ は t_R 6.3分で溶出した。0.0005~0.1mM folic acid、0.001~0.1mM PteGlu₂ および 0.0002~0.1mM PteGlu₃ を用いた時の検量線を Fig.11 に示した。横軸に folic acid、PteGlu₂ および PteGlu₃ の濃度、縦軸にその時のピーク面積を示している。分析試料の注入量は、いずれも 10 μ l である。いずれも相関係数が 0.99 以上の良好な直線性を示し、検出下限については、folic acid では 570 μ g/L (S/N=4)、PteGlu₂ では 570 μ g/L (S/N=4) および PteGlu₃ では 140 μ g/L (S/N=3) であった。

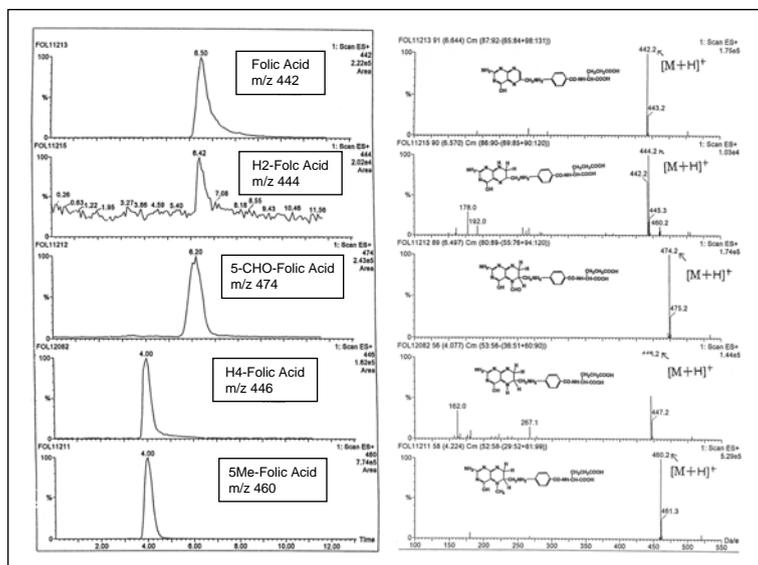


Fig.9 Mass chromatograms and mass spectra obtained by total ion current profile for a mixture of the reduced types of folic acid derivatives.
MS conditions: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70°C; capillary voltage, 3.5kV; cone voltage, 30V; Sample concentration, 10mM.

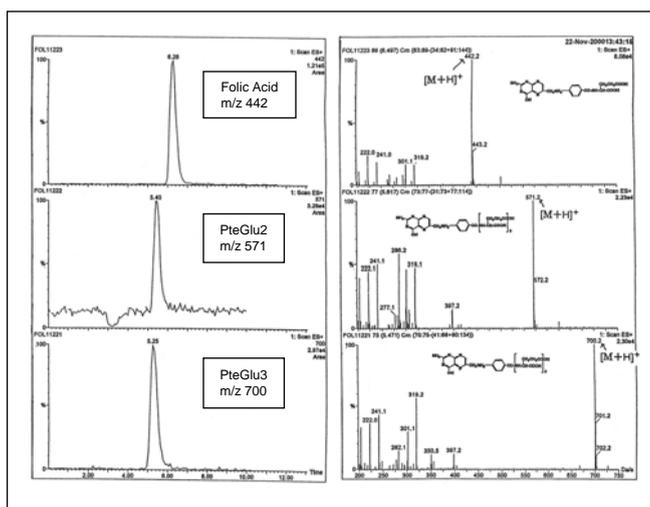


Fig.10 Mass chromatograms and mass spectra obtained by total ion current profile for a mixture of the oxidized types of folic acid derivatives.
MS conditions: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70°C; capillary voltage, 3.5kV; cone voltage, 30V; Sample concentration, 10mM.

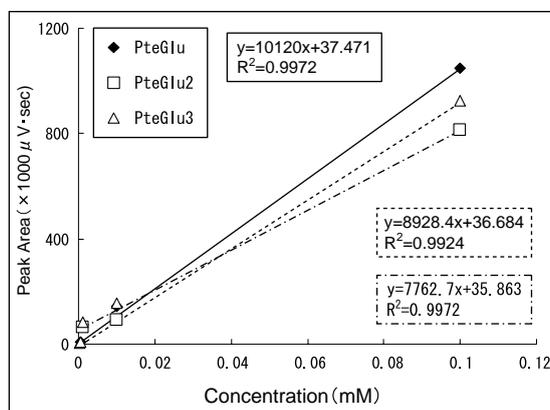


Fig.11 Linearity of the peak areas based on the ion currents with positive ion as the base peak of each oxidized folic acid.
MS conditions on ESI positive mode: source temperature, 70°C ; capillary voltage, 3.5kV; cone voltage, 30V; Sample concentration, 0.0005 ~ 0.1mM Folic acid, 0.001 ~ 0.1mM PteGlu₂ and 0.0002 ~ 0.1mM PteGlu₃.

3-3-6 ほうれん草中の葉酸含有量

これまでに検討してきた食品中の葉酸を定量するための条件を下に、ほうれん草から葉酸を抽出し、その試料をLC/MSによって分析を行った。そのときの分析結果をFig.12に示す。これは、 m/z 442, 571および700と、folic acid, PteGlu₂およびPteGlu₃のそれぞれプロトン化分子関連正イオンについて調べた。このクロマトグラムからも読み取れるように、PteGlu₃については、葉酸としての天然型の存在形態として、極微量ではあるがその他の成分に比べて明らかに高い濃度で含まれていることが分かった。この結果、ほうれん草1g当たり0.38 μ gのPteGlu₃が検出された。またこの試料からは、PteGlu₂の存在を確認することはできなかった。その他、PteGlu₃とfolic acidのマスクロマトグラムにおいて、保持時間5分あたりに同一物質に由来するピークが観察された。推測の域を超えるものではないが、それがPteGlu₃以上のグルタミン酸の数を有する葉酸に由来するシグナルである可能性は大きい。以上の結果により、食品中に含まれる葉酸が抽出され、その後LC/MSにおいて分析できることがわかった。

4 結 言

本研究では、食品中の極微量である葉酸を定量するためにLC/MS法を適用し、固相抽出やカラムスイッチングなどの前処理を併用しながら、イオン化に関わる諸条件の設定を行うことで、定量するための最適条件を見出した。この結果、ほうれん草から葉酸が抽出され、LC/MSによって定量できることがわかった。試料の前処理も従来のように長時間を必要とせず、また連続分析ができるという観点から迅速性において優れていると言える。今回は、試料から葉酸を抽出したサンプルの濃縮が20倍程度であったが、更に濃縮倍率が上がれば検出下限も上がってくる。固相抽出では、主に試料中の夾雑成分の除去について検討したので、濃縮のプロセスを更に検討する必要がある。しかし、固相抽出を行う上で手作業を含むため誤差が生じることは十分考えられる。そのため、なるべく手作業を避けるよう分析の自動化も考えなければならない。また、試料から葉酸を抽出するときの回収率も更に検討が必要である。今回の測定では、ほうれん草から抽出するのみに終わったが、コメ、また食パンや牛肉などの試料からも葉酸の定量についても行っていきたい。また、還元

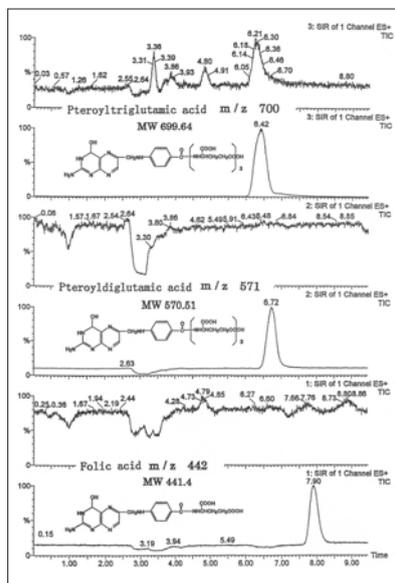


Fig.12 Mass chromatograms and mass spectra obtained by total ion current profile for an extraction sample from spinach, which was pretreated by the solid-phase extraction method, using on-line column switching technique mixture of the oxidized types of folic acid derivatives.

MS conditions: ESI-MS interface in the positive mode; source temperature, 70°C; capillary voltage, 3.5kV; cone voltage, 30V.

型葉酸についても、混合液中での分離の条件、また固相抽出するための検討を深める必要がある。今後は還元型葉酸の分離の確立、また固相抽出の条件の確立をめざし、LC/MS法での葉酸定量分析が生体中の葉酸定量に応用できる方法として提供したい。

葉酸化合物の標準試料を直接注入して得られるマススペクトルからはすべての葉酸化合物からプロトン化正イオンが検出された。葉酸が天然物中で存在する形態が多様であるため、LC/MSでの分析において最適条件にばらつきも見られたが cone voltage を設定するときにも30Vに設定すれば、folic acid, PteGlu₂, PteGlu₃の3種類において検出感度に影響はなく、一斉分析が可能となる。前処理法として固相抽出法を3段階において用いたが、それによって分析カラムとLC/MSのイオン源の汚染を最小限におさえることができ、またほうれん草中の葉酸の濃度を濃縮することも可能となった。しかし、問題点として固相抽出の際の回収率の悪さや、還元型葉酸と酸化型葉酸の分離が完璧ではなかったことなどがあげられる。今後の課題として、まず前処理の検討および還元型葉酸と酸化型葉酸の一斉分析を行いその相互分離可能な条件を見つけることが必要である。更に、相互分離の条件が見つければ還元型葉酸で存在している生体内の葉酸の定量が可能となり、更に葉酸の定量法として期待が持たれる。葉酸のLC/MSによる分析の報告はこれまでになく、本研究で進めてきた実用的なレベルでの測定を可能にするための検討結果からは、検出感度向上のための更なる検討を加えていきたい。

文 献

- 1) 麻生芳郎：一目でわかる代謝，第2版，メディカル・サイエンス・インターナショナル，東京

- (2000).
- 2) 相曾健二・水野安晴・K.E.Johnston・田村康信：ビタミン，9(72巻)，429-436(1998).
 - 3) 渡辺敏明：ビタミン，1(73巻)，39-45(1999).
 - 4) 勝沼恒彦・津田道雄：ビタミンの話，東海大学出版会，東京(1984).
 - 5) Peck Ritter：リッター 生化学，東京化学同人，東京(1999).
 - 6) 小橋昌裕：ビタミン，1(73巻)，23-36(1999).
 - 7) R.J.Leeming, A.Pollock：Metabolism，39(No.9)，902-904(1990).
 - 8) Marie-Christine Etienne：Clin. Chem.，39/1，82-86(1993).
 - 9) M.D.Lucock：Biomed. Molec. Medicine，58，93-112(1996).
 - 10) Kenji Aiso：Anal. Biochem.，272，143-148(1999).
 - 11) Kazuo Iwai, Susumu Nakagawa, Osamu Okinaka：Memories of the Research Institute for Food Science, Kyoto Univ.，No.19，17-37(1959).
 - 12) D.Richard White, Jr：J. Agric. Food Chem.，38，1515-1518(1990).
 - 13) 原田健一・岡 尚男：LC/MS の実際 天然物の分離と構造決定，講談社サイエンティフィック，東京(1996).
 - 14) M.D.Lucock, R.Hartley, R.W.Smithells：Biomed. Chromatogr.，3(No.2)，58-63(1989).
 - 15) Liisa T. Vaherist：J. AOAC International，80(No.2)，373-378(1997).
 - 16) K.Gamoh, T.Yagi：Anal. Sci.，4，433-435(1989).

謝 辞

本研究を推進するにあたり，国際地域連携センター設置の高速液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)装置を使用した。ここに謝意を表す。また本研究は，平成20年度特別教育研究経費「環境調和型物質変換プロセスの構築によるニューマテリアルの創成」研究プロジェクトおよび平成20年度特殊要因経費「高知県全域をフィールドとした総合研究に基づく教育・医療・福祉間で一貫した実効性のある発達障害支援システムの構築」研究プロジェクトの研究経費により行われた。ここに感謝の意を表す。

要 旨

葉酸は，生体に必要不可欠なビタミンB群のひとつである。葉酸欠乏症として巨赤芽球性貧血は古くから知られているが，最近では妊婦の葉酸欠乏症によって胎児が二分脊椎など先天異常を引き起こす危険性が高いことが報告されている。そのため，葉酸摂取の必要性が再認識され始めた。しかし，葉酸の存在形態が複雑であることから，食品中の葉酸濃度を正確に把握することは難しいとされてきた。葉酸化合物の存在形態は様々であり，大きくは酸化型と還元型に分けられ，更に，天然物中にはグルタミン酸ユニットが2～9個結合したポリグルタメート体が多く存在している。一般的に葉酸と言うと，酸化型葉酸である folic acid (= pteroylglutamic acid) をさす場合と，葉酸化合物を総称した場合がある。したがって，食品を対象とした葉酸の定量分析には，複雑な前処理が必要であった。本研究では，食品中の葉酸の定量を目的として，簡単な前処理と液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)法を用いる新しい分析方法の開拓を目指した。ほうれん草の葉を秤量し，その10倍量の20mM 酢酸アンモニウム水溶液(pH 8，0.2mM メルカプトエタノールおよび10mM アスコルビン酸を含む)を加え，乳鉢で粉碎した。粉碎したほうれん草サンプルを，加熱処理(90℃，

20分間)し、遠心分離(3000rpm, 10分間)後、その上清を回収した。このサンプル中の夾雑成分を除去する目的で、前処理用カラムにより二段階の固相抽出を行い、固相抽出したほうれん草サンプルをLC/MSで測定し、標準試料を用いて作成した検量線により、ほうれん草中の葉酸濃度を算出した。移動相として10%アセトニトリルを含む5%酢酸水溶液を用いた結果、folic acid, PteGlu₂, および PteGlu₃ を完全に分離することができた。イオン化モードをポジティブに設定することにより、folic acid, PteGlu₂, および PteGlu₃ は、いずれもプロトン化分子関連正イオン[M+H]⁺として検出された。オクタデシルシリル(ODS)シリカを用いた前処理用カラムによる2段階の固相抽出を行い、標準試料を用いた固相抽出では、回収率が79~87.5%であった。ほうれん草からの抽出液をLC/MSで測定した結果、酸化型葉酸のPteGlu₃が検出され、濃度的にはその他の酸化型葉酸に比べて高いことが分かった。folic acidも極微量ながら検出されたが、PteGlu₂は検出されなかった。本研究により、ほうれん草から葉酸化合物が抽出され、LC/MS法によって十分に定量できることがわかった。このことは本法が、従来のような複雑な前処理を必要とせず、簡単な前処理によって連続分析ができるという点で有用であることを示唆している。