

# Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS を用いた、GC/MS/MS による豆乳中の植物性エストロゲンの分析

## アプリケーション

食品

### 著者

Imma Ferrer、E. Michael Thurman  
Center for Environmental Mass  
Spectrometry,  
University of Colorado, Boulder, CO

Melissa Churley、Harry Prest、  
Phil Stremple  
Agilent Technologies, Inc  
Santa Clara, CA

Phil Wylie、Jerry Zweigenbaum  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808  
USA

### 概要

Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS を使用して、豆乳中の 8 種の植物性エストロゲン (ビオカニン A、クメステロール、ダイゼイン、エコール、フォルモノネチン、グリシタイン、ゲニステイン、およびプルネチン) を同定するための GC/MS/MS 分析メソッドを開発しました。植物性エストロゲンは、酢酸エチルを使用して液液抽出で豆乳から抽出しました。分析対象成分は、トリメチルクロロシラン (TMCS) および N,O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) でトリメチルシリル誘導体化を行いました。異なるコリジョンエネルギーでプリカーサイオンをフラグメント化し、プロダクトイオンスペクトルを取得することで、植物性エストロゲンのフラグメント化パターンを調べました。調査対象のすべての植物性エストロゲンのフラグメント化では、典型的なメチル基とカルボニル基の損失が見られました。同定、確認、および定量のために、各分析対象成分の 2 つのフラグメントイオンを選択しました。検量線は 3 桁以上の直線性を示しました。



Agilent Technologies

## はじめに

植物性エストロゲンは、さまざまな植物から発生する非ステロイド系ポリフェノール化合物の一群であり、エストロゲン受容体に吸着する能力によって生物学的反応を誘発します。通常は、大豆、クローバー、アルファルファ、インゲン、エンドウマメなどの豆類に高濃度で存在します [1]。人体に対するフラボノイド (2-フェニル-1,4-ベンゾピロン構造から派生した水溶性植物色素) の有益効果が報告されており [2]、それにはフリーラジカルを除去する機能が含まれます。しかし、廃水流出物からの合成ホルモンおよびヒトエストロゲンと共に、植物性エストロゲンが魚類の内分泌かく乱物質となっている可能性も指摘されています [3]。また、植物性エストロゲン (特にダイゼイン、ゲニステイン、およびグリシタイン) は、大豆食品を大量かつ頻繁に (週 3 回以上) 摂取する北米男性の精子数減少と関連付けられています [4]。植物性エストロゲンは、植物だけでなく、摂食を通じて人間や家畜類からも排出されるため、食品中のその起源と、地表水および排水中の濃度を評価することが重要です。アジレントが以前に調査した結果、地表水中のダイゼインとゲニステインの顕著な濃度は、大豆加工工場からの排水の影響を直接受けていることがわかっています [5]。

ガスクロマトグラフィと液体クロマトグラフィを含め、フラボノイドを同定および定量するための分析メソッドがいくつか報告されています [6, 7]。マトリクス干渉の可能性があるため、豆乳などの複雑なサンプルでこれらの分析対象成分の存在を同定および確認するには、イオントラップまたはタンデム質量分析メソッド (LC/MS/MS または GC/MS/MS) を使用することが不可欠です。一般に、GC メソッドでは、植物性エストロゲンに対して高い分離能と低い検出下限が得られますが、流速と熱安定性を上げるためトリメチルシリル誘導体化が必要です。通常、シラン処理された植物性エストロゲンを同定するには、2 つ以上のフラグメントイオンを測定する MS/MS 分析が必要です。MS/MS 分析はシングルイオンモニタリング手法よりも高い選択性があります。

このアプリケーションでは、Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS を使用して、豆乳中の 8 種の植物性エストロゲンを同定および確認しました (表 1)。植物性エストロゲンは、調査対象の各分析対象成分の分子イオンのフラグメントイオンを使用して同定しました。

## 実験

### サンプル前処理と誘導体化手順

ビオカニン A、クメステロール、ダイゼイン、エコール、フォルモノネチン、ゲニステイン、グリシタイン、およびプルネチンを

Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入しました。誘導体化試薬である N,O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA)、およびトリメチルクロロシラン (TMCS) は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) から入手しました。10 % の TMCS 誘導体化試薬を作成するために、500  $\mu$ L の TMCS を 5 mL の BSTFA に添加しました。同じ方法で、GC に注入する前に乾燥抽出物に添加するために、2 mL のピリジンを 8 mL の BSTFA と混合して BSTFA/ピリジン (5:1; v:v) 溶媒混合物を作成しました。メタノールと酢酸エチルは、Burdick and Jackson (Muskegon, MI, USA) から入手しました。すべての物質と試薬は分析用純度でした。個々の植物性エストロゲンの標準試料は、500 mg/L (メタノール) としました。これらの溶液から、希釈した標準溶液を誘導体化し、GC/MS/MS での分析に用いました。すべての標準溶液は  $-20^{\circ}\text{C}$  で保管し、使用する前に 2 時間以上室温で平衡化しました。

分析対象成分は、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (BSTFA) およびトリメチルクロロシラン (TMCS) でトリメチルシリル誘導体化を行いました。検量線用の標準溶液は、シラン処理した 5 mL のバイアルで、窒素気流により乾固させました。次に、200  $\mu$ L の 10 % TMCS/BSTFA 誘導体化試薬をバイアルに添加し、15 秒間ボルテックスしました。バイアルを  $60^{\circ}\text{C}$  の加熱ブロックに 1 時間置きました。その後バイアルを加熱ブロックから取り出して 15 分間冷却し、試薬を窒素下で乾固させました。最後に乾燥残留物を 200  $\mu$ L の 5:1 BSTFA/ピリジン注入溶媒で溶解し、30 秒間ボルテックスしました。誘導体化した抽出物は、シラン処理したガラス製ピペットを使用してオートサンブラパイアルに移し、GC/MS/MS で分析しました。

酢酸エチルを抽出溶媒として使用して、豆乳から植物性エストロゲンを抽出しました。豆乳サンプル (1 mL) を 5 mL の酢酸エチルで液液抽出し、窒素気流下で乾燥状態まで蒸発させました。残留物を  $60^{\circ}\text{C}$  で 1 時間、TMCS および BSTFA/ピリジンで誘導体化しました。

### GC/MS/MS 機器

GC/MS による植物性エストロゲンの同定は、Agilent 7890 ガスクロマトグラフと Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を使用しました。クロマトグラフィ分離は、Agilent J&W HP-5 (5 % フェニル、95 % メチルポリシロキサン)、30 m  $\times$  内径 0.25 mm、膜厚 0.25  $\mu$ m のフューズドシリカキャピラリカラムを使用しました。キャリアガスは、電子圧力制御で 1.2 mL/min に維持されたコンスタントフローのヘリウムを使用しました。インジェクタ温度は  $280^{\circ}\text{C}$  で、スプリットレス注入モードを使用しました。オープン温度プログラムは、 $100^{\circ}\text{C}$  (1 分間保持) から  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (1 分間保持) で  $240^{\circ}\text{C}$  まで、 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (4 分間保持) で  $300^{\circ}\text{C}$  までとしました。MS 使用条件

は次のとおりです: -70 eV の電子エネルギーの自動ゲイン制御 (AGC) を使用したポジティブ電子イオン化モード (EI+)。イオン源温度は 300 °C でした。ゲイン電圧は 30 に設定しました。すべての MRM トランジションのドウェルタイムは 50 msec としました。抽出物 1 µL をシステムに注入しました。機器コントロールとデータ分析には MassHunter ソフトウェアを使用しました。

## 結果と考察

### GC/MS/MS 条件の最適化

初期検討は 2 つの部分から構成されます。最初に、最大のシグナルを生成するために各植物性エストロゲンのプリカーサイオ

ンを確認しました。ピオカニン A、ゲニステイン、およびプルネチンを除き、通常は分子イオンをプリカーサイオンに使用しました。これにより、ベースピークイオンが  $[M^{++}-CH_3]$  になりました (表 1)。次に、各化合物を再び最適化して、定量と定性両方のイオン化トランジションのコリジョンエネルギーを決定しました。コリジョンエネルギーは 10 ~ 40 V の間で検討しました。最適化された MRM トランジションを表 2 に示します。

表 2 に、調査対象のすべての分析対象成分のプリカーサイオンと主要なフラグメントイオンを示します。場合によっては、ゲニステインやプルネチンなどでトリメチルシリル基のフラグメント化が発生しました。その他の場合は、メチル基、またはメチル基とカルボニル基が失われました。

表 1. 調査対象の植物性エストロゲンの BSTFA 誘導体の化学式、選択したプリカーサイオン、および構造式

名前	化学式	M+ または M+·	構造式
ピオカニン A	$C_{22}H_{28}O_5Si_2^{++}$ m/z 428	413	
クメステロール	$C_{21}H_{24}O_5Si_2^{++}$ m/z 412	412	
ダイゼイン	$C_{21}H_{26}O_4Si_2^{++}$ m/z 398	398	
エコール	$C_{21}H_{30}O_3Si_2^{++}$ m/z 386	386	
フォルモノネチン	$C_{19}H_{20}O_4Si^{++}$ m/z 340	340	

続く

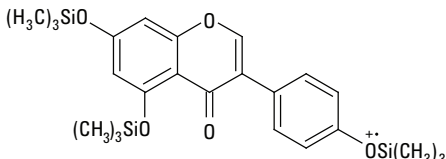
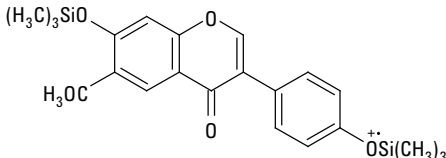
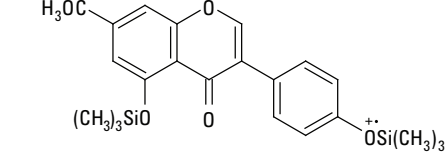
名前	化学式	M+ または M+•	構造式
ゲニステイン	$C_{24}H_{34}O_5Si_3^{++}$ m/z 486	471	
グリシタイン	$C_{22}H_{28}O_5Si_2^{++}$ m/z 428	428	
ブルネチン	$C_{22}H_{28}O_5Si_2^{++}$ m/z 428	413	

表 2. 調査対象の植物性エストロゲンの分析で選択した MRM トランジションと MS 操作パラメータ

化合物	MRM トランジション (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
ビオカニン A	413 > 370	30
	413 > 341	30
クメステロール	412 > 397	20
	412 > 369	20
ダイゼイン	398 > 383	20
	398 > 355	30
エコール	386 > 207	10
	386 > 192	10
フォルモノネチン	340 > 325	10
	340 > 297	20
ゲニステイン	471 > 399	30
	471 > 327	40
グリシタイン	428 > 413	10
	428 > 398	20
ブルネチン	413 > 370	30
	413 > 341	30

図 1 に、ダイゼインの詳細なフラグメント化パターンを示します。分析の観点から、これは定量と確認の目的に使用できるフラグメントイオンを選択するために最も重要なもので、通常は TMS (トリメチルシリル) 基の損失がありません。そのため、相対存在量に基づき、各分析対象成分について可能な場合は 2 つの

選択的なフラグメントイオンを選択しました。ゲニステインのみ、TMS 基の 2 つの損失と一貫した 72 質量単位の 2 つの損失が発生し、メチルラジカルと C=O 基の特徴的な損失を示しませんでした。

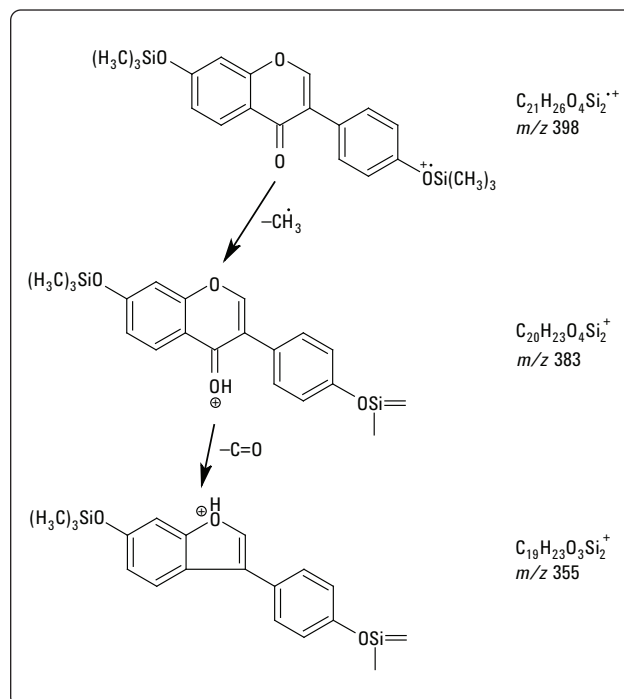


図 1. ダイゼインのフラグメント化経路

## 植物性エストロゲンのクロマトグラフィ分離

GC/MS クロマトグラフィ条件を最適化してすべての分析対象成分間にベースライン分離能を実現する一方で、16 分の適切な分析時間を維持してサンプルのスループットを最大化しました。すべての誘導体化植物性エストロゲンは極性が似通っているため、混合標準溶液は GC/MS オープンで低い昇温プログラム (4 °C/min) を使用して分離しました。図 2 に、調査対象のすべての植物性エストロゲンの 50 ppb 標準混合物質に対応する MRM クロマトグラムを示します。それぞれの定量 MRM トランジションに従って、それぞれ 1 つの対象化合物の抽出イオンクロマトグラムを重ねました。実験セクションで報告したオープン温度プログラムを使用して、良好なクロマトグラフィ分離が得られました。

## 分析パフォーマンス

0.1、0.5、1、5、10、50 および 100 µg/L の濃度の標準溶液について検量線をプロットしました。検量線は、すべての分析対象成分について 1 ~ 100 µg/L の範囲で直線になりました。図 3 に、グリシタインの例を示します。決定係数  $R^2$  の値は >0.99 でした。すべての分析対象成分の機器検出限界 (LOD) を表 3 に示します。LOD が最も低いのはダイゼインとプルネチンでした。フォルモノネチンでは、感度 (つまり、シグナル強度/濃度) が最も低いため、LOD が高くなりました。標準試料のアッセイ内およびアッセイ間変動係数 (CV, n=3) は 2 ~ 8% で、メソッドの再現性が良好であることを示しています。

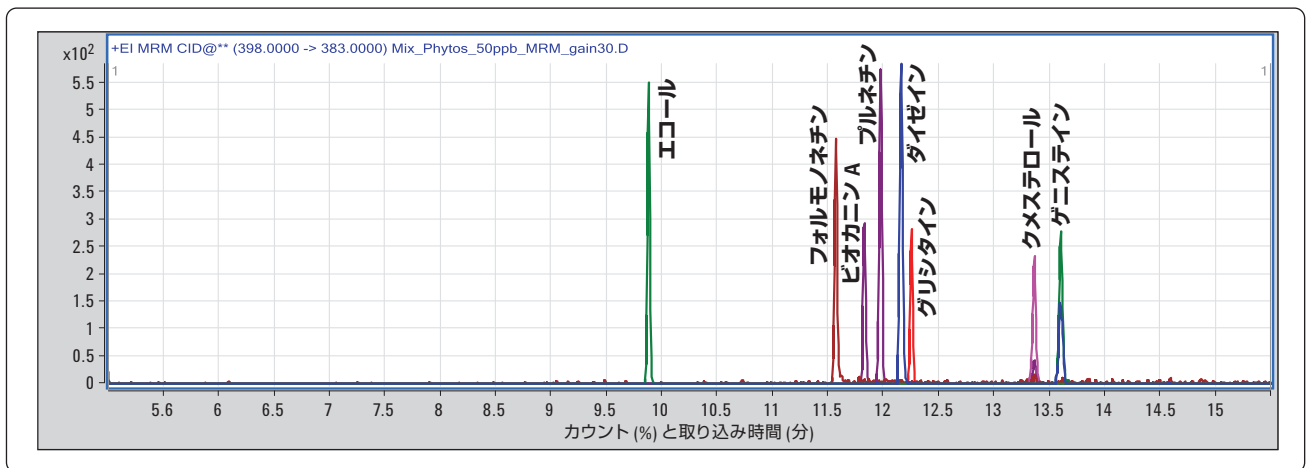


図 2. 8 つの植物性エストロゲンについて 50 ppb の濃度での MRM 抽出クロマトグラム。定量トランジションの抽出イオンクロマトグラムを示しています

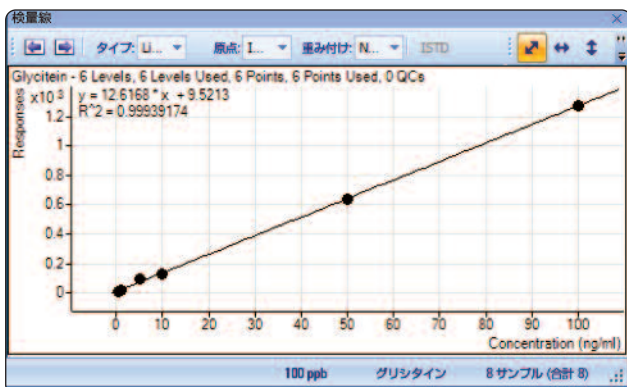


図 3. 0.1 ~ 100 µg/L (ppb) の 7 ポイントを使用したグリシタインの検量線

表 3. 調査対象の植物性エストロゲンの機器検出下限 (LOD)

名前	検量線	$R^2$	LOD (µg/L)
バイオカニン A	$21.8x - 25.1$	0.992	2
クメステロール	$9.4x + 3.9$	0.999	3
ダイゼイン	$20x + 8.8$	0.999	1
エコール	$14.3x - 3.8$	0.999	3
フォルモノネチン	$13.3x + 18.6$	0.999	5
ゲニステイン	$11.4x - 12.5$	0.994	2
グリシタイン	$12.6x + 9.5$	0.999	2
プルネチン	$41.7x - 59.3$	0.992	1

## 豆乳分析への適用

図 4 に、地元の食料品店で購入した市販の豆乳のクロマトグラフィ分析を示します。ゲニステイン (16,000 µg/L) とダイゼイン (7,000 µg/L) は、豆乳サンプルで同定されたごく一般的な植物性エストロゲンでした。また、はるかに低い濃度 (760 µg/L) でのグリシタインの存在が、このメソッドで確認されました。豆乳中にはこの 2 つの分析対象成分が高濃度で存在するため、抽出物の希釈を行って、検出器への過負荷を回避する必要があります。図 4 は、ゲニステインの 2 つの MRM トランジションの存

在と、それぞれのイオン比も示しています。この図に示すように、MRM トランジションの選択性と機器の感度により、この複雑なマトリクスで植物性エストロゲンが簡単に同定されました。

このような複雑なサンプルを GC/MS で分析する場合は、システムの整合性 (特にイオン源とクロマトグラフィカラム) を維持することが非常に重要です。サンプルが複雑で多くの干渉物を含むケースでは、バックフラッシュの利用が推奨されます [8]。

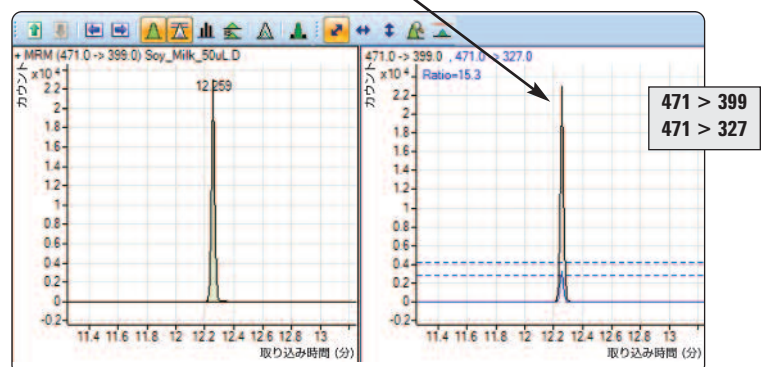
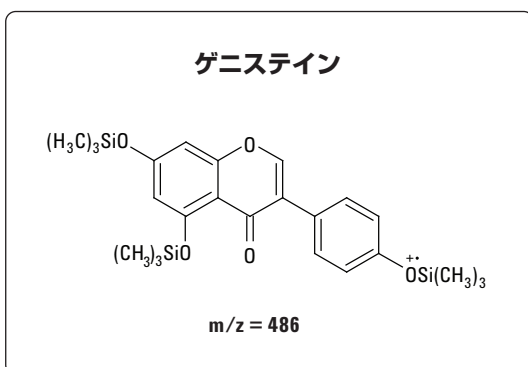
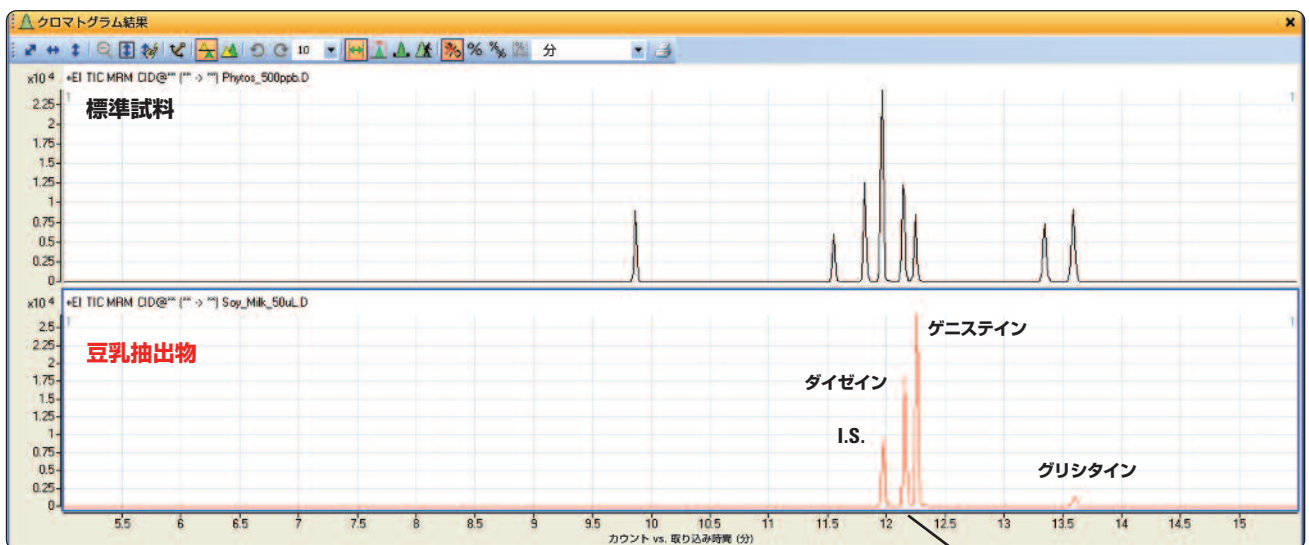


図 4. ダイゼイン、ゲニステイン、およびグリシタインの同定を示す豆乳サンプルの MRM クロマトグラム。ゲニステインの 2 つの MRM トランジションのイオン比も示しています

## 結論

トリメチルシリル誘導体化と GC/MS/MS を使用して、8 種の植物性エストロゲン (ビオカニン A、クメステロール、ダイゼイン、エコール、フォルモノネチン、グリシタイン、ゲニステイン、およびプルネチン) を同定する分析メソッドを開発しました。この調査の結果から、Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS により、豆乳サンプル中の植物性エストロゲンを信頼性高くかつ高感度に同定できることが示されました。さらに、プリカーサイオンをフラグメント化することで、すべての植物性エストロゲンのフラグメント化パターンを調べました。メチル基とカルボニル基の損失を伴う典型的なフラグメント化が検出されました。同定と確認のために、各分析対象成分の 2 つの特性フラグメントイオンを選択しました。最後に、開発したメソッドを豆乳中の植物性エストロゲンの同定と確認に適用しました。

## 参考文献

1. K.R. Price, G.R. Fenwick, Food Addit. Contam. 2 (1985) 73.
2. J.J. Peterson, G.R. Beecher, S.A. Bhagwat, J.T. Dwyer, S.E. Gebhardt, D.B. Haytowitz, J.M. Holden, J. Food Comp. Anal. 19 (2006) S74.
3. M. Kawanishi, T. Takamura-Enya, R. Ermawati, C. Shimohara, M. Sakamoto, K. Matsukawa, T. Matsuda, T. Murahashi, S. Matsui, K. Wakamayashi, T. Watanabe, Y. Tashiro, T. Yagi, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 6424.
4. J.E. Chavarro, T.L. Toth, S.M. Sadio, R. Hauser, 23 (2008) 2584.
5. I. Ferrer, L.B. Barber, E.M. Thurman, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 6024.
6. S. Moors, M. Blaszkewicz, H.M. Bolt, G.H. Degen, Mol. Nutr. Food Res. 51 (2007) 787.
7. M. Erbs, C.C. Hoerger, N. Hartmann, T.D. Bucheli, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 8339.
8. C. Sandy, 「キャピラリー・フロー・テクノロジーとバックフラッシュによるGC/MS メソッドの堅牢性とサイクルタイムの向上」、アジレント資料番号 5990-3367JAJP, 2009.

## 詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2009  
Printed in Japan  
December 18, 2009  
5990-5063JAJP



**Agilent Technologies**