

痩身用健康食品中の含有成分の分析におけるマルチモード ODS カラムの適用

赤松 成基* 吉田 昌史

Simultaneous Determination of Components in Dietary Supplements for Weight Loss Using a Multi-mode ODS Column

Shigeki AKAMATSU* and Masashi YOSHIDA

Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

An LC/MS method for simultaneous determination of five components in dietary supplements was developed and validated: forskolin, capsaicin, α -lipoic acid, carnitine, and ornithine. A multi-mode ODS column consisting of ion exchange and reversed-phase was used for the separation. The method detection limits for all five components were in the range of 0.96-95.6 $\mu\text{g/g}$. The average recoveries ranged from 89.0% to 107.8%. In addition, the method was applied to commercial products. The results in the present study were generally consistent with the labelled contents.

I はじめに

近年、健康志向の高まりから、多種多様な健康食品やサプリメントが流通しており、その宣伝もメディア等で盛んに行われている。特にダイエット（痩身）目的の健康食品は、老若男女問わず、幅広い消費者層からの関心が高い。しかし、これら健康食品の有効性については科学的根拠に乏しいものも存在し、副作用等の有害事象が発生する恐れもある。また、平成 27 年 4 月からは我が国においても「機能性表示食品」制度が始まり¹⁾、健康食品市場はさらに活性化し、利用する消費者も増加すると考えられる。健康食品の中には医薬品として使用されている成分（ α -リポ酸等）もあり、消費者自身が健康食品の特徴を理解し、適切に利用することが求められる。このため公衆衛生の観点からも健康食品の含有成分量等を把握し、表示の信憑性についての監視が必要である。

健康食品中の含有成分分析については、HPLC等が多く用いられているが²⁻⁴⁾、一般的な ODS (Octa Decyl Silyl) カラムでは高極性物質の保持が弱く、分離が不十分であることが多い。一方、HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) カラムに代表される親水性カラムでは、低極性物質ほど分離が困難となる。市販健康食品中には、アミノ酸等の高極性物質から植物由来の低極性物質まで様々な極性成分を含む商品が販売されていることから、これらの一斉分析法の開発が要求されている。本研究では、イオン交換基と ODS から構成されるマルチモード ODS カラムを用いて、LC/MS による様々な極性をもつ 5 種類の含有成分（フォルスコリン、カプサイシン、 α -リポ酸、カルニチン、オルニチン）の一斉分析法を検討し、市販の痩身用健康食品の含有成分分析に適用した。Fig. 1 に 5 種類の対象成分の構造式を示す。

II 材料と方法

1. 試料

平成 24 年に神戸市内の店舗（ドラッグストア等）から購入した痩身用健康食品 7 製品を用いた。形状の内訳は、錠

健康科学部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 赤松 成基

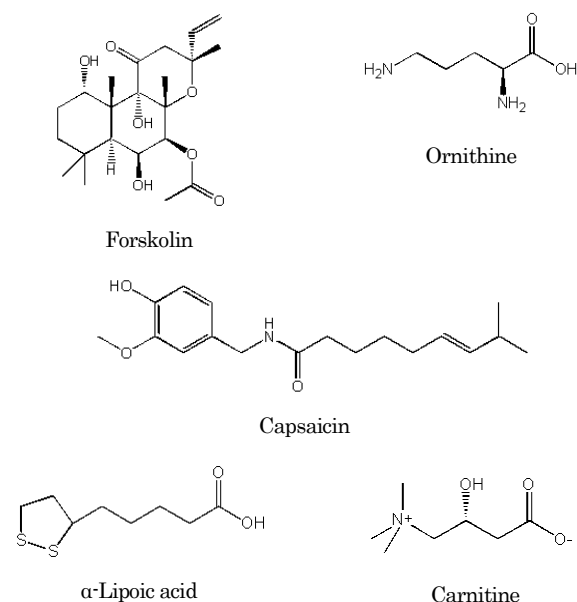


Fig. 1 Chemical structures of the analytes

剤4製品, カプセル剤2製品, 粉末状1製品であった。

2. 試薬

痩身用健康食品に含まれる成分の標準品として、フォルスコリン (ホルスコリン), カプサイシンは和光純薬工業製を用いた。また、α-リポ酸 (DL-α-リポ酸), カルニチン (L-カルニチン) は東京化成工業製, オルニチン (L-オルニチン塩酸塩) はAlfa Aesar製を用いた。メタノールは和光純薬工業製LC/MS用を用い, アセトニトリルはシグマ・アルドリッチ製LC/MS用を用いた。ギ酸は和光純薬工業製, ギ酸アンモニウムは関東化学製の特級を用いた。

標準原液として各10 mgをメタノール5 mL (オルニチンは90%メタノール) に溶解し, -20°Cで保管した。これらの標準原液を適宜混合し, メタノールで希釈して標準溶液を調製した。

3. 試験溶液の調製

試料を必要に応じてミキサー (岩谷産業製IFM-700G) で粉碎し, 均一化した。その約20 mgを精密に量り, 70%メタノール 1.0 mLを加えて超音波下10分間抽出を行った。遠心分離後, 上清を0.45 μmメンブランフィルターでろ過したものを試験原液とし, 適宜希釈してLC/MSで測定した。

4. 分析条件

LC/MS装置は, Agilent製1100MSD型を用いて, 以下の分析条件で行った。

Table 1 Acquisition parameters for mass spectrometer

Compound	ESI	Target ion		Qualifier ion	
		(<i>m/z</i>)	(V) ^{a)}	(<i>m/z</i>)	(V) ^{a)}
Forskolin	-	409	100	409	200
Capsaicin	+	306	100	137	200
α-Lipoic acid	-	205	100	171	200
Ornithine	+	133	100	57	200
Carnitine	+	162	100	102	200

^{a)} Fragmentor voltage

分析カラム: Imtakt製Scherzo SS-C18 (3.0×100 mm, 粒子径3 μm), 移動相A: 0.1%ギ酸, 移動相B: 50 mMギ酸アンモニウム-アセトニトリル (3:7), グラジエント条件: B液; 60% (0 min) - 70% (10 min) - 95% (12 min), 流速: 0.5 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 5 μL, イオン化: エレクトロスプレーイオン化 (ポジティブモード及びネガティブモード), キャピラリー電圧: 4000 V, フラグメンター電圧: 100 V及び200 V, 乾燥ガス: N₂ (10 L/min, 350°C), スキャン範囲: *m/z* 50-500, 定量・確認イオン: Table 1.

III 結果及び考察

1. 分析カラムの検討

LC/MS分析で一般に用いられるODSカラムのほか, HILICカラム, マルチモードODSカラムの全3種類の分析カラムを用いて, 5成分の保持時間での分離を比較した。Fig. 2~Fig. 4に得られた3種類のクロマトグラムを示す。またそれぞれのカラムでの分析条件については, Fig. の脚注に示す。

カラム固定相に疎水性基を結合させたODSカラムでは, 低極性物質のフォルスコリン及びカプサイシンは保持され, ピーク形状も良好であった (Fig. 2)。一方, 高極性物質のカルニチン及びオルニチンはカラムに保持されず, 分離できなかった。また親水性基を導入したHILICカラムでは, オルニチンのみが保持されたが, ピーク形状もややブロードとなった (Fig. 3)。さらに他の4成分はカラムに保持されず, 今後移動相条件を最適化しても全ての成分を分離することは困難と判断した。

マルチモードODSカラムでは, 5成分全てがカラムに保持されたことから移動相条件を最適化し, ベースライン分離が可能となった (Fig. 4)。このカラムは, 固定相として疎水性のODSとともに, カチオン交換基及びアニオン交換基を結合させたものであり, 物質の極性に関わらずカラムに一定の保持ができることが特徴である。今

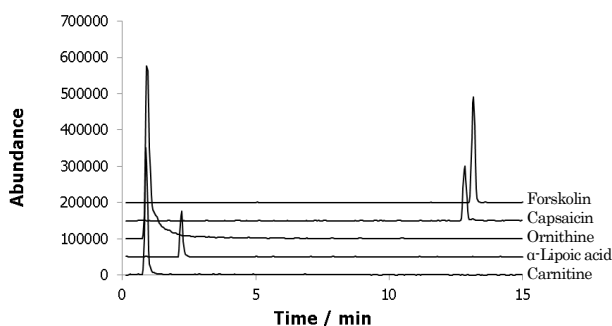


Fig. 2 Extracted ion chromatogram of standard mixture using an ODS column. Sample: forskolin and α -lipoic acid (5 $\mu\text{g/mL}$), capsaicin and carnitine (0.5 $\mu\text{g/mL}$), ornithine (50 $\mu\text{g/mL}$). Column: Ascentis Express C18 (3 \times 100 mm, 3 μm). Flow rate: 0.5 mL/min. Mobile phase: A: 10 mM AcONH_4 , B: ACN. Gradient: 20% B (0 min, 5 min hold) \rightarrow 65% B (15 min).

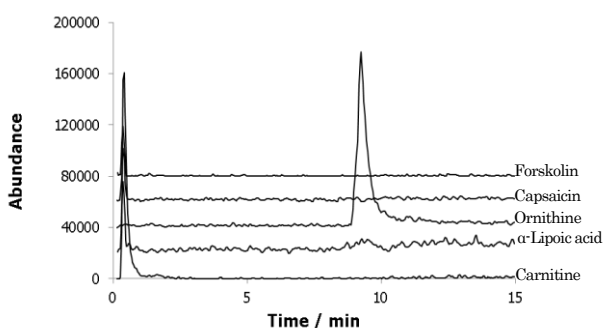


Fig. 3 Extracted ion chromatogram of standard mixture using a HILIC column. Sample: forskolin and α -lipoic acid (1 $\mu\text{g/mL}$), capsaicin and carnitine (0.1 $\mu\text{g/mL}$), ornithine (10 $\mu\text{g/mL}$). Column: Luna 3 μ HILIC (2 \times 50 mm, 3 μm). Flow rate: 0.5 mL/min. Mobile phase: A: 5 mM HCOONH_4 , B: 5 mM HCOONH_4 in 90% ACN. Gradient: 100% B (0 min, 5 min hold) \rightarrow 80% B (15 min).

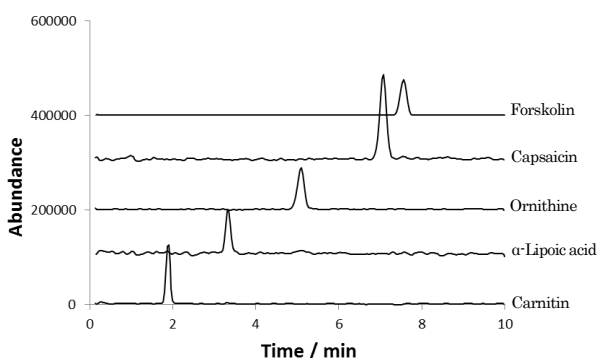


Fig. 4 Extracted ion chromatogram of standard mixture using a Multi-mode ODS column. Sample: forskolin and ornithine (20 $\mu\text{g/mL}$), capsaicin (1 $\mu\text{g/mL}$), carnitine (0.1 $\mu\text{g/mL}$), α -lipoic acid (10 $\mu\text{g/mL}$). Column: Scherzo SS-C18 (3 \times 100 mm, 3 μm). Flow rate: 0.5 mL/min. Mobile phase: A: 0.1% HCOOH , B: 50 mM HCOONH_4 - ACN (30:70). Gradient: 60% B (0 min) \rightarrow 70% B (10 min) \rightarrow 95% B (12 min).

回の5成分においても、疎水性相互作用及び親水性相互作用のいずれか、または両方の相互作用によりカラム表面に保持したと考えられる。また、5成分のうちフォルスコリン及びカプサイシンの保持時間が長いことから、疎水性相互作用が優位に働くことがわかった。また特筆すべき点として、ODSカラムでは α -リポ酸の保持がオルニチンよりも強かったが、マルチモードODSカラムではオルニチンの方が保持が強い結果を示した。これはオルニチンの親水性相互作用が強く、マルチモードODSカラムでは疎水性相互作用との合算した相互作用が α -リポ酸の相互作用の強さを上回った結果と推測される。これらの結果から、マルチモードODSカラムが5成分の一斉分析に最適であることがわかった。

2. 抽出溶媒の検討

あらかじめ今回の測定成分を含まないことを確認した健康食品（ブランク試料）に、既知濃度の5成分を添加した試料を用いて抽出溶媒の回収率に対する影響を評価した。

抽出溶媒は、メタノール濃度を50%、70%、80%として比較した。オルニチンを除く4成分は、いずれの抽出溶媒においても回収率が85%以上であったが、オルニチンは80%メタノールで67% (n=5) と低回収率であった。これはオルニチンの有機溶媒への溶解性が低いことに起因するものと考えられた。一方、50%メタノールでは水溶性の高いマトリックス成分が同時に抽出されることから、測定溶液が白濁した。また、複数回測定時の保持時間が不安定となり、分析カラムの汚染が原因と考えられたため、抽出溶媒は70%メタノールとした。

3. 分析法バリデーション

本研究で用いた分析法の得られた分析能パラメータをTable 2に示す。検出限界 (LOD, 3σ) は、0.96 $\mu\text{g/g}$ (カルニチン) \sim 95.6 $\mu\text{g/g}$ (オルニチン) であり、成分により大きく異なったが、健康食品中の含有成分分析においては十分な感度であった。

添加回収試験はブランク試料に0.025 mg/g (カプサイシン, カルニチン), 0.25 mg/g (フォルスコリン, α -リポ酸), 2.5 mg/g (オルニチン) となるように標準溶液を添加して30分間放置した後、実施した。精度は、1日1回5試行の異なる3日間で試験を繰り返し、併行精度及び室内精度を評価した。真度 (回収率) は89.0% (カルニチン) \sim 107.8% (オルニチン) となり、併行精度は4.1% (α -リポ酸) \sim 8.2% (フォルスコリン), 室内精度は6.6% (α -リポ酸) \sim 13.6% (カプサイシン) と良好な結果が得られた。

Table 2 Method validation parameters

	LOD, µg/g	Recovery ^{a)} , %	Intraday RSD ^{b)} , %	Interday RSD ^{c)} , %
Forskolin	11.2	99.2	8.2	7.9
Capsaicin	1.3	97.2	7.1	13.6
α-Lipoic acid	27.2	95.8	4.1	6.6
Ornithine	95.6	107.8	5.4	8.3
Carnitine	0.96	89.0	4.7	8.0

^{a)} Mean, n=15

^{b)} n=5

^{c)} n=3

Table 3 Analysis of the real samples ^{a)}

No.	Forskolin	Capsaicin	α-Lipoic acid	Ornithine	Carnitine
1	-	-	-	-	11.4
2	-	-	-	-	0.04
3	-	0.12	-	-	-
4	18.4(71.3) ^{b)}	-	13.0(100.8)	-	84.7(109.3)
5	51.8(84.0)	-	-	-	-
6	-	-	-	-	0.02
7	-	-	0.60	17.5	8.74

^{a)} Mean, unit: mg/g (n=3)

^{b)} The value in parenthesis is the corresponding ratio of detected to labelled contents (unit: %).

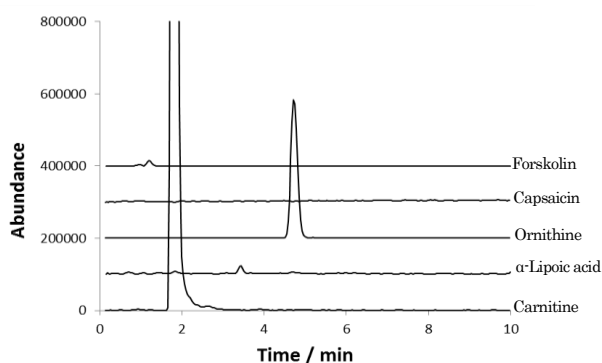


Fig. 5 Representative ion chromatogram of the real sample.
Sample: sample No. 7 in Table 3.

4. 市販健康食品の含有量測定

市販製品 7 検体の測定結果を Table 3 に示す. いずれの製品からも対象成分が検出されたが, 製品によって成分濃度は大きく異なった. 実試料のクロマトグラム例を Fig. 5 に示す. 定量の妨害となるピークは見られなかった. また含有量表示のあった製品の表示値に対する実測値の割合は 71.3%~109.3%であり, 概ね表示値どおりの値となった.

IV 結論

イオン交換基と ODS から構成されるマルチモード ODS カラムを用いて, 低極性物質だけでなく, 高極性物質も同時にベースライン分離が可能な一斉分析法を開発した. 本分析法を, 市販健康食品の 5 成分の含有量測定に適用した結果, 製品中に含まれる濃度は製品間で大きく異なることがわかった. また, 実測値と製品の表示値は概ね一致した.

本分析法は, 極性の高低に関わらず複数成分の一斉分析が可能であったことから, スクリーニング検査としても有効であると考えられる. また, 今後さらなる対象成分数の拡大に応用できると考えられる.

文献

- 1) 消費者庁次長通知: 食品表示基準について. 平成 27 年 3 月 30 日, 消食表 139 号 (2015)
- 2) Schaneberg, B. T. and Khan, I. A.: Quantitative analysis of forskolin in *Coleus forskohlii* (Lamiaceae) by reversed-phase liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **86**, 467-470 (2003)
- 3) Durrani, A. I., Schwartz, H., Schmid, W. and Sontag, G.: α-Lipoic acid in dietary supplements: Development and comparison of HPLC-CEAD and HPLC-ESI-MS methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 694-699 (2007)
- 4) Saria, A., Lembeck, F. and Skofitsch, G.: Determination of capsaicin in tissues and separation of capsaicin analogues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **208**, 41-46 (1981)

(平成28年3月24日受理)