

## 分担研究報告書

グレーズーンの植物体に関する研究

毒性の高いナフトキノンの定量分析に関する研究

研究分担者 政田 さやか 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

### 研究要旨

毒薬相当の急性毒性を有するナフトキノ誘導体 Juglone (JUG) 及び Plumbagin (PLU) の高感度定量の開発を試みた。初めに、定量用機器として汎用される LC/MS/MS を用いた分析法の検討を行ったが、条件検討を尽くしても、2 化合物のフラグメントは安定せず定量可能な MS ピークとして検出することは叶わなかった。そこで、LC-HRMS による検出を試みたところ、同様に比率が一定しない[M-H]<sup>-</sup>と[M+2H]<sup>+</sup>のフラグメントが確認され、化合物の構造が MS による定量分析に適していない可能性が示唆された。クログルミを含有する製品 15 検体の定性分析を行った結果、7 検体から JUG, 1 検体から PLU の検出が認められた。高感度定量分析には、さらなる検討が必要である。

### 研究協力者

後藤佑斗：国立医薬品食品衛生研究所 生薬部  
派遣研究員

### A. 研究目的

植物アレロパシー物質の一種であるナフトキノ誘導体 Juglone (JUG) 及び Plumbagin (PLU) は、哺乳類に対して毒薬相当の急性毒性を有することが報告されている (JUG の LD<sub>50</sub> = 2.5 mg/kg (mouse, oral), PLU の LD<sub>50</sub> = 16 mg/kg (mouse, oral)). 食薬区分では、非医リストに記載されているカキ<柿>, カシグルミ, クログルミ, シコウカ, ホウセンカ, ミチヤンギがナフトキノ誘導体を生成することが知られ、平成 29~30 年度に実施された食品・添加物等規格基準に関する試験検査等新開発食品保健対策関係事業「食品に含まれる「要管理成分(指定成分)」の検討」では、専門家から「部位ごとに含有量が違うのなら、可食部を非医, 非可食部を指定成分の候補とする道があるかもしれない」とのコメントがあり、JUG 及び PLU 含有量の高い品目の健康リスクが指摘

された。そこで本研究では、非医リストに記載された上記植物の部位ごとのナフトキノ含有量、あるいは食薬区分未区分の植物体におけるナフトキノ含有量を測定するための定量分析法の確立を試みた。さらに、クログルミを含有する製品を対象に、2 化合物が検出可能かを検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 試薬・試液

標準試薬 (Juglone, Plumbagin) 及び溶媒は国内試薬メーカーより購入した。

#### 2. 標準溶液の調製

各標準試薬 1.0 mg を MeOH 1.0 mL に溶解し、標準原液とした。各原液を混和して 100 µg/mL 標準溶液を調製した。これを MeOH で希釈し、0.01 - 10 µg/mL 検量線用標準溶液を調製した。

#### 3. 試料の調製

クログルミ含有健康食品は、インターネット店より購入した (Table 1)。

各検体について 1 日摂取量を秤量し、MeOH 10 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出後、5000×g で 3 分間遠心分離した得られた上清について、0.45 μm フィルター（日本ポール）でろ過後に UPLC-MS/MS 及び LC-HRMS 分析に供した。

### 3. UPLC-MS/MS 分析

以下の条件で測定を行った。

#### 【UPLC 条件】

装置, ACQUITY UPLC system (Waters); カラム, ①ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm, Waters 社) ②ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm, Waters 社); サンプル注入量, 2 μL; 移動相, A 液: MilliQ 水, B 液: MeOH; グラジエント (A 液/B 液), 10%B (0-2 min hold) -98%B (2-8 min), 98%B (8-10 min hold); 流速, 0.3 mL/min; カラム温度, 35°C.

#### 【MS 条件】

装置, Xevo TQD (Waters); イオン化法, ESI ネガティブモード; Source gas flow Desolvation, 650 L/Hr; Cone, 0 L/Hr; DL 温度, 200°C; ヒートブロック温度, 150°C; キャピラリー電圧, 2.5 - 30. kV.

### 4. LC-HRMS 分析

以下の条件で測定を行った。

#### 【LC 条件】

装置, DIONEX UltiMate 3000 (Thermo Fisher); カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm, Waters 社); サンプル注入量, 2 μL; 移動相, A 液: MilliQ 水, B 液: MeOH; グラジエント (A 液/B 液), 10%B (0-2 min hold) -98%B (2-10 min), 98%B (10-12 min hold); 流速, 0.3 mL/min; カラム温度, 35°C.

#### 【MS 条件】

装置, Q Exactive (Thermo Fisher); イオン化法, ESI ネガティブモード; Sheath gas flow rate: 50, Aux gas flow rate: 13, Sweep gas flow rate: 3, Spray Voltage: 3.5 kV, Capillary temp.: 350°C, Aux gas

heater temp.: 350°C, Resolution: 70000, Range: 100-1500 m/z.

### C. 研究結果・考察

JUG は、クルミ科クログルミ (*Juglans nigra* L.) に多く含まれることが知られ、果実に含まれる JUG の品種や季節による差が報告されているが、専ら HPLC-PDA や LC-HRMS<sup>®</sup> による定量で、高感度な定量用機器として汎用される LC/MS/MS を用いた分析法は確立されていなかった[1-3]。そこで、UPLC-MS/MS を用いた JUG 及び PLU の高感度定量分析法の確立を試みた。2 化合物の混合標準溶液の測定結果を Fig.1 に示す。JUG は保持時間 5.9 min, PLU は 6.6 min に検出されたが、同一試料の繰り返し測定であってもピーク強度が安定せず、MS フラグメントが単一ピークとして得られていないために、[M-H]<sup>-</sup>をターゲットとした測定値がばらつくことが明らかとなった。試料溶液中あるいは測定中の化合物の分解を疑い、試料調製溶媒、LC のカラム、移動相、MS の電圧や温度等の条件を変えて検討したが、安定したピーク強度が得られる条件は見つからず、UPLC-MS/MS による定量分析は不可能と判断した。

そこで次に、定性性に優れた LC-HRMS を用いた高感度検出を試みた。2 化合物の混合標準溶液の測定結果を Fig.2 に示す。JUG は保持時間 8.3 min, PLU は 9.4 min に検出され、[M-H]<sup>-</sup>をターゲットとした抽出クロマトグラム (XIC) 下での相対検量線法により、JUG: 1 ng~10 μg/mL, PLU: 10 ng~10 μg/mL の範囲で、2 化合物に対して良好な相関を有する検量線を作成できた (Fig. 3)。しかし、MS スペクトルの観察では、主要なフラグメントとして[M-H]<sup>-</sup>と[M+2H]<sup>+</sup>が検出されており、同一試料の繰り返し測定であってもフラグメントの強度比が一定ではなかった。また、MS/MS のフラグメントパターンも再現性が無いことが確認された (Fig. 4)。すなわち、化合物の構造が MS による定量分析に適していない可能性が示唆され、既

報の LC-HRMS<sup>n</sup> による定量値は精査する必要があると思われた。最後に、クログルミを含有する製品 15 検体の定性分析を行った結果、7 検体から JUG, 1 検体から PLU の検出が認められた (Table 1)。本研究でも、LC-PDA による定量には問題がないことを確認しているが (data not shown), より微量なナフトキノンを高感度で定量するためには、さらなる検討が必要である。

#### D. 結論

毒性の高いナフトキノンの高感度定量法の開発が望まれるが、JUG や PLU は構造的に質量分析計による定量分析に適していない可能性があり、高感度定量分析には、さらなる検討が必要である。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

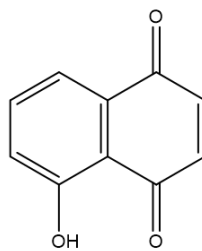
なし

#### G. 参考文献

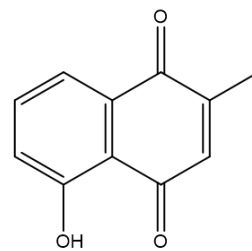
- [1] MEDIC, Aljaz, et al. Identification and quantification of naphthoquinones and other phenolic compounds in leaves, petioles, bark, roots, and buds of *Juglans regia* L., using HPLC-MS/MS. *Horticulturae*, 2021, 7.9: 326.
- [2] LIU, Rongxia, et al. Identification and quantification of bioactive compounds in *Diaphragma juglandis* fructus by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and UHPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019, 67.13: 3811-3825.
- [3] NOUR, Violeta; TRANDAFIR, Ion; COSMULESCU, Sina. HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves. *Journal of chromatographic science*, 2013, 51.9: 883-890.

**Table 1** クロゲルミ含有試料

	クロゲルミ含量(/day)	ピーク検出	
		Juglone	Plumbagin
JN-01	不明	○	-
JN-02	不明	-	-
JN-03	不明	-	-
JN-04	50mg	-	-
JN-05	1200mg	○	-
JN-06	80mg	-	-
JN-07	不明	-	-
JN-08	不明	○	-
JN-09	不明	○	-
JN-10	不明	-	-
JN-11	2000mg	○	-
JN-12	不明	-	-
JN-13	300mg	○	○
JN-14	500mg	○	-
JN-15	500mg	○	-

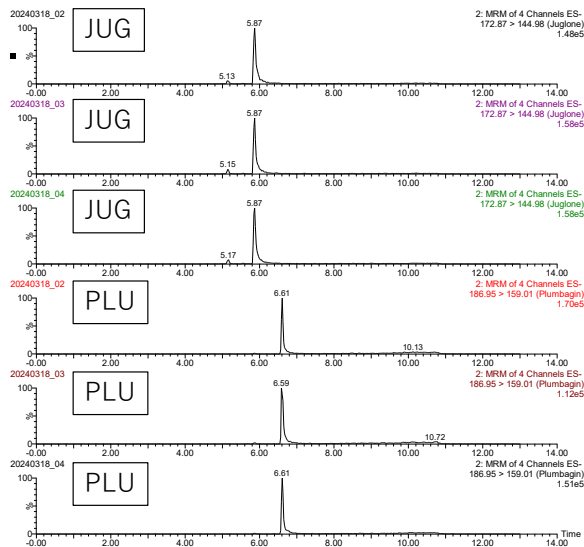


Juglone  
C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>



Plumbagin  
C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>

a) MRM クロマトグラム



b) MS スペクトル

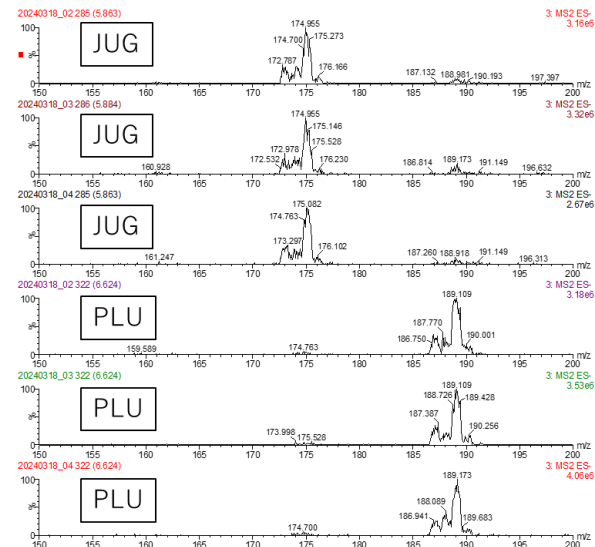


Fig. 1 JUG および PLU 標準試料溶液の LC/MS/MS 測定結果

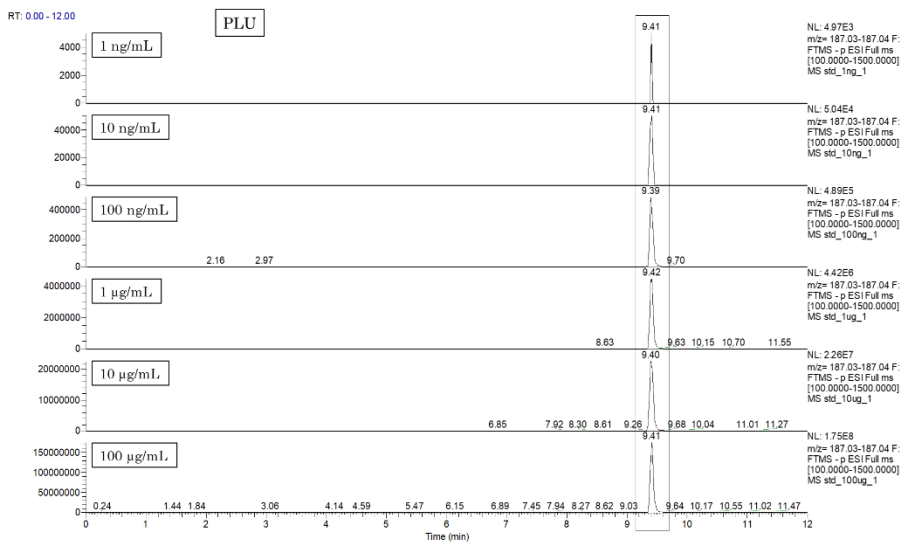
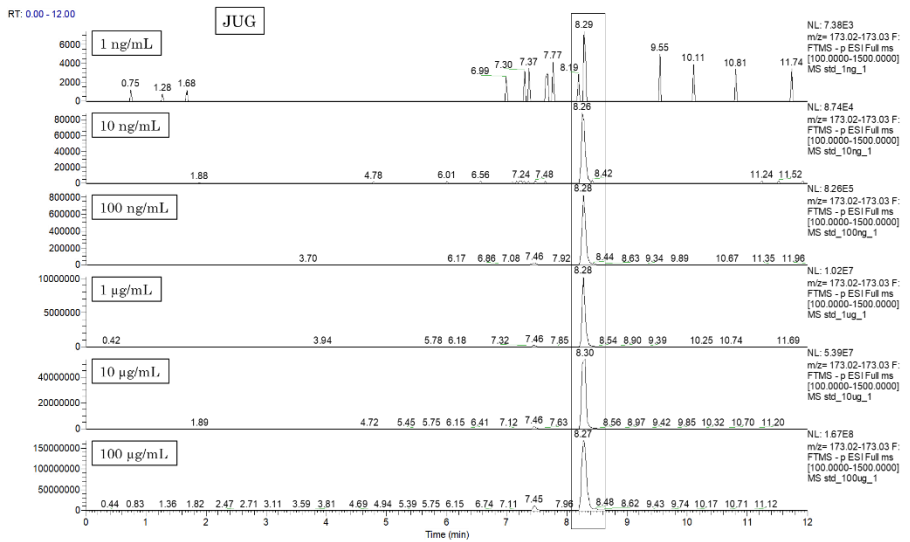
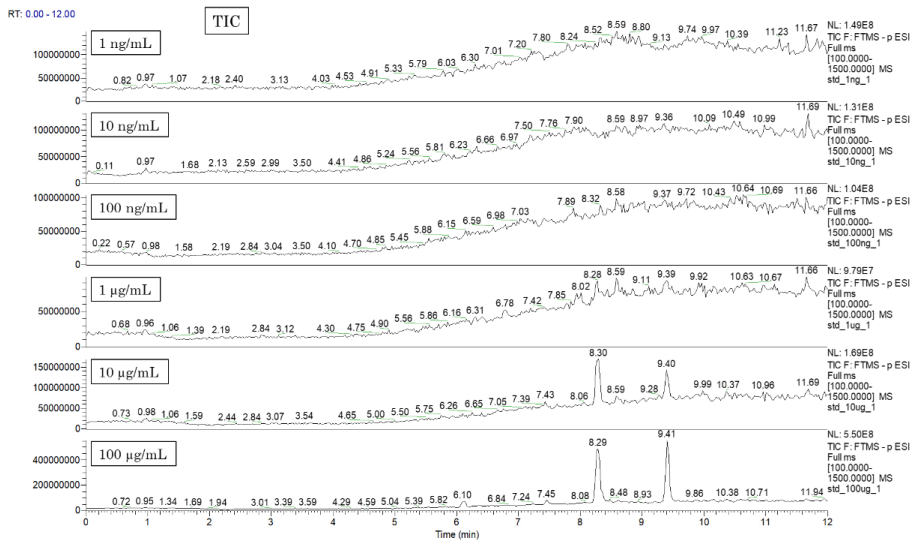


Fig. 2 LC-HRMSによるJUGおよびPLU標準試料溶液のTIC・XICクロマトグラム

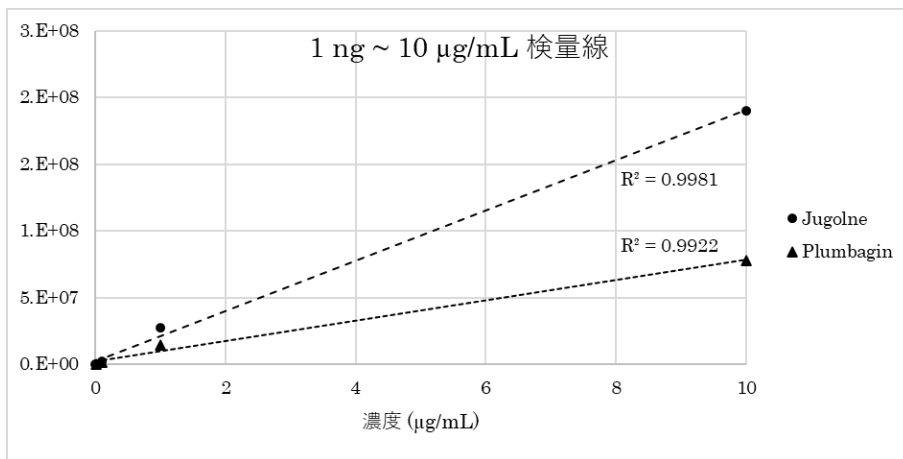
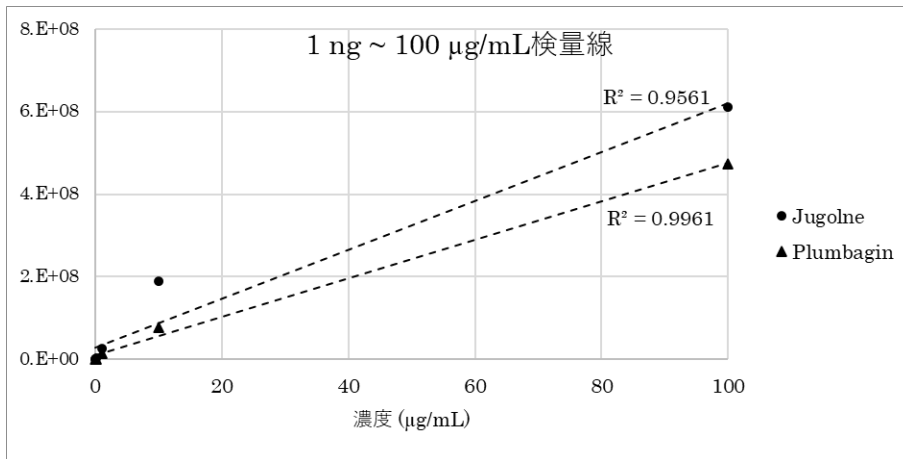


Fig. 3 LC-HRMS の抽出クロマトグラム([M-H]<sup>-</sup>)から得られた JUG および PLU の検量線

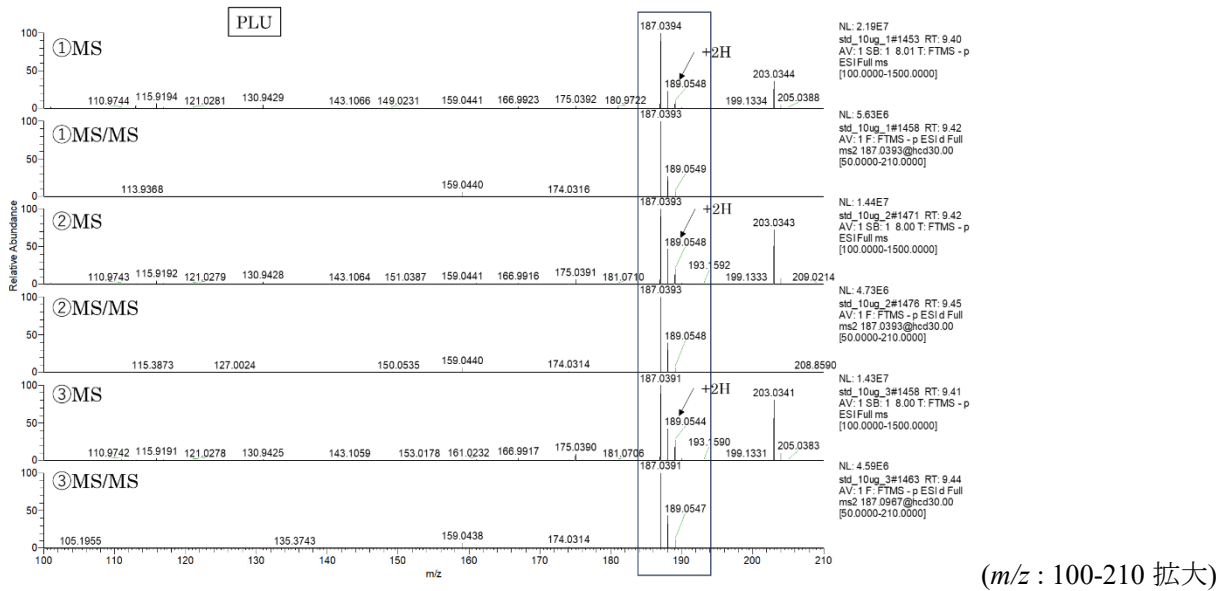
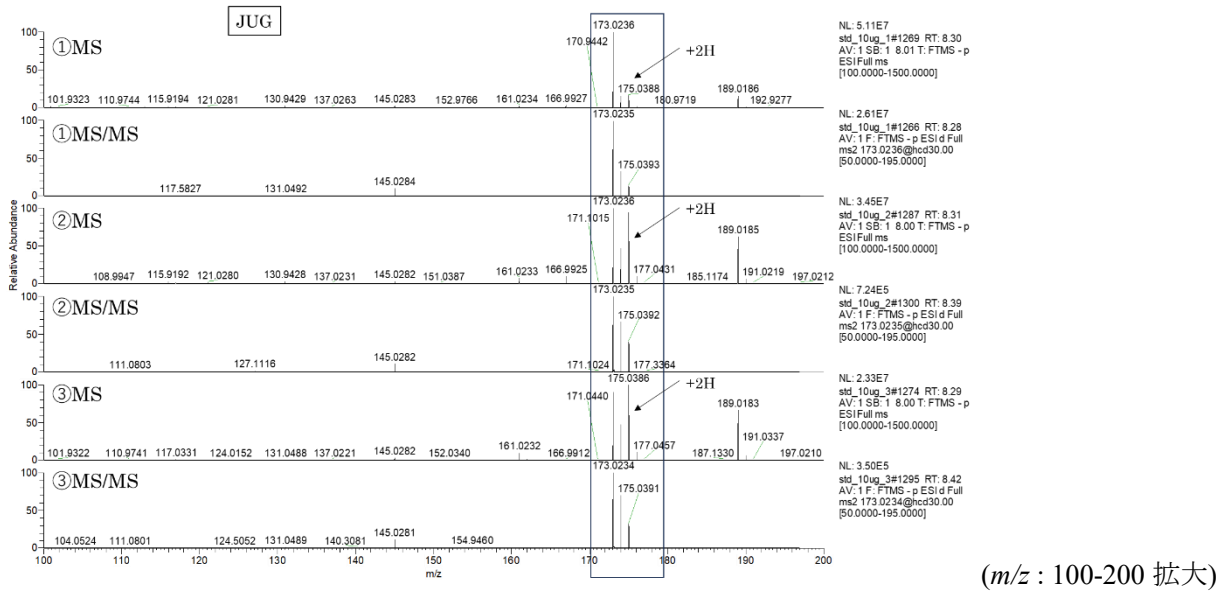


Fig. 4 JUG および PLU 標準試料溶液の 3 回繰り返し測定における MS, MS/MS スペクトル