

Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いた コーヒー飲料中クロロゲン酸類の分析



Authors

滝埜昌彦

澤田浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、試料精製に脂質除去用ミニカラムである Captiva EMR-Lipid を使用し、測定に Ultivo Lite トリプル四重極 LC/MS を用いた 9 種クロロゲン酸類の一斉分析法を紹介します。クロロゲン酸類とはコーヒー豆から初めて見つかった物質でカフェイン酸及びフェルラ酸とキナ酸のエステル類です。様々な化合物が存在しますが、特に含有量の多い 9 種類(3-, 4-, 5-カフェオイルキナ酸, 3-, 4-, 5-フェルロイルキナ酸, 3,4-, 3,5-, 4,5-ジカフェオイルキナ酸)が主なクロロゲン酸類です。これらクロロゲン酸類は高い抗酸化作用を有し、脂肪吸収抑制、発がん予防、糖尿病予防などが報告されています。これまで 9 種類全ての標準品が入手できなかったことからコーヒー中の主要クロロゲン酸類の正確な定量は報告されていません。今回、前述の 9 種類のクロロゲン酸類を入手し、均一液-液抽出法及び Captiva EMR-Lipid を用いた簡便な試料前処理及び小型トリプル四重極 LC/MS を用いたコーヒー飲料中クロロゲン酸類の迅速な一斉分析法を検討しました。

Key words: クロロゲン酸類, コーヒー飲料, 均一液-液抽出法, Ultivo Lite, Captiva EMR-Lipid

分析条件

システム

1260 Infinity II Prime pump (G7104C)
1260 Infinity II Vial Sampler (G7129A)
Ultivo Lite Triple Quadrupole LC/MS
MassHunter Data Acquisition C.01.00
LC/MS条件

今回の分析はトリプル四重極LC/MS法を使用しました。条件は表1及び2に示した通りです。

表1. 分析条件

LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC System		
移動相	A:0.1% 酢酸水溶液 B:メタノール		
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) (P/N:959758-902)		
流速	0.2 mL/min	Time(min)	%B
カラム温度	40 °C	0	5
注入量	1 μL	20	60
グラジエント	右図	30	100
MS	Ultivo Lite Triple Quadrupole LC/MS System		
イオン源	ESI		
測定モード	DynamicMRM (dMRM)		
極性	負イオンモード		
乾燥ガス	350 °C 10L/min		
ネブライザ圧	50 psi		
キャピラリ電圧	3500 V		

表2 クロロゲン酸類のdMRM条件

クロロゲン酸類	プリカーサーイオン	プロダクトイオン	保持時間(分)	測定時間幅(分)	フラグメンター(V)	CE (eV)
3-カフェオイルキナ酸(3-CQA)	353	191	9.26	1.2	80	20
5-カフェオイルキナ酸(5-CQA)	353	191	13.03	1.2	80	20
3-フェルロイルキナ酸(3-FQA)	367	193	13.33	1.2	80	15
4-カフェオイルキナ酸(4-CQA)	353	173	14.04	1.2	80	20
5-フェルロイルキナ酸(5-FQA)	367	191	17.41	1.2	80	15
4-フェルロイルキナ酸(4-FQA)	367	173	17.79	1.2	80	15
3,5-ジカフェオイルキナ酸(3,5-DCCA)	515	353	22.43	2	120	20
3,4-ジカフェオイルキナ酸(3,4-DCCA)	515	353	22.79	2	120	20
4,5-ジカフェオイルキナ酸(4,5-DCCA)	515	353	24.89	1.2	120	20

混合標準液

9種クロロゲン酸類(3-, 4-, 5-カフェオイルキナ酸, 3-, 4-, 5-フェルロイルキナ酸, 3,4-, 3,5-, 4,5-ジカフェオイルキナ酸)標準液は林純薬工業製標準品を正確に秤量し、アセトニトリルで溶解して1 mg/mL溶液を作製しました。これら溶液を混合してアセトニトリルで各濃度に調製しました。

試料調製

試料はスーパーマーケットで購入したレギュラーコーヒー3種(カフェインレス1種), インスタントコーヒー2種(カフェインレス1種)及びボトルコーヒー2種を使用しました。レギュラーコーヒー(7 g)は熱水(150 mL)で紙フィルターを使用して抽出, インスタントコーヒー(2 g)は熱水(140 mL)で溶解し試料としました。試料調製にはBond Elut QuEChERS抽出キット(P/N:5982-5650)及びCaptiva EMR-Lipid(P/N:5190-1004)を使用し図1の通り処理しました。

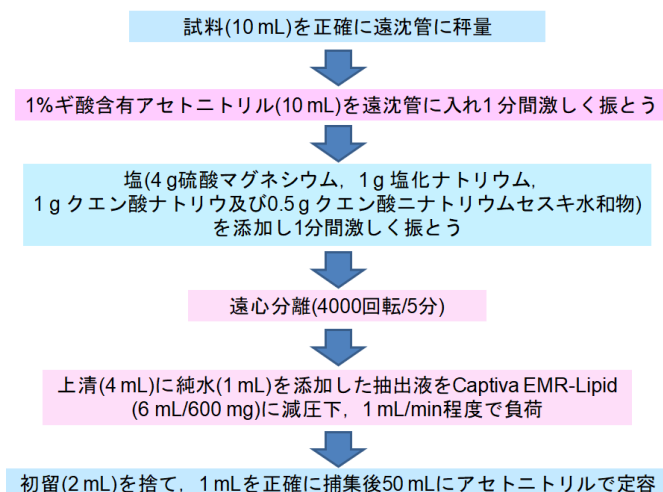


図1 試料調製の工程

結果

クロロゲン酸類のマスペクトル

9種クロロゲン酸類はイオン源にESIを用い負イオンモードで測定しました。結果は全てのクロロゲン酸類で分子からプロトンが脱離した脱プロトン化分子がベースピークイオンとして観察されました。従って, 脱プロトン化分子をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスペクトルを測定しました。結果を図2に示します。異性体によりプロダクトイオンスペクトルは異なっており, 最大強度を示したプロダクトイオン及び最適コリジョンエネルギーを選択し, dMRM条件を作成しました(表2)。

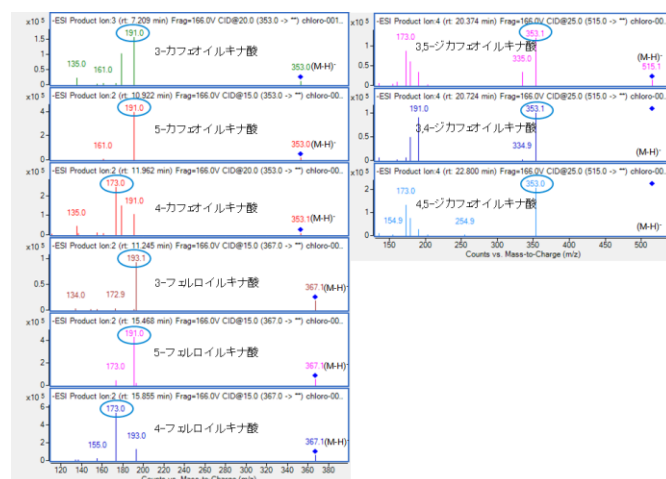


図2 クロロゲン酸類のプロダクトイオンスペクトル

標準液による感度及び直線性

10~1000 ppbの標準液を用いて感度及び直線性の評価を行いました。結果のMRMクロマトグラムは図3, 検量線は図4に示しました。また, 感度, 直線性及び再現性は表3に示しました。クロロゲン酸類の検出限界(S/N=3)は0.1 ppb以下, 検量線の決定係数は0.999以上, 10 ppbにおける相対標準偏差は0.78~2.12%でした。

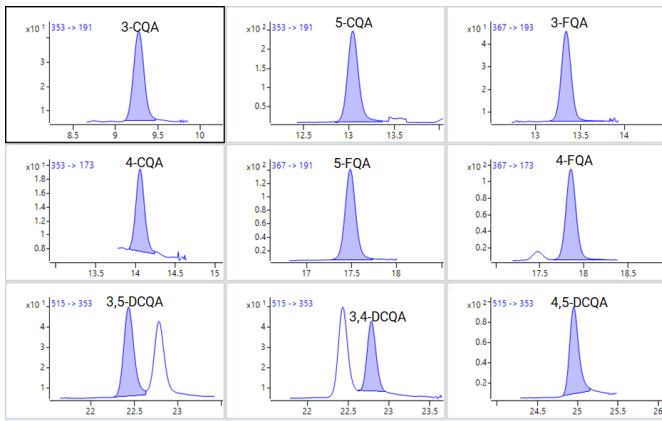


図3 クロロゲン酸類(10 ppb)のMRMクロマトグラム

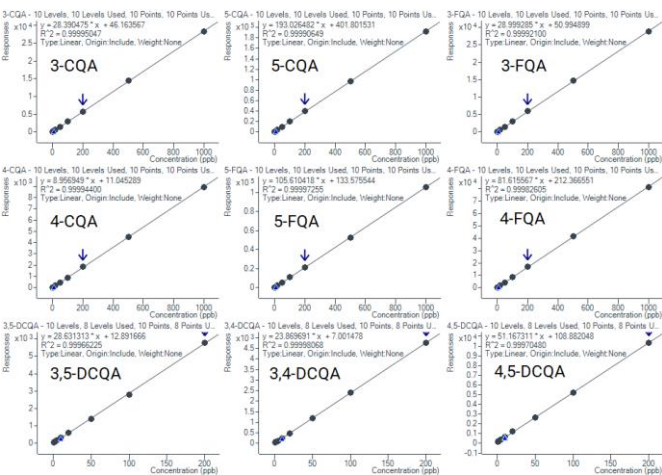


図4 クロロゲン酸類の検量線(濃度範囲: 10~1000 ppb)

表3 クロロゲン酸類の感度, 直線性及び再現性

No	クロロゲン酸類	検出限界		決定係数	相対標準偏差
		10 ppb	S/N=3 at 10 ppb		
1	3-カフェオイルキナ酸	131	0.166	0.9999	2.12
2	5-カフェオイルキナ酸	208	0.144	0.9999	1.45
3	4-カフェオイルキナ酸	182	0.165	0.9999	1.21
4	3-フェルロイルキナ酸	45	0.667	0.9999	0.89
5	5-フェルロイルキナ酸	580	0.052	0.9998	1.24
6	4-フェルロイルキナ酸	190	0.158	0.9996	0.78
7	3,5-ジカフェオイルキナ酸	280	0.107	0.9996*	1.12
8	3,4-ジカフェオイルキナ酸	245	0.122	0.9999*	1.23
9	4,5-ジカフェオイルキナ酸	350	0.086	0.9997*	0.78

*: 1~200 ppb

試料調製

図1に示した方法でアセトニトリル及び1%ギ酸含有アセトニトリルを用いた均一液-液抽出法によるクロロゲン酸類の回収率を表4に示しました。結果は、1%ギ酸を添加することで全てのクロロゲン酸類の回収率が改善され92~104%となりました。Captiva EMR-Lipidは試料中の脂質除去に有効であり、コーヒー中マトリックス成分の除去が可能です。そこで標準液を用いて、Captiva EMR-Lipidからの1mL毎の溶出画分の回収率を測定しました。結果は表4に示したように、2 mLまではカフェオイルキナ酸の回収率が低い値を示しましたが、3 mL画分では全てのクロロゲン酸類で回収率が90%以上となりました。また、全処理工程での回収率は92~103%, n=4での相対標準偏差は3.9~5.7%と良好な結果でした。

表4 試料調製におけるクロロゲン酸類の回収率

No	クロロゲン酸類	均一液-液抽出			Captiva EMR Lipid			全工程*
		A	B	1 mL	2 mL	3 mL		
1	3-カフェオイルキナ酸	40	92	23	88	102	92(5.6)	
2	5-カフェオイルキナ酸	59	93	17	87	101	93(5.7)	
3	4-カフェオイルキナ酸	76	100	48	92	103	101(4.8)	
4	3-フェルロイルキナ酸	83	103	40	91	104	97(5.1)	
5	5-フェルロイルキナ酸	82	102	48	101	99	95(3.9)	
6	4-フェルロイルキナ酸	95	101	75	102	105	103(4.8)	
7	3,5-ジカフェオイルキナ酸	97	103	67	99	103	96(5.3)	
8	3,4-ジカフェオイルキナ酸	92	99	70	103	101	102(4.7)	
9	4,5-ジカフェオイルキナ酸	92	104	70	101	97	98(6.5)	

A:アセトニトリル B:1%ギ酸含有アセトニトリル *()相対標準偏差(n=4)

コーヒー中クロロゲン酸類の測定

図1の方法でレギュラーコーヒー3種(カフェインレス1種), インスタントコーヒー2種(カフェインレス1種)及びボトルコーヒー2種を処理し, 表1,2の条件を用い, クロロゲン酸類を測定しました。結果は図5にクロロゲン酸類のMRMクロマトグラム, 表5に定量値を示しました。その結果, コーヒーの種類の違いによる含有量の大きな違いはありませんでした。クロロゲン酸類ではカフェオイルキナ酸が最も多く, ジカフェオイルキナ酸はモノエステル類と比較して1/10程度の含有量でした。

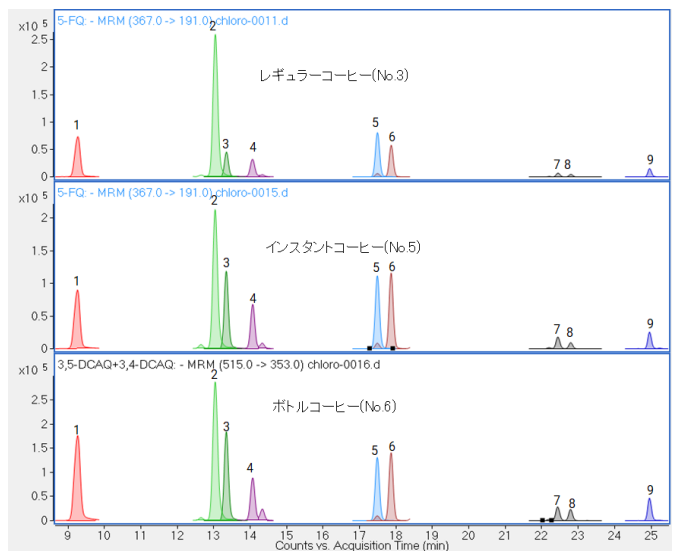


図5 各種コーヒー飲料中クロロゲン酸類のMRMクロマトグラム

表5 各種コーヒー飲料中クロロゲン酸類の定量値

No	クロロゲン酸類	レギュラーコーヒー							インスタントコーヒー							ボトルコーヒー											
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7					
1	3-カフェオイルキナ酸	57.7(4.5)	19.1(4.1)	21.5(4.1)	43.4(3.8)	34.1(3.7)	98.3(4.4)	32.8(5.1)																			
2	5-カフェオイルキナ酸	42.4(3.8)	12.9(3.3)	15.5(3.9)	18.1(3.7)	14.5(3.9)	26.0(4.4)	7.0(5.3)																			
3	3-フェルロイルキナ酸	16.9(4.2)	10.7(3.8)	7.6(4.7)	24.1(4.6)	26.4(4.5)	46.8(5.8)	18.9(3.8)																			
4	4-カフェオイルキナ酸	80.0(5.4)	24.9(4.3)	29.6(5.1)	45.8(6.1)	40.0(3.4)	80.7(5.1)	22.5(5.3)																			
5	5-フェルロイルキナ酸	12.3(5.1)	6.7(5.1)	5.3(4.4)	9.1(4.1)	10.1(4.1)	12.3(4.4)	3.5(5.7)																			
6	4-フェルロイルキナ酸	7.5(3.7)	4.4(5.5)	3.3(5.0)	8.2(5.5)	9.7(4.9)	12.3(3.9)	3.9(4.1)																			
7	3,5-ジカフェオイルキナ酸	3.4(4.4)	1.1(4.8)	0.6(4.8)	2.2(4.9)	2.1(5.1)	3.6(5.0)	0.6(6.1)																			
8	3,4-ジカフェオイルキナ酸	2.6(3.9)	0.8(6.1)	0.5(5.1)	1.2(5.7)	1.3(4.3)	3.1(4.8)	0.5(6.3)																			
9	4,5-ジカフェオイルキナ酸	3.7(4.3)	1.0(5.8)	0.7(4.9)	1.5(4.9)	1.5(4.6)	3.2(3.9)	0.4(5.8)																			

単位:ppm ()相対標準偏差

まとめ

コーヒー飲料中9種クロロゲン酸類の一斉分析に, 均一液-液抽出及びCaptiva EMR-Lipidを用いた試料調製及びトリプル四重極質量分析計を使用する事で迅速な信頼性の高い分析が可能でした。クロロゲン酸類の回収率は92~103%, 再現性は相対標準偏差が3.9~6.5%以下と良好でした。また, コーヒー飲料においても相対標準偏差は6.3%以下でした。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。
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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, May 20, 2020

DE44222.0116898148

LC-MS-202005TK-001

