

Agilent 6230 TOF LC/MS システムによる 食品およびサプリメント中エラグ酸の分析

著者

滝埜昌彦
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、飛行時間形質量分析計を用いた LC/MS による食品およびサプリメント中エラグ酸の分析について紹介します。

近年、食品に含まれるポリフェノール類は抗酸化活性が高くさまざまな生理活性が明らかとなり、健康の維持や疾病の予防を期待できる機能性成分として注目されています。エラグ酸はイチゴ、クランベリー、ブラックベリーなどのベリー類やブドウ、ザクロなどの果物およびクルミなどに含有するポリフェノール系物質です。エラグ酸は高い抗酸化作用を有し、機能性として抗癌性や美白作用の観点から研究が行われてきました。最近では、抗インフルエンザ活性も報告されています。従来、HPLC を用いた方法が生鮮食品や加工食品中のエラグ酸の分析に報告されています。今回、より信頼性の高い精密質量測定が可能な飛行時間形質量分析計を用いた LC/MS および簡便な前処理法を用いた分析法について報告します。

分析条件

システム

1260 Infinity II Flexible Pump (G7104C)
 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)
 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116A)
 G6230B TOF LC/MS system

分析条件

分析条件は表 1 に示しました。イオン源には Jet Stream テクノロジーによるエレクトロスプレー (ESI) イオン化法であるデュアルスプレー AJS イオン源を使用しました。分析カラムには ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラムを使用しました。

表 1. LC/MS 分析条件

項目	設定値
移動相	A: 0.1 % 酢酸水溶液 B: メタノール
グラジエント	20 % B → (15 min) → 100 % B / 1 min
カラム	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (100 mm, 2.1 mm, 1.8 μm) (P/N959758-902)
カラム温度	40 °C
注入量	0.4 μL
流速	0.2 mL/min
質量範囲	m/z=100-1100
測定速度	1.5 Hz (1.5 spectrum/sec)
乾燥ガス	窒素、350°C、10 L/min
シーブスガス	窒素、400°C、12 L/min
極性	負イオン
イオン源	デュアルスプレー AJS-ESI
ネブライザ圧	345 kPa
ノズル電圧	0 V
キャピラリ電圧	3500 V
リファレンスイオン	m/z=112.9856、1033.9881

標準液

エラグ酸は富士フィルム和光純薬製を使用し、10 % ジメチルアセトアミド含有メタノール液で 100 μg/mL の保存溶液を調製し、適宜希釈して検量線用標準液を調製しました。測定試料はイチゴ、ブドウ (スチューベン、ティムコ)、クルミ (信濃クルミ、鬼クルミ、カリフォルニアクルミ)、ジャム (イチゴ、ブルーベリー)、濃縮ジュース (ザクロ)、サプリメント (アフリカマンゴノキエキス、ザクロエキス) を使用しました。

イチゴ、ブドウおよびクルミは Retsch 製 GRINDMIX GM200 で粉碎、サプリメントは乳鉢で粉末化、ジャムは 5 倍量の純水で溶解、濃縮ジュースは純水で 10 倍希釈しました。

試料の抽出、精製は図1に示した通り、イチゴ、ブドウ、ジャムおよびジュースはアジレント製 QuEChERS 抽出キット (EN法、P/N: 5982-5650) の遠沈管を用いてアセトニトリル手動振とう抽出しました。さらに QuEChERS 抽出キット付属の塩を加え手動振とう後、遠心分離し上清を採取しました。サプリメントはアセトニトリルで超音波抽出、クルミは日本精機製作所製ホモジナイザー AM3 で抽出しました。抽出液はアジレント製 Captiva EMR-Lipid (P/N:5190-1004) で脂質を除去しました。

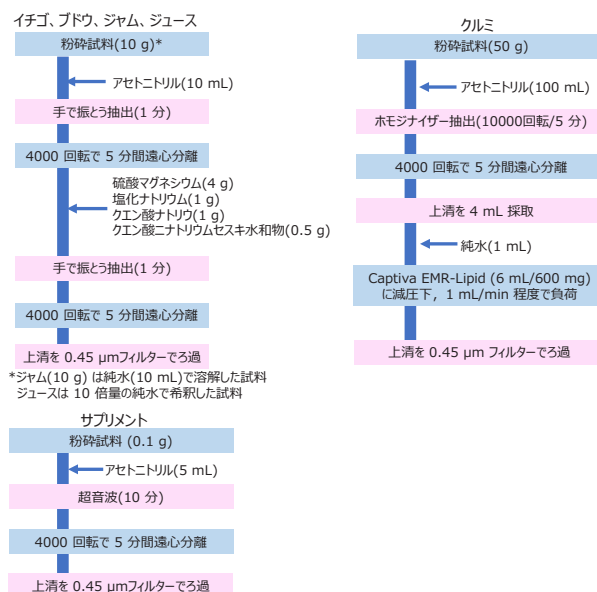


図 1. 試料の前処理工程

結果

標準液

標準液 (1 μg/mL) の TIC およびマススペクトルを図 2 に示しました。酸性移動相を使用することでクロマトグラムのピーク形状は良好で、マススペクトルは負イオンモードで脱プロトン化分子が観察されました。このイオンの質量真度は相対質量誤差で 1.5 ppm でした。

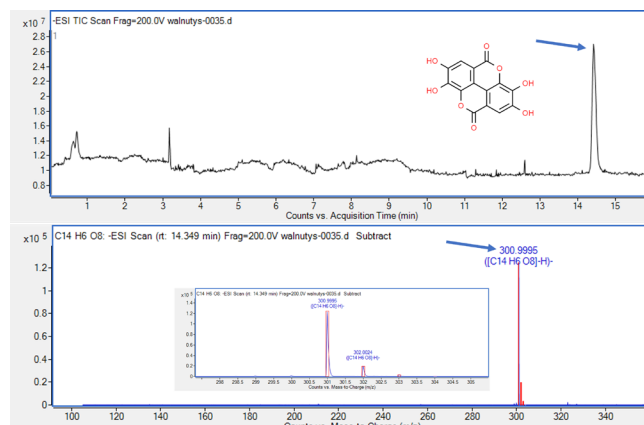


図 2. エラグ酸標準液のTICおよびマススペクトル

m/z=301.00 による抽出イオンクロマトグラム (EIC) [抽出質量範囲: ±0.01u] および検量線を図 3 に示しましたが、検出限界 (S/N=3) は 0.02 ug/mL、相関係数は 0.9999 でした。0.1-10 µg/mL のモニターイオンの質量真度は相対質量誤差で 0.4-1.2 ppm でした。

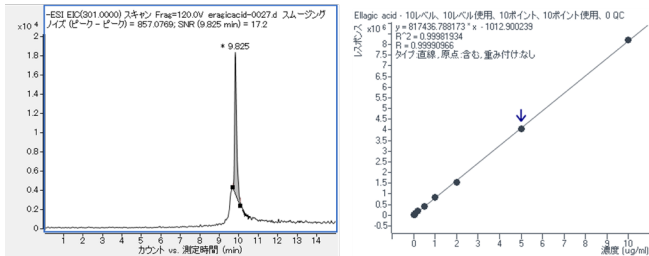


図 3. エラグ酸標準液 (0.1 µg/mL) の EIC および検量線

標準液

クルミは脂質を多く含むことから Captiva EMR-Lipid を用いて脂質除去を検討しました。溶出プロファイルを図 4 に示しました。結果、最初の 1 mL 画分では回収率が低かったことから初留 (1 mL) を捨てた後、2 mL を採取しました。その結果、標準液での回収率は平均 97 %、相対標準偏差は 3.2 % と良好でした。

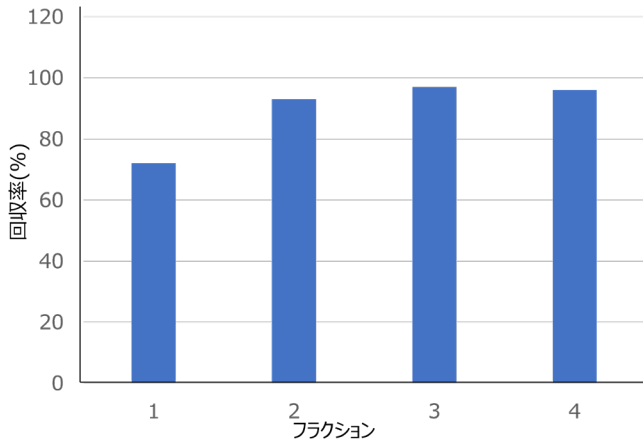


図 4. Captiva EMR-Lipid によるエラグ酸の溶出プロファイル

食品試料中エラグ酸の分析

今回、確立した測定法で 9 種食品および 4 種サプリメントを測定しました。その結果、ブドウおよびブルーベリージャムからエラグ酸は検出されませんでした。検出された 6 種食品および 4 種サプリメントの TIC および EIC を図 5 に示しました。

サプリメントは TIC 中エラグ酸が主ピークでした。一方、食品では試料由来成分のピークも多く、クルミは特に試料由来成分のピークが検出されました。検出されたエラグ酸の濃度は検量線の上限を超えていたことから試料抽出液はメタノールで 10 倍希釈して測定しました。また、試料マトリックスによる影響を確認するため、標準添加法でも測定を行いました。図 6 に各試料を用いた標準添加検量線、表 2 に各試料中エラグ酸

濃度および質量真度を示しました。各試料の濃度はクルミ以外は絶対検量線法と標準添加法で違いは認められませんでした。クルミでは標準添加法が 20-34 % 高い値だったことからクルミ由来の成分によるイオン化阻害が生じたと考えられます。

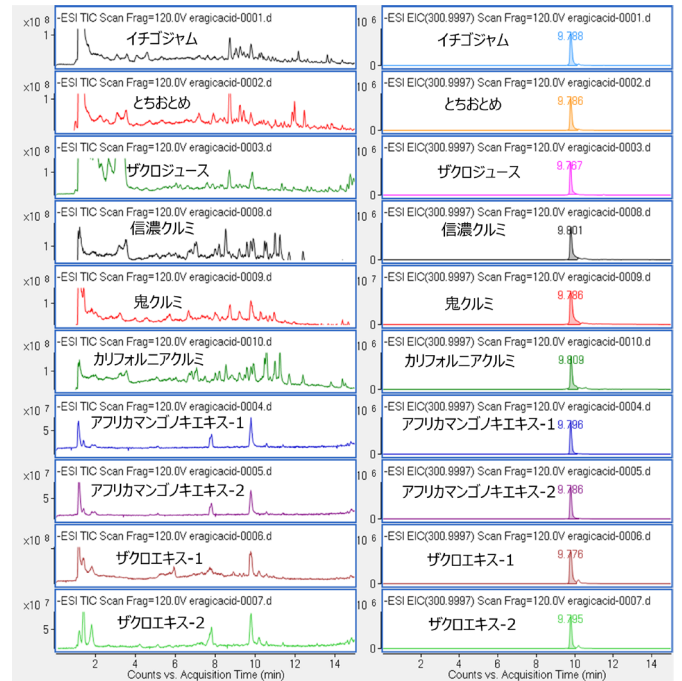


図 5. 食品およびサプリメントの TIC (左図) およびエラグ酸の EIC (右図)

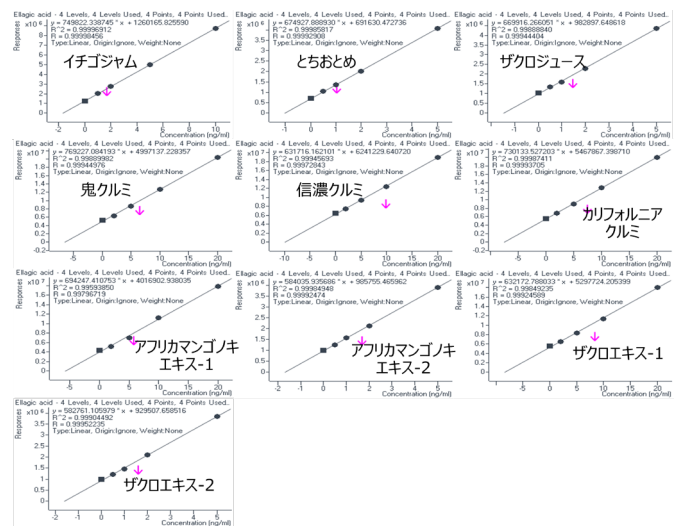


図 6. 各試料による標準添加検量線

表 2. 各試料中エラグ酸濃度および質量真度

試料	濃度 ^{*1}			質量真度 ^{*3}	試料	濃度 ^{*1}			質量真度 ^{*3}
	A	B	併行精度 ^{*2}			A	B	併行精度 ^{*2}	
イチゴジャム	20	20.4	6.2	0.9	カリフォルニア クルミ	125	168	3.1	1.2
とちおとめ	16.3	16.5	5.8	1.1	アフリカマンゴノキ エキス	2.7	2.8	2.7	1.5
ザクロジュース	13.9	14.1	6.1	2.1	アフリカマンゴノキ エキス	1.1	1.2	3.2	0.8
信濃クルミ	118	142	3.8	1.3	ザクロエキス	7.8	7.9	2.5	1.3
鬼クルミ	142	178	3.7	0.8	ザクロエキス	0.9	0.9	2.1	1.1

*1: 食品: µg/g サプリメント: µg/2錠 *2: 相対標準偏差 (%), (3試行) *3: 相対質量誤差 (ppm)

まとめ

Agilent 6230 LC/TOF を用いて食品およびサプリメント中エラグ酸の分析を行いました。簡便な前処理法および高分解能質量分析計を用いることで、さまざまな食品中エラグ酸の信頼性の高い分析が可能でした。また、クルミはマトリックス効果が認められましたが、標準添加法を用いることで正確な測定が可能でした。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE52443857

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, October 3, 2022

5994-5414JAJP