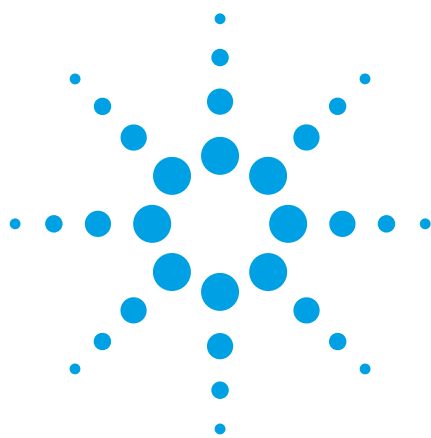




使用安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 分析常見食品的花青素

應用註解

食品 / 製藥

作者

William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

原本以安捷倫 StableBond SB-C18 4.6 × 250 mm 5 µm 管柱或 4.6 mm × 150 mm 3.5 µm 管柱開發的花青素分離方法，移轉至使用安捷倫 1260 快速分離液相層析儀的安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 (4.6 mm × 75 mm, 2.7 µm) 管柱。梯度沖提、注入量與流速均依比例調整，以針對每個評估管柱維持滯留指數。其中一種方法將每次分析時間由 100 分鐘減少為 20 分鐘，並減少 70% 的溶劑消耗量。第二個移轉方法將時間由 67 分鐘減少為 40 分鐘，並減少 40% 的溶劑消耗量。



Agilent Technologies

緒論

花青素屬於水溶性植物色素，並且在許多水果、花朵與植物當中呈現出紅色、藍色和紫色色澤。使用 HPLC 與 HPLC MS 分析花青素，已顯示能有效找出不同水果品種的指紋圖譜，及／或協助判定果汁是否純正。

由於花青素是飲食中的抗氧化物，可能對健康有益，因此越來越獲得關注。目前自然界已發現 300 多種結構不同的花青素。花青素是類黃酮化合物的其中一種，是廣泛存在的植物多酚。黃酮醇、黃烷醇、黃酮、類黃酮醇及黃烷酮醇則是其他類別的類黃酮化合物，與花青素之間的差異在於氧化狀態。

花青素的定性和定量分析，能用以辨別不同的藍莓品種，並判定其品質。是以花青素層析分離對於農業及製酒業的重要性與日俱增。花青素最近也獲得醫藥界的關注，可作為抗氧化物／抗癌物質，因此也引起各界興趣研究其層析分離 [1]。

傳統上此類分離作業的低 pH 移動相（包含甲酸），會造成管柱退化並變更分離結果 [2]。安捷倫 ZORBAX StableBond SB-C18 管柱提供層析操作人員長期穩定性，可在非常低的 pH 值情況下進行逆相分離。許多發表的方法使用 50 mL/L (5%) 甲酸或 30 mL/L (3%) 的磷酸。在本項研究中，使用磷酸及甲酸的方法依據比例調整，以搭配使用安捷倫 Poroshell 120 SB-C18。多種水果或果汁樣品使用本項新方法進行檢驗，其中包括藍莓、黑莓、小紅莓、草莓及石榴汁。

實驗

- G1312B 雙幫浦 SL 搭配移動相 A：3% 磷酸或 5% 甲酸加入水及 B：甲醇
- G1367E 自動液體取樣器 (ALS) SL
- G1316B 柱溫箱 (TCC) SL，溫度設定為 30 °C
- G4212C 光二極體陣列偵測器 (DAD) SL 訊號設定為 525、16 nm，未使用對照訊號，使用 G4212-60008 微型流動液槽（10-mm 路徑，1-μL 變異）
- 使用 ChemStation 版本 B.04.02 控制 HPLC 及處理資料
- 安捷倫 Poroshell 120 SB-C18，4.6 mm × 75 mm，2.7 μm, (p/n 689775-902)

- 安捷倫 ZORBAX SB-C18，4.6 mm × 250 mm，5 μm (p/n 880975-902)
- 安捷倫 ZORBAX SB-C18，4.6 mm × 150 mm，3.5 μm (p/n 863953-902)

甲酸及磷酸向 Sigma Aldrich（美國賓州 Bellefonte）購買。甲醇（高純度）向 Honeywell Burdick and Jackson（美國密西根州 Muskegon 廠房）購買。使用的水是 18 M-W Milli-Q 水（Millipore，美國麻州 Bedford）。新鮮黑莓、藍莓、草莓、小紅莓及石榴汁是向當地雜貨店購買。

製備水果萃取物的方法

開始時混合：10 g 藍莓（或其他水果）、10 mL 溶劑（70:28:2、MeOH:H₂O、甲酸），在乾冰上混合 10 分鐘，讓乾冰昇華。在 10 mL 針筒中透過玻璃棉過濾。讓濾液靜置 1 小時。透過 0.2 μm 濾膜過濾，立即注入 50 μL 進行 HPLC 分析。（4.6 mm × 250 mm 管柱）[3,4]。將產生的透明溶液移轉至安捷倫 MS 分析手寫樣品瓶 (p/n 5190-2278)。

$$\text{方程式 1:} \quad k^* = (t_g F) / (d/2)^2 L (\Delta\%B)$$

其中：

t_g 是梯度時間、

F 是流速

L 是管柱長度

d 是管柱直徑

$\Delta\%B$ 是梯度區間內有機內容物的變化

圖 1 顯示藍莓萃取物的分離作業，使用全多孔性 5 與 3.5 μm SB-C18 管柱，以及較短的表面多孔性安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 2.7 μm 管柱。注入量依據管柱容量按比例調整。兩種管柱的選擇性應非常相似，因為都擁有相同的鍵結相 [5,6,7]。安捷倫 ZORBAX StableBond SB-C18 特別適合 pH 值非常低的方法。先前研究顯示 Poroshell 120 的峰容積約為 1.8 μm 全多孔性管柱的 90%，壓力則大約只有一半。此外 Poroshell 120 的效率可達 3.5 μm 管柱的 2 倍 [6,7]。本項研究顯示從較長的 5 μm 管柱至較短的 3.5 μm 管柱，乃至於更短的 Poroshell 120 管柱的邏輯發展。依據梯度濃度按比例調整管柱長度（直徑不變），可使用公式 1 維持滯留指數 (k') 不變。

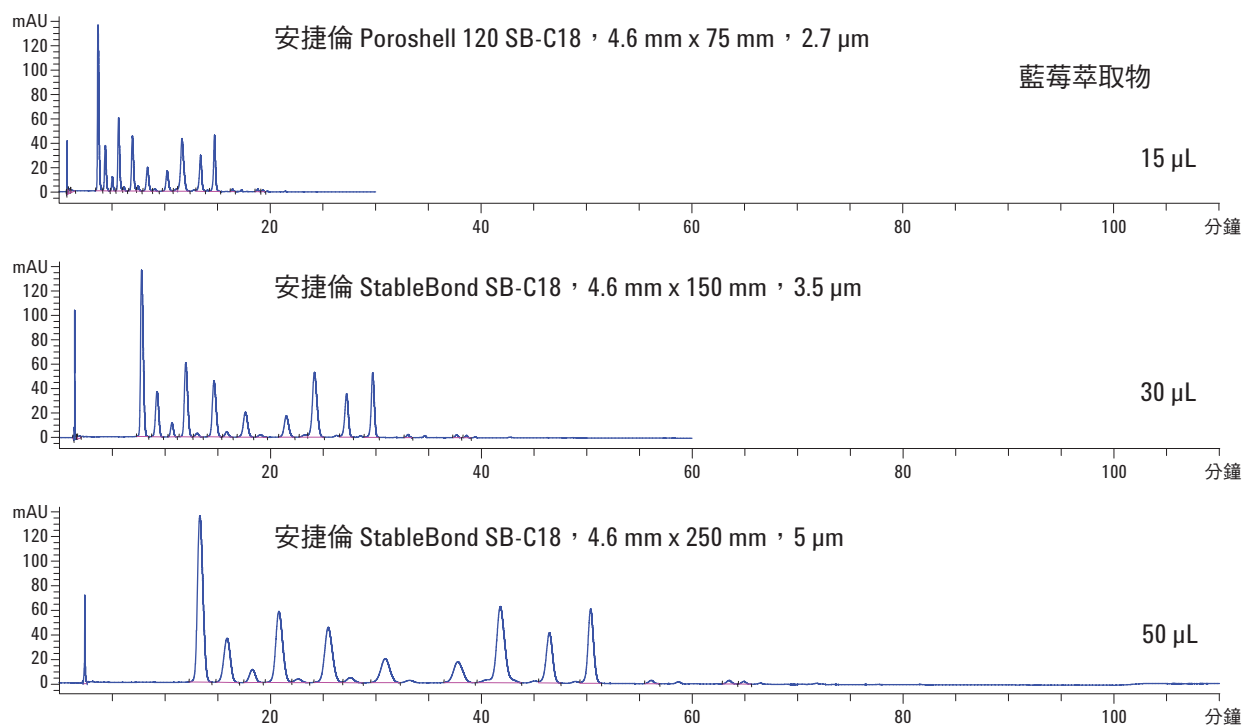


圖 1. 於全多孔性及表面多孔性 *stableBond C18* 管柱進行藍莓花青素分析。重疊比較 250 mm 5 μ m 、150 mm 3.5 μ m 及 75 mm 2.7 μ m 在 1 mL/分鐘的花青素方法

即使是藍莓萃取物這類的複雜樣品，所有波峰均以相同（但較為快速）分離條件進行分離，節省時間與溶劑。表 1 顯示使用的梯度沖提，以及時間由 97 分鐘縮短為 29 分鐘。不另執行其他樣品製備，是因為評估的所有管柱都使用相同的 2 μ m 管柱濾片。測試顯示出這些濾片能更有效避免阻塞，優於全多孔性 3 μ m 管柱使用的濾片 [8]。

表 1. 圖 1、2 及 3a 使用的磷酸梯度濃度；依據參考資料 3 按比例調整

長度	4.6 mm x 250 mm	4.6 mm x 150 mm	4.6 mm x 75 mm	4.6 mm x 75 mm	4.6 mm x 75 mm
顆粒	5	3.5	2.7	2.7	2.7
零件編號	880975-902	863953-902	689775-902	689775-902	689775-902
流速	1	1	1	1.5	2
最大壓力	183 bar	236 bar	236 bar	349 bar	448 bar
注入量	50	30	15	15	15
% B	時間	時間	時間	時間	時間
23	0	0	0	0	0
26	35	21	10.5	7.5	5.25
60	97	58	29.1	20	10

圖 2 中流速或線性速度增加。先前研究顯示，若採用 4.6 mm 管柱，安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 可於 1.5 及 2.5 mL/分鐘之間的較高流速中，獲得更優異的峰容積 [9]。採用公式 1 並維持 k' 不變，可維持分離作業。本情況下最大壓力 448 bar 於 2 mL/分鐘的 50% 甲醇出現，如層析圖所示。不過在 1.5 mL/分鐘的最大壓力仍低於 400 bar。表 1 列出本次研究使用的梯度沖提。

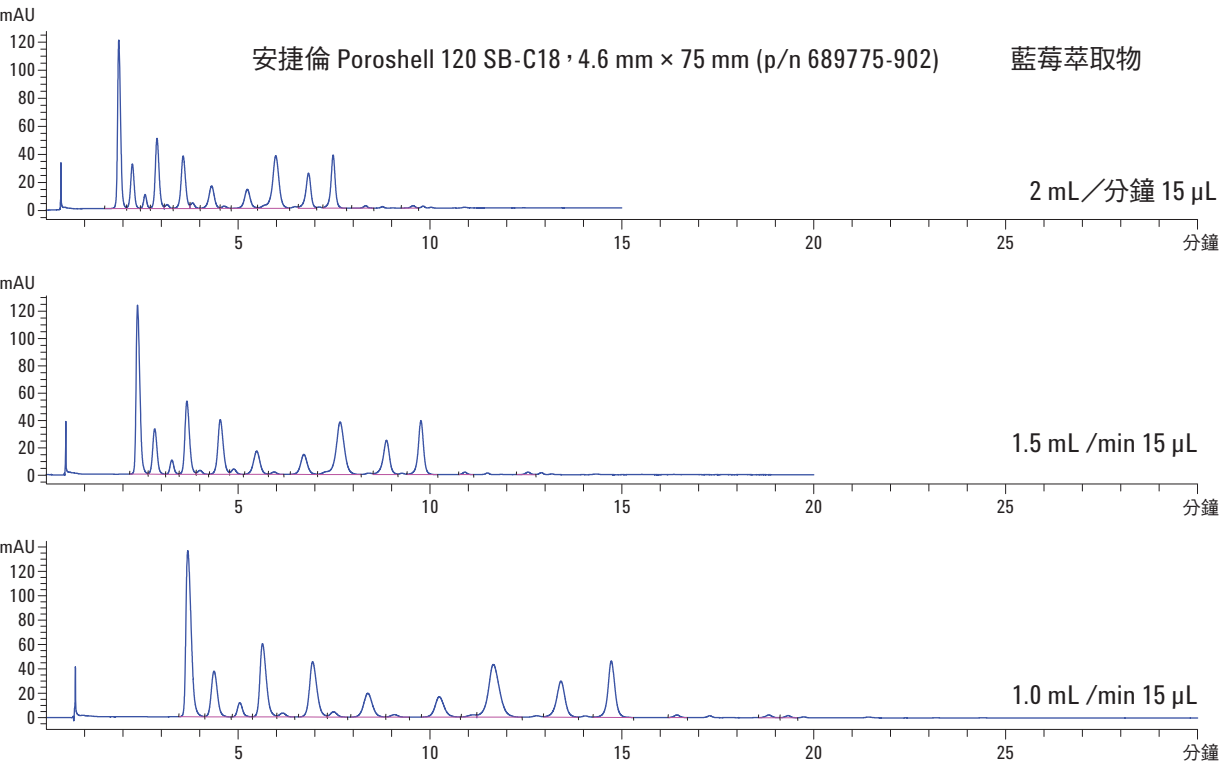


圖 2. 重疊比較花青素方法的藍莓萃取物：於不同流速使用安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 4.6 mm x 75 mm 2.7 μ m

圖 3a 顯示使用表 1 所述 1.5 mL/分鐘方法分析的真實樣品。藍莓、黑莓、小紅莓及草莓樣品使用酸化甲醇製備 [3,4]。注入的石榴汁並未進一步製備。如圖 1 所示，複雜的藍莓層析圖顯示約 20 個波峰 (16 個主要波峰，4 個次要波峰)。Kalt 研究顯示，更加野生、承受更高壓力的藍莓品種，擁有更多花青素波峰 [4]。採栽培方式的黑莓品種顯示數個波峰，但與先前報告的資料一致 [10]。小紅莓顯示參考資料 [11] 說明的獨特性 (cyd-3-gal、cyd-3-

glu、cyd-3-arab、pnd-3-gal、pnd-3-glu、pnd-3-arab)，此外也顯示於參考資料 [10, 12, 13]。草莓也顯示了符合先前報告資料的情形。圖 3b 顯示在稍微不同的梯度沖提使用 5% 甲酸得到的類似結果。原始執行的梯度沖提為 1.5 mL/分鐘，並未嘗試增加移動相的線性速度。表 2 列出原始和調整後產生的梯度沖提。使用甲酸取代磷酸後，就能使用質譜儀進行辨識，但不論使用哪一種移動相修飾劑，都產生類似的指紋結果。

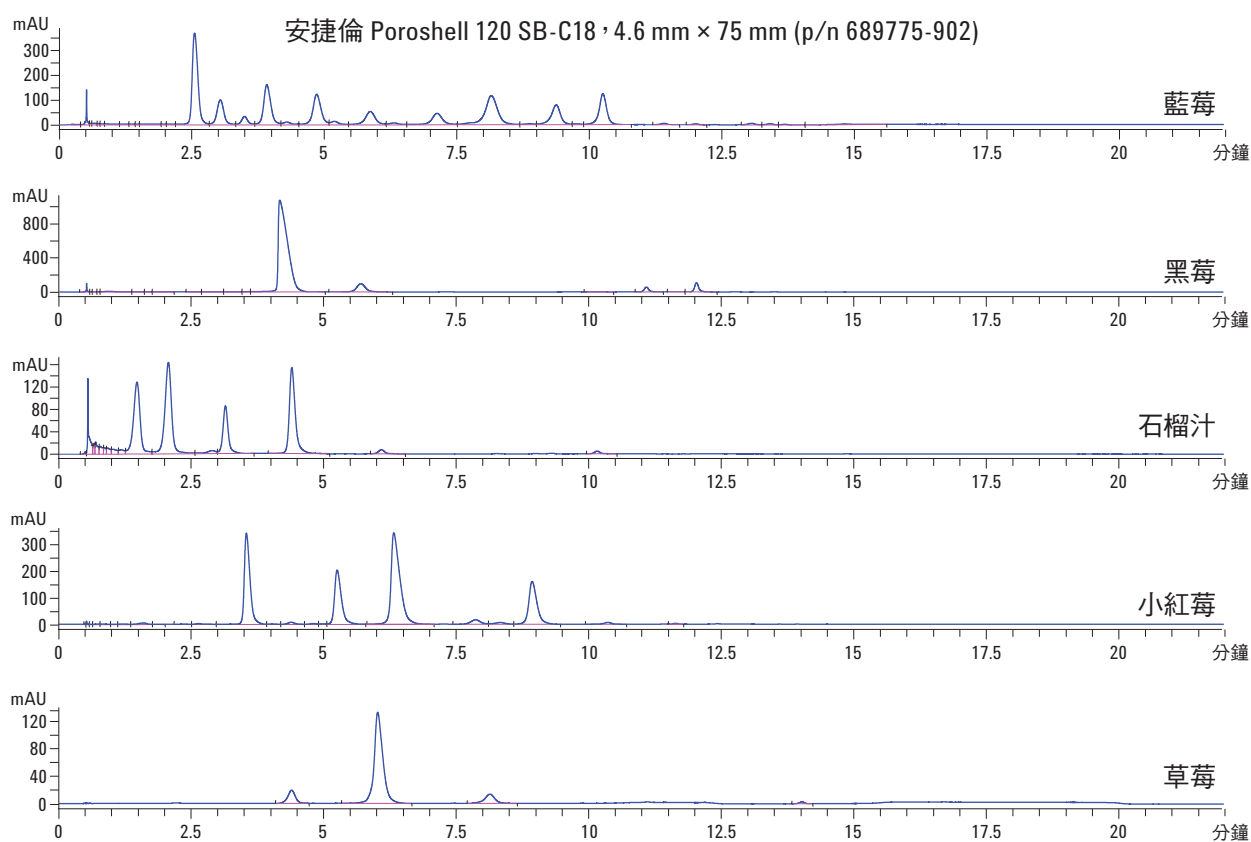


圖 3a. 重疊比較花青素方法：使用安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 處理不同樣品 (使用 H_3PO_4 梯度沖提)

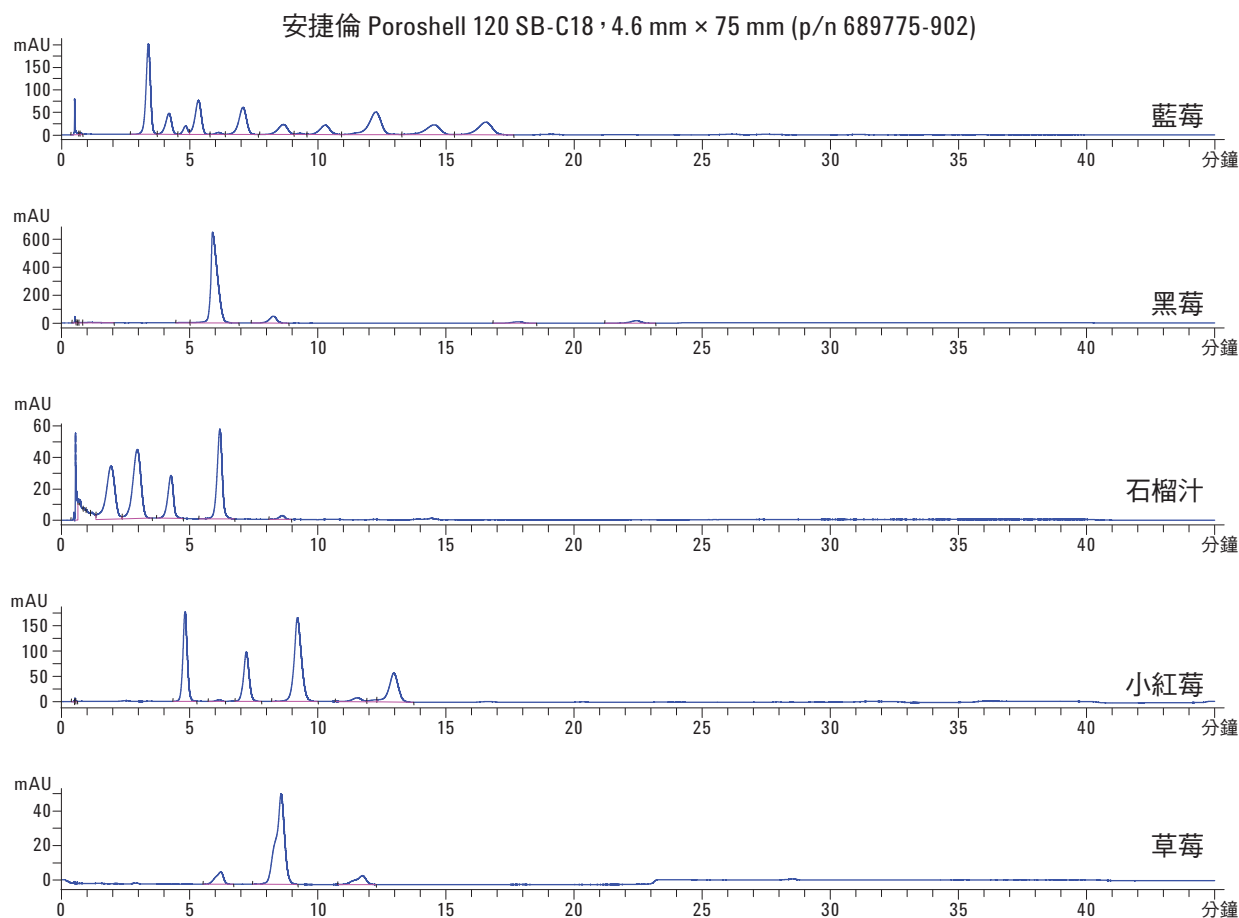


圖 3b. 重疊比較花青素方法：使用安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 處理不同樣品（使用 HCO_2H 梯度沖提）

表 2. 圖 3b 使用的甲酸梯度沖提；依據參考資料 4 按照比例調整

長度	4.6 x 250	4.6 x 75
顆粒	5	
零件編號	880975-902	68775-902
流速	1.5	1.5
最大壓力	274 bar	349 bar
注入量	50	15
%B	時間	時間
14	0	0
17	10	6
23	35	21
47	65	39
14	67	40.2

結論

相較於以傳統多孔性顆粒充填的管柱，表面多孔性顆粒充填的 HPLC 管柱具有許多優勢。表面多孔性安捷倫 Poroshell 120 SB-C18 2.7- μm 管柱，提供近似安捷倫 ZORBAX StableBond SB-C18 管柱的選擇性。使用 Poroshell 120 SB-C18 分析花青素，確能加速分析，每份樣品需要使用的溶劑也較少。加速分析和降低溶劑成本的重要性，在以分析區別植物品種 [4] 或檢驗各種食品 [10, 12] 之際尤其明顯；因為需要分析的樣品可能多達數百個，而每個樣品可能需要 1 小時以上進行分離。新方法可以節省大量時間，或檢驗更多樣品，進一步區別不同植物品種。使用甲酸作為移動相添加物，就能使用質譜儀進行進一步的辨識。

參考資料

1. Ronald E. Wrolstad 博士。〈花青素及多酚對健康可能的益處〉(The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigments and Polyphenolics)。美國奧勒岡州立大學萊納斯鮑林研究所 (The Linus Pauling Institute Oregon State University)。
<http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>。
2. J. P. Goiffon、M. Brun 及 M. J. Bourrier。《層析期刊》(J. Chromatography)。537,101-121, 1991。
3. Robert D. Ricker。〈高效及高速分離天然花青素〉(High-Efficiency and High-Speed Separation of Natural Anthocyanins)。安捷倫科技 (Agilent Technologies)，2002 年 4 月 25 日，5988-6362EN。
4. W. Kalt、J. E. McDonald、R. D. Ricker 及 X. Lu。〈藍莓本身及品種之間的花青素內容及數據〉(Anthocyanin content and profile within and among blueberry species)。《加拿大植物科學期刊》(Can.J. Plant Sci)。79: 617-623。
5. Anne E. Mack 及 William J. Long。〈使用 Poroshell 120 SB-C18 迅速分析茶葉〉(Rapid Tea Analysis on Poroshell 120 SB-C18)。2011 年 4 月 14 日，安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-7842EN。
6. Anne E. Mack 及 William J. Long。〈使用多孔性外層表面多孔性安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱針對食品及飲料添加物進行快速低壓分析〉(Fast, Low Pressure analysis of food and beverage additives using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column)。2010 年 7 月 8 日，安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-6082EN。
7. 安捷倫技術注意事項 (Agilent Technical Note)。〈在 Poroshell 120 EC-C18 及 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱之間移轉方法〉(Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns)。2011 年 2 月 9 日，安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-6588EN。
8. Dorothy J. Phillips、Mark Capparella、Uwe D. Neue、Zoubair El Fallah。〈外層包覆新型小型粒子顆粒，加速分析並提供高分離率解析度〉(A new small particle packing for faster analysis with high resolution)。《製藥及生物醫學分析期刊 15》(Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis)，15 (1997) 1389-1395。
9. William Long 及 Anne E. Mack。〈使用 Poroshell 120 EC-C18 管柱快速分析環境酚〉(Fast Analysis of Environmental Phenols with Poroshell 120 EC-C18 Columns)。2010 年 8 月 31 日，安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-6156。
10. Xianli Wu 及 Ronald L. Prior。〈針對美國常見食物：水果與莓果，利用 HPLC-ESI-MS/MS 全面辨識及特性化其中的花青素〉(Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries)。《農業食品化學期刊》(J. Agric. Food Chem)。2005, 53, 2589-2599。
11. Ronald W. Durst 及 Ronald E. Wrolstad。〈利用 HPLC 分離及特性化花青素〉。(Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC)。《目前的食品分析化學規範》(Current Protocols in Food Analytical Chemistry)
12. Xianli Wu, Gary R. Beecher、Joanne M. Holden、David B. Haytowitz、Susan E. Gebhardt 及 Ronald L. Prior。〈美國常見食品的花青素濃度及預估正常攝取量〉(Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption)。《農業食品化學期刊》(J. Agric. Food Chem)。2006, 54, 4069-4075。
13. Victor Hong 及 Ronald E. Wrolstad。〈使用 HPLC 分離／感光二極體陣列偵測進行花青素的特性化〉(Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins)。《農業食品化學期刊》(J. Agric. Food Chem)。1990, 38, 708-715。

詳細資訊

有關本公司產品與服務的其他資訊，請造訪本公司的網站：
www.agilent.com/chem。

www.agilent.com/chem

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2011 年

於美國印製

2011 年 6 月 27 日

5990-8249CHTW



Agilent Technologies