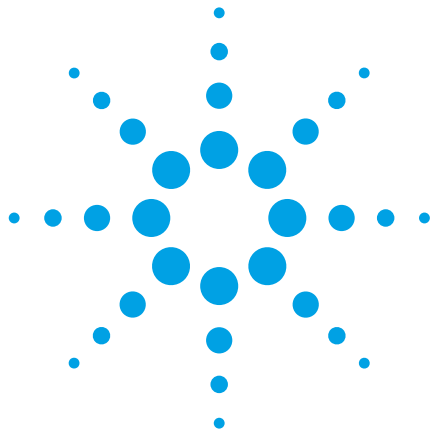




Agilent Poroshell 120 SB-C18 を用いた 食品中のアントシアニンの分析

アプリケーションノート

食品/製薬

著者

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

概要

Agilent StableBond SB-C18、4.6 x 250 mm、5 μ m カラムまたは 4.6 mm x 150 mm、3.5 μ m カラムで開発されたアントシアニン化合物分離用のオリジナルメソッドを、Agilent 1260 液体クロマトグラフにて、Agilent Poroshell 120 SB-C18、4.6 mm x 75 mm、2.7 μ m カラム用に変換しました。グラジエント、注入量、流速を計算し、評価する各カラムのリテンションインデックスを一定に保ちました。1 つ目のメソッドでは、分析時間が 100 分から 20 分に短縮され、溶媒使用量が 70 % 減少しました。第 2 の変換では、分析時間が 67 分から 40 分に短縮され、溶媒使用量が 40 % 減少しました。



Agilent Technologies

はじめに

アントシアニンは、多くの果実や花、植物に見られる水溶性の植物色素で、赤、青、紫の色のもとになります。HPLC や HPLC MS によるアントシアニンの分析は、各種果実の特徴分析や、果実ジュースの真正性の測定に役だつことが知られています。

食物抗酸化剤としての健康上の効果があるとされていることから、アントシアニンに対する関心は高まっています。天然では、300 以上の構造的に異なるアントシアニンが発見されています。アントシアニンは、広く分布する植物性ポリフェノールであるフラボノイド化合物の一種です。フラバノール、フラバン-3-オール、フラボン、フラバノン、フラバノノールは、アントシアニンから派生する酸化状態が異なるフラボノイド種です。

アントシアニンの定性および定量分析は、ブルーベリーの各栽培品種の識別や、その品質の測定に用いられます。そのため、農業やワイン業界においては、アントシアニンのクロマトグラフィー分離の重要性が高まっています。最近では、医療分野においても、抗酸化剤/抗がん剤としてのアントシアニンの使用に注目が集まっているため、アントシアニンのクロマトグラフィー分離に対する関心はさらに高まっています [1]。

従来、この種の分離において低 pH 移動相 (ギ酸を含む) を使用すると、カラムの劣化や分離の変化につながっていました [2]。Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 カラムは、きわめて低い pH が求められる逆相分離における長期的安定性を備えています。多くの公開済みメソッドでは、50 mL/L (5 %) ギ酸または 30 mL/L (3 %) リン酸が用いられています。この研究では、リン酸およびギ酸を用いたメソッドを、Agilent Poroshell 120 SB-C18 用に変換しました。この新メソッドを用いて、ブルーベリー、ブラックベリー、クランベリー、イチゴ、ザクロ果汁といった複数の果実または果汁サンプルを評価しました。

実験手法

- G1312B バイナリポンプ SL、移動相 A : 3 % リン酸または 5 % ギ酸水、B : メタノール
- G1367E オートサンブラ(ALS) SL
- G1316B カラムコンパートメント(TCC) SL、温度を 30 °C に設定
- G4212C ダイオードアレイ検出器 (DAD) SL、シグナルを 525 nm、バンド幅 16 nm に設定、参照は不使用、G4212-60008 マイクロフローセルを使用 (10-mm パス、1-μL 分散)
- HPLC のコントロールおよびデータ処理には ChemStation バージョン B.04.02 を使用
- Agilent Poroshell 120 SB-C18、4.6 mm x 75 mm、2.7 μm (部品番号 687975-902)

- Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 mm x 250 mm、5 μm (部品番号 880975-902)
- Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 mm x 150 mm、3.5 μm (部品番号 863953-902)

ギ酸とリン酸を Sigma Aldrich (ペルフォンテ、ペンシルベニア州) から購入しました。メタノールを Honeywell, Burdick and Jackson High Purity (マスキーゴン、ミシガン州) から購入しました。使用した水は、18 M-W Milli-Q 水 (Millipore、ベッドフォード、マサチューセッツ州) です。新鮮なブラックベリー、ブルーベリー、イチゴ、クランベリー、ザクロ果汁を地元の食料品店で購入しました。

果実抽出物の前処理手法

まず、ブルーベリー (またはその他の果実) 10 g、溶媒 (70:28:2、MeOH:H₂O、ギ酸) 10 mL を混合しました。ドライアイス上で 10 分間混合し、ドライアイス昇華させました。10 mL シリンジ内でガラスウールを用いてろ過しました。ろ液を 1 時間放置し、0.2 μm フィルターでろ過しました。50 μL を直接注入し、HPLC で分析しました (4.6 mm x 250 mm カラム) [3,4]。その後、得られた透明な溶液を、Agilent MS 認証バイアル (部品番号 5190-2278) に移しました。

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

記号:

t_G はグラジエント時間
 F は流速
 L はカラム長さ
 d はカラム直径
 $\Delta \% B$ はグラジエント区分における有機成分の変化

図 1 は、全多孔性 5 および 3.5 μm SB-C18 カラムと、それよりも短い表面多孔性 Agilent Poroshell 120 SB-C18 2.7 μm カラムを用いたブルーベリー抽出液の分離結果を示しています。注入量はカラム容量に応じて変換しました。いずれのカラムも同じ結合相を備えているため、カラムの選択性はきわめて類似しています [5,6,7]。Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 は、きわめて低い pH を用いるメソッドに特に適しています。過去の研究では、Poroshell 120 カラムを用いると、1.8 μm 全多孔性カラムのピークキャパシティの約 90 % を、およそ半分の圧力で得られることが明らかになっています。また、Poroshell 120 の効率は、3.5 μm カラムの 2 倍であることも示されています [6,7]。この研究では、長い 5 μm カラムから短い 3.5 μm カラム、さらに短い Poroshell 120 カラムへの論理的な移行を説明しています。方程式 1 を用いて、グラジエントをカラム長さに応じて計算すれば、リテンションインデックス (k') は一定に保たれます。

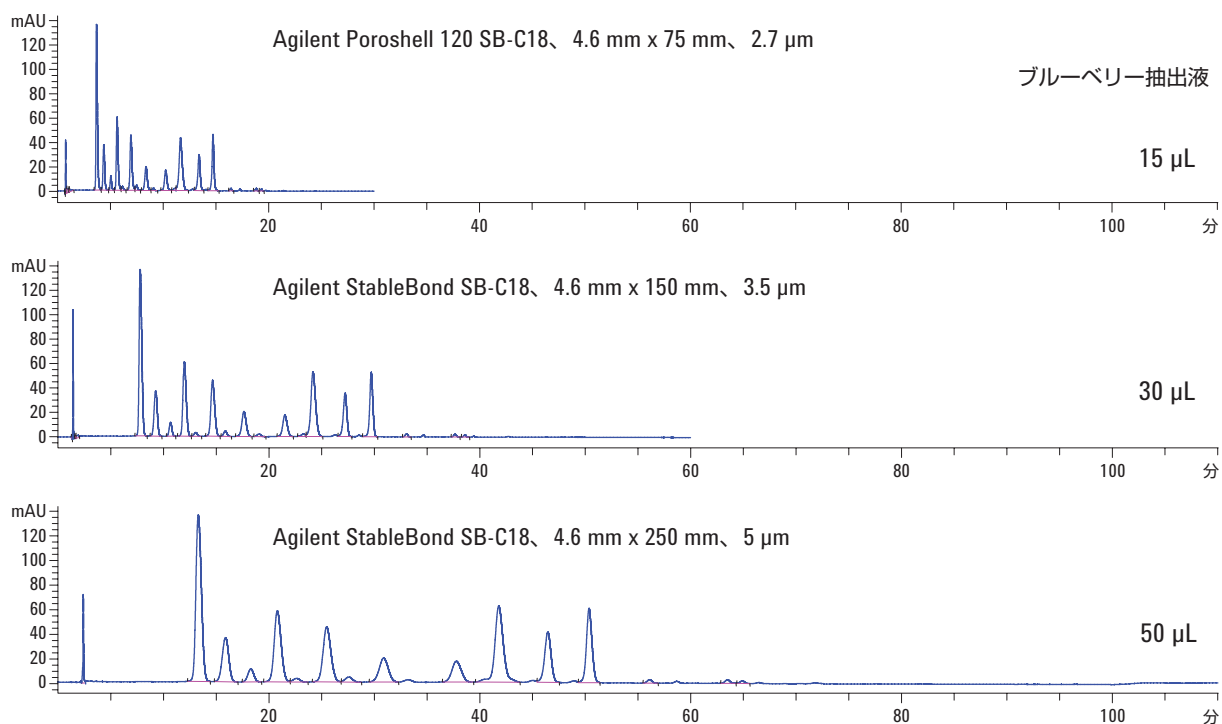


図 1. 全多孔性および表面多孔性 StableBond C18 カラムを用いたブルーベリー中アントシアニンの分析。250 mm 5 μ m、150 mm 3.5 μ m、75 mm 2.7 μ m カラムを用いたアントシアニンメソッドを重ねて表示しています。流速は 1 mL/min です

ブルーベリー抽出液のような複雑な例でも、すべてのピークが同じように分離されるので(時間は短くなります)、時間と溶媒の両方を節約できます。表 1 は、使用したグラジエントを示しています。時間が 97 分から 29 分に短縮されています。評価したすべてのカラムで同じ 2 μ m カラムフリットを使用しているため、追加のサンプル前処理は起こりませんでした。このフリットは、全多孔性 3 μ m カラムで使用されているものよりも、詰まりが生じにくいことが示されています [8]。

表 1. 参考文献 3 から変換した図 1、2、3a のグラジエント

長さ	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
粒子	5	3.5	2.7	2.7	2.7
部品番号	880975-902	863953-902	687975-902	687975-902	687975-902
流速	1	1	1	1.5	2
最大圧力	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

図 2 では、流速を上げています。過去の研究では、4.6 mm カラムで 1.5~2.5 mL/min の高い流速を用いれば、Agilent Poroshell 120 EC-C18 のピークキャパシティが向上することが明らかになっています [9]。方程式 1 を用いて k' を一定に保つことで、同じ分離が維持されます。この例では、クロマトグラムで示されているように、流速 2 mL/min、メタノール成分 50 % において、448 bar という最高圧力に達しました。しかし、流速 1.5 mL/min では、最大圧力は 400 bar 未満でした。この研究で用いたグラジエントを表 1 に示しています。

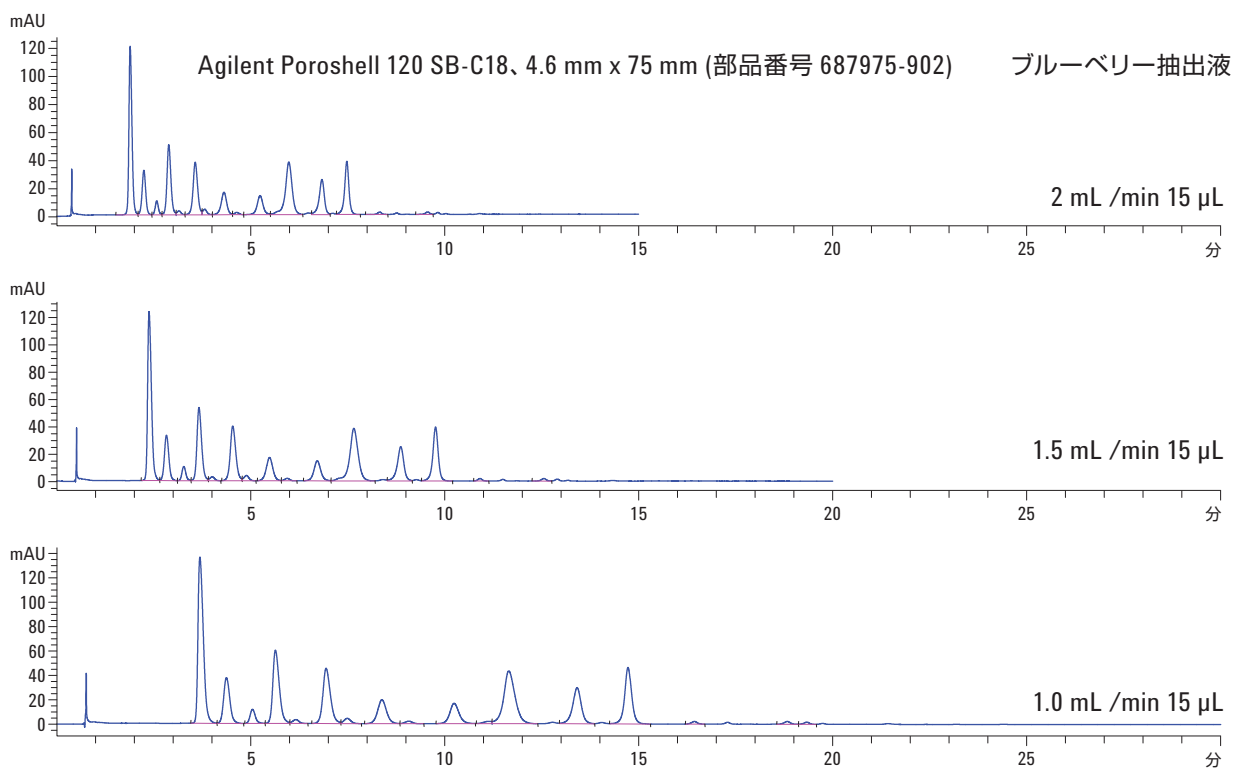


図 2. 異なる流速で分析したブルーベリー抽出液のクロマトグラムの重ね表示

図 3a は、表 1 の 1.5 mL/min メソッドを用いて分析した実サンプルのクロマトグラムを示しています。酸性化メタノールを用いて、ブルーベリー、ブラックベリー、クランベリー、イチゴの各サンプルを前処理しました [3,4]。ザクロ果汁については、さらなる前処理をおこなわずに注入しました。図 1 に示したように、複雑なブルーベリーのクロマトグラムでは、約 20 のピークが見られます (大きいピーク 16、小さいピーク 4)。Kalt の研究では、野生度が高く、ストレスにさらされているブルーベリー品種ほど、アントシアニンピークが多くなることが示されています [4]。栽培種であるブラックベリーでは、ピークが少なくなっていますが、これも過去に報告されているデータと一致しています [10]。クラ

ンベリーで見られる特徴 (cyd-3-gal、cyd-3-glu、cyd-3-arab、pnd-3-gal、pnd-3-glu、pnd-3-arab) は、参考文献 [11] および [10, 12, 13] で示されています。イチゴの結果も、過去に報告されたデータと一致しています。図 3b は、わずかに異なるグラジエントで 5 % ギ酸を用いた場合でも、同様の結果が得られることを示しています。オリジナルのグラジエントは流速が 1.5 mL/min で、移動相の線速度は上げませんでした。ここで用いたオリジナルおよび変換後のグラジエントを表 2 に示しています。ギ酸をリン酸の代わりに使用すれば、質量分析計を検出に使用できますが、いずれの移動相を用いた場合でも、クロマトグラフィー分析では同様の結果が得られます。

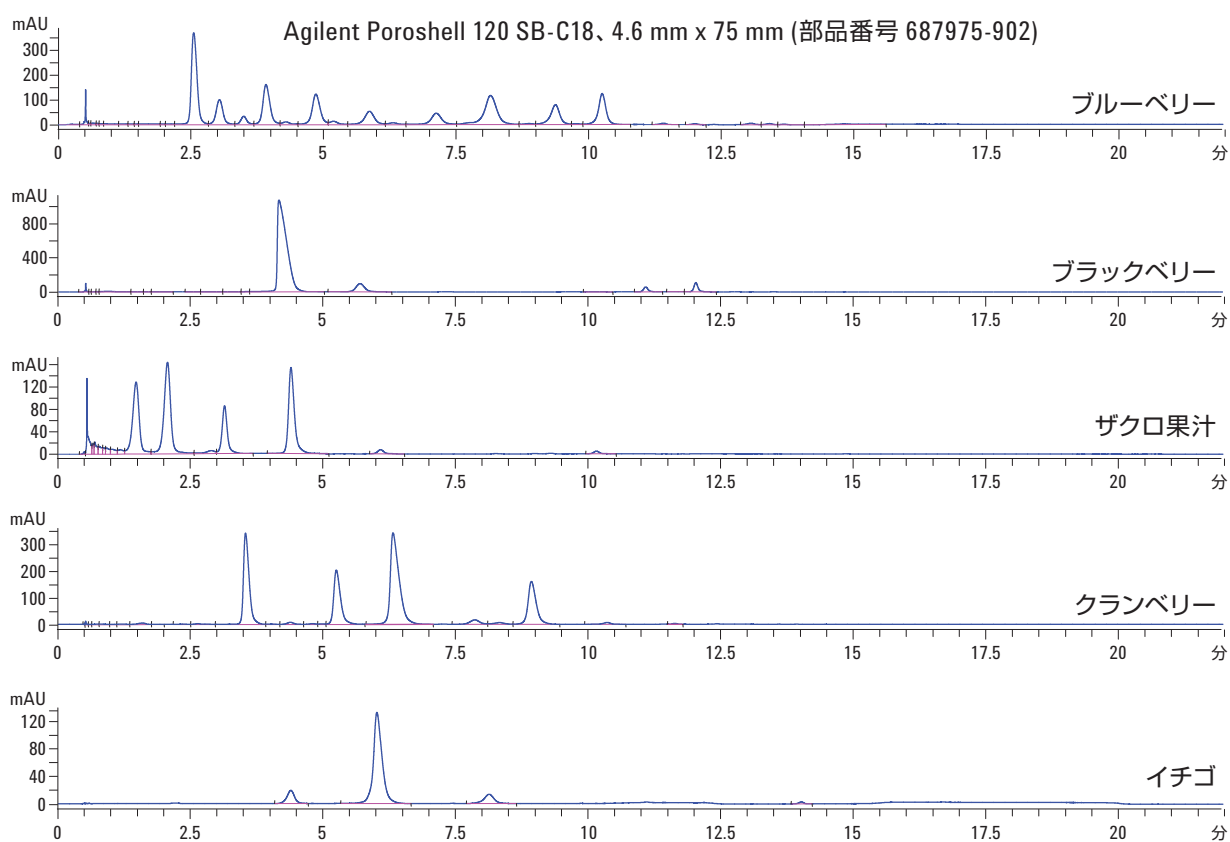


図 3a. 各種サンプルのアントシアニン分析結果の重ね表示

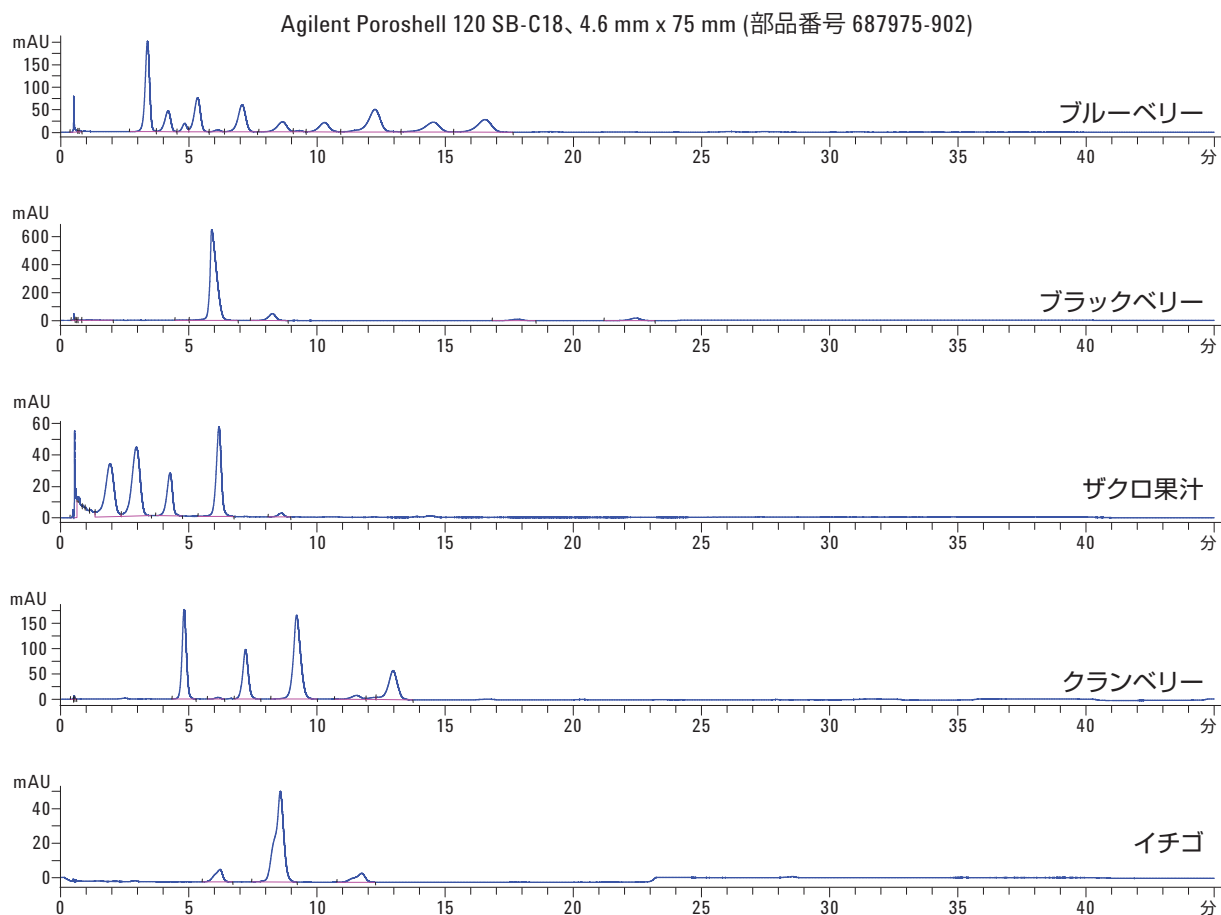


図 3b. 各種サンプルのアントシアニン分析結果の重ね表示

表 2. 参考文献 4 から変換した図 3b のグラジエント

長さ	4.6 x 250	4.6 x 75
粒子	5	
部品番号	880975-902	68775-902
流速	1.5	1.5
最大圧力	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

表面多孔性粒子を充填した HPLC カラムは、従来の全多孔性粒子を充填したカラムに比べて、多くの利点を備えています。表面多孔性 Agilent Poroshell 120 SB-C18、2.7- μ m カラムでは、Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 カラムと同じ選択性が得られます。Poroshell 120 SB-C18 をアントシアニン分析に使用すれば、サンプルあたりの溶媒使用量を減らし、分析時間を短縮できることが示されています。この時間短縮と溶媒削減は、多数のサンプルを分析し、各サンプルの分離に 1 時間以上を要する植物種の識別 [4] や食品品種 [10, 12] アッセイに適用する場合には、明らかに重要となります。分析時間を大幅に短縮し、より多くのサンプルを分析できるようにすることで、さらなる植物種の識別が可能になります。移動相にギ酸を使用すれば、質量分析計を用いたさらなる同定にも対応できます。

参考文献

1. Ronald E. Wrolstad, Ph.D., "The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigments and Polyphenolics," The Linus Pauling Institute Oregon State University, <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>.
2. J. P. Goiffon, M. Brun, M. J. Bourrier, J. Chromatography. 537,101-121, 1991.
3. Robert D. Ricker, "High-Efficiency and High-Speed Separation of Natural Anthocyanins," Agilent Technologies, April 25, 2002, 5988-6362EN.
4. W. Kalt, J. E. McDonald, R. D. Ricker, and X. Lu, "Anthocyanin content and profile within and among blueberry species," Can. J. Plant Sci. 79: 617-623.
5. Anne E. Mack and William J. Long and "Rapid Tea Analysis on Poroshell 120 SB-C18," April 14, 2011, Agilent Technologies publication 5990-7842EN.
6. Anne E. Mack and William J. Long "Fast, Low Pressure analysis of food and beverage additives using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column," July 8, 2010, Agilent Technologies publication 5990-6082EN.
7. Agilent Technical Note, "Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns," February 9, 2011, Agilent Technologies publication 5990-6588EN.
8. Dorothy J. Phillips, Mark Capparella, Uwe D. Neue, Zoubair El Fallah, "A new small particle packing for faster analysis with high resolution," Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15 (1997) 1389-1395.
9. William Long and Anne E. Mack, "Fast Analysis of Environmental Phenols with Poroshell 120 EC-C18 Columns," August 31, 2010, Agilent Technologies publication 5990-6156.
10. Xianli Wu and Ronald L. Prior, Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries, J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 2589-2599.
11. Ronald W. Durst and Ronald E. Wrolstad, "Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC," Current Protocols in Food Analytical Chemistry
12. Xianli Wu, Gary R. Beecher, Joanne M. Holden, David B. Haytowitz, Susan E. Gebhardt, and Ronald L. Prior, "Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption", J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 4069-4075.
13. Victor Hong and Ronald E. Wrolstad, "Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins," J. Agric. Food Chem. 1990, 38, 708-715.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2014

Printed in Japan

February 12, 2014

5990-8249JAJP



Agilent Technologies