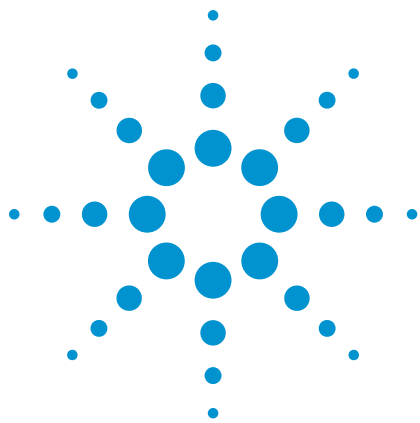




Agilent 1290 Infinity 2D-LC を用いた、 赤ワインとフルーツジュースに含まれる フェノール系抗酸化化合物の定性 および定量分析

アプリケーションノート

食品

著者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany



概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity 2D-LC による逆相/逆相の 2 次元クロマトグラフィーによる複雑な成分の分離を実証します。標準試料の混合物を用いてメソッドを開発し、フルーツジュースと赤ワインに含まれるポリフェノール (抗酸化化合物) の定性および定量を行いました。



Agilent Technologies

はじめに

ポリフェノール化合物は、フェノール酸、フラボノイド、クマリンなどの植物性二次代謝物です。それらの多くは、ブドウ、ベリー、ホップ、ハーブの他、フルーツジュース、ビール、ワインなどの食品や飲料に含まれています¹。これらの化合物には、抗酸化作用とフリーラジカルに対する保護効果があることが知られています。

ポリフェノール化合物を含むマトリクスは非常に複雑なことから、その分析には高い分離能が必要です。そのため、2次元液体クロマトグラフィーが最も効果的で最適な手法になります。1次元目と2次元目で異なるカラムと移動相を用いることにより、通常の HPLC では得ることのできない高い分離能を十分に発揮し、類似する化合物の定性と定量が可能になります。

このアプリケーションノートでは、1290 Infinity 2D-LC による逆相/逆相の2次元クロマトグラフィーで、複雑なマトリクス中のポリフェノールを分離します。標準試料の混合物を用いてメソッドを開発し、フルーツジュースと赤ワインに含まれるポリフェノール (抗酸化化合物) の定性および定量を行いました。

実験

装置

Agilent 1290 Infinity 2D-LC は、以下のモジュールから構成されます。

- Agilent 1290 Infinity ポンプ (G4220A) x 2 台
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A) とクーラー (G1330A)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (TCC) (G1316C) と 1290 Infinity 2D-LC 用 2 ポジション 4 ポート Duo バルブ (G4236A)

- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (DAD) (G4212A) と 60 mm Max-Light フローセル (G4212-60007)
- 1 次元目カラム : Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus, C18, 150 x 2.1 mm, 1.8 µm
- 2 次元目カラム : Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus, Phenyl-Hexyl, 50 x 3.0 mm, 1.8 µm

この構成では、1次元目と2次元目のポンプには同じ性能を持ったものを使用しています。通常、2次元のポンプには高速グラジエントが必要になるため、1290 Infinity ポンプを使用する必要があります。1次元のポンプは、1260/1290 Infinity クォーターナリポンプ、1260 Infinity バイナリポンプ、または 1260 Infinity キャピラリポンプも使用できます。

ソフトウェア

- Open Lab CDS ChemStation Rev C01.03 と 1290 Infinity 2D-LC ソリューションアドオンソフトウェア
- GC Image LLC (米国ネブラスカ州リンカーン) の 2D-LC データ解析用 LCxLC ソフトウェア

メソッド

1 次元目ポンプ

溶媒 A : アセトニトリル + 0.1 % 酢酸
溶媒 B : 水 + 0.1 % 酢酸
流量 : 0.1 mL/min
グラジエント : 0 分 5 % B – 30 分 95 % B
40 分 – 95 % B

ストップタイム : 40 分
ポストタイム : 15 分

2 次元目ポンプ

溶媒 A : メタノール + 0.1 % 酢酸
溶媒 B : 水 + 0.1 % 酢酸
流量 : 3 mL/min
グラジエント : 0 分 – 5 % B
0.5 分 – 15 % B
0.51 分 – 5 % B
0.65 分 – 5 % B

グラジエントモジュレーション :

0 分 5 % B ~ 30 分 50 % B
0.5 分 15 % B ~ 30 分 95 % B
0.51 分 5 % B ~ 30 分 50 % B
0.65 分 5 % B ~ 30 分 50 % B

カラムコンパートメント

- 左側の 1 次元目カラムは 25 °C
- 右側の 2 次元目カラムは 60 °C
- 左側に位置する 2 つの 80 µL ループは 2 ポジション 4 ポート Duo バルブに接続します。
- バルブは 2 次元目のグラジエントサイクルが終了するたびに自動的に切り替わります。この場合、ループは並流方式で使用されます (ループには同じ側から入り溶出します)。

オートサンブラ

注入量 : 5 µL
サンプル温度 : 8 °C
ニードル洗浄 : メタノール中で 6 秒

ダイオードアレイ検出器

波長 : 260/4 nm
スリット幅 : 4 nm
データレート : 80 Hz
フローセル : 60 mm Max-Light フローセル

試薬類

溶媒は全て LC グレードのものを使用しました。アセトニトリルとメタノールはドイツの Merck から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブランのユースポイントカートリッジ (Millipak) を取り付けた Milli-Q Integral システムから得ました。標準試料として使用したすべての化学物質は、ドイツの Sigma-Aldrich から購入しました。標準試料は、全ての化合物において 100 µg/mL に調製し、適宜希釈して使用しました。サンプルとなる赤ワインとフルーツジュースは地元のスーパーマーケットで購入しました。

サンプル前処理法

赤ワインとフルーツジュースをシリンジフィルタ (0.45 μm) でバイアルに直接ろ過し、2次元 LC システムに注入しました。

結果と考察

はじめに、1290 Infinity 2D-LC でのメソッドを最適化するために、ポリフェノール化合物とフラボノイド化合物の標準物質の混合物を作成し、1290 Infinity 2D-LC システムで分離しました (図 1A)。ソフトウェアのピーク検出アルゴリズムにより、それぞれの化合物が自動的に検出されました (図 1B)。

2次元 LC の可能性を最大限に活かすため、安息香酸、フェノール化合物、グリコシド化合物、フラボノイド化合物などさまざまな化合物を標準物質の混合物に使用しました (表 1)。

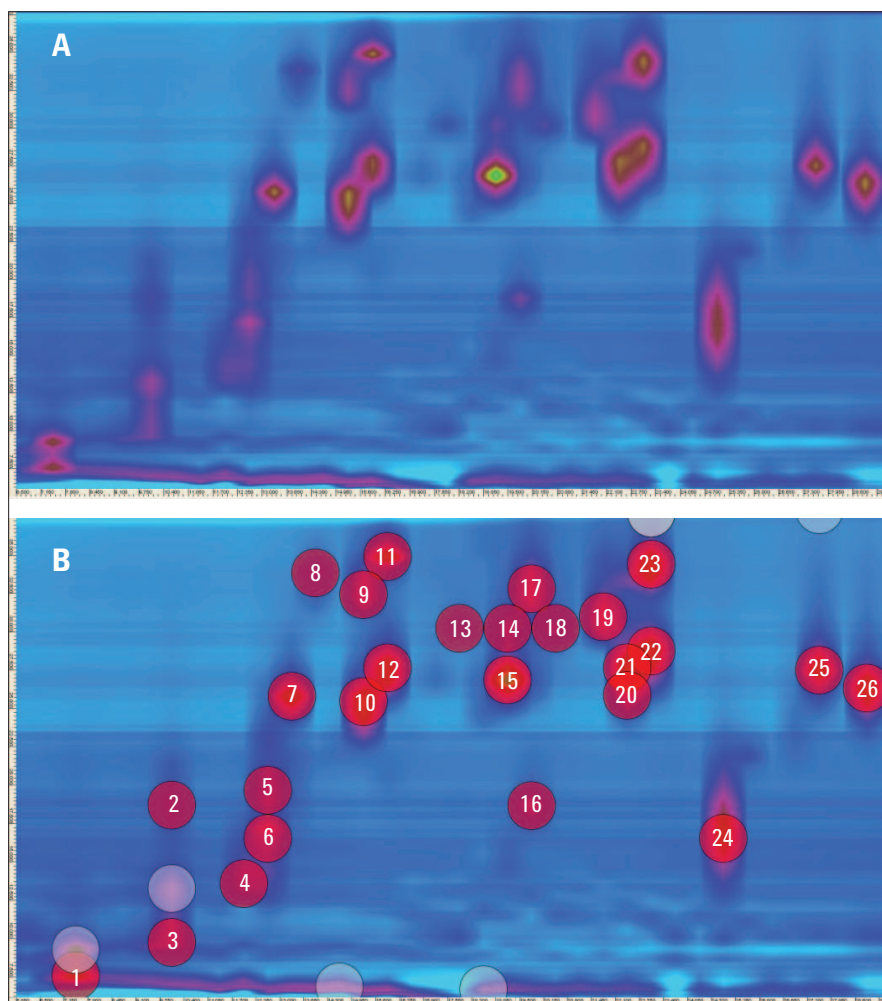


図 1
A) Agilent 1290 Infinity 2D-LC によるポリフェノール化合物 26 種の最適化された分離プロット
B) ソフトウェアで検出しピーク注釈を付けた Agilent 1290 Infinity 2D-LC のプロット

化合物 №	化合物名	ピーク I (分)	ピーク II (秒)	化合物 №	化合物名	ピーク I (分)	ピーク II (秒)
1	没食子酸	7.15	7.56	14	モリン	18.85	30.20
2	エスクリン	9.75	18.63	15	レスベラトロール	18.85	26.65
3	3,4 -OH 安息香酸	9.75	9.74	16	サリチル酸	19.50	18.55
4	OH フェニル酢酸	11.70	13.55	17	ルテオリン	19.50	32.79
5	6,7 -OH クマリン	12.35	19.66	18	ケルセチン	20.15	30.20
6	OH 安息香酸	12.35	16.51	19	ケンフェロール	21.45	30.96
7	シリング酸	13.00	25.78	20	アピゲニン	22.10	25.84
8	ルチン	13.65	33.63	21	ナリンゲニン	22.10	27.65
9	ナリンギン	14.95	32.43	22	ヘスペレチン	22.75	28.74
10	クマリン酸	14.95	25.44	23	7-OH フラボン	22.75	34.29
11	ヘスペリジン	15.60	34.89	24	ビノシルビン	24.70	18.81
12	フェルラ酸	15.60	27.63	25	クリシン	27.30	27.49
13	ミリセチン	17.55	30.20	26	フラボン	28.60	26.33

表 1
標準溶液中で使用した化合物の 1 次元目 および 2 次元目のリテンションタイム

このメソッド用に最適化した 2 次元 LC システムの性能を判定するために、1 次元目および 2 次元目でのリテンションタイムの領域全体を統計的に評価しました。2 次元目のリテンションタイムの RSD [%] 値は 0.5 % より良好で、ソフトウェアで計算したピーク容積の RSD [%] 値は 3 % より良好でした (表 2)。

図 2 に、測定の全体像を 3 次元グラフィックで示します。

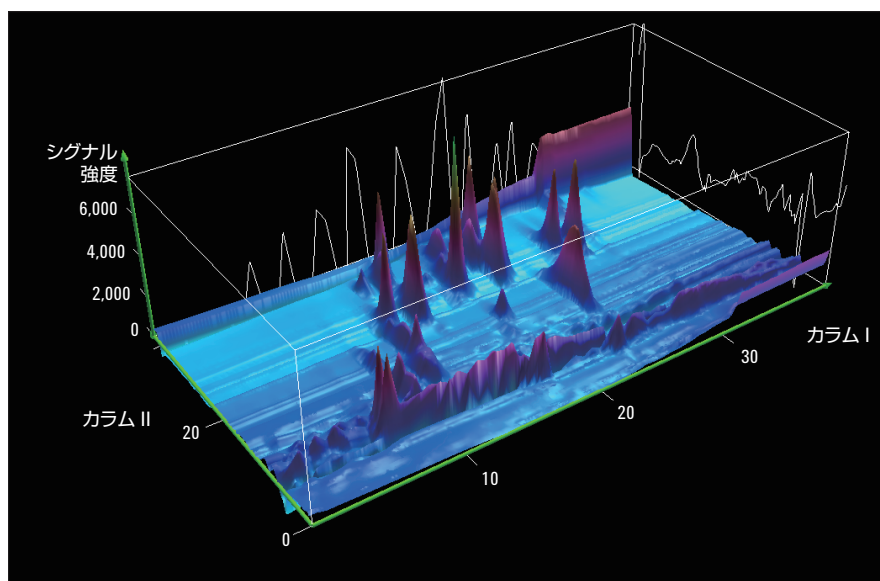


図 2
26 種の標準物質混合物を分離した際の 3 次元表示。1 次元目の分離には 40 分、2 次元目の分離にはそれぞれ 39 秒かかります。背面に 1 次元目のクロマトグラムを示し、どのピークが 2 次元目で分離されているかがわかります。

化合物		1 次元目 RT (分)	2 次元目 RT (秒)	ピーク容積	化合物		1 次元目 RT (分)	2 次元目 RT (秒)	ピーク容積
エスクリン	平均	9.75	18.58	177,383	ルテオリン	平均	19.50	32.70	695,601
	s.d.	nd	0.11	4,713		s.d.	nd	0.11	17,592
	RSD (%)	nd	0.57	2.7		RSD (%)	nd	0.33	2.5
ルチン	平均	13.65	33.68	72,375	7-ヒドロキシフラボン	平均	22.75	34.26	1,388,226
	s.d.	nd	0.07	853		s.d.	nd	0.10	17,195
	RSD (%)	nd	0.22	1.2		RSD (%)	nd	0.30	1.2
クマリン酸	平均	13.00	25.57	660,541	ピノシルビン	平均	24.70	18.85	1,588,654
	s.d.	nd	0.13	13,037		s.d.	nd	0.23	57,580
	RSD (%)	nd	0.52	2.1		RSD (%)	nd	1.24	3.6
レスペラトロール	平均	18.85	26.65	1,122,219	クリシン	平均	27.30	27.42	808,916
	s.d.	nd	0.10	16,089		s.d.	nd	0.11	14,768
	RSD (%)	nd	0.37	1.4		RSD (%)	nd	0.39	1.8
サリチル酸	平均	19.50	18.53	211,092	フラボン	平均	28.60	26.35	1,008,012
	s.d.	nd	0.10	6,895		s.d.	nd	0.13	20,911
	RSD (%)	nd	0.51	3.3		RSD (%)	nd	0.48	2.1

s.d. = 標準偏差

nd = 未測定

表 2
26 種の標準物質混合物のうち一部の化合物のパフォーマンスデータ。リテンションタイム RSD [%] は 0.5 % より良好で、ピーク量 RSD [%] は 3 % より良好です。

続いて、フルーツジュースや赤ワインなど、ポリフェノール化合物とフラボノイド化合物を含んだ実際のサンプル用に開発したメソッドで分離した例を示します。一例として、開発したメソッドで 1290 Infinity 2D-LC を使用した赤ブドウのフルーツジュースを分析しました (図 3)。このサンプルでは、ヒドロキシ安息香酸誘導体を 1 次元目および 2 次元目のリテンションタイムと、標準物質との UV スペクトルの比較によって同定しました。ブドウジュースの主な成分は没食子酸とシリング酸です¹。しかし、地元のスーパーマーケットで購入したフルーツジュースでは、より複雑な 2 次元プロットが得られました (図 4)。つまり、このジュースには果肉の他に、様々な抗酸化成分を含むフルーツから製造されていることが判明しました。今回はヒドロキシ安息香酸誘導体のような化合物に加え、ルチンやエスクリンなどのグリコシド系天然化合物を同定できました。化合物は 1 次元目および 2 次元目のリテンションタイムと、標準物質と比較した UV スペクトルによって同定しました。

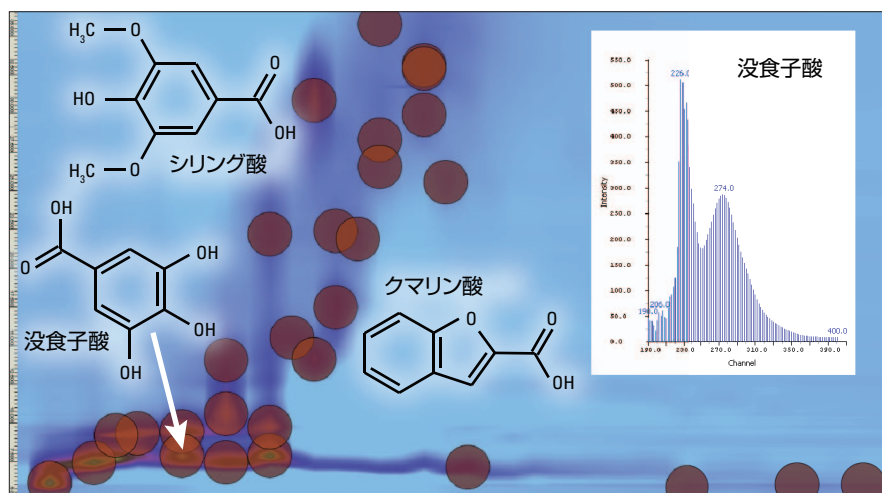


図 3
Agilent 1290 Infinity 2D-LC によって分離された赤ブドウジュースのサンプル。通常、主要成分は没食子酸などのヒドロキシ安息香酸化合物です (挿入図は没食子酸の UV スペクトル)。

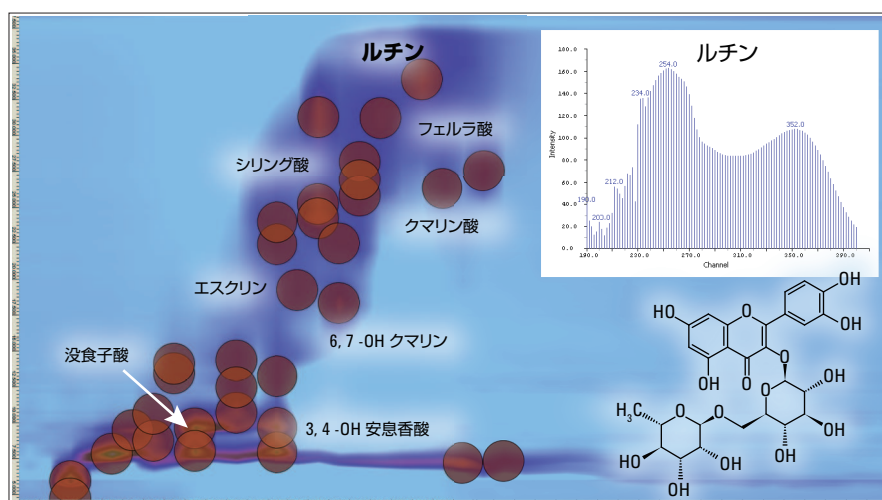


図 4
Agilent 1290 Infinity 2D-LC による、赤ブドウ、緑ブドウ、リンゴ、黒スグリ、チェリー、クランベリー、ザクロ、ビルベリーを含む抗酸化性ミックスジュースの分離。ヒドロキシ安息香酸誘導体に加え、ルチンやエスクリンのようなグリコシド化合物を同定しました。

最後に、1290 Infinity 2D-LC でメルロー赤ワインのサンプルを分析しました (図 5)。2 次元プロットは、赤ワインに含まれることで知られる¹ ヒドロキシ安息香酸の誘導体や、非常に抗酸化作用の高いレスベラトロールなど、通常は早く溶出する化合物を示しています。この化合物は、最初にリテンションタイムと UV スペクトルによって定性的に同定されました。定性的な同定に加え、1290 Infinity 2D-LC では定量的な分析を行うことも可能です。

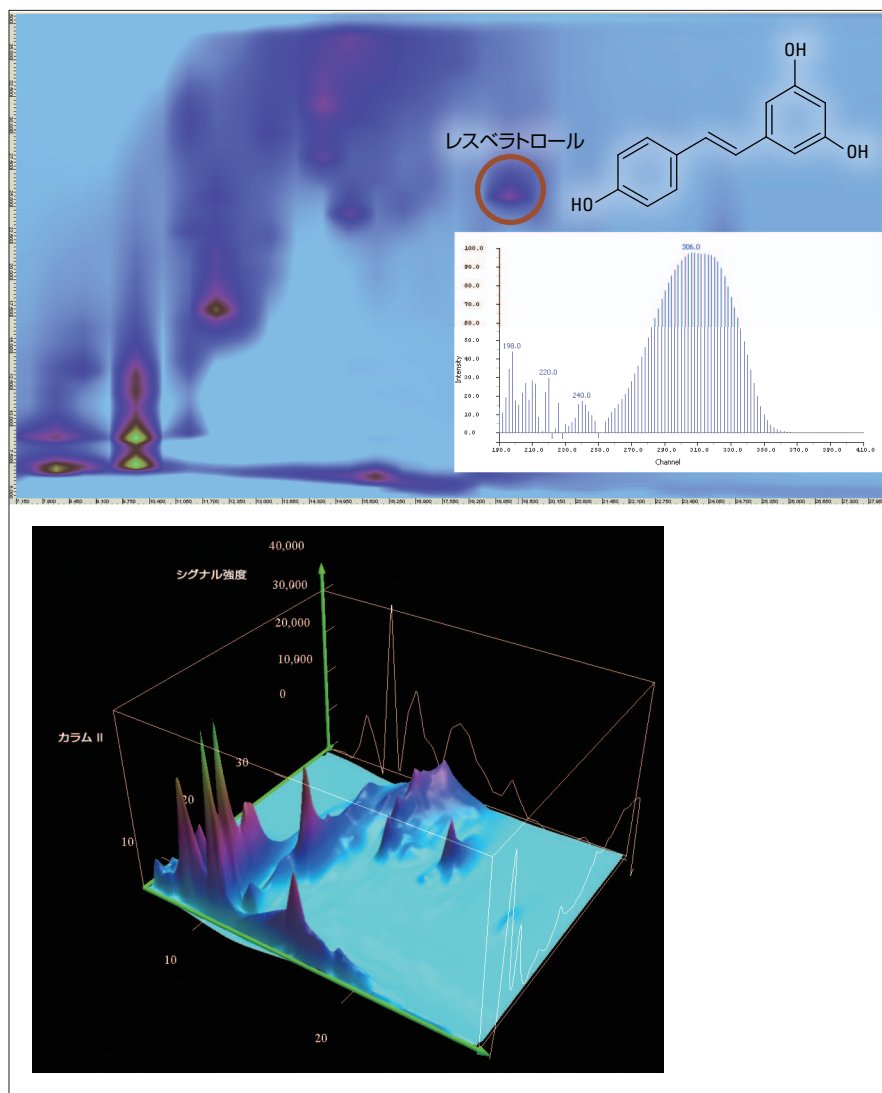


図 5
LCXLC ソフトウェアで可視化した赤ワインの 2D-LC 分析。上の図は、赤ワインサンプルから分離された化合物を 2 次元プロットで示しています。レスベラトロールの UV スペクトルを右下に挿入しています。下の図は分離の 3 次元プロットです。

レスベラトロールを定量するために、レスベラトロールの標準物質をそれぞれの濃度に希釈し、LCxLC ソフトウェアで定量用の検量線を作成しました (図 6)。検量線は 1 µg/mL (定量下限 : LOQ) ~ 50 µg/mL の間で作成し、2D-LC 分析定量で 0.9987 という優れた直線性を示しました。サンプルから、測定したメルロー赤ワイン中に約 4.5 mg/L のレスベラトロールが検出されました。

結論

このアプリケーションノートでは、複雑な天然生産物サンプルの分離に 1290 Infinity 2D-LC が十分に適用できることを実証しています。分離は、複数成分の標準溶液で最適化しました。リテンションタイムの RSD 値は 0.5 % 未満、ピーク容積の RSD 値は 3 % 未満という優れた性能が得られました。

赤ワインの成分の定量 Agilent 1290 Infinity 2D-LC を使用した結果、直線性と LOQ はサンプルマトリクス中の化合物の分離と定量分析に有効であることがわかりました。

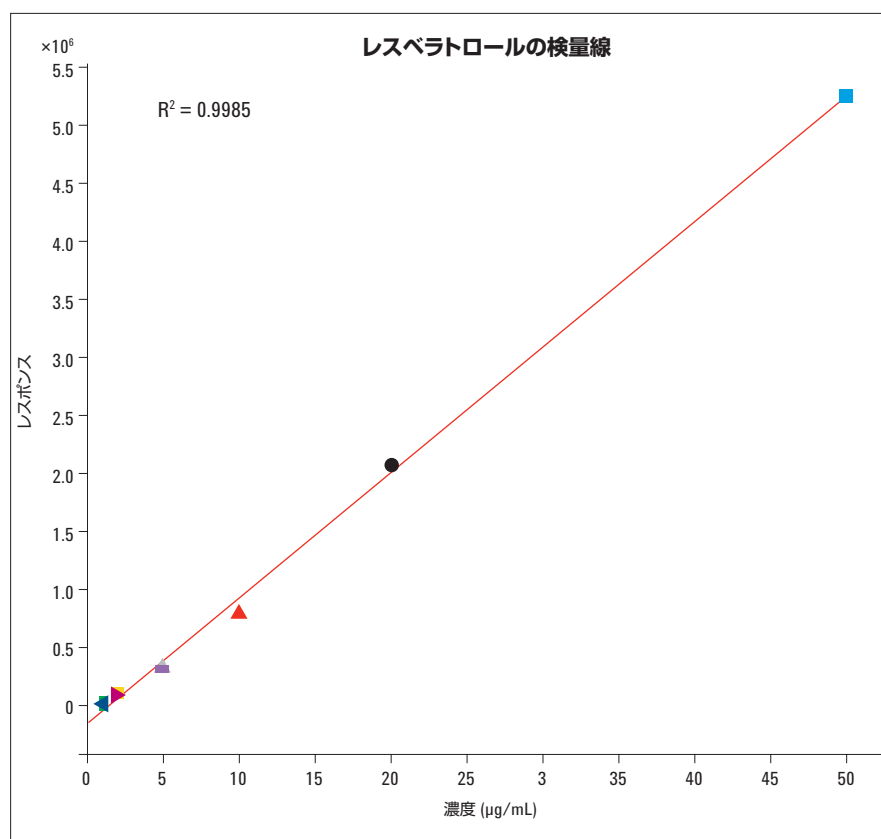


図 6
1290 Infinity 2D-LC を使用した、レスベラトロールの定量を目的とした検量線。1~50 µg/mL の範囲で、メルロー中に 4.5 µg/mL (4.5 mg/L) を検出。

参考文献

1.
Kivilompolo M., Oburka V., Hyötyläinen
T., Comprehensive two-dimensional
liquid chromatography in the analysis
of antioxidant compounds in wines and
juices. Anal. Bioanal. Chem. **2008**, 391,
373-380.

www.agilent.com/chem/lc:jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2012
Published in Japan, May 1, 2012
5991-0426JAJP



Agilent Technologies