ApplicationNOTE

Waters

ACQUITY UPLC™/TUVによる ベリー類中のアントシアニジンの高速分析

Application Note No. 720001870J

概要

アントシアニンは果実、ジュース、ワインなどに青色と赤色を与える植物由来の色素で、抗酸化作用が高いことが報告されています。[1]600種以上のアントシアニン化合物がベリー類などの食品中に存在し同定されていますが、そのすべてを直接的に分析することはとても困難です。しかしながら、試料の酸加水分解によるアグリコン型(アントシアニジン)への変換によって、アントシアニン化合物類の分析はシンプルなものになります。酸加水分解はこの600以上にもなるアントシアニン化合物を6種のアントシアニジン化合物(デルフィニジン・シアニジン・ペツニジン・ペラルゴニジン・ペオニジン・アルビジン)に変換します。つまりアントシアニジンをの定量によって、アントシアニン類の量を概算することができます。

従来法でのアントシアニジンの分析は34分～55分程度の分析時間を要しました。[2][3]Waters ACQUITY UPLC™システムを用いた分析条件の最適化により、分析時間は2.1分と大幅に短縮され、約20倍高速化されました。

このアプリケーションノートではこれらアントシアニジン化合物6種の分析手法と実サンプルの分析結果について説明します。

Acquity™ Ultra Performance LC

化合物名称

アントシアニジン化合物
※( )内は図、表中の表記

デルフィニジン(Delphinidin)
シアニジン(Cyanidin)
ペツニジン(Petunidin)
ペラルゴニジン(Pelargonidin)
ペオニジン(Peonidin)
マルビジン(Malvidin)

実サンプル

生・冷凍・乾燥したベリー類各種
ブルーベリー
ブラックベリー
ラズベリー
ストロベリー
クランベリー

分析条件

装置
Waters ACQUITY UPLC™/TUV
ソフトウエア Empower2
カラム：Waters ACQUITY UPLC™ BEH C_{18}
2.1×50 mm , 1.7 μm
カラム温度：40℃
移動相：A) 0.3 % リン酸/水
B) アセトニトリル
グラジェント：

	%A	%B	Curve
0 min	90	10	6
2 min	80	20	6
2.1 min	90	10	6

流速 ：1.0 ml/min
注入量：2 μl
弱洗浄溶媒：水/アセトニトリル 95/5
強洗浄溶媒：アセトニトリル/IPA/水 70/20/10
検出波長：525nm
サンプリングレート：20ポイント/秒

図1. アントシアニジン標準品のUPLC™クロマトグラム

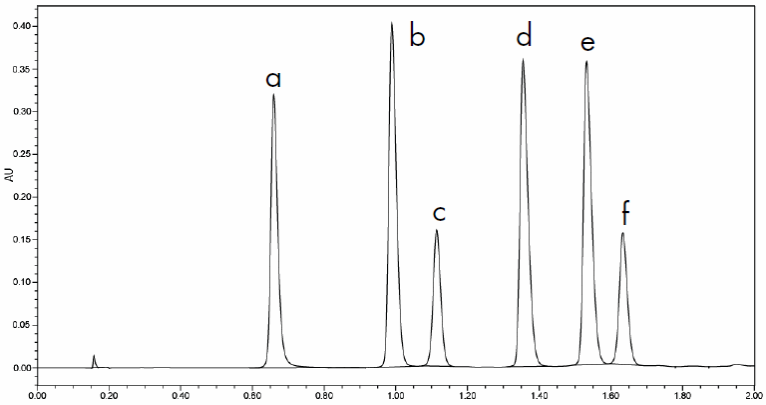

表1. 標準品検量線のR^2値

Standard	*R^2 Value*
Delphinidin	0.9988
Cyanidin	0.9992
Petunidin	0.9992
Pelargonidin	0.9992
Peonidin	0.9992
Malvidin	0.9980

サンプルの準備
各ベリー25+/-0.3gを100mLのメスシリンダーに入れ30mLの抽出溶媒(アセトニトリル/0.3%リン酸水=80/20)を添加しました。その後1.5分間ホモジナイズし、溶液部を遠心管に移し2500rpmで10分間遠心分離しました。

酸加水分解
2mLの抽出液を4mLのバイアルに移し、濃塩酸200μLを添加しました。バイアルはキャップを閉め5秒間ボルテックスミキサーにかけた後、150±2℃のケミカルオーブンに30分間入れました。30分後、加水分解反応を止めるためにバイアルを0℃のフリーザーの中に10分間保存しました。取り出した後室温に戻し、0.45μmのフィルターでろ過した後2mLのバイアルに入れ分析しました。

検量線
シアニジン・ペツニジン・ペラゴニジン・ペオニジンデルフィニジンについては0.1-0.001mg/mLの7点検量線を作成しました。マルビジンは0.3-0.001mg/mLの5点検量線を作成しました。

図1はアントシアニジン6化合物標準品のUPLC™クロマトグラムです。

a デルフィニジン (Delphinidin)
b シアニジン (Cyanidin)
c ペツニジン (Petunidin)
d ペラルゴニジン (Pelargonidin)
e ペオニジン (Peonidin)
f マルビジン (Malvidin)

分析時間2分で6成分が分離されています。

表1は上記標準品検量線のR^2値を求めた結果です。いずれも直線性は良好です。

図2. 実サンプルのUPLC™クロマトグラム

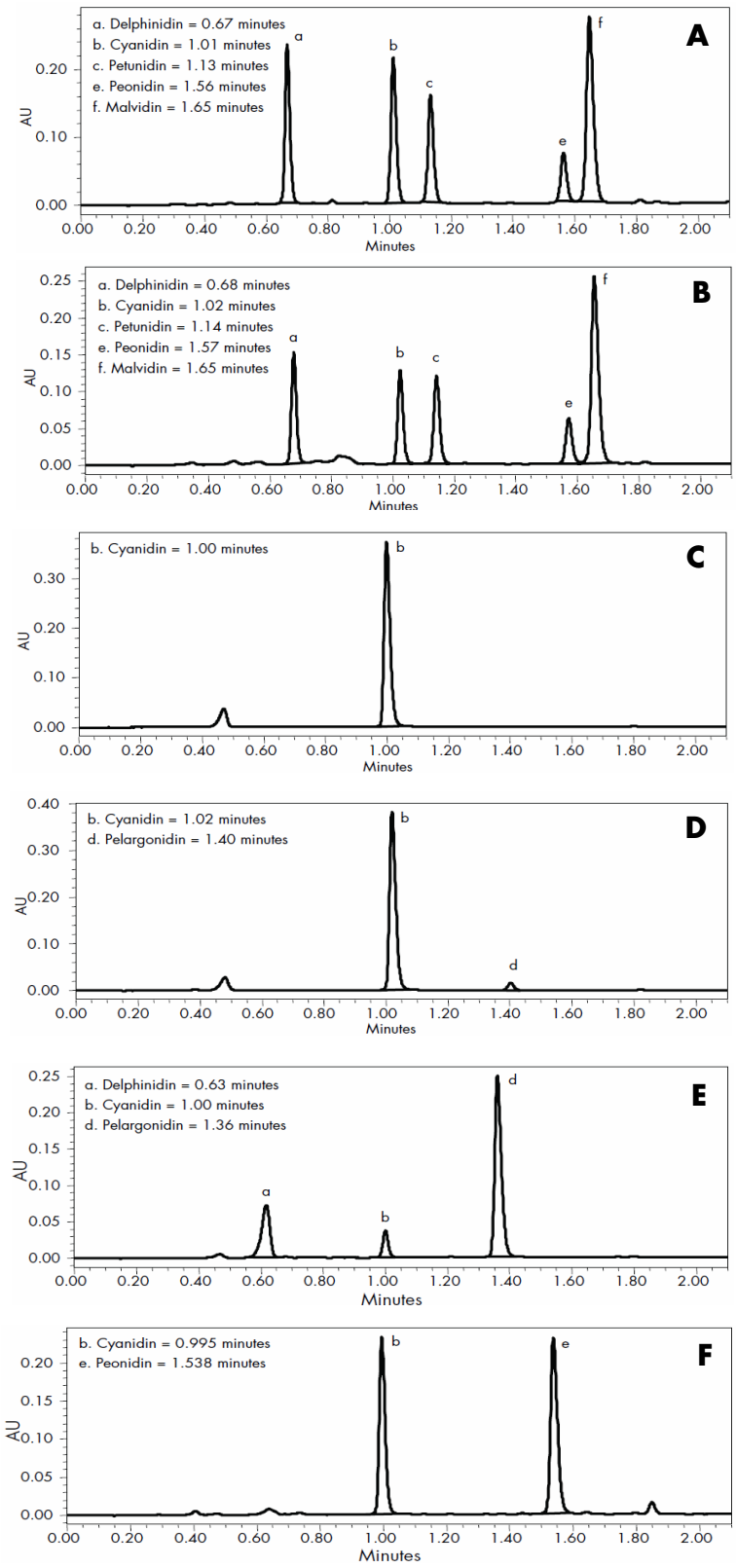

図2に実サンプルのUPLC™クロマトグラムを示します。

A.ローブッシュブルーベリー
B.ワイルドローブッシュブルーベリー
C.冷凍ブラックベリー
D.冷凍ラズベリー
E.冷凍ストロベリー
F.冷凍クランベリー

を表します。ブルーベリーが高い濃度のアントシアニジン化合物を含むことがわかります。種類も5あるいは6化合物を含みます。他のベリー類は1～4種のいずれかを含んでいます。
ブルーベリー中にはマルビジンが他の成分に比べ2倍量存在しています。また、マルビジンはブルーベリーのみに含まれています。

Waters

表2. アントシアニジン化合物の定量結果

アントシアニジン化合物	有機栽培ワイルドブルーベリー	有機栽培ハイブッシュブルーベリー	ローブッシュブルーベリー	ワイルドローブッシュブルーベリー	生ブルーベリー	乾燥ブルーベリー
デルフィニジン	0.59 ± 0.09	0.22 ± 0.07	0.89 ± 0.13	0.34 ± 0.02	0.09 ± 0.01	–
シアニジン	1.59 ± 0.09	0.25 ± 0.02	1.75 ± 0.06	0.82 ± 0.08	0.14 ± 0.00	0.01 ± 0.00
ペツニジン	3.14 ± 0.33	1.52 ± 0.20	3.91 ± 0.25	2.03 ± 0.21	0.79 ± 0.05	0.04 ± 0.01
ペラゴニジン	0.03 ± 0.00	–	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	–	–
ペオニジン	0.67 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.47 ± 0.09	0.09 ± 0.00	0.01 ± 0.00
マルビジン	5.63 ± 0.57	5.07 ± 0.11	5.66 ± 0.22	4.01 ± 0.68	2.00 ± 0.08	0.21 ± 0.05
総量(mg/g)	11.66 ± 1.09	7.21 ± 0.33	12.84 ± 0.59	7.70 ± 1.05	3.11 ± 0.09	0.26 ± 0.06

アントシアニジン化合物	冷凍ブラックベリー	生ブラックベリー	冷凍ラズベリー	生ラズベリー	冷凍ストロベリー	冷凍クランベリー
デルフィニジン	–	–	–	–	0.27 ±0.04	–
シアニジン	4.18 ±0.26	3.14 ±0.43	2.40 ±0.14	2.03 ±0.12	0.25 ±0.05	1.73±0.3
ペツニジン	–	–	–	–	0.03 ±0.04	0.04 ±0.00
ペラゴニジン	0.02 ±0.02	–	0.12 ±0.02	0.10 ±0.02	1.96 ±0.62	0.04 ±0.00
ペオニジン	–	–	0.03 ±0.00	–	–	2.13 ±0.43
マルビジン	–	–	–	–	–	–
総量(mg/g)	4.20 ±0.23	3.14 ±0.43	2.54 ±0.15	2.13 ±0.13	2.51 ±0.68	3.94 ±0.73

図3. ベリーサンプル中の総アントシアニジン量

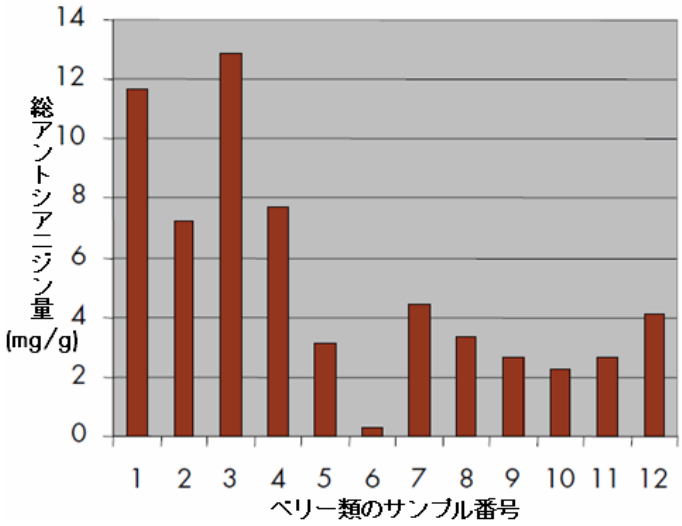

表2は各ベリー中のアントシアニジン量の定量結果のまとめです。各3回ずつ試験を行った平均値を標準偏差とともに示しています。

図3に表2中の総アントシアニジン量のグラフを示します。図中の番号は下記の種類を表します。

1.有機栽培ワイルドブルーベリー
2.有機栽培ハイブッシュブルーベリー
3.ローブッシュブルーベリー
4.ワイルドローブッシュブルーベリー
5.生ブルーベリー
6.乾燥ブルーベリー
7.冷凍ブラックベリー
8.生ブラックベリー
9.冷凍ラズベリー
10.生ラズベリー
11.冷凍ストロベリー
12.冷凍クランベリー

ローブッシュブルーベリーのアントシアニジン量が最も高く、購入品である乾燥ブルーベリーのアントシアニジン量が最も低い結果となりました。これはWuらによって報告[4]された結果とよく一致しています。

参考文献

1. Konczak I, Wei Z. *J. Biomed Biotechnol.* 2004;(5):239-240.
2. Nyman N.A., Kumpulainen J. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49(9):4183-87.
3. Gao L., Mazza G. *J Agric. Food Chem.* 1994;42:118-25.
4. Wu X. et al. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:4026-37.

Waters

日本ウォーターズ株式会社　www.waters.co.jp
東京本社　〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第 5 小池ビル
TEL 03-3471-7191　FAX 03-3471-7118
大阪支社　〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 カトキチ新大阪ビル 11F
TEL 06-6304-8888　FAX 06-6300-1734
ショールーム　東京　大阪
テクニカルセンター　東京　大阪　名古屋　福岡　静岡

LLOYD'S REGISTER QUALITY ASSURANCE ISO9001
UKAS QUALITY MANAGEMENT 001
VIT