Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY QDa 検出器を用いたジュース中のフラボノイド分析

Jinchuan Yang, Rich DeMuro, and Joe Romano
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- ACQUITY® QDa® 検出器は UV/Vis 検出器または PDA検出器よりも優れた選択性を提供します
- ACQUITY QDa が提供する優れた選択性により、必ずしもベースライン分離を必要とせず、簡便かつ迅速なクロマトグラフィー条件が利用できます
- 幅広い濃度レベルの分析に、単一の希釈倍率によるサンプル調製が適用できます
- ACQUITY QDa 検出器は、UV/Vis 検出器と同等の正確性と精度でフラボノイド分析のスループットを大きく向上させることができます

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

ACQUITY UPLC PDA 検出器

ACQUITY QDa 検出器

MassLynx® v. 4.1 MS ソフトウェア

キーワード

ポリフェノール、フラボノイド、フラバノン、ポリメトキシ化ポリメトキシフラボン、ACQUITY QDa

はじめに

フラボノイドは、柑橘系の果物を含む様々な天然物中に発見されたポリフェノール化合物です [1]。フラバノンとフラボンという 2 種類の重要なサブグループが存在します。フラボンはポリメトキシフラボン（PMF）としても知られています。最も一般的なフラバノンはオレンジに含まれるヘスペレチン、最も一般的なフラボンはオレンジとタンジェリンの皮に含まれるタンゲレチンとノビレチンです [2]。異種あるいは柑橘類の多様性によって、顕著な味の特性やフラボノイドプロファイルの多様性が認められるため、柑橘類におけるフラボノイドの分析は多くの場合、品質管理と製品の信頼性の確認のために使用されています [3, 4]。図 1 に本アプリケーションノートで用いたフラボノイドの化学構造を示します。

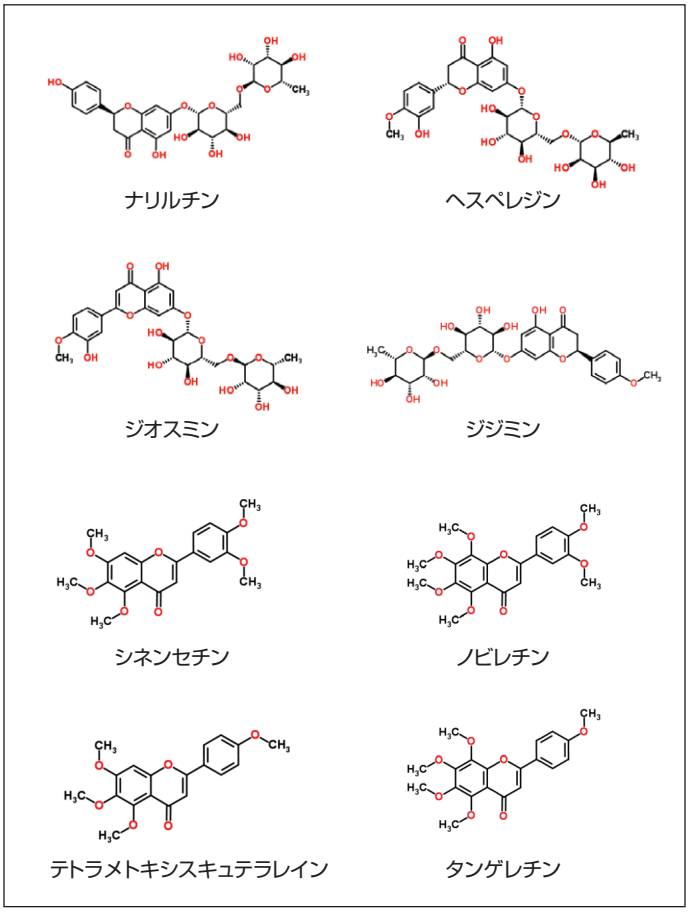

図 1. フラボングリコシドおよびポリメトキシフラボンの化学構造

実験条件

サンプル調製

標準品およびシトラスジュースサンプルは DMSO/アセトニトル水溶液で希釈しました。

LC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class

検出器： ACQUITY QDa

カラム： ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm、2.1 × 100 mm、(製品番号 186003539)

カラム温度： 35℃

サンプル温度： 4 ℃

注入量： 2.0 µL

流速： 0.6 mL/分

移動相 A： 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B： 0.1% ギ酸含有アセトニトリル

分析時間： 13 分

グラジエント：

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)	カーブ
初期値	98	2	6
5.5	27	73	6
6.0	0	100	6
10.0	0	100	6
10.5	98	2	6
13.0	98	2	6

MS 条件

イオン化モード：ESI+

データ取得モード：SIR

コーン電圧：5 V

プローブ温度：デフォルト（600 ℃）

キャピラリー電圧：デフォルト（0.8 kV）

サンプリングレート：デフォルト（5 Hz）

データ管理

MassLynx 4.1 MS ソフトウェア（SCN 888, Build 274）

フラボノイド分析のための最も一般的な技術は、UV/Vis 検出器（UV/Vis）またはフォトダイオードアレイ検出器（PDA）を用いた逆相液体クロマトグラフィーです。PDA はスペクトルデータによってピーク純度の確認が容易にできるので、UV/Vis よりも選択性が優れています。PDA 分析における課題は、フラボノイドの環置換の程度、置換基の種類およびグリコシル化の種類と程度のみが異なった、数十の構造的に類似した化合物から構成されることです。PDA 分析はフラボノイドの微妙な構造の違いを区別するための選択性には欠けています。質量分析（MS）は同重体化合物を除き、より良好な選択性と、PDA 検出よりもフラボノイド分析のための良好な感度を提供できます。しかし、質量分析計のコストおよび使いやすさの観点では、特に製造工場の QC ラボにおいて、フラボノイド分析のために質量分析を採用する際の障害となることがあります。

ウォーターズの ACQUITY UPLC H-Class システムと ACQUITY QDa 検出器は、選択性、使いやすさ、そして手頃な価格という点でフラボノイド分析に最適です。ACQUITY QDa 検出器は手頃なコストと最低限のチューニングのみで質量スペクトルデータを取得できるように設計されています。UV または蛍光発色団を有する化合物の光学検出のカバレッジを拡張するだけでなく、フラボノイドの解析に非常に有用な、類似の構造をもった化合物の選択性を向上させます。

結果および考察

フラボノイドの検出を対象のフラボノイドの分子イオンの選択イオンレコーディング（SIR）によって実施しました。表 1 にフラボノイドおよびそれらの分子イオンの質量対電荷比（*m/z*）のモノアイソトピック質量を示しました。同じ *m/z* 値をもった化合物シネンセチンとタンゲレチンのペアを除いては、ほとんどが異なる *m/z* 値をもちます。シネンセチンとタンゲレチンは容易にクロマトグラフィーで分離することができるので、お互いに干渉することはありません。図 2 に、ジュース試料の UV（325 nm）と ACQUITY QDa 検出器のクロマトグラムを示しました。図 2 のように、シネンセチン（ピーク E）とタンゲレチン（ピーク H）は異なる保持時間で溶出します。ノビレチンとテトラメトキシスキュテラレインは部分的に重なっています。これらのピークの定量は、UV/Vis または PDA 検出を使用する場合には難しいのですが、ACQUITY QDa 検出器ではこれらの 2 つの分析対象をそれぞれ *m/z* 403.2 と 343.1 で選択的にモニターすることができるので問題になりません。

表 1．分析対象の分子イオンの m/z およびとモノアイソトピック質量

分析対象	分子イオン *m/z*	モノアイソトピック質量 (Da)
ナリルチン	581.2	580.18
ジオスミン	609.2	608.17
ヘスペレジン	611.2	610.19
ジジミン	595.3	594.19
シネンセチン	373.1	372.12
ノビレチン	403.2	402.13
テトラメトキシスキュテラレイン	343.1	342.11
タンゲレチン	373.1	372.12

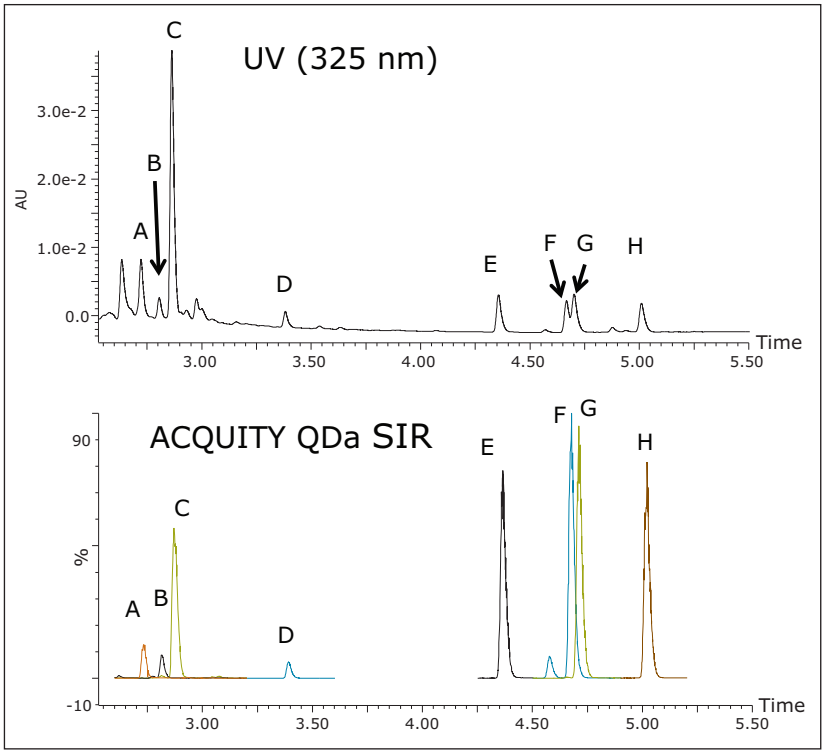

図 2. ジュース中のフラボノイドの UV および SIR クロマトグラム
A) ナリルチン、B) ジオスミン、C) ヘスペレチン、D) ジジミン、E) シネンセチン、
F) ノビレチン、G) テトラメトキシスキュテラレイン、H) タンゲレチン

ACQUITY QDa 検出器を選択することで、クロマトグラフィー条件の開発作業の簡素化が可能になります。化合物が選択的に検出できるのであれば、ベースライン分離できないクロマトグラフィー条件も許容されます。UV/Vis またはその他の光検出器では、構造的に類似の化合物を分離する場合にはすべての分析対象をベースライン分離することが必要であり、それには多くの場合より長い分析時間が必要になります。ここに示した分析法のカラムの平衡化を含めた注入サイクル全体の時間は、既存の分析法よりも少なくとも 1/4 の 13 分です。表 2 は、フルーツジュースの分析結果をまとめたものです。分析性能は、既存の QC 分析法に匹敵しています。

表 2. シトラスジュース中のポリフェノールの精度と再現性 (n=10)

分析対象	保持時間 (分)	精度 (%)	再現性 RSD (%)
ナリルチン	2.73	86	3
ジオスミン	2.81	139	8
ヘスペレジン	2.87	82	3
ジジミン	3.39	94	4
シネンセチン	4.36	103	4
ノビレチン	4.68	110	3
テトラメトキシスキュテラレイン	4.71	100	3
タンゲレチン	5.02	112	3

結論

従来使用されている光学検出器と比較して、ACQUITY QDa 検出器と Waters ACQUITY UPLC H-Class システムの組み合わせは、シトラスジュース中のフラボノイドの検出の選択性を増加させます。この改良された選択性によって、迅速かつ容易なクロマトグラフィー条件とより速くより効率的なサンプル調製手順を採用することが可能となり、分析法開発をシンプルにします。さらにこれらの改善は、労働生産性とサンプルのスループットを向上させます。また、ACQUITY QDa 検出器の使用の容易さと手頃な価格は、日常的な分析ラボのために必要なツールとなっています。

参考文献

1. HS Lee, BW Widmer. Phenolic compounds. In: LML Nollet, ed. *Handbook of Food Analysis.* New York: Marcel Dekker, 1996, 821-894.
2. G Gattuso, D Barreca, C Gargiulli, U Leuzzi and C Caristi. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* 2007, 12, 1641-1673.
3. AOAC Official Method 999.05 Naringin and Neohesperidin in Orange Juice, Official Method of Analysis, AOAC.
4. W Widmer. Determination of Naringin and Neohesperidin in orange juice by liquid chromatography with UV detection to detect the presence of grapefruit juice: collaborative Study. *J. AOAC Int.* 83(5): 1155, 2000.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、MassLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
ACQUITY QDa は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan.

2016年3月 720004985JA PDF