

[Technical Report No.26]

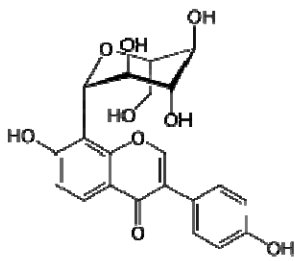
1.6 μ m UHPLCカラムを用いるポリフェノール類の分析

【はじめに】

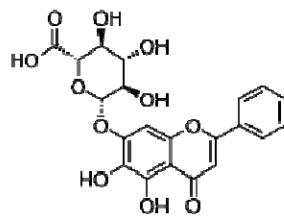
ポリフェノールは動脈硬化や生活習慣病を防ぐ抗酸化作用を持っており、健康食品や医薬品など様々な商品に展開されています。ポリフェノールを含む代表的なものには、お茶やワインに含まれている「カテキン」やブルーベリー、ムラサキイモに含まれる「アントシアニン」など、私たちの身近なところで存在しています。

弊社にもポリフェノールに関する問い合わせが増加しており、メソッドの作り方などをご提案させていただく機会も多い状況です。そこで、本レポートではUHPLCでポリフェノールを分析するためのメソッド開発についてご紹介します。

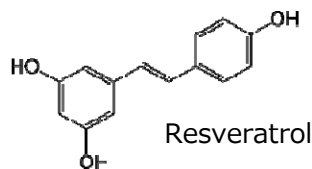
【測定対象としたポリフェノール類】



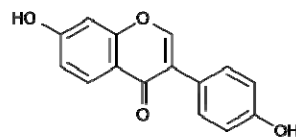
Puerarin



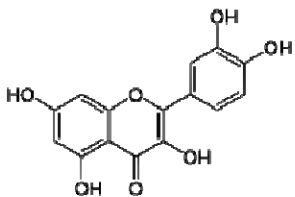
Baicalin



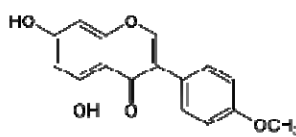
Resveratrol



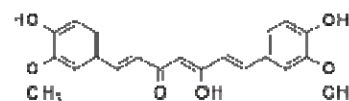
Daizein



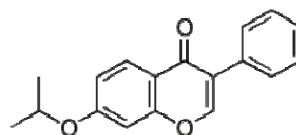
Quercetin



Biochanin A



Curcmin



Ipriflavone

【メソッド開発の手順－分析条件の構築－】

多成分分析であれば、親水性から疎水性化合物の差により(これだけではありませんが)、保持時間に差が生じるので、グラジエント溶出法を検討することになります。UHPLCではHPLCからのメソッド移管するのがスマートですが、このレポートではいきなりUHPLCからスタートする場合についてのメソッド開発を紹介します。とりあえずピークを検出する条件を既存の条件からソフトウェアを使用してメソッド移管することで容易にグラジエント条件を導きだすことができます。HPLCでデータを取ってからのほうが確実ではあるのですが、どうしても時間を節約したい方には打って付けの方法になるのではないのでしょうか？

今回は、Develosil Application Data No.104

「PTH-アミノ酸(20mixture)の分析」より移管しました。

【メソッド開発の手順－移動相の検討－】

メソッド開発には様々な条件検討を行うこととなりますが、予め決めておかなければならない事があります。それは、“最終的に何で検出するか”が重要となります。最終地点がUV検出器であれば様々な移動相を検討できますが、LC/MSでの検出となれば揮発性の溶媒しか使用できないのでUV検出からLC/MSへ移行するのであれば、初期の条件検討から揮発性の溶媒を選択する必要があります。

さらにこのレポートでは、pH調製の時間を省くために0.1%の添加剤を使用して検討を行いました。UV検出器であれば、酢酸・ギ酸・りん酸の使用が可能です。LC/MSではりん酸の使用が不可となりますので、強いて使用するといえればTFAになるかと思います。

【実践：ソフトウェアによるグラジエントメソッドの構築】

「Develosil Application Data No.104」の分析条件を使ってメソッド変換ソフトウェアへ入力します。下の条件にNo.104の分析条件を入力後、使用するカラムの粒子径とサイズを入力するだけで、分析時間と流速が導き出されます。

ここで出された条件のうち、流速は0.375mL/min→0.5 mL/minへ変更しました。これは、Develosil UHPLCカラムの最適流速が0.5mL/minであるところによります。これらの情報だけで分析へと持ち込むことができます。

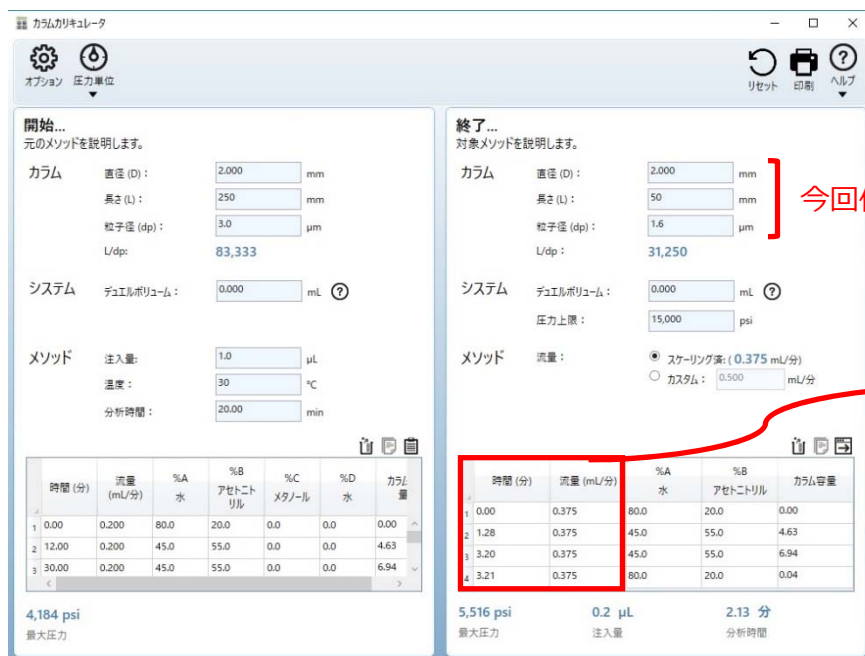


図 カラム仮キュレーターによる分析条件の構築

【実践：移動相の選択】

今回、移動相には0.1%りん酸および0.1%ギ酸を選択しました。どちらの移動相もピペットだけで調製が可能なので、時間もかからず、ヒューマンエラーも起こり難いという利点があります。しかし、前述の通り、りん酸はLC/MSにおいて使用できないため、ギ酸で運用する必要があります。

また、今回測定対象としている化合物の中にQuercetinという化合物がテーリング傾向にあることが分かっています。配位性も強いいためか、キャリーオーバーになることもありますが、りん酸を使用することで、これらの問題点が回避された経緯がありましたので、移動相の検討に追加しました。

【構築されたファーストメソッド】

ここまでの情報をもとに分析条件を設定しました。

Conditions;

Column: Develosil UHPLC C18, 1.6μm
Size: 2.0x50mm

Mobile phase: A) Water + 0.1% HCOOH

B) Acetonitrile + 0.1% HCOOH

Gradient:	min	mL/min	%A	%B	Curve
	0.00	0.5	80	20	6
	1.28	0.5	45	55	6
	3.20	0.5	45	55	6
	3.21	0.5	80	20	6

Temperature: 40°C

Detection: UV260nm

Sample: Polyphenols

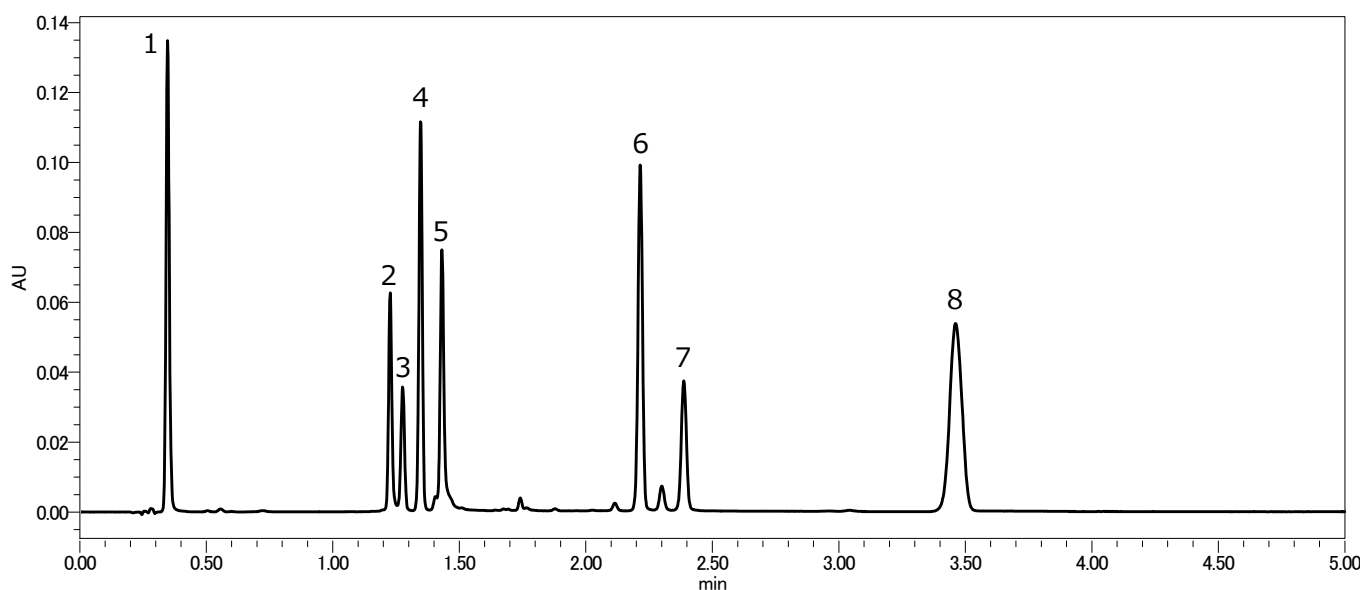
Injection volume: 0.2μL

System: Waters AQUITY UPLC H-Class Plus

Mixer: 100μL

【0.1% HCOOHによるポリフェノール類の分析】

前項より構築されたメソッドを元に分析した結果を示します。



Sample:

1. Puerarin
 2. Baicalin (37.93)
 3. Resveratrol (2.00)
 4. Daidzein (2.75)
 5. Quercetin (3.31)
 6. Biochanin A (26.69)
 7. Curcmin (4.85)
 8. Ipriflavone (16.70)
- ※()内は分離度を示しています

8: Ipriflavoneのピークがメソッド遂行後に溶出しているのでグラジエントを少しだけアレンジしました。

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.5	80	20	6
1.28	0.5	45	55	6
3.60	0.5	45	55	6
3.61	0.5	80	20	6

設定された条件にて、8種のポリフェノールは完全に分離されました。グラジエント溶出のメソッドをアレンジすることで、2-5間の分離改善など、さらに良い結果が期待できます。

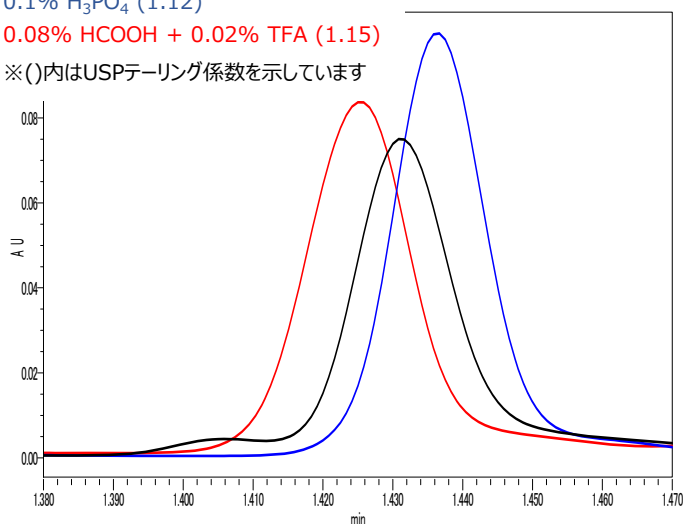
【添加剤の違いによるケセルチンのピーク形状】

上記データのメソッドより添加剤を変更した際のUSPテーリング係数を示します。比較対象は、0.1%ギ酸を基準に、0.1%りん酸、(0.08%ギ酸+0.02% TFA)にて実施しています。0.1%ギ酸においてはUSPテーリング係数が1.43と若干のテーリングが認められますが、比較的良好的な範囲といえ、他の2種の移動相においてはさらに良い結果が得られています。

LC/MSへの導入を考慮した場合、0.1%ギ酸をファーストメソッドとし、より良い結果をだすのであれば(0.08%ギ酸+0.02%TFA)も試す価値があり、懸念される0.1%TFAの使用に比べ、大幅に汚染等が回避できるのではないかと考えます。

- 0.1% HCOOH (1.43)
- 0.1% H₃PO₄ (1.12)
- 0.08% HCOOH + 0.02% TFA (1.15)

※()内はUSPテーリング係数を示しています



【各種移動相条件におけるテーリング係数および分離度】

各種移動相条件にて得られた結果より各化合物のテーリング係数および分離度を示します。当初より懸念されたいいたケセルチンのテーリング係数はりん酸を使用することにより1.43→1.12と改善され、よりシャープなピーク形状が得られました。また、0.08% HCOOH+0.02% TFAでもりん酸を使用した時とほぼ同等の効果が得られることが分かりました。

分離度の観点から、BaicalinとResveratrol間の分離が際どい領域となりますが、中でも0.1% HCOOHが最も良い分離度を示した。分離度はグラジエントメソッドをアレンジすることで解決できる可能性が十分に期待できます。

Compound	0.1% HCOOH		0.1% H ₃ PO ₄		0.08% HCOOH +0.02% TFA	
	Tailing	Rs	Tailing	Rs	Tailing	Rs
Puerarin	1.11		1.22		1.11	
Baicalin	1.15	37.93	N.D.	39.98	N.D.	36.98
Resveratrol	0.95	2.00	N.D.	1.22	N.D.	1.16
Daidzein	0.99	2.75	1.02	2.68	0.96	2.53
Quercetin	1.43	3.31	1.12	3.44	1.15	3.08
Biochanin A	0.99	26.69	1.01	27.34	0.95	24.83
Curcmin	1.01	4.85	1.02	4.88	0.96	4.49
Ipriflavone	1.01	16.70	1.03	16.79	1.00	16.20

■オーダーインフォメーション/Order Information

Develosil UHPLC 1.6μm Series

Size	C30	C18	C8	C1	HILIC
2.0x35mm	201-I20035W	202-I20035W	203-I20035W	204-I20035W	205-I20035W
2.0x50mm	201-I20050W	202-I20050W	203-I20050W	204-I20050W	205-I20050W
2.0x75mm	201-I20075W	202-I20075W	203-I20075W	204-I20075W	205-I20075W
2.0x100mm	201-I20100W	202-I20100W	203-I20100W	204-I20100W	205-I20100W
2.0x150mm	201-I20150W	202-I20150W	203-I20150W	204-I20150W	205-I20150W

Develosil UHPLC 1.6μm Metal-free Series

Size	C30	C18	C8	C1	HILIC
2.0x35mm	201-I20035MFW	202-I20035MFW	203-I20035MFW	204-I20035MFW	205-I20035MFW
2.0x50mm	201-I20050MFW	202-I20050MFW	203-I20050MFW	204-I20050MFW	205-I20050MFW
2.0x75mm	201-I20075MFW	202-I20075MFW	203-I20075MFW	204-I20075MFW	205-I20075MFW
2.0x100mm	201-I20100MFW	202-I20100MFW	203-I20100MFW	204-I20100MFW	205-I20100MFW
2.0x150mm	201-I20150MFW	202-I20150MFW	203-I20150MFW	204-I20150MFW	205-I20150MFW

■お問い合わせ/Contact us



野村化学株式会社

〒489-0004 愛知県瀬戸市日の出町15
Tel: 0561-48-1853 Fax: 0561-48-1434
e-mail: info@develosil.net

Nomura Chemical Co., Ltd.

15, Hinode-cho, Seto, 489-0004, Japan
Tel: +81-561-48-1853 Fax: +81-561-48-1434
e-mail: info@develosil.net

Develosil USA

Develosil USA

10060 Carroll Canyon Rd. Ste. 100 San Diego, CA 92131
Phone: 858-800-2433
Web: <https://develosil.us/>