

アンペロメトリックおよびクーロメトリック検出器を装備した 高速液体クロマトグラフによるブドウ飲料中のフェノール類の定量法

村上 和雄*, 渡邊 快記*, 館野 つや子**

(平成 20 年 9 月 30 日受理)

Determination of Polyphenols in Grape Drinks by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric and Coulometric Detection

MURAKAMI, Kazuo WATANABE, Hayaki and TATENNO, Tsuyako

(Received on September 30, 2008)

キーワード：ポリフェノール, HPLC, アンペロメトリック検出器, クーロメトリック検出器

Key words: polyphenol, HPLC, amperometric detection, coulometric detection

1. はじめに

著者らは、いろいろな状態(固体, 液体, 半固体)の試料中に存在する電気化学的に活性なフェノール類を高速液体クロマトグラフィーで分離し、電気化学的に検出する分析法を研究している。本研究では、ブドウ飲料中に含まれるミリセチン, レスベラトロール, ケルセチン, ケンフェロールの4物質の分析法を検討し、確立できた測定法で定量を試みた。また、通常アンペロメトリック電気化学的検出器と作用電極に多孔性炭素電極を用いたクーロメトリック検出器の応答の違いも検討した。

ミリセチン, レスベラトロール, ケルセチン, ケンフェロールなどのポリフェノール類は、ここ数年健康への関心が高まるに従い見聞する機会が多い。その効果も動脈硬化, 心筋梗塞, 脳梗塞, がんなどの原因となる活性酸素を抑制させる抗酸性があり、またアンチエイジング, コレステロールを低下させるなど多くの健康によい効果があると研究で明らかにされている。

2. 実験

2.1 試薬

本研究で標準品として用いたミリセチンはシグマ製, レスベラトロールはシグマ製, ケルセチンは和光純薬製, ケンフェロールは和光純薬のものを用いた。移動相に用いたアセトニトリルは和光純薬製HPLC用, McIlvaine 緩衝溶液に用いたクエン酸, リン酸水素二ナトリウムは和光純薬製特級であった, その他, 用いた試薬はすべて特級である。移動相, 緩衝溶液を調製した水はミリポア製Milli-Q純水装置から得たものを使用した。

* 環境情報学科環境分析研究室

** 栄養科食品衛生学第一研究室

2.2 装置

アンペロメトリック検出器装備高速液体クロマトグラフでは、ポンプは昭和電工製ポンプDS-10型, アンペロメトリック検出器はBioanalytical (BAS) 製LC-4A型, 作用電極はグラシーカーボン電極, 参照電極は銀/塩化銀電極, 対極はステンレスであった。クーロメトリック検出器装備高速液体クロマトグラフでは、ポンプは、日立製ポンプL-2130型, クーロメトリック検出器はESA製Coulchem III, 作用電極は多孔性炭素電極, 参照電極はパラジウム(Pd)電極, 対極は白金であった。データ処理装置はSICクロマトコーダー21およびKipp&Zonen記録計BD-111型を用いた。分離カラムは昭和電工製逆相カラムShodexC18M 4D(5 μ m, 4.6mm \times 150mm), インジェクターはRheodyne7125(20 μ Lループ)を用いた。

2.3 移動相

移動相はアセトニトリル-0.15M McIlvaine 緩衝溶液(28:72,vol%)で、流量は0.8mL/minであった。

2.4 試料および測定試料の調製

試料は市販の赤・白ワイン, ブドウジュースを選んだ。そして、それらを10~50倍に希釈し、0.4 μ mのマイクロフィルターでろ過後、この溶液5 μ LをHPLCに導入した。

3. 結果および考察

3.1 HPLCの分離条件

ミリセチン, レスベラトロール, ケルセチン, ケンフェロール4物質の分離条件を、移動相にメタノール-水系とアセトニトリル-水系について検討した。分離度, ピークの形状, 溶出時間等からアセトニトリル-水系とした。移動相の保持値に影響するファクターには、緩衝溶液濃度, pH, アセトニトリル濃度がある。

McIlvaine 緩衝溶液濃度0.02~0.20Mで、pH2.0~4.5

で検討した。緩衝溶液濃度 50 mM と 150 mM ではピーク高さに 2 倍の差があり、濃度が高いほどピークが高くなる傾向が見られたが、カラムの寿命を考慮して 0.15 M とした。また、保持時間への pH への影響は見られなかったが、シャープなピークを示す pH 3.5 とした。次に pH 3.5、緩衝溶液濃度 0.150 M で、アセトニトリル濃度 25~45% での保持時間への影響を検討した。Fig.1 はアセトニトリル濃度の 4 種化合物の保持時間への影響である。アセトニトリル濃度の増加とともに保持時間は大きく変化した。アセトニトリル濃度は、4 物質の分離がよく、20 分以内にすべて溶出する 28% にした。以上の結果より、移動相はアセトニトリル-0.15 M McIlvaine 緩衝溶液 (0.15 M, pH 3.5) (28:72 vol%) とした。流量は 0.8 mL/min とした。

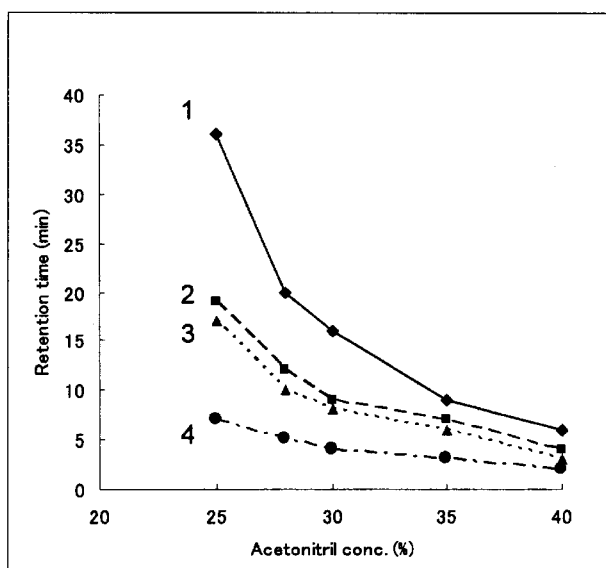


Fig.1 Effect of Acetonitril in mobile phase on the retention time of four polyphenols (10 ng injected)
 1. kaempferol 2. quercetin 3. resveratrol 4. myricetin
 HPLC conditions: ODS column (150 mm × 4.6 ID);
 Column temperature: 25°C; mobile phase:
 Acetonitril-McIlvaine buffer solution (28:72, v/v),
 flow rate: 0.8 mL min⁻¹, Detector : applied pot. amperometric detector 0.80 V vs Ag/AgCl, coulometric detector 0.78 V vs Pd

3.2 アンペロメトリックおよびクーロメトリック検出器の設定電位

電気化学的に活性な物質を検出するには、電解酸化あるいは電解還元し、そのときの電解電流、または電流量を測定する必要がある。その場合、適切な電解電位が必要である。この電位がベースラインの安定性、感度に影響を与える。一般に有機化合物の検出には、電解酸化が利用され、フェノール化合物はフェノール基が酸化されてキノン構造になるが、このときの電流が定量に利用される。

Fig.2 は、アンペロメトリック検出器の場合の検出器の電位とピーク高さの変化 (0.8 V のピーク高さを 1 とした =

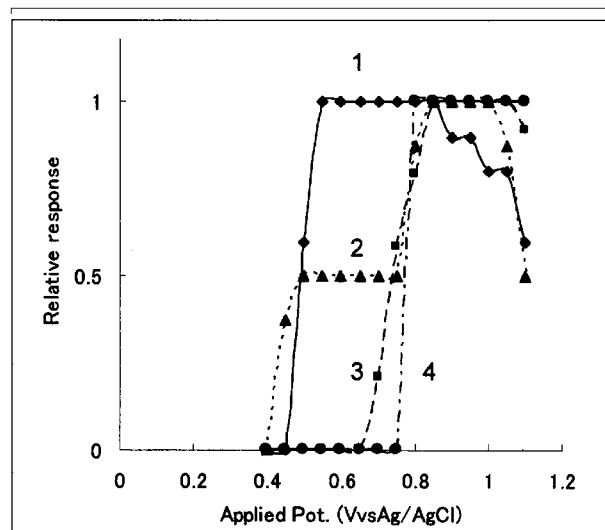


Fig.2 Hydrodynamic voltammograms of four polyphenols with amperometric detection (10 ng injected)
 1. kaempferol 2. quercetin 3. resveratrol 4. myricetin
 HPLC conditions are as in Fig.1

相対感度) を示した (ハイドロダイナミックボルタモグラム)。4 物質とも電位の増加とともにピーク高さが大きくなる。ある電位より大きくなると、ピーク高さは一定の高さ (プラトー) になっている。4 物質の相対感度がプラトーとなる 0.80 V を検出器の設定電位とした。

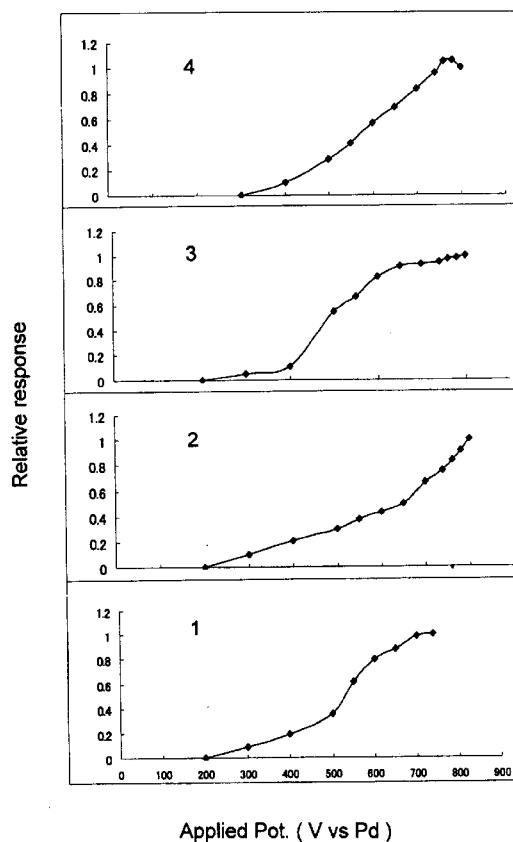


Fig.3 Hydrodynamic voltammograms of four polyphenols with coulometric detection (10 ng injected)
 1. kaempferol 2. quercetin 3. resveratrol 4. myricetin
 HPLC conditions are as in Fig.1

Fig.3はクーロメトリック検出器の4物質のハイドロダイナミックボルタモグラムである。Fig.2とは大きく異なる。これは、作用電極が多孔性炭素であるため作用電極中で測定成分100%が電解酸化される。そのために、一ステップのハイドロダイナミックボルタモグラムになると考えられる。一方、アンペロメトリック検出器の場合は、作用電極表面で電解されるのは、測定成分の数%程度であるので電位を変化させるとボルタモグラムに近いハイドロダイナミックボルタモグラムになると考えられる。クーロメトリック検出器では、対極にPdを使用しているが、設定電位は0.8V以下に設定しないと電極に不都合が生じるためそれ以下の電位で測定してた。4物質ともプラトー部が0.80V近くにあったので、設定電位は、0.78Vとした。以上の結果より、アンペロメトリック検出器の設定電位は0.80V、クーロメトリック検出器は0.78Vにした。

3.3 4種フェノール化合物のクロマトグラム

Fig. 4, 5は3.1, 3.2で検討した測定条件で得られた2つの検出器で測定した4種のクロマトグラムである。4物質の溶出順序は、ミリセチン、リスベラトロール、ケルセチン、ケンフェロールで、20分以内で分離・検出できた。二つのクロマトグラムには差がみられた。アンペロメトリック検出器によるクロマトグラムは非常に分離のよいシャープなピークを示している。一方、クーロメトリック検出器もミリセチン、リスベラトロール、ケルセチン、ケンフェロールの順に同じ保持時間で溶出した。

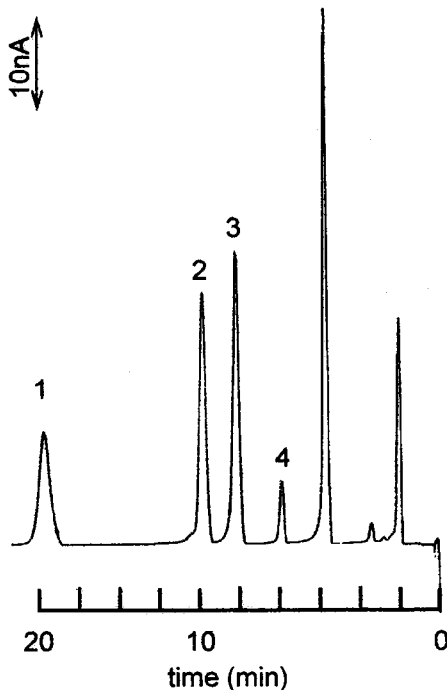


Fig.4 Typical chromatogram of four polyphenols with amperometric detection(10 ng injected)
1. kaempferol 2. quercetin 3. resveratrol
4. myricetin
HPLC conditions are as in Fig.1

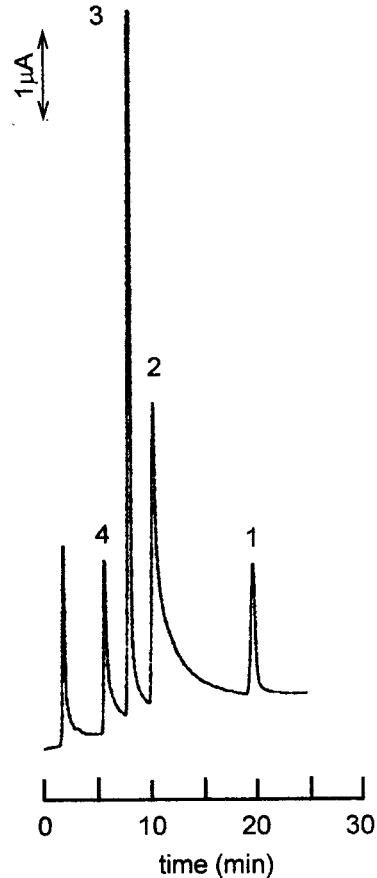


Fig.5 Typical chromatogram of four polyphenols with coulometric detection (10 ng injected)
1. kaempferol 2. quercetin 3. resveratrol
4. myricetin
HPLC conditions are as in Fig.2

3.4 直線性と検出限界

3.3で示した測定条件で、2つの検出器による4種化合物濃度と対応するピーク高さとの直線性を検討した。アンペロメトリック検出器では、4物質とも 10^{-11} ~ 10^{-9} gの範囲で、相関係数 $r=0.999$ の良好な直線性を示した。また、クーロメトリック検出器では、 10^{-12} ~ 10^{-9} gの範囲で、相関係数 $r=0.999$ の良好な直線性を示した。

電気化学的検出法は、他の検出器を比べると高感度、高選択性の検出器であるが、同じ電気化学検出器でもアンペロメトリック法とクーロメトリック法でも感度に差がある。一般的に、原理からみるとクーロメトリック検出法の方が100倍程度感度が高い。S/N=3にしたときの、アンペロメトリック検出器の最小検出量は、ミリセチン32 pg, リスベラトロール30 pg, ケルセチン27 pg, ケンフェロール35 pgであった。一方、クーロメトリック検出器の場合は、ミリセチン0.52 pg, リスベラトロール0.60 pg, ケルセチン0.54 pg, ケンフェロール0.65 pgであった。

3.5 実試料への応用

試料溶液の調製 市販の赤ブドウ酒、ブドウジュースは5 mLを50 mLに、白ブドウ酒10 mLは50 mLに、それぞ

れ純水で希釈し試料溶液とした。測定前に、0.4 μ mのマイクロフィルターでろ過後、HPLCに導入した。

3.6 市販ブドウ飲料中の4物質の定量

これまで述べてきた方法で、ぶどう飲料中のミリセチン、リスベラトロール、ケルセチン、ケンフェロール濃度の測定結果をtable1に示した。

Table 1 ブドウ飲料中のミリセチン、リスベラトロール、ケルセチン、ケンフェロールの濃度 (mg/L)

4物質 (配糖を含まず)	赤ワイン	白ワイン	ブドウジュース
ミリセチン	0.93	0.39	0.78
ケルセチン	3.77	0.11	1.47
リスベラトロール	0.70	0.12	0.37
ケンフェロール	0.68	—	—

Fig.6,7は赤ワインとブドウジュースのクロマトグラムである。本分析法は、ブドウ飲料試料を純水で希釈しただけであるの回収率は100%と見なした。測定結果は、赤ブドウ酒には4物質が含まれていたが、白ワイン、ブドウジュースにはケンフェロールは検出されなかった。白ワインには、ぶどうの皮が使われていないのでケンフェロールが検出されないことが予想される。ブドウジュースには、ケンフェロールが検出されなかったが、これはジュースの加工法、

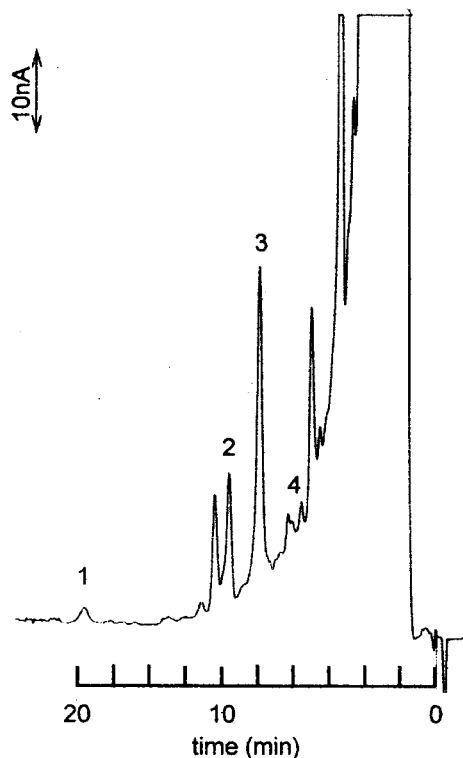


Fig.6 Chromatogram of four polyphenols in a red wine with amperometric detection

1. kaempferol 2. quercetin 3. resveratrol
4. myricetin

Experimental conditins as in Fig.1

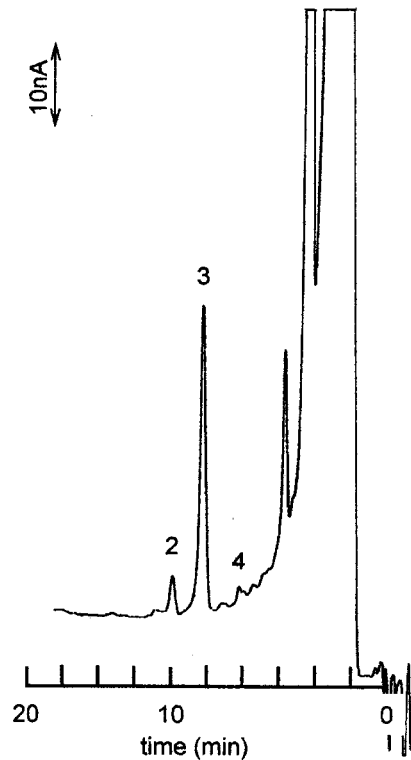


Fig.7 Chromatogram of four polyphenols in a grape juice with amperometric detection

1. kaempferol 2. quercetin 3. resveratrol
4. myricetin

Experimental conditins as in Fig.1

ぶどうの種類等で検出されないことがあると考えられる。上記の測定値は、他の分析法で測定された値とほぼ一致するので、本法はこれら4物質を定量するのに有効な方法と考えられる。

以上のように本定量法は、逆相カラムにODSを用い、移動相にアセトニトリル-Malivain緩衝液(0.15M pH 3.5)(28:72 vol%)を用いることにより、ミリセチン、リスベラトロール、ケルセチン、ケンフェロールの4物質を20分以内に分離でき、アンペロメトリック検出器とクロメトリック検出器を用いることにより、目的成分を高感度、高選択的に検出できた。この測定法をブドウ飲料に応用し、簡単な前処理法で迅速に定量することができた。

最後に、本研究にご協力いただいた環境情報学科環境分析研究室卒業研究生細沼利佳子、瀧上真梨子、加藤木彩、手塚真理江の諸君に感謝します。

Abstract

The simultaneous determination of four polyphenols, myricetin, resveratrol, quercetin and kaempferol in grape drinks was performed by liquid chromatography (HPLC) with amperometric and coulometric detection. The four polyphenols were separated on a ODS C18 reversed-phase column by isocratic elution with a mobile phase of 0.15 M Macchelven buffer pH 4.5-acetonitril (72:28%,v/v) at a flow rate 0.8 mL min⁻¹. The limit of detection polyphenols (S/N=3) was in the 27-35 pg (amperometric detection) and in the 0.52 ng-0.65 pg (injected mass) range at an applied potential of 0.80 V vs Ag/AgCl and 0.780 V vs Pd. Peak heights for the polyphenols were found to be linearity related to the amount injected from 0.1 pg to 1 ng ($r > 0.999$) and from 1 pg to 1 ng ($r > 0.999$). The present method minimizes troublesome and time-consuming pretreatment procedure, and it was applied to the determination of polyphenols in grape drinks.