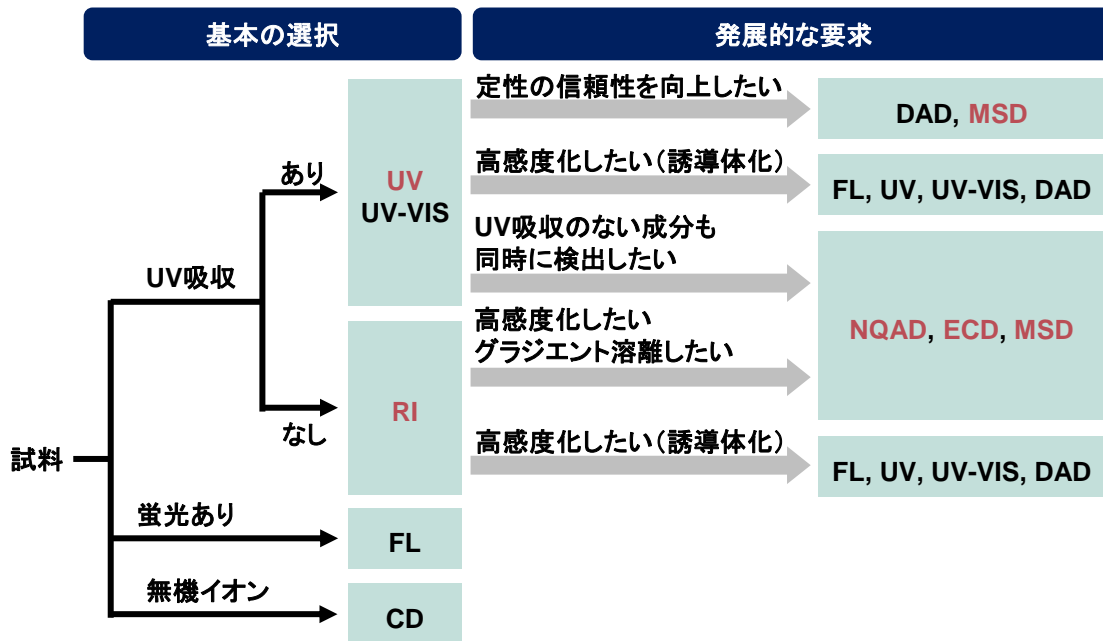


適切な検出器の選択（牛乳中の糖類の分析）

HPLCで正しく定性・定量分析を行うには成分の性質と測定のために合わせて検出器を選択することが重要です。新しく分析したい試料があるとき、UV吸収があるかどうか、蛍光を発するか、無機イオンかどうかによって検出器を選ぶのが基本の選択になります。さらに発展的な要求がある場合は、下記のフローチャートのように他の検出器を検討します。今回は牛乳および低ラクトース牛乳中の糖類の分析を例に、下記のフローチャートで赤字で示した検出器の特長比較を行いました。



高速液体クロマトグラフ Chromaster®

UV検出器

- ✓ 糖類はわずかにUV吸収があるため UV検出器で測定しましたが、標準溶液(各1000 mg/L)のグルコース・ラクトースのピークは非常に小さく、マルトトリオースは検出できませんでした。
- ✓ 牛乳および低ラクトース牛乳中の糖類は検出できず、UV検出器では低濃度の糖類の検出は難しいことがわかりました。

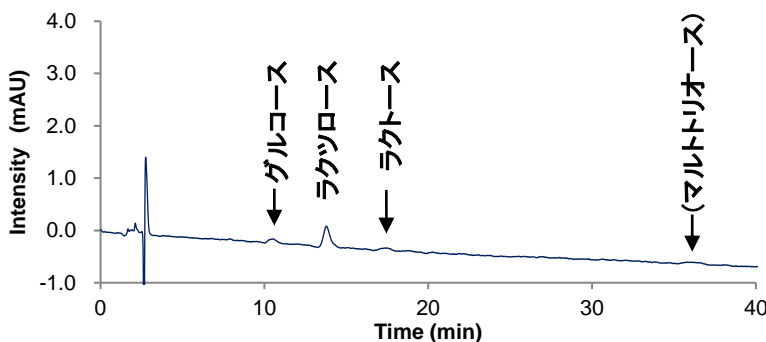


図1 標準溶液(各1000 mg/L)のクロマトグラム

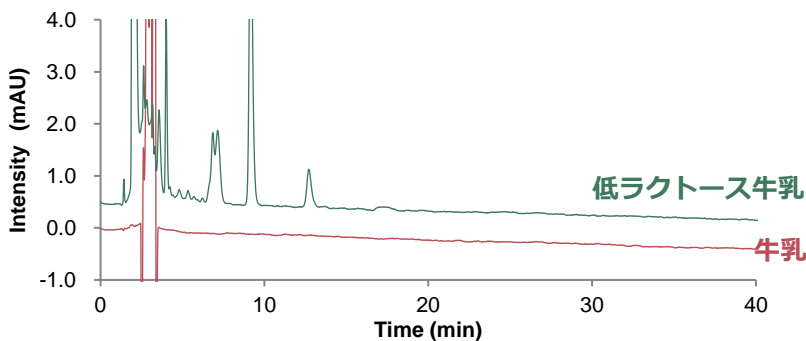


図2 牛乳および低ラクトース牛乳のクロマトグラム

表1 糖類の測定条件(UV検出器)

カラム	Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mmI.D. x 250 mm)
ガードカラム	Shodex Asahipak NH2P-50G 4A
移動相	水/アセトニトリル (23/ 77)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
検出波長	210 nm
注入量	10 μL

【牛乳および低ラクトース牛乳の前処理方法】

- 1) サンプル1 gを80%アセトニトリルで10 mLに定容
- 2) 3000 min⁻¹, 10 min 遠心分離
- 3) 上澄みフィルタろ過
- 4) 低ラクトース乳のろ液のみ80%アセトニトリルで2倍希釈

示差屈折率(RI)検出器

- ✓ 溶液中で光が屈折することを利用して成分を検出するRI検出器は、UV吸収のない成分も検出することができます。
- ✓ UV検出器では検出できなかった標準溶液中のマルトトリオースは検出できましたが、低ラクトース牛乳中のラクツロース、ラクトースは検出できず、RI検出器でも牛乳中の糖類を分析するには感度が不十分でした。

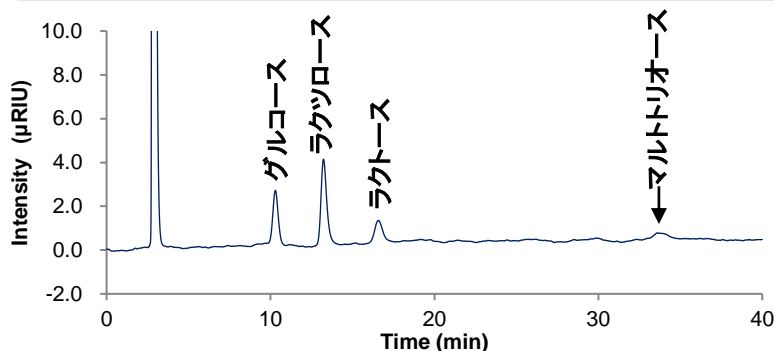


図3 標準溶液 (各1000 mg/L) のクロマトグラム

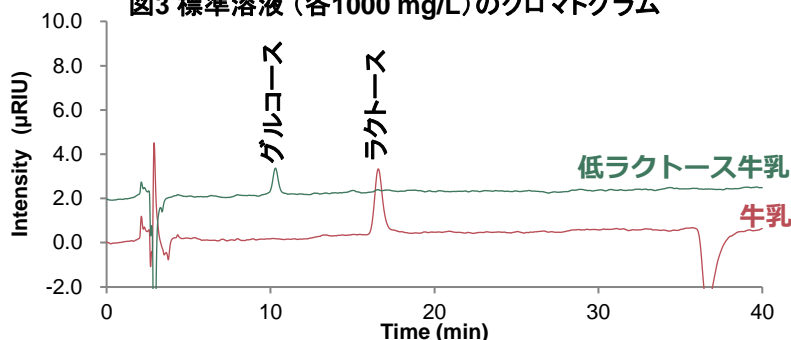


図4 牛乳および低ラクトース牛乳のクロマトグラム

表2 糖類の測定条件(RI検出器)

カラム	Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mmI.D. x 250 mm)
ガードカラム	Shodex Asahipak NH2P-50G 4A
移動相	水/アセトニトリル (23/ 77)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	10 μL

【牛乳および低ラクトース牛乳の前処理方法】

- 1) サンプル1 gを80%アセトニトリルで10 mLに定容
- 2) 3000 min⁻¹, 10 min 遠心分離
- 3) 上澄みフィルタろ過
- 4) 低ラクトース乳のろ液のみ80%アセトニトリルで2倍希釈

エアロゾルベース検出器 NQAD

- ✓ 大阪ソーダ製のエアロゾルベース検出器NQADはUV吸収の有無に関わらず半不揮発性/不揮発性化合物を幅広く検出することができます。NQADでは牛乳・低ラクトース牛乳中の糖類を検出し、定量に十分な強度が得られました。

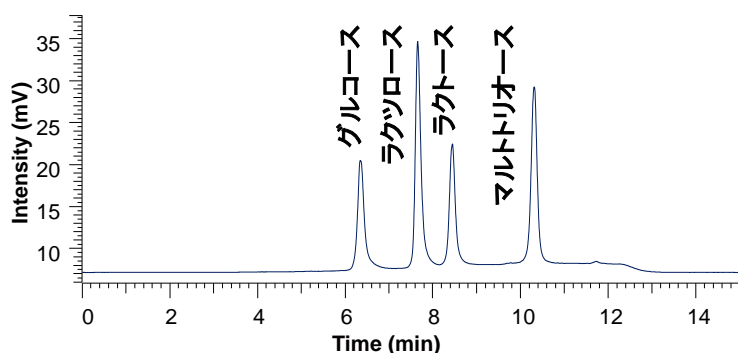


図5 標準溶液 (各100 mg/L) のクロマトグラム

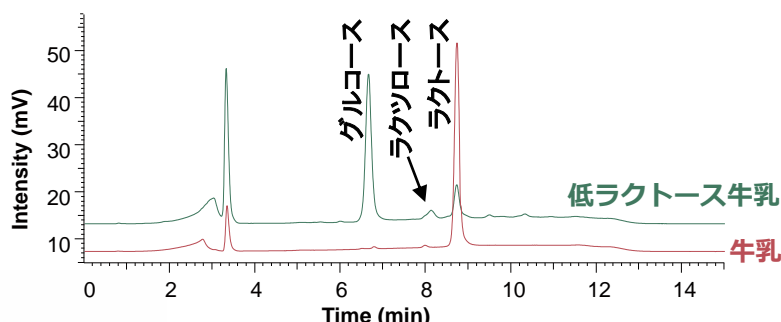


図6 牛乳および低ラクトース牛乳のクロマトグラム



NQAD (大阪ソーダ製)

表3 糖類の測定条件(NQAD)

カラム	Gelpack GL-MH100 (4.6 mmI.D. x 150 mm)
移動相	A : 水、B : アセトニトリル B 80%(0 min)→60%(10 min)→ 80%(10.1 min)→80%(15 min)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
注入量	10 μL
NQAD条件	ネブライザー温度: 30°C エバポレーター温度: 35°C

詳細は「ASLC-065 HPLC-NQADにおける牛乳および低ラクトース飲料の糖類の分析」をご参照ください。

電気化学検出器 (ECD)

- ✓ ジーエルサイエンス製電気化学検出器 ED743は電気化学的に酸化・還元しやすい化合物を高感度に検出します。
- ✓ 標準溶液 (グルコース、ラクトース 各5 mg/L)、牛乳中のラクトースを高強度に検出しました。
- ✓ ECDは酸化・還元物質を特異的に検出するので、夾雑成分の妨害が少ないという特長もあります。

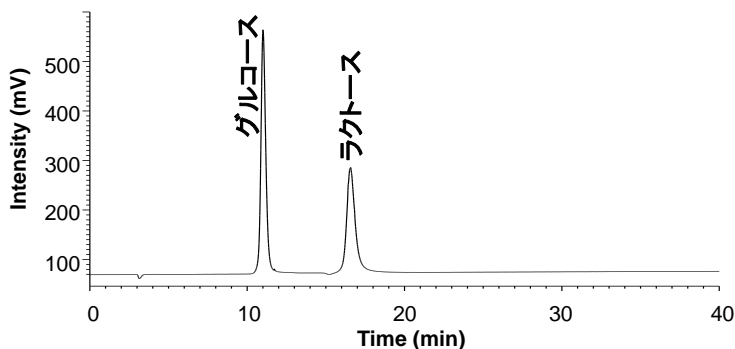


図7 標準溶液 (各5 mg/L) のクロマトグラム

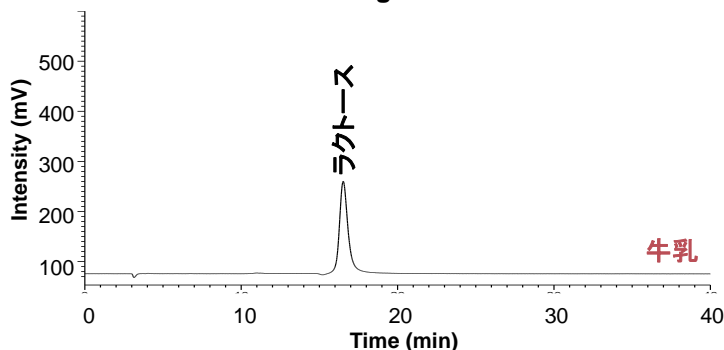


図8 牛乳のクロマトグラム



ED743
(ジーエルサイエンス製)

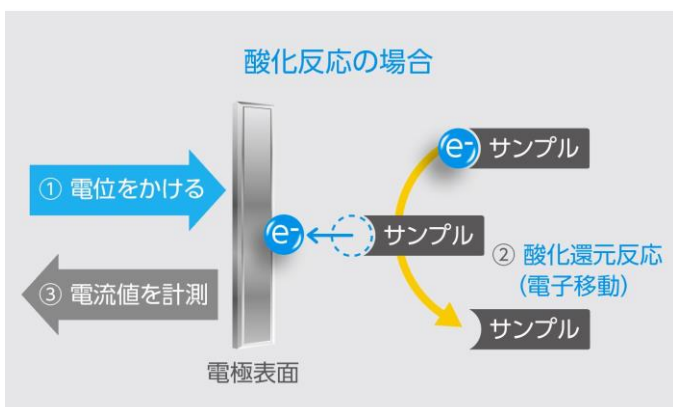
表4 糖類の測定条件 (ECD)

カラム	InertSphere Sugar-1 5um (4.6 mm I.D. x 150 mm) ジーエルサイエンス製
移動相	100 mM NaOH in H ₂ O
流速	0.5 mL/min
カラム温度	30°C
注入量	10 µL
検出	ECD Pulse Mode (ED743, Gold)

【牛乳の前処理方法】

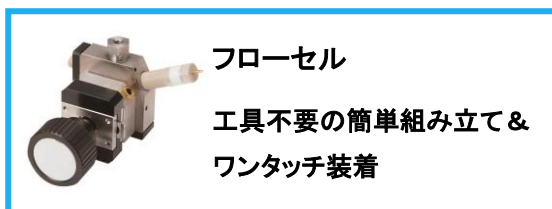
超純水で10000倍希釈

ECDの原理



- ① 検出器セル内の電極に電位を印加します。
- ② 物質が電極表面に移動し、酸化還元反応 (電子移動) が起きます。
- ③ 電子移動が起こることによって流れた電流を測定します。

電流値は反応した物質の量に比例する → 定量が可能



フローセル部分拡大 (Flow cell part enlargement)

質量検出器 (MSD)

- ✓ 濃度 1000 mg/Lの標準液を測定したところ、4種の糖をすべて検出できました。しかしながら、感度差が大きく、また、ラクトース、マルトリアースの強度が低いため、牛乳中の糖類の定量には適さないことがわかりました。
- ✓ MSDでは成分間の感度差が大きいためにありますが、図10のように成分を保持時間だけでなくMSスペクトルでも確認できるため、定性の信頼性が向上します。

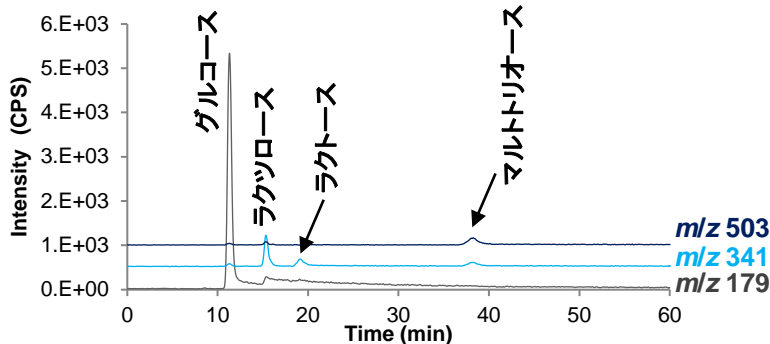


図9 標準溶液 (各1000 mg/L) のクロマトグラム

表5 糖類の測定条件 (MSD)

カラム	Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mmI.D. x 250 mm)
ガードカラム	Shodex Asahipak NH2P-50G 4A
移動相	10 mM酢酸アンモニウム水溶液/アセトニトリル (23/ 77)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
MS条件	ESI negative
注入量	10 µL

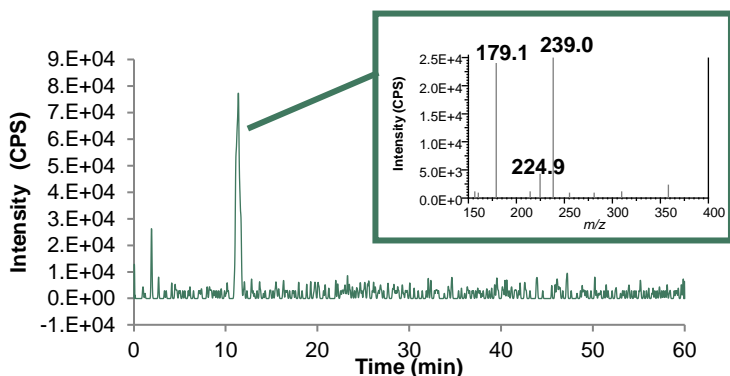


図10 低ラクトース牛乳のトータルイオンクロマトグラム (scan)

【低ラクトース牛乳の前処理方法】

- 1) サンプル1 gを80%アセトニトリルで10 mLに定容
- 2) 3000 min⁻¹, 10 min 遠心分離
- 3) 上澄みフィルタろ過
- 4) ろ液を 80%アセトニトリルで2倍希釈

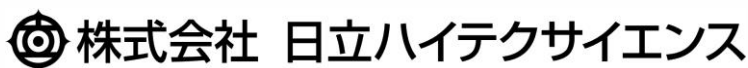
高速液体クロマトグラフ
Chromaster®



<主な装置構成>

Chromaster® 5160 ポンプ、5260 オートサンプラ、5310 カラムオープン、5410 UV検出器、5450 RI検出器、5610 質量検出器、AID、NQAD (大阪ソーダ製)、ED 743 (ジーエルサイエンス製)

ジーエルサイエンス株式会社 と株式会社 日立ハイテクサイエンスは本レポートを提携して作成しています。



【お問い合わせ先】

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行なっております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター 受付時間：9:00~12:00 13:00~17:00 (土日・祝日を除く)

☎ 04-2934-1100 ✉ info@glsc.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.gls.co.jp/technique/app/app_search.html

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。