

蒸発光散乱検出器 (ELSD) を用いた高速液体クロマトグラフィーによる乳糖の定量分析

三浦 誠*、上野 勝*、三浦 徹*、渡邊 裕之*、三枝 朋樹*

Quantitative Analysis of Lactose by HPLC with Evaporative Light Scattering Detection

Makoto MIURA*, Masaru UENO*, Toru MIURA*, Hiroyuki WATANABE* and Tomoki SAEGUSA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Monosaccharides and disaccharides are generally determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index detector (RID) in customs laboratories. However, this detector is not satisfactory for determining low concentrations of lactose because its baseline is unstable. This study investigated a method using an evaporative light scattering detector and a mobile phase consisting of tetrahydrofuran/water for gradient elution. This method showed high sensitivity to lactose and yielded more precise measurements than the HPLC method with RID.

1. 緒 言

2. 実 験

実行関税率表において、ミルク成分を含有する調製食料品は、その含有量が乾燥状態において全重量の 30%を境とし税率格差が大きい。このことから、粉乳又はホエイが配合された調製食料品にミルク成分として多く含まれる乳糖の定量を精度良く行うことは関税率表上重要となっている。現在、税関分析において高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により糖の定量分析を行う際には、固定相、移動相にそれぞれアミノカラム、アセトニトリル／水混液を、検出器には示差屈折率検出器 (RID) を使用する方法（以下、従来法とする。）が一般的である。しかし、輸入されるミルク調製品中のしょ糖及び乳糖は、その含有量に大きな差がある場合が多く、同時に定量する場合にカラムへの負荷を考慮し、しょ糖濃度を約 1%に希釈した試料溶液を HPLC へ導入すると、乳糖のピークは、高さが低く幅の広いプロードな形状になる。そのため、従来法では RID を用いた場合に生じるベースラインの乱れが乳糖を定量する際の測定誤差に影響することが懸念される。

蒸発光散乱検出器 (ELSD) は、RID と同様、光吸収の有無に関係なく物質の検出が可能な検出器であり、RID に比べ検出感度が高く、安定性の高いベースラインを得ることができる。そこで本研究では、ELSD を検出器とした乳糖の定量分析を検討することとした。

2. 1 試料及び試薬

しょ糖、乳糖（試薬特級、和光純薬）

ソルビトール（試薬特級、半井化学薬品）：内部標準

アセトニトリル、テトラヒドロフラン（HPLC 用、和光純薬）

ミルク調製品（輸入品）1 検体

硫酸亜鉛 7 水和物水溶液 (2.0%(W/V)) : 除タンパク剤

水酸化バリウム 8 水和物水溶液 (1.8%(W/V)) : 除タンパク剤

2. 2 装置及び測定条件

HPLC : Waters2695 (Waters)、Agilent1100 (Agilent)

カラム : Shodex Asahipack NH2P-50 4E (4.6 mmID × 250 mm)

Shodex Asahipack NH2P-50 G (Guard column)

カラム温度 : 40 °C

流量 : 1.0 ml

注入量 : 10 μl

検出器 : (1) ELSD : Waters2420 (Waters)

ドリフトチューブ温度 : 60°C

ネプライザー温度 : 30°C

移動相 : テトラヒドロフラン-水混合溶媒

水の割合を 10 分間で 20%から 35%までグラジエント法により変化させた。

次の分析までの平衡化時間を 8 分間とした。

(2) 示差屈折率検出器 : Agilent1100(Agilent)

検出器温度 : 40°C
移動相 : アセトニトリル : 水 = 77 : 23

2. 3 標準試料溶液の作製

本研究では、しょ糖 71%、脱脂粉乳 29%の割合で配合されたミルク調製品を想定し、測定条件の検討を行うこととした。この場合、脱脂粉乳中の乳糖値を 52.2%¹⁾ とすると全体に占める乳糖の割合は約 15%となる。そこで、しょ糖 7.1 g、乳糖 1.5 g を 100ml 容メスフラスコに精秤後、蒸留水で定容したものを標準試料溶液とした。

2. 4 ELSD による乳糖の測定条件の検討

糖の分析では、HPLC の移動相にテトラヒドロフランを用いた場合、アセトニトリルに比べ、しょ糖と乳糖の分離が良好であることが報告²⁾ されている。また、ELSD では、RID では行えないグラジエント法による溶出が可能であることから、乳糖ピーク形状の改善を目的とし、テトラヒドロフランによるグラジエント条件を検討した。

標準試料溶液をしょ糖濃度 2%、乳糖濃度 0.4%になるように希釈し、等量のテトラヒドロフランと混合後、HPLC に 10 μ l 注入し、ELSD による乳糖の測定条件を検討した。なお、内部標準濃度は 0.5%とした。

2. 5 検量線の作成

乳糖 1.0~6.0 mg/ml の濃度範囲における濃度比とクロマトグラムのピーク面積比から検量線を作成した。内部標準であるソルビトールの濃度はいずれも 5 mg/ml である。

2. 6 定量値の繰り返し測定による精度の確認

2.4 で検討した測定条件及び従来法により、標準試料溶液をしょ糖濃度 2%、乳糖濃度 0.4%になるように希釈し、等量のテトラヒドロフラン又はアセトニトリルで希釈した溶液 10 μ l を HPLC に繰り返し 5 回注入し、測定した乳糖の定量値から回収率及び相対標準偏差を求めた。同様の測定を 5 度にわたって行った。

2. 7 実際の輸入品サンプルの分析

ミルク調製品（輸入品）1.5 g を三角フラスコに量りとり、約 10 ml の蒸留水に溶かし、4%濃度のソルビトール（内部標準）を 12.5 ml 加えた。これに 2.0%硫酸亜鉛水溶液を 10 ml 加えて混合し、さらに 1.8%水酸化バリウム水溶液を 10 ml 加えて混合した後、ろ紙（ADVANTEC No.1）でろ過し、サンプル中のたんぱく質を除去した。このろ液を等量のテトラヒドロフランで希釈後、0.45 μ m のメンブレンフィルターを通して、測定用検液を得た。この検液 10 μ l を、繰り返し 5 回注入し、2.4 で検討した ELSD による測定条件により、乳糖の定量値を測定し相対標準偏差を求めた。同様の測定を 5 度にわたって行った。

3. 結果及び考察

3. 1 ELSD による乳糖の測定条件の検討

流速、溶離液の混合比、グラジエント時間を変化させ条件検討した結果、流速 1.0 ml/min、測定時間 10 分間でテトラヒドロフラン-水混合溶媒の水の割合を 20%から 35%まで変化させるグラジエント溶離を行うことで、RID で得られるクロマトグラムと比較し、乳糖の溶出時間が約 16 分から約 8.6 分へと半分に短縮され、しょ糖との分離も良好なクロマトグラムが得られた (Fig.1)。また、従来法に比べ乳糖のピークの SN 比を 5 倍向上させることができた。これは、乳糖ピークの広がりが抑えられシャープになったこと、また、クロマトグラムのベースラインノイズが大幅に減少したためと考えられる。

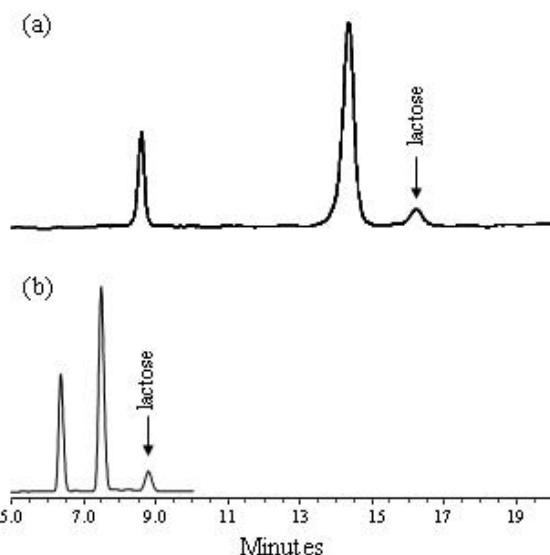


Fig.1 Chromatogram of a standard mixture : (a) RID chromatogram, (b) ELSD chromatogram.

3. 2 検量線の作成

乳糖の検量線は Fig.2 に示すように、1.0~6.0 mg/ml の濃度範囲で二次曲線による検量線で高い相関を示した ($R^2=0.9998$)。

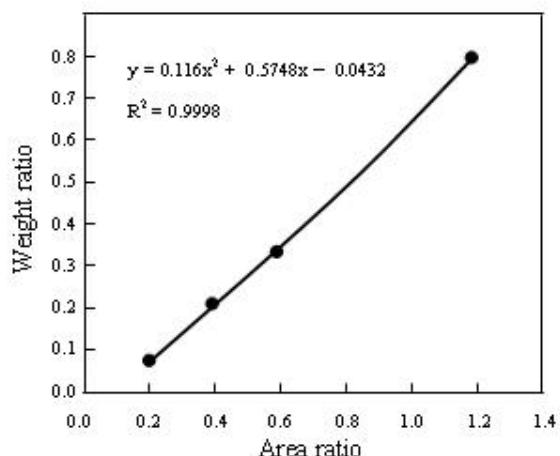


Fig.2 Calibration curve of lactose

3. 3 定量値の繰り返し測定による精度の確認

今回のELSDを使用した測定条件及び従来法について、乳糖を定量分析する上での精確さを比較するため、繰り返し測定時の相対標準偏差及び実際の添加量からの回収率を算出した(Table1)。相対標準偏差は、ELSDによる測定では0.22~1.07%、従来法による測定では4.75~5.79%であり、ELSDを使用した測定条件の方が繰り返し再現性に優れた方法であることを示している。

RIDによる定量では、乳糖の濃度が0.2%ではピークを確認するには十分であっても、ピーク形状がブロードであることからベースラインノイズの影響を大きく受け、安定した定量値を得ることが困難であった。

また、回収率については、RIDによる測定では、92.0~95.9%であったのに対し、ELSDによる測定では99.1~100.8%と良好な回収率が得られた。これらのことから、しょ糖濃度を1%、乳糖濃度を0.2%に希釈した試料溶液についてELSDを使用した測定方法は、従来法に比べてより精確な乳糖の定量が可能であるといえる。

Table 1 Comparison of results measured by ELSD and by RID

ELSD method		RID method	
Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)	Recovery(%)	RSD(%)
1 99.1	1.07	92.0	4.77
2 100.8	0.22	95.3	4.75
3 100.0	0.99	94.9	5.20
4 99.3	0.73	95.9	5.79
5 99.9	0.99	95.5	4.89

^a Mean of five measurements.

^b Relative standard deviation (n=5).

3. 4 実際の輸入品サンプルの分析

しょ糖、脱脂粉乳、デキストリン等を混合したミルク調製品として申告された輸入品について、今回検討したELSDによる測定条件により繰り返し測定を行い、相対標準偏差を算出した(Table2)。5度にわたる繰り返し測定の結果、相対標準偏差は0.16~0.86%であり、今回検討した方法により実際の輸入品についても含有乳糖の精度の高い定量分析が可能であることを確認できた。

Table 2 Relative standard deviation of milk preparation

	1	2	3	4	5
RSD ^a (%)	0.86	0.16	0.67	0.83	0.67

^a Relative standard deviation (n=5).

4. 要 約

蒸発光散乱検出器(ELSD)を用いた高速液体クロマトグラフィーによる乳糖の定量分析について検討を行った。示差屈折率検出器に比べてベースラインが安定しているELSDを用い、グリジエント溶出法により乳糖の定量を行うことで、乳糖濃度が0.2%であっても十分に精度の高い定量分析が可能であることが示された。本測定方法は、ミルク調製品中のしょ糖と乳糖の含有量に大きく差がある場合、HPLCへ導入する試料溶液のしょ糖濃度を1%程度に希釈しても、乳糖を精度良く定量することができる点で従来法よりも優れた測定方法といえる。

文 献

- 1) 佐々木林治朗 監修：“牛乳・乳製品ハンドブック”，P.421 (1967)，(朝倉書店)
- 2) 中村文雄、東郷雅子、廣瀬達也、岩本和郎：関税中央分析所報，36，9 (1997)