

ノート

糖の分析における高速液体クロマトグラフィーの移動相の検討

中 村 文 雄, 東 郷 雅 子, 廣 瀬 達 也, 岩 本 和 郎

Studies of mobile phases in sugar analysis by high-performance liquid chromatography

Fumio NAKAMURA, Masako TOGO, Tatsuya HIROSE and Kazuro IWAMOTO

*Osaka Customs laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka-shi, Osaka 552, Japan

Many HPLC techniques were reported in sugar analysis. In adsorption liquid chromatography acetonitrile-water were used as the mobile phase. Because of harmfulness of acetonitrile acetone-water, tetrahydrofuran-water and ethylalcohol-water were investigated as the mobile phases in sugar analysis by HPLC. In case of using acetone-water as the mobile phase, good results were obtained for determination of sucrose, lactose and sorbitol in sugar preparations.

1. 緒 言

税関分析において、輸出入食品中の糖類の含有率の定量は、関税率表上及び輸出入制度の取り扱いを決定するうえで重要な因子となっている。

HPLC による糖類の分離定量については、いくつかの研究があり^{1)~4)}、逆相系カラムを使用したものは、移動相として水を使用するが、二糖類相互の分離が十分でなく、またカラム温度を高温にしなければならず、順相系カラムを使用したものは、移動相として劇物であるアセトニトリルを使用している。

ここでは、順相系カラムとして Asahipack NH2P-50 を使用し、移動相としてアセトニトリル以外の有機溶媒について検討した。

2. 実 験

2. 1 実験条件

2. 1. 1 装置及び測定条件

HPLC: 島津製作所 LC-10A

システムコントローラー: 島津製作所 SLC-10A

ポンプ: 島津製作所 LC-10AD

脱気装置: 島津製作所 DGU-4A

恒温槽: 島津製作所 CTO-10A

検出器: 昭和電工 Shodex RI-71

データ処理装置: 島津製作所 C-R7A

カラム: Shodex Asahipack NH 2 P-50 4E (4.6mm

i.d.x250mm)

Shodex Asahipack NH2P-50 G (Guard column)

カラム温度: 40°C

流量: アセトニトリル系については 1.0ml/min. その他については 0.5ml/min.

注入量: 20 µl (サンプルループ使用)

2. 1. 2 試薬

果糖, ぶどう糖, しょ糖, 乳糖, 麦芽糖, ソルビトール及びグリセリン: 試薬特級 (キシダ化学製)

蒸留水, アセトニトリル, アセトン, エチルアルコール及びテトラヒドロフラン: HPLC 用 (キシダ化学製)

小麦粉: 市販薄力粉 (日清製粉製)

デキストリン: マックス 1000 (松谷化学製)

2. 2 実験方法

2. 2. 1 移動相組成の検討

果糖, ぶどう糖, しょ糖, 乳糖及び麦芽糖の各標準試薬の 1% 水溶液をそれぞれ調製した。

移動相として, アセトニトリル, アセトン, エチルアルコール及びテトラヒドロフランの各溶媒について水との混合比を変えて, それぞれ上記標準溶液を注入し, 保持係数 k' を求めた。

2. 2. 2 試料の希釈

果糖, ぶどう糖, しょ糖及び乳糖の各 1% 混合水溶液 2ml にアセトン 8ml を加え, ピーク形状の変化を検討した。

また, しょ糖及びグリセリンの各 1% 混合水溶液 2ml にアセトンをそれぞれ 6, 7, 8, 9 及び 10ml 加え, しょ糖とグリセリンのピーク面積比の変動を検討した。

2.2.3 再現性

それぞれの組成の移動相について、しょ糖及びグリセリンの各 1%混合水溶液を、それぞれの移動相組成と同じになるように希釈し、再現性を検討した。

2.2.4 検量線

移動相としてアセトン/水 (80/20) を用い、しょ糖については 0.05%~3.0%の濃度範囲について、乳糖及びソルビトールについては 0.1%~2.0%の濃度範囲について濃度比とピーク面積比との関係について検討した。内標準物質であるグリセリンはいずれの場合も 1%で、調製した試料溶液は移動相と同じ組成になるように、アセトンで 5 倍に希釈してから HPLC に注入した。

次に、テトラヒドロフラン/水 (85/15) を用い、しょ糖については 0.5%~4.0%の濃度範囲について、乳糖については 0.5%~2.5%の濃度範囲について濃度比とピーク面積比との関係について検討した。内標準物質であるソルビトールはいずれの場合も 2%で、調製した試料溶液は移動相と同じ組成になるように、テトラヒドロフランで希釈してから HPLC に注入した。

2.2.5 回収率

小麦粉約 4.8g 及びしょ糖約 1.0g を 100ml メスフラスコに精秤し、正確に濃度既知の約 10%グリセリン水溶液を 10ml 加える。定法によって除たんぱくを行い、定容する。これをろ紙でろ過し、イオン交換フィルター、0.45 μ m メンブランフィルターを順次通し、得られた検液 2ml を 10ml メスフラスコに採りアセトンで定容する。これを HPLC に注入し、しょ糖の回収率を求める。

次に、しょ糖約 1g、デキストリン約 0.14g 及びソルビトール約 0.06g を 100ml メスフラスコに精秤し、同様にグリセリン水溶液を加え、定容する。これを 0.45 μ m メンブランフィルターを通し、得られた検液 2ml を 10ml メスフラスコに採りアセトンで定容する。これを HPLC に注入し、しょ糖及びソルビトールの回収率を求める。

3. 結果及び考察

3.1 移動相組成の検討

順相系カラムによる糖類の分析では、アセトニトリル/水混合液を移動相として用いている場合が多いが、今回、アセトニトリル、アセトン、エチルアルコール及びテトラヒドロフランの各溶媒について水との混合比を変えて 5 種の糖類の溶出挙動を調べた。その結果を Fig.1 に示す。糖類相互の分離はアセトニトリル系が良好であるが、アセトン系でも税関分析上、問題は少ないものと考えられる。また、テトラヒドロフラン系については 2 糖類相互の分離が良好で、特に乳糖と麦芽糖の溶出順序がアセトニトリル系やアセトン系と逆転していることが注目される。エチルアルコール系については、ある程度の分離はしているが、有機溶媒比率が大きくなっているのでベースラインの安定性が悪くなり実用的でない。以後、エチルアルコール系については検討しなかった。

3.2 試料の希釈

今回用いたカラムの分離モードは順相系であり、水溶液のような高極性溶液を注入するとピークがブロードとなる傾向がある⁵⁾。これは注入溶液の溶出力が移動相のそれより大きいことによるので、注入溶液の溶媒組成を移動相組成に近づけるために有機溶媒で希釈することによりピーク形状が良好になった (Fig. 2)。しかし、揮発性の高い有機溶媒で希釈定容することは困難であるため、定量分析に用いるには内標準法を用いる必要がある。ここではグリセリンを内標準物質として用い定量した。

なお、移動相として、アセトン/水 (80/20) を使用し、2.2.2 段階で調製した検液を注入したときの検液の溶媒組成の変化に対するしょ糖とグリセリンのピーク面積比の変動 (C.V.=0.6%, n=5) は小さかった。

アセトニトリル系、テトラヒドロフラン系及びアセトン系の代表的なクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

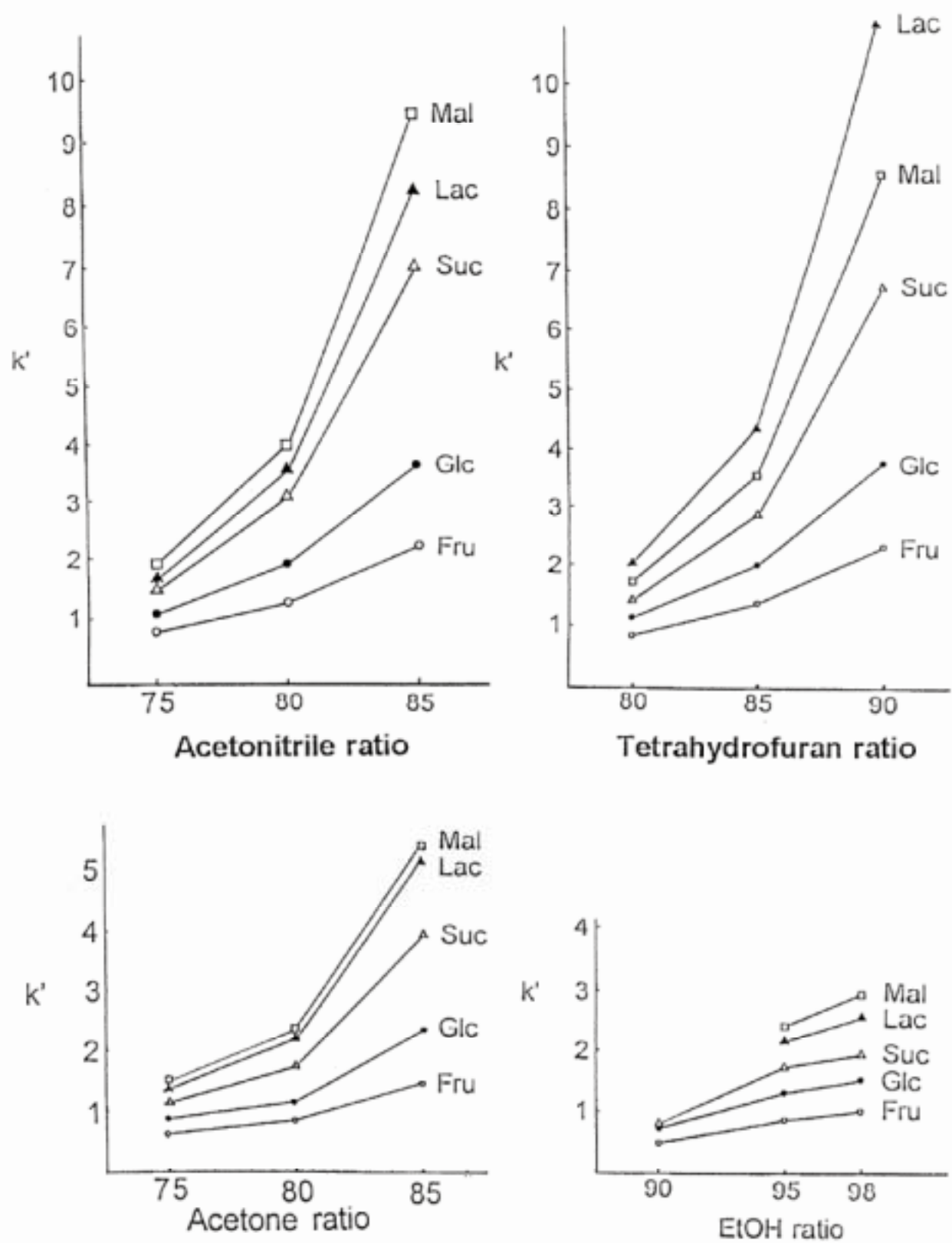


Fig. 1 Comparison of acetonitrile, acetone, ethylalcohol and tetrahydrofuran as the mobile phase

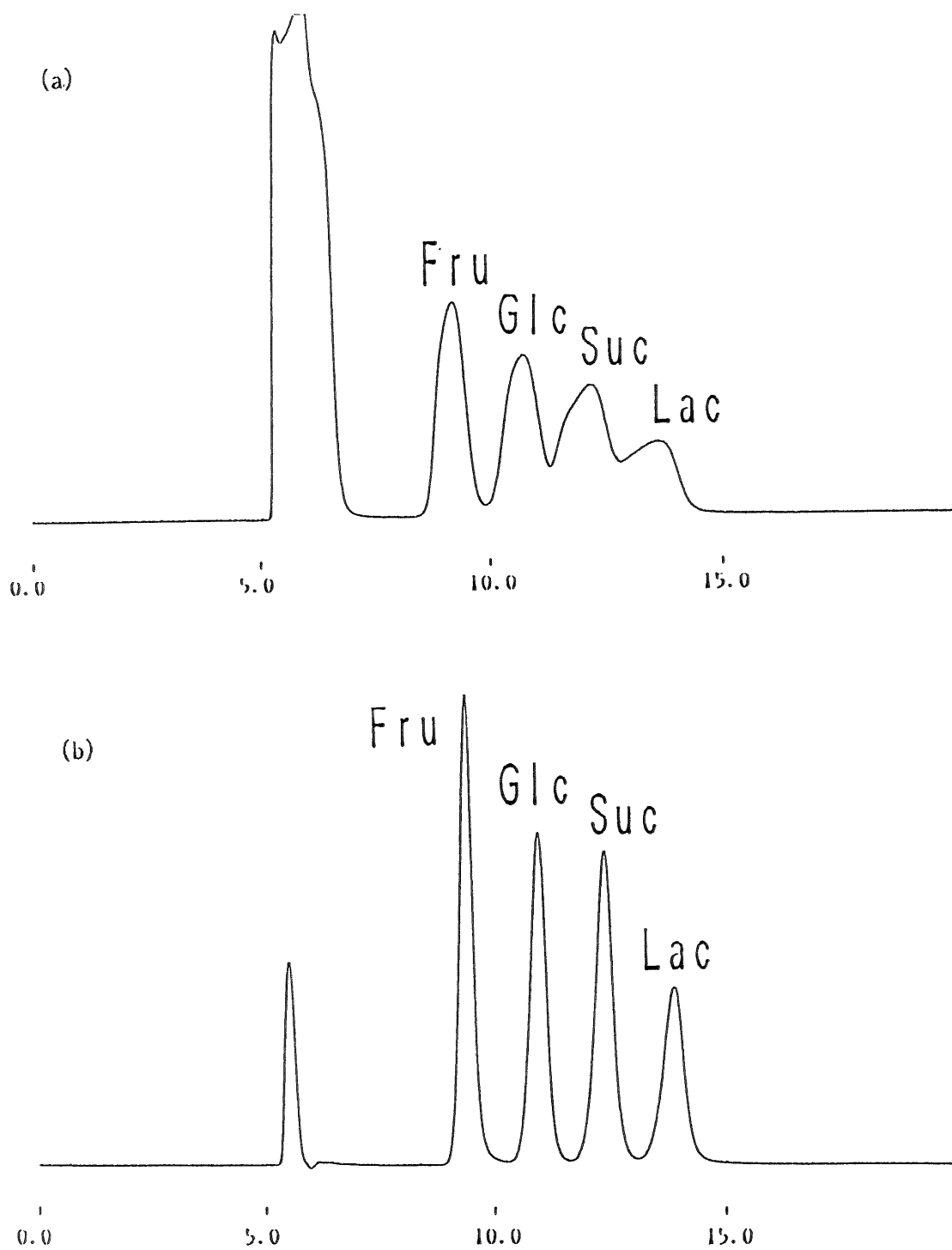


Fig. 2 Chromatograms of mixed sugars using acetone/water (=80 : 20) as the mobile phase
(a) injection solution is aqueous solution
(b) injection solution is diluted five times by acetone

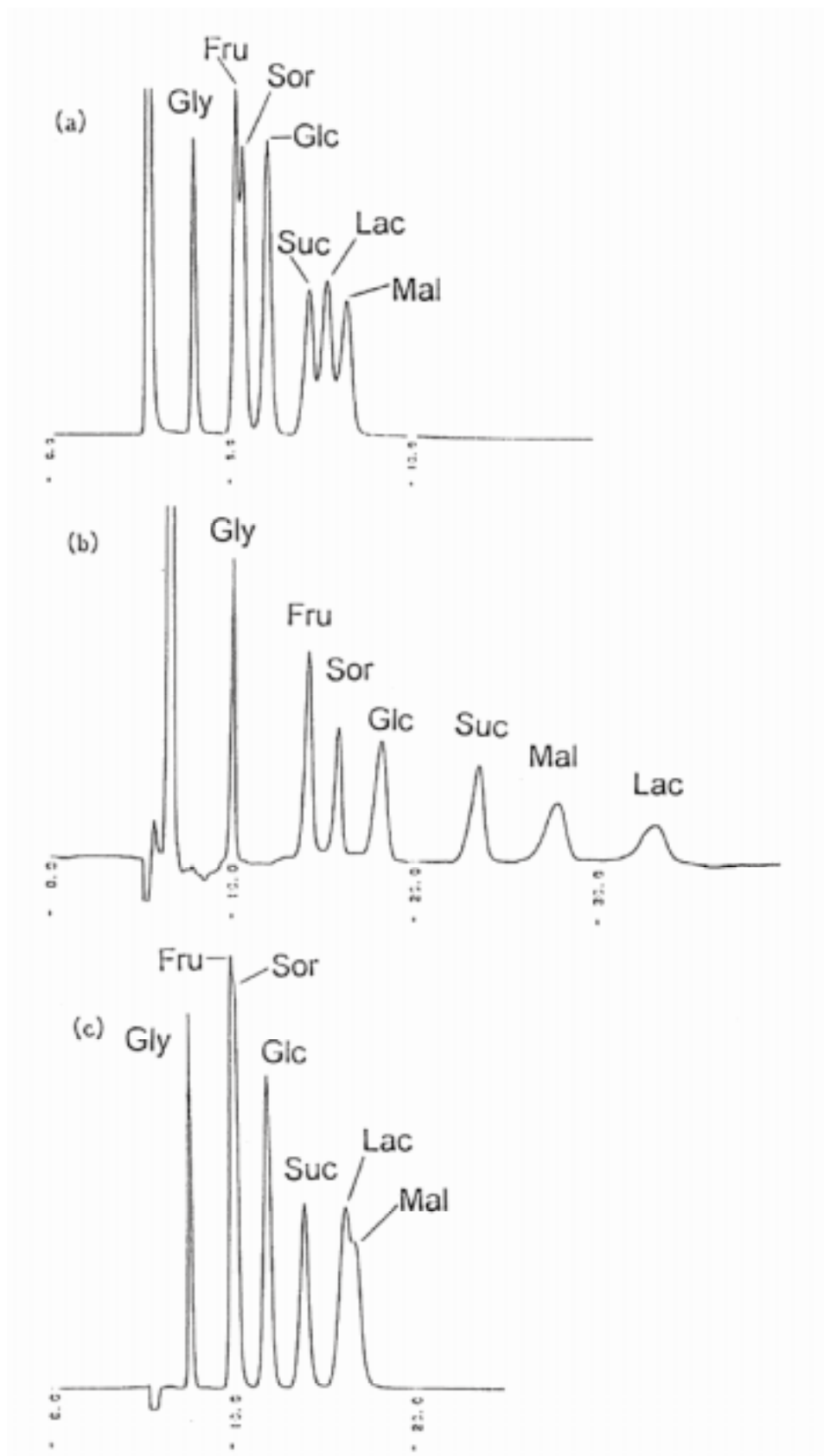


Fig. 3 Chromatograms of mixed sugars by various mobile phases

(a) acetonitrile/water=75/25

(b) tetrahydrofuran/water=85/15

(c) acetone/water=80/20

3.3 再現性

アセトン系のしょ糖とグリセリンのピーク面積比の再現性を

検討した結果を Table 1 に示す。アセトン/水 (80/20) の再現性は、アセトニトリル/水 (75/25) と比較して同程度であった。

Table 1 Reproducibility of standard solution of sucrose by HPLC

Mobile phase	acetone/water 80/20	acetone/water 85/15	acetonitrile /water 75/25
mean of area ratio	1.319	1.288	1.290
C. V. (n=7)	0.37%	1.02%	0.24%

テトラヒドロフラン系は、ベースラインが安定せず、特に内標準物質であるグリセリンが溶出する時間付近で安定しないため、しょ糖濃度を大きくしてしょ糖とグリセリンのピーク面積比の再現性を検討した。また、ソルビトールを内標準物質とした場合のピーク面積比の再現性を検討した結果を Table 2 に示す。しょ糖濃度が大きくなるほど、また、ソルビトールはグリ

セリンと比較して再現性が良くなることがわかった。しかし、注入溶液の糖濃度が大きくなり過ぎると、有機溶媒で希釈することにより糖が析出するおそれがある。また、ソルビトールは多くの調製食品に含有されているため、内標準物質としては適当ではない。

Table 2 Reproducibility of standard solution of sucrose in various components of injection solution

Suc/Gly ratio		
Injection soln.	mean	C.V.(n=5)
2% soln.: THF=10:90	1.1446	2.59%
2% soln.: THF=15:85	1.1000	1.09%
3% soln.: THF=15:85	1.0656	0.58%
5% soln.: THF=15:85	1.0557	0.11%

Suc/Sor ratio		
Injection soln.	mean	C.V.(n=5)
2% soln.: THF=15:85	1.3174	0.54%
2% soln.: THF=30:70	1.2425	0.36%

3.4 検量線

アセトン系において、濃度比とピーク面積比に対する濃度比の関係を求めた。しょ糖は、相関式: $Y=0.7516X+0.0026$ (相関係数 0.99997) 乳糖は、相関式: $Y=0.7874X+0.0148$ (相関係数 0.99995) ソルビトールは、相関式: $Y=0.7740X+0.0054$ (相関係数 0.99998) となり、すべて原点付近を通る良好な直線性を示した。

テトラヒドロフラン系において、内標準物質としてソルビトールを用い、濃度比とピーク面積比に対する濃度比の関係を求めた。しょ糖は、相関式: $Y=0.7690X+0.0161$ (相関係数 0.99996) 乳糖は、相関式: $Y=1.1620X+0.0311$ (相関係数 0.99994) となり、アセトン系と同様にすべて原点付近を通る良好な直線性を示した。

3.5 回収率

アセトン系において、2.2.5で調製した小麦粉 83%、しょ糖 17%の試料を用い、回収率を求めたところ、平均 103.9% (C.V.=0.8%, n=5) であった。また、しょ糖 83%、デキストリン 12%、ソルビトール 5%の試料については、しょ糖は、平均 100.8% (C.V.=0.5%, n=5)、ソルビトールは、平均 103.4% (C.V.=1.7%, n=5) であった。

テトラヒドロフラン系については、ベースラインの安定が良好でないことや、内標準物質の再検討が必要なことから、回収率については省略した。

4. 要 約

今回、順相系カラムとして Asahipack NH2P-50 を使用した糖類の分離定量において、アセトノー水系の移動相では、アセトニトリル水系の移動相と同程度の分離定量を行うことが

できた。

また、テトラヒドロフランー水系の移動相を用いれば、ショ糖、乳糖及び麦芽糖の良好な分離が可能であることがわかったが、正確な定量を行うためには、ベースラインを安定化させることや、内標準物質を再検討することが必要である。

文 献

- 1) 宮城好弘, 出来三男: 本誌, No.19, 65 (1978)
- 2) 出来三男: 本誌, No.23, 15 (1983)
- 3) 松代 康, 松井真一: 本誌, No.32, 33 (1993)
- 4) 大獄秀之, 小笠原利勝, 松代 康, 笹谷 隆, 水城勝美: 本誌, No.33, 29 (1994)
- 5) 増田光宏, 半田光一, 相楽和彦: BUNSEKI KAGAKU, 44, 271 (1995)