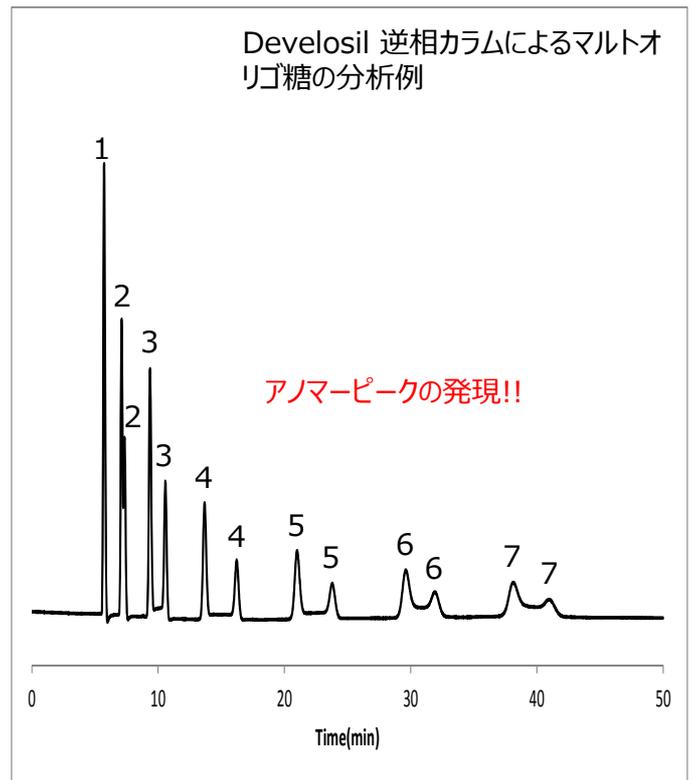
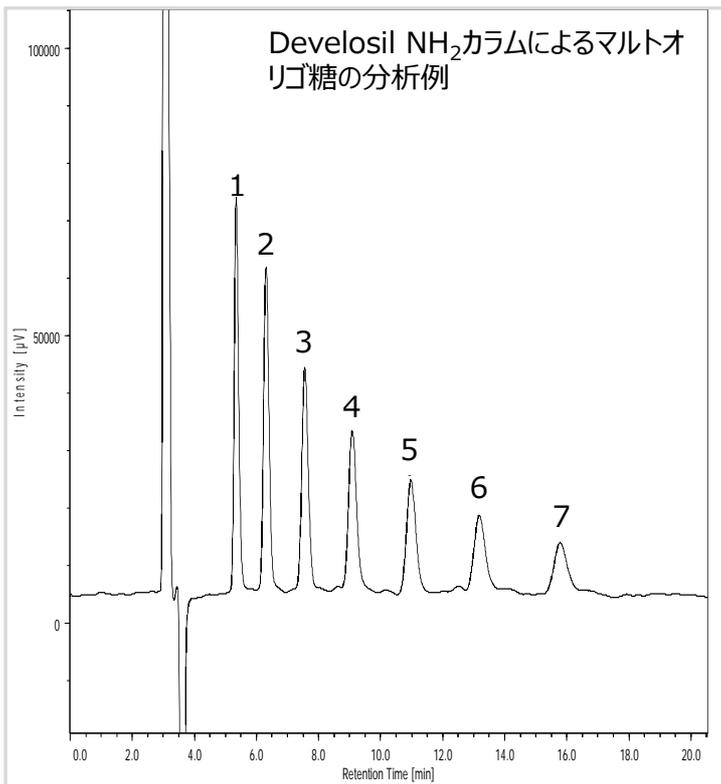


「Develosil NH₂の実力」

アミノカラムは糖類の分析には欠くことのできないカラムです。しかし、このアミノカラムには耐久性が低いという重大な欠点を抱えています。そんな中、弊社はこれまでの性能・分離能を変えずに改質を行うことができ、多くの問題を解決することができました。耐久性に優れた高性能なアミノカラムを菓子・飲料中の糖類の定量分析をもとに紹介します。

1. 糖類の分析を支えるアミノカラム

糖類を分析するにあたり、まず手にするのがアミノカラムであると思います。その他、弊社にもC30カラムを用いた分析例もありますが、アノマーピークが認識されるため1つのサンプルから2つのピークが出るようになってしまいます。定性分析であれば2つでも良いかもしれませんが、定量分析となるとピークを合算する必要があるなどやや面倒だと思います。アミノカラムではこのような事態が起きることなくストレートに定性から定量までこなすことができます。「糖類はやっぱりアミノカラム」です。



2. 飲料中の糖類の定量

皆さんが普段飲まれている飲料（ジュース）等には少なからず糖類が含まれています。では、実際に糖類がどの程度含まれているかをDevelosil NH₂を使って分析してみましょう。

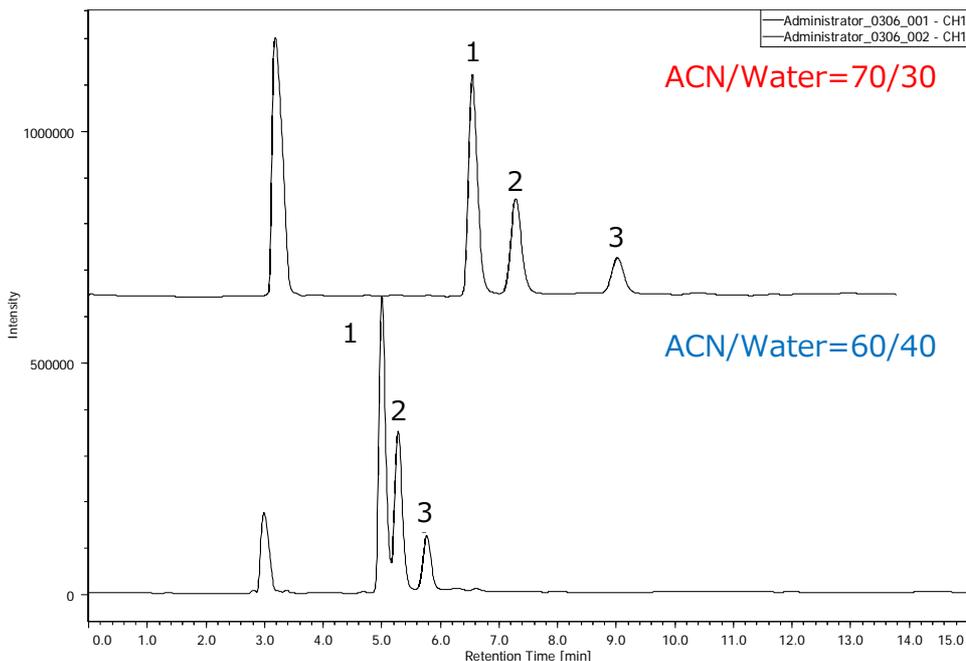
測定までのプロトコル

サンプル調製

- ・移動相(ACN/Water=70/30)にて希釈
- ・0.45umフィルターでろ過

注入

ポイント
サンプルは移動相に溶解させるのがベスト!!



←飲料中に含まれる糖類のクロマトグラム

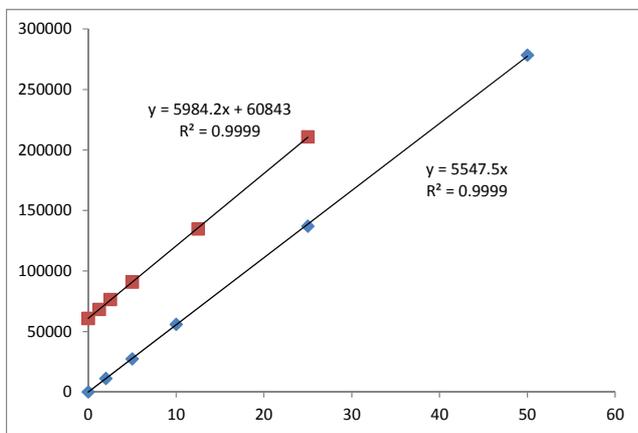
市販の飲料: 移動相=1:1で希釈したものを試料としました。

Analytical conditions;
 Column: Develosil NH₂-5 (4.6x250mm)
 Mobile phase: Acetonitrile/Water=70/30
 Acetonitrile/Water=60/40
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 40°C
 Sample: 1.Fructose 2. Glucose 3. Sucrose
 Injection volume: 5.0uL
 Detector: RI
 System: Jasco 2000series

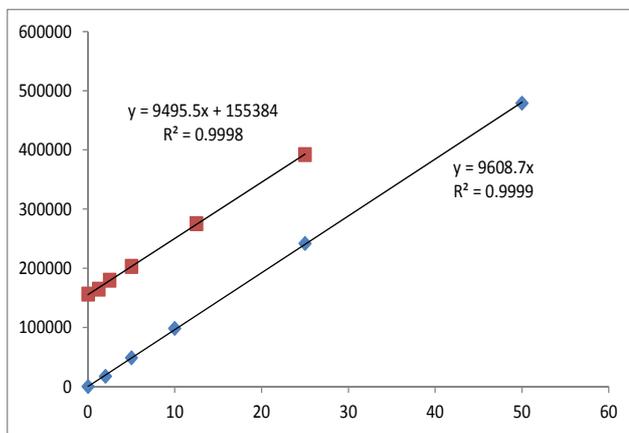
糖類の分析でDevelosil HN₂-5は有機溶媒組成を上げることで保持が強くなります。これは親水性クロマトグラフィー(HILIC)と呼ばれる分離モードです。
 このHILICの特徴は逆相系の移動相を使用しながら高極性の化合物を保持させるところにあります。ODSなどの逆相系であれば高極性化合物は保持されないため水組成を増やしていきますが、これにも限界があります。そんな時にHILICカラムを使うことで余裕のある分離改善が望めます。

添加回収試験法

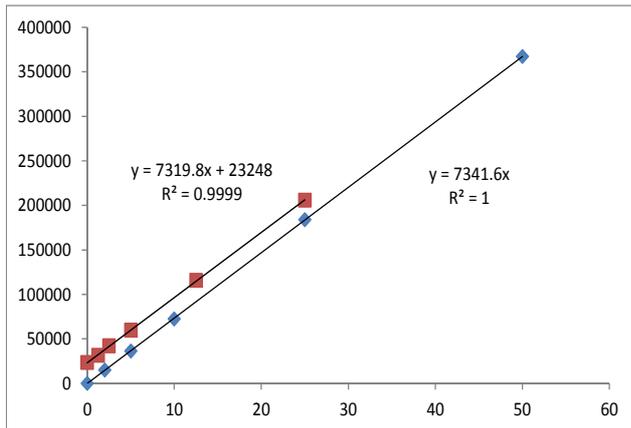
添加回収試験法により検量線を作成し、回収率・相関係数を出し、本法による各糖類の濃度を求める。検出器がRIなのでUV検出器より感度が劣るため定量分析に対するリスクは大きい。



添加回収試験法による検量線 (フルクトース)



添加回収試験法による検量線 (グルコース)



添加回収試験法による検量線（スクロース）

飲料中の糖類を分析した結果、フルクトース、グルコース、スクロースが検出されました。この3種類の化合物について添加回収試験法を行ったところ相関係数 $r^2=0.9998\sim 0.9999$ の間で良好な直線性を得ることができた。また、回収率も99～108%と良好な回収率となった。飲料を試料とした場合、RI検出器であっても分離度およびピーク形状ともに良好で正確に解析ができ、また、余分な前処理も行う必要がないことから回収率低下を回避できたと推測されます。

添加回収試験法より得られた結果

化合物名	濃度 (mg/mL)	回収率 (%)	相関係数 (r^2)
フルクトース	32.2	99	0.9998
グルコース	23.7	108	0.9999
スクロース	6.4	100	0.9999

3. チョコレート中の糖類の定量

先ほどは飲料をサンプルの対象としましたが、次はチョコレート中の糖類を分析してみましょう。チョコレートをサンプルにする場合は飲料とは異なり、除タンパクなど複雑な前処理が必要となります。除タンパクの検討も兼ねてチョコレート中の糖類を分析してみましょう。

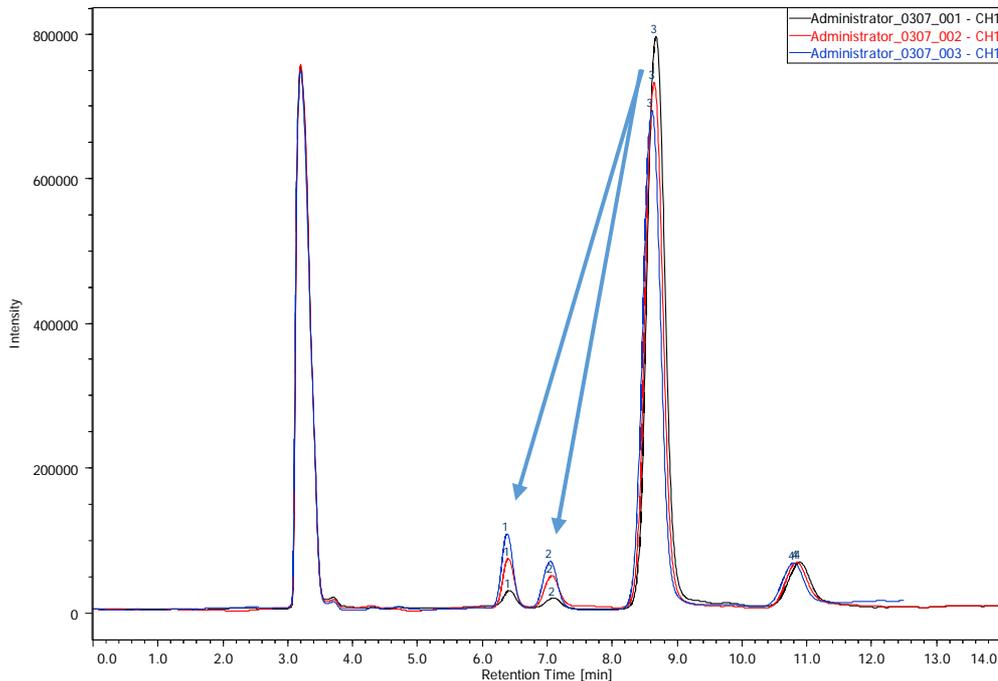
サンプル調製

- ←50mLの遠沈管に20mLの水、チョコレートを1欠片入れ、ヘキサンを20mL加えて攪拌
- ←3900rpm, 15minにて遠心分離
- ←水相のみを取り出し、20mLのヘキサンを加えて攪拌
- ←3900rpm, 15minにて遠心分離
- ←水相に対して1:1となるようにACNを加えて攪拌
- ←13200rpm, 5minにて遠心分離
- ←0.45umフィルターでろ過

ポイント
除タンパクにはACNを使用。TCAを用いると。。

注入

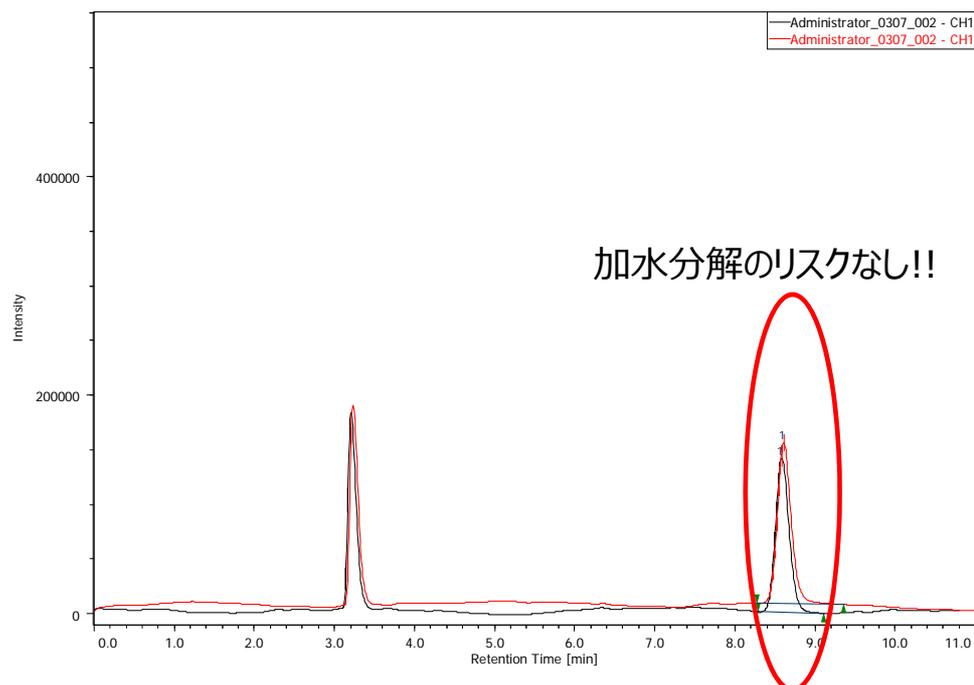
除タンパク



←チョコレート中に含まれるTCA
処理糖類のクロマトグラム

Analytical conditions;
Column: Develosil NH₂-5 (4.6x250mm)
Mobile phase: Acetonitrile/Water=70/30
Flow rate: 1.0mL/min
Temperature: 40°C
Sample: 1.Fructose 2. Glucose 3. Sucrose
Injection volume: 5.0uL
Detector: RI
System: Jasco 2000series

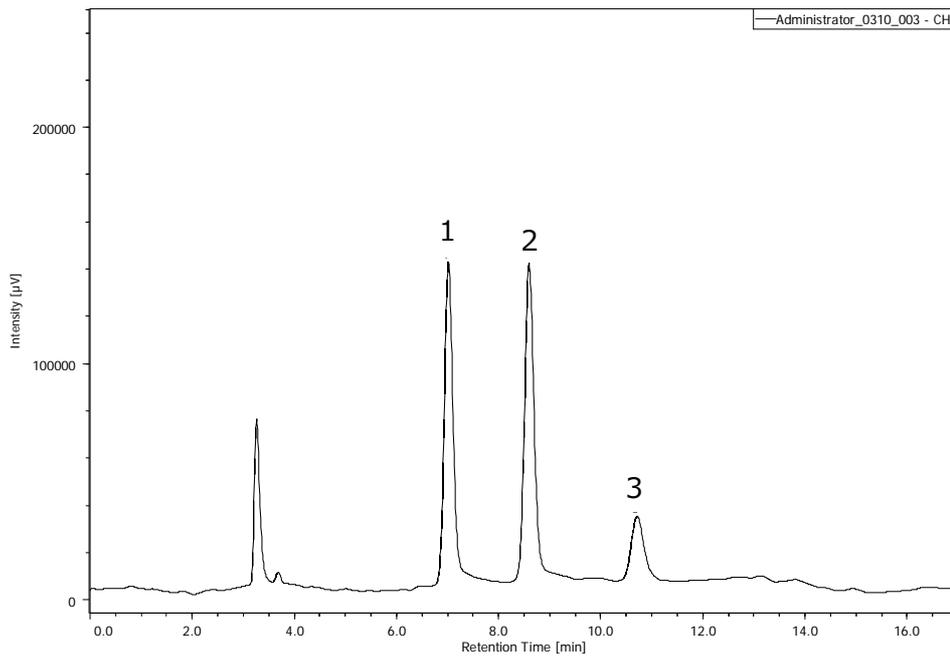
1%TCAを除タンパク剤として用いた場合、時間経過とともにスクロースのピークが減少した（黒→赤→青）。この減少とともにフルクトースおよびグルコースのピークが増加する傾向にあった。これはTCAによる加水分解が原因と考えられるため、ACNにて除タンパクを行った。



加水分解のリスクなし!!

ACNにて処理を行った場合、TCAのように加水分解は起きませんでした。血中成分などの前処理にはTCAは広く使われておりますが、目的成分に合わせて前処理を検討することが重要です。

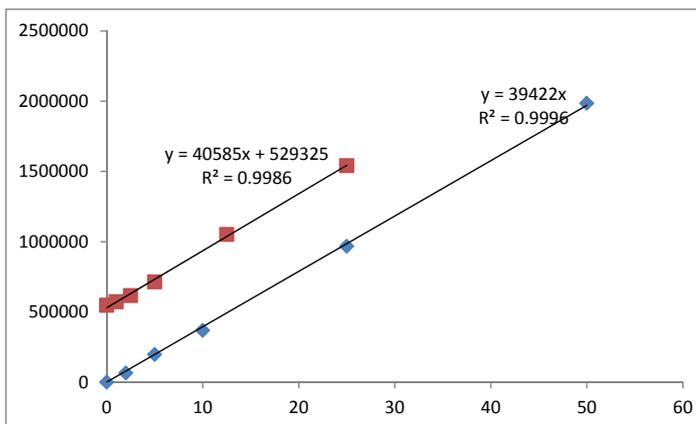
添加回収試験法



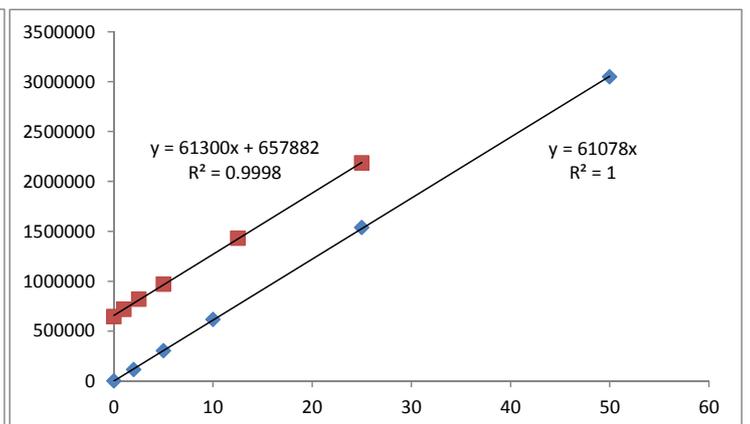
←チョコレート中に含まれる糖類の
クロマトグラム

Analytical conditions;
 Column: Develosil NH₂-5 (4.6x250mm)
 Mobile phase: Acetonitrile/Water=70/30
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 40°C
 Sample: 1.Glucose 2. Sucrose 3. Unknown
 Injection volume: 5.0uL
 Detector: RI
 System: Jasco 2000series

本試験でを使用したチョコレートからはグルコースおよびフルクトースが検出された。飲料と同様の方法にて添加回収試験を行います。



添加回収試験法による検量線 (グルコース)



添加回収試験法による検量線 (スクロース)

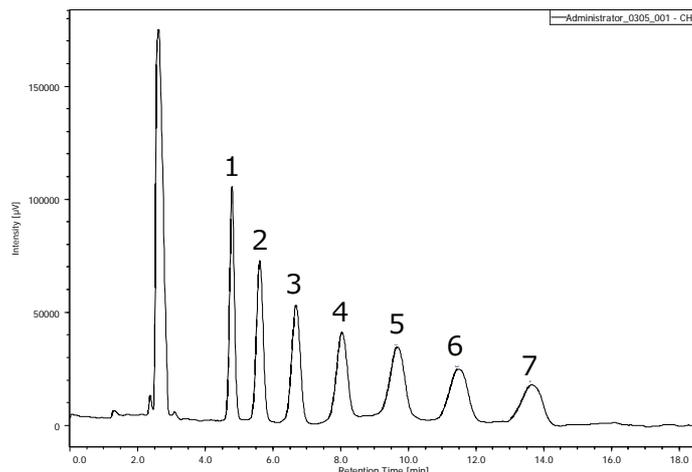
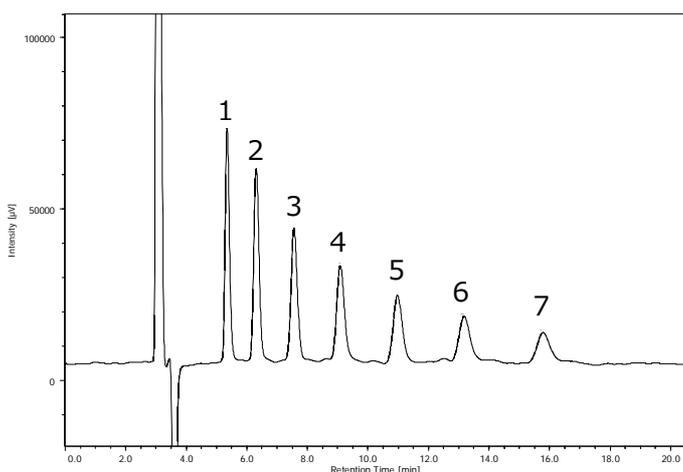
化合物名	濃度 (mg/mL)	回収率 (%)	相関係数 (r^2)
グルコース	57.2	103	0.9996
スクロース	42.2	100	0.9998

チョコレート中の糖類を分析した結果、グルコース、スクロースが検出されました。この2種類の化合物について添加回収試験法を行ったところ相関係数 $r^2=0.9996\sim0.9998$ の間で良好な直線性を得ることができた。また、回収率も100~103%と良好な回収率となった。チョコレートを試料とした場合、前処理が重要となっており、しかも複雑であるため分析誤差が生じやすいが、本試験において、Develosil NH₂カラムを用いることでRI検出器においても十分な定量性が示唆された。

4. Develosil NH₂の真骨頂

マルトオリゴ糖の性能比較

マルトオリゴ糖はNH₂カラムにおいて完全に分離できるかどうか指標になります。弊社Develosil NH₂-5と他社糖分析用カラムとの性能を比較してみましょう。



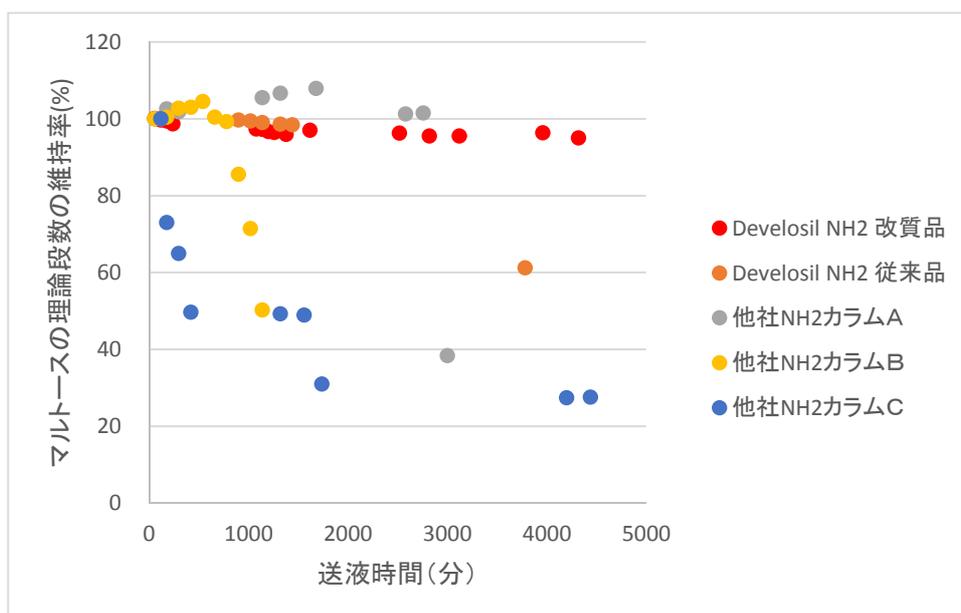
Analytical conditions;
 Column: Develosil NH₂-5 (4.6x250mm)
 他社アミノカラム, 5um (4.6x250mm)
 Mobile phase: Acetonitrile/Water=60/40
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 40℃
 Sample: Maltooligosaccharides (7mixture)
 Injection volume: 5.0uL
 Detector: RI
 System: Jasco 2000series

理論段数比較

Peak No.	Develosil NH ₂ NTP	他社NH ₂ NTP
1	9801	5470
2	9160	3655
3	8728	3155
4	8615	2867
5	8214	2351
6	7913	2047
7	8065	2254

他社アミノカラムと理論段数を比較した場合、Develosil NH₂は圧倒的な理論段数を示しています。そして、何よりも7つ目のピークまではほぼ理論段数が一定であることに注目してください。他社アミノカラムではピークが保持されるに従い、ピークがブロードになり理論段数が低下していきます。弊社が今回行ったアミノカラムの改質にはピークがシャープに溶出することにより理論段数、感度向上に大きな期待ができます。

各社アミノカラムの耐久性



アミノカラムの耐久テスト

Analytical conditions;
 Column: 5種NH₂カラム (5μm, 4.6x250mm)
 Mobile phase: Acetonitrile/Water=75/25
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 40°C
 Sample: Maltose
 Injection volume: 5.0μL
 Detector: RI
 System: Jasco 2000series

5種類のアミノカラムを用いてアミノカラムの耐久テストを行いました。サンプルにはマルトースを用いて、初期値の理論段数を100%とした場合の理論段数の低下を見えています。劣化の早いものについては120分通液で著しく劣化が始まりましたが、今回の対象となるDevelosil NH₂改質品ではおよそ5,000分の通液においても理論段数90%以上を維持しており、改質の効果が大きいことを示しています。耐久性で悩まれている方や糖類の多成分分析を行う方におすすめの1本です。



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
 Web: www.develosil.net