

Application News

No. L474

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

蒸発光散乱検出器を用いた日本酒中のオリゴ糖分析

Analysis of Oligosaccharides in Japanese Sake Using Evaporative Light Scattering Detector

蒸発光散乱検出器 (ELSD) は光吸収を持たない化合物でも、難揮発性化合物であればほとんどの化合物を検出することができるため、幅広い応用が期待できる検出器です。光吸収を持たない化合物分析には示差屈折率検出器 (RID) も用いられますが、ELSD では移動相を蒸発・除去して検出しますので、最初に溶出する溶媒ピークの除去や、グラジエント溶離

条件を適用できるのが示差屈折率検出器と比べた利点となります。今回は内蔵検出器以外の検出器を直接接続することが可能な一体型高速液体クロマトグラフ (Nexera-i) と蒸発光散乱検出器 (ELSD-LT II) を用いた日本酒中のオリゴ糖分析例をご紹介します。

Y. Arai

■ イソマルトオリゴ糖標準試料の分析

Analysis of a Standard Mixture of Isomaltooligosaccharides

糖類の分析では一般に示差屈折率検出器が用いられますが、この場合、グラジエント溶出法が適用できないため、アイソクラティック溶出法を用います。Fig. 1 は蒸発光散乱検出器を用いてイソマルトオリゴ糖の混合標準試料をアイソクラティック条件で分析して得られたクロマトグラムです。その時の分析条件を Table 1 に示します。

Table 1 Isocratic 分析条件
Analytical Conditions: Isocratic Elution

Column	: Asahipak NH ₂ P-50 4E (250 mm L. × 4.6 mm I.D.)
Mobile Phase	: A: 10 mM Ammonium Acetate Buffer B: Acetonitrile
Isocratic B 70 %	
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: ELSD-LT II
Temperature	: 40 °C
Gain	: 7
Nebulizer Gas	: N ₂
Gas Pressure	: 350 kPa

アイソクラティック条件の分析では、特に保持時間が長い成分のピークが広がる傾向があり、このため感度の低下にもつながります。

Fig. 2 に同じ試料をグラジエント溶出により分析した例を示します。分析条件は Table 2 の通りです。ELSD でグラジエント溶出法を用いることで多成分を高感度で分離することが可能です。

Table 2 Gradient 分析条件
Analytical Conditions: Gradient Elution

Column	: Asahipak NH ₂ P-50 4E (250 mm L. × 4.6 mm I.D.)
Mobile Phase	: A: 10 mM Ammonium Acetate Buffer B: Acetonitrile
Linear Gradient	
B 70 % → 40 %, 25 min	
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: ELSD-LT II
Temperature	: 40 °C
Gain	: 7
Nebulizer Gas	: N ₂
Gas Pressure	: 350 kPa

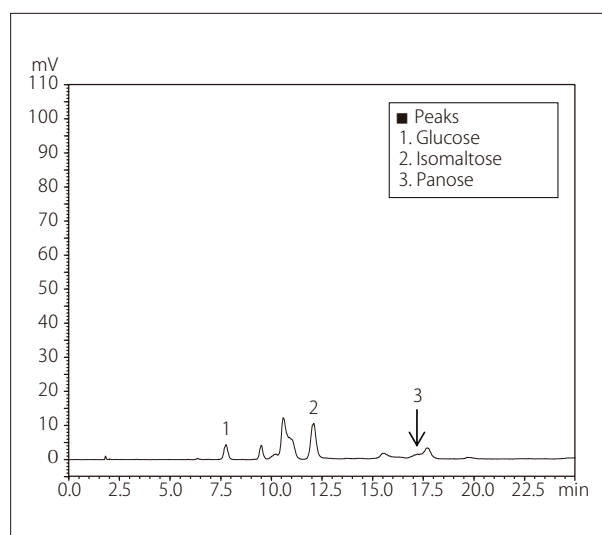


Fig. 1 イソマルトオリゴ糖混合標準品：アイソクラティック条件
Standard of Isomaltooligosaccharides: Isocratic Elution

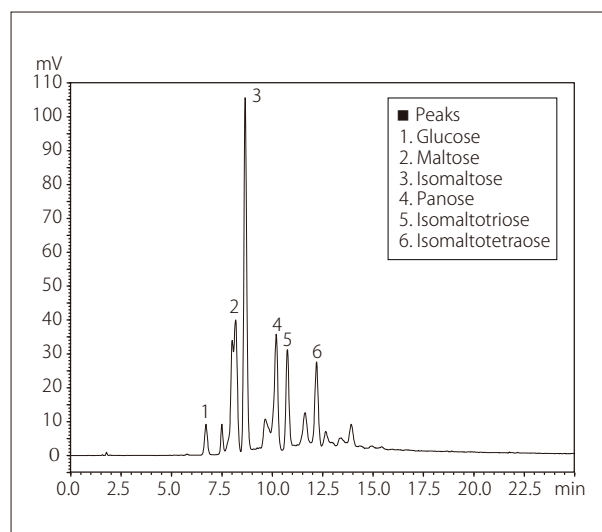


Fig. 2 イソマルトオリゴ糖混合標準品：グラジエント条件
Standard of Isomaltooligosaccharides: Gradient Elution

■日本酒に含まれるオリゴ糖の定量

Quantitative Analysis of Oligosaccharide Included in SAKE

ELSD により日本酒中に含まれるグルコースおよびイソマルトオリゴ糖 2 成分の定量を行いました。Fig. 3 に今回の分析で使用した日本酒分析の前処理手順を示します。Fig. 4 に Table 2 に示した条件で標準試料を分析し、作成した検量線を示します。ELSD のレスポンスは指数応答性を示すため、両対数プロットで直線近似が可能となります。濃度範囲 100, 200, 400, 1000, 2000 mg/L (グルコースは 200, 400, 800, 2000, 4000 mg/L) の間で寄与率 (R²) 0.999 以上と良好な直線性を示しました。Fig. 5 に同じく Table 2 に示した条件で日本酒を分析したクロマトグラムを、Table 3 に標準試料により得られた検量線を用いて算出した定量結果を示します。

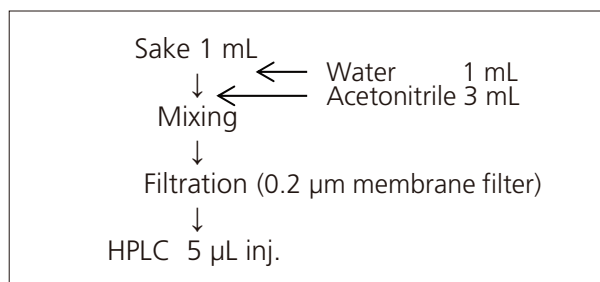


Fig. 3 日本酒の前処理手順
Pretreatment of SAKE

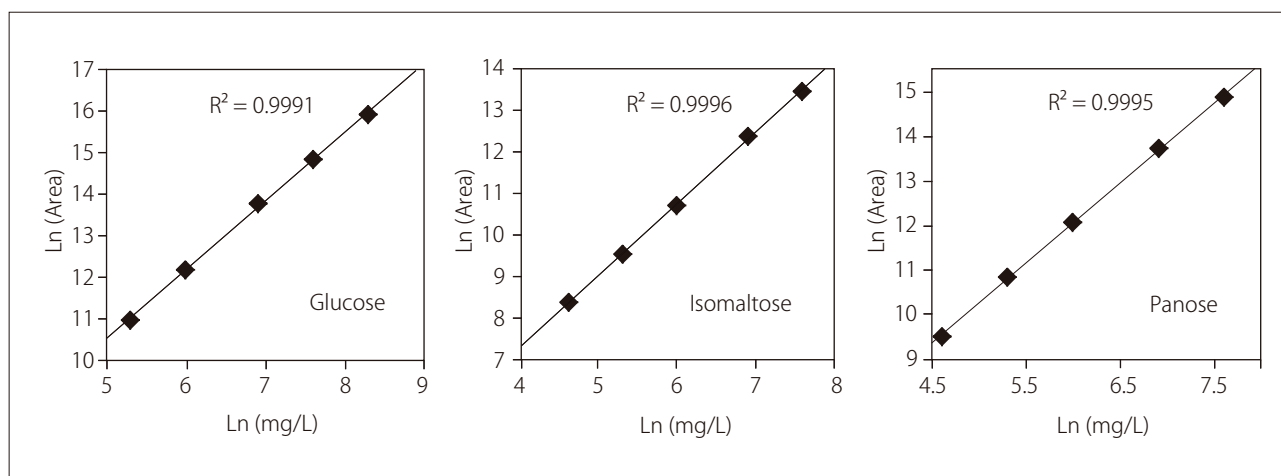


Fig. 4 検量線 (各 5 μL 注入)
Calibration Curves (each injection 5 μL)

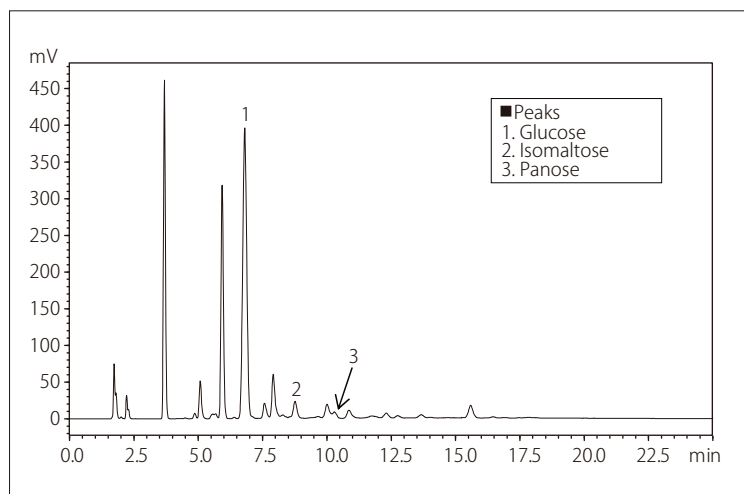


Fig. 5 日本酒のクロマトグラム
Chromatogram of SAKE

Table 3 日本酒中の糖類の定量結果と再現性 (n = 3)
Quantitation Results and Repeatability (n = 3) of
Oligosaccharides in Japanese Sake

	Area	%RSD	Conc.
Glucose	432 × 10 ⁴	0.6	13110 mg/L
Isomaltose	228 × 10 ³	2.1	5130 mg/L
Panose	909 × 10 ²	5.9	1410 mg/L

※濃度は測定試料から得られた結果を原液に換算した値です。