

超高速液体クロマトグラフ Nexera & Prominence UFLC

アプリケーションニュースダイジェスト

食品市場向け



超高速液体クロマトグラフ Nexera & Prominence UFLC アプリケーションニュースダイジェスト 食品市場向け

No.	タイトル	発行	医薬 化粧品	医学 生化学	食品	化学	環境
(全般)							
L371	高速高分離分析の応用 (その 18) 新規高性能カラム “Shim-pack XR-ODS II” 登場	2008 年 10 月	●	●	●	●	●
L393	“Prominence RF-20Axs” 蛍光検出器の応用 (その 2) トコフェロール, 多環芳香族炭化水素の高速分析	2009 年 10 月	●	●	●	●	●
(規制関連)							
L422	高速高分離分析の応用 (その 39) Nexera による食品中アフラトキシンの分析	2011 年 4 月			●		
L430	高速高分離分析の応用 (その 42) Nexera による食品中アフラトキシンの分析 – イムノアフィニティカラムによる前処理 –	2011 年 10 月			●		
(添加物)							
C49	超高速分析の応用 (その 1) カテキン類, 合成着色料の分析	2006 年 12 月			●		
L349	高速高分離分析の応用 (その 5) 合成着色料の分析	2006 年 12 月			●	●	
L421	高速高分離分析の応用 (その 38) “Nexera” による合成着色料の分析	2011 年 4 月			●		
L353	高速高分離分析の応用 (その 7) 安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸の分析	2007 年 7 月	●	●	●		
L354	高速高分離分析の応用 (その 8) アスコルビン酸, エリソルビン酸の分析	2007 年 7 月	●	●	●		
L364	高速高分離分析の応用 (その 14) ルテイン, ゼアキサントンの分析	2008 年 7 月	●		●		
L419	蒸発光散乱検出器の応用 (その 10) グルコシルセラミドの高速分析	2011 年 4 月	●	●	●		
(天然物 / 機能性成分)							
L413	高速高分離分析の応用 (その 35) “Nexera” によるワイン中レスベラトロールの分析	2011 年 1 月	●		●		
L423	高速高分離分析の応用 (その 40) “Nexera” による核酸塩基, ヌクレオシド, ヌクレオチドの分析	2011 年 4 月		●	●		
L342	高速高分離分析の応用 (その 2) 大豆中イソフラボンの分析	2006 年 9 月	●		●		
L347	高速高分離分析の応用 (その 3) イソチオシアナート類およびシニグリンの分析	2006 年 12 月			●		
L360	高速高分離分析の応用 (その 10) 有機酸の分析	2007 年 12 月	●		●	●	
L365	高速高分離分析の応用 (その 15) ニンジン中ギンセンノシド類の分析	2008 年 7 月	●		●		
L366	高速高分離分析の応用 (その 16) 柑橘果汁中フラバノン類の分析 (その 2)	2008 年 7 月			●		
L373A	高速高分離分析の応用 (その 19) 緑茶飲料水中カテキン類の分析	2008 年 11 月			●		
L376A	高速高分離分析の応用 (その 21) 緑茶中カテキン類の分析	2010 年 3 月			●		
L386	高速高分離分析の応用 (その 26) フェノール酸の分析	2009 年 7 月	●	●	●		
L389	高速高分離分析の応用 (その 28) ホップ中 α 酸および β 酸の分析	2009 年 10 月	●		●		
L390	高速高分離分析の応用 (その 29) 自動カラムスイッチングシステムを用いたベリー果汁中フェルラ酸分析の効率化	2009 年 10 月	●		●		
L407	高速高分離分析の応用 (その 33) 生姜中ジゲロール・ショウガオールの分析	2010 年 7 月	●		●		
L432	高速高分離分析の応用 (その 44) オートサンブラ SIL-30AC による自動プレカラム誘導体化アミノ酸の分析	2011 年 12 月	●	●	●		
L433	LC/MS 高速アミノ酸分析システム “UF-Amino Station” (その 1) 超高速アミノ酸分析への新たなアプローチ	2011 年 12 月	●	●	●		
L434	LC/MS 高速アミノ酸分析システム “UF-Amino Station” (その 2) 実試料分析における信頼性の向上	2011 年 12 月	●	●	●		

※ ProminenceUFLC/UFLCX_R を用いたデータも含まれていますが, Nexera であれば, その全てのアプリケーションをカバーする事ができます。

高速高分離分析の応用（その18） 新規高性能カラム “Shim-pack XR-ODS II” 登場

High Speed with High Resolution Analysis (Part 18)

Introducing Newly Developed "Shim-pack XR-ODS II"

アプリケーションニュースNo.L341では、“Shim-pack XR-ODS”（粒子径 $2.2\mu\text{m}$ ）が特別な高耐圧専用LCシステムを必要とせず、高速と高分離の両立を実現することをご紹介しました。

今回、医薬品中不純物や天然物など、多成分分析で求められる一層の高分離ニーズに対応するため“Shim-pack XR-

ODS II”を開発しました。

ここでは、“Shim-pack XR-ODS II”の概要と高速高分離分析例をご紹介します。

T. Yamaguchi

■Shim-pack XR-ODS II の概要

Outline of Shim-pack XR-ODS II

“Shim-pack XR-ODS II”は従来の“Shim-pack XR-ODS”の特長をそのままにカラム耐圧性を向上させ、ロングカラムあるいは低温での高分離分析、高粘性移動相を使用するアプリケーションなどに対応できるように設計されています。超高速高分離LCシステム“Prominence UFLC_{XR}”（システム耐圧66MPa）との組み合わせにより、最大限の性能を発揮します。

UFLC用カラム	Shim-pack XR-ODS	Shim-pack XR-ODS II
特長	超高速 & 高分離分析	高速 & 超高分離分析
最大使用圧力	30 MPa	60 MPa
使用システム（推奨）	Prominence UFLC	Prominence UFLC _{XR}
粒子径	2.2 μm	2.2 μm
細孔径	12 nm	8 nm
カラム長さ	30, 50, 75, 100 mm	75, 100, 150 mm
カラム内径	2.0, 3.0, 4.6 mm	2.0, 3.0 mm

■Shim-pack XR-ODS II の性能

Performance of Shim-pack XR-ODS II

Fig.1は汎用カラム“Shim-pack VP-ODS”（上段）と同じカラム長さの“Shim-pack XR-ODS II”（下段）を用いて、アルキルフェノン類7成分標準混合液（各100 mg/L）を分析した例です。Table1にそれら分析条件を示します。

“Shim-pack XR-ODS II”では、移動相の線速度を“Shim-pack VP-ODS”の約3倍に高めて分析することにより、1サイクルの分析時間を短縮することができ、かつオクタノフェノンにおいて約2倍の理論段数を得ることができました。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack VP-ODS (150 mmL. $\times$ 4.6 mm I.D., 4.6 μm) Shim-pack XR-ODS II (150 mmL. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: Water / Acetonitrile = 3 / 7 (v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL / min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 10 μL (VP-ODS) 4 μL (XR-ODS)
Detection	: SPD-20A at 245 nm
UV Cell	: Conventional Cell (VP-ODS) Semi-micro Cell (XR-ODS)

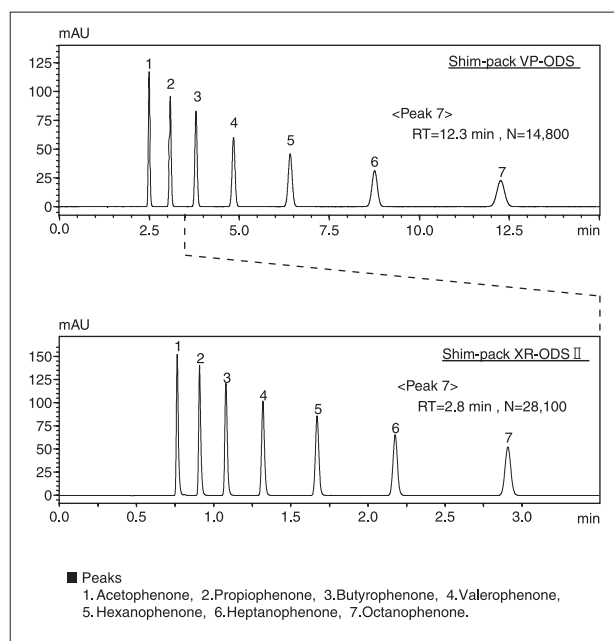


Fig.1 XR-ODS IIとVP-ODSの比較

— アルキルフェノン類7成分のクロマトグラム

（上段：Shim-pack VP-ODS，下段：Shim-pack XR-ODS II）

Comparison of VP-ODS and XR-ODS II

— Chromatograms of a Standard Mixture of 7 Alkylphenones
(Upper: Shim-pack VP-ODS, Lower: Shim-pack XR-ODS II)

■セファゾリンナトリウムの類縁物質試験

Impurity Test of Cefazolin

日本薬局方におけるセファゾリンナトリウムの類縁物質試験では、5 g/Lのセファゾリンナトリウム溶液をHPLCにより分析し、セファゾリンに対するセファゾリン以外の溶出成分の面積比を求めることが記されています。

Fig.2にはセファゾリン溶液（5 g/L）を紫外可視吸光

度検出器（SPD-20A）で分析した結果と、約1分から3分までを拡大したクロマトグラムを示します。またTable 2にはその分析条件を示します。幅広いダイナミックレンジを有するSPD-20Aにより、微細なピークを見逃すことなく高分離かつ高感度に検出できていることがわかります。

Table 2 分析条件 Analytical Conditions	
Column	: Shim-pack XR-ODS II (150 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A ; 20 mmol / L (Sodium) phosphate buffer (pH2.5) B ; Acetonitrile B Conc. 15 % (0 min)→ 30 % (4 min)→ 50 % (9 min)
Flow Rate	: 0.9 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 4 μL
Detection	: SPD-20A at 245 nm
UV Cell	: Semi-micro Cell

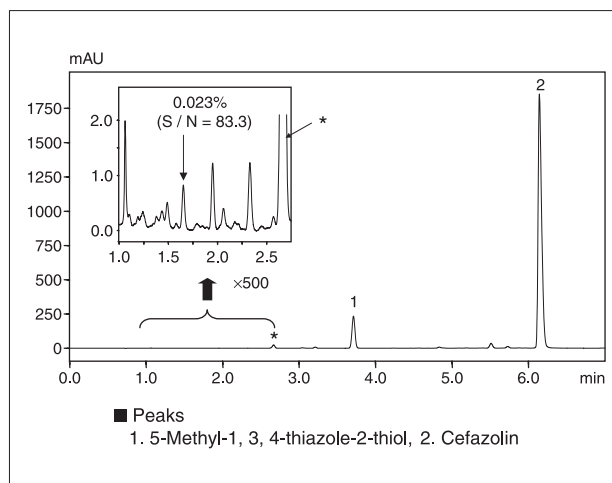


Fig.2 セファゾリンのクロマトグラム
Chromatogram of Cefazolin

■清涼飲料水の分析

Analysis of Soft Drink

Fig.3に清涼飲料水を分析した結果を、Table 3にその分析条件を示します。清涼飲料水はメンブランフィルタ（孔径0.2 μm）でろ過後、4 μLを注入しました。

超高速高分離LCシステム“Prominence UFLCxR”は66MPaまでシステム耐圧を向上したことにより、高粘性移動相溶媒であるメタノールを用いた分析条件の場合においても高速化が可能となります。本分析におけるカラム負荷圧は43MPaとなりました。

Table 3 分析条件 Analytical Conditions	
Column	: Shim-pack XR-ODS II (75 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A ; 40 mmol / L (Sodium) acetate buffer (pH4.0) B ; Methanol A / B = 4 / 1 (v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL / min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 4 μL
Detection	: SPD-20A at 250 nm
UV Cell	: Semi-micro Cell

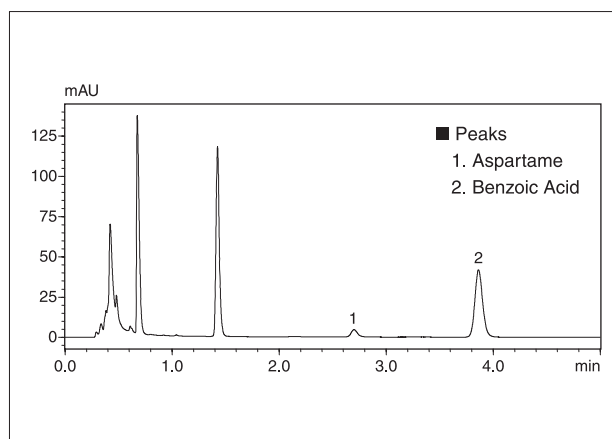


Fig.3 清涼飲料水のクロマトグラム
Chromatogram of Soft Drink

“Prominence RF-20Axs” 蛍光検出器の応用（その2） トコフェロール，多環芳香族炭化水素の高速分析

Applications by the "Prominence RF-20Axs" Fluorescence Detector (Part 2) High Speed Analysis of Tocopherols and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

蛍光検出器は検出感度と選択性の高さにより，幅広い分野で不可欠な検出器として活用されています。

“Prominence RF-20Axs” 蛍光検出器は，これまでにない高感度（水ラマンSN比=2000以上）に加えて，セル温度調節機能を標準装備しており，室温変動に影響されない信

頼性の高い分析が可能となります。また，高速サンプリングと高速レスポンス性能により，超高速LC用蛍光検出器としても性能を発揮します。

ここでは，“Prominence RF-20Axs” を用いたトコフェロールと多環芳香族炭化水素の高速分析例をご紹介します。

K.Watanabe M.Ogaito

トコフェロールの分析

Analysis of Tocopherols

トコフェロール（ビタミンE）は酸化防止剤や栄養強化剤などの食品添加物として用いられるだけでなく，天然食材に含まれる栄養素でもあり， α -トコフェロール（Fig. 1）をはじめ β -， γ -， δ -の異性体が知られています。

HPLCによるトコフェロール異性体の分析では，順相モードと蛍光検出器の組み合わせが広く用いられていますが，ここでは高速高分離分析用カラム“Shim-pack XR-SIL”（粒子径2.2 μ m）と“RF-20Axs”を用いた超高速分析を試みました。Fig. 2に，コンベンショナルカラムである“Shim-pack CLC-SIL(M)”（粒子径5 μ m）と“Shim-pack XR-SIL”を用いたトコフェロール4成分標準溶液（各2 mg/L）の分析例を，Table 1に分析条件を示します。“Shim-pack XR-SIL”を用いることにより，分析時間を4分の1以下に短縮することができました。

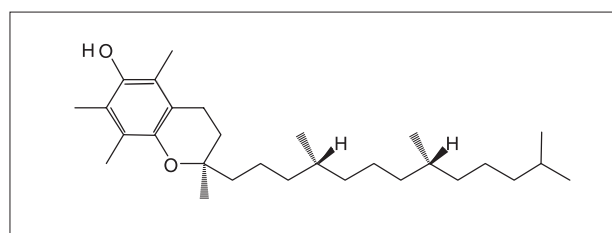


Fig. 1 α -トコフェロールの構造
Structure of α -Tocopherol

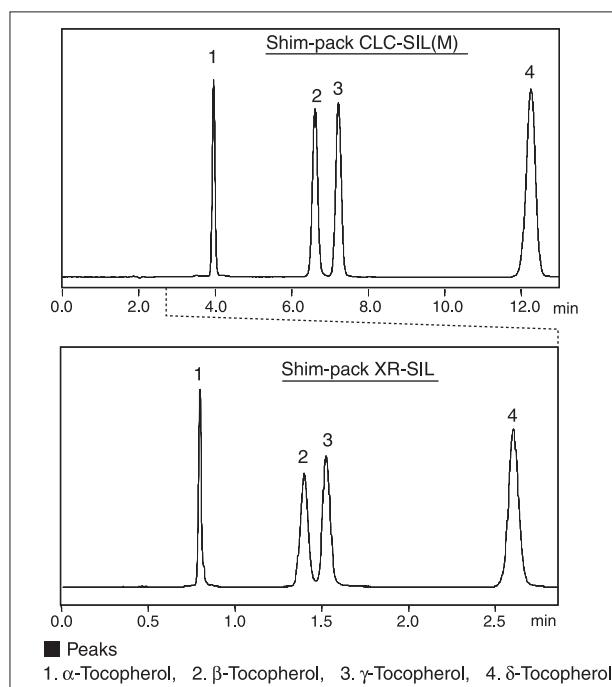


Fig. 2 トコフェロール標準溶液のクロマトグラム（各2 mg/L）
Chromatograms of Standard Mixture of Tocopherols (2 mg/L each)

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-SIL (75 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.2 μ m) Shim-pack CLC-SIL(M) (150 mm L. $\times$ 4.6 mm I.D., 5 μ m)
Mobile Phase	: Hexane / 2-Propanol = 100 / 0.5 (v/v)
Flow Rate	: 1.2 mL/min (XR-SIL), 1.0 mL/min (CLC-SIL(M))
Column Temp.	: 30 $^{\circ}$ C
Injection Volume	: 4 μ L (XR-SIL), 10 μ L (CLC-SIL(M))
Detection	: RF-20Axs Ex. at 298 nm, Em. at 325 nm
Cell Temp.	: 25 $^{\circ}$ C
Flow Cell	: Semi-micro Cell (XR-SIL) Conventional Cell (CLS-SIL(M))

■多環芳香族炭化水素の分析

Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

多環芳香族炭化水素（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ; PAHs）は、広範囲に渡る環境汚染物質のひとつであり、そのいくつかは発がん性、変異原性などの毒性を持つことが知られています。米国環境保護局（EPA）は16成分の多環芳香族炭化水素を「優先汚染物質」に指定して規制対象としており、EPA method 550.1（飲料水）、EPA method 610（排水）などでHPLCやGCを用いた試験法を示しています。

多環芳香族炭化水素の多くは蛍光性であり、蛍光検出器により高感度に選択性良く検出できます。ここでは蛍光を発しないアセナフチレンを除く15成分について、“RF-20Axs”を用いた成分群毎のオンタイム励起・蛍光波長切換による分析を試みました。Fig. 3に15成分標準溶液のクロマトグラムを、Table 2に分析条件を示します。本分析条件により、4分以内にこれら15成分を最適波長で分析することができました。

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: SUPELCOSIL LC-PAH (50 mm L. × 4.6 mm I.D., 3 μm)
Mobile Phase	: A ; Water B ; Acetonitrile
Time Program	: B Conc. 50 % (0-0.5 min) → 88 % (3.0 min) → 88 % (3.0-4.2 min) → 100 % (4.21-4.5 min) → 50 % (4.51-5.0 min)
Flow Rate	: 3.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 5 μL
Detection	: RF-20Axs 0 - 1.54 min Ex. at 270 nm, Em. at 330 nm, Gain : ×1 - 1.89 min Ex. at 250 nm, Em. at 370 nm, Gain : ×1 - 2.30 min Ex. at 330 nm, Em. at 430 nm, Gain : ×4 - 2.75 min Ex. at 270 nm, Em. at 390 nm, Gain : ×1 - 3.62 min Ex. at 290 nm, Em. at 430 nm, Gain : ×1 - 4.20 min Ex. at 370 nm, Em. at 460 nm, Gain : ×16 - 5.00 min Ex. at 270 nm, Em. at 330 nm, Gain : ×1
Cell Temp.	: 20 °C

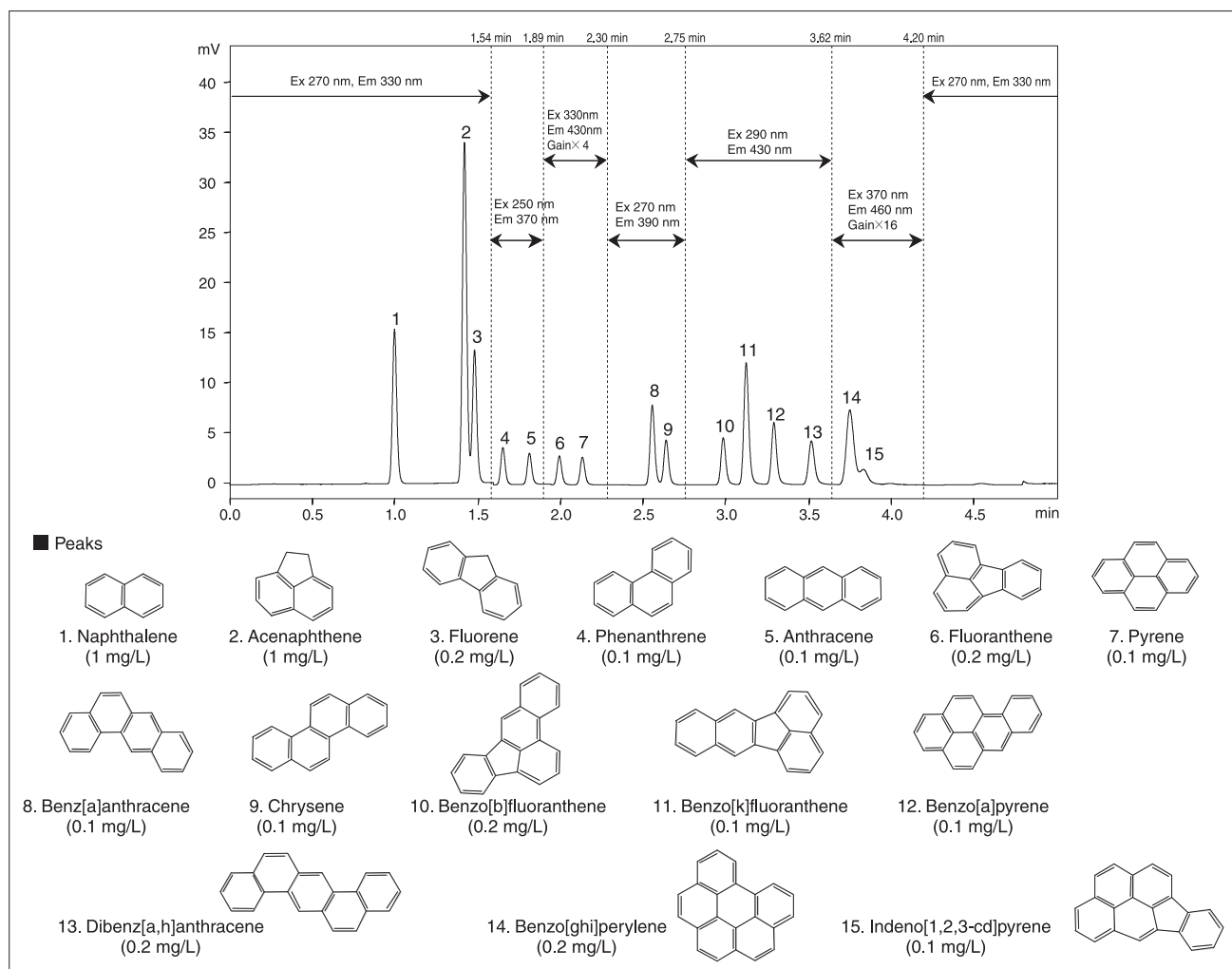


Fig. 3 多環芳香族炭化水素標準溶液のクロマトグラム

Chromatogram of a Standard Mixture of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

高速高分離分析の応用（その39） Nexeraによる食品中アフラトキシンの分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 39)

Analysis of Aflatoxins in Food by Nexera

アフラトキシンは、発がん性や急性毒性を持つカビ毒であり、食品汚染監視のため、HPLCなどによる測定が行われています。

食品中アフラトキシンの超高速分析については、アプリケーションニュースNo. L351で、アフラトキシンB₁/B₂/G₁/G₂の内、感度向上のためB₁およびG₁をトリフルオロ酢酸(TFA)により水酸化体(B_{2a}, G_{2a})に変換後、蛍光分析す

る方法をご紹介しました。

ここでは、高感度蛍光検出器“Prominence RF-20Axs”を超高速LCシステム“Nexera”と組み合わせることにより、TFA処理を行わずにアフラトキシンB₁/B₂/G₁/G₂を直接高感度蛍光検出し、食品中アフラトキシンの超高速分析に応用した例をご紹介します。

A. Nomura K. Watanabe

■アフラトキシン標準溶液の分析 Analysis of Aflatoxin Standard Solution

Fig. 1に、アフラトキシン4成分混合標準液のクロマトグラムを、Table 1にその分析条件を示します。分析カラムには、“Shim-pack XR-ODSII” (100 mm L.×3.0 mm I.D., 2.2 μm) を用いました。各成分濃度は、B₁およびG₁が各20 ng/L (20 ppt)、B₂およびG₂が各5 ng/L (5 ppt)で、水/アセトニトリル=9/1 (v/v) 溶液で調製しました。

RF-20Axsを用いることにより、B₁およびG₁をTFA処理なしで高感度検出することが可能でした。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODSII (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: Water / Methanol / Acetonitrile = 6 / 3 / 1 (v/v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 50 °C
Injection Volume	: 8 μL
Detection	: RF-20Axs Ex. at 365 nm, Em. at 450 nm
RF Cell	: Conventional cell
Cell Temp.	: 25 °C

Fig. 1では注入量を8 μLとしています。さらに微量分析を行うため、試料注入量を増やした場合のピーク形状および分離状態を調べました。

Fig. 2に、Fig. 1で使用したアフラトキシン4成分混合標準液の注入量 8 μL, 30 μL, 50 μLにおけるクロマトグラムを示します。

注入量50 μLにおいても、ピーク形状の崩れはなく、十分な分離が得られています。注入量50 μLでの検出限界(SN比=3.3)は、アフラトキシンB₁が1 ng/L (1 ppt)、アフラトキシンG₁が2 ng/L (2 ppt)となります。

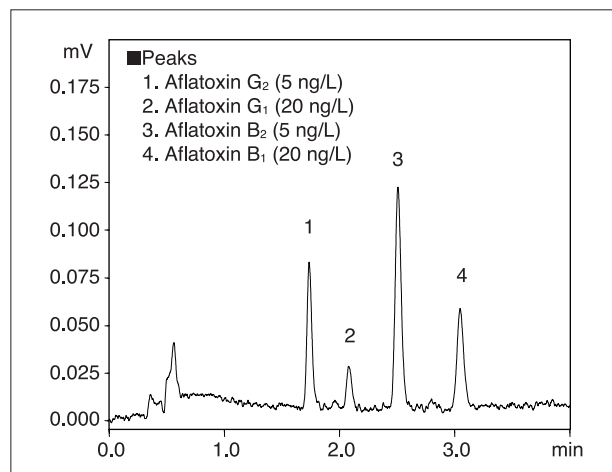


Fig. 1 アフラトキシン標準液のクロマトグラム (8 μL注入)
Chromatogram of a Standard Mixture of Aflatoxins (8 μL injected)

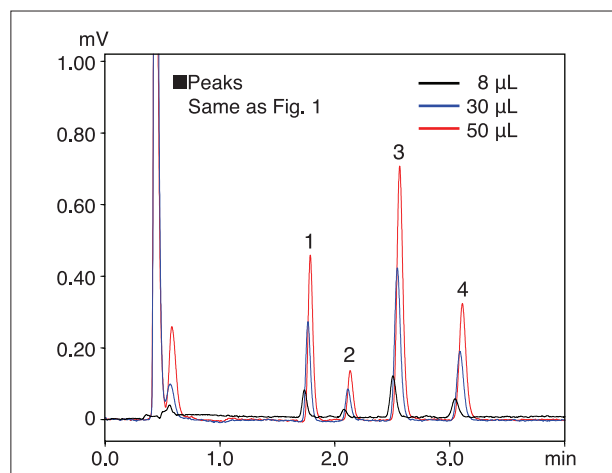


Fig. 2 アフラトキシン標準液のクロマトグラム—注入量の比較
Chromatograms of a Standard Mixture of Aflatoxins
- Comparison of Injection Volume

■セル温調の効果

Effect of Cell Temperature Control

一般に、蛍光強度は温度の影響を受けやすいことが知られています。Fig. 3に、RF-20Axsのセル温度と各アフラトキシンのピーク高さ比 (20 °C のピーク高さを1とする) との関係を示します。

この結果より、特にアフラトキシンB₁, B₂が、室温変動による影響を受けやすいことがわかります。RF-20Axsはセル温調機能を標準搭載していますので、アフラトキシンの高感度分析においても、室温変動の影響を受けることなく精度の高い分析が可能となります。

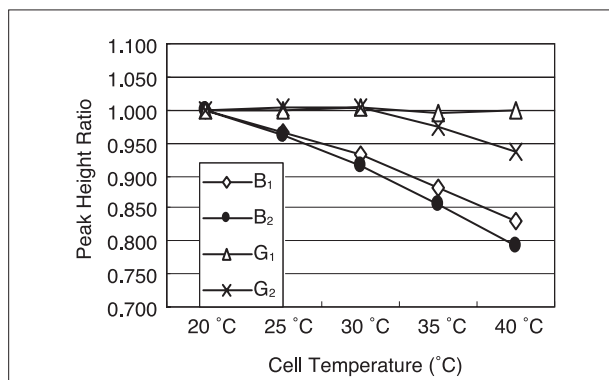


Fig. 3 セル温度とピーク高さ比の関係
Relationship between Cell Temperature and Peak Height Ratio

■食品試料の分析

Analysis of Food Sample

市販小麦粉をFig. 4の手順に従い前処理しました。また、この小麦粉にアフラトキシン標準品4成分を添加 (B₁およびG₁は0.8 μg/kg, B₂およびG₂は0.2 μg/kg になるよう添加)

して、同様の前処理を行いました。これら試料を前頁Table 1の分析条件により分析しました。Fig. 5に、それらのクロマトグラムを示します。

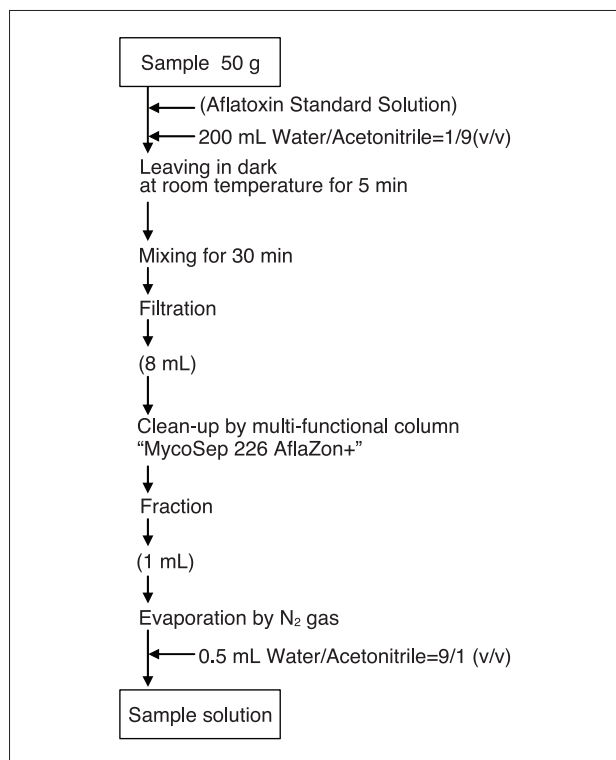


Fig. 4 前処理
Sample Preparation

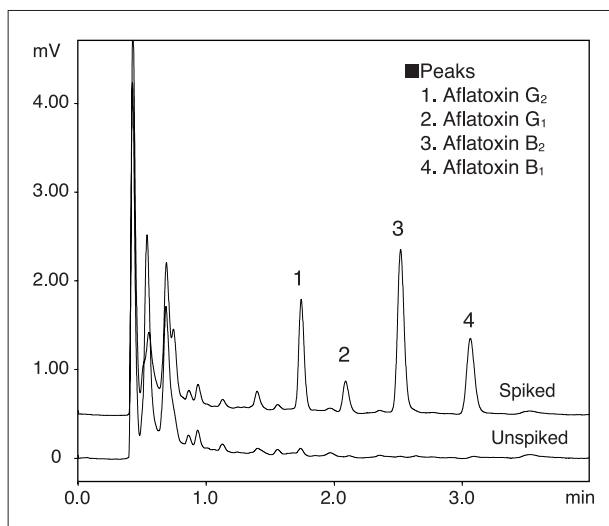


Fig. 5 小麦粉のクロマトグラム (8 μL注入)
(上段：標準添加, 下段：添加なし)
Chromatograms of Wheat Flour Samples (8 μL injected)
(Upper : Spiked, Lower : Unspiked)

高速高分離分析の応用 (その42)

Nexeraによる食品中アフラトキシンの分析 —イムノアフィニティカラムによる前処理—

High Speed with High Resolution Analysis (Part 42)

Analysis of Aflatoxins in Food by Nexera

Using Immunoaffinity Column for Sample Preparation

アフラトキシンは発がん性や急性毒性を持つカビ毒で、食品における汚染が厳しく監視されています。従来、国内のアフラトキシン規制はアフラトキシンB₁に対して行われていましたが、2011年10月より総アフラトキシン (アフラトキシンB₁, B₂, G₁, G₂の総和) を対象とすることになりました¹⁾。

通知試験法²⁾には、アフラトキシンの精製に多機能カラムもしくはイムノアフィニティカラムを用いるよう記述されています²⁾。このうち、香辛料や加工品など夾雑成分の多い試料では、イムノアフィニティカラムによる精製が有効と考えられます。

アプリケーションニュースNo. L422では、アフラトキシン分析の効率化をはかるため、超高速LCシステム“Nexera”によりアフラトキシン4成分を超高速分析し、さらに高感度蛍光検出器“Prominence RF-20Axs”を用いて、アフラトキシンを誘導体化処理なしで直接検出する方法をご紹介します。

ここでは、加工品および香辛料中のアフラトキシンをイムノアフィニティカラムで精製し、これを直接蛍光検出法で高速分析した例をご紹介します。

A. Nomura K. Watanabe

■食品試料の分析—イムノアフィニティカラムによる前処理

Analysis of Food Sample – Sample Preparation with Immunoaffinity Column

焙煎ピーナッツ (加工品) およびナツメグ (香辛料)^{※1}について、次ページFig. 2およびFig. 3の方法で前処理を行いました^{※2}。イムノアフィニティカラムには“AFLAKING” (堀場製作所製)^{※3}を用いました。各試料には、アフラトキシンB₁およびG₁が0.8 μg/kg、B₂およびG₂が0.2 μg/kgになるよう、標準液を添加しました。

Fig. 1に焙煎ピーナッツおよびナツメグの分析結果を、Table 1にその分析条件を示します。この分析方法では、コンベンショナル条件 (アプリケーションニュースNo. L428参照) に比べ、分析時間を約4分の1に短縮可能です。また、イムノアフィニティカラムを用いた前処理では、アフラトキシン以外の成分はほとんど検出されませんので、カラムをさらに短くしていっそうの高速化が期待できます。

なお、本分析法では、アフラトキシンB₁およびG₁をトリフルオロ酢酸(TFA)による誘導体化処理(水酸化体への変換)なしで直接高感度検出していますが、次ページFig. 4にTFA処理後分析した結果を参考として示します。

※1：焙煎ピーナッツおよびナツメグ試料は、財団法人マイコトキシン検査協会様よりご提供いただきました。

※2：通知試験法²⁾とは一部異なります。

※3：“AFLAKING”は株式会社島津ジーエルシーよりご購入いただけます。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODSII (100 mm L.×3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: Water / Methanol / Acetonitrile = 6 / 3 / 1 (v/v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 50 °C
Injection Volume	: 8 μL
Detection	: RF-20Axs Ex. at 365 nm, Em. at 450 nm
RF Cell	: Conventional cell
Cell Temp.	: 25 °C

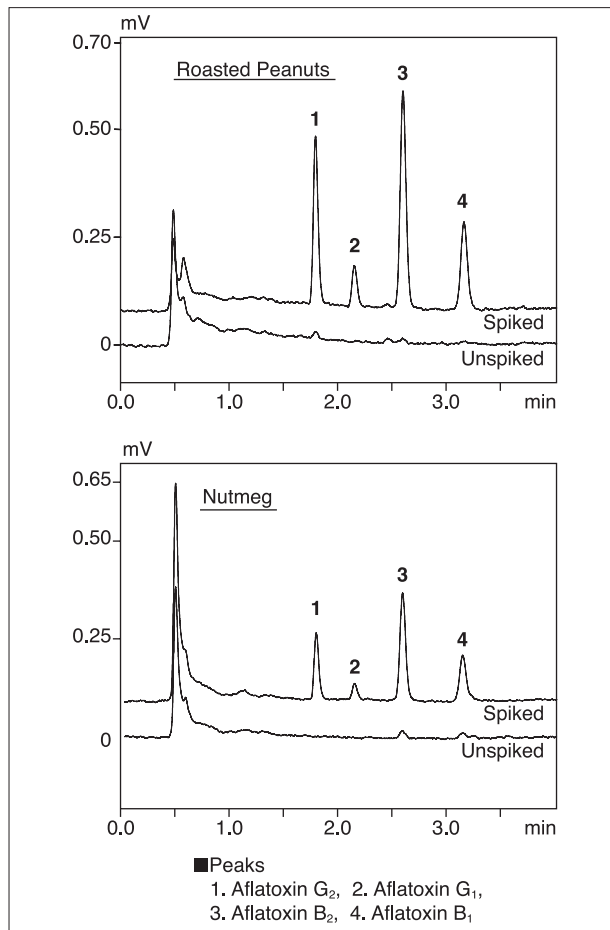


Fig. 1 焙煎ピーナッツおよびナツメグのクロマトグラム
(上段) アフラトキシン標準添加, (下段) 添加なし
Chromatograms of Roasted Peanuts and Nutmeg
(Upper) Spiked, (Lower) Unspiked

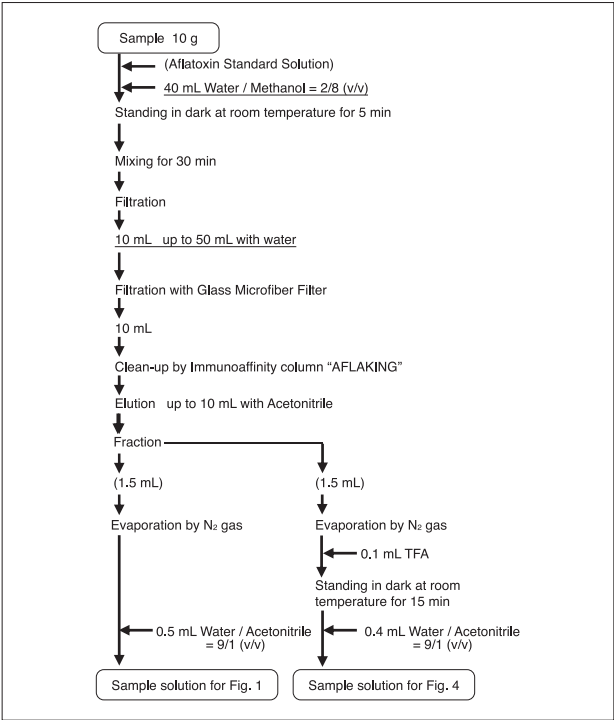


Fig. 2 焙煎ピーナツの前処理
Sample Preparation for Roasted Peanuts

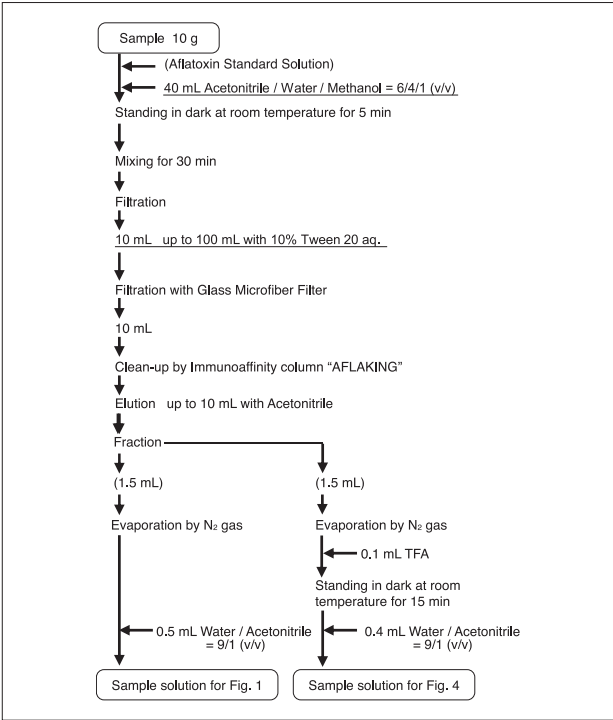


Fig. 3 ナツメグの前処理
Sample Preparation for Nutmeg

■トリフルオロ酢酸による誘導体化処理試料の分析
Analysis of Food Sample after Derivatization with Trifluoroacetic Acid

Fig. 4にTFA誘導体化処理を行った食品試料の分析結果を、Table 2にその分析条件を示します。各試料はFig. 2, Fig. 3に示すように、イムノアフィティカラムによる前処理後、TFAによる誘導体化処理を行いました。

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODSⅡ(100 mm L×3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: Water / Methanol / Acetonitrile = 6 / 3 / 1 (v/v/v)
Flow Rate	: 0.9 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 8 μL
Detection	: RF-20Axs Ex. at 365 nm, Em. at 450 nm
RF Cell	: Conventional cell
Cell Temp.	: 25 °C

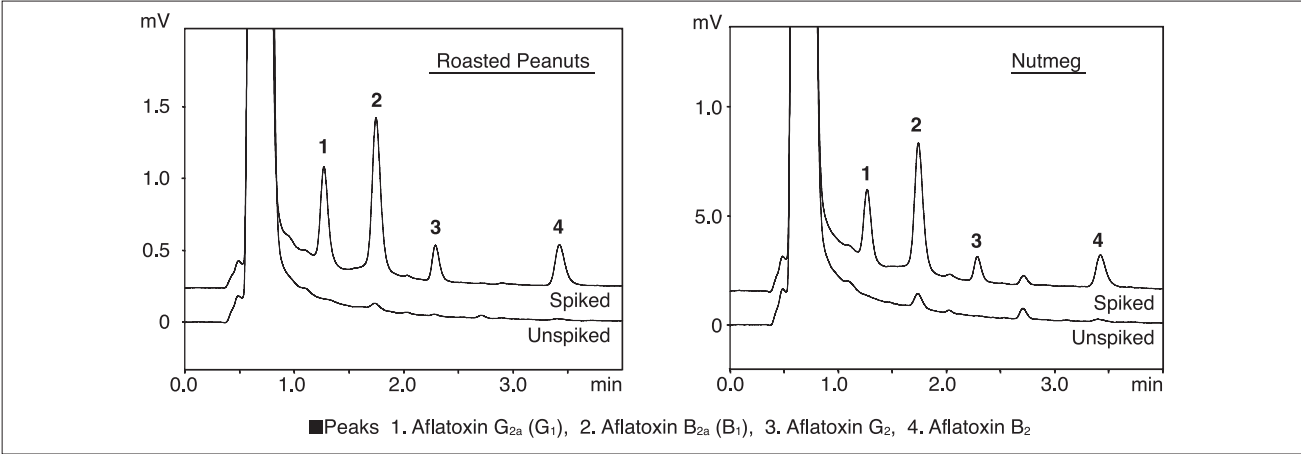


Fig. 4 焙煎ピーナツおよびナツメグのクロマトグラム-TFA誘導体化処理後:(上段) アフラトキシン標準添加, (下段) 添加なし
Chromatograms of Roasted Peanuts and Nutmeg-After Derivatization with TFA ; (Upper) Spiked, (Lower) Unspiked

[参考文献]
1) 「アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて」(平成23年3月31日, 厚生労働省食安発0331第5号)
2) 「総アフラトキシンの試験法について」(平成23年8月16日, 厚生労働省食安発0816第1号)

超高速分析の応用(その1) カテキン類, 合成着色料の分析

Ultra Fast Analysis (Part1) Analysis of Catechins and Artificial Colorings

近年様々な分野で分析のハイスループット化が求められています。“Prominence UFLC”は、高速高分離を目指して開発された超高速LCシステムであり、従来のLCと比較して時間短縮が達成されるのはもちろん、耐久性の向上やキャリーオーバーの抑制によってデータの信頼性を確保し、なおかつ通常のLC分析やカラムスイッチング

システムなどへの対応といった拡張性も有しています。本システムは新開発の高性能カラム“Shim-pack XR-ODS”の使用によって優れたパフォーマンスを発揮します。

ここでは“Prominence UFLC”とLCMS-2010EVを用いた、カテキン類および合成着色料の超高速分析例をご紹介します。

S.Kawano

■LC-MS用Shim-pack XR-ODS

Shim-pack XR-ODS for LC-MS Analysis

Shim-pack XR-ODSには、内径4.6 mm, 3.0 mmおよび2.0 mmの各種カラムが用意されていますが、LC-MS用としては、主にTable 2に示します内径2.0 mmのシリーズがご使用いただけます。

■カテキン類の分析

Analysis of Catechins

Fig.1に緑茶飲料中カテキン類8成分の分析例を示します。多くの分析において、選択性の高い質量分析計を用いること自体が高速化につながりますが、ジアステレオマーの分離にはカラムを始め、分離システムの果たす役割が重要です。従来の分析では20~30 min程度の分析時間が必要ですが、Prominence UFLCを用いることにより2.5 minに短縮することができました。

Table 2 分析条件
Analytical conditions for LC-MS

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mmL. × 2.0 mmI.D., 2.2 μm)
Mobile phase	: A; 0.1 % formic acid – water/tetrahydrofuran = 95/5 B; acetonitrile
Time program	: B Conc. 3 % (0 min)→35 % (2.5 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Column temperature	: 50 °C
Injection volume	: 2 μL
Probe voltage	: -3.5 kV (ESI-Negative mode)
Nebulizing gas flow	: 1.5 L/min
Drying gas pressure	: 0.2 MPa
CDL temperature	: 250 °C
Block heater temperature	: 200 °C
CDL, Q-array voltages	: using default values
SIM	: m/z 305 ((-)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin) m/z 289 ((+)-catechin, (-)-epicatechin) m/z 457 (-)-epigallocatechin gallate, (-)-gallocatechin gallate m/z 441 ((-)-epicatechin gallate, (-)-catechin gallate)

Table1 Shim-pack XR-ODS (LC-MS用)
Shim-pack XR-ODS for LC-MS analysis

Part number	Dimensions		Optimum flow rate (mL/min)
	Inner diameter (mm)	Length (mm)	
228-41605-91	2.0	30	0.4 – 0.5
228-41605-92		50	
228-41605-93		75	
228-41605-94		100	

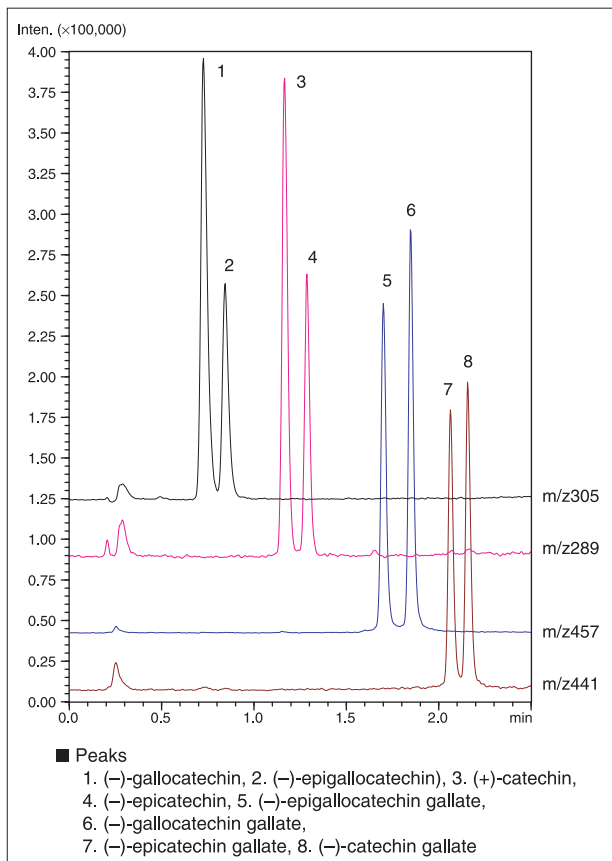


Fig.1 緑茶飲料中カテキン類のSIMクロマトグラム
SIM chromatograms of catechins in green tea

■合成着色料の分析

Analysis of Artificial Colorings

合成着色料標準品（10～100 $\mu\text{g/mL}$ ）の分析例をFig.2に示します。12成分を約5 minで分離することができました。イオン化法はESIを用い、ネガティブイオンを検出しました。合成着色料はナトリウム塩として供給されますが、ここでは水素置換体とし、全体の電荷がゼロのものを分子と考えます。多くの成分は $[\text{M-H}]^-$ の他、 $[\text{2M-H}]^-$ や $[\text{M-2H}]^{2-}$ を与えました（Fig.3）。フロキシシンは塩素原子と臭素原子を、ローズベンガルは塩素原子を複数含む複雑な同位体パターンを示します。これら複数のイオンは成分同定の有力な情報となりますが、マスペクトルの解釈をより容易にすることと、同時に測定したフォトダイオードアレイ検出器によるUVスペクトルを有効に活用するためにも十分な分離が必要になります。

Table3 分析条件
Analytical conditions for LC-MS

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mmL. $\times$ 2.0 mmI.D., 2.2 μm)
Mobile phase	: A; 20 mmol/L ammonium acetate buffer (pH 4.7) B; 20 mmol/L ammonium acetate buffer (pH 4.7) / acetonitrile = 1/1
Time program	: B Conc. 10 % (0 min) $\rightarrow$ 100 % (5.0 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Column temperature	: 40 $^{\circ}\text{C}$
Injection volume	: 5 μL
Probe voltage	: -3.5 kV (ESI-Negative mode)
Nebulizing gas flow	: 1.5 L/min
Drying gas pressure	: 0.2 MPa
CDL temperature	: 250 $^{\circ}\text{C}$
Block heater temperature	: 200 $^{\circ}\text{C}$
CDL, Q-array voltages	: using default values
SIM	: m/z 200 – 1200

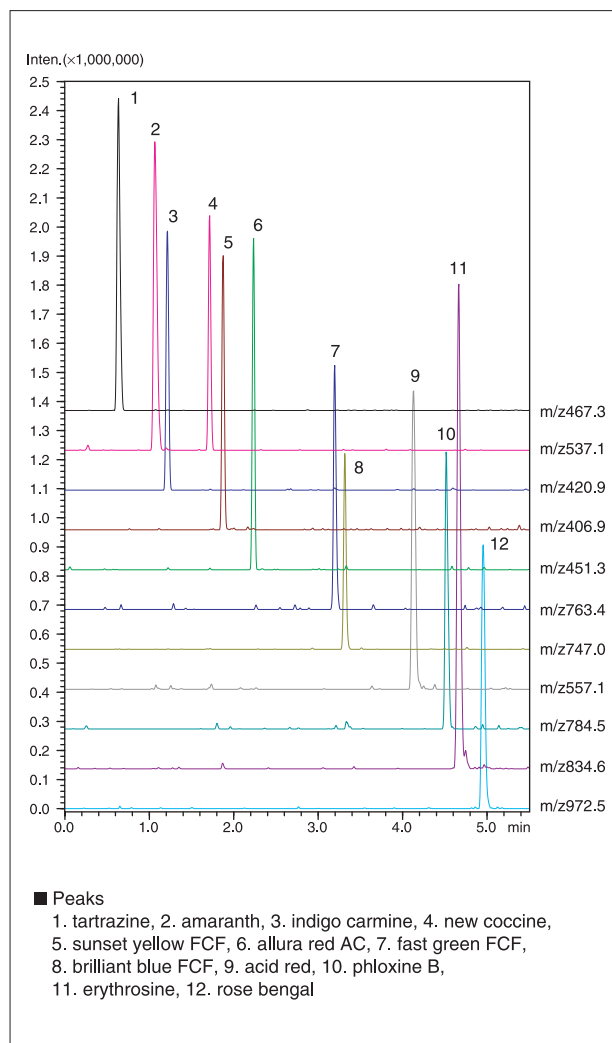


Fig.2 合成着色料のマスキロマトグラム
Mass chromatograms of artificial colorings

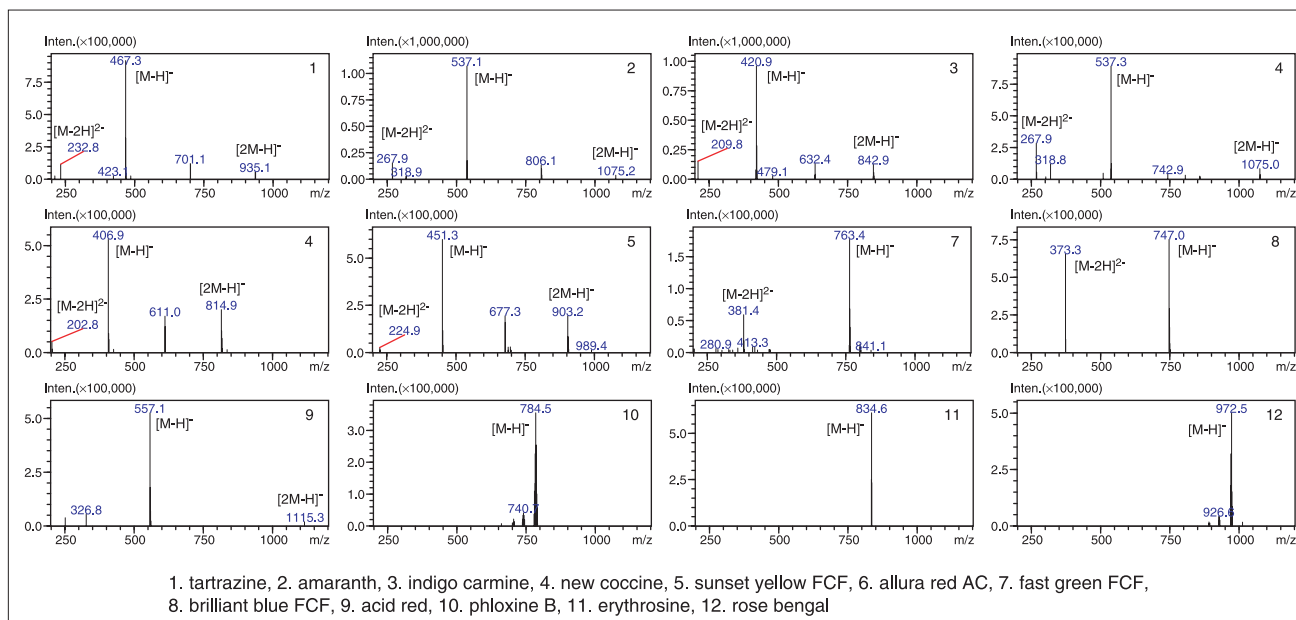


Fig.3 合成着色料のマスペクトル
Mass spectra of artificial colorings

高速高分離分析の応用（その5） 合成着色料の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 5) Analysis of Artificial Colorings

食品添加物として使用される着色料は、天然色素と合成品に分類されます。合成着色料の許可状況は各国で異なりますが、日本では現在12種類が指定されています。

ここでは、超高速LCシステム“Prominence UFLC”および高速高分離用高性能カラム“Shim-pack XR-ODS”を用いた合成着色料の高速一斉分析例をご紹介します。

K.Yamabe

■合成着色料12成分の分析

Analysis of 12 Artificial Colorings

食用赤色2号（アマランス）、食用赤色3号（エリスロシン）、食用赤色40号（アルラレッドAC）、食用赤色102号（ニューコクシン）、食用赤色104号（フロキシン）、食用赤色105号（ローズベンガル）、食用赤色106号（アシッドレッド）、食用黄色4号（タートラジン）、食用黄色5号（サンセットイエロー FCF）、食用緑色3号（ファストグリーンFCF）、食用青色1号（ブリリアントブルーFCF）、食用青色2号（インジゴカルミン）の12成分についての標準混合溶液（各10 mg/L）を調製し、その4 μ Lを注入しました。

Fig.1にフォトダイオードアレイ検出器による3波長クロマトグラムを、Table 1に分析条件を示します。黄色系着色料は450 nm、赤色系着色料は520 nm、青緑系着色料は620 nmのクロマトグラムでピーク同定を行いました。次ページFig.2には、ここで得られた各成分の吸収スペクトルを示します。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (75 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.2 μ m)
Mobile Phase	: A ; 50 mmol/L (Ammonium) acetate buffer (pH4.7) B ; 100 mmol/L (Ammonium) acetate buffer (pH4.7) /Acetonitrile (1 / 1)
Time Program	: B.Conc.10 % (0 min) $\rightarrow$ 50 % (0.5 min-0.6 min) $\rightarrow$ 100 % (2.6 min-3.0 min) $\rightarrow$ 10 % (3.0 min-6.5 min)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Injection Vol.	: 4 μ L
Detection	: SPD-M20A (450 nm, 520 nm, 620 nm)
Flow Cell	: Semi-micro Cell

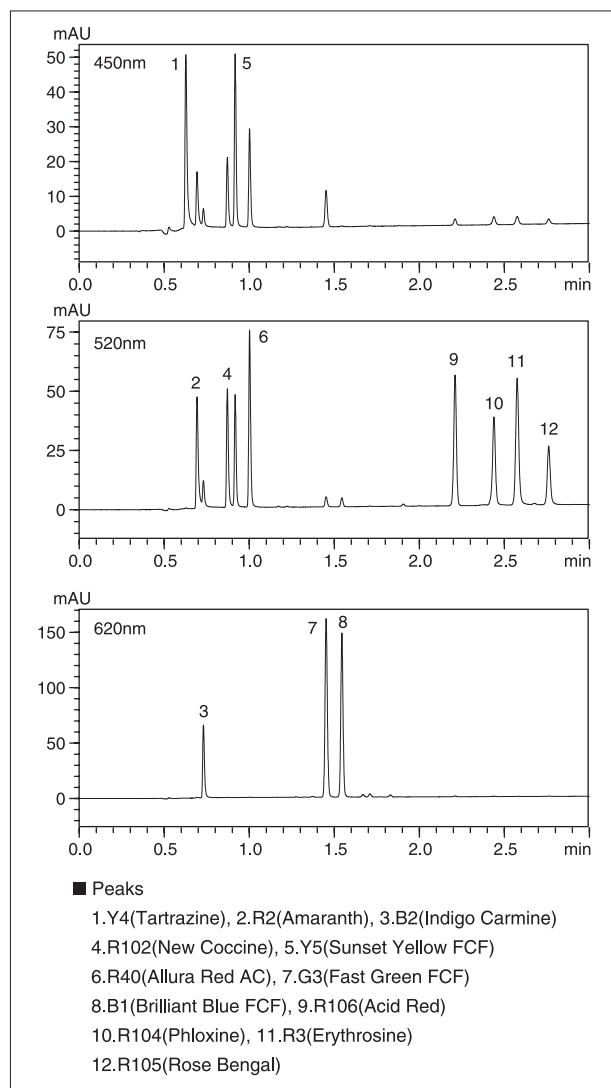


Fig.1 合成着色料12成分のクロマトグラム
Chromatograms of a Standard Mixture of 12 Artificial Colorings

■吸収スペクトル

UV-VIS Spectra

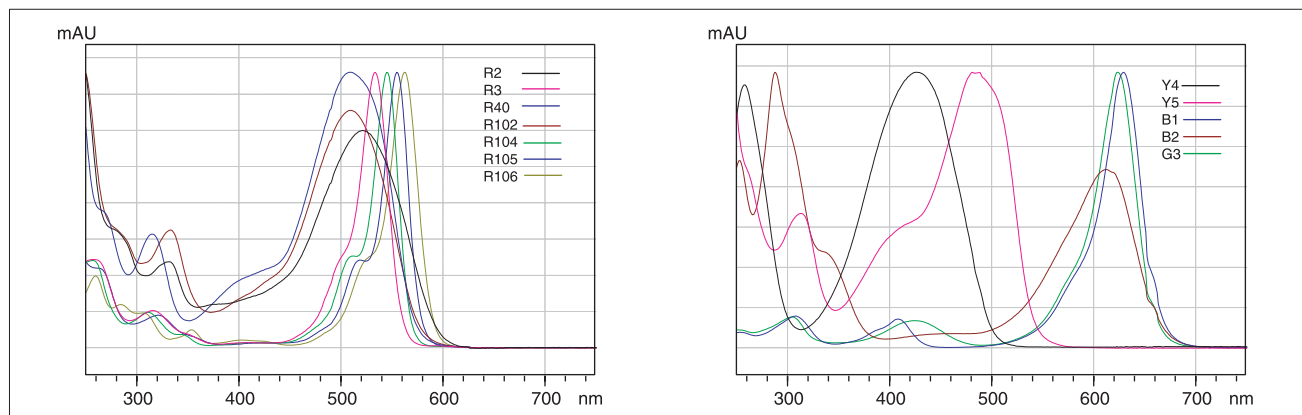


Fig.2 合成着色料12成分のスペクトル
UV-VIS Spectra of 12 Artificial Colorings

■その他の合成着色料との分離

Separation of Other Artificial Colorings

Fig.3下段に前記12成分のクロマトグラムを、また上段にその他日本では食品添加物として許可されていない合成色素9成分（各10 mg/L）のクロマトグラムを示します。これらクロマトグラムは、400～600 nmのMAXプロット

（指定した波長域における各ピークの極大波長によるプロット）で表しています。

また、Fig.4には両者の混合液による等高線プロットを示します。

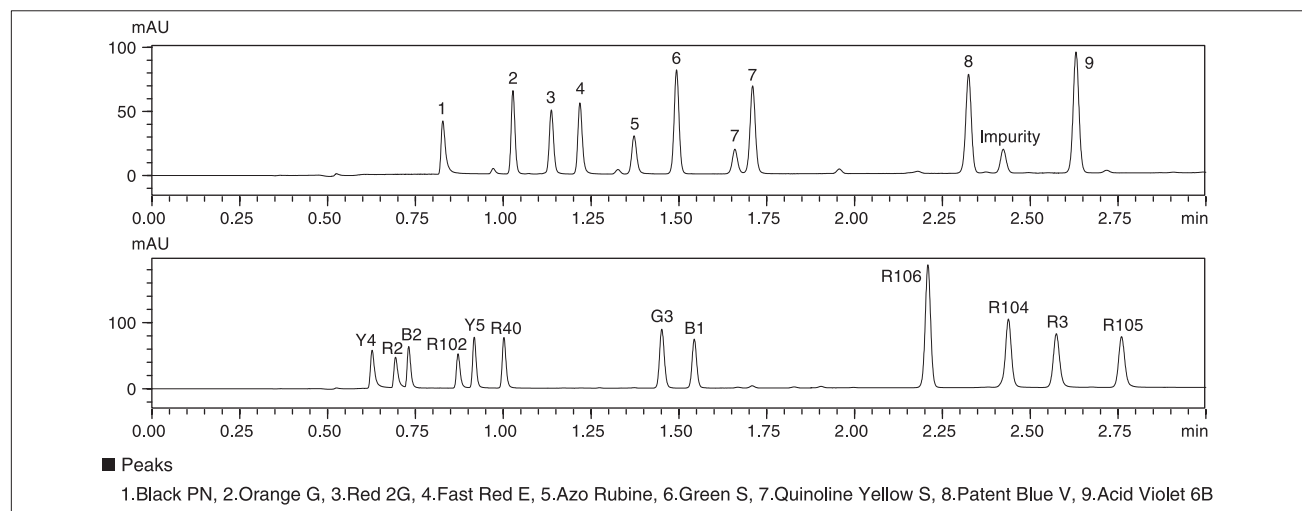


Fig.3 合成着色料のMAXプロット (400-600 nm) (上段:9成分,下段:12成分)
Max Plots (400-600 nm) of Standard Mixtures of Artificial Colorings (Upper: 9 Colorings, Lower : 12 Colorings)

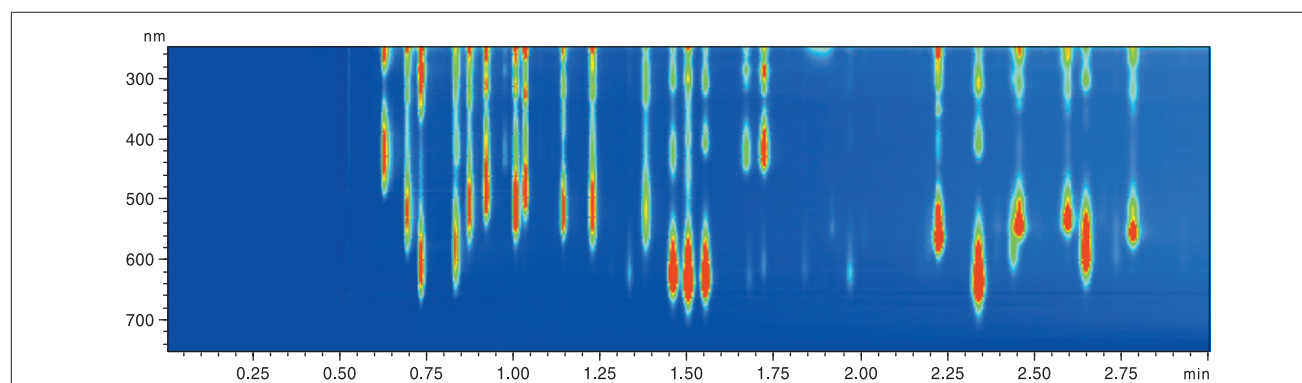


Fig.4 合成着色料21成分の等高線プロット
Contour Plot of a Standard Mixture of 21 Artificial Colorings

高速高分離分析の応用 (その38) “Nexera” による合成着色料の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 38)

Analysis of Artificial Colorings by “Nexera”

合成着色料の高速分析については、アプリケーションニュースNo. L349でご紹介しましたが、今回はいっそうの高速化を目指し、超高速LCシステム“Nexera”および高速

高分離分析用カラム“Phenomenex Kinetex C18”を用いた超高速分析例をご紹介します。

K. Yamabe

■合成着色料12成分の分析 Analysis of 12 Artificial Colorings

12種類のタール系合成着色料について一斉分析を行いました。カラムには、粒子径2.6 μm の“Phenomenex Kinetex C18” (1.9 μm のソリッドコアに極微粒子の多孔質シリカゲルを多層で結合 (層厚0.35 μm) させたCore-Shellカラム) を用い、フォトダイオードアレイ検出器“SPD-M20A”により波長400 nm~700 nmの最大吸光度 (MAXプロット) でモニタを行いました。

Fig. 1に合成着色料12成分標準混合液 (各50 mg/L水溶液) のクロマトグラムと等高線プロットを、Table 1にその分析条件を示します。

本分析条件により、12成分を1分以内に分離することができました。また、6回の繰り返し注入における各ピークの保持時間およびピーク面積再現性 (1 μL 注入) は、Table 2に示すように良好でした。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Phenomenex Kinetex 2.6 μm C18 100 Å (50 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.6 μm)
Mobile Phase	: A; 10 mmol/L Ammonium acetate B; 10 mmol/L Ammonium acetate / Acetonitrile = 1/1 (v/v)
Flow Rate	: 2.5 mL/min
Time Program	: B Conc. 5 % (0.0 min) $\rightarrow$ 100 % (1.1-1.6 min) $\rightarrow$ 5 % (1.61-2.4 min)
	• Mixer : 20 μL
Column Temp.	: 40 $^{\circ}\text{C}$
Injection Volume	: 1 μL
Detection	: SPD-M20A Max Plot 400-700 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

Table 2 合成着色料12成分の再現性 (n=6)
Repeatability of 12 Artificial Colorings (n=6)

Peak No.	Retention Time %RSD	Peak Area %RSD
1	0.103	0.117
2	0.069	0.161
3	0.047	0.289
4	0.068	0.219
5	0.091	0.116
6	0.057	0.203
7	0.066	0.170
8	0.056	0.206
9	0.021	0.073
10	0.034	0.117
11	0.032	0.140
12	0.037	0.148

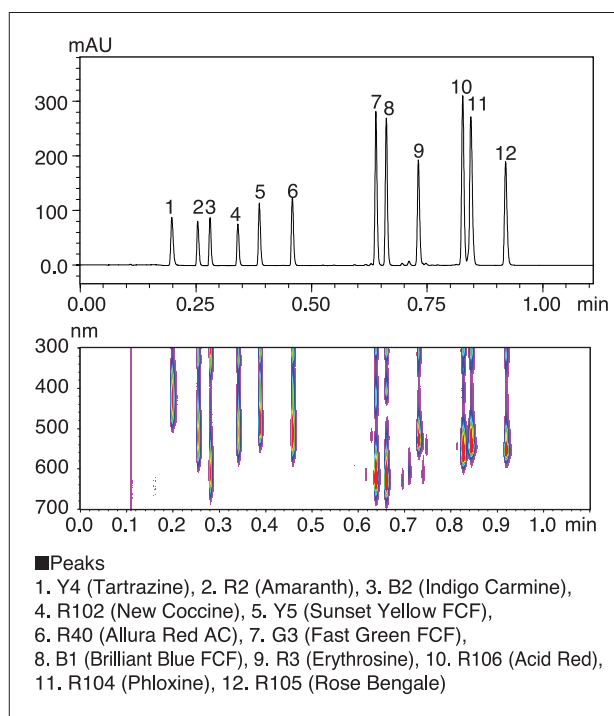
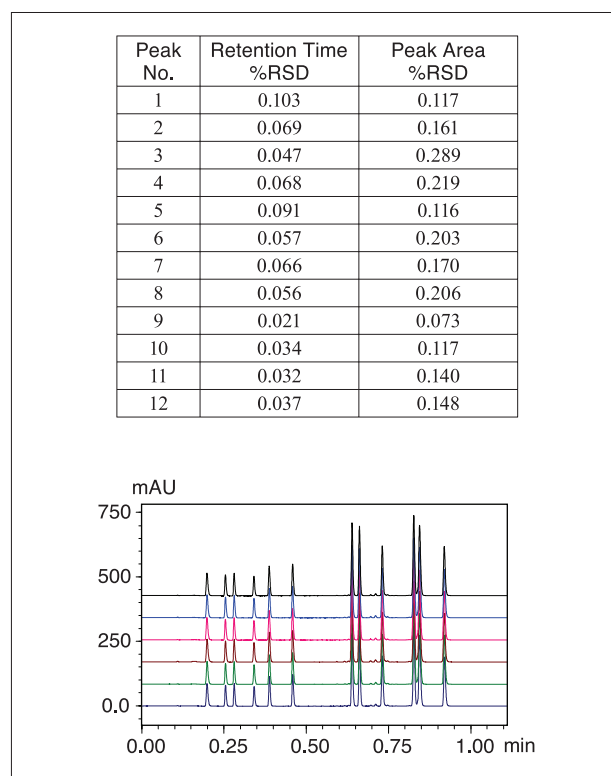


Fig. 1 合成着色料12成分のクロマトグラムおよび等高線プロット (各 50 mg/L 水溶液)
Chromatogram and Contour Plot of a Standard Mixture of 12 Artificial Colorings (50 mg/L each)



食品中合成着色料の分析
Analysis of Artificial Colorings in Food

Table 1の分析条件により、漬汁と飴の抽出液を測定しました。標準品と保持時間が一致する検出ピークは、それぞれ

れスペクトルパターンも一致しました。

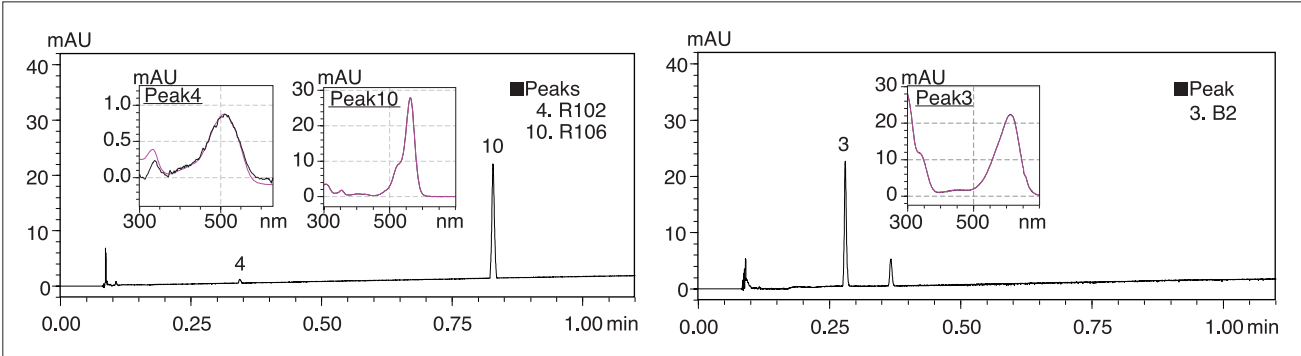


Fig. 2 食品中合成着色料のクロマトグラムおよびスペクトル (左：漬汁，右：飴)
Chromatograms and Spectra of Artificial Colorings in Food (Left : Pickle, Right : Candy)

合成着色料21成分の分析
Analysis of 21 Artificial Colorings

前ページの合成着色料12成分に、さらに9成分を加えた合計21成分について、グラジエント溶離条件を検討することにより (Table 3)、2分以内に一齐分析することができました。

Fig. 3に、MAXプロットおよび3波長のクロマトグラムを示します。黄色系着色料を450 nm、赤色系着色料は520 nm、青緑系着色料は620 nmのクロマトグラムでピークを同定しました。このように、フォトダイオードアレイ検出器では、各成分に適した検出波長を選択して定量を行うことができます。MAXプロットでは、ピーク20 (Orange II) とピーク21 (Patent Blue V) が重なりますが、Fig. 4に示すように450 nmと620 nmではそれぞれ他方の成分がほとんど検出されず、別々に定量することが可能です。

Table 3 分析条件*
Analytical Conditions

Time Program	: B Conc. 5 % (0.0 min) → 100 % (2.5-2.7 min) → 5 % (2.71-3.5 min)
Detection	: SPD-M20A Max Plot 400-700 nm, 450 nm, 520 nm, 620 nm

*その他条件はTable 1と同じ

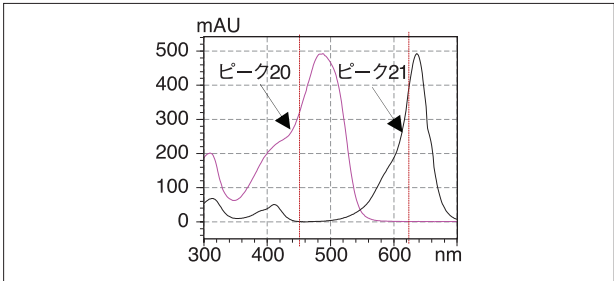


Fig. 4 ピーク20およびピーク21のスペクトル
Spectra of Peak 20 and Peak 21

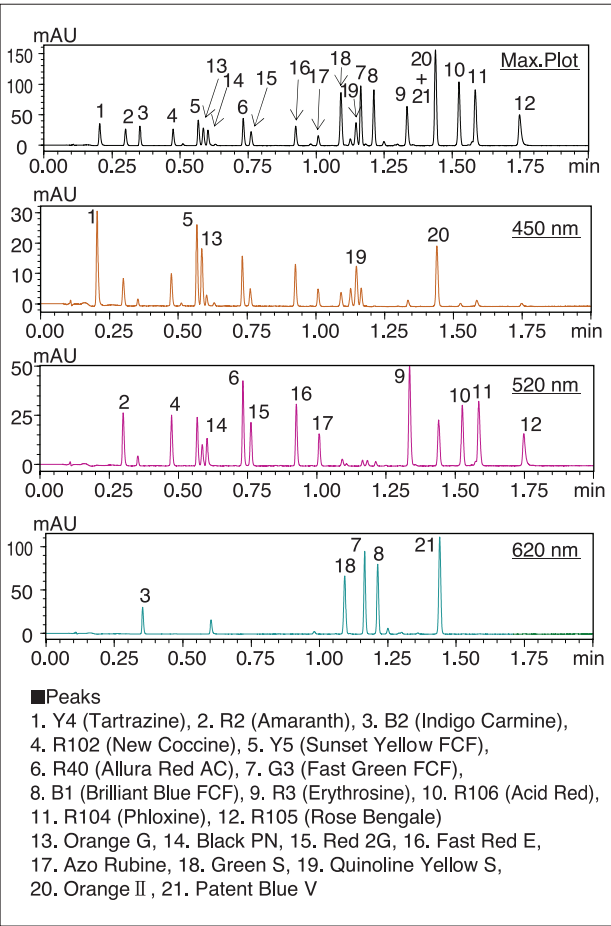


Fig. 3 合成着色料21成分のマルチクロマトグラム (各25 mg/L)
Multi-Chromatogram of a Standard Mixture of 21 Artificial Colorings (25 mg/L each)

高速高分離分析の応用（その7） 安息香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 7) Analysis of Benzoic Acid, Sorbic Acid, and Dehydroacetic Acid

食品の微生物の増殖抑制や食中毒の予防を目的として、安息香酸（ナトリウム）、ソルビン酸（カリウム）、デヒドロ酢酸ナトリウムなどの保存料が用いられていますが、一般に食品中のこれら成分の分析はHPLCにより行われます。

ここでは、超高速LCシステム“Prominence UFLC”および高速高分離用高性能カラム“Shim-pack XR-ODS”を用いた安息香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸の高速分析例をご紹介します。

T.Yamaguchi

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

Fig.1に安息香酸，ソルビン酸およびデヒドロ酢酸の構造式を示します。

安息香酸，ソルビン酸およびデヒドロ酢酸の標準混合溶液（各10 mg/L）をShim-pack XR-ODS（粒子径2.2 μ m）と汎用カラムShim-pack VP-ODS（粒子径4.6 μ m）で分析

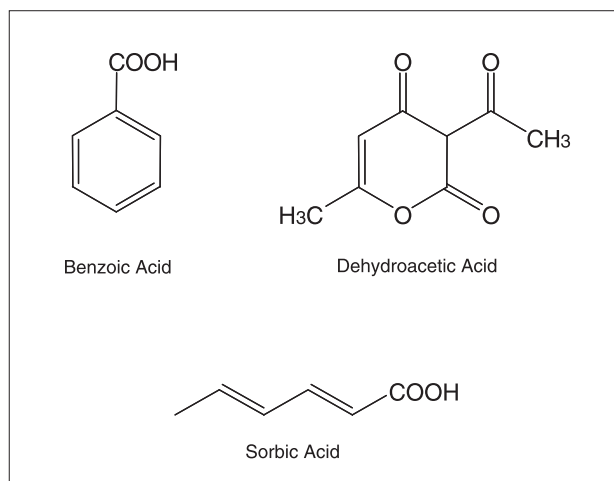


Fig.1 食品保存料3成分の構造式
Structures of 3 Food Preservatives

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (75 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.2 μ m) Shim-pack VP-ODS (150 mm L. $\times$ 4.6 mm I.D., 4.6 μ m)
Mobile Phase	: 5 mmol/L (Sodium) Citrate buffer (pH4.2) / Acetonitrile = 3 / 1 (v / v)
Flow Rate	: 1.0 mL/min (XR-ODS) 1.0 mL/min (VP-ODS)
Column Temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Injection Vol.	: 4 μ L (XR-ODS) 10 μ L (VP-ODS)
Detection	: SPD-20A at 230 nm
UV Cell	: Semi-micro cell (XR-ODS) Conventional cell (VP-ODS)

した例をFig.2に，またその分析条件をTable 1に示します。

Shim-pack XR-ODSでは，Shim-pack VP-ODSに対して1/2の長さのカラムを用い移動相線速度を約2.4倍に高めて分析することにより，分離を保ちつつ，1サイクルの分析時間を約1/5に短縮することができました。

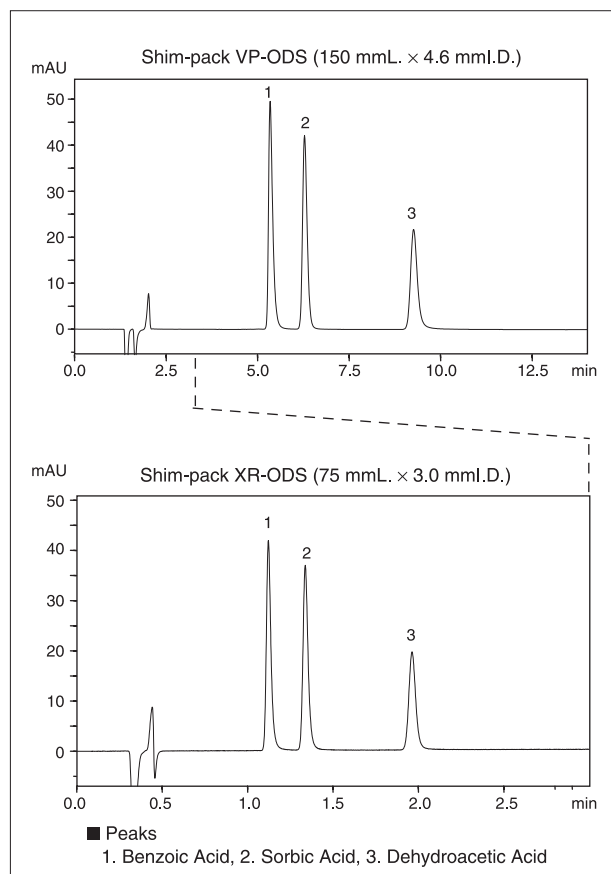


Fig.2 食品保存料3成分のクロマトグラム
(上段:Shim-pack VP-ODS,下段: Shim-pack XR-ODS)
Chromatogram of a Standard Mixture of 3 Food Preservatives
(Upper:Shim-pack VP-ODS, Lower:Shim-pack XR-ODS)

■直線性

Linearity

Fig.3にShim-pack XR-ODSを用いた安息香酸、ソルビン酸およびデヒドロ酢酸標準混合溶液（各1.0～100 mg/L）の検量線を示します。いずれの成分も寄与率（ R^2 ）0.9999と良好な直線性が得られました。

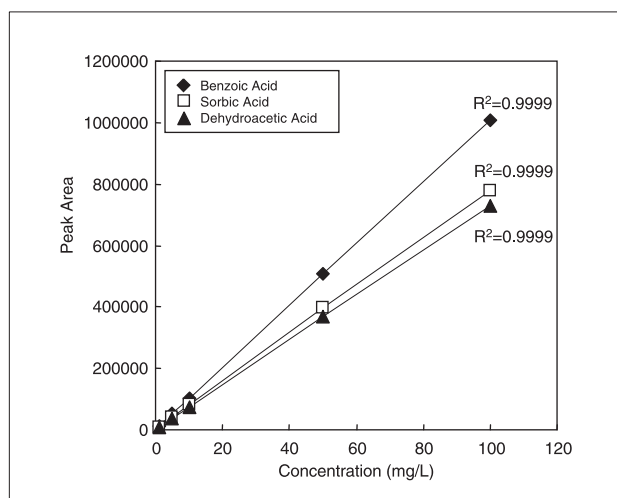


Fig.3 直線性 (各1～100 mg/L, 4 μ L注入)
Linearity (1~100 mg/L each, 4 μ L injected)

■再現性

Repeatability

Table 2に同様に安息香酸、ソルビン酸およびデヒドロ酢酸標準混合溶液（各1.0 mg/L）を分析した際の保持時間およびピーク面積の相対標準偏差（ $n=6$ ）を示します。

Table 2 食品保存料3成分の再現性
Repeatability of Retention Time and Peak Area of
3 Food Preservatives

Compounds	Retention Time	Peak Area
	%RSD	%RSD
Benzoic Acid	0.035	0.68
Sorbic Acid	0.049	0.80
Dehydroacetic Acid	0.037	0.67

■清涼飲料水の分析

Analysis of Soft Drink

Fig.4にShim-pack XR-ODSを用いて市販清涼飲料水を分析した例を示します。分析条件はTable 1と同じです。清涼飲料水は精製水で10倍に希釈，メンブランフィルタ（孔径0.2 μ m）でろ過後，4 μ Lを注入しました。

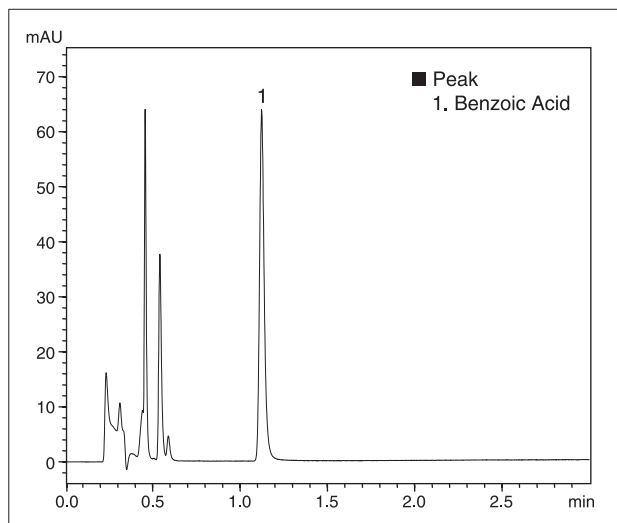


Fig.4 清涼飲料水のクロマトグラム
Chromatogram of Soft Drink

■漬物汁の分析

Analysis of Pickle Squeeze

Fig.5に漬物汁を分析した例を示します。分析条件はTable 1と同じです。漬物汁は遠心分離後に上澄み液を採取し精製水で10倍に希釈，メンブランフィルタ（孔径0.2 μ m）でろ過後，4 μ Lを注入しました。

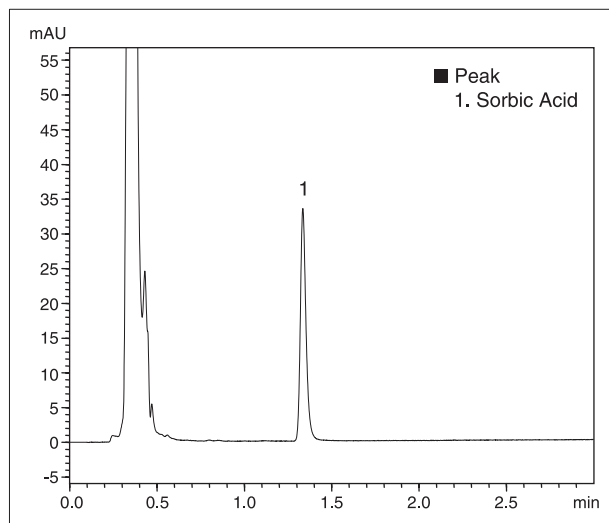


Fig.5 漬物汁のクロマトグラム
Chromatogram of Pickle Squeeze

高速高分離分析の応用（その8） アスコルビン酸，エリスルビン酸の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 8) Analysis of Ascorbic Acid and Erythorbic Acid

食品に酸化防止剤として使用されるアスコルビン酸およびエリスルビン酸の分析法としては、アミノ基化学結合充填剤とアセトニトリル/水系移動相を組み合わせた親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）モードによるHPLCが広く用いられています。

ここでは、超高速LCシステム“Prominence UFLC”と高速分析用HILICモードカラム“Phenomenex LUNA NH₂”（粒子径 3 μ m）を用いたアスコルビン酸およびエリスルビン酸の高速高分離分析例をご紹介します。

K. Watanabe, M. Bendo*
（※株式会社島津ジーエルシー）

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

Fig.1 にアスコルビン酸，エリスルビン酸の構造式を示します。

アスコルビン酸およびエリスルビン酸標準混合溶液（各 20 mg/L）の分析例をFig.2に、その分析条件をTable 1に示します。なお、標準混合溶液はアセトニトリル/水（8/2、

v/v）溶液を用いて調製し、すみやかにその2 μ Lを注入しました。

このように、“Phenomenex LUNA NH₂”（粒子径3 μ m）を用いると、長さ50 mmのカラムで分離を損なうことなく1.5分以内に1分析を終了することが可能となります。

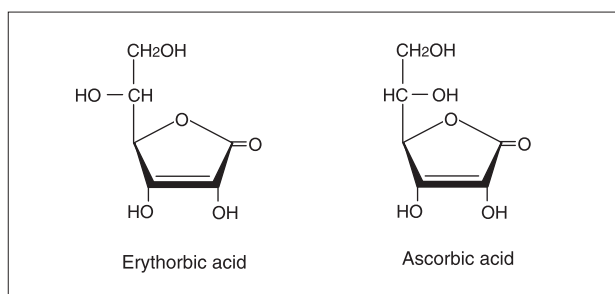


Fig.1 構造式
Structures

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Phenomenex LUNA NH ₂ (50 mmL. × 3.0 mmI.D., 3 μ m)
Mobile Phase	: 50 mmol/L (Triethanolamine) phosphate buffer (pH 2.2) / Acetonitrile = 15 / 85 (v/v)
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Injection vol.	: 2 μ L
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-20AV at 240 nm

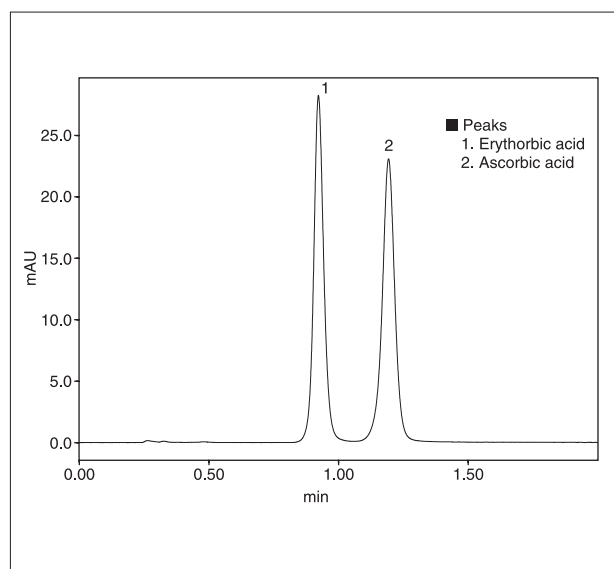


Fig.2 アスコルビン酸およびエリスルビン酸のクロマトグラム
（各20 mg/L, 2 μ L注入）
Chromatogram of a Standard Mixture of Ascorbic Acid
and Erythorbic Acid (20 mg/L each, 2 μ L injected)

■低濃度試料の分析

Analysis of Low Concentration Standard Solution

Fig.3 にアスコルビン酸およびエリソルビン酸標準混合溶液（各0.2 mg/L, 2 μ L注入）のクロマトグラムを示します。この分析を5回繰り返した際のピーク面積の再現性（%RSD）はアスコルビン酸1.75%, エリソルビン酸1.39%となりました。

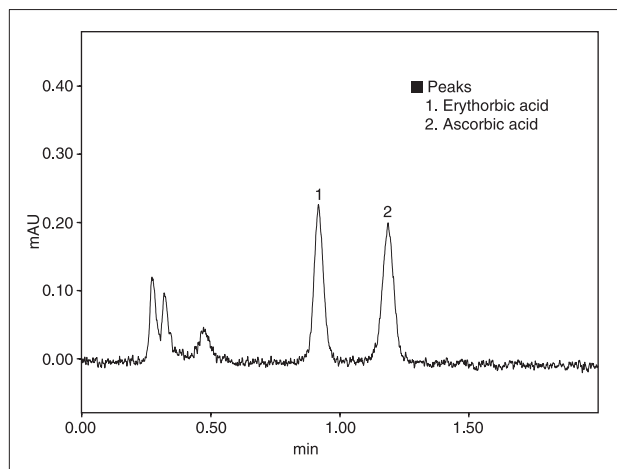


Fig.3 アスコルビン酸およびエリソルビン酸のクロマトグラム
（各0.2 mg/L, 2 μ L注入）
Chromatogram of a Standard Mixture of Ascorbic Acid
and Erythorbic Acid (0.2 mg/L each, 2 μ L injected)

■直線性

Linearity

Fig.4 に 0.2~100 mg/Lにおけるアスコルビン酸およびエリソルビン酸の検量線（各濃度の標準混合溶液を3回繰り返し分析し、その平均ピーク面積から作成）を示します。両成分とも寄与率（ R^2 ）=0.9999と良好な直線性が得られました。

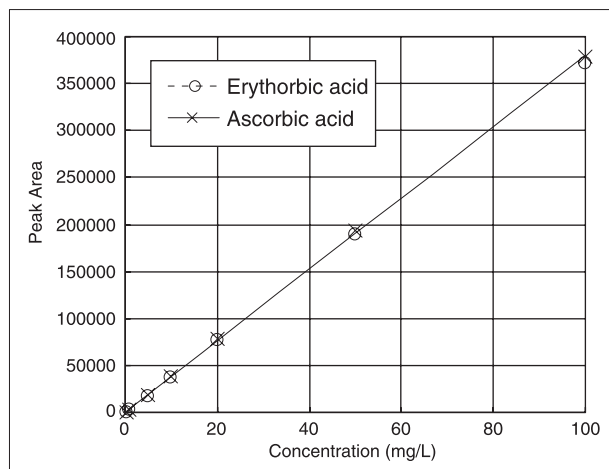


Fig.4 直線性 (0.2~100 mg/L, 2 μ L注入)
Linearity (0.2~100 mg/L, 2 μ L injected)

■清涼飲料水の分析

Analysis of Soft Drink

Fig.5, 6 に市販清涼飲料水の分析例を示します。清涼飲料A（ビタミン入り飲料）は純水で10倍希釈しアセトニトリル/水（8/2, v/v）溶液で10倍希釈後、また清涼飲料

B（緑茶飲料）は純水で5倍希釈しアセトニトリルで5倍希釈後、それぞれメンブランフィルタ（孔径0.2 μ m）でろ過を行い、その2 μ Lを注入しました。

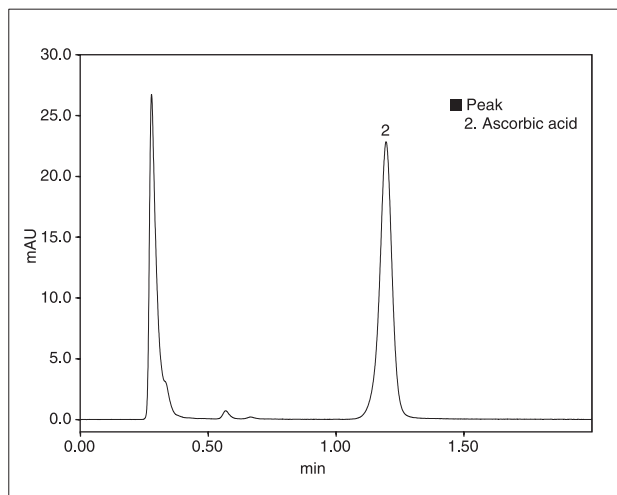


Fig.5 清涼飲料Aのクロマトグラム (2 μ L注入)
Chromatogram of Soft Drink A (2 μ L injected)

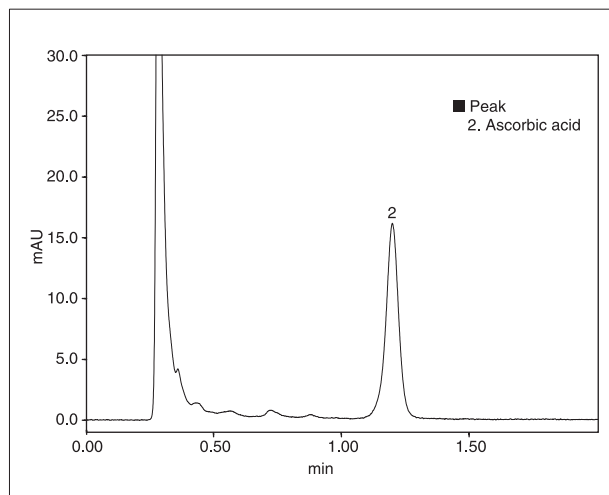


Fig.6 清涼飲料Bのクロマトグラム (2 μ L注入)
Chromatogram of Soft Drink B (2 μ L injected)

高速高分離分析の応用（その14） ルテイン，ゼアキサンチンの分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 14) Analysis of Lutein and Zeaxanthin

ルテインおよびゼアキサンチンは、食品添加物（既存添加物）であるマリーゴールド色素に含まれる成分で、カロテノイドの一種です。これら成分は、近年白内障や加齢性黄斑変性症（AMD）の予防に効果があると言われています。

ここでは、マリーゴールドエキス含有栄養補助食品に着目し、超高速LCシステム“Prominence UFLC”およびフォトダイオードアレイ検出器SPD-M20Aを用いたルテインとゼアキサンチンの分析例をご紹介します。

Y.Nakae

標準試料の分析

Analysis of a Standard Solution

Fig.1にルテインとゼアキサンチンの構造を示します。これら2成分は構造が類似した構造異性体であり、一般に逆相クロマトグラフィーで完全分離させるには工夫が必要です。ここでは、水/メタノール系移動相に対して、さらにテトラヒドロフランを加えることにより、選択性を改善して分離の効率化をはかりました。

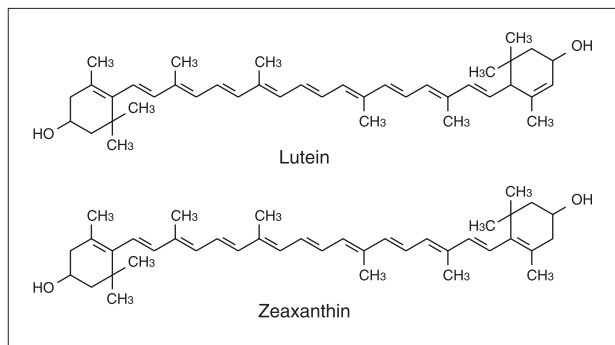


Fig.1 ルテイン、ゼアキサンチンの構造式
Structures of Lutein and Zeaxanthin

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (75 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.2 μm) : Shim-pack VP-ODS (150 mmL. × 4.6 mmI.D., 4.6 μm)
Mobile Phase	: A : Methanol/Tetrahydrofuran/Water= 45/30/25(v/v/v) : B : Tetrahydrofuran
Time Program	: (XR-ODS) B conc. 0 % (0.00-4.50 min)→100 % (4.51-5.50 min) →0 % (5.51-7.50 min) (VP-ODS) B conc. 0 % (0.00-15.50 min)→100 % (15.51-20.00 min) →0 % (20.01-25.00 min)
Flow Rate	: 0.8 mL/min (XR-ODS), 1.0 mL/min (VP-ODS)
Injection Vol.	: 2 μL (XR-ODS), 5 μL (VP-ODS)
Column Temp.	: 50 °C
Detection	: SPD-M20A at 450 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell (XR-ODS) Conventional Cell (VP-ODS)

また、高速高分離用カラム“Shim-pack XR-ODS”（粒子径2.2 μm）を用いることにより、コンベンショナルカラム“Shim-pack VP-ODS”（粒子径4.6 μm）の分離を保ちつつ、分析時間を約1/4に短縮することができました。Table 1に分析条件を示します。本条件では、実試料分析のためにカラム洗浄工程を加えています。

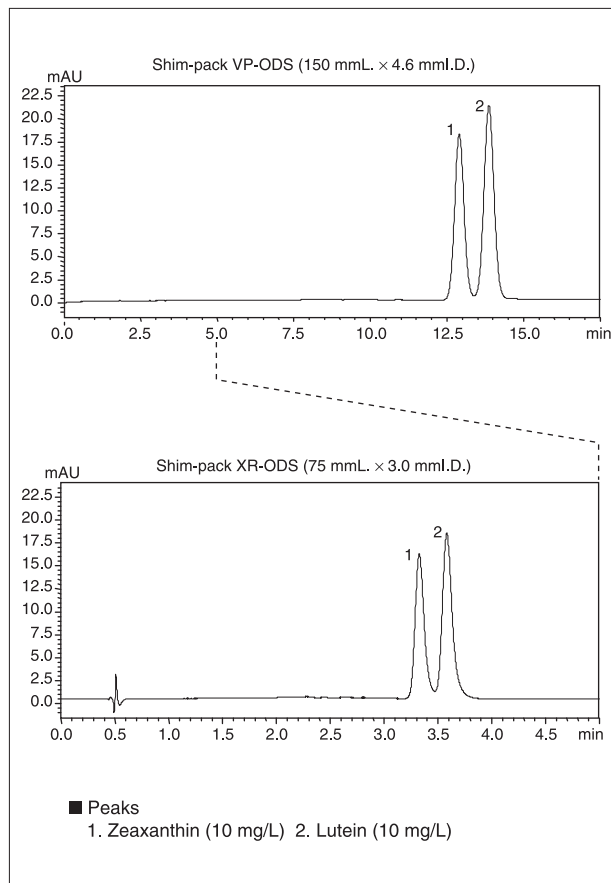


Fig.2 ルテインおよびゼアキサンチンのクロマトグラム
Chromatograms of a Standard Mixture of Lutein and Zeaxanthin

■栄養補助食品の分析

Analysis of Dietary Supplement

Fig.3に市販マリーゴールドエキス含有栄養補助食品（カプセル）の分析例を示します。Fig.4は試料前処理手順です。

Fig.5は標準試料と栄養補助食品中各成分のスペクトルを重ね描きした結果を表しています。

また、Fig.6に栄養補助食品の三次元表示例を示します。

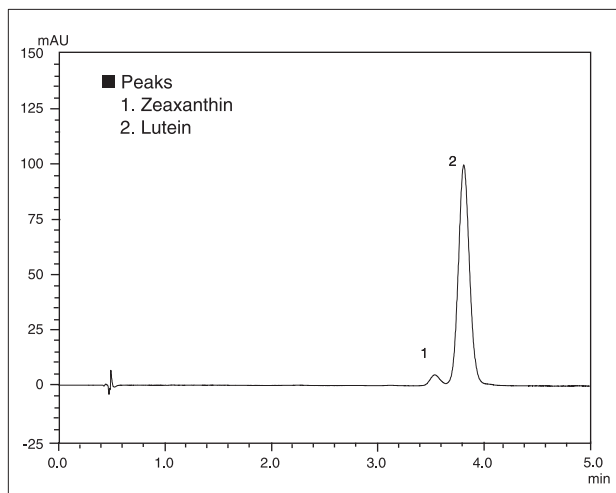


Fig.3 栄養補助食品のクロマトグラム
Chromatogram of Dietary Supplement

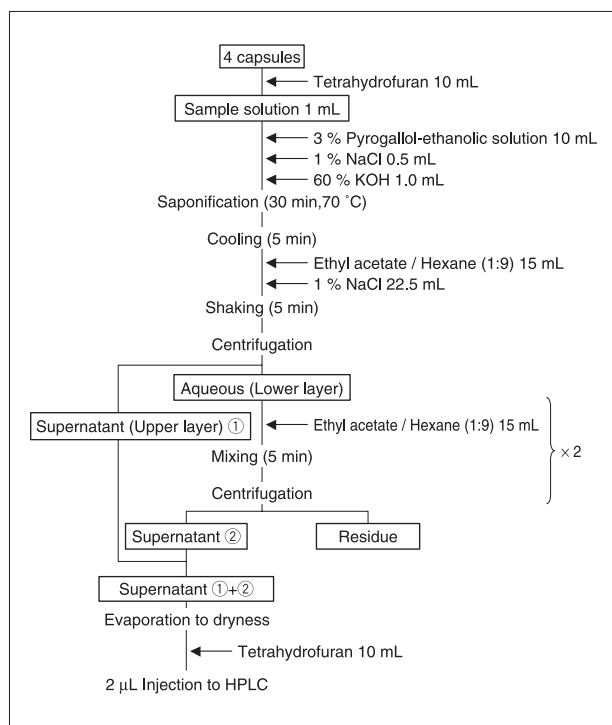


Fig.4 前処理手順
Sample Preparation

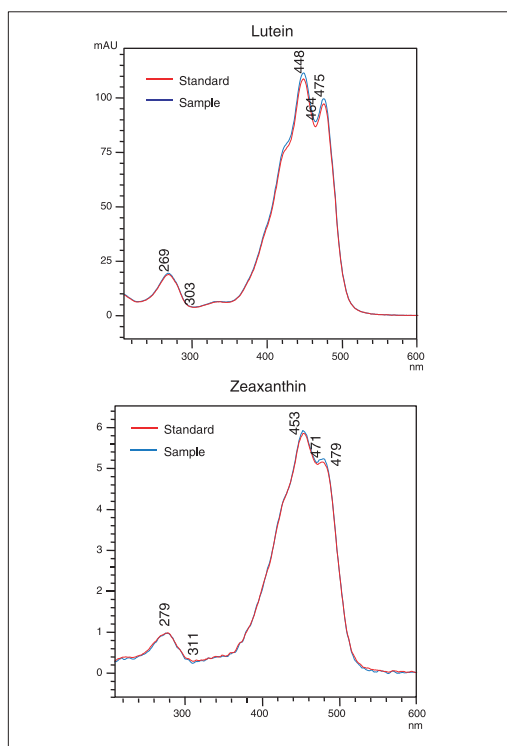


Fig.5 ルテインおよびゼアキサンチンのスペクトル
Spectra of Lutein and Zeaxanthin

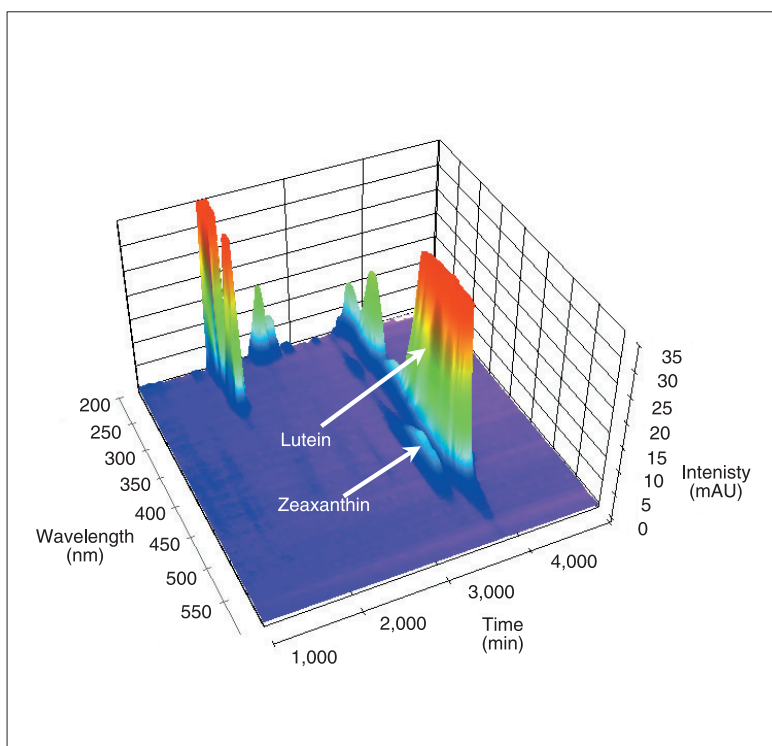


Fig.6 栄養補助食品の三次元表示
3-D Plot of Dietary Supplement

[参考文献]

- 1) 財団法人日本食品分析センター：五訂 日本食品標準成分表 分析マニュアルの解説
- 2) 江川幸恵・馬場強三：長崎県衛生公害研究所報，49,100（2003）

蒸発光散乱検出器の応用（その10） グルコシルセラミドの高速分析

Application of Evaporative Light-Scattering Detector (Part 10)

High Speed Analysis of Glucosylceramide

植物由来のグルコシルセラミドは、保湿効果、抗アトピー効果などの作用が報告されており、化粧品やサプリメントなどに広く用いられています。

ここでは、蒸発光散乱検出器“ELSD-LT II”を超高速LCシステム“Nexera”に接続して、サプリメント中グルコシルセラミドの高速分析を行った例をご紹介します。

H. Terada

■標準溶液の分析

Analysis of Standard Solution

Fig. 1に、米由来グルコシルセラミド主成分の構造式を示します。グルコシルセラミドは、グルコースにセラミドが結合したスフィンゴ糖脂質の一種で、光吸収性をほとんど有しないため、HPLC分析では蒸発光散乱検出器が有効です。

カラムには、超高速分析用“Shim-pack XR-SIL”（粒子径 2.2 μm）を用い、クロロホルムとメタノール/水混合液によるグラジエント溶離法により分析しました。Fig. 2に、グルコシルセラミド標準液（500 mg/L、クロロホルム/メタノール=2/1溶液）のクロマトグラムを、Table 1にその分析条件を示します。

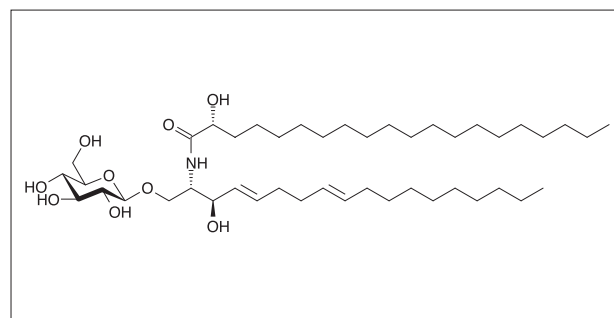


Fig. 1 米由来グルコシルセラミド（主成分）の構造式
Structure of Glucosylceramide from Rice (Major Compound)

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-SIL (75 mmL. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A; Chloroform B; Methanol / Water = 95 / 5 (v/v) B Conc. 1 % (0.0 min) → 25 % (3.0 min) → 90 % (4.0 min) → 1 % (5.0 min) → 1 % (8.0 min)
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Column Temp.	: 35 °C
Injection Volume	: 1 μL
Detection	: ELSD-LT II Temperature : 40 °C Gain : 6 Nebulizer Gas : N ₂ Gas Pressure : 350 kPa

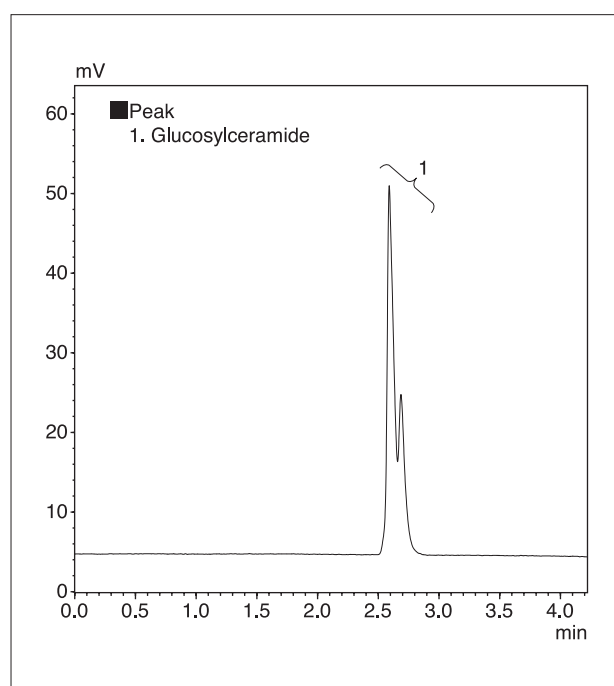


Fig. 2 米由来グルコシルセラミド標準液のクロマトグラム (500 mg/L, 1 μL 注入)
Chromatogram of Glucosylceramide from Rice (500 mg/L, 1 μL injected)

■検量線

Calibration Curve

Fig. 3に、グルコシルセラミド標準液20～1000 mg/Lで作成した検量線を示します。ELSDのレスポンスは、注入した物質質量に対して指数関数応答であるため、検量線は両対数でプロットして定量に用います。なお、検量線、再現性評価にはグルコシルセラミド由来の2つのピーク面積合計値を用いました。

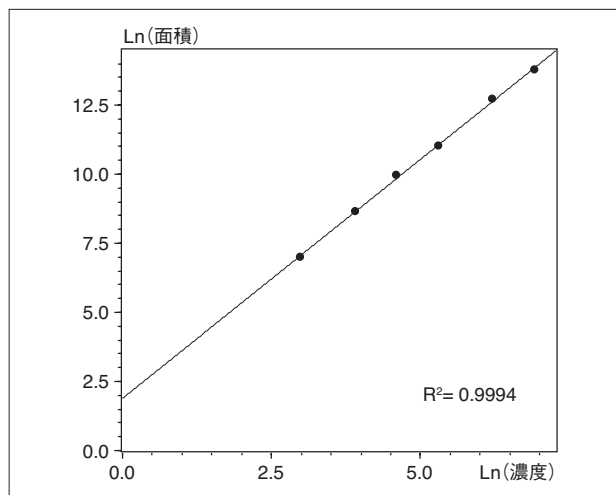


Fig. 3 検量線
Calibration Curve

■再現性

Repeatability

Table 2に、グルコシルセラミド標準液200 mg/Lによるピーク面積の相対標準偏差 (n=6) を示します。

Table 2 ピーク面積再現性
Repeatability of Peak Area

No.	Peak Area
1 st	51,223
2 nd	50,412
3 rd	48,021
4 th	49,716
5 th	47,799
6 th	49,822
Average	49,499
RSD(%)	2.715

■米由来グルコシルセラミド含有サプリメントの分析

Analysis of Dietary Supplement Containing Glucosylceramide from Rice

米由来グルコシルセラミドが含有されている市販サプリメントの分析を行いました。Fig. 4に前処理手順を、Fig. 5にクロマトグラムを示します。

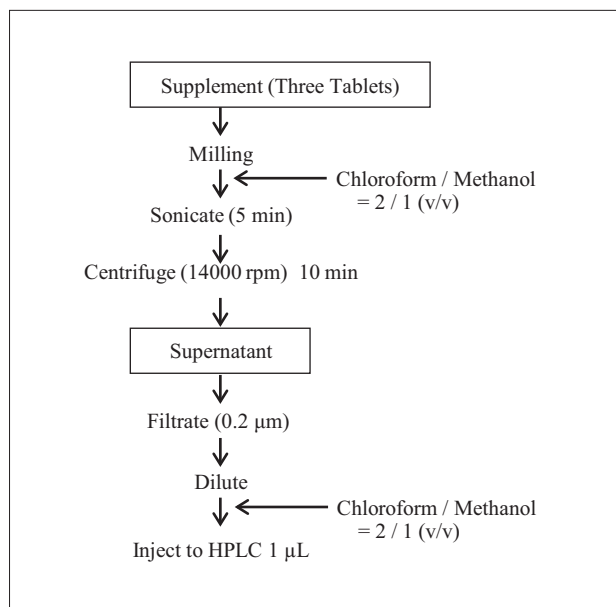


Fig. 4 前処理
Sample Preparation

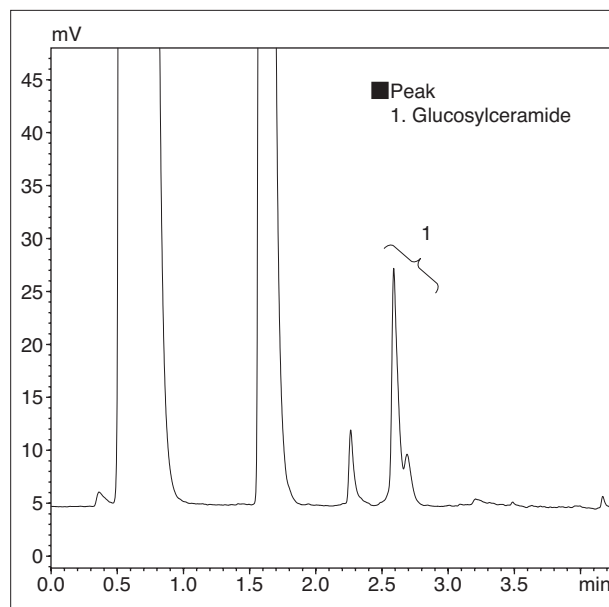


Fig. 5 サプリメントのクロマトグラム
Chromatogram of Dietary Supplement

[参考文献]

M. Kashima, K. Nakagawa, T. Sugawara, T. Miyazawa, C. Murakami, R. Miyashita, J. Ono, F. S. Deschamps, and P. Chaminade: J. Oleo. Sci., 51, 347-354 (2002)

高速高分離分析の応用（その35） “Nexera” によるワイン中レスベラトロールの分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 35)

Analysis of Resveratrol in Wine by “Nexera”

レスベラトロールはポリフェノールの一種であり、植物が病害虫によってストレスにさらされた際、生合成されるファイトアレキシンです。レスベラトロールは抗酸化作用の他、寿命延長効果なども期待されており、活発に研究されている成分です。近年では、食品だけではなく化粧品にも添加さ

れています。

ここでは、超高速液体クロマトグラフ“Nexera”および高感度蛍光検出器“Prominence RF-20Axs”を用いた赤ワイン中のレスベラトロールの超高速分析例をご紹介します。

Y. Hirao

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

Fig. 1に、*trans*-レスベラトロールおよび*cis*-レスベラトロールの構造式を示します。いずれの成分も蛍光検出が可能です。

Fig. 2に、*trans*- および*cis*-レスベラトロール*標準混合溶液（各25 mg/L、50 %メタノール溶液）を1 μL注入した結

果を、Table 1にその分析条件を示します。本分析条件におけるシステム負荷圧は最大約75 MPaでした。なお、今回用いました“Shim-pack XR-ODSⅢ”の耐圧は100 MPaです。

※*cis*体の標準品には若干の*trans*体が含まれています。

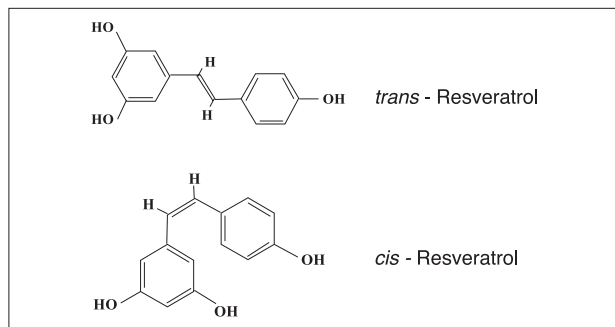


Fig. 1 *trans*-および*cis*-レスベラトロールの構造式
Structures of *trans*- and *cis*- Resveratrol

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODSⅢ (150 mm L. × 2.0 mm I.D. 2.2 μm)
Mobile Phase	: A : 0.2 % Formic acid - Water B : 0.2 % Formic acid - Acetonitrile
Time Program	: B Conc. 23 % (0.00 min) → 26 % (1.00 min) → 40 % (2.50 min) → 100 % (2.51-4.00 min) → 23 % (4.01 min)
Flow Rate	: 0.7 mL/min
Column Temp.	: 60 °C
Injection Volume	: 1 μL
Detection	: RF-20Axs Ex. at 300 nm, Em. at 386 nm
Cell Temp.	: 20 °C
Flow Cell	: Semi-micro Cell

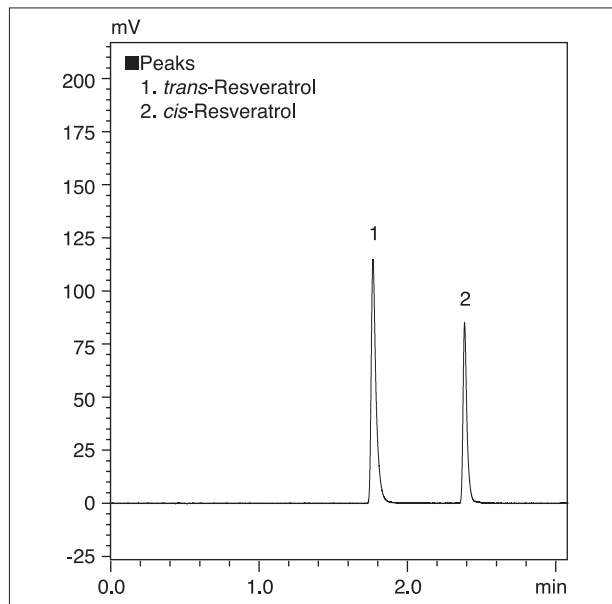


Fig. 2 *trans*-および*cis*-レスベラトロールのクロマトグラム
(各25 mg/L, 1 μL 注入)
Chromatogram of a Standard Mixture of *trans*- and *cis*-Resveratrol (25 mg/L each, 1 μL injected)

■セル温調の効果

Effect of Cell Temperature Control

一般に蛍光検出法では、温度上昇に伴い蛍光強度が減少することが知られています。Fig. 3に、*trans*-および*cis*-レスベラトロール標準溶液（各1 mg/L）の分析における、RF-20Axsのセル温度とピーク面積（蛍光強度）の関係を示します。

trans-レスベラトロールでは、セル温度が20 °Cから30 °Cに上昇することにより、ピーク面積が約18 %減少しています。このような分析においては、RF-20Axsのセル温調機能を用いることにより、室温変動に影響されない精度の高い分析が可能となります。

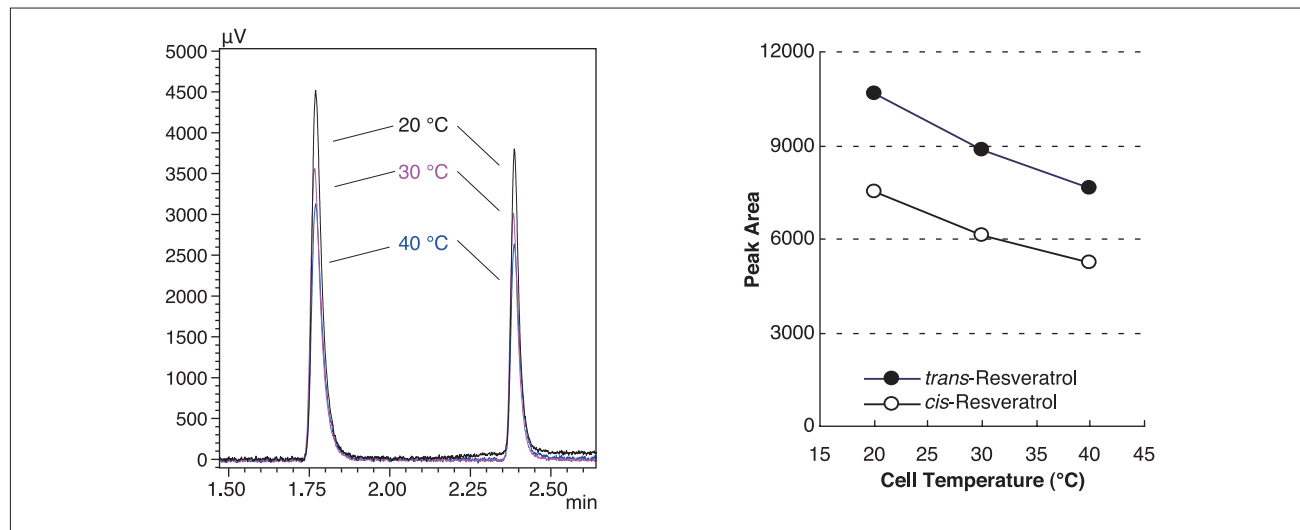


Fig. 3 セル温度とピーク面積の関係
Relationship between Peak Area and Cell Temperature

■赤ワインの分析

Analysis of Red Wine

本分析条件で赤ワインの分析を行いました。Fig. 4に、試料前処理手順を、Fig. 5に前処理した赤ワインのクロマトグラムを示します。

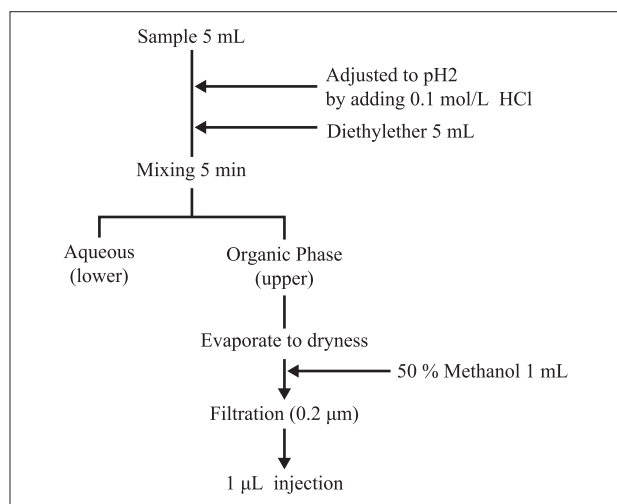


Fig. 4 試料前処理
Sample Preparation

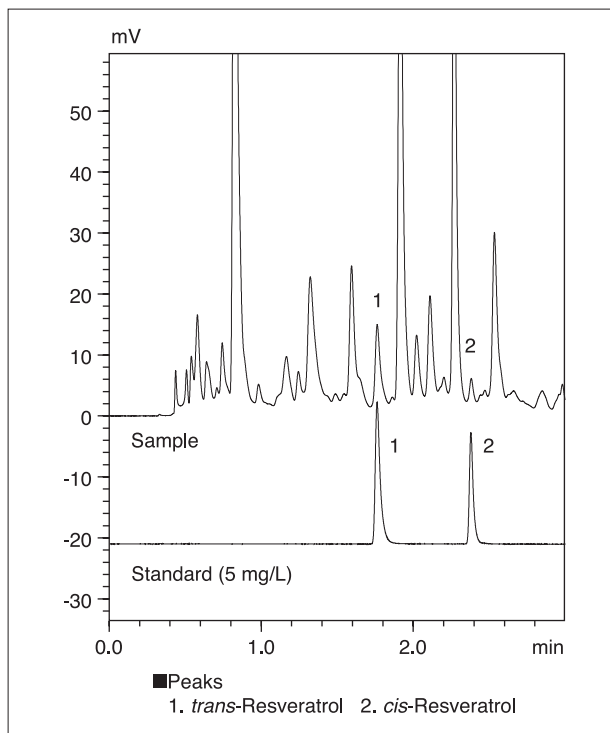


Fig. 5 赤ワインのクロマトグラム
Chromatogram of Red Wine

高速高分離分析の応用（その40）

“Nexera”による核酸塩基，ヌクレオシド，ヌクレオチドの分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 40)

Analysis of Nucleobases, Nucleosides, and Nucleotides by “Nexera”

核酸は、塩基・糖・りん酸からなるヌクレオチドがりん酸エステル結合で連なった生体高分子であり、生体内で遺伝情報を担う成分として重要です。この他、核酸関連化合物である核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドも生体内で様々な働きを持ちます。

ここでは、超高速LCシステム“Nexera”および高速高分離用カラム“Shim-pack XR-ODSⅢ”および“Phenomenex Kinetex C18”を用いた核酸関連化合物の超高速分析ならびに高分離分析例をご紹介します。

K. Tanaka

■核酸塩基，ヌクレオシドの分析

Analysis of Nucleobases and Nucleosides

核酸塩基5成分（アデニン，グアニン，ウラシル，チミン，シトシン）とヌクレオシド5成分（アデノシン，グアノシン，ウリジン，チミジン，シチジン）について，10成分混合標準液（各成分濃度10 mg/L）を調製し，カラムに粒子径 1.7 μm の“Phenomenex Kinetex C18”（100 mm L.×2.1 mm I.D.）を用いて分析を行いました。なお，“Phenomenex Kinetex C18”（粒子径1.7 μm ）は，1.25 μm のソリッドコアに0.23 μm の多孔性膜を結合させたCore-shellカラムです。

Fig. 1に混合標準液1 μL を注入したクロマトグラムを，Table 1にその分析条件を示します。

本分析条件により，コンベンショナル分析で30分程度要していた分析時間を1/10（3分）に短縮することができました。なお，本分析におけるシステム負荷圧は約75 MPaでした。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Kinetex 1.7 μm C18 100 Å (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 1.7 μm)
Mobile Phase	: 200 mmol/L Sodium perchlorate, 100 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH=2.1) aq.
Flow Rate	: 0.7 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 1 μL
Detection	: SPD-20AV at 260 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

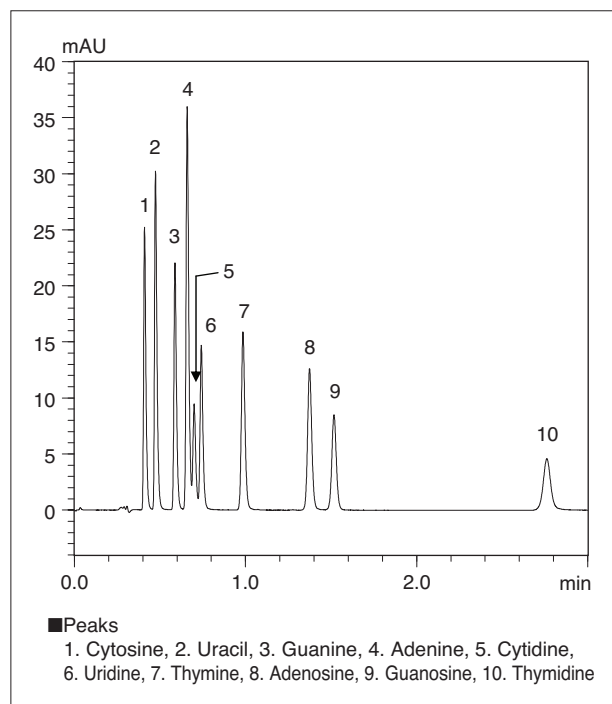


Fig. 1 核酸塩基およびヌクレオシドのクロマトグラム（各10 mg/L）
Chromatogram of a Standard Mixture of Nucleobases and Nucleosides (10 mg/L each)

注) 本資料掲載データのように，水溶液100 %またはそれに近い組成の移動相を使用する場合，一旦送液停止後再開した際，保持時間が減少することがあります。この現象を防ぐため，分析終了時は送液停止前に有機溶媒を含む移動相（例：水/アセトニトリル=1/1）で置換しておくことをお勧めします。また，分析中に保持時間が徐々に小さくなる場合にも，同様の移動相で洗浄してください。

■ATP関連物質の分析

Analysis of ATP-related Compounds

ATP関連物質6成分（ヒポキサンチン、イノシン、IMP、AMP、ADP、ATP）*について、混合標準液（各成分濃度約10 mg/L）を調製し、カラムに粒子径1.6 μm の“Shim-pack XR-ODSⅢ”（50 mm L.×2.0 mm I.D.）を用いて分析を行いました。

Fig. 2に混合標準液1 μL を注入したクロマトグラムを、Table 2にその分析条件を示します。

本分析条件により、コンベンショナル分析で25分程度要していた分析時間を1/10(2.5分)に短縮することができました。なお、本分析におけるシステム負荷圧は約83 MPaでした。

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODSⅢ (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 1.6 μm)
Mobile Phase	: 100 mmol/L Phosphoric acid, 150 mmol/L Triethylamine aq. / Acetonitrile =100/1 (v/v)
Flow Rate	: 0.9 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 1 μL
Detection	: SPD-20AV at 260 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

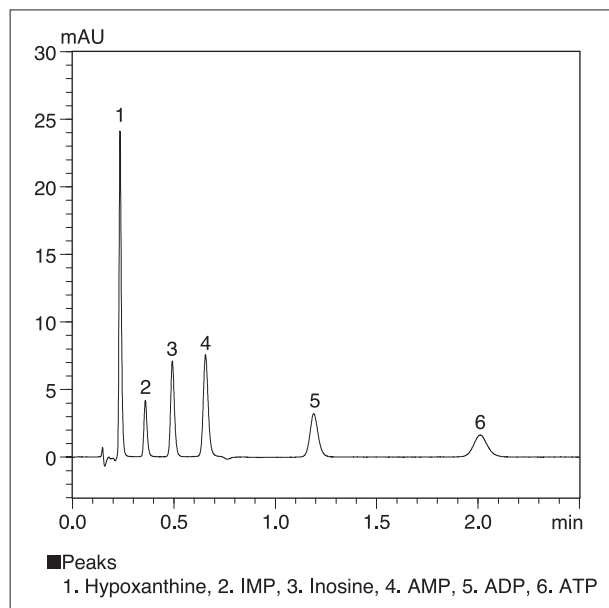


Fig. 2 ATP関連物質のクロマトグラム
Chromatogram of a Standard Mixture of ATP-related Compounds

■ヌクレオチドの分析

Analysis of Nucleotides

ヌクレオチド18成分（AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP、UMP、UDP、UTP、TMP、TDP、TTP、CMP、CDP、CTP、IMP、IDP、ITP）*について、混合標準液（各成分濃度約50 mg/L）を調製し、長さ200 mmの高分離用“Shim-pack XR-ODSⅢ”（200 mm L.×2.0 mm I.D., 粒子径2.2 μm ）を用いて分析を行いました。

Fig. 3に混合標準液1 μL を注入したクロマトグラムを、Table 3にその分析条件を示します。

本分析条件により、これら18成分の高速高分離分析が可能となりました。なお、本分析におけるシステム負荷圧は約78 MPaでした。

Table 3 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODSⅢ (200 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A:100 mmol/L Phosphoric acid, 150 mmol/L Triethylamine aq. B: Mobile Phase A / Acetonitrile =90/10 (v/v) A/B=98/2 (v/v)
Flow Rate	: 0.6 mL/min
Column Temp.	: 50 °C
Injection Volume	: 1 μL
Detection	: SPD-20AV at 260 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

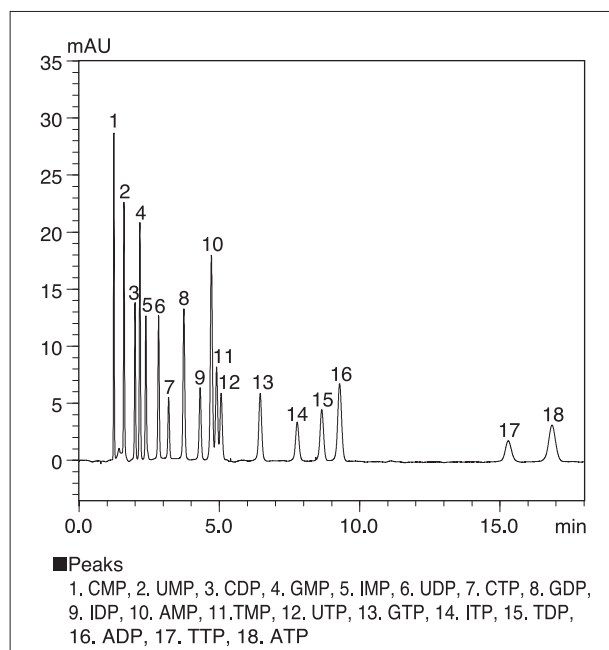


Fig. 3 ヌクレオチドのクロマトグラム
Chromatogram of a Standard Mixture of Nucleotides

* AMP : Adenosine 5'-monophosphate, ADP : Adenosine 5'-diphosphate, ATP : Adenosine 5'-triphosphate, GMP : Guanosine 5'-monophosphate, GDP : Guanosine 5'-diphosphate, GTP : Guanosine 5'-triphosphate, UMP : Uridine 5'-monophosphate, UDP : Uridine 5'-diphosphate, UTP : Uridine 5'-triphosphate, TMP : Thymidine 5'-monophosphate, TDP : Thymidine 5'-diphosphate, TTP : Thymidine 5'-triphosphate, CMP : Cytidine 5'-monophosphate, CDP : Cytidine 5'-diphosphate, CTP : Cytidine 5'-triphosphate, IMP : Inosine 5'-monophosphate, IDP : Inosine 5'-diphosphate, ITP : Inosine 5'-triphosphate

高速高分離分析の応用（その2） 大豆中イソフラボンの分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 2) Analysis of Isoflavones from Soy

大豆イソフラボンとは、大豆、特に大豆胚芽に多く含まれる化合物群で、女性ホルモンであるエストロゲンに似た働きをすることで最近注目されています。

ここでは、高速高分離分析用高性能カラム“Shim-pack XR-ODS”を用いたイソフラボン7成分の一斉分析例をご紹介します。

A.Yamamoto, T.Yamaguchi

■標準品の分析

Analysis of Standard Solution

今回検討したイソフラボン7成分（ダイジン、ゲニスチン、マロニルダイジン、マロニルグリシチン、マロニルゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステイン）標準液（各35 mg/L）をShim-pack XR-ODS（上段）と汎用カラムShim-pack VP-ODS（下段）で分析した例をFig.1に、またその分析条件をTable 1に示します。

Shim-pack XR-ODSでは、移動相線速度をShim-pack VP-ODSの約3.5倍に高めて分析することにより、高分離を保ちつつ1サイクルの分析時間を約1/7に短縮することができました。

なお、これらイソフラボンの構造式を次頁Fig.2に示します。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mmL×3.0 mmI.D., 2.2 μm) Shim-pack VP-ODS (150 mmL×4.6 mmI.D., 4.6 μm)
Mobile Phase	: A; 0.1% Formic acid -Water : B; Acetonitrile
Time Program	: [XR-ODS] B Conc.15% (0 min)→23% (2 min) →75% (2.3-2.5 min) →15% (2.51-4 min) [VP-ODS] B Conc.17% (0 min)→20% (7 min) →70% (18 min) →17% (18.01-28 min)
Flow Rate	: 1.5 mL/min (XR-ODS) 1.0 mL/min (VP-ODS)
Column Temp.	: 40°C
Injection Vol.	: 4 μL (XR-ODS) 10 μL (VP-ODS)
Detection	: SPD-20A at 254 nm
Flow Cell	: Semi-micro cell (XR-ODS) Conventional cell (VP-ODS)

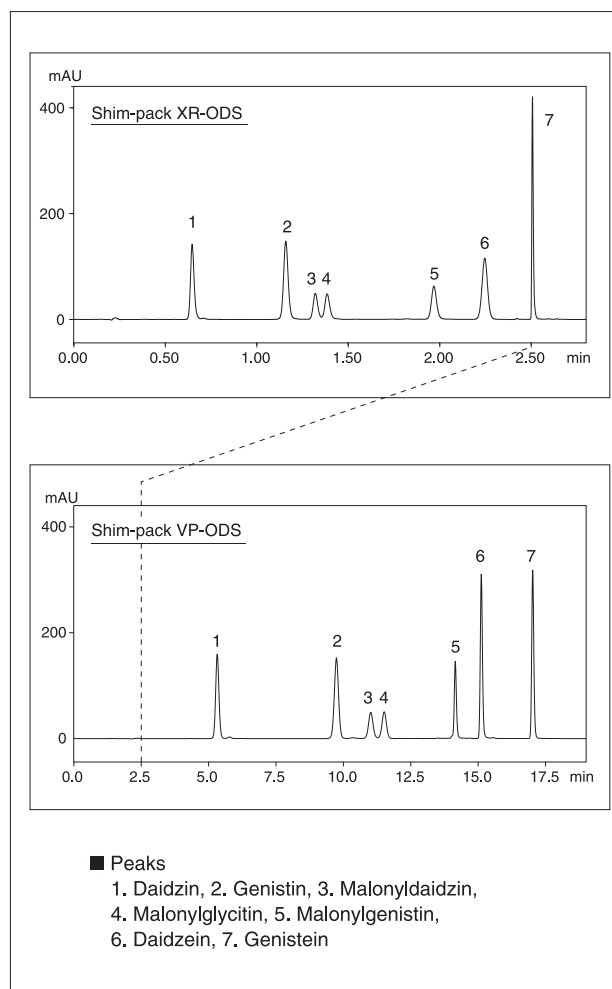


Fig.1 イソフラボン7成分のクロマトグラム（各35 mg/L）
Chromatograms of a Standard Mixture of 7 Isoflavones (35 mg/L each)

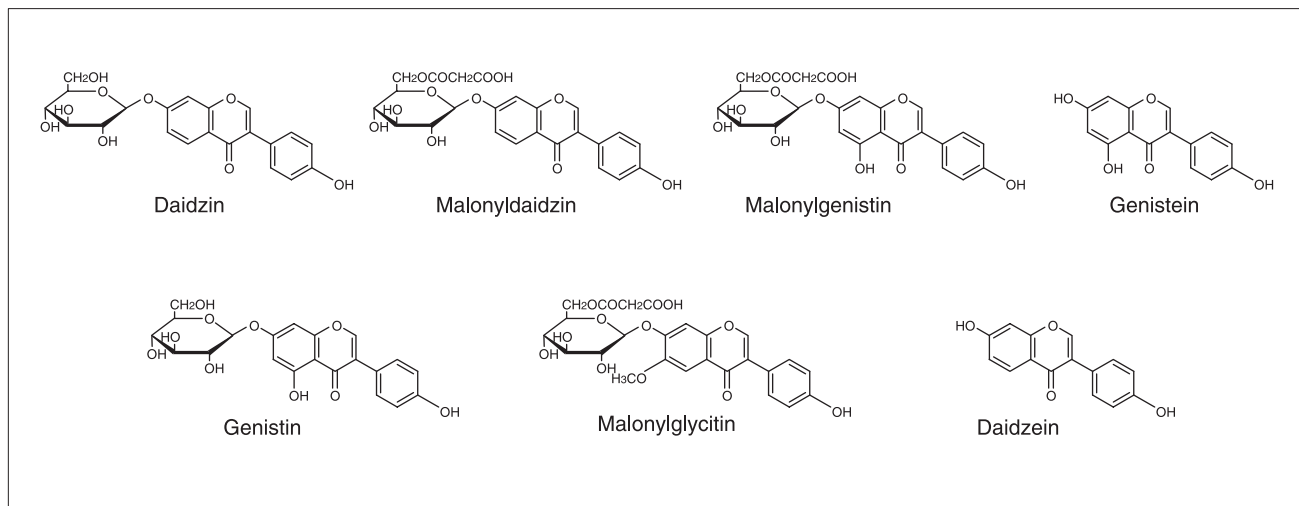


Fig.2 イソフラボン7成分の構造式
Structures of 7 Isoflavones

■食品の分析

Analysis of Foods

大豆食品（黄な粉，味噌，豆乳）をFig.3の手順で前処理を行い，Shim-pack XR-ODSを用いて高速高分離分析した例をFig.4～6に示します。分析条件はTable 1と同じです。

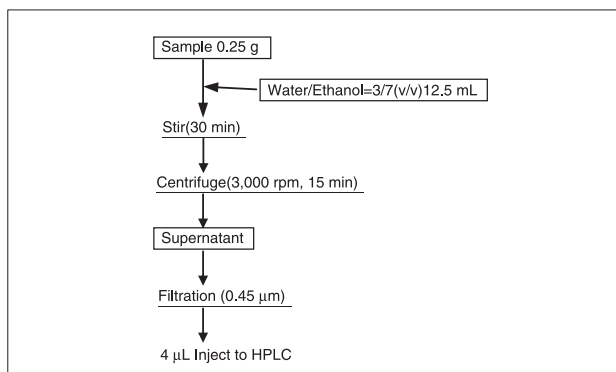


Fig.3 試料前処理
Sample Preparation

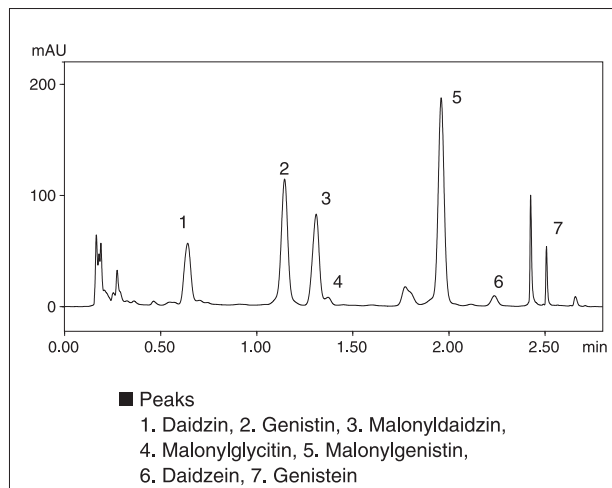


Fig.4 黄な粉のクロマトグラム
Chromatogram of Soybean Flour

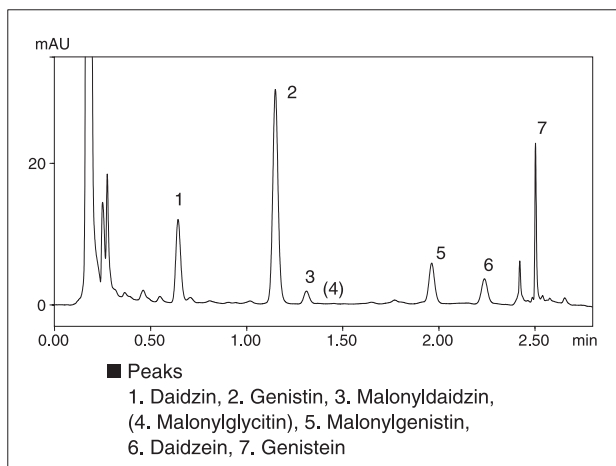


Fig.5 味噌のクロマトグラム
Chromatogram of Miso (Soybean Paste)

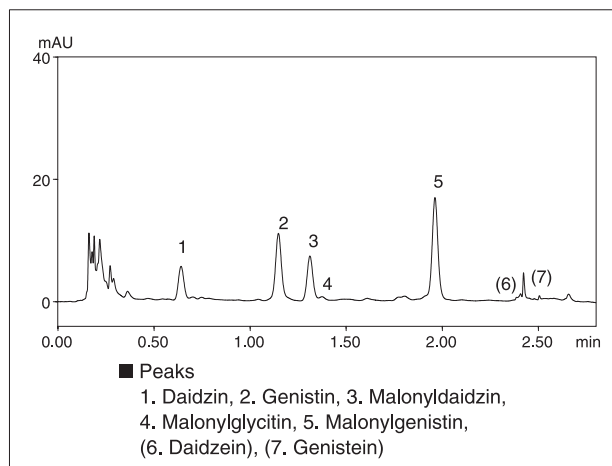


Fig.6 豆乳のクロマトグラム
Chromatogram of Soymilk

高速高分離分析の応用（その3） イソチオシアナート類およびシニグリンの分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 3) Analysis of Isothiocyanates and Sinigrin

わさび、からし等のアブラナ科植物に含まれるイソチオシアナートは、その抗菌作用や抗酸化作用が注目されています。通常、これら辛味成分は、植物組織中に配糖体として存在し、分解酵素ミロシナーゼにより加水分解を受けると同時に転移反応を起こしてイソチオシアナート

トとして遊離することが知られています。

ここでは、超高速LCシステム“Prominence UFLC”および高速高分離用高性能カラム“Shim-pack XR-ODS”を用いた、わさび中のイソチオシアナート類およびその代表的な配糖体であるシニグリンの同時分析例をご紹介します。

J. Masuda

■イソチオシアナート類の分離（カラム比較）

Separation of Isothiocyanates (Comparison of Columns)

イソチオシアナート類5成分（Fig.1）の分離にあたって、コンベンショナルカラム“Shim-pack VP-ODS”（粒子径4.6 μm ）と“Shim-pack XR-ODS”（粒子径2.2 μm ，カラム長さ75 mmと50 mm）を比較した例をFig.2に、その分析条件を次ページTable 1に示します。

上段（VP-ODS）、中段（XR-ODS，75 mm）のクロマトグラムを比較すると、微小粒子径充填カラムを用いることにより理論段数を維持したまま、1/4程度に時間短縮が可能であることがわかります。また、下段（XR-ODS，50 mm）のクロマトグラムに示されるように、カラム長さを短くすることにより、さらなる高速分離が可能となります。この場合、4.6 μm 粒子径カラムに比べて1/7程度に時間短縮が可能であり、かつピーク分離も十分であると判断されます。

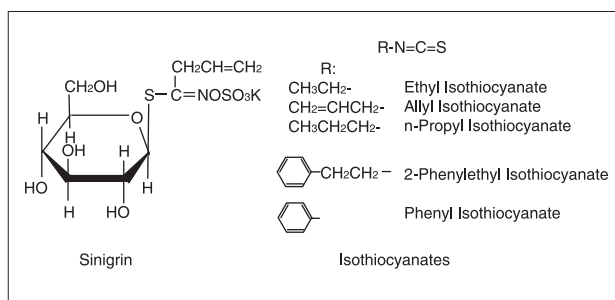


Fig.1 イソチオシアナート類およびシニグリンの構造式
Structures of Isothiocyanates and Sinigrin

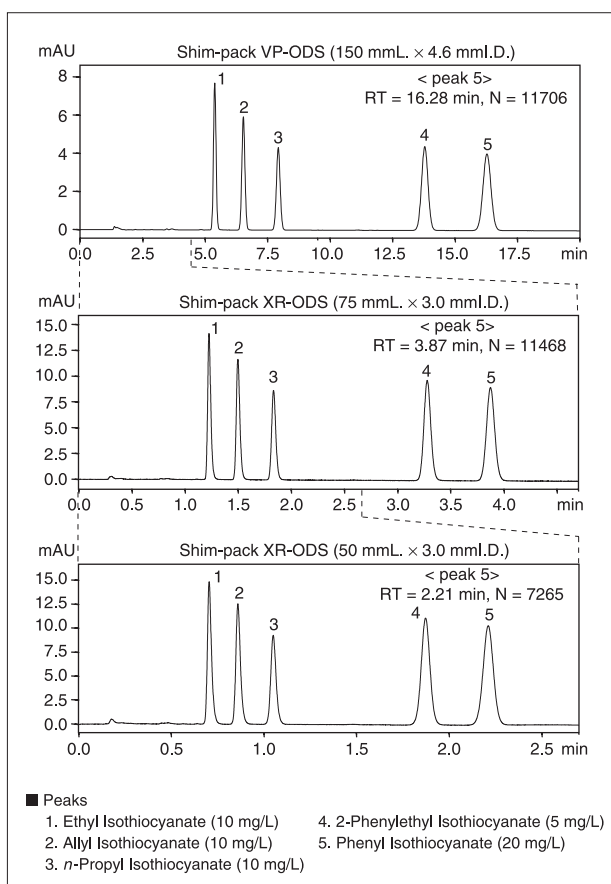


Fig.2 XR-ODSとVP-ODS カラムの比較

- イソチオシアナート類のクロマトグラム -

- Comparison of the XR-ODS column with the VP-ODS column

- Chromatograms of a Standard Mixture of 5 Isothiocyanates

Upper : VP-ODS(150 mm) Middle : XR-ODS (75 mm)

Lower : XR-ODS (50 mm)

■わさび中のイソチオシアナート類とシニグリンの同時分析

Simultaneous Determination of Isothiocyanates and Sinigrin in Japanese Horseradish.

“Shim-pack XR-ODS” (50 mm) を用いた高速分離条件をもとに、粉わさび中に含まれるイソチオシアナート類と、代表的な配糖体であるシニグリン (Fig.1) の同時分析を行いました。シニグリンは親水性が強いことからカラムに保持させるため移動相を最適化するとともに、イソチオシアナート類と同時分析を行うためグラジエント溶出を用いました。なお、シニグリンの検出波長は230 nmとし、分析途中にタイムプログラムを用いてイソチオシアナート類の検出波長である240 nmに切り換えました。標準溶液の分析例をFig.3に、分析条件をTable 2 に示します。

わさび中に含まれるシニグリンは、水を加えると加水分解を受け、主にアリルイソチオシアナートを遊離します。市販の乾燥粉わさびに水を加えた直後、および水を加えて練った後 5分間放置してから、それぞれ分析を行った結果 (Fig.4 上段:直後, 下段:5分間放置後) を比べると、シニグリンおよびアリルイソチオシアナートのピーク強度が変化していることがわかります。

Table 1 分析条件 (Fig. 2)
Analytical Conditions (Fig.2)

Column	: Shim-pack VP-ODS (150 mmL. × 4.6 mm I.D., 4.6 μm) Shim-pack XR-ODS (75 mmL. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) Shim-pack XR-ODS (50 mmL. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A ; 10 mmol /L (Sodium) phosphate buffer [pH 2.6] B ; Acetonitrile A / B = 1 / 1 (v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL/min (VP-ODS, XR-ODS 75 mmL.) 1.2 mL/min (XR-ODS 50 mmL.)
Column Temperature	: 40 °C
Injection Volume	: 10 μL
Detection	: SPD-20A at 240 nm
Flow Cell	: Conventional Cell (VP-ODS) Semi-micro Cell (XR-ODS)

Table 2 分析条件 (Fig.3, Fig.4)
Analytical Conditions (Fig.3, Fig.4)

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mmL. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A ; 10 mmol /L (Imidazole) phosphate buffer [pH 2.6] B ; Acetonitrile
Gradient Program	: 0 min. to 1.5 min. (B 0 % hold) 1.5 min. to 2.0 min. (B 0 % → 50 %) 2.0 min. to 7.0 min. (B 50 % hold) 7.0 min. to 9.0 min. (B 0 % hold)
Flow Rate	: 1.2 mL/min
Column Temperature	: 40 °C
Injection Volume	: 10 μL
Detection	: SPD-20A at 230 nm (0 min. to 2.4 min.) and 240 nm (after 2.4 min.)
Flow Cell	: Semi-micro Cell

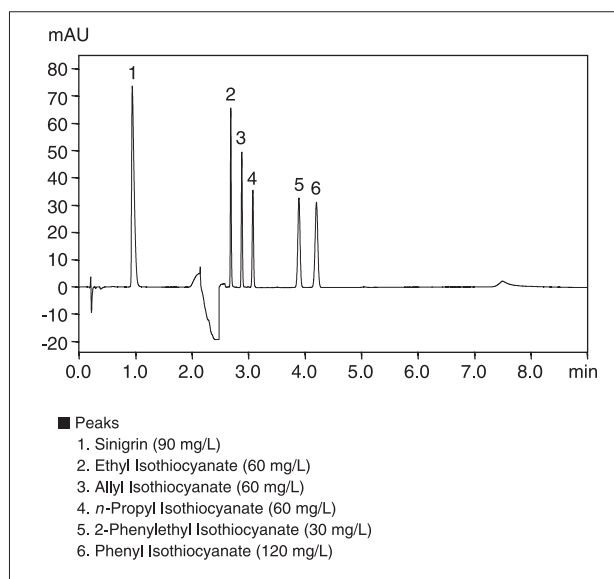


Fig.3 イソチオシアナート類とシニグリンのクロマトグラム (標準試料)
Chromatogram of a Standard Mixture of Isothiocyanates and Sinigrin

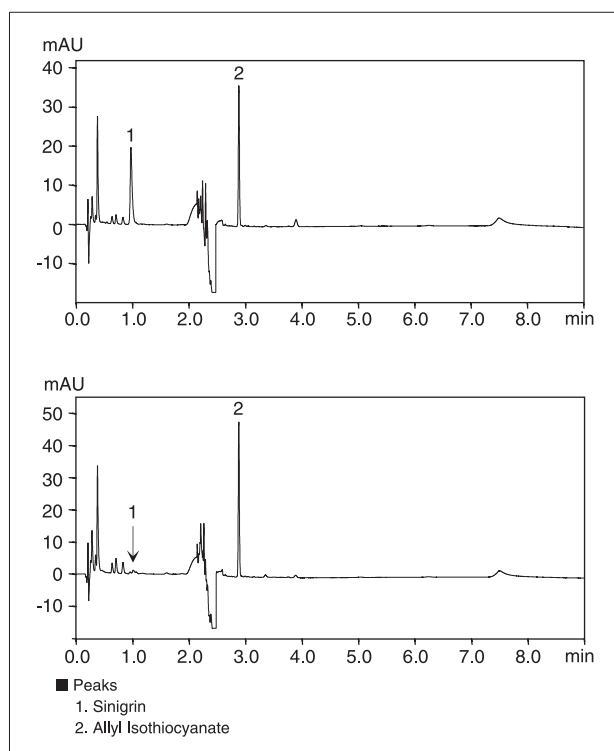


Fig.4 粉わさびのクロマトグラム
上段:水添加直後,下段:水添加5分後
Chromatograms of Japanese Horseradish.
Upper : Just immediately after adding water into the sample
Lower : 5 minutes later after adding water into the sample

高速高分離分析の応用(その10) 有機酸の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 10) Analysis of Organic Acids

一般に、HPLCによる食品中の有機酸（低級脂肪酸）分析には、イオン排除モードとポストカラム反応検出法を組み合わせた方法が用いられますが、分析の高速化という観点では限界があります。

ここでは、逆相モードと吸光度検出器を用いた超高速LCシステム“Prominence UFLC”による有機酸の高速高分離分析例をご紹介します。

M. Ogaito

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

酢酸やくえん酸などの有機酸は極性が高く、逆相カラムで保持させるには移動相として水溶液のみを用いる必要がありますが、一般にこのような移動相ではシリカ系逆相カラムの耐久性が問題になります。そこで、今回は極性基をエンドキャッピングして極性化合物の保持を強めるとともに、水溶液のみの移動相での耐久性を高めたODSカラム“Phenomenex Synergi Hydro-RP”（粒子径2.5 μm ）を用いて検討を行いました。

Fig.1に有機酸標準混合液（ぎ酸、マロン酸、酢酸、くえん酸各100 mg/L、移動相で調製）4 μL を注入したクロマトグラムを、またTable 1にその分析条件を示します。移動相としては酸性りん酸緩衝液を用いて、紫外210 nmで検出しました。本分析条件で、これら有機酸を2分以内に分離することが可能です。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Phenomenex Synergi 2.5 μm Hydro-RP 100 Å (100 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.5 μm)
Mobile Phase	: 10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.6)
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Column Temp.	: 30 °C
Injection volume	: 4 μL
Detection	: SPD-20A at 210 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

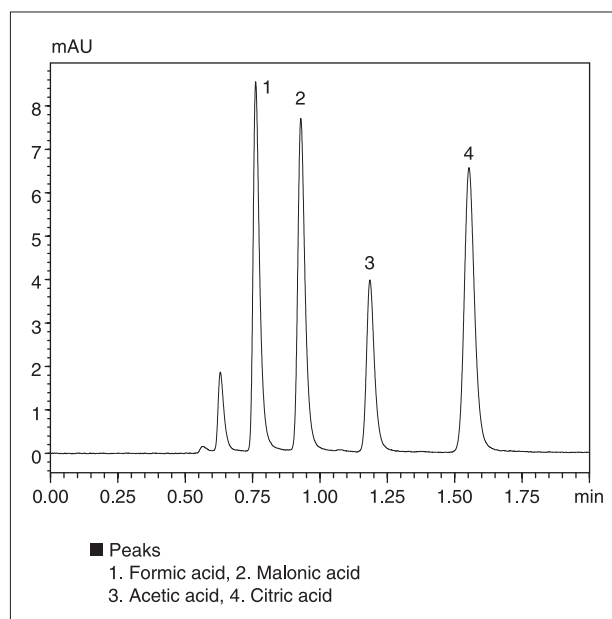


Fig.1 有機酸標準4成分のクロマトグラム（各100 mg/L, 4 μL 注入）
Chromatogram of a Standard Mixture of 4 Organic Acids
(100 mg/L each, 4 μL injected)

■低濃度試料の分析

Analysis of Low Concentration Standard Solution

Fig.2 に有機酸標準混合液（ぎ酸，マロン酸，酢酸，くえん酸各5 mg/L，移動相で調製）4 μ Lを注入したクロマトグラムを示します。この分析を5回繰り返した際のピーク面積の再現性（%RSD）はぎ酸 1.7 %，マロン酸 1.6 %，酢酸 1.9 %，くえん酸 2.1 %でした。

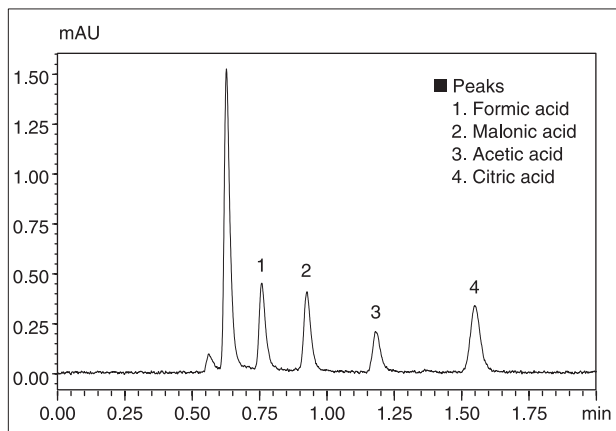


Fig.2 有機酸標準4成分のクロマトグラム (各5 mg/L, 4 μ L注入)
Chromatogram of a Standard Mixture of 4 Organic Acids
(5 mg/L each, 4 μ L injected)

■直線性

Linearity

Fig.3 に5～100 mg/Lにおける各有機酸の検量線を示します。各濃度の標準溶液を5回繰り返し分析を行い、その平均面積値から検量線を作成しました。各有機酸について $R^2=0.9999$ と良好な直線性が得られました。

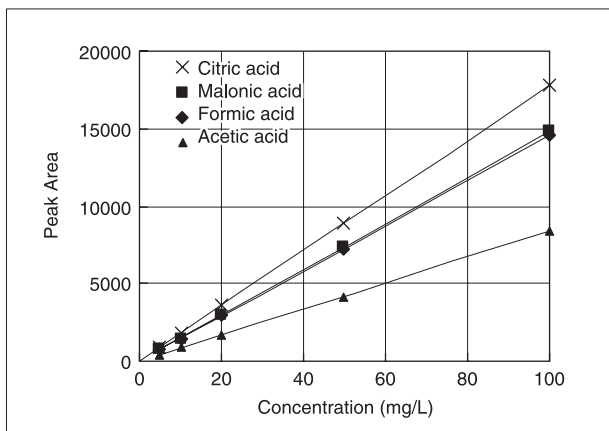


Fig.3 直線性 (5～100 mg/L, 4 μ L注入)
Linearity (5~100 mg/L, 4 μ L injected)

■清涼飲料の分析

Analysis of Soft Drink

Fig.4, 5 に市販清涼飲料のクロマトグラムを示します。清涼飲料Aは移動相で50倍希釈後，清涼飲料Bは移動相で

20倍希釈後，それぞれメンブランフィルタ（孔径0.2 μ m）でろ過を行い，その4 μ Lを注入しました。

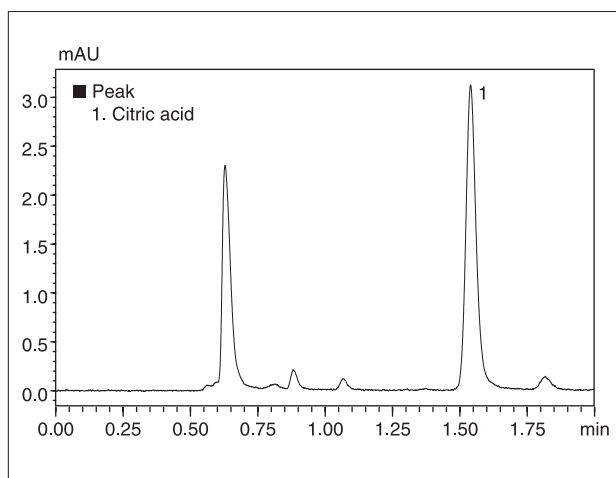


Fig.4 清涼飲料A (4 μ L注入)
Soft Drink A (4 μ L injected)

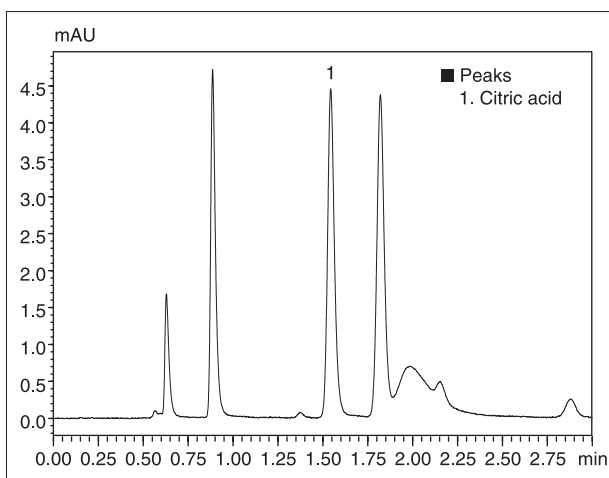


Fig.5 清涼飲料B (4 μ L注入)
Soft Drink B (4 μ L injected)

※本分析における注意点

- ・試料注入
移動相として緩衝液のみを使用していますので，試料溶媒や注入量の影響を受ける場合があります。例えば，アルコール飲料などを多量に注入すると，ピークが歪むことがあります。
- ・検出の選択性
紫外210 nmによる検出ですので，夾雑性分の影響を受けやすくなっています。夾雑物の多い試料では分析が困難な場合があります。
- ・カラムの洗浄
緩衝液のみの移動相で使用していると，有機酸の溶出時間が徐々に遅くなる場合があります。この場合，有機溶媒を含む移動相（例：水/アセトニトリル=1/1）で洗浄してください。この洗浄は，試料中の疎水性成分を洗い出すためにも効果的です。

高速高分離分析の応用（その15） ニンジン中ギンセノシド類の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 15) Analysis of Ginsenosides in Ginseng

ニンジン（高麗人参）は滋養強壮作用を持ち、広く利用されている生薬のひとつであり、その有効成分としてギンセノシド類が知られています。

HPLCを用いてギンセノシド類を分析する場合、各成分の相互分離あるいは夾雑成分との分離に比較的長い分析

時間を要します。

ここでは、超高速LCシステム“Prominence UFLC”と高速高分離用カラム“Phenomenex Synergi 2.5 μ m Polar-RP”を用いたニンジン中ギンセノシド類の分析例をご紹介します。

K.Tanaka

■標準試料の分析

Analysis of a Standard Solution

今回分析対象としたギンセノシド類5成分の構造式をFig.1に示します。ここでは、特にギンセノシドRg1とギンセノシドReを効率良く分離することができる高速高分離用カラム“Phenomenex Synergi 2.5 μ m Polar-RP（粒子径2.5 μ m）”を用いました。

Fig.2にギンセノシド類各50 mg/L混合溶液（60%メタノール水溶液に溶解して調製）2 μ Lを分析した結果を、Table 1にその分析条件を示します。

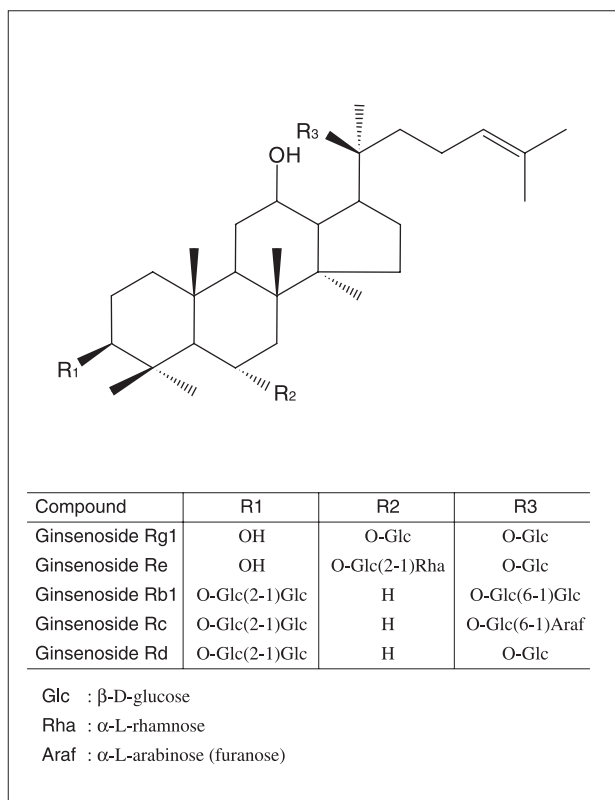


Fig.1 ギンセノシド類の構造式
Structure of Ginsenosides

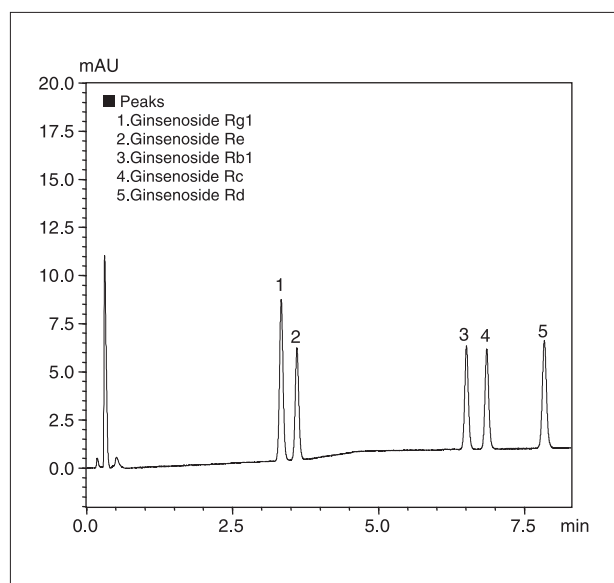


Fig.2 ギンセノシド類標準品5成分のクロマトグラム（各50 mg/L）
Chromatogram of a Standard Mixture of 5 Ginsenosides (50 mg/L each)

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Synergi 2.5 μ m Polar-RP 100Å (50 mm L. $\times$ 2.0 mm I.D., 2.5 μ m)
Mobile Phase	: A : Water B : Acetonitrile B.Conc 15 % (0 min) $\rightarrow$ 20 % (3 min) $\rightarrow$ 25 % (4 min) $\rightarrow$ 30 % (8 min)
Flow Rate	: 0.6 mL/min
Injection Vol.	: 2 μ L
Column Temp.	: 35 $^{\circ}$ C
Detection	: SPD-20A at 203 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

■ニンジン末の分析

Analysis of Powdered Ginseng

Fig.3に日本薬局方を参考とした生薬の前処理手順を示します。Fig.4に市販されているニンジン末をFig.3の手順に沿って前処理後、その2 μ Lを注入した結果を示します。

Fig.5にはFig.3の前処理手順にさらに逆相系固相カート

リッジ（Phenomenex “strata-X”）を用いて固相抽出操作を加えた手順を、またその結果をFig.6に示します。Fig.4に比べ極性の高い夾雑成分が効率よく除去できていることがわかります。

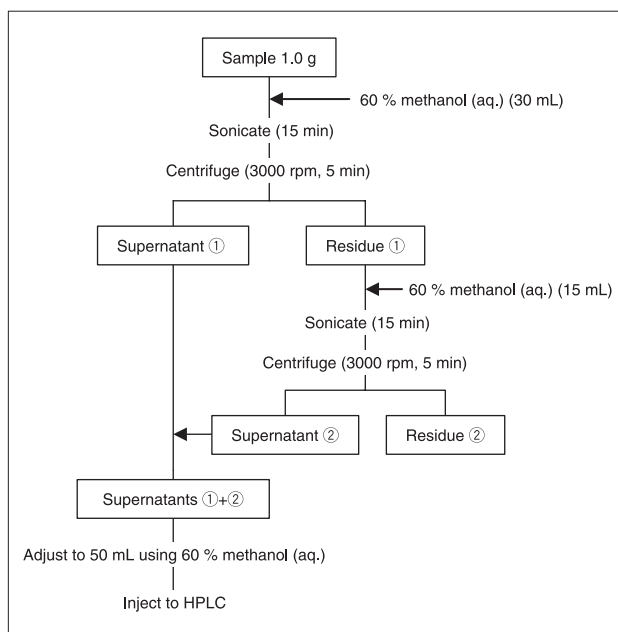


Fig.3 前処理1
Sample Preparation 1

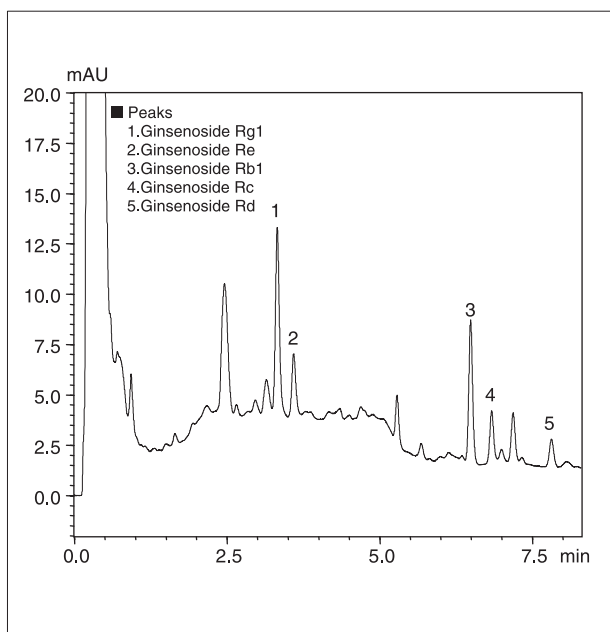


Fig.4 ニンジン末のクロマトグラム (前処理1)
Chromatogram of Powdered Ginseng (Sample Preparation 1)

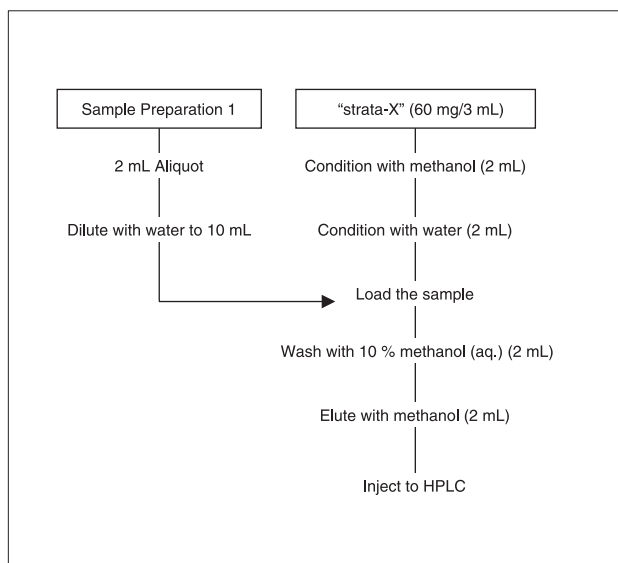


Fig.5 前処理2
Sample Preparation 2

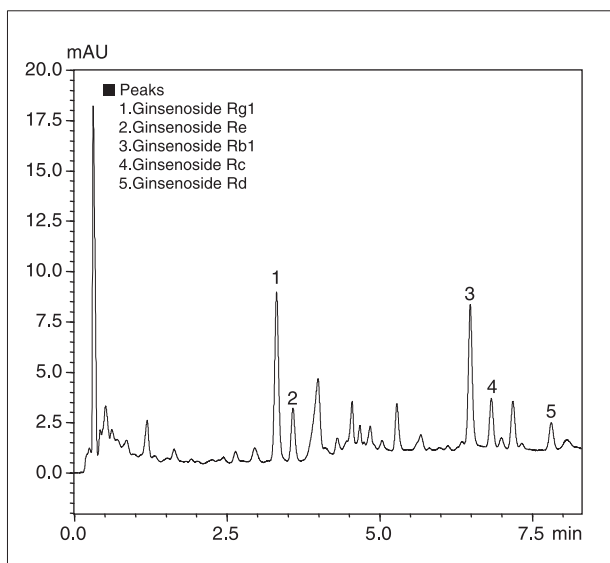


Fig.6 ニンジン末のクロマトグラム (前処理2)
Chromatogram of Powdered Ginseng (Sample Preparation 2)

[参考文献]

第十五改正日本薬局方（財団法人日本公定書協会編集）

高速高分離分析の応用（その16） 柑橘果汁中フラバノン類の分析（その2）

High Speed with High Resolution Analysis (Part 16) Analysis of Flavanones in Citrus Juice (Part 2)

アプリケーションニュースNo.L363では、超高速LC “Prominence UFLC” とフォトダイオードアレイ検出器SPD-M20Aを用いた柑橘類果汁中フラバノン類5成分の高速分析例をご紹介しました。

今回は “Prominence UFLC”/SPD-M20Aに、さらに質

量分析計LCMS-2010EVを接続して、新たにネオヘスペリジンを加えたフラバノン類6成分を高速分析し、UVスペクトルおよびマスマスペクトルにより微量成分の確認を行った例をご紹介します。

K.Watanabe

■フラバノン類6成分の分析

Analysis of 6 Flavanones

Fig.1に分析対象としたフラバノン類を示します。今回はアプリケーションニュースNo.L363で分析対象とした5成分にネオヘスペリジンを加えた計6成分を分析しました。

Fig.2にSPD-M20Aを用いた標準品6成分の一斉分析結果を、Fig.3にネオヘスペリジンのUVスペクトルを示します。また、Table 1に分析条件を示します。

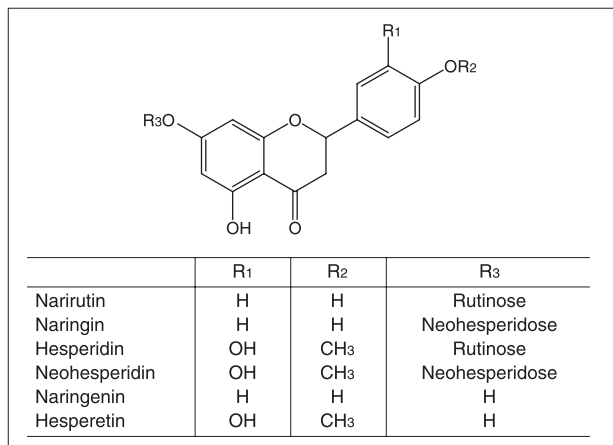


Fig.1 フラバノン類の構造式
Structures of Flavanones

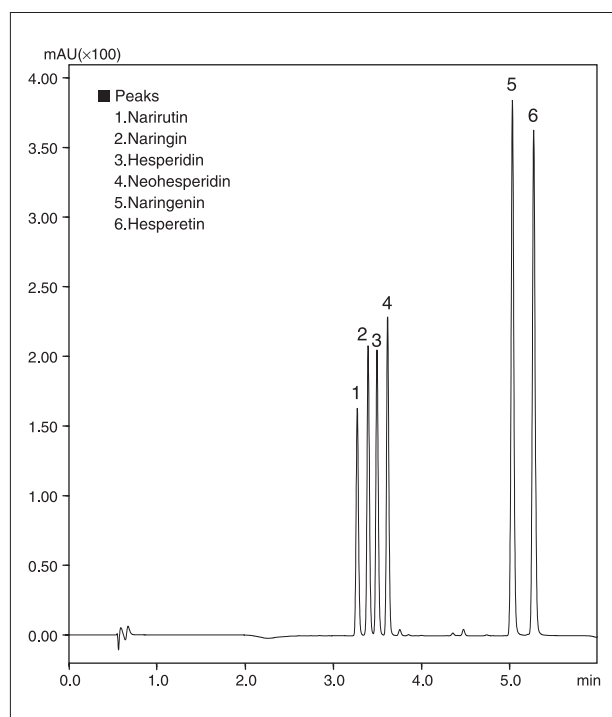


Fig.2 フラバノン類6成分のクロマトグラム (各100 mg/L, 2 μ L注入)
Chromatogram of a Standard Mixture of 6 Flavanones
(100 mg/L each, 2 μ L injected)

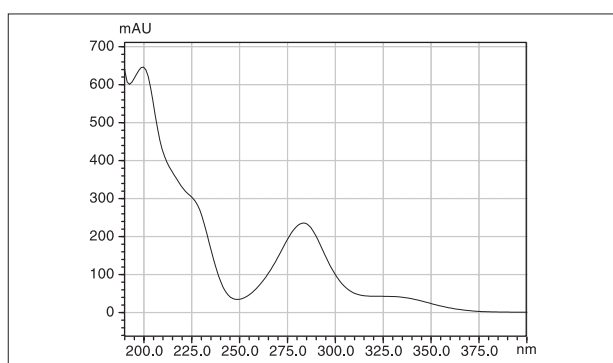


Fig.3 ネオヘスペリジンのUVスペクトル
Spectrum of Neohesperidin

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (75 mmL. $\times$ 2.0 mmI.D., 2.2 μ m)
Mobile Phase	: A ; 10 mmol/L Ammonium formate buffer (pH 3.7) / Acetonitrile = 9 / 1 (v/v) B ; 10 mmol/L Ammonium formate buffer (pH 3.7) / Acetonitrile = 2 / 8 (v/v) B conc. 0 % (0.00 min) $\rightarrow$ 50 % (5.00 min) $\rightarrow$ 100 % (5.01-6.00 min) $\rightarrow$ 0 % (6.01-9.00 min)
Flow Rate	: 0.4 mL/min with Semi-micro Mixer
Injection Volume	: 2 μ L
Column Temp.	: 35 $^{\circ}$ C
Detection	: SPD-M20A at 285 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

■ グレープフルーツ果汁飲料の分析

Analysis of Grapefruit Juice

Fig.4, Fig.5に SPD-M20AおよびLCMS-2010EV を用いた市販グレープフルーツ果汁飲料（果汁100%）の分析例を示します。試料はアプリケーションニュースNo.L363と同様の方法で前処理を行い、2 μ Lを注入しました。

クロマトグラムから、ナリルチンとナリンギンの他ヘスペリジン、ネオヘスペリジンが含まれていることがわかりますが、UVスペクトルおよびマスマスペクトルを比較

することにより、定性情報がさらに補完されます。また、ヘスペリジンのマスマスペクトルにおける m/z 507のイオンは、標準溶液のマスマスペクトルでは確認されないことから夾雑成分であると推測されます。このような場合でも m/z 609のイオンをモニタすることで、より精确な定量が可能となります。Table 2にLCMS-2010EVの条件を示します。（その他の条件はTable 1と同一です）

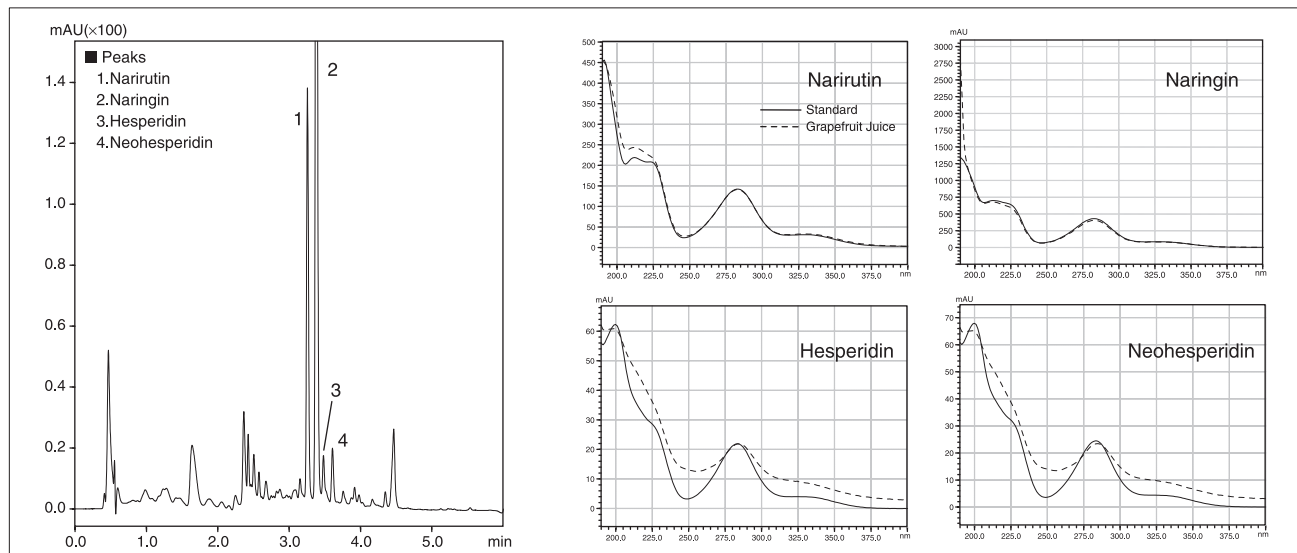


Fig.4 グレープフルーツ果汁中フラバノン類のUVクロマトグラムとUVスペクトル (2 μ L注入)
UV Chromatogram and Spectra of Flavanones in Grapefruit Juice (2 μ L injected)

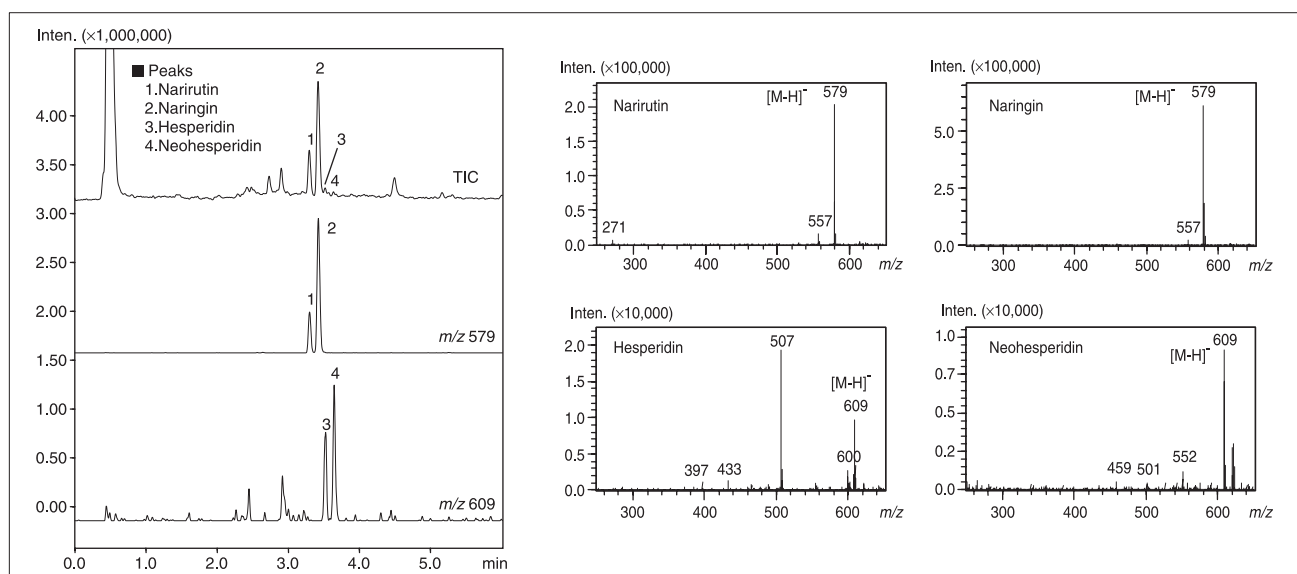


Fig.5 Scanモードによるグレープフルーツ果汁中フラバノン類のマスマクロマトグラムとマスマスペクトル (2 μ L注入)
Mass Chromatograms and Mass Spectra of Flavanones in Grapefruit Juice by Scan Mode (2 μ L injected)

Table 2 LC-MS条件
LC-MS Conditions

Probe Voltage	: -3.5 kV (ESI-Negative mode)	CDL Temp.	: 250 °C
Nebulizing Gas Flow	: 1.5 L/min	Block Heater Temp.	: 200 °C
Drying Gas Pressure	: 0.1 MPa	Scan Range	: m/z 100-650
CDL, Q-array Voltages	: using default values		

高速高分離分析の応用（その19） 緑茶飲料水中カテキン類の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 19) Analysis of Catechins in Green Tea Drink

カテキン類には、抗酸化作用やがん細胞抑制作用があることが学術論文として報告されており、さらにガレートを有するカテキン類はダイエット効果があるとの研究報告もあります。

このような中、近年カテキン類を多く含む緑茶飲料

水が多種市販されるようになってきました。

ここでは、超高速高分離LCシステム“Prominence UFLCXR”および高速高分離用カラムを用いた緑茶飲料水中カテキン類の高速分析例をご紹介します。

T. Yoshida T. Yamaguchi

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

Fig.1に緑茶飲料に含まれるカテキン類およびその分解物である没食子酸、清涼飲料水に広く添加されているカフェインの構造式を示します。

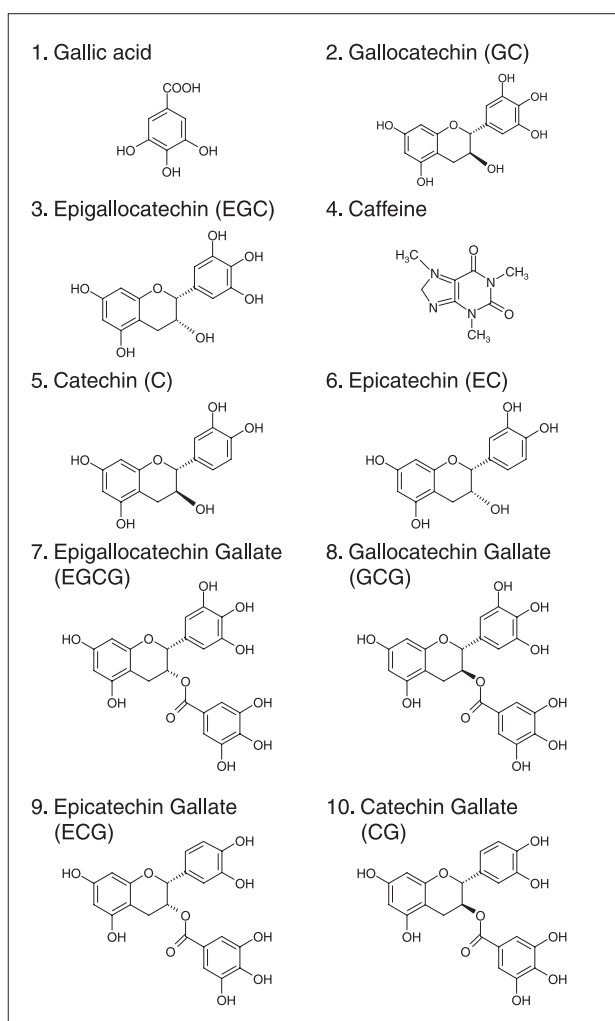


Fig.1 カテキン類、没食子酸、カフェインの構造式
Structures of Catechins, Gallic Acid, and Caffeine

Fig.2に、Fig.1に示した緑茶飲料水に含まれるカテキン類など10成分の標準混合溶液（各100 mg/L）をAMT社製“HALO® C18（粒子径2.7 μ m）”により高速分離したクロマトグラムを示します。また、その分析条件をTable 1に示します。

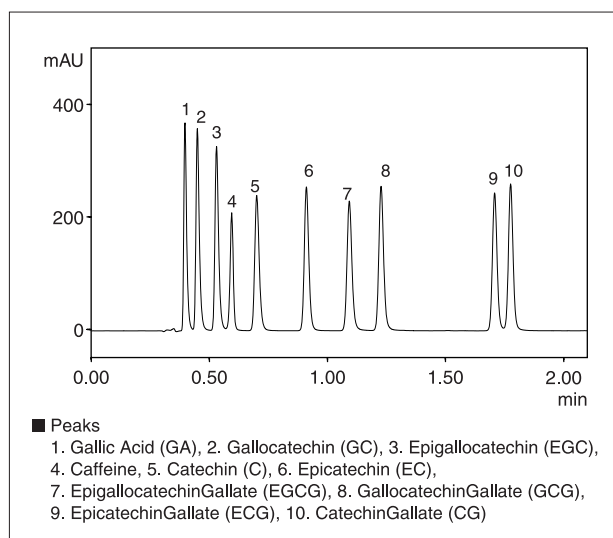


Fig.2 カテキン類、没食子酸、カフェイン標準液のクロマトグラム
（各100 mg/L, 2 μ L注入）
Chromatogram of a Standard Mixture of Catechins, Gallic Acid, and Caffeine (100 mg/L, 2 μ L injected)

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: HALO® C18 (75 mmL. $\times$ 3.0 mmI.D., 2.7 μ m)
Mobile Phase	: A: 0.2 % Phosphoric acid in water / Tetrahydrofuran = 99 / 1 (v/v) B: Acetonitrile/ Tetrahydrofuran = 99 / 1 (v/v)
Time Program	: B conc. 12 % (0 min) $\rightarrow$ 25 % (2 min) $\rightarrow$ 50 % (2.01-2.1 min)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Injection Volume	: 2 μ L
Detection	: SPD-M20A at 230 nm
UV Cell	: Semi-micro Cell

直線性
Linearity

Fig.3に、今回分析した緑茶飲料水に含まれるカテキン類など10成分の内、代表的な没食子酸、ガロカテキン、カフェイン、エピガロカテキンガレート（各1～250 mg/L）の検量線（2 μ L注入時）を示します。いずれの成分も寄与率（ R^2 ）0.9999以上と良好な直線性が得られました。

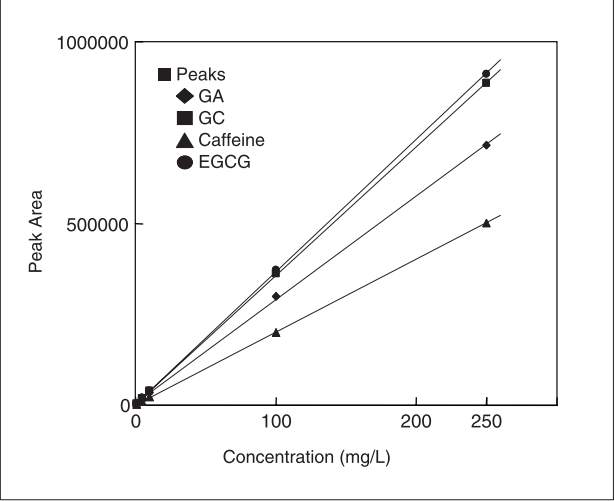


Fig.3 直線性
Linearity

緑茶飲料水の分析
Analysis of Green Tea Drink

Fig.4は市販緑茶飲料水A、Fig.5は市販緑茶飲料水Bのクロマトグラムです。分析条件はTable 1と同じです。
緑茶飲料水Aは精製水で12倍に、緑茶飲料水Bは4倍

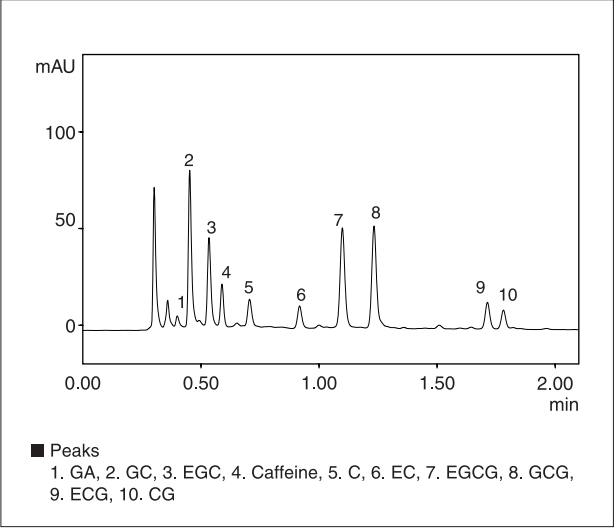


Fig.4 緑茶飲料水Aのクロマトグラム
Chromatogram of Green Tea Drink A

再現性
Repeatability

Table 2には緑茶飲料水に含まれるカテキン類など10成分の標準混合溶液（各100 mg/L含有）を分析した際の保持時間とピーク面積値の再現性（n=6）を示します。

Table 2 カテキン類、没食子酸、カフェインの再現性
Repeatability of Peak Area and Retention Time of Catechins, Gallic Acid, and Caffeine

Compounds	Retention Time	Peak Area
	%RSD	%RSD
Gallic Acid	0.21	0.34
Gallocatechin	0.31	0.36
Epigallocatechin	0.26	0.38
Caffeine	0.21	0.72
Catechin	0.15	0.32
Epicatechin	0.12	0.36
Epigallocatechin Gallate	0.14	0.39
Gallocatechin Gallate	0.14	0.35
Epicatechin Gallate	0.09	0.42
Catechin Gallate	0.08	0.54

にそれぞれ希釈後、メンブランフィルタ（孔径0.22 μ m）でろ過しました。

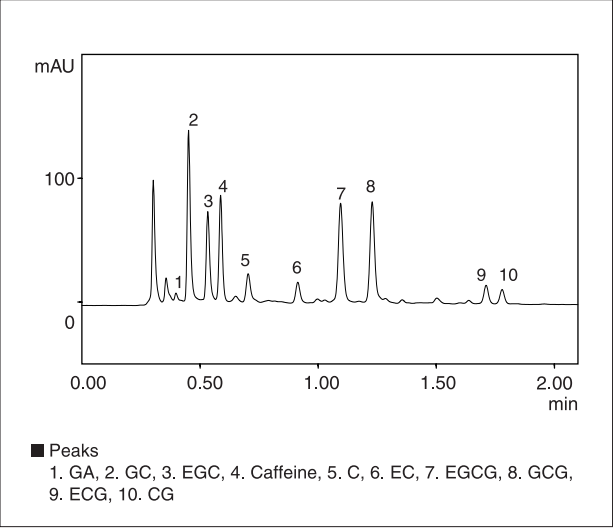


Fig.5 緑茶飲料水Bのクロマトグラム
Chromatogram of Green Tea Drink B

高速高分離分析の応用（その 21） 緑茶中カテキン類の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 21) Analysis of Catechins in Green Tea

近年、健康志向ブームにより、緑茶や緑茶飲料水が注目されています。アプリケーションニュースNo.L373では、緑茶飲料水中に含まれるカテキン類10種類の高速分析をご紹介しますが、今回は抗アレルギー作用があるとの研究報告があるメチルカテキンを含む14種類のカテキン

類について、超高速高分離LCシステム“Prominence UFLC_{XR}”および高速高分離用カラムを用いた高速分析例をご紹介します。なお、今回はLCMS-2020を用いて、UVでの検出結果との比較も行いました。

T.Yoshida

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

Fig.1に今回検討に用いましたメチルカテキン類を含むカテキン類、没食子酸、カフェインの構造式を示します。

Fig.2に、これら14成分の標準混合溶液（各100 mg/L）

をAMT社製“HALO[®] C18（粒子径 2.7 μ m）”により一斉分離したクロマトグラムを示します。また、その分析条件をTable 1に示します。

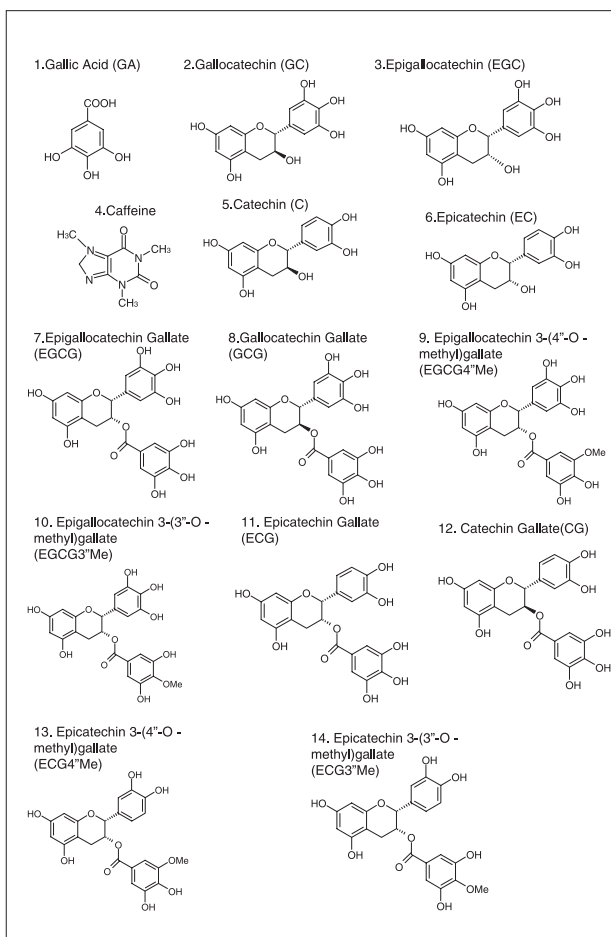


Fig.1 カテキン類、没食子酸、カフェインの構造式
Structures of Catechins, Gallic Acid, and Caffeine

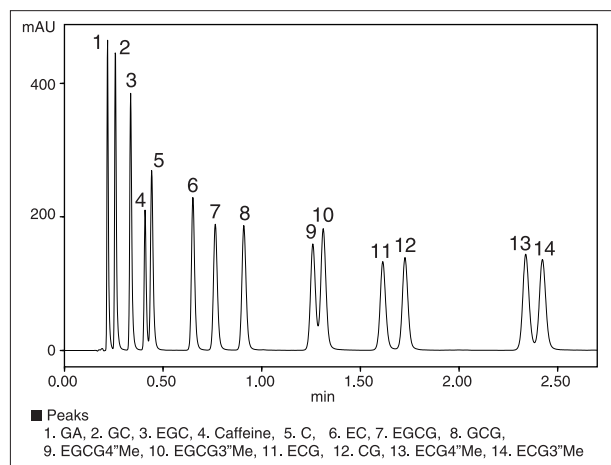


Fig.2 カテキン類、没食子酸、カフェイン標準液のクロマトグラム
（各100 mg/L, 2 μ L注入）
Chromatogram of a Standard Mixture of Catechins, Gallic Acid, and Caffeine

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: HALO [®] C18 (75 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.7 μ m)
Mobile Phase	: A: 0.2 % phosphoric acid (100 % in water / Tetrahydrofuran = 995 / 5 (v/v)) B: Acetonitrile / Tetrahydrofuran = 990 / 10 (v/v)
Time Program	: B conc. 10 % (0 min) $\rightarrow$ 15 % (2.5 min) $\rightarrow$ 50 % (2.51min-3.0 min)
Flow Rate	: 2.0 mL/min
Column Temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Injection Volume	: 2 μ L
Detection	: SPD-M20A at 230 nm
UV Cell	: Semi-micro Cell

■緑茶の分析

Analysis of Green Tea

Fig.3, Fig.4に、市販緑茶を分析したクロマトグラムを示します。分析条件はTable 1と同じです。緑茶葉は3 gを100 mLのお湯で煎じ、純水で10倍に希釈後、孔径0.22 μm

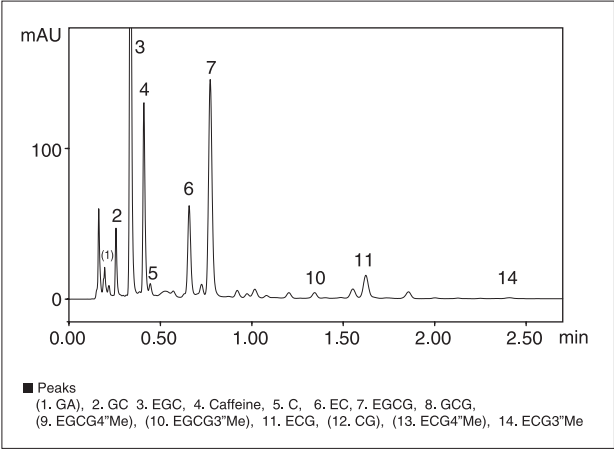


Fig.3 緑茶Aのクロマトグラム
Chromatogram of Green Tea A

メンブランフィルターでろ過しました。緑茶AとBでは、メチルカテキンである EGCG3''Meおよび ECG3''Meの含有量に差があることが確認できました。

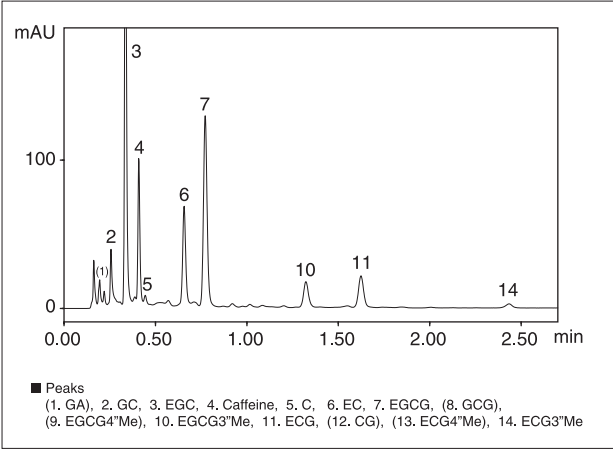


Fig.4 緑茶Bのクロマトグラム
Chromatogram of Green Tea B

■LC-MSによる緑茶の分析

Analysis of Green Tea by LC-MS

Fig.5に、緑茶BをLCMS-2020で分析したMSクロマトグラムを、その分析条件をTable 2に示します。LC-MSの測定にあたって、移動相に添加する酸は揮発性のぎ酸に変更し、テトラヒドロフランの含有量も変更しました。このようにLC-MS法で使用した移動相は、UV検出時の移動相と異なるため、ピーク4 (C) とピーク5 (カフェイン) の溶出順序逆転が観察されました。また、Fig.4で観察されたGAは、Fig.5のLC-MSによる分析結果では確認されておらず、GA以外の化合物である可能性が示唆されました。

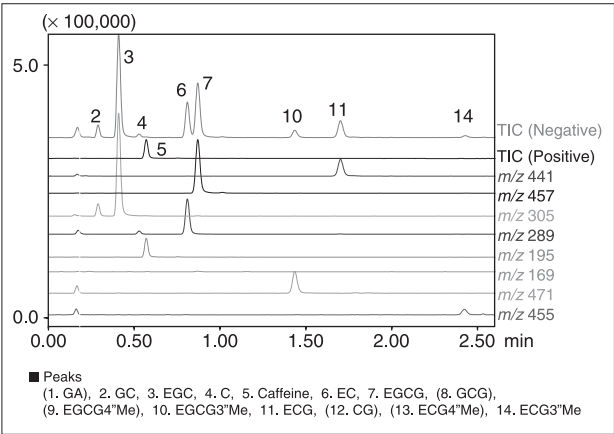


Fig.5 緑茶BのMSクロマトグラム
MS Chromatograms of Green Tea B

Table 2 分析条件
Analytical Conditions of LC/MS

■ LC conditions	
Column	: HALO® C18 (75 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.7 μm)
Mobile Phase	: A ; 0.4 % Formic acid in water / Tetrahydrofran = 995 / 5 (v/v) B; 0.4 % Formic acid in Tetrahydrofran / Acetonitrile = 10 / 990 (v / v)
Time Program	: B conc. 8 % (0 min) → 15 % (2.5 min) → 50 % (2.51-3.0 min)
Flow Rate	: 2.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 2 μL
■ MS conditions (LCMS-2020)	
Probe Voltage	: +4.5 kV (ESI Positive mode), -3.5 kV (ESI Negative mode)
Nebulizing Gas Flow	: 1.5 L/min.
Drying Gas Flow	: 20 L/min.
DL Temperature	: 250 °C
DL Voltage / Q-array Voltage	: Default Values
Monitoring Ions	: m/z 441 (Negative) for ECG and CG m/z 457 (Negative) for EGCG and GCG m/z 305 (Negative) for GC and EGC m/z 289 (Negative) for C and EC m/z 195 (Positive) for Caffeine m/z 169 (Negative) for GA m/z 471 (Negative) for EGCG4'' Me and EGCG3'' Me m/z 455 (Negative) for ECG4'' Me and ECG3'' Me

高速高分離分析の応用（その26） フェノール酸の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 26) Analysis of Phenolic Acids

フェノール酸は、高等植物にエステル体やエーテル体、あるいは遊離状態で存在し、近年その抗酸化作用が注目されている化合物です。果実や果実を原料とした加工食品中におけるフェノール酸を定量するためにHPLC法が多く用いられますが、実試料中における夾雑成分との分離を達成するために、比較的長いカラムとグラジエント

溶離法を用い、時間をかけて分析する場合があります。

ここでは、島津超高速LCシステム“Prominence UFLC_{XR}”およびフォトダイオードアレイ検出器SPD-M20Aによる、フェノール酸の高速高分離分析例をご紹介します。

K.Watanabe K.Yamabe

■フェノール酸11成分と安息香酸の一斉分析

Simultaneous Analysis of 11 Phenolic Acids and Benzoic Acid

Fig.1に、高速高分離用カラム“Shim-pack XR-ODS II”を用いたフェノール酸11成分および安息香酸の標準液（各50 mg/L）のクロマトグラムを、Table 1にその分析条件を示します。比較のためコンベンショナルカラム“Shim-pack VP-ODS”によるデータを示します。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS II (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A; 50 mmol/L Ammonium formate buffer (pH3.6) B; Methanol B Conc. 20 % (0-10 min)→80% (10.01-11 min)→ 20 % (11.01-15 min) 0.5 mL mixer
Flow Rate	: 0.9 mL / min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 4 μL
Detection	: SPD-M20A (Max plot 230-350 nm)
UV Cell	: Semi-micro Cell

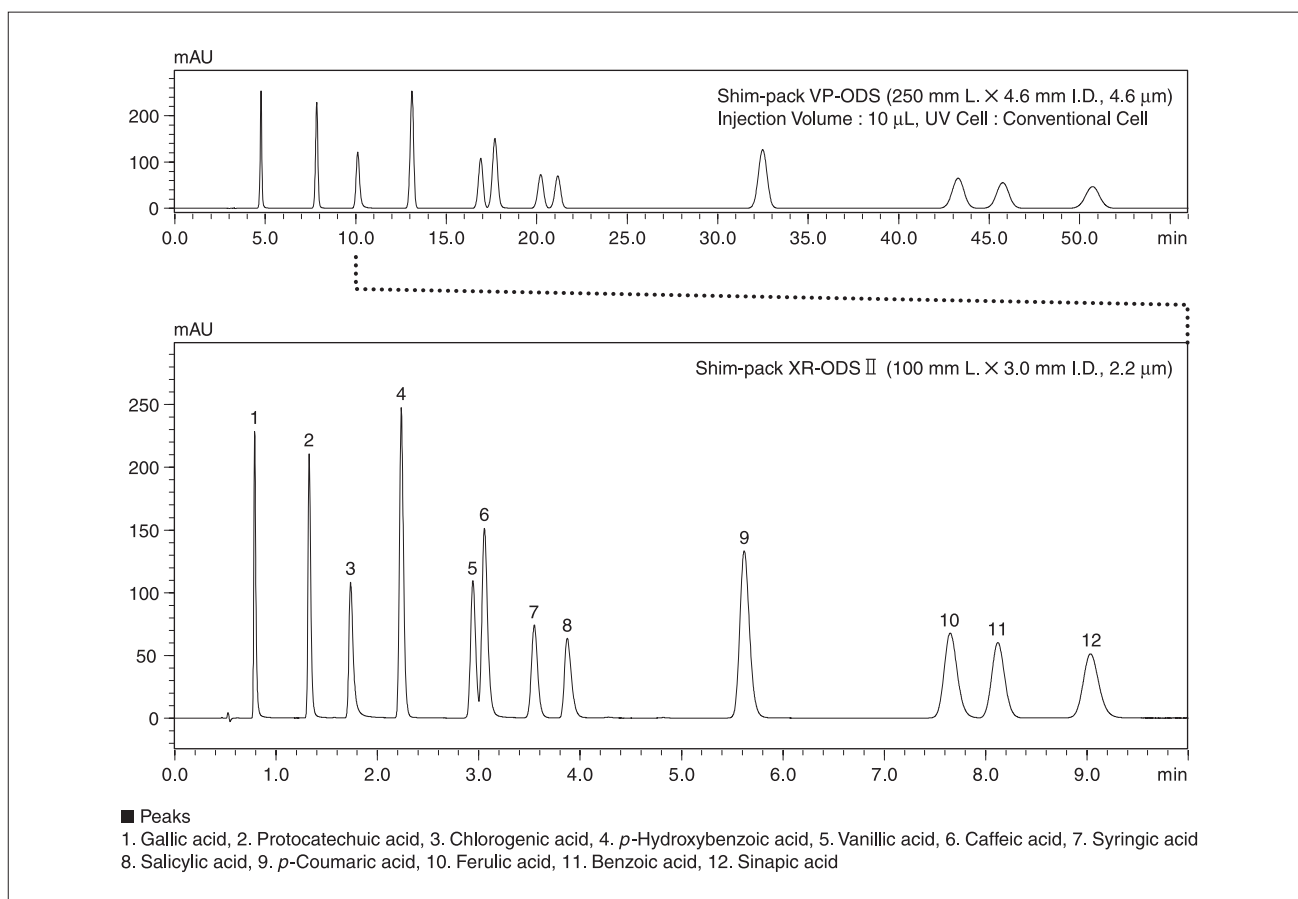


Fig.1 標準混合液のクロマトグラム（各50 mg/L）

Chromatograms of a Standard Mixture of 11 Phenolic Acids and Benzoic Acid (50 mg/L each)

■クロロゲン酸の分析

Analysis of Chlorogenic Acid

クロロゲン酸はコーヒー豆中に多く含まれていることが知られており、アプリケーションニュースNo.L306ではコーヒーの分析例をご紹介します。ここでは、市販ジュースを高速分析しました。

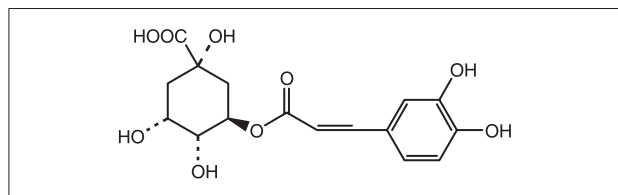


Fig.2 クロロゲン酸の構造式
Structure of Chlorogenic Acid

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A; 50 mmol/L Ammonium acetate buffer (pH4.7) B; Methanol B. Conc. 15 % (0-0.8 min)→80% (0.81-1.0 min)→ 15 % (1.01-1.8 min)
Flow Rate	: 0.9 mL / min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 4 μL
Detection	: SPD-M20A (325 nm)
UV Cell	: Semi-micro Cell

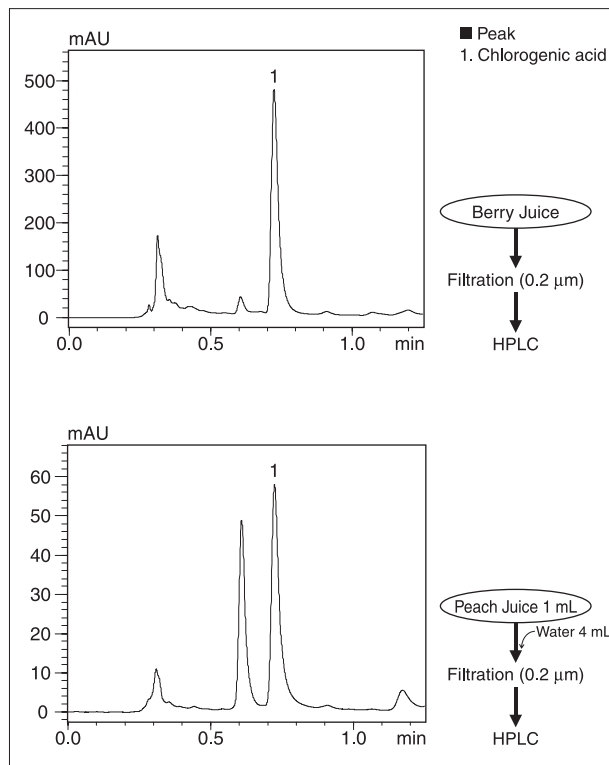


Fig.3 ベリージュース(上)と桃ジュース(下)のクロマトグラム
Chromatograms of Berry Juice (upper) and Peach Juice (lower)

■エラグ酸の分析

Analysis of Ellagic Acid

エラグ酸は植物中では多くは没食子酸と結合したタンニンとして存在します。ここでは加工食品に含まれる遊離のエラグ酸を分析しました。

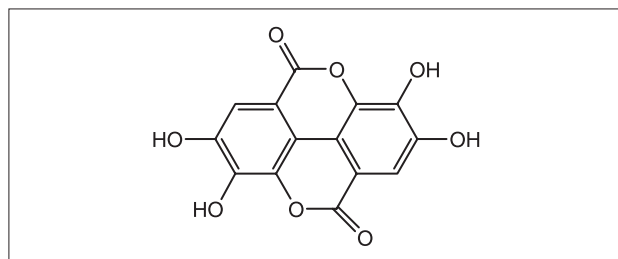


Fig.4 エラグ酸の構造式
Structure of Ellagic Acid

Table 3 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-Phenyl (50 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A; 10 mmol/L Oxalic acid aq. B; Methanol/Acetonitrile=7/3 (v/v) B. Conc. 35%
Flow Rate	: 1.0 mL / min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 2 μL
Detection	: SPD-M20A (366 nm)
UV Cell	: Semi-micro Cell

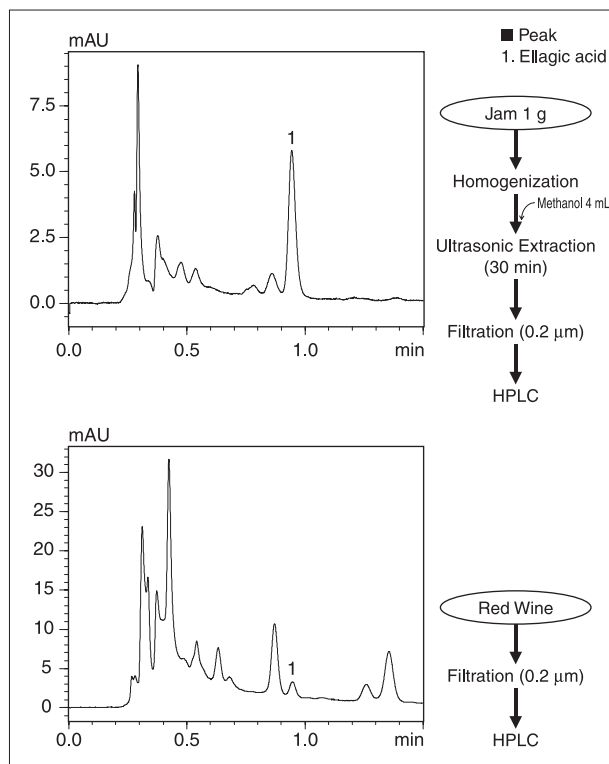


Fig.5 ラズベリージャム(上)と赤ワイン(下)のクロマトグラム
Chromatograms of Raspberry Jam (upper) and Red Wine (lower)

高速高分離分析の応用（その28） ホップ中 α 酸および β 酸の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 28) Analysis of α -Acids and β -Acids in Hops

ビールの原料であるホップには α 酸（フムロン類）、 β 酸（ルブロン類）と呼ばれる成分が含まれています。 α 酸は醸造工程で異性化されることによりビール中の苦味成分であるイソ α 酸（イソフムロン類）に変化します。また、 β 酸はビールの苦味の強さには大きく関係しないものの、苦味のバランスに影響すると言われています。

一般に、 α 酸および β 酸の分析にはHPLCが用いられますが、分析時間としては通常30分程度がかかります。

ここでは、超高速高分離LCシステム“Prominence UFLCXR”および高速高分離用カラムを用いたホップ中 α 酸および β 酸の高速分析例をご紹介します。

K.Tanaka

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

今回は、ホップ中に含まれる α 酸3成分（フムロン、コフムロン、アドフムロン）と β 酸3成分（ルブロン、コルブロン、アドルブロン）の計6成分を分析対象としました。これら成分の構造式をFig. 1に示します。

標準溶液は、標準ホップエキス“International Calibration Extract 2”（American Society of Brewing Chemists）[※] 0.1 gをメタノールに溶解させて全量100 mLとし、孔径0.22 μ mメンブランフィルターでろ過して調製しました。この標準溶液4 μ Lを注入した結果をFig. 2に、また分析条件をTable 1に示します。高速高分離カラムには、AMT社“HALO[®] C18”（粒子径 2.7 μ m）を用いました。なお、本分析でのシステム負荷圧は最大約56 MPaでした。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: HALO [®] C18 (150 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 2.7 μ m)
Mobile Phase	: A: Water/Methanol/Phosphoric acid (85%)/Triethylamine =300 mL/700 mL/19.6 g/15.1 g B: Methanol
Time Program	: B Conc. 0 % (0 min) $\rightarrow$ 35 % (10 min)
Flow Rate	: 1.1 mL/min
Column Temp.	: 50 $^{\circ}$ C
Injection Volume	: 4 μ L
Detection	: SPD-20AV at 330 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

※ “International Calibration Extract 2” の組成

・コフムロン	14.45%
・フムロン+アドフムロン	34.94%
・コルブロン	12.92%
・ルブロン+アドルブロン	12.02%

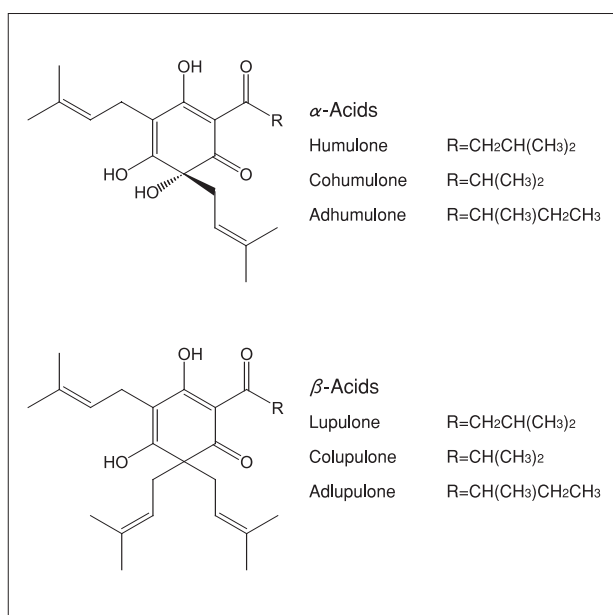


Fig. 1 α 酸および β 酸の構造式
Structures of α -Acids and β -Acids

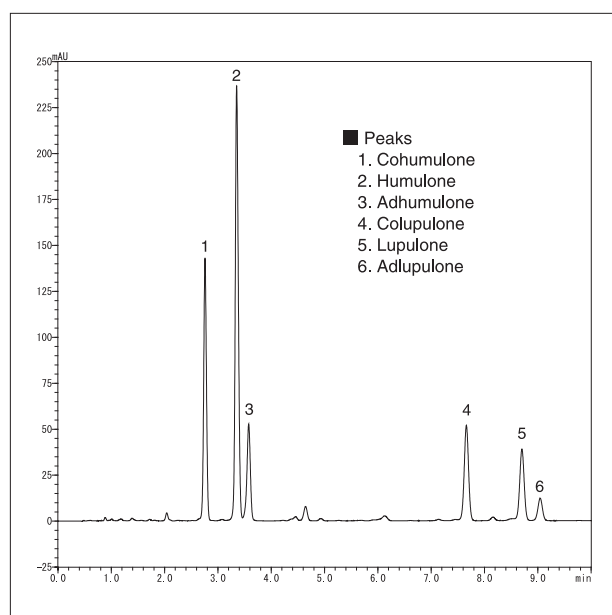


Fig. 2 α 酸および β 酸のクロマトグラム
Chromatogram of a Standard Mixture of α -Acids and β -Acids

■再現性

Repeatability

Table 2に、標準溶液6回繰り返し分析における保持時間とピーク面積の相対標準偏差(%RSD)を示します。保持時間、ピーク面積ともに良好な再現性が得られました。

Table 2 α 酸および β 酸の再現性
Repeatability of Peak Area and Retention Time of α -Acids and β -Acids

Compounds	Retention Time (%RSD)	Peak Area (%RSD)
Cohumulone	0.11	0.16
Humulone	0.10	0.17
Adhumulone	0.09	0.11
Colupulone	0.05	0.21
Lupulone	0.04	0.22
Adlupulone	0.04	0.19

■吸収スペクトル

UV Spectra

Fig. 3に、フォトダイオードアレイ検出器“SPD-M20A”により得られた各成分のスペクトルを示します。 α 酸（フムロン類）と β 酸（ルプロン類）でスペクトル形状の差が観察されました。

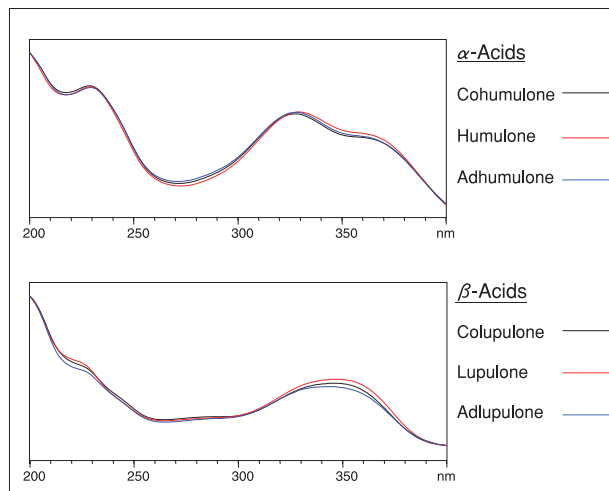


Fig. 3 α 酸および β 酸のUVスペクトル
UV Spectra of α -Acids and β -Acids

■ホップペレットの分析

Analysis of Hop Pellet

Fig. 4に市販ホップペレットの分析例を示します。前処理はFig. 5の前処理手順¹⁾に従って行いました。実試料においても標準溶液 (Fig. 2) と同様に、実用的な分離が得られました。

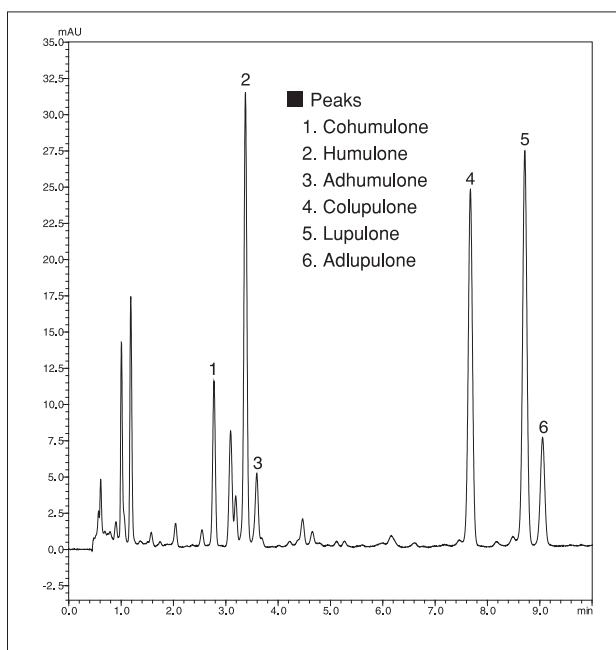


Fig. 4 ホップペレットのクロマトグラム
Chromatogram of Hop Pellet

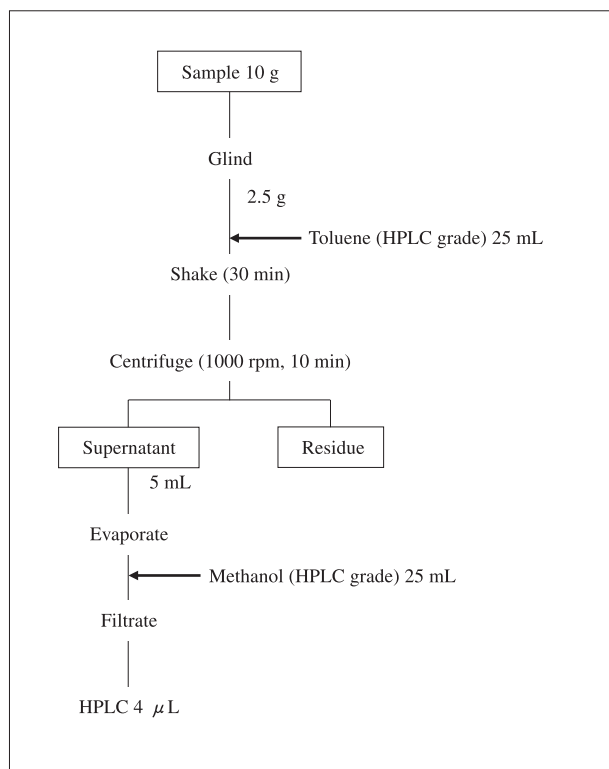


Fig. 5 試料前処理方法
Sample Preparation

[参考文献]

1) ビール酒造組合国際技術委員会[分析委員会]編, 改訂 BCOJビール分析法, 財団法人日本醸造協会 (2004)

高速高分離分析の応用（その29） 自動カラムスイッチングシステムを用いた ベリー果汁中フェルラ酸分析の効率化

High Speed with High Resolution Analysis (Part 29) High Efficiency Analysis of Ferulic Acid in Berry Juice Using Automated Column Switching System

一般に、多数の夾雑成分が含まれる試料中の微量分析種を高速分析する際、前処理や分離条件の設定に長い時間や手間を要する場合があります。

ここでは、このような分析の効率化をはかるため島津

超高速LCシステム“Prominence UFLC”をベースに、1次分離カラム、トラップカラム、2次分離カラムを組み込んだカラムスイッチングシステムを構築し、ベリー果汁中のフェルラ酸分析に応用した例をご紹介します。

K. Yamabe

■システムの原理

Principle of the System

今回検討しましたカラムスイッチングシステムの流路図をFig. 1に示します。オートサンプラから注入された試料を、まずカラム-1（1次分離カラム）を含むライン（実線）で分離します。次に分析種の溶出区間でバルブを切換え、この溶出液をポンプ-2で希釈しながらカラム-2（トラップカラム）に送り濃縮します。その後、カラム-3（2次分離

カラム）を含むライン（点線）で分離を行います。

Fig. 2に今回の分析対象であるフェルラ酸を含むフェノール酸3成分を本システムで分析した結果を、またTable 1にその分析条件を示します。この場合、カラム-1のフェルラ酸溶出区間約0.25分をカラム-2で濃縮し、カラム-3でカラム-1と移動相pHが異なる条件を用いて分析を行いました。

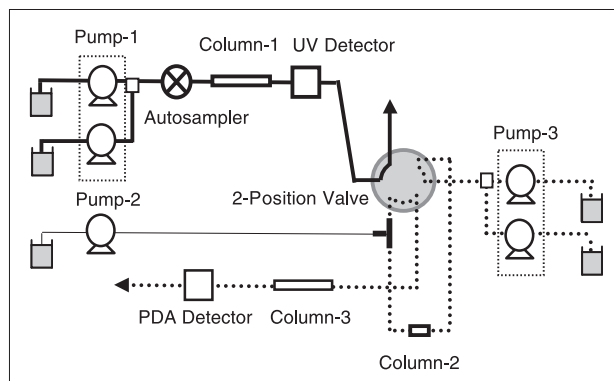


Fig. 1 流路図
Flow Diagram

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

[Column-1]	: Shim-pack XR-ODS(75 mm L.×4.6 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A: 20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.5) B: Acetonitrile, A / B = 75 / 25 (v/v)
Flow Rate	: 1.5 mL/min (0-1.6 min)
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 4 μL
Detection	: SPD-20A (314 nm) with Semi-micro Cell
[Column-2]	: Shim-pack GVP-ODS(10 mm L.×4.6 mm I.D., 4.6 μm)
Mobile Phase	: 20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.5)
Flow Rate	: 0.2 mL/min (0-1.36 min), 4.5 mL/min (1.37-1.8 min)
[Column-3]	: Shim-pack XR-ODS(75 mm L.×4.6 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A: 50 mmol/L (Ammonium) acetate buffer (pH 4.7) B: Acetonitrile, A / B = 80 / 20 (v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Detection	: SPD-M20A (314 nm) with Semi-micro Cell

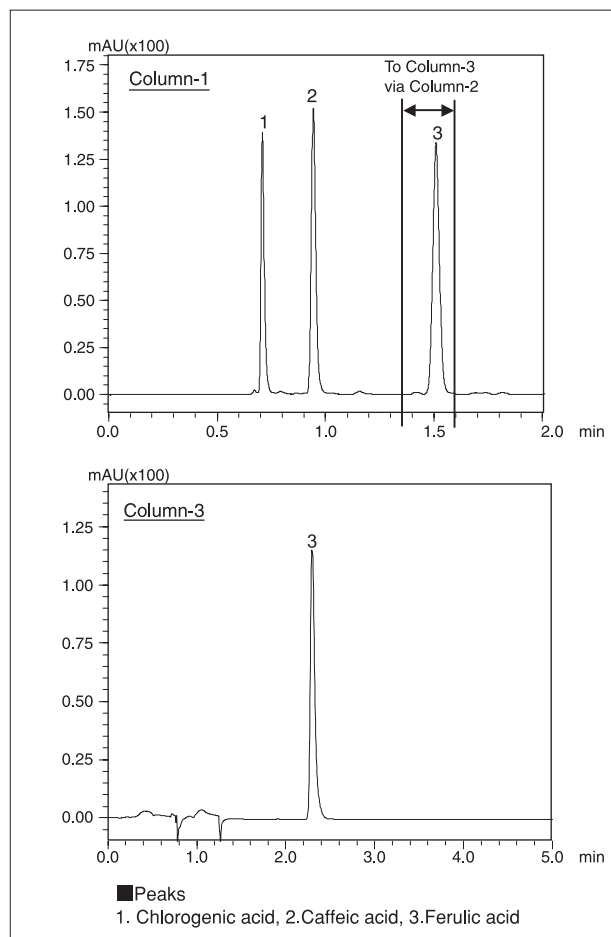


Fig. 2 フェノール酸3成分のクロマトグラム (各50 mg/L)
Chromatograms of a Standard Mixture of 3 Phenolic Acids
(50 mg/L each)

■直線性と再現性

Linearity and Repeatability

この分析ではカラム-1とカラム-3で順に分離を行ないますので、1サイクルは両カラムの分析時間を合わせて約7分です。パルプの切換動作などはタイムプログラムで設定することにより、自動連続分析が可能です。

Fig. 3にフェルラ酸の濃度0.04~20 mg/Lでの検量線を示します。寄与率 (R^2) 0.99999と良好でした。また、濃度20 mg/Lによるピーク面積の再現性 ($n=6$) は0.21 %RSDでした。

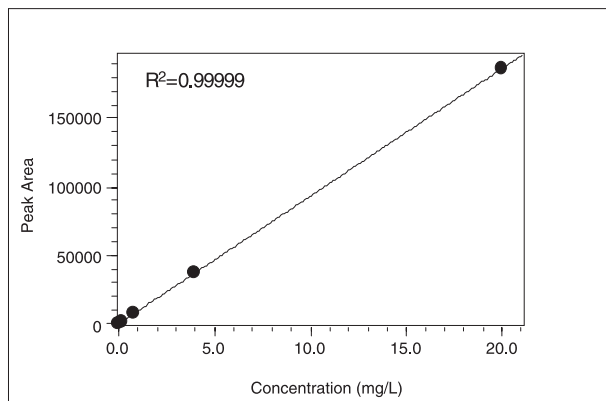


Fig. 3 フェルラ酸の検量線
Calibration Curve of Ferulic Acid

■ベリー果汁の分析

Analysis of Berry Juice

本システムを用いて、市販ベリー果汁中のフェルラ酸を分析した結果をFig. 4に示します。試料は0.22 μ mメンブランフィルターでろ過後、4 μ Lを注入しました。

カラム-1のクロマトグラム中におけるフェルラ酸の溶

出区画が、カラム-3のクロマトグラムでは多数のピークに分離し、分析の効率化が確認できました。なお、カラム-3におけるフェルラ酸のピーク面積再現性 ($n=6$) は0.6 %RSDでした。

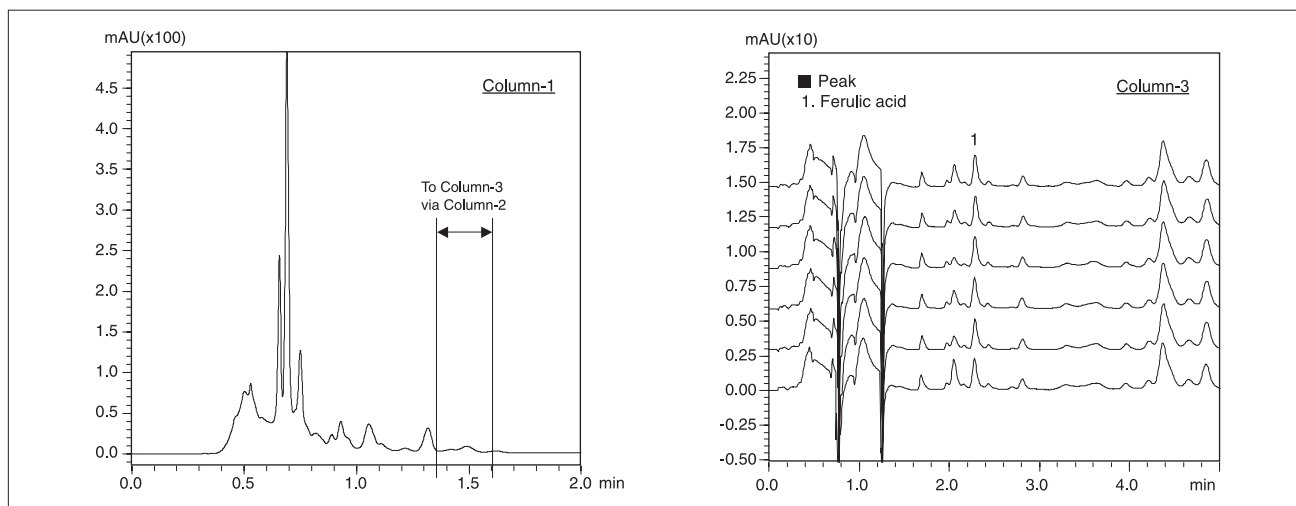


Fig. 4 ベリージュースのクロマトグラム
Chromatograms of Berry Juice

また、フォトダイオードアレイ検出器SPD-M20Aにより得られたフェルラ酸ピークの吸収スペクトル（カラム-3）をフェルラ酸標準品と重ね描きした結果をFig. 5に示します。これら吸収スペクトルが良く一致していることがわかりました。

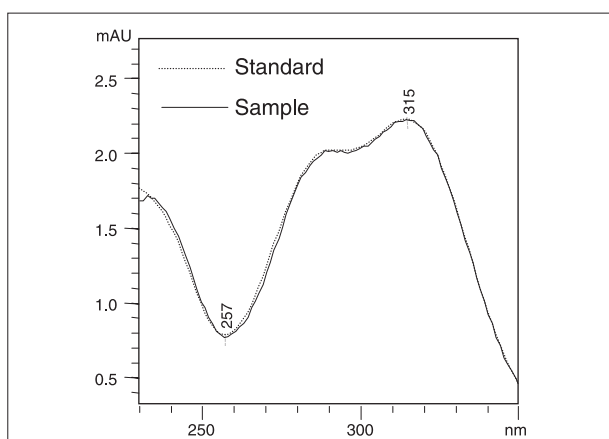


Fig. 5 ピークスペクトル
Peak Spectrum

高速高分離分析の応用 (その33) 生姜中ジンゲロール・ショウガオール分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 33) Analysis of Gingerol and Shogaol in Ginger

生姜は香辛料として使用されるだけではなく、古くから漢方薬としても使用されてきました。近年、生姜がもつ効能に注目が集まっており、生姜を用いたいわゆる健康食品などを見かける頻度も多くなっています。

ここでは、超高速LCシステム“ProminenceUFLC”およびフォトダイオードアレイ検出器“SPD-M20A”を用いた生姜中6-ジンゲロール、6-ショウガオール分析例をご紹介します。

Y. Hirao

■標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

Fig. 1に、6-ジンゲロールと6-ショウガオールの構造を示します。ジンゲロールおよびショウガオールには同族体が存在し、ジンゲロールについては6-ジンゲロール、8-ジンゲロール、10-ジンゲロールが存在しますが、そのうち6-ジンゲロールが生姜中に最も豊富に含まれています。加熱による脱水反応の結果、ジンゲロールはショウガオールに変化しますが、これら成分の含有量は生姜の種類により異なります。

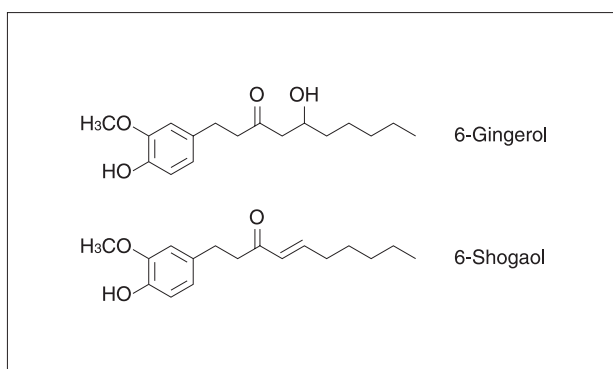


Fig. 1 6-ジンゲロール、6-ショウガオールの構造式
Structures of 6-Gingerol and 6-Shogaol

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack XR-ODS (75 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: A : Water B : Acetonitrile
Time Program	: B Conc. 30→90 % (0.00-2.10 min) →90 % (2.50 min) →100 % (2.51-3.50 min) →30 % (3.51 min)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Injection Volume	: 2 μL
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M20A at 280 nm (Slit Width : 8 nm)
Flow Cell	: Semi-micro Cell

より異なります。

Fig. 2に、高速高分離カラム“Shim-pack XR-ODS”による6-ジンゲロールおよび6-ショウガオール標準液（各100 mg/L、メタノール溶液）のクロマトグラムを、Table 1にその分析条件を示します。なお、本分析条件では、実試料分析のためにカラム洗浄工程を加えています。

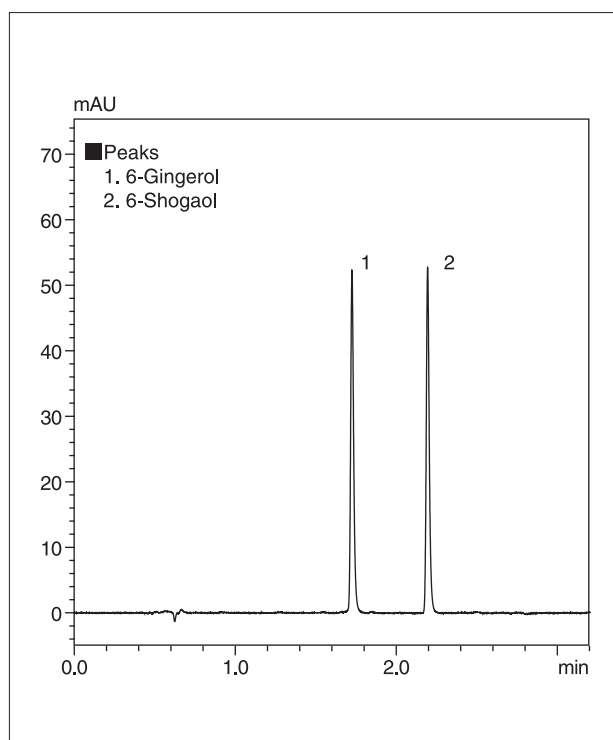


Fig. 2 6-ジンゲロールおよび6-ショウガオール標準液のクロマトグラム
(100 mg/L, 2 μL注入)
Chromatogram of a Standard Mixture of 6-Gingerol and 6-Shogaol
(100 mg/L, 2 μL injected)

■直線性と再現性

Linearity and Repeatability

Fig. 3に、6-ジンゲロールおよび6-ショウガオールについて濃度範囲1.0～250 mg/Lにおける検量線（各濃度3回のピーク面積平均より作成）および繰り返し再現性（n=6）

を示します。両成分とも寄与率（ R^2 ）0.9999以上と良好な直線性が得られました。

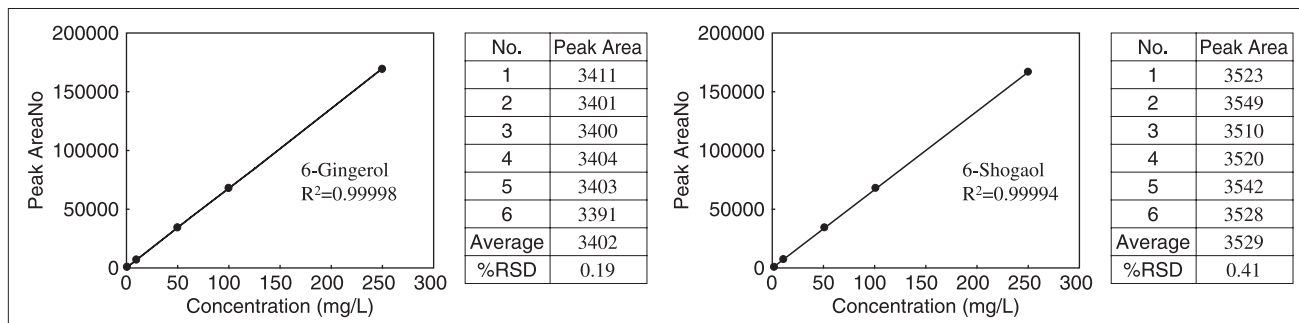


Fig. 3 直線性および再現性
Linearity and Repeatability

■生姜抽出液の分析

Analysis of Ginger Extract

生姜をFig. 4に示す前処理後、Table 1の分析条件により分析しました。Fig. 5に、クロマトグラムを示します。Fig. 6に、6-ジンゲロール標準試料と生姜抽出液中の標準試料と生姜抽出液中6-ジンゲロールのスペクトルと標準品スペクトルを重ね描きした結果を示します。

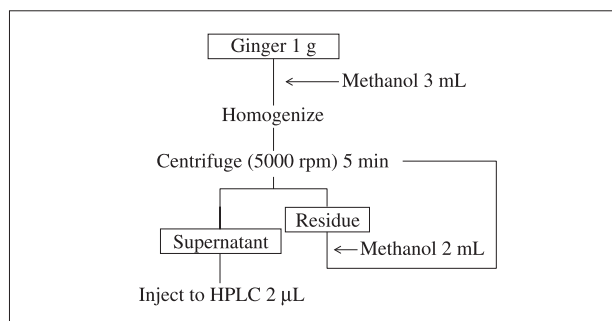


Fig. 4 前処理手順
Sample Preparation

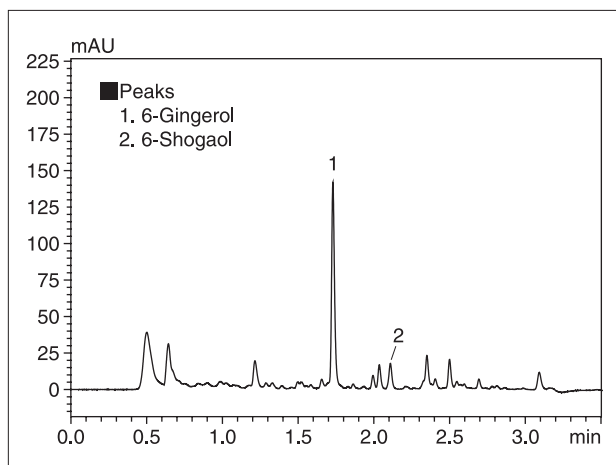


Fig. 5 生姜抽出液のクロマトグラム
Chromatogram of Ginger Extract

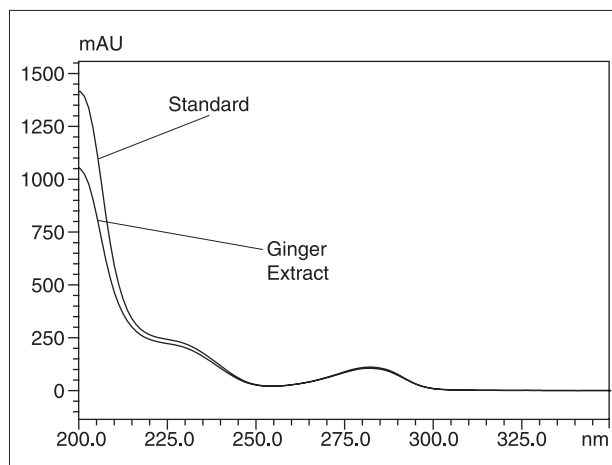


Fig. 6 6-ジンゲロールのスペクトル
Spectra of 6-Gingerol

高速高分離の応用（その44）

オートサンプラSIL-30ACによる自動プレカラム誘導体化アミノ酸の分析

High Speed with High Resolution Analysis (Part 44)

Analysis of Pre-column Derivatized Amino Acids by SIL-30AC Autosampler

アミノ酸分析は食品分野や製薬分野など、幅広い分野において必要とされており、HPLCを用いたアミノ酸の分析では、感度、選択性の向上のために様々な誘導体化法が考案されてきました。これまでにアプリケーションニュースNo.L292および299AではOPAポストカラム誘導体化によるアミノ酸の分析例をご紹介します。

ここでは蛍光検出器“RF-20Axs”と自動前処理機能付きオートサンプラ“SIL-30AC”を用いて、OPAおよびFMOCによってラベル化したアミノ酸の分析例をご紹介します。

Y. Hirao

■アミノ酸22成分の一斉分析

Simultaneous Determination of 22 Amino Acids

本法ではNexeraオートサンプラ“SIL-30AC”の自動前処理機能を活用して、1級アミノ酸の誘導体化を α -フルタルアルデヒド（以下、OPA）で、プロリンなどの2級アミノ酸をクロロギ酸9-フルオレニルメチル（以下、FMOC）にてオートサンプラ内で蛍光物質に自動誘導体化します。誘導体化したアミノ酸は超高速分析用カラム“YMC-Triart C18”（1.9 μ m, 株式会社ワイエムシー製）により分離した後、高感度蛍光検出器“RF-20Axs”により高感度に検出します。なお、OPA誘導体化アミノ酸とFMOC誘導体化アミノ酸は検出波長が異なるため、自動波長切替機能を利用して一斉分析を行っています。

Table 1に本法で使用する誘導体化試薬を示します。また、Fig. 1にはオートサンプラSIL-30ACによる自動誘導体化での試薬の添加および混合のスキームを示します。オートサンプラによる自動誘導体化では反応時間を一定に保つことができますので、要手法によるプレカラム誘導体化と比較し、優れた再現性を得ることができます。

Table 2に分析条件を、Fig. 2に分離したクロマトグラムを示します。

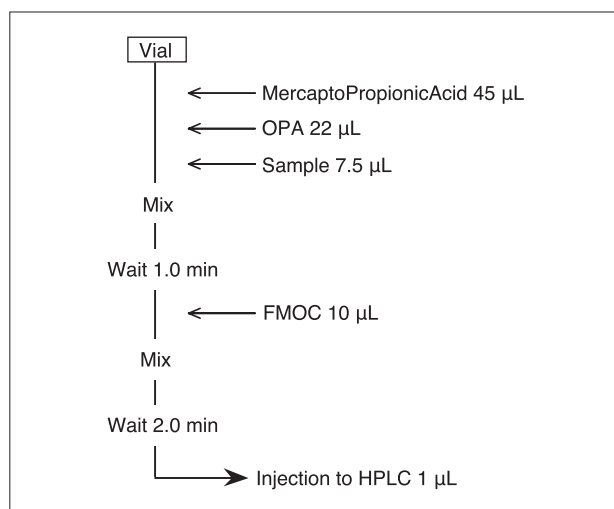


Fig. 1 SIL-30ACによる自動プレカラム誘導体化の流れ
Flowchart of Derivatization with SIL-30AC

Table 1 誘導体化試薬
Derivatization Reagents

●Mercaptopropionic Acid
3 - Mercaptopropionic Acid 10 μ L in 0.1 mol/L Borate Buffer (pH 9.2) 10 mL
● α - Phthalaldehyde Solution
α - Phthalaldehyde 10 mg in 0.1 mol/L Borate Buffer (pH 9.2) 5 mL
●Fluorenyl Methyl Chloro Formate - Acetonitrile Solution
9 - Fluorenyl Methyl Chloro Formate 4 mg in Acetonitrile 20 mL

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: YMC-Triart C18 1.9 μ m (75 mm L. $\times$ 3.0 mm I.D., 1.9 μ m, 株式会社ワイエムシー製)
Mobile Phase	: A : 20 mmol/L Phosphate Potassium Buffer (pH 6.9) B : 45/40/15 Acetonitrile/Methanol/Water
Time Program	: B Conc. 11 % $\rightarrow$ 13 % (0.00-3.00 min) $\rightarrow$ 31 % (5.00 min) $\rightarrow$ 37 % (7.5 min) $\rightarrow$ 70 % (10.00 min) $\rightarrow$ 100 % (10.50-13.50 min) $\rightarrow$ 11 % (14.00 min)
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Column Temp.	: 35 $^{\circ}$ C
Injection Volume	: 1 μ L
Detection	: RF-20Axs Ex. at 350 nm, Em. at 450 nm $\rightarrow$ Ex. at 266 nm, Em. at 305 nm (9.0 min)
Cell Temp.	: 20 $^{\circ}$ C
Flow Cell	: Conventional Cell

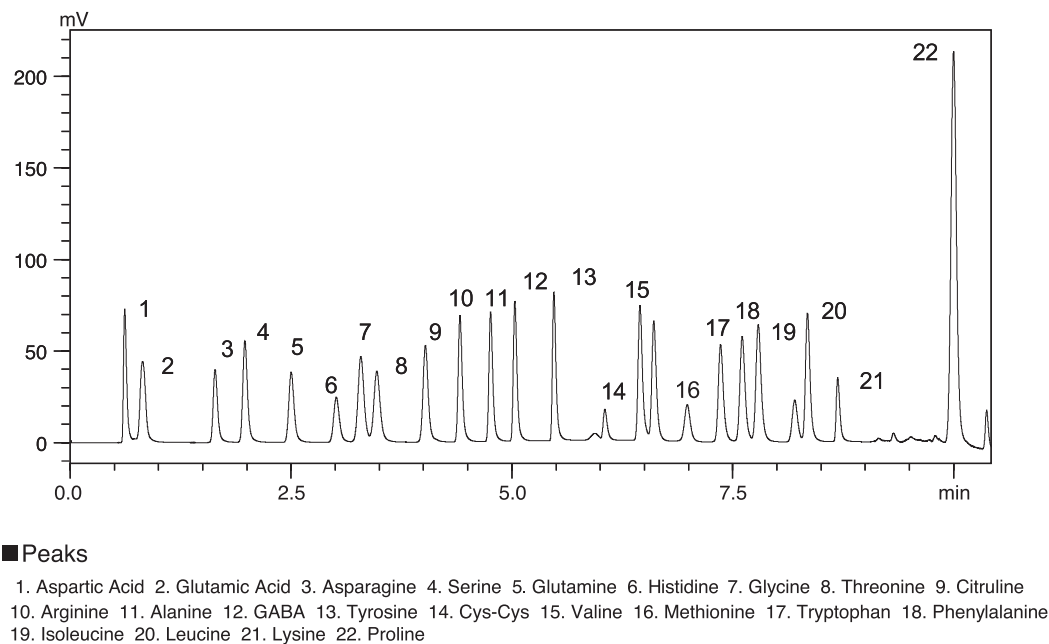


Fig. 2 アミノ酸標準品22成分のクロマトグラム (各10 μmol/L, 1 μL注入)
Chromatogram of 22 Amino Acids (10 μmol/L each, 1 μL injection)

■直線性と再現性

Linearity and Repeatability

各成分のアミノ酸について濃度範囲1~100 μmol/Lの検量線を作成したところ、いずれも寄与率 (R²) が0.999以上の良好な直線性が得られました。アミノ酸22成分を繰り返し分析したときの面積値の再現性 (n=6) を示します。

Table 3 再現性
Repeatability

	Area%RSD		Area%RSD
Asp	0.50	GABA	0.41
Glu	0.48	Tyr	0.55
Asn	0.51	Cys-Cys	0.46
Ser	0.41	Val	0.71
Gln	0.56	Met	0.71
His	0.57	Trp	0.70
Gly	0.29	Phe	0.73
Thr	0.55	Ile	0.63
Citruline	0.46	Leu	0.55
Arg	0.45	Lys	0.56
Ala	0.46	Pro	2.35

■実試料の分析

Analysis of Samples

Fig. 3に市販清涼飲料水を本法で分析した例を示します。試料は孔径0.2 μmのメンブランフィルターでろ過した後、分析に供しました。

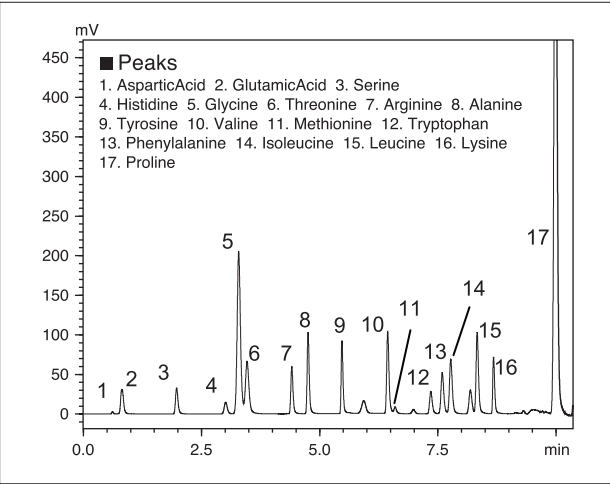


Fig. 3 清涼飲料水のクロマトグラム
Chromatogram of Soft Drink

LC/MS高速アミノ酸分析システム “UF-Amino Station” (その1) 超高速アミノ酸分析への新たなアプローチ

LC/MS Ultra Fast Amino Acid Analysis System “UF-Amino Station” (Part 1)

A Novel Approach for Ultra High Speed Analysis of Amino Acid

アミノ酸分析に従来から用いられているイオン交換-ポストカラム誘導体化HPLC法は、多成分のアミノ酸分析には適しているものの、分析時間が長いことが課題でした。一方、逆相-プレカラム誘導体化-UV検出法によるアミノ酸分析は、分析時間は大幅に短縮できるものの、対象となるアミノ酸成分数に限界があります。

味の素株式会社と共同開発した“UF-Amino Station”は、専用の高速高分離カラムと、超高速対応質量分析計を用い

ることで、わずか9分間で38成分のアミノ酸・アミノ酸関連物質の一斉分析を実現します。加えて、誘導体化処理の自動化、専用ソフトウェアによる簡便操作など、多検体処理をサポートするさまざまな特長を有しています。

ここでは、UF-Amino Station によるアミノ酸分析の基本原理と、アミノ酸の超高速分析を可能にしたシステム特長についてご紹介します。

K. Watanabe J. Masuda

■9分間でアミノ酸38成分を一斉分析

Simultaneous Analysis of 38 Amino Acids in 9 Minutes

Fig. 1 に、生体成分アミノ酸38成分の標準品を、UF-Amino Station (上)と陽イオン交換-ポストカラム誘導体化蛍光検出法によるアミノ酸分析法 (下)で一斉分析した例を示します。陽イオン交換-ポストカラム誘導体化法では38成分の分離に2時間以上を要します。一方、UF-Amino Stationでは、専用の高速高分離カラム“Shim-pack UF-

Amino” (粒子径 2 μm)を用いて38成分のアミノ酸を超高速分離し、さらに超高速対応質量分析計“LCMS-2020”を検出器に採用することで、わずか9分間でこれらの成分を検出することが可能となりました。分析条件をTable 1に示します。

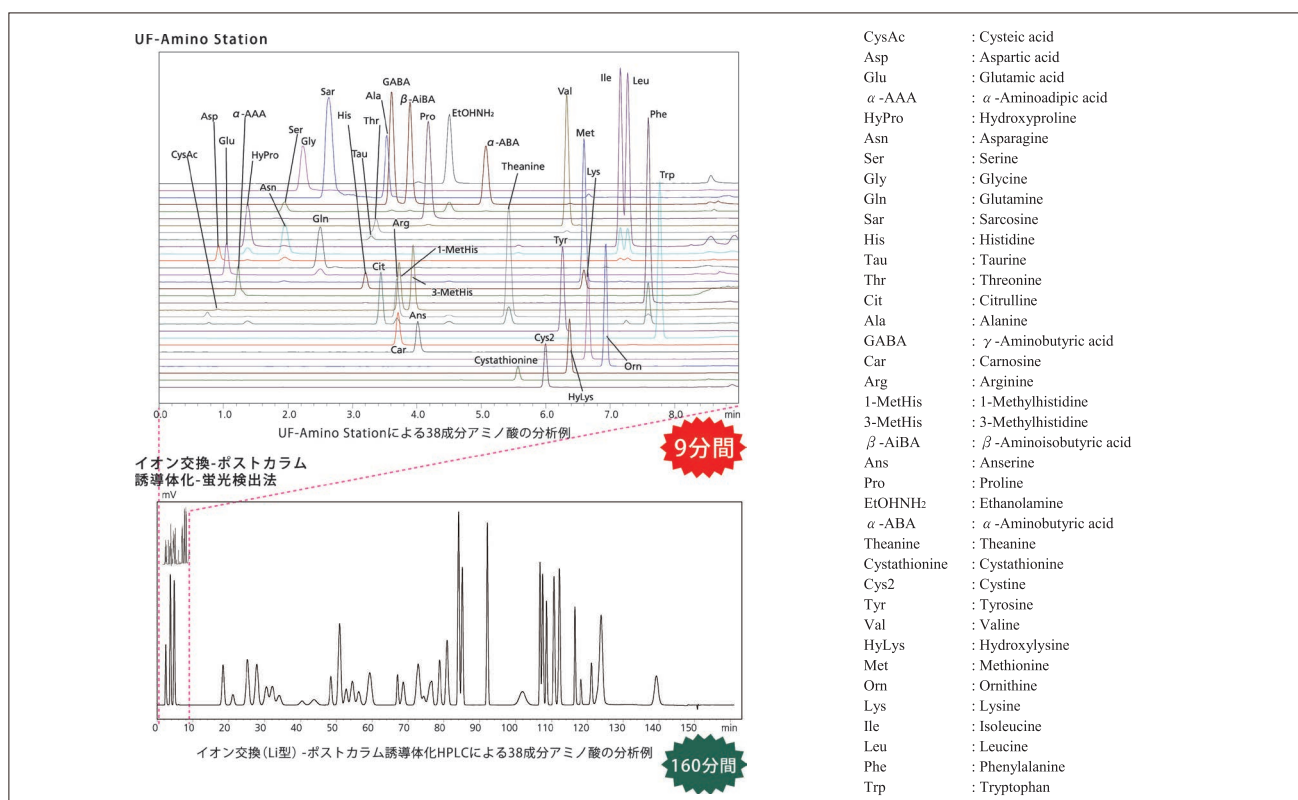


Fig. 1 アミノ酸38成分標準品の一斉分析 (上)UF-Amino Station, (下)陽イオン交換-ポストカラム誘導体化蛍光検出法
Simultaneous Analysis of 38 Amino Acids Standard, (Upper) UF-Amino Station, (Lower) Cation-exchange Chromatography and Fluorescence Detection with Post-Column Derivatization

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack UF-Amino (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 2 μm)	Reaction Reagent	: Amino Tag Wako and Amino Tag Wako Borate Buffer
Mobile Phase	: Amino Tag Wako Eluent Buffer and Acetonitrile, Gradient Elution	Detection	: LCMS-2020
Flow Rate	: 0.3 mL/min	Probe	: ESI Positive
Column Temp.	: 40 °C	※全ての試薬は、和光純薬工業株式会社から入手できます。	

■超高速分析に貢献するオーバーラップ自動誘導体化反応

Automated Derivatization in Overlap Process which Contributes to Ultra Fast Analysis

UF-Amino Stationは、前処理機能付きオートサンプラ“SIL-20AC_{PT}”の自動前処理機能により、アミノ酸の誘導体化プロセスの効率化を図ります。Fig. 2に、自動誘導体化反応のイメージ図を示します。専用ラックに標準溶液、試料溶液、専用反応試薬をセットして分析を開始すると、オートサンプラが各種溶液を採取し、別に用意した空バイアル

内で混合・希釈した上で、混合液を加温反応ユニットに導入します。加熱により誘導体化されたアミノ酸は、バルブの切り替えによってカラムへ注入されます。これらが全てオートサンプラにより自動で行われますので、効率化だけでなく、誘導体化反応の安定性向上も期待できます。

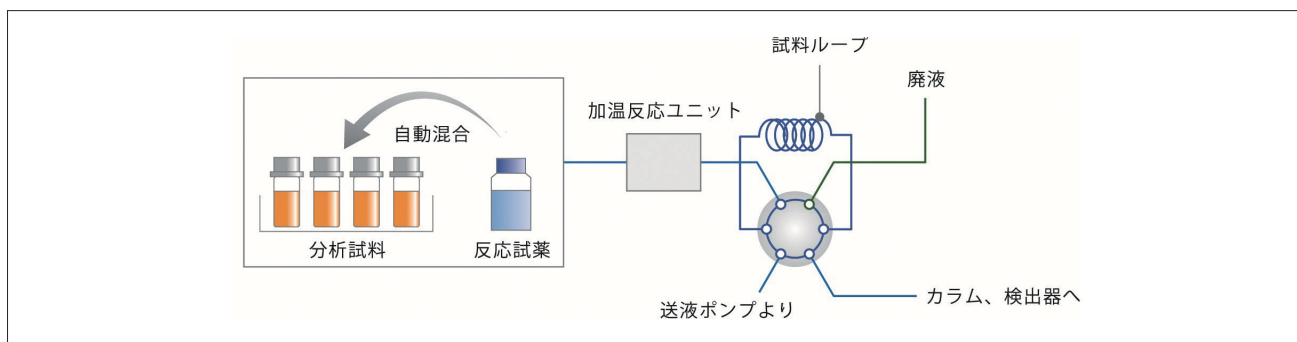


Fig. 2 SIL-20AC_{PT}による自動誘導体化反応
Automated Derivatization by SIL-20AC_{PT}

さらに、自動誘導体化処理と分析を併行して行うことで、分析の更なるスピードアップに貢献します。自動前処理で誘導体化された試料がカラムに注入されると、オートサンプラは次の試料溶液の前処理を開始します。先に注入された試料が分析されている間に、新たな試料溶液と反応試薬の混

合、加温反応ユニットでの誘導体化反応が行われます。1サイクルの分析時間を次の分析への準備に無駄なく利用するため、時間のロスなく効率的に分析を進めることができます。Fig. 3に、前処理のオーバーラップについてのイメージ図を示します。

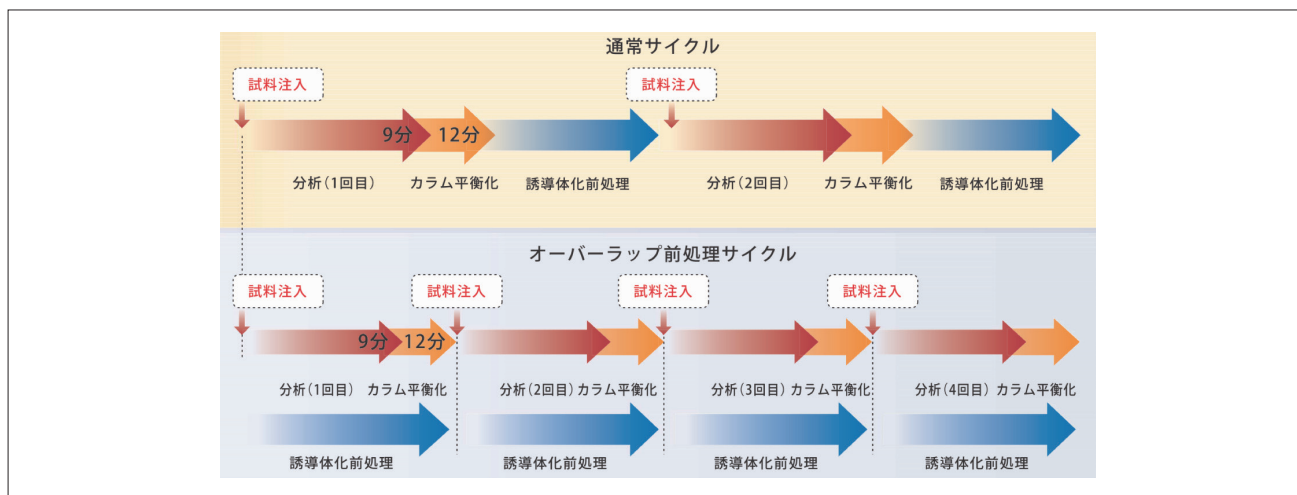


Fig. 3 UF-Amino Stationのオーバーラップ誘導体化処理
Overlap Derivatization Process by UF-Amino Station

LC/MS高速アミノ酸分析システム“UF-Amino Station”（その2） 実試料分析における信頼性の向上

LC/MS Ultra Fast Amino Acid Analysis System “UF-Amino Station” (Part 2) Improvement in Reliability of Sample Analysis

HPLCあるいはUHPLCによる逆相-プレカラム誘導体化アミノ酸分析法は、分析時間の短縮は期待できるものの、生体試料、食品試料など複雑なマトリックスを含む試料においては、分析結果の信頼性に限界がある場合があります。これは、試料中の夾雑成分とアミノ酸の分離、あるいはアミノ酸相互の分離を十分に確保することが困難であるために生ずる問題です。

新たなアミノ酸分析システム“UF-Amino Station”は、検

出に質量分析計を採用しています。その優れた検出選択性により、対象成分が多い場合、あるいは複雑なマトリックスを含む試料を分析する場合においても、信頼性の高い分析を可能とします。また、オートサンブラによる自動誘導体化処理も、定量値の信頼性向上に貢献します。

ここでは、実試料分析において威力を発揮するUF-Amino Stationの特長とその実例をご紹介します。

K. Watanabe J. Masuda

■LC/MSによる優れた検出選択性 Superior Selectivity by LC/MS Detection

Fig. 1に、市販脱脂粉乳中のアミノ酸を、フェニルイソチオシアネート (PITC) を誘導体化試薬に用いたプレカラム誘導体化-UV検出法とUF-Amino Stationとで分析した結果を示します。PITCによる誘導体化アミノ酸をUF-Amino Stationと同等の分離時間で分析すると、アミノ酸同士ある

いは夾雑成分と目的アミノ酸の分離が困難なこともあり、定量結果に影響をおよぼす場合があります。これは主にUV検出法の選択性に起因し、Fig. 1 (上)のクロマトグラムにおいても、分析時間をUF-Amino Stationと同等とすると、夾雑成分の影響により十分な分離の達成が困難であること

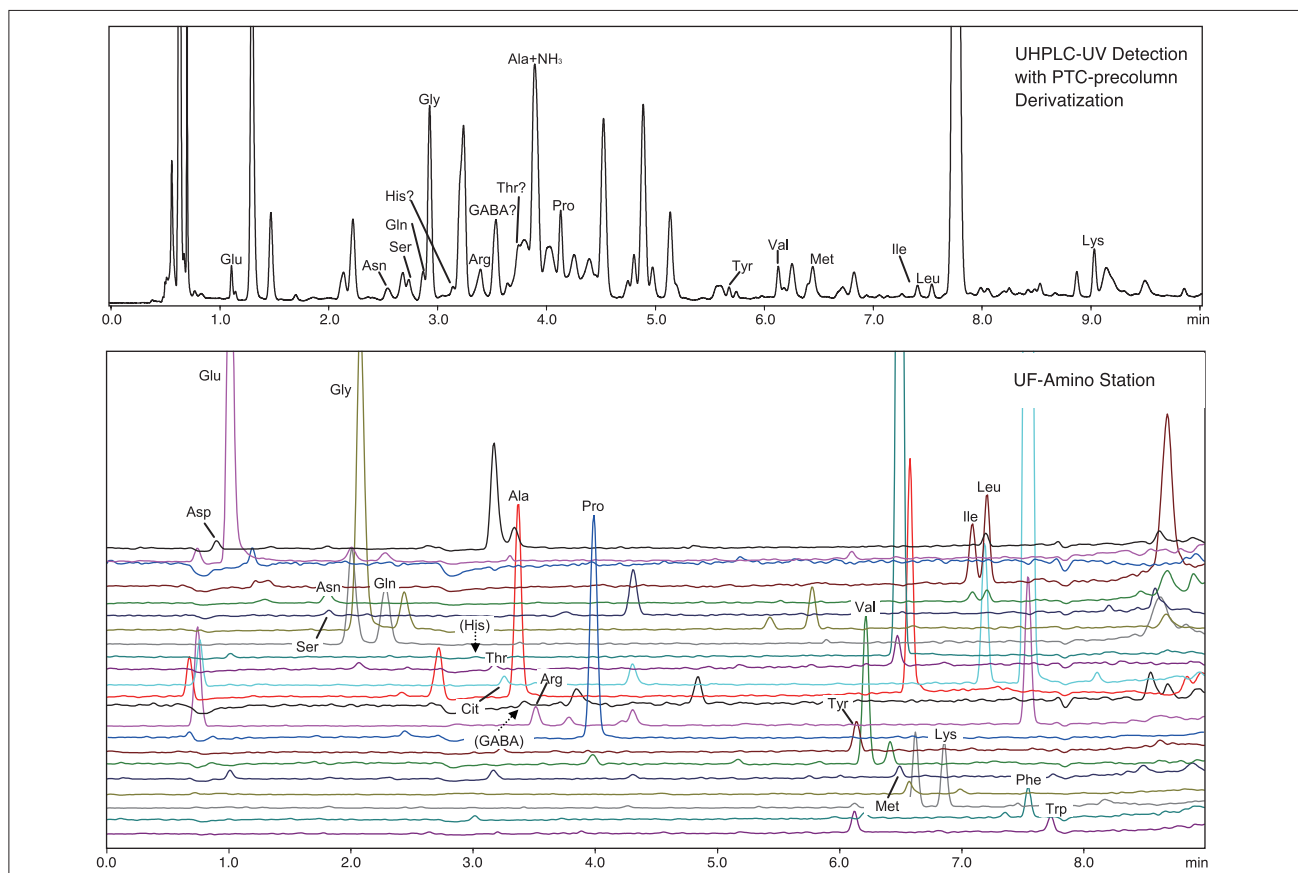


Fig. 1 市販脱脂粉乳中アミノ酸の分析 (上)UHPLCによるPTC-プレカラム誘導体化-UV検出法, (下)UF-Amino Station
Analysis of Amino Acid Analysis in Skim Milk (Upper) UV Detection with PTC-Precolumn Derivatization, (Lower) UF-Amino Station

がわかります。一方、UF-Amino Stationは検出器にLC/MSを用い、それぞれのアミノ酸を独立したマスキロマトグラムで定量します (Fig. 1 (下))。この高い検出選択性により、アミノ酸相互、あるいはアミノ酸と夾雑成分とのピークの重なりによる定量結果への影響を最小にすることが可能です。Fig. 1の分析条件をTable 1 に示します。

Fig. 2に、Fig. 1と同じ市販脱脂粉乳にアミノ酸標準溶液を添加し、UF-Amino Stationにて分析して、アミノ酸の回収率を確認した結果を示します。脱脂粉乳は温水で溶かしアセトニトリルを加えて除タンパク処理を施した後、アミノ

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

[UHPLC, UV Detection with PTC-precursor Derivatization]	
Column	: Shim-pack XR-ODS (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.6 μm)
Mobile Phase	: (Potassium) phosphate buffer (pH 7.0) and Acetonitrile, Gradient Elution
Flow Rate	: 0.9 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Reaction Reagent	: Phenyl Isothiocyanate
Detection	: SPD-20AV at 254 nm with Semi-micro Cell
[UF-Amino Station]	
Refer to Application News No. L433	

酸標準溶液を添加して、さらに指定の方法で内部標準液の添加などを行い、UF-Amino Station に供しました。Fig. 2が示す良好な回収率は、脱脂粉乳のような複雑なマトリックスを含む試料であっても、信頼度の高い定量が可能であることを示しています。

また、アプリケーションニュース No. L433でもご紹介したように、UF-Amino Stationは、前処理機能付きオートサンプラ“SIL-20AC_{PT}”にてアミノ酸を自動で誘導体化します。この機能は、分析の効率化だけではなく誘導体化処理の再現性を向上し、精度に大きく貢献します。

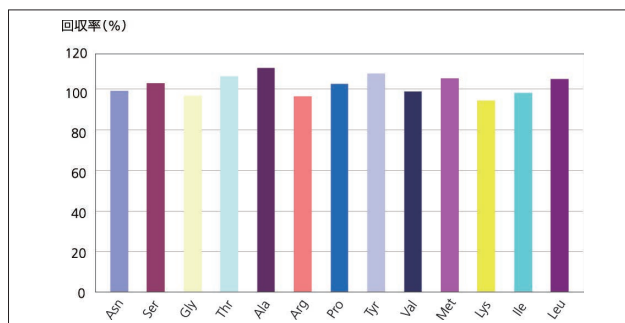


Fig. 2 脱脂粉乳におけるアミノ酸の回収率
Recovery of Amino Acid in Skim Milk

■生体試料への応用例

Applications of Biological Samples

生体試料も夾雑成分が多く、そのためプレカラム誘導体化-UV検出法ではしばしば定量値の信頼性が低下することが問題となります。Fig. 3に、UF-Amino Stationによる市販無血清培地およびラット血漿中のアミノ酸の分析結果を示し

ます。いずれも妨害成分の影響を受けずに分離が可能であることが確認できます。このように、UF-Amino Stationは生体試料中のアミノ酸も精度良く分析することが可能です。

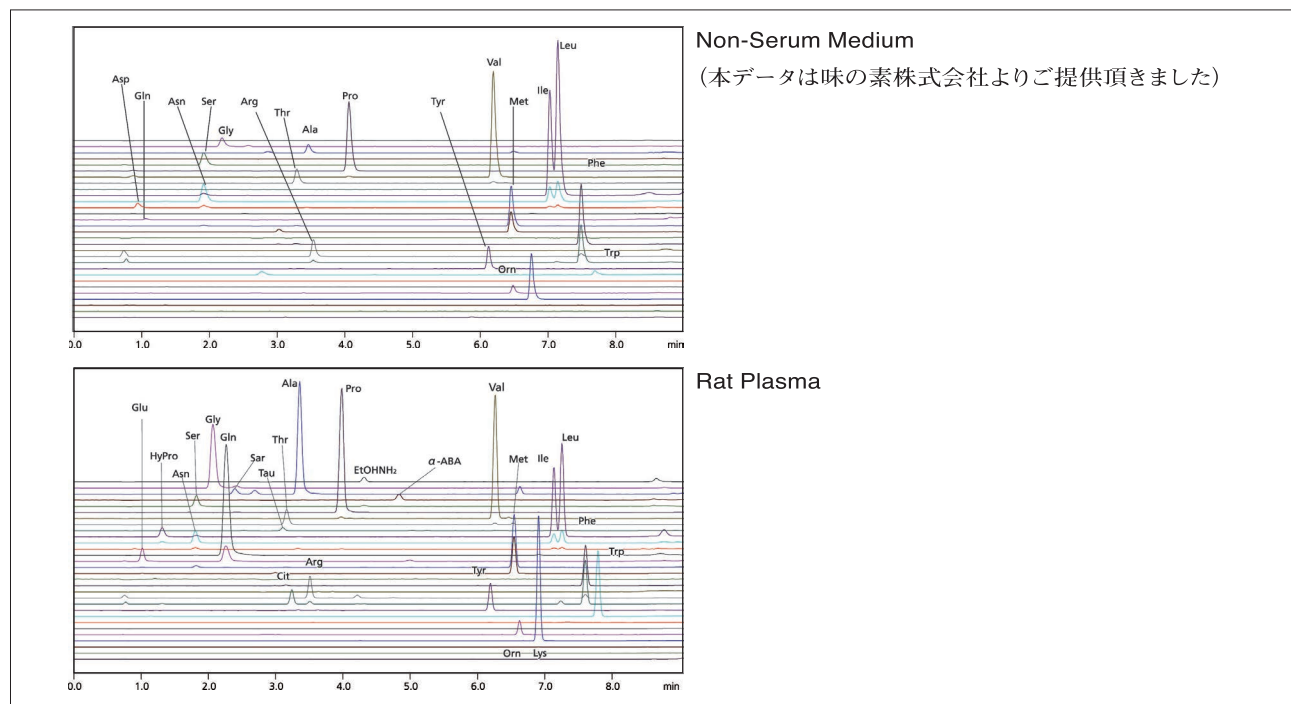


Fig. 3 生体試料におけるアミノ酸の分析：(上)無血清培地、(下)ラット血漿
Applications of Biological Samples: (Upper) Non-Serum Medium, (Lower) Rat Plasma



本社地区事業所認証取得



JQA-0376

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

東京支社 101-8448 東京都千代田区神田錦町1丁目3
(03) 3219-(官公庁・大学担当) 5631・(会社担当) 5685
関西支社 530-0012 大阪市北区芝田1丁目1-4 阪急ターミナルビル14階
(06) 6373-(官公庁・大学担当) 6541・(会社担当) 6556
札幌支店 060-0005 札幌市中央区北五条西6丁目2-2 札幌センタービル8階 (011) 205-5500
東北支店 980-0021 仙台市青葉区中央2丁目9-27 プライムスクエア広瀬通12階 (022) 221-6231
郡山営業所 963-8877 郡山市堂前町6-7 郡山フコク生命ビル2階 (024) 939-3790
つくば支店 305-0031 つくば市吾妻3丁目17-1
(029) 851-(官公庁・大学担当) 8511・(会社担当) 8515
北関東支店 330-0843 さいたま市大宮区吉敷町1丁目41 明治安田生命大宮吉敷町ビル8階
(048) 646-(官公庁・大学担当) 0095・(会社担当) 0081
横浜支店 220-0004 横浜西区北幸2丁目8-29 東武横浜第3ビル7階
(045) 312-(官公庁・大学担当) 4421・(会社担当) 311-4615
静岡支店 422-8062 静岡市駿河区稲川12丁目1-1 伊伝静岡駅南ビル2階 (054) 285-0124
名古屋支店 450-0001 名古屋市中村区那古野1丁目47-1 名古屋国際センタービル19階
(052) 565-(官公庁・大学担当) 7521・(会社担当) 7531
京都支店 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
(075) 823-(官公庁・大学担当) 1604・(会社担当) 1603
神戸支店 650-0034 神戸市中央区京町7-0 松岡ビル8階 (078) 331-9665
岡山営業所 700-0826 岡山市北区唐屋町3番10号 住友生命岡山ニューシティビル6階 (086) 221-2511
四国支店 760-0017 高松市番町1丁目6番1号 住友生命高松ビル9階 (087) 823-6623
広島支店 730-0036 広島市中区袋町4-25 明治安田生命広島ビル15階 (082) 248-4312
九州支店 812-0039 福岡市博多区冷泉町4-20 島津博多ビル4階
(092) 283-(官公庁・大学担当) 3332・(会社担当) 3334

グローバルアプリケーション開発センター

京都 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1 (075) 823-1187
東京 259-1304 秦野市堀山下380-1 (秦野テクノパーク内) (0463) 88-8660

島津コールセンター (操作・分析に関する電話相談窓口) ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

<http://www.an.shimadzu.co.jp/>

未来が変わる。日本が変わる。
株式会社島津製作所はチャレンジ25キャンペーンに参加しています。



初版発行日 2012年4月20日

※掲載データは薬事承認された装置で採取したものではありません。
※本誌は各掲載データ採取時の情報に基づいて編集されています。
※掲載データは参考データであり、保証を行うものではありません。
また、予告なく改訂することがあります。
※現在販売終了となっている製品等を使用している場合があります。