

## 食品成分分析における分離モードと検出法

第115回液体クロマトグラフィー研究懇談会(1996)での上記題目における講演要旨(別紙8枚)に掲載してある食品成分他及びそれらの分離モードと検出法を以下にまとめます。

測定対象成分	分離モード(カラム)	検出法	図 No.
アルティカルブ	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS	6
17β-エストラジオール	逆相(TSKgel ODS-80Ts)	EC	8
エチオフェノカルブ	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS, EC	6
オキサミル	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS	6
カルハリル	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS, EC	6
キシロース	順相(TSKgel Amide-80)	FS	9
グルコース	順相(TSKgel Amide-80)	FS	9, 11
ジエチルスチルベトール	逆相(TSKgel ODS-80Ts)	EC	8
食用黄色4, 5号	逆相(TSKgel ODS-80Ts)	PD	15
食用青色1号	逆相(TSKgel ODS-80Ts)	PD	15
食用赤色2, 3, 102, 104, 105, 106号	逆相(TSKgel ODS-80Ts)	PD	15
食用緑色3号	逆相(TSKgel ODS-80Ts)	PD	15
ゼラノール	逆相(TSKgel ODS-80Ts)	EC	8
タウリン	イオン排除(TSKgel SCX)	RI	16
デンプン	ゲル濾過(TSKgel α-M)	RI	13
ニコチン酸アミド	逆相(TSKgel ODS-120T)	PD	14
乳酸	イオン排除(TSKgel OApak-A)	CM, UV	1
尿素	順相(TSKgel Amide-80)	CM, UV	2
パントテン酸カルシウム	逆相(TSKgel ODS-120T)	PD	14
ビタミンB1, B2, B6, B12	逆相(TSKgel ODS-120T)	PD	14
フェノカルブ	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS, EC	6
フルクトース	順相(TSKgel Amide-80)	FS	9, 11
ペンタヒドロカルブ	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS, EC	6
マルトース	順相(TSKgel Amide-80)	FS	9
マンノース	順相(TSKgel Amide-80)	FS	9
無機陰イオン(Cl <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	イオン交換(TSKgel IC-Anion-PW <sub>xL</sub> )	CM	17
無機陽イオン(Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )	イオン交換(TSKgel IC-Cation I/II)	CM	18
メチオカルブ	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS, EC	5, 6
メチオカルブスルホキシド	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS	6
メチオカルブスルホン	逆相(TSKgel Enviropak G1)	FS	6
葉酸	逆相(TSKgel ODS-120T)	PD	14
ラムノース	順相(TSKgel Amide-80)	FS	9

食品成分分析における分離モードと検出法の選択

東ソー(株) 科学計測事業部

Tel:0467-76-8231

Fax:0467-79-2550

1. はじめに

複雑なマトリックスを有する食品(原材料あるいは素材、加工品)中のある特定の成分をHPLCで分析する場合、その測定目的に適した分離法(カラム、溶離液)と検出法そして前処理法を選択することが必要です。測定対象成分のピークに試料中の夾雑物質が重なることが原因で得られたデータの信頼性を欠くことがしばしばあります。

例えば、図1に陽イオン交換カラム(TSKgel OApak-A、溶離液:0.75mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を用いたイオン排除クロマトグラフィーによる乳酸が添加された食用油のクロマトグラムを示します。検出には、電気伝導度検出器(CM)と紫外可視検出器(UV 210nm)を併用していますが、CMにより得られたクロマトグラム(上段)とUV(下段)では出現するピークのパターンが大きく異なり、更にUVでの測定値はCMに比べ63%高めになっています。実際の添加量はCMによって得られた値と一致しました。これは明らかにUVにおける乳酸のピークに他の夾雑成分が重なっていることを示しています。

同様にCM及びUVを併用し、アクリルアミド基をシリカゲルに化学結合させたカラム(TSK gel Amide-80、溶離液:1.0% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN=10/90)を用いた順相クロマトグラフィーによる尿中の尿素のクロマトグラムを図2に示します。CMによる検出法が夾雑成分の影響を受けていなく信頼性の高い定量値を有していることが示唆されます<sup>1)</sup>。

2. 分析例

①ポストカラム反応型蛍光検出(FS)ー電気化学検出(EC)法によるカルバメート系農薬の分析

農作物の殺虫剤として広く用いられているN-メチルカルバメート系農薬のHPLC分析には逆相クロマトグラフィーにより分離後、アルカリ加水分解し遊離したメチルアミンをOPA(オ-フタルアルデヒド)と反応させて、生成したイソインドール誘導体を蛍光検出する方法があり高感度分析が可能です<sup>2)</sup>。しかしながら、多種類の農産物抽出物への適用に関しては夾雑成分の影響を十分考慮する必要があります。一方、同様な選択的分析法としてアルカリ加水分解後、同時に生成するフェノール骨格を有するようなカルバメート系農薬は電気化学的に検出することができます。図3及び図4にそれぞれ原理図と分析条件(カラム:TSKをgel Enviro pak G1(ポリマー基材の逆相カラム)、溶離液:H<sub>2</sub>O/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)含む装置構成図を、図5にはこのデュアル検出法で得られたメチオカルブを0.5ng添加したオレンジ抽出液のクロマトグラムを示します<sup>3)</sup>。また、グラジエント溶出法による9種のカルバメート系農薬(オキサミル、メチオカルブスルキソド、アルディカルブ、メチオカルブスルホ、ベンソイカルブ、カルバリル、エチオカルブ、フェノカルブ、メチオカルブ)の分離を図6に示します<sup>4)</sup>。フェノール骨格を有するカルバメートだけが選択的にECで検出されていることがわかります。

## ②タンパク同化剤の電気化学検出法

タンパク同化剤は天然に存在する性ホルモンの誘導体及び合成品であり、主に肉用牛の成長促進のために使用されていますが、最近この物質の残留による人への影響が食品衛生上重要視され規制の対象になっています。タンパク同化剤の中で、フェノール性水酸基を有するゼラノール、 $17\beta$ -エストラジオール、ジエチルスチルベトール（図 7）は 2-①と同様電気化学的に活性であるため EC による選択的高感度分析が可能です。図 8 には、これら 10ng の逆相クロマトグラフィー（カラム：TSKgel ODS-80Ts（シリカゲルにオクタデシル基を化学結合）、溶離液：50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0)/ $\text{CH}_3\text{CN}$ =1/1) による分離を示します。

## ③ポストカラム反応型蛍光検出法による還元糖の高感度分析

糖質は、脂質とともに人体のエネルギー源として重要な役割を果たしており、しかも食品成分としての糖質は単に栄養素のみならず、甘味剤や調理・加工・貯蔵の点からもさまざまな用途で利用されています。図 9 は、ラムノース、キシロース、フルクトース、マンノース、グルコース及びマルトースの各 20ng のクロマトグラムで、ベンズアミジン（図 10）を用いたポストカラム反応型蛍光検出法によるで、分離モードは順相クロマトグラフィー（カラム：TSKgel Amide-80、溶離液： $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ =20/80）です。このような還元糖を高感度で分析することが可能であり、1例として図 11 に 10,000倍希釈のリンゴジュースのクロマトグラムを示します。フルクトースとグルコースが選択的に検出されていることがわかります。装置構成を、図 12 に示します。

## ④ゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）によるデンプンの分子量分布の測定

人体のほとんどのエネルギー源である多糖類の一種のデンプンは、グルコースが $\alpha$ -1,4結合して直鎖状につながったアミロース（分子量：数千～十数万）と、グルコースの短い $\alpha$ -1,4結合鎖（約30個）が $\alpha$ -1,6結合した分岐多糖であるアミロペクチン（分子量：数十万）から構成され水にほとんど溶けにくい性質があります。図 13 は、DMSO（ジメチルスルホキシド）を溶離液としたGFCによるコーンスターチのクロマトグラムです（カラム：TSKgel  $\alpha$ -M）。試料は、DMSO中で約 100°C、数時間加熱溶解させました。

## ⑤フォトダイオードアレイ（多波長）検出器の利用

紫外から可視にわたる幅広い波長域をカバーする数百のフォトダイオードアレイ素子を搭載した検出器は、この波長域に吸収を有する成分の同定に極めて有用なものです。図 14 に逆相クロマトグラフィーによるニコチン酸アミド、パントテン酸カルシウム、葉酸、ビタミンB12、B2、B6、B1の水溶性ビタミン（カラム：TSKgel ODS-120T）を、図 15 に同じ分離モードによる黄色4号、赤色2号、102号、黄色5号、緑色3号、青色1号、赤色3号、106号、104号、105号の有機性着色料（カラム：TSKgel 80Ts）のクロマトグラムとスペクトルデータを示します。

## ⑥ドリンク剤中のタウリンの分析

タウリンは、肝臓や筋肉に多く含まれ、また胆汁酸と結合してタウロコール酸など抱合型胆汁酸として胆汁中に存在します。薬理作用としては、胆汁分泌の促進、解毒・鎮痛・解熱作用があり、疲労回復剤としても適用されています。図 16 は、極めて簡単な分離モード（イオン排除クロマトグラフィー カラム：TSKgel SCX(II<sup>+</sup>)、溶離液：0.1% 酢酸）と検出法（示差屈折計

(RI))を組合せて、市販のタウリン含有ドリンク剤を分析したクロマトグラムです。

#### ⑦無機イオンの分析

無機イオン(質)の分析には、比色、炎光、原子吸光、イオン選択性電極などさまざまな方法がありますが、ここではHPLCの分析法の一種である電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフィーでの測定例を紹介します。

図17は、炭酸イオンを含む水道水中の陰イオンのクロマトグラム(右図、左図は標準陰イオンのクロマトグラム、カラム:TSKgel IC-Anion-PW<sub>XL</sub>、溶離液:5 mM ホウ酸+エチレンジアミン(pH 10.5))<sup>5)</sup>で、図18は清涼飲料水やアルコール飲料水中のアルカリ金属及びアルカリ土類金属イオンを同時分析したクロマトグラム(カラム:TSKgel IC-Cation I/II、溶離液:2mM HNO<sub>3</sub>)です。

<sup>1)</sup> 宮永明義、小林善美、海野益郎:第13回イオンクロマトグラフィーフォーラム講演要旨集、P7(1996)

<sup>2)</sup> 厚生省告示第199号(平成6年)

<sup>3)</sup> 宮永明義、内田香苗:第4会環境化学討論会講演要旨集、p336(1995)

<sup>4)</sup> 宮永明義、内田香苗:第56会分析化学討論会講演要旨集、p149(1995)

<sup>5)</sup> 橋本佳巳、宮永明義、石川治:分析化学(Bunseki Kagaku)、45、431(1996)

食用油中の乳酸の分析

カラム: TSKgel OApak-A  
 (7.8mm I. D. x 30cm)  
 TSKgel OApak-P  
 (6.0mm I. D. x 4cm)  
 溶液: 0.75M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 流速: 1.0ml/min  
 温度: 40℃  
 注入量: 50μl  
 検出器: CM (電気伝導度検出器)  
 UV (紫外可視検出器 210nm)  
 試料: 食用油  
 処理: 秤量した食用油に一定量の10mM  
 NaOH溶液を添加攪拌し、遠心分離  
 後水層を注入。

乳酸の定量結果

CM : 1620 mg/l  
 UV : 2640 mg/l

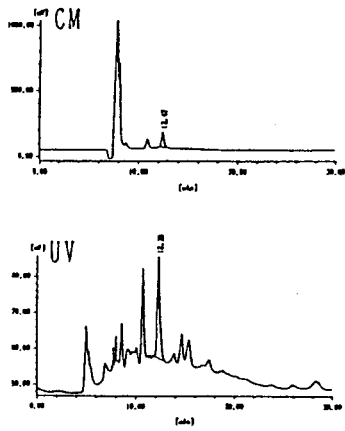


図 1

尿中の尿素のクロマトグラム

測定条件  
 カラム: TSKgel Amide-80  
 (4.6mm I. D. x 25cm)  
 溶離液: 1.0% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O  
 / CH<sub>3</sub>CN = 10 / 90  
 流速: 1.0 ml/min  
 温度: 40℃  
 注入量: 20 μl  
 試料: 尿 (溶離液で20倍希釈)  
 検出: CM, UV (210nm)

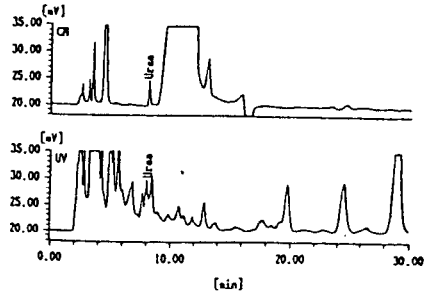


図 2

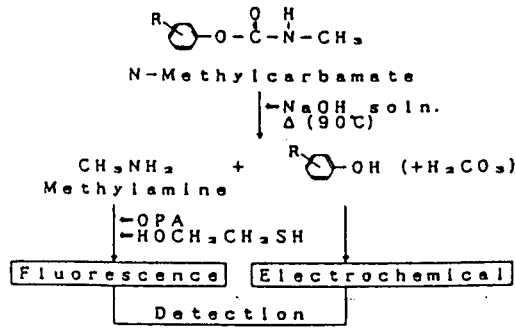


図 3

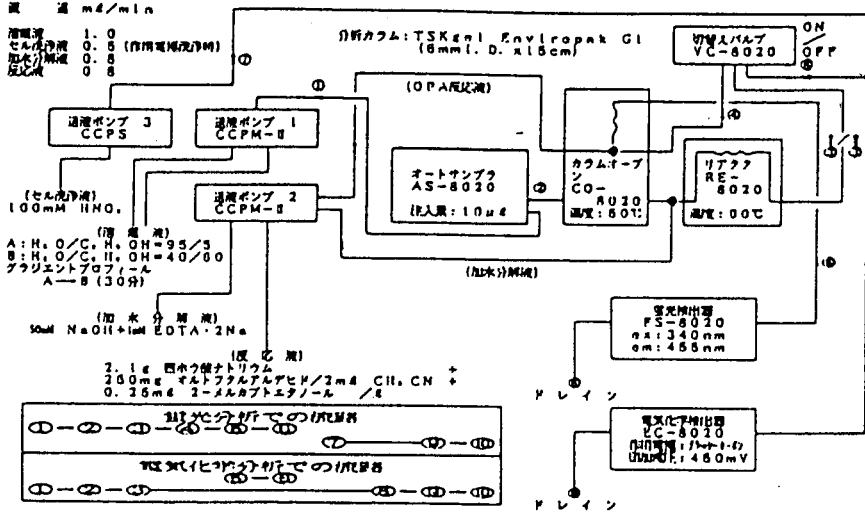


図 4

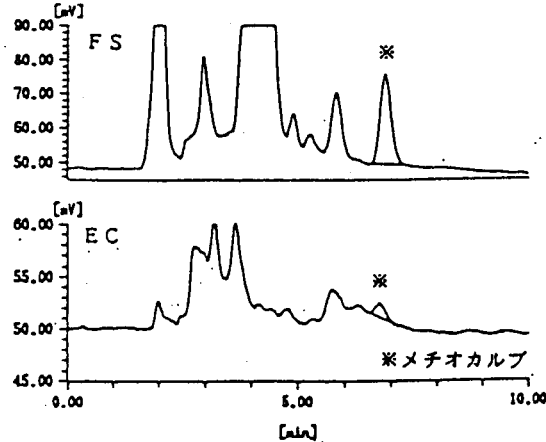


図 5

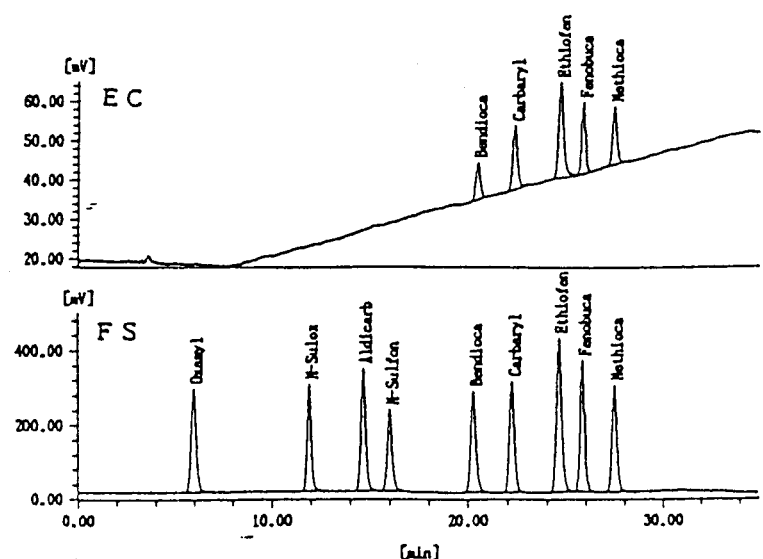
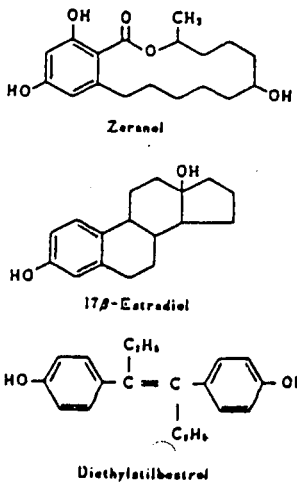
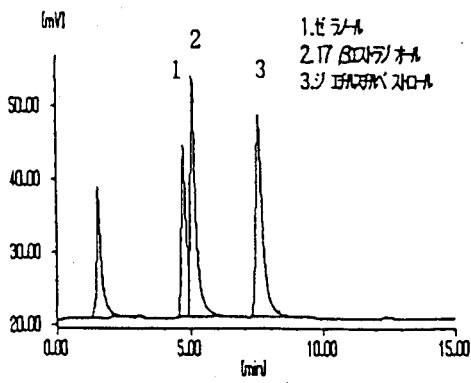


図 6



1.ゼラチン  
2.17 β-D-ガラクトース  
3.ジエチルアミン

カラム : TSKgel ODS-80Ts(4.6mm i.d.×15cm)  
 溶離液 : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7.0)/CH<sub>3</sub>CN=1/1  
 流速 : 1.0 ml/min  
 温度 : 40℃  
 注入量 : 10 μl  
 濃度 : 1 μg/ml each  
 検出 : EC +750mV  
 装置 : CCPM2, EC-8020, AS-8020, CO-8020, SC-8020

図 8

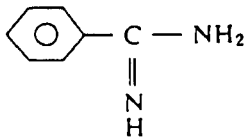


図 10

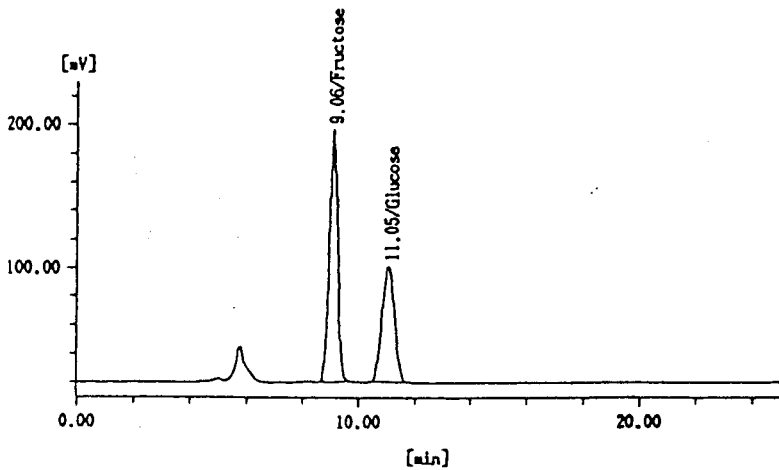
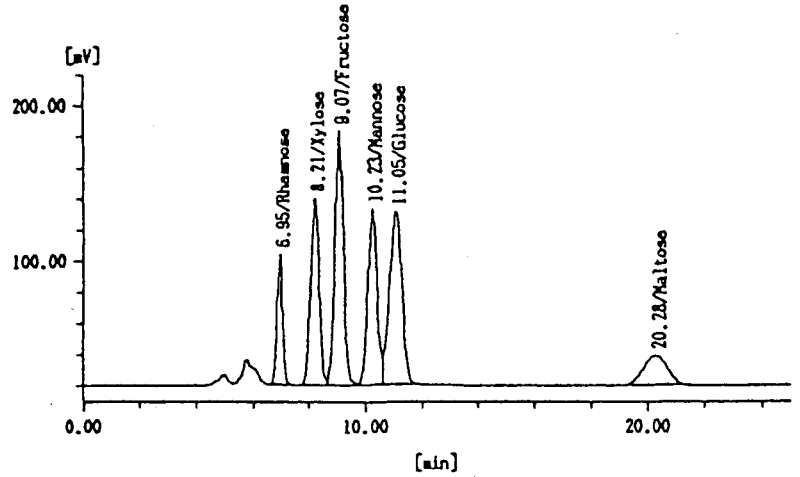


図 11

測定条件  
 カラム : TSKgel α-M (7.8mm I.D.×30cm)×2  
 溶離液 : 5mM NaNO<sub>3</sub> in DMSO  
 \*DMSOの融点は16.54℃です。空欄のない物に手摺に於ける  
 溶液での溶解に十分注意して下さい。  
 流速 : 1.0 ml/min 温度 : 40℃ 注入量 : 100μl  
 前処理 : 試料をDMSOにて0.13%に調製し、95℃で2時間加熱し溶解させて注入  
 検出 : RI  
 装置構成  
 HLC-8120GPC



測定条件  
 カラム : TSKgel Amide-80 (4.6mm ID×25cm)  
 溶離液 : CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=8/2  
 流速 : 0.8ml/min  
 カラム温度 : 80℃  
 反応液 : A液 : 1M 水酸化カリウム  
 B液 : 100mM ペンズアミンジ (溶媒 : CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=2/8)  
 反応液流速 : A液 : 0.6ml/min  
 B液 : 0.6ml/min  
 反応温度 : 90℃  
 注入量 : 20μl  
 検出 : 蛍光検出 励起波長288nm 蛍光波長470nm

図 9

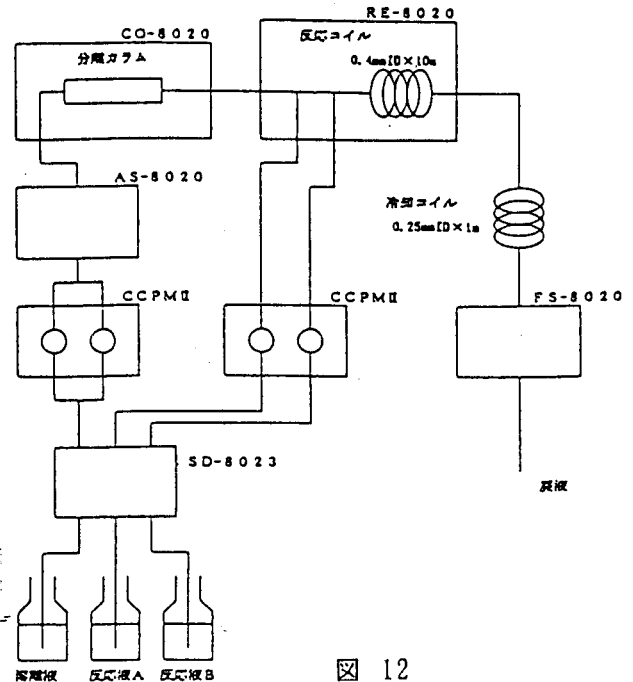


図 12

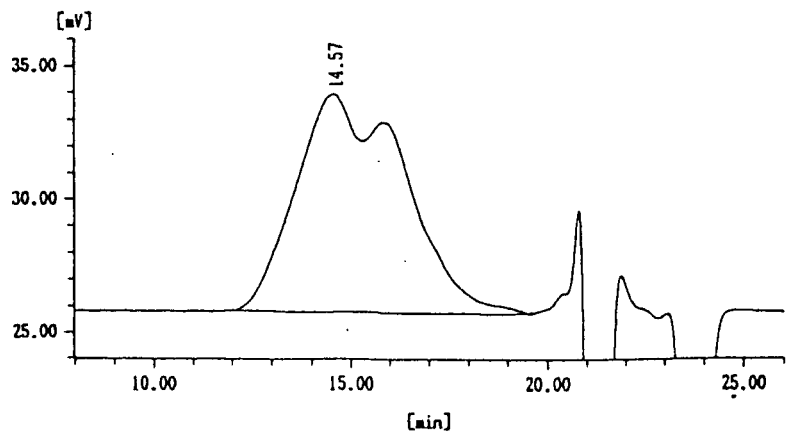
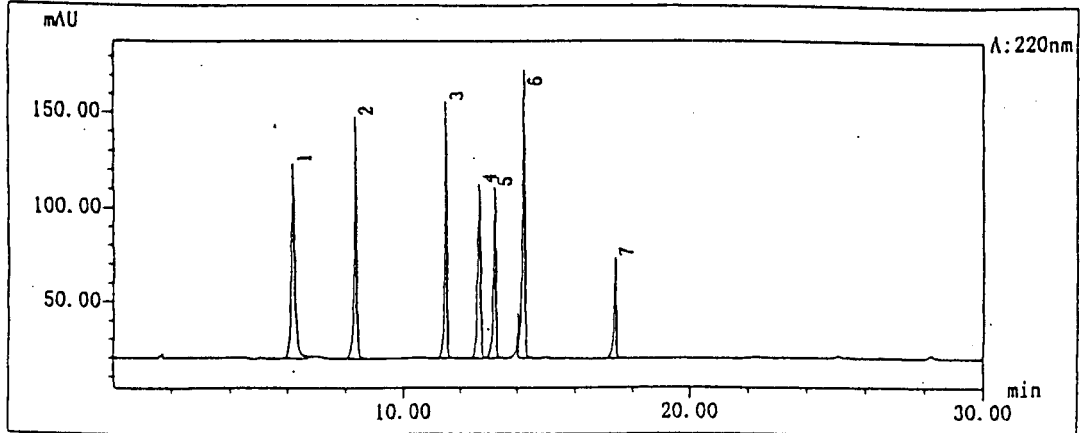
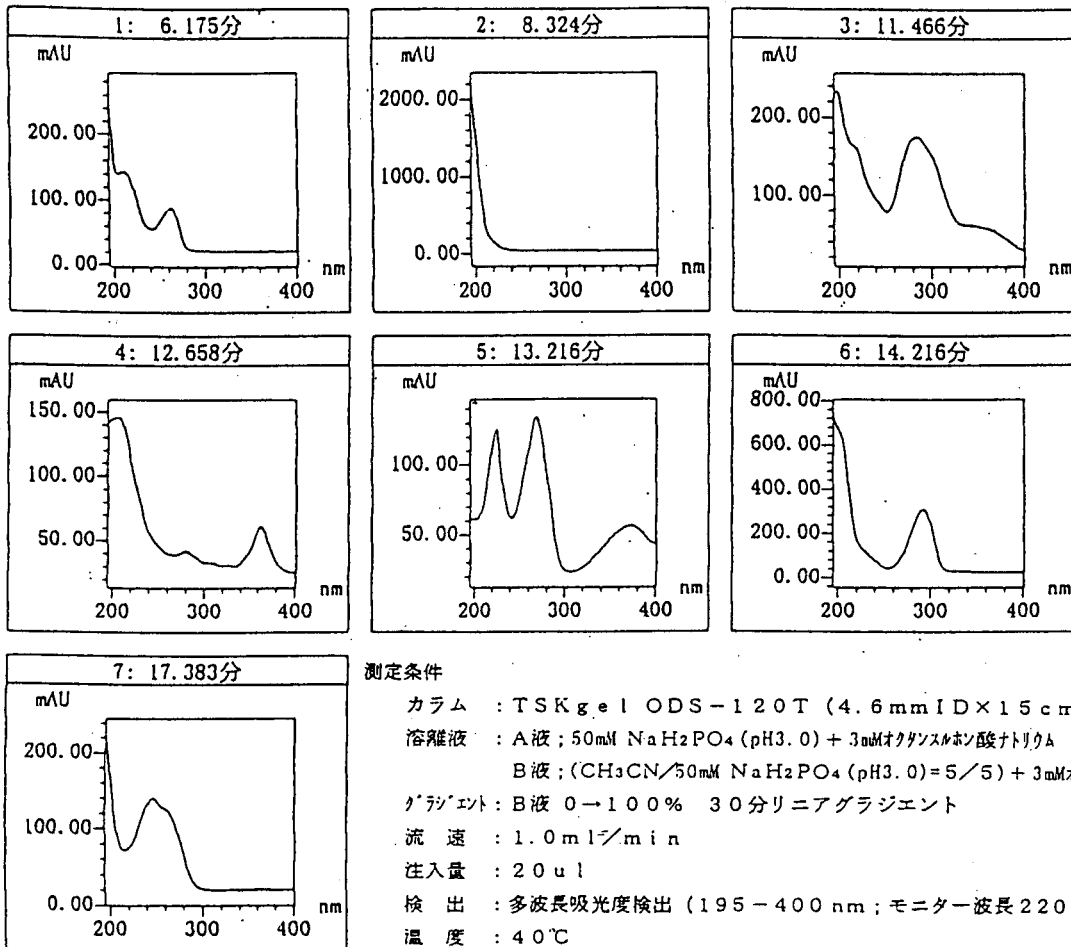


図 13

<クロマトグラム>

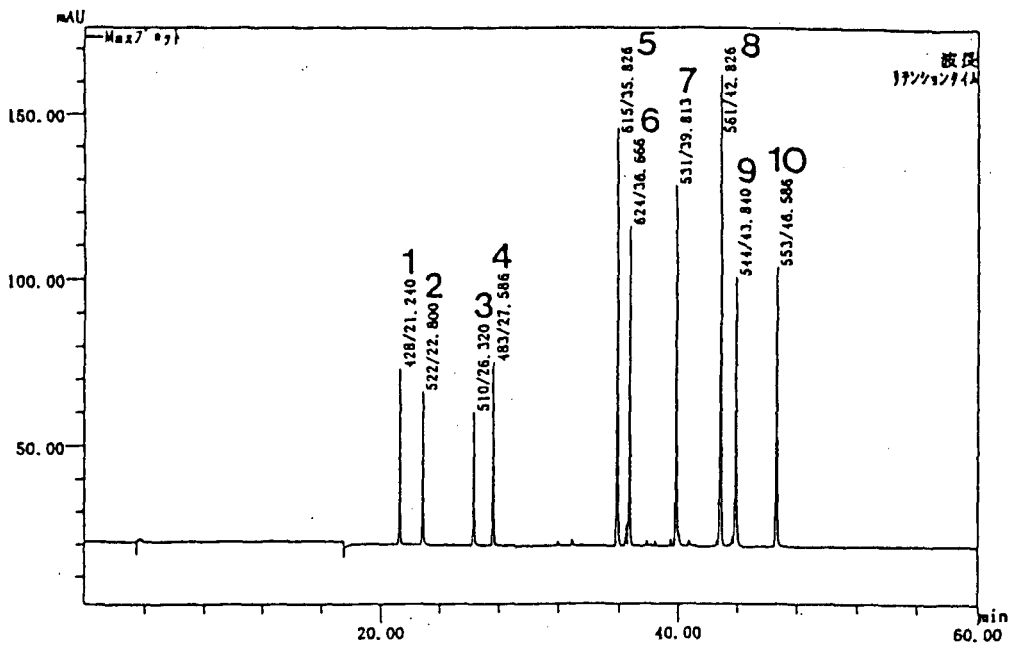


<スペクトル>

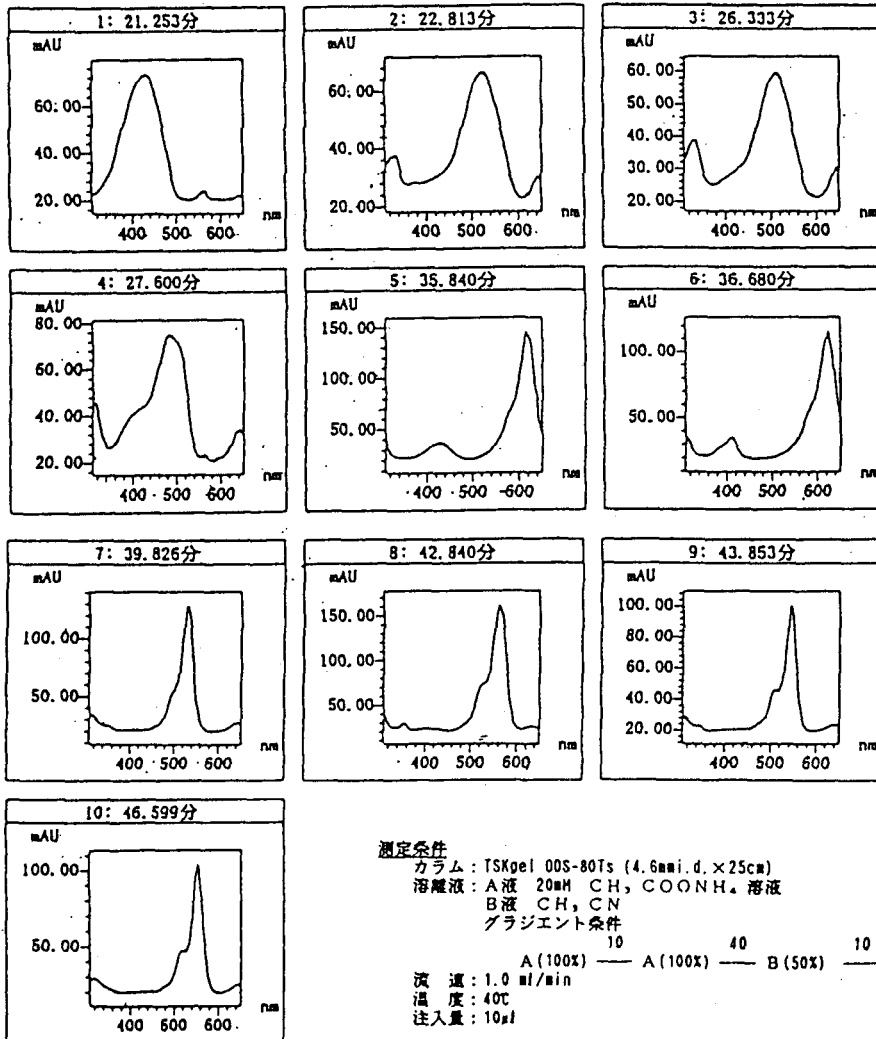


<計算結果>

ピークNo.	波長 (nm)	成分名	保持時間(分)	高さ(mAU)	面積(mAU*秒)	濃度1 (mg/l)	濃度2 (mg/l)
1	A: 220	ニコチン酸アミド	6.175	103.621	942.97	20.000	20.000
2	A: 220	パントテン酸カルシウム	8.325	128.633	788.85	500.000	500.000
3	A: 220	葉酸	11.467	136.295	740.39	20.000	20.000
4	A: 220	ビタミンB12	12.658	93.121	762.13	20.000	20.000
5	A: 220	ビタミンB2	13.217	91.478	573.44	10.000	10.000
6	A: 220	ビタミンB6	14.217	153.169	1008.48	50.000	50.000
7	A: 220	ビタミンB1	17.383	53.617	286.87	20.000	20.000
			759.932	5103.13	640.000	640.000	



波長 420nm



測定条件

カラム: TSKgel ODS-80Ts (4.6mm i.d. x 25cm)  
 溶離液: A液 20mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 溶液  
 B液 CH<sub>3</sub>CN  
 グラジエント条件  
 10 40 10 (分)  
 A (100%) — A (100%) — B (50%) — B (50%)  
 流速: 1.0 ml/min  
 温度: 40℃  
 注入量: 10μl

計算結果

ピークNo.	波長 (nm)	成分名	保持時間 (分)	高さ (mAU)	面積 (mAU*秒)	濃度1 (ug/ml)	濃度2 (ug/ml)
1	A: 420	黄色 4 号	21.253	52.939	278.94	10.000	10.000
2	A: 420	赤色 2 号	22.813	10.603	68.69	10.000	10.000
3	A: 420	赤色 1 0 2 号	26.333	10.117	82.17	10.000	10.000
4	A: 420	黄色 5 号	27.600	24.382	129.54	10.000	10.000
5	A: 420	緑色 3 号	35.840	17.275	114.41	10.000	10.000
-----							
6	A: 420	青色 1 号	36.680	10.441	63.61	10.000	10.000
7	A: 420	赤色 3 号	39.827	1.956	14.07	10.000	10.000
8	A: 420	赤色 1 0 8 号	42.840	4.112	30.41	10.000	10.000
9	A: 420	赤色 1 0 4 号	43.853	1.437	10.64	10.000	10.000
10	A: 420	赤色 1 0 5 号	46.600	1.648	12.47	10.000	10.000
				134.809	772.64	100.000	100.000



測定条件

カラム: TSKgel SCX (H<sup>+</sup>型 7.8mm i.d. × 30cm)  
 溶離液: 0.1% v/v 酢酸, 流速: 1.0 ml/min, 温度: 40°C, 注入量: 20μl  
 試料: 市販タウリン含有ドリンク剤  
 前処理: 試料を脱イオン水にて 10 倍希釈し, 前処理用カートリッジ TOYOPAK ODS に通液しその濾過液を注入

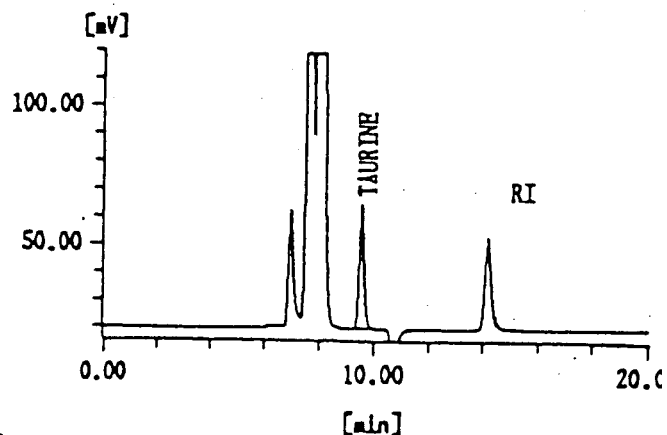


図 16

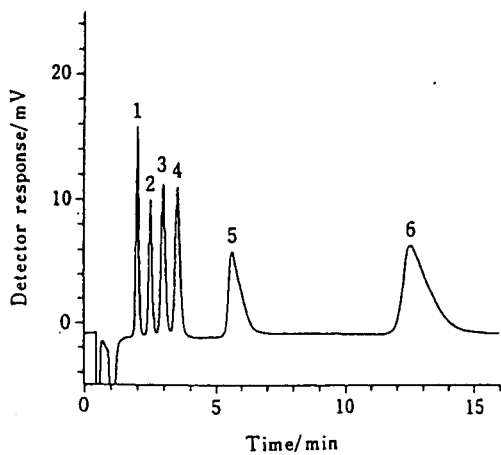


Fig. 3 Chromatogram of standard anions

Column: TSKgel IC-Anion-PW<sub>XL</sub>, 4.6 mm i.d. × 35 mm; Eluent: 5 mM boric acid-ethylenediamine buffer (pH 10.5); Flow rate: 1.0 ml/min; Column temperature: 40°C; Injection volume: 20 μl; Peaks (mg/l): 1, Cl<sup>-</sup> (10.0); 2, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (10.0); 3, Br<sup>-</sup> (20.0); 4, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (50.0); 5, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (50.0); 6, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (50.0)

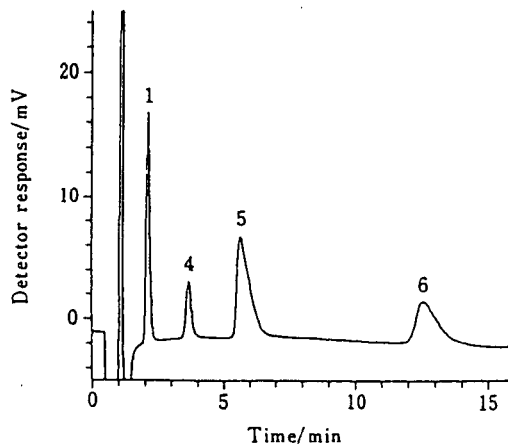


Fig. 7 Chromatogram of tap water

Peaks (mg/l): 1, Cl<sup>-</sup> (14.0); 4, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (8.02); 5, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (51.9); 6, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (19.8). Chromatographic conditions were the same as in Fig. 3.

図 17

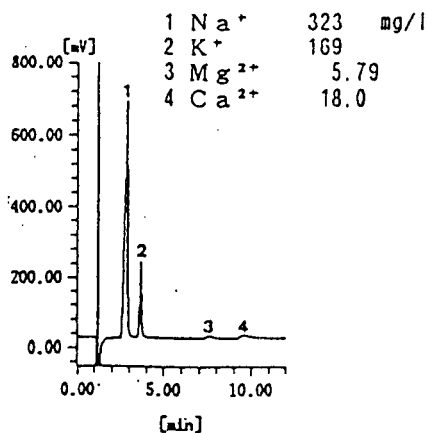
測定条件

カラム: TSKgel IC-Cation I/I (4.6mm i.d. × 10cm)  
 溶離液: 2 mM 硝酸  
 流速: 0.8 ml/min  
 温度: 40°C  
 注入量: 20 μl  
 検出: 電気伝導度

装置

送液ポンプ : CCPS  
 電気伝導度検出器 : CM-8020  
 カラムオープン : CO-8020  
 オートサンブラ : AS-8020  
 システム制御/データ処理 : SC-8020

ミネラルウォーター (10倍希釈)



白ワイン (100倍希釈)

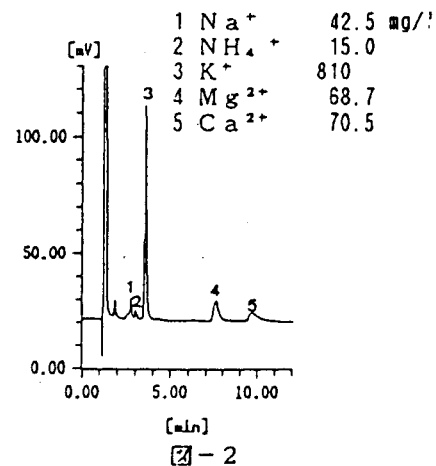


図-2

図 18