



Application Note AN-P-087

イオンクロマトグラフィーによる β -カラクトオリコ糖(GOS)の測定

Improvement on AOAC 2001.02: GOS analysis with IC-PAD

近年、 β -カラクトオリコ糖(GOS)などのフレハイオティクスを含む食品添加物や栄養補助食品への関心が高まっています。GOSは、カラクトース単位が鎖状に結合し、末端にクルコースを持つ場合がある化合物です [1,2]。これらはヒフィス菌増殖促進作用(ヒフィトシェニック効果)を示し、非病原性腸内細菌の成長と健康をサポートします [1]。GOSはもともと初乳の主要成分として発見され(最大12 g/L含有)、その有益な効果を再現するために乳児用調製粉乳にフレハイオティクスとして添加されています。健康的な食生活に対する消費者の意識の高まりによ

り、フレハイオティクスおよびGOS市場は世界的に拡大を続けています。同様に、食品の品質に対する需要の高まりに伴い、食品の表示や安全性に関する規制もより厳格かつ包括的なものになっています(例:EU規則2015/2283)。したかつて、食品、サプリメント、または原材料中の総GOS含有量の測定が、これらの要件を満たす上で不可欠となっています。また、GOS(カラクトオリコ糖)は、確立された形態の食物繊維または消化されない炭水化物であり、すでにノヘルフト(新規食品)の欧州連合リストに承認され、含まれています。

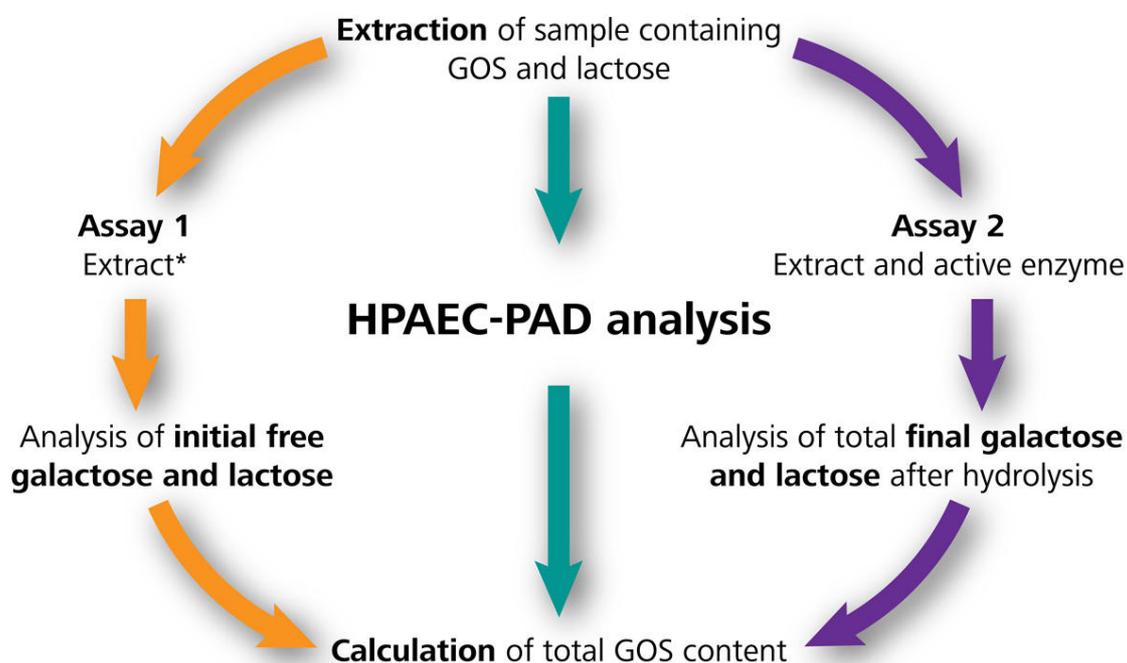
この技術資料では、食品中の総GOS量を測定するための標準AOAC法の最新改良版を紹介します。従来と同じ原理(複雑なGOS分子の酵素加水分解と、それ

に続く単純糖類のクロマトグラフィ分析)を採用しなからも、分析手法の効率を向上させ、実験時間と運用コストの削減を実現しました。

サンプルとサンプル前処理

異なる市販サンプルのGOS 粉末(Carbosynth Ltd.)、Vivinal® GOS 粉末(FrieslandCampina)、サプリメント Bimuno Daily(Clasado Biosciences)[3] を、AOAC 2001.02 に記載されている方法に従い、80 °Cのリン酸緩衝液中で30分間抽出した。得られた抽出液は2つのアリコートに分けられ、アスヘルキ

ルス・オリセー由来のβ-ガラクトシダーゼ酵素による酵素加水分解の前(アッセイ1)および後(アッセイ2)におけるグルコース、ガラクトース、ラクトースの差分分析に用いられた(図1)。サンプルは遠心分離後、超純水(UPW)で希釈して分析を行った。



*AOAC(2001.02): Extract plus deactivated enzyme

図1. パルスアンペロメトリ検出器(IC-flexiPAD)を組み合わせたイオンクロマトグラフィによる総GOS含量の測定スキーム。AOACにおけるアニオンのクロマトグラフィはHPAEC(高性能アニオン交換クロマトグラフィ)と呼ばれるが、ここでは簡略化してICという一般的な用語を使用している。改良された手法では、抽出液を用いて初期のグルコース、ガラクトース、およびラクトース濃度を測定する(アッセイ1)。これは、酵素を不活性化した状態で行うAOACの手順と同等であることが示された[3]が、試薬コストを削減し、追加の手作業を軽減することができる。総GOS含量は、アッセイ1(初期濃度測定)およびアッセイ2(活性化酵素を含む抽出液)の分析結果から算出される。図は[2]を基に改変したものである。

実験

カラクトース、グルコース、およびラクトースの分離は、Metrosep Carb 2 - 250/4.0 分離カラムを用い、水酸化物溶離液で行った(図 2)。記録時間は 18 分間であった。カラムの洗浄には、記録終了後に酢酸を用いた高圧クラシエント(HPG)を実施し、総サンプル分析時間は約 30 分であった。

信号検出はアンペロメトリ検出器(945 Professional Detector Vario - Amperometry)を用い、薄層セル(Au 作動電極および Pd 参照電極)を備えた構成で行った。薄層セルと特別な flexiPAD(ハルスアンペロメトリ検出)波形を組み合わせること、GOS 分析において最良の性能を発揮した。標準的な PAD 条件と比較して、本設定では応答および信号対雑音比が向上した。

手動でのサンプル前処理の後、IC への注入前に、低

容量透析セルを用いたインライン透析を実施し、サンプルを精製した。この完全自動化ステップにより、タンパク質や高分子化合物をサンプルマトリックスから除去し、カラムの保護と寿命の延長を実現した。

総 GOS 含量の計算は、AOAC に従い、自動データ解析(MagIC Net 3.3 ソフトウェア)によって行われた。具体的には、アッセイ 1 とアッセイ 2 におけるカラクトースおよびグルコースの差分を求め(図 2)、初期ラクトース量で補正し、最終的に 100 g のサンプル重量に換算した。

AOAC の標準手法を適応・改良する過程で、さまざまな変数を検討し、最終的に一般的な基準に基づいて検証した。詳細はオープンアクセス論文 Ziegler et al. [3] に記載されている。

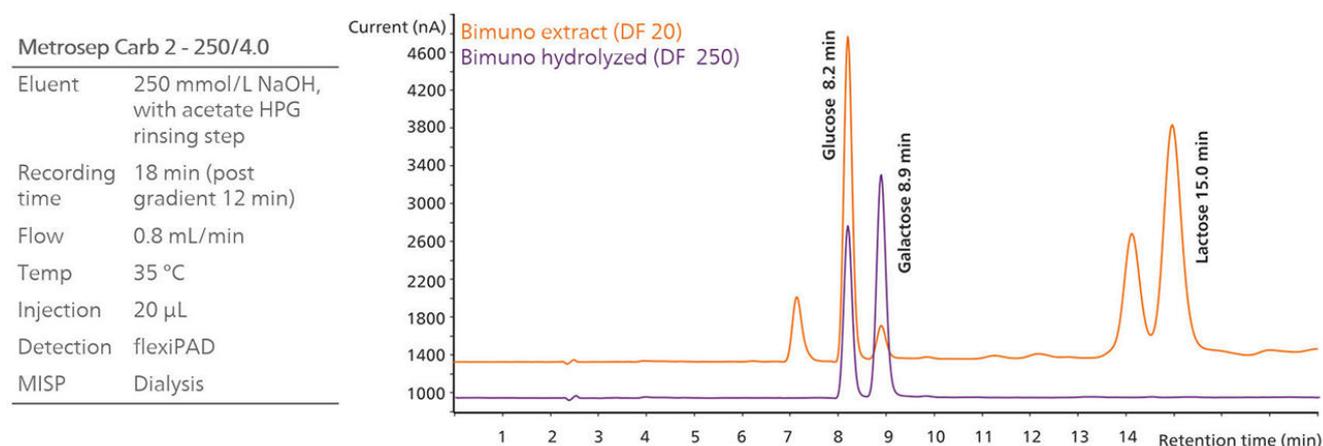


図2. Bimuno サンプルの抽出液 (アッセイ 1、超純水 (UPW) 中で希釈係数 (DF) 20、オレンジ) と、 β -ガラクトシダーゼ処理後の抽出液 (アッセイ 2、DF 250、紫) のオーバーレイ (オフセット付き)。GOS の加水分解、すなわちガラクトース-ガラクトース結合およびガラクトース-グルコース結合の分解により、アッセイ 2 におけるガラクトースおよびグルコースの濃度は、アッセイ 1 に比べて大幅に増加している。高い希釈係数 (DF) は、設定された検量範囲内の正確な定量を保証する。クロマトグラフィの条件の概要は左側に示されている。メトロームのインラインサンプル前処理工程として、インライン透析を用いて追加のサンプル精製を行い、システムの性能向上およびカラム寿命の延長を実現した。

結果

異なる試料の総GOS含量は28~83 g/100 gの範囲であり、複数日にわたる個々の反復測定において最大5%の変動が見られた。乳児用調製粉乳ではより高い6~10%の変動が示された(データの掲載なし)。こ

のようなマトリックスではラクトース含量が高いため、総GOSの測定における不確実性が増大することが要因である[3]。

全体として、満足のいく変動性、目標値およびスハ

イク回収率(表1)に加え、干渉試験[2]の結果から、本法が有用かつ堅牢であることが証明された。検出限界(LOD、DIN 32645)は溶液中でカラクトース0.1 mg/L、クルコースおよびラクトース0.2 mg/Lである。

り、総GOS含量が低い場合でも高精度で測定可能である。

表1. 市販のGOSパウダー、Bimunoテイリーサプリメント、Vivinal®パウダーに対し、改良AOAC 2001.02法を用いて測定した総GOS含量。これらの試料は個別に調製され、複数日にわたって二重測定で分析された(n)。算出されたRSDは、各試料における総GOS含量の変動性を示す指標である。回収率は、目標基準値およびGOSパウダー(基準試料)を用いたスパイク試験から算出され、本法の精度および堅牢性を示している。

サンプル	Total GOS (n) (g/100 g)	Variability over n days (RSD in %)	Total GOS target (g/100 g)	Target recovery (%)	AVG Spike 1 (g/100 g) (Recovery %)	AVG Spike 2 (g/100 g) (Recovery %)
GOS Powder	82.6 ± 4.1 (n = 7)	5.0	>70	n.a.	n.a.	n.a.
Bimuno	75.7 ± 3.0 (n = 7)	3.9	79.7	95	36.8 ± 1.4 (98%)	88.4 ± 12.7 (96%)
Vivinal Powder	27.8 ± 0.5 (n = 4)	1.8	28.5	98	37.8 ± 0.1 (91%)	48.6 ± 0.1 (91%)

結論

多成分分析法として、アンヘロメトリック検出器を用いたイオンクロマトグラフィは、追加の誘導体化工程なしで炭水化物を非常に選択的かつ高感度、かつ堅牢に分析できる手法である。酵素処理と組み合わせることによって、より複雑な炭水化物の定量も可能となる。

総GOS分析のための高度に改良・検証されたIC-flexiPAD法は、分析者にとって効率向上の利点をも

たらす。試料前処理の大幅な改善により、追加の実験作業を削減することで全体の処理時間が短縮されるだけでなく、試薬や消耗品の節約にもつながり、総運用コストを低減できる。このことから、AOAC公式法2001.02の有力な代替手法となる。さらに、メトロームのインライン希釈や自動校正などの追加の自動化工程を導入することで、本法の効率をさらに向上させることが可能である。

参考文献

1. Sangwan et al. (2011), J. Food Sci. 76(4)
2. Boehm & Stahl (2007), J. Nutr. 137(3 Suppl 2)
3. Ziegler et al. (2001), The Column – Europe/Asia 17(02)

Internal reference: AW IC CH6-1436-032021

CONTACT

メトロームジャパン株式会社
143-0006 東京都大田区平
和島6-1-1
null 東京流通センター アネ
ックス9階

metrohm.jp@metrohm.jp

装置構成



940 Professional IC Vario ONE/HPG

940 プロフェッショナル IC Vario ONE/HPG はハイナリー高圧クラシエントを備えたサフレーションの無しのインテリシエントコンハクトIC装置です。942 拡張モジュールを使用することでクオータークラシエントシステムにまで拡張することかてきます。この装置は任意の分離メソッドおよび検出メソッドによって使用することかてきます。

典型的な使用領域:

- クラシエント溶離法後のハルスタイフのアンヘロメトリック検出器による炭水化物分析
- ホストカラム法を使用する、もしくは使用しない UV/VIS検出器によるクラシエント使用



IC Amperometric Detector

インテリシエントIC装置のためのコンハクトかつインテリシエントなアンヘロメトリック検出器。4つの測定モード(DC、PAD、flexIPAD、CV)による優れた選択性、卓越した信号・騒音比、非常に高速の測定待機機能が高精度の測定てきます。



Metrosep Carb 2 - 250/4.0

ICカラムMetrosep Carb 2 - 250/4.0は、アルカリ性溶離液およびハルスアンヘロメトリー検出を用いた炭水化物の測定に特に適しています。大容量の陰イオン交換カラムは、スチロール/シヒニルヘンセン共重合体をヘースとしています。これはpH = 0~14の範囲で安定しており、単糖類および二糖類を分離します。さらに、数種の糖アルコール、無水糖、アミノ糖などの分析にも適しています。Metrosep Carb 2分離カラムの250mmのハーシオンは、複雑な分離のために最適化されています。



858 Professional Sample Processor – Pump

858 プロフェッショナルサンプルプロセッサ - ホンプは、500 μ Lから500 mLまでのサンプルを処理します。サンプルは内蔵式双方向性の2チャンネルのヘリスタリックホンプまたは800 トシーノ電動ヒュレットによって転送されます。