

ノート

食品中の二糖類の分離定量

加藤時信, 出来三男

1. 緒言

加工食品のうち一般に栄養食或いは育児用食品と呼ばれるものにはその原料として乳製品, 麦芽エキス, しょ糖, 卵及び天然果汁等を混合して調製したが多い。これらの食品に含まれる糖質はでん粉, デキストリンなどの多糖類を除いて, 一般にしょ糖, 乳糖, 麦芽糖, ぶどう糖及び果糖が主体となっていると考えられる。食品分析において各構成糖の含有量を知ることは加工食品の起源及び素材の混合割合を推定する上に重要な手掛けりを与えてくれる。

ところが, 食品に含まれる天然糖質には還元性, 非還元性オリゴ糖をはじめとして多種類の糖類が混在しているため, これらを一般に行なわれている酸加水分解による化学的方法^{1), 2, 3)}で分離定量することは不可能であり, 真の糖組成を知るにはペーパークロマトグラフィー, カラムクロマトグラフィー¹⁾及びガスクロマトグラフィー⁴⁾などの分離手段によらねばならない。しかしこれらの方法は, 微量分離分析法としては有効な方法であるが, 操作が複雑であるうえに定量精度が比較的悪い欠点がある。また, 酵素による糖質の分離定量法は^{5), 6)}混合糖質から特定の糖質を定量するには優れた方法であるが, 多種類の酵素を必要とするなどの欠点をもっている。

これに対して, カラムクロマトグラフィーを自動化した分析法の利用は, これらの欠点を克服できることが明らかにされ, 混合糖質の分離定量分析については多数の報告がなされている。さらに, 臨床医学領域からの要求により, 血液中のぶどう糖定量にこの自動分析法が応用されたのをはじめとして, Kesler⁷⁾, Tohn⁸⁾らによって混合糖質の分離定量が報告されている。千田ら⁹⁾は呈色試薬としてりん酸-アニリン系を用いる分離定量法を試みている。

著者ら¹⁰⁾はすでに反応熱検出型自動液体クロマトグラフィーによる単糖類及び二糖類の分離定量について

このノートを「自動液体クロマトグラフによる糖質の分離定量(第3報)」とする。

大蔵省関税中央税所, 千葉県松戸市岩瀬 531

検討し, ピークの高さ或いはピーク面積と糖濃度との間に直線関係があることを報告し, さらに, オルシノール-硫酸系呈色試薬を用いて, しょ糖を分離定量するための基礎条件を検討¹¹⁾してきた。

本報では主として食品中に含まれる二糖類相互の分離定量を目的として, 分離条件及び食品中に糖質と共に存する主な成分の定量に対する影響を検討した。さらにこの方法を2, 3の食品に応用し, 簡単な操作で, しかも比較的短時間でしょ糖, 乳糖及び麦芽糖を分離定量することができることを知ったのでその結果を報告する。

2 実験方法

2・1 装置

液体クロマトグラフは光電比色計を接続した日本電子KK 製 JLC-3C 型自動記録装置を用いた。

2・2 試薬及びイオン交換樹脂の調製

2・2・1 固定相担体

前報¹¹⁾検討の結果により最も分離能のよかつたほう酸型塩基性イオン交換樹脂 LC-R-3 を用いた。樹脂の調製は前報¹¹⁾によった。

2・2・2 展開溶剤

展開溶剤としては二糖類相互の分離能が最もよかつた pH7.0(0.1M H₃BO₃)¹¹⁾及び単糖類や二糖類以外の共存成分を速やかに溶出する目的で pH9.5(0.3M H₃BO₃)のほう酸緩衝液を用いた。緩衝液の調製は前報¹¹⁾によった。

2・2・3 呈色試薬

糖質の呈色にはオルシノール-硫酸を用いた。呈色試薬の調製は前報¹¹⁾によった。

2・2・4 標準物質とその調製

標準物質としてはしょ糖, 麦芽糖, 乳糖, マンノース, 果糖, ガラクトース, キシロース及びぶどう糖を用いた。共存成分の影響を検討するために用いた蛋白質はカゼイン(ミルク), ラクトアルブミン, - グロ

ブリン(牛血清)、アルブミン(卵)、グリアジン(麦)、大豆蛋白であり、有機酸として酢酸、乳酸、クエン酸酒石酸、シュウ酸、りんご酸、コハク酸を用いた。また、配糖体としてはサポニン、エオシアニンを使用した。これらの標準物質はいずれも試薬 1 級以上を用い pH8.0(0.15M H₃BO₃)のほう酸緩衝液に溶解して調製した。

2・3 試料の調製

実験に使用した食品はいずれも pH8.0 のほう酸緩衝液に溶解し、ろ過して調製した。

2・4 測定条件

自動液体クロマトグラフィーの測定条件は Table 1 に示した。

Table 1. Analytical conditions

Stationary phase:LC-R- 3 (borate form)
Mobil phase: Borate buffer
Buffer pH: pH7. 0 → pH9. 5
Buffer change time: 4 hrs.
Buffer flow rate: 0.32 ml/min.
Color reagent: Orcinol-sulfuric acid
Flow rate: 0. 63 ml/min.
Column size: 0.8φ × 15cm
Temp.: 50°C
Reaction bath temp.; 95°C
Reaction tube length: 15m
Wave length: 440 nm
Chart full scale: 100~70% (transmittance)
Chart speed: 2 cm/hr.

3 結果と考察

3・1 分離条件の検討

イオン交換樹脂及び展開溶剤については前報¹¹⁾で検討した結果に基づいて、それぞれ LC - R - 3 (ほう酸型) 及び pH7.0 のほう酸緩衝液を用いた。前報¹¹⁾に示した条件ではしょ糖と他のオリゴ糖類との分離は良好であったが、二糖類相互の分離、とくに麦芽糖と乳糖の分離が高濃度において充分でなかった。また乳糖の前後に近接してラムノース及びリボースが溶出するという報告^{7), 9)}もあり、そこで、これら糖類の相互分離を改善するために、展開溶剤の流速を 0.32ml/min に設定し、カラム温度を種々に変えた場合、各二糖類の溶出速度がどのような挙動を示すかを検討した。

Fig.1 に示したようにカラム温度が 20 ~ 60 の範囲では温度が高いほど二糖類相互の分離は良く、50 以上では麦芽糖と乳糖の分離も完全であった。しょ糖の溶出速度はカラムの温度を変えても顕著な変化はなかった。これはしょ糖がイオン化しないことによるものと考えられる。

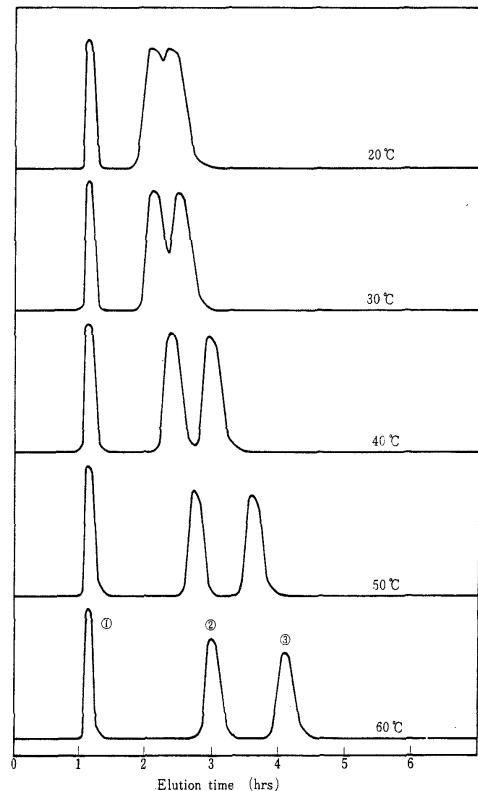


Fig.1 Effect of column temperature on elution rate of sugars.

Analytical conditions are same as cited in Table 1.

Concentration of sugars used are 0.1mg per ml, respectively.

Sucrose Maltose Lactose

3・2 検量線の作成

Table 1 の測定条件により、各種濃度のしょ糖、麦芽糖及び乳糖を用いて得られたクロマグラムのピークの高さをそれぞれの糖質の濃度に対してプロットして求めた検量線は Fig. 2 に示した。いずれも各糖質濃度 20 ~ 300 の範囲で濃度とピークの高さとの間に直線関係が成り立つ。

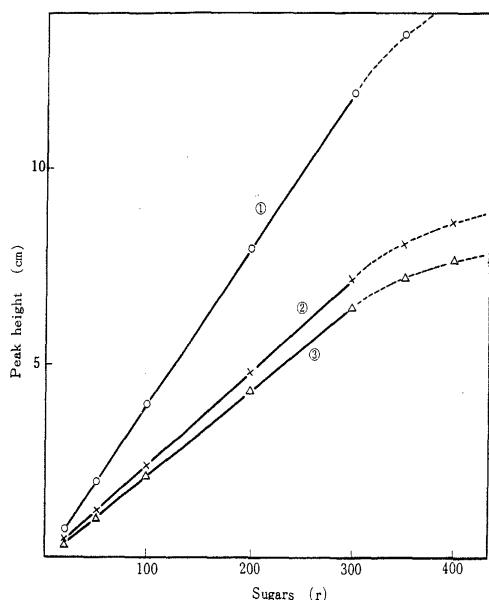


Fig.2 Calibration curves of sugars.

Analytical conditions are same as cited in Table 1.

Sucrose Maltose Lactose

3・3 二糖類の溶出ピークに対する共存成分の妨害

3・3・1 有機酸の影響

酢酸, 乳酸, クエン酸, 酒石酸, シュウ酸, りんご酸及びコハク酸の各有機酸 0.1mg/ml と, しょ糖, 麦芽糖及び乳糖の各二糖類 0.1mg/ml との混合物について行なった液体クロマトグラムは Fig.3 に示したように各有機酸のピークは pH7.0 では溶出速度は遅く, 展開溶剤を pH9.5 に変えると約 1 時間後に巾広い, 弱いピークとして現れてくる。したがって有機酸はいずれも各二糖類の溶出ピークに全く影響を与えないことを知った。

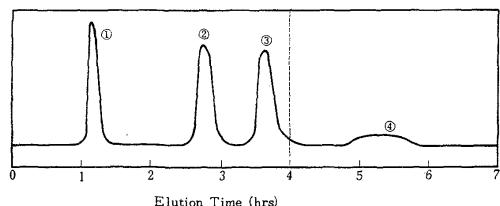


Fig.3 Effect of organic acid on determination of sugars.

Analytical conditions are same as cited in Table 1.

Concentration of organic acids and sugars used are 0.1mg per ml, respectively.

Sucrose Maltose Lactose
Organic acid

3・3・2 蛋白質の影響

グリアジン, カゼイン(ミルク), アルブミン(卵), -グロブリン(牛血清), ラクトアルブミン及び大豆蛋白質をそれぞれ 0.1mg/ml の濃度にしたものについて行なった液体クロマトグラムは Fig.4 に示した。

これらの蛋白質のうちグリアジン, カゼイン, アルブミン(卵), -グロブリンは全くピークとして現われなかった。しかしラクトアルブミンは約 3 時間付近に弱いピークが認められ, 大豆蛋白質では約 1 時間付近に弱いピークが現われるほか展開溶剤の pH を 9.5 に変えてから約 30 分付近に巾広く極めて弱いピークが認められた。この大豆蛋白質から現われるピークのうち, 最初に出現するピークは共存するサポニンによるものと考えられるが, このことは 3・3・3 で検討した配糖体の影響でのべる結果からも説明できる。しかし, ここに用いた蛋白質はいずれも二糖類の分離定量を妨害しなかった。

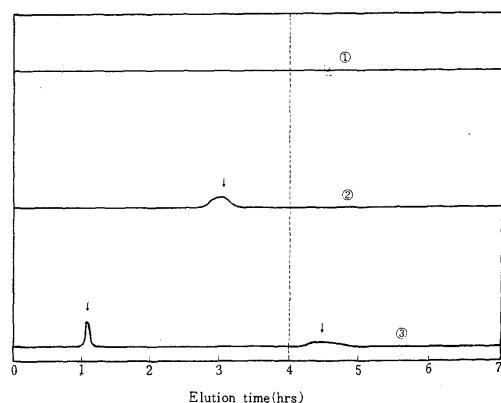


Fig.4 Effect of proteins on determination of sugars.

Analytical conditions are same as cited in Table 1.

Concentration of proteins injected are 0.1mg per ml, respectively.

Gliadine (wheat), cassein (Milk), Albumin (Eggs) and -Globulin (Bovine)
Lactalbumin Soy protein

3・3・3 配糖体の影響

エノシアニン及びサポニンをそれぞれ 0.1mg/ml の濃度にしたものについて同様な条件で測定したときの液体クロマトグラムは Fig.5 に示した。エノシアニンはこの条件では溶出せず、17 時間後でもピークを示さなかった。一方サポニンは試料注入後約 1 時間で 2 号のピークとなって溶出し、このピークはしょ糖のピークと重複することからサポニンの存在はしょ糖の定量の障害となる。

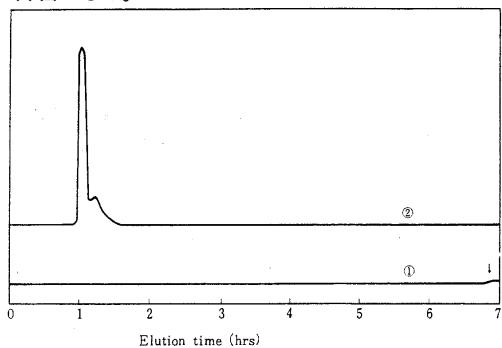


Fig.5 Effect of glycosides on determination of sugars.

Analytical conditions are same as cited in Table 1.

Concentration of glycosides used are 0.1mg per ml, respectively.

Enocianine Saponin

3・4 応用例

Table 1 に示した測定条件に従って、次の 3 種の食品中のしょ糖、麦芽糖及び乳糖を分離定量した。

Sample No.1 Malted milk chocolate flavor

Sample No.2 Oval tine

Sample No.3 Chocolate flavored marshmallows

用いた食品のペーパークロマトグラフによる糖組成を Fig.6 に示した。

Table 2. Sugar contents in foods

	Sucrose	Maltose	Lactose
Sample No. 1	62%	16%	2 %
Sample No. 2	8	35	7
Sample No. 3	27	12	—

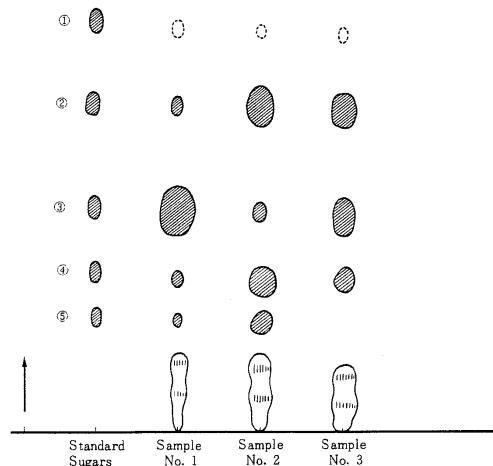


Fig.6 Paper chromatograms of sugars in foods.

Solvent : Butanol/Acetic acid/water(4/1/1)

Colour reagent : Anilin hydrogen phthalate

Fructose Glucose Sucrose

Maltose Lactose

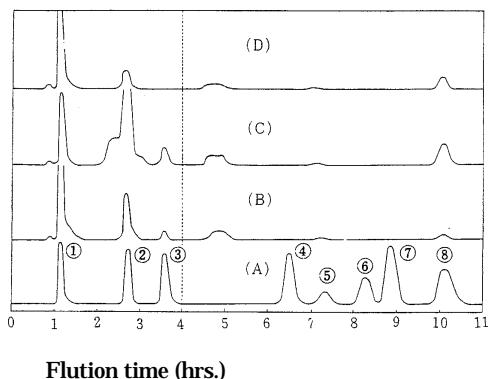


Fig.7 Chromatograms of sugars in foods and standard sugars.

Analytical conditions are same as cited in Table 1.

(A) Standard sugars (B) Sample No.1

(C) Sample No.2 (D) Sample No.3

Sucrose Maltose Lactose

Mannose Fructose Galactose

Xyrose Glucose

それぞれの試料及び標準糖質の自動液体クロマトグラムは Fig.7 に示した。これら各糖類のピーク高から直接しょ糖、麦芽糖及び乳糖を検量線を用いて算出した結果は Table 2 に示した。Table 2 からわかるように希釈率を加えることにより比較的高濃度の糖を含む試料についても容易に定量することができ、しかも分析操作は極めて簡単である。

4 総 括

食品中のしょ糖、麦芽糖及び乳糖の同時分離定量を目的として、二糖類相互の分離条件を検討し、また食品中に共存する主な成分の二糖類定量への影響を検討した。

固定相としてほう酸型塩基性イオン交換樹脂(LC

- R - 3)を用い、展開溶剤としてほう酸緩衝液を用いた場合、カラム温度は 20~60 の範囲では、温度が高いほど二糖類相互の分離は良好であった。オルシノール-硫酸を呈色試薬とした場合、しょ糖、麦芽糖及び乳糖のそれぞれ 20~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲でピーク高との間に直線関係が得られた。食品中に共存する有機酸及び蛋白質は液体クロマトグラフィーによる二糖類の分離定量を妨害しなかった。また、配糖体のうちエノシアニンは分離定量を妨害しなかったが、サポニンはしょ糖に近接して溶出するため、食品中に多量にサポニンを含有する場合にはこの条件は不適当であり、さらに分離方法を検討する必要がある。

この方法を加工食品中のしょ糖、麦芽糖及び乳糖の同時分離定量に応用し、除蛋白質等の操作のない簡単な分析操作によって定量できた。

文 献

- 1) 日本化学会編：“実験化学講座 (生化学 I)23”, P.412, 丸善 (昭.23) .
- 2) M. B. Jacobs : “The Chemical Analysis of Food and Food Products (Third Edition) ” P.434, D.Van Nostrand Company, Inc., New York, (1958).
- 3) 東京大学農学部農芸化学教室編：“実験農芸化学上巻 ” P.127. (1960), 朝倉書店.
- 4) 舟阪渡、池川信夫編：“最新ガスクロマトグラフィー・基礎と応用・(, 応用編)” (昭.40), 広川書店.
- 5) H. U. Bergmeyer : “Method of Enzymatic Analysis ” P.99, Academic Press, New York, (1963).
- 6) 高橋昭次、桑田五郎、森本輝彦：農化., 40, 261(1966).
- 7) R. B. Kesler : *Anal.Chem.*, 39, 1416 (1967).
- 8) M. John, G. Trenel and H. Hellweg : *J. Chromatog.*, 42, 476 (1969).
- 9) 千田孝之、藤原喜延、鷹野重威：*The Hitachi Scientific Instrument News*, 12, (5), 719 (1969).
- 10) 出来三男：本誌, No.6, 1 (1968).
- 11) 加藤時信、出来三男：本誌, No.10, 89 (1970).

Automatic Analysis of Sugars by Liquid Chromatography. (3)

Determination of Disaccharides in Foods

Tokinobu KATO, Mitsuo DEKI

Central Customs Laboratory

531 Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken.

Received Dec. 28, 1970