

報 文

高速液体クロマトグラフィーによる混合糖の定量

宮 城 好 弘^{*}, 出 来 三 男^{**}

食品中に一般に含まれる混合糖質中、グルコース、フルクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース及びデキストリンについて、高速液体クロマトグラフィーと酵素法を併用して分離定量する方法を検討した。

カラムは、SCR 100、溶出液は、脱炭酸した水、カラム槽温度 40℃、検出器は、示差屈折計 (10^{-5} RIU, 30℃) を用い、SCR 100 が二糖類相互の分離に不十分である欠点を補うため、相当する酵素 (シュクロースに対しインベルターゼ、デキストリンに対し、 α -グルコシダーゼ) を用いた。絶対検量線法により、グルコース、フルクトース、シュクロース、マルトースは、ほぼ原点をとる直線を示し、グルコースとシュクロース、マルトースとシュクロース及びラクトースとデキストリンの各混合糖質は、酵素法を併用することによって各糖質の分離定量ができた。

1 緒 言

関税率表分類において、砂糖の有無は、分類上一つの大きな要素となっている。

一般に、食品中に含まれる糖質は、グルコース、フルクトース、シュクロース、ラクトースなどのほか、いくつかのオリゴ糖が混在しており、これらの糖質が共存する場合には、化学的方法だけでは十分な分離定量はできない。そのため、カラムクロマトグラフィー、酵素法などによる分離定量が必要となる。

これまで、われわれは、液体クロマトグラフィーや酵素法などによる糖質の分離定量について検討し^{1)~4)}、とくに酵素法は、二・三種類の混合糖の分離定量法として有用であることを明かにして来た。

最近、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、分析の迅速性と、高い分離性能の面から各種化合物の分離法として、広く利用されているところである。

HPLC による糖質の分離定量については、いくつかの研究があるが^{5),6)}、イオン交換法及び吸着分配法が主なものである。これらの方法では、二糖類相互の分離が十分でなく、また、分離能はよくてもカラムの

劣下が著しいことなどの難点がある。

ここでは、カラム充填剤として、比較的に単糖類の分離が良好な SCR 100 を用い、二糖類は、相当する酵素により、加水分解したのち、同様に分離する方法について、二・三検討した結果について報告する。

2 実験方法

2・1 装 置

島津・デュボン高速液体クロマトグラフ 830 型

カラム: SCR 100 (500 mm × 10 mm)

カラム槽温度: 40℃

検知器: 示差屈折計 (10^{-5} RIU, 30℃)

2・2 試 薬

溶出液は、煮沸し、脱炭酸した水。

グルコース、フルクトース、シュクロース、ラクトース及びデキストリンの各糖質は、試薬特級を用いた。

酵素製剤は、Merk 社製のインベルターゼ、マルターゼ、 α -グルコシダーゼを用いた。

* 大蔵省関税中央分析所: 271 千葉県松戸市岩瀬 531

** 大蔵省関税局企画課: 100 東京都千代田区霞ヶ関 3-1-1

2・3 操作

各糖質約1grを精密に秤り取り、水に溶かして、10mlとして、これを標準原液とした。各標準原液1.0mlを10ml容メスフラスコに入れ、混合標準液を調製した。混合標準液中の各糖の最終濃度は、約1%である。

二糖類の加水分解条件は、標準液4.0mlに各酵素液1.0ml(最終酵素濃度0.1%)を加え、37℃、1時間反応させて行った。

検液1~5 µlをHPLCに注入し、得られたクロマトグラム上のピーク高さを測定し、糖質濃度とピーク高さとの関係を示した。

3 結果と考察

3・1 分離条件の検討

SCR 100は、水を溶出液に用いるため、分離能は、溶出液の流速及びカラム温度によって決まる。

溶出液の流速(圧力)による各糖質の出現時間と分離性状をFig. 1に示した。すなわち、流速が1 ml/min.以下では、各糖の分離は良いが、ピークはブロードとなり検出感度も低下する。また、溶出時間も長くなり、流速1.0 ml/min.の条件で、シュクロースの溶出は、8.6 min.であった。これに対し、流速を大きくすると、ピークはシャープになり、溶出時間も短縮されるが、各糖の分離が悪くなる。各種検討の結果1.4 ml/min. (50 kg/cm²)の条件が最も適した分離性状を示した。すなわち、この条件では、フルクトース 6.8 min.、グルコース 6.1 min.、シュクロース、マルトース、ラクトースは、ともに 5.1 min.で溶出した。

カラム温度と分離能の関係については検討しなかった。この実験では、カラム温度は40℃とした。

3・2 検量線の作成

各種糖質の標準液を、HPLCにマイクロシリンジで一定量注入し、そのクロマトグラムのピーク高さと糖濃度との関係を求めた。3回の繰り返し実験による平均値で、各糖質のくり返し精度も高く、例えば、シュクロースでは、繰り返し精度の標準偏差は、 $\sigma = 0.081$ であり良好な結果が得られた。この結果をFig. 2に示す。

クロマトグラムのピーク高さと糖濃度との間には、

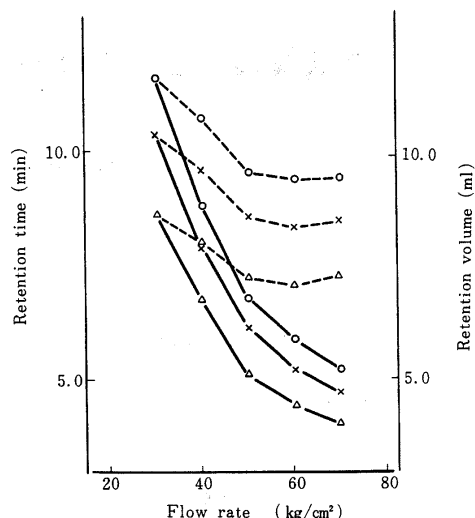


Fig. 1 Retention time and retention volume of mixed sugars

——, Retention time; - - - - - Retention volume ○: Fluctose; ×: Glucose; △: Sucrose, Maltose, Lactose; Column, SCR-100 (500mm×10mm); Eluent, water; Column bath temperature 40℃; RI detector (16×10^{-5} RIU, 30℃)

直線関係が認められ、各糖質を10 µgから50 µgまで一定量ずつ注入し、得られたクロマトグラムから各糖質の濃度とピーク高さとの関係をFig. 3及びFig. 4に示す。

各糖質の回帰直線は、シュクロース、マルトースでは、やや原点をはずれるが、グルコースでは、 $Y = 1.689x - 0.034$ であり、フルクトースでは、 $Y = 1.059x - 0.860$ でほぼ原点をとる直線が得られ、いずれの糖の場合も検量線として十分に満足できるものである。

3・3 混合糖質の分離定量

SCR 100を用いた場合、グルコースとフルクトース及びシュクロースの混合物では、各糖質の分離定量は容易であるが、例えば、シュクロースとラクトースのように、二種以上の二糖類が混合している場合には、これらの混合糖を、SCR 100によって、直接分離定量することはできない。

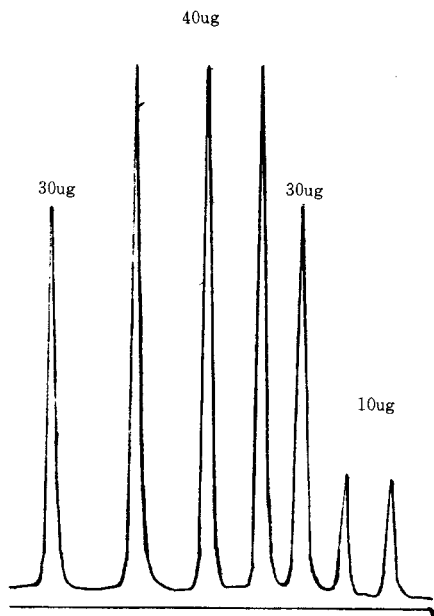


Fig. 2 Relationship between peak height and injection volume

Column, SCR-100; Eluent, water; Flow rate, 50kg/cm²; RI detector (16×10^{-5} RIU, 30°C); Sample, sucrose

われわれは、これまで混合糖質の分離定量法として、各種加水分解酵素による定量法を検討して来たが^{1),2)}、この方法は、グルコースの酸化によって生成する H_2O_2 を利用して間接的に定量する方法であった。

ここでは、SCR 100 が、二糖類相互の分離が不十分である欠点を補うため、予め、二糖類及びデキストリンは、相当する加水分解酵素によって単糖類に分解したのち、個々の糖を SCR 100 で分離して定量する方法について検討した。

すなわち、シュクロースは、インペルターゼによってグルコースとフルクトースに加水分解したのち、グルコースを定量してシュクロース含量を求めた。

シュクロースとグルコースの各種濃度の混合液を調製し、インペルターゼ濃度を 0.1%、37℃、1時間作用させて、得られたグルコースとフルクトースの増加量を Fig. 5 に示す。グルコース、シュクロース混合液中のシュクロースの含有量の増加に伴い、加水分

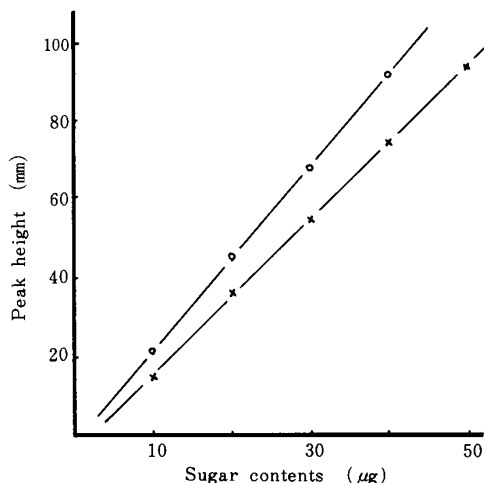


Fig. 3 Calibration curve of sucrose and maltose

Column, SCR-100; Eluent, water; Flow rate, 50kg/cm²; Column bath temperature, 40°C; RI detector (16×10^{-5} RIU, 30°C)

—○—: Sucrose, $Y=2.342x-2.156$;

—×—: Maltose, $Y=1.959x-4.590$

解後の、グルコース、フルクトースの含有量が定量的に増加しており、グルコース共存下でのシュクロースの定量は、グルコース、又は、フルクトースいずれの検量線を用いても容易に定量することができた。

マルトースとシュクロースが混在する場合は、まずインペルターゼでシュクロースを加水分解したのち、これを、SCR 100 で分離して、グルコース、マルトースを同時に定量した。

すなわち、各種濃度のマルトースとシュクロースの混合液を調製し、インペルターゼを 0.1%濃度、37℃、1時間作用させて、シュクロースをグルコースとフルクトースに加水分解してマルトース、グルコース、フルクトースのそれぞれのピーク高さを測定すると、Fig. 6 に示すとおり、シュクロースの含有量に応じてグルコースとフルクトースが定量的に増加して行き、シュクロース、マルトース共存下での、両者の定量は、マルトース、グルコースのいずれの検量線を用いても定量し得ることがわかった。

ラクトースとデキストリンが共存する場合、市販デ

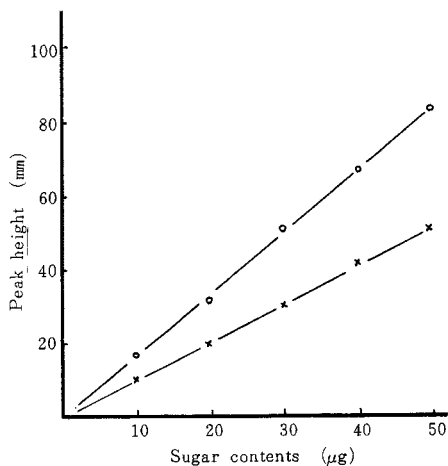


Fig. 4 Calibration curve of glucose and fructose

Column, SCR-100; Eluent, water; Flow rate, 50kg/cm²

Column bath temperature 40°C;

RI detector (16×10^{-5} RIU, 30°C)

—○—: Glucose $Y = 1.689x - 0.034$;

—×—: Fructose $Y = 1.059x - 0.860$

キストリンは、一般に単糖のほか、オリゴ糖などの混合物からなっており、また、ラクトースも同様に還元性があるので、化学的分析法だけでは、両者の分離定量は、困難であるが、HPLC を利用することによって容易に両者を定量することができる。

他の混合糖の場合と同様に、ラクトースとデキストリンの各種濃度の混合液を調製し、 α -グルコシダーゼを濃度 0.1%，37℃，1時間作用させると、グルコースのピーク高さは、Table 1 及び Fig. 7 に示すとおり、デキストリンの含有量に応じて定量的に増加し、デキストリンとラクトース共存下での両者の定量は、ラクトース、グルコースの検量線を用いることにより容易に定量できた。

4 総 括

高速液体クロマトグラフィーにより、グルコース、フルクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース、デキストリンの各糖質の混合液について分離定

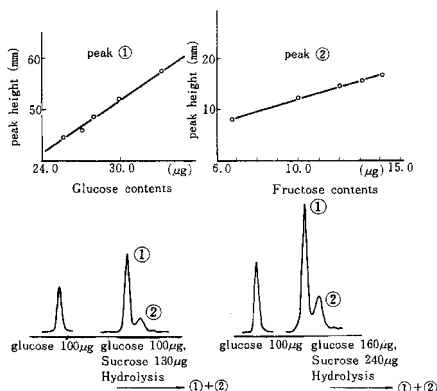


Fig. 5 Determination of sucrose in glucose

Column, SCR-100; Eluent, water; Flow rate, 50kg/cm²;

Column bath temperature, 40°C; RI detector (16×10^{-5} RIU, 30°C)

Hydrolysis of sucrose: Invertase contents (final 0.1%), Reaction at 37°C, 60 min.

①: Glucose, ②: Fructose

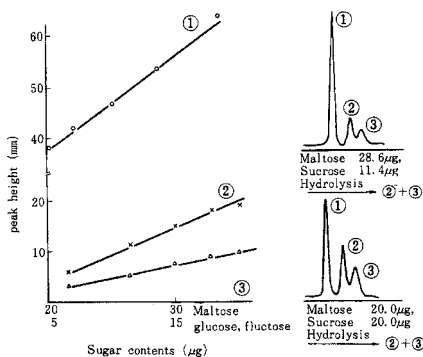


Fig. 6 Determination of maltose in sucrose

Column, SCR-100 (500mm×10mm); Eluent, water;

Flow rate, 50kg/cm²; RI detector (16×10^{-5} RIU, 30°C)

Hydrolysis of sucrose: Invertase contents (final 0.1%) Reaction at 37°C, 60min.;

① Maltose,

② Glucose,

③ Fructose

量を行った。

カラムは、SCR 100，溶出液は、脱炭酸した水。カラム槽温度は、40℃，検出器は、示差屈折計 (10^{-5})

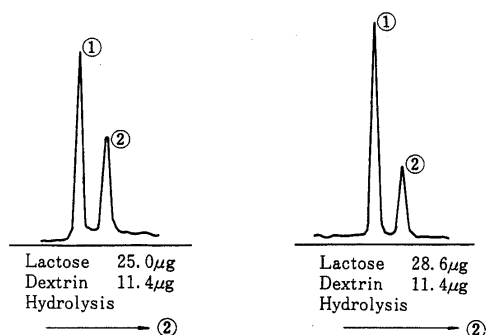


Fig. 7 Chromatograms of dextrin in lactose

Column, SCR-100 (500mm×10mm); Eluent, water;
Flow rate, 50kg/cm²; RI detector (16×10⁻⁴ RIU, 30℃)
Hydrolysis of dextrin : γ -glucosidase contents
(final 0.1%), Reaction at 37℃, 60 min.;
①Lactose, ②Glucose

RIU, 30)を用い, SCR 100 が二糖類相互の分離が不十分である欠点を補うため, 酵素法を併用する方法について検討し, 次のような結果が得られた。

グルコース, フルクトース, シュクロース, マルトースの検量線を, クロマトグラムのピーク高さから, 絶対検量線法によって作成し, ほぼ原点をとる直線

Table 1 Determination of dextrin in lactose

Weight (μ g)		Peak height (mm)	
Lactose	Dextrin	Lactose	Glucose
33.3	6.7	62.5	9.0
28.6	11.4	53.0	18.0
25.0	15.0	46.5	25.0
22.2	17.8	41.0	30.5
20.0	20.0	36.5	34.0

Analytical conditions are same as cited in Fig.7.

を示す検量線が得られた。

グルコースとシュクロースが混在する場合, シュクロースをインペルターゼで加水分解し, グルコースまたは, フルクトースを定量することにより, シュクロース含量が求められた。

マルトースとシュクロースが混在する場合も, シュクロースをインペルターゼで加水分解し, グルコース, マルトースのそれぞれのピーク高さから, シュクロース, マルトースを同時に定量できた。

ラクトースとデキストリンが混在する場合には, デキストリンを, - グルコシダーゼで加水分解して, ラクトースとグルコースの混合物としたのち定量できた。

文 献

- 1) 出来三男, 吉村実: 本誌, No.1, 1 (1965).
- 2) 出来三男, 吉村実: 本誌, No.2, 15 (1966).
- 3) 出来三男: 本誌, No.6, 1 (1968).
- 4) 加藤時信, 出来三男: 本誌, No.10, 89 (1970).
- 5) 加藤時信, 出来三男: 本誌, No.11, 47 (1970).
- 6) W. J. HVRST and R. A. MARTIN: *A. O. A. C.*, 60, 1180 (1977).
- 7) M. R. RADISH and A. L. HUEBNER: *J. Chromatogr.*, 147, 185 (1978).
- 8) J. J. カークランド: “高速液体クロマトグラフィー”, 平田美正監修, 講談社 (1972).
- 9) 波多野博行編: “高速液体クロマトグラフィー, 化学の領域増刊” 102号 (1973).

Quantitative Analysis of Mixed Sugars by High Pressure Liquid Chromatography

Yoshihiro MIYAGI* and Mitsuo DEKI**

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 531, Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, 271 Japan

*Planning and Duty Section of Customs and Tariff Bureau, Ministry of Finance,
3 - 1 - 1, Kasumigaseki, Chiyoda - ku, Tokyo, 100 Japan

Quantitative determination of mixed sugars of glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose and dextrin by HPLC were investigated.

Analytical conditions were as follows : packed column, SCR - 100 (Shimadzu, 500mm × 10mm); column bath temperature, 40 °C; eluent, water; flow rate, 1.4ml/min (50kg/cm²); and detector, RI detector (10⁻⁵ RIU).

Since the determination of sucrose, maltose and dextrin in these mixture was difficult to carry out directly by HPLC equipped with SCR - 100 column, these sugars were determined after hydrolyzed with invertase, maltase or α-glucosidase.

The same method was also applied to the determination of the following mixed sugars : glucose and sucrose, sucrose and maltose, lactose and dextrin.

The good result and accuracy were obtained.

Received Sept. 5, 1978