

ノート

HPLC による砂糖調製品の定量

大 獄 秀 之*, 小笠原 利 勝*, 松 代 康**, 笹 谷 隆**, 水 城 勝 美**

Quantitative Analysis of Sugar Preparations by HPLC

Hideyuki OHTAKE*, Toshikatsu OGASAWARA*, Yasushi MATSUSHIRO**,

Takashi SASATANI** and Katsumi MIZUKI**

*Nagoya Customs Laboratory

2-2-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken, 455 JAPAN

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271 Japan

The determination of sugar, dextrin and sugaralcohols in sugar preparation by HPLC was investigated.

In case of using a distilled water for the mobile phase (column: Polyspher CH CA300xφ6.5 mm) obtained a stabilized baseline for determination of low content solution.

Calibration curve showed a linear between 0.1% and 1.0% solution of various sugars and sugaralcohols.

This method obtained a good result for determination of sucrose, glucose, sugaralcohols and dextrin mixture in sugar preparations.

It was found that another method (column: Pack Polyamin250xφ4.6mm, eluent: acetonitrile/water=75/25) was applicable to the determination of sugars and Hydrogenated starch hydrolyzates in sugar preparation.

1 緒 言

最近、各種糖類や糖アルコールが混在する砂糖調製品の輸入が急増している。砂糖調製品中の糖類等の種類や含有率は、関税率表分類上及び輸入制限上の取扱いを行う上で、重要な因子の一つである。

従来、糖類等の分析方法はレイン・エイノン法、ハーネス法、酵素法等を用いてきたが、これらの方法は長時間を要し、また、煩雑な操作と熟練を必要とする。

そこで、近年、各種化合物の正確、かつ迅速な分析法として、一般的となってきた HPLC を用い、砂糖と糖アルコール、砂糖とデキストリン、砂糖と還元水飴等の定量分析の方法について検討を行った。

2 実 験

2.1 実験条件

2.1.1 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ：横河電気 LC100P 型

サンプルインジェクター：レオダイネ 885-0120 型

(スタートスイッチ付)

カラムオープン：横河電気 LC100P 型

RI 検出器：昭和電気 Shodex RI SE-61 型

カラム：MERCH Polyspher CH CA

(300xφ6.5mm 溶離液：蒸留水を減圧脱気したもの)

YMC-Pack Polyamin

(250 X φ4.6mm 溶離液：Acetonitrile/water=75/25)

*名古屋税関業務部分析部門 〒455 愛知県名古屋市港区入船2-3-12

**大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬531

流 速：毎分 0.5ml
 カラム温度：80℃
 注 入 量：5.0 μ l
 注 入 方 法：バルブブルー方式

2.1.2 試薬及び器具

試薬

しょ糖、ソルビトール、マルチトール、グルコース（試薬特級 和光純薬）

α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、インペルターゼ（生化学工業）

デキストリン、還元水飴（松谷化学工業）

器具

ろ過フィルター ADVANTIC TOYO ϕ 13mm 0.5 μ
 （水型）

イオン交換フィルター TOYOPAC IC-SP 型
 DEAE 型
 （東洋曹達工業）

2.2 実験方法

2.2.1 ピークの再現性

しょ糖、ソルビトール及びマルチトールの各標準試薬をそれぞれ 1%水溶液に調製した。これをカラム：Polyspher CH CA, 溶離液：蒸留水を脱気したもの、注入量：5.0 μ l を、3 回測定しピークのリテンションタイム、高さ及び面積の変動を検討した。

2.2.2 検量線の作成

しょ糖については、0.5～2.0%濃度の範囲で、ソルビトール、マルチトール及びグルコースについては、0.1～1.0%濃度の範囲で濃度と高さの直線関係について調べた。

2.3 混合試料の分析

2.3.1 しょ糖と糖アルコール混合試料の定量

しょ糖、ソルビトール及びマルチトールをそれぞれ 8：2 及び 9：1 の割合（w/w）に正確に混合し、糖アルコールの濃度が 0.1%水溶液になるよう調製した。これを各 4 回測定し、回収率の変動をみた。

2.3.2 しょ糖とデキストリン混合試料の定量

しょ糖とデキストリン（DE 値：3～5, 7～9, 10～12）をそれぞれ 8：2 及び 9：1 の割合に混合した試料の 1g を α -アミラーゼで分解し、試料中のデキストリンをグルコース単位まで完全に酵素分解した。次に、除たんぱくを行い、デキストリンの濃度が、0.1%になるように調製し、イオン交換フィルター及びろ過フィルターでろ過し（以下前処理という）、このろ液を注入し回収率の変動をみた。

2.3.3 しょ糖及び還元水飴の定量

Polyspher CH CA カラムはマルチトールとグルコースの分離が良くないので、しょ糖：83%, グルコース：11%及び還元水飴：6%の割合に混合した試料の定量について、次のような条件で実験を行った。

カラム：YMC-Pack Polyamin, 溶離液：アセトニトリル／蒸留水＝75／25, 注入量：5.0 μ l, 試料調製は次のように行った。

① 還元水飴を α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼで分解し、前処理後マルチトール生成割合を測定する。

② しょ糖と還元水飴を混合した試料を溶解し、前処理後測定する。

③ しょ糖と還元水飴を混合した試料を溶解し、 α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼで分解し、前処理後測定する。

④ しょ糖と還元水飴を混合した試料を溶解し、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ及びインペルターゼで分解し、前処理後測定する。

3 結果と考察

3.1 ピークのリテンションタイム及び再現性

しょ糖、ソルビトール及びマルチトールの 1%濃度での測定結果を Table 1～3 に示す。各成分のリテンションタイム、ピークの高さ及びピーク的面積は安定した値を示す。

Table 1 Analytical results of sucrose standard solution by HPLC

	Time (min)	Peak height	Peak area
1	7.76	613.04	13,931.22
2	7.76	610.91	13,851.91
3	7.76	609.82	13,394.81
AVE	7.76	611.26	13,725.98

Table 2 Analytical results of sorbitol standard solution by HPLC

	Time (min)	Peak height	Peak area
1	16.12	274.08	14,417.30
2	16.11	275.20	14,474.28
3	16.16	275.60	14,280.24
AVE	16.13	274.96	14,390.61

Table 3 Analytical results of maltitol standard solution by HPLC

	Time (min)	Peak height	Peak area
1	10.33	460.20	14,958.66
2	10.34	459.43	15,040.84
3	10.22	454.83	14,873.04
Ave	10.30	458.15	14,957.51

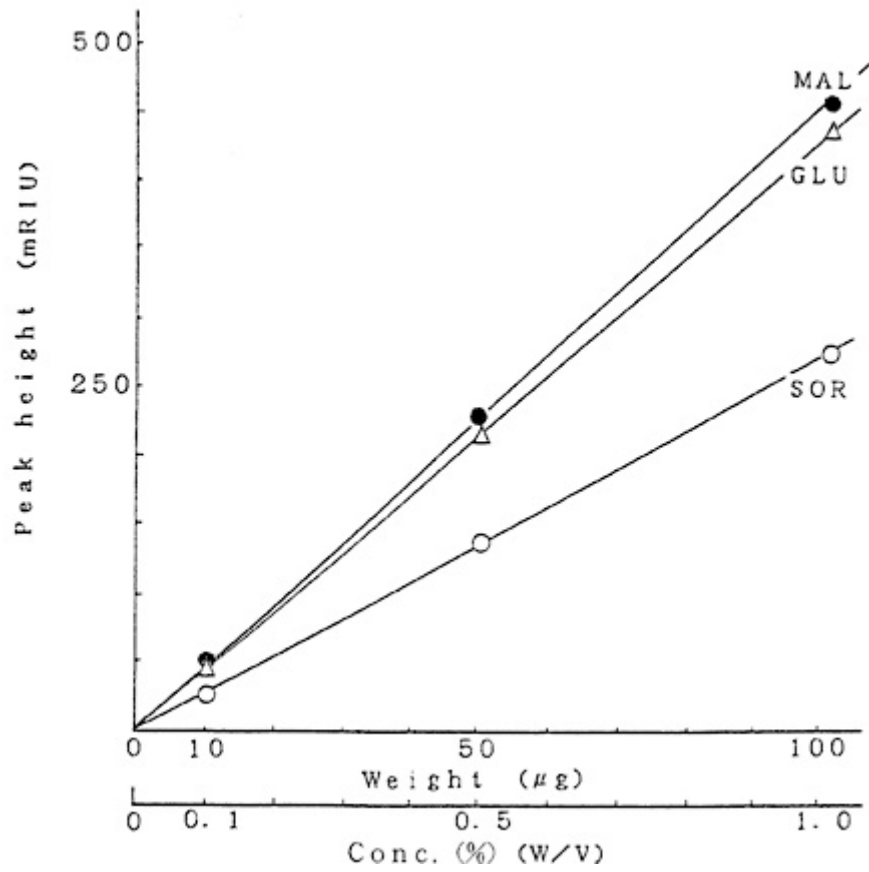


Fig. 1 Calibration curve of glucose, sorbitol and maltitol

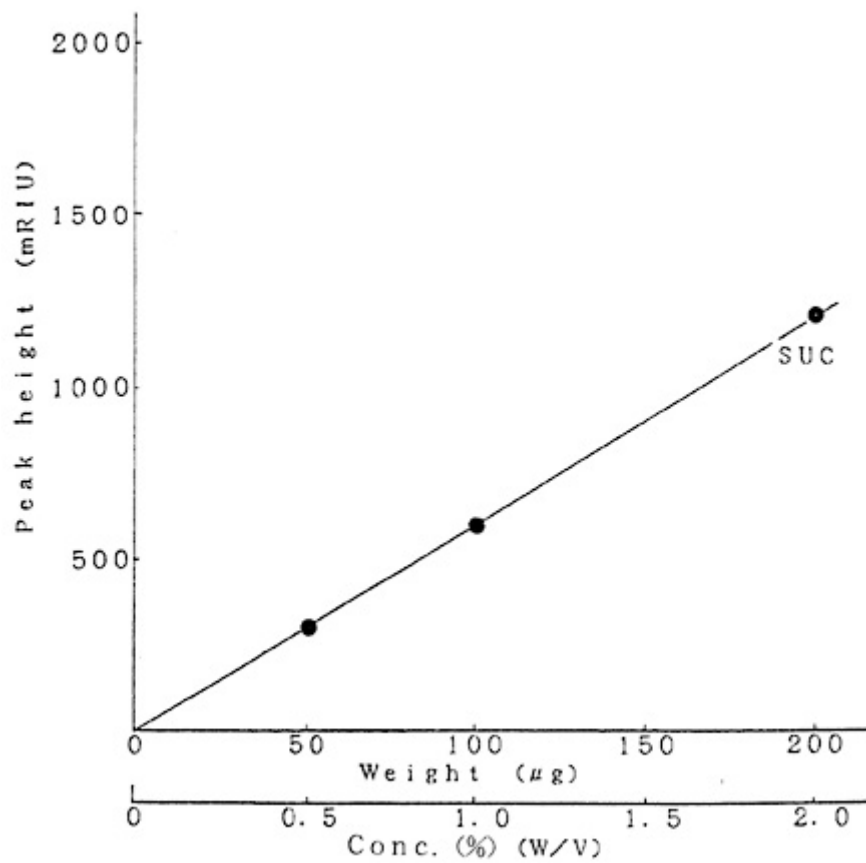


Fig. 2 Calibration curve of sucrose

3.2 検量線の作成

グルコース、ソルビトール及びマルチトールの 0.1~1.0%濃度の検量線を Fig. 1 に、しょ糖の 0.5~2.0%濃度の検量線を Fig. 2に示す。

各成分とも原点を通る直線性（相関関係 $R=0.9999$ 以上）を示した。しかし、このカラムはグルコースとマルチトールのピークが重なり合うので、両者が混合している試料は定量が困難である。

3.3 しょ糖と糖アルコール混合試料の測定

しょ糖 80%とソルビトール 20%混合試料、しょ糖 90%とソルビトール 10%混合試料、しょ糖 80%とマルチトール 20%混合試料及びしょ糖 90%とマルチトール 10%混合試料を Table 4 ~7 にそれぞれの測定結果を示した。

Table 4 Analytical values for standard mixture
(Suc : 80%, Sor : 20%)

	Sucrose	sorbitol
1	79.19	19.77
2	79.56	19.81
3	80.10	20.13
4	80.27	20.25
AVE	79.78	19.99
STD	0.43	0.20

Table 5 Analytical values for standard mixture
(Suc : 90%, Sor : 10%)

	Sucrose	sorbitol
1	89.10	9.86
2	89.90	9.88
3	89.84	9.98
4	88.81	9.31
AVE	89.41	9.76
STD	0.47	0.26

Table 6 Analytical values for standard mixture
(Suc : 80%, Mal : 20%)

	Sucrose	sorbitol
1	80.47	20.47
2	80.30	20.39
3	80.19	20.66
4	79.10	19.86
AVE	79.10	20.35
STD	0.54	0.30

Table 7 Analytical values for standard mixture
(Suc : 90%, Mal : 10%)

	Sucrose	sorbitol
1	89.20	9.33
2	89.33	9.84
3	89.66	9.87
4	88.69	9.79
AVE	89.47	9.71
STD	0.21	0.22

4 回測定した結果、各成分とも安定した回収率が得られた。糖類と糖アルコール類の混在する試料でも各成分の定量値に与える影響は、認められなかった。

3.4 しょ糖とデキストリンの混合試料の測定

しょ糖とデキストリン（DE 値：3~4, 7~9, 10~12）の混合試料中のデキストリンを酵素分解した結果を Table 8 に示した。デキストリンは酵素によりグルコース単位まで完全に分解したものと考えられるため、デキストリンの含有量は、次の式で求められる。

$$\text{デキストリン量} = \text{グルコース} \times 0.9$$

Table 8 Recovery of sugar and Dextrin in sugar preparation

Sugar		Dextrin	
Standard(%)	Anal. Val. (%)	Dextrin(DE) (%)	Glucose(%)
80	79.32	20 (3~ 4)	19.66
90	88.38	10 (3~ 4)	9.67
80	79.98	20 (7~ 9)	19.66
90	88.01	10 (7~ 9)	9.24
80	80.02	20 (10~12)	20.50
90	88.34	10 (10~12)	9.66

3.5 しょ糖、グルコース及び還元水飴の定量

還元水飴（Hydrogenated Starch Hydrolyzates）のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

(1) 2. 3. 3-①の還元水飴を α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼで分解したものの結果を、Fig. 4に示す。これにより混合前の還元水飴のマルチトール生成率を求めたところ、還元水飴100に対し25.8のマルチトールが得られた。

(2) 2. 3. 3-②のしょ糖、グルコース及び還元水飴の混合物の結果を Fig. 5に示す。グルコースとしょ糖のピークは検出されるが、還元水飴を構成する糖アルコールはほとんど検出されない。定量した結果、しょ糖83%とグルコース11.4%が得られた。

(3) 2. 3. 3-③のしょ糖、グルコース及び還元水飴の混合物を α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼで分解したものの結果を Fig. 6に示す。グルコースとしょ糖のピークは確認できるが、マルチトールのピークはしょ糖と重なり確認ができない。

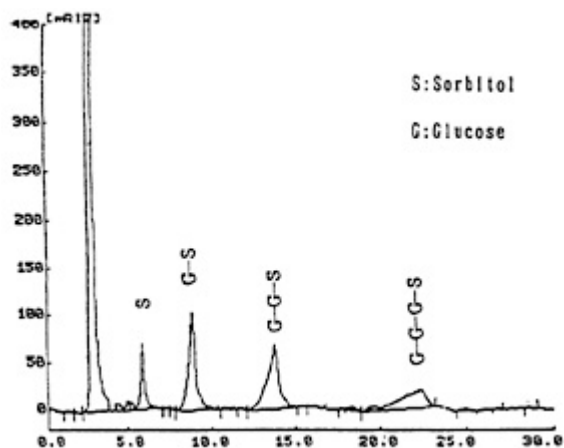


Fig. 3 Chromatogram of hydrogenated starch hydrolyzates
Column : YMC-pack Popyamin
Eluent : Acetonitrile/water=75/25

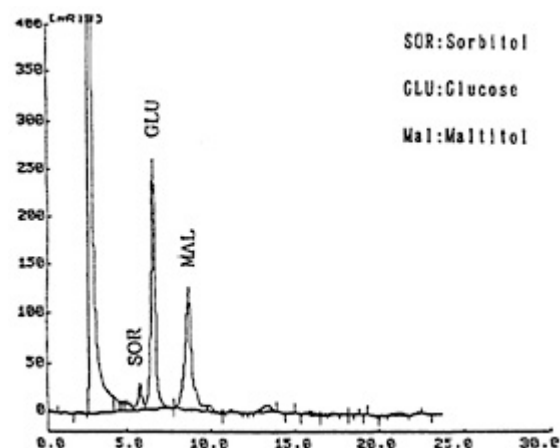


Fig. 4 Chromatogram of hydrolysis products by glucoamylase and α-amylase of the hydrogenated starch hydrolyzates

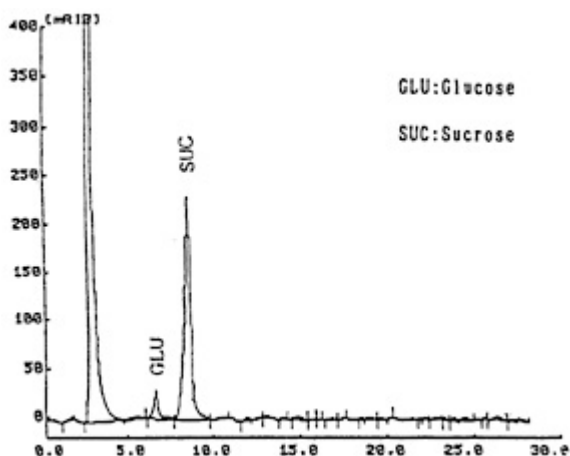


Fig. 5 Chromatogram of sugar preparation
(Sucrose : 83%, Glucose : 11% and
Hydrogenated starch hydrolyzates : 6%)

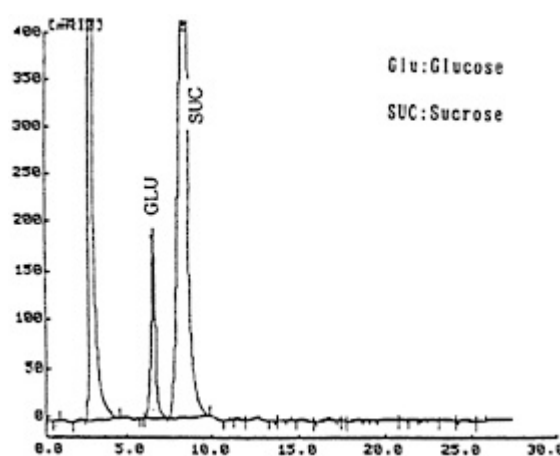


Fig. 6 Chromatogram of hydrolysis products by glucoamylase and α-amylase of the sugar preparation
(Sucrose : 83%, Glucose : 11% and Hydrogenated
starch hydrolyzates : 6%)

(4) 2. 3. 3-④のしょ糖, グルコース及び還元水飴の混合物をα-アミラーゼ, グルコアミラーゼ及びインペルターゼで分解したものの結果を Fig. 7に示す。

インペルターゼでしょ糖を分解すると, Fig. 6で確認できなかったマルチトールのピークが分離できた。

還元水飴の含有量は次のとおりである。

$$\text{還元水飴量(\%)} = \frac{\text{2-3-3の④のマルチトール量}}{\text{2-3-3の①のマルチトール量}} \times 100$$

上記の式より求めると5.8%が得られた。

還元水飴の配合割合の高いものについては, 糖類の測定に影響を及ぼす恐れがあるので, しょ糖をインペルターゼで分解し果糖からしょ糖を求める方法等も考えられ, さらに検討が必要である。

また, 砂糖調製品は砂糖に混合した原料の製造方法がそれぞれ異なるので, 正確な値を求めるには, 混合した原料と比較分析することが望ましい。

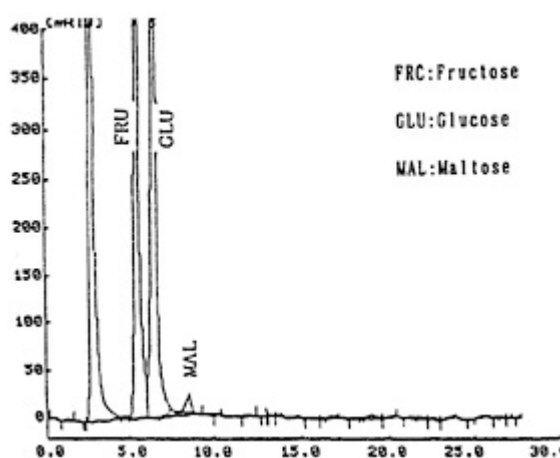


Fig. 7 Chromatogram of hydrolysis products by glucoamylase, α-amylase and invertase of the sugar preparation
(Sucrose : 83%, glucose : 11% and Hydrogenated
starch hydrolyzates : 6%)

3.6 カラムの検討

Polyspher CH CA：砂糖調製品を分析するためのカラムとしては、溶離液に蒸留水を用いるためにベースラインの安定が良く、低濃度から定量が可能である。

また、数週間にわたり測定したが、再現性も良くランニングコストが低いなどの利点がある。しかし、マルチトールとグルコースのピークが重なるために、マルチトールとグルコースが混在している試料は、両者の定量が困難である。

YMC-Polyamin：砂糖調製品を分析するためのカラムとしては、順相カラムのため低分子量の成分の分離が良く、シャープなピークが得られる。しかし、アセトニトリル等の有機溶剤を使用し、マルチトールとしょ糖のピークが重なるために、さらにしょ糖を酵素分解した後、マルチトールの定量を行う必要

がある。

4 要 約

しょ糖に糖アルコール、デキストリン、還元水飴等の混在する試料の HPLC による定量方法について検討した。

移動相に水系のカラムを用いた場合には、ベースラインの安定が非常に良く、低濃度からの定量が可能である。しょ糖と糖類及び糖アルコール類の検量線は、0.1%～1.0%の範囲で直線関係を示した。

また、還元水飴を含有する砂糖調製品も、酵素分解後、順相のカラムで還元水飴を定量することができた。