

パルスドアンペロメトリー検出器（PAD）を用いた 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による糖類の定量分析

榎本 敬次*, 磯田 育恵*, 平元 秀和*, 中村 文雄*

Quantitative Analysis of Sugars by High-performance Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detector

Keiji ENOMOTO*, Ikue ISOTA*, Hidekazu HIRAMOTO* and Fumio NAKAMURA*

*Osaka Customs Laboratory

4-11-28, Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka 559-0031 Japan

In customs laboratories, the quantitative analysis of sugars is carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index detector (RID). In this study, the quantitative analysis method with pulsed amperometric detector (PAD) was compared with the conventional method and was found to be superior.

1. 緒 言

輸入食品中の糖類の含有量の定量は、関税率表上等の取り扱いを決定する上で重要な因子となっている。

特に、関税率表番号第 19.02 項、第 20.01 項から第 20.05 項まで及び第 21.06 項に掲げる「調製食料品（砂糖を加えたもの）」は、国内分類例規において、砂糖の含有量が全重量の 2%以下の調製食料品を含まない取扱いとされていることから、微量のしょ糖の定量が必要となっている。

また、関税率表番号第 19.01 項及び第 21.06 項に規定する第 04.01 項から第 04.04 項までの物品の調製食料品（ミルクの天然の組成分の含有量の合計が乾燥状態において全重量の 30%以上のものに限る。）は、高関税率が適用されるので、ミルクの天然の組成分のひとつである乳糖の定量も非常に重要である。

現在、上記の分析は、主に示差屈折率検出器（RID）を用いて、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により行っている¹⁾。また、蒸発光散乱検出器（ELSD）を用いた定量分析も検討されている²⁾が、本研究では、糖類を選択的に検出できるため夾雜物の影響を受けにくく、単糖類、オリゴ糖、多糖類を高感度に分析できるとされているパルスドアンペロメトリー検出器（PAD）を用い、それに高アルカリ対応の陰イオン交換カラムを組み合わせたしょ糖及び乳糖の定量分析法を検討し、示差屈折率検出器を用いた定量分析方法と比較したので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

しょ糖、乳糖、果糖、ぶどう糖、麦芽糖、マンノース、キシロース、セロビオース：試薬特級（キシダ化学製）
ソルビトール、イノシトール、マンニトール：
試薬特級（キシダ化学製）
エリスリトール、キシリトール、マルチトール：
試薬（東京化成製）
グリセリン、水酸化ナトリウム、くえん酸、硫酸ナトリウム：
試薬特級（キシダ化学製）
塩化ナトリウム：試薬 1 級（キシダ化学製）
アセトン：HPLC 用（キシダ化学製）
超純水：純水製造装置（MILLIPORE SIMPLICITY UV）で製造
したもの用いた。

2.2 分析装置及び測定条件

(1) HPLC : LC-2000 (日本分光)

パルスドアンペロメトリー検出器： ICA-5212 (東亜 DKK)
カラム： TOA-DKK PCI-510 (4.6 mm I.D. × 250 mmL)
ガードカラム： TOA-DKK PCI-510G
カラム温度： 室温
移動相： 100 mM 水酸化ナトリウム水溶液
流量： 1.0 ml/min
注入量： 20 µl

(2) HPLC : LC-2000 (日本分光)

* 大阪税関業務部分析部門 〒559-0031 大阪府大阪市住之江区南港東 4-11-28

示差屈折率検出器 : RI-2031Plus (日本分光)
 カラム : MITSUBISHI MCI GEL CK08EC (8 mm I.D. × 300 mmL)
 ガードカラム : MITSUBISHI MCI GEL CK08ECG
 カラム温度 : 75°C
 移動相 : 水
 流量 : 0.6 ml/min
 注入量 : 20 μ l

(3) HPLC : Agilent1100 (Agilent)

示差屈折率検出器 : Shodex RI-71 (昭和電工)
 カラム : Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm I.D. × 250 mmL)
 ガードカラム : Shodex Asahipak NH2P-50G 4A
 カラム温度 : 40°C
 移動相 : アセトン/水 (80/20)
 流量 : 0.5 ml/min
 注入量 : 20 μ l (溶媒組成 : アセトン/水 = 80/20)

2.3 実験方法

2.3.1 糖類の分離について

しょ糖、乳糖、果糖、ぶどう糖、麦芽糖、ソルビトール及びグリセリンの分離を 2.2 の各測定条件において検討した。分析の際の濃度は、測定条件(1)については 100 mg/l 水溶液、測定条件(2)については 10000 mg/l 水溶液、測定条件(3)については 2000 mg/l 水溶液 (10000 mg/l 水溶液をアセトンで 5 倍希釈) とした。

また、測定条件(1)については、上記に加えて、イノシトール、エリスリトール、キシリトール、マンニトール、マルチトール、マンノース、キシロース及びセロビオースについて、保持時間を測定した。

2.3.2 検出器の選択性について

糖類を分析する際、夾雑物として分析試料に含まれる可能性のあるくえん酸、塩化ナトリウム及び硫酸ナトリウムの 10000 mg/l 水溶液を測定条件(1)及び(2)で分析を行い、糖類を選択的に検出できる可能性について検討した。

2.3.3 検量線の直線性について

測定条件(1)については、5 mg/l ~ 500 mg/l の濃度範囲、測定条件(2)については、25 mg/l ~ 20000 mg/l の濃度範囲、測定条件(3)

については、50 mg/l ~ 4000 mg/l の濃度範囲のしょ糖及び乳糖を分析し、濃度とピーク面積の関係について検討した。

2.3.4 定量下限について

各測定条件において、検出下限付近濃度 (測定条件(1)については 0.5 mg/l、測定条件(2)及び(3)については 20 mg/l) のしょ糖及び乳糖を添加した試料を繰返し (15 回) 測定し、その標準偏差から求める方法 (JIS K 0136 12.2(a)³⁾ 参照) を用いて、しょ糖及び乳糖の検出下限を求め、その 10/3 倍を定量下限とした。

2.3.5 繰返し性について

各測定条件において、濃度 100 mg/l のしょ糖を繰返し (6 回) 分析し、ピーク面積の相対標準偏差を求めた。

2.3.6 回収率について

米粉約 4.9 g 及びしょ糖約 0.1 g を 100 ml メスフラスコに精ひょうし、内標準として 10000 mg/l ソルビトール水溶液を 3 ml 加え定容後、これをろ紙でろ過し、再び 100 ml メスフラスコに 10 ml 採取し定容後、測定条件(1)で分析した。この精ひょうからの全操作をそれぞれ 6 回行い、しょ糖の回収率を求めた。

次に、しょ糖約 0.65 g、乳糖約 0.15 g 及び塩化ナトリウム約 0.06 g を 100 ml メスフラスコに精ひょうし、内標準として約 10000 mg/l ソルビトール水溶液を 10 ml 加え定容後、これを再び 100 ml メスフラスコに 3 ml 採取し定容後、測定条件(1)で分析した。同じくこの精ひょうからの全操作をそれぞれ 6 回行い、しょ糖及び乳糖の回収率を求めた。

3. 結果及び考察

3.1 糖類の分離について

2.3.1 のクロマトグラムを Fig.1 に示す。PAD を用いた測定条件(1)では、7 種類の試料に対して完全分離 (分離度 2.0 以上) した。一方、測定条件(2)では、しょ糖、乳糖及び麦芽糖が分離しなかつた。測定条件(3)では、乳糖と麦芽糖及び果糖とソルビトールが分離しなかつた。

また、測定条件(1)についての各種の糖及び糖アルコールの保持時間を Table 1 に示す。

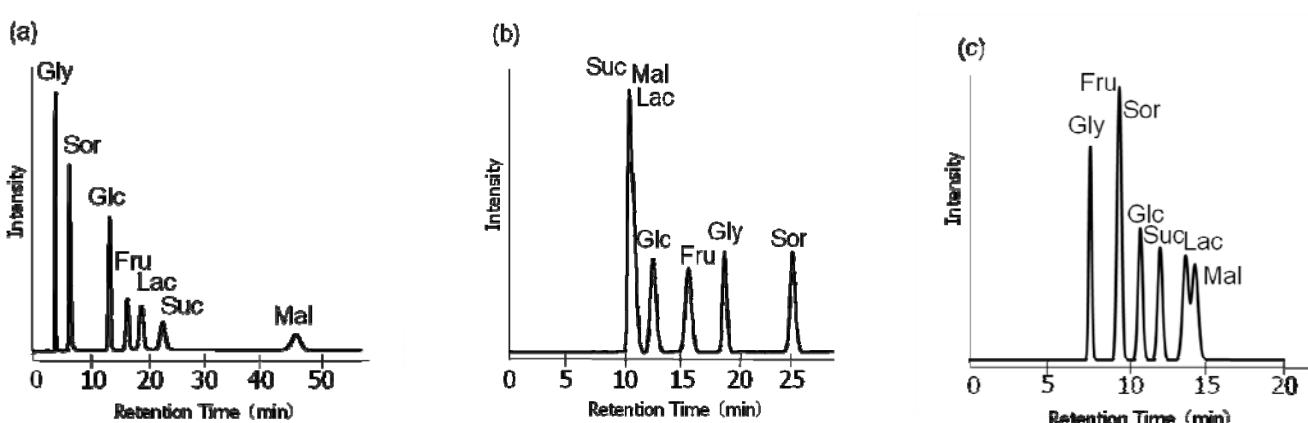


Fig.1 Chromatograms of mixed sugars (Suc: sucrose, Lac: lactose, Fru: fructose, Glc: glucose, Mal: maltose, Sor: sorbitol, Gly: glycerin)
 (a) measurement condition (1) (b) measurement condition (2) (c) measurement condition (3)

Table 1 Retention time of sugars and sugar alcohols

Sugar	Retention time (min)
mannose	12.0
glucose	12.8
xylose	13.9
fructose	17.3
lactose	18.8
sucrose	22.7
cellobiose	28.6
maltose	46.8

Sugar alcohol	Retention time (min)
inositol	3.3
erythritol	4.1
xylitol	4.7
sorbitol	6.2
mannitol	6.9
maltitol	14.7

3.2 検出器の選択性について

PAD を用いた測定条件(1)では、くえん酸、塩化ナトリウム及び硫酸ナトリウムをいずれも検出しなかったが、測定条件(2)では、いずれも検出した。例として、硫酸ナトリウムに関するクロマトグラムを Fig.2 に示す。

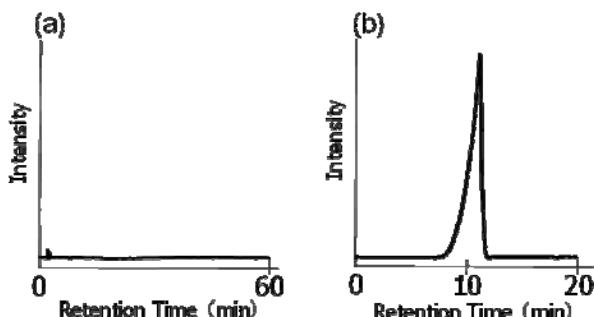


Fig.2 Chromatograms of sodium sulfate
(a) measurement condition (1)
(b) measurement condition (2)

3.3 検量線の直線性について

測定条件(2)及び(3)については、2.3.3 にある濃度範囲において、原点付近を通る良好な直線性(測定条件(2)のしょ糖の相関係数: $R^2=0.999998$ 、乳糖の相関係数: $R^2=0.999995$ 、測定条件(3)のしょ糖の相関係数: $R^2=0.9997$ 、乳糖の相関係数: $R^2=0.9998$)を示した。

一方、測定条件(1)については、しょ糖及び乳糖共に 5 mg/l～200 mg/l の濃度範囲では、原点付近を通る良好な直線性(しょ糖の相関係数: $R^2=0.99994$ 、乳糖の相関係数: $R^2=0.99994$)を示したが、濃度が 300 mg/l 以上になると、良好な直線性を示さなくなつた (Fig.3)。

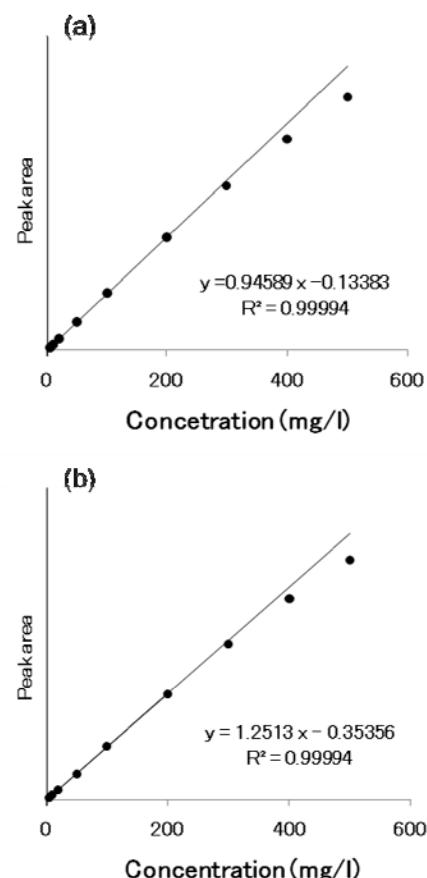


Fig.3 Relationship between concentration and peak area
(a) sucrose
(b) lactose
(Correlation formula is based on a value from 5 mg/l to 200 mg/l)

3.4 定量下限について

2.3.4 の結果を Table 2 に示す。PAD を用いた測定条件(1)は、測定条件(2)及び(3)よりも定量下限が約 10～50 倍低かった。

Table 2 Limit of quantitation of three measurement conditions

Measurement condition	Limit of quantitation of sucrose (mg/l)	Limit of quantitation of lactose (mg/l)
(1)	1.27	1.03
(2)	14.7	23.8
(3)	44.7	56.0

3.5 繰返し性について

2.3.5 の結果を Table 3 に示す。濃度 100 mg/l のしょ糖を用いた場合は、PAD を用いた測定条件(1)は、測定条件(2)及び(3)よりも繰返し性がよかつた。

Table 3 Repeatability of three measurement conditions in 100 mg/l

Measurement condition	RSD (n=6)
(1)	0.59%
(2)	1.15%
(3)	2.51%

3.6 回収率について

米粉約 4.9 g 及びしょ糖約 0.1 g の混合物を分析した際のしょ糖の回収率は平均 100.26% (RSD=1.16%、n=6) であった。また、しょ糖約 0.65 g、乳糖約 0.15 g 及び塩化ナトリウム約 0.06 g の混合物を分析した際のしょ糖及び乳糖の回収率は、それぞれ平均 100.44% (RSD=1.12%、n=6) 及び 99.62% (RSD=0.49%、n=6) であった。

4. 要 約

PAD を用いた HPLC による糖類の定量分析法について検討を行った。PAD は従来使用していた RID と比較すると、くえん酸、塩化ナトリウム及び硫酸ナトリウムのような夾雑物に対して、糖類を選択的に検出できるとともに、糖類の定量下限が低く、低濃度における繰返し性も良いことから、糖類の微量分析に適している優れた検出器であることがわかった。また、高アルカリ対応の陰イオン交換カラムを用いることによって、糖類の良好な分離ができることもわかった。今後、PAD と高アルカリ対応の陰イオン交換カラムを用い、移動相組成やグラジエント分析を検討することによって、多種多様な糖及び糖アルコールのより良好な分離・定量が期待できる。

文 献

- 1) 中村文雄、東郷雅子、廣瀬達也、岩本和郎：関税中央分析所所報、**36**、9 (1997).
- 2) 三浦誠、上野勝、三浦徹、渡邊裕之、三枝朋樹：関税中央分析所所報、**48**、21 (2008).
- 3) JIS K 0136、高速液体クロマトグラフィー質量分析通則 (2004).