

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による糖類の定量分析法について

増田 靖子*, 徳島 將光*, 五十嵐 智大*, 松本 啓嗣*

Quantitative analytical method of sugars by high performance liquid chromatography (HPLC)

MASUDA Seiko*, TOKUSHIMA Masamitsu*, IGARASHI Tomohiro* and MATSUMOTO Yoshitsugu*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Imported foods may have different classifications on the present Customs Tariff Schedule depending on the percentage of sugars content. HPLC is often used for the quantitative analysis of sugars. Depending on the type of column, inorganic cations and the reducing sugars in the test solution may damage the column and may have a negative effect on the quantitative analysis results. In this study, we investigated the sample preparation method and the separation conditions of HPLC using various columns. As a result, it was possible to perform deproteinization by preparing a test solution using a 50% acetonitrile aqueous solution without dissolving the inorganic cations derived from the deproteinizing agent in the test solution. In addition, with respect to the three types of HILIC columns that were newly investigated, by determining the separation conditions and internal standard substances, it became possible to perform accurate quantitative analysis of sucrose regardless of the composition of the sample requested for analysis. From the results of the addition recovery test using simulated samples, it was confirmed that the improved analytical method using three types of HILIC columns enables quantitative analysis of sucrose comparable to the Customs Analytical Method No.108. For lactose as well, the results were comparable to the Customs Analytical Method No.108, depending on the types of simulated samples and the combination of columns.

1. 緒 言

輸入される食品の中には、含有する糖類の割合により関税率表上の分類が異なるものがあるため、糖類の正確な定量は必要不可欠である。糖類の定量分析法は、税関分析法 No.108「菓子類のしょ糖分の定量分析法」等に規定されているが、規定された定量分析法のうち、様々な糖類の混合物でも特定の糖を選択的に定量することが可能で、かつ、データの客観性に優れる高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」という。）を選択することが多い。

税関分析法に規定する HPLC による糖類の定量分析法（以下「現行法」という。）においては、配位子交換カラム又はアミノカラムにより分離及び定量を行うことになっているが、いずれのカラムを使用する場合にも、以下の点について改善が望まれる。

① 配位子交換カラムの対イオンが置換されてしまうこと

現行法で調製した試料検液中には、除たんぱく剤由来の亜鉛及びバリウムが含まれ、試料由来のナトリウム、カルシウム等が多量に含まれる場合もある。しかし、配位子交換カラムを使用する際、カラムの対イオン以外の無機陽イオンが試料検液中に存在すると、カラムの対イオンがこれらの無機陽イオンに置換されてしまう^{1,2)}。これにより、カラムに充填されているゲルの密度が変化してカラムが破損するおそれがあるほか、カラムの分離能が低下し、定量分析結果に悪影響を及ぼすおそれがある。

② アミノカラムに還元糖が結合してしまうこと

アミノカラムを使用する際、還元糖が試料検液中に存在すると、還元糖のアルデヒド基とカラムのアミノ基がシップ塩基を形成し、化学的に結合する。これにより、カラムの分離能が低下し、定量分析結果に悪影響を及ぼすおそれがある³⁾。

③ 分析に適したカラムの選択が難しいこと

実際の分析依頼試料には、しょ糖、乳糖等の定量対象となる糖以外にも、ぶどう糖、果糖、麦芽糖等の糖類やソルビトール等の糖アルコール類を含有している場合があるが、カラムごとに分離可能な糖類や糖アルコール類が異なるため、分析依頼試料に適したカラムの選択が困難となっている。また、本来は分離可能なカラムであっても、前記①又は②の理由によりカラムの分離能が低下している場合には分離が不完全となり、定量分析結果に悪影響を及ぼすおそれがある。

④ 分析に適した内標準物質の選択が難しいこと

内標準物質として、現行法ではソルビトール、グリセリン等を使用するよう規定しているが、ソルビトールは分析依頼試料に含まれている場合があり、内標準物質として使用できない場合がある。また、グリセリンはアミノカラムでは保持時間が小さすぎるため、試料検液中の夾雜成分と分離が十分でない場合が想定され、そのような場合には定量分析結果に悪影響を及ぼすおそれがある。

そこで本研究では、糖類のうち定量分析を依頼される頻度の高いしょ糖及び乳糖について、以上の点を改善した試料調製法（以下「改良法」という。）及び分離条件等について検討したので報告

する。

2. 実験

2.1 試薬、試料及び器具

2.1.1 試薬

ショ糖、乳糖一水和物（以下「乳糖」という。）、麦芽糖一水和物（以下「麦芽糖」という。）、ぶどう糖、果糖、ソルビトール、マンニトール、マルチトール、ジヒドロキシアセトン二量体、ペンタエリトリトール、グルコサミン塩酸塩、ラクチトール、ツラノース、アミグダリン n 水和物、グリセリン、トリエチルアミン（富士フィルム和光純薬）

トリメチロールプロパン、メソエリトリトール、N-アセチルグルコサミン、ラクツロース、サリシン（東京化成工業）

イットリウム標準液、ナトリウム標準液、カリウム標準液、カルシウム標準液、亜鉛標準液、バリウム標準液 1000 ppm（富士フィルム和光純薬）

キシリトール（シグマアルドリッヂ）

ジグリセロール（ナカライテスク）

イソマルトース（林原）

F-キット 乳糖/D-ガラクトース（以下「F-キット」という。）

Roche / R-Biopharm

2.1.2 試料

市販品：小麦粉（薄力粉）、全粉乳、カカオ脂、乳児用粉ミルク、製菓用ミックス粉、脱脂粉乳

輸入品：大豆たんぱく質、砂糖調製品（ショ糖 82.8%、食塩 17.2%）

ICP 用模擬試料：脱脂粉乳に塩化ナトリウム 5% 及び塩化カリウム 1% を添加したもの

F-キット用模擬試料：小麦粉にショ糖 30% 及び乳糖 15% を添加したもの並びにカカオ脂にショ糖 30% 及び乳糖 15% を添加したもの

2.1.3 器具

陽イオン交換カートリッジ：TOYOPAK IC-SP M（東ソー）

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）

装置：NICOLET 6700（Thermo SCIENTIFIC）

2.2.2 ICP 発光分析装置（ICP-OES）

装置：ICPS-8100（島津製作所）

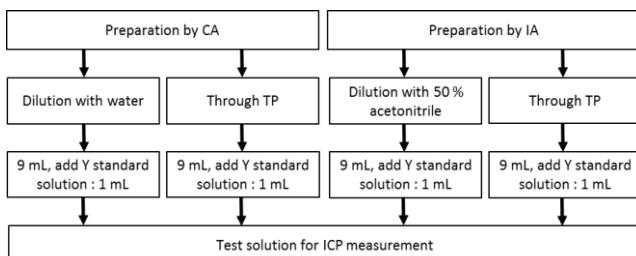


Fig. 1 Flowchart of sample preparation for ICP measurement.

2.2.3 HPLC

装置：1260 Infinity II（Agilent Technologies）

検出器：示差屈折率検出器

分離カラム：

- ① Asahipak NH2P-50 4E, 250 × 4.6 mm I.D., 粒径 5 μm (Shodex)
- ② HILICpak VG-50 4E, 250 × 4.6 mm I.D., 粒径 5 μm (Shodex)
- ③ XBridge BEH Amide, 150 × 4.6 mm I.D., 粒径 2.5 μm (Waters)
- ④ RSpak DC-613, 150 × 6.0 mm I.D., 粒径 6 μm (Shodex)
- ⑤ Shim-pack SCR-101C, 300 × 7.9 mm I.D., 粒径 10 μm (島津製作所)

カラム①～③は、親水性相互作用クロマトグラフィーカラム（以下「HILIC カラム」という。カラム①は特に「アミノカラム」という。）、カラム④は、HILIC と配位子交換を組み合わせたカラム（対イオン：Na⁺）、カラム⑤は配位子交換カラム（対イオン：Ca²⁺）である。なお、カラム①及び⑤は現行法に記載されているカラムである。

2.2.4 紫外可視分光光度計

装置：V-660（日本分光）

測定波長：340 nm

2.3 実験

2.3.1 除たんぱく剤の検討

現行法で使用している、無機陽イオンを多量に含む除たんぱく剤を使用しない試料調製法を検討した。

まず、小麦粉、全粉乳及びカカオ脂各 1 g を三角フラスコに量り取り、50% エタノール水溶液、70% エタノール水溶液又は 50% アセトニトリル水溶液各 10 mL を加え、50 °C の温浴中で 30 分間振とうし、そのろ液を蒸発させ、残留物中のたんぱく質の有無を FT-IR により確認した。また、乳児用粉ミルク、製菓用ミックス粉及び大豆たんぱく質各 1 g について 50% アセトニトリル水溶液 10 mL を用いて同様に操作し、残留物中のたんぱく質の有無を FT-IR により確認した。

2.3.2 無機陽イオンの除去の確認

ICP 用模擬試料及び輸入品の砂糖調製品について、現行法及び 2.3.1 で決定した除たんぱく剤を使用した改良法により調製した試料検液中の無機陽イオン濃度の差異並びに陽イオン交換カートリッジの効果を確認するため、Fig. 1 に従って試料検液を調製し、ICP-OES を用いて無機陽イオンの濃度を測定した。

Table 1 Analytical method and equipment used in this study.

Name	Abbreviation
Current analytical method (No.108)	CA
Improved analytical method	IA
Cation exchange cartridge (TOYOPAK IC-SP M)	TP

なお、本研究では糖類の抽出液 1 mL に対して陽イオン交換カートリッジ 1 本を使用した。

図及び表に用いた英略称を、Table 1 に示す (2.3.4 の表及び図においても同じ。).

2.3.2.1 現行法による調製

ICP 用模擬試料 10 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、現行法により調製した検液について、測定元素の濃度が 2.3.2.3 で調製する検量線用検液の元素濃度と同程度になるように水で希釈した溶液及び陽イオン交換カートリッジに通した溶液を調製し、これらをそれぞれ異なる三角フラスコに正確に 9 mL 取り、次いでイットリウム標準液を内標準物質として正確に 1 mL 加え混和したものを、ICP 用検液とした (Fig. 1)。

砂糖調製品についても同様に調製した。このとき、試料採取量は約 1.2 g とした。

2.3.2.2 改良法による調製

ICP 用模擬試料 5 g を 50 mL 容メスフラスコに量り取り、改良法により調製した検液について、測定元素の濃度が 2.3.2.3 で調製する検量線用検液の元素濃度と同程度になるように 50 % アセトニトリル水溶液で希釈した溶液及び陽イオン交換カートリッジに通した溶液を調製し、これらをそれぞれ異なる三角フラスコに正確に 9 mL 取り、次いでイットリウム標準液を正確に 1 mL 加え混和したものを、ICP 用検液とした (Fig. 1)。

砂糖調製品についても同様に調製した。このとき、試料採取量は約 1.2 g とした。

2.3.2.3 検量線用検液の調製

ナトリウム標準液、カリウム標準液、カルシウム標準液、亜鉛標準液及びバリウム標準液 10 mL ずつを同一の 100 mL 容メスフラスコに正確に取った。この標準混合液を 2 本用意し、現行法用は水で、改良法用はアセトニトリルで定容した。これらをそれぞれ異なる三角フラスコに正確に 9 mL 取り、次いでイットリウム標準液を正確に 1 mL 加え混和したものを、検量線用検液とした。

2.3.3 糖類の分離条件及び内標準物質の検討

アミノカラム及び配位子交換カラムの他に糖類の分析が可能なカラムとして、アミノカラム以外の種々の HILIC カラムが市販されている。そのような HILIC カラムの一種であるカラム②～④において、しょ糖及び乳糖に対し、分析依頼試料に含まれていることの多いぶどう糖、果糖、麦芽糖及びソルビトールが完全に分離可能な温度、流速及び移動相の条件を検討した。決定した分離条件を用いて適切な内標準物質を検討した。また、カラム①及び⑤においても適切な内標準物質を検討した。

なお、アミノカラムであるカラム①は、前述のとおり還元糖を含む試料検液の分析には適さないため、還元糖の標準試薬及び 2.3.4 における全粉乳を用いた模擬試料は測定しなかった。また、小麦粉及びカカオ脂を用いた模擬試料については、しょ糖のみを添加して試験した。カラム⑤はしょ糖や乳糖等の二糖類の相互分離が不十分であるため、2.3.4 の添加回収試験においては全粉乳を用いた模擬試料の測定は行わず、また、小麦粉及びカカオ脂を用いた模擬試料については、しょ糖及び乳糖は同時に添加せず、個別に模擬試料を調製して測定した。

内標準物質の候補として、マンニトール、マルチトール、ジヒ

ドロキシアセトン二量体、ベンタエリトリトール、グルコサミン塩酸塩、ラクチトール、ツラノース、アミグダリン n 水和物、グリセリン、トリメチロールプロパン、メソエリトリトール、N-アセチルグルコサミン、ラクツロース、サリシン、キシリトール、ジグリセロール及びイソマルトースを検討した。

2.3.4 添加回収試験

しょ糖及び乳糖について、小麦粉、全粉乳及びカカオ脂を用いた模擬試料を作成し、添加回収試験を行った。

表に用いた英略称を Table 2 に、作成した模擬試料を Table 3 に示す。

Table 2 Samples used in this study.

Name	Abbreviation
Flour	FL
Whole milk powder	WMP
Cocoa butter	CB

2.3.4.1 現行法によるしょ糖の添加回収試験

現行法に記載のあるカラム①を用いて、現行法でのしょ糖の回収率を求めた。

100 mL 容メスフラスコに Table 3 の各物質を量り取り、現行法により調製した (n=3)。このとき内標準物質は、10 % ソルビトール水溶液を用いて、Table 3 に示す添加量分を検液中に正確に加えた。検液中のしょ糖濃度は 0.5 % となる。この検液を現行法に規定された条件で測定し、回収率を求めた。なお、前述のとおり全粉乳を用いた模擬試料は測定しなかった。

検量線用検液を次のとおり調製した。しょ糖 1 g を量り取り、水で 100 mL に定容した溶液の 15 mL, 25 mL 及び 40 mL をそれぞれ異なる 50 mL 容メスフラスコに正確に分取し、次いで 10 % ソルビトール水溶液を正確に 2.5 mL 加え、水で定容した。

2.3.4.2 改良法によるしょ糖の添加回収試験

カラム①～⑤を用いて、改良法でのしょ糖の回収率を求めた。

3.5 の手順に従い、改良法による模擬試料の検液を調製した (n=3)。このとき、50 mL 容メスフラスコに量り取る各物質の量は Table 3 に示すとおりとし、3.3 に記載している内標準物質の水溶液を用いて、Table 3 に示す添加量分を検液中に正確に加えた。しょ糖を 1 g 添加した模擬試料の検液中のしょ糖濃度は 1 % となる。この検液を 3.3 に記載の条件で測定してしょ糖の回収率を求め、2.3.4.1 で求めた現行法での回収率と比較した。

カラム①については、前述のとおり全粉乳を用いた模擬試料は測定しなかった。カラム④については対イオンが Na^+ の配位子交換カラムであり、 Ca^{2+} を含有する全粉乳を用いた模擬試料の測定には前述のとおり適さないため、改良法により調製した検液をさらに陽イオン交換カートリッジに通した検液について測定した。カラム⑤については前述のとおり、しょ糖のみを添加して検液を調製し測定した。

検量線用検液を次のとおり調製した。しょ糖 3.5 g を量り取り、

Table 3 Simulated samples for HPLC measurement used in this study (n = 3).

Method	Column	Simulated samples for HPLC measurement	Added component (g)					Internal standard (g)
			FL	WMP	CB	Sucrose	Lactose	
CA	①	FL (Sucrose 30 % added)	1.16	-	-	0.5	-	0.5
		CB (Sucrose 30 % added)	-	-	1.16	0.5	-	0.5
IA	①	FL (Sucrose 30 % added)	2.33	-	-	1	-	1
		CB (Sucrose 30 % added)	-	-	2.33	1	-	1
②	②	FL (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	1.83	-	-	1	0.5	1
		FL (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	0.916	-	-	0.5	0.25	0.5
		WMP (Sucrose 50 % added)	-	0.5	-	0.5	-	0.5
		WMP (Sucrose 50 % added)	-	0.25	-	0.25	-	0.5
		CB (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	-	-	1.83	1	0.5	1
		CB (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	-	-	0.916	0.5	0.25	0.5
③	③	FL (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	0.916	-	-	0.5	0.25	0.5
		WMP (Sucrose 50 % added)	-	0.5	-	0.5	-	0.5
		CB (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	-	-	0.916	0.5	0.25	0.5
④	④	FL (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	1.83	-	-	1	0.5	1
		FL (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	0.916	-	-	0.5	0.25	0.5
		FL (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	0.458	-	-	0.25	0.125	0.25
		FL (Sucrose 30 % and lactose 15 % added) + TP	1.83	-	-	1	0.5	1
		WMP (Sucrose 50 % added) + TP	-	0.5	-	0.5	-	0.5
		CB (Sucrose 30 % and lactose 15 % added)	-	-	1.83	1	0.5	1
⑤	⑤	FL (Sucrose 30 % added)	1.16	-	-	0.5	-	0.5
		FL (Lactose 15 % added)	1.416	-	-	-	0.25	0.5
		CB (Sucrose 30 % added)	-	-	1.16	0.5	-	0.5
		CB (Lactose 15 % added)	-	-	1.416	-	0.25	0.5

水で 50 mL に定容した溶液の 5 mL, 10 mL 及び 20 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコに正確に分取し、次いで 3.3 に記載している内標準物質の 10% 水溶液を正確に 10 mL 加えた。カラム①～④を使用する場合は水量が合計で約 50 mL となるよう水を加えたのちアセトニトリルで定容し、カラム⑤を使用する場合は水で定容した。

2.3.4.3 陽イオン交換カートリッジによる回収率への影響の確認

陽イオン交換カートリッジによる回収率への影響の確認を行うため、カラム④における小麦粉を用いた模擬試料については、陽イオン交換カートリッジを通した検液も調製し (Table 3), 測定した。

2.3.4.4 現行法による乳糖の添加回収試験

乳糖の定量分析の現行法として、F-キットを用いた酵素法により、乳糖の回収率を求めた。

F-キット用模擬試料各 4 g をそれぞれ 100 mL 容メスフラスコに量り取り、F-キットの取扱説明書に従い調製した (n=3)。このとき、小麦粉を用いた模擬試料は除たんぱくを、カカオ脂を用いた模擬試料は脱脂を行ったうえで調製した。検液中の乳糖濃度は 0.6 mg / mL となる。

検量線用検液を次のとおり調製した。乳糖 0.75 g を量り取り、水で 50 mL に定容した溶液の 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL 及び 6 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコに正確に分取し、水で定容した。

これらの模擬試料検液及び検量線用検液について、F-キットの取扱説明書に従い、紫外可視分光光度計で測定し、乳糖の回収率を求めた。

2.3.4.5 改良法による乳糖の添加回収試験

カラム②～⑤を用いて、改良法での乳糖の回収率を求めた。

3.5 の手順に従い、改良法による模擬試料の検液を調製した (n = 3)。このとき、50 mL 容メスフラスコに量り取る各物質の量は Table 3 に示すとおりとし、3.3 に記載している内標準物質の水溶液を用いて、Table 3 に示す添加量分を検液中に正確に加えた。乳糖を 0.5 g 添加した模擬試料の検液中の乳糖濃度は 0.5 % となる。この検液を 3.3 に記載の条件で測定して乳糖の回収率を求め、2.3.4.4 で F-キットを用いて求めた回収率と比較した。

カラム④については上記改良法の検液に加え、2.3.4.3 と同様に陽イオン交換カートリッジを通した検液を調製し測定した。また、カラム⑤については前述のとおり、乳糖のみを添加して検液を調製し測定した。

検量線用検液を次のとおり調製した。乳糖 1.75 g を量り取り、水で 50 mL に定容した溶液の 5 mL, 10 mL 及び 20 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコに正確に分取し、次いで 3.3 に記載している内標準物質の 10 % 水溶液を正確に 10 mL 加えた。カラム②～④を使用する場合は水量が合計で約 50 mL となるよう水を加えたのちアセトニトリルで定容し、カラム⑤を使用する場合は水で定容した。

2.3.5 改良法の決定

2.3.1, 2.3.2 及び 2.3.4 の結果から総合的に判断し、糖類の新たな試料調製法を決定した。

3. 結果及び考察

3.1 除たんぱく剤の検討

小麦粉については、50 % 及び 70 % エタノール水溶液を使用した場合は残留物中にたんぱく質の吸収 (アミド I : 1650 cm⁻¹ 付近, アミド II : 1550 cm⁻¹ 付近⁴⁾ 等) が認められたが、50 % アセトニトリル水溶液を使用した場合は残留物中にたんぱく質の吸収はほとんど認められなかった。全粉乳については、いずれの水溶液を使用した場合でも残留物中にたんぱく質の吸収は認められず、さらに脂質の吸収 (エステル結合の C=O 伸縮振動 : 1750 cm⁻¹ 付近, エステル結合の C-O 伸縮振動 : 1100～1200 cm⁻¹ 付近⁵⁾ も認められなかった。カカオ脂については、50 % エタノール水溶液及び 50 % アセトニトリル水溶液を使用した場合は残留物中に脂質の吸収は認められなかった。乳児用粉ミルク、製菓用ミックス粉及び大豆たんぱく質についても、50 % アセトニトリル水溶液を使用した場合は残留物中にたんぱく質の吸収は認められなかった。

以上の結果から、いずれの試料も 50 % アセトニトリル水溶液を使用することによりたんぱく質の除去が可能であり、さらに脂質の除去も可能であることが確認された。

3.2 無機陽イオンの除去の確認

Table 4 Concentration of inorganic cations. (mg / kg)

	Simulated sample for ICP measurement				Sugar preparation			
	Analytical method							
	CA	CA	IA	IA	CA	CA	IA	IA
	+TP		+TP		+TP		+TP	
Na	22,565	1,020	14,818	20	61,831	2,407	7,927	12
K	100	0.2	12,478	20	-	-	-	-
Ca	378,443	500	1,970	2	-	-	-	-
Zn	5,019	20	-	-	64,819	83	-	-
Ba	68,254	110	-	-	1,992	166	-	-

2.3.2 に従い、ICP-OES を用いて無機陽イオンの濃度を測定した結果を Table 4 に示す。濃度は、試料採取量に対する各元素の検出重量 (単位 : mg / kg) とした。改良法により調製した試料検液に

ついては、現行法で使用している除たんぱく剤を用いないため亜鉛やバリウムが検出されず、さらに陽イオン交換カートリッジに通すことで、試料検液中の無機陽イオンを大幅に低減させることができた。

3.3 糖類の分離条件及び内標準物質の検討

2.3.3 で検討した結果、カラムごとに適切な分離条件及び内標準物質は次のとおりとなった。カラム①～⑤を用いて測定した糖類、糖アルコール類及び内標準物質の保持時間を Table 5 に、そのクロマトグラムを Fig. 2～Fig. 6 に示す。

カラム①

移動相 : アセトン / 水 = 80 / 20⁶⁾

カラム温度 : 50 °C

流速 : 1.0 mL / min

内標準物質 : キシリトール

カラム②

移動相 : アセトニトリル / アセトン / メタノール / 水 = 43 / 43 / 8 / 6

カラム温度 : 60 °C

流速 : 1.0 mL / min

内標準物質 : メソエリトリトール又はペンタエリトリトール

カラム③

移動相 : アセトン / 水 = 84 / 16 (トリエチルアミン 0.05 % 添加)

カラム温度 : 85 °C

流速 : 1.0 mL / min

内標準物質 : キシリトール (果糖を含有しない場合に限る.) 又はラクソース (麦芽糖を含有しない場合に限る.)

カラム④

移動相 : アセトニトリル / アセトン / 水 = 24 / 56 / 20 (トリエチルアミン 0.05 % 添加)

カラム温度 : 80 °C

流速 : 1.0 mL / min

内標準物質 : キシリトール (果糖を含有しない場合に限る.) 又はラクチトール

カラム⑤

移動相 : 水

カラム温度 : 85 °C

流速 : 0.7 mL / min

内標準物質 : キシリトール (ソルビトールを含有しない場合に限る.) 又はグリセリン

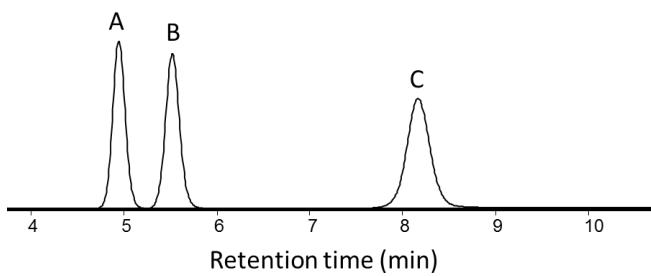


Fig. 2 Chromatogram of sugar, sugar alcohol and internal standard with a column ①.

A: Xylitol, B: Sorbitol, C: Sucrose

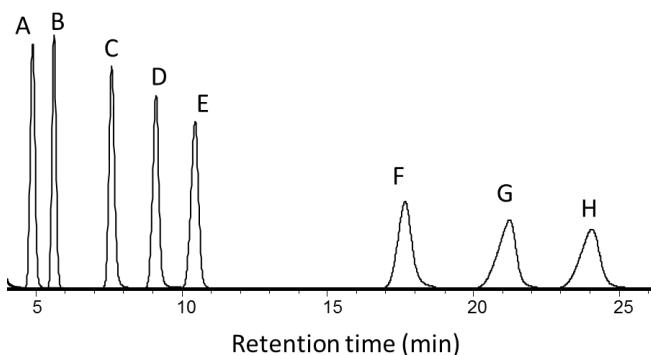


Fig. 3 Chromatogram of sugars, sugar alcohol and internal standard with a column ②.

A: Pentaerythritol, B: meso-Erythritol, C: Fructose, D: Sorbitol, E: Glucose, F: Sucrose, G: Lactose, H: Maltose

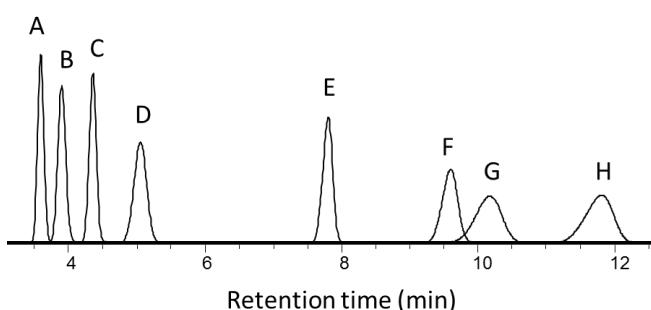


Fig. 4 Chromatogram of sugars, sugar alcohol and internal standard with a column ③.

A: Xylitol, B: Fructose, C: Sorbitol, D: Glucose, E: Sucrose, F: Lactulose, G: Maltose, H: Lactose

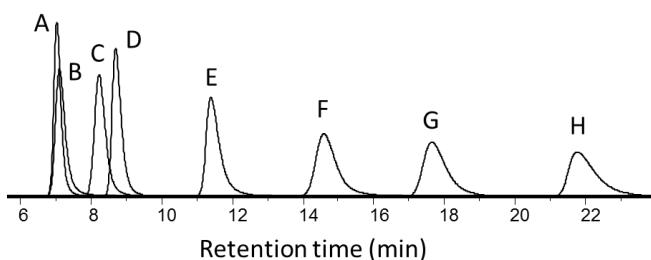


Fig. 5 Chromatogram of sugars, sugar alcohol and internal standard with a column ④.

A: Xylitol, B: Fructose, C: Glucose, D: Sorbitol, E: Sucrose, F: Maltose, G: Lactose, H: Lactitol

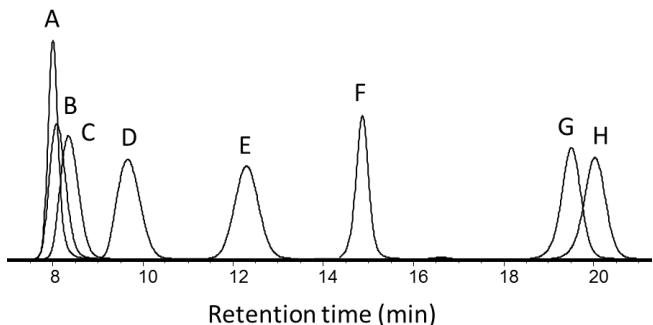


Fig. 6 Chromatogram of sugars, sugar alcohol and internal standard with a column ⑤.

A: Sucrose, B: Maltose, C: Lactose, D: Glucose, E: Fructose, F: Glycerol, G: Xylitol, H: Sorbitol

Table 5 Retention time of sugars, sugar alcohol and internal standard. (min)

		Column				
		①	②	③	④	⑤
Sugars	Fructose	-	7.610	3.900	7.093	12.305
and	Sorbitol	5.523	9.131	4.361	8.688	20.028
sugar	Glucose	-	10.461	5.057	8.219	9.669
alcohol	Sucrose	8.163	17.657	7.812	11.391	8.013
	Lactose	-	21.233	11.815	17.661	8.357
	Maltose	-	24.063	10.170	14.593	8.101
Internal	Xylitol	4.948	-	3.592	7.018	19.508
standard	meso-Erythritol	-	5.641	-	-	-
	Pentaerythritol	-	4.913	-	-	-
	Lactulose	-	-	9.595	-	-
	Lactitol	-	-	-	21.788	-
	Glycerol	-	-	-	-	14.869

3.4 添加回収試験

2.3.4 に従い添加回収試験を実施した現行法での結果を Table 6 に、改良法での結果を Table 7 に示す。

しょ糖、乳糖とともに、現行法での回収率は約 100~102 % と良好な結果となった。

改良法での全粉乳を用いた模擬試料として、当初、しょ糖 30 % を含有する模擬試料を作成しヘキサンを用いて脱脂操作を行ったところエマルションを形成してしまい、ヘキサン層の除去が困難となつたため、しょ糖濃度を高くして（添加するしょ糖割合を 50 % として）試験した。

Table 6 Results of the recovery rate of flour and cocoa butter (n = 3) by current analytical method.

	Sucrose		Lactose	
	Recovery rate (%)	RSD (%)	Recovery rate (%)	RSD (%)
FL	100.56	0.37	101.80	0.58
CB	99.92	0.94	100.67	0.67

Table 7 Results of the recovery rate of flour, whole milk powder and cocoa butter (n = 3) by improved analytical method. Sucrose was measured with a column ①～⑤ and lactose was measured with a column ②～⑤.

Column	Internal standard	Sample	Sucrose				Lactose			
			Concentration of test solution (%)	Recovery rate (%)	RSD (%)	t-test (p=0.05)	Concentration of test solution (%)	Recovery rate (%)	RSD (%)	t-test (p=0.05)
①	Xylitol	FL	1	100.57	0.14	0.99	-	-	-	-
		CB	1	100.30	0.24	0.25	-	-	-	-
②	meso-Erythritol	FL	1	98.00	0.61	0.088	0.5	91.91	0.62	0.0031
		FL	0.5	100.48	1.85	0.94	0.25	100.48	1.29	0.17
		WMP	0.5	97.06	1.24	-	-	-	-	-
		WMP	0.25	101.05	0.85	-	-	-	-	-
		CB	1	98.24	0.35	0.025	0.5	97.77	0.53	0.0084
		CB	0.5	100.61	0.50	0.20	0.25	98.68	1.04	0.19
③	Pentaerythritol	FL	0.5	100.85	1.42	0.79	0.25	97.53	1.01	0.033
		WMP	0.25	101.85	1.64	-	-	-	-	-
		CB	0.5	100.50	1.07	0.31	0.25	97.22	1.26	0.011
④	Xylitol	FL	0.5	100.59	0.08	0.97	0.25	98.51	0.35	0.014
		WMP	0.5	100.06	0.11	-	-	-	-	-
		CB	0.5	100.13	0.15	0.56	0.25	100.15	0.59	0.12
	Lactulose	FL	0.5	98.23	0.11	0.087	0.25	96.21	0.33	0.0036
		WMP	0.5	100.28	0.37	-	-	-	-	-
		CB	0.5	100.37	0.11	0.28	0.25	100.34	0.53	0.22
⑤	Xylitol	FL	1	99.97	0.12	0.44	0.5	95.02	0.50	0.000088
		FL	0.5	100.20	0.14	0.62	0.25	98.06	1.13	0.00027
		FL	0.25	99.86	0.62	0.36	0.125	98.80	1.83	0.044
		FL	1 (+ TP)	126.81	0.39	0.0054	0.5 (+ TP)	116.11	0.87	0.0057
		FL	1 (+ TP, water 1 mL)	98.75	0.17	0.11	0.5 (+ TP, water 1 mL)	94.76	1.27	0.0042
		FL	0.5 (+ TP, water 2 mL)	99.47	0.71	0.29	0.25 (+ TP, water 2 mL)	97.35	3.22	0.025
		FL	0.5 (+ TP, water 3 mL)	98.80	1.19	0.13	0.25 (+ TP, water 3 mL)	96.83	1.80	0.0096
		WMP	0.5 (+ TP)	118.51	0.91	-	-	-	-	-
	Lactitol	CB	1	99.93	0.68	0.97	0.5	99.72	0.47	0.15
		FL	1	100.68	0.38	0.87	0.5	95.83	0.73	0.00025
		FL	0.5	99.50	1.20	0.15	0.25	97.45	1.77	0.0029
		FL	0.25	99.67	1.67	0.22	0.125	98.66	2.55	0.0064
		FL	1 (+ TP)	112.01	1.46	0.018	0.5 (+ TP)	102.43	1.32	0.50
		FL	1 (+ TP, water 1 mL)	98.65	1.00	0.14	0.5 (+ TP, water 1 mL)	94.74	1.08	0.0011
		FL	0.5 (+ TP, water 2 mL)	101.92	2.25	0.23	0.25 (+ TP, water 2 mL)	99.82	2.77	0.11
		FL	0.5 (+ TP, water 3 mL)	103.14	3.68	0.0039	0.25 (+ TP, water 3 mL)	101.22	2.06	0.43
	Glycerol	WMP	0.5 (+ TP)	109.24	1.86	-	-	-	-	-
		CB	1	99.24	0.68	0.42	0.5	99.10	0.52	0.028
⑥	Xylitol	FL	0.5	103.44	0.19	0.045	0.25	103.17	0.24	0.018
		CB	0.5	97.77	0.17	0.0085	0.25	97.89	0.26	0.014
	Glycerol	FL	0.5	104.75	0.09	0.025	0.25	104.06	0.11	0.020
		CB	0.5	100.89	0.09	0.018	0.25	100.66	0.42	0.99

統計的手法である t 検定については、しょ糖については現行法でカラム①を用いて測定した結果と、乳糖については F-キットを用いて測定した結果との間で、信頼区間 95% で実施した。

カラム①では、改良法でのしょ糖の回収率は約 100~101% と良好な結果となり、 t 検定を行った結果、有意確率が 0.05 を上回り、有意差は認められなかった。

カラム②では、内標準物質にメソエリトリトールを使用した場合、小麦粉を用いた模擬試料（検液中のしょ糖濃度：1%，乳糖濃度：0.5%）については、乳糖の回収率は約 92% と低く、カカオ脂を用いた模擬試料（検液中のしょ糖濃度：1%，乳糖濃度：0.5%）については、しょ糖及び乳糖の回収率は約 98% とやや低い結果となり、それぞれ t 検定を行った結果、いずれも有意確率が 0.05 を下回り、有意差が認められた。全粉乳を用いた模擬試料（検液中のしょ糖濃度：0.5%）についても、しょ糖の回収率が約 97% とやや低い結果となった。そこで、試料採取量をすべて半分にして実施したところ、いずれも良好で有意差のない結果となったことから、改良法では検液中のしょ糖濃度が 0.5%（乳たんぱく質を含有する場合は 0.25%），乳糖濃度が 0.25% となるように試料採取を行うのが望ましい。

また、同カラムで内標準物質にペンタエリトリトールを使用した場合、しょ糖については良好な結果となったが、乳糖については回収率が約 97~98% とやや低く、 t 検定を行った結果、有意差が認められた。このことから、選択する内標準物質の違いが測定結果に影響を与える可能性があるため、添加回収試験を行っていない内標準物質を使用した定量分析は行わないほうが望ましいと考えられる。

カラム④を用いて試験した、陽イオン交換カートリッジを通した小麦粉を用いた模擬試料（検液中のしょ糖濃度：1%，乳糖濃度：0.5%）におけるしょ糖及び乳糖並びに陽イオン交換カートリッジを通した全粉乳を用いた模擬試料（検液中のしょ糖濃度：0.5%）におけるしょ糖の回収率が約 102%~127% と、100% を大きく超過し、 t 検定を行った結果、ほとんどの場合で有意差が認められた。これは陽イオン交換カートリッジを通した際に、無機陽イオンだけでなく糖類や内標準物質も吸着し又は保持されていることが主要な原因と考えられる。そこで、Fig. 7 に従って検液を調製して測定し、それぞれ回収率を求めたところ、通す水の量を増やすことでしょ糖及び乳糖の回収率が改善される傾向が確認され、 t 検定を行った結果、しょ糖についてはほとんどの場合で有意差は認められなかった。しかし、乳糖については有意差が認められたものも散見されたことに加え、水を通すことで相対標準偏差が増加する傾向が確認された。

配位子交換カラムであるカラム⑤を用いて試験し、 t 検定を行った結果、ほとんどの場合で有意差が認められた。この原因として、改良法で除たんぱく剤として使用しているアセトニトリルのピークがクロマトグラム上に大きく現れるうえ、選択した内標準物質のピークと近接していることが考えられる (Fig. 8)。このため、除たんぱく剤を再考する必要がある。

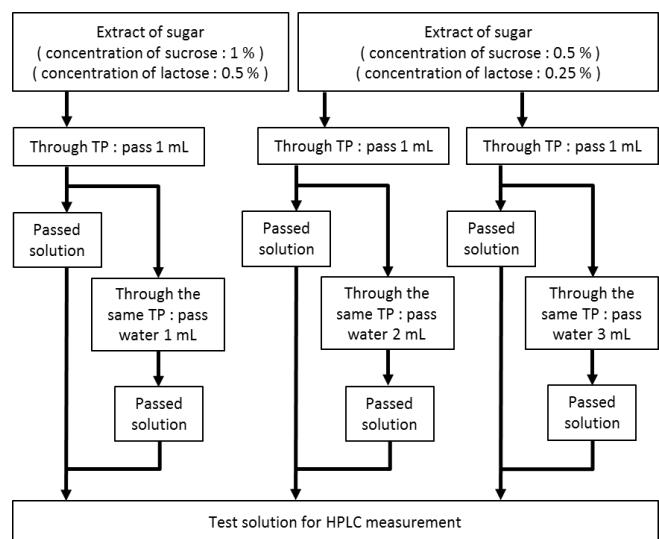


Fig. 7 Flowchart of sample preparation with a cation exchange cartridge.

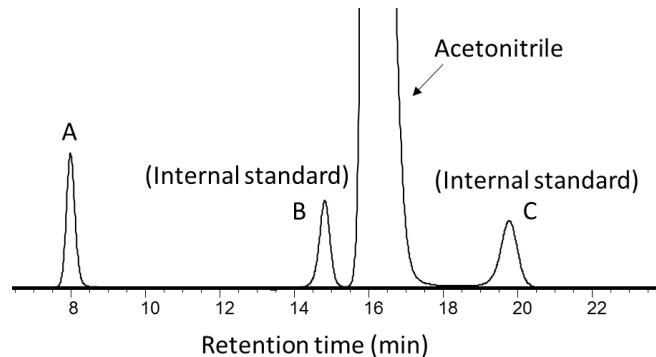


Fig. 8 Chromatogram of cocoa butter added sucrose, glycerol and xylitol with a column⑤.

A: Sucrose, B: Glycerol, C: Xylitol

カラム④及び⑤の結果から、配位子交換カラムについては、陽イオン交換カートリッジを通した場合又は今後再考する除たんぱく剤を使用した場合の回収率の結果等を比較しながら、最適な試料調製法を再検討する必要がある。

3.5 改良法の決定

3.1, 3.2 及び 3.4 の結果から、HILIC カラムを使用する場合の改良法での試料調製を次のとおり決定した。

まず、しょ糖濃度が 1%（乳たんぱく質を含有する場合は 0.5%）となるように、試料を 50 mL 容メスフラスコに量り取り、水 20 mL を加え、試料を分散させた。脂肪を含む試料であれば、ヘキサン 20 mL を加えて 10 分間軽く振とうした後、しばらく静置し、ヘキサン層を駆込ピペット等で除去した。この操作を 2 回行った。続いて、水 10 mL を加え、50 °C の温浴中で 30 分間振とうしたのち、5%（乳たんぱく質を含有する場合は 2.5%）内標準物質水溶液 10 mL を正確に加え、水で定容した。この溶液 25 mL を 50 mL 容メスフラスコに取り、アセトニトリルを加えて定容した。この

溶液を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過したものを試料検液とした。検液中のしょ糖濃度は 0.5% (乳たんぱく質を含有する場合は 0.25%) となる。以上の実験手順を Fig. 9 に示す。

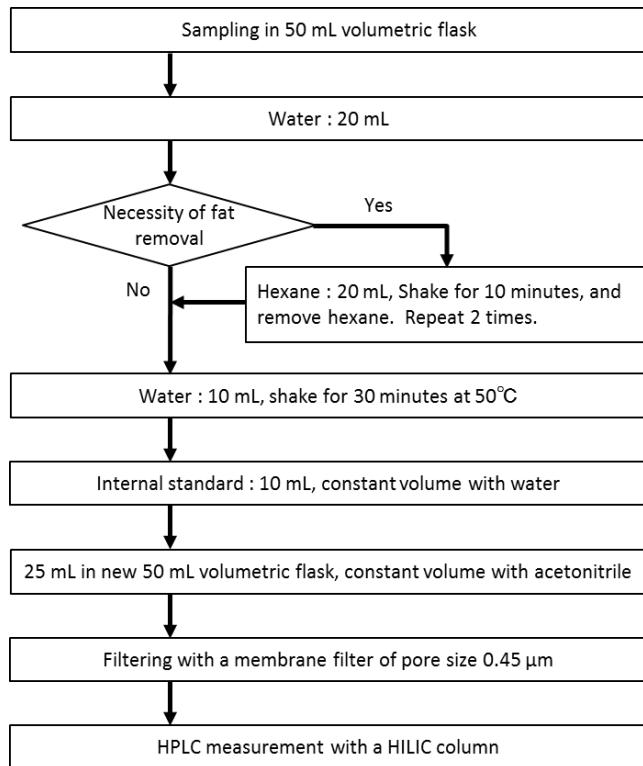


Fig. 9 Schematic diagram of improved analytical method.

なお、3.1 により、アセトニトリルで脱脂ができると確認したものの、水で糖類を抽出する際に油脂を多量に含む試料が分散しないため糖類の完全な抽出が困難であり、糖類の抽出をアセトニトリルを多量に含む水で行うと、アセトニトリルに対する糖類の溶

解度が非常に低いことにより糖類の完全な抽出が困難であると考えられるため、最初に試料をヘキサンで脱脂し、アセトニトリルで補完的に脱脂を行うという手順とした。

この試料調製法に従い検液を調製し、HILIC カラムで測定する改良法は、現行法と遜色ないしょ糖の定量分析法と考えられる。乳糖については、現行法と遜色ない結果が得られたものもあったが、模擬試料の種類とカラムの組み合わせによっては回収率がやや低いものも見受けられたことから、今後分析条件を検討する必要がある。配位子交換カラムについては、たんぱく質及び無機塩類を含有しない試料に限り、現行法によるしょ糖の定量分析が可能であるが、それ以外の試料については除たんぱく剤を再検討する必要等がある。

4. 要 約

本研究では、現行法である税関分析法 No.108 「菓子類のしょ糖分の定量分析法」の改善可能な点を検討し、試料調製法及び分離条件を検討した。

試料調製法については、50%アセトニトリル水溶液を用いることにより、除たんぱく剤由来の無機陽イオンを試料検液中に溶解させることなく除たんぱくを行なうことが可能となった。

新たに検討した 3 種類の HILIC カラムの分離条件や適切な内標準物質を決定したことにより、分析依頼試料の組成にかかわらず、しょ糖の正確な定量分析が可能となった。

模擬試料を用いた添加回収試験の結果から、3 種類の HILIC カラムを使用した改良法は、現行法と遜色ないしょ糖の定量分析が可能であることが確認できた。また乳糖についても模擬試料の種類とカラムの組み合わせによっては現行法と遜色ない結果が得られた。今後、たんぱく質又は無機塩類を含有する試料でも配位子交換カラムを使用した分析が可能となるよう、除たんぱく剤の再考等の検討を行う。

文 献

- 1) Shodexホームページ: Shinoちゃんの液クロSOS「糖分析 (1: SUGARシリーズ)」, <https://www.shodex.com/ja/dso/009.html> (参照2020-04-22)
- 2) 住化ケムテックスホームページ:「イオン交換樹脂のイオンに対する選択性について」, <https://www.chemtex.co.jp/seihin/ion/topics/page/3/> (参照2020-05-21)
- 3) Watersホームページ:「食品成分分析: 糖類の高分離高感度分析」, <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/mkt14163.pdf> (参照2020-04-22)
- 4) 堀口 博:“赤外吸光図説総覧—有機構造化学の基礎と実際—”, P.269 (1973) (三共出版)
- 5) 舟橋三郎, 原 一郎, 山川民夫:“脂質 1”, P.590 (1970) (共立出版)
- 6) 中村文雄, 東郷雅子, 廣瀬達也, 岩本和郎: 関税中央分析所報, 36, 9 (1997)