

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(第2報)

小川 浩史*, 馬越 秀一*, 松本 啓嗣*

Quantitative Analytical Method of Sugars by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Second Report)

OGAWA Hirofumi*, UMAKOSHI Shuichi* 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 sugar content. HPLC is often used for the quantitative analysis of sugars. In the quantitative analysis of sugars by HPLC using ligand exchange columns, inorganic cations in the test solution such as barium ions derived from barium hydroxide, which is the deproteinizing agent, may damage the column and reduce column performance. In the worst case scenario, the quantitative analysis results are affected. In this study, we investigated the deproteinizing agent suitable for ligand exchange columns. As a result, by using ammonium hydrogen carbonate as the deproteinizing agent, it has become possible to perform deproteinization without dissolving barium ions in the test solution. In addition, it was proven possible to remove ammonium hydrogen carbonate from the test solution by heating and stirring after deproteinization. From the results of the quantitative analysis of sucrose in confectionery, it was confirmed that the improved analysis method using ammonium hydrogen carbonate enables quantitative analysis of sucrose comparable to Customs Analysis Method No.108. From foregoing results, a sample preparation method that enables quantitative analysis of saccharides without damaging the ligand exchange columns was established.

1. 緒 言

砂糖菓子やココア調製品などの食品の分類において、含有する糖類の割合によって関税分類が異なる場合があるため、糖類の正確な定量は必要不可欠である。食品中の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、規定されているいくつかの定量分析法のうち、複数の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とされているが、以下の点について改善が望まれる。

① 除たんぱく剤に硫酸亜鉛及び水酸化バリウムを使用している点

配位子交換カラムを使用する場合に、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、カラムの対イオンとそれらの無機陽イオンとの交換¹⁾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の劣化につながり、分離能や定量分析結果に悪影響を及ぼすおそれがある。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る。特に現行法では使用カラム例として対イオンがカルシウムの配位子交換カラムが挙げられているが、一般的にバリウムはカルシウムに比べて強酸性陽イオン交換樹脂による選択性が大きい²⁾。そのため対イオンのカルシウムがバリウムに交換されてしまう。

② アミノカラムでは還元糖を含有する試料を分析できない点
アミノカラムを使用する場合に、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、カラムの分解能が低下し、定量分析結果に悪影響を及ぼすことがある³⁾。

③ 分析に適したカラムや内標準物質の選択が難しい点

実際の試料にはしょ糖、乳糖等の定量対象となる糖類以外にも、その他の糖類や糖アルコール類等の夾雑成分を含有している場合が多い。カラムごとに分離可能な糖類や糖アルコール類は異なるため、正確な定量分析のためには試料ごとに適切なカラム及び内標準物質を選択する必要がある。ところが、現行法では具体的に例示されているカラムが少ない上に、カラムごとの分離パターンが示されていないことから、試料に含有する成分に応じたカラム及び内標準物質の選択が難しくなっている。

このような背景から第1報においては、様々なカラムについての分析条件及び内標準物質の検討を行い、さらに新たな除たんぱ

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

く剤として 50 %アセトニトリル水溶液を検討した⁴⁾。その結果、糖類のうち定量分析が必要となる頻度の高いしょ糖については、アミノカラムを含む3種類の親水性相互作用クロマトグラフィーカラムでは正確な定量が可能であることが明らかとなった。一方で、移動相に水のみを使用する配位子交換カラムについては、試料検液中のアセトニトリルの影響によりしょ糖の正確な定量が不可能であることが明らかとなった。

そこで本研究では、引き続きしょ糖について、移動相に水のみを使用する配位子交換カラムを用いても正確に定量することが可能となる試料調製法(以下「改良法」という。)を確立するために、新たな除たんぱく剤の検討を行い、さらに市販品の菓子類等に含まれるしょ糖分について、改良法及び現行法により定量分析を行い、結果を比較したので報告する。

2. 実験

2.1 試薬及び試料

2.1.1 試薬

しょ糖、ソルビトール、トリクロロ酢酸、炭酸水素アンモニウム(富士フイルム和光純薬)

2.1.2 試料

市販品 : 小麦粉(薄力粉)、菓子類5種(クッキーなどの焼き菓子5種)、あんこ2種(こしあん及び抹茶あん)

内標準物質溶液 : 10%ソルビトール水溶液

除たんぱく剤 : 20%トリクロロ酢酸水溶液、1M炭酸水素アンモニウム水溶液

2.2 装置及び測定条件

装置 : 高速液体クロマトグラフ LC-20AD(島津製作所)

検出器 : 示差屈折率検出器

カラム :

①MCI GEL CK08EC、300 × 8.0 mm I.D., 粒径 9 μm(三菱ケミカル)

②Shim-pack SCR-101C、300 × 7.9 mm I.D., 粒径 10 μm(島津製作所)

カラム①及び②は配位子交換カラム(対イオン:Ca²⁺)であり、現行法に記載されているカラムでもある。

測定条件:

カラム①:

移動相 : 水

カラム温度 : 85 °C

流速 : 0.6 mL/min

カラム②:

移動相 : 水

カラム温度 : 85 °C

流速 : 1.0 mL/min

2.3 実験

2.3.1 除たんぱく法の検討

新たな除たんぱく剤として、酸による変性を利用した除たんぱく剤として汎用性の高いトリクロロ酢酸と、塩析を利用した除たんぱく剤として過去にココアの定量分析の研究において検討が行われている炭酸水素アンモニウム⁵⁾について検討を行った。

まず 100 mL メスフラスコに模擬試料(しょ糖 30 %を含有する小麦粉)約 1.6 g(しょ糖換算で約 0.5 g)を量り取り、水 50 mL を加えて十分に振とうして混合した。続いて各除たんぱく剤をトリクロロ酢酸については 20 mL、炭酸水素アンモニウムについては 30 mL ずつ加えた後、内標準物質溶液を正確に 5 mL ずつ加えてから水で定容した。トリクロロ酢酸については、その検液を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過したろ液をカラム①を用いて測定した。炭酸水素アンモニウムについては、検液の一部を 50 mL 容遠沈管に移して 7,500 rpm で 10 分間遠心分離した後、上澄み液をメンブレンフィルターでろ過したろ液を同じくカラム①を用いて測定した。測定条件は 2.2.1 の条件を用いた。さらに検量線を作成し、その検量線を元に模擬試料のしょ糖の回収率を求めた。

検量線用検液については、次のとおり調製した。100 mL 容メスフラスコにしょ糖 2 g を量り取り、水で定容した溶液の 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、次いで内標準物質溶液を正確に 5 mL ずつ加えてから水で定容した。

2.3.2 炭酸水素アンモニウムの除去方法の検討

2.3.1 で検討を行った除たんぱく剤のうち、炭酸水素アンモニウムは陽イオンとしてアンモニウムイオンを含んでいる。アンモニウムイオンはカルシウムイオンに比べて強酸性陽イオン交換樹脂による選択性は低いものの、連続して高濃度のアンモニウムイオンをカラムに注入すると、カラムの対イオンと交換する可能性があるため、除たんぱく操作後に試料検液中からの炭酸水素アンモニウムを除去する方法について検討した。炭酸水素アンモニウムは加熱することで、アンモニア、二酸化炭素及び水に分解することから⁶⁾、加熱攪拌による炭酸水素アンモニウムの除去について検討を行った。まず 2.3.1 と同様な手順で調製した模擬試料検液について、ろ紙によるろ過で除たんぱく操作を完了させた。このろ液をそのままメンブレンフィルターでろ過をしたろ液と加熱攪拌操作を行ってからメンブレンフィルターでろ過したろ液について、それぞれカラム①を用いて測定した。加熱攪拌操作については、80 °C に設定したホットスター上でそれぞれ 10, 30, 60 及び 90 分間攪拌したものと、沸騰浴上で 5 分間攪拌したものについて検討を行った。

2.3.3 改良法の決定

2.3.1 及び 2.3.2 の検討結果から総合的に判断して、改良法を決定した。

2.3.4 現行法との比較

2.3.3 で決定した改良法及び現行法をそれぞれ用いて、市販品のビスケットなどの菓子類 5 種及びあんこ 2 種に含まれるしょ糖分の定量分析を行って、得られた結果について比較を行った。改良

法で調製した検液はカラム①及び②を用いて測定した。現行法で調製した検液についてはカラム①を用いて測定した。

3. 結果及び考察

3.1 除たんぱく法の検討

トリクロロ酢酸を用いて除たんぱくした検液については、しょ糖のピークにトリクロロ酢酸のピークが重なってしまうことに加え、しょ糖が加水分解してできるブドウ糖及び果糖のピークが確認された。これはトリクロロ酢酸が強酸性のために、しょ糖が酸による加水分解を受けていると考えられる。このことから、トリクロロ酢酸はしょ糖の定量分析には適さないことが明らかとなつた。

一方、炭酸水素アンモニウムを用いて除たんぱくした検液については、しょ糖のピークの近くに炭酸水素アンモニウム由来のピークが現れるものの(Fig.1)、ピーク同士の分離度が1.5以上であることからピークが完全分離しているとみなしあり⁷⁾、検量線による回収率の算出を行った。回収率は3検体の平均で約100.9%と良好な結果となった。この結果から以降の検討は、除たんぱく剤に炭酸水素アンモニウムを用いて行った。

3.2 炭酸水素アンモニウムの除去方法の検討

ホットスターで加熱攪拌した検液及び沸騰浴中で攪拌した検液のクロマトグラムをFig.2及びFig.3に示す。ホットスターで80°Cに加熱しながら攪拌した場合は、60分間以上加熱攪拌を行うとクロマトグラム上で炭酸水素アンモニウム由来のピークが確認されなくなった。一方、沸騰浴で5分間攪拌した場合についてもクロマトグラム上では炭酸水素アンモニウム由来のピークは確認されなかった。また、加熱攪拌後のしょ糖の回収率については、加熱前とほぼ変化が見られず、t検定によって有意差が認められなかった。このことから、以降の検討では除たんぱく操作後に加熱攪拌による炭酸水素アンモニウムの除去を行うこととした。

また追加実験として、しょ糖に代えて還元糖である乳糖及びぶどう糖を用いた模擬試料についても同様に加熱攪拌を行ったところ、各糖類のピーク面積の減少が確認された。加えて、糖類のピークの前後に微小なピークが複数確認されたことから、炭酸水素アンモニウムに由来するアンモニウムイオン又はその分解により生じるアンモニアと還元糖の一部が反応していると考えられる³⁾。この結果から、しょ糖の定量分析において試料が還元糖を含有している場合には、還元糖とアンモニウムイオン又はアンモニアの反応生成物のピークがしょ糖のピークと重なり定量結果に影響を与えるおそれがあるため、注意が必要である。

3.3 改良法の決定

3.1及び3.2の結果から、配位子交換カラムを用いる場合の改良法の手順を次のとおり決定した。

まず、しょ糖濃度が0.5%程度となるように試料を100mL容メ

スフラスコに量り取り、水50mLを加えて試料を分散させた。脂肪を含む試料であれば、ヘキサン20mLを加えて10分間軽く振とうした後、しばらく静置してからヘキサン層を駆込みペットで

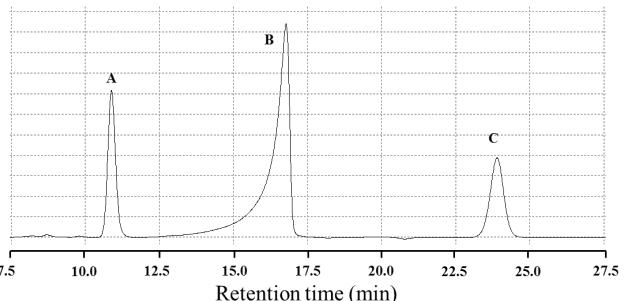


Fig.1 Chromatogram of simulated sample deproteinized by ammonium hydrogen carbonate.

A:Sucrose, B:Ammonium hydrogen carbonate, C:Sorbitol

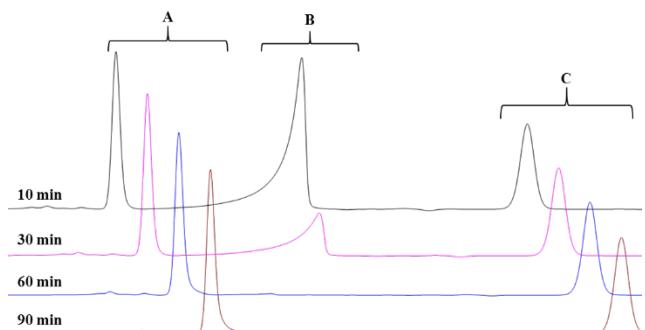


Fig.2 Chromatograms of simulated sample heated on hot stirrer at 80 °C.

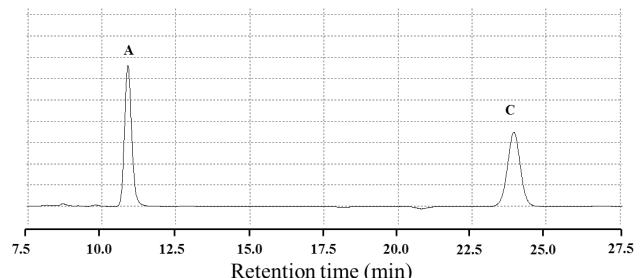


Fig.3 Chromatogram of simulated sample heated on water bath at 100 °C.

除去した。この操作を2回繰り返した。続いて内標準物質溶液5mLを正確に加えた後、1M炭酸水素アンモニウム水溶液を30mLを加えてから、水で定容した。この検液の一部を50mL容遠沈管に移して7,500rpmで10分間遠心分離した後、上清をろ紙でろ過した。このろ液約2mLを三角フラスコに移して沸騰浴中で5分間加熱攪拌してからメンブレンフィルターで再度ろ過したものを持てて試料検液とした。また沸騰浴での加熱時に試料検液が濃縮されるので、必要に応じて再稀釀を行った。以上の実験手順をFig.4に示す。

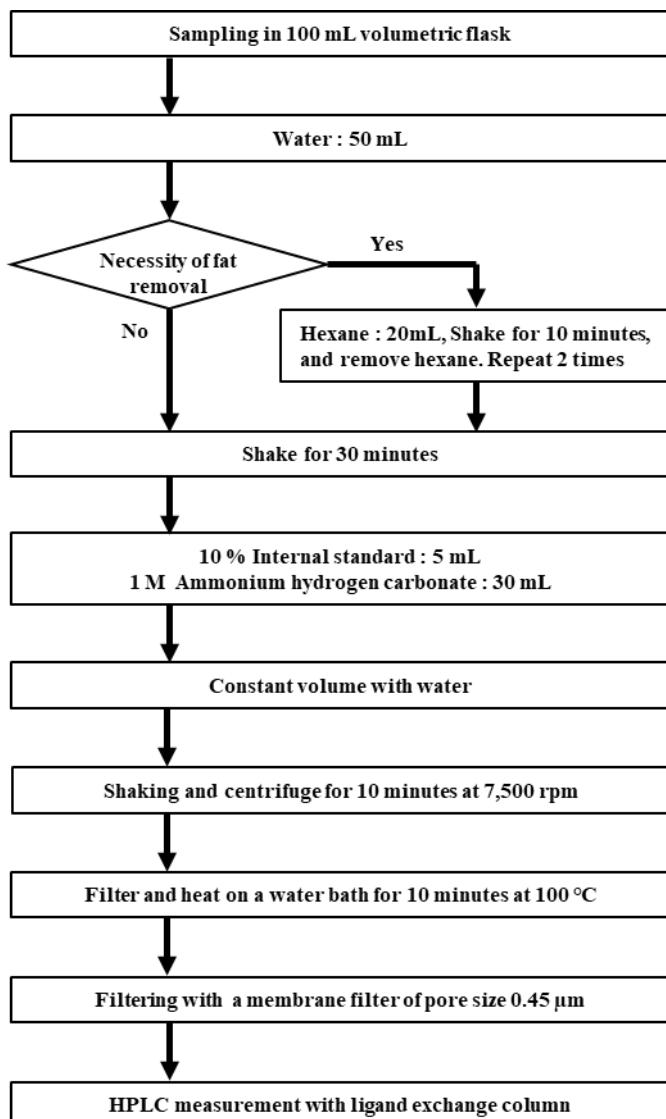


Fig.4 Schematic diagram of improved analysis method.

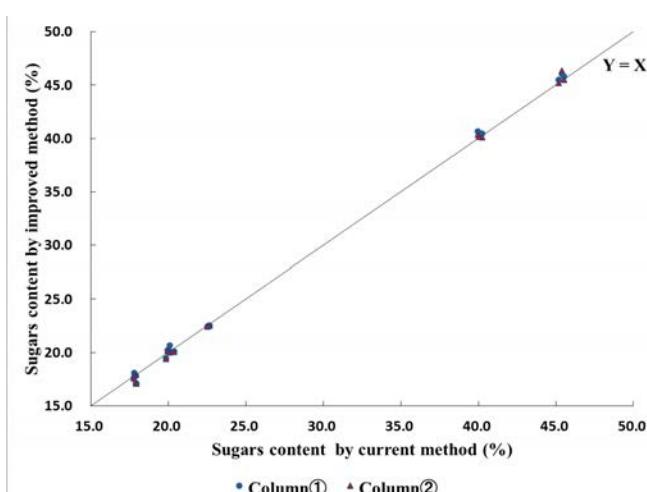


Fig.5 Scatter plot of sugars content by current method and improved method.

Table 1 Results of sugars content of baked confectionery and sweet bean pastes.

Sample	Method	Column	sample	Sugar content(%)	RSD(%)	Average of sugar content(%)	RSD(%)
Confectionery 1	Improved	①	1	20.20	0.11	19.92	2.08
			2	19.44	0.13		
			3	20.12	0.06		
	Improved	②	1	20.16	0.07	19.88	2.09
			2	19.40	0.02		
			3	20.07	0.16		
	Current	①	1	19.97	0.09	20.07	1.33
			2	19.87	0.03		
			3	20.38	0.10		
Confectionery 2	Improved	①	1	17.87	0.10	17.91	0.81
			2	17.80	0.07		
			3	18.08	0.09		
	Improved	②	1	17.89	0.08	17.89	0.08
			2	17.91	0.07		
			3	17.88	0.07		
	Current	①	1	17.92	0.14	17.85	0.37
			2	17.83	0.12		
			3	17.80	0.10		
Confectionery 3	Improved	①	1	22.54	0.11	22.49	0.22
			2	22.50	0.05		
			3	22.44	0.06		
	Improved	②	1	22.54	0.04	22.49	0.32
			2	22.52	0.04		
			3	22.41	0.15		
	Current	①	1	22.66	0.05	22.58	0.33
			2	22.56	0.05		
			3	22.52	0.12		
Confectionery 4	Improved	①	1	17.59	0.07	17.27	1.62
			2	17.09	0.09		
			3	17.13	0.07		
	Improved	②	1	17.59	0.10	17.27	1.59
			2	17.10	0.03		
			3	17.13	0.09		
	Current	①	1	17.76	0.14	17.87	0.58
			2	17.96	0.05		
			3	17.90	0.11		
Confectionery 5	Improved	①	1	20.07	0.12	20.25	1.74
			2	20.02	0.12		
			3	20.66	0.06		
	Improved	②	1	20.11	0.10	20.07	0.24
			2	20.09	0.21		
			3	20.02	0.19		
	Current	①	1	20.12	0.10	20.09	0.17
			2	20.06	0.06		
			3	20.10	0.01		
Sweet bean paste 1	Improved	①	1	45.49	0.05	45.78	0.61
			2	46.05	0.09		
			3	45.80	0.04		
	Improved	②	1	45.22	0.03	45.69	1.29
			2	46.35	0.08		
			3	45.51	0.04		
	Current	①	1	45.17	0.13	45.35	0.37
			2	45.38	0.03		
			3	45.51	0.15		
Sweet bean paste 2	Improved	①	1	40.44	0.12	40.53	0.30
			2	40.67	0.08		
			3	40.48	0.01		
	Improved	②	1	40.11	0.20	40.20	0.34
			2	40.36	0.02		
			3	40.13	0.07		
	Current	①	1	40.23	0.08	40.08	0.35
			2	39.96	0.06		
			3	40.04	0.11		

3.4 現行法との比較

改良法及び現行法によって求めた各菓子類等に含まれるしょ糖分を Table 1 に示す。また現行法によって求めたしょ糖分を X, 改良法によって求めたしょ糖分を Y としてグラフにプロットした散布図を Fig.5 に示す。

しょ糖分は、各菓子類等について 3 検体ずつサンプリングし、各サンプルについて 3 回測定を行い、その平均から算出した。改良法による定量結果は、カラム①及びカラム②で一致した結果が得られ、また現行法による定量結果ともほぼ一致した。加えて、散布図(Fig.5)において、各菓子類等についてのプロットが直線 Y

= X に重なるように分布していることからも、改良法及び現行法による定量結果が互いによく一致していると言える⁸⁾.

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」において試料調製法として配位子交換カラムの早期劣化につながる恐れのある除たんぱく剤を用いていることから、配位子交換カラムを用いてしょ糖の定量を行う場合により適切な除たんぱく法の検討を行った。

検討の結果、除たんぱく剤として炭酸水素アンモニウムを用いることで、配位子交換カラムの対イオンと交換しやすいバリウム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うことが可能となった。

また、除たんぱく操作後に加熱攪拌を行うことで、しょ糖の定量結果に影響を与えずに試料検液中から炭酸水素アンモニウムを除去することが可能となった。

本研究の結果から、2種類の配位子交換カラムを使用した改良法は、現行法と遜色なく市販品の菓子類等に含まれるしょ糖分の定量分析が可能であることが明らかとなった。

文 献

- 1) Shodex. “Shinoちゃんの液クロSOS「糖分析(1: SUGARシリーズ)」”. Shodex. <https://www.shodex.com/ja/dso/009.html> (参照2021-02-22)
- 2) 住化ケムテックス. “イオン交換樹脂のイオンに対する選択性について”. 住化ケムテックス. <https://www.chemtex.co.jp/seihin/ion/topics/page/3/> (参照2021-02-22)
- 3) Waters. “食品成分分析：糖類の高分離高感度分析”. Waters. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/mkt14163.pdf> (参照2021-02-22)
- 4) 増田 靖子, 徳島 將光, 五十嵐 智大, 松本 啓嗣: 関税中央分析所報, **60**, 11 (2020)
- 5) 佐藤 晴紀, 岩崎 智子, 増田 靖子, 徳島 将光, 五十嵐 智大, 松本 啓嗣: 関税中央分析所報, **60**, 35 (2020)
- 6) 大木 道則, 大沢 利昭, 田中 元治, 千原 秀昭: “化学大辞典”, P.1370(1989), (東京化学同人)
- 7) 日本薬局方解説書編集委員会: “第十六改正日本薬局方 条文と注釈”, P.88(2011), (廣川書店)
- 8) 丹羽 誠: “これならわかる化学のための統計手法—正しいデータの扱い方—”, P.108(2008), (化学同人)