

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による ミルク調製品中の乳糖とショ糖の同時定量分析について（第 2 報）

堀川 七海*, 平元 秀和*, 廣瀬 達也*

Simultaneous quantitative analytical method for lactose and sucrose in milk preparations by high performance liquid chromatography (HPLC) (second report)

HORIKAWA Nanami*, HIRAMOTO Hidekazu* and HIROSE Tatsuya*

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

On the Customs Tariff Schedule, preparations with total natural milk content constituting 30% or more of the total weight (under dry conditions) have higher tariff rates than those below 30%. Therefore, quantitative analysis of lactose, which is one of the natural components of milk, is extremely useful in tariff classification. Milk preparations often contain sucrose, but lactose and sucrose cannot be quantified at the same time by the enzymatic method, which is one method used as a lactose quantitative analysis method. The procedure is also complex. So high performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index detector is often used for the quantitative analysis of sugars. However, when reducing sugars are contained in the test solution, these sugars are adsorbed on the column and the quantification accuracy declines with the conventionally used amino column. In this study, we investigated an amino column that is different from the conventionally-used amino column. As a result, a superior recovery rate of sucrose and whole milk powder was observed when meso-erythritol is used as an internal standard and deproteinized by an acetonitrile. Furthermore good results were also obtained in the quantitative analysis of lactose content in confectionery.

1. 緒 言

関税率表第 19.01 項及び第 21.06 項に分類される、第 04.01 項から第 04.04 項までの物品の調製食料品について、ミルクの天然組成分の含有量の合計が乾燥状態において全重量の 30 % 以上のものは、30 % 未満のものと比べて高い関税率が設定されており、ミルクの天然の組成分のひとつである乳糖の量を分析することは関税分類において非常に有用である。ミルク調製品に含有されるショ糖の量によっても税表上の所属が異なるため、乳糖だけでなく、ショ糖についても定量する必要があるが、乳糖の定量分析法の一つである酵素法では、乳糖とショ糖を同時に定量することができない。

糖類の定量分析には示差屈折率検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー（以下、「HPLC」という。）が用いられることが多いが、この HPLC による方法で従来から使用しているアミノカラムは、乳糖などの還元糖が試料検液中に存在する場合、還元糖のアルデヒド基とカラムのアミノ基がシッフ塩基を形成することにより糖類がカラムに吸着し、定量精度の悪化やカラム寿命が低下する可能性が指摘されている¹⁾。

平松らの報告²⁾で、親水性相互作用クロマトグラフィー（以下、「HILIC」という。）カラムの一種であり還元糖のアルデヒド基と

相互作用しにくいアミド基をカラムのシリカ基材表面に有する、アミドカラム（XBridge BEH Amide）（以下、「XBridge カラム」という。）において乳糖とショ糖の同時定量の可能性を見出したが、麦芽糖を乳糖と完全に分離できず、麦芽糖が試料に含有される場合、定量結果に影響を及ぼす可能性が示唆された。

そこで本研究では、一般のアミノカラムよりも還元糖について高い回収率を実現³⁾し、増田らの報告⁴⁾において乳糖と麦芽糖の分離が十分なことが明らかとなっている、HILIC カラムの一種であるアミノカラム（HILICpak VG-50 4E）（以下、「HILICpak カラム」という。）を使用し、乳糖とショ糖の同時定量における分析条件の検討を行うとともに、模擬試料及び市販品の菓子類等について定量分析を行い酵素法との比較を行った。また、併せて HILICpak カラムにおける還元糖の回収率確認のため、アミドカラムである XBridge カラムを用いた模擬試料の定量分析との比較も行ったので報告する。

2. 実 験

2.1 試薬、試料及び器具

2.1.1 試薬

ショ糖、乳糖、麦芽糖、果糖、ぶどう糖、トレハロース、乳カ

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

ゼイン, トリエチルアミン (キシダ化学)

メソエリトリトール, マルチトール, キシリトール, ソルビトール (東京化成工業)

アセトニトリル, メタノール, アセトン, 蒸留水: HPLC 用 (キシダ化学)

ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム, 硫酸亜鉛七水和物, 水酸化ナトリウム: 酵素法用 (キシダ化学)

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

輸入品: 全粉乳

市販品: 小麦粉, バター, 加糖練乳, ミルクチョコレート

2.1.3 器具

シリンジレスフィルター : ミニユニ UN203NPUAQU (ワットマン)

メンブレンフィルター : DISMIC (13HP020AN) (アドバンテック)

遠心式フィルターユニット: ビバスピインターボ 4, 3KDa (ザルトリウス)

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 高速液体クロマトグラフ

装置 : 高速液体クロマトグラフ LC-2000 (日本分光)

検出器 : 示差屈折率検出器 RI-203Plus (日本分光)

カラム :

① HILICpak VG-50 4E, 250×4.6 mm I.D., 粒径 5 µm(Shodex)
分離条件は 2.3.1 にて検討

② XBridge BEH Amide, 150×4.6 mm I.D., 粒径 2.5 µm(Waters)
移動相 : アセトン/メタノール/水 = 78/11/11²⁾
(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 : マルチトール

2.2.2 紫外可視分光光度計

装置 : UV-1800 (島津製作所)

波長 : 340 nm

2.3 実験

2.3.1 糖類の分離条件及び内標準物質の検討

2.3.1(1) 糖類の分離条件の検討

カラム①において, 本研究の定量分析対象である乳糖及び乳糖に対し, 麦芽糖が完全に分離可能な温度及び溶離液組成の条件を検討した。

溶離液組成は以下の①から④の 4 種類を試験し, 温度は 40 °C と 60 °C の 2 通りを試験した。

①アセトニトリル/メタノール/水 = 80/10/10

②アセトニトリル/メタノール/水 = 80/8/12

③アセトニトリル/メタノール/水 = 80/6/14

④アセトニトリル/メタノール/水 = 80/5/15

これらを比較した結果から, 以降の測定条件を決定し, 適切な内標準物質を検討した。

内標準物質の候補として, メソエリトリトール, 果糖, キシリトール, ソルビトール, ぶどう糖及びトレハロースについて検討し, 2 種類を選択した。

2.3.1(2) 内標準物質の検討

2.3.1(1)により選択した 2 種類の内標準候補物質について定量用検量線の直線性を確認するために次の操作を行った。

乳糖 0.9 g 及び乳糖 0.2 g, 乳糖 1.1 g 及び乳糖 0.25 g, 乳糖 1.3 g 及び乳糖 0.3 g, 乳糖 1.5 g 及び乳糖 0.35 g, 乳糖 1.8 g 及び乳糖 0.4 g をそれぞれ異なる 5 本の 100 mL 容メスフラスコに量り取り, 内標準候補物質の 10 % 水溶液をそれぞれ 8 mL ずつ加え, 水で定容した。この溶液 0.25 mL とアセトニトリル 0.25 mL を混合後, シリンジレスフィルター (孔径 0.45 µm) を用いてろ過し, 検量線用検液とした (乳糖濃度: 0.45 ~ 0.85 %, 乳糖濃度: 0.1 ~ 0.2 %)。これらの検量線用検液を, 測定の繰り返し回数を 3 回として測定し, 横軸に乳糖及び乳糖と内標準物質との濃度比を, 縦軸に乳糖及び乳糖と内標準物質とのピーク面積比をプロットして検量線を作成し, カラム①における内標準物質を決定した。

2.3.2 除たんぱく法の検討

模擬試料を用いた乳糖及び乳糖の添加回収試験を行い, HPLC 及び酵素法での回収率の結果を比較することで, 最適な除たんぱく法の検討を行った。

2.3.2(1) HPLC

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除たんぱく法として, 遠心式フィルターユニットを用いた限外ろ過及び試料溶液と等量のアセトニトリルを加えて攪拌する方法 (以下, 「有機溶媒による変性沈殿法」という。) を検討した。

乳糖 65 %, 乳糖 15 %, 乳糖 7.5 %, 乳糖 7.5 %, 小麦粉 5 % の割合で混合した除たんぱく用模擬試料を作製し, 以下の手順により除たんぱく処理を含む検液調製を行い測定に供した。なお, 乳糖, 乳糖及び乳糖については全粉乳を模したものとして添加しており, また, 乳糖はバターから有機溶媒によって抽出したものを使用した。

200 mL 容三角フラスコ 3 本に除たんぱく用模擬試料 2 g を量り取り, それぞれに水 92 mL を加え, 30 分間超音波処理を行った。次いで 2.3.1(2)で決定した内標準物質の 10 % 水溶液 8 mL を加え, よく攪拌した後ろ紙でろ過した。

限外ろ過による方法^{5),6)}では, そのろ液 4 mL を遠心式フィルターユニットに入れ, 7500 × g で 30 分間遠心分離し, ろ過膜を通過した溶液 0.25 mL とアセトニトリル 0.25 mL を混合後, シリンジレスフィルター (孔径 0.45 µm) を用いてろ過し, 模擬試料検液とした。

有機溶媒による変性沈殿法^{4)~6)}では, ろ液 3 mL とアセトニトリル 3 mL を混合後, メンブレンフィルター (孔径 0.45 µm) を用いてろ過し, 模擬試料検液とした。

これらの模擬試料検液について, カラム①は 2.3.1 で決定した

条件, カラム②は 2.2.1 に記載の条件で測定してしょ糖及び乳糖の回収率を求め, その定量結果から除たんぱく法について決定した。

検量線用検液については, カラム①は 2.3.1(2)のとおり調製し, 内標準物質は 2.3.1(2)で決定した内標準物質を用いた。カラム②については次のとおり調製した。しょ糖 1.1 g 及び乳糖 0.1 g, しょ糖 1.2 g 及び乳糖 0.2 g, しょ糖 1.3 g 及び乳糖 0.3 g, しょ糖 1.4 g 及び乳糖 0.4 g, しょ糖 1.5g 及び乳糖 0.5 g をそれぞれ異なる 5 本の 100 mL 容メスフラスコに量り取り, マルチトール 10 %水溶液をそれぞれ 8 mL ずつ加え, 水で定容した。この溶液 0.25 mL とアセトニトリル 0.25 mL を混合後, シリンジレスフィルター (孔径 0.45 μm) を用いてろ過し, カラム②の検量線用検液とした。

2.3.2(2) 酵素法

100 mL 容メスフラスコ 3 本に 2.3.2(1)で作製した除たんぱく用模擬試料 1 g を量り取り, F キットの取扱説明書に従い模擬試料検液を調製した。

検量線用検液は次のとおり調製した。乳糖 0.5 g を量り取り, 水で 50 mL に定容した溶液の 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL 及び 10 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, 2.3.2(1)で HPLC を用いて求めた回収率と比較した。

2.3.3 添加回収試験

2.3.3(1) HPLC

しょ糖 65 %, 全粉乳 30 %, 小麦粉 5 %の割合で混合した添加回収試験用模擬試料を作製し, 2.3.2(1)で決定した除たんぱく処理を行い, 模擬試料検液を調製した。カラム①及び②を用いて 2.3.2(1)と同様の条件で測定を行い, しょ糖及び全粉乳の回収率を求めた。全粉乳の回収率は, 別途 200 mL 容三角フラスコ 3 本に全粉乳 0.6 g を量り取り, 模擬試料と同様の操作で調製した検液中の乳糖の含有率をもとに算出した。

2.3.3(2) 酵素法

100 mL 容メスフラスコ 3 本に 2.3.3(1)で作製した添加回収試験用模擬試料 1g を量り取り, 2.3.2(2)と同様に模擬試料検液を調製し, 全粉乳の回収率を求め, 2.3.3(1)で HPLC 法を用いて求めた回収率と比較した。全粉乳の回収率は, 別途 100 mL 容メスフラスコ 3 本に全粉乳 0.6 g を量り取り, 模擬試料と同様の操作で調製した検液中の乳糖の含有率をもとに算出した。

2.3.4 繰返し性

2.3.3(1)の模擬試料検液をカラム①及び②において, それぞれ繰返し 5 回ずつ測定し, しょ糖の回収率及び別途測定した全粉乳中の乳糖の含有率から算出した全粉乳の回収率のそれぞれの相対標準偏差を求めた。

2.3.5 菓子類の分析

2.3.5(1) HPLC 法

市販品の加糖練乳及びミルクチョコレートを用いて 2.3.3(1)と同様の操作で試料検液を調製し, カラム①を用いて乳糖分の定量分析を行った。加糖練乳については 100 mL 容メスフラスコに 20

g 量り取り, 水で定容した溶液を 200 mL 容三角フラスコ 3 本に 10 mL ずつ分注した。また, ミルクチョコレートについては 50 mL 容遠沈管 3 本に 2 g ずつ量り取り, 脱脂操作を行ったうえで調製した。

脱脂操作は, 試料を量り取った遠沈管に石油エーテルを 20 mL ずつ加え, 時々攪拌しながら 15 分間放置した後, 3000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上清を駒込ピペットで除去した。この操作を 2 回行ったのち, 石油エーテルを完全に蒸散させた。

2.3.5(2) 酵素法

市販品の加糖練乳及びミルクチョコレートを用いて 2.3.3(2)と同様の操作で調製した試料検液について乳糖分の定量分析を行い, 2.3.5(1)で HPLC 法を用いて求めた定量結果との比較を行った。加糖練乳については 100 mL 容メスフラスコに 20 g 量り取り, 水で定容した溶液を 100 mL 容メスフラスコ 3 本に 5 mL ずつ分注した。また, ミルクチョコレートについては 100 mL 容メスフラスコ 3 本に 1 g ずつ量り取った。

3. 結果及び考察

3.1 糖類の分離条件及び内標準物質の検討

3.1.1 糖類の分離条件の検討

2.3.1(1)の①から④のそれぞれの組成の溶離液で測定を行い, 得られたクロマトグラム (Fig.1) の各ピークの保持時間や分離度から検討した結果, ①から④にかけて溶離液中のメタノールの割合を減らし, 水の割合を増やしたところ, しょ糖と乳糖の分離度が向上した一方で, 乳糖と麦芽糖の分離度は低下した。③の組成の溶離液は, 最も各ピークが均等に分離し, 分離度も良好であったため, 今回試験した 4 種類の溶離液の組成の中で最も適していると考えられる。そこで, ③の組成の溶離液を用い, カラム温度 40 $^{\circ}\text{C}$ と 60 $^{\circ}\text{C}$ の 2 通りで測定を行い得られたクロマトグラム (Fig.2) を比較したところ, 60 $^{\circ}\text{C}$ の方が各ピークがより均等に分離した。よって, しょ糖, 乳糖及び麦芽糖の適切と考えられる分離条件は次のとおりとなった。

移動相 : アセトニトリル/メタノール/水=80/6/14
カラム温度 : 60 $^{\circ}\text{C}$

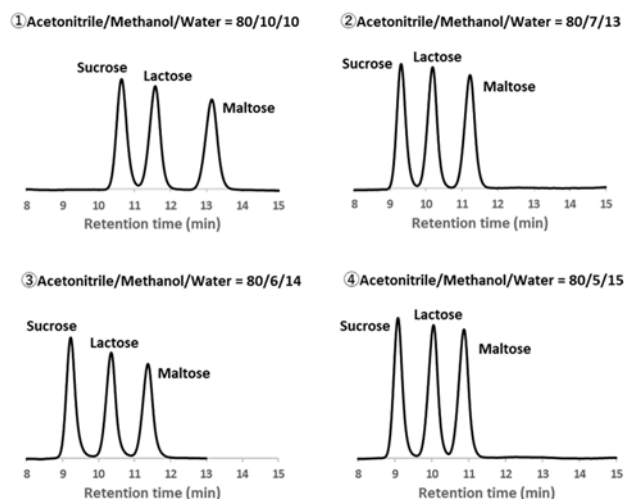


Fig.1 Chromatogram of sucrose, lactose, and maltose with eluents ①-④.

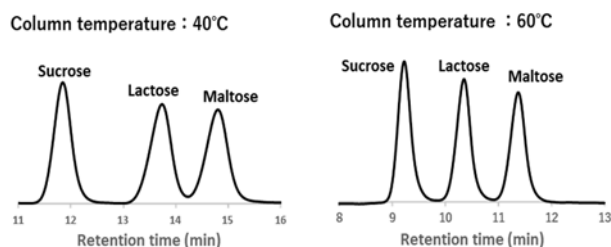


Fig.2 Chromatogram of sucrose, lactose, and maltose at column temperatures of 40 °C and 60 °C.

また、この分離条件でカラム①を用いて測定した糖及び糖アルコール類の保持時間を Table 1 に、そのクロマトグラムを Fig.3 に示す。ここで、他の糖及び糖アルコール類との分離が良好なメソエリトリール及びトレハロースを 2.3.1(2)で使用する内標準候補物質とした。

Table 1 Retention time of sugars and sugar alcohols with column ①

Category	Compound name	Retention time (min)
Sugar	Fructose	5.6
	Glucose	6.9
	Sucrose	9.2
	Lactose	10.4
	Maltose	11.4
	Trehalose	13.0
Sugar alcohol	meso-Erythritol	4.7
	Xylitol	5.3
	Sorbitol	6.2

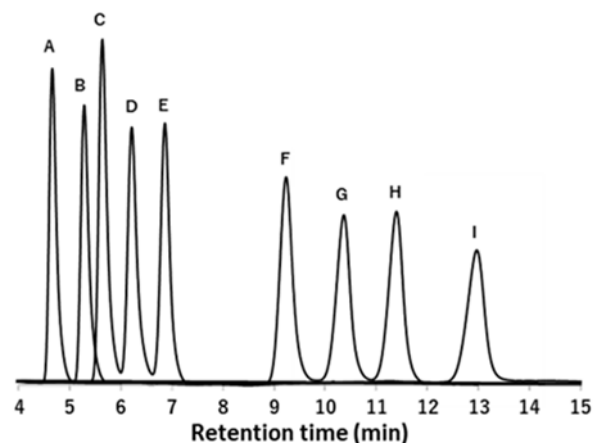


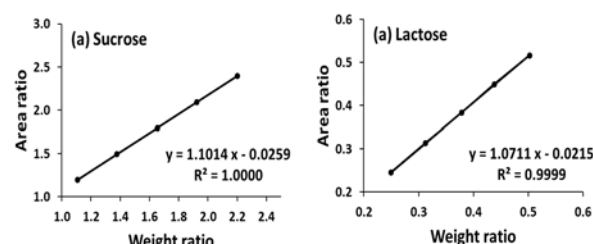
Fig.3 Chromatogram of sugar and sugar alcohol with column ①.

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

3.1.2 内標準物質の検討

3.1 で決定した分離条件において、しょ糖及び乳糖は 2.3.2 に示した濃度範囲においてメソエリトリール又はトレハロースを内標準物質とした場合に、いずれも原点を通る良好な直線性 (メソエリトリール; しょ糖の相関関係: $R^2=1.0000$, 乳糖の相関関係: $R^2=0.9999$, トレハロース; しょ糖の相関関係: $R^2=0.9999$, 乳糖の相関関係: $R^2=0.9995$) を示した。メソエリトリールを内標準物質として測定した検量線を Fig.4 に、トレハロースを内標準物質として測定した検量線を Fig.5 に示す。

ここで、Table 1 で示した保持時間のとおり、メソエリトリールを内標準物質とした場合、トレハロースを用いた場合よりも分析時間を短縮できるため、カラム①における内標準物質をメソエリトリールとした。

Fig.4 Calibration curve of sucrose and lactose
(internal standard : meso-Erythritol).

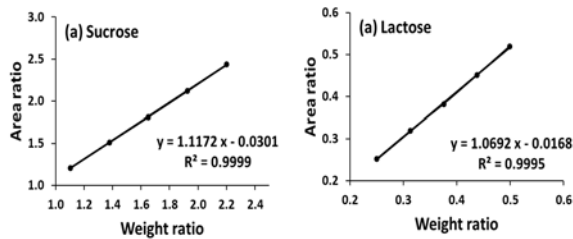


Fig.5 Calibration curve of sucrose and lactose (internal standard : trehalose).

以上から、カラム①の適切な分離条件及び内標準物質は以下のよう

移動相 : アセトニトリル/メタノール/水 = 80/6/14
 カラム温度 : 60 °C
 流速 : 1.0 mL/min
 内標準物質 : メソエリトリール

3.2 除たんぱく法の検討

限外ろ過による方法では、遠心式フィルターユニットの膜に含まれるグリセリンが混入し、3.1.1 で決定したカラム①の内標準物質であるメソエリトリールとピークが接近してしまったため、カラム①における除たんぱく法としては検討しなかった (Fig.6).

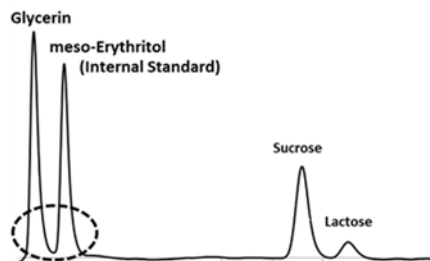


Fig.6 Chromatogram of meso-erythritol, sucrose and lactose with column ①.

カラム②については、グリセリンの各ピークへの影響は見られなかったため、限外ろ過による方法はカラム②について、有機溶媒による変性沈殿法はカラム①及び②の両カラムについて検討した。

HPLC と酵素法でそれぞれ定量分析した際のしよ糖及び乳糖の回収率及び相対標準偏差を Table 2 に示す。

有機溶媒による変性沈殿法については、各模擬試料の乳糖の回収率はカラム①及び②において 100 % 前後と良好であり、しよ糖についても良好な結果となった。また、乳糖の回収率について、HPLC と酵素法を比較しても同様の回収率となった。一方で、限外ろ過による方法では、乳糖の回収率は 100 % 近い値となったが、しよ糖の回収率については 106 % と 100 % を大きく上回る結果となった。

以上の結果から、以降の検討における除たんぱく操作は、有機溶媒による変性沈殿法に決定した。

Table 2 Results of recovery rate of simulated samples (n = 3) by HPLC (Column ①, ②) and enzymatic method

Column	Deproteination	Sucrose		Lactose	
		Recovery rate (%)	RSD (%)	Recovery rate (%)	RSD (%)
①	Deturend precipitation	101.18	0.33	99.25	0.28
②	Deturend precipitation	100.55	0.53	100.01	1.46
	Ultrafiltration	106.01	0.37	99.00	2.12
Enzymatic method		-	-	101.30	0.86

3.3 各分析法における模擬試料のしよ糖及び全粉乳の回収率

HPLC と酵素法でそれぞれ定量分析した際のしよ糖及び全粉乳の回収率及び相対標準偏差を Table 3 に示す。

HPLC での全粉乳の回収率は、カラム①及び②のいずれでもおよそ 100 % と良好であり、カラム①において従来のアミノカラムの問題点である還元糖の回収率の低下は見られなかった。また、しよ糖の回収率もいずれのカラムでも良好な結果が得られ、HPLC と酵素法を比較しても全粉乳の回収率が概ね一致した。

なお、測定回数を重ねるにつれカラム圧の上昇が認められた。

Table 3 Results of recovery rate of simulated samples containing whole milk powder (n = 3) by HPLC (Column ①, ②) and enzymatic method

Column	Sucrose		Whole milk powder	
	Recovery rate (%)	RSD (%)	Recovery rate (%)	RSD (%)
①	100.57	0.18	100.82	0.61
②	99.70	0.25	100.90	0.67
Enzymatic method		-	100.55	0.84

3.4 繰り返し精度

2.3.3(1)の模擬試料検液をカラム①及び②においてそれぞれ繰り返し 5 回ずつ測定し、しよ糖及び全粉乳の回収率のそれぞれの繰り返し測定の際の相対標準偏差を求めた結果、カラム①ではしよ糖 0.63 %、全粉乳については 1.71 %、カラム②ではしよ糖 0.35 %、全粉乳 1.26 % とどちらのカラムにおいても比較的良好な繰り返し精度を示した (Table 4)。

Table 4 Repeatability of simulated sample containing whole milk powder

Column	RSD(%) (n = 5)
①	Sucrose 0.63
	Whole milk powder 1.71
②	Sucrose 0.35
	Whole milk powder 1.26

3.5 各分析法における菓子類の乳糖定量結果の比較

乳糖分を含有する菓子類として、全乳にしょ糖を加えて濃縮した加糖練乳及び油脂を多量に含むミルクチョコレートについて HPLC と酵素法でそれぞれ定量分析した際の乳糖分及び相対標準偏差を Table 5 に示す。

HPLC 及び酵素法によって求めた各菓子類等に含まれる乳糖分は、ほぼ一致した結果となった。

なお、3.3 と同様、測定回数を重ねるにつれカラム圧の上昇が認められた。

Table 5 Results of lactose content of confectionery (n = 3) by HPLC and enzymatic method

Sample	Method	Lactose content (%)	RSD(%)
Sweetened condensed milk	HPLC	11.13	1.71
	Enzymatic method	11.36	0.14
Milk chocolate	HPLC	9.65	0.38
	Enzymatic method	9.78	1.37

4. 要 約

本研究では、HILIC カラムの一種である HILICpak カラムを用いて分析条件の検討を行うとともに、模擬試料及び市販品の菓子類等について定量分析を行い酵素法との比較を行った。また、併せて HILICpak カラムにおける還元糖の回収率確認のため、アミドカラムである XBridge カラムを用いた模擬試料の定量分析との比較も行った。

検討を行った結果、しょ糖、乳糖及び麦芽糖が分離する分析条件において、有機溶媒による変性沈殿法で全粉乳を含む模擬試料のしょ糖及び全粉乳の回収率は、概ね 100 % と良好な結果となり、繰り返し精度についても比較的良好であった。XBridge カラムを用いた定量結果と比較しても概ね一致し、アミノカラムの問題点として指摘されている、カラムのアミノ基と還元糖がシッフ塩基を形成することで起こる還元糖の回収率の低下は見られなかった。また、今回の分析条件下において、市販品の菓子類に含まれる乳糖分について 2 種類の菓子類において酵素法による定量値と同様の結果が得られた。

一方、今回検討した有機溶媒による変性沈殿法では、測定を重ねるにつれカラム圧上昇が認められたことから、たんぱく除去が不十分であったことが考えられる。したがって除たんぱく法については、現在主に用いられている除たんぱく法の採用も含め、更なる検討が必要である。

文 献

- 1) 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 2021-07-21)
- 2) 平松南実, 平元秀和, 甲田正人：関税中央分析所報, **61**, 67 (2021)
- 3) Shodex ホームページ：「VG-50 の特長(1) (還元糖の回収率)」(<https://www.shodex.com/ja/da1/02/19/01.html>) (参照 2021-07-21)
- 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) 中村洋：“分析試料前処理ハンドブック”, P.179 (2003),(丸善)
- 6) 日本分析化学会関東支部：“高速液体クロマトグラフィーハンドブック”, P.236 (2000),(丸善)