

HPLC法による少糖類の一斉定量分析の検討について

高野 香織*, 岡本 健*, 大嶽 秀之*, 武藤 辰雄*

Simultaneous quantitative analysis of mono- and oligosaccharides by the HPLC method

Kaori TAKANO*, Ken OKAMOTO*, Hideyuki OTAKE* and Tatsuo MUTO*

*Nagoya Customs Laboratory

2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-8535 Japan

For the quantitative analysis of sucrose in food preparations and lactose in milk preparations using HPLC, we studied the separation method and quantitative analysis method using a C30 column under the mobile phase using 100% water. The C30 column is one type of a reverse-phase column in which a triacontyl group was introduced as column packing material. For the quantitative analysis of sucrose and lactose by the C30 column using an internal standard substance, Raffinose, which is a trisaccharide, is optimal as the internal standard substance. Analytical curves of sucrose and lactose using the C30 column showed linearity. The analysis method using the C30 column enabled quantitative analysis of sucrose and lactose with a smaller error than the method using an amino column which is conventionally used for sugars.

1. 緒 言

農水産品や食品の分析において、その構成成分である少糖類の定量は関税分類の決定のために重要な分析の一つである。少糖類は、その含有割合により関税分類が異なるものがあるため、正確に定量することは必要不可欠である。

少糖類の定量分析には、一般的に高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）法が用いられている。同法は、糖類を分離するために順相アミノ系カラム（以下「アミノ系カラム」という。）を使用し、移動相にはアセトニトリルと水を混合したものをを用いて定量を行っている¹⁾。しかし、アセトニトリルは毒物及び劇物取締法の劇物や水質汚濁防止法の有害物質等の化学物質関連法令に規制されており、また世界的な供給量不足のため価格も高騰していることから、分析及び廃液の保管・廃棄の負担も生じている。

今回、人体に影響がなく廃液の処理も簡便な移動相として、水のみを用いた HPLC 法による少糖類の分析法の検討を行った。分離カラムにトリアコンチル基を修飾した逆相カラム（以下「C30 カラム」という。）を用いて、水 100% 移動相における少糖類の分離定量を行ったので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

輸入品 A（しょ糖、スキムミルク及びデキストリンの調製品）：
1 検体

輸入品 B（しょ糖、全粉乳及びデキストリンの調製品）：1 検体
しょ糖（関東化学製）
乳糖一水和物（和光純薬工業製）
スキムミルク粉末（和光純薬工業製）
ラフィノース五水和物（東京化成工業製）
グリセリン（関東化学製）
アセトニトリル（HPLC 用・関東化学製）

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：LC-20 システム（島津製作所製）
検出器：示差屈折率検出器（島津製作所製）

2.2.2 C30 カラム条件

カラム：Develosil RP-AQUEOUS (AR-5) (4.6 × 250mm)
2 連結（野村化学製）

ガードカラム：Develosil RP-AR（野村化学製）

カラム温度：30 及び 40

流速：0.7 ml/min

移動相：水

注入量：10 µl

2.2.3 アミノ系カラム条件

カラム：Asahipak NH2P-50 4E (4.6 × 250mm)（昭和電工製）

ガードカラム：Asahipak NH2P-50G 4A（昭和電工製）

カラム温度：40

流 速：1.0 ml/min

* 名古屋税関業務部 〒455-8535 愛知県名古屋市港区入船 2-3-12

移動相：アセトニトリル/水（75/25）

注入量：20 μ l

内部標準：グリセリン

2.2.4 測定試料の調製

試料は全てイオン交換水に溶かし、粉乳を含む試料については2%硫酸亜鉛水溶液及び1.8%水酸化バリウム水溶液にて除たんぱく後、孔径0.22 μ mのメンブランフィルターでろ過した。C30カラム条件における分析では、この試料溶液をそのまま測定溶液とし、アミノ系カラム条件における分析では、試料溶液をアセトニトリルと1:1で混合したものを測定溶液とした。

2.3 実験方法

2.3.1 C30カラムにおける分析条件及び内部標準物質の検討

ぶどう糖、果糖、しょ糖、麦芽糖及び乳糖について、0.2%水溶液を調製し、2.2.2の条件にてカラム温度を30及び40の2条件にて測定し、各糖のクロマトグラムの分離に最適なカラム温度を検討した。続いて、決定したカラム温度条件下で上述の5種類の糖類のクロマトグラムに影響しない内部標準物質を選択した。

2.3.2 しょ糖及び乳糖の定量性の比較

C30カラム及びアミノ系カラムについて、低濃度範囲（0.01～0.05%）及び高濃度範囲（0.5～1.5%）のしょ糖及び乳糖混合溶液に、C30カラムにおける分析では内部標準物質は0.1%、アミノ系カラムにおける分析では内部標準物質は0.3%になるように添加し試料溶液とした。得られたクロマトグラムから濃度ごとにしょ糖及び乳糖のピーク面積（ A_x 及び A_y ）と内部標準物質のピーク面積（ A_s ）の比（ A_x/A_s 及び A_y/A_s ）をそれぞれ求め、この値に対するしょ糖及び乳糖と内部標準物質の重量比により検量線を作成した。

2.3.3 模擬試料の調製

標準のしょ糖及びスキムミルクを7:3の重量比となるように混合し、模擬試料とした。

2.3.4 模擬試料によるしょ糖及び乳糖の回収率

2.3.3にて調製した模擬試料0.5g及びミルク分定のための標準スキムミルク0.4gについて、しょ糖分及び乳糖分をC30カラム及びアミノ系カラムにて測定し、得られたクロマトグラムについて内部標準物質のピーク面積（ A_s ）に対するしょ糖及び乳糖のピーク面積の比（ A_x/A_s 及び A_y/A_s ）を求めた。この面積比としょ糖及び乳糖の検量線から内部標準物質としょ糖及び乳糖の重量比（ W_x/W_s 、 $Wy1/W_s$ 及び $Wy2/W_s$ ）をそれぞれ求め、次式によりC30カラム及びアミノ系カラムにおけるしょ糖及びスキムミルクの回収率を算出し比較した。

$$\text{しょ糖回収率}(\%) = (W_x / W_s \times M_s) / S_x \times 100$$

$$\text{スキムミルク回収率}(\%) = (Wy1 / W_s \times M_s) /$$

$$(Wy2 / W_s \times M_s / Sy2) / Sy1 \times 100$$

W_x / W_s ：検量線から求めた模擬試料中の内部標準物質としょ糖の重量比

$Wy1 / W_s$ ：検量線から求めた模擬試料中の内部標準物質と乳糖の重量比

$Wy2 / W_s$ ：検量線から求めた標準スキムミルク中の内部標準物質と乳糖の重量比

M_s ：内部標準物質の重量（mg）

S_x ：模擬試料中のしょ糖の採取量（mg）

$Sy1$ ：模擬試料中のスキムミルクの採取量（mg）

$Sy2$ ：標準スキムミルクの採取量（mg）

2.3.6 輸入貨物の分析

2.1における輸入品A及びBをそれぞれ1.0g採り、各検体中のしょ糖及び乳糖をC30カラム及びアミノ系カラムにて定量し、しょ糖及び乳糖の含有率を比較した。

3. 結果及び考察

3.1 C30カラムにおける分析条件及び内部標準物質の検討

3.1.1 C30カラムにおける分析条件の検討

主要な少糖類であるぶどう糖、果糖、しょ糖、麦芽糖及び乳糖について、2.2.2の条件において、カラム温度を30及び40にて測定したクロマトグラムをFig1, 2に示す。30における分析では、二糖類である麦芽糖及び乳糖はアノマー分離によりクロマトグラムのピークが2本に分かれた。また、単糖類であるぶどう糖及び果糖のクロマトグラムのピークは分離しなかった。対して、40においては麦芽糖及び乳糖のアノマー分離に由来するピークの枝分かれが抑制され、しょ糖、麦芽糖及び乳糖については良好な分離が得られた。糖類の還元末端が型と型に分かれるアノマー分離はカラム温度を上昇させることで抑制できるが、C30カラムのメーカーが推奨する分析温度は40以下であるため、本研究におけるカラム温度条件は40を採用し、当条件にてしょ糖分及びミルクに含まれる乳糖分の定量性を検討した。

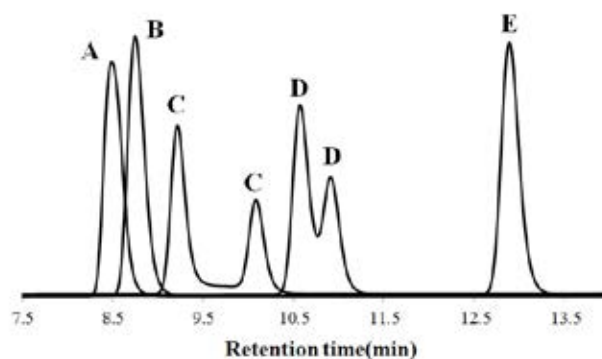


Fig. 1 Chromatogram of sugars in C30 column (column oven temperature 30°C)

Chromatographic conditions are described in 2.2.

A: Glucose; B: Fructose; C: Lactose; D: Maltose; E: Sucrose

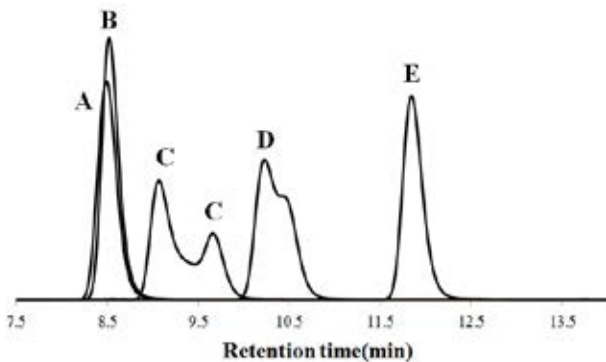


Fig. 2 Chromatogram of sugars in C30 column (column oven temperature 40°C)
Chromatographic conditions are described in 2.2.
A: Glucose; B: Fructose; C: Lactose; D: Maltose; E: Sucrose

3.1.2 C30 カラムにおける内部標準物質の検討

2.2.2 及び前記の条件におけるしょ糖及び乳糖と、内部標準物質として検討したソルビトール、グリセリン、メレチトース及びラフィノースの各クロマトグラムを Fig. 3 に示す。アミノ系カラムの内部標準物質として使用しているグリセリンのピークは、C30 カラムにおいては乳糖と重なったため使用できなかった。対してラフィノースのピークは乳糖及びしょ糖と良好に分離した。

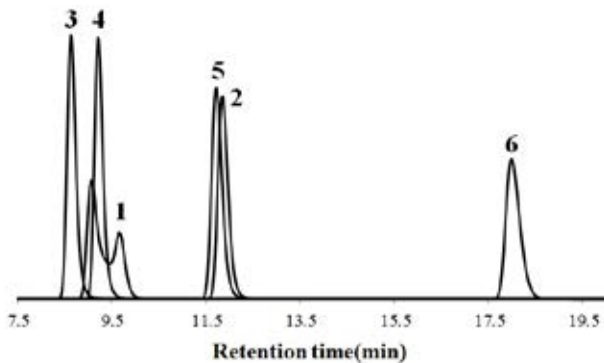


Fig. 3 Chromatogram of internal standards in C30 column
Chromatographic conditions are the same as in Fig. 2.
1: Lactose; 2: Sucrose; 3: Glycerine; 4: Sorbitol; 5: Melicitoise; 6: Raffinose

3.2 しょ糖及び乳糖の定量性

2.3.2 に従い、C30 カラムを用いて測定したしょ糖及び乳糖の検量線及び相関係数 (R^2) を求めた。アノマー分離によりクロマトグラムのピークが2本に枝分かれした乳糖については、ピーク面積を合算して計算した。低濃度範囲 (0.01 ~ 0.05%) においては、しょ糖の相関式は $y=1.1819x+0.00008$ ($R^2=0.9999$)、乳糖の相関式は $y=1.1037x+0.0114$ ($R^2=0.9994$) となった。高濃度範囲 (0.5 ~ 1.5%) においては、しょ糖の相関式は $y=1.1416x+0.0658$ ($R^2=0.9999$)、乳糖の相関式は $y=1.1269x+0.0212$ ($R^2=0.9999$) となった。よって、C30 カラムを用いて測定したしょ糖及び乳糖の検量線は、高濃度及び低濃度のいずれの範囲においても相関係数 0.999 以上の直線性を示した。以上の結果から、乳糖の検量線においては、2本に

分かれたクロマトグラムのピークを合算しても、直線性には影響しないことが判明した。

アミノ系カラムを用いて測定する場合、2.2.4 に述べたように移動相のアセトニトリル混合溶媒に試料である糖類を溶解させるため、測定前に試料溶液とアセトニトリルを 1:1 で混合する操作が必要である。対して C30 カラムは移動相が水であるため試料溶液をそのままカラムに導入することができ、アミノ系カラムと比較して実験操作を簡略化することが可能であった。

3.3 模擬試料の回収率の比較

2.3.4 で得られた模擬試料中のしょ糖及びスキムミルクの混合割合に対する平均回収率をそれぞれ Table1 に示す ($n=6$)。C30 カラムにおけるしょ糖及びスキムミルクの平均回収率は、しょ糖 100.2%、スキムミルク 99.9% となった。一方、アミノ系カラムにおけるしょ糖及びスキムミルクの平均回収率は、しょ糖 99.8%、スキムミルク 100.6% となった。また、各カラムにおけるしょ糖及び乳糖の測定値の標準誤差を求めたところ Fig.4 のとおりとなり、アミノ系カラムよりも C30 カラムの方が小さくなった。これらのことから、C30 カラムのしょ糖及びスキムミルクの回収率はアミノ系カラムと同様にほぼ 100% の値を示し、C30 カラムを用いることで混合試料においてもアミノ系カラムより小さな誤差で各成分の定量が可能であることが判明した。

Table 1 Average of recovery of the model sample of sucrose and skimmed milk powder ($n=6$)
The value of skim milk was quantified by the value of lactose contained.

	Recovery of model sample (%)	
	Sucrose	Skimmed milk powder
C30	100.2	99.9
Amino	99.8	100.6

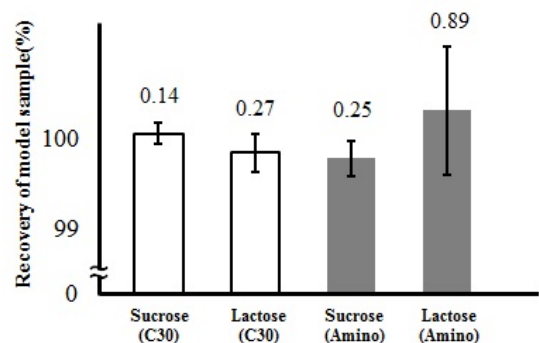


Fig. 4 Standard error of quantity of sucrose and lactose in model sample ($n=6$)

3.4 輸入貨物の分析値の比較

当関に申告された輸入貨物 2 検体中のしょ糖及び乳糖の平均定量値を Table2 に示す ($n=3$)。C30 カラムにおける、輸入品 A 中のしょ糖分は 70.4%、乳糖分は 16.2% であり、輸入品 B 中のしょ糖

分は 66.5%、乳糖分は 12.2%であった。一方、アミノ系カラムにおける輸入品 A 中のしょ糖分は 70.6%、乳糖分は 16.9%であり、輸入品 B 中のしょ糖分は 66.7%、乳糖分は 11.9%であった。

Table 2 Average of content of sucrose and lactose in two import samples (n = 3)
The ingredients of samples are described in 2.1.

	Contents of sucrose and lactose(%)			
	Sucrose + Skimmed milk powder sample		Sucrose + Whole milk powder sample	
	Sucrose	Lactose	Sucrose	Lactose
C30	70.4	16.2	66.5	12.2
amino	70.6	15.9	66.7	11.9

4. 要 約

HPLC 法を用いてしょ糖及び乳糖を定量するために、C30 カラムを用いた水 100%移動相条件下における分離・定量方法を検討した。内部標準物質には、三糖類であるラフィノースが最適であった。当該条件においては試料溶媒が水 100%であってもカラムに直接導入することが可能であることから、測定前に試料溶液にアセトニトリルを加え調製する必要があるアミノ系カラムよりも実験操作を簡略化することができた。

C30 カラム及びアミノ系カラムの定量値を比較したところ、標準のしょ糖及びスキムミルクを混合した組成が既知の模擬試料におけるしょ糖及びスキムミルクの回収率はいずれのカラムも約 100%を示し、輸入貨物のミルク調製品においてもしょ糖及び乳糖の定量を行うことが可能であった。

以上のことから、C30 カラムを用いた HPLC 法によるしょ糖及び乳糖の定量分析は、特別な廃液処理も不要な水を移動相として用いることで、人体に影響が無く経費も安価であり、食品中の少糖類の定量に有効な分析法の一つと考えられる。

文 献

- 1) 中村文雄, 東郷雅子, 廣瀬達也, 岩本和郎: 関税中央分析所報, 36, 9 (1997)