

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しょ糖の同時定量分析について

平松 南実*, 平元 秀和*, 甲田 正人*

Simultaneous Quantitative Analytical Method of Lactose and Sucrose in Milk Preparations by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HIRAMATSU Minami*, HIRAMOTO Hidekazu* and KOTA Masahito*

*Osaka Customs Laboratory, 4-11-28 Nankohigashi, Suiminoe-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 less than 30%. Therefore, quantitative analysis of lactose which is one of the natural compositions of milk is extremely useful in tariff classification. As a quantitative analysis method for lactose, almost all customs carry out quantitative analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index detector. However, when quantitative analysis is carried out simultaneously with sucrose, it is difficult to prepare a calibration curve showing a good correlation coefficient with the conventionally used amino column. Furthermore, when reducing sugars are contained in the test solution, these sugars are adsorbed in the column and the quantification accuracy declines. In this study, a new amido column which is one of the HILIC columns was investigated as a column that can simultaneously quantify sucrose and lactose instead of the conventional amino column. As a result, a superior recovery rate of sucrose and skim milk powder was observed when trehalose was used as an internal standard with the current deproteinizing agent (Customs Analytical Method No.108) and maltitol was used as an internal standard and deproteinized by ultrafiltration.

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いる。実際にその閾値付近 (29%前後) の含有率とされる貨物が数多く申告されるため、ミルクの天然の組成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。

税関における乳糖の定量分析法の一つとして、酵素法による乳糖の定量があるが、乳糖とその他の糖類についてそれぞれ別の操作を行う必要があるため、現在多くの税関では、より簡便な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。）による乳糖の定量分析を行っている。

また、税関で分析するミルク調製品にはしょ糖も含まれていることが多く、しょ糖含有量によっても税表上の所属が異なるため、乳糖の定量だけでなく、しょ糖についても同時に定量する必要があるが、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では、しょ糖との同時定量を行う場合、測定濃度範囲では乳糖のピーク面積が小さく、しょ糖のピークと近接するため、良好な相関係数を示す検量線を作成して定量を行うことが困難である

という問題があった。また、乳糖などの還元糖を検液中に含有する場合、それらが開環して形成するアルデヒド基がアミノカラム中のアミノ基とシップ塩基を形成することによりカラムに糖類が吸着し、定量精度の悪化やカラム寿命が低下する可能性も指摘されている^{1,2)}。配位子交換カラムについても、二糖類同士の分離が困難であるため、しょ糖と乳糖の同時分析には不適である。

そこで本研究では、アミノカラムに代わる新たなしょ糖及び乳糖の同時定量が可能な分析カラムとして、アミン系官能基ではなく、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、親水性相互作用クロマトグラフィー（以下、「HILIC」という。）カラムの一種であるアミドカラム（XBridge BEH Amide (Waters)）を使用し、分離条件の検討及び脱脂粉乳を含む模擬試料を用いた定量分析を行ったので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試薬

しょ糖、乳糖、果糖、ぶどう糖、麦芽糖、トレハロース、トリクロロ酢酸、硫酸亜鉛、水酸化バリウム、トリエチルアミン（キシダ化学）

* 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

マルチトール, ソルビトール, キシリトール, ラクトロース (東京化成)

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

2.1.2 試料

輸入品: 脱脂粉乳, デキストリン

2.1.3 器具

シリジレスフィルター : 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)

陽イオン交換カートリッジ: TOYOPAK IC-SP M (東ソー)

遠心式フィルターユニット: アミコンウルトラ-4, PLBC ウルトラセル-3, 3 kDa (メルク)

2.2 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-2031Plus (日本分光)

カラム: XBridge BEH Amide (150×4.6 mm I.D.), 2.5 μ m (Waters)

2.3 実験

2.3.1 糖類の分離条件の検討

本研究の定量分析対象であるしょ糖, 乳糖及びしょ糖と乳糖の中間の保持時間であるマルチトールを内標準物質の候補として, 溶離液の組成による各ピークの分離度及びピーク幅等のピーク形状を確認した。

しょ糖 1.3 g, 乳糖 0.3 g 及びマルチトール 1.0 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り, 水を加えて定容した。この溶液 0.25 mL とアセトン 0.25 mL を混合後, シリジレスフィルター (孔径 0.45 μ m) を用いてろ過したものを検液とし, 測定に供した。

溶離液の組成は以下の①から④の4種類を試験した。なお, 塩基性条件とするため, いずれの溶離液にもトリエチルアミン 0.05% を添加した。

①アセトン/水 = 80/20

②アセトン/メタノール/水 = 80/10/10

③アセトン/メタノール/水 = 78/11/11

④アセトン/メタノール/水 = 75/15/10

これらを比較した結果から, 以降の測定の際の溶離液の組成を決定した。

2.3.2 検液の組成及び注入量

マルチトールを内標準物質の候補とし, マルチトール 10g を 100mL 容メスフラスコに量り取り, 水で定容して 10%水溶液を調製し, 以下の試料溶液の調製に使用した。

しょ糖 1.3 g 及び乳糖 0.3 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り, マルチトール 10%水溶液 10mL を加え, 水で定容した。この溶液とアセトンをアセトン 50%となるように混合した後, シリジレスフィルター (孔径 0.45 μ m) を用いてろ過し, 検液とした (アセトン50%検液)。同様にしょ糖1.04 g 及び乳糖 0.24 g, しょ糖0.78 g 及び乳糖 0.18 g をそれぞれ 100 mL 容メスフラスコに量

り取り, マルチトール 10%水溶液 10 mL を加え, 水で定容した後, それぞれアセトン 40%, 30%となるように混合した後, シリジレスフィルターを用いてろ過し, 検液とした (アセトン40%及び30%検液)。これらアセトンの割合が30, 40及び50%の検液をそれぞれ測定して得られたクロマトグラムの各ピークの分離度及びピーク形状等を比較した。

また, アセトン50%の検液について, 注入量を 10 μ L 及び 5 μ L としてそれぞれ測定し, 同様に各ピークの分離度及びピーク形状等を比較した。

これらを比較した結果から, 以降のしょ糖及び脱脂粉乳の定量分析の測定を行う際の検液の組成及び注入量を決定した。

2.3.3 除たんぱく法及び内標準物質の検討

粉乳等のミルク調製品試料の除たんぱく法として, 税関でたんぱく質を含む試料に広く用いられている現行法 (税関分析法 No.108 菓子類のしょ糖分の定量分析法³⁾) の除たんぱく剤 (硫酸亜鉛水溶液及び水酸化バリウム水溶液), トリクロロ酢酸水溶液, 有機溶媒 (アセトニトリル) 及び遠心式フィルターユニットを用いた限外ろ過による方法を検討した。

また, しょ糖及び乳糖の同時定量分析に適した内標準物質の候補として, マルチトールの他に果糖, ぶどう糖, ラクトロース, トレハロース, キシリトール及びソルビトールについても検討した。10%マルチトール水溶液の調製と同様に、それぞれの内標準候補物質について 10%水溶液を調製した。

しょ糖 1.36 g, 脱脂粉乳 0.58 g, デキストリン 0.06 g を 200 mL 容三角フラスコにそれぞれ量り取り, 実際に分析依頼実績のあつたしょ糖 68%, 脱脂粉乳 29%及びデキストリン 3%となる模擬試料を作製し, トリクロロ酢酸以外の方法でそれぞれ除たんぱく処理を行い測定に供した。脱脂粉乳の回収率は, 別途 200 mL 容三角フラスコに脱脂粉乳 0.58 g 量り取り, 模擬試料と同様の操作で検液を調製した脱脂粉乳中の乳糖の含有率 (n=3) をもとに算出した。トリクロロ酢酸の検討については模擬試料ではなく、しょ糖、乳糖及びマルチトールを使用し予備測定を行った。

2.3.3(1) 現行除たんぱく法³⁾

脱脂粉乳 0.58 g の入った 200 mL 容三角フラスコ 3 本及び模擬試料 2 g の入った 200 mL 容三角フラスコ 3 本にそれぞれ水 70 mL を加え, 30 分間超音波処理を行った。次いで内標準候補物質の 10%水溶液 10 mL を加えた後, 硫酸亜鉛水溶液及び水酸化バリウム水溶液各 10 mL をそれぞれ加え, よく攪拌した後, メンブレンフィルター (孔径 0.20 μ m) でろ過し, ろ液 1.5 mL を陽イオン交換カートリッジに通した。この溶液 0.25 mL とアセトン 0.25 mL を混合後, シリジレスフィルター (孔径 0.45 μ m) を用いてろ過し, 脱脂粉乳検液 (n=3) 及び模擬試料検液 (n=3) とした。なお, 除たんぱく剤の硫酸亜鉛水溶液は, 硫酸亜鉛七水和物 18 g を量り取り, 蒸留水を用いて 1000 mL に定容し, 水酸化バリウム水溶液は, 水酸化バリウム八水和物 20 g を量り取り, 蒸留水を用いて 1000 mL に定容し調製した。

2.3.3(2) トリクロロ酢酸水溶液による方法^{4), 5)}

しょ糖 1.3 g, 乳糖 0.3 g を 3 本の 100 mL 容メスフラスコにそれぞれ量り取り, 少量の水に溶解した後, 10%マルチトール水溶液

10 mLを加えた。次いで10%トリクロロ酢酸水溶液を最終濃度がそれぞれ0%, 2%及び5%となるように加え、水を加えて定容した。この溶液0.25 mLとアセトン0.25 mLを混合後、シリジレスフィルター(孔径0.45 μm)を用いてろ過し、検液とした。

2.3.3(3) 有機溶媒による方法^{4)~6)}

脱脂粉乳0.58 gの入った200 mL容三角フラスコ3本及び模擬試料2 gの入った200 mL容三角フラスコ3本にそれぞれ水90 mLを加え、30分間超音波処理を行った。次いで10%マルチトール水溶液10 mLをそれぞれ加え、よく攪拌した後ろ紙でろ過し、ろ液0.25 mLとアセトニトリル0.25 mLを混合後、シリジレスフィルター(孔径0.45 μm)を用いてろ過し、脱脂粉乳検液(n=3)及び模擬試料検液(n=3)とした。

2.3.3(4) 限外ろ過による方法^{4), 5)}

脱脂粉乳0.58 gの入った200 mL容三角フラスコ3本及び模擬試料2 gの入った200 mL容三角フラスコ5本に水90 mLをそれぞれ加え、30分間超音波処理を行った。次いで10%マルチトール水溶液10 mLをそれぞれ加え、よく攪拌した後ろ紙でろ過した。このろ液4 mLを遠心式フィルターユニットへ入れ、2000 × gで30分間遠心分離し、ろ過膜を通過した溶液0.25 mLとアセトン0.25 mLを混合後、シリジレスフィルター(孔径0.45 μm)を用いてろ過し、脱脂粉乳検液(n=3)及び模擬試料検液(n=5)とした。

2.3.4 検量線の直線性の検証

ショ糖1.1 g及び乳糖0.1 g、ショ糖1.2 g及び乳糖0.2 g、ショ糖1.3 g及び乳糖0.3 g、ショ糖1.4 g及び乳糖0.4 g、ショ糖1.5 g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、内標準溶液として10%トレハロース水溶液を10 mLずつ加え、水で定容した。この溶液0.25 mLとアセトン0.25 mLを混合後、シリジレスフィルター(孔径0.45 μm)を用いてろ過し、検量線用検液とした(ショ糖濃度:0.55~0.75%, 乳糖濃度:0.05~0.25%)。これら5種類の濃度の検液を用いて、ショ糖及び乳糖の濃度と内標準物質に対するピーク面積比の関係(検量線の直線性)について検討した。10%トレハロース水溶液の代わりに、10%マルチトール水溶液を加えて調製した場合についても同様に検討した。

2.3.5 繰返し性

現行除たんぱく法及び2.3.3の結果現行除たんぱく法と同等の回収率であることが判明した除たんぱく法について、繰り返し性の検証を行った。現行除たんぱく法を行った2.3.3(1)の模擬試料検液(n=3)及び限外ろ過を行った2.3.3(4)の模擬試料検液(n=5)をそれぞれ繰り返し5回ずつ測定し、ショ糖の回収率及び別途測定した脱脂粉乳中の乳糖の含有率から算出した脱脂粉乳の回収率のそれぞれの相対標準偏差を求めた。

3. 結果及び考察

3.1 糖類の分離条件の検討

2.3.1の①から④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、ピーク形状等から検討した結果、①では各ピークの保持時間が短く、ピークの大幅なテーリングも確認された。各糖類を適切な保持時間に調節するため、溶離液中の水の割合を減らし、溶出力が水よりも小さいメタノールを加えた②~④の組成では、各ピークの形状及び分離が向上する結果となった。④の組成では各ピークがプロードとなり、②及び③の組成のクロマトグラムを比較した結果、③の方がピークの対称性が良好であり、各ピークの分離度も大きかったため、今回試験した4種類の溶離液の組成では最適であると考えられる。よって、ショ糖、乳糖及びマルチトールの適切と考えられる分離条件は以下のように決定した。

移動相 : アセトン/メタノール/水 = 78/11/11

(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

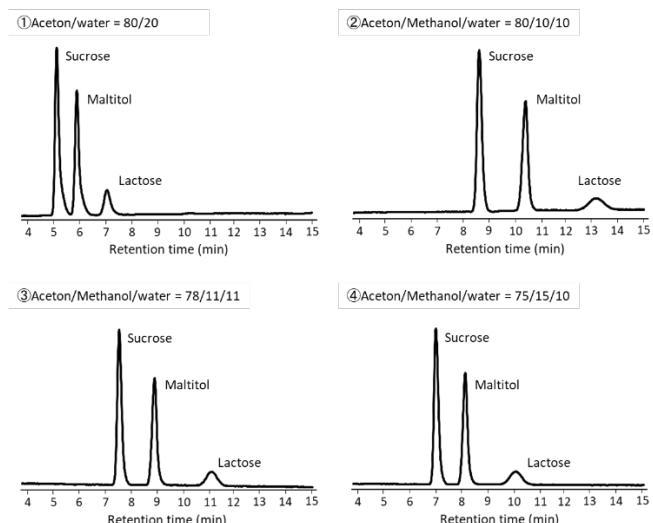


Fig.1 Chromatogram of maltitol, sucrose and lactose with eluent①~④.

また、この分離条件で測定した糖類及び糖アルコール類の保持時間をTable1に、そのクロマトグラムをFig.2に示す。乳糖とピークの重なる麦芽糖を除き、いずれの糖及び糖アルコール類もショ糖及び乳糖と完全に分離するため、以降の定量分析における内標準物質の候補とした。但し、キシリトール及びソルビトールは果糖と、マルチトール及びラクツロースは麦芽糖とそれぞれ完全に分離することができないため、この測定条件ではショ糖及び乳糖のほか、これらの糖及び糖アルコール類を試料中に含有している場合に内標準物質として使用することができない可能性がある。トレハロースは今回測定したいずれの糖及び糖アルコール類とも完全に分離することができるため、幅広い試料に適用可能であると考えられる。

Table 1 Retention time of sugars and sugar alcohols

	Retention time (min)
Sugar	Fructose 3.6
	Glucose 4.7
	Sucrose 7.5
	Lactulose 8.8
	Maltose 9.9
	Lactose 10.9
Sugar alcohol	Trehalose 13.3
	Xylitol 3.3
	Sorbitol 4.0
	Maltitol 8.8

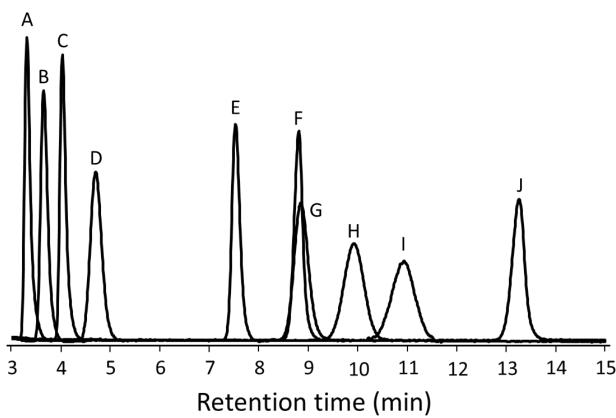


Fig.2 Chromatogram of sugar, sugar alcohol with XBridge BEH Amide column.

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

また、アミノカラムによる定量分析で内標準物質として使用しているグリセリンは保持時間が短く、溶媒の大きなピークと重なるため、今回の測定条件では使用することは不可能であった。

3.2 検液の組成及び注入量

2.3.2の結果、カラムへ注入する検液中の水の割合が多くなるほどピークがブロードとなり分離度が低下した。

また、注入量は 5 μ L の方がわずかにピーク幅が小さくなつたが、10 μ L でも十分に良好なピークの分離度のクロマトグラムが得られ、ピーク面積も大きいため誤差の少ない定量が行えると考えられることから、以降の定量分析は以下の検液の組成及び注入量で試験した。

検液組成：アセトン／水 = 50 / 50

注入量 : 10 μ L

また、さらにアセトンの割合を増やすことでピーク形状がより良好となり分離が向上する可能性も考えられる⁷⁾が、乳糖は溶解度が低く、アセトン等の有機溶媒の割合の高い溶液中では析出して回収率が低下する可能性があることから、今回試験した検液中の水の割合は最大で 50% とした。

3.3 除たんぱく法及び内標準法の検討

3.3.1 現行除たんぱく法による内標準物質の検討

模擬試料を現行除たんぱく法 (2.3.3(1)) で処理し、2.3.3 に記載の 7 種類の内標準物質を用いて定量分析した際のしょ糖及び脱脂粉乳の回収率及び 3 検体の回収率の相対標準偏差を Table 2 に示す。

内標準物質に糖アルコール（キシリトール、ソルビトール及びマルチトール）を使用した場合、各模擬試料のしょ糖の回収率は 102~121%、脱脂粉乳の回収率は 97~110% とマルチトールを除いて 100% から大きく乖離した値となり、特にキシリトール及びソルビトールでは 3 検体の回収率の相対標準偏差も大きいため、今回の測定条件下における内標準物質への適用は困難である。

一方、糖類（果糖、グルコース、ラクトース及びトレハロース）をそれぞれ内標準物質として使用した場合、脱脂粉乳の回収率はいずれも 99~102% と比較的良好な結果となった。しょ糖の回収率は、溶媒の大きなピークと近接する果糖で 104% とやや高い値となったものの、グルコース、ラクトース、トレハロースでは 98~102% と糖アルコールを内標準物質に用いた場合よりも良好であり、特にトレハロースでは脱脂粉乳としょ糖両方とも 100% に近い回収率を示したため、現行除たんぱく法により除たんぱくを行う場合には適した内標準物質となると考えられる。この実験結果を受けて、2.3.5 の試料調製には、内標準物質としてトレハロースを使用することとした。

Table 2 Results of recovery rate of simulated sample containing skim milk powder (n = 3) treated with current deproteinization agent

	Internal standard	Recovery rate (%)	RSD (%)
Sucrose	Fructose	103.61	0.78
	Glucose	101.34	0.49
	Lactulose	98.81	0.06
	Trehalose	99.45	0.13
	Xylitol	113.86	8.48
	Sorbitol	120.06	1.46
Skim milk powder	Maltitol	103.91	0.20
	Fructose	99.33	0.80
	Glucose	99.32	0.70
	Lactulose	99.76	0.23
	Trehalose	99.20	0.10
	Xylitol	97.55	8.20
	Sorbitol	104.72	1.32
	Maltitol	100.41	1.06

3.3.2 現行除たんぱく法以外の検討

トリクロロ酢酸による方法 (2.3.3(2)) は、しょ糖、乳糖及びマルチトールの試薬を用いたサンプルの予備測定において、トリクロロ酢酸の最終濃度が 2% 及び 5% とした場合の両方でしょ糖及びマルチトールのピーク面積の減少が見られたため、今回の模擬試

料の定量分析においては適用しなかった (Fig.3)。しょ糖溶液にトリクロロ酢酸を加えた溶液では、薄層クロマトグラフィーにより、しょ糖に加え果糖及びぶどう糖のスポットが確認されたことから、このピーク面積の減少は、高濃度のトリクロロ酢酸溶液を加えたことにより糖が検液調製中に加水分解されたことが原因と考えられる。

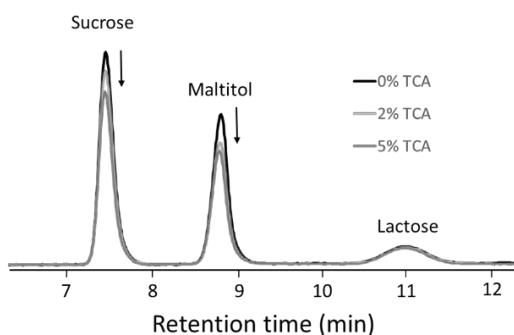


Fig.3 Decomposition of sucrose and maltitol by trichloroacetic acid (TCA) (0%, 2%, 5%).

そのためトリクロロ酢酸による方法の他に、無機陽イオンを含む現行法の除たんぱく剤に代わって除たんぱくを行うことが可能であると報告のあった有機溶媒による方法 (2.3.3(3)) 及び限外ろ過による方法 (2.3.3(4)) の2通りの除たんぱく法についても検討した。それぞれの方法で定量分析した際のしょ糖及び脱脂粉乳の回収率及び相対標準偏差を Table3 に示す。なお、いずれも内標準物質はマルチトールとした。

各模擬試料の脱脂粉乳の回収率は、有機溶媒 (50%アセトニトリル) による方法、限外ろ過による方法いずれも 100% 前後と良好な結果となった。また、現行法の除たんぱく剤による方法では 102 ~ 105% とやや高い値となっていたしょ糖の回収率についても、いずれも 100% 前後と良好な結果となった。回収率の相対標準偏差も大きくはなかったが、50%アセトニトリルによる方法では、今回はフィルター付きバイアル内での小スケールでの混和及びろ過操作であり、除たんぱくの程度が不十分であったと考えられる。したがって、測定中にカラム圧が著しく増加したことから、実用化するには前処理操作の更なる検討が必要である。一方、限外ろ過による方法ではカラム圧に大きな変化は見られなかったため、測定に十分な除たんぱくができるものと考えられる。

以上の結果より、トリクロロ酢酸による方法及び50%アセトニトリルによる方法は、本研究では除たんぱく法として不適当であると判断した。ミルクの天然の組成分である乳糖の定量を行うためには、現行除たんぱく法により処理する場合はトレハロースを内標準物質とすることが適当であり、また、現行除たんぱく法による場合には回収率が 100% を超過したマルチトールも、限外ろ過による除たんぱく法では良好な回収率を示し、内標準物質に適用可能である。

Table 3 Results of recovery rate of simulated sample containing skim milk powder treated with pretreatment methods

		Recovery rate (%)	RSD (%)
Sucrose	50% acetonitrile (n = 3)	99.38	0.17
	Ultrafiltration (n = 5)	100.29	0.05
Skim milk powder	50% acetonitrile (n = 3)	98.77	0.25
	Ultrafiltration (n = 5)	100.38	0.57

3.4 検量線の直線性

2.3.1 及び 2.3.2 で決定した測定条件において、しょ糖及び乳糖は 2.3.4 に示した濃度範囲においてトレハロース及びマルチトールを内標準物質とした場合に、いずれも原点付近を通る良好な直線性 (トレハロース:しょ糖の相関係数: $R^2 = 0.9995$ 、乳糖の相関係数: $R^2 = 0.9997$ 、マルチトール:しょ糖の相関係数: $R^2 = 1.0000$ 、乳糖の相関係数: $R^2 = 0.9999$) を示した。トレハロースを内標準物質として測定した検量線を Fig.4 に、マルチトールを内標準物質として測定した検量線を Fig.5 に示す。

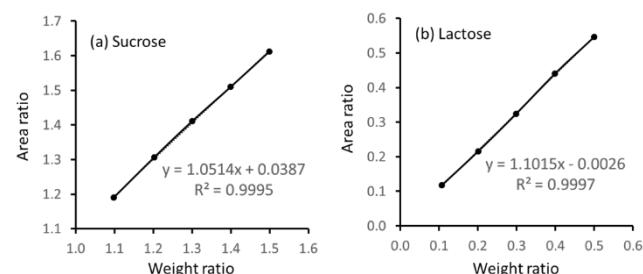


Fig.4 Calibration curve of sucrose and lactose (internal standard : trehalose).

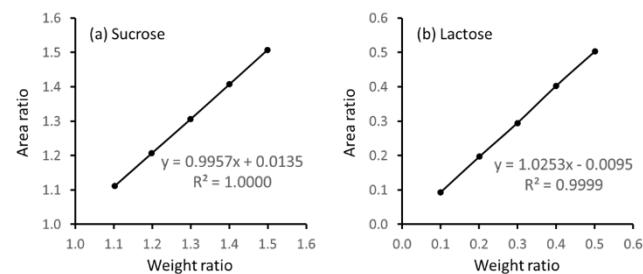


Fig.5 Calibration curve of sucrose and lactose (internal standard : maltitol).

3.5 繰返し性

現行除たんぱく法により処理した 2.3.3(1)の模擬試料検液 (n = 3) 及び限外ろ過により除たんぱく処理した 2.3.3(4)の模擬試料検液 (n = 5) をそれぞれ繰返し 5 回ずつ測定し、しょ糖の回収率及び脱脂粉乳の回収率のそれぞれの繰返し測定の際の相対標準偏差を求めた結果、2.3.3(1)の模擬試料検液ではしょ糖については 0.30 ~ 0.73%、脱脂粉乳については 0.40 ~ 0.59%、2.3.3(4)ではしょ糖については 0.12 ~ 0.30%、脱脂粉乳については 0.76 ~ 2.27% とどちらの除たんぱく法においても比較的良好な繰返し性を示した。

(Table 4).

Table 4 Repeatability of simulated sample containing skim milk powder treated with pretreatment methods

		RSD (%)
Sucrose	Current deproteinization agent (n = 3)	0.30 ~ 0.73
	Ultrafiltration (n = 5)	0.12 ~ 0.30
Skim milk powder	Current deproteinization agent (n = 3)	0.40 ~ 0.59
	Ultrafiltration (n = 5)	0.76 ~ 2.27

4. 要 約

本研究では、従来から HPLC によるしょ糖及び乳糖の定量分析に使用しているアミノカラムに代わり、しょ糖及び乳糖の同時定量が可能な分析カラムとして、新たに HILIC カラムの一種であるアミドカラムの適用を検討し、分離条件の検討及び模擬試料を用いた定量分析を行った。

今回検討を行った結果、脱脂粉乳を含む模擬試料中のしょ糖及

び脱脂粉乳の回収率は、トレハロースを内標準物質とし、現行法の除たんぱく剤（硫酸亜鉛水溶液及び水酸化バリウム水溶液）を添加する方法によって、概ね 100%と良好な結果となった。トレハロースは今回試験したいずれの糖類及び糖アルコール類とも完全に分離できるため、内標準物質として適していると考えられる。

また、マルチトールを内標準物質とし、試料溶液を限外ろ過による除たんぱくする法によっても、回収率は概ね 100%と良好な結果を示した。この方法は現行除たんぱく法と比較して操作が簡便であり、複数のサンプルを同時に処理することができるという利点がある。また、これら 2 通りの方法については、回収率とあわせて繰返し精度についても概ね良好であることがわかった。しかし、今回の測定条件下では麦芽糖のピークをマルチトール及び乳糖のピークと完全に分離できないため、試料中に麦芽糖を含有する場合は溶離液の組成等の条件の変更や、別途回収試験を実施したうえで内標準物質を検討し直す必要がある。今後、異なる様々な組成の分析試料や全粉乳等の脂肪分を含む試料についても検討を行うことで、酵素法による乳糖の定量法に代わる HPLC によるしょ糖及び乳糖の同時定量分析が確立できると考えられる。

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.chemtex.co.jp/seihim/ion/topics/page/3/>) (参照2020-07-06)
- 2) K. Jenkins : *Chromatography Today*, **8**, 14 (2015) .
- 3) 関税中央分析所ホームページ：税関分析法「菓子類のしょ糖分の定量分析法」(https://www.customs.go.jp/ccl_search/analysis_search/a_108_j.pdf) (参照2020-09-07)
- 4) 中村洋：“分析試料前処理ハンドブック”，P.179 (2003), (丸善)
- 5) 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)
- 6) 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**, 11 (2020) .
- 7) Shodexホームページ：「アミノカラムで糖を分析する方に」(<https://www.shodex.com/ja/dso/033.html>) (参照2020-07-06)