高速液体クロマトグラフィーによる乳製品中の 糖類の定量法

安井 健*・古川 剛**・長谷 幸*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Saccharides in Dairy Products

TAKESHI YASUI*, TAKESHI FURUKAWA** and SAKI HASE*

Using a LiChrosorb NH₂ (10 μ m) column, fructose, glucose, lactose and sucrose were separated and determined quantitatively. Samples were dissolved in water or diluted with water if necessary, treated with 80% ethanol, centrifuged at 1150 g, and then the supernatants were injected into a liquid chromatograph without further purifications. Analytical time was less than 10 minutes. The average recovery of lactose added to samples was 102.3%. Precision study showed when the sugar content was more than 1%, the average of coefficient of variations was 4.5%.

(Received Nov. 13, 1979)

食品中に含まれる糖類のうち、フラクトース、グルコース、ラクトース、マルトース、シュクロースの5種の糖は、その含有量も比較的多く、また摂取した場合にはエネルギーとして有効に利用されるので、種々の食品についてこれらの糖類の分別定量法を確立することは、食品分析法を研究する者にとって重要な課題である。

液体クロマトグラフィーを用いる乳製品中の糖類の定量法は、HOBBS ら¹⁾、WARTHESSEN ら²⁾、HURST ら³⁾により設定されているが、試料の前処理法に関しては、さらに改良を加えることにより、定量操作をより簡易、迅速にできる可能性があった。そこで、WARTHESSEN ら²⁾が用いている前処理法である80%エタノール抽出法を基礎に、前処理法の簡易化を試みた。

実験方法

1. 液体クロマトグラフおよび操作条件

送液ポンプ: 635A (日立), インジェクター: Model

7120 (Rheodyne) (サンプルループ容量: 1 mL), プレカラム: LiChrosorb NH₂ (10 μ m) (Merck) 2.6 mm I. D. $\times$ 50 mm, カラム: LiChrosorb NH₂ (10 μ m) (Merck) 2.6 mm I. D. $\times$ 250 mm (カラム温度: 室温, 移動相流速: 1.0 mL/min), 検出器: Shodex RI Model SE-11 (昭和電工) (感度: 32×10^{-5} RIU), 記録計: 056 (日立) (フルスケール: 2 mV, チャート速度: 10 mm/min), マイクロシリンジ: 702 SNR (Hamilton).

2. 試薬

アセトニトリル (和光純薬工業), 99.5%エタノール (甘槽化学工業), フラクトース (関東化学), グルコース, シュクロース (日本理化学薬品), ラクトース (東京化成工業); 特級試薬を使用した。

水はイオン交換水をバイレックス製蒸留器で蒸留したものを使用した。

80%エタノールは99.5%エタノール4容と水1容とを混合して調製した。

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. 2-1-2, Kan'nondai, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki, 305

** 農林水産省東京農林規格検査所 (〒108 東京都港区港南 4-4-7)

Japanese Government Agricultural and Forestry Products Inspection Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. 4-4-7, Kohnan, Minato-ku, Tokyo, 108

移動相はアセトニトリル 3 容と水 1 容とを混合して調製し、使用する直前に、超音波洗浄槽中で 1 分間脱気した。

3. 標準液

(1) 混合標準原液；減圧下 (30 mmHg), 70°C で恒量に至るまで乾燥したフラクトース, グルコース, ラクトース, シュクロース, それぞれ 1 g を精秤し, 混合し, 水に溶解して 100 ml 定容とした。(2) 混合標準液 (5 mg/ml); 混合標準原液 25 ml を 99.5% エタノールで希釈して 50 ml 定容とした。(3) 混合標準液 (1 mg/ml); 混合標準原液 5 ml に, 99.5% エタノール 20 ml を加え, さらに 80% エタノールで希釈して 50 ml 定容とした。

これらの標準液は -18°C 以下で保存した。

4. 試料の前処理法

(1) 牛乳, 乳飲料, 醗酵乳 (無糖) など, 糖類含量がおおよそ 10% 以下の試料

50 ml 容メスフラスコに, 十分に攪拌または混合して均一にした試料 5 g 程度を秤取し, 99.5% エタノール 20 ml を加え, さらに 80% エタノールをほぼ定容になるまで加えた。栓をして, 50 回反転させ混合し, 20°C 恒温槽中に 30 分間放置した。80% エタノールを加えて定容とし, 栓をして, 50 回反転させ混合し, 共栓付遠沈管中で遠心分離 (1150 g, 5 分間) し, 上清を得た。この上清を試料液とした。

(2) 醗酵乳 (加糖), 乳酸菌飲料 (生菌), 練乳 (無糖), アイスクリームなど, 糖類含量がおおよそ 10% から 40% の試料

50 ml 容メスフラスコに, 十分に攪拌または混合して均一にした試料 2 g 程度を秤取し, 99.5% エタノール 8 ml を加え, さらに 80% エタノールをほぼ定容になるまで加えた。以下 (1) と同様に処理し, 上清を得, これを試料液とした。

(3) 乳酸菌飲料 (殺菌), 粉乳, 練乳 (加糖) など, 糖類含量がおおよそ 40% 以上の試料

50 ml 容メスフラスコに, 十分に攪拌または混合して均一にした試料 0.5 g 程度を秤取し, 水 5 ml を加えて溶解または希釈し, 99.5% エタノール 20 ml を加え, さらに 80% エタノールをほぼ定容になるまで加えた。以下 (1) と同様に処理し, 上清を得, これを試料液とした。

5. 糖類の定量

混合標準液および試料液は, それぞれ 20 μ l を液体クロマトグラフに注入した。原則として混合標準液は 3 回平行で, 試料は 3 点平行 (サンプリング: 3 回) で測定を行なった。測定の順序はランダム配置で行なった。各

ピークの面積は半値幅法で求めた。糖類の含量 (%) は, 絶対検量線法 (2 点検量線) により試料液中の糖類濃度 (mg/ml) を求め, 試料液容量 (ml) を乗じ, 試料秤取量 (mg) で除し, 100 を乗じて求めた。混合標準液の各ピークの面積値, 試料中の糖類の含量値における異常値は, GRUBBS の方法⁴⁾によって棄却した。

結果および考察

設定した方法によって混合標準液および試料液を分析した際のクロマトグラムの例を Fig. 1-Fig. 2 に示した。フラクトースとグルコースとはベースライン分離をしていないが, 半値幅法によるピーク面積測定には影響がなかった。また, 1 回の分析に要する時間はおよそ

Fig. 1 Chromatogram of sugars in standard solution

(1) fructose; (2) glucose; (3) sucrose; (4) lactose; mobile phase=CH₃CN/H₂O (75/25); flow rate=1.0 ml/min; detector=RI.

Fig. 2 Chromatogram of sugars in ice cream

(1) fructose; (2) glucose; (3) sucrose; (4) lactose.

Table 1. Recovery of added lactose to samples

sample	taken, g	unspiked*, mg	lactose added, mg	spiked found**, mg	recovery***, %
[liquid milk]					
ordinary liquid milk	5.1378	211.009	60.822	268.312	94.2
milk beverage, coffee	5.2321	109.874	60.822	176.643	109.8
[cream]					
cream, 20% milk fat	4.9727	151.170	60.822	2149381	103.9
[fermented milk and lactic acid bacteria beverage]					
yogurt, partially skimmed, sweetened	2.1252	90.810	65.958	156.670	99.9
[ice cream]					
ice cream, 8% milk fat	2.1985	106.847	65.958	173.170	100.2
[milk powder]					
skim powder, domestic	0.5495	269.420	60.822	330.599	100.6
[evaporated milk and condensed milk]					
condensed whole milk, sweetened	0.5324	54.821	60.822	120.122	107.4

*: calculated from the lactose content of the same lot of sample

**: mean of 3 determinations

***: $100 \times [(\text{mg lactose in spiked sample} - \text{mg lactose in unspiked sample}) / (\text{mg lactose added to sample})]$

10 分間であった。

混合標準液の溶媒として、80%エタノールと 50% エタノールを使用しているが、これは水を溶媒とした場合には、移動相よりも極性が高いために、ピーク幅が広がるなどピーク形状が混合標準液と試料液とで異なり、その結果として面積測定に伴う誤差が、混合標準液と試料液の間で異なる可能性があったためである。また、混合標準液 (5 mg/ml) のエタノール濃度を 50% にしているのは、 -18°C 以下における保存の際のラクトースの析出を抑えるためである。すなわち、80%エタノール濃度では、 -18°C 、約 1 週間の保存で、ラクトースの結晶が生成し、この結晶を振とうによって溶解させることが不可能であったからである。

設定した前処理法における正確さを確認するために行なったラクトースの添加回収試験の結果を Table 1 に示した。ラクトースの回収率は平均 102.3% であり、添加したラクトースは定量的に回収された。この結果は設定した定量法の正確さを示しているものと考えられた。また、設定した前処理法では乳酸菌飲料など pH が酸性の試料でも中和処理を行っていないが、これは試料液 (乳酸菌飲料の場合 pH 約 5.5) を 20°C 、約 1 日放置しても、シュクロースの加水分解に伴うシュクロース量の減少およびフラクトース、グルコース量の増加などの変化が見出されなかったためである。

WARTHESSEN ら²⁾の前処理法は、80%エタノール処理の際、2 回抽出→遠心分離の操作を繰り返して上清を得、

この上清を合し定容とし、これを試料液とする方法である。これに対し、設定した方法では、80%エタノールで処理後、直ちに定容とし、遠心分離により上清、すなわち試料液を得ているので、処理時間の短かさ、および処理操作の少なさの点から有利であると考えられ、また、上清を分取し定容とすることに伴う糖類の損失も防ぐことができるので、定量操作としても優れていると考えられた。また、80%エタノール処理における最大の問題点は、ラクトースの 80% エタノールに対する溶解性の小ささであり、これを克服するために、HURST ら³⁾は熱水処理法を、DUNMIRE ら⁵⁾は温 50%エタノール処理法を用いている。しかし、ラクトースの 80%エタノールに対する溶解性は、溶解させる条件や、他の糖類などの共存によりかなり異なり、例えば、ラクトースに 5 mg/ml 濃度になるように 80%エタノールを加えても溶解しないが、水で溶解した後に 99.5%エタノールを加えて 5 mg/ml・80%エタノールにすれば、約 12 時間は溶解した状態にあることや、他の糖類が共存すれば、5 mg/ml・80%エタノールの濃度でも、 20°C で 1 週間以上、溶解状態で保存でき、20 mg/ml の濃度でも、 20°C で 1 昼夜、結晶の析出なしに保存できることが明らかになったので、調製した試料液を調製した日のうちに使用し、試料液中のラクトースの最高濃度を 5 mg/ml までとするなど、処理条件を選択すれば、ラクトースの 80%エタノールに対する低溶解性は実用上問題がないと判断された。

Table 2. Determination of saccharides in dairy products (based on 3 parallel determinations)

sample	taken*	fructose mean, % (CV**, %)	glucose mean, % (CV, %)	sucrose mean, % (CV, %)	lactose mean, % (CV, %)
[liquid milk]					
ordinary liquid milk (1)	a	—	—	—	4.13 (2.2)
(2)	a	—	—	—	4.13 (3.9)
milk beverage, fruit flavored	a	1.39 (6.3)	1.69 (3.9)	3.36 (2.2)	5.01 (3.0)
[cream]					
cream, 20% milk fat	a	—	—	—	4.06 (1.4)
[fermented milk and lactic acid bacteria beverage]					
yogurt, whole milk, unsweetened	a	—	—	—	3.13 (3.3)
yogurt, partially skimmed, sweetened	b	1.72 (6.4)	2.14 (16.3)	6.57 (11.3)	3.54 (17.2)
yogurt, sweetened	b	—	—	12.00 (2.0)	2.84 (1.6)
lactic acid bacteria beverage, higher milk-solids-not-fat	b	3.20 (0.9)	3.63 (0.2)	4.63 (0.5)	1.26 (9.9)
lactic acid bacteria beverage, pasteurized after fermentation, highly sweetened (1)	c	10.81 (1.3)	10.60 (1.2)	27.75 (0.6)	1>
(2)	c	10.01 (1.1)	9.95 (4.8)	29.10 (1.6)	1>
lactic acid bacteria beverage, lower milk-solids-not-fat (1)	b	3.63 (1.6)	4.11 (0.5)	4.90 (1.5)	0.33 (39.7)
(2)	b	3.17 (2.4)	3.83 (2.5)	5.47 (1.6)	0.66 (14.8)
[ice cream]					
ice cream, 8% milk fat	b	0.55 (12.7)	1.24 (6.7)	11.10 (1.7)	4.59 (12.9)
ice milk	b	0.48 (75.4)	0.86 (3.7)	12.30 (5.4)	4.76 (10.2)
"rakuto-aisu"***	b	0.59 (7.1)	1.52 (7.9)	11.41†(0.1†)	3.76 (2.3)
[milk powder]					
skim milk powder, domestic	c	—	—	—	51.13 (3.3)
modified milk powder for infants	c	—	—	—	49.85 (3.4)
mixed powder for "rakuto-aisu"†	c	—	2.42 (25.7)	26.98 (3.8)	22.48 (9.3)
mixed powder frozen dessert	c	—	—	49.65 (2.3)	12.25 (14.8)
[evaporated milk and condensed milk]					
evaporated milk	b	—	—	—	9.86 (2.6)
condensed whole milk, sweetened					
(1)	c	—	—	43.85 (0.3)	11.91 (0.2)
(2)	c	—	—	45.32 (1.8)	10.92 (19.2)

*: a: ca. 5 g, b: ca. 2 g, c: ca. 0.5 g

Taken samples were treated with 80% ethanol in 50 ml volumetric flasks, centrifuged at 1150 G for 5 minutes in centrifugal tubes, and the supernatants were injected into liquid chromatograph.

**: coefficient of variations

***: ice milk like product substituted with foreign fats

†: based on 2 parallel determinations

設定した分析法に従って市販の乳製品を分析した結果を Table 2 に示した。含量 1%以上の糖類の 3 点平行測定値の変動係数は平均 4.5% (n=47) となり、精度的にも満足のいくものであった。測定の精度は、試料秤取量と試料液中の糖類濃度により変化するが、試料液中の糖類濃度が 1 mg/ml 以上であれば、変動係数 10%以内で測定できるものと考えられた。

使用した LiChrosorb NH₂ (10 μm) カラムの理論段

数 (N; 5 mg ラクトース/ml 80%エタノール溶液を 20 μl 注入して測定した。) は、充てん直後で約 3000 段/m で、この値は 100 回の分析を行なっても、変化しなかった。しかし、フラクトースとグルコースのピークの分離度は次第に低下し、1 例では、約 75 回の分析を行なった時点で、2 つのピーク間の谷の最下部の高さが、低いほうのピークの高さの半分になった。このように分離度の低下したカラムは水で洗浄しても分離度が向上しないの

でカラム自体を交換する必要があった。この設定した分析法では前処理条件を簡略にするために、メンブランフィルター処理などの精製操作は省略してあるのでカラムの劣化が起りやすいのかもしれない。しかし、カラムの充てんは簡単に行なえる操作であるので、前処理法を簡易化した利点、正確で精度の良い定量法としての特徴は十分に生かされるものと考えられた。

要 約

高速液体クロマトグラフィーを用いる乳製品中の糖類の定量法を設定した。試料は必要ならば水で溶解または希釈した後、80%エタノールで処理し、遠心分離し、その上清を試料液とした。LiChrosorb NH₂ (10 μm) カラム (2.6 i. d. × 250 mm) を用い、移動相 (アセトニトリル: 水 = 75:25) を 1.0 ml/min の流速で送液することにより、フラクトース、グルコース、シュクロース、ラク

トースを 10 分間以内で分析することができた。この方法におけるラクトースの添加回収率は平均 102.3%であった。また市販乳製品を分析した際の測定値の変動係数は平均 4.5%であった。

文 献

- 1) HOBBS, J.S. and LAWRENCE, J.G.: *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 45 (1972).
- 2) WARTHESEN, J.J. and KRAMER, P.L.: *J. Food Sci.*, **44**, (2), 626 (1979).
- 3) HURST, W.J., MARTIN, R.A. JR. and ZOUMAS, B.L.: *J. Food Sci.*, **44**, (2), 892 (1979).
- 4) 日本規格協会編: JIS ハンドブック 品質管理 1977 (日本規格協会) p. 475 (1977).
- 5) DUNMIRE, D.L. and OTTO, S.E.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, (1), 176 (1979).

(昭和 54 年 11 月 13 日受理)

新 刊 紹 介

小 麦 蛋 白 質

—その化学と加工技術—

遠 藤 悦 雄 著

植物性蛋白食品が登場してかなりの年月が経過して、この利用も量的には多いと云えないが、年年各方面に着実に伸びている。大豆蛋白質については国の内外で数種類の成書が刊行されているが、小麦蛋白質に関してはこれまでに全くみられない。今回新進食料工業(株)研究所長の遠藤悦雄氏は、その 20 余年の 究 究 および 実 際 の 製 造 の 体 験 を 基 に して 本 書 の よう に ま と め て 刊 行 さ れ た。伝統的利用もさることながら、わが国で最初にバイタルグルテンを開発、製造された氏が現代的利用に力を入れて執筆されている。内容目次で分るように小麦蛋白質の化学のような基礎から実際分離製造法、伝統的利用から現在および今後の新しい利用法まで幅広く、実際に役立つように体験的によくまとめている。

(A 5 版 230 頁)

内 容 目 次

総 論

- 第1章 小麦蛋白質の一般的性質
- 第2章 小麦蛋白質の分離法 (1) 小麦粉より湿式による分離法
- 第3章 小麦蛋白質の分離法 (2) 小麦全粒より湿式による分離法
- 第4章 小麦蛋白質の分離法 (3) 小麦粉より乾式分級並びに溶剤分離
- 第5章 伝統食品としての焼酎・生麴
- 第6章 加水分解植物蛋白 (HVP) 調味料の製造法と利用
- 第7章 粉末状小麦蛋白食品の製造法
- 第8章 粉末状小麦蛋白食品の利用
- 第9章 その他の小麦蛋白食品の製造と利用
- 第10章 小麦蛋白質の新しい利用開発

発行: 東京都文京区湯島 1 丁目 9 の 14

食品研究社

定価: 3800 円 送料 200 円