高速液体クロマトグラフィーによる発酵食品中のエリスリトールの定量について

(昭和63年5月23日受理)

新藤辰二[*1] 佐々木義幸[*1] 三木啓道[*1]
江口 通[*1] 萩原清和[*2] 市川富夫[*2]

Determination of Erythritol in Fermented Foods by High Performance Liquid Chromatography

Tatsuji SHINDOU[*1], Yoshiyuki SASAKI[*1], Hiromichi MIKI[*1], Toru EGUCHI[*1], Kiyokazu HAGIWARA[*2] and Tomio ICHIKAWA[*2]

([*1]Division of Chemical and Biological Analysis, Nikken Chemicals Co., Ltd.: 1-346, Kitabukuro-machi, Omiya-shi, Saitama, Japan; [*2]Division of Applied Food Research, National Institute of Nutrition: 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

A simple and rapid determination of erythritol, a new low-calory natural sweetener, in foods was developed. Erythritol is known to be present in various foods, and its determination is usually carried out by paper chromatography or gas chromatography, and is extremely time-consuming. We attempted to develop a rapid and simple determination method for erythritol using CK08SH resin (in free form) in high performance liquid chromatography. We found that the resin was most useful for accurate determination, and used the method to determine erythritol in Japanese-sake, wine, soy-sauce, and miso-bean paste; the amounts found were 0.015〜0.091 w/v% in Japanese-sake, wine, and soy-sauce, and 0.13% in miso-bean paste.

(Received May 23, 1988)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 発酵食品 fermented food; エリスリトール erythritol; 糖アルコール sugar alcohol; 天然甘味料 natural sweetener

緒　言

4価の糖アルコールであるエリスリトールは，砂糖の70〜80%の甘味度[1)]を有するため，新しい天然甘味料としての利用が期待される．またこのものは動物実験において，経口投与量の約95%がそのままの形で尿及び糞中に排泄されることから[*3]，低カロリー甘味料としての期待もある．エリスリトールは，清酒[2),3)]，ワイン[4),5)]及びしょう油[6)]などの発酵食品中の存在が，ガスクロマトグラフィー(GC)やペーパークロマトグラフィーにより明らかにされている．またキノコ[7),8)]，地衣類[9)〜11)]，及び麻の葉[12)]などの植物体中での存在も明らかにされている．なお，清酒，ワイン及びしょう油などの味と，エリスリトールとの関連性のあることも予想されるが，証明されていない．

今回，一般食品中でのエリスリトールの存在を検討する研究の一部として，従来より食品中のエリスリトールの測定に用いられてきたGCより，短時間で簡易に行える高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による発酵食品中のエリスリトール測定法を検討し，良好な結果を得た．また存在が明らかにされていなかったみそ及びビール中での存在も明らかにしたので報告する．

実験方法

1．試　料

清酒，ワイン，ビール，しょう油，及びみそはいずれも市販品を用いた．

---

*1 日研化学(株)大宮工場総合試験室：埼玉県大宮市北袋町1-346

*2 国立栄養研究所応用食品部：東京都新宿区戸山1-23-1

*3 野田恭二，奥 恒行，高井克治：第42回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集 p. 175 (1988).

2. 試　　薬

MB-3: (株)オルガノ製アンバーライト IR-120B と IRA-410 の等量混合イオン交換樹脂

その他用いた試薬類はすべて特級品，あるいはそれに準ずるものである．エリスリトール，イソソルビドは，日研化学(株)製の純度 100%のものを用いた．

3. 装　　置

高速液体クロマトグラフ: (株)日本ウォーターズ製 201 型

検出器: (株)日本ウォーターズ製 R-410 型示差屈折計

データ処理装置: (株)日立製作所製 D-2000 型クロマトデータ処理装置

4. HPLC の測定条件

カラム: 三菱化成(株)製 CK08SH(8 mm i.d.×500 mm)

カラム温度: 室温

移動相: 1%H_3PO_4

流量: 1 ml/min

試料注入量: 10〜30 μl

5. 試料溶液の調製

1) 清酒，ワイン，ビール

試料 100 ml を正確にとり（ビールについては約 1 時間攪拌後），内部標準溶液（イソソルビド 5 g/100 ml 水，以下 I. S. と記す）0.5 ml 及び活性炭 0.5 g を加えよく攪拌した後，ろ過した．

2) しょう油

試料 50 ml を正確にとり，I. S. 0.5 ml を加えた後，減圧下に約 10 ml に濃縮した．この濃縮液に 80%エタノール 30 ml を加えてよく攪拌し，上澄液をろ過した後，減圧下濃縮乾固し，残留物を水 50 ml に溶解し，活性炭 2 g を加え，よく攪拌した後ろ過した．

3) み　　そ

試料 20 g を精密に量り，I. S. 0.5 ml 及び，80%エタノール 30 ml を加えてよく攪拌した後，遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) し，得られた上澄液をろ過した．ろ液を減圧下に約 5 ml まで濃縮し，残留物を水 50 ml に溶解し，これに活性炭 2 g を加え，よく攪拌した後，ろ過した．

1)，2) 及び 3) の操作で得られたろ液に MB-3 を 2〜10 g 加えて脱塩した後，ろ過した．ここで得られた溶液を更に減圧濃縮し，メンブランフィルター (MILLEX-HV, 0.45 μm, 25 mm i. d.) でろ過した後，その 10〜30 μl を HPLC で分析した．

6. 検量線の作成

エリスリトール 50, 100, 150 及び 200 mg を精密に量り，水を加えて 100 ml とする．この液 10 ml に I. S. 0.5 ml を加える．これらの液それぞれ 20 μl を HPLC で分析した．

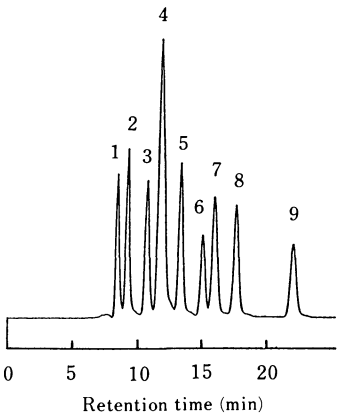

Fig. 1. High performance liquid chromatogram of sugars and sugar alcohols in standard solution

(1) raffinose, (2) sucrose, (3) glucose, (4) D-fructose, D-sorbitol, D-mannitol, (5) erythritol, (6) glycerol, (7) iso-sorbide, (8) ethylen-glycol, (9) ethanol

Column: CK08SH; mobile phase: 1% H_3PO_4; flow rate: 1.0 ml/min; detector: RI

7. 添加回収実験

清酒，ワイン及びビール 100 ml にエリスリトール 10 mg を，しょう油 50 ml にエリスリトール 40 mg を，またみそ 20 g にエリスリトール 20 mg をそれぞれ添加し，5. の方法により試験溶液を調製し，HPLC で分析した．

結果及び考察

1. HPLC 測定条件の検討

HPLC による糖及び糖アルコールの定量には，従来アミノプロピル基を結合させたシリカゲルが利用されてきた[13), 14)]が，最近，陽イオン交換樹脂が用いられるようになってきた[15)]．

本研究では，まず単糖及び少糖の分離に用いられている，三菱化成(株)製の Ca 結合型陽イオン交換樹脂 (CK 06SC) を用いて*4，エリスリトールの分離定量を試みたが，溶出時間が 30 分と長く，ピークがブロードになるなど良好な結果が得られなかった．そこで遊離型陽イオン交換樹脂 (CK08SH) を用いて 1%リン酸でエリスリトールを溶出したところ，溶出時間，ピークの形状など満足すべき結果が得られ，また，他の糖及び糖アルコール類についても検討したところ，Fig. 1 に示したように，エリスリトールは他の糖及び糖アルコール類ともよく分離し，良好な結果を得た．

更に，本測定条件では Table 1 に示したように，エリスリトールの異性体であるスレイトールとも良好な分離

*4 Technical Data Sheet No 1, 糖分析，三菱化成(株).

Table 1. Retention Time Data

Compound		Retention time (min)
1	Raffinose	8.60
2	Maltotriose	8.67
3	D-Cellobiose	9.19
4	Maltose	9.39
5	Sucrose	9.40
6	Lactose	9.57
7	Glucose	10.86
8	Inositol	11.28
9	D-Xylose	11.57
10	D-Fructose	11.80
11	D-Mannitol	11.92
12	D-Sorbitol	12.17
13	Xylitol	13.15
14	Erythritol	13.57
15	DL-Threitol	14.10
16	Glycerol	15.34
17	Iso-sorbide	16.31
18	Ethylen-glycol	18.03
19	Propylen-glycol	18.86
20	Methanol	20.67
21	Ethanol	23.04

Column: CK08SH; mobile phase: 1%H_3PO_4; flow rate: 1.0 ml/min.; detector: RI

Table 2. Recoveries of Erythritol from Fermented Foods

Sample	Added (mg)	Found[a] (mg)	Recovery (%)	C. V.[b] (%)
Japanese-sake	0	15.2		
	10	24.9	97	2.4
Wine	0	17.0		
	10	27.5	105	3.5
Beer	0	trace		
	10	10.1	101	3.3
Soy-sauce	0	45.5		
	40	87.1	104	4.5
Miso-bean paste	0	26.1		
	20	45.7	98	4.1

[a] Average of five trials
[b] Coefficient of variation

を示し，また，加工食品へ品質保持剤などとして添加されるプロピレングリコールとも良好な分離を示した．

2．検量線及び定量限界

実験方法 6 に従い検量線を作成したところ，エリスリトール 10〜40 μg の範囲で原点を通る良好な直線が得られた．

定量限界は清酒，ワイン，ビール及びしょう油で 0.001 W/V%，みそで 0.005%であった．

3．添加回収実験

実験方法 7 に従い回収率を求めたところ，Table 2 に示したように良好な回収率となった．

Table 3. Erythritol Contents in Fermented Foods

Fermented food		Erythritol (w/v%)
Japanese-sake	(A)[a]	0.015
	(B)[b]	0.018
Wine	(A)[c]	0.017
	(B)[d]	0.028
	(C)[e]	0.030
Beer	(A)[f]	trace[g]
	(B)[f]	trace
Soy-sauce		0.091
Miso-bean paste		0.131 (w/w%)

[a] Second-grade, [b] First-grade, [c] Japanese wine, white, 1982, [d] Japanese wine, red, 1981, [e] German wine, Auslese, white, 1983, [f] American beer. [g] trace signifies < 0.001.

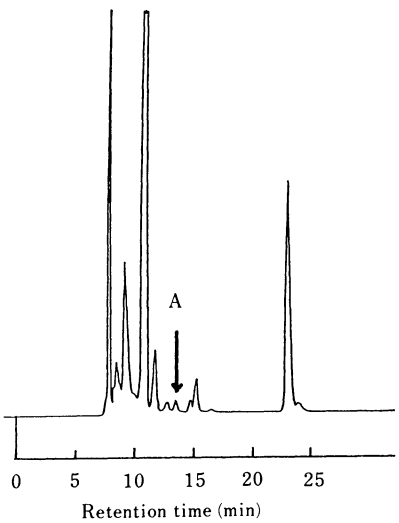

Fig. 2. High performance liquid chromatogram of sugars and sugar alcohols in miso-bean paste
Peak A: erythritol
HPLC conditions: same as in Fig. 1.

4．発酵食品中のエリスリトール含量

本法を用いて発酵食品中のエリスリトール量を定量した結果を Table 3 に示した．また，みそから調製した試料溶液の高速液体クロマトグラムを Fig. 2 に示した。

従来清酒中のエリスリトールについてはペーパークロマトグラフィーで分離，確認され[2]，その製造あるいは貯蔵中のエリスリトールの変化については，上槽時に 0.14%であったものは，あまり大きな変化はないと報告されている[3]．ワインについては，TMS 化後 GC による

定量が行われており，33～272 mg/l 及び 0～692 mg/l などの報告がある[4),5)]. 今回清酒2種類及びワイン3種類についてエリスリトールを測定したところ，文献値[4),5)]に近い値であった.

しょう油についてはペーパークロマトグラフィーでその存在が認められているが測定値は知られていない[6)]. また，みそ及びビールについてはエリスリトールの存在は知られていない. そこで，しょう油，みそ及びビール中のエリスリトールを測定した. しょう油，みそは清酒，ワインに比べて3倍以上のエリスリトールが含まれていた.

このような各種発酵食品中のエリスリトール含量の相違は，主として製造時に使用される微生物のエリスリトール生成能の相違又は熟成の度合などによるものと思われる. エリスリトールは砂糖の70～80%の甘味度を有する[1)]ことから，みそ，しょう油，清酒，ワイン及びビールなどの味と関連性が予想される. 今後これらの点について明らかにされる必要があろう.

文　献

1) 佐々木　尭：ブレインテクノニュース (6), 6～8 (1988).
2) 大西　博，斎藤成正：醗酵工学. **38**, 536～538 (1960).
3) 増田義実，佐々木　定，山下和夫，服部圭助，伊藤芳直：醸協. **62**, 1,242～1,244 (1967).
4) Dubernet, M. O., Bertrand, A., Riberean, G. P.: C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. **279**, 1,561～1,564 (1974).
5) Sponholz, W. R., Dittrich, H. H.: Vitis **24**, 97～105 (1985).
6) 大西　博，斉藤成正：醗酵工学. **37**, 457～461 (1959).
7) 吉田　博，菅原龍幸，林　淳三：日食工誌. **31**, 765～771 (1984).
8) 吉田　博，菅原龍幸，林　淳三：同上 **33**, 426～433 (1986).
9) Huneck, S., Trotet, G.: Z. Naturforsch. **22b**, 363 (1967).
10) Huneck, S., Follmann G., Weber, W. A. Trotet, G.: *ibid.* **22b**, 671～673 (1967)
11) Huneck, S., Follmann, G.: *ibid.* **22b**, 1,369～1,370 (1967).
12) Hanstveit, G., Wold, J. K.: Carbohyd. Res. **29**, 325～329 (1973).
13) 安井　健，古川　剛，長谷　幸：日食工誌. **27**, 358～362 (1980).
14) Conrad, E. C., Palmer, J. K.: Food Technology, 84～90 (1976).
15) Pecind, R., Bonn, G., Burtsher, E., Bobleter, O.: J. Chromatogr. **287**, 245～258 (1981).