

Application News

No. L507

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

Prominence-i を用いた 低分子水溶性食物繊維の分析

Analysis of Low Molecular Weight Water Soluble Dietary Fiber by Prominence-i

食物繊維は、消化器系疾患、循環器系疾患、糖尿病などの発生率を減少させる疫学的調査結果から、生理作用に関する研究が進み、腸内においてコレステロールなどの脂質の吸収を抑制させたり、有害物質を吸着し排泄を促す役割など、様々な効果が知られています。近年その機能が注目され、化学的に合成された食物繊維を添加した加工食品なども増えてきました。食品の栄養成分表示においては、食物繊維の含有量を積極的に表示したり、また国によっては表示が義務化されています。

食物繊維の対象成分は多く、定義は国や政策により異なります。主に、細胞壁を構成するセルロース、ヘミセルロース、リグニンや、動物性多糖類キチン、キトサンなど（不溶性食物繊維）、ベクチンなどの多糖類（高分子水溶性食物繊維）や化学的に合成された多糖類ポリデキストロースや難消化性デキストリンなど（低分子水溶性食物繊維）があります。

食物繊維の測定法は一般的に酵素-重量法（enzymatic-gravimetric method、プロスキー法）が用いられています。試料に酵素反応を行った後にろ過し、その残渣の重量を測定して食物繊維量とします。しかしこの方法では、ポリデキストロースや難消化性デキストリンなど、低分子水溶性食物繊維の回収率が低いことが問題になっていました。この方法に HPLC 法を加え、酵素-重量法のろ液を HPLC 分析し、それぞれの定量結果の合算値を食物繊維の総量として表示します。なお、日本の食品表示基準（平成二十七年三月二十日内閣府令第十号）においては、プロスキー法又は高速液体クロマトグラフ法で測定することになっています。

本アプリケーションニュースでは、「食品表示基準について別添 栄養成分等の分析方法等」⁽¹⁾を参考に、酵素-HPLC 法を用いて低分子水溶性食物繊維の分析を行いました。

装置には一体型 HPLC の Prominence-i に示差屈折率検出器 RID-20A を搭載したものをしました。

A. Nomura

飲料中の低分子水溶性食物繊維の前処理

Pretreatment of Low Molecular Weight Water Soluble Dietary Fiber in Drink

分析方法⁽¹⁾に従って、難消化性デキストリンを含む清涼飲料水 2 種類を前処理しました。Fig. 1 に、前処理手順を示します。3 種類の酵素処理を行った後（Fig. 1 図中「※」操作後）、一般的な試料ではエタノール沈殿およびろ過の工程を追加する必要がありますが、明らかに低分子水溶性食物繊維だけを使用した食品の場合は、この工程を省略することができます。今回分析した清涼飲料水は 2 種類とも低分子水溶性食物繊維だけを使用していると考えられるので、この工程を省略しました。その後、イオン交換カラムを通し、HPLC 用試料溶液としました。詳細は分析方法⁽¹⁾をご参照ください。

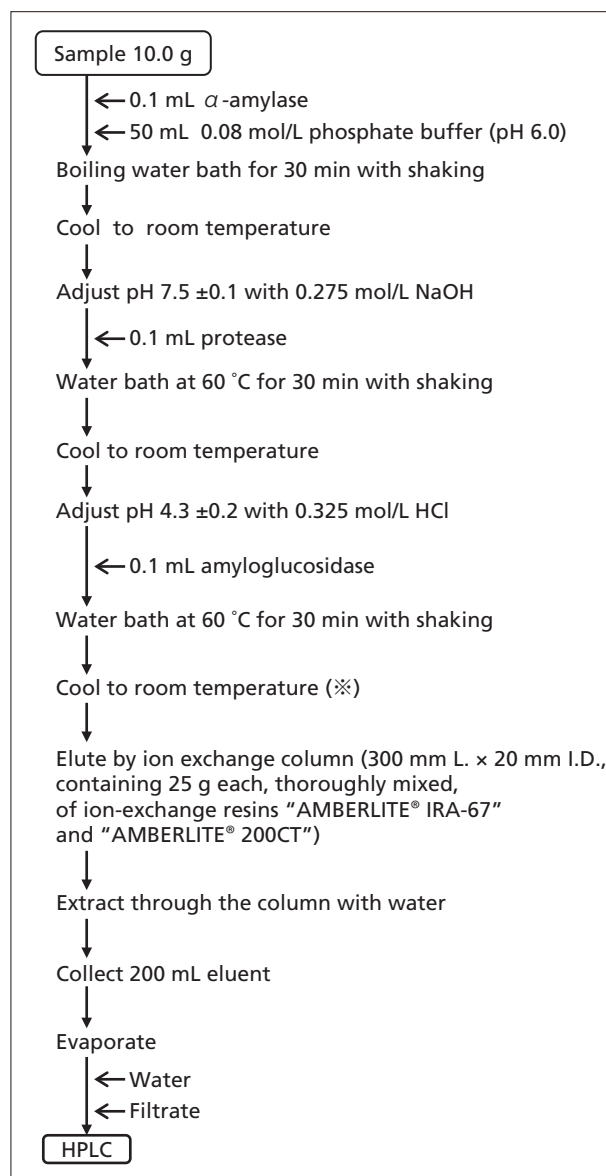


Fig. 1 前処理手順
Pretreatment Procedure

AMBERLITE® はザ・ダウ・ケミカル・カンパニーまたは関連会社の登録商標です。

■低分子水溶性食物繊維の HPLC 分析

HPLC Analysis of Low Molecular Weight Water Soluble Dietary Fiber

清涼飲料水 2 種類を Fig. 1 に従って処理し、HPLC で分析しました。その結果を、マルトトリオースの分析結果とともに Fig. 2, 3 に示します。分析条件は Table 1 に示します。得られたクロマトグラム上で、単糖類、二糖類などと、三糖類以上のものを分け、三糖類以上のものを食物繊維画分とします。このため、三糖類のひとつであるマルトトリオースを同条件で分析し、その溶出位置と同じかそれよりも前に溶出したピークを食物繊維画分とするよう、分析方法⁽¹⁾に記載されています。同分析方法⁽¹⁾では、HPLC 用カラムとして配位子交換系カラムもしくはゲルろ過系カラムを使用するよう記載されていますが、ここでは、配位子交換系カラム Shim-pack SPR-Na を用いました。配位子交換系カラムは、主として糖分析によく用いられるもので、糖同士の分離に優れています。従って、グルコースと他の糖類との分離が容易であるため、以下に示すようなグルコースを内標準物質として使用する場合に、適していると言えます。

実際に定量を行う場合は、でんぷんの分解等により生成するブドウ糖（グルコース）を内標準物質として用います。試料中のブドウ糖質量を別途ピラノースオキシターゼ法により求め、食物繊維画分とブドウ糖のピーク面積の比率にブドウ糖質量を掛けて、低分子水溶性食物繊維量とします。試料や HPLC 用カラムの種類によっては、ブドウ糖が他の共存成分と分離しない場合があります。その場合には、例えばグリセリンなどの内標準物質を前処理工程の酵素処理後に既知濃度添加しておき、食物繊維画分ピークと内標準物質ピークの面積比率から定量を行います。なお、ブドウ糖以外の内標準物質を用いる場合には、ブドウ糖と添加内標準物質の感度に差があるため、ブドウ糖の感度に対する係数を求めて補正する必要があります。

HPLC 分析により求めた低分子水溶性食物繊維量は、別途プロスキー法により求めた値と合算し食物繊維量として表示します。ただし、試料中に含まれる難消化性オリゴ糖を表示する場合には、本法の食物繊維画分にはオリゴ糖も含まれるため、差し引いたものを食物繊維量とします。詳細は分析方法⁽¹⁾をご参照ください。

Table 1 HPLC 分析条件
Analytical HPLC Conditions

System	: Prominence-i, RID-20A
Column	: Shim-pack SPR-Na (250 mm L. × 7.8 mm I.D., 8 μm) × 2
Guard Column	: Shim-pack SPR-Na (50 mm L. × 7.8 mm I.D., 8 μm)
Mobile Phase	: Water
Flow Rate	: 0.50 mL/min
Column Temp.	: 80 °C
Injection Volume	: 20 μL
Detection	: RID-20A

(1)「食品表示基準について 別添 栄養成分等の分析方法等」
(平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号消費者庁次長通知)

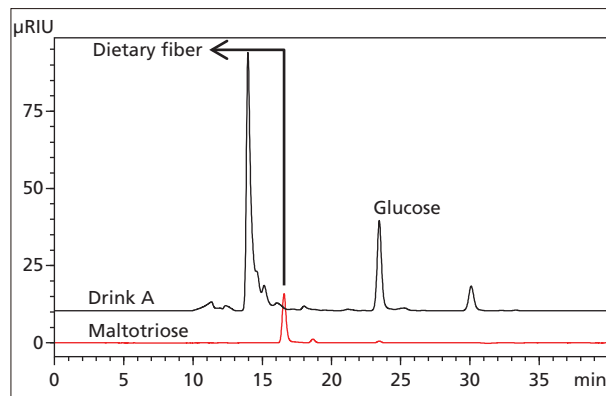


Fig. 2 飲料 A 中の低分子水溶性食物繊維の分析
Chromatogram of Drink A

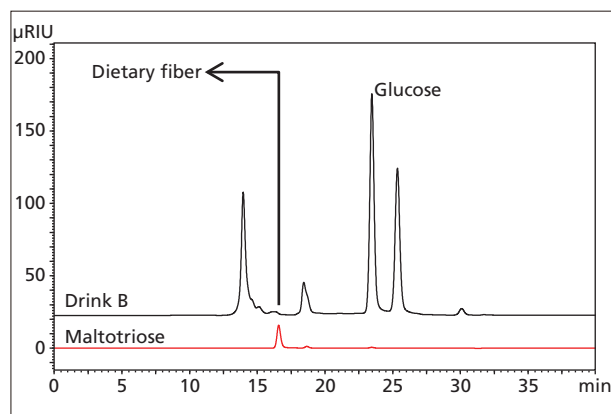


Fig. 3 飲料 B 中の低分子水溶性食物繊維の分析
Chromatogram of Drink B