

## 調味料中の塩分による定量妨害を受けない 単糖、二糖およびオリゴ糖15成分の一斉分析

岩田 奈津紀

### ユーザーベネフィット

- ◆ グラジエント溶離法により、単糖からオリゴ糖まで計15成分の高感度分析が可能
- ◆ 共溶出することが知られているグルコースとガラクトースの分離が可能
- ◆ 塩分を多く含む食品でも脱塩により微量に存在する糖を定量可能

### ■はじめに

糖尿病や肥満、アレルギー、認知症などを引き起こす要因に糖質が関係することが明らかになっています。これらの予防、治療に糖質制限が有効とされています。糖質制限で見落としがちなものに調味料があります。実際、調味料の中には多くの糖質が含まれているものがあります。

また、調味料には糖の他に塩分も多く含まれているものがあります。塩分の多い試料では、示差屈折率検出器 (RID) や蒸発光散乱検出器 (ELSD) など選択性の乏しい検出器を用いた糖の定量分析で妨害される場合が多いです。本稿では、前処理工程において実試料の脱塩を行うことにより、定量妨害となる塩を除去することで定量精度を上げました。

ここでは、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) で糖15成分を分離し、ELSD-LT IIIで検出した例をご紹介します。また、実試料に6種類の市販調味料を分析した例も併せてご紹介します。

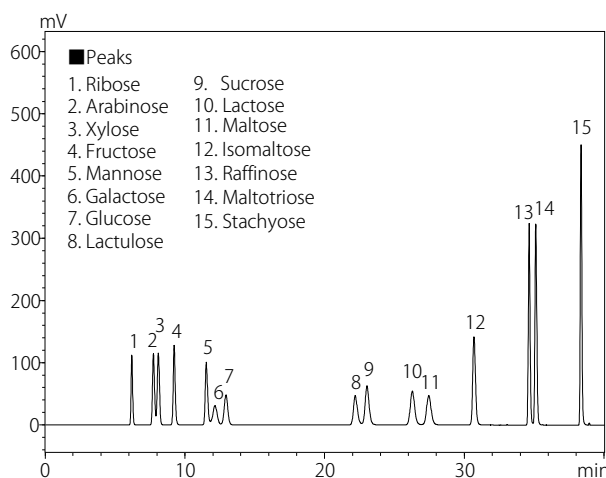


図1 糖15成分混合標準溶液 (各100 mg/L) のクロマトグラム

### ■単糖、二糖およびオリゴ糖15成分混合標準溶液の分析

対象成分は、単糖から四糖までのオリゴ糖15成分です (表1)。図1に糖15成分混合標準溶液 (各100 mg/L、70% アセトニトリル水溶液で調製) のクロマトグラムを、表2に分析条件を示します。グラジエント溶離法により、約40分で15成分を溶出できました。一方で、ガラクトースとグルコースは分子式が同じ立体異性体であり、LC分析においては共溶出することが知られています。しかし、本稿の分析条件であれば、それらを分離することができました。

表1 対象成分

Compounds	saccharide
1	Ribose
2	Arabinose
3	Xylose
4	Fructose
5	Mannose
6	Galactose
7	Glucose
8	Lactulose
9	Sucrose
10	Lactose
11	Maltose
12	Isomaltose
13	Raffinose
14	Maltotriose
15	Stachyose

表2 分析条件

System	: Nexera lite
Column	: Shodex HILICpak VG-50 4E (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Mobile phase	: A) water B) acetonitrile
Time Program	: 88%B (0-12 min)→83.5%B (25 min) →60%B (40-45 min)→88%B (45.10-55 min)
Column temp.	: 45 °C
Injection volume	: 10 μL
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*1
Detection (ELSD)	: ELSD-LT III
Gain	: Wide
Filter	: 4 sec
Drift Tube Temp.	: 40 °C
Nebulizer Gas	: N <sub>2</sub>
Gas Pressure	: 350 kPa

\*1 P/N: 227-34001-01

### ■再現性

表3に、各100 mg/Lの標準溶液について、6回繰り返し分析における保持時間と面積の再現性 (%RSD) を示します。保持時間と面積の再現性はそれぞれ0.2%、6.3%以下の結果が得られました。

表3 6回繰り返し分析における再現性 (%RSD)

Compounds	Retention time	Area
1 Ribose	0.09	6.22
2 Arabinose	0.06	5.23
3 Xylose	0.04	5.44
4 Fructose	0.04	6.12
5 Mannose	0.00	4.66
6 Galactose	0.15	5.71
7 Glucose	0.09	6.04
8 Lactulose	0.07	4.70
9 Sucrose	0.04	3.68
10 Lactose	0.05	3.80
11 Maltose	0.05	3.18
12 Isomaltose	0.04	2.59
13 Raffinose	0.02	1.22
14 Maltotriose	0.02	1.15
15 Stachyose	0.02	2.99

### ■検量線

対象の15成分について検量線を作成したところ、いずれの成分においても寄与率 $r^2=0.998$ 以上と良好な直線性が得られました。なお、ELSD の強度は濃度に対して指数応答であるため、両対数軸でプロットしました。図2に検量線の一例を、表4に検量線濃度範囲と寄与率を示します。

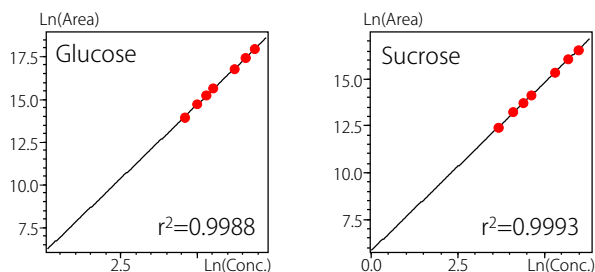


図2 検量線

表4 検量線濃度範囲と寄与率 ( $r^2$ )

Compounds	Conc. range (mg/L)	$r^2$
1 Ribose	10-80	0.9982
2 Arabinose	10-80	0.9991
3 Xylose	10-80	0.9988
4 Fructose	100-1000	0.9980
5 Mannose	10-100	0.9991
6 Galactose	40-400	0.9992
7 Glucose	100-1000	0.9988
8 Lactulose	10-80	0.9986
9 Sucrose	40-400	0.9993
10 Lactose	10-80	0.9998
11 Maltose	10-400	0.9991
12 Isomaltose	10-400	0.9990
13 Raffinose	10-100	0.9993
14 Maltotriose	10-80	0.9997
15 Stachyose	10-80	0.9999

### ■BBQソースの分析

図3に前処理プロトコールを示します。市販のBBQソース100 mgを秤量し、70%アセトニトリル水溶液によって抽出し、20 mLに定容しました。次いで、遠心分離を行い、その上清を0.2 μmのメンブランフィルターでろ過しました。

図4にクロマトグラムを示します。BBQソースからはフルクトース、グルコース、マルトースが検出されました。

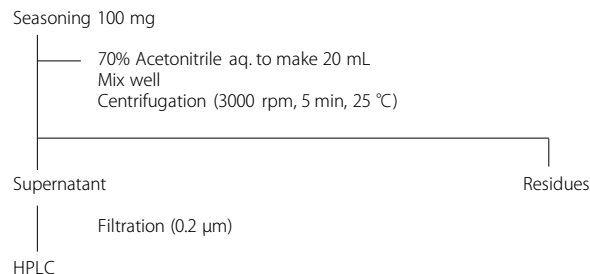


図3 前処理プロトコール (BBQソース)

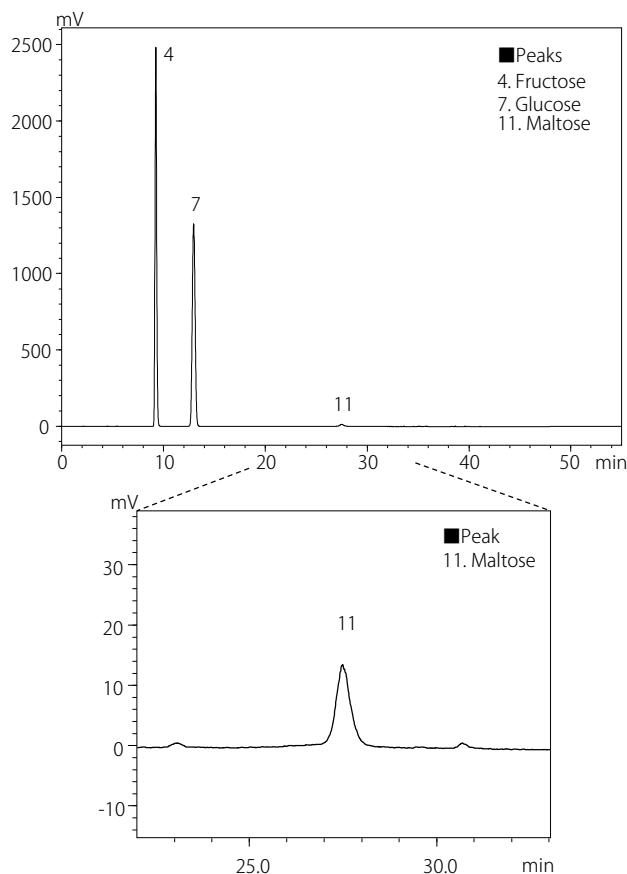


図4 BBQソースのクロマトグラム

### ■ ステーキソース、ケチャップの分析

図5に前処理プロトコルを示します。市販のステーキソース、ケチャップをそれぞれ100 mg秤量し、70%アセトニトリル水溶液によって抽出し、それぞれ図5に示した容量に定容しました。次いで、遠心分離を行い、その上清を得ました。なお、これらの試料には塩分が含まれており、微量に含まれる糖の定量を妨害するため、陽イオン交換モードの固相抽出 (SPE) カートリッジで脱塩を行いました。SPEカートリッジには、S\*Pure Pte Ltd製 Maxi-Clean™ SPE 0.5 mL IC-H (H<sup>+</sup>型) を使用しました。操作方法は、超純水でコンディショニングしたSPEカートリッジに、前工程で得られた上清を負荷しました。初流2 mLを廃棄し、次の溶出液を0.2 μmのメンブランフィルターでろ過し、HPLCに供しました。

図6、7にそれぞれの試料から得られたクロマトグラムを示します。約30分に検出されたピークが塩です。IC-Hで脱塩することで、塩に被って埋もれていた微量のマルトース、イソマルトースを定量することができました。

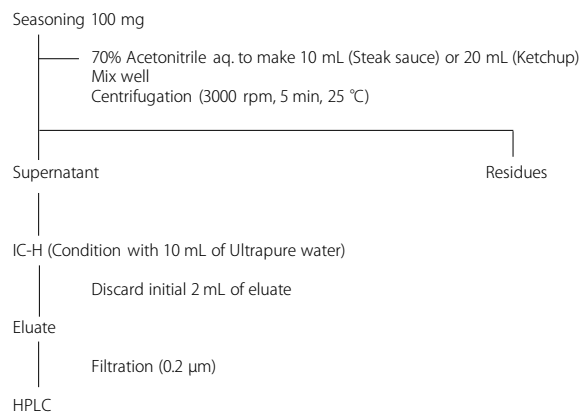


図5 前処理プロトコル (ステーキソース、ケチャップ)

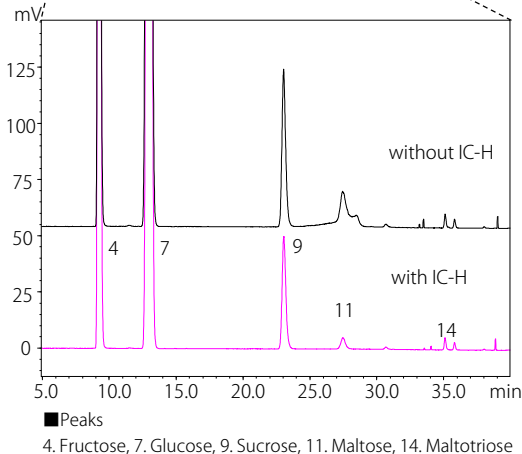
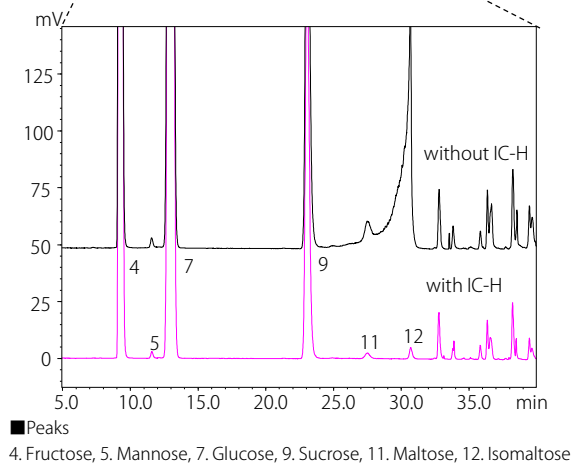
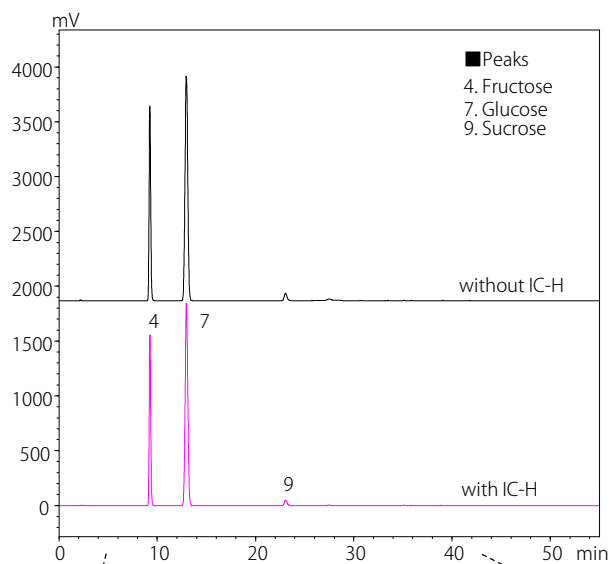
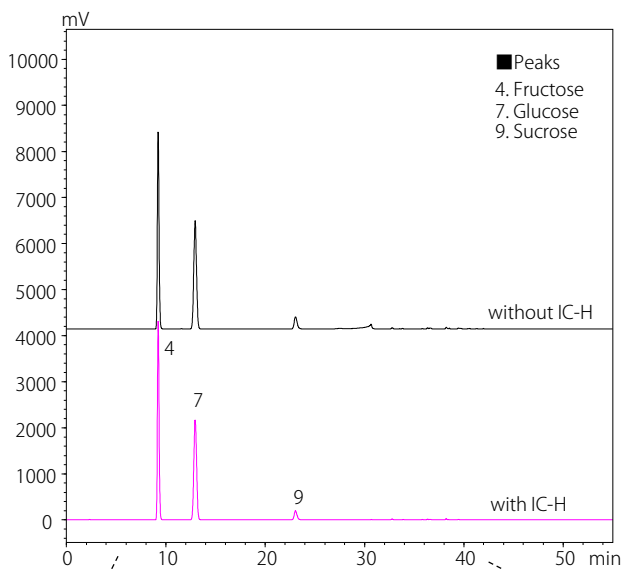


図6 ステーキソースのクロマトグラム

図7 ケチャップのクロマトグラム

### ■ 醤油、黒酢の分析

図8に前処理プロトコルを示します。市販の醤油、黒酢をそれぞれ100 µL秤量し、70%アセトニトリル水溶液によって抽出し、それぞれ5 mLに定容しました。ステーキソースなどと同様にこれらの試料にも高濃度の塩分が含まれているため、IC-Hで脱塩を行いました。脱塩以降の前処理方法は、前項と同じです。

図9、10にそれぞれの試料から得られたクロマトグラムを示します。IC-Hで脱塩することで、これらの試料には高濃度の塩に被る糖がないことを確認できました。また、醤油はガラクトースとグルコースが共存しましたが、分離定量が可能でした。

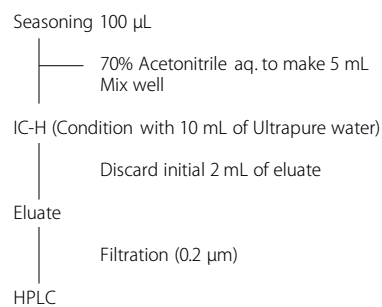


図8 前処理プロトコル (醤油、黒酢)

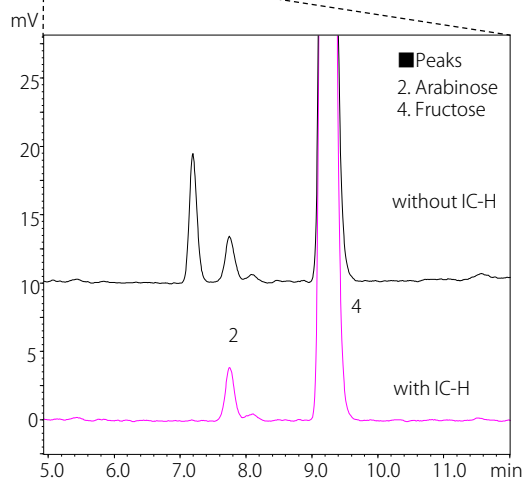
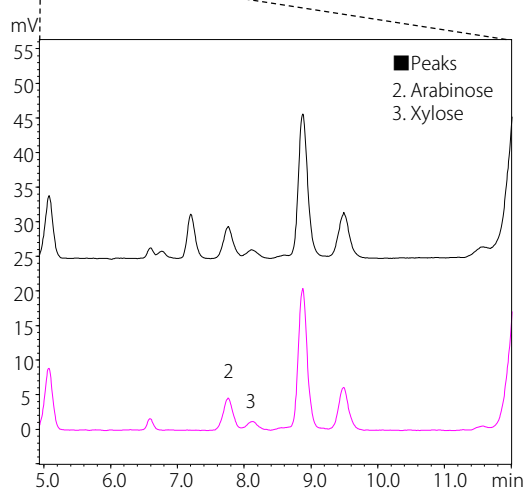
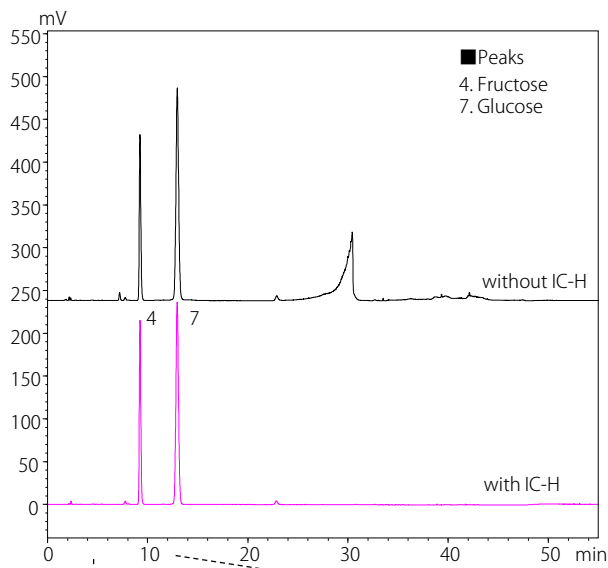
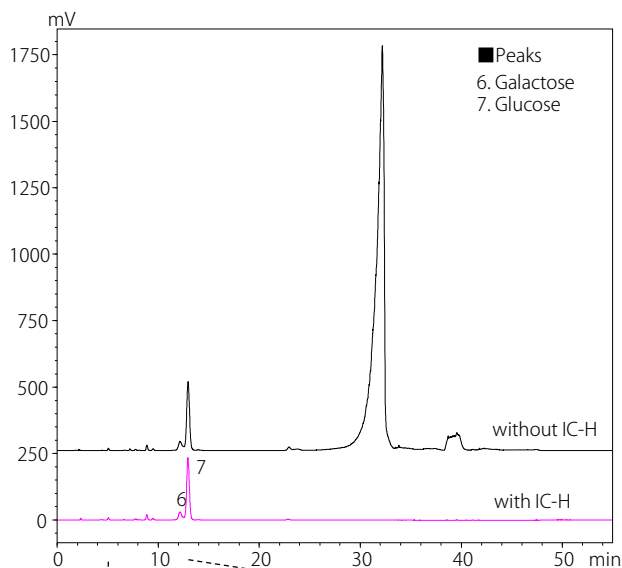


図9 醤油のクロマトグラム

図10 黒酢のクロマトグラム

## ■ 添加回収試験

ケチャップを用いて添加回収試験を行いました。ケチャップ100 mgに各2000 mg/100 g（試料溶液中の濃度は各100 mg/L）になるようにフルクトース、グルコース、スクロースを添加し、図5の前処理プロトコールに則って、5サンプルを同時に前処理しました。表5に添加回収試験結果を示します。

表5 添加回収試験 (N=5)

N	Recovery rates (%)		
	Fructose	Glucose	Sucrose
1	82.0	80.0	93.3
2	92.5	91.7	99.2
3	83.2	81.5	88.1
4	88.2	80.8	94.1
5	82.8	80.3	95.3
Average (%RSD)	85.8 (0.91)	82.9 (0.64)	94.0 (2.05)

## ■ バルサミコ酢の分析

図11に前処理プロトコールを示します。市販のバルサミコ酢100 µLを秤量し、70%アセトニトリル水溶液によって抽出し、20 mLに定容しました。次いで、0.2 µmのメンブランフィルターでろ過した液をHPLCに供しました。

図12にクロマトグラムを示します。バルサミコ酢からはフルクトース、グルコースが検出されました。

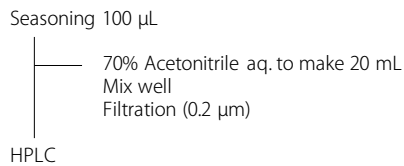


図11 前処理プロトコール（バルサミコ酢）

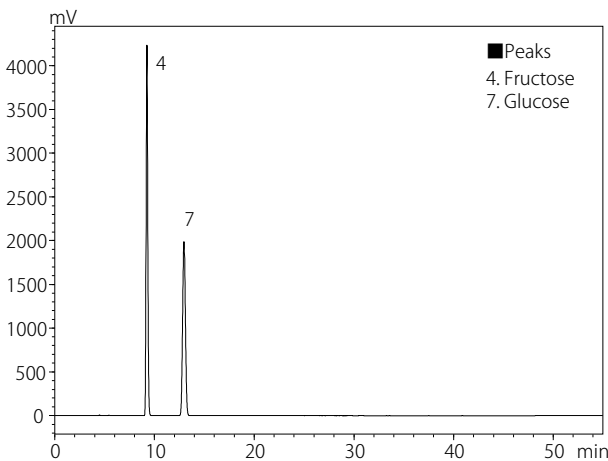


図12 バルサミコ酢のクロマトグラム

## ■ 各調味料の分析結果

表6に各調味料中の糖の分析結果を示します。なお、この濃度は前処理後の濃度となります。

表6 各調味料の分析結果

Compounds	Concentration (mg/L)					
	BBQ sauce	Steak sauce	Ketchup	Soy sauce	Black vinegar	Balsamic vinegar
	Dilution ratio					
	200	100	200	50	50	200
2 Arabinose	N.D.	N.D.	N.D.	21.2	18.5	N.D.
3 Xylose	N.D.	N.D.	N.D.	12.0	N.D.	N.D.
4 Fructose	541.6	772.7	398.5	N.D.	116.1	757.0
5 Mannose	N.D.	17.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6 Galactose	N.D.	N.D.	N.D.	95.8	N.D.	N.D.
7 Glucose	596.6	803.9	710.1	214.9	210.2	757.0
9 Sucrose	N.D.	182.8	84.6	N.D.	N.D.	N.D.
11 Maltose	56.6	22.1	31.7	N.D.	N.D.	N.D.
12 Isomaltose	N.D.	17.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
14 Maltotriose	N.D.	N.D.	12.5	N.D.	N.D.	N.D.

## ■ まとめ

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）で単糖、二糖およびオリゴ糖の計15成分を分離し、ELSD-LT IIIを用いて検出しました。グラジエント溶離法を用いることにより、約40分で全ての成分を溶出することができました。また、ガラクトースとグルコースは共溶出することが知られていますが、それらを分離することもできました。

今回分析した調味料の内、ステーキソース、ケチャップ、醤油、黒酢にはいずれも塩分が含まれていたため、前処理工程においてH+型の陽イオン交換モードのSPEカートリッジを用いることで、試料中の塩を除去しました。その結果、塩に被って埋もれていた微量の糖を定量することが可能となりました。ならびに、高濃度の塩に被る糖がないことも確認できました。

Nexera、SHIMADZU LabTotalは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。  
 Maxi-Cleanは、S\*Pure Pte Ltdの商標です。  
 HILICPAKIは、昭和電工(株)の登録商標です。  
 S\*Pure Pte Ltd製 Maxi-Clean SPE 0.5 mL IC-H (H+型) は株式会社島津ジーエルシーより購入いただけます。