

# ELSD-LT IIIを使用した ビール飲料中の単糖・オリゴ糖の一斉分析

赤木 美穂、田邊 彩乃、加藤 理英

## ユーザーベネフィット

- ◆ 検出に蒸発光散乱検出器ELSD-LT IIIを用いることで、グラジエント溶離による糖の一斉分析が可能です。
- ◆ マルトオリゴ糖とイソマルトオリゴ糖などの糖を分離することができ、ビール飲料中のこれらの成分の定量が可能です。
- ◆ ELSD-LT IIIのダイナミックレンジ拡張機能により、サンプル中に含まれる成分の濃度差が大きい試料でも感度設定の検出を行うことなく、最適な感度で定量を行うことが可能です。

## はじめに

ビール飲料に含まれる糖は、主に麦芽などの原材料に含まれるデンプンが糖化されることで生成し、ビール飲料の風味を決定する要素の1つです。

蒸発光散乱検出器 (ELSD) は、糖のような紫外可視吸収をもたない化合物の分析に適しています。グラジエント溶離も適用できるため、多成分の一斉分析が可能な点が特長です。

本アプリケーションニュースでは、ビール飲料に含まれる単糖・オリゴ糖を同時分析した例について紹介します。装置は、一体型高速液体クロマトグラフ i-Series LC-2050C に、検出器としてELSD-LT IIIを追加して使用しました。また、糖分析においてよく利用される親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) により、水とアセトニトリルを使用したグラジエント条件で分析可能でした。

## 混合標準溶液の分析

フルクトースとスクロースの混合標準溶液、マルトオリゴ糖 (M1~M10) の混合標準溶液、イソマルトオリゴ糖 (I2~I5) の混合標準溶液をそれぞれ分析し、各成分の分離を確認しました。なお、マルトオリゴ糖の分析には株式会社センシュエ科学製10種混合試料 (P/N: BC-GM、濃度非公開) を使用しました。また、フルクトース、スクロース、イソマルトオリゴ糖の分析には、各成分濃度が50 mg/Lとなるように水/アセトニトリル=3/7混液で調製した混合溶液を使用しました。

図1に各混合標準溶液のクロマトグラムの重ね描きを、表1に分析条件を示します。各成分を50分以内に分析することが可能でした。また、図1の保持時間34分~43分 (枠線内) を拡大したクロマトグラムを図2に示します。マルトオリゴ糖とイソマルトオリゴ糖が分離できています。

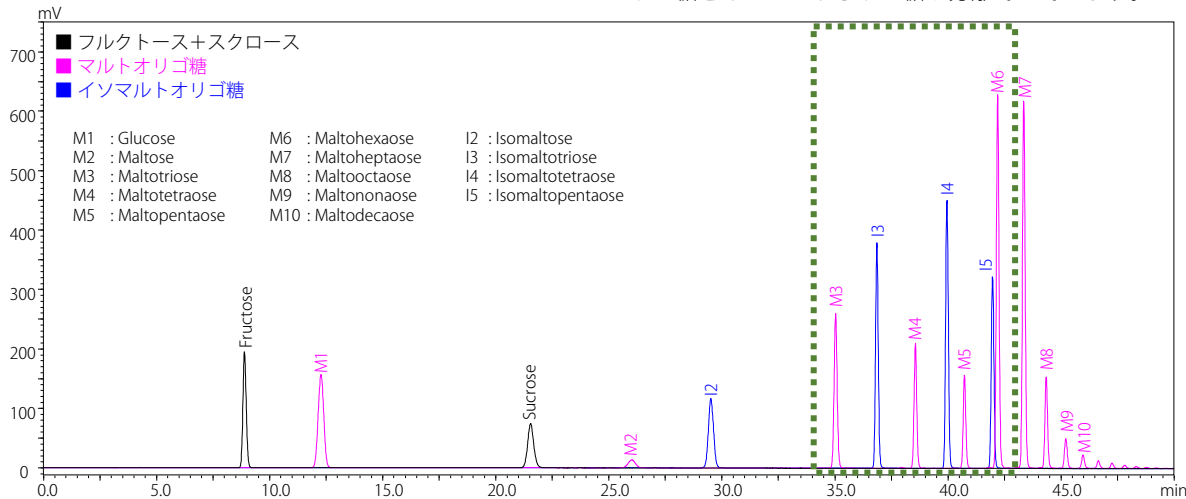


図1 各標準溶液のクロマトグラム (重ね描き)

表1 分析条件

System	: i-Series LC-2050C
Column	: Shodex HILICpak VG-50 4E (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A) Water B) Acetonitrile
Flow rate	: 1.0 mL/min
Time program	: 88%B (0-12 min)→83.5%B (25 min) →50%B (50 min)→88%B (50.1-60 min)
Mixer	: 40 μL
Column temp.	: 45 °C
Injection volume	: 20 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

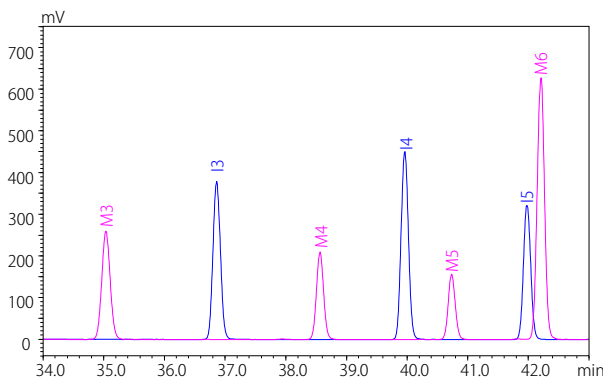


図2 マルトオリゴ糖とイソマルトオリゴ糖の分離  
(図1枠線内の拡大図)

## ■ 検量線

フルクトース、スクロース、マルトオリゴ糖 (M1～M7)、イソマルトオリゴ糖 (I2～I5) の各成分について、5、10、50、100、200 mg/Lの標準溶液を調製しました。これらの分析結果から作成した各成分の検量線を、図3～5に示します。なお、ELSDのレスポンスは濃度の対数に対して指数応答であるため、両対数軸でプロットしています。いずれの対象成分についても、寄与率0.997以上となりました。

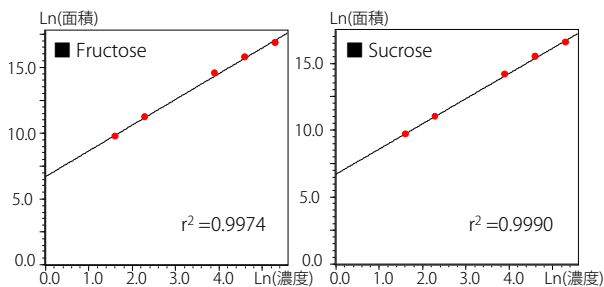


図3 フルクトース、スクロースの検量線

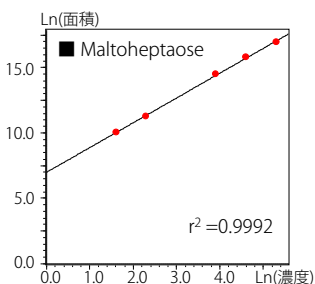
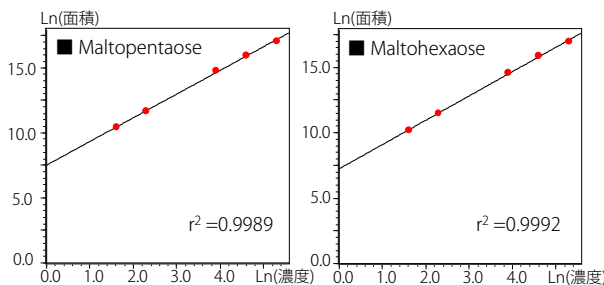
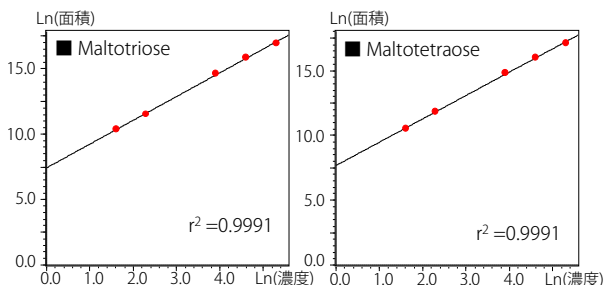
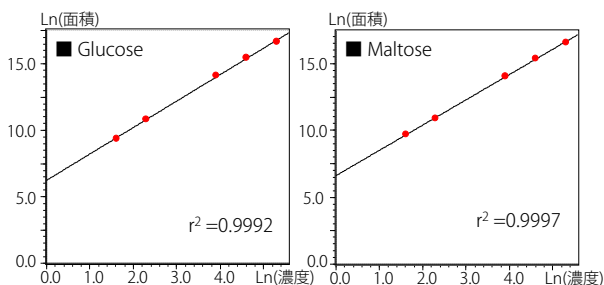


図4 マルトオリゴ糖 (M1～M7) の検量線

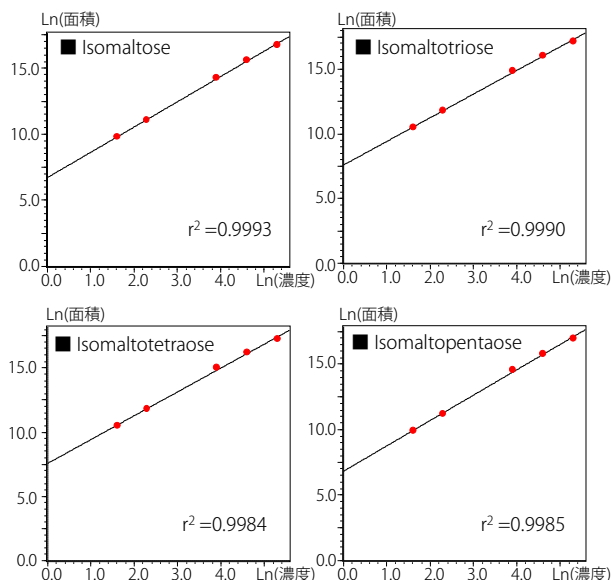


図5 イソマルトオリゴ糖の検量線

## ■ 再現性

検量線作成で使用した、各成分の50 mg/L混合標準溶液について、5回くり返し分析を行い、再現性評価を行いました。表2に保持時間の再現性を、表3にピーク面積値の再現性を相対標準偏差 (%RSD) で示します。いずれの成分についても、保持時間再現性は0.2%以内、面積値再現性は4%以内と、良好な結果が得られました。

表2 保持時間の再現性評価 (n=5)

Compound	Average of retention time (min)	%RSD
Fructose	8.9	0.07
Sucrose	21.6	0.07
Glucose	12.4	0.11
Maltose	26.2	0.13
Maltotriose	35.1	0.05
Maltotetraose	38.6	0.04
Maltopentaose	40.8	0.04
Maltohexaose	42.3	0.04
Maltoheptaose	43.4	0.04
Isomaltose	29.5	0.13
Isomaltotriose	36.9	0.04
Isomaltotetraose	40.0	0.02
Isomaltopentaose	42.0	0.02

表3 ピーク面積値の再現性評価 (n=5)

Compound	Average of peak area	%RSD
Fructose	2,013,719	0.63
Sucrose	1,392,641	1.38
Glucose	1,558,588	3.22
Maltose	1,430,044	3.12
Maltotriose	2,550,256	2.04
Maltotetraose	3,258,277	3.82
Maltopentaose	3,029,923	3.78
Maltohexaose	2,812,045	2.56
Maltoheptaose	2,666,494	3.28
Isomaltose	1,827,958	2.81
Isomaltotriose	3,356,850	2.57
Isomaltotetraose	3,794,042	1.74
Isomaltopentaose	2,744,466	2.67

## ■ビール飲料の分析

### ●分析例

試料として10種類の市販ビール飲料（ビールA～G、糖質ゼロビールH、発泡酒、ノンアルコールビール）を分析しました。脱炭酸処理したビール飲料を、水/アセトニトリル=1/1混液で20倍希釈し、0.2 μmのメンブレンフィルターでろ過後、HPLCに供しました。

図6～15に、各ビール飲料のクロマトグラムを示します。検量線の最下点（5 mg/L）以上の濃度で検出されたものについて、成分名を表記しています。感度のパラメーターを自動で最適化するELSD-LT IIIのダイナミックレンジ拡張機能により、各成分の濃度差が大きい試料でも分析可能でした。

ビールA～Cのクロマトグラムを比較すると、含まれている糖の種類や濃度が類似していました。一方、色が濃いビールD、クラフトビールE～Gでは、ビールA～Cと比較して特定の成分の比率が高い傾向がありました。糖質ゼロビールHでは、いずれの対象成分も微量で、ほぼ検出されませんでした。また、発泡酒IIはビールと類似したクロマトグラムが得られたのに対し、ノンアルコールビールIはビールと比較して単糖を多く含む結果でした。このように、単糖・オリゴ糖を分析したクロマトグラムの比較から、各ビール飲料の特徴をとらえることができました。

M1 : Glucose            M5 : Maltopentaose        I2 : Isomaltose  
M2 : Maltose           M6 : Maltohexaose        I3 : Isomaltotriose  
M3 : Maltotriose       M7 : Maltoheptaose       I4 : Isomaltotetraose  
M4 : Maltotetraose    I5 : Isomaltopentaose

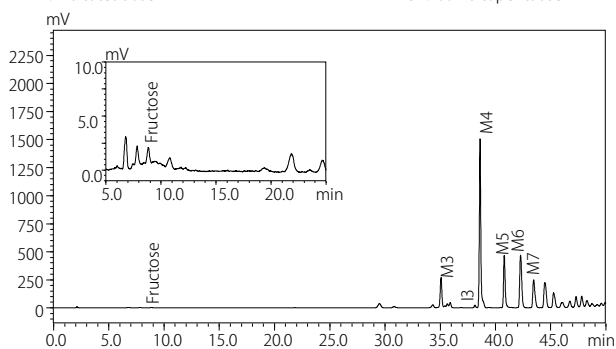


図6 ビールAのクロマトグラム

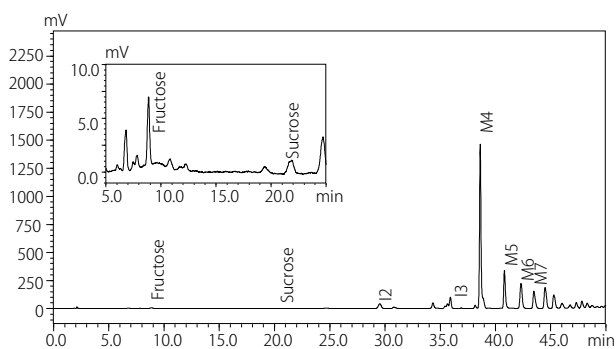


図7 ビールBのクロマトグラム

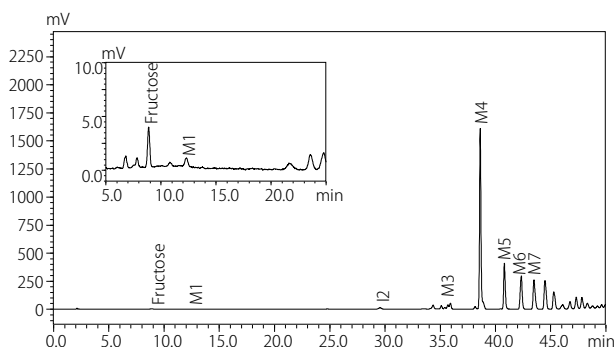


図8 ビールCのクロマトグラム

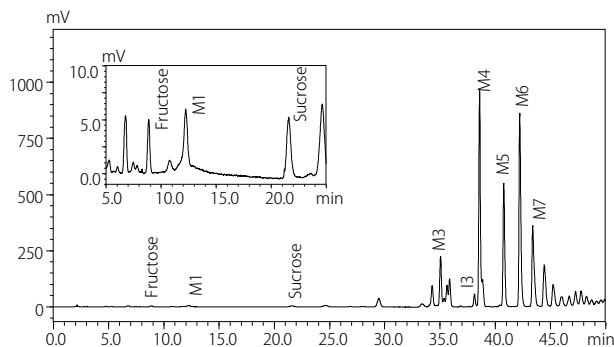


図9 ビールDのクロマトグラム

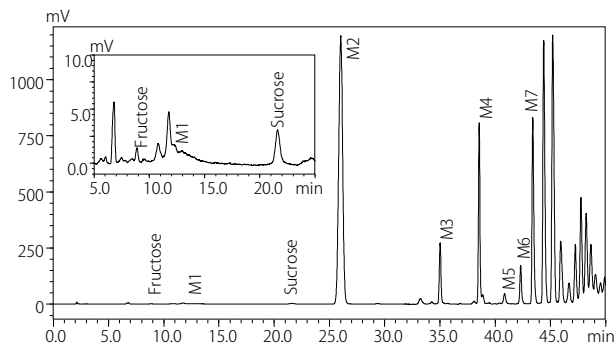


図10 ビールEのクロマトグラム

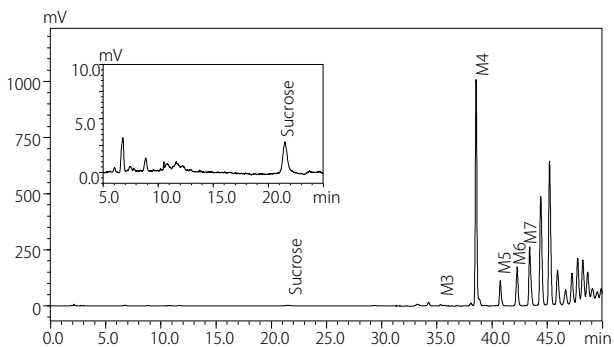


図11 ビールFのクロマトグラム

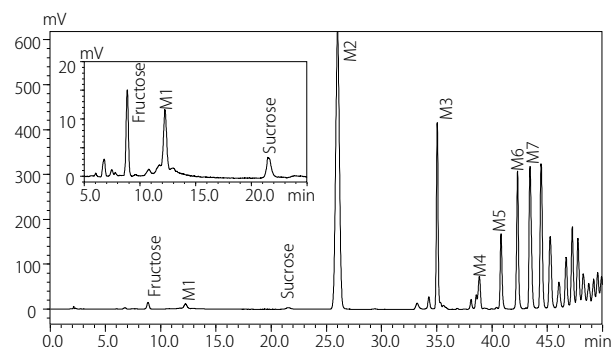


図12 ビールGのクロマトグラム

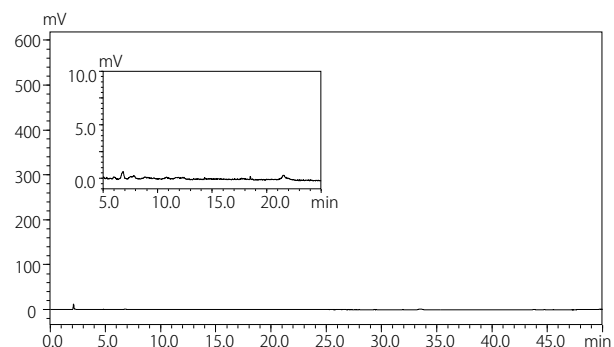


図13 糖質ゼロビールHのクロマトグラム

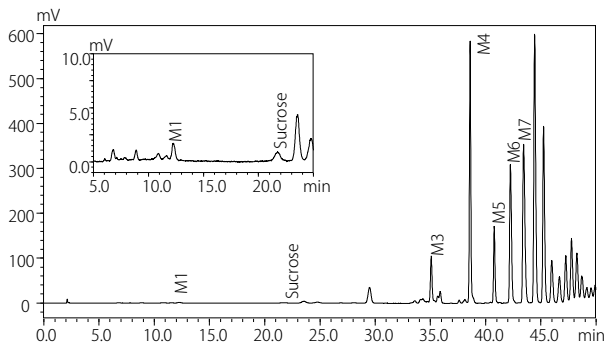


図14 発泡酒のクロマトグラム

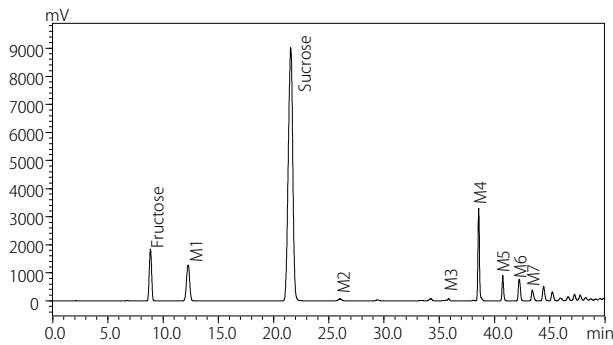


図15 ノンアルコールビールJのクロマトグラム

●再現性

ビールAについて5回くり返し分析を行い、単糖・オリゴ糖の定量および再現性の評価を行いました。表4に、前処理後の各成分の濃度を定量した結果を示します。また、表5に保持時間の再現性を、表6にピーク面積値の再現性を相対標準偏差 (%RSD) で示します。いずれの成分についても、保持時間再現性は0.2%以内、面積値再現性は4%以内と、良好な結果が得られました。

表4 ビールAにおける各成分の濃度 (n=5)

Compound	Average of concentration (mg/L)
Sucrose	10.3
Maltotriose	62.7
Maltotetraose	135.2
Maltopentaose	78.1
Maltohexaose	92.7
Maltoheptaose	76.3
Isomaltotriose	5.6

表5 ビールAにおける各成分の保持時間の再現性評価 (n=5)

Compound	Average of retention time (min)	%RSD
Sucrose	21.6	0.11
Maltotriose	35.0	0.02
Maltotetraose	38.6	0.01
Maltopentaose	40.8	0.02
Maltohexaose	42.2	0.02
Maltoheptaose	43.4	0.02
Isomaltotriose	36.8	0.02

表6 ビールAにおける各成分の面積値の再現性評価 (n=5)

Compound	Average of peak area	%RSD
Sucrose	67,674	3.52
Maltotriose	3,115,892	1.26
Maltotetraose	15,084,463	1.56
Maltopentaose	5,169,858	0.50
Maltohexaose	6,369,978	0.94
Maltoheptaose	4,047,583	1.82
Isomaltotriose	46,088	1.17

●添加回収率

ビールAの試料にフルクトース、スクロース、マルトオリゴ糖 (M1~M7) の標準溶液を各50 mg/Lとなるように添加した試料を6回調製して分析し、添加回収率を評価しました。なお、ビールAにほとんど含まれていない成分については、ビールA中の濃度を0 mg/Lとして算出しました。表7のように、いずれの対象成分についても添加回収率90~110%と、良好な結果が得られました。

表7 ビールAにおける各成分の添加回収率の評価 (n=6)

Compound	Average of recovery (%)
Fructose	92.6
Sucrose	91.2
Glucose	108.6
Maltose	97.9
Maltotriose	103.5
Maltotetraose	93.6
Maltopentaose	97.0
Maltohexaose	93.4
Maltoheptaose	102.5

■まとめ

ビール飲料中の単糖・オリゴ糖の多成分一斉分析を行いました。検出にELSD-LT IIIを用いることで、水とアセトニトリルを使用した簡単なグラジエント条件により、フルクトース、スクロース、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖を分離することができました。また、各成分の検量線の直線性と、ビール飲料分析時の保持時間および面積値の再現性、添加回収率について、良好な結果が得られました。

SHIMADZU LabTotal は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2023年 10月  
01-00604A-JP A改訂版発行：2024年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。