

調味料中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成分一斉分析法の開発

第28回 クロマトグラフィーシンポジウム

P-26

岩田奈津紀, 堀江真之介, 早川禎宏
島津製作所 分析計測事業部

調味料中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成分一斉分析法の開発

1. 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おり、これらの予防、治療に糖質制限が有効とされている。しかし、糖質制限で見落としがちな調味料にも多くの糖質を含むものがある。

一方で、調味料には糖質の他に塩分も多く含むものがある。塩分の多い調味料では、示差屈折率検出器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場合、塩分によって糖の定量が妨害される場合もある。本発表では、糖15成分の分離検討を行ったので報告する。また、塩分を含む調味料に関しては、前処理工程として脱塩処理を検討したので、報告する。



Nexera™ ELSDシステム

調味料中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成分一斉分析法の開発

2. 実験と結果

2-1. 対象成分と分析条件

対象成分は、単糖、二糖、オリゴ糖の15成分である（表1）。分離検出は、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）で分離し、ELSDで検出した。まず、単糖7成分に対して、カラム温度による分離検討を行った（図1、表2）。総合的に45 °Cの条件が分離良好であった。かつ、ガラクトースとグルコースのように共溶出する立体異性体も分離できた。

表1 対象成分

	Compound	Saccharide
1	Ribose	
2	Arabinose	
3	Xylose	
4	Fructose	monosaccharide
5	Mannose	
6	Galactose	
7	Glucose	
8	Lactulose	
9	Sucrose	
10	Lactose	disaccharide
11	Maltose	
12	Isomaltose	
13	Raffinose	trisaccharide
14	Maltotriose	
15	Stachyose	tetrasaccharide

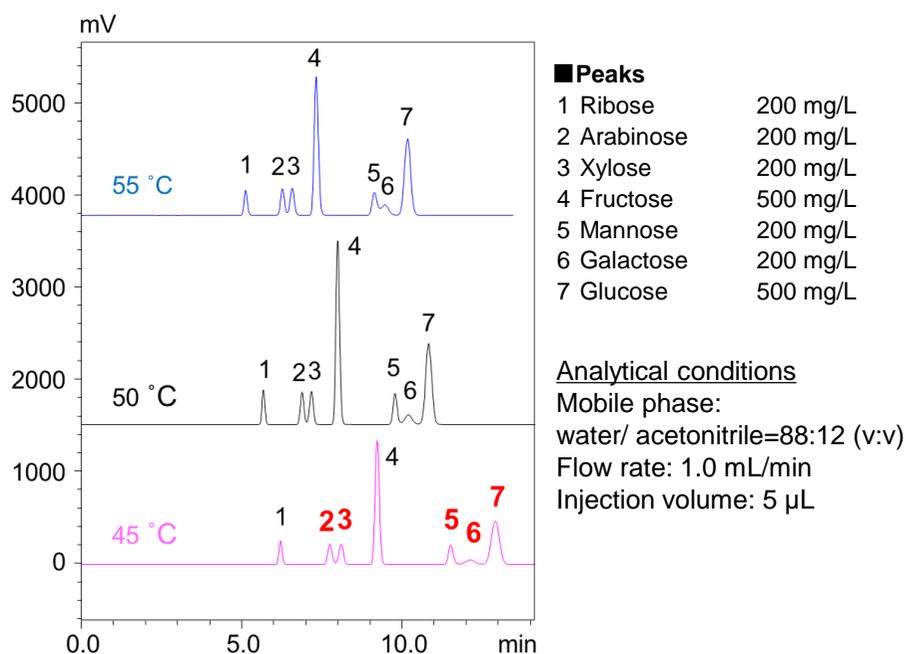


表2 カラム温度別の分離度の比較

Peaks	Resolutions		
	55 °C	50 °C	45 °C
2 and 3	1.22	1.28	1.31
5 and 6	0.77	1.19	1.33
6 and 7	1.65	1.56	1.46

図1 カラム温度別のクロマトグラムの比較

調味料中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成分一斉分析法の開発

先の結果を踏まえ、単糖からオリゴ糖までの15成分の分離検討を行った。表3に分析条件を、図2に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示す。グラジエント溶離法により、約40分で15成分を分離できた。

表3 分析条件

System	: Nexera™ lite
Column	: Shodex HILICpak VG-50 4E (250 × 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
Detection	: ELSD-LT III
Gain	: Wide
Filter	: 4 sec
Drift Tube Temp.	: 40 °C
Nebulizer Gas	: N ₂
Gas Pressure	: 350 kPa

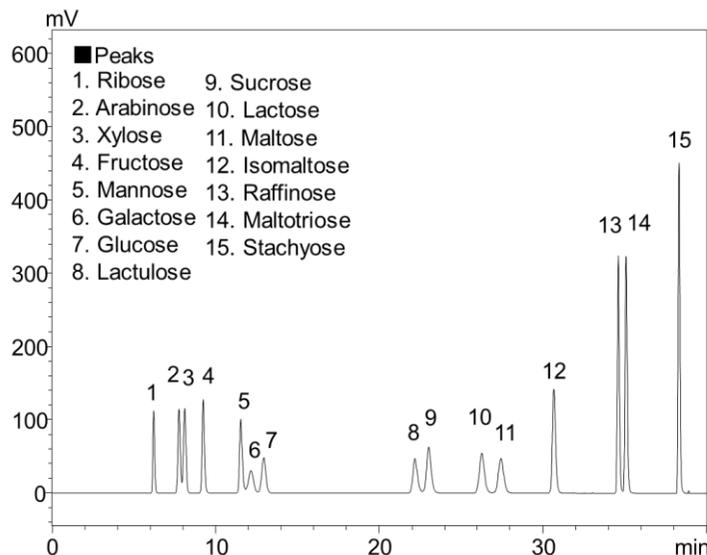


図2 15成分混合標準溶液（各100 mg/L）のクロマトグラム

2-2.再現性と直線性

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)確認した。保持時間、面積ともに再現性はそれぞれ0.2%以下、6.3%以下の結果が得られた。

対象の15成分について両対数プロットにより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た（表4）。図3に検量線の一例を示す。

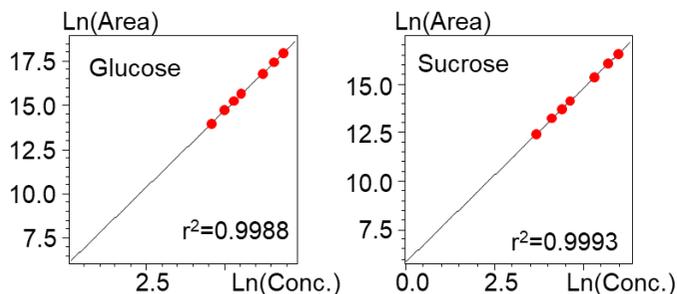


図3 検量線の一例

表4 検量線濃度範囲と寄与率 (r^2)

Compound	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

調味料中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成分一斉分析法の開発

2-3.塩分を含まない調味料の分析

市販調味料（バルサミコ酢、バーベキューソース）を試料とし、70%アセトニトリル水溶液で抽出した。バーベキューソースについては、抽出時に析出物が生じたため遠心分離を行い、その上清を得た。クロマトグラムから糖の定量妨害となるピークは確認されなかった（図4、5）。表5に分析結果を示す。なお、この濃度は前処理後の濃度となる。

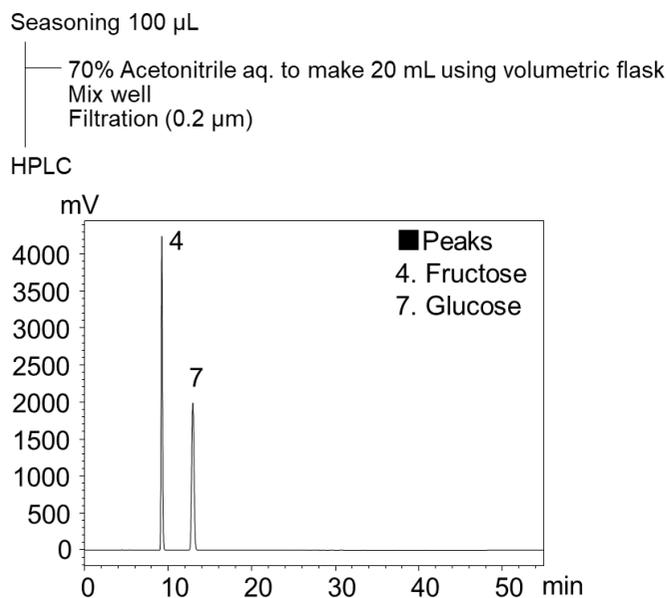


図4 バルサミコ酢のクロマトグラム

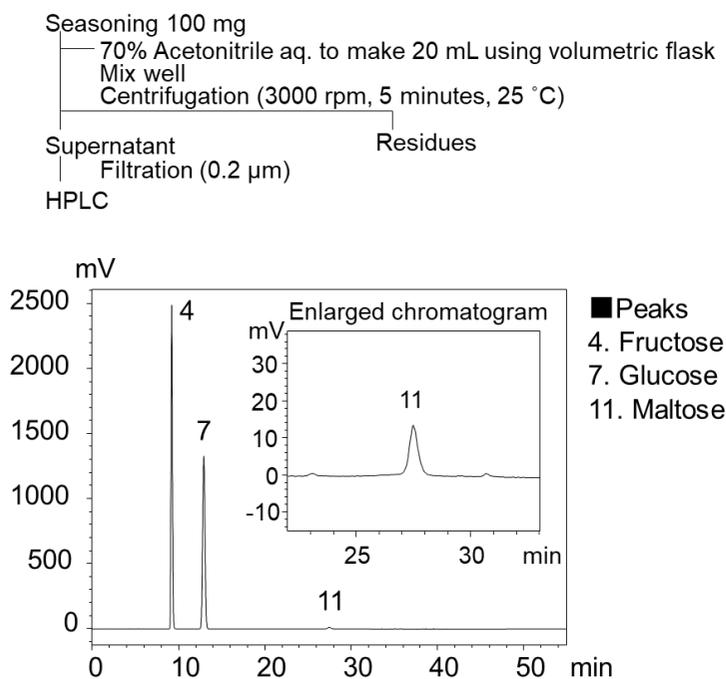


図5 BBQソースのクロマトグラム

表5 分析結果

Compound	Concentration (mg/L)	
	BBQ sauce	Balsamic vinegar
	Dilution ratio	
	200	200
4 Fructose	541.6	757.0
7 Glucose	596.6	757.0
11 Maltose	56.6	N.D.

N.D.: not detected

調味料中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成分一斉分析法の開発

2-4. 添加回収試験

塩分を除去するため、H+型の陽イオン交換モードの固相抽出カートリッジMaxi-Clean™ SPE 0.5 mL IC-H (S*Pure Pte Ltd製、以下IC-H) による脱塩を行った。IC-Hによる脱塩条件について抽出液負荷後の初流廃棄容量を検討した(1, 1.5, 2 mL)。その結果、2 mLの時に95%以上の回収率が得られた(図6)。

ケチャップを試料に用いて、5併行の添加回収試験を実施した。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、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た。真度は82.9~94.0% (回収率の平均値)、併行精度は0.6~2.1%であった(表6)。

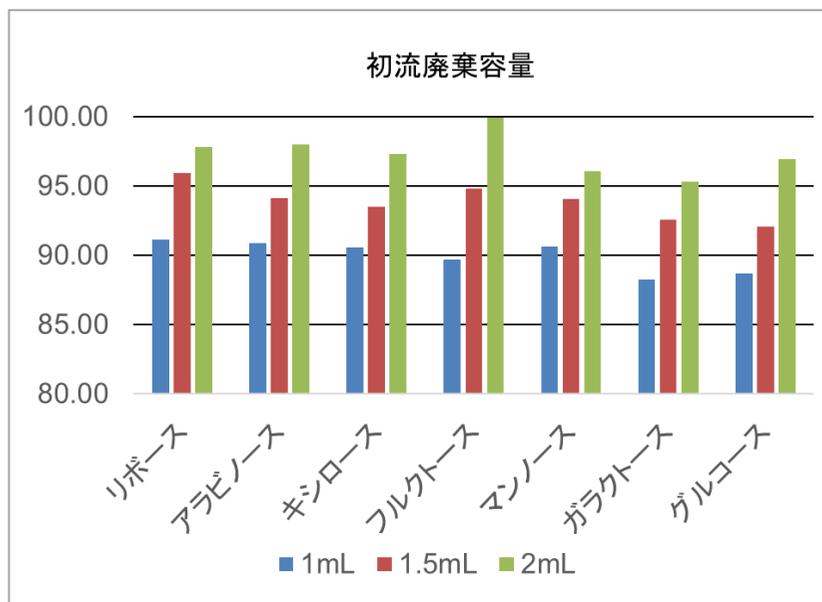


図6 初流廃棄容量

表6 添加回収試験 (N=5)

N	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	85.8	82.9	94.0
(%RSD)	(0.91)	(0.64)	(2.05)

調味料中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成分一斉分析法の開発

2-5.塩分を含む調味料の分析

市販調味料（ステーキソース、ケチャップ、醤油、黒酢）を試料とし、70%アセトニトリル水溶液で抽出した。ステーキソース、ケチャップについては、抽出時に析出物が生じたため遠心分離を行い、その上清を得た。IC-Hにより試料の脱塩を行うことで、塩の共溶出により検出が困難であった微量のマルトース、イソマルトースが定量可能となった（図7、8）。さらに、高濃度の塩に被る糖がないことも確認できた（図9、10）。表7、8に分析結果を示す。なお、この濃度は前処理後の濃度となる。

表7 分析結果

Compound	Concentration (mg/L)	
	Steak sauce	Ketchup
	Dilution ratio	
	100	200
4 Fructose	772.7	398.5
5 Mannose	17.1	N.D.
7 Glucose	803.9	710.1
9 Sucrose	182.8	84.6
11 Maltose	22.1	31.7
12 Isomaltose	17.2	N.D.
14 Maltotriose	N.D.	12.5

N.D.: not detected

Seasoning 100 mg
 — 70% Acetonitrile aq. to make 10 mL (Steak sauce) or 20 mL (Ketchup)
 using volumetric flask
 Mix well
 Centrifugation (3000 rpm, 5 minutes, 25 °C)
 Supernatant Residues
 IC-H (Condition with 10 mL of Ultrapure water)
 Discard initial 2 mL of eluate
 Eluate
 Filtration (0.2 μm)
 HPLC

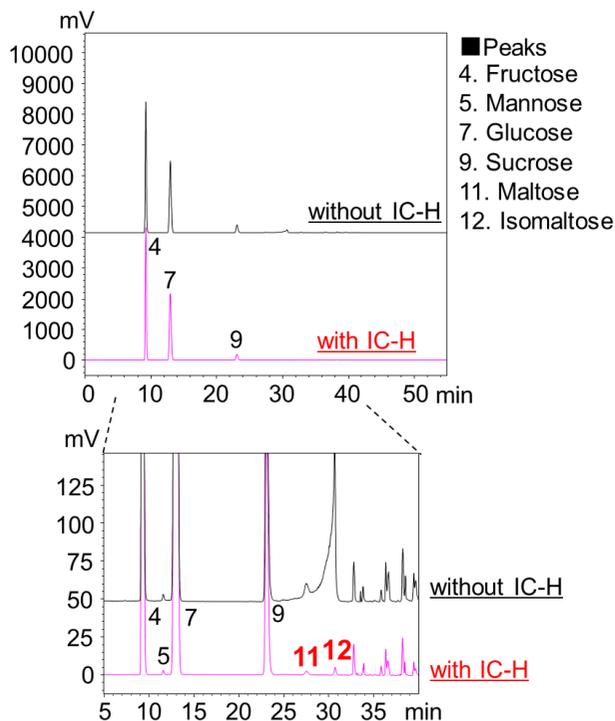


図7 ステーキソースのクロマトグラム

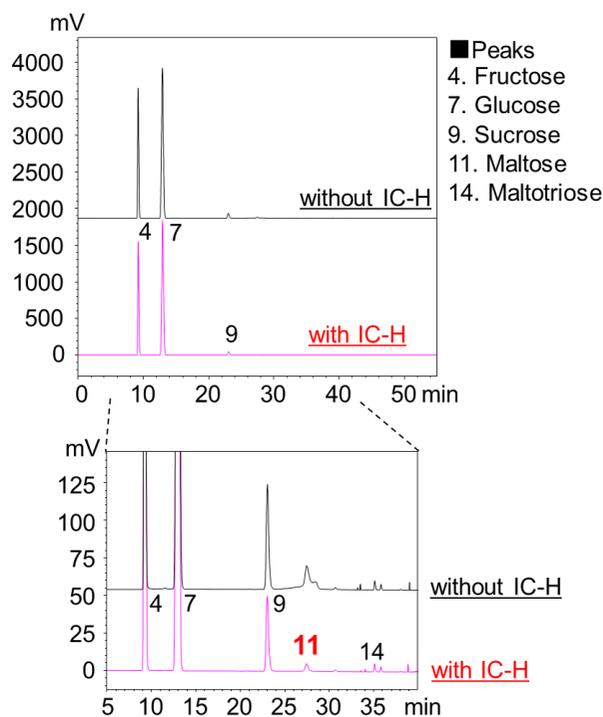


図8 ケチャップのクロマトグラム

調味料中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成分一斉分析法の開発

Seasoning 100 μ L
 70% Acetonitrile aq. to make 5 mL using volumetric flask
 Mix well
 IC-H (Condition with 10 mL of Ultrapure water)
 Discard initial 2 mL of eluate
 Eluate
 Filtration (0.2 μ m)
 HPLC

表8 分析結果

Compound	Concentration (mg/L)	
	Soy sauce	Black vinegar
	Dilution ratio	
	50	50
2 Arabinose	21.2	18.5
3 Xylose	12.0	N.D.
4 Fructose	N.D.	116.1
6 Galactose	95.8	N.D.
7 Glucose	214.9	210.2

N.D.: not detected

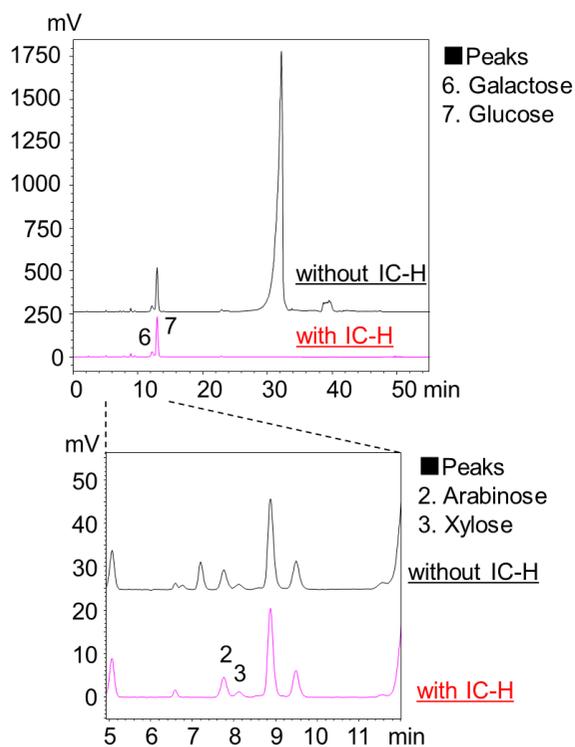


図9 醤油のクロマトグラム

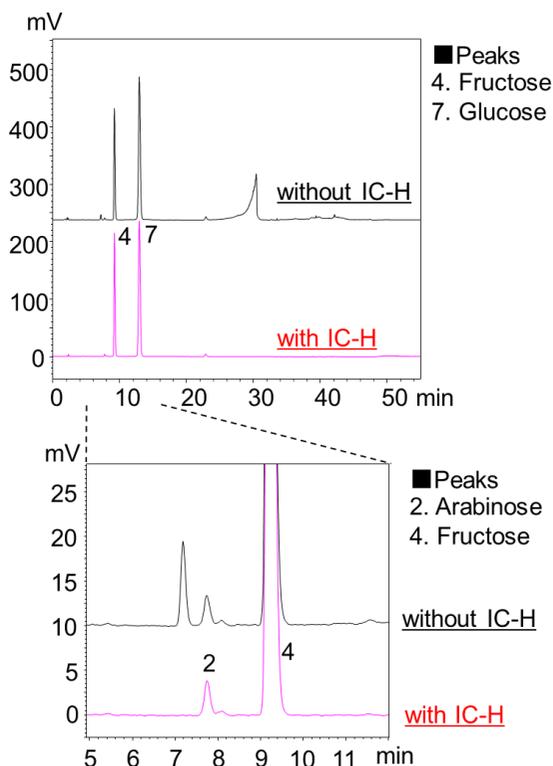


図10 黒酢のクロマトグラム

ポストカラム誘導体化法による低ラクトース製品中のラクトースおよびその類縁物質の高感度分析

3. 結論

- 前処理で脱塩すること、および、HILICとグラジエント溶離法を組み合わせることにより単糖、二糖およびオリゴ糖の計15成分の一斉分析法を開発した。
- 塩分を多く含む食品であっても、塩分による定量妨害を受けずに微量の糖の定量が可能となった。



以上より、本前処理および分析法はペースト状の調味料にも適用可能であったため、調味料以外の塩分を含む食品もホモジナイズ処理により適用可能であると考えられる。

First Edition: April, 2022