

# 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

**第32回 クロマトグラフィー科学会議**

P-29

悴田 朋佳, 周 毅婷, 平尾 美子, 堀江 真之介  
島津製作所 分析計測事業部

# 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

## 1. はじめに

ラクトース（乳糖）はガラクトースとグルコースからなる二糖で、乳製品中に多く含まれている。ラクトースを加水分解するための酵素、ラクターゼの活性や腸内での分泌量が不十分な場合に起こる消化器系の疾患が乳糖不耐症であり、世界人口の7割以上が患っていることが知られている。乳糖不耐症患者向けに、様々な低ラクトースおよびラクトースフリーの製品が開発されている。これら製品の多くは酵素加水分解によってラクトースの量を減らしているが、酵素加水分解が不完全な場合、少量のラクトースが製品に残存する可能性がある。

EU加盟国の中には、乳児用以外の食品に「低ラクトース」「ラクトースフリー」の表示をする際に、最終製品に含まれるラクトース濃度の基準値を設定している国があり、そのほとんどは0.01~1 g/100 gの範囲内に設定されている。しかし、本発表時点において、乳児用以外の低ラクトース製品、ラクトースフリー製品に対するラクトース濃度の基準や規制は見当たらない。また、乳製品には類縁物質としてアロラクトースとラクツロースが含まれることもあるが、これらの化学構造（図1）がラクトースに類似しているため、分離し、確認することが困難であった。

本発表では、ラクトース、アロラクトース、ラクツロースとその他の6種類の糖の高感度分析法とこれを適用した低ラクトース牛乳に含まれる糖の定量について紹介する。

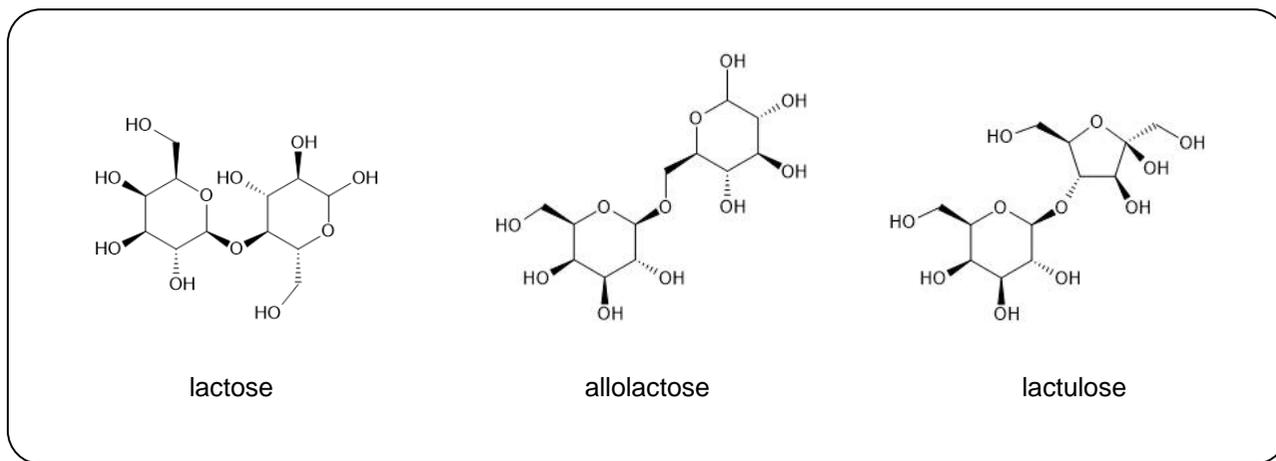


図1 ラクトース、アロラクトース、ラクツロースの化学構造

# 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

## 2. 実験

今回は9種類の糖（キシロース、アラビノース、フルクトース、マンノース、グルコース、ガラクトース、ラクツロース、ラクトース、アロラクトース）を目的成分とした。分析にはNexera™還元糖分析システム（島津製作所）を用いた。図2にシステムの外観と流路図、表1に分析条件を示す。これら9種類の糖を親水性相互作用クロマトグラフィー用カラムで分離させた後、アルギニン反応試薬としてポストカラム誘導体化し、蛍光検出した。この検出法は、ほう酸の存在下で糖がアルギニンと反応して、強い蛍光誘導体を生成する性質を利用している。誘導体化された糖は蛍光検出器により高感度に検出できるようになり、示差屈折率検出法では検出が困難であった低濃度の糖の分析が可能になる。

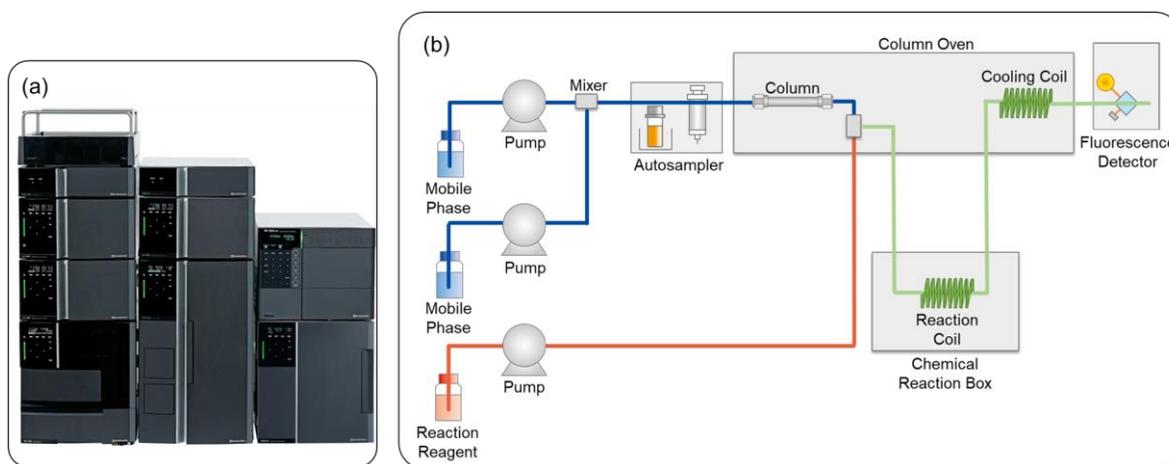


図2 Nexera™還元糖分析システムの外観 (a) と流路図 (b)

表1 分析条件

System	: Nexera Reducing Sugar Analysis System
<b>&lt;Separation&gt;</b>	
Column	: Shodex Asahipak NH2P-50 4E (250 mm × 4.6 mmI.D., 5 μm)
Guard Column	: Shodex Asahipak NH2P-50G 4A (10 mm × 4.6 mmI.D., 5 μm)
Mobile Phase A	: Water/85% Phosphoric acid=1000:3
Mobile Phase B	: Acetonitrile/85% Phosphoric acid=1000:3
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Time Program	: B Conc. 90%(0 min)-89%(90 min)-78%(110-120 min)-90%(120.01-150 min)
Mixer Capacity	: 1.7 mL
Column Temp.	: 45 °C
Injection Vol.	: 10 μL
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass
<b>&lt;Post-column Reaction&gt;</b>	
Reaction Reagent	: Mixed aqueous solution of 5 g/L arginine, 0.4 mol/L borate and 0.2 mol/L potassium hydroxide
Flow Rate	: 0.5 mL/min
Reaction Temp.	: 150 °C
Detection	: Ex. 320 nm, Em. 430 nm (RF-20AXS)
Cell Temp.	: 25 °C
Reaction Coil	: SUS tubing, 8 m × 0.5 mmI.D.

# 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. 結果

### 3-1. 糖混合標準液の分析

図3に糖混合標準液のクロマトグラムを示す。9種類の糖はベースライン分離することができた。

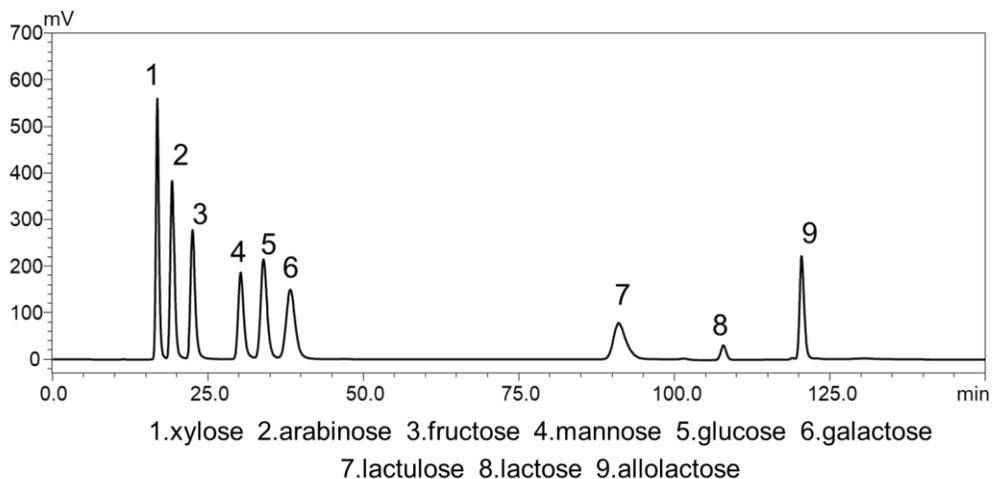


図3 糖混合標準液のクロマトグラム

(Concentration of lactose : 400 mg/L; allolactose and lactulose : 200 mg/L; other 6 saccharides : 100 mg/L)

### 3-2. 直線性と定量下限

9種類の糖の検量線を作成した。いずれの成分においても寄与率 $r^2$ は0.9999以上と良好な直線性が得られた。図4に検量線の一例を示す。さらに、今回の分析における定量下限を標準溶液のS/N比から計算した。検量線の濃度範囲、寄与率と定量下限を表2に示す。

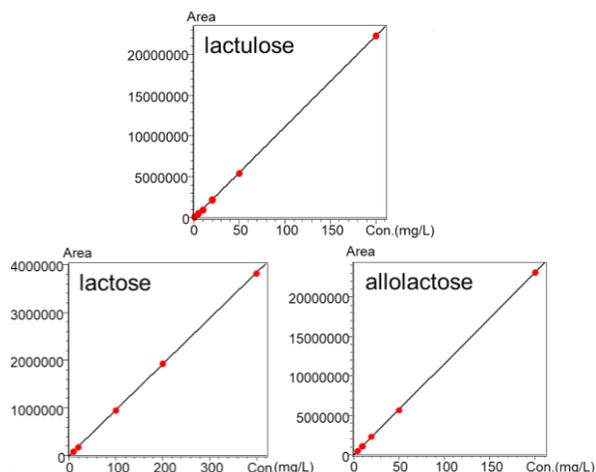


表2 検量線の濃度範囲、寄与率と定量下限

Compound	Conc. range (mg/L)	$r^2$	Limit of quantification (mg/L)	
1	xylose	2.5-100	0.99997	0.020
2	arabinose	2.5-100	0.99991	0.030
3	fructose	2.5-100	0.99997	0.041
4	mannose	2.5-100	0.99994	0.062
5	glucose	2.5-200	0.99997	0.053
6	galactose	2.5-200	0.99998	0.076
7	lactulose	1-200	0.99994	0.294
8	lactose	10-400	0.99997	1.427
9	allolactose	5-200	0.99997	0.103

図4 検量線

# 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. 結果

### 3-3.低ラクトース牛乳の分析

低ラクトース牛乳を今回の条件で分析した。低ラクトース牛乳を70%アセトニトリル水溶液によって除タンパク処理を行い、遠心分離を行った。その後、0.2 μmのメンブレンフィルターでろ過した液を分析に供した。前処理した後の低ラクトース牛乳（100倍希釈）のクロマトグラム図5に示す。低ラクトース牛乳からはグルコース、ガラクトース、ラクツロース、ラクトース、アロラクトースが検出された。表3に、前処理した後の低ラクトース牛乳に含まれる糖の濃度を示す。

さらに、低ラクトース牛乳を用いて添加回収試験を行った。表4に添加回収試験の結果を示す。

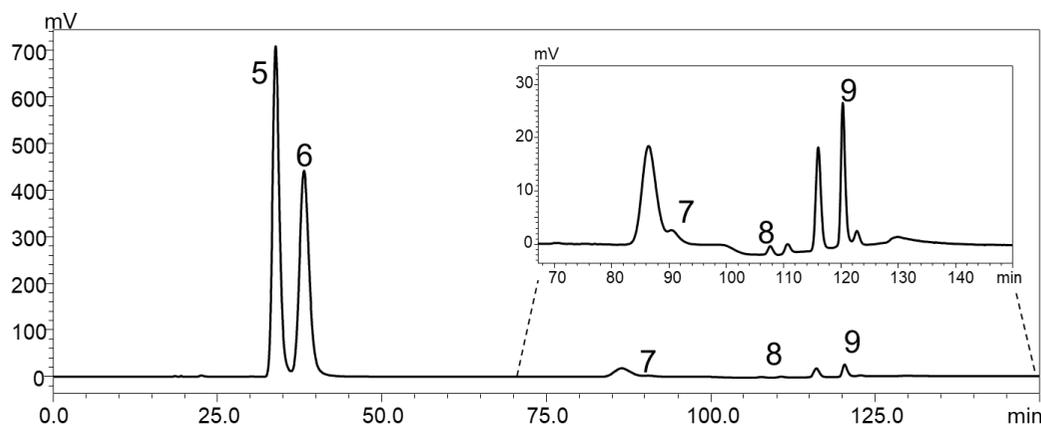


図5 低ラクトース牛乳のクロマトグラム(100倍希釈)

表3 低ラクトース牛乳の分析結果(100倍希釈)

	Compound	Concentration (mg/L)
1	xylose	Not detected
2	arabinose	Not detected
3	fructose	Not detected
4	mannose	Not detected
5	glucose	171.6
6	galactose	153.3
7	lactulose	3.8
8	lactose	10.8
9	allolactose	12.8

表4 添加回収試験の結果(n=3)

	Compound	Spike concentration (mg/L)	Average recovery rate(%) (n=3)
1	xylose	5	103.6
2	arabinose	5	102.7
3	fructose	5	104.1
4	mannose	5	102.0
5	glucose	5	100.7
6	galactose	5	103.8
7	lactulose	10	102.1
8	lactose	20	97.8
9	allolactose	10	94.1

## 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

### 4.まとめ

- ポストカラム誘導体化法による低ラクトース乳製品中のラクトース、アロラクトース、ラクツロースなどの糖の高感度な一斉分析法を開発した。
- 低ラクトース牛乳に含まれる糖を定量し、回収率は良好であった。
- 本分析法は高感度であることから、低ラクトース乳製品中に含まれる微量のラクトース、アロラクトースおよびラクツロースの定量に適用可能と考える。

First Edition: April, 2022