

異性化液糖及び砂糖混合異性化液糖の
果糖、ぶどう糖及び砂糖含有率（HPLC法）測定手順書

	ページ
アミノカラム法	1
配位子交換カラム法	9

異性化液糖及び砂糖混合異性化液糖の果糖、ぶどう糖 及び砂糖含有率測定方法（アミノカラム法）手順書

1. 適用範囲

この測定方法は日本農林規格における異性化液糖及び砂糖混合異性化液糖に適用する。

2. 測定方法の概要

試料を 50 %エタノールで希釈した後、メンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフでアミノカラムを用いて測定する。標準溶液のピーク面積から、試料中の各糖含有率を算出する。

3. 注意事項

アセトニトリルは引火性があり、蒸気の吸引は嘔吐等を起こす。また、皮膚、眼等を刺激し炎症を起こすことがある。取り扱う際は、局所排気装置等を使用し、マスク、ゴーグル等を使用すること。また、そのまま排水に捨てず、回収し適切に処理すること。

4. 試薬等

試薬に用いる水及び試薬は、次のとおりとする。

- (a) 水：イオン交換法によって精製した水又は逆浸透膜法、蒸留法、イオン交換法などを組み合わせた方法によって精製したもので、JIS K 8008 に規定する A3 以上の品質を有するもの⁽¹⁾。
- (b) 果糖：純度 99 %以上のもの。
- (c) ぶどう糖：JIS K 8824 に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。
- (d) しょ糖：JIS K 8383 に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。
- (e) アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ（HPLC）用。
- (f) エタノール(99.5)：JIS K 8101 に規定する特級、高速液体クロマトグラフ用又はそれと同等以上のもの。

(1) 水の種類が複数あるときは、グレードがより高いもの（A1 < A2 < A3 < A4）を使用する。

5. 器具及び装置等

試験に用いる器具及び装置は、次のとおりとする。

- (a) 電子天びん：1 mg の桁まで量ることができるもの。
- (b) 減圧乾燥器：3 kPa (23 mmHg) 以下に減圧でき、かつ 60 °C に設定した場合の温度調節精度が ± 2 °C であるもの。庫内が清浄であること。
- (c) デシケーター：JIS K 8001 に規定するもの。すなわち、乾燥剤として JIS Z 0701 に規定するシリカゲル(A 形 1 種) を入れたものを用いる。シリカゲルは塩化コバルト(II)で着色したものとし、その色が変色した時には約 130 °C で加熱して再生する。

- (d) **メンブランフィルター**：孔径が 0.45 μm 又はそれより小さいもので四フッ化エチレン樹脂 (PTFE) などのフィルター材質及びハウジング材質が 50%エタノールに耐性があり、分析対象成分の吸着等がないもの。
- (e) **ビーカー**：呼び容量 50 mL、コニカルビーカー又はトールビーカーでもよい。
- (f) **全量ピペット**：呼び容量 3、4、6、8 mL。JIS R 3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。
- (g) **全量フラスコ**：呼び容量：10、100、500 mL。JIS R 3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。
- (h) **高速液体クロマトグラフ (HPLC)** ⁽²⁾：示差屈折率検出器 (RID)、脱気装置及びカラム恒温槽 (オーブン) が備えられているシステムを使用する。
- (i) **分析カラム**：Shodex Asahipak, NH2P-50 4E、内径 4.6 mm、長さ 250 mm のもの又はそれと同等の分離能力を有するもの。
- (j) **保護カラム**：Shodex Asahipak, NH2P-50G 4A、内径 4.6 mm、長さ 10 mm のもの又はこれと同等の能力を有するもの。

(2) 補足を参照のこと。

6. 試薬の調製

試薬の調製は、次のとおり行う。

※溶媒の混合比はすべて体積比 (v/v) とする。

※各溶液の作製量は必要に応じて変更してもよい。また、同一組成の市販品を使用してもよい。

6.1 50 %エタノール

エタノール (99.5) 500 mL に水 500 mL を加えてよく混合する。容量を量る容器はメスシリンダーを使用する。

6.2 混合標準溶液

(a) 試薬の乾燥

果糖、ぶどう糖及びびしょ糖をそれぞれ約 7 g ずつ別々に量りとり、減圧乾燥器を用いて 60 $^{\circ}\text{C}$ 、3 kPa (23 mmHg) 以下で 3 時間乾燥する。乾燥後の試薬はデシケーターで保存し、室温になってから 24 時間以内に使用する。

(b) 5 % (50 mg/mL) 混合標準溶液

果糖、ぶどう糖及びびしょ糖をそれぞれ 5 g ずつ 1 mg の桁まで量りとり⁽³⁾。これを全量フラスコ (100 mL) に移し⁽⁴⁾、50 %エタノールを約 80 mL 加え試薬を完全に溶かした後^{(5),(6)}、さらに 50 %エタノールを標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(c) 4 % (40 mg/mL) 混合標準溶液

5 %混合標準溶液を全量ピペット (8 mL) を用いて、全量フラスコ (10 mL) にとり、50 %エタノールを標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(d) 3 % (30 mg/mL) 混合標準溶液

5 %混合標準溶液を全量ピペット（6 mL）を用いて、全量フラスコ（10 mL）にとり、50 %エタノールを標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(e) 2 % (20 mg/mL) 混合標準溶液

5 %混合標準溶液を全量ピペット（4 mL）を用いて、全量フラスコ（10 mL）にとり、50 %エタノールを標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(f) 0.03 % (0.3 mg/mL) 混合標準溶液

5 %混合標準溶液を全量ピペット（3 mL）を用いて、全量フラスコ（500 mL）にとり、50 %エタノールを標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

- (3) 試料及び分析精度に関わる試薬は、秤量の30分以上前に天びん室又は天びん室がない場合には天びんの近くに置く。
- (4) 試料を量り取った容器を50 %エタノールで十分に洗い込むこと。漏斗を用いて、直接全量フラスコに量り取る場合には、漏斗の脚の内径が細いとしよ糖が詰まることがあるので事前に確認すること。
- (5) 超音波をかけてもよい。ただし、超音波をかけているときに水温が上昇する場合があるので、超音波槽から取り出した後、必ず室温にもどしてからこれ以降の操作を行うこと。
- (6) 糖類溶液は、比重が重いため、下層に溜まるので、50 %エタノールを加えながら時々軽く混ぜること。

7. 測定手順

7.1 試料溶液の調製

試料⁽⁷⁾ 6 g をビーカー（50 mL）に1 mg の桁まで量りとり、約 20 mL の50 %エタノールを加えてガラス棒でよくかき混ぜ、漏斗を用いて全量フラスコ（100 mL）に移す⁽⁸⁾。次いで5 ~ 20 mL の50 %エタノールで3回以上ビーカー、ガラス棒及び漏斗を洗い、全量フラスコに移す。さらに50 %エタノールを標線まで加えて定容とする⁽⁹⁾。栓をした後上下によく振り混ぜる。その溶液の一部をメンブランフィルターでろ過し、ろ液をHPLC分析⁽¹⁰⁾に供する。

- (7) 試料及び分析精度に関わる試薬は、秤量の30分以上前に天びん室又は天びん室がない場合には天びんの近くに置く。
- (8) 50%エタノールは注ぐときに液だれしやすいので、ガラス棒に伝わって流し入れるとよい。
- (9) 糖類溶液は、比重が重いため、下層に溜まるので、50 %エタノールを加えながら時々軽く混ぜること。
- (10) 注入量は検量線作成のときと同量にする。また、試験結果がでるまでは試料溶液の一部をマイティバイアル（アズワン株式会社、耐熱、耐冷及び耐薬品性に優れている）等に入れ冷蔵保存しておくことよい。

7.2 検量線作成

0.03、2、3、4、5 %混合標準溶液を分析し⁽¹¹⁾、濃度とピーク面積について直線回帰分析を行い、検量線 $y=ax+b$ (y : ピーク面積、 x : 濃度) の傾き a と切片 b を求める。検量線には原点を含めない。直線性の指標の一つである⁽¹²⁾ 相関係数が 0.99 以上⁽¹³⁾ 得られた場合、試料の分析を行う。

(11) 50 %エタノール等を数回分析し、ベースラインに異常がないことを確認してから、混合標準溶液の分析を行う。

(12) 直線性はExcel等で作成した検量線を目視で確認することが基本とされている。

(13) 通常、分析が正確に行われていれば、相関係数は0.999以上となる。

7.3 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析条件

HPLC 分析条件には、下記の定義 (日本薬局方) で混合標準溶液のすべてのピークがベースライン分離 ($R_s \geq 1.5$) する方法を用いる。

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h2} + W_{0.5h1}}$$

t_{R1} : 前のピークの保持時間

t_{R2} : 後ろのピークの保持時間

$W_{0.5h1}$: 前のピークの50%高さ位置でのピーク幅

$W_{0.5h2}$: 後ろのピークの50%高さ位置でのピーク幅

(HPLC分析の一例)

分析カラム: Shodex Asahipak, NH2P-50 4E, ϕ 4.6 mm \times 250 mm (Shodex社製)

ガードカラム: Shodex Asahipak, NH2P-50G 4A, ϕ 4.6 mm \times 10 mm (Shodex社製)

溶離液: 75 %アセトニトリル (イソクラティック溶離)

流速: 1 mL/min

注入量: 5 μ L

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

RIDセル温度: 40 $^{\circ}$ C

分析時間: 15 分 (しよ糖が溶出された後にピークが検出される場合があるため20分程度が望ましい)

保持容量: 果糖 7.0 mL、ぶどう糖 8.9 mL、しよ糖 12.2 mL (保持時間 \times 流速)

8. 計算

各糖のピーク面積をそれぞれの検量線に代入して、試料溶液の各糖濃度を求め、次式より試料の各糖含有量 (%) を算出する。

$$\text{各糖含有量 (\%)} = \frac{A (\%) \times \frac{1}{100} \times 100 \text{ mL (希釈液量)}}{B (\text{g})} \times 100$$

A: 検量線から求めた試料溶液の各糖濃度 (%)

B: 試料採取量 (g)

9. HPLC測定上注意事項

- (a) 計算はパソコンや電卓を用いて行い、数値を計算途中で丸めてはいけない。
- (b) 本試験の検量線の範囲は各糖の JAS 規格値を網羅している。従って、検量線より外れた濃度については特に求める必要はない。ただし、明らかに定量可能（定量下限以上）な場合、検量線を外挿して求める。
- (c) 検出下限以下の糖については ND とする。

補足 1. 示差屈折率検出器 (RID) について

この検出器の安定には数時間を要する場合もあることから、以下の点に留意する。

- (a) 検出器の電源を早めに入れる。測定日の前日までには電源を入れることが望ましい。
- (b) 屈折率は温度により変化するため、セル温度を一定にすることが望ましい。
- (c) この検出器は空調等の影響を受けやすい。特に夏期はセル温度を一定にしても空調の切り替え等でベースラインのドリフト、また装置が空調の吹き出し口の近くの場合にはベースラインの周期的なうねりが観測されることがある。前者の場合には室温を一定に保ち、急激な室温の上昇・下降を避ける。空調が切れた夜間は室温があまり変化しないので安定して分析を行える。後者の場合には、RI 検出器に直接風が当たらないように工夫する。
- (d) 次の場合、リファレンスセル内を分析用溶離液で十分にパージする。
 - ・溶離液を交換した場合
 - ・溶離液を継ぎ足した場合
 - ・カラムを交換した場合
 - ・ベースラインが安定しない場合
- (e) パージ時間は機種及び使用年数・頻度・環境等によって異なるが 30 分以上行う。長い時には 6 時間以上必要な場合がある。
- (f) 混合標準溶液の分析と試料の分析との間にはリファレンスセルのパージを行わない。パージを行った場合には、再度検量線用混合標準溶液を分析し相関係数等を確認して試料を分析する。
- (g) 空気の溶解で屈折率が変化し、ベースラインに変化を与えるために、オンラインでの脱気が望ましい。その場合、特に移動相調製時に脱気を行う必要はないが、減圧

(アスピレーターなどを使用) 下での超音波による脱気や超音波による脱気などを行ってもよい。

補足 2. サンプル注入方式について

HPLC へのサンプル注入は、自動試料導入装置 (オートサンプラー) ⁽¹⁴⁾ によるオートインジェクター方式及びマイクロシリンジによるマニュアルインジェクター方式があり、各方式にはサンプルループを完全に試料で満たす方法及びサンプルループを部分的に試料で満たす方法がある ⁽¹⁵⁾。

(a) サンプルループを完全に試料で満たす方法

注入量と同量のサンプルループ ⁽¹⁶⁾ を使用する。マイクロシリンジを使用した場合、通常、ループ容量の 2 倍以上を注入すること、となっていることが多いが、本試験においてはループ容量の 5 倍以上を一度に注入する。オートサンプラーを使用した場合、メーカー推奨の条件で注入する ⁽¹⁷⁾。

(b) サンプルループを部分的に試料で満たす方法

マイクロシリンジを使用した場合、シリンジには最小目盛が 0.1 μ L で容量が 10 μ L ⁽¹⁸⁾、若しくは容量が 5 μ L のものを使用する ⁽¹⁹⁾。

(14) バイアル瓶の底に空気の層ができ空打ちする場合がありますので気泡がないことを確認する。特に溶液が水でガラス微量瓶 (ガラスインサート) を使用する場合には必ず確認すること。

(15) サンプルループを完全に試料で満たす方法を推奨する。

(16) レオダイン (Rheodyne) 社からは、5、10、20、50、100 μ L 等が販売されている。

(17) 溶液に応じた吸引速度及び排出速度等のパラメーターがある。

(18) ハミルトン (Hamilton) 社等から販売されている。

(19) 実際にはシリンジのタイプより、再現性良く HPLC に注入することが重要である。

補足 3. ピークの積分 ⁽²⁰⁾

ピークの裾を拡大して、以下のようにしてピークの切り方 (積分) を確認する。

(a) 混合標準溶液

自動で積分をすると濃度によってピークの切り方が異なる場合があるので注意する。異なった場合にはマニュアル積分等でベースラインの引き方を修正する。

(b) 試料

目的のピークに夾雑ピークが近接する場合、目的のピークが夾雑ピークのベースラインの影響を受けるときがある。その場合、マニュアル積分等で検量線のベースラインと同じように引く。

(20) JIS規格 (K0124:2002) を参照。

補足 4. アミノカラムの一般的な洗浄方法

長時間測定しているうちに、糖類の溶出挙動が変化したり、分離度が落ちることがある。その場合には、ガードカラムを交換する。交換しても改善されない場合、以下の方法で分析カラムを洗浄する。なお、各洗浄時間はポンプからカラム導入直前までのラインを交換後の溶離液で置換した後の時間である。

- (a) 流速を 0.8m L/min にする。
- (b) 10 %アセトニトリル（水には超純水（A4）を使用）を 2 時間流す。
- (c) リニアグラジエントで 3 時間かけて 100 %アセトニトリルにする。
- (d) アセトニトリルを 2 時間流す。
- (e) 分析用の溶離液を 1 時間流す。

補足 5. Shodex Asahipak, NH2P-50の洗浄方法

Shodex Asahipak, NH2P-50 はシリカ系のカラムとは異なり、基材にポリマーゲルを使用しているため、酸性・塩基性溶液で洗浄することができる。従って「補足 4. アミノカラムの一般的な洗浄方法」を行ってもカラムが回復しない場合には以下のような方法で洗浄を試みる。なお、各洗浄時間はポンプからカラム導入直前までのラインを交換後の溶離液で置換した後の時間である。

- (a) 流速を 0.5 mL/min に設定する。
- (b) カラムへの通液方向とは逆になるようにカラムを取り付ける。
- (c) 水を 10 分間流す。
- (d) 0.1 mol/L 過塩素酸溶液を 2 時間流す。
- (e) 水を 10 分間流す。
- (f) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 2 時間流す。
- (g) 水を 20 分間流す。
- (h) 分析用溶離液を 1 時間流す。
- (i) カラムを通液方向に取り付ける。

試験用試料の調製

製品をスターラー等で攪拌して均質化し試料とする。

共同試験結果

異性化液糖及び砂糖混合異性化液糖の果糖、ぶどう糖及び砂糖含有率（アミノカラム法）

果糖

- (1) 参加試験室数：14
- (2) マテリアル数：6
- (3) 濃度：16.7～71.1 %
- (4) 併行標準偏差 (S_p)：0.15～0.41
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R)：0.32～1.2
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_p)：0.49～1.3 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R)：1.3～2.3 %

ぶどう糖

- (1) 参加試験室数：14
- (2) マテリアル数：6
- (3) 濃度：0.9～38.4 %
- (4) 併行標準偏差 (S_p)：0.075～0.58
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R)：0.31～0.74
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_p)：1.2～8.8 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R)：1.9～40 %

しょ糖

- (1) 参加試験室数：14
- (2) マテリアル数：3
- (3) 濃度：5.8～37.8 %
- (4) 併行標準偏差 (S_p)：0.16～0.39
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R)：0.35～0.72
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_p)：1.0～2.7 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R)：1.7～5.9 %

※ 共同試験には、果糖、ぶどう糖及びしょ糖を混合したマテリアル3種、果糖及びぶどう糖を混合したマテリアル3種を用いた。

異性化液糖及び砂糖混合異性化液糖の果糖、ぶどう糖 及び砂糖含有率測定方法（配位子交換カラム法）手順書

1. 適用範囲

この測定方法は日本農林規格における異性化液糖及び砂糖混合異性化液糖に適用する。

2. 測定方法の概要

試料を水で希釈した後、メンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフで陽イオン交換樹脂充填カラムを用いて測定する。標準溶液のピーク面積から、試料中の各糖含有率を算出する。

3. 注意事項

乾燥器内で操作する際は、金属部分への接触による火傷に注意する。

4. 試薬等

- (a) 水：イオン交換法によって精製した水又は逆浸透膜法、蒸留法、イオン交換法などを組み合わせた方法によって精製したもので、JIS K 8008 に規定する A3 以上の品質を有するもの⁽¹⁾。
- (b) 果糖：純度 99 %以上のもの。
- (c) ぶどう糖：JIS K 8824 に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。
- (d) しょ糖：JIS K 8383 に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。

(1) 水の種類が複数あるときは、グレードがより高いもの（A1 < A2 < A3 < A4）を使用すること。

5. 器具及び装置

試験に用いる器具及び装置は、次のとおりとする。

- (a) 電子天びん：1 mg の桁まで量ることができるもの。
- (b) 減圧乾燥器：3 kPa (23 mmHg) 以下に減圧でき、かつ 60 °C に設定した場合の温度調節精度が ± 2 °C であるもの。庫内が清浄であること。
- (c) デシケーター：JIS K 8001 に規定するもの。すなわち、乾燥剤として JIS Z 0701 に規定するシリカゲル(A 形 1 種) を入れたものを用いる。シリカゲルは塩化コバルト(II)で着色したものとし、その色に変色した時には約 130 °C で加熱して再生する。
- (d) メンブランフィルター：孔径が 0.45 μ m 又はそれより小さいものでセルロース混合エステル、セルロースアセテート又は親水性四フッ化エチレン樹脂 (PTFE) などの水系の溶液のろ過に適したもの。分析対象成分の吸着等がないもの。
- (e) ビーカー：呼び容量 50 mL、コニカルビーカー又はトールビーカーでもよい。
- (f) 全量ピペット：呼び容量 3、4、6、8 mL。JIS R 3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。

- (g) 全量フラスコ：呼び容量：10、100、500 mL。JIS R 3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。
- (h) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) ⁽²⁾：示差屈折率検出器 (RID)、脱気装置及びカラム恒温槽 (オープン) が備えられているシステムを使用する。
- (i) 分析カラム：Shodex SUGAR SC1011、内径 8.0 mm、長さ 300 mm のもの又はそれと同等の分離能力を有するもの。
- (j) 保護カラム：Shodex SUGAR SC-LG5、内径 6.0 mm、長さ 50 mm のもの又はこれと同等の能力を有するもの。

(2) 補足を参照のこと。

6. 試薬の調製

試薬の調製は、次のとおり行う。

※溶媒の混合比はすべて体積比 (v/v) とする。

※各溶液の作製量は必要に応じて変更してもよい。また、同一組成の市販品を使用してもよい。

(a) 試薬の乾燥

果糖、ぶどう糖及びびしょ糖をそれぞれ約 7 g ずつ別々に量りとり、減圧乾燥器を用いて 60 °C、3 kPa (23 mmHg) 以下で 3 時間乾燥する。乾燥後の試薬はデシケーターで保存し、室温になってから 24 時間以内に使用する。

(b) 5% (50 mg/mL) 混合標準液

果糖、ぶどう糖及びびしょ糖をそれぞれ 5 g ずつ 1 mg の桁まで量りとり⁽³⁾。これを全量フラスコ (100 mL) に移し⁽⁴⁾、水を約 80 mL 加え試薬を完全に溶かした後^{(5), (6)}、さらに水を標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(c) 4% (40 mg/mL) 混合標準液

5%混合標準液を全量ピペット (8 mL) を用いて、全量フラスコ (10 mL) にとり、水を標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(d) 3% (30 mg/mL) 混合標準液

5%混合標準液を全量ピペット (6 mL) を用いて、全量フラスコ (10 mL) にとり、水を標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(e) 2% (20 mg/mL) 混合標準液

5%混合標準液を全量ピペット (4 mL) を用いて、全量フラスコ (10 mL) にとり、水を標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(f) 0.03% (0.3 mg/mL) 混合標準液

5%混合標準液を全量ピペット (3 mL) を用いて、全量フラスコ (500 mL) にとり、水を標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。

(3) 試料及び分析精度に関わる試薬は、秤量の30分以上前に天びん室又は天びん室がない場合には天びんの近くに置く。

(4) 試料を量り取った容器を水で十分に洗い込むこと。漏斗を用いて、直接全量フラスコに量り取る

場合には、漏斗の脚の内径が細いとしょ糖が詰まることがあるので事前に確認すること。

(5) 超音波をかけてもよい。ただし、超音波をかけているときに水温が上昇する場合がありますので、超音波槽から取り出した後、必ず室温にもどしてからこれ以降の操作を行うこと。

(6) 糖類溶液は、比重が重いため、下層に溜まるので、水を加えながら時々軽く混ぜること。

7. 測定手順

7.1 試料溶液の調製

試料⁽⁷⁾ 6 g を 50 mL ビーカー (50 mL) に 0.001 g の桁まで量りとり、約 20 mL の水を加えて円を描くようによく振り混ぜ⁽⁸⁾、漏斗を用いて全量フラスコ (100 mL) に移す。次いで 10 ~ 20 mL の水で 3 回以上ビーカーを洗い⁽⁹⁾ 全量フラスコに移す。さらに水を標線まで加えて定容とする。栓をした後上下によく振り混ぜる。その溶液の一部をメンブランフィルターでろ過し、ろ液を HPLC 分析⁽¹⁰⁾ に供する。

(7) 試料及び分析精度に関わる試薬は、秤量の30分以上前に天びん室又は天びん室がない場合には天びんの近くに置く。

(8) ガラス棒を用いてもよい。

(9) 漏斗も同時に洗う。ガラス棒を用いた場合、ガラス棒も洗う。

(10) 注入量は検量線作成のときと同量にする。また、試験結果がでるまでは試料溶液の一部をマイティバイアル (アズワン株式会社、耐熱、耐冷及び耐薬品性に優れている) 等に入れ冷蔵保存しておくことよい。

7.2 検量線作成

0.03、2、3、4、5%混合標準液を分析し⁽¹¹⁾、濃度とピーク面積及び濃度とピーク高さについて直線回帰分析を行い、検量線 $y=ax+b$ (y : ピーク面積 or 高さ、 x : 濃度) の傾き a と切片 b を求める。検量線には原点を含めない。直線性の指標の一つである⁽¹²⁾ 相関係数が 0.99 以上⁽¹³⁾ 得られた場合、試料の分析を行う。

(11) 水等を数回分析し、ベースラインに異常がないことを確認してから、混合標準液の分析を行う。

(12) 直線性はExcel等で作成した検量線を目視で確認することが基本とされている。

(13) 通常、分析が正確に行われていれば、相関係数は0.999以上となる。

7.3 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析条件

HPLC 分析条件には、下記の定義 (日本薬局方) で混合標準液のすべてのピークがベースライン分離 ($R_s \geq 1.5$) する方法を用いる。

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h2} + W_{0.5h1}}$$

t_{R1} : 前のピークの保持時間

t_{R2} : 後ろのピークの保持時間

W_{0.5h1} : 前のピークの50%高さ位置でのピーク幅

W_{0.5h2} : 後ろのピークの50%高さ位置でのピーク幅

(HPLC分析の一例)

分析カラム : SUGAR, SC1011, φ 8.0 mm × 300 mm (Shodex社製)

ガードカラム : SUGAR, SC-LG5, φ 6.0 mm × 50 mm (Shodex社製)

溶 離 液 : 水 (イソクラティック溶離)

流 速 : 0.6 mL/min

注 入 量 : 5 μL

カラム温度 : 80 °C

RIDセル温度 : 50~55 °C

分 析 時 間 : 20 分

保 持 容 量 : (しよ糖8.9 mL) ぶどう糖10.4 mL、果糖12.8 mL (保持時間×流速)

8. 計算

各糖のピーク面積をそれぞれの検量線に代入して、試料溶液の各糖濃度を求め、次式より試料の各糖含有量 (%) を算出する。

$$\text{各糖含有量 (\%)} = \frac{A (\%) \times \frac{1}{100} \times 100 \text{ mL (希釈液量)}}{B (\text{g})} \times 100$$

A: 検量線から求めた試料溶液の各糖濃度 (%)

B: 試料採取量 (g)

9. HPLC測定上注意事項

- 計算はパソコンや電卓を用いて行い、数値を計算途中で丸めてはいけない。
- 本試験の検量線の範囲は各糖の JAS 規格値を網羅している。従って、検量線より外れた濃度については特に求める必要はない。ただし、明らかに定量可能 (定量下限以上) な場合、検量線を外挿して求める。
- 検出下限以下の糖については ND とする。

補足 1. 示差屈折率検出器 (RID) について

この検出器の安定には数時間を要する場合もあることから、以下の点に留意する。

- 検出器の電源を早めに入れる。測定日の前日までには電源を入れることが望ましい。

- (b) 屈折率は温度により変化するため、セル温度を一定にすることが望ましい。
- (c) この検出器は空調等の影響を受けやすい。特に夏期はセル温度を一定にしても空調の切り替え等でベースラインのドリフト、また装置が空調の吹き出し口の近くの場合にはベースラインの周期的なうねりが観測されることがある。前者の場合には室温を一定に保ち、急激な室温の上昇・下降を避ける。空調が切れた夜間は室温があまり変化しないので安定して分析を行える。後者の場合には、RI 検出器に直接風が当たらないように工夫する。
- (d) 次の場合、リファレンスセル内を分析用溶離液で十分にパージする。
- ・溶離液を交換した場合
 - ・溶離液を継ぎ足した場合
 - ・カラムを交換した場合
 - ・ベースラインが安定しない場合
- (e) パージ時間は機種及び使用年数・頻度・環境等によって異なるが 30 分以上行う。長い時には 6 時間以上必要な場合がある。
- (f) 混合標準溶液の分析と試料の分析との間にはリファレンスセルのパージを行わない。パージを行った場合には、再度検量線用混合標準溶液を分析し相関係数等を確認して試料を分析する。
- (g) 空気の溶解で屈折率が変化し、ベースラインに変化を与えるために、オンラインでの脱気が望ましい。また、可能であれば溶離液調製時に、減圧（アスピレーターなどを使用）下での超音波による脱気（超音波だけでもよい）による脱気を行うとよい。

補足 2. サンプル注入方式について

HPLC へのサンプル注入は、自動試料導入装置（オートサンプラー）⁽¹⁴⁾によるオートインジェクター方式及びマイクロシリンジによるマニュアルインジェクター方式があり、各方式にはサンプルループを完全に試料で満たす方法及びサンプルループを部分的に試料で満たす方法がある⁽¹⁵⁾。

(a) サンプルループを完全に試料で満たす方法

注入量と同量のサンプルループ⁽¹⁶⁾を使用する。マイクロシリンジを使用した場合、通常、ループ容量の 2 倍以上を注入すること、となっていることが多いが、本試験においてはループ容量の 5 倍以上を一度に注入する。オートサンプラーを使用した場合、メーカー推奨の条件で注入する⁽¹⁷⁾。

(b) サンプルループを部分的に試料で満たす方法

マイクロシリンジを使用した場合、シリンジには最小目盛が $0.1 \mu\text{L}$ で容量が $10 \mu\text{L}$ ⁽¹⁸⁾、若しくは容量が $5 \mu\text{L}$ のものを使用する⁽¹⁹⁾。

(14) バイアル瓶の底に空気の層ができ空打ちする可能性があるので気泡がないことを確認する。特に溶液が水でガラス微量瓶（ガラスインサート）を使用する場合には必ず確認すること。

(15) サンプルループを完全に試料で満たす方法を推奨する。

(16) レオダイン（Rheodyne）社からは、5、10、20、50、100 μL 等が販売されている。

- (17) 溶液に応じた吸引速度及び排出速度等のパラメーターがある。
- (18) ハミルトン(Hamilton)社等から販売されている。
- (19) 実際にはシリンジのタイプより、再現性良くHPLCに注入することが重要である。

補足3. ピークの積分⁽²⁰⁾

ピークの裾を拡大して、以下のようにしてピークの切り方(積分)を確認する。

(a) 混合標準液

自動で積分をすると濃度によってピークの切り方が異なる場合があるので注意する。異なった場合にはマニュアル積分等でベースラインの引き方を修正する。

(b) 試料

目的のピークに夾雑ピークが近接する場合、目的のピークが夾雑ピークのベースラインの影響を受けるときがある。その場合、マニュアル積分等で検量線のベースラインと同じように引く。

(20) JIS規格 (K0124:2002) を参照。

補足4. SC1011のカラムについて

一般：新品の場合には、装着後流速を徐々に上げていくこと。

(例：0.2 mL/min(1min) → 0.3 mL/min (1min) → 0.4 mL/min (1min)...))

耐圧：カラム一本当たりの最高使用圧力は5 Mpa (= 50 bar = 725 psi)である。

流速：加温しない場合には0.5 mL/min以下で使用すること。

停止：カラム恒温槽のスイッチを切り、流速を0.3 ~ 0.5 mL/minに落とし、カラム温度が室温になってからポンプを停止すること。

保管：一ヶ月に一度は0.3 mL/minで2時間以上水を流す。

試験用試料の調製

製品をスターラー等で攪拌して均質化し試料とする。

共同試験結果

異性化液糖及び砂糖混合異性化液糖の果糖、ぶどう糖及び砂糖含有率（配位子交換カラム法）

果糖

- (1) 参加試験室数：14
- (2) マテリアル数：6
- (3) 濃度：17.0～65.9 %
- (4) 併行標準偏差 (S_p)：0.082～0.25
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R)：0.23～0.79
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_p)：0.23～0.70 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R)：1.1～1.9 %

ぶどう糖

- (1) 参加試験室数：14
- (2) マテリアル数：6
- (3) 濃度：6.4～38.0 %
- (4) 併行標準偏差 (S_p)：0.0093～0.29
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R)：0.24～0.49
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_p)：0.15～1.4 %
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R)：0.77～3.7 %

※ 共同試験のマテリアル6種の内、3種にはしょ糖も混合していたが、しょ糖と麦芽糖の分離が難しいため、しょ糖の定量は行わなかった。

※ ぶどう糖を約1%混合したマテリアルは、ぶどう糖がきょう雑ピークと重なったため、定量は行わなかった。