

風味調味料の糖分（果糖、ぶどう糖、しょ糖及び乳糖）測定手順書

独立行政法人農林水産消費安全技術センター

1. 適用範囲

この測定方法は風味調味料の日本農林規格に規定する風味調味料に適用する。

2. 測定法の概要

試料を水に溶解させ、糖を抽出した後、SPE カートリッジで精製し、エタノールでタンパク除去を行い、メンブランフィルターでろ過し HPLC 試験液とする。果糖、ぶどう糖、しょ糖及び乳糖の混合標準溶液、試料 HPLC 試験液を HPLC 分析する。混合標準溶液の各糖ピーク面積で作成した検量線を用い、試料の各糖含有量を算出する。各糖含有量を合計して全糖含有量を求め、その試料全量に対する百分比を糖分とする。

3. 注意事項

- (a) メタノール、エタノール及びアセトニトリルは引火性があり、蒸気の吸引は頭痛、めまい、嘔吐等を起こす。また、眼、鼻、のどの粘膜への繰り返し接触は炎症を引き起こす。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。
- (b) メタノール、エタノール及びアセトニトリルは水生生物に有害であるため、そのまま排水に捨てず、回収し適切に処理すること。

4. 略号表

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

PTFE: Poly(tetrafluoroethylene)

RI: Refractive Index

SPE: Solid Phase Extraction

5. 試薬等

- (a) 水：蒸留法もしくはイオン交換法によって精製した水又は逆浸透法、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、日本工業規格（以下「JIS」という。） K0557 に規定する A2 以上の品質を有するもの。
- (b) 果糖 (D-Fructose)：純度 99 % 以上のもの。
- (c) ぶどう糖 (D-Glucose)：JIS K8824 に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。
- (d) しょ糖 (Sucrose)：JIS K8383 に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。
- (e) 乳糖⁽¹⁾ (Lactose monohydrate)：JIS K8728 に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。
- (f) エタノール (Ethanol)：高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用のもの。

- (g) メタノール：JIS K8891に規定する特級、又はそれと同等以上のもの。
- (h) アセトニトリル(Acetonitrile)：高速液体クロマトグラフ(HPLC)用のもの。

(1) 乳糖の無水物は吸湿性が高いため、1水和物を用いる。

6. 器具及び装置

- (a) 電子天秤：0.1 mg まで量りとることのできるもの。
- (b) 真空乾燥器：2.7 kPa (20 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 R3503 に規定するもので、乾燥剤としてシリカゲルを入れたもの。シリカゲルは塩化コバルト(II)等で着色したものをを用い、デシケーター本体と蓋のすり合わせ部分にはワセリン等を塗り、密着させる。デシケーターの中に湿度計や湿度インジケーター等を入れ、デシケーター内部の湿度を管理する。湿度が 10 % を超えたとき、もしくはシリカゲルの色が変わり始めたときには、シリカゲルを交換すること。
- (d) 全量ピペット：1、2、2.5、4、6 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。
- (e) 全量フラスコ：10、25、50、100 mL 容。JIS R3505 に規定されているクラス A 又は同等以上のもの。
- (f) ろ紙：JIS P3801 に規定されている 5 種 B 相当のものを使用する。
- (g) 固相抽出(SPE)カートリッジ：OASIS HLB (3 cc / 60 mg, Waters)を使用する。
- (h) 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四フッ化エチレン樹脂(PTFE)などのフィルター材質が有機溶媒に対応しているものを使用する。
- (i) HPLC⁽²⁾：示差屈折率(RI)検出器、カラムオーブン、脱気装置が備えられているシステムを使用する。
- (j) 分析カラム：内径4.6mm、長さ250mmのステンレス管にポリビニルアルコールゲル若しくはシリカゲルにポリアミンを化学結合したものを充填したもの又はこれと同等の分離能力を有するもの(Shodex Asahipak, NH2P-50 4E、YMC-Pack Polyamine II など)。
- (k) 保護カラム：使用する場合には、分析カラムと同じ充填剤を充填したもの。

(2) 補足を参照のこと。

7. 試薬の調製

溶媒の混合比はすべて体積比(v/v)とする。

7.1 試薬の乾燥

果糖、ぶどう糖、しょ糖及び乳糖を約 1.5g ずつ別々に量りとり、真空乾燥器を用いて 60 °C、20mmHg 以下で 3 時間乾燥させる⁽³⁾。乾燥後の試薬はデシケーターで保存する。

(3) 別法として容器の恒量を先に求め、それに約1gを正確に量りとってもよい。その場合には、次の

「7.2混合標準溶液の調製」の際に、試薬全量を使用することができる。

7.2 混合標準溶液の調製

(a) 10 mg/mL (1 %) 混合標準溶液

あらかじめ乾燥させた果糖、ぶどう糖及びしょ糖を約 1g、乳糖を約 1.1g、それぞれ正確に量りとり⁽⁴⁾。次いで同じ 100mL 容全量フラスコに移し、水を 50 mL⁽⁵⁾ 加え完全に溶解させた後、軽く振り混ぜながらエタノールを標線まで加える。栓をした後よく振り混ぜる。

(b) 6 mg/mL (0.6 %) 混合標準溶液

10 mg/mL 混合標準溶液を全量ピペットで 6 mL とり、10 mL 容全量フラスコに入れ、50 %エタノール水溶液を標線まで加える。栓をした後よく振り混ぜる。

(c) 4 mg/mL (0.4 %) 混合標準溶液

10 mg/mL 混合標準溶液を全量ピペットで 4 mL とり、10 mL 容全量フラスコに入れ、50 %エタノール水溶液を標線まで加える。栓をした後よく振り混ぜる。

(d) 2 mg/mL (0.2 %) 混合標準溶液

10 mg/mL 混合標準溶液を全量ピペットで 2 mL とり、10 mL 容全量フラスコに入れ、50 %エタノール水溶液を標線まで加える。栓をした後よく振り混ぜる。

(e) 1 mg/mL (0.1 %) 混合標準溶液

10 mg/mL 混合標準溶液を全量ピペットで 1 mL とり、10 mL 容全量フラスコに入れ、50 %エタノール水溶液を標線まで加える。栓をした後よく振り混ぜる。

(f) 0.2 mg/mL (0.02 %) 混合標準溶液

10 mg/mL 混合標準溶液を全量ピペットで 1 mL とり、50 mL 容全量フラスコに入れ、50 %エタノール水溶液を標線まで加える。栓をした後よく振り混ぜる。

(4) 正確な重量を用いて検量線の各濃度を正確に算出する。

(5) メスシリンダーを用いてもよい。

8. 測定手順

8.1 前処理

(a) 抽出

前処理のフローチャートを図 1 に示す。試料約 5g を正確に 50mL 容全量フラスコに量りとり⁽⁶⁾ 35mL の水を加え⁽⁷⁾、時折軽く振り混ぜながら⁽⁸⁾ 超音波を室温で 20 分間かける⁽⁹⁾。超音波槽から取り出し 5 分間静置後⁽¹⁰⁾、水を標線まで加える。栓をした後 60 秒以上、上下に強く振り混ぜ、ろ紙でろ過する。

(6) 風味調味料は吸湿性があるために、開封後は速やかに秤量を行う。

(7) 超音波をかける前に、できるだけ溶かす。特に粉末試料は固まりやすい。水はメスシリンダーを用いてはかり取ってもよい。

(8) 振り混ぜないと不溶物が固まる。

(9) 水温が上がる場合がある。その時は超音波槽の水を途中で入れ替えるか、超音波による抽出操作終了後に室温になってから定容する。

(10) 室温に戻すために行う。

(b) SPEカートリッジによる精製

SPE カートリッジにメタノール 2 mL、水 2 mL⁽¹¹⁾を順次通過させた後、カートリッジに残っている水を排出する⁽¹²⁾。これに、ろ液 2.5mL^(13, 14)を通過させた後、カートリッジに残っているろ液を排出する⁽¹⁵⁾。次いで水 2.5 mL^(13, 15)を通過させた後、カートリッジに残っている水を排出する^(12, 15)。

- (11) 洗浄及び平衡化の流速は10 mL/minを超えない範囲で行う。水は1 mLずつ2回に分けて平衡化する。
- (12) 例えば、シリンジを用いて上から加圧した場合(図2)、最後に一、二回程度空気を送り込む。OASISは固相に親水性のポリマーを使用しているので、固相が乾燥しても分析値に影響を与えない。この操作はエタノールで定容した時に、エタノール濃度が低くなりタンパク除去効率の低下を防止するために行う。

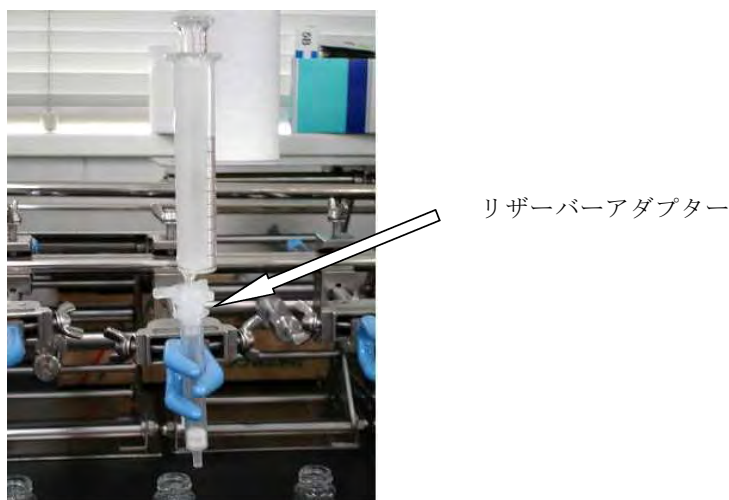


図2 ガラスシリンジを用いて加圧する場合(一例)

- (13) ろ液及び水の排出の流速は1 mL/minを超えない範囲で行う。
- (14) 全量ピペットを用いる。
- (15) カートリッジを通過させたろ液及び水は、直接25 mL容の全量フラスコにとる。

(c) タンパク除去及び定容

5 mL の SPE カートリッジ通過液全量を 25 mL 容全量フラスコにとり、軽く振り混ぜながらエタノールをメニスカスの下端が標線より 1～2 mm 下くらいまで加え⁽¹⁶⁾(図3)、超音波を 5 分間かける⁽¹⁷⁾。超音波槽から取り出し、5 分間静置後⁽¹⁸⁾メニスカスの下端を標線に合わせ、栓をし 60 秒以上、上下に強く振り混ぜる⁽¹⁹⁾。これをメンブランフィルターでろ過し、この 20 μ L を HPLC 分析に供する。

- (16) 全量フラスコの口付近にSPEカートリッジからの溶出液が付着するので、口をエタノールで洗いながら加える。この時気泡が発生する。また、白く濁る場合があるが、これはタンパク、多糖類及び糖類等が変性もしくは析出したためと考えられる。
- (17) 溶液を均一にするために行う。
- (18) 室温に戻すために行う。
- (19) 乳糖は80 %エタノール水溶液に溶けにくいのでよく振り混ぜる。その後、メニスカスが標線より下がる場合があるが、改めて調製する必要はない。



溶液が首のところまでいくと、混合させにくいので、それまでに、よく混合させておくこと。

この付近までは、エタノールと水とを混合させやすいので、なるべく標線を越えないように、よく振り混ぜる。振り混ぜたときに溶液が標線を越えると粘性の高い多糖類やタンパクが壁面に付着し、正確に定容できない場合がある。

図3 定容操作

8.2 検量線作成

0.2、1、2、4、6mg/mL 混合標準溶液を分析し⁽²⁰⁾、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。検量線作成の際の濃度は、混合標準溶液の調製で量りとした重量⁽²¹⁾から算出した正確な濃度を用いる。検量線には原点を含めない。直線性の指標である相関係数が 0.99 以上得られた場合、試料の分析を行う。

(20) 注入量は試験溶液測定のとときと同量の20 μ Lにする。

(21) 乳糖 1 水和物は無水物換算した重量とする。

8.3 HPLC分析条件

- (a) カラム温度：30℃付近の一定温度
- (b) 移動相：60～80%のアセトニトリルで混合比が一定のもの
- (c) 流速：0.5～1.5ml/min の一定流速 ((a)及び(b)を微調整して乳糖標準品の保持時間が10～20分程度となるようにする。)

試験に用いる分析カラムは、当該試験を行う測定条件において、希釈混合標準溶液を測定したときに JIS K 0124 に規定する分離度が各糖ともに 1.5 以上であること、かつ、試験溶液を測定したときに定量を妨害するピークが無いことを確認したものを使用すること。(22)

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

R : 分離度
tR1 : 前のピークの保持時間
tR2 : 後ろのピークの保持時間
W0.5h1 : 前のピークの 50%高さ位置でのピーク幅
W0.5h2 : 後ろのピークの 50%高さ位置でのピーク幅
ただし、tR1、tR2、W0.5h1、W0.5h2 は同じ単位を用いる。

(HPLC 分析条件の一例)

分析カラム : Shodex Asahipak, NH2P-50 4E, 4.6 mm I.D. × 250 mm
ガードカラム : Shodex Asahipak, NH2P-50G 4A, 4.6 mm I.D. × 10 mm
移動相 : 75 %アセトニトリル水溶液
流速 : 1 mL/min
注入量 : 20 μL
カラム温度 : 30 °C
分析時間 : 20 分

(22) 検討したカラムの中では、YMC-Pack Polyamine II は測定対象の糖の分離度、選択性、ロット間差の結果がいずれも良好であった。YMC-Pack PA-G及びAsahipak NH2P-50 AEはロットの違いにより妨害物質のピークと重なる場合があった。

9. 計算

各糖のピーク面積を検量線に代入して、HPLC 試験液の各糖濃度を求め、次式より試料の各糖含有量(mg/g)を算出する。

$$\text{各糖含有量(mg/g)} = \frac{A \text{ (mg/mL)} \times 25\text{mL(最終希釈液量)} \times \frac{50 \text{ mL(試料希釈液量)}}{2.5 \text{ mL(SPE 負荷量)}}}{B \text{ (g)}}$$

A: 検量線から求めた試験液の各糖濃度(mg/mL), B: 風味調味料採取量(g)

各糖含有量を合計して全糖含有量を求め、その試料全量に対する百分比を糖分とする。

10. HPLC分析上の注意事項

- (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) 検量線より求めた濃度が 6 mg/mL 以上の糖については、検量線の範囲内に入るように適宜に希釈して、HPLC で再測定する。

補足 1. RI 検出器について

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) 検出器の電源は早めに入れた方がよい。
- (b) アセトニトリルと水とを別々に送液して、オンラインミキサーで混合するより、前もって混合して送液した方がよい。
- (c) 屈折率は温度により変化するため、セル温度を一定にしたほうがよい。
- (d) リファレンス側フローセル内を分析用移動相で十分に置換する。
- (e) セル内の気泡の発生を抑えるために、検出器に若干の背圧をかけたほうがよい場合がある。その場合には、例えば、廃液瓶を検出器より高い位置に設置したり、抵抗管（内径 0.25 mm ものを 50 cm ～ 1 m）を排出側に取り付けたりする。ただし、RI 検出器は紫外可視吸光光度検出器よりセル耐圧が低く破損しやすいため、細心の注意が必要である。
- (f) 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のみによる脱気などを行ってもよい。

補足 2. 糖の溶出順

「8.3. HPLC分析条件」に従うと、果糖、ぶどう糖、しょ糖、乳糖の順に検出される。

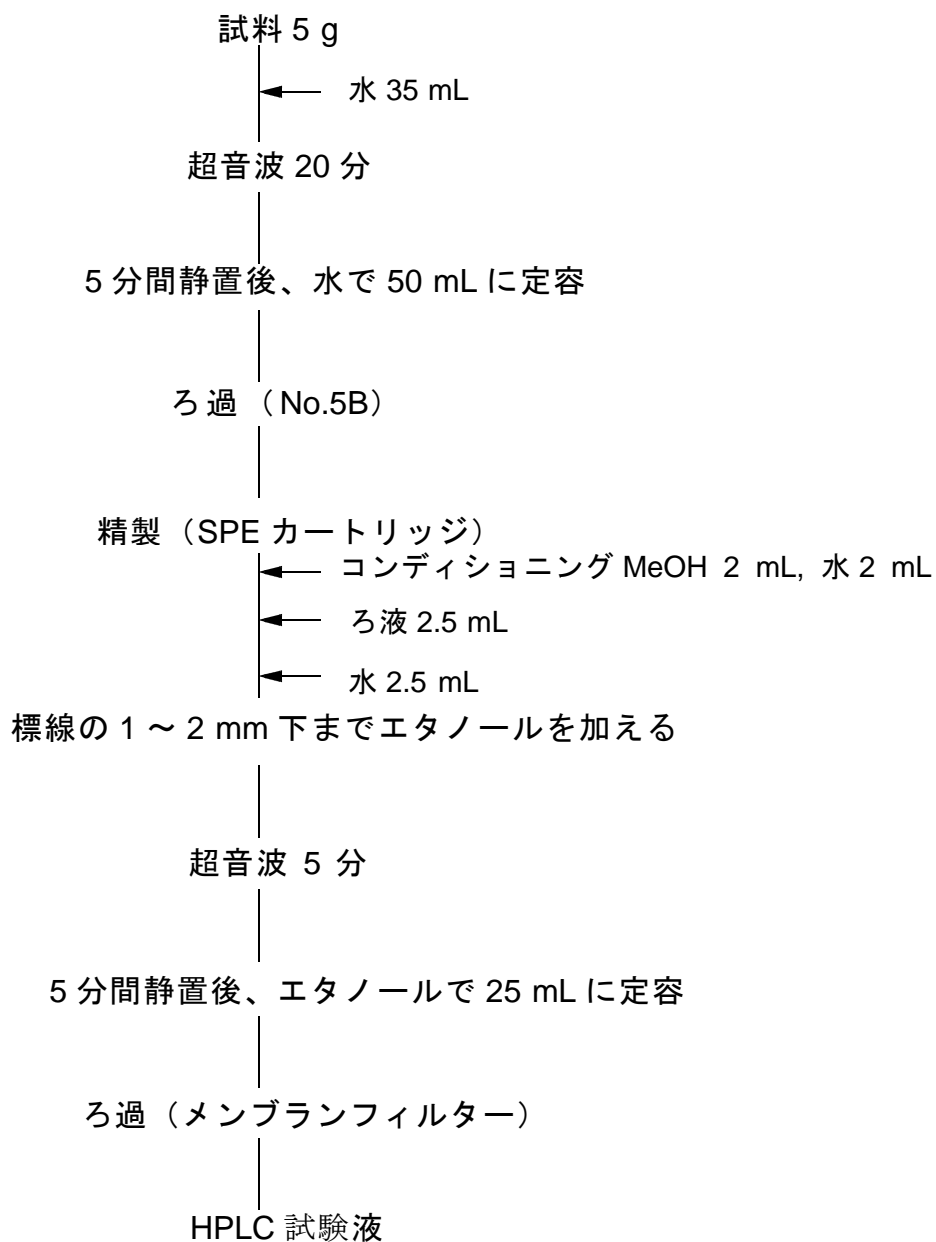


図 1 風味調味料の糖分測定手順

共同試験結果

風味調味料の糖分（ぶどう糖含有量）

- (1) 参加試験室数：10
- (2) マテリアル数：7
- (3) ぶどう糖濃度：28.0～34.0%
- (4) 併行標準偏差 (S_r)：0.56～1.1
- (5) 室間再現標準偏差 (S_R)：1.4～1.6
- (6) 併行相対標準偏差 (RSD_r)：1.6～3.9%
- (7) 室間再現相対標準偏差 (RSD_R)：4.1～5.9%

風味調味料の糖分（しょ糖含有量）

- (1) 参加試験室数：10
- (2) マテリアル数：7
- (3) しょ糖濃度：8.59～20.6%
- (4) S_r ：0.29～0.52
- (5) S_R ：0.59～0.71
- (6) RSD_r ：2.4～3.4%
- (7) RSD_R ：3.1～6.9%

風味調味料の糖分（乳糖含有量）

- (1) 参加試験室数：10
- (2) マテリアル数：7
- (3) 乳糖濃度：8.38～42.0%
- (4) S_r ：0.44～1.0
- (5) S_R ：1.0～2.2
- (6) RSD_r ：2.3～5.2%
- (7) RSD_R ：5.2～10%

※ 試験に用いた風味調味料は、いずれのマテリアルも果糖を含有していなかった。

履歴

年月日	改訂内容等
2006/03/02	HPLC 法による共同試験(2005/12)の結果を JAS 規格分析手法検討委員会で評価した。均質性試験の結果から分析方法に大きな問題はないと判断されたが、数種のマテリアルにおいては HorRat による妥当性が確認されなかった。
2007/11/27	風味調味料の日本農林規格の糖分測定方法改正。 (ソモギー法に変えて HPLC 法を採用。)
2012/02/15	HPLC 分析カラムの追加のための複数試験室による試験(2012/01)の結果を妥当性確認調査検討・評価委員会で評価した。
2013/04/01	風味調味料の日本農林規格の糖分測定方法改正。 (HPLC 分析カラムの追加。HPLC の条件を拡張。)
2013/09/10	手順書 2013 新規作成 (2005 共同試験手順書に追加記載。体裁変更)。