

食品中の糖類のガスクロマトグラフィーによる定量 (2)

誌名	食品総合研究所研究報告 = Report of National Food Research Institute
ISSN	03019780
著者	安井, 健 新国, 郁美 長谷, 幸
巻/号	34号
掲載ページ	p. 110-115
発行年月	1979年1月

食品中の糖類のガスクロマトグラフィーによる定量

(第2報) ジャム, ようかん, チューインガム, ビスケット, クラッカー,
りんご清澄果汁中の糖類の定量

安 井 健・新 国 郁 美・長 谷 幸

Quantitative Determination of Saccharides in Foods by Gas Chromatography

Part 2. Determination of mono- and disaccharides in jams, "Yokans",
chewing gums, biscuits, crackers and apple juices

Takeshi YASUI, Ikumi NIKKUNI and Saki HASE

A gas chromatographic method has been developed to determine the saccharides in jams, "Yokans", chewing gums, biscuits, crackers and apple juices. Sugars are extracted from samples with 80% ethanol and/or water, an aliquot of the extract is dried, trimethylsilylated and TMS-sugars are analysed by GLC. Precision study showed when the contents of a sugar are below 1%, between 1% and 10%, and above 10%, the average of coefficients of variations (the range of coefficients of variations) are 7.6% (0.00-28.41%), 5.8% (0.44-19.37%) and 1.4% (0.25-3.12%), respectively. The recovery of added sucrose from the samples were 95.8-100.5%.

食品中の糖類を分別定量することの必要性は、前報¹⁾で述べた。

この報文では、ジャム、ようかん、チューインガム、ビスケット、クラッカー、りんご清澄果汁中の糖類の定量を、糖類をトリメチルシリル (TMS) 化し、ガスクロマトグラフィー (GLC) を用いて行なう場合の、試料の前処理法、ならびに、定量法の正確さ、および、定量法の精度について述べる。現在までに、ここで検討の対象とした食品のうち、H. G. JONES ら²⁾はビスケット中の糖類について、C. FLYNN ら³⁾、D. A. KLINE ら⁴⁾、J. J. RYAN⁵⁾、D. A. HEATHERBELL⁶⁾は果汁あるいは果実中の糖類について、岩田ら⁷⁾は、ビスケット、ようかん、ジャムなどの中の糖類について、TMS 化後、GLC を用いて定量を行なっている。しかし、彼らの方法は、後述するように操作上問題があると考えられる点があり、分析法としては、改良しなければならない点が多いと判断された。また、チューインガム、クラッカー中の糖類を GLC を用いて定量した報告はない。

なお、mannitol と sorbitol の定性は、トリフルオロアセチル (TFA) 誘導体の GLC により行なった。

実 験

1. 試 薬

実験に使用した試薬は、maltitol を除いて、市販特級または1級試薬を用いた。

Maltitol は、橋本ら⁸⁾の方法に準じて、maltose を還元して調製した。

定量のための検量線を作成するために用いた糖類は、maltose と maltitol を除いて、減圧下 (30mmHg)、70°C で恒量になるまで乾燥したものを使用した。Maltose は、減圧下 (30mmHg) 100°C で恒量になるまで乾燥したものを使用した。Maltitol は、フィルム法⁹⁾により、減圧下 (30mmHg)、90°C で恒量になるまで乾燥して水分含量を求め、乾物換算した。

Pyridine は、水酸化カリウムで乾燥した後、蒸留したものを使用した。

2. TMS 誘導体の調製

前報¹⁾で述べた、pyridine・N-trimethylsilyl imidazole・trimethylchlorosilane を用いる方法を使用した。

なお、糖液の乾燥の際には、水溶液の場合には、凍結乾燥を用い、ethanol 溶液の場合には、減圧乾燥 (40°C 以下、ロータリーエバポレーター) を用いた。減圧乾燥の場合には、99.5% ethanol との共沸により脱水した。

内部標準物質には pyrene を用いた (40mg/50ml pyridine)。

ガスクロマトグラフには、TMS 誘導体調製の反応液を1 μ l 注入した。

3. TFA 誘導体の調製

NAKAMURA らりの方法に準じた方法で行なった。すなわち、10ml 容または 25ml 容ガラス共通摺合せなす形またはなし形フラスコに糖類溶液を入れ (糖類として 100mg 以下)、乾燥した。N, N-dimethylformamide 2.0ml を加えた。Trifluoroacetic anhydride 1ml を加えた。共栓して振とうし、糖類を溶解させ、80°C で1分間加熱した。

4. 糖類の定量法

GLC のピークの面積測定には、デジタルインテグレーター (ITG) を使用した。

各試料の測定回数は3回以上とした。

定量のための検量線は次のように作成した；各糖類の標準液 (10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml) を調製し、25ml 容メスフラスコに、量をかえて標準液を採取し、純水で定容とし、濃度の異なる糖類混合標準液 (0.4 μ g/25ml-40 μ g/25ml) を調製した。その 2ml を採り、凍結乾燥した (0.032 μ g-3.2 μ g)。TMS 化し、GLC で3回分析し、糖類と内部標準物質のピークの面積比を求めた。別に計算した、反応液中の糖類と内部標準物質の重量比と面積比とから、最小2乗法により、回帰直線を求め、これを検量線とした。

5. GLC および ITG 条件

第1表に示した。

6. 食品の前処理法

食品の前処理法は、複数の方法を比較検討し、最適な方法を設定した。

7. Sucrose の添加回収試験

設定した前処理法の正確さを確認するために、sucrose の添加回収試験を行なった。

Sucrose は微粉末にしたものを、n-hexane 抽出処理のあるものは、n-hexane 乾燥後、n-hexane 抽出処理のないものは、試料採取の直後に添加した。

Table 1. Apparatus and Operating Conditions for Gas Chromatography

Gas chromatograph	Shimadzu GC-6APF with dual hydrogen flame ionization detectors
Columns	
for TMS derivatives	3% Silicone DC QF-1 on Chromosorb W (AW DMCS), 60-80 mesh, 3.0m \times 3mm id, glass
column temperature	120°C-240°C
Program rate	6°C/min
for TFA derivatives	5% Silicone XE-60 on Chromosorb W (AW DMCS), 60-80 mesh, 2.0m \times 3mm id, glass
column temperature	120°C-210°C
programm rate	1°C/min
Injection temperature	250°C
Detector temperature	250°C
FID impedance	10 ² M Ω
Carrier gas(N ₂) flow rate	60 ml/min
FID hydrogen flow rate	49 ml/min
air flow rate	1 l/min
Digital integrator	Shimadzu ITG-4A
Noise filter	3
Minimum peak count	100
Peak detect	20 μ V/min
Threshold	∞ μ V
Delay	2 sec

結果および考察

1. TFA 誘導体の分離法

Xylose, fructose, glucose, mannitol, sorbitol の混合物の TFA 誘導体の GLC のチャートを第1図に示した。加藤ら¹⁰⁾も報告しているように、mannitol と sorbitol は、相互に完全に分離し、定性に使用できた。

2. 食品の前処理法

2.1. ジャム

混和することにより、均一化した試料 5g 程度を、200ml 容 ビーカーに正確に秤取し、脱イオン水約 50 ml を加え、ディスパーズミキサー (MRK-ILADO Laboratory Disperser X-1020, 三田村理研工業(株))

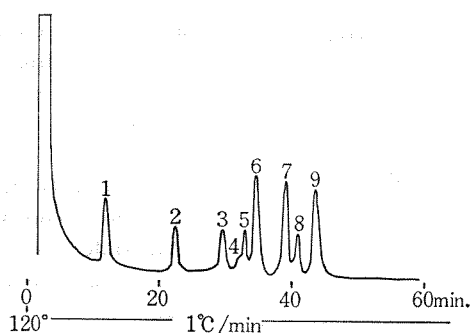


Fig. 1 Gas chromatogram of the TFA derivatives of a mixture of sugars
1, 2, xylose; 3, 4, fructose; 5, 8, glucose;
6, xylitol; 7, mannitol; 9, sorbitol.

で1分間処理し、分散させた。ディスパーズミキサーに付着した試料は、脱イオン水でビーカー中に洗い落とした。分散させた試料液のpHを、pHメーターを用いて、水酸化ナトリウム液で、7に調整し、pH電極に付着した試料は、脱イオン水でビーカー中に洗い落とした。100ml容メスフラスコに、ビーカーの内容物を定量的に移し、脱イオン水で定容とした。この4mlを、Amberlite CG-50 (Type I, H⁺型)のカラム (20×20 id mm) と Amberlite CG-4B (Type I, OH⁻型)のカラム (20×20 id mm) で連続的に処理し、カラムを脱イオン水各10mlで8回洗浄し、流出液を得た。流出液を合せ、脱イオン水で、200ml定容とした。この2mlまたは3mlを乾燥し、TMS化のための試料とした。

岩田ら⁹⁾が報告した方法は、試料をホモジネートとしたのち、沝過し、残渣を繰り返し洗浄し、沝液を合わせて試料溶液とする方法であるが、操作の詳細については、述べられていない。また、前処理中に中和操作を行っていないので、sucroseの加水分解が進む可能性も否定できなかった。

ジャムのように、ペクチン質を含む試料の場合、試料に直接80% ethanolを加え、抽出する方法は、ペクチン質が沈澱し、後の操作が困難になるので、使用できなかった。このような試料は脱イオン水中に分散させた後処理する方法が適当であると考えられた。

糖類の抽出の際のpH調整について検討したが、液のpHの調整は、pHメーターを用い、水酸化ナトリウム液で、pH7にする方法が、最も確実な方法であっ

た。炭酸カルシウム(粉末)の添加では、液のpHは、ほとんど変化せず、中性にはならなかった。また、炭酸ナトリウム(粉末)では、pHの調整が困難であった。

抽出液の精製に、中性酢酸鉛を用いる方法を検討したが、単糖類の損失が明らかに認められた。一般的に、糖類の定量の場合、鉛塩を抽出液の精製に用いることは、好ましくないと考えられた。

2. 2. ようかん

みじん切り(5mm角程度)にしてから混和することにより均一化した試料2g程度を、50ml容ガラス製共通摺合せ遠沈管に、正確に秤取した。80% ethanol 20mlを加えて、ガラス棒で押しつぶし、ガラス棒に付着した試料は、80% ethanolで遠沈管中に洗い落としした。ディスパーズミキサーで、1分間処理し、分散させ、ディスパーズミキサーに付着した試料は、80% ethanolで遠沈管中に洗い落としした。沸石を入れ、水冷冷却管をつけ湯浴上で30分間還流した。アリン管ガラスフィルター15AG2に、遠沈管の内容物を定量的に移し、沝過し、沝過残渣を脱イオン水各10mlで4回洗浄し、沝液を得た。沝液を合せ脱イオン水で250ml定容とした。その1mlを乾燥し、TMS化のための試料とした。

岩田ら⁹⁾が報告した方法は、ホモジネートとしたのち80% ethanolを加え、冷却管をつけ、水浴中で1時間還流し、沝過し、残渣については、還流、沝過の操作をくり返して、沝液を合わせて、試料溶液とする方法であるが、詳細については述べられていない。

ここで設定した方法と岩田ら⁹⁾に準じた方法による前処理を行なって得られた定量値の間には有意差は見出されなかった。ここで設定した方法は、岩田ら⁹⁾の方法に比べ、処理に要する時間が短かいので、より適当な方法であると結論できた。

2. 3. チューインガム

0℃以下で十分に冷却した試料をハンディミル(meller, 三田村理研工業(株))で処理することにより粉碎し、均一化した。その2g程度を、50ml容ガラス共通摺合せ遠沈管に正確に秤取した。80% ethanol 20mlを加え、十分に振り混ぜた後、液のpHを、pHメーターを用いて、水酸化ナトリウム/80% ethanol溶液で、7に調整した。pH電極は80% ethanolで洗浄し、洗液は、遠沈管に入れた。沸石を加え、水冷冷却管をつけ湯浴上で30分間還流した。アリン管形ガラスフィルター15AG2に、遠沈管の内容物を定量的に移し、沝過し、沝過残渣を、脱イオン水各10mlで4回洗浄し、沝液を得た。沝液を合せ脱イオン水で250ml定容とした。そ

の1 ml を乾燥し、TMS 化のための試料とした。

チューインガムを粉碎した試料は、水になじまないの
で、脱イオン水を加え、抽出する方法は、水面に浮いて
しまうので使用することができなかった。また、80%
ethanol 中でも、遠心分離を行なうと、遠沈管底にこび
りついてしまうので、遠心分離の操作も使用できなかった。

2. 4. ビスケット

ハンディミルで粉碎することにより均一化した試料 2
g 程度を、50ml 容ガラス製共通摺合せ遠沈管に正確に
秤取した。*n*-hexane 20ml を加え、共栓をし、1 分間
振とうし、遠心分離(1150 g, 5 分間)し、デカンテーシ
ョンで、*n*-hexane 層を捨てた。再び、*n*-hexane 20ml
を加え、共栓をし、1 分間振とうし、共栓に付着した試
料を *n*-hexane で遠沈管中に洗い落とし、共栓をし、遠
心分離(1150g, 5 分間)した。*n*-hexane 層をデカンテ
ーションで除去し、一夜放置し乾燥させた。80% etha
nol 20ml を加え、沸石を入れ、水冷却管をつけ、湯
浴上で30分間還流した。アリン管形ガラスフィルター15
AG 2 に内容物を定量的に移し、*ろ*過し、*ろ*過残渣を脱
イオン水各 10ml で 5 回洗浄し、*ろ*液を得た。*ろ*液を合
わせ、脱イオン水で 250ml 定容とした。その 1 ml を
乾燥し、TMS のための試料とした。

H.G. JONES ら²⁾ が報告した方法は、粉碎した試料
を、105°C 1 時間乾燥後、*n*-hexane で、ソックスレー
抽出器を用いて脂肪を抽出し、乾燥後、一定量を秤量し
80% ethanol 50-70ml で 2 回、還流抽出し、試料溶液
を得る方法であった。この方法は、脱脂試料を秤取する
操作があるので、分析法としての一貫性に欠け、定量に
影響を与える可能性があった(岩田ら⁶⁾ の方法は H.G.
JONES ら²⁾ の方法に準じた方法である)。

ここで設定した方法は、採取した試料について、*n*-
hexane 抽出を行なうように改良した方法である。また、
n-hexane 抽出の前処理としての、乾燥(105°C, 1 時間)
処理は、必要がないことが明らかになった。一般に、*n*-
hexane 抽出では、全ての脂肪が抽出されるのではない
が、残存する脂肪は、定量に影響を与えなかった。また、
この方法による前処理に要する時間は、H. G.
JONES ら²⁾ の方法と比べ、短かく、また得られた糖類
の定量値も大であった。

2. 5. クラッカー

ハンディミルで粉碎することにより均一化した試料 2
g 程度を、50ml 容ガラス製共通摺合せ遠沈管に正確に
秤取した。*n*-hexane, 20ml を加え、共栓をし、1 分間

振とうし、遠心分離(1150 g, 5 分間)し、デカンテー
ーションで、*n*-hexane 層を捨てた。再び、*n*-hexane 20
ml を加え、共栓をし、1 分間振とうし、共栓に付着し
た試料を *n*-hexane で遠沈管中に洗い落とし、共栓を
し、遠心分離(1150 g, 5 分間)した。*n*-hexane 層を
デカンテーションで除去し、一夜放置し乾燥させた。80
% ethanol, 20ml を加え、共栓をし、1 分間振とうし
遠心分離(1150 g, 5 分間)し、デカンテーションで上
清を得た。残渣に再び 80% ethanol, 20ml を加え、
共栓をし、1 分間振とうし、遠心分離(1150g, 5 分間)
し、デカンテーションで上清を得る操作を 9 回繰り返した。
上清を合わせ、80% ethanol で 250ml 定容とし
た。その 10ml を乾燥し、TMS のための試料とした。

クラッカーは、純水中で膨潤するので、グラスフィル
ター上での脱イオン水洗浄による抽出処理は不可能であ
った。

2. 6. りんご清澄果汁

振とうして均一化した試料 4ml を 100ml 容ビーカ
ーに採取した。脱イオン水約 50ml を加え、液の pH
を、pH メーターを用いて、水酸化ナトリウム液で、7
に調整した。pH 電極に付着した試料は、脱イオン水で
ビーカー中に洗い落とし、100ml 容メスフラスコに内
容物を定量的に移し、脱イオン水を加え、定容とした。
その 1 ml を乾燥し、TMS 化のための試料とした。

C. FLENN ら³⁾, D. A. KLINE ら⁴⁾, J. J. RYAN⁵⁾,
D. A. HEATHERBLL⁷⁾ が果汁あるいは果実中の糖類の定
量について報告した方法は、いずれも、糖液の精製に酢
酸鉛を使用しているの、単糖類が損失する可能性があ
った。

ここで設定した方法では、糖類を精製していないが、
イオン交換樹脂による精製を行なっても得られた定量値
には、有意差がなかった。

3. 食品中の糖類の定量

市販の食品17点(ジャム7点、ようかん5点、チュー
インガム1点、ビスケット2点、クラッカー1点、りん
ご清澄果汁1点)中を糖類を分析した結果を、第2表に
示した。

定量結果をみると、ジャムのうち、水飴を使用してい
るという表示のある、JA-1, JA-4, JA-5 には、水飴
に由来する maltose が含まれていた。また、マルチット
シラップを使用しているという表示のある、JA-6, JA-
7 には、maltitol の他に sorbitol も含まれていること
を、TFA 誘導体の GLC により定性した。この sorbi
tol は、マルチットシラップに含まれていたものと考

Table 2. Determination of Sugars in Foods (Average of 3(*) or 9(**) determinations)

		Fructose		Glucose		Maltose		Sucrose		Mannitol		Sorbitol		Maltitol	
		mean %	CV %	mean %	CV %	mean %	CV %	mean %	CV %	mean %	CV %	mean %	CV %	mean %	CV %
Jam	JA-1*	7.24	0.44	19.38	0.35	3.57	5.35	21.70	3.12	—	—	—	—	—	—
	JA-2*	11.59	0.82	10.33	0.53	—	—	45.67	1.30	—	—	—	—	—	—
	JA-3*	14.39	0.85	22.13	0.89	—	—	30.51	1.06	—	—	—	—	—	—
	JA-4*	4.86	1.79	21.52	0.51	4.33	1.87	10.41	1.95	—	—	—	—	—	—
	JA-5*	4.51	4.66	19.77	0.25	4.72	2.82	9.75	1.23	—	—	—	—	—	—
	JA-6*	1.92	8.75	1.75	19.37	—	—	—	—	—	—	2.43	9.42	42.71	2.00
	JA-7*	3.74	8.82	4.71	4.25	—	—	—	—	—	—	2.22	5.68	40.45	2.71
"Yokan"	YO-1*	0.95	1.47	0.97	5.88	—	—	56.51	1.40	—	—	—	—	—	—
	YO-2*	0.33	0.00	0.55	1.82	—	—	59.63	0.76	—	—	—	—	—	—
	YO-3*	0.31	11.29	0.53	5.85	—	—	58.64	2.88	—	—	—	—	—	—
	YO-4*	0.44	18.41	0.74	0.00	—	—	57.28	1.47	—	—	—	—	—	—
	YO-5*	0.33	5.15	0.54	1.85	—	—	58.65	0.97	—	—	—	—	—	—
Chewing gum	CHE-1**	—	—	38.00	1.25	—	—	29.19	16.0	—	—	—	—	—	—
Biscuit	BI-1**	0.39	12.05	0.55	1.64	—	—	17.31	1.72	—	—	—	—	—	—
	BI-2*	0.76	12.63	0.77	5.19	—	—	19.11	1.56	0.16	25.00	—	—	—	—
Cracker	CR-1*	0.15	5.33	0.13	5.38	1.33	2.93	0.04	0.00	0.10	5.00	—	—	—	—
Apple juice	JU-1**	6.38	4.87	2.96	7.91	—	—	1.95	7.59	—	—	0.44	28.41	—	—

えられた。

また、ビスケット (BI-2)、クラッカー (CR-1) 中の mannitol の定性は、TFA 誘導体の GLC により行なった。

市販食品中の糖類の定量値をもとに、ここで設定した定量法による定量の精度を検討した。その結果、定量の精度は、変動係数で表わすと、含量 1% 以下の糖類の定量の場合、平均 7.6% (範囲、0.00-28.41%)、含量 1% から 10% の糖類の定量の場合、平均 5.8% (範囲、0.44-19.37%)、含量 10% 以上の糖類の定量の場合、平均 1.4% (範囲、0.25-3.12%) であった。すなわち、糖類の含量が多いほど、定量の精度が良くなる傾向があった。

4. Sucrose の添加回収試験

Sucrose の添加回収試験の結果を第 3 表に示した。

添加した sucrose の回収率は、95.8% から 100.5% となり、添加した sucrose は、ほぼ定量的に回収された。このことは、糖類の抽出液中の夾雑物が、糖類の TMS 化を阻害せず、定量にも影響を与えないことを示していた。

Table 3. Recovery of Sucrose in Foods (*Average of 3 determinations)

	Added (mg)	Found (mg)	Recovery* (%)
Jam	900	862.2	95.8
"Yokan"	200	194.0	97.0
Chewing gum	200	196.4	98.2
Biscuit	200	201.0	100.5
Cracker	20	19.6	98.0
Apple juice	200	196.0	98.0

要 約

ジャム、ようかん、チューインガム、ビスケット、クラッカー、りんご清澄果汁中の糖類を、脱イオン水または 80% ethanol、または 80% ethanol と脱イオン水で抽出後、その一定量を採り、乾燥後、TMS 化し、GLC を用いて定量する方法を確立した。

この定量法の精度は、変動係数で表わすと、含量 1%

以下の糖類の定量の場合、平均 7.6% (範囲, 0.00-28.41%), 含量 1% から 10% の糖類の定量の場合、平均 5.8% (範囲, 0.44-19.37%), 含量 10% 以上の糖類の定量の場合、平均 1.4% (範囲, 0.25-3.12%) であった。

この定量法の正確さは、sucrose の添加回収試験の結果、回収率が 95.8% から 100.5% となったことから良好であった。

この研究は、昭和49—51年度特別研究「品質評価のための食品の化学分析法の確立に関する研究」の一環として行なわれ、また、研究に要した費用の一部は、昭和50—51年度特別研究費によった。

文 献

- 1) 安井 健・竹中麗子・長谷 幸：食総研報，34，105 (1978).
- 2) JONES, H.G., SMITH, D. M. and SAHASRABU-DHE, M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49, 1183 (1966).
- 3) FLYNN, C. and WENDT, A.S.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 1067 (1970).
- 4) KLINE, D. A., FERNANDEZ-FLORES, E. and JOHNSON, A. R.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 1198 (1970).
- 5) RYAN, J.J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 55, 1104 (1972).
- 6) 岩田有三・佐々木義幸・折口和範・小島 炳：食品工誌，20，60 (1973).
- 7) HEATHERBELL, D.A.: *J. Sci. Food Agric.*, 25, 1095 (1974).
- 8) 橋本誠二・金枝 純・岩田有三・折口和範：阿部公昭・小田恒郎：澱粉科学，19，129 (1972).
- 9) 食品分析研究会編：食品分析研究会報告書，p.5，昭和48年3月。
- 10) NAKAMURA H. and TAMURA Z.: *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 2314 (1970).
- 11) 加藤三郎・下田通敏・金子次雄：食衛誌，14, 583 (1973).