

I 研 究 報 告

〔山梨衛公研年報 第28号 1~4頁, 1984〕

糖アルコール分析法の検討と食品への応用

深澤喜延 岩下まさ子

D-ソルビットとD-マンニットは植物界, 特に果実や野菜, さらに海藻類に広く常在している糖アルコールである^{1,2)}。また, D-ソルビットはD-グルコースから, D-マンニットはD-フルクトースから細菌などにより生成することが知られている^{3,4)}。一方, しょ糖を接触還元することにより工業的に得られる⁵⁾両糖アルコールは食品添加物に指定され, D-ソルビットは甘味料としてD-マンニットは粘着防止剤として加工食品に用いられている。

食品中の糖アルコールの分析は, 古くは過ヨウ素酸化法などによっていた⁶⁾が, 共存する糖類の妨害を除去するために複雑な前処理を必要とした。1966年以降, ガスクロマトグラフ(GC)法による分析が主流になった^{6,7)}が, 糖と同様に揮発性がないことから, 種々の誘導体による定量法の検討が試みられた^{8,9)}。近年は高速液体クロマトグラフィーによる分析も実用化され¹⁰⁾, さらに酵素法による定量法も開発されている¹¹⁾。

「衛生試験法・注解」はその追補版¹²⁾でアセチル誘導体のGC法を記載し, 前年に出版された「食品中の食品添加物分析法(準公定法)」でもアセチル誘導体のGC法による同時分析法¹³⁾を採用しているが, 分析法の細部には若干の相違がある。

今回, 食品添加物の摂取量調査を行なう機会を得て, D-ソルビットとD-マンニットを分担した。そこで準公定法のGC法(以下「原法」)を追試し, 若干の改良を加えた方法により各種食品群の分析を実施して, 両者についてほぼ満足する結果を得たので報告する。

試 験 方 法

1. 試 薬 ・ 試 液

試薬は入手可能な高純度のものを用い, 試液は原法¹¹⁾に準じて調製した。

2. 試験溶液の調製

混合した食品群試料20gを共通摺合せフラスコに採り80%エタノール60mlを加えて水浴上で15分間還流加熱し, 放冷後冷却遠心分離を行なった。上澄液をメスフ

スコ(100ml)に傾斜法で移し, 残渣に80%エタノール30mlを加えてよく攪拌し, 再度遠心分離を行なって上澄液を先のメスフラスコに移し, 80%エタノールを加えて100mlとしたものを試験溶液とした。

3. 試験溶液の濃縮と乾燥

試験溶液5~10mlを共通摺合せナス型フラスコに採り内部標準液(キシリトール:4mg/ml)1mlを加えて60~65°Cの水浴上で減圧濃縮乾固し, さらに常圧下60~65°Cで約1時間乾燥した。

4. アセチル化

フラスコ中の乾燥物に, 脱水ピリジン4ml, 無水酢酸2mlを加えて65~70°Cの水浴中で1時間以上加熱しアセチル化を行なった。放冷後, 水を用いてメスフラスコまたは共栓比色管に移し, 水を加えて25mlとした。

5. エーテル抽出

アセチル化液5mlを共栓比色管に採り, エチルエーテル25mlを加えて5分間, 水平振とうして抽出した。

6. 試料液の調製

エーテル層を別の共栓比色管に吸引分取して, 無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち, 40°C以下で減圧濃縮し, アセトンで定容(5~10ml)として試料液とした。

7. 定 量

試料液の一定量(2~4 μ l)をGCに注入し, 得られたクロマトグラムから内部標準物質とのピーク高さ比で定量した。

ガスクロマトグラフィー操作条件の1例

カラム: ガラス ϕ 3mm \times 2.25m

充填剤: XE-60(3%)-OV-17(2%),

Chromosorb W(AW-DMCS)

カラム温度: 200°C

注入口温度: 250°C

キャリアガス: N₂30ml/min

空気: 1,000ml/min

水素: 0.5kg/cm²

検出器: FID

結果と考察

1. 試験法の検討

今回は原法のうち、(1)試料溶液の調製、(2)アセチル化の条件、(3)アセチル誘導体の抽出、(4)GC操作条件ならびに(5)共存する糖類の妨害の5点について検討した。なお(1)、(2)および(3)については後述するXE-60カラムによる定温分析で検討した。

(1) 試料溶液調製法の検討

原法では、試験対象食品の組成によって調製法をかえている。すなわち、糖質食品では水抽出を、タンパク食品では80%エタノール加熱抽出を、油脂食品ではn-ヘキサン脱脂後80%エタノール加熱抽出を採用している。多数の混合された食品を短時間に処理する必要から、調製法の統一化と簡便化をはかった。

糖質食品は、水または80%エタノールによる抽出が報告されている^{11,12)}が、処理時間の短縮を図るため、タンパク食品と同様に処理することとした。また、脂質を多く含む食品は脱脂操作を省くことを検討したが、80%エタノール抽出後、抽出液を低温に保持することによってエタノール層と油脂が完全に分離したので、冷却遠心分離を行なうことで、抽出液のみを傾斜法で分取することが可能であった。

そこで、全ての食品群について、80%エタノールによる加熱還流抽出法を採用した。

(2) アセチル化条件の検討

脱水ピリジンの存在下で糖アルコールは無水酢酸によって容易にアセチル化される。しかし、ピリジンは特有な臭気を有し、多数の試料を処理する時は試験者に不快感を与える。そこで、アセチル化の試薬量と時間について検討した。D-ソルビット、D-マンニット、キシリトールをそれぞれ16mg含む乾燥物について、脱水ピリジン14mlと無水酢酸7mlを加えて65~70°Cで1~4時間アセチル化を行なった。4時間加熱後室温に15時間放置したものを標準とし、それらの結果を図1に示した。図1から明らかなように、アセチル化に要する時間は1時間で十分であった。そこで、同様の乾燥物について試薬量を検討したところ、脱水ピリジン2ml、無水酢酸1mlでアセチル化が十分に完了することを確認した(図2)が、他の糖類に消費される試薬量を考慮して、以後の試験は脱水ピリジン4ml、無水酢酸2ml、反応温度は65~70°C、反応時間は1時間と設定した。

(3) アセチル誘導体の抽出条件の検討

原法では、アセチル化液の全量を用いてエチルエーテルで3回抽出しているが、アセチル化前に内部標準物質を加え、同時にアセチル化していることから、エーテル抽出の簡便化を図った。今回は、アセチル化液を水で約

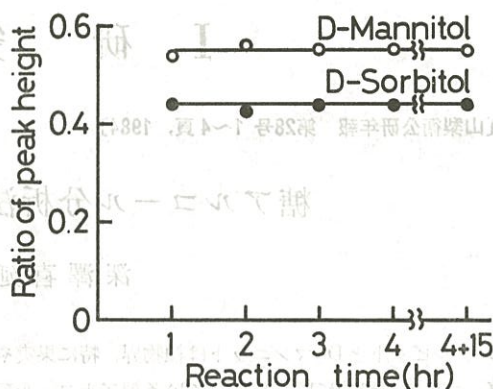


図1 アセチル化時間の検討

D-ソルビット、D-マンニット、キシリシール:16mg
無水酢酸:7ml, ピリジン:14ml
反応温度:65~70°C

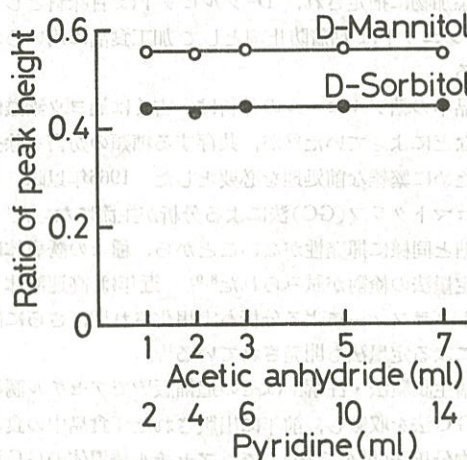


図2 アセチル化試薬量の検討

D-ソルビット、D-マンニット、キシリトール:16mg
反応温度:65~70°C, 反応時間:1時間

表1 エチルエーテル抽出回数とピーク高さ比

μg/ml	D-マンニット		D-ソルビット	
	抽出回数 1	抽出回数 2	抽出回数 1	抽出回数 2
80	0.21	0.22	0.16	0.16
160	0.42	0.42	0.33	0.33
240	0.65	0.65	0.52	0.51
320	0.87	0.87	0.69	0.69
400	1.08	1.06	0.86	0.84

キシリトール:200 μg/ml

5倍に希釈し、その5mlについて5倍量のエチルエーテルによる1回抽出を試みた。その結果、抽出操作は共栓比色管で行ない、吸引分取することにより、原法と全く

一致したピーク高さ比が得られることを確認した(表1)。

このことから、アセチル化以後の操作は十分であることが判明した。

(4) GC操作条件の検討

原法では昇温分析(150→220°C, 6°C/min)を採用しているが、分析時間を短縮するために定温での分析を試みた。内径3mm,長さ2.5mのガラスカラムにXE-60(3%)を充てんしカラム温度200°Cの条件で糖アルコール3成分のアセチル誘導体は図3に示したようにきれいに分離した。原法の注記で指摘しているような濃度による保持時間のずれは観察されず、内部標準物質とのピーク高さ比で試料液中の濃度として16~400µg/mlの範囲で、検量線は直線性が得られた。

このことから、至適条件を選択すれば、定温分析で十分であると考えられる。

(5) 糖類の妨害の除去についての検討

原法の注記、解説では糖類の妨害について触れていない。また、衛生試験法注解ではECNSS-M(3%)で糖と糖アルコールのアセチル誘導体のある種のは保持時間(Rt)が近似または一致することを指摘している。

食品特に加工食品には、山中¹³⁾も述べているようにしょ糖、ブドウ糖、果糖などが存在することが考えられるため、これら糖類のアセチル誘導体についてRtを検討した。原法のXE-60カラムではD-グルコースとD-マンニットのRtが近似し、クロマトグラム上で分離が不十分であった。そこで数種の充てん剤を用いて、D-マンニット、D-ソルビット、D-グルコース、D-フルクトースについて検討した。表2に示したように、いずれの充てん剤でも4物質を完全に分離できなかった。特にD-マンニットは、XE-60, QF-1カラムではD-グルコースと、OV-17, SE-30などでは、D-ソルビットと分離が不十分であった。

そのため、XE-60(1m)とOV-17(1m)を連結したカラムで分析を試みたところ、図4に示したように良好なクロマトグラムが得られた。また、試料中にD-グルコースが40倍存在してもD-マンニットの定量を妨害しないことを確認した。

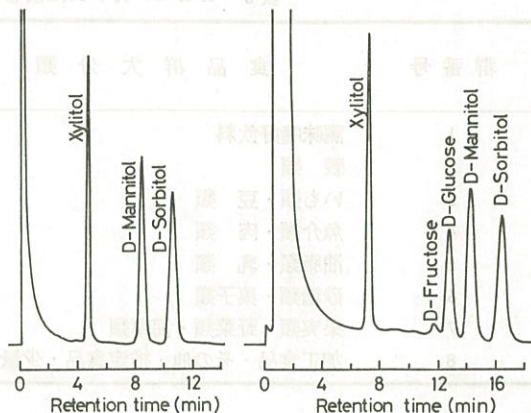


図3 XE-60カラムによるアセチル誘導体のクロマトグラム

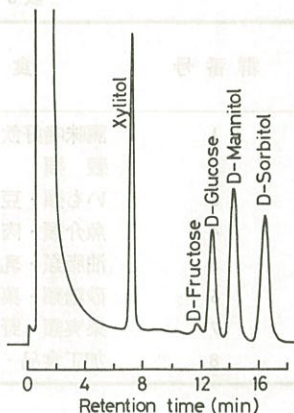


図4 XE60:OV-17連結カラムによるアセチル誘導体のクロマトグラム

2. 食品群試料への応用

以上の試験法の検討結果をふまえて、実際の食品群試料への応用について添加回収試験を行ない検討した。すなわち、食品添加物摂取量調査の食品群別試料について2段階の添加を行ない表3,表4に示した結果を得た。表3はD-ソルビットについてXE-60カラムで行なった結果であり、表4はD-ソルビットとD-マンニットについて連結カラムで実施した結果である。D-ソルビットは10mg添加で低い回収率を示した食品群があったが、20mg, 100mgの添加ではいずれの食品群も80%以上の高率で回収された。D-マンニットも同様に安定した回収率が得られた。

以上の回収試験の結果から、本改良法は広範囲の食品について、D-ソルビットとD-マンニットを定量することが可能であると考えられる。

ま と め

食品中の糖アルコールの定量法について、アセチル誘導体をガスクロマトグラフィーで分析する方法を検討した。

表2 各種充てん剤によるアセチル誘導体の相対保持時間

充てん剤	カラム温度 (°C)	相 対 保 持 時 間 (キシリトール:1.00)			
		D-フルクトース	D-グルコース	D-マンニット	D-ソルビット
XE-60 (3%)	190	1.67	1.84	1.91	2.42
OV-17 (2%)	220	1.72	1.89	2.36	2.43
QE-1 (2%)	170	1.61 0.83	2.04 1.74	1.81	2.33
SE-52 (10%)	180	1.38	1.81	2.38	2.48
JXR-Siliconc (5%)	180	1.30	1.76	2.32	2.42

表3 XE-60 カラムによる D-ソルビットの添加回収試験結果 (%)

群番号	食品群大分類	D-ソルビット添加量	
		20mg/20 g	100mg/20 g
1	調味嗜好飲料	103.1 (2.3%)	104.6 (0.9%)
2	穀類	94.8 (4.7%)	96.7 (1.9%)
3	いも類・豆類	91.0 (4.0%)	93.7 (4.2%)
4	魚介類・肉類	100.1 (1.6%)	94.4 (1.5%)
5	油脂類・乳類	95.7 (9.1%)	99.3 (1.8%)
6	砂糖類・菓子類	81.3 (9.8%)	86.5 (1.4%)
7	果実類・野菜類・海草類	111.4 (5.7%)	101.6 (1.2%)
8	加工食品・その他・推定食品・少量食品	87.5 (7.3%)	87.9 (3.4%)

n : 3 (): 変動係数

表4 XE-60 : OV-17 連結カラムによる添加回収試験結果 (%)

群番号	D-マンニット		D-ソルビット	
	10D-mg/20 g	100mg/20 g	10mg/20 g	100mg/20 g
1	74.8 (6.2%)	98.5 (0.9%)	82.3 (0.6%)	95.9 (0.7%)
2	95.1 (10.6%)	93.3 (3.3%)	64.2 (2.1%)	89.4 (0.3%)
3	92.7 (5.3%)	96.2 (0.9%)	95.6 (3.0%)	95.7 (0.3%)
4	81.9 (2.1%)	93.3 (1.1%)	78.2 (2.6%)	94.2 (1.4%)
5	74.2 (1.1%)	96.9 (7.7%)	92.7 (1.9%)	103.0 (1.8%)
6	74.2 (2.9%)	81.9 (8.3%)	97.1 (3.3%)	80.5 (4.5%)
7	98.1 (2.3%)	91.8 (3.3%)	108.0 (4.5%)	89.1 (3.2%)
8	105.6 (1.5%)	88.2 (2.2%)	110.0 (2.0%)	90.6 (1.2%)

n : 3 (): 変動係数

1. D-ソルビットは食品添加物分析法収載の方法で定量することができたが、D-マンニットはD-グルコースなどが存在する場合は不可能であった。

2. D-マンニットを定量するため、XE-60とOV-17の連結カラムによる分析を試み、良好な結果を得た。

3. 本改良法は、広範囲の食品へ応用することが可能であった。

本研究は、昭和58、59年度厚生科学研究「食品添加物の1日摂取量調査に関する研究」の一環として実施した。

また本研究の一部は、第21回全国衛生化学技術協議会(山口市, 1984. 9. 27~28)において発表した。

文 献

1) R. E. Worlsted, R. S. Shallenberger : J. Assoc. Off. Anal. Chem **64**, 91~103 (1981)
 2) 田中平三ら : 日本公衛誌 **12**, 607~618 (1983)
 3) 水野 卓, 西沢一俊 : 図解糖質化学便覧 388, 共立出版 (1971)

4) 中山 啓, 天水喜美子 : 日食工誌 **24**, 582~583 (1977)
 5) 石館守三監修 : 第四版食品添加物公定書解説書 B-908~911, 廣川書店 (1979)
 6) 藤井清次ら : 食衛誌 **9**, 322~324 (1968)
 7) H. G. Jones, D. M. Smith, M. Sahasrabudhe : J. Assoc. Off. Anal. Chem. **49**, 1183 (1966)
 8) 岩田有三ら : 日食工誌 **20**, 60~65 (1973)
 9) 加藤三郎, 下田通敏, 金子次雄 : 食衛誌 **14**, 583~594 (1973)
 10) E. C. Samarco : J. Assco. Off. Anal. Chem. **60**, 1318~1320 (1977)
 11) 厚生省環境衛生局食品化学課編 : 食品中の食品添加物分析法 268~282, 講談社 (1982)
 12) 日本薬学会編 : 衛生試験法・注解 (1980), 追補版 (1983) 1281~1283 金原出版 (1983)
 13) 山中 啓, 天水喜美子 : 日食工誌 **24**, 36~37 (1977)