

食品中の希少糖分析方法の検討

白尾 美佳

帝京短期大学 生活科学科

【抄録】

【目的】 希少糖とは、自然界での存在量が少ない単糖およびその誘導体を指し、約 50 種類以上存在すると報告されている。これらの希少糖は、近年、その効能の面から注目されている。特に、希少糖の中でも D-アルロース (D-プシコース) はさまざまな機能性があることが確認されており、需要も多くなってきている。しかし、食品中の希少糖は存在自体が少ないため、分析することが難しい。そこで、迅速かつ簡便に分析できる方法の確立が望まれていることから、希少糖を含む食品の迅速かつ高精度な分析法の確立を目的とした。

【方法】 本研究では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた希少糖の分析法の最適化を行った。分離モードでは、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー等の検討のほか、移動相は、種類や濃度、検出は、UV, ECD, エアロゾルベース検出器などを使用した検討をおこなった。これらの分析手法において、良好な分析条件を用いて、食品中の希少糖の分析に応用した。

【結果】 分析条件の検討結果、分離モードは、親水性相互作用クロマトグラフィー、移動相は 70 ~ 80% アセトニトリル、検出は、エアロゾルベース検出にて良好な分析が可能になった。また、これらの分離・検出において、シロップ、飴、清涼飲料水などの食品中の希少糖の分析が可能になった。

【考察】 食品中の希少糖分析法の確立を目指して、分離分析法の検討をおこなった。糖類は、紫外吸収を持たないことから、UV 検出器では低波長においても検出は難しく、ECD などの検出では、分析操作が煩雑なことから、エアロゾルベース検出を行った。エアロベース検出は、他の検出法に比較して、再現性もよく、良好な希少糖の検出性能が向上した。しかしながら、さらに検出感度やピーク分離の向上が望まれる。希少糖の含有量は、同じ種類の食品においても差があることから、希少糖がどのくらい含有しているのかを分かるように表示の必要性があるものと考えられる。本手法は、希少糖の品質管理や製品開発に有用であり、今後の希少糖利用の促進に寄与することが期待される。

【キーワード】 希少糖, D-アルロース, 食品

I. 緒言

自然界に多量に存在にする単糖類としてグルコースやフルクトースなどがよく知られているが、近年、希少糖が機能性の面からも注目されている。国際希少糖学会によると、希少糖は「自然界にその存在量が少ない単糖とその誘導体」として定義されている。代表的な希少糖に、D-アルロース、D-アロース、D-タガトース、キシリトール、エリスリトール、L-グルコース、L-リボースが挙げられるが、単糖とその誘導体としての糖アルコール等を加えると、60 種類以上となるといわれている。これらの希少糖の一つ

である D-アルロースは、D-フルクトースに異性化酵素である D-アルロース 3-エピメラーゼならびに D-タガトース 3-エピメラーゼを作用させると異性化して、生成される¹⁻³⁾。D-アルロースは砂糖の 7 割程度の甘味度を有するものの、低エネルギーであることから、食後血糖上昇抑制効果や内臓脂肪蓄積抑制効果を有することが明らかになっている^{4,5)}。これらのことから、D-アルロースは現代人の健康維持、増進に資する有用な食品素材の候補であるといえる。

また、D-アルロースを含む希少糖含有食品の販売も行われており、様々な食品に利用されている。このような新規食品の開発に当たって

は、食品中の成分分析の確立は必要不可欠である。既に、食品に含まれる D- アルロースを定量的にする方法は報告されているものの、糖類は UV 検出においては選択性が高い長波長での検出は難しいことから、分析するためには条件検討が必要である。さらに、様々な希少糖については、迅速、簡便に精度よく同時分析できる方法は確立していない²⁾。

そこで希少糖の分析方法について検討したので報告する。

II. 方法

1. 試薬及び試料

D- アルロース, D- アロース, キシリトールは、東京化成工業株式会社, D- グルコース, D- フルクトースは和光純薬工業株式会社より購入した。アセトニトリルは、和光純薬株式会社製の特級を用いた。

食品試料は、市販の希少糖含有食品を用いた。シロップ 2 種類, 飴は、梅飴, 塩飴の 2 種類, みかんサイダー 1 種類の 5 種類とした。

2. 試料の調製

シロップ, みかんサイダーについては、蒸留水で 10 倍に希釈した。希少糖含有飴は、粉碎後、蒸留水で 100 倍に希釈した。それぞれの試料は、希釈後 0.45 μ m フィルターにてろ過を行ったのち、HPLC に供した。

3. 希少糖の分析

HPLC は、ポンプは Nanospace Si-2 3001 (資生堂 Fine Chemicals), オートサンプラーは Nanospace SI2 (資生堂 Fine Chemicals) を用いた。カラムは、逆相系のカラム, 親水性相互作用カラムなどを用いた。検出は、UV, ECD, エアロゾル検出器, 移動相は、アセトニトリル : 水を用いて検討した。

III. 結果

1. 希少糖の分析条件

糖類の分析では、長波長での紫外吸光度検出においては、検出が難しく、近年注目されている分離モード陰イオン交換クロマトグラフィー, サイズ排除クロマトグラフィー, 親水

性相互作用クロマトグラフィーの三種類検討した。分離においては、親水性が高いことから親水性相互作用クロマトグラフィーにおいて良好な分離分析であった。検出は、UV 検出, 示差屈折率検出, ECD, 移動相を噴霧・気化し、エアロゾル状態の微粒子に水分を凝縮させ、レーザーでカウントするエアロゾルベース検出について検討したところ、エアロゾルベース検出器が感度良く検出可能になった。移動相は、アセトニトリル, エタノール等の濃度を変えて、分離, 再現性などを検討した。その結果、アセトニトリルの濃度が 70% から 80% 程度が良好な検出が得られた。アセトニトリルの濃度が薄い方が、各ピークの分離はよかったが、再現性については、80% が良好であった。最適条件は、以下の条件であった。

カラム : HILIC pak VG-50 4D

(昭和電気株式会社)

検出器 : エアロゾルベース検出器

(NQAD5600 資生堂)

移動相 : 80%アセトニトリル

流速 : 600 μ l/min

上記に示した条件において、試料として標準溶液ならびに単糖類の混合液を用いて分析した結果を Fig.1 に示す。本条件を用いた分析において、D- アルロース, D- アロース, D- グルコース, D- フルクトースを 15 分以内で分離可能になった。

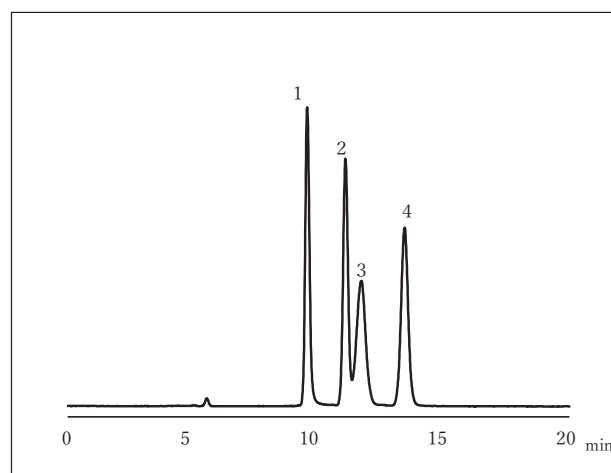


Figure 1. 希少糖標準液及び単糖類のクロマトグラム

1.D-Allulose 2:D-Fructose 3:D-Allose 4:D-Glucose

Table 1. 定量範囲および再現性

	定量下限値 (mg/ml)	定量上限値 (mg/ml)	相関係数(R ²)	変動係数(%)
D-アルロース	0.5	2.0	0.9914	3.9
D-アロース	0.5	2.0	0.9931	4.0
D-グルコース	0.5	2.0	0.9934	3.3
D-フルクトース	0.5	2.0	0.9931	3.1

2. 定量範囲と再現性

標準試料における定量範囲と再現性について Table 1 に示した。検量線の作成では、D-アルロースは 0.5 ～ 2.0 mg/ml の範囲で相関係数 0.99 以上の良好な直線関係を示した。また、D-アロース、D-グルコース、D-フルクトースにおいてもほぼ同様な結果が得られた。

3. 食品中の希少糖の分析

食品中に含有される希少糖について、シロップ 2 種類、飴、サイダーのクロマトグラムを Figure 2 ～ 6 に示した。シロップ A においては、D-アルロース、D-アロース、シロップ B も、D-アルロース、D-アロースが含まれていた。シロップ A は、希少糖の含有量が約 10%、シロップ B の試料では 0.05% 未満であった。希少糖含有飴は、梅飴では、D-アルロース、塩飴は、D-アルロース、D-アロース、サイダーでは、D-アルロース、D-アロースが含有されていた。含有量は、梅飴は、D-アルロースは約 1.72 mg/g、D-アロースは約 1.32 mg/g、D-グルコースは約 201.96 mg/g、D-フルクトースは約 68.20 mg/g、塩飴は、D-アルロースは約 4.76 mg/g、D-アロースは約 8.13 mg/g、D-グルコースは約 131.84 mg/g、D-フルクトースは約 45.60 mg/g 含有されていた。みかんサイダーでは、100ml あたり D-アルロースは約 0.48g、D-アロースは約 0.47g、D-グルコースは約 7.02g、D-フルクトースは約 5.17 mg 含有されていることになる。

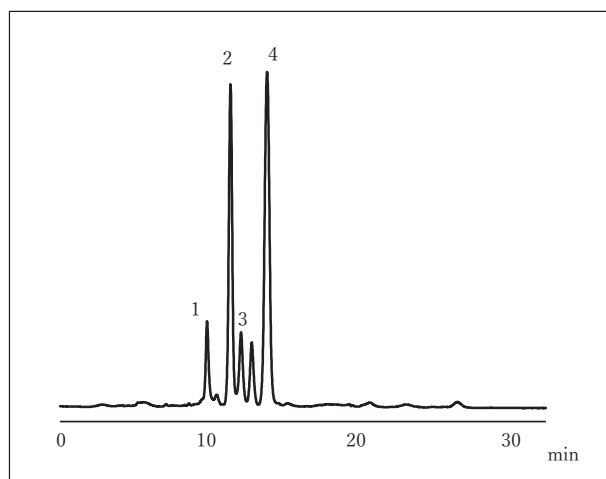


Figure 2. シロップ A のクロマトグラム
1:D-Allulose 2:D-Fructose 3:D-Allose 4:D-Glucose

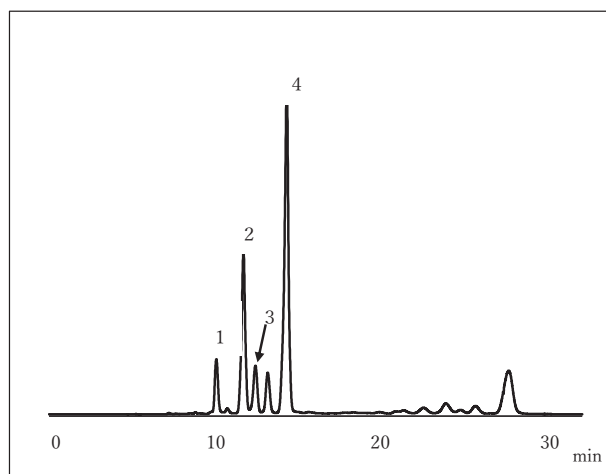


Figure 3. シロップ B のクロマトグラム
1:D-Allulose 2:D-Fructose 3:D-Allose 4:D-Glucose

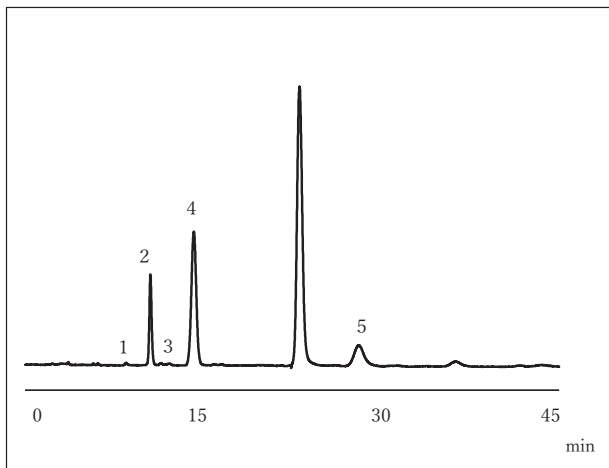


Figure 4. 梅飴のクロマトグラム

1:D-Allulose 2:D-Fructose 3:D-Allose 4:D-Glucose
5:D-Maltose

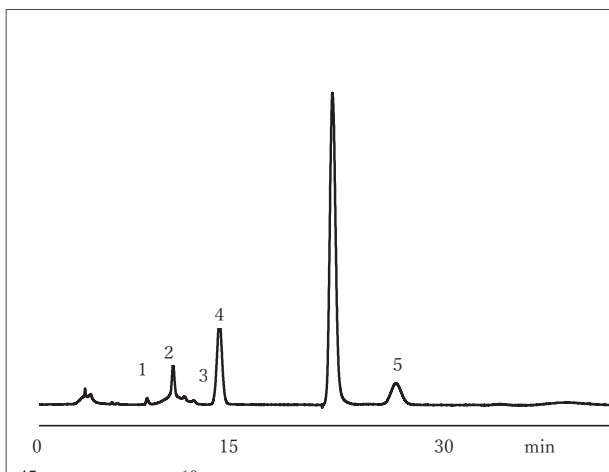


Figure 5. 塩飴のクロマトグラム

1:D-Allulose 2:D-Fructose 3:D-Allose 4:D-Glucose
5:D-Maltose

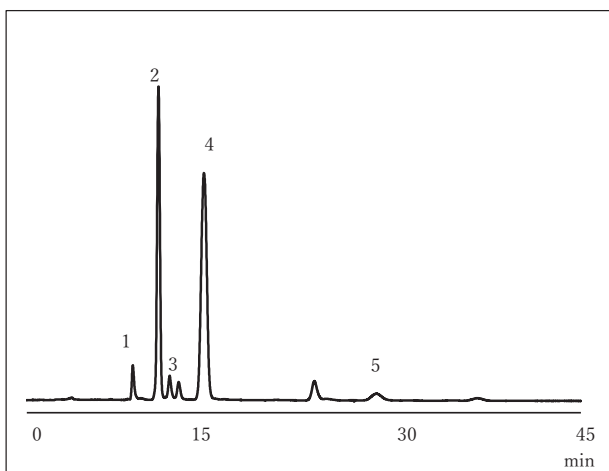


Figure 6. みかんサイダーのクロマトグラム

1:D-Allulose 2:D-Fructose 3:D-Allose 4:D-Glucose
5:D-Maltose

IV. 考察

本研究で確立した HPLC を用いた分析法は、希少糖を含む食品中での迅速かつ高精度な定量を実現した。分離モードは、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) モード、検出は、エアロゾルベース検出器の組み合わせにより、良好な分離が可能になった。

食品中の希少糖は、市販希少糖含有シロップは2種類分析をおこなったが、シロップ A では、約 10% の希少糖が含有されていたが、シロップ B の試料では 0.05% 未満しか含有されていなかった。同じ種類のシロップでも、含有量が大きく異なる商品が存在することが確認できた。商品選択において、含有量の違いは重要である。そのため、含有量の表記などの必要性が望まれる。希少糖入りみかんサイダーを1本食すると、D-アルロース約 0.96g, D-アロース約 0.96g, D-グルコース約 14.03g, D-フルクトース約 10.33g 摂取することになる。今回分析した食品の場合は、希少糖のほかにも D-グルコースや D-フルクトースなどの糖類も含有されていることから、今後の課題として食品中の希少糖、単糖、オリゴ糖などの同時分離分析条件の検討、希少糖の機能性などの検討も必要である。さらに、定量値の再現性を向上させるためには、エアロゾルベース検出器では、窒素を使用するが、窒素供給量を一定に保つ必要がある。

一般的に、希少糖理解はまだ広まっていないため、より大量生産を可能にし、手軽に手に入る糖として、2型糖尿病などの生活習慣病改善につながるものと期待される。

利益相反について

開示すべき利益相反はありません。

【文献】

- 1) H. Itoh, H. Okaya, A. R. Khan, S. Tajima, S. Hayakawa, and K. Izumori (1994) Purification and characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 2168-2171.
- 2) Takeshita, K., Suga, A., Takada, G. and Izumori, K. (2000) Mass production of D-psicose from D-fructose by continuous bioreactor system using immobilized D-tagatos. *Biosci. Bioeng.*, 90, 453-455.

- 3) D.K. Oh, N.H. Kim, H.J. Kim, C.S. Park, S.W. Kim, M. Ko, B.W. Park, H.M. Jung, and K.H. Yoon (2007) D-psicose production from D-fructose using an isolated strain, *Sinorhizobium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 559-563
- 4) N. Hayashi, T. Iida, T. Yamada, K. Okuma, I. Takehara, T. Yamamoto, K. Yamada, and M. Tokuda (2010) Study on the postprandial blood glucose suppression effect of D-psicose in borderline diabetes and the safety of long-term ingestion by normal human subjects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 510-519.
- 5) T. Iida, N. Hayashi, T. Yamada, Y. Yoshikawa, S. Miyazato, Y. Kishimoto, K. Okuma, M. Tokuda, and K. Izumori: (2010) Failure of D-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans. *Metabolism*, 59, 206-214.
- 6) Y. Han, E.Y. Kwon, M.K. Yu, S.J. Lee, H.J. Kim, S.B. Kim, Y.H. Kim, and M.S. Choi: (2018) A preliminary study for evaluating the dose-dependent effect of D-allulose for fat mass reduction in adult humans: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*, 10, 160-174 .
- 7) 島田健作, 大谷耕平, Pushpa Kiran Gullapalli, 吉原明秀, 秋光和也, 何森 健 (2022) 希少糖の実用化ーブシコースの大量生産に係る研究開発及び応用研究ー, *応用糖質科学*, 12 (1), 33-39
- 8) 大島久華, 木村功, 井上昌子, 香川典子, 何森 健 (2008) 食品に含まれる希少糖ブシコースの定量法の開発 (2). *香川県産業技術センター研究報告*, 8, 62-64

Study on Analytical Methods for Rare Sugars in Foods

Mika SHIRAO

Department of Living Science, Teikyo Junior College

【abstract】

【Purpose】 Rare sugars refer to monosaccharides and their derivatives that are present in small quantities in nature, with over 50 types reported to exist. These rare sugars have attracted attention in recent years due to their beneficial effects. In particular, D-allulose (D-psicose) has been proven to have various functional properties, and its demand is increasing. However, the analysis of rare sugars in food is challenging due to their low concentrations. Therefore, there is a need for the development of a rapid and simple analytical method. This study aims to establish a high-precision and rapid analysis method for rare sugars in foods.

【Methods】 In this study, the optimization of a rare sugar analysis method using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was conducted. Various separation modes were examined, including normal-phase chromatography, reversed-phase chromatography, and hydrophilic interaction chromatography (HILIC). Additionally, the type and concentration of the mobile phase were tested, as well as detectors such as UV absorption, refractive index (RI) detection, and charged aerosol detection (CAD). Based on the results of these tests, a suitable analysis condition was established and applied to the analysis of rare sugars in rare-sugar-containing foods.

【Results】 The optimization of analytical conditions resulted in the use of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for separation, an 80% acetonitrile mobile phase, and water condensation particle counter detection, all of which enabled effective analysis. The analysis of rare sugars in rare-sugar-containing foods, such as syrups, candies, and soft drinks, was successfully conducted.

【Discussion】 The analytical method established in this study using HPLC enables the rapid and high-precision quantification of rare sugars in foods. The combination of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) and water condensation particle counter (WPCP) detection improved the separation and detection performance for rare sugars. This method is useful for quality control and product development involving rare sugars and is expected to contribute to the promotion of rare sugar utilization in the future.

【Key words】 Rare sugars, D-allulose, Food