

## 水溶性食物繊維のHPLC-RI分析における代替内部標準物質の検討

飯田 憲司<sup>a</sup>, 貞升 友紀<sup>a</sup>

食物繊維の分析法で用いられる酵素が通知法上変更され、水溶性食物繊維のHPLC-RI分析において従前から内部標準物質として用いていたグリセリンでは正確な測定値が得られない懸念が生じた。そこでグリセリンに替わる内部標準物質として各糖類、糖アルコール類、低級アルコール計19種を検討した。その結果、目的物質及び夾雑物質と分離ができるジエチレングリコールおよびエチレングリコールのうち、さらに分離度の高いジエチレングリコールを内部標準物質として選択した。難消化性デキストリンの測定を行い、旧酵素でグリセリンを内部標準物質としたときの規格基準法との測定結果の同等性を確認した。次に、清涼飲料水中における妥当性を確認した。その結果、1 g/100 mL (食物繊維として0.876 g/100mL) となるように調製した時の真度92.0-96.2%、併行精度7.0-7.1%、および室内精度7.0-7.1%とガイドラインの目標値を満たしていた。水溶性食物繊維の測定においては、内部標準物質にジエチレングリコールを使用することが適切であることを示唆した。

**キーワード**：食物繊維，水溶性食物繊維，内部標準物質，ジエチレングリコール，難消化性デキストリン，HPLC-RI

する。

### はじめに

平成27年4月1日の食品表示法施行に伴い、熱量、たんぱく質、脂質等の栄養成分表示が義務づけられ、食物繊維については摂取量が不足していることを理由に推奨表示とされた<sup>1)</sup>。食物繊維は血糖値上昇抑制、体脂肪低減作用、血圧上昇抑制等様々な機能が報告<sup>2)</sup>されており、近年特別用途食品や機能性表示食品として種々の商品が販売されている。

食物繊維の測定法は食品表示基準<sup>3)</sup> 別表9の第3欄<sup>4)</sup> および食品表示基準についての別添栄養成分等の分析方法等<sup>5)</sup> (以下、公定法) に示されており、水溶性食物繊維を含む場合はAOAC Method 2001.03<sup>6)</sup> に準拠した方法を用いることとされている。その中で、低分子水溶性食物繊維をHPLC-RIで測定する際はグリセリンを内部標準物質として用いると記述されている。

その後公定法で指定されている酵素のうちプロテアーゼ中にβ-グルカンを分解する酵素が混入して定量値が減少する恐れのあることが判明し、平成28年の通知<sup>7)</sup> にて示された酵素が変更された。しかし、新たに指定されたプロテアーゼ酵素溶液にはグリセリンが安定剤として含まれているとの報告があった<sup>8)</sup>。よって、新たな酵素溶液を使用すると、酵素溶液中のグリセリン量が内部標準物質として添加したグリセリン量に加算されて定量値を低く見積もる影響があるため、グリセリンに替わる内部標準物質が必要となる。過去に内部標準物質としてジエチレングリコールを用い大麦中の食物繊維を測定した事例<sup>9)</sup> がある。そこで、これを含む19種の糖やアルコール類について、内部標準物質として用いることが可能かどうか検討を行った。また、清涼飲料水における妥当性の確認を行ったので併せて報告

### 実験方法

#### 1. 試料

難消化性デキストリン：大塚製薬(株)製品を用いた。

#### 2. 試薬

酵素：Megazyme社製 総食物繊維測定キットK-TDFR (耐熱性アミラーゼ、プロテアーゼ、アミログルコシターゼ。以下、新酵素) およびSigma-Aldrich社製No.TDF-100A (耐熱性アミラーゼ、プロテアーゼ、アミログルコシターゼ。以下、旧酵素) を用いた。

イオン交換樹脂：オルガノ(株)製 アンバーライトIRA-67型 (OH型) および200CT型 (H型) を用いた。

グリセリン、ジエチレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール：富士フィルム和光純薬(株)製 特級を用いた。

フルクトース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、フコース、マンノース、スクロース、マルトース、ラクトース、トレハロース、エリスリトール、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、ラクチトール、アラビトール：特級又は生化学用を用いた。

#### 3. 装置および測定条件

分解装置：VELP社製 GDE酵素分解装置

HPLC：島津製作所(株)製 LC-20シリーズ、示差屈折率検出器：RID-20A

カラム：東ソー製 TSK-GEL G2500PW<sub>XL</sub> (7.8 mm i.d. × 300 mm) を2本直列に接続、カラム温度：80°C、流速：0.5 mL/min、移動相：水、注入量：20 μL

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

4. 分析方法

1) 内部標準物質の調製

各種糖類、糖アルコール類および低級アルコールを水で10 mg/mLとなるように調製した溶液を「3. 装置および測定条件」に示した条件で測定した。

2) 水溶性食物繊維の分析法

公定法、および特定保健用食品の表示許可等について別添3 特定保健用食品（規格基準型）制度における規格基準<sup>10)</sup>の定量法（以下、規格基準法）に準じた。すなわち、3種類の酵素による一連の処理をした溶液に対し、不溶性食物繊維の分析で行うエタノール添加による沈殿生成は省略し、エタノール添加の代わりに酵素を失活させる目的で沸騰水浴中の加熱工程を追加した。分析方法のフローチャートを図1に示す。マルトトリオースより前のピークを水溶性食物繊維画分とした(図2)。

3) 性能の確認

難消化性デキストリン1 gを用い、旧酵素を用いた規格基準法と新酵素を用いた本法で分析し、性能を比較した。また、難消化性デキストリンが1 g/100 mLとなるように調製したコーラ飲料および烏龍茶について妥当性評価を実施した。

結果および考察

1. 内部標準物質の検討

公定法による水溶性食物繊維の測定は、ゲルろ過カラムまたは配位子交換カラムを用いて分子量順に溶出させ、三糖類の1つであるマルトトリオースのピーク溶出位置を指標とし、これと同じかこれより前に溶出するものを食物繊維画分として、グルコースとの面積比およびグルコース量から計算して低分子水溶性食物繊維量を求める。しかし、

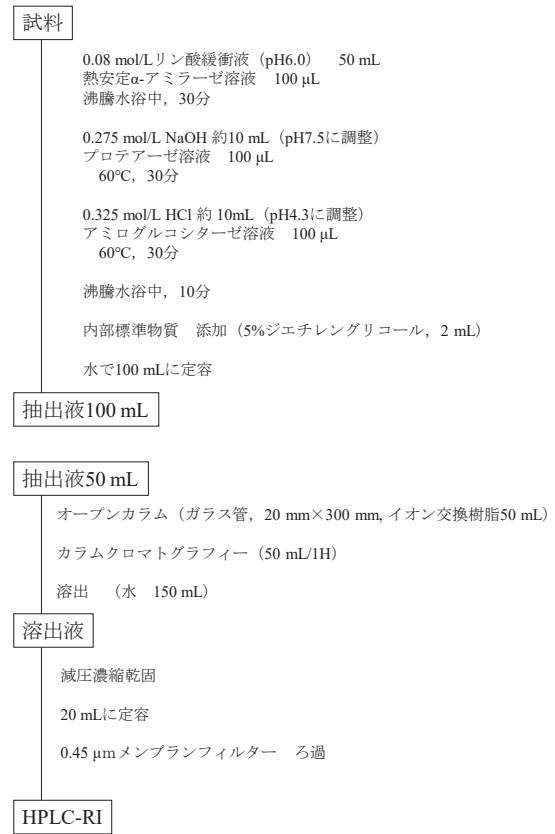


図1. 水溶性食物繊維分析法のフローチャート

グルコースの保持時間付近には夾雑ピークが重なることが多いため、通常は内部標準物質を添加して測定し、グルコースとの比率を求め補正換算して定量する。よって、新たな内部標準物質には食物繊維画分の指標とされるマルトトリオース、内部標準物質として用いてきたグリセリン、および食品中の糖類等のピークと分離する物質を選ぶ必要がある。また、酵素由来のピークと分離することも必要にな

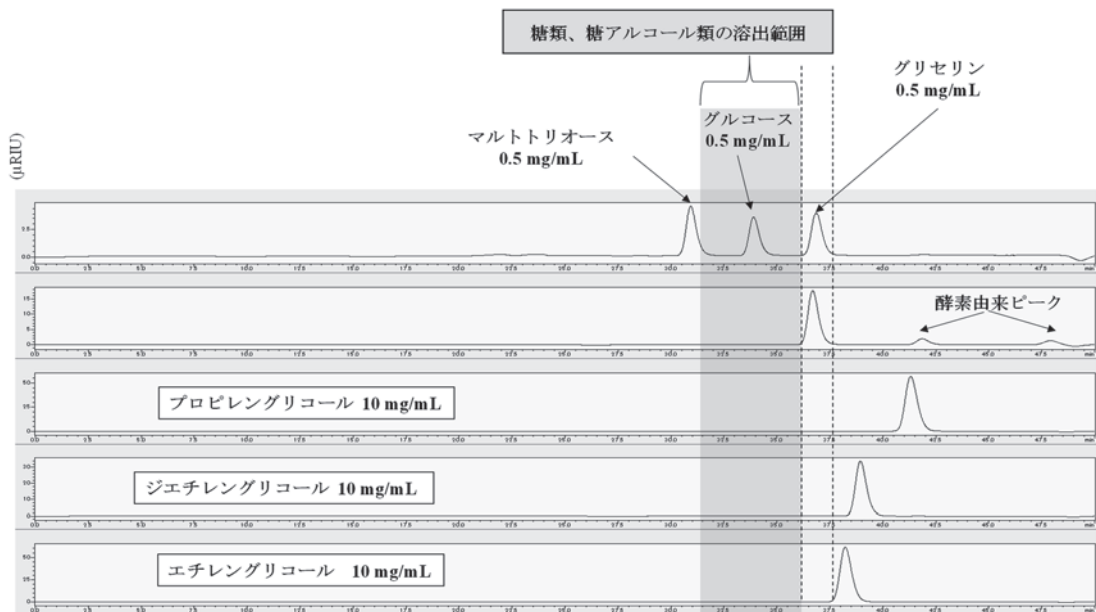


図2. 内部標準物質検討のクロマトグラム

(分)

る。以上の条件を満たす内部標準物質を探索するため、まずは糖類10種および糖アルコール類6種を測定したところ、測定した糖類および糖アルコール類全てがマルトトリオースとグリセリンとの両ピーク間で溶出し、グルコースやグリセリン、夾雑成分等とピークが重なるため内部標準物質として用いるには不適切であった。続いて低級アルコールのジエチレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコールを測定した結果、今回の分析条件ではジエチレングリコールおよびエチレングリコールが先に述べた内部標準物質としての条件を満たすことが判明した。クロマトグラムを図2に示す。ただし、分離度を計算したところジエチレングリコールとグリセリンの分離度は2.3、エチレングリコールとグリセリンの分離度は1.2であり、ジエチレングリコールの方がグリセリンとの分離度が高く内部標準物質として適切であった。よって、以下の妥当性確認にはジエチレングリコールを用いることとした。

## 2. 性能の確認

水溶性食物繊維の中で、特定保健用食品や機能性表示食品によく利用され<sup>9)</sup>、かつ規格基準が定められており<sup>10)</sup> 評価が可能な難消化性デキストリンについて、新法の適用性を評価した。規格基準法は旧酵素を用い、内部標準物質としてグリセリンを用いると定められている。まず、今回用いた難消化性デキストリンを規格基準法で測定したところ、食物繊維として85.6%であり、規格基準（食物繊維として85.0-95.0%）を満たしていることを確認した。次に、新酵素および内部標準物質としてジエチレングリコールを用いて測定を行った（図3）。その結果、表1に示したように平均値87.6%、変動係数1.68%と規格基準を満たす良好な結果が得られた。規格基準法との値を比較した<sup>11)</sup> ところ、F検定およびt検定で測定値の有意差はみられなかった（有意水準 $\alpha=0.01$ ）。よって、新酵素および内部標準物質にジエチレングリコールを用いた分析でも、水溶性食物繊維は規格基準法と同等の測定が可能であることが示された。

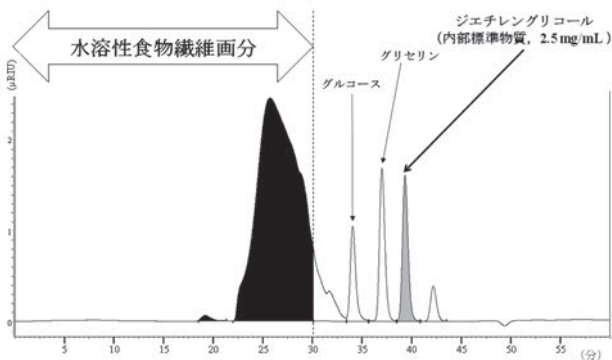


図3.新法による難消化性デキストリン（食物繊維画分）のクロマトグラム

表1. 水溶性食物繊維の測定結果

	規格基準法による	
	水溶性食物繊維含量* (%)	水溶性食物繊維含量** (%)
1回目	87.2	85.0
2回目	89.5	85.7
3回目	85.7	85.0
4回目	87.0	86.0
5回目	88.7	86.3
平均値	87.6	85.6
変動係数	1.68	0.68

\* : 酵素は新酵素, 内部標準物質はジエチレングリコールを用いた

\*\* : 酵素は旧酵素, 内部標準物質はグリセリンを用いた

水溶性食物繊維の公定法においては妥当性評価に関する記述が設けられていないため、今回は「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」<sup>12)</sup> に従った。サンプリング量は5 mLとし、1試行者2併行5日間で実施した。その結果、選択性、真度、併行精度、室内精度について妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。

(表2)

表2. 妥当性評価

試料	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
コーラ飲料	96.2	7.1	7.1
烏龍茶	92.0	7.0	7.0

難消化性デキストリンが1 g/100 mLとなるように調製  
(食物繊維として0.876 g/100 mL)  
1試行者, 2併行・5日間, サンプリング量: 5 mL

なお、新酵素中のグリセリン含有の課題解決のため、令和4年プロテアーゼおよびアミログルコシターゼは基本グリセリンを含まない酵素への変更が示された<sup>13)</sup>。しかし、注釈には今回の検討で新酵素としたキットも未だ同等の扱いで記述されており、このキットにグリセリンが安定剤として含まれているにも関わらず、注意喚起等の記載はない。また、グリセリンは食品添加物であり、添加された食品では定量値に影響が出る可能性が高い。そのため、特にグリセリンが含まれる食品の水溶性食物繊維の測定においては、内部標準物質にジエチレングリコールを使用する本法を応用することが適切であると考えられる。

## ま と め

消費者庁通知による食物繊維の分析法で用いる酵素の変更に伴い、従来水溶性食物繊維の分析において内部標準物質としていたグリセリンの使用が困難となった。代替の内部標準物質を検討したところ、目的及び夾雑物質との分離度が高いジエチレングリコールおよびエチレングリコールが使用できることが判明した。そのうち、より他の成分との分離が良好なジエチレングリコールを内部標準物質として用いることとした。難消化性デキストリンの測定を実施したところ、旧酵素を適用した方法と同等であった。また、

清涼飲料水中の分析における妥当性評価し基準を満たしていることを確認できた。本検討による内部標準物質の代替により、酵素キットの添加剤の影響を解決するとともに、加工食品中水溶性食物繊維分析に応用する際の糸口も提示することができた。

(本研究の概要は第54回全国衛生化学技術協議会年会、2017年11月、にて発表した。)

## 文 献

- 1)消費庁次長：消食表第139号，食品表示基準について，平成27年3月30日。
- 2) 食物繊維学会編集委員会編，食物繊維 ～基礎と応用～ 第3版，121-226, 2008, 第一出版，東京。
- 3) 食品表示基準，内閣府令第10号，平成27年3月20日。
- 4) 食品表示基準，別表第9～別表第21，  
[https://www.caa.go.jp/policies/policy/food\\_labeling/food\\_labeling\\_act/assets/food\\_labeling\\_cms201\\_230309\\_02.pdf](https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act/assets/food_labeling_cms201_230309_02.pdf)  
(2023年9月29日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5)消費庁次長：消食表第139号，食品表示基準について，別添 栄養成分等の分析方法等，平成27年3月30日。
- 6) Christopher Blake, Vitamins and Other Nutrients, George W. Latimer, Jr.(ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 21th Edition, Chapter 45, 111-116, 2019, AOAC INTERNATIONAL, ROCKVILLE, MARYLAND, USA.
- 7) 消費庁次長：消食表第532号，「食品表示基準について」の一部改正について，平成28年8月9日。
- 8) 伊藤祐介，奥村雅人，吉田幹彦，他：日本食物繊維学会第21回学術集会講演要旨集, s82-s83, 2016.
- 9) 食品と開発編集部，食品と開発，**58**(1), 57-74, 2023.
- 10) 消費者庁次長：消食表第259号，特定保健用食品の表示許可等について，別添3 特定保健用食品（規格基準型）制度における規格基準，  
[https://www.caa.go.jp/policies/policy/food\\_labeling/foods\\_for\\_specified\\_health\\_uses/notice/assets/food\\_labeling\\_cms201\\_220831\\_04.pdf](https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_for_specified_health_uses/notice/assets/food_labeling_cms201_220831_04.pdf) (2023年9月29日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 11)日本分析化学会編，改訂5版 分析化学データブック，217, 2004, 丸善，東京。
- 12) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長：食安発1224第1号，食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（通知），平成22年12月24日。
- 13) 消費者庁次長：消食表第128号，「食品表示基準について」の一部改正について，令和4年3月30日。

**Investigation of Alternative Internal Standard for HPLC–RI Analysis of Soluble Dietary Fiber**Kenji IIDA<sup>a</sup> and Yuki SADAMASU<sup>a</sup>

A concern arises that the use of glycerol as an internal standard in the HPLC–RI analysis of soluble dietary fiber may cause inaccurate results due to changes in the enzymes used in the official method for dietary fiber analysis. We investigated 19 types of sugars, sugar alcohols, and lower alcohols as internal standard substances to replace glycerol. The results, revealed that diethylene glycol and ethylene glycol could be separated from the target substance and contaminants. Indigestible dextrin was measured with diethylene glycol, which demonstrated a higher resolution than ethylene glycol. This study confirmed the equivalence of the measurement results with the standard method using the old enzyme and glycerol. The method for measuring indigestible dextrin in soft drinks using diethylene glycol was validated. The trueness, repeatability, and reproducibility ranges were 92.0–96.2, 7.0–7.1, and 7.0%–7.1%, respectively, when adjusted to 1 g/100 mL (0.876 g/100 mL as dietary fiber). These achieved the Japanese guideline criteria. We indicated that the use of diethylene glycol, as an internal standard, is appropriate for measuring soluble dietary fiber.

**Keywords:** dietary fiber, soluble dietary fiber, internal standard, diethylene glycol, indigestible dextrin, HPLC–RI