Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

糖質のUPLC-MS分析

Kenneth J. Fountain, Chris Hudella, Doug McCabe, Damian Morrison

緒言

糖質は自然界に最も豊富に存在する有機化合物で、多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たします。植物および動物体の構成成分としてだけでなく、多くの生物体細胞へのエネルギーの貯蔵と運搬にも使用されます。

“糖質”という用語は単糖類、二糖類、オリゴ糖類（3-10の単糖が結合）、多糖類（何千もの単糖が結合したものにまで及ぶ）を指しています。各単糖（例えばフルクトース、グルコース、ガラクトース）の異性体の数は炭素数に従って多くなります。オリゴ糖類と多糖類など複雑な糖質では、異性体の分離はより困難になります。

糖質は通常アミノまたはポリアミンカラムをHILICモードで使用して分離し、UV吸収が弱いため示差屈折計（RI）で検出します。しかしながら、これらの技術には塩による妨害、アノマー変旋光やグラジエント分離を行えないなどの問題があります。さらに、アミノカラムやポリアミンカラムでは還元糖（グルコース、マルトース、ラクトース）はシッフ塩基やエナミンを形成しカラムに吸着するため、結果としてカラム寿命が低減します。また、イオン交換クロマトグラフィーを用いた技術は高塩濃度のバッファを使用するためMS検出には適していません。

質量分析法は蒸発光散乱（ELS）検出の約10倍、RI検出の約100倍の感度があるため糖質を検出するのに適した技術です。プロテオミクスとバイオ医薬品の分野以外では、糖質の分析にMS検出を使用した報告は少ししかありません。2件はフローインジェクション（FIA）を用いてMS装置に注入した報告[1,2]で、1件はNMRとESI-MSの錯化剤として移動相にルビジウムを用いた報告[3]です。

ICP-MSとESI-MSもグルコース、スクロース、フルクトースのフラグメンテーションの研究に使用されています[4]。FIAではクロマトグラフィー分離がないためマトリックスの妨害により異性体の分離や正確な定量ができません。移動相への金属錯化剤の使用またはMS検出前のポストカラムでのイオン化剤添加も分析を複雑にしMSのイオン源を汚染します。

ESI-MSにアミドカラムを用いたHILICモードを組み合わせることで食品中のアミノ酸、ペプチド、複合糖質、有機酸を誘導体化なしに十分に分析することができています[5]。これらの分離は比較的大きい粒子径5μmのカラムを用いて行われており、分析時間は100分以上かかっています。

本アプリケーションノートでは、様々なサンプルマトリックス中の単糖類および複雑な糖質をUPLC-MSを用いて誘導体化なしに迅速に分析しています。ACQUITY UPLC BEH Amideカラムの耐久性により、誘導体化、金属錯化剤、ポストカラム添加なしにクロマトグラフィー分離を向上しMSシグナルを増強する高pH移動相を使用できます。

実験方法

装置	: Waters ACQUITY UPLC® systems with ACQUITY SQD
データシステム	: MassLynx version 4.1
カラム	: ACQUITY UPLC BEH Amide, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm (P/N 186004800), 2.1 x 100 mm, 1.7 μm (P/N 186004801), or 2.1 x 150 mm, 1.7 μm (P/N 186004802)
弱洗浄溶媒	: 75/25 CAN/H_2O (500 μL)
強洗浄溶媒	: 20/30 CAN/H_2O (800 μL)
シール洗浄	: 50/50 ACN/H_2O
注入モード	: Partial loop with needle overfill (PLNO)

移動相、流速、グラジエント条件、カラム温度、注入量は図の説明に記載した通りです。

MS条件

イオン化モード	: ES-
キャピラリー電圧	: 2.8 kV
コーン電圧	: 25 V
ソース温度	: 120 ℃
脱溶媒温度	: 350 ℃
脱溶媒ガス	: 500 L/hr
コーンガス	: 50 L/hr
デュエルタイム	: 40 or 80 ms
SIR *m/z*	: 179.2 (fructose, glucose) 341.3 (sucrose, maltose, lactose) 503.4, 665.5, 827.6, 989.7, 1151.8 (maltooligosaccharides n=1 to 5) 121.1 (erythritol), 803.8 (stevioside), 950.1 (rebaudioside C), 966.1 (rebaudioside A)

サンプル前処理

食品糖のスタンダード(フルクトース、グルコース、スクロース、マルトース、ラクトース)は50/50 ACN/ H_2O溶液に溶かして10μg/mLに調製しました。その他スタンダードは50/50 ACN/ H_2O溶液に溶かして指定の濃度に調製しました。ビールサンプルは50/50 ACN/ H_2Oで1:1に希釈して調製しました。天然甘味料の粉末は50/50 ACN/ H_2Oに溶解し、メープルシロップサンプルは50/50 ACN/ H_2Oに溶解して濃度0.5から1mg/mLに調製しました。全てのサンプルは0.45μm PVDFシリンジフィルターを用いてろ過しました。

結果と考察

溶液中で還元糖は、環状糖がαおよびβアノマー構造で平衡状態に達し変旋光を示します。糖によっては一定の条件下でこれらアノマーが分離するため、1つの糖質に対して2つのピークが存在し同定および定量が難しくなります。図1では酸性条件下および添加剤を使用しない条件下ではスタンダード混合物中還元糖のアノマーが明らかに存在し、5種類の食品糖のベースライン分離が達成できていません。

塩基性移動相モディファイアを使用すると、アノマーが分離せずに1つのピークに溶出して糖質のイオン化効率が向上します。この条件ではよりシンプルなクロマトが得られるためより正確な糖質の同定と定量が可能になります。また、pH上昇により全ての糖の保持が向上します。

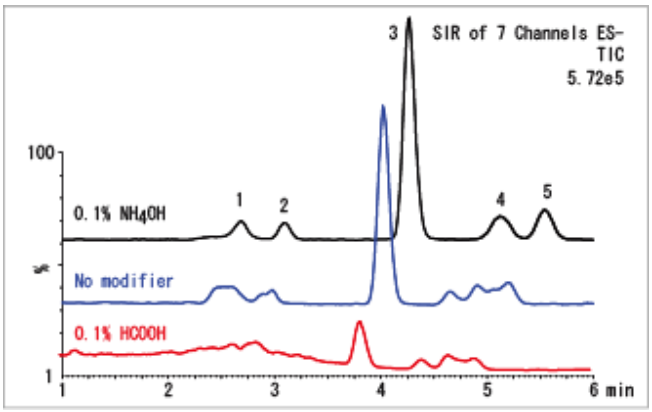

図1 ギ酸添加、モディファイア無添加、アンモニア添加の75/25 ACN/H_2O移動相を用いた糖質のUPLC-MS分析。流速:0.13mL/min、カラム温度:35℃、注入量:0.7μL。各分析種の濃度は10μg/mL in 50/50 ACN/H_2O。カラムサイズは2.1×50mm, 1.7μm。ピーク:(1) fructose (2) glucose (3) sucrose (4) maltose (5) lactose

アセトニトリルの代わりにアセトンを有機溶媒として使用した場合にも、同じ糖質のスタンダード混合物で同様の分離が達成されました(図2)。予測どおりカラムが長くなると分離度も向上しました。代替溶媒が使用できることは2008年度末からのアセトニトリルの不足のような事態の際にも重要で、UPLC-MSによる糖質の分析においての代替案となります。アミノベースのカラムとは異なりシッフ塩基を形成しないため、温度を上昇させることでアノマーを1つのピークに溶出しかつ全体の分離向上を促進することが可能です。図2に示した高温、高pH条件下でもACQUITY UPLC BEH Amideカラムは耐久性が高く、糖質の保持時間の低減は最小限で2000回以上(連続的な試験で8日間)のインジェクションが可能です(データは記載していません)。

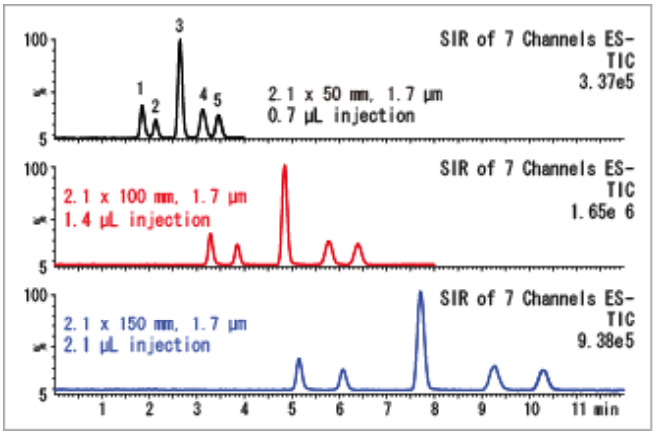

図2 有機溶媒としてアセトンを使用した糖質のUPLC-MS分析。アイソクラティック移動相: 77/23 アセトン/H_2O with 0.05% NH_4OH。流速:0.13mL/min、カラム温度:85℃。カラムサイズおよび注入量は図に記載。サンプルおよびピーク溶出順序は図1と同じ。

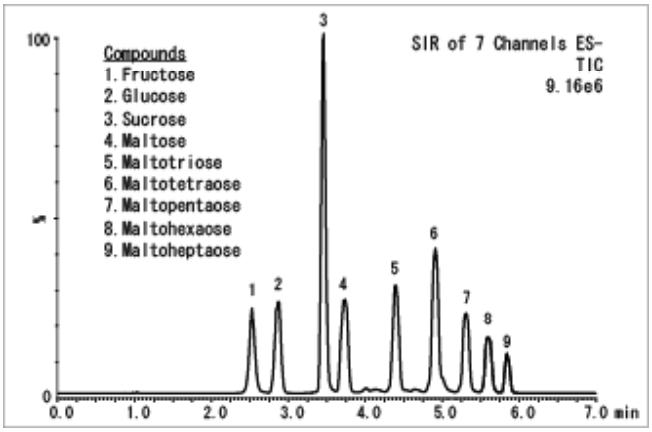

図3 単糖、二糖、オリゴ糖類のUPLC-MS分離。移動相A:80/20 ACN/H_2O with 0.1% NH_4OH。移動相B: 30/70 ACN/H_2O with 0.1% NH_4OH。グラジエント:0-60%B (5分間)、0%に戻して10分間平衡化。流速:0.17mL/min、カラム温度:35℃。

図3には、マルトオリゴ糖を含むより複雑な糖質混合物の分離を示しています。複雑な糖質分析にはグラジエント分析が必要で、この分析はグラジエント条件下で行われました。この条件下ではグラジエントを通じて顕著なベースラインの上昇は見られませんでした。これはアミノカラムやポリアミンカラムで頻繁におこる問題であるMSブリードがBEH Amideカラムでは見られないことを示唆しています。

このメソッドの主要なアプリケーションの1つは市販食品および飲料製品中の糖質分析です。これは原料受け入れ試験、工程内サンプル分析、最終製品の品質管理に適応できます。例えば、ビールは原料の1つとして大麦麦芽を使用して製造されますが、大麦麦芽には多くの単糖類、二糖類、より複雑な多糖類が含まれます。発酵過程で酵母は糖質を消費してアルコールと炭酸ガスに変換するため、最終製品にはマルトースやその他単糖類はほとんどまたは全く含まれません。図4は市販ビールサンプルの食品糖スタンダードに対する比較分析結果を示しています。

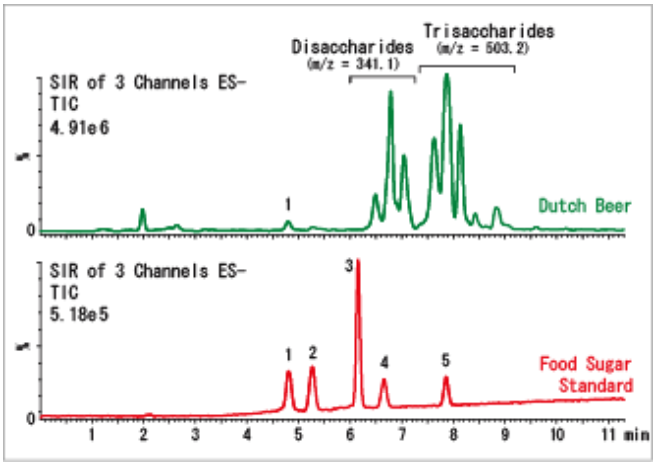

図4 ビール中糖質のUPLC-MS分析。移動相は図3と同じ。グラジエント:10-70%B (10分間)、10%に戻して25分間平衡化。流速:0.13mL/min、カラム温度:35℃、注入量:2µL。各分析種および標準品の濃度は10µg/mL in 50/50 ACN/H_2O。カラムサイズは2.1×100 mm、1.7µm。ピーク:(1) fructose (2) glucose (3) sucrose (4) maltose (5)maltotriose

単糖類だけでなく複雑な多糖類も含まれるためこの分離はグラジエント条件下で行われました。ビールサンプルのUPLC-MS分析から、数多くの二糖類および三糖類の異性体が顕著なレベルで存在することが示されました。多くの単糖（例えばグルコースおよびフルクトース）は検出されませんでしたが、フルクトースは微量に検出されました。この例では、最終飲料製品中での糖同定に対するUPLC-MSの適性を示しています。同じメソッドを原料受け入れ検査や、発酵飲料の工程内サンプル分析にも使用することができます。

多くの市販メープルシロップの比較にもUPLC-MSを使用しました。最終製品の糖質含量に影響する多くの加工技術があります。現在、メープルシロップは不足しており、純メープルシロップの供給不足を補うために、製造業者は“でんぷん”のシロップを添加する可能性があります。5種類の異なるシロップの比較を図5に示しました。図に示すように本物のメープルシロップの主要成分はスクロースです。しかしながら、UPLC-MS分析の結果から全ての市販のシロップが純メープルシロップというわけではなく、甘味を増強し純メープルシロップ供給不足を補うためにコーンシロップ等の“でんぷん”を使用している可能性を示唆しています。“Light syrup”と他のブランドの差異も検出でき、特にオリゴ糖類を含む領域で差が見られました（>4分）。

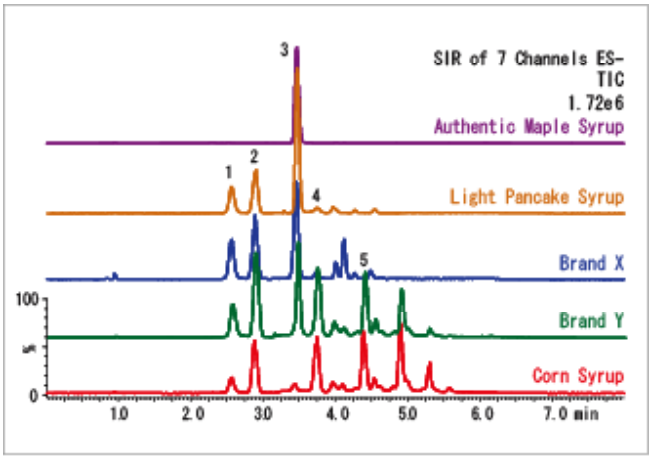

図5　様々なメープルシロップ中糖質のUPLC-MS分析。条件は図3と同じ。
ピーク：(1) fructose (2) glucose (3) sucrose (4) maltose (5)maltotriose

最後に、UPLC-MSを用いて天然甘味料中のステビア関連化合物およびエリスリトール（糖アルコール）の分析を行いました。ステビアは南アメリカおよび中央アメリカ原産の多年生キク科の植物です。ステビアの葉の抽出物は砂糖の甘味度の約300倍で、低炭水化物かつ低糖甘味料の砂糖の代替品として多くの国で使用されています。ステビアの甘味はステビア植物中のステビオールグリコシドによるものです。

最近まで、US FDA（米国食品医薬品局）はステビア化合物の甘味料としての使用を禁止していました。しかし現在その使用禁止措置は撤廃され、多くのステビア関連甘味料が市販されるようになっています。図6には2種類の市販ステビア関連甘味料の比較を示しています。UPLC-MS分析の結果、市販甘味料（ブランドY）には予測されるステビオールグリコシドが含まれていました。
一方のブランドXは主に糖アルコールのエリスリトール（同様に天然甘味料として使用される）により構成されていました。ベースラインの精査によりブランドX製品には、ステビア植物に由来するレバウディオシド A（Reb-A）が少量（<1%）含まれていることが示唆されました。

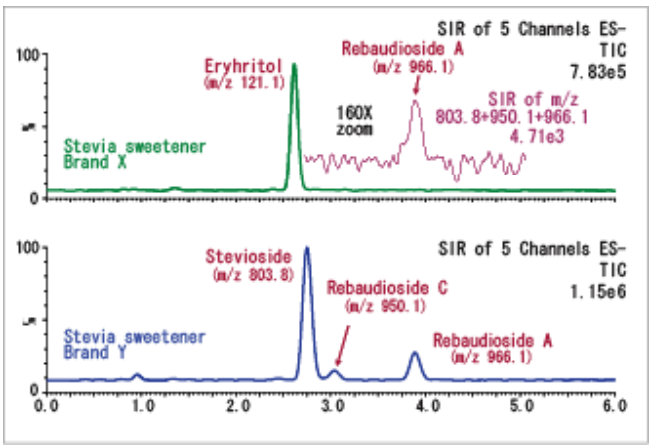

図6　2種類の市販ステビア関連甘味料のUPLC-MS分析。アイソクラティック移動相：77.5/22.5 ACN/H_2O with 0.1% NH_4OH。流速：0.2mL/min、カラム温度：35℃、注入量：1.3μL。ブランドY製品の濃度は50μg/mL in 50/50 ACN/H_2O。ブランドX製品の濃度は10μg/mL in 50/50 ACN/H_2O。カラムサイズは2.1×100 mm、1.7μm。

結論

- ACQUITY UPLC BEH Amideカラムを市販食品・飲料製品中の単糖および複雑な糖質の分離に使用しました。
- 移動相中の高pHモディファイア（アンモニア）の存在によりアノマーが1つのピークに溶出して、クロマトグラフィーがシンプルになりより正確な糖質の定量が可能になります。
- BEH Amideカラムに高pH移動相を使用することで糖質のイオン化効率を向上でき、エレクトロスプレーイオン化質量分析計で誘導体化なしに糖質をそのまま検出可能になります。
- 分離の選択性を変更せずにアセトニトリルの代替としてアセトンを使用できます。
- 市販食品の工程の差異特定や市販飲料中の異なる糖質の分子量確認をUPLC-MSで十分に達成します。
- BEH Amideカラムは天然甘味料の定性をするためのステビオールグリコシドと糖アルコールの分離にも使用できます。

参考文献

1. C.R. Taormina, J.T. Baca, S.A. Asher, J.J. Grabowski, D.N. Finegold, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 18 (2007) 332-336.
2. P. Mauri, M. Minoggio, P. Simonetti, C. Gardana, P. Pietta, Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 743-748.
3. T. Fujimoto, S. Sakuri, A. Tsutsui, K. Furihata, T. Machinami, M. Tashiro, Anal. Sci. 21 (2005) 1245-1247.
4. V.F. Taylor, R.E. March, H.P. Longerich, C.J. Stadey, Int. J. Mass Spetrom. 243 (2005) 71-84.
5. H. Schlichtherle-Cerny, M. Affolter, C. Cerny, Anal. Chem. 75 (2003) 2349-2354.

© 2010 Waters Corporation.
Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY、UPLC、ACQUITY、および MassLynx は、Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001
東京都品川区北品川1-3-12第5八潮ビル
TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011
大阪市淀川区西中島5-14-10カトキチ新大阪ビル11F
TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡