Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

UPLC/RI（示差屈折率検出器）を用いた食品マトリックス中の糖類の分析

Mark E. Benvenuti
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

RI 検出器を接続した UPLC® を使用することで、種々のマトリックス中の糖（フルクトース、グルコース、スクロース、マルトースおよびラクトース）分析において、以下のような利点を得ることができます。

- 分析時間が 3.5 分以下になることによりスループットが向上。
- アイソクラティック条件のため、注入間のカラム平衡化が不要。
- 糖分析において頑健性に優れた UPLC BEH Amide カラムの使用が可能。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム
ACQUITY® RI 検出器
ACQUITY UPLC BEH Amide カラム

キーワード

糖、BEH Amide カラム

はじめに

天然物に由来する糖、又は人工的に添加された糖は様々な食品中から検出されます。フルクトース、グルコースとスクロースは、種々のフルーツジュースにおける重要な構成成分です。マルトースは、コーンや穀物由来の製品から検出されます。乳糖として知られているラクトースは、乳製品中に存在します。これらの糖は、食品中の 5 つの主要な糖として知られています。

これら糖の分析は品質管理において、また、製品の信頼性や不純物混入の確認において重要です。これらの分子は UV 吸収を持たないため、通常 LC 分析では、光散乱 (ELS) や電気化学、RI などの検出器を使用します。多くの研究室では、使用方法が簡単で注入間のカラム平衡化が不要なことから、RI 検出器を使用しています。RI は再現性に優れ、定量において濃度に比例したレスポンスを示します。また、高純度の窒素供給が不要であり経済的なため、工業施設に理想的です。

これらのサンプルの検出に RI 検出器を導入した研究室では、粒子径 2 µm 以下のテクノロジーを利用できる、UPLC に適合した RI 検出器が求められていました。

このアプリケーションノートでは、3.5 分以下の分析時間で、数種の異なる食品マトリックス中の糖類を分析するための、ACQUITY RI 検出器を接続した ACQUITY UPLC H-Class システムの有効性をご紹介します。

図 1. RI 検出器を接続した ACQUITY UPLC H-Class システム

分析条件

LC条件

システム	：ACQUITY UPLC H-Class
分析時間	：3.5 分
カラム	：ACQUITY BEH Amide 2.1 × 50 mm、1.7 µm
カラム温度	：85℃
移動相	：0.05% トリエチルアミン（TEA）含有 77% アセトン水溶液
流速	：0.15 mL/min
注入量	：1.0 µL
検出器	：ACQUITY RI 検出器
データ取り込み	：20 ポイント / 秒
タイムコンスタント	：標準
セル温度	：40℃

標準試料の調製

フルクトース、グルコース、スクロース、マルトースおよびラクトースのストック溶液は、各糖を水に～ 1 g 溶解させ、水で 100 mL に希釈し調製しました。このストック溶液を 50% アセトニトリル水溶液で希釈し、表 1 に示す 6 つの濃度の標準試料を調製しました。

サンプルの調製

固形分を除去するために、オレンジ、白ブドウとパイナップルジュースの各サンプルを 4000 rpm で 30 分間遠心分離にかけました。上澄みを 50% アセトニトリル水溶液で 5 倍希釈し、注入試料としました。

コーンシロップは 1.024 g を水に溶解し、50 mL に希釈しました。この溶液 500 µL を等量の 50% アセトニトリル水溶液で希釈し、注入試料としました。

低脂肪乳サンプルは、50% アセトニトリル水溶液で 10 倍に希釈し、脂質を沈殿させるために 4000 rpm で 30 分間遠心分離にかけました。上澄みの分画を集め、注入試料としました。

Std	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Lactose
1.0	6505.0	5125.0	5110.0	5065.0	5165.0
2.0	2602.0	2050.0	2044.0	2026.0	2066.0
3.0	1301.0	1025.0	1022.0	1013.0	1033.0
4.0	650.5	512.5	511.0	506.5	516.5
5.0	520.4	410.0	408.8	405.2	413.2
6.0	260.2	205.0	204.4	202.6	206.6

表 1. 糖の混合標準試料の濃度 (ppm(mg/kg))

結果および考察

6 種の濃度の混合標準溶液のクロマトグラムを図 2 に示します。全ての対象成分が 3.5 分以内に溶出しています。図 3 は各糖についての検量線を示しており、全ての化合物で決定係数は 0.999 以上となりました。

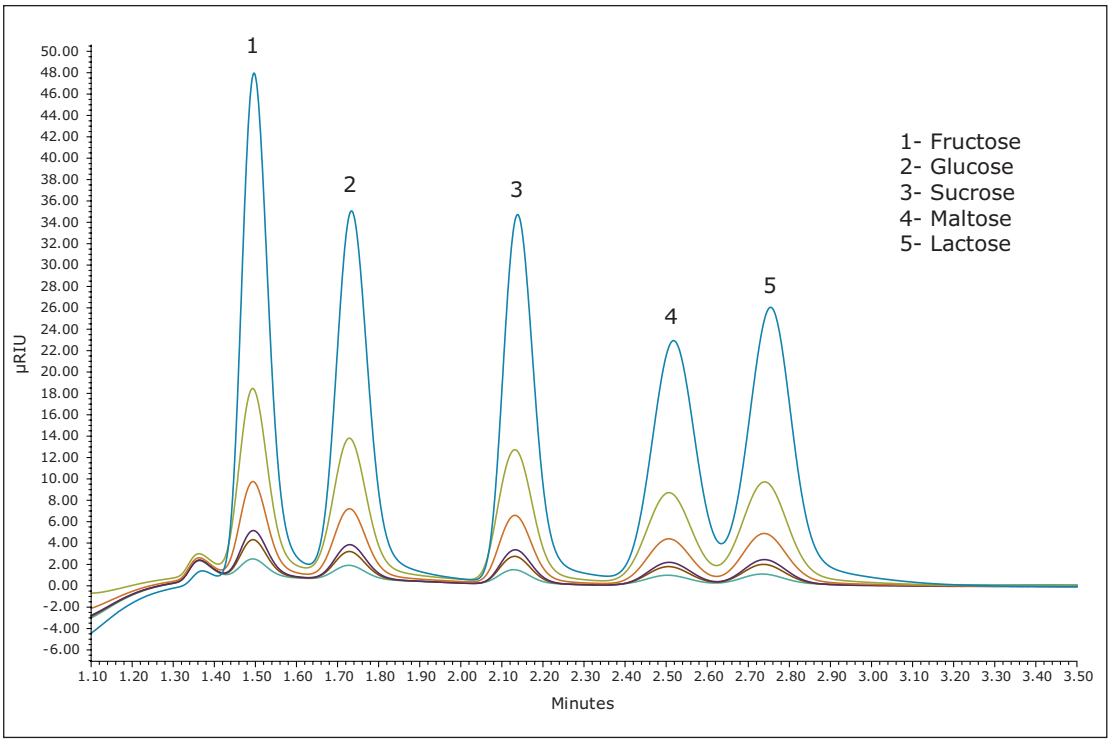

図 2. 6 種の異なる濃度の標準試料における重ねがきクロマトグラム

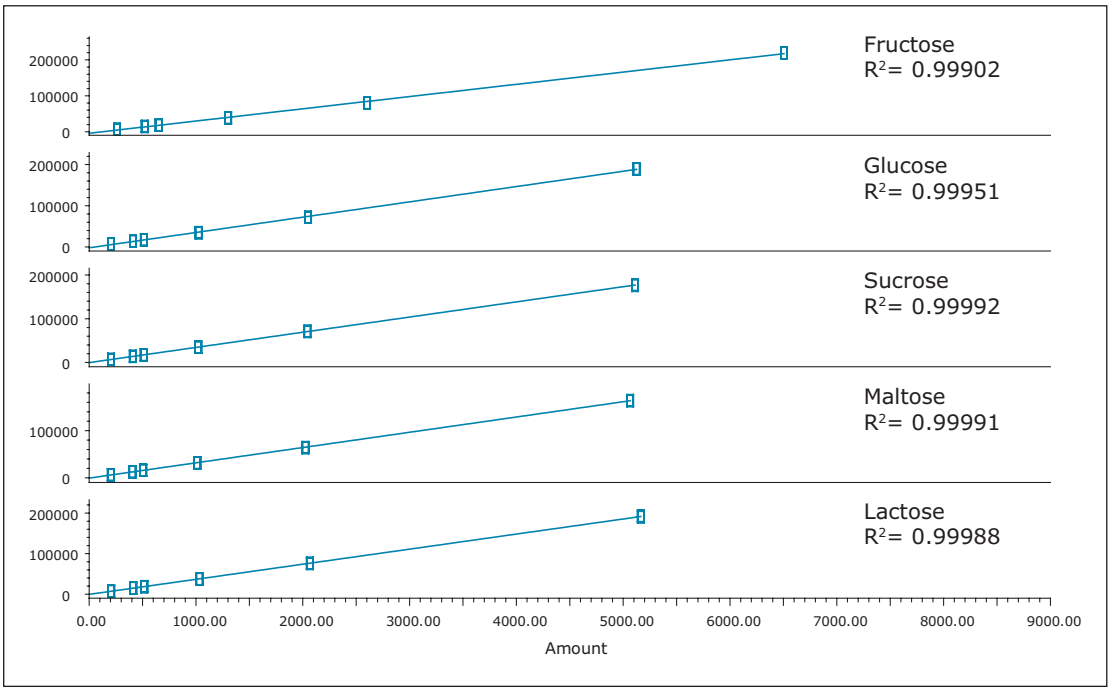

図 3. 5 種類の糖の検量線プロット

フルーツジュース中の糖類の定量分析条件の有用性を評価するために行った、3 種のフルーツジュースサンプルの分析結果を図 4 に示します。それぞれのジュースの糖含量と組成の違いが、顕著に現れました。白ブドウジュースにはフルクトースとグルコースが含まれていますが、スクロースは検出されませんでした。この結果は文献と一致しています。保持時間と濃度の再現性を評価するため、各ジュースの 3 回注入結果を表 2 に示します。全ての成分において、保持時間および濃度の %RSD はそれぞれ 0.11% および 1.25% 以下となりました。

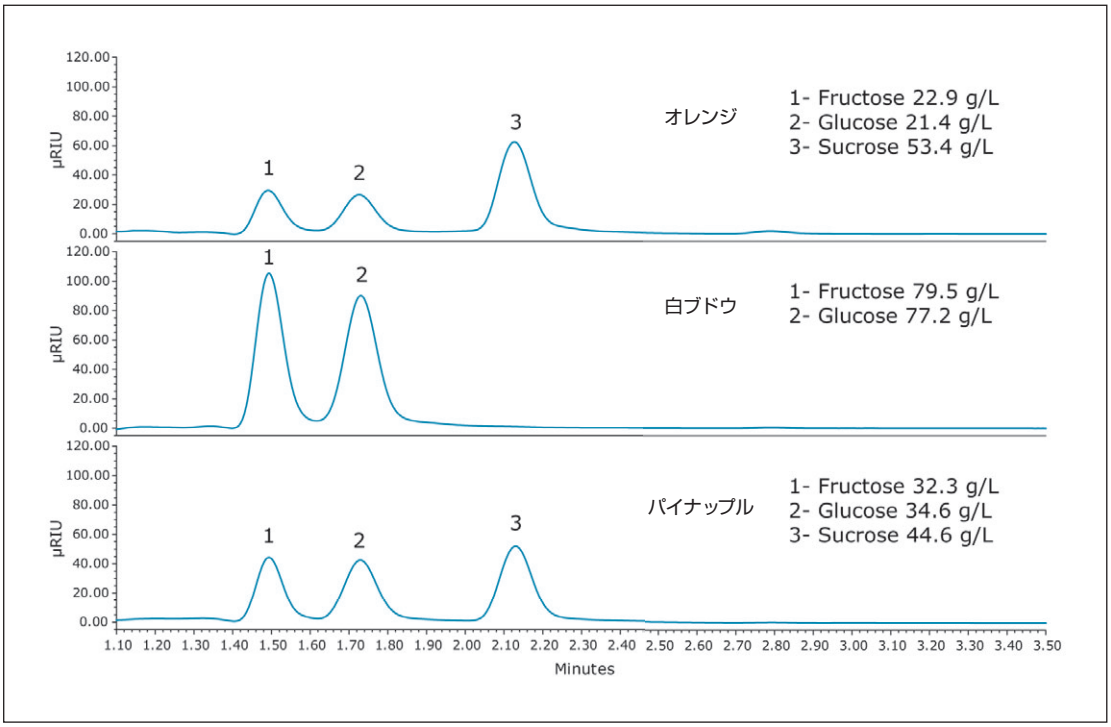

図 4. オレンジジュース、白ブドウジュースおよびパイナップルジュースのクロマトグラム

Sugar	オレンジ		白ブドウ		パイナップル	
	RT	Amount	RT	Amount	RT	Amount
Fructose	0.104	1.218	0.048	0.365	0.066	0.371
Glucose	0.038	0.827	0.035	0.659	0.049	0.321
Sucrose	0.035	0.588	N/A	N/A	0.043	0.429

表 2. 各ジュースサンプルの 3 回注入時の保持時間および含量の相対標準偏差 (%RSD)

コーンシロップと低脂肪乳のクロマトグラムを図 5 および 6 に示します。これらのサンプルは、フルーツジュースサンプルと比較し、かなり異なるクロマトグラム形状を示しました。市販のコーンシロップサンプルは図 5 に示すように、グルコースとマルトースを主成分としています。コーンスターチがグルコースを酵素的にフルクトースに変換した、フルクトース含量が多いコーンシロップと異なり、このサンプルはまだ高濃度のマルトース含量を維持していました。ラクトースは乳製品より検出される糖であり、図 6 の乳サンプルのクロマトグラムでも確認できます。

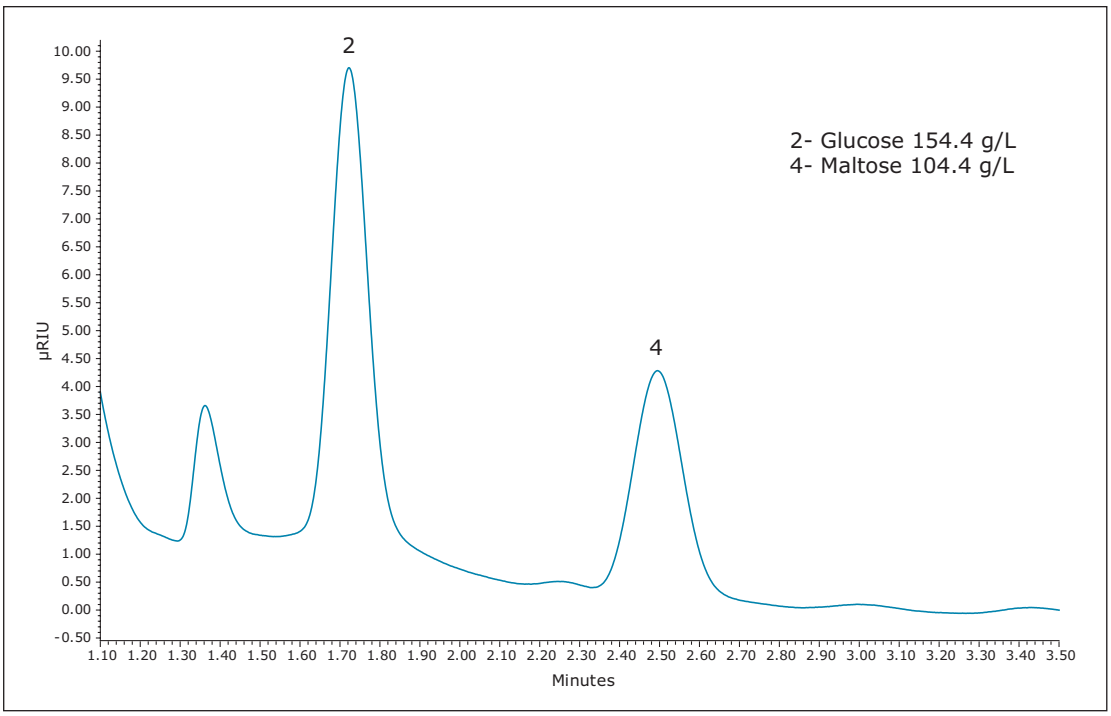

図 5. グルコースとマルトースの濃度を定量したコーンシロップのクロマトグラム

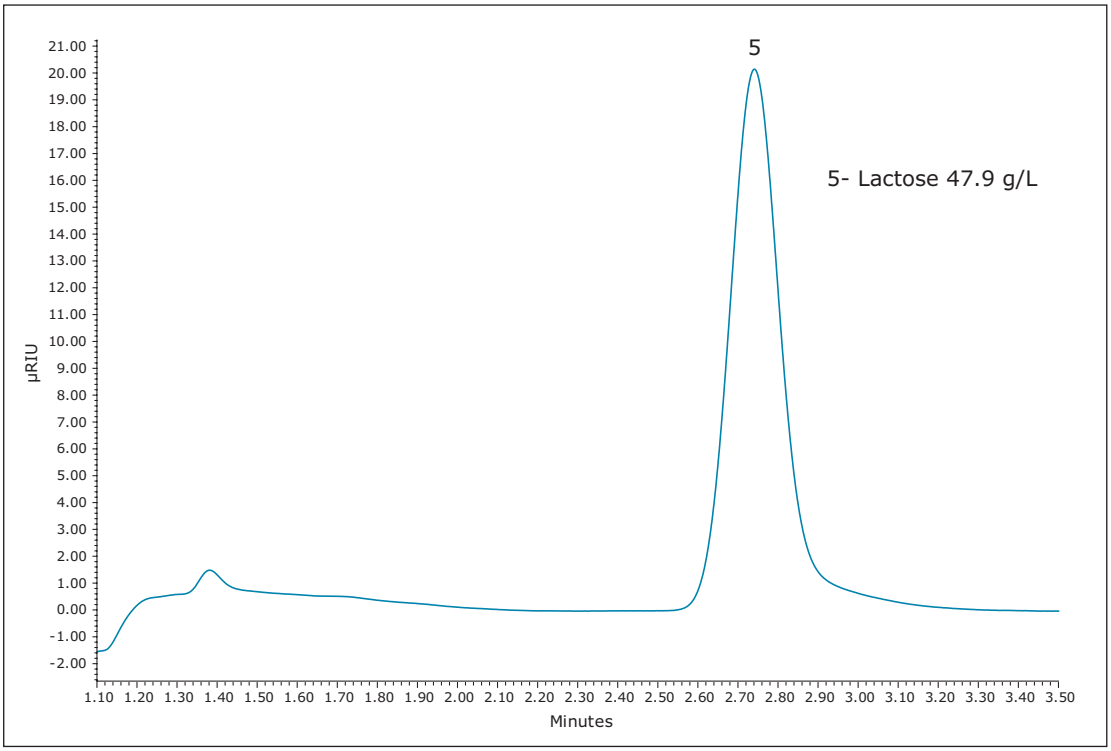

図 6. ラクトースを検出した低脂肪乳のクロマトグラム

UPLC テクノロジー は、3.5 分未満の分析時間で、高効率および迅速な糖分離を可能にします。塩基性移動相条件かつ高いカラム温度を使用することができる BEH Amide カラムを使用することで、ピーク形状や定量性を向上させることができます。システムボリュームの小さい ACQUITY RI 検出器 は拡散が少なく、UPLC の鋭いピークに最適な検出器といえます。また、糖分析においてより信頼できる定量結果を得るための安定したベースラインのパフォーマンスを供給します。

まとめ

このアプリケーションノートでは、糖分析のための高速アイソクラティック条件を紹介しています。RI 検出器を接続した ACQUITY UPLC H-Class システムにより、以下の利点を得ることができます。

- カラム平衡化が不要なため、分析時間が短縮
- 分析時間の短縮に伴うスループットの向上
- 低流速により、溶媒コストおよび廃液にかかるコストを低減

Reference

1. Sanz *et al*. Inositols and Carbohydrates in Different Fresh Fruit Juices. *Food Chemistry*. 2004; 87: 326.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル 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 サムティ新大阪フロントビル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 札幌

Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY、UPLC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
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。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan. 2013年8月 720004677JA PDF