Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY UPLC H-Class システム及び ACQUITY QDa 検出器を用いたさまざまな食品中に含まれる甘味料の高速一斉分析

Mark Benvenuti, Dimple Shah, and Jennifer A. Burgess
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- ACQUITY QDa® 検出器を用いることで一回の注入により甘味料の同時分析が可能
- 天然甘味料、人工甘味料、非栄養性甘味料が 10 分以内に定量可能
- 共溶出する化合物について十分な化合物情報が得られる直交性を兼ね備えた MS 検出器
- ACQUITY QDa 検出器を用いることで UV 吸収をもたない人工甘味料に対し、感度および選択性を付与

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

ACQUITY QDa 検出器

MassLynx® MS ソフトウエア

キーワード

アスパルテーム、サッカリン、レバウジオシド、ステビオシド、ステビア、アセスルファーム K、ネオテーム、スクラロース、QDa

はじめに

砂糖はその甘味で有名であり、味わいを高めるために製品製造時に添加されます。砂糖の過剰摂取は健康に悪影響を及ぼすため、食品および飲料製品には非栄養性甘味料が広く用いられています。例えば、ソフトドリンク、卓上甘味料、チョコレート、乳製品など、「ダイエット食品」と呼ばれるほとんどのものに含まれています。多くの場合、これらの製品に全体的な甘さを付与するため、さまざまな甘味料と組み合わせて用いられています。アスパルテーム、サッカリン、アセスルファーム K、ネオテームおよびスクラロースはアメリカ合衆国の FDA[1] により認可されています。レバウジオシド A 及びステビオシドのような化合物は南アメリカステビア植物に起源があり、甘味料としてアメリカ合衆国でよりポピュラーになっています。2010 年に欧州食品安全機関（EFSA）では甘味料としてステビオシドの使用を認可しています。

欧州連合（EU）の指令 94/35/EC は 4 つの改正（96/83/EC、2003/115/EC、2006/52/EC および 2009/163/EU）に沿って特定のタイプの食品について甘味料の濃度を規制しています。EU 委員会規則 1129/2011 リストにはさまざまな食品における許容される人工甘味料の最大濃度を記載しています。従って、食品中の甘味料の含有量を決めることは製品品質の一貫性を確保するために重要です。

甘味料の分析に用いられる最も一般的な方法は HPLC 法であり、検出には UV が用いられます。このシステムではアセスルファーム K、アスパルテーム、サッカリン、ネオテームなどの検出は可能ですが、UV 吸収をもたないサイクラミン酸、スクラロースは分析ができません。MS 検出器を用いることで全ての甘味料を 1 つの方法で分析することが可能になります。ウォーターズの ACQUITY QDa 検出器を用いることで、食品および飲料に携わる科学者が既存のクロマトグラフィーワークフローに MS 検出器を取り入れることが可能です。ACQUITY QDa 検出器は甘味料を 1 回の分析で行うだけでなく、化合物のアサインが容易になり、全ての化合物をベースライン分離する必要がなくなります。

Waters® UPLC® H-Class システムと ACQUITY QDa 検出器を組み合わせて用いることで、食品および飲料メーカーは、1 回の分析で製品中に含まれる甘味料の同定及び定量を効率よく行うことができます。

本アプリケーションノートでは食品及び飲料サンプルを用いて甘味料の分析を行い、高速で信頼性及び高感度を有するメソッドを紹介しています。

実験

UPLC 条件

UPLC システム	ACQUITY UPLC H-Class
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 × 100 mm
カラム温度	40 ℃
注入量	2 µL
流速	0.4 mL/min
移動相 A	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B	0.1% ギ酸含有アセトニトリル
洗浄溶媒	50/50　水 / メタノール (v/v)
パージ溶媒	10/90　アセトニトリル / 水 (v/v)
シール洗浄	10/90　アセトニトリル / 水 (v/v)

表 1. 甘味料分析の UPLC グラジエント

Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.4	90	10	6
1.0	0.4	90	10	6
4.0	0.4	40	60	6
5.0	0.4	40	60	6
5.1	0.4	0	100	6
6.1	0.4	0	100	6
6.2	0.4	90	10	6
9.5	0.4	90	10	6

検出器条件

検出器 1	ACQUITY UPLC PDA
波長	取り込み波長　210 ～ 400 nm
解析波長	214 nm 及び 254 nm
ポイント数	10 ポイント / 秒
検出器 2	ACQUITY QDa
イオン化モード	ESI-
プローブ温度	500 ℃
キャピラリー電圧	0.6 kV
サンプリングレート	5 ポイント / 秒
モード	フルスキャン *m/z* 150 ～ 1000 (セントロイド)
コーン電圧	5 ～ 40 V（ランプ機能使用）
SIR チャンネル	表 2 参照

標準溶液調製

各甘味料のストック溶液は、水を用いて調製しました。さらに水にて希釈を行い 0.04 ～ 30 mg/L の溶液を調製しました。

サンプル調製

本検討では全 7 種類のサンプルの分析を行いました。サンプルは市販のものを購入し用いました。サンプルはそれぞれ 2 種の飲料（ダイエットコーラおよびダイエット紅茶）、卓上甘味料 2 種、既製品のプリン、キャンディー、ダイエットマーマレードです。

卓上甘味料（1 g 以下）を 100 mL の水に溶解した溶液、さらに 20 倍及び 10 倍に希釈した溶液をそれぞれ調製しました。希釈レベルが異なる 3 種の溶液はサンプル中に含まれる濃度の異なる甘味料を分析するために用いました。

キャンディー（5.281 g）とプリン（1.244 g）はそれぞれ 100 mL の水に溶解した溶液、さらに 10 倍希釈した溶液を注入溶液としました。

マーマレード（1.432 g）については 100 mL の水に溶解し注入溶液としました。

飲料については 0.22 µm の PVDF フィルターを用いてろ過後、水を用いて 20 倍希釈したものを注入溶液としました。

結果および考察

今回の検討に用いた 8 種の甘味料の構造式を図 1 に示しています。これらの甘味料は逆相分析用カラムで分離を行い、ACQUITY QDa 検出器を用いて分離を行いました。それぞれの甘味料の保持時間、選択的イオンモニタリング（SIR）質量電荷比（*m/z*）及びコーン電圧を表 2 に示しています。

表 2. 甘味料の保持時間、SIR m/z 及びコーン電圧

Compounds	SIR *m/z*	Cone Voltage (V)	RT (min)
Acesulfame K	162.0	12	1.04
Aspertame	293.0	12	3.20
Cyclamate	178.0	24	1.77
Neotame	377.0	15	4.43
Rebaudioside A	965.5	28	4.11
Saccharin	182.0	24	1.34
Stevioside	803.3	24	4.14
Sucralose	395	20	3.20

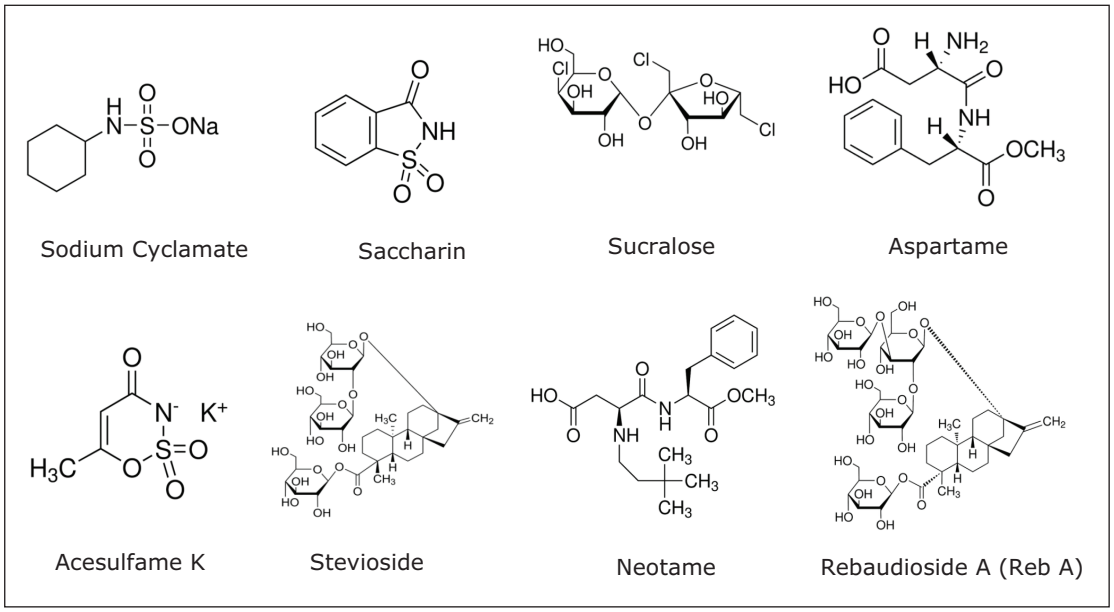

図 1. 分析を行った甘味料の化学構造式

図 2 に各甘味料標準溶液の SIR クロマトグラムを示しています。図 2 の結果より 2 組が共溶出しています。

アスパルテーム（保持時間 3.2 分）とスクラロース（保持時間 3.2 分）、レバウジオシド A（保持時間 4.11 分）とステビオシド（保持時間 4.14 分）が共溶出していますが、アスパルテーム（*m/z* 293）とスクラロース（*m/z* 395）は質量が異なるため MS 検出による化合物の分離が可能です。同様にレバウジオシド A（*m/z* 965.5）とステビオシド（*m/z* 803.3）も共溶出していますが、ACQUITY QDa 検出器を用いることで個々に検出可能です。

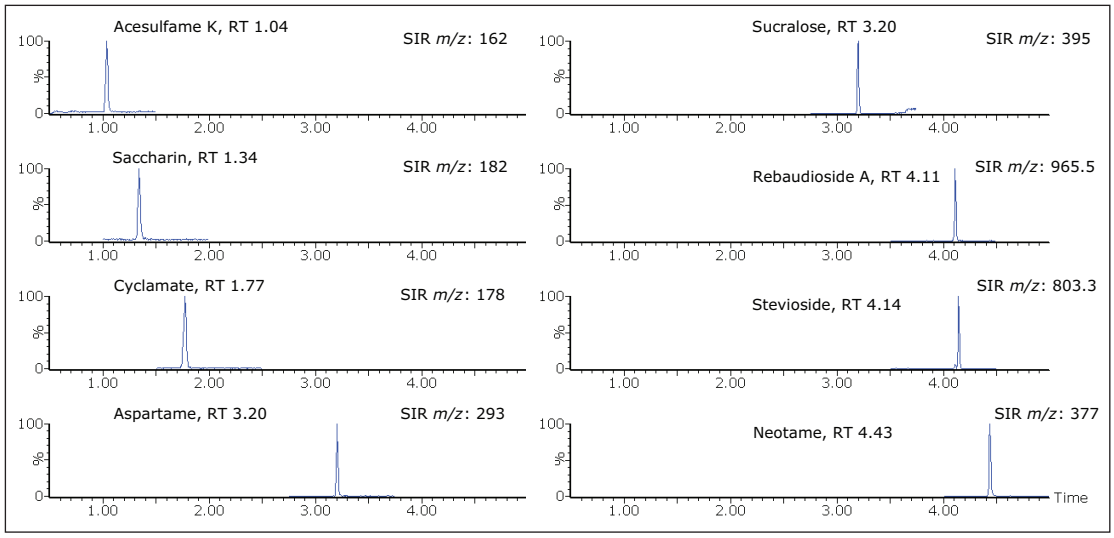

図 2. 全甘味料の標準溶液 SIR クロマトグラム

共溶出している 2 つの甘味料について図 3 に検量線を示しています。これらの化合物はクロマトグラムでは分離していませんが、MS 検出を用いることで選択的に正確な定量が可能になります。MS 検出により化合物を識別することで、時間のかかるメソッド開発や共溶出している化合物をベースライン分離するために最適化を行う手間を省くことができます。

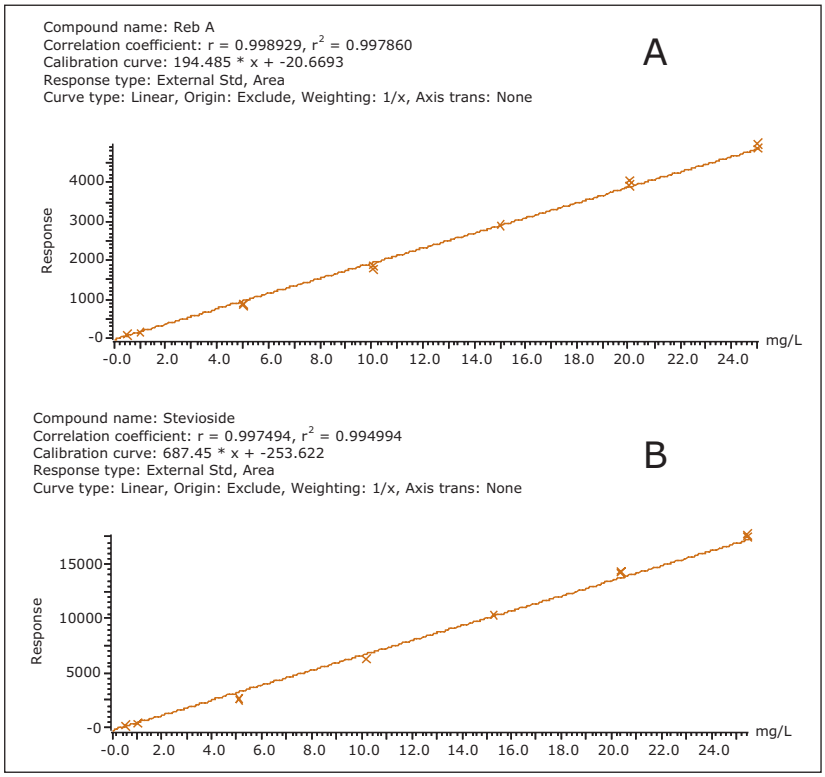

図 3. 共溶出している化合物の検量線（A：レバウジオシド　B：ステビオシド）

構造的に UV 吸収をもたないため、UV 検出ができない甘味料についても MS 検出を用いることで分析が可能になります。サイクラミン酸及びスクラロースは UV 吸収がありませんが、ACQUITY QDa 検出器を用いることで容易に検出可能です。図 4 にサイクラミン酸（保持時間 1.77 分）及びスクラロース（保持時間 3.2 分）の 5 mg/L 溶液について、254 nm における UV クロマトグラム及び SIR クロマトグラムを示しました。

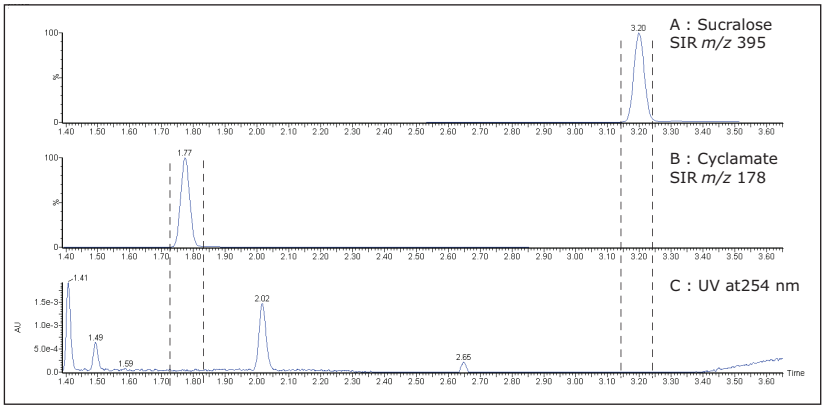

図 4. 5 mg/L の標準混合溶液の SIR クロマトグラム（A：スクラロース B：サイクラミン酸）及び 254 nm における UV クロマトグラム（C）

それぞれの甘味料について直線性を確認したところ決定係数 (R^2) はいずれの化合物についても> 0.994 でした。表 3 に本検討における甘味料の濃度範囲と R^2 値を示しています。

表 3. 8 種の甘味料の検量線範囲及び決定係数 (R2) 値

Sweeteners	Conc. range (mg/L)	Correlation coefficient R^2
Acesulfame K	0.04 - 4	0.999
Aspartame	0.5 - 25	0.996
Cyclamate	0.5 - 25	0.998
Neotame	0.4 - 25	0.998
Rebaudioside A	0.5 - 25	0.997
Saccharin	0.05 - 3	0.999
Stevioside	0.5 - 26	0.994
Sucralose	0.5 - 30	0.999

サンプル分析

7 種のサンプルは前述の通り調製し、2 回ずつ分析を行いました。表 4 には全 7 種のサンプルの定量結果を示しています。1 つめの卓上甘味料中にはアセスルファーム K が 98 mg/kg、アスパルテーム 15,080 mg/kg、サッカリンが 3798 mg/kg が配合されていました。2 つめの卓上甘味料はレバウジオシド A3105 mg/kg、ステビオシド 630 mg/kg が配合されていました。共溶出している片方の化合物の強度が小さく、含有されていることが分かりませんでしたが、MS 検出を用いることで選択性及び感度が向上し、共溶出している化合物双方がサンプル中に含まれていることを容易に明らかにすることが可能です。図 5 には標準溶液及び 2 つめの卓上甘味料中に含まれるレバウジオシド A 及びステビオシドの SIR クロマトグラムを示しています。

アスパルテームはダイエットコーラおよびダイエット紅茶中に 30 mg/L 及び 489 mg/L の濃度で含まれていました。スクラロースはキャンディー中に 145 mg/kg、マーマレード中に 297 mg/kg 含まれていました。マーマレード中に含まれるスクラロースの量は欧州委員会の規定 1129/2011 の範囲内であることが確認できました。

表 4. 7 種サンプルの定量結果

Sample	Acesulfame K	Aspartame	Rebaudioside A	Saccharin	Stevioside	Sucralose	Unit
Diet cola	30	480	–	–	–	–	mg/L
Candy	–	–	–	–	–	145	mg/kg
Diet tea	–	379	–	–	–	–	mg/L
Marmalade	–	–	–	–	–	297	mg/kg
Pudding	208	–	–	–	-	168	mg/kg
Table-top sweetener 1	98	15080	–	3798	–	–	mg/kg
Table-top sweetener 2	–	–	31050	–	630	–	mg/kg

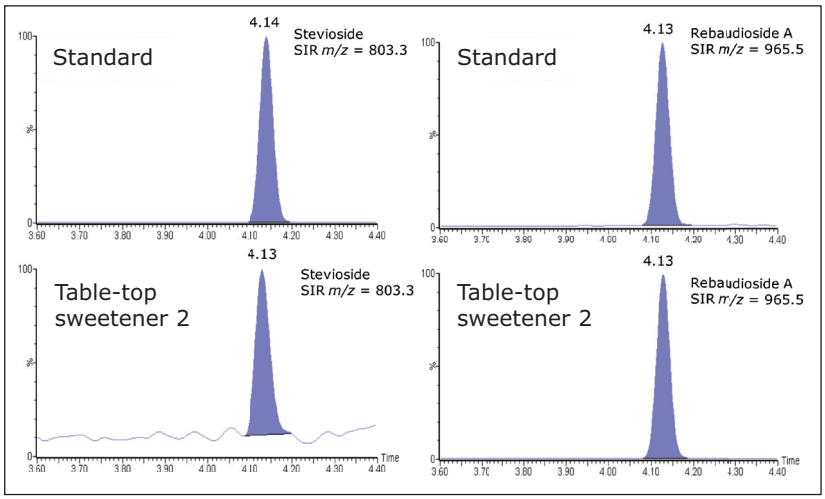

図 5. 標準溶液及びサンプル (卓上甘味料 2) のステビオシド及びレバウジオシド A の SIR クロマトグラム

結論

本アプリケーションノートでは天然甘味料、人工甘味料、非栄養性甘味料について、ACQUITY UPLC H-Class システムおよび ACQUITY QDa 検出器を用いて、分離・検出・定量を行いました。

ACQUITY QDa 検出器は UV 吸収をもつ化合物、UV 吸収をもたない化合物どちらも 1 回の分析で測定することが可能であり、UV 検出器がある場合、ない場合のどちらでも既存のワークフローに容易に組み込むことが可能です。MS 検出は検出器の選択性を向上させ、異なる質量の化合物の場合にはベースライン分離する必要がなくなります。メソッド開発にかかる時間を省力化し、分離の確認のために個々のスタンダードを注入する必要もなくなります。

参考文献

1. D J Yang, B Chen. Simultaneous determination of non-nutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. *J Agric Food Chem.* 57(8): 3022-3027, 2009.

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 富山

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC、MassLynx、QDa 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。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan. 2014年6月 720005017JA PDF