[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY Arc システムを用いた飲料分析

Mark Benvenuti and Jennifer Burgess
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

ACQUITY® Arc™ システム、Waters® 飲料分析移動相キット、XBridge® Phenyl カラム、ウォーターズの飲料分析スタンダードキットまたは Waters Big-4 Calibration Stock Standard を用いた飲料分析では、以下のメリットがあります。

- エタノールベースの環境にやさしい移動相
- 飲料に一般的に含まれる低濃度の成分の分析に適した一点検量、栄養ドリンクのように高濃度のカフェインを含みサッカリンやアスパルテームを含まない試料の分析に適した多点検量に対応
- 同時溶出する既知化合物の影響を避けるための 2 波長取り込み
- 9500 psi の耐圧があるシステム、充填剤の粒子径 2.5 µm のカラムを使用
- HPLC と UHPLC の分離を再現するデュアルフローパス

ウォーターズのソリューション

ACQUITY Arc システム、
2489 紫外可視光 (UV/Vis) 検出器、
ACQUITY QDa® 検出器、
XBridge Phenyl ***XP*** カラム、
飲料分析移動相キット、
飲料分析スタンダードキット

キーワード

清涼飲料、LC、非栄養性甘味料、
アセスルファムカリウム、サッカリン、
カフェイン、アスパルテーム、
安息香酸エステル、ソルビン酸塩、飲料

はじめに

飲料の市場は、多くの食品・飲料メーカーが注目しています。飲料には、炭酸飲料、栄養ドリンク、近年注目されているビタミン飲料やお茶のような健康飲料が含まれます。

このような製品は興奮剤としてカフェイン、保存料として安息香酸エステル・ソルビン酸塩、またアセスルファムカリウム・アスパルテーム・サッカリンなどの非栄養性甘味料を含みます。

品質管理では、特定の濃度範囲での分析が重要になります。本アプリケーションノートでは、ウォーターズの ACQUITY Arc™ システム、XBridge Phenyl ***XP*** カラム、飲料分析移動相キットを用い、これらの化合物を 10 分以内に分析できることをご紹介します。

図 1. ACQUITY Arc システム

実験条件

LC条件

LC システム：　ACQUITY Arc

分析時間：　10.0 分

カラム：　XBridge Phenyl ***XP*** 2.5 µm、4.6 × 50 mm

カラム温度：　35℃

移動相：　Waters 飲料分析移動相キット

流量：　1.0 mL / 分

流路：　パス 1（HPLC モード）

注入量：　5 µL

検出器：　2489 紫外可視（UV/Vis）検出器

検出波長：　214、247 nm

標準品の調製

A：飲料分析スタンダード（一点検量）

ウォーターズ　飲料分析　5 成分スタンダード溶液 製品番号 186006008 を、ウォーターズ　飲料分析スタンダード固体（アスパルテーム）製品番号 186006010 に添加し、アスパルテームが溶解するまで撹拌しました。この操作により、150 mg/L アセスルファムカリウム、100 mg/L サッカリン、200 mg/L 安息香酸エステル、100 mg/L ソルビン酸塩、100 mg/mL カフェイン、500 mg/mL アスパルテームの混合標準品が調製されます。

Std	Big 4 analytes (mg/L)
1	500
2	400
3	200
4	100
5	50
6	40
7	20
8	10

表 1.　Big-4 の成分：アセスルファムカリウム、安息香酸エステル、ソルビン酸、カフェインの標準品の濃度

B：標準溶液（多点検量）

Waters Big-4 Calibration Stock Standard 製品番号 186007980（1000 mg/mL アセスルファムカリウム、安息香酸エステル、ソルビン酸塩、カフェイン）を水にて表 1 の 8 段階の濃度に希釈しました。

飲料サンプル調製

炭酸飲料は超音波洗浄機を使用して炭酸を除去しました。全ての飲料は 0.2 µm PVDF フィルターでろ過後に注入溶液としました。

結果および考察

ACQUITY Arc システムに XBridge Phenyl ***XP*** カラムを接続して飲料の標準品を分析したクロマトグラムを図 2 に掲載しました。分析の目的に応じて、二通りの検量線を作成しました。 図 2A は、Waters 飲料分析スタンダードのクロマトグラムで、溶出順にアセスルファムカリウム、サッカリン、安息香酸エステル、ソルビン酸塩、カフェイン、アスパルテームが含まれます。各成分は UV の吸収極大が異なるため、ピーク高さの比は波長によって異なりますが 2489 検出器では、一度の分析で 2 波長同時取り込みが可能です。図 2A と図 2B には 214 nm と 247 nm のクロマトグラムを掲載しました。図 2B は Big-4 Standard のクロマトグラムで、Waters 飲料分析スタンダードに含まれる成分のうち、サッカリンとアスパルテームを除いた成分が含まれます。これらの甘味料を含まない飲料の分析には、この 2 成分は不要です。

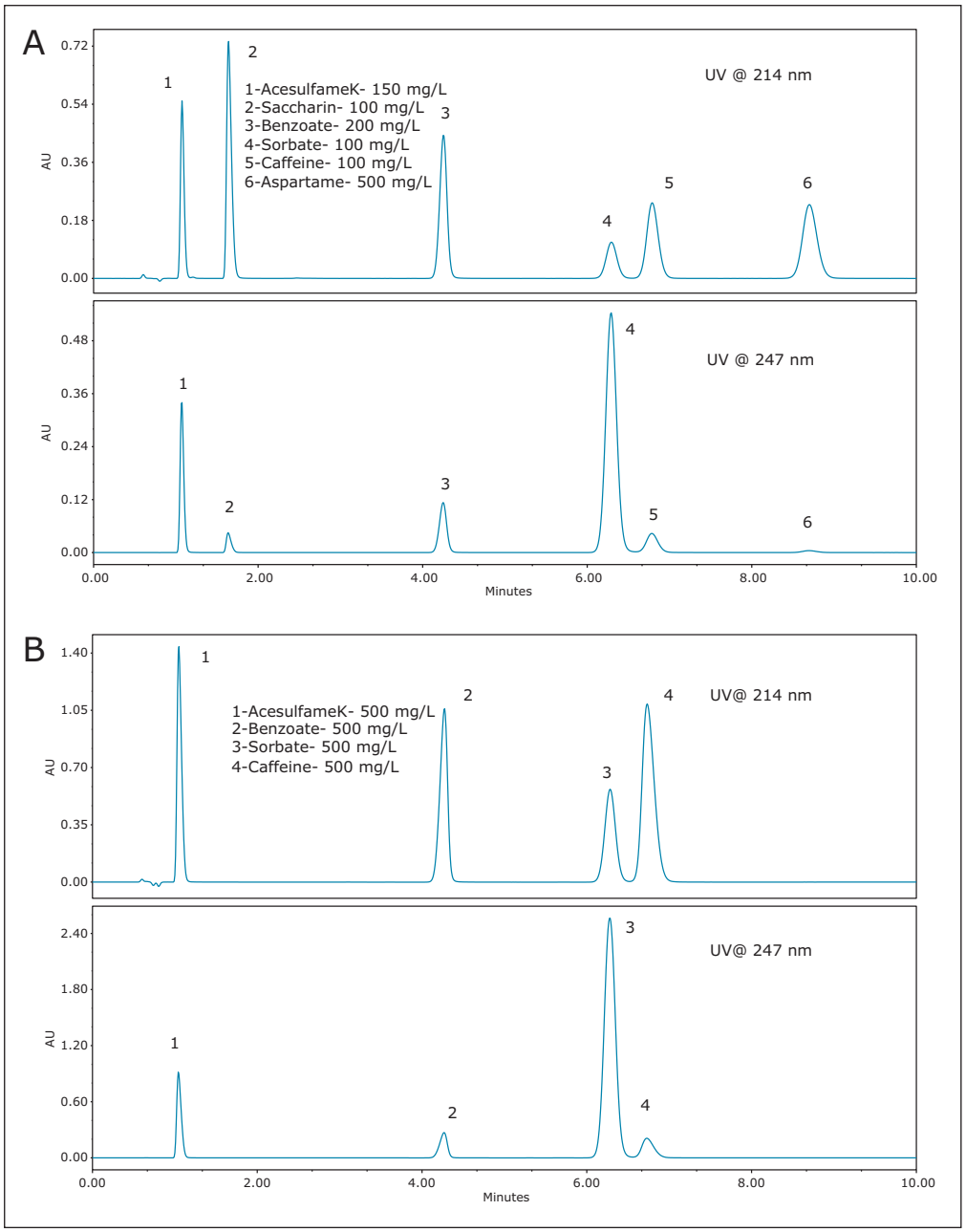

図 2A. 飲料分析スタンダードのクロマトグラム
図 2B. Waters Big-4 Beverage Standard のクロマトグラム

市販の飲料 5 種類を用いて、分析条件を検証しました。結果を図 3 ～ 7 に掲載します。炭酸飲料の例としてダイエットコーラ（図 3）、サイダー（図 4）があります。それぞれに含まれる各成分濃度を、2 波長の検量線を用いて算出しました。いずれも全成分について 4%以内で合致します。図 3 ～ 7 に記載の濃度は一点検量で算出しました。

近年販売されるようになった清涼飲料には栄養成分や添加物が含まれています。例えば、必須栄養素や抗酸化剤、植物の抽出物が挙げられます。図 5、6、7 に例を示します。図 5 はダイエットビタミン飲料、図 6 はダイエット栄養ドリンクです。どちらのサンプルも、2 波長における定量結果は、アセスルファムカリウムを除いて合致します（2.1% 以内）。ダイエットレモンティー（図 7）では二波長における定量結果はアセスルファムカリウムも含めて 3.4% 以内で合致しました。

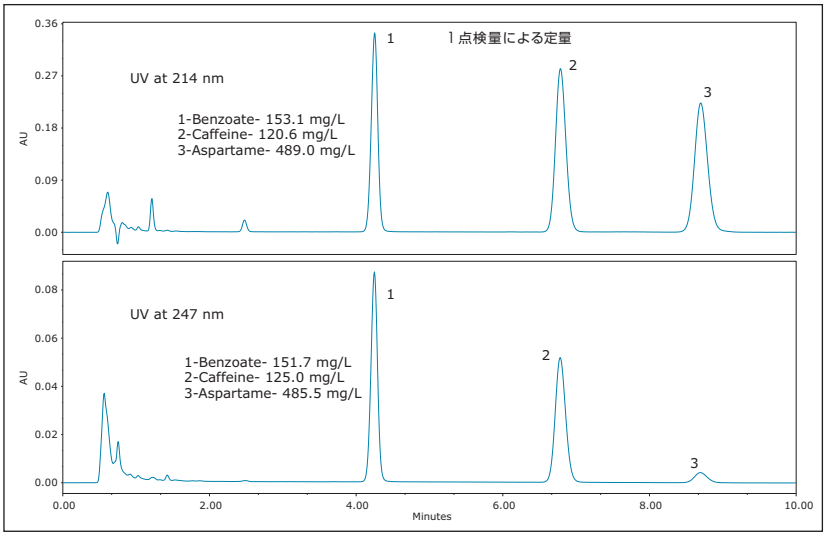

図 3. ダイエットコーラのクロマトグラム

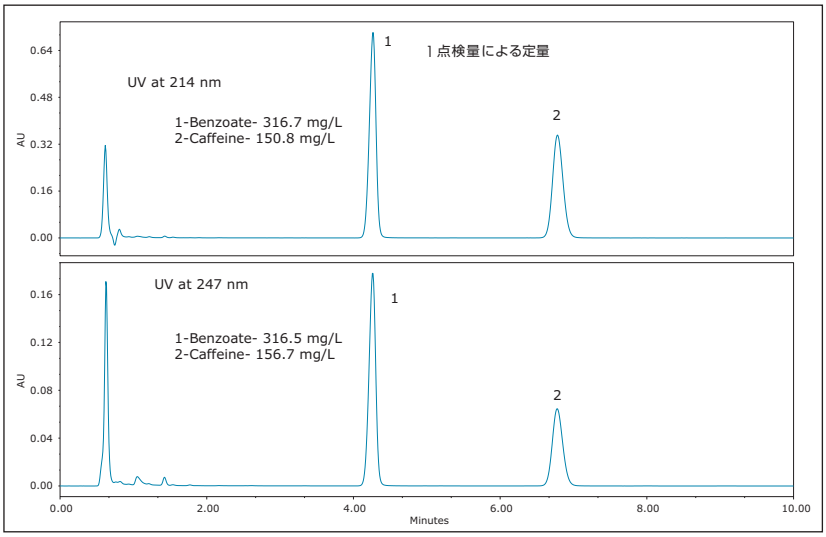

図 4. サイダーのクロマトグラム

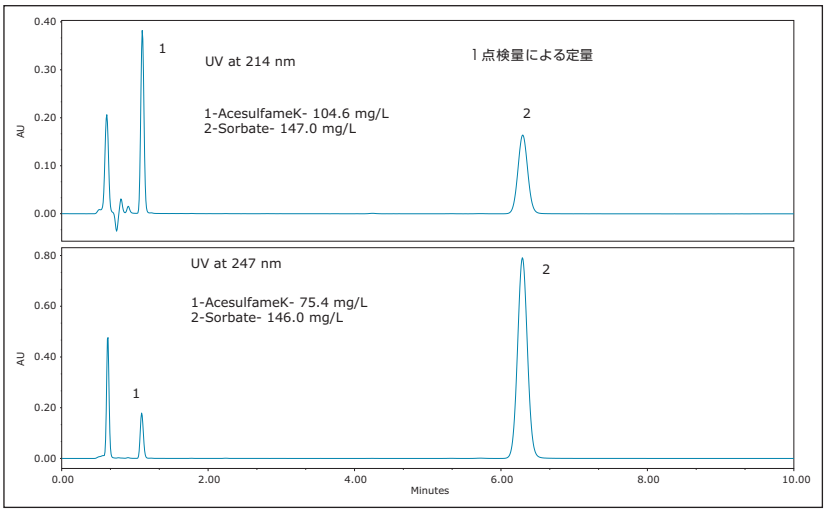

図 5. ダイエットビタミン飲料のクロマトグラム

ダイエットビタミン飲料とダイエット栄養ドリンクにおけるアセスルファムカリウムの定量値の違いについて考察したところ、これらには他の清涼飲料には含まれないビタミン B を含むことがわかりました。化合物の質量測定が可能な ACQUITY QDa 検出器を用いた分析により、ビタミン B がアセスルファムカリウムに近接して溶出していることがわかりました。図 8 にビタミン飲料中に含まれるアセスルファムカリウムの 214 nm でのクロマトグラムと、ACQUITY QDa で取得した各ビタミン B の *m/z* でのマスクロマトグラムを示しました。ビタミン B6 がアセスルファムカリウムと同時溶出していることがわかります。

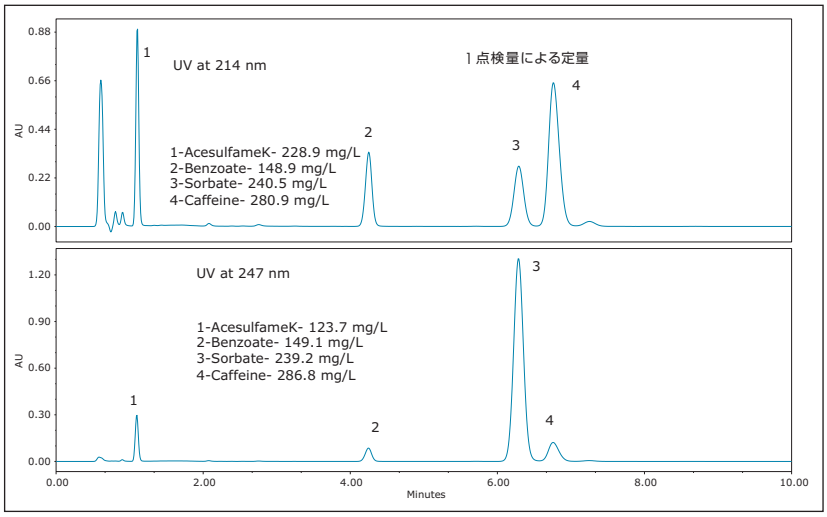

図 6. ダイエット栄養ドリンクのクロマトグラム

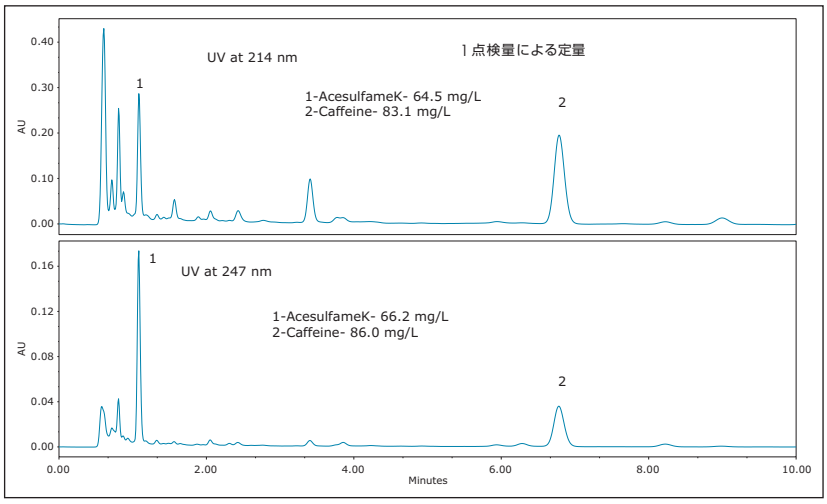

図 7. ダイエットレモンティーのクロマトグラム

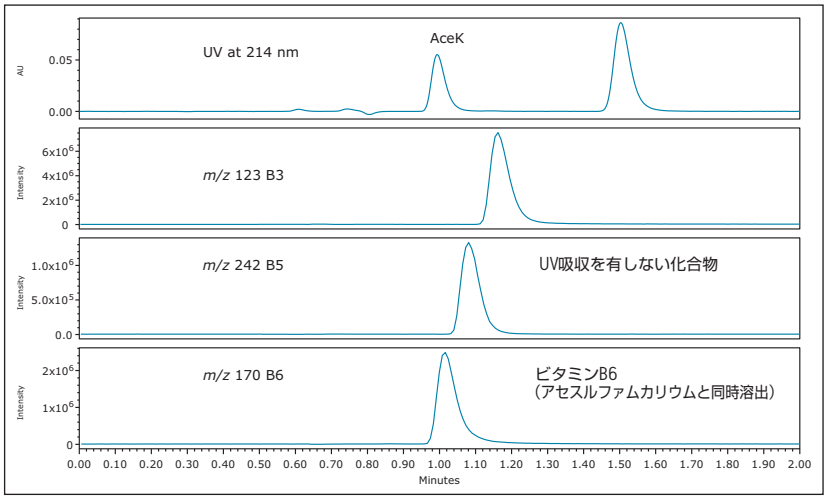

図 8. アセスルファムカリウムの UV クロマトグラムと各ビタミン B の SIR クロマトグラムの重ね書き

ビタミン B6 とアセスルファムカリウムの UV スペクトルを、図 9A 及び図 9B に掲載しました。214 nm は特異性がなく、アセスルファムカリウムに加えてビタミン B6 による吸収が多くなっています。その結果、214 nm で検出するとアセスルファムカリウムの定量値が実際より大きくなります。ビタミン B6 は 247 nm での吸収をほとんど持たないので、アセスルファムカリウムとビタミン B6 を含む飲料の分析には 247 nm を使用します。

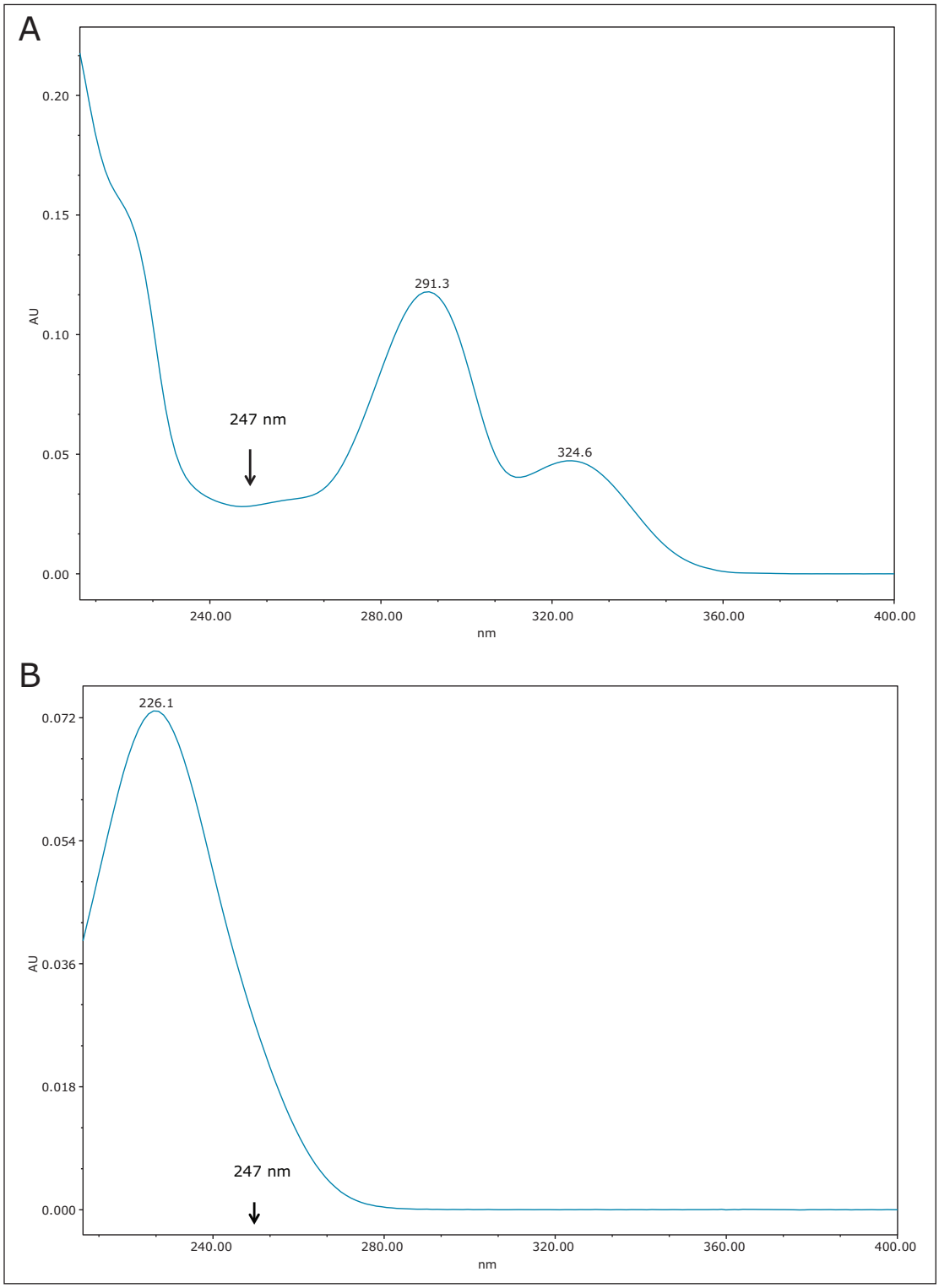

図 9A. ビタミン B6 の UV スペクトル
図 9B. アセスルファムカリウムの UV スペクトル

図 10 に、ウォーターズ Big-4 Standard を用いた多点検量線を掲載しました。全成分において決定係数 R^2>0.999 が得られています。表 2 はウォーターズ飲料分析スタンダードの、6 回繰り返し注入における保持時間の再現性の結果です。全成分、相対標準偏差（%RSD）<0.2 となりました。表 3 はサイダー中の安息香酸エステルとカフェインの 7 回繰り返し注入における保持時間と定量値の再現性の結果です。1 点検量で定量を行いました。表 4 は、1 点検量と多点検量での栄養ドリンク中の各成分の定量結果です。ビタミン B6 の影響を排除するために、247 nm で検出しました。

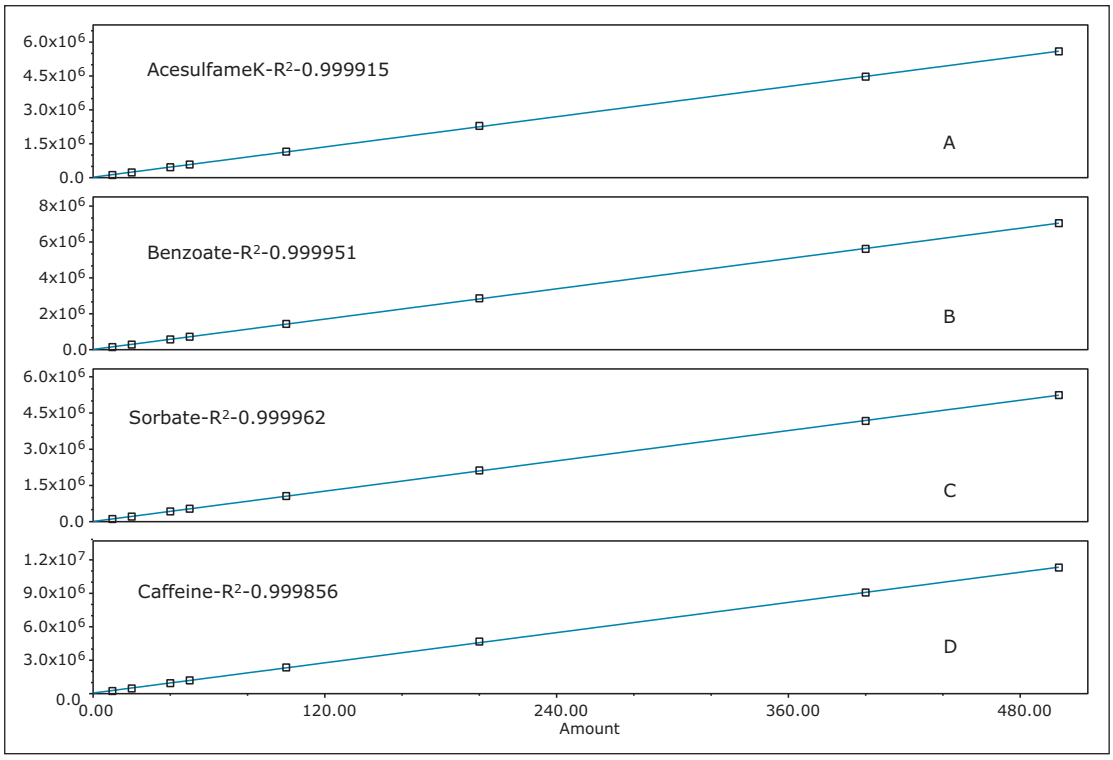

図 10. A-D Big-4 に含まれる成分の検量線

Analyte	RT (min)	%RSD
Acesulfame K	1.08	0.16
Saccharin	1.64	0.10
Benzoate	4.25	0.04
Sorbate	6.30	0.03
Caffeine	6.79	0.03
Aspartame	8.70	0.02

表 2. ウォーターズ飲料分析スタンダードの 6 回繰り返し注入における保持時間の再現性

Analyte	RT	%RSD	Amount	%RSD
Benzoate	4.27	0.05	316.64	0.17
Caffeine	6.78	0.04	150.80	0.21

表 3. サイダーの 7 回繰り返し注入における保持時間と定量値の再現性

Analyte	Single Point at 247nm	Multi Point at 247 nm	%RSD
AcesulfameK	123.7	123.9	0.24
Benzoate	149.1	148.9	0.13
Sorbate	239.2	245.1	1.24
Caffeine	286.8	288.6	0.33

表 4. 栄養ドリンクの 247 nm における 1 点検量と多点検量での定量値（mg/L）比較

まとめ

ACQUITY Arc システムおよびウォーターズの試薬キット（移動相 / 標準品）を用いることで、清涼飲料に含まれる各成分を迅速に測定、定量することが可能です。本システムを導入すると以下のようなメリットがあります。

- 成分、含有濃度に応じて 1 点検量・多点検量を使い分けることが可能
- エタノールベースの移動相のため、シンプルで廃棄コストを低減させることが可能
- 超音波洗浄機にかけ、フィルターろ過をするのみの簡単なサンプル調製
- アセスルファムカリウムの定量においてビタミン B6 の影響がない UV 検出波長を選択

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

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

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年10月 720005474JA PDF