[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

MS検出器付きのACQUITY Arc システムを用いた、ジュース、ビール、ワインおよびウイスキー中の単糖類、二糖類およびアルジトールのプロファイリングと定量分析

Mark E. Benvenuti, Gareth Cleland, and Jennifer Burgess
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 示差屈折（RI）やエバポレイト光散乱（ELS）検出器と比べて、低濃度の糖の検出が可能に
- 必要最小限のサンプル前処理、マトリックス効果を低減するための希釈が可能に
- 分離が困難な異性体のソルビトールとマンニトールのクロマトグラフィーによる分離

ウォーターズのソリューション

ACQUITY® Arc™ システム

ACQUITY QDa® 検出器

XBridge® BEH Amide XP カラム

Empower® 3 CDS ソフトウェア

キーワード

糖類、糖、フルクトース、グルコース、スクロース、マルトース、マンニトール、ソルビトール、ウイスキー、糖質

はじめに

糖および糖アルコールは、人において栄養学的に重要な、天然の食品成分である糖質に分類されます。近年では、先進諸国における肥満や糖尿病の発症率の増加に伴い、糖の摂取状況を把握することに非常に大きな関心が集まっており、その結果として、年々厳しくなる規制の要求に応えるため、製品の表示による正確な情報提供が必要とされています。食品製品の糖含有量のプロファイリングは、製品の信憑性や混入物のある粗悪品の可能性を評価するための手段としても役立ちます。

糖や糖アルコールは、発色団を持たず類似した構造の分子が多いため、未だ分析上の課題があるアプリケーションです。図 1 に、本試験で分析した化合物の化学式および構造式を示しましたが、このような糖化合物の多くは構造が類似した異性体同士です。糖の分析には、その優れた分離能力や正確さ、分析時間などの理由から HPLC が選択されてきました。

示差屈折率（RI）検出器やエバポレイト光散乱（ELS）検出器に代わる手法としては、エレクトロスプレーイオン化（ESI）を用いた質量検出があります。質量検出は従来の LC のための検出器に対する相補的な手法です。

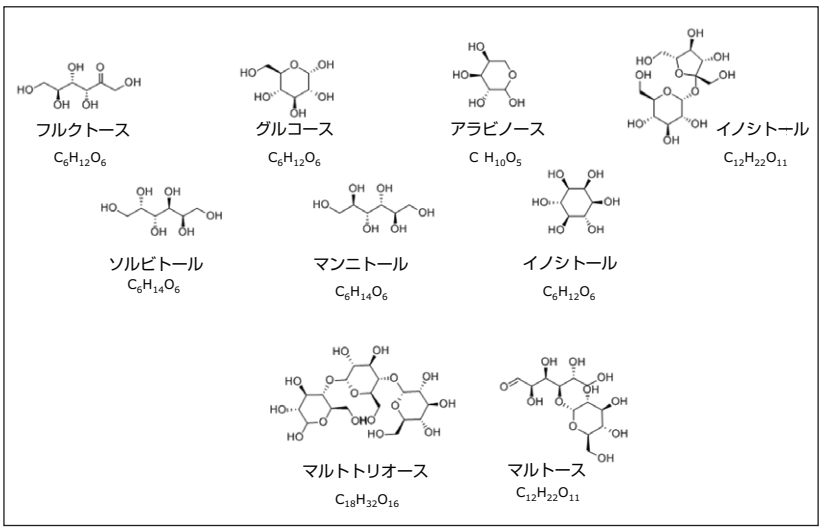

図 1. 分析した糖化合物の構造式および化学式

実験方法

LC 条件

LC システム： ACQUITY Arc

データシステム：Empower 3

分析時間： 40.0 分

カラム： XBridge® XP BEH Amide

2.5 µm、3.0 × 150 mm

カラム温度： 85℃

移動相 A： 90% アセトニトリル：5% IPA：5% 水 *

移動相 B： 80% アセトニトリル：20% 水 *

流速： 0.8 mL/ 分

注入量： 1 µL

	時間 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
1.	初期値	0.8	100	0
2.	4.5	0.8	100	0
3.	18.0	0.8	0	100
4.	25.0	0.8	0	100
5.	25.1	0.8	100	0
6.	40.0	0.8	100	0

* いずれも 500 ppb 塩酸グアニジンおよび 0.05% ジエチルアミン含有。

MS 条件

MS システム： ACQUITY QDa（パフォーマンスタイプ）

イオン化モード：ESI-

キャピラリー電圧：0.8 V

コーン電圧： 5.0 V

プローブ温度： 600℃

取り込み速度： 2 Hz

フルスキャン： 50 - 800 Hz

検量線： 二次式、重みづけ 1/x

スムージング： 平均フィルター、レベル 7

SIR チャンネル：

分析種	分子式	SIR (*m/z*) ($[M+Cl]^-$ ion)
アラビノース	$C_5H_{10}O_5$	185
フルクトース	$C_6H_{12}O_6$	215
グルコース	$C_6H_{12}O_6$	215
イノシトール	$C_6H_{12}O_6$	215
ソルビトール	$C_6H_{14}O_6$	217
マンニトール	$C_6H_{14}O_6$	217
スクロース	$C_{12}H_{22}O_{11}$	377
マルトース	$C_{12}H_{22}O_{11}$	377
マルトトリオース	$C_{18}H_{32}O_{16}$	539

標準溶液調製

上記 9 種の糖類をアセトニトリル - 水の 1：1 溶液に溶解し、100 mg/L をストック溶液としました。このストック溶液をさらに希釈し、9 種類の濃度の溶液（1、2、4、5、10、20、40、50 および 100 mg/L）としました。

試料調製

すべての試料を現地で購入し、オレンジ、リンゴ、パイナップル、ザクロ、ブドウのジュース試料を評価しました。酒類については 、3 種のラガービール（1 種はノンアルコール）の他、レモン風味ビール、リンゴ酒、シェリー酒、赤ワインが各 1 種、ウイスキー 4 種を評価しました。ビール試料は超音波処理して炭酸を除去しました。すべての試料を 0.22 µm PVDF シリンジフィルターでろ過し、アセトニトリル - 水の 1：1 溶液で希釈しました。希釈倍率は、表 1 に示しました。

試料	希釈率
ラガー1 および 2	5
ノンアルコールビール	500
リンゴ酒	500
レモン風味ビール	50
シェリー酒	500
赤ワイン	500
ウイスキー	2
オレンジジュース	1000
リンゴジュース	1000
パイナップルジュース	1000
ザクロジュース	1000
ブドウジュース	2500

表 1. 検討した“市販品”試料の希釈率

質量検出によって、より低濃度の検出限界、そして試料中の成分のマススペクトル情報の取得が可能になります。クロマトグラフィーの保持時間と質量の両方の情報を得ることにより、糖や糖アルコールの分析における選択性が向上します。ここでは、Waters® ACQUITY Arc システムと ACQUITY QDa 検出器を用いて、ジュース、ワイン、ビールおよびウイスキー試料中の糖のプロファイリングおよび定量を行ったアプリケーションをご紹介します。

結果および考察

図 2 は ACQUITY QDa および PDA 検出器が付属した ACQUITY Arc システムです。本分析では PDA 検出器を使用していませんが、参考のために設置しました。図 3 は上記の分析種をそれぞれ 100 mg/L で混合した標準溶液の SIR クロマトグラムを示しています。全ての標準品について優れた分離を達成しました。最初にアイソクラティック条件を使用し、分離が難しいソルビトールとマンニトールの組み合わせを含む低分子の糖類を分離しました。4.5 分後にグラジエントを開始した後、混合標準溶液中の高分子の糖類を順次分離溶出しました。

図 2. ACQUITY QDa および PDA 検出器を接続した ACQUITY Arc システム

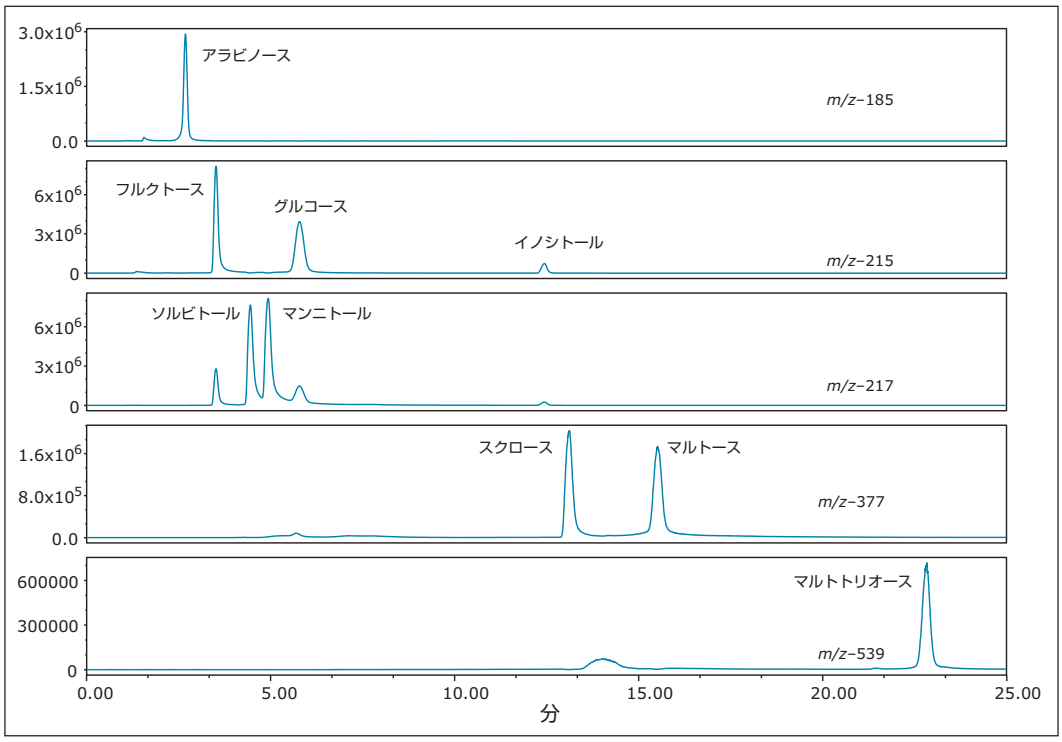

図 3. 本研究で使用した 9 種の糖混合標準溶液の SIR クロマトグラム。記載した m/z は $[M+Cl]^-$ イオン

各標準溶液の Scan データから抽出したマススペクトルを図 4 に示します。移動相に塩酸グアニジンを使用することで、化合物が確実に塩素付加体（$[M+Cl]^-$ イオン）を生成しました。^{37}Cl 付加体のわずかなピークも認められました。図 5 には検討した化合物の検量線を示しました。全ての分析種で R^2 >0.995 を達成しました。

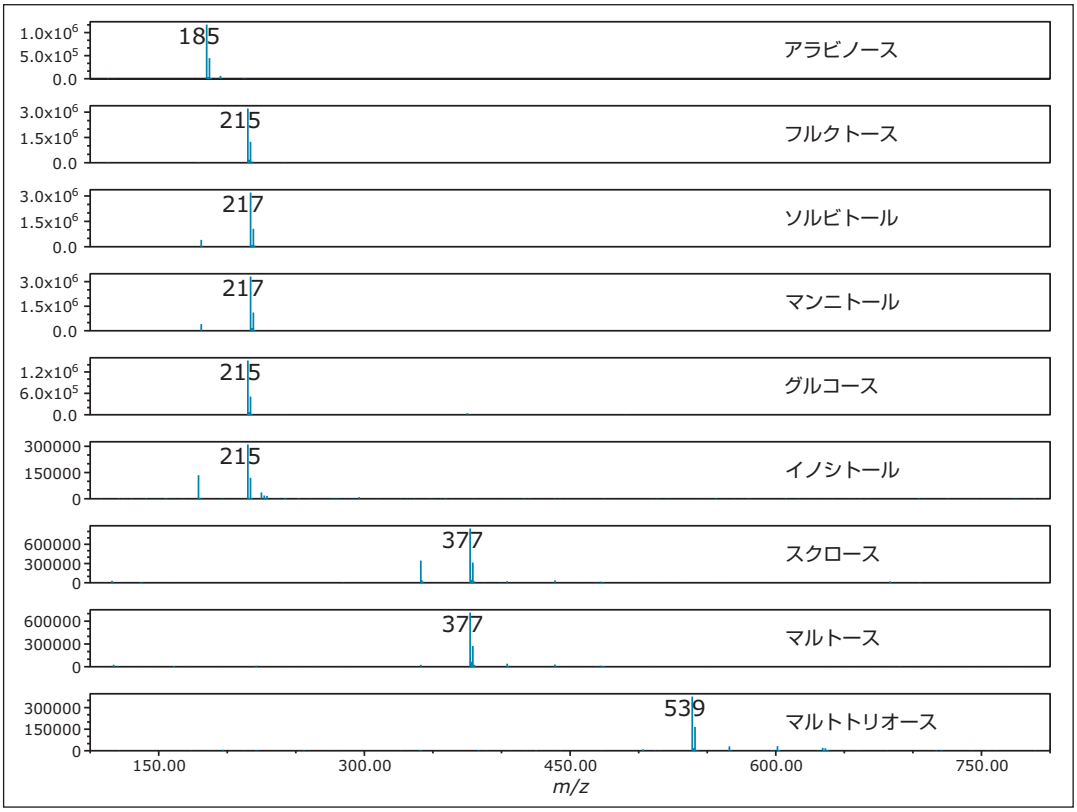

図 4.9 種の糖混合標準溶液のスキャンデータから抽出したマススペクトル情報。記述した m/z は $[M+Cl]^-$ イオン

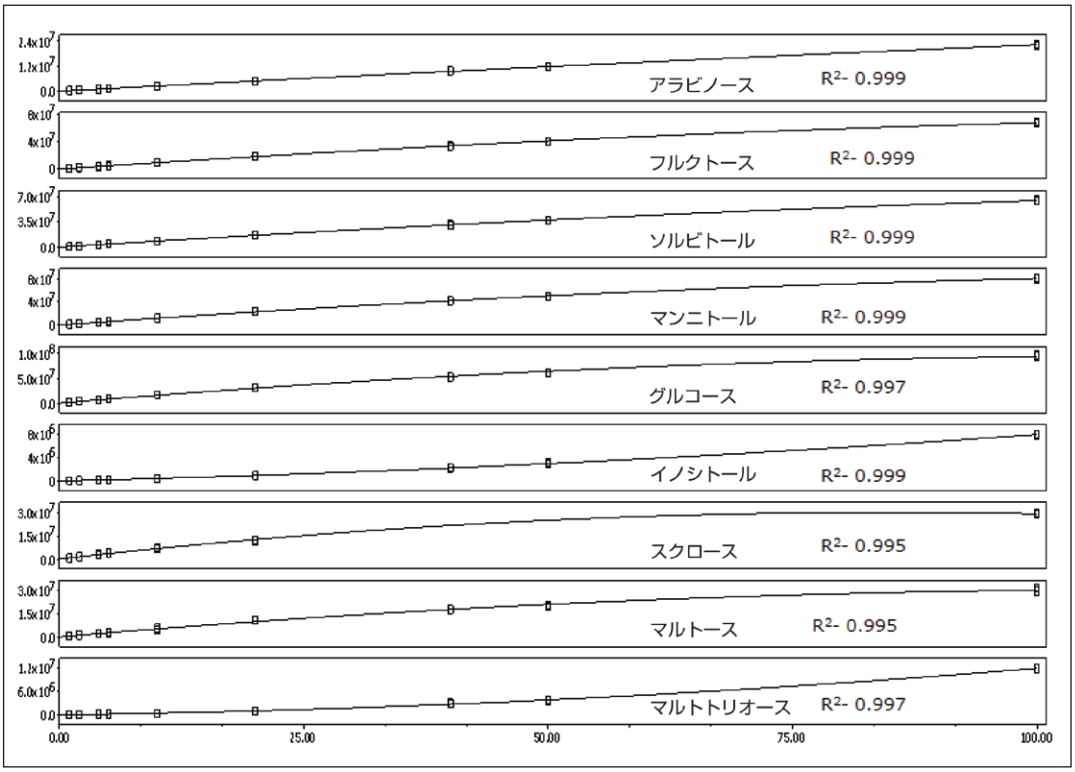

図 5. 分析した 9 種の糖混合標準溶液の検量線。分析種ごとに R^2 値を表示

図 6（A–E）はラガービールの SIR プロファイルです。図 6A（*m/z* 185）では、アラビノースが認められましたが、それ以外にもピークが検出されており、ペントースなど他の糖類の存在が示唆されました。図 6B（*m/z* 215）にはフルクトースおよびグルコースの存在が確認されています。示差屈折率などの感度の低い手法[1]とは対照的に、ACQUITY QDa による感度向上により、化合物の検出に改善が認められました。図 6C（*m/z* 217）では、ソルビトール、マンニトールが認められます。また、小さなピークはフルクトースおよびグルコースの Cl^{37} 付加体に由来するピークで、ソルビトールおよびマンニトールの分子量と一致するものです。図 5D、5E（それぞれ *m/z* 377、539）では DP2 および DP3 化合物のマルトース、マルトトリオースが、同一質量を有する異性体を伴って検出されたことから、穀類を原料とする飲料であると考えられました。

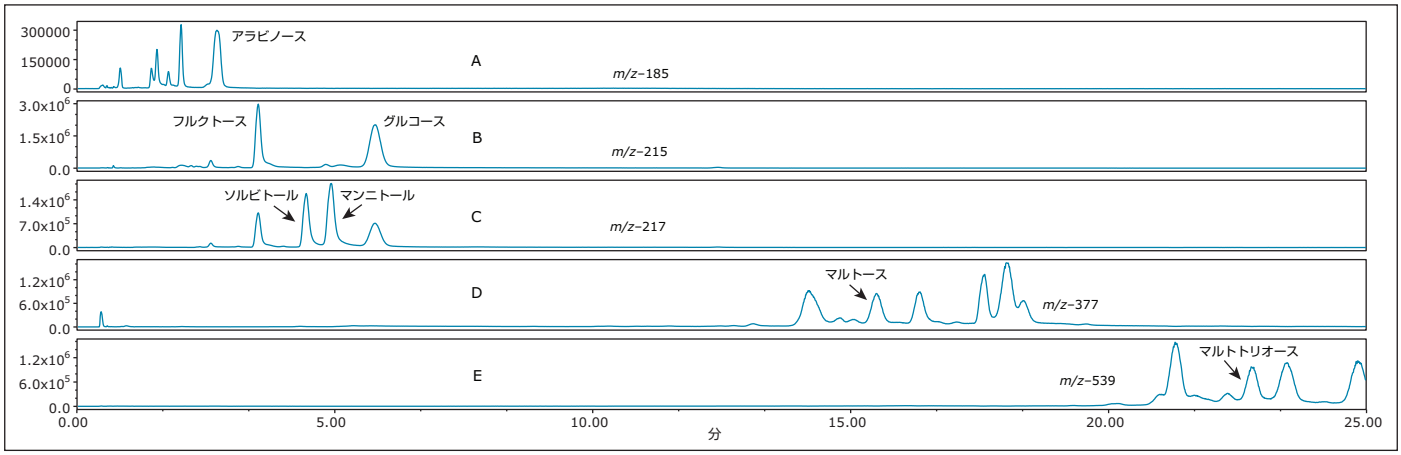

図 6. 存在が確認された糖類を記載した、ラガービールの SIR プロファイル

図 7（A–E）には、シェリー酒のプロファイルを示しています。シェリーで存在が確認された主要な分析種はフルクトース、グルコースです（図 7B）。アラビノース（図 7A）、ソルビトール、マンニトール（図 7C）については、いずれも微少なピークが確認されました。マルトースについては、明確なピークが認められました（図 7D）。ワインは穀類ではなくブドウを原料としているため、予想されていたように DP3 化合物は確認されませんでした（図 7E）。

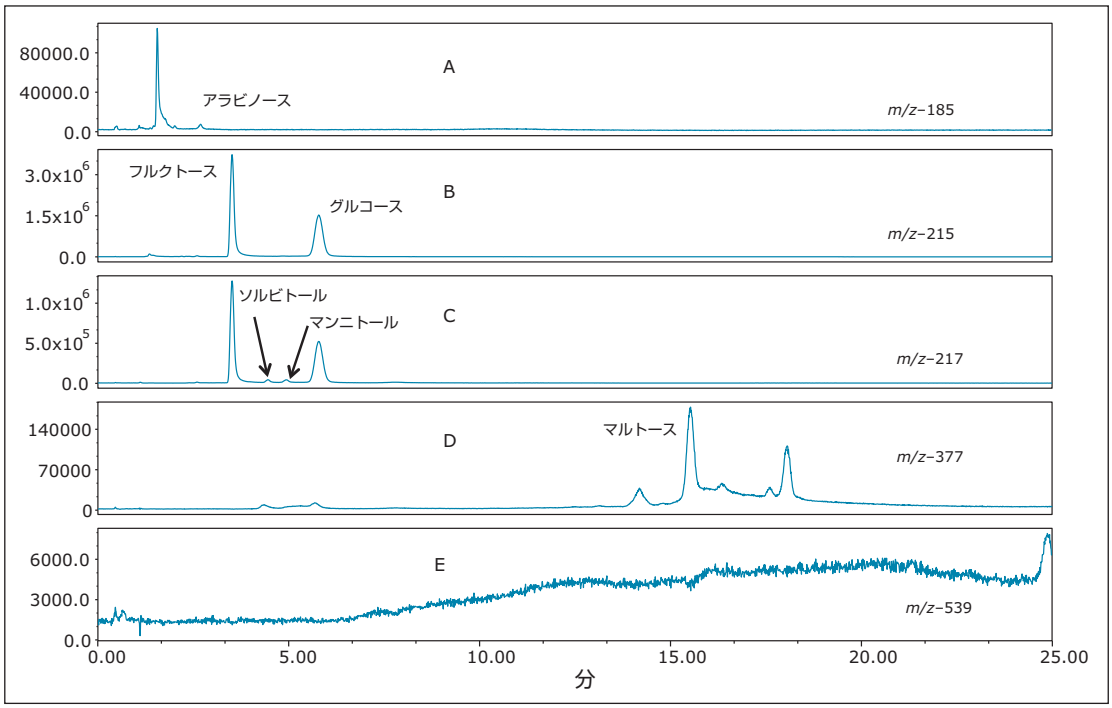

図 7. 存在が確認された糖類を記載した、シェリー酒の SIR プロファイル

図 8（A–E）はウイスキー試料の SIR プロファイルです。アラビノース（図 8A）、フルクトース、グルコース（図 8B）が確認されました。特に興味深いことは、図 8B（*m/z* 215）、および 8C（*m/z* 217）に保持時間 4.85 分に、明確な未知の糖のピークが現れたことです。RI または ELS 検出器と保持時間情報のみを用いた場合は、このピークがマンニトールと誤認された可能性が非常に高いと推測されました。このピークが *m/z* 215 および *m/z* 217 の両方に見られたことから、この成分がアルジトールではなく単糖と同じ質量であることが示唆されました。図 3 および 4 から分かるように、マンニトールは *m/z* 215 のイオンが検出されていません。

最後に、リンゴジュース試料から得た SIR クロマトグラムを図 9（A–E）に示します。アラビノース、フルクトース、グルコース、ソルビトールおよびスクロースの存在が明らかです。

各種フルーツジュースの定量結果を表 2 に示します。オレンジ、リンゴおよびパイナップルジュースには、フルクトース、グルコースおよびスクロースが含まれていました。これらのジュースの糖の含有量と比率は、他の文献で報告された値と同様です [2,3]。特に興味深いことは、ザクロジュースにソルビトールが検出された点です。ザクロジュース [4] には通常、ソルビトールが検出されないことから、これは混入物が添加された粗悪品の証拠になると考えられます。試験したもう 1 つの試料からは、ソルビトールは検出されませんでした（図 10）。ブドウジュース試料はフルクトース、グルコースを検出しましたが、予測されたようにスクロースは不検出でした [2,3]。

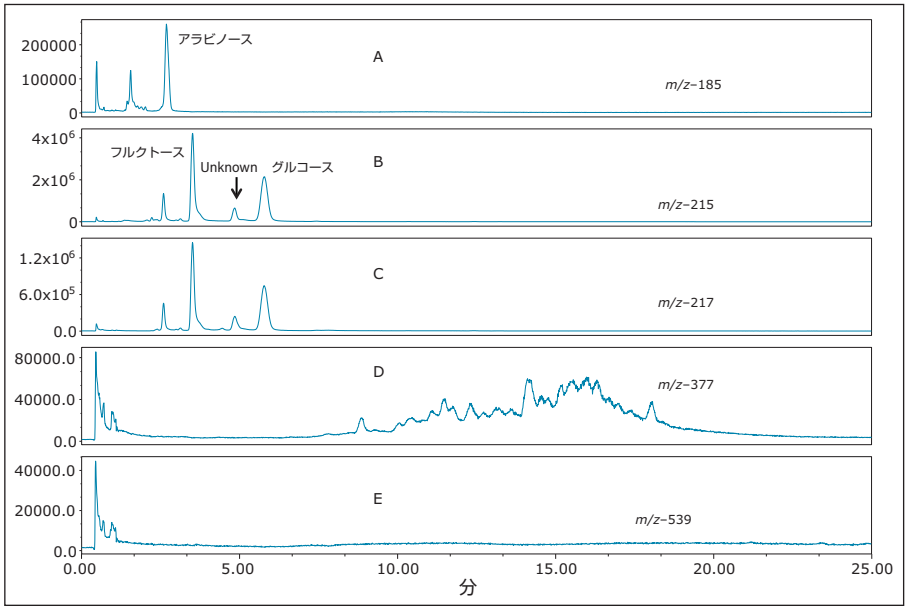

図 8. 確認された糖類の他、m/z 215 で存在が確認された未知の糖を示したウイスキーの SIR プロファイル

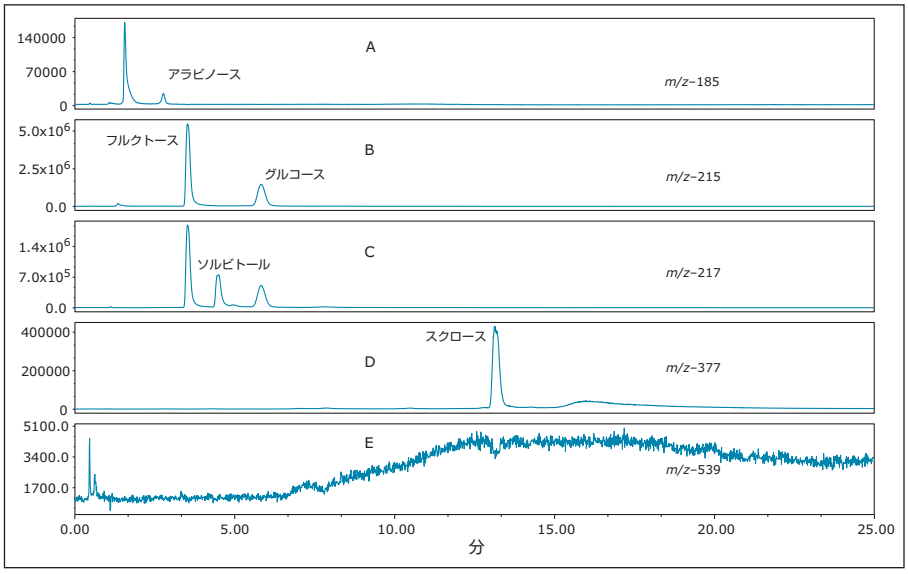

図 9. 存在が確認された糖類を記載したリンゴジュース試料の SIR プロファイル

ジュース	フルクトース	グルコース	ソルビトール	マンニトール	スクロース
オレンジ	25.1	23.6	ND	ND	52.6
リンゴ	70.2	30.2	7.6	ND	10.6
パイナップル	37.4	40.6	ND	ND	41.9
ザクロ	64.8	71.1	19.7	4.3	0.9
ぶどう	83.0	82.5	ND	ND	ND

表 2. 本試験でプロファイリングされた、各種フルーツジュースの定量試験で得られた濃度算出値（g/L）

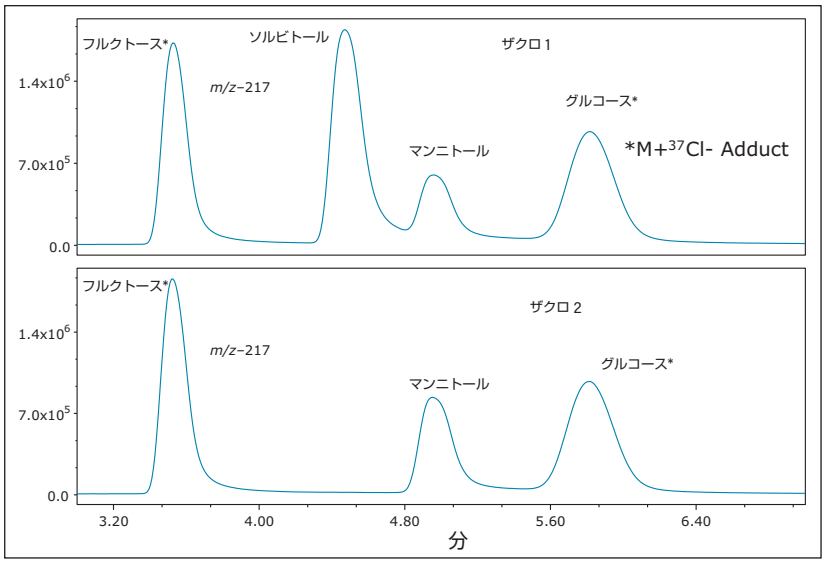

図10. 2 種のザクロジュース試料で存在が確認された糖類を記述した SIR クロマトグラムの拡大図。試料の 1 つにはソルビトールが検出され、不純物添加の可能性が示唆

分析種	RT	% RSD	含有量	%RSD
フルクトース	3.54	0.12	25.1	1.33
グルコース	5.84	0.11	23.6	1.82
スクロース	13.16	0.12	52.6	7.82

表 3. オレンジジュースの 7 回注入における保持時間（分）および含有量（g/L）の再現性データ

まとめ

- ACQUITY Arc システムと ACQUITY QDa 検出器の組み合わせにより、感度と選択性が向上し、1 回の注入で単糖類および二糖類の試料の分析および定量が可能となります。
- 質量検出は、示差屈折率（RI）検出やエバポレイト光散乱（ELS）検出に対する実用的な代替手法になります。
- 感度向上によって、より希釈倍率の高い試料の分析が可能となり、マトリックス効果が最小限に抑えられます。
- 質量検出とクロマトグラフィー分離の組み合わせにより、偽陽性を低減しながら、当該分析種の同定を行う上での選択性が向上します。

参考文献

1. M Castellari et al. Determination of Carboxylic Acids, Carbohydrates, Glycerol, Ethanol, and 5-HMF in Beer by High-Performance Liquid Chromatography and UV–Refractive Index Double Detection. *Journal of Chromatographic Science*. 39: 236–238, January 2001.
2. M L Sanz et al. Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chemistry*. 87: 325–328, 2004.
3. M Benvenuti. Analysis of Food Sugars in Various Matrices. Waters application note no. 720004677EN, May, 2013.
4. R Jahromi. 6.21 *Reference Guide for Pomegranate*. Revision June 2012.

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

©2017 Waters Corporation. Produced in Japan. 2017年1月 720005609JA PDF