Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY Arc システムおよびACQUITY QDa 検出器を用いた牛乳、調製粉乳中の単糖および二糖類のプロファイリング

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

アプリケーションのメリット

- ACQUITY Arc™ システムによる、HPLC または UHPLC 分離をエミュレートする2種類のフローパスの選択肢
- 分離が困難な異性体同士、グルコースとガラクトースのクロマトグラフィー分離
- ACQUITY QDa 検出器による、糖分析で一般的に用いられる示差屈折率（RI）検出器やエバポレイト光散乱（ELS）検出器との相補的な検出

ウォーターズのソリューション

ACQUITYR Arc™ システム

ACQUITY QDa® 検出器

XBridge® BEH Amide XP カラム

キーワード

質量検出、調製粉乳、牛乳、糖質、単糖、二糖

はじめに

糖および糖アルコールは、天然の食品成分である糖質に分類され、栄養学的に重要なメリットがあります。一部の糖は風味を増したり、生鮮食品を模倣するために加工食品に添加されます。近年では、先進諸国での肥満や糖尿病の発症率の増加に伴い、糖の摂取をより正しくモニターする必要性が高まっており、その結果、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。

糖や糖アルコールはその化合物の構造内に発色団を持たず、異性体などの非常に類似した構造の分子が多いため分析は容易ではありません。図 1 に、構造式および化学式を示します。優れた分離能や精度、分析時間などの理由から、糖分析には HPLC が選択され[1]、検出には RI や ELS が用いられてきました。RI 検出は分析中のいかなる変動も避けるために、移動相の十分な管理が必要なため、アイソクラティックでの分析が求められます。また、RI 検出では移動相組成を変えると、平衡化に数時間を要することがあるため、次の分析で移動相組成を変更することも、容易ではありません。ELS 検出器は移動相組成の変化には強いものの、複雑な食品のマトリックス中の糖を分析する際には、感度面で要求に見合わないケースもしばしば発生します。

これらの検出手法の代替となるのが、エレクトロスプレーイオン化（ESI）を用いた 質量検出です。Waters® ACQUITY QDa 検出器は、より低濃度の検出限界の実現と、試料中の成分のマススペクトル情報の取得を可能にします。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プロファイリングにおける選択性も向上します。ACQUITY QDa 検出器は、LC システムと一体化するように総合的にデザインされた唯一のMS検出器です。LCのモジュールと積み重ねることができ、占有スペースもPDA 検出器と同一です。QDa 検出器を操作するための長時間のトレーニングを必要としないため、ユーザーが慣れているHPLCで、すぐに質量検出による改善された選択性と感度のメリットを手にすることが可能です。本アプリケーションノートでは、ACQUITY QDa 検出器を ACQUITY Arc システムに接続して、牛乳や調製粉乳中の糖のプロファイリングを行った結果についてご紹介します。

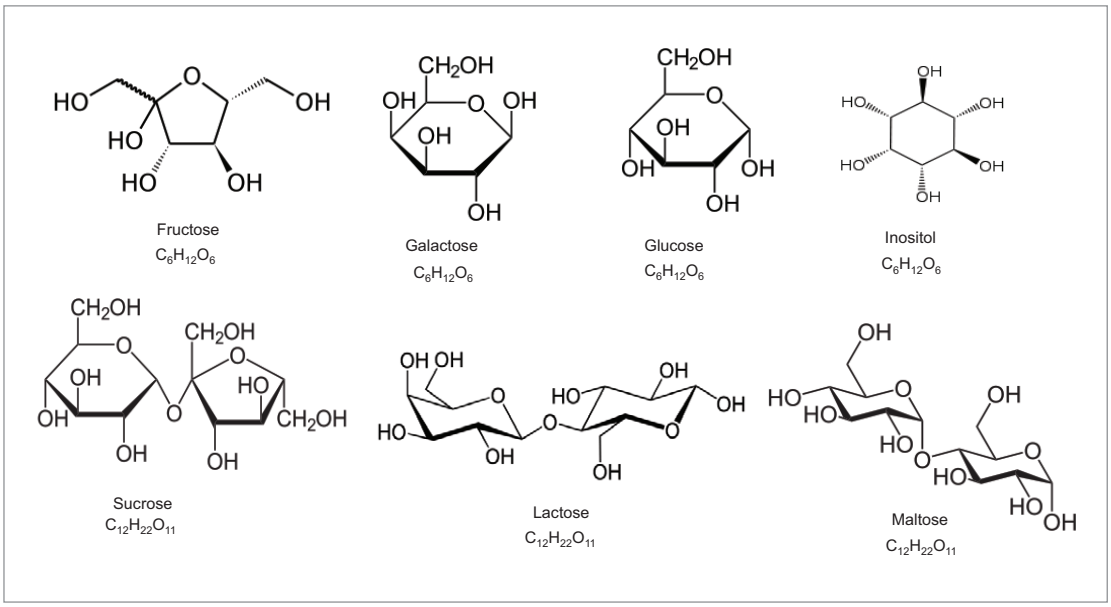

図 1. 分析した糖化合物の構造式および化学式

図 2. PDA および ACQUITY QDa 検出器を付属した ACQUITY Arc システム

実験方法

LC 条件

LC システム：	ACQUITY Arc Path 1
分析時間：	30.0分
カラム：	XBridge BEH Amide ***XP*** 2.5 µm、3.0 × 150 mm
カラム温度：	85℃
移動相：	90：5：5 アセトニトリル - 水- 0.05% ジエチルアミンおよび 500 ppb 塩酸グアニジン含有 2 -プロパノール
流速：	0.8 mL/分
注入量：	1 µL

MS 条件

MS システム：	ACQUITY QDa（パフォーマンス）
イオン化モード：	ESI-
キャピラリー電圧：	0.8 kV
コーン電圧：	5.0 V
プローブ温度：	600℃
取り込み速度：	2 Hz
スキャン範囲：	*m/z* 100 - 500
検量線：	二次式、1/x の重みづけ
スムージング：	平均、レベル 7
SIR[M+Cl-]⁻：	215.0 フルクトース、グルコース、 ガラクトース、イノシトール 377.0 スクロース、ラクトース、マルトース

標準溶液調製

上記 7種の糖類をアセトニトリル - 水の 1：1 溶液に溶解し、50 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（0.5、1、2、2.5、5、10、20、25 および 50 mg/mL）としました。

試料調製

脱脂粉乳、牛乳加工調製粉乳、大豆加工調製粉乳および低脂肪乳を購入し、試料としました。これらはChavez-Servin らの前処理法[2]に従い以下のように調製しました。

- 約 0.6 g の試料を 25 mL のメスフラスコに添加
- エタノール - 水の1：1溶液 10 mL を添加
- ウォーターバスで、60℃、25分間超音波処理
- 冷却後、250 µL の Carrez 1* 試薬を添加し、1分間撹拌
- 250 µL の Carrez 2** 試薬を添加し、1分間撹拌
- 5 mL のアセトニトリルを添加し、混合
- 25 mL になるようにエタノール - 水の1：1溶液を添加
- 十分に混合し、50 mL 遠心管に移して静置
- rcf 2465 g で 30 分間遠心
- 0.2 µm PVDF フィルターで上清をろ過
- *Carrez 1 試薬：0.36 g $K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$ を溶解した 10 mL 水溶液
- **Carrez 2 試薬：0.72 g $ZnSO_4\cdot 7H_2O$ を溶解した 10 mL 水溶液

上清をアセトニトリル - 水の1：1溶液で希釈し、スクロースおよびラクトース分析用の 500倍希釈液、およびフルクトース、グルコース、ガラクトースおよびイノシトール分析用の 20倍希釈液としました。この25倍希釈も、最終的な定量計算の際に考慮しました。

結果および考察

図 2 は ACQUITY QDa および PDA検出器を接続した ACQUITY Arc システムです。PDA 検出器を図示していますが、UV 検出は本分析では使用していません。図 3 は本試験で使用した 5 ppm（標準溶液 5）の7 種の糖混合標準溶液の SIR クロマトグラムを示しています。記載した *m/z*（215 および 377）は $[M + Cl]^-$ イオンを示しています。図 4 は分析種のマススペクトルです。塩酸グアニジンを移動相に添加すると、平衡状態が塩素付加体（単糖およびイノシトールでは*m/z* 215、二糖では*m/z* 377）側にシフトしました。なお、このカラム充填剤を使用して、ガラクトースおよびグルコースのベースライン分離を行い、ラクトース後にマルトースを溶出させています。

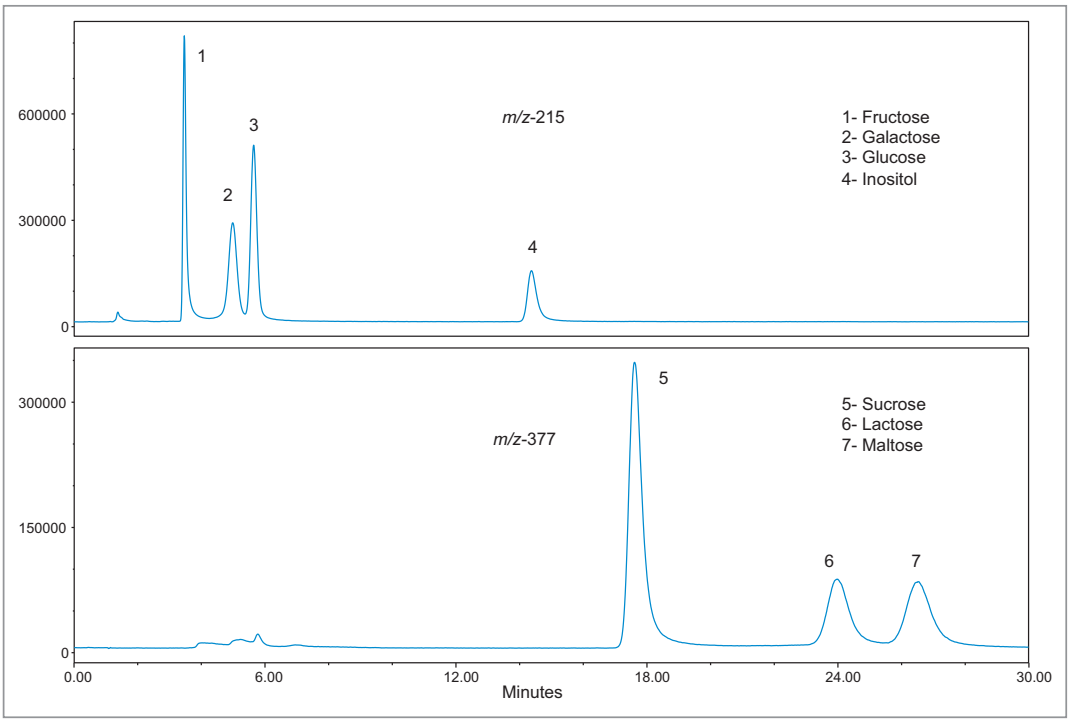

図 3. 本試験で使用した 7 種の糖混合標準溶液の SIR クロマトグラム。記載した m/z は $[M + Cl]^-$ イオンを示しています。

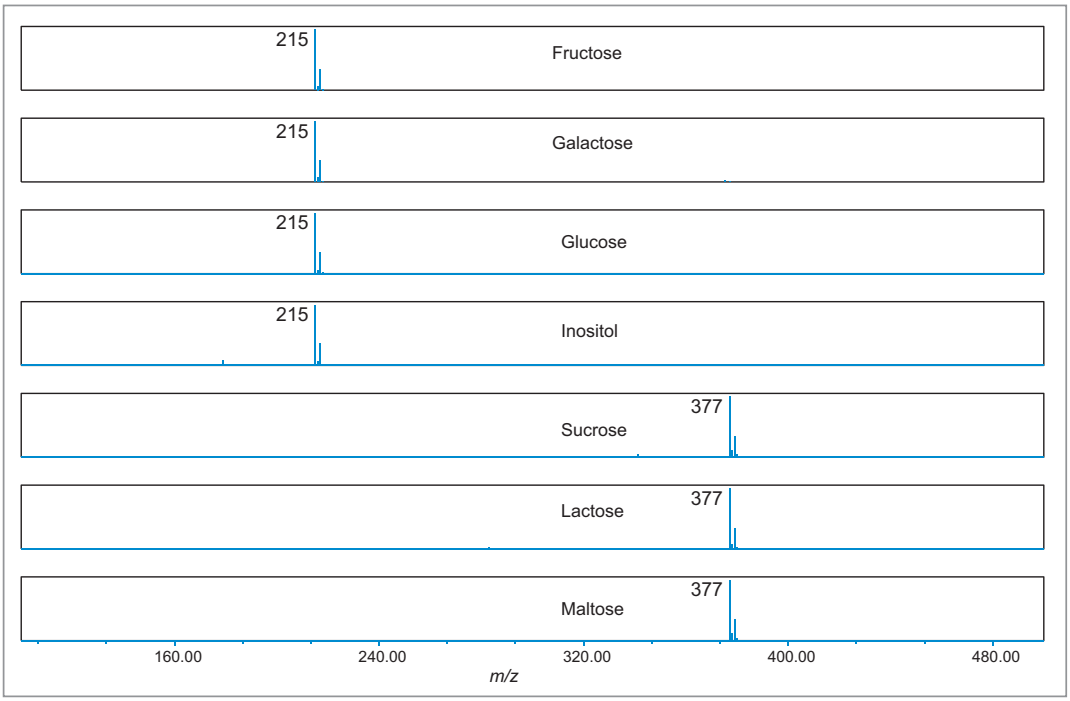

図 4. 7 種の糖混合標準溶液の Scan データから抽出したマススペクトル。記述した m/z は $[M + Cl]^-$ イオンを示しています。

図 5 は 5 ppm（標準溶液 5）の糖混合標準溶液、牛乳加工調製粉乳、大豆加工調製粉乳の SIR クロマトグラム（*m/z* 215）を示しています。注目すべきことに、大豆加工調製粉乳では予想通りガラクトースが検出されませんでしたが、調製粉乳の重要な栄養素であるイノシトールは両方の調製粉乳から検出されました[3]。図 6 ではイノシトールの部分を拡大しています。

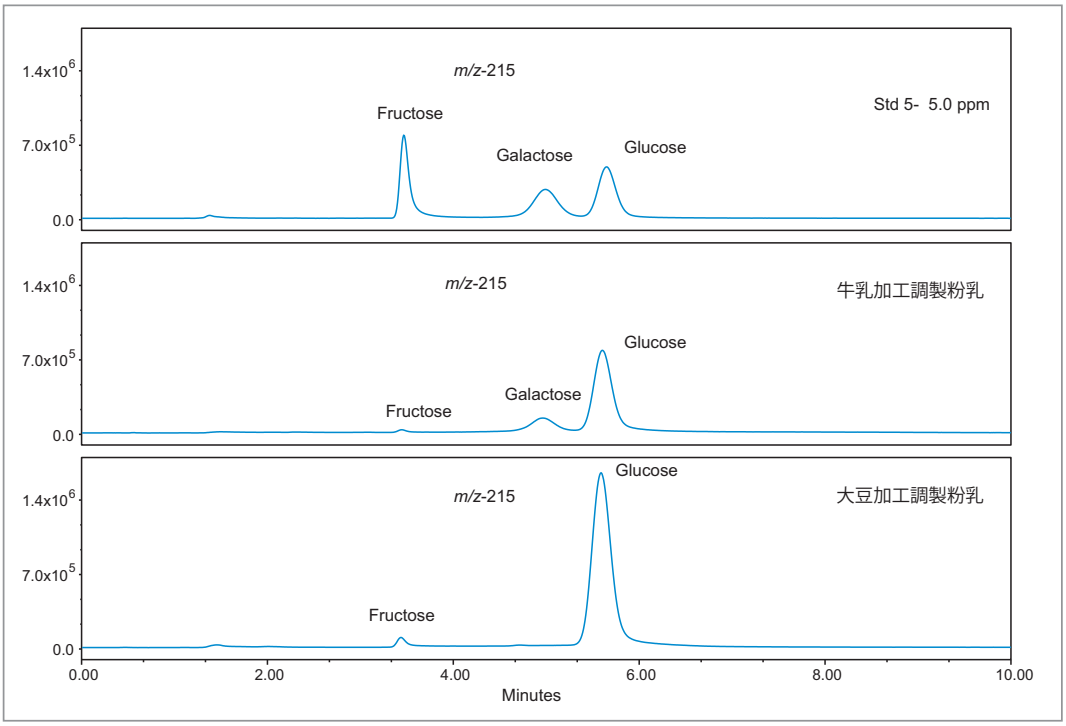

図 5. 牛乳加工調製粉乳、大豆加工調製粉乳を用いた糖類、フルクトース、ガラクトースおよびグルコースにの標準溶液 5 の SIR クロマトグラム（m/z 215）

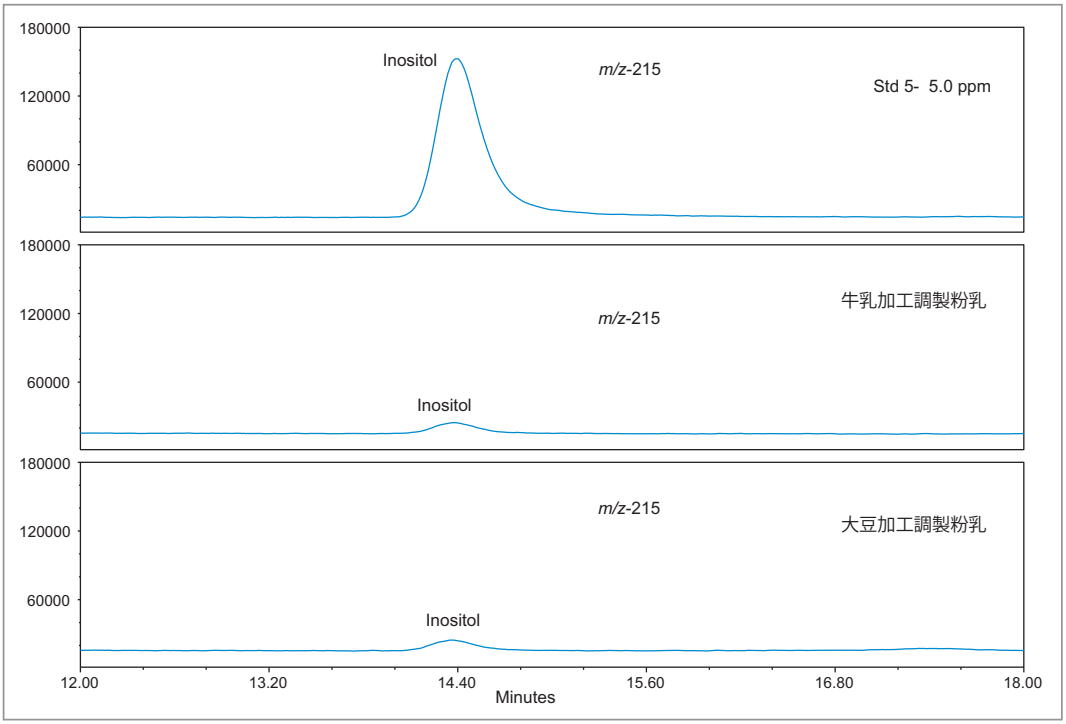

図 6. 標準溶液 5、牛乳加工調製粉乳、大豆加工調製粉乳を用いたイノシトールの SIR プロファイル

図 7 は 5 ppm（標準溶液 5）の糖混合標準溶液、牛乳加工調製粉乳、大豆加工調製粉乳の SIR クロマトグラム（*m/z* 377）を示しています。この図が示すように、大豆加工調製粉乳ではラクトースが検出されませんでしたが、その一方で、牛乳加工調製粉乳では検出されなかったスクロースおよびマルトースが検出されました。2種類の糖は植物源料由来であり、人工的に添加されない限り牛乳加工調製粉乳のマトリックスには存在しないため、期待どおりの結果です。図 8 は分析種の検量線を示しました。全ての分析種で決定係数（R^2）は >0.998 でした。

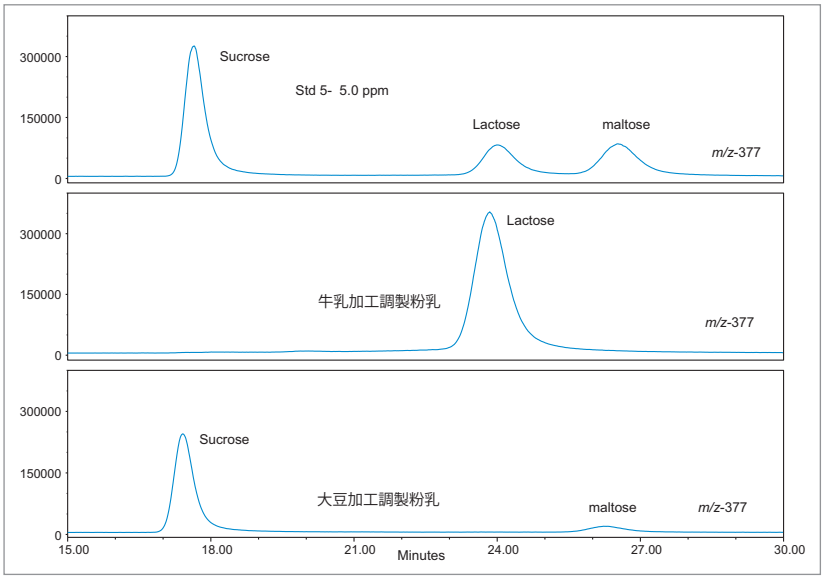

図 7. 標準溶液 5、牛乳加工調製粉乳、大豆加工調製粉乳を用いたスクロース、ラクトースおよびマルトースの SIR プロファイル

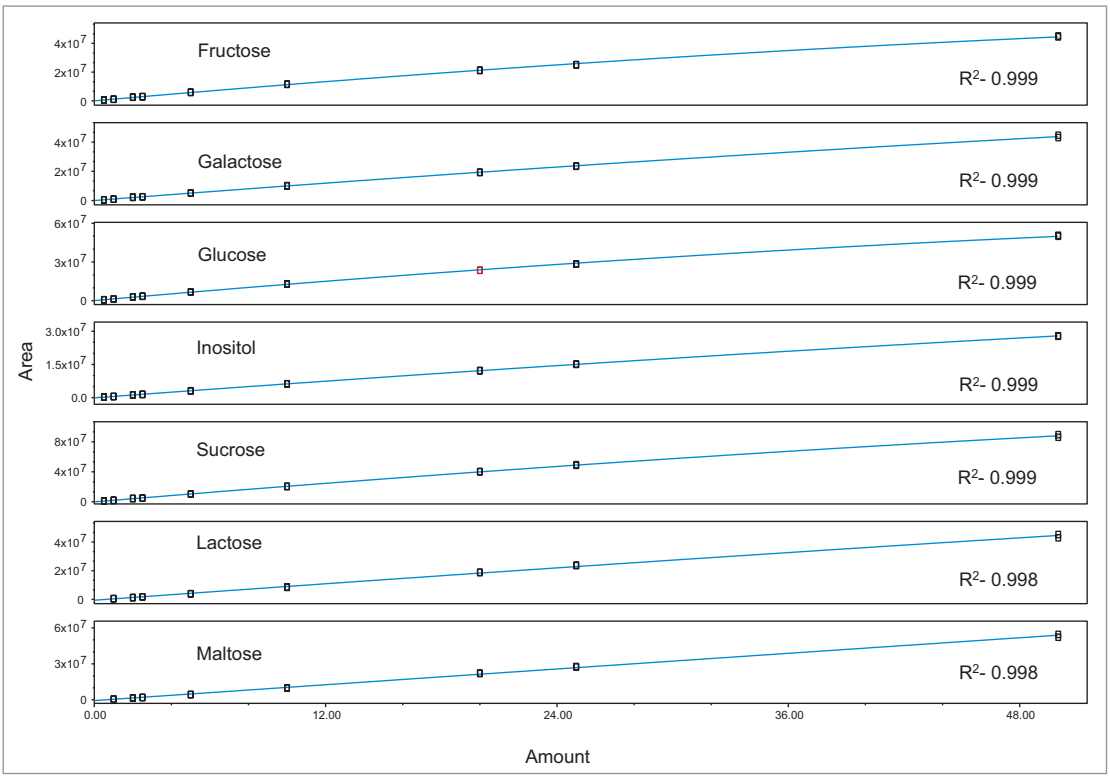

図 8. R^2 値を示した 7 種の糖混合標準溶液の検量線。二次式を使用

表 1 は検討した糖類についての定量値のリストです。牛乳加工および大豆加工調製粉乳中のイノシトール値は Indyk が報告した値[4] とおおむね一致しました。同様に、牛乳加工調製粉乳中のラクトース値は Ferreira が報告した値[5] とおおむね一致しました。表 2 は大豆加工調製粉乳を 7 回注入した再現性データです。RSD は保持時間で <0.25%、含有量で <8.20% でした。

試料	フルクトース	ガラクトース	グルコース	イノシトール	スクロース	ラクトース	マルトース
脱脂粉乳	0.04	0.837	1.295	0.389	ND	381.647	ND
牛乳加工調製粉乳	0.113	2.377	7.681	0.339	ND	394.996	ND
大豆加工調製粉乳	0.481	ND	19.579	0.359	83.705	ND	28.594
低脂肪乳	ND	0.130	0.125	0.078	ND	42.775	ND

表 1. 本試験でプロファイリングした様々な加工乳および調製粉乳の定量試験から得た濃度算出値（g/kg）

分析種	RT	% RSD	含有量	%RSD
フラクトース	3.44	0.10	0.48	8.17
グルコース	5.59	0.10	19.58	3.71
イノシトール	14.34	0.10	0.36	3.14
スクロース	17.41	0.14	83.71	1.42
マルトース	26.27	0.22	28.59	2.02

表 2. 大豆加工調製粉乳を 7 回注入したときの保持時間（分）および含有量（g/kg）の再現性データ

まとめ

乳製品中の糖類の分析は、UV 吸収を持たない密接に関連した化合物の混合物であるため、容易ではありません。ACQUITY Arc システム、ACQUITY QDa 検出器および XBridge BEH Amide カラムの組み合わせは、ACQUITY 分離で期待される高度な性能、高分離、高感度、およびスループットの改善のみならず、質量検出器の RI 検出器や ELS 検出器に対する相補的な検出能力により、以下のような更なるアドバンテージをもたらします。

- 化合物同定のために、保持時間と質量情報を組み合わせることで、分析の選択性が向上
- 高感度かつ選択的な検出器による UV 吸収のない分子の検出
- 分離が困難な異性体同士である、ガラクトースおよびグルコースのクロマトグラフィー分離

参考文献

1. IMPLVO Ferreira, et al. Determination of Sugars and Some Other Compounds in Infant Formula, Follow Up Milks and Human Milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydr Polym.* 37: (3) 225-229, 1998.
2. JL Chavez-Servin et al Analysis of Mono and Di-Saccarides in Milk Based Formulae by High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection. *J Chrom A.* 1043: (2) 211-215, 2004.
3. HE Indyk and DC Woolard. Determination of Free Myo-Inositol in Milk and Infant Formula by High Performance Liquid Chromatography. *Analyst.* 119: 397-402, 1994.
4. Ibid p 401.
5. Ferreira, Op. Cit. p 227.

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 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 720005767JA PDF