

9種類の甘味料の分離及び定性分析 合成および植物由来の甘味料一斉分析



Author

林 慶子

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

砂糖の大量摂取は肥満や多くの疾患の原因とされ、代替の甘味料として合成甘味料や天然由来の甘味料が食品や飲料に添加物として使用されています。

合成甘味料であるアセスルファムKはスクロースの約200倍の甘味を有するといわれています。また、ステビアや甘草由来の甘味料であるステビオシドやグリチルリチンは配糖体です。これらの甘味料は少ない含有量でも強い甘味を有するため、高感度な測定手法が望まれます。

逆相分配クロマトグラフィーによる合成甘味料の分析はさまざまな検出器を用いて行われてきましたが、同様の用途で使用される天然の甘味料と同時に測定を行った例は多くありませんでした。

本アプリケーションノートでは9種類の甘味料のHPLC分離及びシングル四重極MS検出を行い、市販のペットボトル飲料から得られたピークの同定を行いました。

Key word： 食品添加剤、合成甘味料、ステビア、甘草

分析条件

システム

1260 Agilent Infinity II HPLCシステム
 1260 Infinity II Quaternary Pump (G7111B)
 1260 Infinity II Vial Sampler (G7129A)
 Agilent Infinity Lab LC/MSD (G6125B)
 OpenLAB ChemStation C01.07. SR3

試料

アセスルファムK、サッカリン、アスパルテム、サイクラミン、スクラロース、ズルチン、レバウディオシドA、ステビオシド及びグリチルリチンは移動相Aで溶解し100 mg/Lに調製しました。2種類の市販のペットボトル飲料は直接分析に供しました。

表1.分析条件

HPLC	
移動相A	水/メタノール/アセトン=85/10/5 +0.1%酢酸
移動相B	アセトニトリル/アセトン=95/5+0.1%酢酸
流速	0.4 mL/min
グラジエント	0%B(0 min) →30%B(10 min)→95%B(15 min)
分析時間	20分 (ポストラン8分)
カラム	ZORBAX Extend-C18, 3.0 x 100 mm, 1.8 μm (PN: 728975-302)
カラム温度	25°C
注入	1 μL
MSD	
イオン源	ESI
ドライガス	10 L/min @220°C
ネブライザ圧	55 psi
キャピラリ電圧	3000 V
シグナル	Scan(m/z=100-1500), Negative

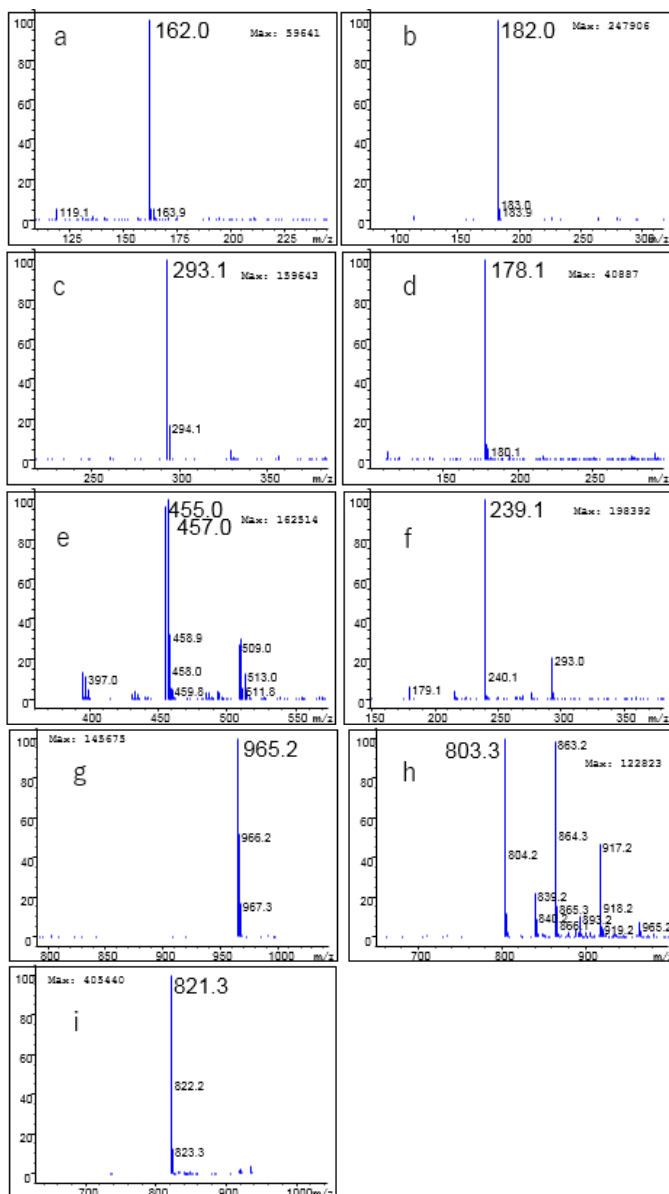


図2. 100 mg/L標準試料のマススペクトル

結果

標準試料のクロマトグラム

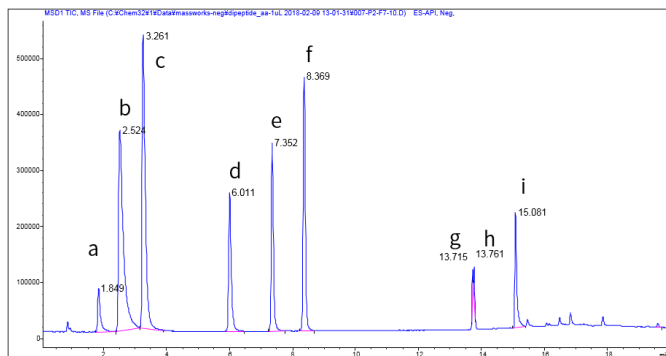


図1. 標準試料のクロマトグラム

表2. 検出されたイオン及びイオン種

	化合物名	m/z	イオン種
a	アセスルファムK	162.0	[M-K] ⁻
b	サッカリン	182.0	[M-Na] ⁻
c	アスパルテム	293.1	[M-H] ⁻
d	サイクラミン	178.1	[M-Na] ⁻
e	スクラロース	455.0	[M+CH ₃ COO] ⁻
f	ズルチン	239.1	[M+CH ₃ COO] ⁻
g	レバウディオシドA	965.2	[M-H] ⁻
h	ステビオシド	803.3	[M-H] ⁻
i	グリチルリチン	821.1	[M-H] ⁻

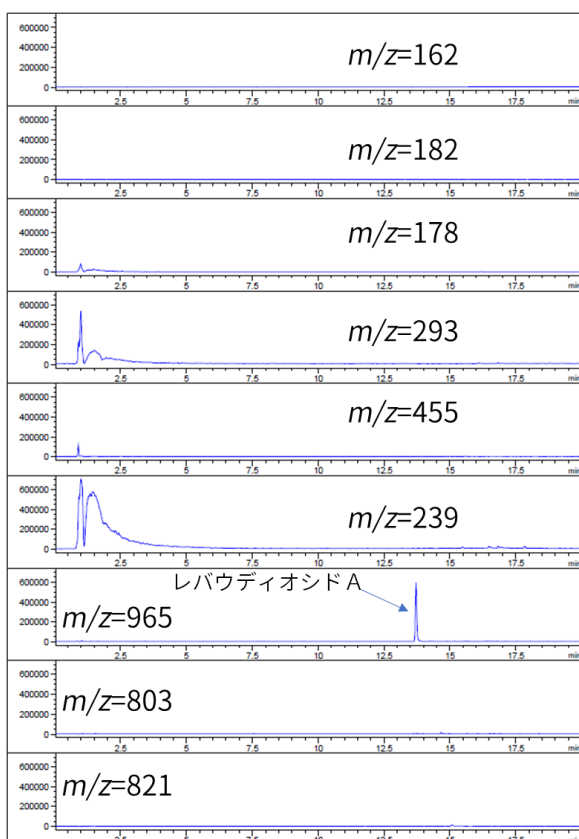


図3. 試料Aのクロマトグラム

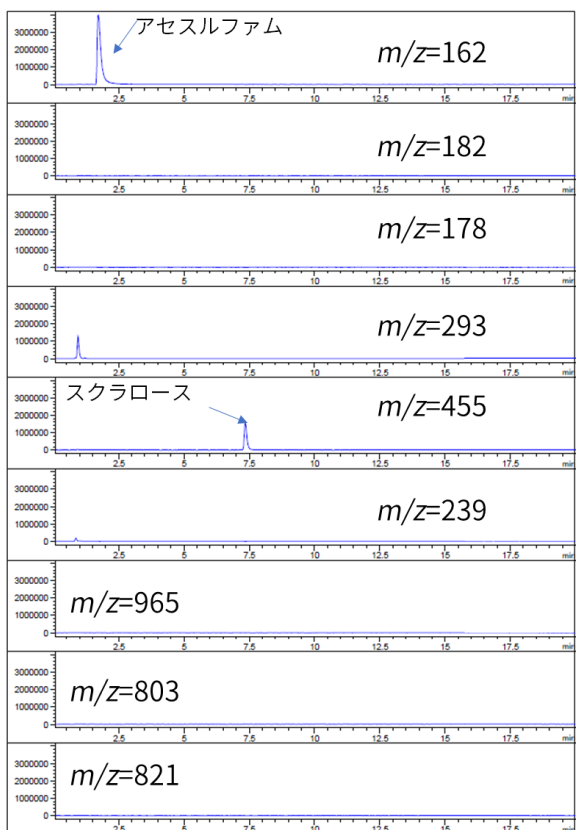


図4. 試料Bのクロマトグラム

図1に標準試料のTICを示しました。各ピークのピークトップが分離し、良好な分離が得られました。図2に各甘味料のマススペクトルを示しました。それぞれの化合物と観測されたイオン種を表2に示しました。アセスルファムK及びサッカリン・サイクラミンはカリウム脱離及びナトリウム脱離イオンを観測し、スクラロース・ズルチンは酢酸付加イオンを観測しました。アスパルテム・レバウディオシドA・ステビオシド・グリチルリチンはプロトン脱離イオンを観測しました。

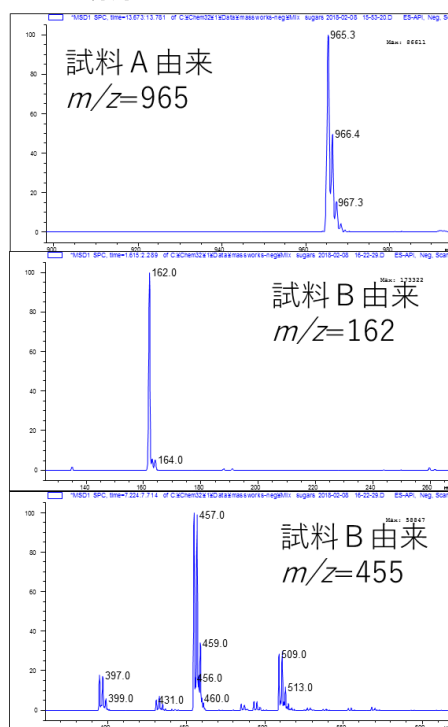


図5. 実試料から観測されたスペクトル

図3及び図4に市販飲料を直接分析したクロマトグラムを示しました。試料AからはレバウディオシドAが検出され、試料Bからはアセスルファム及びスクラロースが観測されました。LC/MS分析による保持時間及びマススペクトルの確認により、詳細な甘味料分析が可能であることが示されました。実試料から観測されたマススペクトルを図5に示しました。標準試料と同様のマススペクトルが得られました。

次に、図3のクロマトグラムをMassWorksソフトウェア(Cerno Bioscience, G6887-64000)で解析し、検出されたピークの組成推定を行いました。LC/MSにおけるMassWorksによる定性解析ではキャリブレーション化合物を準備し、同一もしくは直前の分析にてキャリブレーションを行う必要があります。この実験では分析前にMSD装置に内蔵されているTuning液(G2421-60001)によるキャリブレーションデータ採取を行いました。これにより、キャリブレーション化合物の試料選定及び調製の手間を削減することが可能です。

Negative Ion (m/z)	組成
112.9850	C2O2F3
734.0067	C14H18O8N3P3F15
1033.9875	C20H18O8N3P3F27

表3. キャリブレーションに使用したイオン

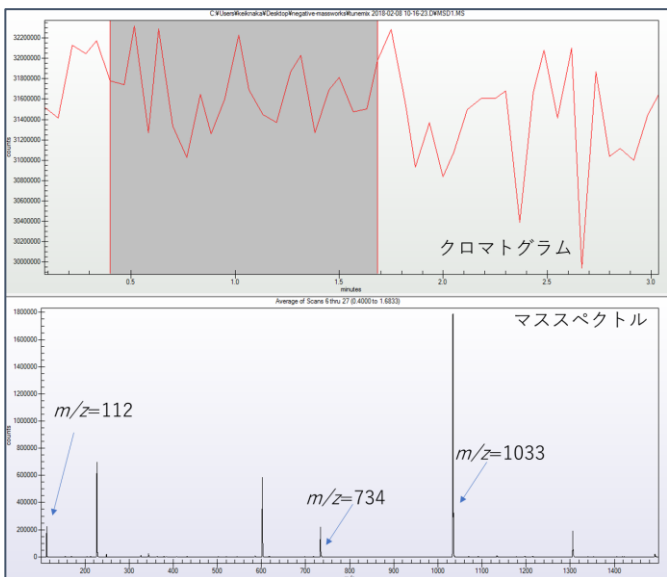


図6. MassWorksによるチューニング画面の例（上：トータルイオンクロマトグラム、下：マススペクトル）

本実験のキャリブレーションに用いたTuning液由来のイオンを表3に示し、キャリブレーション画面の例を図6に示しました。図7に試料AのMassWorksによる組成式解析結果を示しました。レバウディオシドA標準試料と溶出時間の及び m/z が一致したピークの組成はC43H65O24と推定され、レバウディオシドAのプロトン脱離体の組成と一致しました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, February 7, 2018

LC-MS-201803HK-001

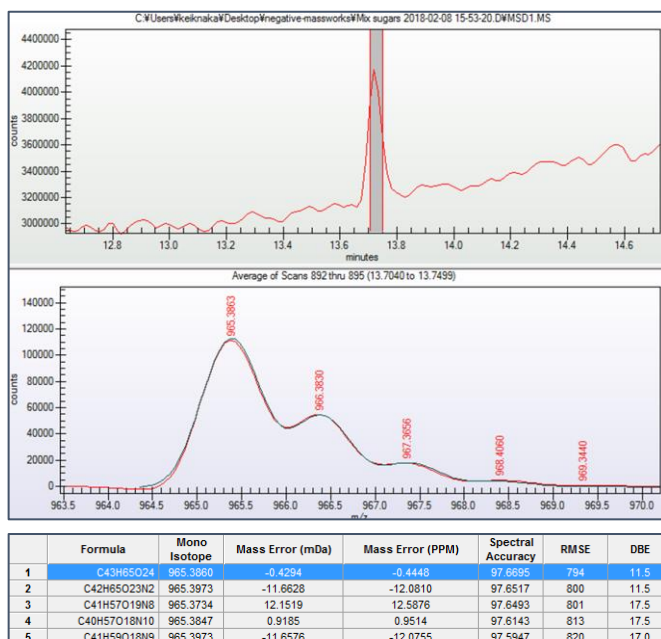


図7. MassWorksによる組成推定画面（上：トータルイオンクロマトグラム、中：マススペクトル、下：組成の候補）

結果

9種類の人工及び天然の甘味料をLC/MSで分析しました。市販の清涼飲料水から添加剤として使用された甘味料の溶出時間及び m/z による定性が可能でした。

MassWorksソフトウェアにより、観測されたイオンの組成推定を行ったところ、組成の候補がレバウディオシドAのプロトン付加体と一致しました。