

LC/MS を用いた食品中の 7 種糖アルコール（糖質系甘味料）の一斉分析

吉岡 直樹* 林 幸子 川元 達彦 吉田 昌史

Determination of 7 Sugar Alcohols by LC/MS in Food Samples

Naoki YOSHIOKA*, Sachiko HAYASHI, Tatsuhiko KAWAMOTO and Masashi YOSHIDA

Health Science Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

A simple and rapid determination method of sugar alcohols, erythritol, xylitol, D-sorbitol, D-mannitol, maltitol, lactitol and palatinit in food samples by LC/MS was developed. Sugar alcohols were extracted with water or hot water and diluted with 50% acetonitrile. The separation was performed on a HILIC column with acetonitrile-10mM ammonium formate (90:10) as a mobile phase. The recoveries from soft drink, jelly and gum fortified with the compounds at 1 mg/g and 10 mg/g ranged from 88.0 to 106.2 % and from 90.6 to 107.0 %, respectively. The quantitation limits ($S/N=10$) in jelly were 0.1 mg/g (erythritol, D-sorbitol, D-mannitol and maltitol), 0.2 mg/g (lactitol) and 0.3 mg/g (xylitol and palatinit).

I はじめに

糖アルコールは糖質の一種であるが、体内で吸収されにくく低カロリーで、虫歯の原因にもなりにくいことから、近年、菓子等の多くの食品に利用されている。糖アルコールのうち、キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールは食品衛生法の指定添加物となっているが（キシリトール、D-ソルビトールの使用基準は設定されていない）、その他の糖アルコールは食品の扱いとされており、すべての食品に制限なく使用が可能である。これらの糖アルコールは、一度に大量に摂取すると下痢を引き起こすことがあり、緩下作用に対する最大無作用量（男性）は、キシリトールで0.30 g/kg 体重、D-マンニトールで0.18 g/kg 体重との報告がある¹⁾。このため、摂取量によっては、体重の軽い子供の場合、最大無作用量を超過し、健康被害を生じる恐れがある。

糖アルコールの公定分析法として、指定添加物であるキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールについては、アセチル誘導体化後 FID-GC で分析する方法が食品衛生検査指針²⁾に掲載されており、その他の方法として、示差屈折率検出器付 HPLC による方法、パルスドエレクトロケミカル検出器付イオンクロマトグラフを用いる方法が紹介されている。しかし、前者の方法は、誘導体化に一晩必要であり、後者の方法は検出感度が低いこと、また特殊な検出器が必要であり、すべてに共通して煩雑な方法となっている。

今回、糖アルコールのうち、エリスリトール、キシリトール、D-ソルビトール、D-マンニトール、マルチトール、ラクチトール、パラチニット（還元パラチノース）の 7 種について、LC/MS を用いた簡便な一斉分析法を検討した。

II 方法

1. 試料

市販の清涼飲料水、菓子（ゼリー、ガム）を用いた。

健康科学部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究センター
健康科学研究センター
健康科学部 吉岡 直樹

2. 試薬及び試液

標準品として、エリスリトール・キシリトール・D-ソルビトール・D-マンニトール（高速液体クロマトグラフ用）、マルチトール・パラチニット（生化学用）、ラクチトール水合物（特級）は和光純薬製を用いた。各糖アルコールの構造式をFig.1に示した。

各標準品100 mgを水に溶解して50 mLとし、2000 µg/mLの標準原液とした。混合標準溶液の作製については、エリスリトール、D-ソルビトール、マルチトール、パラチニットをAグループ、キシリトール、D-マンニトール、ラクチトールをBグループとし、それぞれ混合溶液を作製した。各混合標準溶液は50%アセトニトリルで希釈し、0.05~10 µg/mLの検量線用標準溶液を調製した。

また、アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ用）及びギ酸アンモニウム（特級）は和光純薬製を用い、シリンジフィルターはMerck Millipore製Millex-LH（PTFE製、0.45 µm）を使用した。

3. 装置及び測定条件

装置：Agilent 1200 Series LC + 6210 TOF

カラム：ジーエルサイエンス Inertsil HILIC (250 mm × 2.1 mm, 5 µm)

移動相：アセトニトリル：10 mMギ酸アンモニウム水溶液=90:10

流速：0.3 mL/min カラム温度：40°C 注入量：2 µL
イオン化法及びキャピラリー電圧：ESI (Negative, 4000 V)

乾燥ガス：13 L/min (350°C) ネブライザー圧力：40 psig
フラグメンター電圧：100 V

定量イオン：

エリスリトール m/z 167.0561 [M+HCOO]⁻,

キシリトール m/z 197.0667 [M+HCOO]⁻,

D-ソルビトール・D-マンニトール

m/z 181.0718 [M-H]⁻,

マルチトール・ラクチトール・パラチニット

m/z 343.1246 [M-H]⁻

確認イオン：

エリスリトール m/z 157.0273 [M+Cl]⁻,

キシリトール m/z 151.0612 [M-H]⁻,

D-ソルビトール・D-マンニトール

m/z 227.0772 [M+HCOO]⁻,

マルチトール・ラクチトール・パラチニット

m/z 379.1013 [M+Cl]⁻

4. 試験溶液の調製

(液状食品)

試料0.5 gを水で希釈して100 mLに定容し、抽出液とした。

(ガム)

試料0.5 gを50 mL遠沈管に入れ、熱水（約85°C）25 mLを加えて、1分間ホモジナイズした。上清を分取し、残渣に熱水25 mL加え、さらに1分間ホモジナイズし、上清を分取した。両抽出液を併せて冷却後、ろ紙でろ過し、水で100 mLに定容し、抽出液とした。

(ガム以外の固形食品)

試料0.5 gを50 mL遠沈管に入れ、熱水（約85°C）25 mLを加えて、1分間ホモジナイズした。ホモジナイザーの刃を熱水25 mLで洗い、この洗液と抽出液とを併せて冷却後、ろ紙でろ過し、水で100 mLに定容し、抽出液とした。

それぞれ100mLに定容した抽出液を1 mL分取し、50%アセトニトリルを加えて10 mLに定容した一部を、シリンジフィルターでろ過し、LC/MS用試験溶液とした。

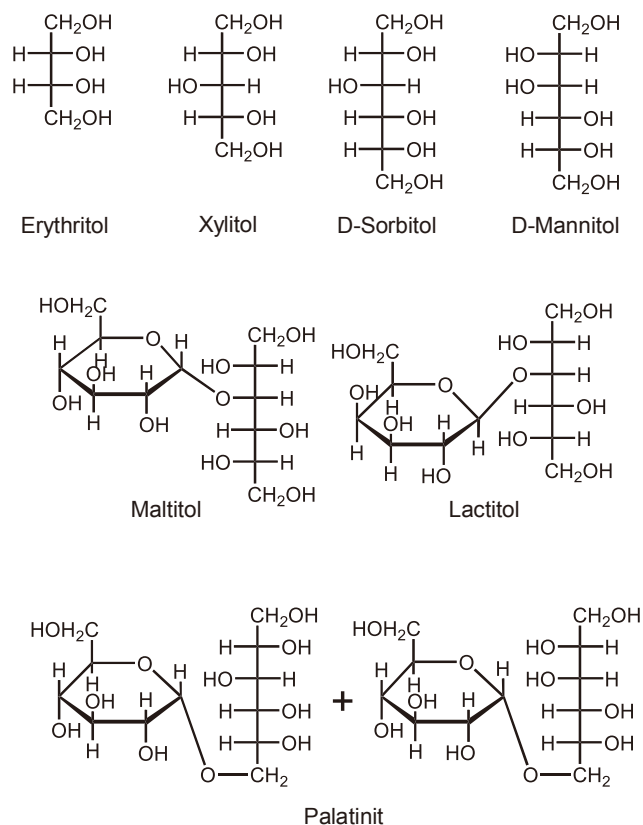


Fig.1 Chemical structures of sugar alcohols

III 結果及び考察

1. 分析カラムの検討

分析カラムについては、高極性化合物の分離に適した4種のカラム、ジーエルサイエンス製の Inertsil HILIC (250 mm×2.1 mm, 5 μm)、東ソー製の TSKgel Amide-80 (250 mm×2.0 mm, 5 μm)、Waters製の Atlantis HILIC Silica (150 mm×2.1 mm, 3 μm)、インタクト製の Scherzo SM-C18 (150 mm×3.0 mm, 3 μm) を用いて糖アルコールの分離を検討した結果、細木らが保湿ティッシュペーパー中のD-ソルビトールの含有量調査³⁾で使用しているInertsil HILICが他の糖アルコールについても、最も良い分離及びピーク形状を示したため、本カラムを用いることとした。また、この条件においても、異性体であるD-ソルビトール、D-マンニトールのピークがわずかに重なるため、混合標準溶液は2グループに分けて作製した。

2. 定量及び確認イオンの検討

移動相の検討として、Inertsil HILICを用い、アセトニトリル-水系で分析を行うと、正イオンモードではナトリウム付加イオン[M+Na]⁺が主として観測され、負イオンモードでは塩素付加イオン[M+Cl]⁻やギ酸付加イオン[M+HCOO]⁻、プロトン脱離イオン[M-H]⁻が観測された。

また、アセトニトリル-ギ酸アンモニウム水溶液系においては、正イオンモードではプロトン付加イオン[M+H]⁺やナトリウム付加イオンが、負イオンモードではギ酸付加イオンやプロトン脱離イオン、塩素付加イオンが観測された。

このうち、アセトニトリル-水系での負イオンモード分析が最も高感度であったが、ギ酸付加イオンはガラス器具やカラム内の不純物由来のイオンであるため、安定的にギ酸イオンが供給でき、次に感度の良かったアセトニトリル-ギ酸アンモニウム水溶液系移動相での負イオンモードで分析を行うこととした。この条件では、定量イオンを各糖アルコールのギ酸付加イオンまたはプロトン脱離イオンとし、確認イオンをギ酸付加イオン、プロトン脱離イオンまたは塩素付加イオンとした。塩素付加イオンもガラス器具等由来と考えられるイオンであるが、エリスリトール、マルチトール、ラクチトール、パラチニットについては他に確認イオンが観測されなかったため、塩素付加イオンを用いることとした。パラチニットは2種異性体の等モル混合物であるため、2つのピークの合計面積を用いて定量を行った。

検量線においては、7種すべての糖アルコールについて

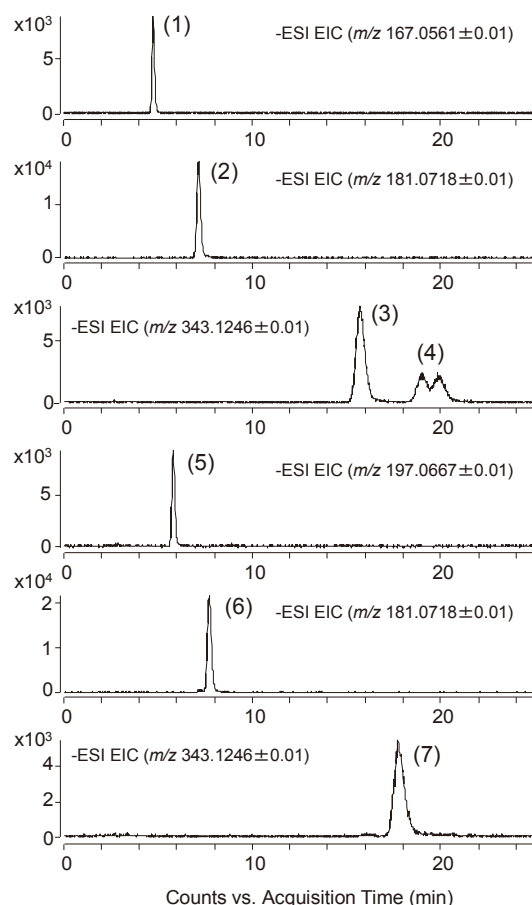


Fig.2 Extracted ion chromatograms obtained from 1 μg/mL standard solution of erythritol (1), D-sorbitol (2), maltitol (3), palatinin (4), xylitol (5), D-mannitol (6) and lactitol (7)

0.05~10 μg/mLの範囲で良好な直線性が得られた ($R^2 \geq 0.998$). Fig.2に各糖アルコール標準溶液 (1 μg/mL)のクロマトグラムを示した。

3. 抽出法の検討

食品衛生検査指針のキシリトール試験法²⁾では、ガムについては、水を加えて一夜放置した後、ろ過し、残留物をさらに熱水 (60°C水浴上) で抽出となっている。今回は、抽出操作の迅速化のため、守安らの食品中のカフェイン等の抽出法⁴⁾を参考とし、熱水を加えてホモジナイズし抽出を行った。また、ガム以外の固形食品及び液状食品は、新藤らの方法⁵⁾を参考に熱水でホモジナイズ、または水で希釈し抽出を行った。

4. 添加回収試験

清涼飲料水、ゼリー、ガムに、糖アルコール7種をそれぞれ1 mg/g及び10 mg/g相当添加し、回収試験 (n = 3)を行った。ガムについては、ブランクとして用いたガムに

Table 1 Recoveries of sugar alcohols from soft drink, jelly and gum fortified at 1 mg/g and 10 mg/g.

Analyte	Fortification level (mg/g)	Soft drink		Jelly		Gum	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Erythritol	1	98.9	2.3	102.7	4.1	102.7	2.2
	10	100.8	3.5	106.4	2.9	107.0	2.7
Xylitol	1	88.0	5.0	104.8	3.8	96.7	6.5
	10	96.7	2.1	94.4	1.4	90.8	1.6
D-Sorbitol	1	106.2	1.9	99.0	2.7	— ^{*1}	—
	10	98.8	5.6	106.5	3.6	74.1 ^{**2}	10.7
D-Mannitol	1	92.9	5.3	95.7	0.7	94.1	5.4
	10	102.8	2.7	90.6	1.2	96.0	6.5
Maltitol	1	98.4	3.9	100.6	5.6	95.3	4.9
	10	100.6	3.3	100.4	4.4	101.8	6.1
Lactitol	1	94.9	4.0	101.1	6.2	101.3	2.8
	10	103.0	6.6	105.3	4.4	100.4	3.8
Palatinit	1	102.3	6.7	102.6	2.8	105.1	0.8
	10	98.8	3.7	99.8	3.9	105.5	4.3

^{*1} Recovery was not calculated. (n=3)
^{**2} Recovery was calculated by subtracting the blank value.

D-ソルビトールが約15 mg/g含有されていたため、1 mg/g相当添加分の回収率は算出せず、10 mg/g相当添加分はブランク値を差し引き、参考値とした。回収率をTable 1に、清涼飲料水及びゼリーのクロマトグラム(各1 mg/g相当添加)をそれぞれFig.3及びFig.4に示した。マルチトール、ラクチトール、パラチニットの定量イオンであるm/z 343.1246のマスクロマトグラム上、13.5分付近にサンプルに含有するスクロース由来のピークが観測されたが、他の糖アルコールの定量の妨害にはならなかった。

本分析法での定量限界(S/N=10)は、ゼリーに添加した場合で0.1 mg/g (エリスリトール, D-ソルビトール, D-マンニトール, マルチトール), 0.2 mg/g (ラクチトール), 0.3 mg/g (キシリトール, パラチニット)であった。

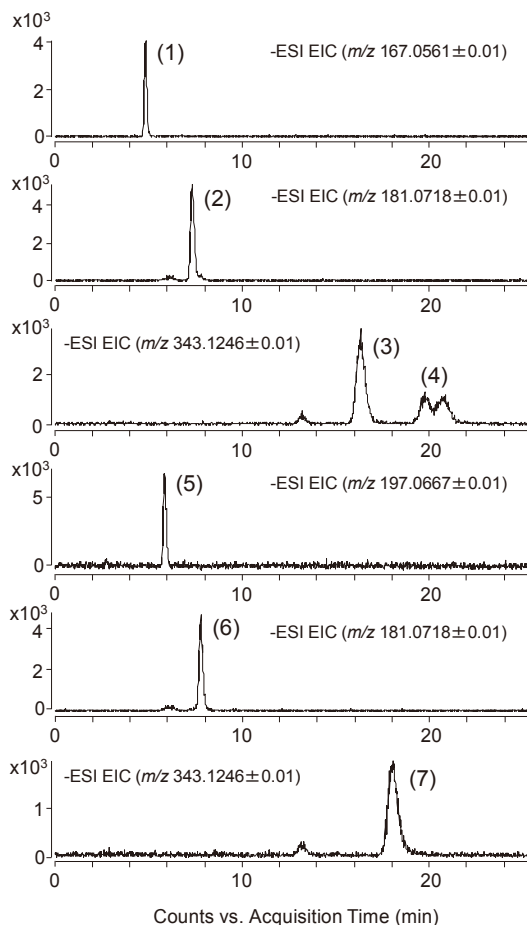


Fig.3 Typical extracted ion chromatograms obtained from soft drink fortified with erythritol (1), D-sorbitol (2), maltitol (3), palatinit (4), xylitol (5), D-mannitol (6) and lactitol (7) at 1 mg/g

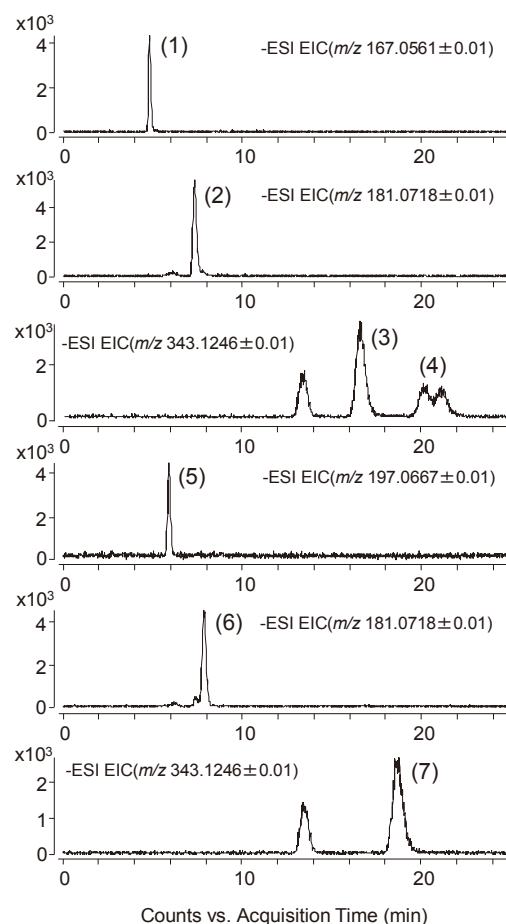


Fig.4 Typical extracted ion chromatograms obtained from jelly fortified with erythritol (1), sorbitol (2), maltitol (3), palatinit (4), xylitol (5), mannitol (6) and lactitol (7) at 1 mg/g

IV 結 論

7種糖アルコール（エリスリトール，キシリトール，D-ソルビトール，D-マンニトール，マルチトール，ラクチトール，パラチニット）のLC/MSによる一斉分析法を検討した。その結果，簡易な抽出法を用い，分離にHILICカラムを用いることにより，誘導体化の必要がなく迅速な分析が可能であった。清涼飲料水，ゼリー，ガムに添加した時の回収率は88.0~106.2%（1 mg/g添加），90.6~107.0%（10 mg/g添加）であり，定量限界は，ゼリーに添加した場合で0.1~0.3 mg/gであった。

文 献

- 1) 山崎智沙，藤井真理子，水取敦子，湯浅真由美，坂牧成恵，大山明日子，上野まどか：食品における糖アルコール類の含有実態調査。食品衛生研究，**66**，57-62（2016）
- 2) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編，p.221-227，日本食品衛生協会，東京（2003）
- 3) 細木伸泰，工藤寛，宮本啓二，宮田淳：保湿ティッシュペーパー中の D-ソルビトールの含有量調査。札幌市衛研年報，**42**，74-76（2015）
- 4) 守安貴子，斉藤和夫，中里光男，石川ふさ子，藤沼賢司，二島太一郎，田村行弘：HPLC による食品中のカフェイン，テオブロミン及びテオフィリンの同時分析法。食衛誌，**37**，14-19（1996）
- 5) 新藤哲也，貞升友紀，鈴木敬子，田中康一，外川明子，植松洋子：食品中糖アルコールの HPLC 定量法及び LC-MS 確認法。食衛誌，**54**，358-363（2013）
（平成 29 年 3 月 15 日受理）