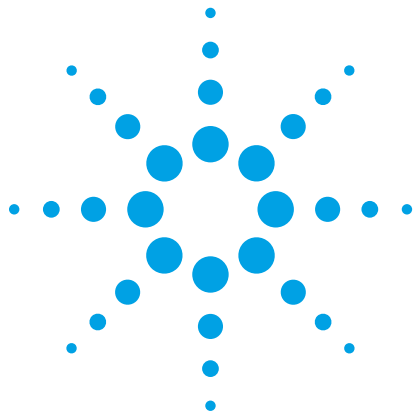




シリンジフィルタによるろ過と HPLC を使用した 飲料中食品添加物の分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

著者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

飲料に含まれる食品添加物を分析するためのサンプル前処理で Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタを詳細にテストしました。このサンプル前処理メソッドは、HPLC 分析前の直接注入または希釈のみでの注入のためのサンプルろ過を目的としています。ろ過を評価するために、幅広い化学特性および物理特性を持つ 13 種類の一般的な食品添加物を選択しました。Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを用いた HPLC メソッドを使用して、ろ過後の対象化合物の回収率を評価しました。結果から、サンプル溶液や対象化合物に基づいてろ過メンブランを適切に選択すると、Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタで幅広い食品添加物について優れた回収率が得られることがわかりました。開発したメソッドを使用して、16 種類の飲料製品の食品添加物を同定しました。

はじめに

保存料、甘味料、着色料、刺激剤などの非栄養食品添加物は、飲料および食品製品で頻繁に使用されています。これらの添加物は一般に安全ですが、特定のレベルでは有害になることがあり、アレルギーや子どもの多動を引き起こす可能性があるため、使用が制限されている国もあります。したがって、食品品質管理におけるこれらの化合物の分析は、添加剤の使用が国際的な食品品質管理基準を満たしていることを確認するために重要です。



Agilent Technologies

多くの合成または人工添加物は水溶性であるため、HPLC 分析に理想的です。ほとんどの飲料製品はサンプルマトリックスが複雑でないため LC で容易に分析できます。そのため、これらのサンプルは、通常は直接注入や希釈のみでの LC カラムへの注入に適しています。ただし、食品サンプル中の粒子がカラムにマイナスの影響を与えることがあります。したがって、飲料に含まれる添加剤の分析では、通常は HPLC 前のろ過が重要な、または唯一のサンプル前処理手順となります。特にジュースなど、大量の粒子が含まれる一部のサンプルでは、多層フィルタを使用したろ過の必要性が増します。飲むヨーグルトやアイスコーヒーなど、一部の飲用製品には牛乳が添加されています。この牛乳にはタンパク質が含まれ、ろ過の前に有機溶媒を使用してタンパク質を沈殿させる必要があります。

サンプルろ過を使用するときの大きな課題は、その処理によって成分が失われる場合があるということです。成分の損失は、ろ過メンブランと対象化合物の間の不要な相互作用が原因で生じることがあります。対象化合物の物理特性、化学構造、イオン化特性、分子量に加えて製品の処方がこの相互作用に影響を与えます。一方、特にメンブランポリマーの化学構造、疎水性または親水性、ポリマーの処方、純度などのメンブランの特性も相互作用に関連しています。不要な相互作用が発生すると、ろ過の際に対象化合物がメンブランに非特異的に結合することがあります。

サンプル溶液中で対象化合物の可溶性が低い場合も、半溶解状態の化合物クラスタがメンブランろ過でフィルタを通過できないことがあるため、化合物の損失が生じることがあります。比較的極性の低い化合物では、サンプル溶液での対象化合物の可溶性がろ過回収率に大きな影響を与えることがあります [1]。サンプル溶液は、化合物の可溶性とメンブランの湿潤性に直接影響を与えることがあるため、成分損失を引き起こすもう一つの要因となります。

従って、フィルタメンブランの選択は、サンプル溶液や、メンブランとサンプルとの相互作用に左右されます。ただし、メンブランと対象化合物との相互作用は通常は予測が困難であるため、フィルタメンブランの選択は、まずサンプル溶液を検討することから始めます。水系サンプルでは、酢酸セルロース (CA)、ポリエーテルスルホン (PES)、および再生セルロース (RC) など、親水

性タイプのメンブランが適しています。有機溶媒系サンプル、特に強い溶媒では、ポリプロピレン (PP) またはポリテトラフルオロエチレン (PTFE) フィルタを使用する必要があります。有機/水系混合サンプルでは、溶媒の組成に応じて PTFE、PP、ナイロン (ポリアクリルアミド、PA)、RC、および PES フィルタを使用できます。したがって、選択したフィルタを使用して不要な相互作用を防止するために、ろ過回収率の予備テストを行うことを強くお勧めします。フィルタの選択に関わるその他の要因には、サンプルマトリックスおよびサンプル量、検出機器の要件などがあります。

Agilent Captiva プレミアムシリレンジフィルタは清潔であることが十分にテストされており、テスト条件下で検出可能な抽出物が一切ないことを示す HPLC または LC/MS 証明書が付いています [2]。これらの徹底したテストと証明書は、ろ過によって引き起こされる潜在的な汚染に関する懸念の軽減に役立ちます。

この実験では、飲料中の幅広い食品添加物グループの分析で、さまざまなタイプのシリレンジフィルタをろ過回収率に基づいて評価しました。HPLC 分析の前に、選択した適切なシリレンジフィルタを使用して飲料または食品サンプルを前処理しました。

実験手法

使用機器

Agilent 1200 HPLC システムを使用し、Agilent Poroshell 120 カラムメソッドに基づいて HPLC メソッドを開発しました [3]。

カラム:	Agilent Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 µm (p/n 695975-302)	
溶離液:	A: 20 mM 酢酸アンモニウム、pH 4.8 B: アセトニトリル	
注入量:	3 µL	
流量:	0.851 mL/min	
グラジエント:	時間	% B (分)
	0.01	14
	2.1	52
	2.8	52
	2.81	100
合計サイクルタイム:	4.5 分 (サンプル分析に 3 分間、平衡後に 1.5 分間)	
温度:	30 °C	
検出器:	DAD SL、信号を 235 および 254 nm に設定	

化学薬品および試薬

純水な食品添加物および酢酸アンモニウムを Sigma-Aldrich Corp. 社 (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。HPLC グレードのアセトニトリル (ACN) およびメタノール (MeOH) を Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。

フィルタ性能を評価するために、保存料、着色料、甘味料を含む 13 種類の一般的な食品添加物を選択しました。図 1 に食品添加物の化学構造と pKa 値を示します。

溶液および標準試料

化合物の粉末を Milli-Q 水またはメタノールに溶解して各化合物の個別の原液 (5.0 mg/mL) を調製します。溶液を激しく攪拌して混合し、完全に溶解させます。化合物の原液を適切に希釈し、12 種類の化合物が 50 µg/mL、アスパルテームが 300 µg/mL 含まれる混合標準溶液を水で作成しました。この標準混合液を HPLC メソッド開発とピークの同定に使用しました。ろ過回収率を評価するために、12 種類の化合物の各原液 200 µL とアスパルテーム原液 600 µL を混合して、高濃度のスパイク溶液を生成しました。この溶液を使用して飲料サンプルにスパイクし、50 µg/mL (アスパルテームは 150 µg/mL) に相当する濃度にします。

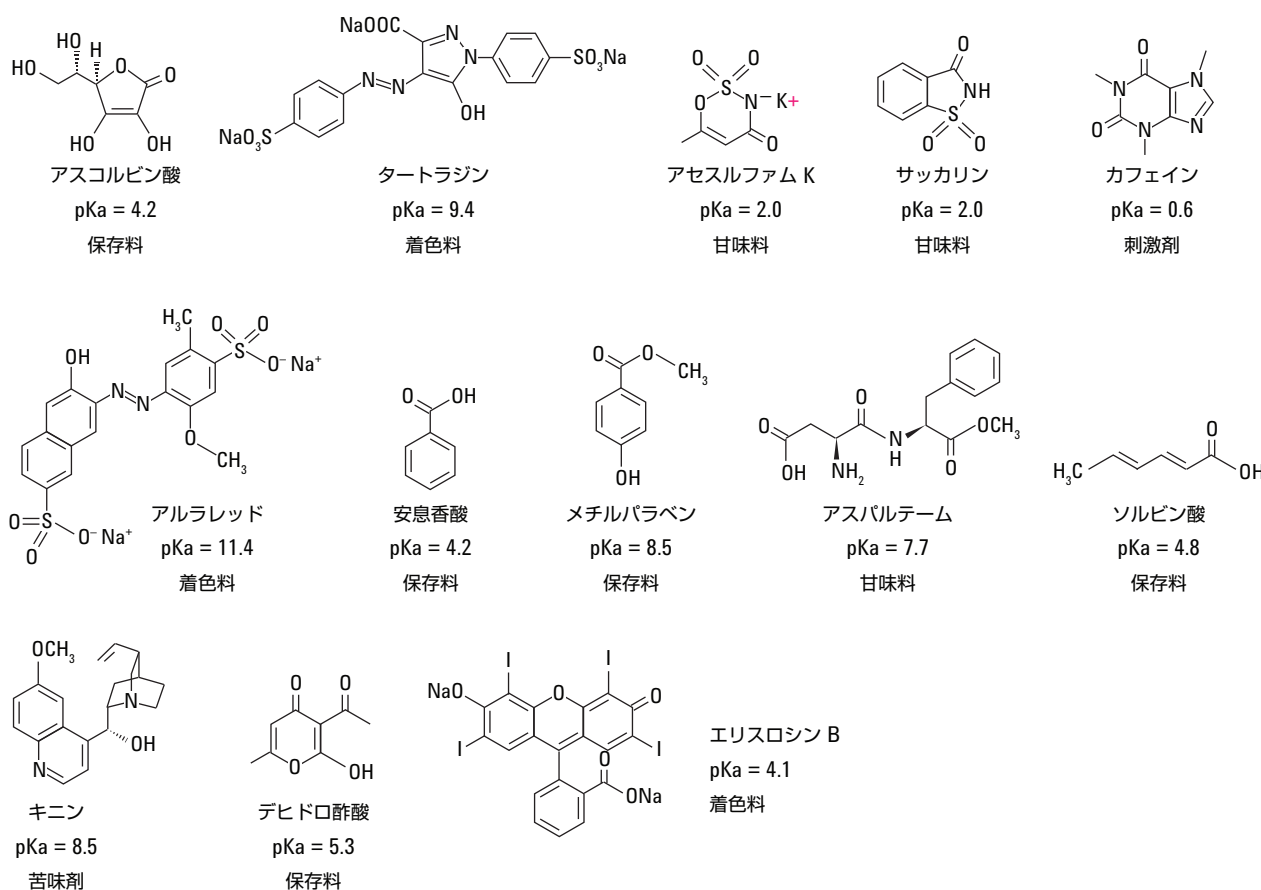


図 1. この実験で使用した食品添加物

サンプル前処理

16 種類の異なる飲料製品を地元のスーパーマーケットで購入しました。これらのサンプルを、添加物の存在量とサンプルマトリックスに応じて直接使用するか、水または有機溶媒で適切に希釈しました。アセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒を牛乳が含まれるサンプルに加え、タンパク質を沈殿させました。サンプルをろ過して沈殿物を除去し、次に HPLC で分析しました。

ろ過回収率を評価するために添加剤標準をスパイクする 2 つのサンプルを選択しました。水系サンプルの評価にはスポーツドリンク、Thirst Quencher を使用しました。適切な量の標準スパイク溶液を Thirst Quencher ブランクに加え、添加剤の最終的な濃度を 50/150 µg/mL にしました。HPLC 分析の前に、このサンプル 2 mL を遠心分離するか、またはさまざまな Captiva プレミアムシリンジフィルタでろ過しました。水系/有機溶媒溶液中のサンプルを評価するためにダイエット飲料、Dannon Yogurt を使用しました。同様に、混合したスパイク溶液を Dannon Yogurt ブランクに加え、最終濃度を 50/150 µg/mL にしました。スパイクしたサンプルを等量のメタノールで希釈し、最終的なサンプル溶液を 1:1 MeOH:水としました。前述の処理と同様に、HPLC 分析の前に、このサンプル 2 mL を遠心分離するか、またはさまざまな Captiva プレミアムシリンジフィルタでろ過しました。

食品添加物のろ過回収率として次のタイプのシリンジフィルタを評価しました。

水溶液中のサンプル：

- Agilent Captiva プレミアム PES シリンジフィルタ、25 mm、0.2 µm (p/n 5190-5098) および 0.45 µm (p/n 5190-5099)
- Agilent Captiva プレミアム RC シリンジフィルタ、25 mm、0.2 µm (p/n 5190-5110) および 0.45 µm (p/n 5190-5111)
- Agilent Captiva プレミアム CA シリンジフィルタ、28 mm、0.2 µm (p/n 5190-5116) および 0.45 µm (p/n 5190-5117)

水系/有機溶媒溶液中のサンプル：

- Agilent Captiva プレミアム RC シリンジフィルタ、25 mm、0.2 µm (p/n 5190-5110) および 0.45 µm (p/n 5190-5111)
- Agilent Captiva プレミアム PTFE シリンジフィルタ、25 mm、0.2 µm (p/n 5190-5086) および 0.45 µm (p/n 5190-5087)
- Agilent Captiva プレミアムガラスファイバ/PTFE シリンジフィルタ、25 mm、0.2 µm (p/n 5190-5128) および 0.45 µm (p/n 5190-5129)
- Agilent Captiva プレミアムナイロンシリンジフィルタ、25 mm、0.2 µm (p/n 5190-5092) および 0.45 µm (p/n 5190-5093)

結果と考察

HPLC による分離とピークの同定

表面多孔質粒子が充填された HPLC カラムは、全多孔質粒子が充填された従来のカラムよりも高いカラム効率と大幅に短い分析時間が得られることがわかりました。Agilent Poroshell 120 カラムは 2 μm 未満のカラムと同様の効率と選択性を高い背圧なしに提供します。したがって、Poroshell 120 カラムは通常の 400 bar HPLC システムで使用できるだけでなく、高い効率、短い分析時間、溶媒の節約を実現します。

この HPLC メソッドは、Poroshell 120 カラムを使用したこれまでのメソッドを基にしたものです [3]。わずか 3 分間でベースライン分離が達成されました。2 つの波長 (235 nm および 254 nm) を使用して、すべての対象化合物を 1 回の分析でモニタリングしました。ピーク同定のための 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準試薬の LC クロマトグラムを図 2 に示します。

ろ過回収率の評価

サンプルサイズに制限がないため、最大のメンブラン接触表面積を持ち、最大の吸着を示す 25 mm のシリンジフィルタを評価に使用しました。

相対回収率として結果を評価しました。これは、ろ過サンプル中の対象化合物と遠心分離サンプル中の対象化合物のピーク面積の比較です。遠心分離では対象化合物の損失がないと仮定すると、ろ過サンプルのピークが遠心分離サンプルのピークに近いほど、ろ過回収率は高くなります。この結果を図 3 および 4 に示します。

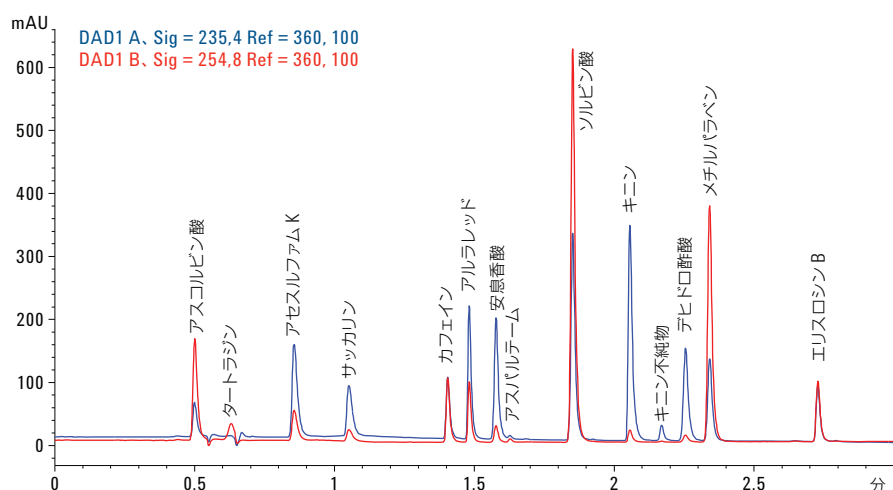


図 2. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の混合標準試料 (13 種類の食品添加物) の HPLC クロマトグラム

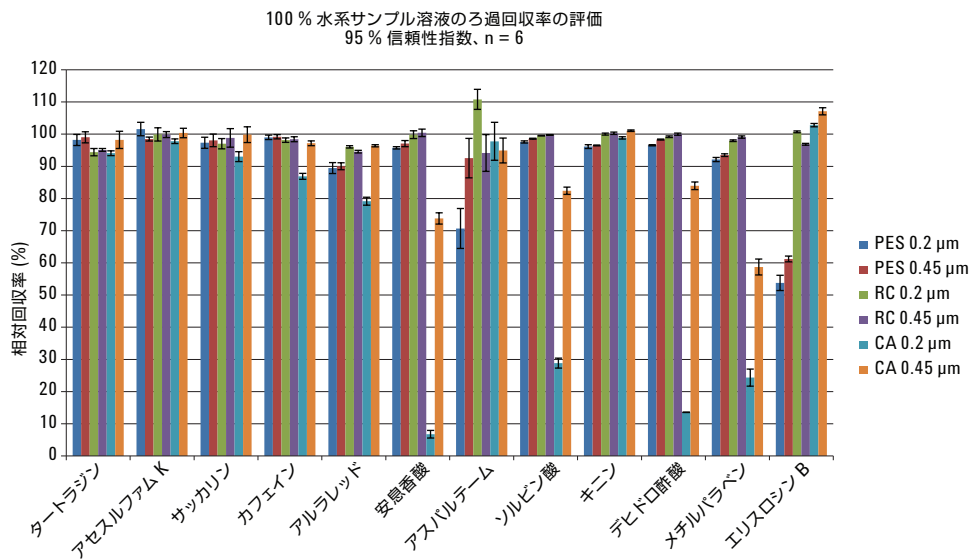


図 3. 100 % 水系サンプル溶液のろ過回収率の評価の結果、信頼度指数 95 %、n = 6。Thirst Quencher サンプルを HPLC 注入前に直接ろ過、相対回収率 (%) = 遠心分離サンプルを基準にしたろ過サンプルの正規化ピーク面積比

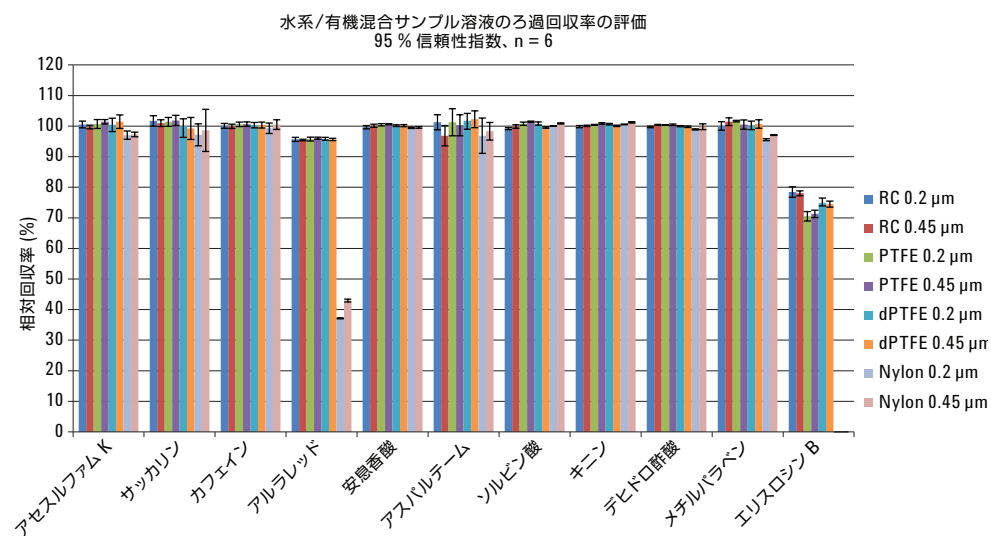


図 4. 水系/溶媒系サンプル溶液のろ過回収率の評価の結果、信頼度指数 95 %、n = 6。ダイエット飲料サンプルを MeOH で希釈して 1:1 MeOH:水サンプル溶液を生成し、攪拌してろ過した後 HPLC に注入、相対回収率 (%) = 遠心分離サンプルを基準にしたろ過サンプルの正規化ピーク面積比

100 % 水溶液中のサンプルについては、親水性メンブレンのフィルタを選択しました。再生セルロース (RC) フィルタは、すべての対象化合物について優れた回収率 (>95 %) を示しました。ただし、PES フィルタや酢酸セルロース (CA) ではろ過の際に一部の化合物が失われ、特に CA フィルタでは、これがいくつかの酸の大きな損失につながりました。メンブレンが対象化合物の吸着を示した場合、0.2 µm メンブレンフィルタは 0.45 µm メンブレンフィルタよりも大きい吸着を示しました。これは、0.45 µm メンブレンと比較して 0.2 µm メンブレンの方が密度が高いことが理由と思われます。したがって、必ず必要な場合を除き、メンブレンへの不要な吸着を防止するために 0.45 µm フィルタを選択します。

水系/有機サンプル溶液中のサンプルでは、疎水性メンブレンを持つフィルタを含めました。RC、PTFE、および多層 PTFE シリンジフィルタを使用すると、エリスロシン B を除くすべての食品添加物で優れた一貫性のある回収率が得られました。多層 PTFE シリンジフィルタは、対象化合物を吸着せず、少ない抵抗で容易なる過を提供しました。ジュースなどの一部の飲料サンプルでは、多層フィルタの使用を強くお勧めします。エリスロシン B について低い回収率が見られましたが、通常、これはサンプル溶液への比較的低い可溶性に関連するものと考えられます。ナイロンフィルタは、食品着色料、アルラレッドおよびエリスロシン B について大きな吸着を示しました (回収率 < 50 %)。

評価の結果から、水系サンプル溶液と水系/有機サンプル溶液すべての中で、RC フィルタが最高の回収率を提供することがわかりました。水系サンプルおよび水系/溶媒系サンプルの RC フィルタのろ過回収率を比較すると、水系/溶媒系サンプル溶液では、ほとんどの対象化合物について回収率がわずかに高くなりました (最大 5 %)。これらはサンプル溶液中での化合物の可溶性に関連していました。優れた可溶性は、ろ過の際の対象化合物の損失を防ぐ上で役立ちました。食品着色料は、ろ過によって容易に失われると考えられます。追加試験を行い、食品色素分析に与えるろ過の影響を評価する予定です。

LC 注入前に 0.45 µm フィルタでろ過すると、粒子が適切に除去され、Poroshell 120 カラムを保護することがわかりました [4]。この実験では一般的な 400 bar HPLC システムで Poroshell 120 を使用したため、RC 0.45 µm シリンジフィルタを RC 0.2 µm フィルタの代わりに使用して 16 種類の飲料サンプルを調べました。

飲料のろ過

開発したメソッドを 16 種類の飲料製品の食品添加物の分析に使用して、特定のアプリケーションでのメソッドの適合性をさらに評価しました。表 1 に示すように、これらの製品についてさまざまなサンプル前処理手順を実行しました。14 種類の製品で各種の食品添加物が検出されました。これらの添加物は、リテンションタイムと UV スペクトルの標準試料との比較に基づいて同定しました。クロマトグラムの比較を図 5 に、添加物の同定とろ過回収率の結果を表 1 に示します。

結論

シリンジフィルタを使用したろ過は、飲料および飲用食品製品中の食品添加物を分析するための容易でシンプル、高効率、そして堅牢なサンプル前処理手法であることがわかりました。飲料サンプルは、HPLC 分析の前に直接ろ過することも、希釈後にろ過することもできます。フルーツジュースなど、大量の粒子が含まれる製品では、フィルタメンブレンが短時間で詰まらないように、多層フィルタを使用することをお勧めします。メンブレンタイプやポアサイズ、フィルタサイズ、多層フィルタ/レギュラーフィルタなどのフィルタの選択は、サンプル溶液やマトリックス、対象化合物の特性、および機器分析の要件に基づいて行います。アジレントは、適切なフィルタ選択のガイドとなるオンラインセレクションツールを提供しています [5]。ろ過の際の不要な損失を防ぐには、実際のサンプルにフィルタを使用する前に簡単な回収率の評価を実施してください。

今回の分析から、Agilent Captiva プレミアム再生セルロースシリンジフィルタは、優れたろ過回収率と粒子除去効率を提供する、飲料製品中の食品添加物を分析するための優れた選択肢であることがわかりました。

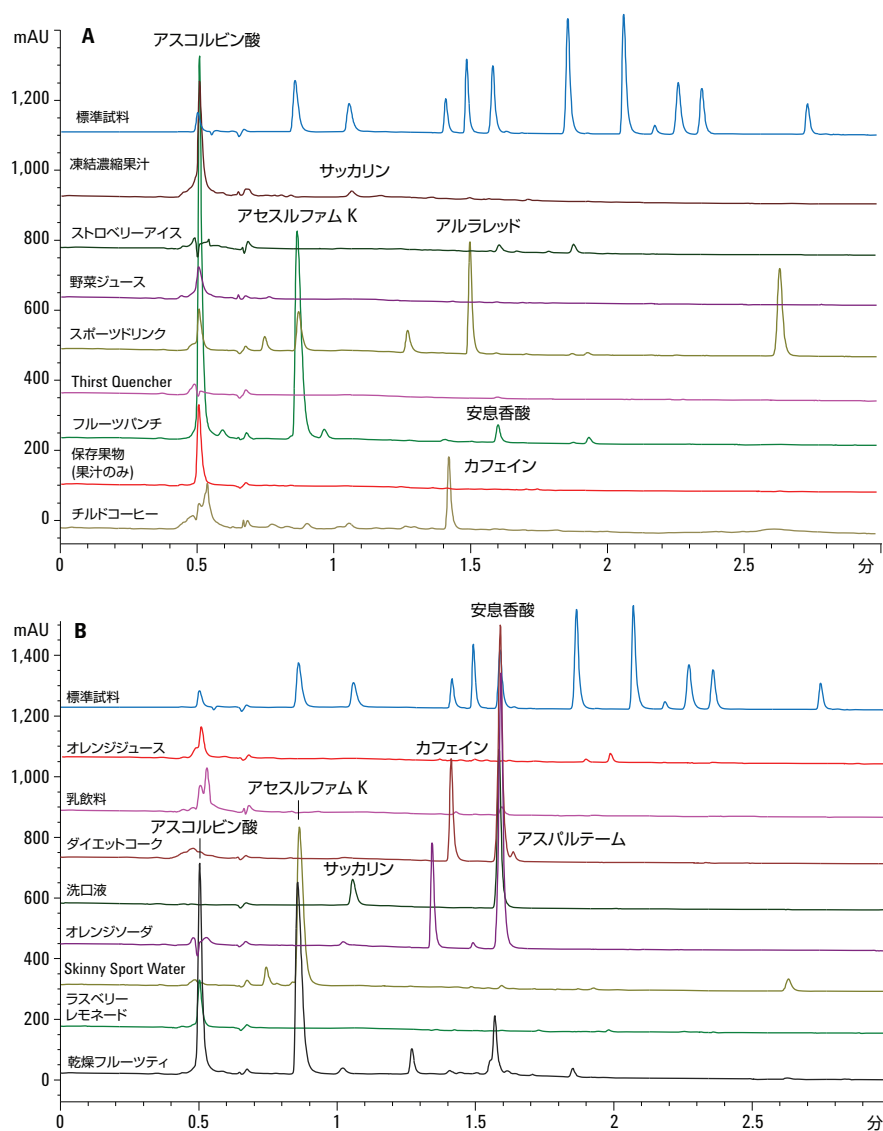


図 5. 主要なサンプル前処理手法としてろ過を使用した HPLC/UV による飲料製品中の食品添加物の分析。サンプルは Agilent Captiva プレミアム 0.45 μ m RC シリンジフィルタでろ過しました。A) 飲料製品 1～8 のクロマトグラムの比較、B) 飲料製品 9～16 のクロマトグラムの比較

表 1. 飲料製品中の食品添加物の分析

飲料製品	サンプル前処理	検出された添加物	相対ろ過回収率 (%) の 平均値、n = 3
凍結濃縮果汁	室温で解凍、水で 10 倍に希釈	アスコルビン酸 サッカリン	103.4 103.1
ストロベリーアイス	室温で解凍、MeOH で 2 倍に希釈し、攪拌	N/A	N/A
野菜ジュース	水で 10 倍に希釈し、攪拌	アスコルビン酸	99.4
スポーツドリンク	直接使用	アスコルビン酸 アセスルファム K アルラレッド	97.0 99.3 94.6
Thirst Quencher	直接使用	N/A	N/A
フルーツパンチ	直接使用	アスコルビン酸 アセスルファム K 安息香酸	100.8 100.2 100.2
保存果物 (果汁だけを分析)	水で 10 倍に希釈し、攪拌	アスコルビン酸	98.6
チルドコーヒー	アセトニトリルで 3 倍に希釈し、攪拌	カフェイン	101.6
ダイエットコーク	直接使用	カフェイン 安息香酸 アスバルテーム	99.1 99.4 99.2
洗口液	水で 50 倍に希釈し、攪拌	サッカリン 安息香酸	101.4 100.4
オレンジソーダ	直接使用	アルラレッド 安息香酸	96.2 99.2
Skinny Sport Water	直接使用	アセスルファム K	99.9
乳飲料	MeOH で 2 倍に希釈し、攪拌	安息香酸	99.9
ラズベリーレモネード	水で 5 倍に希釈し、攪拌	アスコルビン酸	100.1
オレンジジュース	水で 5 倍に希釈し、攪拌	アスコルビン酸	90.9
乾燥フルーツティ	粉末茶 1 袋を 50 mL の水に溶解し、 水で 10 倍に希釈し、攪拌	アスコルビン酸 アセスルファム K	100.5 100.0

相対回収率 (%) = 遠心分離サンプルを基準にしたろ過サンプルの正規化ピーク面積比

参考文献

1. N. Chamkasem, F.J.Schenck, T. Harmon, J-M.D. Dimandja, L. Mitchell “Reduction in Sample Filtration Analyte Losses for Pesticide Analysis by LC/MS” FDA Laboratory Information Bulletin, No. 4444.U.S. FDA, Silver Spring, MD, United States (2010).
2. Anon. “Agilent Captiva Syringe Filters - Raise Your Sample Filtration Standards” Brochure, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-1230EN (2013).
3. A.E.Mack, W.J.Long “Fast, Low Pressure Analysis of Food and Beverage Additives Using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5990-6082EN (2010).
4. L. Zhao “Syringe Filter Filtration Efficiency and Impact on LC Column Life” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-1309EN (2012).
5. Agilent Captiva Syringe Filter Selection Guide.
<http://filtrationselectiontool.chem.agilent.com/product-guide/agilent-filters-product-guide>

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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. 2013

Printed in Japan

December 12, 2013

5991-3737JAJP



Agilent Technologies