



カラムと溶媒の自動選択機能を 活用した単一 LC システムによる 複数の食品アプリケーションの分析

Agilent 1260 Infinity II マルチメソッドソリューション

アプリケーションノート

食品試験・農業

著者

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

Agilent 1260 Infinity II マルチメソッドソリューションでは、1 つの LC システムにおいて手動でシステムを変更しなくても、複数の LC アプリケーションを実施できます。通常、最大 15 の異なる移動相を用いた溶媒の自動選択、さらに最大 4 本のカラムの自動切り替えにより、100 を超える異なる分離条件を使用できます。カラムと溶媒をメソッドパラメータとして指定し、複数のカラムと溶媒を使用する複数のメソッドをシーケンスの一部として実施できます。このアプリケーションノートでは、食品管理ラボのアプリケーション例として実施した酸化防止剤、甘味料、および防腐剤の分析における 1260 Infinity II マルチメソッドソリューションの使用方法について説明します。



Agilent Technologies

はじめに

多くのラボでは、複数のカラム、移動相、その他のクロマトグラフィーパラメータが必要になる複数のアプリケーションを同じ LC システムで実施しています。通常、この場合には、機器を目的のアプリケーションに適合させるために、カラムと移動相を手動で交換する必要があります。Agilent 1260 Infinity II マルチメソッドソリューションでは、通常、最大 15 の異なる移動相を用いた溶媒の自動選択、さらに長さが 300 mm 以下の最大 4 本のカラムの自動切り替えが使用できます。この設定により、手動でシステムを変更しなくても 100 を超える異なる分離条件を使用できます。さらに多数のカラムと移動相を切り替える必要がある場合は、以前のアプリケーションノート¹で説明した、Agilent 1290 Infinity II マルチメソッドソリューションが最適な機器です。

食品添加物は、栄養価や官能評価値を向上させるため、または消費期限を延ばすために、食品に添加されている、または食品の製造、処理、包装、保管に関与している物質です²。食品添加物の例として、ビタミン、香気物質、甘味料、着色料、防腐剤、酸化防止剤などがあります。ほとんどの国では、食品添加物の使用は規制されています。欧州連合では、食品添加物として使用される物質は E 番号でコード分類されています。

BHA (E 320)、BHT (E 321) のような酸化防止剤は、脂質酸化を抑制するために使用されており、脂質分解生成物による好ましくない香気物の生成が原因の食品劣化を回避しています²。アセスルファミン K (E 950)、サッカリン (E 954) のような甘味料は甘い感覚を生成する化合物ですが、栄養価は無視できるほど低いものです²。防腐剤や抗菌剤は、物理的方法で微小植物を除去できない場合に消費期限を延ばすために必要です。ソルビン酸 (E 200)、安息香酸 (E 210) のような弱酸は、酸性食品で頻繁に使用されています²。サリチル酸は化粧品の抗菌剤として使用されていますが、一方で、にきび治療用の角質溶解薬としても使用されています³。

このアプリケーションノートでは、食品管理ラボのアプリケーション例として実施した酸化防止剤、甘味料、および防腐剤の分析における 1260 Infinity II マルチメソッドソリューションの使用方法について説明します。

実験方法

装置

Agilent 1260 Infinity II マルチメソッドソリューションを、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7111B)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、溶媒選択バルブ (G4235A) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラ (G7167A)、サンプル冷却システム (オプション 100) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、4 カラム選択バルブ (G4237A) とキャピラリーキット (オプション 006) を搭載したカラム識別キットとバルブドライブ (オプション 058) 付き
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 HS (G7117C)、光路長 10 mm の Max-Light カートリッジセル (G4212-60008) を搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition、リビジョン C.01.07 SR 2 [255]

カラム

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 685975-902T)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-902T)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-906T)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルは Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak, EMD Millipore、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。リン酸二水素カリウムは Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。酢酸、トリフルオロ酢酸、没食子酸プロピル、tert-ブチルヒドロキノン、ブチルヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、アセスルファミン K、サッカリンナトリウム、および安息香酸は、Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。アスパルテームとソルビン酸は Supelco (ベルフォント、米国) から購入しました。サリチル酸と 2',4',5'-トリヒドロキシベンチロフェノンはそれぞれ、Fluka (ブフス、スイス) および Synquest Laboratories (アラチュア、米国) から購入しました。

サンプルおよびメソッド

酸化防止剤の分析

標準試料：ブチルヒドロキシアニソール (BHA、E 320)、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT、E 321)、没食子酸プロピル (PG、E 310)、tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ、E 319)、および 2',4',5'-トリヒドロキシブチロフェノン (THBP) の混合物を、PG と THBP は濃度 10 µg/mL、BHA と TBHQ は濃度 50 µg/mL、BHT は濃度 100 µg/mL において、水：アセトニトリル (80：20、v：v) の溶液で前処理しました。

サンプルとサンプル前処理：チューインガムを、地域のスーパーマーケット（ドイツ）で購入しました。1 片のチューインガムを細断し、超音波洗浄器において 20 mL のアセトニトリルで抽出しました。分析する前に 1 mL プラスチックシリンジと Captiva プレミアムシリンジフィルタナイロン、15 mm、0.45 µm (p/n 5190-5091) を使用して抽出物をろ過しました。

甘味料の分析

標準試料：アセスルファム K (E 950)、アスパルテム (E 951)、およびサッカリンナトリウム (E 954) の混合物を、各成分の濃度 10 µg/mL において、水：アセトニトリル (90：10、v：v) の溶液で前処理しました。

サンプルとサンプル前処理：無糖のスポーツドリンクを地域のスーパーマーケット（ドイツ）で購入しました。サンプルを超音波処理で脱気し、1 mL プラスチックシリンジと Captiva プレミアムシリンジフィルタ再生セルロース、15 mm、0.45 µm (p/n 5190-5109) を使用してろ過しました。分析では、サンプルを水で 1：10 に希釈して使用しました。

防腐剤の分析

標準試料：安息香酸 (E 210)、サリチル酸、およびソルビン酸 (E 200) の混合物を、各成分の濃度 10 µg/mL において、水：アセトニトリル (90：10、v：v) の溶液で前処理しました。

サンプルとサンプル前処理：フェイシャルトニックを地域のスーパーマーケット（ドイツ）で購入しました。1 mL プラスチックシリンジと Captiva プレミアムシリンジフィルタ再生セルロース、15 mm、0.45 µm (p/n 5190-5109) を使用してサンプルをろ過しました。分析では、サンプルを水で 1：1,000 に希釈して使用しました。

表 1. 酸化防止剤の分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、4.6 × 100 mm、2.7 µm
溶媒	A) 水 + 0.5 % 酢酸 B) アセトニトリル
グラジエント	0 分 – 10 %B 10 分 – 95 %B
ストップタイム	15 分
ポストタイム	10 分
流量	1.000 mL/min
温度	40 °C
検出	280 nm/4 nm、リファレンス 390 nm/20 nm、20 Hz、スペクトル採取
注入量	10.0 µL
サンプル温度	10 °C

表 2. 甘味料の分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 × 100 mm、2.7 µm
溶媒	A) 20 mM KH ₂ PO ₄ 水溶液、pH 3 B) アセトニトリル
グラジエント	0 分 – 15 %B 10 分 – 80 %B
ストップタイム	10 分
ポストタイム	5 分
流量	1.000 mL/min
温度	30 °C
検出	214 nm/4 nm、リファレンス 360 nm/100 nm、20 Hz、スペクトル採取
注入量	10.0 µL
サンプル温度	10 °C

表 3. 防腐剤の分析のクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8、4.6 × 100 mm、2.7 µm
溶媒	A) 水 + 0.05 % トリフルオロ酢酸 B) アセトニトリル:イソプロパノール (50：50) + 0.05 % トリフルオロ酢酸
グラジエント	0 分 – 15 %B 10 分 – 40 %B
ストップタイム	10 分
ポストタイム	5 分
流量	1.000 mL/min
温度	40 °C
検出	235 nm/4 nm、リファレンス 380 nm/40 nm、20 Hz、スペクトル採取
注入量	10.0 µL
サンプル温度	10 °C

機器の設定

1260 Infinity II マルチメソッドソリューションには、カラムと溶媒をメソッドパラメータとして指定する機能があります。この機能により、1 台の機器でユーザーが操作しなくても、複数のカラムと溶媒を使用する複数のメソッドが実施できると同時に、これらのメソッドをシーケンスの一部として使用できます。

機器の構成時に、溶媒選択バルブを Agilent 1260 Infinity II クォータリポンプとクラスタリングして、ポンプとバルブのクラスタを形成します。溶媒選択バルブとポンプのクラスタリングについては、以前のアプリケーションノート⁴で説明されています。このアプリケーションノートでは、溶媒選択バルブを 1260 Infinity II クォータリポンプのチャンネル A に接続して、使用する水系溶媒を選択できるようにしました。[Pump Valve Cluster Configuration (ポンプバルブクラスタの構成)] メニューで、溶媒選択バルブのポジションおよび 1260 Infinity II クォータリポンプのチャンネル B、C、D のポジションに対して、接続されている溶媒を示す名前を付けます。ポンプとバルブクラスタのメソッドでは、ドロップダウンメニューから名前で溶媒を選択することができ、溶媒選択バルブは自動的に対応するポジションに切り替わります。

カラム識別タグリーダー (カラム識別キットの一部) と Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタットを使用してカラムの履歴を追跡できます。カラムにカラム識別タグを取り付けると、説明、形状データ、pH、圧力、温度制限などのカラム特性が、ChemStation カラムテーブルで自動的に使用できるようになります (図 1)。注入回数、測定最高温度、最初と最新の注入日付などのカラム履歴が、カラム識別タグで追跡されます。

#	Installed	Location	Tag	Description	Col. Serial#	Batch#	Product#	# Injections	Max. P [bar]	Max. T [°C]	Max. pH	Min. pH	Length	Diameter	Size	Void Unit	Comment
1	YES	Left 1	Sealed	Poroshell 120 SB-C18	USCEW03045	B16095	685975-902T	79	600	90.0	8.0	1.0	100.0	4.6	2.7	1,000 ml	
2	YES	Left 2	Sealed	Poroshell 120 EC-C18	USCF507202	B16107	695975-902T	29	600	60.0	8.0	2.0	100.0	4.6	2.7	1,000 ml	
3	YES	Left 3	Sealed	Poroshell 120 EC-C8	USDFK01718	B16046	695975-906T	142	600	60.0	8.0	2.0	100.0	4.6	2.7	1,000 ml	

図 1. ChemStation カラムテーブル

[Column Assignment (カラム割り当て)] 画面 (図 2) で、4 カラム選択バルブの配管を定義し、取り付けたカラムをそれぞれのポジションに割り当てます。[Column Assignment (カラム割り当て)] 画面は、直接 ChemStation カラムテーブルに接続されます。カラム識別タグを付けて取り付けたカラムは、自動的に正しい位置に割り当てられます。

4 カラム選択バルブでは、カラムに接続するか、バイパスまたは廃液ポジションとして使用できる 4 つのポジションが用意されています。このアプリケーションノートでは、3 本のカラムを取り付けて、1 つのポジションをバイパスポジションとして使用しました。

カラムの寿命を最大限に延ばすために、必要なカラムを流路に切り替える前に、ポンプから検出器までのシステムを、バイパスを通して新しい移動相でフラッシングすることを推奨します。これにより、このカラムで推奨されていない pH 値を持つ溶媒からカラムを保護します。さらに、使用後にカラムの寿命を最大限に延ばすために最適な溶媒でカラムをフラッシングすることを推奨します。これを実行する簡単な方法は、アプリケーションごとにマスターシーケンスを設定することです。ここで、フラッシング、カラム平衡化、カラム保管を管理します。

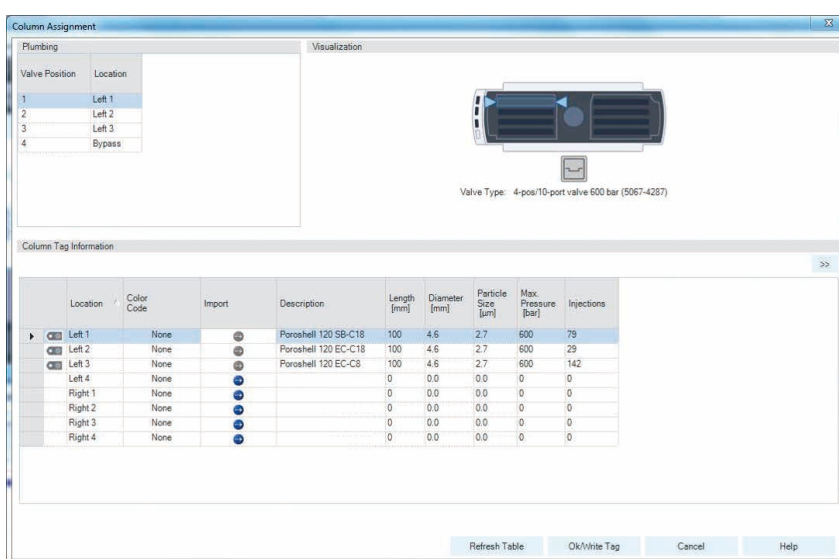


図 2. [Column Assignment (カラム割り当て)] 画面

カラムを割り当てたら、1260 Infinity II マルチカラムサーモスタットの [Method (メソッド)] 画面のドロップダウンメニューから特定のメソッドで使用するカラムを選択できます (図 3)。メソッドをロードすると、4 カラム選択バルブが、選択したカラムに対応するポジションに自動的に切り替わります。

結果と考察

このアプリケーションノートでは、食品管理ラボのアプリケーション例として、1260 Infinity II マルチメソッドソリューションを使用して酸化防止剤、甘味料、および防腐剤を分析しました。これらの分析は、カラムと溶媒をメソッドパラメータとして指定して、単一のシーケンスで実施できます。

酸化防止剤の分析

図 4 に、10 回の連続分析で測定した、酸化防止剤の PG、THBP、TBHQ、BHA、BHT の分析結果、およびリテンションタイムと面積精度を示します。すべてのピークにおいて、きわめて良好なリテンションタイム精度が得られました。PG、THBP、TBHQ、および BHT については、標準混合物中でこれらの化合物が分解したことにより面積精度が損なわれました。

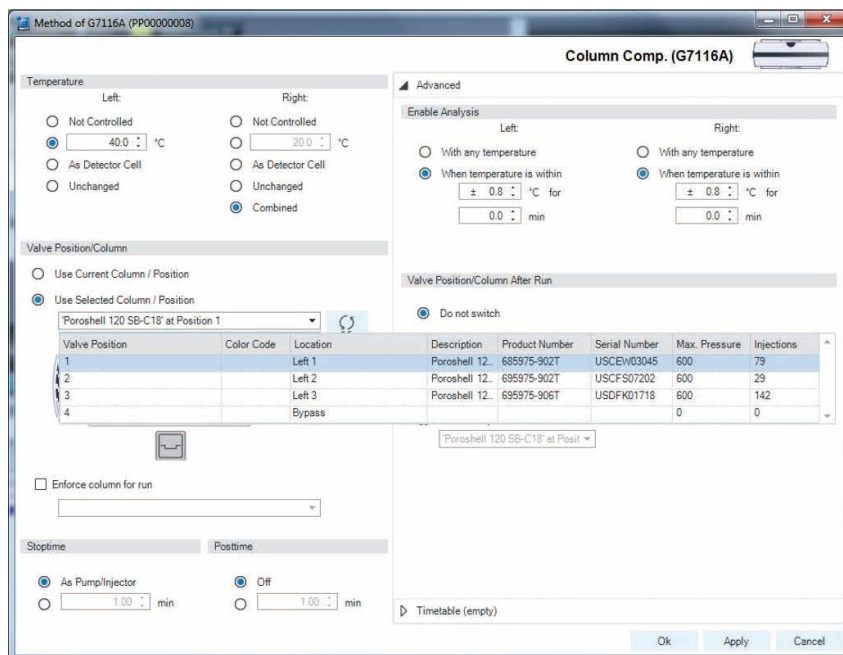
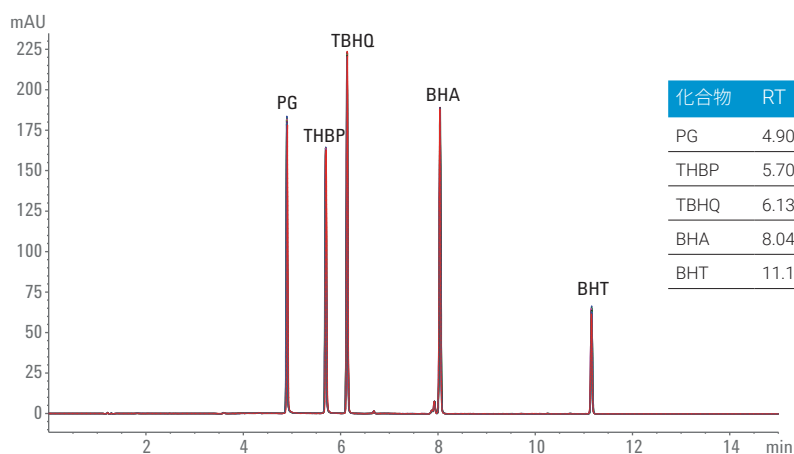


図 3. Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタットの [Method (メソッド)] 内のカラム選択画面



化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積	面積の RSD (%)	分離度
PG	4.90	0.09	298.6	0.92	—
THBP	5.70	0.07	302.7	0.67	17.7
TBHQ	6.13	0.05	422.7	0.56	8.9
BHA	8.04	0.03	398.9	0.11	36.1
BHT	11.16	0.03	136.2	2.18	55.9

図 4. 酸化防止剤の分析：標準混合物の 10 回連続分析の重ね表示、およびリテンションタイムと面積精度の測定結果

実際のサンプル分析例として、チューインガムを分析しました。チューインガムのサンプルでは、リテンションタイムとUV スペクトルに基づいて、BHA を同定できました (図 5)。

甘味料の分析

図 6 に、10 回の連続分析で測定した、甘味料のアセスルファム、アスパルテーム、サッカリンの分析結果、およびリテンションタイムと面積精度を示します。すべてのピークについて、きわめて良好なリテンションタイムと面積精度が得られました。

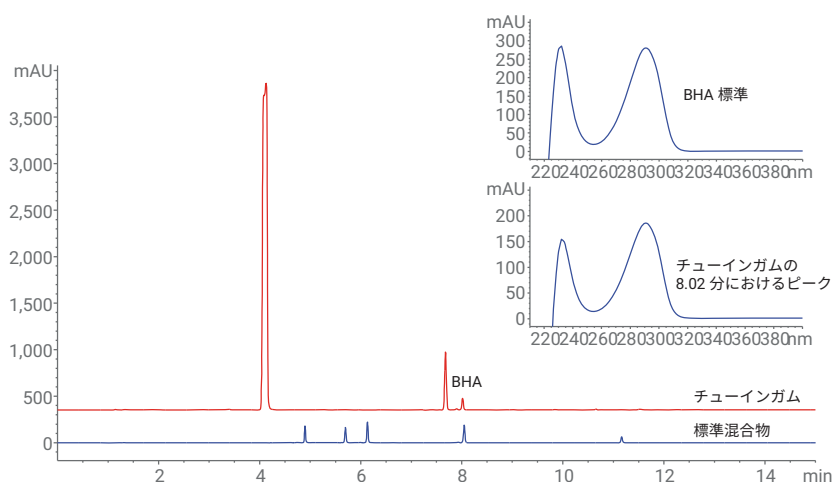
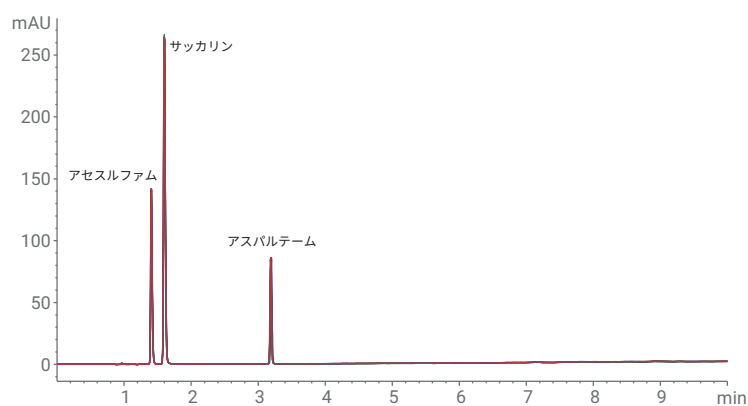


図 5. 酸化防止剤の分析：チューインガム中の BHA の同定



化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積	面積の RSD (%)	分離度
アセスルファム	1.41	0.10	222.4	0.08	—
サッカリン	1.60	0.14	471.0	0.09	4.5
アスパルテーム	3.19	0.12	130.1	0.08	37.2

図 6. 甘味料の分析：標準混合物の 10 回連続分析の重ね表示、およびリテンションタイムと面積精度の測定結果

実際のサンプル分析例として、無糖のスポーツドリンクを分析しました。スポーツドリンクのサンプルでは、リテンションタイムと UV スペクトルに基づいてアセスルファムとアスパルテームを同定できました (図 7)。

防腐剤の分析

図 8 に、10 回の連続分析で測定した、防腐剤のソルビン酸、安息香酸、サリチル酸の分析結果、およびリテンションタイムと面積精度を示します。すべてのピークにおいて、きわめて良好なリテンションタイムと面積精度が得られました。

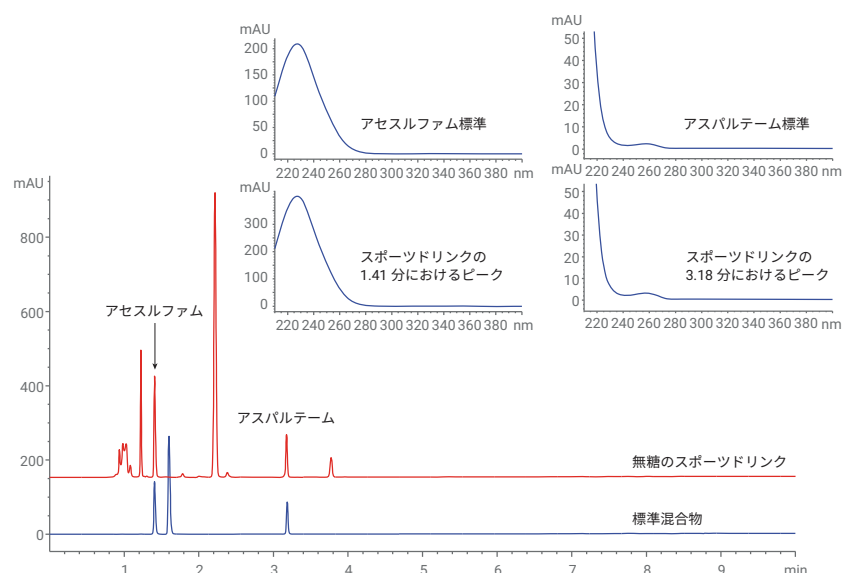
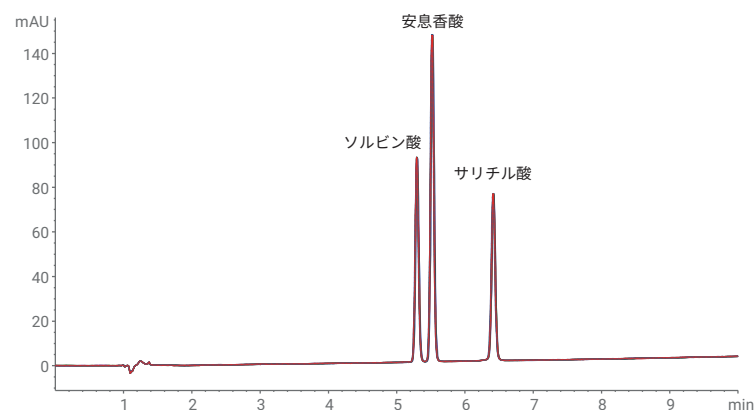


図 7. 甘味料の分析：無糖のスポーツドリンク中のアセスルファムとアスパルテームの同定



化合物	RT (分)	RT RSD (%)	面積	面積の RSD (%)	分離度
ソルビン酸	5.30	0.08	319.2	0.03	—
安息香酸	5.52	0.08	515.6	0.04	2.4
サリチル酸	6.42	0.07	293.8	0.18	9.2

図 8. 防腐剤の分析：標準混合物の 10 回連続分析の重ね表示、およびリテンションタイムと面積精度の測定結果

実際のサンプル分析例として、フェイシャルトニックを分析しました。フェイシャルトニックのサンプルでは、リテンションタイムと UV スペクトルに基づいてサリチル酸を同定できました (図 9)。

結論

Agilent 1260 Infinity II マルチメソッドソリューションでは、1 つの LC システムにおいて手動でシステムを変更しなくても、複数のカラムと移動相を使用する複数の LC アプリケーションを実施できます。このアプリケーションノートでは、食品管理ラボのアプリケーション例として実施した酸化防止剤、甘味料、および防腐剤の分析について説明しています。すべてのアプリケーション例について、きわめて良好なリテンションタイムと面積精度が得られました。リテンションタイムと UV スペクトルに基づいて、食品および化粧品サンプル中の酸化防止剤、甘味料、および防腐剤を同定できました。

参考文献

1. Naegele, E. The Agilent 1290 Infinity II Multimethod Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5679EN, **2015**.
2. Belitz; et al., Food Chemistry, 4th revised and extended edition, *Springer* **2009**.
3. Judefeind; et al. Stable isotope dilution analysis of salicylic acid and hydroquinone in human skin samples by gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography B* **2007**, 852, 300-307.
4. Gratzfeld-Huesgen, A.; Naegele, E. The Agilent 1290 Infinity Multimethod Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5600EN, **2010**.

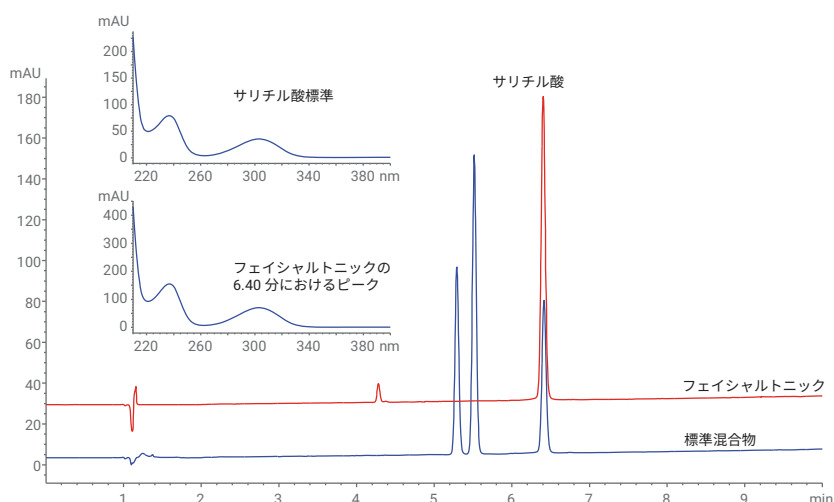


図 9.防腐剤の分析：フェイシャルトニック中のサリチル酸の同定

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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. 2016
Printed in Japan, December 1, 2016
5991-7622JAJP



Agilent Technologies