

Agilent Intuvo 9000 GC による ISO/CD 20714 に従った電子タバコリキッド中のニコチン、プロピレングリコール、およびグリセロールの測定

著者

Frank David, Bram D'Haenens, and Christophe Devos, Research Institute for Chromatography, Pres. Kennedypark 26, B-8500 Kortrijk, Belgium

Rebecca Veeneman, Ph.D. Agilent Technologies, Inc.

概要

本アプリケーションノートでは、電子ニコチン送達システム（電子タバコ）で使用されているリキッド中のプロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンを、Agilent Intuvo 9000 GC システムで分析を行いました。ドラフトの ISO/CD 20714 標準規格案に基づいた標準メソッドおよび高速メソッドの 2 つをテストし、これらの対象成分を正確に定量することができました。分析には揮発性極性物質用に設計された DB-BAC1 ウルトライナートカラムを使用することにより、いずれのメソッドにおいても優れた直線性、再現性、および感度が得られることが確認できました。高速 GC-FID メソッドを使用した場合には、冷却時間を含めた 1 サンプルあたりの分析時間は 5 分未満で、標準メソッドと比較して半分以下の時間で分析を行うことができました。

はじめに

電子タバコは、速いペースで普及が進んでおり、現在ではバッテリー式ヒーターとリキッド容器から構成される、多様な電子タバコが市販されています。通常これらの器具は、電子タバコリキッドと呼ばれる、プロピレングリコールとグリセロールなど沸点の高い成分を溶媒に用いた、ニコチンや香氣成分を含む溶液から、エアロゾル蒸気を発生させます。

この電子タバコリキッドの品質管理では、プロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの含有量を定量分析する必要があります。EU 規制 269 では、電子タバコリキッド中のニコチンの含有量は濃度 3 ～ 20 mg/mL の範囲に規制されており¹、1 mL あたり 20 mg を超えるニコチンが含まれているリキッドはタバコ製品と見なされ、タバコ製品指令で規制されています²。さらに香料添加物のような微量成分の定性および定量測定には、GC/MS ソリューションが使用されます³。

先ごろ、電子タバコで使用されているリキッド中のニコチン、プロピレングリコール、およびグリセロールの測定に対する標準規格 ISO/CD 20714 として、GC-FID 分析に基づいたメソッドが提案されました⁴。テスト対象の成分は比較的極性が高いため、定量分析の際には適切なカラムを選択することがきわめて重要になります。標準的な非極性カラムでは、誘導体化していないグリコールとグリセロールで良好なピーク形状が得られない可能性があるため、正確な定量が実施できません。ISO/CD 20714 のドラフトメソッドでは、分離カラムとして DB-ALC1 (30 m × 0.32 mm、

1.8 μm) カラムが提案されています。血中アルコール濃度測定など、揮発性極性物質の分析用に設計されたこのカラムでは、グリセロールとニコチンで優れたピーク形状を得ることができます。先ごろ、これらの揮発性極性物質の分析用として、ウルトライナート DB-BAC1 UI カラムが発売され、本報ではこのカラムを使用して分析メソッドの作成を行いました。

一般的に分析メソッドの性能は、注入口から検出器までの全サンプル流路の不活性度と品質にも左右されます。そのため本実験では、DB-BAC1 UI カラムを電子タバコリキッド中のプロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの定量分析以外の用途には使用せず、Agilent Intuvo 9000 GC システムの適応性を評価するためのテストを実施しました。最初に、ISO のドラフトメソッドを標準メソッドとして分析を行い、直線性、感度、および再現性をテストし、一般的な GC であるオープンが空気浴タイプの Agilent 7890 GC で得られた結果と比較しました。

高速メソッド開発では、Intuvo 9000 GC の高速加熱および冷却機能を活用しました。

実験方法

サンプル前処理

プロピレングリコール、グリセロール、ニコチン、1,4-ブタンジオール (IS 1)、およびキナルジン (IS 2) は、純粋標準として Sigma-Aldrich (ベアアセ、ベルギー) から購入しました。イソプロパノール (溶媒) は BioSolve (ファルケンスワルト、オランダ) から入手しました。

キャリブレーション溶液は、ISO/CD 20714 に従って前処理しました。5 つのキャリブレーションレベルと 1 つのブランクを前処理しました (表 1 参照)。

GC パラメータ

Agilent 7890B GC および Agilent Intuvo 9000 GC のそれぞれで、GC-FID 分析を実施しました。両方のシステムに、スプリット/スプリットレス注入口、水素炎イオン化検出器、および 10 μL シリンジ付きの Agilent 7693 オートサンブラ (ALS) を搭載しました。

カラムは 30 m × 0.32 mm、1.8 μm DB-BAC1 UI を取り付けました (p/n 123-9334UI (7890B GC)、123-9334UI-INT (Intuvo 9000 GC))。

表 1. イソプロパノールで前処理した、電子タバコリキッド中のプロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの定量分析用のキャリブレーション溶液

	濃度 (mg/mL)					
	ブランク	L1	L2	L3	L4	L5
プロピレングリコール	0.00	0.12	0.60	2.42	6.05	12.09
グリセロール	0.00	0.12	0.41	1.64	4.10	8.20
ニコチン	0.00	0.022	0.075	0.300	0.749	1.499
IS 1 (1,4-ブタンジオール)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
IS 2 (キナルジン)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

標準メソッドでは、ISO/CD 20714 に記載されているパラメータに基づいて各パラメータを設定しました。表 2 に、これらのパラメータを示しました。Intuvo 9000 GC では、分析時間を 1/3 にした高速メソッドをプログラムしました。表 3 に、高速メソッドのパラメータを示しました。

結果と考察

図 1 は、Intuvo 9000 GC の標準メソッドで分析した、キャリブレーションサンプル L1（最低濃度）の結果を示しています。3.34 分にプロピレングリコール、4.31 分に IS 1（1,4-ブタンジオール）、5.00 分にグリセロール、6.87 分に IS 2（キナルジン）、および 7.24 分にニコチンが溶出しており、良好な分離が得られました。これらのピークのリテンションタイムは、7890B GC で測定したリテンションタイムと比較して 0.2 分以内に収まっていました。2 種類の形式のカラム（従来の形式と Intuvo 形式）を使用したことを考えると、これは注目に値することであり、ピーク形状もすべて良好でした。最低濃度においても、グリセロールとニコチンが問題なく検出できています。

表 2. 電子タバコリキッド中のプロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの定量分析で用いた標準 GC-FID パラメータ

パラメータ	値
注入口	スプリット (1:50) - 250 °C、スプリットライナ UI (p/n 5190-2295)
注入量	1 µL
カラム流量	1.5 mL/min 水素
オープン温度プログラム	100 °C (1 分間保持) 15 °C/min で 130 °C まで昇温 40 °C/min で 220 °C まで昇温 (5 分間保持)
Intuvo ガードチップ温度	オーブントラックモード
Intuvo バス温度	220 °C
Intuvo 検出器テール	275 °C
検出器	FID 275 °C、40 mL/min 水素、400 mL/min 空気

表 3. 電子タバコリキッド中のプロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの定量分析で用いた高速 GC-FID メソッドのパラメータ

パラメータ	値
注入口	スプリット (1:50) - 250 °C、スプリットライナ UI (p/n 5190-2295)
注入量	1 µL
カラム流量	6 mL/min 水素
オープン温度プログラム	100 °C (0.33 分間保持) 45 °C/min で 130 °C まで昇温 120 °C/min で 220 °C まで昇温 (1.75 分間保持)
Intuvo ガードチップ温度	オーブントラックモード
Intuvo バス温度	220 °C
Intuvo 検出器テール	275 °C
検出器	FID 275 °C、40 mL/min 水素、400 mL/min 空気

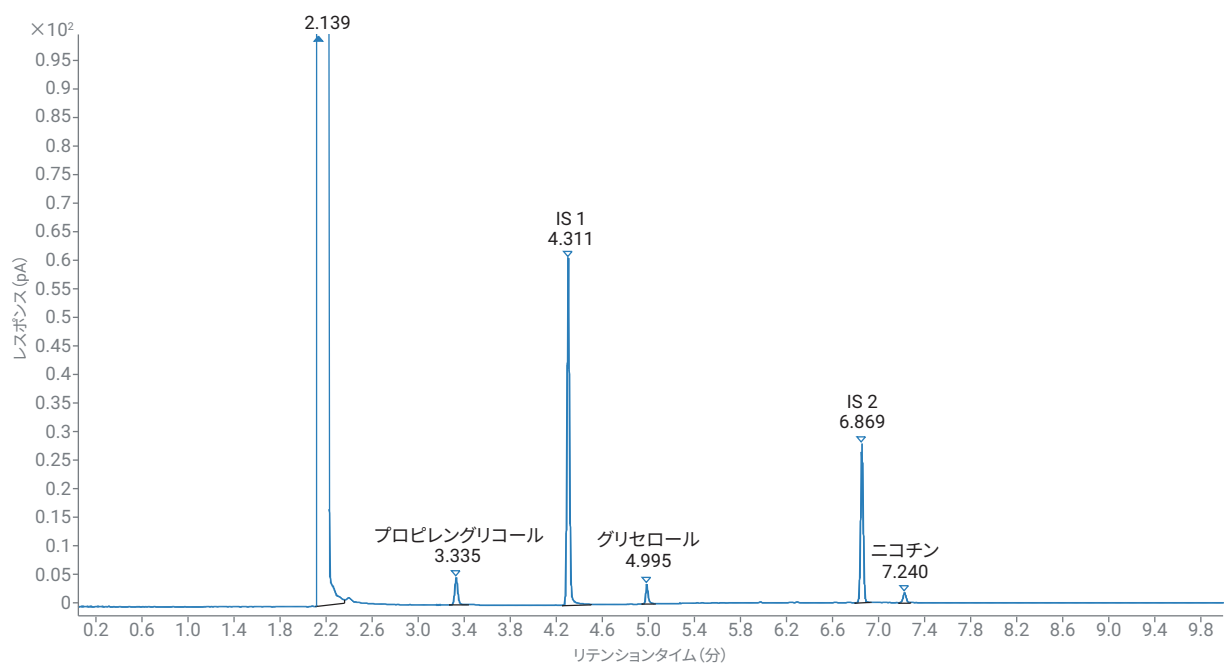


図 1. Agilent Intuvo 9000 GC におけるキャリブレーション混合物 L1 の GC-FID 分析

次に、プロピレングリコールとグリセロール、ニコチンについて表 1 に従い、検量線を作成しました。図 2～4 に、Intuvo 9000 GC で得られた検量線を示します。すべての検量線において、R² が 0.999 を超える良好な直線性を示しています。

同じキャリブレーションサンプルを 7890B GC でも分析したところ、同様の検量線が得られました。表 4 では、両方の GC における 3 種類のターゲット成分の傾き、切片、および R² 値を比較しています。これらのデータから、いずれのシステムにおいても良好な分析結果が得られることがわかります。検量線の傾きの類似性は注目に値するものであり、これは両方のシステムのレスポンスファクタと感度が同じであることを示しています。

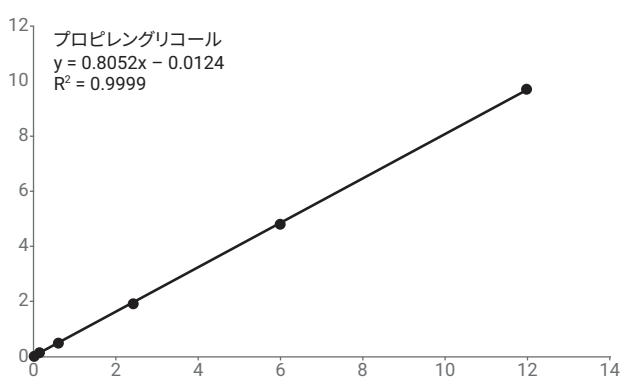


図 2. 内部標準として 1,4-ブタンジオールを用いたプロピレングリコールの検量線

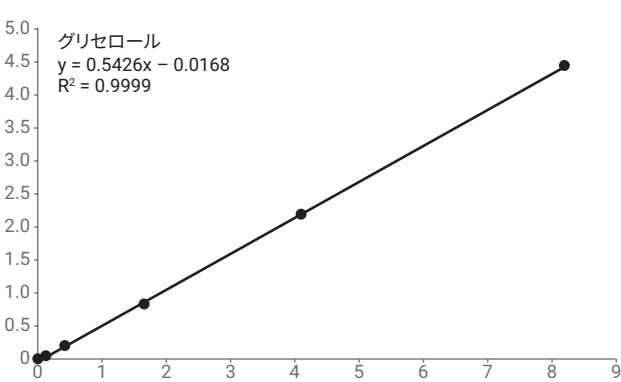


図 3. 内部標準として 1,4-ブタンジオールを用いたグリセロールの検量線

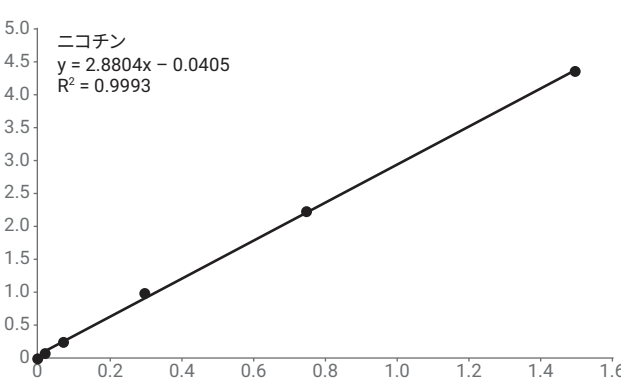


図 4. 内部標準としてキナルジンをを用いたニコチンの検量線

表 4. Agilent 7890B GC および Agilent Intuvo 9000 GC で分析したターゲット化合物の検量線データ (傾き、Y 軸、切片、および R²)

キャリブレーション	Agilent 7890B GC			Agilent Intuvo 9000 GC		
	傾き	切片	R ²	傾き	切片	R ²
プロピレングリコール	0,8052	-0.0125	1,0000	0,8052	-0.0124	0,9999
グリセロール	0,5400	-0.0184	0,9999	0,5426	-0.0168	0,9999
ニコチン	2,8833	0.0461	0,9991	2,8804	0.0405	0,9993

次に、2 種類の電子タバコリキッドサンプル（サンプル 1、2）を 6 回繰り返して分析しました。図 5 と 6 にそれぞれのサンプルのクロマトグラムを示します。両方のサンプルは主に、プロピレングリコール（3.3 分）、グリセロール

（5.0 分）、およびニコチン（7.24 分）から構成され、その他の低いピークは香気成分に該当します。

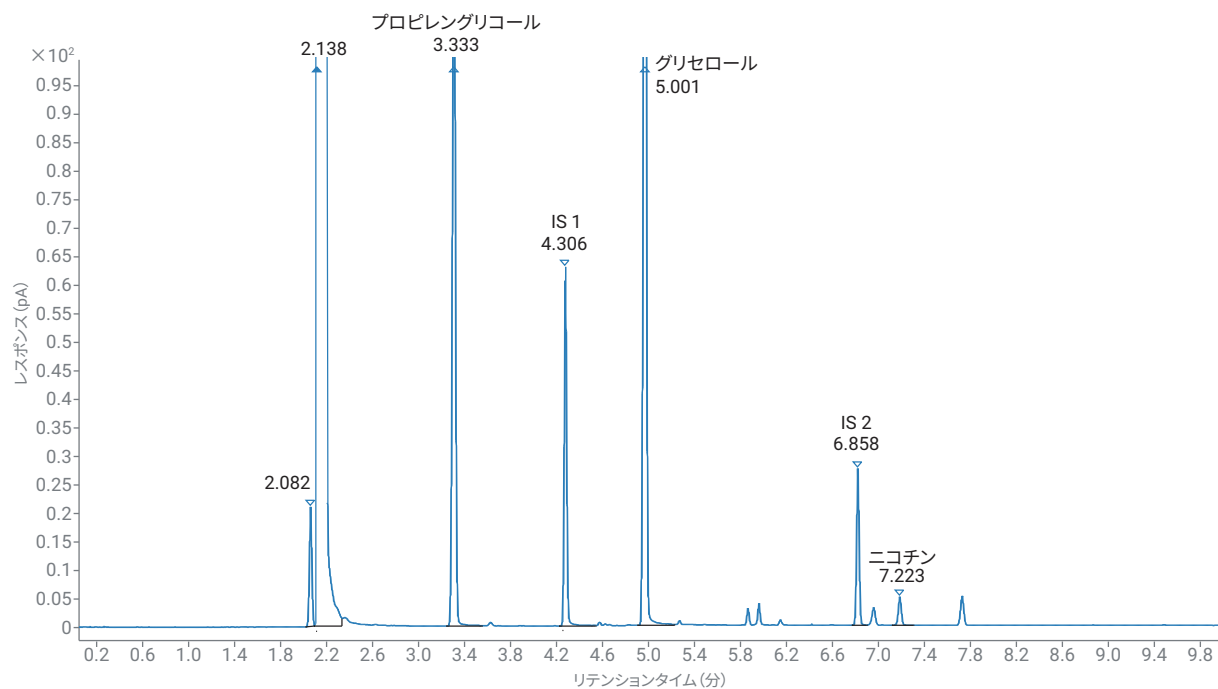


図 5. Agilent Intuvo 9000 GC で標準 GC メソッドを用いた電子タバコリキッドサンプル 1 の GC-FID 分析

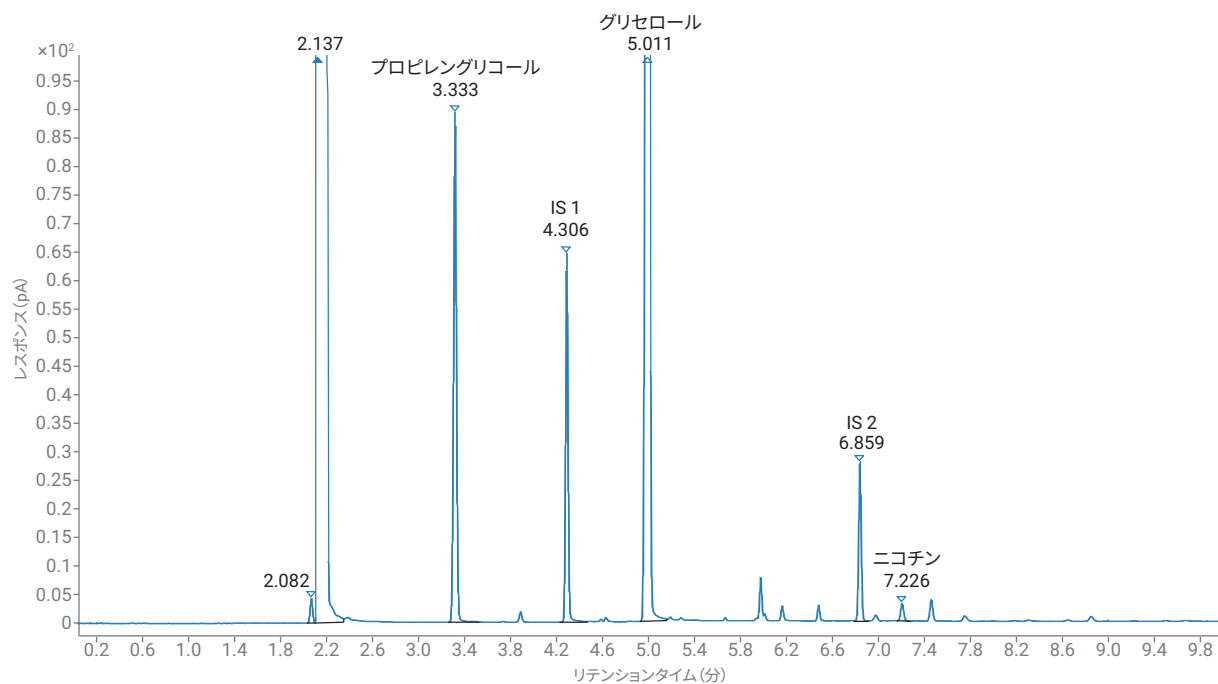


図 6. Agilent Intuvo 9000 GC で標準 GC メソッドを用いた電子タバコリキッドサンプル 2 の GC-FID 分析

両方のサンプル中のターゲット化合物の濃度は、検量線を用いて決定しました。表 5 では、7890B GC と Intuvo 9000 GC での標準メソッドによる分析で得られたデータを比較しています。サンプル 1 には約 7.8 mg/g のニコチンが含まれており、サンプル 2 には 3.6 mg/g のニコチンが含まれていますが、どちらも 20 mg/g の規制値を十分に下回っています。また、再現性については、プロピレングリコールとグリセロールでは RSD 1 % 未満、またニコチンでは RSD 2 % と優れた結果が得られました。

さらに、キャリブレーション溶液とサンプルを、Intuvo 9000 GC の高速昇温プログラムと高流量 (6 mL/min) を活用した高速メソッドで分析しました。図 7 に、最低濃度のキャリブレーションサンプル L1 のクロマトグラムを、図 8 ~ 10 に、プロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの検量線を示します。検量線の傾きからもわかるように、良好な直線性およびレスポンスファクタが得られ、分析時間は 3.5 分に短縮されました。また冷却時間を含めた 1 サンプルあたりの分析時間は 5 分未満でした。

表 5. Agilent 7890B GC および Agilent Intuvo 9000 GC における、2 種類の電子タバコリキッドサンプル中のプロピレングリコール、グリセロール、およびニコチン測定で得られた定量データ

サンプル	Agilent 7890B GC			Agilent Intuvo 9000 GC		
	平均 (mg/g)	S	RSD (%)	平均 (mg/g)	S	RSD (%)
サンプル 1						
プロピレングリコール	318	1	0,4	320	2	0,5
グリセロール	664	4	0,6	667	2	0,3
ニコチン	8,01	0,07	0,88	7,78	0,05	0,68
サンプル 2						
プロピレングリコール	140	0	0,2	142	1	0,4
グリセロール	838	4	0,5	847	4	0,5
ニコチン	3,60	0,03	0,96	3,58	0,06	1,77

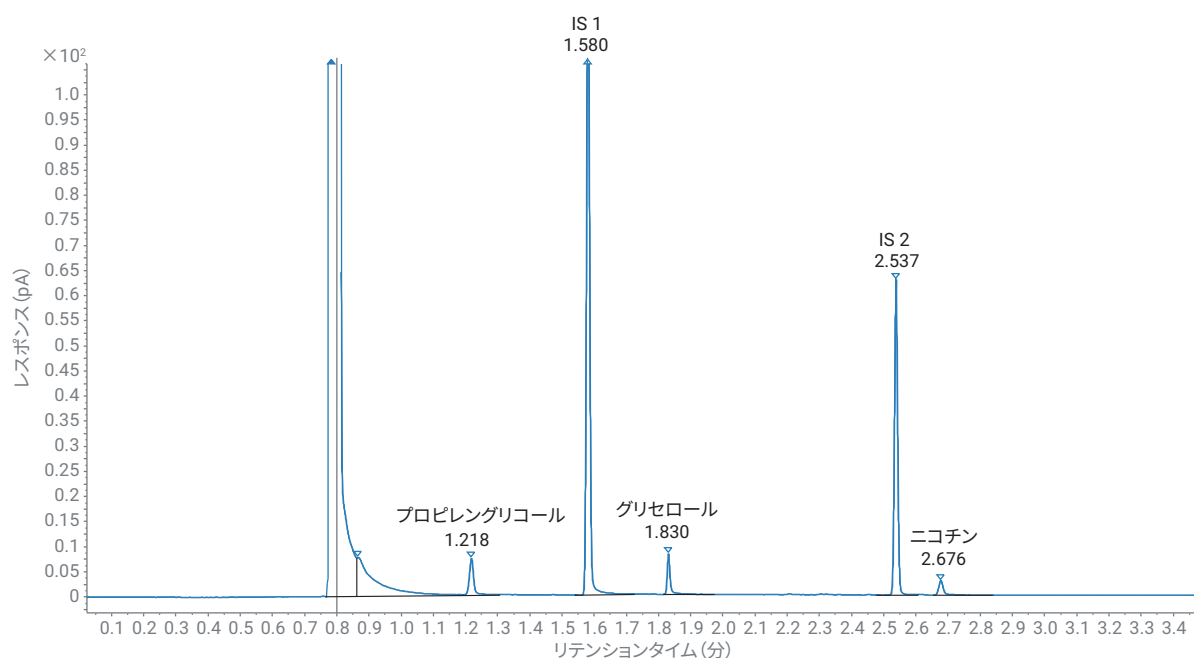


図 7. Agilent Intuvo 9000 GC におけるキャリブレーション混合物 L1 の高速 GC-FID 分析

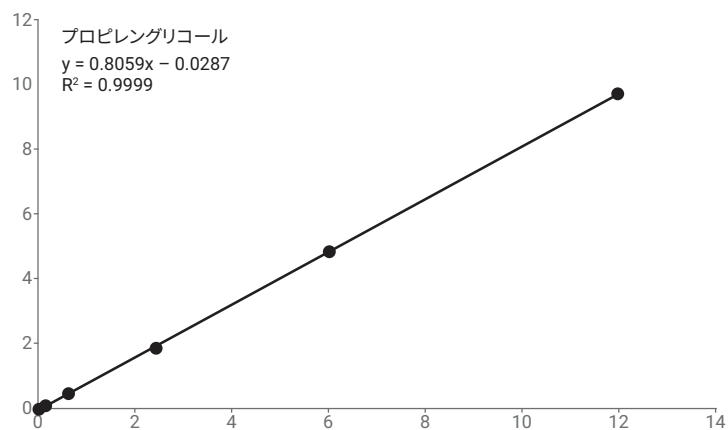


図 8. 内部標準として 1,4-ブタンジオールを用いた高速 GC メソッドによる
プロピレングリコールの検量線

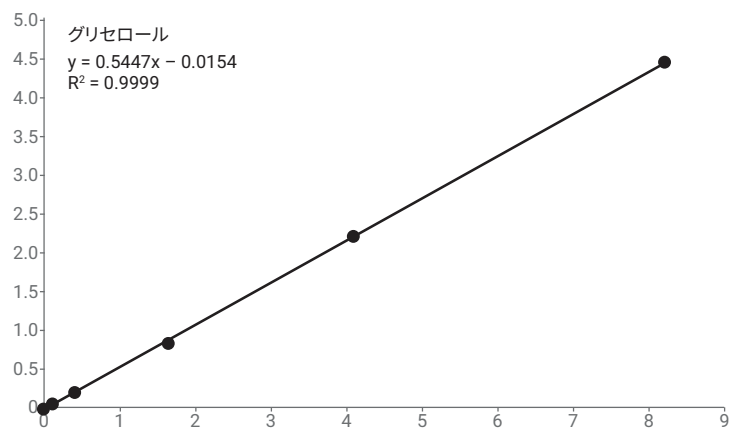


図 9. 内部標準として 1,4-ブタンジオールを用いた高速 GC メソッドによる
グリセロールの検量線

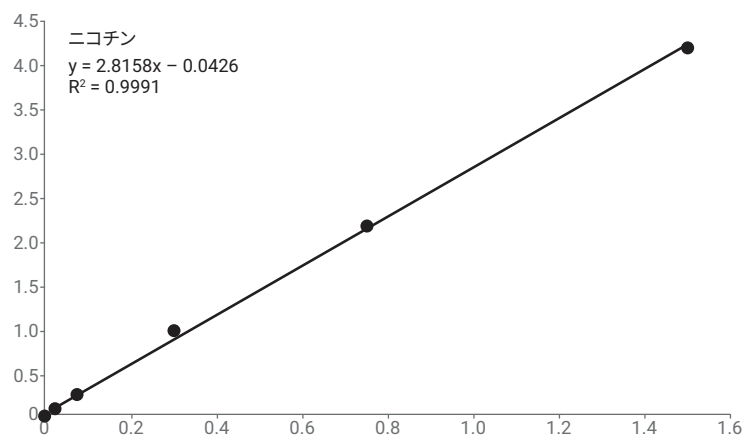


図 10. 内部標準としてキナルジンをを用いた高速 GC メソッドによるニコチンの検量線

図 11 と 12 は、サンプル 1 および 2 に対して高速メソッドにより得られたクロマトグラムを示しています。分離能は標準メソッドの場合とほぼ同等であり、ターゲット化合物を正確に

測定するには十分です。高速分析によりピークの拡散が抑えられるため、ピークの高さと感度は約 2 倍高くなっています。

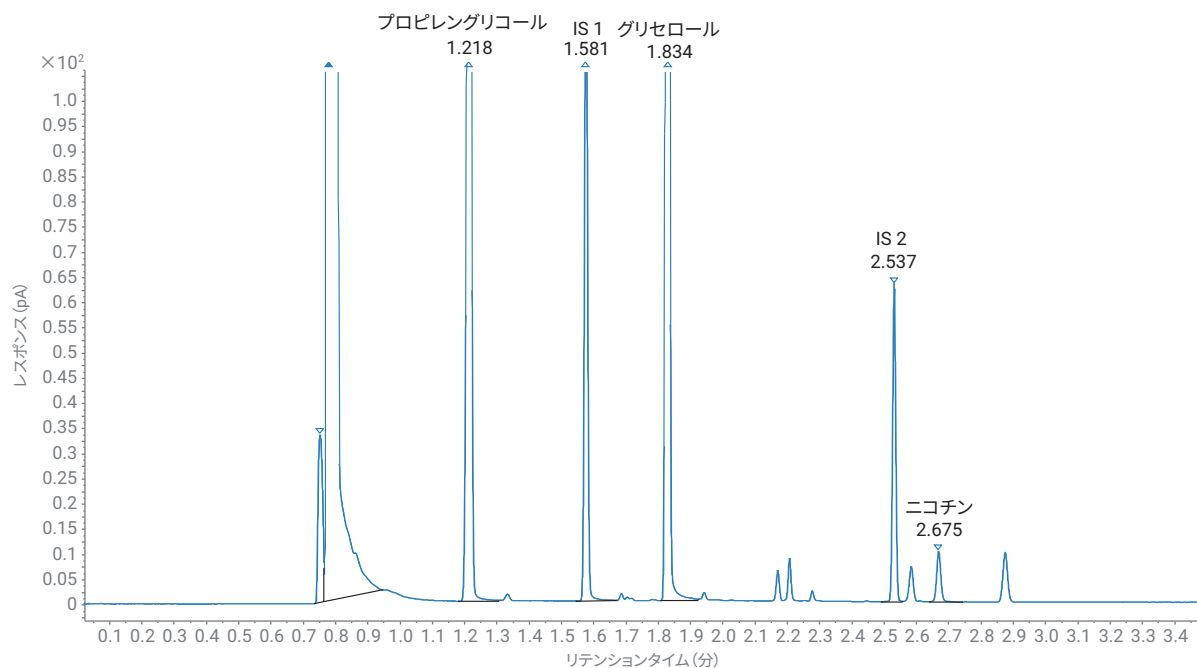


図 11. Agilent Intuvo 9000 GC における電子タバコリキッドサンプル 1 の高速 GC-FID 分析

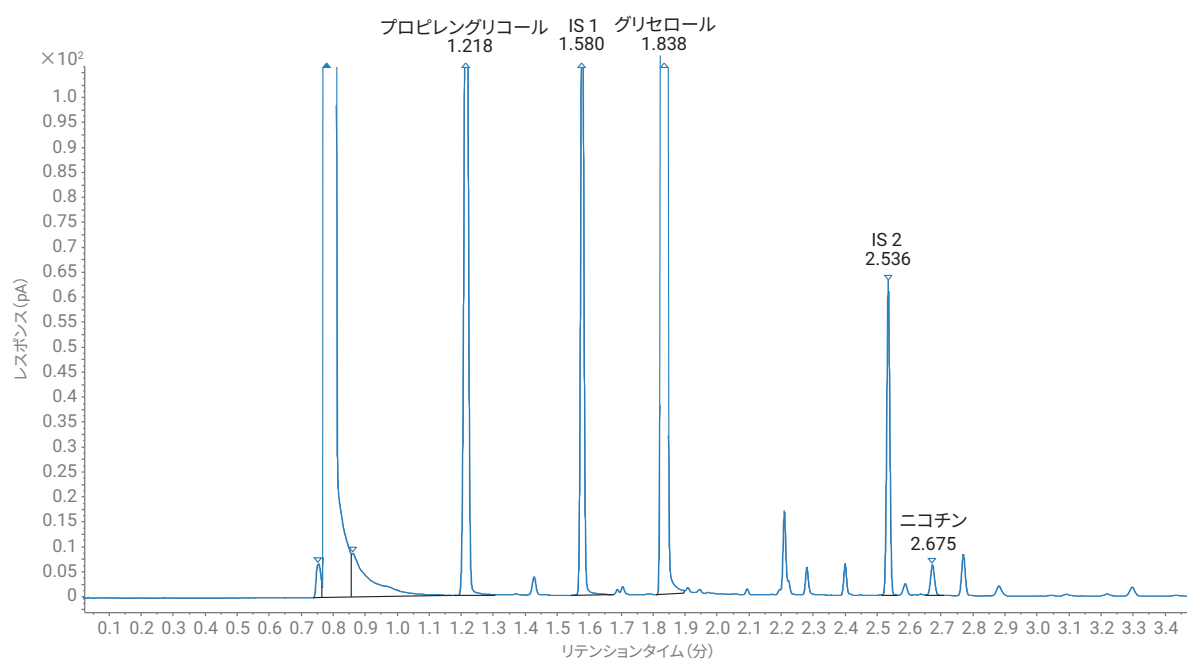


図 12. Agilent Intuvo 9000 GC における電子タバコリキッドサンプル 2 の高速 GC-FID 分析

両方のサンプルを 6 回繰り返して分析し、再現性のテストを行った結果を表 6 に示します。RSD はすべて 1 % 未満であり、これは再現性と堅牢性が優れていることを示しています。プロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの定量値は、標準メソッドを用いた場合の値によく一致しています。

結論

Agilent Intuvo 9000 GC-FID システムでは、ISO/CD 20714 に従って電子タバコリキッド中のプロピレングリコール、グリセロール、およびニコチンの定量分析を実施することが可能です。Agilent ウルトライナート DB-BAC 1 カラムを、本分析の専用として用いることにより、優れた直線性、感度、および再現性が得られました。ガードチップおよび Intuvo 流路のどちらも、ピーク形状とメソッド性能には悪影響を与えませんでした。Intuvo 9000 GC で得られた定量結果は、Agilent 7890B GC で得られた結果と同等でした。

Intuvo 9000 GC では高速加熱および冷却機能により、標準メソッドの 3 倍の速度で分析を実施できます。高速メソッドを用いた場合、標準メソッドと比較して同等の定量結果、直線性、および再現性が得られました。さらに高速分析によりピークの拡散が抑制されることで感度は向上し、1 サンプル当たりの分析時間は標準メソッドと比較して半分以下の 5 分未満に短縮されました。

表 6. 電子タバコリキッドサンプルの高速 GC-FID 分析の再現性テスト (n = 6)

サンプル 1	分析 1	分析 2	分析 3	分析 4	分析 5	分析 6	平均値	S	RSD (%)
プロピレングリコール	319	319	319	319	319	319	319	0	0,1
グリセロール	663	662	664	663	663	663	663	1	0,1
ニコチン	7,82	7,82	7,80	7,76	7,79	7,78	7,79	0,02	0,28
サンプル 2	分析 1	分析 2	分析 3	分析 4	分析 5	分析 6	平均値	S	RSD (%)
プロピレングリコール	140	139	139	139	139	140	140	0	0,2
グリセロール	841	839	839	837	841	840	839	2	0,2
ニコチン	3,54	3,53	3,56	3,57	3,55	3,53	3,55	0,02	0,44

参考文献

1. Report from the Commission to the European Parliament and the Council on the potential risks to public health associated with the use of refillable electronic cigarettes, EUROPEAN COMMISSION, COM(2016) 269 final, Brussels, 20.5.2016.<http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?qid=1463746733783&uri=COM%3A2016%3A269%3AFIN>
2. Directive 2014/40/EU of the European Parliament and of the Council of 3 April 2014 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States concerning the manufacture, presentation and sale of tobacco and related products and repealing Directive 2001/37/EC, Official *Journal of the European Union* L 127/1, 29.4.2014 https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/tobacco/docs/dir_201440_en.pdf
3. Sandy, C.; *et al.* Qualitative Analysis of E-Cigarette Liquids using Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6412EN, 27 October, **2015**.
4. ISO/CD 20714, E-liquid -- Determination of nicotine, propylene glycol and glycerol in liquids used in electronic nicotine delivery devices -- Gas chromatographic method <https://www.iso.org/standard/68905.html>

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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. 2018, 2019

Printed in Japan, November 12, 2019

5991-8990JAJP

DE.3724768519.