

Agilent Chem Elut S 保持型液液抽出 (SLE) カートリッジを用いた HPLC による 醤油および食用酢中のパラベンの分析

著者

Xia Yang
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent Chem Elut S 12 cc 保持型液液抽出 (SLE) カートリッジを用いて、醤油および食用酢中の 7 種類のパラベンを LC/DAD 検出によって分析した結果を紹介します。比較のために、従来型の液液抽出 (LLE) と 4 種類の市販の SLE 製品もテストしました。技術的には、SLE は従来型 LLE と比べてワークフローが簡素化され、時間と労力の大幅な節減が可能になります。Chem Elut S で用いられる新しい合成担体は、回収率、再現性、容量、クリーンさが考慮され、性能が向上しています。

はじめに

LLE は従来型のサンプル前処理法で、水性相のイオン強度と抽出溶媒の極性を変えることにより、多くの水性サンプル抽出に適用できます。分析対象物をさまざまな水性マトリックスから良好な回収率と再現性で抽出できることが示されてきました。しかし、分析対象物を分離するためのサンプルの混合、有機相を取り除くための明確な相分離、エマルジョン生成に、長い時間と多大な労力がかかる場合があります。また、複数の抽出物では時間や労力が膨れ上がるため一層困難になります。自動化ワークフローを求めるハイスループットラボでの利用も難しい場合があります。

SLE は LLE に代わる改善された技術で、時間と労力の節減、エマルジョン形成が生じない、自動化が容易などの利点があります。従来の SLE 製品は天然のケイソウ土 (DE) 材を使用しているため、充填剤の品質や粒子の一貫性の管理が困難で、製品性能にばらつきが生じることがあります。新しい合成 Chem Elut S 材は、充填剤の品質と一貫性が厳しくモニタリングされる管理された工程の下で製造されています。Chem Elut S では、製品性能と再現性が大幅に向上しました。

パラベンは、焼き菓子、ソース、ジュース、ゼリーなどの食品に防腐剤として幅広く添加されているパラヒドロキシ安息香酸エステル (図 1) です。パラベンを使用することで、カビ、酵母菌、細菌の繁殖を防ぎ、食品の保存期間を延ばすことができます。このパラベンは、米国や中国などの一部の国では、一定の許容レベルでは安全であると認められていますが、マレーシアなどの他の国々では禁止されています。

中国の規制メソッド GB5009.31-2016 では食品のサンプル前処理に LLE の使用を提案したのもいくつかあります¹。しかし、このメソッドは抽出ステップが複数あって非常に時間がかかり、大量のジエチルエーテルを使用するため、環境への影響が懸念されます。このアプリケーションノートでは、Chem Elut S 12 cc カートリッジを用いて、酢酸エチルを抽出溶媒として使用し、醤油および食用酢中の 7 種類のパラベンを分析します。Chem Elut S メソッドで使用した溶媒は、LLE による規制メソッドと比べて毒性が低く、少量でした。このメソッドにより、ワークフローの簡素化、時間の短縮と労力の削減、さらには優れた性能とクリーンさも実現しました。

実験方法

試薬

すべての試薬と溶媒は、HPLC または分析グレードのものを使用しました。メタノール (MeOH) は Honeywell 社 (マスキーゴン、ミシガン州、米国)、酢酸エチル (EtOAc) は Dikma 社 (レイクフォレスト、カリフォルニア州、米国)、塩化ナトリウムは Sinopharm Chemical Reagent 社 (上海、中国) から購入しました。パラベン標準のメチルパラベン (MP)、エチルパラベン (EP)、プロピルパラベン (PP)、イソプロピルパラベン (iPP)、ブチルパラベン (BP)、ヘプチルパラベン (HP)、ベンジルパラベン (BnP) は AccuStandard 社 (ニューヘイブン、コネチカット州、米国) から購入しました。醤油と食用酢は地域のスーパーマーケットで購入しました。

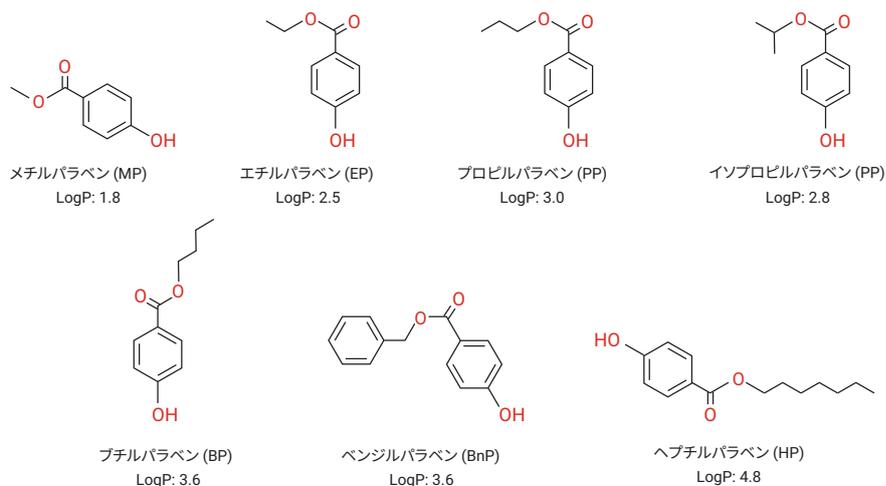


図 1. 醤油と食用酢に含まれる調査対象の 7 種類のパラベンの構造式と logP 値

標準および溶液の調製

混合標準スパイク溶液を 1 mg/mL となるように MeOH 中で調整し、適量の個々の原液で希釈し、使用するまで -20 °C で保管しました。1 % の NaCl 溶液は、Milli-Q 水 100 mL 中に NaCl 1 g を溶解して調製しました。

機器と装置

分析には、Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ、Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ、インラインデガッサ、Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器を使用しました。製品のクリーンさの評価には、Agilent Intuvo 9000 GC と Agilent 7000 トリプル四重極 GC/MS を組み合わせて、GC/MS フルスキャンを用いました。データの取得と分析には、Agilent OpenLab および Agilent MassHunter ソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理に用いたその他の装置および材料は以下のとおりです。

- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Eppendorf Centrifuge 5810R (ハンブルグ、ドイツ)
- Agilent Chem Elut S 12 cc、3 mL (部品番号 5610-2008)
- 4 個の市販の SLE 12 cc 製品
- SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder (メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Agilent Vac Elut 20 マニホールド (部品番号 12234101)

サンプル前処理

混合標準スパイク溶液を使用して醤油と食用酢にスパイクし、回収率を測定しました。今回使用したメソッドは、ボディソープ中のパラベンの測定用に開発され、発表された LLE および SLE メソッドを改訂したものです²。図 2 に、サンプル前処理のフローを示します。醤油と食用酢のサンプルは抽出前に適宜、調製しました。20 ng/mL のスパイクレベルで SLE と LLE でそれぞれ 6 回繰り返し分析を実行しました。塩化ナトリウムを加えて食用酢のイオン強度を高めました。Chem Elut S (12 cc) と 4 個の市販の SLE カートリッジ製品 (12 cc) を調査して比較しました。LLE は

遠心分離チューブで実施しました。抽出効率を高めるために、ジェノグラインダーを使用してサンプルを十分に混合しました。遠心分離後に、水の層の一部が混入しないように慎重に、EtOAc 層を汚れないガラスチューブに移し、窒素で乾燥させました。最後に、注入のために残留物を 1 mL の MeOH で再溶解しました。

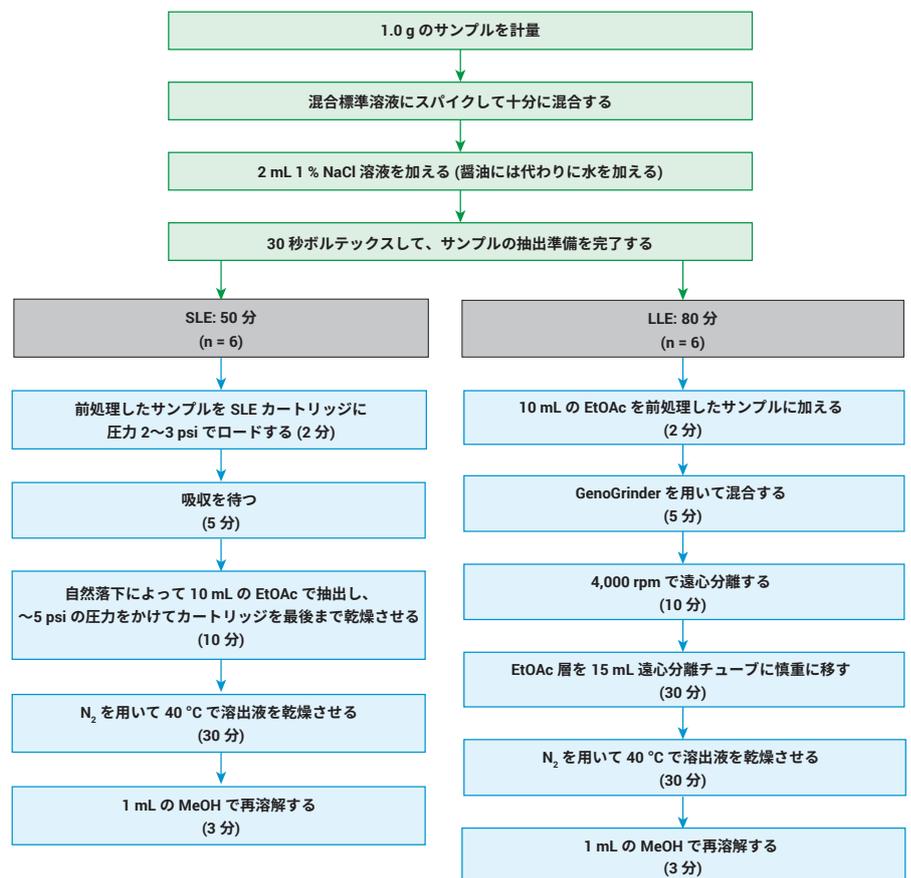


図 2. SLE および LLE を使用して醤油と食用酢からパラベンを抽出するために使用したプロトコル

HPLC 条件

7 種類のパラベン、特に PP と iPP の異性体の分離について、HPLC カラムを調査しました。Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP カラムは、各 C18 カラムと比べて良好な分離を示しました。図 3 に、希釈なしの 7 種類のパラベン (20 ppb) 標準溶液のクロマトグラムと、LLE 後の醤油と食用酢のマトリックスブランクのクロマトグラムを重ねて示します。主な干渉物質が3 分以内に溶出され、クロマトグラフィーでターゲットパラベンと干渉するものはありませんでした。

結果と考察

SLE と LLE の比較

図 2 に、SLE と LLE の抽出プロトコルと処理時間の詳細を示します。6 回の繰り返し分析の準備に必要な合計所要時間は、LLE では 80 分、SLE では 50 分でした。LLE はより多くの時間と労力がかかりました。水性相の有機相からの分離には特別な注意が必要になり、誤って水層が移された場合は、LLE での乾燥時間が長くなることがあります。結果として、複数サンプルの同時調製は困難でした。一方、SLE の抽出ワークフローは格段に容易で、自動実行でき、特別な注意は必要なく、サンプル抽出の生産性が大幅に向上しました。

図 4 は、6 回の繰り返し分析における醤油と食用酢中の 20 ng/g での回収率と再現性の結果を示しています。LLE と合成 SLE (Chem Elut S) の両方のメソッドで、分析対象物の回収率 (88 ~ 110 %) と再現性 (RSD < 10 %) について良好な結果を得ることができました。

構成			
成分	Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A) Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B) Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B) Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)		
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部品番号 695975-308)		
カラム温度	35 °C		
DAD パラメータ	260 nm		
注入量	2 μL		
移動相	A) 水 B) MeOH		
グラジエント	時間 (分)	% B	流量 (mL/min)
	0	30	0.5
	1.0	45	0.5
	4.0	65	0.5
	6.0	95	0.5
	8.0	95	0.5
ストップタイム	10 分		

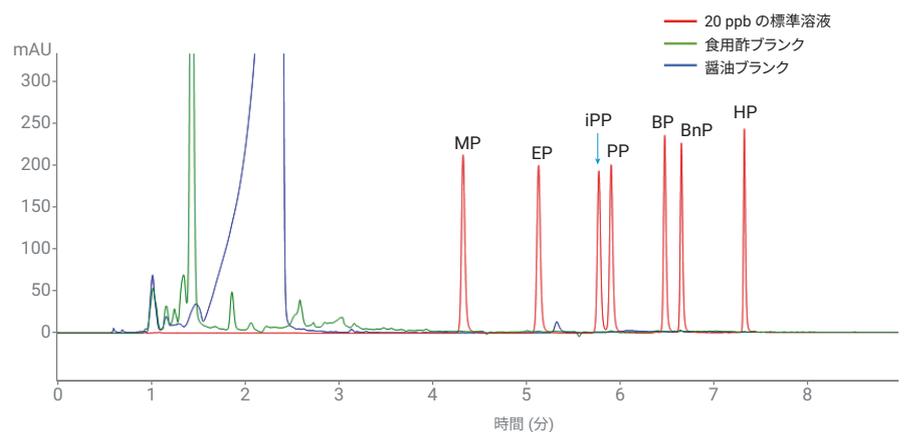


図 3. パラベン標準溶液中の MP、EP、PP、iPP、BP、HP、BnP (赤色)、LLE 後の食用酢のマトリックスブランク (緑色)、LLE 後の醤油のマトリックスブランク (青色) の代表的なクロマトグラム

Chem Elut S と他社 SLE 製品の比較

Chem Elut S and と 4 社の SLE 製品の性能を、醤油と食用酢に含まれる 7 種類のパラベンについて 20 ng/g のスパイクレベルで比較しました。他社製品 1、3、4 は DE-ベースの充填剤で、他社製品 2 は合成 SLE 充填剤でした。醤油では製品間に大きな差異はありませんでしたが、Chem Elut S は食用酢、特に最も疎水性の高いパラベン HP については明

らかな優位性を示しました。Chem Elut S と他社製品 2 が、全体としてやや優れていました (RSD < 5%)。HP の分析では、Chem Elut S は概して他社 SLE 製品 4 種と同等かわずかに優れています (図 5)。

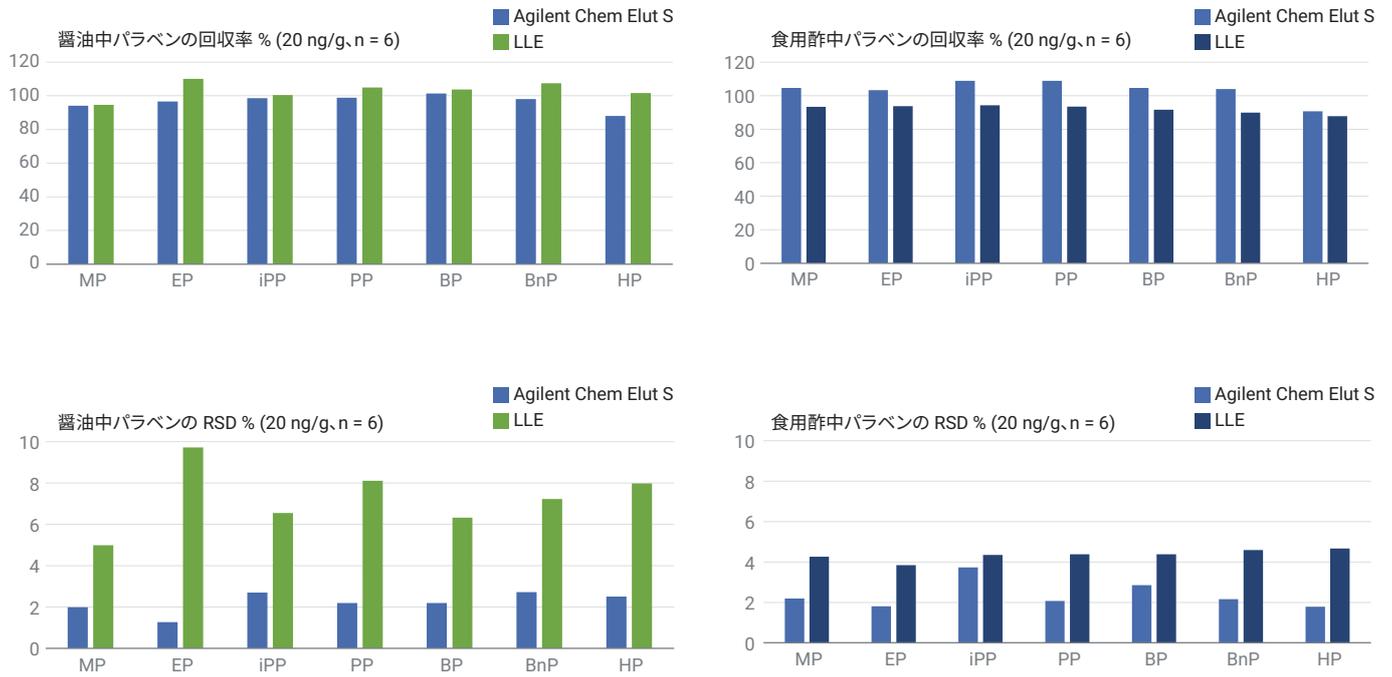


図 4. 20 ng/g スパイクレベルの 6 回繰り返し分析で Agilent Chem Elut S と LLE メソッドを用いて得られた回収率と RSD の結果

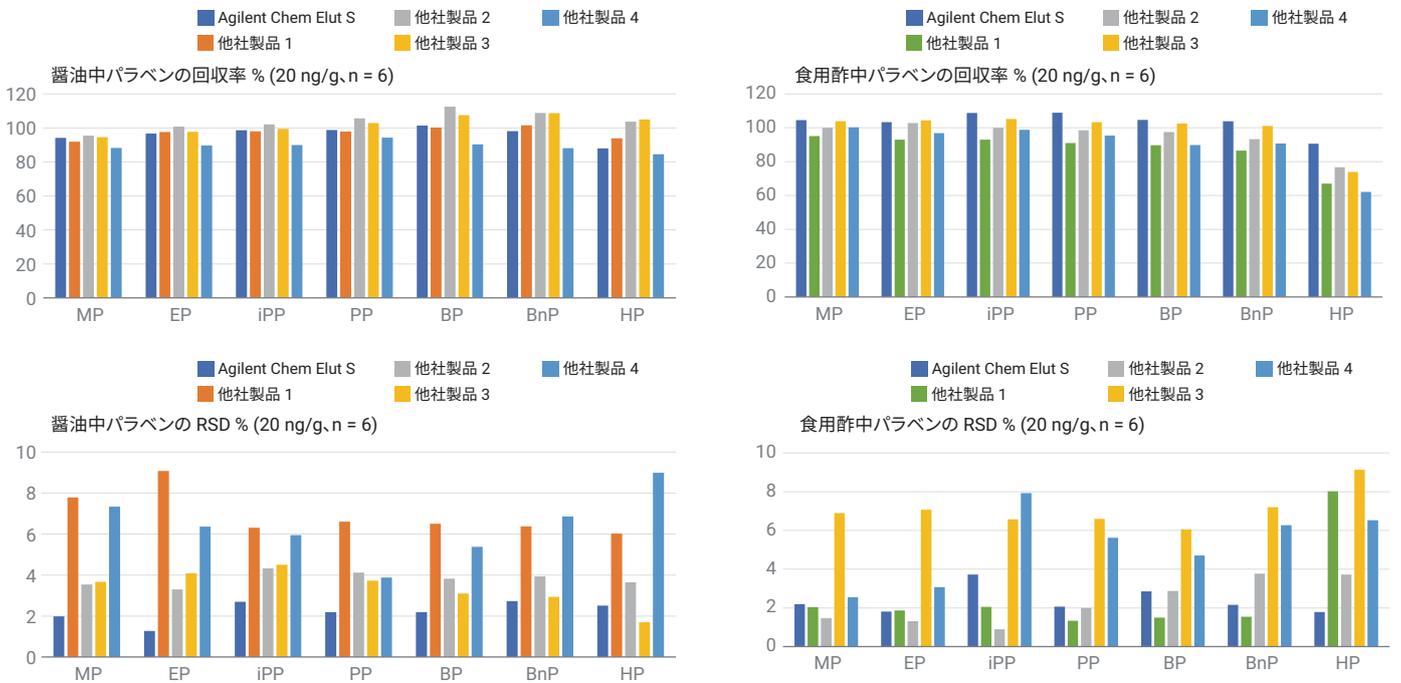


図 5. 20 ng/g スパイクレベルの 6 回繰り返し分析で Agilent Chem Elut S と他社製 SLE 製品 4 種を用いて得られた回収率と RSD の結果

Chem Elut S 充填剤はより高い保水力を提供します。そのため、推奨のサンプルロード量は 3 mL です。これは、他社製品の同等の形式のカートリッジで推奨されるロード量 (2 mL) の 1.5 倍です。分析対象物の回収率が同等で、サンプルサイズが大きいため、メソッドの感度が確実に向上しました。図 6 に、各種 SLE 製品を使用して、同一サンプル濃度 (食用酢中 5 ng/g) で分析を行ったときのクロマトグラムを示します。Chem Elut S (薄緑色) は、非常に高いピークレスポンスと感度を示し、明らかな干渉物質はありませんでした。一方、他社製品 2 (赤色) と他社製品 4 (青色) の結果からは共抽出が観察されました。

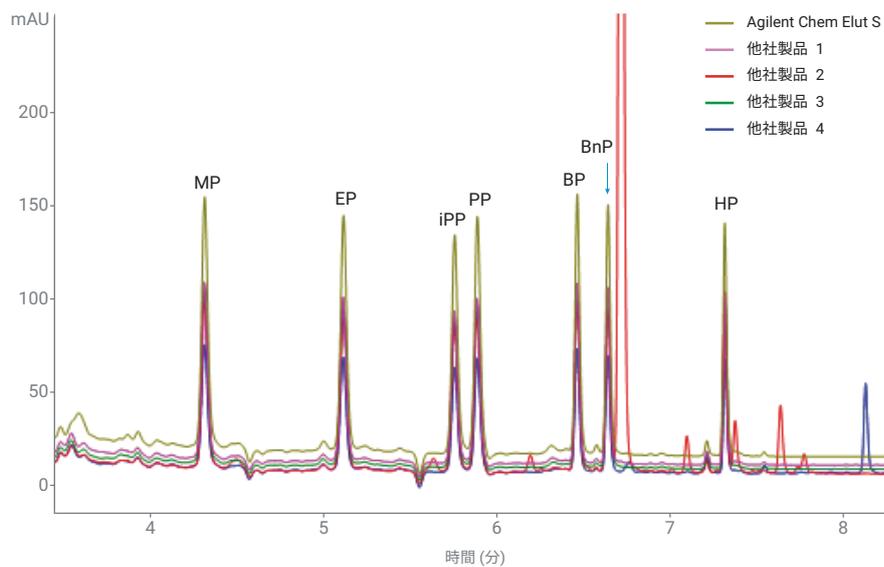


図 6. 同一形式 (12 cc) カートリッジを用いた場合の食用酢中の 5 ng/g パラベンのサンプルのクロマトグラフィーの比較

一部の他社 SLE 製品では予想外の汚染物質ピークが見られました。汚染物質の原因を検証するために、マトリックスの代わりに水を使用し、類似のプロトコルで SLE 製品のクリーンさをテストしました。図 7 は、260 nm での UV 検出と GC/MS フルスキャン検出を使用して各製品のクリーンさを調査した結果を示しています。他社製品 2 (合成 SLE) では、UV 検出と GC/MS フルスキャン検出の両方でカートリッジからより多くの干渉物質が示されました。他社製品 4 SLE カートリッジも複数の干渉物質ピークを示しました。Chem Elut S と他社製品 1、他社製品 3 は、より少ない干渉物質を示しました。UV 検出の結果は、リテンションタイムとピーク高に関して、醤油と食用酢中のパラベン分析における干渉物質のピークが一致しています。これにより、干渉物質は食品マトリックスではなく SLE 製品を原因とするものであることが実証されました。

結論

このアプリケーションノートでは、醤油と食用酢中のパラベンの分析において複数の SLE 製品を使用して LLE と SLE を総合的に比較しました。SLE ではサンプルエマルジョン生成なしのシンプルな抽出を使用し、LLE よりも抽出時間を 40 % 短縮できました。LLE と比べて、Chem Elut S は食品中のパラベン分析において優れた回収率と精度、優れた保水能力、充填剤の適格なクリーンさも示しました。他社製の SLE 製品と比較した場合、Chem Elut S は、特に疎水性がより高い物質について、同等以上の精度と分析対象物の回収率を示しました。結論として、Chem Elut S メソッドによりワークフローの簡素化、感度と再現性の向上、サンプル汚染の防止が実現しました。

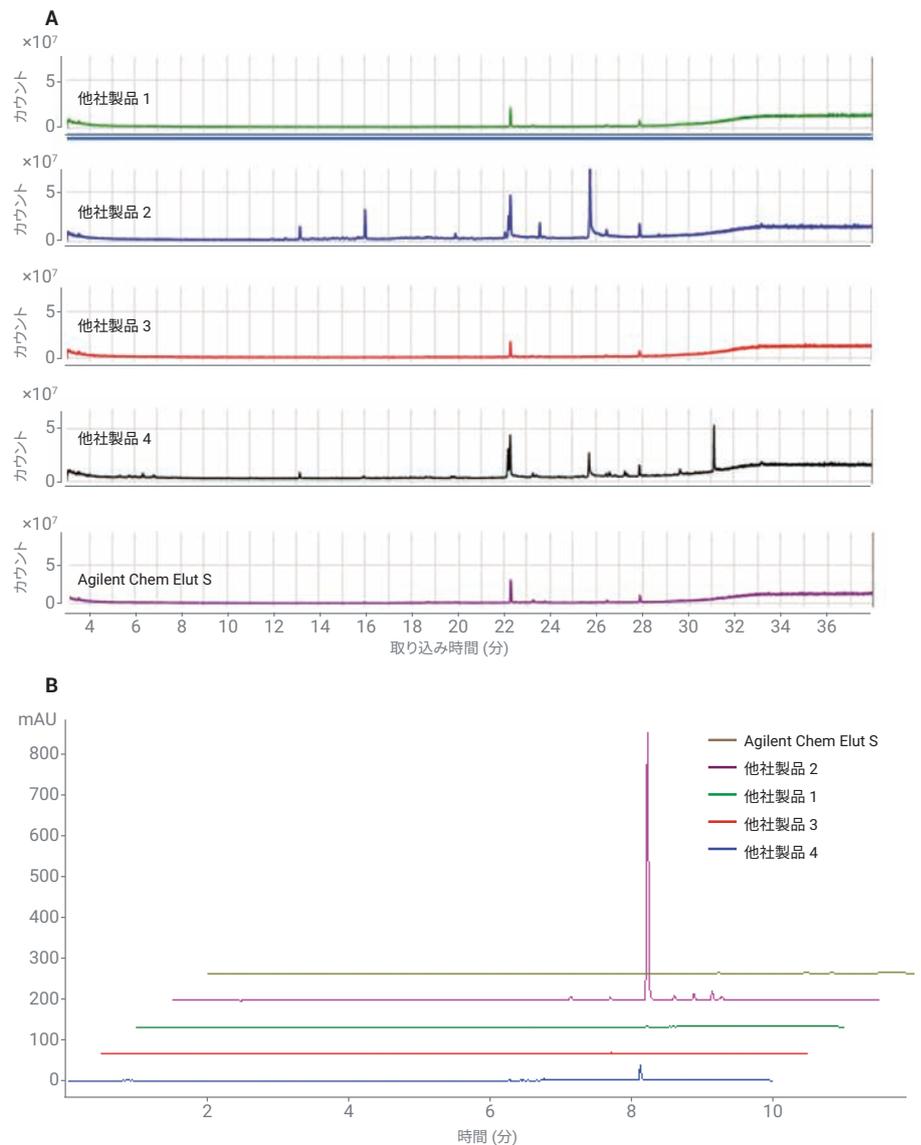


図 7. GC/MS フルスキャン検出 (A) と 260 nm UV 検出 (B) による 12 cc SLE カートリッジについての希釈なしの溶媒を用いたクリーンさのテスト

参考文献

1. Chinese National Food Safety Standard - Determination of p-Hydroxybenzoic Acid Esters in Foodstuffs:GB5009.31-2016.
2. Zimmerman, D. C.; et al. Determination of Parabens in Body Wash using Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2735EN, **2013**.

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. 2019
Printed in Japan, May 24, 2019
5994-1018JAJP