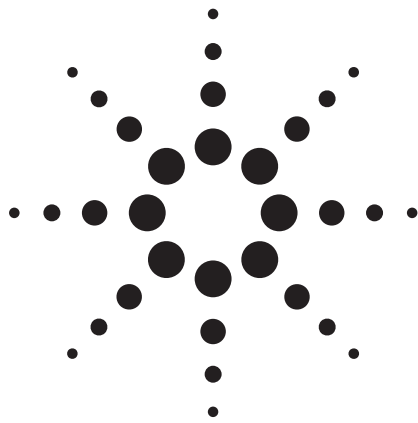


Agilent HC(2)/TC(2) 逆相カラムによる 7種類の合成／人工食品着色料の分離



アプリケーション

食品／香料

著者

Rongjie Fu
Agilent Technologies, Inc.
412 Ying Lun Road
Pu Dong, Shanghai 200131
China

要旨

食品や飲料では、製品の外見を良くするために、多くの合成または人工着色料(赤色33号、サンセットイエローなど)が使われています。これらの化合物は、逆相液体クロマトグラフにより容易に分離できます[1]。本研究では、新しいC18カラムを使って、リン酸バッファとアセトニトリル移動相を用いたグラジエント手法により、7種類の食品着色料を分離しました。この手法は多くのサンプルに適しており、本研究でも飲料中の着色料の分析に利用しています。

はじめに

合成または人工食品着色料は、ほぼすべてが水溶性で、逆相カラムを用いたHPLC分析には最適なサンプルです。これらの化合物は一般に安全なものですが、一部には子どもにおけるアレルギー反応や過敏症といった有害な影響が疑われるものもあります。こうした影響から、一部の国では人工食品着色料に関する規制が設けられています。

国際的な食品品質管理基準を満たしていることを証明する必要があることから、食品の品質管理における着色料の定量の重要性は、ますます高まっています。本研究に用いた7種類の着色料(ほとんどはアゾ色素)の構造を図1に示しています。これらの化合物は、飲料の色をカラフルで魅力的にするために使用されます。

本アプリケーションの目的は、Agilent TC-C18(2)で7種類の着色料を分離するメソッドを開発し、そのメソッドを飲料サンプル中の着色料の分析に応用することです。この新しいカラムは、5 μm の高純度(Bタイプ)シリカが充填されています。表面積は290 m^2/g で、C18と結合し、炭素含有量は12%です。12%という炭素含有量は、この表面積のカラムでは標準的なもので、炭素含有量の比較的多いカラムより親水性が高くなっています。シリカ表面の特殊処理とエンドキャップの改良により、とりわけ極性化合物や塩基性化合物の分離において、すぐれた性能を発揮するカラムになっています。



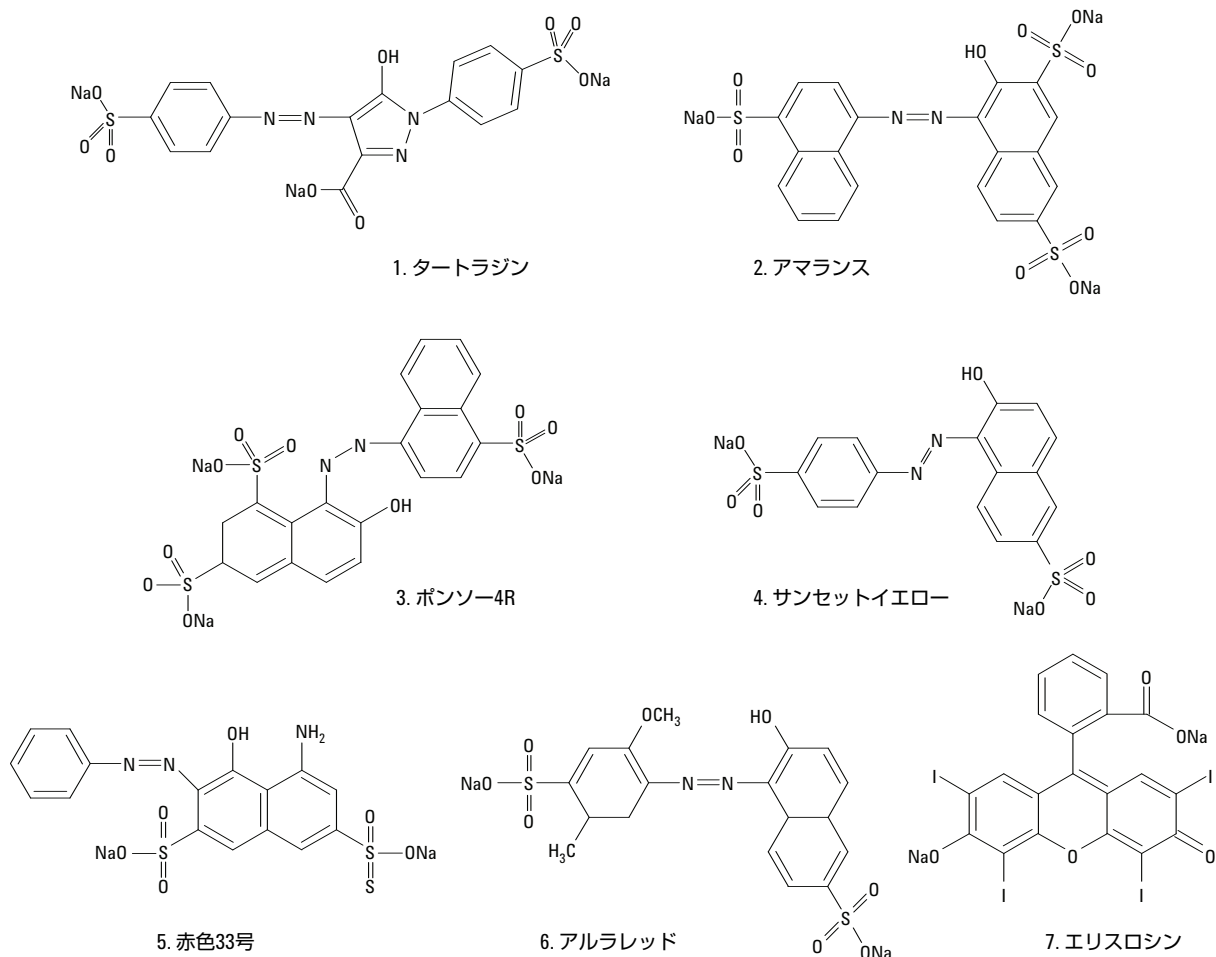


図1. 着色料の化学構造

HPLC条件

使用装置	DADを搭載したAgilent 1200SL
カラム	Agilent TC-C18(2)、4.6 mm×150 mm、5 μm
移動相	A: 20 mMリン酸バッファ、pH 7.0 B: メタノール
グラジエント	0-15分、10% B - 90% B
流速	1 mL/min
検出器波長	254 nm
温度	30 °C
注入量	5 μL

Agilent TC-C18(2)で分離する7種類の食品着色料標準物質

図1に示す化合物は水溶性の極性化合物で、水溶性を高めるスルホン酸基を有しています。実際には、これらの化合物の多くは、食品中では塩の状態で使用されています。これらの化合物の分離には、C18カラムを使用しました。アジレントは、ルーチン分析やQC/QA分析用に、2種類の新しいC18カラムを提供しています。1つは炭素含有量17%のHC-C18(2)カラム、もう1つは炭素含有量12%のTC-C18(2)です。この炭素含有量の違いにより、分析対象成分の極性の有無に応じて、最適なカラムを選択できるようになっています。通常、極性のある分析対象成分の場合、効果的に保持するためには含水量の多い移動相が必要となります。本アプリケーションの人工食品着色料分析では、有機性の低い移動相で開始するグラジエントメソッドを開発しました。含水量の多い移動相で開始する本メソッド開発では、炭素含有量12%のTC-C18(2)カラムが最適な選択肢となります。TC-C18(2)カラムは、極性化合物や、極性物質と非極性物質の混合物の分析にも使用できます。

図2には、Agilent TC-C18(2)カラム (4.6 mm×150 mm、5 μm) で分離した着色料7種類のクロマトグラムを示しています。pH 7.0のリン酸バッファとメタノール移動相を使用したところ、すべての化合物が左右対称のピークで分離され、1.0に近い米国薬局方 (USP) テーリング係数とベースライン分離能を示し、再現性も良好でした。酸性が強いため、各化合物のピーク形状と分離能は、使用する移動相のpHに大きな影響を受けます。pH値が異なる3種類の移動相を用いて、分離を繰り返しおこないました。この分析のクロマトグラムを図3に示しています。これらのクロマトグラムでは、ピーク形状と

分離能がpHに影響されることがはっきりと示されています。特に、もっとも酸性と極性の強い最初の3つの化合物では、影響が大きくなっています。pH 2.2という低いpHでは、ピーク1と2、およびピーク4と5の間の分離能が低下しましたが、エリスロシン (ピーク7) などの溶出の遅い化合物では、pHによる影響は小さくなりました。エリスロシンは、今回の全化合物のなかでもっとも疎水性が高い物質です。全体的な溶出順序は、通常逆相LCで予期されるように、化合物の疎水性に左右されました。

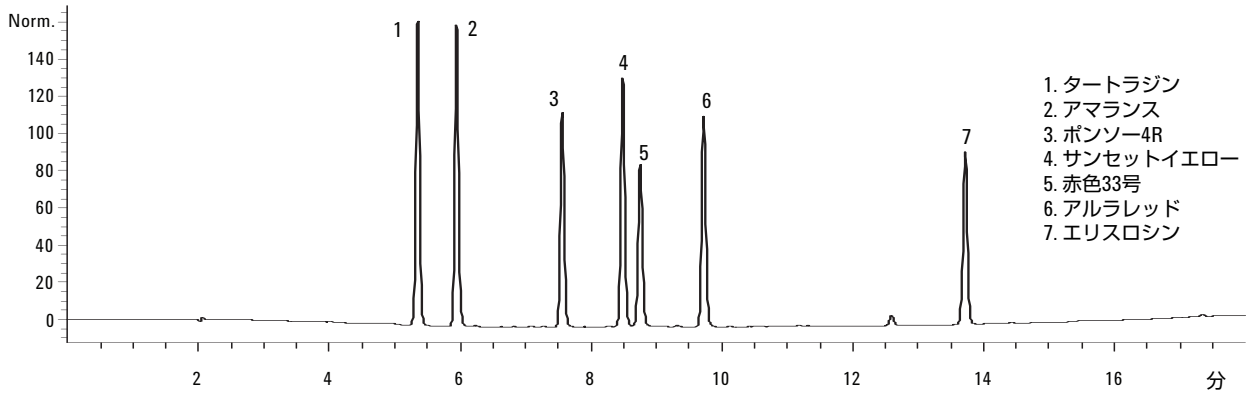


図2. Agilent TC-C18(2)カラムで分析した着色料標準サンプルのクロマトグラム

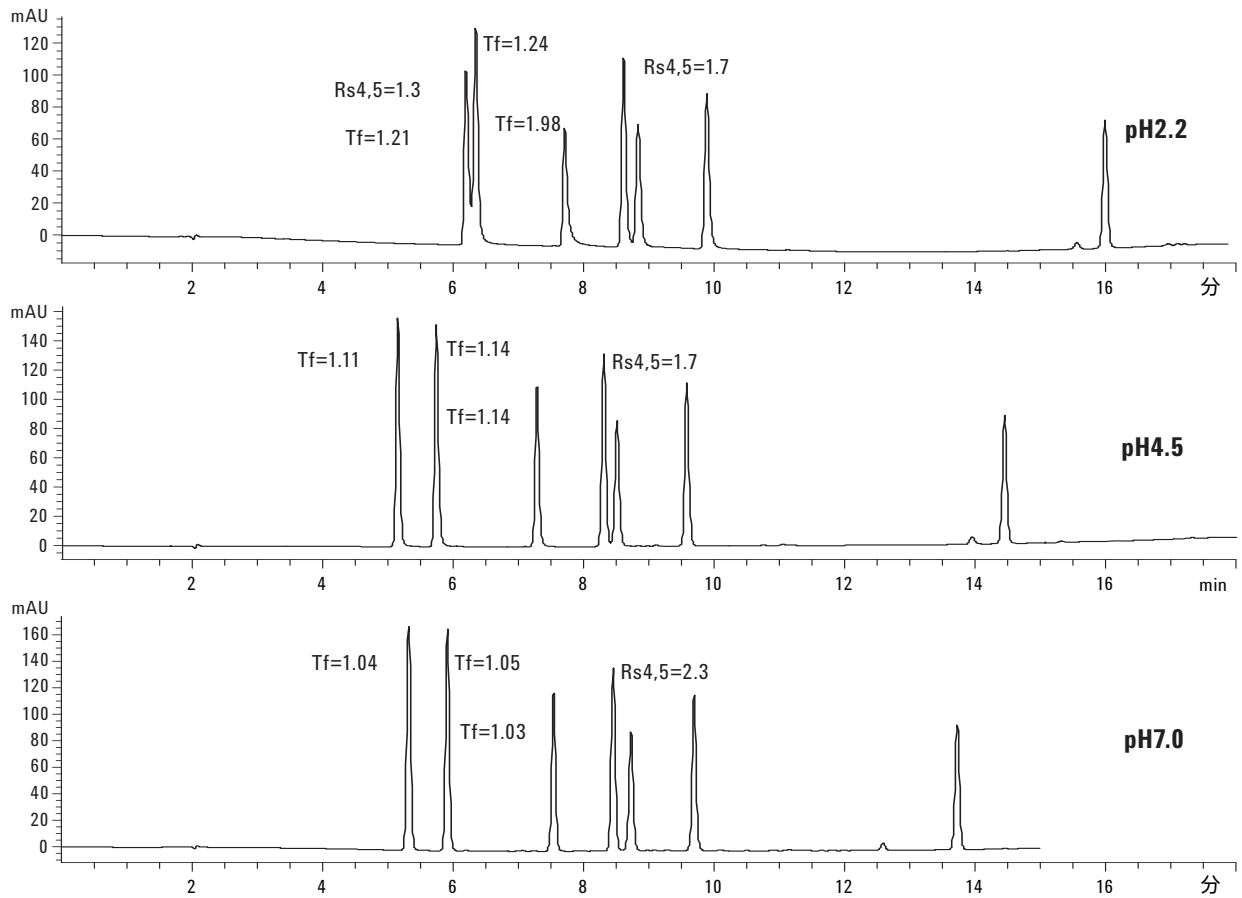


図3. Agilent TC-C18(2)カラムで異なるpHの移動相を用いて分析した着色料標準サンプル

ロット間の再現性

カラムのロット間再現性は、堅牢なHPLCメソッドやルーチンモニタリングにとっては重要な要素です。図4に、本メソッドにおけるTC-C18(2)カラムを評価した再現性テストの結果を示しています。このテストでは、同一のHPLC条件で、3種類のカラムバッチを分析しました。図4のクロマトグラムでは、カラムのロット間におけるリテンションタイムのドリフトやピーク形状の変化はほとんど見られません。この結果は、これらのカラムの製造および充てんの技術が高いことを示しています。

飲料中の人工食品着色料の分析

合成または人工食品着色料は、フルーツ風味の飲料やソーダ、ケーキ、キャンディなど、多くの一般的な飲料や食品に含ま

れています。本アプリケーションでは、2種類の飲料に含まれる複数の着色料を分離しました。フレーバーソーダとドリンクパウダーという2つの一般的な飲料を選択しました。サンプルの前処理にあたっては、オレンジフレーバーのソーダを脱気し、0.45 μm フィルタでろ過したのちに、分析をおこないました。ドリンクパウダーについては、水に溶解し、0.45 μm フィルタでろ過したのちに、注入して分析しました。これらのサンプルのクロマトグラムを図5に示しています。オレンジフレーバーのソーダサンプルでは、3種類の着色料が検出され、完全に分離されました。標準サンプルの分析結果をもとに、最初に検出された既知のピークと、それ以前に検出された未知のピークを判定しました。飲料パウダーサンプルでは、2つの分析対象着色料が検出され、効果的な定量分析を実施できる程度に分離されました。

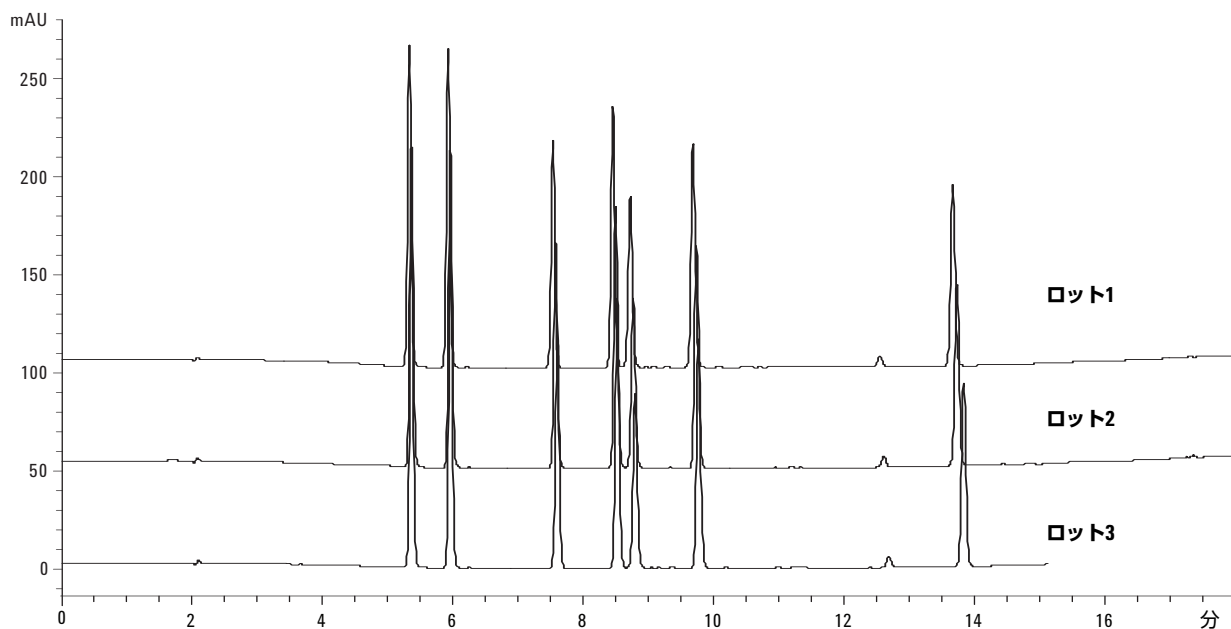


図4. ロット間の再現性(TC-C18[2]、4.6 mm X 150 mm、5 μm)

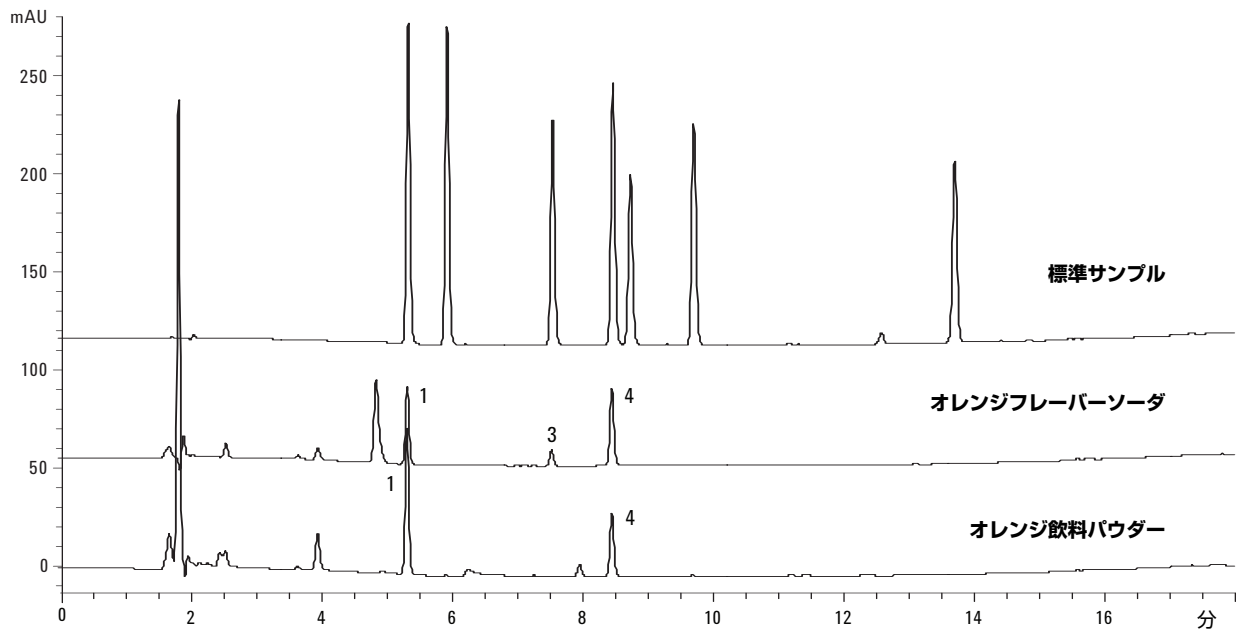


図5. 2種類のサンプルのクロマトグラム

飲料パウダーでは、添加されている食品着色料の濃度は低いものでした。低濃度サンプルの場合、検出および定量の要件を満たすためには、大容量の注入が必要となります。50 μ Lを注入した2つのクロマトグラムを図6に示しています。依然として良好な分離能を示し、ピークは左右対称で、バンドの拡

大もほとんど見られません。オレンジフレーバーのソーダサンプルでは、ピーク1と未知の化合物が完全に分離されました。こうした結果は、表面積の広いTC-C18(2)カラムのキャパシティの高さを示しています。

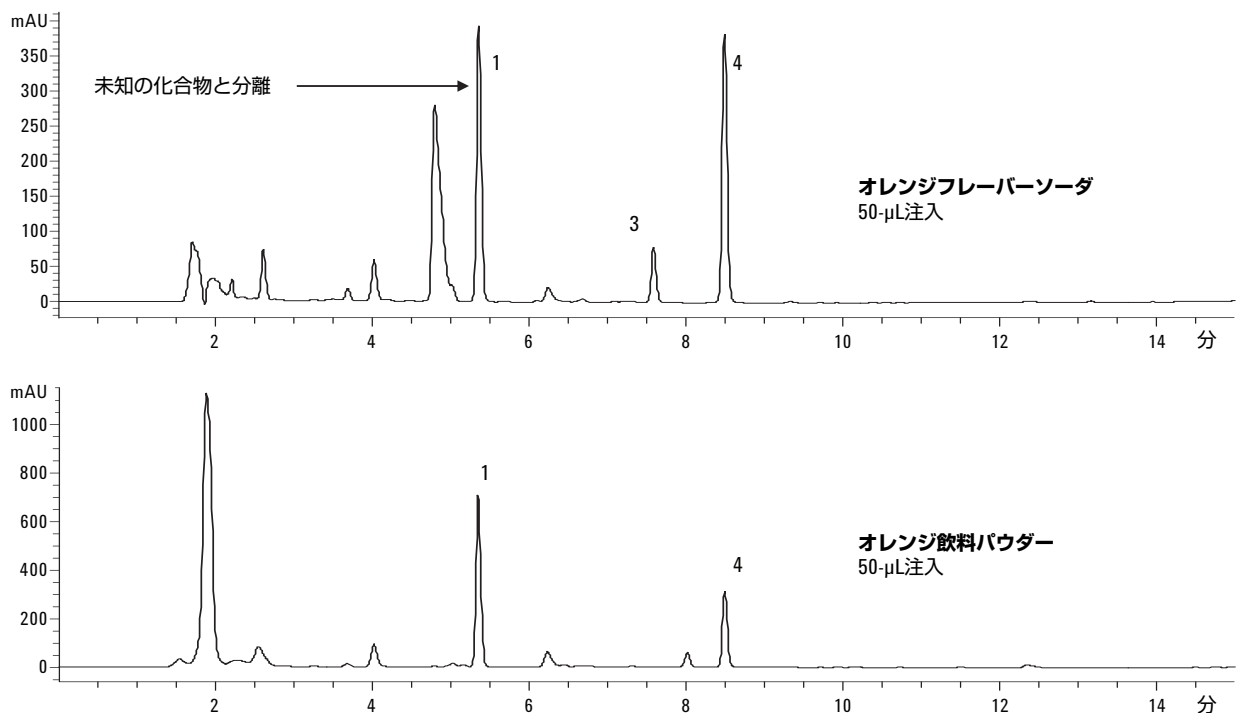


図6. 50- μ L注入のクロマトグラム

HC-C18(2)との選択性の比較

すでに述べたように、HC-C18(2)の炭素含有量はTC-C18(2)よりも高いため、非極性化合物の保持力は強い一方で、極性化合物の保持力はTC-C18(2)ほどではありません。図7のクロマトグラムからは、HC-C18(2)カラムの極性食品着色料の保持力が、TC-C18(2)カラムよりもやや低いことが見てとれます。このクロマトグラムでは、炭素含有量の違いにより、ピーク4とピーク5の選択性にも違いが生じることも示されています。図8には、TC-C18(2)およびHC-C18(2)カラムで分析したオレンジフレーバーソーダのクロマトグラムを示しています。TC-C18(2)カラムのピーク1と夾雑物の溶出順序は、

HC-C18(2)カラムとは逆になっています。TC-C18(2)カラムでは、夾雑物は対象化合物1よりも先に溶出し、良好な分離能を示しています。大量のサンプルを注入した場合でも、ベースライン分離能は依然として良好でした。溶出順序が逆になったケースでは、2つの化合物はベースラインで分離されず、ベースラインで分離するためには移動相組成の調整が必要でした。本メソッドでは、グラジエント開始時における移動相の有機性が低い(10%)ことから、本アプリケーションには炭素含有量の低いTC-C18(2)カラムを選択しました。重要なのは、2つのカラムの選択性の違いにより、メソッド開発におけるカラムの選択肢が広がる点です。

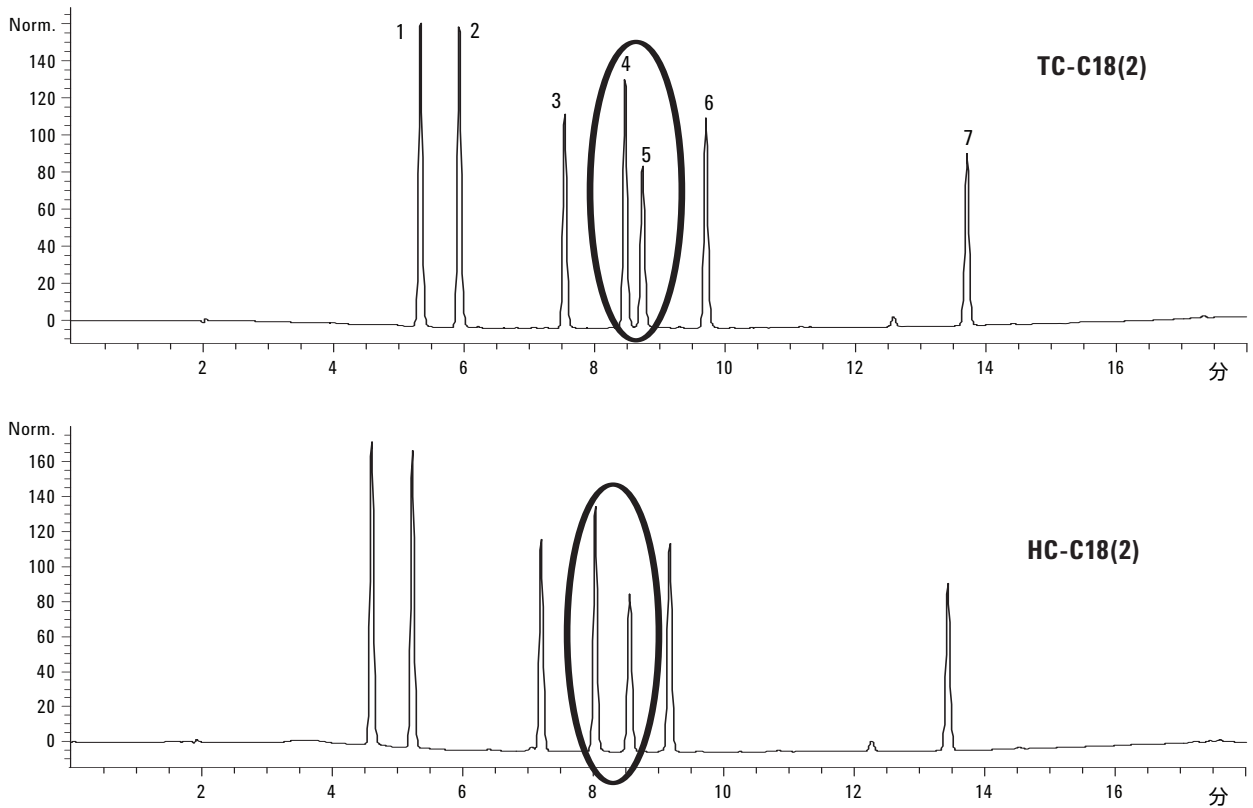


図7. TC-C18(2)とHC-C18(2)で分析した着色料標準サンプルのクロマトグラム

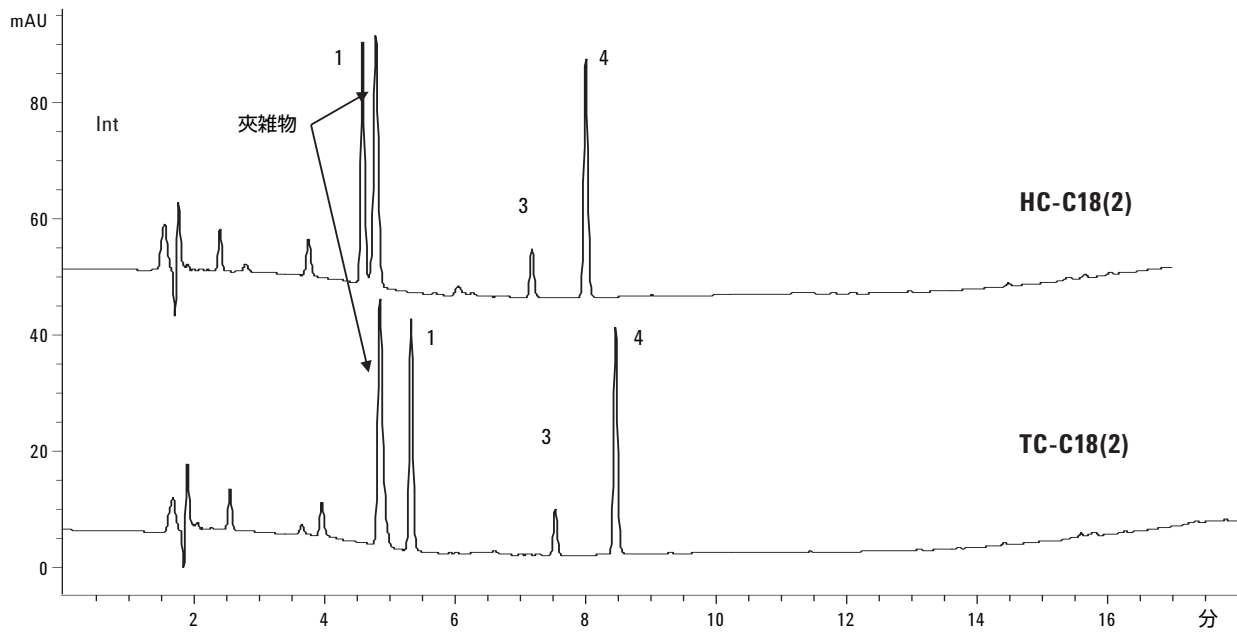


図8. TC-C18(2)とHC-C18(2)の選択性の違い

結論

Agilent TC-C18(2)では、単純なグラジエントメソッドにより、多くの一般的な合成着色料を分離できます。このメソッドでは、多くの合成食品着色料がベースラインで分離され、左右対称のピークと良好な再現性が得られます。

Agilent TC-C18(2)カラムを使えば、食品および飲料中の合成着色料の日常的なQC分析において、信頼性の高い結果を得ることができます。

参考文献

1. Fang Yanyan, Agilent Technologies, publication 5989-3639CHCN. www.agilent.com/chem

詳細情報

アジレントの製品とサービスの詳細については、ウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

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。

本文書に記載の情報、説明、仕様等は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
March 27, 2008
5989-8307JAJP