

キャピラリカラムバックフラッシュを使用した化粧品中香料アレルゲンの分析

アプリケーション

食品

著者

Frank David

Research Institute for Chromatography

Pres. Kennedypark 26

8500 Kortrijk

Belgium

Matthew S. Klee

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Road

Wilmington, DE 19808-1610

USA

要約

GC/MS を使用して、化粧品中の香料アレルゲンを測定しました。非選択抽出/希釈による簡単なサンプル前処理の後、高速スキャンとリテンションタイムをロックした条件の下で、抽出物の分析を行いました。定対象化合物の溶出後、キャピラリカラムバックフラッシュを使用して、洗剤などの低揮発性マトリックス成分を効率的に除去しました。その結果、カラムと検出器の汚染を低減し、サンプル処理数を大幅に増やすことができました。

緒言

EU 指令 2003/15/EC [1] によると、化粧品製品中の 27 種類の香料成分について、ボディーソープや石鹸などの洗い流される製品では 100 ppm (mg/kg)、香水やクリームなどの肌につけた状態を保つ製品では 10 ppm を超える濃度の成分については、ラベルに表示する必要があります。

ます。そのため、様々な種類の化粧品中の対象成分をモニタリングする定性および定量メソッドが必要です。

サンプルマトリックスと溶質濃度に応じて、様々なサンプル前処理法が開発および適用されています [2]。化粧品製品中のアレルゲン測定での大きな問題の 1 つは、洗剤 (非イオン性またはイオン性)、ワックス、脂質などの揮発性の低い、あるいは非揮発性成分の存在に関係しています。選択的なサンプル前処理をしていないサンプルが導入されると、これらの成分は分析システムを汚染します。しかし、測定対象化合物は広範囲の揮発度 (リモネンから安息香酸エステルまで) と極性 (相対的に極性の高いベンジルアルコールから非極性の安息香酸ベンジルまで) に及ぶため、選択抽出または選択的サンプル導入は簡単ではありません。そのため、最適なメソッドは ppm の感度を示すとともに、測定対象成分が相対的な揮発度および極性による影響を受けないようにする必要があります。さらに、品質管理を行う環境での日常的な分析では、サンプル前処理を最低限に抑える必要があり、非選択的な溶液または抽出物の直接注入が好まれます。最近、パッキド PTV ライナと自動ライナ交換を組み合わせた非揮発性物質の選択的保持を用いた、液体サンプル導入が開発および実証されました [3]。しかし、この手法には専用のサンブラが必要です。

本アプリケーションノートでは、標準スプリット/スプリットレス注入口とキャピラリフロー技術を用いた代替メソッドを推奨します。カラム末端に QuickSwap デバイスを使用し (質量分析計トランスファラインに接続)、その結果、補助エレクトロニックニューマティクスコントロール (EPC) でカラム出口圧力をコントロールすることができます。測定対象ピークがカラムから溶出した後、



Agilent Technologies

注入口圧力を下げ、出口圧力を上げることで、カラムに残っているサンプル成分をカラム先端からスプリット注入口に強制的に戻し、スプリットベントトラップで捕捉します。

分析は、リテンションタイムをロックしたGC/MS メソッドで行いました。30 m x 内径 0.25 mm x 0.25 µm HP-5MS カラムをヘリウムキャリアガスで使用したリファレンスメソッド [2] を、15 m カラムと水素キャリアガスを使用し、最大限の処理数を得るための高速スキミングメソッドに変換しました。その結果、測定対象溶質の分離に必要な分析時間は、24 分から 8 分に短縮されました (3 倍のスピードアップ)。低揮発性サンプルマトリックス成分がカラムからバックフラッシュされるため、その後の分析への、残留によるカラムと検出器の汚染、ベースラインの変動、ゴーストピークなどを回避します。

サンプル前処理

適切な溶媒 (一般的に、アセトンまたはジクロロメタン) で、サンプルを濃度 5% (50 mg/mL) に希釈します。サンプルを 15 分間、超音波槽の中に置き、測定対象溶質を溶媒に完全に溶かします。抽出および溶解後、サンプルを遠心分離器にかけ、上澄みをオートサンプリングバイアルに移します。

本アプリケーションノートでは、香料化合物と非イオン性洗剤を含むシャンプーサンプルに関するデータが得られました。

GC 条件

すべての分析は、Agilent 7890A GC/5975 MSD の組み合わせで行いました。注入には、7683 ALS を使用しました。GC/MS 条件をまとめると以下のようになります。

GC/MS条件

カラム	15 m x 0.25 mm id x 0.25 µm HP-5MS	Agilent P/N 19091-431
キャリアガス/圧力	Hydrogen	11.050 psi constant pressure
カラムアウトレット/圧力	QuickSwap	4 psi via auxiliary EPC
インレット	Split/splitless in split mode	250 °C, split ratio = 50:1
オープン温度プログラム	高速分析 (3 倍スピードアップ*)	50 °C (0.33 分) → 24 °C/min で 240 °C まで
MSD 設定値	トランスファライン温度	250 °C
	イオン源温度	300 °C
	四重極温度	150 °C
	オートチューン	EMV +0V
QuickSwap リストリクタ	17 cm x 内径 110 µm (4 psi)	P/N G3185-60063
検出	スキャンモードの MS	40 ~ 350 amu、サンプル = 2 ¹
MSD イベント	溶媒ディレイ	1.5 分
	検出器オフ (バックフラッシュ中)	8.0 分

* これらの条件下で、α-イソメチルイオノン は 5.17 分で溶出し、先に発表されたリテンションタイムロッキング (RTL) 法 [2] との比較で、3 倍の時間短縮に相当します。

バックフラッシュ条件 (8 分に開始)

注入口圧力	2 psi
補助圧力	70 psi
バックフラッシュ時間	2.75 分
バックフラッシュ温度	240 °C

結果

まず、一般的な方法でシャンプー抽出物を分析しました。バックフラッシュを使用せず、オープンで 320 °Cまでプログラムして、遅く溶出する成分が溶出したことを確認しました。図 1 には、10 回連続分析の全イオンクロマトグラムの重ね書きを示しています。クロマトグラムの最初の部分では、優れたリテンションタイムとピーク面積の再現性が得られています。

このサンプルでは、リモネン (ピーク 1)、リナロール (2)、ユージノール (3)、リリアル (4)、ヘキシルシナムアルデヒド (5)、安息香酸ベンジル (6)、サリチル酸ベンジル (7) を含むいくつかのアレルゲンを検出できました。8 分から後には測定対象溶質は一切溶出しません

が、非イオン性洗剤に該当するピークが検出されます。320 °Cの空焼きを行っても、これらの化合物はカラムから完全に除去されません。このことは、ゴーストピークの様子から分かります (たとえば、矢印で示された 11.7 分のピーク)。このピークと残留によるその他のピークは、サンプル注入を繰り返す度に一定の間隔で増加するため、すべての低揮発性サンプル成分がカラムから溶出するとは限らないことを明確に示しています。また、10 分後に、ベースラインの上昇がはっきりと見られます。この 14 分の分析のうち、最初の 8 分だけが、測定対象アレルゲンの必要な分離および定量に実際に必要であることに注目します。残りの時間は、カラムを空焼きすることで、カラムに残ったサンプル成分を除去しようとする一般的な方法に相当します。しかしここで示したように、簡単に除去できない場合があります。

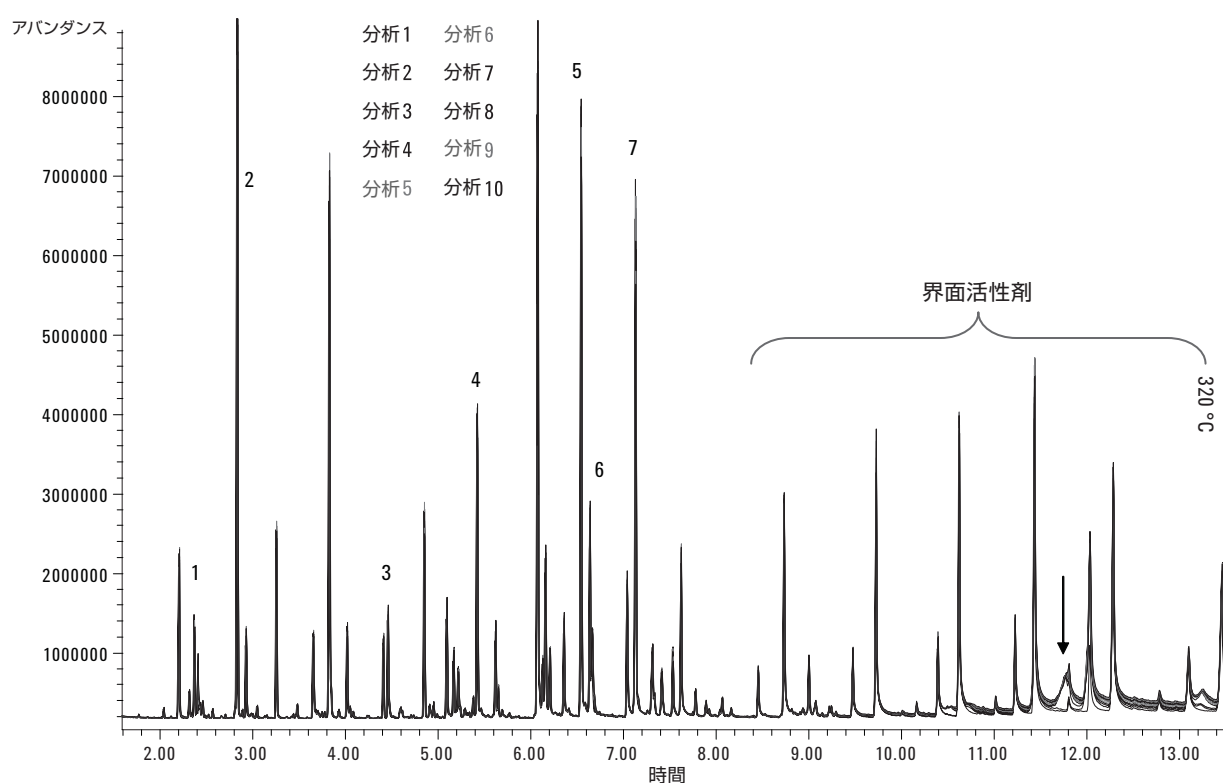


図 1. 10 回連続のシャンプー抽出物の分析の重ね合わせ (オープン温度は 320 °Cにプログラムされ、バックフラッシュなし)。

この 10 回のサンプル分析のシーケンスの後、ブランクランを 2 回行いました。クロマトグラムは図 2 に示します。いくつかの汚染ピーク (おそらく、サンプルバイアルのセプタム由来の物質) が 6 ~ 9 分周辺で溶出し、両方のブランクランで一定です。10 分の後に溶出している大きなピークからは、高分子量物質がカラムに蓄積していて、320 °C にプログラミングしても、これらの化合物が除去されなかったことを明らかに示しています。

その後の実験で、サンプル抽出物を新たに 6 回連続で分析を行いました。各分析では、最も強く保持される測定対象アレルゲンのリテンションタイムである 8 分の後に分析を終了しました。サンプル分析後、ブランクランを 2 回行いました。1 回は、サンプルと同じ温度プログラムを用いて、240 °C (8 分) で終了し、もう 1 回は、320 °C まで続ける温度プログラムで行いました。6 回のサンプル分析、最初のブランクラン (8 分で終了)、およそ 2 回目のブランクラン (320 °C まで分析) のクロマトグラムを図 3 に重ね合わせています。

最初のブランクランでも、いくつかのゴーストピークが 8 分の分析時間ウィンドウ内に現れます。320 °C まで分析した 2 回目のブランクランからは、各注入サンプルからの低揮発性成分がカラムに蓄積していることが、はっきりと分かります。この例で示されたようなサンプル物質が蓄積すると、カラムがすぐに劣化し、少量サンプル成分を検出および定量する能力が大きく損なわれます。遅く溶出するサンプル成分を高温で除去しようとする (カラムの焼き出し) 標準的な手法を行うことで、カラムが固定相高分子の酸化や分裂により早期劣化する傾向があるだけでなく、汚れがカラムから質量分析計イオン源に移動し、その性能を低下させ、より頻繁に洗浄を行うが必要になります。

次に、バックフラッシュメソッドを設定し、10 回のサンプル分析を行い、その後にブランクランを行いました。このサンプル分析のクロマトグラムは図 4 のとおりです。

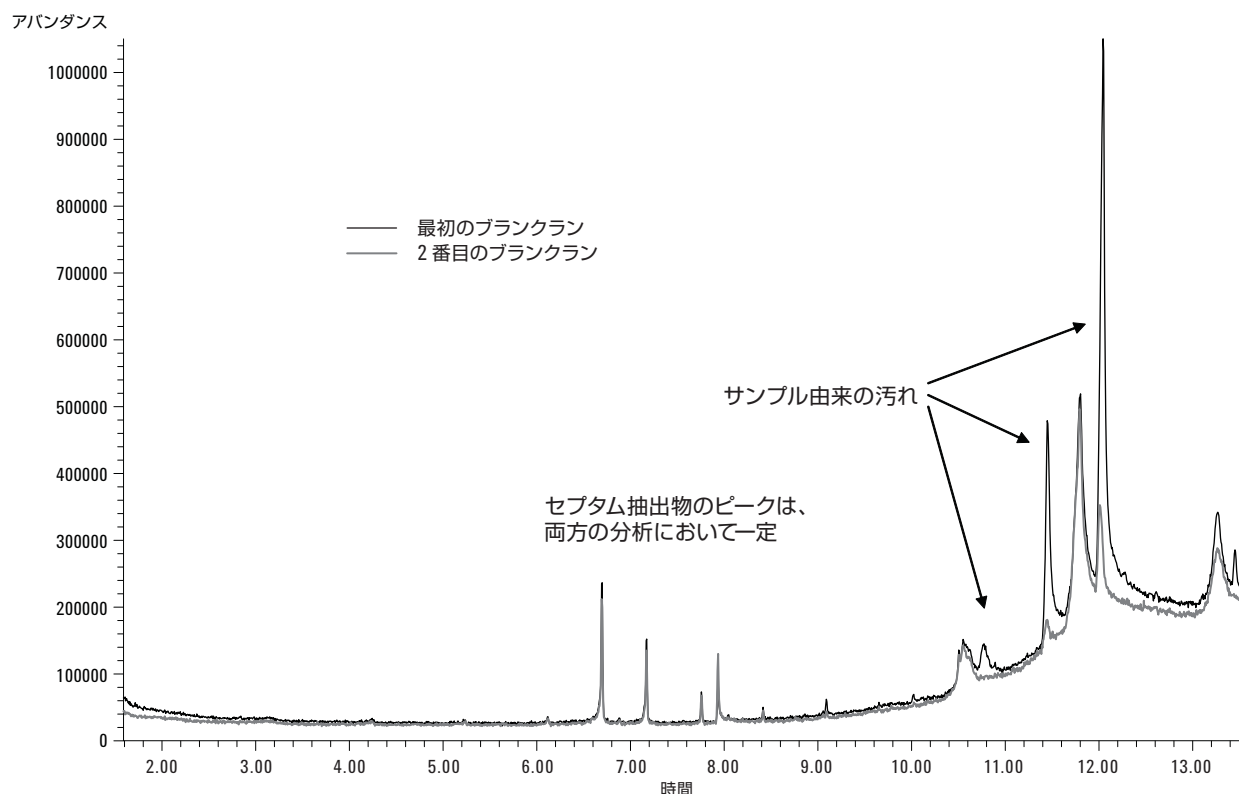


図 2. シャンプー抽出物の分析後、2 回連続のブランクラン。

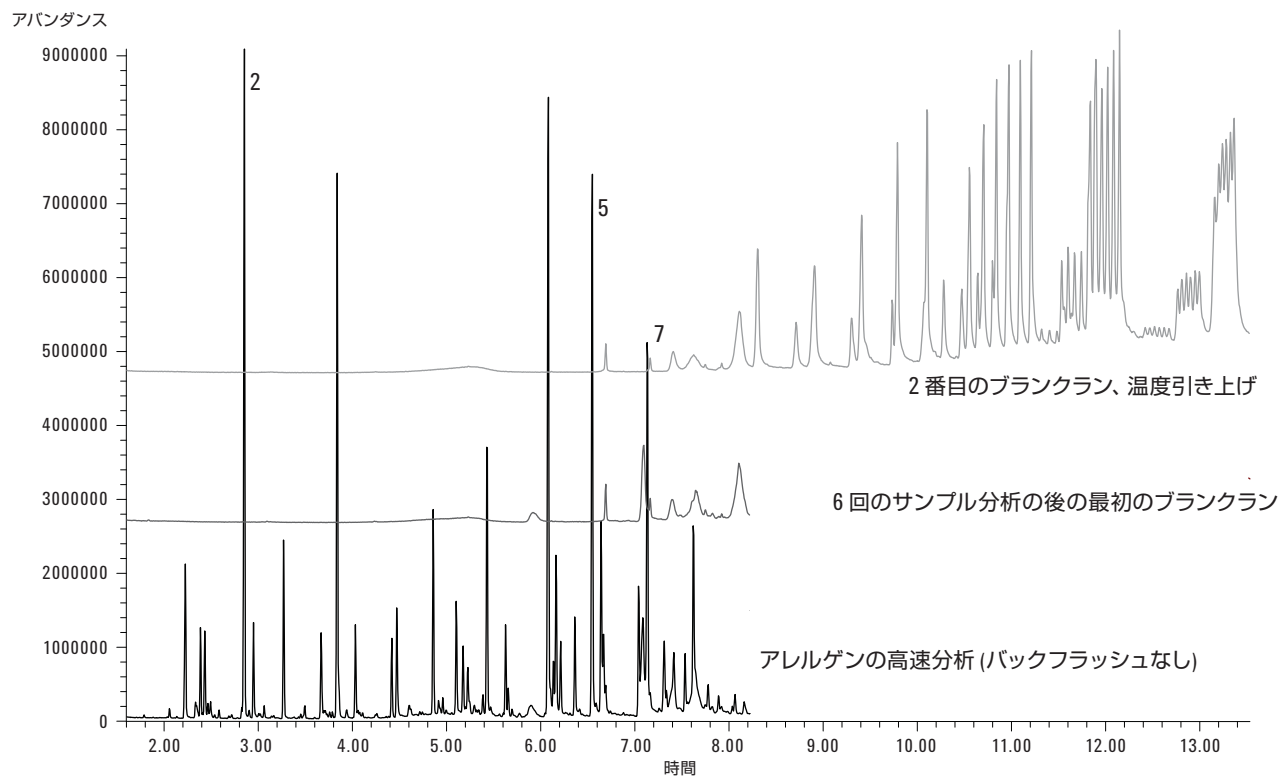


図 3. シャンプー抽出物の 6 回の分析の重ね合わせ。240 °C に終了した分析 (下)、240 °C までのブランクラン (中央)、320 °C までの 2 回目のブランクラン (上)。

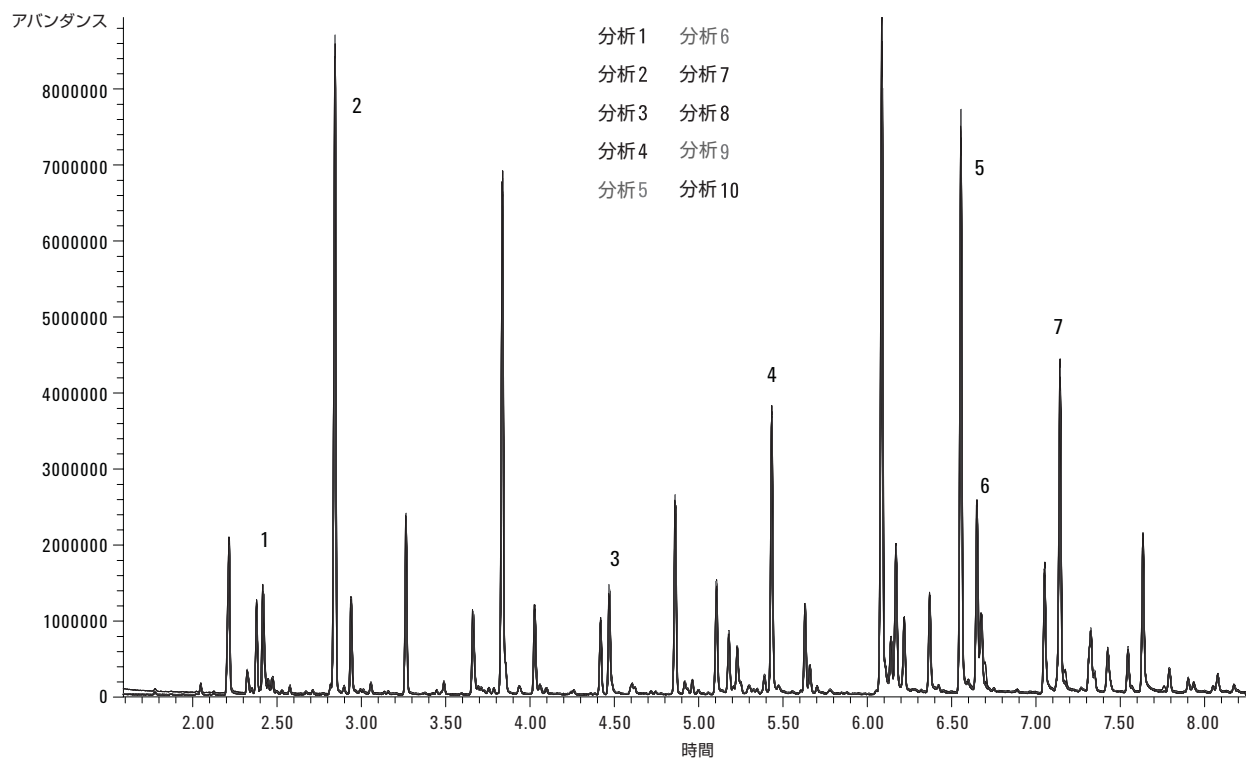


図 4. 10 回連続のシャンプー抽出物の分析の重ね合わせ (オープン温度は 240 °C にプログラムされ、バックフラッシュあり)。

図 4 で、ゴーストピークが現れず、ベースラインが上昇していないことから、サンプル成分の残留は見られず、優れたリテンションタイムとピーク面積の再現性が得られたことが、はっきりと分かります。

図 5 では、10 回目の分析が、その後すぐに行われたブランクランに重ね合わせられています。ブランクランでは、溶媒バイアルのセブタム由来のピークだけが見られます。洗剤のピークは、カラムから効率的且つ効果的に除去されました。

全分析時間は、13.6 分 (320 °C までの温度プログラムおよび 2 分間のホールド時間) から、11 分 (240 °C までの

温度プログラムおよび 2.75 分のバックフラッシュ時間) に短縮されました。さらに、バックフラッシュを行わない長い分析では得られなかった、すべての低揮発性物質のカラムからの除去が可能でした。おまけに、最終オープン温度が低いために、オープン冷却と平衡時間も短縮されました。

同定した 7 種類のアレルゲン各々に対して、リテンションタイムおよびピーク面積の再現性を測定した結果が、表 1 に記載されています。リテンションタイムの標準偏差は、0.002 分より良くなりました ($RSD < 0.03\%$)。また、ピーク面積の再現性に関して、優れた値が得られました。

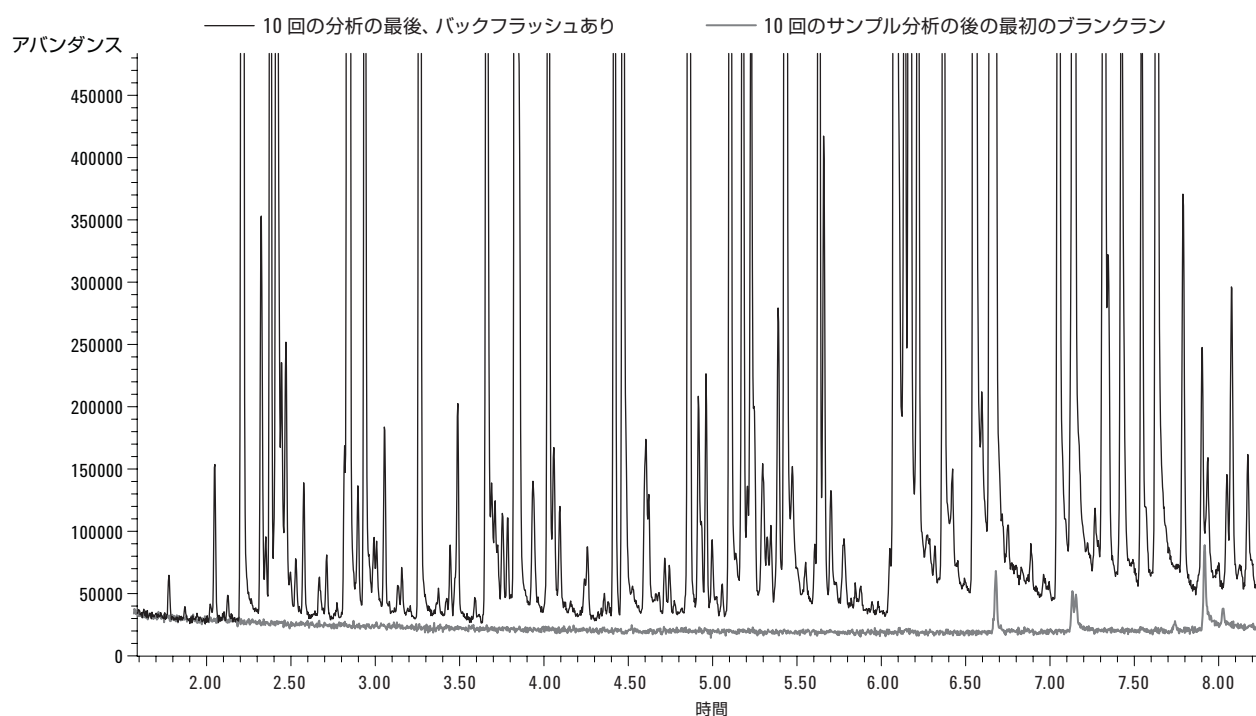


図 5. シャンプー抽出物の 10 回の分析の重ね合わせ (オープン は 240 °C にプログラム)。バックフラッシュあり (上) とその後のブランクラン (下)。

表 1. 同定した 7 種類のアレルゲン

	RT 分	RT SD 分	RT RSD %	面積 RSD %
リモネン	2.3771	0.0005	0.020	1.80
リナロール	2.8372	0.0004	0.015%	1.60
ユージノール	4.4671	0.0003	0.007	1.60
リリアル	5.4312	0.0015	0.028	1.53
ヘキシルシンナムアルデヒド	6.5514	0.0016	0.022	2.00
安息香酸ベンジル	6.6467	0.0000	0.000	2.00
サリチル酸ベンジル	7.1405	0.0013	0.018	2.98
平均		0.0008	0.015	1.95

結論

化粧品中の香料アレルゲンの測定では、スプリット/スプリットレス注入口へのサンプル直接注入を使用できます。以前発表されたリテンションタイムをロックしたメソッドと比較すると、5975 MSD と組み合わせて、短いカラムと水素キャリアガスを使用することで、分析時間が 1/3 に短縮されました。7890A GC と共にバックフラッシュメソッドを使用すると、カラムと検出器への汚染は最低限に抑えられました。オープンサイクルの周期を速くすることで、分析時間が 20% 短縮されました。前の注入からのゴーストピークは排除されました。優れたリテンションタイム再現性とピーク面積再現性が得られました。

香料成分の分析は、たとえばポリエチレングリコールカラム（最高使用温度 250 °C）などの極性固定相を持ち、最高使用温度が限られているカラムでも行われるため、7890A GC と共にキャピラリフロー技術を用いたキャピラリカラムバックフラッシュ法は、中程度の温度で強く保持されるサンプル成分を除去するうえで非常に興味深いツールです。

参考文献

1. Directive 2003/15/EC, Official Journal of the European Union, L 66/26, 11.3.2003.
2. F. David, C. Devos, and P. Sandra, LC.GC Europe, 19, 602-616, November 2005.
3. F. David, C. Devos, D. Joulain, A. Chaintreau, and P. Sandra, *J. Sep. Science*, 29, 1587-1594 (2006).

詳細情報

弊社の製品およびサービスに関する詳細情報は、ホームページ www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料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。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録は行っておりません。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料の複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
March 23, 2007
5989-6460JAJP



Agilent Technologies