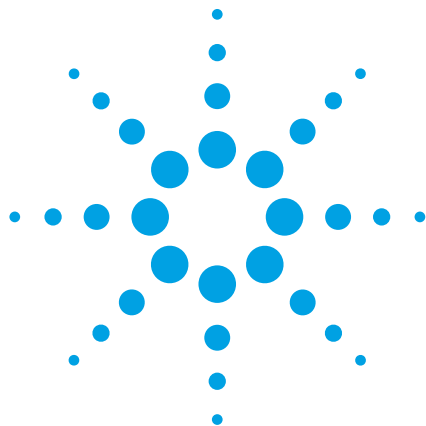




Agilent 1290 Infinity LC による 柑橘油中のフロクマリン 5-MOP および 8-MOP 測定のための グリーン LC メソッドの開発

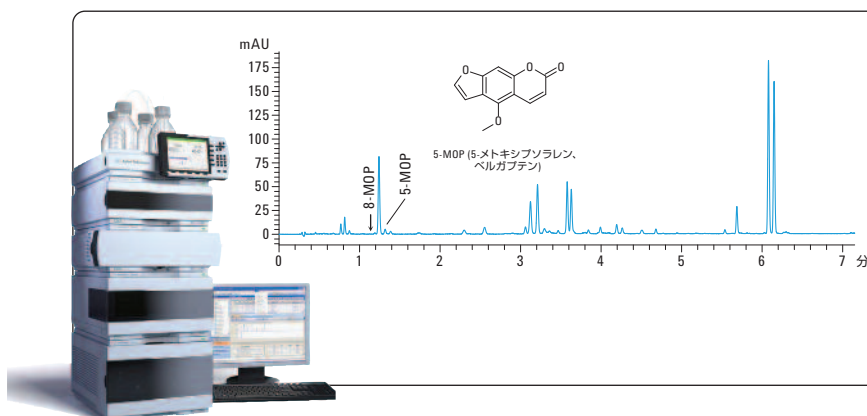
アプリケーションノート

天然物、香水

著者

Gerd Vanhoenacker, Frank David, and
Pat Sandra
Research Institute for Chromatography
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Bernd Glatz and Edgar Naegele
Agilent Technologies R & D and
Marketing GmbH and Co. KG
Hewlett-Packard-Str. 8
76337 Waldbronn
Germany



概要

Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、レモン油およびオレンジ油に含まれるフロクマリン 5-メトキシプソラレン (5-MOP) および 8-メトキシプソラレン (8-MOP) を分析しました。1000 bar において、移動相としてアセトニトリルおよび水を使用し、逆相 (RP) 液体クロマトグラフィー (LC) の総分析時間を 4 分に短縮できました。環境への影響と、アセトニトリル不足の現状を考慮し、水/メタノールおよび水/エタノールで構成された移動相と水/アセトニトリルの移動相とを比較しました。有機修飾剤の特性が選択性およびピークキャパシティに与える影響を調査しました。レモン油サンプルに含まれる約 50 mg/kg の 5-MOP の測定について、異なるメソッドの性能指数を比較しました。8-MOP は ppm レベルでは検出されませんでした。いずれのフロクマリンも、約 1 mg/kg の柑橘油が検出限界でした。



Agilent Technologies

はじめに

フロクマリンは天然物であり、芳香性の化粧品に使用される植物エキスや精油に含まれている場合があります。こうしたフロクマリンは、光変異原性および光発がん性を持つ物質であることが確認されています。国際がん研究機関 (IARC) によると、5-MOP (5-メトキシプソレン、ベルガプテン) および 8-MOP (8-メトキシプソレン、キサントトキシン) が UV 放射と結びついた場合、それぞれ、グループ 2A (おそらく発がん性あり) およびグループ 1 (発がん性あり) の発がん性物質に分類されます。

その上で、化粧品に含まれるソラレンの限界値が定義されています。Commission Directive 95/34/EC of 1995 によると、日焼け止めおよびブロンジング製品に含まれるフロクマリンの量は、1 mg/kg (1 ppm) 未満とされています。¹ この 1 ppm の制限を化粧品の最終製品すべてに対して拡大することが議論されています。² そのため、化粧品や化粧品用の精油に含まれるフロクマリンの高速分析は極めて重要です。

Agilent 1290 Infinity LC システムと UV 検出器を組み合わせ、レモン油およびオレンジ油サンプルに含まれる 5-MOP および 8-MOP (図 1) を測定しました。標準的な LC 機器を使用した場合には、これらのサンプルの分析に通常 30 分かかります。³ Agilent 1290 Infinity LC の高圧力性能を活用し、分析速度が向上するかを調査しました。このような分析では、移動相は通常、水とアセトニトリルで構成されます。異なる有機修飾剤 (アセトニトリル、メタノール、およびエタノール) を比較し、移動相の構成要素として生物分解性のエタノールを使用する環境に優しいメソッドを開発しました。

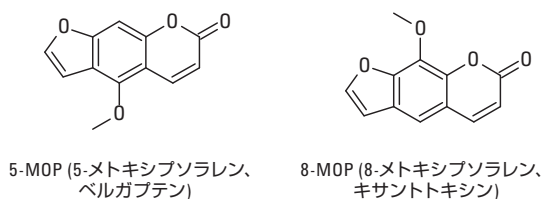


図 1
5-MOP および 8-MOP の構造。

Agilent 1290 Infinity LC を使用したフロクマリンの微量分析におけるダイオードアレイ検出器 (DAD) および質量分析計 (MS) の機能については、あらためて紹介します。⁴

実験

機器およびメソッド

以下の構成で Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

溶液とサンプル

5-MOP および 8-MOP 標準試料をエタノールで希釈して保存液 500 µg/mL を用意しました。注入前に、これらの溶液をさらにエタノールで希釈しました。レモン油およびオレンジ油のサンプルを使用しました。これらのオイルは、各オイル単独および混合した場合について分析しました。また、注入前にエタノールで体積比 1/10 に希釈しました。

部品番号	説明
G4220A	Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (一体型バキュームデガッサ搭載)
G4226A	Agilent 1290 Infinity オートサンプラ
G1316C	Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント
G4212A	Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器

メソッドパラメータ:	
カラム	C18 150 mm L × 2.1 mm (内径)、1.7 µm (粒径) C18 100 mm L × 2.1 mm (内径)、1.7 µm (粒径)
移動相	A = 水 B = アセトニトリル、メタノール、またはエタノール
流量	可変
グラジエント	可変
温度	80 °C
注入	1 µL
検出	DAD、シグナル 315/4 nm、リファレンス 500/60 nm、40 Hz

結果と考察

速度の向上

Agilent 1290 Infinity LC システムの高圧力性能を活用し、分析速度の向上を図りました。水/アセトニトリルグラジエントを使用する RP-LC メソッドから開始し、流量およびグラジエントスロープを同じ割合で増加させました。また、溶出プロフィールを維持するため、分析開始時のアイソクラティックのホールド時間を減らしました。流量を 0.45 から始め、0.6、0.9、および 1.2 mL/min と増加させた結果、長さ 150 mm のカラムで最大 1090 bar の圧力損失が生じました。分析時間は 2.5 倍以上速くなり、分離能も損なわれませんでした。図 2A、B、および C は、オイルの混合サンプルについてのプロフィールの典型例を示しています。このサンプルでは、5-MOP のみが検出されました。ご使用のカラムおよびハードウェアが 1000 bar 以上に対応している場合は、図 2C の分析条件のみを使用してください。

カラム長を 100 mm に短くし、流量を 1.45 mL/min に上昇させると、速度がさらに向上します (図 2D)。圧力 1000 bar の場合、分析時間が約 4 分になるという結果を得ました。高速分析で短いカラムを使用する短所は、分離能が下がる点です。ただし、サンプルに含まれる 5-MOP を検出するには、まだ十分な分離が得られます。

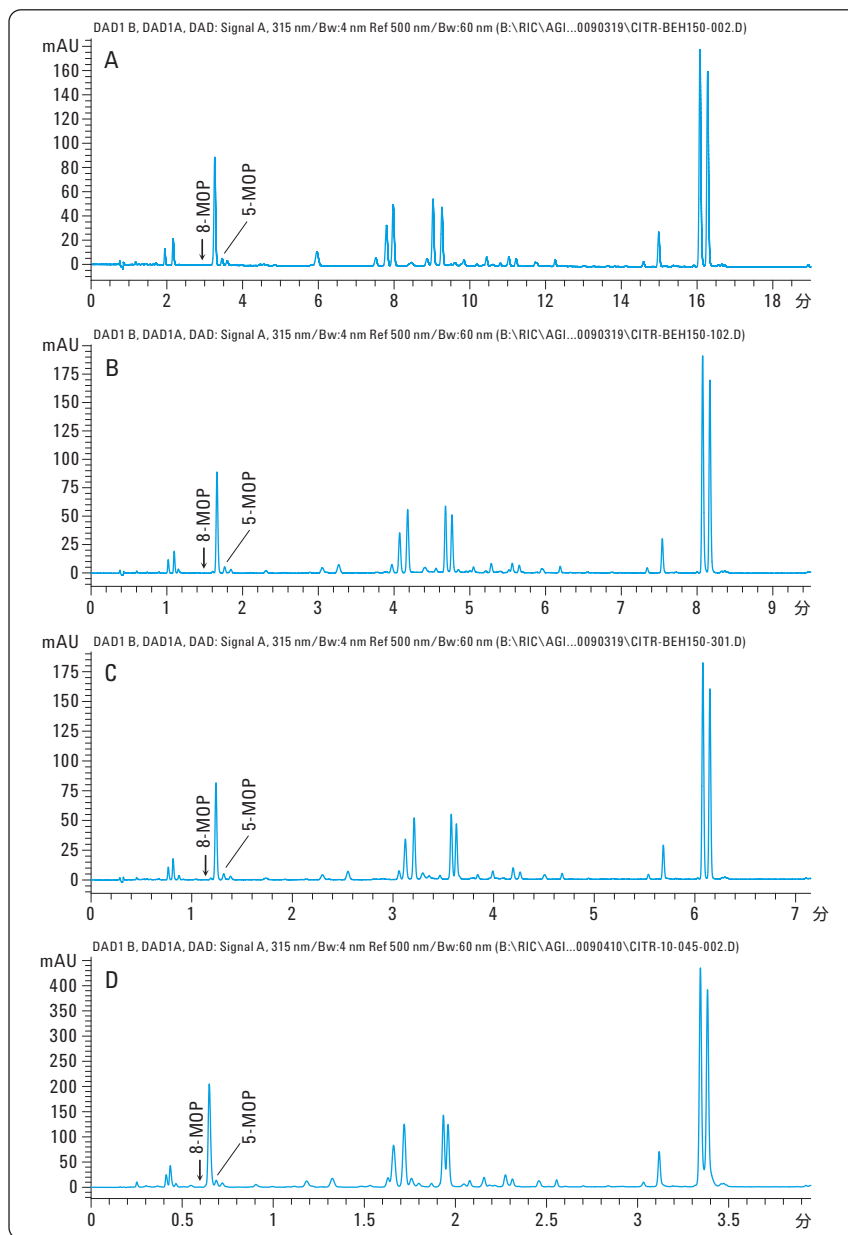


図 2
異なる流量およびカラムを使用して混合オイルサンプルを分析したクロマトグラム。
流量/カラム長: 0.45 mL/min/150 mm (A)、0.9 mL/min/150 mm (B)、1.2 mL/min/150 mm (C)、
および 1.45 mL/min/100 mm (D)。移動相: 水-アセトニトリル。

図 2 の条件	A	B	C	D
カラム長	150 mm	150 mm	150 mm	100 mm
流量	0.45 mL/min	0.9 mL/min	1.2 mL/min	1.45 mL/min
グラジエント	0 ~ 5 分: 30 % B アイソクラティック 5 ~ 25 分: 30 ~ 100 % B	0 ~ 2.5 分: 30 % B アイソクラティック 2.5 ~ 12.5 分: 30 ~ 100 % B	0 ~ 1.9 分: 30 % B アイソクラティック 1.9 ~ 9.4 分: 30 ~ 100 % B	0 ~ 1 分: 30 % B アイソクラティック 1 ~ 5.2 分: 30 ~ 100 % B
最大圧力	440 bar	840 bar	1090 bar	1000 bar

環境に優しい クロマトグラフィ

2 つ目のアプリケーションでは、Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、環境に優しい LC メソッドを開発しました。異なる有機修飾剤を使用して、柑橘油を分析しました。それぞれの組み合わせの溶出ウィンドウが同じになるように、溶媒組成およびグラジエントを調整する必要がありました。結果を図 3 に示します。溶出プロフィールは、セクション 1 で分析したサンプル (混合オイルサンプル) の場合と大きく異なることが分かります。これは、オレンジ油には主にポリメトキシ化フラバノイドが含まれているのに対し、レモン油は大部分がソラレン誘導体で構成されているためです。

移動相として水とエタノールのみを使用してサンプル分析すると、環境に優しいクロマトグラフィが実現します。これは、環境保護の点でも、またアセトニトリルが不足している現状を考慮すると、コストの点でも興味深いアプローチです。水/エタノールの移動相を使用する際の短所は、大きな背圧が生じることです。この特殊な分析では、エタノールを使用する場合の圧力は 770 bar に達しますが、アセトニトリルおよびメタノールを使用する場合は、それぞれ、440 および 590 bar に過ぎませんでした。Agilent 1290 Infinity LC は、1200 bar に対応しているので、このような大きな背圧が生じても問題ありません。

3 つのクロマトグラムで 5-MOP の存在を明確に測定できました。このことから、混合サンプルの場合、5-MOP はオレンジ油サンプルではなくレモン油サンプルに由来していることが分かります。ただし、微量濃度ですべてのプロクマリンを同定および定量するには、マススペクトロメトリーが最適です。⁴

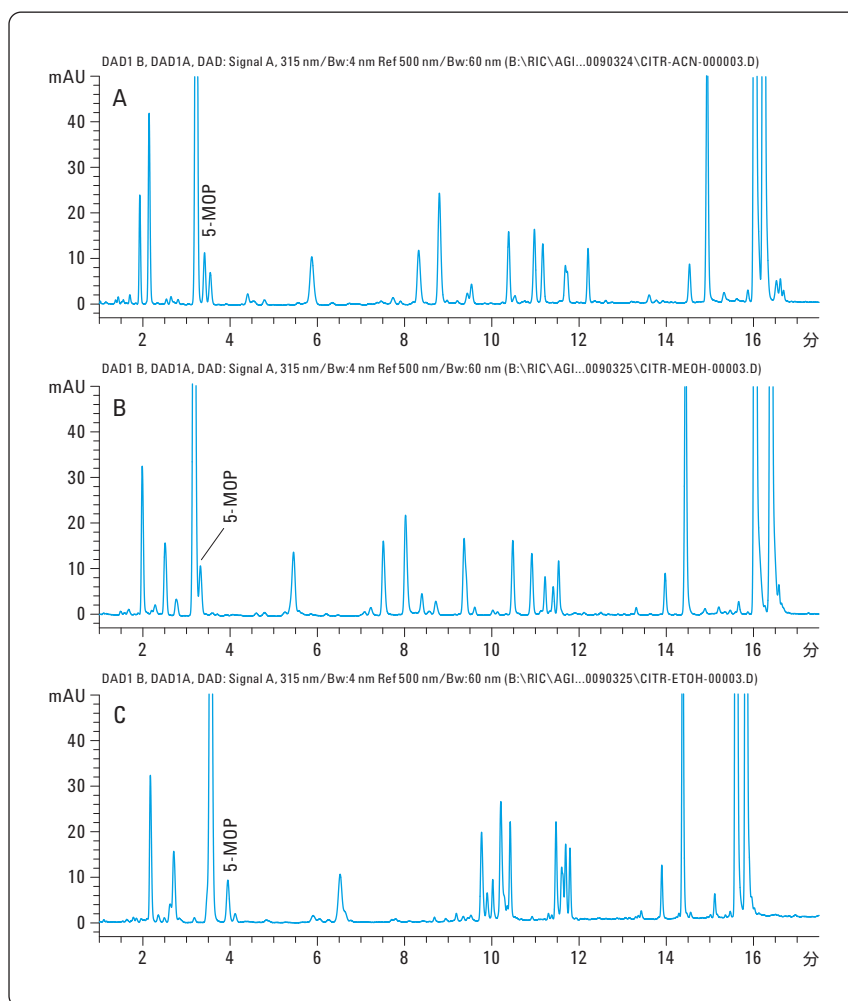


図 3
3 つの異なる修飾剤を使用してレモン油サンプルを分析した際のクロマトグラム。
アセトニトリル (A)、メタノール (B)、およびエタノール (C)。流量: 0.45 mL/min。

図 3 の条件	A	B	C
修飾剤	アセトニトリル	メタノール	エタノール
グラジエント	0 ~ 5 分: 30 % B アイソクラティック 5 ~ 25 分: 30 ~ 100 % B	0 ~ 3.5 分: 40 % B アイソクラティック 3.5 ~ 23.5 分: 40 ~ 100 % B	0 ~ 5 分: 23 % B アイソクラティック 5 ~ 25 分: 23 ~ 100 % B
最大圧力	440 bar	590 bar	770 bar

定量データおよび パフォーマンスデータ

異なるメソッドを適用して、レモン油サンプルに含まれる 5-MOP の定量分析を実行し、パフォーマンスを比較しました (表 1)。0.1、0.5、1、5、および 10 µg/mL の 5-MOP を含む標準溶液のシングル連続注入を行い、検量線を作成しました。表 1 は、そのデータをまとめたものです。

異なるメソッドの分離能を比較するために、それぞれについてピークキャパシティを計算しました。これは、5 µg/mL の 5-MOP 溶液に対して決定したベース (4 σ) での平均ピーク幅でグラジエント時間を割ることにより求めました。予想どおり、150 mm のカラムに比べると、短いカラムでは分離能が落ちます。アセトニトリルおよびエタノールのピークキャパシティは近い値である一方で、水 / アセトニトリルを使用した場合のピークキャパシティは流量が増加しても影響を受けない点は注目に値します。

5-MOP のアッセイは、すべてのメソッドで非常によく似ており、相対標準偏差 (RSD) は 1.98 % でした。サンプル溶液では、平均濃度 5.46 µg/mL が検出されました。これは、もとのレモン油に 51 mg/kg の 5-MOP が含まれることに相当します。

移動相	カラムの長さ (mm)	流量 (mL/min)	最大圧力 (bar)	ピーク キャパシティ	直線性 (R ²)	アッセイ 5-MOP (µg/mL)*
アセトニトリル	150	0.45	440	219	>0.9999	5.39
メタノール	150	0.45	590	192	>0.9999	5.60
エタノール	150	0.45	770	215	>0.9999	5.30
アセトニトリル	150	0.90	850	218	>0.9999	5.53
アセトニトリル	150	1.20	1090	213	>0.9999	5.44
アセトニトリル	100	1.45	1000	152	>0.9999	5.52
平均						5.46
相対標準偏差 (%)						1.98

* サンプル溶液中の濃度。分析の前に、オイルをエタノールで 1/10 v/v に希釈しています。

表 1.
異なるメソッドの比較。アッセイは、レモン油サンプルで実行しました。

結論

Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、柑橘油サンプルに含まれるフロクマリンを分析しました。水/アセトニトリル移動相を使用した元々のメソッドのパフォーマンスを、アセトニトリルをメタノールまたはエタノールで置換した環境に優しいクロマトグラフィメソッドと比較しました。さらに、高速メソッドのパフォーマンスを評価しました。本アプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システムの高圧力性能および検出器の高取込速度が分析速度の向上に極めて有効なツールであることが実証されました。さらに、Agilent 1290 Infinity LC システムは、既存のメソッドに比べて毒性が低く環境負荷の少ないメソッドに応用できることを示しました。

参考文献

1.
Eightieth Commission Directive 95/34/EC of 10 July 1995 adapting to technical progress Annexes II, III, VI and VII to Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (1995)
2.
Sixth plenary of 13 December 2005, Scientific Committee on Consumer Products SCCP/0942/05, Opinion on furocoumarins in cosmetic products (2005)
- 3
Frérot E., Decorzant E., J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 6879-6886.
4.
G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, 準備中。

www.agilent.com/chem/1290:jp

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。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Printed in Japan, May 1, 2009
Publication Number 5990-4033JAJP



Agilent Technologies