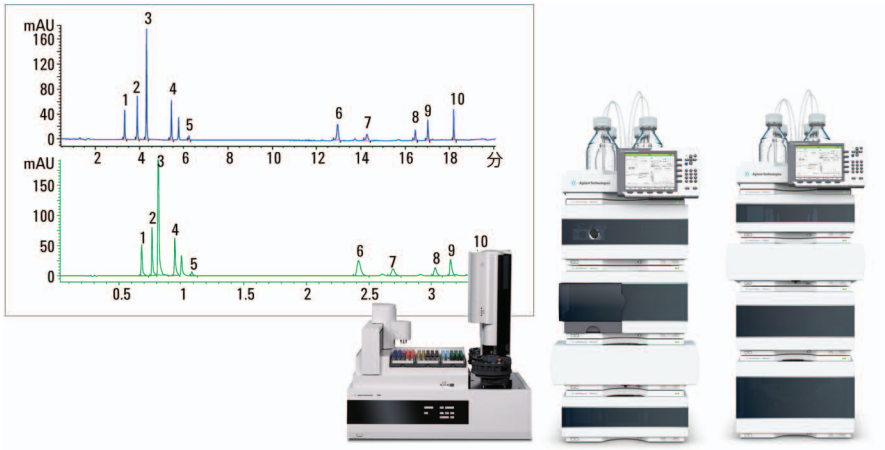
菓子類に含まれる着色料の分析

アプリケーションノート

食品分析



著者

Siji Joseph,
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

概要

合成または人工着色料は、商品の外観を良くする目的で食品や飲料の添加物として使用されています。この実験では、10 種類の合成着色料を同時に測定するための堅牢な逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) メソッドを開発しました。分離と定量は、Agilent Poroshell EC-C18 カラムを使用して Agilent 1260 Infinity LC システムにより行いました。メソッドの堅牢性は部分的バリデーションにより確認しました。菓子類からの着色料の分析結果から、このメソッドが構成成分の多い食品中の合成着色料の定量に適していることがわかります。最後に、この HPLC メソッドを、Agilent 1290 Infinity LC システムを使用した、分析時間の短い超高圧液体クロマトグラフィー (UHPLC) メソッドに効果的に変換し、分離能を低下させずに高速分析を行うことができました。Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (DAD) を使用し、さまざまな波長での測定を行い、異なる着色料をその最大吸光度で定量しました。各着色料の検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、精度、確度、および直線性を両方のメソッドを使用して求めました。LOD、LOQ、および直線性の実験のためのサンプル前処理は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを分析ワークフローに組み込むことによって省力化しました。

Agilent Technologies

はじめに

着色料は、染料、色素、または食品に加えたときに発色する物質として定義されています[1]。主に植物または動物由来の天然および合成着色料があります。ターメリックやサフラン等がこれに当たります。合成色素は、タートラジンやインジゴカルミンなどの化学合成着色料です[2]。食品を着色することは多くの理由があります。例えば、長期間の保存条件で生じる退色の調整、自然に発生する色の変化の補正、無色の食品の着色などがその例です。実際に、市場に出回っているほとんどの包装食品に着色料は使用されています[1]。一日の許容量を超える人工着色料の過剰摂取が、子どもの行動異常を引き起こす可能性があることが指摘されています[3]。米国食品医薬品局 (FDA) は、許可された着色料だけを食品に使用するよう管理する規制を設定しています。この規制では、着色料を同定し、定量するための高精度の分析手法の重要性を強調しています。

このアプリケーションノートでは、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを用いて開発した逆相高圧液体クロマトグラフィーメソッドを紹介します。食品着色料は水溶性であるため、逆相 HPLC はこれらの物質の理想的な分析手法となります。

メソッド

機器およびソフトウェア

次のモジュールで構成される Agilent 1260 Infinity クォータナリ LC システムを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity クォータナリポンプおよびデガッサ (G1311B)
- Agilent 1260 Infinity 高性能オートサンプラ (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212B)、Max-Light フローセル付き (光路長 60 mm) (G4212-60007)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラム、4.6 x 150 mm、2.7 µm (693975-902)

また次のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して UHPLC 分析を開発し、実行しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ、デガッサ (G4220A) および 100 µL Jet Weaver ミキサ付き
- Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)、Max-Light フローセル付き (分散ボリューム 1.0 µL、光路長 10 mm) (G4212-60008)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラム、内径 2.1 mm、長さ 75 mm、2.7 µm 粒子を充填 (697775-902)

いずれのシステムも、Agilent ChemStation バージョン B.04.02 を使用して制御しました。

リニアリティ確認のための液の希釈は、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して前処理しました。

試薬および材料

使用したすべての化学物質と溶媒は HPLC グレードのものであり、超純水は Milli Q 水精製システム (Millipore Elix 10 モデル、米国) から採取したものを使用しました。メタノールはスーパーグラジエントグレードのもので、Lab-Scan (タイ、バンコク) から購入しました。リン酸水素二ナトリウムおよび o-リン酸は Fluka (ドイツ) から購入しました。ジメチルスルホキシド (DMSO) は Qualigens (インド) から購入しました。タートラジン、アマランス、インジゴカルミン、ポンソー 4R、サンセットイエロー FCF、カルモイシン、ファストグリーン FCF、アシッドブルー /エリオグラウシン、ポンソー 3R、およびエリスロシン B の標準は Aldrich (インド) から購入しました。回収率および定量分析のための菓子類は実験室所在地で購入しました。

分析条件

逆相液体クロマトグラフィーと UHPLC に使用する分析条件を表 1 に示します。

着色料標準溶液

タートラジン、アマランス、インジゴカルミン、ポンソー 4R、サンセットイエロー FCF、カルモイシン、ファストグリーン FCF、アシッドブルー /エリオグラウシン、ポンソー 3R、およびエリスロシン B の標準原液は、約 20 mg の標準物を秤量し、10 mL メスフラスコに移すことで個別に調製しました。300 µL 量の DMSO を各フラスコに加え、移動相 A および B を 80:20 の比率で事前に混合した溶液を希釈液として使用しました。必要に応じて超音波処理を利用しました。

標準混合溶液と直線性レベル

約 100 µL の各標準溶液を正確に混合し、各着色料の濃度が 200 ppm になる 2,000 µL の標準混合液を調製しました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、この 200 ppm の標準混合溶液をさらに段階希釈した溶液を調製し、これを用いてリニアリティを確認しました。濃度を変えた標準溶液は 0.01～200 ng/µL の範囲に対応していました (10 個のレベルと 6 回の繰り返し)。

パラメータ	Agilent 1260 Infinity クォータナリ LC システム	Agilent 1290 Infinity LC システム
カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、4.6 x 150 mm、2.7 µm (p/n N693975-902)	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 75 mm、2.7 µm (p/n 697775-902)
カラムオーブン	45 °C	45 °C
注入量	5 µL (フラッシュポートで 5 秒間ニードル洗浄)	1 µL (フラッシュポートで 5 秒間ニードル洗浄)
サンプルトレイ温度	5 °C	5 °C
移動相 A	10 mM Na_2HPO_4、pH 7	10 mM Na_2HPO_4、pH 7
移動相 B	メタノール	メタノール
グラジエント	0 分 : 5 % B	0 分 : 5 % B
	4 分 : 30 % B	0.15 分 : 5 % B
	10 分 : 40 % B	0.5 分 : 30 % B
	14 分 : 40 % B	2.3 分 : 40 % B
	18 分 : 95 % B	2.6 分 : 40 % B
	22 分 : 95 % B	3.25 分 : 95 % B
	22.1 分 : 5 % B	4.00 分 : 95 % B
		4.01 分 : 5 % B
ポストラン時間	5 分間	1 分間
流量	1.2 mL/min	0.7 mL/min
フローセル	60 mm 光路 (p/n G4212-60007)	10 mm 光路 (p/n G4212-60008)
測定波長	288 nm : インジゴカルミン	288 nm : インジゴカルミン
	428 nm : タートラジン	428 nm : タートラジン
	484 nm : サンセットイエロー FCF	484 nm : サンセットイエロー FCF
	511 nm : ポンソー 4R およびポンソー 3R	511 nm : ポンソー 4R およびポンソー 3R
	520 nm : アマランスおよびカルモイシン	520 nm : アマランスおよびカルモイシン
	530 nm : エリスロシン B	530 nm : エリスロシン B
	626 nm : ファストグリーン FCF およびアシッドブルー	626 nm : ファストグリーン FCF およびアシッドブルー
データサンプリングレート	20 Hz、ピーク幅 0.013 分 (0.25 秒の応答時間)	80 Hz、ピーク幅 0.003 分 (0.062 秒の応答時間)

表 1
Agilent 1260 Infinity LC システムと Agilent 1290 Infinity LC システムの設定

着色料の定量および回収率の実験のためのサンプル前処理

さまざまな着色料が含まれる菓子から 5 種類のサンプルを調製し、着色料の定量と回収率算出の実験に使用しました。2 g の菓子に含まれる着色料を 400 µL の DMSO と 20 mL の希釈液を順次に加えるシンプルなプロセスによって抽出しました。超音波処理し、Beckman Coulter Allegra X22R 遠心機システム (C0650 ロータ付き) を使用して 8,300 rcf で 10 分間遠心分離した後、0.25 µm PTFE Agilent Econofilter シリンジフィルタメンブレンで溶液をろ過し、分析に使用しました。スパイクした/スパイクしていない菓子サンプルを使用して回収率の実験を行いました。カラム上で標準物が 25 ng となるよう、混合標準液をスパイクしました。抽出手順はそれまでの手順と同一です。

注意事項

溶液の状態で化合物を長期に安定して保存するために、未使用時には、前処理済みのすべての溶液をアルミホイルで包み、4 °C の冷暗所に保管しました。分析時には、冷却機能付きのオートサンプラで 温度を 5 °C に維持しました。

手順

表 2 に、200 ng/µL の標準混合溶液をさらに希釈することにより作成したキャリブレーションレベルを示します。その後の 2 つのシーケンスで 500 µL シリンジを取り付けた Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用し、直線性レベルを作成しました。最初のシーケンスでは固定量の希釈液を各バイアルに加え、第 2 のシーケンスでは、250 µL の 200 ng/µL 溶液をバイアルに加えて 15 秒間攪拌しました。2 つのシーケンスを実行する代わりに、これらのステップを 1 つのメソッドにプログラミングし、1 つのシーケンスとして実行することもできます。直前のレベルから 250/100 µL を取り出し、これを次のレベルのバイアルに加えることで、段階的に溶液を希釈して行きました。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチの設定で使用したシリンジパラメータを表 3 に示します。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ[4] の設定については、アジレントアプリケーションノート (資料番号 5990-6850JAJP) で詳細に説明しています。

DMSO で希釈した 5 µL の溶液ブランクとし、各キャリブレーションレベルについて 6 回繰り返し注入しました。各レベルの面積およびリテンションタイム (RT) 情報を使用して、標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (RSD) の値を計算しました。検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) は、低い方の直線性レベルの注入から得られました。各リニアリティレベルの着色料のピーク面積の平均値を濃度に対してプロットし、リニアリティカーブを作成しました。

初期濃度 (ppm または ng/µL)	採取した液量 (µL) (第 2 のシーケンス)	希釈液の液量 (µL) (最初のシーケンス)	合計量 (µL)	測定した液の濃度 (ng/µL)	5 µL 注入した時のサンプル量 (ng)	レベル名
200	250	250	500	100	500	10
100	100	400	500	20	100	9
20	250	250	500	10	50	8
10	100	400	500	2	10	7
2	250	250	500	1	5	6
1	100	400	500	0.2	1	5
0.2	250	250	500	0.1	0.5	4
0.1	100	400	500	0.02	0.1	3
0.02	250	250	500	0.01	0.05	2
0.01	100	400	500	0.002	0.01	1

表 2
キャリブレーションレベル作成のための希釈の詳細

パラメータ	溶媒事前予備洗浄 1	分注洗浄	分注ポンプ	分注設定
ポンプ数または洗浄回数	1	1	2	
洗浄ボリューム (µL)	250	250	50	
吸引速度 (µL/min)	500	500	500	500
分注速度 (µL/min)	2500	2500	2500	2500
ニードル深さオフセット (mm)	-1	-1	-1	-1
粘度遅延 (秒)	1	1	1	1
タレット溶媒	A			
エアギャップ (% シリンジ容量)	0			0

表 3
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチのシリンジパラメータ

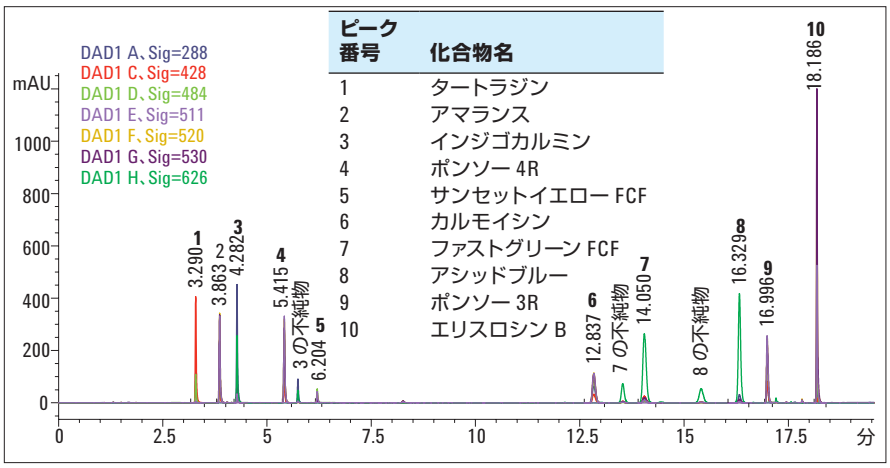
6 つの重要なメソッドパラメータを変更し、メソッドの堅牢性を評価しました。各着色料が約 30 ng (オンカラム) 含まれる標準混合液を 6 回繰り返して注入することで、メソッドの堅牢性を確認しました。2 g の菓子に 25 ng の着色料標準物をスパイクしたサンプルとスパイクしないサンプルを用意し、回収率の実験を行いました。10 種類のすべての着色料標準物の吸収スペクトルを使用して UV スペクトルライブラリを作成しました。リテンションタイムとともにこのライブラリを使用して、菓子に含まれる着色料を同定しました。

このメソッドを変換して、UHPLC 用の効果的なメソッドを作成しました。各着色料の 検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、および直線性を評価し、メソッドの精度を面積とリテンションタイム (RT) の RSD により確認しました。UHPLC メソッドを使用したすべての着色料の線形曲線もプロットしました。UHPLC メソッドを使用すると、分離能を低下させずに非常に高速の分析を行うことができます。

結果と考察

分離および検出

Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mm x 4.6 mm、2.7 µm) カラムを使用することで、10 種類の着色料を 20 分間で良好に分離できました。異なる着色料では極大吸収波長も異なることがわかりました。10 種類の着色料のクロマトグラフィー溶出パターンを図 1 に示し、着色料のリストをそれぞれの極大吸収波長とともに表 4 に示します。ChemStation ソフトウェアのピーク純度機能を使用して各ピークの純度をチェックし、メソッドの特異性を評価しました。精度、直線範囲、確度、特異性、回収率、および堅牢性の実験を行ってメソッドのバリデーションを行いました。



ピーク番号	化合物名
1	タートラジン
2	アマランス
3	インジゴカルミン
4	ポンソー 4R
5	サンセットイエロー FCF
6	カルモイシン
7	ファストグリーン FCF
8	アシッドブルー
9	ポンソー 3R
10	エリスロシン B

図 1
15 cm の Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを使用した 10 種類の着色料の分離。7 つの異なる波長のトレースを重ね書きしました。

サンプル番号	化合物名	分子式	分子量	リテンションタイム	極大吸収波長
1	タートラジン	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	534.36	3.29	428
2	アマランス	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604.47	3.86	522
3	インジゴカルミン (インジゴチン)	$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$	466.35	4.28 (不純物 5.74)	288 および 612
4	ポンソー 4R (ポンソー SX)	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604.47	5.41	510
5	サンセット イエロー FCF	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	452.37	6.20	482
6	カルモイシン	$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	502.43	12.83	518
7	ファスト グリーン FCF	$C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$	808.85	14.04 (不純物 13.52)	622
8	アシッドブルー / エリオグラウシン	$C_{37}H_{34}Na_2N_2O_9S_3$	792.85	16.32 (不純物 15.40)	628
9	ポンソー 3R	$C_{19}H_{16}N_2Na_2O_7S$	494.45	16.99	512
10	エリスロシン B	$C_{20}H_8I_4O_5$	835.89	18.18	530

表 4
着色料と、各着色料について観察された極大吸収のリスト

検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ)

S/N 比が 3 となる対象化合物濃度を LOD、S/N 比が 10 となる対象化合物濃度を LOQ と見なしました。各着色料について観察された LOD および LOQ の値を表 5 に示します。例として、ポンソー 4R (0.1 ng オンカラム) の LOD のクロマトグラムをブランクと重ね書きして図 2 に示します。

直線性

前処理済みのすべての濃度について注入を 6 回繰り返して、LOQ レベルから最大濃度レベルまでの各着色料について、面積応答と濃度値の関係を求めました。すべての着色料について得られた回帰係数を表 5 に示します。

ピーク番号	化合物名	LOD (ng)	LOQ (ng)	トータルレベル (n=6)	オンカラムの直線範囲 (ng)	線型方程式	R^2 値
1	タートラジン	0.05	0.1	8	0.1〜100	y = 15.477x - 5.7137	0.9993
2	アマランス	0.1	0.25	7	0.25〜100	y = 12.686x - 5.8682	0.9993
3	インジゴカルミン	0.05	0.1	8	0.1〜100	y = 16.723x - 5.9163	0.9993
4	ポンソー 4R	0.05	0.1	8	0.1〜100	y = 13.168x - 5.0258	0.9993
5	サンセットイエロー FCF	0.25	0.5	8	0.5〜1000	y = 1.8621x + 7.2227	0.9992
6	カルモイシン	0.25	0.5	8	0.5〜1000	y = 10.018x + 41.05	0.9993
7	ファストグリーン FCF	0.1	0.25	7	0.25〜100	y = 31.981x - 14.22	0.9993
8	アシッドブルー	0.05	0.1	8	0.1〜100	y = 36.351x - 12.193	0.9994
9	ポンソー 3R	0.1	0.25	9	0.25〜1000	y = 11.324x + 39.972	0.9992
10	エリスロシン B	0.05	0.1	8	0.1〜100	y = 40.628x - 10.168	0.9997

表 5
10 種類のすべての着色料の LOD、LOQ、および直線性の結果。0.1 ng/µL の標準溶液を 2.5 µL 注入することにより 0.25 ng のオンカラム濃度が得られました。

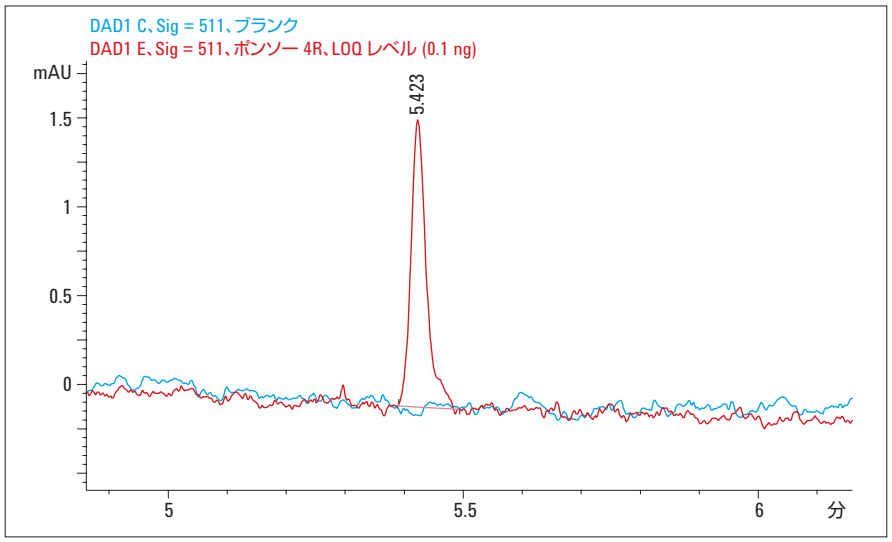


図 2
ポンソー 4R の LOQ (0.1 ng) のクロマトグラムとブランクとの重ね書き表示

リテンションタイムと面積の精度

メソッドの精度を確認するために、1、10、および 100 ng の (オンカラム) 濃度で 10 種類のすべての着色料のリテンションタイム (RT) と面積の相対標準偏差 (RSD) の値を計算しました。観察された面積の最大 RSD 値は 1.19 % (1 ng のカルモイシン)、RT の最大 RSD 値は 0.09 % (10 ng のタートラジン) でした。10 種類の着色料から得られた面積の RSD 値のグラフを図 3 に、RT の RSD 値を図 4 に示します。

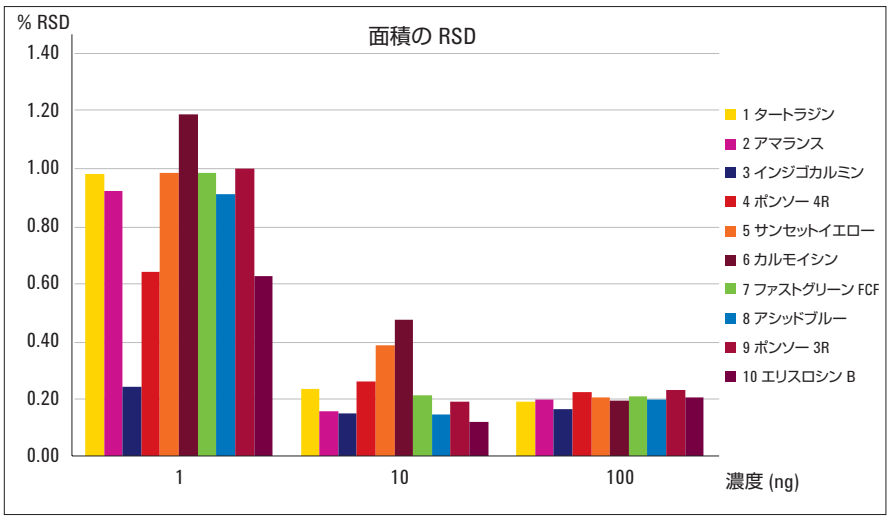


図 3
1 ng、10 ng、および 100 ng の (オンカラム) 濃度ですべての着色料について得られたピーク面積の再現性

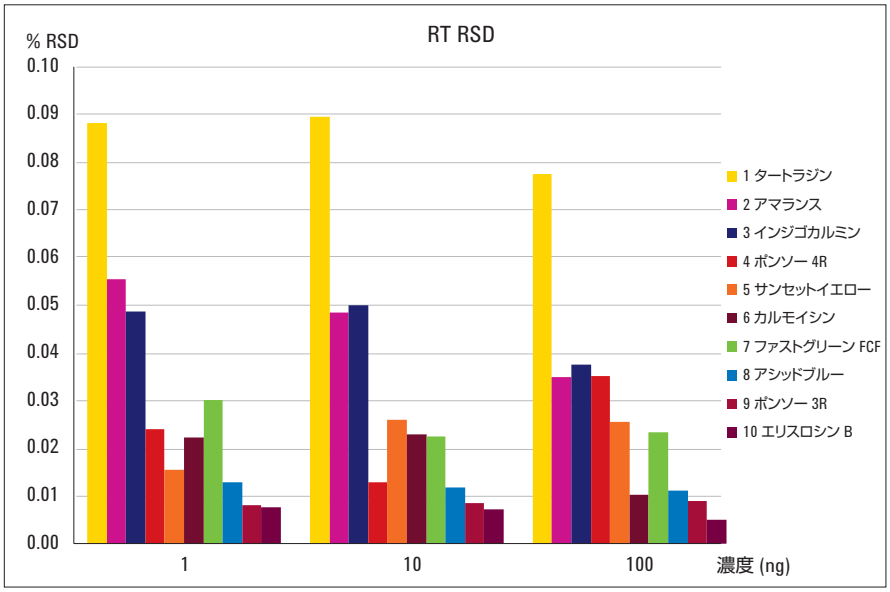


図 4
1 ng、10 ng、および 100 ng の (オンカラム) 濃度ですべての着色料について得られたリテンションタイムの再現性

堅牢性

6 つの重要なメソッドパラメータを意図的に変化させることで、メソッドの堅牢性を評価しました。面積とリテンションタイムで得られたデータのばらつきを計算し、元のメソッドと比較しました。標準物をスパイクした着色料の混合溶液を 6 回繰り返して注入しました。リテンションタイムと面積の許容偏差をそれぞれ ± 3 % と ± 5 % に設定しました。この実験で使用した堅牢性テストの条件を表 6 に、堅牢性の実験の結果を図 5 および図 6 にまとめます。

サンプル番号	パラメータ (実際の値)	変更の幅	変更後の値
1	流量 (1.2)	2 %	1.224 mL/min 1.176 mL/min
2	注入量 (5 µL)	2 %	5.1 µL 4.9 µL
3	波長 (288、428、484、511、520、530、626 nm)	(±) 3 nm	波長 (291、431、487、514、523、533、629 nm) 波長 (285、425、481、508、517、527、623 nm)
4	pH (7.0)	(±) 0.15	10 mm 緩衝液 pH 7.15 10 mm 緩衝液 pH 6.85
5	カラム温度 (45 °C)	(±) 2 °C	47 °C 43 °C
6	グラジエントの勾配 (6.25、4 分間で 5～30、13.75、4 分間で 40～95)	～10 %	6.75、4 分間で 5～32、14.25、4 分間で 38～95 5.75、4 分間で 5～28、13.25、4 分間で 42～95

表 6
この実験で使用した堅牢性テストの条件

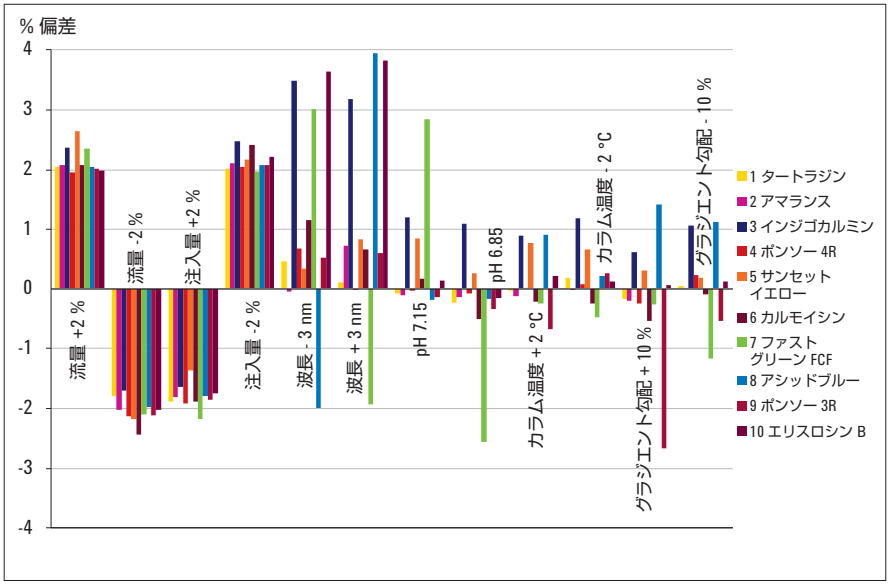


図 5
堅牢性テストの結果のまとめ (面積)

10 種類の全着色料の面積のばらつきが、変化させたすべてのパラメータの許容限界内であることがわかりました。また、移動相の流量、注入量、および pH に対するリテンションタイムのばらつきも、この堅牢性の実験の許容限界値内であることがわかりました。ただし、カラム温度の上昇がリテンションタイムのばらつきに与える影響は、2 つの化合物で許容限界値を超えました。カラム温度を下げると、3 つの化合物で リテンションタイムのばらつきが許容限界値を超えました。リテンションタイムに大きな影響を与える重要なパラメータの 1 つがグラジエントの勾配であることがわかりました。グラジエントの勾配を ± 10 % 変化させると、6 つ以上の化合物が許容限界値を超えるリテンションタイムのばらつきになることがわかりました。堅牢性の検証結果は、このメソッドが通常の使用では高い信頼性を提供し、パラメータを意図的に変更しても、かなりのレベルまで性能が影響を受けないことを示しています。

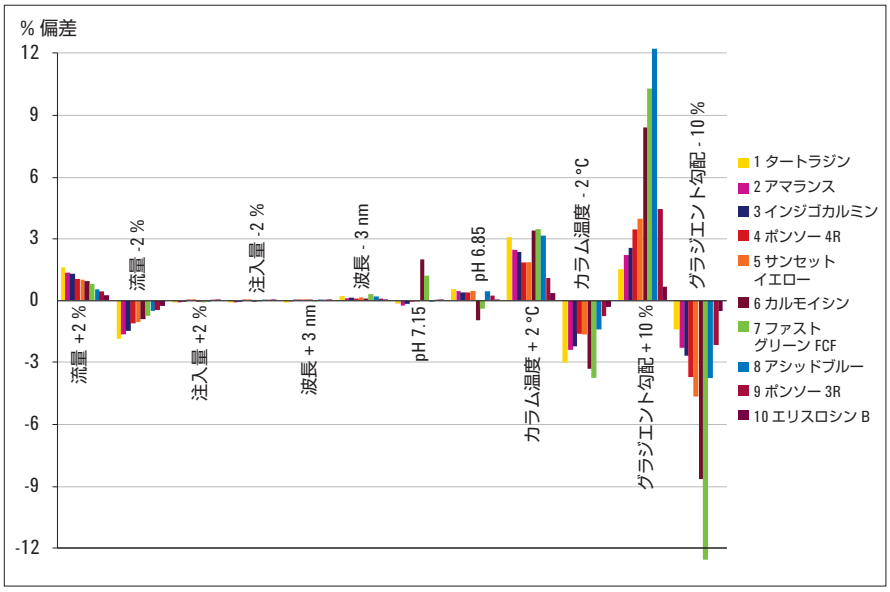


図 6
堅牢性テストの結果のまとめ (リテンションタイム)

菓子類に含まれる着色料の回収率

5 種類の異なる色のついた菓子に含まれるさまざまな着色料の回収率測定を標準添加法により行いました[5]。この分析では、10 種類の全着色料の標準混合溶液を 25 ng (オンカラム) 使用しました。標準物をスパイクしたサンプル、スパイクしていないサンプル、および標準クロマトグラムの各着色料のピーク面積を個別に測定しました。標準物をスパイクしたサンプルとスパイクしていないサンプルの検出器応答の違いを、標準クロマトグラムで測定された応答と比較し、回収率の百分率として表しました。菓子に含まれるすべての着色料の回収率は 98 % を超えました。標準物をスパイクした、またはスパイクしていない赤い菓子の抽出サンプルと標準混合溶液で観察されたクロマトグラムを図 7 に示します。

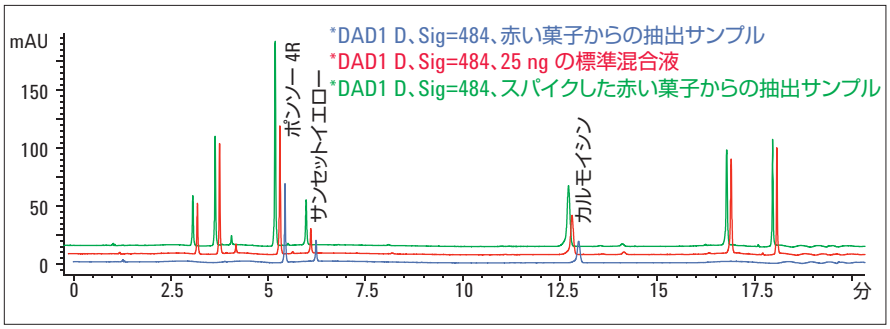


図 7
スパイクした/スパイクしていない赤い菓子の抽出サンプルと標準混合液の重ね書き

菓子類に含まれる着色料の定量

面積応答を使用して、さまざまな色のついた菓子に含まれる着色料を測定しました。線形曲線から得られた線形方程式を計算に使用しました。さらに、社内で作成した UV スペクトルライブラリを利用し、スペクトルのマッチ度を使用して化合物を同定しました。5 種類の異なる菓子 1 g に含まれる着色料の量の計算値を表 7 に示します。赤い菓子に含まれるポンソー 4R のピークとライブラリスペクトルとの間で確認されたスペクトルの重ね書きを図 8 に示します。

項目番号	菓子の色	成分	存在量 (µg/g)
Sweet_1	青	アシッドブルー	44.7
Sweet_2	黄	タートラジン	61.7
Sweet_3	緑	タートラジン	52.5
		アシッドブルー	10.9
Sweet_4	オレンジ	タートラジン	24.8
		ポンソー 4R	26.9
		サンセットイエロー FCF	43.3
Sweet_5	赤	ポンソー 4R	27.5
		サンセットイエロー FCF	38.3
		カルモイシン	20.6

表 7
1 g の菓子に含まれる着色料の量の計算値

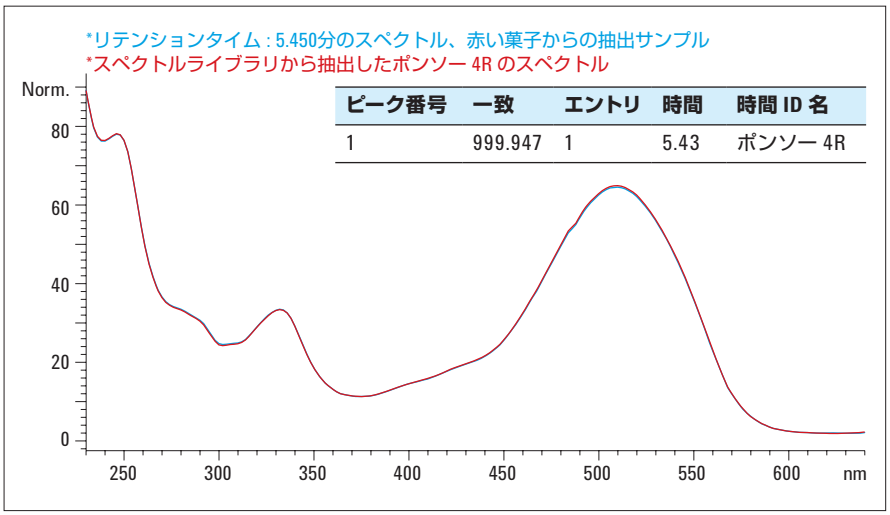


図 8
赤い菓子のポンソー 4R のピークとライブラリスペクトルとのスペクトルの重ね書き

UHPLC メソッド

ダイオードアレイ検出器つきの UHPLC を用いた 10 種類の着色料の分離 メソッドを開発しました。この UHPLC メソッドは優れた分離能を示し、所要時間 21 分間の HPLC グラジエントと比較して約 81 % の分析時間の短縮と 89 % の溶媒消費量の削減を達成しました (図 9)。ファストグリーン FCF のピークとその不純物 (図 1 で 13.526 分に溶出するピーク) との分離度が、この HPLC メソッドのすべてのピークの中で最も低いことがわかったため、UHPLCで分析時間を短縮して行く場合には、この部分の分離をモニターすることで、全体的なピークの分離能を評価しました。HPLC メソッドではこの分離度は 3.71 でしたが、分析時間の短い UHPLC メソッドでは、この値は 1.8 を下回りました。UHPLC メソッドで観察された LOD (検出下限)、LOQ (定量下限)、および直線性の結果を表 8 に示します。メソッドの精度を評価するために、リテンションタイム の RSD 値 (相対標準偏差) と 10 ng のオンカラム濃度の面積を計算しました。サンセットイエローが最もピーク面積の RSD 値、リテンションタイムの RSD 値ともに最も大きく、それぞれ 0.84 % と 0.04 % でした。この結果を図 10 に示します。面積と リテンションタイムの RSD 値が小さいほど、そのメソッドが高精度であることを示しています。これらの結果は、開発した UHPLC メソッドの信頼性を証明するものです。この方法を使用すると、菓子サンプルに含まれる着色料の迅速定量が可能になります。

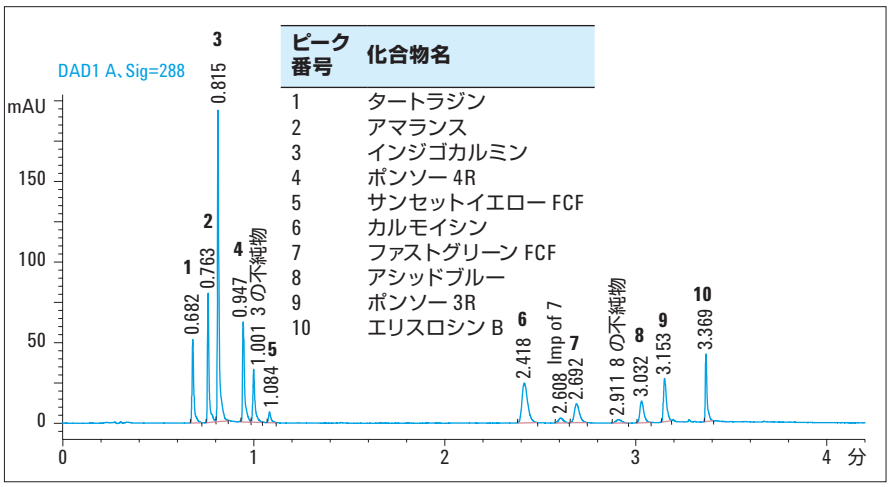


図 9
Agilent 1290 Infinity LC システムで UHPLC メソッドを使用した 10 種類の着色料の分離

ピーク番号	化合物名	LOD (ng)	LOQ (ng)	総合的なレベル (n=6)	オンカラムの直線範囲 (ng)	線型方程式	R^2 値
1	タートラジン	0.05	0.1	9	0.1〜200	y = 4.6746x + 2.5573	0.9998
2	アマランス	0.1	0.25	8	0.25〜200	y = 3.7682x + 0.585	0.9996
3	インジゴカルミン	0.05	0.1	9	0.1〜200	y = 4.3278x + 3.0266	0.9998
4	ポンソー 4R	0.1	0.25	8	0.25〜200	y = 3.9616x + 1.4427	0.9997
5	サンセットイエロー FCF	0.5	1	6	1〜200	y = 0.6479x + 0.8958	0.9993
6	カルモイシン	0.25	1	6	1〜200	y = 3.8231x + 0.5447	0.9996
7	ファストグリーン FCF	0.1	0.25	8	0.25〜100	y = 9.008x + 3.0979	0.9998
8	アシッドブルー	0.1	0.25	8	0.25〜100	y = 10.083x + 14.681	0.9991
9	ポンソー 3R	0.1	0.25	8	0.25〜200	y = 4.1461x + 0.4156	0.9995
10	エリスロシン B	0.05	0.1	9	0.1〜100	y = 11.354x + 11.912	0.9996

表 8
Agilent 1290 Infinity LC システムを用いた UHPLC メソッドでの LOD (検出下限) および LOQ (定量下限) の値

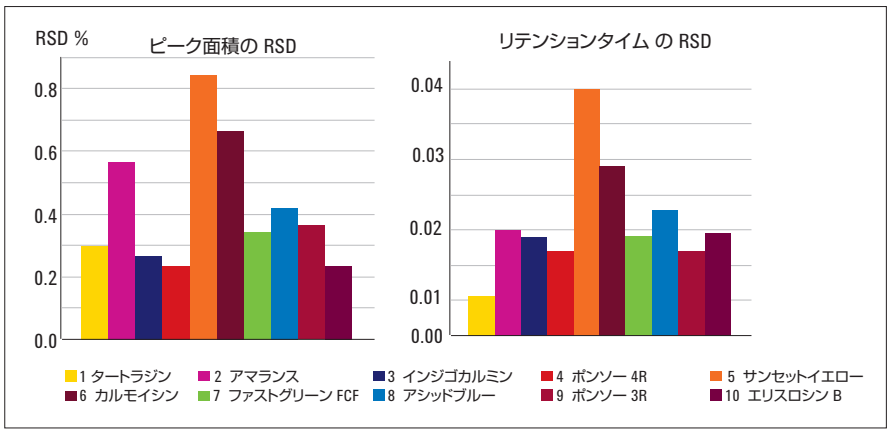


図 10
10 ng レベルのオンカラム濃度で 10 種類の全着色料について UHPLC の結果から得られたピーク面積とリテンションタイムの RSD (相対標準偏差) 値。注入量は 1 µL (6 回の繰り返し注入)

結論

Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを用いて 10 種類の着色料を分離し、定量しました。Agilent 1260 Infinity LC システムで、所要時間 20 分間の堅牢な HPLC グラジエントメソッドを開発しました。このメソッドについては、部分バリデーションを実施し、タートラジン、アマランス、インジゴカルミン、ポンソー 4R、サンセットイエロー FCF、カルモイシン、ファストグリーン FCF、アシッドブルー / エリオグラウシン、ポンソー 3R、エリスロシン B などの着色料の定量に有効であることを証明しました。このメソッドはシンプルで、高い特異性、感度、迅速性を備えており、優れた精度、直線性、および回収率値も提供します。5 種類の異なる色のついた菓子中の着色料を定量することで、このメソッドが効率的に使用出来ることが確認されました。その後、Agilent 1290 Infinity LC システムを使用した所要時間 4 分間の UHPLC メソッドに応用し、約 81 % の分析時間の短縮と 89 % の溶媒使用量の削減を達成しました。Agilent 1260 および 1290 Infinity LC システムを使用したこれらのメソッドは、着色料の正確なルーチン分析に使用することができます。Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによって、直線性を確認する実験のためのサンプル前処理を迅速化しました。優れた直線性の結果から、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによって得られた結果により、この手法が非常に高精度であり、分析者の操作の違いに由来する誤差を軽減することが確認されました。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration. Food Ingredients and Colors, International Food Information Council (IFIC). November 2004; revised April **2010**.

2. The role of natural color additives in food allergy. Christine d. Lucas, john b. Hallagan, International Association of Color Manufacturers, 1620 I Street, NW, Suite 925, Washington DC, USA, **2006**.

3. Smart GuideTo Food Dyes: Buying foods that can help learning. David Wallinga, M.D., Director of the Institute for Agriculture and Trade Policy’s Food and Health Program, with the assistance of Robin Schow, **2009**.

4. W.D. Snyder、「Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによる連続希釈の前処理自動化：水素炎イオン化検出器の性能評価に使用するサンプルセットの作成」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-6850JAJP、**2010**.

5. Duncan Thorburn Burns, Klaus Danzer, and Alan Townshend, Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 11, pp. 2201–2205, **2002**.

www.agilent.com/chem/jp

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., 2012

Published in Japan, January 1, 2012
5990-9525JAJP

Agilent Technologies