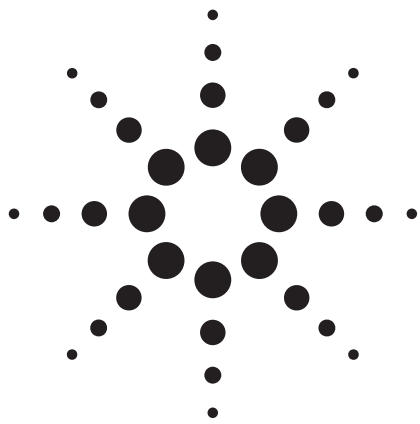




Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、Eclipse XDB-Phenyl、StableBond SB-Phenyl カラムを使用した非栄養食品添加物の選択的分析

アプリケーション

食品

著者

Anne E. Brooks、William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

3.5 ミクロン ZORBAX Eclipse Plus C18、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、Eclipse XDB-Phenyl、および StableBond SB-Phenyl Rapid Resolution カラムをアイソクラティック溶媒システムとともに使用して、9 種類の一般的な食品添加物を分析しました。pH 2.5 の 20 mM リン酸緩衝液または 0.2 パーセントのギ酸とともにメタノールまたはアセトニトリルが含まれている移動相を使用しました。用いたすべてのカラムで優れたピーク形状が得られましたが、C18 と各種フェニルカラム (特に Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムと StableBond SB-Phenyl カラム) を比べた場合に、選択性と分離能に差が見られました。また、選択性の違いとピーク形状は、ギ酸移動相修飾剤を使用した場合も保持されました。ギ酸を使用すると、マスマススペクトロメトリーを使用して未知の物質を検査できます。



Agilent Technologies

はじめに

非栄養食品添加物は食品および非食品消費者製品によく添加される物質です。これらの添加物は、鮮度を維持し、風味を高める役割を果たします。これらの化合物の一部には、抗菌性のあるパラベンや安息香酸などの保存料と、犠牲酸化剤として機能するアスコルビン酸やソルビン酸などの酸が含まれています。アスパルテームやサッカリンなどの非栄養甘味料は、ダイエット飲料や歯科用製品など天然甘味料を使用しない製品で一般に使用されています。カフェインなどの物質は、飲料、ガム、およびキャンディに弱刺激剤としてしばしば添加されています。適切な量であれば、これらの各添加剤に毒性はなく、重要な機能を果たしますが、より高いレベルでは、アレルギー反応を引き起こしたり、長期の摂取後に人によっては感作を引き起こしたりすることがあります。このような副作用を防ぐために、添加物のレベルを規制および監視することが重要です。これらの添加成分に見られる一般的な構造の 1 つは共役結合です。これは、フェニル固定相と相互作用して、アルキルやその他のフェニル相に比べて多様な選択性をもたらすことがあります。

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 などのアルキルカラムは、多様な分析に十分に使用できるため、一般に万能カラムと呼ばれます。多くのクロマトグラファは C18 カラムを中心に HPLC メソッド開発を行っていますが、他のカラムも選択性の利点を提供できます。C18 の分離は主に疎水的相互作用に基づいていますが、フェニルカラムなどの他のカラムは、 π - π 相互作用を使用した芳香族選択性の程度に基づく分離も行うことができます。 π - π 相互作用の程度は、フェニル相のタイプやシリカのタイプなど、多くのファクタに基づきます。これは、参考文献 1~3 に示されています。フェニルカラムに適用されるその他の選択性の例は、[4-8] で見るすることができます。これらは 1.8、3.5、および 5.0 μ m 粒子で示されています。アジレントでは、3.5 ミクロンのサイズの 3 つのフェニル相を提供しています。これには、新しい Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、Eclipse XDB-Phenyl (エチルフェニル相)、および StableBond SB-Phenyl (エンドキャップ処理されていないタイプ B シリカに結合したフェネチル相) が含まれます。3.5 ミクロン粒子は、以前は 5 ミクロンの物質よりも効率を高めるために示されていました。これらは、15-cm のカラム長さで 25-cm 5 ミクロンのカラムの効率を提供します。多くの分析ラボでは、これらの実証されたカラムに変更すると、時間と溶媒を 40 パーセント節約できます。これらのカラムは、効率と堅牢性 (ロバストネス) に優れているため、食品ラボでの使用に理想的です。

今回の作業では、共役結合を持つサンプルによる HPLC メソッド開発でフェニルカラムを使用する際、一連の非栄養食品添加物が用いられます。製品サンプルの分析を通じ、サンプルの複雑さのレベルが、分析の分離能と速度の点でカラムの選択にどのように影響を与えるかも示します。

実験手法

今回の分析では、Agilent 1200 Rapid Resolution LC (RRLC) システムを使用しました。

- 移動相での G1312B バイナリポンプ SL A: 水中の 20 mM リン酸二水素カリウム、pH 2.5 または 0.2% 酢酸。B: メタノールまたはアセトニトリル。流量は 1.5 mL/min でした。メタノール移動相では、分析は A/B (70:30) のアイソクラティックでした。同等の溶媒強度のアセトニトリルをメタノールで置換した場合、分析は A/B (79:21) のアイソクラティックでした。
- G1376C オートサンブラ (ALS) SL。注入量は 2.0 μ L でした。
- G1316B カラムコンパートメント (TCC) SL。温度は 25°C でした。
- G1315C ダイオードアレイ検出器 (DAD) SL。波長は 220、16 nm Ref = 420、20 nm、G1314-60083 セミマイクロフローセル (6-mm パス、5 μ L の量) でした。
- ChemStation バージョン B.02.01 を使用して、HPLC をコントロールし、データを処理しました。

今回の作業では 4 種類の Agilent ZORBAX カラムを使用しました。

- ZORBAX Rapid Resolution Eclipse Plus C18、4.6 mm $\times$ 150 mm、3.5 μ m、Agilent P/N 959963-902
- ZORBAX Rapid Resolution Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、4.6 mm $\times$ 150 mm、3.5 μ m、Agilent P/N 959963-912
- ZORBAX Rapid Resolution Eclipse XDB-Phenyl、4.6 mm $\times$ 150 mm、3.5 μ m、Agilent P/N 963967-912
- ZORBAX Rapid Resolution StableBond SB-Phenyl、4.6 mm $\times$ 150 mm、3.5 μ m、Agilent P/N 863953-912

図 1 に、今回の作業で調べた化合物を、それぞれの構造、pKa 値、および添加機能とともに示します。すべての化合物は約 2 mg/mL の濃度まで水で溶解しました。複合型サンプルは、各溶液の等しいアリコートを組み合わせて生成しました。

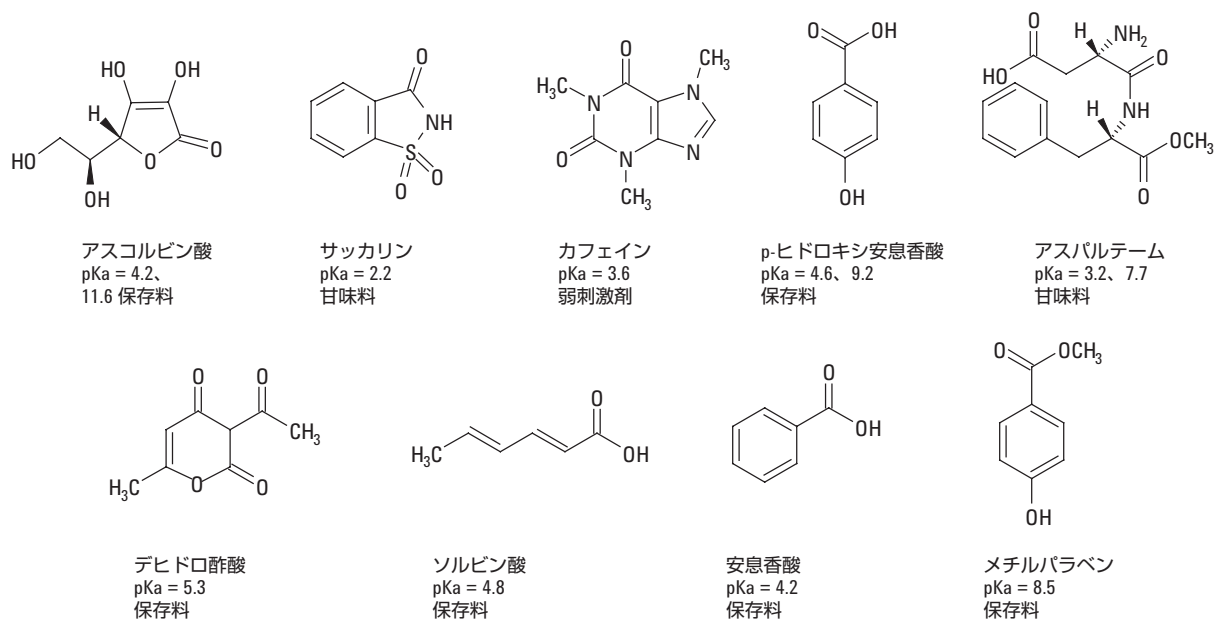


図 1. 対象成分 (非栄養添加物)。

化合物は Sigma Aldrich (ペンシルバニア州ベルフォント) から購入しました。また、ギ酸、リン酸、およびリン酸二水素カリウムも Sigma Aldrich から購入しました。メタノールは、Honeywell Burdick and Jackson (ミシガン州マスキーゴン) から購入しました。水は、18 M- Ω Milli-Q 水 (マサチューセッツ州ベッドフォード) で精製したものを用了。

結果と考察

図 1 に示した化合物は、多くの食品および非食品消費者製品の成分として見られます。これらの製品として、飲料やデンタルケア製品などがありますが、これらに限定されません。

今回の分析では、ZORBAX Eclipse Plus C18、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl、Eclipse XDB-Phenyl、および StableBond SB-Phenyl 間の選択性を調査しました。図 2 に示すクロマトグラムでは、Rapid Resolution 4.6 mm $\times$ 150 mm、3.5 ミクロンのカラムを使用したこれらの化合物の分離を比較しています。

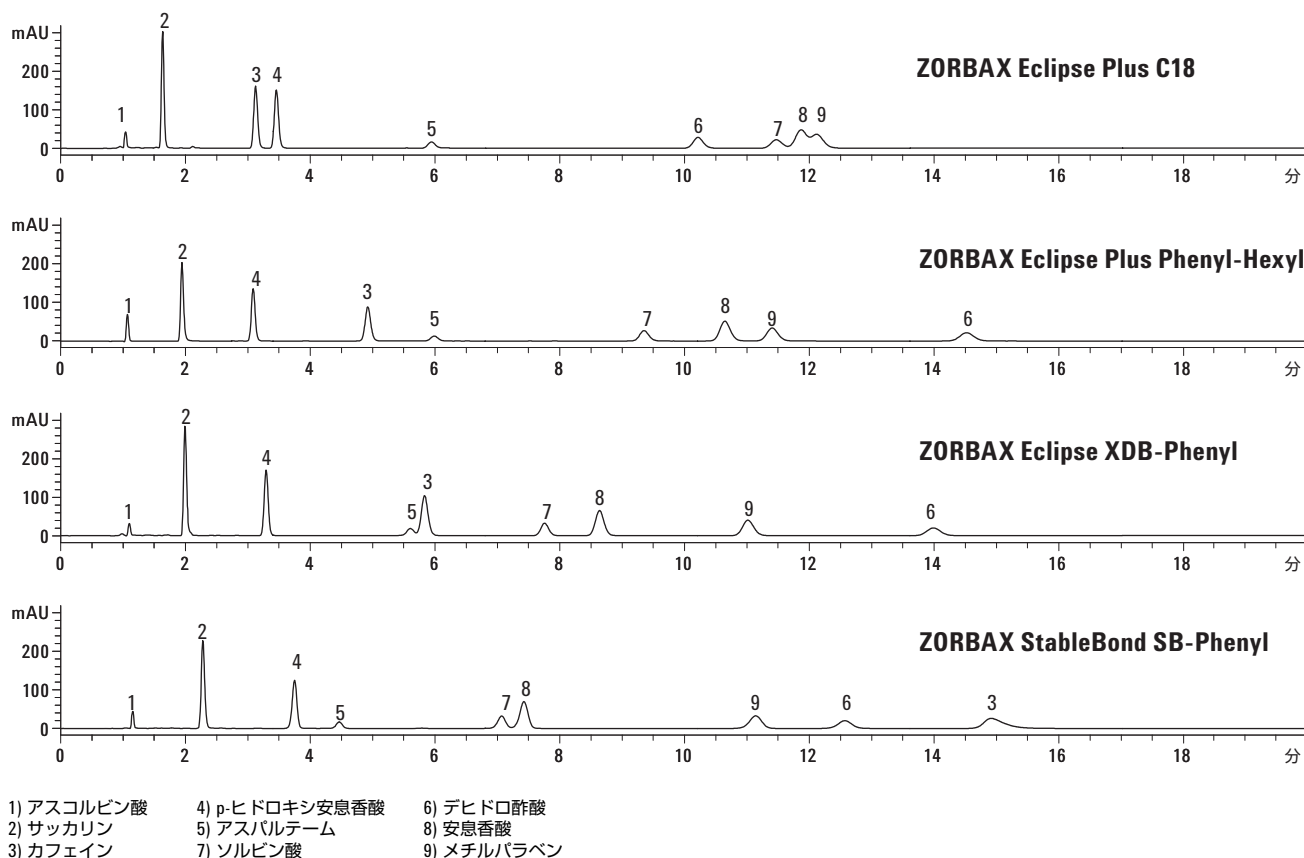


図 2. 30% メタノールと 70% 20 mM リン酸緩衝液、pH 2.5 を使用した C18 および各種フェニルカラムでの添加物の選択性。流量は 1.5 mL/min でした。

最大の選択性差異は、カフェイン (3)、デヒドロ酢酸 (6)、ソルビン酸 (7)、および安息香酸 (8) に見られます。すべてのカラムについて、アスコルビン酸 (1)、サッカリン (2)、p-ヒドロキシ安息香酸 (4)、アスパルテーム (5)、およびメチルパラベン (9) の溶出には大きな差はありませんでした。Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムは、 $R = 2.32$ の最小分離能の特定条件下で、このアプリケーションに対して最適な分離を提供します。Eclipse Plus C18 カラムも、最初の 6 つの化合物に対しては優れた分離を提供しますが、ソルビン酸 (7)、安息香酸 (8)、およびメチルパラベン (9) の分離は、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムで示されたほど良好ではありません。また、カフェイン (3) と p-ヒドロキシ安息香酸 (4) のピークは、C18 カラムと比べた場合に、Phenyl-Hexyl カラムでは逆の順序でした。StableBond SBPhenyl

カラムは、2 番目に優れた分離 (最小分離能、 $R = 1.51$) を提供し、選択性は大幅に異なります。最も顕著なのは、カフェインのクロマトグラム終端への移動であり、C18 カラムでは 6 番目の位置で溶出するデヒドロ酢酸がこれに先行します。図 3 に、図 2 で示したメタノール分離と比較した場合の、同等の強度のアセトニトリル移動相を用いた同様の分離を示します。アセトニトリルで最も注目すべきは、メタノール分離と比較した場合の C18 とフェニルカラムでのフェニルクロマトグラムの顕著な圧縮、および選択性の差異が見られるということです。アセトニトリルの場合、分析対象物と結合相の間の π - π 相互作用よりも π 結合のほうが支配的になることが理論化されています [9]。この場合、メタノール分離がアセトニトリル分離よりも優れていることは明らかです。

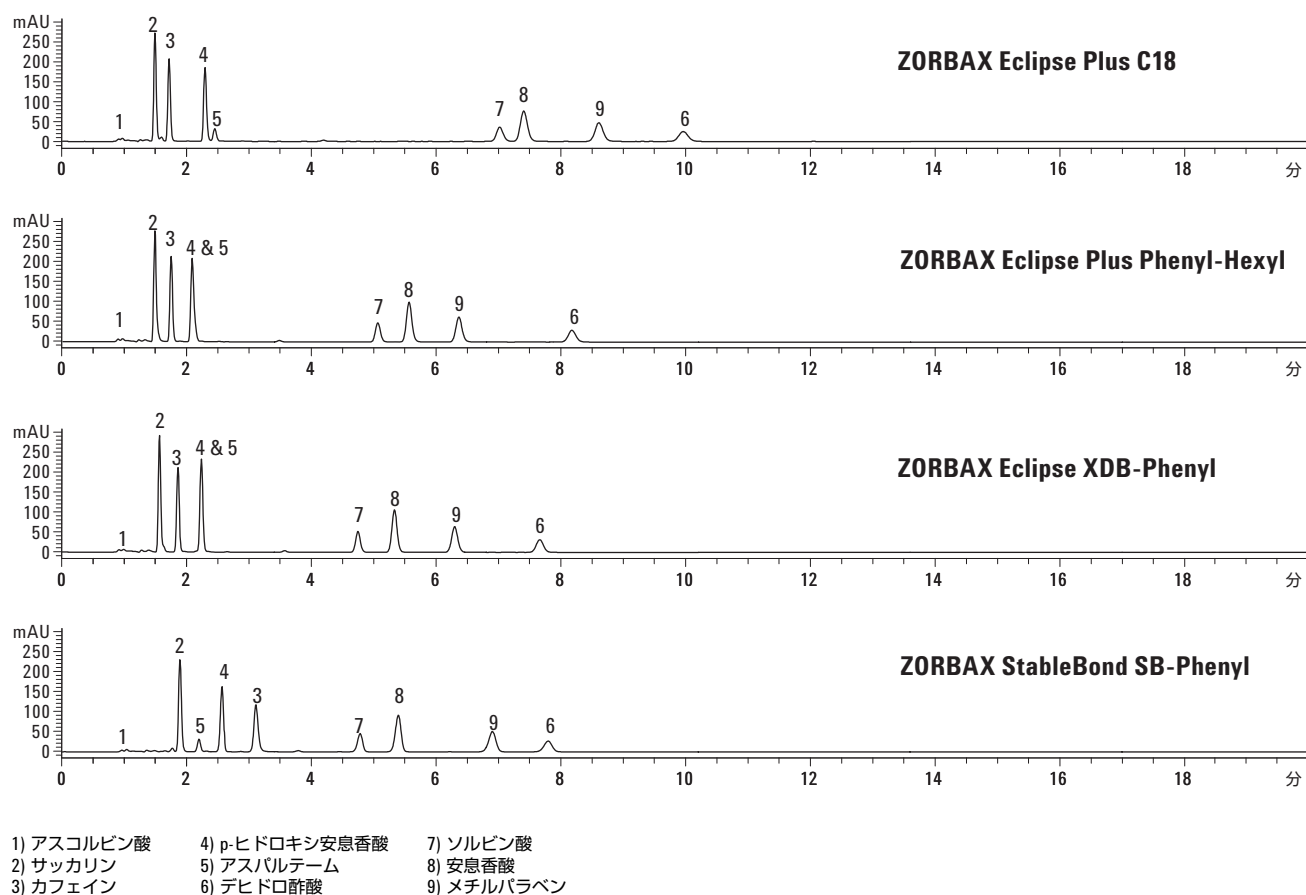


図 3. 21% アセトニトリルと 79% 20 mM リン酸緩衝液、pH 2.5 を使用した C18 および各種フェニルカラムでの添加物の選択性。流量は 1.5 mL/min でした。

多くの QC ラボでは、リン酸緩衝液を使用して移動相の pH コントロールを維持します。ただし、リン酸緩衝液は揮発性がないため、質量分析計と互換性がありません。図 4 は、メタノールとリン酸緩衝液または 0.2 パーセントギ酸を使用した C18 カラムとフェニルカラムのクロマトグラムを比較したものです。注目すべきは、溶媒を別の溶媒にシフトしたときに、選択性と溶出順序の変化がないことです。これは、ギ酸移動相が追加的な移動相として機能でき、MS 検出が必要な場合に理想的であることを示しています。

前に述べたように、非栄養甘味料および保存料は、多くの飲料および歯科用製品に使用されています。ほとんどの加工飲料の単純な調査では、今回調査した化合物の少なくとも 1 つか 2 つ

が示されます。TaB コーラ (Coca-Cola Co.、ジョージア州アトランタ)、Monster Energy (Monster Beverages Co.、カリフォルニア州コ罗纳) などの飲料、Listerine (McNeil-PPC, Inc.、ニュージャージー州スギルマン)、Scope (The Proctor & Gamble Co.、オハイオ州シンシナティ) などのマウスウォッシュを含む複数の製品を調査しました。各製品の成分リストを表 2 に示します。少なくとも 1 つのケースで、1 つの成分が 2 回リストされています (安息香酸ナトリウムおよび安息香酸は、移動相の酸性度によって安息香酸のプロトン付加が完全に確保されるため、低 pH で分析することにより結合されます)。ご覧のように、今回の作業では他の多数の成分は分析されていません。多くの場合、2 番目の HPLC テストまたは LCMS などのその他のテストを使用できます。

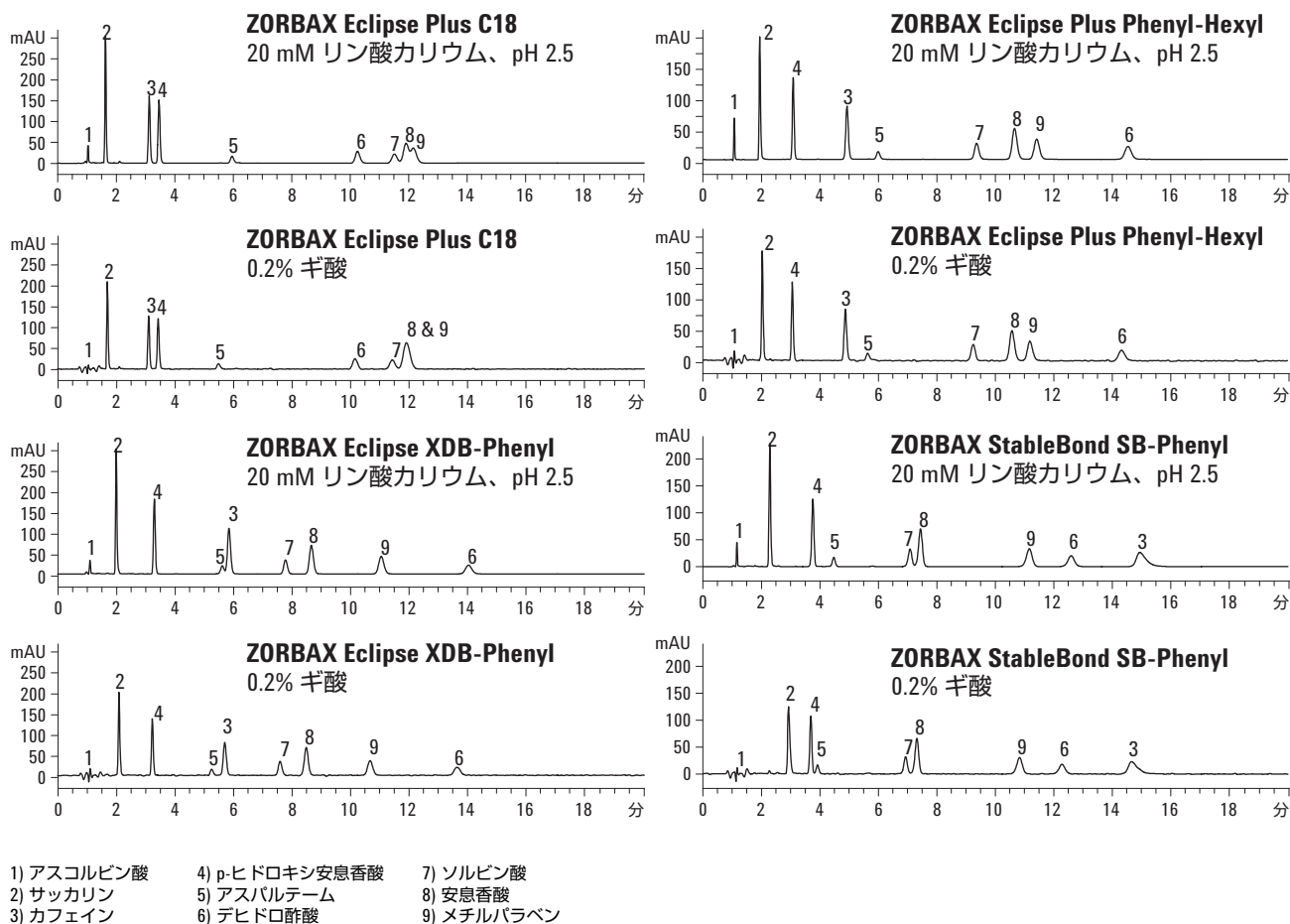


図 4. C18 およびフェニルカラムでの、食品添加物分離に対する 70% 20 mM リン酸緩衝液、pH 2.5 と、70% の 0.2% ギ酸/30% のメタノールの比較。流量は 1.5 mL/min でした。

表 2. 製品と成分

製品	分析成分	その他の成分
TaB	サッカリンカルシウム、安息香酸カリウム、カフェイン、アスパルテーム	炭酸水、カラメル色素、天然香料、リン酸
Monster Energy	カフェイン、ソルビン酸、安息香酸	炭酸水、スクロース、グルコース、クエン酸、天然香料、オタネニンジンエキス、L-カルチニン、ナイアシンアミド、塩化ナトリウム、グルクロノラクトン、イノシトール、ガラナ種エキス、ピリドキシン、ヒドロクロリド、スクラロース、リボフラビン、マルトデキストリン、シアノバロミン
Listerine	安息香酸、サッカリンナトリウム、	ユーカリプトロール、メントール、サリチル酸メチル、チモール有効成分: 水、アルコール (21.6%)、ソルビトール液、香料、ポロクサマー 407、FD&C 緑色 3 号
Scope	サッカリンナトリウム、安息香酸ナトリウム、安息香酸	水、アルコール、グリセリン、香料、ポリソルベート 80、青色 1 号、黄色 5 号、塩化セチルピリジニウム

式 1. 分離能式

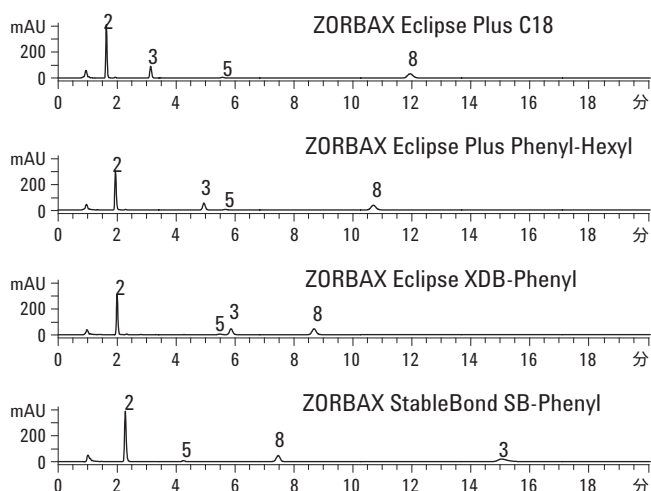
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'}{k' + 1}$$

理論段数

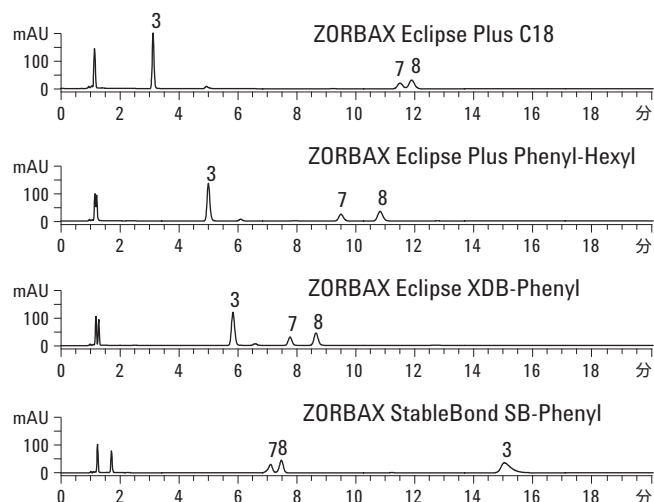
選択性

リテンション

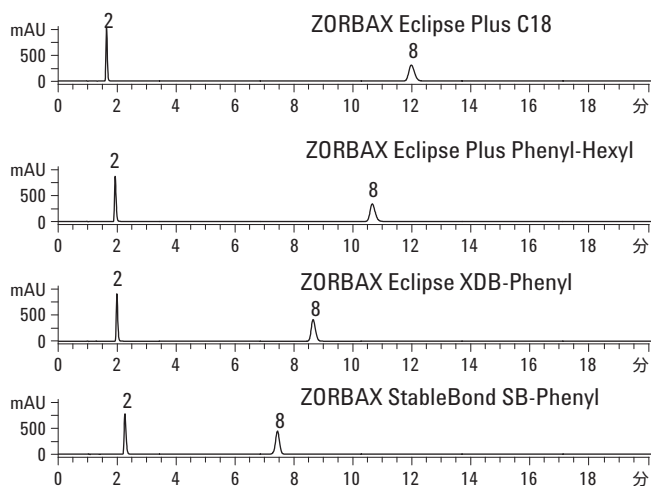
TaB



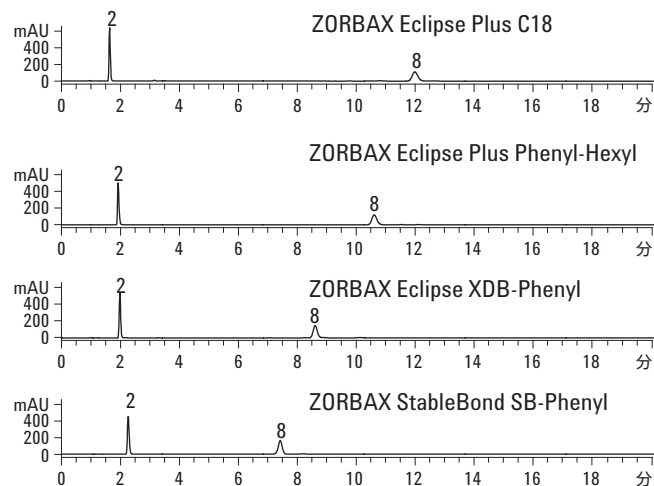
Monster Energy



Cool Mint Listerine



Original Mint Scope



- | | | |
|------------|----------------|------------|
| 1) アスコルビン酸 | 4) p-ヒドロキシ安息香酸 | 7) ソルビン酸 |
| 2) サッカリン | 5) アスパルテーム | 8) 安息香酸 |
| 3) カフェイン | 6) デヒドロ酢酸 | 9) メチルパラベン |

図 5. 各種カラムによるソフトドリンク、栄養ドリンク、およびマウスウォッシュの分析。

図3に示されているように、この移動相での9つの化合物の混合物の最適な分離は、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムで実現されます。ただし、すべてのサンプルに同じ対象混合物が含まれていないことは明らかです。図5に示されている TaB サンプルでは、Eclipse Plus C18、Phenyl-Hexyl、および StableBond SB-Phenyl カラムがすべて、サンプルの全分析に対して良好な分離能を提供していることがわかります。Monster Energy ドリンクの場合、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムはこの混合物の全成分について優れた分離能を提供しますが、Eclipse XDB-Phenyl カラムはより短い時間で同様の分離能を提供します。最後に、マウスウォッシュサンプルの分析では、StableBond SB-Phenyl カラムが、十分な分離能を維持したまま最も高速な分離を提供します。

結論

分析において選択性は非常に重要です。分離能の式(式1)で示したように、選択性はこの式の最重要係数です。今回の分析では、選択した溶媒(メタノールとアセトニトリル)から導出される選択性と、異なるカラムから導出される選択性を検証しました。選択性の重要性は、混合物中の選択した成分のみ含む実際のサンプルの検証でさらに強調されており、分析速度を考慮する場合には特に、分析条件の変更が必要になる場合があります。

参考文献

1. K. Croes et al., "Relevance of π - π and Dipole-Dipole Interactions for Retention on Cyano and Phenyl Columns in Reversed Phase Liquid Chromatography," *J. Chromatogr.*, 1098, 123–130, 2005.
2. M. R. Euerby, et al., "Chromatographic Classification and Comparison of Commercially Available Reversed Phase Columns Containing Phenyl Moieties Using Principal Component Analysis," *J. Chromatogr. A*, 1154, 138–151, 2007.

3. V. R. Meyer, *Practical High Performance Liquid Chromatography*, Fourth Ed., p 34, Wiley, 2004.
4. J. Henderson and W. Long, "Resolving Potentially Harmful Azo-Colorant Amines Using the Distinct Selectivities of the Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl and StableBond Phenyl Columns," Agilent Technologies publication 5989-8542EN, 2007.
5. W. Long and J. Henderson, "High Resolution Analysis of Taxanes Using Rapid Resolution HT (1.8 μ m) Agilent Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Columns," Agilent Technologies publication 5989-9340EN, 2008.
6. William Long, John Henderson, and Maureen Joseph, "Comparing Selectivity of Phenylhexyl and Other Types of Phenyl Bonded Phases," *LC GC Magazine* June 2008.
7. J. Henderson and W. Long, "Exceptional Selectivities of Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Phenyl Columns to Separate Estrogens," Agilent Technologies publication 5989-9130EN, 2008.
8. W. Long and J. Henderson, "Unique Selectivity and High Throughput Applications of SB-Phenyl RRHT," Agilent Technologies publication 5989-6067EN, 2007.
9. M. Yang, et al., "Impact of Methanol and Acetonitrile on Separations Based on π - π Interactions with Reversed Phase Phenyl Columns," *J. Chromatogr.*, 1097, 124–129, 2005.

詳細情報

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

www.agilent.com/chem/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。

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。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、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008
Published in Japan
November 3, 2008
5989-9951JAJP



Agilent Technologies