Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

CORTECS 2.7 µm カラムによる トウガラシオレオレジン中のスダン染料のLC-MS分析

Michael S. Young and Kim Van Tran
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 低 ppb 検出限界での高感度 LC-MS 分析
- すべてのLCシステムで分析の効率化が可能な 2.7 µm ソリッドコアカラム
- 複雑なオレオレジンマトリックスについて SPE による簡便で効果的なサンプル前処理

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

CORTECS® 2.7 µm カラム

Xevo® TQD

Sep-Pak® Silica

キーワード

トウガラシオレオレジン、LC-MS/MS、スダン染料

はじめに

スダン染料は、ろう、油、溶媒、プラスチックの着色に使用される水溶性のジアゾ化合物の一種です。これらの染料の多くは、各々の化合物、またその混合物でも、赤トウガラシ中に天然に存在する着色化合物と非常によく似た色を呈します（図 1 に主な 2 種類のトウガラシ色素の化合物の構造を示します）。スダン染料は潜在的に発がん性があるにもかかわらず、現在でも時折トウガラシ由来の製品の色を強めるために使用されます。このような使用法は違法であり、どのレベルであっても食品からスダン染料が検出されることは禁止されています。一般的なトウガラシ由来の物質中のスダン染料検出には、高感度で再現性の高いメソッドが必要です。トウガラシ由来の物質の中でも、トウガラシオレオレジンはトウガラシから抽出された高濃度の精油と樹脂の混合物であり、新鮮なトウガラシやトウガラシパウダーと比較してサンプルマトリックスはさらに複雑です。トウガラシオレオレジンは、食品産業においては添加剤として香りの増強・着色の両方の用途で使用され、その他にも医療用や護身用の催涙スプレーなどに用いられるカプサイシンの原料としても使用されます。トウガラシオレオレジンが食品の着色料として使用されるようになって以来、この物質中の検出には効果的な分析法が必要とされてきました。このアプリケーションノートでは、トウガラシオレオレジン中の主要なスダン染料の定性に最適な SPE によるサンプル前処理、ならびに粒子径 2.7 µm ソリッドコアパーティクルを充填した分析カラムによるメソッドを紹介します。このソリッドコアパーティクルタイプのカラムは、低いカラム背圧で高いカラム効率を実現し、かつ HPLC においても UPLC においても使用可能です。このアプリケーションで使用したスダン染料の構造は、図 2 に記載しています。

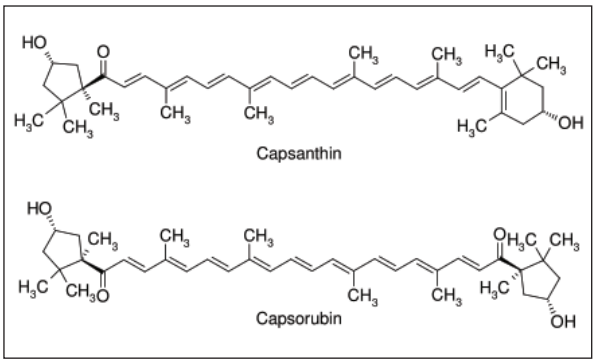

図 1. トウガラシオレオレジン中の天然着色化合物

実験方法

LC条件

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class システム

カラム：　CORTECS C_{18}、2.7 µm
2.1×100 mm（P/N 186007400）

移動相 A：　0.1% ギ酸水溶液

移動相 B：　0.1% ギ酸メタノール溶液

移動相 C：　0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

注入量：　5 µL

注入モード：パーシャルループインジェクション

カラム温度：45 ℃

弱ニードル洗浄溶媒：10：90
メタノール：水（600 µL）

強ニードル洗浄溶媒：メタノール（200 µL）

シール洗浄溶媒：10：90
アセトニトリル：水

流速：　0.40 mL/min

グラジエント：

Time	%A	%B	%C
Initial	80	10	10
0.5	40	30	30
5.0	0	50	50
9.0	0	50	50
9.1	80	10	10
12.0	80	10	10

MS条件

質量分析計：Xevo TQD

イオン化モード：ESI ポジティブ

ソース温度：150 ℃

脱溶媒温度：500 ℃

コーンガス流速：30 L/hr

コリジョンガス流速：0.15 mL/min

データ管理：MassLynx® v4.1

今回の実験で使用した MRM トランジションとソース温度については表 1 を参照。

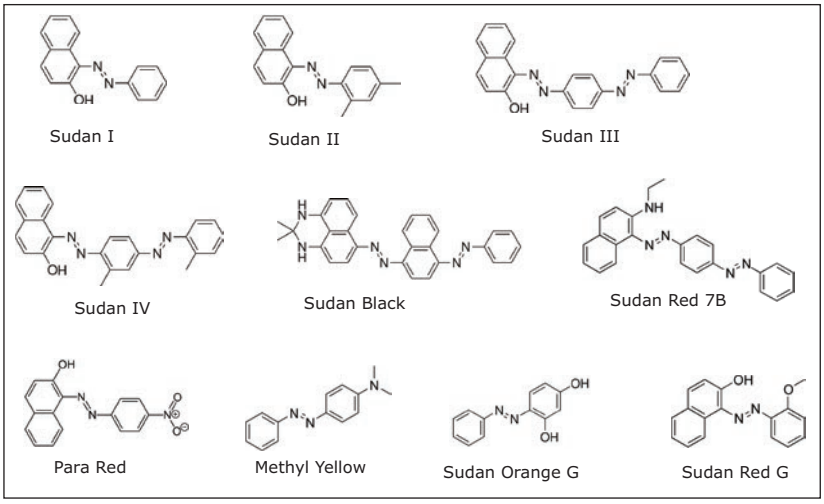

図 2. 今回の実験で使用したスダン染料

サンプル前処理

トウガラシオレオレジン（カプサイシン）は商業的に供給されているものを入手しました。このオレオレジンの 0.1g を 1 mL ヘキサンに溶解させたものをサンプルとし、Sep-Pak Silica カートリッジ（6cc、500mg、P/N WAT043400）を 3 mL のヘキサンでコンディショニングした後、希釈したサンプルをロードしました。カートリッジは 2 mL のヘキサンで洗浄し、5:95 アセトニトリル / ジクロロメタン 2 mL で脱離させました。脱離液は乾固させ、150 µL のメタノールに再溶解させました。全ての SPE カートリッジを使用するステップにおいては、バキュームマニホールドを使用し、流速 2 mL/min に達する最小限の圧力で吸引しました。

Compound	Precursor Ion (*m/z*)	Cone (V)	Production Ion 1 (*m/z*)	Collision 1 (eV)	Product Ion 2 (m/z)	Collision 2 (eV)
Sudan Orange G	215.1	32	93	Z0	122	14
Dimethyl Yellow	226.1	42	77	30	121	30
Sudan I	249.1	34	93	Z0	156	14
Sudan II	277.1	30	121	24	156	Z0
Sudan Red G	Z79	28	123	18	108	34
Para Red	294.1	30	143	30	128	35
Sudan III	353.2	48	197.1	26	156	24
Sudan Red 7B	330.15	30	183.1	15	115	50
Sudan IV	381.2	50	106.1	42	91.04	24
Rhodamine B	443.3	80	341	66	355.2	60
Sudan Black B	457.1	58	194	35	211.1	26

表 1. 今回の実験で使用した MRM トランジションとソースパラメーター

結果および考察

結果を表 2 に示しています。この実験においては、フェノール系（Sudan Ⅰ等）、ポリフェノール系（Sudan Orange G）、アミン系（Sudan Black 等）などのスダン染料が検出されました。クリーンアップに使用した Sep-Pak Silica カートリッジは、ターゲットとしている 10 種類すべてのスダン染料を効率よく保持できるため採用しました。一般的な回収率が 75% から 100%であるのに対し、ポリフェノール系の Sudan Orange G の回収率はおよそ 50 % でした。この化合物は他の染料と比較して、シリカ固定相により強く保持されるためです。この化合物の回収率は脱離溶媒のボリュームを増やす、もしくは脱離溶媒中のアセトニトリルの比率を増やすことで向上させることができますが、このどちらのステップも著しくクリーンアップ効果を低下させ、最終脱離液中に特に色の濃いマトリックス化合物が高濃度で残ってしまいます。図 3 はクリーンアップ前後でのサンプルの様子を示しています。左側のバイアルは SPE でクリーンアップする前にヘキサンに溶解させた 1.0 mL のサンプルを 150 µL に分注したもの、右側のバイアルは SPE クリーンアップ後にメタノール 150 µL に再溶解させたものです。SPE プロトコールにより、明らかな色素除去効果が見られると同時に、溶出液はおよそ 7 倍に濃縮されています。

Compound %	Recovery (% RSD) 10 ppb	100 ppb
polyphenolic		
Sudan Orange G	46 (28)	54 (23)
phenolic		
Sudan I	69 (16)	78 (4)
Sudan 11	80 (17)	86 (10)
Sudan III	73 (8)	75 (7)
Sudan IV	106 (16)	100 (14)
Sudan Red G	75 (13)	79(3)
Para Red	75 (30)	79 (5)
amine		
Methyl Yellow	81 (10)	84 (3)
Sudan Black	73 (13)	88 (13)
Sudan Red 7B	83 (9)	82 (7)

表 2. 10 種類のスダン染料の回収率データ（n=6）

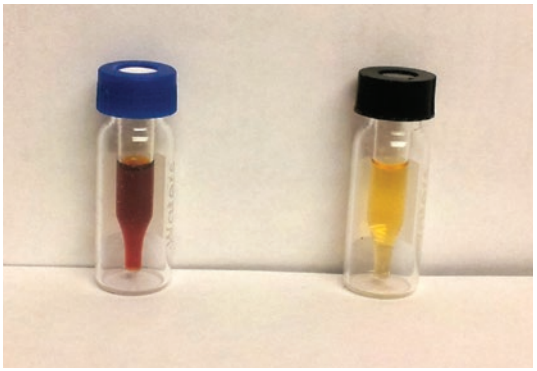

図 3. SPE クリーンアップ：左側のバイアルはクリーンアップしていないトウガラシオレオレジンのサンプル、右側はクリーンアップ後に濃縮したトウガラシオレオレジンのサンプル

この実験において、CORTECS 2.7 µm ソリッドコアパーティクルカラムは優れたクロマトグラフィー性能を発揮しました。サンプルマトリックス中において 200 回以上インジェクションをした後も、この優れた分離性能は維持されていました。図 4 は、100ng/g (ppb) を添加したサンプルの典型的な分析を示しています。この分析は ACQUITY UPLC H-Class システムで実施しました。ACQUITY UPLC H-Class システムは、UPLC の耐圧と流速条件下での分析はもちろん、この実験で使用しているような HPLC 条件下においても卓越した性能を発揮するように設計されています。今回の実験におけるカラム背圧はおよそ 3100 psi であり、耐圧が 4000psi もしくはそれ以上のコンベンショナルな HPLC システムでも問題なく使用できる圧力です。さらに UPLC の性能を最大限に活かして分析したい分析者には、CORTECS 1.6 µm ソリッドコアカラムに分析法を移管することも可能です。

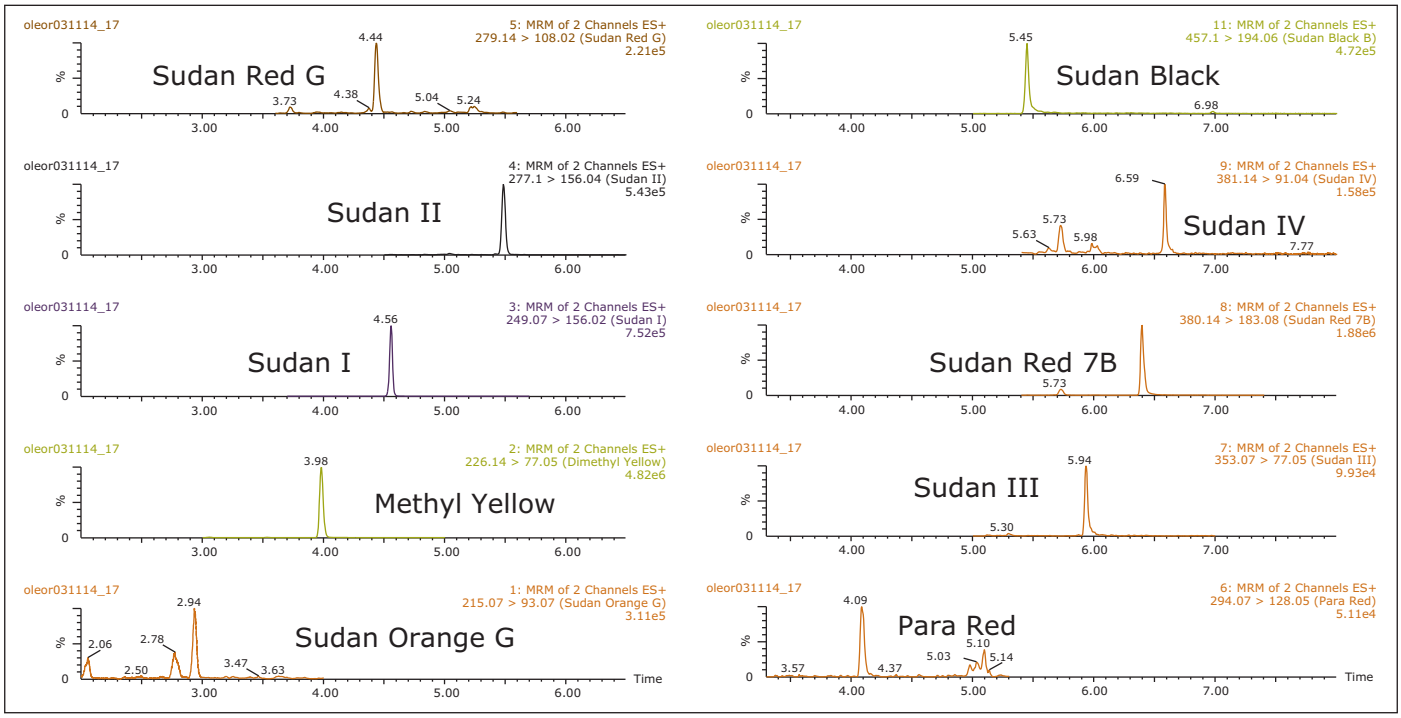

図 4. 100ppb (ng/g) 添加したオレオレジンサンプルの抽出イオンクロマトグラム

結論

- トウガラシオレオレジン中のスダン染料検出に効果的なメソッドの開発
- Sep-Pak Silica カートリッジによる効果的なクリーンアップ
- ほぼ全ての HPLC で使用可能な背圧下において卓越したクロマトグラフィー性能を発揮する CORTECS C_{18}、2.7 µm ソリッドコアカラム

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、UPLC、Sep-Pak、MassLynx、CORTECS および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan. 2014年10月 720005070JA PDF