



耐久性に優れたLCカラムと 費用対効果の高い内部標準による 食品中アクリルアミド分析の改善

焼く、炒める、揚げる、など高熱調理の過程で糖類とアミノ酸であるアスパラギンが反応すると、食品中にアクリルアミドが形成される可能性があります。アクリルアミドの発生や濃度がかかわってくる商品例としては、ポテトチップス、穀類を原料とする焼き菓子、コーヒーなどがあげられます。食品中のアクリルアミドの検出は、スウェーデン国立食品庁によって2002年に初めて報告され、それ以来、食品や飼料に由来するさまざまな食品の汚染規模や、食事からの暴露に関連する潜在的な健康影響をより理解するための世界的な取り組みが拡大しています。アクリルアミドは非常に危険な化学物質として分類されており、実験動物では大量投与によりがんを引き起こす可能性が指摘されています(ただし、これまでのところ、食事による暴露とヒトの癌発生率の増加との直接的な関係は証明されていません)。公衆衛生維持のために、食品や飲料中のアクリルアミド濃度を正確に測定できる、効率的な測定法が必要とされます。ここでは、食品中のアクリルアミド分析に対する代表的なアプローチを、Allure Acrylamideカラムと重水素化内部標準を使用する改善されたプロセスと比較します。分析時間の短縮とシステム適合性を逸脱することのない長期間にわたるサンプルスループットも利点となります。

現行の分析手法

LC-MS / MS法の選択

食品マトリックス中の正確なアクリルアミド分析には、技術的な課題があります。アクリルアミド分子は小さく、比較的揮発性が高い化合物であるため、当初はGC/MSによる手法が追求されました。しかしこれらの手法は、望ましくないステップである、アクリルアミドの臭素化誘導体への変換に依存するものでした[1]。その後、LC-MS/MSを用いた手法が研究され、現在では食品サンプルのアクリルアミド分析に日常的に使用される最も一般的な分析法となりました。LC-MS/MS法は依然として分析のハードルに直面しています。中でも注目すべきは、アクリルアミドの選択的な保持と複雑なマトリックスから共抽出された化合物からの分離で、現在も研究が進められています。

多孔質グラファイトカーボン(PGC)LCカラムの使用

ヨーロッパでは、食品中のアクリルアミドの分析方法が正式に定められており(EN 16618:2015)、多孔性グラファイトカーボン(PGC: porous graphitized carbon)を充填したガードカラムと分析カラムの使用が求められています。これは、従来の逆相(RP)保持メカニズムを用いてアクリルアミドを分析することが難しいことも一因です。比較的厳密なEN法によるサンプル前処理手順を行った後でさえ、共抽出される可能性があるマトリックス成分からアクリルアミドを分離するのに充分な保持が得られるため、PGCカラムは現在業界では一般的に使用されています。PGCカラムは、水系100%移動相で使用可能です。この条件では多くの逆相カラムが「Dewetting」と呼ばれる保持時間が極端に短くなる現象を起こし、有機溶媒の割合の高い移動相での時間のかかる洗浄によるカラム再生が必要になります。

重水素化内部標準物質の使用

正確な定量が必要不可欠ですが、抽出プロセスではかなりのばらつきが生じる可能性があるため、ENメソッドでは内部標準物質を抽出溶媒と共にサンプルへ添加することが推奨されています。アクリルアミド分析には一般に¹³C標識内部標準物質を使用しますが、ENメソッドでは代わりに重水素化内部標準物質の使用が可能となっています。¹³C標識アクリルアミドよりも大幅に安価なアクリルアミド-d₃は内部標準物質として優れ、かつ費用対効果の高い選択肢です。

メソッド要件

EN16618:2015に準拠した食品中のアクリルアミド分析で求められる分析時間は8分です。システム適合性の要件を満たすためには、アクリルアミドは1.7分より後に溶出する必要があります。さらに、ENメソッドに概説されている2段階SPEサンプル前処理工程の後でもサンプル抽出液中に残留しているマトリックス成分をカラムから洗い出すため、アクリルアミド溶出後に追加時間が必要です。マトリックス成分はPGCカラムに強く保持されるため、分析毎に充分なページを行わないとカラム性能が低下し、システム適合性の要件である保持時間1.7分を満たすことができなくなる可能性があります。

逆相分析によるサンプルスループットの向上

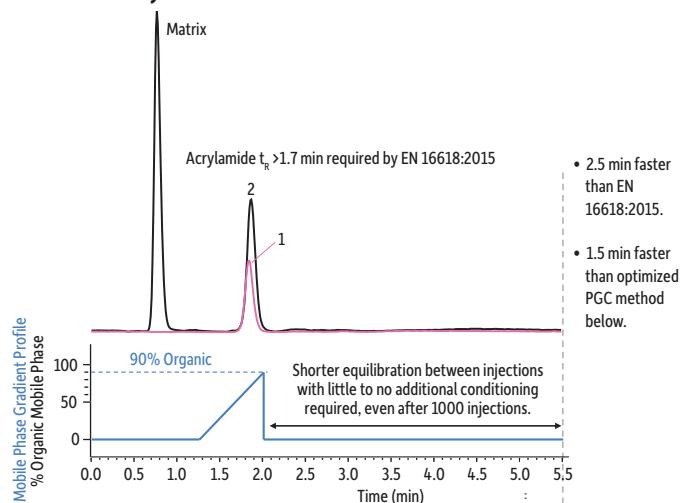
PGCカラムの使用するラボではシステム適合性の閾値に近づくと、システム適合性基準を満たす性能に復帰することを期待して長時間におよぶカラム再生の手順を実施するか、ガードカラムと場合によっては分離カラムも交換するかの選択に直面します。どちらも時間と費用のかかる問題であり、サンプルスループットが滞ります。Allure Acrylamide カラムへの切り替えは優れた代替手段です。独自の極性基を組み込んだアクリルアミドを保持する逆相固定相は、水系100%移動相条件に適合し、PGCカラムよりも短い分析時間と長いカラム寿命を提供します。Allure Acrylamideガードカラムおよび分離カラムを使用すると、最も良いバランスを得ることができます。つまり、ENのシステム適合性要件を満たす充分なアクリルアミドの保持を提供する一方で、共抽出されたマトリックスは分析毎に短時間でカラム洗浄ができないほど強く保持されません。その結果、Allure Acrylamide カラムを使用するラボでは、より少ないカラム本数でより多くのサンプルを分析できます。これは、あらゆる食品分析機関にとって強力なコスト節約の組み合わせです。次の例は、多検体を取り扱う食品検査機関における、重水素化内部標準物質とともに Allure Acrylamide カラムとガードカートリッジを使用する利点を示しています。

短い分析時間

マトリックス化合物は Allure Acrylamideカラムから迅速に溶出するため、最適条件下で運用したPGCカラムよりも素早く平衡化します。図1は、食品(このケースではポテトチップス)中のアクリルアミド分析の2つの異なるメソッドの例です。1つはAllure Acrylamideカラムを、もう1つは代表的なPGCカラムを用いています。PGCカラムを用いたメソッドでは、ENメソッドからさらに最適化し、分析時間を8分から7分に短縮しつつ、最適なカラムフラッシングおよび平衡化時間を維持しました。さらにフラッシングしても、カラムの耐久性に大きな向上は見られませんでした。Allure Acrylamideカラムによるアクリルアミド分析は、マトリックス成分から良好な分離で1.7分の保持というメソッド要件を満たしながらも、平衡化時間ははるかに短くなりました。EN 16618:2015と比較して1分析あたり2.5分、最適化したPGCカラムメソッドと比較しても1.5分の短縮となるため多くのサンプルを分析でき、ラボの生産性が向上します。

図 1: ポテトチップスのような複雑なマトリックスの場合でも平衡化にかかる時間がPGCカラムよりはるかに短いため、Allure Acrylamideカラムを使用することでサンプルスループットを増加することができます。

A. Allure Acrylamide Column

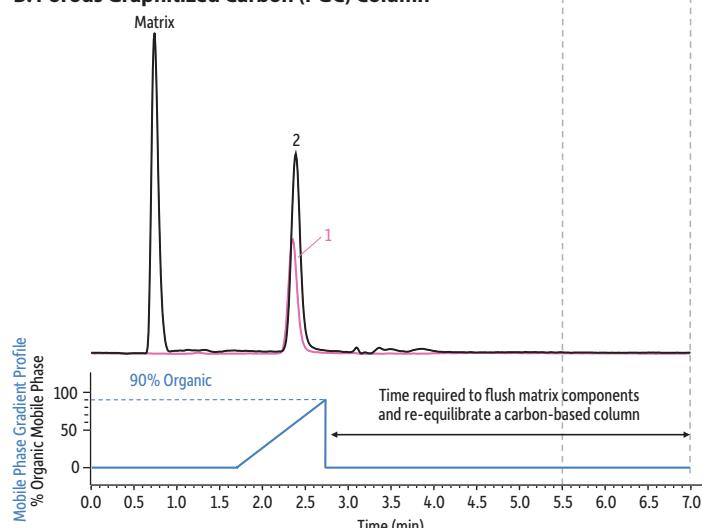


Peaks	Conc. (ng/mL)	Precursor	Product
1. Acrylamide-d3 (IS)	200	75.1	58.1
2. Acrylamide	Endogenous	72.1	55.1

Column	See notes
Temp.:	22 °C
Sample	Acrylamide-d3
Diluent:	Water
Inj. Vol.:	10 µL
Mobile Phase	A. 0.001% Formic acid in water, B. 0.001% formic acid in acetonitrile
Detector	MS/MS
Ion Mode:	ESI+
Mode:	MRM
Instrument	HPLC
Notes	Extracted per EN 16618:2015

ホモジナイズしたポテトチップス 2.0 gを50 mL遠沈管に秤量し、40mLの水を加えた後に内部標準試薬を添加。手で30秒間振とうした後に15秒間ボルテックスし、さらにシェーカーにて60分間振とうしてサンプル抽出の搅拌を最大限に実施。冷却遠心機にて10°C、3,600 x gで20分間遠心分離後、上部の脂質層とチューブ底部の固形物を注意深く避け、水層の抽出液を適切な容器に採取。

B. Porous Graphitized Carbon (PGC) Column



クリーンアップには、第一のSPEカートリッジ(非極性、SAX、SCX 固定相からなるmultimode SPEカラム、1,000 mg/6 mL)を3mLメタノールで2回、6mL水でコンディショニング。先の水層10mLについてSPEカートリッジを通過させ溶出液を捕集。次のクリーンアップステップでは、第二のSPEカートリッジ(架橋ポリスチレン/ポリDVB SPEカラム、500mg/6mL)を5mLメタノールと5mL水でコンディショニング。第一ステップで回収した溶出液を全てカートリッジにロードし、4mL水で洗浄して洗浄液は廃棄。2mLの60%メタノール水溶液でアクリルアミドを溶出。回収したサンプルは濃縮管に移し40°C以下のエバボレーターでメタノールを留去。緩やかに窒素を吹きつけ、最終容量が0.5 ~ 0.8mLになるまで濃縮し、最終サンプルをオートサンプラバイアルに移し、LC-MS/MSで分析。

Column Details

A. Allure Acrylamide column: 5 µm, 50 mm x 2.1 mm ID analytical column (cat.# 9167552) with 5 µm, 10 mm x 2.1 mm ID guard cartridge (cat.# 916750212).
B. Porous graphitized carbon column: 5 µm, 50 mm x 2.1 mm ID analytical column with 5 µm, 10 mm x 2.1 mm ID guard cartridge.

Mobile Phase Gradients (%B)

A. Allure Acrylamide column: 0.00 min (0%), 1.00 min (0%), 2.00 min (90%), 2.01 min (0%), 5.50 min (0%), flow = 0.4 mL/min.
B. Porous graphitized carbon column: 0.00 min (0%), 1.70 min (0%), 2.70 min (90%), 2.71 min (0%), 7.00 min (0%), flow = 0.4 mL/min.

LC_FS0530_0532

優れた耐久性

図2は、代表的なPGCカラムと比べてAllure Acrylamideカラムではアクリルアミドの保持時間が非常に安定していることを示しています。PGCカラムでは、EN 16618:2015に従って抽出しクリーンアップしたコーヒーサンプルの注入を開始してすぐに保持が弱くなりはじめ、475回注入すると最終的にシステム適合性の要件である1.7分の保持時間を満たすことができなくなりました。対照的に、1000回の注入後でさえ、Allure Acrylamideの性能は安定しており、次の分析に対応する準備ができます。図3は、Allure Acrylamideカラムでの最初の注入から1000回目の注入まで、クロマトグラフィーが影響を受けないことを示しています。共抽出されたマトリックス化合物を強く保持するのではなく溶出できることは、カラムメンテナンスをほとんど行わずに、数百回もの繰り返しマトリックス注入後でも非常に安定した性能をもたらすカギとなります。

図 2: Allure Acrylamideカラムは、1000回注入後でもEN 16618:2015システム適合性の要件を満たしています。これは、一般的なPGCカラムの2倍以上の注入回数です。

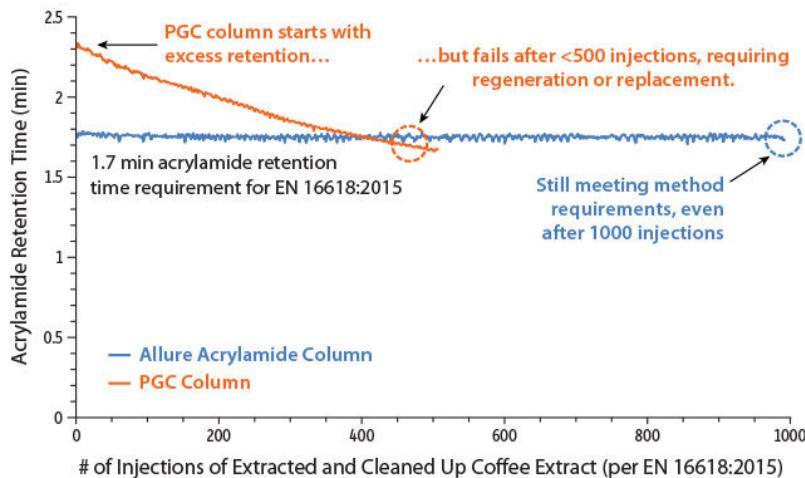
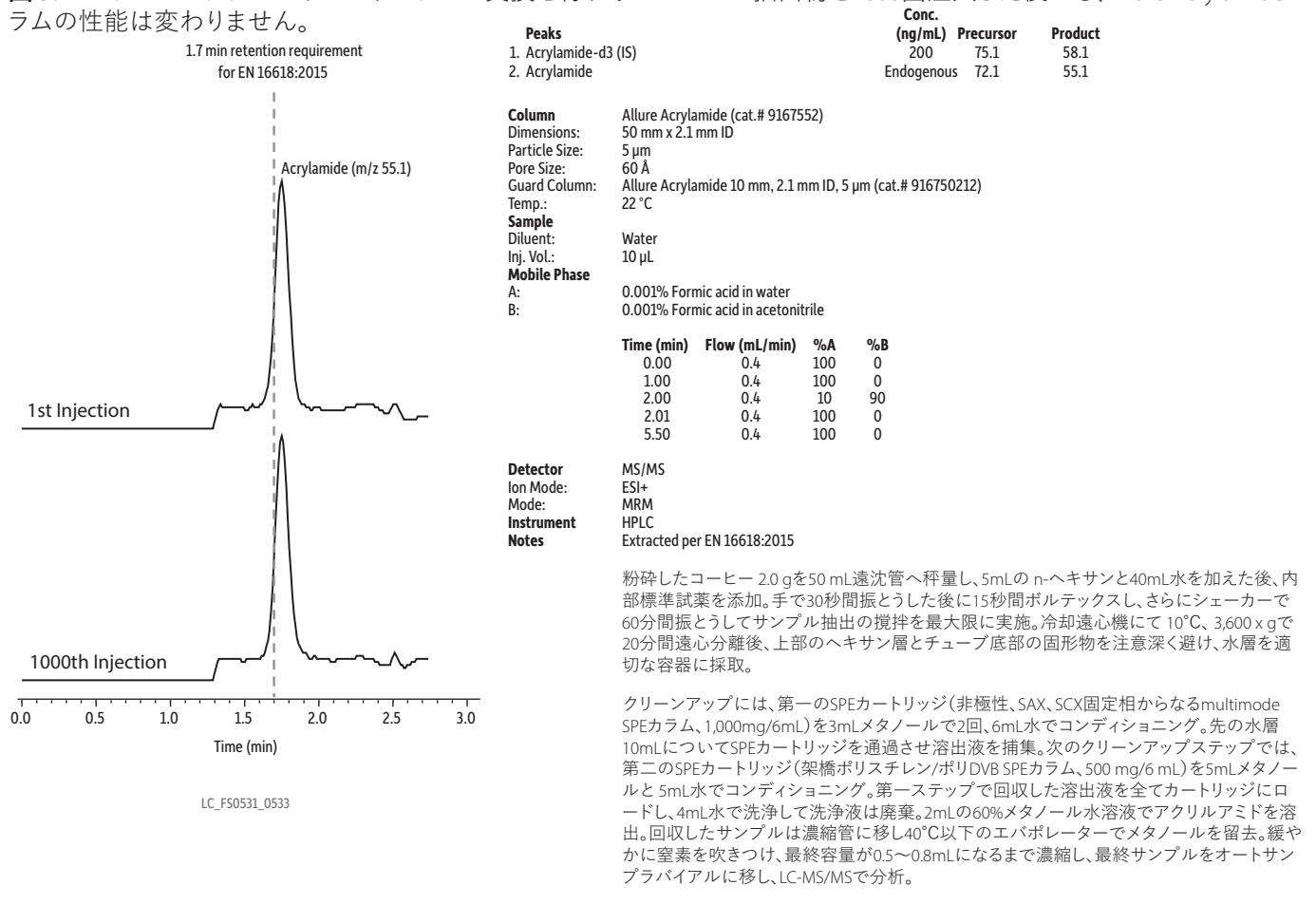


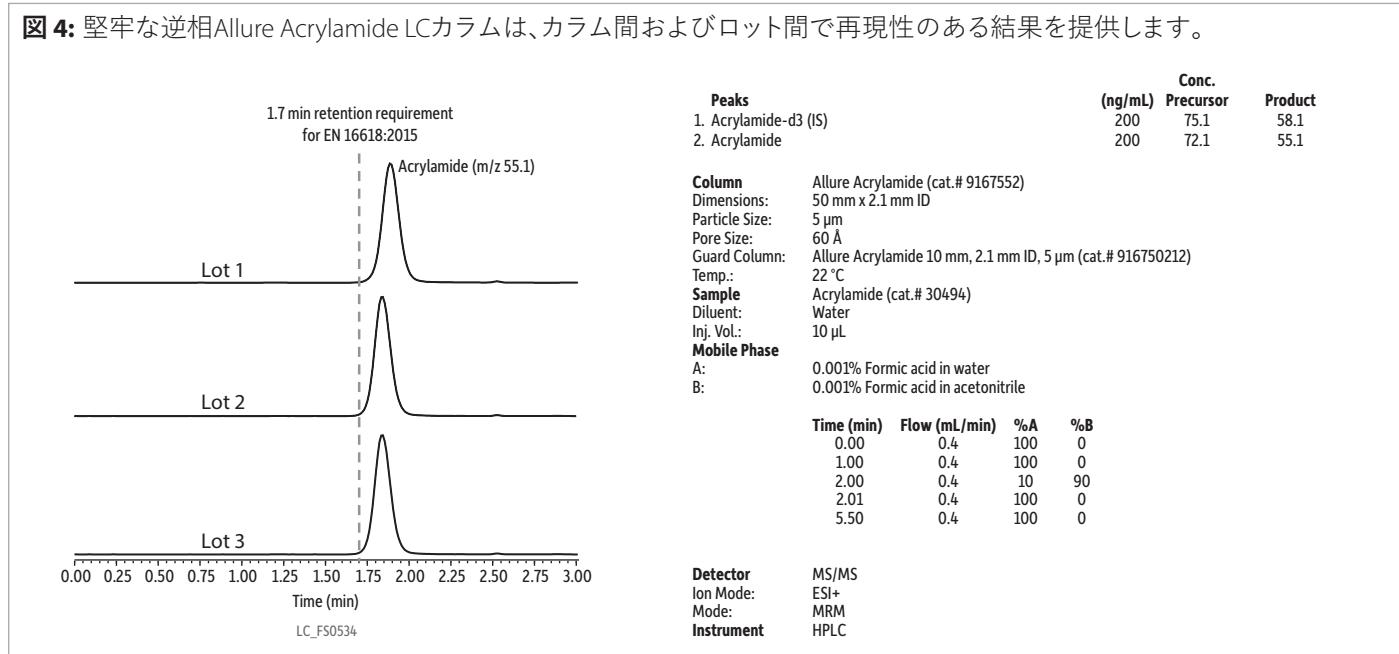
図 3: システムメンテナンスやガードカラムの交換を行わずにコーヒー抽出物を1000回注入した後でも、Allure Acrylamideカラムの性能は変わりません。



一貫したカラム間の性能

100%水性移動相に耐えるように開発されたRestek Allure Acrylamideガードおよび分離カラムは、分析毎の、そしてカラム間でも堅牢な性能を発揮します。古いカラムから新しいAllure Acrylamideカラムへ交換する時が来たとき、厳格な製造手順と品質テストによってアクリルアミド分析で同じ性能が得られることを保証します(図4)。

図 4: 堅牢な逆相Allure Acrylamide LCカラムは、カラム間およびロット間で再現性のある結果を提供します。



食品中のアクリルアミド分析のためのより良いソリューション

EN 16618:2015で用いられているPGCカラムはアクリルアミドを十分に保持しますが、共抽出したマトリックス成分を強く保持するため分析毎に長い平衡時間が必要で、カラムの耐久性が短くなります。Allure Acrylamideカラムを使用すると、アクリルアミドの十分な保持を確保しながら、マトリックス化合物をより効率的かつ効果的に洗浄することができるため、全体的にアクリルアミド分析を迅速化することができます。その結果、システム適合性の要件をより多検体注入にわたり維持できるため、メンテナンスが必要になる前により多くのサンプルを分析できます。Allure Acrylamide分離カラム及びガードカートリッジと重水素化内部標準の組み合わせにより、分析ラボは短時間かつ少ないカラム本数でより多くのサンプルを分析することができ、生産性と収益性の向上へつながります。

参考文献

- [1] J.A.G. Roach, D. Andrzejewski, M.L. Gay, D. Nortrup, S.M. Musser, Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7547–7554.
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0346354>

Allure Acrylamide LC カラム

- ・数百回のマトリックス注入の後でも安定した保持時間。
- ・迅速な平衡化時間により、メソッドの最適化と分析時間の短縮が可能になります。
- ・飲料水中のアクリルアミドのようなpptレベルの測定を正確に。
- ・食品に求められるEN16618:2015および米国FDA手順要件に適合。
- ・分析毎そしてカラム間での信頼性が高く耐久性のある性能。



内径	長さ	入数	cat.#
5 µm 粒子			
2.1 mm	50 mm	ea.	9167552
3.0 mm	150 mm	ea.	916756E

粒子: 5 µm, 球状
細孔径: 60 Å
炭素含有率: 非開示
エンドキャップ: なし
表面積: 450 m²/g
pH 範囲: 2.5 - 8
最高使用温度: 80 °C

Allure ガードカートリッジ

粒子サイズ: 5 µm 細孔径: 60 Å

品名	粒子径	サイズ	入数	cat.#
Allure Acrylamide ガードカートリッジ	5 µm	10 x 2.1 mm	3-pk.	916750212



Acrylamide

Acrylamide (79-06-1)

成分名	CAS #	Conc. in Solvent	CRM?	Max Shelf Life on Ship Date	Min Shelf Life on Ship Date	Shipping Conditions	Storage Temperature	qty.	cat.#
Acrylamide	79-06-1	1,000 µg/mL in methanol, 1 mL/ampul	Yes	24 months	6 months	Ambient	0 °C or colder	ea.	30494



Acrylamide-d3

重水素標識したアクリルアミドは、食品または環境サンプル中のアクリルアミド分析に対して費用対効果の優れた同位体標識内部標準物質です。

Acrylamide-d3 (122775-19-3)

成分名	CAS #	Conc. in Solvent	CRM?	Max Shelf Life on Ship Date	Min Shelf Life on Ship Date	Shipping Conditions	Storage Temperature	qty.	cat.#
Acryl-amide-d3	122775-19-3	500 µg/mL in acetonitrile, 5 mL/ampul	Yes	24 months	6 months	Ambient	10 °C or colder	ea.	30153





アプリケーションやRestek製品についてなにかご質問はありますか?
Restek株式会社へお問合せください(www.restek.jp/contact-us)

Restekの特許および商標は、Restek Corporationの所有物です。(全リストについてはwww.restek.jp/Patents-Trademarksを参照)Restekの文献またはウェブサイトにあるその他の商標は、それぞれの所有者に帰属します。Restek登録商標は米国で登録されており、他の国でも登録されている可能性があります。

© 2020 Restek Corporation. All rights reserved. Printed in Japan.

www.restek.jp



Lit. Cat.# FFAR3126B-JP