

ISSUE 2 | 2018

Analytix Reporter

モノリス型 シリカカラムを 使用した飼育水中の 寄生虫駆除剤の測定

アレルギー誘発性フレグランス試験 – 認証標準物質 (CRM) と
GC FID/GC MSアプリケーション

新製品 エッセンシャルオイルの標準物質

新規SPEカートリッジを使用した
パブリカパウダー中のPAHsの分析

高性能薄層クロマトグラフィー：
薬用植物の迅速かつ効率的なフィンガープリント分析法

HWI Pharma Solutions社の
新しい植物化学標準物質

生体高分子の分離を改善する
BIOshell™ IgG 1,000 Å C4 UHPLCカラム

Supel™ Genie HybridSPE™
オンラインカートリッジを用いた生体試料中の
リン脂質除去およびLC/MS/MS分析

LC/MS測定における感度アップのコツ

GC BIDとイオン液体カラムWatercol™を使用した
液化石油ガスの水分測定法

Analytix Reporter

Environmental

- 3 モノリス型シリカカラムを使用した
飼育水中の寄生虫駆除剤の測定

Cosmetics & Personal Care

- 7 アレルギー誘発性フレグランス試験 –
認証標準物質 (CRM) とGC FID/GC MS
アプリケーション
- 10 新製品 エッセンシャルオイルの標準物質

Food & Beverage

- 11 新規SPEカートリッジを使用した
パブリカパウダー中のPAHsの分析

Nutritional Supplements

- 15 高性能薄層クロマトグラフィー:
薬用植物の迅速かつ効率的な
フィンガープリント分析法
- 18 HWI Pharma Solutions社の
新しい植物化学標準物質

Pharma & BioPharma

- 19 生体高分子の分離を改善する
BIOshell™ IgG 1,000 Å C4 UHPLC
カラム

Clinical & Forensic

- 23 Supel™ Genie HybridSPE™オンライン
カートリッジを用いた生体試料中の
リン脂質除去および、LC/MS/MS分析

Analytical Science & Tech. Innovations

- 27 LC/MS測定における感度アップのコツ

In Essence

- 30 GC BIDとイオン液体カラム
Watercol™を使用した
液化石油ガスの水分測定法

読者の皆様へ

私たちは「ライフサイエンスにおける問題を世界の科学コミュニティと協力して解決する」というミッションに沿って、研究者の皆様が課題を解決する事を全力でお手伝いしております。

当社の分析製品は、世界各地のさまざまな研究所、業界、およびアプリケーションに採用されております。これら製品をご利用いただく皆様との交流が深まるほど、難しい状況下において信頼性の高い分析結果を得られる製品が求められていることを実感しています。

本号では、科学コミュニティの協力のもと、測定方法を最適化できた事例、困難な分析を解決できた事例、分析上の課題に対して新たな解決策を提供できた事例をご紹介します。本号でご紹介するアプリケーションは、水族館の海水に含まれる寄生虫駆除剤の簡便な分析法、光度測定による鉄分の高感度検出法(英語版にのみ収載)、パブリカ粉末中のPAHs(多環芳香族炭化水素)の測定法、HPTLCによるジンセノサイド類のフィンガープリント法、LC/MS分析の前処理として血漿・血清からリン脂質をオンラインで除去する方法、mAbs QC向けに改良された高分子化合物分離用HPLCカラムです。これらのアプリケーションは標準物質と高品質なHPLC/MS用溶媒によって補完されます。

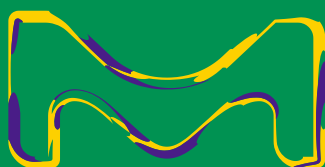
本ニュースレターで紹介するトピックは、当社の分析コミュニティにおいて見出されたものです。皆様に関心を寄せ、研究のヒントにいただければ幸いです。分析上の困難な課題があれば、当社がどのようにお手伝いできるか是非お知らせください。

Happy Analysis!



Trevor Jones

VP, Head of Marketing,
Advanced Analytical
trevor.jones@merckgroup.com



SigmaAldrich.com/analytical

Sign up at SigmaAldrich.com/ar-reg

モノリス型シリカカラムを使用した飼育水中の寄生虫駆除剤の測定

Bruce Herzig, Applications Scientist, MilliporeSigma 828 Highland Ave Cincinnati, OH, bruce.herzig@merckgroup.com

Kailen Gilde, Environmental Analyst II, Georgia Aquarium, 225 Baker St. NW, Atlanta, GA

緒言

プラジカンテル(PZQ)は、水族館業界で単生類やその他の寄生虫の駆除処理に利用されています。この使用方法としては、対象生物への直接投与ではなく、水槽タンクの飼育水に溶解させることによる薬浴が行われることが多いです。

駆除の状況によって飼育タンクと分けた別のタンクで薬浴したり、または駆除対象となる系全体に対して直接薬浴することも可能です。薬浴の効果が治療レベルに達しているか、および薬剤の濃度レベルがいつまで持続するかを判断するには、薬浴水中の薬剤濃度をチェックすることが重要です。水族館の飼育水に含まれるPZQを測定する現行の方法では、飼育水の試料から固相抽出(SPE)によって分析種を分離した後、得られた抽出物をHPLCで分析します。

このような手法では所要時間とコストがかさむため、駆除処理を十分な規模でモニタリングすることは困難です。本研究では、主にSPEによる試料前処理の工程を省略することで分析を簡略化し、分析全体の所要時間を短縮することを目的としました。

実験

現行の分析方法はWalt Disney World Resort EpcotのThe Living Seas¹によって開発されたものであり、血清中のPZQの測定に関する論文²を参照しています。血清中のPZQをHPLCで分析するには、マトリックスが大量に含まれているためにSPEを用いた試料前処理が必要ですが、少量の海水を注入する今回のようなケースでは、移動相の有機溶媒濃度を十分に低く設定すれば塩類の析出は起こらないので、問題ないと考えられます。例えば、移動相のアセトニトリル濃度が40%であれば試料中の塩類が析出することはありません。モノリス型シリカカラムの担体は夾雑物を多く含む試料に耐えるため、このカラムを利用すればSPEによる試料前処理を省略できます。移動相のアセトニトリル濃度と試料注入量の変更、および試料前処理の簡略化によって分析方法の感度と効率が向上し、分析時間も大幅に短縮することができます。さらに、これらの変更により、試料前処理に要するアセトニトリルの使用量を削減するとともに、メタノールを使用する必要はまったくなくなります。その結果、本方法で発生する廃棄溶媒の量も削減できると考えられます。

結果および考察

分離の改善

図1の結果はジョージア水族館で取得したものであり、試料の注入量は50 μ L、移動相のアセトニトリル(ACN)濃度は40%です。PZQのピーク形状が不良であることから、注入量がかかり多くオーバーロードであることが分かります。

図2以降のデータでは、Chromolith® HighResolution RP-18e 100-4.6 HPLCカラムを使用しました。

Partisil ODS3カラムを利用した図1の分析をChromolith HRを用いて実施しました。図2(紫色の線)は2 mg/LのPZQ標準試料(ACN中)を50 μ L注入した結果です。図1では14分を要した分析時間がChromolithカラムでは約2分まで短縮され、ピークの対称性も改善されました。海水試料の直接注入をシミュレートするため、3.5%のNaClを含む水で標準試料を調製しました(図2、緑色の線)。このクロマトグラムでは、注入溶媒がデッドボリューム中に拡散することによってベースラインが乱れていることが分かります。

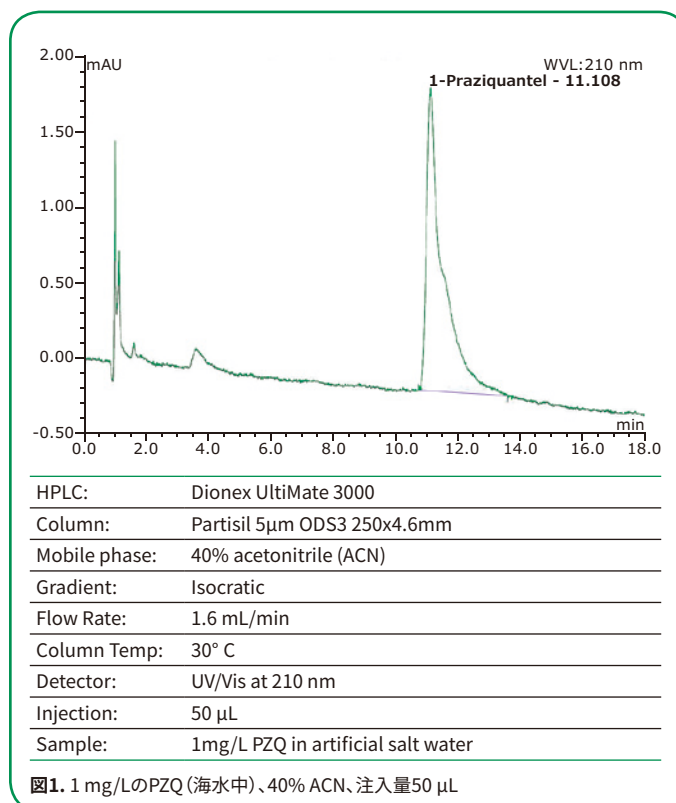


図3も2 mg/LのPZQ標準試料をChromolith HRIに注入した結果ですが、注入量を10 μ Lに減らしました。注入量を減らしても感度は維持され、ピークの変離能と形状が著しく改善されています。

図4は、移動相のアセトニトリル濃度を低くし、流速も1 mL/minまで低下した結果です。アセトニトリル濃度は40% (紫色の線)、50% (緑の線)、60% (黄色の線) です。

これらの実験結果より、分析時間が短く溶媒使用量も多くない、50%アセトニトリルの条件を採用することとしました (図4のクロマトグラムの緑色の線)。

以上の検討結果より、従来のDisneyの技法からHPLCによる分離工程を最適化して有機溶媒の使用量を削減し、分離効率を改善することができました。次のセクションでは、SPEによる前処理工程を省略した試料調製方法について説明します。

試料調製方法の改善

図5は、ジョージア水族館より提供された、5.2 mg/LのPZQを含む薬浴水試料10 μ LをSPEによる前処理なしで直接注入した結果です。この結果から、試料の前処理を省略しても分析に悪影響が出ないことが分かりました。

ジョージア水族館から得た薬浴水試料に10 mg/LでPZQを添加しました。図6は、5.2 mg/LのPZQを含む元の試料 (緑色の線) と添加試料 (紫色の線) を重ねたものです。

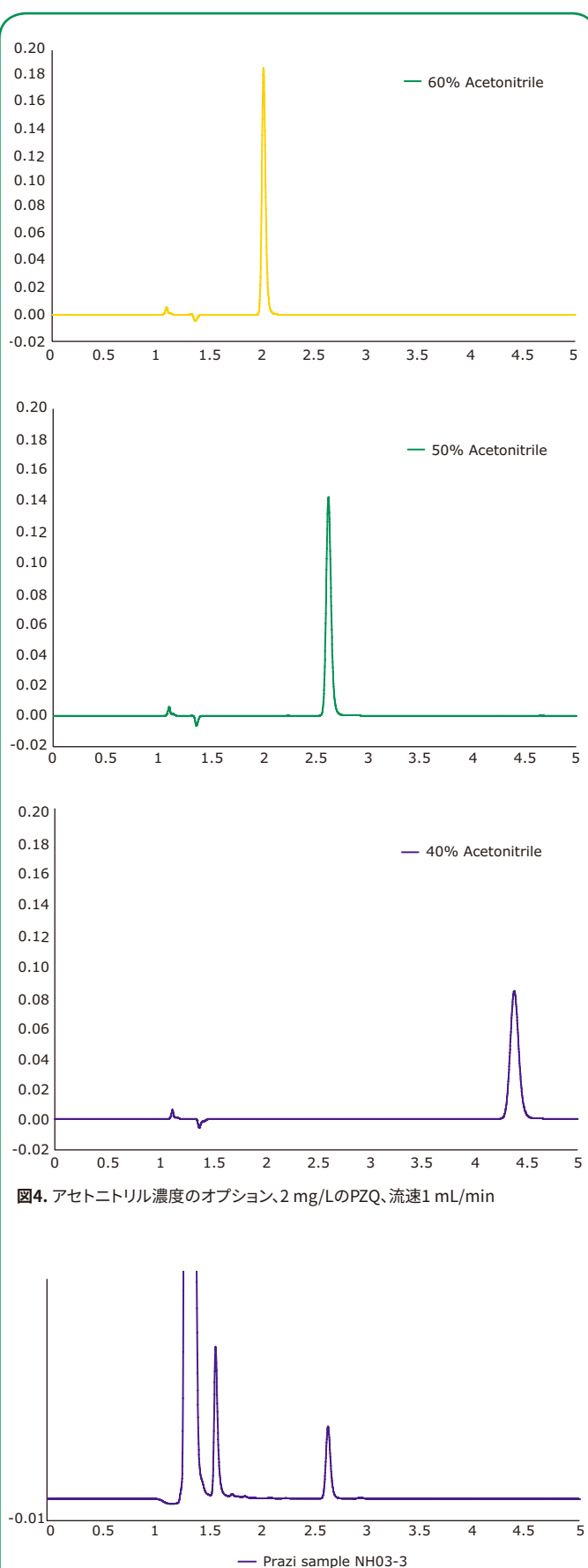


図4. アセトニトリル濃度のオプション、2 mg/LのPZQ、流速1 mL/min

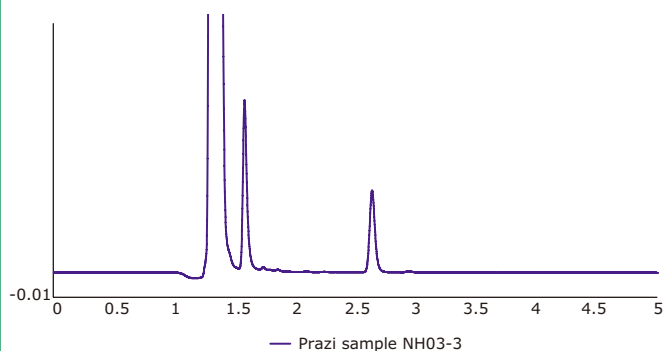


図5. ジョージア水族館から得た試料NH03-3の分析結果 (SPE抽出による前処理なし)

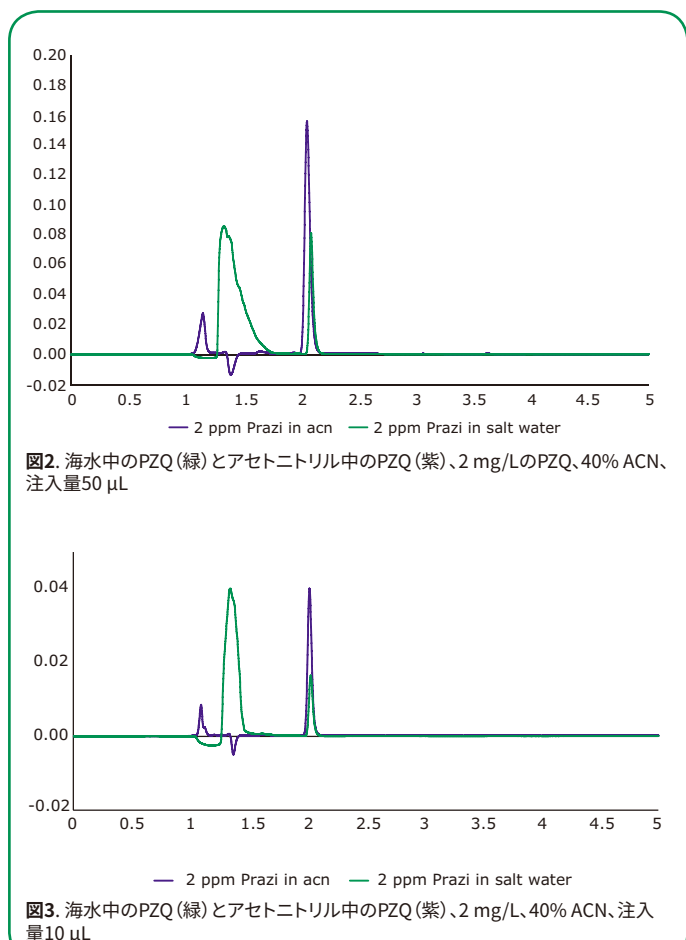


図2. 海水中のPZQ (緑) とアセトニトリル中のPZQ (紫)、2 mg/LのPZQ、40% ACN、注入量50 μ L

図3. 海水中のPZQ (緑) とアセトニトリル中のPZQ (紫)、2 mg/L、40% ACN、注入量10 μ L

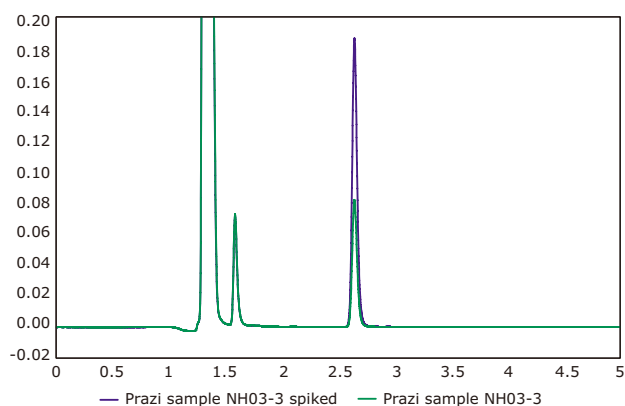


図6. ジョージア水族館から得た試料NH03-3、直接注入（緑）、10 mg/LのPZQを添加（紫）

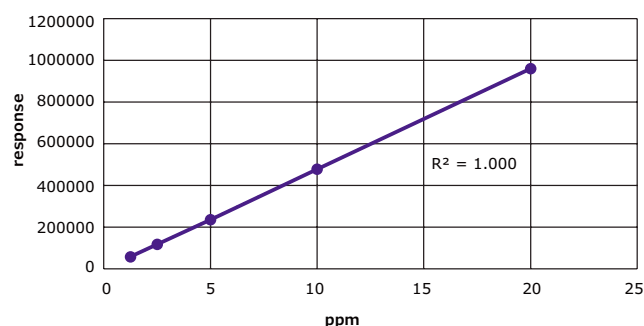


図7. 5種類の標準試料（1.25 mg/L～20 mg/LのPZQ（ACN中））から作成した検量線

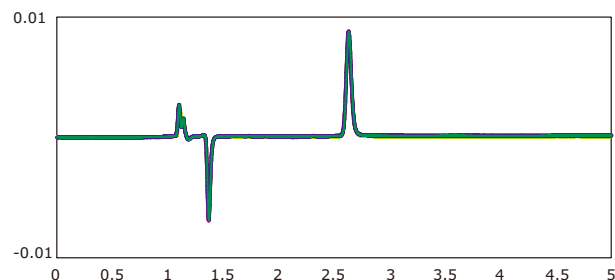


図8. 6回分のPZQ標準試料（0.625 mg/L）のクロマトグラムを重ねたもの

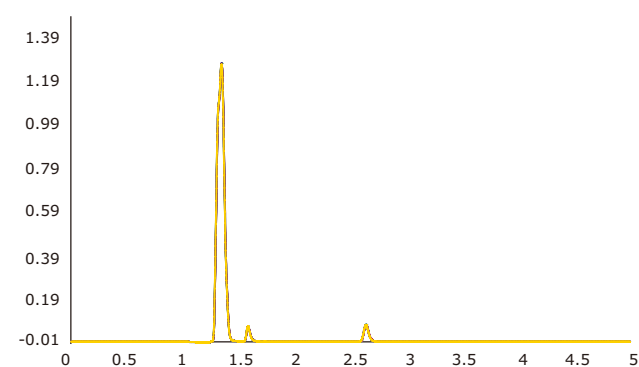


図9. ジョージア水族館のPZQ薬浴試料から得た混合試料を500回繰り返して連続注入したときの10回分の注入

薬浴試料の添加回収率を表1に示します。

表1. ジョージア水族館から得た薬浴試料の添加回収率

Sample	Determined Amount	Spike Amount	Spike Recovery
NH03-6 spiked	10.02	10.00	96.92%
NH03-6	0.33		
NH03-4 spiked	14.96	10.00	96.50%
NH03-4	5.31		
Water blank spiked	9.71	10.00	97.11%
Water blank	0.00		
3.5% Salt Water blank spiked	9.75	10.00	97.49%
3.5% Salt Water blank	0.00		

5種類の標準試料（アセトニトリルでPZQ 1.25mg/ml～20 mg/mlに調製）を使用して本HPLCシステムの検量線を作成しました。図7に検量線（相関係数は1.000）とデータを示します。

0.625 mg/Lの標準試料を6回繰り返して注入し検出限界（Method detection limit, MDL）を計算しました。表2と図8に示すデータより、T検定にもとづきMDLは0.015 mg/Lと計算されました。

表2. MDLの計算に使用した0.625 mg/L標準試料の繰り返し分析

Replicate	1	2	3	4	5	6	Avg	Sd	MDL*
ppm	0.674	0.675	0.676	0.686	0.678	0.675	0.677	0.004	0.015

*Students' t-test

海水試料のマトリックスを複数回注入することでカラム寿命に影響を生じるか否かを評価するために、ジョージア水族館から提供された混合試料を500回連続して注入しました。図9は、500回の注入シーケンス中の10回分の注入を重ねたものです。（50回ごとに）等しい間隔を空けて連続して注入しました。500回注入しても、保持時間と応答はいずれも安定していました。カラム圧力は、その間に約950 psiから1,800 psiに上昇しました。システムを90%水+10%ACNで洗浄すると、500回連続注入開始時の低いカラム圧力を容易に回復できました。これは、カラムとHPLCシステムをきれいに洗浄できることを示します。各試料の分析終了ごとに同様の洗浄ステップを含めることにより、システムの圧力を適切に維持することを推奨します。

表3に、SPEによる試料前処理を行う従来法と、本稿で開発した手法の比較を示します。試料はいずれもジョージア水族館で調製された薬浴水を用い、いずれの方法でも類似した結果が得られました。

（次のページへ続く）

表3. 試料前処理を含むSPE法と本稿で開発した手法の比較

Sample Name	Retention Time	Chromolith Method Result	Result from GA Aquarium SPE Method
Prazi sample NH03-1	2.635	nd	nd
Prazi sample NH03-2	2.645	5.17	5.1692
Prazi sample NH03-3	2.644	5.21	5.3906
Prazi sample NH03-4	2.644	5.32	5.6451
Prazi sample NH03-5	2.645	4.34	5.4443
Prazi sample NH03-6	2.646	0.20	1.3211
Prazi sample NH03-7	2.635	nd	nd
Prazi sample NQ01-1	2.635	nd	0.0627

結論

新しい方法により、HPLC分析に要する時間を試料当たり18分から5分に短縮できました。これは、研究室での時間とコストの節約をもたらします。モノリス型カラムは「夾雑物」を含む試料に耐えるため、海水試料を装置に直接注入できるのでSPEによる試料の前処理が不要になります。その結果、試料当たりの分析時間がさらに20分短縮されます。表4で概説したように、試料当たり合計約30分の短縮となります。

表4. 試料前処理を含むSPE法と本稿で開発した手法の所要時間の比較

Method Step	Time Per Sample (min)	
	SPE Method	New Method
SPE Extraction	20	0
Sample Prep for HPLC	3	3
HPLC Analysis	18	5
Total Time Spent:	41	8

さらに、SPEによる固相抽出が不要かつ分析時間が短縮されるため、アセトニトリルの消費量を84%削減することが可能です。そのため、本方法は研究室で生じる廃棄溶媒を低減し、より環境負荷の小さい手法と言えます。

この新しい方法は、95%を超える回収率と0.015 mg/Lの検出限界 (MDL) という、信頼性と感度に優れた結果をもたらします。新しい方法の開発によりPZQの検査効率とコスト効率が向上するため、薬浴水のモニター測定頻度を高めることが期待されます。

装置および分析条件

Final Method:	
instrument:	Waters Acquity Arc with PDA
column:	Chromolith® High Resolution RP-18 Endcapped 100 x 4.6 mm (1.52022)
mobile Phase:	50% Acetonitrile (AX0142) / 50% Water (Milli-Q)
flow Rate:	1 mL/min.
column Temp:	30 °C
detector:	PDA @220 nm
injection Volume:	10 µL
sample:	Seawater (Filtered)

References

1. Crowder, J. and T. Charanda. 2004. Determination of Praziquantel in seawater. 1st AQUALITY symposium. Oceanario De Lisboa, Portugal.
2. Xiao, S., B.A. Catto, and L.T. Webster, Jr. 1983. Quantitative determination of Praziquantel in serum by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 275: 127 – 132.

Featured Products

Description	Cat.No.
HPLC	
Chromolith High Resolution RP-18 Endcapped 100-4.6	1.52022
Solvents	
Acetonitrile: Omnisolv™*	AX0142
Water was from a Milli-Q® Advantage lab water system	
Standard	
Praziquantel VETRANAL™, 250 mg	46648

*only available in North America

Related Products

Chromolith High Resolution RP-18 Endcapped 150-4.6	1.52023
Chromolith HighResolution RP-18 Endcapped 5-4.6 guard cartridges (3 pieces)	1.52025
Chromolith 5-4.6 guard cartridge holder	1.52032
Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv™	1.00030

Chromolith HPLCカラムの詳細については[SigmaAldrich.com/chromolith](https://www.sigmaaldrich.com/chromolith)をご覧ください。

Millipore
Filtration, Separation & Preparation

Enjoy the Quality of Millex® Filters
SKIP THE PAIN

多検体のクロマトグラフィーサンプルの調製に。
吸引ろ過システム サンプリンティ G2の詳細はこちらから
merckmillipore.com/samplcity-jp





アレルギー誘発性フレグランス試験 — 認証標準物質 (CRM) とGC FID/GC MSアプリケーション

新しいIFRAメソッドのためのキャリブレーション用混合溶液をご提供

Markus Obkircher, Head of Reference Materials R&D, markus.obkircher@sial.com

Hanspeter Sprecher, R&D Senior Scientist, hanspeter.sprecher@sial.com

Leonard Sidisky, Gas Separations R&D Manager, len.sidisky@sial.com

Kathleen H. Kiefer, Principal Scientist, kathy.kiefer@sial.com

Matthias Nold, Global Product Manager Reference Materials, matthias.nold@sial.com



昨年、国際化粧品香料協会 (IFRA) は、欧州消費者安全科学委員会 (SCCS) の意見に応じて、アレルギー誘発の可能性のある57種類の香料物質の新しい試験方法を公開しました。これに対応して、EU 規則No. 1223/2009の改正も提案されています。

この新しい分析方法はIFRAの分析作業部会によって開発された方法であり、FIDまたは質量分析検出器を備えたガスクロマトグラフィー (GC-FIDまたはGC-MS) を使用し、香料原料およびオイル中の、0.002% (20 mg/kg) を超える濃度の香料物質57種類およびこれらに関連する異性体を同定、定量します。この新しい方法によって、複雑に混ざった香料物質の中から化学的に確定されたアレルギー原の存在をスクリーニングできるようになるでしょう。

本稿ではこれに対応した認証標準物質および従来のWax/PEG相と比べ、ユニークな選択性と安定性を有するイオン液体カラムを使用したGCの分析を紹介します。

混合溶液の認証標準物質 (CRM)

私達は複数の成分を混合溶液として調製した2種類の認証標準物質 (CRM) の提供を開始しました。これらの認証標準物質は上述した新しいIFRAメソッド用のキャリブラント、キャリブレーション用標準物質として使用するのに適しています。2種類の混合溶液中に含まれる各物質は主にアルコールとカルボニル化合物からなる一連の化合物クラスから構成されており、いずれも定量NMR (qNMR) 法により個別に特徴づけられ、含有量測定が行われています。qNMRは相対的な一次標準法であり、シグナル強度は共鳴

に寄与するプロトンの数に比例します。したがって、内部標準物質を介して、分析対象物質のシグナル強度を米国国立標準技術研究所が供給している標準物質 (NIST SRM) の異なる化合物に直接トレーサブルをとることが可能です。個々のqNMR法による認証は、ISO/IEC 17025認定に従い当社Buchs (スイス) にある製造拠点で開発され、確立された認証ワークフローに準じて行っています。

このワークフローではまず始めに、物質の吸湿性および揮発性といった一連の特性の予備的なテストを行います。さらに測定を続け、それぞれの分析対象物質とqNMR測定に使用する内部標準物質との適合性を確認します。

結果に直接的な影響を与えることから信頼性の高い計量値は必須であるため、度量衡的な方法で行います。感度の低い装置を使用すると計量手続きに由来する不確かさへの寄与が大きくなるため、特定の専用装置とマイクロ天秤を使うことが成功の鍵となります。分析対象となる成分の多くは沸点が比較的低い物質であるため、天秤の選択は最も重要になります。qNMR測定では質量分率 (g/g) の値が得られ、広く認められているNISTの一次標準物質を使うことで、SI単位への直接的なトレーサビリティを確立できました。加えて、早期に均質性および安定性に関する知見も得られました。なお、さまざまな異性体の中で対象とするピークがNMRで完全に分離できない場合には、その比はISO/IEC 17025認定に基づいてガスクロマトグラフィー (GC) 測定によって決定しました。

その後、ISO 17034認定ワークフローに従い、原料物質の重量を測定して溶解し、メチル-ブチルエーテルで希釈しました。得られた原料溶液を褐色のガラスアンプルに充填した後、GC-MSによる均質性試験を実施してこの工程の管理を行いました。

最終的なアンプルは保管温度の下、製品の全有効期間にわたっての安定性、および、保管温度よりも高い温度になると考えられるお客様の下への輸送中の安定性を保証するための試験を行いました。また、ISO 17034に完全に準拠させるため長期間安定性研究 (LTS) および加速安定性試験 (AST) をGC-MSにより実施しました。

安定性試験、均質性試験、およびqNMR測定から得られた結果はそれ自体がいずれも、認証書に成分ごとに含める全体の不確かさに寄与します。濃度の認証値、g/kgおよびg/L単位 (認証された20° Cの下で密度測定による) で示した各成分の全体の拡張不確か

さに加えて、認証書にはロット番号、有効期限日、意図された用途、認定印、作成および証明書を発行したケミストの署名が記載されています。

お客様にとって適切な溶液であることを保証するために、この認証標準物質は発売前に一連の研究室間比較研究の中で試験を行いました。

表1 に2種類の混合物の製品番号と組成を示します。これらの製品と認証書の見本は、当社のウェブサイト sigma-aldrich.com/fragrancestandards でご覧になれます。

表1. Fragrance Allergen Mixes A1 and A2 with Composition.
濃度は2,000 mg/kg (*を付した化合物は除く)。ロットに特有の認証値は製品とともに供給される認証書に記載。いずれの混合物も2 mLおよび5 mLのパッケージ(アンプル)で提供。

Fragrance Allergen Mix A1	Fragrance Allergen Mix A2
Cat. No.: 89131	Cat. No.: 16558
Qty.: 2 mL, 5 mL	Qty.: 2 mL, 5 mL
Solvent: Methyl-tert-butyl ether (MTBE)	Solvent: Methyl-tert-butyl ether (MTBE)
α-Amylcinnamyl alcohol	3-Propylidene phthalide
trans-Anethole	α-Acetyl Cedrene
Anise alcohol	Isoeugenyl Acetate
Benzyl alcohol	α-Amylcinnamaldehyde
β-Caryophyllene	Amyl salicylate
Cinnamyl alcohol	Benzaldehyde
Citronellol	Benzyl benzoate
Ebanol 1	Benzyl cinnamate
Ebanol 2	Benzyl salicylate
Eugenol	Butylphenyl methylpropional
trans,trans-Farnesol	Camphor
Geraniol	Carvone
Isoeugenol (E+Z)	Cinnamaldehyde
R(+)-Limonene	Neral
Linalool	Geranial
Menthol	Coumarin
α-Pinene	β-Damascenone (Rose Ketone-4)
β-Pinene	α-Damascone
α-Santalol	β-Damascone "E"
β-Santalol	δ-Damascone (Rose Ketone-3)
Sclareol	Dimethylbenzylcarbonyl acetate (DMBCA)
α-Terpinene	Eugenyl acetate
Terpineol, mainly α	Galaxolide 1
Trimethyl-benzenepropanol	Galaxolide 2
	Geranyl acetate
	Hexadecanolactone / Dihydroambrettolide
	α-Hexylcinnamaldehyde
	Hydroxycitronellal
	Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde - major
	Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde - minor*
	α-Isomethylionone
	Linalyl acetate
	Methyl salicylate
	Methyl-2-octynoate
	Salicylaldehyde
	Terpinolene
	α-Tetramethylacetyloctahydronaphthalene (ISO E™ α)*
	β-Tetramethylacetyloctahydronaphthalene (ISO E β)
	γ-Tetramethylacetyloctahydronaphthalene (ISO E γ)*
	Vanillin

* Compounds deviate from the nominal concentration of 2000 mg/kg

GC-FIDおよびGC-MSアプリケーション

ここからは、2種類の混合溶液中からイオン液体カラムを使用してアレルギーを分離した結果について説明します。**図2,3**に示すクロマトグラムは極性カラムであるSLB®-IL60iを使って得たものです。このSLB®-IL60iはwax/PEG相に似た極性を有し、ユニークな選択性を示します。また、ワックスカラム(**図1**)とは異なり、この極性カラムを使用するとベースラインの上昇を最小限に抑えられます(**図2**および**図3**)。IFRAの新しい方法¹では、FID(比較的高濃度の試料の場合)およびMSの使用を論じていることから、以下の図では、それぞれGC-FIDを使った場合(**図2**)およびGC-MSを使った場合(**図3**)のSLB®-IL60iのブリードの様子を示します。

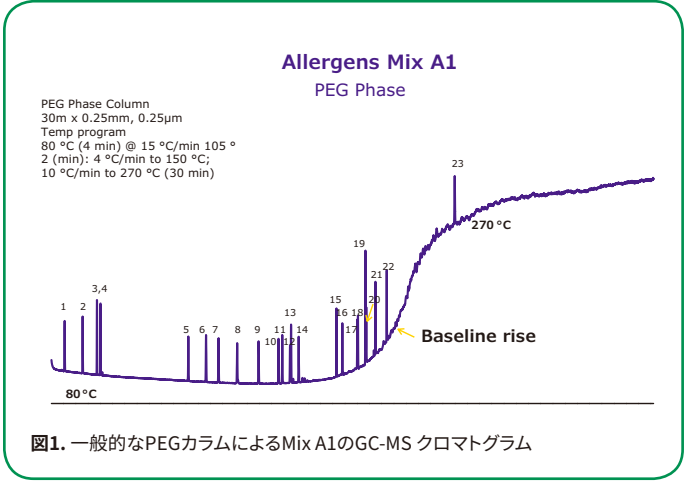


図1. 一般的なPEGカラムによるMix A1のGC-MS クロマトグラム

実験

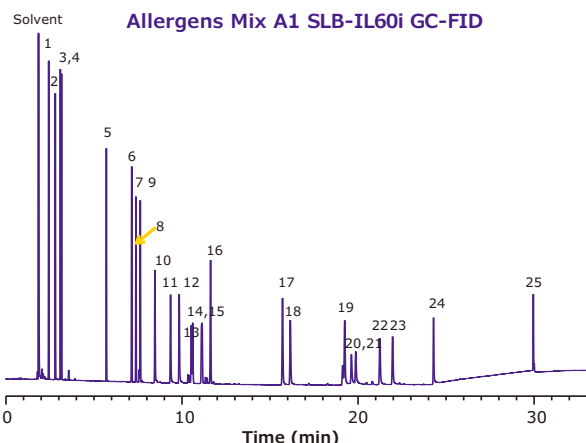
2種類の香料アレルギー試料Mix A1(**図2**)およびMix A2(**図3**)をMTBEに溶解し(100 µL/mL)、専用のイオン液体キャピラリーカラムを使用しGC-FIDまたはGC-MSにより、**表2**および**表3**の条件で分析を行いました。

表2. Mix A1のGC-FID法の分析条件(ピークの同定はGC-MS分離による)

Column:	SLB™-IL60i 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm (29832-U)
Inlet:	250 °C
Oven:	70 °C @ 10 °C/min. to 135 °C (2 min.); 3 °C/min. to 170 °C (1 min.); 10 °C/min.to 270 °C (3 min.)
Flow:	31.457 cm/s Helium
Detector:	FID: 310 °C
Liner:	Cup liner
Split:	100:1
Sample:	1 µL (100 µL Mix A1 cat. no. 89131 in 1 mL of MTBE)

表3. Mix A2のGC-MS法の分析条件

Column:	SLB-IL60i, 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm (29832-U)
Inlet:	250 °C
Oven:	70 °C @ 10 °C/min. to 135 °C (2 min.); 3 °C/min. to 170 °C (1 min.); 10 °C/min. to 270 (30 min.)
Flow:	1.06 mL/min. (38 cm/s) Helium
Detector:	GC-MS, Ion Source: 250 °C, Interface Temp.: 200 °C
Liner:	Splitless with wool (Shimadzu 221-48876-03)
Split:	100:1
Sample:	1 µL (100 µL Mix A2 cat.no 16558 in 1 mL MTBE)

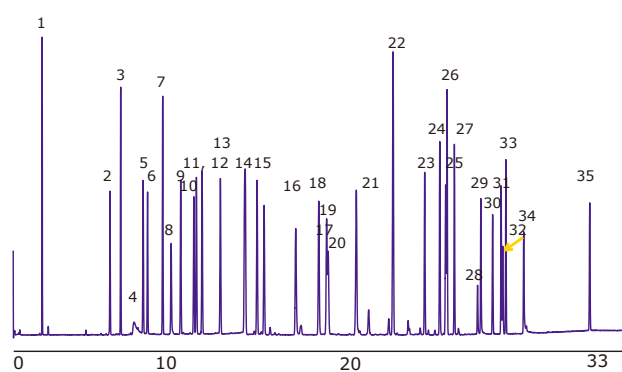


Peak IDs

- | | |
|---------------------------|------------------------------------|
| 1. α -Pinene | 14. Ebanol 2 |
| 2. β -Pinene | 15. Anise alcohol |
| 3. Limonene | 16. trans-Anethole |
| 4. α -Terpinene | 17. Trimethylbenzenepropanol |
| 5. Linalool | 18. Eugenol |
| 6. β -Caryophyllene | 19. Santalol isomer |
| 7. Menthol | 20. Cinnamyl alcohol |
| 8. γ -Terpineol | 21. trans,trans-Farnesol |
| 9. α -Terpineol | 22. Santalol isomer |
| 10. Citronellol | 23. Isoeugenol (E+Z) |
| 11. Geraniol | 24. α -Amylcinnamyl alcohol |
| 12. Benzyl alcohol | 25. Sclareol |
| 13. Ebanol 1 | |

図2. GC-FID Separation of Mix A1 on a SLB™-IL60i Column

Allergens Mix A2 SLB-IL60i GC-MS



Peak IDs

- | | |
|---|--|
| 1. Terpinolene | 20. Cinnamaldehyde |
| 2. Benzaldehyde | 21. Tetramethyl acetyl octahydronaphthalene (ISO E™ Super) - all Isomers |
| 3. Linalyl acetate | 22. Galaxolide 1 & 2 |
| 4. Salicylaldehyde | 23. α -Amylcinnamaldehyde |
| 5. Camphor | 24. α -Acetyl cedrene |
| 6. Methyl-2-octynoate | 25. Eugenyl acetate |
| 7. Geranyl acetate | 26. Hexadecanolactone / Dihydroambrettolide |
| 8. Methyl salicylate | 27. α -Hexylcinnamaldehyde |
| 9. Neral | 28. Vanillin |
| 10. Carvone | 29. Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde - major & minor |
| 11. Geranial | 30. 3-Propylidene phthalide |
| 12. Dimethylbenzylcarbonyl acetate (DMBCA) | 31. Isoeugenol acetate |
| 13. Damascone Isomer | 32. Coumarin |
| 14. β -Damasconone (Rose Ketone-4)/Damascone Isomer | 33. Benzyl benzoate |
| 15. α -Isomethylionone | 34. Benzyl salicylate |
| 16. Damascone Isomer | 35. Benzyl cinnamate |
| 17. Hydroxycitronellal | |
| 18. Butylphenyl methylpropional | |
| 19. Amyl Salicylate | |

図3. GC-MS of Fragrance Allergen Mix A2 on a SLB-IL60i Column

結果および考察

図2および図3から、2種類の香料アレルゲンMixのSLB-IL60iによる特徴的な分離の様子が見て取れます。いずれのクロマトグラムもベースラインの上昇は小さく、ユニークな選択性を示しています。図4には、香料アレルゲンMix A1に含まれるファルネソールおよびサンタロールの異性体をSLB-IL60iにより分離した例を一般的に使用されている他のカラム(ここでは方法は明示しません)と比較して示します。これらの化合物の分離では、イオン液体相が最も優れた選択性を示します。

まとめ

弊社では新しいIFRAメソッド用のキャリブレーション溶液を信頼性が高く高品質な2種類の調製済み認証標準物質として、香料メーカーや研究室に提供します。これは、パーソナルケア製品の安全性を向上させ、メーカーが顧客の信頼を維持できるという点で大きな進展です。

GC分析においては、SLB-IL60iイオン液体カラムが、香料物質の分析にこれまで使用されてきたキャピラリーカラムに取って代わります。SLB-IL60iではユニークな分離パターンが得られ、共溶出が起きることは稀です(この点は今後で論じる予定です)。また、従来のPEG/waxのような極性カラムと比較して、SLB-IL60iではカラムブリードが著しく低減されます。

SLB-5ms

PEG Phase

SLB-IL60i

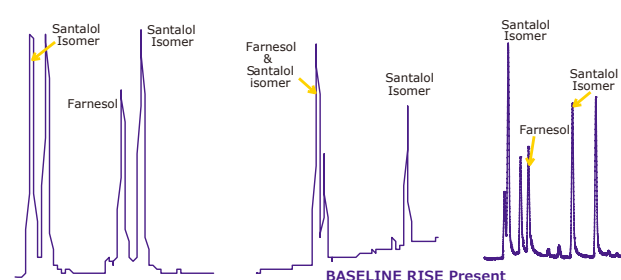


図4. 3種類のカラムによるサンタロールおよびファルネソールの分離比較

Reference

1. THE INTERNATIONAL FRAGRANCE ASSOCIATION (IFRA) Analytical Method to Quantify 57 Suspected Allergens (and Isomers) in Ready to Inject Fragrance Materials by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy, November 15th, 2016

Featured Products

Description	Qty.	Cat. No.
Fragrance Allergen Standard A1	2 mL/5 mL	89131
Fragrance Allergen Standard A2	2 mL/5 mL	16558
SLB-IL60i, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.20 μ m	1 ea	29832-U

COSMETICS & PERSONAL CARE

新製品 エッセンシャルオイルの標準物質

Matthias Nold, Global Product Manager Reference Materials, matthias.nold@sial.com

エッセンシャルオイル(精油)は、蒸気蒸留や他の抽出技術によって原料となる植物から得られる揮発性の疎水性液体です。これらはパーソナルケア、医薬品、アロマセラピー用として数世紀にわたって使用されてきました。

天然香料としてのエッセンシャルオイルの世界的な需要は急速に増加しており、利益を最大化するために、より安価な精油や合成

した化合物を意図的に添加されたものも見受けられます。このように添加された不純物の検出は非常に難しいことがあります。

一般的に、ガスクロマトグラフィーが最も使用されていますが、製品に存在しないと考えられる化合物を迅速に検出するため、またはフィンガープリントで製品の同一性を確認するために、HPTLCは、非常に効率的な方法です。

このような目的のため、私たちはHWI pharma servicesのさまざまな精油の標準物質を提供しています。これらの製品は、定量NMR(q-NMR)によって値付けされたHWI社の一次標準物質にトレサブルな、二次標準物質です。

各製品において、主成分の少なくとも1つについて質量パーセント値が提供され、いくつかの他の重要な成分についても定性されています。製品に添付されているリーフレットには、GCメソッドとクロマトグラムが記載されており、最新ロットについては、HPTLCのフィンガープリントも記載されています。

この度、このポートフォリオに10の新製品を追加しました。(表1) すべての製品を確認したい場合はWEBサイトにてご確認ください。please visit <http://www.sigma-aldrich.com/phytochem-jp>

表1. New essential oil reference materials

Cat. No.	Description	Quantitative Marker	Qualitative Marker	Package Size
05941501	Bergamot oil	Limonene	α -Pinene, β -Pinene, Linalool, Limonene, Geranyl acetate	1 mL
06031501	Cinnamon oil	Eugenol	Linalool, 1,8-Cineole, Eugenol	1 mL
06001501	Dwarf pine oil	α -Pinene	α -Pinene, β -Pinene, (+)-3- δ -Carene, Myrcene, Limonene	1 mL
05971501	Frankincense oil	α -Pinene, (+)-3- δ -Carene	α -Pinene, (+)-3- δ -Carene, β -Pinene, Limonene, γ -Terpinene, Sabinene hydrate, Terpinen-4-ol	1 mL
05981501	Lemon oil	Limonene	Limonene, β -Pinene, γ -Terpinene	1 mL
06011501	Mint oil	(-)-Menthol, (-)-Menthone	(-)-Menthol, (-)-Menthone, Limonene, Menthyl acetate, Isopulegol	1 mL
05991501	Pine needle oil	α -Pinene	α -Pinene, β -Pinene, (+)-3- δ -Carene, Myrcene, Limonene	1 mL
06021501	Sage oil	α -Thujone	α -Thujone, α -Pinene, D/L-Camphor, Bornyl acetate	1 mL
05961501	Spruce needle oil	(-)-Bornyl acetate	(-)-Bornyl acetate, α -Pinene, Camphene, (+)-3- δ -Carene, Limonene	1 mL
05951501	Ylang-ylang oil	Geranyl acetate	Geranyl acetate, Benzyl acetate, Linalool	1 mL

新規SPEカートリッジを使用した パプリカパウダー中のPAHsの分析

Katherine K. Stenerson, Principal R&D Scientist, katherine.stenerson@sial.com

緒言

パプリカは乾燥した甘トウガラシから作られるスパイスであり、さまざまな種類の料理の香り付けや色付けに使用されます。環境下や乾燥工程中にトウガラシ植物を多環芳香族炭化水素 (PAHs) に暴露すると、パプリカパウダーがこれらの汚染物質で汚染されるおそれがあります。料理や加工食品にハーブを使用することがますます増えてきているため、PAHs、特に発がん性のあるPAHsへの暴露が懸念されます。欧州連合 (EU) は、乾燥ハーブと乾燥スパイスに含まれる数種類のPAHsの最大許容レベルを規制するに至りました。特に、パプリカの最大許容レベルはベンゾ[a]ピレンが10 ng/g、ベンゾ[a]ピレン、クリセン、ベンゾ[a]アントラセン、およびベンゾ[b]フルオランテンの合計が50 ng/gと定められています¹。

ハーブとスパイスに含まれるPAHsの検査に使用する試料を調製するには、溶媒抽出とその後のクリーンアップステップが必要です。従来のクリーンアップ方法には、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、シリカゲルによる固相抽出 (SPE) などがありました^{2,3}。ここ数年、PAHsを分析する高バックグラウンド試料の新しいクリーンアップ法では、Florisil® 上層とZ-Sep/C18下層を含む二重層SPEカートリッジを利用するようになってきました。このカートリッジ (Supelclean™ EZ-POP NP) は食用油からのPAHs直接抽出と生物試料からの抽出物クリーンアップに使用されています^{4,5}。本研究では、最適化したQuEChERS抽出の後、EZ-POP NP SPE カートリッジでクリーンアップしたパプリカ試料のPAHsを分析しました。弱い吸着剤によるQuEChERSクリーンアップと比べて、EZ-POP NPによってはるかに高純度の抽出物が得られました。抽出方法の最適化とEZ-POP NPによるクリーンアップにより、10 ng/gの添加レベルで70%を超える回収率 (内部標準による補正なしで計算) が得られました。

実験

試料のパプリカは地元の食料品店で購入しました。方法の精度と再現性を評価するための試料には、表1に示すPAHsを含む混合物を10 ng/gの割合で添加しました。添加後、試料を1時間放置して平衡化してから抽出しました。試料抽出物は図1に示す手順で調製しました。抽出物は、図2に詳細を示すEZ-POP NPカートリッジを使用したSPEによってクリーンアップしました。分析は、表2に示す条件と表1のトランジションでGC/MS/MSにより行いました。GC分析直前に内部標準混合物を抽出物に添加し、分析装置のパフォーマンスを確認するために使用しました。試料は、無添加パプリカ抽出物を使用して作成したマトリックスマッチング検量線を用いて定量しました。

表1. 分析したPAHsとGC/MS/MS分析に使用したトランジション

Peak #	Compound	RT	MRM 1	CE	MRM 2	CE
1	Naphthalene-d ₈ (IS)	5.21	136/108	20	136/84	25
2	Naphthalene	5.25	128/102	20	128/78	20
3	Acenaphthylene	7.62	152/126	30	152/102	30
4	Acenaphthene	7.88	153/127	30	152/126	30
5	Fluorene	9.2	166/165	15	165/164	20
6	Phenanthrene	13.5	178/152	25	176/150	25
7	Anthracene	13.71	178/151	30	176/150	25
8	Fluoranthene-d ₁₀ (IS)	20.76	212/208	35	210/208	15
9	Fluoranthene	20.91	202/152	30	201/200	15
10	Pyrene	22.95	201/200	15	200/174	25
11	Benz[a]anthracene	29.42	228/226	30	114/101	10
12	Cyclopenta[cd]pyrene	29.72	226/225	30	226/224	40
13	Chrysene	29.81	228/226	30	113/112	10
14	5-Methyl chrysene (IS)	31.7	242/241	20	241/239	30
15	Benzo[b]fluoranthene	33.60	252/250	30	126/113	10
16	Benzo[k]fluoranthene	33.67	252/250	30	126/113	10
17	Benzo[j]fluoranthene	33.71	252/250	30	126/113	10
18	Benzo[a]pyrene	34.64	252/250	35	125/124	10
19	Perylene-d ₁₂	34.84	264/260	35	130/116	15
20	Dibenzo[a,h]anthracene	37.13	278/276	35	125/124	10
21	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	37.2	138/137	10	137/136	15
22	Benzo[g,h,i]perylene	38.13	138/137	15	137/136	15
23	Dibenzo[a,i]pyrene	41.77	302/301	20	302/300	40
24	Dibenzo[a,e]pyrene	43.27	302/301	40	302/300	40
25	Coronene (IS)	43.76	300/299	35	300/298	50
26	Dibenzo[a,i]pyrene	44.29	302/301	40	302/300	40
27	Dibenzo[a,h]pyrene	44.68	302/301	20	302/300	40

結果および考察

GC/MS/MS条件: 分析条件はPAHs用に最適化されました。感度とピーク形状を改善するために、注入ポートの高さとMS温度を高くするとともに、圧力パルス注入と内径2mmのインレットライナーを使用しました。オープン温度プログラムはAndersonらが使用したプログラムに基づいていたため、MRMトランジションでは識別不能なベンゾ[b]、[k]、および[j]フルオランテンなどの異性体をクロマトグラフィーで分離できるようにする必要があります⁶。この温度プログラムとGCキャピラリーカラム (SLB-PAHms) の組み合わせにより、すべての異性体群が十分に分離されました。図3にベンゾ[b]、[k]、および[j]フルオランテンの異性体の分離例を示します。これらの異性体は5%フェニルメチルシリコンや「X-5」タイプの液相では分離できません。

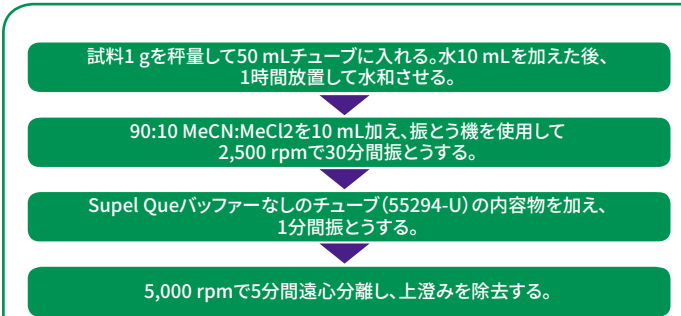


図1. パブリカ中のPAHsに使用する試料抽出手順



図2. EZ-POP NPを使用したSPEによるパブリカ抽出物クリーンアップ手順

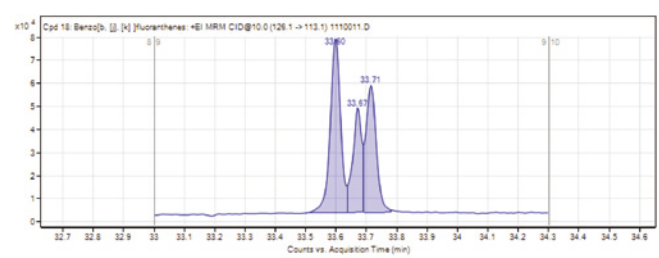


図3. SLB[®]-PAH MSカラム上でのベンゾ[b]、[k]、および[j]フルオランテンのGC/MS分析 (パブリカ抽出物に10 ppbで含有)

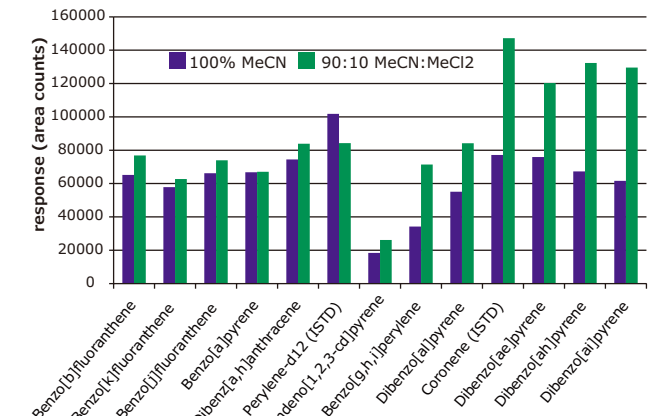


図4. 添加パブリカ (10 ng/g) からの5環および6環PAHs回収に対する抽出溶媒の効果

表2. GC分析条件

column	SLB [™] -PAHms, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 μm (28340-U)
oven	60 °C (1 min), 40 °C/min to 180 °C, 3 °C/min to 230 °C, 1.5 °C/min to 235 °C (10 min), 15 °C/min to 280 °C (3 min), 15 °C/min to 350 °C (15 min)
inj. temp	300 °C
carrier gas	helium, 0.8 mL/min, constant
detector	MRM, per Table 1
MS source temp.	250 °C
Quadrupole temps	200 °C (Q1 & Q2)
injection	1 μL, pulsed splitless (60 psi until 0.75 min, splitter on at 0.75 min)
liner	2 mm I.D. FocusLiner [™] with taper

試料調製手順の最適化

試料は、「QuEChERS法に類似した」方法に基づいて抽出しました。QuEChERSに通常使用される100%アセトニトリルから抽出溶媒の組成を最適化し、より質量が大きいPAHsの回収率を向上させました。図4に、10 ng/gで添加したパブリカから100%アセトニトリルおよび90:10アセトニトリル:塩化メチレン混合溶媒で抽出した、5環および6環PAHsの絶対感度を示します。抽出溶媒の効果のみ評価するために、得られた抽出物はSPEによるクリーンアップを行う前に分析しました。90:10混合溶媒を使用した5環および6環PAHsの回収率の方が良いことが感度の高さから示されます。予想通り、90:10混合溶媒を使用した抽出物の方が、油性残渣として認められる高いバックグラウンドを示しました。そのため、塩化メチレンの割合を高めた抽出溶媒の評価は行いませんでした。

EZ-POP NP SPEカートリッジを使用する方が、QuEChERS法によるクリーンアップより良好な結果が得られました。そもそも、EZ-POP NPカートリッジは食用油、特にオリーブオイル中のPAHs分析用に開発されました。アセトニトリルは分析物質の回収とバックグラウンドの保持を均衡させるため、食用油試料とともに使用するのが推奨される溶出溶媒です。従来の研究では、塩化メチレンを加えるとPAHの回収率は向上するものの、最終抽出物中のバックグラウンドの量が増えるという好ましくない副作用があることが示されていました⁴。しかし、パブリカの溶媒抽出物に含まれる油成分は極めて少ないため、クリーンアップ手法を改良し、バックグラウンドが許容できないレベルまで増えずに5環および6環PAHsの回収率を向上させることができました。具体的には、塩化メチレンを含むように溶出溶媒の組成を変更しました。図5に、EZ-POP NPクリーンアップ中にさまざまな溶出溶媒を使用して得た4～6環のPAHsの絶対感度の比較を示します。処理した試料は、パブリカ(10 ng/gを添加)を90:10アセトニトリル:塩化メチレンで抽出したものでした。溶出溶媒に塩化メチレンを加えると、すべてのPAHsの感度が増えました。いくつかの化合物で10%添加と20%添加での感度差が最小になりましたが、最終抽出物中のバックグラウンドは増えました。したがって、EZ-POP NPクリーンアップに使用する溶出溶媒として90:10アセトニトリル:塩化メチレンを選択しました。

バックグラウンドの低減

パブリカなどの乾燥試料の場合、弱い吸着剤を使用するQuEChERS法によるクリーンアップはバックグラウンドを許容できるレベルまで低減させる能力を備えていません。農薬の分析では、活性炭と第1級、第2級アミン(PSA)、またはアミノプロピル基で官能化したシリカを含む二重層SPEカートリッジをクリーン

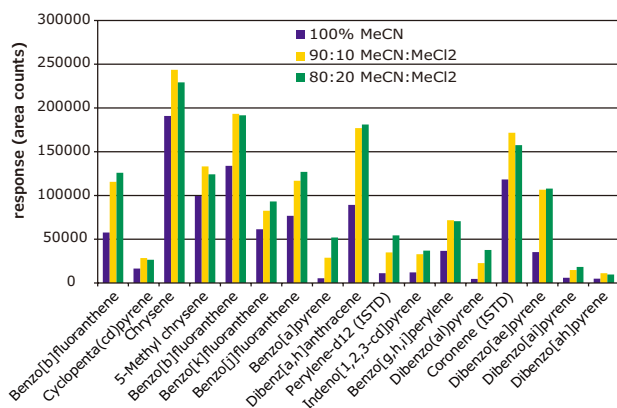


図5. 添加パプリカ (10 ng/g) からの4~6環PAHs回収用EZ-POP NPクリーンアップ中に使用する溶出溶媒組成の効果

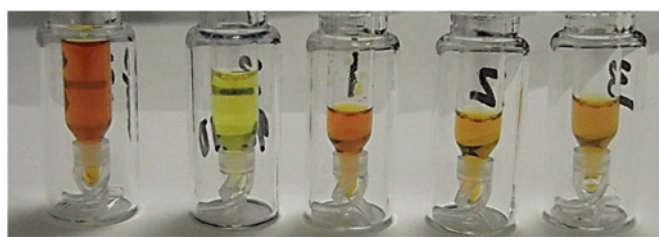


図6. EZ-POP NP SPE、および類似した吸着剤のQuEChERSを使用してクリーンアップしたパプリカ抽出物。Z-Sep、Z-Sep/C18、およびZ-Sep+はQuEChERSクリーンアップ

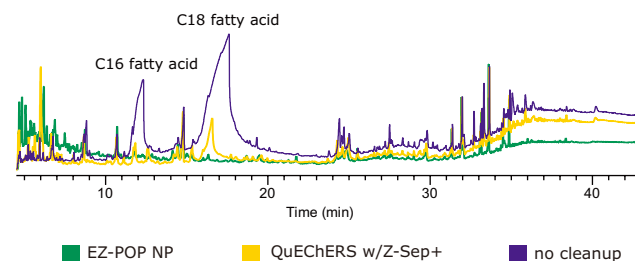


図7. パプリカ抽出物のGC/MSスキャンの比較 (EZ-POP NP、Z-Sep+を使用したQuEChERS、およびクリーンアップなし)

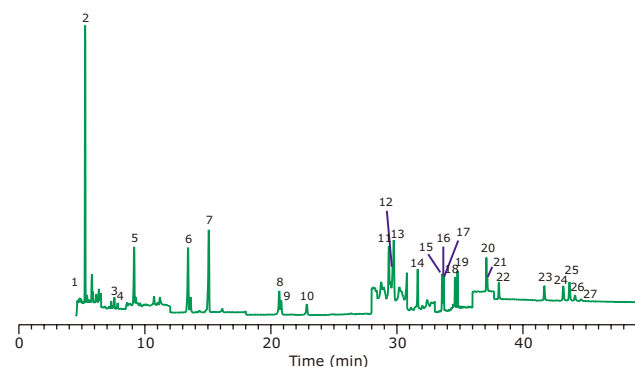


図8. 10 ng/gを添加し、EZ-POP NPでクリーンアップした後のパプリカに含まれるPAHsのGC/MS/MS分析。ピークIDは表1に示すとおりである。

アップに使用できますが、活性炭はこれらの化合物を強く保持して回収率を低下させるため、PAHsには使えません。EZ-POP NPは活性炭を含まないのでPAHsに適しています。EZ-POP NPカートリッジにあるものと類似した吸着剤を含む混合物を使用し、EZ-POP NPのクリーンアップ性能をQuEChERSと直接比較しました。90:10=アセトニトリル:塩化メチレンを使用して生成し、EZ-POP NPとQuEChERSでクリーンアップしたパプリカ抽出物を図6に示します。クリーンアップなしのものに比べていずれの方法でも色が薄くなり、EZ-POP NPで最も薄くなりました。Z-Sepでクリーンアップした試料には、瓶の内部にあるような油のいくつかの残留成分が認められました。比較のためにGC/MSスキャンを使用すると(図7)、EZ-POP NPクリーンアップでバックグラウンド(特に、C16およびC18脂肪酸の除去に関して)が最も低くなりました。比較に含めた3種類のQuEChERS吸着剤の中でZ-Sep+のバックグラウンドが最も低かったため、ここにはZ-Sep+のデータのみを示します。EZ-POP NPで最適化した最終的なクリーンアップ法を使用すると、図8に示すようにバックグラウンドのないすべてのPAHsを検出できました。

PAHsの添加回収率および未知試料の分析 10 ng/gを添加したパプリカ試料の分析に対する回収率と再現性のデータを表3に示します。回収率の値はすべて、内部標準による補正なしで測定した絶対的な値です。フルオレンとジベンゾ[a,h]ピレン以外の回収率は全般的に良好(> 70%)であり、RSD値は15%以下でした。フルオレンのピークとともに溶離するマトリックス干渉がいくつかあり(モニターした両MRMに存在)、ジベンゾ[a,h]ピレンの感度は添加により不安定であったために再現性が低下しました。

表3. 添加レベルが10 ng/g (n = 3)であるパプリカからのPAHs回収率および再現性

n=3	avg. % Recovery	% RSD
Naphthalene	124%	11%
Acenaphthene	78%	13%
Acenaphthylene	76%	15%
Fluorene	52%	27%
Phenanthrene	102%	4%
Anthracene	78%	12%
Fluoranthene	95%	7%
Pyrene	100%	3%
Benz[a]anthracene	99%	9%
Cyclopenta[c,d]pyrene	70%	12%
Chrysene	99%	6%
5-Methyl chrysene	91%	10%
Benzo[b]fluoranthene	89%	6%
Benzo[k]fluoranthene	82%	6%
Benzo[j]fluoranthene	97%	8%
Benzo[a]pyrene	91%	12%
Dibenz[a,h]anthracene	84%	6%
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	86%	12%
Benzo[g,h,i]perylene	80%	5%
Dibenzo[a,i]pyrene	108%	12%
Dibenzo[a,e]pyrene	82%	5%
Dibenzo[a,i]pyrene	108%	15%
Dibenzo[a,h]pyrene	147%	36%

添加回収率の測定に使用したパプリカに加え、さらに2種類のブランドを添加物なしで分析しました。1つには「燻製パプリカ」というラベルがあったため、はるかに高いレベルのPAHを含むと予想されました。いずれのブランドも繰り返して分析し、その結果

表4. 無添加パプリカ試料の分析 (RPD率 = 再現率)

n=2	Brand A		Brand B*	
	Conc. (ng/g)	%RPD	Conc. (ng/g)	%RPD
Naphthalene	69.8	5%	302	3%
Acenaphthene	3.0	10%	211.6	1%
Acenaphthylene	ND		27.7	4%
Fluorene	ND		272.2	6%
Phenanthrene	25.1	2%	2833	56%
Anthracene	ND		677	4%
Fluoranthene	ND		995	8%
Pyrene	ND		884	7%
Benz[a]anthracene	ND		177.6	7%
Cyclopenta[c,d]pyrene	7.1	1%	99	7%
Chrysene	ND		103.1	8%
5-Methyl chrysene	ND		0.6	25%
Benzo[b]fluoranthene	ND		10.8	5%
Benzo[k]fluoranthene	ND		ND	
Benzo[j]fluoranthene	ND		6.4	5%
Benzo[a]pyrene	ND		8.3	6%
Dibenz[a,h]anthracene	ND		ND	
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	ND		2.3	2%
Benzo[g,h,i]perylene	ND		2.6	5%
Dibenzo[a,i]pyrene	ND		ND	
Dibenzo[a,e]pyrene	ND		ND	
Dibenzo[a,i]pyrene	ND		ND	
Dibenzo[a,h]pyrene	ND		ND	

*燻製パプリカ

を表4にまとめました。ブランドAでは数種類のPAHsが検出されましたが、ハーブやスパイスに対するEUの限界値を超えるレベルのものはありませんでした。一方、燻製された試料は、EUの規制リストにある4種類のPAHsのすべてを検出可能なレベルで含んでいました。ベンゾ[a]ピレンは最大許容レベル(10 ng/g)未満でしたが、このPAHとベンゾ[a]アントラセン、クリセン、およびベンゾ[b]フルオランテンを合わせたレベルは、最大許容レベル(50 ng/g)をはるかに超えていました。これは、燻製加工によってPAHsが生成され、最終的にパプリカ中に蓄積したものと予想されます。しかし、燻製ハーブの消費量は一般的に少ないことから、EU規制では燻製ハーブに規制限界値を適用しないことを明確に規定しています。

感度とピーク形状の問題により、質量の重いPAHsをGC/MSによって低レベルで分析するのは困難場合があります。装置の性能は夾雑物を含む試料の注入に伴って急激に低下するおそれがあります。パプリカ抽出物の分析でもそうであるか確認するために、分析対象外である4～6環のPAHsの内部標準を分析前に抽出物に加えました。その後、これらの化合物の感度を測定全体でモニターしたところ、どの内部標準でも感度低下は観察されず、各エリアの偏差は15%以下でした。これは、本クリーンアップが厳密なGC法を生み出すのに十分であったことを示します。

結論

パプリカパウダーに低レベルで含まれるPAHsを分析するための試料調製法を開発しました。抽出プロトコールでは、塩化メチレンを抽出溶媒に加えて回収率を向上させる「改良QuEChERS」法を利用しました。クリーンアップは、塩化メチレンをアセトニトリル溶出溶媒に加え、EZ-POP NPカートリッジによるSPEを使用して達成しました。この改良により、4～6環のPAHsのほとんどで

絶対回収率が80%を超え、RSD値は15%未満になりました。SPE クリーンアップによって抽出物のバックグラウンドが低下し、特にC16とC18の脂肪酸は、弱い吸着剤を使用するQuEChERSクリーンアップと比べて大幅に低下しました。MRMで識別できない異性体群をクロマトグラフィーで分離するには、アプリケーション固有のGCカラム (SLB®-PAHms) のPAHs分析が必要でした。

References

1. Commission Regulation (EU) 2015/1933 of 27 October 2015 amending Regulation EC/1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa fibre, banana chips, food supplements, dried herbs and dried spices. *Off. J. Eur. Union* **2015**, L282/11.

2. Rozentale, I.; Lun, A. Y.; Zacs, D.; Bartkevics, V., The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in dried herbs and spices. *Food Control*. **2018**, 83, 45-53.

3. Monado-Maraña, O.; Pérez, R.L.; Escandar, G.M.; Muñoz de Peña, A.; Galeano-Díaz, T., Combination of liquid chromatography with multivariate curve resolution-alternating least-squares (MCR-ALS) in the quantitation of polynuclear aromatic hydrocarbons present in paprika samples. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 8254-8262.

4. Stenerson, K.K.; Shimelis, O.; Halpenny, M.; Espenschied, K.; Ye, M.M., Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in olive oil after solid-phase extraction using a dual-layer sorbent cartridge followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 4933-4939.

5. Cabillic, J.; Fallot, C., Final Report on the Feasibility Study of QuEChERS Extraction and / or Purification for Analysis of PAHs in Biota, AQUAREF Report 2015 - 22 p.

6. Anderson, K.A.; Szelewski, M.J.; Wilson, G; Quimby, B.D.; Hoffman, P.D., Modified ion source triple quadrupole mass spectrometer gas chromatograph for polycyclic aromatic hydrocarbon analyses. *J. Chrom. A*. **2015**, 1419, 89-98.

Featured Products

Description	Cat.No.
Supelclean™ EZ-POP NP SPE Cartridge	54341-U
SLB™-PAHms, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm	28340-U

多環芳香族標準物質の一覧は [SigmaAldrich.com/pahstandards](https://www.sigmaaldrich.com/pahstandards) をご覧ください。

Related Products

Sample Preparation	
Empty extraction tubes, 50 mL	55248-U
QuEChERS Shaker and Rack Starter Kit, USA compatible plug	55278-U
QuEChERS Shaker and Rack Starter Kit, EU Schuko plug	55438-U
Visiprep™ DL SPE Vacuum Manifold, 12 port	57044
Visiprep DL SPE Vacuum Manifold, 24 port	57265
Disposable Valve Liners, PTFE, Pk.100	57059
Solvents & Reagents	
Acetonitrile, SupraSolv™ for GCMS	1.00665
Methylene chloride, puriss ACS reagent grade	32222
GC Accessories	
Inlet Liner, Split/Splitless TypeSingle Taper FocusLiner™ Design (wool packed)	2879901-U
Molded Thermogreen™ LB-2 Septa, solid discs	28676-U
Thermo-O-Ring™ Inlet Liner O-Ring	21003-U
Gold-Plated Inlet Seal (Straight Design)	23318-U
Capillary Column Nut for Agilent® MS	28034-U
Vials	
Certified Vial Kit, Low Adsorption (LA), 2 mL, amber w PTFE-silicone septa, pk of 100	29652-U

食品分析の詳細については[SigmaAldrich.com/food](https://www.sigmaaldrich.com/food) をご覧ください。

高性能薄層クロマトグラフィー：薬用植物の迅速かつ効率的なフィンガープリント分析法

ジンセノサイド類の HPTLC フィンガープリント法

Tiên Do, Scientific Support Specialist / Deputy head of laboratory (CAMAG), tien.do@camag.com

Melanie Broszat, Scientific Business Development Manager (CAMAG), melanie.broszat@camag.com

Matthias Nold, Product Manager Reference Materials, matthias.nold@sial.com



高麗人参の主要な生理活性物質であるジンセノサイド類は、トリテルペンサポニンであり、その多くはC3位とC20位に様々な糖部分(グルコース、ラムノース、キシロース、アラビノースなど)を結合したダンマラン骨格(17個の炭素から構成される4環構造)からなります。これまでに30種を超えるジンセノサイド類が同定され、次の2つのカテゴリーに分類されました。

・20(S)-プロトパナキサジオール(PPD) (Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Rg3、Rh2、Rs1)

・20(S)-プロトパナキサトリオール(PPT) (Re、Rf、Rg1、Rg2、Rh1)

PPDは、C6位にカルボキシル基がある点がPPTと異なります。

さらに、数種の希少なジンセノサイド類(オコチロール系サポニンF11(24-R-プソイドジンセノサイド)、5環性オレアナン系サポニンRo(3,28-o-ビスデスモシド)など)も同定されました。オタネニンジン(Panax ginseng)は、一般に朝鮮人参(高麗人参)として知られています。

本稿では、CAMAG社の自動TLC装置、当社のTLCプレート、分析用標準物質、および抽出物標準物質を使用した、ジンセノサイド類の分析に適したHPTLC法を紹介します。この抽出物標準物質はHWI Analytik社が製造し、Merck Sigma-Aldrichが独占販売しています。

HPTLCフィンガープリント法では以下に示す3つの公定法に従い、標準物質の R_f 値と色および根抽出物のマッチングゾーンと比較して様々な種の朝鮮人参(根および根抽出物)のジンセノサイド類を検出します。どの規制に従うかによって、3つの同定法のいずれかを使用できます。

方法1: 欧州薬局方のモノグラフ(USP<203>)によるHPTLC法¹

方法2: 米国薬局方のモノグラフ(USP DSC 2015)によるHPTLC法²

方法3: HPTLC協会(HPTLC技術を向上させるための国際協会)の方法

推奨するCAMAG社の装置：

自動TLCサンプラー(ATS 4)、自動展開槽(ADC 2)、TLCビジュアライザー 2、クロマトグラム浸漬装置3、TLCプレートヒーター 3、およびvisionCATS。

誘導体化試薬：

アニスアルデヒド¹または硫酸試薬^{2,3}

試料：

70%メタノール溶液で抽出物(HWI)を0.015g/mlに調製しました。

注：**方法2**および**方法3**とは試料の調製方法が異なります。

標準物質：

ジンセノサイド類の標準溶液はメタノールで濃度0.5 mg/mLに調製しました。

注：**方法3**とはアプライ量が異なります。

方法1: USP<203>⁴に準拠したクロマトグラフィー：

TLCプレート: HPTLC Si 60 F₂₅₄ 20 × 10 cm (メルク社製)

試料のアプライ: 試料各4 μ Lと標準物質2 μ Lを下端から8 mm、左端から20 mmの位置に8 mmの帯状にアプライします^{1,3}。

注：**方法3**とは、試料の調製方法と標準物質および試料のアプライ量が異なります。

試料各4 μ Lと標準物質4 μ Lを下端から8 mm、左端から20 mmの位置に8 mmの帯状にアプライします²。

注：**方法2**とは試料の調製方法が異なります。

展開溶媒:酢酸エチル – 水 – ブタノール 25:50:100 (v/v/v) – 上層¹

ジクロロメタン – エタノール – 水 70:45:6.5 (v/v/v)²

クロロホルム – 酢酸エチル – メタノール – 水 15:40:22:9 (v/v/v/v)³

展開:自動展開槽ADC2は、使用前に塩化マグネシウム飽和水溶液で相対湿度33%で10分間コンディショニングします¹。

展開前に、ろ紙を用いてADC 2を展開溶媒で20分間飽和させます。プレートはMgCl₂

飽和水溶液で相対湿度が33%になるように10分間コンディショニングします^{2,3}。

展開距離:下端から70 mm^{1,2}、または下端から80 mm³

プレート乾燥:冷気流中で5分間

誘導体化:クロマトグラム浸漬装置3を使用してアニスアルデヒド試薬(p-アニスアルデヒド0.5 mL、氷酢酸10 mL、メタノール85 mL、および硫酸5 mLの混合物)にプレートを浸漬し(浸漬速度:3 cm/s、浸漬時間:0 s) 105° Cで5分間加熱します¹。

クロマトグラム浸漬装置3を使用して硫酸試薬(10%メタノール溶液)にプレートを浸漬し(浸漬速度:3 cm/s、浸漬時間:0 s)、100° Cで5分間加熱します^{2,3}。

評価:方法3の参考文献に従い、誘導体化した後、TLCビジュアライザー 2を使用して100° Cの白色光^{1,2,3}と366 nmの紫外線^{2,3}下で記録しました。

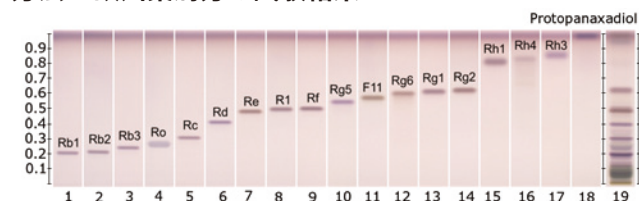
結果および考察

ジンセノサイド標準物質と *Panax ginseng* 根抽出物の HPTLC クロマトグラム

Method1 ~ 3の結果得られた誘導体化後のHPTLCクロマトグラムを以下に示します。

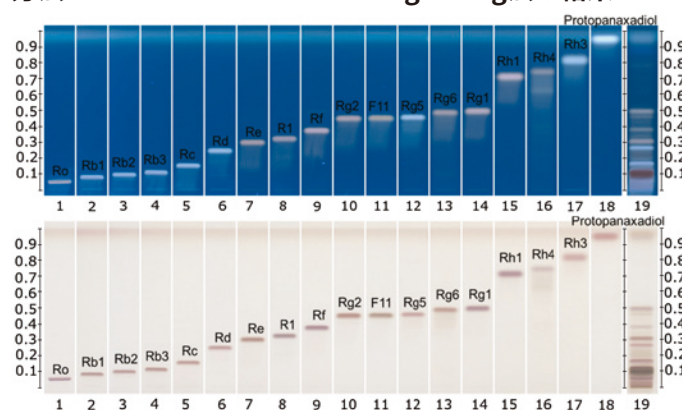
トラック1 ~ 17:ジンセノサイド類、**18:**プロトパナキサジオール、**19:***Panax ginseng*根抽出物(商品番号:05115001 バッチ:HWI01294)

方法1: 欧州薬局方の試験結果



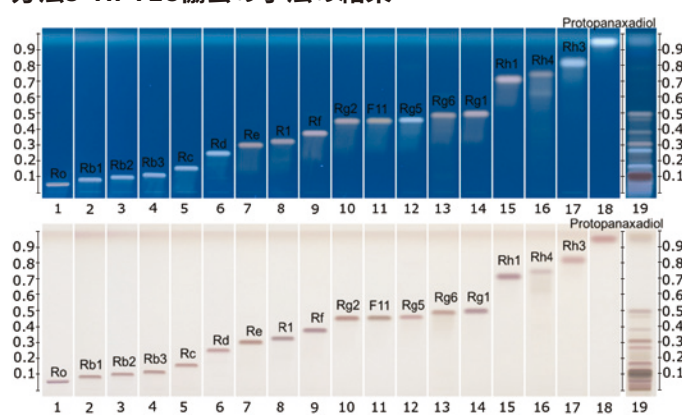
誘導体化後の白色光下HPTLCクロマトグラム

方法2: USP DSC 2015 Tianshi ginseng法の結果



誘導体化後のUV366 nmおよび白色光下HPTLCクロマトグラム

方法3: HPTLC協会の手法の結果



誘導体化後のUV366 nmおよび白色光下HPTLCクロマトグラム

ジンセノサイド類を含む植物(様々な種の朝鮮人参)の HPTLC クロマトグラム

P. ginseng、*P. quinquefolium*、*P. notoginseng*、*P. japonicus*、*P. vietnamensis*の根および根抽出物を収集して分析しました。植物の標準物質として*P. ginseng*根抽出物(商品番号:0511-50-01 バッチ:HWI01294)を使用し、オタネニンジン(ジンセノサイドRfは存在し、F11は存在しないと推定される)を同定しました。

ご存知でしたか？

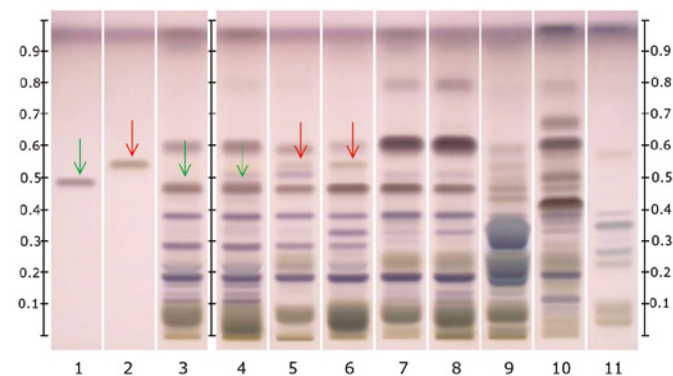
メルクは、ブリーディングの少ないTLC-MS用のプレートを取り扱っています！

詳細は以下URLより、最新のTLC総合カタログをご参考ください。

www.merckmilliporejp/tlc



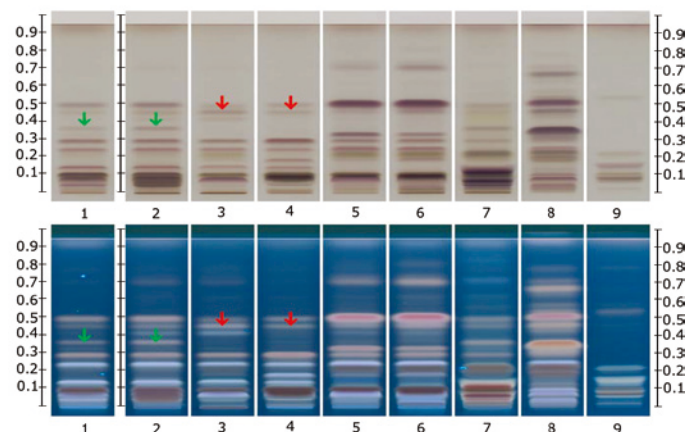
方法1: 欧州薬局方に準拠¹



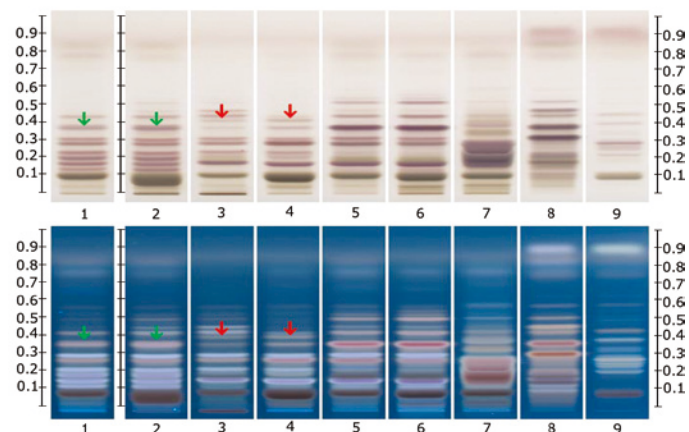
誘導体化後の白色光下HPTLCクロマトグラム

トラック1:ジンセノサイドRf(緑色の矢印)、**2:**ジンセノサイドF11(赤色の矢印)、**3:***P. ginseng*根抽出物(商品番号:0511-50-01 バッチ:HWI01294、ジンセノサイドRfを(緑色の矢印))、**4:***P. ginseng*根(ジンセノサイドRf(緑色の矢印))、**5:***P. quinquefolium*根抽出物(アメリカ人参、ジンセノサイドF11(赤色の矢印))、**6:***P. quinquefolium*根(アメリカ人参、ジンセノサイドF11(赤色の矢印))、**7:***P. notoginseng*根抽出物、**8:***P. notoginseng*根、**9:***P. japonicas*根、**10:***P. vietnamensis*根、**11:**野生のベトナム人参の根

方法2: USP DSC 2015 Tianshi ginseng法に準拠²



方法3: HPTLC協会法に準拠³



方法2および3のパラメーター

誘導体化した後のプレートを白色光およびUV366nm下でのクロマトグラム。ジンセノサイドRfを緑の矢印で、ジンセノサイドF11を赤の矢印で示します。

トラック1:*P. ginseng*根抽出物(商品番号:05115001 バッチ:HWI01294、ジンセノサイドRf(緑色の矢印))、**2:***P. ginseng*根(ジンセノサイドRf(緑色の矢印))、**3:***P. quinquefolium*根抽出物(アメリカ人参、ジンセノサイドF11(赤色の矢印))、**4:***P. quinquefolium*根(アメリカ人参、ジンセノサイドF11を(赤色の矢印))、**5:***P. notoginseng*根抽出物、**6:***P. notoginseng*根、**7:***P. japonicas*根、**8:***P. vietnamensis*根、**9:**野生のベトナム人参の根

本稿で示した方法はいずれも、様々な種の朝鮮人参に含まれるジンセノサイド類の検出に適しています。ジンセノサイドRfが朝鮮人参固有であるのに対して、F11はアメリカ人参だけに見られます。したがって、Rf/F11比は、アメリカ人参と朝鮮人参を区別する植物化学マーカーとして利用されます。今回使用した植物の標準物質(Panaxginseng 根抽出物、商品番号:0511-50-01)は、Rfは存在しF11は存在しないことがいずれの手法においても確認できている、朝鮮人参の同定に適しています。

方法1と2は、薬局方(それぞれ欧州薬局方、米国薬局方)のモノグラフに従っているという利点があります。**方法3は**HPTLC協会が提供する代替方法です。この方法ではRfとF11の分離が改善されており、アメリカ人参と朝鮮人参がさらに明確に区別されます。硫酸試薬で誘導体化する(**方法2と3**)とUV366 nm下で色の出方が変わるため、同定に便利です。

Featured Products

Description	Package Size	Cat. No.
Analytical Standards		
Ginsenoside Rb1*	10mg	170580
Ginsenoside Rb2	10mg	41868
Ginsenoside Rb3	10mg	42635
Ginsenoside Rc	5mg	44987
Ginsenoside Rd	10mg	01518
Ginsenoside Re*	10mg	03000590
Ginsenoside Re	10mg	77960
Ginsenoside Rf*	10mg	01580590
Ginsenoside Rg1*	10mg	00370580
Ginsenoside Rg2	10mg	08171
Ginsenoside Rg3	10mg	64139
Ginsenoside Rg5	5mg	43016
Ginsenoside Rh1	10mg	56805
Ginsenoside Rh3	5mg	43084
Ginsenoside Rh4	5mg	42776
Ginsenoside Ro	10mg	94381
Notoginsenoside R1	10mg	77089
Protopanaxadiol	10mg	62685
Protopanaxatriol	10mg	42476
Pseudoginsenoside F11	10mg	67530

*HWI reference standard

Featured Products (cont.)

Description	Package Size	Cat. No.
Extract Reference Material		
Panax ginseng extract	500mg	05115001
Quantitative Markers: Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1 and Rg2		
Qualitative Markers**: Ginsenoside Rb1 and Rg1		
(**: traceable to HWI primary pharmaceutical standards)		
TLC Plates		
HPTLC glass plate Silica gel 60 F254 20×10 cm	50 Plates	1.05642

References

1. Ginseng root: Monograph in Ph. Eur. 8.0, 01/2008:2383. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, France.
2. Tienchi Ginseng Root and Rhizome Dry Extract: Monograph in USP 40-NF35 (2017). United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, USA.
3. HPTLC identification method for *Panax ginseng*, HPTLC Association (www.hptlc-association.org) (accessed May 22, 2016)
4. <203> High-Performance Thin-Layer Chromatography Procedure for Identification of Articles of Botanical Origin in USP 39-NF34. (2016), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, USA

Find all available analytical standards for phytochemicals listed on

SigmaAldrich.com/medicinalplants

For all ginsenoside standards see

SigmaAldrich.com/panax

An overview of all plant extract reference materials can be found at SigmaAldrich.com/plantextracts

NUTRITIONAL SUPPLEMENTS

HWI Pharma Solutions社の新しい植物化学標準物質

Matthias Nold, Product Manager, Reference Materials, matthias.nold@sial.com



当社は、リュルツハイム(ドイツ)にあるHWI-Pharma Solutions社製標準物質を販売しています¹。2011年1月に最初の製品シリーズの販売を開始してから製品のラインナップを絶え間なく拡大し、現在の製品数は120を超えています。

定量値は定量NMR(qNMR)²で測定します。これは直接的な比較方法であり、マスバランス法に代わる有機化合物の定量法として利用されています。製品に添付された証明書にはクロマトグラフィー純度値も載っています。

最近、いくつかの新製品がポートフォリオに加えられました(表1参照)。完全なリストはSigmaAldrich.com/phytopharmaでご覧になれます。

表1. 新しく加えられたHWI社製植物医薬品標準物質

Description	Package Size	Cat. No.
Benzyl acetate	100mg	05880595
Berberine chloride	50mg	00900585
Carminic acid	25mg	03320585
(±)-β-Citronellol	100mg	05630590
Ectoine	100mg	02380595
Hydroxyectoine	100mg	02390595
Isoxanthohumol	25mg	05890580
DL-Kavain	25mg	05790585
Alpha-onocerin	10mg	05800590
Patchouli alcohol	10mg	05690595

References:

1. G. Förster, F. Michel, M. Nold; Analytix 1/2010 page 11.
2. M. Veith; Analytix 1/2010 page 14.

ファイトケミカル標準物質のWEBサイトはこちら
カタログもご用意しています

<http://www.sigma-aldrich.com/phytochem-jp>

生体高分子の分離を改善する BIOshell™ IgG 1,000 Å C4 UHPLCカラム

Cory E. Muraco, Senior R&D Scientist, Technology and Workflow R&D, cory.muraco@sial.com

緒言

モノクローナル抗体 (mAb) は、アルツハイマー病やパーキンソン病、潰瘍性大腸炎、多くの種類のがんをはじめとする様々な病気の治療を目的とし多くの製薬会社で広く製造されています。治療用組み換えmAbsの大部分は、免疫グロブリンスーパーファミリーのヒト免疫グロブリンG (IgG) カテゴリーに属します。

図1にIgG抗体の概略図を示します。一般的なIgG抗体は、ジスルフィド結合により2本の重鎖 (HC) につながる2本の軽鎖 (LC) からなります。さらに、LCとHCは高反応性側鎖をもつアミノ酸から構成されるため、IgGは翻訳後にとりわけリン酸化、メチル化、酸化、およびニトロシル化によって修飾されることがあります (翻訳後修飾)。これらの修飾によってmAbsの結合親和性が変化し、誤った抗原に結合したり、どの抗原にも結合しなかったり、細胞表面の誤ったレセプターに結合することがあり、バイオ医薬品のロット間差の原因となる恐れがあります。そのため、バイオ医薬品を製造販売する上ではロット間差を評価する厳格な方法を開発する必要があり、上述の翻訳後修飾は米国食品医薬品局 (FDA) と欧州医薬品庁 (EMA) の両方が監視する重要品質特性 (Critical Quality Attributes, CQAs) として知られています。規制機関がこのような厳格な要件を定めているため、バイオ医薬品の純度と構造を評価する正確、堅牢、かつハイスループットな方法を開発するための多くの研究がこの20年間に行われてきました。

超高性能液体クロマトグラフィー (UHPLC) は、生体高分子のキャラクタリゼーションを行う有効な手法として期待されており、バイオ医薬品の研究開発および品質管理 (QC) 研究所のほとんどが、この種の装置をすぐに利用できる準備を整えました。UHPLCはカラム外での拡散とデッドボリュームが小さく、装置の上限圧力が高いため、医薬品候補化合物の詳細な構造解析を可能にし、また品質管理部門においては1日あたり数百種類の試料を分析することも可能になりました。

UHPLC装置の進歩に加えて、HPLCカラムと固定相の開発分野でも多くの進展が見られました。現在、充填剤微粒子の形態としては、全多孔性粒子 (FPPs) と表面多孔性粒子 (SPPs、コアシェル粒子またはFused-Core™粒子とも呼ばれる) の2種類が市販されています。生体高分子のような大きな流体力学的半径をもつ分析種に対しては、UHPLC装置の拡散性が低いというメリットを活用するために粒子径サブ-2 µm、細孔径300ÅのFPPs充填カラムが用いられてきました。このようなカラムは2000年代半ばからごく一般的なものになりましたが、mAbsや抗体薬物複合体 (ADCs) のように大きなタンパク質や複雑なタンパク質を分析する場合は課題がありました。充填剤が全多孔性構造であるうえに、細孔径が分析種のサイズに対して小さいため、粒子内での分析種の拡散が制限されてしまうのです。このような構造は同時にvan Deemter式の物質移動項を増加させるため、ピークテーリング、分離能の喪失、および回収率の低下をもたらします。

近年、SPPsを充填したカラムが多く使用され、特にタンパク質やペプチドなど生体分子の特性評価が求められる場面で顕著に使用されています。歴史的には、1960年代終わりから1970年代初めにかけてHorvathとKirklandがSPPの概念を提唱し、SPP作製のための初期合成技法を開発しました^{2,3}。過去40年間の復活と再生を経て、現在、技術の進歩したSPPはいくつもの応用分野でUHPLCに使用されています。応用分野には、低分子医薬品の分離、農薬の分析、グリカンの分析、キラルの分離、高分子の分離などがあります。図2に、SPPの走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像を示します。SPPの中心に、非多孔質の核 (シリカコア) があることが分かります。

現在メルク・シグマアルドリッチで取り扱っている生体高分子分析用カラムBIOshellのラインナップには、サブ2µmのFPPsカラムの代替となるSPPカラムがあります。近年、新製品 BIOshell IgG 1,000 Å C4カラムも発売しました。このカラムには、多孔質層の厚みが0.5 µm、非多孔質の核の直径が1.7 µmの粒子径2.7 µmのSPPsが充填されています。細孔径は1,000 Åであるため、mAbsやADCs、そしてそれらよりはるかに大きな生体高分子の分析も可能です。SPP充填カラムにはFPP充填カラムを凌駕する利点が多くあります。まずSPPsは物質移動の面で大きな利点があり、

(次のページへ続く)

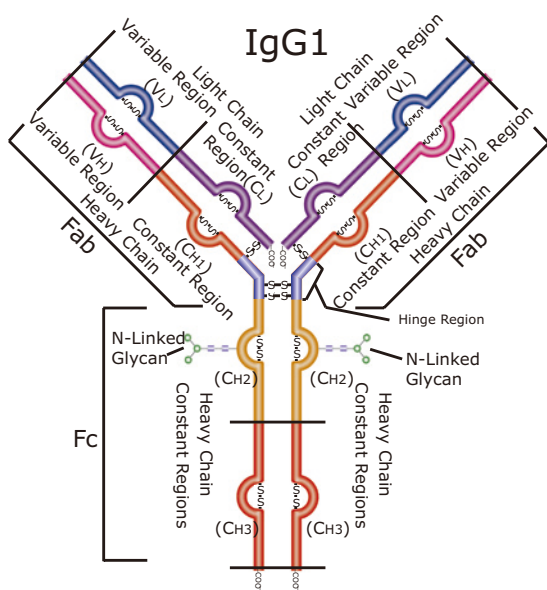


図1. 複雑なドメイン構造を有するヒトIgG1抗体の概略図。

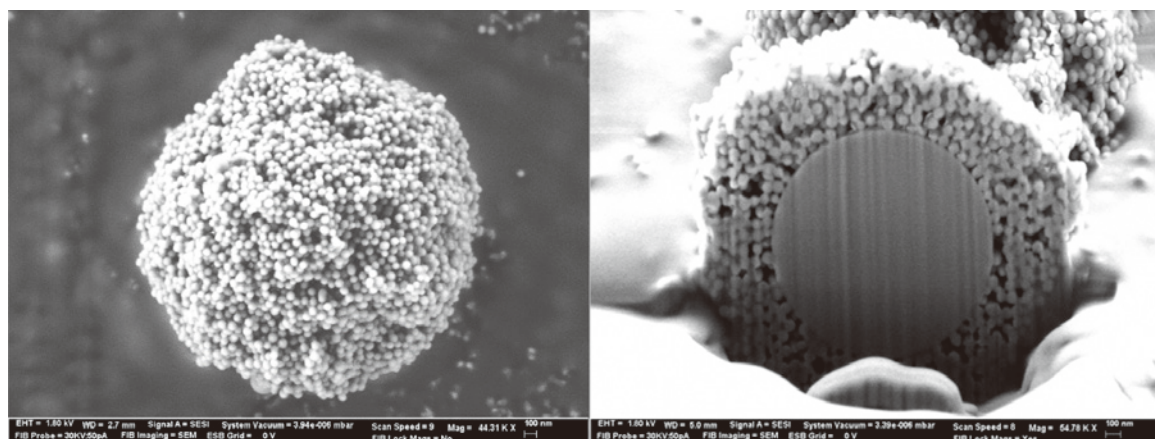


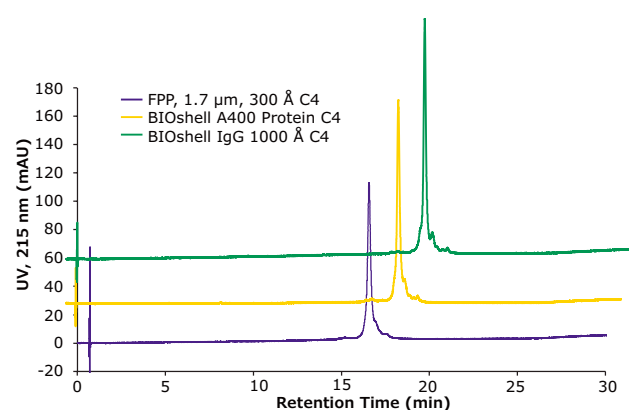
図2. BIOshell IgG 1,000 Å C4 SPP粒子のSEM画像。左: 粒子の多孔性外殻(シェル)、右: 非多孔質の核(シリカコア)を示す粒子断面図。データはAdvanced Materials Technology (AMT) 社提供。

バンド広がりを抑えられます。またSPP充填カラムはFPP充填カラムより均一に充填できるため、van Deemter式のエディ拡散(A項)が減少します。さらに、粒子径の大きなSPP充填カラムでもサブ2 μ mのFPPカラムと同等以上のカラム効率を有するため、カラム背圧の上昇に起因するオンカラム摩擦熱のリスクを抑えて速い流速での分析が可能になります。以下では、BIOshell IgG 1,000 Å C4カラムの利点を市販の高分子分析用FPPカラムと比較して記します。

BIOshell IgG 1,000 Å C4カラムの効率上の利点

前述のとおり、SPP粒子が持つ高いカラム効率は、主にSPP粒子内で拡散経路が短いことによる物質移動の増進によるものです。さらに、BIOshell IgGカラムの細孔径は1,000 Åと十分に大きいため、バンドの拡大や分離能の喪失につながる可能性があるサイズ排除の影響が最小限に抑えられます。これらの影響について、SigmaMAbモノクローナル抗体標準物質を3種類のカラム(BIOshell IgG 1,000 Å C4、BIOshell A400 Protein C4、および粒子径1.7 μ m、細孔径300 ÅのFPP充填カラム)で分析し比較した結果を図3に示します。BIOshell IgGカラムでは、メインピークである抗体のピーク半値幅が狭く、その周囲に見られる微量の変異体の分離も改善されていることがわかります。

図3に示される傾向が他のmAbsにもみられるを確認するため、同様の条件で複数のmAbsを分析し、ピーク半値幅とカラム効率を比較しました。図4にその比較結果をまとめます。BIOshell IgG 1,000 Å C4カラムではmAbsのピーク半値幅が0.23分を超えるものは1つもありませんでしたが、他の2つのカラムではこの値が常に高くなり他のmAbでも図3と同様の傾向が確認されました。



Conditions	
Column:	As indicated
Mobile Phase:	[A] 70:30 water (0.1% TFA): acetonitrile (0.1% TFA) [B] 50:50 water (0.1% TFA): acetonitrile (0.1% TFA)
Gradient:	0% B to 50% B in 25 min 50% B to 100% B in 5 min
Flow Rate:	0.4 mL/min
Column Temp.:	75 °C
Detector:	UV, 215 nm
Injection:	1.0 μ L
Sample:	SigmaMAb (MSQC4), 1 g/L, water (0.05% TFA)

図3. クロマトグラフィーによるSigmaMAb(組み換えIgG1抗体標準物質)の分析結果の比較

BIOshell IgGカラムによる物質移動の影響の低減

高流速でのカラム効率を評価する方法として、様々な流速での分析種のピーク容量を調べる手法があります。SPPsでは、van Deemter式の物質移動項が流速による影響を比較的受けないため、理論的には、流速を速くしてもピーク容量の変化は比較的小さいはずですが、一方、FPP充填カラムは物質移動の項が流速による影響を受けるため、高流速でピーク容量の変化が観察されます。SigmaMAbを分析種として、BIOshell IgG 1,000 Å C4カラム、BIOshell A400 Protein C4、および従来のFPP C4カラムで流速を

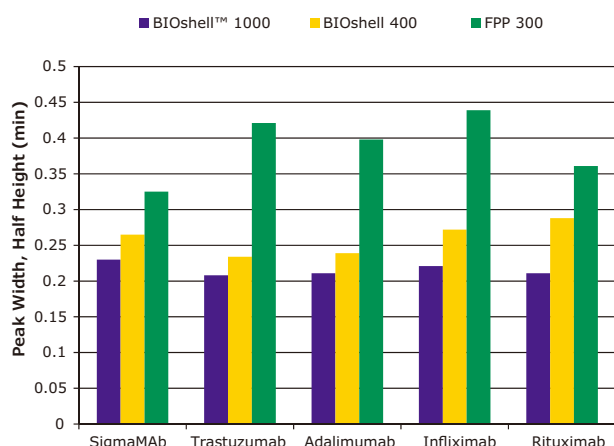


図4. モノクローナル抗体5種類のピーク半値幅の比較

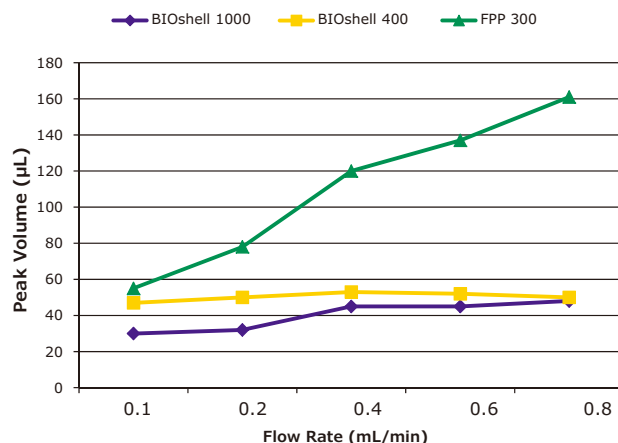


図5. 流速がSigmaMABのピーク容量に与える影響
2種類のSPP充填カラムは、FPPカラムに比べて傾きが緩やかであり、高流速で使用しても比較的シャープなピークが得られることが示されました。(分析条件は図3の条件よりグラジエント容量を10mlに維持。ピーク容量＝ピーク半値幅×流速。)

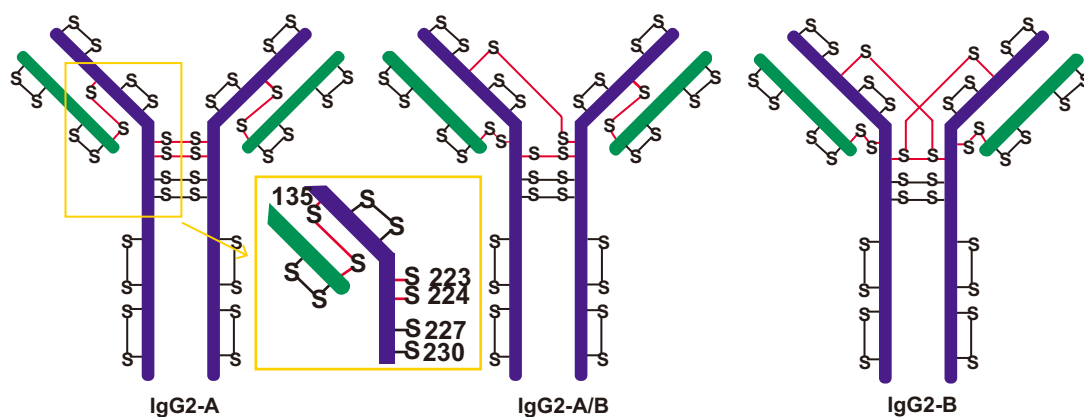


図6. IgG2抗体のジスルフィド結合アイソフォーム。
黄四角部分: ヒンジ領域のシステインのアミノ酸番号を示す。
赤線: ジスルフィド結合の組み換えが起こるSシステイン⁴。

変化させたときのピーク容量の変化を確認しました。図5に結果をまとめます。予想通り、2種類のBIOshell™カラムでは流速を速めてもピーク容量の変化が小さかった一方、FPP 300カラムではvan Deemter式のC項の影響による急激な増加が見られます。

BIOshell IgGカラムによるIgG2抗体のシステイン変異体の分離

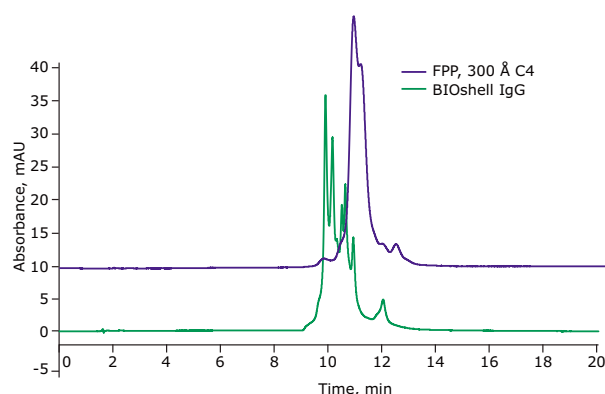
IgG2抗体はエフェクター機能活性が低いため、タンパク質治療薬として適したフォーマットになりつつあります。しかし、どのIgG2バイオ医薬品も、ヒンジ領域のジスルフィド結合パターンが異なるIgG2アイソフォームを様々な割合で含んでいます。図6に、IgG2抗体に考えられるいくつかのアイソフォーム⁴を示します。

これらのアイソフォームのうちいくつかは患者に免疫原性効果をもつ可能性があるため、バイオ医薬品のロット間再現性を確保するためにこれらの変異体を分離する手法が求められています。近年、BIOshell IgG 1,000 Å C4カラムを用いてこれらの様々な変異体を分離する手法が開発されました。図7に、FPP充填カラムとBIOshell IgGカラムを使用してIgG2抗体である Denosumab(デノスマブ)の様々なジスルフィド結合アイソフォームを分離した結果を示します。BIOshell IgGカラムを使用した場合、FPP充填カラムよりもジスルフィド結合アイソフォームの分離が大幅に改善することが確認されました。BIOshell IgGカラムを用いたこの分析手法と、酸化-還元増幅やチオールによるタグ化、質量分析などを組み合わせることで、図7のピークを同定および確認できると考えられます。

Conditions:

Column:	As indicated
Mobile Phase:	[A] 88:10:2 water (0.1% DFA): acetonitrile (0.1% DFA): n-propanol (0.1% DFA) [B] 10: 20:70 water (0.1% DFA): acetonitrile (0.1% DFA): n-propanol (0.1% DFA)
Gradient:	14% B to 24% B in 20 min
Flow Rate:	0.2 mL/min
Column Temp.:	80 °C
Detector:	UV, 280 nm
Injection:	2.0 µL
Sample:	Denosumab, 2.0 mg/mL, water (0.1% DFA)

図7. BIOshell IgG 1,000 Å C4カラムを用いたデノスマブの分析

**結論**

新薬の市場ではバイオ医薬品が徐々に増加しており、それらの純度測定が極めて困難な課題になると考えられます。こういった課題を解決するための新たなメソッド開発を行う上で、BIOshell IgG1,000 Å C4カラムのような新しいカラム技術が必要となります。SPPsを充填したBIOshell IgGカラムは、背圧を上昇させることなく高速・高効率な分離を可能にします。規制当局より、新薬の監視にさらなるCQAsを追加することが求められている現在、BIOshell IgGカラムはメソッド開発担当者に価値ある選択肢を提供することとなるでしょう。

当社で販売する生体高分子分析用カラム BIOshellの詳細については、SigmaAldrich.com/BIOshellをご参考ください。

References

1. C. E. Muraco, *LC/GC North America*, **35**, 734-745 (2017)
2. C. G. Horvath, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.*, **39**, 1422-1428 (1967)
3. J. J. Kirland, *Anal. Chem.*, **41**, 218-220 (1969)
4. L. M. Jones, W. Cui, H. Zhang, M. L. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **24**, 835-842 (2013)

Featured Products

Description	Cat.No.
BIOshell IgG 1000 Å C4, 10 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm	63288-U
BIOshell A400 Protein C4, 10 cm x 2.1 mm I.D., 3.4 µm	66825-U
EXP™ Pre-Column Filterset	51163-U
EXP Pre-Column Filter Cartridges	51164-U
SILu™ Lite SigmaMAb Universal Antibody Standard human	MSQC4
Water for chromatography (LC/MS Grade) LiChrosolv™	115333
Acetonitrile hypergrade for LC/MS LiChrosolv	100029
Trifluoroacetic acid, ≥99%, purified by redistillation, for protein sequencing*	299537

*Product available in North America

Related Products

BIOshell IgG, C4 2.7 µm Guard Cartridge 5mm x 2.1mm, Pk.3	63291-U
Guard Cartridge Holder, for use with Ascentis™ Express & BIOshell Guard Columns, pk of 1	53500-U
Trifluoroacetic acid for protein sequence analysis	1.08178

**Brighter
MABs**

BIOshell IgG 1000 Å
Fused-Core HPLC Columns

- IgGやそのフラグメント・凝集体、生体高分子の逆相分析に
- 90°Cでの高温分析が可能! 低pHでの優れた耐久性
- 大きなポアサイズでIgG凝集体の速い物質移動を実現し、優れた分離性能



www.sigma-aldrich/hplc-jp



Supelco®
Analytical Products

Supel™ Genie HybridSPE™オンラインカートリッジを用いた生体試料中のリン脂質除去および、LC/MS/MS分析

Hillel Brandes, Separations R&D, hillel.brandes@sial.com

緒言

リン脂質(PLs)は、血液、血漿、血清、脳脊髄液などに(mg/mLレベルで)存在します。多くの場合、PLsは試料調製中に様々な対象検体と一緒に抽出され、試料中に存在する脂質は、LC/MS分析において様々な問題を引き起こすものとして知られています。PLsは、MS検出においてイオン化抑制を引き起こすおそれがあります。PLsはまた、逆相(C18、C8など)カラム上に蓄積する傾向もあり、分離を損ね、カラムの寿命も縮めます。したがって、PLsを除去しないとLC/MS分析の精度、再現性、および感度が大幅に損なわれる原因となります。

低分子のLC/MS分析に先立って生体試料からリン脂質を選択的に除去するため、HybridSPEリン脂質除去技術が開発されました。この技術は、ジルコニア粒子の親和性を利用してリン脂質と選択的に結合し、それを除去します。この技術は、96穴プレートとミニカラムカートリッジという、2つの製品形状で数年前に発売されました。ここでは、リン脂質除去の代替として、新しい製品形状であるオンラインカートリッジについて説明します。LC/MSカラムを備えるオンラインカートリッジ装置を考案し、タンパク質を沈殿させた血漿試料からリン脂質を除去する効率を評価しました。物理化学的特性が異なる3セットの化合物群を用いて、システム適合性を検証しました。

実験

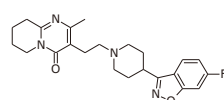
材料

Supel Genie HybridSPEオンラインカートリッジ(長さ2 cm×内径4.0 mm)、ラット血漿K2-EDTA(Lampireカタログ番号7306407)、タンパク質沈殿溶媒:1%のギ酸を含むアセトニトリル、または1%(w/v)のギ酸アンモニウムを含むメタノール。

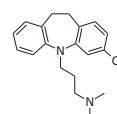
試料処理手順:血漿試料と沈殿溶媒を1:3の割合で混合し、ラット血漿または検体を混ぜたラット血漿からタンパク質を沈殿させました。次に、混合物を10,000 rpmで3分間遠心分離し、得られた上清をLC/MS分析用に収集しました。

3 sets of analytes

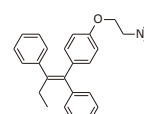
セット1: Basic analytes



Risperidone

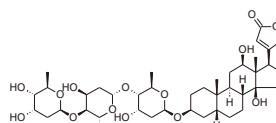


Clomipramine

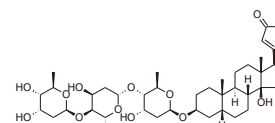


Tamoxifen

セット2: Polar neutral analytes

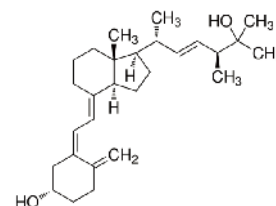


Digoxin

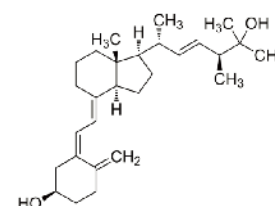


Digitoxin

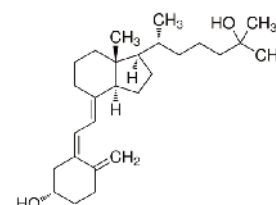
セット3: Non-polar neutral analytes



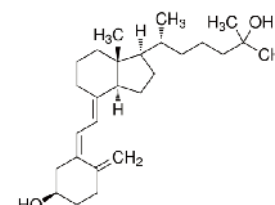
25-Hydroxyvitamin D₂



3-*epi*-25-Hydroxyvitamin D₂



25-Hydroxyvitamin D₃

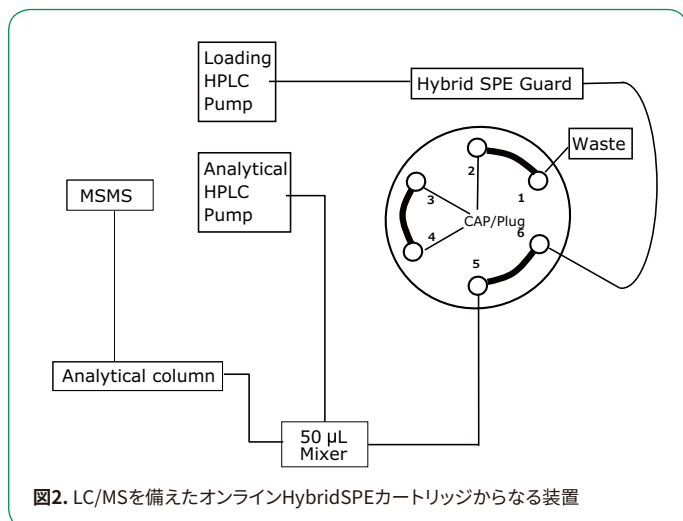


3-*epi*-25-Hydroxyvitamin D₃

(次のページへ続く)

HybridSPE-LC/MS装置

この装置は、図2に示すようにHPLC分離用のポンプと、タンパク質沈殿試料をロードしてHybridSPEオンラインカートリッジを洗浄するための2つのポンプから構成されています。試料ローディング移動相とHPLC分離移動相を混合するため、50 μ LのT字管を採用しています。試料をHPLCカラムにロードしたら、二位置切換弁によりカートリッジの洗浄が可能になります。



セット1検体および2検体のためのHybridSPE-LC/MS分析条件

Instrument:	Shimadzu™ LCMS-8030 with 2DLC setup
HPLC column:	Ascentis™ Express F5 10 cm x 2.1 mm (53569-U)
Mobile phase:	(A) Water/10 mM ammonium formate; (B) methanol
Gradient:	0% B% for 4 min, to 75% B in 0.5 min, held for 8 min
Flow:	0.3 mL/min
Column temperature:	45 °C
Sample loading flow:	0.1 mL/min
Sample loading solvent:	methanol with 10 mM ammonium formate
Injection Vol:	1 μ L
Detection:	MS, ESI(+), MRM mode

セット3検体のためのHybridSPE-LC/MS分析条件

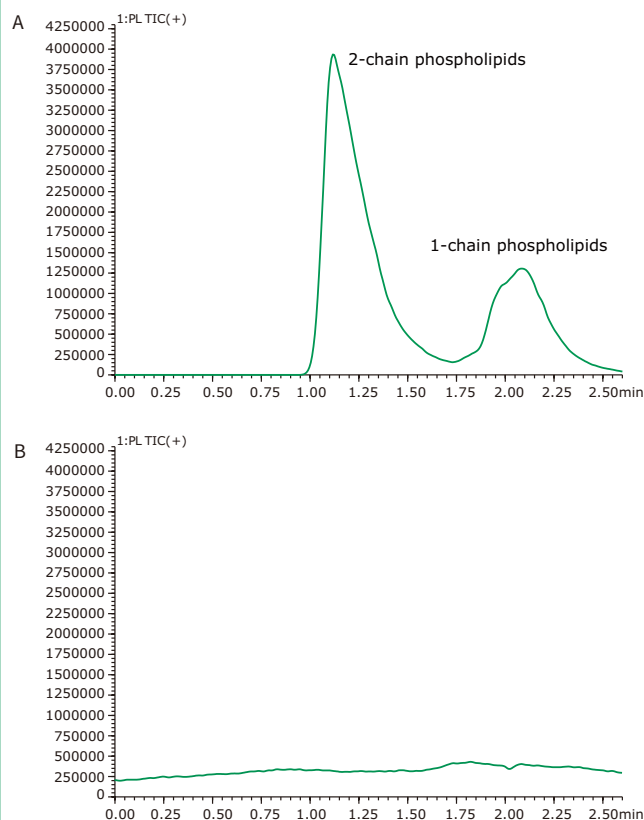
Instrument:	Shimadzu™ LCMS-8030 with 2DLC setup
HPLC column:	Ascentis Express C18 5 cm x 2.1 mm (53822-U)
Mobile phase:	(A) Water; (B) 90% Acetonitrile, each with 10 mM ammonium formate
Gradient:	0% B% for 4 min, to 80% B in 2 min, held for 1.5 min
Flow:	0.3 mL/min
Column temperature:	35 °C
Sample loading flow:	0.1 mL/min
Sample loading solvent:	80% acetonitrile with 50 mM ammonium formate
Injection Vol:	1 μ L
Detection:	MS, ESI(+), MRM mode

リン脂質検出におけるHybridSPE-LC/MS分析条件:

Instrument:	Shimadzu™ LCMS-8030 with 2DLC setup
HPLC column:	Ascentis Express OH5 5 cm x 2.1 mm (53749-U)
Mobile phase:	(A) Water; (B) 90% Acetonitrile, each with 10 mM ammonium formate
Isocratic:	85% B
Flow:	0.3 mL/min
Column temperature:	35 °C
Sample loading flow:	0.2 mL/min
Sample loading solvent:	90% acetonitrile with 10 mM ammonium formate
Injection:	1 μ L
Detection:	MS, ESI(+), MRM mode
Phospholipid ions:	precursor ions 496, 520, 522, 524, 758, 782, 786, and 810, product ions are all 184

結果および考察

Supel Genie HybridSPEオンラインカートリッジは、タンパク質を沈殿させた1 μ Lの血漿試料を100回以上注入しても、リン脂質を除去できるように設計されています。図3(A)は、除去されなかったラット血漿中のリン脂質によって高強度のブロードピークが2つ生じることを示します。2つのピークは、1本および2本のアシル鎖を含むリン脂質にそれぞれ対応します。HybridSPEオンラインカートリッジ(図2)では、同じラット血漿試料における120回目の注入でもリン脂質のピークは検出されません(図3(B)参照)。この結果から、タンパク質を沈殿させた1 μ Lの血漿試料を120回連続して注入しても、Supel Genie HybridSPEオンラインカートリッジがリン脂質を除去できることが実証されました。



Supel™ Genie HybridSPE™オンラインカートリッジにおけるシステム適合性が、塩基性および中性化合物を含む3セットの検体で実証されました。図4～6から分かるように、測定したどの検体でも、ピーク幅が6 s未満、テーリング係数が0.9～1.3である対称

的なピークが認められました。表1に、オンラインSPE法を使用した時における標的化合物の回収率と再現性を要約します。測定したどの検体でも94～102%の回収率が得られ、1～5%の再現性が実証されました。

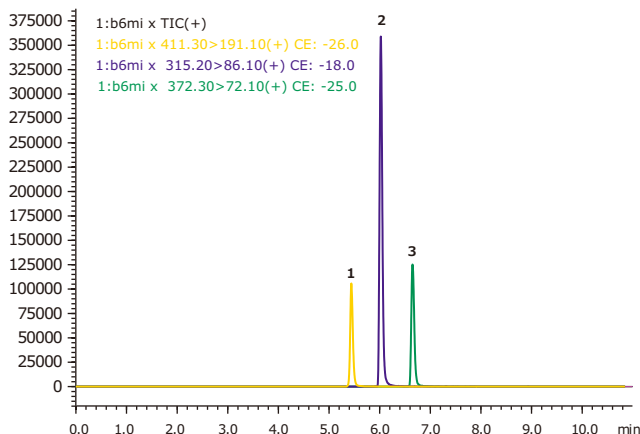


図4. Set-1: Basic analytesの代表的なLC/MSクロマトグラム

Peak	Analyte	Peak width at 50% height (s)	Taliling factor
1	Risperidone	3.54	1.2
2	clomipramine	3.78	1.3
3	Tamoxifen	3.36	1.2

- どのピークもシャープで、ピーク幅は4 s未満
- ピークは対称でテーリング係数は1.2～1.3
- ベースラインは低くノイズがない。妨害ピークは認められない

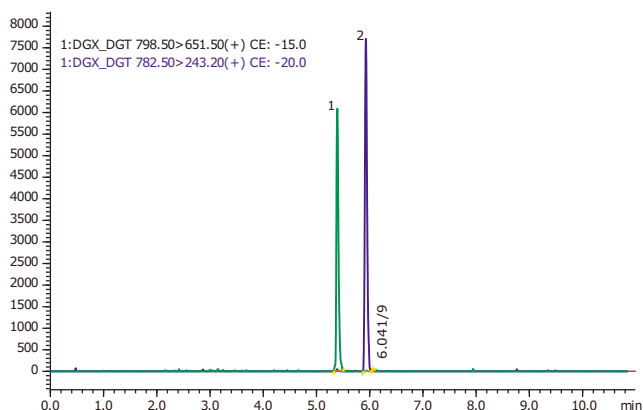


図5. Set-2: Polar neutral analytesの代表的なLC/MSクロマトグラム

Peak	Analyte	Peak width at 50% height (s)	Taliling factor
1	Digoxin	2.52	1.3
2	Digitoxin	2.70	1.2

- 両方のピークともシャープで、ピーク幅は3 s未満
- ピークは両方とも対称でテーリング係数は1.2～1.3
- ベースラインは低くノイズがない。妨害ピークは認められない

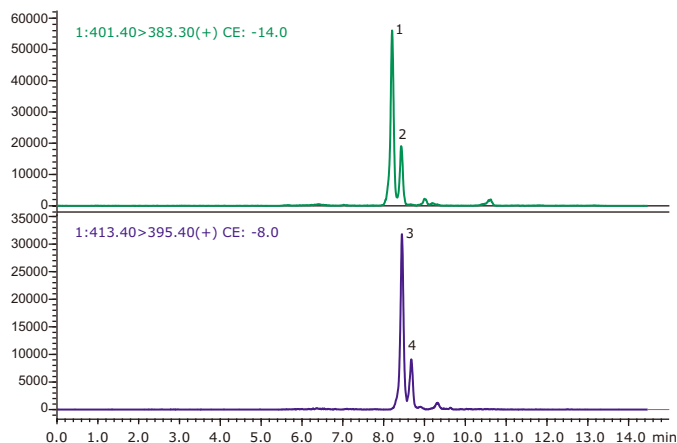


図6. Set-3: Non Polar neutral analytesの代表的なLC/MSクロマトグラム

Peak	Analyte	Peak width at 50% height (s)	Taliling factor
1	25-OH D3	4.74	0.9
2	3- <i>epi</i> -25-OH D3	4.80	0.9
3	25-OH D2	4.62	1.0
4	3- <i>epi</i> -25-OH D2	5.10	0.9

- どのピークもシャープで、ピーク幅は6 s未満
- ピークは対称でテーリング係数は0.9～1.0
- ベースラインは低くノイズがない。妨害ピークは認められない

表1. 検体の回収率および再現性

Analyte	Retention time (mm)	MRM Quantifier	Avg. Recovery*	%RSD, n=20
Digoxin	5.4	798.5/651.5	96%	4.9
Digitoxin	5.9	782.5/243.2	97%	2.2
Risperidone	5.4	411.3/191.3	102%	1.5
clomipramine	6.0	315.2/86.1	94%	1.1
Tamoxifen	6.6	372.3/72.2	98%	1.4
25-OH D3	8.2	401.4/383.3	102%	1.2
3- <i>epi</i> -25-OH D3	8.4	401.4/383.3	102%	2.5
25-OH D2	8.4	413.4/395.4	100%	2.0
3- <i>epi</i> -25-OH D2	8.6	413.4/395.4	99%	4.2

* The recovery was calculated by comparison of the peak area of the spiked analytes in plasma to those of the neat analytes at the same concentration.

まとめ

LC/MS分析におけるリン脂質除去用オンラインカートリッジの開発に成功しました。性能試験において、1 µLの血漿試料をオンラインカートリッジに120回連続して注入した後も、95%を超えるリン脂質を除去できることが実証されました。LC/MS検出部を備えたオンラインHybridSPEを使用する3つのアプリケーションが確立されました。検体の回収率は94%～102%、再現性は1%～5%です。試験した検体全てで、ピーク幅が6 s未満、テーリング係数が0.9～1.3であるシャープで対称的なピークが認められました。

Featured Products

Description	Cat. No.
Sample Preparation	
Supel Genie HybridSPE On-line Starter Kit	55324-U
Supel Genie HybridSPE On-line SPE Cartridge, pk. of 2	55326-U
Supel Genie HybridSPE On-line SPE Cartridge, pk. of 6	55327-U
LC	
Ascentis Express C18 5 cm x 2.1 mm, 2.7 µm	53822-U
Ascentis Express F5 10 cm x 2.1 mm, 2.7 µm	53569-U
Ascentis Express OH5 5 cm x 2.1 mm, 2.7 µm	53749-U

Related Products

Description	Cat. No.
Sample Preparation	
Supel Genie RP-Amide On-line Starter Kit	55516-U
Supel Genie RP-Amide On-line SPE Cartridge, pk. of 2	55519-U
Supel Genie RP-Amide On-line SPE Cartridge, pk. of 6	55522-U
Supel Genie C8 On-line Starter Kit	55274-U
Supel Genie C8 On-line SPE Cartridge, pk. of 2	55512-U
Supel Genie C8 On-line SPE Cartridge, pk. of 6	55515-U
Solvents	
Water for chromatography (LC/MS Grade) LiChrosolv™	1.15333
Acetonitrile hypergrade for LC/MS LiChrosolv	1.00029

ご存知でしたか？

タンパク・リン脂質除去に有効な前処理用固相 ハイブリッドSPEは、96ウェルプレートの製品もご用意しています！

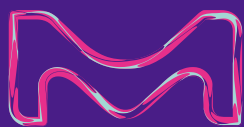
詳細はこちらから

[SigmaAldrich.com/hybridspe](https://sigmaaldrich.com/hybridspe)

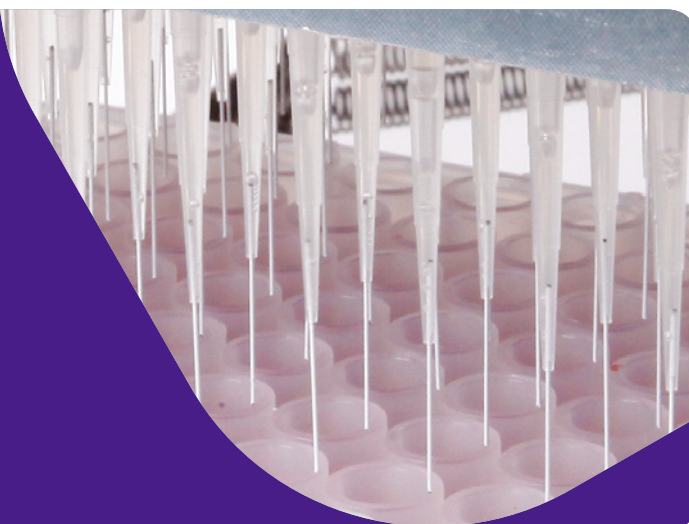
streamline
your sample prep

SPME LC (BioSPME) Tips

Microsampling and Sample
Preparation in one step



[SigmaAldrich.com/biospme](https://sigmaaldrich.com/biospme)



LC/MS測定における感度アップのコツ

Stephan Altmaier, Head of Instrumental Analytics R&D, stephan.altmaier@merckgroup.com

緒言

LC/MSによる高感度分析を達成するためには、超高純度溶媒と試薬を使用すること、そしてサンプルと移動相が接触するすべての配管、消耗品やシステムを慎重に取り扱うことが重要です。サンプル調製からMSでの検出に至る全プロセスにおいて汚染を防ぐことができれば、感度を向上することが可能となります。

以下のセクションでは、LC/MSの感度と検出限界(LOD)を最大化する様々な手段を示します。どのヒントもイオンサプレッション、付加体形成、バックグラウンドノイズの上昇、およびスペクトルの複雑化を引き起こすコンタミネーションの防止につながります。

概要 — 溶媒と添加剤

LC/MSに使用する代表的な溶媒として、水、アセトニトリル、メタノール、イソプロパノール、n-プロパノールなどがあげられます。また、分析種のプロトン化や脱プロトン化を行うために、酸(ギ酸など)、塩基(アンモニアなど)、緩衝剤(酢酸アンモニウムなど)といった添加剤が使用されます。

これらの溶媒と添加物の品質はMSの検出感度に大きく影響を及ぼすため、MSグレードの溶媒と超高純度の添加物を利用することが不可欠です。このような試薬には、LC/MSグレードであることを示すラベルが貼付されています。

メルク・シグマアルドリッチでは、アセトニトリルやメタノールなどのHPLC用溶媒として、イソクラティックグレード、グラジエントグレード、およびLC/MS用ハイパーグレードという3つのグレードのラインナップを取り揃えています。MS分析にはハイパーグレードの溶媒を使用し、最高の性能を確保するとともに信頼性の高い結果を保証する必要があります。

水については、ボトル水または純水装置(Milli-Q®)で精製した超純水が、MSでの使用に適しています。水の消費量が少ない場合はボトル水が好ましい一方、消費量が多い環境では純水装置(Milli-Q®)の使用が推奨されます。Milli-Q®システムはタイプIの水を供給するため、LC/MS分析に最適です。Milli-Q®システムは、水質の維持や改善のために定期的なメンテナンスが必要です。

緩衝剤は、移動相のpHをクロマトグラフィー分離に適した条件に調整し、分析種のプロトン化・脱プロトン化をエレクトロスプレーイオン化のプロセスに適した条件にするために使用されます。LC/MSでは、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、トリエチルアミンといった揮発性の緩衝剤と添加物のみ利用する必要があります。不揮発性緩衝剤(硫酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩など)を使用するとMSイオン源内で析出するため、最終的に手間のかかる洗浄工程が必要になります。緩衝剤の濃度が高いと、イオンサプレッションが発生する可能性があります。

緩衝剤は分析種Mをイオン化しますが、アンモニウム、ギ酸塩、酢酸塩などとの付加体 [M+緩衝剤] が形成される可能性があります。そのため、特定のm/z値を持つ付加信号がスペクトル内に生じて定量分析が損なわれる可能性があります。したがって、食品、体液、組織などの塩濃度が高い試料には、固相抽出法(SPE) (Supel™-Select HLB、またはLiChrolut™およびSupelclean™カートリッジなど)を使用した脱塩ステップを推奨します。

一般に酸・塩基はそれらの塩よりも純度が高いため、LC/MSに使用する緩衝剤は酸と塩基を滴定して調製する必要があります。塩の試薬を使用しなければならない場合は、使用する塩のMS分析を事前に行い、汚染物質が含まれていないか、含まれている場合はどのような種類の汚染物質であるかを確認する必要があります。

溶媒や添加剤中の不純物・汚染物質は、カラムの固定相上に蓄積し、グラジエント分析中にゴーストピークとして溶離するおそれがあります(図1)。特に、グラジエント分析の前に逆相カラムを水の比率が高い条件下で平衡化した場合に生じる可能性があります。平衡化を行わなかった場合でも、汚染物質の濃度が高い、汚染物質の保持が強い、またはグラジエント初期条件の水の比率が高い場合にもゴーストピークが現れる可能性があります。グラジエント分析でのゴーストピークを回避するには、カラムの平衡化時間

分析条件:

装置:	Bruker Esquire 6000plus
移動相:	A: 水/アセトニトリル95/5 (v/v) + 0.1%のギ酸 B: アセトニトリル + 0.1%のギ酸
グラジエント:	0分100% A, 3分 5% A, 5分 5% A
流量:	0.4 mL/分
温度:	25°C
検出器:	pos. ESI-MS (TIC)
試料:	水系溶媒A中にプラスチックチューブを浸漬して添加した可塑剤

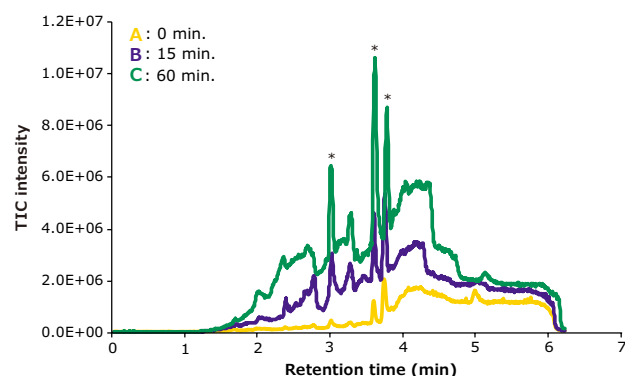


図1. 平衡化時間が汚染物質のカラムへの蓄積に与える影響。平衡化を長時間行くと、水系溶媒Aに含まれる可塑剤がカラムに蓄積しゴーストピークの原因となる。可塑剤に起因するピークをアスタリスク(*)で示す。

をできる限り短くし、平衡化に用いる移動相の容量がカラムボリュームの10倍を上回らないようにする必要があります。

塩酸、硫酸、硝酸などの強酸は分析種と強いイオン対を形成し、どのイオン化タイプにも適さなくなるため、このような酸は避ける必要があります。さらに、このような強酸のいくつかは好ましくない酸化特性を持っています。

多くの研究室では、ペプチドおよびタンパク質とイオン対を形成し、HPLC分離を改善するのにトリフルオロ酢酸(TFA)を使用しますが、TFAはMS検出中に検体の強いイオン抑制を引き起こし、質量分析計を汚染する可能性もあります。TFAを使用する必要がある場合は、弱酸やイソプロパノールを添加してイオンサプレッションを低減させる必要があります。あるいは、ジフルオロ酢酸(DFA)は、イオンサプレッションの影響を(TFAを使用した場合より)低減させるための選択肢です。

溶媒および添加物—保管と取り扱い

溶媒は、正規メーカーのボトルに保管する必要があります。正規メーカーのボトル材質は、表面処理済みアンバーガラスまたはホウケイ酸ガラスのいずれかであり、容器からの汚染を最小限にとどめます。汚染の原因となりうる別の容器への注入や移しかえは可能な限り避ける必要がありますので、用途に適した容量のボトルを選択することをお勧めします。標準的な透明のボトルやソーダ石灰ガラスのボトルは避けます。アルカリやシリカが滲出すると、分析種との付加体が形成される可能性があります。

ボトルは密閉し、専用キャップ・アダプター、チューブを用いて直接HPLCシステムに接続する必要があります。自作の接続用ア

クセサリーは汚染原因となる可能性が高いだけでなく、研究室雰囲気内に有機溶媒が蒸発する可能性もあります。

可塑剤、帯電防止剤、安定剤、滑止剤などの添加物が滲出する可能性があるボトル、漏斗、ビーカー、手袋などのプラスチック器具の使用は避けます(図2)。唯一の例外は、メーカーが滲出と抽出の可能性をすでに試験した器具、例えばピペットチップやシリンジです。

実験用機器

MS分析で使用する試薬はいずれも揮発性で純度が高いため、実験用の機器や容器はドラフトチャンバー内で蒸発させることによって最も簡単に洗浄できます。汚染が認められた場合は、機器を適切に洗浄するために、MSグレードの溶媒を流して洗浄する必要があります。

もし自動洗浄機を使用する必要がある場合は、洗浄後にMSグレードの溶媒を流して容器を何度も洗浄／すすぐことが極めて重要です。

HPLCカラム

HPLCカラムのサイズを選択するときは、試料のサイズ、検出手法、必要なローダビリティなどの要因だけでなく、溶媒消費量の削減といったコスト面での検討事項も指針になります。カラム内径(i.d.)を細くし、それに伴って試料注入量と流速を調整することで、分離度と感度の改善も行うことができます。

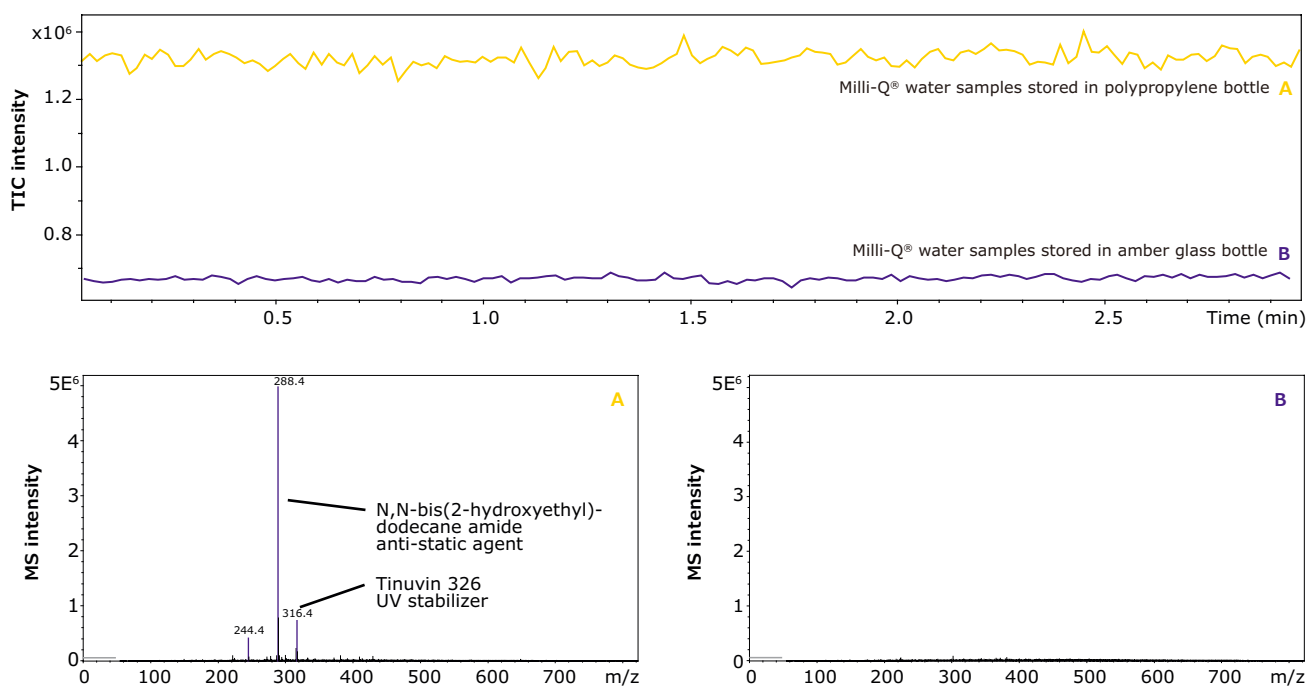
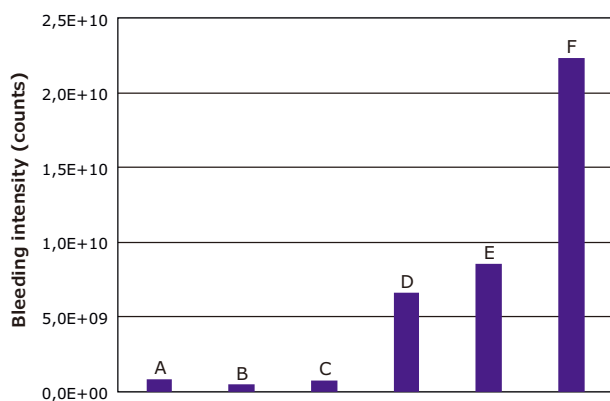


図2. ポリプロピレン(A)と清浄なアンバーガラスボトル(B)のそれぞれに保管したMilli-Qより採水した超純水試料の質量スペクトル(下段)、および同じ試料のTIC(上段)。分析は、ポジティブESIモードでMSに溶媒を直接注入して実施。



Conditions:

Column:	As indicated
Mobile phase:	acetonitrile/25 mM ammonium acetate pH 6.8 80/20 (v/v), 6 min.
Flow:	0.8 mL/min
Temperature:	50 °C
Detector:	Ion-trap MS (m/z 50-2000)

図3. 各社HILICカラムのMSにおけるブリーディングの比較

A: Merck Purospher® STAR Si 100-2.1
 B: Merck Purospher STAR ZIC™-HILIC 100-2.1
 C: Brand A HILIC 100x2.1 (normal phase material)
 D: Brand B HILIC 100x2 (ammonium sulfonic acid)
 E: Brand C HILIC 100x2 (phosphorylcholine)
 F: Brand D HILIC 100x2.1 (ammonium sulfonic acid)

HPLCカラムからの汚染は、LC/MSにおいて可能性と頻度が高いにも関わらず見落とされがちです。シリカベースの固定相の多くは、主に酸性pH (pH 2未満など) で加水分解によって修飾基の固定相からの開裂(カラムブリーディングと呼ばれる現象)を生じやすい傾向があります(図3)。

カラム使用前に洗浄プロトコルを実施することは、カラムブリーディングの影響を低減するのに有効です。あるいは、MSで使用する前に、水系の組成から有機溶媒系の組成まで広範囲に最大10回のグラジエント分析をカラムに実施する必要があります。

HPLCシステム

HPLCシステム自体を適切に構成することは感度向上にも寄与する可能性があります。重要なパラメーターは、デッドボリューム(HPLCカラム容積を除くインジェクターから検出セルまでの全システム容積)の最小化です。デッドボリュームが大きいと、ブロードピーク、テーリング、またはスプリットを引き起こし、分離能と低下につながり、ひいては感度の低下と微量成分の検出不良が生じる可能性があります。したがって、デッドボリュームにつながるすべてのシステムパーツ(チューブ、コネクタ、取付具)は、可能な限り小さく短くすることが鉄則です。

ポンプのインレットフィルターは、1~2カ月ごと、または溶媒をアセトニトリルからメタノール(またはその逆)に変更したら交換します。このメンテナンス作業によりベースラインノイズが低下し、システムとカラムへのダメージも防ぎます。

溶離液のフィルターフリットは、ガラス製ではなくステンレスまたはPEEK製にする必要があります。ガラス製のフィルターフリットで緩衝剤の残渣を取り除くことは困難であり、シリカとアルカリがガラスフィルターから滲出して付加体を形成する可能性もあるため、洗浄が面倒です。

一般的な推奨事項

LCでの分離の観点から、水系~有機系までの非常に様々な組成の移動相を使用しなければならない場面も多いと思います。LC/MSが故障することなく動作し、噴霧が安定するためには、一般的には移動相中の水含有量は5~80%に設定する必要があります。

水含有量が5%未満であると、緩衝剤が移動相とHPLCシステムの中に析出する可能性があります。その対策として、適切な有機溶媒を選択することや、溶離液中の緩衝剤の濃度を低く保つことなどがあげられます。使用する溶媒中(とグラジエント範囲内)での緩衝剤の溶解度は必ずチェックすることが重要です。

水分含有量が80%を超えると、MSのスプレーの効率が悪くなります。この対策として以下の方法が挙げられます。

1. LCの後とMSイオン源の前にアセトニトリル、メタノールといった揮発性有機溶媒を添加し、溶離液の表面張力を低減する。
2. スプリットやカラム交換を行い、MSに導入される流量を減らす。
3. 乾燥ガスの温度・流量の増加といったMSイオン源側の微調整。

システムと移動相両方の微生物汚染、および固定相のダメージを回避するために、移動相の水分含有量は95%以上に設定してはいけません。水の比率を高くする必要がある場合は、0.05%のアジ化ナトリウムを移動相に添加できます。あるいは、スタンバイ前に有機溶媒(できればイソプロパノールまたはメタノール)でHPLCシステムを定期的に洗浄することが不可欠です。アセトニトリルは重合してシステムバルブを塞ぐ可能性があるため、使用してはなりません。

結論

質量分析法は、複雑なサンプル中の分析種を同定および定量化するための強力な技法です。質量分析の成功のカギは、試料の調製から機器の洗浄に至るLC/MSワークフロー全体での汚染の低減です。その第一歩は、溶媒や緩衝剤、試薬、カラムを含む消耗品のすべてをLC/MS用の最高品質のものにすることです。超高純度の溶媒および試薬と汚染を発生させない取り扱いを組み合わせることによって、LC/MS感度の最大化と低いLODが保証されます。

Chromatography Today, 第10巻, 第4号, *Buyers Guide 2017年11/12月号*で初めて発表されました。

当社のLC/MS溶媒と試薬の詳細については[SigmaAldrich.com/lc-ms](https://www.sigmaaldrich.com/lc-ms)をご覧ください。

IN ESSENCE

GC BIDとイオン液体カラムWatercol™を使用した
液化石油ガスの水分測定法

Shimadzu Application Data Sheet No.18



石油化学原料に含まれる水分は処理システムに問題を起こす恐れがあります。パイプラインやバルブの凍結、高価な触媒の触媒毒など、これらはそのわずかな例にすぎません。石油に含まれる水分を上流の供給源から下流の処理工場まで監視することは、連続運転を保証するのに極めて重要です。

従来の水分測定法では「硫黄相互作用」が問題となっていました。GCによる新しい測定オプションではこれを回避できます。島津製作所が技術を保有するバリア放電イオン化(BID)検出器と当社Supelcoブランドの水分分析カラム「Watercol」を組み合わせると、原料に含まれる水分を分離し(図1)、感度と精度の高い結果が得られました(表1)。これら水分測定の検出感度はppmレベル以下まで対応することが可能です。

装置

Gas chromatograph: Tracera (GC-2010 Plus A + BID-2010 Plus)

Sample injection: Valco Internal Liquid Sample Injector with Splitter Injection Unit

Gas purifier: Supelco High Capacity Gas Purifier (Cat.#29541-U)

分析条件

Column: Watercol 1910, 60 m x 0.25 mm ID, 0.20 μm

Oven: 35 °C (2.0 min) – 5 °C/min – 150 °C (15 min)
Total. 40 minCarrier gas: Helium 45 cm/sec
(Column flow rate 3.78 mL/min)

Inj. volume: 2 μL

Split: 1:5

Transfer line temp.: 175 °C (After Internal Liquid Sample Injector to GC column Oven)

Detector temp.: 200 °C

Discharge gas vol.: 50 mL/min(He)

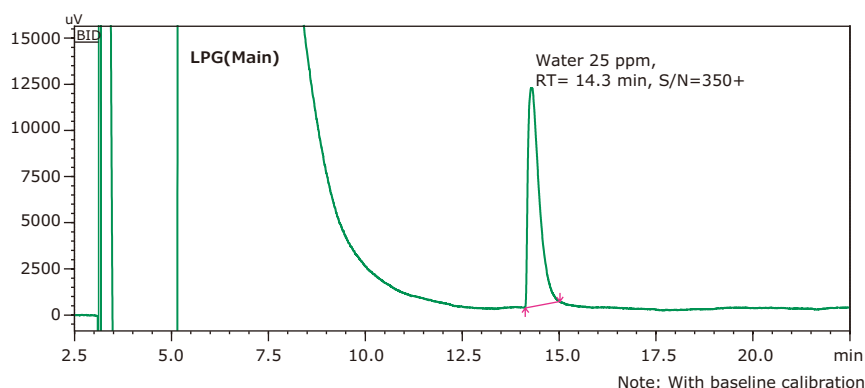


図1. LPGに含まれる水分測定(25 ppm)のクロマトグラム。定量限界(S/N = 10)と検出限界(S/N = 3.3)は、それぞれ0.66 ppmと0.22 ppmまで下げることができます。

表1: Repeatability of Water analysis(n=5).

Water	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	Average	Standard Deviation	%RSD
RT(min)	14.285	14.288	14.286	14.296	14.304	14.292	0.008	0.06
Area(mV•s)	244,037	249,854	246,884	242,950	238,428	244,430	4,296	1.76
Height(mV)	12,418	12,600	12,468	12,045	11,851	12,276	315	2.57
Conc.(ppm)	24.96	25.56	25.25	24.85	24.39	25.00	0.44	1.76

この応用例はASTMの新しい標準手順として提案されています。
<https://www.astm.org/DATABASE.CART/WORKITEMS/WK59649.htm>

Watercolカラムの詳細については[SigmaAldrich.com/watercol](https://www.sigmaaldrich.com/watercol)をご覧ください。

島津製作所のアプリケーションは[SigmaAldrich.com/shimadzu-ads18](https://www.sigmaaldrich.com/shimadzu-ads18)からダウンロードできます。

Related products:

Description	Cat. No.
Watercol 1910 Capillary GC Column L x I.D. 30 m x 0.25 mm, df 0.20 μm	29711-U
Watercol 1910 Capillary GC Column L x I.D. 30 m x 0.32 mm, df 0.26 μm	29714-U

カールフィッシャー試薬 Aquastar™ 脱水溶剤なら安心で確実!!



せんぱーい!
カールフィッシャーの水分滴定で
時々、終点がくる時間が遅い時が
あるんですよね・・・。

そう? あんまり気にしてなかったけど、
いま試薬は何使ってるの?

滴定液はメルクのコンビタイトラント、
脱水溶剤は特級メタノールです。

別に問題無さそうよね・・・
何が原因かメルクに聞いてみたら?

メルクテクニカルサービス TEL:03-4531-1140 に電話っと...
プルルル... あの一...カールフィッシャー法で水分滴定しているんですけど、
たまに終点に来るのに時間がかかるのですが、何か原因はありますか?

それは脱水溶剤が原因かもしれないのお

はい!
メルクじゃ!



試薬グレードの汎用品を使用した際に 起こるトラブル

- ・溶媒由来の不純物が邪魔して終点来ない。
- ・きれいすぎる(水分量が低すぎる)場合、開始できないことがある。
(有機溶剤グレードなど)
- ・溶剤を交換したのに、測定ボタンを押しても測定が始まらない。
(超脱水グレード)



カールフィッシャー用の脱水溶剤を 使用すれば安心!

- ・製品規格で終点確認済み。
- ・水分量0.01%以下が保証されている。
- ・有機塩素系を使っていないのでより安全で、環境にも配慮。



製品詳細は下記へ

[Sigma.com/aquastar-jp](https://sigma.com/aquastar-jp)

Supelco®

Analytical Products

測定結果に 不安はありませんか？ 標準物質の精度は重要です

私達の認証標準物質 (CRM) は信頼性確保に重要な指標を網羅しています。

全ての標準物質製造拠点で以下の認定を受け、信頼性確保に不可欠な、認証標準物質 (CRM) を製造、供給しています。

- ISO/IEC 17025
- ISO Guide 34/ISO 17034

<http://www.sigma.com/std-jp>

認証標準物質 (CRM)

安定性、均質性、不確かさと
トレーサビリティ

効率を高める

溶液に希釈されている製品は、難しい
粉末の秤量作業が不要になり、作業者
間における濃度のばらつきを抑え、
エラーを低減することが可能です。

時間と労力を セーブする

溶液に調整済のCRMは、
秤量、溶液の調製、内部
での技術開発の時間等が
削減可能。お客様の時間
と労力を節約できます。

高い正確性

溶液の濃度、未希釈
品の重量、プロパティ
値の認証



LINE公式アカウント
はじめました



サイエンス系
お役立ちメディア

M-hub



m-hub.jp



メルクライフサイエンス公式 Facebook ページ
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス公式 Twitter アカウント
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Sigma-Aldrich Co. LLC の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2019 年 1 月時点の情報です。©2019 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.sigma-aldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: jpnts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245 Fax: 03-6756-8302

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: sialjpcs@sial.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

AAM028-1901-10K-E