

Analytix Reporter

表面保護型ファイバーを使用した 固相マイクロ抽出 (SPME) による 食品中のビスフェノールAの分析

ファイトケミカル標準物質の新しいラインアップ

ホップと大麻に含まれるテルペン類のヘッドスペースSPME-GC/MS分析

NEW テルペノイド混合溶液 (認証標準物質/CRM)

Passiflora incarnata への HPTLC の応用

SPME と GC/MS による水中の揮発性有機化合物の改良測定法:
ISO規格17943

「国際単位系 (SI)」へのトレーサビリティが確保された
¹⁹F 定量 NMR 用認証標準物質

ヒト血清中の甲状腺ホルモンのオンライン固相抽出と LC-MS 分析

滴定の改良

最も困難な分離に対する革新的なソリューション –
イオン液体キャピラリー GC カラム

前処理およびクロマトグラフィー 分析用高純度カーボン吸着剤

Analytix Reporter

FOOD & BEVERAGE

- 3 表面保護型ファイバーを使用した固相マイクロ抽出 (SPME) による食品中のビスフェノールAの分析
- 7 ファイトケミカル標準物質の新しいラインアップ
- 9 ホップと大麻に含まれるテルペン類のヘッドスペースSPME-GC/MS分析
- 13 **NEW** テルペノイド混合溶液 (認証標準物質/CRM)

NUTRITIONAL SUPPLEMENTS

- 15 *Passiflora incarnata* へのHPTLCの応用

ENVIRONMENTAL

- 17 SPMEとGS/MSによる水中の揮発性有機化合物の改良測定法:ISO規格17943

PHARMA & BIOPHARMA

- 21 「国際単位系 (SI)」へのトレーサビリティが確保された¹⁹F定量NMR用認証標準物質

CLINICAL & FORENSIC

- 26 ヒト血清中の甲状腺ホルモンのオンライン固相抽出とLC-MS分析

SCIENCE & TECHNOLOGY INNOVATIONS

- 29 滴定の改良
- 30 最も困難な分離に対する革新的なソリューション ーイオン液体キャピラリーGCカラム
- 32 前処理およびクロマトグラフィー分析用高純度カーボン吸着剤

読者の皆様へ

Analytix Reporterへようこそ

近年、Merckのライフサイエンス事業は、当社の製品をお客様である皆様に合わせていくつかのアップデートを行いました。

現在、当社のライフサイエンス事業には、Sigma-Aldrich®、SAFC®、BioReliance®、Milli-Q®、Millipore®、そしてSupelco®という6つのポートフォリオのブランドがあります。Supelco®ポートフォリオは事業の中心となる柱であり、分析関連製品をお求めになるお客様に信頼されるブランドになっています。

Supelco®ブランドの考え方は単純で、「分析化学者が分析化学者のために作った高品質な製品」です。当社が取り組む分析用消耗品の包括的な範囲は、分光化学と分光分析、モバイル分析/フォトメトリー、クロマトグラフィー、滴定、などのほか、一般的な分析技術にわたります。製品は、お客様のニーズに合わせ、組み合わせでも使用できます。

当社は、精度と正確さがお客様にとって最も重要であり、お客様の業務に不可欠であることを理解しています。そのため、その高い基準がお客様の基準にマッチすることを保証します。どの製品も厳格な品質管理プロセスを経るため、お客様の試験プロトコルの完全性と得られた結果の再現性を保証できるのです。

Analytix Reporterの本号に掲載した記事は、当社のSupelco®製品と同じ範囲を網羅しています。

本号がお客様にとって洞察にあふれた有益なものになることを望んでいます。



Von Krosigk

Friederike von Krosigk
Head of Global Portfolio Branding Strategy
Life Science
friederike.krosigk@merckgroup.com

Supelco®

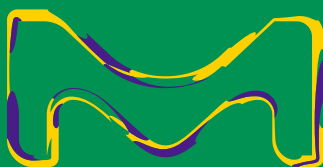
Millipore®

BioReliance®

Sigma-Aldrich®

Milli-Q®

SAFC®



SigmaAldrich.com/Supelco

For your personal copy, sign up at
SigmaAldrich.com/ar-reg

表面保護型ファイバーを使用した固相マイクロ抽出 (SPME) による食品中のビスフェノールAの分析

Katherine Stenerson, Principal Scientist, Katherine.stenerson@milliporesigma.com

緒言

ビスフェノールA (BPA) は、ポリカーボネートボトルや、スープ、ジュースなどに使われる金属缶の内面コーティングといった食品包装用途で使われています。BPAは内分泌かく乱物質の疑いがあるため、包装材料から食品に移行することによる、長期にわたる低レベルの暴露が懸念されます。食品接触用途でのBPAの使用は米国食品医薬品局 (FDA) が規制しており、2013年には乳児用調製粉乳の包装材料への使用が禁止されました¹。その他の食品接触用途に対する安全マージンは、FDAが「NOAEL」(「no observed adverse effect level: 有害な影響が認められないレベル、無毒性量」の略語) として公表しました。このNOAELは5 mg/kg体重/日に設定されており、これは推定される食事摂取量をはるかに上回ります²。同様に、欧州連合 (EU) も耐容1日摂取量「TDI」を4 µg/kg体重/日に設定しました³。食事によるBPAへの暴露は少ないと考えられますが、缶や蓋の内面コーティング、プラスチック容器などから食品への移行を評価するための試験が続けられています。EUでは、容器から食品へのBPAの特定移行限度値 (SML) が2018年9月に0.05 mg/kg (以前は0.6 mg/kg) に改正されました。乳児や幼児が使用することを目的とする食品に接触する材料では、コーティングやニスからのBPAの移行はまったく認められていません⁴。

食品中のBPAを測定するための抽出方法には溶媒抽出 (SE) と固相抽出 (SPE) の両方がありますが、一般にSPEは液体試料に、SEは固体試料に使用されます。分析はLC、GCのいずれでも行え、文献ではいずれの方法も使用されています。固相マイクロ抽出 (SPME) は水中のBPA測定に使用されてきましたが、検出感度および脂肪、タンパク質などのマトリックス成分への暴露に関連するファイバーの耐久性の問題から、食品マトリックス中のBPA測定に広く使用されたことはありません^{5,6}。

本アプリケーションの目的は、SPME法で様々な食品中のBPAを分析するための迅速、容易、かつ高感度の方法を開発することでした。これまで指摘されていた食品マトリックスとSPMEに関連する問題に、保護層 (Overcoated、以下OC) のあるジビニルベンゼン (DVB) ファイバーを使って取り組みました。ポリジメチルシロキサン (PDMS) からなるこの保護層は、DVB層を汚染から保護してファイバーの物理的堅牢性を高めています。



さらに、保護層に付着した物質は、このような試料に一般に行われる洗浄ステップ中にさらに容易に除去されます。OC-DVBファイバーを使用したSPME抽出に引き続いてGC-MS/MS分析を行うことにより、最適な検出感度を得ることが出来ました。本稿では、方法の開発、最適化、および耐久性比較で取ったステップの概要を示します。なお、詳細についてはSigmaAldrich.com/Analytix (Issue 4) で本稿のオンライン版をご覧ください。

実験

OCファイバーを使用したSPMEの最適化された最終的な方法を表1に示します。抽出後、7890/7000C GC-MS/MSシステムのインレット内でファイバーから脱着し、表2にまとめた条件で分析を進めました。

表1: 食品試料からBPAを抽出するための最適化されたSPME手順

sample/ matrix:	10 mL vial containing 0.5 g of sample and 6.5 mL of water at pH 4 containing 25 % sodium chloride
SPME fiber:	Overcoated PDMS-DVB, 23 gauge
incubation:	10 min, 50 °C, 400 rpm
extraction:	immersion, 50 min, 50 °C, 250 rpm, vial penetration 34 mm
wash:	0.5 min, 250 rpm, vial penetration 34 mm
desorption:	3 min, 260 °C
post bake:	6 min, 270 °C

表2: GC-MS/MS条件

column:	SLB®-PAHms, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm (28340-U)
oven:	100 °C (3 min), 15 °C/min to 300 °C (10 min)
inj.temp.:	260 °C
carrier gas:	helium, 1 mL/min constant flow
detector:	MRM: BPA: 213/119, 213/91, 119/91 BPA-d16: 224/125, 224/97, 125/97
MSD interface:	325 °C
liner:	0.75 mm I.D. SPME

分析した試料（缶詰のカボチャ、ピューレ状のニンジン離乳食、クリーム状のチキンスープ、缶入りエナジードリンク）は地元の食料品店から購入し、試験を行うまで冷蔵保存しました。これらを0.5 g秤量し、10 mLオートサンプラーバイアルに入れてSPME用試料を調製しました。精度と繰り返し性を測定するための添加試料は、メタノール中の1 µg/mL BPA溶液5 µLを0.5 gの試料に直接添加して10 ng/gにしました。その後、試料を30～60分間平衡化しました。各試料にSPME希釈液6.5 mL（25wt%のNaClを含有するLC-MS/MSグレード水、H₃PO₄でpH=4に調整）を加えた後、内部標準物質BPA-d16の1 µg/mLメタノール溶液を7 µL加えました。試験所に由来するBPAのバックグラウンドを低減するために、使用する計量器具とピペットはすべてガラス製とし、メタノールで3回すすいでから使用しました。また、SPME希釈液を作るために使用する塩はマッフル炉で処理し、ガラス瓶に保管しました。

試料（添加および非添加）を前述の方法で作成したマトリックス検量線に対して定量化し、表1の方法に従って抽出しました。

結果および考察

分析方法の最適化

分析方法を開発する第1の目標は、多くのタイプの試料に使用できる単一のSPMEパラメーターセットを決定することでした。重要なパラメーターを最適化した概要を以下の各項に示します（詳細についてはSigmaAldrich.com/Analytixでオンライン版をご覧ください）。

塩、pHおよび希釈液：塩を添加してpHを低下させると、BPAとBPA-d16両方の応答が著しく増大しました（結果は示していません）。分析した試料の大部分は粘性が極めて高く、SPMEを行う前に希釈する必要があったため、25%の塩を含有するpH 4の水を希釈液として選択しました。様々な試料量／希釈液で実験した結果、0.5 gを希釈して7 mLにすると、評価したすべてのマトリックスに対して適切に機能することが分かりました。評価したマトリックスには、缶詰のカボチャ、ピューレ状のニンジン、クリーム状の濃縮チキンスープ、果実風味のエナジードリンクが含まれます（エナジードリンクは、希釈せずに分析できたと思われます）。

抽出後の洗浄：本方法は食品試料にSPMEを浸漬させ使用することになるため、抽出後に洗浄ステップを組み込むことは、GCインレット内での脱着に先立って、ファイバー表面に残存するマ

トリックスを除去する上で重要でした。これまでの研究から、このステップは、標準的なDVBファイバーより保護層のあるファイバーで使用する方が有効なことが認められました⁷。最大限洗浄するために、本方法では30秒の時間を選択しました。それでも良好な応答が得られたため、洗浄しない場合／洗浄時間を短縮した場合と比べて、応答損失が本方法の検出感度に大きな影響を与えるとは考えられませんでした。

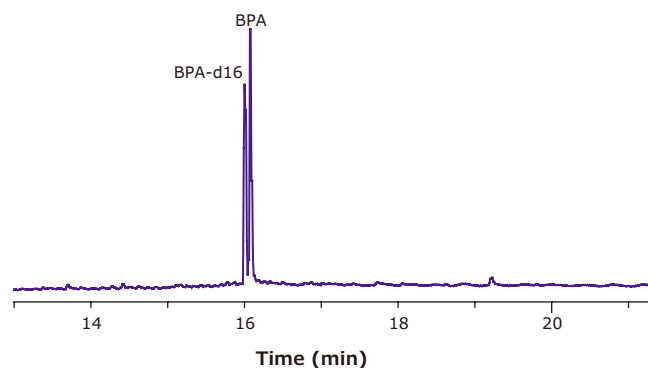
抽出および平衡化条件：0.1 ng/mLを添加（400 rpmで攪拌して10分平衡化）したpH 4の25%塩水を使って、10～60分の抽出時間を調査しました。10～50分の間は応答が着実に上昇し、50～60分で最大になりました。そのため、抽出時間として50分を選択しました。

特に、ピューレ状のニンジン離乳食のような重いマトリックスで行うと温度が抽出速度に影響を与える可能性があるため、抽出温度の影響を30°C、40°C、50°Cで調査しました。BPAの絶対応答は温度とともに上昇したため、抽出と平衡化の温度として50°Cを選択しました。

BPAのバックグラウンド：BPAはラボに共通する汚染物質であるため、どの方法で分析してもバックグラウンドの取り扱いが大きな課題になります。SPMEは試料調製のステップが最小限で済むため、液-液抽出やSPEと比較して汚染源を低減できます。SPME法でバックグラウンドを低減するために取るいくつかのステップには、メタノールによるピペットとガラス器具のすすぎ洗浄、マッフル炉での塩化ナトリウム処理、ガラス瓶中での希釈溶液用LC-MS/MS水の使用などがありました。GCへの注入によってバックグラウンドがいくらか生じたため、セプタムパージの設定を3～6 mL/分に増やしてこれを低減しました。それでも、SPMEプロセスに起因するBPAバックグラウンドがいくらか存在しましたが、試料からの低レベル検出は可能でした。

キャリブレーション：SPMEは平衡抽出技法であるため、試料と同一の方法を使って抽出した標準試料に対して定量化しなければなりません。BPAの場合はマトリックスごとに抽出効率がばらついていたため、正確に定量化するにはマトリックスキャリブレーションを使用する必要がありました。それぞれの非添加試料は「0」濃度点として含めました。

図1: メタノール中10 ppm標準試料のSLB-PAHmsによるBPAとBPA-d16（非誘導体化）のGC-MS分析（フルスキャン）



GC-MS/MS分析：BPAのGC分析は、シリル化またはアセチル化を使って誘導体化する方法が一般的です。これによってピーク形状と応答が向上し、定量化が改善されます^{5,6}。本方法ではイオン液体液相のSLB[®]-PAHmsカラムを使用したため、**図1**のような、十分なクロマトグラフィー性能と応答を得ることができる誘導体化は不要でした。

SPME法の性能

添加試料と非添加試料の分析。調査した4種類すべてのマトリックスでBPAと内部標準物質BPA-d16の両方を干渉なく検出できました。最も重いマトリックスであった缶詰のカボチャの例を**図2**に示します。**図3**から分かるように、SPME法は様々なマトリックスから良好な直線性を示しました。濃度はng/mLの単位ですが、これは分析前に試料0.5 gを希釈して最終的な体積を7 mLにした濃度を反映しているためであり、元の試料に含まれるBPAは7 ~ 140 ng/gに換算されます。これらの同じマトリックスからの方法の精度と再現性は、10 ppbで添加した試料を分析して測定しました。これらの評価結果を**表3**に示します。精度は4種類すべてのマトリックスで80%超、再現性はパーセント相対標準偏差 (%RSD) または相対的パーセント差異 (%RPD) で15%未満でした。マトリックスマッチ検量線を使って添加試料を定量化したため、「0」濃度または標準添加法を使った非添加分析により、添加前の各試料に存在したBPAのレベルを決定できました。これらの数値を**表4**に報告します。ガラス瓶に入ったニンジン／離乳食中で検出されたBPAは、おそらく内面がコーティングされた蓋から浸出した結果であ

り、検出されたレベルは、金属製の蓋が付いたガラス瓶に入った離乳食の別の分析での範囲に収まっています⁸。缶詰試料では、クリーム状のチキンスープで最高レベルのBPAが検出されましたが、このレベルでも缶詰のチキンスープの別の測定で過去に得られたBPAレベルを下回っていました⁹。また、スープを水で希釈せずに直接分析したことにも注意すべきです。スープを飲むときの一般的な下ごしらえではスープを水で1：1に希釈する必要があるため、BPAのレベルは基本的に50%低下します。

前述したように、重いマトリックス中に浸漬してSPMEを行うときは、GCインレット内での脱着ステップの前に残存マトリックスを除去するための抽出後洗浄ステップが不可欠です。OCのあるPDMS/DVBファイバーと、OCのない標準タイプのPDMS/DVBファイバーの両方を缶詰のカボチャ試料のいくつかの抽出物に使用し、ファイバーの耐久性と方法の耐久性を比較しました。個々のカボチャ試料を検量し、BPA-d16を10 ppbで添加しました。これらを連続シーケンスで抽出し、6回抽出するたびに1 ng/mLのBPA/BPA-d16を添加した水試料を抽出しました。その結果を**図4**に示します。応答感度の傾向を調査するために、面積カウントを最初の試料抽出に正規化しました。OCファイバーを使用した25回の抽出では応答の顕著な低下は見られませんでした。また、試

表3: 添加試料に適用したSPME法の精度および再現性

Sample	Spike Level	Avg. Amount Measured	Accuracy	RSD
fruit flavored energy drink	10 ng/mL	11.5 ng/mL	115 %	1 % (n=3)
baby food, carrots	10 ng/g	11.7 ng/g	117 %	2 %*
cream of chicken soup (condensed)	10 ng/g	8.2 ng/g	82 %	9 %*
pumpkin	10 ng/g	11.0 ng/g	110 %	13 % (n=6)

*%RPD, 2 replicates

表4: 標準添加物を使用して算出した非添加試料のBPAレベル

Sample	Container Type	BPA Level - measured in unspiked sample
fruit flavored energy drink	can	0.8 ng/mL
baby food, carrots	glass jar with metal lid	0.65 ng/g
cream of chicken soup (condensed)	can	12.7 ng/g
pumpkin	can	1.6 ng/g

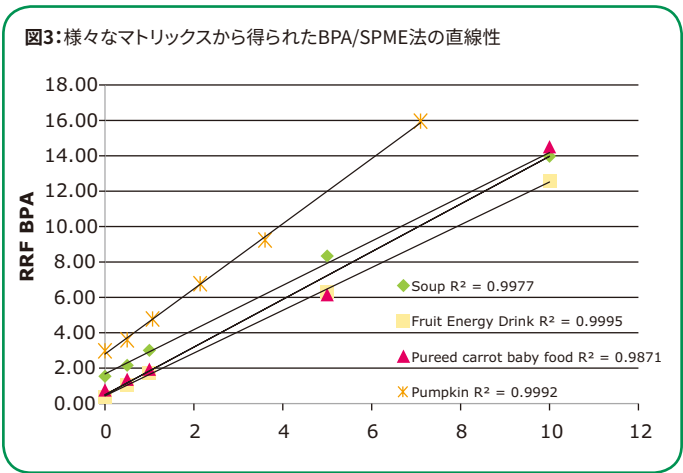
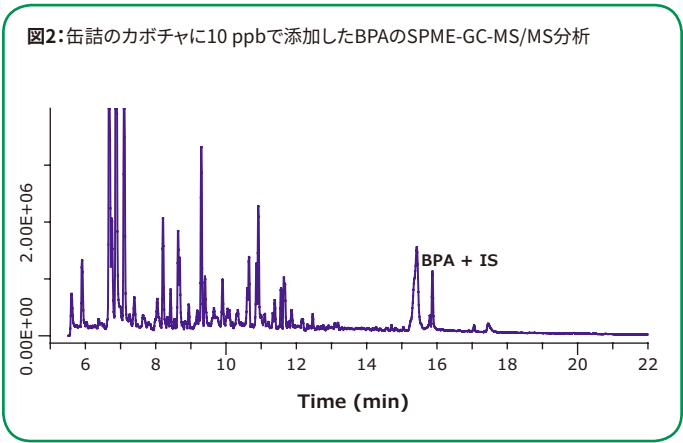
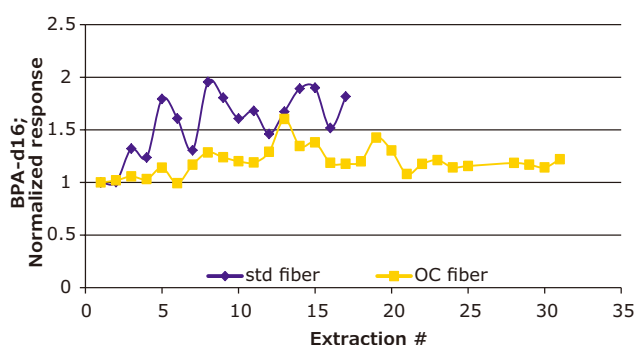


図4: 添加したカボチャ試料の繰り返し抽出から得られたBPA-d16の応答感度の傾向。



試験シーケンス後にいくつかの変色は認められましたが、物理的に損傷した痕跡はなくファイバーの状態は極めて良好でした。一方、標準ファイバーによる抽出では保護層がファイバーコアから完全に剥がれたため、18回で中止しました。図4から分かるように、応答傾向には一貫性が見られませんでした。耐久性試験から得られた結果は、保護層が相をカボチャのマトリックスへの暴露による損傷から保護している、および／または残存マトリックスを除去する上で抽出後の洗浄ステップがOCファイバーにさらに有効である、のいずれかであることを示しています。したがって、これはファイバーの寿命を延ばすのに役立ちます。

要約と結果

様々な食品から低レベルのBPAを分析するために、保護層のあるPDMS/DVBファイバーを使用した浸漬SPME-GC-MS/MS法を開発しました。様々なマトリックス (果実風味の飲料、缶詰のカボチャ、ピューレ状のニンジン離乳食、クリーム状のチキンスープ) から得られた方法の直線性は、0.9871 (ニンジン) ~ 0.9995 (飲料) の範囲に収まっていました。また、10 ppbレベルで添加した方法の精度と再現性は80 ~ 110%、RSD/RPD値は15%未満でした。耐久性試験により、標準ファイバーと比較してOCファイバーの方が物理的堅牢性に優れ、応答の一貫性が高いことが示されました。SPME法はわずかなステップで済み、自動化が容易でした。さらに、検出感度が高く、GC-MS/MSと組み合わせると様々なマトリックスに使用するのに必要な選択性が得られました。

References

- Indirect Food Additives: Adhesives and Components of Coatings. Fed. Regist. 2013, 78 (134), 41840-41843.
- Aungst, J. Division of Food Contact Notifications, Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Dept. of Health & Human Services, Memorandum regarding 2014 updated safety assessment of Bisphenol A for use in food contact applications, 6/17/2014; accessed via FDA .gov.
- Bisphenol A, European Food Safety Authority Site, efsa.europa.eu/topics/topic/bisphenol (status 23.11.2018).
- Commission Regulation (EU) 2018/213 on use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials.
- Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. J. Chrom. A. 2009, 1216, 449-469.
- Chang, C.; Chou, C.; Lee, M. Determining leaching of bisphenol A from plastic container by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 2005, 539, 41-17.
- Stenerson, K.K.; Young, T.; Shirey, R.; Chen, Y.; Sidisky, L. Application of SPME Using an Overcoated PDMS-DVB Fiber to the Extraction of Pesticides from Spaghetti Sauce: Method Evaluation and Comparison to QuEChERS. LCGC North America, 2016, 34 (7), 500-509.
- Cao, X.; Corriveau, J.; Popovic, S.; Clement, G.; Beraldin, F.; Dufresne, G. Bisphenol A in Baby Food Products in Glass Jars with Metal Lids from Canadian Markets. J. Agric. Food Chem, 2009, 57, 5345-5354.
- Noonan, G.O.; Ackerman, L.K.; Begley, T.H. Concentration of Bisphenol A in Highly Consumed Canned Foods on the U.S. Market. J. Agric. Food Chem., 2011, 59, 7178-7185.

本分析で使用した製品

Description	Cat. No.
SPME OC Fiber Assembly (PDMS/DVB), Pk.3	57439-U
SPME fiber holder for use with CTC autosampler	57347-U
SLB®-PAHms capillary GC column, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm	28340-U
Bisphenol A, certified reference material, TraceCERT®, 100 mg	42088
Bisphenol A-d16, analytical standard, 50 mg	442876

関連製品

Description	Cat. No.
Sodium chloride, ACS reagent grade	746398
Clear vial, screw top, 10 mL, for CTC autosampler, Pk.100	SU860099
Magnetic screw cap, with 1.3 mm septa, for autosampler vial, Pk.100	SU860101
0.75 mm I.D. direct (SPME) liner for Agilent®	2637501
Molded Thermogreen™ LB-2 septa with injection hole, 11 mm, Pk.50	28336-U

保護層のあるSPMEファイバーの詳細については、SigmaAldrich.com/spme-ocfをご覧ください。

当社の食品安全ツールについては、SigmaAldrich.com/food-and-beverageをご覧ください。

ファイトケミカル標準物質の新しいラインアップ

PhytoLab社の標準物質がSigmaAldrich.comから入手可能に

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



植物は、栄養補助食品や医薬品の両方において重要な原料です。自然界では植物の組成がばらついており、不純物の添加問題も増加しているため、植物由来の製品の品質を管理する必要があります。植物成分の確実な同定と正確な定量化が極めて重要であり、信頼性の高い標準物質を入手することが要求されます。

当社は、植物化学物質の試験とその標準物質の製造の世界的リーダーであるPhytoLab社と提携しました。同社のphyproof®標準物質が世界中で当社のウェブポータルから入手できるようになり、当社の植物化学用標準物質のラインアップが大幅に増加します。右記に、初期製品のリストを掲載します(表1)。さらに多くの製品が今後導入される予定です。最新のリストについては[SigmaAldrich.com/phytolab](https://sigmaaldrich.com/phytolab)をご覧ください。

当社の植物化学物質の未希釈品、溶液品を含む標準物質、認証標準物質(CRM)、植物抽出物とエッセンシャルオイルの標準物質はウェブサイトでご覧いただけます。

どの製品も、化合物クラス別または植物属別に表示可能です。

表1: SigmaAldrich.comから入手できるようになったPhytoLab社製植物医薬品の標準物質

Product Name English	Qty.	Cat. No.
Amarogentin	10 mg	PHL80178
Anemonin	10 mg	PHL80346
Apiin	10 mg	PHL89161
Atropine sulfate	20 mg	PHL80892
Bacoside A	10 mg	PHL89576
Berberine chloride dihydrate	100 mg	PHL89487
Caffeoylmalic acid	10 mg	PHL89238
Californidine perchlorate	10 mg	PHL89592
(-)-Catechin 3-gallate	10 mg	PHL82497
α-Chaconine	5 mg	PHL80075
Chelidonine	20 mg	PHL89600
Cimifugin	10 mg	PHL89387
Cinnamtannin A2	5 mg	PHL83372
Convallatoxin	10 mg	PHL80834
8-p-Coumaroylharpagide	10 mg	PHL89178
Crocin	10 mg	PHL80391

Product Name English	Qty.	Cat. No.
Cucurbitacin B	10 mg	PHL82226
Cucurbitacin E	10 mg	PHL80013
Cucurbitacin E-2-O-glucoside	10 mg	PHL89613
Cucurbitacin I	10 mg	PHL89464
(-)-Curine	10 mg	PHL80979
Cyanidin 3,5-diglucoside chloride	10 mg	PHL89615
Cymarine	20 mg	PHL89838
23-epi-26-Deoxyactein	10 mg	PHL89183
3,5-Dicaffeoylquinic acid	10 mg	PHL80426
3,4-Dicaffeoylquinic acid	10 mg	PHL80425
4,5-Dicaffeoylquinic acid	10 mg	PHL80427
Digitoxin	25 mg	PHL82516
Echimidine	10 mg	PHL89553
Echimidine N-oxide	5 mg	PHL83590
(-)-Englerin A	10 mg	PHL82530
Erucifoline	5 mg	PHL83432
Erucifoline N-oxide	5 mg	PHL83433
Eupatilin	10 mg	PHL80337
Europine hydrochloride	10 mg	PHL83237
Europine N-oxide	10 mg	PHL83238
Gelsemine	10 mg	PHL80457
Gentiopicroside	10 mg	PHL89512
Ginkgotoxin hydrochloride	10 mg	PHL82638
Ginsenoside Rc	10 mg	PHL89210
Glucoraphanin potassium salt	10 mg	PHL89215
Guaiazulene	100 mg	PHL89697
Harpagide	10 mg	PHL89703
Heliotrine	10 mg	PHL80403
Heliotrine N-oxide	10 mg	PHL83236
Hyoscyamine sulfate	20 mg	PHL82389
Indicine hydrochloride	10 mg	PHL83234
Indicine N-oxide	10 mg	PHL83235
Indirubin	10 mg	PHL89716
Intermedine	10 mg	PHL82424
Intermedine N-oxide	5 mg	PHL83446
Isorhamnetin 3-rutinoside	10 mg	PHL83337
Isoxanthohumol	10 mg	PHL89234
Jaceosidin	10 mg	PHL80786
Jacobine	5 mg	PHL83434
Jacobine N-oxide	5 mg	PHL83435

Product Name English	Qty.	Cat. No.
Kahweol	20 mg	PHL82293
Lasiocarpine	10 mg	PHL80412
Lasiocarpine N-oxide	10 mg	PHL83220
Z-Ligustilide solution	10 mg	PHL89242
Lycopsamine	10 mg	PHL89726
Lycopsamine N-oxide	5 mg	PHL83447
Malvidin 3,5-diglucoside chloride	10 mg	PHL89727
Marrubiin	10 mg	PHL89830
Miliacin	10 mg	PHL82261
Mitraphylline	10 mg	PHL89736
Monocrotaline N-oxide	10 mg	PHL82629
Muscimol	10 mg	PHL89495
Nordihydrocapsaicin	10 mg	PHL89254
Pelargonidin 3-glucoside chloride	10 mg	PHL89753
Petunidin 3-glucoside chloride	5 mg	PHL89755
Primulic acid I	10 mg	PHL89259
Primulic acid II	10 mg	PHL89260
Protodioscin	10 mg	PHL80522
Punicalagin (A + B mixture)	10 mg	PHL80524
Quercetin	20 mg	PHL89262
Retrorsine N-oxide	10 mg	PHL82630
Ruscogenin	10 mg	PHL89268
Sabinene	100 mg	PHL82342
Sanguinarine chloride	10 mg	PHL89327
Sarsasapogenin	20 mg	PHL80531
Scopolamine hydrobromide	5 mg	PHL80046
Scopolin	10 mg	PHL82649
Sempervirine nitrate	10 mg	PHL83105
Senecionine N-oxide	5 mg	PHL82631
Seneciophylline N-oxide	5 mg	PHL82632
Senecivernine	5 mg	PHL83436
Senecivernine N-oxide	5 mg	PHL83437
Silybin (A + B mixture)	25 mg	PHL89280
α -Solanine	10 mg	PHL80074
γ -Strophanthin	20 mg	PHL80207
α,β -Thujone	100 mg	PHL82669
Trichodesmine	10 mg	PHL83438
Trifolirhizin	10 mg	PHL80547
Tryptanthrine	10 mg	PHL83458
Urushiol (15:2)	10 mg	PHL80181

当社から入手できるPhytoLab社製標準物質のリストについては、[SigmaAldrich.com/phytolab](https://sigmaaldrich.com/phytolab)をご覧ください。

植物抽出標準物質の概要については、[SigmaAldrich.com/plantextracts](https://sigmaaldrich.com/plantextracts)をご覧ください。

当社の分析用標準物質と認証標準物質(CRM)の包括的なポートフォリオについては、[SigmaAldrich.com/standards](https://sigmaaldrich.com/standards)をご覧ください。

ホップと大麻に含まれるテルペン類の ヘッドスペースSPME-GC/MS分析

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

本アプリケーションでは、ヘッドスペースSPMEをGC/MSと組み合わせて使用し、一般的なホップと大麻の両方に存在する数種のテルペン類を分析しました。

テルペン類はいくつかの植物により合成される低分子化合物です。テルペンという名称はこれらの化合物を高濃度で含有する樹脂（テルペンチン）に由来しています。テルペン分子は、イソプレン単位がhead-to-tail型で結合して形成されます（図1）。そのため、構造に含まれるこれらのイソプレン単位の数に応じて分類されます（表1）。テルペン類の構造は環状または開いたもののいずれかであり、二重結合、ヒドロキシル基、カルボニル基、その他の官能基を含むこともあります。CとH以外の元素を含むテルペンはテルペノイドと呼ばれます¹。

図1: イソプレン単位

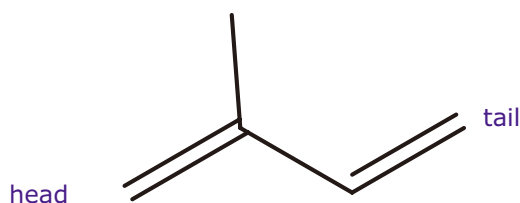


表1: テルペン類の分類

Classification	Number of Isoprene Units
Monoterpene	2
Sesquiterpene	3
Diterpene	4
Triterpene	6
Tetraterpene	8

テルペン類は植物から採取されるエッセンシャルオイルに含まれ、植物やそのオイルに特徴的な芳香を持ちます。例えば、d-リモネンはレモン、オレンジ、キャラウェイ、植物オイルに存在し、レモンのような芳香を持ちます。成分としてテルペンとテルペノイドを含有するエッセンシャルオイルはアロマセラピーと呼ばれる療法の用途に利用されており、不安、うつ、不眠といった症状の軽減に役立ちます²。そのため、これらの化合物を含有する植物がオイル、茶、トニックなどの調合に使用されるようになりました。

植物の同定へのテルペンプロファイルの使用

cannabis sativa（大麻またはマリファナ）植物には、モノ、セスキ、ジ、トリの他、テルペノイドに由来する多様なその他の化合物など、100種類を超える様々なテルペンとテルペノイドが含まれます³。テルペンプロファイルは必ずしも大麻試料の産地の起源を示しませんが、法医学的アプリケーションで様々な試料に共通な起源を確定するのに利用できます⁴。さらに、独特の芳香や風味を持つ様々な大麻種がこれまで開発されてきましたが、これらの芳香や風味は大麻中に存在する特定のテルペン類の量の違いによります⁵。Humulus lupulus（一般的なホップ）と大麻はいずれもアサ科に属します⁶。したがって、それぞれが含有するテルペン類には類似性があります。テルペン類は、植物商品に特徴的な官能特性と、大麻では芽を加熱または気化させたときの特徴的な芳香の両方を持っています⁷。

実験

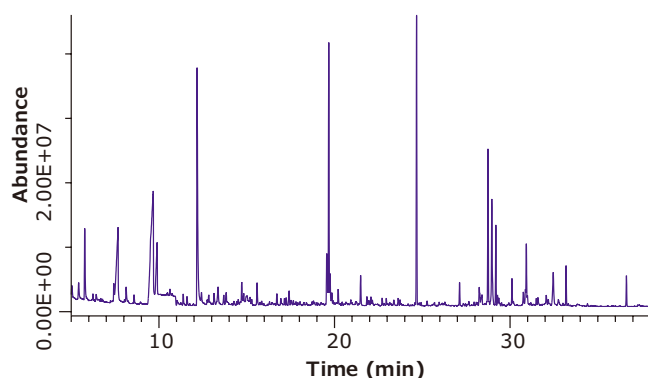
乾燥大麻試料は、Hari H. Singh博士（米国国立薬物乱用研究所（国立衛生研究所）化学・生理学システム研究部門プログラムディレクター）のご厚意により入手しました。なお、試料の抽出された種は不明です。種が不明なホップの花をネットショップから購入しました。また、ペレット化されたカスケード種と米国ゴールドディング種のホップを地元の自家製ビール販売店から購入しました。クロマトグラフィーによる分離はEquity[®]-1キャピラリー GCカラムで行い、同定は保持指標およびスペクトルライブラリーとのマッチングにより行いました。最終的な分析条件は図中に示してあります。

SPME法の最適化

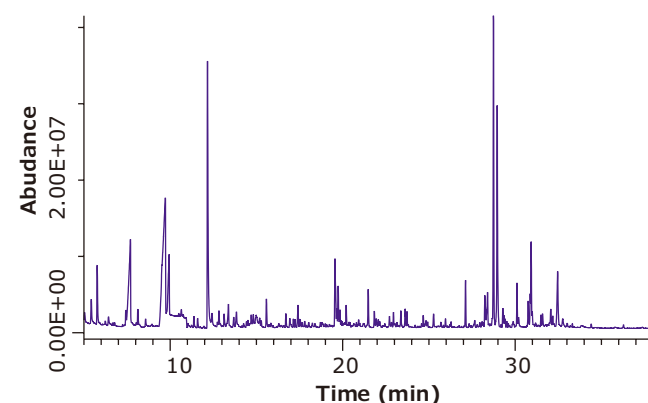
乾燥したホップの花の試料（10 mLバイアル中に0.2 g）を使ったSPME法を開発しました。SPMEパラメーターの初期値はこれまでに公表された研究に基づきました⁸。本分析でのGC/MSの結果を図2に示します。一連のパラメーターの初期値には、PDMSファイバー 100 μm、試料サイズ1 g、抽出前の室温での平衡化60分間を使用しました。その後、試料サイズを0.2 gに減らし、平衡化温度を40°Cに上げました。昇温により、検出感度は低下せずに平衡化時間が60分から30分に短縮されました（図3および図4）。最初に行った抽出時間は20分間でしたが、さらに短い10分間の抽出時間を評価しました。しかし、検出感度が損なわれたため、抽出時間は20分間のままにしました。次に、DVB/CAR/PDMSファイバーを評価しました（図5）。予想通り、このファイバーは低分子化合物をより多く抽出しました。これらの低分子化合物は、MSスペクトルの一致により短鎖のアルコールと酸であると同定されました。

図2:乾燥したホップの花のヘッドスペースSPME-GC/MS分析 (PDMS:100 μ m、試料:1 g)

Sample/matrix:	1 g ground hop flowers
SPME fiber:	100 μ m PDMS (57341-U)
Sample equilibration:	60 min, room temperature
Extraction:	20 min, headspace, 40 °C
Desorption process:	3 min, 270 °C
Fiber post bake:	3 min, 270 °C
Column:	Equity®-1, 60 m x 0.25 mm I.D., 0.25 μ m (28047-U)
Oven:	60 °C (2 min), 5 °C/min to 275 °C (5 min)
Inj. temp.:	270 °C
Detector:	MSD
MSD interface:	300 °C
Scan range:	full scan, m/z 50-500
Carrier gas:	helium, 1 mL/min constant flow
Liner:	0.75 mm ID SPME

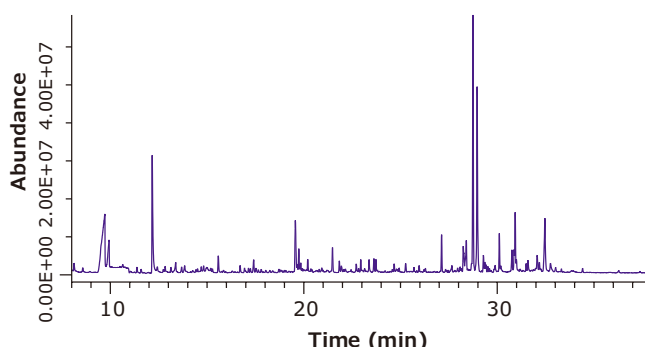
**図3:**乾燥したホップの花のヘッドスペースSPME-GC/MS分析 (PDMS:100 μ m、試料:0.2 g)

Conditions same as Figure 2 except:
sample/matrix: 0.2 g ground hop flowers

**図4:**乾燥したホップの花のヘッドスペースSPME-GC/MS分析、試料平衡化温度を昇温 (PDMS:100 μ m、試料:0.2 g)

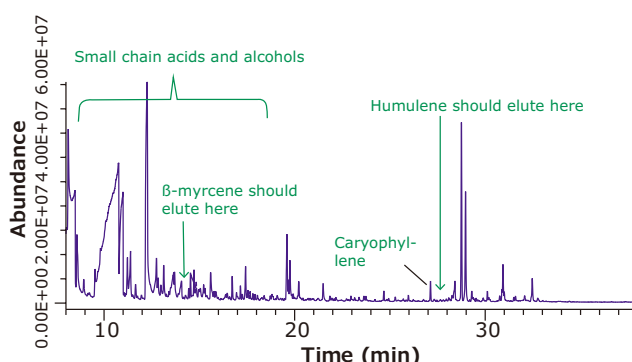
Conditions same as Figure 2 except:

sample/matrix:	0.2 g ground hop flowers
sample equilibration:	30 min, 40 °C

**図5:**乾燥したホップの花のヘッドスペースSPME-GC/MS分析、試料平衡化温度を昇温 (DVB/CAR/PDMS、試料:0.2 g)

Conditions same as Figure 2 except:

sample/matrix:	0.2 g ground hop flowers
SPME fiber:	50/30 μ m DVB/CAR/PDMS (57298-U)
sample equilibration:	30 min, 40 °C



のデータを公表された値(表2および表3)と比較し、図6と図7に示すように最終同定を行いました。

ホップ試料中のテルペン類

乾燥したホップの花の試料(図5)のテルペンプロファイルでは、ホップとホップオイルに含まれる代表的な芳香化合物であるβ-ミルセン、フムレン、カリオフィレンが突出しているはず⁹。しかし、カリオフィレンは同定されたものの、β-ミルセン、フムレンはいずれもライブラリー検索で検出できるほど高いレベルでは存在しませんでした。テルペンプロファイルはホップ種の違いによってばらつくことが知られているため、この結果は試料や実際に分析したホップ種の違いによるものかもしれません¹⁰。パッケージには種を特定する記載がなかったため、分析したホップの花の種は分かりません。比較のため、ペレット化された異なる2種のホップ試料を粉碎して分析しました。これらの試料は緑色を呈し、乾燥した花より強いホップ様の特徴的な香りがありました。これらの試料を分析すると、いずれもβ-ミルセン、カリオフィレン、フムレンが高いレベルで存在する特徴的なテルペンプロファ

GC/MSを使用したテルペン類の同定

DVB/CAR/PDMSファイバーを使用し、最適化されたSPME法でホップと大麻の試料を分析しました。MSスペクトルをWileyおよびNISTライブラリーの標準スペクトルとマッチングしてピーク同定を行いました。また、保持指標に基づいて同定を確認しました。各試料中で同定された化合物に対する保持指標は、同一のGC条件下で分析されたn-アルカン標準物質を用いて計算しました。こ

表2:MSスペクトルライブラリーとのマッチングおよび保持指標で
同定されたホップペレット中のテルペン類

Peak No.	RT (min)	Name	RI (calculated)	RI (literature)	Reference
1	8.58	Hexanal	—	780	11
2	12.84	α -Pinene	939	942	11
3	13.28	Camphene	953	954	11
4	13.71	6-Methyl-5-hepten-2-one	966	968	11
5	14.1	β -Pinene	979	981	11
6	14.41	β -Myrcene	988	986	11
7	15.32	Cymene	1018	1020	11
8	15.65	d-Limonene	1030	1030	11
9	15.98	β -Ocimene	1041	1038	11
10	16.72	cis-Linalool oxide	1066	1068	11
11	17.49	Linalool	1089	1092	11
12	21.86	Geraniol	1239	1243	11
13	25.28	Geranyl acetate	1363	1364	11
14	25.85	α -Ylangene	1384	1373	8
15	25.97	α -Copaene	1388	1398	11
16	27.22	Caryophyllene	1437	1428	11
17	27.4	trans- α -Bergamotene + unknown	1445	1443	12
18	17.63	trans- β -Farnesene	1454	1450	8
19	28.11	Humulene	1473	1465	11
20	28.41	γ -Muurolene	1484	1475	11
21	28.45	γ -Selinene	1486	1472	12
22	28.68	Geranyl isobutyrate	1495	1493	11
23	28.79	β -Selinene	1499	1487	8
24	28.94	α -Muurolene	1505	1500	11
25	28.97	α -Selinene	1507	1501	12
26	29.31	γ -Cadinene	1521	1518	11
27	29.37	Calamenene	1524	1518	11
28	29.45	Δ -Cadinene	1527	1524	11
29	30.93	Caryophyllene oxide	1590	1584	8
30	31.5	Humulene oxide	1614	1599	12

イルを示しました(図6)。SPME法により、2種のホップ間でのテルペンプロファイルの違いを検出できました。例えば、ファルネセン(ピーク18)はカスケード種のホップでは同定されましたが、米国ゴールディング種の試料では低すぎて確認できませんでした。カスケード種のホップに含まれるファルネセンのレベルはオイル全体の3~7%と予想されますが、米国ゴールディング種では1%未満と推測されます¹³。

大麻試料中のテルペン類

大麻試料中で同定されたテルペン類(図7)を表3に示します。得られたプロファイルはこれまでの乾燥大麻の分析で見られたものと類似していました^{4,8}。図7のピーク1~27(ピーク7を除く)はモノテルペンとモノテルペノイドでした。その後の溶出ピークはセスキテルペン類と、セスキテルペノイドであるカリオフィレンオキシドから構成されていました。最も多いテルペンはカリオフィレンでした。この化合物が突出していたのは、試験した大麻固有の種および/または試験した乾燥試料の特質である可能性があります。これまでの研究では、乾燥させることによってこの化合物のレベルがその他のテルペン類とテルペノイド類より著しく増加す

図6:ホップペレットのヘッドスペースSPME-GC/MS分析

The peak elution order is listed in Table 2.

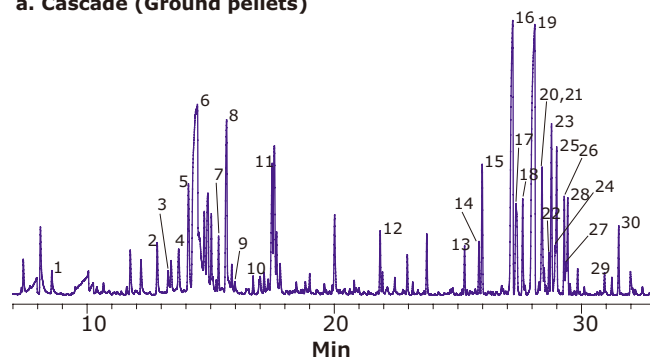
Conditions same as Figure 2 except:

sample/matrix: 0.5 g ground hop flowers (hops pellets)

SPME fiber: 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS (57298-U)

sample equilibration: 30 min, 40 °C

a. Cascade (Ground pellets)



b. US Golding (Ground pellets)

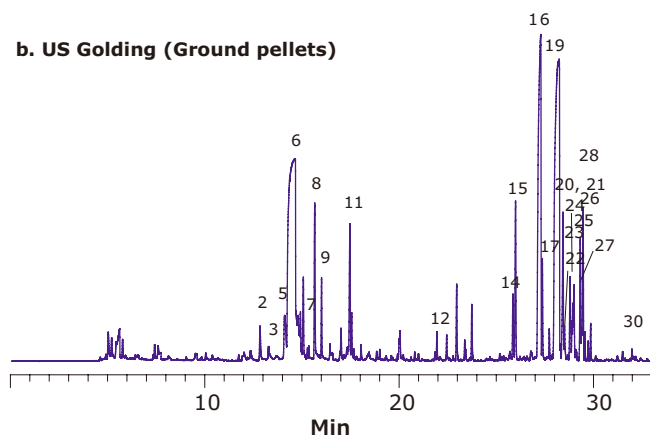


図7:乾燥大麻のヘッドスペースSPME-GC/MS分析

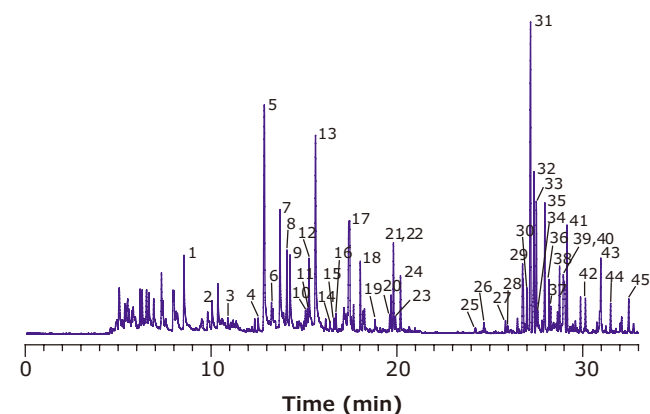
The peak elution order is listed in Table 3.

Same as Figure 2 except:

sample/matrix: 0.5 g dried, ground cannabis

SPME fiber: 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS (57298-U)

sample equilibration: 30 min, 40 °C



(continued on next page)

ることが示されています⁴。そのため、揮発性が高いモノテルペン類とテルペノイド類のレベルが低くなると予想され、これはある程度観察されました。モノテルペン類とテルペノイド類の中で最も多かったのは α -ピネンとd-リモネンでした。

表3: MSスペクトルライブラリーとのマッチングおよび保持指標で同定された乾燥大麻中のテルペン類

Peak No.	RT (min)	Name	RI (calculated)	RI (literature)	Reference
1	8.57	Hexanal	—	—	—
2	10.05	Hexene-1-ol	—	—	—
3	10.89	2-Heptanone	—	—	—
4	12.56	α -Thujene	928	938	11
5	12.86	α -Pinene + unknown	939	942	11
6	13.27	Camphene	953	954	11
7	13.69	6-Methyl-5-hepten-2-one	966	968	11
8	14.09	β -Pinene	979	981	11
9	14.27	β -Myrcene	984	986	11
10	15.09	δ -3-Carene	1010	1015	12
11	15.2	α -Terpinene	1014	1012	12
12	15.29	Cymene	1018	1020	11
13	15.6	d-Limonene	1028	1030	11
14	16.42	γ -Terpinene	1056	1057	11
15	16.6	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1062	1078	11
16	16.72	<i>cis</i> -Linalool oxide	1066	1068	11
17	17.43	Linalool	1087	1092	11
18	18.04	d-Fenchyl alcohol	1107	1110	11
19	18.82	<i>trans</i> -Pinocarveol	1135	1134	12
20	19.59	Borneol L	1161	1164	11
21	19.81	1,8-Methandien-4-ol	1168	1173	8
22	19.81	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1168	1172	12
23	19.92	Terpinene-4-ol	1172	1185	11
24	20.22	α -Terpineol	1181	1185	11
25	24.2	Piperitenone	1322	1320	12
26	24.76	Piperitenone oxide	1344	1352	12
27	25.85	α -Ylangene	1384	1373	8
28	25.97	α -Copaene	1388	1398	11
29	26.76	γ -Caryophyllene	1419	1403	12
30	27.01	α -Santalene	1429	1428	12
31	27.16	Caryophyllene	1435	1428	11
32	27.36	<i>trans</i> - α -Bergamotene + unknown	1443	1443	12
33	27.49	α -Guaiene	1448	1441	8
34	27.56	<i>trans</i> - β -Farnesene	1451	1446	12
35	27.98	Humulene	1467	1465	11
36	28.17	Alloaromadendrene	1475	1478	11
37	28.25	α -Curcumene	1478	1479	12
38	28.75	β -Selinene	1497	1487	8
39	28.97	α -Selinene	1507	1497	8
40	28.97	β -Bisobolene	1507	1506	8
41	29.13	α -Bulnesene	1514	1513	12
42	30.12	Selina-3,7(11)-diene	1556	1542	12
43	30.94	Caryophyllene oxide	1590	1595	12
44	31.5	Humulene oxide	1614	1599	12
45	32.48	Caryophylla-3,8(13)-dien-5-ol A	1658	1656	12

結論

ヘッドスペースSPME-GC/MS法を使って、ホップと大麻両方のテルペン／テルペノイドプロファイルを分析しました。本方法では特徴的なテルペン類とテルペノイドのいずれも検出可能であり、様々なホップ種を区別できました。

References

1. Fessenden, R.J; Fessenden, J.S. Lipids and Related Natural Products. *Organic Chemistry*, 2nd Edition; Willard Grant Press: Boston, MA, 1979; pp 897-904.
2. Bauer, B., M.D. What are the Benefits of Aromatherapy? mayoclinic.org/healthy-lifestyle, accessed 9/22/15.
3. Turner, C.E.; Elsohly, E.G.; Boeren, E.G. Constituents of Cannabis Sativa L., XVIII. A Review of the Natural Constituents. *J. Nat. Prod.*, 1980, 43, 169-234.
4. Hood, L.V.S.; Barry, G.T. Headspace Volatiles of Marihuana and Hashish: Gas Chromatographic Analysis of Samples of Different Geographic Origin. *J. Chrom. A.*, 1978, 166, 499-506.
5. Rahn, B. Terpenes: The Flavors of Cannabis Aromatherapy. 2/12/2014. www.leafly.com/news, accessed September 18, 2015.
6. Plants Database. www.usda.gov, accessed September 14, 2015.
7. Kemsley, J. Cannabis Safety. *CEN*, 2015, April 20, 27-28.
8. Marchini, M.; Charvoz, C.; Dujourdy, L.; Baldovini, N. Multidimensional Analysis of Cannabis Volatile Constituents: Identification of 5,5-dimethyl-1-vinylbicyclo[1.1.1]hexane as a Volatile Marker of Hashish, the Resin of Cannabis Sativa L. *J. Chrom. A.*, 2014, 1370, 200-215.
9. Wolfe, Peter H. MS Thesis, Oregon State University, 2012.
10. Hop varieties. BarthHaasGroup.com, September 15, 2015.
11. Jennings, W.; Shibamoto, T. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*, Academic Press, 1980.
12. NIST Chemistry WebBook. www.webbook.nist.gov/chemistry.
13. Variety Manual USA Hops. Hop Growers of America, www.USAhops.org, accessed September 22, 2015.

本分析で使用した製品

Description	Cat. No.
Capillary GC column	
Equity®-1, 60 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μ m	28047
SPME Fibers and Accessories	
SPME fiber assembly Divinylbenzene/Carboxen®/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), d _i 50/30 μ m, needle size 23 ga, StableFlex™, for use with autosampler, pk of 3	57298-U
SPME fiber assembly Polydimethylsiloxane (PDMS), d _i 100 μ m (nonbonded phase), needle size 23 ga, for use with autosampler, pk of 3	57341-U
SPME fiber holder for CTC autosampler	57347-U
SPME fiber holder for manual sampling	57330-U
Accessories	
Inlet Liner, Direct (SPME) Type, straight design, 0.75 mm I.D. for Agilent® GC	2637501
Molded Thermogreen® LB-2 Septa, with injection hole, 11 mm, pk of 50	28336-U
Headspace Vial, screw top, rounded bottom, 10 mL, clear glass, pk of 100	SU860099
Magnetic Screw Cap for Headspace Vials, PTFE/silicone septum, pk of 100	SU860103

SPME技術の詳細については、SigmaAldrich.com/spmeをご覧ください。

NEW テルペノイド混合溶液 (認証標準物質/CRM)

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

Jenna Milliken, R&D Senior Scientist jenna.milliken@sial.com

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



前のアプリケーションノート(9～12ページ)で述べたように、テルペノイド類は様々な分野で重要な天然物のグループです。スパイス、アロマセラピー、香料、植物化学物質で重要な役割を担っており、例えば大麻の強烈な香りもテルペノイド類によるものです。また、大麻に見られる薬効や生理学的作用のいくつかは特定のテルペノイド類に起因します。テルペン類の試験やプロファイリングを使用してその特性の理解を深めることができますが、様々な種を同定し、分類するにはさらに信頼性の高い標準物質が必要です。そのため、当社は2種類のテルペン混合溶液(CRM40755およびCRM40937)を開発、また、60種類を超えるテルペノイド類用単一成分CRM溶液を確立しました。これらの混合溶液の濃度は2000 µg/mL(メタノール溶液中)です。

また、約250種類のイソプレノイド標準物質(未希釈品)も提供しています。これらの標準物質については[SigmaAldrich.com/terpenoids](https://sigmaaldrich.com/terpenoids)をご覧ください。

表1: CANNABIS TERPENE MIX A CRM40755の成分

#	Compound	Concentration	CAS Number
	Internal Standard	2000 µg/mL	N/A
2	α-Pinene	2000 µg/mL	80-56-8
3	Camphene	2000 µg/mL	79-92-5
4	β-Pinene	2000 µg/mL	127-91-3
5	3-Carene	2000 µg/mL	13466-78-9
6	α-Terpinene	2000 µg/mL	99-86-5
7	(R)-(+)-Limonene	2000 µg/mL	5989-27-5
8	γ-Terpinene	2000 µg/mL	99-85-4
9	L-(-)-Fenchone	2000 µg/mL	7787-20-4
10	Fenchol	2000 µg/mL	2217-02-9
11	(1R) (+) Camphor	2000 µg/mL	464-49-3
12	Isoborneol	2000 µg/mL	124-76-5
13	Menthol	2000 µg/mL	89-78-1
14	Citronellol	2000 µg/mL	106-22-9
15	(+)-Pulegone	2000 µg/mL	89-82-7
16	Geranyl acetate	2000 µg/mL	105-87-3
17	α Cedrene	2000 µg/mL	469-61-4
18	α Humulene	2000 µg/mL	6753-98-6
19	Nerolidol*	2000 µg/mL	7212-44-4
20	(+)-Cedrol	2000 µg/mL	77-53-2
21	(-)-α-Bisabolol	2000 µg/mL	23089-26-1

表2: CANNABIS TERPENE MIX B CRM40937の成分

#	Compound	Concentration	CAS Number
	Internal Standard	2000 µg/mL	N/A
2	β-Pinene	2000 µg/mL	18172-67-3
3	(1S)-(+)-3-Carene	2000 µg/mL	498-15-7
4	p-Cymene	2000 µg/mL	99-87-6
5	Limonene	2000 µg/mL	138-86-3
6	Terpinolene	2000 µg/mL	586-62-9
7	Linalool	2000 µg/mL	78-70-6
8	(1S)-(-)-Camphor	2000 µg/mL	464-48-2
9	(+)-Borneol	2000 µg/mL	464-43-7
10	(-)-α-Terpineol	2000 µg/mL	10482-56-1
11	Geraniol	2000 µg/mL	106-24-1
12	β-Caryophyllene	2000 µg/mL	87-44-5
13	cis-Nerolidol	2000 µg/mL	3790-78-1
14	β-Eudesmol	2000 µg/mL	473-15-4
15	Phytol**	2000 µg/mL	7541-49-3

*異性体の総面積

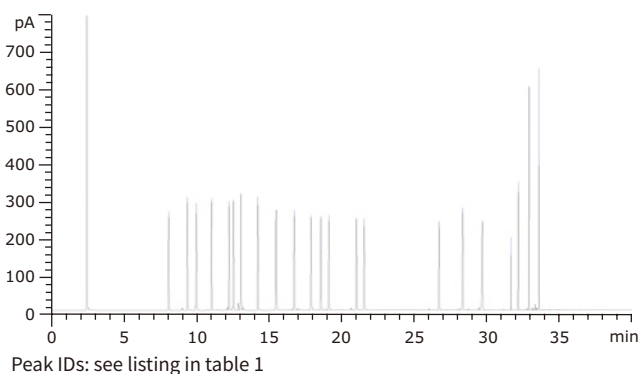
**異性体の総量として認証

CANNABIS TERPENE MIX A – CRM40755

Column: SLB®-5ms 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm 60 ° C
for 3.5 min, 3.5 ° C/min to 155 ° C, 30 ° C/min
to 300 ° C, hold 5 min

Detector: FID, 310 ° C

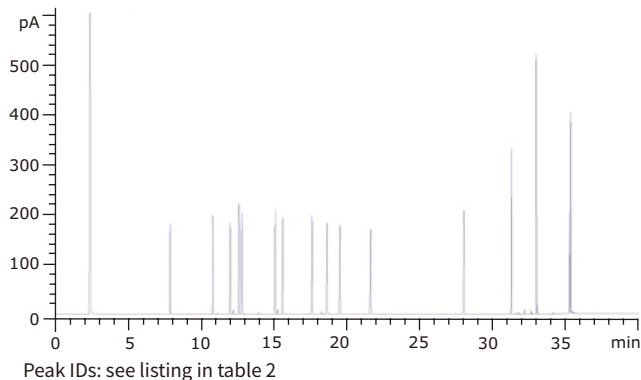
Injection Volume: 1 µL

**CANNABIS TERPENE MIX B – CRM40937**

Column: SLB®-5ms; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm df
60 ° C for 3.5 min, 3.5 ° C/min to
155 ° C, 30 ° C/min to 300 ° C, hold 5 min

Detector: FID, 310 ° C

Injection Volume: 1 µL

**表3:単一成分溶液**

Solution of	Qty.	Cat. No.
(-)-Bisabolol	1 mL	CRM40763
(+)-Borneol	1 mL	CRM40901
(-)-Borneol	1 mL	CRM40456
Camphene	1 mL	CRM40378
(±)-Camphor	1 mL	CRM40393
(1R)-(+)-Camphor	1 mL	CRM40374
(+)-3-δ-Carene	1 mL	CRM40416
β-Caryophyllene	1 mL	CRM40483
(-)-Caryophyllene oxide	1 mL	CRM40928
Cedrene	1 mL	CRM40482
Cedrol	1 mL	CRM40903
Cetone	1 mL	CRM40383
Citronellol	1 mL	CRM40469
p-Cymene	1 mL	CRM40419
Dihydrocarveol	1 mL	CRM40914
Eucalyptol	1 mL	CRM40684
Farnesol	1 mL	CRM40689
Fenchol	1 mL	CRM40746
(+)-Fenchone	1 mL	CRM40747
L-(-)-Fenchone	1 mL	CRM40762
Geraniol	1 mL	CRM40749
Geranyl acetate	1 mL	CRM40764
Guaiacol	1 mL	CRM40484
(-)-Guaiol	1 mL	CRM40917
Humulene	1 mL	CRM40921
Hydroxycitronellal	1 mL	CRM40908
Isoborneol	1 mL	CRM40471
Isolongifolene	1 mL	CRM40391
Isopulegol	1 mL	CRM40757

Solution of	Qty.	Cat. No.
Lilial	1 mL	CRM40184
(R)-(+)-Limonene	1 mL	CRM40422
Linalool	1 mL	CRM40437
Longifolene	1 mL	CRM40481
Lyrar	1 mL	CRM40911
(+)-Menthol	1 mL	CRM40474
β-Myrcene	1 mL	CRM42262
Nerol	1 mL	CRM40744
cis-Nerolidal	1 mL	CRM40743
trans-Nerolidal	1 mL	CRM40742
Nerolidol	1 mL	CRM40906
cis/trans-Ocimene	1 mL	CRM40748
Phytol	1 mL	CRM40375
(-)-β-Pinene	1 mL	CRM40417
(+/-)-α-Pinene	1 mL	CRM40339
(+/-)-β-Pinene	1 mL	CRM40433
Safrole	1 mL	CRM40478
α-Terpinene	1 mL	CRM40443
γ-Terpinene	1 mL	CRM40431
(-)-α-Terpeneo	1 mL	CRM40907
α-Terpeneol	1 mL	CRM40428
Terpinolene	1 mL	CRM40929
α & β-Thujone	1 mL	CRM40909
Thymol	1 mL	CRM40188
Valencene	1 mL	CRM40934
Verbenon	1 mL	CRM40189

詳細については、[SigmaAldrich.com/terpenoids](https://sigmaaldrich.com/terpenoids)をご覧ください。

Passiflora incarnataへのHPTLCの応用

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



前稿では、イチヨウ (Analytix 2016年第5号)、オトギリソウ (Analytix 2017年第1号)、朝鮮人参 (Analytix Reporter 2018年第2号) など、一連の薬用植物へのHPTLC (高性能薄層クロマトグラフィ) の応用を紹介しました。引き続き、本稿ではトケイソウについて植物のHPTLCフィンガープリント分析の有効性をさらに示します。当社は分析試薬と標準物質を包括的に提供しており、本応用例に使用した消耗品 (TLC/HPTLCプレート、溶媒、分析用標準物質、抽出物標準物質) はいずれも当社の製品です。

Passiflora incarnata (トケイソウ) は、ラテンアメリカ先住民が何世紀にもわたって馴染んできた植物です。トケイソウは、スペイン人の医師Monardesにより1569年にペルーで発見され、ヨーロッパでは、観賞植物として長年利用されてきました。20世紀後半、トケイソウはホメオパシーの分野で活用されるようになりました。効果の弱い鎮痛剤として利用され、強心効果や神経鎮静効果も併せ持っています。トケイソウはもともと熱帯雨林に自生し、主にインド、米国 (フロリダ)、イタリア、スペインで生薬生産向けに栽培されています。

TLCフィンガープリント分析は、ほとんどの薬局方で生薬の同定法として規定されています。トケイソウの薬草には、グリコシル化された数種のフラボノイド類が存在します。これらの化合物は、誘導体化後、本稿に示すHPTLCフィンガープリント分析により鋭敏に検出できます。

結果および考察

HPTLC協会¹に従って実証された方法を使えば、HPTLCフィンガープリント分析による*Passiflora incarnata*の迅速な同定が可能です。システム適合性試験として標準物質をアプライし、得られた結果の適格性 (R_f 値が規定された許容範囲 ΔR_f 0.025以内に収まらなければなりません) を確認します。さらに、*Passiflora incarnata*に

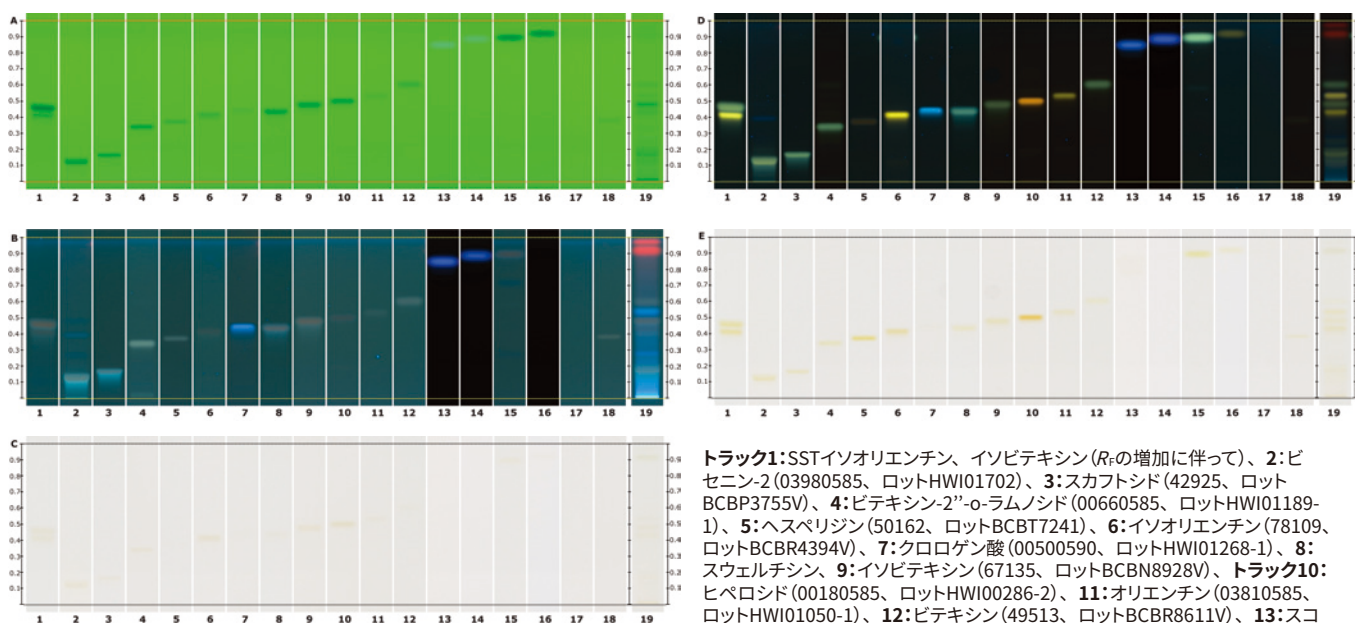


図1: 誘導体化前のUV 254 nm (A)、UV 366 nm (B)、および白色光 (C) でのクロマトグラム、NP/PEGで誘導体化後のUV 366 nm (D)、ならびにNP/PEGで誘導体化後の白色光 (E) でのクロマトグラム

トラック1: SSTイソオリエンチン、イソビテキシン (R_f の増加に伴って)、2: ビセニン-2 (03980585、ロットHWI01702)、3: スカフトシド (42925、ロットBCBP3755V)、4: ビテキシン-2''-o-ラムノシド (00660585、ロットHWI01189-1)、5: ヘスペリジン (50162、ロットBCBT7241)、6: イソオリエンチン (78109、ロットBCBR4394V)、7: クロコゲン酸 (00500590、ロットHWI01268-1)、8: スウェルチン、9: イソビテキシン (67135、ロットBCBN8928V)、**トラック10:** ヒペロシド (00180585、ロットHWI00286-2)、11: オリエンチン (03810585、ロットHWI01050-1)、12: ビテキシン (49513、ロットBCBR8611V)、13: スコボレチン (38332、ロットBCBS2552V)、14: ウンベリフェロン (54826、ロットBCBR1694V)、15: アビゲニン (01760595、ロットHWI00086-1)、16: クリシン (95082、ロットBCBP9460V)、17: オレアノール酸 (42515、ロットBCBT0832)、18: α -テルピネオール (04899、ロットBCBS7535V)、19: *Passiflora incarnata* 抽出物標準物質 (05085001、ロットHWI01280)

存在するグリコシル化されたフラボノイド類の標準物質も塗布します。

システム適合性試験

(UV 254 nm、 ΔR_f 0.025、 $\min_{\text{height}}$ 0.010 AU)

- イソオリエンチン (0.15 mg/mL) : クエンチングゾーン R_f 約0.041
- イソビテキシン (0.15 mg/mL) : クエンチングゾーン R_f 約0.046

本試験ではHWI社の抽出物標準物質 (トラック19) を使用しました。本抽出物に存在するゾーンは色、位置ともに標準物質のピセニン-2、スカフトシド、イソオリエンチン、イソビテキシン、オリエンチン、ビテキシンと一致しました。また、得られたHPTLCフィンガープリントは、トケイソウ科の薬草に含まれる化学種のイソビテキシン¹と類似していました。

HPTLCフィンガープリント分析により、時間とコストを要する試料の調製を行わずに並行して多数の試料を迅速に同定できます。目視比較による評価は単純かつ便利です。HPTLCは植物物質の同定試験に適した方法と考えられます。

Reference

1. www.hptlc-association.org: Passion flower herb and passion flower dry extract identification (version 2018-05-07)

USP<203>に準拠したクロマトグラフィー

固定相	HPTLC Si 60 F ₂₅₄ 、20 × 10 cm
試料のアプライ	ATS 4を使用し、試験溶液と標準物質各4 μLを15トラックに、バンド長さ8 mm、トラック間隔11.4 mm、左端から20 mm、下端から8 mmの位置にバンド状に塗布
展開溶媒	酢酸エチル、ギ酸、水、エチルメチルケトン (50:10:10:30、v/v/v/v)
展開	相対湿度33%で、塩化マグネシウム (MgCl ₂) 飽和水溶液を使用してコンディショニングした後、ADC内でろ紙を使用して展開槽を20分間飽和させる。
展開距離	70 mm (下端から)
プレート乾燥	ADC 2で5分間乾燥
誘導体化	NP試薬: 5 mg/mLの2-アミノエチルジフェニルポリナート (酢酸エチル中)、PEG試薬: 50 mg/mLのポリエチレングリコール400 (ジクロロメタン中)
誘導体化前の噴霧用にNP試薬とPEG試薬を混合 (1:1、v/v)	プレートを100° Cで3分間加熱し、自然冷却。混合物で誘導体化 (ノズルで噴霧: 緑、噴霧レベル: 3、噴霧容量: 3 mL)。プレートを冷気流中で2分間乾燥させて写真を撮影

本分析で使用した製品

Description	Package Size	Cat. No.
Analytical Standards		
Chlorogenic acid*	25 mg	00500590
Vitexin 2-O-rhamnoside*	10 mg	00660585
Apigenin	10 mg	01760595
Chrysin	50 mg	95082
Hesperidin	10 mg	50162
Hyperoside*	25 mg	00180585
Isorientin	10 mg	78109
Isorientin*	10 mg	03820585
Isovitexin	5 mg	67135
Isovitexin*	10 mg	01120590
Oleanolic Acid	10 mg	42515
Oleanolic Acid*	10 mg	03920590
Orientin*	10 mg	03810585
Schaftoside	5 mg	42925
Scopoletin	10 mg	38332
α-Terpineol	250 mg	04899
α-Terpineol*	100 mg	03420590
Umbelliferone	50 mg	54826
Vicenin-2*	10 mg	03980585
Vitexin	10 mg	49513
Vitexin*	10 mg	00840595
Extract Reference Material		
Passiflora incarnata extract	500 mg	05085001
Quantified Components:		Isovitexin
Qualitatively Confirmed Components:		Vitexin, Orientin, Homoorientin, Isovitexin
TLC Plates		
HPTLC glass plate silica gel 60 F ₂₅₄ 20×10 cm	50 Plates	1.05642

*HWI reference standard

入手可能なすべての植物化学物質分析用標準物質のリストについては、[SigmaAldrich.com/medicinalplants](https://www.sigmaaldrich.com/medicinalplants)をご覧ください。

すべての植物抽出物標準物質の概要については、[SigmaAldrich.com/plantextracts](https://www.sigmaaldrich.com/plantextracts)をご覧ください。

高性能薄層クロマトグラフィープレートの特徴の詳細については、[SigmaAldrich.com/tlc](https://www.sigmaaldrich.com/tlc)をご覧ください。

SPMEとGS/MSによる水中の揮発性有機化合物の改良測定法：ISO規格17943

Frank Michel, Analytical & Chromatography Scientific Advisor, Advanced Analytical, frank.michel@sial.com

Yong Chen, Sr. Scientist Gas Separation R&D, yong.chen@sial.com

Robert Shirey, Principal R&D Scientist, bob.shirey@sial.com

水中の揮発性有機化合物は有毒なため、その分析が重要です。現在のその測定方法では感度、選択性、または自動化への適用性が不足しています。本稿では、固相マイクロ抽出 (SPME) と GS/MS を使った新たな ISO 17943 規格を紹介します。SPME を使った試料調製によって検出限界を下げることができ、方法全体の自動化も容易になります。また、GS/MS により、要求される感度と選択性が得られます。本 ISO 規格の適格性は試験所間試験によって検証されました。本方法の卓越した性能はその結果によって確認されます。

緒言

揮発性有機化合物 (VOC) は植物の香りなどの天然起源で生じるものもありますが、日常的に使用する製品から発生したり、それらの製品の製造過程やポリマー、接着剤、塗料、石油製品、医薬品から放出されたりするため、その大部分は人為起源です。VOC の代表的な用途には、ガソリン添加物、溶媒および油圧作動油、ドライクリーニングでの使用が挙げられます。VOC の多くは有毒であり、既知または疑いのあるヒト発がん性物質であるため、人間の健康上の観点から、世界中で水資源の汚染が深刻な懸念となっています。

そのため、飲用水、地下水、地表水中の VOC の総量を制限および規制する多くの国際規定が制定されてきました。このような規定の例には、米国の安全飲料水法 (SDWA)¹ や、健康への配慮に基づいて VOC リストを含む飲用水の国内基準値を設定した、SDWA に

対応するカナダの法律があります。その他の例は、揮発性有機物質ごとの数値を規制する、人が消費することを目的とした水の質に係る欧州理事会指令 98/83/EC です²。また、指令 200/60/EC³ 第 16 条中の EU 水枠組み指令 (WFD) には、「水質汚染への対処戦略」が述べられています。指令 2008/105/EC (EQS 指令)⁴ によれば、VOC ごとの環境基準 (EQS) 値は 0.4 ~ 20 µg/L の範囲にすべきとしています。WFD の附属書 V (品質成

分の監視基準) では、可能であれば、水の分析に ISO および CEN 規格を使用することを要求しています。

水中 VOC を測定するための既存の ISO および CEN 規格はもはや最先端の手法ではありません。ISO 10301⁵ では、液/液抽出 (LLE) をガスクロマトグラフィー (GS) と炎イオン化検出器 (FID) または電子捕捉検出器 (ECD) による検出と組み合わせて使用します。ISO 11423⁶ では、ヘッドスペース (HS) サンプルングを GC/FID または GC/ECD と組み合わせて使用します。検出器の感度や選択性が不十分なため、関連する特定の VOC では、これらの ISO 規格を使用したときに要求される検出限界を達成できません。ISO 15680⁷ には、パージ-トラップ濃縮とガスクロマトグラフィー-質量分析 (GS-MS) 分析を使用して選択性と検出限界を向上させる代替方法が示されています。ただし、トラップが汚染されやすいこと、およびその自動化の達成がやや困難であることがパージ-トラップの弱点です⁸。

HS-SPMEとGS/MSによる水中VOCの改良測定法：ISO規格17943

固相マイクロ抽出 (SPME) を GS/MS と組み合わせる方法は、水中 VOC を測定する魅力的な代替法です。SPME は 1990 年に Janusz Pawliszyn により開発されました⁹ (図 1)。それ以来、SPME の開発と応用に関する発表の数が増えてきていることに示されるように、SPME は環境、医薬品、および食品の分析にさらに広く受け入れられてきています。さらに、標準的な GC オートサンプラーを利用した SPME の自動化が 1993 年に始まったことも本技法の普及に拍車をかけました。SPME を利用して水から VOC を抽出することがいくつかの刊行物で解説されています¹⁰⁻¹²。ヘッドスペース SPME (HS-SPME) は従来の水中 VOC 測定法より信頼性が高く、有益な代替法であることがこれらの刊行物で立証されました。さらに、SPME は他の多くの公定法にも使用されて成功を収めています¹³⁻¹⁵。



図1: SPME マニュアルホルダー

このため、水中VOCに対する新たなISO規格17943が策定されました。本規格は、飲用水、地下水、地表水、処理済廃水に含まれるハロゲン化炭化水素、ガソリン添加物（BTEX、MTBE、ETBEなど）、揮発性芳香族化合物、ジェオスミンや2-メチルイソボルネオールのような臭気の強い物質など、極めて様々なクラスの中から60種類を超えるVOCのHS-SPMEとGC/MSによる測定を対象としています。当然、検出限界はマトリックス、特定の化合物、利用する質量分析器によって決まりますが、ISO 17943での大部分の化合物検出限界は0.01 µg/L以下です。標準化作業を通して得られた追加検証データによれば、本方法は個々の物質の濃度が0.01 µg/L～100 µg/Lである範囲に適用可能なことが示されています。

新しいISO規格17943の適格性を検証するための世界的な試験所間試験

この新しいISO規格の策定の一環として、新しい方法を検証するための国際的な試験所間試験が実施されました¹⁶。各試験所は、2種類の水試料（一方は地表水、他方は廃水）に含まれる61種類の化合物の濃度測定を行うことが要求されました。地表水試料は都市部の工業地帯（ミュールハイム（ドイツ）を流れるルール川）から、都市廃水試料は工場排水から採取されました。いずれの試料も前処理を施して安定化し、試験に参加する試験所が知らない濃度（地表水は0.02 ～ 0.80 µg/L（約50%は0.10 g/L未満）、廃水は0.05 ～ 3.0 µg/L（約50%は0.50 g/L未満）の範囲）で添加しました。試験所間試験に参加した試験所は、規格草案の方法に規定された手順に厳密に従って、独立した複製分析を2種類の試料それぞれから4回実施する必要があります。メタノール中に溶かした61種類のVOCの認証標準物質をそれぞれ含有する、3本のアンプルにキャリブレーション溶液のセットを充填したものがすべての試験所に配布されました。これらの原液はそれぞれの物質を100 µg/mLの濃度で含有し、すべての手順を校正するために用いる、対応する多成分標準水溶液の調製に使用するものでした。結果は、試料受領後30日以内に報告する必要があります。

弊社のラボ（Supelcoブランドのアプリケーションラボ）は試験所間試験に参加した試験所の1つです。ISO規格17943の草案に準拠し、内部標準物質としてトルエン-d₈、ベンゼン-d₆、フルオロベンゼンを使って2種類の水試料を分析しました（表1および表2、図2）。GC分析にはVOCOLキャピラリー GCカラムを使用しました。このカラムはVOC分析用に設計された中極性カラムで、極めて揮発しやすい化合物に強い保持力と優れた分解能を発揮します。HS-SPMEには、試験所間試験に参加した試験所の大部分でも使用したDVB/CAR/PDMSファイバーを使いました。CAR/PDMSファイバーを使った試験所はDVB/CAR/PDMSを使った試験所より少数でした。なお、ISO規格17943によれば、Carboxen/PDMS (85 µm)、DVB/Carboxen/PDMS (50/30 µm) ファイバーのいずれも使用可能です。

表1: HS-SPME抽出条件

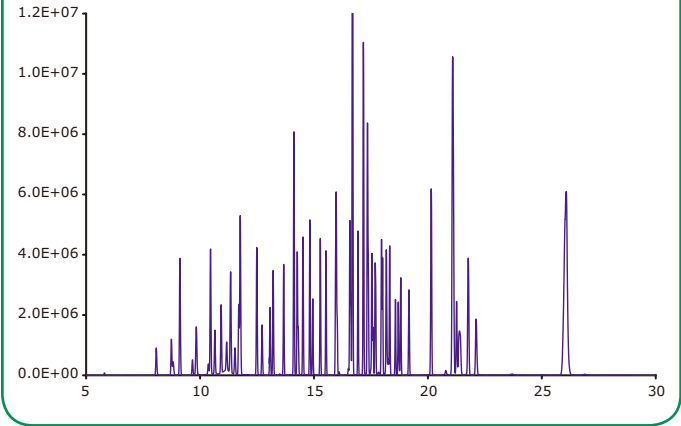
Sample volume:	10 mL
HS-Vial:	20 mL, addition of 3 g salt
SPME fiber:	DVB/CAR/PDMS, 24 gauge
Incubation time:	10 min @ 40 °C
Extraction time:	10 min @ 40 °C
Autosampler:	CTC CombiPAL™ (agitated by circular motion of the vial, velocity: 250 rpm)

表2: GC/MS分析条件

GC:	Agilent® GC/MS
Column:	VOCOL®, 60 m x 0,25 mm I.D., 1.5 µm
Carrier gas:	He, 1 mL/min
Injection/Liner:	Splitless, SPME liner w/ 0,75 mm ID
Desorption/Injector:	10 min @ 270 °C
Oven program:	35 °C, 1 min; 10 °C/min to 150 °C; 20 °C/min to 250, 20 min
Sample:	61 VOCs, 1 ppm, in water plus three internal standards

図2: Agilent® GC/MSにVOCOL® GCカラムを使用したHS-SPME抽出後に得られた、61種類の水中VOCのクロマトグラム

Compound Name	RT (min)	Compound Name	RT (min)
Vinyl chloride	5.8	Chlorobenzene	15.975
1,1-Dichloroethene	8.077	1,1,1-2-tetrachloroethane	15.983
Methylenechloride	8.743	p-Xylene	16.573
MTBE	8.819	o-Xylene	16.573
trans-1,2-Dichloroethylene	9.113	Styrene	16.619
1,1-Dichloroethane	9.667	2-Ethyl-5,5-dimethyl-1,3-dioxane	16.695
ETBE	9.834	Cumene	16.933
2,2-Dichloropropane	10.365	Bromoform	17.162
cis-1,2-Dichloroethylene	10.46	1,1,2,2-Tetrachloroethane	17.175
Trichloromethane	10.649	1,2,3-Trichloropropane	17.346
Bromochloromethane	10.927	Propylbenzene	17.386
1,1,1-Trichloroethane	11.166	Pseudocumene	17.544
TAME	11.339	Bromobenzene	17.596
1,1-Dichloro-1-propene	11.344	2-Chlorotoluene	17.688
Carbon tetrachloride	11.533	4-Chlorotoluene	17.688
1,2-Dichloroethane	11.7	tert-Butylbenzene	17.966
Benzene	11.761	Mesitylene	18.015
Trichloroethylene	12.491	sec-Butylbenzene	18.173
1,2-Dichloropropane	12.722	p-Cymene	18.32
Bromodichloromethane	13.073	1,3-Dichlorobenzene	18.577
Dibromomethane	13.21	1,4-Dichlorobenzene	18.698
cis-1,3-Dichloro-1-propene	13.671	Butylbenzene	18.807
Toluene	14.119	1,2-Dichlorobenzene	19.17
trans-1,3-Dichloro-1-propene	14.267	DBCP	20.145
2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane	14.311	2-Methylisoborneol	21.087
1,1,2-Trichloroethane	14.52	1,2,4-Trichlorobenzene	21.257
1,3-Dichloropropane	14.817	Hexachlorobutadiene	21.386
Tetrachloroethylene	14.946	Naphthalene	21.773
Dibromochloromethane	15.277	1,3,5-Trichlorobenzene	22.113
1,2-Dibromoethane	15.527	Geosmin	26.074
Ethylbenzene	15.945		



試験所間試験の評価

世界中から40を超える試験所が本試験所間試験に登録しました。そのうち、全部で27の試験所がISO 5725-2¹⁷に従った評価プロセスに含めるべき結果を報告しました。9試験所からは何の結果も提出されませんでした。6試験所は規定された手順から著しく逸脱していたため、評価から除外せざるを得ませんでした。また、個々の結果のいくつかは異常値であったため、除外する必要がありました。

10試験所が61種類すべてのパラメーターを分析し、9試験所がほぼすべてのパラメーターを分析しました。表現方法が異なっていたため、20を超える試験所が61種類のVOCのほとんどを分析したことになり、これが統計的評価の有効な基礎になります。データは、結果全体の平均（異常値を除く）、回収率（割り当てられた値からの）、再現性（異なる試験所間でのばらつき）、繰り返し性（試験所内でのばらつき）について分析しました。

評価の一例として、**図3**に2-クロロトルエンの結果を示します。この化合物については24試験所からの結果を評価できました。全体の平均値（緑色の線）は割り当てられた値（紫色の線）に極めて近くなっています。24試験所の大部分は初めてSPMEを行ったにもかかわらず、割り当てられた値に極めて近い結果を達成しました。また、90%を超える化合物の回収率は84～116%（地表水）、81～118%（廃水）でした。再現性（試験所間でのばらつき）は90%を超える化合物で31%未満（地表水）、35%未満（廃水）であり、繰り返し性（試験所内でのばらつき）は90%を超える化合物で10%未満（地表水）、8%未満（廃水）でした。

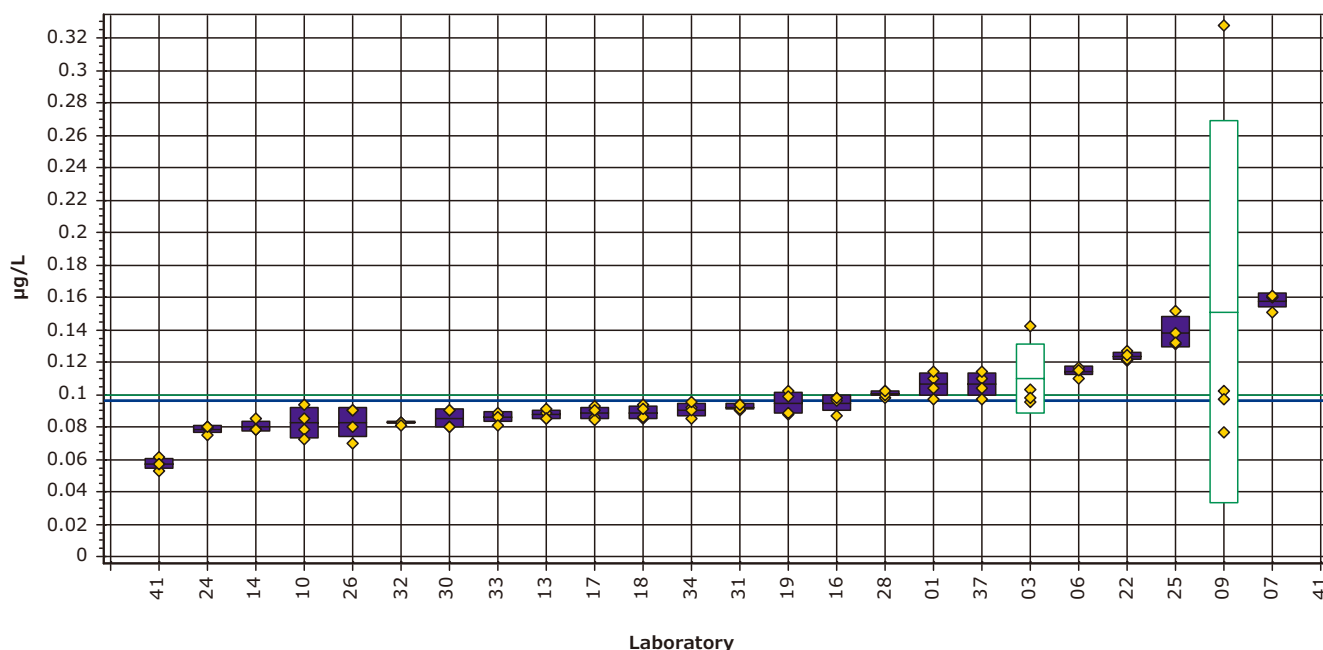
要約

試験所間試験で得られた極めて優れた結果は、GC/MSと組み合わせたHS-SPMEで水中VOCを測定したときの高い性能、高い信頼性、高い再現性を明確に示しています。新しいISO 17943は、検出感度と選択性の点で水中VOC測定に対する既存の公定法を改善したのになります。さらに、SPMEを全自動化できることは本分析を1日24時間、週7日実施する上で有効です。

References

1. US Safe Drinking Water Act 55 (SDWA)
2. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities, L330, p 32-54.
3. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities, 22/12/2000, L327, p 1-73.
4. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, 22/12/2000, L348, p 84-97.
5. ISO 10301: Water quality-Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons – Gas chromatographic methods. Geneva, 1997.
6. ISO 11423-1: Water quality-Determination of benzene and some derivatives – Part 1: Head-space gas chromatographic method. Geneva, 1997.
7. ISO 15680: Water quality-Gas chromatographic determination of a number of monocyclic aromatic hydrocarbons, naphthalene and several chlorinated compounds using purge and-trap and thermal desorption. Geneva, 2003.
8. Schmidt, T. C. Analysis of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA) in ground and surface water. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22 (2003) 776-784.

図3:ISO 17943の適格性を検証するための試験所間試験の結果を示す図（2-クロロトルエンの例）。紫色の水平線は割り当てられた値、緑色の水平線は全体の平均を示します。



9. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Analytical Chemistry (1990), 62(19), 2145-8.
10. Antoniou, V.; Koukouraki, E.E.; Diamadopoulos, E. J. Chromatogr., 1132 (2006) 310-314.
11. San-Juan, P.M.; Carrillo, J.D.; Tena, M.T. J. Chromatogr., 1139 (2007) 27-35.
12. Antelo, A.; Lasa, M.; Millán, E. Chromatographia, 66, (2007) 555-563.
13. ASTM D 6520, 2000. Standard Practice for the SPME of Water and Its Headspace for the Analysis of Volatile and Semi-Volatile Organic Compounds
14. ASTM D 6889, 2003. Standard Practice for Fast Screening for Volatile Organic Compounds in Water Using SPME
15. ISO 27108. Determination of selected plant treatment agents and biocide products - Method using solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)
16. Report – ISO 17943 – interlaboratory trial for validation on VOCs (ISO/TC 147/SC 2): Water quality – Determination of volatile organic compounds in water – Method using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), IWW Water Centre Muelheim an der Ruhr, December 2013
17. International Standardization Organization. ISO 5725-2: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, 1994.

本分析で使った製品

Description	Qty.	Cat.No.
SPME Fiber Divinylbenzene/Carboxen®/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), 24 ga, for use with autosampler	3	57329-U
SPME Fiber Holder for use with CTC CombiPAL™, Gerstel® MPS2 and Thermo® TriPlus Autosamplers	1	57347-U
VOCOL® Capillary GC Column, 60 m × 0.25 mm, df 1.50 µm	1	24154

Description	Qty.	Cat.No.
Reference Standards		
ISO 17943 57 Component VOC Mix, 200 µg/mL each component in methanol, 1 mL, Certified Reference Material	1 mL	44926-U
SO 17943 Odor Compounds Mix, 200 µg/mL each component in methanol, 1 mL, Certified Reference Material	1 mL	44923-U
1,3,5-Trichlorobenzene Certified Reference Material, TraceCERT®	100 mg	3824
Vinyl chloride solution 200 µg/mL in methanol, analytical standard	1 mL	48625
Accessories		
Headspace vial, screw top, rounded bottom (vial only) volume 20 mL, amber glass vial, Pk. 100	100	SU860098
Magnetic Screw Cap for Headspace Vials, 18 mm thread PTFE/silicone septum, septum thickness 1.3 mm, Pk. 100	100	SU860101

関連製品

Description	Qty.	Cat.No.
SPME Fiber Carboxen®/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) 85 µm, 24 ga, StableFlex™ fiber, for use with autosampler	3	57335-U
SPME fiber Divinylbenzene/Carboxen®/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), 23 ga, StableFlex™, for use with autosampler	3	57298-U
SPME fiber Carboxen®/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) df 85 µm, needle size 23 ga, StableFlex™, for use with autosampler	3	57295-U

SPME技術の詳細については、
[SigmaAldrich.com/spme](https://sigmaaldrich.com/spme)をご覧ください。

教育用ビデオについては、
[SigmaAldrich.com/spme-videos](https://sigmaaldrich.com/spme-videos)をご覧ください。

SPME for GC Analysis

Getting Started with Solid Phase Microextraction



SPME日本語版新カタログを発刊しました。

- おい・かおりの分析に！
- オフフレバー分析に！
- 残留農薬分析に！
- 環境中の微量分析に！



かんたんカタログ検索！ カタログファインダー

かんたん検索で、PDFのダウンロードや
カタログ請求も一括で行えます。

ダウンロードはこちらから
sigmaaldrich-jp.com/catalog/

「国際単位系 (SI)」へのトレーサビリティが確保された¹⁹F定量NMR用認証標準物質

Romana Rigger, Alexander Rück, Christine Hellriegel, Robert Sauermoser, Fabienne Morf, Kathrin Breitruck, Markus Obkircher

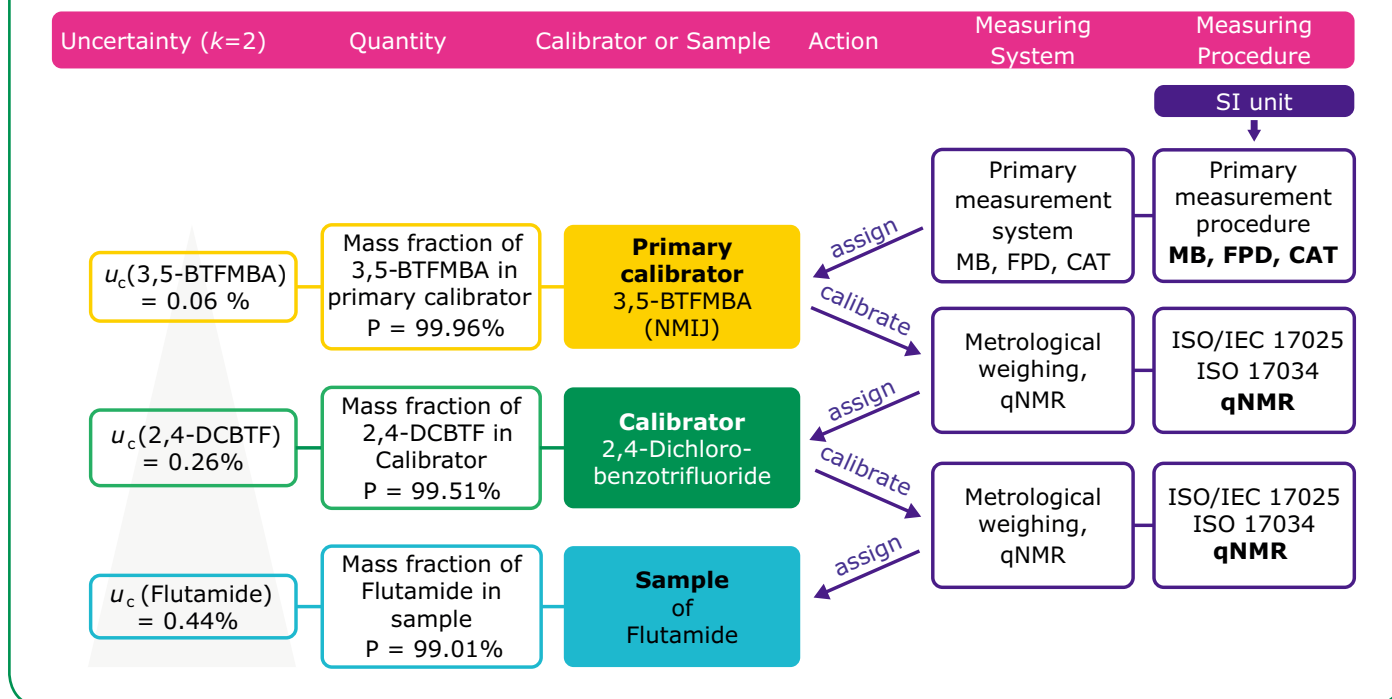
Markus Obkircher, Head of Reference Materials R&D, markus.obkircher@merckgroup.com

近年、定量NMR (qNMR) 法が、有機物質の含有量測定や不純物の定量的評価に最も重要なツールの1つになりました。メタボロミクス、環境分析、生理学的経路の研究など、新しい応用分野でqNMRを実施するとさらに複雑な分子とシステムが関係するため、¹H-qNMRを使用することが困難でしたが、その他のNMR活性な核種、例えば³¹Pや¹⁹Fを利用することにより¹、H-qNMRを使用する必要がなくなります。

当社は、ISO/IEC 17025とISO Guide 34 (2017年よりISO 17034)の認定を受けた、Buchs (スイス) の製造拠点でqNMRを使用し、SI単位にトレーサブルな認証標準物質 (CRM) を2009年より製造しています (トレーサビリティチェーンの例を図1に示します)。HPLCまたはGC用の有機化合物の認証標準物質 (CRM) であ

るTraceCERT®シリーズの製品は本技法を使用して認証され、農薬、ビタミン、アミノ酸、可塑剤、PAH、抗生物質、FAMEなど、200を超える多くの製品をご提供しています。さらに、当社ではNIST (国立標準技術研究所、米国) またはNMIJ (産業総合研究所計量標準総合センター) から供給される一次物質にトレーサブルなqNMR用標準物質のツールキットも提供しています。SigmaAldrich.com/qnmrをご覧ください。また、qNMR用標準物質の製品ラインは拡大し続け、現在16種類の様々な¹H qNMR用CRMが開発されています。これらは全領域のスペクトルと溶解度をカバーしているため、数百種類の有機化合物のqNMR認証へアクセス可能にします。

図1: フルタミドのトレーサビリティチェーン。認証は、2,4-DCBTF (二次校正物質) と3,5-BTFMBA (一次校正物質) を比較し、最終的にSI単位と比較して実施しました。MB=マスバランス法、FPD=凝固点降下法、CAT=電量酸滴定法



場合によって、特に複雑な高分子の認証に関しては¹H-qNMRでは限界がありました。しかし、新しい応用分野では、多くの場合にヘテロ原子、³¹Pと¹⁹Fが存在します。そこで、当社はSIにトレーサブルな4種類の³¹P-qNMR用CRMを発表しました。

以下のセクションでは、¹⁹F qNMRで使用するCRMの開発について説明します。本稿は2017年に発表した論文からの抜粋です。詳細についてはこの参考文献をご覧ください¹。

3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸(3,5-BTFMBS、NMIJ CRM 4601-a)はNMIJの認証を受けた¹Hおよび¹⁹F qNMRで使用する一次CRMです。¹⁹FのNMRシフト範囲は非常に大きいものの、¹⁹F qNMRに必要な線形励起ウィンドウは極めて小さく、磁場の強さとNMRパラメーターに左右されます。新しいNMR実験の使用を含む、このジレンマに対処する技法は以前に発表しました。そのため、当社は、被分析物質のシフトに対応してさらに選択でき、標準的な¹⁹F qNMR実験に利用可能な様々なシフト領域にピークを持つ、qNMR用CRMの開発に着手しました。最も一般的な構造要素のうちの2つは、CF₃基と置換芳香族化合物に直接結合したフッ素原子です。CF₃基の¹⁹Fのシフトは-55～-90 ppm周辺に生じるのに対して、芳香環に結合したフッ素原子のシフトはほぼ-110～-180 ppmに見られます。その他の構造要素は、-70～-140 ppm (CF₂) または-120～-240 ppm (飽和または不飽和脂肪族化合物中のフッ素原子)でシグナルを示します。

最近、当社は3種類の異なる¹⁹F qNMR用CRMを開発しました。これらのCRMは溶解度、安定性、均質性、純度、シフト範囲といった様々なパラメーターに基づいて選定されました。SIへのトレーサビリティと認証概念を示す必須条件として、当社は¹H核と¹⁹F核の両方を持つ分子を選択しました。2,4-ジクロロベンゾトリフルオリド(2,4-DCBTF、cat. no. 53396)は液体であり、溶媒(DMSO-d₆)によってはCF₃基が¹⁹Fスペクトルの-61.2 ppmでシングレットピークを示します。3個の芳香族プロトンは¹Hスペクトルの7.5～8.5 ppm (DMSO-d₆)で分析可能なシグナルを示します。2-クロロ-4-フルオロトルエン(2Cl4FT、cat. no. 80730)も液体であり、芳香環に結合したフッ素原子は¹⁹Fスペクトルの-115.3 ppm(DMSO-d₆)で多重項ピークを示します。また、3個の芳香族プロトンは¹Hスペクトルの7.0～8.0 ppmでピークを示し、2.3 ppm周辺(DMSO-d₆)でメチル基に対する別のピークも見られます。4,4'-ジフルオロ

ベンゾフェノン(4,4'-DFBP、cat. no. 07563)は固体であり、対称的な位置にある2個のフッ素原子は¹⁹Fスペクトルの-106.5 ppm周辺(DMSO-d₆)で多重項を示します。8個の芳香族プロトンは7.0～8.0 ppm (DMSO-d₆)にシグナルを示します。3種類の化合物はいずれも一般的な有機NMR溶媒に溶解します。分子量は215 g/mol (2,4-DCBTF)、144.57 g/mol (2Cl4FT)、218.2 g/mol (4,4'-DFBP)です。純度値、拡張測定不確かさ、NMR溶媒固有のシフト、緩和時間(T1)については表1をご覧ください。

19F qNMRの技術的側面

¹⁹F qNMRの特性は、NMRスペクトル中に存在する¹³Cと¹²Cのサテライトによって与えられます。¹²Cおよび¹³Cとの¹⁹Fの相互作用が同位体効果を引き起こす結果、一方では非対称なサテライトが、他方ではデカップリングしていないスペクトルの主なピークの周辺に複数のサテライトが生じます。さらに、ピーク形状は構造要素によって異なります。一般に、CF₃のピークは一重線のシグナルパターンを示し、芳香環に結合した¹⁹F原子は多重線のシグナルパターンを示します。

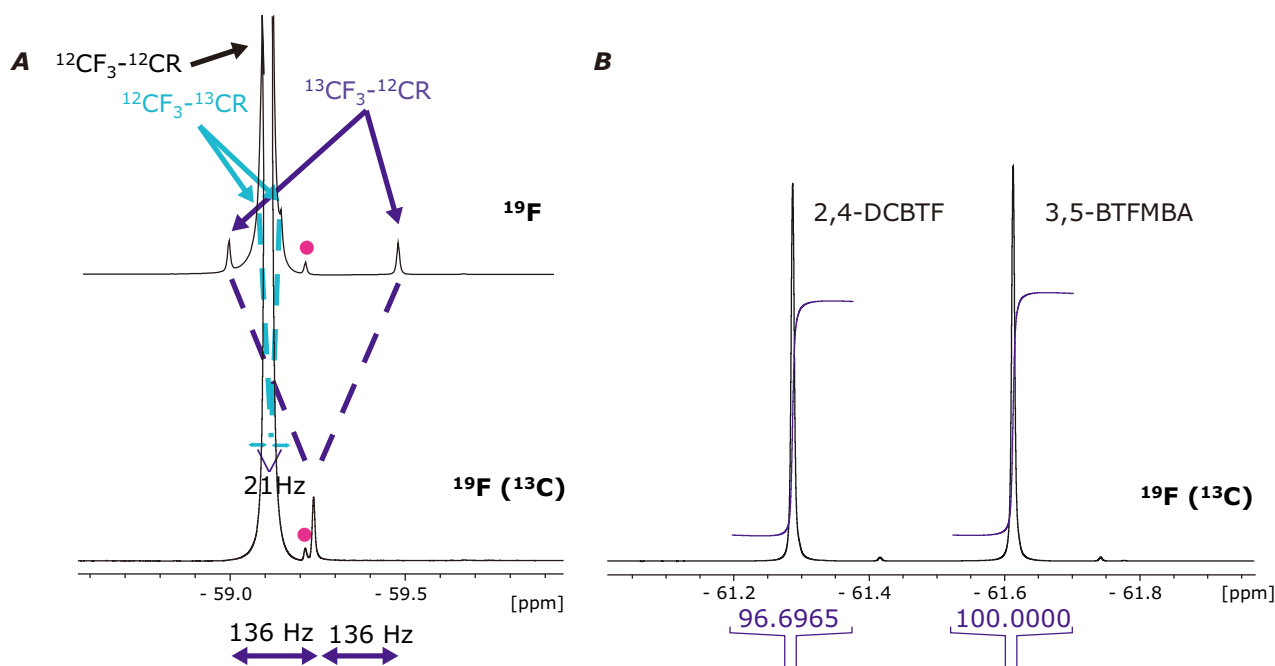
³¹P qNMRと同様に、¹⁹F qNMRでのデータ取得中は逆ゲート付きデカップリングを使用しました。例えば、出力ゲート付きデカップラーの代わりにこの方法を使うとNOE (核オーバーハウザー効果)の蓄積が最小限に抑えられます。本実験ではデータ取得中のみデカップリングを適用するため、デカップリングステップの間にスピン系が平衡に達せるようになります。逆ゲート付きデカップリングを適用すると、主なピークの片側のみにサテライトが1つだけ生じます(図2)。予備試験を行うときは、サテライトと不純物を区別するために、一組のデカップリングスペクトルとカップリングスペクトルを記録しました。デカップリングを行ったスペクトルの積分(図2)は、両サテライト、¹²Cサテライトのみのいずれかを含めて、または、可能であればサテライトを含めずに行いました。いずれの可能性を選択しても、線幅に関して内部標準物質および試料化合物と同じ方法で積分しました。

¹³Cと同様に、¹⁹F核も広い化学シフト範囲を持っています。定量的に測定するには、全スペクトル幅での広域励起が要求されます。パルス励起に利用できるラジオ波周波数出力が不十分なため、シグナル強度、及びシグナル積分に誤差が生じやすくなることがあ

表1: ¹⁹FqNMR用CRMデータの要約。溶解度試験は市販のNMR溶媒を使用して室温で実施しました。T1緩和時間はCRM (c = 10～20 mg/mL、25°C) に対するもののみ記録しました。u_c (CRM)はCRMの複合された測定不確かさ、d (ppm)は¹⁹Fスペクトル(k = 2)でのケミカルシフトです。

Substance	Cat. No.	Package Size	Purity (%)	u _c (CRM) (%)	CDCl ₃		DMSO-d ₆		CD ₃ OD		CD ₃ CN	
					δ (ppm)	T1 (s)	δ (ppm)	T1 (s)	δ (ppm)	T1 (s)	δ (ppm)	T1 (s)
4,4'-Difluoro-benzophenone	07563	1g	99.82	0.30	-105.8	2.4	-106.5	1.4	-108.1	2.8	-108.3	2.3
2,4-Dichloro-benzotrifluoride	53396	1g	99.51	0.26	-62.5	2.3	-61.2	1.2	-65.4	3.3	-63.0	2.9
2-Chloro-4-fluorotoluene	80730	1g	99.57	0.24	-115.8	4.4	-115.3	3.3	-117.7	4.8	-117.3	4.7

図2:A:カップリングスペクトル(^{19}F)とデカップリングスペクトル(^{19}F (^{13}C))でのフルタミドの ^{19}F NMRシグナル。ピンクの点は不純物です。カップリングスペクトルでのサテライトは、主なピークの周辺に非対称に配置されます。B:2,4-DCBTF(被分析物質)と3,5-BTFMBA(内部標準物質)の積分例。いずれのシグナルも外部のサテライトを除いて積分しました。



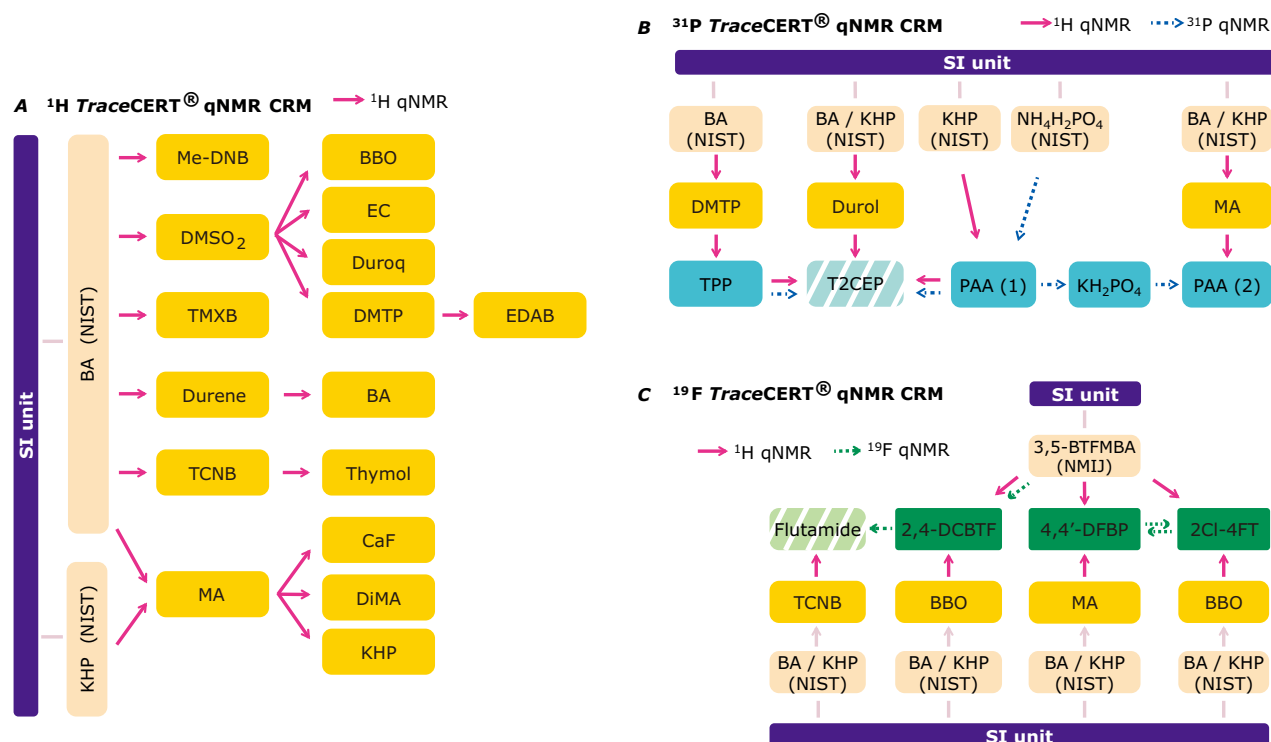
ります。この影響により、正確な定量化が保証できる周波数範囲(15 ~ 30 kHz、600 MHz NMR、90°パルス)が比較的狭くなります。そのため、十分な予備試験を実施した後、スペクトル幅とトランスミッターの周波数オフセットを正確に調整する必要があります。さらに、取得時間を可能な限り短く設定してNOEが蓄積しないようにすることが重要ですが、自由誘導減衰(FID)の打ち切りによるスペクトル品質の損失を回避するのに十分な長さでなければなりません。そのため、定量測定に先立ってFIDをさらに分析する必要があります。どの ^{19}F NMR実験も、Prodigy TCIプローブヘッドを備えたBruker Avance III 600 MHz NMR装置で行いました。標準的なプローブ(^{19}F 専用のプローブの代わりに)を使用しても、良好なスペクトル品質を確保できました。プローブヘッドおよびサンプルチューブ材料によるバックグラウンドの歪み、パルスブレイクスルー、リングアップアーチファクトはスペクトル品質、特にベースライン(ベースラインのうねり)に影響を与えます。これは ^{19}F 、 ^{11}B 、 ^{29}Si でよく見られ、広いスペクトル幅を測定するときに増大します。これは、追加の処理ステップ(データ変換前に最初のデータ点を削除することによるFID修復)を適用するか、またはプレスキャン遅延を延ばすことによって対処できます。当社でのCRM開発中の ^{19}F NMR実験ではプレスキャン遅延を延ばし、FID

は削除しませんでした。T1時間は反転回復実験により測定しました。 ^{19}F NMR用CRMの代表的なT1時間は、混合物と溶媒の濃度によって1.2 ~ 4.8秒になります。T1時間に7 ~ 10の係数を掛けると20 ~ 35秒のD1時間が得られます。

^{19}F qNMR用CRM — 一次CRMを経由したSIへのトレーサビリティ

既に発表した ^{31}P に関する研究と同様に、SI単位へのトレーサビリティを保証し、 ^1H および ^{19}F qNMR実験の比較可能性、したがって測定された核種の結果の独立性を示すために、精巧な ^{19}F qNMR用CRMのトレーサビリティスキームを作成しました(図3、C)。一次標準物質として、産業総合研究所計量標準総合センターの3,5-BTFMBAを選択しました。この標準物質は極めて高い純度(99.96%)と、極めて低い拡張測定不確かさ(0.06%、 $k=2$)を持っており、2つの対称的な CF_3 基は-61.3 ppm(DMSO- d_6 中)でシャープな ^{19}F シグナルを示します。3つの芳香族プロトンは、溶媒によって8.2 ~ 8.6 ppm(DMSO- d_6 中)周辺でシグナルを与えます。3,5-BTFMBAは一般的な有機溶媒に溶解し、 ^1H および ^{19}F qNMR向けにNMIJにより指定されています。

図3: ¹H (A)、³¹P (B)、¹⁹F (C) qNMR用CRMのためのトレーサビリティチェーン。ピンク色の矢印は¹H qNMR測定、青色の矢印は³¹P qNMR測定、緑の矢印は¹⁹F qNMR測定を示します。薄い灰色のボックスは一次標準物質、濃い灰色のボックスは¹H TraceCERT® qNMR用CRM、濃い青色と濃い緑色のボックスは³¹Pおよび¹⁹F TraceCERT® qNMR用CRM、薄い青色と薄い緑色のボックスは試験物質 (クロマトグラフィー用TraceCERT® CRM) を示します。



3,5-BTFMBAを使った¹⁹Fおよび¹H qNMRにより2,4-DCBTFの純度値を認証しました。第2の方法では、一次CRM BA (NIST SRM® 350b) へのトレーサビリティを有する1,2,4,5-テトラクロロ-3-ニトロベンゼン (TCNB, cat. no. 40384) を使って¹H qNMRによって認証しました。3つの純度値とその拡張測定不確かさは完全に一致しました (SD=0.015、図4)。 u_c (CRM) ($k=2$) の値も様々な実験間で同等です (0.25 ~ 0.29%)。

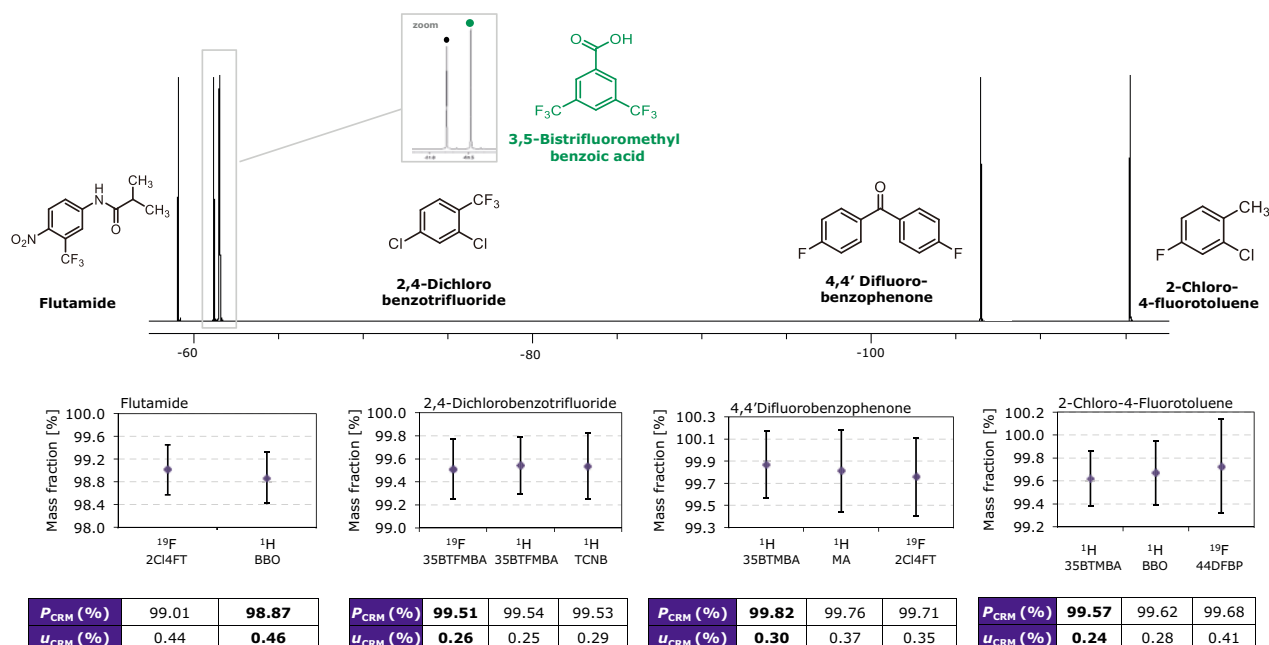
ピークのシグナル形状とスペクトル領域が異なるため、2Cl4FTと4,4'-DFBPは別のルートで認証しました。2Cl4FTのSIへのトレーサビリティは、3,5-BTFMBAを使った¹H qNMRによる質量分率測定により達成されました。第2の方法では、安息香酸ベンジル (BBO) を内部標準物質として使いました。第3の数値は、4,4'-DFBPを使って¹⁹F qNMRにより内部標準物質として割り当てました。3通りの異なる測定から得られた純度値は拡張測定不確かさ以内に重複しており、やはりよく一致しています (SD=0.053、図4)。不確かさ値 u_c (CRM) ($k=2$) も2,4-DCBTFのそれと同様でした (0.24 ~ 0.41%)。

4,4'-DFBPの純度値の認証は3,5-BTFMBAを使って¹H qNMRにより行い、第2の方法では、マレイン酸 (MA, cat. no. 92816) を内部標

準物質として使いました。¹⁹F qNMRによる認証は2Cl4FTを使用し、観察した核種の結果の独立性が改めて示されました。3つの数値はいずれも同等で、3つの結果のSDは小さくなっています (SD=0.055、図4)。 u_c (CRM) の値は他の2つの¹⁹F qNMR用CRMと比べてわずかに高くなっています (0.30 ~ 0.37%)。不確かさが上昇した (例えば、2Cl4F2では0.41%、4,4'-DFBPでは0.37%) のは測定手順によるものではなく、内部標準物質 (4,4'-DFBP、MA) と物質の均質性が不確かさにさらに大きく寄与するためです。他のすべての¹⁹F認証では、全体的な測定の繰り返し性が不確かさに最も大きく寄与しています。

最後に、TraceCERT®フルタミドCRMに純度値を割り当てる実験を行いました。2,4-DCBTFを内部標準物質として使った¹⁹F qNMRにより、確立されたCRM (BBO) を使った¹H qNMRによる一般的なルートでのものに匹敵する結果が得られるのを示すことができました。ここでも、全体的な測定の繰り返し性が不確かさに最も大きく寄与しており、¹H、¹⁹Fによる認証と同じ順番でした。純度値は拡張測定不確かさ以内に重複しており (図4)、含フッ素有機物質の純度を割り当てる独立した方法として¹⁹F qNMRを日常的に利用できることが改めて明確に示されました。

図4:様々な二次CRMと一次CRM 3,5-BTFMBAのシフトを示す¹⁹Fスペクトル。ピークは、構造要素(CF₃または芳香環に結合したF)に従って様々な領域にシフトします。様々な内部標準物質を使った、¹⁹Fおよび¹H qNMRによる二次CRMの純度の測定結果を示します。被分析物質の様々な純度値(P_{CRM})はその拡張測定不確かさu_{CRM}以内にあり、2,4-DCBTF、4,4'-DFBP、2Cl4FTに対する認証値を太字で示し、3種類の物質に対する一次CRMとしてCRM 4601-aを選択しました。NMRスペクトルの化学シフトのため、¹⁹Fに基づく直接比較は2,4-DCBTFの場合に限り可能でした。4,4'-DFBPと2Cl4FTでは¹H qNMRを使用する必要がありましたが、標準物質は同様にCRM 4601-aでした。フルタミドも両方の方法で測定できました。



結論

要約すると、¹H、³¹P、または¹⁹F TraceCERT[®] CRMを使用するqNMRは非常に価値のある方法です。本稿では、正確なqNMR認証に重要で操作者が特に意識する必要がある、注意を要する側面の概要を述べました。提示した一連の¹H、³¹P、¹⁹F qNMR用CRMは、ISO 17034認定の下で標準物質生産者に求められる要件を満たし、物質の均質性、長短期の安定性といった追加データをカバーしながら生産されます。

Reference

1. Rigger R, Rück A, Hellriegel C, Sauer Moser R, Morf F, Breittrück K, Obkircher M (2017) Journal of AOAC International, Vol. 100, No. 5, 1365-1375.

当社のqNMR製品の概要については、[SigmaAldrich.com/qnmr](https://www.sigmaaldrich.com/qnmr)をご覧ください。

有機TraceCERT[®]認証標準物質(CRM)の全ポートフォリオについては、[SigmaAldrich.com/organiccrm](https://www.sigmaaldrich.com/organiccrm)をご覧ください。

本分析で使用した製品

Description	Qty.	Cat. No.
TraceCERT [®] , certified reference material for ¹⁹ F-qNMR		
4,4'-Difluorobenzophenone	500 mg, 1 g	07563
2,4-Dichlorobenzotrifluoride	500 mg	53396
2-Chloro-4-fluorotoluene	500 mg	80730

関連製品

Description	Qty.	Cat. No.
TraceCERT [®] , certified reference material for ³¹ P-qNMR		
Triphenyl phosphate	1 g	05498
Potassium phosphate monobasic	1 g	92214
Phosphonoacetic acid	1 g	96708
Triethyl phosphate	1 g	90999

Description	Atom %	Cat. No.
Deuterated solvents		
Chloroform-d6	99.96	151858
Dimethyl sulfoxide-d6	99.96	156914
Methanol-d4	99.96	444758
Acetonitrile-d3	99.96	233323

CLINICAL & FORENSIC

ヒト血清中の甲状腺ホルモンのオンライン固相抽出とLC-MS分析

Hillel Brandes, Analytical Technology Specialist, hillel.brandes@milliporesigma.com

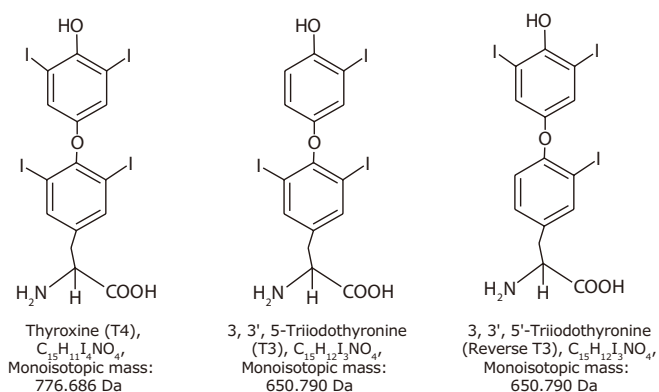
緒言

甲状腺ホルモンは成長や代謝、タンパク質の合成、脳の発達といった生物学的プロセスを調節する上で重要な役割を担っています。特に、3,3',5,5'-テトラヨード-L-サイロニン(サイロキシン:T4)と3,3',5-トリヨード-L-サイロニン(トリヨウ素サイロニン:T3)は、いずれも発達と正常な生理学的機能の維持に欠かすことができません。

臨床検査室では、総T4と総T3の測定量、さらには遊離T4 (FT4)と遊離T3 (FT3) の推定量が甲状腺疾患の診断と経過観察に重要です。ほとんどの臨床検査室では、甲状腺ホルモンの測定にイムノアッセイを使用します。イムノアッセイをベースとする手法は比較的時間がかからず、検体のスループットが高いため自動化に適していますが、干渉による問題から大きな影響を受け、遊離ホルモンのアベイラビリティを変えるタンパク質量の変化によってアッセイが複雑になります¹。

血清や細胞組織などの生物学的マトリックス中に存在する甲状腺ホルモンを測定する上で、液体クロマトグラフィー質量分析 (LS-MS) がイムノアッセイより優れた特異性とスピードを持つことが報告されています。とはいえ、報告された試料の調製手順(代表的なものは、液-液抽出に続いて固相抽出 (SPE) を行うもの)は時間を要する多くのステップを含み、自動化に向いていません^{2,3}。そこで、本研究では、生物学的マトリックスからT4、T3、3,3',5'-トリヨード-L-サイロニン (rT3) を迅速に測定するためのオンラインSPEとLC-MSを組み合わせた有効な方法を示します。

図1: 甲状腺検体の化学構造



Note T3 and rT3 are isobaric

実験

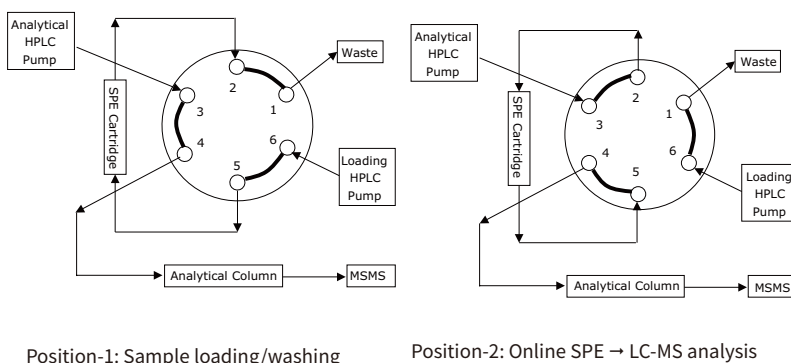
材料: Supel™ Genie C8およびRP-Amide (RPA) オンラインカートリッジ (2 cm × 4.0 mm内径)、ヒト血清 (Cat. No. H1388)、タンパク質沈殿溶媒: 1% (w/v) のギ酸アンモニウムを含有するメタノール

試料の処理手順: 検体を添加したヒト血清と沈殿溶媒を1:3の比でボルテックスミキサーによって混合し、タンパク質を沈殿させました。その後、混合物を10,000 × gで3分間遠心分離し、得られた上澄み液を回収してLC-MSに直接注入して分析しました。

オンラインSPE-LC-MS装置: 図2に示すように、本装置は6ポートのスイッチングバルブと2台のポンプ (一方は試料のロードおよび洗

図2: オンラインSPE-LC-MSシステムの構成

column:	Ascentis® Express Biphenyl, 10 cm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm (64065-U)
mobile phase:	(A) water; (B) methanol, each with 0.1 % acetic acid
isocratic:	70 % B for 10 min
flow:	0.3 mL/min
column temp:	35 °C
SPE online cartridge:	Supel™ Genie C8 and RP-Amide, 2 cm x 4 mm I.D.
sample loading/washing:	Equilibrate in Pos-1: 2.5 min (10 % MeOH). Load sample by injecting 2 μl in Pos-1. Leave to wash for 2 min. Switch to Pos-2 for online analytical separation (70 % MeOH, reverse flow)
sample loading solvent:	10 % methanol
injection vol:	2 μL injection
detection:	MS, ESI(+), MRM mode
instrument:	Shimadzu® LCMS-8030 with 2DLC setup



浄用、他方は試料の溶出用)から構成されています。カートリッジからのピークブロードの可能性を最小限に抑えるために、試料のロード／洗浄の流れ方向とその後の溶出方向は逆になっています。

結果および考察

SPEによる従来（オフライン）の試料調製には、一般的にコーディショニング、試料のロード、洗浄、溶出、最終的な乾固と移動相溶液での試料の再構成といった、手間と時間を要する多くのステップが含まれています。Supel™ Genie C8とRPAオンラインカートリッジは、試料調製プロセスの自動化、手作業時間と人為ミスの最小化、試料の処理に要する全体的な時間の短縮を目的として開発されました。本研究では、C8とRPAオンラインカートリッジをLC-MSと組み合わせて利用し、ヒト血清から甲状腺ホルモンを検出しました。C8およびRPAオンラインカートリッジを利用して得られた、ヒト血清に添加されたT3、rT3、T4の代表的なLC-MSクロマトグラムを図3と図4に示します。ヒト血清試料は、胃酸アンモニウムを含有するメタノールによってタンパク質を沈殿さ

せただけですぐにオンラインSPEに注入し、LC-MS分析を行いました。試料のロード／洗浄はすべて装置で行い、手作業は行いませんでした。さらに、時間を要する溶媒の乾固と再溶解のステップもなくなりました。

図3と図4から分かるように、C8、RPAのいずれも、複雑なヒト血清から微量（本ケースでは100 ng/mL × 2 μL）の甲状腺ホルモンをトラップできました。3種類の検体はすべて相互に分離され、ピーク高さ1/2でのピークの幅は6秒未満、テーリング係数は1.4～1.8でした。また、総分析時間は6分以内に収まりました。

ヒト血清試料を120回連続注入して得られた、C8とRPAを使ったオンラインSPE-LC-MSの耐久性を表1と表2にそれぞれ示します。これらの結果から分かるように、C8やRPAを使用した場合の検体の保持時間は再現性が極めて高く、RSDは0.1～0.2%でした。また、ピーク面積の再現性(%RSD)はC18、RPAのいずれでも非常に良好であり、それぞれ6.2～7.0%、5.1～7.7%でした。

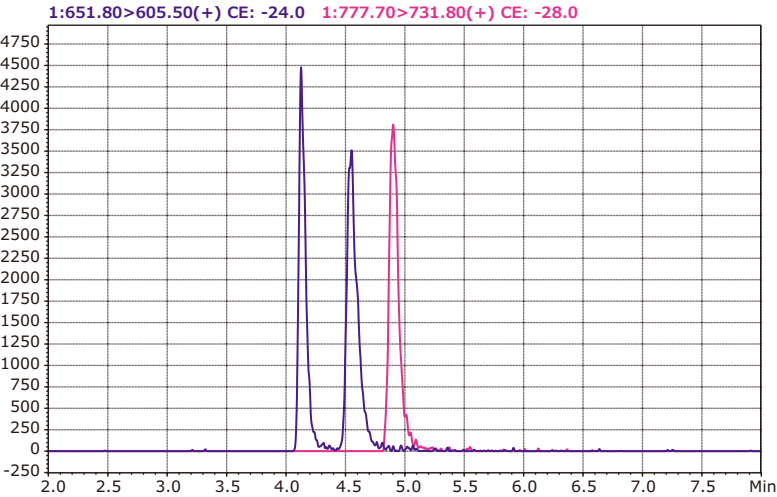
表1: C8カートリッジを使用したシステムの耐久性

Analyte	MRM Quantifier	Retention Time (Min) (Avg. n = 120)	Retention Time Reproducibility (%RSD, n=120)	Peak Area (Avg. n = 120)	Peak Area Reproducibility (%RSD, n = 120)
3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3)	651.8 / 605.5	4.13	0.1	17711	6.9
3,3',5-triiodo-L-thyronine (rT3)	651.8 / 605.5	4.53	0.2	22081	7
3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine (T4)	777.7 / 731.8	4.89	0.1	22233	6.2

表2: RPAカートリッジを使用したシステムの耐久性

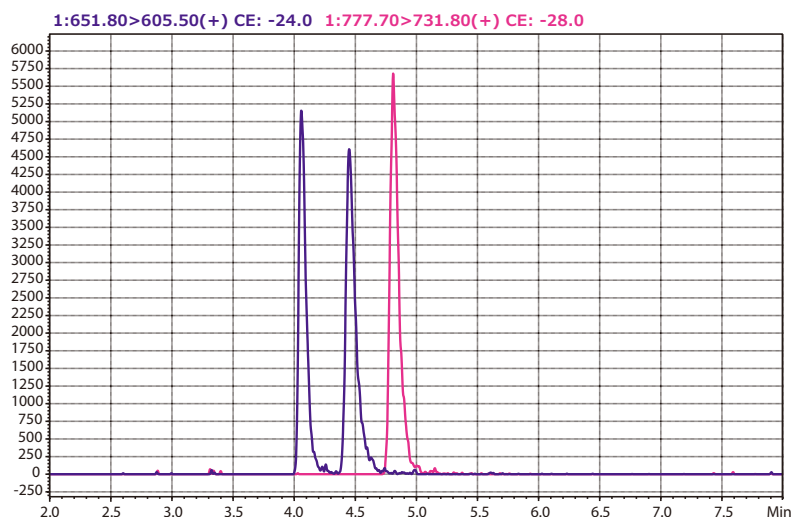
Analyte	MRM Quantifier	Retention Time (Min) (Avg. n = 120)	Retention Time Reproducibility (%RSD, n=120)	Peak Area (Avg. n = 120)	Peak Area Reproducibility (%RSD, n = 120)
3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3)	651.8 / 605.5	4.03	0.2	27046	5.1
3,3',5-triiodo-L-thyronine (rT3)	651.8 / 605.5	4.43	0.2	33723	6.2
3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine (T4)	777.7 / 731.8	4.79	0.2	23766	7.7

図3: C8オンラインカートリッジを使用して得られた、ヒト血清中の甲状腺ホルモンの代表的なLS-MSクロマトグラム



Peak	Analyte	Peak Width at 50 % Height (s)	Tailing Factor
1	T3	3.7	1.6
2	rT3	5.2	1.5
3	T4	4.9	1.4

図4: RPAオンラインカートリッジを使用して得られた、ヒト血清中の甲状腺ホルモンの代表的なLC-MSクロマトグラム



Peak	Analyte	Peak Width at 50% Height (s)	Tailing Factor
1	T3	3.7	1.6
2	rT3	5.2	1.5
3	T4	4.9	1.4

2種類のオンラインカートリッジを比較すると、C8カートリッジよりRPAの方が3種類すべての甲状腺検体について良好なシグナル（ピーク高さおよび面積）が得られるようです。このメカニズムは不明ですが、RPAは水素結合を形成する極性部分を有する検体を良好に保持することが知られています。その他、ピーク形状とピーク面積の再現性の点ではC8とRPAのいずれでも同様の結果が出ています。

まとめ

手作業と時間を要するステップを最小限に抑えてヒト血清中の甲状腺ホルモンを迅速に検出する、オンラインSPE-LC-MS法を開発しました。C8およびRP-Amideオンラインカートリッジのいずれも、タンパク質を沈殿させたヒト血清試料から微量の検体を捕捉可能であることが示されました。T3、rT3、T4の3種類の検体はすべてビフェニルカラムで分離され、鋭く左右対称なピーク形状が得られました。さらに、120回連続注入して得られた甲状腺ホルモンの保持時間の再現性(%RSD)はC8、RPAオンラインカートリッジのいずれでも0.1～0.2%であり、ピーク面積の再現性(%RSD)は5.1～7.7%でした。これらのRSDは、オンラインSPE-LC-MSシステムが優れた耐久性を備えていることを示します。

References

- Kahric-Janjic N, Soldin SJ, Soldin OP, West T, Gu J, Jonklaas J, Tandem mass spectrometry improves the accuracy of free thyroxine measurements during pregnancy. *Thyroid*. 2007;17(4): 303-11.
- Susan S-C. Taia, Lorna T. Sniegowski and Michael J. Welch, Candidate Reference Method for Total Thyroxine in Human Serum Use of Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. *Clinical Chemistry*, 2002; 48(4): 637-642.
- Dongli Wang and Heather M. Stapleton, Analysis of thyroid hormones in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 397(5): 1831-1839.

本分析で使用した製品

Description	Cat. No.
Ascentis® Express Biphenyl HPLC Column, 10 cm × 2.1 mm I.D., 2.7 μm	64065-U
Supel™ Genie RP-Amide Online Starter Kit*	55516-U
Supel™ Genie RP-Amide Online SPE Cartridge, pk. of 2	55519-U
Supel™ Genie RP-Amide Online SPE Cartridge, pk. of 6	55522-U
Supel™ Genie C8 Online Starter Kit*	55274-U
Supel™ Genie C8 Online SPE Cartridge, pk. of 2	55512-U
Supel™ Genie C8 Online SPE Cartridge, pk. of 6	55515-U

関連製品

Description	Cat. No.
Supel™ Genie HybridSPE® Online Starter Kit*	55324-U
Supel™ Genie HybridSPE® Online SPE Cartridge, pk. of 2	55326-U
Supel™ Genie HybridSPE® Online SPE Cartridge, pk. of 6	55327-U

Thyroid Hormones	
L-Thyroxine (T4), 100 μg/mL in 0.1 N NH ₃ in methanol, 1 mL	T-073
3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3), 100 μg/mL in 0.1 N NH ₃ in methanol, 1 mL	T-074
3,3',5'-Triiodo-L-thyronine (reverse T3) 100 μg/mL in 0.1 N NH ₃ in methanol, 1 mL	T-075
3,3',5-Triiodo-L-thyronine- ¹³ C ₆ (T3- ¹³ C ₆), 100 μg/mL in 0.1 N NH ₃ in methanol, 1 mL	T-077
3,3',5'-Triiodo-L-thyronine- ¹³ C ₆ (reverse T3- ¹³ C ₆), 100 μg/mL in 0.1 N NH ₃ in methanol, 1 mL	T-078

* 1 Holder, 1 cartridge

詳細については、[SigmaAldrich.com/onlinespe](https://www.sigmaaldrich.com/onlinespe)をご覧ください。
当社のLC-MS溶媒の概要については、[SigmaAldrich.com/LC-MS](https://www.sigmaaldrich.com/LC-MS)、
[SigmaAldrich.com/UHPLC-MS](https://www.sigmaaldrich.com/UHPLC-MS)をご覧ください。

滴定の改良

Connected Reagents

3S

afe
mart
ecure

3S試薬 – Safe (安全)、Smart (スマート)、Secure (確実)

Metrohm社のOMNIS滴定プラットフォームのための、容量滴定用試薬

滴定試薬のクローズドエンドツーエンドなソリューション:

3S adapter technologyは、RFID技術による自動データ転送によって試情報を装置にインプットします。



利点

- 3Sキャップで密閉された、すぐに使用できる容量滴定液
- 独自の封入によるユニークな開封メカニズム
- キャップ上のRFIDチップに瓶内の試薬の情報をすべて登録
- キャップに一体化された吸引カートリッジ
- 吸引管を最初から瓶と一体化



瓶の安全な開封

安全性の向上 – 独自の開封メカニズムで汚染リスクを最小化

スマートなデータ転送

使いやすさの向上 – 試薬と装置のソフトウェアの通信を自動化

セキュアなデータ転送

品質の向上 – RFID技術による自動データ転送によって転記ミスをなくす



Description	Pack size	Cat. No.
Silver nitrate solution 0.1 mol/L for 3S adapter technology	1 L	1.50689.1000
Perchloric acid solution 0.1 mol/L in glacial acetic acid for 3S adapter technology	1 L	1.50695.1000
Hydrochloric acid solution 1 mol/L for 3S adapter technology	1 L	1.50696.1000
Hydrochloric acid solution 0.1 mol/L for 3S adapter technology	1 L	1.50677.1000
Iodine solution 0.05 mol/L for 3S adapter technology	1 L	1.50690.1000
Sodium thiosulfate solution 0.1 mol/L for 3S adapter technology	1 L	1.50691.1000
Sulfuric acid solution 0.25 mol/L for 3S adapter technology	1 L	1.50692.1000
Cerium(IV) sulfate solution 0.1 mol/L for 3S adapter technology	1 L	1.50693.1000

詳細とビデオについては、
[SigmaAldrich.com/3S](https://www.sigmaaldrich.com/3S)をご覧ください。

SCIENCE & TECHNOLOGY INNOVATIONS

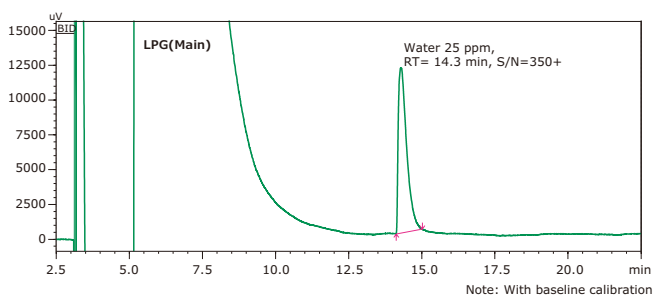
最も困難な分離に対する革新的なソリューション –
イオン液体キャピラリーGCカラム

Supelco®の革新的なガスクロマトグラフィーソリューション

Lisa Battle (McCombie), Product Manager, GC & Carbons, lisa.mccombie@milliporesigma.com

この数十年間、ガスクロマトグラフィーは液相の開発が繰り返されながら利用されてきました。最新のものはポリマー材料をベースとしていますが、新しい選択性と応用の選択肢をもたらすイオン液体(IL)カラムの導入によって、新たな1ページが開かれました。最も注目されているイオン液体キャピラリーカラムの1つがWatercol™カラムであることは間違いありません。このカラムによって、特別な試験を行う必要なく、様々なマトリックス中の水分をGCで定性的・定量的に検出できるようになり、とりわけガス試料で非常に勇往します(図1)。

図1: LPG中の水分検出 (25 ppm) のクロマトグラム。定量限界 (S/N = 10)、検出限界 (S/N = 3.3) はそれぞれ0.66 ppm、0.22 ppmまで改善できます(島津製作所のご厚意によります。Analytix Reporter第2号も参照)。



Instrument

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. No. 29541-U)

Analysis Conditions

column: Watercol™ 1910, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.20 µm (29711-U)

oven: 35 °C (2 min), 5 °C/min to 150 °C (15 min)

carrier gas: Helium 45 cm/sec (Column flow rate 3.78 mL/min)

inj. volume: 2 µL

split: 5:1

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)

ASTM D3606 (火花点火燃料中のベンゼンとトルエンをガスクロマトグラフィーによって測定する標準的な試験方法) を考えると、ILカラムの代替品であるSLB®-ILD3606が利用可能です。このカラムは、改質ガソリン中の芳香族と含酸素化合物を1つのカラムで完全に分離でき(図2)、このカラムを利用すると分析時間が大幅に短縮され、結果が改善されます。

Supelcoはこの他にも、高分解能PAH分析用のSLB®-ILPAH (図3)、高い不活性と組み合わせた独自の選択性を持つ新たに改良されたiシリーズ (SLB®-IL60i、SLB®-IL76i、SLB®-IL111i) など、数種のILカラムを提供しています。これらのiシリーズカラムは、石油、食品、化学分析など様々な分野で利用でき、信頼性が高く再現性のある結果をもたらすことができます。SLB®-IL60iがPEG/Wax相に類似した極性を有するのに対して、SLB®-IL111iは現在入手できる最も極性が高いGC液相であり、不飽和脂肪酸メチルエステル (FAME) 異性体の測定に利点をもたらすことができます。

イオン液体技術の背景

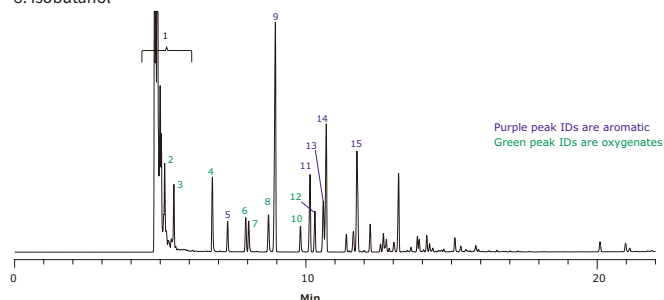
2005年、Daniel W. Armstrong教授(テキサス大学アーリントン校)は、実用的なGC固定相としてジカチオン型、ポリカチオン型イオン液体を効果的に利用できる可能性があることを示しました。これらの液相は結合によってリンケージされ、無機アニオン、有機アニオンのいずれかをリンケージさせた2種類以上の有機カチオンから構成されます。イオン液体相は、従来のGC固定相とは物理的にも化学的にも異なります。

- イオン液体の固定相中の分子は、大きく嵩高いポリシロキサンポリマー、ポリエチレングリコールの液相よりはるかに小さく、活性なヒドロキシル基も存在しません。これらの特徴により、**水分や酸素の存在下でも安定性に優れています。**
- イオン液体は選択性を変更するための多くの修飾が可能です。基本構造はジカチオン型またはポリカチオン型が可能です。多くのカチオン、結合、アニオンの選択肢があります。カチオンおよび/または結合にペンダント基を付加することができます。

図2:改質ガソリン中の含酸素化合物の分離

column:	SLB®-ILD3606, 60 m × 0.25 mm I.D., 0.20 µm (29691-U)
oven:	50 °C (6 min), 15 °C/min to 265 °C (10 min)
inj. temp.:	250 °C
detector:	FID, 250 °C
carrier gas:	helium, 21 cm/sec
injection:	1 µL, 100:1 split
liner:	4 mm I.D., split type, cup design
sample:	reformulated gasoline (contains 10% ethanol) with 7 other oxygenates added (at 2.5-5%)

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. C5-C11 aliphatic hydrocarbons | 9. Toluene |
| 2. Methyl tert-butyl ether (MTBE) | 10. n-Butanol |
| 3. tert-Amyl butyl ether (TAME) | 11. Ethylbenzene |
| 4. Ethanol | 12. Methyl isobutyl ketone (MIBK) |
| 5. Benzene | 13. p-Xylene |
| 6. sec-Butanol | 14. m-Xylene |
| 7. n-Propanol | 15. o-Xylene |
| 8. Isobutanol | |



メルクはSupelco®ブランドで本技術の特許を取得しており、イオン液体GCカラム技術を様々なアプリケーション分野に展開しています。

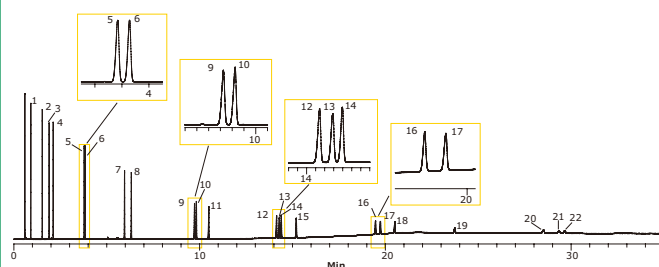
これらのカラムは、いくつかの点で現行の実務にインパクトを与える可能性があります。

- 非イオン液体カラムと類似した選択性と極性を有しながら、使用最高温度がさらに高く、湿度および/または酸素による損傷を受けにくいカラムを設計できるため、GC-MSに理想的なカラムになります。
- 従来の汎用カラムに対して特異的な選択性やこれまで得られなかった極性(例えば、TCEPよりはるかに極性が高いSLB®-IL111i)を持ち、様々な官能基を有する化合物に良好なピーク形状と分離を示すカラムを設計できます。
- 直交性と高い熱安定性を有する設計により、多次元分離にカラムを利用できます。

図3:PAH混合物中の22成分に含まれる、分類が困難な化合物群のILPAHによる分離

column:	SLB®-ILPAH, 20 m × 0.18 mm I.D., 0.05 µm (29799-U)
oven:	90 °C (6 min), 20 °C/min to 225 °C, 5 °C/min to 300 °C (10 min)
inj. temp.:	300 °C
detector:	FID, 310 °C
carrier gas:	hydrogen, 1.3 mL/min, constant flow
injection:	1 µL, 50:1 split
liner:	4 mm I.D., split type, cup design
sample:	10 PAHs, each at 100 µg/mL in methylene chloride

- | | | |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1. Naphthalene | 9. Benzo[a]anthracene | 16. Dibenz[a,h]anthracene |
| 2. Acenaphthene | 10. Chrysene | 17. Indeno[1,2,3-cd]pyrene |
| 3. Acenaphthalene | 11. 5-Methylchrysene | 18. Benzo[g,h,i]perylene |
| 4. Fluorene | 12. Benzo[b]fluoranthene | 19. Dibenzo[a,l]pyrene |
| 5. Phenanthrene | 13. Benzo[k]fluoranthene | 20. Dibenzo[a,e]pyrene |
| 6. Anthracene | 14. Benzo[j]fluoranthene | 21. Dibenzo[a,i]pyrene |
| 7. Fluoranthene | 15. Benzo[a]pyrene | 22. Dibenzo[a,h]pyrene |
| 8. Pyrene | | |



本分析で使用した製品

Description	Cat. No.
Watercol™ 1910, 30 m × 0.25 mm ID, 0.20 µm	29711-U
SLB®-ILPAH, 20 m × 0.18 mm I.D., 0.05 µm	29799-U
SLB®-ILD3606, 60 m × 0.25 mm I.D., 0.20 µm	29691-U

Watercolおよびiシリーズカラムの詳細については、SigmaAldrich.com/watercol、SigmaAldrich.com/il-gc-inertをご覧ください。

革新的な本技術の詳細については、SigmaAldrich.com/il-gcをご覧ください。

Supelco®
Analytical Products

**ACCURATE
SEPARATIONS
FOR GC**

Visit SigmaAldrich.com/GC
to see our comprehensive portfolio

MERCK

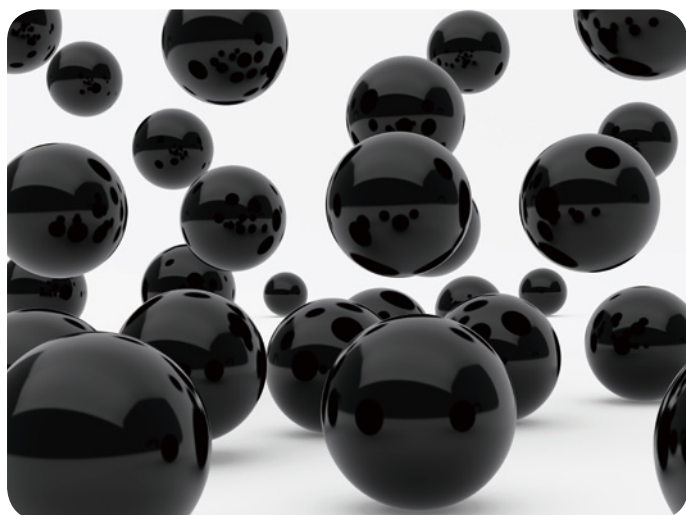
SCIENCE & TECHNOLOGY INNOVATIONS

前処理およびクロマトグラフィー分析用
高純度カーボン吸着剤

Leidy Peña Duque, Senior R&D Scientist Gas Separations, leidy.penaduque@milliporesigma.com

Wiliam Betz, Principal Scientist Gas Separation R&D, wiliam.betz@milliporesigma.com

緒言



Supelco®初の高純度カーボン吸着剤は、ガスクロマトグラフィー充填カラム用に作製されました。その後、熱脱離チューブ用特殊カーボンが開発され、固相抽出(SPE)カートリッジにカーボンが導入されました。その後の開発では、Supelco®のカーボンを使用してPLOTカラムと固相マイクロ抽出SPMEファイバーがあります。最新のSupelcoカーボン技術には、電子アプリケーション用ナノカーボンがあります。

メルクは全部で75種類のSupelco®ブランドのカーボン中間体を有しており、様々な分析装置で他の装置と組み合わせて利用されたり、単独で利用されたりしています。これらのカーボンは高度なカスタマイズと再利用が可能です。これらは活性炭との相違点です。これらのカーボンは以下のように分類されます。

- Carboxen®とCarbosieve®は、高圧(16,000 ~ 20,000 psi)下での永久気体分析と低分子分析、大気サンプリングチューブを使用した揮発性有機化合物分析、SPE分析のための水溶性試料からの低分子抽出に適した、アモルファスカーボンからなるモレキュラーシーブです。
- Carbopack™とナノカーボンは黒鉛化カーボンブラックです。これらのカーボンは、ガスクロマトグラフィーによる分析のために揮発性、半揮発性、および不揮発性化合物を分離したり、SPEアプリケーションのために水溶性試料から半揮発性および不揮

発性化合物を抽出したりするのに効果的です。Carbopackは一般に400 psiにしか耐えられませんが、大気捕集のアプリケーションでは半揮発性および不揮発性化合物の分離に有効な吸着剤です。

- Graphsphere™は黒鉛化ポリマーカーボンであり、充填層システム中の粒子形状が球状であるため、黒鉛化カーボンブラックにない利点を備えています。また、砕けにくく、ガスおよび液体アプリケーションの充填層システム中で使用すると超高压(16,000 ~ 20,000 psi)に耐えることができます。グラファイト表面の特徴は均一性であるため、クロマトグラフィー、試料調製のいずれにも独自の選択性を提供します。

4つのカーボンはいずれも、Supelco®のベルフォンテ(米国)にある拠点で加工されています。これらのカーボンは、カーボンモレキュラーシーブ、グラファイトカーボンブラック、またはグラファイトポリマーカーボンを含むキットで利用することも可能です。

カーボンの特性

粒子径分布

カーボンの粒子径の範囲はすべて200 nm ~ 850 μmであるため、粒子径分布は特定のアプリケーションに合わせて調整できます。

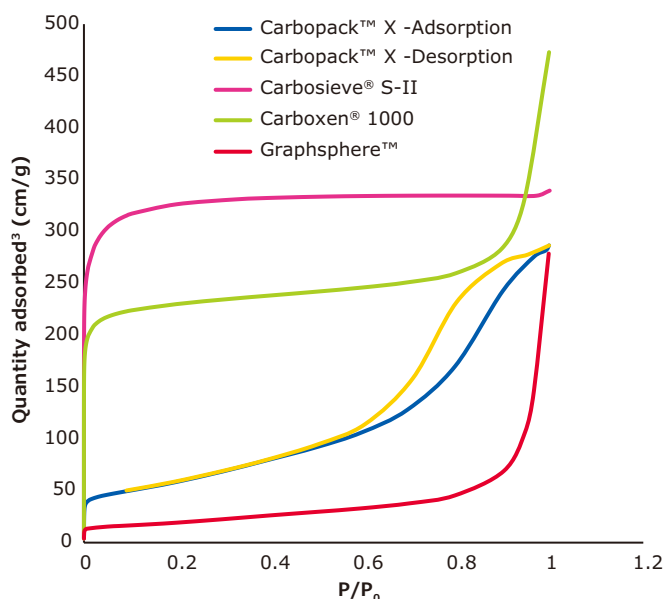
細孔径分布

当社のカーボン吸着剤の細孔構造は、いずれもウルトラマイクロ孔(細孔径7 Å未満)から細孔径が500 Åを超えるマクロ孔までを持つように修飾できます。図1のプロットは、様々な吸着剤によるN₂吸着の77 Kの等温線です。Carbosieve® S-IIIに見られるI型等温線がマイクロポーラス材料の特徴であるのに対して、Carbopack™ Xなどのメソポーラス材料はこの材料に特有のヒステリシスループを示します。

Graphsphere™などの非多孔質材料は極めて低い吸着値を示します。

多様なサイズの様々な細孔を含むマルチポーラスカーボンも利用できます。様々な細孔径分布を有する4つのカーボン種の代表例を図2に重ねて示します。この図のy軸には、細孔サイズの間隔に適合する窒素ガスの比容積をx軸の細孔サイズ／幅に対してプロットしています。マイクロ孔は20 Å未満の細孔と定義

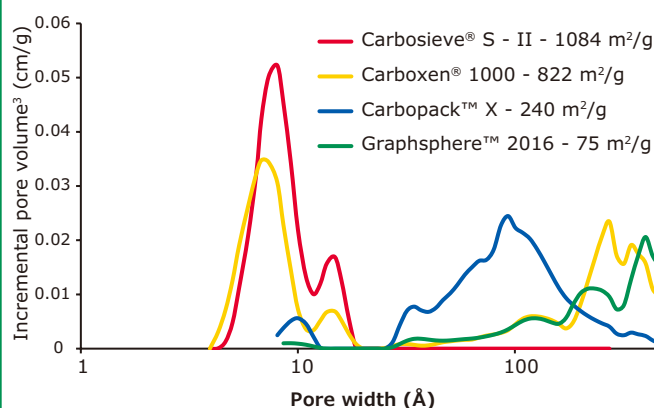
図1: Supelco®カーボンによるN₂吸着の等温線



されており、メソ孔は20 ~ 500 Åの細孔、500 Åを超える細孔はマクロ孔と考えられます。図2に、マイクロ孔、メソ孔、および／またはマクロ孔を含む様々なカーボンの細孔径分布を示します。Carbosieve® S-IIは8 Åが最も多いマイクロ孔のみ含むカーボンであるのに対して、Carboxen® 1000はマイクロ孔とマクロ孔の両方を含むマルチポーラスカーボンです。Carbopack™ Xがメソ孔のみのカーボンであるのに対して、Graphsphere™の細孔の大部分はマクロ孔領域にあります。CarbosieveやCarboxenなどのマイクロポーラスカーボンはCarbopack™やGraphsphere™のようなマクロポーラスカーボンより大きな表面積を有し、さらに大きな容量を提供します。

Supelco®カーボンのアプリケーション事例

図2: 代表的なSupelco®カーボンの細孔径分布 (PSD) と表面積 (m²/g)



ガスクロマトグラフィー

Supelco®のマイクロポーラスカーボンは、N₂、O₂などの永久気体を分離するための充填カラムに利用できます。Carbosieve® S-IIとCarboxen® 1000は、寸法が6 ft × 1/8 inのステンレス鋼製充填カラム中で空気を効果的に分離します (図3参照)。充填カラム中では気体分子の側方拡散が顕著であり、この現象によってカラム径が分離効率に影響を与える可能性があり、粒子径を最適化してバランスを取ります。

4.8 m × 3.18 mmの充填カラム中で180 ~ 250 μmの粒子を使用した場合の保持時間は、30 m × 0.53 mm内径のPLOTカラム側壁に2 μmの粒子を付着させた場合 (PLOTカラム) と同一です (図4参照) が、ピーク幅は大きくなります。図4の赤色のクロマトグラムは熱伝導度検出器からのシグナル、黒色のクロマトグラムはメタナイザー／炎イオン化検出器 (FID) からのシグナルを示します。

図3: Carbosieve® S-IIとCarboxen® 1000を充填したクロマトグラフィーカラムを使った大気分離

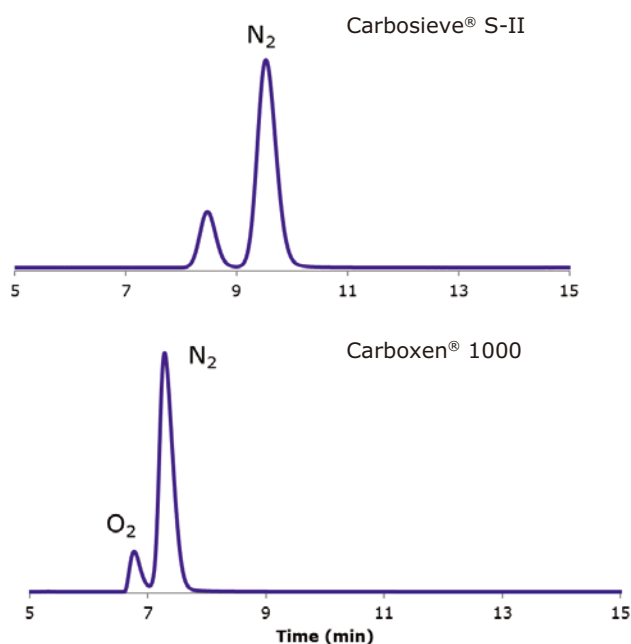
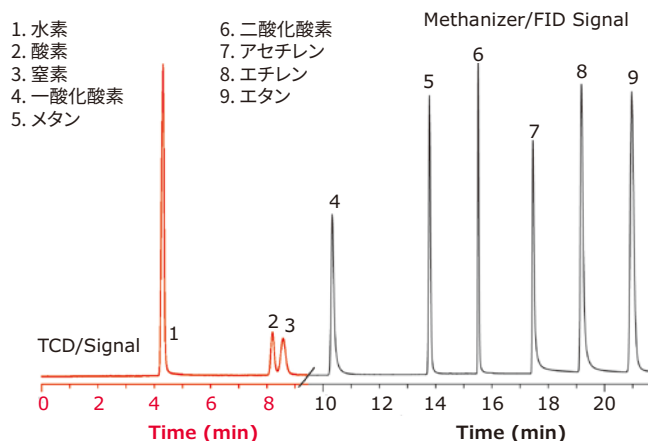


図4: Carboxen® 1010 PLOTカラムによる永久ガスと低級炭化水素の分離

column:	Carboxen® 1010 PLOT, 30 m x 0.53 mm I.D., 30.0 µm (25467)
oven:	35 °C (7.5 minutes) to 250 °C at 24 °C/minute
injector:	200 °C
detector:	TCD/methanizer-FID, 230 °C
flow:	Argon, 3.0 mL/min
valve:	150 °C
injection:	10.0 µL valve injection
sample:	transformer gas for ASTM method D3612-96

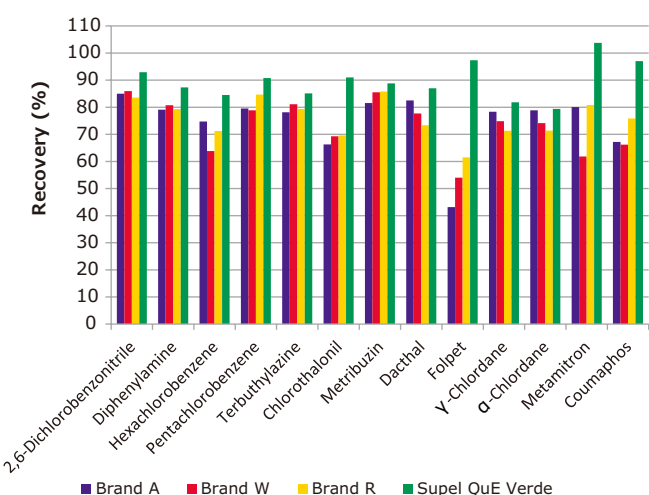


試料分離

SPE

これらのカーボン吸着剤は試料分離技法でも広く利用されています。カーボンがSPEカートリッジアプリケーションのマトリックス干渉を除去し、精製した試料を注入でき、HPLCやGCによって正確に分析できます。このアプリケーションで対象の分子を保持することなく試料を精製するには、Carbopack™やGraphsphere™のような粒子径と細孔径が大きなカーボンが効果的です。ENVI-Carb™とENVI-Carb™ Yはそれぞれ、ENVI-Carb™、Supel™ QuE VerdeなどのSPE製品に利用されるCarbopackです。ENVI-Carb™がクロロフィルとカロテノイドを極めて効率的に除去すると同時に、Supel™ QuE Verde製品はクロロフィルを除去して平面構造を持つ農薬(プラナー農薬)を回収します(図5参照)。

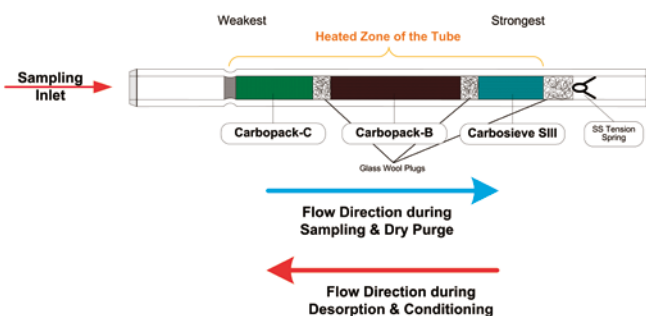
図5: Supel™ QuE Verdeと比較した、様々なQuEChERSブランドのプラナー農薬の回収率



大気サンプリング

シングルベッドおよびマルチベッドカーボン吸着剤チューブが、大気サンプリング分析者にとって重要なツールになりました。一例として、毒性、揮発性、および半揮発性有機化合物のモニター用に米国EPA向けに開発された初めてのチューブである、Carbotrap® 300 3ベッドチューブ (Carbotrap® C、Carbotrap® B、Carbosieve® S-III) が挙げられます(図6参照)。Carbopack™ BとCarboxen® 1000を含む2ベッドチューブの開発は、後にEPAが定めた61種類の気中浮遊汚染化合物リストに極めて重要でした。

図6: 大気サンプリング用マルチベッドチューブ (Carbotrap® 300)

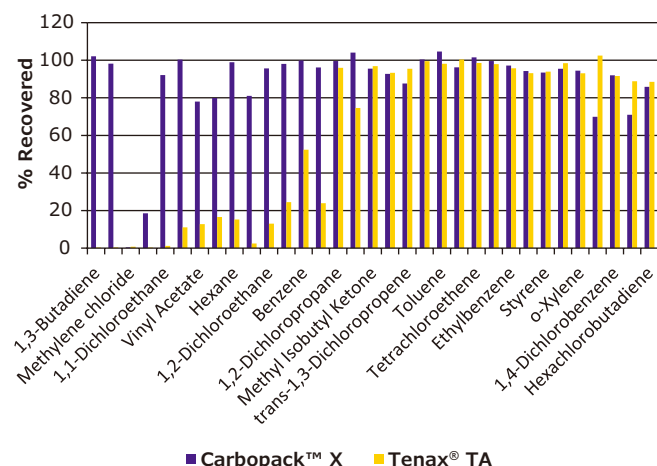


EPAとその他の取り組みでは、1,3-ブタジエンとその他の様々な揮発性有機化合物の72時間パッシブサンプリングに使用する、メソポーラス黒鉛化カーボンブラック (Carbopack™ X) を含むシングルベッドチューブの開発に重点を置きました(図7参照)。

固相マイクロ抽出 (SPME)

メルクが特許を取得した固定化技術を使用して、水性および大気環境から有機化合物を抽出するためのSPMEファイバーに粒子径が2.0 µmのカーボンを固定化しました(図8参照)。

図7: Carbopack™ X受動的サンプリングチューブのデータ

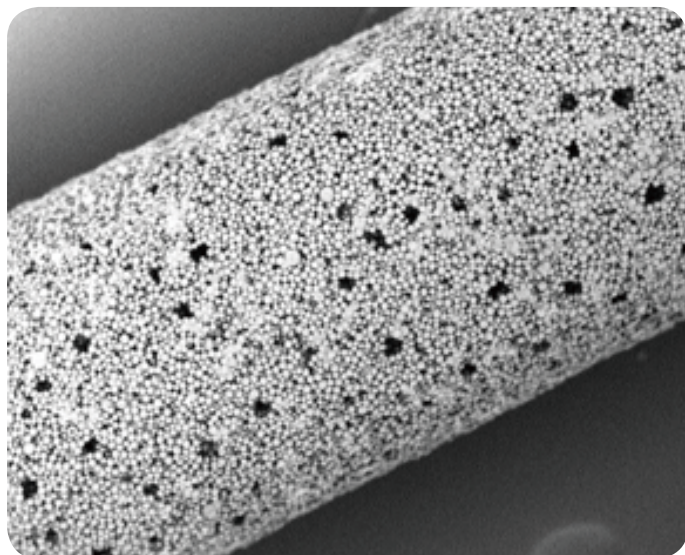


しかし、ほとんどの要求は特定の作業を実行できる専用のカーボン吸着剤を必要とします。その場合は、扱う試料のタイプ（ガス、液体、ペースト）、吸着して分析しようとする被検物質の種類、吸着後に被検物質を回収する必要性の有無をお知らせください。当社の研究開発チームが、既存の吸着剤の適用可能性、または新規吸着剤開発の必要性を調査します。

当社のカーボン吸着剤のポートフォリオに関する詳細を調べたり、「Supelco®カーボン吸着剤」のパフレットをダウンロードしたりするときは、[SigmaAldrich.com/carbon](https://www.sigmaaldrich.com/carbon)をご覧ください。

見積もりのご依頼があればSupelco_Quotes@sial.comまでお問い合わせください。

図8: Carboxen® 1006を固定相に用いたSPMEファイバー



結論

Supelco®はカーボン吸着剤の研究と製品開発に40年以上の実績を有しています。その証しは、現在以下に使用されている当社の専用高純度炭素吸着剤に見ることができます。

- 大気サンプリングデバイスの捕集剤
- SPEハードウェア、パーティトラップ、GCカラムの充填剤
- ガス流または液体流の精製
- 反応混合物からの合成化合物の回収
- 注目を集めているその他のアプリケーション

新しい吸着剤に関心があり、目的とする物理仕様（表面積、多孔度、細孔径、粒子径範囲など）が分かっているお客様はぜひご連絡ください。当社は、それが製造可能かどうか調査します。また、[SigmaAldrich.com/carbon](https://www.sigmaaldrich.com/carbon)でご覧いただける、既存のサンプルキットの1つを試すこともできます。



Enhance your Analysis

Highly customizable synthetic adsorbents for trace analysis of air, water, and soil.

[SigmaAldrich.com/Adsorbents](https://www.sigmaaldrich.com/Adsorbents)



Supelco®

Analytical Products

350年先の未来まで

MerckのSupelco®分析用製品



Supelcoの足跡

- 1966: 吸着剤およびバックドGCカラムでGC事業に参入
- 1971: Carbosieve®でカーボン吸着剤事業に参入
- 1979: 安定な5 µm球形粒子を精密単層結合したSUPELCOSIL™シリーズでHPLCに参入
- 1983: 作業による有毒化学物質への曝露を防ぐ、産業衛生向け溶媒脱離チューブシリーズを発表して大気サンプリング市場に参入
- 1985: Supelclean™ SPEチューブでサンプル前処理事業に参入
- 1993: SPMEファイバーを発売
- 1994: ISO 9001 品質管理システム
- 2006: Sigma-AldrichがキラルクロマトグラフィーのリーダーであるAstec®を買収
- 2007: Advanced Materials Technologyと共同で世界初のFused-Core®粒子を世界市場に投入、Ascentis® Expressを発表
- 2018: Merck KGaAの全分析用製品をSupelco®に統合し、分析技法を包括的にカバー

精密、正確、一貫性



メルク公式アカウント
友だち追加は
コチラ



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
カタログ
ファインダー



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。記載内容は2019年9月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Supelco are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2019 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. 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。