

MERCK

ISSUE 6 | 2021

Analytix

Reporter

Beverage Testing with the Award
Winning MQuant® StripScan App



Mobile Business Award
Winner 2020



The life science business
of Merck operates as
MilliporeSigma in the
U.S. and Canada.

Supelco®
Analytical Products

FOOD & BEVERAGE

- 3 MQuant® StripScanモバイルアプリを用いた飲料の測定
- 7 ヘッドスペースSPME/GC-MSを用いたコンブチャ(kombucha)のアルコール簡易測定法
- 10 カバ抽出物のHPLC分析

CHEMICAL INDUSTRY

- 13 シングルユース装置の溶出物試験

CANNABIS

- 16 大麻のテルペンGC/MS分析

FOOD & BEVERAGE

- 20 大麻のカナビノイド分析：効率的なHPLCワークフローの開発

CLINICAL & FORENSIC

- 24 コロナウイルスSARS-CoV-2試験用ポジティブコントロール EURM-019

COSMETICS & PERSONAL CARE

- 25 認証標準物質を使用したサンスクリーン剤の適格性評価
- 26 エッセンシャルオイルの真正性：HPTLCフィンガープリント法

NUTRITIONAL SUPPLEMENTS

- 29 ショウガを始めとする生薬の分析にご興味はありますか？

PHARMA & BIOPHARMA

- 31 治療用抗体の遊離N-グリカン分析
- 34 アピキサバンのHPLC/UVアッセイと有機不純物プロファイリング

SCIENCE & TECHNOLOGY INNOVATIONS

- 36 折れにくいSPMEファイバーで再現性を改善
- 40 ISO/IEC 17025認定試験所の容量滴定用試薬
- 42 イオンクロマトグラフィーと陽イオンサプレッション

Ideas for content? Let us know.

SigmaAldrich.com/ar-ideas



SigmaAldrich.com/Supelco

読者のみなさまへ

Covid-19の大流行により、私たちは働き方の変革を余儀なくされました。例えばサイトに勤務する人員の変化、ソーシャルディスタンス、リモートワーク、人員削減などの課題です。これらはいままで以上に、より効率的なニーズやコストの削減の流れを拡大させています。

私たちが開発しようとしているのは、分析化学を通じてこれらの制約と課題に向き合うことです。ラボのデジタルトランスフォーメーションにより、より効果的で信頼のあるメソッドを作り出すことが可能です。このデジタルトランスフォーメーションはパンデミックが終息した後も、有効なものとなるでしょう。

では、大きな投資負担を伴わずに、どうすればそれを実現できるのでしょうか。1つの方法は、現在広く利用されているスマートフォンやタブレットを、ポータブルで手頃な価格の化学分析デバイスとして使用することです。紙を使わず、シームレスに接続されたドキュメントワークフローが可能になります。スマートフォンベースで挙げると、テストストリップを読み取るためのMQuant® StripScanアプリです。これにより、信頼性の高いモバイルオンサイト結果の取得と化学分析の文書化が可能になります。このアプリの可能性は最近、スイスのザンクトガレン大学に認められ、モバイルビジネス賞を受賞しました。2020年にメルクと私たちのソフトウェア開発パートナーインクラウドエンジニアリングに贈られました。この権威ある賞はアプリデータベースの価値や多くの分野、例えば環境、食品、水質分析で利用できることをたたえています。この権威ある賞はアプリデータベースの価値や多くの分野、例えば環境、食品、水質分析で利用できることをたたえています。



Mobile Business Award
Winner 2020

しかしそうは言っても、まだラボでスマートフォンを利用しているのはさほど多くありません。その間、ベンチトップ光度計から結果データを転送するためのSpectroquant® PROVE Connectなどの他のデータ転送ソリューションや、ポータブル比色計からのデータ転送用のSpectroquant® MOVEデータ転送により、エラーが少なくなり、紙のドキュメントが減り、作業が楽になりました。これらはSupelco® デジタルソリューションポートフォリオのほんの一例であり、シームレスなコネクションによりデータへのアクセス、データ管理が可能になります。ラボの効率性、信頼性に貢献するポートフォリオ全体に関しては、こちらのサイトをご覧ください。<https://bit.ly/3894jTi>

Yours sincerely,



Saskia Neubacher

Dr. Saskia Neubacher
Product Manager for
Mobile Analytical Workflows

SigmaAldrich.com/mobile-laboratory

For your personal copy, sign up at
SigmaAldrich.com/Analytix

MQuant® StripScanモバイルアプリを用いた飲料の測定

Saskia Neubacher, Product Manager Mobile Analytical Workflows, Analytix@merckgroup.com

概要

pHと硝酸塩含有量は、食品および飲料 (F&B) の品質と安全性を測定するために使用される2つの重要なパラメーターです。一般に、pH測定は、pH試験紙、pHメーター、または電極を使用して行われ、硝酸塩含有量の測定は、分光光度計または電極を用いて行われます。本文では、MQuant® StripScanモバイルアプリを使用して、オレンジジュースサンプルのpHとミネラルウォーターサンプルの硝酸塩濃度を測定する方法と効率について説明します。結果は、MQuant® StripScanモバイルアプリを、食品および飲料分析におけるpHおよび硝酸塩測定のための、より洗練された機器を用いた方法の実行可能な代替手段として使用できる可能性があることを示しています。

序章

高品質で安全な食品および飲料製品の確実な配送は、世界のF&B業界にとって重要です。pHは、製品の色、風味、食感、味、および栄養上の全体的な価値を維持する上で重要な役割を果たし、最終的な食品および飲料製品の品質に大きく影響します。さらに、適切なpHを維持することは、食品の安全性上重要です¹。たとえば、缶詰または保存食品のpHを4.6に維持すると、ボツリヌス菌などの有毒細菌の増殖を防ぐのに役立ちます。加えて、バクテリアや酵母、カビなどの多くの微生物は、非常に低いまたは高いpH値の下では生き残ることも成長することもできません。

食品業界では、原材料のpHを監視することは、原材料の劣化を防ぐために不可欠であり、それが最終製品の保存期限に影響を与える可能性があります。たとえば、ジュースや醸造所では、食品加工に加える前に水のpHを測定することで、高品質で安全な最終製品が保証されます³。

原料水源が都市の水システムであり、水質が時間とともに大幅に変化する可能性がある場合には、特に重要です。

pH測定の従来の方法では、pHメーターを使用します。これは、pH電極と参照電極の間の電位差を使用して読み取ります。pHスケールの対数的性質により、わずかな変化でも非常に重要になり、わずか0.3単位の変化でさえ、酸濃度が2倍になることを示します⁴。

さらに、電極によるpH測定は、温度、電極の安定性 (ドリフトとヒステリシス)、応答勾配/検量線の品質、および機器の精度などの要因に大きく影響されます⁵。

pHを測定するための新しい方法で、MQuant® StripScanモバイルアプリをテストストリップと組み合わせて使用する方法があります。この方法は、数秒でpHを測定し、自動データ保存、詳細なドキュメント用のグラフの生成、およびデスクトップデバイスへの自動データ転送などの利点があります⁶。

硝酸塩 (NO_3^-) は、食品や飲料製品の品質に大きな影響を与えるもう1つの化合物です。地球の窒素循環の一部として自然に発生しますが、さまざまな人間の活動が、農業活動 (無機肥料の過剰使用による)、衛生、工業プロセスからの拡散、固形廃棄物の処分を通じて地球に影響しています⁷。

高レベルの硝酸塩を含む食品や飲料の摂取は、健康に悪影響を与える可能性があります。たとえば、アミンまたはアミドとの反応時に発がん性のニトロソアミンを生成する可能性があります。ある条件下では、硝酸塩は胃の細菌の減少によって亜硝酸塩 (NO_2^-) を生成し、赤血球の酸素輸送障害に起因する、深刻な状態であるメトヘモグロビン血症と呼ばれるまれな血液障害を引き起こす可能性があります⁸。食品や飲料、および給水における硝酸塩の安全限界: たとえば、欧州食品安全機関 (EFSA) によって定められた硝酸塩の現在の一日摂取許容量 (ADI) は、1日あたり体重1キログラムあたり3.7 ミリグラム (mg/kg 体重/日) です。米国環境保護庁 (EPA) は、水中の硝酸塩の最大汚染レベル (MCL) を 10 mg/L (窒素として、硝酸塩の 45 mg/L に相当) としています⁹。食品医薬品局 (FDA) の許容値ボトル入り水中の硝酸塩レベルはEPAと同じですが、食品では、最終製品のレベルは500パートパーミリオン (ppm) を超えてはなりません¹⁰。



硝酸塩含有量測定に利用できるさまざまな方法には、分光光度法、化学発光法、電気化学的検出法、クロマトグラフィー法、キャピラリー電気泳動法、分光蛍光法などがあります¹¹。これらの技術は高い感度と選択性を提供しますが、面倒な化学的作業も伴い、特殊で高価な機器を必要とします。これらの問題に対処するために、試験紙に基づく迅速な検出技術が人気を集めています。MQuant® StripScanスマートフォンアプリと組み合わせることで、迅速で手頃な価格で、ほとんどの測定で無害であり、液体の化学廃棄物を処理する必要が無い、試験紙測定が可能です。

本文では、食品および飲料製品のpHと硝酸塩含有量を測定するためのMQuant® StripScanモバイルアプリと試験紙の使用について説明します。

方法と材料

食品、飲料サンプルのpHと硝酸塩を測定するために、MQuant® テストストリップ (Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ) を使用しました。具体的には、0～14の範囲のpH試験紙と0～500 mg/Lの範囲の硝酸塩試験紙です。試験紙はメーカーの指示に従って使用し、MQuant® StripScanアプリを適切なリファレンスカード (Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ) と組み合わせて使用して読み取りを実行しました。

1. サンプルに試験紙を浸し、アプリで測定するパラメーター (pH または硝酸塩) を選択します。
2. アプリにカウントダウンが表示されたら、試験紙から余分なサンプルを取り除き、試験紙をリファレンスカードに置きます。
3. リファレンスカードをスマートフォンのカメラビュー内に配置します。画面上のマークをリファレンスカードに合わせます。画像が自動的に取得され、結果がすぐに表示されます。

A. オレンジジュースのpH

MQuant® pHインジケーターストリップ (pH 0～14) と対応するpHリファレンスカードを使用して、4つのオレンジジュースサンプルを分析しました。各サンプルに対して5つの個別の測定をしました。

試験紙を使用したpH測定値を、pHメーターを使用して行った測定値と比較しました。

B. ミネラルウォーター中の硝酸塩

MQuant® 硝酸塩テストストリップ (0～500 mg/L) と対応するリファレンスカードを使用して、ミネラルウォーターの3つのサンプルをテストしました。各サンプルに対して5回の測定が行われました。

硝酸塩の測定値は、2つの異なる参照方法と比較されました。

1. Spectroquant® 光度計を使用した測光測定
2. Reflectoquant® システム (リフレクトメーター) を使用した反射率測定

結果と考察

食品や飲料の品質管理をサポートするために、さまざまな最新の分析技術が使用されています。これらには、モバイル測光 (例: Spectroquant® MOVE100光度計) または反射率測定 (Reflectoquant® RQflex₂₀)、ベンチトップ分光光度法 (例: Spectroquant® Proveシリーズ)、クロマトグラフィー、質量分析、NMR、X線分析、および原子分光法があります。これらの技術は高い感度と選択性を提供しますが、それらのほとんどはまた、面倒な化学作業と機器への高額な投資を伴います。

試験紙に基づく迅速な検出技術が一般的になっています。色または蛍光の視覚的観察は、試験紙検出方法の基礎を形成します。通常、試験物質は試験紙の反応パッド上の化学物質と反応して色が変化し、検証のために色の基準と比較します¹²。ただし、この手法の欠点の1つは、半定量的であるということです。目視による読み取りはあまり正確ではなく、個人差や記述ミスが発生しがちです。これらの側面は、試験紙用の新しいアプリリーダーであるMQuant® StripScanアプリによって対処できます⁶。



A.オレンジジュースサンプルのpH測定

とりわけ、pH測定は、食品および飲料業界、たとえばフルーツジュースの品質管理に関連しています。ジュースは、取り扱い中に環境中の空気や微生物と接触する可能性があるため、腐敗しやすい傾向があります。腐ったフルーツジュース製品はさまざまな食中毒につながる可能性があるため、これは懸念事項です。このリスクにもかかわらず、微生物は通常、製品の低いpHがそれらの成長を助長しないため、有意な量で存在しません。したがって、ジュース製品のpHを管理することは、それらの保存期限と安全性の両方にとって重要です。

MQuant® pHインジケーターストリップ (pH 0~14)、MQuant® StripScanアプリ、および対応するリファレンスカードを使用して、4つのオレンジジュースサンプルを分析しました。pH測定値をpHメーターを使用した測定値と比較しました。結果を表1に示します。

表 1. MQuant® StripScanとpHメーターを使用したpH測定値の比較

オレンジジュースの サンプル番号	pH	
	MQuant® StripScan	pHメーター
1	4	3.95
2	4	3.85
3	4	3.83
4	4	3.87

表1の結果は、5回の測定の平均です。MQuant® StripScanアプリは、0.5 pH単位の増分で結果を表示しますが、pHメーターは小数点以下2桁の精度を表示します。実験データは、アプリによって得られた結果がpHメーターで測定された値に対応することを示しており、アプリによって提供される精度が使用事例では十分な精度の場合、StripScanアプリを用いたMQuant試験紙測定法はpH測定の代替となりうることを示しています。

B.ミネラルウォーター中の硝酸塩

硝酸塩のモニタリングは、過剰に摂取すると健康に悪影響を与える可能性があるため重要です。一例は、通常ミネラルウォーターで調製される乳児用調製粉乳の調製です。1リットルあたり50 mgの硝酸塩 (50 mg / L) を含む水から作られるとした場合では、1日あたり体重1キログラムあたり平均約8.3~8.5 mgの硝酸塩になり、EFSAによって定められた 3.7 mg / kg体重/日の現在の一日摂取許容量 (ADI) の2倍以上になります。乳児用調製粉乳の製造に使用される硝酸塩レベルの高い水は、粉ミルクを与えられた乳児の毎日の曝露レベルに深刻な影響を及ぼします。

2つのミネラルウォーターサンプルの硝酸塩含有量を測定しました。高速MQuant® StripScan法を、Reflectoquant® システムを使用した反射率測定を使用した測定、およびSpectroquant® システムを使用した測光測定と比較しました。結果を表2に示します。

表2: MQuant® StripScanアプリ、Reflectoquant® システム、およびSpectroquant® 測定を使用して測定されたミネラルウォーターサンプルの硝酸塩濃度

サンプル	NO ₃ ⁻ 濃度 [mg/L]		
	MQuant® StripScan	*Reflectoquant®	Spectroquant®
水 1	0	<3	2.7
水 2	10	12	12.0
柑橘系香料を使用した水	10	10	>25.0

* MQuant® StripScan アプリとReflectoquant® 機器の結果は5回測定した平均値を基にしています。

予想通り、測光測定は、この実験で比較した3つの方法の中で最も正確な結果を示しました。

水サンプル 1 の硝酸塩含有量は非常に低かったため、反射測定およびアプリリーダーの検出限界を下回りました。したがって、Reflectoquant® システムは、NO₃⁻ 含有量が3 mg/Lの「測定範囲を下回る」と正しく測定されました。MQuant® StripScan法は、濃度が5 mg/Lの「測定限界を下回る」ことも正しく測定されました。

水サンプル 2 の硝酸塩含有量は、反射率測定と測光によって同時に 12 mg/Lと測定されました。MQuant® StripScanアプリの10mg/Lの測定値も、アプリによって測定された増分値が0 - 5 - 10 - 15 - 20 - 25 - 25 - 35 - 50 - 75 - 100 - 250 - 500 mg/L であるため、これらの参照値に準拠していました。したがって、アプリによって測定された増分値は、他の2つの方法の結果と近似値でした。

柑橘系フレーバー水の硝酸塩濃度も測定しました。この場合、サンプルの糖度が高いために測定が妨げられたため、Spectroquant® 測光測定では正確な結果が得られませんでした。反射測定とMQuant® StripScanアプリで得られた結果は互いに一致しており、同様の測定法精度が見られることを示唆しています。

要約すると、MQuant® 試験紙とStripScanアプリで得られた測定値は、参照方法の範囲内でした。システムの半定量的な性質のため、行われた測定の精度は低くなりました。非常に低い濃度で正確な値を得るには、測光法が最適です。同時に、MQuant® 試験紙とStripScanアプリは、「ある、なし」のみが必要な場合（つまり、濃度がしきい値を上回っているか下回っているか）、およびサンプル中の硝酸塩含有量の一般的な濃度範囲を決定するための迅速な代替手段として最適です。

試験紙を用いた方法は、測光測定に干渉する可能性のある添加剤を含むサンプルの利点を示しています。ここでの試験紙を使用した測定では、サンプル処理を必要とせず、サンプルを直接測定するのに十分な結果が得られました。

結論

オレンジジュースサンプルのpHとミネラルウォーターサンプルの硝酸塩濃度を、MQuant® StripScanモバイルアプリとMQuant® 試験紙を使用して測定しました。すべてのサンプルで、MQuant® StripScanモバイルアプリで得られたデータは、参照方法で得られた結果と比較して範囲内でした。これにより、このスマートフォンベースの分析ツールは、pHを測定するためのpHメーターや、硝酸塩を測定するための分光光度計など、より洗練された機器ベースの方法に代わる実行可能な方法を提供するという結論が得られました。

pH電極または湿式化学法よりも試験紙を使用する一般的な利点は、その使いやすさ、速度、低コスト、および使用後に試験紙を通常の廃棄物と一緒に廃棄できるという事実です。これにより、機器の洗浄や有害な液体廃棄物の処分が不要になるため、測定プロセスが大幅に合理化され、時間と費用を節約できます。

試験紙をMQuant® StripScanモバイルアプリによる読み出しと組み合わせることにより、専用の読み出し機器を購入することなく、試験紙の読み出しの精度と再現性が向上します。付加価値として、デジタルデータの取得とトレーサビリティは、より良いドキュメントのためにデータをグラフ化、共有、およびエクスポートする簡単な方法とともに、アプリソリューションによって提供されます。これにより、本方法は、高精度の結果を必要としないオンサイトおよびインプロセステスト、およびpHおよび化学物質のスクリーニングが日常的に実行される実験室または生産サイトでの日常的な使用に適しています。

謝辞

この記事の実験データはAdvanced Analytical R&Dによって提供され、この記事の作成と改訂はSai Sandeep MannimalaとMaricarDubeにサポートしていただきました。

References

- Andrés-Bello, A., et al. Effect of pH on color and texture of food products. Food Engineering Reviews. 2013, 5, 158-170
- Cunningham, E. What impact does pH have on food and nutrition? Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics. 2009, 109, 1816.
- McGlynn, W. Importance of Food pH in Commercial Canning Operations. Food and Technology Fact Sheet. 2003, 118, 1-8.
- Riddle, P. pH meters and their electrodes: calibration, maintenance and use. The Biomedical Scientist. 2013, April, 202-205
- Zhou, D. D. Microelectrodes for in-vivo determination of pH. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications. Academic Press, 2008; 261-305
- Schröter, S. Mobile Environmental Analysis Methods: What to Expect from New Smartphone Technology. Analytix Reporter. 2019, 14, 29.
- Mateo-Sagasta, J.; Zadeh, S.M.; Turrall, A. World pollution from agriculture: A global review – executive summary. Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2017.
- Ward, Mary H., et al. Drinking water nitrate and human health: an updated review. International journal of environmental research and public health. 2018. 15, 1557.
- National Primary Drinking Water Regulations. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>

- Nitrate/Nitrite Toxicity What Are U.S. Standards and Regulations for Nitrates and Nitrites Exposure? <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=28&po=8>
- Singha, P.; Singh, M.K.; Bega, Y.R.; Nishada, G.R. A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples. Talanta. 2019, 191, 364-381.
- Cheng, Nan, et al. A review of test strips in rapid detection of food safety. Austin J. Nutr. Food Sci. 2014, 2, 1038.

Featured Products

Description	製品番号
MQuant® pH-indicator strips pH 0-14 Universal indicator, Pk.100	1.09535
MQuant® StripScan Reference Card for analyzing MQuant® pH indicator strips pH 0-14 (Cat. No. 1.09535)	1.03736
MQuant® Nitrate Test, colorimetric with test strips, Pk. 25 or 100	1.10020
MQuant® StripScan Reference Card for analyzing MQuant® Nitrate Test (Cat. No. 1.10020)	1.03733

MQuant® StripScan App can be downloaded via the Apple Appstore and Google Play.



SigmaAldrich.com/mquant-stripscan

Related Products

Description	製品番号
Reflectoquant® Reflectometer RQflex® 20	1.17246
Nitrate Test 5-225 mg/L (NO ₃ ⁻), for use with RQflex®20, 50 Tests	1.16971
Spectroquant® Prove 100 Photometer, suitable for UV/Vis spectroscopy	1.73016
Spectroquant® Prove 300 Photometer, suitable for UV/Vis spectroscopy	1.73017
Spectroquant® Prove 600 Photometer, suitable for UV/Vis spectroscopy	1.73018
Nitrate Test photometric, 0.3-30.0 mg/L (NO ₃ ⁻ N), Spectroquant®, 100 Tests	1.01842

A comprehensive portfolio for a rapid, flexible, and reliable analysis of water, food, and beverages can be discovered at

SigmaAldrich.com/mobile-lab

For other connected solutions for seamless and reliable data transfer in photometry, titration, sample prep, and for product & safety data please visit us at

SigmaAldrich.com/connected

ヘッドスペースSPME/GC-MSを用いた コンブチャ (kombucha) のアルコール簡易測定法

Katherine K. Stenerson, Analytical Sciences Liaison, Analytix@merckgroup.com

要約

様々なコンブチャのエタノール含有量をSPME (固相マイクロ抽出) で分析しました。その結果、多くのコンブチャのエタノール濃度は、米国でノンアルコールとして販売できる飲料の上限値である0.5 %を上回っていることが分かりました。

緒言

コンブチャは発酵茶飲料の一種であり、糖分と茶を含む溶液に酵母と酢酸菌 (「紅茶キノコ」と呼ばれることもあります) の混合物を添加して作られます。発酵後には、フェノール類、水溶性ビタミン、有機酸、さらには若干のアルコール (エタノール) を含む発泡性溶液となります。コンブチャに関連する健康効果の多くは、これらの化合物の多くがもつ抗酸化作用に由来しています^{1,2}。

米国でコンブチャをノンアルコール飲料として販売するためには、アルコール度数が0.5 %未満である必要があります³。ヘッドスペースガスクロマトグラフィー (HS-GC) は、様々な水性マトリックス中のエタノール分析に適用できる技法です。様々な甘味料や香味成分を含むことがあるコンブチャの場合、ヘッドスペースを利用すれば試料に含まれる他の成分から揮発性アルコールを単離できます。通常のヘッドスペース分析ではGCに加えて別の捕集、濃縮装置が必要となります。それに対してヘッドスペース固相マイクロ抽出 (HS-SPME) はコンブチャなどの飲料中アルコール含有量を分析する従来法に代わる方法です。この分析法は手動でも自動でも行うことができ、濃縮器やGCに外付けするヘッドスペース分析器を使用する必要もありません。また一般に、他の従来法と比べて迅速かつ安価に実施できます。

本研究ではコンブチャのアルコール含有量を測定するためのHS-SPME法を開発しました。GC-MSを使用して正確な測定ができるようにしました。開発したHS-SPME法は迅速、簡単、正確、かつ高感度の方法で、自動化も容易です。

実験

最適化した最終的なHS-SPME/GC-MS法を表1に示します。アルコール度数 (% ABV) 0.10、0.40、0.80、1.00、1.50および2.00 %の濃度のアルコールキャリブレーション用標準溶液を調製しました。また、内部標準物質/試料の希釈溶液を、25 %塩化ナトリウムを含む0.05 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH=7) 中で未希釈エタノール-d₆を直接希釈して濃度0.08 % ABVで調製し、SPMEを行う前の試料の希釈に使用しました。内部標準物質/希釈溶液は毎日調製し、使用するまで冷蔵保存しました。すべての試料とキャリブレーション用標準溶液はSPME前にそれぞれ400 µLを、冷蔵保存しておいた内部標準物質/試料希釈溶液3.6 mLに添加して、10:1で希釈しました。

試験したすべてのコンブチャ試料は地元の食料品店で購入し、分析まで冷蔵保存しました。分析法のバリデーションプロセスでの添加試料の調製には、アルコール含有量が非常に低いことが確認されたショウガ風味のコンブチャを使用しました。

表 1. HS-SPME / GC-MS条件

sample/matrix:	400 µL tea sample + 3.6 mL salt/buffer soln. (0.05 M Na ₂ HPO ₄ at pH 7 w/25% NaCl) containing ethanol-d ₆ (I.S.) at 0.08% ABV in 10 mL headspace vial
SPME fiber:	polydimethylsiloxane (PDMS), 100 µm film, 23 ga (57341-U)
incubation:	7 min, 40 °C, agitation at 250 rpm
extraction:	2 min, headspace, 40 °C, agitation at 250 rpm
desorption process:	3 min, 250 °C, split 10:1
fiber post-bake:	5 min, 260 °C
column:	SUPELCOWAX® 10, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.50 µm (24284)
oven:	40 °C (5 min), 8 °C/min to 70 °C, 20 °C/min to 250 °C (5 min)
carrier gas:	helium, 1 mL/min, constant flow
detector:	MSD, full scan, m/z=25-300 (m/z=45 used for quant of ethanol, m/z=49 for ISTD)
MSD interface:	250 °C
injection:	SPME, 10:1 split
liner:	0.75 mm I.D. SPME

SPMEカタログ
ダウンロードはコチラ

<https://bit.ly/3rZ3pl6>



結果および考察

HS-SPME法の最適化

SPMEは非常に感度が高い技法であり、通常は極めて低濃度の被分析物質の試験に適用されます。本方法で対象とした分析範囲は0.10～2.00 % ABVでしたが、SPMEにとってこの量はあまりに高濃度と考えられます。そこで本研究の目的は、この分析範囲全体にわたって高い正確度と再現性で使用できるSPME法を開発することでした。SPMEファイバーと検出器にオーバーロードとならないよう、試料の希釈およびSPMEファイバー脱離時のスプリット比を10：1とすることが必要でした。当初、方法の最適化のためにCarboxen[®]/PDMSファイバーを選択しましたが、分析範囲全体で線形応答を得ることができませんでした。図1に、0.10～1.00 % ABVの範囲でCarboxen[®]/PDMSファイバーと100 μm PDMSファイバーを使用した際のGC-FIDによるクロマトピークの比較を示します。相関係数(r^2)値が高かったことから、この範囲での線形性はPDMSファイバーを使用した方がわずかに良好でした。また、Carboxen[®]/PDMSファイバーを使用して得られた応答曲線は0.80～1.00 % ABVの間で若干横ばいになり始め、この傾向は高濃度ほど顕著になるものと予想されました。十分な感度が得られたことから、以降の研究ではPDMSファイバーを選択しました。ファイバーを選択した後、メソッドの開発を通して、抽出温度、時間、試料への添加物、試料の希釈などのパラメータの評価をさらに行いました。これらすべてのパラメータを最適化して、水試料、コンプチャ試料いずれでもアルコール応答のばらつきが最小限に抑

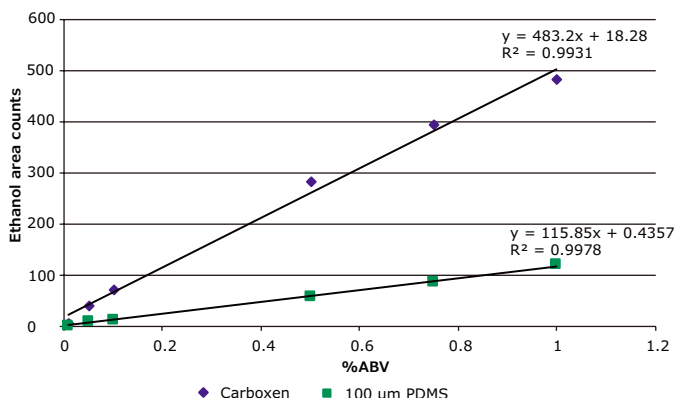


図1. Comparison of Alcohol Response (GC-FID) from Water obtained by HS-SPME; 100 μm PDMS and Carboxen[®]/PDMS Fibers.

表2. HS-SPME法の確度と再現性

Spiking Level (% ABV)	Amt. Measured in Unspiked Kombucha (% ABV)	Avg. Measured (% ABV)	Avg. Measured Less Unspiked (% ABV)	Repeatability % RSD (n=5)	% Accuracy	LOD (% ABV)	LOQ (% ABV)
0.10 (used for LOD & LOQ)	0.011	0.11	0.098	3*	98	0.01	0.03
0.50	0.011	0.51	0.50	2	100		
1.00	0.011	1.00	0.99	1	99		
2.00	0.026	1.99	1.96	1	98		

*n=8

えられるようにしました(詳しくはSigmaAldrich.comで本稿の拡大版をご覧ください)。最終的に得られた方法では、エタノール応答は試料マトリックスの影響を受けることはありませんでした。これにより、エタノール水溶液で作製した検量線に対して試料を定量できるようになりました。

メソッドバリデーション

HS-SPME GC/MS法の正確度を、濃度0.10～2.00 % ABVで添加したジンジャー風味のコンプチャの反復試料を使用して評価しました。検出限界と定量限界を決定するため、0.1 % ABVで添加した反復試料を用いました。方法の確度、再現性、検出限界および定量限界は表2にまとめてあります。コンプチャの添加試料では良好な線形性が得られ、0.10～2.00 % ABVの範囲での線形相関係数は0.999でした。また分析範囲全体で98～100 % ABVという非常に高い確度が得られ、方法の再現性は4 % RSD未満でした。0.1 % ABVで添加したコンプチャ試料(n = 8)を使用して、本方法の検出限界(LOD)および定量限界(LOQ)はそれぞれ、標準偏差(0.003)の3倍と10倍と算出されました。これらの計算値は、0.010 % ABVおよび0.030 % ABVで添加したコンプチャ試料の分析により実験的に検証されました。各濃度の添加試料(n=5)について、LOQでの確度は95 %であり、再現性は6 % RSDでした。またLODでの確度は83 %であり、再現性は21 % RSDでした。このようにLODでの確度が低く、再現性が不良であったのは、LODでのシグナル・ノイズ比がLOQでの約2分の1、添加濃度0.1 %での4.5分の1であったように、LODでのエタノール応答が不良であったためと考えられます。0.01 % ABVでの定量が必要な場合は、スプリットレスのSPME注入を使用するなど本方法に単純な修正を加えれば、エタノールの測定感度を向上できると思われます。

認証標準物質の分析

さらに、低アルコールビールの認証標準物質とあらかじめ調製したアルコール水溶液を使用して、本法のバリデーションを行いました。結果を表3にまとめます。それぞれの試料は数日にわたって複数回分析し、異なる分析者が異なる装置を用いて実施することもありました。日内確度はビール試料で96～101 %、アルコール水溶液では94～103 %であり、再現性はすべての試料セットで6 % RSD未満でした。

表 3. 認証標準物質を用いた本メソッドの確度

Sample	Certified conc. (% ABV)	# of Replicates	# Instruments/ Analysts	Range (% ABV)	Avg. Amt. Measured (% ABV)	Avg. % Accuracy	Reproducibility % RSD
Low alcohol beer	0.51	10	2/2	0.48-0.51	0.50	98	2
Alcohol in water, 80 mg/dL	0.10	4	2/1	0.095-0.11	0.099	98	5
Alcohol in water, 200 mg/dL	0.25	3	2/2	0.24-0.26	0.25	99	3
Alcohol in water, 400 mg/dL	0.51	7	2/2	0.49-0.52	0.51	100	3

コンブチャの分析

10社の異なるメーカーから購入した合計20種類のコンブチャ試料（うち1種は自家製の試料）を、HS-SPME/GCMS法にて試験しました。試料はすべて購入後、冷蔵庫に保存し、ラベルに表示された「賞味期限」内に瓶を開封して直ちに分析に供しました。結果を図2にまとめます。このセットではすべての試料で2～3回反復分析しました。方法の日間再現性を決定するため、8種類の試料からなるサブセットを2日間で1日3回反復分析しました。このサブセットの試料のアルコール含有量は0.39～1.66 % ABVと幅がありました。測定のばらつきを各試料の6回の反復分析の平均値の% RSDとして決定しまし

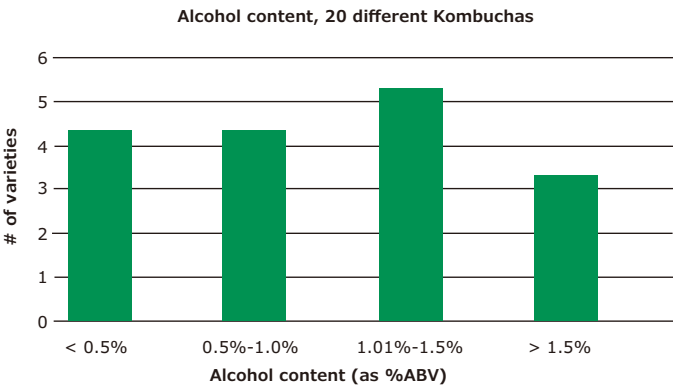


図 2. Alcohol (Ethanol) Content, as % ABV, Measured on 20 Kombucha Tea Samples using HS-SPME.

た。その結果、すべての試料について% RSDは3 %未満であり、別の日（装置や分析者などその他のパラメータは同一）に分析した別の試料バッチにわたる方法の再現性は良好であることが示されました。

結論

コンブチャ試料中のアルコール含有量を正確かつ精度良く測定できるHS-SPME/GC-MS法を開発しました。最適化した方法では0.1～2.0 % ABVの範囲で正確な測定ができましたが、その定量限界から、正確な測定は0.03 % ABVの低濃度まで可能であることが示されています。再現性は、8種類の異なるコンブチャの分析で示されたように、2日間の反復測定で4 % RSD未満でした。今回の手順では希釈する手法を用いたことでマトリックス

の影響を最小限に抑えられ、これによりノンアルコールビールやワインなどのアルコール濃度が低い他のマトリックスにもHS-SPME法を利用できるようになりました。9つのメーカーから市販されている20種類のコンブチャ試料に本HS-SPME/GC-MS法を適用し、ほとんどのアルコール濃度が0.5 % ABVを上回っていることが分かりました。この結果は「これらの製品のアルコール測定に現在使用されている方法が不正確であること」および／または「瓶詰め後に冷蔵保存しても発酵は継続してアルコール濃度が上昇すること」を示しています。

References

1. Sun, T., Li, J., Chen, C. (2015) J. Food and Drug Analysis 23, 709-718.
2. Jayabalan, R.; Marimuthu, S.; Thangaraj, P.; Sathishkumar, M.; Binupriya, A.R.; Swaminathan, K.; Yun, S.E. (2008) J. Agric. Food Chem. 56, 9064-9071.
3. Alcohol and Tobacco Tax Trade Bureau, "General Kombucha Information", ttb.gov/kombucha, accessed 07/08/2020.

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

Featured Products

Description	製品番号
SUPELLOWAX [®] 10, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.50 μm	24284
SPME fiber assembly, 100 μm PDMS for autosampler, 23 ga, Pk.3	57341-U
SPME fiber holder for autosampler	57347-U
Inlet Liner, Direct (SPME) Type, 0.75 mm I.D. for Agilent, Pk.1	2637501
Headspace vial with screw top, clear, 10 mL, Pk.100	SU860099
Magnetic screw cap for headspace vial w/1.5 mm PTFE silicone septa, Pk.100	SU860103
Ethanol, 200 proof anhydrous, >99.5% purity*	459836
Ethanol-d ₆ , >99.5% atom %D	186414
Sodium phosphate, monobasic, for HPLC, 99-101%	52074
Sodium phosphate, dibasic, for HPLC, ACS grade*	SX0723
Sodium chloride, EMSURE [®]	106404

*Not Available in all countries. Please visit [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com) to see alternatives.

カバ抽出物のHPLC分析

生姜とカバ根の新しいファイトケミカル認証標準物質混合溶液

Adam J. Kuszak; Stephen A. Wise - Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, Maryland, USA

Chris Leija, Senior Scientist, Reference Materials & Workflows; Uma Sreenivasan, Head of Reference Materials & Workflows R&D;

Matthias Nold, Product Manager Reference Materials;



緒言

植物由来の製品は、生薬、栄養サプリメント、化粧品用途と広く利用されています。植物の化学組成は複雑であるとともに天然でばらつきがあることは、植物製品の品質管理に大きな課題をもたらしています。植物種を検証し、異なる植物部位や異なる植物種が混入していたり、合成成分が添加されたりしていないかを検出するためには、クロマトグラフィーによる化学マーカーのフィンガープリント分析が効率的な方法です。当社では、多種多様な植物で最も重要なマーカー化合物の1500を超えるファイトケミカル標準物質（未希釈）の包括的な製品シリーズを取り揃えています。

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

植物由来物質の定性的かつ定量的な分析では、複数の重要成分の試験が必要になります。そのため分析には、未希釈物質から多成分を含む溶液を調製する時間のかかる作業です。調製した溶液は安定性を確立しなければならないことから、おそらく頻繁に調製が必要となるでしょう。このような溶液調製に代わる効果的な方法を提供すべく、当社では植物に特化した認証標準物質（CRM）混合溶液の製品シリーズを用意しています。

これらSupelco®ブランド製品は、テキサス州ラウンドロックにあるISO/IEC 17025およびISO 17034認証を取得したCerilliant®の拠点で生産されており、一連の薬用植物および栄養サプリメントで重要となる複数の成分を校正・検証するためのコスト効率が高く精度の高いツールとなります。これらのCRMは、すべての被分析物質のトレーサブルな数値と拡張不確かさを含む包括的な分析証明書添付して提供します。

最近、この製品シリーズへ新たにカバ混合溶液が加われました（表1に組成を示します）。この新製品は、その他開発中の製品（ジンジャー由来のジゲロールおよびショウガオール）のCRM混合溶液などと共に、米国・国立衛生研究所（NIH）ダイエタリーサプリメント局（ODS）と共同で開発しました。カバのもつ健康効果と安全性に生物医学的関心が高まっていることに加え、食品とサプリメント製剤に一層厳しい特性評価が求められていることに応え¹、ODS分析法・標準物質プログラム（ODS Analytical Methods and Reference Materials Program）はCerilliant社と契約し、産業界、学術機関、そして規制当局の科学者と分析者をサポートすべく、カバの主な成分のCRMキャリブレーション溶液を開発しました。

表 1. Composition of the new Kava CRM Mix **K-007** (1 mL in Acetonitrile)

Components	Concentration (µg/mL)
Yangonin	250
Desmethoxyyangonin	250
Dihydrokavain	250
D,L-Kavain	250
Methysticin	250
Dihydromethysticin	250
Flavokavain A	25
Flavokavain B	25
Flavokavain C	25

背景

カバカバとも呼ばれるカバ (*Piper methysticum* G. Forst.) は南太平洋諸島原産の植物ですが、世界の他の国々でも生薬および栄養サプリメントとしての人気が高まっています。カバは従来、根茎から作る儀式的飲み物として消費されてきましたが、それがもつリラックス効果により伝統薬としても長い歴史があります²。カバには多数のカバラクトンとフラボカワイン (別名「フラボカバイン」) が含まれており、それぞれが特有の生理活性をもち、また相乗的に生理活性を示すこともあります。カバの品種によってはこれら成分の割合が異なることもあります。現在の生物医学研究では、不安障害の治療、がん進行の予防や調節の可能性について、カバ成分の安全性と有効性が検討されています³。2000年代初頭にカバの摂取に伴う肝毒性の症例が多数報告されたことで公衆衛生上の懸念が生じ、一部の国では輸入制限が課せられました⁴。しかし、近年は多くの規制管理が緩和されています。研究者の中には、カバがもつと思われる肝毒性は、市販のエキスに使用されている溶媒の種類に関連しているか、または特定のフラボカワインと生薬との相互作用によるものかもしれない、という意見があります。とはいえ、カバの成分の安全性の理解については、引き続き検討していく必要があるでしょう。

試料調製と分析法

粉碎したカバ根 (noble cultivar) とカバカバエキス含有カプセル剤の試料の分析を行いました。定性的かつ定量的な評価を行うため、これらの試料を新製品 Kava CRM Mix と比較しました。Kava CRM Mix (製品番号 K-007) に含まれているカバラクトンとフラボカバインの化学構造を図1に示します。Kava CRM溶液を使用してカバラクトンは6.25~250 µg/mL、フラボカバインは0.625~25 µg/mL の範囲で5点検量線を作成しました。

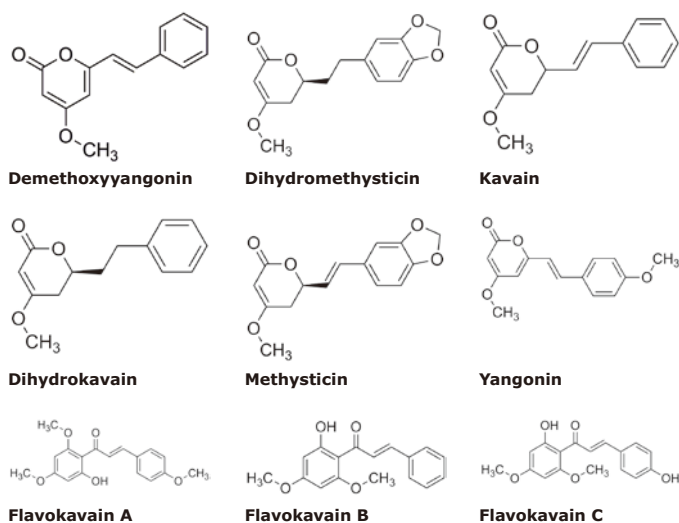


図1. カバ由来成分の化学構造

分析のため、カバ根とカバカプセル剤それぞれ750 mgを抽出溶媒 (メタノール：水=70:30の混合液) 50 mLに懸濁させ、60分間超音波破碎しました。4000 rpmで5分間遠心分離した後、可溶性画分を0.2 µm PTFEシリンジフィルターを通してろ過し、HPLCに注入しました (条件は表2参照)。

表2. HPLC条件

HPLCカラム:	Ascentis® Express C18, 15 cm x 3.0 mm, 2.7 µm (53816-U)					
移動相溶媒:	[A] 0.1 % H ₃ PO ₄ ; [B] isopropyl alcohol; [C] acetonitrile					
グラジエント条件:	Time (min)	0	6	16	18	18.1
	A	70	58	15	15	70
	B	20	20	10	10	20
	C	10	22	75	75	10
流速:	0.5 mL/min					
カラム圧力:	460 bar					
カラム温度:	30 °C					
検出器:	UV, 220 nm					
注入量:	1 µL					
サンプル:	kava root or capsules, 750 mg in 50 mL 70:30 MeOH:Water					

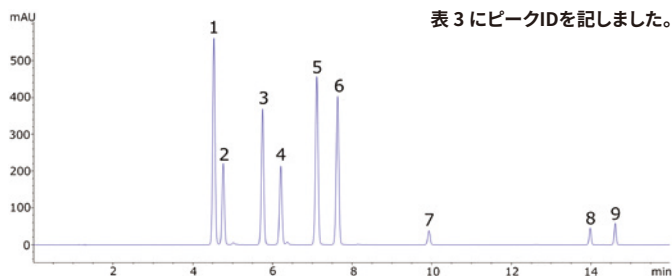


表3にピークIDを記しました。

図2. カバ標準品のクロマトグラム (CRM Mix 製品番号 K-007)

結果

Ascentis® Express C18カラムとKava CRM溶液を使用して、2種類のカバ製品中のカバラクトンとフラボカバインを分離し、定量することができました。ピークの同定と溶出順の決定のため、各被分析物質だけを含む単一成分溶液を調製しました。分析したカバの根抽出物とカバカプセル剤は、典型的なカバラクトンの分布を示しました (図3および4)。

類縁化合物の
HPLC分離向けカラムは
こちら



<https://bit.ly/3vpmk96>



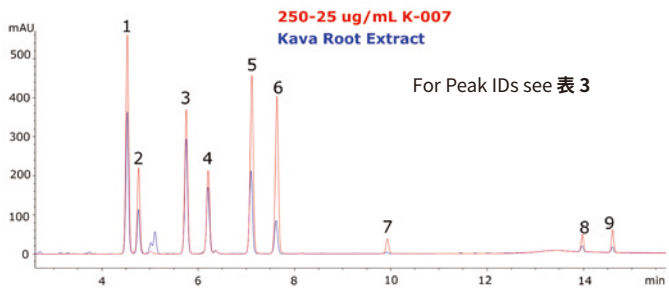


図 3. カバ CRM Mix 製品番号 K-007 (red)とカバの根抽出物 (blue) のクロマトグラム

検量線は分析範囲にわたって非常に良好な線形性 ($R^2 > 0.999$) を示しました。各被分析物質の定量から、いずれの試料でもカバラクトンと比べてフラボカバインの存在量は低いことが明らかになりました。根およびカプセル剤の試料に含まれていたカバラクトンおよびフラボカバインの総量 (%重量基準) はそれぞれ5.68 %および17.90 %でした (表3)。

表 3. カバサンプルにおけるカバラクトンとフラボカバイン含有量 (% weight)

Peak #	Analyte	% Weight	
		#	Capsules
1	Methysticin	1.03	2.18
2	Dihydromethysticin	0.82	2.09
3	Kavain	1.29	4.60
4	Dihydrokavain	1.31	4.40
5	Yangonin	0.75	2.14
6	Demethoxyyangonin	0.35	1.93
7	Flavokavain C	0.02	0.04
8	Flavokavain A	0.06	0.23
9	Flavokavain B	0.04	0.28
Total		5.68	17.90

結論

本分析の結果から、カバCRM溶液は、カバ製品中のカバラクトンおよびフラボカバインのHPLC-UV分析に利用できることが示されました。カバCRMを溶液の形で用いることで、物質使用の利便性と効率性、一貫性、正確性および計量計測トレーサビリティが得られます。新製品であるカバCRM混合溶液は、カバ製品の化学組成を分析してその効力と真正性を確認するための非常に効率的なツールです。

References

1. Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) 2018.005: Determination of Kavalactones and/or Flavokavains from Kava (Piper methysticum). Journal of AOAC INTERNATIONAL, Volume 101, Issue 4, 1 July 2018, Pages 1256–1260, <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SMPR2018.005>

2. Singh, Y.N. and M. Blumenthal. 1997. Kava - An Overview. HerbalGram 39:3356.

3. PubMed ID: 30396607; PubMed ID: 29641222; PubMed ID: 31172600

4. HerbalGram. 2002; 55:26-32 American Botanical Council.

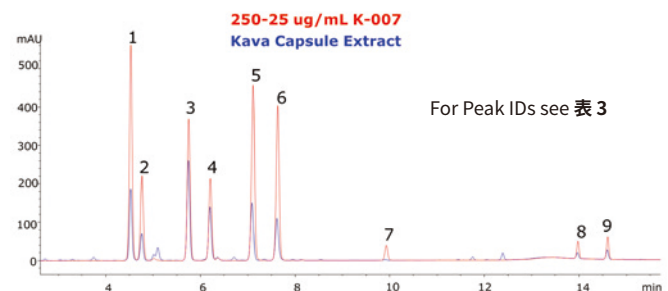


図 4. カバ CRM Mix 製品番号 K-007 (red)とカバカプセル剤抽出物 (blue) のクロマトグラム

Featured Products

Description	製品番号
Ascentis® Express C18, 15 cm x 3.0 mm I.D., 2.7 µm	53816-U
Ascentis® Express C18, 2.7 µm Guard Cartridge	53504-U
Ascentis® Express Guard Cartridge Holder	53500-U
Kava Mix, Cerilliant® Certified Reference Material	K-007
Millex® Syringe Filters, Hydrophilic PTFE 0.20 µm	SLLG033
Solvents & Reagents	
Ultrapure water from Milli-Q® system IQ 7005 or bottled water	Milli-Q or 101262
Phosphoric Acid, for HPLC, LiChropur®, 85%	49685
Acetonitrile for UHPLC	900667
Methanol for UHPLC	900688
Isopropanol, HPLC Plus	650447

Related Products

Description	製品番号
Powdered kava extract, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard	1355709
DL-Kavain, primary reference standard	05790585
Methysticin, phyproof® Reference Substance	PHL89250
Dihydromethysticin, phyproof® Reference Substance	PHL89186
(±)-Kavain, phyproof® Reference Substance	PHL89239
Dihydrokavain, phyproof® Reference Substance	PHL89185
Yangonin, phyproof® Reference Substance	PHL89293
Desmethoxyyangonin, phyproof® Reference Substance	PHL89184
Flavokawain A, phyproof® Reference Substance	PHL83762
Flavokawain B, phyproof® Reference Substance	PHL83763
Flavokawain C, phyproof® Reference Substance	PHL83854

ファイトケミカルCRMミックスの全製品は以下のサイトでご覧いただけます。

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

ファイトケミカル標準物質のカタログはこちらから請求いただけます。

<https://bit.ly/379SpI0>

シングルユース装置の溶出物調査

抽出物と浸出物(E&L)のための認証標準物質の混合溶液で、未知の溶出物をGC/MSで迅速に定性・定量

Maria Viehoff, Project Manager for Extractables and Leachables Studies

Sebastian Siefert, Scientist Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Saskia Haehn, Manager Extractables and Leachables Laboratory

Matthias Nold, Product Manager Reference Materials, Analytix@merckgroup.com



一般的に医薬品の製造にはいくつかの工程がありますが、その際、ポリマー材料で構成された製造ユニットの部品をプロセスの流れで通過することがあります。このような直接的な接触により、いわゆる溶出物の蓄積が起こり、目的とする製品の安全性と品質が損なわれる可能性があります。

そのような生産工程における高分子材料を用いた部品の例として、シングルユースシステム (SUS) があります。シングルユース機器のメーカーは、エンドユーザーの製品に含まれる可能性のある溶出物の概要を示すために、自社の材料について関心を持っています。抽出物のデータは、実験室で様々な製造条件を想定して作成されるため、プロセス中に発生する様々な可能性についての貴重な情報となります。

そのような生産工程における高分子材料を用いた部品の例として、シングルユースシステム (SUS) があります。シングルユース機器のメーカーは、エンドユーザーの製品に含まれる可能性のある溶出物の概要を示すために、自社の材料について関心を持っています。抽出物のデータは、実験室で様々な製造条件を想定して作成されるため、プロセス中に発生する様々な可能性についての貴重な情報となります。

BPOG (BioPhorum Operations Group) ガイドライン¹およびポリマー成分とシステムに係るUSP 665ガイドライン (draft version 案)²によれば、溶出物に関する検討は種々の溶媒とインキュベーション時間を使用して実施し、分析は溶出物に適用できる様々な分析法を使用すべきとしています。これらの分析法の一つがガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) です。これは添加剤、不純物、ポリマー成分、分解生成物、または抽出溶媒と材料の相互作用生成物など、半揮発性の溶出物の測定に用いられます。シングルユース装置の製造に使用されたポリマー材料の正確な組成が不明である場合には、ノンターゲット分析が不可欠です。迅速な同定を可能とするため、当社ではGC/MSで検出される最も一般的な溶出物 (図1) の認証標準物質 (CRM) 混合溶液および各成分の標準物質 (未希釈品) を発売しました。これらの物質を使用することで、これら14種類の成分の同定のみならず、NIST SRMへのトレーサビリティのある定量も可能となります。以下では、フィルターの溶出物研究で存在していた主な溶出物の同定と定量のためにGC用溶出物・浸出物スクリーニング標準物質 (Extractables and Leachables Screening Standard) 混合溶液を使用したアプリケーションを説明します。

浸出物：一般的な工程条件または保存条件の下で、製品接触材料 (シングルユースシステムなど) との直接接触により、製剤に移行する化合物；浸出物は製剤の毒性または有効性に影響することがあります。

溶出物：極端な条件下 (非常に強い溶媒、過剰な時間および温度など) で製品接触材料から抽出される化合物。溶出物プロファイルは浸出物プロファイルの最悪のケースを表しています。

シングルユースシステム (SUS)：医薬品製造に使用されるバイオプロセッシング用の使い捨て装置。通常はポリマー材料製です。

利点：柔軟性、洗浄バリデーションが不要、低投資、交差汚染がない

SUSの例：バイオリアクター、使い捨てのフィルターやチューブ

溶出物試験のためのGC法

シングルユース装置の溶出物試験で使用した装置パラメータを表1にまとめてあります。BPOGのプロトコル¹に従い、分離はSupelco® SLB - 5 msキャピラリーカラムにより行いました。軌道回転させながら40 °Cで7日間 WFI (注射用水) で抽出した後採取して代表試料を調製し、さらに抽出溶媒としてジクロロメタン、液-液抽出 (LLE) 標準物質としてp-テルフェニル-d₁₄を使用してLLEにより処理しました。得られた試料には分析前に内部標準物質としてフェナントレン-d₁₀を添加しました。試料および標準物質混合溶液を1回のシーケンスで分析しました。

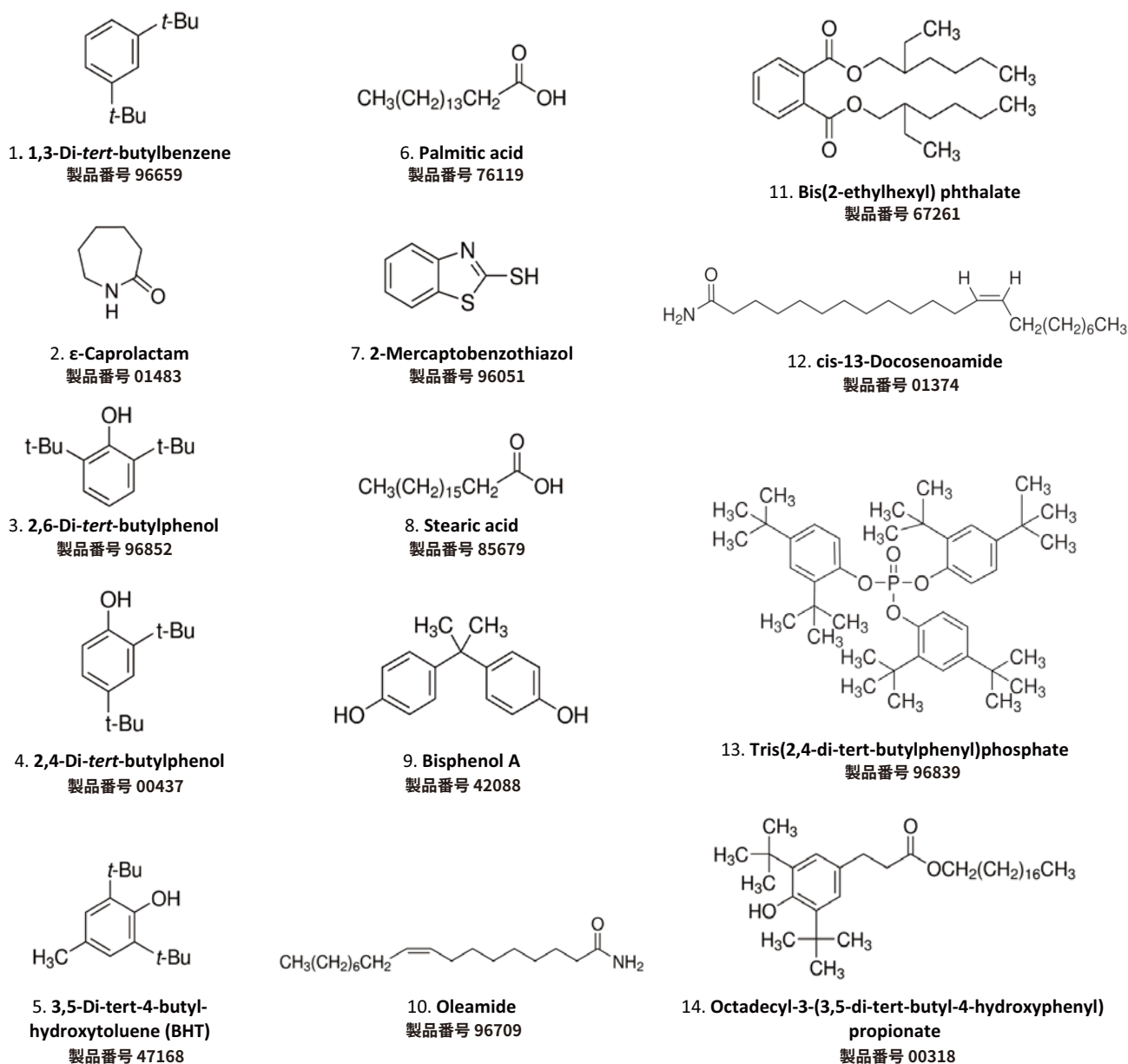


図 1. Components of the Extractables and Leachables Screening Standard for GC Cat. No. 01829; in Elution Order of Below Method. Concentration is 50 mg/L in *tert*-Butyl methyl ether for each component. For all the analytes, individual neat reference materials are also available under the catalog numbers listed.

表 1. GC条件

GC装置:	Agilent® HP7890, QToF 7200
GCカラム:	SLB®-5ms, 30 m x 0.25 mm, df=0.25 μ m (28471-U)
カラムオープン:	50 °C (3 min), 10 °C/min to 320 °C (15 min)
注入口温度:	280 °C
キャリアガス:	helium, 1.2 mL/min
検出器:	MSD, full scan, m/z 25-800 Transfer line 250 °C, EI, Ion Source 230 °C, Electron Energy 70 eV
注入力:	1 μ L, pulsed splitless 350 kPa, 0.5 min, then 1:25
注入口ライナー:	4 mm I.D. Inlet liner, split, focus, tapered, glass wool, deactivated
サンプル試料:	1. Extractables and Leachables Screening Standard for GC (01829), 50 mg/L in <i>tert</i> -butyl methyl ether 2. Product of a 1 day filter extraction with water for injection (WFI)

結果および考察

GC用抽出物と浸出物（E&L）スクリーニング標準物質のクロマトグラムを図2に示します。全14種の標準物質が検出され、ほぼ完全に分離されました。質量分析計で検出したことから、共溶出した成分もそれらの抽出イオンクロマトグラムにより同定できました。保持時間とm/z比のマッチングにより、シングルユースフィルターを抽出した際の主な溶出物として ϵ -カプロラクタムを同定しました（図3）。抽出イオンクロマトグラムをもとにGC用溶出物・浸出物スクリーニング標準物質のカプロラクタムのピークに対して定量分析を行うことができました。

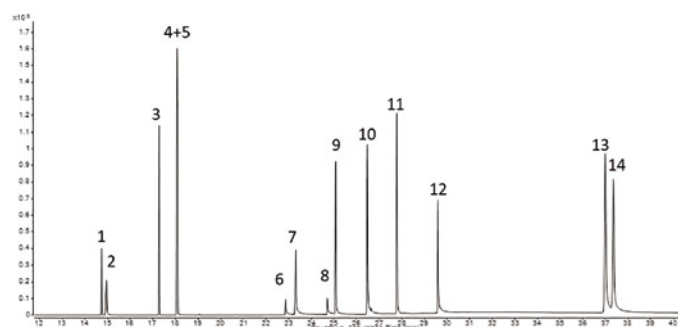


図 2. Extractables and Leachables Screening Standard for GC, 50 mg/L in *tert*-Butyl methyl ether (Peak IDs - 表 2).

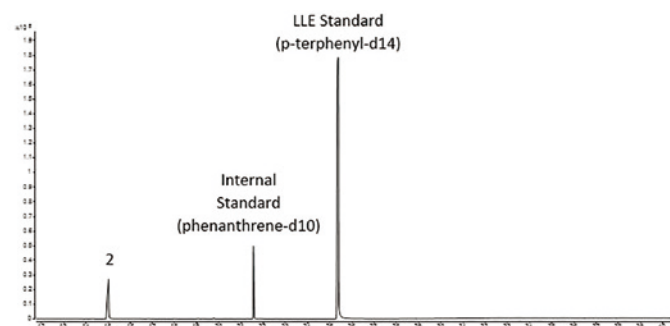


図 3. Representative Sample of a Single-use Equipment Extraction (Peak IDs - 表 2).

結論

本稿で示した事例から、シングルユース装置に起因する最も一般的な溶出物を信頼性高く同定・定量するのに、GC用溶出物・浸出物スクリーニング標準物質を適用できること、そしてその意義が示された。

表 2. Peak Identifications

Peak#	Name	CAS#
1	1,3-Di- <i>tert</i> -butylbenzene	1014-60-4
2	ϵ -Caprolactam	105-60-2
3	2,6-Di- <i>tert</i> -butylphenol	128-39-2
4	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	96-76-4
5	3,5-Di- <i>tert</i> -4-butylhydroxytoluene (BHT)	128-37-0
6	Palmitic acid	57-10-3
7	2-Mercapto-benzothiazol	149-30-4
8	Stearic acid	57-11-4
9	Bisphenol A	80-05-7
10	Oleamide	301-02-0
11	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	117-81-7
12	<i>cis</i> -13-Docosenoamide	112-84-5
13	Tris(2,4-di- <i>tert</i> -butylphenyl)phosphate	95906-11-9
14	Octadecyl-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyphenyl) propionate	2082-79-3

References

- Ding et al. Standardized Extractables Testing Protocol for Single-Use Systems in Biomanufacturing, Pharmaceutical Engineering, (2014).
- <665> Plastic Materials, Components and Systems Used in the Manufacturing of Pharmaceutical Drug Products and Biopharmaceutical Drug Substances and Products, third draft, published on March 1, 2019 by the USP.

Featured Products

Description	製品番号
Extractables and Leachables Screening Standard for GC, 1 mL or 5 mL	01829
SLB®-5ms, 30 m x 0.25 mm, df = 0.25 μ m	28471-U
Dichloromethane, for gas chromatography ECD and FID SupraSolv®	1.06054
<i>p</i> -Terphenyl- d_{14} , analytical standard, 100mg	442734
Phenanthrene- d_{10} , analytical standard, 100mg	442753

Related Products

Description	製品番号
Internal Standard Solutions	
<i>p</i> -Terphenyl- d_{14} solution, certified reference material, 2000 μ g/mL in dichloromethane	48418
Phenanthrene- d_{10} solution, certified reference material, 2000 μ g/mL in methanol	48094
Single Component Reference Materials	
1,3-Di- <i>tert</i> -butylbenzene, reference material, 100 mg	96659
2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol, reference material, 100 mg	00437
2,6-Di- <i>tert</i> -butylphenol, reference material, 100 mg	96852
2-Mercaptobenzothiazol, reference material, 100 mg	96051
3,5-Di- <i>tert</i> -4-butyl-hydroxytoluene (BHT), reference material, 500 mg	47168
Bis(2-ethylhexyl) phthalate, certified reference material, TraceCERT®, 100 mg	67261
Bisphenol A, certified reference material, TraceCERT®, 100 mg	42088
<i>cis</i> -13-Docosenoamide, reference material, 100 mg	01374
Octadecyl-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyphenyl)propionate, reference material, 100 mg	00318
Oleamide, reference material, 100 mg	96709
Palmitic acid, analytical standard, 5 g	76119
Stearic acid, analytical standard, 500 mg or 5 g	85679
Tris(2,4-di- <i>tert</i> -butylphenyl)phosphate, reference material, 100 mg	96839
ϵ -Caprolactam, reference material, 100 mg	01483

To see our complete portfolio of reference materials for extractable and leachable testing, visit us at <https://bit.ly/3jGmhTJ>

大麻のテルペンGC/MS分析

Katherine K. Stenerson, Analytical Sciences Liaison

要約

大麻に含まれる 31 種類のテルペンを抽出しGC-MS分析するための効率的かつ簡易なワークフローを開発しました。この分析法は、単純な溶媒抽出と、それに続くSLB®-5 msキャピラリーカラムによる高速かつ効率的なGC-MS分析です。

緒言

テルペンは、大麻花の香気と芳香の元となっている化合物クラスです。品種が異なると特徴的なテルペンプロファイルを示すことから、多くの消費者にとって大麻製品のラベルにテルペン含有量が表示されていることは重要です。本稿を作成している時点で、コンセンサスが得られているテルペン試験法はありません。現在用いられている一般的な手法は2つあり、ヘッドスペース抽出または溶媒抽出の後、GC分析を行います。不揮発性のマトリックス成分がテルペンと共抽出されることはないという点でヘッドスペース分析の方が溶媒抽出法よりも「クリーンな」分析法です。しかし、従来のヘッドスペース分析ではヘッドスペース分析装置という特殊な装置が必要となることがあります。固相マイクロ抽出 (SPME) によるヘッドスペース分析は従来のヘッドスペース分析と同様の利点を持ち、非常に高感度で、手動またはオートサンプラーによって実施可能です^{1,2}。

溶媒抽出も特殊な装置は不要で、テルペンプロファイルを測定するための有効な手段として使われてきました³。本研究では、溶媒抽出と認証標準物質およびGC-MS分析を組み合わせることで大麻花に含まれるテルペンを同定・定量する方法を実証します。使用した分析法では、単純かつ迅速に溶媒抽出を行った後、高効率な20 m x 0.18 mm x 0.18 µm SLB®-5 msカラムで分析しました。SLB®-5 msカラムは長さが短いうえに内径が小さいことから、対象とした31種類のテルペンを17分未満で分離・溶出できました。フルスキャンモードでのGC-MSにより、保持時間と組み合わせるライブラリーマッチングを使用することでスペクトル同定が可能となり、大麻試料に含まれる対象テルペンの同一性を検証できました。標準物質を追加すれば、この分析法をさらに多くのテルペンまで広げることができるでしょう。

試料調製と分析法

粗く粉碎した大麻の抽出物を、図1の方法に従って調製しました。遠心分離後、上清を除去し、GC分析のため2 mL褐色オートサンブラー用バイアルに移しました。表1に示した条件に従いGC-MS分析を進めました。2種類の大麻テルペンCRM混合溶液から、0.75 ~ 200 ppmの範囲で検量線（化合物によって範囲は異なる）を作成しました。注入時に試料と標準溶液の両方に内部標準物質としてトリデカン（100 ppm）をサンドイッチ注入法を使用して添加しました。MS法の一環として行う同定を補助するため、CRMを使用して各テルペンに固有の保持時間を規定し、対応する定量イオンと定性イオンの比とともに標準スペクトルを作成しました。

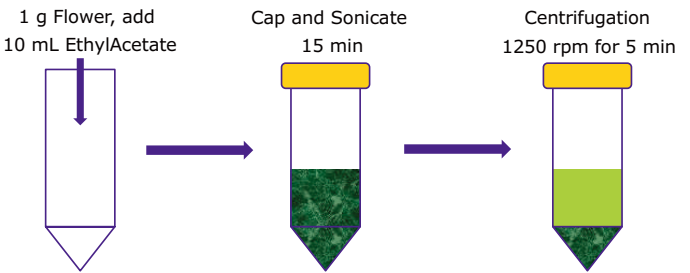


図 1. 分析前処理スキーム

表 1. GC条件

Gas Chromatograph Conditions	
column:	SLB®-5ms 20 m x 0.18 mm ID; 0.18 µm (28564-U)
oven:	45 °C (2 min), 10° C/min to 140° C (0.5 min), 30° C/min to 300° C (2 min)
inj. temp.:	300° C
carrier gas:	helium, 0.75 mL/min constant Flow
detector:	MSD
injection:	2.0 µL – pulsed split 50:1
liner:	Single Taper FocusLiner™ with wool (2879905-U)
sample:	Hemp extract (1 g flower in 10 mL ethyl acetate)

MS Conditions	
tuning:	Auto-tune
acquisition:	Full Scan Mode (EI); 40-400 amu
solvent delay:	4 min
MS source temperature:	300°C
MS quad temp.:	150°C
MS transfer line temp.:	300°C

結果

本GC法では対象とした31 種類のテルペンを17 分未満で溶出し、
図2に示すようにピーク形状と分離度は極めて良好でした。

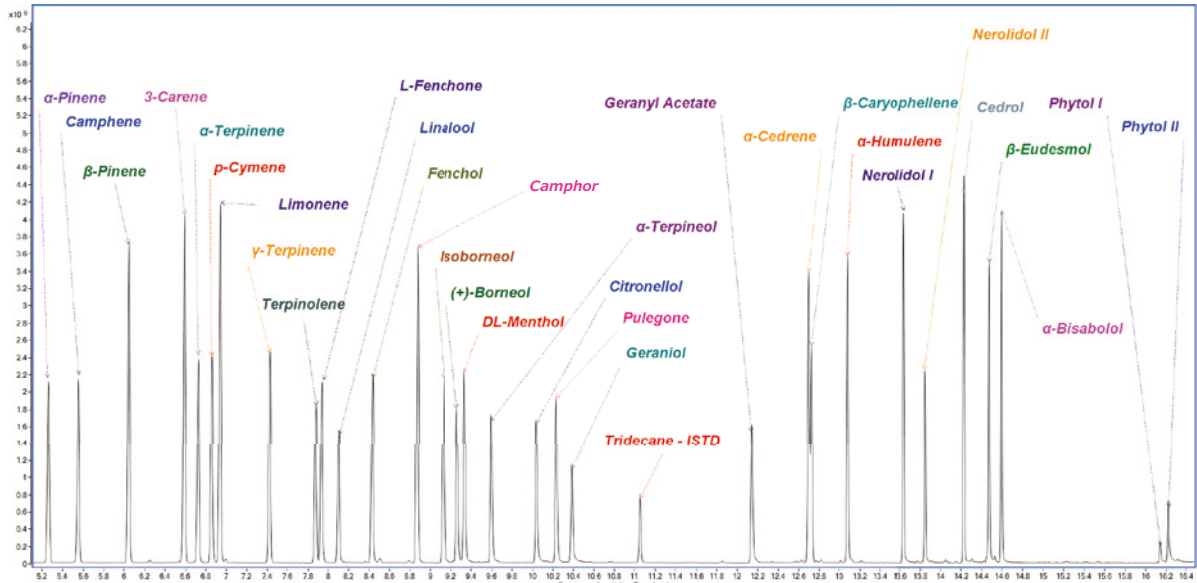


図 2. 大麻テルペン標準物質におけるGC-MSクロマトグラム (Retention Time Range 5 to 16.5 min)

表 2. 31 種大麻テルペンと IS

Peaks	Compound	CAS #	Ret. Time [min]	Lib Match Factor	r ²	Range [µg/mL]	Detected in hemp sample?
1	α-Pinene	80-56-8	5.257	98.99	0.99991	0.75-100	Y
2	Camphene	79-92-5	5.553	99.00	0.99990	0.75-100	Y
3	β-Pinene	127-91-3	6.049	99.17	0.99995	1.50-200	Y
4	3-Carene	13466-78-9	6.589	99.15	0.99992	1.50-200	Y
5	α-Terpinene	99-86-5	6.726	99.62	0.99987	0.75-100	Y
6	p-Cymene	99-87-6	6.856	99.58	0.99987	0.75-100	Y
7	Limonene	138-86-3	6.938	99.21	0.99997	1.50-200	Y
8	γ-Terpinene	99-85-4	7.422	99.35	0.99994	0.75-100	Y
9	Terpinolene	586-62-9	7.872	99.21	0.99990	0.75-100	N
10	L-Fenchone	7787-20-4	7.930	99.47	0.99989	0.75-100	Y
11	Linalool	78-70-6	8.101	99.37	0.99915	0.75-100	Y
12	Fenchol	2217-02-9	8.426	99.43	0.99996	0.75-100	Y
13	Camphor	76-22-2	8.866	99.57	0.99997	1.50-200	Y
14	Isoborneol	124-76-5	9.126	99.45	0.99983	0.75-100	Y
15	(+)-Borneol	464-43-7	9.259	99.36	0.99968	0.75-100	Y
16	DL-Menthol	89-78-1	9.331	99.52	0.99988	0.75-100	Y
17	α-Terpineol	10482-56-1	9.596	99.34	0.99942	0.75-100	Y
18	Citronellol	106-22-9	10.036	99.05	0.99961	0.75-100	Y
19	Pulegone	89-82-7	10.234	99.55	0.99956	0.75-100	Y
20	Geraniol	106-24-1	10.386	98.21	0.99946	0.75-100	Y
21	Geranyl Acetate	105-87-3	12.145	98.64	0.99980	0.75-100	Y
22	α-Cedrene	469-61-4	12.699	99.62	0.99997	0.75-100	N
23	β-Caryophellene	87-44-5	12.728	99.68	0.99953	0.75-100	Y
24	α-Humulene	6753-98-6	13.082	98.90	0.99975	0.75-100	Y
25	Nerolidol I	7212-44-4	13.636	98.73	0.99913	1.50-200	Y
26	Nerolidol II	7212-44-4	13.845	99.19	0.99905		Y
27	Cedrol	77-53-2	14.226	99.46	0.99978	0.75-100	Y
28	β-Eudesmol	473-15-4	14.471	99.60	0.99945	0.75-100	Y
29	α-Bisabolol	23089-26-1	14.594	99.62	0.99965	0.75-100	Y
30	Phytol I	7541-49-3	16.145	92.91	0.99975	0.75-100	Y
31	Phytol II	7541-49-3	16.225	92.91	0.99950		Y
ISTD	Tridecane	629-50-5	11.050	96.17	*****	100 ppm	

本GC-MS法はすべての被分析物質について良好な線形性を示しました(表2)。加えて保持時間の安定性も評価しました。MSスペクトルが類似したテルペンが存在していることから、保持時間が濃度やマトリックス成分の存在によって変化しないことが重要です。SLB®- 5 msカラムにより得られた保持時間の安定性を、α-ピネンを例に図3および4に示します。図3は、使用した9種類のキャリブレーション用標準溶液から得られた定量イオンの抽出イオンクロ

マトグラム(EIC)のオーバーレイです。濃度の変化に伴う保持時間のシフトは認められません。同様に図4は、50 ppmの標準溶液を3回注入して得られたα-ピネンのピークのオーバーレイですが、保持時間や応答に違いは見られません。マトリックス中での保持時間の安定性も評価し、これについては以降で論じます。

抽出した大麻試料を分析し、本分析の対象とした31 種類のテルペンのうち29 種類の存在を同定しました(表2および図5)。大

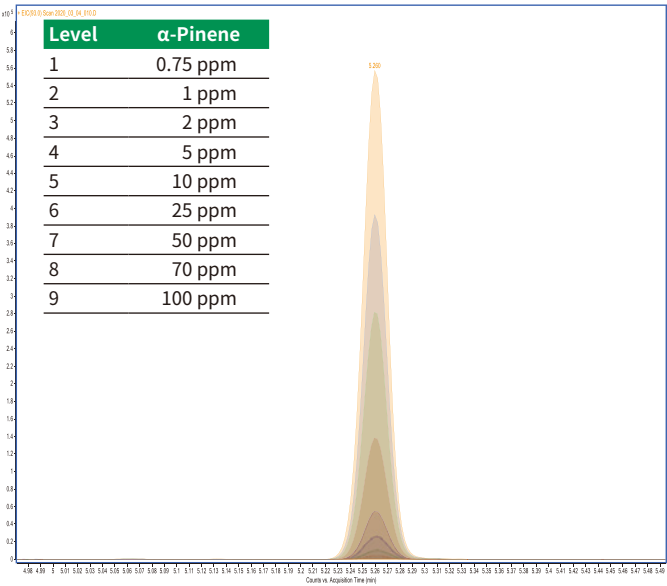


図 3. 各濃度におけるα-ピネン標準品のGCMSピーク

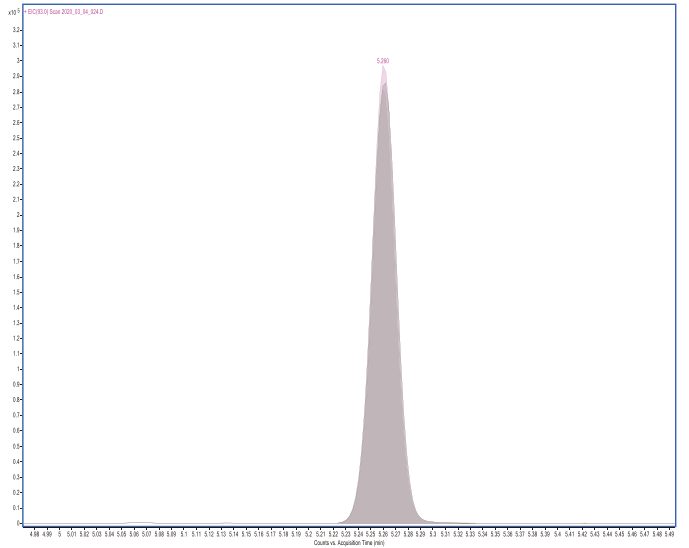


図 4. 三回測定した際の 50 μg/mL α-ピネン標準品ピーク

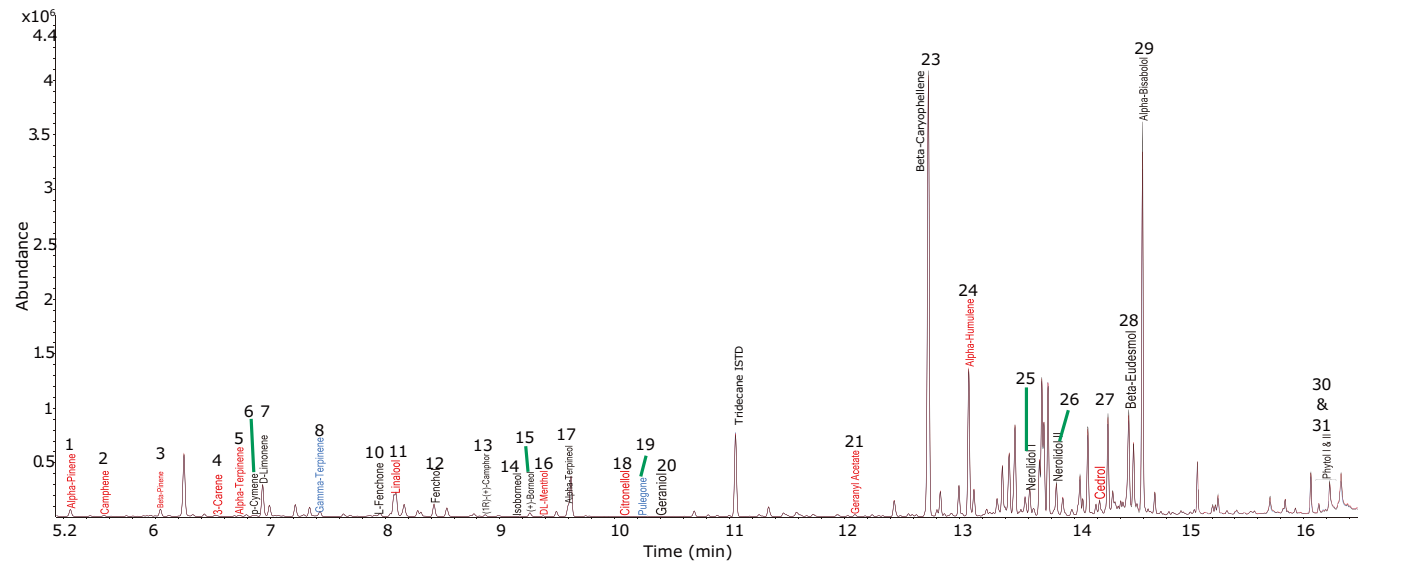


図 5. 大麻抽出物におけるGCMSクロマトグラム

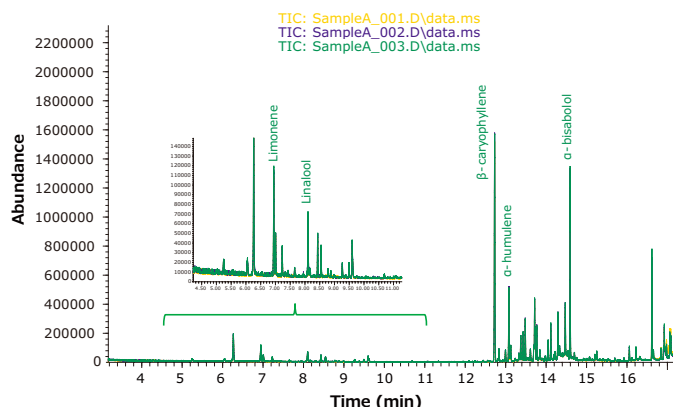


図 6. 大麻抽出物を3回GCMS測定した際のクロマトグラム

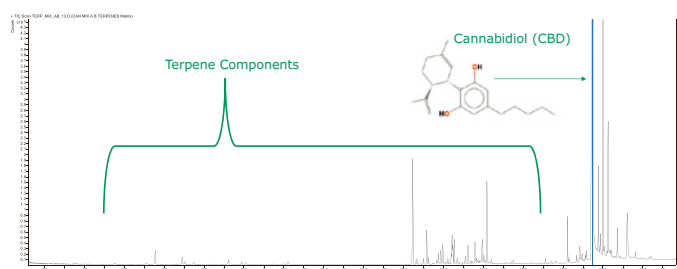


図 7. 溶媒抽出によって共抽出されたカンナビノイドのGCMSクロマトグラム (TIC)

麻中に存在する各種テルペンの濃度は様々で、β-カリオフィレンおよびα-ピサボロールなどの数種のテルペンは他種に比べてはるかに高濃度でした。本方法の検量範囲は約100倍の幅があったため、大麻に存在する様々な濃度のテルペンを定量できました。加えて、マトリックス中でも保持時間が安定していることに加えスペクトルIDもピーク同定に役立ちました。このことは、図6に示した大麻抽出物を複数回注入した際の全イオンクロマトグラム (TIC) のオーバーレイから確認できます。キャリブレーション用標準溶液と同様に保持時間のシフトは観察されませんでした。なお、溶媒抽出法ではカンナビノイドも共抽出されました (図7) が、これらの溶出は分析中で十分に遅く、テルペンには干渉しなかったことに留意されたい。



分析前処理製品
カタログ
ダウンロードはこちら



<https://bit.ly/3fUxTzb>

結論

大麻花に含まれる、対象としたテルペンの分析を目的とした単純な溶媒抽出とGC-MSとを組み合わせた測定法の有用性が実証され、29種類のテルペンを同定しました。認証標準物質とMSスペクトルを組み合わせることで、マトリックス中での適切な同定が可能となり、20 m x 0.18 mm I.D. x 0.18 μm SLB® - 5 ms カラムにより分析の速度と効率を両立しました。本方法では31種類のテルペンを対象としましたが、CRMを追加すればさらに対象を拡大できます。

References

1. Halpenny, M.; Stenerson, K.K. Analysis of Terpenes in Cannabis Using Headspace Solid-Phase Microextraction and GC-MS. *LCGC North America* - Special Issue, 2017, 35 (5), 27-32.
2. Stenerson K.K. Headspace SPME-GC/MS Analysis of Terpenes in Hops and Cannabis. *Analytix Reporter- Issue 3*, 2018, 9-12
3. Giese, M.W.; Lewis, M.A.; Giese, L.; Smith, K.M. Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *J. AOAC Int.*, 2015, 98 (6), 1503-1522.

Related products

Description	製品番号
Reference Materials & Solvents	
Cannabis Terpene Mix A, TraceCERT® certified reference material, 2000 μg/mL each component in methanol, 1 mL	CRM40755
Cannabis Terpene Mix B, TraceCERT® certified reference material, 2000 μg/mL each component in methanol, 1 mL	CRM40937
Tridecane analytical standard	91490
Ethyl acetate for gas chromatography MS SupraSolv®	1.00789
GC	
SLB®-5ms Capillary GC Column L × I.D. 20 m × 0.18 mm, df 0.18 μm	28564-U
Inlet Liner, Split/Splitless Type, Single Taper FocusLiner™ Design (wool packed), Pk.5	2879905-U
Molded Thermogreen® LB-2 Septa, solid discs diam. 11 mm, Pk.50	28676-U
Hamilton® Microliter™ syringe, cemented needle 701 ASN, volume 10 μL, needle size 23s ga (cone tip), needle L 43 mm (1.71 in.), Pk.6	21317
Accessories	
BenchMixer™ XLQ QuEChERS Shaker/Vortexer AC/DC input 115 V AC, US 2-pin plug	Z742705
BenchMixer™ XLQ QuEChERS Shaker/Vortexer AC/DC input 230 V AC, Schuko plug	Z742706
BenchMixer™ XLQ QuEChERS Shaker/Vortexer AC/DC input 230 V AC, UK plug	Z742707
Certified Vial Kit, Low Adsorption (LA), 2 mL, pk of 100 volume 2 mL, amber glass vial (with marking spot), natural PTFE/silicone septa, thread for 9 mm	29653-U
Corning® 50 mL centrifuge tubes 50 mL centrifuge tubes, polypropylene, conical bottom w/ CentriStar cap, rack packed, sterile, natural, 25/rack, 500/cs	CLS430828
Eppendorf® epT.I.P.S. box volume range 2-200 μL	Z640220
Eppendorf® epT.I.P.S. box volume range 50-1000 μL	Z640247
Eppendorf® epT.I.P.S. box volume range 100-5000 μL	Z640271

大麻のカンナビノイド分析： 効率的なHPLCワークフローの開発

Chris Leija, Senior Scientist, Reference Materials & Workflows
Katherine K. Stenerson, Analytical Sciences Liaison

要約

大麻の花の試料中に含まれるカンナビノイドを効率的かつ短時間で分析するために、いくつかの異なるHPLC法の選択肢を探求します。グラジエント分析とイソクラティック分析の違いを検討し、カンナビノイドの重量パーセントの測定に関してこれら2通りの分析法を比較します。

緒言

大麻草に含まれるカンナビノイドおよびその他の天然化合物の有効性が提唱されているため、マリファナと大麻製品はいずれも医療用として消費されます。マリファナの場合、製品の品質と安全性を確保する必要があることから、カンナビノイド試験(しばしば「効力試験」と呼ばれます)の必要性が強く求められています。大麻および大麻由来製品のカンナビノイド試験も増加傾向にあります。テトラヒドロカンナビノール (THC) の含有量が低い *Cannabis sativa* の系統に分類される大麻は、2018年農業改善法 (Agriculture Improvement Act of 2018、別称「2018年農業法案 (2018 Farm Bill)」) の可決により、現在米国において連邦レベルで合法化されています。その結果、米国農務省 (USDA) により米国・国内大麻生産プログラム (Domestic Hemp Production Program) が確立されました。このプログラムの下で発行されたガイドライン「暫定最終規則 (IFR)」では、「大麻と分類される製品はTHC含有量が0.3%未満でなければならない」と規定されています²。この規定の後、カンナビノイド含有量に関する大麻の品質検査のみならず、製品が法的要件を満たすことを確認するための正確なTHC測定の必要性が増すこととなりました。

マリファナと大麻の両方に含まれている注目すべき2つの主要なカンナビノイドは、テトラヒドロカンナビノール (THC) とカンナビジオール (CBD) であり、これらは一般に製品情報ラベルで報告されています。とはいえ、他にも多数のカンナビノイドが存在しており、一部の州では、報告を義務付ける数に係る要件を増やしつつあります。そこで試験では、複数のカンナビノイドを識別し、その正確な結果を示す必要があります。

マリファナと大麻の花の場合、カンナビノイド試験の一般的な方法では、メタノールまたはエタノールによる単純な液体抽出の後、HPLC-UV分析を行います。質量分析 (MS) 検出器に比べて操作が容易で安価なことから、UV検出器が好まれますが、適切な同定と正確な定量を行うためにはクロマトグラフィーでピークを分離する必要があります。

カンナビノイド分析のための多くのHPLC法では、グラジエント溶出を利用します。しかし、グラジエント溶出では、初期条件に戻すための平衡化が試料ごとに必要となるため、しばしば全体の分析時間が長くなります。一方、イソクラティック法を利用すれば平衡化を繰り返す必要はなく、ひいては単位時間あたりに分析可能な試料数を増やすことができます。ただしその代わりに、一部の分析で分離能が損なわれる可能性があります。本研究では、Ascentis® Express HPLCカラムにより、グラジエント条件、イソクラティック条件いずれでも17種のカンナビノイドを分離できることを実証します。それぞれの一連の条件について、全溶出時間が8分未満になるようにしました。さらにこれらの分析法を乾燥大麻花の分析に応用しました。試験対象としたカンナビノイドは、AOACが乾燥植物物質、チョコレートおよび濃縮物に対する標準試験法の性能要件 (SMPR) に記載したものに加え、その他3種のカンナビノイドにも注目しました^{3,4,5}。

実験

使用した試料調製法は、大麻中のカンナビノイド定量に対するファーストアクションのAOAC法を引用しました⁶。外部から提供された大麻花 (産地不明) 試料5 gをCryo-Cup™グラインダーを使用してホモジナイズし、粒子径を1 mm未満としました。カンナビノイドが分解されることなく試料をホモジナイズするために、試料を冷却して行う手法を使用することが望ましいです。低温にすることで被分析物質の分解を抑制し、均一な粒子径が得られます。



**Fused-core HPLCカラム製品
カタログはこちら**
<https://bit.ly/2XLM8kt>



**Supelcoのユニークな
HPLCカラム製品はこちら**
<https://bit.ly/2Wx0aTr>



ホモジナイズした大麻花試料500 mg を50 mL 遠沈管に秤量しました。エタノールの20 mLアリコートを添加し、遠沈管をボルテックスミキサーで短時間混合しました。その後250 rpmで30 分間振とうし、4000 rpmで5 分間遠心して植物物質をペレット化しました。上清を50 mL褐色メスフラスコに注意深くデカンテーションして放置しました。同じ50 mL遠沈管にエタノールの20 mLアリコートを添加して、植物物質から2回目の抽出を行いました。その後、得られた上清と最初の上清を合わせ、エタノールを加えて最終的な体積を50 mLとしました。大麻試料に含まれる高濃度と低濃度のカンナビノイドを定量できるよう、抽出液をメタノールで1:10および1:100に希釈しました。希釈した抽出液はMini-Uniprep™ G₂ フィルターバイアルを使って0.20 µm PTFEメンブレンでろ過し、ガラス製のオートサンプラー用バイアルに直接移しました。

各カンナビノイドの認証標準物質から、17種のカンナビノイドを50 µg/mL (CBLAは25 µg/mL) で含むピーク同定用標準溶液を調製しました。別途、後に試料中で定量するカンナビノイドを含む混合溶液を100 µg/mLで調製した後、希釈して0.25~100 µg/mLの6種のキャリブレーション用標準溶液を作製しました。同一の大麻花抽出液セットを2通りの異なる条件セット(表1)を使用してHPLC分析を行いました。条件の詳細は下記セクションで詳述します。分析に用いた装置は最新のUHPLCであり、低圧ミキシングシステムと1 µL UVフローセルを合わせて使用しました。

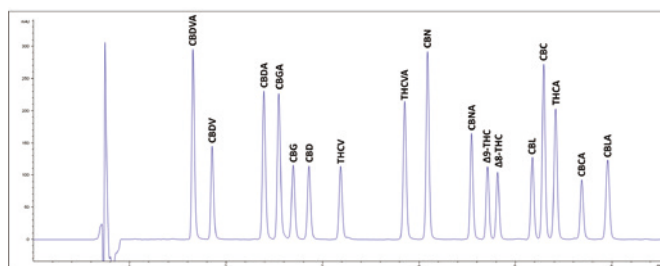


図1. 2 µm Ascentis® Express C₁₈ カラムを用いた、カンナビノイド化合物のグラジエントHPLC測定

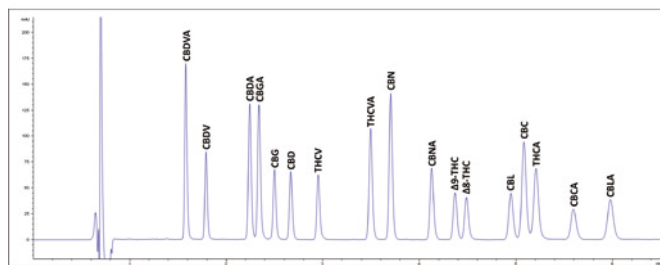


図2. 2.7 µm Ascentis® Express C₁₈ カラムを用いた、カンナビノイド化合物のグラジエントHPLC測定

結果および考察

HPLC法の最適化 本ワークフローのHPLC法開発においては、検討すべきいくつかの要素(分離効率、速度、移動相組成、流量、イソクラティック条件かグラジエント条件)がありました。

本研究でカラムはAscentis® Expressの製品群から選択しました。Ascentis® Expressカラムファミリーは硬いコア/多孔性シェルの構造(「表面多孔性」とも呼ばれます)の粒子を充填しており、同じ粒子径でも従来の全多孔性粒子と比べて分離効率がより高くなります。

グラジエント法 2 µmと2.7 µm粒子径のC18カラムを用いて、グラジエント法を開発しました。各カラムについて表1に示すようにグラジエント条件と注入量を最適化しました。ピーク形状と分離度を改善するため、移動相にギ酸とギ酸アンモニウムを添加しました。2種類のカラムそれぞれでピーク同定用混合溶液中の17種類のカンナビノイドが分離されたことを示すクロマトグラムを図1および図2に示します。分離時間は6分間強でした。予想していた通り、分離は2 µmカラムの方が良好でした。この他に2 µm C18カラムを用いた方法では、低流量(2 µmで0.4 mL/分、2.7 µmで0.8 mL/分)となるのが利点であり、これによって1回の分析に使用する移動相が少なくなり、結果的に溶媒使用量および廃液処理のいずれの点でもコスト削減につながるでしょう。しかし、小さい2 µm粒子では背圧が高くなるため、UHPLCシステムの使用が必要になります。

イソクラティック法 イソクラティックHPLC法はグラジエント法と比べると単純であり、次の試料との間で分析前に平衡化を行う必要がないため、迅速な分析が可能になります。17種類のカンナビノイド向けにAscentis® Express C8カラムによるイソクラティック法を開発しました(表1)。移動相の有機成分および水性成分はグラジエント法で用いた移動相と同一の組成とし、その比率を本アプリケーション用に最適化しました。得られた分離(図3)では、グラジエント法と比べてピークがブロード(特にΔ⁸-およびΔ⁹-THC)になり、分析時間も2分長くなりました。グラジエント法では溶媒強度を上げていき、保持が強い被分析物質

表1. HPLC条件

Column	Ascentis® Express C18 15 cm x 2.1 mm, 2.0 µm (50814-U)	Ascentis® Express C18 15 cm x 3 mm, 2.7 µm (53816-U)	Ascentis® Express C8 15 cm x 3 mm, 2.7 µm (53853-U)
移動相溶媒:	[A] 5 mM ammonium formate + 0.1% formic acid in water [B] 0.1% formic acid in acetonitrile		
移動相条件:	75% to 90% B in 2 min; held at 90% B for 5 min	75% to 85% B in 2 min; held at 85% B for 5 min	Isocratic: 27:73, A:B
流速:	0.4 mL/min	0.8 mL/min	0.7 mL/min
カラム圧力:	530 bar	250 bar	220 bar
カラム温度:	25 °C	25 °C	30 °C
検出器:	UV, 228 nm	UV, 228 nm	UV, 228 nm
注入量:	3 µL	5 µL	5 µL

の溶出を速めているため、イソクラティック法で分析時間が長くなることはあらかじめ想定されていました。イソクラティック法を最適化する中でC8 固定相の使用はこうした点にある程度対処する助けとなりました。というのも、同じ条件でC18固定相を用いた場合は保持時間がさらに長くなると考えられたためです。また、C8固定相では一部の酸性カンナビノイドに対する選択性がC18相と異なっており、具体的には、THCVA、CBNA、THCA、CBCAおよびCBLAの保持時間は中性カンナビノイドに対してシフトし、その結果これらカンナビノイドの2つでは溶出順が変わりました。注記：最終ピークの後にさらに6分間（合計8分間+6分間）流すことで、カラムを十分に洗浄できることが証明されました。イソクラティック法ではACNの組成を高くしますが、このことも洗浄時間の短縮に役立ちました。ただし、カラムへのさらなる蓄積を防ぐためには、試料バッチごとに高濃度の有機溶媒による洗浄を行うのが適切です。

大麻花のカンナビノイド分析 大麻試料の分析を2.7 μm C8固定相、2 μm C18固定相の双方を使用して行いました。前述の通りに調製した大麻抽出液を、まずは17種類のピーク同定用混合溶液と比較してスクリーニングしました。さらに最も一般的な6種のカンナビノイドを双方のカラムで定量的に分析して同様の結果を得ました（表2）。このような2通りの方法により、大麻の特徴である高濃度の総CBDの存在が確認されました。THCとCBDの総含有量は、脱炭酸による質量変化を考慮した換算係数 0.877 を適用した後、中性型と酸性型の合計として算出しました。このような2通りのカラム手法により、大麻の特徴である高濃度の総CBDの存在が確認されました。しかしながら、総THC含有量は、USDA暫定最終規則により大麻として認められる0.3 %の上限値を上回っていました。

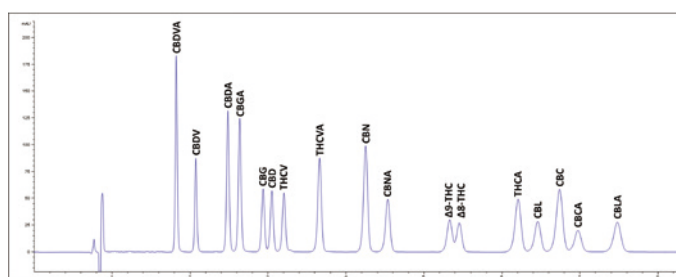


図 3. 2.7 μm Ascentis® Express C8 カラムを用いた、カンナビノイド化合物のアイソクラティックHPLC測定

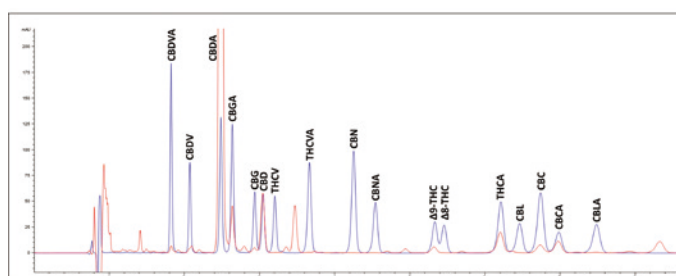


図 4. 図3と大麻サンプルとのクロマトグラム比較結果

表 2. C18、C8カラムによる6種カンナビノイド分析比較結果

Analyte*	w/w % (Dry Weight)	
	C8, 2.7 μm	C18, 2 μm
CBDA	18.20	18.10
CBG	0.13	0.10
CBD	1.40	1.40
CBN	ND	ND
Δ^9 -THC	0.22	0.24
THCA	0.46	0.50
Total THC	0.62	0.68
Total CBD	17.36	17.26

*For analyte abbreviations, see featured products table on the next page

結論

17種類のカンナビノイド分析のための完全なHPLCワークフローを、グラジエントおよびイソクラティック双方のHPLC法を使用して開発しました。大麻試料の総THC含有量を2通りのHPLC法で評価し、USDA暫定最終規則により大麻に分類されるための要件である総THC上限値の0.3 %を大幅に上回ることを確認しました。得られた結果から、大麻に特徴的な高い総CBD含有量が認められ、その大半は酸性型（CBDA）として検出されました。いずれの方法で得られた結果も一致しており、マトリックス成分が多いにも関わらず高い選択性を示しました。今回のワークフローは、植物物質や重量パーセント濃度0.05～100 %の濃縮物に含まれるカンナビノイドの定量へ容易に応用できます。また、いずれ法も分析時間が短く、溶媒消費量も少ないことから、ハイスループットでコスト効率に優れた分析法となります。

References

1. Hemp: USDA.gov/topics/hemp, accessed Apr. 6th, 2020.
2. Establishment of a Domestic Hemp Production Program. Fed. Regist., 2019, 84 (211), 58522-58564.
3. AOAC SMPR 2017.002. Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Quantitation of Cannabinoids in Dried Plant Materials
4. AOAC SMPR 2017.019. Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Quantitation of Cannabinoids in Edible Chocolate
5. AOAC SMPR 2017.001. Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Quantitation of Cannabinoids in Cannabis Concentrates
6. Vaclavik, L.; Benes, F.; Fenclova, M.; Hricko, J.; Krmela, A.; Svobodova, V.; Hajsova, J.; Mastovska, K. Quantitation of Cannabinoids in Cannabis Dried Plant Materials, Concentrates, and Oils Using Liquid Chromatography-Diode Array Detection Technique with Optional Mass Spectrometric Detection: Single-Laboratory Validation Study, First Action 2018.11. J. AOAC 2019, 6, 1822-1833.

Featured Products

Description	製品番号
HPLC Columns	
Ascentis® Express C18, 15 cm x 2.1 mm, 2 µm	50814-U
Ascentis® Express C18, 15 cm x 3.0 mm, 2.7 µm	53816-U
Ascentis® Express C8, 15 cm x 3.0 mm, 2.7 µm	53853-U
Solvents & Reagents	
Ultrapure water from Milli-Q® System e.g. IQ 7005 or bottled water	Milli-Q® or 1.01262
Acetonitrile Solution, contains 0.1 % (v/v) formic acid, for UHPLC, for MS	900686
Water Solution, contains 0.1 % (v/v) formic acid, for UHPLC, for MS	900687
Ammonium Formate, eluent additive for LC-MS, LiChropur®, ≥ 99.0%	70221
Formic Acid, for LC-MS LiChropur®	5.33002
Ethyl Alcohol, HPLC/spectrophotometric grade*	459828
Methanol, UHPLC, for mass spectrometry	900688
Sample Preparation Hardware, Tubes and Flasks	
Corning® 50 mL centrifuge tubes, polypropylene, conical bottom w/ CentriStar cap	CLS430828
BRAND® BLAUBRAND® Volumetric Flask, Glass Stopper, Amber Glass, 50 mL	Z327050
BRAND® BLAUBRAND® Volumetric Flask, Glass Stopper, Amber Glass, 20 mL	Z327026
BenchMixer™ Shaker/Vortexer, 115V, US 2-pin plug	Z742705
BenchMixer™ Shaker/Vortexer, 230V, Schuko plug	Z742706
BenchMixer™ Shaker/Vortexer, 230V, UK Plug	Z742707
Corning® LSE™ Compact Centrifuge, 120 V	CLS6755
Corning® LSE™ Compact Centrifuge, 230 V, EU plug	CLS6759
Corning® LSE™ Compact Centrifuge, 230 V, UK plug	CLS6758
Corning® LSE Rotor fixed angle rotor for 6 x 50 mL tubes	CLS480136
Whatman® Mini-UniPrep G2 Filter Vial Starter Kit, Pk.100	WHAGN203 APEORGSP

*Not Available in all countries. Please visit SigmaAldrich.com to check for alternatives.

Related Products

Description	製品番号
Ascentis® Express Guard Cartridge Holder, Pk.1	53500-U
Ascentis® Express C18, 5 mm × 2.1 mm, 2 µm Guard Cartridge, Pk.3	50822-U
Ascentis® Express C18, 5 mm × 3 mm, 2.7 µm Guard Cartridge, Pk.3	53504-U
Ascentis® Express C8, 5 mm × 3 mm, 2.7 µm Guard Cartridge, Pk.3	53511-U
BRAND Seripettor Bottle-top Dispenser	Z627577
Certified Vial Kit - Amber	29653-U
Millex® Syringe Filter, Hydrophilic PTFE Filters, 0.20 µm	SLLG033
Samplicity® G2 Filtration System	SAMP2SYSB
Millex® Samplicity® Hydrophilic PTFE Filters, 0.20 µm, Pk.96	SAMPLG001
Millipore® Chemical Duty Pump, 115 V/60 Hz	WP6111560
Millipore® Chemical Duty Pump, 220 V/50 Hz	WP6122050
Corning Glass Media Storage Bottles (1L)	CLS13991L

高性能とコストパフォーマンスの
両立を実現した

**UHPLC用
C18カラムを
お探しならばこちら**



<https://bit.ly/2R577Ma>

**カーボンHPLCカラムを
ご存じですか？**



製品情報はこちら

<https://bit.ly/2SUWPib>

コロナウイルスSARS-CoV-2試験用 ポジティブコントロール EURM-019

JRC issues a synthetic single stranded RNA (ssRNA) for real-time PCR analysis

Matthias Nold, Product Manager Reference Materials, Analytix@merckgroup.com

2019-nCoV (2019新型コロナウイルス) と呼ばれるコロナウイルスSARS-CoV-2によって引き起こされる呼吸器疾患COVID-19の世界的な大流行は、世界中のあらゆる地域で人々の生活に大きな影響を及ぼしています。WHOはこれを、国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態であると宣言しました。

有効かつ信頼性のあるウイルスの分析を確実に行うため、欧州委員会の総局の一つである共同研究センター (Joint Research Centre (JRC)) は、コロナウイルスSARS-CoV-2の存在を検出するための試験でポジティブコントロールとして用いることを目的とした、一本鎖RNA (ssRNA) 標準物質を公表しました。

これは、SARS-CoV-2のリアルタイムRT-PCRアッセイにおいて、転写と増幅のステップの正確性の検証に用いることができます。

EURM-019 は、*in vitro* 転写 (IVT) された合成一本鎖RNA (ssRNA) を緩衝液に溶解させた溶液です。生残 ウイルスは一切含みません。

この880ntのユニバーサル合成ssRNAは、以下のRT-PCRアッセイで増幅できる標的領域を含みます。

- 米国疾病予防管理センター (米国) により開発されたN₁、N₂、およびN3遺伝子
- シャリター (ドイツ) により開発されたE遺伝子およびRdRP遺伝子
- 国立感染症研究所 (日本) により開発されたN 遺伝子
- タイ保健省 (タイ) により開発されたN 遺伝子
- 欧州委員会の共同研究センター (EU) により開発されたS 遺伝子

関連製品

欧州委員会のJRC (旧IRMM) の認証標準物質

Description	製品番号
Single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2	EURM019



JRCの任務は、EUの政策を支持し、欧州共通の信頼性のある測定システムを推進させることです。これには、環境分析、食品分析、臨床化学、物性および産業用途などのさまざまなアプリケーションを目的として、認証標準物質 (単一成分やマトリクス標準) の開発と製造が含まれます。弊社は、JRC標準物質の指定代理店です。

関連リンク

コロナウイルスCOVID-19 (SARS-CoV-2) 検出、性状分析、ワクチンおよび治療法の製造

Please find more information at

SigmaAldrich.com/EURM019

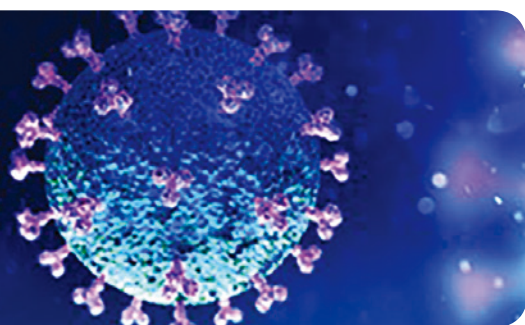
分析用標準物質および認証標準物質

SigmaAldrich.com/standards

関連文献

- Ascentis Express アセンティスエクスプレスC18カラムおよびUV検出を用いた、欧州薬局方10ガイドラインに従ったロピナビルの分析アッセイ
- USPモノグラフに従ったリン酸クロロキンのHPLCアッセイおよび不純物プロファイリング法

Working on COVID-19?
Find relevant products in one place
SigmaAldrich.com/COVID-19



認証標準物質を使用したサンスクリーン剤の適格性評価

Nick Hauser, Product Manager Reference Materials, Analytix@merckgroup.com

身体が太陽光を吸収することは、免疫機能と適切な骨密度の維持に重要な栄養素である「ビタミンD」を作り出すことに役立ちます。また、日光を浴びることで、体内時計を合わせて睡眠周期や心の健康にも影響を与えるプラスの効果があります。しかし、過度の日光を浴びると時には身体に悪影響となります。たとえば、皮膚が紫外線 (UV) を受けることで、皮膚が損傷する恐れがあります。「日焼け (サンバーン)」はUV照射の直接的な結果と言えますが、長年にわたってUVを浴び続けると皮膚がんを発症する可能性があり、世界では毎年約300万人が新たに皮膚がんと診断されています。

太陽から地球に到達する日光に含まれる紫外線には、紫外線A波 (UVA) と紫外線B波 (UVB) の2種類の光があります。UVAとUVBはいずれもがんを引き起こす可能性があります。日光に含まれる紫外線の約95%はUVAです。UVAは長波長の紫外線で、皮膚の老化とシワの大きな原因と考えられています。一方、UVBはさほど多くはありませんが、それでも日焼けの原因として確認されることが多いことから、短期間での身体への影響は大きいと考えられます。

このような日光の有害作用から自身を守るのを助ける方法の一つに、サンスクリーン剤の使用が挙げられます。サンスクリーン剤の使用は皮膚を老化とシワから守り、日焼けを防ぐことにも役立ちます。さらに、皮膚がんのリスクもサンスクリーン剤の使用により低減できます。

サンスクリーン剤はローション、ジェル、スプレー、クリームなど様々な種類や形状で幅広く利用されています。サンスクリーン剤に含まれる有効成分の多くは日光からの紫外線を吸収することで皮膚を保護します。一般にこれらの有効成分は有機化合物であり、その構造に応じてそれぞれUVAまたはUVBの吸収を目的とする数種の化合物が配合されることもあります。有効成分の他に数種の不活性化化合物が残りの成分となります。これらの不活性化化合物はサンスクリーン剤自体の形状によって異なり、保存剤や賦形剤を含むこともあります。

ヒトの皮膚に直接吸収されるというサンスクリーン剤に特有の性質のため、米国食品医薬品局 (FDA) をはじめとする世界数カ国の規制機関がサンスクリーン剤を一般用医薬品 (OTC薬) として規制しています。サンスクリーン剤のメーカーは、自社の処方に含まれる成分の安全性に関して情報を提供することが求められます。そうした成分の品質と安全性を証明するためには標準物質を使用することが不可欠です。

サンスクリーン剤に含まれる各成分について、下記のようなSupelco[®] 認証標準物質 (CRM) をご用意しています。これらのCRMは医薬品二次標準物質であり、対応する薬局方の一次標準物質にトレーサブルであり、適格性が確認されています。そのため、自身のラボで標準試薬を調製してバリデーションするのにかかる時間と手間を省くことができます。また、包括的な分析証明書により、特性評価の方法と結果の詳細をご提供します。サンスクリーン剤に関連するCRMについての詳細、医薬品二次標準物質の全製品一覧は、当社ウェブサイト [SigmaAldrich.com/secondarystandards](https://www.sigmaaldrich.com/secondarystandards) をご覧ください。

Description	UV Absorbent	Preservative	Excipient	Pack Size	製品番号
Avobenzene	x			1 g	PHR1073
Ensulizole	x			1 g	PHR1301
Homosalate	x			1 g	PHR1085
Octinoxate	x			1 g	PHR1080
Octisalate	x			1 g	PHR1081
Octocrylene	x			1 g	PHR1083
Oxybenzone	x			1 g	PHR1074
Padimate O	x			10 g	PHR1355
Butylparaben		x		1 g	PHR1022
Ethylparaben		x		1 g	PHR1011
Methylparaben		x		1 g	PHR1012
Propylparaben		x		1 g	PHR1010
Cetyl Alcohol			x	1 g	PHR1133
D4 Cyclomethicone			x	500 mg	PHR1565
D5 Cyclomethicone			x	500 mg	PHR1566
Dibutyl Phthalate			x	1 g	PHR1366
Diethyl Phthalate			x	1 g	PHR1476
Disodium EDTA			x	1 g	PHR1068
DMDM Hydantoin			x	1 mL	PHR1358
Phenoxyethanol			x	1.5 g	PHR1121
Propylene Glycol			x	1.5 g	PHR1051
Retinyl Palmitate			x	1 g	PHR1235
Sodium Lauryl Sulfate			x	2 g	PHR1949
Tocopheryl Acetate			x	500 mg	PHR1030

For our complete offering of reference materials, visit [SigmaAldrich.com/standards](https://www.sigmaaldrich.com/standards)

An overview of our offering for the Cosmetic & Personal Care R&D Workflow can be found at [SigmaAldrich.com/cosmetics](https://www.sigmaaldrich.com/cosmetics)

エッセンシャルオイルの真正性： HPTLCフィンガープリント法

Ilona Trettin, Application Specialist (CAMAG)

Melanie Broszat, Scientific Business Development Manager (CAMAG)

Monika Bäumle Product Manager TLC, Matthias Nold Product Manager Reference Materials, Analytix@merckgroup.com

パーソナルケア、医薬品、アロマテラピー用の製品として天然エッセンシャルオイルの人気の高まっていることから、エッセンシャルオイルの世界市場は急速に拡大しています¹。残念なことに、市場の拡大によって、最大限の利益を上げる目的で、安価なオイルやオイル成分を添加した粗悪品が出回る可能性が高まっています。粗悪品は非常に様々な方法で作られることから、これらの製品を分析することは難しい課題といえます。このような粗悪品を効率的に発見する方法の一つがクロマトグラフィー・フィンガープリンティング法です。中でも、ガスクロマトグラフィーや、本稿に示している高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) の使用が有効です。

分析ラボでのエッセンシャルオイルの粗悪品の試験をサポートするため、当社では広く使用されている25種類のエッセンシャルオイルについて、HWI pharma services社の標準物質を提供しています。製品シリーズに加わった最新の標準物質10種を表1に示します。本研究ではこれらのエッセンシャルオイルを対象としました。これらの製品は、qNMR (定量的NMR) またはマスバランス法で定量したHWI社の一次標準物質にトレーサブルな二次標準物質です。本稿の9ページの記事に示したバニラエキス標準物質と同様に、各製品とも少なくとも1つの主成分について定量値を示し、その他の数種の重要な成分はGC-FIDによる定性的な検証を行っています。製品一覧は当社ウェブサイト[SigmaAldrich.com/essentialoils](https://www.sigmaaldrich.com/essentialoils)でご覧になれます。

上述の通りHPTLCは高速で効率的なフィンガープリンティング法であるため、エッセンシャルオイルの真正性試験におけるGCの完全な代替法、またはこれを補完する試験法となります。エッセンシャルオイルを同定するための標準HPTLC法 (評価のため欧州薬局方委員会に提出済) を使用して、標準物質とオイルのマッチングゾーンのRF値と色調を比較することにより10種のエッセンシャルオイルのHWI社製二次標準物質のフィンガープリントを作成しました。その例として次ページにシナモン・オイル (桂皮油)、レモン・オイル、パインニードル・オイル (松葉油) のフィンガープリントを示します (図1~3)。10種すべてのエッセンシャルオイルの結果は、[SigmaAldrich.com/analytix](https://www.sigmaaldrich.com/analytix)、第7号の本記事のオンライン版でご覧になれます。

この分析法でエッセンシャルオイルに含まれる可能性のあるすべての成分を必ずしも検出できるわけではありません (カンフェン、メントフラン、 α -ピネン、 β -ピネン、 γ -テルピネンなど) が、様々な検出法 (UVおよび化学誘導体化) を利用することで粗悪品を発見できる確率が高まります。

クロマトグラフィー条件

分析機器	automatic TLC Sampler (ATS 4), Automatic Developing Chamber (ADC 2), Derivatizer, TLC Plate Heater 3, TLC Visualizer 2, visionCATS 2.5
試料	エッセンシャルオイルはトルエン溶液で以下の濃度で調製しました。 • Cinnamon oil at 30 μL/mL • Tea tree oil and Ylang-Ylang at 15 μL/mL • Bergamot oil, mint oil, patchouli oil, peppermint oil, and sage oil at 20 μL/mL • Lemon oil at 80 μL/mL • Dwarf pine oil, pine oil, and spruce needle oil at 100 μL/mL • Frankincense oil at 200 μL/mL

この研究で使用した標準溶液	
トルエン溶液で下記の各濃度で調製	
Bornyl acetate, eugenol and geranyl acetate	0.50 μ L/mL
Linalool and terpinen-4-ol	1.00 μ L/mL
Bornyl acetate	1.50 μ L/mL
Linalyl acetate and terpinen-4-ol	2.00 μ L/mL
Bornyl acetate	3.00 μ L/mL
1,8-Cineole	10.00 μ L/mL
Menthone	20.00 μ L/mL
(R)-(+)-limonene	120.00 μ L/mL
(+)-Borneol	0.25 mg/mL
(-)-Carvone	0.35 mg/mL
(+)-Borneol	0.50 mg/mL
Borneol, isoeugenyl acetate, and menthol	1.00 mg/mL
Menthol	1.50 mg/mL
Menthol	3.00 mg/mL
Patchoulol	4.00 mg/mL
(+)-(α)-Terpineol in methanol	0.50 mg/mL
(+)-(α)-Terpineol in methanol	1.00 mg/mL

New!

TLC総合カタログ (2021年版)

—TLC分析必携の一冊!

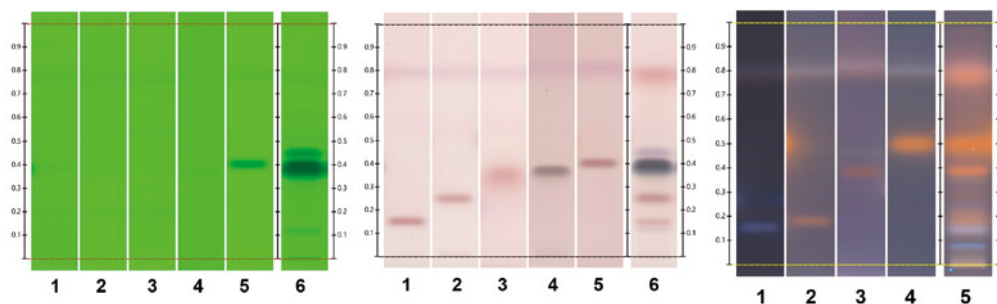
カタログ請求はこちらから

<https://bit.ly/3x6v6tj>



Supelco[®]
Analytical Products

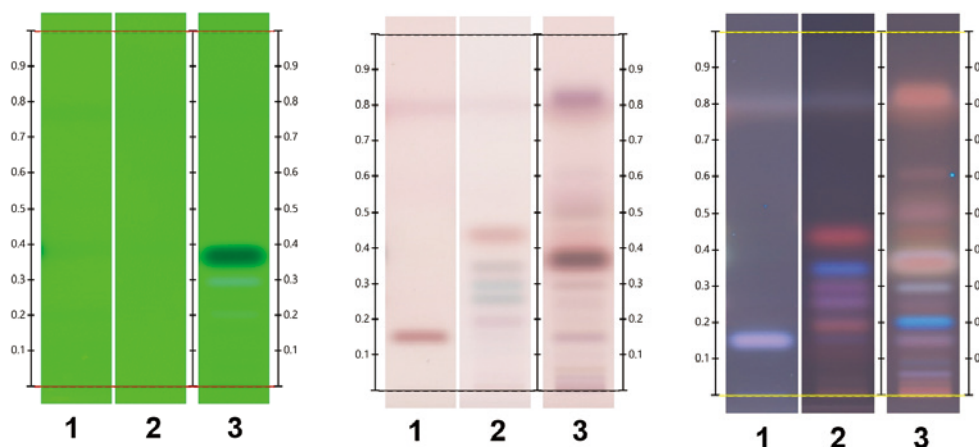
図 1 シナモンオイルのデータ (Cat. No. 06031501, batch HWI01937)



左から順に：誘導体化前のUV 254nm下のクロマトグラム、アニスアルデヒドで誘導体化後の白色および366nmのクロマトグラム

Track 1: (+)- α -terpineol, 1 mg/mL (R_f 0.15) (cat. no. 83073, batch: BCBS₇₅₃₅V);
2: linalool 1 μ L/mL (R_f 0.25) (cat. no. 00350190, batch: HWI₀₁₁₃₅-1); **3:** 1.8-cineole, 10 μ L/mL (R_f 0.35) (cat. no. 00020590, batch: HWI₀₀₆₅₄-2);
4: eugenol, 0.5 μ L/mL (R_f 0.37) (cat. no. 01050595, batch: HWI₀₀₃₀₁-1); **5:** isoeugenyl acetate, 1 mg/mL (R_f 0.40) (cat. no. 0.7055, batch: BCBV₆₀₈₀); **6:** cinnamon oil, 30 μ L/mL (cat. no. 06031501, batch: HWI₀₁₉₃₇)

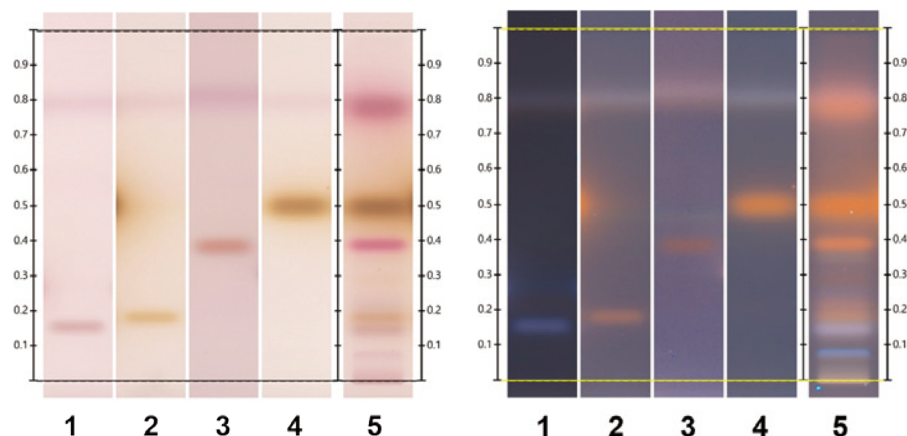
図 2. レモンオイルのデータ (Cat. no. 05981501, batch HWI01936)



左から順に：誘導体化前のUV 254nm下のクロマトグラム、誘導体化後の白色および366nmのクロマトグラム

Track 1: (+)- α -terpineol, 0.5 mg/mL (R_f 0.15) (cat. no. 83073, batch: BCBS₇₅₃₅V);
2: (R)-(+)-limonene, 120 μ L/mL (main zone at R_f 0.44; zones below due to impurities) (cat. no. 00590590, batch: HWI₀₁₃₂₃-2);
3: lemon oil, 80 μ L/mL (cat. no. 05981501, batch: HWI₀₁₉₃₆)

図 3. 松葉オイルのデータ (Cat. No. 05991501, batch HWI01932)



左から順に：誘導体化後の白色および366nmのクロマトグラム

Track 1: (+)- α -terpineol, 0.5 mg/mL (R_f 0.15) (cat. no. 83073, batch: BCBS₇₅₃₅V);
2: (+)-borneol, 0.5 mg/mL (R_f 0.18) (cat. no. 68878, batch: 14627);
3: (-)-carvone, 0.35 mg/mL (R_f 0.38) (cat. no. 00290595, batch: HWI₀₀₂₃₆-1);
4: bornyl acetate, 1.5 μ L/mL (R_f 0.50) (cat. no. 00400585, batch: HWI₀₁₇₁₃);
5: pine oil, 100 μ L/mL (cat. no. 05991501, batch: HWI₀₁₉₃₂)

10種類すべてのエッセンシャルオイルのクロマトグラムはこちらの記事で確認いただけます (英語版)。 [SigmaAldrich.com/Analytix](https://www.sigmaaldrich.com/Analytix), Issue 7/2020

エッセンシャルオイルのHPTLCによる標準定性メソッド (評価のため欧州薬局方委員会に提出済)	
プレート	HPTLC Silica gel 60 F ₂₅₄ , 20 x 10 cm (1.05642)
誘導体化試薬	ATS 4 bandwise、15トラック、バンド幅8mm、トラック距離11.4mm、左橋からの距離 20mm、下端からの距離 8mm、付加量 2μL (試験溶液および標準液)
展開溶媒	酢酸エチル-トルエン (5:95; v/v)
展開	20分間ペーパーを入れた状態で飽和させ、塩化マグネシウムを飽和溶液を用いて10分間相対湿度33%の状態にしておく
展開距離	70 mm (下端から)
プレート乾燥	ADC 2内で5分間乾燥
条件	TLCビジュアライザー2を用い、誘導体化後白光下と366nmで測定
誘導体化	プレートは誘導体化装置 (ノズル: 青、スプレーレベル; 1-3、スプレーボリューム; 3mL) を用いてアニスアルデヒドでスプレーします。 アニスアルデヒド試薬: p-アニスアルデヒド0.5mL、氷酢酸10mL、メタノール85mL、硫酸5mL

*based on the nozzle series

表 1. エッセンシャルオイルの標準物質

Description	Package Size	製品番号
Bergamot oil	1 mL	05941501
Cinnamon oil	1 mL	06031501
Dwarf pine oil	1 mL	06001501
Frankincense oil	1 mL	05971501
Lemon oil	1 mL	05981501
Mint oil	1 mL	06011501
Pine needle oil	1 mL	05991501
Sage oil	1 mL	06021501
Spruce needle oil	1 mL	05961501
Ylang-ylang oil	1 mL	05951501

表 2. 標準物質

Description	Package Size	製品番号
(+)-Borneol	10 mg	68878
Bornyl acetate*	50 mg	00400585
(-)-Carvone*	100 mg	00290595
1.8-Cineole*	100 mg	00020590
Eugenol*	100 mg	01050595
Isoeugenyl acetate	100 mg	07055
(R)-(+)-Limonene*	100 mg	00590590
Linalool*	100 mg	00350190
Linalyl acetate	100 mg	49599
(-)-Menthol*	100 mg	00580590
(-)-Menthone*	100 mg	04660585
Patchoulol*	10 mg	05690595
Terpinen-4-ol*	50 mg	03900590
(+)-α-Terpineol	5 mL	83073

* HWI primary reference material

Reference:

- 1. Boren KE, Young DG, Woolley CL, Smith BL, Carlson RE, J Environ Anal Chem 2015, 2:2

お勧め製品

Description	製品番号
HPTLC Silica gel 60 F ₂₅₄ , 20 x 10 cm, 50 ea.	1.05642
Reference Materials see 表 1 & 2	

関連製品

Description	製品番号
溶媒&試薬	
Acetic acid, for luminescence, BioUltra, ≥ 99.5% (GC)	45726
p-Anisaldehyde, 98%	A88107
Ethyl acetate, for HPLC, ≥ 99.7%	34858
Magnesium chloride hexahydrate for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph. Eur.	1.05833
Methanol, for liquid chromatography LiChrosolv®	1.06018
Toluene, for liquid chromatography LiChrosolv®	1.08327
Sulfuric acid, puriss., meets analytical specification of Ph. Eur.	07208-M

ご存じですか...

メルクは質量分析計を使った迅速定性やキャラクタリゼーションに使えるMSグレードのTLC&HPTLCプレートをご用意しています。

TLCアプリケーション、TLC総合カタログこちらから
<https://bit.ly/3l3PLMr>

ショウガを始めとする生薬の分析にご興味はありますか？

PhytoLab社標準物質に新たな製品が加わり、さらにCerilliant®ショウガ用認証標準物質が発売されました

Matthias Nold, Product Manager Reference Materials, Analytix@merckgroup.com



植物性医薬品と植物由来の栄養サプリメントの人気は世界中で高まっています。しかし植物の組成は複雑でばらつきもあることから、その効率的な品質管理は非常に難しく、混ぜ物をした粗悪な製品を作りやすくしています。

数種のマーカーを分析するだけでは植物製品の安全性と品質を確保するには必ずしも十分ではありません。そのため、最も関連する植物成分について十分に特性評価された標準物質を入手できるかが重要になっています。当社では約 2000 種類のファイトケミカル標準物質の幅広い選択肢をご用意しています。この製品群で大きな割合を占めるのがphyproof®標準物質です。この標準物質はドイツを拠点とするPhytoLab社が製造し、適格性を確認していますが、この製品群の範囲が大きく広がりました。

PhytoLab社の新たなファイトケミカル標準物質

PhytoLab社はファイトケミカルの試験とその標準物質の製造で世界をリードしている企業です。昨年、当社はPhytoLab社とphyproof®標準物質の世界販売に関して提携を結んだことを発表しました。昨年中に当社システムへ1300を超える製品を追加し、高純度の植物成分からなる高品質な標準物質を当社の発注システムを通してご利用いただけるようになりました。

さらに239の新製品を追加したことで、現在では全種類のphyproof®標準物質を当社でご購入いただけます。

下記リスト(表1)は今回新たに加わった製品の数例です。ご覧のように、フラボノイド、イソプレノイド、アルカロイド、グルコシノレートといった各種製品クラスを幅広く取り揃えております。

全製品リストをぜひ[SigmaAldrich.com/phytolab](https://www.sigmaaldrich.com/phytolab)でご覧ください。

表 1. Selected new Product Additions of Phytopharma Standards manufactured by PhytoLab

Description	Product Class	Pack Size	製品番号
Integerrimine	Alkaloids	5 mg	PHL83968
Littorine hydrochloride	Alkaloids	10 mg	PHL84100
Riddelliine	Alkaloids	5 mg	PHL84102
Cirsimarín	Flavonoids	10 mg	PHL85726
Petunidín chloride	Flavonoids	5 mg	PHL80225
Tamarixetin	Flavonoids	10 mg	PHL85778
Glucosylsin potassium salt	Glucosinolates	5 mg	PHL85742
Glucoraphasatin potassium salt	Glucosinolates	5 mg	PHL84216
Absinthín	Isoprenoids	10 mg	PHL84170
Terminolósíde	Isoprenoids	10 mg	PHL84263
Fukínolíc acid	Organic Acids	10 mg	PHL84767
Fumarprotocetraríc acid	Organic Acids	5 mg	PHL82266

ショウガ成分の新たなファイトケミカル認証標準物質混合溶液

植物性医薬品の品質管理では、通常、単一のマーカー化合物だけではなく、複数の重要成分を試験します。試験のためには実用標準の多成分溶液を調製する必要があり、それぞれの成分の購入や調整する時間が必要です。これらを削減するため当社では、最も一般的な数種の植物性医薬品に含まれる重要成分についてすぐに使用できる便利な混合溶液を幅広くご提供しています。

これらSupelco®ファイトケミカル認証標準物質(CRM)混合溶液は、ISO/IEC 17025およびISO 17034認定を受けた当社の米国テキサス州ラウンドロックの拠点で生産しています。

Analytix Reporter (日本語版) Issue6 10 ページでは、HPLC アプリケーションと Kava の新しい認証標準物質の混合溶液を紹介しました。

今回は、生および乾燥したショウガ (*Zingiber officinale*) の根茎に含まれる主要な辛味成分であるジンゲロールとショウガオールを含む、ショウガの認証標準物質の混合溶液を紹介します。

Description:	Ginger Gingerols and Shogaols Mix
Components:	6-Gingerol, 8-Gingerol, 10-Gingerol, 6-Shogaol, 8-Shogaol, 10-Shogaol
Concentration:	500 µg/mL each component in acetonitrile
Package Size:	1 mL
Cat. No.:	G-027

私たちのファイトケミカルのCRMミックスの全製品は以下のサイトでご覧いただけます。

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

ファイトケミカルの標準物質のカタログはこちらから請求いただけます。

<https://bit.ly/379SpI0>



COVID-19 Related

COVID-19検査の結果の正確さを確認する

ISO/IEC 17043およびISO 13485に準拠して作成されたSARS-CoV-2検出のための技能試験プログラム

このSARS-CoV-2 技能試験プログラムでは、核酸増幅法 (PCR法) でウイルスRNA を検出する手法におけるお客様の検査の品質保証をサポートします。

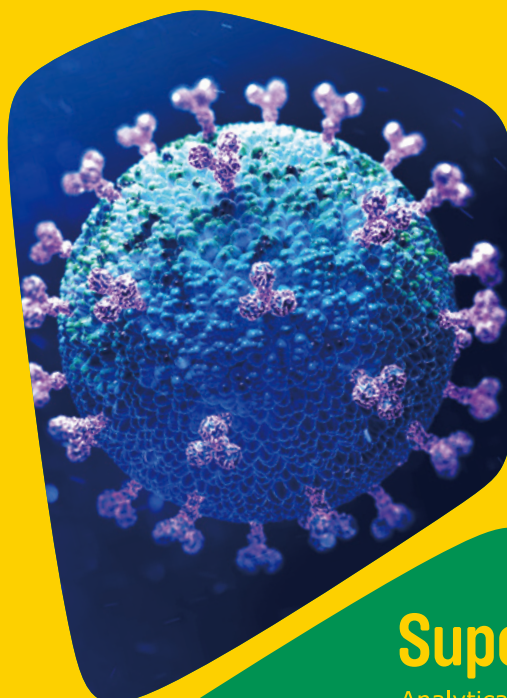
特徴

- 定性した結果を報告するだけでなく、比較のためにCq (Ct) 値などの定量的な数値もフレキシブルに記載可能
- サンプルキットはISO/IEC 17043 とISO 13485 に基づき製造
- 幅広いコピー数のRNA 配列を有するポジティブコントロールおよびネガティブコントロールを含む非感染性の液体試料
- CDC およびWHO が示しているRdRp、N (Nucleocapsid)、E (Envelope)、S (Spike) などの特定の遺伝子配列領域を対象
- サンプルの濃度範囲が広く、装置の感度をダイナミックレンジで試験可能
- スケジュール管理に便利なクイックターンスタディ
※ クイックターンスタディは予め決められたスケジュールとは関係なく、いつでも依頼することが可能な試験です。

カタログのご請求はこちら

<https://bit.ly/3iSVkKV>

[SigmaAldrich.com/COVID-19](https://sigmaaldrich.com/COVID-19)



Supelco®
Analytical Products

治療用抗体の遊離N-グリカン分析

Maricar Dube, Analytical Sciences Liaison

Cory Muraco, HPLC Product Manager

Judy Boland, Senior R&D Scientist

Amber Henry, R&D Scientist

緒言

30年以上前に初めて米国FDAの承認を受けて以来、治療用モノクローナル抗体 (mAb) の成長には目覚ましいものがあります。実際、この5年間で治療用抗体がベストセラー医薬品となり¹、新規承認と標的という点で成長を続けています²。

モノクローナル抗体は標的特異性をもつことから、有効性が高く副作用が少ない医薬品です。しかし、化学合成された低分子治療薬と比較すると、mAbはその大きさと開発および生産の特質から、著しく複雑なものとなっています。これらのmAbは遺伝子組換え技術を使用して哺乳動物細胞株またはその他の発現系において発現させますが、主に翻訳後修飾 (PTM) によって不均一となります³。これらのPTMはmAbの有効性、安定性、半減期および安全性に影響することから、特性を明らかにする必要があります。

グリコシル化 (糖鎖付加) はmAbにとって最も一般的で重要なPTMの一つです。グリコシル化ではタンパク質の特定部位にグリカンが結合します。最も一般的には、アスパラギン (Asn) のアミノ酸残基で (N-結合) またはセリン/トレオニン (Ser/Thr) のアミノ酸残基で (O-結合) が形成されます⁴。N-グリカンの分析には、インタクト糖タンパク質、グリコペプチド、遊離グリカン、単糖類の分析と、4つのレベルのアプローチがあります⁵。本稿では、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) による遊離N-グリカン分析に焦点を当てます。

遊離N-グリカン分析のステップの概要を図1に示します。N-結合グリカンをペプチド-N-グリコシダーゼF (PNGase F) などのアミダーゼにより切り出します。次に遊離したグリカンをアミノベンズアミド (2-AB) やプロカインアミド (4-アミノ-N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]ベンズアミド) などの蛍光タグで標識します。HPLC分析に先立ち、過剰なタグと塩類を除去するためのクリーンアップステップが必要です。親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) は他のHPLC法 (逆相、陰イオン交換など) と比べて、グリカンの分離と定量に優れていることが実証されている技法です⁴。

本稿では、BIOshell™ Glycan HPLCカラムを使用して、プロカインアミドを標識したセツキシマブ (アービタックス®) のN-グリカンを分析します。BIOshell™ Glycan HPLCカラムは、HILICを使用して高速、高分離能、かつ高再現性でグリカンを同定できるよう特別に設計されたカラムです。

実験

グリカンの切り出しと標識—糖鎖の切り出しは、PNGase Fast Kit を使用してFASP (フィルター支援試料調製) 法により行いました。プロカインアミドを使用して、切り出されたグリカンを還元的アミノ化によって標識しました。

試料のクリーンアップ—標識した試料を99%アセトニトリルで希釈し、コンディショニング済みのDiscovery Glycan SPEカートリッジにロードしました。重力によりカートリッジ内をゆっくりと流下させて (若干の加圧や吸引も適していると思われます)、試料が完全に樹脂ベッド中にあるようにしました。カートリッジを99%アセトニトリルで5回吸引洗浄しました。洗浄ステップ後、カートリッジに20%アセトニトリルを添加して、重力によりゆっくりと溶出させました (若干の加圧や吸引も適していると思われます)。溶出液がすべて樹脂ベッドを通過した後、吸引してすべての液体をSPEから採取管に抜き取りました。その後、溶出した標識グリカンを真空遠心機で乾燥しました。SPE条件を表1に示します。

高分子向け
HPLCカラム
製品カタログ
ダウンロードはこちら

<https://bit.ly/2RCU4C4>



Glycan Release

Labelling

Cleanup

HPLC Analysis

図1. 遊離N-グリカンHPLC分析ワークフロー-HPLC.

表 1. SPE条件

サンプル試料:	Labeled sample diluted with 1 mL 99% acetonitrile/1% water
固相抽出カラム:	Discovery® Glycan SPE Tube (55465-U)
コンディショニング:	1 mL 99% acetonitrile/1% water
サンプルロード:	diluted labeled sample slowly sink into bed
洗浄:	5 x 1mL 99% acetonitrile/1% water
溶出:	400 µL 20% acetonitrile/80% water, slowly sink into bed
溶出前作業:	drying by vacuum centrifugation

HPLC Analysis - The dried and labeled glycans were solubilized by dissolving in 50 µL of 75% ACN / 25% 75 mM ammonium formate pH 4.4, vortexing for 2 mins, followed by centrifugation at 16,000 x g for 2 mins. 表 2 shows the chromatographic conditions.

表 2. プロカインアミドで標識したセツキシマブグリカンのHPLC分析条件

HPLCカラム:	BIOshell™ Glycan; 15 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm
移動相溶媒:	[A]: 75 mM ammonium formate pH 4.4 (50 mM ammonium hydroxide, adjusted to pH 4.4 with formic acid) [B]: Acetonitrile
グラジエント条件:	75% B to 59% B in 75 min
流速:	0.37 mL/min
カラム温度:	58 °C
検出器:	Fluorescence, 308 nm excitation, 359 nm emission
注入量:	10 µL
サンプル試料:	dried procainamide labeled Cetuximab reconstituted in 50 µL 25% 75 mM ammonium formate pH 4.4 and 75% acetonitrile

結果

本研究では、セツキシマブをモデルの治療用mAbとして使用し、遊離N-グリカン进行分析しました。セツキシマブは上皮成長因子受容体 (EGFR) に対するマウス-ヒトのキメラ型IgG₁モノクローナル抗体です。セツキシマブは頭部がん、頸部がん、結腸直腸がんの治療に用いられます。この抗体は結晶性フラグメント (Fc) 領域と抗原結合フラグメント (Fab) 領域いずれもN-グリコシル化されています。N-グリカンがmAbに結合し、その結果、様々な生物学および物理化学のプロセスに影響を与えることを示す研究と報告が多数あることから、安全性と品質の問題が生じています^{6,7}。グリコシル化が影響を与えるプロセスには、mAbの構造的完全性の増強、血清中半減期、抗体依存性細胞障害作用 (ADCC)、抗炎症活性、免疫、および抗原の認識などがあります。このことは、グリコシル化のパターンを理解することの必要性が大きいことを明確に示しています。

BIOshell™ HPLCカラムはFused-Core® 粒子 [コアシェル粒子または表面多孔性粒子 (SPP) とも呼ばれます] をベースとしており、この粒子は硬いシリカコアの周りを高純度シリカの薄い多孔性シェルが覆う構造が特徴です。このような設計によって、図2に示すように従来の全多孔性粒子と比較して拡散経路が短くなっています。

この短い拡散経路が短いことから溶質の物質移動 (ファン・デームテルの式の「C」項) が速くなり、それに付随してカラム効率が向上します。

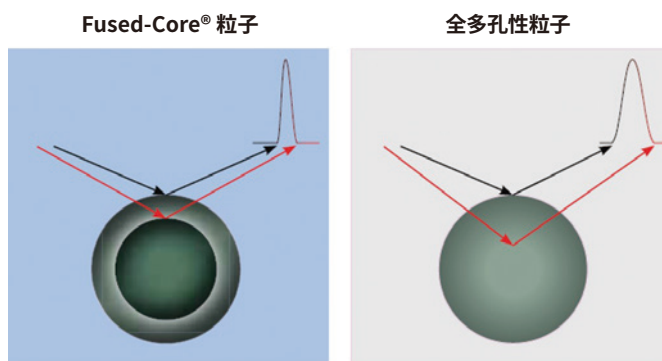


図 2. Fused-Core® 粒子と全多孔性粒子の比較

BIOshell™ Glycanカラムの固定相は、5つのヒドロキシル (-OH) 基をもつ高極性リガンドを当社独自の新しい化学結合を介してシリカに結合させています。このようなカラムのユニークな化学特性はオリゴ糖、特にタンパク質に結合したグリカンをオリゴ糖のHILICで一般的な移動相を使用して分析するのに適しています。

プロカインアミドで標識したセツキシマブグリカンの蛍光クロマトグラムを図3に示します。BIOshell™ Glycanカラムにより、このmAbの複雑なグリコシル化を解明することができました。対応する糖鎖はMS分析により同定しました (質量分析データは示していません)。

N-結合グリカンのHPLC分析を成功させるためには、効率的かつ再現性のあるグリカン切り出しステップが必要です。従来のプロト

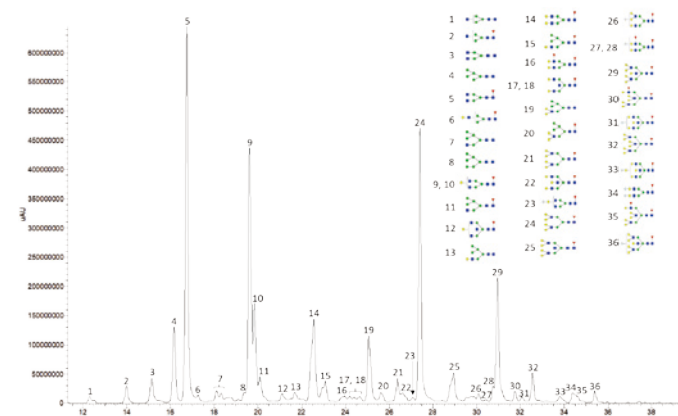


図 3. Bioshell Glycanカラムによるプロカインアミド標識セツキシマブグリカンの蛍光クロマトグラム LC-MS was Used to Characterize each Peak (Chromatogram not shown). A rapid Release Glycan Protocol was used.

コルでは、複数回洗浄し、未変性または変性mAbを一晩消化しています。本稿の実験セクションで説明したプロトコルは、PNGase Fを用いてN-結合グリカンを迅速に脱グリコシル化するために独自開発した界面活性剤ベースの緩衝液を使用する短時間プロトコルです。この短時間プロトコルでは、消化に一晩要した従来のプロト

コルに比べて、15分間のインキュベーションでN-グリカン完全に切り出せます。

別の実験ではBIOshell™ Glycanカラムを使用して、セツキシマブから遊離グリカンを切り出す次の3つのプロトコルを比較しました：

- 従来の一晩プロトコル、グアニジン塩酸塩で変性
- 短時間プロトコル、非還元条件 (迅速な脱グリコシル化)
- 短時間プロトコル、還元条件 (2-メルカプトエタノールを使用する還元条件下での迅速な脱グリコシル化)

結果を図4に示します。

この特定の被分析物質 (セツキシマブ) の場合、一部のグリカン種、例えばG₀F-N、Man₅、G₀F、G₁ (F₁,6)、Man₅G₀Fハイブリッド、

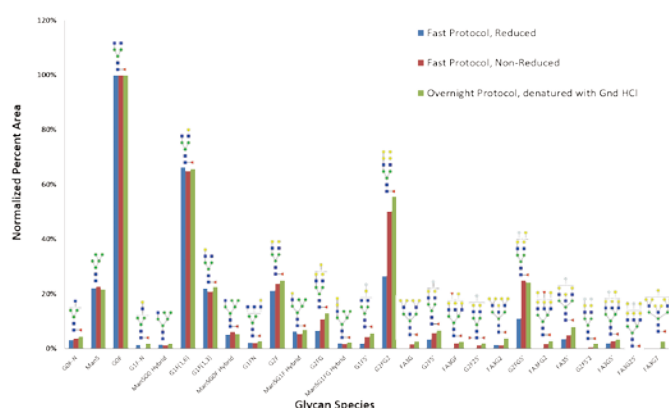


図4. セツキシマブに対する3方法のグリカン遊離法の比較: ■ Fast (reduced), ■ Fast (non-reduced), and ■ Traditional overnight protocol. A BIOshell™ Glycan Column was Used in all three Samples.

G₁F (1,3) については、3つのプロトコルいずれでも効率は同程度でした。しかし、グリカンの中には、2-メルカプトエタノールを使用する還元ステップを含む短時間プロトコルでは効率的に切り出されないものもありました。例えばG₁F₅'、G₂FG₂、FA₃G、FA₃GF、G₂F₂S'およびG₂FGS'です。実際、短時間プロトコルを用いる場合、大半のタンパク質では変性ステップで2-メルカプトエタノールを使用する必要はありません。ただしRNase Bなど2-メルカプトエタノールが必要と思われるタンパク質もあります。遊離グリカンの分析法を最適化する際は、その一環として、2-メルカプトエタノールを使用した場合と使用しなかった場合で短時間プロトコルを検討して、どちらの方が最良の結果が得られるかを確認することをお勧めします。

タンパク質の中には、短時間での脱グリコシル化法が適していないものがあることにも注意してください。グリカン分析のプロトコルが確立されていないmAbに取り組む場合には、従来の一晩消化を行うプロトコルの結果と短時間／迅速消化プロトコルの結果を比較することが最善です⁸。

結論

治療用mAbの有効性と安全性を保証するために、規制当局からそのグリコシル化パターンの特性評価とモニタリングが求められます。それらの構造は複雑であるためグリカンの分析と同定は容易ではないかもしれませんが、本稿では、適切なグリカンの切り出しと標識プロトコルの後、BIOshell™ Glycan HPLCカラムによりセツキシマブの複雑なグリコシル化を解明できたことを示しました。グリカンを分析するうえでもう一つの考察すべき重要な課題は脱グリコシル化プロトコルです。時間を大幅に節約できる短時間法もありますが、従来の一晩消化する方法と結果を比較し、より効率的な脱グリコシル化プロトコルを選択することをお勧めします。

Featured Products

Description	製品番号
Glycan Release	
PNGase Fast Kit	EMS0001-1KT
30 kDa MWCO Centrifugal Filtration Units, 0.5 mL	MRCF0R030
Labeling	
Procainamide HCl	SML2088 or PHR1252
Cleanup	
Discovery® Glycan SPE Tube 50mg / 1mL, Pk.108	55465-U
Visiprep™ SPE Vacuum Manifold DL (Disposable Liner), 12-port	57044
Acetonitrile, HPLC gradient grade or hypergrade for LC-MS LiChrosolv®	34851 or 1.00029
HPLC	
BIOshell™ Glycan, 15 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 μm	50994-U
Acetonitrile hypergrade for LC-MS LiChrosolv®	1.00029
Ammonium formate eluent additive for LC-MS, LiChropur™, ≥ 99.0%	70221
Formic acid 98% - 100% for LC-MS LiChropur™	5.33002

References

1. Lu, R.-M.; Hwang, Y.-C.; Liu, I.-J.; Lee, C.-C.; Tsai, H.-Z.; Li, H.-J.; Wu, H.-C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. J BiomED Sci 2020, 27, 1-30.
2. Wan, H. An overall comparison of small molecules and large biologics in ADME testing. ADMET & DMPK 2016, 4, 1-22.
3. Yang, X.; Bartlett, M. G. Glycan analysis for protein therapeutics. J Chromatography B 2019, 1120, 29-40.
4. Zhang, L.; Luo, S.; Zhang, B. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. MABS 2016, 8, 205-215.
5. Jones, A. N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins. BioPharm International 2017, 30, 20-25.
6. Giddens, J. P.; Lomino, J. V.; DiLillo, D. J.; Ravetch, J. V.; Wang, L.-X. Site-selective chemoenzymatic glycoengineering of Fab and Fc glycans of a therapeutic antibody. PNAS 2018, 115, 12023-12027.
7. Lie, S.; et. al. Comprehensive N-Glycan Profiling of Cetuximab Biosimilar Candidate by NP-HPLC and MALDI-MS. PLoS One 2017, 12, 1-14.
8. PNGase Fast Kit Technical Bulletin <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/2/ems0001bul.pdf>

To see our complete offer for LC-MS, visit us at <https://bit.ly/3DHTZjy>

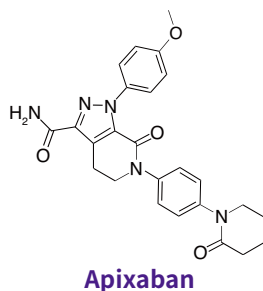
アピキサバンのHPLC/UVアッセイと有機不純物プロファイリング

Sonal Shinde, Application Scientist

緒言

アピキサバンは遊離型および凝血塊に結合した第Xa因子（プロトロンビンからトロンビンへの変換を触媒）を選択的かつ可逆的に阻害する経口投与可能な阻害薬です。エリキュース®の商標で販売されており、通常は非弁膜症性心房細動の患者に対して脳卒中と塞栓症のリスクを低減するために処方されます。また、人工膝関節または人工股関節の置換術を受ける患者で肺血栓塞栓症（PE）につながる恐れがある深部静脈血栓症（DVT）の予防にも使用されます。アピキサバンはファイザー社とブリストル・マイヤーズ スクイブ社が共同で開発し、2012年に欧州で、2014年には米国で承認を受けました。

現時点では、アピキサバンのアッセイや有機不純物プロファイリング法に利用できる薬局方のモノグラフはいずれもありません。そこで、これらの目的のためにC18 Fused-Core® 粒子充填カラムとUV検出（235 nm）を使用する新たなHPLC法を開発し、バリデーションを行いました。HPLC-UV検出を使用した235 nmでのアピキサバンの検出限界（LOD）は0.33 ppm、定量限界（LOQ）は1.0 ppmです。



HPLC条件

HPLCカラム:	Ascentis® Express C18, 15 cm x 4.6 mm I.D., 2.7 µm particles (53829-U)		
バッファ:	dissolve 2.04 g of potassium dihydrogen phosphate in 1500 mL Milli-Q® water (10mM). Adjust to pH 5.0 with triethylamine.		
移動相溶媒:	[A] buffer:methanol (90:10) (v/v) [B] buffer:acetonitrile:methanol (20:20:60) (v/v/v)		
グラジエント条件:	Time (min)	A(%)	B(%)
	0	65	35
	18	55	45
	20	55	45
	22	50	50
	25	40	60
	30	30	70
	35	30	70
	40	65	35
	50	65	35
流速:	1 mL/min		
カラム圧力:	132-147 bar (1914-2131 psi)		
カラム温度:	40 °C		
検出器:	UV @ 235 nm (analytical flow cell; 10 µL)		
注入量:	3 µL		
希釈:	mix water and acetonitrile 50:50 (v/v)		
保存標準溶液:	0.5 mg/mL of Apixaban standard in diluent.		
標準溶液:	dilute 5 mL of stock standard solution to 100 mL to obtain 25 ppm standard solution. (図 1)		
システム適合性試験測定用溶液:	weigh 2.5 mg of each impurity in 20 mL volumetric flask. Dilute to volume with diluent. Add 1 mL of this solution into a 50 mL volumetric flask and dilute to volume with standard stock solution. (図 2)		
サンプル溶液:	0.5 mg/mL of Apixaban sample in diluent (図 3)		

図 1. ブランクと標準品のクロマトグラム

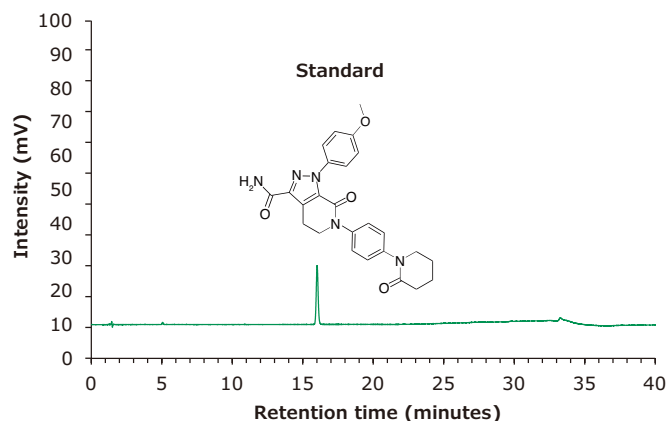
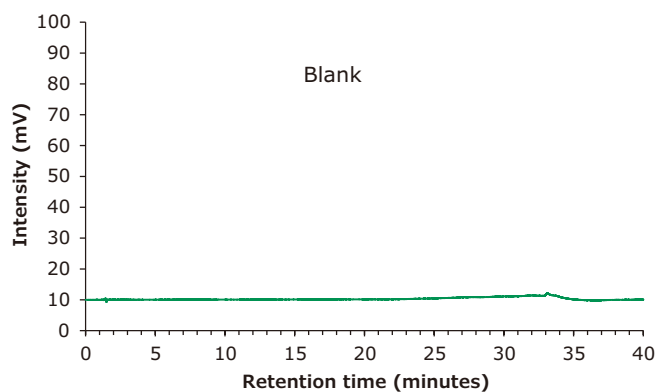
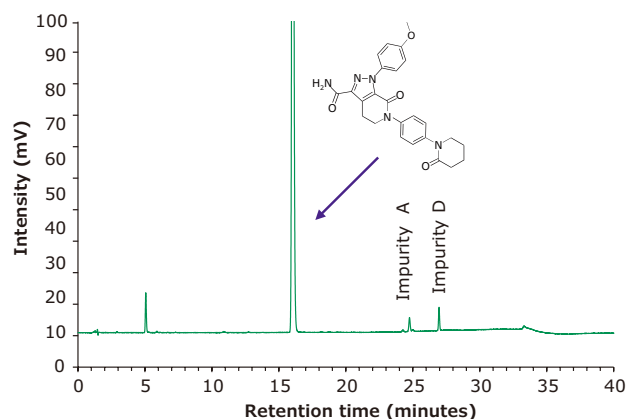
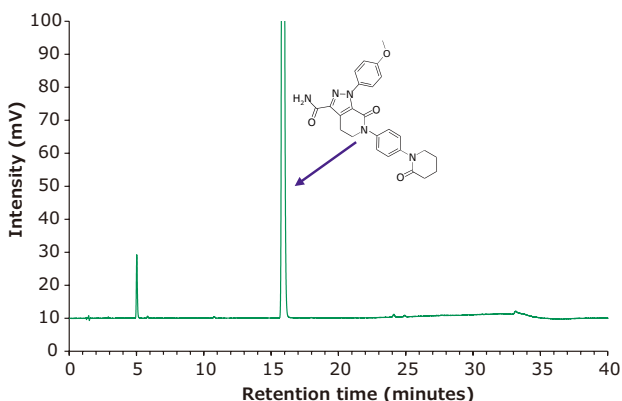


図 2. システム適合性試験



Peak	Compound	Retention Time (min)	RRT	Resolution	Tailing Factor
1	Apixaban	16.0	1.0	-	1.2
2	Impurity A	24.8	1.5	40.3	1.0
3	Impurity D	27.0	1.7	13.6	1.1

図 3. サンプル溶液



Peak	Compound	Retention Time (min)	Resolution	Tailing Factor
1	Apixaban	16.0	50327	1.2

Validation and Verification

1. Specificity

サンプル標準品と不純物の溶出時間を定める。

Compound	RT (min)
1 Apixaban	16.0
2 Impurity A	24.8
3 Impurity D	27.0

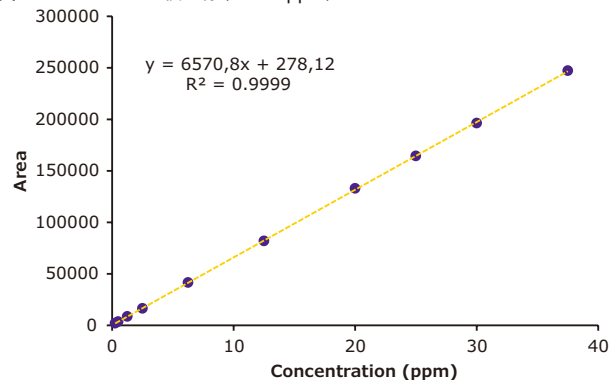
2. Standard Repeatability (25 ppm)

Sample	Apixaban (Area)
STD 1	165029
STD 2	165045
STD 3	165194
STD 4	165159
STD 5	165032
Mean	165091.8
Standard Deviation	78.5
RSD (%)	0.1

3. Linearity, LOD & LOQ

Concentration (µg/mL)	Apixaban (Area)
0.25	2015
0.5	3527
1.25	8605
2.5	16392
6.25	41517
12.5	81937
20	132946
25	164362
30	196291
37.5	247176
LOQ (S/N ratio 10)	1.0 ppm
LOD (S/N ratio 3)	0.33 ppm

図 4. アピキサバンの検量線 (0-37.5 ppm)



Featured Products

Description	製品番号
Ascentis® Express C18, 15 cm x 4.6 mm I.D., 2.7 µm particles	53829-U
Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph Eur.	1.00030
Methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph Eur.	1.06007
Potassium dihydrogen phosphate for analysis EMSURE® ISO	1.04873
Triethylamine for HPLC, LiChropur™, ≥ 99.5% (GC)	81101

Read more about our offer for HPLC at

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

折れにくいSPMEファイバーで 再現性を改善

Robert Shirey, Principal R&D Scientist
Michael Halpenny, R&D Technician

要約

ニチノール（Nitinol）コアにCarboxen[®]またはジビニルベンゼン（DVB）コーティングを施した吸着剤SPMEファイバーを紹介する本研究では、ニチノールコアファイバーと従来品を比べて、不活性特性と被分析物質の回収率を評価しました。再現性と機械的安定性が改善しているため、既存の分析法にそのまま利用できることを示します。

緒言

2019年後半、ニチノールコアのSupelco[®] 吸着剤ファイバーが導入されました。吸着剤「粒子」をコーティングしたSPMEファイバーは、吸着剤「フィルム」コーティングのファイバーと比べ、試料中の被分析物質とコーティングの間で複合的な相互作用／機構が起こりやすくなり、多くの場合で被分析物質の保持／感度が改善されます。しかし、粒子型SPMEファイバーには吸着剤、結合剤／接着剤など様々な材料が使用されていることから、ファイバー間のばらつきが大きくなることがあります。ニチノールコアにコーティングしたファイバーは標準的なステンレス鋼（SS）製のアセンブリーに収納されており、耐久性に優れるだけでなく、再現性も高いです。本稿では、ばらつきの要因として考えられるコーティング処理、検査工程、不活性特性、原材料および耐久性などの種々の因子について、フューズドシリカコアにコーティングした場合と、ニチノールコアにコーティングした場合とを比較して考察します。

研究結果

コーティング処理

ニチノールコアファイバーは、最先端の新しいコーティング装置を使用して製造されています。この装置により、信頼性と再現性のあるニチノールコアへのコーティングの塗布が可能となり、全工程をモニターできます。表1に複数のコーティングロットから測定したコーティングファイバー径を示します。ロット間およびロット内のばらつきは1 % RSD未満でした。

この独自に開発した新たなコーティング処理によって、コーティングをニチノールコアの周囲に均一に分布させてしっかりと接着できるようになったことも、ファイバーの再現性向上に寄与しています。さらに、この新たに作成されたニチノールコアファイバーの性能の再現性を、これまで用いられてきたフューズドシリカコアファイバーに対して試験しました。

表 1. SPMEファイバーロット間差

Fiber Lot	Diameter Measurements	
	μm	RSD
2049-10	282.5	0.37 %
2049-11	283.3	0.39 %
2049-13	278.7	0.26 %
2049-46	277.0	0.19 %
2049-47	276.2	0.24 %
2049-48	282.2	0.13 %
2049-57	281.7	0.38 %
2049-74	277.3	0.39 %
2049-75	277.8	0.39 %
Average#	279.6	0.29 %#
Std. Dev.	2.76	
RSD	0.99 %*	

*Inter-lot Variability #Intra-lot Variability

分析試験の結果

試験法の精度

ファイバーのQC試験では、ファイバーコーティングの性能を適切に測定する必要があります。試験する混合溶液に含まれる成分は吸着剤の各種特性を測定できるものとし、試験法は信頼できるものでなければなりません。

どのような吸着剤でも抽出効率と脱着効率のバランスがあるため、試験する混合溶液には、保持が難しい被分析物質と、脱着が難しい被分析物質が含まれている必要があります。異なる吸着機構によって保持される様々なクラスの吸着物質が有用です。これらの基準を満たす4つの成分を配合した混合溶液を調製しました。

試験法のバリデーションを行うため、ファイバー交換機能のあるオートサンプラーを使用しました。この機能により、ファイバーごとに複数回の抽出（4）を、またロットごとに複数のファイバー試験を自動的に行うことができました。ファイバーごとに4つの試料で4回の抽出を行うことは、各被分析物質について、抽出4回の面積カウントの精度を確立できるという利点があります。

表2に200超のファイバーによる反復抽出（合計800回の抽出）の平均精度を示します。使用したファイバーはフューズドシリカおよびニチノールコアにPDMS/DVBおよびCarboxen[®]/PDMSコーティングしたものです。

試験結果から、本試験法の再現性と信頼性は高いことが示されました。

表 2. 正確度 (as %RSD) 再現性

Isobutyl acetate	Toluene	n-Butanol	o-Xylene	Average of 4
2.03%	2.04%	1.92%	1.80%	1.95%

ファイバーコアの比較

ニチノールコアにCarboxen[®]/PDMS相コーティングを施したファイバー14ロットと、フューズドシリカコアにコーティングを施した14ロットを、前項で説明した自動化QC試験法を用いて評価しました。それぞれのコアについて、被分析物質ごとのRSDを各ロットのファイバーでの総抽出回数に基づいて決定しました。ロットごとの全体のRSDは、4つの被分析物質のRSD値の平均値としました。コアタイプごとに全ロットのロット内RSD値を平均し、コアタイプごとの全体のロット内RSD値を求めました。

ロット間RSD値は、コアタイプごとに14ロットで抽出を行い、全抽出から被分析物質ごとのRSDを決定することで求めました。4つの被分析物質のRSD値を平均して、コアタイプごとの全体のロット間でのばらつきを求めました。図1にCarboxen[®]/PDMSコーティングが施された2種類のファイバーコアについて、そのロット内およびロット間のばらつきの結果を示します。

この結果から、ニチノールコアにコーティングしたファイバーでは、フューズドシリカ (FS) コアにコーティングしたファイバーと比較し、ロット内のばらつきが43.8 %、ロット間のばらつきは68.1 %低下することが分かりました。この低下率の算出には式「 $[(FS - \text{ニチノール}) \div FS] \times 100$ 」を使用しました。

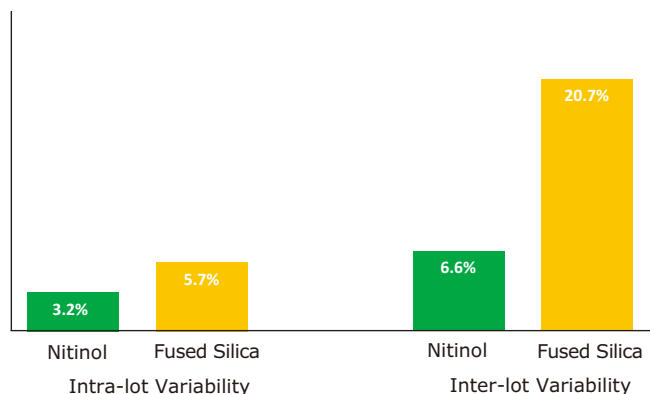


図 1. 従来品 (Carboxen[®]/PDMS) ニチノールファイバーのロット間、内のバラつき (n=14 Fiber Coating Lots/Core)

図2はPDMS/DVBコーティングのファイバーコア間でのばらつきの結果です。これらの計算値は、8ロットのフューズドシリカファイバーと8ロットのニチノールコアファイバーから、Carboxen[®]/PDMSコーティングのばらつきの算出に使用したものと同一手順で求めました。

この結果から、ニチノールコア上にコーティングしたファイバーでは、フューズドシリカにコーティングしたファイバーと比較し、ロット内のばらつきが81.3 %、ロット間のばらつきは71.6 %低下することが分かりました。一般にロット内のばらつきはロット間のばらつきと比べて有意に低いことが確認されていますが、PDMS/DVB

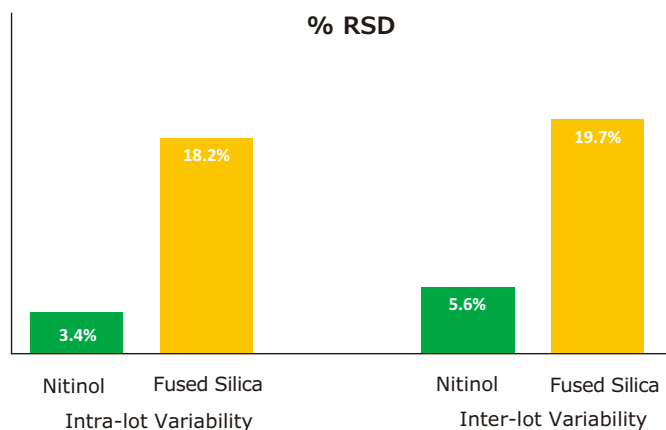


図 2. 従来品 (PDMS/DVB) とニチノールファイバーのロット間、内のバラつき (n=8 Lots per Fiber Core Type)

をコーティングしたフューズドシリカコアファイバーのばらつきはロット内とロット間で同程度でした。このことは、フューズドシリカコアにCarboxen[®]コーティングしたファイバーには当てはまりませんでした。Carboxen[®]カーボンモレキュラーシーブはDVBと比べてはるかに強い吸着剤であり、そのミクロ孔率は高く、ミクロ孔の平均径 (12 Å) もDVB (18 Å) より小さくなっています。コーティング厚さのばらつきは、Carboxen[®]コーティングファイバーとDVBコーティングファイバーを比較する因子としては低いです。弱い吸着剤への被分析物質の保持は、強い吸着剤に比べ、コーティング厚に大きく左右されます。また弱い吸着剤では、コーティング厚さのばらつきはわずかであっても容易に認められます。ニチノールコアのコーティング処理は、フューズドシリカコアの処理と比べて厳格に制御されているため、フューズドシリカコアの方がロット内のコーティング厚さのばらつきが大きくなっています。このことは、コーティングのばらつきを検出する試験プロセスが効率的かつ信頼性があり、ひいてはファイバーの高い品質と再現性が確保されていることを示しています。

不活性特性

信頼でき再現性のある結果が得られ、目的とする被分析物質-コーティング相互作用のみを生じるファイバーとするためには、コアが不活性である必要があります。コアが活性を示すと、脱離プロセスの間に一部の被分析物質の分解を触媒してしまうことがあります。これは被分析物質の応答を低下させるのみならず、元の試料には存在していなかった物質が合成される恐れもあります。例えばハロゲン化アルキルは、特に脱着温度が250 °Cを上回ると分解しやすくなる傾向があります。温度が高いほど大きく分解されます。一般に、分解は反応を触媒する鉄の存在によってさらに起こりやすくなります。

フューズドシリカは一般に、高不活性の基準として用いられています。そこでフューズドシリカコア上のコーティングとニチノールコア上のコーティングを比較しました。ニチノールはチタンとニッケルの合金で、これらが組成の99.99 %以上を占めています。微量金属もわずかに存在しますが、1 ppmより低いレベルです。この金属材料を使用して医療業界ではステントなど高度に不活性なデバイスを作成しています。

本研究では、ハロアルカンの抽出と脱離に関してコアの比較を行いました。ハロゲン化アルキルの分解が起こる場合、その多くはHClまたはHBr分子の脱離と不飽和ハロアルケン生成を伴います。試料にはハロアルケンを追加していなかったため、分析で存在を認めたハロアルケンはハロアルカンの分解によって生じたことになります。Carboxen®/PDMSコーティングとPDMS/DVBコーティングをファイバーコア間で比較しました。図3および図4は、それぞれCarboxen® / PDMSコーティングとPDMS/DVBコーティングのコアタイプ別の平均分解率を示しています。この平均値は、ファイバーコーティング別とコアタイプ別にそれぞれ行った4回の抽出に基づいています。

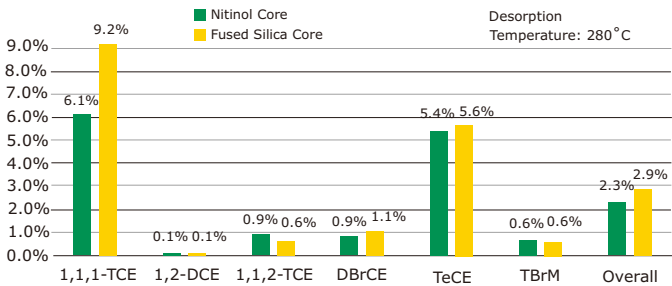


図 3. Carboxen®/PDMS fibers (n=4) におけるハロアルカンの分解率
1,1,1-TCE =1,1,1-trichloroethane; 1,2-DCE=1,2-dichloroethane;
1,1,2-TCE=1,1,2-trichloroethane; DBrCE=dibromochloroethane; TeCE=sum
of 1,1,1,2- & 1,1,1,1-tetrachloroethane; TBrM=Bromoform; Overall=Average
breakdown of all haloalkanes

結果から、いずれのコアタイプでもその挙動は同様であり、被分析物質の分解の主な原因は脱着温度であることが分かります。いずれのコアタイプも不活性と考えられます。

表 3. SPMEファイバーコア、コーティングの違いによる分析感度比較 (Peak Area)

Analyte	PDMS/DVB Coating			Carboxen®/PDMS Coating		
	Nitinol	Fused silica	Percent Difference	Nitinol	Fused silica	Percent Difference
1,1,1-trichloroethane	8088154	7912758	2.2%	29939050	31422213	-5.0%
1,2-dichloroethane	4293384	4117080	4.1%	26590648	24668157	7.2%
1,1,2-trichloroethane	11273578	11725096	-4.0%	22329364	20896864	6.4%
dibromochloromethane	17196101	17801539	-3.5%	28040335	26462127	5.6%
1,1,1,2-tetrachloroethane	21794638	22258723	-2.1%	25229513	23347665	7.5%
tribromomethane	20050799	20789889	-3.7%	21482461	19892605	7.4%
1,1,2,2-tetrachloroethane	25324934	25937177	-2.4%	24819794	24055163	3.1%

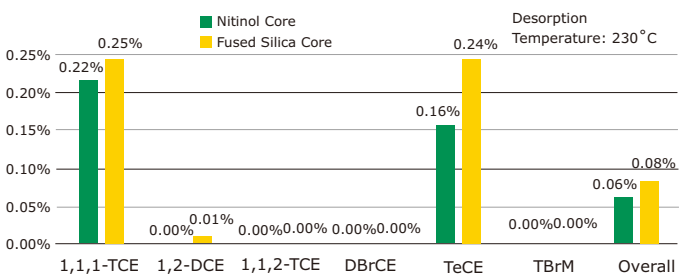


図 4. PDMS/DVB (n=4) におけるハロアルカンの分解率 - For Compound IDs see 図 3.

原材料

Supelco® SPMEファイバーに使用するコーティング剤は自社で製造しています。自社製造によって、コーティングの生産に使用する材料を完全に管理できます。もしメーカーが粒子や吸着剤を外部業者から購入する場合には、仕入材料の規格と製造工程を管理することはほぼ不可能でしょう。その結果、原材料のロット間でコーティングのばらつきが大きくなると考えられます。

ニチノールコアファイバーの導入以降、吸着粒子およびポリマーにはさらに規格を加えてきました。規格の追加により、原材料の製造ロット間の一貫性はさらに確かなものとなり、ロット間でのばらつきが低いファイバーを生産しています。

被分析物質の回収性能

現在、フューズドシリカコアに吸着剤をコーティングしたファイバーを使用しているユーザーは、ニチノールに移行した際のファイバー性能を不安に思われるかもしれません。当社の試験では、同一のコーティングであれば2種類のコアタイプ間で被分析物質の回収率にほとんど差はないことが明らかになっています。回収率が類似していることを実証するため、両方のファイバーコアに2種類の吸着剤をコーティングして、ハロゲン化アルキル群を4回抽出しました。表3に、各コーティングタイプのファイバーコアで得られた応答の平均値とそれらの増減率を示します。

Nitinol response – fused silica response

Nitinol response

2種類のコアタイプ間での被分析物質の応答差は小さく、同じコアタイプで異なるコーティングロットのファイバー間で予想される応答差と同程度でした。

耐久性

堅牢性の高いコーティング処理によって製造された耐久性の高いファイバーは、破断や損傷が生じる可能性が低くなり、実施可能な抽出回数が増やせます。ニチノールコアファイバーは極めて柔軟で、機械的に安定しています。図5の写真ではファイバーを90度曲げても折れないことが分かります。ロッドの内側が接触するまで180度曲げたとしても、折れることはありません。フューズドシリカファイバーは通常、30～45度曲げると破断します。ただし、ニチノールコアファイバーは柔軟性に富むとはいえ、機械的ストレスは最小限に留めることをお勧めします。

ファイバーコーティングに何らかの損傷が生じるとファイバーのばらつきが増えます。当社独自のコーティング処理によって、しっかりと接着した損傷を受けにくいコーティングを施し、その結果、長期間再現性の高い結果が得られます。

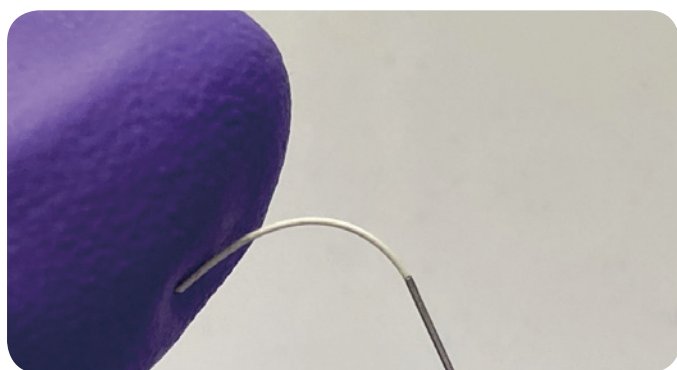


図 5. ニチノールファイバーは90°曲げることができる

結論

ニチノールコア上に施した吸着剤ファイバーコーティングは、以下の理由から極めて再現性が高いことが確認されています。

- 最先端の新しいコーティング技術ーコーティングされたファイバー径のばらつきは1% RSD未満
- ニチノールコアのロット内の再現性はフューズドシリカコアと比べて改善。Carboxen[®] コーティングのばらつきは43.8%低下、DVBコーティングでは81.3 %低下
- ニチノールコアのロット間の再現性はフューズドシリカコアと比べて改善。Carboxen[®] コーティングのばらつきは68.1%低下、DVBコーティングでは71.7 %低下
- 新たなQC検査工程

同じファイバーで繰り返し抽出した場合のばらつきは2 % RSD未満

様々な吸着機構を調べる検査項目

- ファイバーの優れた不活性特性ーフューズドシリカのファイバーコアと同等、またはそれ以上
- 高度に管理された原材料ー自社製材料に規格を追加することで、材料ロット間のばらつきをより厳密に管理
- 高い耐久性ーしっかりと接着した滑らかなコーティングをもつほぼ破断しない柔軟性に富むファイバー

コーティングが同一であれば、コアタイプが異なっても被分析物質の回収率は同程度です。

以上の結果は、フューズドシリカコアの吸着剤ファイバーを使用しているユーザーは、同一のコーティングが施されたニチノールコアファイバーへとその分析法を容易に移行し、改善できる利点があることを示唆しています。

Featured Products

Fiber Coating and Thickness	Fiber Core/ Assembly Type	Hub Description	Sampling Mode and Needle Size			
			Manual Holder/(w/spring)		Autosampler	
			23 Ga*	24 Ga*	23 Ga*	24 Ga*
Carboxen®/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)						
75 µm CAR/PDMS	NIT/SS	Black Metallic	57901-U	57904-U	57907-U	57908-U
Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB)						
65 µm PDMS/DVB	NIT/SS	Blue Metallic	57916-U	57921-U	57923-U	57931-U



折れにくいSPMEファイバーの
製品情報はこちら

<https://bit.ly/3kkztwE>



ISO/IEC 17025認定試験所の容量滴定用試薬

正確で信頼性の高い滴定結果を保証できる最高ランクの標準溶液

Bettina Straub-Jubb, Product Manager Titration, Analytix@merckgroup.com

メルクのDIN EN ISO/IEC 17025認定校正試験所で分析済のTitripur容量滴定用試薬

ドイツ・ダルムシュタットにあるMerck KGaAの品質管理試験所は現在、DAKKS (Deutsche Akkreditierungsstelle - ドイツ認定機関) によりDIN EN ISO/IEC 17025に準拠した「容量滴定用試薬の物質濃度」のための校正試験所D-K-15185-01-00としての認定を受けています(図1)。このような校正試験所としての認定は、試験所に与えられる最高水準の一つです。

Titripur 容量滴定用試薬とCertipur® 容量滴定用標準試薬CRM (認証標準物質) を組み合わせて使用することで、適正かつ信頼できる滴定結果が一貫して保証されます。レギュレーション下で作業している試験所、または自身でISO/IEC 17025認定を取得している試験所は、その監査に対してより十分な準備ができています。ISO/IEC 17025は、ILAC (国際試験所認定協力機構) を通して試験所に与えられる国際的に認められた認定であり、世界的に受け入れられています。各国にILACに加盟する自国の認定機関があります。

メルクが認定を取得する目的は?

Merck KGaA (ドイツ・ダルムシュタット) は早くも1994年に、緩衝液のpH値を測定する品質管理試験所として初めてISO/IEC 17025認定を取得しました。その後25年にわたり、お客様の日常的な分析プロセスをサポートさせていただくため、メルクでは分析製品、分析手順および試験所の認定範囲を広げてまいりました。その結果、自社のCRMに対して標準物質の製造者としてのISO 17034に準拠した認定を受け、さらに現在では、当社のISO/IEC 17025認定を取得した試験所で自社のTitripur®容量滴定用試薬の分析も実施しています。





ILACはISO/IEC 17011に基づく国際的な認定機関であり、校正ラボ (ISO/IEC 17025認定) と試験機関 (ISO/IEC 17025) を含む適合性評価機関の認定に携わっています。

図 1. メルク(ドイツ・ダルムシュタット)の認定証明書(DAKKSによる認定書)
<https://bit.ly/2TJmr2s>



Certificate of Analysis

1.09141.1000 Sodium hydroxide solution $c(\text{NaOH}) = 0.1 \text{ mol/l}$ (0.1 N) Titripur®
Reag. Ph Eur
Batch HC02423141

	Spec. Values		Batch Values	
Form	liquid		liquid	
Amount-of-substance concentration	0.0995 - 0.1005	mol/l	0.1000	mol/l
Measurement uncertainty	+/- 0.0003	mol/l	+/- 0.0003	mol/l
Traceability	NIST SRM		84L	

Accreditation: This volumetric solution is certified according to DIN EN ISO/IEC 17025. Merck KGaA, Darmstadt, Germany is accredited as calibration laboratory D-K-15185-01-00 for amount-of-substance concentrations in volumetric solutions according to DIN EN ISO/IEC 17025 by DAkkS (Deutsche Akkreditierungsstelle). The accreditation certificate can be found at www.sigmaaldrich.com/ISO17025.

The concentration is determined by volumetric titration and refers to 20°C.

The certified value is traceable to a primary standard from the National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA (NIST SRM 84 potassium hydrogen phthalate) by means of volumetric standard potassium hydrogen phthalate (article number 1.02400). This volumetric standard is certified by the accredited calibration laboratory of Merck KGaA, Darmstadt, Germany according to DIN EN ISO 17025. The uncertainty is expressed as expanded measurement uncertainty with a coverage factor $k=2$ covering a confidence level of 95%. All measurements are carried out in the calibration laboratory D-K-15185-01-00 of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Note: The titer is a correction factor to correct for variations of the volumetric solution, the titration equipment, the temperature and other laboratory conditions. For correct titration results it is recommended to determine a titer with the laboratory specific equipment and under laboratory specific conditions directly after opening a new bottle and at regular time intervals.

Date of release (DD.MM.YYYY) 07.05.2020
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.05.2023

Ayfer Yildirim
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

図2. ISO/IEC17025に基づく容量滴定認証標準物質(Titripur®)の試験成績書

トレーサビリティと不確かさ

校正試験所としてDIN EN ISO/IEC 17025試験所認定を受けたことで、製品分析値のSI単位へのトレーサビリティが完全に確保されています。Titripur® 滴定用試薬ではNIST（米国・国立標準技術研究所）の一次標準物質まで遡ってトレースしています。繰り返し性や再現性など、あらゆる不確かさの要因を文書化し、拡張測定不確かさ（各製品の分析証明書で確認できます（図2））と規格範囲に含めています（<https://bit.ly/2TJmr2s>の付属文書を参照）。

- 分析結果への自信
- 監査用のドキュメント
- 品質マネジメントシステムへの安全性
- 試薬および標準物質の一貫した品質
- 試験、校正データ、および作業を行う担当者における自信の向上
- コストと時間の節約—複数の作業が不要
- 容量滴定試薬と標準物質で試験および評価される製品の品質への信頼

滴定製品に関する情報はこちらから。 <https://bit.ly/3y5AQVw>

イオンクロマトグラフィーと陽イオンサプレッション

微量カチオンの分析

Christian Emmenegger, Head of Competence Center Ion Chromatography, Metrohm, christian.emmenegger@metrohm.com

Matthias Nold, Product Manager Reference Materials, Merck

Daniel Weibel, Product Manager Trace Organic Analysis & Sensorics, Merck, Analytix@merckgroup.com

イオンクロマトグラフィーによるカチオン、アミンおよび遷移金属の微量分析は、イオン抑制（サプレッション）してもしなくても行うことができます。しかし一部のアプリケーションでは特に高感度の分析が求められ、これは連続的なサプレッションによってのみ行うことができます。というのも、被分析物質の検出限界はサプレッションによって著しく低下するためです¹。こういった分析は、例えば発電所や医薬品のアプリケーションで多く行われています。さらに、陽イオンサプレッション分析を必要としている基準や規格も複数あります [例えば ASTM D6919 - 17「イオンクロマトグラフィーにより水中および排水中に溶解しているアルカリカチオンとアルカリ土類カチオンおよびアンモニウムを測定する標準試験法 (Standard Test Method for Determination of Dissolved Alkali and Alkaline Earth Cations and Ammonium in Water and Wastewater by Ion Chromatography) 」。つまり、サプレッションによってバックグラウンドの伝導率が最低限にまで低下し、ベースラインのノイズが減少します。これらの効果は共にシグナル・ノイズ比を改善し、測定システムの感度を上昇させます。それゆえ、極めて低濃度のカチオンの定量が必要であるときは、連続サプレッションを行う分析が最適な方法となります。

連続サプレッションの使用が有益となる分析

陽イオンサプレッションが行われるいくつかの典型例を挙げます：

- 高濃度モノエタノールアミン存在下の微量および超微量のNa分析（原子力発電所で一般的な試料マトリックス）。
- 超純水中の微量および超微量のアルカリ金属とアルカリ土類金属（Li、Na、K、MgまたはCaなど）および NH_4^+ 分析。
- 各種の水試料中の微量な遷移金属（Co、Ni、Zn、MnおよびCdなど）分析。
- 医薬品中の脂肪族および芳香族アミン。例えば、セチリジン・HCl中のピペラジン、アトルバスタチン中のテトラブチルアンモニウム、メロペネム中のジメチルアミン、イマチニブメシル酸塩中のジメチルアミン、メグルミン塩中のメグルミン分析。

どのように連続陽イオンサプレッションは機能するのか？

「連続サプレッション」という用語は、ケミカルサプレッションとその直後に CO_2 抑制を組み合わせることを意味します。

ケミカルサプレッション

Metrohm Suppressor Module (MSM) は炭酸緩衝液を使用したコンディショニング／再生です (Cat#78698)。この陰イオン交換樹脂はすべてのイオンペアをその炭酸水素塩に変換します。溶離液として解離酸（硝酸など）を使用します。さらに痕跡分析においてベースラインを安定化するため、微量のルビジウムを添加します (Cat#78737)。

溶離液のイオンペアも炭酸水素塩に置換されます。このようにして生成する炭酸は不安定で、ごくわずかししか解離しないことから、抑制を行わない溶離液と比べてバックグラウンドの伝導率が低い測定が可能となります。

連続サプレッション

連続サプレッションでは、ケミカルサプレッションに続けて CO_2 抑制を組み合わせで行います。これはMetrohm CO_2 Suppressorで行うことができます。MCS中で溶離液は、真空中で囲まれたガス透過性メンブレンから成るキャピラリー内を通過します。これによって形成した二酸化炭素が除去されることから、流路内のすべての炭酸水素塩が除去されます。被分析物質以外に残っている物質は、主に水だけです。

上述のように構成された連続サプレッションにより、バックグラウンドの伝導率が低く抑えられ ($< 0.2 \mu\text{S}/\text{cm}$)、被分析物質の検出感度が上昇します。サプレッションによって注入ピークは非常に小さくなります。つまり、注入ピークと早期に溶出するカチオン（リチウムなど）の間の分離度が高くなるため、これらピークの積分と定量が容易になります。

酸性吸収溶液中のアンモニウムの測定²

化学業界ではアンモニアガスの排出を低減またはなくするため、メーカーは法律によりアンモニアスクラバーシステムを利用することが義務付けられています。システムに利用される酸性スクラバー溶液のpHは一般に2以下です。このpHは、カチオンの直接伝導率検出に通常用いられるシリカ系ICカラムにとっては低すぎる値です。

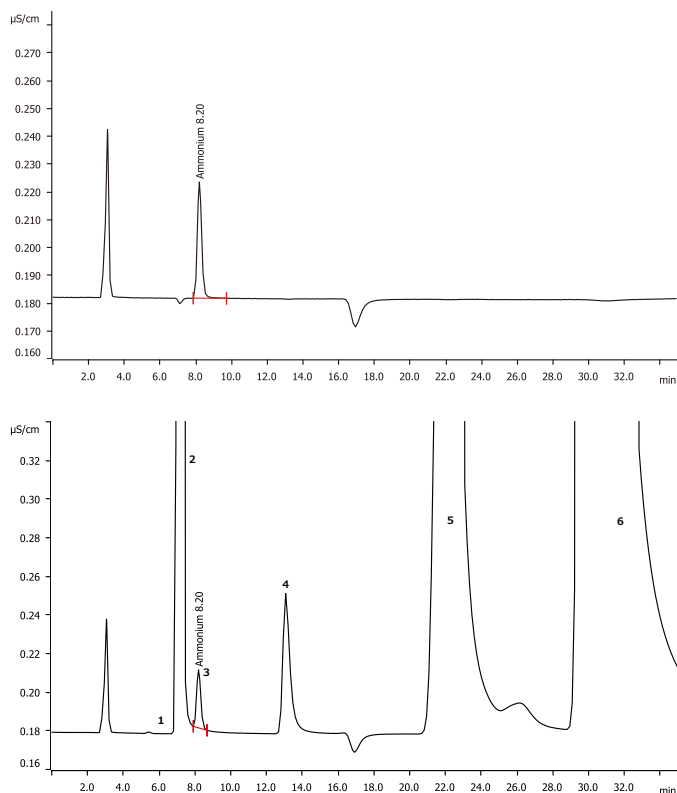


図1. 酸性標準溶液のクロマトグラム(上)と酸性飲料水にアンモニアをスパイクしたクロマトグラム(下)。ピーク3はNH₄⁺です。

Metrosep C Supp 2は、低pHの試料の注入が可能なポリマー系カラムです。このことを実証するため本研究では、0.15および0.4 mg/Lでアンモニウムを添加した2種類の酸性飲料水試料を分析しました。図1と表1に示す結果から、このような酸性溶液の伝導率測定による分析を、連続陽イオンサプレッション後に行うことができたことが分かります。

測定されたアンモニア濃度を表1に示します(図1のピーク3)。Li⁺(1)、Na⁺(2)、K⁺(4)、Mg₂⁺(5)、Ca₂⁺(6)は定量しませんでした。MgとCaの間のピークはZnと思われます。17分で認められる負のピークは、溶離液中のRbに相当します。

表1. 連続サプレッションを用いたアンモニア濃度

Sample Cation	Standard		Drinking water spiked		Drinking water spiked	
	Conc [mg/L]	Recovery [%; N=2]	Conc [mg/L]	Recovery [%; N=2]	Conc [mg/L]	Recovery [%; N=2]
NH ₄ ⁺	0.2	100	0.15	96.7	0.4	97.5

分析条件

サンプル	Drinking water acidified to pH 2, directly injected, no further sample prep
カラム	Metrosep C Supp 2 – 250/4.0 Metrosep C Supp 2 Guard/4.0
溶液	
溶離液	5.0 mM nitric acid 50 µg/L rubidium
溶離液濃度	100 mM nitric acid 1 mg/L rubidium
サプレッサー再生剤	70 mM NaHCO ₃ 70 mM Na ₂ CO ₃
rinsing solution:	STREAM
パラメーター	
流速	1.0 mL/min
注入量	10 µL
pmax:	25 MPa
記録時間	34 min
カラム温度	40 °C
分析	
連続サプレッション後の導電率検出	
分析機器	
930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg	
IC Conductivity Detector	
858 Professional Sample Processor	
941 Eluent Production Module	
MSM-HC Rotor C	

結論

本稿では、Metrosep C Supp 2カラムで使用する2成分からなる酸性の硝酸／硝酸ルビジウム濃縮IC溶離液と炭酸水素ナトリウム／炭酸ナトリウム抑制剤／再生剤により、アンモニアスクラバーで見られるような酸性溶液中のアンモニウムを正確に定量できることを実証しました。また当社では、IC用認証標準物質(CRM)として代表的ないくつかの無機カチオン標準物質もご提供しています。

References

1. Metrohm Literature 8.000.5163 “Brochure: Cation suppression in ion chromatography – Cation determination in the trace range”, <https://www.metrohm.com/en/documents/80005163>
2. Metrohm Literature AN-CS-017 “IC Application note: Metrosep C Supp 2 – 250/4.0: Ammonium in acidic absorption solution – proof of concept”, <https://www.metrohm.com/en/applications/AN-CS-017>

お勧め製品

Description	Package Size	製品番号
IC 移動相濃縮液		
Nitric acid/Rubidium nitrate concentrate	1 L, 2.5 L	78737
Sodium carbonate regenerant	2.5 L	78698
IC 認証標準物質 - TraceCERT®		
Ammonium Standard for IC	100 mL	59755
Lithium Standard for IC	100 mL	59878
Sodium Standard for IC	100 mL	43492
Magnesium Standard for IC	100 mL	89441
Potassium Standard for IC	100 mL	53337
Calcium Standard for IC	100 mL	39865
Zinc Standard for IC	100 mL	67902

イオンクロマトグラフィー製品に関する情報はこちらから。

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

農薬 標準物質/認証標準物質 (CRM)

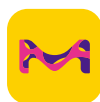
- 分析標準物質から認証標準物質へ

カタログ請求はカタログファインダーから

<https://bit.ly/3866pmQ>



Supelco®
Analytical Products



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 - メールニュース
www.merckmillipore.com/wm



メルクライフサイエンス公式
SNS、動画コンテンツをご覧ください。

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。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2021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. ©2021 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.sigmaaldrich.com/JP/ja

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: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

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@merckgroup.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。

AAM113-2109-7K-E