



MERCK

Analytix Reporter Issue 7 | 2023

Analytix Reporter

TOPIX

LC/MS/MSによる食物アレルギー分析

一般財団法人 日本食品検査 事業本部試験部門 橘田 規

FOOD & BEVERAGE

オーツ麦中のグリホサート、AMPA、
グルホシネートの新しいLC-MS/MS法

COSMETIC & PERSONAL CARE

日焼け止めの安全性が気になる？

PHARMA & BIOPHARMA

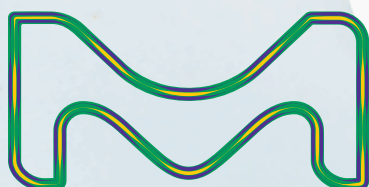
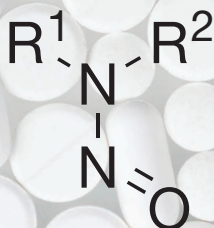
バルサルタン中のN-ニトロソアミンの測定
LC-UV/MSを用いた抽出物調査
BIOshell™ A400 Protein C4カラムを用いた
治療用モノクローナル抗体トラスツズマブの分析

ENVIRONMENTAL

ポリエーテルスルホン (PES) 製
シリンジフィルターのPFAS抽出物の分析
EPAメソッド537.1, 533, 8327における
PFASのLC-MS分析
PFASのLC-MSを用いた高速分離について

SCIENCE & TECHNOLOGY INNOVATIONS

安定同位体標識アミノ酸混合溶液
HPLC Tips & Tricks: 注入量の最適化



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

Supelco®
Analytical Products

TOPIX

- 3 LC/MS/MSによる食物アレルギー分析
一般財団法人 日本食品検査 事業本部試験部門 橘田 規

FOOD & BEVERAGE

- 8 オーツ麦中のグリホサート、AMPA、
グルホシネートの新しいLC-MS/MS法

COSMETIC & PERSONAL CARE

- 13 日焼け止めの安全性が気になる？

PHARMA & BIOPHARMA

- 15 バルサルタン中のN-ニトロソアミンの測定
19 LC-UV/MSを用いた抽出物調査
23 BIOshell™ A400 Protein C4カラムを用いた
治療用モノクローナル抗体トラスツズマブの分析

ENVIRONMENTAL

- 26 ポリエーテルスルホン (PES) 製
シリンジフィルターのPFAS抽出物の分析
30 EPAメソッド537.1, 533, 8327におけるPFASのLC-MS分析
32 PFASのLC-MSを用いた高速分離について

SCIENCE & TECHNOLOGY INNOVATIONS

- 34 安定同位体標識アミノ酸混合溶液
35 HPLC Tips & Tricks: 注入量の最適化

技術的な質問に関するお問合せは
テクニカルサービスへ。
jpts@merckgroup.com

LC/MS/MSによる食物アレルギー分析

一般財団法人 日本食品検査 事業本部試験部門 橋田 規

1. 食物アレルギー

近年のアレルギー疾患の増加は著しく、現在ではわが国の全人口の約2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患しているといわれている¹。特に、花粉やダニをアレルギーとするアレルギー性鼻炎・結膜炎と並んで食物アレルギーの増加は顕著である。食物アレルギーとは、食物に含まれる抗原（食物アレルギー）によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して、生体にとって不利益な症状が誘発される現象のことであり、症例としては特異的IgE抗体が関与するIgE介在性食物アレルギーが最も多くみられる。IgE介在性食物アレルギーの有症率は、日本では乳児で7.6%～10%^{2,3}、2歳児で6.7%³、3歳児で約5%^{2,3}、学童以降で1.3%～4.5%^{4,5}とされている。日本における全年齢を通じた有症率は1%～2%と推定されているが、フランスで3%～5%⁶、アメリカで3.5%～4%⁷との報告があるため、今後、日本でも更に患者数が増える可能性がある。

IgE介在性食物アレルギーの多くは、食物アレルギーの原因食品（図1）を摂取してから2時間以内に症状が誘発される即時型反応である。原因食品の上位を占める鶏卵、牛乳、木の実類、小麦、落花生はいずれも乳児から幼児早期の主要原因食品であるが、鶏卵、牛乳、小麦では耐性化率が高く、木の実類、落花生では耐性化率が低いと考えられている。

食物アレルギーの症状は、多くの場合、口唇・舌・のどの痒みや鼻汁など、不快な程度にとどまるが、進行すると全身の発疹、呼吸困難、腹痛、嘔吐などの重篤な症状が起きる。非常に感受性が高い人では、摂取した食物アレルギーがごく微量であっても、血圧低下や意識障害を伴うアナフィラキシーショックにより死に至ることがある。したがって、食物アレルギーをもつ人は、食物アレルギーを含む食品を誤食しないように十分注意しなければならない。

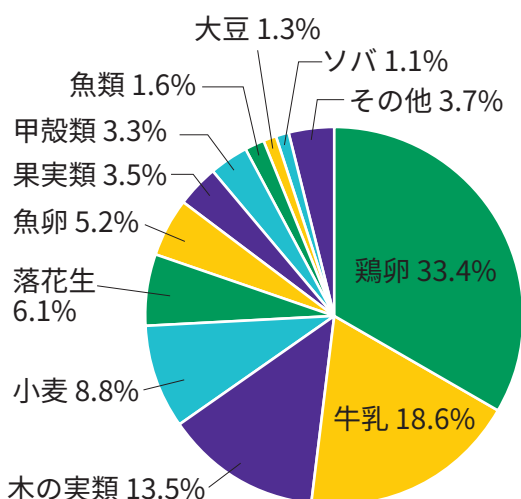


図1. 即時型食物アレルギーの原因食品⁸

2. 食物アレルギー表示制度と検査法

食物アレルギーを含む食品の誤食による健康被害の発生を防止する観点から、平成13年4月に食品衛生法（昭和22年法律第233号）に基づくアレルギー物質を含む食品の表示制度⁹が創設され、平成27年4月からは食品表示法（平成25年法律第70号）に基づく食品表示基準¹⁰および関連通知等に従い運用されている。2023年4月現在では、表1に示す特定原材料8品目とそれに準ずる20品目がアレルギー表示の対象になっている。

食物アレルギー表示制度を所管する消費者庁（平成22年8月までは厚生労働省）からは、アレルギー表示が適切に実施されていることを検証するための検査方法が通知され、スクリーニング検査としてはELISA（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）法による定量検査法が、確認検査としてはウエスタンブロット法およびPCR（Polymerase Chain Reaction）法による定性検査法が示されている¹¹。なお、検査実務においては、試料1g当たりの特定原材料由来のタンパク質含有量が10 μg以上のものを陽性と判定することとされている。

表1. 食物アレルギー表示の対象品目

原材料の名称	
特定原材料（表示の義務）	えび・かに・くるみ・小麦・そば・卵・乳・落花生（ピーナッツ）
特定原材料に準ずるもの（表示の推奨）	アーモンド・あわび・いか・いくら・オレンジ・カシューナッツ・キウイフルーツ・牛肉・ごま・さけ・さば・大豆・鶏肉・バナナ・豚肉・まつたけ・もも・やまいも・りんご・ゼラチン

3. LC/MS/MSによる食物アレルギー分析

食物アレルギー表示制度においては、消費者庁から示された特定原材料の検査法（公定法）と同等又は同等以上の性能をもつ検査法の使用が認められているため、複数の特定原材料を対象としてスクリーニング検査と確認検査を同時に行うことができる液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS、liquid chromatography tandem mass spectrometry）が用いられるようになってきた。LC/MS/MSは、特定原材料に含まれるタンパク質を緩衝液で抽出し、還元・アルキル化を行った後、トリブシンで消化して得られる特異性の高いペプチドを検出・定量する方法である。抗原抗体反応を利用したELISA法では、共存する食品マトリックスによっては交差反応による偽陽性判定を避けることができないが、LC/MS/MSでは偽陽性判定を防ぐことができるため信頼性の高い方法である。

LC/MS/MSでは、特定原材料に由来するタンパク質を定量用標準物質として準備し、それを分析法に従いトリプシン消化した上で、生成したペプチドをLC/MS/MSにより測定し、検量線を作成する。したがって、LC/MS/MSで正確な分析値を得るためには、定量用標準物質とするタンパク質の組成、含有量等の情報が必要不可欠である。

今般、即時型食物アレルギーの主要な原因食品である鶏卵および牛乳を分析対象として、鶏卵および牛乳由来タンパク質を定量用標準品とした食物アレルギー分析法を開発したので報告する。

3.1. 定量用標準品

表2に示すように、鶏卵は全体の58%が卵白、31%が卵黄で構成されており、それぞれの部位にはタンパク質が11.0%、17.5%ずつ含まれている。卵白に含まれるタンパク質としてはオボアルブミン (Ovalbumin)、オボトランスフェリン (Ovotransferrin)、オボムコイド (Ovomucoid)、リゾチーム (Lysozyme) など10種類以上が知られており、最も含有量が多いオボアルブミンでは卵白タンパク質全体の54%～66%を占める(表3)。これを鶏卵に含まれるタンパク質全体に対する割合に換算すると20.8%～25.4%に相当する。同様に、卵黄に含まれるタンパク質にはアポビテリン (Apovitellenin)、リポビテリン (Lipovitellin)、リベチン (Livetin)、ホスピチン (Phosvitin) などがあり、最も含有量の多いアポビテリンでは卵黄タンパク質全体の37.3%を占め(表4)、

鶏卵のタンパク質全体に換算すると22.9%に相当する。

牛乳は殆どが水分(87.4%¹⁴)でできており、タンパク質の含有量は3.3%¹⁴と僅かである。牛乳のタンパク質は、表5に示したとおり、主に79.5%のカゼインと19.3%の乳清タンパク質で構成されており、最も含有量の多いαS1-カゼインでは牛乳タンパク質全体の30.6%を占める。

特定原材料の検査に用いる定量用標準物質として1種類のタンパク質を用いただけでは、鶏卵、牛乳、いずれにおいても特定原材料に由来するタンパク質の組成全体をカバーしているとは言い難い。そこで、鶏卵分析用の標準品には、鶏卵由来タンパク質であるオボアルブミン、オボトランスフェリン、オボムコイド、リゾチームの4種類を、牛乳分析用の標準品には、牛乳由来タンパク質であるカゼイン、α-ラクトアルブミン (α-Lactalbumin)、β-ラクトグロブリン (β-Lactoglobulin) の3種類(いずれもシグマ アルドリッチ製の認証標準物質)を用いることとした(表6)。

鶏卵分析用の標準品として卵黄由来タンパク質が入手できなかったため、上記4種類のタンパク質では鶏卵由来タンパク質のカバー率は47%に留まったが、卵白由来タンパク質に対しては86%と高いカバー率が得られる。また、牛乳分析用の標準品に用いるカゼイン (Bos d 8)は表7に示したとおり、牛乳に含まれるカゼインを網羅しており、そのために上記3種類のタンパク質で牛乳由来タンパク質に対して91%と高いカバー率が得られる。

表2. 鶏卵構成部位の質量比と含有成分の組成¹²

部位	質量比	水分	タンパク質	脂質	灰分
全卵	100	65.5	11.8	11.0	11.7
卵白	58	88.0	11.0	0.2	0.8
卵黄	31	48.0	17.5	32.5	2.0
卵殻	11	0.0	4.0	0.0	96.0

表3. 卵白のタンパク質組成¹³

成分	含有率 (%)
オボアルブミン	54 - 66
オボトランスフェリン	12 - 13
オボムコイド	9.5 - 11
リゾチーム	2.3 - 4.5
オボムチン	1.5 - 3.5
オボインヒビター	0.1 - 1.5
オボグロブリン G2	1.0 - 6
オボグロブリン G3	1.0 - 6
リボフラビン結合タンパク質	1.0
アビジン	0.05 - 0.5
オボスタチン	0.5

表4. 卵黄のタンパク質組成¹²

成分	含有率 (%)
アポビテリン	37.3
リポビテリン	40.0
α-リポビテリン	26.7
β-リポビテリン	13.3
リベチン	22.7
α-リベチン	2.7
β-リベチン	4.0
γ-リベチン	2.7
ホスピチン	13.3
ビオチン結合タンパク質	Tr

※ Tr : 痕跡量

表5. 牛乳のタンパク質組成¹⁵

成分	含有率(%)
カゼイン	79.5
αS1-カゼイン	30.6
αS2-カゼイン	8.0
β-カゼイン	28.4
κ-カゼイン	10.1
乳清タンパク質	19.3
α-ラクトアルブミン	3.7
β-ラクトグロブリン	9.8
ウシ血清アルブミン	1.2
免疫グロブリン	2.1
プロテオースペプトン	2.4

3.2. 前処理法

フードミキサーで均質化した試料に、尿素含有トリス緩衝液を加えて振とう抽出した後、インキュベートおよび遠心分離を行い、上清を抽出液とした。抽出液に尿素およびジチオトレイトール含有トリス緩衝液を添加し、インキュベートした。更に、ヨードアセトアミド溶液を加え、インキュベートした。そこに、トリス緩衝液およびトリプシン溶液を添加し、インキュベートした後、50%ギ酸を添加した。適宜、固相抽出等による精製、希釈およびろ過を行い、測定溶液とした。

3.3. 測定条件

液体クロマトグラフ (HPLC) にはNexeraX3 (島津製作所製) を、分析カラムにはShim-pack XR-ODS III (長さ7.5 mm × 内径2.0 mm、粒子径1.6 μm) (島津製作所製) を用い、オープン温度は50℃とした。移動相には、A液 アセトニトリル、B液 0.1%ギ酸によるグラジエント溶離を用いた。移動相の流速は0.5 mL/minとした。

質量分析計にはLCMS-8060NX (島津製作所製) を用いた。イオン化モードはESI(+)を、測定モードはMRMを用いた。モニターイオンは表8に示した。

表6. 定量用標準品とした認証標準物質

タンパク質	品名	製品番号
オボアルブミン	Gal d 2 (LoTox)	LTN-GD2-1
オボトランスフェリン	Gal d 3	NA-GD3-1
オボムコイド	Gal d 1 (LoTox)	LTN-GD1-1
リゾチーム	Gal d 4 (LoTox)	LTN-GD4-1
カゼイン	Bos d 8	NA-BD8-1
α-ラクトアルブミン	Bos d 4	NA-BD4-1
β-ラクトグロブリン	Bos d 5	NA-BD5-1

表7. カゼイン (Bos d 8) の成分組成

成分	含有率 (%)
αS1-カゼイン	41.59
αS2-カゼイン	31.81
β-カゼイン	21.99
κ-カゼイン	4.34
その他	2.10

表8. 分析対象タンパク質から生成したペプチドのモニターイオン

タンパク質	ペプチド	モニターイオン (m/z)
オボアルブミン	HIATNAVLFFGR	449.4>639.2
オボトランスフェリン	SAGWNIPIGTLLHR	512.4>906.6
	YFGYTGALR	524.4>737.4
オボムコイド	VMVLCNR	446.3>661.3
		446.3>562.3
リゾチーム	GTDVQAWIR	523.4>673.3
		523.4>545.3
αS1-カゼイン	YLGYLEQLLR	634.5>991.5
αS2-カゼイン	NAVPIPTTLNR	598.6>285.2
	FALPQYLK	490.4>648.4
β-カゼイン	VLPVPQK	391.0>568.3
		391.0>372.1
	AVPYPQR	415.8>400.2
		415.8>660.5
κ-カゼイン	YIPIQYVLSR	626.5>765.4
α-ラクトアルブミン	VGINYWLAHK	401.1>468.3
β-ラクトグロブリン	IPAVFK	337.7>561.3
		337.7>464.2
	ALPMHIR	419.4>653.3

3.4. 市販食品への本法の適用

原材料表示に鶏卵および牛乳が記載された市販のたまごボーロ（焼菓子）およびプリン（生菓子）を入手し、本法によって分析を行った。検量線の決定係数は、いずれのペプチドにおいても0.995以上と直線性は良好であった。例として、図2にオボアルブミンの検量線を示した。図3に標準溶液の代表的な抽出イオンクロマトグラムを示した。表9に示したとおり、どちらの試料でも、本法の分析対象とするタンパク質はすべて検出されており、鶏卵由来タンパク質および牛乳由来タンパク質の合計値はいずれも10 ug/g以上であることから陽性と判定した。上述したとおり、本法は牛乳については原材料由来タンパク質の91%をカバーしているが、鶏卵については全体の31%を占める卵黄由来のタンパク質を分析対象としていないことから、鶏卵由来タンパク質の合計値が10 ug/g未満である場合には基準適合性において注意を要するが、分析実務においては大変有効な手法である。

表9. 試料分析の結果 (ug/g)

	たまごボーロ	プリン
鶏卵由来タンパク質		
オボアルブミン	949	62
オボトランスフェリン	116	14
オボムコイド	337	17
リゾチーム	12	1
合計	1414	94
判定	陽性 (≥ 10 ug/g)	陽性 (≥ 10 ug/g)
牛乳由来タンパク質		
αS1-カゼイン	4316	891
αS2-カゼイン	1916	947
β-カゼイン	3552	510
κ-カゼイン	3065	272
α-ラクトアルブミン	29	5
β-ラクトグロブリン	60	25
合計	12938	2650
判定	陽性 (≥ 10 ug/g)	陽性 (≥ 10 ug/g)

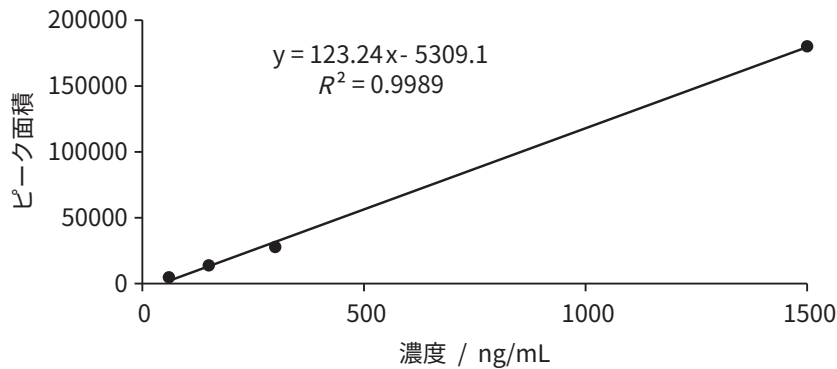


図2. オボアルブミンの検量線

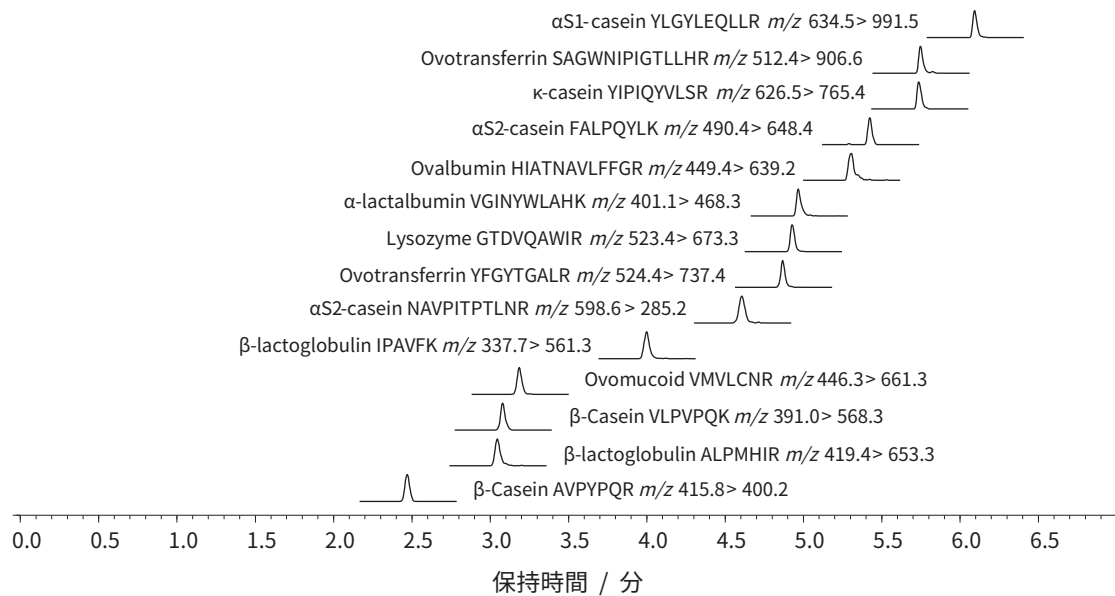


図3. 標準溶液の抽出イオンクロマトグラム

4. まとめ

本稿で紹介した食物アレルギーの分析法は、食品中に含まれる特定原材料由来のタンパク質を緩衝液で抽出した後、トリプシン消化によりペプチドに変換し、特異性の高いペプチドをLC/MS/MSにより分析することで、元のタンパク質の含有量を定量する手法である。本法では6残基～14残基のペプチドをLC/MS/MSの分析対象としているため、他のタンパク質のアミノ酸配列と一致し誤同定する可能性が低く、3価以上のイオンが生成することによるイオン強度の分散・感度低下が起きにくい分析法である。したがって、ELISA法で偽陽性・偽陰性の判定となる試料の検査においてその効力を発揮する。また、原材料に含まれる個々のタンパク質の含有量が分かるため、例えば原乳の産地や季節によるタンパク質組成の変動をモニターする方法として活用することができる。

本法は同時に複数の特定原材料の検査を行うことができる効率的な分析手法であるため、行政検査や自主検査において広く活用されることが期待されるが、現時点では、特定原材料由来タンパク質が認証標準物質として入手できるものは限られている。今後、LC/MS/MSの分析に適した標準物質が開発、市販されることが望まれる。

文献

1. 厚生科学審議会疾病対策部会リウマチ・アレルギー対策委員会, リウマチ・アレルギー対策委員会報告書 (平成23年).
2. Ebisawa M, et al., *J Allergy Clin Immunol*, **125**, AB215 (2010).
3. Yamamoto-Hanada K, et al., *World Allergy Organization J*, **13**, 100479 (2020).
4. 今井孝成, 日本小児科学会雑誌, **109**, 1117-22 (2005).
5. 平成25年度学校生活における健康管理に関する調査事業報告書, (公財) 日本学校保健会 (2014).
6. Kanny G, et al., *J Allergy Clin Immunol*, **108**, 133-40 (2001).
7. Munoz-Furlong A, et al., *J Allergy Clin Immunol*, **113**, S100 (2004).
8. 海老澤元宏, 杉崎千鶴子, 佐藤さくら, 今井孝成, 即時型食物アレルギーによる健康被害に関する全国実態調査, 令和3年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書, 消費者庁 (2022).
9. 食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について (平成13年3月15日付け食発第79号厚生労働省医薬局食品保健部長通知).
10. 食品表示基準について (平成27年3月30日付け消食表第139号消費者庁次長通知).
11. アレルギー物質を含む食品の検査方法について (平成22年9月10日付け消食表第286号消費者庁次長通知).
12. W.J.Stadelman, O.J.Cotterill 編, 森田重広 訳, 卵の科学と技術, 学窓社 (1979).
13. Y. Zhu, et al., *Trends in Food Science & Technology*, **78**, 188-196 (2018).
14. 日本食品標準成分表2020年版 (八訂), 令和2年12月.
15. V. Raikos, *Food Hydrocolloids*, **7**, 259-265 (2010).

著者プロフィール

一般財団法人日本食品検査
事業本部試験部門 副部長

橘田 規

山梨県甲府市出身。横浜市立大学理学部要素科学科卒業後、化学工業メーカーでの品質管理業務等に従事した後、財団法人日本冷凍食品検査協会(現在の一般財団法人日本食品検査)へ入会、理化学試験業務、試験法開発業務を経験し現在は事業本部試験部門副部長。食品産業コーデックス対策委員会専門委員、液体クロマトグラフィー研究懇談会役員、残留農薬分析国際交流会幹事などを務める。

オート麦中のグリホサート、AMPA、グルホシネートの新しいLC-MS/MS法

Olga I. Shimelis, R&D Manager; Teresa Marsala, Senior R&D Technician; M. James Ross, Senior R&D Scientist

概要

LC-MS/MSを用いた穀物中のグリホサート、アミノメチルホスホン酸 (AMPA)、グルホシネート測定法について解説します。この方法は誘導体化を行わずにグリホサートとその代謝物の分析が可能で、サンプルはQuick Polar Pesticides (QuPPE) 手法に基づく抽出法で行い、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS/MS) で分析します。カーボンカラム (カーボンベースのHPLCカラム) により分析対象物を保持し、塩基性炭酸アンモニウムバッファーとアセトニトリル：水の移動相、ネガティブESI条件下で適切なイオンを設定しました。分析装置はSciex 6500 MSを用い、オート麦ベースのサンプルで10 ppbという低い検出限界を実現しました。複数の穀物で分析した結果、グリホサート、AMPA、グルホシネートの検出レベルはメソッドの検出限界を超えることが分かりました。

はじめに

グリホサートは、世界で最も使用されている除草剤の一つであり、年間64万トン以上のグリホサートが畑に散布されています¹。この化学物質の使用量は、トウモロコシ、大豆、綿花などの遺伝子組み換えでグリホサート耐性のある作物が導入された後に増加しました。米国では、環境保護庁 (EPA) の規制文書Code of Federal Regulations (CFR)-title 40-volume 26で、食品および農産物中のグリホサートに対する許容値が設定されています²。穀類 (Crop group 15) におけるグリホサート残留に対するEPAの許容量は30 ppmに設定されており、この許容量には米、大豆、トウモロコシは含まれていません。分析においてグリホサートと一緒に用いられることの多い除草剤であるグルホシネートの許容値は、穀類で0.4 ppm、米で1.0 ppmです。この許容値には代謝物や分解物も含まれており、グリホサートの代謝物であるAMPAも本研究の対象としました (図1)。比較のため、欧州連合 (EU) では、オート麦の最大残留基準値 (MRL) は、グリホサートが20 mg/kg、グルホシネートが0.03 mg/kg (より低い検出下限値) です。米の場合、グリホサートとグルホシネートのMRLは、それぞれ0.1 mg/kgおよび0.9 mg/kgです³。このアプリケーションでは、穀物、特に朝食用シリアル製造に使用されるオート麦に含まれるグリホサートの存在を調査しました。グリホサート分析手法は、過去30年以上にわたって数多く開発されました。HPLC法には蛍光検出の前にo-フタルアルデヒドで分析対象物を誘導体化する方法⁴、また、フルオレニルメチルオキシカルボニルクロリド (FMOC) を用いてグリホサートを誘導体化し、蛍光検出する方法も提案され、広く使用されています⁵。近年、最新の高感度かつ堅牢なLC-MS/

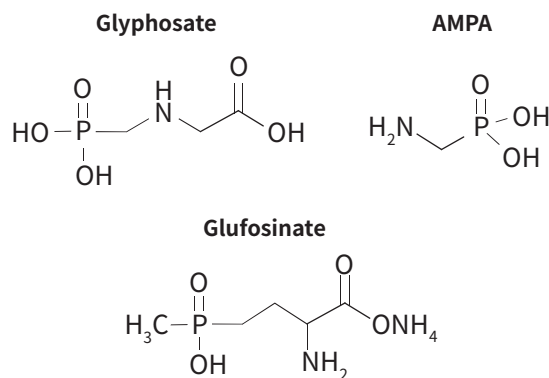


図1. グリホサート、AMPA、グルホシネートの構造式

MS装置の導入が進みグリホサートとその代謝物を誘導体化せずに分析することが可能になりました。質量分析ベースのグリホサート分析には、これまでイオン交換、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC)、カーボンHPLCカラムなど、複数のカラムが使用されています⁶。HILICベースやイオン交換法では酸性の移動相でグリホサートとその類縁体を検出するためにESI(+)を使用する場合もあります^{6,7}。HILICベースのメソッドでは非常に極性の高い分析物を非極性の希釈液に溶解させるという課題があります。イオン交換法では、検出にマイナスイオン化モードを使用し、移動相にクエン酸またはクエン酸塩を使用します⁵。これらの添加剤は揮発性ではないため、質量分析法による検出には適しません。弊社は以前、炭酸緩衝液と陰イオン交換カラムを用いてESI(-)中のグリホサートの検出が可能であることを発表しています⁸。今回は揮発性炭酸水素緩衝液の移動相とSupel™ Carbon LCカラムを使用しました。このカラムは、独自のミックスモード保持機構を有しており、HILIC条件を必要とせずに極性分析物の保持を向上させることができます。

実験

グリホサート、AMPA、グルホシネートアンモニウムは分析用標準物質を、グリホサート-2-¹³C, ¹⁵N、AMPA-¹³C, ¹⁵N、グルホシネート-D₃は同位体標識した内部標準物質を使用しました。内部標準物質と非同位体標識標準物質の溶液は、1 mg/mLの水に調製し、穀物のマトリックス用のスパイクに使用しました。

オーガニックオートミールをテストマトリックスとして選択し、この実験に使用しました。地元商店のオーガニックオートミールの複数のサンプルを、以下のステップでグリホサートについてスクリーニングしました(図2)。すべてのオートミールにある程度のレベルのグリホサートとその他の化合物が検出されました。今回の検討

でシリアル試料はグリホサートを24 ppbを含んでいますが、3つの分析対象物すべてでバックグラウンドが最も低いものを選びました。この特定のマトリックスは、80 ppbと800 ppbを含むようにスパイクしました。スパイクされたサンプルは、本検討およびバリデーション時の分析対象物の回収率を評価するために使用しました。

複数のオートミールシリアル試料は近所のスーパーで購入し、グリホサート汚染について検討しました。

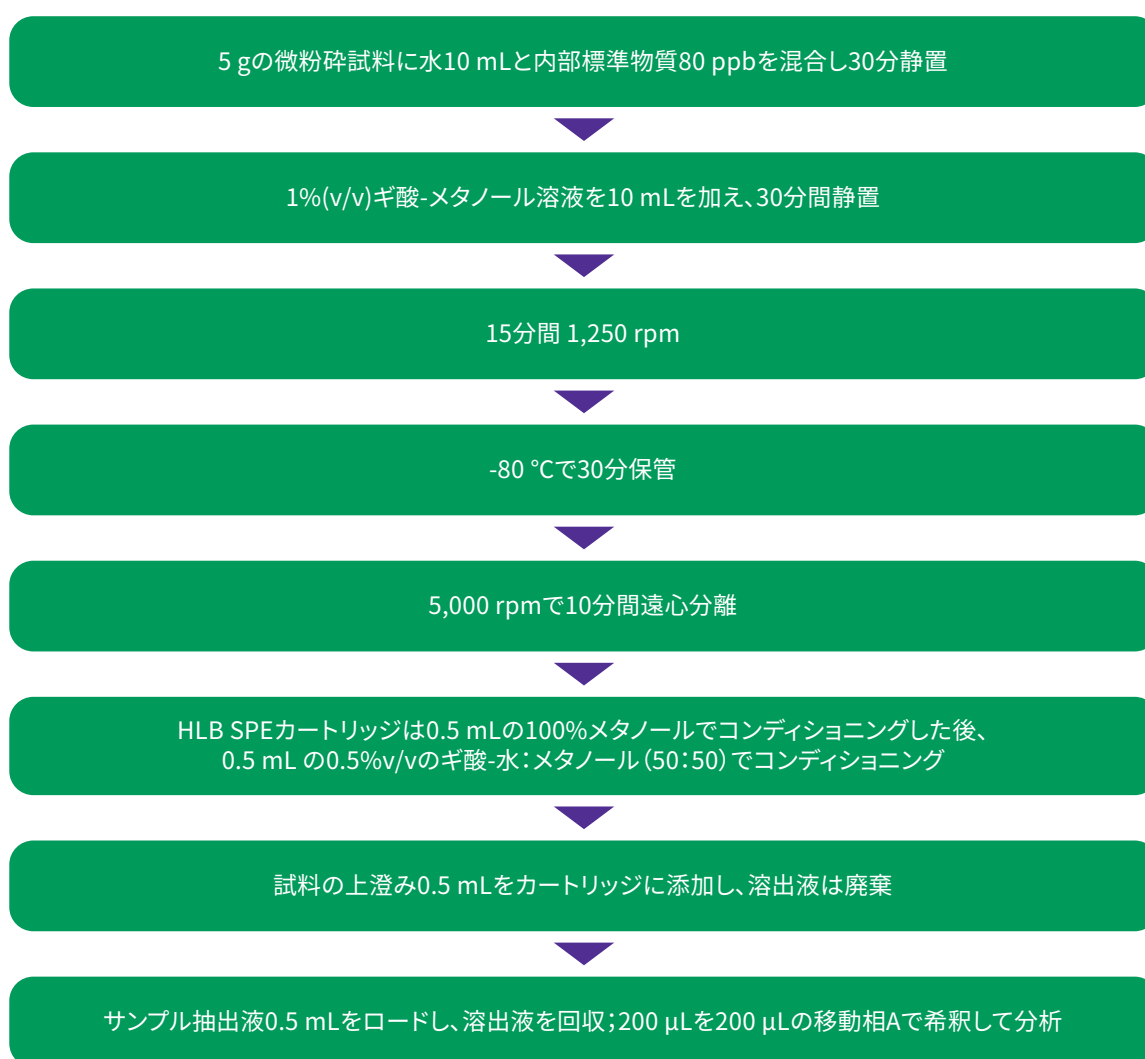


図2. サンプル前処理ステップ

サンプル前処理

抽出方法は、欧州連合（EU）で収穫された果物や野菜を対象とし、Quick Polar Pesticides (QuPPE) 手法に基づき、最終抽出溶媒に0.5%ギ酸-水：メタノール（50：50）を使用しました⁶。

Chamkasem and Harmon⁹が報告した方法と同様に、SupelTM Swift HLBカートリッジを用いた固相抽出（SPE）クリーンアップを行いました。Swift HLBカートリッジは、逆相モードで幅広い分析対象物に適用することができます。今回使用する固相抽出法は化学的な「ろ過」（干渉除去）に基づく方法です。この方法では、サンプル抽出液をHLBカートリッジに通過させ、分析のために溶出液を回収するのみです。HLBは、ターゲット化合物よりも疎水性の高い不純物を保持し、極性分析物は通過させることができます。

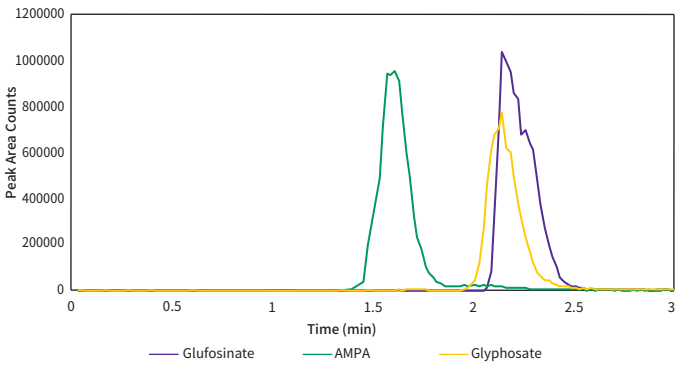
LC-MS/MS法

分析にはSupelTM Carbon LCカラムを使用し、極性の高い分析対象物を良好に保持することができました。水性移動相[A]は炭酸アンモニウム緩衝液（pH9）を使用し、ESI(-)条件下でモニターした分析対象物（図1）のリン酸またはホスホン酸部分を適切にイオン化できるようにしました。また、炭酸アンモニウム緩衝液は揮発性であり、LC/MSに適しています。有機移動相[B]は、アセトニトリル：水（95：5）としました。表1にMSの分析対象パラメータを示します。図3は、標準注入のクロマトグラムとLC装置のパラメーターを示しています。

外部検量線は内部標準を使用し、0.25%（v/v）ギ酸-水：メタノール=75:25で調製しました。検量線の濃度範囲は3 ng/mLから200 ng/mLで、直線性は各化合物でR² 0.99より良好でした。グリホサートの代表的な検量線は図4に示します。

表1. 分析対象のMSパラメーター

Compound		Q1	Q3	DP	EP	CX
Glyphosate	Quant	168	63	-30	-5.9	-26
	Qual	168	124	-30	-5.5	-16
Glyphosate-2- ¹³ C, ¹⁵ N	Quant	167	63	-30	-6.5	-28
	Qual	110	80	-15	-10.0	-36
AMPA	Quant	110	63	-15	-10.0	-28
	Qual	110	80	-15	-10.0	-36
AMPA- ¹³ C, ¹⁵ N	Quant	112	63	-15	-6.5	-24
	Qual	180	95	-50	-10.0	-24
Glufosinate	Quant	180	63	-50	-6.0	-56
	Qual	180	95	-50	-10.0	-24
Glufosinate-D ₃	Quant	183	63	-50	-5.0	-70



LC Conditions				
Instrument:	Agilent 1290 HPLC with AB Sciex Triple Quad 6500+			
Columns:	Supel™ Carbon LC, 10 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 μm (59986-U)			
Mobile phase:	[A] 20 mM ammonium carbonate pH9; [B] acetonitrile:water (95:5)			
Gradient:	Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
	0.0	100	0	0.2
	3.0	100	0	0.2
	3.1	0	100	0.5
	5.0	0	100	0.5
	5.1	100	0	0.2
	8.0	100	0	0.2
	Column Temp.:	30 °C		
Detection:	ESI (-) MS/MS (図1参照)			
Injection:	20 μL			
MS Parameters				
Voltage:	-4,500 V			
Curtain gas:	30			
Source temp:	600 °C			
Gas 1 / Gas 2:	50 / 70			

図3. SupelTM Carbon LCカラムを用いたグリホサート、AMPA、グルホシネートのLC/MS分析条件。各分析物の定量ランジションと100 ng/mLキャリブレーションスタンダード

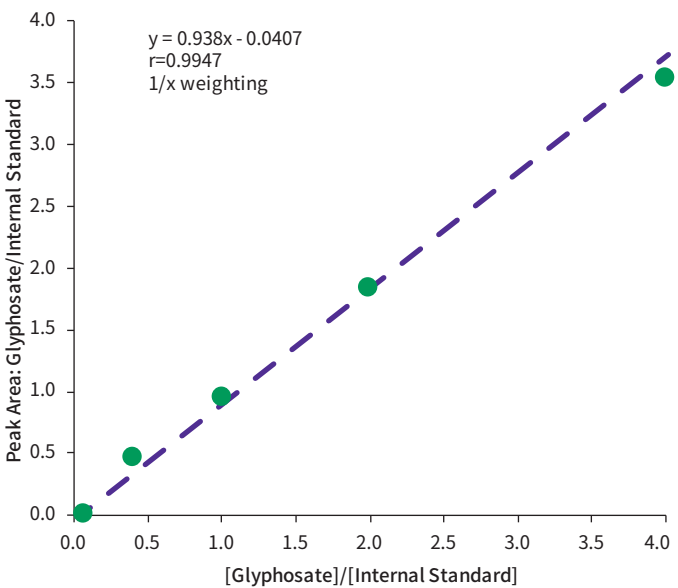


図4. グリホサートの代表的な検量線。グリホサートのキャリブレーターは3～200 ng/mLで内部標準物質濃度は 50 ng/mL

結果

分析検討

サンプル前処理は溶媒抽出を使用しました。SPEはサンプルをカートリッジに通すだけでよいためクリーンアップのファーストチョイスとなりました。分析対象物はすべて極性であるため、Supel™ Swift HLBに保持されず、良好な回収率が期待されました。

この方法は簡単な希釈ステップの後、調製した抽出物を注入することが可能です。HPLCカラムからの溶出は、移動相と同じ水溶性炭酸緩衝液で行いました。その後、アセトニトリルを用いてカラム洗浄を行いました。抽出されたサンプルを複数回 (n>100) 注入しても、有意な保持時間の変化は生じませんでした。例えば、5日間の注入と2種類の移動相を用いた場合の保持時間の変動はRSD 3.2%であり、このLCメソッドの堅牢性を示しています。

オーガニックのオートミール試料について、グリホサートおよび関連化合物のスクリーニングを行いました。これらの結果を表2に示します。すべての化合物がサンプルに存在することが確認され、このメソッドの感度の高さが示されました。分析対象物の全体濃度が最も低いサンプルNをメソッドの検証に使用することにしました。

表2. 有機オーツ麦のバックグラウンド分析結果

Cereal	Glyphosate (ppb)	AMPA (ppb)	Glufosinate (ppb)
Sample S	8.0	38	44
Sample Z	4.8	198	39
Sample N	24.6	<LOQ	<LOQ
Water control	ND	ND	ND

試料Nは3つの分析対象物のLOQを測定するため、6回行われ24 ppbがスパイクされています。回収率は80~120%以内、RSDは15%以下であることが確認されました。LOQはS/N比10:1で計算しました。

- Glyphosate 6 ppb
- AMPA 11 ppb
- Glufosinate 8 ppb

試料Nは、80 ppbと800 ppbの両方のレベルで3つの分析対象物をスパイクしました。800 ppbスパイクしたサンプルのグリホサートとAMPAのクロマトグラムを図5に示します。定量結果は表3に示します。3つの分析対象物のすべてが、両方のスパイクレベルで検出され定量することが出来ました。メソッドの精度は、回収率として測定し、既知のスパイク量です。80 ppbと800 ppbのスパイクの場合、グリホサートの回収率は124%と96%、AMPAの回収率は132%、104%で、グルホシネートは初日で80%、88%であった。2日目のテストでも同様の回収率となりました。

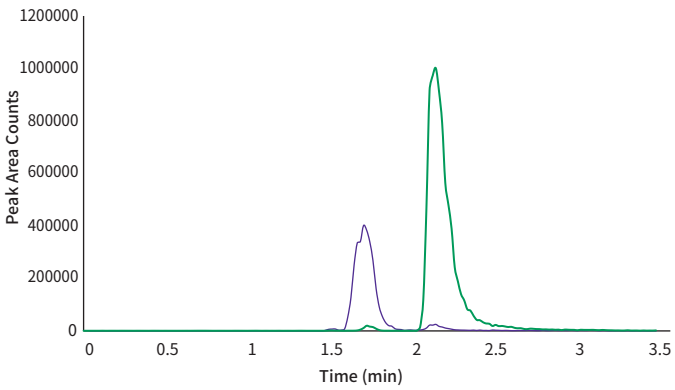


図5. グリホサート（緑色）とAMPA（紫色）は、800 ppbでオートミールにスパイクさせたもの

表3. オーガニック表示のある穀物・穀類に80 ppbと800 ppbにスパイクしたメソッドバリデーションの結果

Spiking level (n=5)	Compound	Day 1% recovery (%RSD)	Day 2% recovery (%RSD)
80 ppb	Glyphosate	124 (6)	134 (7)
	AMPA	132 (6)	106 (13)
	Glufosinate	80 (18)	109 (6)
800 ppb	Glyphosate	96 (3)	96 (4)
	AMPA	104 (10)	91 (7)
	Glufosinate	89 (4)	111 (5)

穀物中のグリホサートの同定と定量

提案した方法で穀物中のグリホサート分析の結果を表4に示します。これらのサンプルは食料品店で購入したもので、サンプルNには「オーガニック」のラベルが貼られていました。

表4. オート麦入りシリアル分析結果

Samples n=3	Glyphosate (ppb)	% RSD	AMPA (ppb)	%RSD	Glufosinate (ppb)	% RSD
Sample N	24.6	5.0	<LOQ	n/a	<LOQ	n/a
Sample C	178.0	3.0	12	1.4	<LOQ	n/a
Sample R	259.0	9.7	41	9.9	<LOQ	n/a

まとめ

今回の検討したグリホサートおよび関連化合物の分析法では、塩基性pH条件下で安定なSupel™ Carbon LCカラムを用いたLC-MS/MSを使用しました。このカラムは、抽出溶媒としてメタノールの存在下で、極性分析対象物の十分な保持を実現しました。移動相には、質量分析に適合し、効率的なイオン化を可能にする20 mM炭酸アンモニウムバッファーを使用しました。オート麦のシリアルサンプルについては、メタノールと水の混合液を用いたQuPPE手法に基づく抽出を行い、その後Supel™ Swift HLB SPEを用いたクリーンアップを行いました。安定同位体標識した内部標準物質を使用することで、グリホサートおよび関連化合物の精度が高くなりました。トリプルクワッドMS検出を用いたこのメソッドにおけるグリホサートの定量限界 (LOQ) は、6 ppbでした。オート麦を含むシリアルには、25~260 ppbのグリホサートを含んでいることが分かりました。

References

- Grossmann E., What Do We Really Know About Roundup Weed Killer?; National Geographic Apr 23, 2015, <http://news.nationalgeographic.com/2015/04/150422-glyphosate-roundup-herbicide-weeds/> (accessed December 17, 2021).
- Glyphosate; tolerances for residues. § 180.364 <https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2020-title40-vol26/CFR-2020-title40-vol26-sec180-364> (accessed January 14, 2022).
- European commission EU pesticide database, pesticide residue(s) and maximum residue levels (mg/kg) https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/?event=details&pest_res_ids=120,320&product_ids=236,237&v=1&e=search.pr (assessed January 12, 2022)
- Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water-Supplement I (EPA/600/4-90-020). This document is available through NTIS (<http://www.ntis.gov>). https://www.nemi.gov/methods/method_summary/4806/ (accessed January 25, 2022).
- Ehling, S.; Reddy, T.M. Total Residue Analysis of Glyphosate and Three Metabolites in Soy and Milk-based Nutritional Ingredients by Derivatization with Fluorenylmethyloxycarbonyl Chloride and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Poster in Proceedings of ASMS, San Antonio, TX, 2016EURL-SRM
- Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement Quick Polar Pesticides Method, I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method), Version 12, https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPPE_PO_V12.pdf (accessed December 17, 2021)
- Nagatomi, Y., et al. Simultaneous LC-MS/MS Analysis of Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolic Products in Beer, Barley Tea, and Their Ingredients, BioSci. Biotechnol. Biochem., 2013, 77 (11), 2218–2221. DOI: 10.1271/bbb.130433

- Shimelis O., LC-MS/MS Method for Determination of Glyphosate, AMPA, and Glufosinate in Cereals; Chromatography Today, Jun 12 2019, <https://www.chromatographytoday.com/article/lc-ms/48/milliporesigma/lc-msms-method-for-determination-of-glyphosate-ampa-and-glufosinate-in-cereals/2556> (accessed Dec 22, 2021)
- Chamkasem., N.; Harmon, T. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 2016, 408(18), 4995–5004. DOI: 10.1007/s00216-016-9597-6

注目製品

製品名	カタログ番号
HPLCカラム & 固相抽出	
Supel™ Carbon LC, 10 cm x 2.1 mm, 2.7 µm	59986-U
Supel™ Swift HLB SPE Tubes, 30 mg/1 mL, Pk. 108	57493-U
標準物質	
Aminomethylphosphonic acid (AMPA), analytical standard PESTANAL®, 50 mg	05164
Glyphosate, analytical standard PESTANAL®, 250 mg	45521
Glufosinate-ammonium, analytical standard PESTANAL®, 100 mg	45520
Glyphosate	89432
Glufosinate-ammonium	49677
Glyphosate-2- ¹³ C, ¹⁵ N, analytical standard PESTANAL®, 5 mg	90479
溶媒、試薬、アクセサリ (クロマト周辺製品)	
Acetonitrile hypergrade for LC-MS LiChrosolv™	1.00029
Methanol UHPLC, suitable for mass spectrometry (MS)	900688
Ammonium hydrogen carbonate, for LC-MS LiChropur™, 50 g	5.33005
Formic acid, puriss. p.a., ACS reagent, reag. Ph. Eur., ≥ 98%	33015
Brand Centrifuge tubes, PP, w/caps, 50 mL, Pk. 300	BR114820
Pyrex disposable culture tubes, rimless, 10 mL, Pk. 1000	CLS9944513

関連製品

製品名	カタログ番号
溶媒、試薬	
Methanol for UHPLC-MS LiChrosolv™	1.03726
Acetonitrile for UHPLC-MS LiChrosolv™	1.03725
Ammonia solution 25%, for HPLC LiChropur™	5.43830
Formic acid for LC-MS LiChropur™, 97.5-98.5% (T)	00940
標準物質	
Glyphosate, certified reference material, TraceCERT™, 100 mg	89432
Glyphosate-2- ¹³ C, PESTANAL®, analytical standard, 5 mg	90007
Glufosinate-ammonium, certified reference material, TraceCERT™, 100 mg	49677



**HPLC
カーボンカラム
のカタログはこちらで
入手可能です。**

<http://bit.ly/3ZV33vh>

**Supel™ Swift
固相抽出カートリッジ
のカタログはこちらから
入手可能です。**

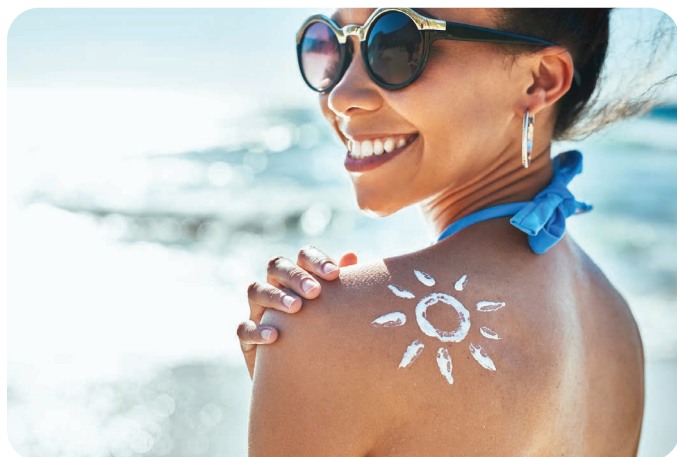
<https://bit.ly/3ZBZXgs>



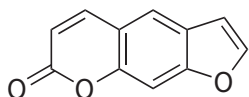
日焼け止めの安全性が気になる？

フロクマリン類の認証標準物質グレードの混合溶液

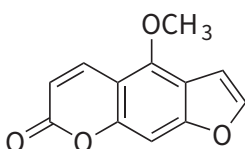
Matthias Nold, Product Manager Reference Materials, Analytix@milliporesigma.com



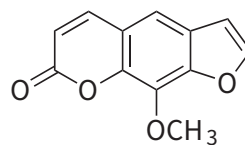
フロクマリン類は、様々な植物が作り出す化学物質の一種ですが、セリ科とミカン科の植物に多く含まれており、柑橘系のオイル抽出物等にも含まれています。一般に、フロクマリン類の化学構造は、**図1**に示すように、クマリンと融合したフラン環を含んでいます。



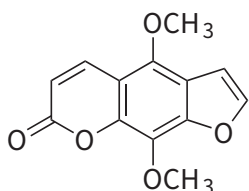
Psoralen



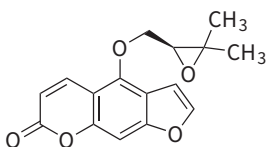
Bergapten



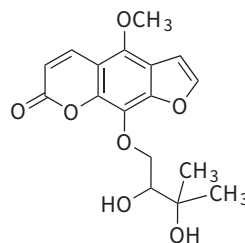
Xanthotoxin



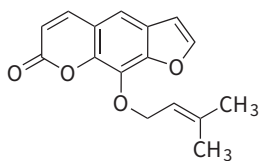
Isopimpinellin hydrate



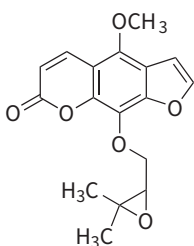
Oxypeucedanin



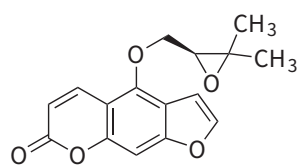
Oxypeucedanin



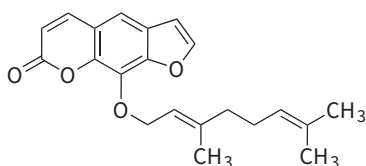
Byakangelicol



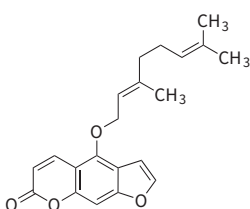
Byakangelicin



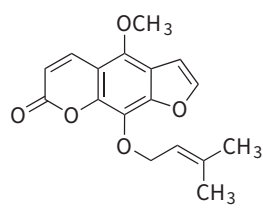
Heraclenin



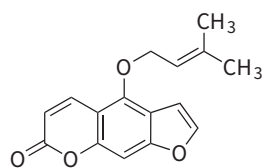
8-Geranyloxypsoralen



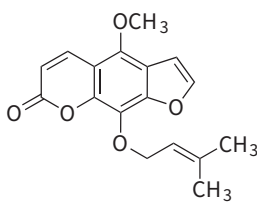
Bergamottin



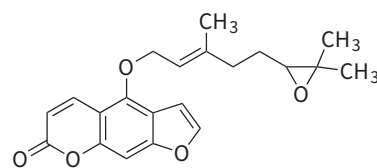
Imperatorin



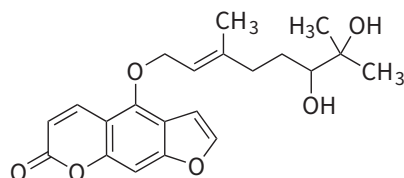
Isoimperatorin



Phellopterin



Epoxybergamottin



6',7'-Dihydroxybergamottin

図1. Chemical Structures of Furocoumarins

フロクマリンは紫外線によって活性化され、毒性を発揮することがあり、EUでは日焼け止めやブロンズ製品の柑橘類由来の成分は、フロクマリン含有量が1 mg/kg以下でなければなりません。

国際化粧品香料協会 (IFRA) は、HPLC-DADによるフロクマリンの公式分析方法を開発しています。Supelco®では、IFRA法のための認証標準物質グレードの混合溶液を提供しています。

Key Features

- NIST SRMにトレーサブルな認証標準物質 / TraceCERT™ シリーズ
- ISO 17034に基づき製造
- 混合溶液のそれぞれの物質はq-NMRで認証 (ISO/IEC 17025 認定の元)
- LC法による均質性、長期安定性の試験
- 総合的な不確かさを含む包括的な証明書を提供

Product Number	93102
Product Name	Furocoumarin Mix
Quality	certified reference material, TraceCERT™
Solvent	Acetonitrile
Concentrations	250 mg/kg per component
Package Size	1 mL

Components:

Compound	CAS No.	カタログ番号
Psoralen	66-97-7	55738*
Bergapten	484-20-8	55991*
Xanthotoxin	298-81-7	55992*
Isopimpinellin	482-27-9	56182*
Oxypeucedanin	737-52-0	63346*
Oxypeucedanin hydrate	24724-52-5	63354*
Byakangelicol	61046-59-1	63399*
Byakangelicin	19573-01-4	63503*
Heraclenin	35740-18-2	63353*
8-Geranyloxypsoralen	71612-25-4	56349*
Bergamottin	7380-40-7	56393*
Imperatorin	482-44-0	55996*
Isoimperatorin	482-45-1	56148*
Phellopterin	2543-94-4	56149*
Epoxybergamottin	206978-14-5	56394*
6',7'-Dihydroxybergamottin	145414-76-2	56446*

*coming soon also as single component reference material

Note: The components of the mix will also be made available as neat certified reference materials under the product numbers listed above.

化粧品にフィトケミカルを使用していますか？

原材料のテストやQCのための標準物質をお探しなら、当社の標準物質の包括的なポートフォリオをご覧ください。

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



バルサルタン中のN-ニトロソアミンの測定

Frank Michel, Analytical & Chromatography Scientific Advisor

Sanjay Poman, Application Expert, Mumbai Analytical Laboratory

Sundaram Palaniswamy, Workflow Solutions Manager Advanced Analytical

はじめに

2018年7月、医薬品の規制当局にバルサルタン（**図1**）製品にニトロソアミン不純物であるニトロソジメチルアミン（NDMA）の発生について報告がありました¹。バルサルタンは、アンジオテンシン-イルレセプターブロッカーで、高血圧症の治療に使用されます。バルサルタンは、テトラゾール基（4つの窒素と1つの炭素を持つ環）を共通に持つサルタンと呼ばれる構造に関連した化合物群に属します²。その後、他のサルタン系医薬品やラニジジン医薬品にN-ニトロソジエチルアミン（NDEA）、N-ニトロソジイソプロピルアミン（NDIPA）、N-ニトロソエチルイソプロピルアミン（NEIPA）、N-ニトロソジブチルアミン（NDBA）などの他のニトロソアミン不純物の混入が明らかになりました。そしてバルサルタン原薬を使用した医薬品の世界的な回収が行われ、バルサルタン原薬を使用した医薬品が暫定的に市場で不足する事態となりました。

N-ニトロソアミンはニトロソ官能基（-N=O）を持つ化合物です。世界保健機関（WHO）の国際がん研究機関（IARC）によると、ニトロソアミンの多くは動物に対して発がん性や遺伝毒性があり、人に対する発がん性物質の可能性があるととしています。規制当局と原薬メーカーはニトロソアミンは、製造工程で酸性条件下で2級または3級アミンと亜硝酸塩を反応により生成することを発見しました。サルタンはテトラゾール環の形成に亜硝酸ナトリウムを必要とし、その結果、N-ニトロソアミンが生成されることがあります。ま

た汚染された溶媒、試薬、製造装置でニトロソアミンが添加される可能性もあります³。このため、欧州薬局方（Ph.Eur.）委員会がで、原薬中のニトロソアミンについて1 ppm未満の暫定規制値を設定、2020年末に30 ppbに引き下げました⁴。

この基準での測定は高感度かつ高選択的な分析技術を使用する必要があります。ほとんどのメソッドは、GC-MSまたはHPLC-MSを使用しています⁵⁻⁷。その分析には複数のニトロソアミン、原薬、製剤があり不純物検査のために特別な試験法が必要となります。

本研究では、バルサルタン製剤中の5種類のニトロソアミン不純物（NDMA、NDEA、NEIPA、NDIPA、NDBA）を、米国食品医薬品局（FDA）のガイドラインに従って、EI MRMモードのGC-MS/MSで試験しました。FDAのOffice of Testing and Research（OTR）が公表しているメソッドの1つをメソッド開発のベースとして使用⁸、メソッドバリデーションは米国薬局方（USP）の要求事項にそって実施しました⁹。

実験

GC-MS/MS法では、幅広いニトロソアミンに対応するため、液体注入法を採用しました。OTR法とは逆に、膜厚の薄い（1 μmではなく0.5 μm）ワックスカラムを選択しました。しかし、これはクロマトグラフィーに関するUSP General Chapter<621>に従うものです¹⁰。クロマトグラフィー、およびMS/MSの条件を示します（**表1～表3**）。

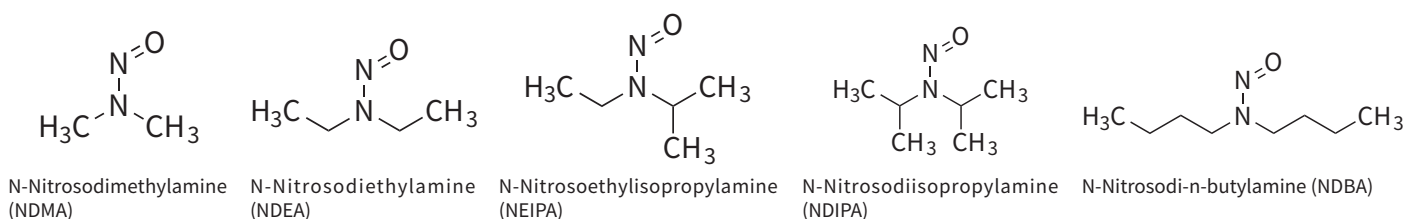


図1. 今回検討したN-ニトロソアミン

表1. クロマトグラフィー条件と試料の調製

Experimental Conditions	
Column:	SUPELCO WAX 10, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.5 µm (24284)
Oven:	40 °C (0.5min), 20 °C /min to 200 °C , 60 °C /min to 250 °C (3 min)
Inj. temp.:	250 °C
Carrier gas:	Helium, 1.0 mL/min
Detector:	MS/MS (表 2、表 3 参照)
Injection:	2 µL – Splitless pulsed injection
Liner:	4 mm single taper liner with glass wool
Sample diluent:	Dichloromethane
Sample preparation:	ピルカッターを使い、1錠ずつ四つにカットし、15 mL の遠沈管に入れます。その後 5 mL のジクロロメタンを添加します。 次に試料を1分間ボルテックスした後、4,000 rpm で2.5分間遠心分離を行います。使い捨てピペットを用いて、約 2 mL のジクロロメタン層を、0.45 µm PVDF フィルターを付けた 5 mL シリンジに移します。 約 0.5 mL の試料を 2 mL バイアルにろ過し、キャップをします。
Standard solutions:	2.5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, 80 ng/mL, and 100 ng/mL each prepared in dichloromethane (NDMA/NDEA/NEIPA/NDIPA/NDBA)

表2. MS/MS条件

MS/MS Conditions	
Tuning:	Auto-tuning
Acquisition:	MRM (EI mode)
Collision gas:	Nitrogen @ 1.5 mL/min
Quench gas:	Helium @ 4.0 mL/min
Solvent delay:	7 min
MS source temperature:	230 °C
Quad temperature:	150 °C
Electron energy:	70 eV
Dwell time:	50 ms

表3. 5種類のニトロソアミンのMRM

Peaks	Compound	Transition	Retention Time
1	NDMA MRM1	74→44	6.952
	NDMA MRM2	74→42	6.952
2	NDEA MRM1	102→85	7.533
	NDEA MRM2	102→56	7.528
3	NEIPA MRM1	116→99	7.784
	NEIPA MRM2	71→56	7.787
4	NDIPA MRM1	130→42	7.971
	NDIPA MRM2	130→88	7.976
5	NDBA MRM1	158→99	9.497
	NDBA MRM2	84→56	9.494

5つのニトロソアミンを10分以下で分離することが出来、ターゲットピークも溶媒やマトリックスのピークからうまく分離することが出来ました(図2)。観察されたリテンションタイムは、FDA OTR法と比較してより短くなっており、これはGC カラムの膜厚が薄いことに起因していると考えられます。

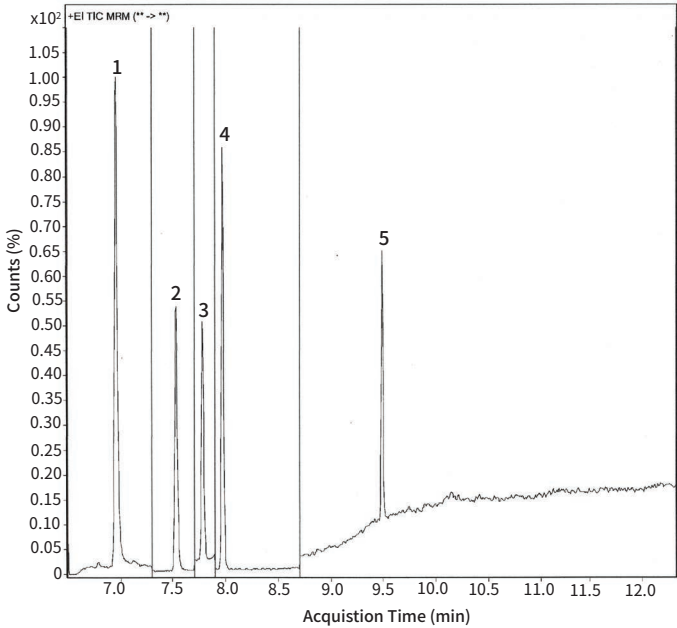


図2. 40 ng/mLでのシステム適合性溶液のクロマトグラムの一例。ピーク番号については、表3をご参照ください。

低い検出限界は複数のMRM実現するために、2つのトランジションによるMRMで確認しました。2つの例を図3にクロマトグラムで示します(S/N比10以上で、2.5 ppbの低濃度)。

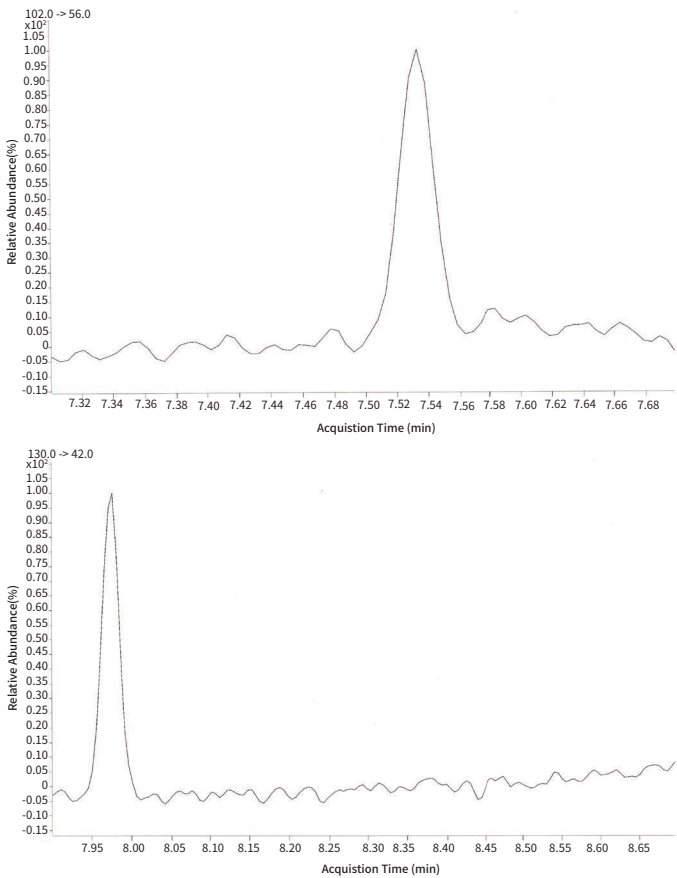


図3. もっとも低い2.5ppbのクロマトグラム 上段：NDEA、下段：NDIPA

メソッド適合性

バリデートされたFDA-OTR法では、40 ng/mL の標準液を 6 回繰り返し注入した場合の% RSDを $\leq 5\%$ としています。この方法で測定した結果、両MRMですべての不純物について5%未満となりました(表4)。

表4. 40 ng/mLニトロソアミン標準液の6回連続注入の精度

Compound	% RSD for MRM1	% RSD for MRM2
NDMA	1.8	1.3
NDEA	1.1	1.1
NEIPA	4.2	1.5
NDIPA	0.9	2.2
NDBA	4.3	3.0

さらに、その相関係数(r^2)はの直線検量線は、 ≥ 0.998 とされ、今回の検討では5つのニトロソアミンについて両MRMでこれを満たす値となりました。(表5)。

表5. 両MRMにおけるニトロソアミンの相関係数(r^2)

Impurity	MRM1	MRM2
NDMA	0.9994	0.9995
NDEA	0.9991	0.9995
NEIPA	0.9995	0.9995
NDIPA	0.9996	0.9994
NDBA	0.9983	0.9981

バルサルタン製剤への適用について

地元の薬局で購入した市販のバルサルタン製剤に、製剤中の濃度が10 ppb (NDBAは40 ppb) となるようにニトロソアミン系不純物をスパイクしました。ニトロソアミンの回収率を測定したところ、それぞれ94.5~105.7%の範囲となりました。(表6)。

表6. スパイクされた薬品中のニトロソアミンの回収率

Impurity	Recovery of 10 ppb in drug product
NDMA	99.0%
NDEA	103.5%
NEIPA	94.5%
NDIPA	103.9%
NDBA	105.7%

FDA-OTR法では、バルサルタン製剤中のニトロソアミンの定量限界(LOQ)は8~40 ppbの範囲であるとしています。弊社の方法では、バルサルタン製剤においてさらに低いLOQを確認しました(表7)。LOQは、各化合物のシグナル/ノイズ(S/N)比10に基づく検量線から算出し、バルサルタン錠剤への標準添加実験によって検証しました。検出限界(LOD)は、シグナル/ノイズ(S/N)比3で計算しました。

表7. FDA-OTR法と弊社の実験におけるLOQ

Impurity	FDA-OTRのLOQ [ppb]	弊社実験によるLOQ [ppb]
NDMA	13	3
NDEA	8	5
NEIPA	8	3
NDIPA	8	5
NDBA	40	32

まとめ

ニトロソアミン不純物の定量は、FDA-OTR法に基づき、SUPELLOWAXカラムを用いたMRMモードのGC-MS/MSで容易に達成することができました。すべてのニトロソアミンは、溶媒やマトリックスのピークからだけでなく、互いによく分離され、システム適合性の要件を満たしていました。このメソッドは、ニトロソアミン不純物が混入したバルサルタン製剤の分析に有効です。

References

- WHO. Information Note Nitrosamine impurities. www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/en/ (accessed Nov. 2021)
- European Medicines Agency (EMA). Notification to the CHMP/EMA Secretariat of a Referral under Article 31 of Directive 2001/83/EC. www.ema.europa.eu/en/documents/referral/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-notification_en.pdf (accessed Nov. 2021)
- EMA. Referral under Article 31 of Directive 2001/83/EC angiotensin-II receptor antagonists (sartans) containing a tetrazole group. www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf (accessed Nov. 2021)
- European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM). Ph. Eur. Commission adopts a new general chapter for the analysis of N-nitrosamine impurities. 07.12.2020, www.edqm.eu/en/news/ph-eur-commission-adopts-new-general-chapter-analysis-n-nitrosamine-impurities (accessed Nov. 2021)
- FDA. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan). <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan> (accessed Nov. 2021)
- EDQM. Ad-hoc projects of the OMCL Network / Methods for determination of nitrosamines. www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network (accessed Nov. 2021)
- Taiwan Food and Drug Administration (TFDA). Analytical Methods. www.fda.gov.tw/ENG/siteList.aspx?sid=10360 (accessed Nov.2021)
- US FDA. Combined Direct Injection N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), and N-Nitrosodibutylamine (NDBA) Impurity Assay by GC-MS/MS, www.fda.gov/media/123409/download (accessed Nov. 2021)
- USP General Chapter <1225> Validation of Compendial Procedures, USP43-NF38
- USP General Chapter <621> Chromatography USP43-NF38

注目製品

製品名	カタログ番号
GC カラム	
SUPELCOWAX 10 GC Capillary Column 30 m × 0.25 mm, df 0.50 µm	24284
溶媒	
Dichloromethane for GC-MS SupraSolv™	1.00668
標準物質	
N-Nitrosodimethylamine Certified Reference Material 5000 µg/mL in methanol	CRM40059
N-Nitrosodimethylamine USP Reference Standard	1466674
N-Nitrosodimethylamine Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material	PHR2407
N-Nitrosodiethylamine Certified Reference Material 5000 µg/mL in methanol	40334
N-Nitrosodiethylamine USP Reference Standard	1466652
N-Nitrosodiethylamine Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material	PHR2408
N-Nitroso-ethyl-isopropylamine EP Reference Standard	Y0002262
N-Nitroso-ethyl-isopropylamine USP Reference Standard	1466685
N-Nitroso-ethyl-isopropylamine Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material	PHR3609
N-Nitroso-diisopropylamine EP Reference Standard	Y0002263
N-Nitroso-diisopropylamine USP Reference Standard	1466663
N-Nitroso-diisopropylamine Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material	PHR3607
N-Nitrosodi-n-butylamine Certified Reference Material, 2000 µg/mL in methylene chloride	48320-U
N-Nitrosodi-n-butylamine USP Reference Standard	1466641
N-Nitrosodi-n-butylamine Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material	PHR3608
アクセサリー & 周辺製品	
Millex® HV Durapore and (PFDV) 0.45µm syringe filter	SLHV033NS
Inlet Liner, Split/Splitless Type, Single Taper FocusLiner Design (wool packed), pkg of 5 ea (also available as pkg of 1 ea (2879901-U) and pkg of 25 ea (2879925-U))	2879905-U
Supelco® Helium Purifier SS fittings, 1/4 in. Swagelok (nuts and ferrules included)	27601-U
Supelco® Helium Purifier SS fittings, 1/8 in. Swagelok (nuts and ferrules included)	27600-U

製品名	カタログ番号
OMI Tube Holder for use with OMI-2 purifier tubes	23921
OMI-2 Purifier Tube	23906
Super Clean (Base-Plate Design) Gas Purifier triple trap (hydrocarbon, moisture, oxygen)	SU861026
Super Clean (Base-Plate Design) Base Plate single position, size 1/8 in.	SU861011
Super Clean (Base-Plate Design) Kit carrier gas kit (includes SU861026 + SU861011)	28878-U

関連製品

製品名	カタログ番号
Valsartan Pharmaceutical Secondary Standard; CRM	PHR1315
Valsartan EP Reference Standard	Y0001132
Valsartan BP Reference Standard	BP1161
Valsartan USP Reference Standard	1708762
D-Valsartan (Valsartan Related Compound A), Pharmaceutical Secondary Standard; CRM	PHR1875
D-Valsartan (Valsartan Related Compound A), USP Reference Standard	1708773
Valsartan Related Compound B USP Reference Standard	1708784
Valsartan Related Compound B Pharmaceutical Secondary Standard; CRM	PHR1876
Valsartan Related Compound C USP Reference Standard	1708795
Valsartan Related Compound C Pharmaceutical Secondary Standard; CRM	PHR1877
Valsartan Related Compound E USP Reference Standard	1708810
Valsartan Related Compound E Pharmaceutical Secondary Standard; CRM	PHR1878
Valsartan Chiral System Suitability Mixture solution	V-073
Valsartan for peak identification EP Reference Standard	Y0001131
Valsartan for system suitability EP Reference Standard	Y0001145

薬局方標準物質に関する情報は、下記をご覧ください。

SigmaAldrich.com/pharmastandards

GCカラムをどのようにして選びますか？

An optimized chromatographic separation
begins with the right column

GCカラム選択ガイドでは、以下の情報を提供しています。

- カラム選択
- 考慮すべきパラメータ
- どのような用途にどのような液相が適しているか

GCカタログはこちらから入手できます。

<https://bit.ly/3J36DgH>



LC-UV/MSを用いた抽出物調査

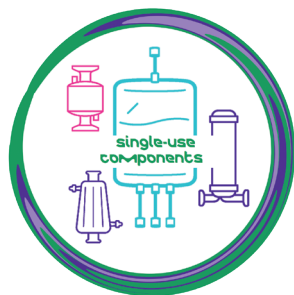
抽出物および浸出物の認証標準物質 (CRM) 混合溶液を用いたシングルユースシステムの未知抽出物の効率的な同定と定量化

Tim Mueller, Scientist Liquid Chromatography-Mass Spectrometry;

Marc Gemeinder, Project Manager for Extractables and Leachables Studies;

Saskia Haehn, Manager Extractables and Leachables Laboratory;

Matthias Nold, Product Manager Reference Materials; Analytix@milliporesigma.com



Single-Use Equipment

Analytix Reporter誌の8号では、シングルユースの装置で抽出物および浸出物 (E&L) を検出するGC/MSメソッドを紹介しました。さらに、最も一般的な抽出物を効率的に検出・定量するために、GC用のTraceCERT™抽出物および浸出物認定標準物質 (CRM) ミックスを使用することの利便性も実証しました。

ここでは、LC-UV/MSに基づくE&L研究により、液体クロマトグラフィー法に対応するCRMミックスの使用について紹介します。

高分子材料でできたシングルユースシステム (SUS) は、医薬品の製造や取り扱いにおいて一般的に使用される部品です。このような直接の接触は、高分子材料成分の製品への溶出による医薬品の汚染につながる可能性があります。

このリスクを管理するためには、材料から移行する可能性のある化合物を把握すること (抽出性試験) と、ある条件下で移行が起る量を把握すること (溶出性試験) が重要です。

BPOG (BioPhorum Operations Group) ガイドライン¹やUSP <665> guidelines for polymeric components and systems² (ドラフト版) にあるように、抽出物に関する調査は、さまざまな溶媒や培養時間を用いて行い、抽出物にさまざまな分析方法を適用して分析する必要があります。

添加物、不純物、ポリマー成分、分解生成物などの不揮発性抽出物の分析には、液体クロマトグラフィー-紫外分光法/質量分析法 (LC-UV/MS) が適しています。UVとMSは、幅広い種類の抽出物を検出するために選択されます。一般的に高分子材料の正確な組成は不明であるため、潜在的な抽出物の検出と同定を含むノンターゲット分析が必要です。

このような分析を容易にするために、LC-UV/MS試験で一般的に見られる21種類の抽出物に対するCRM混合溶液を開発しました。このCRMミックスは、未知の抽出物の迅速な同定に役立つだけでなく、NIST SRMへのトレーサビリティを持ち、定量にも使用できます。この混合溶液には様々な物質が含まれているため、潜在的な抽出物を見落とすリスクを低減するため、また、分析法を確認するのに適しています。混合溶液に含まれる21種類の化合物を表2に示します。

浸出物 (Leachables):

製品に接触する材料 (例: シングルユースシステム) から製剤に移行する化合物。プロセスや保管条件下での直接接触によりおこり、医薬品の毒性または効率に影響を与える可能性があります。

抽出物 (Extractables):

通常、極端な条件下 (過酷な溶媒、膨大な時間、温度) で製品接触材料から抽出される化合物。

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ス用の通常高分子で使い捨ての装置

- **利点:**
柔軟性、洗浄バリデーションが不要、低投資、クロスコンタミネーションがない
- **SUSの一例:**
バイオリアクター、ディスポーザブルフィルター、チューブなど

以下では、LC用抽出物・溶出物スクリーニング標準物質を用いて、フィルターの抽出物試験における主要な抽出物の定性と定量を行うアプリケーションについて説明します。

LC Method for Extractables Testing

シングルユース機器（フィルター）のための抽出試験に適用した機器パラメータは、表1にまとめています。BPOGプロトコル¹に従い、分離はC18カラム（Ascentis™ C18 Column: 15 cm x 2.1 mm, 3 μm）で実施しました。50%エタノールを用い、オービタル回転下、40 °Cで24時間抽出した後、サンプルを採取しました。このサンプルと標準物質の混合溶液を1シーケンスで実行しました。

表1. Experimental conditions

Instrument:	Agilent Infinity II, QToF 6546		
Column:	Ascentis™ C18, 15 cm x 2.1 mm, 3 μm (581302-U)		
Mobile Phases:	[A] water; [B] methanol		
Gradient:	Time (min)	%A	%B
	0	100	0
	1	100	0
	15	0	100
	25	0	100
	25.1	100	0
	30	100	0
Flow:	0.5 mL/min		
Columns Temp.:	40 °C		
Detector:	DAD, 191 – 400 nm; MSD, full scan, m/z 75-1500		
Injection:	5 μL		
Samples:	1. Extract of a single use filter (24 h extraction with 50% ethanol) 2. Extractables and Leachables Screening Standard for LC (95636), 10 mg/L in acetonitrile		

結果と考察

LC用抽出物および浸出物スクリーニング標準物質のクロマトグラムを図1、図3に示します（UV、ESI pos、ESI neg、ピークIDは表2）。UV-MS検出器の組み合わせにより、21種類の化合物すべてがほぼ完全に分離して検出されました。また、16種類の参照化合物はUV（220 nm）、13種類の参照化合物はESIポジティブ、14種類の参照化合物はESIネガティブイオンで検出することができました。

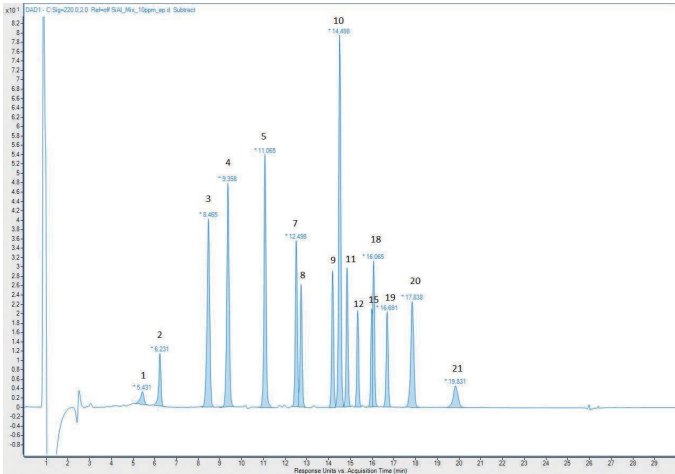


図1. Extractables and Leachables Screening Standard for LC, UV (220 nm), 10 mg/L in acetonitrile.

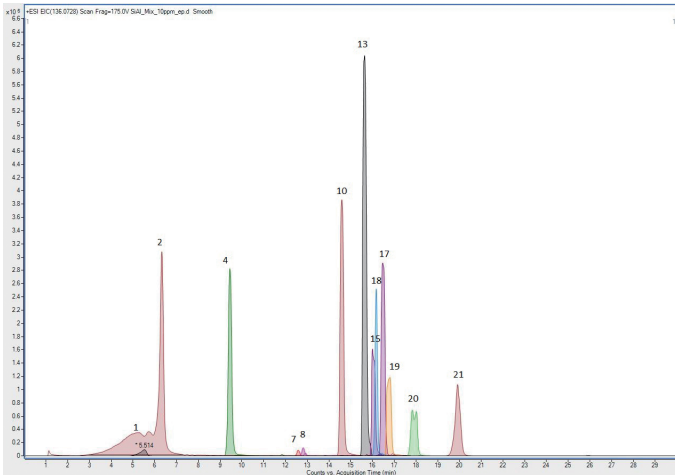


図2. Extractables and Leachables Screening Standard for LC, ESI positive, 10 mg/L in acetonitrile.

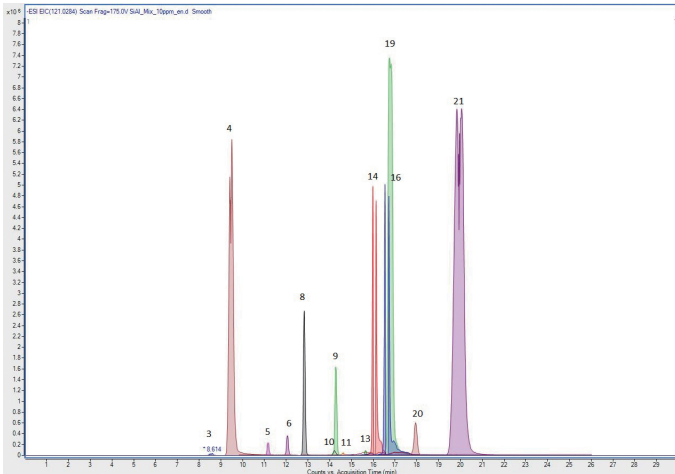


図3. Extractables and Leachables Screening Standard for LC, ESI negative, 10 mg/L in acetonitrile.

保持時間と m/z 比の一致により、Pentaerythritol tetrakis(3,5-di-tertbutyl-4-hydroxyhydrocinnamate) (Irganox 1010) がシングルユースフィルターの抽出時の主抽出物として特定されました (図4参照)。定量的な LC用抽出物・浸出物スクリーニング標準溶液中のPentaerythritol tetrakis(3,5-ditert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate) (Irganox 1010) ピークに対する分析は、UV (220 nm), ESI positiveまたはESI negativeクロマトグラムに基づいて実行されました。



図4. Representative sample of a single-use equipment extraction. Top: Extract Sample of Single Use Filter with 50% Ethanol, bottom: Extractables and Leachables Screening Standard for LC

表2. Peak IDs, selected ions, and retention times of compounds

Peak	Compound	CAS	Molecular Formula	m/z	UV absorption at 220 nm	Most prominent adducts		
						ESI pos	ESI neg	RT [min]
1	ε -Caprolactam	105-60-2	C ₆ H ₁₁ NO	136.0728	very weak	[M+H] ⁺	-	5.43
2	Dibenzylamine	103-49-1	C ₁₄ H ₁₅ N	198.1279	yes	[M+H] ⁺	-	6.23
3	Benzoic acid	65-85-0	C ₇ H ₆ O ₂	121.0284	yes	-	[M-H] ⁻	8.48
4	2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT)	149-30-4	C ₇ H ₅ NS ₂	167.9931	yes	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	9.36
				165.9788				
5	Bisphenol A (BPA)	80-05-7	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	227.1077	yes	-	[M-H] ⁻	11.1
6	2-Ethylhexanoic acid	149-57-5	C ₈ H ₁₆ O ₂	143.1082	no	-	[M-H] ⁻	12.1
7	Bis(4-chlorophenyl) sulfone	80-07-9	C ₁₂ H ₈ Cl ₂ O ₂ S	308.9519	yes	[M+H] ⁺	-	12.5
8	3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl alcohol	88-26-6	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	259.1672	yes	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	12.7
				235.1705				
9	2,4-Di-tert-butylphenol	96-76-4	C ₁₄ H ₂₂ O	205.1597	yes	-	[M-H] ⁻	14.2
10	2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl) benzotriazole	2440-22-4	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O	226.0972	yes	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	14.5
				224.0826				
11	Butylhydroxytoluene (BHT)	128-37-0	C ₁₅ H ₂₄ O	219.1754	yes	-	[M-H] ⁻	14.9
12	1,3-Di-tert-butylbenzene	1014-60-4	C ₁₄ H ₂₂	-	yes	-	-	15.3
13	Oleamide	301-02-0	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2795	very weak	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	15.6
				280.2643				
14	Palmitic acid	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.2331	no	-	[M-H] ⁻	16.1
15	Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	391.2839	yes	[M+H] ⁺	-	16.0
16	Stearic acid	57-11-4	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283.2644	no	-	[M-H] ⁻	16.5
17	Erucamide	112-84-5	C ₂₂ H ₄₃ NO	338.3417	very weak	[M+H] ⁺	-	16.5
18	Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanurate	27676-62-6	C ₄₈ H ₆₉ N ₃ O ₆	806.5084	yes	[M+Na] ⁺	-	16.1
19	Pentaerythritol tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate)	6683-19-8	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1199.7770	yes	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	16.7
				1175.7726				
20	Tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphate	95906-11-9	C ₄₂ H ₆₃ O ₄ P	685.4365	yes	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	17.8
				661.4378				
21	Octadecyl-3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionate	2082-79-3	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	553.4597	yes	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	19.8
				529.4624				

まとめ

この例は、LC分析における抽出物・溶出物スクリーニング標準の適用性と価値を示しています。シングルユース機器から生じる最も一般的な抽出物の分析です。Ascentis™ C18 カラムを使用した LC-UV/MS メソッドでは、21成分の信頼性の高い同定と定量が可能でした。

References

1. Ding et al. Standardized Extractables Testing Protocol for Single-Use Systems in Biomanufacturing, Pharmaceutical Engineering, (2017). <https://ispe.org/pharmaceutical-engineering/ispeak/standardized-extractables-testing-protocol-single-use-systems-0>
2. USP <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.

注目製品

製品名	カタログ番号
Extractables and Leachables Screening Standard for LC, certified reference material, 50 µg/mL per component, 1 mL or 5 mL	95636
Ascentis™ C18, 15 cm x 2.1 mm, 3 µm	581302-U

関連製品

製品名	Pack Size	カタログ番号
Extractables and Leachables Screening Standard for GC, certified reference material, 50 µg/mL per compound in tert-butyl methyl ether	1 mL or 5 mL	01829
Single Component Certified Reference Materials		
Benzoic acid	1 g	PHR1050
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	100 mg	67261

製品名	Pack Size	カタログ番号
Bis(4-chlorophenyl)sulfone	100 mg	CRM96153
Bisphenol A	100 mg	42088
ε -Caprolactam	100 mg	CRM01483
Dibenzylamine (DBA)	100 mg	CRM95728
3,5-Di-tert-4-butyl-hydroxytoluene (BHT)	100 mg	CRM96857
1,3-Di-tert-butylbenzene	100 mg	CRM96659
2,4-Di-tert-butylphenol	100 mg	CRM00437
cis-13-Docosenoamide (Erucamide)	100 mg	CRM01374
2-Ethylhexanoic acid	3 X 1.2 ML	PHR1914
2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)benzotriazole (Drometrizole)	100 mg	CRM96697
2-Mercaptobenzothiazol	100 mg	CRM96051
Octadecyl-3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate (Irganox 1076)	100 mg	CRM00318
Oleamide	100 mg	CRM96709
Palmitic acid	1 g	PHR1120
Pentaerythritol tetrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate) (Irganox 1010)	100 mg	CRM96656
Stearic acid	1 g	PHR1114
Tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphate (Irgafos 168-oxide)	100 mg	CRM96839
Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanurate (Irganox 3114)	100 mg	CRM96737

Solvents

Water for Chromatography (LC-MS Grade) Lichrosolv™ (or water tab fresh from a Milli-Q® IQ ultrapure water system)	1.15333
Methanol, gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv™ Reag. Ph Eur	1.06007

To see our complete portfolio visit us at
SigmaAldrich.com/extractablesandleachables

LC-MS分析で一貫した結果を得るために

低分子から高分子までのLC-MSワークフローに対応した実績ある分析のためのセクションをご紹介します。

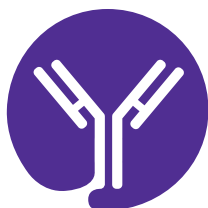
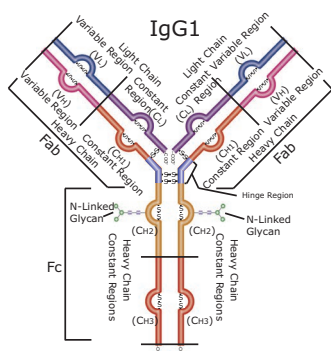
SigmaAldrich.com/lcms



BIOshell™ A400 Protein C4カラムを用いた 治療用モノクローナル抗体トラスツズマブの分析

インタクトなモノクローナル抗体 (mAbs) の高速・高分解能解析

Sundaram Palaniswamy, Segment Lead, Pharma QC; Aditya Pratihast, Application Scientist



概要

逆相で分析される低分子の大半は1500 Da以下の質量ですが、治療用タンパク質やタンパク質薬物複合体の分離では、HPLCカラムの性能を向上させる必要性が高まっています。このアプリケーションノートでは、インタクトな治療用モノクローナル抗体であるトラスツズマブの分析を逆相モードで高分解能で高速かつ再現性の高いことを示しました。BIOshell™ A400 Protein C4 カラムを使用すると、5分以内に分離と定量が可能で、さらに熱ストレス試験で生じた分解化合物をモニタリングすることができます。

はじめに

ここ数年、モノクローナル抗体 (mAb) は医薬品市場で最も売れている医薬品となり、2018年には世界で最も売れている医薬品トップ10のうち8つが生物学的製剤となりました。世界の治療用モノクローナル抗体市場は、2018年に約1,150億ドルで、2025年には3,000億ドルにまで成長すると言われています。また、2019年12月時点で、79種類の治療用mAbが米国FDAにより世界中で販売承認されていますが、その数は今後増加する可能性が大きいとされています¹。

- 1) インタクトなmAbの分析には、サイズ排除クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーによるHPLCが確立されています。しかし、逆相 (RP) 分野の技術進歩により、インタクトなタンパク質に対する分析法として有望視されています²。
- 2) インタクトなmAbは分子サイズが大きいため、ワイドポアの完全多孔質粒子では移動が遅く、分析時間が長くなるため、まだ分析に成功した例はほとんどありません。

一方で表面多孔質粒子は、これらの課題を克服しています。ロード性が低く、固定相の種類も限られています。分離能の高いコアシェルカラムは、インタクトなmAbを迅速かつ高効率に分離することができます。

ここでは、BIOshell™ A400 Protein C4カラムがRP-HPLCを用いたインタクトなトラスツズマブの高速・高分離分離に適していることを検証しました。メソッドの保持時間および面積精度は良好で、このカラムの適合性が実証されました。さらに、バイオ医薬品のQCアプリケーションに非常に適した定量性と頑健性も示されました。

実験

本実験は島津製 LC-2010CHT HPLCシステムで行い、治療薬のトラスツズマブは地元の薬局から購入しました。

分析方法

BIOshell™ A400 Protein C4カラムを用いたインタクトなトラスツズマブのクロマトグラフィーパラメータを表1に示します。

表1. トラスツズマブのRP HPLC分析に使用した
クロマトグラフィーパラメーター

LC Parameters			
Column:	BIOshell™ A400 Protein C4, 100 x 2.1 mm I.D., 3.4 µm (66825-U)		
Mobile Phase:	[A] Water + 0.1% TFA; [B] Acetonitrile + 0.09% TFA		
Gradient Program:	Time	%A	%B
	0	95	5
	1	95	5
	2	80	20
	6	50	50
	8	5	95
	8.1	95	5
Post Time:	2 minutes		
Flow rate:	1 mL/min		
Autosampler Temp.:	5 °C		
Column Temp.:	80 °C		
Detector:	UV 280 nm, 20 Hz		
Injection volume:	10 µL		
Sample:	1 mg/mL trastuzumab (1:10 dilution of formulation in mobile phase A)		

直線性、定量下限(LOQ)、検出下限(LOD)

1~25 µg/mLまでの9種類のトラスツズマブ標準液を用いて検量線を作成しました。S/N (Signal to Noise Ratio) >3となるmAb濃度をLOD、S/N>10となる濃度をLOQとしました。

強制劣化試験

分解生成物をモニタリングするために、ネイティブおよび加熱ストレス下のトラスツズマブのクロマトグラフィープロファイルを比較しました。強制分解試験では、1 mg/mL のトラスツズマブを 10 ppm の過酸化水素 (H₂O₂) にばく露し、その後 80 °Cで60分間加熱しました。10 µLのアリコートでRP HPLC分析に使用しました。

結果と考察

インタクトトラスツズマブ分析

HPLC 分析では、コアシェル粒子と 400 Å のポアサイズを持つ BIOshell™ A400 Protein C4, 3.4 µm HPLC カラムを用いてインタクトなトラスツズマブの再現性の高い高速・高分離能分離を実現しました。バイオ医薬品の開発および品質管理アプリケーションに適していることが分かります。図1は、このクロマトグラフィーの条件下で、6回測定したものを重ね書きしたもので、5分未満で優れたピーク形状を得ることができています。

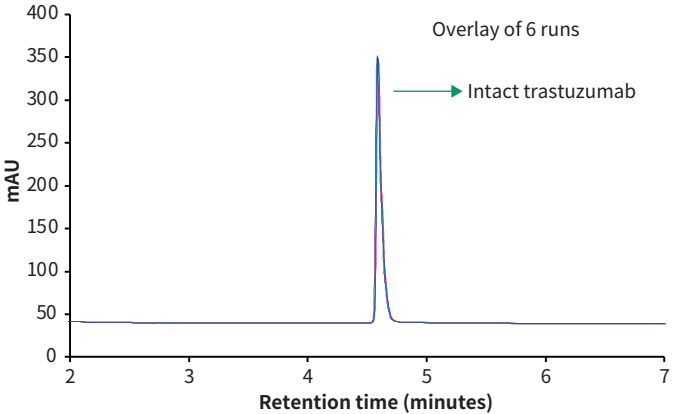


図1. BIOshell™ A400を用いたトラスツズマブのRP-HPLC分析
HPLCカラム：Protein C4, 100 x 2.1 mm, 3.4 µm

保持時間・面積の精度

表2はトラスツズマブ注入の6回の測定から得られた平均 Retention Time (RT) とArea RSDを示したものです。保持時間およびピーク面積のRSDはそれぞれ0.1%および0.29%未満であり、本手法の優れた再現性と精度を示しています。

表2. トラスツズマブ (1 mg/mL) の保持時間とピーク面積の精度 (n = 6)

	Mean	RSD (%)
Retention Time (min)	4.58	0.1
Peak Area	987268	0.29

検出下限と定量下限

トラスツズマブのLODおよびLOQはそれぞれ0.125 µg/mLおよび0.25 µg/mLであり、本法は高感度であることが示されました。観測されたトラスツズマブのLODおよびLOQ値を表3に示しました。また、2回のキャリブレーションとブランクの代表的なクロマトグラムを図2に重ね合わせて示しました。

表3. LOD、LOQ、平均面積とリテンションタイム (n = 3)

	Concentration (µg/mL)	Mean Area (n=3)	Retention Time (min)
LOD	0.125	9562	4.58
LOQ	0.25	21977	4.58

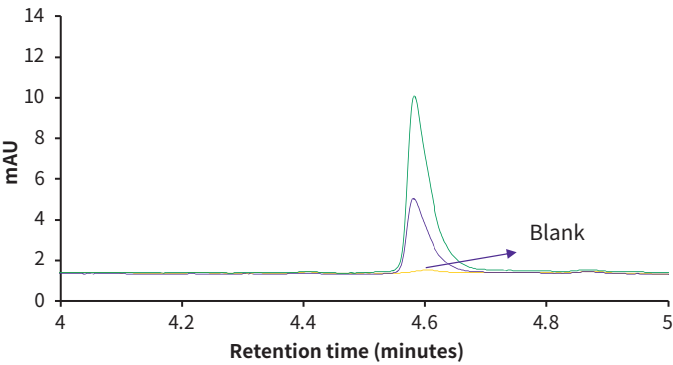


図2. 2回のキャリブレーションとブランクの代表的なクロマトグラムを同じ縮尺で重ね合わせたもの

直線性

トラスツズマブの直線性曲線は、1 µg/mL から 25 µg/mL まで、ピーク面積と濃度を用いて作成しました。平均ピーク面積を表4に示しました。また、トラスツズマブの直線性曲線を図3に示します。

表4. トラスツズマブの直線性範囲 (n = 3)

Trastuzumab Conc. (µg/mL)	Average Area
1	95,961
2	194,821
4	394,886
6	593,986
8	791,940
10	984,370
15	1,480,051
20	1,940,216
25	2,447,554

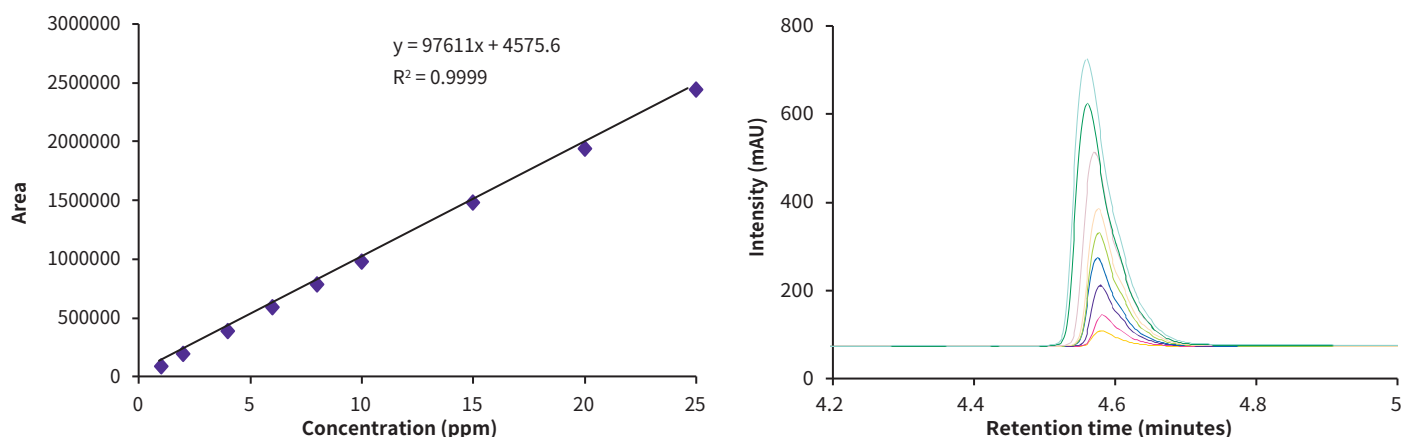


図3. トラスツズマブの1~25 µg/mLまでの9種類の標準濃度での直線性は、優れた相関を示しました。

トラスツズマブの分解試験

本法が安定性を示すかどうかを評価するために、RP-HPLCを用いてインタクトとストレス下のトラスツズマブを比較しました。ストレスの結果、ピークのRTまたは面積に偏差が生じた場合は、分解

生成物とみなしました。

図4はストレスを与えていないトラスツズマブと熱ストレスを与えたトラスツズマブのRP-HPLC プロファイルと比較したものです。

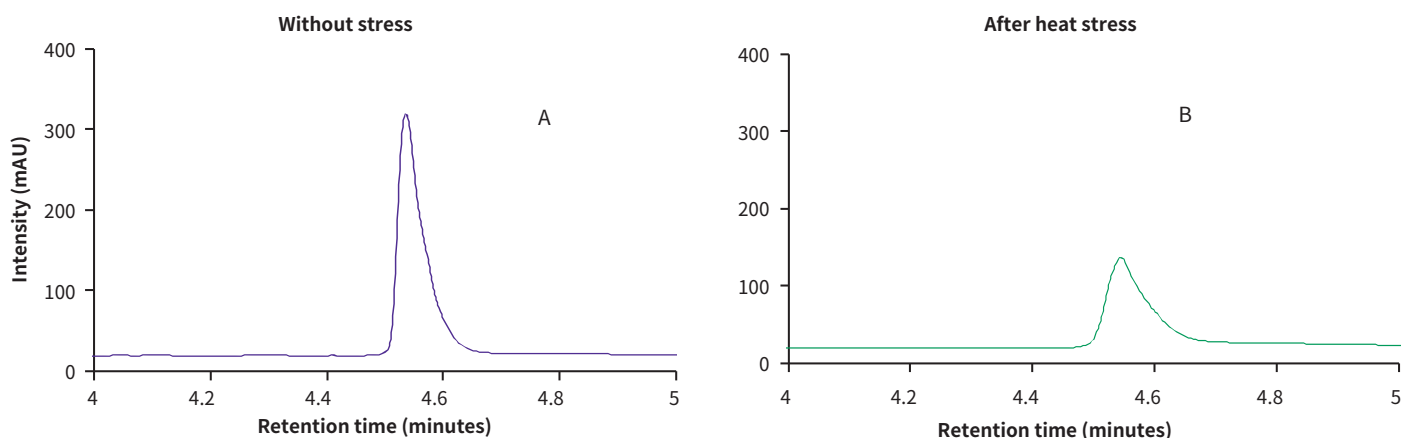


図4. BIOshell™ A400 Protein C4, 100 x 2.1 mm, 3.4 µm RP-HPLC
熱ストレスのないトラスツズマブサンプル(A)と熱ストレスのあるトラスツズマブサンプル(B)のRP-HPLC プロファイル

結論

インタクトなmAbの分析は、サイズ、翻訳後修飾、不均質性の最初のレベルの解析が可能です。RP-HPLCによるmAbの分析には、大きなポアサイズ、疎水性固定相、適切なクロマトグラフィーマトリックスが必要です。このアプリケーションノートでは、インタクトなトラスツズマブを分析するためのシンプルなLC-UVメソッドを紹介しました。BIOshell™ A400 Protein C4 カラムを使用して、インタクトなトラスツズマブを高分離能かつ迅速に分離する方法を開発することができました。面積およびRT精度は良好であり、本手法の信頼性を示しました。また、9種類の標準濃度を用いた検量線は、優れた直線性の検量線は優れた直線性係数を示し、本法が定量的かつ正確であることも示しています。トラスツズマブのLODおよびLOQは0.125 µg/mLであり、本法は高感度であることが確認されました。さらに、熱ストレス試験により、BIOshell™ A400 Protein C4カラムは分解したmAbをモニターできることが実証されこの方法は安定性試験に使用できることがわかりました。

References

1. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-Ju, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, Wu H-C. 2020. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*. 27(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
2. Navas N, Herrera A, Martínez-Ortega A, Salmerón-García A, Cabeza J, Cuadros-Rodríguez L. 2013. Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405(29):9351–9363. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7368-1>.

注目製品

製品名	カタログ番号
BIOshell™ A400 Protein C4, 100 x 2.1 mm I.D., 3.4 µm	66825-U
LiChrosolv™ Acetonitrile Isocratic Grade	1.14291
Trifluoroacetic acid HPLC grade	302031
Water for chromatography LiChrosolv™	1.15333

HPLCカラムの詳細は、下記をご覧ください。

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

ポリエーテルスルホン (PES) 製シリンジフィルターの PFAS 抽出物の分析

Lindsay D. Lozeau, Research Scientist; Amy Laws, Product Segment Head – Cell & Analytical Filtration;
Maricar Dube, Technical Marketing Manager

要旨

近年、様々なマトリックスに含まれるPFAS(パーフルオロアルキル化合物)の測定ガイドラインと測定方法が規制当局によって発行されています。PFASの分析において重要なことは、データの正確性に影響を与える可能性のある試料へのコンタミネーションで、ろ過などサンプル前処理に由来するもの含まれます。この記事ではEPAメソッド537.1は、Millex®シリンジ PES (ポリエーテルスルホン)を使用したフィルター Millipore Express™ (ミリポア エクスプレス) 膜は、PFASが検出されなかったということを示したものです。

序論

PFASは、ポリおよびペルフルオロアルキル物質の総称で永遠の化合物として知られ、長鎖・短鎖を含む4,000種類以上あるとされています。消火用フォームや撥水剤に含まれるPFASなどその優れた特性と幅広い用途により、環境や生物中に人工化学物質として蓄積されてきました。このことは人の健康や、肝臓、がん、免疫低下、高血圧症など潜在的な負の影響を与えています¹⁻³。

これを受けて、欧米の機関では規制措置を講じました。ストックホルム条約は2つの規制を提案しました。PFAS化合物であるパーフルオロオクタン酸 (PFOA) およびパーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) -ある種の免除を2020年から適用しました。米国環境保護庁の保護局 (EPA) は、アクション・プラン (行動計画) を2019年に続き、2020年の早い時期に安全な飲料水を検査するための推奨すべき濃度を70 pptとしました。欧州連合 (EU) は、2020年半ばにPFOAの規制値を25 (ppb) にすることを提案しました。規制の提案や措置に対応して、大学や分析機関では、さまざまなマトリックス中のPFASを試験・モニタリングするための分析法を開発しました。これらの規制は、人体へのばく露や環境汚染の程度を理解し、将来の浄化活動に役立てるために重要となります。

現在、水に関する分析法の多くは対象とするPFAS (通常 20~30 化合物) について内部標準やサロゲート物質を添加した後、固相抽出を行いLC-MS/MSで測定する手法です。表1にPFASのメソッドを示します。

表1. PFASのメソッド

Country	Method	マトリックス	測定限度/レンジ	前処理	分析法
USA	EPA 533	Drinking water	1.6-16 ng/L	SPE	LC-MS/MS
	EPA 537.1	Drinking water	0.53-6.3 ng/L	SPE	LC-MS/MS
	EPA Draft 1633	Aqueous, soil, biosolids, sediment, tissue	1.6-40 ng/L (typical, aqueous)	SPE; Filtration	LC-MS/MS
	SW-846 Method 8327	Non-potable groundwater, surface water, wastewater	10-400 ng/L	SPE; Filtration	LC-MS/MS
	ASTM D7979-20	Water matrix (no drinking water)	0.7-107 ng/L (MDL)	Solvent extraction; Filtration	LC-MS/MS
	EPA Draft 1633	Aqueous, soil, biosolids, sediment, tissue	1.6-40 ng/L (typical, aqueous)	SPE; Filtration	LC-MS/MS
	ASTM D7968-17a	Environmental solids: soil, sediment, sludge	25-20,000 ng/kg	Solvent extraction; Filtration	LC-MS/MS
	FDA Method C-010.01	Food (bread, lettuce, milk, fish)	0.05-5 ng/g	QuEChERS; Filtration; SPE	LC-MS/MS
EU	ISO 25101	Drinking water, groundwater, surface water (fresh and sea water)	2-10,000 ng/L for PFOS; 10-10,000 ng/L for PFOA	SPE	LC-MS/MS
	ISO 21675	Drinking water, naturalwater, waste water (< 2g/L solid particulate material)	≥0.2 ng/L (LOQ)	Filtration as needed; SPE	LC-MS/MS

略号: MDL = minimum detection limit; LOQ = limit of quantitation; SPE = solid phase extraction; PFAS = perfluoroalkyl substances; PFOA = perfluorooctanoic acid; PFOS = perfluorooctanesulfonic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry

PFAS測定におけるサンプルろ過の必要性

飲料水は「きれいな」マトリックスとされサンプルの一部としてろ過を必要としないことが多いですが、SW-846 メソッド 8327、ASTM D7968、ASTM D7979および ISO 21675では、排水のように高い粒子をもつ可能性のあるマトリックスを含んでいる可能性があります。溶液中の微粒子は、サンプル分析、カラムの寿命、装置全体の機能に悪影響を及ぼす可能性があります。そのためには、シリンジフィルター形式のメンブレンを使用したろ過が一般的に用いられています。

最近の研究ではさまざまなソース（保管容器、バイアル、チューブの他、試料に接するプラスチック等）からPFAS汚染が懸念されています。メンブレンフィルターやハウジングも同様に汚染源となる可能性があります。今回、PES膜とPPハウジングをEPAメソッド 537.1で試験しました⁴。このメソッドは試料前処理を要求していませんが、シリンジフィルターを使って溶出する汚染レベルを試験す

るために使用しました。

実験

サンプルをろ過するメディアがPFAS汚染に寄与しているかどうかを判断するために、EPA 537.1を用いて分析しました。概要を示します。250 mL の PFAS を含まない水試料にサロゲートをスパイクしました。0.08 ppbの内部標準スパイクは、QCブランクに使用しました。サンプルボトルとチューブはメタノールで洗浄しました。サンプルはまず、PES Millipore Express™膜を用いた非滅菌 Millex®シリンジフィルターでろ過し、その後、スチレンジビニルベンゼン (SDVB) SPEカートリッジで抽出しました。PES膜付き非滅菌 Millex®シリンジフィルター3ロットを評価しました。SPE溶出液は 96：4% (v/v) メタノール：水で1 mLに濃縮し、C18カラムを使用しLC-MS/MS分析しました。

図1に実験概要を示します。表2にLC-MS/MS条件を示します。

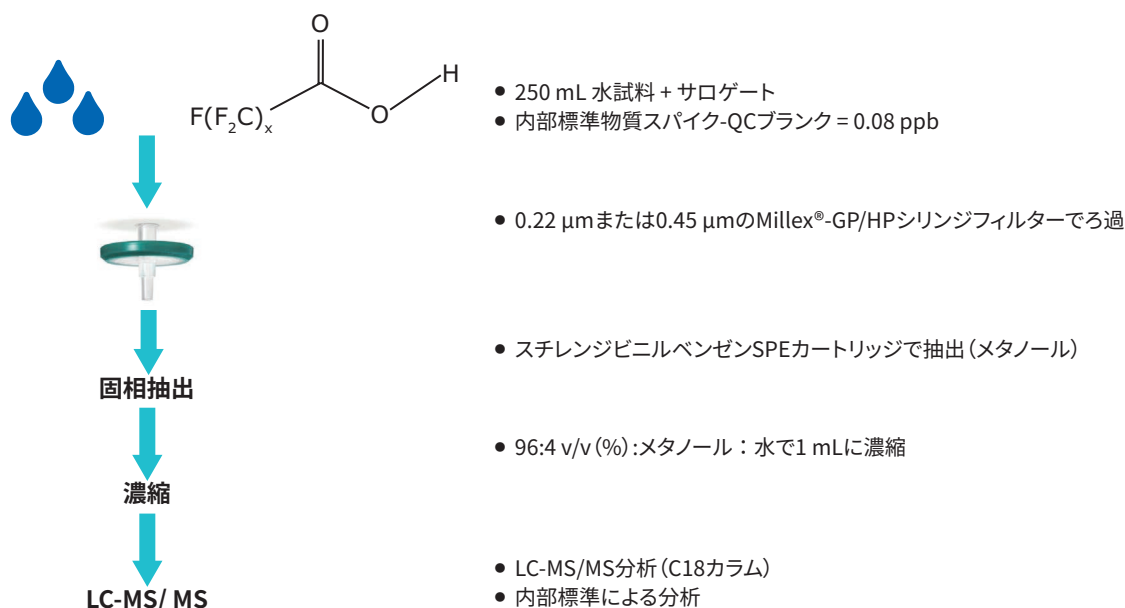


図1. PFASコンタミネーションの確認テストの概要

**PFASの分析
総合カタログ
をご用意しました。**



Accuracy
+ Precision
Confidence

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

表2. LC-MS/MS条件

Column:	C18, 100 x 2.1 mm I.D., 2.7 μm superficially porous particles			
Mobile phase:	[A] Water, 0.1% (v/v) acetic acid; [B] Methanol (MeOH), 0.1% (v/v) acetic acid			
Gradient:	Time (min)	A%	B%	Flow (mL/min)
	0-0.0	65%	35%	0.4
	0-7.0	0%	100%	0.4
	7.0-10.0	0%	100%	0.7
	10.0-11.0	0%	100%	0.7
	11.0-15.0	65%	35%	0.4
Flow rate:	See gradient table			
Detection:	MS/MS, ESI(-), details of MS/MS conditions can be requested from the author			
Column temp:	50.0 °C			
Injection volume:	3-5 μL autosampler injection			
Sample :	SPE eluate concentrated to 1 mL methanol: water, 96:4% (v/v)			

結果と考察

PES膜を使用した非滅菌Millex®フィルター中のPFAS抽出物は、EPA Method 537.1に沿って測定、測定対象に含まれていない次世代PFASを含むいくつかの化合物を対象としました。0.22 μmと0.45 μmのPES膜の各3ロットを試験したところ、MDLでPFASが検出されることはありませんでした(表3)。この結果は、PES膜を有する非滅菌Millex®-GP/HPシリンジフィルターが信頼性が高く、サンプルのろ過に使用するのに適切であることを示しています。環境中のPFAS化合物を固相抽出することで、ろ過を必要とする環境マトリックス中のPFAS化合物を分析することができます。

表3. EPA 537.1メソッドで非滅菌PES膜を用いてろ過後のPFASの検出

				Millex® PES					
				0.22 μm			0.45 μm		
Compound	Abbreviation	RL (ppb)	MDL (ppb)	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3
Perfluoroalkylcarboxylic Acids									
Perfluorobutanoic acid	PFBA	0.0040	0.0020						
Perfluoropentanoic acid	PFPeA	0.0020	0.0010						
Perfluorohexanoic acid	PFHxA	0.0020	0.0010						
Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	0.0020	0.0010						
Perfluorooctanoic acid	PFOA	0.0020	0.0010						
Perfluorononanoic acid	PFNA	0.0020	0.0010						
Perfluorodecanoic acid	PFDA	0.0020	0.0010						
Perfluoroundecanoic acid	PFUnDA	0.0020	0.0010						
Perfluorododecanoic acid	PFDoDA	0.0020	0.0010						
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	0.0020	0.0010						
Perfluorotetradecanoic acid	PFTeDA	0.0020	0.0010						
Perfluoroalkylsulfonic Acids, Perfluorooctanesulfonamides, and Perfluorooctanesulfonamidoacetic Acids									
Perfluorobutanesulfonic acid	PFBS	0.0020	0.0010						
Perfluoropentanesulfonic acid	PFPeS	0.0020	0.0010						
Perfluorohexanesulfonic acid	PFHxS	0.0020	0.0010						
Perfluoroheptanesulfonic acid	PFHpS	0.0020	0.0010						
Perfluorooctanesulfonic acid	PFOS	0.0020	0.0010						
Perfluorononanesulfonic acid	PFNS	0.0020	0.0010						
Perfluorodecanesulfonic acid	PFDS	0.0020	0.0010						
PFOSA	PFOSA	0.0040	0.0020						
N-MeFOSAA	MeFOSAA	0.0040	0.0020						
N-EtFOSAA	EtFOSAA	0.0040	0.0020						
Fluorotelomer Sulfonates and Next Generation PFAS Analytes									
4:2 Fluorotelomer sulfonate	8:2 FTS	0.0080	0.0020						
6:2 Fluorotelomer sulfonate	6:2 FTS	0.0080	0.0020						
8:2 Fluorotelomer sulfonate	8:2 FTS	0.0080	0.0020						
HFPO-DA	GenX	0.0040	0.0020						
ADONA	ADONA	0.0080	0.0020						
9Cl-PF3ONS (F-53B Major)	--	0.0080	0.0020						
11Cl-PF3OUdS (F-53B Minor)	--	0.0080	0.0020						

略号: RL = reporting limit (ppb); MDL = minimum detection limit (ppb); ND = not detected above both RL and MDL.

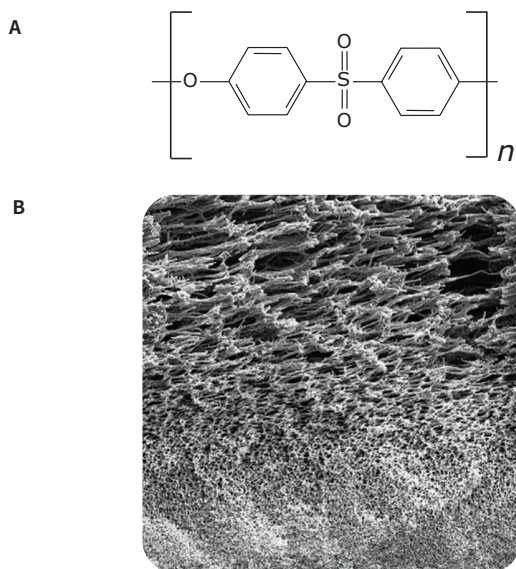


図2. (A) ポリエーテルスルホン膜の構造 (B) SEM画像: PES膜の非対称な孔構造

今回使用した非滅菌Millex®シリンジフィルターの微多孔膜は、Millipore Express™ PES膜です。表2にポリマーの繰り返し単位と膜のSEM画像を示します。PESはセルロース膜の代替として一般的に使用されており、熱安定性、耐久性、酸性・アルカリ性溶液への耐性で知られています。この膜は、水系ろ過用途に適しており、高速流、高ろ過容量、低タンパク質結合を提供します。Millipore Express™ PES膜は、独自の非対称構造により、ろ過能力を向上させ、より高い粒子負荷とタンパク質濃度に耐えることができます。SW-846メソッドで検査した水試料に検出されました。8327、ASTM D7968、ASTM D797、ISO 21675のPFASメソッドに準拠しています。

PES膜付き非滅菌33 mm Millex®シリンジフィルターは、ハウジングがポリプロピレンで、膜はフッ素系化合物を使用していません。

結論

人の健康に対するPFASの脅威に対する懸念が高まり、米国と欧州で規制措置が連鎖的に施行されるようになりました。主な対象は飲料水ですが、PFASをより多く含む他のマトリックスも規制の対象となっています。微粒子についても現在調査が行われています。微粒子の多いサンプルは、LC-MSの前にはろ過が必要で、さらに固相抽出によるクリーンアップを必要とすることがあります。EPAメソッド537.1を用いPES膜を使用したMillex®シリンジフィルターを試したところPFASは検出されませんでした。そのため、より高微粒子のサンプルのろ過が必要な場合のワークフローでは、PES膜またはナイロン膜（ガラス繊維プレフィルター付きまたはなし）の非滅菌Millex®シリンジフィルターが適切な選択肢です。

References

1. Kwiatkowski CF, Andrews DQ, Birnbaum LS, Bruton TA, DeWitt JC, Knappe DRU, Maffini MV, Miller MF, Pelch KE, Reade A, et al. 2020. Scientific Basis for Managing PFAS as a Chemical Class. Environ. Sci. Technol. Lett. 7(8):532-543. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00255>
2. Winchell LJ, Wells MJ, Ross JJ, Fonoll X, Norton JW, Kuplicki S, Khan M, Bell KY. 2021. Analyses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) through the urban water cycle: Toward achieving an integrated analytical workflow across aqueous, solid, and gaseous matrices in water and wastewater treatment. Science of The Total Environment. 774145257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145257>
3. Pérez F, Nadal M, Navarro-Ortega A, Fàbrega F, Domingo JL, Barceló D, Farré M. 2013. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. Environment International. 59354-362. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.004>
4. USEPA, 2020a. Method 537.1, version 2.0, Determination of Selected Per- and Polyfluorinated Alkyl Substances in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryId=343042&Lab=NERL

注目製品

製品名	カタログ番号
Syringe Filters	
Millex®-GP Syringe Filter, PES 0.22 µm	SLGP033N
Millex®-HP Syringe Filter, PES 0.45 µm	SLHP033N
Millex® Syringe Filter, Nylon, 0.20 µm	SLGN033
Millex® Syringe Filter, Nylon, HPF, 0.20 µm	SLGNM25

関連製品

製品名	カタログ番号
SPE - Supelclean™	
ENVI™-Chrom P 6 mL/500 mg SPE Tube	57226
ENVI-WAX™ SPE Tube, 200 mg/6 mL, Pk.30	54056-U
ENVI-WAX™ SPE Tube, 500 mg/6 mL, Pk.30	54057-U
HPLC column	
Ascentis™ Express PFAS 10 cm x 2.1 mm ID, 2.7 µm	53559-U
Ascentis™ Express PFAS Delay column 5 cm x 3.0 mm	53572-U
Solvents & Reagents	
Methanol for chromatography (LC-MS grade) LiChrosolv™	1.06035
Water for chromatography (LC-MS grade) LiChrosolv™ or ultrapure water from a Milli-Q® IQ 7 series water purification system	1.15333
Acetic Acid for HPLC LiChropur™	5.43808

サンプルろ過に関する詳しい情報ナイロンフィルターに関する情報はこちらをご覧ください。

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

PFAS分析に関するカタログはこちらをご覧ください。

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

EPAメソッド537.1, 533, 8327におけるPFASのLC-MS分析

Ascentis™ Express PFAS HPLC Columns

Petra Lewits, Product Manager Analytical Chromatography, HPLC Column; Cory Muraco, Product Manager, Liquid Chromatography Technology

PFAS（パーフルオロアルキル、ポリフルオロアルキル 物質）は、環境中に広く存在しています。近年、その毒性が注目されています。

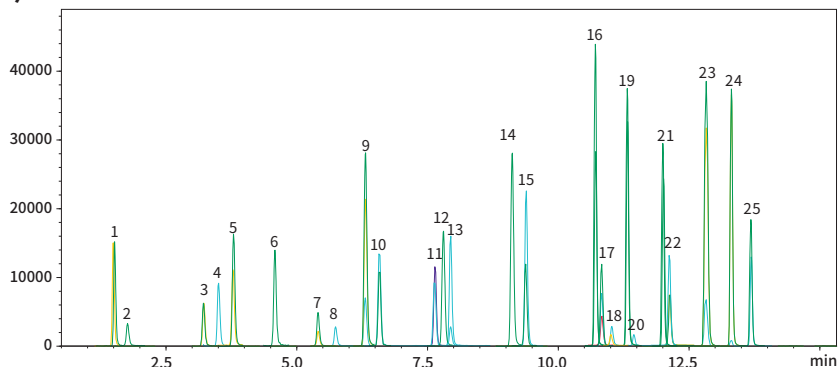
米国環境保護庁（EPA）は、29種類のPFASに関して3つの方法を開発、検証し公表しています。EPA 8327は様々なマトリックス中（例：水、固体）のパーフルオロアルキル物質およびポリフルオロアルキル物質（PFAS）を液体クロマトグラフィー/タンデム（LC-MS/MS）で分析しています。

Ascentis™ Express PFAS HPLCカラムは分枝状および直鎖状異性体を含む短鎖および長鎖のPFAS化合物を分離するために設計されていて、EPAメソッドに準拠しています。

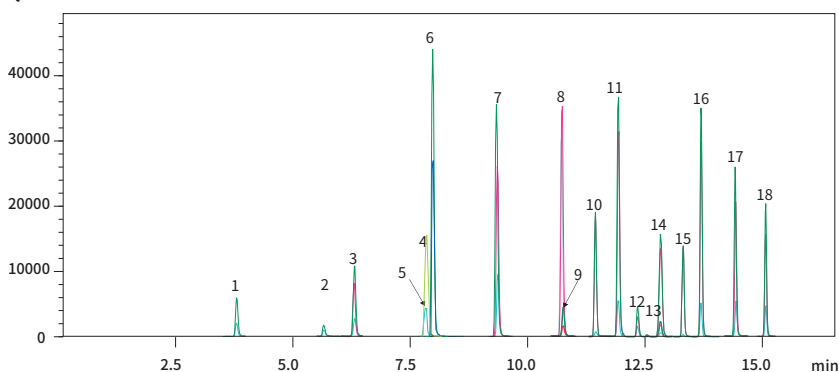
Ascentis™ Express PFAS ディレイカラムの使用で、装置から発生するPFASのコンタミネーションによる分析への影響を避けることが可能です。

表1の分析条件でEPAの3種類のメソッドの分析データを図1と表2に示します。

A) EPA Method 533



B) EPA Method 537.1



C) EPA Method 8327

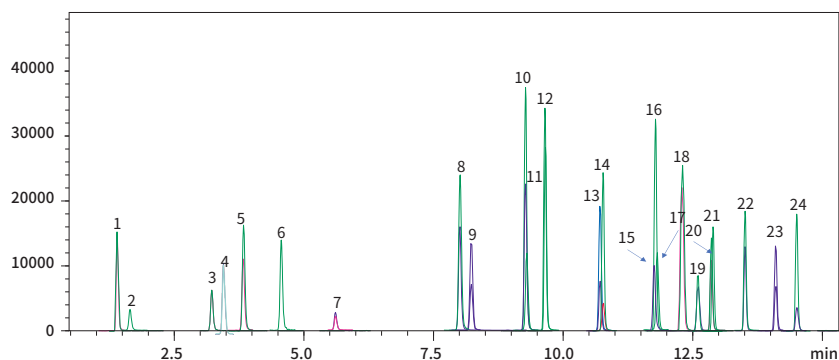


図1. Ascentis™ Express PFASとディレイカラムを用いた分析 (Peak IDs は 表2を参照)

表1. LC-MS 条件

LC Conditions		
Analytical Column:	Ascentis™ Express PFAS, 100 x 2.1 mm I.D., 2.7 µm (53559-U)	
Delay Column:	Ascentis™ Express PFAS Delay, 50 x 3 mm I.D., 2.7 µm (53572-U)	
Mobile Phase A:	[A] 10 mM Ammonium acetate; [B] methanol	
Gradient:	Time	%B
	0.0	33.0
	18.0	98.0
	18.1	100.0
	21.0	100.0
	21.1	33.0
	26.0	End

Flow Rate:	0.4 mL/min
Pressure:	485 bar
Temperature:	35 °C
Injection Volume:	2.0 µL
Sample Solvent:	Methanol (96%), water (4%)
MS Conditions:	
Detection:	ESI(-) MS/MS
LC System:	Shimadzu Nexera X2
ESI LCMS system:	Shimadzu LCMS-8040
Spray Voltage:	-2.0 kV
Nebulizing gas:	2 L/min
Drying gas:	15 L/min
DL temp:	250 °C

表2. MS トランジションとリテンションタイム

Compound	Transition	EPA 533		EPA 537.1		EPA 8327	
		Peak #	t _R (min)	Peak #	t _R (min)	Peak #	t _R (min)
PFBA	213.0000>169.0000	1	1.36			1	1.36
4:2FTS	229.0000>85.0000	2	1.89			2	1.89
PFPeA	263.0000>219.0000	3	3.22			3	3.22
PFBS	299.0000>80.0000	4	3.81	1	3.789	4	3.81
PFHpS	279.0000>85.0000	5	3.97			5	3.97
PFPeS	315.0000>135.0000	6	4.79			6	4.79
PFMPA	327.0000>307.0000	7	5.43				
PFHxA	313.0000>269.0000	8	5.68	2	5.639	7	5.68
PFEESA	349.0000>80.0000	9	6.10				
HFPO-DA	285.0000>169.0000	10	6.34	3	6.307		
PFHpA	363.0000>319.0000	11	7.76	4	7.723	8	7.76
PFHxS	399.0000>80.0000	12	7.99	5	7.936	9	7.99
ADONA	377.0000>250.9000	13	8.01	6	7.978		
FOSA	427.0000>407.0000					10	9.30
PFOA	413.0000>369.0000	14	9.40	7	9.368	11	9.40
PFMBA	449.0000>80.0000	15	9.51				
PFDS	295.0000>201.0000					12	9.70
PFNA	463.0000>419.0000	16	10.75	8	10.715	13	10.75
PFOS	499.0000>80.0000	17	10.79	9	10.762	14	10.79
9Cl-PF3ONS	530.9000>351.0000	18	11.46	10	11.439		
PFNS	527.0000>507.0000					15	11.84
PFDA	513.0000>469.0000	19	11.89	11	11.857	16	11.89
8:2FTS	549.0000>80.0000	20	11.90			17	11.90
N-MeFOSAA	570.0000>419.0000			12	12.336	18	12.37
6:2FTS	498.0000>78.0000	21	12.68			19	12.68
NFDHA	599.0000>80.0000	22	12.85				
PFUnA	563.0000>519.0000	23	12.86	13	12.822	20	12.86
N-EtFOSAA	584.0000>419.0000			14	12.827	21	12.87
11Cl-PF3OUdS	630.7000>451.0000	24	13.33	15	13.311		
PFDoA	613.0000>569.0000	25	13.71	16	13.690	22	13.71
PFTTrDA	663.0000>619.0000			17	14.435	23	14.45
PFTeDA	713.0000>669.0000			18	15.083	24	15.10

注目製品

製品名	カタログ番号
Ascentis™ Express PFAS, 100 x 2.1 mm I.D., 2.7 µm	53559-U
Ascentis™ Express PFAS Delay, 50 x 3 mm I.D., 2.7 µm	53572-U
Methanol for chromatography (LC-MS grade) LiChrosolv™	1.06035
Water for chromatography (LC-MS grade) LiChrosolv™ or ultrapure water from a Milli-Q® IQ 7 series water purification system	1.15333
Ammonium acetate suitable for mass spectrometry (MS), LiChropur™, eluent additive for LC-MS	73594

PFAS分析のポータルサイト

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

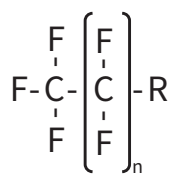
標準物質の検索サイト

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

PFASのLC-MSを用いた高速分離について

Petra Lewits, Cory Muraco, Product Manager Liquid Separations

Johanna Simon, Scientist Central Analytics



PFAS（パーフルオロ／ポリフルオロアルキル化合物）は、難分解性で人工的な有機化合物で広く環境中に存在します。その毒性に関する最近の知見をもとに米国食品医薬品局（FDA）、米国環境保護庁（EPA）はPFASに対する行動を開始しました。そのため、信頼性が高く、迅速な測定方法が必要とされています。

PFASは一般的に液体クロマトグラフィー-質量分析計（LC-MS）で測定します。LC-MS/MSで使用する分析カラムはODS（C18カラム）で、弊社のAscentis™ Express PFASカラムは表面多孔質シリカ粒子（SPP）ベースのODSで、PFASの混合品を用いてテストされて

います。これにより、PFASの分析において適合性と信頼性の高いカラムとなります。

PFASの分析では、HPLCシステムから発生するPFASやシステムに使用する部材からの汚染が懸念されています。そのため、分析システムの注入ポートの前にディレイカラムをつけることが推奨されています（図1）。Ascentis™ Express PFAS ディレイカラムは様々な移動相の条件下でPFASの保持が非常に高いのが特長です。したがって、PFASのバックグラウンドによる汚染の影響が遅くなって現れるため、試料中のPFASと一緒に共溶出するのを避けることが可能です。

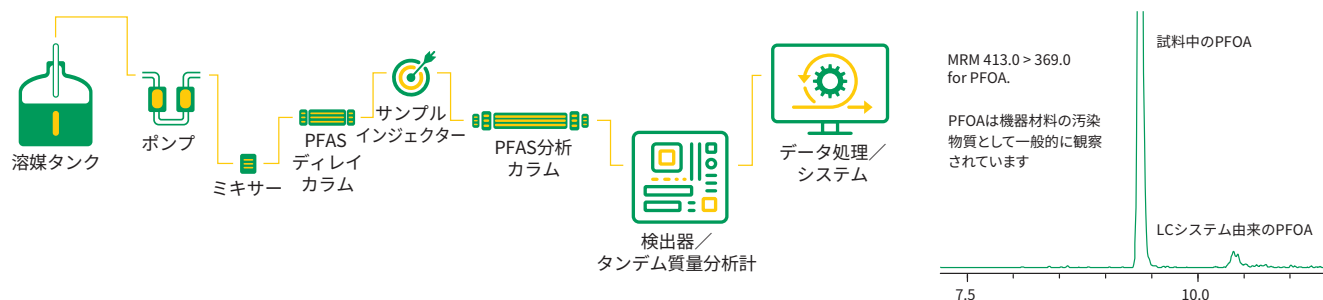


図1. PFAS分析の分析装置セットアップとディレイカラムを用いたペルフルオロオクタン酸(PFOA) (MRM 413.0>369.0)のクロマトグラム

PFAS分析用の Millex® Pes膜シリンジフィルター

- 粒子状物質を含むサンプルに最適
- ポリエーテルスルホン(PES)膜のメンブレン
- ポリプロピレン製ハウジング

SigmaAldrich.com/onemillex



Millipore®
Preparation, Separation,
Filtration & Monitoring Products

PFASのLC-MS分析 - 5分で33化合物を分析

Ascentis™ Express PFAS HPLC カラムの Fused-Core技術はEPA 537.1、EPA 533、およびEPA 8327でPFASの33化合物の迅速分離を実証しました (図2)。

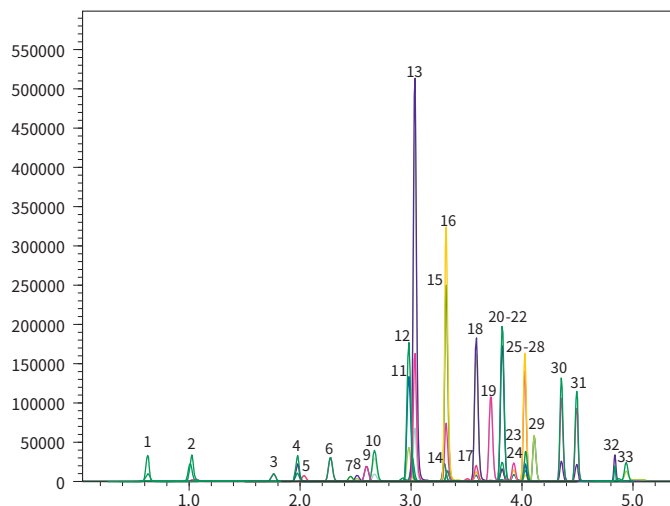


図2.5分で33種類のPFASを分離

分析条件

Analytical col.:	Ascentis™ Express 90Å PFAS, 10 cm x 2.1 mm, 2.7 µm (53559-U)														
Delay col.:	Ascentis™ Express 90Å PFAS Delay, 5 cm x 3 mm, 2.7 µm (53572-U)														
Mobile phase :	[A]10 mM Ammonium acetate; [B] Methanol														
Gradient:	<table><tr><th>Time (min)</th><th>%B</th></tr><tr><td>0.0</td><td>33.0</td></tr><tr><td>4.0</td><td>98.0</td></tr><tr><td>4.1</td><td>100.0</td></tr><tr><td>6.0</td><td>100.0</td></tr><tr><td>6.1</td><td>33.0</td></tr><tr><td>7.5</td><td>End</td></tr></table>	Time (min)	%B	0.0	33.0	4.0	98.0	4.1	100.0	6.0	100.0	6.1	33.0	7.5	End
Time (min)	%B														
0.0	33.0														
4.0	98.0														
4.1	100.0														
6.0	100.0														
6.1	33.0														
7.5	End														
Flow rate:	0.4 mL/min														
Pressure:	479 bar (6947 psi)														
Temperature:	35 °C														
Detection:	ESI (-) MS/MS; ESI LCMS system: Shimadzu LCMS-8040; Spray voltage: -2.0 kV; Nebulizing gas: 2 L/min; Drying gas: 15 L/min; DL temp: 250 °C ; Heat block: 400 °C														
Inj. vol.:	2.0 µL														
Sample solvent:	methanol (96%) water (4%)														

PFAS化合物

Peak	Compound	Transition	Retention Time (min)
1	PFBA	213.0>169.0	0.755
2	4:2FTS	229.0>85.0	1.031
3	PFPeA	263.0>219.0	1.762
4	PFBS	299.0>80.0	1.979
5	PFHpS	279.0>85.0	2.035
6	PFPeS	315.0>135.0	2.273
7	PFMPA	327.0>307.0	2.454
8	PFHxA	313.0>269.0	2.514
9	PFEESA	349.0>80.0	2.599
10	HFPO-DA	285.0>169.0	2.670
11	PFHxS	399.0>80.0	3.013
12	NaDONA	377.0>251.0	3.033
13	ADONA	377.0>250.9	3.034
14	FOSA	427.0>407.0	3.299
15	PFOA	413.0>369.0	3.316
16	PFMBA	449.0>80.0	3.328
17	PFHpA	363.0>319.0	3.388
18	PFOS	499.0>80.0	3.588
19	9CI-PF3ONS	530.9>351.0	3.719
20	8:2FTS	549.0>80.0	3.816
21	PFNS	527.0>507.0	3.820
22	PFDA	513.0>469.0	3.822
23	N-MeFOSAA	570.0>419.0	3.925
24	PFNA	463.0>419.0	3.942
25	NFDHA	599.0>80.0	4.015
26	PFUnA	563.0>519.0	4.025
27	N-EtFOSAA	584.0>419.0	4.029
28	6:2FTS	498.0>78.0	4.033
29	11CI-PF3OUdS	630.7>451.0	4.110
30	PFTTrDA	663.0>619.0	4.355
31	PFDoA	613.0>569.0	4.496
32	PFTeDA	713.0>669.0	4.745
33	PFDS	295.0>201.0	4.921

注目製品

製品名	カタログ番号
Ascentis™ Express 90Å PFAS, 10 cm x 2.1 mm, 2.7 µm	53559-U
Ascentis™ Express 90Å PFAS Delay, 5 cm x 3 mm, 2.7 µm	53572-U
Solvents & Reagents	
Methanol for chromatography (LC-MS grade) LiChrosolv™	1.06035
Water for chromatography (LC-MS grade) LiChrosolv™ or tap fresh from an appropriate Milli-Q® system	1.15333
Ammonium acetate suitable for mass spectrometry (MS), LiChropur™, eluent additive for LC-MS	73594

関連製品

製品名	カタログ番号
Analytical Standards	
Perfluorobutanoic acid, neat	68808
Perfluoropentanoic acid, neat	68542
Perfluorohexanoic acid, neat	43809
Perfluorooctanoic acid, neat	33824
Perfluorononanoic acid, neat	91977
Perfluorodecanoic acid, neat	43929
Perfluorododecanoic acid, neat	92291
Perfluorotetradecanoic acid, neat	80312
Pentadecafluorooctanoic acid, 100 µg/mL in methanol	33603
Heptaecafluorooctanoic acid, 100 µg/mL in methanol	33607
Perfluorooctane sulfonic acid, neat	33829

安定同位体標識アミノ酸混合溶液

Matthias Nold, Shailly Krishna Rajuth, Product Manager Reference Materials, Analytix@milliporesigma.com

アミノ酸は、タンパク質の構成成分や、二次代謝産物の生合成の前駆体として、生化学の中心的役割を担っています。また、食品添加物（人工甘味料や風味増強剤）、医薬品、生分解性プラスチック、キラル触媒の合成など、アミノ酸は様々な用途に使用されています。アミノ酸の分析には、一般的にペプチド結合を加水分解し、放出されたアミノ酸を適切な分析方法で分析することが必要です¹。

同位体標識アミノ酸は、Isobaric-tagged isotope dilution mass spectrometry (IT-IDMS) 法によるアミノ酸分析 (AAA) の内部標準として使用することができます。IT-IDMS法は、従来のAAA法と比較して、精度、正確さ、感度が優れています²。

私たちは、幅広い種類の高品質な標準物質を提供できるよう努めており、弊社の標準物質のポートフォリオは、現在20,000以上の製品を提供しています。ラインナップは[SigmaAldrich.com/standards](https://www.sigmaaldrich.com/standards)でご覧いただけます。

最近、2つの新しい認証標準物質グレードのアミノ酸ラベル化体の混合溶液がポートフォリオに加われました。これらの混合溶液は、アミノ酸のLC/MSまたはGC/MS定量（誘導体化後）およびその他の研究用途での内部標準として使用するのに適しています。

Key Features

- TraceCERT™ 認証標準物質、NISTの1次標準にトレーサブル
- ISO 17034のもと確立されたワークフローで製造された安定同位体標識アミノ酸混合溶液
- 混合溶液中のコンポーネントはqNMR認証 (ISO 17025認定の元)
- LC法による均質性、長期安定性の試験済み
- 包括的な証明書が付属

References

1. Odia A.; Zekeri Esezobor O. Therapeutic Uses of Amino Acids. Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal, Asao T., Asaduzzaman M., Eds; IntechOpen, 2017 DOI: 10.5772/intechopen.68932
2. Woolfitt A.R., Solano M.I., Williams T.L., James L. Pirkle J. L., Barr J.R., Amino Acid Analysis of Peptides Using Isobaric-Tagged Isotope Dilution LC-MS/MS, Anal. Chem. 2009, 81, 10, 3979-3985, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac900367q>

Product Number:	96378
Product Name:	Stable Isotope Labeled Amino Acid Mix Solution 1
Grade:	certified reference material, TraceCERT™
Solvent:	HCl (0.1 M)
Concentrations:	1250-2500 nmol/mL
Package Size:	1 mL

Component	CAS No.	Nominal Concentration
L-Alanine- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	202407-38-3	2.5 mmol/L
L-Arginine- ¹³ C ₆	55443-58-8	2.5 mmol/L
L-Aspartic acid- ¹³ C ₄	55443-54-4	2.5 mmol/L
L-Cystine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂	1252803-65-8	1.25 mmol/L
L-Glutamic acid- ¹³ C ₅	55443-55-5	2.5 mmol/L
Glycine- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	211057-02-2	2.5 mmol/L
L-Histidine- ¹³ C ₆	55443-59-9	2.5 mmol/L
L-Isoleucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	202468-35-7	2.5 mmol/L
L-Leucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	202406-52-8	2.5 mmol/L
L-Lysine- ¹³ C ₆	55443-57-7	2.5 mmol/L
L-Methionine- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	202468-47-1	2.5 mmol/L
L-Phenyl- ¹³ C ₆ -alanine	180268-82-0	2.5 mmol/L
L-Proline- ¹³ C ₅	201740-83-2	2.5 mmol/L
L-Serine- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	202407-34-9	2.5 mmol/L
L-Threonine- ¹³ C ₄	55443-53-3	2.5 mmol/L
L-Tyrosine-(phenyl- ¹³ C ₆)	201595-63-3	2.5 mmol/L
L-Valine- ¹³ C ₅	55443-52-2	2.5 mmol/L

Product Number:	01428
Product Name:	Stable Isotope Labeled Amino Acid Mix Solution 2
Suffix:	certified reference material, TraceCERT™
Solvent:	HCl (0.1 M)
Concentrations:	500-2500 nmol/mL
Package Size:	1 mL

Component	CAS No.	Nominal Concentration
L-Alanine- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	202407-38-3	0.5 mmol/L
L-Arginine- ¹³ C ₆	55443-58-8	0.5 mmol/L
L-Aspartic acid- ¹³ C ₄	55443-54-4	0.5 mmol/L
L-Glutamic acid- ¹³ C ₅	55443-55-5	0.5 mmol/L
Glycine- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	211057-02-2	2.5 mmol/L
L-Leucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	202406-52-8	0.5 mmol/L
L-Methionine- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	202468-47-1	0.5 mmol/L
L-Phenyl- ¹³ C ₆ -alanine	180268-82-0	0.5 mmol/L
L-Proline- ¹³ C ₅	201740-83-2	0.5 mmol/L
L-Tyrosine-(phenyl- ¹³ C ₆)	201595-63-3	0.5 mmol/L
L-Valine- ¹³ C ₅	55443-52-2	0.5 mmol/L

アミノ酸標準物質のすべてのラインナップはこちらから
[SigmaAldrich.com/aminoacidstandards](https://www.sigmaaldrich.com/aminoacidstandards)

HPLC Tips & Tricks: 注入量の最適化

Dr. Egidijus Machtejevas, Sr. Technical Advisor, Analytical Chromatography Workflows.

ピーク面積は注入量やサンプル濃度と直線関係にあります。また、ピーク面積はカラムや検出器が過負荷でない場合、また試料が移動相に溶解している場合、ピーク面積は注入量／試料濃度に比例します。カラムや検出器に負荷がかかっておらず、注入時にカラムを流れる移動相に試料が溶解している場合、ピーク面積は注入量／試料濃度に比例します。試料を注入する際、HPLCでは注入量に関係し、これはオートサンプラーの設定によって決まります。希釈した試料の場合、試料量を増やすことが検出限界や感度を改善する方法の一つとして考えることが出来ます。しかし、HPLC/UHPLCにおいて試料注入量を増やすことや濃度に関係して、次のようないくつかの問題が起こります。カラムに注入する量が多すぎると過負荷を起こし、ピーク高も試料量が多くなるほど高くなり、ピーク幅もよりブロードになります。すなわち分離したピーク間において分解能を低くしてしまうことがあります。一般的に注入量を変更するとピークに影響を及ぼします（カラムのディメンジョン-長さ、内径、充填タイプ-完全多孔質、表面的多孔質、モノシリック、表面積、官能基密度、クロマトグラフィーモード、保持機構やピークリテンション-ピーク容量など）。経験則では、クロマトグラフィーシステムの変更（カラム長、径、粒径、保持時間）は、カラムから溶出するピークのボリュームは少なくなり、分解能の低下を防ぐためにサンプル量も減らす必要があります。これらは異なるパラメータのため、これらの影響を評価することは容易ではなく、分析条件やカラムサイズ、許容可能な最小の分解能で判断しているのが現状です。一般的には注入量はカラムの全容量に対して1~2%（試料濃度は $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）とされており、HPLC分析では標準的な考えとなっています。

しかし、実際の最大許容負荷は、複数の異なる負荷注入を行い、重要なピークペア分離能やメインピークのクロマトグラフィー性能パラメータを比較することで判断できます。例として、よく使われる UHPLCカラムは $50 \times 2.1 \text{ mm}$ の大きさで、総容量 $173 \mu\text{L}$ 、ボイド容量 $\sim 120 \mu\text{L}$ （全多孔質粒子タイプは0.7倍を考慮）は、 $1.2 \sim 2.4 \mu\text{L}$ の範囲（試料濃度 $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）でバンドの広がりや分解能のロスを抑えています。（他の事例；内径 4.6 mm 、 $50 \sim 250 \text{ mm}$ の長さ-理想的な注入： 5.8 および $58 \mu\text{L}$ 、内径 3 mm 、長さ $50 \sim 150 \text{ mm}$ の場合注入量は $2.5 \sim 14.8 \mu\text{L}$ でした。）

アイソクラティックモードの場合、グラジエントモードに比べて、容量負荷の影響を受けやすいことに注意が必要です。アイソクラティックモードの場合、ピーク保持量（ μL ；流量にピーク溶出時間をかけたもの）をピーク効率（カラムあたりのプレート数）の平方根で割れば、おおよそ推奨される注入量の上限を算出することができます。カラムが過負荷となっているのをどうやって判断するのでしょうか？ 大きな容量の試料がカラムに導入されると、ピークは前に出始め（ピークシンメトリーファクター <1 ）、リテンションタイムも減少し、カラム効率や分離能が悪くなります。それを回避するコツはスウィートスポット、すなわち分解能と感度との間のバランスを確認することです。実用的には簡単で、インジェクターが再現良く注入できる最少量からスタート、最大3%までにすることです。検出限界と分解能は注入量に依存しますので、問題が起きた際はこのことを念頭に置いてください。



Looking for a Starting Point for a New Method?

2700以上のクロマトグラフィーのアプリケーションが検索できます。ぜひご利用ください。

SigmaAldrich.com/chromatogram-search

Greener Alternatives

A better tomorrow starts
with better research today



Re-engineered greener
Products



Products aligned with the 12
Principles of Green Chemistry

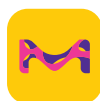


Products enabling research of
alternative energy



Design for Sustainability (DfS)
Developed Products

SigmaAldrich.com/greener



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2023年6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. ©2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン

ライフサイエンス サイエンス & ラボソリューションズ事業本部

〒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

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。

AAM154-2306-PDF-E