

Analytix Reporter

【トピックス】

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 誘導体化法による カルボニル化合物の分析

千葉大学 内山茂久

【環境】

Supelco ブランドの新しい大気捕集製品
SLB-IL PAH を用いた PAH 類の異性体高分離分析
表層水中のリン酸

【食品 & 飲料】

HPTLC および HPLC による黒コショウの分析
ウコン粉末中の残留農薬分析
インスタントコーヒー中の水分滴定

【医薬】

HILIC カラムを用いたヌクレオシドの保持と選択性
USP モノグラフで許容される HPLC 分析条件の改変
医薬品の元素不純物

contents

目次

【トピックス】

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体化法によるカルボニル化合物の分析 — 3

千葉大学 内山茂久

【環境】

Supelcoブランドの新しい大気捕集製品 — 12

SLB-IL PAHを用いたPAH類の異性体の高分離分析 — 13

表層水中のリン酸 — 15

【食品&飲料】

高性能薄層クロマトグラフィーおよびHPLCによる黒コショウの分析 — 18

ウコン粉末中の残留農薬分析におけるサンプル前処理と平面構造を持つ農薬の回収率向上 — 21

インスタントコーヒー中の水分滴定 — 26

【医薬】

親水性ポリマー系固相抽出カラムSupel™-Select HLB — 28

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラムを用いたヌクレオシドの保持と選択性 — 31

USPモノグラフで許容されるHPLC分析条件の改変 — 34

医薬品の元素不純物 — 38



カタログ番号 (Cat.No) が「黒色」の製品はシグマ アルドリッチ、「青色」の製品はメルクへお問い合わせください

シグマ アルドリッチ

製品に関するお問い合わせ:

Tel: 03-6756-8245

Email: sialjpts@sial.com

納期などご注文に関するお問い合わせ:

Tel: 03-6756-8275

FAX: 03-6756-8301

Email: sialjpcs@sial.com

メルク

製品に関するお問い合わせ:

Tel: 03-4531-1140

Email: bioinfo@merckgroup.com

納期などご注文に関するお問い合わせ:

Tel: 03-4531-1141

FAX: 03-5434-4837



新製品、セミナー、お得なキャンペーンなどの情報をお届けする

Eメールニュース配信登録はこちらから

www.sigma-aldrich.com/email

【トピックス】

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体化法によるカルボニル化合物の分析

千葉大学工学部 内山茂久

はじめに

環境大気中にはホルムアルデヒドやアセトアルデヒドなどの多くのカルボニル化合物が存在している。これらの中には、ヒトに対して刺激を与え、喘息などのアレルギー症状や発がんを引き起こす有害物質が含まれるため注意が必要である。昨今、シックビルディングシンドロームや化学物質過敏性といった様々な建物に関連した健康被害の問題が浮上しているが、これらの原因物質としても取りざたされている。従って、環境空気中のカルボニル化合物を分析し、実態を把握することは非常に重要である。

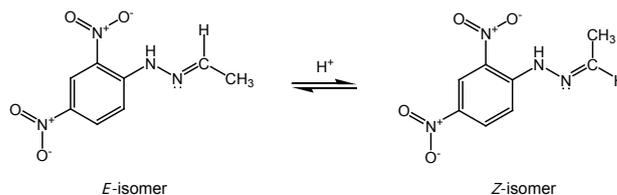
カルボニル化合物の分析法としては、現在、2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (DNPH) 誘導体化-HPLC分析法が最も広く利用されている。DNPHとカルボニル化合物の反応は、Scheme 1に示すようにDNPHのNH₂基がカルボニル化合物のC=O基に求核付加反応を起こしヒドラゾン誘導体を生成することによるが、1926年にBradyら[1]により最初に報告された。その後、空気中のカルボニル化合物を分析するために、DNPH溶液を用いるインピンジャー法が使用されてきたが、現在は操作が簡単なDNPHをコーティングしたシリカを充填したDNPHカートリッジ法[2]が最も多く使用されている。また、DNPHカートリッジ法はアクティブサンプリング法[3]ばかりでなく、拡散サンプリング法[4, 5]としても利用されている。

筆者らは、十数年にわたりDNPHとカルボニル化合物の反応を研究し、DNPH誘導体の異性化、DNPH誘導体の還元的アミノ化、ジアルデヒド類の分析、カルボン酸のDNPH誘導体化等、多くの新しい知見を報告してきた。本トピックスではDNPH誘導体化法の理解を深めるために、これらの研究結果を集約した。

DNPH誘導体の異性化

一般にカルボニル化合物のDNPH誘導体 (ヒドラゾン誘導体) は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析されることが多いが、ヒドラゾン誘導体のC=N二重結合における窒素原子は孤立電子対を持つため、対称性を持つホルムアルデヒド等を除いて全て幾何異性体 (*E*, *Z*)

が存在する (Scheme 2)。従って、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてヒドラゾン誘導体を分析すると、二つのピークが検出されてしまい分析精度が低下してしまう。



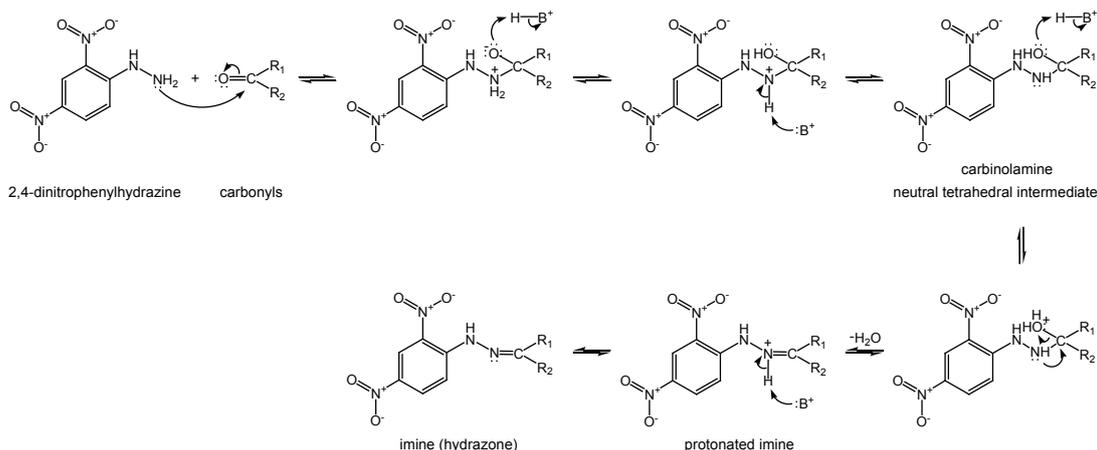
Scheme 2. Chemical structures of *E*- and *Z*-stereoisomers of acetaldehyde DNPhydrazone.

飽和アルデヒドDNPH誘導体の異性化 [6]

純粋なヒドラゾン誘導体は*E*-異性体のみである。すなわち、DNPHとカルボニル化合物を反応させ、生成した誘導体を再結晶により精製した純粋なヒドラゾン誘導体は、アセトニトリルに溶解してHPLCで分析すると*E*-異性体しか検出されない。しかし、この溶液にリン酸溶液を添加すると、瞬時に異性化反応を起こし*Z*-体を生成する[6]。

一例として、アセトアルデヒドとプロパナールのヒドラゾン誘導体における、リン酸濃度による異性体比の変化をFig. 1に示す。この異性化反応は比較的速く、一定の異性対比 (アセトアルデヒド誘導体 *Z/E* = 0.32、プロパナール誘導体 *Z/E* = 0.16) で平衡状態に達する。また、*E*-体と*Z*-体の紫外吸収スペクトルは異なり、極大吸収波長は*E*-体の方が5~8 nm長波長側に偏る。一方、365 nmの紫外光を照射すると、酸添加と同様に異性化し*Z*-体を生成する。しかし、異性体比は初期濃度によって異なる。たとえば初期濃度100 μmol/Lの時、アセトアルデヒド誘導体の異性対比 (*Z/E*) は400分で平衡状態になり0.55を示す[6]。また、紫外線によってアルデヒド-DNPH誘導体 (*E*+*Z*) が分解し減少する。ホルムアルデヒド誘導体の減少が最も激しく、初期濃度10 μmol/Lのとき、480分で0.72 μmol/Lまで減少する。

アルデヒドと2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの反応は酸触媒の存



Scheme 1. Scheme of the derivatization reaction of DNPH with carbonyls.

在下で行われるので、DNPH誘導体の実試料には必然的に酸が含まれ、異性化が起こる。しかし、市販されているヒドラゾン誘導体の標準溶液は酸を含んでいないので、Supelcoの標準溶液 (TO11/IP-6A Aldehyde/Ketone-DNPH Mix) を除いて*E*-異性体のみである。標準試料にも酸を添加し、試料溶液と異性対比を同一にすることが必要である。また、DNPH誘導体は、紫外光により不安定な異性体比を生成するばかりでなく分解するので、遮光して保管すべきである。

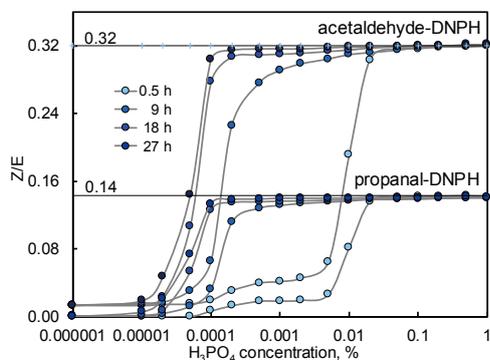


Fig. 1. Changes in the isomer ratios of acetaldehyde and propanal DNPhydrazone with phosphoric acid. Reproduced with permission from Fig. 5 in Ref. [6].

不飽和アルデヒドDNPH誘導体の異性化 [7]

不飽和アルデヒドのヒドラゾン誘導体の異性体比は、飽和アルデヒドの場合と異なる。Fig. 2に4-ペンテナル (4C5-D) とトランス-2-ペンテナル (T2C5-D) のヒドラゾン誘導体における酸濃度による異性体比の変化を示す。共役二重結合を有する α,β -不飽和アルデヒドの場合、異性体比はアクロレイン誘導体が0.018、他は0.035~0.036を示し、飽和アルデヒド誘導体に比べて小さい[7]。一方、共役二重結合を有しない不飽和アルデヒドの異性体比は0.14~0.21であり、飽和アルデヒド誘導体と同程度の値を示す。Fig. 3に各種不飽和アルデヒド誘導体の紫外吸収スペクトルを示す。なお図中で、Tは

trans、続く数字は位置を、Cに続く数字は炭素数を表している。つまり、T2C5は*trans*-2-ペンテナルヒドラゾン誘導体である。 α,β -不飽和アルデヒド誘導体 (T2Cn) は極大吸収波長が長波長側に偏り、吸収スペクトルの強度も高くなる。これは、 α,β -不飽和アルデヒド誘導体の共役二重結合に起因する深色効果が表れたものである。Fig. 4に α,β -不飽和アルデヒド誘導体であるアクロレイン (2C3)、*trans*-2-ブテナール (T2C4)、*trans*-2-ペンテナル (T2C5)、*trans*-2-ヘキサナル (T2C6)、*trans*-2-ヘプテナール (T2C7)、*trans*-オクタナル (T2C8)、*trans*-2-ノネナル (T2C9)、*trans*-2-デセナル (T2C10)、3-アルケナル誘導体である3-ブテナール (3C4)、*trans*-3-ヘキサナル (T3C6)、4-アルケナル誘導体である4-ペンテナル、*trans*-4-デセナル (T4C6) 誘導体のクロマトグラムを示す。T2C4と3C4、T2C6とT3C6の保持時間は同一であり、ピーク強度も等しい。また、それぞれのスペクトルも等しいことから、これらの異性体は同一の物質であることが推測される。すなわち、3-アルケナルはDNPHと反応する時、対応する2-アルケナル誘導体に異性化することが考えられる (Scheme 3)。従って、DNPH誘導体法では2-アルケナルと3-アルケナルを分けて分析することが出来ない。

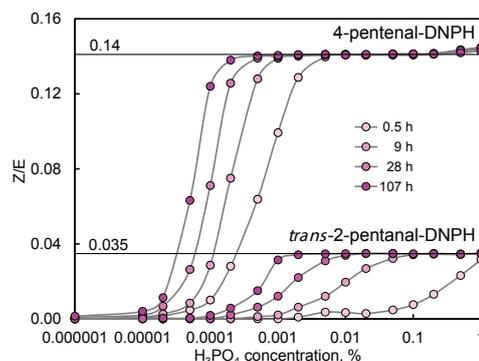


Fig. 2. Changes in the isomer ratios of 4-pentenal and *trans*-2-pentanal DNPhydrazone with phosphoric acid. Reproduced with permission from Fig. 4 in Ref. [7].

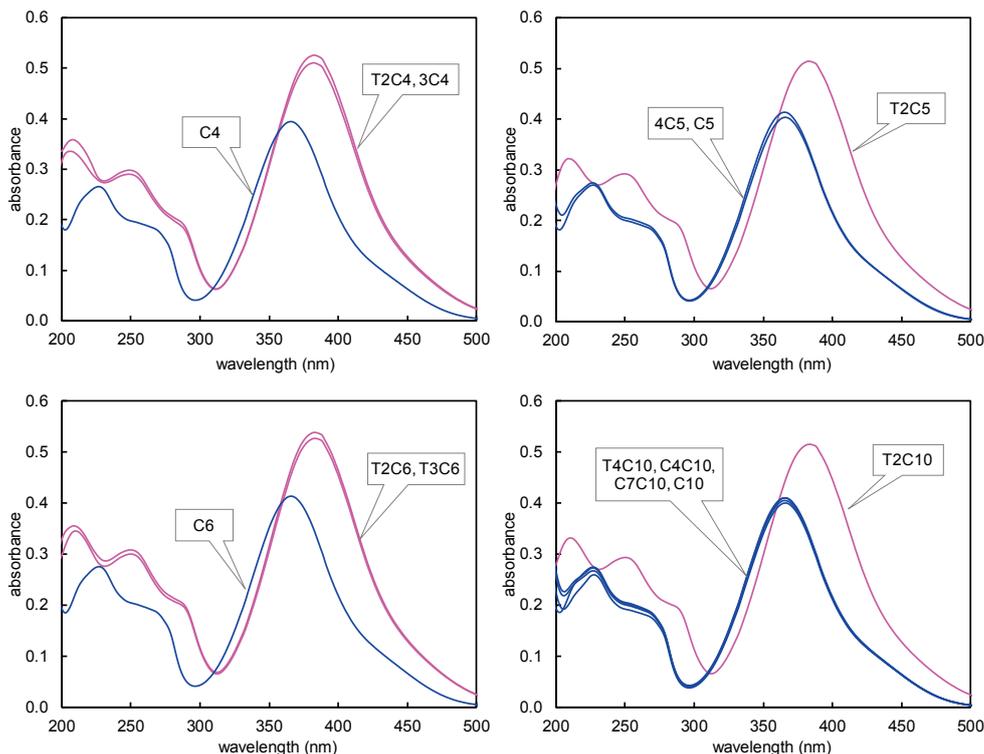


Fig. 3. UV- visible absorption spectra of alkenal-2,4-dinitrophenylhydrazones in 50/50 v/v mix solution of acetonitrile/water. (20 μ mol/L). Reproduced with permission from Fig. 2 in Ref. [7].

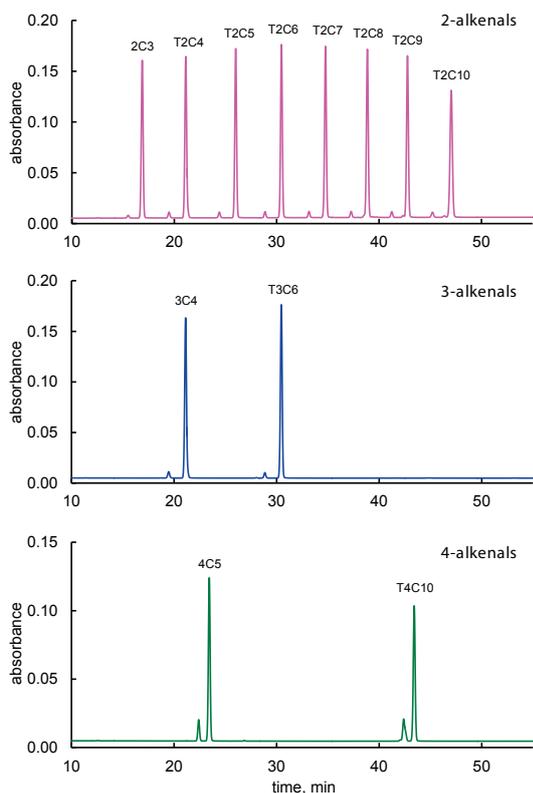
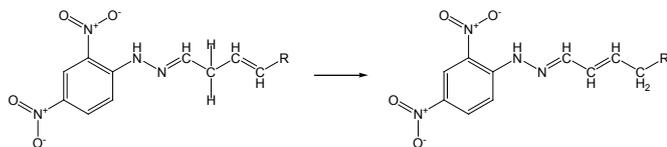


Fig. 4. Chromatograms of alkenal-2,4-DNPhydrazones. Reproduced with permission from Fig. 1 in Ref. [7].



Scheme 3. UV- visible absorption spectra of alkenal-2,4-dinitrophenylhydrazones in 50/50 v/v mix solution of acetonitrile/water. (20 μmol/L)

ケトン類 [8]

ケトン類のヒドラゾン誘導体もアルデヒド類と同様に酸触媒の下で異性体を生じる。Fig. 5に2-ブタンヒドラゾン誘導体の様々なリン酸濃度における異性体比の変化を示す。2-ブタン誘導体の場合、異性体比が0.20で平衡状態になる。しかし、この時、DNPH誘導体の減少及びDNPHの生成が観測された[8]。Fig. 6に2-ブタン - DNPH誘導体 (10 μmol/L) にリン酸を0.1 mol/L添加したときのクロマトグラムの変化を示す。時間の経過に伴い、DNPHのピークが出現すると同時に2-ブタン誘導体のピークが減少し、平衡状態に達する。なお、2-ブタン誘導体の減少に伴う異性体比の変化は観測されず、常に一定である。前述したように、カルボニル化合物とDNPHの反応は、DNPHのカルボニル炭素への求核付加 - 脱水反応であり可逆反応である。したがって、誘導体の安定性はカルボニル炭素上の局所的な正電荷が小さいケトン誘導体の方がより不安定である。また立体因子もケトン誘導体の方が不安定であるので、リン酸に含まれていた水により平衡状態が変わったことが考えられる。Fig. 7に2-ブタン - DNPH誘導体 (100 μmol/L) に水を添加した時の経時変化を示す。水を添加することで逆反応が起き、2-ブタン誘導体濃度が減少するとともにDNPH濃度が増加する[8]。湿度の高いときにDNPHカートリッジを用いてケトン類を捕集、分析するときは注意が必要である。

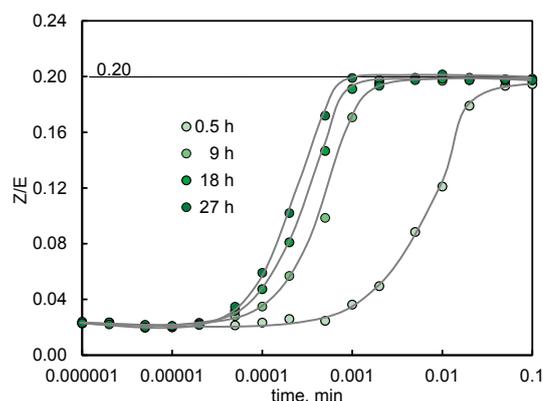


Fig. 5. Changes in the isomer ratios of 2-butanone-DNPhydrazone with phosphoric acid. Reproduced with permission from Fig. 2 in Ref. [8].

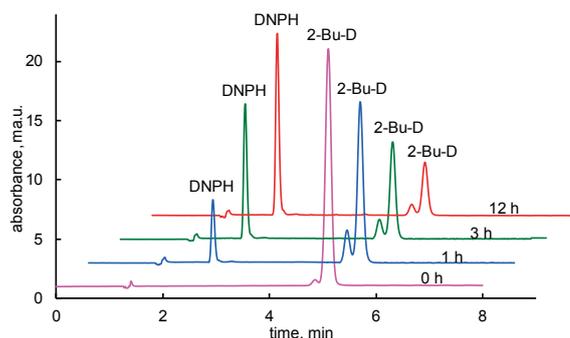


Fig. 6. Changes in chromatographic profile of 2-butanone-2,4-dinitrophenylhydrazone with time at 0.1 mol/L phosphoric acid acetonitrile solution. Reproduced with permission from Fig. 4 in Ref. [8].

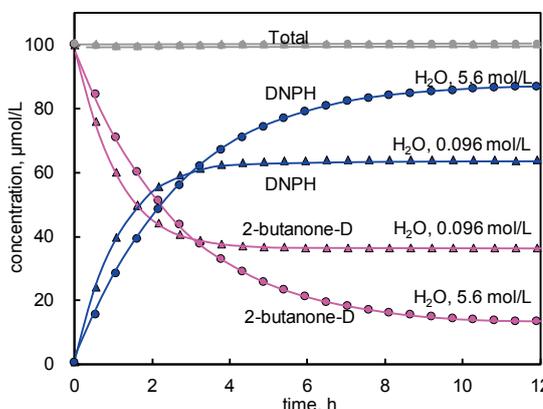


Fig. 7. Decomposition of 2-butanone-DNPhydrazone with water. Reproduced with permission from Fig. 5 in Ref. [8].

異性体比

前述したようにアルデヒド類、ケトン類のヒドラゾン誘導体にはE/Z幾何異性体が存在する。これらの異性体比は、酸濃度にかかわらず常に一定である。Table 1にこれらの異性体比と極大吸収波長を示す。極大吸収波長はE-異性体の方がZ-異性体より長波長側に偏る。アクロレインを除く2-アルケナール誘導体の異性体比 (Z/E) は約0.035、アクロレイン誘導体は最も小さい異性体比 (0.018) を示す。また、アセトアルデヒド誘導体を除く飽和アルデヒド誘導体は約0.15、アセトアルデヒド誘導体の異性体比は最も大きい値 (0.32) を示す。一方、ケトン類のヒドラゾン誘導体は0.2~0.25の異性体比を示す。

物質ごとに異性体比が異なり、極大吸収波長も異なることから、

HPLCやGC/MSを用いてDNPH誘導体を分析する際は、異性体について十分留意する必要がある。

Table 1. The isomer ratio and maximum absorption wavelengths of (*E*- and *Z*-) isomers of DNPhydrazone derivatives at 50/50 v/v acetonitrile/water.

Carbonyls	Isomer ratio Z/E	λ_{max} , nm Z-isomer	λ_{max} , nm E-isomer
alkanals			
formaldehyde	n.a.	356	
acetaldehyde	0.32	360	365
propanal	0.14	358	366
butanal	0.15	358	365
pentanal	0.15	358	365
hexanal	0.16	358	365
heptanal	0.15	358	365
octanal	0.15	358	364
nonanal	0.15	358	364
decanal	0.16	358	364
alkenals			
2-propenal	0.018	367	374
<i>trans</i> -2-butenal	0.035	373	383
<i>trans</i> -2-pentenal	0.035	373	383
<i>trans</i> -2-hexenal	0.035	373	383
<i>trans</i> -2-heptenal	0.035	373	383
<i>trans</i> -2-octenal	0.035	373	383
<i>trans</i> -2-nonenal	0.036	373	383
<i>trans</i> -2-decenal	0.036	373	383
ketones			
2-propanone	n.a.	369	
2-butanone	0.20	367	369
2-pentanone	0.24	367	368
2-hexanone	0.25	367	370

ヒドラゾン誘導体の還元的アミノ化 [9] (ダブルピークのシングルピーク化)

ヒドラゾン誘導体にC=N二重結合があるため幾何異性体を生じ、HPLC分析において種々の問題を引き起こす。従って、この二重結合を開裂すれば異性体の問題を解消できるはずである。そこで、ヒドラゾン誘導体をScheme 4の反応により2-ピコリンボランを用いて還元的にアミノ化し、HPLCで分析する方法を開発した[9]。C1~C10のアルデヒド2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体50 μ mol/Lに2-ピコリンボランを添加したときのHPLCクロマトグラムをFig. 8に示す。添加前(上段)は*Z*, *E*の幾何異性体によるダブルピークが検出されるが、2-ピコリンボランを添加すると、還元体のピークが出現しはじめ、20分経過(中段)するとほぼ半分、80分経過(下段)すると全て還元体に変換する。この還元体はC=N二重結合を持たないので、いずれの誘導体もシングルピークである。アセトアルデヒドDNPH誘導体と還元体の紫外吸収スペクトルをFig. 9に示す。



Scheme 4. Scheme of the reductive amination of carbonyl 2,4-DNPhydrazone with 2-picoline borane.

二重結合が無くなるため、紫外可視吸収スペクトルが5~8 nm短波長側に偏り、極大吸収波長は352nmを示した。ヒドラゾンの2-ピコリンボランによる還元的アミノ化反応は、酸触媒の存在により速度が速くなる。リン酸を触媒とした場合、リン酸量の増加に伴い反応速度が速くなったが、50 mmol/Lを超えるとクロマトグラムのピーク形状が崩れてしまい、定量が困難になる。

実際に環境大気をDNPHカートリッジ (Lp DNPH S10, Supelco) に100 mL/minの流速で24時間捕集した後、アセトニトリル5 mLで抽出する。この抽出溶液に0.1 mol/Lの2-ピコリンボランアセトニトリル溶液を100 μ L、触媒として1 mol/Lのリン酸アセトニトリル溶液を100 μ L添加する。20分間放置した後、HPLCで分析した時のクロマトグラムをFig. 10に示す。なお、分離カラムにはSupelco, Ascentis® RP-Amide (150mm \times 4.6 mm, 3 μ m)を使用した。DNPHカートリッジの溶出液(上図)には、各誘導体の異性体によるダブルピークが検出されるが、2-ピコリンボランを添加することによりDNPH誘導体が還元され、全てシングルピークになった(下図)。この還元的アミノ化により、ダブルピークに起因する様々な問題が解消されるので、高い分析精度が確保される。

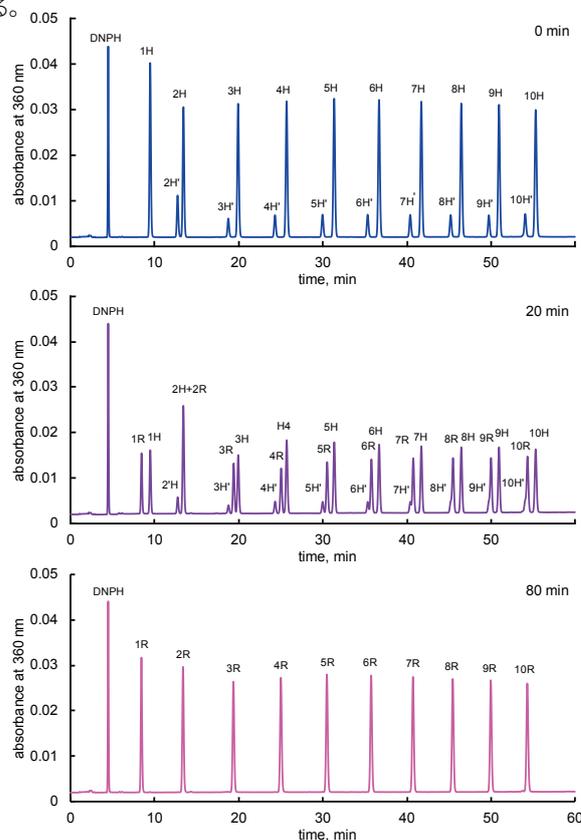


Fig. 8. Chromatographic profiles of DNPhydrazone and their reduced forms changing with reaction time. Number of peak name indicates carbon number of precursor aldehyde (1: formaldehyde, 2: acetaldehyde, 3: propanal, 4: butanal, 5: pentanal, 6: hexanal, 7: heptanal, 8: octanal, 9: nonanal, and 10: decanal), "H" indicates DNPhydrazone derivative and "R" indicates reduced form of DNPhydrazone derivative. Prime sign indicates *Z*-isomer of DNPhydrazone derivative. Reproduced with permission from Figure 3 in Ref. [9].

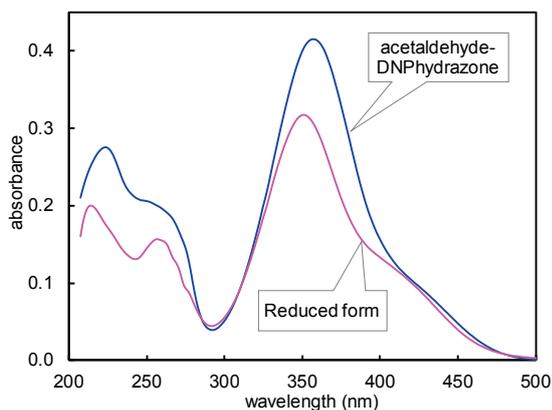


Fig. 9. UV spectra of acetaldehyde DNPhhydrazone and its reduced form. Reproduced with permission from Figure 1 in Ref. [9].

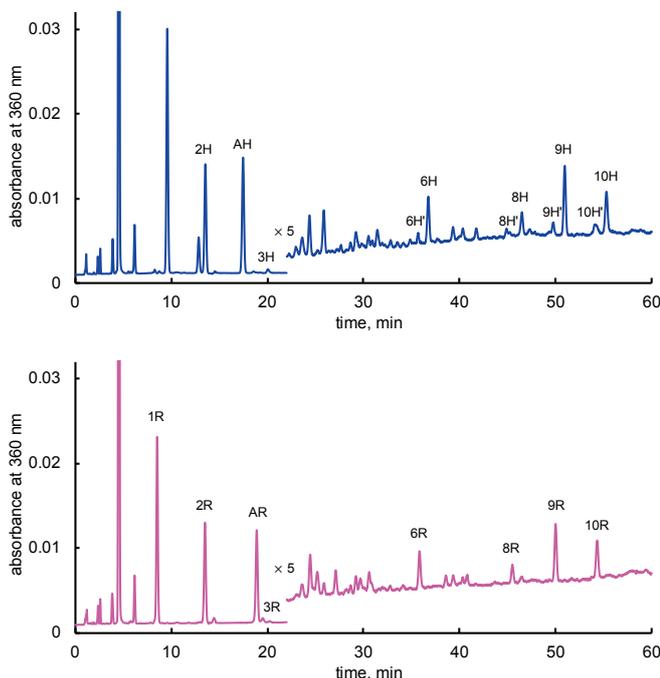


Fig. 10. Chromatographic profiles of DNPhhydrazones (upperpanel) and their reduced forms (lower panel). The number of the peak name indicates the carbon number of the precursor aldehyde. "H" indicates the DNPhhydrazone derivative and "R" indicates the reduced form of the DNPhhydrazone derivative. The prime sign indicates the Z-isomer of the DNPhhydrazone derivative. AH and AR indicate acetone DNPhhydrazone and its reduced form (N-(2,4-dinitrophenyl)-N-isopropylhydrazine). Reproduced with permission from Figure 5 in Ref. [9].

還元的アミノ化による グルタルアルデヒドの分析 [10]

グルタルアルデヒドのヒドラゾン誘導体は官能基が二つあるため *E-E*, *E-Z*, *Z-Z* の三つの幾何異性体が存在し、HPLCクロマトグラムでも三つのピークが検出される。グルタルアルデヒドのヒドラゾン誘導体を2-ピコリンボランを用いて還元的アミノ化を行うと特異な反応が起こる。例えば、0.5 mmol/Lグルタルアルデヒド-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体アセトニトリル溶液2 mLに1 mol/Lのリン酸アセトニトリル溶液1 mLを添加する。15分間放置した後、0.1 mol/Lの2-ピコリンボランアセトニトリル溶液を200 μ L添加し、10 mLに定容する。この溶液をHPLCで分析すると、2-ピコリンボラン添加前にはFig. 11 上図に示すようなヒドラゾン誘導体の幾何異性体による3つのピークが検出されたが、15分間で2種類の幾何異性体は完全に還元され Fig. 11 下図に示すような1つのピークになった。このピークの物質をGC/MS及びNMRで同定すると、ピペリジン骨格を有するN-(2,4-ジニトロフェニル)-1-ピペリジナミン (DNPPA) であった。すなわち、グルタルアルデヒドは、Scheme 5の反応により最終的にDNPPAに誘導体化されることが明らかになった。

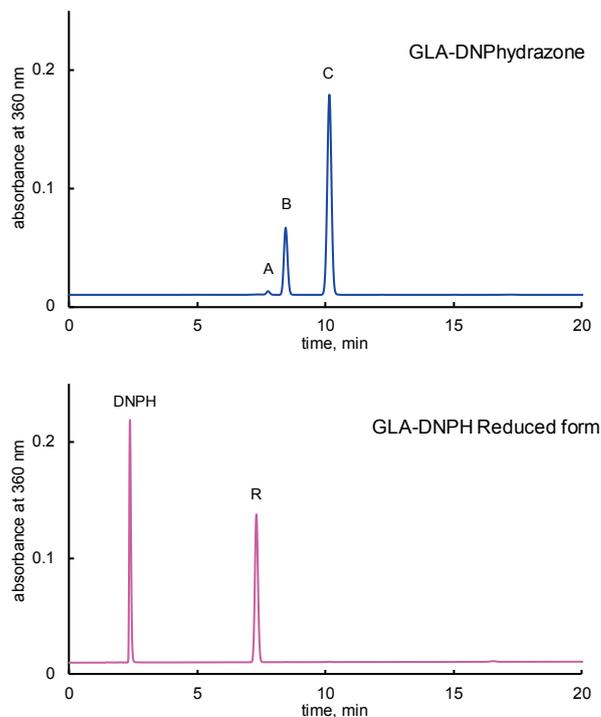


Fig. 11. Chromatograms of GLA-DNPhhydrazone derivative (upper) and its corresponding reduced form (lower). Reproduced with permission from Fig. 2 in Ref. [10].

グルタルアルデヒドの還元的アミノ化反応は、酸触媒であるリン酸によって速くなる。リン酸濃度を変化させて2-ピコリンボランを反応させた時の各物質の経時変化をFig. 12に示す。リン酸濃度が50 $\mu\text{mol/L}$ のとき、15分程度で反応は終了する。

実際にグルタルアルデヒドを使用している病院検査室の空気をDNPHカートリッジで捕集し、溶出液を2-ピコリンボランで還元してHPLCで分析した時のクロマトグラムをFig. 13に示す。なお、分離カラムにはSupelco、Ascentis® RP-Amide (150mm \times 4.6 mm, 3 μm)を使用した。グルタルアルデヒドDNPH誘導体の3つの異性体ピークがDNPPAの一つのピークになり分析精度が向上した。

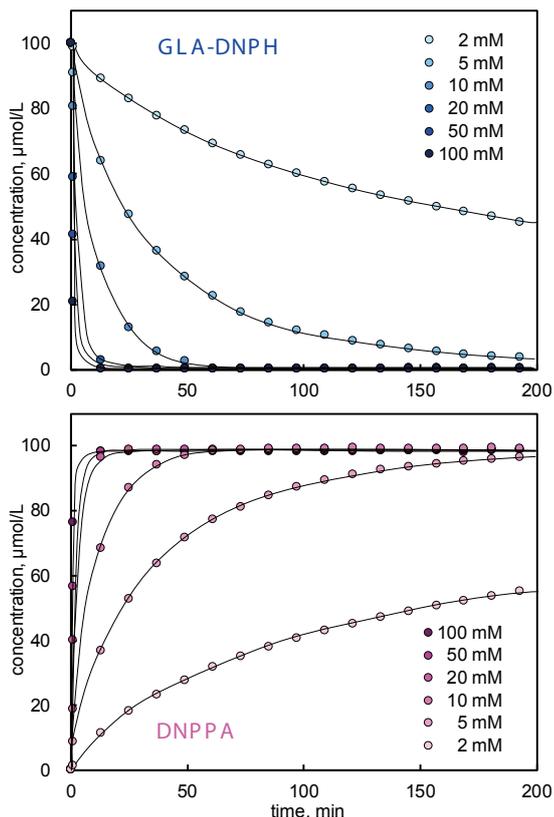
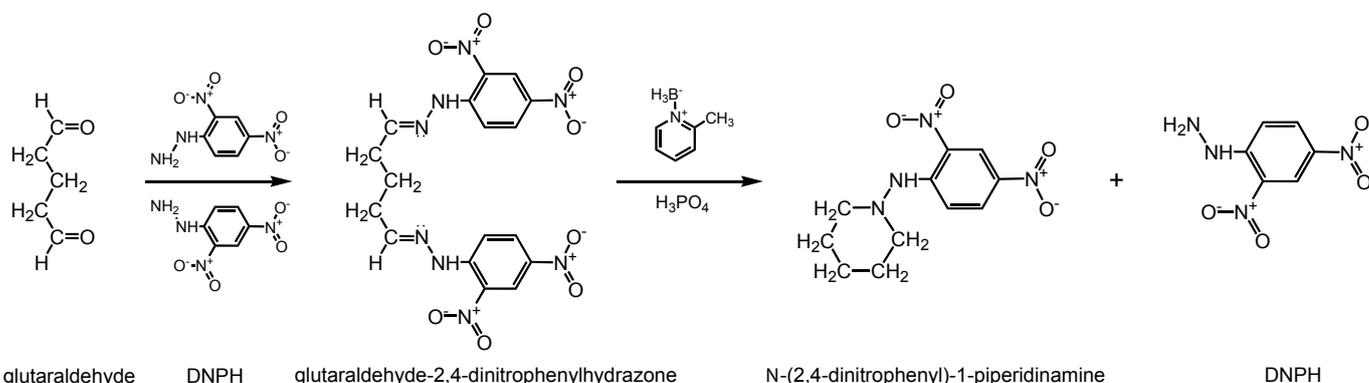


Fig. 12. Changes in GLA-DNPhydrazone (lower) and its reduced form (upper) concentrations with time under various concentrations of phosphoric acid. Reproduced with permission from Fig. 5 in Ref. [10].



Scheme 5. Reductive amination of GLA-DNPhydrazone with 2-picoline borane. Reproduced with permission from Fig. 4 in Ref. [10].

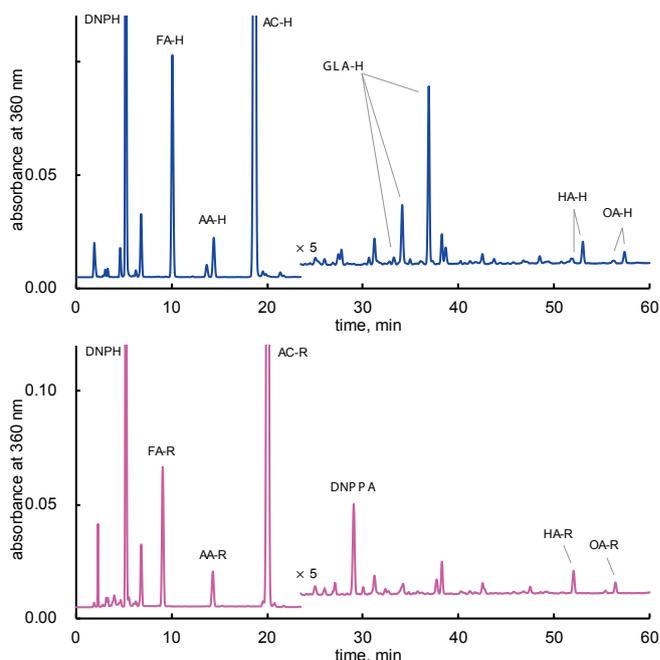


Fig. 13. Chromatographic profiles of DNPhydrazone (upper panel) and their reduced forms (lower panel). The separation was performed in the gradient mode. FA, formaldehyde; AA, acetaldehyde; AC, acetone; HA, hexanal; OA, octanal. “H” indicates DNPhydrazone derivative and “R” indicates reduced form of DNPhydrazone derivative. Reproduced with permission from Fig. 6 in Ref. [10].

フタルアルデヒドとDNPHの反応 [11]

近年、オルトフタルアルデヒド (OPA) はグルタルアルデヒドの代替消毒剤として使用され始めている。フタルアルデヒドをDNPHで誘導体化すると、その分子構造から3つの位置異性体 (オルト、イソ、テレ) が生成する。イソとテレフタルアルデヒドの場合、DNPHが過剰の状態で作成すると、主要な生成物はビス誘導体であり、フタルアルデヒドが過剰な状態で合成すると、主要な生成物はモノ誘導体である。一方、オルトフタルアルデヒドの場合は、どちらの条件でもビス誘導体だけが生成する[11]。

OPA標準ガスをDNPH-カートリッジで捕集した後、アセトニトリルで溶出しHPLCで分析した。溶出溶液中でのモノ、ビス誘導体の経時変化をFig. 14に示す。溶出直後の溶液にはモノとビス誘導体が混在するが、時間とともにビス誘導体の量が増大し4時間で、OPAは全てビス誘導体になった[11]。このモノ誘導体からビス誘導体への変化は、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、酢酸エチルなどの非プロトン性極性溶媒の場合に速く、メタノールなどのプロトン性極性溶媒の場合は非常に遅い。

実際に内視鏡の消毒にフタルアルデヒドを使用している病院検査室の空気をDNPHカートリッジで捕集した時のHPLCクロマトグラムをFig. 15に示す。なお、分離カラムにはSupelco、Ascentis® RP-Amide (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) を使用した。OPAはヘプタナール誘導体とオクタナール誘導体の間にビス誘導体としてのみ検出される。

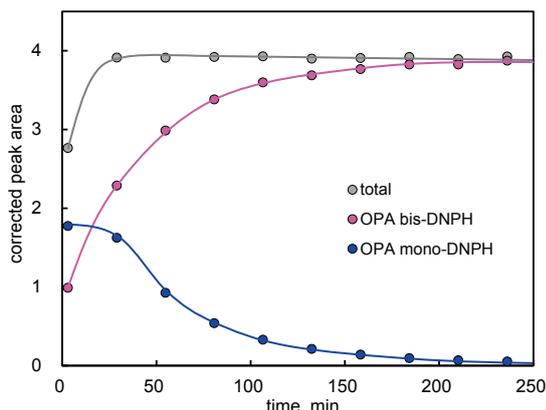


Fig. 14. Transformation of OPA mono-DNPhydrazone to OPA bis-DNPhydrazone in acetonitrile. OPA mono-DNPhydrazone data were converted by multiplying the absorbance by the molar absorptivity ratio of bis- to mono-DNPhydrazone (i.e. 1.7). Reproduced with permission from Fig. 4 in Ref. [11].

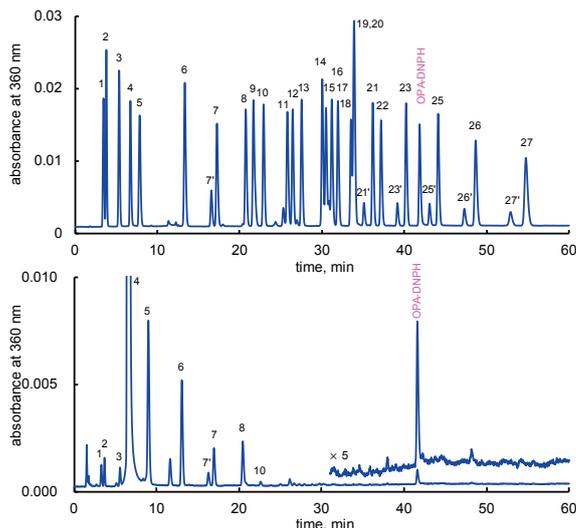
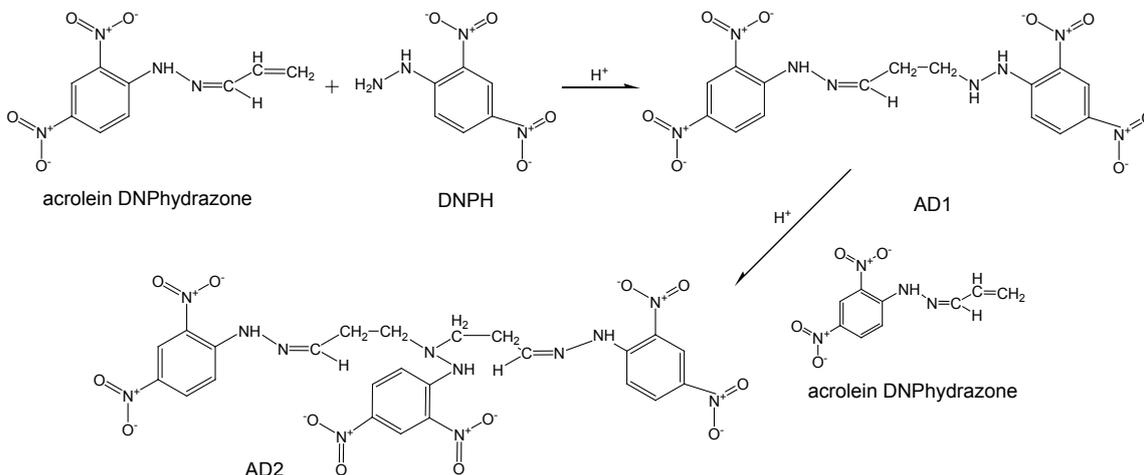


Fig. 15. Chromatograms of carboxylic acid and carbonyl 2,4-dinitrophenylhydrazones. (A) Reference solution (20 μmol/L, 26 components). (B) Sample solution from workplace air. A prime sign indicates the Z-isomer. Reproduced with permission from Fig. 8 in Ref. [11].

DNPHカートリッジ中でのアクロレイン誘導体の分解 [12]

アクロレイン (ACR) を含む2-アルケナル類はα炭素に二重結合を有するため、ヒドラゾン誘導体に未反応のDNPHが付加してしまい、正確な定量ができない。ACRヒドラゾン誘導体へのDNPH付加反応をScheme 6に示す。また、Fig. 16にACR標準ガスをDNPHカートリッジ (Lp DNPH S10, Supelco) に通気し、所定時間静置した時の経時変化を示す。ACRヒドラゾン誘導体は非常に速い速度で分解し、付加物AD1、AD2を生成する。この付加反応はDNPHカートリッジ中だけでなく、溶出液中でも進行する。しかし、溶液中での分解は比較的遅く、付加物はAD1だけである。

このDNPHカートリッジ中での付加反応を阻止するため、空気中のACRをハイドロキノン (HQ) 含浸シリカカートリッジ (HQカートリッジ) に一旦吸着捕集した後、溶出溶液中でDNPH誘導体化することで、ヒドラゾン誘導体の分解を防ぐ方法を開発した[12]。HQはACRの重合を防ぐための重合禁止剤である。また、溶出液中での分解は、アセトニトリル等の非プロトン性極性溶媒で付加反応が進行するので、誘導体化後にプロトン性極性溶媒 (エタ



Scheme 6. Decomposition of acrolein DNPhydrazone with DNPH

ノール)を添加することで回避することが出来る[12]。HQカートリッジをDNPHカートリッジの前段に取り付け捕集を行った時のACR-Dの経時変化をFig. 16にピンクの丸で示した。HQカートリッジ中では、ACRは最低8時間まで安定である。

実際にタバコ主流煙に含まれるACRを捕集した時には高い精度で分析可能であった。しかし、タバコ主流煙の捕集量は600mL程度の少量であり、実際の大気捕集に適用するとHQカートリッジを破過してしまう。担体としてシリカではなくより強力なカーボンモレキュラーシーブスCarboxen® 572カートリッジ (Supelco, Carboxen 572 for Tobacco Smoke) [13, 14]が有効だと思われる。

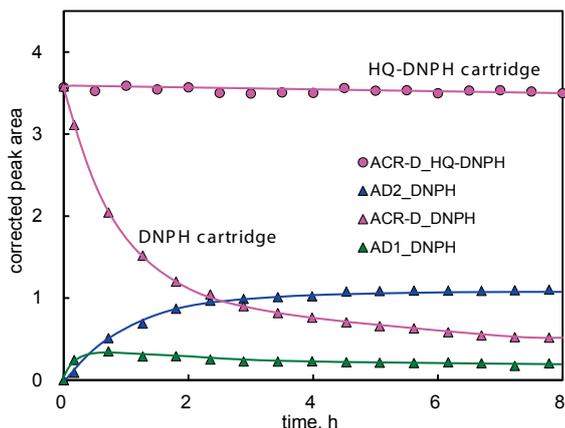
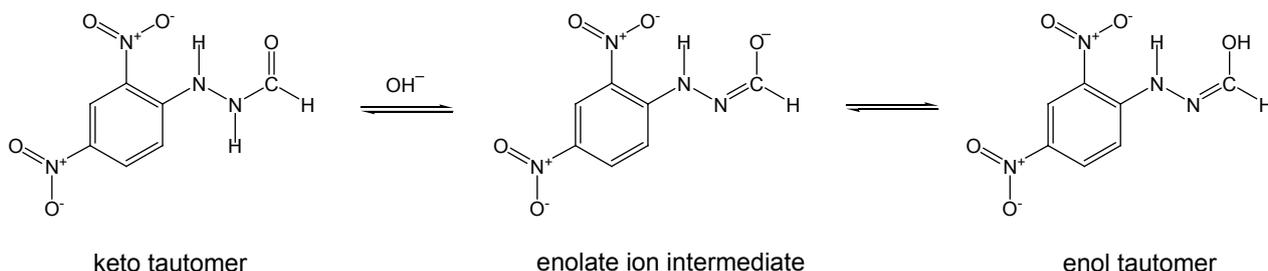
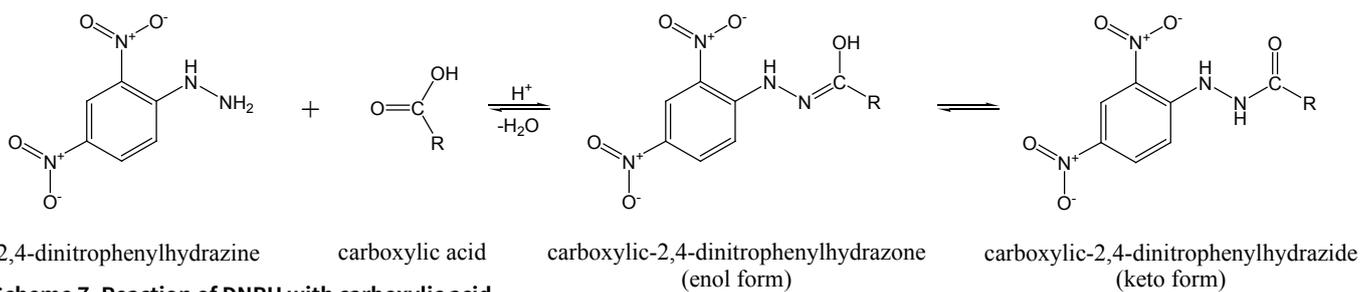


Fig. 16. The decomposition of acrolein DNPhydrazone (ACR-D) and the formation of adducts (AD1, AD2) in a DNPH-cartridge at 35°C. Circles indicate the data obtained from a HQ-DNP cartridge method. Reproduced with permission from Fig. 6 in Ref. [12].

DNPHと低級脂肪酸の反応 [15]

前述したように、DNPHとカルボニル化合物の反応は、今から約90年前に発見された。そして現在まで、DNPHはアルデヒド類とケトン類のカルボニル基とだけ反応し、カルボン酸やエステル類のカルボニル基とは反応しないとされていた。しかし、DNPHカートリッジにギ酸の蒸気を通気すると、DNPHカートリッジ中のDNPHシリカの色が徐々に薄くなりDNPHに変化がみられる。この溶出液をNMRで分析した結果、ギ酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラジドの生成が確認された[15]。すなわち、ギ酸とDNPHが反応して、まず、ギ酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンが生成し、これがケト-エノール互変編異性によりギ酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラジドが生成したことが推測される (Scheme 7)。DNPHカートリッジ中でのDNPHとギ酸-2,4-ジニトロフェニルヒドラジドの経時変化をFig. 17に示す。ギ酸とDNPHの反応は比較的遅く、全て反応するのに400分を要した。しかし、DNPH-シリカのリン酸量を1% w/vにし、捕集後のカートリッジを加熱することで反応は促進される。

カルボン酸-DNPH誘導体のケト-エノール互変編異性は、リン酸水素カリウム等の塩基性物質を加えることでコントロールできる (Scheme 8)。Fig. 18に様々なリン酸水素カリウム濃度におけるカルボン酸-DNPH誘導体アセトニトリル溶液の紫外可視吸収スペクトルを示す。極大吸収波長が337 nm付近の吸収がヒドラジド誘導体(ケト型)を、418 nm付近の吸収はヒドラゾン誘導体(エノール型)を示し、等吸収点は372 nmである。HPLC分析において、これらの物質の保持時間は移動相の水素イオン濃度によって変化するので、適切な量のリン酸水素カリウムを移動相に添加することで完全に分離することが出来る。Fig. 19にリン酸水素カリウムを0.1 mmol/L移動相に添加した時のC1~C6のカルボン酸とアルデヒドのDNPH誘導体のクロマトグラムを示す。なお、分離カラムにはSupelco、Ascentis® RP-Amide (150 mm × 3 mm, 3 μm)を使用した。全ての物質は完全に分離し、C1~C6のカルボン酸とアルデヒドの同時定量が可能である。



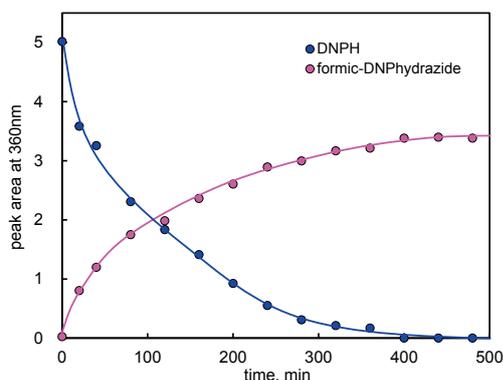


Fig. 17. The reaction of adsorbed formic acid and DNPH with time. ($\lambda=360$ nm). Reproduced with permission from Figure 1 in Ref. [15].

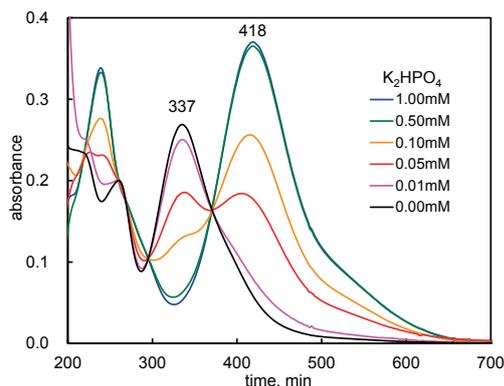


Fig. 18. Changes in the UV-visible absorption spectra of formic-DNPH derivative with the mobile phase containing various concentrations of dipotassium hydrogen phosphate.

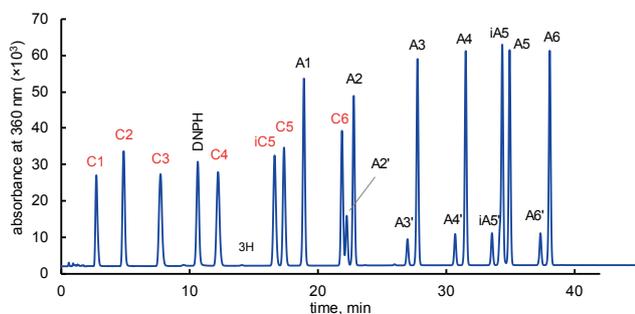


Fig. 19. Chromatographic profiles of C1-C6 carboxylic-DNPhydrazides and aldehyde-2,4-dinitro-phenylhydrazones on two different columns (100 μ mol/L) at maximum absorption wavelengths between 300 nm and 500 nm. A prime sign indicates the Z-isomer. Reproduced with permission from Fig. 10 in Ref. [16]. C1, formic acid DNPhydrazone; C2, acetic acid DNPhydrazone; C3, propionic acid DNPhydrazone; C4, butyric acid DNPhydrazone; i-C5, i-pentanoic acid DNPhydrazone; n-C5, n-pentanoic acid DNPhydrazone; C6, hexanoic acid DNPhydrazone; A1, formaldehyde DNPhydrazone; A2, acetaldehyde DNPhydrazone; A3, propionaldehyde DNPhydrazone; A4, butyraldehyde DNPhydrazone; i-A5, i-pentanal DNPhydrazone; n-A5, DNPhydrazone; n-pentanal, DNPhydrazone; A6, hexanal DNPhydrazone.

まとめ

DNPHとカルボニル化合物の反応は、約90年前に発見された反応であるが、筆者らの研究により、異性体の挙動、2-ピコリンボランによる還元的アミノ化、DNPHとカルボン酸の反応などが明らかになった。今後、これらの知見を基に、空気中におけるカルボニル化合物の分析技術をさらに向上させたい。

文献

- [1] Brady, O. L.; Elsmie, G. V., The use of 2,4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for aldehydes and ketones. *Analyst* **1926**, *51*, (599), 77-78.
- [2] Beasley, R. K.; Hoffmann, C. E.; Rueppel, M. L.; Worley, J. W., Sampling of Formaldehyde in Air with Coated Solid Sorbent and Determination by High-Performance Liquid-Chromatography. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, (7), 1110-1114.
- [3] U.S. Environmental Protection Agency (1999), Compendium method TO-11A, Determination of Formaldehyde in Ambient Air Using Adsorbent Cartridge Followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), U.S. Environmental Protection Agency: Research Triangle Park, NC, 1999.
- [4] Uchiyama, S.; Aoyagi, S.; Ando, M., Evaluation of a diffusive sampler for measurement of carbonyl compounds in air. *Atmos. Environ.* **2004**, *38*, (37), 6319-6326.
- [5] Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Kunugita, N., A diffusive sampling device for simultaneous determination of ozone and carbonyls. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *691*, (1-2), 119-124.
- [6] Uchiyama, S.; Ando, M.; Aoyagi, S., Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **2003**, *996*, (1-2), 95-102.
- [7] Uchiyama, S.; Matsushima, E.; Aoyagi, S.; Ando, M., Measurement of acid-catalyzed isomerization of unsaturated aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives by high-performance liquid chromatography analysis. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *523*, (2), 157-163.
- [8] Uchiyama, S.; Kaneko, T.; Tokunaga, H.; Ando, M.; Otsubo, Y., Acid-catalyzed isomerization and decomposition of ketone-2,4-dinitrophenylhydrazones. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *605*, (2), 198-204.
- [9] Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Matsumoto, M.; Suzuki, G., Reductive amination of aldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazones using 2-picoline borane and high-performance liquid chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, (1), 485-9.
- [10] Uchiyama, S.; Sakamoto, H.; Ohno, A.; Inaba, Y.; Nakagome, H.; Kunugita, N., Reductive amination of glutaraldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone using 2-picoline borane and high-performance liquid chromatographic analysis. *Analyst* **2012**, *137*, (18), 4274-4279.
- [11] Uchiyama, S.; Matsushima, E.; Tokunaga, H.; Otsubo, Y.; Ando, M., Determination of orthophthalaldehyde in air using 2,4-dinitrophenylhydrazine-impregnated silica cartridge and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, (1-2), 165-71.
- [12] Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Kunugita, N., Determination of acrolein and other carbonyls in cigarette smoke using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, (26), 4383-4388.
- [13] Uchiyama, S.; Tomizawa, T.; Inaba, Y.; Kunugita, N., Simultaneous determination of volatile organic compounds and carbonyls in mainstream cigarette smoke using a sorbent cartridge followed by two-step elution. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1314*, (0), 31-37.
- [14] Uchiyama, S.; Hayashida, H.; Izu, R.; Inaba, Y.; Nakagome, H.; Kunugita, N., Determination of nicotine, tar, volatile organic compounds and carbonyls in mainstream cigarette smoke using a glass filter and a sorbent cartridge followed by the two-phase/one-pot elution method with carbon disulfide and methanol. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1426*, 48-55.
- [15] Uchiyama, S.; Matsushima, E.; Aoyagi, S.; Ando, M., Simultaneous determination of C1-C4 carboxylic acids and aldehydes using 2,4-dinitrophenylhydrazine-impregnated silica gel and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, (19), 5849-54.
- [16] Uchiyama, S.; Inaba, Y.; Kunugita, N., Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, (17), 1282-1289.

Supelcoブランドの新しい大気捕集製品

大気や室内環境中の化学物質をどのように採取するかはマトリックスや化合物により異なります。誤った捕集方法は測定結果も信頼性のないものとなります。正しい測定結果のためには、対象化合物に適した捕集、試料前処理、分析テクニックを理解することが必要です。

Supelcoブランドの大気捕集製品は日本、米国、欧州でも広く知られており、高品質で定評がある製品をグローバルに供給しています。今号では注目のユニークな新製品をご紹介します。

DSD-BPE/DNPH

特長

- パッシブサンプラー
- アルデヒド、ケトン、オゾン同時測定が可能
- ポンプ不要
- 屋外でもオゾンの影響を受けずにアルデヒドの定量が可能
- 拡散フィルターを採用で風の影響を受けない

仕様

吸着剤：BPE/DNPH含浸シリカゲル
粒子径：60/80 mesh、球形シリカゲル

製品名	入数	カタログ番号	希望販売価格
DSD-BPE/DNPH	10	28294-U	¥28,000

Carboxen 572 Rezorian tube

特長

- アクティブサンプラー
- たばこ煙に含まれる揮発性有機化合物 (VOC) とアルデヒドの定量が可能
- ひと吹きのとばこ煙でも測定可能
- インピンジャー不要
- VOCは二硫化硫黄で溶出後、GCで測定
- アルデヒドはメタノールで溶出後、2,4-DNPHで誘導体化後、HPLCで測定

仕様

吸着剤：Carboxen®
粒子径：20/45 mesh

製品名	入数	カタログ番号	希望販売価格
Carboxen レゾリアンチューブ (3ml)	10	54293-U	¥12,800
	50	54294-U	¥62,300

TOPICS 1

厚生労働省が新たにシックハウス症候群を引き起こすおそれのある化学物質3種 (2-エチル-1-ヘキサノール、テキサノール、2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート；TXIB) について、室内濃度の指針値策定を予定しています。この3物質の測定法は「室内空气中化学物質の採取方法と測定方法 (Ver.2)」の3.トルエン、*o*-, *p*-, *m*-キシレン及び *p*-ジクロロベンゼン等揮発性有機化合物の測定法を用いることになっており、捕集管には「内径3~4mm程度のガラス管にカーボン系吸着剤約300mg程度を充てんしたもの」と規定されており、対応製品としてOrbo™-91シリーズをご用意しています。

製品名	カタログ番号	希望販売価格
ORBO-91L 25本入り	4561	¥27,600
ORBO-91XL 25本入り	4565	¥27,600
ORBO-91T 25本入り	20366-U	¥33,500
ORBO-101 25本入り	20254-U	¥23,100

標準物質		
2-Ethyl-1-hexanol	08607-1ML-F	¥5,000
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	41601-1ML	¥9,500

TOPICS 2

2017年9月、大気・室内大気捕集用カートリッジおよび関連製品カタログを発行しました。アルデヒド、揮発性有機化合物、ニコチン、イソシアネートの捕集に必要なパッシブ・アクティブサンプラー、充填剤、熱脱離チューブを掲載しており、分析者必携のカタログです。



カタログ請求はこちら：

www.sigma-aldrich.com/catalog-jp

【環境】

SLB-IL PAHを用いた PAH類の異性体の高分離分析

Lisa McCombie, Product Manager GC, lisa.mccombie@sial.com; and Len Sidisky, R&D Manager Gas Chromatography

多環芳香族 (PAH) 類はあらゆる環境下において存在しています。PAHは残留性有機汚染物質 (POPs) として知られるグループに属し、発がん性物質として知られているため、モニタリングが重要です。これらの物質は、クロマトグラフィーで分離するのが困難な複数の異性体が存在します。SLB®-ILPAHはイオン液体を固定相に持つ特殊カラムです。固定相の選択性と効率的なカラムサイズを選択によって、いくつかの異性体を含むPAH類の高い分解が得られます。表1にカラムの仕様を示します。

表1. SLB-ILPAHカラム仕様

Application:	This special purpose and specially tested capillary GC column is designed for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). It incorporates an ionic liquid stationary phase. Each column is individually tested to ensure resolution of several key sets (phenanthrene / anthracene, benzo[a]anthracene / chrysene / triphenylene, and benzo [b]fluoranthene / benzo[k]fluoranthene / benzo[j]fluoranthene).
USP Code:	None
Phase:	Non-bonded; 1,12-Di(tripropylphosphonium)dodecane bis(trifluoromethanesulfonyl)imide
Temp. Limits:	Subambient to 300 °C (isothermal or programmed)

分離

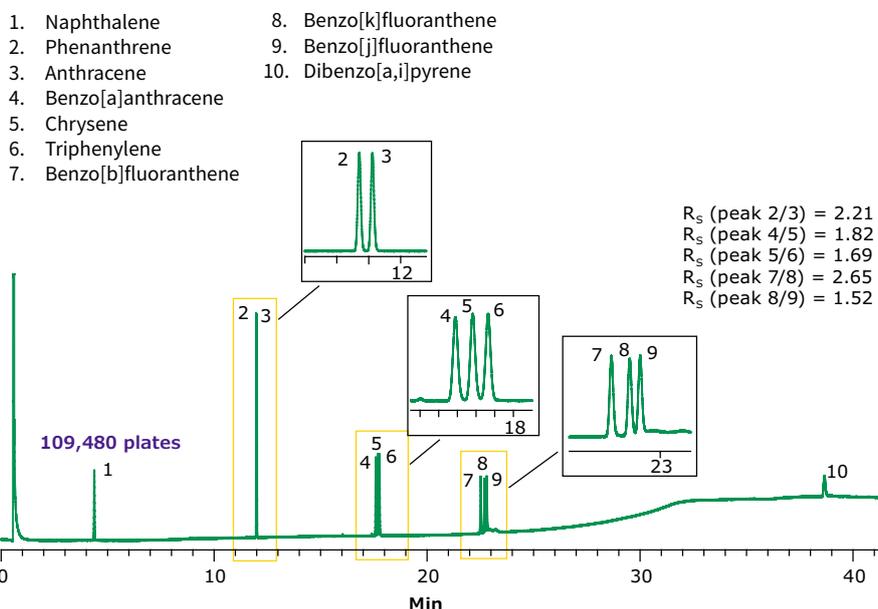
各SLB-ILPAHカラムは、PAH類に対する厳しい分離度要件を満たすことを確認しています。図1に、QCテストミックスの分析から得られたクロマトグラムを示します。このクロマトグラムから得られた分離度 (RS) の結果は以下のとおりです。

- フェナントレン/アントラセン=2.21
- ベンゾ[a]アントラセン/クリセン=1.82
- クリセン/トリフェニレン=1.69
- ベンゾ[b]フルオランテン/ベンゾ[k]フルオランテン=2.65
- ベンゾ[k]フルオランテン/ベンゾ[j]フルオラン=1.52

カラム効率もナフタレンの理論段数から測定、このクロマトグラムでは、109,480段と良好な値でした。

図1. QC Test Mix

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



22成分のPAHミックス

世界中の規制当局がPAH類の分析方法を公表しています。これらの方法に挙げられた分析対象物質の数は、16~24にわたります。実際の使用方法にさらに近いデータを示すために、頻繁に分析対象となっているPAH類を含む22成分のPAH混合溶液をSLB®-ILPAHカラムで分析しました。このカラムは、ピーク5/6、ピーク9/10、ピーク12/13/14について高い分離度を備えています。また、このカラムがジベンゾ[a,h]アントラセン（ピーク16）とインデノ[1,2,3-cd]ペリレン（ピーク17）のベースライン分離ができることがわかります。この中で最後に溶出するピークは、他のカラムでは共溶出することがほとんどで、質量分析法 (MS) を使わないと同定できません。

結論

イオン液体GCカラムの強みは独自の選択性です。多くの場合、ポリシロキサンポリマーやポリエチレングリコールのカラムより分離度が高くなります。PAH類の分析は、その他のカラムでは不可能な分離をイオン液体カラムがどのように達成できるかを示す良い一例です。また、SLB-ILPAHはPAH類を用いて特性試験を行っており、PAH類の分析を行う際におすすめのカラムです。

Featured Product

製品名	カタログ番号
SLB-ILPAH Capillary GC Column, 20 m × 0.18 mm I.D., 0.05 μm	29799-U

Related Product

製品名	カタログ番号
SLB-ILPAH Capillary GC Column, 15 m × 0.10 mm I.D., 0.03 μm	お問い合わせ

製品情報、アプリケーションは以下のウェブサイトでご覧下さい

SigmaAldrich.com/il-gc

ご存知ですか？

弊社では、PAH類の単一成分や混合溶液の認証標準物質 (CRM) をご用意しています。また、ご希望に応じてカスタム溶液も承っております。

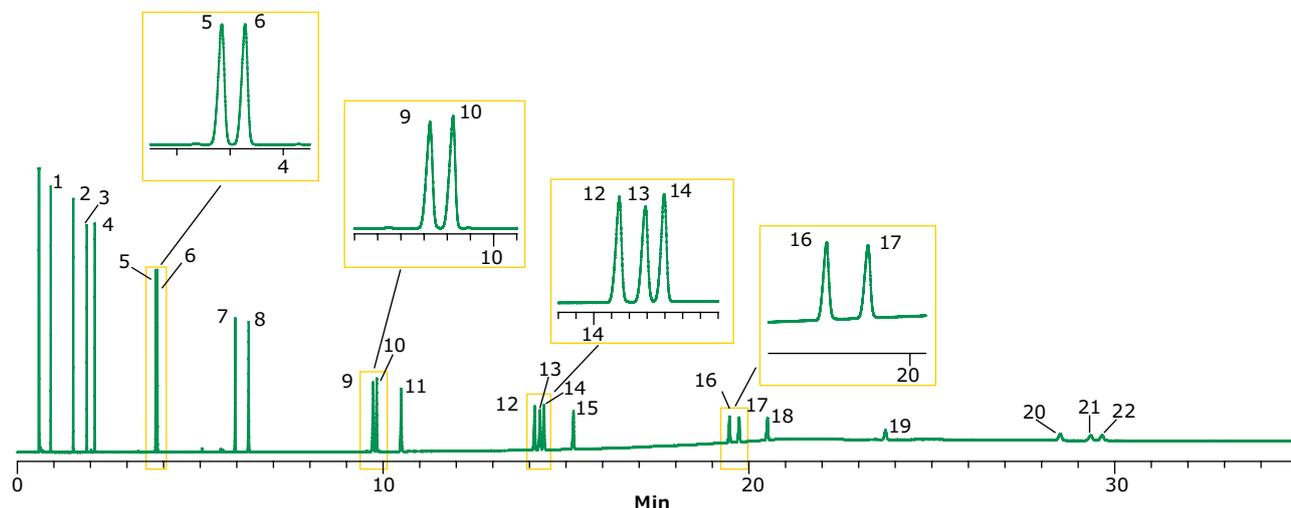
詳細については、以下のサイトをご覧ください。

SigmaAldrich.com/pahstandards

図2. 22成分のPAH混合

column:	SLB-ILPAH, 20 m × 0.18 mm I.D., 0.05 μm (29799-U)
oven:	150 °C, 15 °C/min to 225 °C, 5 °C/min to 300 °C (15 min)
inj. temp.:	300 °C
detector:	FID, 310 °C
carrier gas:	hydrogen, 1.3 mL/min, constant flow
injection:	1 μL, 300:1 split
liner:	2.3 mm I.D., split/splitless type, wool packed straight FocusLiner™ design
sample:	22 analytes, each at 100 μg/mL in methylene chloride

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



【環境】

表層水中のリン酸

A Rapid and Reliable Determination Method using the Photometric Spectroquant® Test

Katrin Schwind, Scientist Associate, Analytical Point-of-Use R&D, katrin.schwind@merckgroup.com

Gunter Decker, Senior Global Product Manager, Analytical Point-of-Use Analytics | Photometry, gunter.decker@merckgroup.com



表層水中のリン酸

リンは生物と植物に不可欠な元素です¹。自然界では、汚染されていない水の中で有機的に結合したリン酸、縮合リン酸塩、またはオルトリン酸の形で存在し、多くの場合、その化学式から $PO_4\text{-P}$ と呼ばれます。自然水中に存在する少量のリンが植物の成長を促進することはありません。しかし、リンの濃度が上昇すると藻類が増殖して水域の富栄養化につながります^{2,3}。

20世紀半ば、リン酸による水域の人為的汚染が、とりわけ肥料、廃水、および洗剤による広範に及ぶ富栄養化をもたらしました。洗剤へのリン酸の使用の中止と廃水処理工場でのリン酸沈殿処理によりリン酸濃度を下げる対策が講じられ、リン酸の環境負荷は約75%減少しました^{2,4}。

最も良い例はコンスタンツ湖（ボーデン湖、ドイツ）です。この湖の $PO_4\text{-P}$ 濃度は1970年代終わりに84 $\mu\text{g/L}$ でしたが、現在この大きな水域の $PO_4\text{-P}$ はわずか5~6 $\mu\text{g/L}$ のレベルです^{5,6}。

表層水中のリン酸測定

低い濃度の $PO_4\text{-P}$ の測定は容易ではありません。DIN EN ISO 10304-1によれば、イオンクロマトグラフィー法での低い濃度側の測定範囲は33 $\mu\text{g/L}$ $PO_4\text{-P}$ (100 $\mu\text{g/L}$ $PO_4\text{-P}$ と等価) であり、これは表層水に通常存在するリン酸の濃度よりはるかに高い値です。測光法では、これよりはるかに高い感度で測定できます。DIN EN ISO 6878によれば、測光法で面倒な抽出手順を行わない場合の水の中リンの定量下限は5 $\mu\text{g/L}$ $PO_4\text{-P}$ です⁸。

Spectroquant リン酸テストキット

Spectroquant リン酸テスト(カタログ番号114848)は、表層水のオルトリン酸含量を高い信頼性で定量化する、リーズナブルで使いやすい高感度な代替手段です。この方法は、リン酸の標準的な測定法であるDIN EN ISO 6878、APHA 4500-P E、およびEPA 365.2+3に類似しています。

Spectroquant ProveシリーズのProve 600分光光度計と100 mm角セルを用いて $PO_4\text{-P}$ の濃度を2.5 $\mu\text{g/L}$ のレベルで測定できるため、表層水中の低濃度の $PO_4\text{-P}$ をすばやく高い信頼性で測定できます。

Spectroquant リン酸テストは測定感度以外にも利点を持っていま

す。従来の測光法とは異なり、時間のかかる校正ステップが不要です。Spectroquantシリーズの機器はすべて10点校正の検量線が予めプログラムされているため、水サンプルのリン酸含量を正確に定量できます。

ランベルト-ベールの法則を適用し、様々なサイズのセル (Prove 600では10 mm、20 mm、50 mm、および100 mm) を使用すると0.0025~5.00 mg/L $PO_4\text{-P}$ の範囲で測定できるため、最初に検量線を作成しなくてもサンプル中の未知のリン酸濃度を直接的に定量できます。

Spectroquant®リン酸テストキットとの比較

(カタログ番号114848)とDIN EN ISO 6878に準拠した測光法

いずれの方法も同じ原理に基づいています。オルトリン酸イオンは、モリブデンおよびアンチモンイオンと硫酸溶液中で反応してリンモリブデン酸を生成します。リンモリブデン酸は次いでアスコルビン酸で還元されてリンモリブデンブルー(PMB)を形成し、これを測光法で定量します⁹。

標準法と比較したときにSpectroquantテストキットがもたらすさらなる利点は、予めプログラムされた検量線に加えて使いやすいことです。DIN EN ISO 6878法に従って測定するには、試薬を別々に調製しなければなりません。これには、検量線作成用に調製しなければならない標準溶液のほか、少なくとも5種類の別々の溶液の調製が必要です⁸。

Spectroquantテストキットには、分析に必要な試薬がすぐに使用できる包装形態で入っています。100 mmセルでの高感度リン酸定量に必要なことは、2つの試薬を加えることだけです。20滴の試薬 $PO_4\text{-1}$ と撚り切りスプーン4杯(付属品のマイクロスプーンを使用)の試薬 $PO_4\text{-2}$ を20 mLのサンプル溶液に加えるだけです。5分間の反応時間が経過してからサンプルの吸光度を光度計で測定すると、光度計のディスプレイにリン酸の濃度が表示されます。詳しい使用方は、Spectroquant リン酸テスト(カタログ番号114848)の製品ウェブサイトにあるアプリケーションの説明から、オンラインで利用可能な「地下水および表層水中のオルトリン酸高感度測定」をご覧ください¹⁰。

表層水中のリン酸濃度の定量にSpectroquantテストキットを用いて6つのサンプルの $PO_4\text{-P}$ 含量を調査しました。比較のため、DIN EN ISO 6878法に準拠した参照分析も実施しました。DIN法の検出限界である0.003 mg/L $PO_4\text{-P}$ は、DIN 32645に準拠して決定しました。

表1に、Spectroquantテストキットで得られた結果とDIN EN ISO 6878法で得られた結果を比較して示します。

表1: Spectroquantテストキットでの測定結果の比較

(Cat. No. 114848) and acc. to DIN EN ISO 6878

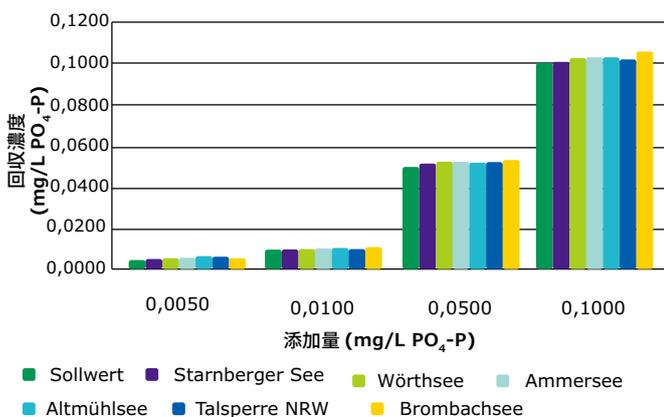
Surface water	β [mg/L $PO_4\text{-P}$]	
	Spectroquant®- Test	DIN EN ISO 6878
Lake Starnberger See	< 0.0025	< 0.003
Lake Wörthsee	< 0.0025	< 0.003
Lake Altmühlsee	0.0126	0.0130
Lake Brombachsee	0.0025	0.0056
Lake Ammersee	< 0.0025	< 0.003
Dam reservoir North Rhine Westfalia	< 0.0025	< 0.003

2つの方法は同程度の結果を示し、6サンプル中4サンプルのPO₄-P濃度が測定範囲を下回っていました。測定値が範囲内に入っていたのは6サンプル中2サンプルだけでした。ブロムバッハ湖のサンプルでは、検出された濃度に0.0031 mg/L PO₄-Pの差がありました。アルトミュール湖のサンプルでは、SpectroquantとDINの結果の差はわずか0.0004 mg/L PO₄-Pでした。DIN EN ISO法での回収率は97%でした。

参照分析手順に加え、標準添加法でもサンプルを測定しました。この調査では、5つの湖の水サンプルと1つの貯水池のサンプルに異なる4種類の濃度のPO₄-Pを添加し、それぞれのサンプル回収率を測定しました。図3にこの調査の結果を示します。

加えた標準濃度はすべてのサンプルで回収できました。平均回収率は105% ± 5%でした。

図3: 標準品添加後に回収したオルトリン酸の濃度



精度をこれ以上向上させる必要があれば、特定の測定範囲にユーザー校正を実行できます。これを、0.0025~0.0250 mg/L PO₄-Pの測定範囲で記録した10点校正の検量線で明らかにします。プロットしたグラフを図4に示します。

図4: 0.0025~0.0250 mg/L PO₄-Pの測定範囲での検量線

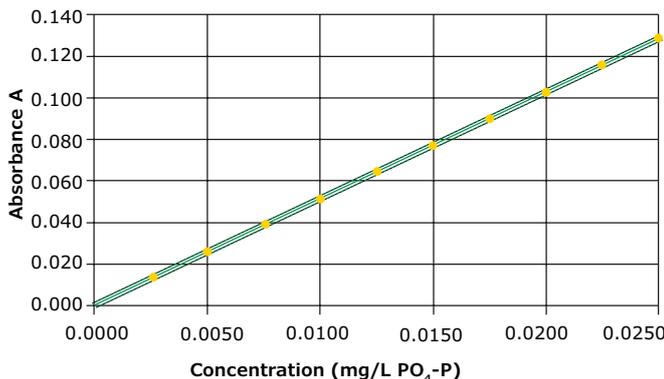


図4では良好な直線性を示しています。予めプログラムされた方法と比べて性能特性を著しく改善でき、±0.0001 mg/Lの標準偏差、±0.88%の変動係数、および±0.0003 mg/Lの信頼区間が達成されました(表2参照)。

表2: 性能特性の比較

	Pre-programmed method	User calibration
	0.0025 – 0.5000 mg/L PO ₄ -P	0.0025 – 0.0250 mg/L PO ₄ -P
Method standard deviation (mg/L)	0.0029	0.0001
Method coefficient of variation (%)	1.2	0.88
Confidence interval (mg/L)	0.006	0.0003

まとめ

Spectroquant リン酸テスト (カタログ番号114848) は、地下水と表層水に含まれるオルトリン酸の標準的な定量方法に対する迅速、リーズナブル、かつ高精度な代替手段です。その結果はDIN EN ISO 6878標準法を使用して得たものと同等です。標準添加法を使用することにより、テストキットが地下水と表層水に含まれるPO₄-Pの定量に適していることが示されました。

References

- H.-D. Belitz, W. Gosch, Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, 1st edition, 1982.
- D. Gleisberg, Chem. unserer Zeit, 1988, 22(6), 201-207.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 4500P - Phosphorus, 1999.
- G. Metzner, Phosphate aus Wasch- und Reinigungsmitteln im kommunalen Abwasser der Bundesrepublik Deutschland, 2006.
- Internationale Gewässerschutzkommission für den Bodensee, Gesunder Bodensee dank niedriger Phosphorwerte, IGKB press release, June .
- Bodensee-Wasserversorgung, <http://www.zvbvw.de/index.php?id=135> [date of access: 25 August 2016]
- DIN EN ISO 10304-1:2009-07, Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von gelösten Anionen mittels Flüssigkeits-Ionenchromatographie – Teil 1: Bestimmung von Bromid, Chlorid, Fluorid, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat (ISO 10304-1:2007)
- DIN EN ISO 6878:2004-09, Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von Phosphor – Photometrisches Verfahren mittels Ammoniummolybdat (ISO 6878:2004)
- Package leaflet Spectroquant Phosphate Test, Cat. No. 114848, January 2016. SigmaAldrich.com/catalog/product/mm/114848 under “Protocols& Articles”

Ordering Information:

製品名	カタログ番号
Spectroquant® Phosphate Test Kit	1.14848
Spectroquant® Prove 600 UV/VIS Spectrophotometer	1.73018
Water for analysis	1.16754

JUST PROVE IT. Spectroquant® Prove water analytic system

Spectroquant® Prove は水質分析に最適な分光光度計です。

専用の試薬キットを用いることで、簡単にサンプルの調整・測定が可能です。

機器を実際に見て体感したい! というお客様にデモンストレーション申込み受付中です。



お申込みはこちら
www.merckmillipore.jp/prove

分析用標準物質 & 認証標準物質 (CRM)

約4万品目を超える品揃え
標準物質に特化した検索ツールで楽々検索



www.sigma-aldrich.com/std-jp

高性能薄層クロマトグラフィーおよびHPLCによる黒コショウの分析

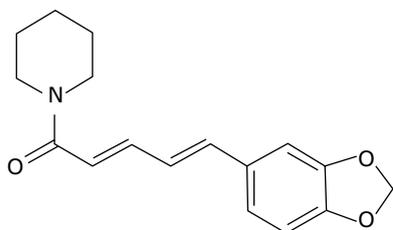
According to the United States Pharmacopeia

Anita Piper, Markus Burholt, Stephan Altmaier, Michael Schulz and Patrik Appelblad, patrik.appelblad@merckgroup.com

はじめに

栄養補助食品（サプリメント）とは、実際には何を指すのでしょうか。栄養補助食品は世間一般で大量に摂取されており、多くの場合、ビタミン、ミネラル、さらにはボタニカルと呼ばれる植物由来の成分のことも指します。栄養補助食品は、通常の食生活では不足するおそれがある栄養分を補給することを目的としたものです。身近なスパイスである黒コショウは栄養補助食品ともみなされ、piperine (図1参照)の供給源です。

図1. Piperine structure.



分析方法を開発する際には、装置、消耗品やアクセサリ、サンプル前処理手法など様々な選択をする必要がありますが、常にサンプルが何であるのかを念頭に置き、そのサンプルを分析し信頼できる結果を得るために何が適しているのかを考える必要があります。言い換えれば、サンプルによってすべてが決まるのです。

しかしながら医薬品管理においては、米国、英国、欧州、中国、日本薬局方といった様々な薬局方によって方法が規制されており、薬局方が公式の試験法（モノグラフ）を制定して更新しています。つまり公定法においては単純にサンプルを意思決定の中心に置くことはできず、モノグラフの内容に純粋に従うことになります。変更してもよいこと、満たすべきシステム適合性基準、および妥当性を確認する方法についても明確に定義されています。

本稿では黒コショウの粉末をサンプルとして選択し、現行の米国薬局方（USP）ガイドラインに従って試験を行いました。

黒コショウ抽出物のモノグラフ

USP40-NF35にある黒コショウ粉末抽出物のモノグラフは2つのセクションからなり、1つは同定試験、もうひとつは組成分析です。黒コショウ粉末は、“粉末化または極微細に粉末化した黒コショウ”と定義されています。黒コショウ粉末は、乾燥重量で2.5%以上のpiperineを含んでいます。同定試験に供する黒コショウ粉末はその植物学的な性質から高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）を実施することが必要となり、組成分析の手法は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）となります。

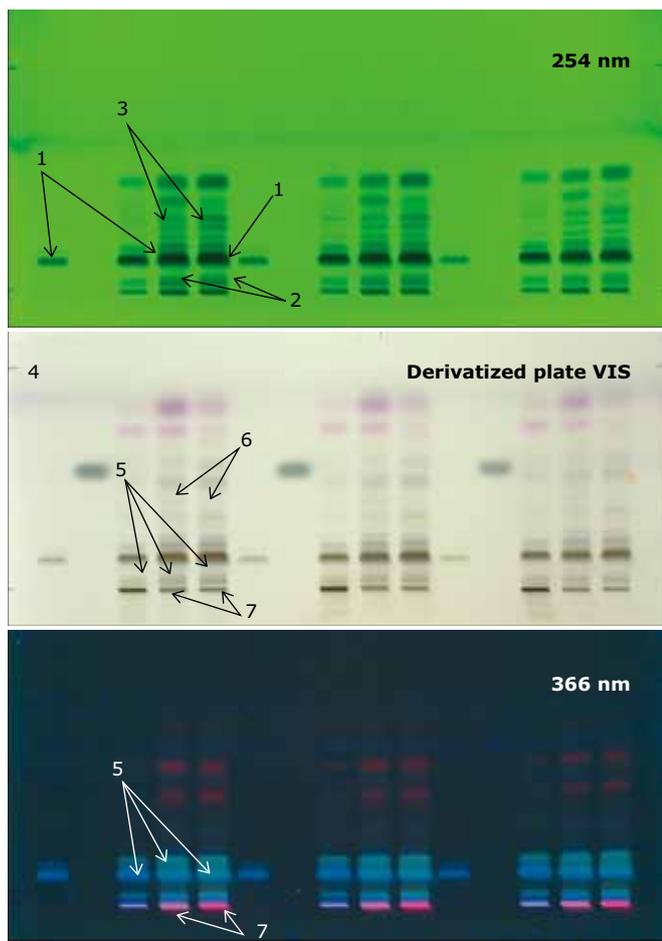
HPTLC(高性能薄層クロマトグラフィー)を用いた同定

モノグラフでは、平均粒径が5 μmのシリカゲルを担体とするHPTLCプレートを指定し、展開溶媒にはヘキサン: 酢酸エチル= 5:3 (v/v)の混合液を指定しています。試料溶液はバンド幅が8 mmとなるようプレートに塗布し6 cm展開を行います。プレートに塗布した各レーンは以下のとおりです。（左から順に）

- **レーン1:** 3 ulの標準溶液A、メタノールで調製した0.9 mg/mlのpiperine USP参照標準物質 (RS)
- **レーン2:** 3 ulの標準溶液B、メタノールで調製した2 mg/mlのborneol標準溶液
- **レーン3:** 15 ulの標準溶液C、メタノールで調製した5 mg/mlのUSP黒コショウ粉末抽出RS、超音波処理、遠心分離後の上清を使用
- **レーン4および5:** 市販のコショウサンプル 7ul 2種類（どちらも約0.5 gの黒コショウ粉末を5 mLのmethanolに添加し、10分間超音波処理した後の上澄みを使用。濃度は同一になるよう調製）

得られたHPTLCのクロマトグラムを図2に示します。USPモノグラフに従った、黒コショウ抽出物の特性評価要件と結果は次の通りとなります。

図2. USP40-NF35に従ったHPTLCによる黒コショウ粉末の同定



UV254 nmでの確認

飽和展開槽を使用し、適切な機器を用いHPTLCプレートを約33%の相対湿度に静置してプレコンディショニングします。溶媒フロントがプレートの下端から約7 cmの位置にくるまで展開します。HPTLCプレートを展開槽から取り出し、乾燥した後254 nmのUV光を照射し検出します。

1. 254 nm照射下では試料溶液のクロマトグラムにおいてRF (保持係数) = 約0.15付近に強いバンドが確認でき、これは標準溶液A (レーン1) のpiperineのバンドに対応します。
2. RF = 0.02付近にバンドが確認できます。
3. RF = 0.3から0.5付近に、等間隔に並んだ同じ強度のバンドが3つ確認できます。

誘導体化とUV 365 nmでの確認

展開後のHPTLCプレートを誘導体化溶液 (17 mlの氷冷したメタノール、2 mlの酢酸、1 mLの硫酸、および0.1 mLのアニスアルデヒドをこの順で混合したもの) で処理し、100°Cで5分間加熱して呈色反応を行い、白色光下で観察しました。

4. 試料溶液のクロマトグラムは白色光下で、標準溶液Cのメインバンドと位置および色が似たメインバンドが観察できます。
5. 標準溶液Aのpiperineのバンドと色およびRF (約0.15) が同じ濃緑色のバンドも、これらのバンドに含まれます。
6. 標準溶液Bのborneolのバンドのやや下付近、RF = 0.47付近に弱い紫色のバンドが確認できます。
7. クロマトグラムの下部、RF = 0.07付近に緑がかったバンドが観察されます。これはUV366 nm照射下ではピンク色に見えます。

試料溶液と標準溶液Cのクロマトグラムでは、上述の他にも複数の小さなバンドが観察される可能性があります。試料溶液のクロマトグラムでは、畢撥 (ヒハツ、黒コショウとよく似たスパイス) とは異なりRF = 0.10と0.58に青いバンドは検出されません。HPTLCプレート (ガラスプレートSi 60 F254、20×10 cm、カタログ番号1.05642) を用いてUSPモノグラフに規定された手順に従い、黒コショウ同定試験の合否基準を満たすことができました。

HPLCによる組成分析

HPLCによる組成分析は、モノグラフではグラジエント法が定められており、4.6 × 250 mm、5 μm、100 ÅのパッキングL1 (C18) カラムを規定しています。本実験では、Purospher® STAR、4.6 × 250 mm、5 μm、RP-18eカラムでシステム適合性基準を満たすことを示します。

移動相Aは0.5 mLのリン酸と無水リン酸2水素ナトリウム0.14 gを超純水で1000mlになるよう溶解して調製し、移動相Bはアセトニトリル (グラジエントグレード、カタログ番号 1.00030) を用いました。表1にグラジエントプログラムを示します。グラジエント法では、カラムを十分に再平衡化し良好な再現性を得ることが重要です。カラムの再平衡化に必要な移動相の流量 (容積) の求め方はいくつかあります。カラム体積約4.2 mL (カラム形状250 × 4.6 mm) に対して、流速1.5 mL/minで約20分間平衡化した場合、カラム体積の7倍の30 mL流したことになるのでこの場合は確実に再平衡化できます。また、平衡化に必要な移動相の流量 (容積) は、カラムの充填剤の充填度と空隙率によって決まる空隙容量の視点から計算することもでき、この場合内径4.6mmのカラムが0.1 ml/cmであれば25cmのカラムは2.5mLと計算することができます。したがって、30mlの移動相を流した場合はカラム空隙容量の12倍流したことになります。いずれのアプローチでも重要なことは、必ず十分量の移動相を流して平衡化し、再現性を確保することです。

試料は、黒コショウ粉末 (約2 g) を250 mLのコンデンサー付きフラスコに入れ、50 mLのHPLC用メタノールで20分還流して調製しました (最終抽出液が無色になるまで繰り返した後、抽出液を混ぜ合わせて真空濃縮しました)。試料の採集体積をメタノールで100 mLに調製し、0.45 μmのMillex® PVDFシリンジフィルターでろ過してからHPLC分析を行いました。システム適合性は、標準溶液A (0.1 mg/mLのUSP piperine RS のメタノール溶液) と標準溶液B (超音波処理とろ過した後メタノールで調製した約0.5 mg/mLのUSP黒コショウ粉末抽出液RS) を用いて測定しました。この方法の合否基準は、溶液

表1. HPLC試験条件

column:	Purospher® STAR RP-18 endcapped, 5µm (Cat. No. 1.51456)
mobile phase:	A: anhydrous potassium dihydrogen phosphate (0.14 g) in 900 mL of Milli-Q® water, titrated with 0.5 mL concentrated phosphoric acid. Dilute with water to 1000 mL, mix, filter and degas. B: Acetonitrile (gradient grade)
gradient:	95 to 55% A in 8 min, held for 10 min; 55 to 20% A in 7 min; held for 3 min; 20 to 55% A in 7 min; 55 to 95% A in 5 min
flow rate:	1.5 mL/min
pressure:	124-232 bar (1798-3364 psi)
column temp.:	Ambient
detector:	UV 343 & 270 nm
injection:	20 µL
sample:	Black pepper (2 g) extracted with methanol and filtered through a 0.45 µm Millex® PVDF Filter

A分析時のpiperineのピークのテーリングファクターが1.5以下であることと定義されています。

343 nmで検出した試料溶液のクロマトグラムは、piperineに該当する保持時間にメインピークが確認されなければなりません(図3)。試料溶液のクロマトグラムを標準溶液BおよびUSP黒コショウ粉末抽出液RSに付属されているクロマトグラムと比較したところ、それ以外にpiperamideのピークも確認されました。試料溶液の343 nmで検出したクロマトグラムでは、さらにpiperyleneに対応するピークも確認されています。また270 nmで検出した試料溶液のクロマトグラムでは、piperineのピークに対して1.14の相対保持時間に(2E,4E)-N-isobutyldecadienamideに起因するピークが見られず、畢撥とは異なる特徴が確認できました(表2)。データは示しませんが、Piperineのキャリブレーションカーブを343 nmと270 nmで比較すると、343 nmの方が検出限界(LOD)と定量限界(LOQ)がわずかに悪いことが分かりましたが、いずれの場合もLODは10 ppm以上でした。

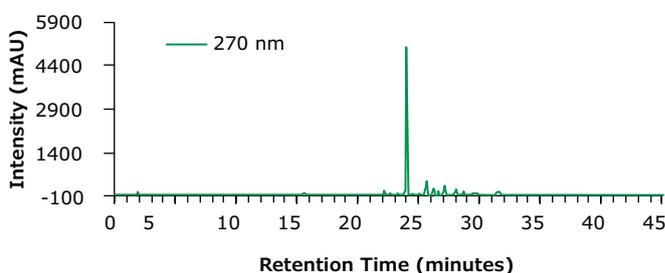
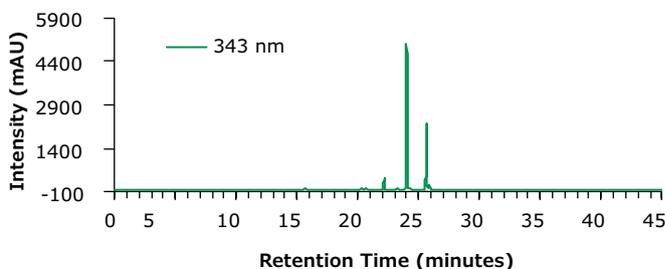
結論

公定法に従ってクロマトグラフィー法で栄養補助食品を試験する場合、ガイドラインに基づいて何をどのように使用し、操作すべきか理解する必要があります。本稿では、適切なHPTLCプレートおよびHPLCカラム、適切なシリンジフィルター、高純度溶媒・試薬を用い、USPモノグラフの手順に従うことにより、黒コショウのシステム適合性基準を容易に満たせることが示されました。

表2. 各物質のHPLCによる保持時間

Peak	Compound	RT (min)	Tailing Factor (USP)	RRT
1	t_0 (void volume)	2,5		
2	Piperine	24,0	0,9	1,0
3	(2E,4E)-N-isobutyldecadienamide	25,6	1,0	1,1

図3. 試料溶液のクロマトグラム



Featured Products

製品名	カタログ番号
TLC & HPLC	
HPTLC glass plate Si 60 F ₂₅₄ , 20 x 10 cm	1.05642
Purospher® STAR RP-18 endcapped 250 x 4.6 mm, 5 µm	1.51456
Solvents & Reagents	
Ethyl acetate for liquid chromatography LiChrosolv®	1.00868
n-Hexane for liquid chromatography LiChrosolv®	1.04391
Water for chromatography (LC-MS Grade) LiChrosolv®	1.15333
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 anhydrous for HPLC LiChropur®	5.43841
Ortho-Phosphoric acid 85% for HPLC LiChropur®	5.43828
Filtration	
Millex® syringe filter units, disposable, Durapore® PVDF, Pk.1000	SLHVX13NK
Standards	
Piperine - United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, 20 mg	1543200
Powdered Black Pepper Extract - United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, 1 g	1509019

ウコン粉末中の残留農薬分析における サンプル前処理と 平面構造を持つ農薬の回収率向上

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

背景

ウコンは南アジア原産の植物で、その大部分はインドで生産されています。ウコンの根茎は、食品、化粧品、およびいくつかの医薬品に使用される粉末ウコンを生産するために栽培されています。ウコンは数千年前から伝統的な医薬品に使われており、抗酸化作用、抗炎症作用、抗変異原性作用、抗菌作用、抗癌性作用の可能性を示す研究が注目されています¹。ウコンや他のスパイスの残留農薬検査は多くの国で実施されており、例えばカナダではウコンの根に残留する42種類の農薬に対して基準値を設けています^{2,3}。ウコンには100種類以上の成分が含まれており、その主成分はクルクミンや揮発性油です。クルクミンはウコン特有の黄色/オレンジ色を示す物質で、揮発性油は主にテルペン系の化学構造物質です。これらに加えウコンには脂質も多く含まれています⁴。従って、ウコン中の残留農薬分析をするにあたり、その際に共存する色素や油がGC / MS、LC / MSシステムの両方を汚染する恐れがあります。ウコンなどの非常に大きい夾雑成分由来のバックグラウンドを有するサンプルを前処理する場合、標準的なQuEChERS法によるクリーンアップのみでは十分な前処理効果が得られないことがあります。これらを更に精製するため、追加で積層式の固相抽出 (SPE) を使用することが多いです。この際の積層式カラムは、上層にグラファイトカーボンブラック (GCB)、下層には第1級-第2級アミン (PSA) を含みます。PSAは脂肪酸などを除去し、GCBは色素やステロールなどの平面構造を持つ成分を除去します。しかしながら、一般的なGCBはヘキサクロロベンゼンのような平面構造を有する農薬も強く保持してしまいます。これらの農薬の回収率を上げるためにはトルエンを用いて溶出させる事が多いですが、トルエンの使用するとPSAに保持させていた夾雑成分も溶出してしまう事が想定され、最終分析サンプルを汚染します⁵。本研究では、上記とは異なる2層式SPEカラムをウコンの精製にもちいました。今回使用した前処理カラム、Supelclean™Ultra 2400は、乾燥した製品 (スパイス、紅茶など) など、従来では除去が難しいと言われていた夾雑成分を精製、除去できるように設計されています。上層は、PSA、C18とGraphosphere™2031として知られているグラファイトカーボンブラックの混合物で構成されています。このカーボン、溶出溶媒にトルエンを必要とせず、平面構造を持つ農薬の回収率を高めます。カートリッジの下層には、ジルコニアコート化シリカゲルである、Z-Sepが含まれています。Z-Sepは脂溶性夾雑成分や、いくつかの色素を除去します。これによって従来のGCB / PSA積層式カラムと比較して、平面構造を有する農薬を溶出するためのトルエンを使用する必要がなくなります。

実験方法

ウコン粉末は地元の食料品店で購入しました。表1および表2にある殺虫剤を用いてサンプル中の終濃度が100ng / gになるよう調整しました。サンプル調製は図1の手順でおこないました。標準品スパイクサンプル3つと、1つの未スパイク (ブランク) を調製し、農薬の分析は、表3および表4に列挙された条件にてGC / MS / MSおよびLC / MS / MSを用いて測定しました。農薬回収率は、スパイクされた3つの測定結果の平均をとり、ブランクにて検出されたものは誤差範囲でした。

結果、考察

QuEChERS抽出物は黄色の油状残渣を有する橙褐色でした (図2)。LCおよびGC両方の精製後サンプルは写真の通りです。図3および図4は、クリーンアップ前後を比較したものです。LC抽出物は、ウコン由来の色がほとんどありませんでした。GC分析のための抽出物は淡黄色を示してはいたが、実質的には油状の残留物がほとんど存在していませんでした。GC抽出物のフルスキャンGC / MS測定結果を、図5に示します。ピークパターンは両者で似ており、主要なピークは主にテルペン化合物で構成されています。これらの化合物はGCの注入口で容易に揮発し、システム汚染の問題はありません。前処理の結果、図5のピーク面積の合計は21%減少していました。

表1. ウコン中における農薬試験項目とGC/MS/MS測定条件

	MRM 1	CE	MRM 2	CE
Alachlor	188/160	10	188/130	40
Aldrin	263/193	35	263/191	35
γ-BHC	183/147	15	181/145	5
Azinphos-methyl	160/77	15	132/77	15
Chlorpyrifos	314/286	5	314/258	15
Chlorpyrifos-methyl	286/93	20	288/93	20
Cypermthrins	165/91	10	163/91	10
4,4'-DDT	235/199	15	235/165	25
Diazinon	199/135	15	137/84	10
Dichlorvos	185/93	25	145/109	25
Dimethoate	125/79	20	93/63	10
Disulfoton	88/60	5	88/59	15
Endosulfan β	241/206	15	241/170	30
Endosulfan-α	241/206	15	241/170	30
Ethion	231/129	20	121/65	10
Fenitrothion	277/125	20	277/109	20
Heptachlor	274/239	15	272/237	15
Hexachlorobenzene	284/249	20	284/214	35
Iprodione I	314/56	35	187/124	25
Iprodione II	316/56	35	187/124	25
Malathion	173/99	15	158/125	5
Metalaxyl	234/174	10	234/146	20
Methoxychlor	227/169	30	227/141	30
Mevinphos	192/127	25	192/109	25
Parathion-methyl	233/109	10	124/47	10
Permethrins	183/168	10	183/165	10
Phenthoate	274/125	15	274/121	10
Phorate	260/75	5	231/129	25
Phosalone	182/102	15	182/75	30
Pirimiphos-methyl	290/151	20	290/125	25
Profenophos	339/269	15	339/188	15
Quintozene	295/237	20	237/143	30
Vinclozolin	212/145	30	187/124	20

表2. ウコン中における農薬試験項目とLC/MS/MS測定条件

	MRM	Frag (V)	CE (V)	Cell Acc (V)
Acephate	184/143	70	0	5
Acetamiprid	223.1/126	80	27	2
Boscalid (Nicobifen)	343/307.1	145	16	6
Carbendazim (Azole)	192.1/160.1	105	16	2
Chlorbufam	224/172.02	120	5	3
Cycluron	199.2/72	120	20	2
Diffubenzuron	311/158	80	8	2
Fenoxanil	329.08/189	80	30	3
Fosthiazate	284/61	90	60	2
Methabenzthiazuron	222.1/165.1	90	12	2
Methamidophos	142/125	85	10	2
Methomyl	163.1/106	50	4	2
Monocrotophos (Azodrin)	224.1/193	65	0	5
Nitralin	346.11/304	100	10	3
Oxamyl	237.1/72	60	12	2
Pirimicarb	239.15/72.1	100	20	2
Procymidon	301/284*	70	8	2
Propaquizafop	444.12/100.1	125	16	2
Tetraconazole	372/159	130	36	2
Uniconazole-P	292.1/125	135	40	2

表3. ウコン中の残留農薬分析におけるGC/MS/MS測定条件

column:	SLB®-5ms, 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm (28471-U)
oven:	50°C (2 min), 8°C/min to 320°C (5 min)
inj. temp.:	250°C
carrier gas:	helium, 1.4 mL/min, constant
detector:	MRM (see table 1)
MSD interface:	320°C
injection :	1μL, splitless (splitter open at 0.75 min)
liner:	4 mm I.D., split/splitless type, single taper wool packed FocusLiner™ design (2879901-U)

表4. ウコン中の残留農薬分析におけるLC/MS/MS測定条件

column:	Ascentis® Express C18, 10 cm × 2.1 mm ID, 2 μm (50813-U)
mobile phase:	[A] 5 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in water; [B] 5 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in methanol
gradient:	95% A, 5% B held for 1 min; to 50% A in 3 min; to 100% B in 8 min; held for 1 min; to 95% A in 1.5 min; held at 95% A for 1.5 min
flow rate:	0.4 mL/min
detector:	MRM (see table 2)
injection:	5 μL

図1. GCおよびLC分析サンプルにおける、ウコン粉末の抽出と精製

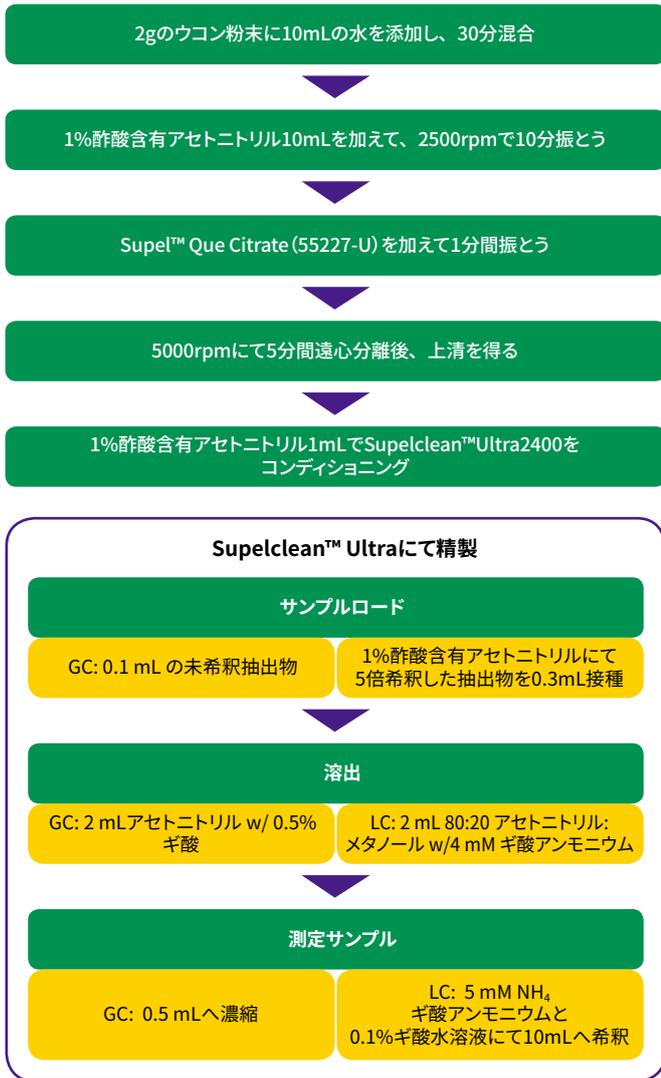


図2. QuEChERS抽出後の未希釈サンプル



図3. LC/MS/MS分析用ウコン抽出液(167倍希釈);未処理、処理後の比較

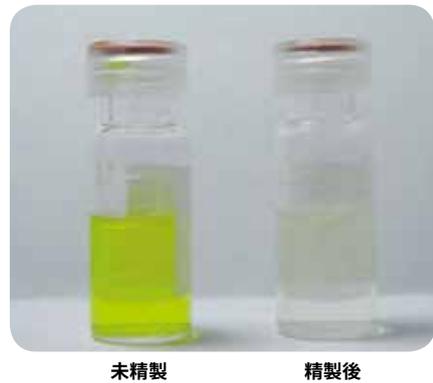
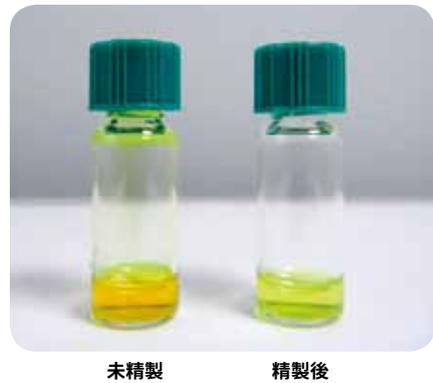


図4. GC/MS/MS分析用ウコン抽出液(5倍希釈);未処理、処理後の比較



殺虫剤の回収率と再現性

殺虫剤をスパイクしたウコン試料 (n = 3) から得られた平均回収率を表5に示しました。51種の殺虫剤のうち、ヘキサクロロベンゼン(回収率67%)を除く全ての回収率は70%以上でした。従来法においてはグラファイトカーボンブラックを含む積層カラムから良好な回収率を得るためにはトルエンを溶出溶媒に使用するが、本研究では使っていません。スパイクされた農薬サンプルのRSD値として計算された再現性は、51種の農薬のうち44種については20%未満でした。図6に示すように、多くの化合物は10%未満のRSD値を示しており、20%を超えるRSD値を示す農薬は、そもそもMS/MS測定において感度が低いものである傾向が見受けられました。

表5.ウコン粉末中の終濃度100 ng/gにて調整した農薬の回収率 (n=3)

Pesticide	Avg. Recovery	RSD	Analysis
Alachlor	99%	23%	GC/MS/MS
Aldrin	85%	10%	GC/MS/MS
Azinphos-methyl	89%	11%	GC/MS/MS
γ-BHC	83%	8%	GC/MS/MS
Chlorpyrifos	96%	12%	GC/MS/MS
Chlorpyrifos-Methyl	113%	6%	GC/MS/MS
Cypermthrin (isomer 1)	99%	15%	GC/MS/MS
4,4'-DDT	95%	8%	GC/MS/MS
Diazinon	92%	14%	GC/MS/MS
Dichlorvos	78%	31%	GC/MS/MS
Dlsulfoton	86%	7%	GC/MS/MS
Endosulfan β	86%	35%	GC/MS/MS
Endosulfan-α	92%	23%	GC/MS/MS
Ethion	97%	7%	GC/MS/MS
Fenitrothion	63%	5%	GC/MS/MS
Heptachlor	81%	7%	GC/MS/MS
Hexachlorobenzene	67%	9%	GC/MS/MS
Iprodione (isomer 1)	103%	5%	GC/MS/MS
Malathion	90%	10%	GC/MS/MS
Metalaxyl	86%	21%	GC/MS/MS
Methoxychlor	78%	12%	GC/MS/MS
Mevinphos	73%	7%	GC/MS/MS
Parathion-Methyl	88%	8%	GC/MS/MS
Permethrin (isomer 1)	104%	24%	GC/MS/MS
Phenthoate	89%	7%	GC/MS/MS
Phorate	82%	10%	GC/MS/MS

Pesticide	Avg. Recovery	RSD	Analysis
Phosalone	90%	7%	GC/MS/MS
Pirimiphos-methyl	74%	3%	GC/MS/MS
Profenophos	88%	7%	GC/MS/MS
Quintozene	75%	8%	GC/MS/MS
Vinclozolin	90%	6%	GC/MS/MS
Acephate	89%	6%	LC/MS/MS
Acetamiprid	102%	4%	LC/MS/MS
Boscalid (Nicobifen)	86%	7%	LC/MS/MS
Carbendazim (Azole)	106%	7%	LC/MS/MS
Chlorbufam	92%	18%	LC/MS/MS
Cycluron	103%	5%	LC/MS/MS
Diflubenzuron	101%	5%	LC/MS/MS
Fenoxanil	91%	10%	LC/MS/MS
Fosthiazate	95%	4%	LC/MS/MS
Methabenzthiazuron	96%	4%	LC/MS/MS
Methamidophos	85%	5%	LC/MS/MS
Methomyl	106%	6%	LC/MS/MS
Monocrotophos (Azodrin)	97%	3%	LC/MS/MS
Nitralin	124%	55%	LC/MS/MS
Oxamyl	104%	3%	LC/MS/MS
Pirimicarb	97%	3%	LC/MS/MS
Procymidon	91%	13%	LC/MS/MS
Propaquizafop	97%	1%	LC/MS/MS
Tetraconazole	98%	2%	LC/MS/MS
Uniconazole-P	103%	19%	LC/MS/MS

図5. Supelclean™ Ultra 2400を用いて前処理したウコン抽出液におけるGC/MS測定結果

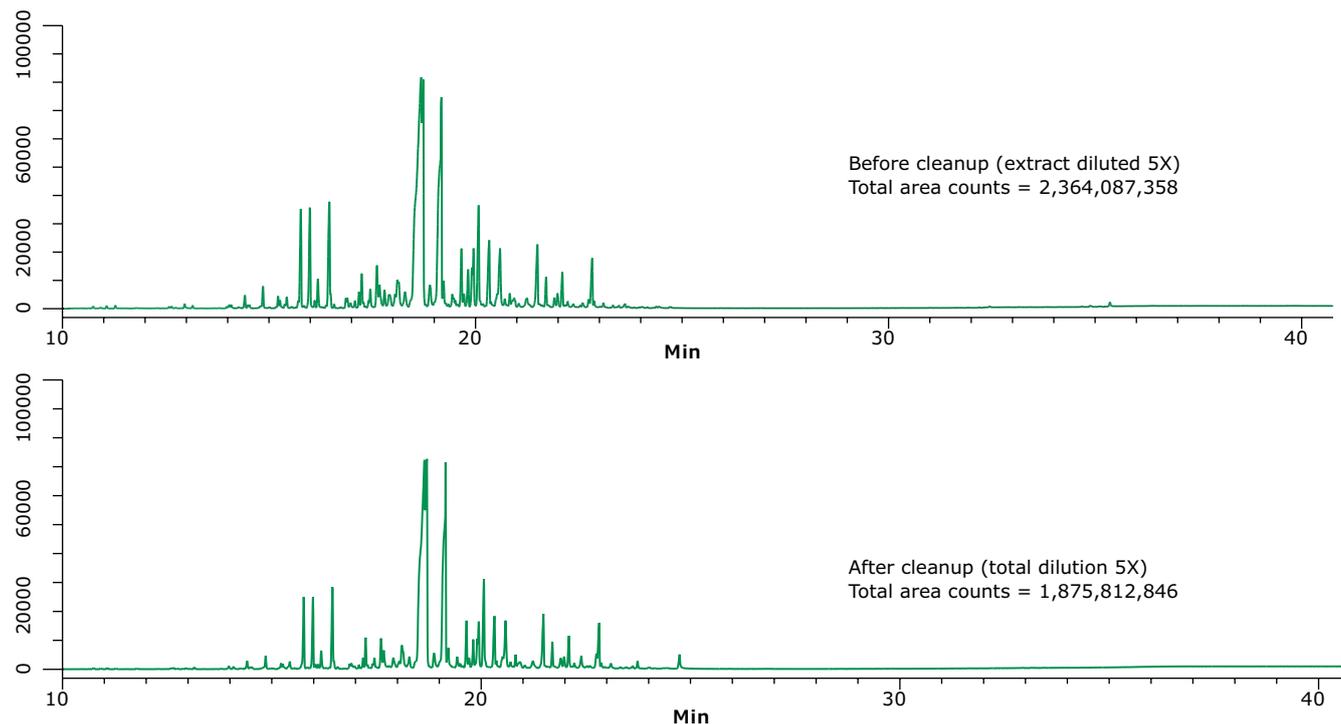
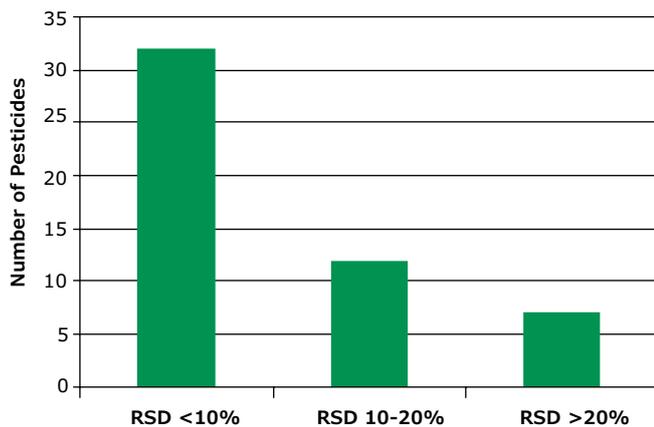


図6. ウコン粉末におけるSupelclean™ Ultra 2400を用いた際の平均農薬回収率

(Recoveries from turmeric powder spiked at 100 ng/g.)



おわりに

本研究ではSupelclean™ Ultra 2400カラムを用いた新しい精製法を示しました。このカラム内の吸着剤によって、ウコン以外のスパイスなど乾燥した食品のようなサンプルの精製を可能にします。上層に使用されているGraphsphere™ 2031カーボンは、溶出溶媒にトルエンを使用せず平面構造を有する農薬の回収率を維持しながら、同時に色素を除去します。また、GCとHPLC分析の両方のウコン精製結果に示されているように、カラムの下層にあるZ-Sep吸着剤は油およびいくつかの色素を除去する事ができました。結果としてウコン粉末中における残留農薬分析において、夾雑成分を除くと同時に幅広い化学的特性を持つ農薬に対する高い回収率を実現しました。本研究では、1mLのSupelclean™ Ultra 2400カートリッジを使用しましたが、これより大きい3mLサイズへも応用可能であり、より高いサンプル負荷に対応することもできます。

ご存知ですか？

シグマアルドリッチジャパンは天然物の標準物質をご用意しています。

ウコン属 (Curcuma) の標準物質は sigma-adrich.com/turmeric をご覧ください。

引用文献

- Prasa, S.; Aggarwal, B. Turmeric, the Golden Spice. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd ed.; CRC Press/Taylor&Francis: Boca Raton (FL), 2011; Chapter 13.
- Health Canada MRL database. www.hc-sc.gc.ca (accessed 1/27/2016).
- Electronic Code of Federal Regulations (eCFR), Title 40, Chapter 1, Subchapter E, Part 180, updated 1/26/2016.
- Li, S.; Yuan, W.; Deng, G.; Wang, P.; Yang, P. "Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.)" (2011). *Faculty Publications*. Paper 1. http://scholarworks.sfasu.edu/agriculture_facultypubs/1 (accessed 1/27/2016)
- Shimelis, O.; Yang, Y.; Stenerson, K.; Kaneko, T.; Ye, M. Evaluation of Solid-Phase Extraction Dual-layer Carbon/Primary Secondary Amine for Clean-up of Fatty Acid Matrix Components From Food Extracts in Multiresidue Pesticide Analysis. *J. Chrom. A*, 2007, 1165, 18-25.

Featured Products

製品名	カタログ番号
Supelclean™ Ultra 2400 SPE Cartridges	
1 mL, pk of 108	52779-U
3 mL, pk of 54	54281-U
Supel™ QuE QuEChERS Products	
Citrate Extraction Tube, 12 mL, pk of 50	55227-U
Empty Centrifuge Tube, 50 mL, pk of 50	55248-U
Columns	
SLB®-5ms Capillary GC Column, 30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm	28471-U
Ascentis® Express C18 HPLC Column, 10 cm × 2.1 mm I.D., 2 μm particle size	50813-U
Accessories	
QuEChERS Shaker and Rack Starter Kit, USA compatible plug, AC input 115 V	55278-U
QuEChERS Shaker and Rack Starter Kit, Schuko plug, AC input 230 V	55438-U
Visiprep™ DL 12-port Solid Phase Extraction Manifold	57044
Disposable valve liners, PTFE, 100 ea.	57059

Related Products

製品名	カタログ番号
Solvents and Reagents	
Acetonitrile hypergrade for LC-MS LiChrosolv®	1.00029
Acetic acid 100% for LC-MS LiChropur®	5.33001
Formic acid 98% - 100% for LC-MS LiChropur®	5.33002
Ammonium formate for mass spectrometry, ≥99.0%	70221
Acetonitrile for GC-MS SupraSolv®	1.00665
Accessories	
Certified Vial Kit, Low Adsorption (LA), 2 mL, pk of 100	29653-U
Inlet Liner, Split/Splitless Type, Single Taper FocusLiner™ Design (wool packed)	2879901-U

ジルコニアコート化シリカゲル Z-SEPシリーズの詳細はこちら

www.sigma-aldrich.com/zsep-jp

農薬標準物質はこちら

www.sigma-aldrich.com/peststd-jp

インスタントコーヒー中の水分滴定

By Karl Fischer Titration

Bettina Straub-Jubb, Global Product Manager Titration, bettina.straub-jubb@merckgroup.com



食品は極めて幅広い化合物で構成されています。炭水化物や、脂肪、タンパク質など、測定対象に含まれる成分のうち、どの成分が多いかによって測定可能な手法は異なります。カールフィッシャー溶媒に時間をかけて溶解していく複雑なマトリックスや、水が少しずつしか抽出されない場合には、溶解剤を使用する必要があり、さらに、加温下で滴定したり、ホモジナイザーで水分の抽出を速めたりすることが可能です。

そのような複雑なマトリックスの代表のひとつにコーヒーがあげられます。

コーヒーは単なる飲料ではありません

コーヒーは17世紀には贅沢な食品で、裕福な人しか手が届きませんでした。しかし、19世紀以降は大量生産品になって誰もが日常的に飲む飲料になりました。さらに、今では重要な貿易品と考えられ、ライフスタイルを形作る生産品にも進化しつつあります。消費者の大きな関心は、コーヒーの味が良いかどうかです。これを保証する品質パラメーターの1つは水分量です。コーヒー豆、焙煎コーヒー、およびインスタントコーヒー中の水分量は、豆の焙煎工程やコーヒー粉末の品質、味、および消費期限に影響するため、その定量方法が関心の対象になります。

インスタントコーヒーのカールフィッシャー滴定

インスタントコーヒーには、極めて強く結合した水が含まれています。メタノールによる抽出は極めて遅く、緩やかです。容量滴定法ではホルムアミドとサリチル酸を添加すると、水分の抽出が加速されます。サリチル酸は、pHを適切な範囲に保つ緩衝機能を持ちます。さらに加温下で滴定し、ホモジナイザーを用いるのが効果的です。あるいは、水分気化法を電量滴定法と組み合わせて用いることも可能です。水の沸化温度には約105°Cが適温です。電量滴定法だけの滴定は推奨されません。

容量滴定法の手順

カールフィッシャー用の脱水溶剤を最初に滴定セルに入れて予備滴定を行います。脱水溶剤として40 mLのAquastar®-コンビメタノールまたはAquastar-ソルベントを滴定セルに入れ、20 mLのホルムアミドと12 gのサリチル酸を加えます。脱水溶剤にAquastar-ソルベントを用いる場合は、滴定液としてAquastar-コンビタイトラント 5またはAquastar-タイトラント 5を選ぶことができます。次いで、約0.3~0.5 gのインスタントコーヒーを加えて滴定を開始します。試料を加える前と加えた後の秤量値を記録しておき正確な重量を測定します。試料を3分間攪拌し、完全に溶解させることを推奨します。水の放出を加速するには、脱水溶剤を50°Cまで加温させます。コーヒー粒子が大きすぎる場合は、滴定セルに加える前に粉碎しなければならない場合があります。

通常の力価測定 (Aquastar-水標準液 1%を用いるなど) を行うことを推奨します。力価測定は、ホルムアミドとサリチル酸を含む実際の脱水溶剤 (コンビメタノールまたはコンビソルベント) で行うことが重要です。

水分計のパラメーター

- 抽出時間 (攪拌時間) : 180秒
 - 既定の滴定設定: $I(\text{pol}) = 20 \sim 50 \mu\text{A}$,
 - $U(\text{EP}) = 100 \sim 250 \text{ mV}$
 - 終点: ドリフトが $20 \mu\text{L}/\text{min}$ 未満
- 試薬情報はOrdering Informationをご覧ください。

電量滴定法と水分気化装置を組み合わせた方法

インスタントコーヒーは水分が少なく、一般に精度が不十分であるため、直接電量滴定を行うことは推奨されません。

水分気化法を用いると、インスタントコーヒー中から水を抽出／放出できるため、電量滴定法で測定が可能です。電量滴定用試薬 Aquastar-コンビクーロマトフリットは隔膜付き水分計の陰極セルと陽極セルに使えるため、試薬が1つで済むことから取り扱いや方法が簡素化されます。約10 mLの溶液を陰極セルに、150 mLを陽極セルにそれぞれ入れることを推奨します。その後、予備滴定を行います。ドリフトが安定したら、試料バイアルのブランク値を測定して一連の測定を開始できます。次いで、0.1 gの試料を秤量して試料バイアルに入れ、直ちに密封します。バイアルを手動または自動で気化装置に入れ、選択した温度プログラムまで加熱します。このようにして放出した水分をキャリアガス（乾燥空気または窒素）で滴定セルに移し、水分測定を行います。

最初の試料測定開始前や連続測定の場合は途中、または最後の測定後にオープン標準品（Aquastar-オープン標準品 1%など）を用い、水分気化装置や水分計の性能をチェック、検証することを推奨します。

滴定パラメーター

オープン設定:

- ・ 加熱温度:105°C、抽出時間:600秒

隔膜付きセルに対する水分計設定

- ・ 終点示度、例: I(pol) = 5~10 μ A
- ・ U(EP) = 50~100 mV
- ・ 終点:ドリフトが20 μ g/min未満



Ordering Information

製品名	カタログ番号
Volumetric Titration	
Aquastar® - CombiTitrant 5, one component reagent, 1 mL = approx. 5 mg water	188005
Aquastar - Titrant 5, two component reagents, 1 mL = approx. 5 mg water	188010
Aquastar® - CombiMethanol, one component solvent, max. 0.01% water	188009
Aquastar® - Solvent, two component solvent	188015
Formamide	109684
Salicylic acid	100635
Aquastar Water Standards 1% in ampoules	188052
Oven Method with Coulometric Titration	
Aquastar - CombiCoulomat frit, Coulometric Karl Fischer reagent for cells with diaphragm	109255
Aquastar - Oven Standard 1%, solid standard for the Karl Fischer oven method	188054

他の食品や飲料のアプリケーション例は

[SigmaAldrich.com/application-note](https://www.sigmaaldrich.com/application-note)

Aquastarシリーズのカルフィシャー試薬は

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

Aquastar® 水標準品

信頼性の確保には水標準品の使用が不可欠です。

- ・ 高精度の信頼性
- ・ DIN EN ISO /IEC17025 の認定を受けたラボで製造
- ・ ISOGuide31 に従った証明書付き
- ・ 低いロット間差
- ・ 便利で使いやすいパッケージング

詳細はこちら [SigmaAldrich.com/Aquastar](https://www.sigmaaldrich.com/Aquastar)



【医薬】

親水性ポリマー系固相抽出カラム Supel™-Select HLB

Carmen T. Santasania, An Trinh, and Mati Sarker

緒言

生体試料マトリックス中の低分子を回収、濃縮する際に親水性ポリマー系固相抽出カラムが使用される機会が増えてきました。従来の逆相系固相抽出 (C18など) と異なり、親水性ポリマーは疎水性成分 (ポリスチレン/ジビニルベンゼンなど) と親水性成分 (メタクリレート、ビニルイミダゾール、N-ビニルピロリドン/水酸基) からなります。親水性ポリマー系固相は非極性官能基と極性官能基の両方を含むので、中程度の極性から非極性までの化合物しか保持できないシリカベースの逆相系固相の性質と異なり、広い範囲の分析対象物を保持できます。また保持された化合物はメタノールやアセトニトリルといった有機溶媒で容易に溶出する事ができます。それに加えて、親水性ポリマー系固相は極性官能基を持つために乾燥しにくく、逆相系固相抽出カラムと比較してコンディショニングが簡便で再現性の高い結果が期待できます。



P001336

本報告では、幅広い医薬品とパーソナルケア用品を生体試料 (血漿) と、飲料水の双方から抽出する際に、親水性ポリマー系固相「Supel™-Select HLB (Select HLB)」を用いました。血漿サンプルでは、強力なコレステロール降下薬である2種類のスタチン製剤を抽出する方法を紹介します。飲料水サンプルでは、EPA法1694 (*Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS*) に準じて使用しました。

近年、医薬品とパーソナルケア化合物が公共の飲料水に混入し、有害な影響を及ぼすことを示唆する報告がありました。これら化合物の影響で、ヒトのホルモン代謝経路のかく乱、抗生物質耐性菌の出現、およびある種のガン発生率上昇などにつながる恐れがあります¹。2002年に米国地質調査所が都市部の下水試料を検査した際、サンプリングした検体の80%で上記のような化合物が検出されました²。

Supel-Select HLB 固相抽出カラムとは?

Select HLBの保持担体は、水性試料から幅広い化合物を固相抽出するために開発されたスチレン系ポリマーです。この保持メカニズムは主として疎水性相互作用に基づきますが、親水基を導入しているため高極性化合物も保持します。(HLB: hydrophilic lipophilic balance)。Select HLBに保持される極性化合物の例には、ピロキシシン (logPo/w -0.56)、リボフラビン (logPo/w -2.02)、ビオチン (logPo/w 0.11) などがあります。表1と2に、この固相抽出カラムの仕様と特長/利点を記しました。

表1. Supel-Select HLBの仕様

担体	親水性基導入スチレン/ジビニルベンゼン共重合体
使用pH範囲	0-14
粒子径	55-60 μm
MS適合性	あり
表面積	400-410 m ² /g
ポア容量	0.88 mL/g
ポアサイズ	87 Å

血漿中におけるスタチン製剤の抽出

本研究では、ラットの血漿にプラバスタチンとアトルバスタチンを100 ng/mLと5 ng/mLの濃度になるよう添加し、添加したラット血漿試料 (n=3) をSelect HLBで抽出しました。30 mg/1 mL (54181-U) および2つの他社ポリマー系固相抽出カラムを表3に示す方法で処理しLC-MS/MSで測定しました。図1に示す結果から、Select HLBは他社相当品と同様に、どちらの分析対象物にも良好な精製効果と高い回収率を示しました。

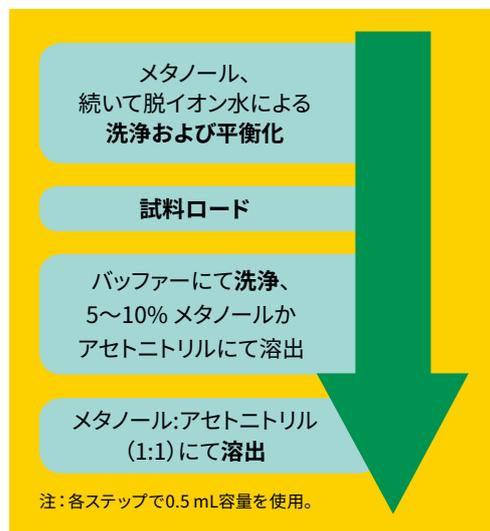
表2. Supel-Select HLBの特長と利点

特長	利点
親水性基導入スチレン／ジビニルベンゼン共重合体	幅広い分析対象物(極性、非極性、酸、塩基まで)を保持および抽出可
簡単な操作手順	簡便なメソッド開発でコスト削減
大容量	試料処理時間の短縮
乾燥耐性あり	高い再現性
UV、MS検出阻害が少ない	低バックグラウンド、高感度分析に
安定品質	ロット間差が少ない

水サンプル中の医薬品およびパーソナルケア用品の抽出

本研究では、EPA法1694 (Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS)³に従い、Supel-Select HLB と他社相当品の親水性ポリマー系固相抽出カラムと比較しました。48種類のグループ1医薬品を含む溶液を、EPA法1694、Column CS-5に記載された濃度(25~25,000 ng/mL)で調製し、試験試料は1 Lの飲料水に4 mLのCS-5校正溶液を添加しました。1 Lの添加試料を表4に示す手順で抽出し、Ascentis® Express C18、10 cm × 2.1 mm (52823-U) を使用してEPA法1694、表2および表3に記載されたLC-MS/MS条件にて測定しました。Supel-Select HLBと相当品Wの回収率を、2種類の異なる溶出溶媒(メタノールおよびメタノール:アセトニトリル (50:50) (表5参照))を使用して比較しました。

表3. 血漿中スタチン製剤の抽出手順



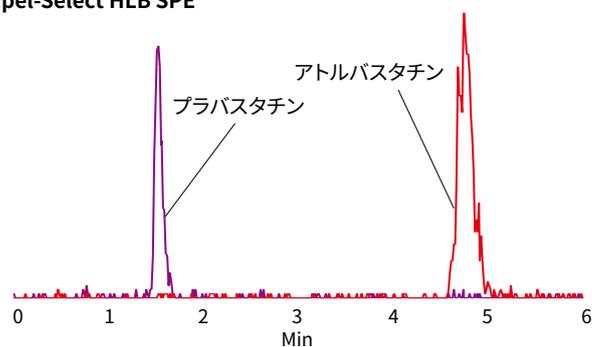
ご存じですか?

Supel-Select HLB は他社相当品に比べてわずかに疎水性が高いため、多くの場合、保持された分析対象物を完全に溶出するのにメタノール:アセトニトリル (50:50) の混合液を必要とします。

図1. 5 ng/mLのスタチン製剤を添加し、Supel-Select HLBで抽出したラット血漿のトータルイオンクロマトグラム

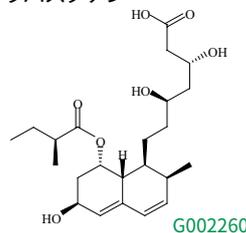
分析カラム: Ascentis Express C18, 5.0 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 μm (53822-U)
 移動相溶媒: methanol:0.1% acetic acid (60:40)
 流速: 0.2 mL/min.
 カラム温度: 35 °C
 検出器: MS/MS, Applied Bio System 3200 Q TRAP
 注入量: 5 μL

Supel-Select HLB SPE

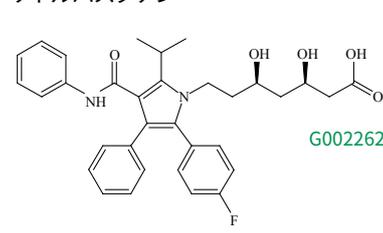


G004385

プラバスタチン



アトルバスタチン



Absolute Recovery ± RSD (n=3)

	5 ng/mL spike		100 ng/mL spike	
	Prava-statin	Atorva-statin	Prava-statin	Atorva-statin
Supel-Select HLB	84 ± 8%	92 ± 5%	103 ± 4.2%	89 ± 3.9%
Competitor W	83 ± 17%	92 ± 2%	104 ± 2.2%	87 ± 1.1%
Competitor P	77 ± 5%	93 ± 2%	102 ± 3.0%	91 ± 1.3%

試験した化合物の過半数は、Select HLBと相当品の間で同程度の回収率を示しました。両製品で試験した48の分析対象物は、61~65%の平均回収率を示しました。Select HLBの方が、市販されている同等の親水性ポリマー系固相抽出カラムよりわずかに疎水性が高いことがわかります。メタノール:アセトニトリル溶出溶媒により試験した48種類の化合物のうち、少なくとも20種類でSelect HLBの回収率が向上(>10%)しました。

ご存じですか?

Supel-Select HLB は他社相当品より
価格が約 30%お買得!*

無償サンプルをご用意しています。

www.sigma-aldrich.com/spe-sample-jp

*2017年12月現在、当社インターネット調査に基づく

表4. EPA法1694: グループ1化合物における操作手順

SPE: Supel-Select HLB SPEチューブ、200 mg/6 mL (54183-U) および相当品W

- 各SPEカートリッジを20 mLのメタノールで洗浄、続いて6 mLの脱イオン水と6 mLのpH 4脱イオン水(6 M HClで調整)でコンディショニング。
- 1 Lの水試料、pH 4(6 M HClで調整)をロード。
- カートリッジをバキュームマニホールドにて5分間乾燥。
- 12 mLのメタノールまたは12 mLのメタノール:アセトニトリル(50:50)で溶出。
- SPE溶出液を40°Cの窒素で4 mLまで蒸発させ、4 mLのLC移動相溶媒を添加。

表5. EPA法1694グループ1医薬品の回収率

Analyte	Supel-Select HLB		Competitor W	
	CH ₃ OH:CH ₃ CN (50:50) Elution	CH ₃ OH Elution	CH ₃ OH:CH ₃ CN (50:50) Elution	CH ₃ OH Elution
1,7-Dimethylxanthine	14.41	56.15	83.59	68.65
Acetaminophen	119.50	112.30	136.48	141.18
Ampicillin	0.00	14.10	0.00	12.50
Azithromycin	101.00	52.99	58.90	50.34
Caffeine	70.71	86.23	81.43	85.51
Carbadox	80.77	73.10	59.76	69.46
Carbamazepine	81.47	79.63	83.38	92.86
Cefotaxime	45.49	74.14	20.44	61.79
Ciprofloxacin	21.73	57.14	50.58	94.74
Clinafloxacin	69.46	59.29	74.29	70.18
Cloxacillin	42.83	0.00	28.48	15.00
Codeine	3.75	8.72	66.02	64.18
Cotinine	9.48	8.12	65.50	34.20
Dehydronifedipine	63.84	77.11	87.74	74.40
Digoxigenin	69.96	80.12	76.86	83.28
Digoxin	80.05	NA	50.33	NA
Diltiazem	114.46	124.52	123.47	138.04
Diphenhydramine	100.00	119.02	99.38	82.48
Enrofloxacin	55.53	58.37	40.91	80.42
Erythromycin hydrate	95.65	63.87	59.68	57.10
Flumequine	83.10	56.27	44.15	69.57
Fluoxetine	61.50	55.35	77.46	55.76
Lincomycin	2.62	7.98	44.74	31.98
Lomefloxacin	23.37	67.09	54.74	97.58
Miconazole	84.02	52.03	71.13	81.71
Norfloxacin	18.15	41.29	60.49	89.35
Norgestimate	392.24	39.36	215.30	41.35
Ofloxacin	23.10	59.14	56.58	75.96
Ormetoprim	27.54	86.80	66.27	103.55
Oxacillin	0.00	19.12	0.00	6.24
Oxolinic acid	64.97	44.26	50.27	43.82
Penicillin G	0.00	6.08	0.00	6.06
Penicillin V	27.89	55.12	81.87	38.77
Roxithromycin	32.64	39.30	19.73	31.33
Sarafloxacin	53.21	56.24	58.18	67.63
Sulfachloropyridazine	78.05	67.09	49.19	62.39
Sulfadiazine	104.79	70.16	77.84	76.70
Sulfadimethoxine	73.65	51.34	45.27	63.09
Sulfamerazine	93.64	76.88	57.73	89.25
Sulfamethazine	94.59	74.00	78.11	73.40
Sulfamethizole	85.61	74.48	48.99	76.72
Sulfamethoxazole	72.46	56.14	49.35	71.43
Sulfanilamide	10.11	7.49	24.80	32.84
Sulfathiazole	104.27	73.91	66.82	68.12
Thiabendazole	95.54	77.95	86.99	83.65
Trimethoprim	25.68	65.20	83.91	100.84
Tylosin	97.70	44.26	46.36	26.11
Virginiamycin	71.92	56.16	68.08	63.36

また、アセトニトリル溶出では10種類のグループ1化合物で回収率が向上しました。Select HLBを使用して最適な回収率を得るには、最初にメタノール、次にメタノール:アセトニトリルで溶出することを推奨します。

結論

Select HLBは、複雑な水性試料マトリックスから極めて広範な化合物を抽出するために開発された親水性ポリマー系固相抽出カラムです。本報告では、この固相抽出カラムの有用性を血漿中のスタチン製剤と飲料水中の48種類の医薬品という2つの用途で示しました。Select HLBは、他社相当品と同程度の回収率と選択性、および高い回収率を提供します。

References

- Mesner, M., Pharmaceuticals in Drinking Water: Pharmaceuticals and Personal Care Products Down the Drain, Utah State University <http://extension.usu.edu/waterquality/htm/homeownerswater/pharmaceuticals/>
- USGS, 2007 Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in US Streams. USGS Fact Sheet FS-027-02 <http://toxics.usgs.gov/pubs/FS-027-02/>
- US EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS <http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/files/1694.pdf>

Featured Products

製品名	入数	カタログ番号
Supel-Select HLB SPE		
30 mg/1 mL	100	54181-U
60 mg/3 mL	50	54182-U
200 mg/6 mL	30	54183-U
500 mg/12 mL	20	54184-U
1 g/20 mL	20	54186-U
Supel-Select HLB 96-well SPE		
30 mg /well	1	575661-U

Related Information

詳細情報および無償サンプルは、
www.sigma-aldrich.com/spe-sample-jp
をご覧ください。

【医薬】

親水性相互作用 クロマトグラフィー (HILIC) カラムを用いた ヌクレオシドの保持と選択性

David S. Bell, R&D Manager and Hugh Cramer, Applications Scientist dave.bell@sial.com

要約

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) の相互作用メカニズムには、分配、極性相互作用、イオン交換作用などがあります¹。分配では、極性分析対象物が有機溶媒リッチな移動相から固定相上に形成される水和層に保持されます。また、イオン交換作用が帯電した分析対象物との間で起こる可能性もあります。たとえば、未修飾シリカは有機溶媒リッチな移動相の存在下で水を吸着する特性があり、分析対象物が分配することがあります。また、正に帯電した分析対象物と強く相互作用することもあります。ペンタフルオロフェニルプロピル固定相はほとんど分配を示しませんが、高いイオン交換能を示します²。逆に、ペンタヒドロキシル固定相は表面に多くの水分を保持するため、ほぼ分配メカニズムのみによって分析対象物を保持し、イオン交換の作用は比較的低くなります。固定相の化学的性質が持つ基本的な相互作用を理解することにより、与えられた分離の課題に適した相互作用を選ぶことができます。

図1. ヌクレオシドの化学構造

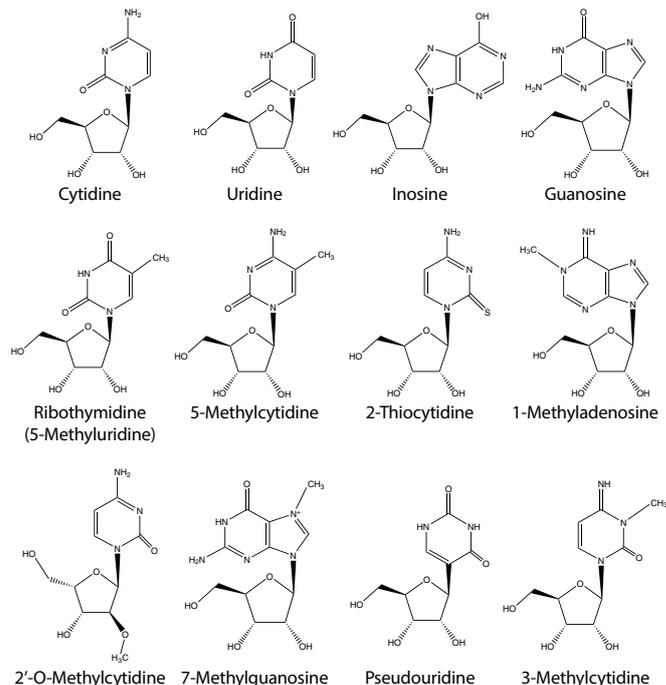


表1. ヌクレオシドの溶解度およびイオン化定数*

Name	pK _a (Most Acidic)	pK _a (Most Basic)	LogD at pH				
			1.7	4.6	6.5	7.4	8
Cytidine	13.5	4.3	-4.02	-2.28	-2.18	-2.18	-2.18
Uridine	9.4	n/a	-1.91	-1.91	-1.91	-1.92	-1.93
Inosine - T1**	0	8.7	-4.16	-4.16	-4.16	-4.18	-4.22
Inosine - T2	13.2	3.3	-3.6	-1.98	-1.95	-1.95	-1.95
Inosine - T3	8.9	1.6	-2.37	-2.19	-2.19	-2.21	-2.25
Guanosine - T1**	9.6	2.4	-2.62	-1.88	-1.88	-1.88	-1.89
Guanosine - T2	13.2	3.1	-3.13	-1.66	-1.64	-1.64	-1.64
5-Methyluridine	9.6	n/a	-1.49	-1.49	-1.49	-1.49	-1.49
5-Methylcytidine	13.5	4.6	-3.69	-1.97	-1.78	-1.78	-1.78
7-Methylguanosine	6.8	-4	-6.12	-6.11	-5.79	-5.58	-5.54
Pseudouridine	8.5	-4.6	-1.2	-1.2	-1.21	-1.29	-1.48
3-Methylcytidine	13.3	8.9	-3.84	-3.84	-3.72	-3.29	-2.83
2-Thiocytidine	13	2.8	-2.48	-1.41	-1.4	-1.4	-1.4
1-Methyladenosine	13.2	6.1	-4.78	-3.52	-2.19	-2.05	-2.03
2'-O-methylcytidine	13.4	4.3	-3.25	-1.51	-1.38	-1.38	-1.38

*Calculated values from ACD/Percepta, v. 14.0.0

**Inosine and guanosine exist as tautomers

本研究では、一連のヌクレオシドにおけるHILIC分析の有用性を示します。ヌクレオシドは一般に弱塩基性の極性分子です。たとえば、シチジンは、4.3という pK_a 値を示します。一方、酸性が最も強い pK_a は13.5です。化合物は、4.3未満のpHでは主に正に帯電しますが、ほとんどのHILIC条件下におけるpHは化合物が中性です。図1と表1に、分析対象物の化学構造と関連データをそれぞれ示します。前述の固定相をいくつかのHILIC条件下で使用し、一連の化合物をスクリーニングしました。

実験方法

12種類のヌクレオシドにAscentis® Express OH5 (ペンタヒドロキシシリル基)、Ascentis Express F5 (ペンタフルオロフェニルプロピル基)、およびAscentis Express HILIC (未修飾シリカ) を用いて、様々な移動相溶媒、pHで保持と選択性のデータを取得しました。それぞれの条件で95% アセトニトリルから80%アセトニトリルまでのグラジエント溶出で測定しました。ギ酸でpHを3、4、5、および6.9に調整した5 mMの酢酸アンモニウムと0.1%ギ酸を用いて検討しました。流速0.6 mL/min、カラム温度35°C、UV検出波長250 nmで測定、各濃度は10~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲になるように混合され、注入量は0.5 μL です。

図2. Ascentis® Express OH5を用いた際の保持挙動

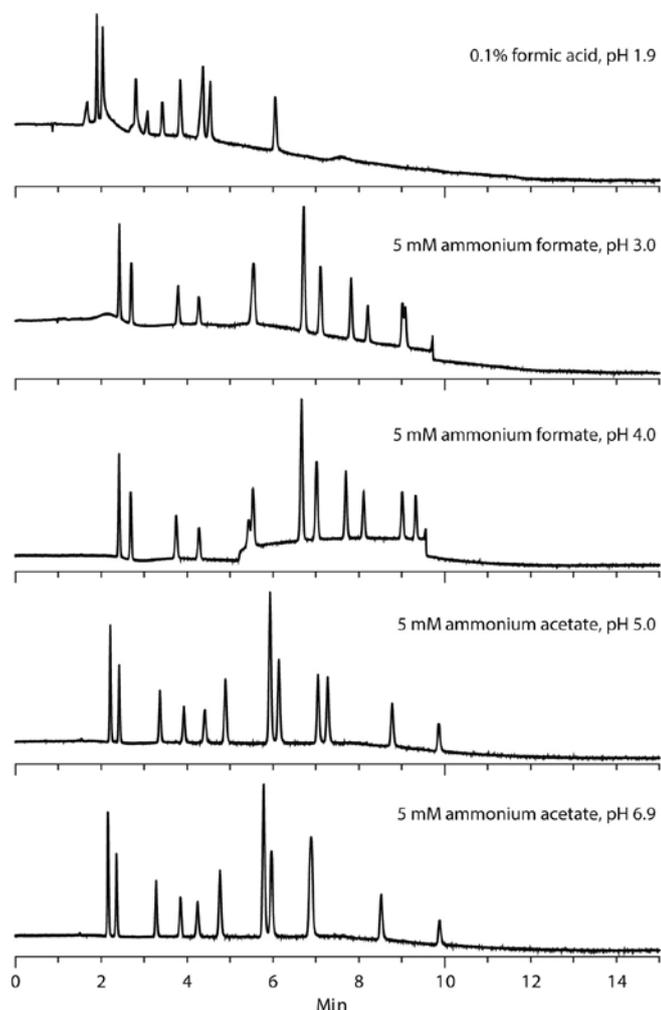
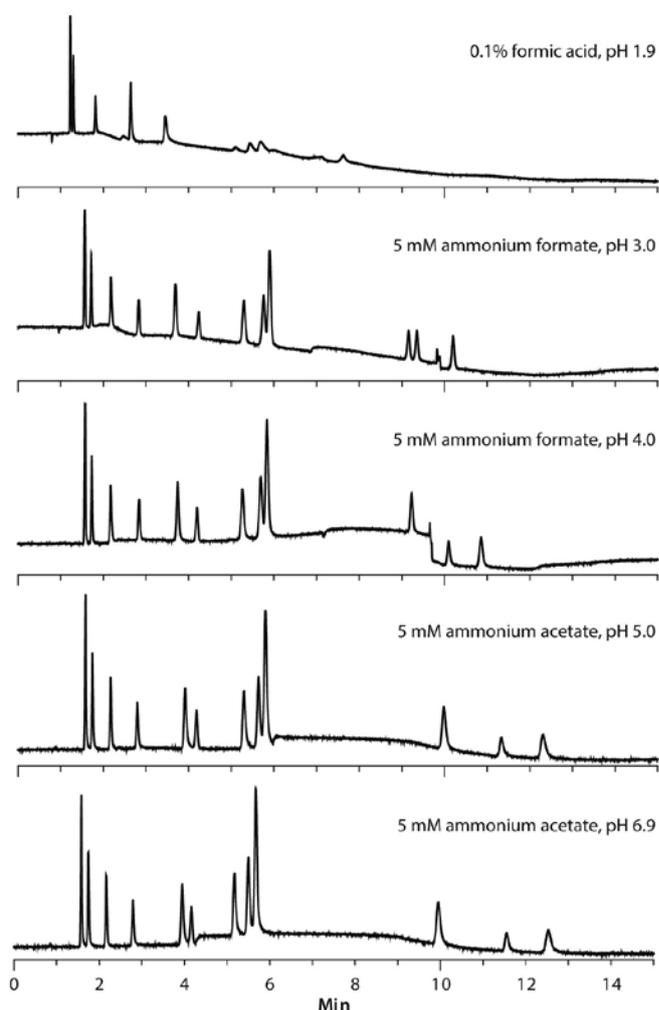


図3. Ascentis Express HILIC (未修飾シリカ)を用いた際の保持挙動



結果、考察

測定したヌクレオシドの大部分は中性であるため、イオン交換作用では保持できません。これら化合物を保持するには、固定相が分配メカニズムを持つ必要があります。Ascentis® Express OH5とHILIC (未修飾シリカ) のいずれも、表面に水を吸着するのに十分な極性を持つため、分配を起こす能力があります。図2と3に、OH5およびHILIC (未修飾シリカ) カラムによるスクリーニング結果を示します。いずれの固定相も良好な保持と選択性を提供しています。最後の3つの溶出化合物で、OH5固定相と比べてHILIC固定相で相対的な保持が増えていました。これらの溶出が遅いHILIC (未修飾シリカ) ではpHの変化で動きますが、OH5を使用した場合は比較的安定しています。これらの結果から、HILICではイオン交換作用が起きていると推察され、イオン交換作用はHILIC (未修飾シリカ) 固定相よりOH5固定相の方が少ないことが分かります。溶出が遅い化合物は、1-メチルアデニン (pK_a 6.1)、3-メチルシチジン (pK_a 8.9) および帯電した7-メチルグアノシンと特定されました。図4に、Ascentis Express F5 (ペンタフルオロフェニルプロピル) で実施した同じ実験を示します。

この固定相の化学的性質から分配メカニズムを示さないため、ヌクレオシドは保持する事ができません。いくつかのヌクレオシドのみ、イオン交換作用によってF5に保持されることが観察されました。

スクリーニングデータから、pH5の移動相条件にて使用したOH5カラムが、最も高い選択性を提供することが示されました。これらの条件を精緻化して、図5に示す分離が得られました。

図4. Ascentis Express F5を用いた際のヌクレオシド混合物の保持挙動

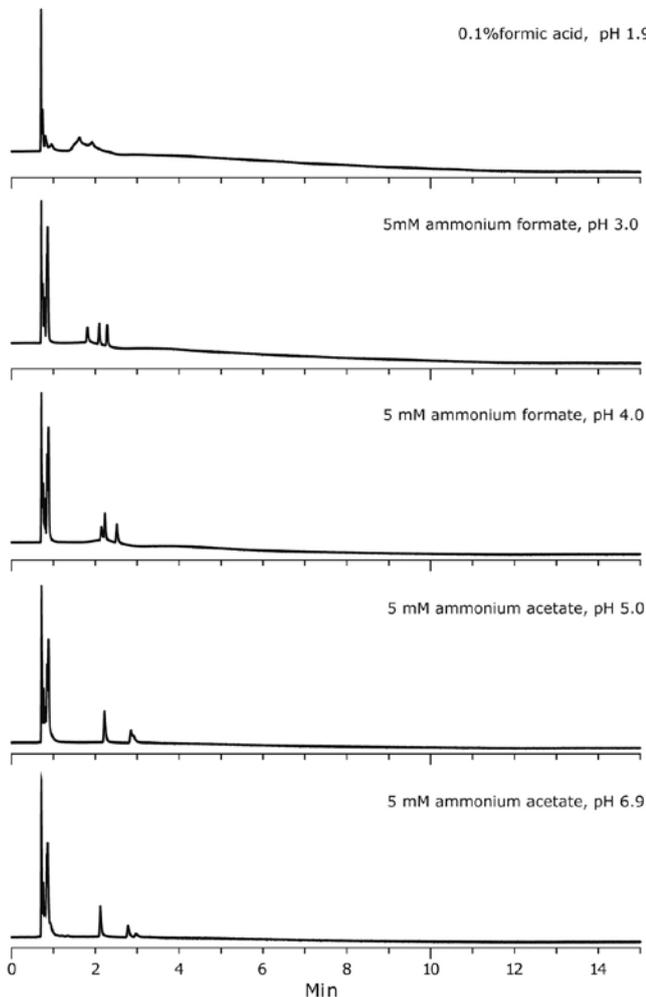
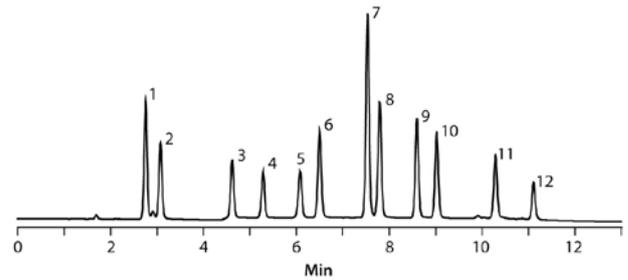


図5. Ascentis Express OH5を用いて最適化したヌクレオシドの分析結果

column: Ascentis Express OH5, 10 cm x 2.1 mm, 2.7 μm (53757-U)
 mobile phase: (A) 5 mM ammonium acetate, pH 5.0 with acetic acid in 95:5, acetonitrile:water; (B) 5 mM ammonium acetate, pH 5.0 with acetic acid in 80:20, acetonitrile:water
 gradient: 0% B held for 1 min; to 100% B in 10 min; held at 100% B for 1 min
 flow rate: 0.3 mL/min
 column temp.: 25 °C
 detector: UV at 250 nm
 injection: 2 μL
 sample: 10 – 100 μg/mL in 95:5, acetonitrile:water
 other information: pH of buffer stock (in water) was adjusted before further dilution with water and/or acetonitrile

- | | | |
|------------------------|---------------------|-----------------------|
| 1. Ribothymidine | 5. Pseudouridine | 9. Guanosine |
| 2. Uridine | 6. Inosine | 10. 3-Methylcytidine |
| 3. 2-Thiocytidine | 7. 5-Methylcytidine | 11. 1-Methyladenosine |
| 4. 2'-O-Methylcytidine | 8. Cytidine | 12. 7-Methylguanosine |



結論

HILICカラムは、分配、極性、およびイオン交換相互作用が同時に働く複雑な保持挙動を示します。これらを用いたカラムスクリーニングは、各々の固定相が示す相互作用を理解することが重要です。本研究では、Ascentis Express OH5 (ペンタヒドロキシ基)、HILIC (未修飾シリカ)、およびF5 (ペンタフルオロフェニルプロピル基) を比較しました。OH5固定相は主に分配メカニズムを、F5固定相は主にイオン交換を、HILIC固定相は2つの相互作用を融合した結果になりました。

References

1. W. Naidong, Journal of Chromatography B, 796 (2003) 209-224.
2. D.S. Bell, Jones, A. Daniel, Journal of Chromatography A, 1073 (2005) 99-109.

+ Featured Products

長さ	HILIC (Si)	F5	OH5
Ascentis Express HPLC Columns, 2.1 mm I.D., 2.7 μm			
2 cm	—	53592-U	53779-U
3 cm	53933-U	53566-U	53748-U
5 cm	53934-U	53567-U	53749-U
7.5 cm	53938-U	53568-U	53755-U
10 cm	53939-U	53569-U	53757-U
15 cm	53946-U	53571-U	53764-U

USPモノグラフで許容されるHPLC分析条件の改変 ～モノリス型カラム Chromolith®を用いたEsomeprazol溶出試験の高速化～

はじめに

メルクのドイツ本社では、各国薬局方に従った分析手法をユーザーの皆様へお届けする取り組みを行っています。2015年に発行したデータ集“Complete monograph method –Solutions for regulated Pharmaceutical Instrumental Analysis Methods with HPLC, FTIR, KF, AAS and ICP –“ (以下CMMデータ集) では、2016年までに特許が切れる4種類の医薬品 (Aripiprazole、Esomeprazole、Raloxifene、Olmesartan medoxomil) に関して、薬局方やガイドラインに従った分析手法の実例や2015年当時最新のUSP37アップデートのポイントをまとめています。CMMデータ集で紹介している試験法はすべてUSP37-NF32モノグラフに従っており、USP38-NF33の要件も満たしています。HPLC試験に関しては、USPでは規定のカラムを必ず使用しなければいけないという拘束はなく、カラムを変更することが望ましいケースも少なからずあり、カラムに限らず試験条件を変更する際の規定も細かく記載されています。本稿ではCMMデータ集の内容から一部抜粋し、USPモノグラフのHPLC試験に許容される試験条件の変更方法、また具体的な変更事例として、Esomeprasolの溶出試験をモノリス型カラムChromolithを用いて高速化した例をご紹介します。

USP General chapterについて

USP-NFは米国薬局方 (USP) と国民医薬品集 (NF) を合わせたもので、一般的に“USP”といえば“USP-NF”を意味します。製剤原料、投与形態、および調合に対するモノグラフはUSPに、食品サプリメントと含有物に対するモノグラフはUSPの別セクションに、賦形剤に対するモノグラフはNFにあります。USP-NFは継続的に改訂されており、USP-NFの標準版として追補 (supplements) が年2回発行されますがさらに細かく、正誤表、暫定改訂告知 (IRA)、改訂速報、ステージ6調和の各プロセスがあり、それぞれの段階でウェブサイト (<http://www.usp.org/usp-nf>) のUSP-NFセクションで告知されます。USP-NFの“General chapter”は日本薬局方という「一般試験法」に該当し、各モノグラフの参照元となる基本的な試験手順が詳細に記述されています。General noticeには、用語の定義とモノグラフの要件の解釈に必要な情報が掲載されています。なおCMMデータ集の中では、Chapter197 (IRまたはFTIRによる同定に関連)、232～233 (AASまたはICPによる重金属分析に関連)、621 (クロマトグラフィー)、711 (溶

出試験)、および921 (水分定量/カールフィッシャー滴定) の各分析手法に関連する詳細をまとめてありますので、こちらもぜひご参考ください。

USPモノグラフの変更はどこまで許容されるのか?

- カラムの充填剤は変更可能か?
- 溶媒使用量削減のため、より細かいカラムにスケールダウンしてもよいか?
- 分析の高速化は可能か?

これらの答えはすべて“YES”です。しかしながら、クロマトグラフィーの分離挙動に影響を与えるパラメーターは以下に挙げるように物理的・化学的な要素が多数あるため、どのように変更を実施すべきか詳細がUSP General chapterで定められています。

クロマトグラフィーの分離挙動に影響を与えるパラメーター

- 移動相の組成・イオン強度・温度・pH
- 流速・カラムサイズ・カラムの温度・背圧
- 充填剤基材の種類 (微粒子型/モノリス型)、粒子径・マクロポア径、空隙率、比表面積
- 固定相の化学修飾 (逆相かその他の表面修飾、またはエンドキャッピングや炭素率などで表される修飾率)

場合によっては、USPモノグラフに記載されているものとは異なる長さ、内径、粒子径のカラムを使用することが望ましいケースもあります。表1にはUSPで規定される各Lカテゴリーの内容を、表2にはUSPとEPにおけるクロマトグラフィー条件変更に関する規定をまとめました。どのようなケースでも、固定相の化学的特性 (USPでいうカラムのLカテゴリー) を変更することは手法の変更とみなされ、全面的な認証 (バリデーション) が必要になります。またグラジエント分析の場合はイソクラティック分析よりも変更に関する制限が厳しく、移動相の組成を調整することは選択性を変化させる可能性があるため推奨されていません。流速、カラム内径、粒子径の変更も許容されていません。しかしながら必要に応じてカラム充填剤 (化学的特性は変更不可)、また、もし規定されている場合は分析開始直後のイソクラティック保持時間、および/またはシステム容量の変更は許容されます。では表2の中でも特筆すべき項目について述べていきます。

表1. メルクの提供するUSPモノグラフに使用可能なカラムカテゴリー

Packing	Description	Chemistry
L1	Octadecylsilane chemically bonded to porous silica or ceramic micro-particles, 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic rod.	RP-18 (C18 or ODS)
L3	Porous silica particles, 1.5 -10 µm in diameter, or a monolithic rod.	Silica(Si)
L7	Octylsilanechemically bonded to totally porous or superficially porous silica particles 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic rod.	RP-8 (C8)
L9	An essentially monomolecular layer of aminopropylsilane chemically bonded to totally porous silica gel support, 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic rod.	NH2
L10	Nitrilegroups chemically bonded to porous silica particles 1.5 to 10 µm in diameter , or a monolithic rod.	CN
L11	Phenyl groups chemically bonded to porous silica particles 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic rod.	Phenyl
L20	Dihydropropanegroups chemically bonded to porous silica particles, 1.5 to 10 µm in diameter, or a monolithic rod.	Diol
L29	Gamma alumina, reverse-phase, low carbon percentage by weight, alumina-based polybutadienespherical particles, 5 µm in diameter with a pore volume of 80 angstrom units.	Alumina
L45	Beta cyclodextrin, R,S-hydroxypropylether derivative, bonded to porous silica particles, 5 -10 µm in diameter.	Cyclodextrin(Chiral)

* 2014年11月よりL9、10、11、20に“or a monolithic rod”と追記され、使用可能なカラムとしてモノリス型カラムが正式に追加されました。

表2. USPおよびEPにおけるHPLC試験条件変更に関する規定(抜粋)*

	USP	EP
カラム長(L)	(USP37より新たに追加)	±70%
カラム内径(dc)	イソクラティック分析の場合:L/dpが一定、または規定されたL/dpの-25%~+50%の範囲内であれば、粒径および/またはカラム長を変更可能	±25%
粒子径(dp)	グラジエント分析の場合:カラム長、カラム内径、および粒子径の変更は許容されていない	Reduction of 50%, no increase
流速(F)	(USP37より新たに追加) カラムサイズと粒子径を変更した場合の流速は以下の式で求めることが可能。 $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$ F ₁ :元の流速、F ₂ :変更後の流速、dc:カラム内径、dp:粒子径 イソクラティック分析の場合:流速は±50%までの変更のみ許容されている グラジエント分析の場合:流速、カラム内径、粒子径の変更は許容されていない	±50%
カラム温度	±10°C	±10°C (max 60°C)
注入量	精度、直線性(linearity)、および検出限界が許容範囲内であれば変更可能。	May be decreased if LOD and repeatability is OK)
pH	イソクラティック分析、グラジエント分析ともに±0.2まで変更可能。	±0.2 units
UV波長	変更は許容されていない	No adjustment is permitted
バッファー濃度	pHの変動が許容範囲内であれば、±10%まで変更可能	±10%
移動相の溶媒組成	少量成分のみ、相対比で±30%、絶対量で±10%の範囲で変更可能。	±30% relative, or ±30% absolute whichever is larger

USPにおいて、ガードカラムはモノグラフに特筆が無い限り以下の要件を満たした場合に使用可能

(a) 長さは本カラムの15%以下

(b) 内径は本カラムと同一またはそれ以下

(c) 充填剤の基材(シリカゲル等)は本カラムと同じもので、同じ官能基が修飾されているもの

(b) いずれの場合もガードカラムを接続した状態でシステム適合性の要件を満たす

*詳細は <http://www.merckmillipore.jp/hplc> からダウンロードいただける CMM データ集をご参考ください。

<カラム長(L)、カラム内径(dc)、粒子径(dp)>

イソクラティック分析の場合、理論段数(N)が規定カラムの-25%~+50%の範囲内であれば異なるL、dpのカラムを使用可能です。また粒子径の変更を表面多孔質粒子充填剤に適応する際は、Nが規定カラムの-25%~+50%の範囲内であれば、異なるカラム長、カラム内径の組み合わせを使用することが許容されています。これらの変更の結果理論段数Nが増えてピーク体積が小さくなった場合は、装置配管、検出器のセル容積、サンプリング間隔、注入量なども最適化し、カラム外バンド広がりを最小限に抑える必要がでてくる可能性があります。モノグラフに粒子径が記載されていない場合、L/dpは、該当する最大粒径を用いて計算します。

<流速(F)>

粒子径(dp)を小さく変更した場合、元の粒子径の場合と同じカラム効率(理論段高)を得るためにはより早い線流速が必要となるため、流速も変更する必要があります。例えばイソクラティック分析で粒子径を3 μm以上のものから3 μm以下に変更する場合は、流速を早くしてより大きい線流速に設定し、カラム効率が20%以上低下しないよう調整します。また逆に、3 μm以下のサイズから3 μm以上の粒子径に変更する場合は流速を落とし、同じようにカラム効率の低下が20%未満になるよう調整します。

一背圧と分析時間はどれだけ変更しても構わない一

以上の通り、カラム長、内径、粒子径、流速は、同等の理論段を供するように調整して設定することが可能です。表3には市販されている代表的なカラムサイズを掲載しましたが、すべてのサイズにおいて、上述のパラメーターを調整することで同等の理論段が得られるのです。

カラム長、内径、粒子径、流速は変更に関して細かく規定されている一方で、背圧と分析時間は変更に関しての規定が一切なく、制限なく変更することが可能です。言い換えると、規定の手法より優れた分析条件での試験が可能なのです。

たとえば、もしモノグラフで4.6-150 mm、5 μmのカラムで流速1.5

ml/minで試験する、と規定されていたとします。この場合、75 - 2.1 mm、2.5 μmのカラムを使用し、流速1.5 ml/min x 0.4 = 0.6 ml/minでも同じ理論段が得られます。結果として背圧は4倍程度に高くなりますが、試験時間は元の試験の30%程度まで短縮することができます。

<試料注入量>

試料注入量は、許容された精度、直線性(linearity)、および検出限界の範囲内であれば調整できます。ただし、注入量が大きすぎるとバンドの広がりが起こり、理論段と分離度が低下することに注意が必要です。これはグラジエント分析とイソクラティック分析のいずれにも当てはまります。

注入量を増減する最も簡単な方法は、カラム体積を比較し、カラム体積と注入量の体積比を一定に保つことです。4.6-250 mmのカラムを2.1-100 mmのカラムに変更する場合、カラム体積が4.6-250 = 4.15 mLから2.1-100 = 0.346 mLと1/12になるので、注入量も1/12に減らす必要があります。このケースで元のカラムの注入量が20 μLであった場合、スケールダウン後の注入量は2 (1.7) μL以下とすることをお勧めします。

<移動相の溶媒組成>

イソクラティック試験に限り、移動相中50%以下の少量成分の組成の変更が許容されます。これらの成分は元の組成の±30%の範囲内であれば変更できますが、移動相全体に対して±10%を超える変更は許容されていません。三成分混合の場合は少量成分の1種類のみ変更できます。いずれの場合も、一番多い成分の溶媒を使用して全体が100%になるようにします。以下に、二成分混合系と三成分混合系の組成変更の例を示します。

2成分混合系の場合: A:B=50:50の移動相では、少量成分A(もしくはB、全体の50%)の30%は移動相全体の15%にあたり、移動相全体の±10%以内という変更許容量から逸脱してしまいます。したがって、50:50の移動相の場合、40:60~60:40の範囲で変更可能ということになります。また、A:B=2:98の移動相では、少量成分A(全体の2%)の

30%は全移動相中の0.6%にあたるので、この場合はA:B=1.4:98.6~2.6:97.4の範囲内で変更が可能ということになります。

3成分混合系の場合：A:B:C = 60:35:5の移動相では、2番目に多い成分であるB（全体の35%）の30%は全体の10.5%にあたり、絶対量で±10%以内という変更許容量を超えます。したがってBの成分は、全体の25%~45%の範囲内で調整できます。成分Cを変更する場合、C（全体の5%）の30%は全体の1.5%にあたるので、Cの成分は全体の3.5%~6.5%の範囲内で調整できます。よって、A:B:Cは50:45:5~70:25:5または58.5:35:6.5~61.5:35:3.5の範囲で変更することが可能となります。

モノグラフの要件を満たす正しいカラム選択

HPLCカラムの選択は極めて重要であり、慎重に検討しないとモノグラフに設定された要件を満たすことは困難です。USPでモノグラフカラムとして記述されたカラムはそれしか使ってはいけないという拘束はなく、実際のモノグラフにはカラムの形状と分類が記載されているだけである点に留意することが重要です。またUSPは、ユーザーがHPLCカラムを相互参照するのに役立つHPLCカラムのデータベースも用意していますが、データベースそのものはあくまでも「その試験法の開発・認証の際に使用されたカラムと等価なカラムをユーザーが探すための参考情報を提供するツール」であることが明記されており、データベースに記載されたカラムを使用した場合も、USPの基準を満たしていることを別途検証する必要がある点に留意する必要があります。

表1に示した通り、メルクでは現時点でL1、L3、L7、L8、L10、L11、L20、L29、およびL45のカラムを提供しています。これらはモノグラフカラムとは異なるようにみえるかもしれませんが、USPの要件を満たしています。

Esomeprazole分析の高速化

最後にモノリス型カラムChromolith®を用いた分析の高速化事例をご紹介します。

Esomeprazole（エソメプラゾール）はOmeprazoleのSエナンチオマーであり、アストラゼネカ社が開発したプロトンポンプ阻害剤です。胃壁細胞中のH⁺ / K⁺ ATPaseの働きを阻害し胃酸の生成を抑制することで、消化不良、消化性潰瘍疾患、胃食道逆流症、およびソリンジャー・エリソン症候群の治療に使用されます。一般的な商業ブランド名はNexium®、Essocam、Esomezol®で、2010年の全世界での売上高は49億ドルです。特許期間は2014年に満了しました。CMMデータ集では、Esomeprazole magnesiumおよびEsomeprazole magnesium遅延放出カプセルのUSP37-NF32の実験手順に従ったデータを紹介しています。アッセイ、関連物質（RS）、および溶出試験は、微粒子充填型およびモノリス型カラムChromolithのC8、C18カラムを用いて実施しました。これらの手法は主にイソクラティック試験であり、規定されたカラムサイズに応じてUHPLCに変更しました。またモノリス型カラムの挙動はコアシェルカラムと似ているため、理論段数Nが規定カラムの-25%~+50%の範囲に保たれていれば使用可能となります。本稿では、Esomeprazole magnesiumカプセルの溶出試験を、USPモノグラフで規定された微粒子充填型カラムか

表3 パラメーターの調整により同等のNを示すカラムサイズ一覧

カラム長 (L, mm)	カラム内径 (dc, mm)	粒子径 (dp, μm)	相対値				
			L/dp	F	N	Pressure	Run Time
250	4.6	10	25000	0.5	0.8	0.2	3.3
150	4.6	5	30000	1.0	1.0	1.0	1.0
150	2.1	5	30000	0.2	1.0	1.0	1.0
100	4.6	3.5	28600	1.4	1.0	1.9	0.5
100	2.1	3.5	28600	0.3	1.0	1.9	0.5
75	4.6	2.5	30000	2.00	1.0	4.0	0.3
75	2.1	2.5	30000	0.4	1.0	4.0	0.3
50	4.6	1.7	29400	2.9	1.0	8.5	0.1
50	2.1	1.7	29400	0.6	1.0	8.5	0.1

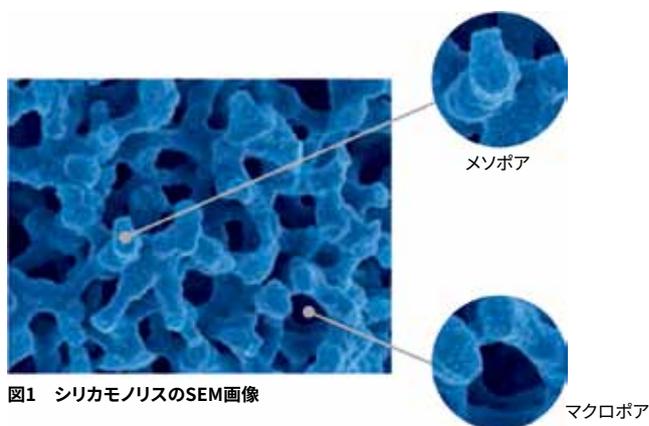


表4 Purospher®STAR RP-18eカラムを用いたEsomeprazoleの溶出試験条件

カラム:	Purospher STAR RP-18 endcapped (5 μm) 150x4.6 mm (型番1.51455.0008)
注入量:	20 ul
検出:	UV 302 nm
セル:	10 ul
流速:	1.0 ml/min
Medium:	0.1 N 塩酸 300 mlで2時間後、リン酸バッファー (pH6.8) で以下の手順で継続。ベッセルに700 ml 0.086 M のリン酸2ナトリウムを添加し、必要に応じて2 N 塩酸または2 N 水酸化ナトリウムでpH 6.8 ±0.05に調整する。
装置条件:	100 rpm (pH 6.8のリン酸バッファーで30分)
移動相:	1.0 Mのリン酸二水素ナトリウムバッファー10.5 mlと0.5 Mのリン酸2ナトリウムバッファー60 mlを混合し、純水で1000 mlに希釈し、pH 7.3のリン酸バッファーを調製する。このバッファー500mlと350mlのアセトニトリルを混合し、純水で1000 mlに希釈する。
温度:	25°C
希釈:	5.24 gのリン酸3ナトリウム12水和物を水に溶解し、0.5 Mのリン酸2ナトリウム溶液110 mlを添加し純水で1000 mlに希釈する。
標準品溶液:	USP Omeprazole RS 10 mgを250ml以上の容量の攪拌フラスコに投入し、10ml程度のアルコールで溶解する。これに希釈液40 mlを添加し規定量まで純水で希釈する。
サンプル溶液:	pH 6.8のリン酸バッファー中で30分攪拌後適切なフィルターでろ過し、5.0 mlのろ液を0.25Mの水酸化ナトリウム1.0 mlを含む適切なガラス容器に移す。よく攪拌した後、暗所に保存する。
背圧:	149 Bar (2160 psi)

らモノリス型カラムChromolith® HighResolutionに移行した事例を掲載します。モノリス型カラムは、ゾル-ゲル法により精製した多孔質シリカ連続体「モノリス型シリカ」(図1)を基材に用いており、マクロポアとメソポアからなる二次元ポア構造を持っています。約1.5umのマクロポアの存在により通液性が良く低い背圧をもたらし、優れたカラム耐久性と分析の高速化につながります。USPモノグラフに従い、4.6-150 mm、5 umの L1カラム (Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 μm) 4.6-150 mm (型番1.51455.0008) を用いた試験条件を表4に、その結果を図2に示します。こちらの手法では適合性に求められる要件 (75%以上のesomeprazole (C17H19N3O3S) が溶解する) を満たしていることが確認できました。Chromolithカラムを用いた新しい手法では、基材を微粒子充填型からモノリス型シリカに変更するとともに、カラムサイズを4.6-100mmに変更しました。試料注入量は単純計算では13 ul となりますが、微粒子充填型カラムよりカラム効率

良かったためさらに減らすことができ、5ulで実施しています。試験条件を表5に、その結果を図3に示します。この新しい手法ではすべての性能基準を満たしながらも、従来法の3倍の高速化を達成し、クロマトグラフィー分離度の向上、そしてカラム背圧の低下を達成することができました。

CMMデータ集では本稿でご紹介した以外にも、有効薬剤成分(API)分析、関連物質(不純物プロファイル)も示しています。また、水分定量に使用するカールフィッシャー法、金属量定量に使用する原子吸光分光法(AAS)、誘導結合プラズマ(ICP)法、および同定に使用するFTIR分析も紹介していますので、さらに詳しい情報が必要な場合には是非ご参考ください。

参考文献：“Complete monograph method -Solutions for regulated Pharmaceutical Instrumental Analysis Methods with HPLC, FTIR, KF, AAS and ICP - 2015年メルク株式会社発行

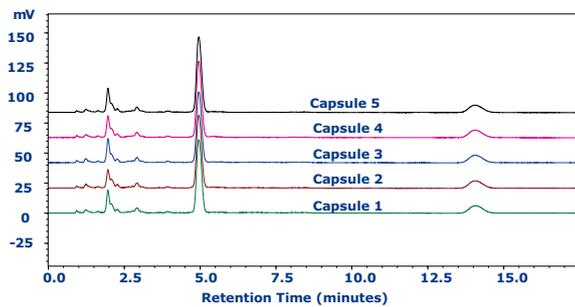


図2. Purospher STAR RP-18eカラムを用いたEsomeprazole 溶出試験結果

サンプル (area unit)	標準品 (area units)	Label claim (mg/capsule)	Media volume (ml)	Dissolution (%)
318234				91.2
312926				89.7
316158	357635	40	1000	90.6
313776				89.9
311351				89.2
Average				90.1

esomeprazoleの溶解性の算出方法: $Result = (rU/rS) \times (CS/L) \times V \times 100 = 90.1\%$

rU= peak response from the Sample solution

rS= peak response from the Standard solution

CS = concentration of the Standard solution (mg/mL)

L = label claim (mg/Capsule)

V = volume of Medium, 1000 mL

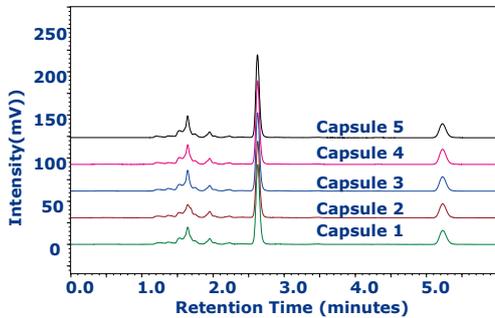


図3. Chromolithカラムを用いたEsomeprazoleの溶出試験結果

サンプル (area unit)	標準品 (area units)	標準品 (ug/ml)	Label claim (mg/capsule)	Media volume (ml)	Dissolution (%)
671494					91.6
656845					89.6
665258	751234	0.041	40	1000	90.8
658643					89.9
655000					89.3
Average					90.2

esomeprazoleの溶解性(%)の算出方法: $Result = (rU/rS) \times (CS/L) \times V \times 100 = 90.2\%$

rU= peak response from the Sample solution

rS= peak response from the Standard solution

CS = concentration of the Standard solution (mg/mL)

L = label claim (mg/Capsule)

V = volume of Medium, 1000 mL

表5. Chromolithカラムを用いたEsomeprazoleの溶出試験条件

カラム:	Chromolith HighResolution RP-18 endcapped 4.6-100 mm (型番1.52022.0001)
注入量:	5 ul
検出:	UV 302 nm
セル:	10 ul
流速:	1.0 mL/min
Medium:	0.1 N 塩酸 300 mlで2時間後、リン酸バッファー (pH6.8) で以下の手順で継続。ベッセルに700 ml 0.086 M のリン酸2ナトリウムを添加し、必要に応じて2 N 塩酸または2 N 水酸化ナトリウムでpH 6.8 ±0.05に調整する。
装置条件:	100 rpm (pH 6.8のリン酸バッファーで30分)
移動相:	1.0 Mのリン酸二水素ナトリウムバッファー10.5 mlと0.5 Mのリン酸2ナトリウムバッファー60 mLを混合し、純水で1000 mlに希釈し、pH 7.3のリン酸バッファーを調製する。このバッファー500mlと350mlのアセトニトリルを混合し、純水で1000 mlに希釈する。
温度:	25°C
希釈:	5.24 gのリン酸3ナトリウム12水和物を水に溶解し、0.5 Mのリン酸2ナトリウム溶液110 mlを添加し純水で1000 mlに希釈する。
標準品溶液:	USP Omeprazole RS 10 mgを250ml以上の容量の攪拌フラスコに投入し、10ml程度のアルコールで溶解する。これに希釈液40 mlを添加し規定量まで純水で希釈する。
サンプル溶液:	pH 6.8のリン酸バッファー中で30分攪拌後、一部を採取し適切なフィルターでろ過し試験する。5.0 mlのろ液を0.25Mの水酸化ナトリウム1.0 mlを含む適切なガラス容器に移し、よく攪拌した後暗所に保存する。
背圧:	75 Bar (1080 psi)

医薬品の元素不純物

—ICH Q3D、USP、Ph.Eur.5.20のための認証標準物質—

Certified Reference Materials for ICH Q3D, USP<232> & <2232> and Ph.Eur. 5.20

Ingrid Hayenga, Product Manager Reference Materials, ingrid.hayenga@sial.com

医薬品への金属の混入は「元素不純物」と呼ばれ、いくつもの汚染源から発生します。医薬品の合成時に意図的に添加される場合や、意図せず汚染物として混入してしまう場合（製造装置との相互作用で混入する場合、医薬品の成分として混入する場合など）があり、最終的に製剤中で検出されてしまいます。元素不純物はその毒性により患者の健康に危害を及ぼすため、混入レベルを許容限度内に管理する必要があります¹。

ICH Q3Dガイドラインの進化

2009年、医薬品規制調和国際会議 (ICH) は、医薬品および原料中の金属不純物を制限するため、国際的に調和のとれたガイドラインを策定することを提案しました。このアプローチで、元素不純物の制限に関する明確なガイドラインが全世界に提供されたため、各国規制当局には大きな影響があり、たとえ国や地域が異なっても透明性のある同じ結果に導かれる状況になったのです。

ICHはステップ4の「元素不純物ガイドライン」の中で、リスクアセスメントプロセスにおける意思決定を容易にすることを旨とし、元素不純物を4つのクラスに分類しました。

クラス1: これらの不純物はヒトに著しい毒性を持つため、医薬品製造での利用が制限または禁止されます。広く用いられる材料（採掘賦形剤など）からの不純物として見つかることがあります。クラス1に含まれる4元素はすべて、潜在的なあらゆる混入源と投与経路でリスクアセスメントによる評価を実施する必要があります。

クラス1元素は、As、Cd、Hg、およびPbが該当します。

クラス2: この不純物は一般的に、投与経路に依存してヒトへの毒性を発現すると考えられています。医薬品への相対的な混入しやすさに基づき、2つのサブクラス2Aと2Bに分類されます。

・クラス2A；医薬品に混入する可能性が比較的高いため、潜在的なあらゆる混入源と投与経路全体でリスクアセスメントが必要です。クラス2A元素はCo、Ni、およびVです。

・クラス2B；天然の存在量が少なく、他の材料から遊離される可能性が低いため、医薬品に混入する可能性が低いものです。そのため、医薬品の原料、賦形剤またはその他の成分の製造中に意図的に加えない限り、リスクアセスメントの対象から除外されます。

クラス2B元素はAg、Au、Ir、Os、Pd、Pt、Rh、Ru、Se、およびTiです。

クラス3: この元素は経口投与では比較的毒性が低いものの、吸入または非経口ルートで投与する場合はリスクアセスメントが必要になることがあります。

クラス3元素はBa、Cr、Cu、Li、Mo、Sb、およびSnです。

その他の元素: 毒性が低いため、および／または各国で規制が異なるため許容1日最大曝露量 (PDE値) が定められていない元素不純物がいくつかあります。これらの元素が医薬品中に存在する場合は、他のガイドラインおよび／またはその国・地域の規制により取り扱われます。

この元素はAl、B、Ca、Fe、K、Mg、Mn、Na、W、およびZnです。

USPとEPの評価

2010年まで、USPとEPにおける医薬品の元素不純物（重金属による汚染）の確認手法には金属硫化物の沈殿と鉛標準品との比較による比色法が定められていました。（USP <231>およびPh.Eur. 2.4.8）その後現在までに、各薬局方においてICH Q3Dガイドラインに従った改定が行われています。

<USP改定の流れ>

USPはICHが2010年に発行した元素不純物ガイドライン (Q3D) に基づいて、不純物の制限、医薬品と原料の分析工程、および栄養補助食品中の元素汚染物質をカバーする3つの新しいGeneral Chapterを提案しました。

- Chapter USP <232>: Ph.Eur. 5.20: 医薬品中の元素不純物 - 制限
- Chapter USP <233>: 医薬品中の元素不純物 - 手順
- Chapter USP <2232>: 栄養補助食品中の元素汚染物質

USPは2018年1月1日をGeneral Chapter <232>、<233>、および<232>の施行日と定めており、以降は新規に申請する医薬品、既存の医薬品共にガイドラインに従う必要があります。この実施は、2014年12月16日にアナウンスされたICH Q3Dステップ4元素不純物ガイドラインの内容に合わせ、別の医薬品・医療機関が定めたタイムラインと一致しているものです。

<EP改定の流れ>

EPは、2014年7月に元素不純物に関する戦略とICH Q3Dの実施に関する計画をアナウンスし、それからほぼ1年後の2015年4月に元素不純物に関する方針とGeneral text、Individual textの改版スケジュールを発表しました。同年8月には、ICH Q3Dの適用範囲から外す医薬品を明確化しました。2016年6月以降は、新規医薬品またはすでに承認された医薬品のいずれかを含有する新たに製造承認を得る製品に関してこのガイドラインが適用されています。また既存の医薬品（すでに承認された医薬品の新しい相互承認申請を含む）についても、2017年12月からガイドラインに従う必要があります。

ICHの原則により、金属触媒と金属試薬に関するEMAガイドラインが、General Test 5.20とGeneral Method 2.4.20に置き換えられました。2018年1月1日に実施されるPh.Eur. Suppl. 9.3では、天然由来の物質を除いて、個々のモノグラフに元素不純物の試験はありません。元素不純物固有の性質から考えれば、医薬品中に混入しうる元素汚染源のほとんどは天然由来の物質であると考えられるからです。EP当局は、PDE値が定められていない元素（ICH Q3Dガイドラインで「その他の元素」に分類された元素）に関して、別途試験を実施することも推奨しています²。

<日本国内の流れ>

2015年9月30日、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知（薬食審査発0930第4号）として「医薬品の元素不純物ガイドラインについて」が発出され、日本国内においてもICH Q3Dが施行されることとなりました。

本ガイドラインの適用は、2017年4月1日以降に承認申請される新医薬品のみとなりますが、今後、既存製剤への適用についても検討が行われていきます。

分析法

ICHは規制のグローバルの調和を図ることを目的とした機関であるため、元素不純物分析のための機器分析法を特に推奨してはいませんが、USP <233>では製剤または成分に含まれる元素不純物の推定濃度に応じて以下の分析手法を提案しています。

- ppmオーダーの場合：ICP-OESまたは原子吸光
- ppbオーダーの場合：ICP-MS

また日本薬局方の従来の試験法は重金属試験法およびヒ素試験法ですが、2012年10月、第16改正日本薬局方第一追補よりICP-AES、ICP-MSが一般試験法として記載されています。

元素不純物に対するICH Q3Dの制限

全24元素に対し、3つの主な投与経路に応じて毒性限度値がPDF値（permitted daily exposure：1日に許容される摂取限度値、単位：mg/day）として定められています。表1に、1日の服用量が10 g以下の医薬品に適用されるPDE値を示します。

表2に、リスクアセスメントで検討すべき元素を挙げました。

表1. 元素不純物に対する許容1日曝露量（PDE値）

Element	Class	Oral PDE (µg/day)	Parenteral PDE (µg/day)	Inhalation PDE (µg/day)
As	1	15	15	2
Cd	1	5	2	2
Hg	1	30	3	1
Pb	1	5	5	5
Co	2A	50	5	3
V	2A	100	10	1
Ni	2A	200	20	5
Tl	2B	8	8	8
Au	2B	100	100	1
Pd	2B	100	10	1
Ir	2B	100	10	1
Os	2B	100	10	1
Rb	2B	100	10	1
Ru	2B	100	10	1
Se	2B	150	80	130
Ag	2B	150	10	7
Pt	2B	100	10	1
Li	3	550	250	25
Sb	3	1200	90	20
Ba	3	1400	700	300
Mo	3	3000	1500	10
Cu	3	3000	300	30
Sn	3	6000	600	60
Cr	3	11000	1100	3

Q3Dガイドラインに適合したICP用標準物質

Q3Dガイドラインに従った元素不純物分析では複数元素を同時に分析する必要があり、その元素の組み合わせも決まってきます。このようなケースでは、すでに目的の組成で混合されている標準品を用いることで、シングルエレメントスタンダードを用いる場合と比較して以下のメリットがあります。

- 混合調整する作業時間の削減
- コストの削減（シングルエレメントスタンダードを買い揃えるよりも低コスト）
- 正確で再現性の高い分析の実現

混合調整する作業は時間がかかり、手技に依存してデータがばらつくリスクもありますので、適切な試薬を用いることをお勧めします。

シグマアルドリッチは、元素比がICH Q3DガイドラインのPDE値に対応している元素混合標準品 *TraceCERT*を提供しています。standard IIはクラス1、2A、および2Bの元素の一部を含む混合物、standard IIIはIに含まれていないクラス2Bの元素を、standard IIIはクラス3元素をすべて含みます。

表3に、各製品に含まれる元素濃度（mg/l）をまとめました。

また表4に、*TraceCERT*の特長を挙げましたが、より詳しい情報をお求めの場合は、[Sigma.com/crm-jp](https://www.sigma.com/crm-jp)をご覧ください。

表2. リスクアセスメントで評価すべき元素

Element	Class	If Intentionally Added (all routes)	If not intentionally added		
			Oral	Parenteral	Inhalation
As	1	Yes	Yes	Yes	Yes
Cd	1	Yes	Yes	Yes	Yes
Hg	1	Yes	Yes	Yes	Yes
Pb	1	Yes	Yes	Yes	Yes
Co	2A	Yes	Yes	Yes	Yes
V	2A	Yes	Yes	Yes	Yes
Ni	2A	Yes	Yes	Yes	Yes
Tl	2B	Yes	No	No	No
Au	2B	Yes	No	No	No
Pd	2B	Yes	No	No	No
Ir	2B	Yes	No	No	No
Os	2B	Yes	No	No	No
Rb	2B	Yes	No	No	No
Ru	2B	Yes	No	No	No
Se	2B	Yes	No	No	No
Ag	2B	Yes	No	No	No
Pt	2B	Yes	No	No	No
Li	3	Yes	No	No	No
Sb	3	Yes	No	No	No
Ba	3	Yes	No	No	No
Mo	3	Yes	No	No	No
Cu	3	Yes	No	No	No
Sn	3	Yes	No	No	No
Cr	3	Yes	No	No	No

表4. TraceCERTの特長

TraceCERT®
Unique level of accuracy and lot-specific value
Produced according to ISO Guide 34 and analyzed in our ISO/IEC 17025 accredited lab; traceable to at least two independent references (NIST, BAM or SI unit kg)
Sophisticated packaging and comprehensive documentation including proper uncertainty calculation, expiry date and storage information
Packaged in opaque and gas-tight aluminum foil bags for extended stability. Certificates are included and list up to 70 trace impurities for the TraceCERT products.
250 mL package size*

文献

1. ICH Q3D limits from Step 4 version, December 16, 2014 Option 1
2. Thermo Fischer, the Medicine Maker, Edition 4 – August 2016100

表3. ICH Q3Dに適合した多元素標準品TraceCERTの元素組成

Element	Class	TraceCERT® Elemental Impurities Mix according to ICH Q3D oral			TraceCERT® Elemental Impurities Mix according to ICH Q3D parenteral		
		Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 1	Standard 2	Standard 3
		Cat. No.	Cat. No.	Cat. No.	Cat. No.	Cat. No.	Cat. No.
		19041	73108	69729	89118	89922	07368
		In 12% HNO ₃	In 10% HCl	In 5% HNO ₃ & HF<0.5%	In 12% HNO ₃	In 10% HCl	In 5% HNO ₃ & <0.5% HF
Ag	2B	150 mg/L			10 mg/L		
As	1	15 mg/L			15 mg/L		
Au	2B		100 mg/L			100 mg/L	
Ba	3			140 mg/L			70 mg/L
Cd	1	5 mg/L			2 mg/L		
Co	2A	50 mg/L			5 mg/L		
Cr	3			1100 mg/L			110 mg/L
Cu	3			300 mg/L			30 mg/L
Hg	1	30 mg/L			3 mg/L		
Ir	2B		100 mg/L			10 mg/L	
Li	3			55 mg/L			25 mg/L
Mo	3			300 mg/L			150 mg/L
Ni	2A	200 mg/L			20 mg/L		
Os	2B		100 mg/L			10 mg/L	
Pb	1	5 mg/L			5 mg/L		
Pd	2B		100 mg/L			10 mg/L	
Pt	2B		100 mg/L			10 mg/L	
Rh	2B		100 mg/L			10 mg/L	
Ru	2B		100 mg/L			10 mg/L	

(Analytix Reporter Issue 1 2017)

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Sigma-Aldrich Co. LLCの登録商標もしくは商標です。FocusLiner is a trademark of SGE Analytical Science Pty Ltd., Nexium is a registered trademark of ASTRAXENCA AB, Esomesol is a registered trademark of Novartis AG 本紙記載の内容は 2017 年 12 月時点の情報です。©2017 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品に関するお問い合わせは、弊社テクニカルサービスへ

TEL : 03-6756-8245 FAX : 03-6756-8302

E-mail : sialjpts@sial.com

在庫照会・ご注文方法に関するお問い合わせは、弊社カスタマーサービスへ

TEL : 03-6756-8275 FAX : 03-6756-8301

E-mail : sialjpcs@sial.com

www.sigma-aldrich.com/japan

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。

お問い合わせは下記代理店へ