

Vol.21 (JUL.2016)

Analytix

臨床&法医学

- UHPLC/MS/MS を用いた血漿中ジギトキシンおよびジゴキシンの測定
- Bio-SPME (固相マイクロ抽出) を用いた微量サンプリング法の開発と DBS (Dried blood spots, 乾燥ろ紙血液) との比較

医薬

- リボフラビン (ビタミン B₂) および不純物の分析における USP 法の代替手法

食品

- SPME (直接浸漬) および Fast GC を用いたトリプル四重極 MS で検出した植物油中のフタル酸エステルの分析法の開発
- NARP-HPLC-APCI-MS を用いた乳製品およびシーフード中のトリアシルグリセロール類の同定と定量
- Supelclean™ EZ-POP NP、Silica Gel SPE および SLB®-5ms GC カラムを用いた魚油中ポリ塩化ビフェニル類 (PCB) の分析
- 海産毒 (マリントキシン) の認証標準物質

環境

- ISO 17943 用の認証標準物質 (CRM)

SAJ2011

臨床&法医学

- 3 UHPLC/MS/MS を用いた血漿中ジギトキシンおよびジゴキシンの測定
リン脂質とタンパク質の同時クリーンアップ
- 9 Bio-SPME（固相マイクロ抽出）を用いた微量サンプリング法の開発と DBS（Dried blood spots, 乾燥ろ紙血液）との比較

医薬

- 12 リボフラビン（ビタミン B₂）および不純物の分析における USP 法の代替手法
Titan™ C18 カラムと LC/MS/MS 検出を用いて

食品

- 15 SPME（直接浸漬）および Fast GC を用いたトリプル四重極 MS で検出した植物油中のフタル酸エステルの分析法の開発
- 19 NARP-HPLC-APCI-MS を用いた乳製品およびシーフード中のトリアシルグリセロール類の同定と定量
- 24 Supelclean™ EZ-POP NP、Silica Gel SPE および SLB®-5ms GC カラムを用いた魚油中ポリ塩化ビフェニル類（PCB）の分析
- 30 海産毒（マリントキシン）の認証標準物質
Sigma-Aldrich はカナダの National Research Council（NRC）の取扱いを開始しました

環境

- 32 ISO 17943 用の認証標準物質（CRM）



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

[Sigma.com/email](https://sigma.com/email)

UHPLC/MS/MS を用いた血漿中ジギトキシンおよびジゴキシンの測定

リン脂質とタンパク質の同時クリーンアップ

Xiaoning Lu, Sr. R&D Chemist, and David S. Bell, HPLC R&D Manager, Supelco xiaoning.lu@sial.com

緒言

ジギトキシンおよびジゴキシンは、ジキタリス（キツネノテブクロ）という植物に由来する強心配糖体です。これらの物質は数百年にわたって様々な心臓の治療に用いられてきました。ジギトキシンおよびジゴキシンは、治療効果のある有効域の範囲が狭く毒性が高いため、患者体内における濃度をモニタリングする必要があります^{1,2}。その方法として免疫学的測定法がありますが、時間と手間がかかります。さらに、免疫学的測定法では、ジギトキシンとジゴキシンを分離、選択する事ができません。それはこの両者が水酸基1つのみ異なる類縁化合物であるためです（図1）。

本研究は、血漿中におけるジギトキシンおよびジゴキシンのUHPLC/MS/MS 定量分析法の開発を行いました。また、ジルコニアベースの吸着剤である HybridSPE®-PLus を用いてタンパク質とリン脂質を同時に除去する簡単なサンプルクリーンアップ法を検討しました。

実験

対象物質を添加したラット血漿サンプル 100 μ L を HybridSPE-PLus 96 ウェルプレートのウェルに加え、次いで 1% 酢酸含有アセトニトリル溶液 300 μ L を加えてタンパク質を沈殿させました。ウェルをプラスチック膜でシールし、デジタル振盪機上 (1000rpm) で 2 分間振盪し攪拌しました。プレートをバキュームマニホールドに移し、4 分間減圧して得た溶出液を LC/MS/MS で分析しました。

LC/MS/MS 条件

試料調製: HybridSPE-PLus 96 ウェルプレート
 カラム: Titan™ C18、10 cm \times 2.1 mm I.D.、1.9 μ m
 移動相: 10 mM 酢酸アンモニウム 水溶液: メタノール (20:80)
 流速: 0.2 mL/min
 検出器: MS、ESI(+), MRM
 装置: Shimadzu™ LCMS-8030

結果と考察

MS スペクトルに対する移動相組成の影響

図 2A から、ジギトキシンおよびジゴキシンが、0.1% 酢酸含有アセトニトリル: 水 (50:50) 移動相溶液中で主にナトリウム付加体としてイオン化されていることが分かります。ナトリウムイオンはジギトキシンおよびジゴキシンに対してプロトン (H^+) よりはるかに高い親和性を有しているため、移動相中ではナトリウム付加体が優先されます。さらに、ナトリウム付加体は、衝突エネルギーやガス圧にかかわらず、ほとんど断片化しないため、MS/MS モードではモニターすることができません。このナトリウム付加体形成の問題は、移動相を酢酸アンモニウムを含む水: メタノールに代えることで解決できます。

移動相を酢酸から酢酸アンモニウムに代えるとジギトキシンおよびジゴキシンは主にアンモニウム付加体を形成します（図 2B）。ジギトキシンおよびジゴキシンのアンモニウム付加体は、弱いイオン化条件で容易に断片化することが分かっています（図 3）。digitoxin および digoxin の LC/MS/MS 定量に対しては、それぞれ 782.5/635.5 および 798.5/651.5 の MRM モードで測定しました。

図1 ジゴキシンとジギトキシン

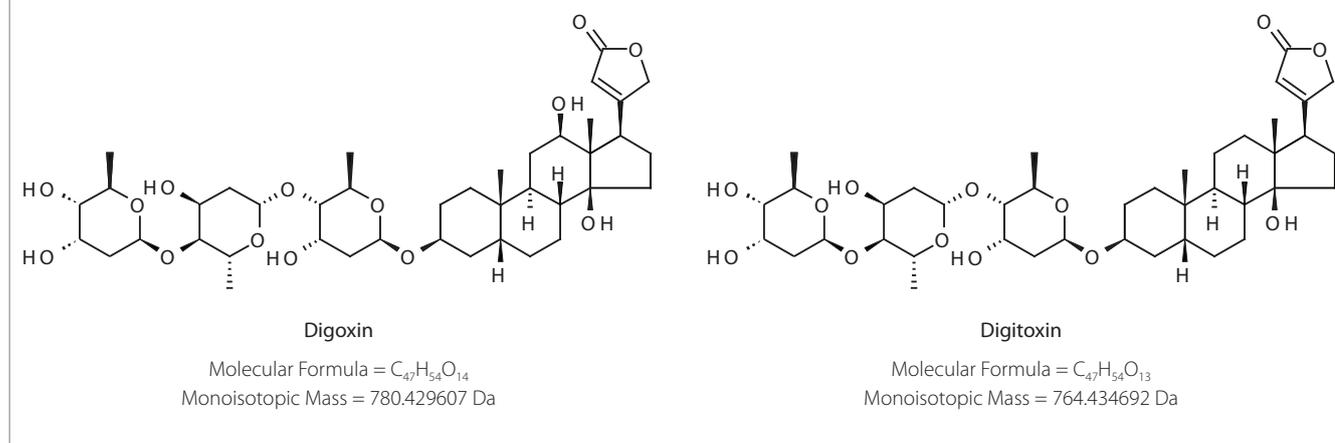
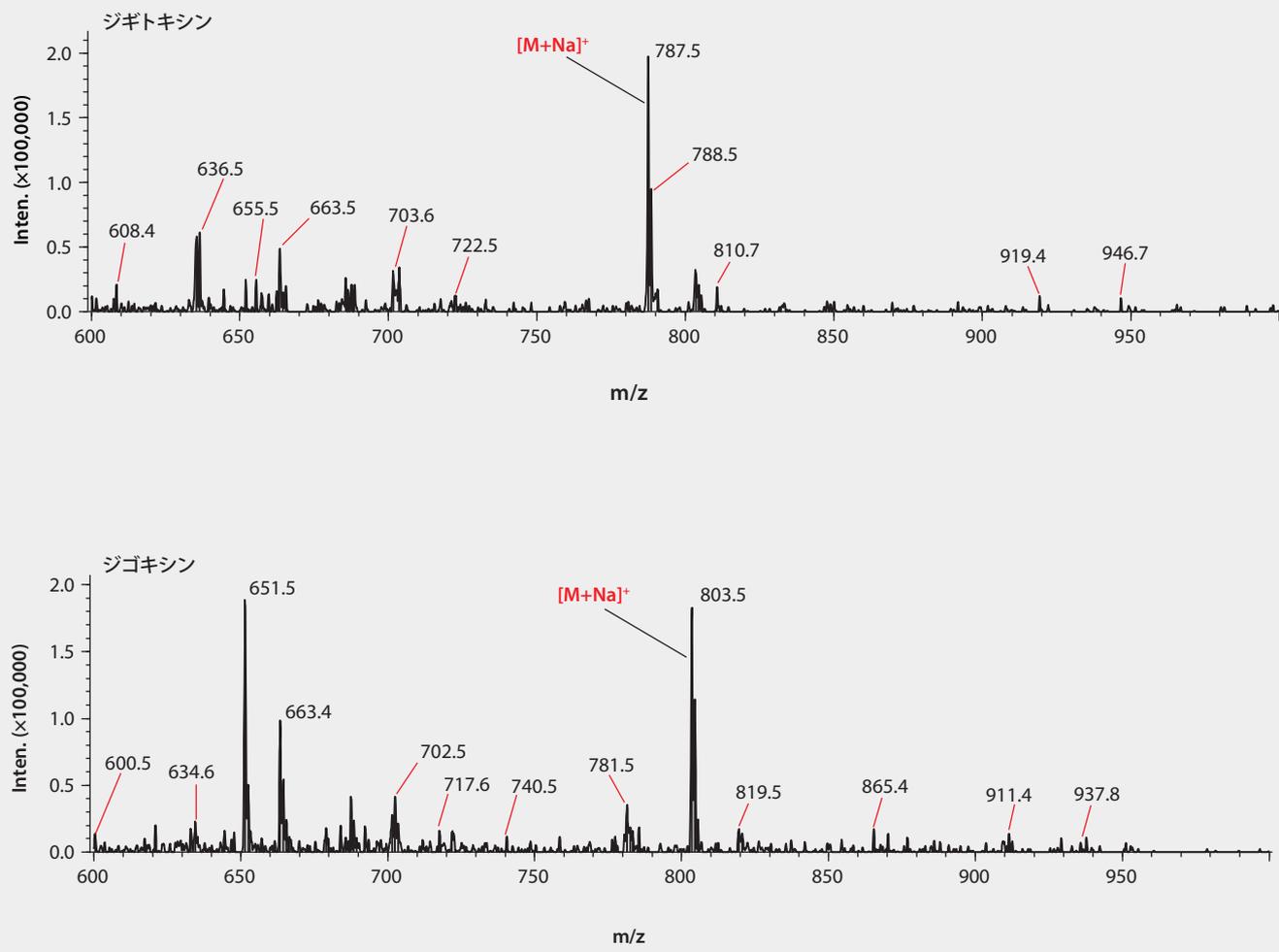


図 2A ギ酸含有移動相使用時におけるジギトキシンおよびジゴキシンの MS スペクトル
mobile phase: 0.1% formic acid in water: acetonitrile (50:50)



検量線の直線性と検出限界

図 4 から、2 つの分析対象物が 4 分以内で Titan™ C18 カラムによってきれいに分離されていることが分かります。LC/MS/MS 法の検出限界は 0.01 ng/mL です。この方法の検量線の直線性は $r^2 > 0.999$ でした (図 5)。

試料調製法の比較

生物マトリックスの LC/MS 分析前処理には、タンパク質沈殿法が広く使われています。この方法はタンパク質の除去には効果的ですが、リン脂質の除去には効果がありません³。実際に、タンパク質沈殿後のラットの血漿には、複数種のリン脂質が高濃度で存在していることが、それらの MS シグナルが強いことから (図 6A) 分かりました。本研究では、沈殿したタンパク質とリン脂質の両方を血漿試料中から効果的に除去する HybridSPE®-PLus を利用しました (図 6B)。

HybridSPE-PLus 技術の有効性のメカニズムは、ジルコニアとリン脂質のリン酸基とのルイス酸/ルイス塩基によるユニークな相互作用に基づいています⁴。

図 7 は、タンパク質沈殿法と HybridSPE-PLus 法の 2 つの試料調製法における LC/MS/MS 測定結果を比較したものです。タンパク質沈殿法で調製した 2 つの分析対象物は、HybridSPE-PLus で調製した試料におけるシグナルレベルの 3 分の 1 から 4 分の 1 しかないため、回収率が低くなっています (表 1)。さらに、タンパク質沈殿法で調製した場合、カラムへのリン脂質の蓄積のために、2 つの分析対象物試料のシグナルレベルは注入回数が増すごとに下がっていくため、再現性が悪く、カラムの寿命が短くなってしまいました。これとは逆に HybridSPE-PLus で調製した試料は、高い回収率 (>90%) と良好な再現性 (<6% RSD) を示し HybridSPE-PLus を使用することでマトリックス効果を低減することができました。

図 2B ギ酸アンモニウム含有移動相使用時におけるジギトキシンおよびジゴキシンの MS スペクトル
mobile phase: 10 mM ammonium formate in water:methanol (50:50)

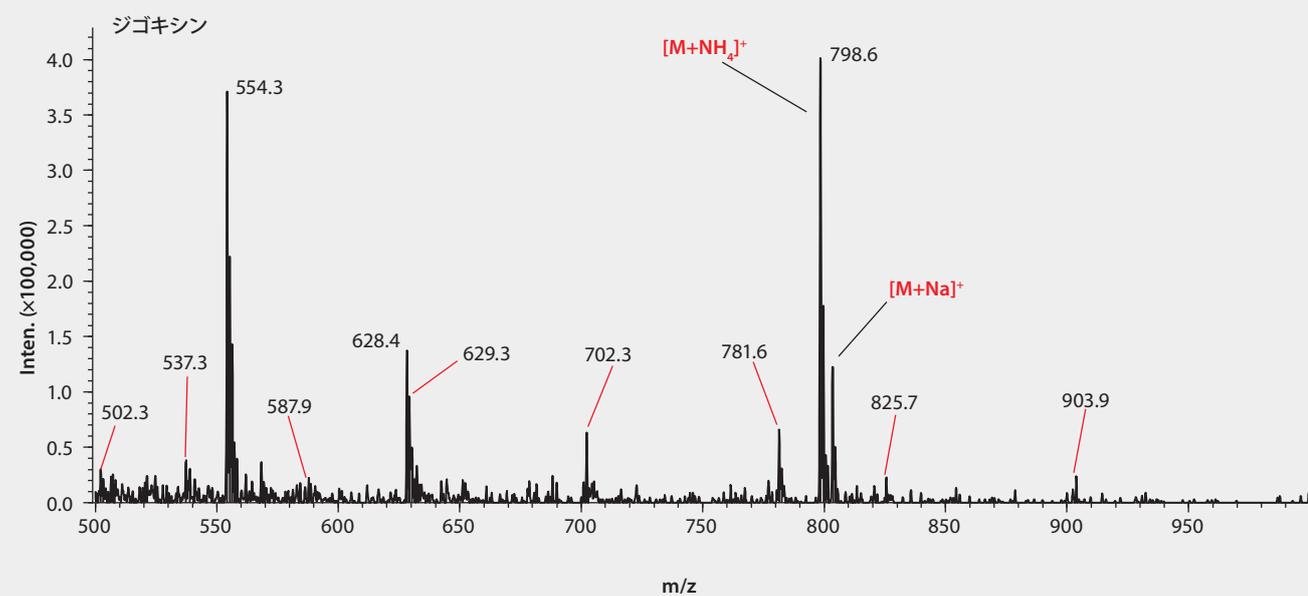
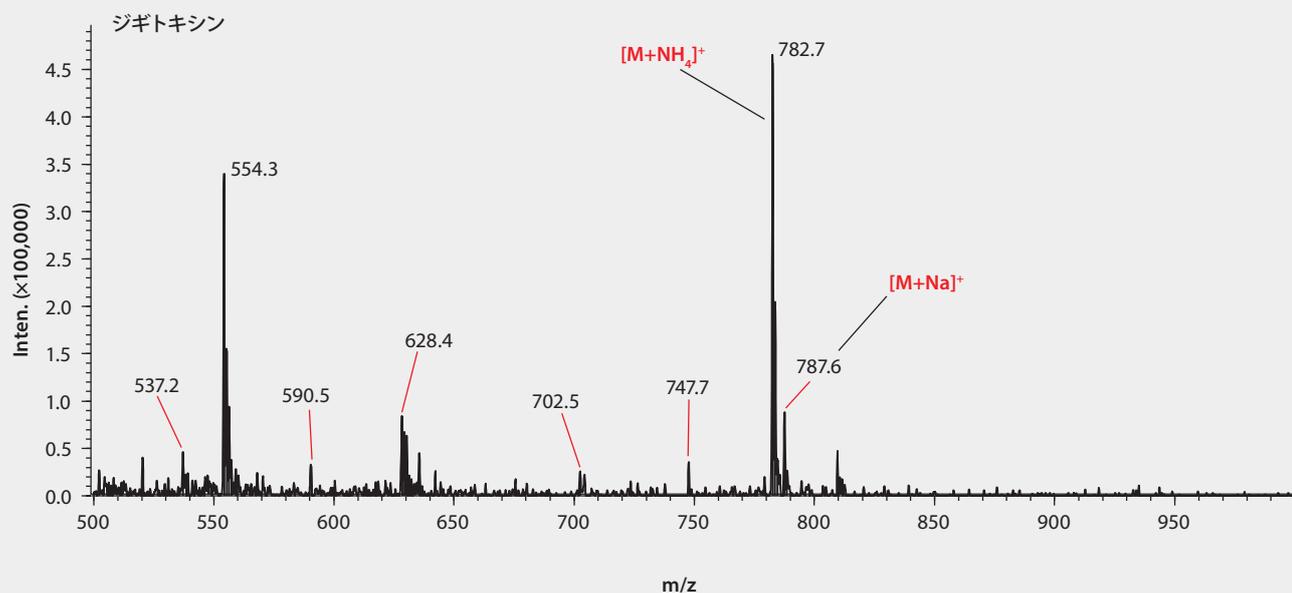


表 1 タンパク質沈殿法と HybridSPE®-PLus 法を用いた血漿中の分析対象物における回収率比較

	Protein Precipitation Method			HybridSPE®-PLus Method	
	MRM Quantifier Ions	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
ジギトキシン	782.5/635.5	27.0	28.8	94.7	5.8
ジゴキシシン	798.5/651.5	35.4	12.1	95.1	4.1

n = 37

(continued on next page)

図3 ジギトキシンおよびジゴキシンにおけるアンモニア付加体 (アンモニウム付加物) の MS/MS スペクトル
mobile phase: 10 mM ammonium formate in water:methanol (50:50)

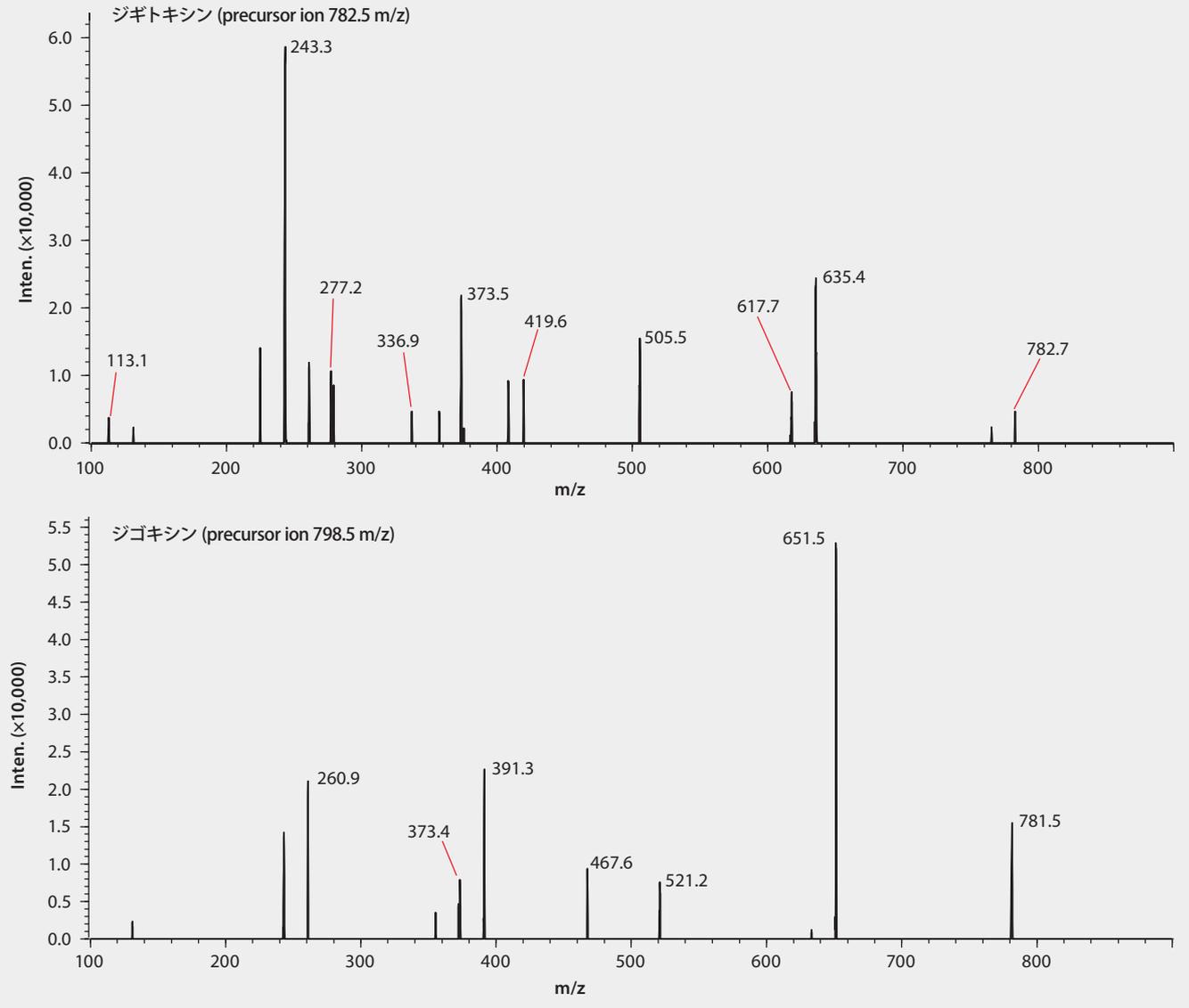


図4 HybridSPE®-Plus法を用いて前処理したラット血漿中におけるジゴキシンおよびジギトキシンのUHPLC/MS/MS測定結果

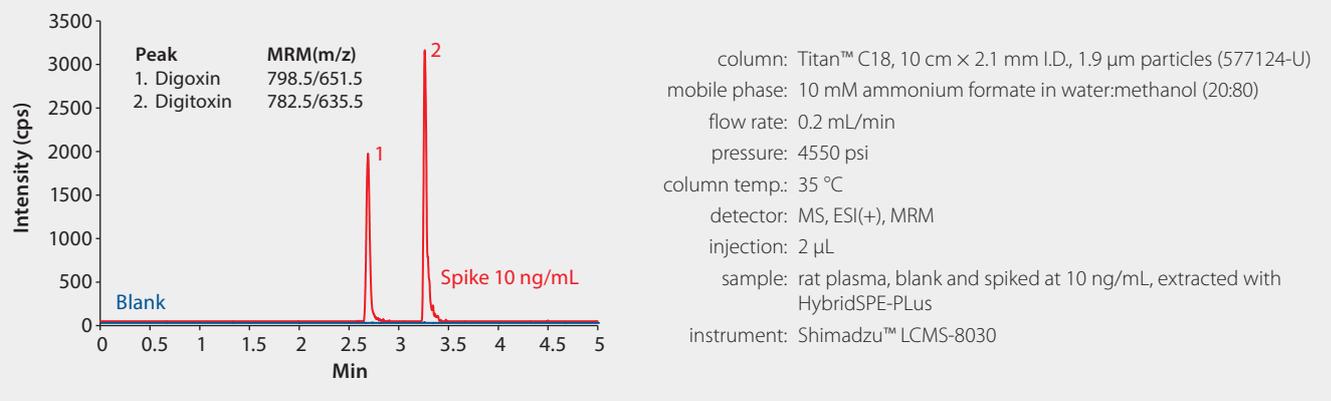


図5 ジギトキシンおよびジゴキシン LC/MS/MS 測定における検量線

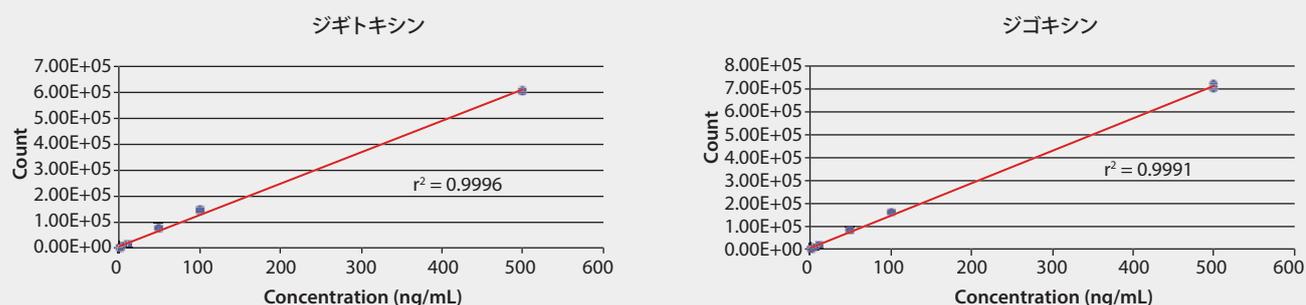
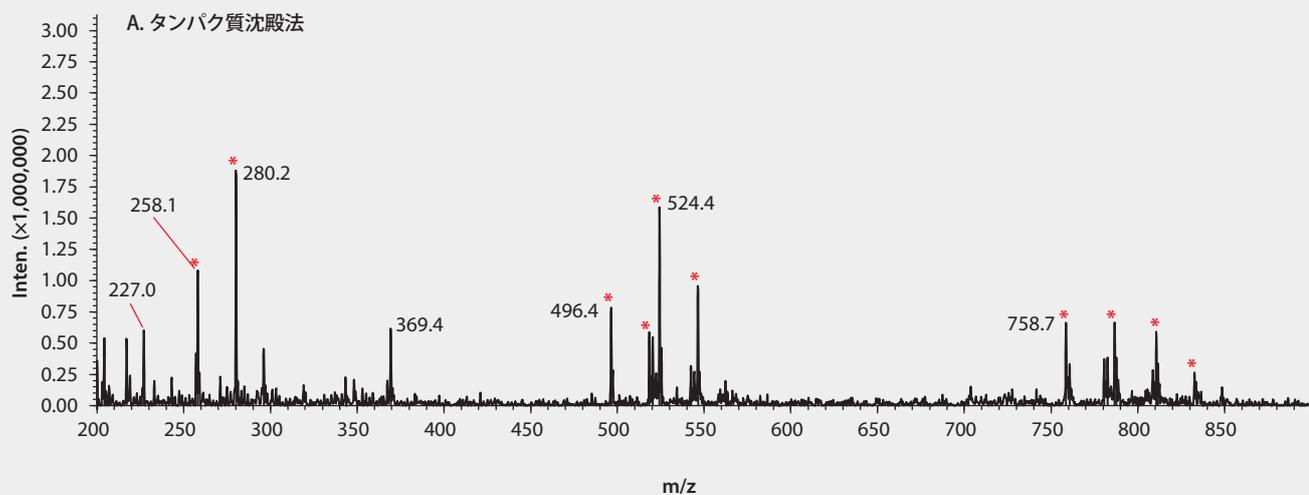


図6 HybridSPE®-PLus 法とタンパク質沈殿法を用いた際の血漿中におけるリン脂質除去比較結果を示す MS スペクトル



*Indicates phospholipids which are confirmed by MS/MS spectra with product ion of 184/104.

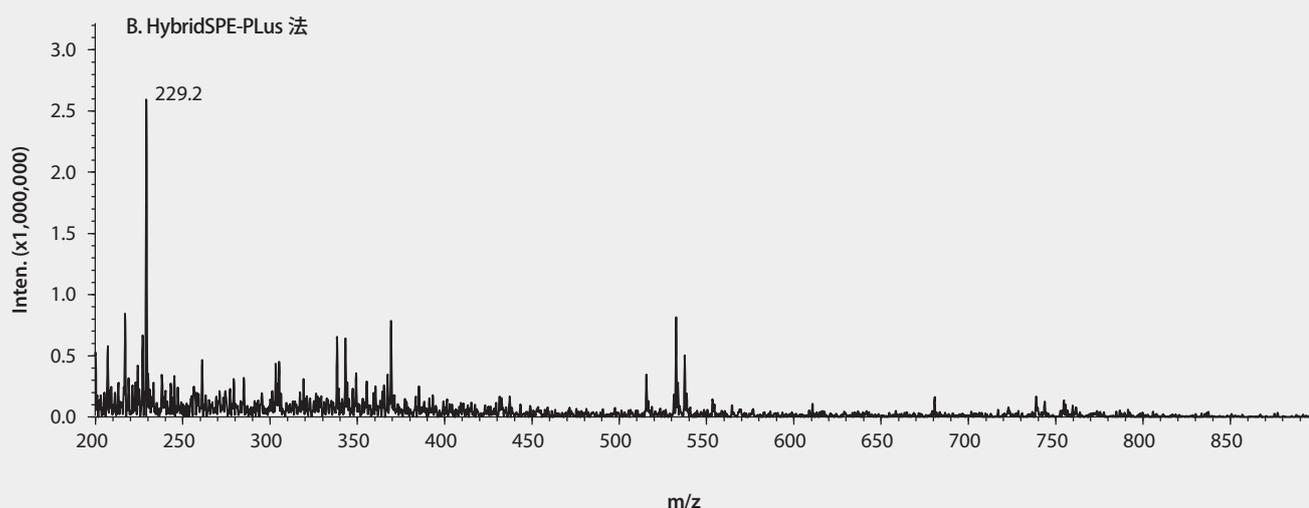
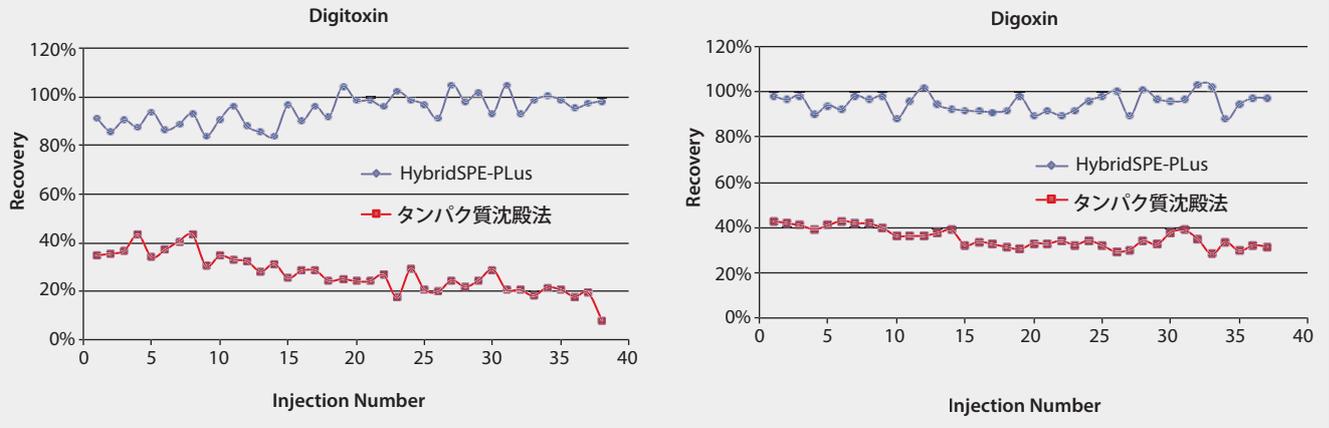


図7 HybridSPE®-PLus 法とタンパク質沈殿法におけるジギトキシンおよびジゴキシンの回収率比較

タンパク質沈殿法と HybridSPE-PLus で調製したラット血清における LC/MS/MS シグナルレベルの注入回数別変化。試料：ラット血漿に終濃度 10 ng/mL でジギトキシンおよびジゴキシンを添加した。条件は図4と同じ。



まとめ

血漿中のジギトキシンおよびジゴキシンを定量するために、高速かつ高感度の LC/MS/MS 法を開発しました。Titan™ C18 UHPLC カラムを用いて、2つの分析対象物を4分以内に分離しました。タンパク質沈殿法を用いた場合に観察されたイオン抑制や再現性の低下など悪性のマトリックス効果は、HybridSPE-PLus で克服できました。この方法は、生体試料マトリックス中のリン脂質とタンパク質を簡便かつ迅速にクリーンアップする革新的な方法です。

References

- Valdes, R. Jr.; Jortani, S. A; Gheorghiadu M. Standards of laboratory practice: cardiac drug monitoring. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1096-1109.
- Digoxin: serious drug interactions. *Prescribe Int.* **2010**, *19* (106), 68-70.
- Aurand, C. *Understanding, Visualizing, and Reducing the Impact of Phospholipid-Induced Ion Suppression in LC-MS*; Supelco Reporter Volume 30.2: 10-12.
- HybridSPE-Phospholipid Technology Home Page. <http://www.sigmaaldrich.com/hybrid-spe-pl> (accessed March 1, 2015)

Featured Products

Description	Cat. No.
U/HPLC Columns	
Titan C18, 10 cm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm particles	577124-U
Sample Prep Devices	
HybridSPE-PLus 96-Well Plate Essentials Kit, pk/1	52818-U
HybridSPE-PLus 96-Well Plate, 50 mg/well, pk/1	575659-U
HybridSPE-PLus 96-Well Plate, 50 mg/well, pk/20	575673-U
Standards and CRMs	
Digitoxin solution, 1.0 mg/mL in methanol, ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	D-067
Digoxin, Certified Reference Material, TraceCERT®, 50 mg	04599

Bio-SPME (固相マイクロ抽出) を用いた微量サンプリング法の開発と DBS (Dried blood spots, 乾燥ろ紙血液) との比較

Craig Aurand, Principal Research Scientist and David S. Bell, R&D Manager craig.aurand@sial.com

臨床研究の分野では、微量サンプリング法に関心が高まっています。その理由は、コストや倫理上の問題から、研究者が採血に代わる方法を求めているからです。本研究では、生体試料マトリックスに対して HPLC、UHPLC および LC/MS 分析に先立って行うことのできる微量サンプリング法として、固相マイクロ抽出 (SPME) を紹介します。SPME における生体試料への応用は、最近の論文のテーマにもなっています¹。SPME ファイバーを用いることで、その他の試料前処理を不要にし、生体試料マトリックス中の目的物質を直接サンプリングできます。また、SPME ファイバーには濃縮効果もあるため、分析対象物に対する感度が高くなります。

Bio-SPME ファイバーの特徴

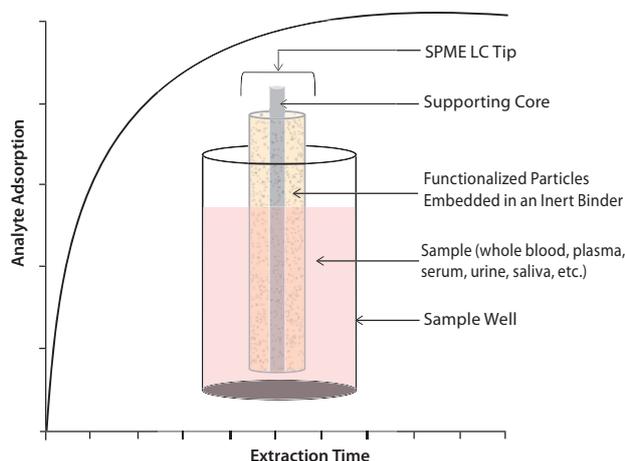
Bio-SPME は、丈夫で柔軟な金属ファイバー上に固定された構造をしているため、皮下注射用針 (57281-U) あるいはピペットのチップ (57234-U) に挿入され、生体内、生体外および生体内微量サンプリングに利用することができます。これらは、液体クロマトグラフィーに通常用いられる溶媒 (アセトニトリルなど) にも適合性があり、SPME LC と呼ばれています。原理的にどのような LC タイプの固定相でも修飾することができますが、本研究では広く用いられている C18 固定相を用いました。分析対象物は SPME ファイバーの固定相と試料マトリックスとの間で分配される平衡に基づき抽出されます (図 1)。試料の抽出後、分析対象物を逆相系 HPLC 溶媒を用いて SPME ファイバーから溶出します。

Bio-SPME は、生体試料マトリックスから直接サンプリングができるため、タンパク質沈殿、遠心分離あるいは試料の凍結/溶解といった処理をする必要がありません。この Bio-SPME 法は、試料濃縮とクリーンアップを同時に行い、試料前処理工程を大幅に削減することができます。Bio-SPME に必要な試料の量はファイバーをカバーする分だけでよく、試料容器の形態にもよりますが極めて微量ですみます。また、96 ウェルの SPME LC チップは、ロボットによる自動化を実現します (図 2)。

本研究の目的: DBS と Bio-SPME との比較

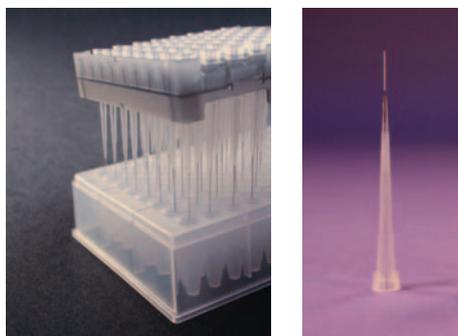
本研究では、モデル化合物を用いて、血中の対象成分における UHPLC/MS 測定 (抽出効率および検出限界) について、SPME LC チップを用いた Bio-SPME と DBS (乾燥ろ紙血液) とを比較しました。クロマトグラフィーの結果は図 3 のとおりです。

図 1 Bio-SPME をもちいた生体試料における分析対象物の抽出・吸着メカニズム



SPME の吸着メカニズムは、分析対象物が SPME ファイバーの固定相と溶液 (試料) に分配される平衡過程にあります。この分配の比率は、分析対象物の固定相への親和性と試料マトリックスへの親和性との比で決まります。一定時間静置すれば、試料マトリックスと固定相との間で分析対象物の濃度は平衡に達します。

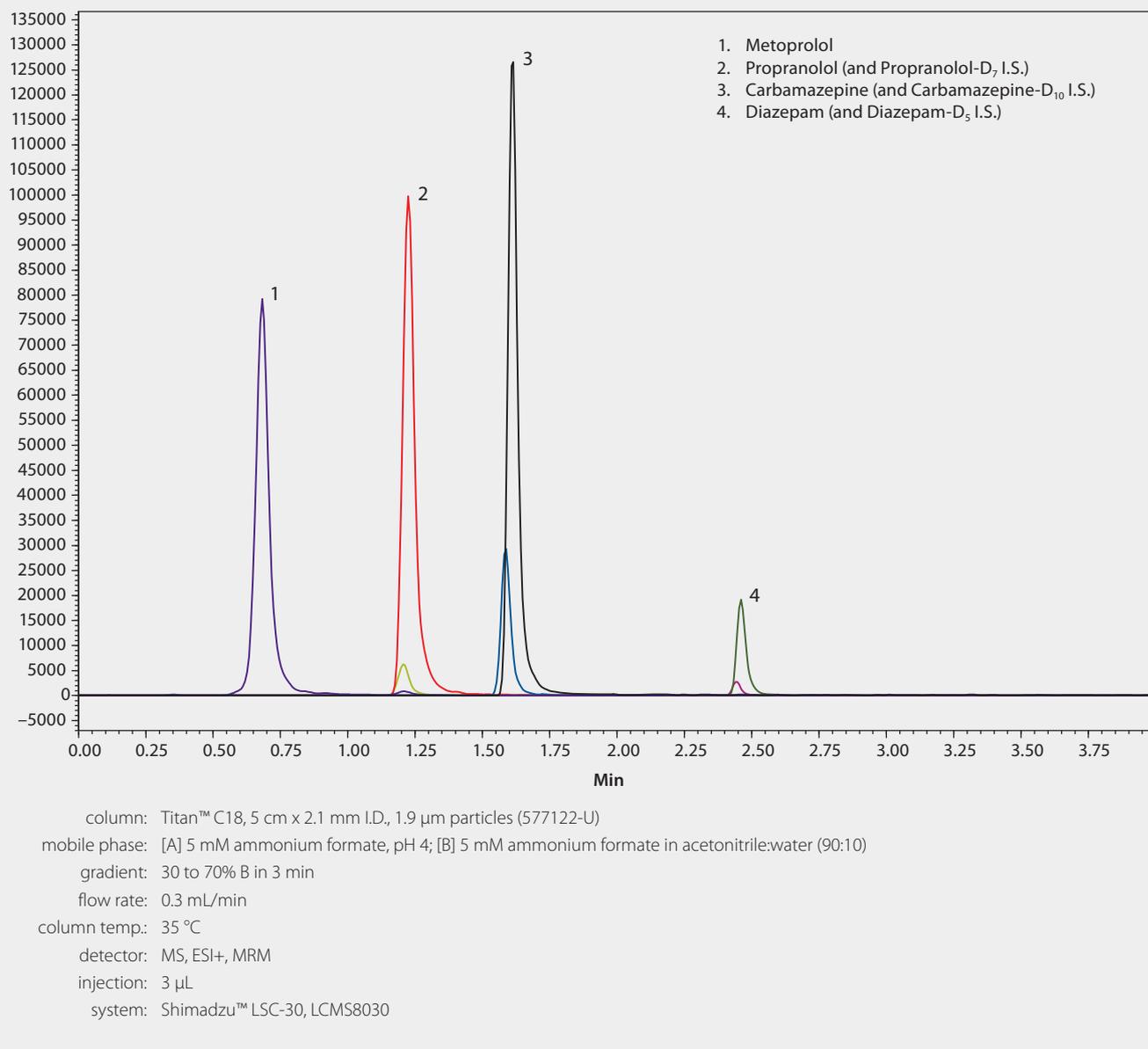
図 2 SPME LC チップ



実験

Metoprolol, Propranolol, Carbamazepine, Diazepam およびそれらの重水素化体をそれぞれ終濃度 10 ng/mL となるようにストック溶液と検量線用溶液を調製しました。内部標準物質として重水素化体を組み合わせたストック溶液は 20 ng/mL で調製しました。ヘマトクリット (HCT) レベル 45% のヒト全血を、全分析対象物合計濃度が 50 ng/mL となるよう添加し 1 時間静置しました。それぞれの試料 300 μ L を、96 ウェルプレートに加えて抽出しました。

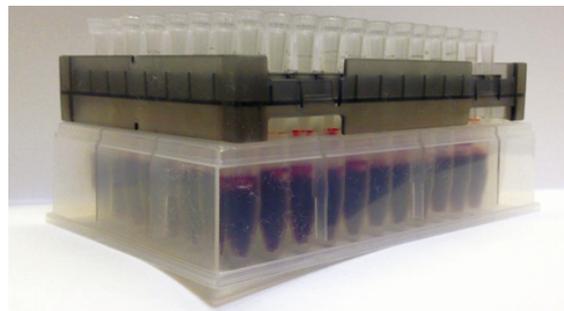
図3 Bio-SPME を用いて抽出した全血中における Metoprolol, Propranolol, Diazepam, Carbamazepine の UHPLC/MS 分析



Bio-SPME 抽出

図4に、96ウェルのSPME LCチップを用いた全血における抽出プロセスを示します。チップは、抽出前にあらかじめ20分間アセトニトリル:水(50:50)でコンディショニングしておき、その後、振盪機で500 rpmで攪拌しながら血液試料にBio-SPMEを15分間曝露・抽出し、試料から取り出して蒸留水で30秒間洗浄しました。余計な水分はろ紙で除去しました。このチップを、20 ng/mLの内部標準を含む右図の容器に入れた50 μLのメタノール中で30分間浸漬させ、吸着物を溶出させました。溶出は、振盪機で30分間(500 rpm)実施しました。その後、溶出した試料をLC/MS/MSを用いて測定しました。

図4 Bio-SPME抽出セット。チップが血液試料に挿入されていることが確認できます。

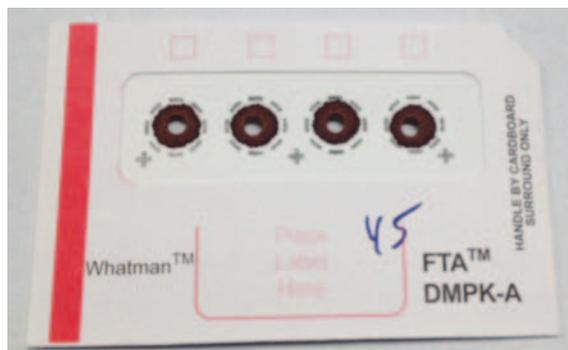


(continued on next page)

DBS (乾燥ろ紙血液)

図5に、全血をスポットしたDBSカードから3 mmの薄片を切り抜いたものを示します。20 μL の試料をDBSカードにピペットで移し、一晚乾燥させました。個々の血痕から切り取った3 mmの薄片は、100 μL の容器に入れ、20 ng/mLの内部標準を含む50 μL のメタノール中で2時間吸着物を脱離させました。

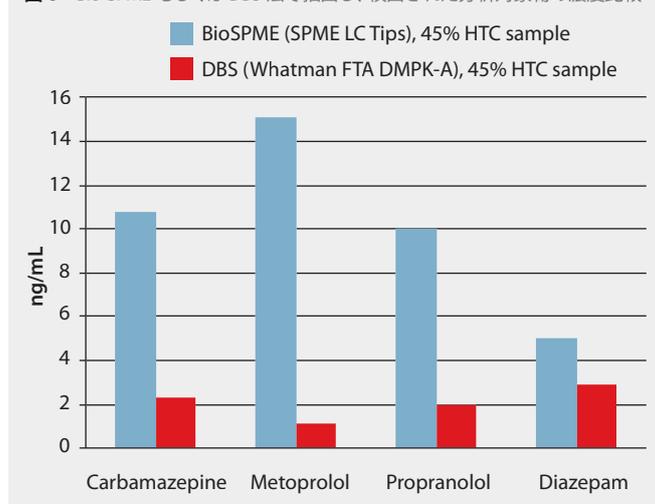
図5 血液試料をスポットし、そこから3 mmの薄片を切り抜いたDBSカード



分析対象物における回収率の比較

DBSカードから溶出した分析対象物の絶対量は、SPME LCチップを用いたBio-SPME法と比較してはるかに少量でした。図6から、SPME LCチップの分析対象物における検出濃度は、DBSカードより高いことが分かります。このBio-SPME法の効果は、SPMEファイバー固定相の濃縮能に由来していますが、ファイバーから分析対象物を取り出すのに必要な溶出溶媒の液量が少ないことにも由来しています。これに対してDBSカードから切り出した3 mmの薄片の場合、得られる試料の量が少ないことと、薄片を浸漬するのに必要な溶出溶媒の液量が多いことが原因で、蒸発させ試料を濃縮しない限り少量しか検出できません。結果として、SPME LCチップを使った場合の分析対象物の検出レベルは、DBSカードを用いた場合の5~10倍になっています。

図6 Bio-SPMEもしくはDBS法で抽出し、検出された分析対象物の濃度比較



結論

Bio-SPMEは簡便で選択性の高い微量サンプリング法であり、全血、血漿、血清、尿および唾液といった生体試料マトリックスから目的物質を単離する際、DBS法の代替になり得る方法です。

Bio-SPMEは、分析対象物を濃縮するのに加え、試料マトリックスが固定相に吸着するのを防ぐため、試料を精製することもできます。過去の研究では、Bio-SPME法を使えば従来のタンパク質沈殿法よりも、分析対象物の検出レベルが高くなり、試料マトリックスが著しく減少することが示されています²。

References

- Bojko, B.; Pawliszyn, J. In vivo and ex vivo SPME: a low invasive sampling and sample preparation tool in clinical bioanalysis. *Bioanalysis* **2014**, *6* (9), 1227-1239.
- Aurand, Craig. Two Distinct Sample Prep Approaches to Overcome Matrix Effect in LC/MS of Serum or Plasma Samples. *Supelco Reporter Volume 32.2*: 15-17.

+ Featured Products

Description	Cat. No.
U/HPLC Columns	
Titan™ C18, 5 cm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm particles	577122-U
Sample Prep Devices	
SPME LC Tips, functional group C18, sample pack of 8 tips	5709-U
SPME LC Tips, functional group C18, 96-tip array	57234-U
SPME LC Fiber Needle Probes, functional group C18, package of 5 probes	57281-U
Standards and CRMs	
Metoprolol Tartrate, 1.0 mg/mL (as free base) in methanol, Cerilliant Certified Reference Material	M-123
Propranolol HCl, 1.0 mg/mL (as free base) in methanol, Cerilliant Certified Reference Material	P-055
Propranolol-D ₇ (ring-D ₇), 100 μg /mL in methanol with 5% 1 M HCl, Cerilliant Certified Reference Material	P-085
Carbamazepine, 1.0 mg/mL in methanol, Cerilliant Certified Reference Material	C-053
Carbamazepine-D ₁₀ , 100 μg /mL in methanol, Cerilliant Certified Reference Material	C-094
Diazepam, 1.0 mg/mL in methanol, Cerilliant Certified Reference Material	D-907
Diazepam-D ₅ , 1.0 mg/mL in methanol, Cerilliant Certified Reference Material	D-910

リボフラビン (ビタミン B₂) および不純物の分析における USP 法の代替手法

Titan™ C18 カラムと LC/MS/MS 検出

Nicolas J. Hauser and Carmen T. Santasania carmen.santasania@sial.com

リボフラビンおよびその不純物を同定する方法について、面倒な USP 法および EP 法に代えて、Titan C18 UHPLC カラムと LC/MS/MS 検出を用いた方法について述べます。この新しい方法は、UV-Vis 検出にも対応しています。

緒言

リボフラビン (ビタミン B₂) は必須の微量栄養素で、植物や多くの微生物は合成できますが、高等動物は合成することができません。この栄養素は、炭水化物の酵素による酸化に必要な補酵素の前駆体なので、基礎代謝には欠かせない化合物です。リボフラビン剤は食物やエサへの一般的な添加剤であり、幼児用ミルクやシリアル栄養強化剤です。食品への添加が広がっているため、リボフラビン剤の純度を確定することは重要です。USP (米国薬局方) および EP (ヨーロッパ薬局方) には、リボフラビンの不純物について古くから分析法が存在し、その手法は時間や労力がかかるため、近年の検出手法には適さないものとなっています。

現在規定されているリボフラビン分析法の問題

リボフラビン不純物に関して、現在の USP 法は定量的ではなく、4つの不純物からリボフラビンを分離するためにイオンペアクロマトグラフィーを用いた手法を規定しています。EP 法も USP 法も、強塩基 (0.1 M NaOH) への溶解を規定しており、分析対象物が劣化しナトリウム付加物が生成するため質量分析 (MS) 検出にも悪影響が出ます。

新しい方法の概要

本研究の目的は、USP 法および EP 法に代わる MS を利用した方法を開発することにあります。MS を用いて特異性を向上させることに加え、分析にかかる時間を短くすることもねらいです。実際に以下の2点で向上が見られました。第1に、溶解剤を水酸化ナトリウムから切り替え、イオンペア試薬をなくすことで、LC/MS への適合性が向上しました。第2に、高速グラジエントによって、分解能を犠牲にすることなく分析時間を短くできました。参照標準品を用いることで、よく知られた不純物が確認されるとともに、その他の不純物が同定されました。

表 1 本研究で使用した MRM トランジション

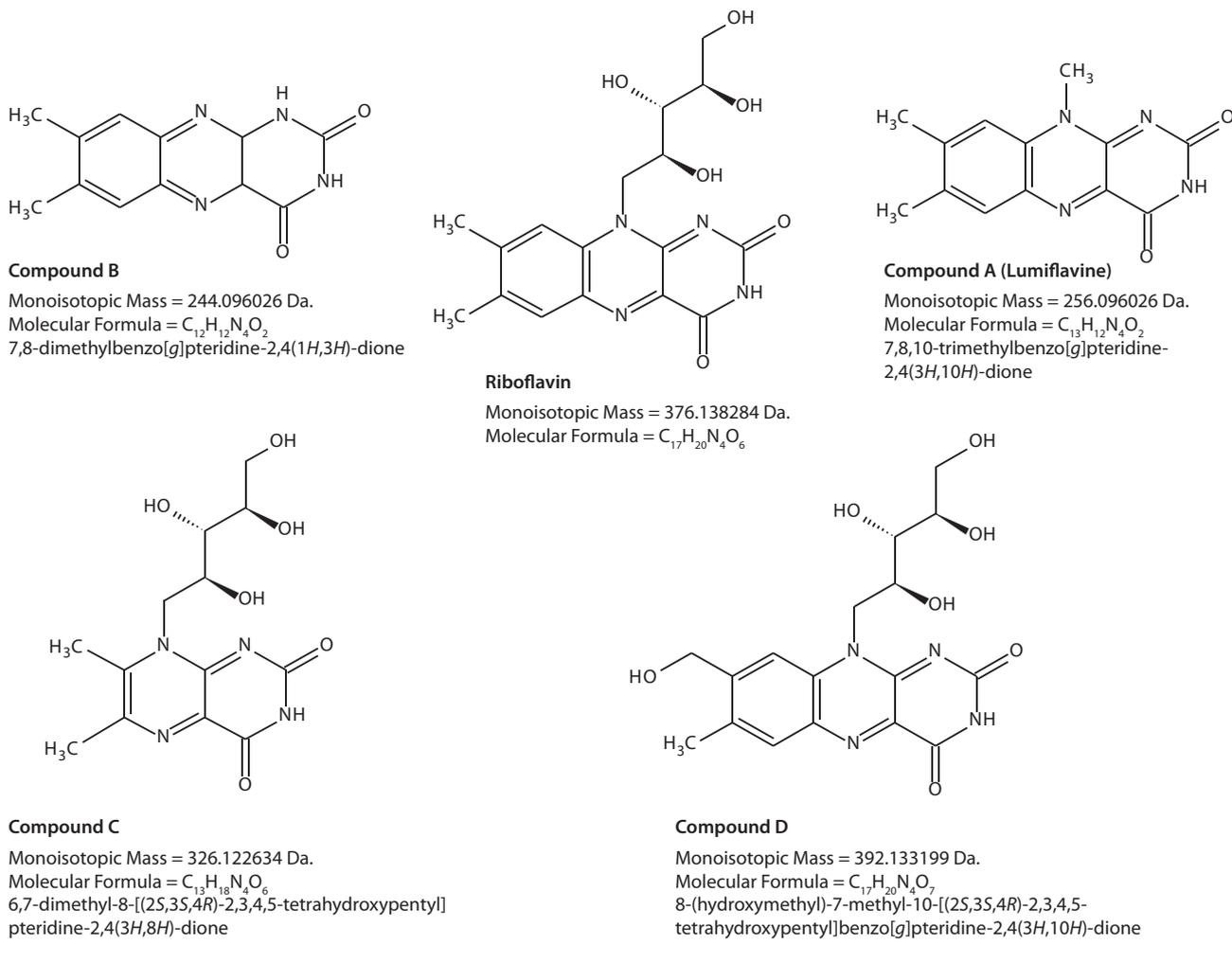
Certified Reference Material	Transition 1	Transition 2	Transition 3
Riboflavin	377.10 > 43.23	377.10 > 172.24	377.10 > 243.14
Lumiflavine (7,8,10-trimethylbenzo[g]pteridine-2,4(3H,10H)-dione), Compound A	257.12 > 156.28	257.12 > 171.16	257.12 > 186.24
7,8-Dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione, Compound B	MS only at m/z=243.41		
6,7-Dimethyl-8-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]pteridine-2,4(3H,8H)-dione, Compound C	327.15 > 43.23	327.15 > 57.27	327.15 > 193.22
8-(Hydroxymethyl)-7-methyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzo[g]pteridine-2,4(3H,10H)-dione, Compound D	393.16 > 43.23	393.16 > 57.27	393.16 > 259.13

実験

本研究では Sigma-Aldrich/RTC より入手したリボフラビン認証標準物質 (CRM) を使用しました。不純物である、Compound B (7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione) は、個別の標準品としては市販されていませんでしたが、リボフラビン認証標準物質中に存在していました。その他の化合物は市販品を用いました。MRM (多重反応モニタリング) トランジションは表 1 に示すとおりです。それぞれのイオンに3つのトランジションを用いました。図 1 に、化合物の構造、名称、モノアイソトピック質量および分子式を示します。これらの主な不純物の構造は MS で確認しました。これらの化合物はメタノールや水に溶解しないので、適切な希釈剤を探すために多くの実験を行いました。最終的にリボフラビンと不純物を完全に溶解するのは DMSO でした。リボフラビンのストック溶液は、5分間超音波をあてて 1mg/mL としました。必要に応じてこのストック溶液を希釈し、その後のすべての実験に用い、使用しないときは冷凍庫で保管しました。

図 2 に LC および MS 条件を示します。LC カラムには 1.9 μm の完全多孔性の単分散シリカ粒子を充填した Titan C18、10 cm × 2.1 mm I.D. を使用しました。移動相には、0.1% ギ酸 アセトニトリル - 水のグラジエントを用いました。チューニング用の溶液には、1 μg/mL の 50:50 (0.1% ギ酸 - 水溶液 : 0.1% ギ酸 - アセトニトリル) をリボフラビンおよび化合物 A に対して使用しました。化合物 C および D には、同じ溶媒系で 0.6 μg/mL の溶液を用いました。

図1 リボフラビンおよび関連化合物の構造

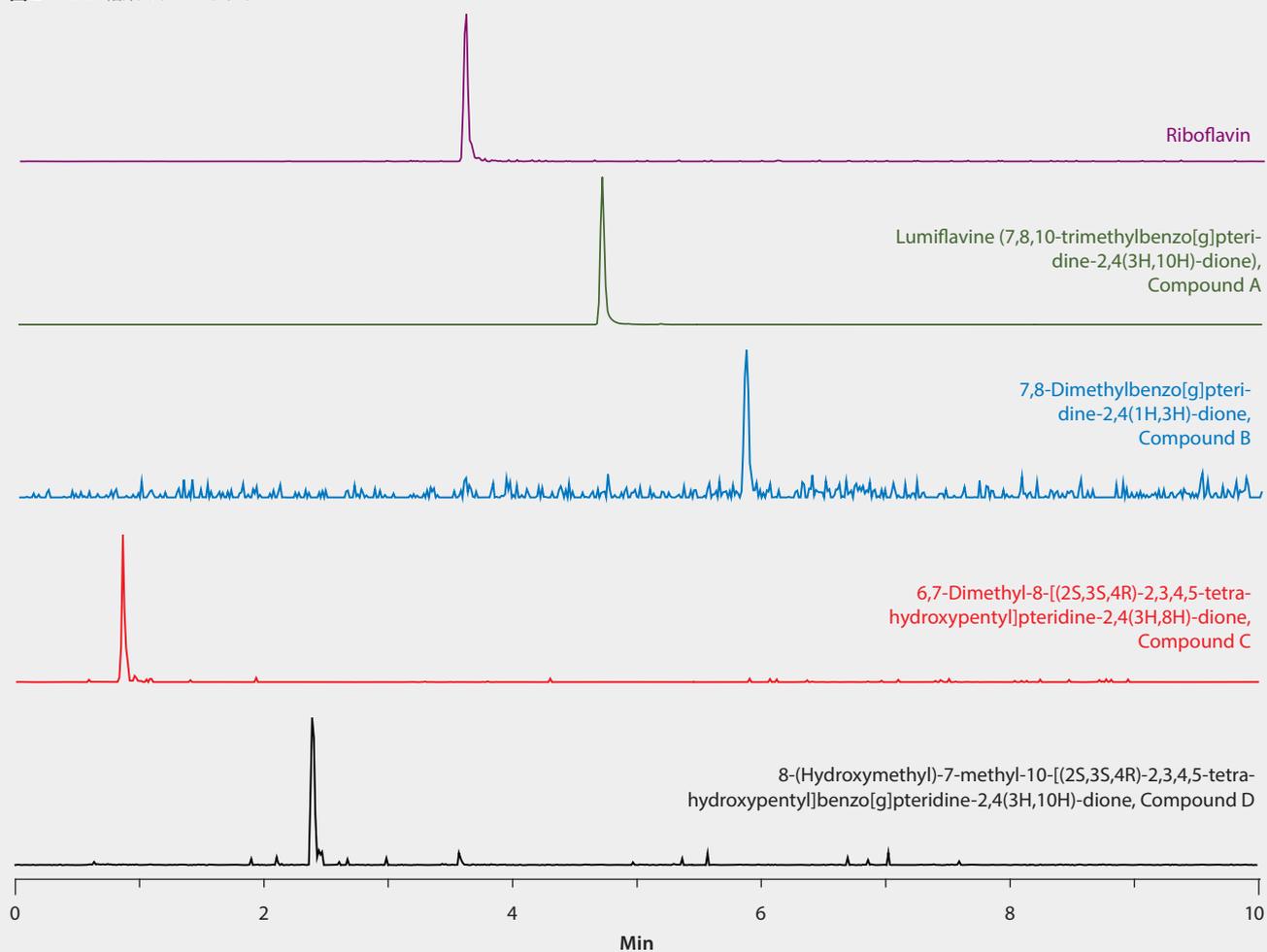


結果と考察

USP および EP の報告書に記載されているリボフラビンおよび不純物の分析法は 1 時間以上かかり、MS の障害になる水酸化ナトリウムおよびイオンペア試薬を使用します。ここで報告した方法は、有効な代替法になります。図 2 に、リボフラビンおよび関連不純物に対する MRM 結果を示します。Titan™ C18 カラムと高速のアセトニト

リルグラジエントを組み合わせることで、素晴らしい分離能が得られ、MS 検出に適用可能な条件の下、短時間で分析できました。水酸化ナトリウムを DMSO にすることで、イオンペア試薬を使用せずに、MS 検出が使えるようになり、特定性と選択性の両方が同時に改善しました。この方法は UV 検出にも対応しています。

図2 MRM 結果のクロマトグラム



column: Titan C18, 10 cm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm particles (577124-U)
 mobile phase: 0.1% formic acid in water in (A) water; (B) acetonitrile
 gradient: 5 to 25% B in 6 min; held at 25% B for 0.1 min; to 5% B in 4 min
 flow rate: 0.5 mL/min
 pressure: 5,000 psi (345 bar)
 column temp.: 35 °C
 detector: ESI (+), MRM and TIC mode or UV, 276 nm
 injection: 2 μL
 sample: compounds in initial mobile phase

Other MS Conditions:

capillary (kV):	2.29
cone (V):	54.95
extractor (V):	5.13
source temperature (°C):	151
desolvation temperature (°C):	349
cone gas flow (L/Hr):	2
desolvation gas flow (L/hr):	646
collision gas flow (mL/min):	ON

References

1. USP Method Official Monograph of August 1, 2012.
2. EP Method 7.0 Official Monograph.

+ **Featured Products**

Description	Cat. No.
HPLC Column	
Titan™ C18, 10 cm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm particles	577124-U
Standards	
Riboflavin, pharmaceutical secondary standard; traceable to USP and PhEur	PHR1054

SPME (直接浸漬) および Fast GC を用いたトリプル四重極 MS で検出した植物油中のフタル酸エステルの分析法の開発

Giorgia Purcaro,¹ Laura Barp,² and Luigi Mondello^{1,2}

¹Chromaleont s.r.l., c/o "Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute" Department, University of Messina, viale Annunziata, 98168 Messina, Italy

²"Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute" Department, University of Messina, viale Annunziata, 98168 Messina, Italy

len.sidisky@sial.com

緒言

フタル酸エステル (PAE) とは、主に可塑剤として使用されている合成化合物群で、内分泌攪乱化学物質として分類され、潜在的なヒト発ガン性物質です¹。プラスチック材料中の PAE は、ポリマーマトリックスに化学的に結合しているわけではないので、経時的に外に出ていきます。PAE は食品中に高レベルで見つかることがあり、それは主にプラスチック包装フィルムから直接移行してきたものです。PAE は親油性なので高脂肪の食品は特にその危険性があります。食品中の PAE 量に関して規制はありませんが、EU 指令 2007/19/EC では、食品に接触する材料からの PAE の移行について議論され、そういった材料に許可される物質を一覧にしています。PAE はどこにでもあるので、その定量分析は容易ではありません^{2,3}。最低限の操作を伴う方法が強く望まれます。食品および植物油中の PAE を分析するのに提案されている多くの方法は、試料調製後にガスクロマトグラフィー分析法 (GC/MS) で定量を行うものです。PAE 分析における試料調製の主な目的は、基本的にトリアシルグリセロール (TAG) と遊離脂肪酸の妨害を取り除くことにあります^{4,5}。従来型の温度プログラム気化 (PTV) GC インジェクターを改良し、希釈した油を直接ライナーに注入して PAE を蒸発させ、TAG をインジェクターに残すという代替法が提案されました。残った TAG はその後バックフラッシュモードで排出口から除去します⁶。植物油中の PAE の分析における調製段階での試料操作を最小限にするために、ヘッドスペース固相マイクロ抽出 (HS-SPME) も検討されていますが、定量限界がそれほど低くありません^{7,8}。本研究の目的は、簡単で高速な SPME を用いた試料調製法を開発し最適化することで、最小限の試料操作で、堅牢で高速かつ正確な GC トリプル四重極 MS (QqQ) 定量を可能にすることにあります。

実験

10 種の PAE を含む 10,000 mg/L のストック溶液を調製しました。PAE 各種の略称を表 1 に示します。可塑剤用に認証されている食用油あるいは油脂標準品がないため、エキストラバージンオリーブオイル (EVO) のサンプルに 2 mg/kg の PAE 標準溶液を添加し、メソッドの最適化に使用しました。溶剤、ガラス器具、キャップおよびセブタムには特別な注意を払い、使用前の汚染を防ぎました。

最適化した試料調製法と分析法を図 1 に示します。多重反応モニタリング (MRM) 獲得モードを、標準 PAE 溶液を注入することで最適化した表 2 のトランジション条件を使用して適用しました。8 種の植物油 (EVO 2 種、オリーブオイル 1 種、ピーナツ油 1 種、ひまわり油 2 種、大豆油 1 種および混合シードオイル 1 種) をイタリアのメッシーナの店で購入し、この方法で調製および分析しました。

表 1 PAE (分析対象) の略称

Analyte	Abbreviation
Dimethyl Phthalate	DMP
Diethyl Phthalate	DEP
Dipropyl Phthalate	DPP
Diisobutyl Phthalate	DiBP
Dibutyl Phthalate	DBP
Benzylbutyl Phthalate	BBP
Dicyclohexyl Phthalate	DCHP
Diethylhexyl Phthalate	DEHP
Diisononyl Phthalate	DiNP
Diisodecyl Phthalate	DiDP

表 2 GC/QqQMS の最適化条件

Target	Quant m/z	CE	Qual 1 m/z	CE	Qual 2 m/z	CE
DMP	163>77	20	163>133	10	163>135	15
DEP	149>65	25	149>93	15	149>121	10
DPP	149>65	25	149>93	20	149>121	15
DiBP	149>65	25	149>93	15	149>121	15
DBP	149>65	25	149>93	20	149>121	15
BBP	149>65	20	149>93	15	149>121	10
DCHP + DEHP	149>65	20	149>93	20	149>121	10
DiNP	149>65	20	293>167	5	293>149	5
DiDP	149>65	20	307>167	5	307>149	5

結果と考察

メソッドの最適化

微極性 SLB®-5ms GC カラムを用いて、DiNP および DiDP を除くすべての対象 PAE のベースライン分離ができました。例外の 2 種は、多くの同素体があるために部分的に共溶出するため、合計で定量しました。添加した EVO 試料の MRM クロマトグラムを図 1 に示します。DI-SPME (直接浸漬) ステップを、試料抽出時間、脱着時間、脱着温度、および油のアセトニトリルに対する比について最適化しました。具体的には、10、20 および 30 分の試料抽出時間を試験しました。抽出効率と再現性値 (n=3) は、抽出時間 20 分の場合が他の抽出時間よりも極めて良好でした。ここで、16 分の GC 分析時間に加えて次の注入までに系を冷やす数分を考えると、20 分のファイバー抽出時間が、試料調製時間と装置の稼働時間が一致する最適の選択です (図 2)。インジェクター内でファイバーから脱着させる温度の最適化においては、250、270 および 280°C を試験しました。280°C で脱着でシグナルが最も高くなり、キャリアオーバー効果が全くないことがわかりました (図 3)。最後に、異なる量、特に 0.5 および

(continued on next page)

2 gの油を3 mLのアセトニトリルで抽出し、油/溶媒比の最適化を行いました。この結果、2 gの油を使う場合には油と溶媒との分配比が0.5 gの場合ほど好適でないことが分かりました。どちらの量でも使用できますが、試料の消費を最低限にし、分配比を最適にし、ダイナミックレンジを拡張するため、試料量は0.5 gのままにしました。

メソッドの検証

6点の校正曲線 (n=3) を、0.02 ~ 10 mg/kgの段階的濃度の添加EVO試料を分析することで作成しました。良好な相関 (R²) が0.9962 ~ 0.9994の範囲で得られました。値はEVO油のブランク試料での値で補正しました。2 mg/kgで添加したEVO試料を2日間にわたり6回 (1日3回) 分析し、日内および日ごとの精度 (CV%) を評価しました。CV%値は、DiNP+DiDPを除きすべてのPAEで10%未満で、DiNP+DiDPでも日内の精度で11.9%でした。添加試料 (4 mg/kg) の分析値と予想される値との差の相対値 (E%) を計算したところ、DiBPとDiNP+DiDPではそれぞれ10.2%、11.8%でしたが、他のすべてのPAEでは10%未満でした。表3にこのメソッドの性能の特徴とともに、信号雑音比 (S/N) の10倍で得た定量限界 (LOQ) 値およびEurachem Guidelines⁹ に準拠して得たLOQを示しました。S/Nを用いたLOQの評価は、主に用いた方法によって決まりますが、PAEはどこにでもあるので、ブランクの問題が避けがたく存在すること

は考慮していません。そのためEurachem Guidelinesに従った計算も行いました。この方法では、このような状況では次の式を用いることを提案しています。

$$\sigma'_0 = \sigma_b \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}\right)}$$

ここで、 σ_b はブランク試料の標準偏差、 n は結果報告に用いたときに平均値を求めた試料数、 n_b はブランク補正値を計算したときのブランク試料数を示します。

表3 結果

Target	R ²	E% (n=3)	Precision CV% (n=6)	LoQ (ppm) S/N	LoQ (ppm) Eurachem
DMP	0.9989	2.1	7.0	0.018	0.055
DEP	0.9994	8.0	5.4	0.020	0.057
DPP	0.9989	7.7	7.9	0.018	0.035
DiBP	0.9962	10.2	5.9	0.015	0.523
DBP	0.9989	7.6	4.8	0.018	0.064
BBP	0.9991	9.7	9.6	0.047	0.156
DCHP	0.9994	-1.0	6.1	0.015	0.025
DEHP	0.9991	-1.3	8.0	0.016	0.292
DiNP+DiDP	0.9970	-11.8	11.9	0.144	0.157

図1 PAE類を添加したエキストラバージンオリーブオイルのGC/MS MRM クロマトグラム

sample/matrix: 0.5 g extra virgin olive weighed into a 10 mL glass centrifuge tube, spiked with phthalate esters at 2 mg/kg, 3 mL acetonitrile added, vortexed 30 sec, centrifuged 10 min at 3000 rpm, 1.5 mL acetonitrile from the top transferred to a 2 mL vial
 SPME fiber: 100 μm PDMS (57300-U)
 extraction: direct-immersion, 20 min, constant stirring at 500 rpm
 desorption process: 280 °C for 5 min, splitless
 column: SLB®-5ms, 10 m × 0.10 mm I.D., 0.10 μm (28465-U)
 oven: 90 °C (5 min), 30 °C/min to 310 °C, 50 °C/min to 350 °C (3 min)
 inj. temp.: 280 °C
 carrier gas: helium, 50 cm/sec
 detector: MS (triple quadrupole), 220 °C, ESI(+), MRM, 70 eV
 MSD interface: 280 °C

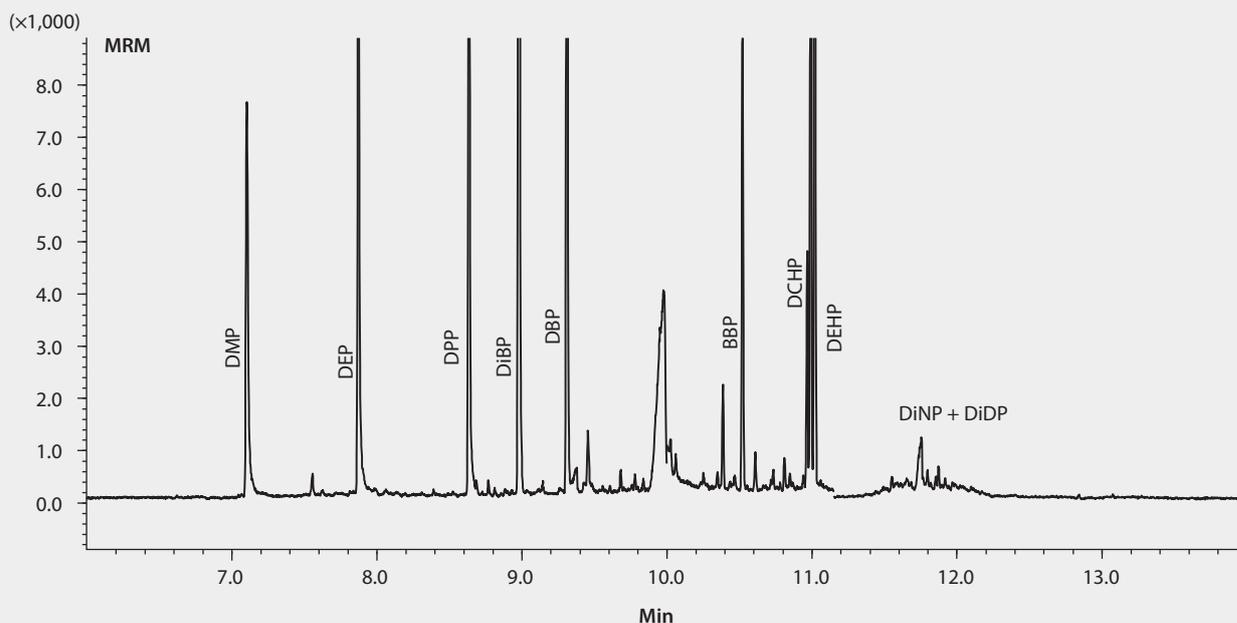


図2 SPME ファイバー抽出時間が PAE 回収率に及ぼす影響

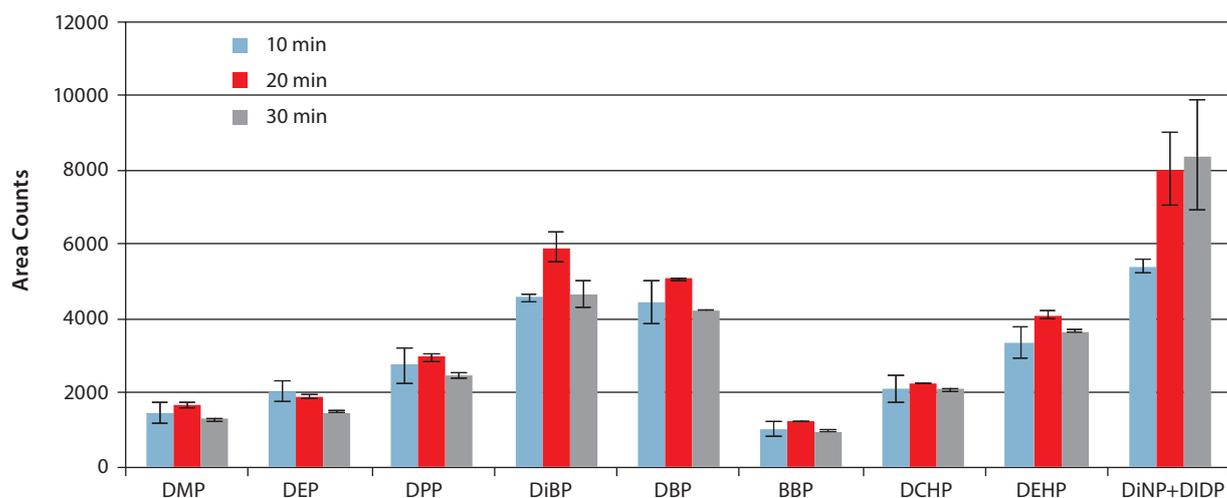


図3 SPME ファイバー脱着温度が PAE 回収率に及ぼす影響

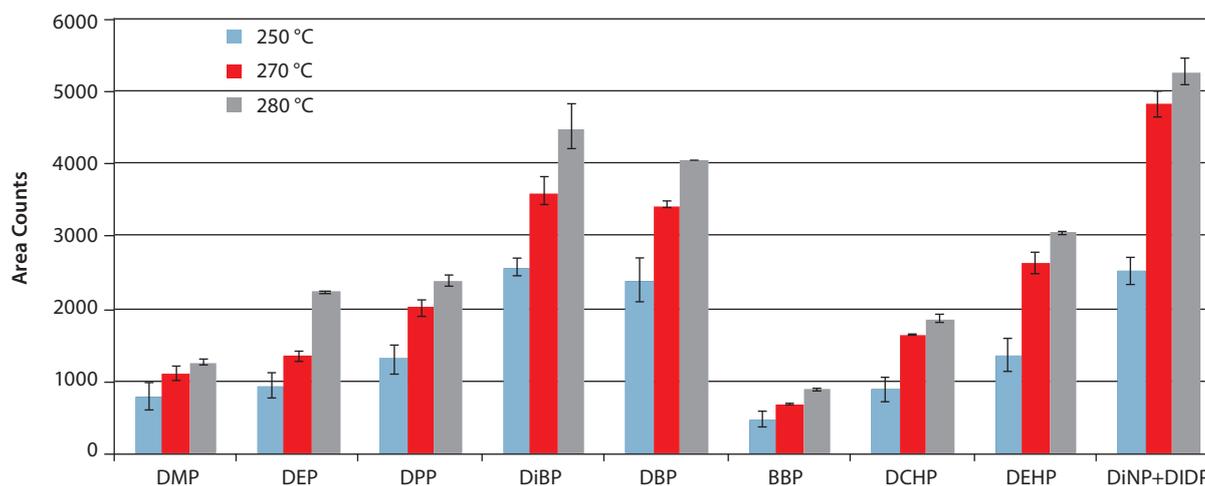


表4 様々な植物油中で見つかった PAE (mg/kg)

Oil Type	EVO 1	EVO 2	Olive	Sunflower	Sunflower	Mixed Seeds	Peanut	Soybean
Packaging	Aluminum	Glass	Glass	Plastic	Plastic	Plastic	Plastic	Plastic
DMP	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	0.044*	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
DEP	0.228	<LOQ ^a	<LOQ ^a	0.071	0.329	0.888	0.320	0.626
DPP	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	0.244	0.019*	<LOQ ^a	0.018*	<LOQ ^a
DiBP	0.953	<LOQ ^a	0.944	<LOQ ^a	0.589	3.911	1.296	3.219
DBP	0.127	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	0.616	0.052*	0.213
BBP	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	0.305	<LOQ ^a	0.099*	<LOQ ^a	<LOQ ^a
DCHP	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	0.140	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a	<LOQ ^a
DEHP	0.618	0.310	2.341	<LOQ ^a	0.114*	2.506	0.585	0.446
DiNP+DiDP	5.991	7.207	1.074	<LOQ ^a	<LOQ ^a	0.311	<LOQ ^a	0.207

LOQ^a refers to the S/N value; *LOQ (S/N) <value<LOQ (Eurachem Guidelines).

(continued on next page)

実際の植物油試料

DI-SPME-GC QqQ MS で最適化された方法を用いて、種々の植物油中の PAE 類を分析しました。表 4 は、種々の PAE の量 (2 つの試料の平均値) を試料調製手順別の汚染物質を差し引いたものです。また包装材料の情報も記載しました。シードオイル類よりオリーブ由来の油試料から多くの DiNP+DiDP が検出されました。シードオイル類の中では、混合シードオイルが最も汚染されており、次いで大豆油、ピーナツ油が汚染されていました。

結論

高速で簡単、高感度の植物油中 PAE 分析法を開発し、本論文で紹介しました。大量の TAG を取り除くための高速 LLE 抽出に引き続き、DI モードで PDMS SPME ファイバーを使用することで、線形性、再現性、正確性および定量限界の点で良好な性能が得られました。この方法は堅牢性が高く、300 回超の分析後でも選択性および効率といった点でカラム性能は変わりませんでした。

References

1. Ventrice, P.; Ventrice, D.; Russo, E.; De Sarro, G. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *36*, 88-96.
2. Tienpont, B.; David, F.; Dewulf, E.; Sandra, P. Pitfalls and solutions for the trace determination of phthalates in water samples. *Chromatographia.* **2005**, *61*, 365-370.
3. Fankhauser-Noti, A.; Grob, K. Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: Investigation of the sources, tips and tricks. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *582*, 353-360.
4. Cavaliere, B.; Macchione, B.; Sindona, G.; Tagarelli, A. Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil. *J. Chromatogr., A.* **2008**, *1205*, 137-143.
5. Mariani, C.; Venturini, S.; Grob, K. Presence of phthalates in vegetable oil. *Riv. Ita. Sost. Grasse.* **2006**, *83*, 251-256.
6. Fankhauser-Noti, A.; Grob, K. Injector-internal thermal desorption from edible oils performed by programmed temperature vaporizing (PTV) injection. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2365-2374.
7. Rios, J.; Morales, A.; Marquez-Ruiz, G. Headspace solid-phase microextraction of oil matrices heated at high temperature and phthalate esters determination by gas chromatography multistage mass spectrometry. *Talanta.* **2010**, *80*, 2076-2082.
8. Holadova, K.; Prokupkova, G.; Hajslova, J.; Poustka, J. Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *582*, 24-33.
9. Magnusson, B.; Ornemark, U., Eds.; Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.

+ Featured Products

Description	Cat. No.
GC Capillary Column	
SLB®-5ms, 10 m × 0.10 mm I.D., 0.10 μm	28465-U
SPME Fibers and Accessories	
SPME fiber assembly Polydimethylsiloxane (PDMS) df 100 μm (nonbonded phase, needle size 24 ga, for use with manual holder)	57300-U
SPME Fiber Holder for use with manual sampling	57330-U

NARP-HPLC-APCI-MS を用いた乳製品 およびシーフード中のトリアシルグリセロール類の同定と定量

Marco Beccaria¹ and Luigi Mondello^{1,2}

¹Chromaleont s.r.l., c/o "Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute" Department, University of Messina, viale Annunziata, 98168 Messina, Italy

²"Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute" Department, University of Messina, viale Annunziata, 98168 Messina, Italy

len.sidisky@sial.com

チーズやヨーグルトといった乳製品由来の脂肪や、マグロやエビといった海洋生物由来の脂肪など、食物に含まれる脂肪（食物性脂肪）にはトリアシルグリセロール（TAG）類が複合し含有しています。TAGの組成には、気候、食物、授乳の段階といった要素が影響します。食物性脂肪中のTAGの組成に強い関心が払われているのには2つの理由があります。1つは、TAG類が、生理学および栄養において重要な役割を果たしていることです。もう1つは、食品廃棄物を減らし、リサイクルし、再利用する必要があることです。食品の多くには、消費者用賞味期限を過ぎても食品補助食品あるいは研究目的で使用できるTAG類のような重要な成分が含まれています。

乳製品の全脂肪を分析する場合、脂肪分を完全に抽出することは重要なステップです。それは汚染があったり抽出が不適切だったりすると、誤った結果が得られるからです。脂肪抽出においては脂肪の酸化や加水分解を防ぐために、注意深く試料を調製し分析する必要があります。そういった人為操作により、信頼性の高い脂肪成分の同定や定量ができなくなるからです。本報告では、様々な脂肪性食品試料から脂肪分を抽出し、LC/MS法を使ってTAGの成分分析をする方法について述べます。この研究は最終的に、食品が古くなるに従ってTAG成分がどう変わるかを調べる研究につながる最初のステップです。

脂肪分析用の試料抽出

乳製品の全脂肪を完全に抽出するのに、Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (SBR) 抽出法 (IDF-International Standard 5B, 1986) を用いました¹。ヨーグルト試料にはISO 14156:2012法を用いて、確実に全脂肪分を抽出しました。マグロとエビは、BlighとDyerの方法²で処理しました。

1. チーズ

モッツアレラ、水牛モッツアレラ、インヴェルニッツィ、ゴルゴンゾーラ、ストラッキノー、マスカルポーネ、水牛リコッタ、ロビオーラなど種々のチーズを調べました。脂肪分は、チーズ試料を10g（正確に秤量）、20 mLの0.2 N塩酸および20 mLのエタノールをメスフラスコに加えることで抽出しました。メスフラスコを50°Cの水槽に漬け、マグネチックスターラーを使い一定速度で30分穏やかに振とうし均一な懸濁液を作りました。フラスコを流水で室温まで冷却後、210 mLのn-ヘキサンとジエチルエーテル（1:2, v/v）を加え、混合液をさらに15分振とうしました。懸濁液を10分間静置し、層を分離させました。この抽出手順を3回繰り返しました。有機層を貯め、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、真空で乾固状態にしました。得られた乾燥残渣は使用するまで-18°Cで保管しました。

2. ヨーグルト

ヨーグルトの脂肪分は、ヨーグルト試料を10g（正確に秤量）、20 mLの0.5Nアンモニア溶液および80 mLのエタノールを分液ロートに加えることで抽出しました。分液ロートを揺すりながら、100 mLのジエチルエーテル、次いで100 mLのn-ペンタンを加えました。懸濁液を10分静置し、層を分離させました。エーテル層を回収し無水硫酸ナトリウムの上で乾燥してろ過し、ロータリーエバポレーターで乾固状態にしました。得られた乾燥残渣は使用するまで-18°Cで保管しました。

3. シーフード

マグロとエビの試料は、脂肪分を10g（正確に秤量）、30 mLのクロロホルム/メタノール（1:2, v/v）を分液ロートに加えることで抽出しました。攪拌後、有機層を取り出して別の分液ロートに加え、10 mLのクロロホルムと10 mLの蒸留水を追加し、攪拌しました。得られた溶液を5～6本の遠心管に分けて入れ、3,000 rpmで15分間遠心分離、2つの層が得られました。下の層には脂肪分が含まれており、これを集め保管しました。上の層も集め最初の分液ロートに入っている元の固形サンプルを合わせ、さらに2回抽出しました。計3回分の抽出物を採取、超音波処理し、無水硫酸ナトリウムの上で乾燥してろ過した後、真空下で乾固状態にしました。得られた乾燥残渣は使用するまで-18°Cで保管しました。

NARP-HPLC-APCI-MS による分析

脂肪抽出物の最終乾燥試料15～30 mgを1 mLのアセトンで希釈し、0.45 μm Acrodisc® ナイロン膜フィルターでろ過し、LC/MS分析に供しました。脂肪抽出物のTAG組成は、最適化したNARP（非水逆相）-HPLC法をポジティブ大気圧イオン化質量分析（APCI-MS）検出と組み合わせで分析しました。C18修飾 Fused-Core® シリカ粒子を詰めた Ascentis® Express U/HPLC カラムによって高分解能での分離ができました。

結果と考察

図1～3に、テストした種々の乳製品の代表的なクロマトグラムを示します。図4は、インヴェルニッツィチーズのNARP-HPLC-APCI-MS分析でのTICクロマトグラムについて2カ所を拡大したものです。表1には、最も複雑な試料であるインヴェルニッツィチーズ試料からNARP-HPLC-APCI-MS分析で確認されたTAGです。TAG組成が貯蔵中および賞味期限後にどう変化するかについては、現在当社で研究中です。そのデータは、GC-FID/MS実験で得られた脂肪酸の組成と相関すると予想されます。この研究のねらいは、様々な商品について賞味期限後の栄養価を明らかにし、動物の餌への転用あるいは栄養補助食品用へ向けての生活性化合物の抽出、あるいは生化学研究用途などに使えるかどうかを評価することにあります。

(continued on next page)

表1 NARP-HPLC-APCI-MS 分析で見つかったインヴェルニッツィチーズ試料中の TAG

保持時間 (RT)、化合物番号 (N)、および面積 % を示します。ジアシルグリセロール類 (DAG) は [] マークで示しました。

No.	TAG	RT (min)	Area %	No.	TAG	RT (min)	Area %	No.	TAG	RT (min)	Area %	No.	TAG	RT (min)	Area %
1	[MBu]	3.10	n.q.	43	MCaCa	19.86	0.06	85	PdLaLa	28.47	*	127	LMP	34.86	0.01
2	[MCp]	3.82	n.q.	44	LaLaCa	19.86	*	86	PPdC	28.47	*	128	OPLa	35.31	0.17
3	[PBu]	4.20	n.q.	45	PCaC	20.03	0.60	87	OLCa	29.17	0.09	129	SOCa	35.31	*
4	[PCp]	5.40	n.q.	46	MLaC	20.03	*	88	OOC	29.17	*	130	OMM	35.31	*
5	[OCp]	5.40	n.q.	47	OPoBu	20.43	2.77	89	OOCO	29.17	*	131	PPLa	35.94	0.37
6	[SCp]	7.39	n.q.	48	OLBu	20.43	*	90	OMCa	29.55	0.11	132	SMLa	35.94	*
7	LaCaBu	8.03	0.42	49	MMCp	20.43	*	91	OLaLa	29.55	*	133	SPCa	35.94	*
8	CaCC	8.03	*	50	PLaCp	20.43	*	92	OPC	29.62	0.59	134	PMM	35.94	*
9	CaCaCp	8.03	*	51	OMBu	20.71	7.87	93	SOCp	30.02	0.59	135	SSC	35.94	*
10	LaCCp	8.03	*	52	PMBu	21.16	11.70	94	PMCa	30.02	*	136	PPdM	36.77	0.01
11	MCBu	8.18	0.17	53	PdCaCa	21.72	0.02	95	MMLa	30.02	*	137	OOL	36.98	<0.01
12	OCpBu	8.34	0.57	54	PPdBu	22.37	0.87	96	SLaCa	30.02	*	138	OOM	37.44	0.06
13	PCpBu	8.34	*	55	EdMBu	22.37	*	97	PPC	30.18	0.69	139	OPM	38.02	0.14
14	CaCaC	9.95	0.01	56	OPdBu	22.51	0.92	98	SMC	30.18	*	140	SOLa	38.02	*
15	LaCaCp	10.14	0.08	57	OPoCp	23.06	0.60	99	SPCp	30.69	1.01	141	SMM	38.67	0.09
16	MCCp	10.20	0.12	58	OLaC	23.06	*	100	OPdCa	31.03	0.03	142	PPM	38.67	*
17	MCaBu	10.75	1.57	59	OCaCa	23.06	*	101	EdPC	31.03	*	143	SPLa	38.67	*
18	OCBu	11.05	1.42	60	MMC	23.49	0.99	102	EdMca	31.03	*	144	OOPd	39.45	0.02
19	PCBu	11.27	0.34	61	PCaCa	23.49	*	103	SSBu	31.45	0.77	145	OPPd	39.45	*
20	PdCaBu	12.53	0.18	62	OMCp	23.49	*	104	PPdCa	31.63	0.05	146	EdPM	39.45	*
21	[MM]	12.73	n.q.	63	OOBu	23.88	3.46	105	OLLa	31.99	0.05	147	OOO	39.87	0.01
22	[PLa]	12.73	n.q.	64	PMCp	24.09	1.42	106	OOCa	31.99	*	148	PPPd	40.02	0.04
23	LaCaC	12.99	0.04	65	OPBu	24.18	12.51	107	OPCa	32.48	0.37	149	OOP	40.02	*
24	MCC	13.36	0.34	66	PPBu	24.72	14.81	108	OMLa	32.48	*	150	SLP	40.33	<0.01
25	MCaCp	13.36	*	67	SMBu	24.72	*	109	PPoLa	32.48	*	151	OPP	40.61	0.06
26	PCCp	13.45	0.28	68	PPdCp	25.24	0.31	110	PMMo	32.48	*	152	SOM	40.91	0.01
27	OCaBu	13.70	1.12	69	PdLaCa	25.24	*	111	SOC	32.48	*	153	PPP	41.27	0.05
28	MLaBu	14.06	3.66	70	OPdCp	25.88	0.61	112	PPCa	33.06	0.21	154	SPM	41.27	*
29	PCaBu	14.06	*	71	OOCp	26.41	0.89	113	MMM	33.06	*	155	EdPP	41.96	0.01
30	PdLaBu	15.83	0.24	72	OLC	26.41	*	114	SMCa	33.06	*	156	OEdP	41.96	*
31	LaCaCa	16.22	0.05	73	OLaCa	26.41	*	115	PMLa	33.06	*	157	SPPd	41.96	*
32	MCaC	16.46	0.39	74	OMC	26.41	*	116	SLaLa	33.06	*	158	SOO	42.54	0.01
33	PCaCp	16.89	0.80	75	OPCp	26.83	1.59	117	SPC	33.30	0.35	159	SPO	43.11	0.03
34	OBuLa	17.20	2.24	76	PMC	26.83	*	118	SSCp	33.88	0.14	160	SPP	43.73	0.02
35	PoMBu	17.24	0.71	77	PLaCa	26.83	*	119	EdPCa	33.98	0.04	161	SSM	43.73	*
36	PMoBu	17.24	*	78	MMCa	26.83	*	120	OLaPd	33.98	*	162	SOEd	44.35	<0.01
37	MMBu	17.58	5.87	79	PPCp	27.46	3.20	121	LLP	34.20	<0.01	163	SSPd	44.90	<0.01
38	PLaBu	17.58	*	80	SMCp	27.46	*	122	OLL	34.20	*	164	SEdP	44.90	*
39	PdCaC	18.28	0.19	81	SOBu	28.01	0.50	123	OOMo	34.48	0.01	165	SSO	45.44	<0.01
40	PdCpLa	18.67	0.15	82	SPBu	28.2	6.38	124	OLM	34.61	0.01	166	SSP	46.03	0.01
41	PdMBu	19.43	0.46	83	EdPCp	28.47	0.08	125	OOLa	34.79	0.02	167	SSS	48.16	<0.01
42	OCaC	19.72	0.13	84	SPdCp	28.47	*	126	OPoM	34.79	*				

表1の略称

Bu: Butyric acid (C4:0)、**Cp**: Caproic acid (C6:0)、**C**: Caprylic acid (C8:0)、**Ca**: Caprinic acid (C10:0)、**La**: Lauric acid (C12:0)、**M**: Myristic acid (C14:0)、**Mo**: Myristoleic acid (C14:1)、**Pd**: Pentadecanoic acid (C15:0)、**P**: Palmitic acid (C16:0)、**Po**: Palmitoleic acid (C16:1)、**Ed**: Heptadecanoic acid (C17:0)、**S**: Stearic acid (C18:0)、**O**: Oleic acid (C18:1)、**L**: Linoleic acid (C18:2)、**Ln**: Linolenic acid (C18:3)

[]: diacylglycerol

*: 一つ前の TAG と重なって溶出

図1 ノッチョリーナモッツアレラチーズ中のTAG類のNARP-HPLC-APCI-MS分析

column: Ascentis® Express C18, 15 cm x 4.6 mm I.D., 2.7 μm (53829-U)
 mobile phase: [A] acetonitrile; [B] 2-propanol (IPA)
 gradient: 0 to 70% B in 50 min; held at 70% B for 5 min; to 0% B in 1 min
 flow rate: 1 mL/min
 detector: MS, APCI(+), mass range 250–1100 m/z
 injection: 7 to 20 μL
 sample: lipid extract, 15 to 30 mg/mL in acetone

LC/MS Instrument Conditions:

Shimadzu™ LCMS-2010 APCI(+): range 250–1100 m/z; nebulizing gas (N₂) flow: 2.0 L/min; heat block: 300 °C, CDL temperature: 300 °C; interface temperature: 450 °C; detector voltage: 1.6 kV
 Partition Number (PN): 炭素数の総和は二重結合数の二倍を引いたもの

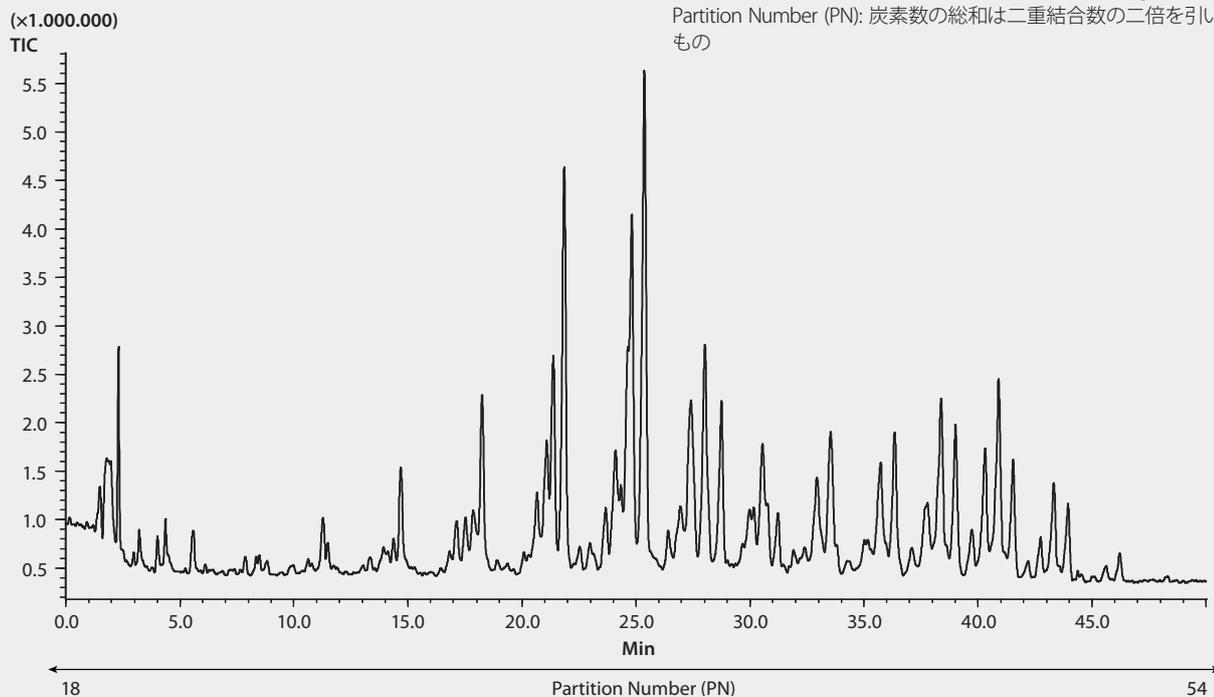
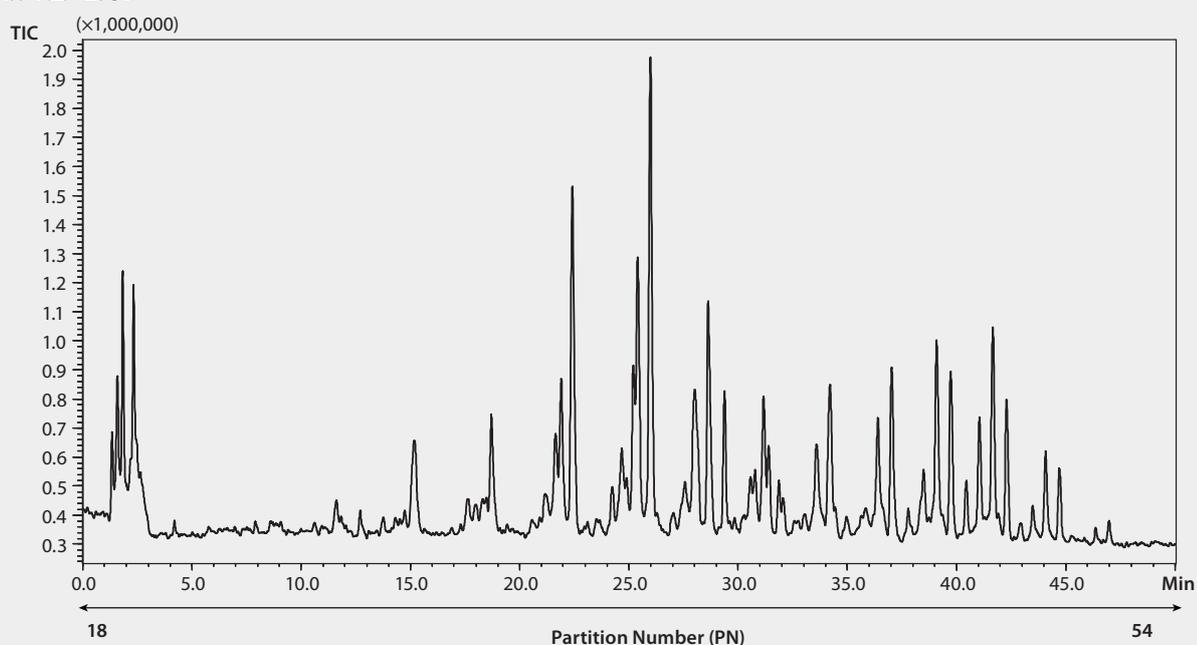


図2 ヨーグルト中のTAG類のNARP-HPLC-APCI-MS分析

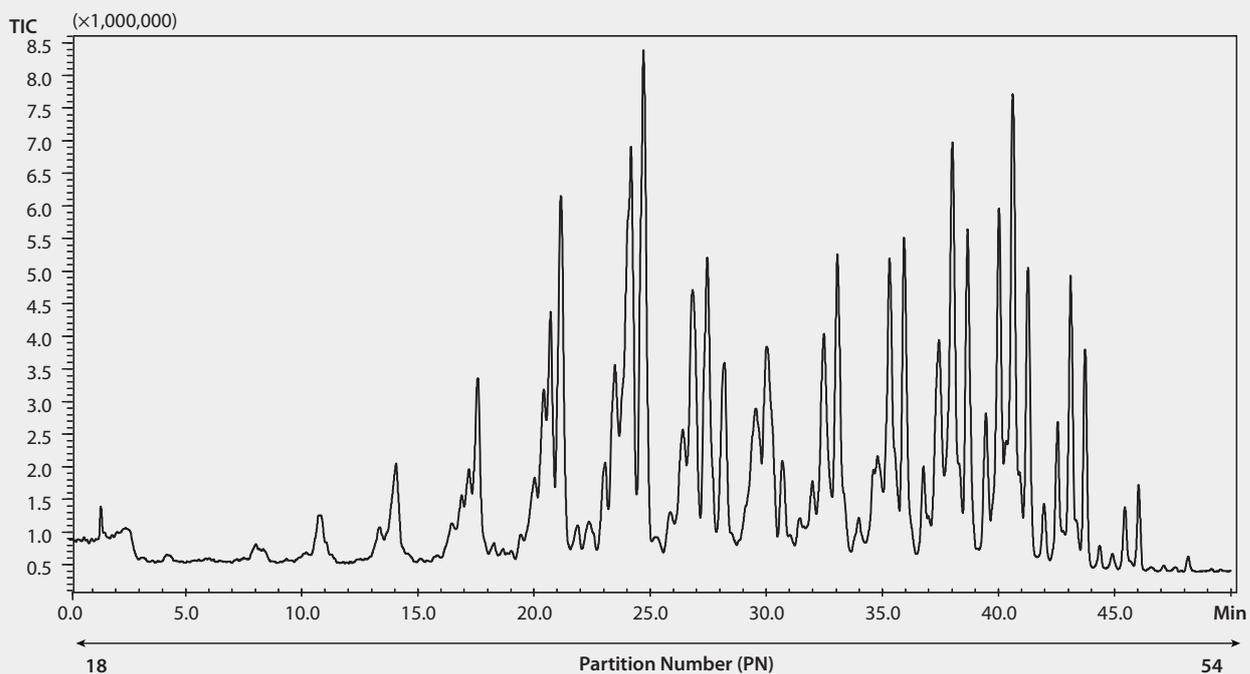
分析条件は図1と同じ



(continued on next page)

図3 インヴェルニッツィチーズ中のTAG類のNARP-HPLC-APCI-MS分析

分析条件は図1と同じ。



Supel™ QuE Z-Sep

SUPELCO
Solutions within.™

Z-Sepシリーズは
妨害となる脂質と色素を強力に除去します

製品の詳細とサンプルのご請求はこちら
sigma.com/zsep-jp

Explore the solutions within

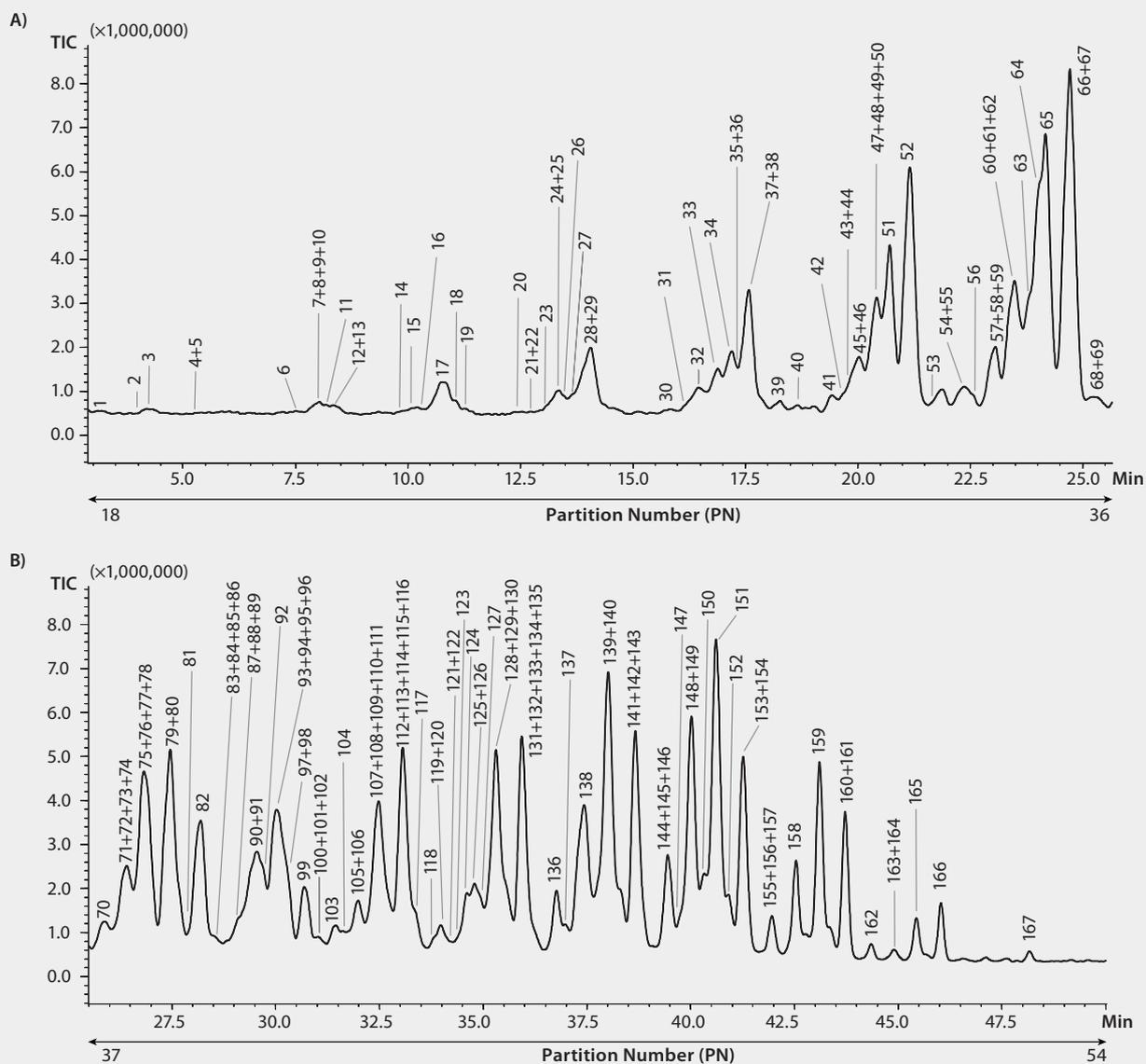


SIGMA-ALDRICH®

図4 インヴェルニッツチーズ中の NARP-HPLC-APCI-MS 分析における TIC クロマトグラムの拡大図

Panel A: 0 - 25.5 minutes

Panel B: 25.5 - 50 minutes



Featured Products

Description	Cat. No.
HPLC Column	
Ascentis® Express C18, 15 cm x 4.6 mm I.D., 2.7 µm particles	53829-U
Lipid Extraction Reagents	
Hexane, puriss. p.a., ACS reagent, reag. Ph. Eur., ≥99% (GC)	32293
Diethyl ether, ACS reagent, anhydrous, ≥99.0%, contains BHT as inhibitor	346136
Sodium sulfate, anhydrous, free-flowing, Redi-Dri™, ACS reagent, ≥99%	746363

Description	Cat. No.
Ammonia, anhydrous, ≥99.99%	294993
Pentane, anhydrous, ≥99%	236705
Accessories	
Acrodisc® syringe filters, nylon membrane, diam. 25 mm, pore size 0.45 µm	2259977

Supelclean™ EZ-POP NP、Silica Gel SPE および SLB®-5ms GC カラムを用いた魚油中ポリ塩化ビフェニル類 (PCB) の分析

Kathy Stenerson¹, Principle R&D Scientist; Caitlin Brown², 2014 Summer Intern
¹Sigma-Aldrich/Supelco, Bellefonte, PA
²Pennsylvania State University, University Park, State College, PA
 jennifer.claus@sial.com

ポリ塩化ビフェニル (PCB) 類は、かつて、絶縁流体、誘電体および潤滑剤として広く用いられていました。中でも幅広く用いられた用途にトランス (変圧器) があります。PCB の使用は多くの国で禁止され、その製造および使用は Stockholm Convention (ストックホルム会議) で禁じられています¹。しかし、PCB は未だに不法投棄や不適切な廃棄物処理、PCB を含む変圧器からの漏えい、あるいは公共または産業用焼却炉での廃棄物燃焼によって環境中に放出されていると思われる²。

The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (米国毒性物質疾病登録局) は、頻度、毒性の強さおよび曝露の可能性といった点に基づき、PCB を最も有毒な化学物質の第 9 位に挙げました³。PCB は疎水性なので、生体に蓄積する傾向があり、ヒトのような食物連鎖上位の生物の食料を汚染することになります。PCB を含む装置が洗浄されたり、川や海に投棄されたりした場合、PCB は、何らかのルートで魚のような水生生物の体内に入っていく可能性があります。その結果、魚や魚原料製品を日常的に摂る人々の健康上のリスクとなります。

魚油は、エイコサペンタ塩酸 (EPA) やドコサヘキサ塩酸 (DHA) など健康上メリットのある脂肪酸を多く含むため、人気の高い健康補助食品です。そのため、魚油の摂取による PCB 曝露に関して懸念が高まり、最大汚染限度が欧州連合 (EU) 規制に挙げられ、また、カリフォルニア州法修正案 65 汚染物リストに入ることになりました^{4,5}。こういった状況が、魚油の PCB 分析の必要性につながっています。一般的な分析方法は、GC/MS か、GC/ECD で行います。その場合、脂肪分の多い魚油マトリックスから PCB を分離するために、サンプル抽出および精製が必要です。通常行われる方法として、液体抽出後に硫酸精製する方法、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を用いる方法、多層シリカやアルミナカラムを用いたカラムクロマトグラフィーを用いる方法があります⁶。本報告では、抽出に Supelclean™ EZ-POP NP SPE を、追加精製にシリカゲルカートリッジを用いた固相抽出 (SPE) 法を開発しました。得られた抽出物は、バックグラウンドが低く、GC/ECD を用いてすべての PCB 類の分析が可能でした。

実験

購入したタラの肝油を、1 塩化から 10 塩化までの 19 種の PCB 類を 10 ng/g で添加しました。この 19 種は、世界保健機関 (WHO) によって構造がダイオキシン様と規定された 12 種のコプラナー PCB 類と、環境中によく見られる 7 種が含まれます (表 1)。添加後、油を数日間静置してから分析しました。また、添加を行わない油も同様に用意しました。添加および無添加の魚油試料を表 2 および 3 に記載した方法で抽出およびクリーンアップしました。分析は図 1 に示した

条件を使って GC/ECD で行いました。定量は、ヘキサンで調製した外部標準液を用いて 5 点校正曲線で行いました。

表 1 魚油分析で見つかった PCB 類 (IUPAC 名称)

Peak No.	Congener No.	IUPAC name	t _r (min)
1	28	2,4,4'-Trichlorobiphenyl	11.01
2	52	2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl	11.57
3	101	2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl	12.92
4	81	3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl	13.33
5	77	3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl	13.49
6	123	2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl	13.81
7	118	2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl	13.87
8	114	2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl	14.01
9	153	2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl	14.19
10	105	2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl	14.24
11	138	2,2',3,4,4',5-Hexachlorobiphenyl	14.58
12	126	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl	14.74
13	167	2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl	15.02
14	156	2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl	15.34
15	157	2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl	15.40
16	180	2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl	15.57
17	169	3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl	15.89
18	189	2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl	16.41
19	209	Decachlorobiphenyl	17.79

表 2 Supelclean™ EZ-POP NP を用いた魚油からの PCB 類の SPE 抽出

試料/マトリックス: PCB 類を 10 ng/g で含むタラの肝油
 SPE チューブ: Supelclean EZ-POP NP, 12 mL (54341-U)
 コンディショニング: 10 mL acetone, 10 分間 10" ~ 15" Hg で乾燥
 試料添加: 0.5 g タラの肝油、カートリッジ上で直接秤量
 溶出: 15 mL acetonitrile
 溶出液後処理: アセトニトリルで溶出後、2 × 10 mL 分のヘキサンで逆抽出。hexane 抽出物を 40°C 窒素下で 1 mL まで蒸発。

表 3 Supelclean LC-Si による魚油抽出物の SPE クリーンアップ

試料/マトリックス: EZ-POP NP SPE 法 (表 2) を用いて調製した魚油の抽出物
 SPE チューブ: Supelclean LC-Si, 100 mg/1 mL (504041)
 コンディショニング: 4 mL acetone, 10 分間 10" ~ 15" Hg, その後 4 mL hexane
 試料添加: 表 3 の方法を用いて調製した濃縮 hexane 抽出物 1 mL
 溶出: 5 mL hexane
 溶出液後処理: 40°C 窒素下で 1 mL まで濃縮

結果と考察

メソッドの最適化

当初、タラ肝油の抽出とクリーンアップは EZ-POP NP カートリッジのみで行いました。得られたアセトニトリル抽出物を濃縮し GC/ECD に注入しました。しかし、バックグラウンドが高すぎ、最初に溶出する 2 種の PCB 類しか検出できませんでした (図 1)。試料の量と溶出溶媒であるアセトニトリルの量を減らしてバックグラウンドを減らそうと試みました。しかしこれでは GC/ECD 分析を行うのに十分な濃度で抽出物を精製できませんでした。本来 EZ-POP NP SPE カートリッジは、植物由来の食用油中の非極性汚染物の分析用に開発されたもので、GC 分析に十分なレベルで抽出物を精製できます。しかし、植物油は動物や海洋生物由来の油とは組成が異なります。そのため、本来は植物油用の EZ-POP NP SPE 法を改良することが必要です。シリカゲルは、油性試料の分画およびクリーンアップに広く用いられる順相の充填剤です。シリカゲルのみで抽出及び精製を行うと、多くの場合、大きいサイズのカートリッジと大量の溶媒を必要とします。しかし、EZ-POP NP カートリッジを用いて調製したタラ肝油抽出物の場合は、1mL/100mg の小さいサイズのシリカゲルカートリッジで十分な精製が可能となり、すべての PCB 類を検出できることがわかりました (図 2)。このシリカゲルカートリッジを使うには、EZ-POP NP 抽出から得たアセトニトリル抽出物を、非極性溶媒に溶媒交換しなければなりません。これは単純なヘキサンへの逆抽出により実行しました。

回収率および再現性

上記で最適化した SPE 法を 10 ng/g の PCB を添加したタラ肝油試料の抽出に適用しました。図 3 には、ブランク差し引き後の平均回収率を、再現性を示すエラーバーとともに示します。平均回収率は 75 ~ 120% ですが、疎水性の最も高い PCB209 では 59% と低くなっていました。6 試料の標準偏差 (% RSD) は 1 ~ 17% の範囲で平均

RSD は 5% でした。無添加のタラ肝油からは 3 種の PCB 類が検出されました (図 4)。いずれもコプラナー PCB ではなく、WHO によってダイオキシン様としてリストに挙げられたものでもありません。無添加タラ肝油の 3 試料で平均した検出量を表 4 に示します。測定再現性は PCB 類 No. 153 および No. 180 に対して <10% RSD でした。No. 138 に対してはこれより高い値となりましたが、これはこの物質のピークの直近にベースラインの負ピークがあり試料のピーク積分が困難だったためです。このようなベースラインの乱れによる妨害は、ECD 分析では珍しくなく、検出セルや溶出液が妨害試料成分 (ECD で検出しない物質) で汚れている場合に起きることがあります。

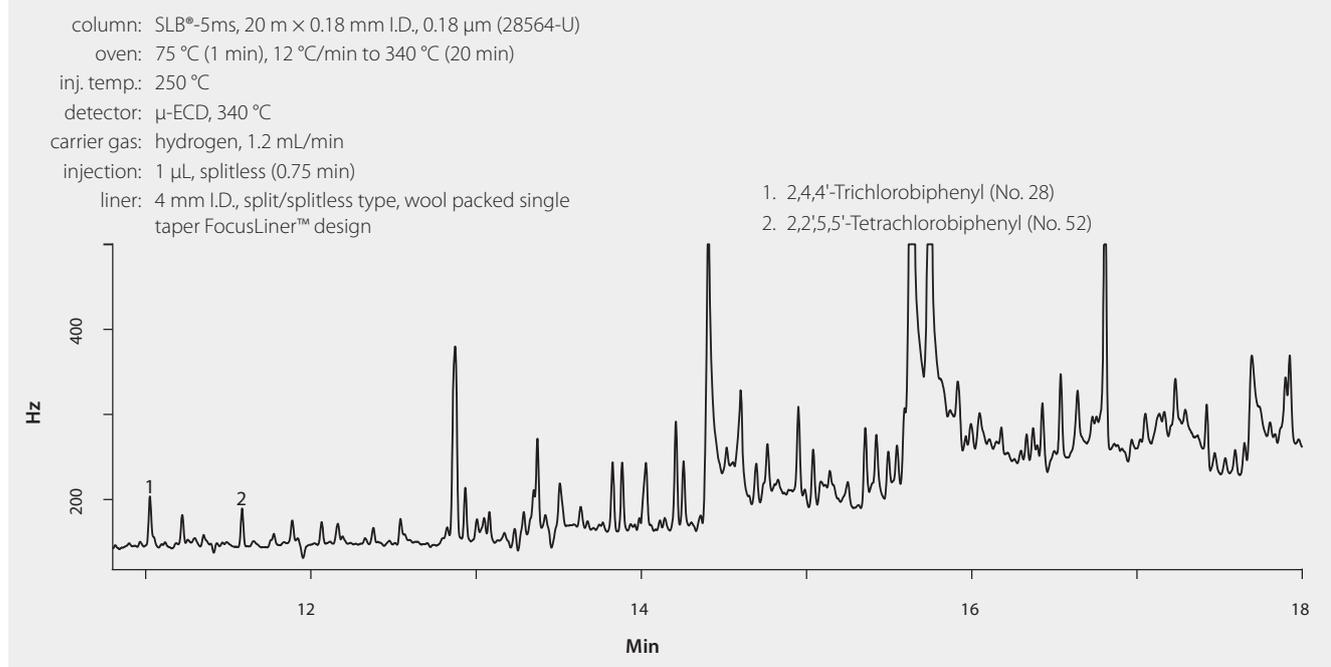
他のサンプル前処理との比較

EZ-POP NP /シリカゲル SPE 法によって得た魚油抽出物の精製について、2 種類の抽出および精製法で比較しました。方法は、1) ヘキサン希釈の後、硫酸で精製、2) ヘキサン希釈の後、大型シリカゲル SPE 抽出 (2 g/12 mL) および C18 SPE カートリッジ (1 g/6 mL) で精製。添加したタラ肝油試料をこの 2 種の方法で調製しましたが、いずれも得られた抽出物のバックグラウンドが GC/ECD 分析には大きすぎることがわかりました (図 5 および 6)。硫酸で精製した抽出物の場合、バックグラウンドなしで検出された PCB 種は 2 種だけで、シリカ /C18 SPE で調製した試料ではマトリックスが多すぎて 1 種も検出できませんでした。

表 4 無添加のタラ肝油中に検出された PCB 類

PCB Congener	Concentration (ng/g)	% RSD, n=3
153	16	7%
138	18	23%
180	8	9%

図 1 Supelclean™ EZ-POP NP 抽出しただけの、PCB 類を添加した魚油の GC/ECD 分析



(continued on next page)

図2 Supelclean™ EZ-POP NP 後にシリカゲル SPE クリーンアップした、PCB 類を添加した魚油の GC/ECD 分析

分析条件は図1と同じ

- | | | |
|--|---|--|
| 1. 2,4,4'-Trichlorobiphenyl (No. 28) | 7. 2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl (No. 118) | 13. 2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (No. 167) |
| 2. 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (No. 52) | 8. 2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl (No. 114) | 14. 2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl (No. 156) |
| 3. 2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl (No. 101) | 9. 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (No. 153) | 15. 2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl (No. 157) |
| 4. 3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl (No. 81) | 10. 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl (No. 105) | 16. 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl (No. 180) |
| 5. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (No. 77) | 11. 2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobiphenyl (No. 138) | 17. 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (No. 169) |
| 6. 2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl (No. 123) | 12. 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (No. 126) | 18. 2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl (No. 189) |
| | | 19. Decachlorobiphenyl (No. 209) |

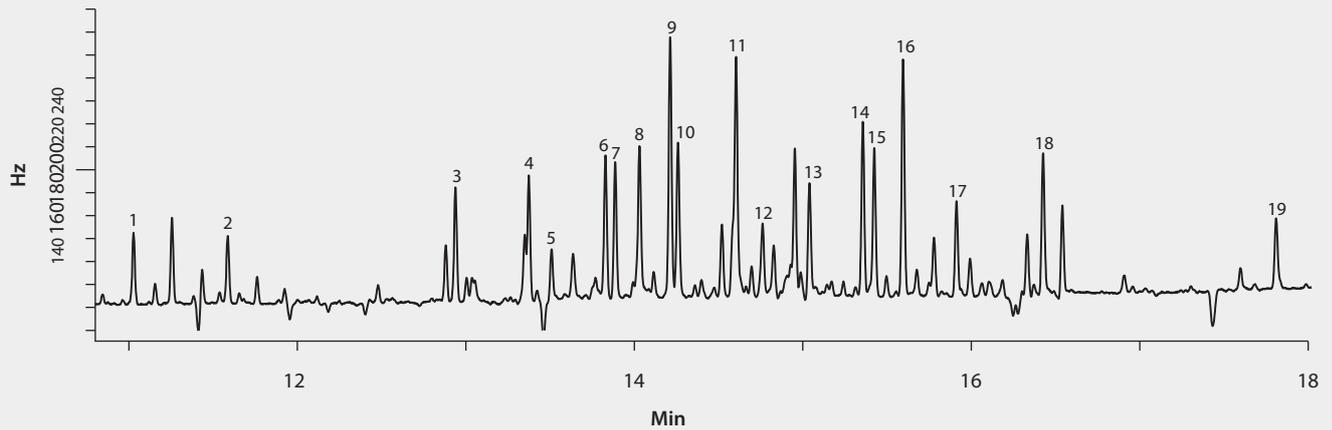


図3 Supelclean EZ-POP NP 後シリカゲル SPE クリーンアップした、PCB 10 ng/g で添加したタラ肝油試料の PCB 平均回収率、n=6

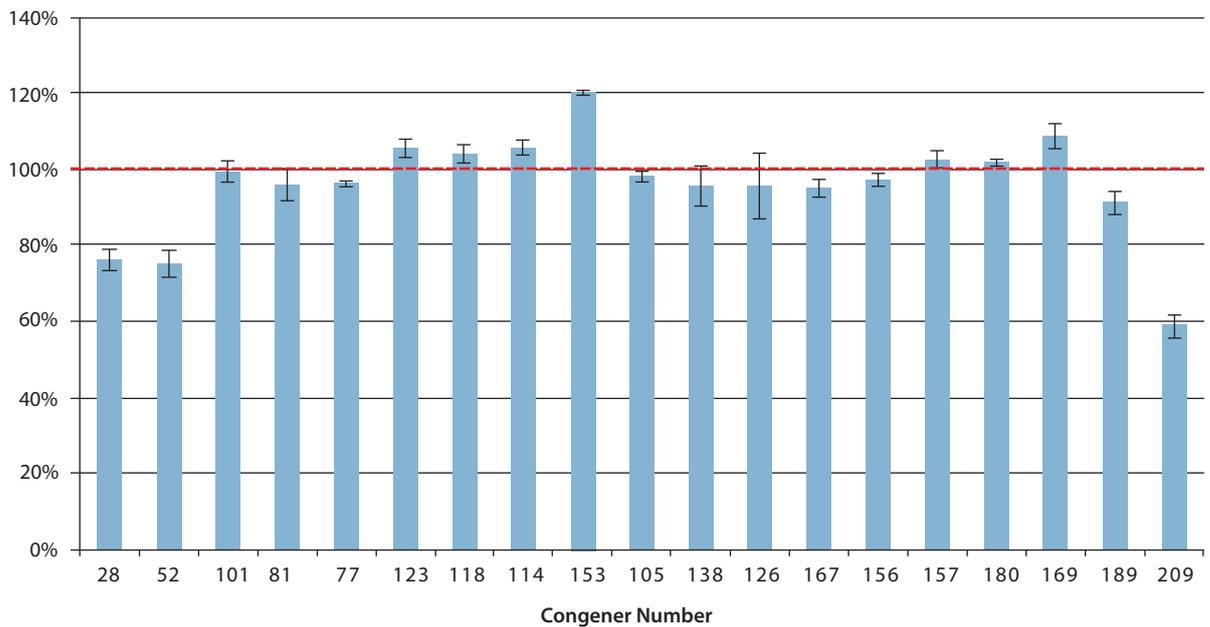


図4 Supelclean™ EZ-POP NP 後にシリカゲル SPE クリーンアップを用いた PCB 無添加タラ肝油試料の標的 PCB 類に対する GC/ECD 分析

分析条件は図1と同じ

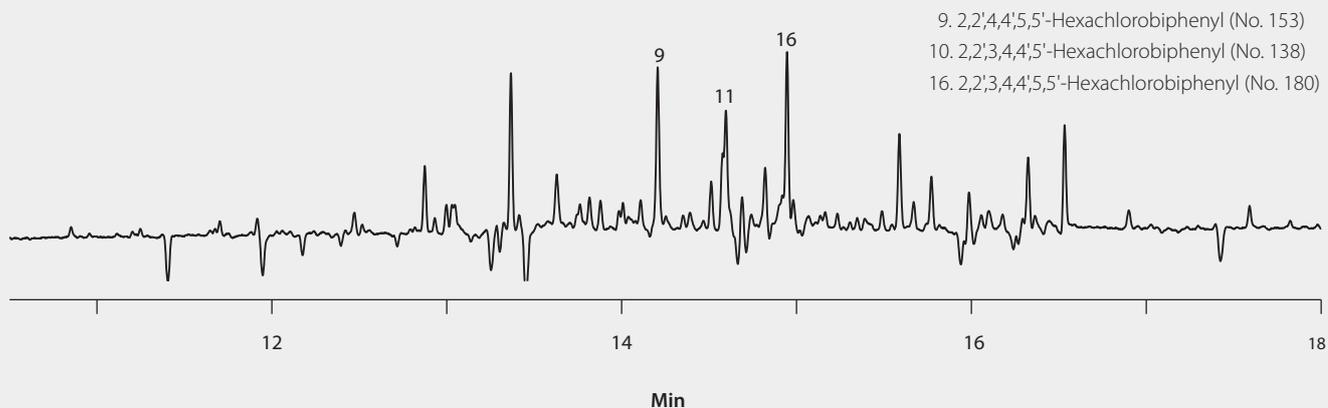


図5 ヘキサン希釈および硫酸クリーンアップした PCB 添加タラ肝油

分析条件は図1と同じ

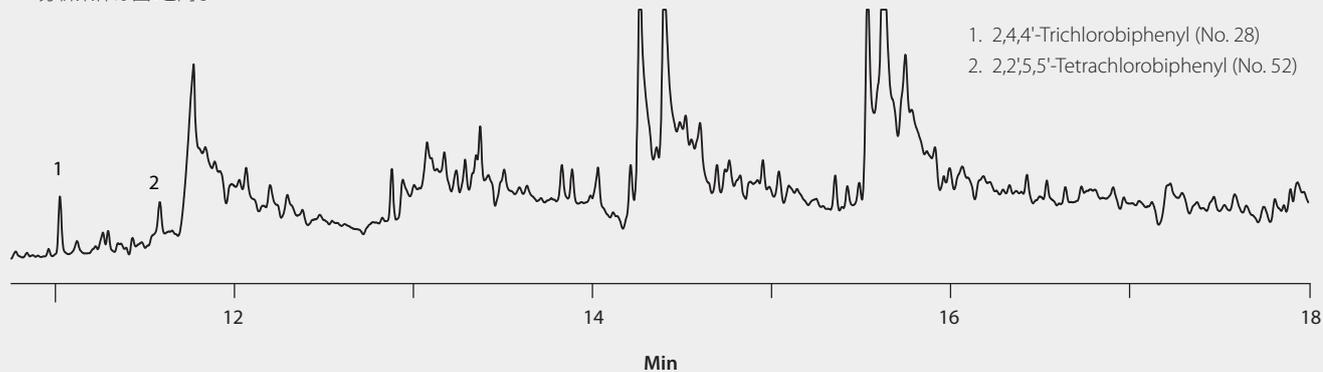
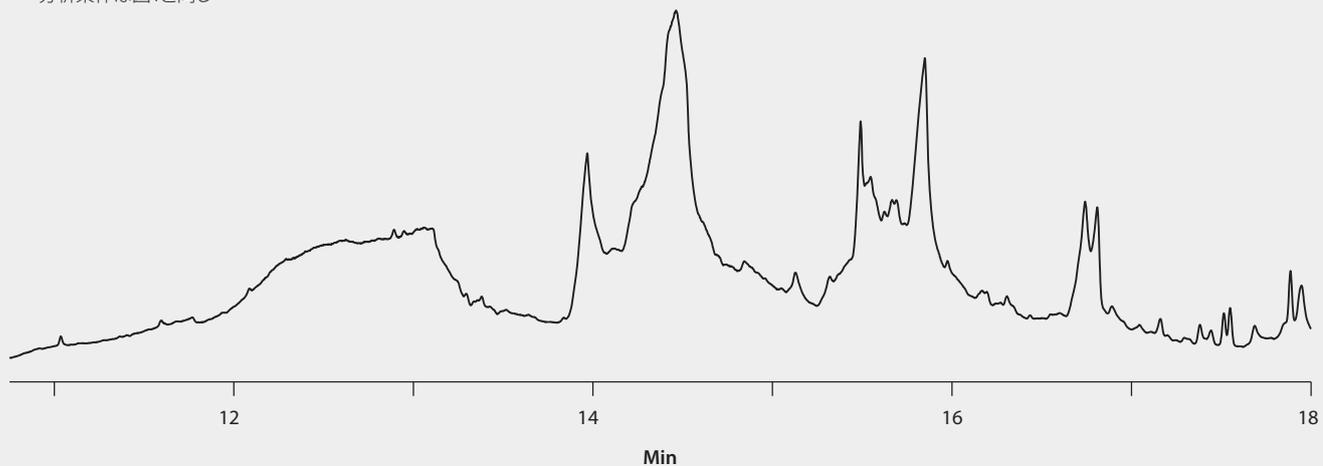


図6 シリカゲル SPE および C18 SPE でクリーンアップした PCB 添加タラ肝油

分析条件は図1と同じ



(continued on next page)

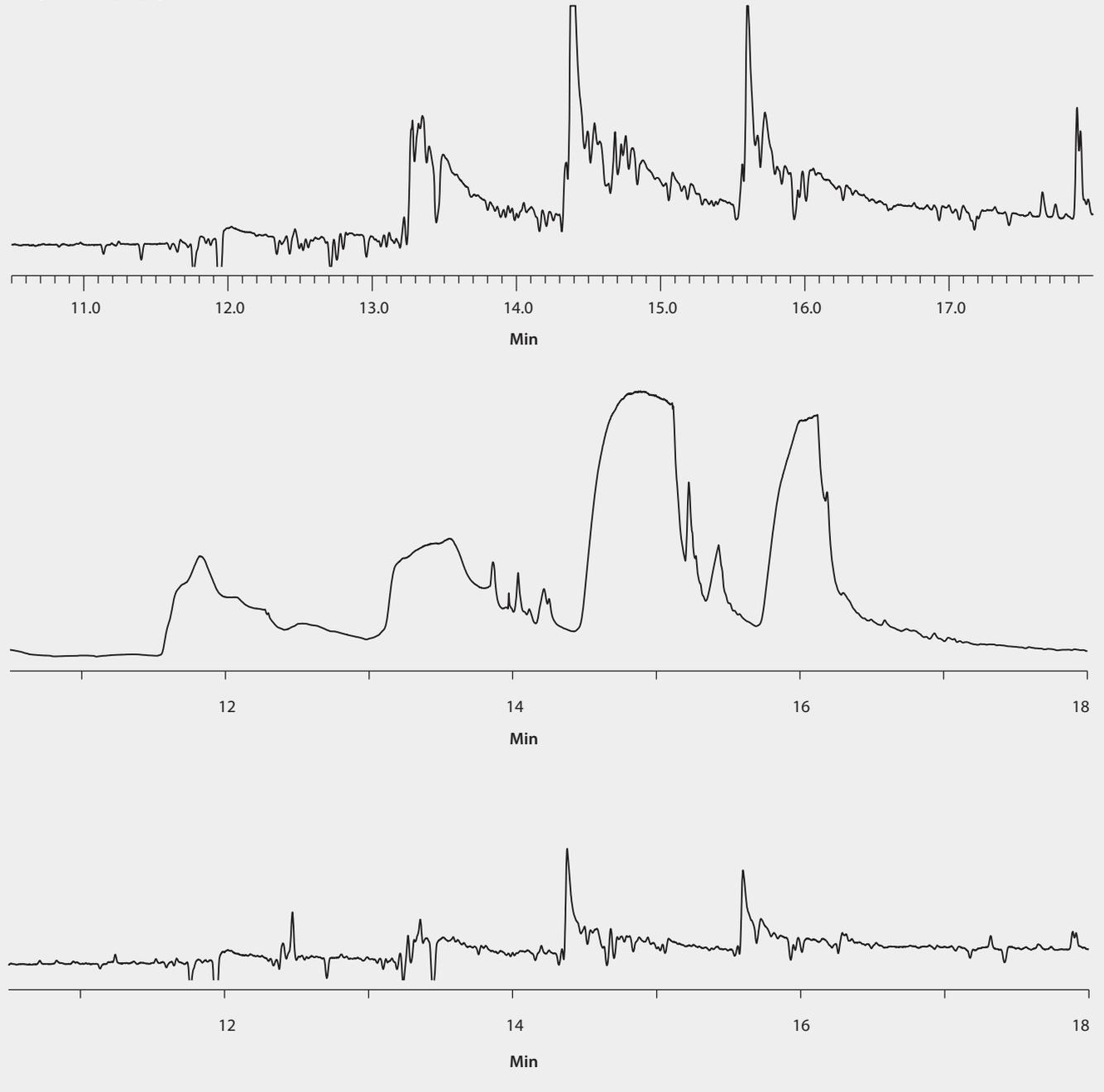
市販魚油カプセルの分析

純粋な魚油試料の分析に成功したので、EZ-POP NP/シリカゲル抽出および精製法を適用して市販の魚油カプセルの分析を行いました。3種のブランド品を対象に、そのままの試料に目的のPCB類が存在するかどうかを分析しました。しかし、魚油カプセルの中には、純粋なタラ肝油では観察されなかったバックグラウンドがありました(図7)。調べた3種中2種でバックグラウンドが目的のPCB類の検

出を妨害しました。ブランドCでは、バックグラウンドが低かったので分析できましたが、PCBは何も検出されませんでした。魚油カプセル抽出物でバックグラウンドが高い理由は、カプセル内容物の原材料に関連している可能性があります。原材料のリストには、ゼラチンや水のような増量剤が含まれており、これらが妨害して脂肪分バックグラウンドが溶媒に残った可能性があります。

図7 Supelclean™ EZ-POP NP /シリカゲル法で調製した魚油カプセル3ブランド抽出物のGC/ECD分析

分析条件は図1と同じ



結論

本稿で紹介した Supelclean™ EZ-POP NP とシリカ SPE を用いた試料前処理法は、タラ肝油を適切にクリーンアップでき、GC/ECD による PCB 類の分析が可能になりました。これに対し、希釈/酸での精製法あるいはシリカゲル/C18 SPE 法による従来の試料調製法の抽出物は PCB 類の分析に不向きでした。このメソッドでの添加試料からの回収率は、PCB 209 を除いて 75% 以上でした。(PCB209 の回収率は 59%)。無添加のタラ肝油の場合、対象物リストに載っている PCB 類の数種が低レベルで検出されましたが、ダイオキシン様と考えられているものではありませんでした。この方法は純粋な魚油の場合にはうまくいきましたが、市販の魚油カプセルには適していませんでした。これは、水やゼラチンのようなカプセル内の非脂肪増量剤が原因の可能性があります。これらの増量剤は、EZ-POP NP カートリッジ中の Florisil® の活性および第 2 精製に使用したカートリッジ中のシリカの活性を妨害し、バックグラウンドとして脂肪分が溶媒に残った可能性が考えられます。

References

1. Stockholm Convention: Protecting human health and the environment from persistent organic pollutants. chm.pops.int (accessed Aug 2015)
2. U.S. Environmental Protection Agency. Basic Information: Polychlorinated Biphenyl (PCB). <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcb/about.htm> (accessed Aug 2015)
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Priority List of Hazardous Substances. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (accessed Aug 2015)
4. Regulation EC/1881/2006. *Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs*: Document 2006R1881-EN-01.07.2007-001.001-1; 2006; section 5.10; European Union Commission: December, 2006.
5. State of California Environmental Protection Agency Office of Environmental Health Hazard Assessment Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act of 1986. Chemicals Known to the State to Cause Cancer of Reproductive Toxicity. March 27, 2015. http://oehha.ca.gov/prop65/prop65_list/files/P65single03272015.pdf (accessed Aug 2015).
6. Voorspoels, S.; Ricci, M.; Held, A. *Certification of mass fractions of polychlorinated biphenyls (PCBs 28, 52, 74, 99, 101, 105, 110, 118, 138, 149, 153, 156, 177, 180, 183, 187, 194, and 196) in fish oil*; ERM®-BB350; European Commission, IRMM: Geel, Belgium, 2010.

+ Featured Products

Description	Cat. No.
Supelclean SPE Products	
EZ-POP NP, 12 mL, pack of 20	54341-U
LC-Si, 1 mL, pack of 108	504041
Column	
SLB®-5ms Capillary GC Column, 20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 µm	28564-U
Accessories	
Visiprep™ DL 24-port Solid Phase Extraction Manifold	57265
Visiprep™ DL 12-port Solid Phase Extraction Manifold	57044
Disposable valve liners, PTFE, pack of 100	57059

Did you know . . .

Z-Sep シリーズは妨害となる脂質と色素を強力に除去します。

詳細とサンプル請求はこちら

sigma.com/zsep-jp

Supel™ QuE (QuEChERS)

SUPEL QUE シリーズは

- ▶ 充填剤の豊富なラインアップ、チューブサイズの幅広い選択が可能
- ▶ ユニークな特徴をもつ革新的な新しい吸着剤をご用意
 - Z-Sep 吸着剤: 脂質の多い難しい食品に
 - Supel QuE Verde: 緑色のマトリックス中の平面構造をもつ農薬に

無料サンプル配布中!

sigma.com/dspe-jp



SIGMA-ALDRICH®

Reporter 33.4 Food & Beverage Supplement

sigma-aldrich.com/food

海産毒 (マリトキシン) の認証標準物質

Sigma-Aldrich はカナダの National Research Council (NRC) の取扱いを開始しました

Matthias Nold, Product Manager Analytical Standards matthias.nold@sial.com



海洋藻の中には、フィコトキシン (藻毒) と呼ばれる強力な毒物を生成する種があります。食物連鎖を通じ、こういった毒は魚やムラサキガイのような海洋無脊椎動物の体内で蓄積し有害な濃度に濃縮されて、ヒトが食べたときに消化器系や神経性などの様々な中毒症状を引き起こすことがあります。

ヒトの食中毒リスクを下げるため、食品用シーフードの安全性確保のための規制が導入されています。FDA は、saxitoxin、brevetoxin-2、okadaic acid、domoic acid および azaspiracid 類縁体ならびに ciguatoxin 類に対し、許容限界を設定しました [1]。欧州委員会は、domoic acid、okadaic acid、dinophysistoxin 類、pectenotoxin 類、yessotoxin 類および azaspiracid 類縁体に対し、EC 規制 No. 853/2004 で上限値を定め、検出法 (LC-MS/MS が好適) を規制 No. 2074/2005 および No. 15/2011 で規定しています。

分析法の開発と正確な定量のためには、標準物質として用いる毒物が必要ですが、入手は大変困難です。なぜな

ら化学構造が複雑 (図 1) であり、多くの立体中心やマクロサイクルあるいは縮合環を含んでいます。そのため有機合成が可能な場合でも非常に手間がかかるため、目的の化合物は、それを生成する藻あるいは汚染された魚介類より抽出し精製しなければなりません。

カナダ学術研究会議 (NRC) は、幅広い規制海洋生体毒素に対する認証標準物質 (CRM) を開発しました。ラインナップには、キャリブレーションに使用できる単一成分の認証標準物質とマトリックス認証標準物質があります。毒物の化学構造と純度は、精製後に NMR と LC-MS を組み合わせて確認しています。濃度は定量 NMR と種々のクロマトグラフィーで定めてあり、均一性および安定性のテストは包括的にを行っています。

NRC の製品群は、現在 Sigma-Aldrich より入手できます。次ページにその一部をご案内いたします。これらの製品は当社ウェブサイト、sigma-aldrich.com/marinetoxins でもご覧いただけます。

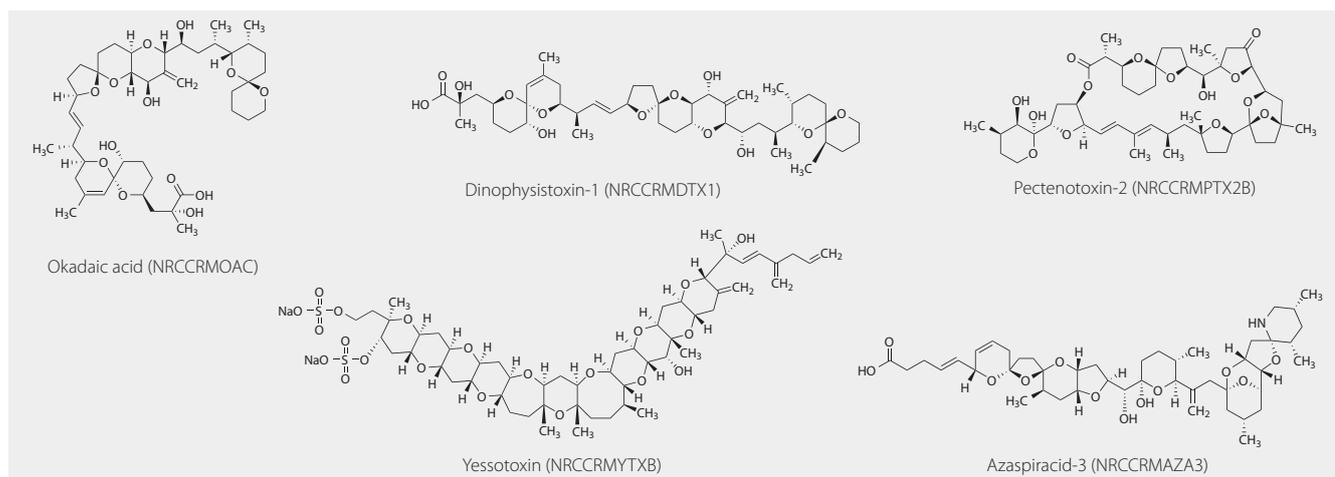


図1 毒素の化学構造

表1 NRCのマリトキシソシン認証標準物質 (溶液)

Cat. No.	Description	Composition*
NRCCRMATX	Anatoxin-a solution	30 μM in methanol: water ((9:91, v/v) with 0.01% acetic acid)
NRCCRMAZA3	Azaspiracid-3 solution	1.3 μM in methanol
NRCCRMVYTXB	Cylindrospermopsin solution	30 μM in deionized water (filtered)
NRCCRMDCNEOC	Decarbamoylneosaxitoxin solution	30 μM in hydrochloric acid (3 mM)
NRCCRMDCSTXB	Decarbamoylsaxitoxin solution	65 μM in hydrochloric acid (3 mM)
NRCCRMSPX1	13-Desmethylspirolide C solution	10 μM in methanol with 0.05% TFA
NRCCRMDTX1	Dinophysistoxin-1 solution	19 μM in methanol
NRCCRMDTX2	Dinophysistoxin-2 solution	10 μM in methanol
NRCCRMGTX14C	Gonyautoxin-1 and Gonyautoxin-4 solution	GTX-1: 60 μM and GTX-4: 20 μM in hydrochloric acid (3 mM)
NRCCRMGTX23C	Gonyautoxin-2 and Gonyautoxin-3 solution	Gonyautoxin-2: 114 μM and Gonyautoxin-3: 43 μM in hydrochloric acid (3 mM)
NRCCRMHYTX	1-Homoyessotoxin solution	5 μM in methanol
NRCCRMDMMCLR	[Dha7]-Microcystin-LR solution	10 μM in methanol: water (1:1) (v/v)
NRCCRMMCLR	Microcystin-LR solution	10 μM in methanol: water (1:1) (v/v)
NRCCRMMCRR	Microcystin-RR solution	10 μM in methanol: water (1:1) (v/v)
NRCCRMNEOC	Neosaxitoxin solution	66 μM in hydrochloric acid (3mM)
NRCCRMNODR	Nodularin solution	12 μM in methanol: water (1:1) (v/v)
NRCCRMOAC	Okadaic acid solution	17 μM in methanol
NRCCRMPTX2B	Pectenotoxin-2 solution	5 μM in methanol
NRCCRMSTXF	Saxitoxin dihydrochloride solution	66 μM in hydrochloric acid (3mM)
NRCCRMC12B	N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-2 and N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-3 solution	C1: 113 μM and C2: 34 μM in filtered, aqueous acetic acid (~17 μM, pH 5)
NRCCRMVYTXB	Yessotoxin solution	5 μM in methanol

表2 NRCのマトリックス認証標準物質

Cat. No.	Description	Composition*
NRCCRMZEROMUS	Mussel tissue (<i>Mytilus edulis</i>)	negative control
NRCCRMAZAMUS	Mussel tissue (<i>Mytilus edulis</i>) contaminated with azaspiracids	AZA1 – 1.16 μg/g, AZA2 – 0.273 μg/g and AZA3 – 0.211 μg/g
NRCCRMASPMUSD	Mussel tissue (<i>Mytilus edulis</i>) contaminated with domoic acid and isomers	Domoic acid: 48 μg/g, C5'-epi-Domoic acid: 1.9 μg/g, Isodomoic acid E: 1.0 μg/g (non-certified), Isodomoic acid D: 2.3 μg/g (non-certified), Isodomoic acid A: 1.5 μg/g (non-certified)

* 不確かさを含む正確な値については、認証書をご覧ください。

[1] <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252395.pdf>

ISO 17943 用の認証標準物質 (CRM)

Cory E. Muraco, R&D Scientist at Supelco cory.muraco@SIAL.com

揮発性有機化合物 (VOC) は、塗料、石油製品、冷却剤、医薬品およびドライクリーニング溶剤など多くの日用品製造プロセスで一般的に使用されています。また VOC は自然界でも、植物の間でメッセージをやり取りする化学物質として、あるいは昆虫や動物では捕食されるのを防ぐ抑制剤として使われています。しかし VOC は、ヒトが継続的に曝露すると健康に害を及ぼすこともあります。この問題は、建築材料のオフガスによって室内空気中の VOC 濃度が許容限界を超える場合に顕著になります。VOC は環境に有害で、環境に入る道筋の1つは、工場、廃棄物リサイクル施設、自然水源と混合する施設などからの排水です。

国際標準化機構 (ISO) は、ヘッドスペース SPME/GC-MS により水中の VOC を測定する新しい方法を開発しました。この方法は、水試料中の 60 種類以上の VOC 濃度を測定します。この方法の校正には認証標準物質 (CRM) が必要です。ISO/IEC 17025 と Guide 34 の2つの認定を受けた施設である Supelco では、ISO 17943 を網羅する3種の CRM を開発しました。表 1 は、これらの混合物の成分を示します。CRM に関する詳しい情報については、下記のウェブサイトをご覧ください。 sigma.com/crm-jp

表 1 ISO 17943 用認証標準物質

Cat. No.	Description	Composition	Concentration	Package Size	
44923-U	ISO 17943 Odor Compounds Mix	(+/-)-Geosmin Methylisoborneol	2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolane 2-Ethyl-5,5-dimethyl-1,3-dioxane	200 µg/mL in methanol 1 x 1 mL	
44926-U	ISO 17943 VOC 57 Compounds Mix	tert-Amyl methyl ether Benzene Bromobenzene Bromochloromethane Bromodichloromethane Bromoform Butylbenzene sec-Butylbenzene tert-Butylbenzene tert-Butyl ethyl ether Carbon tetrachloride Chlorobenzene Chloroform 2-Chlorotoluene 4-Chlorotoluene Cumene Dibromochloromethane Dibromomethane 1,2-Dibromo-3-chloropropane	1,2-Dibromoethane 1,2-Dichlorobenzene 1,3-Dichlorobenzene 1,4-Dichlorobenzene 1,1-Dichloroethane 1,2-Dichloroethane 1,1-Dichloroethene trans-1,2-Dichloroethene cis-1,2-Dichloroethene Dichloromethane 1,2-Dichloropropane 1,3-Dichloropropane 2,2-Dichloropropane 1,1-Dichloropropene cis-1,3-Dichloropropene trans-1,3-Dichloropropene Ethylbenzene Hexachlorobutadiene p-Isopropyltoluene	200 µg/mL in methanol Methyl tert-butyl ether Naphthalene n-Propylbenzene Styrene 1,1,1,2-Tetrachloroethane 1,1,2,2-Tetrachloroethane Tetrachloroethene Toluene 1,2,3-Trichlorobenzene 1,2,4-Trichlorobenzene 1,1,1-Trichloroethane 1,1,2-Trichloroethane Trichloroethylene 1,2,3-Trichloropropane 1,3,5-Trimethylbenzene 1,2,4-Trimethylbenzene m-Xylene o-Xylene p-Xylene	1 x 1 mL
48625	Vinyl chloride	Vinyl chloride		200 µg/mL in methanol 1 x 1 mL	

2016_Analytix 1

©2016 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA, SAFC, SIGMA-ALDRICH, ALDRICH and SUPELCO are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. FLUKA is a trademark of Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH. Sigma-Aldrich, Sigma and SAFC brand products are sold by affiliated Sigma-Aldrich distributors. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see product information on the Sigma-Aldrich website at www.sigmaaldrich.com. TraceCERT, Ascentis, HybridSPE and SLB are registered trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC. Redi-Dri, Supel, Supelclean, Titan and Visiprep is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC. Florisil is a registered trademark of U.S. Silica Company. Fused-Core is a registered trademark of Advanced Materials Technology, Inc. Acrodisc is a registered trademark of Pall Corporation. FocusLiner is a trademark of SGE Analytical Science Pty Ltd. Shimadzu is a trademark of Shimadzu Corporation.

本記事の製品および情報は2016年6月1日現在の情報であり、掲載の品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。最新の情報は、弊社Webサイト (sigma-aldrich.com/japan) をご覧ください。掲載価格は希望納入価格 (税別) です。詳細は販売代理店様へご確認ください。弊社の試薬は試験研究用のみを目的として販売しております。医薬品原料並びに工業用原料等としてご購入の際は、こちらのWebサイト (sigma.com/safc-jp) をご覧ください。

SIGMA-ALDRICH®

シグマ アルドリッチ ジャパン

〒140-0002 東京都品川区東品川2-2-24 天王洲セントラルタワー4階

製品に関するお問い合わせは、弊社テクニカルサポートへ

TEL:03-5796-7330 FAX:03-5796-7335

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:03-5796-7320 FAX:03-5796-7325

E-mail:sialjpcs@sial.com

<http://www.sigma-aldrich.com/japan>

お問い合わせは下記代理店へ