

Vol.22 (Dec.2016)

Analytix

トピックス

- ・*trans*-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレンと2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いるオゾンとカルボニル化合物同時測定

環境

- ・11種のイソシアネートの捕集および5分間のUHPLC分析
- ・新製品: イソシアネートの定性、定量のための認証標準物質

食品

- ・ホウレンソウおよびフレッシュオレガノにおける平面構造を有する農薬の回収率の改善
- ・オリーブオイル中におけるPAHの検出と、新規SPEカートリッジを用いた回収率の改善およびバックグラウンドの低下
- ・エッセンシャルオイル中のCarvone光学異性体の解析

HPLC カラム (技術情報)

- ・フッ素化フェニル固定相、PFPP・F5 (ペンタフルオロフェニルプロピル) UHPLC カラムを用いた類縁化合物の分離と、親水性化合物の保持

臨床/Bioanalytical

- ・血清、血漿試料由来の夾雑成分に対するLC/MS分析前処理方法の提案

製薬/薬毒物

- ・Astec® CHIROBIOTIC® V2 による尿中のMethamphetamineのキラルLC/MS分析
- ・Astec® CYCLOBOND® I 2000 HP-RSP — キラルHPLCおよびLC-MS分離に適したユニークな光学活性固定相

SAJ2066

SIGMA-ALDRICH®

トピックス

- 3 *trans*-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレンと
2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いる
オゾンとカルボニル化合物同時測定
千葉大学工学部 内山茂久

環境

- 8 11種のイソシアネートの捕集および5分間の
UHPLC分析
ASSET™ EZ4-NCO サンプラーと Titan™ C18
UHPLC カラム
- 9 **新製品**: イソシアネートの定性、定量のための
認証標準物質
重水素化体、イソシアネート誘導体

食品

- 12 ホウレンソウおよびフレッシュオレガノ中に
おける平面構造を有する農薬の回収率の改善
QuEChERS 用 Supel™ QuE Verde
- 14 オリーブオイル中における PAH の検出と、
新規 SPE カートリッジを用いた回収率の改善
およびバックグラウンドの低下
- 18 エッセンシャルオイル中の Carvone 光学異性体
の解析
Astec® CHIRALDEX® G-TA キャピラリー GC
カラムを用いて

HPLC カラム (技術情報)

- 20 フッ素化フェニル固定相、PFPP・F5 (ペンタフル
オロフェニルプロピル) UHPLC カラムを用いた
類縁化合物の分離と、親水性化合物の保持

臨床/Bioanalytical

- 23 血清、血漿試料由来の夾雑成分に対する
LC/MS 分析前処理方法の提案
イオンサプレッションの影響低減における2つ
のアプローチ

製薬/薬毒物

- 26 Astec® CHIROBIOTIC® V2 による尿中の
Methamphetamine のキラル LC/MS 分析
LC-MS による市販 L-Methamphetamine からの
不法 D-Methamphetamine の区別
- 28 Astec® CYCLOBOND® I 2000 HP-RSP - キラル
HPLC および LC-MS 分離用に適したユニークな
光学活性固定相



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)

trans-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレンと2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いる オゾンとカルボニル化合物同時測定

千葉大学工学部 内山茂久

ホルムアルデヒドやアセトアルデヒドなどのカルボニル化合物は、ヒトに対して刺激を与えるばかりでなく、喘息などのアレルギー症状や発がんを引き起こす疑いのある有害物質であり、変異原性を有する。昨今、シックビルディング症候群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。また、環境大気中には比較的高濃度のオゾンが存在するが、オゾンは光化学オキシダントの原因物質であり、目やのどに刺激を与えるなどの健康被害を引き起こす。

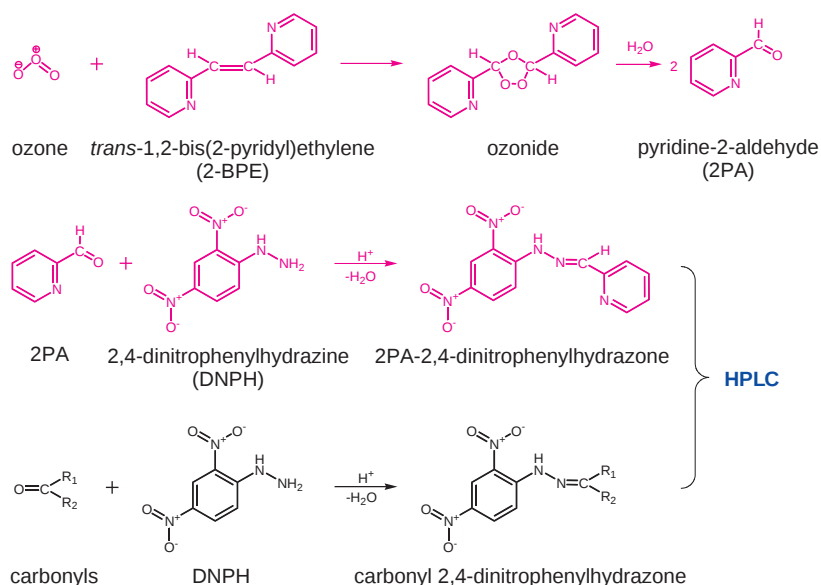
カルボニル化合物の分析としては、約90年前に報告された2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)を用いる誘導体化反応^[1]を利用した溶液捕集法(インピンジャー法)が広く用いられてきたが、現在はDNPHを含浸させたシリカを充填したDNPHカートリッジ法が主流であり多くの公定法に採用されている。しかし、DNPHカートリッジ法は大気中に比較的高濃度で存在するオゾンにより、DNPH及びDNPH誘導体が破壊されることが報告されている^[2]。そのため、ヨウ化カリウム(KI)を充填したオゾンスクラバーをDNPHカートリッジの前段に取り付け、オゾンを除去する方法が一般に広く使用されている。しかし、高温多湿時にはKIが湿潤するため、ポンプによる吸引が不可能になったり、オゾンとKIが反応し酸化力の強い三ヨウ化カリウム(KI₃)を生成しDNPH誘導体やDNPHを破壊する^[3]など問題が多い。この問題を解決するために、日本ではヨウ化カリウムを加熱し、湿度による水分の凝集を防ぐことが行われている。しかし、この方法は専用の加熱装置が必要であるばかりでなく、加熱による化学物質の変化も懸念される。

室内空気中には α -ピネンや β -リモネンなどのテルペン類が比較的高濃度で存在するが、これらのテルペン類が外気から流入したオゾンと反応し、アルデヒド類を二次的に生成する恐れがある。したがって、カルボニル化合物だけではなく、二次生成に関与するオゾンも同時に測定しなければ、室内汚染のメカニズムを解明できない。

オゾンとカルボニル化合物同時測定用の捕集カートリッジとして、trans-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレン(BPE)とDNPHから構成されるBPE-DNPHカートリッジ(アクティブサンプラー)^[4,5]とDSD-BPE/DNPH(拡散サンプラー)^[6]が開発されている。これらのサンプラーはBPEがオゾンスクラバーとしても機能するため、ヨウ化カリウム等の余計なオゾンスクラバーを必要としない。

オゾンとカルボニル化合物同時測定の原理

BPEとオゾン、カルボニル化合物とDNPHの反応をScheme1に、オゾンとカルボニル化合物同時測定の概略をFigure1示す。空気中のアルデヒド類はDNPHと反応してヒドラゾン誘導体を生成する。一方、オゾンは、いわゆるエチレンのオゾン分解と同様に、BPEと反応してピリジンアルデヒド(PA)を生成する。このPAをDNPHでヒドラゾン誘導体にして、他のアルデヒド誘導体と共に高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分析することにより、オゾンとカルボニル化合物の同時測定が可能になる^[4,5]。前述したようにDNPH及びアルデヒドのヒドラゾン誘導体はオゾンで破壊されることが報告^[2]されているが、DNPHと共存するBPEはオゾンスクラバーとしても機能するので、破壊を防ぐことができる。



Scheme 1. Scheme for the simultaneous determination of ozone and carbonyls.

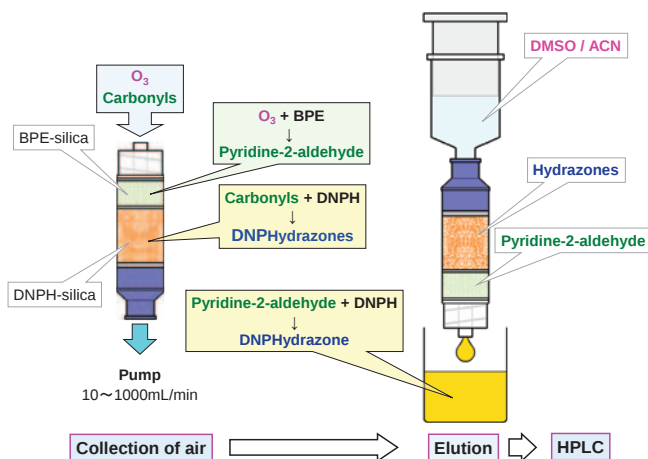


Figure 1. Scheme of the procedure for the simultaneous determination of ozone and carbonyls using a BPE-DNPH cartridge.

BPE の特性

ピリジンアルデヒドヒドラゾン誘導体の溶解度

trans-1,2-ビスピリジルエチレンには、*trans*-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレン(2-BPE)、*trans*-1,2-ビス(3-ピリジル)エチレン(3-BPE)、*trans*-1,2-ビス(4-ピリジル)エチレン(4-BPE)の3種類の位置異性体が存在し、オゾンと反応すると、それぞれピリジン-2-アルデヒド(2-PA)、ピリジン-3-アルデヒド(3-PA)、ピリジン-4-アルデヒド(4-PA)を生成する。一般に芳香族アルデヒドのDNPH誘導体はアセトニトリルに溶け難い^[7]とされているが、PAも溶解度が低い。しかし、ジメチルスルホキシドを溶出液に加えると溶解度が上昇する(Figure 2)。3種類の異性体の中で2-PAが最も溶解度が高く、ジメチルスルホキシドが30%のアセトニトリル溶液では6.2 mmol/Lの溶解度を示した。

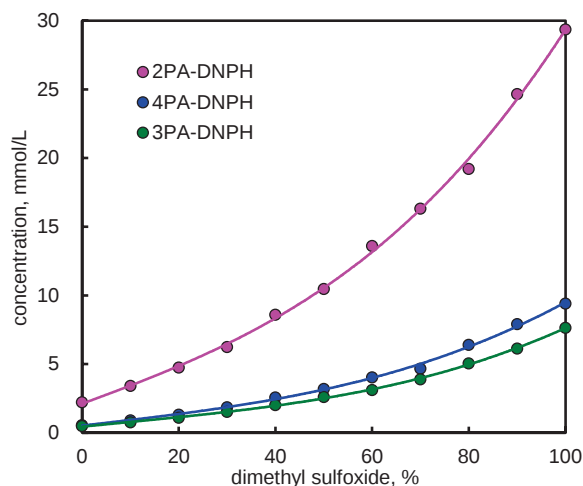


Figure 2. Solubility of isomeric pyridine aldehyde 2,4-DNPhydrazones in various solutions of dimethyl sulfoxide and acetonitrile. Reproduced with permission from Figure 1 in Ref. ^[5]

BPE のオゾンに対する反応率

オゾンとBPEが反応して、PAが100%生成するわけではない。Figure 3にBPE-DNPHカートリッジ法とオゾン計による分析値の比較を示す。オゾン計はNIST標準器で校正を行った装置である。2-BPEを捕集剤として使用した場合、オゾン濃度が300 ppbを超えても良好な相関関係($r = 0.9998$)を示したが、4-BPEの場合は100 ppbを超えると分析値が若干低下した。Figure 3において、2-PAの回帰直線の傾きは0.84であるが、この値が反応率に相当する。

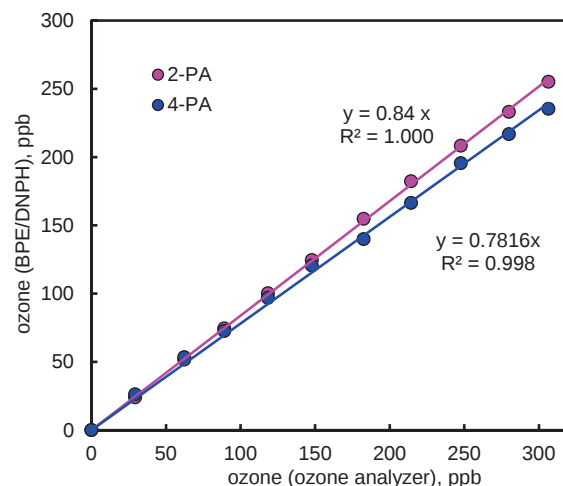


Figure 3. Relationship between UV-absorption ozone analyzer and BPE/DNPH methods. Reproduced with permission from Figure 4 in Ref. ^[5]

湿度の影響

BPEとオゾンが反応するとき、中間体であるオゾニドを分解するための水が必要である(Scheme 1)。Figure 4に様々な湿度におけるBPEとオゾンの反応を示す。2-BPEと4-BPEを比較すると、2-BPEの方が4-BPEより湿度の影響を受け難く、湿度32%以上でほぼ完全に反応することが分かる。

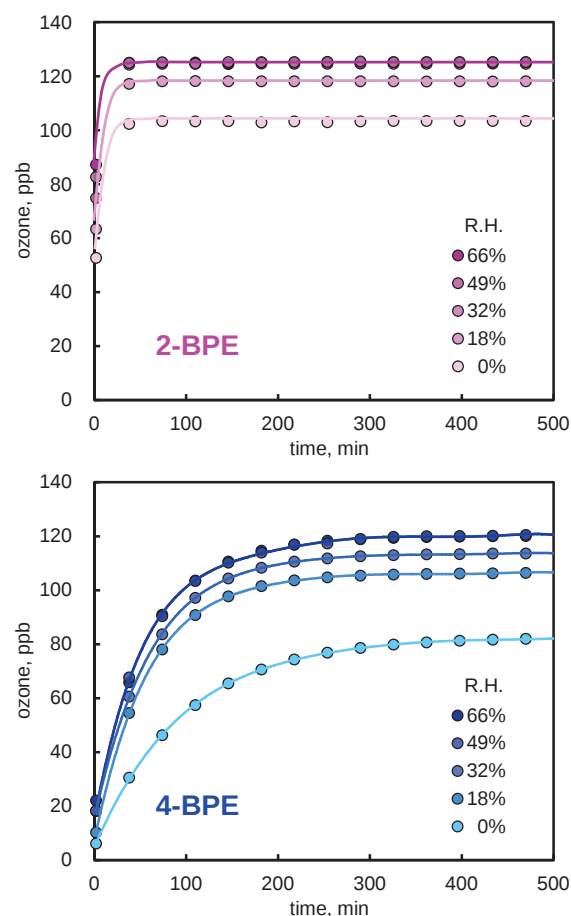


Figure 4. Changes in reactivities of ozone with 2-BPE or ozone with 4-BPE at a wide range of relative humidities. Reproduced with permission from Figure 5 in Ref. ^[5]

実際の空気の測定

BPE-DNPH カートリッジ法と DNPH カートリッジ法を用いて、環境大気を 100 mL/min の流量で 24 時間同時捕集した時のクロマトグラムを **Figure 5** に示す。なお、HPLC の分析条件は **Table 1** の通りで、この分析条件により C1 ～ C10 までのカルボニル化合物を分析することが可能である。

Table 1. HPLC conditions

HPLC	Prominence LC-20, Shimadzu,
Column	Ascentis RP-Amide, 3 μ m particle size, 150 mm $\times$ 3 mm i.d. column (Supelco Inc)
Column temperature	35°C
Mobile phase	A: acetonitrile / water (50 / 50 v/v) containing 10 mmol/L ammonium acetate B: acetonitrile / water (80 / 20 v/v)
Gradient program	100% A for 5 min, followed by a linear gradient from 100 % A to 100 % B in 50 min and then held for 10 min.
Flow rate	0.8 mL/min
Injection volume	10 μ L

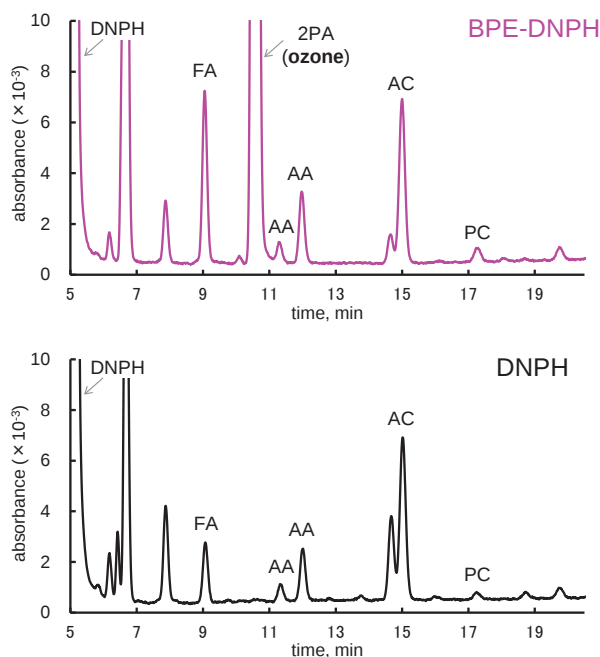


Figure 5. HPLC chromatograms of the eluate solution from BPE-DNPH cartridge (upper panel) and DNPH cartridge (lower panel). FA, formaldehyde-DNPhydrazone; AA, acetaldehyde-DNPhydrazone; AC, acetone-DNPhydrazone; PA, propanal-DNPhydrazone

BPE-DNPH 法で分析したホルムアルデヒド (FA) とアセトアルデヒド (AA) のピークは、いずれも DNPH 法より高い。DNPH 法は KI オゾンスクラバーを付けなかったため、これらの物質はオゾンで分解したことが考えられる。BPE-DNPH では 2PA の大きなピークが検出されているが、これはオゾンと BPE が反応して生成した物質である。FA と AA の間に検出されるが、**Table 1** の条件で分析することにより、他のピークと完全に分離することができる。

実際の環境大気を分析した時の BPE-DNPH カートリッジ法とオゾン計の比較を **Figure 6** に示す。なお、BPE は 2-BPE を用い、千葉市内の大気汚染常時監視測定局舎 (AMS) の大気導入口に設置し、24 時間捕集を行った比較結果である。なお、大気濃度は (1) 式から求めることができる。

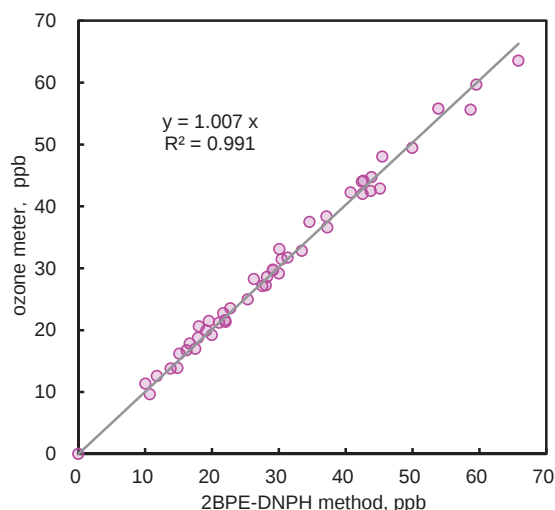


Figure 6. Relationship between the 2-BPE/DNPH method and the ozone auto analyzer in Air Monitoring Station (AMS). Reproduced with permission from Figure 6 in Ref. [5]

$$\text{ozone}(\text{mg}/\text{m}^3) = \frac{[2\text{PA}] \times [M]}{2} \times \frac{1}{R} \times \frac{1}{V} \quad (1)$$

$$\text{ozone}(\text{ppb}) = \frac{[2\text{PA}] \times [0.082 \times (273 + t)]}{2} \times \frac{1}{R} \times \frac{1}{V} \quad (2)$$

2PA: HPLC による 2PA の分析値 (μ mol)

M: オゾンの分子量 (g/mol)

R: 2BPE の反応係数 (0.84)

V: 大気吸引量 (m^3)

t: 気温 ($^{\circ}\text{C}$)

BPE-DNPH カートリッジ法と大気汚染常時監視測定局舎のオゾン計の値はよく一致している。**Table 2** に従来のオゾンスクラバーとしてヨウ化カリウムを用いた DNPH カートリッジ法と BPE-DNPH カートリッジ法で測定したホルムアルデヒド、アセトアルデヒドの値を示す。大気汚染常時監視測定局舎のオゾン計の濃度は 1 時間値の 24 時間平均値であるが、最小値と最大値の差が大きく、一日の中で大きく変動した。それにもかかわらず、BPE-DNPH カートリッジの測定値とオゾン系の値はよく一致していることから、BPE-DNPH カートリッジ法は正確に 24 時間平均濃度を測定できることが分かる。

比較的高湿度のとき (March 1-2, April 25-26)、BPE-DNPH カートリッジ法によるホルムアルデヒドとアセトアルデヒド濃度は KI-DNPH 法より高い値を示したが、これは高湿度により KI が湿潤し、アルデヒド類をトラップしたことが考えられる。一方、BPE-DNPH カートリッジは湿度の影響を受けないので、安定した測定値が得られている。

Table 2. Concentrations of ozone and carbonyls measured in ambient air collected by a DNPH cartridge coupled with a KI ozone scrubber (KI) and a 2-BPE/DNPH cartridge (2BPE). Air collections were performed simultaneously at Chiba City's Air Monitoring Station (AMS), January - May 2009. Concentration units are in $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Reproduced with permission from Table 1 in Ref. [5]

date (2009)	weather conditions			2-BPE/DNPH, KI/DNPH						AMS	
	weather	Temp.	RH	formaldehyde		acetaldehyde		ozone	Mean	ozone	
		°C	%	2BPE	KI	2BPE	KI	2BPE		min.	max.
Jan 10-11	fair/fair	4.6	46	1.8	n.a.	1.7	n.a.	63	63	4	84
Jan 11-12	fair/fair	3.9	53	4.1	n.a.	3.2	n.a.	33	38	4	86
Jan 17-18	fair/fair	6.3	60	3.3	n.a.	3.1	n.a.	30	28	2	80
Jan 24-25	clouds/clouds	3.4	85	1.5	n.a.	1.4	n.a.	35	36	4	64
Feb 7-8	fair/fair	7.5	62	3.0	n.a.	4.2	n.a.	38	41	4	84
Feb 14-15	fair/fair	16	63	2.8	n.a.	2.9	n.a.	62	66	26	130
Feb 21-22	fair/fair	5.3	44	2.2	2.1	2.0	2.0	39	43	4	100
Feb 28-1	clouds/clouds	7.3	61	1.6	1.3	1.5	1.3	57	57	12	88
Mar 1-2	rain/clouds	6.1	86	1.5	0.9	1.5	1.0	43	46	4	88
Mar 20-21	clouds/fair	7.0	53	1.8	1.5	1.9	1.9	61	63	8	100
Mar 21-22	fair/clouds	14	58	1.6	1.5	1.2	1.3	85	88	58	100
Mar 28-29	clouds/fair	7.3	54	2.0	1.9	1.8	1.9	53	57	4	100
Apr 4-5	clouds/rain	14	71	2.4	n.a.	2.2	n.a.	84	85	14	130
Apr 11-12	fair/clouds	18	64	3.7	3.4	2.5	2.3	110	120	36	180
Apr 18-19	clouds/clouds	13	64	3.1	3.0	2.2	2.0	69	75	16	160
Apr 25-26	rain/fair	13	97	2.1	0.9	1.9	0.8	74	77	36	110
May 2-3	fair/clouds	20	63	2.8	2.6	2.8	2.7	130	130	88	160
May 3-4	clouds/clouds	20	64	2.1	1.9	1.4	0.9	120	110	96	130
May 4-5	clouds/rain	20	67	2.1	1.8	1.5	1.2	90	86	42	120
May 9-10	fair/fair	22	71	3.4	3.0	2.6	2.3	85	88	58	130
May 23-24	clouds/rain	23	68	3.6	3.4	3.2	2.8	91	96	38	110
May 30-31	rain/clouds	19	92	1.8	1.0	1.2	0.5	46	47	28	64

n.a.: not available

結論

BPE-DNPH カートリッジ法はオゾンとカルボニル化合物を同時に分析することが可能である。また、BPE-DNPH カートリッジの前段のBPEはオゾンスクラバーとしても機能するので、ヨウ化カリウム等の余計なオゾンスクラバーを取り付ける必要がない。さらに、湿度の影響を受けないことから、ヨウ化カリウムを利用したオゾンスクラバーでは測定困難な高湿度の時でも測定が可能である。

[1] O.L. Brady, and G.V. Elsmie, *Analyst*, **1926**, 51, 77.

[2] R.R. Arnts, and S.B. Tejada, *Environ. Sci. Technol.*, **1989**, 23, 1428.

[3] Uchiyama, S. et al. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1229, 293

[4] Uchiyama, S. et al. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 3285.

[5] Uchiyama, S. et al. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 6552.

[6] Uchiyama, S. et al. *Analytica Chimica. Acta* **2011**, 691, 119.

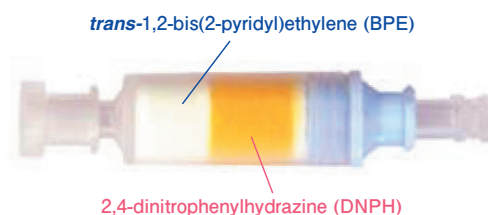
[7] Uchiyama, S. et al. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1116, 165.

BPE-DNPH カートリッジ (アクティブサンプラー)

アルデヒドなどのカルボニル化合物とオゾンと同時に捕集
オゾンスクラバーの必要がないため、ヨウ化カリウムを利用した
オゾンスクラバーでは測定困難な高湿度の時でも測定が可能
BPE-DNPH カートリッジの詳細はこちら sigma.com/bpednph-jp

NEW! DSD-BPE/DNPH (パッシブサンプラー)

ポンプなどの動力を必要とせず、誰にでも簡単にサンプリングが可能
子供の健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) でも使用されています。
DSD-BPE/DNPH の詳細はこちら sigma.com/dsd-bpednph-jp





大気中微小粒子（PM2.5）の測定に シリアル番号で楽々管理 PM2.5 エアモニタリング用フィルター

- ポリプロピレン製サポートリング付きで耐久性・ハンドリング性が向上
- 固有シリアル番号で分析作業の効率化
- 接着剤を不使用のヒートシール方式を採用



取り出しが簡単で作業時間が短縮できます。

製品の詳細はこちら

www.merckmillipore.jp/pollutiontesting

メルク株式会社

ライフサイエンス バイオサイエンス営業部 アナリティクスセールスグループ

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp

お問合せ ▶ bioinfo@merckgroup.com Tel: 0120-633-358 Fax: 03-5434-4859



11種のイソシアネートの捕集および5分間のUHPLC分析

ASSET™ EZ4-NCO サンプラーと Titan™ C18 UHPLC カラム

イソシアネートは非常に反応性の高い低分子化合物で、柔軟で硬質な発泡体、繊維、塗装やニスなどのコーティングおよびエラストマーの製造に広く使用されています。イソシアネートを含むスプレー式ポリウレタン製品は、トラックの荷台、トレーラー、ボート、基礎、甲板などでセメント、木材、ガラスファイバー、鉄やアルミなどを保護するために幅広く使われています。

イソシアネートは、目、消化管や呼吸器の粘膜に対して強い刺激性を持っており、作業者に感受性を与え、再度それに曝露したときにひどい喘息発作を引き起こします。イソシアネートへの曝露を防ぐことが、この健康被害をなくす最重要なステップです。閉鎖された環境では換気などの手法がイソシアネートの曝露を抑える基本的な方法です。使用者の隔離や、保護服や保護具などその他の方法が必要になることもあります。また、作業者の健康には、曝露量のモニタリングも同じく重要です。

労働安全衛生の支援のために、個別モニタリング用の簡単な捕集管と分析キットを開発しました。イソシアネート捕集用 ASSET EZ4-NCO ドライサンプラー (図 1) は、現場で作業者が試薬を加えたり抽出したりする必要はなく、また特別な保存条件は一切必要ないので、作業者が安全に個別サンプリングを行えます。さらに、他の市販デバイスより低い検出限界能を有している、唯一のデバイスです。ASSET EZ4-NCO サンプリングデバイスは、イソシアネート類の di-n-butylamine (DBA) の誘導体化に基づくユニークなドライサンプラーで、DBA を染み込ませたデニューダとフィルターで構成されています。抽出物は、LC-MS/MS で分析します。この分析法は、他の方法では達成できない限界感度と低い検出限界を有しています。

このサンプラーには以下の利点があります。

- ・蒸気および微粒子、両方のイソシアネートに対する低い検出限界能
- ・5分から8時間までサンプリング可能
- ・迅速な誘導体化反応と安定した誘導体化物
- ・サンプリングの前と後で特別な保管は不要
- ・高キャパシティー
- ・不干涉
- ・破過なし
- ・作業現場での抽出不要

考察

図 2 に 11 種の汎用イソシアネートのクロマトグラムを示します。このイソシアネートの混合溶液は標準品として市販しています (カタログ番号 40141-U)。グラジエント移動相には LC-MS に適した水、アセトニトリルおよびギ酸からなる溶媒および緩衝液を用います。すべてのピークはきちんと分離されており、ベースラインも良好です。ピーク形状はテーリングも少なく、左右対称です。図 2 で使用した

Wayne K. Way, HPLC/GC Market Segment Manager wayne.way@sial.com

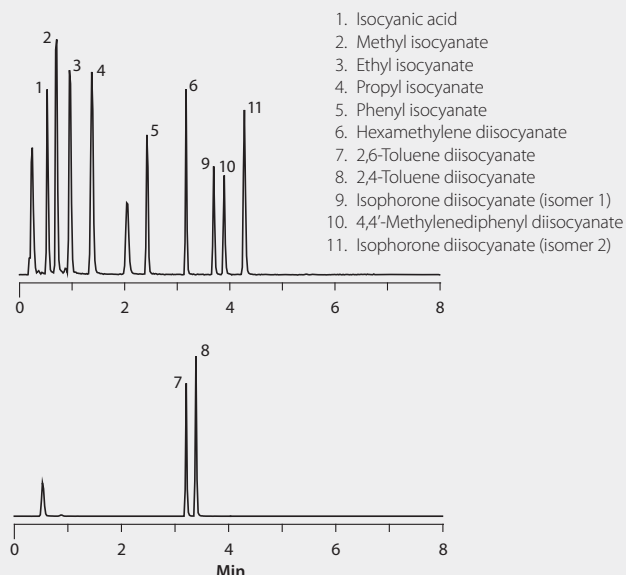
5 cm × 2.1 mm Titan UHPLC カラム (カタログ番号 577122-U) は、弊社 Supelco ブランドの新製品です。Titan UHPLC カラムは安価で高品質な UHPLC 用カラムです。

図 1 ASSET イソシアネートフィールドサンプラーの外観写真



図 2 MS 検出した 11 種の汎用イソシアネートのクロマトグラム

カラム: Titan C18, 5 cm × 2.1 mm, 1.9 μm (577122-U)
 移動相: (A) 0.05% ギ酸、5:95 アセトニトリル:水中
 (B) 0.05% ギ酸、95:5 アセトニトリル:水中
 流速: 0.5 mL/min
 圧力: 270 bar
 カラム温度: 30°C
 検出器: MS, ESI (+), MRM
 注入量: 2 μL
 試料: アセトニトリル中のイソシアネート、0.06 μg/mL



ASSET フィールドサンプラーに関するより詳しい情報は、sigma-aldrich.com/asset をご覧ください。
 Titan UHPLC に関するより詳しい情報は、sigma-aldrich.com/titan-jp をご覧ください。

新製品：イソシアネートの定性、定量のための認証標準物質

重水素化体、イソシアネート誘導体

1984年にボパールで起こったメチルイソシアネートが大気中に漏れ出し数千人が死亡した事故以降、空気中のイソシアネート類の分析および定量について改めて関心が高まっています。イソシアネート類は、ポリウレタンフォーム、コーティングおよび接着剤の製造で主に使われています。ポリイソシアネートと多価アルコール間の反応が熱によって進み、その結果、ポリイソシアネートは蒸発して空気中に放出され、呼吸により人体に入ります。人体に入ると、イソシアネートはグルタチオンと反応してチオエーテル結合を形成し、体中を移動することが可能になります。イソシアネート曝露の急性中毒は、軽度な目の痛みおよび咳から胃痛および過換気になります。しかし、高濃度、あるいは低濃度でも長期間イソシアネート類に曝露されると、脳浮腫、腎尿細管壊死、肝臓の脂肪変性または壊死性腸炎によって死亡する可能性もあります。

R-N=C=O 官能基を含む有機化合物であれば、すべてイソシアネート類に分類されます。イソシアネート類はモノマーとしても存在できますが、独特な「R」基によって結合することの多いポリマーとしても存在可能です。表1は、ジ-n-ブチルアミン (DBA) 誘導体として一般的なイソシアネートモノマーの構造、正式名称および略称を示しています。

Supelco® が製造したイソシアネートの分析用標準物質は DBA 誘導体の形であるとともに、これらの重水素化体も内部標準として利用できます。イソシアネート類は保存期間が短く、水溶液中で不安定であり、クロマトグラフィーの良い結果が得られません。水性溶媒による加水分解で、イソシアネート類は第一級アミンおよび第二級アミンに変換され、それはクロマトグラム上で劣化物のピークとして現れます。Supelco の標準物質が DBA によって誘導体化されているのはこのためです。また、誘導体化されたイソシアネートスタンダードは、Supelco の ASSET™ EZ4-NCO Dry サンプラーにも使用できます。Supelco は、大気汚染モニタリング用に誘導体化されたイソシアネート標準物質をこのレベルで取り揃えている唯一の会社です。

2013年6月20日、米国労働安全衛生局 (OSHA) は、職場のイソシアネート曝露に関して3年間効力を持つ国家重点計画 (NEP) を施行しました。この期間中、労働者のイソシアネート類への曝露がモニターされ、イソシアネート類への曝露を軽減する方法について議論されます。空気試料中のイソシアネート類を定量する現メソッドで用いる標準物質は、DBA で誘導体化されたイソシアネート類より不安定な、1,2-PP および MAP で誘導体化された標準物質です。

Cory Muraco, R&D Scientist at Supelco cory.muraco@sial.com
Alok Kumar, Principal R&D Scientist at Supelco alok.kumar@sial.com

Supelco の ASSET EZ4-NCO Dry サンプラーを用いて空気試料を捕集し、Supelco のイソシアネート標準物質を使用して、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS) によって、試料中のイソシアネート類の濃度を信頼性高く定量することが可能です。Supelco の標準物質は、空気中の有機窒素化合物の定量に関する国際的な方法 (ISO 17734-1) を遵守しています。

単一成分溶液を提供する他に、Supelco は1回のテストで複数のイソシアネート類を分析するために、多成分混合物とオリゴマーも提供しています。そのような標準物質の一例 (CRM40569) を図1に示します。

DBA / イソシアネートの分析用標準物質はすべて、ISO/IEC 17025 および ISO Guide 34 の要求事項を満たした認証標準物質 (CRM) です。標準物質は、LC-CLND を用いて検証され、濃度は、米国国立標準技術研究所 (NIST) によって製造された尿素標準物質と比較して定量されました。イソシアネートモノマーの混合物もカスタムメイドで製造可能です。分析証明書は、各製品と共に出荷されます。イソシアネート CRM の最新のリストは、sigma-aldrich.com/crm をご覧ください。

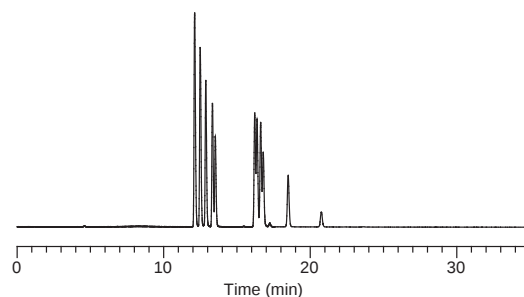


図1 LC-CLND (液体クロマトグラフィー化学発光窒素検出) で分析した CRM40569 のクロマトグラム。
カラム: Ascentis® Express-C18 (15 cm × 4.6 mm, 2.7 μm)
移動相のプロフィール: 0分 40:60% メタノール: 水、3分 70:30%、5分 90:10%、31分 40:60%、温度: 50°C
注入量: 5 μL
溶出順序: ICA-DBA、MIC-DBA、EIC-DBA、PIC-DBA、PHI-DBA、1,6-HDI-DBA、2,4-TDI-DBA、2,6-TDI-DBA、4,4'-MDI-DBA、IPDI-DBA Isomer 1、IPDI-DBA Isomer 2

Structure	Name
	Isocyanic acid-di-n-butylamine (ICA-DBA)
	Methyl isocyanate-di-n-butylamine (MIC-DBA)
	Ethyl isocyanate-di-n-butylamine (EIC-DBA)
	Propyl isocyanate-di-n-butylamine (PIC-DBA)
	Phenyl isocyanate-di-n-butylamine (PHI-DBA)
	Hexamethylene diisocyanate-di-n-butylamine (1,6-HDI-DBA)
	2,4-Toluene-diisocyanate-di-n-butylamine (2,4-TDI-DBA)
	2,6-Toluene-diisocyanate-di-n-butylamine (2,6-TDI-DBA)

Cat. No.	Description	Package Size
CRM40609	4,4'-HMDI-2(di-n-butyl amine) Solution, 100 µg/mL in Methanol	1 x 1 mL
CRM40612	4,4'-HMDI-2(di-n-butyl amine-d9) Solution, 100 µg/mL in Methanol	1 x 1 mL
CRM40613	m-TMX-diisocyanate-2(di-n-butylamine) Solution, 100 µg/mL in Methanol	1 x 1 mL
CRM40614	m-TMX-diisocyanate-2(di-n-butylamine-d9) Solution, 100 µg/mL in Methanol	1 x 1 mL

Table Single Component CRMs

Cat. No.	Description	Quantity
5027-U	ASSET EZ4-NCO Dry Sampler	10
5028-U	ASSET EZ4-NCO Dry Sampler	50
5047-U	Sample Kit Includes 2 samplers, 1 calibration fitting, and 2 tube adaptors	2

Table ASSET™ Sampler

Structure	Name
	4,4'-Methylenediphenyl diisocyanate-di-n-butylamine (4,4'-MDI-DBA)
	Isophorone diisocyanate-di-n-butylamine (isomers 1 and 2) (IPDI1/2-DBA)
	4,4'-Methylene dicyclohexyldiisocyanate-di-n-butylamine (4,4'-HMDI-DBA)
	m-Tetramethylxylene diisocyanate-di-n-butylamine (m-TMXDI-DBA)

Table 1 Structure of Supelco® Isocyanate DBA Derivatives

Cat. No.	Description	Package Size
CRM40589	HDI-DBA Oligomers Standard Varied Concentration in Methanol HDI-Monomer di-n-butylamine HDI-Uretdione di-n-butylamine	1 x 1 mL HDI-Biuret di-n-butylamine HDI-Isocyanurate di-n-butylamine
CRM40590	HDI-DBA-d9 Oligomers Standard Varied Concentration in Methanol HDI-Monomer di-n-butylamine-d9 HDI-Uretdione di-n-butylamine-d9	1 x 1 mL HDI-Biuret di-n-butylamine-d9 HDI-Isocyanurate di-n-butylamine-d9
CRM40605	IPDI-DBA Oligomers Standard Varied Concentration in Methanol IPDI-Monomer di-n-butylamine (Isomer 1) IPDI-Monomer di-n-butylamine (Isomer 2)	1 x 1 mL IPDI isocyanurate di-n-butylamine (Oligomers)
CRM40606	IPDI-DBA-d9 Oligomers Standard Varied Concentration in Methanol IPDI-Monomer di-n-butylamine-d9 (Isomer 1) IPDI-Monomer di-n-butylamine-d9 (Isomer 2)	1 x 1 mL IPDI-Isocyanurate di-n-butylamine-d9 (Oligomers)
CRM40603	MDI-DBA Oligomers Standard Varied Concentration in Methanol 4,4'-MDI monomer di-n-butylamine 2,4'-MDI monomer di-n-butylamine-d9	1 x 1 mL MDI trimer di-n-butylamine MDI tetramers di-n-butylamine
CRM40604	MDI-DBA-d9 Oligomers Standard Varied Concentration in Methanol 4,4'-MDI monomer di-n-butylamine-d9 2,4'-MDI monomer di-n-butylamine-d9	1 x 1 mL MDI-trimer di-n-butylamine-d9 MDI-tetramers di-n-butylamine-d9
CRM40569	DBA Isocyanate Monomers Mix Varied Concentration in Acetone ICA Monomer di-n-butylamine MIC Monomer di-n-butylamine EIC Monomer di-n-butylamine PIC Monomer di-n-butylamine PHI Monomer di-n-butylamine IPDI Isomer 2 di-n-butylamine	1 x 1 mL 1,6-HDI Monomer di-n-butylamine 2,4-TDI Monomer di-n-butylamine 2,6-TDI Monomer di-n-butylamine 4,4'-MDI Monomer di-n-butylamine IPDI Isomer 1 di-n-butylamine
CRM40570	DBA-d9 Monomers Internal Standard Mix Varied Concentration in Acetone ICA Monomer di-n-butylamine-d9 MIC Monomer di-n-butylamine-d9 EIC Monomer di-n-butylamine-d9 PIC Monomer di-n-butylamine-d9 PHI Monomer di-n-butylamine-d9 IPDI Isomer 2 di-n-butylamine-d9	1 x 1 mL 1,6-HDI Monomer di-n-butylamine-d9 2,4-TDI Monomer di-n-butylamine-d9 2,6-TDI Monomer di-n-butylamine-d9 4,4'-MDI Monomer di-n-butylamine-d9 IPDI Isomer 1 di-n-butylamine-d9

MERCK

Just prove it. spectroquant® prove

多検体・多項目のスクリーニングに 最適な分光光度計

廃水処理や飲料水・飲料、工業用水を分析する際に便利な分光光度計 Spectroquant Prove を開発しました。
シンプルな操作、安全なデータ管理、ヘビーユースに適した耐久性を併せ持ち、専用試薬を用いた広範な測定項目が
予めプログラムされているため水質分析がスムーズに行えます。



化学分析用テストキット関連製品の最新情報はこちら
www.merckmillipore.jp/test-kits

メルク株式会社

ライフサイエンス バイオサイエンス営業部 アナリティクスセールスグループ

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp

お問合せ ▶ bioinfo@merckgroup.com Tel: 0120-633-358 Fax: 03-5434-4859



ハウレンソウおよびフレッシュオレガノ中における平面構造を有する農薬の回収率の改善

QuEChERS 用 Supel™ QuE Verde

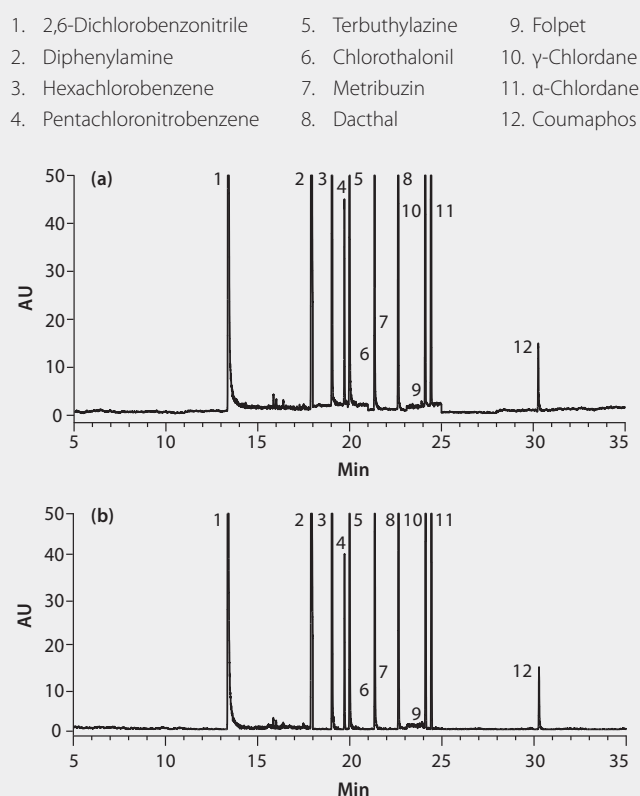
QuEChERS 法の新しい精製方法として改良した新しいグラファイトカーボンブラック (GCB) を用い、さらに、Z-Sep+、一級 - 二級アミン (PSA) を組み合わせ、Supel QuE Verdeを開発しました。この充填剤の組み合わせは、現行の QuEChERS 法用の充填剤より平面構造を有する農薬の回収率が高く、かつクロロフィル含量の高いマトリックスでの色素除去を十分に行う事ができます。本稿では、ハウレンソウおよびオレガノ抽出物からいくつかの平面構造を有する農薬を GC/MS で分析した例を紹介します。

実験

QuEChERS 法の抽出および精製は、AOAC International Official Method 2007.01¹ に概述されたのと同様の方法で行いました。有機ハウレンソウと生のオレガノをアセトニトリルで抽出しました。図 1 に概述した手順は、2 mL の試験管を用いた抽出およびクリーンアップ手順をすべて記述したものです。アセトニトリル抽出物には、主に平面構造を持つ農薬の混合物を濃度が 50 ng/mL となるよう添加しました。抽出は三重に行い最終抽出物は図 1 に示す GC 条件で GC/MS で分析しました。

図 1 Supel QuE Verde でクリーンアップした後の (a) ハウレンソウ抽出物、(b) フレッシュオレガノ抽出物における平面構造を有する農薬のクロマトグラム

試料/マトリックス: (a) 均一化された有機ハウレンソウ、10 g
(b) 均一化された生オレガノ、10 g
抽出用チューブ: Supel QuE Acetate 抽出用チューブ (55234-U)
抽出プロセス: 均一化ハウレンソウまたはオレガノを 50 mL の遠心管 (55248-U) に入れ 10 mL のアセトニトリルを添加
Supel QuE Acetate 抽出チューブの中身を追加
自動振盪器で 2 分間 2,500 rpm で振盪
5 分間 3,500 rpm で遠心分離、上澄み液にアセトニトリル中の平面構造を有する農薬の混合物を 50 ng/mL になるよう添加
精製用チューブ: Supel QuE Verde、2 mL (55447-U)
精製プロセス: 1 mL の上澄み液を Supel QuE Verde 精製チューブに移す。自動振盪器で 2 分間 2,500 rpm で振盪、3,000 rpm で 3 分間遠心分離し、GC/MS 分析用に茶褐色の低吸着バイアルに入れる。
カラム: SLB®-5ms, 20 m × 0.18 mm 内径、0.18 μm (28564-U)
オープン: 60°C (1 分)、8°C/min で 300°C まで (10 分)
注入温度: 250°C
検出器: MSD、イオンモード (SIM) 選択
MSD 界面: 325°C
キャリアガス: ヘリウム、0.7 mL/min 定常
注入: 1 μL、スプリットレス (0.75 分にスプリッター開放)
ライナー: 2.3 mm 内径、スプリット/スプリットレス型、シングルテーパーウル充填 FocusLiner™ デザイン (2879901-U)



結果と考察

農薬を添加していない抽出サンプルをフルスキャンモードで GC/MS 分析し、バックグラウンドを確認しました。続いて、抽出物に農薬をスパイクしたサンプルを選択イオンモード (SIM) で分析したところ、Supel™ QuE Verde での精製は、混合物に含まれる 12 種の平面構造を持つ残留農薬をすべて定性、定量できました (図 1)。

Supel QuE Verde での精製後には、ホウレンソウおよびオレガノの抽出物から緑色の色素の大半が除去されていました。全クロロフィル除去率は、664 nm、647 nm および 630 nm での吸光度を測定してスペクトロメーターで確認し、精製後の抽出物と各サンプルの最初のアセトニトリル抽出物とを比較することで行いました。すべての場合でクロロフィル除去率は 95% 以上でした。

農薬を 50 ng/mL 添加したホウレンソウおよびオレガノ抽出物を 2 mL Supel QuE Verde 精製用チューブで精製した場合の回収率を図 2 にまとめました。回収率は、両方のマトリックスで試験したすべての平面構造を持つ農薬について 70 ~ 120% の範囲にありました。再現性は、添加したレプリカについて $n=3$ で %RSD で決定し、いずれのマトリックスでも大変良好でした。%RSD 値として 20% であったクロロタロニルを除いて、すべての農薬で %RSD は 5% 未満でした。

結論

食品分析における分析方法に必要な性能は、一般的に農薬の回収率で 70 ~ 120%、クロロフィル除去率で 95% 以上とされています。GCB では表面の平面構造と平面構造を持つ農薬との相互作用が強くなるので、色素除去と分析物回収率との間で妥協する必要があります。これはヘキサクロロベンゼンおよびクロロタロニルのような

最も平面な農薬の場合に顕著です。Supel QuE Verde は、新しく改良したカーボンとジルコニアコート化シリカゲル (Z-Sep+) を組み合わせており、平面構造を持つ農薬の回収率と色素除去のバランスが最適化されています。本稿の例で示すように、Supel QuE Verde を用いた QuEChERS 精製を GC/MS 分析の前処理で用いれば、平面構造を持つ農薬の回収率を維持しつつ、ホウレンソウおよびオレガノからクロロフィルを除去できます。

Reference

1. AOAC Official Method 2007.01, Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

Featured Products

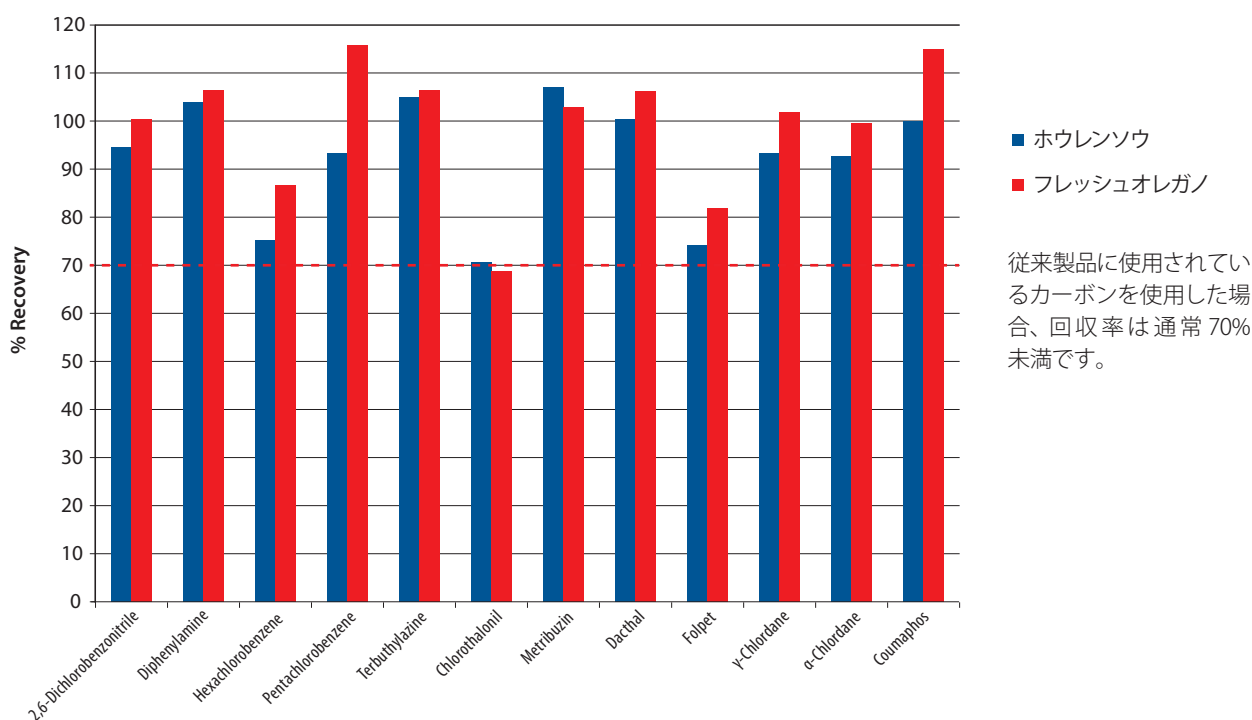
Description	Cat. No.
Supel QuE QuEChERS Products	
Verde Cleanup Tube, 2 mL, 100 ea	55447-U
Verde Cleanup Tube, 15 mL, 50 ea	55442-U
Acetate Extraction Tube, 12 mL, 50 ea	55234-U
Empty Centrifuge Tube, 50 mL, 50 ea	55248-U
Columns	
SLB-5ms Capillary GC Column, 20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 μ m	28564-U
Accessories	
Inlet Liner, Split/Splitless Type, Single Taper FocusLiner Design (wool packed)	2879901-U

Related Information

サンプルのお問い合わせはこちら

sigma.com/dspe-jp

図 2 ホウレンソウおよびオレガノ抽出物に農薬を 50 ng/mL で添加し、2 mL Supel QuE Verde 管で精製したときの平均回収率% ($n=3$)。



オリーブオイル中における PAH の検出と、新規 SPE カートリッジを用いた回収率の改善およびバックグラウンドの低下

背景

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、自然界でのプロセスあるいは石油精製および化石燃料の不完全燃焼などの人工プロセスの結果として環境中に見られる化合物の一群です。ベンゾ [a] ピレンなど、実験動物で発がん性の性質を持つことがわかっているものもあります¹。PAH は、汚染した表面への直接接触、汚染空気 (例えばタバコの煙) の吸入および食品を通して人体へ進入する可能性があります。PAH は親油性なので、オリーブオイルなどの食用油に簡単に移行することができます。オリーブおよび/またはオリーブベースの製品の汚染は、成長、収穫、貯蔵および製造の間に工業プロセスでの曝露あるいは自動車排ガスへの曝露などで起こる可能性があります²。

スペインとイタリアは、オリーブオイルの最大の消費国で、これに米国が続きます³。オリーブオイルは、心臓病、がん、アルツハイマー病およびパーキンソン病のリスクの減少に関連して研究されている「地中海食」の重要な部分を占めています⁴。これらの化合物への曝露に対する懸念から、欧州連合の数カ国で、オリーブオイル中の PAH 含量の基準値を設けることになりました。2011 年に、欧州連合委員会規制 No. 835/2011 は、食用油を含む様々な食品材料における上限を設定しました。脂肪 (カカオバターとココナツオイルを除く) における上限は、ベンゾ [a] ピレン単体では 2 ng/g、ベンゾ [a] ピレン、ベンゾ [b] フルオランテン、クリセンおよびベンゾ [a] アントラセンの混合では 10 ng/g です⁵。

オリーブオイル中の PAH の分析は、親油性である PAH を脂質の多いマトリックスから分離するのが難しいため、容易ではありません。従来の抽出および精製の方法は、液液抽出の後、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) やオープンカラムでの順相 SPE を行うものです。GPC は非常に優れたクリーンアップ技術ですが、特別な装置が必要で、多くの場合サンプル調製に余計に 1 日必要になります。順相 SPE を用いた抽出とクリーンアップには、大型のガラスカラムが必要ですが、それは高価で、大量の溶媒が必要です。本研究では、オリーブオイルからの PAH の抽出と精製のための新しい手法を評価しました。開発した方法は、Supelclean™ EZ-POP NP を用います。これは、二層式の固相抽出カラムで上部に Florisil®、下部に Z-Sep/C18 の混合物が充填されています。Florisil は、脂肪酸などの極性の官能性を持つ化合物を保持します。Z-Sep/C18 は、ルイス酸/塩基の相互作用 (Z-Sep) と疎水性相互作用 (C18) によって脂肪成分を保持する働きを持ちます。このようにして脂質が優先的に保持される一方で、PAH はアセトニトリルとともに溶出されます。そして、得られる抽出物は、HPLC/FLD または GC/MS で分析できます。

本研究では、PAH を添加したオリーブオイルからの PAH の抽出について、EZ-POP NP 法を従来のシリカゲル SPE 法と比較しました。GC/MS 分析によって検出されるバックグラウンドならびに回収率と再現性を、構造に 2 ~ 6 個の環を含む PAH について、2 つの技術で比較しました。

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

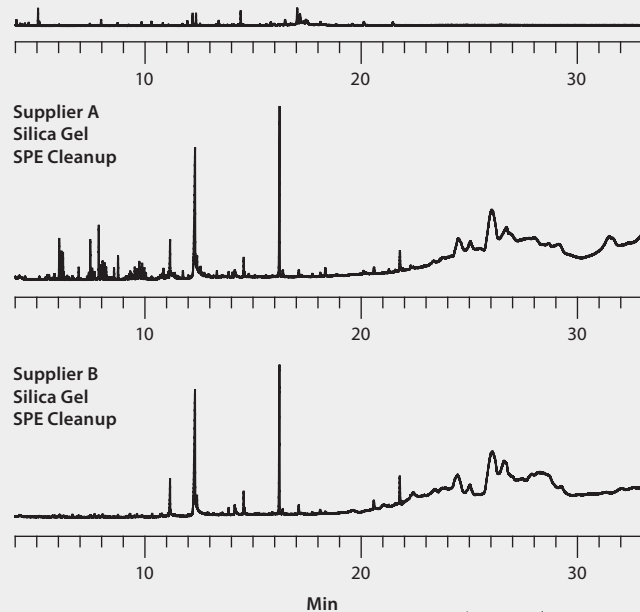
実験

エクストラライトオリーブオイルに 20 ng/g の PAH を添加し、分析の前に数日間静置しました。とりわけたサンプルを、EZ-POP NP SPE と 2 種の 5 g/20 mL シリカゲルカートリッジ上での順相 SPE を使って抽出しました。サンプル調製手順を表 1 に示します。分析は、図 1 に示す条件を用いた選択イオンモード (SIM) で GC/MS によって行いました。この条件は、特に 5 個および 6 個の環を持つ PAH の感度とピーク形に合わせて最適化したものです。定量には、添加されていないオリーブオイル抽出物で作成した五点校正曲線を用いました。

図 1a GC/MS Analysis of Olive Oil Extracts for PAH quantitation

カラム: SLB®-5ms, 20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 µm (28564-U)
 オープン: 60 °C (1 min.), 15 °C/min. to 250 °C, 8 °C/min. to 330 °C (7 min.)
 注入温度: 300 °C
 MS interface: 330 °C
 MS source temp: 250 °C
 MS: 200 °C
 注入: 1 µL, pulsed splitless (50 psi until 0.75 min, splitter open at 0.75 min.)
 キャリアガス: helium, 1 mL/min constant flow
 ライナー: 4 mm ID FocusLiner™ with taper and quartz wool
 GC/MS: Agilent® 7890/5975, selected ion mode (SIM)

図 1b Total Ion Chromatogram (TIC) of Extracts (same y-scale) for background analysis.



(continued on next page)

表 1 SPE 手順

	Silica Gel SPE, 5 g/20 mL	EZ-POP NP
Condition	20 mL of hexane (gravity)	10 mL of acetone (gravity), followed by drying at -10 to -15" Hg for 10 min.
Load	1 mL of 5 g oil diluted to final volume of 10 mL in hexane	0.5 mL of oil, weighed directly onto cartridge
Wash	3 mL of hexane:methylene chloride (70:30)	None
Elute	8 mL of hexane:methylene chloride (70:30)	15 mL of acetonitrile, applied in 2 x 7.5 mL volumes
Flow Rate	Gravity	Approx. 1 drop / second (using vacuum)
Concentration	Final volume = 1 mL, 40 °C under nitrogen	Final volume = 1 mL, 40 °C under nitrogen

結果および考察

オリーブオイル抽出物を、フルスキャンモードの GC/MS によって分析しました。両方の抽出物（同一の Y スケール）から生成されるトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図 1 で比較しました。EZ-POP NP と比較して、どちらのシリカゲル抽出物でも非常に高いバックグラウンドが観測されました。実際のサンプル分析のときには、シリカゲル抽出物中に存在した溶出の遅いバックグラウンドが GC/MS システムを汚染したため、除去するために強力な空焼きが必要でした。この大きなバックグラウンドのために、PAH ピークのうち最後に溶出する 6 種の保持時間にシフトが起こり、定性が難しくなりました。ブランド B のシリカゲルの場合、最後の内部標準（ペリレン- d_{12} ）は、検出することができませんでした。

回収率と再現性

各々の抽出から得られる平均回収率を図 2 に示します。エラーバーは、各々の $n = 3$ に対する再現性 (%RSD) を表します。全体として、回収率と再現性は、EZ-POP NP を用いた方がシリカゲルを用いた場合より上回っていました。前述のように、シリカゲルで調製した抽出物では、分子量の大きい PAH で、特異的なマトリックス効果の問題が見られました。さらに、高いバックグラウンドのため、分子量の小さい PAH の積分が困難で、回収率値に影響が出ました。運転を繰り返すと、シリカゲル抽出物中のいくつかの PAH の応答が低下しました。これは、GC システムの汚染によるものでした。対照的に、EZ-POP NP を用いて調製された抽出物ではこれらの問題はありませんでした。

低レベル PAH の検出

欧州連合委員会規則 835/2011 で示される 2 ng/g レベルでの PAH 検出のためにシングル四重極 GC/MS システムを使うためには、前に記載した方法にいくつかの修正を加える必要があります。具体的には、機器に注入する分析対象物の量を増やすために、最終体積が少量になるようサンプルを濃縮することが必要となる場合があります。オリーブオイル抽出物の別のセットを EZ-POP NP を使って調製しました。このセットには、欧州連合限度 2 ng/g のベンゾ [a] ピレンを添加しました。抽出は、抽出物を GC/MS 分析の前に最終体積 0.2 mL に濃縮したこと以外は表 1 に記載したのと同様に行いました。定量は、PAH を添加されていないオリーブオイル抽出物に PAH を添加して同じ最終体積に濃縮した校正曲線を使って行いました。

さらに、応答を増強するために、GC の運転条件に以下の軽微な変更を行いました。

- 4 mm I.D. ライナーをテーパー付き 2 mm I.D. FocusLiner™ に交換
- 1 μ L から 0.5 μ L への注入体積の減少

より小型の ID ライナーに代えることで、最も分子量の大きい PAH の応答を増強しました。注入体積の減少は、アセトニトリル注入から生じる気化体積がライナーの容量を上回らないようにするために必要でした。

得られた回収率を表 2 にまとめます。比較のために、前の実験の 20 ng/g で得られた回収率を含めます。低い添加レベルでのベンゾ [a] ピレンの回収率が、20 ng/g の添加の場合と同等でした。さらに、RSD 値は 17% で、再現性は許容できるレベルでした。

表 2 EZ-POP NP (%RSD) を用いた、添加されたオリーブオイルからのベンゾ [a] ピレン添加の回収率

	2 ng/g Spike Level, n=4	20 ng/g Spike Level, n=3
Benzo[a]pyrene	91 (17)	91 (20)

GC/MS 手法の耐久性

GC 分析では、注入口ライナーおよびカラムでの残査の蓄積、および検出器の汚染の結果として、検出感度の低下が起こるおそれがあります。使用する SPE 方法を許容レベルにするためには、GC または検出器を急速に汚染することのない抽出物を作製しなければなりません。EZ-POP NP を用いて生成したオリーブオイル抽出物の清浄度を、PAH 20 ng/g を添加した抽出物を GC/MS システムへ繰り返し注入し（合計 98 回）その絶対応答をモニターすることで評価しました。PAH への応答は 45 回の注入までかなり安定である (RSD < 10%) ことが判明しました。この点の後、応答は徐々に下落し、98 回の注入の後、応答の減少の合計は、ほぼ 20 ~ 30% の範囲でした (図 3)。しかし、最後の注入でも PAH 全種を容易に検出できました。この試験の終了後、ライナーを GC システムから取り外し観察したところ、認識できる残渣は見られませんでした (図 4)。

結論

Florisil® と Z-Sep/C18 混合物とを組み合わせた二層式 EZ-POP NP SPE カートリッジを使うことで、2 ~ 6 環の PAH をオリーブオイルから抽出することができました。用いた PAH では、得られる回収率と再現性はシリカゲルを用いた順相 SPE より優れており、抽出物はかなりきれいでした。欧州連合規制レベルの 2 ng/g ベンゾ [a] ピレンで示したように、低レベル分析も可能でした。EZ-POP NP 法はステップの数が最小限で済み、シリカゲル SPE より使用する溶媒が少なく、HPLC/FLD または GC/MS 分析に使えるアセトニトリル中に最終的な抽出物が得られます。GC/MS 分析の場合、シングル四重極 MS 測定器の分析に十分なクリーンアップができ、MS/MS 検出の必要も、GC システムのハードウェア修正の必要もありません。オリーブオイル抽出物の反復注入による耐久性テストでは、GC/MS システムを早期に汚染することはなく、全 98 回の分析後でもまだ容易に全 PAH を検出できました。

図2 シリカゲルおよび Supelclean™ EZ-POP NP SPE を用いてオリーブオイルから抽出した PAH の回収率および再現性 (n = 3)。20 ng/g の添加レベル

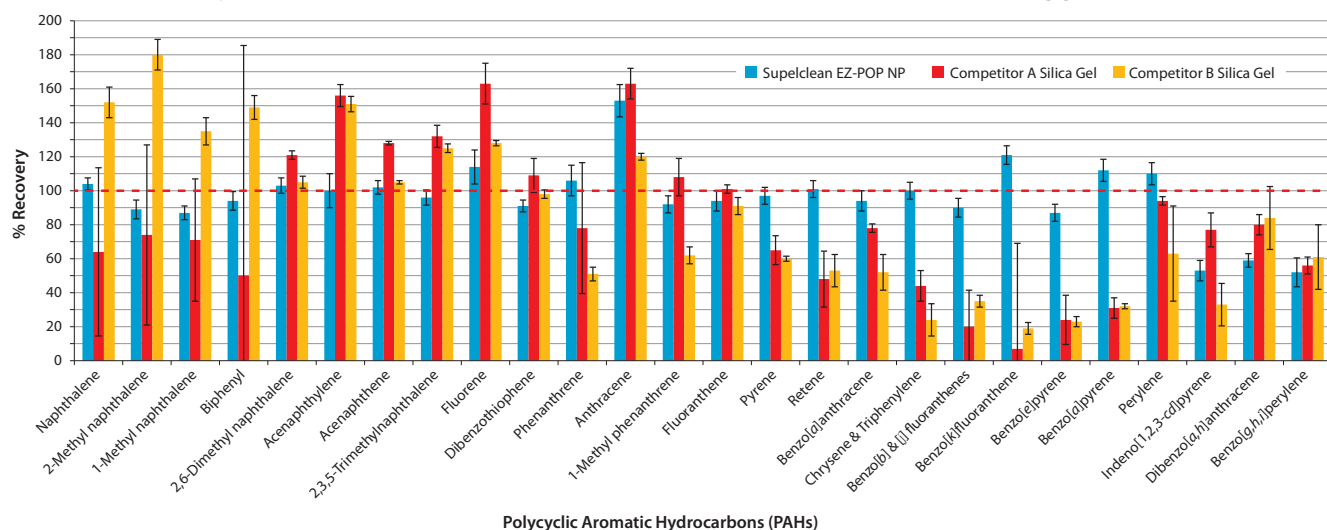


図3 Supelclean EZ-POP NP を用いて生成したオリーブオイル抽出物中の PAH の絶対的応答の、GC/MS システムへの 98 回の導入後の変化

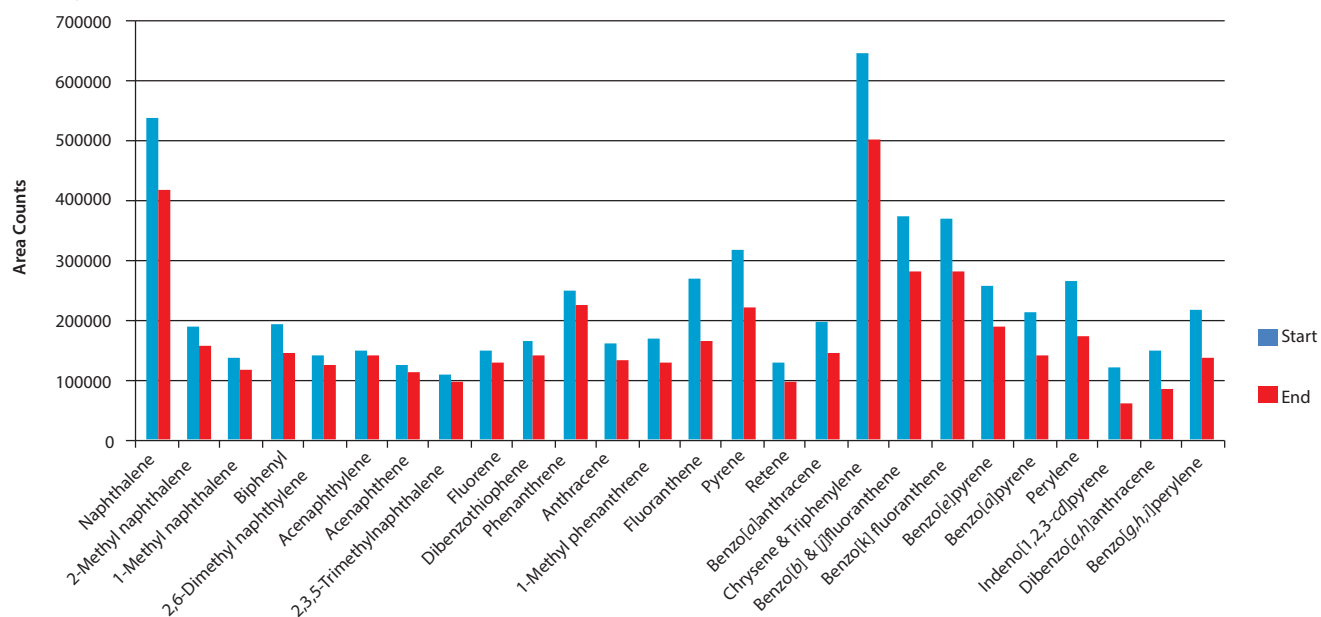
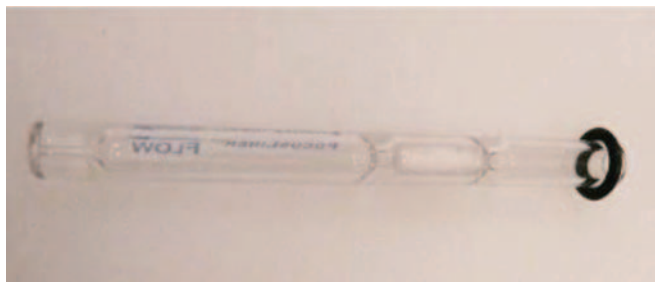


図 4 Supelclean™ EZ-POP NP を用いて調製したオリーブオイル抽出物による耐久性テスト後の GC 注入口ライナー



+ Featured Products

Description	Cat. No.
Supelclean SPE Cartridge	
EZ-POP NP, 12 mL, 20 ea	54341-U
SLB®-5ms Capillary GC Column	
20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 µm	28564-U
Analytical Standards	
Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix, TraceCERT® CRM – 2000 µg/mL each component in methylene chloride:benzene (1:1)	CRM48905
Naphthalene-d ₈ solution – 2000 µg/mL in methylene chloride	48715-U
Fluoranthene-d ₁₀ – 50 mg ampul	442843
Perylene-d ₁₂ solution – 2000 µg/mL in methylene chloride	48081

+ Related Information

Visit our "Food & Beverage Analysis" web portal at:
sigma-aldrich.com/food

Did you know...

脂質の多い試料の精製に！
新しい脂質除去剤 Z-SEPシリーズ (Z-SEP, Z-SEP+, Z-SEP/C18)
詳細はこちら **sigma.com/spe-jp**

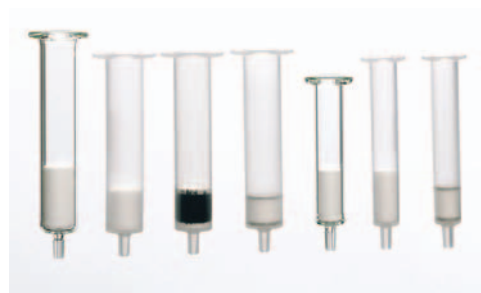
References

1. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, US EPA factsheet, January 2008, Office of Solid Waste, Washington DC. (epa.gov/osw)
2. Moret, S.; Conte, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *J. Chrom. A.* **2000**, 882, 245-253.
3. Global Olive Oil Market: Trends & Opportunities (2012-2017). Researchand Markets brochure. www.researchandmarkets.com/reports/2399367.
4. "Mediterranean Diet: A Heart-Healthy Eating Plan". mayoclinic.org (accessed 1/13/2014).
5. EU Commission Regulation No 835/2011; Official Journal of the European Union: August 20, **2011** (215), 4-8.
6. More S.; Conte, L. A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils. *J. Sep. Sci.* **2002**, 25, 96-100.

試してみませんか？ Supelco® の固相抽出カラム

汎用的な製品から弊社独自のユニークな製品まで
Supelco の固相抽出カラムは豊富なラインアップで
お客様のお悩みを解決いたします。

- *EZ-POP、ジルコニアコート化シリカゲル Z-SEP シリーズ
- *QuECHERS 法用チューブもご用意しています



この機会に是非お試しください。

製品の詳細はこちら >> **sigma.com/spe-jp**

無償サンプルのご依頼はこちらから >> **sigma.com/spe-sample-jp**

エッセンシャルオイル中の Carvone 光学異性体の解析

Astec® CHIRALDEX® G-TA キャピラリー GC カラムを用いて

Leonard M. Sidisky, R&D Manager len.sidisky@sial.comx

緒言

D-Carvone および L-Carvone は、全く異なる匂いを持つ光学異性体化合物です。これらの光学異性体化合物は特徴が全く異なります。D-Carvone は、キャラウェイシードエッセンシャルオイル中に見られる主成分でディルシードエッセンシャルオイルにも多く含まれます。L-Carvone は、スペアミントエッセンシャルオイル中に見られる主成分の1つです。Carvone の光学異性体を分離することは、容易ではなく、キラルキャピラリー GC カラムの利用が必要です。本研究では、キャラウェイシード、ディルシード、ネイティブスペアミントおよびスコッチスペアミントの各エッセンシャルオイル試料中の D-Carvone および L-Carvone 光学異性体を、Astec CHIRALDEX G-TA キャピラリー GC カラムを使用して分離しました。

Astec CHIRALDEX G-TA は、2,6-Di-o-pentyl-3-trifluoroacetyl で誘導体化した gamma cyclodextrin キャピラリー GC カラムの一種で、アルコール、ケトン、酸、アルデヒドやラクトンなど含酸素化合物に高い選択性を有しています。この固定相はキラル分離で重要なメカニズムの一つである表面相互作用を利用したものです。

実験

L 体を高濃度にした、D-Carvone と L-Carvone の混合物をまず Astec CHIRALDEX G-TA カラムで分析、これら化合物の溶出パターンを調べました。GC 条件は表 1 にまとめてあります。Carvone 光学異性体のピーク同定は、未希釈の D-Carvone および L-Carvone の単一成分をそれぞれ注入して行いました。

表 1 GC 条件

カラム:	Astec CHIRALDEX G-TA, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.12 µm (73033A)
昇温:	40 °C (1 min), 2 °C/min to 170 °C (15 min)
注入温度:	250 °C
検出器:	FID, 250 °C
キャリアガス:	helium, 25 cm/sec (set @ 110 °C)
注入:	wet needle, 100:1 split

キャラウェイシード、ディルシード、ネイティブスペアミントおよびスコッチスペアミントエッセンシャルオイル試料は、まず未希釈のオイルで評価し、特徴となるプロファイルを決め、もともとの Carvone 光学異性体ピークを同定しました。次いでキャラウェイシードおよびディルシードエッセンシャルオイルには L-Carvone を添加しました。2 種のスペアミントエッセンシャルオイルには、D-Carvone を添加しました。これらの添加した 4 試料を再評価し、オイル中にもともと入っている Carvone 光学異性体と、添加した光学異性体とを分離できるかどうかを調べました。

結果と考察

図 1 から、D-Carvone 光学異性体が L-Carvone より先に流出することが分かります。図 2、4、6 および 8 は、キャラウェイシードおよびディルシード、ネイティブスペアミントおよびスコッチスペアミント

エッセンシャルオイルの未希釈試料の解析によるクロマトグラムです。添加した試料のクロマトグラムは、図 3、5、7 および 9 で、添加した光学異性体が分離され同定できることが分かります。これによって、Astec CHIRALDEX G-TA キャピラリー GC カラムのキラル選択性が分かります。

図 1 D-Carvone および L-Carvone を含む標準品

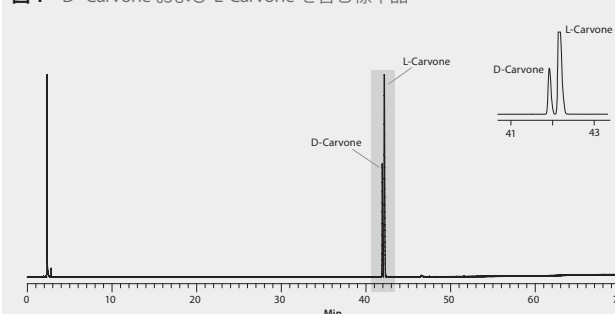


図 2 キャラウェイシードエッセンシャルオイル

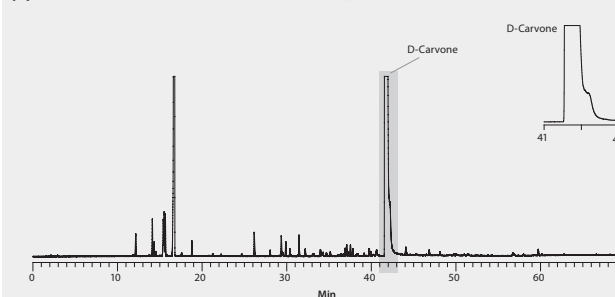


図 3 L-Carvone を添加したキャラウェイシードエッセンシャルオイル

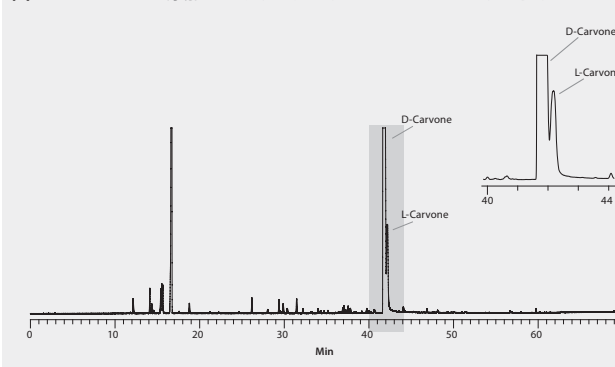


図4 デイルシードエッセンシャルオイル

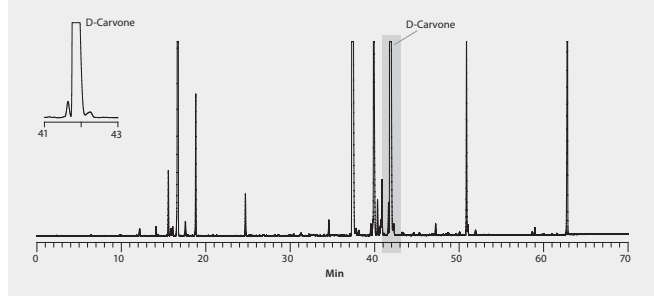


図8 スコッチスペアミントエッセンシャルオイル

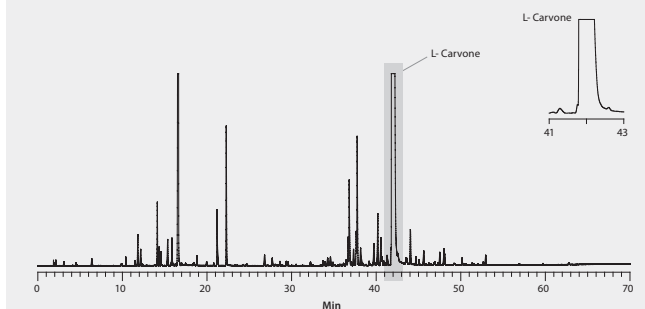


図5 L-Carvone を添加したデイルシードエッセンシャルオイル

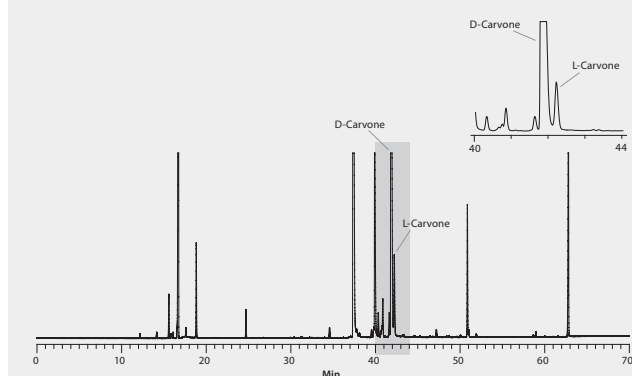


図9 D-Carvone を添加したスコッチスペアミントエッセンシャルオイル

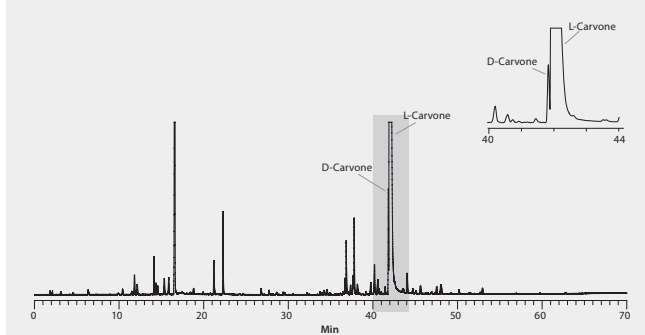


図6 スペアミントエッセンシャルオイル (Native)

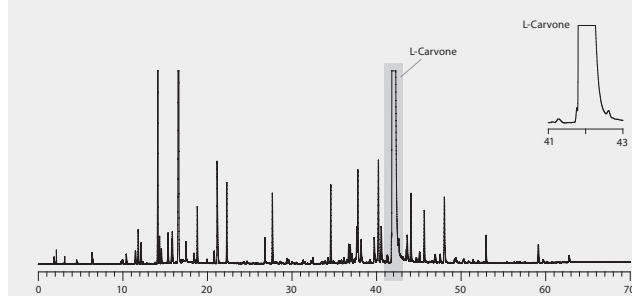
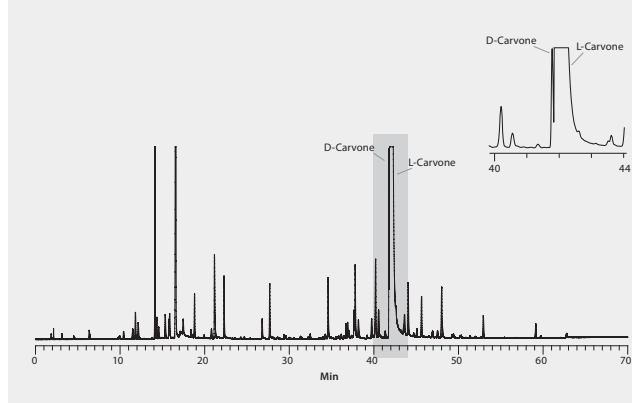


図7 スペアミントエッセンシャルオイル (Native/D-Carvone 添加)



結論

以上の結果から、今回使用したカラム (Astec® CHIRALDEX® G-TA, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.12 μ m) は、未希釈のエッセンシャルオイル中の D-Carvone および L-Carvone 光学異性体を分離するのに使用でき、D-Carvone 光学異性体が L-Carvone 光学異性体より先に流出することが分かりました。

Reference

1. Ravid, U.; Putievsky, E.; Katzir, I.; Weinstein, V.; Ikan, R., Chiral GC analysis of (S)(+)- and (R)(-)-Carvone with high enantiometric purity in caraway, dill and spearmint oils. *Flavour and Fragrance Journal* **1992**, 7, 280-292.

+ Featured Products

Description	Cat. No.
Astec CHIRALDEX G-TA, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.12 μ m	73033AST
S-(+)-Carvone (D-Carvone), Analytical Standard	22070
R-(-)-Carvone (L-Carvone), Analytical Standard	22060

+ Related Product

Description	Cat. No.
Astec CHIRALDEX G-TA, 10 m x 0.25 mm I.D., 0.12 μ m	73031AST
Astec CHIRALDEX G-TA, 20 m x 0.25 mm I.D., 0.12 μ m	73032AST
Astec CHIRALDEX G-TA, 40 m x 0.25 mm I.D., 0.12 μ m	73034AST
Astec CHIRALDEX G-TA, 50 m x 0.25 mm I.D., 0.12 μ m	73035AST

フッ素化フェニル固定相、PFPP・F5 (ペンタフルオロフェニルプロピル) UHPLC カラムを用いた類縁化合物の分離と、親水性化合物の保持

David S. Bell and Carmen T. Santasania carmen.santasania@sial.com

フッ素化フェニル固定相による保持メカニズム

フッ素化フェニル固定相はバクリタセルの効率的な分離に利用され有名になりましたが、近年では薬物代謝物における位置異性体の分離や低分子ペプチドの保持、カビ毒の分離、アミノ酸の一斉分析、メタボローム研究に注目した利用が進んでいます。今後は製薬のみならず食品、環境分野においても広く普及する事が予想されます。フッ素化フェニル固定相は保持メカニズムが従来のものと異なるので、汎用のC18カラムでは分離できないような類縁体の測定によく用いられています。

フッ素化フェニル固定相は、逆相系固定相のアルキル基よりも大きいイオン交換容量を示します。電離定数の違いによって分析対象物を分離させたり、極性の高い代謝物や分解物をイオン交換により保持させる事ができます。また、フッ素化フェニル固定相のもう一つの特徴は、従来の固定相と比較して類縁化合物や位置異性体に対する構造認識性が高い事です。

フッ素化フェニル固定相を有効に活用するためには、保持と選択性メカニズムについての基礎知識を持つことが重要です。本稿では、従来のアルキル固定相と差別化されるフッ素化フェニル固定相において特徴的なイオン性相互作用と化学構造の認識性について紹介します。

保持メカニズムの特徴と分離例

フッ素化フェニル固定相の最も一般的な構造であるペンタフルオロフェニルプロピル (PFPP、F5 と略) を図1に示します。F5 固定相は、炭素とフッ素の結合 (C-F) により強い双極子 (分極相互作用) および π - π 相互作用を持ち、フッ素原子の電気陰性度により電荷移動相互作用も可能です。

図1 PFPP (ペンタフルオロフェニルプロピル) 固定相の化学構造

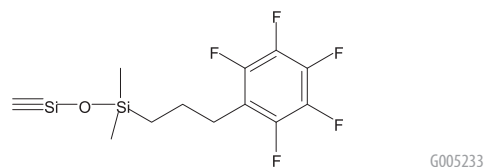
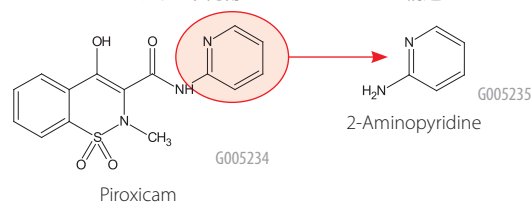


図2 ピロキシカムとその不純物 2-アミノピリジンの構造



汎用的なアルキル固定相であるC18 (ODS) やC8 (octyl) に共通する欠点は、親水性の高い極性化合物を保持できない事です。F5 固定相はイオン交換や分極相互作用を持つため、多くの場合において極性化合物の保持が可能です。図2に消炎鎮痛剤であるピロキシカムと製剤分解物である2-アミノピリジン (2-AMP) の構造を示します。2-AMPは極性が高い ($\log P=0.53 \pm 0.27$) ため、従来のアルキル固定相で保持することは困難です。図3にC18固定相を用いてピロキシカムと2-AMPを分析した結果を示します。ピロキシカムは保持されましたが、2-AMPは保持されず、定量できませんでした。移動相の有機溶媒含有比率を下げてpHを高めても、アルキル固定相における2-AMPの保持はできませんでした。イオンペア試薬の添加によって2-AMPが保持する可能性もありますが、再現性の低下やカラムの劣化が懸念されます。図4にF5固定相を用いてピロキシカムと2-AMPを分析したクロマトグラムを示します。フッ素化フェニル固定相を用いると、イオンペア試薬を使う事も無く、C18固定相を用いた時と同様の移動相条件において2-AMPを保持し、ピロキシカムと分離する事ができました。2-AMPの保持メカニズムは、F5固定相の分極相互作用とイオン交換相互作用であると解釈する事ができます。

図3 C18 カラムを用いたピロキシカムと 2-アミノピリジンの分離

カラム: Ascentis® Express C18、長さ 10 cm× 内径 4.6 mm
 粒子径 2.7 μm (53827-U)
 移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH3)
 移動相 B: アセトニトリル
 移動相比率: A:B = 75:25 (v/v)
 流速: 0.8 mL/min.
 カラム温度: 35℃
 圧力: 1635 psi
 検出器: UV PDA (波長 230 nm) および MS ESI (+), SIM
 注入量: 5 μL
 試料調製: 2-アミノピリジン (10 μg/mL)、ピロキシカム (100 μg/mL)、
 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3): アセトニトリル = 90:10

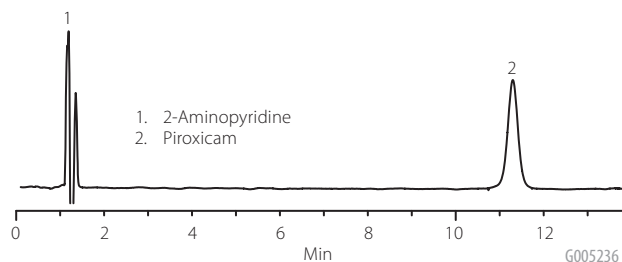
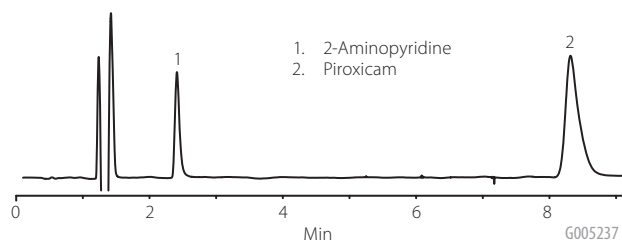


図4 F5 カラムを用いたピロキシカムと 2-アミノピリジンの分離

カラム: Ascentis Express F5、長さ 10 cm× 内径 4.6 mm
 粒子径 2.7 μm (53590-U)
 移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH3)
 移動相 B: アセトニトリル
 移動相比率: A:B = 75:25 (v/v)
 流速: 0.8 mL/min.
 カラム温度: 35℃
 圧力: 1635 psi
 検出器: UV PDA (波長 230 nm) および MS ESI (+), SIM
 注入量: 5 μL
 試料調製: 2-アミノピリジン (10 μg/mL)、ピロキシカム (100 μg/mL)、
 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 3): アセトニトリル = 90:10



C18 のような逆相系固定相を用いて水溶解度が同程度の化合物を分離する事は、アルキル固定相の構造認識能力では困難な事例を紹介しします。図5に示したようなヒドロコルチゾンとプレドニゾロンは、二重結合の数が1つだけ異なる類縁化合物です。この構造からも予想されるように、ヒドロコルチゾンとプレドニゾロンの水溶解性は非常に類似しています。図6に内部標準 (IS) としてプレドニゾンを添加して、ヒドロコルチゾンとプレドニゾロンを C18 および F5 固定相を用いて分析したクロマトグラムを示します。フッ素化フェニル固定相による構造認識性によって類縁化合物の分離をすることができました。

図5 ヒドロコルチゾンとプレドニゾロンの化学構造

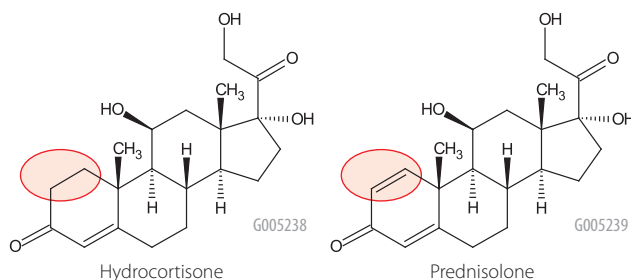
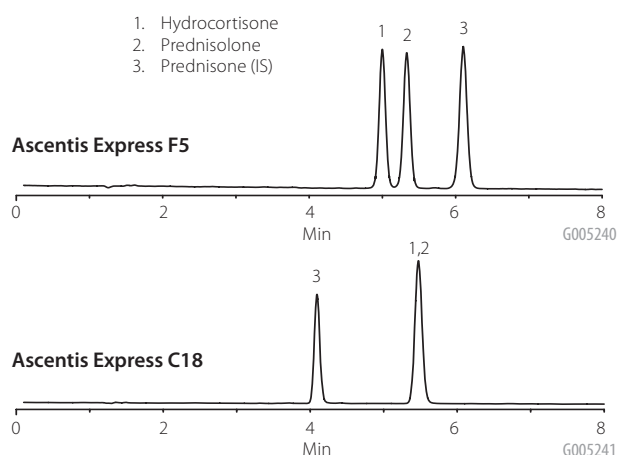


図6 ステロイド類縁化合物における C18 と F5 固定相の分離挙動

カラム: Ascentis Express F5 (53590-U) および
 Ascentis Express C18 (53827-U)、
 長さ 10 cm × 内径 4.6 mm、粒子径 2.7 μm
 移動相 A: 水
 移動相 B: methanol
 移動相比: A:B = 50:50 (v/v)
 流速: 0.8 mL/min.
 カラム温度: 35℃
 圧力: 約 2400 psi
 検出器: UV (波長 240 nm)
 注入量: 5 μL
 試料調製: 各 10 μg/mL、水: メタノール = 90:10



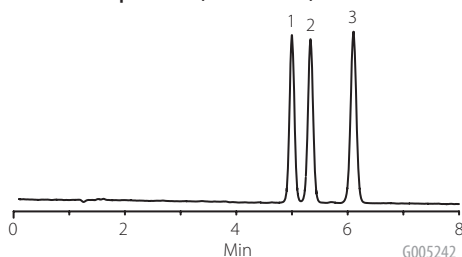
高効率で異なる選択性

F5 固定相による測定は、コアシェルカラム (Fused-Core®) である Ascentis® Express F5 を用いる事で高速、高分離メソッドに対応させる事ができます。図 7 は、全多孔性 Discovery® HS F5 とコアシェルカラムである Ascentis Express F5 を図 6 と同じ条件で測定し比較したものです。Ascentis Express F5 を用いる事によって分析時間が短縮されると同時に、ピーク形状もシャープになっている事から大幅な分離効率の向上を実現する事ができました。

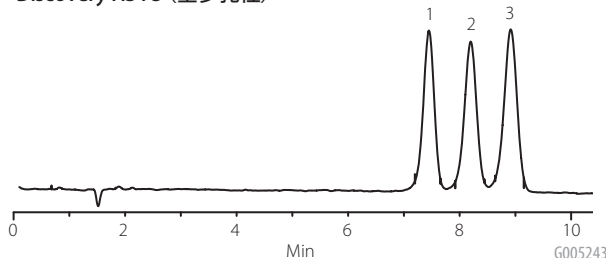
図 7 ステロイド系類縁化合物における全多孔性 F5 カラムと F5 コアシェルカラムの分析比較

Conditions same as Figure 6.

Ascentis Express F5 (Fused-Core)



Discovery HS F5 (全多孔性)



Did you know...

F5 カラムは分析から分取まで対応したカラムをガードカートリッジとともに用意しております。また、F5 製品を用いた分析アプリケーション例や国際誌への引用例も多数存在しております。これらの製品に関するより詳しい情報は、sigma.com/f5-jp をご覧ください。

まとめ

本稿では F5 固定相における高極性物質やイオン性化合物の保持と、ステロイド系類縁化合物の選択的分離例を紹介しました。

近年、高極性物質における LC/MS を用いた分析例が増えて来ましたが、水溶性の高い物質を従来の C18 のような逆相系カラムを用いて測定する際、移動相の有機溶媒比率を下げて保持しようとする MS のイオン化効率が悪くなり、検出感度の低下が懸念されます。また、薬物代謝物探索においては位置異性体のような同一分子量の化合物を測定する際に、MS ではこれらを判別する事ができないので分析カラムの構造認識性能にて分離をしなければなりません。従って、分析対象物質が高極性でありながら位置異性体構造を持つような際に、F5 固定相は C18 固定相と比較して高い有機溶媒の移動相条件で位置異性体の分離を高感度で MS 検出する事が期待できます。

+ Featured Products

Ascentis Express F5 HPLC Columns (2.7 µm)

I.D. (mm)	Length (cm)	Cat. No.
2.1	2	53592-U
2.1	3	53566-U
2.1	5	53567-U
2.1	7.5	53568-U
2.1	10	53569-U
2.1	15	53571-U
3.0	3	53574-U
3.0	5	53576-U
3.0	7.5	53577-U
3.0	10	53578-U
3.0	15	53579-U
4.6	3	53581-U
4.6	5	53583-U
4.6	7.5	53584-U
4.6	10	53590-U
4.6	15	53591-U

Ascentis Express F5 Guard Holder and Cartridges

Description	Qty.	Cat. No.
Universal Guard Cartridge Holder	1	53500-U
Guard Cartridge, 2.1 x 5 mm	3	53594-U
Guard Cartridge, 3.0 x 5 mm	3	53597-U
Guard Cartridge, 4.6 x 5 mm	3	53599-U

血清、血漿試料由来の夾雑成分に対する LC/MS 分析前処理方法の提案

イオンサプレッションの影響低減における 2 つのアプローチ

背景

エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) は、生体試料中における低分子化合物の同定や、定量に用いられています。また、近年の MS 分析における検出限界はフェムトグラム以下であるとも言われています。このような技術の進歩によって極微量物質の検出が可能になりましたが、ESI-MS にも限界があります。分析対象物質とともにサンプル中に存在している夾雑成分が引き起こすイオンサプレッションは、LC/MS 分析条件において検討すべき項目の 1 つです。イオンサプレッションは夾雑成分と分析対象物質との間で ESI におけるイオン源において電荷の獲得競争が生じた結果として発生します。その結果、分析対象物質の検出感度が低くなる事や、測定ごとの再現性を得る事が出来なくなったりします。

LC/MS 分析における夾雑成分の影響

医学・臨床、法医学および生体試料分析において問題となるのは、生体マトリックス由来のリン脂質の影響です。リン脂質は細胞膜の主成分であり、MS 分析におけるイオン源の汚染要因として知られています (図 1)。リン脂質は従来の固相抽出 (SPE) においてタンパク質沈殿時の試料前処理の際に分析物と共に抽出されるため、イオンサプレッションの主要因となります。また、リン脂質は HPLC カラムを用いた分離をおこなった際に、分析対象物質と同じ時間帯に溶出する事があります。これら夾雑成分の共溶出が対象物質の検出感度を低下させ、分析精度と再現性を得る事を困難にする原因となります。また、リン脂質は HPLC カラムの寿命を短くする事も懸念されます。リン脂質がカラムに蓄積すると予期できないときに溶出する事があるため、測定毎の再現性低下の要因にもなります。リン脂質由来の汚染に対しておこなう HPLC カラムや分析流路の洗浄には大量のグラジエント溶出が必要であり、サンプル分析におけるスループット性が悪くなります。リン脂質の LC/MS 分析に対する影響については、過去の特集記事¹⁻³でも詳しく検討しました。

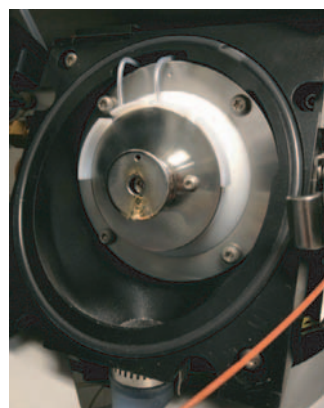


図 1 血清、血漿由来の夾雑成分であるリン脂質によって汚染された MS イオン源

Craig R. Aurand, Technology Program Manager craig.aurand@sial.com

夾雑成分の影響を減少させる方法

本稿では、夾雑成分であるリン脂質の影響を緩和する 2 種類の方法について紹介します。これら 2 種類の方法は、分析対象物質を夾雑成分から分ける方法が異なります。1 つ目の方法は、分析対象物質をサンプル溶液に残したまま、夾雑成分を除外する事に焦点を当てています。2 つ目の方法は分析対象物質を夾雑成分から抽出します。いずれの場合も夾雑成分であるリン脂質が主な成分であり、血清、血漿試料におけるイオンサプレッションの影響を減少させることを目的としています。

図 2 HybridSPE®-Phospholipid を用いたリン脂質除去効果を示す LC/MS 測定結果

HybridSPE-Plus を用いた精製とタンパク質沈殿法における、血漿中のプロプラノロールとその水酸化代謝物の LC/MS 測定結果

カラム: Ascentis® Express F5、長さ 5 cm × 内径 2.1 mm、粒子径 2.7 μm (53567-U)

移動相: [A] 2 mM ギ酸アンモニウム含有、アセトニトリル
[B] 2 mM ギ酸アンモニウム含有超純水、(A:B = 90:10)

流速: 0.4 mL/min

圧力: 1073 psi (74 bar)

カラム温度: 35°C

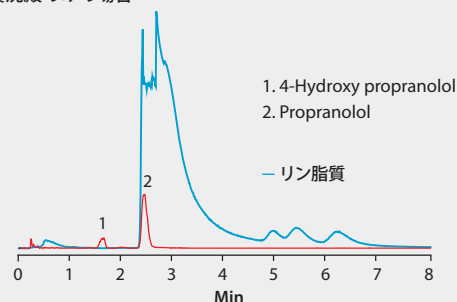
検出器: MS, ESI(+) TOF, m/z 100-1000

注入量: 2 μL

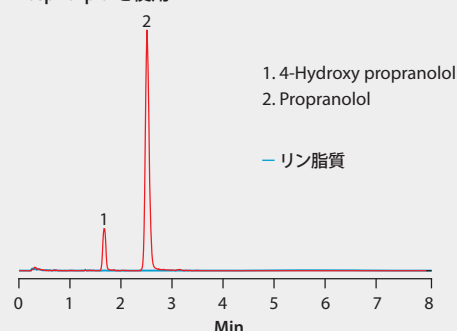
試料濃度: 各化合物、200 ng/mL

使用装置: Agilent® 1200SL Rapid Resolution、6210 Time of Flight (TOF) MS

タンパク質沈殿のみの場合



HybridSPE-Phospholipid を使用



(continued on next page)

アプローチ 1: 夾雑成分の除去

夾雑成分の除去を試みるこのアプローチでは、HybridSPE®-Phospholipid をもちいて、血清、血漿からリン脂質を選択的に除去します。HybridSPE-Phospholipid は、96 穴プレートあるいは SPE シリンジチューブにジルコニア-シリカ粒子を充填したもので構成されています。ジルコニア原子における電子欠損性の空の d 軌道は、リン脂質の電子が豊富なリン酸基とルイス酸/塩基の相互作用で結合します。これにより効率的にリン脂質を回収できます。タンパク質もウェルプレートまたはシリンジチューブ内における沈殿によって除去されます。血清、血漿試料を HybridSPE-Phospholipid プレートまたはシリンジチューブに添加、その後、沈殿溶媒を 3:1 の比率で加えます。試料を減圧吸引、もしくは遠心分離器を用いて処理し、タンパク質を完全に沈殿させます。

図 2 に、同一の血漿試料をタンパク質沈殿法（上図）もしくは HybridSPE-Phospholipid を用いたリン脂質除去法（下図）で処理した LC/MS 測定結果を示します。タンパク質沈殿法では分析対象物質とリン脂質のピークが重なっていると同時に、HybridSPE-Phospholipid プレートで処理した試料より、分析対象物質の検出感度が低くなっている事がわかります。HybridSPE-Phospholipid は試料からリン脂質を除去する事でイオンサプレッションの影響を減少させ、分析対象物質の検出感度を上昇させました。図 3 のグラフから、タンパク質沈殿法ではリン脂質によるイオンサプレッションのためにプロプラノロールの検出感度が 75% 減少していることがわかります。この条件においてプロプラノロールはリン脂質の大部分が溶出した時間と同様の時間帯に溶出していました。プロプラノロールに対する標準偏差の値もリン脂質におけるイオンサプレッションの影響を受けたために再現性が低く大きな値になっています。逆に、HybridSPE-Phospholipid で処理した試料では検出感度が改善し、標準偏差の値も小さくなっています。リン脂質を選択的に除去する事で分析カラムに注入される夾雑成分が少なくなるため、再現性の高い分析方法になりました。

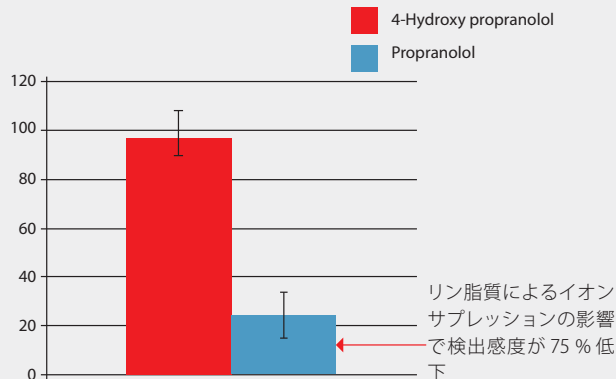
アプローチ 2: 分析対象物質の抽出

イオンサプレッションに対する 2 つ目のアプローチは、夾雑成分を除去しつつ分析対象物質の抽出・濃縮をおこなうものです。このアプローチは従来の SPE と同様に分析対象物質との結合と、夾雑成分の洗浄工程を伴うものです。これらサンプル前処理方法は固相マイクロ抽出 (SPME) にも適用されています⁴。図 4 に 2 種の生体サンプル用 SPME (BioSPME) ファイバーの構造を示します。

SPME 法は、試験溶液（今回の場合は血清、血漿）と SPME ファイバー上の固定相と分析対象物質の分配平衡によってサンプルの前処理をおこないます。BioSPME ファイバーは C18 シリカ粒子がコーティングされたもので構成されています。分析対象物質は逆相系 HPLC 溶媒を用いてファイバーから脱離され、LC/MS にて直接分析する事が可能です。BioSPME ファイバーの保持特性によって、大きな生体高分子のファイバーへの結合を防ぐことができます。これによって夾雑成分を共抽出する事なく、分析対象物質を選択的に濃縮する事ができます。その結果、分析対象物質の濃縮と試料の洗浄、精製を同時におこなう事ができます。また、BioSPME は測定試料に対して非破壊的なサンプル前処理方法のため、同一の試料から複数回の抽出、精製をする事が可能です。

図 3 タンパク質沈殿法のための処理とリン脂質除去プレートを用いたサンプル前処理方法におけるイオンサプレッションの影響比較
(分析条件は図 2 と同様)

タンパク質沈殿法の場合



HybridSPE-Phospholipid を使用

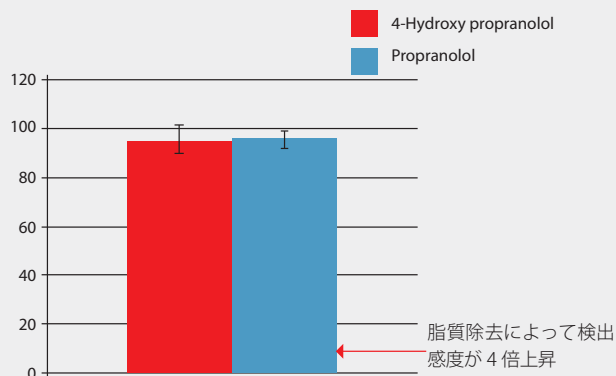


図 4 チップ型およびニードル型 BioSPME

ニードル型



チップ型

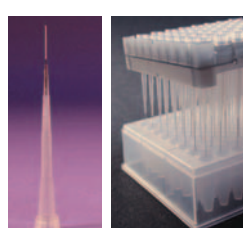


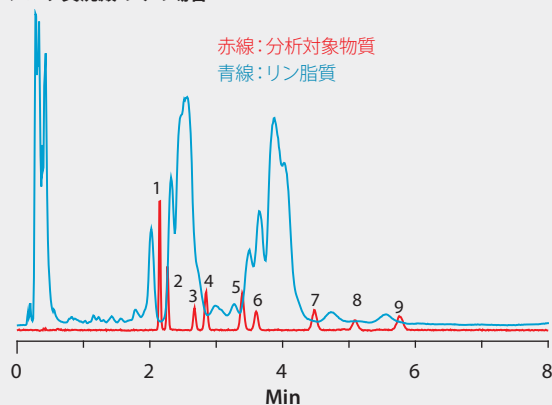
図 5 の 2 つの LC/MS 測定結果は、9 種のカチノン化合物を添加した血漿試料を測定したものです。上のクロマトグラムはタンパク質沈殿法のための前処理結果を示しており、下のクロマトグラムでは、BioSPME ファイバーを用いて前処理をおこないました。2 つの前処理方法を比較すると、BioSPME 法はタンパク質沈殿法に対して検出感度が 2 倍でありながらリン脂質の検出を 1/10 にする事ができました。従って、BioSPME ファイバーを用いる事で夾雑成分由来のイオンサプレッションによる検出感度の低下を防ぎながら、生体試料サンプル中から分析対象物質を濃縮して検出する事ができます。

図5 タンパク質沈殿法のための処理とBioSPMEを用いたサンプル前処理方法におけるイオンサプレッションの影響比較

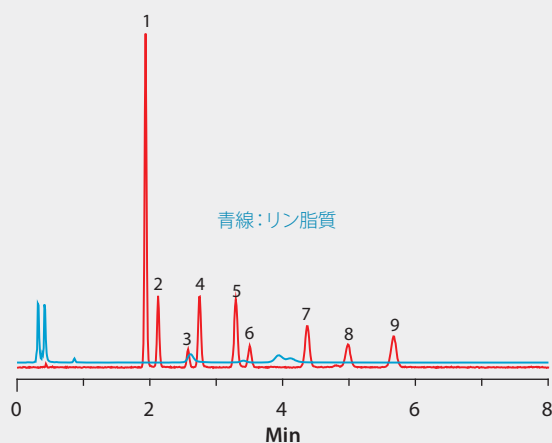
カラム: Ascentis® Express HILIC、長さ 10 cm× 内径 2.1 mm、
粒子径 2.7 µm (53939-U)
移動相: 5 mM 酢酸アンモニウム含有 98:2 (v/v) アセトニトリル:水
流速: 0.6 mL/min
圧力: 1842 psi (127 bar)
カラム温度: 35°C
検出器: MS, ESI(+) TOF, m/z 100-1000
注入量: 1 µL
試料濃度: 各 50 ng/mL
使用装置: Agilent® 1290 Infinity™; 6210
Time of Flight (TOF) MS

1. MDPV
2. Buphedrone
3. 3-Fluoromethcathinone
4. Butylone
5. Ethylone
6. 3-Fluoromethcathinone
7. Mephedrone
8. Methylone
9. Methedrone

タンパク質沈殿法の場合



BioSPMEを使用



まとめ

本稿では HybridSPE-Phospholipid を用いたリン脂質除去法と、BioSPME を用いた分析対象成分の効果的な抽出方法を紹介しました。これら前処理方法は血清、血漿サンプル中の夾雑成分におけるイオンサプレッションの影響を低減させることによって、LC/MS 分析の検出感度、再現性を高める事ができました。

References

1. Aurand, Craig. *Understanding, Visualizing and Reducing the Impact of Phospholipid-Induced Ion Suppression in LC/MS*; Supelco Reporter Volume 30.2: 10–12.
2. Aurand, Craig. *Investigating Matrix Interference in Analysis of Antiarrhythmic Cardiac Drugs in Plasma*; Supelco Reporter Volume 31.1: 12–15.
3. Aurand, Craig. *Improvement in LC-MS/MS Analysis of Vitamin D Metabolites in Serum by Leveraging Column Selectivity and Effective Sample Prep*; Supelco Reporter Volume 31.1: 16–17.
4. Bojko, Barbara; Pawliszyn, Janusz. *In vivo and ex vivo SPME: a low invasive sampling and sample preparation tool in clinical bioanalysis*. *Bioanalysis*, 2014, 6(9), 1227–1239.

+ Featured Products

Description	Cat. No.
U/HPLC Columns	
Ascentis Express F5, 5 cm × 2.1 mm I.D., 2.7 µm particle size	53567-U
Ascentis Express HILIC, 10 cm × 2.1 mm I.D., 2.7 µm particle size	53939-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
Protein Precipitation 96-Well Plate, pk/1	55263-U
SPME LC Fiber Needle Probe, functional group C18, package of 5 probes	57281-U
SPME LC Tips, functional group C18, sample pack of 8 tips	5709-U
SPME LC Tips, functional group C18, 96-tip array	57234-U
Standards and CRMs	
Propranolol hydrochloride solution, 1.0 mg/mL (as free base) in methanol, Cerilliant Certified Reference Material	P-055
(±)-4-Hydroxypropranolol hydrochloride, 25 mg, Fluka analytical standard	00881
3,4-Methylenedioxypropylovalerone HCl (MDPV) solution, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	M-146
Buphedrone hydrochloride solution, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	B-047
3-Fluoromethcathinone hydrochloride solution, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	F-016
Butylone hydrochloride solution, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	B-045
Ethylone hydrochloride, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	E-071
4-Fluoromethcathinone hydrochloride solution, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	F-015
Mephedrone hydrochloride solution, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	M-138
Methylone hydrochloride, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	M-140
Methedrone hydrochloride solution, 1.0 mg/mL in methanol (as free base), ampule of 1 mL, Cerilliant Certified Reference Material	M-147

Astec® CHIROBIOTIC® V2 による尿中の Methamphetamine のキラル LC/MS 分析

LC-MS による市販 L-Methamphetamine からの不法 D-Methamphetamine の区別

Marc D. Julliard,¹ Jason E. Strull,¹ Dylan M. Stone¹
and David S. Bell²

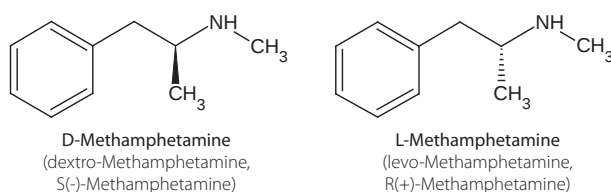
¹ MD Labs Pain Management Toxicology, Reno, Nevada, U.S.A.

² Sigma-Aldrich/Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A.

dave.bell@sial.com

Methamphetamine (図 1) は強力な刺激剤で、濫用薬物あるいはスポーツにおけるドーピング剤として使用されることがよくあります。それが尿中に存在するかどうかは、酵素免疫測定法でスクリーニングされ、マススペクトロメトリッククロマトグラフィー法を使って確認します。しかし、この分子には 2 つの光学異性体があります。1 つは L-Methamphetamine (あるいは levo-Methamphetamine) で、Vicks Vapor のような市販薬に処方されている血管収縮剤です。もう 1 つが不法刺激剤である D-Methamphetamine です¹。免疫測定法では、この合法品と不法品の 2 つを区別できないので、いずれが試料中に基準濃度を超えて検出されると陽性として報告されます。薬毒物研究で濫用薬物の定量に広く利用されている逆相 LC-MS 法でも同様です。

図 1 D-Methamphetamine および L-Methamphetamine の構造



このことは、Selegiline や Fenproporex など、代謝されて Methamphetamine になるような合法の鼻炎薬もしくは医薬品を使用している患者からの試料を分析する際に問題になります²。本稿では、酵素免疫測定法で Methamphetamine が陽性となった試料中に存在する分子がどの分子であるかを確かめるために、Astec CHIROBIOTIC V2 HPLC カラムを用いたキラル LC-MS 法を開発しました。この方法を実際の患者の試料に適用し、究極レベルの高精度で上記のような区別ができることが示されました。

実験

(rac)-Methamphetamine および (L)-Methamphetamine の標準物質を Cerilliant®, TX, U.S.A. より購入しました。尿試料は、ペインクリニックの患者から採取したものと処方コンプライアンスモニターの目的でランダムドラッグテストプログラムの一環で集めたものを用いました。すべての試料は -4°C で保管し、分析前の午前に解凍しました。キラル LC-MS/MS 分析では、試料を以下のように処理しました。125 µL の試料液を 1 mL のジエチルエーテルに添加しました。この希釈した試料を 30 分間攪拌し、10,000 rpm で 10 分間遠心分離しました。有機上澄み液を 500 µL 取りヒーターブロックで 56°C で完全に蒸発させました。乾燥した抽出物を 0.5 mL の開始移動相に再分散し、10 µL をカラムに注入しました。患者試料の分析に先立ち両光学異性体を含むメタノール溶液 (D:L, 1:3) である添加標準試料を注入しました。

液体クロマトグラフィーシステム (Waters® AQUITY UPLC, Waters, Milford MA, U.S.A.) を均一溶媒モードで、Astec CHIROBIOTIC V2 カラム (25 cm × 4.6 mm, 5 µm) (Sigma-Aldrich®/Supelco®, Bellefonte, PA, U.S.A.) を使用し、温度調節なしで稼働しました。移動相は水:メタノール (5:95, v/v) 中の 0.05% w/v トリフルオロ酢酸アンモニウムで、流量は 1 mL/min としました。全稼働時間は 13.00 分でした。保持時間は、D-Methamphetamine および L-Methamphetamine に対しそれぞれ 10.75 分および 11.62 分でした。質量分析条件 (MS, Waters) は、ESI+ モードおよび MRM モードで測定しました。150.0 → 91.0 と 150.0 → 119.0 の 2 つのトランジションをモニターして、両光学異性体を直接同定しました。ピークスムージングと積分を MassLynx™ ソフトウェアで処理し、相対比を決定しました。D- および L- のピーク同定は、添加標準品試料との保持時間の比較で行いました。

結果

以前、C18 カラムを用いた分析で Methamphetamine 陽性とされた実際の患者の尿試料に対し、Astec CHIROBIOTIC V2 カラムおよびメタノールトリフルオロ酢酸アンモニウム移動相を用いた D-Methamphetamine および L-Methamphetamine のキラル分離を適用し成功しました。図 2 に、標準品および複数の患者試料のクロマトグラムを示します。図の **Trace 1** は、D-Methamphetamine および L-Methamphetamine の 1:3 標準品混合物を示します。**Trace 2 ~ 4** からは、患者試料に D-Methamphetamine の応答が見られ、これらの患者がこの薬品を不法使用していたことを示しています。**Trace 5** の L-Methamphetamine の応答は、市販薬由来の L-Methamphetamine の合法使用を示しています。

図 2 Astec® CHIROBIOTIC® V2 と LC/MS/MS を用いた Methamphetamine の D 体、L 体の鏡像異性体の光学分離

試料/マトリックス: Urine extracted as described in experimental section. Final concentration of spiked standards in Trace 1 represents 500 ng/mL (D-Methamphetamine) and 1,500 ng/mL (L-Methamphetamine) in urine

カラム: Astec CHIROBIOTIC V2, 25 cm x 4.6 mm, 5 µm (11024AST)

移動相: 0.05% ammonium trifluoroacetic acid in water:methanol (5:95, v/v)

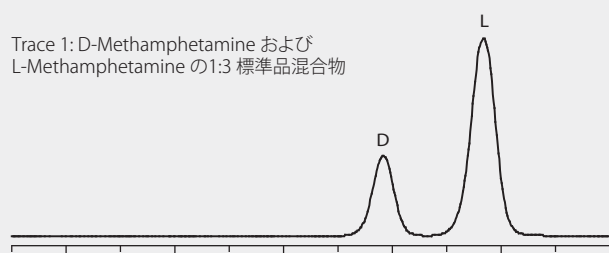
流速: 0.45 mL/min

カラム温度: ambient (20-22 °C)

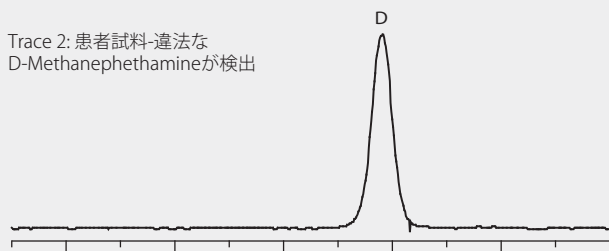
検出器: MS, ESI(+), MRM, 150.0/91.0, 150.0/110.0

注入量: 250 µL

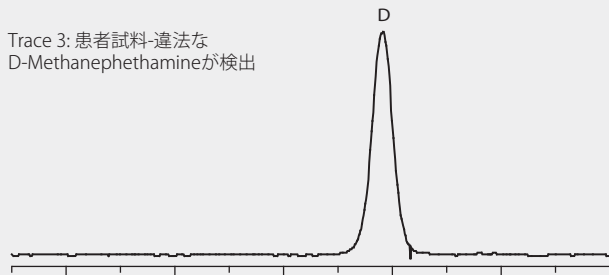
Trace 1: D-Methamphetamine および L-Methamphetamine の1:3 標準品混合物



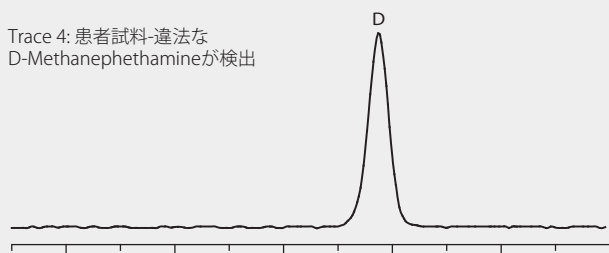
Trace 2: 患者試料-違法な D-Methamphetamine が検出



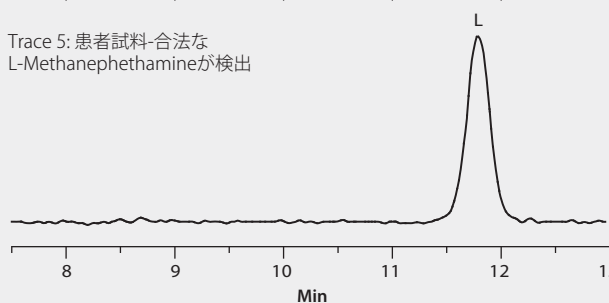
Trace 3: 患者試料-違法な D-Methamphetamine が検出



Trace 4: 患者試料-違法な D-Methamphetamine が検出



Trace 5: 患者試料-合法的な L-Methamphetamine が検出



Conclusion

違法薬物のスクリーニング研究は正確性が要求されます。メタンフェタミンの場合、スクリーニング結果では陽性となっても、しばしば処方された治療薬の代謝物である場合があります。また D-Methamphetamine と大衆薬品でみられる L-Methamphetamine とを区別が出来ない場合があります。

Astec CHIROBIOTEC V2 は、LC/MS を用いて Methamphetamine 光学異性体を効果的に分離することが可能で、尿中に存在する立体異性体の僅かな違いを確認することが出来ます。

References

- Esposito, F. M.; Crumpton, S.; Mitchell, J.; Flegel, R. R. Evaluation of the 20% D-Methamphetamine requirement for determining illicit use of Methamphetamine in urine. *J. Anal. Toxicol.* 36(6), 2012, 399-404.
- Kraemer, T.; Maurer, H. H. Determination of amphetamine, Methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 713(1), 1998, 163-187.

+ Featured Products

Description	Cat. No.
Astec CHIROBIOTIC V2, 25 cm x 4.6 mm, 5 µm	11024AST
(±)-Methamphetamine, 100 µg/mL in methanol, 1 mL ampule	M-022*
R(-)-Methamphetamine (levo-Methamphetamine), 1.0 mg/mL in methanol, 1 mL ampule	M-024*
S(+)-Methamphetamine (dextro-Methamphetamine), 1.0 mg/mL in methanol, 1 mL ampule	M-020*

*日本国内では取扱致しておりません。

HPLC キラルカラム sial.com/lc_chiral-jp

Astec® CYCLOBOND® I 2000 HP-RSP – キラル HPLC および LC-MS 分離用に適したユニークな光学活性固定相

(R,S) -Hydroxypropyl 修飾の beta-Cyclodextrin 固定相カラムは、短い保持時間とエナンチオ選択性という利点を有しています。CYCLOBOND I 2000 HP-RSP は、H 結合能が大きくなり、キラルスクリーニングに向けた幅広いキラル選択性を有しています。このカラムは、薬学、環境、一般有機化学用途における塩基性および中性の化合物に最適です。

CYCLOBOND I 2000 HP-RSP による Pyrimidine (ピリミジン) 系除草剤で植物成長抑制剤である Ancyamidol (アンシミドール) の光学異性体の分離をここに示します。

CYCLOBOND 相は水系／極性移動相をイオン性添加剤とともに使用できるので、LC-MS 用途に最適です。

HPLC キラルカラム sial.com/lc_chiral-jp

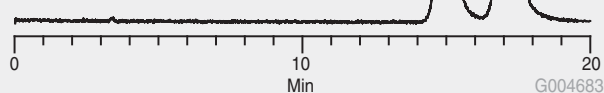
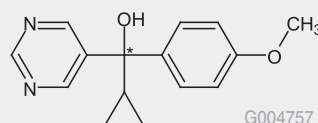
+ Featured Products

Description	Cat. No.
Astec CYCLOBOND I 2000 HP-RSP, 25 cm x 4.6 mm I.D., 5 µm particles	24024AST

図1 Astec CYCLOBOND I 2000 HP-RSP による Ancyamidol 光学異性体の分離

カラム: CYCLOBOND I 2000 HP-RSP, 25 cm x 4.6 mm I.D., 5 µm particles (24024AST)
移動相: (80:20) 5 mM ammonium acetate (pH 6.0):acetonitrile
流速: 1 mL/min.
温度: 35 °C
検出器: MS (m/z = 257)
注入量: 5 µL
試料: ancyamidol, 1 mg/mL in methanol

Ancyamidol



NEW Analytical Standards Portal

標準物質の検索は
sigma.com/std-jp



©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. 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. Asset, Titan, Supel, Supelclean and Infinity are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC. FocusLiner is a trademark of SGE Analytical Science Pty Ltd. Florisil is a registered trademark of U.S. Silica Company. Spectroquant is a registered trademark of Merck KGaA. Fused-Core is a registered trademark of Advanced Materials Technology, Inc. Agilent is a registered trademark of Agilent Technologies, Inc. IKA is a registered trademark of IKA-Werke GmbH & Co. KG. Cerilliant is a trademark of Cerilliant Corporation. Waters is a trademark of Waters. Ascentis, SLB, TraceCERT, Astec, CHIRALDEX, Discovery, HybridSPE and CYCLOBOND are registered trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC

本記事の製品および情報は2016年12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。

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、弊社テクニカルサポートへ

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

<http://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