

蛍光検出器およびPDA 検出器i-PDeA II機能を用いた皮膚感作性試験ADRAの選択性向上

林田 桃香、野村 文子

ユーザーベネフィット

- ◆ 共溶出のある成分でもi-PDeA IIで解析することで、分離条件を変更することなく単離したピークを得ることができます。
- ◆ 蛍光検出器を用いることで、より高い選択性、感度を得ることができます。

■はじめに

皮膚感作性試験ADRAは、システインもしくはリジンとナフタレン環を含む*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (以降NAC)、 α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (以降NAL)を用いて、化学物質の皮膚へのアレルギー性を評価する試験です。OECDテストガイドラインに沿った分析事例をAN_01-00258で紹介しました。被験物質によってはNAC、NALピーク位置やその前後に共溶出ピークが出ることがあり、その際にはLC分離条件の検討が必要となります。ADRA試験では、試験溶液の調製から72時間以内に分析する必要があるため、共溶出ピークと重なってしまった場合には試験を最初からやり直す必要があります。

本報告では、上記のような場合においても分析条件を変更することなく、検出の選択性を高めて共溶出の影響を回避する方法を2つ紹介します。1つは、UV検出器より選択性の高い蛍光検出器 (RF) を用い、共溶出の影響を回避した例です。もう1つには、フォトダイオードアレイ型UV検出器 (PDA) を用い、デコンボリューション機能i-PDeA IIで解析し、単離したピークを得た例を紹介します。*)

■分析条件

表1に分析条件を示します。試薬類はADRAキット (富士フイルム和光純薬製) を用いて調製しました。分析の詳細はAN_01-00258に記載しました。

表1 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ Velox C18 *1 (150 mm × 3.0 mm I.D., 2.7 μm)
Mobile Phase	: A) 0.1%TFA in Water B) 0.1%TFA in Acetonitrile
Time Program for NAC	: B conc. 30% (0 min)→55% (9.5 min)→ 100% (10-13 min)→30% (13.5-20 min)
Time Program for NAL	: B conc. 20% (0 min)→45% (9.5 min)→ 100% (10-13 min)→20% (13.5-20 min)
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 10 μL
96-well Plate	: TORAST 96well 500 RU*2 NAL-96 sealing film (USA Scientific)*3
Detection	: SPD-M40 at 281 nm RF-20Axs (Ex:284 nm, Em:335 nm)

*1 P/N: 227-32010-04、*2 P/N: 370-04010-01

*3 P/N: 2923-5000

■蛍光検出器の例

クロラミンTは、条件によってNALのピーク位置に共溶出が見られることがあります。図1にNAL溶液、クロラミンT溶液、NAL・クロラミンT混合溶液のクロマトグラムとUVスペクトルを示しました。図1上より、NAL位置にピークが検出されていますが、図1中より、UVスペクトルが異なることがわかります。図1下に蛍光検出器 (RF) で採取したクロマトグラムを示しました。蛍光検出器では、共溶出成分は検出されませんでした。

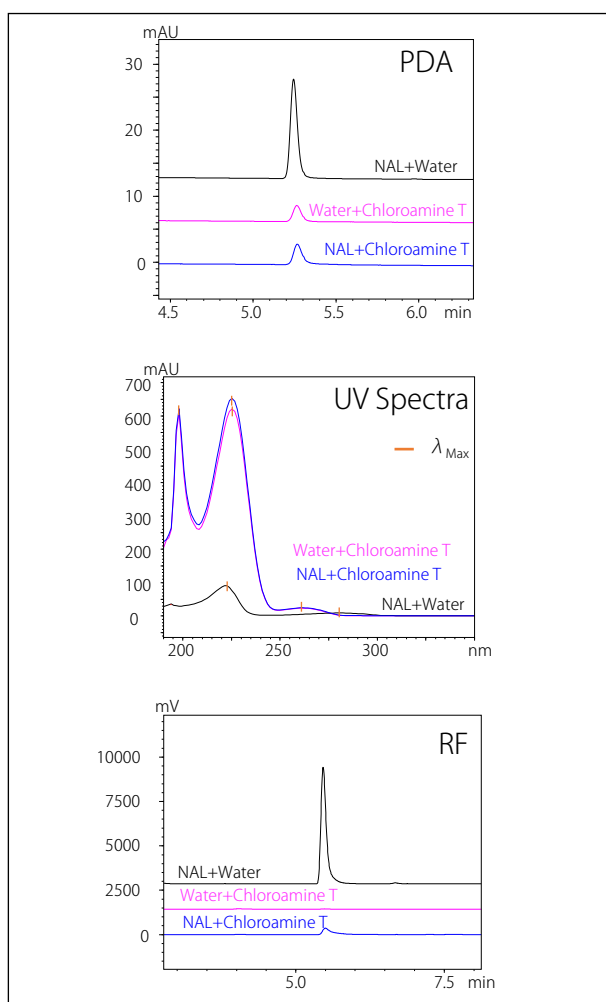


図1 被験物質クロラミンTのNALの結果
上) UVクロマトグラム、中) UVスペクトル、下) RFクロマトグラム

■蛍光検出器による習熟度試験

表2に参照コントロール (RC) の結果を、図2にNAC、NALの検量線を示します。いずれも良好な結果が得られました。表3に陽性対照と習熟度化合物を試験した結果を示します。すべて良好な結果が得られました。

*) i-PDeA IIは夾雑ピークと対象ピークの強度差や分離度により正しい結果が得られないことがあります。重複ピークの確認方法の1つとしてのご使用を推奨します。i-PDeA IIの詳細は、島津テクニカルレポート (C191-0078) をご参照ください。

表2 蛍光検出器を用いた参照コントロール(RC)の結果

		Acceptance Criteria	NAC	NAL
RC-A	Conc.	3.2-4.4 μM	3.7	4.0
RC-B、RC-C (Acetonitrile)	CV (%) (n=9)	<10	<0.1	<0.1
RC-C (Water)	Conc.	3.2-4.4 μM	3.6	3.7
	CV (%) (n=3)	<10	0.1	0.1
RC-C (Acetonitrile)	Conc.	3.2-4.4 μM	3.8	4.0
	CV (%) (n=3)	<10	<0.1	<0.1
RC-C (Acetone)	Conc.	3.2-4.4 μM	3.9	3.9
	CV (%) (n=3)	<10	<0.1	<0.1

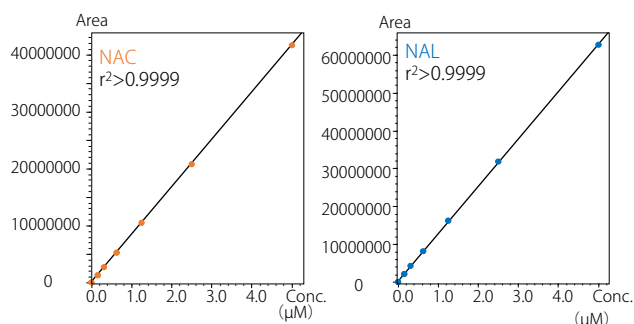


図2 蛍光検出器を用いたNAC、NALの検量線

■ピークデコンボリューション機能i-PDeAllによる解析例

未分離ピークのデコンボリューションを行うLabSolutions™ (ワークステーション) のi-PDeAll機能を用いれば、PDAで得られたスペクトル情報を元に各成分の単一クロマトグラムの近似解をシミュレーションで求めることが可能です。図3にtrans-2-ヘキサナールを被験物質にしたときのNACのクロマトグラム、図4に2,3-ブタンジオンを被験物質にしたときのNALのクロマトグラムを示します。近接して溶出していたピークとNAC/NALを分解することができました。ピークデコンボリューションしたクロマトグラムを使って定量することも可能です。*)

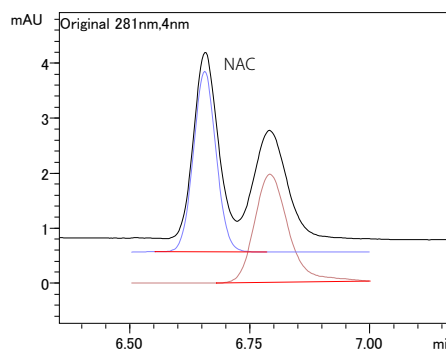


図3 trans-2-ヘキサナール、NAC混合溶液のクロマトグラム (6.5-7minをデコンボリューション)

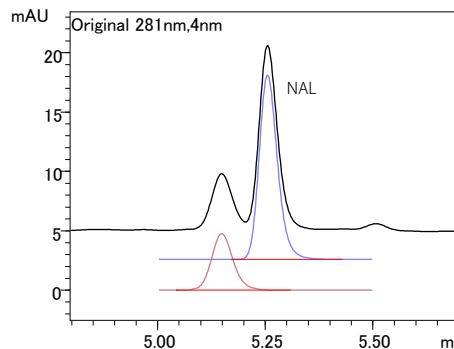


図4 2,3-ブタンジオン、NAL混合溶液のクロマトグラム (5-5.5minをデコンボリューション)

■まとめ

ADRA分析に蛍光検出器を用い、UV検出器と比較して高い選択性、感度を得ることができました。また、UV検出器(AN_01-00258)と同様に、習熟度試験で良好な結果が得られました。

PDA検出器のピークデコンボリューション機能i-PDeAllを用いることで、共溶出ピークによる影響を回避し推定ピーク面積を得ることができました。

- 本アプリケーションニュース作成にあたり、富士フィルム株式会社 山本裕介様、藤田正晴様、笠原利彦様に多大なご協力頂きました。
- 参考資料はAN_01-00258をご参照ください。

表3 蛍光検出器を用いた陽性対照 (PC)、習熟度化合物のNAC、NAL減少率と標準偏差 (n=3)

No.	Substance	Solvent	NAC Depletion (%)			NAL Depletion (%)		
			Criteria	Result	SD	Criteria	Result	SD
PC	Squaric acid diethyl ester	Acetonitrile	15-40	17.8	0.1	40-85	84.8	3.1
1	p-Benzoquinone	Acetonitrile	90-100	100	<0.1	40-70	56.4	0.1
2	Diphenylcyclopropenone	Acetonitrile	15-45	23.7	1.2	≤10	0.0	0.1
3	2-Methy-2H-isothazol-3-one	Water	80-100	99.2	<0.1	≤7	0.3	0.3
4	Palmitoyl Chloride	Acetonitrile	≤10	5.7	0.6	50-100	51.3	1.0
5	Imidazolidinyl urea	Water	10-45	32.3	3.2	≤10	0.3	0.1
6	Farnesal	Acetonitrile	20-40	30.6	1.7	≤15	1.3	0.3
7	Glycerol	Water	≤7	0.0	<0.1	≤7	0.0	<0.1
8	Isopropanol	Water	≤7	0.3	0.6	≤7	0.7	0.5
9	Dimethyl isophthalate	Acetonitrile	≤7	0.9	1.5	≤7	0.0	<0.1
10	Propyl paraben	Acetonitrile	≤7	1.1	1.5	≤7	0.0	<0.1

Nexera、LabSolutions およびShim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00304-JP 初版発行：2022年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Clubにご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022