

蛍光検出器 RF-20A の基礎と応用

1. 蛍光検出法の基礎

蛍光とは物質に特定の波長(励起波長)の光を照射して、それより長い波長(蛍光波長)に発せられる光のことを言います。蛍光検出器は紫外吸光検出器(UV)のように特定の波長の光を照射してその吸収度合いを測定するのではなく、照射した光によって試料が励起された後に放射される光を分光器で分光し、特定波長の光の強度を測定します。蛍光検出の特長としては以下の点が挙げられます。

- 1) 物質特有の励起・蛍光波長で測定するため、選択性が高い
- 2) 蛍光物質を高感度に検出可能
- 3) 誘導体化法による感度、選択性の向上

一般的には蛍光検出法は感度や選択性が求められる分析に広く用いられており、LC/MSによる高感度分析が広く使われるようになった今でも、HPLCによる蛍光検出法が指定されている試験法も多く見られます。また、LC/MSと比較して安価で、かつメンテナンスも容易という特長もあります。ここでは蛍光検出器の基本的な原理と、分析をより高感度に、そして安定して行うための工夫をProminence RF-20Axsの事例を示しながら説明します。

1-2. 蛍光の原理

蛍光物質が蛍光を発する原理は以下の通りです。物質に励起光を照射すると物質は励起状態になります。励起状態は不安定であり、物質は元の状態(基底状態)に戻ります。この時にエネルギーを光として放出するのが蛍光であり、蛍光検出器は放出された蛍光の強度を測定します。特定の波長で励起させ、さらに特定の波長で蛍光を測定するため、吸光度検出器などと比較して選択性が高くなります(Fig. 1)。

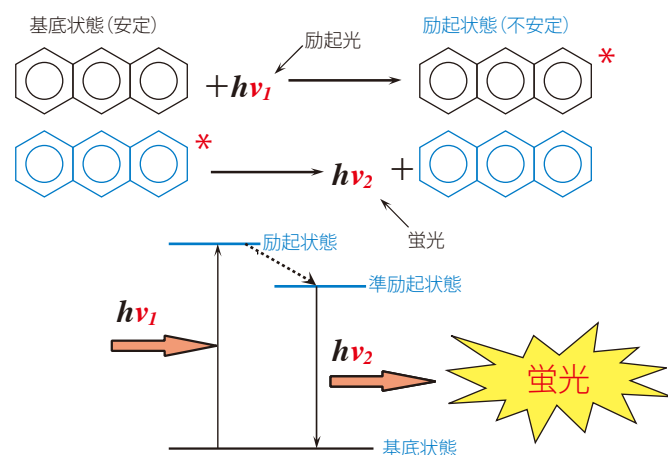


Fig.1: 物質が蛍光を発する仕組み

1-3. 蛍光発光の特性

蛍光スペクトルの一例をFig. 2に示します。励起光を照射すると、励起波長付近には励起散乱光とラマン散乱光が生じるため、励起波長と蛍光波長の設定が近すぎる場合は正しいクロマトグラムが得られない場合があります。また、溶媒が蛍光を発する場合にはバックグラウンドのノイズが高くなりますので、移動相にはHPLCグレードの水や溶媒をご使用ください。

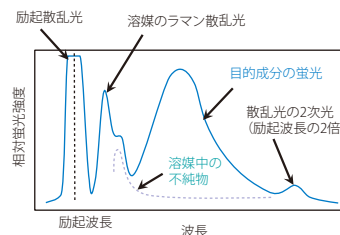


Fig.2: 蛍光スペクトルの特長

1-4. 蛍光検出器の感度と選択性

蛍光の原理で説明したとおり、蛍光検出器には感度と選択性が高いという特長があります。以下のデータは食品中のビタミンB2分析のクロマトグラムです。Fig. 3の吸光度検出法では、選択性が低いために夾雑成分と目的成分のピークが重なっています。さらにピーク強度も弱いため、定量は困難です。一方、Fig. 4の蛍光検出法では、多くの夾雑成分はピークとしてクロマトグラム上には現れていません。また、移動相が蛍光を持たない場合はバックグラウンドも低レベルに抑えることが可能なため、選択的かつ高感度検出が期待出来ます。一般的な検出法での感度レベルはTable 1の通りです。

Table 1: 各検出法の一般的な感度

検出方法	一般的感度
吸光度	ng
蛍光	pg
示差屈折率	μg
電気化学	pg
電気伝導度	ng

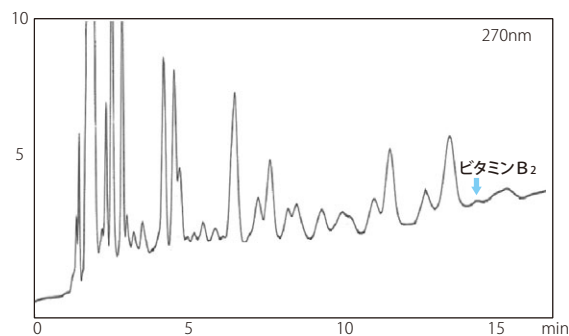


Fig.3: 吸光度検出

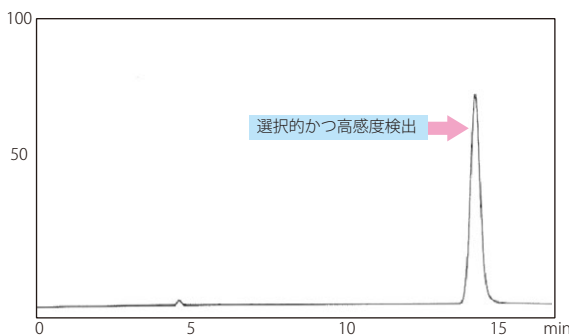


Fig.4: 蛍光検出

2. 蛍光検出法に影響を与える要因

蛍光検出法による分析では、環境の影響を受けて本来のピーク強度や再現性が得られない場合があります。ここでは、蛍光検出に影響を与える要因について解説します。

2-1. 移動相中の溶存酸素の影響

移動相中に溶存酸素が存在すると蛍光強度が小さくなります。これをクエンチング(消光)現象と言います。これは、移動相中の気体分子の衝突により、分析種のエネルギーが失われるためで、特に移動相の脱気が不安定であったり、オフライン脱気のみで分析を続けたりすることによって蛍光強度が変化し、結果として面積再現性が悪くなる場合があります(Fig. 5)。オンライン脱気ユニットを使用すると安定した脱気が得られ、再現性良く、かつ感度よく分析が可能です。

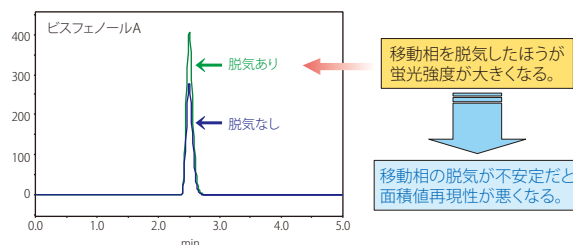


Fig.5: 移動相中の溶存酸素によるピーク強度の変化

2-2. 室温の影響

温度が上昇するにつれて分子間衝突が増大し、エネルギーの損失が起こります。これにより、蛍光強度は温度が高くなるほど弱くなります。温度依存性が高い物質では常温付近で1℃の変化により約5%も強度が変化する例もあります。従って、蛍光検出器の検出部分の温度を極力低く一定にコントロールできれば、感度および面積再現性の向上が期待出来ます。

O-フタルアルデヒド (OPA) をラベル化試薬とするポストカラム蛍光誘導体化法を用いたアミノ酸分析において、検出器セルの温度を25℃、30℃、35℃、40℃に設定して分析を行いました。Fig. 6のクロマトグラムは各温度における分析結果の重ね書きです。Fig. 7には25℃の面積値を100%とした場合の各温度における相対面積値 (%) をプロットしています。検出器温度が上がるにつれてピーク面積値が減少し、中には25℃と40℃で25%以上の面積低下が発生している成分もあります。実際の分析環境に近い25℃と30℃で比較しても、Alaのように10%以上も面積値が低下している成分もあり、感度・再現性の両面において検出器セル温度を一定にする必要性がわかります。

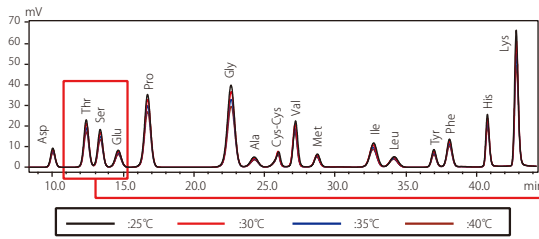


Fig.6: アミノ酸分析におけるセル温度の影響

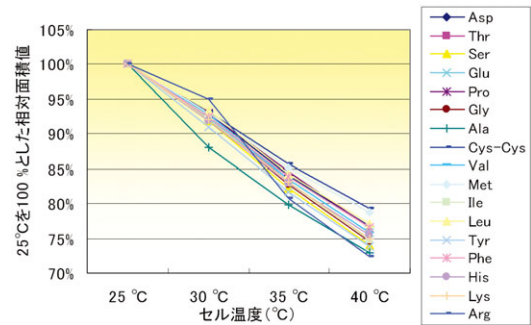


Fig.7: 25℃温調時の面積値を100%とした場合の各温度の相対面積値 (%)

3. 蛍光検出器RF-20Axsの特長

Prominence RF-20Axsは、室温の変動に対しても安定した分析を実現するため温調セルを装備しています。RF-20Axsは検出器セルだけでなく、光電子増倍管 (Photo-multiplier-tube, PMT) も含めた温調機能 (冷却機能付 (※室温-10℃~)) を有しており、たとえ室温が大きく変化するような環境であっても室温付近で検出部温度を一定に保ち、感度を損なうことなく優れた再現性をもたらします。

室温付近の温調による感度・安定性の向上以外にも、RF-20Axsでは光学系や検出器セルを新規設計することで更なる感度の向上を実現しました。その結果、光量は従来機種とのRF-10AxsLと比べて100倍 (RF-20Axs) となり、水ラマンS/N比はRF-20Axsは2000以上で、極微量成分の検出が求められる分析にも威力を発揮します。

3-1. アントラセンによる超高感度分析例

Fig. 8にアントラセンの極微量分析の結果を示します。アントラセン10.48 fg注入でS/N比 21.5を実現しています (RF-20Axs)。これは、検出限界 (S/N比 3) 約1.5 fgに相当し、卓越した感度を有していることを示しています。

移動相	水 / アセトニトリル = 30 / 70 (v/v)
流速	0.6 mL/min
カラム	Shim-pack XR-ODS 2.0 mmI.D. × 50 mmL, 2.2 μm
温度	40℃
検出	励起波長: 250 nm, 蛍光波長: 400 nm

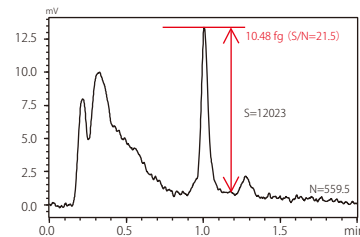


Fig.8: RF-20Axsのアントラセン超高感度分析例

3-2. 温調機能 (冷却機能付) による安定した分析を実現

Fig. 9に室温変動時におけるセル温調の有効性を示します。セルを温調すれば、室温が変動してもピーク強度はほとんど変化ありません。Table 4には30℃におけるピーク面積値の25℃におけるそれとの変化率と、25℃から30℃へ室温が変動した時の面積値再現性結果を示しています。このように、セル温調を有するRF-20Axsでは室温の影響を受けることなく優れた再現性を実現します。

移動相	水 / アセトニトリル = 20 / 80 (v/v)
流速	1.0 mL/min
カラム	Shim-pack VP-ODS 4.6 mmI.D. × 150 mmL, 4.6 μm
温度	40℃
検出	励起波長: 360 nm, 蛍光波長: 450 nm
試料	アクリジン

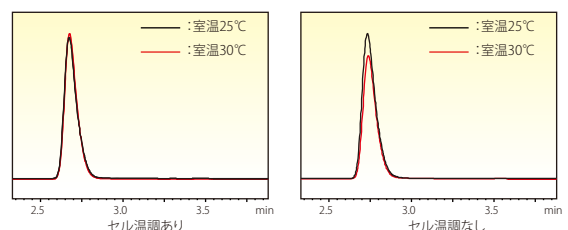


Fig.9: セル温調がある場合と無い場合のクロマトグラム比較

Table 4: 室温変動に対するセル温調の効果

	ピーク面積変化率 (%)	室温変動下での%RSD
セル温調あり	0.64	0.29
セル温調なし	-17.45	6.30

- ・ 温調によって面積再現性が向上する
- ・ 検出部の温度は低い方が強度は大きくなる
- ・ 冷却機能付セル温調による室温付近の温調が有効

4. 超高速分析への対応

超高速分析で得られるシャープなピークに追従するためには、より高速なレスポンスが必要です。RF-20A/20Axsは10msec(100Hz)のレスポンスにより、分離を損なうことなく超高速分析が実現できます。超高速分析ではカラム外でのピーク拡散による分離の低下を防ぐため、検出器セルも小容量タイプを使用します。一方で蛍光検出法では感度がセル容量に依存するため、小容量セルでは感度低下が生じますが、RF-20Axsは超高感度化により、超高速分析でも高感度分析が可能となっています。RF-20Axsがあればコンベンショナル分析から超高速分析まで1台で対応可能であり、あらゆる分析で最高のパフォーマンスが得られます。Fig. 9はトコフェロールのコンベンショナル分析から超高速分析への移行例です。

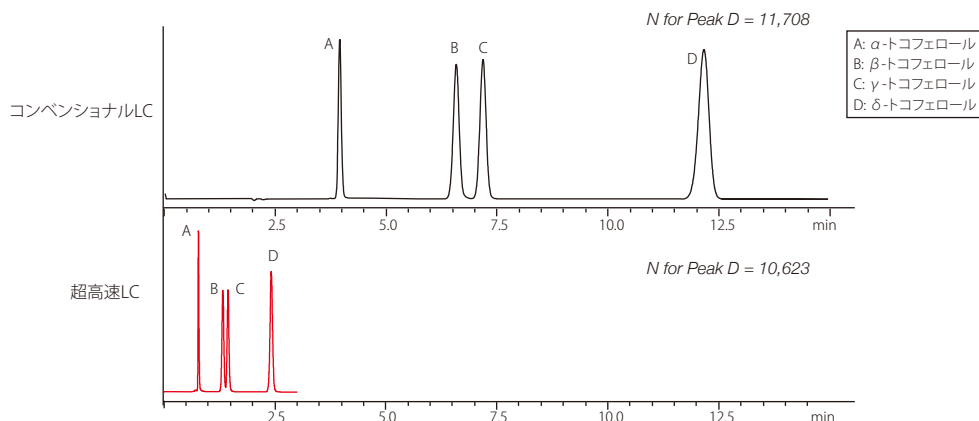


Fig.9: トコフェロールのコンベンショナルLCから超高速LCへの移行例

Table 5: コンベンショナルLCの分析条件

移動相	ヘキサン/2-プロパノール = 100 / 0.5 (v/v)
流速	1.0 mL/min
カラム	Shim-pack CLC-SIL (M) 4.6 mmI.D. × 150 mmL, 5 μm
温度	30 °C
検出	励起波長: 298 nm, 蛍光波長: 325 nm

Table 6: 超高速LCの分析条件

移動相	ヘキサン/2-プロパノール = 100 / 0.5 (v/v)
流速	1.2 mL/min
カラム	Shim-pack XR-SIL 3 mmI.D. × 75 mmL, 2.2 μm
温度	30 °C
検出	励起波長: 298 nm, 蛍光波長: 325 nm

5. アプリケーション例

5-1. エンロフロキサシンの高感度分析

エンロフロキサシンはニューキノロン系合成抗菌剤の一種です (Fig.10)。動物用医薬品として、牛や豚の肺炎や大腸菌性下痢症の予防および治療に用いられています。日本では養殖魚への使用は認められておらず、特定の輸入品に対しては全ロットに対して製品検査義務がある物質です。ここでは公定法に定められた分析法によってエンロフロキサシンの高感度分析を行い、LOD (Limited Of Detection, 検出限界) を測定しました。その結果、RF-20AxsではFig.11に示しますようにLOD=0.05μg/Lとなり、高感度に検出が可能であることがわかります。さらにFig.12には0.05μg/Lから1000μg/Lにおける検量線を示しています。極微量濃度から高濃度まで幅広いダイナミックレンジで高い再現性と直線性を有することが示されました。

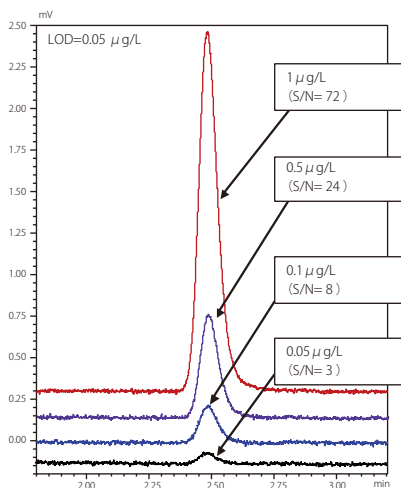


Fig.11: 各濃度におけるエンロフロキサシンのクロマトグラム

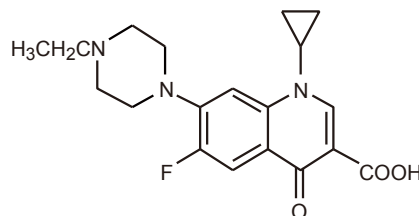


Fig.10: エンロフロキサシンの構造式

Table 7: エンロフロキサシンの分析条件

移動相	マキルベン緩衝溶液 (pH 3.0) / アセトニトリル = 85 / 15 (v/v)
流速	0.5 mL/min
カラム	Shim-pack XR-ODS 2.0 mmI.D. × 75 mmL, 2.2 μm
温度	40 °C
検出	励起波長: 285 nm, 蛍光波長: 460 nm
注入量	2 μL

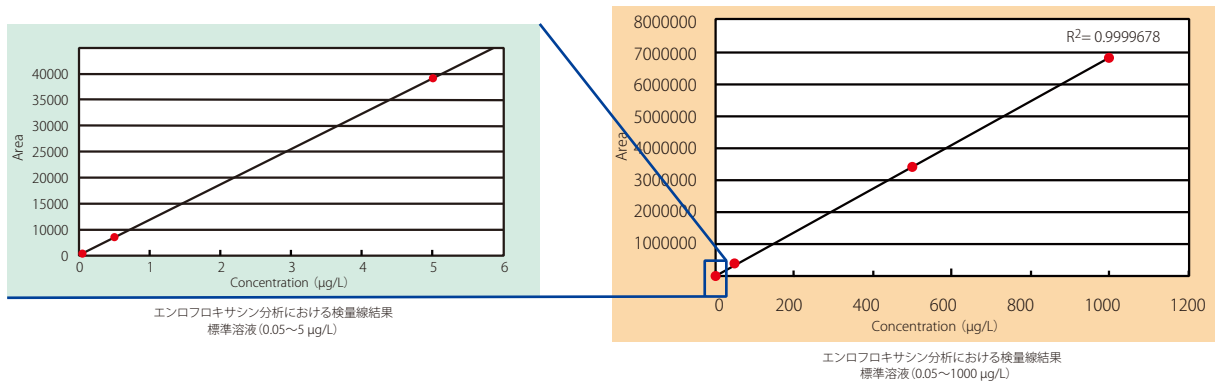


Fig.12: エノフロキサシンの検量線データ(左は極微量域の拡大)

5-2. 陰イオン界面活性剤(LAS)のコンベンショナル分析と超高速分析

純水に計0.04mg/LのLASを添加して濃縮操作無しに分析を行いました。水道水基準ではLASの5成分合計0.2mg/Lが基準値となっています。その検査方法では検水を250倍濃縮後にHPLC分析することが示されていますが、本分析例では濃縮操作無しに直接注入で分析が可能であることがわかります。さらに超高速分析による時間短縮も可能であり、分析時間を約1/5に短縮することが出来ました。

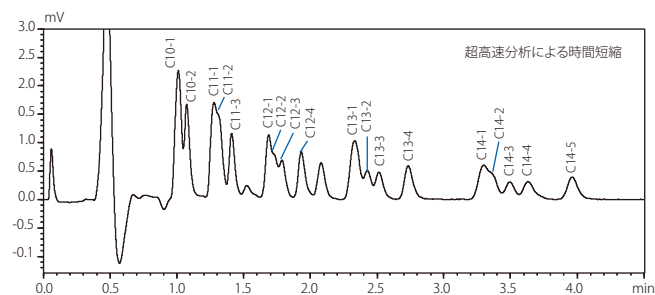
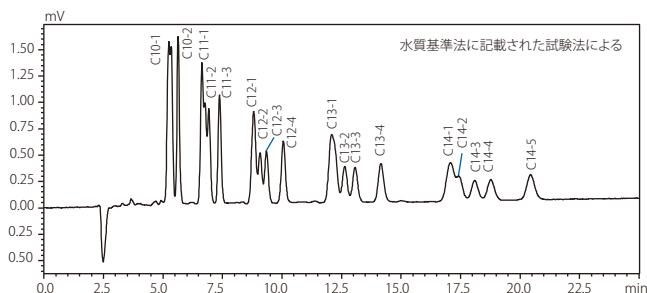


Fig.13: LASのコンベンショナル分析と超高速分析の比較

Table 8: コンベンショナルLCの分析条件

移動相	水/アセトニトリル = 35/65 (v/v) (0.1 mol/L 過塩素酸ナトリウムを含む)
流速	1.0 mL/min
カラム	Shim-pack VP-ODS 4.6 mmI.D.×250 mmL, 4.6 µm
温度	40 °C
検出	励起波長: 221 nm、蛍光波長: 284 nm
試料	陰イオン界面活性剤標準溶液を純水に添加, 20 µL注入



約5倍の高速化

Table 9: 超高速LCの分析条件

移動相	水/アセトニトリル = 35/65 (v/v) (0.1 mol/L 過塩素酸ナトリウムを含む)
流速	1.0 mL/min
カラム	Shim-pack XR-ODS 3.0 mmI.D.×100 mmL, 2.2 µm
温度	40 °C
検出	励起波長: 221 nm、蛍光波長: 284 nm
試料	陰イオン界面活性剤標準溶液, 8 µL注入

5-3. 多環芳香族 (PAH) の一斉分析

米国環境保護局 (EPA) は、多環芳香族 (PAH) 16成分を「優先汚染物質」に指定し、規制対象としています。ここでは16成分の内の15成分の一斉分析を行いました。PAHは各成分によって最適な励起波長と蛍光波長が異なります。従って、分析中に波長を切替える必要がありますが、高速分析では、ピークとピークの間隔が非常に狭いため、いかにオンタイムに波長を切替えるかが重要となります。RF-20A / 20Axsは100 Hzの高速サンプリングと、オンタイム波長切替が可能ですので、このような多成分における波長切替分析に威力を発揮します。

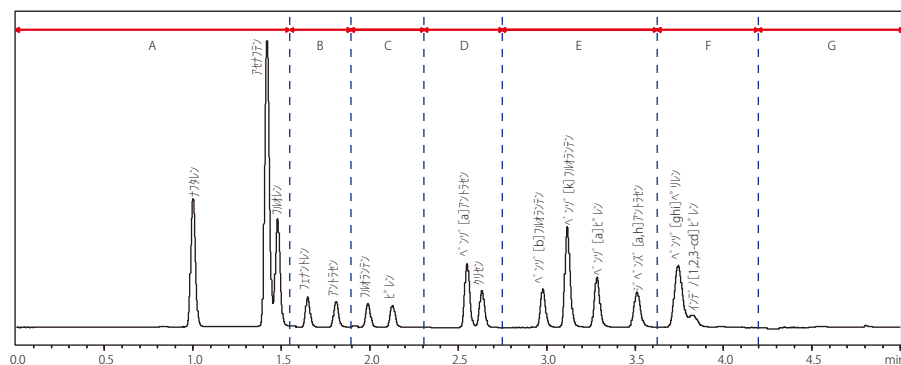


Fig.14: 多環芳香族15成分の一斉高速分析例

Table 10: 多環芳香族の分析条件

移動相	A; 水, B; アセトニトリル
グラジエント	B Conc. = 50% (0-0.5min), 50-88% (0.5-3.0min), 88% (3.0-4.2min), 100% (4.21-4.5min), 50% (4.51-5.0min)
流速	3.0 mL/min
カラム	SUPELCO SIL LC-PAH 4.6 mmI.D.×50 mmL, 3 μm
温度	40 °C
検出	区間毎に励起波長、蛍光波長を切替 (Table 11)

Table 11: 区間毎の設定波長

A	励起波長: 270 nm、蛍光波長: 330 nm
B	励起波長: 250 nm、蛍光波長: 370 nm
C	励起波長: 330 nm、蛍光波長: 430 nm
D	励起波長: 270 nm、蛍光波長: 390 nm
E	励起波長: 290 nm、蛍光波長: 430 nm
F	励起波長: 370 nm、蛍光波長: 460 nm
G	励起波長: 270 nm、蛍光波長: 330 nm

5-4. アミノ酸の分析例

o-フタルアルデヒド (OPA) /N-アセチルシステインを反応試薬とするポストカラム蛍光誘導体化検出法を用いた、アミノ酸自動分析システムです。チオール系の反応助剤として、島津独自のN-アセチルシステイン (無臭性個体) を採用していますので、従来からのメルカプトエタノールを用いる方法に比べ、取り扱いが容易な上、プロリンなどのイミノ酸の感度が向上します。移動相、反応液がキット化されていますので、煩わしいこれらの液調製が不要です。Fig. 15では従来機種RF-10AxlとRF-20Axsのクロマトグラムおよび各成分のS/N比の比較を示しています。その結果、ほとんどの成分で4~5倍の感度向上が実現できました。

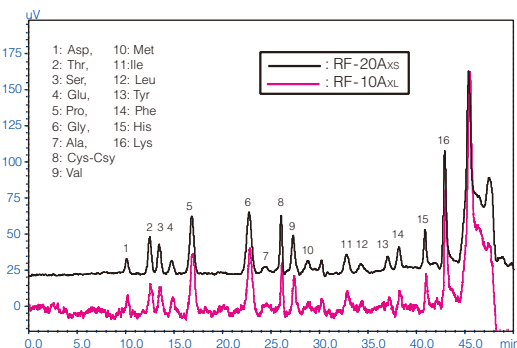


Fig.15: RF-10AxlとRF-20Axsのアミノ酸分析比較

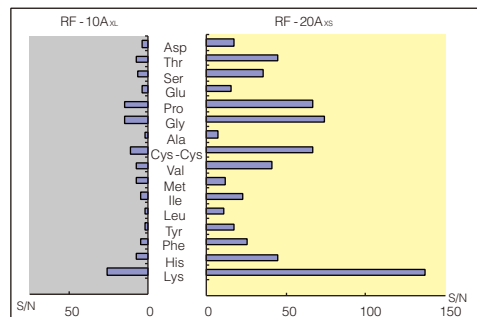


Table 12: アミノ酸の分析条件

移動相	アミノ酸分析移動相キット
流速	0.4 mL/min, 高圧グラジエント分析
カラム	Shim-pack Amino-Na 6.0 mmI.D.×100 mmL.
温度	60 °C
検出	励起波長: 350 nm、蛍光波長: 450 nm
試料	アミノ酸標準試料, 10 μL注入

Table 13: アミノ酸のポストカラム反応条件

反応液	アミノ酸分析OPA試薬キット
流速	各0.2 mL/min
反応温度	60 °C

5-5. カルバメート分析における再現性

N-メチルカルバメート農薬は、殺虫剤として広く用いられる農薬で、ポジティブリスト制度関連、水質管理目標設定項目関連などの各種規制において、残留基準や目標値が設定されています。島津Prominenceカルバメート分析システムは、*o*-フタルアルデヒド(OPA)を反応試薬とするポストカラム蛍光誘導体化検出法を用いた、N-メチルカルバメート系農薬自動分析システムです。ポジティブリスト制度に関する個別試験法や、水質管理目標設定項目の試験法に準拠する分析が可能です。Fig. 16はカルバメートの連続分析結果を示しています。各成分の再現性についてはTable 16に示しますように、良好な再現性を実現していることがわかります。

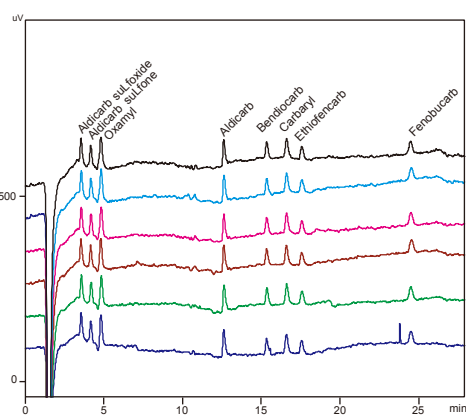


Fig.16: カルバメートの連続分析結果

Table 14: カルバメートの分析条件

移動相	水 / メタノール
流速	1.0 mL/min, 高圧グラジエント分析
カラム	Shim-pack FC-ODS 4.6 mmI.D.×75 mmL., 3 μm
温度	50 °C
検出	励起波長: 339 nm, 蛍光波長: 445 nm
注入量	10 μL (0.5 μg/L)

Table 15: カルバメートのポストカラム反応条件

反応液	A: 水酸化ナトリウム水溶液 B: OPA, β-メルカプトプロピオン酸を含むほう酸緩衝溶液
流速	各0.5 mL/min
温度	100 °Cおよび50 °C

Table 16: 各成分の再現性 (n=6)

成分名	面積値再現性 (%RSD)	成分名	面積値再現性 (%RSD)
Aldicarb sulfoxide	2.63	Bendiocarb	2.44
Aldicarb sulfone	2.53	Carbaryl	1.62
Oxamyl	2.57	Ethiofencarb	2.69
Aldicarb	1.42	Fenobucarb	1.96

5-6. 還元糖の分析例

糖類の分離、検出方法にはさまざまな手段があり、検出器には示差屈折率検出器、蒸発光散乱検出器も良く用いられますが、分離条件や感度、選択性の面から定量が困難な場合があります。島津Prominence還元糖分析システムは、配位子交換、ほう酸錯体-陰イオン交換、HILICなどの方法で分離させた糖類を、ほう酸とアルギニンを含む反応液と高温下で反応させ蛍光誘導体化し、これを検出する応用システムです。夾雑成分が多い試料中の還元糖を選択性良く、高感度に分析することが可能です (Fig. 17)。ここでは従来機種RF-10AxLとRF-20Axsでデータの比較を行い (Table 19)、ほとんどの成分で10倍以上の感度向上が実現されました。10 μL注入時の検出限界は0.1~0.3 μmol/L (スクロースは約1 μmol/L)、定量限界は0.4~1 μmol/L (スクロースは約4 μmol/L) となりました。

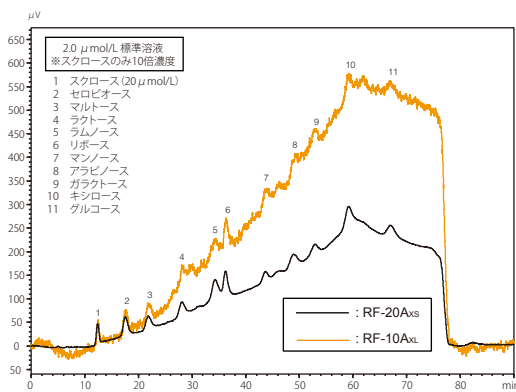


Fig.17: 還元糖の分析結果

Table 17: 還元糖の分析条件

移動相	ほう酸カリウム緩衝溶液
流速	0.6 mL/min, グラジエント溶離法
カラム	Shim-pack ISA-07/S2504 4.0 mmI.D.×250 mmL.
温度	65 °C
検出	励起波長: 320 nm, 蛍光波長: 430 nm
注入量	10 μL

Table 18: 還元糖のポストカラム反応条件

反応液	アルギニン, ほう酸水溶液
流速	0.5 mL/min
温度	150 °C

Table 19: RF-20AxsとRF-10AxLの感度比較

	ピーク#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RF-20Axs	S/N	46.01	40.66	27.82	28.89	49.22	59.92	20.33	27.82	20.33	44.94	23.54
RF-10AxL	S/N	3.37	3.09	2.59	2.73	2.30	4.09	2.23	2.44	2.01	2.94	1.80
	感度比	13.6	13.2	10.8	10.6	21.4	14.6	9.1	11.4	10.1	15.3	13.1

本レポートの掲載情報は著作権により保護されています。本情報を商業利用を目的として販売、複製または改ざんして利用することはできません。また、掲載情報については充分検討を行っていますが、正確性や完全性を当社は保証するものではありません。従って掲載情報に関連して何らかの業務もしくは契約を行おうとされる場合は、別途あらためて当社営業担当と打ち合わせして、ご確認や契約をしていただく必要があります。本レポート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。

初版発行：2010年7月



分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>