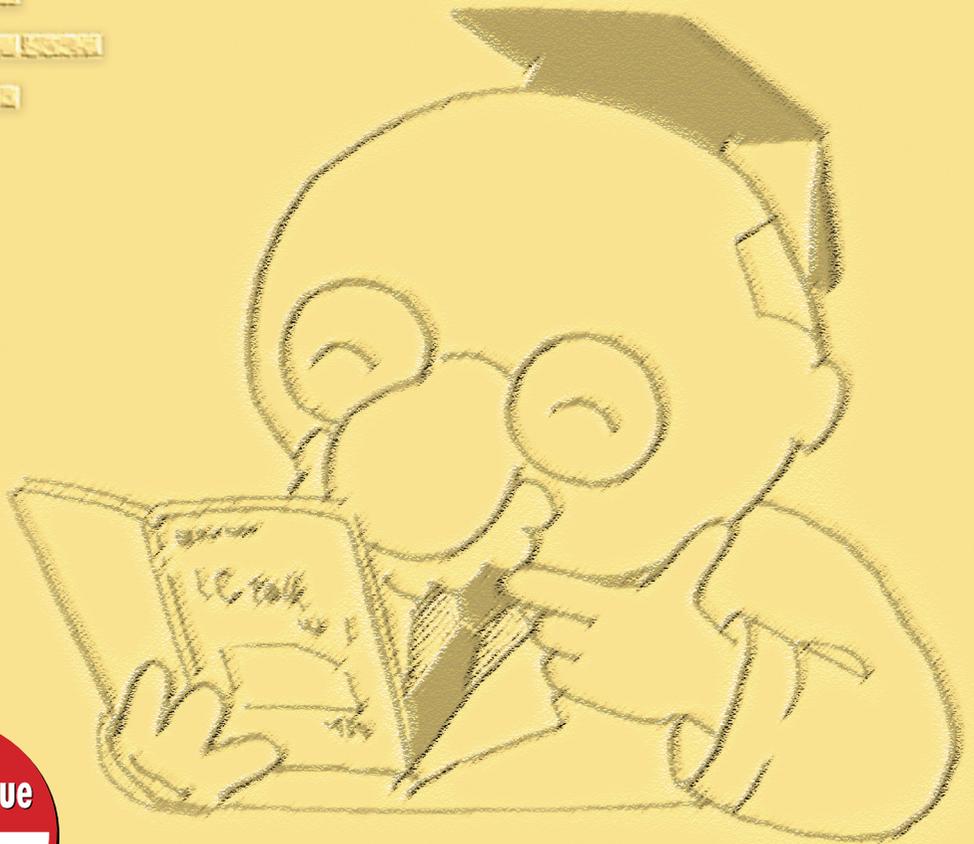


LC talk

特集号 “HPLC入門”



Special Issue
VII

2004

創刊20周年記念



平素は **LC talk** をご愛読いただきありがとうございます。

さて、**LC talk** は 1984 年秋に創刊以来、今年で 20 周年を迎えることになりました。このような長きに渡り発行することができましたのは、皆様方のご支援の賜物であり、関係者一同、厚く御礼申し上げます。次の 10 年に向けて、さらに内容を充実して HPLC の技術情報をお届けする所存でございますので、引き続きご支援賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

2004 年秋号は創刊 20 周年を記念して、「特集号 “HPLC 入門”」としてお届けいたします。既刊 **LC talk** の「入門 (Introductory)」から 22 編を厳選し、内容をアップデートして編集しました。この特集号が、皆様方のお役に立てば幸いです。

2004 年 11 月
“**LC talk club**” 事務局



目次

内 容	ページ
1. 逆相クロマトグラフィーの話 (Vol.1 P10 )	4
2. 逆相イオンペアクロマトグラフィーの話 (Vol.2 P10 )	5
3. HPLCにおける誘導体化 (Vol.3 P10 )	6
4. 逆相クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィー (Vol.8 P10 )	7
5. シリカゲル系充てん剤について (Vol.11 P10 )	8
6. 吸光光度検出法 (Vol.14 P10 )	9
7. アフィニティークロマトグラフィー (Vol.16 P10 )	10
8. 順相クロマトグラフィーの話 (Vol.19 P10 )	11
9. 配位子交換クロマトグラフィー (Vol.24 P8 )	12
10. GLP/GMP 関連用語解説－RSD (C.V.) について (Vol.36 P8 )	13
11. GLP/GMP 関連用語解説－テーリング係数, 分離度について (Vol.37 P4 )	14
12. 検出限界について (Vol.40 P8 )	16
13. LC - MS の話～ その1～ (Vol.46 P8 )	18
14. LC - MS の話～ その2～ (Vol.47 P8 )	19
15. LC - MS の話～ その3～ (Vol.48 P8 )	20
16. 糖類の分離法 (Vol.49 P8 )	21
17. 糖類の検出法 (Vol.50 P8 )	22
18. 続・糖類の検出法 (Vol.51 P8 )	23
19. 蒸発光散乱検出器の話 (Vol.52 P8 )	24
20. アミノ酸の分析法 (Vol.53 P8 )	25
21. 有機酸の分析法 (Vol.54 P8 )	26
22. サイズ排除クロマトグラフィーの話 (Vol.55 P8 )	27

HPLCの分離モードの中でもっともよく用いられているモードとして逆相クロマトグラフィーがあげられます。対象となり得る化合物の多様さの点では他のモードを圧倒していると言ってよいでしょう。逆相クロマトグラフィーでは試料がカラムに保持される現象の原因のうち支配的なものが固定相とサンプルの間に働く疎水的相互作用であるということになります。逆相クロマトグラフィー用カラムの充てん剤としては、シリカゲルを担体としてアルキル鎖を化学結合させたものと樹脂を基本とするものの2種類がありますが、前者の方が理論段数が高いので特殊な場合を除いては前者を使用します。樹脂を用いなければならない場合というのは、分離のため移動相pHをシリカゲルの使用範囲からはずれたところに設定する必要がある場合、あるいはシリカゲル表面に残っている未反応シラノール基が分離に悪影響を及ぼし、それを移動相の内容を変えることによっては解決できない場合などが考えられますが、比較的珍しいケースと言うことができます。シリカゲルに化学結合させるアルキル基として用いられるものとしてはオクタデシル基、オクチル基、トリメチル基が代表的です。(図1)アルキル鎖が長くなるほど保持力は強くなります。カラム

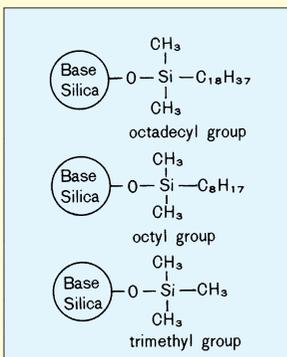


図1 固定相の種類

カラム選択を行ったあと移動相の内容を決めます。基本は水あるいは緩衝液と有機溶媒の混合溶媒になりますが、分離に影響を与える因子のうち大きなものは(1)有機溶媒の種類、(2)有機溶媒の割合、(3)緩衝液のpH、の3つになります。(1)については、通常使用されているのは、アセトニトリルまたはメタノールです。分析上もっとも望ましいのはHPLC用のアセトニトリルです。紫外吸収が少ないので低ノイズ分析ができる、低圧力で分析が行えるのでカラム寿命が長くなるという2点が利点としてあげられます。ただし例外として、分離の選択性の点からメタノールを選ぶことがあります。つまりメタノールならピークAとBが分離するがアセトニトリルでは分離しない、あるいはAとBはどちらの溶媒でも容易に分離するが、AとBの α (k' 値の比)がアセトニトリルでは大きくなり、メタノールの方が分析が短時間に終了するといったような場合です。(2)の

有機溶媒の割合は必要な分離がようやく達成されている、もっとも溶出が早くなる割合が最適条件になります。(有機溶媒の割合を増やせば溶出は早くなります。また減らせば遅くなりますが分離は良くなります。)中性物質だけが分析対象の場合、保持時間は移動相pHの影響を受けないので分析は通常水/有機溶媒系で行ないます。その場合条件設定は(1)、(2)だけになります。酸性、あるいは塩基性物質に対しては、さらに(3)の条件設定を行なう必要があります。たとえば安息香酸を例にとると溶液中で図2のような平衡状態で存在しています。溶液のpHを下げれば、この平衡は右にかたより、電荷を持たない状態の割合が多くなります。逆に上げれば左の解離した状態が多くなります。逆相的に保持されやすいのは電荷を持たない状態ですので、この場合pHを下げれば保持が強くなり、pHを上げれば早く溶出します。アミノ類など塩基性物質の場合には、逆にpHを上げれば保持が強くなります。このpH依存性に着目し、保持を強くするため、解離が抑制されるようなpHに設定し分析を行った場合これをイオン抑制法と呼んでいます。このように酸、塩基は移動相のpHという因子の影響を受けますので、分析の再現性を得るためには水ではなく緩衝液を使用する必要があります。また分離調節という点から見れば、酸、塩基は移動相のpHという因子を変えることにより、他の物質からの選択的な分離を達成することができるわけです。さて緩衝液は通常弱酸あるいは弱塩

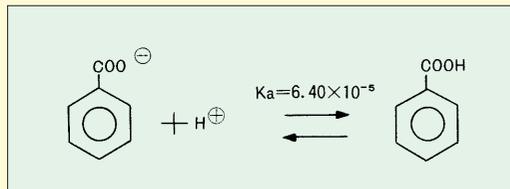


図2 安息香酸

基の塩を水に溶解させて調製します。よく使用するものには、りん酸緩衝液、酢酸緩衝液、ほう酸緩衝液、くえん酸緩衝液、アンモニウム緩衝液などがありますが、緩衝液は用いた弱酸のpKa (弱塩基の場合は共役酸のpKa)と同じpHのところが一番強い緩衝能を示すのでpKaを基準に選択を行います。たとえば目的とする緩衝液pHが4.8であったとします。酢酸のpKaは4.8と非常に近く酢酸緩衝液を使うのがこの場合望ましいわけです。ただし、紫外吸光度検出器を用い210nm付近の短波長で測定を行う時には、酢酸およびくえん酸はカルボキシル基の吸収によりバックグラウンドが上がり測定上望ましくありません。(3)の条件設定に関しては、化合物の性質に関する情報を得て、上述したような点に注意して、できるだけ短時間に他の物質との分離が達成できるようなpHにしてやることになります。

さて逆相クロマトグラフィーの適用化合物の範囲を大幅に広げた手法として逆相イオンペアクロマトグラフィーがあります。これについては次回にお話したいと思います。

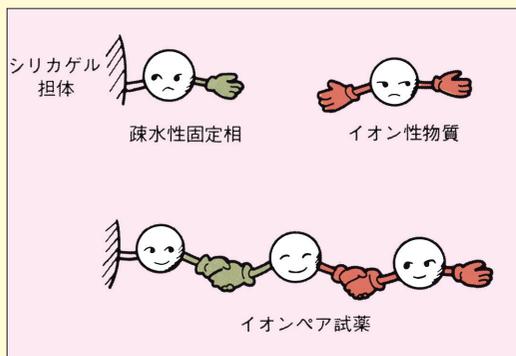
逆相イオンペア クロマトグラフィーの話

(LC talk Vol.2 Introductory より)

前回は、HPLCのモードの中でもっとも広く用いられ、HPLC発展に重要な役割を果たしている逆相クロマトグラフィー（RPCと略）についてお話ししましたが、今回は、このRPCの応用性を広げる逆相イオンペアクロマトグラフィー（RP-IPCと略）についてお話しします。

IPCは、そもそもイオンペア抽出法と呼ばれる溶媒抽出法より発展して来たものです。イオンペア抽出法は、水溶液中のイオン性物質に対し、それと逆電荷をもつカウンターイオンを添加しイオンペアを形成させ、全体の電荷を中和して有機溶媒層へ抽出する方法です。HPLCへの応用は、当初シリカゲルを用いて行われましたが、現在ではほとんどがRPCにおいて行われます。RPCにおいて、試料の極性が低くなれば保持は増大するというのもっとも基本的なことです。前回お話ししましたようにイオン性物質の分析をRPCで行う場合、その解離状態により保持は変わり、非解離の状態にすれば保持は強くなります。

したがって、あるイオン性物質に対しそれとイオンペアを形成するカウンターイオンを加えると極性が低くなり保持を強めることができます。たとえば、チアミン（ビタミンB₁）の分析について考えてみましょう。チアミンは、分子内に4級窒素を持つ強塩基物質で通常の移動相中で正電荷を帯びます。このためRPC用充てん剤の炭化水素固定相と疎水的相互作用を行うことなくカラムを素通りしてしまいます。この場合、移動相の中に負電荷をもつオクタンスルホン酸イオンを加えるとチアミンとイオンペアを形成し、極性が低くなり充てん剤固定相に保持されるようになります。つまり、非極性な固定相とイオン性の試料との橋渡しをするのがイオンペア試薬（カウンターイオン）なのです。



RP-IPCの保持機構は、実際のところ上に述べたような単純なモデルだけでは説明できません。一般に考えられているモデルには次の3つがあります。まず最初は、上で述べた「イオンペアモデル」です。その次は「イオン交換モデル」

」です。これは、まずイオンペア試薬の非極性部位が充てん剤に吸着され、イオン交換タイプの表面が形成され、それに試料がイオン交換的に保持されるというものです。そして、いまひとつは、「イオン相互作用モデル」で、イオンペアモデルやイオン交換モデルより広い範囲の作用を考えたモデルです。つまり、静電気力ばかりでなく親移動相的、反移動相的な力、親固定相的、反固定相的な力に影響される動的平衡を考えたモデルです。しかし、これらのモデルでは説明できない現象も観測されており、さらにいくつかのモデルも考えられていますが、ここではこれ以上は述べないことにします。

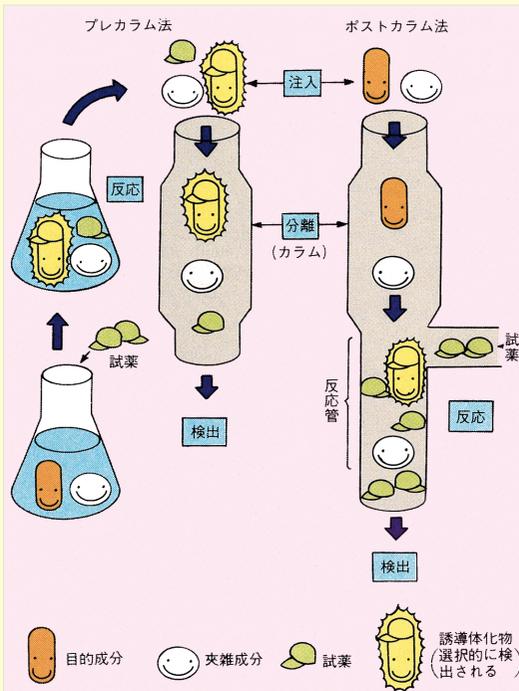
チアミンの分析例で述べましたように、一般に塩基性物質に対するイオンペア試薬としては、ペンタンスルホン酸ナトリウム、オクタンスルホン酸ナトリウムなどのアルキルスルホン酸塩が用いられます。また、酸性物質に対するイオンペア試薬としては、水酸化テトラブチルアンモニウムなどのテトラアルキルアンモニウムイオンがよく用いられます。いずれの場合も各試薬メーカーより容易に手に入れることができます。また、最近ではHPLC用に精製された高純度の各イオンペア試薬も市販されています。RP-IPCにおける試料の保持は、通常のRPCと同様に、移動相の有機溶媒含量、緩衝液濃度、pHなどに影響されますが、イオンペア試薬の種類、濃度によっても影響されます。一般に、イオンペア試薬のアルキル鎖が長くなるほど、また、一定濃度までは濃度が高くなるほど試料の保持は増大します。イオンペア試薬濃度が一定濃度に達すると、保持の減少（foldover）が観測されます。

さて、最後にRP-IPCを用いる際の注意点を2つばかりお話しします。まず、イオンペア試薬をカラムに流しはじめてからカラムが十分安定するには時間がかかるということを留意しておいてください。通常のRPC用の移動相と同じ位の平衡時間で試料を注入しても保持時間が安定しないことは往々にしてあることです。あせらず十分安定するのを待ってください。それから、逆にカラムよりイオンペア試薬を洗い流す時、特にテトラアルキルアンモニウムイオンなどの塩基性イオンペア試薬を用いている場合、いきなり水だけを流してはいけません。緩衝液を洗い出すつもりで水だけを流しても疎水性部位をもつテトラブチルアンモニウムイオンは充てん剤に吸着したままになっており、充てん剤のシリカを劣化させてしまいます。このような場合は、酸性緩衝液と有機溶媒の1対1から1対2位の混合液でまずイオンペア試薬を洗い出すことが大切です。

以上、RP-IPCは、RPCの、ひいてはHPLCの応用範囲をぐんと広げてくれるパワフルな方法で、今後さらに新しい応用例が登場してくると思います。

HPLCが進歩し、広く普及するにつれ、より複雑な試料中のより微量な目的成分の分離定量が要求されるようになってきています。しかし、このような分析は通常のHPLC用の検出器だけでは困難な場合も多く何らかの工夫をしなければなりません。そのひとつのアプローチが誘導体化であり、目的成分の検出感度ならびに選択性を向上させることを目的としています。より良い誘導体化を行うため、新しい試薬の開発あるいは新しい手法の開発がさかんに行われています。ここでは、HPLCにおける誘導体化の一般的な手法をお話してみたいと思います。

HPLCにおける誘導体化には、プレカラム誘導体化法(Pre-column derivatization)とポストカラム誘導体化法(Post-column derivatization)とがあります。(以下それぞれプレカラム法、ポストカラム法と略します。)これは、誘導体化のための反応を、カラムに試料を注入する前に行なうか、カラムで試料を分離した後に行なうかの違いです。次に両手法の特長についてお話ししましょう。



a) プレカラム法

プレカラム法では、誘導体化反応は多くの場合オフラインで行われます。クロマトグラフィー系外で誘導体化反応が行われるため、ポストカラム法と比較すれば次のような特長があります。

- 1) 装置構成が単純である。

- 2) 反応条件(反応時間、反応温度、試薬の数など)に制約がない。
- 3) 誘導体化試薬の量は少量であるので、高価な試薬でも使用できる。
- 4) 反応試薬そのものが、検出されるような場合(例えば反応試薬が400nmに光吸収を持ち、反応生成物もまた400nmに光吸収を持つといった場合)でもそれが目的成分の誘導体化物と分離されていれば、定量精度、検出限界には影響を及ぼさない。
- 5) 誘導体化することにより、もとの成分よりも分離条件の選択が容易になることがある。

このようにプレカラム法では、反応の選択という意味ではかなり自由度を持っていますが、正確な定量を行うためには次の条件を満足する必要があります。

- 1) 反応の再現性が優れていること。
- 2) 反応生成物が時間的に安定であること。
- 3) 副生成物のピークが、他の分析対象物のピークを妨害しないこと。

プレカラム法で用いる試薬の例としては、カルボキシル基、アミノ基、水酸基などと反応する試薬が試薬メーカーから数多く販売されています。

b) ポストカラム法

ポストカラム法では、オンラインで誘導体化が進みます。そのためプレカラム法と比較して次の特長を持っています。

- 1) 反応操作が自動化されているので無人運転も容易にできる。
- 2) 反応時間は、移動相送液ポンプおよび反応試薬送液ポンプの流量により正確に制御されているので、反応生成物が時間的に不安定であっても適用できる。

また反応は必ずしも100%進行する必要もない。しかし、ポストカラム法の場合は次のような条件を満たしていることが必要になります。

- 1) 反応試薬は、目的成分と反応してはじめて検出される物質に変化し、それ自身は検出されないこと。(バックグラウンド上昇を抑えるため。)
- 2) 反応条件を良くするために移動相条件中のある因子(pH、有機溶媒濃度など)が制限を受けることがあるが、そのことによって分離が犠牲にならないこと。
- 3) 反応部での成分バンドの広がり分離を損わない程度に小さいこと。(言い換えると反応時間が短いこと。)

ポストカラム法の例としては、OPA(オルトフタルアルデヒド)を用いたアミノ酸分析、アルギニンを用いた還元糖分析などがあります。

誘導体化の手法を選択する際には上記の特長を良く理解して、分析目的に対し、適した方法を選ぶことが必要です。

今後HPLCに対する要求は、広く厳しくなってくるのが予想されます。その要求に応えていくためには、誘導体化法を用いた新しいHPLCシステムを開発していくことが不可欠となるでしょう。

逆相クロマトグラフィーと疎水クロマトグラフィー

(LC talk Vol.8 Introductory より)

たんぱく質、核酸などの分離に関しては、従来、ゲル濾過クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーが利用されてきましたが、最近では、逆相クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィーによる分離の研究もさかんです。特に、近年、化学結合型シリカゲルを中心とした新しい硬質ゲルが次々と開発され、これらの生体高分子の分離が著しく高速化されたことによって、今後、この分野でHPLCが果たす役割はますます重要になると考えられます。

たんぱく質と固定相の間の疎水の相互作用を利用して分離する手法として、逆相クロマトグラフィー (Reversed Phase Chromatography, RPC) と疎水クロマトグラフィー (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) がありますが、ここではこの2つの手法の特徴について紹介します。RPCは、従来からHPLCの主流として、低分子量物質の分析に広く用いられてきましたが、最近では核酸やたんぱく質分析にも利用されています。たんぱく質を分析する場合は、細孔径の大きな化学結合型シリカゲルをカラム充てん剤として用い、移動相条件としては、通常pH2~3あるいは中性付近で有機溶媒量を増加させていくグラジエント溶出法が用いられます。この場合、試料として用いたたんぱく質は、多くの場合変性を伴っているため、ポリペプチドの分析と呼ぶ方がふさわしいかもしれません。一方、HICでは通常、RPC用充てん剤よりもはるかに疎水性の低い充てん剤を用い、溶離条件として、塩の濃度を低下させていくグラジエント溶出法が用いられます。この場合は、RPCの場合のように移動相に有機溶媒を使用しないので、多くの場合、たんぱく質の高次構造をそこなうことなく分析可能です。従って、たんぱく質試料の変性が少なく、分取精製手法としても期待されています。

これら2つのクロマトグラフィーに用いられる充てん剤を比べてみましょう。RPCの場合は、化学結合型シリカゲルが主流で、従来用いられてきた細孔径の小さいもの (8~10nm)よりも30nm以上の大細孔径シリカゲルに、アルキル基を導入したものが試料の回収率の点で良いとされています。たんぱく質試料の回収率については、化学結合型シリカゲルに残存するシラノール基にも左右され、また残存シラノール基の量はメーカー差及びロット差にも左右されるので、現状では定量的考察が難しいようです。一般にシリ

カ中のシラノール基は $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 程度存在すると言われており、通常RPC用充てん剤の合成にあたっては、アルキル基を含むシランカップリング剤をシラノール基に反応させますが、反応するシラノール基は、アルキル基の鎖長に依存するものの $3\sim 4\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 程度で、一般にトリメチルクロロシランなどを用いて二次シリル化が行なわれ、クロマトグラフィーにおける残存シラノール基の影響を小さくする工夫がされています。このようにして得られたRPC用充てん剤を用いてたんぱく質を分析する場合は、前述したように、有機溶媒を移動相に用いる必要があります。変性及び回収率の問題などから、現在では、比較的分子量のポリペプチドの分析が主流となっています。例えば、たんぱく質をトリプシンなどの酵素で分解して得られたポリペプチドの分析などはよく知られた例です。一方、HICの場合は、基本的にゲル濾過クロマトグラフィーで用いられる親水性ゲルに、アルキル基やフェニル基などの疎水基を導入した充てん剤が用いられ、導入された疎水基の量はRPCの場合に比べはるかに少なくなっています。現在市販されているHIC用充てん剤には、シリカ系、ポリマー系の2種類がありますが、シリカ系の場合は残存シラノール基の影響をなくすようにメーカーによって工夫されているようです。このように、RPCとHICに用いられる充てん剤の間には、疎水性の点で大きな差があり、これが前述したような溶離条件の差につながっています。

試料の分離については、RPCの方がHICよりも良いのですが、HICの方が試料の変性が少ないことが知られています。今後、たんぱく質や核酸の分析にHICやRPCが重要な役割を果たすものと期待され、目的に応じて両者をうまく使い分けていくことが必要です。



激流の中を岩にぶつかりながら…RPC



清流をスイスイ…HIC

シリカゲル系充てん剤について

(LCtalk Vol.11 Introductory より)

現在HPLCで広範に使用されているカラムは、ODSシリカゲルを中心とした化学結合型全多孔性球状シリカゲルが充てんされたものです。HPLC分析を実際に行った方の中には、カラムのロット差に困ったり、あるいは、同じODSでもメーカー間の差異に疑問を持たれた方も多いと思いますが、今回はシリカゲル系充てん剤について少し詳しく観ることにします。

汎用ODSシリカゲルは、一般には平均粒子径 $5\mu\text{m}$ 、平均細孔径 $6\sim 10\text{nm}$ の球状で多孔性のシリカゲルにジメチルオクタデシルクロロシランのようなシランカップリング剤を反応させることによって製造されています。シリカゲル表面には、約 $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$ のシラノール基が存在していますが、シランカップリング剤との反応によってシロキササン結合を介してオクタデシル基が導入されます。ただし、ジメチルオクタデシルシリル基のようにかさ高い置換基を用いる場合は、その立体障害のためどうしても未反応シラノール基が残ってしまいます。この“残存シラノール基”の量は、反応条件によっても異なりますが、通常のODSシリカでは $5\mu\text{mol}/\text{m}^2$ です。従って、より立体障害の小さい置換基をもつシランカップリング剤で残存シラノール基をシリル化する試みがなされてきました。これが、トリメチルクロロシラン (TMS-Cl) などによる“二次シリル化”ですが現在市販されているODSシリカゲルは、ほとんどこのようなTMS化が行われています (図1)。これは、塩基性試料の吸着に残存シラノール基が関与しているためですが、残存シラノール基の量についてはメーカー間で差が見られますので塩基性試料の分析には特に注意する必要があります。

ODSシリカゲルをもう少し詳しく見てみましょう。通常は“球状シリカゲル”と記されているものでも顕微鏡で観察すると破砕状のシリカゲルが混入している場合もあり、また、公称“ $5\mu\text{m}$ ”でも $2\mu\text{m}$ 以下の微粒子や $10\mu\text{m}$ 程度の粒子などが多く混入しているものもあります。これは、メーカーによって顕著な差が見られますが、このような粒子形状のバラツキはカラムの充てん状態に悪影響を与えます。通常は充てんカラムを購入される方が多いと思いますが、短時間の使用でカラム入口にすきまが生じるようなカラムは、粒子形状のバラツキからカラム充てんがうまくいっていないものと考えられます。

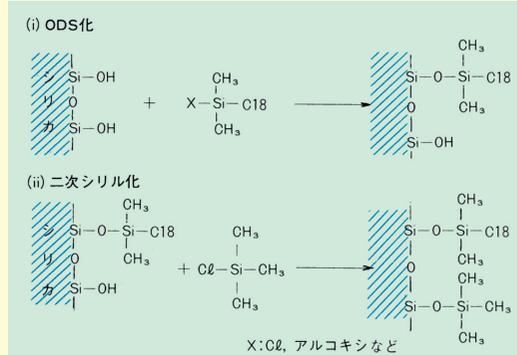


図1 シリカ表面のシリル化反応

また、公称“ 10nm ”の平均細孔径のシリカゲルと言っても実際はある幅の細孔径分布をもっており、細孔径分布の狭さもメーカーによって異なります。微細孔の多いシリカゲルは、ODSのようなかさ高いシランカップリング剤が拡散していけないため、ODSの導入量が減少してしまい、また、場合によっては二次シリル化もされず残存シラノール基として残ってしまいます。従って、ロット差のない充てん剤の製造には細孔径分布のコントロールも重要になります。一般に平均細孔径が大きくなるに従ってシリカゲルの比表面積は減少するので、見かけのODS導入量が少なくなり低分子物質の保持は弱くなります。細孔径が 30nm 以上の“ワイドポア”シリカゲルは最近特にタンパク、核酸などの高分子の分析に用いられていますが、これは、充てん剤細孔径が大きいほど、高分子試料が速やかに細孔内外に拡散するためです。

化学結合型シリカゲル系充てん剤には、用いるシリル化剤の種類によって、ODSのほか、オクチル、フェニル、シアノプロピル (CN)、アミノプロピル (NH_2) など種々のタイプを製造することが可能で、分析目的によって使い分けが必要が必要です。このような充てん剤の使用pH範囲は、だいたい $2\sim 8$ ですが、これはアルカリ側ではシリカの溶解が起こり、また、 $\text{pH}2$ 以下ではSi-C結合の切断から化学結合固定相の脱離が起こるためです。耐アルカリ性を改善したカラムとしては、ポリマーでシリカゲルをコーティングしたカラムや、合成ポリマー表面にオクタデシル基を導入したカラムが用いられることがあります。しかし、化学結合型シリカゲルカラムは、安価で耐久性のある高性能な充てん剤として、現在も幅広く利用されています。

吸光光度検出法は分子内の原子価電子の励起に基づく吸光度を測定する検出法で、汎用性に富み、選択性にも優れている上に、扱い易いことも手伝って、HPLCの検出法のうちでは最も広く使用されています。

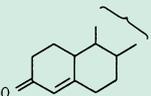
吸光度 (Absorbance, A) とは、光路長 l なる溶液を単色光が透過するとき、入射光の強度 I_0 に対する透過光の強度 I の比の負の対数として定義され、溶質の濃度 C と次のような関係があります。

$$A = \epsilon C l$$

ここで、 ϵ は溶質の吸光係数です。この式のうち、吸光度が濃度に比例する関係を Beer の法則と言いますが、溶質間の相互作用が無視でき、溶質の化学的状態が濃度に依存しないとき成立します。HPLC の場合は通常、カラムから溶出した分析対象成分の濃度が希薄なため、Beer の法則が成立し、成分濃度の一次関数として定量に用いられます。

それでは、いったいどんな物質が吸光光度法の対象となり、どのような条件で測定されるのか、考えてみましょう。分子内には σ 電子、 π 電子、および結合に関与していない n 電子がありますが、光によって励起されると、結合性あるいは非結合性軌道から反結合性軌道へ遷移します (各反結合性軌道は * で示される)。これらの遷移のうち、 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 遷移に必要なエネルギーは著しく大きいので、飽和炭化水素のような単結合しか持たない化合物は、本検出法の波長範囲 (190 ~ 700 nm) では検出されません。 n 電子や孤立した π 結合を有する化合物は $n \rightarrow \pi^*$ 、 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移により、紫外域に吸収を示しますが、その吸光係数は小さいのが一般的です。したがって、実際に対象となる物質は共役系に限られています。しかしながら、HPLC で取り扱う物質の多くは共役系であり、それゆえ、吸光光度検出法が汎用されるわけです。

検出にあたっては、測定波長の設定が、感度および選択性の良し悪しを決定するため、重要なカギになります。測定波長は、夾雑成分が多い場合にはそれらの影響の少ない波長を選ぶこともあります。通常は分析対象成分の示す極大吸収波長とします。これは最も高い感度が得られることに理由があることは勿論のこと、波長設定に誤差が生じて感度にあまり影響しないためでもあります。極大吸収波長は分光光度計で吸収スペクトルを測定して求めますが、簡単なポリエンあるいはエノン構造であれば、Woodward や Fieser の経験的計算法により算出することができます。これは、基本骨格とそれに結合する各官能基に与えられた数値を加え合わせて求めるもので、鉱質ステロイドなどのステロイドエノン为例にとると、次のようになります。

基本骨格		215
アルキル基の β 置換		12 × 2
環外二重結合		5
計		244 (nm)

この計算法は分光光学を取り扱った有機化学の成書には必ず記述されていますので、詳しくはそれらを参照してください。

物質の吸収スペクトルや吸光係数はその化学構造に支配されるものですが、溶液では溶媒和や第三物質との相互作用ならびに解離状態によって変化します。特に解離基が共役系にある場合、その変化が大きく、例えばアニリンでは極大吸収波長およびその波長での吸光係数が次のように変わります。

		
極大吸収波長 (nm)	235 280	230 254
吸光係数	8,600 1,430	7,500 160

したがって、移動相は分離の面からだけでなく、検出の面からも至適な条件を検討する必要があります。アニリンにおいては、移動相の pH をアニリンの pK_a よりも高くした方が感度の点でも選択性の点でも都合が良いといえます。また、このように解離状態によって大きく吸光度が変化する物質の場合、緩衝液を用いて解離度を一定にしておかないと良好な再現性や直線性が得られないことに注意しなければなりません。

移動相は対象成分の化学的状態を左右するため、本検出法では重要な要素となりますが、それ以外に移動相自体の吸光性も考慮する必要があります。例えば、吸光性の高い物質が移動相中に存在すると、ノイズが大きくなり、ときにはシステムピークが出現することがあります。またグラジエント溶出の場合にはベースラインの変動にもつながりますので、測定波長での吸収が少ない移動相を用いることが好ましいと言えます。

吸光光度検出法は、装置の性能も現在大きく向上しており、至適な条件さえ整えば、成分によっては pmol の検出も可能になっています。物質の吸光性を十分に把握すれば微量分析にも威力を発揮します。大いに活用してみてください。

酵素と基質、あるいは抗原と抗体というような生体関連物質には、特異的に相互を認識し複合体を形成する性質がありますが、このような生物学的親和力を利用して分離精製を行う手法のひとつにアフィニティークロマトグラフィーがあります。例えば、非常に数多くの成分を含むマトリックスの中から特定の酵素を取り出したい場合は、目的とする酵素に対する基質あるいは阻害剤など、その酵素に対して特異的な親和力を示す物質をリガンドとして用いれば、目的とする酵素のみを選択的に取り出すことが可能となります。

■アフィニティークロマトグラフィーの操作手順

操作手順は次の4つの過程に分けられます。

(1) カラムの平衡化

適当なリガンドを固定化した充てん剤をカラムに詰め、試料を吸着させる時に用いる溶液でカラムを平衡化させる。

(2) 試料の添加と目的物質の吸着 (図 (a))

カラムに試料を導入して目的成分を吸着させる。

(3) カラムの洗浄 (図 (b))

充てん剤に吸着されていない成分を洗浄操作によってカラムから除去する。

(4) 目的成分の溶出 (図 (c))

充てん剤に吸着されている目的成分をカラムから溶出させるための溶液を流して、目的成分を回収した後再び(1)に戻る。

このように、アフィニティークロマトグラフィーを用いれば、原理的には多成分を含む複雑なマトリックスの中から、簡単な操作で効率よく目的成分のみを取り出すことが可能です。

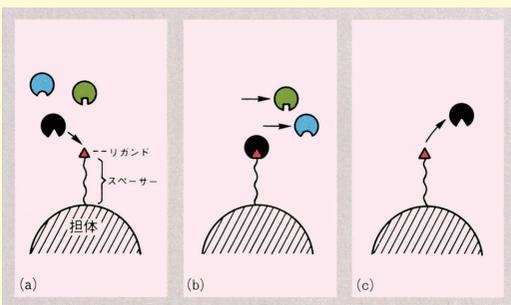


図 アフィニティークロマトグラフィーの原理

■リガンドの選択と充てん剤への固定化について

実際にアフィニティークロマトグラフィーを行う場合は、リガンドの選択、充てん剤担体の選択、リガンドの固定化法について事前に充分検討しておく必要があります。

●リガンドの選択

リガンドとして用いる物質と目的成分の間の親和力があ

まり強すぎるとカラムから溶出させることが困難になることもあります。複数のリガンドが考えられる場合は、目的成分に対する選択性が高く、かつ、できる限り温和な条件でカラムから溶出させることが可能な物質をリガンドとして選択します。

●充てん剤担体の選択

現在広く用いられている担体は、アガロース、親水性合成高分子 (ポリビニルアルコール、ポリアクリレートなど) の球状粒子です。基本的には試料に対して不活性で、使用する条件下で物理的、化学的に安定な担体を選択する必要があります。また粒子が多孔性の場合は、細孔分布、比表面積などがリガンドの固定化量及び充てん剤表面の有効リガンド量にも影響を与えますので注意が必要です。

●リガンドの固定化法

固定化法についてはCNBr法をはじめとして数多くの手法が報告されています。リガンドの固定化にあたっては、目的成分と親和力を示す部位が有効に機能するような固定化法を選択する必要があります。また、特に目的物質がたんぱくなどの高分子の場合は、リガンドと担体の間のスペーサーの長さも重要になってきます。最近では種々の活性化担体も市販されており、手軽にリガンドを固定化することができます。

■応用例について

アフィニティークロマトグラフィーを用いた分離精製については数多くの例が報告されています。

たんぱく質を分離するにあたって、低分子リガンドを固定化した例としては、糖をリガンドとしたレクチンの分離、ホルモンを結合させた担体を利用したホルモンレセプターの分離などが報告されています。また、高分子物質をリガンドとして用いた例としては、カルモジュリン固定化担体を用いたカルモジュリン結合たんぱくの分離、コラーゲンをリガンドとしたフィブロネクチンの分離などがあります。

また酵素の精製についても多数の報告がありますが、基質をリガンドとして用いる場合は、酵素によるリガンドの分解を防ぐためにクロマトグラフィーの条件について工夫する必要があります。

抗原または抗体をリガンドとして、特異抗体や抗原を単離する方法も広く用いられていますが、この場合は、抗原と抗体間の親和力が非常に強いいため、溶出液のpHを下げたり、変性剤やカオトロピックイオンを用いるなどの工夫がされています。

以上、アフィニティークロマトグラフィーは多くの場合、吸着体を自作しなければならない欠点がありますが、目的成分を効率良く単離する簡便な方法として今後も広く利用されていくでしょう。

現在、HPLCの分離モードの中では逆相クロマトグラフィーが最も頻りに用いられています。これに対して、順相クロマトグラフィーは、限定された範囲で用いられているというのが現状です。この理由として、逆相イオンペアクロマトグラフィーの発展により、分析対象がイオン性成分のように従来困難であった化合物にまで拡大したことや、水系の移動相を用いることにより操作性が良いことなど、逆相クロマトグラフィーの持つ数多い利点が挙げられます。しかし、順相クロマトグラフィーは、逆相クロマトグラフィーをはじめとする他の分離モードとは異なった特性を持つため、目的によっては非常に有用な方法であるといえます。

■順相クロマトグラフィーとは？

順相クロマトグラフィーは、元来の定義では分配クロマトグラフィーのうち固定相の極性が移動相の極性より高いものを指します。また、従来、固-液クロマトグラフィーという別のモードとして扱われていた吸着クロマトグラフィーについても、順相クロマトグラフィーに含めて考えることが一般化しています。順相クロマトグラフィーの固定相としては、ほとんどの場合、多孔性シリカゲルをそのまま(SILカラム)、あるいはその表面にアミノプロピル基(NH₂カラム)やシアノプロピル基(CNカラム)などの極性官能基を化学結合させたものが用いられます。移動相には、通常、n-ヘキサンなどの非極性溶媒に、エタノールなどの極性溶媒を添加したものをを用いますが、極性の高い成分の分析には、水を含む移動相を使用する場合があります。各成分間の分離は、固定相と移動相の間の分配比の違いによってなされますが、順相クロマトグラフィーにおける固定相と対象成分との相互作用は、水素結合相互作用や静電相互作用などのいわゆる親水相互作用が主となります。このため、疎水相互作用が主たる相互作用である逆相クロマトグラフィーとは、一般に分離の選択性が異なります。

■順相クロマトグラフィーを用いる目的

順相クロマトグラフィーでは、逆相クロマトグラフィーで分離が困難なトコフェロールの異性体や保持の困難な糖類を容易に相互分離できます。逆に、アルキルベンゼンスルホン酸の分析においてアルキル鎖長や分岐の異なる各成分をまとめて溶出させることができます。これらの特性は、前に述べたように化合物の保持にかかわる部位が逆相クロマトグラフィーとは異なることに起因します。また、順相クロマトグラフィーでは、主として水を含まない移動相を用いるので、酸無水物のように加水分解されやすい化合物を分離する目的や、分画後の濃縮、乾固が必要となる分取、精製の目的に非常に好適であるといえます。さらには蛍光検出における量子収率や吸光検出における吸光係数や検出波長の観点から、順相クロマトグラフィーが好適な場合があります。

■順相クロマトグラフィーにおける分離の検討

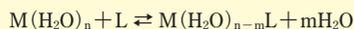
順相クロマトグラフィーでは、一般に移動相の極性を上げると溶出が早まります。たとえば、n-ヘキサン/エタノール混合系移動相においては、極性が高い方の溶媒であるエタノールの比率を増すと、溶出が早まります。これは、逆相クロマトグラフィーで移動相の極性を下げると溶出が早まるのと逆の関係になりますので注意が必要です。この際、移動相に粘性の低い溶媒を用いることにより、①高い流速での使用や、②早いカラム平衡が得られる場合があります。また、NH₂カラムやCNカラムなどを使用した場合、移動相の組成によっては移動相と固定相の極性が逆転して、逆相クロマトグラフィー用カラムとして機能することがあります。したがって、特に水の比率が高い移動相を用いるときには、溶出挙動が大きく変化することがあることを考慮する必要があります。

■おわりに

上述のように順相クロマトグラフィーは、分析目的によっては重要な分離法であり、今後とも目的は限られるものの利用され続けるものと考えられます。

▶今回は、最近、糖や光学異性体の分離によく用いられている配位子交換クロマトグラフィーについて、お話ししたいと思います。

▶まず、分離機構について考えてみましょう。物質（分子あるいはイオン）には電子を受容したり、供与したりする性質があります。例えば、金属イオンは前者の性質をもち、電子受容体と呼ばれます。金属イオンの近傍に、電子を供与する性質を有する物質（電子供与体）が存在すると、両者の間に電子の授受による結合（配位結合）が生じ、錯体が形成されます。この電子供与体を配位子と呼びます。ほとんどの金属イオンが、水溶液中で水分子を配位した錯体（アква錯体）を形成しているのは、この例です。いま、金属イオンの水溶液中に他の配位子を共存させると、その配位子は、水分子と競合して、金属イオンと錯体を形成しようとし、この反応を式で表すと、次の様になります。



▶ここで、Mは配位数nの金属イオン、Lは配位数mの配位子です。この置換反応を配位子交換反応と呼びますが、このような反応を基に、金属イオンを固定したカラムを用い、成分（配位子）間の金属イオンに対する結合力の差（錯体の安定度の差）を利用して分離するクロマトグラフィーが配位子交換クロマトグラフィーです。

▶金属イオンの固定化には、スルホン基、カルボキシル基、アミノ基などの官能基を導入した樹脂に、金属イオンをイオン結合あるいは配位結合させる方法がとられます。また、適当な配位子を樹脂に導入して行う場合もあります。一方、移動相には、適当な競合配位子を含む溶液を用い、競合配位子の濃度や、pHなどを調整して、成分の溶出を制御します。

▶錯体の安定度は、配位子の塩基性、配位数、立体的因子に依存し、多座配位子の場合は、キレート環の大きさや数も影響します。また、金属イオンのイオン半径、電荷も錯体の安定度に関係します。

▶例えば、単糖の配位子交換クロマトグラフィーでは、Ca²⁺またはPb²⁺を固定したスルホン化ポリスチレンゲルを充てんしたカラムを用い、水を移動相にして行われます。ここでは競合配位子は水分子そのものです。図1にCa型およびPb型配位子交換クロマトグラフィーによる各単糖の溶出位置を示しましたが、成分により保持が異なるのがわかります。

▶糖と金属イオンとの錯体形成は、糖の隣接炭素に結合した2個の水酸基と金属イオンの間での配位結合によって起こり、その2個の水酸基がeclipsedもしくはgaucheの立体配座をとるとき錯体を生じ、antiでは生じないとされています。そのため、各単糖の金属錯体の安定度はそのような配座をとりやすいか否かによって決定されます。マンニトールやソルビトールなどの糖アルコールの場合、錯体形成に係る水酸基が多く、好ましい配座をとりやすいことが、強く保持される原因と考えられます。環状のシクロヘキシトールあるいはピラノースでは、とり得る立体配座が制限されるので、糖アルコールより錯体形成が起こりにくくなりますが、これらの糖では、隣接する3個の水酸基がaq-eq-aqとなるものほど安定度が高くなると言われています。

▶以上のように、配位子交換クロマトグラフィーでは、物質の立体因子も分離に寄与するため、通常のモードでは分離できない成分も分析が可能となる場合があります。もちろん、対象成分は配位能を有する場合が原則で、本クロマトグラフィーを応用する上では、成分の配位性を考慮し、適切な固定相および移動相をデザインしなければなりません。

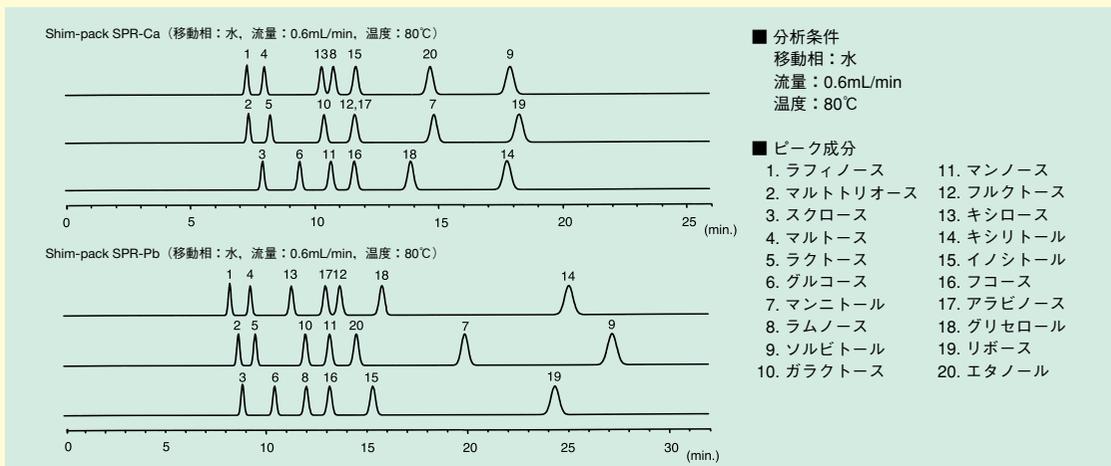


図1 Ca型、Pb型配位子交換クロマトグラフィーによる単糖の溶出位置

GLP/GMP 関連用語解説一 RSD (C.V.) について

(LCtalk Vol.36  より)

国際的に品質管理の重要性が高まる中で、ISO-9000シリーズや医薬品GLP/GMPに代表されるように、様々な業種で、分析機器・データの信頼性を客観的に証明する手段として、機器および分析手法のバリデーションが要求されるようになってきています。このバリデーションにおいて、メソッドバリデーションやシステム適合性試験（システムスタートピリティテスト）の項目の一つに、分析結果のバラツキの度合い、すなわち、「精度（precision）」（精密さ）の確認があります。今回は、この「精度」を表す、RSD (C.V.) について考えてみたいと思います。

私たちが、分析データを記録または表示するとき、1点だけの採取の場合はその値そのものを、複数点採取の場合は平均値やメジアン（中間値）を代表値として採用するケースが多いと思います。しかしながら、データにバラツキがあるときは、代表値のみでは、データの状況を正確に表現できない場合があります。実際問題、分析データは毎回、完全に一致するのではなく、バラつきます。そこで、そのバラツキを統計学的な計算を利用して、客観的に表現した指標としてRSD (C.V.) がよく利用されます。表1をご覧ください。平均値は結果 (1)、結果 (2) とともに、同じ100ですが、明らかに、結果 (2) のデータのバラツキが大きいことが分かり、RSDを計算すると、結果 (1) はRSD = 2.92%、結果 (2) はRSD = 29.2%となります。

表1 平均値とRSD

データ	結果 (1)	結果 (2)
x_1	101	110
x_2	96	60
x_3	103	130
x_4	102	120
x_5	98	80
平均 (\bar{x})	100	100
RSD (C.V.)	2.92%	29.2%

RSD (Relative Standard Deviation, 相対標準偏差), C.V. (Coefficient of Variation, 変動係数) は同義で、データのバラツキ（「精度」）を客観的に表現する値で、以下の式のように、標準偏差 (SD) を平均 (\bar{x}) で割った値として定義されています。また、標準偏差の自由度（平方根の中の分子）には、通常、 n （データ数）ではなく、 $n-1$ を使用します。これは、計算に用いたデータが全て（母集団）ではなく、母集団を推定するための代表値であるためです。標準偏差 (SD) の計算式は②式または③式で行うのが普通です。

表2に計算の一例を示しますが、計算機や表計算ソフトウェアを利用すれば簡単に計算することができます。

$$\text{RSD (C.V.)} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \dots\dots\dots ①$$

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \dots\dots\dots ②$$

$$= \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n - 1}} \dots\dots\dots ③$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \dots\dots\dots ④$$

表2 RSD (C.V.) の計算の一例

データ (n=5)	保持時間 RT [min]	面積値 AREA [μ Vsec]	濃度 CONC. [ppm]
x_1	9.234	513513	100.38
x_2	9.252	514403	100.55
x_3	9.243	513612	100.40
x_4	9.233	512712	100.22
x_5	9.242	513403	100.36
$\sum x_i$	46.204	2567643	501.91
$\sum (x_i^2)$	426.962162	1318559569475	50382.7849
\bar{x}	9.241	513528.6	100.382
SD	0.00773	603.0	0.1176
RSD (C.V.)	0.084%	0.12%	0.12%

また、データ数 n （繰り返し分析回数）は、データのバラツキの大きさやデータ採取の困難さを考慮して決定します。ICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）のガイドライン（1997）“分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）”の精度の項では以下のいずれかの方法で評価することが求められています。

ア 規定する範囲を含む濃度について、分析法の全操作を少なくとも9回繰り返して測定する（例えば、3濃度についての分析法の全操作を各濃度3回ずつ繰り返して測定する。）。

イ 試料濃度の100%に相当する濃度で、分析法の全操作を少なくとも6回繰り返して測定する。

なお、島津HPLCワークステーションLCsolutionでは、保持時間や面積値の標準偏差やRSDを自動的に計算することができます。

一般に、HPLCシステムの場合、保持時間の精度をチェックすることにより、①流量安定性（ポンプの送液安定性、チェックバルブの動作安定性、液漏れの有無）、②分析カラム性能、③グラジエント精度、④移動相安定性、⑤周囲温度変化、⑥流路詰まりの有無を、また、面積値または濃度値の精度をチェックすることにより、①注入精度、②検出の安定性、③反応の安定性（プレ、ポストカラム反応システムの場合）を判断する情報が得られます。

GLP/GMP 関連用語解説一 テーリング係数，分離度について

(LCtalk Vol.37  より)

メソッドバリデーションやシステム適合性試験の特異性 (Specificity) の項目の中で、今回は、テーリング係数と分離度について考えてみたいと思います。

1. テーリング係数 (シンメトリー係数)

テーリング係数 (Tf, Tailing Factor) は、溶出したそれぞれのピークの対称性を示す指標で、シンメトリー係数 (Symmetry Factor) とも呼ばれています。クロマトグラフィーのピークは理想的には対称 (Tf=1) ですが、様々な要因で非対称になります。おもな要因としては、以下が考えられます。

- ① 試料成分のカラム内での副次的な吸着
- ② カラム表面 (固定相) の状態 (非平衡, 汚れ)
- ③ 試料成分の濃度, 粘度過多
- ④ 流速過多などの不適切な分析条件
- ⑤ カラムの充填の不均一
- ⑥ カラム内の死容積, チャネリング
- ⑦ インジェクタや配管などの流路の死容積
- ⑧ カラムの温度ムラ, 勾配

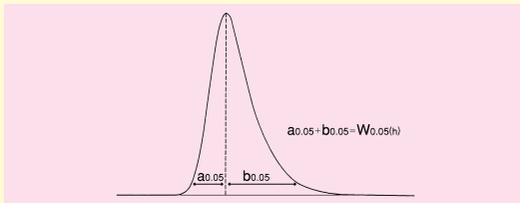
ピークの非対称性が、システムに由来するのか、成分 (分析条件) 固有の問題かを調べる方法の一つは、副次的な相互作用の少ない成分を分析したときのテーリング係数と比較することです。例えば、逆相クロマトグラフィーの場合、ナフトレンや、安息香酸エステルなどを用います。

テーリング係数 (Tf) は、次式で定義されています。

$$Tf = \frac{W_{0.05h}}{2 \times a_{0.05}}$$

$a_{0.05}$: ピーク5%高さ位置での、ピーク前半 (開始点~頂点) の幅

$W_{0.05h}$: ピーク5%高さ位置でのピーク幅



一般に、 $Tf < 1$ のとき、リーディング (leadingまたは fronting), $Tf > 1$ のとき、テーリング (tailing) と呼んでいます。通常、 $Tf = 0.5 \sim 1.5$ 程度が適切な値で、この範囲を超える場合、その原因を探る方が良いでしょう。参考までに、FDAのReviewer Guidance³⁾のSystem Suitabilityの項では「 $Tf < 2$ が好ましい」としています。

2. 分離度

一方、分離度 (R_s , Resolution) は2成分の分離の程度を示す指標で、前後2成分の保持時間の差を、ピーク幅の平均で割った値で定義されます。理論段数⁴⁾と同様、半値幅法と接線によるピーク幅法の採用の違いにより、日本薬局方¹⁾とUSP²⁾で少し定義が異なります。

(1) 日本薬局方¹⁾

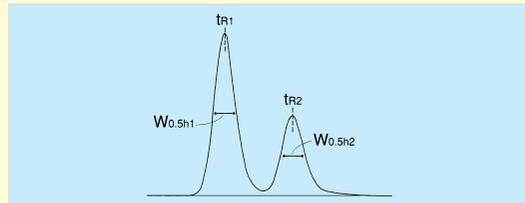
$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h2} + W_{0.5h1}}$$

t_{R1} : 前のピークの保持時間

t_{R2} : 後ろのピークの保持時間

$W_{0.5h1}$: 前のピークの50%高さ位置でのピーク幅

$W_{0.5h2}$: 後ろのピークの50%高さ位置でのピーク幅



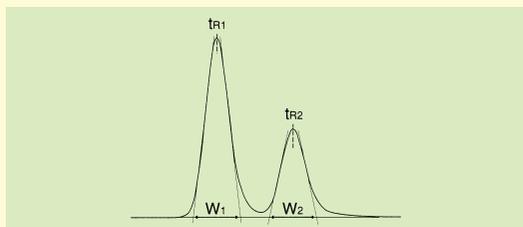
(2) USP²⁾

$$R_s = 2 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_2 + W_1}$$

W_1 : 前のピークのピーク幅*

W_2 : 後ろのピークのピーク幅*

(*注: ピーク左右の変曲点位置の接線とベースラインの2つの交点間の時間幅をピーク幅とする。)



通常、 $R_s \geq 1.5$ のとき、ほぼ分離（ベースライン分離）していると考えられ、定量の信頼性を得るために好ましいと言えます。クロマトグラフィーでの特長の一つは、多成分同時分析ですから、この値は重要です。

参考までに、FDAの Reviewer Guidance³⁾の System Suitabilityの項では「対象ピークと最も近接するピーク（不純物、賦形剤、分解成分、内標など）との分離は、 $R_s > 2$ が好ましい」としています。

また、**分離係数** (α , Separation Factor) も使用する場合があります。分離係数は、2つのピークの保持係数 (k, Retention Factor) の比として、以下のように定義されます。

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

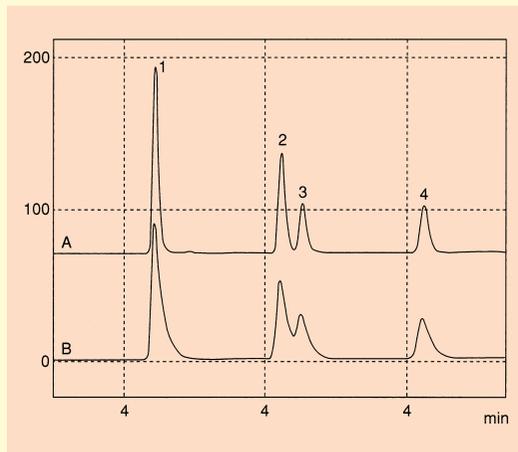
- k_1 : 前のピークのk
- k_2 : 後ろのピークのk
- t_0 : 非保持時間
- t_{R1} : 前のピークの保持時間
- t_{R2} : 後ろのピークの保持時間

なお、島津HPLCワークステーションLCsolutionでは、カラムパフォーマンス機能により、JP、USPなどの各種計算方法により、テーリング係数、分離度、分離係数を自動計算することが可能です。また、QA/QC機能を用いた合否判定機能により、これらパラメータの計算結果が基準値を満たさない場合には、再注入や分析停止などのアクションを起こすことができます。

参考文献

1. 第十二改正日本薬局方、一般試験法（液体クロマトグラフ）
2. USP (United States Pharmacopeia) XXIII-5, <621> Chromatography
3. Center for Drug Evaluation and Research (CDER, FDA), Reviewer Guidance, Nov. (1994) "Validation of Chromatographic Methods"
4. Lctalk vol.34, TEC 「理論段数の計算式」

<テーリング係数、分離度の計算例>



ピーク	日本薬局方, DB			USP		
	テーリング係数	理論段数	分離度	テーリング係数	理論段数	分離度
A	1	1.41	15649	1.41	12701	
	2	1.28	20444	11.34	17558	10.34
	3	—	20389	1.65	17718	1.53
	4	1.20	22245	8.47	20233	7.97
B	1	2.49	5972	2.49	5426	
	2	—	7917	7.02	7310	6.70
	3	—	—	—	5371	0.90
	4	1.71	9957	—	9316	4.91



リーディングぎみの博士

分析法または分析機器の能力を表すとき、よく「感度」という言葉を用いて微量成分の検出力を論じることがあります。感度とは、実は、試料成分量に対する検出応答量の大きさを示す用語であって、正しくは「検出限界」や「定量限界」が検出力の指標になります。

検出限界とはブランクと有意に異なるシグナルを与える物質の量と定義されます。しかしながら、「有意に異なる」ということについてはISOにもJISにも規定されていないのが実情で、統一した解釈がないために検出限界の取り扱いに混乱をもたらす原因となっています。

ここでは、唯一国際的な調和が図られているICH（日米EU医薬品規制調和国际会議）における検出限界の定義とその測定方法について解説します。

ICHでは、検出限界とは「分析対象成分の検出できる最低の量のこと、ただし、このとき必ずしも定量できなくてもよい」と定義されています。「必ずしも定量できなくてもよい」とは許容される真度、精度を伴っていないかともよいという意味であって、定量限界とはこの点で異なります。

検出限界を求める手法は分析法が機器分析法であるか否かによって異なりますが、大別して、次の3法があります。

(1) 視覚的評価に基づく方法

機器分析法によらない分析法のときに用いる方法で、既知濃度の試料を段階的に希釈していき、ブランク試料との差違が確認できる希釈段階をもって検出限界とします。

(2) シグナル対ノイズに基づく方法

主にクロマトグラフィーで用いる方法で、目的成分のシグナルとベースラインノイズを計測し、その比率が2：1または3：1になるときの成分濃度（質量）を検出限界とします。シグナルは、ピーク高さがノイズレベルの10倍以上になるように試料濃度を調製し、それを測定してピーク高さ h を計測します（European Pharmacopeia-1987）。

ノイズは、ピーク半幅の20倍の時間内での最大の振幅 h_N を計測し、その1/2をノイズ N とするか（図1, European Pharmacopeia-1987）、15分間記録して得られたベースラインを横軸方向に0.5～1分間単位で分割し（ X_1, X_2, X_3, \dots ）、各区画内のノイズを包含する最小幅の平行線をひいて縦軸方向における各区画の平行線の幅を計測し（ Y_1, Y_2, Y_3, \dots ）、その平均値を求めてノイズ N として計測します（図2, JAIMA S 0005-1984, ASTM E 1657-1994）。

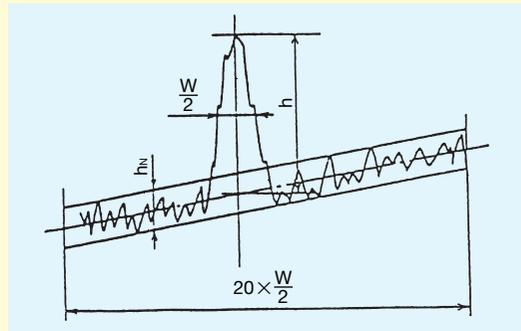


図1

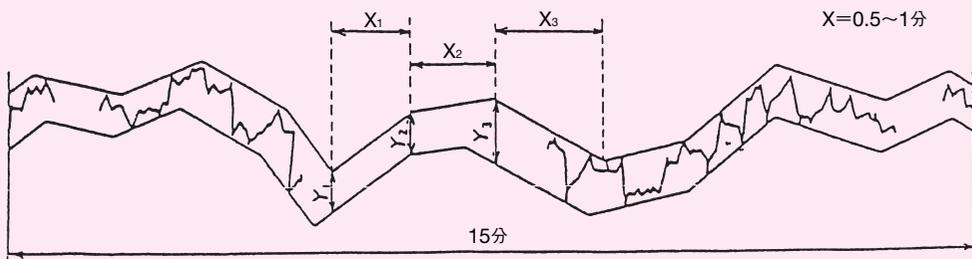


図2



(3) レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法

ブランク試料を分析してその標準偏差を求め、検出限界に近い濃度(質量)の目的成分を含有する何点かの試料を分析して回帰直線の残差の標準偏差またはy切片の標準偏差を求め、以下の式から検出限界を計算する方法です。

$$DL = 3.3 \sigma / a$$

(σ : レスポンスの標準偏差,
a: 検量線の傾き)

これはCurrieの検出限界(L. A. Currie: IUPAC Provisional draft, 1994)と呼ばれるもので、ブランク信号の分布N(μ_B, σ_B)の平均 μ_B より $\mu_B + 3.29 \sigma_B$ の位置の信号に対応する物質の量、すなわち、第一種の過誤が起こる確率(存在しないにもかかわらず存在すると誤認する確率)、および第二種の過誤が起こる確率(存在するにもかかわらず存在しないと誤認する確率)が、いずれも5%となる信号分布N(μ_S, σ_S)を与える物質の量を検出限界とします。

HPLCでは通常、シグナル対ノイズに基づく方法またはレスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法が用いられています。

シグナル対ノイズに基づく方法は簡便であり、最も一般的な方法ですが、グラジエント溶出法のようにベースラインが変動する場合や近傍に不純物ピークが認められる場合には適していません。レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法は算出に当たって多くのデータが必要になりますが、どのような場合にも使用できる利点があります。

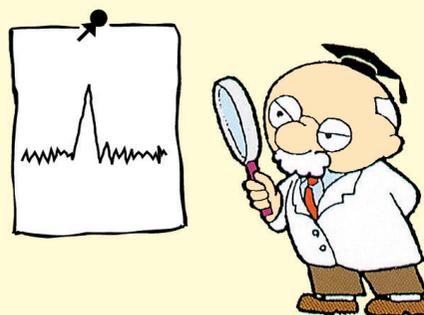
以下にレスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法を示しますが、HPLCではブランクの標準偏差を求めることができませんので、回帰直線(残差またはy切片)の標準偏差から求める方法を採用します。

理論濃度	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	0.12%
1st run	3551	4446	6182	7963	9405
2nd run	3282	5089	6294	8154	9226
3rd run	3013	5050	6418	8078	9084
4th run	3635	4907	6793	7668	9780
5th run	3119	4686	6109	7525	9591

表1 既知濃度の目的成分を含有する試料の分析データ

- 検出限界 : $DL = 3.3s_{y/x}/a = 0.011$ (%)
(残差の標準偏差:
 $s_{y/x} = \{ \sum \{ y_i - (ax_i + b) \}^2 / (n - 2) \}^{1/2} = 252.857$)
または
- 検出限界 : $DL = 3.3s_y/a = 0.013$ (%)
(y切片の標準偏差:
 $s_y = s_{y/x} \{ 1 + 1/n + (\sum x_i/n)^2 / \sum (x_i - \sum x_i/n)^2 \}^{1/2} = 294.879$)
(a = 76182 : 回帰直線の傾き,
b = 267.36 : y切片,
n = 25 : 総分析回数)

なお、実例に示したy切片の標準偏差の計算式は、独立変数(理論濃度)が0の場合の回帰従属変数(外挿予測値)の分散を意味するものです。y切片の標準偏差を求める計算式は別にありますが、その計算式を用いた場合、他の方法(S/N比や残差標準偏差で計算する方法)に比べて小さな値になることが指摘されています。そのため、この計算式の方が好ましいとされています。



「ノイズをしっかり測るぞ！」

●はじめに

現在、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)は製薬・環境・食品・工業材料など、幅広い分野で広く普及しつつあります。今号よりLC-MSについて複数回にわたり解説してみようと思います。

●LC-MSの長所って？

一般的にLCでは試料中の各成分の固定相(カラム)と移動相に対する親和性(保持力)の差によって成分を分離し、成分の性質によってUV、蛍光、電気伝導度などで検出します。これら検出器では、物質の定性は主に保持時間で、定量はピーク強度・面積で行います。クロマトグラフィーは分離能力に優れていますが、多成分同時分析など複数の成分がほぼ同時にカラムから溶出する場合には確実な定性・定量が困難になります。

一方、MSは試料成分を様々な方法でイオン化させ、得られたイオンを真空中で質量と電荷の比(m/z)によって分離し、各イオンの強度を測定する高感度な検出法です。得られるマススペクトルは、ある質量数のイオンがどの程度存在するかを示すことができますので、定性分析の大きな助けになります。質量数は分子に特有の情報であり、MSによりこれらの情報をダイレクトに得ることができるからです。ただしこれは単一成分を測定した場合であり、複数成分が同時に注入された場合、スペクトルの解析が極めて難しくなります。

LC-MSは分離能力に優れたLCと定性能力に優れたMSを結合した装置で、スキャン測定より得られるマススペクトルでは溶出成分に分子量と構造情報を与え、他のLC検出器より得られる保持時間による定性を補完します(図1)。またSIM(選択イオンモニタリング)測定では、質量数という選択性の高いパラメーターを用いて検出します。仮にLC分離が不十分でも、夾雑物質の影響を回避した定量分析を行うことができるのです。対象物の広さと選択性を兼ね備えているという点でLC

の検出器として優れた特性を有しています。

●GC-MSと比べて

ガスクロマトグラフィー(GC)においては、比較的早くから質量分析計が検出器として用いられており、その有益性は広く認められています。物質の分離・定性といった点でGCMSは有効な手段ですが、分析可能な試料は比較的分子量の気体または揮発性化合物、熱安定性の高いものなどに限られてきます。一方でLCでは、移動相(液体)に溶解さえすれば、GCMSでは不得意な成分である難揮発性あるいは熱不安定な化合物の分析が可能です。すなわち、LC-MSには分析試料の適用範囲が広いといった利点があります。

●LC-MSの装置構成

質量分析計は、試料導入のための機器(HPLC,GCなど)、これをつなぐインタフェース部分、試料をイオン化するイオン源、生成イオンを効率よく導入する静電レンズ部、イオンをm/zによって分離する質量分析部、分離したイオンを検出する検出部から構成されます。

イオンの分離法により様々な種類がありますが、ここでは一般的にLCMSの検出器に採用されている大気圧イオン化-四重極型MSの構成を示します(図2)。大気圧イオン化部にはエレクトロスプレーイオン化(ESI)、大気圧化学イオン化(APCI)などがあり、HPLCとのインタフェースおよびイオン源の役割をします。ここで生じたイオンは、脱溶媒後オクタポールなどにより収束され、四重極に導入されます。四重極には直流と高周波交流を重ねた電圧を印加し、目的のm/zを持つイオンのみを通過させます。検出器に到達したイオンの量を信号化してPCに取り込みます。

さて次号では、LC-MSのイオン化法などについて解説します。

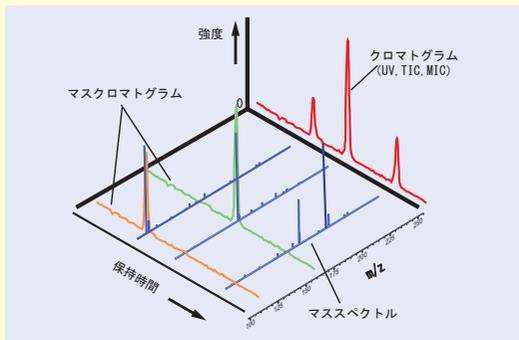


図1 クロマトグラムとマススペクトル

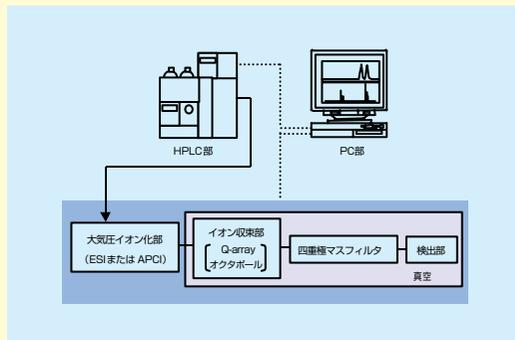


図2 LC-MSシステム構成

前号では、① マススペクトルから分子量・構造情報が得られる、② 選択性の高さより夾雑物の影響を回避した定量分析が行える、③ 難揮発性あるいは熱不安定な化合物の分析が可能など、LC-MS分析の概要とその優れた特性について述べました。本号では、LC-MSのイオン化法について解説します。

● 「LCとMSの結合」

GC-MSが複合分析装置として成功し、LCとMSのオンライン結合へ期待が高まりましたが、LC-MSが汎用に使われ始めたのはごく最近です。

質量分析計は目的成分を気相中にイオンとして取り出し、このイオンを高真空下で検出する装置です。GC-MSの場合はGC部分で目的成分はガス化していますので、MSにそのまま導入することができます。一方LC-MSでは、LCを単純にMSに接続しても液体である移動相が気化し、大量のガスがMS内に導入され、真空度の低下により目的イオンが検出部まで到達できなくなります。LCからの溶出液がわずか1mL/minの流量でもこれが気化すると、溶媒の種類によっては約1000倍の体積になり、膨大なガス量になってしまいます。LC-MSでは、いかに移動相を取り除くかが重要なポイントになります。これまで様々なインターフェースが開発されてきましたが、感度、安定性、使い勝手等に問題を残していました。

● 「大気圧イオン化法」

近年、大気圧イオン化法(API)の登場で、インターフェースが大きく改良されたことにより、安定的にイオンを得られるようになりました。名前の通り大気圧下でイオン化するのが特徴で、溶媒を真空の外に残すという点で非常に有効です。現在APIには主に2つのインターフェースがあります。

1つは、**エレクトロスプレー法(ESI)**で、イオン性・高極性化合物に有効なイオン化法です(図1)。ESIでは試料溶液は、先端に3~5kV程度の高電圧を印加したキャピラリーに導かれます。キャピラリーの外側から霧化ガス(ネブライザガスとも呼ばれます)を流しスプレーすることで、印加した電圧と同符号の細かな帯電液滴が作られます。帯電液滴は移動の過程で溶媒の蒸発・表面電場の増加が進み、電荷同士の反発力が液体の表面張力を超えると分裂します。蒸発と分裂を繰り返すことにより、微細な液滴になり、最終的には試料イオンが気相中に放出されると考えられています(イオン蒸発)。ESIは最もソフトなイオン化法で、高極性、難揮発性、熱不安定化合物に適用が可能です。生じるイオンも主にプロトン化分子(脱プロトン化分子)で、複雑なフラグメントイオンが生じませんので、簡便に化合物の分子量が得られます。また化合物によっては多価イオンが生じるため、例えば分子量10,000の化合物であっても、20個のイオンはm/z501, 10個のイオンはm/z1,001となり小型の質量分析計でも検出できます。これら多価イオンから、コンピュータ計算により分子量の推定も可能です。ESIは天然物、生体高分子、医薬品な

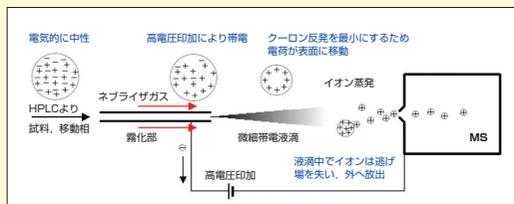


図1 エレクトロスプレーイオン化 (ESI) : イオン蒸発

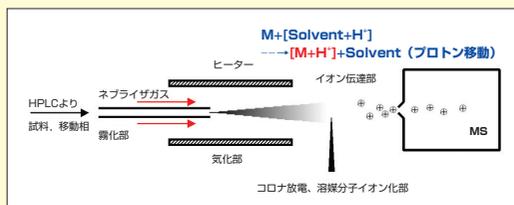


図2 大気圧化学イオン化 (APCI) : イオン分子反応

どの分析に広く用いられています。

もう1つは**大気圧化学イオン化法(APCI)**で、GC-MSのCIと同様、化学イオン化法の一種です(図2)。ESIと似た構造のインターフェースですがイオン化の原理が異なり、主に低・中極性の化合物に適しています。APCIでは、試料溶液をヒーター中(400℃程度に加熱)にN₂ガスなどを用いてスプレーし、溶媒と試料分子を気化させます。溶媒分子はコロナ放電によってイオン化され、安定した反応イオンを生じます。この反応イオンと試料分子の間でプロトン授受が起こり(イオン分子反応)、試料分子はプロトン付加あるいはプロトン脱離を起こしイオンとなります。このイオン分子反応にはプロトン移動反応、求電子付加反応などいくつかのパターンが知られています。ESIと同様に、主としてプロトン化分子(脱プロトン化分子)が検出され、脂溶性の高い化合物、溶液中でイオン化しない化合物の分析に用いられます。

図3にイオン化法と分析対象物の関係を示します。HPLC自体、非常に多くの化合物を測定対象としており、イオン化法としてESIとAPCIを使い分けることで、広範な有機化合物をカバーできるようになりました。

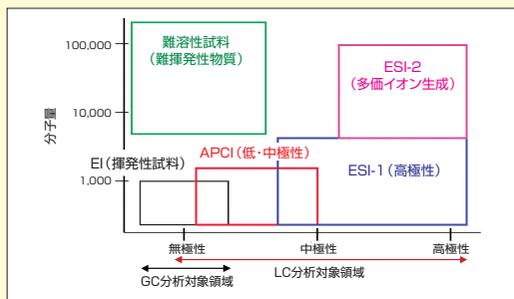


図3 イオン化法と分析対象化合物

大気圧イオン化法 (API) の開発により、広範な有機化合物をイオン化できるようになり、LC-MSの分析適用範囲も拡大しています。ところで、APIではどのようなマススペクトルが得られるのでしょうか。今回はこのお話です。

● 「APIのマススペクトル」

ESI, APCIいずれにおいても、主としてプロトン化分子が、また他に金属付加、溶媒付加したイオンが検出されることは以前述べました。ここではGC-MSで良く用いられているEI (電子イオン化) と比較してみます。図1にビタミンB2 (riboflavin) のEIおよびESIスペクトルを示します。縦軸はイオン強度、横軸は質量と電荷の比 (m/z) のグラフに表されます。

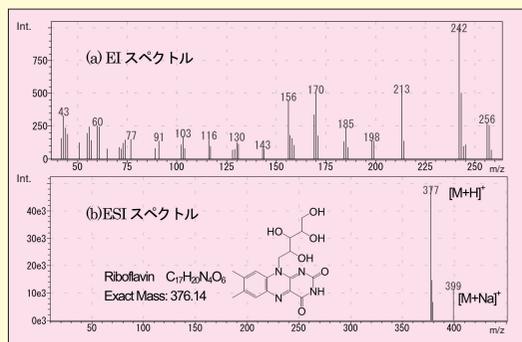


図1 ビタミンB2のマススペクトル

EIでは電子線により気相の分子から電子1個が外れ、分子イオン (ラジカルカチオン) が生成します。これは瞬時に分裂し、一群のフラグメントイオンが生成します。これらフラグメントイオンのパターンを考察し、構造情報を得ることができます。しかし分子イオンピークが検出されない場合も少なくありません。図1 (a) においても分子イオンは検出されず、フラグメントイオンのみが検出されています。EIは分子量情報を得にくく、CI (化学イオン化) など相補的な分析が必要になります。

これに対しソフトなイオン化法であるESIでは、 m/z 377にプロトン化分子、 m/z 399にナトリウム付加イオンが検出されるといったシンプルなスペクトルを示し、フラグメントイオンはほとんど見られません。このようにAPIでは、未知化合物の構造推定に重要な分子量情報を容易に得ることができます (ビタミンB2は塩基性の官能基を持つので、この例では正イオンモードを用いています)。しかしフラグメントイオンを生じにくいということは、これらを解析して官能基など構造情報を得ることが難しいともいえます。

APIで構造情報を得る手法としては、衝突誘起解離 (CID) と呼ばれる方法でフラグメントイオンを生成させ、これを測定する方法があります。静電レンズ部分でのCID (図2) や、後にふれますが衝突室を持ったタンデム型質量分析計により

CIDを起こさせることができます。図2では、静電レンズ部分に印加する電圧を上げることで、抗生物質エリスロマイシンのフラグメントイオンを生じさせた例を示します。これらイオンを利用してクロマトグラム上に現れるマイナー成分の同定が可能で (島津アプリケーションニュース, LCMS No. C21)。

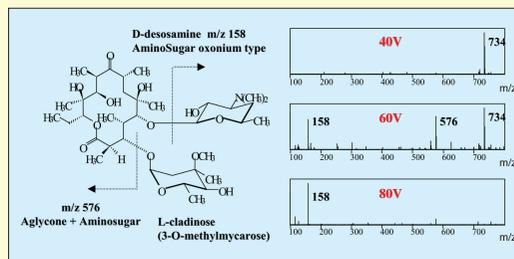


図2 エリスロマイシンの衝突誘起解離スペクトル

● 「多価イオン測定」

APIのうち、特にESIでは複数のイオン化部位を持つ化合物で、分子イオンが多電荷を持つ場合があることが知られています (正イオンの場合は複数のプロトンが付加, $[M+nH]^n$)。連続した荷電状態分布をもち、 m/z 500-2000の範囲に現れますが、プロトン付加の程度は化合物のpKaや溶液のpHに強く影響されます。このような多価イオンが観測されれば、質量分析計の測定範囲を超える分子量を持つ化合物でも分子量情報が得られます。非常に分子量の大きい、極性の高い、タンパク質、核酸などの生体高分子の測定に利用されています。図3にタンパク質の例としてウマミオグロビンのESIスペクトルを示します。ここでは9~20個のイオンが検出されており、その分子量はデコンボリューション計算により16951.3と算出されます。アミノ酸組成から計算した理論分子量16951.5と比較し、そのずれは0.002%以下と非常に正確な値が得られています。

ほとんどの場合、 $z=1$ のみのピークしか得られないGC-MSとの大きな違いがここに見られます。

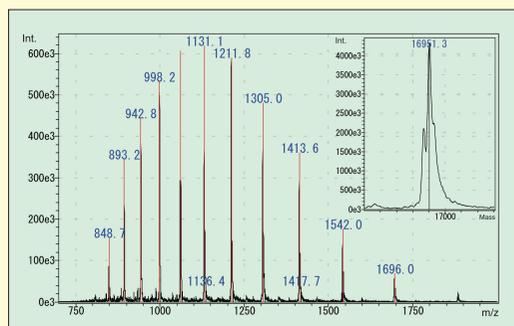


図3 ウマ心筋ミオグロビンのESIスペクトルとデコンボリューションにより算出した分子量

糖類は自然界にもっとも広く、多量に存在する有機化合物群のひとつであり、その種類は単糖、オリゴ糖から多糖、中性糖、酸性糖、アミノ糖、糖アルコール、さらにそれらの異性体等々多岐に渡ります。これら糖類の分離分析にはHPLCが広く用いられていますが、分析にあたっては目的に応じて適切な分離法や検出法を選択する必要があります。今回は、この内分離法（主に中性糖）についてのお話です。

●分離法の種類

糖類の分離法には、代表的なモードとして以下の5種類があり、それぞれ異なった作用に基づき分離されます。

- ・サイズ排除 ……………分子の大きさ
- ・配位子交換 ……………金属対イオンとの錯形成力
- ・分配（順相） ……………固定相（水相）への分配力
- ・陰イオン交換 ……………陰イオン交換力
- ・ほう酸錯体陰イオン交換
……………ほう酸との錯体の陰イオン交換力
(ただし、これらのモードが複数関与する場合もあります。)

●サイズ排除

糖類を分子量により分離したい場合に用います。数百から数百万分子量に渡る分子量分布がわかります。基本的には分子サイズによる分離ですので、同一分子サイズの成分は分離できません。充てん剤としては親水性ポリマーが用いられ、通常移動相には水のみを用います。しかし、イオン性成分などでは、充てん剤と相互作用が起こるため、移動相に塩類を添加することもあります。

●配位子交換

スルホン化ポリスチレンゲルに金属対イオンとして、ナトリウム (Na型)、カルシウム (Ca型)、鉛 (Pb型) などを持たせた充てん剤が用いられ、主として二糖以下以下の糖類の分離に適しています。この方法による糖類の保持は、主として糖類の水酸基と金属対イオンとの錯形成に基づくもので、糖類が金属対イオンの水和水と交換して生成した錯体の安定性と関係付けられます。分離のベースにあるのは、排除限界分子量約1000のサイズ排除法なのですが、金属対イオンの種類と糖類のもつ水酸基の位置や数により同じ分子量の単糖類でも保持に差が出てきます。Na型ではほとんどサイズ排除作用のため、グルコースとフルクトースが分離できる程度ですが、Ca型では糖アルコールが選択的に保持され、Pb型では糖アルコールの保持がさらに強くなり、一部単糖類相互分離も良くなります。

この方法で用いる移動相は水ですので、環境にやさしい分離法と言えますが、逆に移動相による分離のコントロールはできません。また、二糖類の相互分離が困難、Ca型やPb型ではカラム温度を80℃程度に設定する必要がある

（アノマー分離によるピークの割れや崩れを防ぐため）点など注意が必要です。

●分配（順相）

単糖類からオリゴ糖までの分離に適しています。特に、オリゴ糖構成糖の1個1個の違いを識別することができますので、二糖類の相互分離も容易です。分配法では、一般にシリカやポリマー担体にアミノ基を結合させた充てん剤が用いられます。移動相はアセトニトリルと水の混合液が用いられ、水の比率が増えるほど溶出がはやくなります。また、糖類の分子量が大きいものほど遅く溶出します。

この方法による糖類の保持は、固定相に「濃縮」された水に対する糖類の分配に起因するものと考えられます。なお、固定相のアミノ基は糖類のアルデヒド基と反応してシッフ塩基を作りますので、特に五単糖（アラビノース、リボース等）ではピークが大きくテーリングすることがあります。これは、移動相に塩を添加することにより抑制することができます。また、単糖同士の相互分離には限界がありますので注意してください。

●陰イオン交換

中性糖のpKaは12程度ですから、強塩基性移動相では陰イオン交換樹脂に保持させることができます。この場合、移動相としては0.1モル程度の水酸化ナトリウム溶液が用いられます。一般に、単糖類からオリゴ糖の順に溶出します。水酸化ナトリウム濃度を変化させるグラジエント法と組み合わせますと、多成分の一斉分離が可能となります。

●ほう酸錯体陰イオン交換法

糖類のようなポリオキシ化合物は、ほう酸やほう酸塩と速やかに反応して負電荷をもつ錯体を形成します。つまり、移動相にほう酸緩衝液を用いると、糖類を陰イオン交換で分離することが可能となります。この方法は、単糖から二糖類の相互分離に優れた方法です。特にほう酸緩衝液の濃度とpHを変化させるグラジエント法により、多成分を効率良く分離することができます。

以上、糖類の分離は案外と難しいものです。目的成分と夾雑成分により、最適な分離モードを選ぶ必要があります。なお、糖類の分析について、以下の技術資料がありますので参考にしてください。

HPLCアプリケーションレポートNo.11

「高速液体クロマトグラフィーによる糖類の分析」

(資料番号：CA190-385)

※最寄りの支店・営業所にご請求ください。

前号では、糖類の「分離法」についてお話ししましたが、今回は「検出法」(主に中性糖)についてのお話です。

●検出法の種類

ある物質の検出法を選ぶ際、みなさんはまず、その物質の構造をご覧になると思います。糖類の構造といえば、めばしい官能基は「OH基」のみで、さて、どうやって検出しようか…ということになりますね。HPLCによる糖類の検出法としては、大きくは以下の方法があります。

- ・紫外可視検出
 - …直接 (190~195nm),
 - 誘導体化 (プレカラム, ポストカラム)
- ・示差屈折率
- ・蛍光検出
 - …誘導体化 (プレカラム, ポストカラム)
- ・電気化学検出
 - …Cu電極, Au電極
- ・蒸発光散乱検出

それでは、それぞれについて簡単に解説しましょう。

●紫外可視検出

糖類の紫外吸収は190~195nm付近でしか得られません。従って、直接紫外検出を行う場合、このような低波長域に限られますので、移動相が水のみで、かつ、よほどきれいな試料でない限り、実用上は困難と考えてください。紫外可視検出を目的とした誘導体化法としては、ポストカラム法では、古くはオルシノール-硫酸法などの呈色反応を利用した方法が用いられていましたが、耐食性の装置が必要で取り扱いも厄介なため、今では使われていません。その他、プレカラム法も実用的に使われている方法はありません。

●示差屈折率検出

示差屈折率検出法は、試料成分と移動相に屈折率の差があれば何であれ検出できる汎用検出法で、糖類の分析には定番の検出法として広く用いられています。もともと検出感度はあまり期待できませんでしたが、最近では装置の性能が向上し、水系移動相においてはnmolオーダーの検出も可能となっています。しかし、汎用検出法であるが故、検出の選択性は乏しくなります。また、グラジエント溶出法が使えませんので、分配法によるオリゴ糖分析やほう酸錯体陰イオン交換法を用いる多成分分析には有効ではありません。さらに、分配法では、高感度時にベースラインの「うねり」が起こります。これは、固定相表面における移動相(アセトニトリル/水混合液)の平衡状態が僅かな温度変化により微妙にずれるため、これが屈折率変化となって検出器で検出されると考えられます。その他、ほう酸錯体陰イオン交換法では、ほう酸のゴーストピーク(システ

ムピーク)があたかも糖のピークのように出現しますのでご注意ください。

●蛍光検出

蛍光検出法は、感度や検出選択性の面で非常に優れていますが、成分が発蛍光性であることが必要です。糖類は、発蛍光性ではありませんので、蛍光誘導体化法が種々検討されています。プレカラム法では、2-アミノピリジンを試薬に用いるピリジルアミノ誘導体化が、糖タンパクの糖鎖構造解析において広く用いられており、pmolオーダーの検出が可能となります。ただし、プレカラム法の常ですが、誘導体化処理にはある程度の時間と手間が必要です。この点、ポストカラム法では誘導体化反応は自動化されていますので、ルーチン分析で好まれます。ポストカラム法としては、1980年代に2-シアノアセタミド、エタノールアミンなどを用いた多くの方法が考案されました。同時期、筆者らは、塩基性アミノ酸であるアルギニンがほう酸存在下、糖類との加熱反応で強い発蛍光誘導体を生成することを見出し、これを応用した分析システムを構築しました。このシステムは、現在でも多くのお客様にお使いいただいております。開発者としては嬉しい限りです。

●電気化学検出

電気化学検出法も高感度な検出法で、糖類についてはCuやAu電極を用いる方法があります。特に、Au電極とパルスモードを組み合わせる方法では、数pmolレベルの糖が検出できます。ただし、反応液を強アルカリに保つ必要があるため、移動相条件によっては、カラム溶出液に別ポンプにより、高濃度の水酸化ナトリウムを添加することが必要になります。また、検出の選択性は高くありませんので、夾雑成分との分離が問題になることがあります。

●蒸発光散乱検出器

蒸発光散乱法は、カラム溶出液を噴霧して移動相を蒸発除去後、溶質に光を当ててその散乱光を検出する方法で、不揮発性の成分は何でも検出できる汎用検出器です。20年ほど前から市販装置がありましたが、感度や操作性などの点で難があり、あまり普及しませんでした。しかし、最近では性能の良い装置も現れ、汎用検出器として見直されています。グラジエント溶出法が適用できますので、糖類の検出では、特に分配法によるオリゴ糖分析に効果的です。ただし、その原理上、不揮発性移動相(例えば緩衝液)は使用できませんので注意してください。

以上、糖類の分析を行う際には、分離法に加えて検出法も選択肢が多いですので、目的に応じて最適なものをお選びください。

49号では、糖類の「分離法」を、また50号では、「検出法」についてお話しましたが、この内ポスカラム蛍光検出法についてもう少し教えてほしい…とのお便りをたくさん頂戴しました。そこで、今回は「検出法」の続編として、アルギニン試薬を用いるポスカラム蛍光検出法の特集(?)です。

●ポスカラム蛍光法は、どんな時必要?

50号でお話ししましたように、糖類の検出法にはいくつかの選択肢があります。乱暴な言い方ですが、「甘い」と感じられるような糖濃度の試料では、まず第一に示差屈折率検出器が候補になります。現に、食品分野では一般的に示差屈折率検出器が広く用いられています。しかし、同じ食品でも醤油など醸造食品の場合はどうでしょうか? 醤油中の糖類としては、グルコースが代表選手で、示差屈折率検出器でも検出は可能なのですが、分析する人はむしろグルコース以外の微量糖(リボース、マンノース、アラビノース、ガラクトース、キシロースなど)がお目当てではないでしょうか? そうなると示差屈折率検出器では手に負えなくなります。また、感度という点では電気化学検出器が考えられますが、醤油中には多量のアミノ酸が含まれており、この妨害のため分析は困難になります。このような時、ポスカラム蛍光法が必要になるのです。

●アルギニン試薬によるポスカラム法とは?

筆者らは、還元糖がほう酸存在下、塩基性アミノ酸であるアルギニンとの加熱反応(150℃)により強い発蛍光誘導体(励起波長340nm, 蛍光波長430nm)を生成することを見出し¹⁾、この反応を応用したポスカラム蛍光検出HPLCシステムを構築しました。図1はその流路図です。

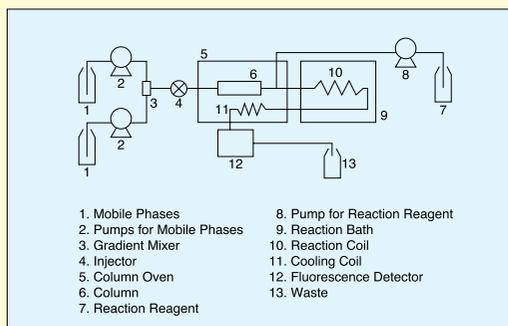


図1 流路図

本法は、49号でお話ししました糖類の代表的な各分離法に適用することが出来ますが、ほう酸錯体陰イオン交換法と組み合わせるのが、最も効果的です。ほう酸錯体陰イオン交換法は、単糖から2糖類の相互分離に優れた方法です

が、分離の効率化にはグラジエント溶出が必要であり、示差屈折率検出器が使えません。このアルギニン試薬を用いたポスカラム蛍光検出-ほう酸錯体陰イオン交換法は、現在も広くお使いいただいております。

●アルギニン試薬のメリットは?

還元糖のポスカラム蛍光検出法には、いくつかの方法がありますが、アルギニン試薬のメリットは何と言っても、簡単に手に入る、価格が手頃、安全性が高いということでしょう。また、アルギニン法では非還元性二糖であるスクロースも検出できます。還元性二糖のマルトースと比較して、感度的には1/10程度になるものの、スクロースが検出できることは大きなメリットです。

●More about アルギニン試薬!

その後筆者らは、アルギニン試薬を移動相に予め添加しておく方法を検討しました。この方法では、ポスカラム法でしばしばその効率が問題になるミキシング部や反応試薬送液ポンプが不要になり、より反応効率を高めることができ、かつ装置をシンプル化できると考えたからです。検討の結果、ほう酸錯体陰イオン交換法では、移動相中のアルギニンが糖類の分離に何ら影響を与えることなく、反応コイル内で150℃に加熱されて効率良く反応することがわかりました。

●先程の醤油の分析は?

さて、話は戻って先程の醤油中の糖分析ですが、このシステムではどんな分析結果になるのでしょうか。図2は市販醤油の分析結果です。グルコース以外の微量糖が検出されているのがわかりますね。

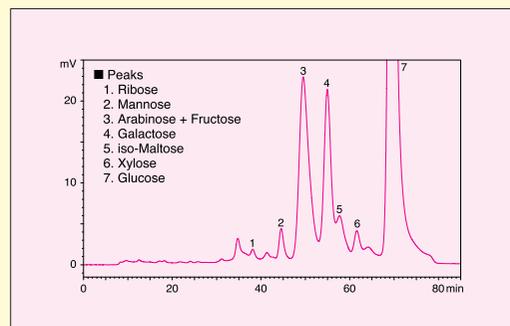


図2 醤油の分析

- 1) H.Mikami and Y.Ishida:Bunseki Kagaku, 32, E207 (1983)
- 2) H.Mikami and Y. Ishida :10th International Symposium on Column Liquid Chromatography (1986)

前号では「talk」と「Applications」に蒸発光散乱検出器(以下ELSD)が登場し、読者の方々より「ELSDについてもっと教えて!」とのお便りをたくさん頂戴しました。そこで、今回はELSDのお話です。

●ELSDって?

ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) は、カラム溶出液を噴霧して移動相溶媒を蒸発させ、残った不揮発性成分に光を当て、その散乱光を検出するという検出器です。つまり、移動相と一緒に蒸発しない物質は基本的に何でも検出できるため、「Universal Detector」などと呼ばれます。実はこのELSD、20年以上も前からあったのですが、感度や安定性などに難点があり、広くは普及しませんでした。しかしここ数年來、特に医薬品分野におけるニーズの高まりから、次々と改良が加えられて性能も大きく向上し、再び注目を集めています。

●ELSDの原理は?

図1に島津ELSD-LTの検出原理を示します。ELSDの検出過程は①カラム溶出液の噴霧、②移動相の蒸発、③不揮発性成分による散乱光の検出…の3段階に分けられます。カラム溶出液はネブライザ部分で窒素または空気により噴霧されます。さらに、ドリフトチューブと呼ばれる温度調節された管の中を進むにつれ、移動相が蒸発除去されて、不揮発性成分だけが検出部に送られます。検出部では、これら成分に光を照射し、その散乱光をフォトマルで検出します。図2には検出部の構造を示します。

●ELSD vs. RID

UV吸収がなくても何でも検出できる…と言うと、示差屈折率検出器(RID)が頭に浮かびますね。RIDでは、試料成分と移動相の屈折率の差を検出しますが、通常、これらの屈折率には何らかの差があるため、基本的に何でも検出できることとなります。では、同じ「Universal Detector」でありながら、検出原理が全く異なるELSDとRIDとを比べるとどうでしょうか。

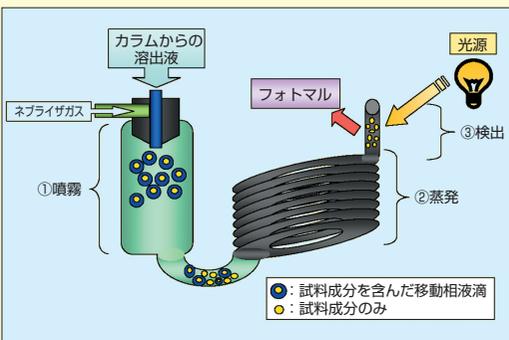


図1 検出原理 (ELSD-LT)

[ELSDが良い点]

まずは感度。糖類の分析で比較しますと、ELSDが5~10倍S/Nが高くなります。次にRIDで悩まされるベースラインドリフト。RIDでは、移動相と試料成分の極めて僅かな屈折率の差を検出しますから、移動相の屈折率は常に一定で安定している必要があります。ところが、屈折率は微妙な温度変化や流量変化の影響を受けますので、最新の装置でも高感度分析時にまっすぐなベースラインを得るのは難しいものです。ましてや、グラジエント溶出なんてとんでもありませんね。一方、ELSDでは、これらに何も悩まされることがありません。特に、グラジエント溶出が適用できる点は、UV吸収のない多成分分析に強力な検出手段となります。さらに、RIDでは試料溶媒が移動相と異なる場合、この溶媒ピークが目的成分ピーク妨害することもあります。ELSDでは問題ありません。

[ELSDの注意点]

RIDでは用いる移動相に特に制約はありませんが、ELSDでは移動相が蒸発することが大前提ですから、揮発性であるものに限られます。つまり、りん酸緩衝液などは使用できません。また、チリやゴミなども検出してしまうため、移動相中の不純物やカラム充てん剤溶出物などがノイズの原因となりますので要注意です。それからもうひとつ…RIDは幅広い範囲で直線性が得られますが、ELSDにおいては、原理的に物質量と散乱強度は指数関係となるため、両対数による検量線の直線化が必要です。

●ELSDが注目されている分野は?

ELSDは従来から、UV検出が困難な糖類や脂質関係の分析に用いられていますが、最近では医薬品分野で不純物の確認用として注目されています。(Vol.51「talk」参照) また、生薬など天然物の分析でも応用されています。さらに応用が広がれば、ELSD人気はますます高まりそうですね。

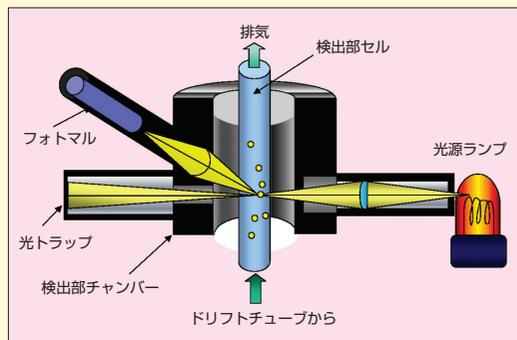


図2 検出部の構造 (ELSD-LT)

健康食品ブームで注目されている「アミノ酸」ですが、この物質を分析するのにもっともよく使われているのがHPLCです。今回は、検出法を中心にアミノ酸の分析法についてのお話です。

●検出法の種類

アミノ酸をUV検出するには、カルボキシル基(-COOH)の200~210nmでの吸収を利用するしかありません。一部、ベンゼン環を持つアミノ酸は250~280nmでの検出も可能ですが、一般にはそのままの形で高感度に選択性良く分析するのは困難です。

そこで、古くから誘導体化法が使われています。多くのアミノ酸は、その構造の中にアミノ基(-NH₂、-NHR)を有しており、これに対して選択的に反応するような誘導体化試薬が用いられます。

●プレカラム誘導体化法

注入する前にアミノ酸を誘導体化し、その生成物をHPLCで分離・検出する方法です。図1にその概念を示します。

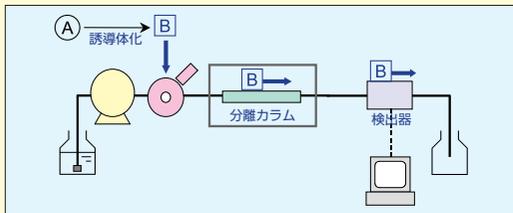


図1 プレカラム誘導体化法

この方法の主な利点は、以下の通りです。

- ・一般に、反応系を小さく設定することで試薬消費量を少なくできる。
- ・そのことによって高価な試薬の使用が可能となり、低いバックグラウンドとあいまって高感度化が可能。
- ・未反応の誘導体化試薬が検出されるとしても、カラムで分離されれば問題ない。

逆に欠点は、試料と誘導体化試薬とが直接に混合されることから、反応効率が試料マトリクス(共存成分や溶媒などの種類)の影響を受けやすいことです。こうしたことから、プレカラム誘導体化法は、ある程度試料の種類を限定した上で高感度分析を目指すのに適した方法と言えるでしょう。

アミノ酸分析用の代表的なプレカラム誘導体化試薬として、o-フタルアルデヒド、イソチオシアン酸フェニル、フルオレサミン、ダンシルクロライドなどが挙げられます。反応操作は様々で、室温で単に混合するだけで速やかに反応が進行するものあれば、反応に加熱が必要なもの、反応後にクリーンアップが必要なものなどもあります。

反応生成物の分離には、多くの場合逆相クロマトグラフィーが用いられます。迅速かつ分離性能が高いため、条件設定次第では非常にハイスループットな分析が可能です。

●ポストカラム誘導体化

ポストカラム誘導体化法は、カラムでアミノ酸を分離した後、誘導体化試薬を送液・混合して反応させ、最後に検出器に導く方法です。図2に、その代表的な流路図を示します。

この方法の主な利点は、以下の通りです。

- ・反応が自動化できるため、定量性・再現性に優れる。
- ・反応前に試料成分がカラムで分離されるため、そのマトリクスの影響を受けにくく、広範囲の試料に適用できる。

逆に欠点は、高感度化しにくいこと、反応試薬を流しっ放し

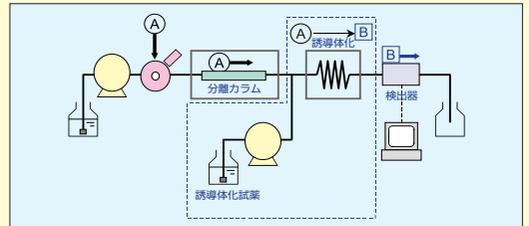


図2 ポストカラム誘導体化法

なので試薬消費量が多いことなどです。このようなことから、ポストカラム誘導体化法は、いったん反応系を最適化してしまえば広範囲の試料に適用でき、定量性に優れたルーチン分析向きの手法と言えるでしょう。

ポストカラム誘導体化では反応試薬が連続的に検出器に流れ込むため、未反応試薬は検出されはならないという制限があり、使用できる試薬の種類が限られます。現在アミノ酸分析用に用いられている試薬は、ニンヒドリンとo-フタルアルデヒドのほぼ2種類に限られています。前者は可視吸光度検出、後者は蛍光検出です。

分離にもっともよく用いられるのは、陽イオン交換クロマトグラフィーです。アミノ酸はアミノ基とカルボキシル基の両方を構造中に有する両性イオンですから、陽イオン交換では酸性の強いもの(陰イオンになりやすいもの)ほど早く溶出し、塩基性の強いもの(陽イオンになりやすいもの)ほど遅く溶出します。

ところで、現在のHPLCの主流は逆相クロマトグラフィーなのに、なぜ陽イオン交換が用いられるのでしょうか?これは、陽イオン交換を使うことにより、逆相法では難しい、アミノ酸とそれ以外のアミノ基含有物質(アミン類)との分離を容易に効率良く行えるからです。

アミノ酸分析に用いられる誘導体化試薬はアミノ基に対して反応性を有するため、一般的なアミン類に対しても反応し、それらをピークとして検出してしまう可能性があります。ところが、アミン類はほとんどの場合カルボキシル基のような陰イオン性の官能基を持たないため、アミノ酸よりは塩基性が強く、陽イオン交換においてはアミノ酸類よりも遅く溶出します。すなわち、陽イオン交換を使うことにより、アミン類がアミノ酸の定量を妨害することがなくなるわけです。

このように、アミノ酸とアミンとを分離できる陽イオン交換クロマトグラフィーと、アミノ基に対して選択的に反応するポストカラム誘導体化検出とは、まさに「理想的な結婚(?)」と言えるのです。

図3には、アミノ酸飲料を、o-フタルアルデヒドを用いたポストカラム誘導体化法により分析したときのクロマトグラム例を示します。

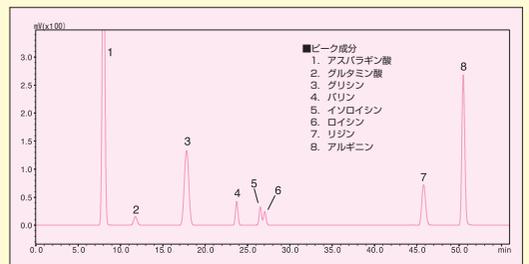


図3 市販アミノ酸飲料の分析

有機酸は、食品の「うまみ」として、アミノ酸や糖と並んでよく分析される成分のひとつです。今回は、この有機酸のHPLCによる分析法についてお話します。

●分離法

有機酸の主な分離モードとしては、一般に陰イオン交換、イオン排除、逆相の3種類があります。以下に各モードの特長を簡単に説明します。

・イオン交換モード (図1)

充てん剤の正イオンを、移動相中の負イオンと有機酸イオン (負イオン) で奪い合って分離するモードと言えます。有機酸のイオン半径やイオン価数によって、カラムへの保持挙動が変わります。多くの有機酸を分離するには、グラジエント溶出法が必要で、分析時間も長くなります。

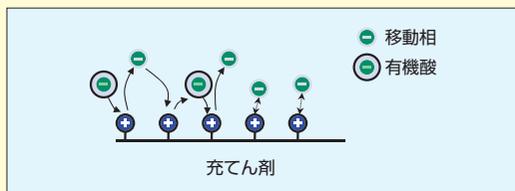


図1 イオン交換モード

・イオン排除モード (図2)

有機酸分析では最も一般的なモードで、充てん剤としては、H型陽イオン交換樹脂が用いられ、有機酸は固定相 (H型イオン交換基) - 移動相間におけるDonnan排除の大小により分離できます。このモードでは、固定相の負電荷により、強酸は大きな静電的排除を受けて充てん剤ポア内部に浸透できませんが、有機酸のような弱酸はその電荷の大きさ (pKaと考慮してください) により、どれだけポア内部へ浸透できるかが決まり、溶出時間の差 (分離) が生じるわけです。したがって、有機酸は原理的にはpKaの小さい順に溶出し、中性物質の溶出位置 (完全にポアに浸透した位置) までですべて溶出することになります。ただし、実際は一部充てん剤マトリックスとの疎水的相互作用なども生じるため、特に疎水性の高い有機酸の溶出は遅くなる場合があります。このモードは、簡便な方法のため広く用いられています。

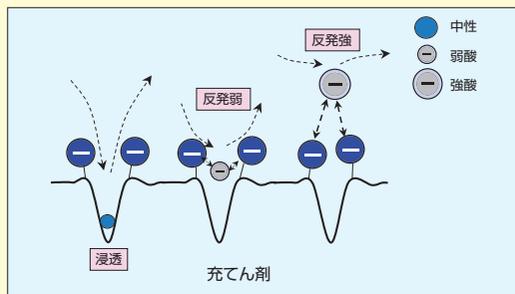


図2 イオン排除モード

・逆相モード

HPLCで最も汎用性の高いモードですが、有機酸分析にはそれ程広くは用いられません。これは、有機酸が親水性であるため、十分な保持や選択性を得られないことが多いからです。しかし、最近では親水性の高い物質をも十分保持させることができる逆相用カラムも市販されるようになってきました。

●検出法

最も簡便な検出法は、UV直接検出法で、カルボキシル基による200~210nmの吸収を検出します。しかし、この波長領域では多くの有機物が吸収を持つため、夾雑物による妨害が大きく、よほどきれいな試料でないとう正確な定量は困難です。示差屈折率検出器を用いることもありますが、選択性が乏しいことに加え、感度面での課題が残ります。また、電気伝導度検出器による直接検出では、移動相のバックグラウンド電気伝導度を下げる必要があります。

有機酸を選択的に高感度検出するポストカラム法としては、pH指示薬-可視吸光検出法や、pH緩衝化-電気伝導度検出法があります。pH指示薬法は、有機酸によるpH指示薬の色変化を利用した検出法ですが、直線性や操作性に難があります。一方、pH緩衝化法は、感度、選択性と精度に優れた方法です。

●pH緩衝化法

有機酸分析で広く用いられるイオン排除モードでは、通常酸性移動相が使われますので、バックグラウンド電気伝導度は常に高い状態にあります。そこで、カラム溶出液にpH緩衝化試薬を連続的に加え、pHを中性付近にすることにより、有機酸を解離状態にして電気伝導度検出器で高感度に検出しようという方法です。つまり、移動相のバックグラウンドを下げ、かつ有機酸の解離を促進し感度を上げることができ、一石二鳥というわけです。

pH緩衝化法では、有機酸を感度良く、かつ選択的に検出できるだけでなく、検量線の直線領域が広いため濃度範囲の広い分析対象試料にも有効な方法で、島津有機酸分析システムに採用されています。図3は、醤油の分析例です。本システムを用いることにより、醤油のような試料でも、夾雑物の妨害もなく精度良く有機酸分析ができます。

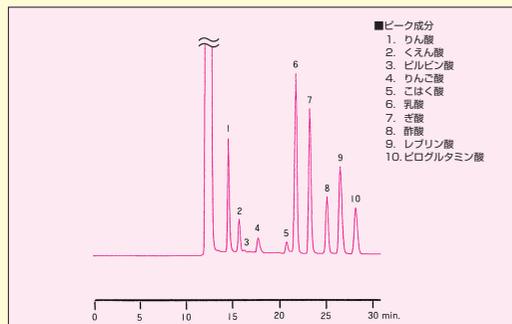


図3 醤油のクロマトグラム

「サイズ排除クロマトグラフィー」や「GPC」という言葉はよく耳にしますが、いったいどのような情報が得られるのか、もう一度、初心に帰って確認をしてみましょう。

●サイズ排除クロマトグラフィー (SEC : Size Exclusion Chromatography)

多孔性充てん剤の孔径（ポアサイズ）の大小によって溶質分子がポア内に浸透したり、ポア外に排除されたりする現象を利用して分離するモードです。一般には、疎水性充てん剤と非水系(有機溶媒)移動相を用いて合成高分子の分子量分布測定を行う手法を「GPC(ゲル浸透クロマトグラフィー :Gel Permeation Chromatography)」と呼びます。また、親水性充てん剤と水系移動相を用いて多糖類、たんぱく質などの水溶性高分子の分離あるいは分子量分布測定を行う手法を「ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC : Gel Filtration Chromatography)」と呼ぶことがあります。

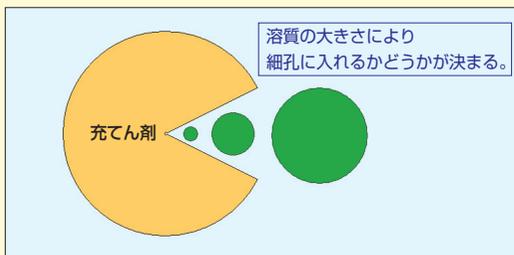


図1 サイズ排除モードの原理

●分子量分布測定で得られる情報は？

高分子物質の多くは、低分子物質と異なり分子量の異なる同族体の集合です。従来から、高分子物質の分子量を測定する手法として光散乱法、浸透圧法、粘度法などありますが、これらの測定値では、単一の分子とみなした統計的な平均値を表しているにすぎません。故に、同一の平均分子量を示してもその分布に大きな違いが生じることがあります。サイズ排除クロマトグラフィーは、高分子の諸物性の違いを見極めるのに優れた方法です。

●平均分子量とは？

実際に分子量、分子量分布を測定する場合には、高分子試料を溶媒に溶かして分子同士をバラバラにする必要があります。溶媒の中で高分子が1個の状態を表現できれば、この状態で分子量を測定するのが理想的と言えます。分子量の異なる同族体の集合体が「高分子」ですから、分子量分布のパターンとして認識するだけでなく、分子量の平均値、分子量分布が広い狭いかを判定するパラメータも必要です。平均分子量には、「数平均分子量 (\bar{M}_n)」、「重量平均分子量 (\bar{M}_w)」、「Z平均分子量 (\bar{M}_z)」、「粘度平均分子量 (\bar{M}_v)」などがあります。サイズ排除クロマトグラフィーにおけるピーク頂点の分子量は、 \bar{M}_n と \bar{M}_w の間を変化します。

また、分子量分布が広い狭いかを判定するパラメータとして分散度 (\bar{M}_w/\bar{M}_n) があります。この値が1.0に近い値であれば分布が狭く、大きくなると分布が広くなることを意味しています。

●校正曲線とは？

高分子の溶出位置(V_e)と分子量 (M) との間には、一般的に次式が成立します。

$$\text{Log } M = b - cV_e \quad (b, c: \text{定数})$$

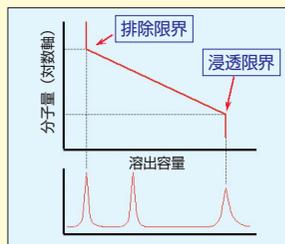


図2 校正曲線とクロマトグラム

この関係をグラフに表したものが校正曲線です。縦軸に分子量、横軸に溶出位置をとり、あらかじめ分子量が判明している分子量マーカーを用いて溶出容量(保持時間)を求めて校正曲線を作成します。あるサイズよりも大きい溶質は、固定相の網目構造に全く入れずに

一様に排除されてしまいます。これを「排除限界」といいます。逆にあるサイズよりも小さい溶質は固定相内に完全に浸透しきってしまうため、ほぼ同じ位置に溶出します。これを「浸透限界」といいます。校正曲線は、排除限界と浸透限界の中間領域で作成します。

一つの充てん剤(カラム)で広範囲の分子量をカバーすることは困難であるため、サイズ排除カラムは、一般に同一の性質を持ち孔径の異なる複数の充てん剤がシリーズで販売されていますので、分離したい分子量範囲から適切なカラムを選択します。

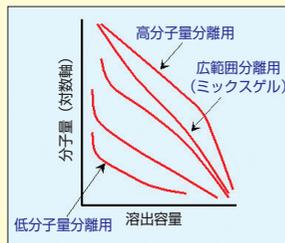


図3 カラムと校正曲線

試料の分子量分布が広範囲に及んでいる場合は、同一シリーズカラムからそれらをカバーできる数本を選択し、直列に接続して使用します。あるいは、最初から孔径の異なる充てん剤を混合した(ミックスゲル)カラムを使用する場合もあります。

●注意すべき点は？

サイズ排除クロマトグラフィーで注意すべき点は、分子量と実際の分子の大きさとは必ずしも一致しないということがあるという点です。2つの物質の分子量が同じでもその構造がかさ高い場合と密な場合とでは実際の大きさは異なります。また、溶解させる溶媒の種類によっても構造が粗くなったり、密になったりすることがあります。

また、分子量分布を算出するためにあらかじめ分子量がわかっている分子量マーカーを利用しますが、厳密にはこの分子量マーカーと実試料の物質が異なってしまうと、せっかく分子量分布を算出しても、参考値となってしまうことがあります。

さらに、試料成分と充てん剤に相互作用(吸着、イオン交換他)があると正しい分子量分布を知ることができません。サイズ排除クロマトグラフィーの原理を理解するのは比較的易しいのですが、実際の分析や結果を解析する際には、いろいろ奥深いものがありますね。

LC talk
Special Issue VII

発行日：2004年11月20日

改定日：2017年9月20日

編集・発行：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
“**LC talk club**”

連絡先：分析計測事業部 “**LC talk club**” 事務局
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
E-mail : analytic@group.shimadzu.co.jp

※掲載内容は、2004年発行時に基づいています。