

LC TALK

Vol. 101
October 2017



Talk HPLCとの出会い、発展、そして糖タンパク質の糖鎖解析へのHPLCの適用 …… P. 2

in the LAB 電子天びんを知ろうーその3 天びんの点検について …… P. 4

Products 一体型高速液体クロマトグラフ i-Series Plus …… P. 6

Applications 第十七改正日本薬局方に準拠したモンテルカストナトリウムの分析 …… P. 8

Introductory 蛍光検出法のはなしーその1 原理と特長 …… P. 10

Q&A 試料溶媒とピーク形状の関連について …… P. 12

Talk

HPLCとの出会い、発展、
そして糖タンパク質の糖鎖解析への
HPLCの適用株式会社東レリサーチセンター
水野 保子

私とHPLCの出会いは、学生時代に遡りますが、自分で精製したタンパク質（レクチン：糖鎖を認識するタンパク質）のアミノ酸組成を算出するために使用した「アミノ酸分析計」になります。4種類の移動相とポストラベル用のニンヒドリン試薬を使用しなければならなかったこと、装置の立ち上げが大変だったこと、プログラムを入力する部分の基盤が扱いにくかったことなどから、複雑で面倒な装置という印象でした。

入社直後はイムノアッセイや電気泳動を担当していましたが、その後幸運にも糖タンパク質の構造解析に携わることになり、多くの分離モードのカラムを使用してきました。その際の測定機器はほぼ島津製作所のHPLCでした。その頃は機器導入時の据付担当者にメンテナンスも含めHPLCに関して多くのことを教えてもらいました。そのおかげでHPLCの扱い・知識が増え、また自分でもかなり修理ができるようになりました。機器トラブルは喜ばしいことではありませんが、機器の内部を観察しながらの修理は意外と楽しく、修理が完了したときには達成感も感じていました。今は機器のブラックボックス化が進み、またCSVやPart 11対応が必要なことから、自力で修理することも少なくなっているようです。

さて、糖タンパク質の構造解析の担当になったものの、現実には途方に暮れていました。というのも、タンパク質の精製・分析は学生時代に経験していますが、糖分析の経験が全くなかったからです。糖関連の研究室出身ということで担当を任せられましたが、糖分析についての知識もなく、社内でもやったことがないため相談相手もなく、と悲惨な状況でした。とにかく糖分析に関係ありそうな文献・書籍を片っ端から読み、行き詰ったときには文献の著者に直接電話して教をを請うなどで、何とか糖分析を立ち上げました。

糖組成分析では、島津の三上博久先生、近大の本田進先生（当時の所属）などの論文・書籍を参考にし、中性糖、アミノ糖、シアル酸など糖の種類や性質に応じた加水分解条件及びHPLC条件を最適化し、測定法を構築しました¹⁾。糖は紫外や

可視に吸収がないので、選択性と検出感度をあげるためポストカラムで蛍光標識する方法を採用しました。実際に分析を始めると、環境などから混入するグルコースやキシロースのコンタミや、塩濃度の高い移動相の使用による塩の析出など多くの問題がありました。例えば、塩の析出対策として測定ごとにポンプヘッドを分解洗浄したり（当時の機器には自動洗浄機能はありませんでした）、頻繁にプランジャーやプランジャーシールを交換したり（当時の機器はプランジャー交換のたびにカバーを外す必要がありました）とかなり大変でした。

糖タンパク質の糖鎖のうちN-グリカンの構造解析では、阪大の長谷純宏先生、名市大の高橋禮子先生（いずれも当時の所属）に直接ご指導いただく機会に恵まれ、本当に助かりました。長谷先生開発の「2-アミノピリジンで蛍光誘導標識（PA化）し、ODSカラムで高感度かつ構造の違いで糖鎖を分離する方法」²⁾と、高橋先生考案の「既知構造のPA化糖鎖をODS（構造で分離、横軸）及びHILIC（分子量で分離、縦軸）カラムで測定して得た保持時間情報（グルコースオリゴマー換算）から作成した2次元糖鎖マップのデータベースを用いて解析する方法」³⁾を取り入れ、解析を始めました。しかしながら、実際に解析を始めると、データベースにない糖鎖などこの方法では容易に構造を決定できないものもあり、頭を抱えることもたびたびありました。

そのころ、高分子を高感度で測定できるソフトイオン化法であるMALDIやESI（両イオン化法に対しては2002年にノーベル化学賞が授与されました）を搭載した質量分析計（TOF/MS）が相次いで商品化されました。分子量やMS/MSの情報があれば、構造決定できなかった糖鎖も容易に解析できるのではと考え、N-グリカンの構造解析にMALDI-TOF/MS（その時は島津製でした）をいち早く導入し、新2次元糖鎖マップ法⁴⁾及び糖鎖解析ソフト^{5),6)}を開発しました（図1）。新2次元糖鎖マップ法は原法のHILICカラムの保持時間情報を質量に置き換えたマップで、コンピュータによるデータベース検索、及び構造

から保持時間を予測できる機能ももたせました。結果、予想通り構造解析が容易になりました（解析例：図2）。

その当時はN-グリカンの構造解析にMALDI-TOF/MSを活用している研究者がほとんどいなかったため、学会で発表したところ大反響でした^{4),5)}。またこのHPLCとMALDIを組み合わせた方法の開発により、医薬品申請用データとして糖タンパク質医薬品の糖鎖構造解析を確実に実施できるようになり、競合他社と差別化できる極めて優位性の高い分析メニューとなりました。

時が経ち、糖鎖構造解析の分野も超高速LCが取り入れられ、ESI-Q-TOF/MSなどに直接接続し測定することが多くなりました。また、シアル酸が遊離しにくい、過剰試薬を除きやすいな

どの理由で2-アミノベンズアミド（2AB化）標識⁷⁾（HILICカラム法使用）が海外で主流になると、日本でも2AB化を使うようになり、日本人が先に開発したPA化標識が世界標準にならず、非常に残念に思っています。CHO細胞で発現したIgG抗体の糖鎖のように解析が容易なものは2AB化でもいいのですが、実際には複雑な構造のものも多いため、構造異性体の分離に優れているPA化逆相カラム法も必要なので今は併用しています。すなわち試料により、最適な手法を見極め解析しています。これからも進化するHPLC、そしてカラムを上手く活用し、確実かつ迅速に、そして他社に先駆けた手法で糖鎖解析を行っていきたく思います。

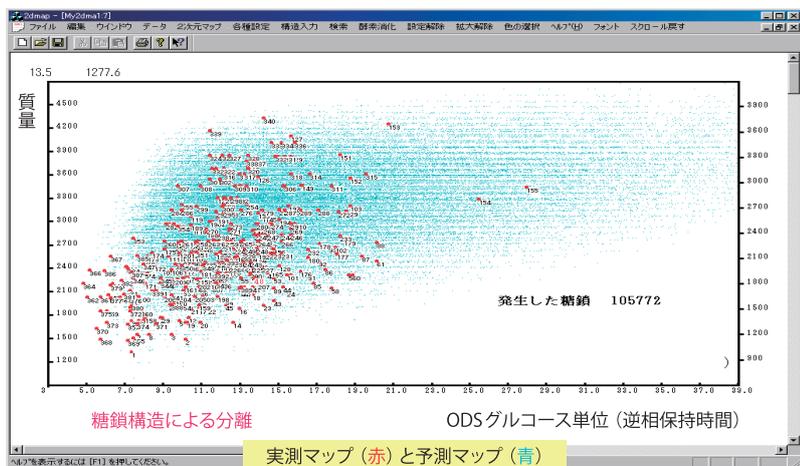


図1 新2次元糖鎖マップ

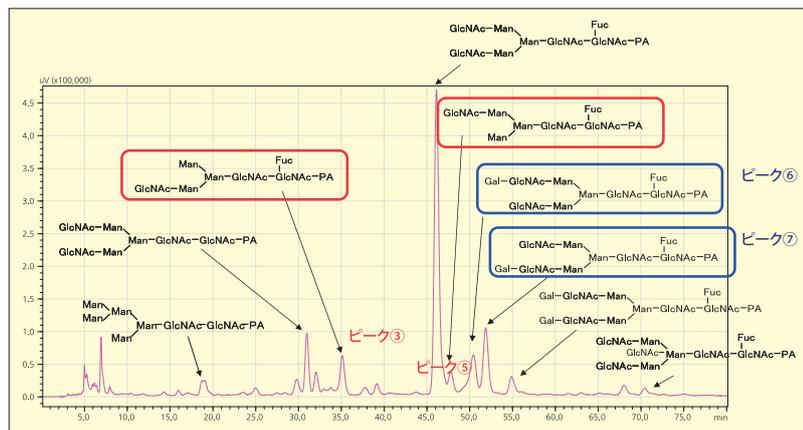


図2 PA化糖鎖の逆相カラム及びMALDIによる構造解析例（試料：抗メチル化DNA抗体）
ピーク③と⑤、ピーク⑥と⑦の構造異性体も分離可能

参考文献

- 1) 水野保子ら, 第60回日本生化学会大会 (1987)
- 2) Hase, S., et al., *J. Biochem.* 85, 989-994 & 995-1002 (1979)
- 3) Tomiya, N., et al., *Anal. Biochem.*, 171, 73-90 (1988)
- 4) 水野保子ら, 第68回日本生化学会大会 (1995)
- 5) Mizuno Y., et al., 19th International Carbohydrate Symposium (1988)
- 6) Mizuno Y., et al., *Anal. Chem.* 71, 4764-4711 (1999)
- 7) Bigge, J. C., et al., *Anal. Biochem.* 230, 229-238 (1995)

執筆者紹介

京都大学大学院薬学研究科修士修了、東レ株式会社入社と同時に株式会社東レリサーチセンターに入社、入社後2年間はELISAなどを担当、その後20年以上、糖タンパク質の構造解析を担当、その過程でバイオ医薬品の特性解析の受託をいち早く導入、最近5年間はGMPや信頼性基準で実施する安定性試験や特性解析分野の品質保証責任者を担当、この4月より医薬品の分析の営業を担当。

専門分野

糖タンパク質の構造解析
バイオ医薬品の特性解析

将来の夢

世界遺産めぐり?

趣味

茶道、華道、旅行、スポーツ観戦

in the LAB

電子天びんを知ろうーその3 天びんの点検について

天びんビジネスユニット
服部 康治

電子天びんを使っていて、何気なく「サンプルをお皿に載せて、表示パネルに表示されている質量表示をそのまま記録する」といった計量作業をされていませんか？電子天びんも日を追うごとに性能が向上し、簡単に精度よく計量できるようになっています。しかしながら、その簡単さ故に知らぬ間に不確かさが混入し、そのまま鵜呑みして最終計量桁まで信用してしまうというケースもあります。「この計量値って、本当に正しく安心できる値だろうか？」と今一度、ご確認ください。そのために、今回お話しする「天びんの点検」の内容を参考に、天びんを使った安心できる計量を実施していただくことをお勧めします。



写真1 分析天びん APシリーズ

1. 天びんの点検・校正について

天びんには、お使いになる方が行う点検作業として、毎日の計量作業前に行う「日常点検」と、一定の時期あるいは使用期間を決めて行う「定期点検」とがあります。

前者の「日常点検」は毎日の作業となりますので、効率性を考えて「必要最小限の作業で、天びんの点検を行うこと」がポイントです。一方、後者の「定期点検」は時期を決めて点検を行いますので、性能点検を含めた一通りの点検作業が必要となります。

2. 日常点検

毎日あるいは使用前に行う点検項目は、以下の通りで「最小限の作業で天びんが正常に働いていることを確認する」という内容となります。

- (1) 設置環境の状態は変わっていないか
- (2) 天びんの皿や周囲が汚れていないか
- (3) 表示がばらついていないか
- (4) ひょう量値があっているか

ひょう量値の点検では、既に質量の判っている分銅を皿に載せ、その表示値との差が基準値（使用者が独自に決めた数値）以内にあることを確認します。基準値を越えた場合の処置も手順書で決めておく必要があり、再調整を行って基準値内になったことを確認するか、修理に出すなどの手順を決めておきます。

最近では日常点検においても、通常、使う点とひょう量近くの点といった2か所、3か所で点検するケースが増えています。表1のように、日常点検では性能点検だけではなく、お皿やひょう室内の汚れの点検やデジタル表示の動きを点検するなど、電子天びんの状態もあわせて点検することをお勧めします。表2に、日常点検記録書の例を示します。

表1 日常点検の点検項目

点検項目	点検方法	管理基準	処置
(1) 設置状態	土台（安定）を確認する水準器（水平）の確認	机・土台が安定していること 水平であること	据付環境の整備 水平調整
(2) 皿およびひょう量室	サンプルが散乱して汚れていないか確認する	散乱していないこと 汚れていないこと	アルコール等で拭く 刷毛で掃除する
(3) 動作	十分に通電し、表示状態をかく点検する	表示が静止していること	外乱のない状態で表示不安定ならば修理する。
(4) 性能	（校正を行った後、）ひょう量に相当する分銅を測定する	使用公差内であること	公差内であれば日常点検としては終了し通常作業に移る。

表2 日常点検記録書（例）

点検月日	天びんの状態	性能、使用分銅番号、測定値 （使用公差=±1.0 mg）	判定	点検者
2017/9/14	異常なし	200.0005 g、使用分銅 A-01	OK	島津太郎
↓				
毎日の作業前に記入します。特に、使う分銅番号の記入をお願いします。				

3. 定期点検

定期点検は、上記日常点検 (1) ~ (4) の項目に加えて、(5) 繰り返し性、(6) 偏置 (四隅) 誤差、(7) 器差 (直線性) の3項目の性能点検を追加して実施するのが一般的です。必要に応じてヒステリシスやドリフト検査を追加することもあります。

定期点検の周期は、特に法律で定められている訳ではありません。お使いになる方が用途、要求仕様にあわせて決めていただくこととなります。最近では、一般に1~2年に1回程度で点検を行われることが多いです。それでは、具体的に定期点検での性能点検はどのようなものか説明して行きましょう。

● 繰り返し性 (デュアルレンジの場合は、大小レンジ共に点検)

下記手順で、繰り返し性点検を行います。

- ①校正用おもり内蔵型の機種は、その内蔵おもりによる校正を行う。
- ②ひょう量の1/2付近またはそれ以上の単一分銅 (やむを得ない場合、2個まで可) を5回以上載せ降ろしし、ゼロ点と荷重時の測定値を記録する。ゼロ点の測定値を記録する代わりに、毎回表示をゼロに設定してから荷重を載せて荷重時の値のみ記録する方法でもよい。
- ③ゼロ点と荷重時の値それぞれ (前項でゼロ点の測定をしなかった場合、荷重時の値のみ) において、幅 (最大値-最小値) を求め、その値が点検公差以内であれば合格とする。

● 偏置 (四隅) 誤差 (デュアルレンジの場合は、大レンジのみ点検)

下記手順で、偏置 (四隅) 誤差点検を行います。

- ①ひょう量の1/3~1/2付近の単一分銅を図3に示す位置 (中央、右前、右後、左後、左前、中央) に順番に載せ、測定値を記録する。(中央は皿の中心に、それ以外は皿上面を4分割した個々の範囲の中心に載せる。例えば、丸皿の場合は、円の中心から1/2半径だけずらした位置に載せる。)

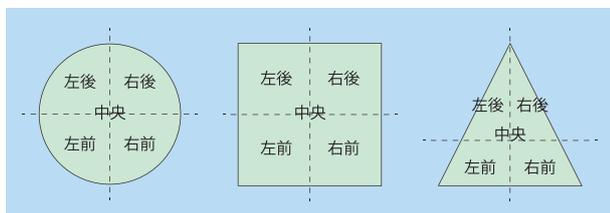


図3 偏置 (四隅) 誤差点検時 分銅載置位置

- ②中央に載せた時の値2つの平均値と、中央以外の位置での値との差 (これを偏置誤差という) がすべて±点検公差以内であれば合格とする。中央に載せた時の値2つの平均値ではなく、始めの中央の値との差を偏置誤差としてもよい。

● 器差 (直線性) (デュアルレンジの場合は、大小レンジ共に点検)

下記手順で、器差 (直線性) 点検を行います。

- ①観測点を、ひょう量付近を含め4点以上設定する。観測点は、以下を参考にして設定する。
 - A) ひょう量範囲を均等に分割した値またはその近辺。
 - B) 点検公差の切り替わる点。
 - C) 点検依頼者が重要とされる荷重域。
- ②設定した観測点に対応する分銅を以下の順番で載せて、測定値を記録する。

ゼロ点→第1 (最小) 観測点→第2 観測点→第3 観測点・・・

→最大観測点 (ひょう量付近)→ゼロ点

なお、ゼロ点の測定値を記録する代わりに、毎回表示をゼロに設定してから荷重を載せ、荷重時の測定値のみ記録する方法でもよい。
- ③各観測点の測定値から、初めと最後の「ゼロ点」の平均値を差し引く。(前項でゼロ点の測定をしなかった場合は不要)
- ④前項で求めた値と、載せた分銅の協定値との差 (「器差」という) をそれぞれ求め、それらすべてが±点検公差以内であれば合格とする。

さて、今回の「天びんの点検」についてのお話しは、お役に立ちましたでしょうか? 日常の分析業務のご参考になりましたら幸いです。

(「その1」、「その2」につきましては、「Special Issue X」をご覧ください。)

高速応答、高安定性を実現
分析天びんの新たなステージへ

HPLC分析をサポートする分析天びん

APシリーズ

最小表示0.01mgモデル誕生

for HPLC

高速液体クロマトグラフ
お使いのお客様に

※この写真はAP135Wです。
※イオナイザはオプションです。



緩衝溶液調製モード (AP-Wのみ)

HPLCでよく用いられる緩衝溶液 (13種類) をサポート。
緩衝溶液の種類と量を指定し、あとは表示に従い簡単調製。
日常の分析作業の効率化と測定ミスを防ぎます。

登録されている緩衝溶液 (一部抜粋)

番号	緩衝溶液リスト
1	100mM リン酸(ナトリウム)緩衝溶液 pH=2.1
2	10mM リン酸(ナトリウム)緩衝溶液 pH=2.6
3	50mM リン酸(ナトリウム)緩衝溶液 pH=2.8
4	100mM リン酸(ナトリウム)緩衝溶液 pH=6.8
5	10mM リン酸(ナトリウム)緩衝溶液 pH=6.9

緩衝溶液調製手順



Products

一体型高速液体クロマトグラフ i-Series Plus



グローバルアプリケーション開発センター
尾坂 裕輔

一体型HPLC “i-Series” が、“i-Series Plus” として生まれ変わりました。既存のメソッドをより一層スムーズに移管する「ACTO※」機能を全機種に搭載するとともに、メソッド開発を支援するメソッドスカウティングシステムへの拡張も可能になりました。“i-Series Plus” は、開発部門から製造や品質管理部門に至るメソッド開発、移管業務を同じシステムで実現でき、ラボの生産性が大幅に改善します。また、オートサンブラには簡易自動前処理機能が標準装備され、試料の自動希釈や試薬添加、共注入分析などが可能となり、試料調製にかかる作業効率の向上も支援します。

※ ACTO: Analytical Condition Transfer and Optimization



1. メソッド移管をハード、ソフトの両面から支援

i-Series Plusは、互換性の高いシステム容量により、他社システムの分析メソッドの移行を容易にします(図1)。さらに、オプションの配管キットを使用することにより、当社従来機と互換性を持たせることも可能です。また、システム容量を変更したくない場合、ACTO機能を用いることにより、グラジエント開始のタイミングをソフトウェアで容易に調整することができます。

このように、i-Series Plusは、ハードウェア、ソフトウェアの両面から既存分析メソッドの移管作業を支援します(図2)。

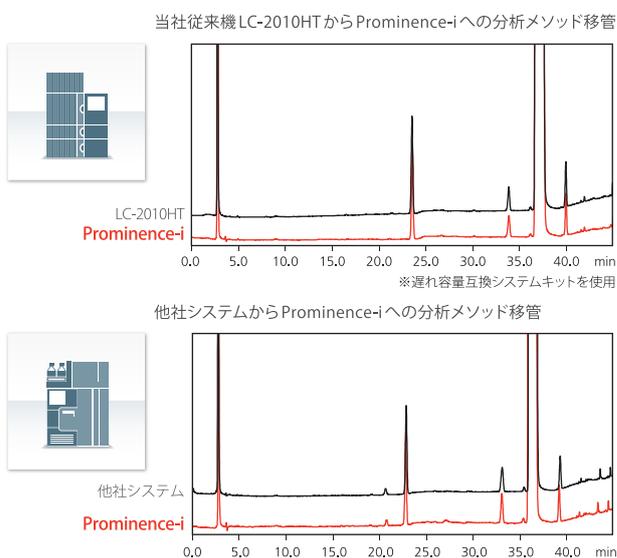


図1 互換性のあるシステム容量 (ハードウェア)

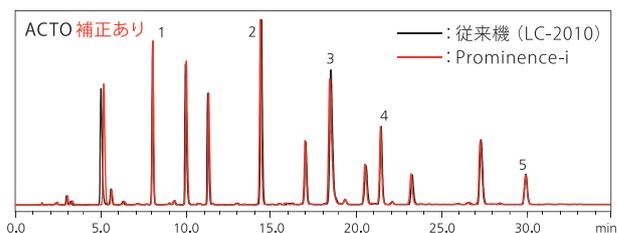
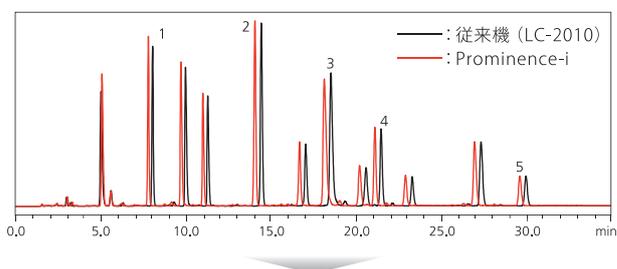


図2 ACTOを使用してシステム容量の違いを補正した例 (ソフトウェア)

2. メソッドスカウティングをi-Series Plusで

メソッド開発には、いくつかフェーズがありますが、その中でも手間の掛かる最適な移動相とカラムの組合せを探索するメソッドスカウティングを、i-Series Plusでも行うことができるようになりました。品質管理部門や製造部門などへ多数導入されるi-Series Plusですが、同じ装置でメソッド開発を行うことで、メソッド移管における作業効率をさらに向上させることができます。

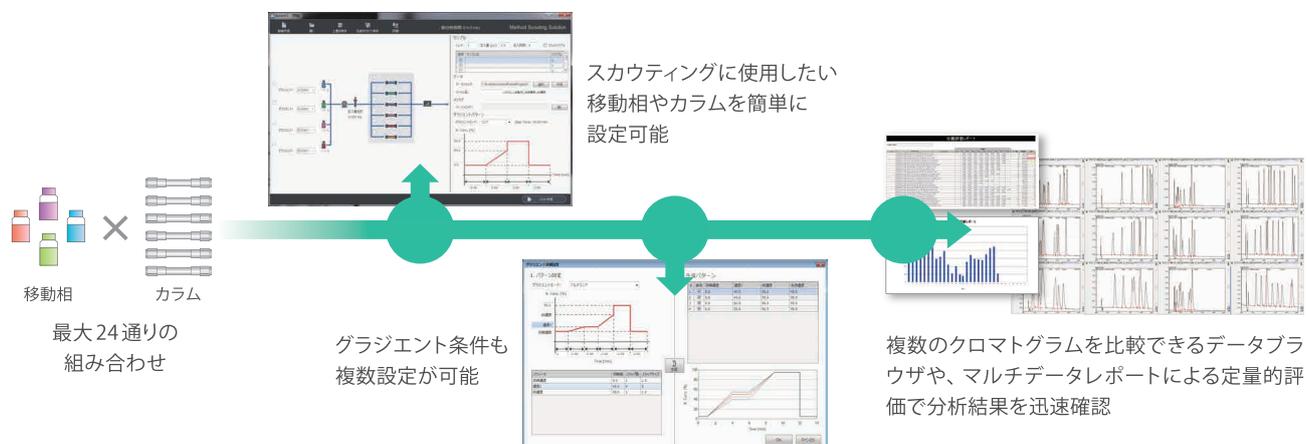


図3 メソッドスカウティング

3. 試料の希釈や共注入を自動化させる前処理機能を搭載

i-Series Plusの自動前処理機能は各動作に合わせたテンプレートに必要な項目を入力するだけで、試料の希釈、試薬の添加など、試料の前処理操作を自動で実行します。操作ミスがなくすとともに、分析業務全体の効率化が図れます。

● 検量線の作成から未知試料の定量までを自動化する希釈機能

試料を特定の希釈率で希釈することが可能です。例えば、標準試料の原液をオートサンプラにセットし、希望する希釈率のメソッドを指定するだけで、検量線を自動作成することができます。もちろん、連続で未知試料の分析も行い、定量結果をレポート出力することも可能です。

● さまざまな用途へ使える共注入機能

試料溶媒の溶出力が強い場合、そのまま分析するとピーク形状が崩れることがあります。試料吸引時、同時に希釈液も吸引、混合することによりピーク形状を改善することができます。また、複数の試薬を指定した順番に吸引、混合して試料と反応させ、それを分析することもできます。

図5は、OPA/FMOC試薬によるアミノ酸のプレカラム誘導体化について、本機能を用いて行った結果です。吸引した試料をすべて分析へ供することから、必要とする試薬や試料の量を最小限に抑えつつ、高感度な分析が可能です。

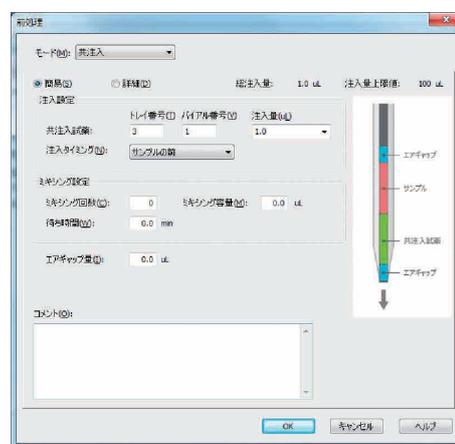


図4 共注入（簡易）設定画面

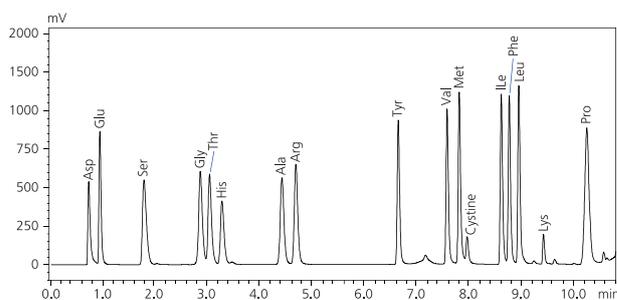


図5 OPA/FMOC試薬によるアミノ酸の自動プレカラム誘導体化例

Applications

第十七改正日本薬局方に準拠した モンテルカストナトリウムの分析

グローバルアプリケーション開発センター
中嶋 康介

モンテルカストナトリウム (図1) は、気管支ぜんそくやアレルギー性鼻炎の治療薬として用いられ、第十七改正日本薬局方に収載されました。

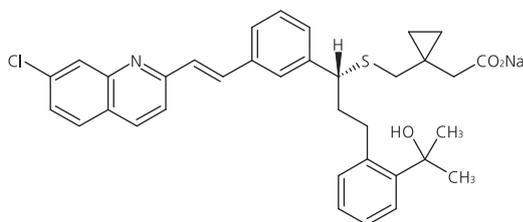


図1 モンテルカストナトリウムの構造式

現在、日本薬局方は米国薬局方および欧州薬局方との国際調和を目指しており、またモンテルカストナトリウムは既に米国薬局方と欧州薬局方の間で調和が図られた医薬品です。日本薬局方に収載された試験法はこれらに基づいた内容となっており、類縁物質の構造式や分析時の流量が明記されるなど、今後の試験法のあり方を示す内容となっています。

ここでは、一体型HPLC “i-Series Plus” の “Prominence-i” と “Nexera-i MT” を用いた、第十七改正日本薬局方に準拠したモンテルカストナトリウムのシステム適合性試験についてご紹介します。

1. Prominence-iによる モンテルカストナトリウムの分析

汎用一体型HPLC Prominence-iを用いて、日本薬局方に記載されたモンテルカストナトリウム定量法に基づくシステム適合性試験を行いました。まず、システム適合性試験用モンテルカスト標準品によりピーク同定用溶液 A (1 mg/mL) を調製し、その後ピーク同定用溶液 A 1 mL を透明な容器に入れ 20 分間静置することでピーク同定用溶液 B を調製しました。表 1 に、Prominence-i によるピーク同定用溶液 B の分析条件を、また図 2 にそのクロマトグラムを示します。

この分析の結果、日本薬局方に記載されている類縁物質を同定することができました。また、表 2 に、システム適合性試験の結果を示します。

表1 分析条件

カラム	フェニルシリカ (内径 4.6 mm、長さ 50 mm、粒子径 1.8 μm)
流量	1.2 mL/min
移動相	A) 水/トリフルオロ酢酸=2000/3 B) アセトニトリル/トリフルオロ酢酸=2000/3 : グラジエント溶離 B 濃度 40% (0 min) → 40% (3 min) → 51% (16 min)
温度	30 °C
検出器	吸光光度検出器 238 nm (セル温度 40 °C)
注入量	10 μL

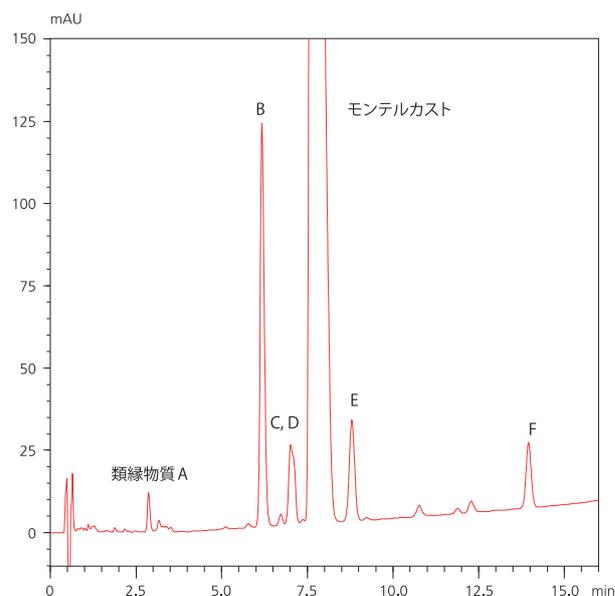


図2 Prominence-iによるモンテルカスト標準液
(ピーク同定用溶液 B) のクロマトグラム

表2 システム適合性試験結果 (Prominence-i)

システム適合性試験	結果	J判定
分離度 (モンテルカストと類縁物質 B)	≥ 2.5	3.8 PASSED
分離度 (モンテルカストと類縁物質 E)	≥ 1.5	2.8 PASSED
システムの再現性 (面積の相対標準偏差)	$\leq 0.73\%$	0.27 PASSED

2. Nexera-i MTによる モンテルカストナトリウムの分析

Nexera-i MTは、HPLCとUHPLCの2種類の流路をもち、HPLCからUHPLCへのメソッド移管を1台で可能とする装置です。ここでは、Nexera-i MTのHPLC流路を用いて、Prominence-iと同様の方法でモンテルカストナトリウムの分析を行いました。図3に、そのクロマトグラムを、また表3にシステム適合性試験結果を示します。この分析により、Prominence-iと同等の結果が得られました。

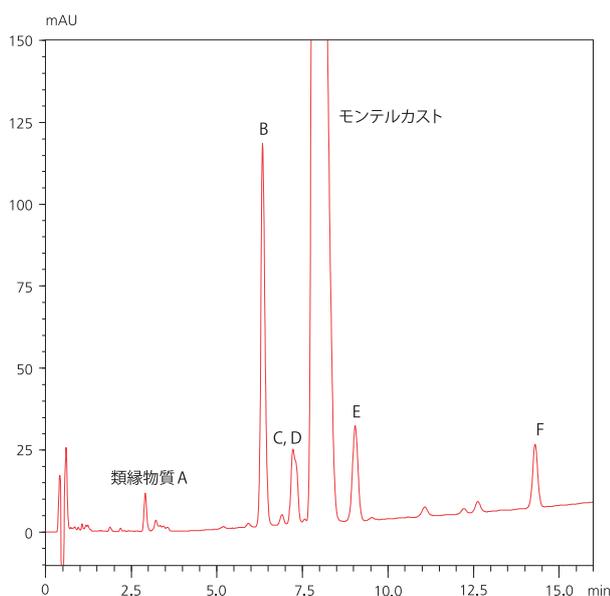


図3 Nexera-i MTによるモンテルカスト標準液
(ピーク同定用溶液B)のクロマトグラム

表3 システム適合性試験結果 (Nexera-i MT)

システム適合性試験	結果	J判定
分離度 (モンテルカストと類縁物質 B)	≥ 2.5	3.8 PASSED
分離度 (モンテルカストと類縁物質 E)	≥ 1.5	2.8 PASSED
システムの再現性 (面積の相対標準偏差)	$\leq 0.73\%$	0.21 PASSED

3. ACTO機能によるシステム容量差の補正

次に、一体型HPLC“i-Series Plus”とワークステーション“LabSolutions”に標準搭載されているACTO (Analytical Condition Transfer and Optimization) 機能によるLCシステムの移管例をご紹介します。

既存のLCシステムによる分析メソッドを他のLCシステムに移管する場合、システム容量や送液ユニットの性能差等により保持時間が一致しないことがあります。そのような時、ACTO機能の一つである「グラジエント開始時間の調整」を実行することにより、指定した容量分だけグラジエントのかけ始めるタイミングを調節することができます。

図4の (a) に Prominence-i で採取したクロマトグラムを、(b) に Nexera-i MT の HPLC 流路で採取したクロマトグラムを示します。Nexera-i MT による分析では、グラジエント開始時間の調整機能を有効にしており、装置間のシステム容量差を補正することにより、表4に示すように Prominence-i と互換性のあるクロマトグラムが得られました。

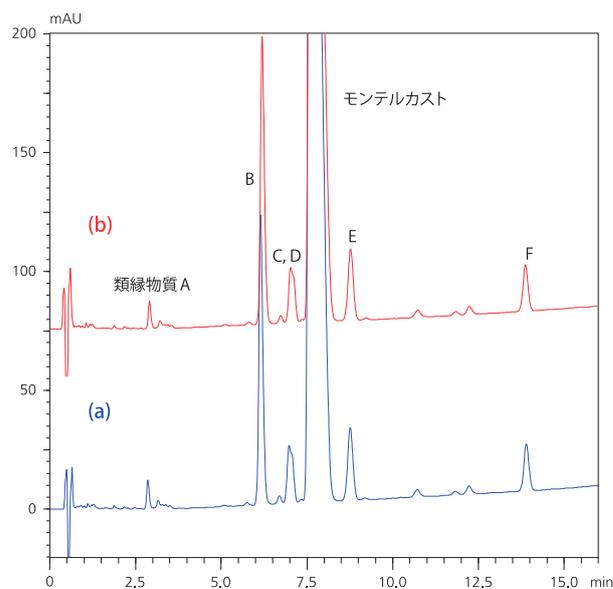


図4 グラジエント開始時間の調整機能によるメソッド移管例
(a) Prominence-i (b) Nexera-i MT

表4 Prominence-iとNexera-i MTの保持時間の差 (%)

成分	グラジエント調整前	グラジエント調整後
類縁物質 A	1.3	1.1
類縁物質 B	2.7	0.3
類縁物質 C, D	3.1	0.2
モンテルカスト	2.7	-0.1
類縁物質 E	2.8	-0.1
類縁物質 F	2.5	-0.3

Introductory

蛍光検出法のはなしーその1 原理と特長

グローバルアプリケーション開発センター
三上 博久

蛍光検出法は、高感度、高選択的な検出法として、HPLCで重要な役割を果たしています。今回は、この蛍光検出法の原理と特長についてお話しします。

1. ルミネッセンスと蛍光

物質が外部エネルギー（電磁波、熱、摩擦、電界、化学反応など）を吸収した励起状態（エネルギーが高い状態）から、熱放射を伴わずに特定の波長の光を放射（発光）して基底状態（エネルギーの最も低い安定な状態）に戻る現象を「ルミネッセンス」と呼びます。ルミネッセンスは、吸収するエネルギー源により種々に分類されますが、光照射の場合を「フォトルミネッセンス」と呼び、「蛍光 (fluorescence)」や「りん光 (phosphorescence)」がこれに含まれます。この他、エネルギー源が化学反応の場合を「化学発光 (ケミルミネッセンス)」、生物化学的反応に基づく場合を「生物発光 (バイオルミネッセンス)」(ホタルや深海生物の発光) などと呼びます。ちなみに、液晶テレビなどの表示部に用いられる有機ELの「EL」は、「エレクトロルミネッセンス」の略です。

2. 蛍光発光の原理

● 紫外可視光の吸収

光を固有のエネルギーをもつ粒子、すなわち光子と考えると、光子のエネルギー (E) は式 (1) で表すことができます。ここで、 ν : 振動数、 λ : 波長、 h : プランク定数、 c : 光の速度です。

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \dots\dots (1)$$

物質が紫外可視域の光エネルギーを吸収すると、電子が基底状態から励起状態に遷移（電子遷移）します。光吸収は、基底状態と励起状態間のエネルギー差に相当する波長の光が照

射された時に起ります。物質には、それぞれの電子構造に依存した固有のエネルギー準位があるため、吸収される光の波長が異なります。なお、式 (1) から、短い波長の光ほどエネルギーが高いことがわかります。

● エネルギーの放出と蛍光

図1に、光エネルギーの吸収と放出についての模式図を示します。横線が各エネルギー準位であり、この不連続な飛び飛びのエネルギー準位に合致した波長の光のみが吸収される訳です。

図1では、電子が第二励起状態 (S_2) におけるある振動準位（細い線で表されている各励起状態のさらに細かいエネルギー準位）のエネルギーに相当する光を吸収して遷移した例を示しています。このエネルギー状態に遷移した電子は、 S_2 の最低振動準位へ、さらにこれと交差する第一励起状態 (S_1) の振動準位へ（内部転換）、次に S_1 の最低振動準位へと熱放出により瞬時に移動（無放射遷移：図中の点線矢印）します。その後、 S_1 から基底状態 (S_0) に戻る訳ですが、この S_1 から無放射遷移ではなく、光としてエネルギーを放出（放射遷移）するのが蛍光です。なお、時として S_1 からこれと交差する三重項状態第一励起状態 (T_1) の振動準位へ移動し（項間交差）、 T_1 の最低振動準位から発光することがあります。これがりん光です。（一重項状態と三重項状態についての説明は、ここでは省略します。）

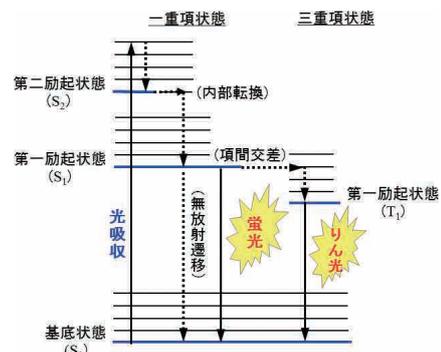


図1 光エネルギーの吸収と放出

3. 蛍光検出法の特長

蛍光検出法の特長としては、蛍光物質から発せられる光エネルギーを直接検出する方法であるため、高い感度（場合によっては吸光度検出法の1000倍以上）が得られる点、光吸収をもつ物質が発蛍光性とは限らない上、分析種に固有の励起・蛍光波長で検出するため、高い検出選択性が得られる点が挙げられます。

図2は、食品中のビタミンB₂（リボフラビン）分析を吸光度検出（波長：270 nm）と蛍光検出（励起波長：450 nm、蛍光波長：520 nm）で行ったクロマトグラムです。吸光度検出では、夾雑成分が多くビタミンB₂の定量が困難な状況であり、さらに前処理や分離条件の検討が必要となります。一方、蛍光検出の場合、夾雑成分の妨害は一切受けられないため、このまま高感度定量分析を行うことができます。

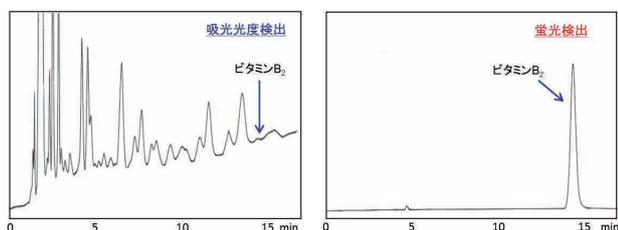


図2 食品中ビタミンB₂のクロマトグラム

このように、蛍光検出法では高感度・高選択性検出が可能になりますが、反面、検出できるのが蛍光物質に限られます。このため、蛍光検出法は、蛍光物質でない分析種を何らかの試薬と反応させて蛍光誘導体に変換して検出する誘導体化検出法でも広く用いられています。

4. 蛍光の特性

● 励起スペクトルと蛍光スペクトル

蛍光波長を一定にして、励起光波長を変化させた時の蛍光強度をプロットすると「励起スペクトル」が得られ、その強度が最大となる波長が「励起極大波長」です。同様に、励起波長を一定にして、蛍光強度の変化をプロットすると「蛍光スペクトル」が得られ、最大強度の波長が「蛍光極大波長」です（図3）。

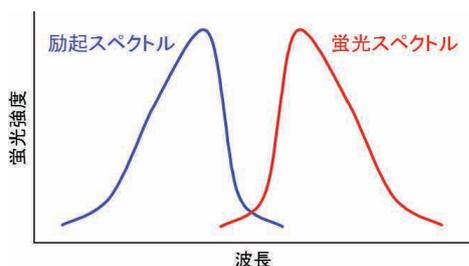


図3 励起スペクトルと蛍光スペクトル

● カシャ (Kasha) の法則

蛍光発光が通常S₁から起こるというもので、図1で説明した通りです。より高いエネルギーの光（より短い波長の光）で励起しても、蛍光発光が起こるのはS₁からであるため、蛍光発光は励起波長に依存しないことがわかります。

● ストークス (Stokes) の法則

蛍光スペクトルは、通常励起スペクトルよりも長波長側に現れるというものです。これは、蛍光発光がS₁から起こることを考えれば容易に理解できると思います。つまり、励起エネルギー→発光エネルギーですから（図1参照）、励起波長をλ₁、蛍光波長をλ₂とすると、式(1)よりhc/λ₁>hc/λ₂、即ちλ₁<λ₂となる訳ですね。

● 鏡像関係

励起スペクトルと蛍光スペクトルは、多くの蛍光物質で図3のように、左右対称に近い鏡像関係を示します。

5. 蛍光強度の関係式

蛍光強度 (F) は、吸収された励起光の強度 (I_{abs}) に比例し、式(2)で表せます。ここで、φ_fは蛍光量子収率（蛍光発光した光子数/吸収した励起光の光子数）です。

$$F = I_{\text{abs}} \phi_f \quad \dots \dots (2)$$

励起光（入射光）強度をI₀、透過光強度をIとすると、I_{abs}=I₀-Iとなりますので、ランバート・ベールの法則と組み合わせると式(3)が得られます。ここで、k:定数、ε:モル吸光係数、c:濃度、l:光路長です。

$$F = kI_0 \phi_f \epsilon c l \quad \dots \dots (3)$$

式(3)は、蛍光強度が濃度に比例していることを示しています。ただし、濃度が高くなると比例関係は崩れますので注意してください。また、蛍光強度は励起光強度にも比例しますので、光源強度が高感度化に重要であることもわかります。

以上、蛍光検出法は、幅広い分野においてHPLCの高感度、高選択的分析に欠かせない検出法ですが、実際の使用にあたっては知っておくべき留意点も多々あります。次回は、これらについてお話ししましょう。

Q&A

Q 試料溶媒とピーク形状の関連について教えてください。

A HPLC分析において、試料を溶解する溶媒（試料溶媒）がピーク形状に大きな影響を与えます。特に、試料溶媒の種類や組成が移動相と異なる場合には、要注意です。

図1は、試料溶媒組成がピーク形状に与える影響の例を示します。(a)と(b)のクロマトグラムは、2種類の試料溶媒で調製した標準液を同一装置、同一分析条件で分析した結果です。(b)のクロマトグラムだけを見ていると気が付きにくいですが、(a)と比較すると(b)のピークが広がっていることがわかります。(a)と(b)の違いは、試料溶媒が(a)では移動相と同じ有機溶媒比率であるのに対し、(b)では逆相モードにおける強溶媒であるアセトニトリルのみになっている点です。

このことを少し詳しく見てみましょう。図2に、試料溶媒の違

い（メタノールと水）による分析種のカラム内での挙動を模式的に示します。ここで、分析種が両溶媒に可溶であり、カラムはODS、移動相は水/メタノール（1/1）とします。試料溶媒が移動相に比べ溶出力が強いメタノールの場合、試料溶媒の移動とともに分析種の一部が移動するため（試料溶媒であるメタノールにより溶出する）、分析種ゾーンが広がります。一方、弱溶媒である水の場合では、分析種は試料溶媒の移動とは関係なく入口に留った後、移動相により溶出されるため、このような現象が起きないのです。この現象は、試料溶媒が移動相に比べて強溶媒であるほど起きやすくなり、注入量が多いとピーク形状が崩れることもあります。また、分析試料溶液と標準液とで、溶媒種や組成が異なる場合にもご注意ください。

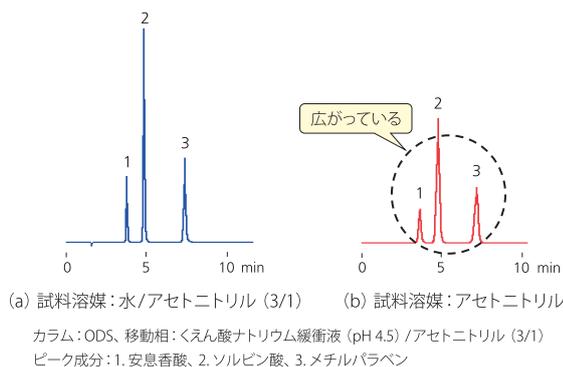


図1 試料溶媒の違いによるピーク形状の違い

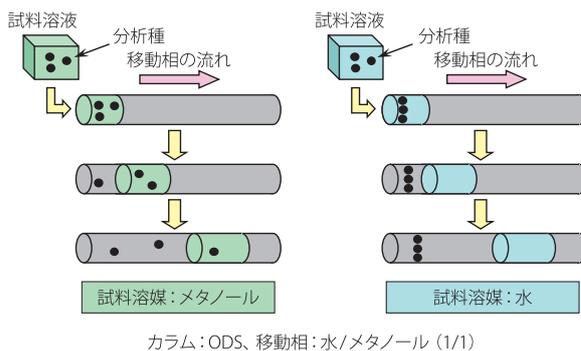


図2 試料溶媒の違いによる分析種のカラム内での挙動