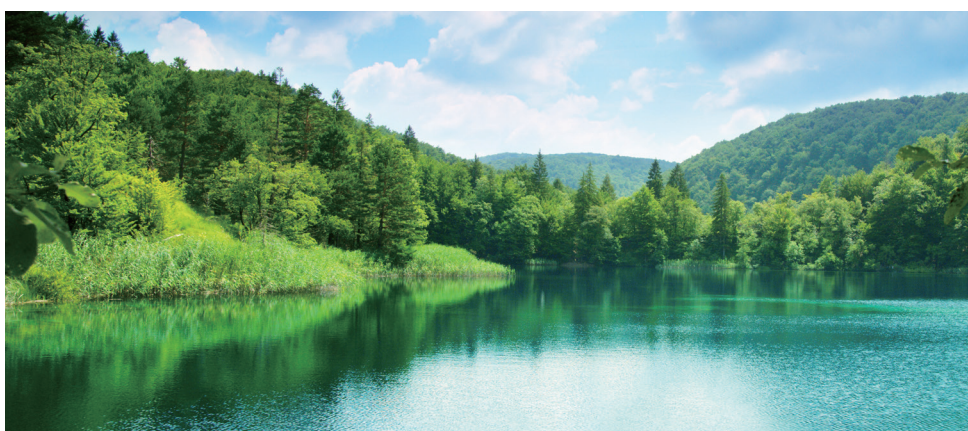


LC TALK

Vol. 104
August 2018



Talk LC-MSによる食物アレルギーの一斉分析 …… P. 2

in the LAB よくあるトラブルと対処法 ベースラインドリフト …… P. 4

Applications Prominence UFPLCによるイブプロフェンと類縁物質の分取精製 …… P. 6

Products ミクロ流量対応 高速液体クロマトグラフ質量分析計システム
Nexera Mikros …… P. 8

TEC フォトダイオードアレイ検出器における新規解析機能“i-PDeA II” …… P. 10

Talk

LC-MSによる
食物アレルギーの一斉分析

一般財団法人日本食品検査
橘田 規

食物に含まれる抗原（食物アレルギー）によって引き起こされる免疫学的機序を介して、生体にとって不利益な症状が誘発されることを食物アレルギーといいます。症例が最も多い免疫学的機序は、特異的IgE抗体が関与するIgE依存性反応です。IgE依存性反応の多くは、原因食品（図1）を摂取してから2時間以内に症状が誘発される即時型反応です。鶏卵、牛乳、小麦、大豆は、乳児から幼児早期の主要原因食品であり、自然耐性獲得率が高いと考えられています。

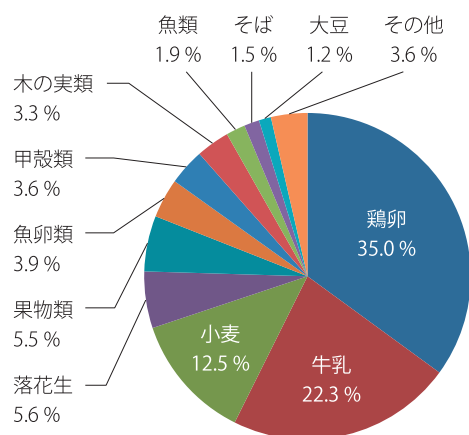


図1 即時型食物アレルギーの原因食品¹⁾

食物アレルギーの症状は、多くの場合、口唇・舌・のどの痒みや鼻汁など、不快な程度にとどまりますが、進行すると全身の発疹、呼吸困難、腹痛、嘔吐などの重篤な症状が起きることもあります。また、非常に感受性が高い人では、摂取した食物アレルギーがごく微量であっても、血圧低下や意識障害を伴うアナフィラキシーショックにより死に至ることがあります。したがって、食物アレルギーをもつ人は、食物アレルギーを含む食品を誤食しないように十分注意する必要があります。

食物アレルギーを含む食品の誤食による健康被害の発生を防止する観点から、平成13年4月にアレルギーを含む食品に関する表示制度が創設されました。その後の改正と平成27年4月に施行された食品表示法によって、表1に示す特定原材料7品目とそれに準ずる20品目が表示の対象になっています。平成14年11月と平成17年11月には、この表示制度が適切に実施されていることを検証するための検査方法が通知され、その中で定量検査法としてELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法が示されています²⁾。ELISA法は、対象とする原材料に含まれる多くのタンパク質に結合する抗体を用いる方法と、特定のタンパク質に結合する抗体を用いる方法がありますが、より特異性の高い後者であっても交差反応による偽陽性の判定を完全には避けることができません。また、食品メーカー、食品商社などが品質管理の目的で行う食品の出荷前検査では、表1の原材料を一斉に検出できる分析法が望ましいのですが、ELISA法はこれに適した方法ではありません。そこで、私たちは、高感度・高選択性を特徴とするLC-MSを用いて同時に複数の原材料を検出・定量する方法を検討してきました。

表1 アレルギー表示の対象品目

	原材料の名称
特定原材料 (表示の義務)	卵、乳、小麦、えび、かに、そば、落花生
特定原材料に 準ずるもの (表示の推奨)	あわび、いか、いくら、オレンジ、 カシューナッツ、キウイフルーツ、牛肉、 くるみ、ごま、さけ、さば、大豆、鶏肉、 バナナ、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、 りんご、ゼラチン

LC-MSによる食物アレルギー一斉分析法では、各原材料に含まれるタンパク質に由来するペプチドを検出・定量します。正確な分析結果が得られるかどうかはターゲットペプチドの選択に懸かっています。原材料「乳」を例に、ターゲットペプチドの選択方法について紹介します。牛乳から抽出したタンパク質に対して、還元・アルキル化を行った後、トリプシンで消化してペプチドを得ます。これをLC-MSで測定し、牛乳に含まれるタンパク質に由来するペプチドの情報を網羅的に取得します。Swiss-Protなどのタンパク質配列データベースから牛（学名：Bos taurus）のもつタンパク質の配列情報を入手し、LC-MS測定で検出したペプチドをこのタンパク質の配列に当てはめていきます（表2）。この段階で、タンパク質の全配列に占めるペプチドの比率が大きいものがターゲットタンパク質の候補になります。牛乳の場合、13種類のペプチドが当てはまり、全配列の85%を占めるBeta-lactoglobulinがターゲットタンパク質の第1候補になります。Beta-lactoglobulinに由来し、LC-MS測定で検出されたペプチド（表3）の中には、牛以外の哺乳類のBeta-lactoglobulinに相同性のあるものや穀類、野菜類等の一般食品に含まれるタンパク質に相同性のあるもの

が多く含まれています。このような偽陽性の判定を引き起こす可能性の高いペプチドは、データベース検索や実試料分析から得た情報を基に取り除いていきます。この作業を入念に行うことで、特異性の高いターゲットペプチドを見付け出します。「乳」以外の原材料についても、同様の方法で複数のターゲットタンパク質およびこれらに由来する複数のターゲットペプチドを選択します。

現在、特定原材料を対象とした一斉分析法を確立すべく、各原材料のターゲットペプチドの絞り込みを行っているところです。また、試料から目的のタンパク質を抽出することができなければ偽陰性の判定をする可能性がありますので、様々な加工形態に適した試料粉碎法と抽出方法を検討し、幅広い食品に適用可能な分析法を開発する予定です。

引用文献

- 1) 平成27年度 食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書, 消費者庁, 平成28年3月.
- 2) 食品表示基準について（平成27年3月30日 消費者庁次長通知 消費表第139号）別添「アレルギーを含む食品の検査方法」

表2 牛乳に含まれる主なタンパク質

Description	Coverage	Peptides
Beta-casein	81 %	13
Beta-lactoglobulin	85 %	18
Kappa-casein	54 %	11
Alpha-S1-casein	73 %	18
Serum albumin	75 %	48
Lactotransferrin	64 %	43
Alpha-S2-casein	68 %	24
Alpha-lactalbumin	79 %	14
Lactadherin	70 %	25
Butyrophilin subfamily 1 member A1	59 %	25
Xanthine dehydrogenase/oxidase	39 %	34
Polymeric immunoglobulin receptor	34 %	18
Perilipin-2	46 %	15

表3 Beta-lactoglobulin由来の主なペプチド

Sequence
LSFNPTQLEEQCHI
TPEVDDEALEK
TPEVDDEALEKFDK
VYVEELKPTPEGDLILLQK
VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR
GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR
WENGECQK
ALPMHIR
IDALNENK
GLDIQK
VLVLDTDYKK
TKIPAVFK
IPAVFK
VLVLDTDYK
KYLLFCMENSAPESLACQCLVR
YLLFCMENSAPESLACQCLVR
YLLFCMENSAPESLACQCLVR
KIIAEK
ILAEK

執筆者紹介

山梨県甲府市出身。横浜市立大学理学部要素科学科卒業。化学工業メーカーで品質管理業務等を経験した後、財団法人日本冷凍食品検査協会（現在の一般財団法人日本食品検査）に入会し、理化学試験業務、試験法開発業務に従事。現在、事業本部試験部門副部長。食品産業コーデックス対策委員会専門委員、液体クロマトグラフィー研究懇談会役員、残留農薬分析国際交流会幹事などを務める。

専門分野

食品汚染物質及び機能性成分の
LC-MS/MSアプリケーション開発

将来の夢

温泉めぐり

趣

味

お酒、自転車、ビリヤード

in the LAB

よくあるトラブルと対処法
ベースラインドリフト島津総合サービス リサーチセンター
三上 博久

今号では「よくあるトラブルと対処法」の第2弾として、ベースラインドリフトについて、その原因と対策について解説します。

図1に、日常分析で経験するベースラインドリフトのパターン例を示します。

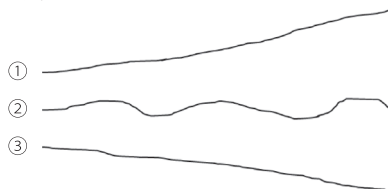


図1 ベースラインドリフトのパターン例

①と③は一定方向への上昇あるいは下降、②は上下のうねりです。実際には、これらが合わさったパターンの中もあり、周期が短いあるいは長い場合、規則的あるいは不規則な場合があります。図2に、これらベースラインドリフトの主な原因をまとめます。これらは、用いる検出器によって影響の程度が異なります。

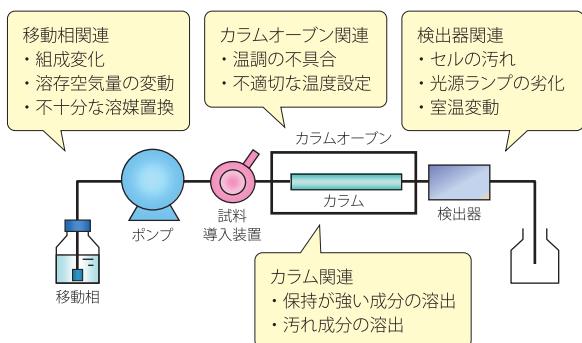


図2 ベースラインドリフトの主な原因

図3に、ベースラインドリフトの原因を調べるための一般的な手順を示します。まずは、一旦移動相の送液を停止して様子を確認します。次に、カラムを外して抵抗管（例えば、内径0.3 mm、2 m程度の配管）を接続して送液します。この結果により、ある程度原因を推定し問題箇所を絞り込むことができます。

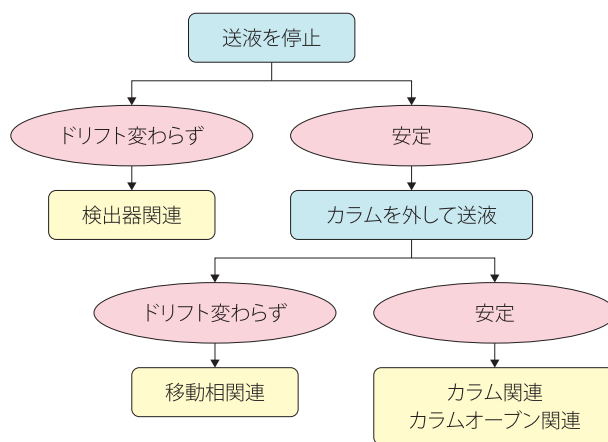


図3 ベースラインドリフト原因調査の一般的手順

1. 移動相関連

組成変化や溶存空気量変動がベースラインドリフトの原因となるのは、一般に吸光光度検出器（特に、短波長域）、示差屈折率検出器、電気化学検出器、電気伝導度検出器などです。

● 組成変化

移動相容器内での組成変化は、水と有機溶媒との混合溶媒で、液温（室温）が高い時や大きな移動相容器に少量の移動相を入れて用いる時などで起こりやすくなります。移動相の量に応じた容器や専用の容器キャップ（図4）の使用をお勧めします。



図4 移動相容器用キャップの例

また、グラジエント溶離の流路を用いて混合溶媒を調製する方法（例えば、A液を水、B液をアセトニトリルとして、必要な比率で送液してイソクラティック溶離する方法）もあります。ただし、検出器によっては僅かな混合むらより、うねりが生じることがある点、ご注意ください。

● 溶存空気量の変動

溶存空気量の変動は、脱気装置の不調時、オフライン脱気（アスピレーターによる脱気など）における空气の再溶解により起こります。後者では、オンライン脱気装置の使用をお勧めします。吸光光度検出器における溶存空気量の影響は、用いる有機溶媒によっても異なります。図5に、いくつかの溶媒における空気飽和による吸光度変化（脱気した溶媒と空気飽和した溶媒との吸光度の差）を表しています。ここで注目すべきは、逆相クロマトグラフィーで多用するアセトニトリルとメタノールです。メタノールでは、溶存空気による吸光度変化が大きく、特に短波長域でのベースラインドリフトの原因となり得ることを頭に入れておきましょう。

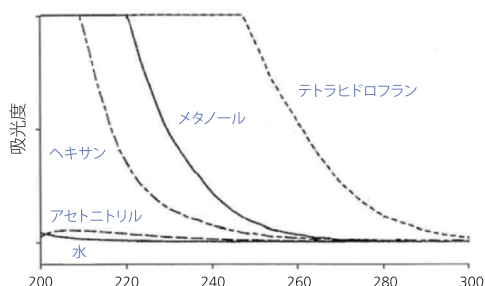


図5 空気飽和による吸光度変化

● 不十分な溶媒置換

前に使用した溶媒（移動相や洗浄溶媒）の置換が十分で流路に残存している場合、ベースラインドリフトの原因となることがあります。

2. カラム関連

● 保持が強い成分の溶出

イソクラティック溶離において、カラムに強く保持される試料中の夾雑成分が、長時間かけて溶出する（ブロードなピークとなるため、ベースラインドリフトのように見える）ことがあります。この場合、前処理方法を再検討するか、一分析毎に洗浄工程を加え、このような成分を除去します。

● 汚れ成分の溶出

別の分析条件で使用していた時の汚れ成分が原因となることがあります。分析前には、必ずカラムの使用履歴を確認しましょう。異なる検出器を用いる場合、あるいは検出器が同じで

も検出条件や感度が異なる場合、汚れ成分がベースラインドリフトとなって現れることがあります。

3. カラムオープン関連

温度の影響を受けやすい吸光光度検出器（短波長域）、示差屈折率検出器、電気化学検出器、電気伝導度検出器などでは、ベースラインドリフトの原因となる可能性があります。

● 温調の不具合

温調不良によってカラムから溶出する移動相温度が変動するために起こります。

● 不適切な温度設定

カラムオープンには、温度設定範囲の仕様があります。例えば、「室温+10℃以上」という仕様のカラムオープンを用いる時、室温25℃で、30℃に設定すると温調精度が仕様外になってしまいます。この場では、35℃以上に設定してください。

4. 検出器関連

● セルの汚れ

試料中の夾雑成分による汚れは、移動相で十分洗浄できないことも多くあります。フローセルの洗浄は、注射器を用いて洗浄液（例えば、脂溶性の汚れには2-プロパノール）を流して行います。汚れがひどい場合には、取扱説明書を調べ、分解可能であれば分解して超音波洗浄などを行います。

● 光源ランプの劣化

光源ランプの光量不足は、ベースラインドリフトの原因となります。光源ランプは、取扱説明書記載の交換目安時間に応じての交換が必要です。ランプの積算点灯時間が記憶できる装置では、点検時などに確認しましょう。

● 室温変動

前項で述べました温度の影響を受けやすい検出器では、室温変化に気を付けてください。装置の設置場所として、実験室の出入口やエアコン噴出口付近、直射日光の当たる窓の側などの温度変動の大きい場所、風が当たりやすい場所は避ける必要があります。移動できない場合には、カラム出口から検出器入口までの配管に断熱材を巻く、検出器に風除けを設置するなどの対策が有効なこともあります。

情報コーナー

公益社団法人日本分析化学会 LC/MS分析士認証試験

■ 三段認証試験：10月3日（水）、東京 ■ 二段認証試験：11月1日（木）、東京・京都 ■ 初段認証試験：12月17日（月）、東京・京都
詳しくは、日本分析化学会のホームページをご覧ください。

Applications

Prominence UFPLCによる イブプロフェンと類縁物質の分取精製

グローバルアプリケーション開発センター
中嶋 康介

LCによる分取精製は、医薬品の合成や天然物中の有効成分の探索、微量の未知化合物の構造解析など、医薬・食品化学といった分野で広く用いられる手法です。Prominence UFPLC[®]は分取に加え濃縮、精製、回収など分取に関わる工程を自動化することにより、分取精製の大幅な省力化を可能としました。

ここでは、UFPLCアドバンスドシステムを用い、医薬品イブプロフェンとその類縁物質の混合試料を分取精製した例をご紹介します。

※ UFPLC：Ultra Fast Preparative and Purification Liquid Chromatographyの略

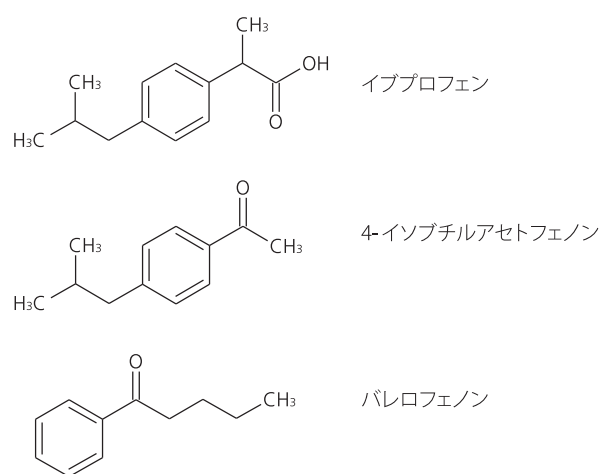


図1 イブプロフェンと類縁物質の構造式

1. UFPLCによる分取精製の流れ

Prominence UFPLCは、分取LCにトラップカラムを組み合わせ、分取に関わる様々な工程を自動で実施するシステムです。以下に、UFPLCによる分取精製の工程を示します。

1. 分取LCにより混合試料中の成分を分離し目的成分をトラップカラムに導入
2. トラップカラム内を超純水で置換
3. 有機溶媒によりトラップカラムから目的成分溶出

2. イブプロフェンと類縁物質の分取精製

イブプロフェンは、非ステロイド系抗炎症剤（NSAIDs）の一種で解熱や鎮痛剤として使用されている医薬品です。米国薬局方USP-NFには、イブプロフェンと分解物である4-イソブチルアセトフェノン、バレロフェノン（内標準物質）（図1）の分析法が収載されています。今回、UFPLCによりこれら3成分の混合溶液からそれぞれの成分を分取精製しました。

表1に、分取精製条件、図2に混合溶液の分取クロマトグラムを示します。混合溶液は、対象とした3成分を移動相で溶解し、各成分が5000 mg/Lになるよう調製しました。

表1 分取精製条件

装 置	： Prominence UFPLC
分取LC条件	
カラム	： Shim-pack VP-ODS （内径 10 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm）
移動相	： A) 1 % (w/v) クロロ酢酸水溶液 （アンモニア水により、pH 3.0に調整） B) アセトニトリル A/B = 2/3 (v/v)
流 量	： 9.0 mL/min
温 度	： 室温
注入量	： 100 μL
検出器	： 紫外吸光光度検出器 230 nm（分取セル）
脱塩条件	
カラム	： Shim-pack C2P-H（内径 20 mm、長さ 30 mm）
脱塩溶媒	： A) 2 % (v/v) アセトニトリル水溶液、B) 水
脱塩条件	： A 15 mL/min (0-2 min) →A 8 mL/min (2.01-4 min) →B 8 mL/min (4.01-8 min)
溶出条件	
溶出液	： アセトニトリル
流 量	： 4.5 mL/min
検出器	： 紫外吸光光度検出器 230 nm（分取セル）

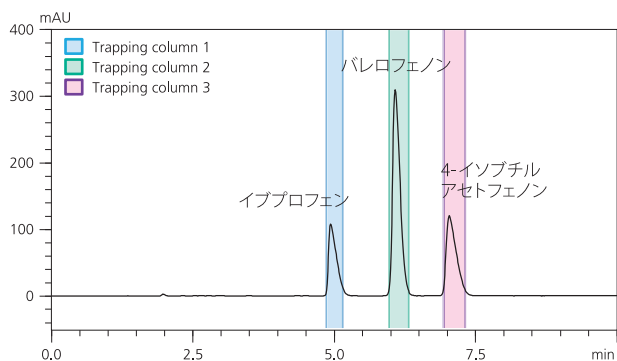


図2 イブプロフェンと類縁物質の分取クロマトグラム (UFPLC)

3. イブプロフェンと類縁物質の純度確認

UFPLCにより回収したイブプロフェン、パレロフェノン、4-イソブチルアセトフェノンの画分を分析し、純度確認を行いました。表2に分析条件を、図3にクロマトグラムを示します。また、表3にそれぞれの画分に含まれる目的成分の純度を面積百分率 (UV 230 nm) で示します。

表2 純度確認の分析条件

装置	: Prominence HPLC
カラム	: Shim-pack VP-ODS (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm)
移動相	: A) 1 % (w/v) クロロ酢酸水溶液 (アンモニア水により pH 3.0 に調製) B) アセトニトリル A/B = 2/3 (v/v)
流量	: 2.0 mL/min
温度	: 30 °C
注入量	: 10 μL
検出器	: 紫外吸光度検出器 230 nm (分析セル)

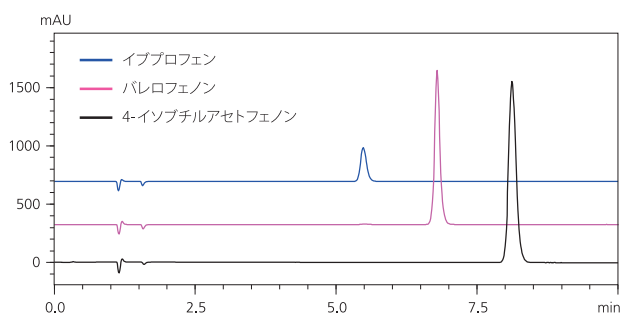


図3 UFPLCにより得られた各画分のクロマトグラム

表3 画分に含まれる目的成分の純度

	面積 %
イブプロフェン	99.2
パレロフェノン	99.6
4-イソブチルアセトフェノン	99.8

(面積百分率 UV 230 nm)

4. UFPLCと分取LCの画分乾燥時間の比較

混合物を分取LCにより分離し回収した際、画分を次工程で使用するため溶媒を乾燥させることがあります。しかし、従来の逆相分取LCでは移動相に水を含んでいるため、乾燥に多大な時間を要します。また、移動相に不揮発性の緩衝液を使用していた場合、乾燥後その塩が析出することがあります。UFPLCによる分取精製ではトラップカラム上で脱塩を行うため、分離工程で使った不揮発性の塩を除去することが可能で、トラップカラムからのサンプル回収には有機溶媒を使用するため、乾燥時間が大幅に短縮されます。

乾燥時間の短縮を確認するために、UFPLCで回収したイブプロフェンの画分を遠心濃縮機で乾燥しました。また、標準的な分取LCでイブプロフェン溶液を回収した場合の画分の乾燥時間を計測し、その長さを比較しました。標準的な分取LCの画分は乾燥に約180分を要したのに対し、UFPLCの画分は約20分で乾燥が完了しました (図4)。

それぞれの乾燥物を確認すると、分取LCの画分からは移動相として使用したクロロ酢酸アンモニウム塩が析出し、そのままでは次工程で使用できない状態でした。一方、UFPLCの画分はトラップカラム上で脱塩を行っているため、乾燥後にイブプロフェン単体の結晶を確認することができました (図5)。

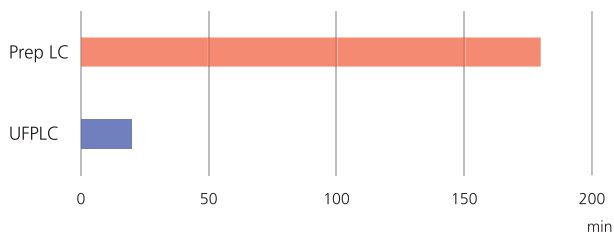


図4 溶媒乾燥時間の比較



図5 イブプロフェン画分の乾燥後の状態

Products

マイクロ流量対応 高速液体クロマトグラフ質量分析計システム Nexera Mikros

グローバルアプリケーション開発センター
河野 慎一



1. ミクロLCMSシステム Nexera Mikros

ミクロLCMSシステム Nexera Mikrosは、特に1 ~ 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で動作し、セミミクロLCMSシステムより高感度に検出でき、ナノLCMSシステムと比べて分析時間の短縮と堅牢性に優れています。ライフサイエンス研究において、開発期間、開発コストの低減に貢献します。また、優れた操作性およびメンテナンス性は、スループットの向上に寄与します。



図1 送液ユニット LC-Mikros

2. カラム-MS インターフェイス接続機構 UF-Link™

UF-Linkにより、ミクロLCMS用カラムを簡単にデッドボリュームなく取り付けすることができます。カラム外拡散による感度低下を最小限に抑え、またカラム着脱を繰り返しても再現性良くデータが得られます。



カラムにアダプタを取り付けます。
アダプタはユニファインェジで、幅広い種類の
カラムに取り付け可能です。



カラムをオープン内のUF-Link機構に設置し
ます。



レバーを倒して接続完了です。

図2 UF-Link接続手順

3. Micro-ESI 8060

Micro-ESI 8060は、マイクロ流量でのイオン化に最適化されています。質量分析計のイオン取り込み口に対するイオン化プローブの位置および角度を最適化しました。これにより、世界最高レベルの高感度と優れた堅牢性の両立を実現しました。また、Micro-ESI 8060では、ワンタッチレバーを解除し、ユニットを開いて持ち上げるだけで別のイオン化ユニットへの交換作業を行うことができます。



4. システムラインナップ

● 直接注入システム

注入量が少なく、脱塩などの前処理済み試料の分析向けシステムです。



● トラップ&エリユートシステム

セミマイクロシステムでの注入量などを維持し、感度向上を目的としたシステムです。



● イオン化促進（メイクアップフロー）システム

上記の2システムにLC-20ADnanoを1台追加し、ネガティブモードでの感度向上を目的としたシステムです。

分析カラムの後ろにT字配管を追加し、有機溶媒の添加が可能です。



5. Shim-pack MCシリーズ

マイクロLCMS用分析カラムShim-pack MCシリーズは、マイクロ領域での移動相送液に対応した逆相カラムです。カラム接液部の不活性化処理により金属吸着を抑制し、低分子化合物やペプチドの分析に適用することが可能です。

● 分析カラム

Shim-pack MC C18

P/N	固定相	粒子径 (μm)	内径 (mm)	長さ (mm)
228-59937-91	C18	1.9	0.3	50
228-59937-93			0.175	
228-59937-95			0.15	

● トラップカラム

Shim-pack MCT C18

P/N	固定相	粒子径 (μm)	内径 (mm)	長さ (mm)
228-59938-91	C18	3	0.3	35
228-59938-92			0.5	

Shim-pack MCT C8

P/N	固定相	粒子径 (μm)	内径 (mm)	長さ (mm)
228-59939-91	C8	3	0.3	35
228-59939-92			0.5	

TEC

フォトダイオードアレイ検出器における 新規解析機能 “*i*-PDeA II”

グローバルアプリケーション開発センター
丹羽 宏之

フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器の新規機能 “*i*-PDeA II” は、PDA検出器の基本性能の向上とHPLC/UHPLCシステムの優れた再現性、そして計量化学 (ケモメトリクス) 技術との融合により、カラムでは分離が困難なピークをソフトウェア上で分離する新しい解析機能です※1。*i*-PDeA IIを用いることにより、標準試料が準備できない成分についても、定量を行うことができ、各成分のみの吸収スペクトルを得ることができます。

ここでは、*i*-PDeA IIの概要と応用例についてご紹介します。

※1 エーザイ株式会社との共同開発

1. *i*-PDeA IIの概要

i-PDeA IIとは、PDA検出器で取得したデータについて、カラムでの分離が困難な複数成分が重なったピークを、ソフトウェア上で各成分のピークに分離する機能です (図1)。また、他成分の影響を排除し、注目する成分のみの吸収スペクトルも同時に得ることができます。

PDA検出器では、クロマトグラム上の各時刻について、測定波長領域での吸光度情報を取得しています。図2に示すように、複数成分の混合物をPDA検出器で分析した場合に得られる吸光度データ (*D*) は、各成分の吸収スペクトル (*S*) と濃度の積との足し合わせになっていると考えられます。各時刻における成分の濃度とは、各成分のピークプロファイル (*C*) を表します。なお、実際のデータは、ノイズやベースラインドリフトなどに起因する残渣 (*R*) も足し合わされて得られます。

i-PDeA IIでは、多変量解析の一つの手法 (MCR-ALS法) を用いて、PDA検出器から得られる吸光度データという1つの既知データをもとに、各成分の吸収スペクトルとピークプロファイルという2つの未知パラメーターの組み合わせを推測しています。なお、1つの実測データから2つの未知パラメーターを推測するため、それらの解は一意に定まりません。そのため、*i*-PDeA IIでは、実測データに最も近くなるピークプロフ

イルと吸収スペクトルの組み合わせを各成分の吸収スペクトルとピークプロファイルとして表示しています。

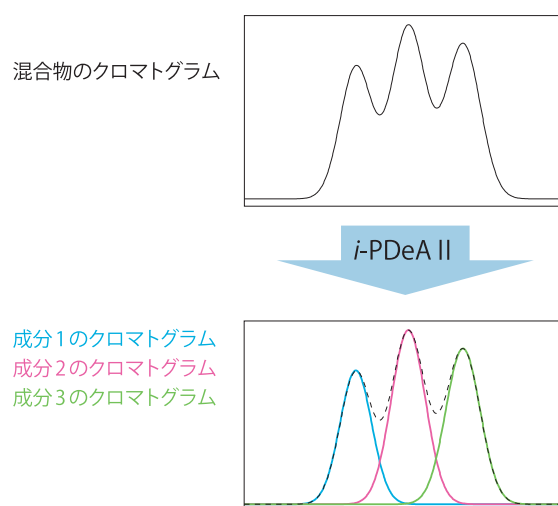


図1 *i*-PDeA IIで得られるクロマトグラム

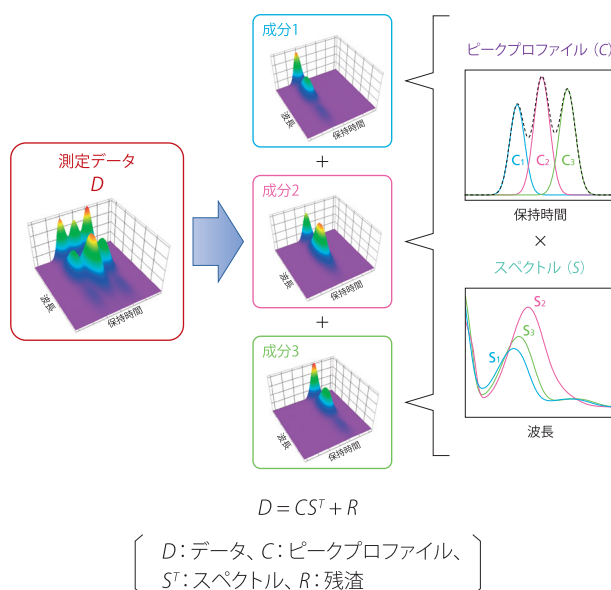


図2 混合物のデータの成り立ち

以上の原理により、PDA検出器から得られる混合物のデータから複数の目的成分のピークを抽出し、共溶出する他の成分の影響を排除した各成分のみのピークプロファイルと吸収スペクトルを得ることが可能になります。

2. i-PDeA II の使い方

PDA検出器で取得したデータがあれば、LabSolutions^{※2}により時間範囲と波長範囲を指定するだけで、i-PDeA IIを使用することができます(図3)。

時間範囲と波長範囲には、データ取得を行った全範囲がデフォルトで表示されますが、そのままi-PDeA IIを使用すると、計算に時間がかかるため、解析に必要な時間範囲と波長範囲を指定してi-PDeA IIを使用することをお勧めします。

※2 i-PDeA II機能は、LabSolutions LC/GC Ver. 5.90以降、LabSolutions DB Ver. 6.80以降、LabSolutions CS Ver. 6.81以降でご利用いただけます。

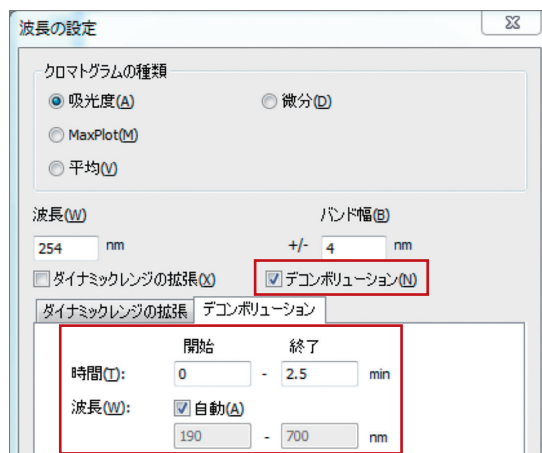


図3 i-PDeA II設定画面

3. i-PDeA II の応用例

i-PDeA IIの応用例として、メチルアセトフェノンの位置異性体 *o*-メチルアセトフェノン (*o*-MAP)、*m*-メチルアセトフェノン (*m*-MAP)、*p*-メチルアセトフェノン (*p*-MAP) (図4)の混合物に対して適用した結果をご紹介します。

o-MAP、*m*-MAPおよび*p*-MAPの各標準試料を30 vol%メタノール水溶液に溶解し、400 µg/mLに調製した標準液を準備し、表1の条件で分析しました。図5に、各標準液の分析結果を示します。

メチルアセトフェノンは、*o*-MAP → *p*-MAP → *m*-MAPの順に溶出し、それぞれの測定データのピークトップから切り出したスペクトルから、各成分間の類似度は (*o*-MAP/*p*-MAP) = 0.8410、(*p*-MAP/*m*-MAP) = 0.9123、(*o*-MAP/*m*-MAP) = 0.9809の関係にあることを確認しました。

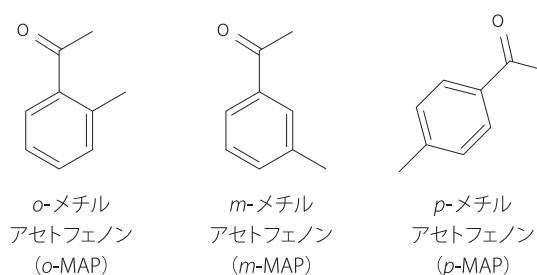


図4 メチルアセトフェノン異性体の構造

表1 分析条件

装置	: Prominence-i 3D (PDA)
カラム	: Shim-pack XR-ODSIII (内径 3.0 mm、長さ 50 mm、粒子径 2.2 µm)
移動相	: メタノール/水 = 3/7 (v/v)
流量	: 1.0 mL/min
温度	: 40 °C
サンプリング	: 240 ms
スリット幅	: 1.2 nm
波長範囲	: 190 ~ 400 nm
注入量	: 1.5 µL

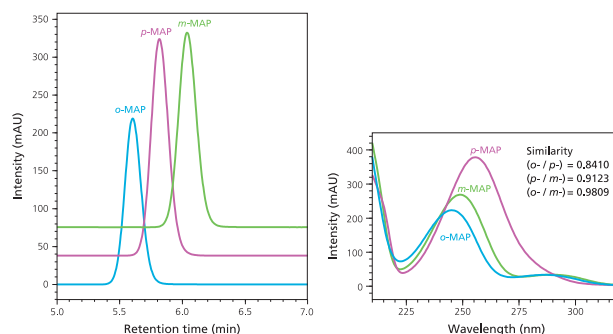


図5 各標準液の分析結果

次に、*o*-MAP、*m*-MAPおよび*p*-MAPの各標準試料を400 µg/mL、400 µg/mL、4 µg/mLの濃度に調製した混合溶液を同じ条件で分析しました(図6)。

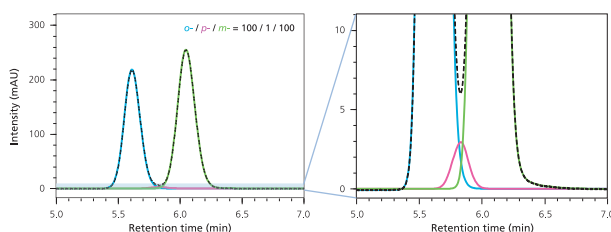


図6 3成分混合試料に対するi-PDeA II使用結果

各成分の相対濃度が (*o*-MAP/*p*-MAP/*m*-MAP) = 100/1/100となるため、相対濃度1の*p*-MAPが前後に溶出する相対濃度100の*o*-MAPと*m*-MAPのピークに埋没してしまい、目視では*p*-MAPの存在を確認することはできませんでした。

時間範囲5.0～7.0分、波長範囲210～320 nmの測定データに対して*i*-PDeA IIを使用することにより、*o*-MAP、*m*-MAPおよび*p*-MAPを独立したピークとして分離することができました。

4. *i*-PDeA II による標準試料の純度測定

図5の各標準試料の純度を確認するため、各標準液のデータに対して*i*-PDeA IIを使用すると、*p*-MAPの標準液に不純物が含まれていることが示唆されました。ピークの溶出時間とスペクトルの類似度から、この不純物は*m*-MAPであると推定されます(図7)。

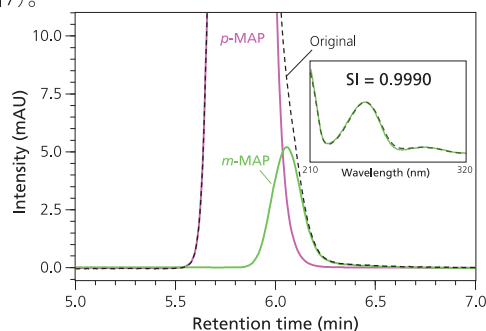


図7 *p*-MAP標準液ピークに対する*i*-PDeA II使用結果

不純物を分離するため、*p*-MAPの標準液を超高速度分析用逆相カラムShim-pack XR-Phenyl(内径3.0 mm、長さ75 mm、粒子径2.2 μm)を用いて分析しました(図8)。

この結果、*p*-MAPのピークの裾に重なっていた*m*-MAPが分離され、3回の分析結果の平均から、*p*-MAPの標準液中に面積割合で2.15 %の*m*-MAPが含有されていることが確認できました。

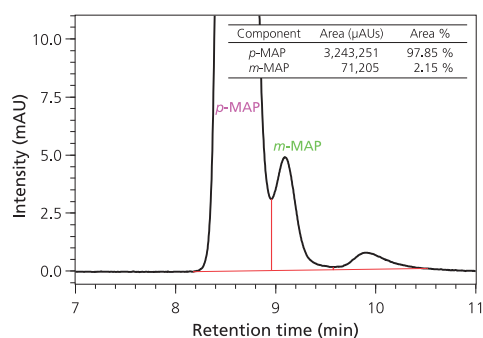


図8 Phenylカラムによる*p*-MAP標準液の分析結果

5. *i*-PDeA II で得られるピーク面積とスペクトルの評価

3成分混合試料と同濃度の*o*-MAP、*m*-MAPおよび*p*-MAPの標準液をそれぞれ分析し、1成分のみを分析した場合と3成分

混合試料を分析して*i*-PDeA IIを使用したピーク分離結果を比較しました(表2)。

標準液を1成分ずつ分析して得た面積を真値の欄に、混合試料を分析して*i*-PDeA II機能を用いてピークを分離して得た面積を混合試料(分離ピーク)の欄に示します。なお、いずれも面積は3回分析の平均値を用いました。また、1成分ずつの標準液を分析して得た吸収スペクトルと*i*-PDeA IIで得た吸収スペクトルについて類似度を算出しました。

表2 *i*-PDeA IIの性能評価

成分	面積 (μAUs)		誤差 %	類似度
	真値	混合試料 (分離ピーク)		
<i>o</i> -MAP	2,090,806	2,080,405	-0.50 %	1.0000
<i>p</i> -MAP	27,666	26,639	-3.71 %	0.9996
<i>m</i> -MAP	2,658,837	2,656,836	-0.08 %	1.0000

各成分の相対濃度が(*o*-MAP/*p*-MAP/*m*-MAP) = 100/1/100の3成分混合試料の例では、*i*-PDeA IIでの分離後の面積と標準液を1成分ずつ分析して得た面積を比較すると、相対濃度100である*o*-MAPと*m*-MAPについては面積誤差は±1%未満、類似度は0.9999以上でした。相対濃度1の*p*-MAPについても面積誤差は±4%未満、類似度は0.9996という結果を得ました。

図9に*p*-MAPの標準液から得た吸収スペクトルと*i*-PDeA IIを用いて混合試料から推定した吸収スペクトルを規格化し、重ねて示します。

i-PDeA II機能を用いることで、混合試料中の相対濃度が低い*p*-MAPについても精度良く吸収スペクトルを推定することができました。

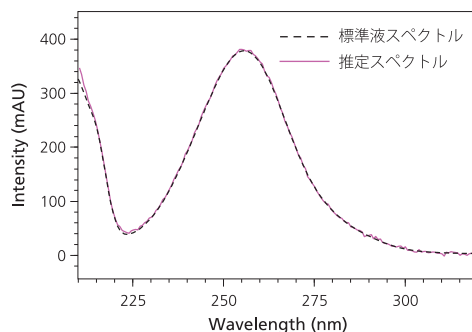


図9 標準液と*i*-PDeA IIで得られた吸収スペクトルの比較

参考文献

- 1) S. Arase, et al., *J. Chromatogr. A*, 1469, 35-47(2016)
- 2) 島津テクニカルレポート「フォトダイオードアレイ検出器の新しいデータ解析手法の原理と概要」(C191-0078)