

LC TALK

Vol. 105
October 2018



Talk 定量分析の要は、検量線と分析技術者 …… P. 2

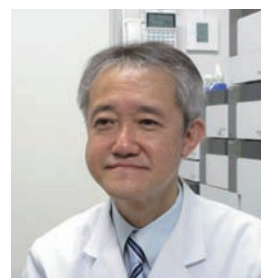
Now 毛髪表面上に存在する皮脂の脂肪酸解析 …… P. 4

Introductory 誘導体化検出の基礎 …… P. 6

Products 分取精製LCシステム“Nexera Prep”シリーズ
フラクションコレクター FRC-40 …… P. 8

Applications 環境省有害大気分析マニュアルに準拠した
大気粉じん中六価クロム分析法 …… P. 10

Talk

定量分析の要は、
検量線と分析技術者株式会社総合環境分析
大塚 克弘

弊社は、環境計量証明業として1983年に設立しました。環境計量証明業とは、計量法に基づいた環境分析測定の実業所になります。私は1989年に入社し、まだ弊社が設立してから6年しか経って居らず、当時はプレハブ建ての小さい会社でした。今はプレハブ建てではありませんが、今も小さい会社です。入社当時、分析技術者は10人ぐらいしか居らず女性ばかりで、男性は私を含めて2人でした。その頃は、分析試料として環境水（河川、湖沼など）、浄化槽排水、下水排水、工場排水などを扱ったBOD、COD、蒸留分離分析などの手分析が主流でした。私の当初の分析担当は、蒸留装置を使った分析でシアンやふっ素などでした。

当時、弊社で所持していた分析機器は吸光光度計、原子吸光光度計、ガスクロマトグラフ（ECD、FPD、FID）程度で、高速液体クロマトグラフ（HPLC）はまだありませんでした。分析機器の殆どが島津製作所製だったのを覚えています。環境分析としては、まだ法規制項目も現在より少なくこの程度で十分でした。

1993年に水質汚濁防止法施行令が改正して揮発性有機化合物9項目、農薬3項目、重金属1項目が有害物質として追加され、GC/MSやHPLCの購入が必要となりました。農薬3項目のうち、チウラムの分析方法に固相抽出-HPLC法が採用され、HPLCの中古を買って分析をしていました。かなり古いHPLCで、オートサンプラーや脱気装置もなく、手動で試料を注入していたので、大量検体が入荷すると大変だったのを思い出します。

2003年になると水道法における水質基準の陰イオン界面活性剤の検査方法が固相抽出-HPLCに替わりました。また、2012年には、ハロ酢酸3項目の検査方法にLC/MS、非イオン界面活性剤の検査方法に固相抽出-HPLC法がそれぞれ追加されました。2013年には、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩（LAS）が「水生生物の保全に係る水質環境基準」に追加され、分析方法として固相抽出-LC/MS/MSが採

用されました。

2015年には、水道水基準のフェノール類の検査方法に固相抽出-LC/MSが追加になり、2016年には、ホルムアルデヒドの検査方法に誘導体化-HPLC法、誘導体化-LC/MSが追加になりました。ざっと、環境分析及び水道水分析のLCについての変遷を追ってきましたが、この業界でのHPLCの歴史は浅いのです。

我々の様な環境分析・水道水分析の受託分析は公定法に忠実に行わなければならない、独自の分析方法が認められることはまずありません。そこで、独自性を出すためには、短納期、大量検体処理が求められますが、その上で正確なデータが如何に担保されているかが重要になります。水道水分析では、「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」（平成24年9月6日付け健水発0906第1号別添）があり、環境分析では、直接的な企業に対するガイドラインはなく、「環境測定分析を外部に委託する場合における精度管理に関するマニュアル」（平成22年7月環境省水・大気環境局総務課環境管理技術室）というガイドラインがあります。精度管理に関しては、細かい部分での決まりがないので、会社としての特徴が活かされることになるでしょう。

入社して1年位してすぐに、精度管理に興味をもちました。きっかけは、定量分析をする上で、どこまで正確な値を求めるかを精度管理に求めようとしたからです。というのは、人によって正確さを求めていつまでも分析時間をとっている人が居るなどに対して、何か基準が欲しかったのです。私もそうでしたが。

その時に一番興味を持ったのは、検量線でした。検量線は、定量分析において最も重要なパラメーターとしての役割を果たしています。検量線はHPLCであれば、毎回作成する必要があり、その検量線の出来栄によっては、計算される試料のデータすべてに大きな影響を与えます。また、検量線からHPLCの調子を計ることもできます。

新規項目導入時には、検量線の善し悪しでまず最初の分析の問題点が浮き彫りになり、改善の足掛かりになります。検量線のばらつき程度を評価する上で、最も簡便なのは、検量線作成時によく解析ソフトで算出される寄与率（決定係数） R^2 で評価することがあります。ところが、 R^2 は0～1の値を取りますが、どの程度が良いのか基準がありません。もちろん、1であれば良いのですが、そこで、私が2006年に次の式を導いてみました。

$$\hat{R}^2 = \frac{S_{aa}}{S_{aa} + \psi_1^2 \cdot \frac{(n-2)}{(1-h_1)}}$$

$$\alpha = x_i / x_1$$

$$S_{aa} = \sum (\alpha_i - \bar{\alpha})^2$$

$$h_1 = \frac{1}{n} + \frac{(\alpha_1 - \bar{\alpha})^2}{S_{aa}}$$

$\hat{R}^2$ は寄与率（決定係数）の推定値、 ψ_1 は検量線の最低濃度の変動係数（100 %を1とした場合）、 x は標準物質の濃度、 α は標準物質の最低濃度の倍率です。この式は、目標とする検量線の最低濃度の残差による変動係数、検量線幅（定量範囲）とプロット数から R^2 を推定するもので、ある程度の目安になるものと思ってください。この式から、最低濃度の変動係数が0.2、検量線幅は上限値が最低濃度の10倍まででプロット数が4であると、 R^2 は約0.995になります。弊社では、HPLCの R^2 は、0.995以上に管理しています。実際の経験上でもこの程度が管理しやすい値だと思います。

一昨年、LC/MS担当者が次々と退職してしまい、HPLCを触ったこともない技術2課（GC、LCの部署）の石川が担当することになりました。引継ぎの時も、もちろん検量線の R^2 を0.995以上にすることを目標の一つにしていた、3か月の引継ぎでよく熟していたと思います。しかし、それから半年近く経って分析操作に慣れてきたときに彼が入院してしまいました。急な事態に、技術2課は混乱しました。LC/MSを測定できるのが、水道水中のハロ酢酸分析を習いたての技術2課の小路だけでした。石川が退院するまでの1か月の間に、LC/MSで測定する水道水の農薬45項目、環境基準のLASが入荷することになっており、農薬はすべての項目ではありませんが12検体、LASが2検体でした。

その時は、ブランク、回収率、変動係数の確認を取りつつ、もちろん検量線の R^2 が0.995以上になることも確認し、夜遅く又は休日出勤をして、2人で格闘しながらどうにか仕事を終わらせました。検量線を中心に評価して改善を図ることと、担当技術者の分析スキル能力によって効率良くLC/MSの分析が可能になったのだと思っています。

この原稿を執筆しているときに、小路と話をしていて、「あの時はよく喧嘩もしながら短時間で良く熟したな」と今だからこそ笑い話ですが、当時は壮絶なものでした。

参考文献

- 1) 大塚克弘, 環境と測定技術, Vol.33, No.8 (2006)



執筆者紹介

日本大学農獣医学部農芸化学科卒業後、乳業会社で牛乳をパックに充填する製造ラインで働く、その後、株式会社総合環境分析入社、環境分析、水道水分析、計量管理者、営業など様々な仕事を担当。現在、技術部長。

専門分野

環境、水道水のGC、LC分析

将来の夢

楽しい隠居生活

趣味

鎌倉の遺跡探索と案内

Now

毛髪表面上に存在する 皮脂の脂肪酸解析



サンスター株式会社
上中 麻規子

サンスターの分析部門は、口腔ケア商品、ヘアケア・スキンケア商品、健康食品、と社内でも取り扱う幅広い分野に関して、基礎研究から製造販売まで、商品開発の様々なステップで評価解析を行っている。今回は、ヘアケア商品の開発における基礎研究の一例を紹介する。

図1のAさんとBさんは、どちらの毛髪がべたついて見えるだろう？どちらも整髪剤をつけていない写真だが、おそらく毛髪の束感やテカリといったところから、Aさんの方がべたついていると感じた人が多いのではないだろうか。このように、髪がべたついて見える人がいる一方で、そうでない人もいるが、このような両者の違いがなぜ生じるのかを調べることとした。

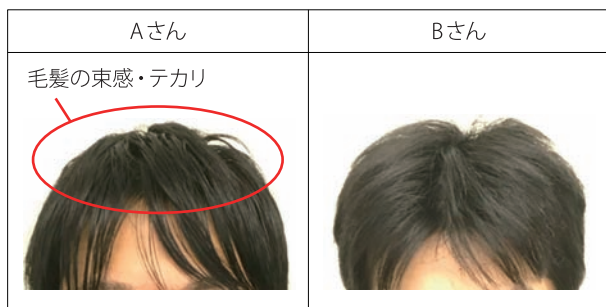


図1 AさんとBさんの毛髪の写真

皮脂腺から分泌された皮脂は、フケやにおいといった原因だけでなく、皮脂が毛髪上へ移行することでテカリや束感が生まれる結果、周囲にべたついた不快な印象を与えてしまう。そこで、皮脂を解析することで見た目のべたつき感の原因を明らかにすることを目的として研究に着手した。皮脂には、トリグリセリド、遊離脂肪酸、ワックスエステル、スクワレンなど、様々な成分が含まれていることが知られている。先行研究¹⁾によれば、洗髪後は皮脂組成においてトリグリセリド比率が高いが、時間経過とともにトリグリセリド比率は減少し、逆に遊離脂肪酸比率が上昇すること、さらに洗髪後時間経過とともにべたつきの自覚症状が増加することが報告されている。

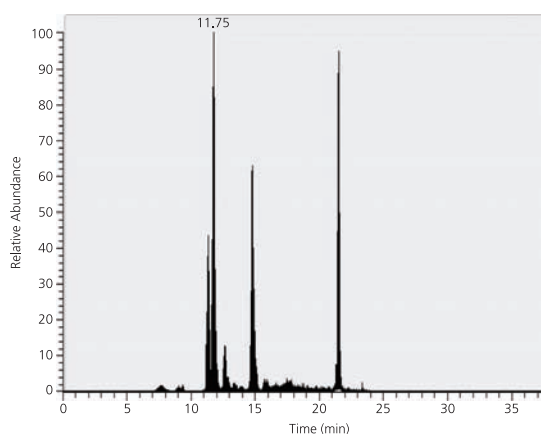
また、頭皮および毛髪上の脂質組成を調べた別の先行研究²⁾より、頭皮にはトリグリセリドが多く、毛髪上には遊離脂肪酸が多いことが報告されている。そこで、遊離脂肪酸とべたつき感に関連性が高いのではないか、という仮説をもとに、毛髪がべたつく人とべたつかない人の脂肪酸解析を行った。

実験の流れを以下に示す。まず23名の被験者を、アンケートおよび専門パネルによる目視評価により、毛髪がべたついて見えるべたつき群とべたついて見えない非べたつき群に、群分けを行った。続いて被験者には、皮脂採取2日前の入浴時に指定のシャンプーで洗髪してもらい、その後は皮脂採取当日まで洗髪や整髪剤の使用を中止してもらった。皮脂採取当日は、皮脂量測定器により頭皮の皮脂量を測定した後、1人あたり脱脂綿5枚を使用し、スワブ法により毛髪全体から皮脂を採取した。メタノール及びクロロホルムにより皮脂を抽出し、被験者1人分の脱脂綿5枚を1つの分析バイアルに濃縮した。各サンプルはLC/MSで分析し、遊離脂肪酸に着目して詳細な解析を実施した。

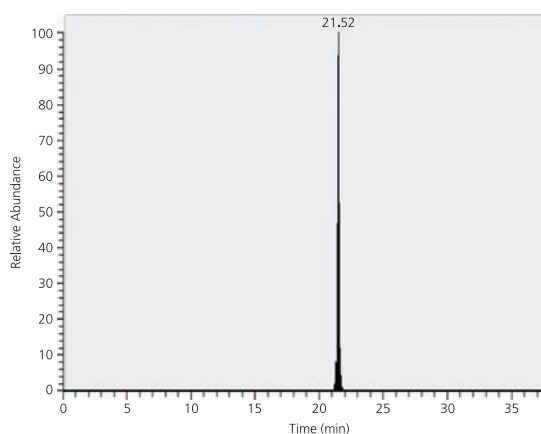
LC/MSの分析条件を次に述べる。装置はUHPLCおよび精密質量を測定できる質量分析計を用い、カラムはODSカラムを用いた。炭素数の長い脂肪酸も分析できるよう、アセトニトリルおよび2-プロパノールを含む溶離液を用いた。

全ての脂肪酸の標準試薬を入手することが困難であるため、以下の2つの考えのもと、脂肪酸分析を行った。

- ① 精密質量で特異的に検出：標準試薬が無くても、精密質量が分かればある程度の定性分析が可能（図2）。
- ② 特定の標準試薬の測定結果から他の脂肪酸の保持時間（RT）を予測：ODSカラムを用いた場合、炭素数が多くなるに従いRTが遅くなり、二重結合が多くなるに従いRTが早くなる（図3）。これは、①の定性分析をサポートする情報になり得る。



m/z 395.4
Mass tolerance 1000 ppmのマスキロマトグラム



m/z 395.3889
Mass tolerance 10 ppmのマスキロマトグラム

図2 精密質量でピークを絞り込んだ例

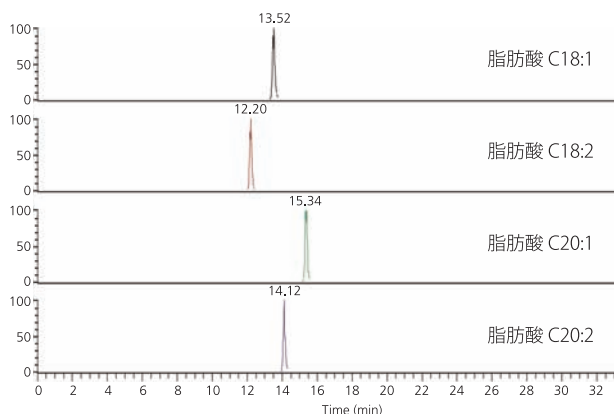


図3 脂肪酸による保持時間の違い

また、脂肪酸分析をする上での注意点を3つ紹介する。

- ① システム由来のコンタミネーション：一部の脂肪酸は、潤滑剤としてHPLCのポンプシステムなどに使用されている場合がある。ポンプの出口とカラムを直結し、ピークが検出される場合はシステム由来、ピークが検出されない場合はキャリアオーバーと判断できる。システム由来と判明した場合は、ポンプとオートサンプラーの間に短いカラムを入れると良い。システム由来の脂肪酸はカラムでトラップされた分溶出時間が遅くなり、試料のピークと分離することが可能になる。
- ② 雰囲気由来のコンタミネーション：実験室の環境によっては、雰囲気中からも脂肪酸の一部がコンタミすることがある。対処法として、水系溶媒のポンプと、ミキシングポンプの間に、短いカラムを入れる。すると、有機溶媒のグラジエントに関係なく、水系溶媒にコンタミネーションした脂肪酸はカラムにトラップされて出てこない。
- ③ その他の注意点：操作ブランクを設ける。遠心分離を利用し、フィルター濾過は極力避ける。コンタミネーションの濃縮を避けるため、使用溶媒量を少なくする。

結果として、頭皮の皮脂量は群間に差がなかった。一方脂肪酸については、脂肪酸全体に対する不飽和脂肪酸の割合を算出すると、べたつき群では非べたつき群より毛髪上の不飽和脂肪酸の割合が有意に高いことがわかった。なお、被験者によって皮脂の採取量がバラバラであるため、被験者ごとに検出された脂肪酸の面積値の合計を100%とし、各脂肪酸比率を算出して解析を行った。

以上から、見た目のべたつき感には皮脂量ではなく遊離脂肪酸中の不飽和脂肪酸の割合が関係していることが示唆された。

この研究結果は、べたつきの原因となる脂肪酸を効果的に除去するために、新しく皮脂除去成分PEG-20 ラノリンを配合した商品に生かされている。

参考文献

- 1) 加藤圭子他, 頭部の皮脂と洗髪, 臨牀看護, 26(3), 414-420(2000)
- 2) 坂本哲夫他, FRAGRANCE JOURNAL, 22(10)(164), 65-72(1994)

執筆者紹介

2013年サンスター株式会社入社。分析部門においてHPLCを用いた口腔ケア商品の成分分析、GC-MSを用いた食品中臭気成分の高感度分析法開発、SEMやFT-IRを用いた生体試料評価などを担当。現在、研究推進センター安全性分析グループにおいて、ICを用いた食品素材スクリーニング法開発やLC-MSを用いた化粧品有効成分の皮膚透過性試験などに従事。

専門分野

経皮吸収

将来の夢

旅行で全都道府県制覇

趣味

旅行、果物狩り

Introductory

誘導体化検出の基礎

島津総合サービス リサーチセンター
三上 博久

HPLCでは、誘導体化検出という方法がしばしば用いられます。今回は、この誘導体化検出の基礎についてのお話です。

1. 誘導体化検出とは

誘導体化 (derivatization) とは、抽出・分離・検出を容易にする目的で、分析種を他の化学種に誘導する操作¹⁾です。HPLCでは、様々な原理に基づいた検出器が用いられますが、これら検出器を用いて十分な感度や選択性が得られない場合、分析種を検出しやすいような誘導体に変換して検出することがあります。これが、誘導体化検出です。

HPLCにおける誘導体化検出の主目的は、検出感度や検出選択性の向上です。一般には、感度と選択性が優れる蛍光検出器に適用できるように、分析種を蛍光誘導体に変換します。

2. プレカラム誘導体化

プレカラム誘導体化 (precolumn derivatization) は、カラム分離に先立ち、分析種を分離・検出に適した化学種に誘導する操作¹⁾です (図1)。最近ではLC/MSでも、イオン化効率を高めるために、プレカラム誘導体化が行われるようになってきました。

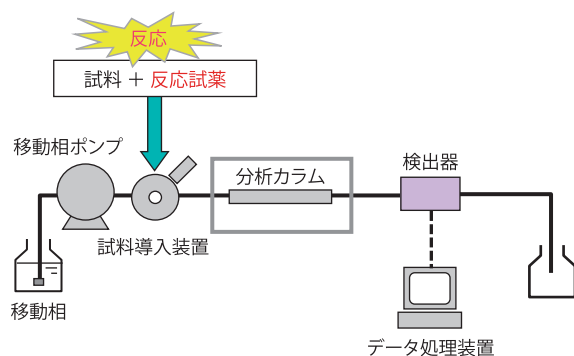


図1 プレカラム誘導体化

プレカラム誘導体化の特長と留意点をまとめると、次のようになります。

● 特長

- ① HPLC装置に特別な付属品が不要
- ② 反応条件 (反応時間、試薬数、操作等) に制約を受けない
- ③ 誘導体化することにより、分離選択性の向上、分離の改善に効果的な場合がある
- ④ 反応試薬は必要最小量だけ使えば良いので、高価な試薬でも使用できる
- ⑤ 反応試薬が検出されても、分析種と分離できればよい

● 留意点

- ① 反応の再現性が良好なこと
- ② 誘導体化物が時間的に安定なこと
- ③ 誘導体化物の収率が一定であること
- ④ 副生成物を出来るだけ生じないこと
- ⑤ 自動化が煩雑

● 応用例

プレカラム誘導体化用の試薬は、分析種に応じて多く種類の試薬が市販されています。詳細については、試薬メーカーのカatalog、技術資料などが参考にできます。

プレカラム誘導体化の中で、最もよく研究されている分析種の一つがアミノ酸です。アミノ酸の誘導体化試薬としては、*o*-フタルアルデヒド (OPA) が広く用いられています。OPAは一級アミノ酸と室温で迅速に反応し、強い発蛍光物質を生成します。アミノ酸はそのままでは極性が高く、逆相での保持は困難ですが、この蛍光誘導体は疎水性が増すため逆相カラムで保持させ、効率良く分離することができます。なお、OPAではプロリンなどの二級アミノ酸は蛍光誘導体化されませんが、二級アミノ酸に対してはOPA反応の後、クロロギ酸 9-フ

ルオレニルメチル (FMOc) と反応させて蛍光誘導体化します。この方法は、自動前処理機能が付いたオートサンプラで自動化する事が可能です。

図2は、OPA/FMOc 試薬を用いた自動プレカラム蛍光誘導体によるアミノ酸の分析例です。(詳細については、LCtalk Vol.85 <https://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/support/lib/lctalk/85/85uhplc.htm> をご覧ください。)

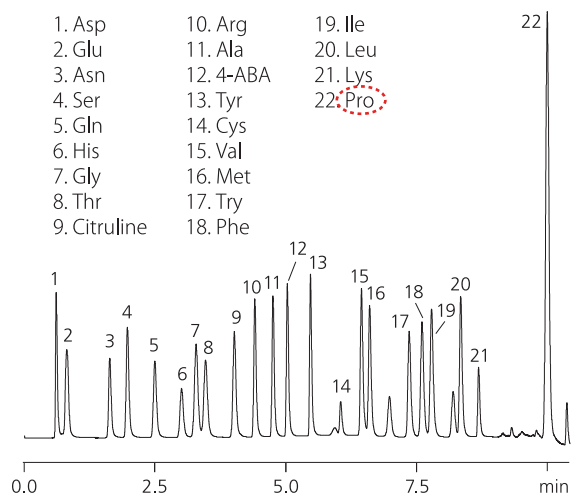


図2 自動プレカラム誘導体化によるアミノ酸の分析例
(反応試薬: Proのみ FMOc、その他は OPA)

3. ポストカラム誘導体化

ポストカラム誘導体化 (postcolumn derivatization) は、カラムから溶出した後に反応試薬などを作用させ、検出能を向上させるために分析種を他の化学種に誘導する操作¹⁾です(図3)。なお、反応試薬を添加するのではなく、紫外線を照射して光化学反応を利用して誘導体化する方法もあります。

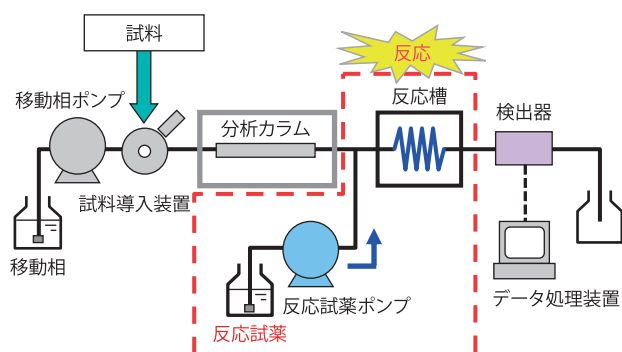


図3 ポストカラム誘導体化

ポストカラム誘導体化の特長と留意点をまとめると、次のようになります。

● 特長

- ① 反応操作が自動化されているので連続運転が容易
- ② 煩雑な反応操作を必要としない
- ③ 流量や温度が一定であれば反応は一定と見なせるので、反応生成物が不安定であっても適応できる
- ④ 同様に、必ずしも反応が100%完結していなくてもよい
- ⑤ 誘導体化物が複数であっても、再現性、定量性が十分確保できればよい

● 留意点

- ① 反応試薬がバックグラウンドに影響しないこと
- ② 分離条件が反応に影響を与えないこと
- ③ 反応試薬が高価であるとランニングコストが問題
- ④ 反応時間が長いと困難
- ⑤ 反応試薬の数はできれば1種類、多くても2種類程度でないと実用的でない

● 応用例

ポストカラム誘導体化はアミノ酸、有機酸、糖などの分析に広く用いられています。また、水道水や農産物中の残留農薬分析をはじめ公の試験方法にも種々採用されています。

図4は、反応試薬としてアミノ酸のアルギニンとほう酸を用いたポストカラム蛍光誘導体化²⁾による還元糖の高感度分析例です。分離には、HILICモードを用いています。この例における各還元糖の注入量は、5 pmolです。

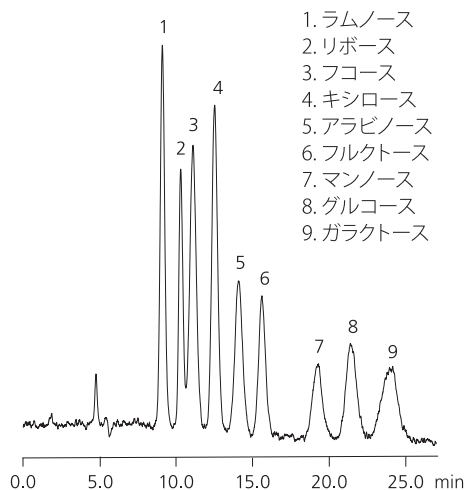


図4 ポストカラム誘導体化による還元糖の分析例
(反応試薬: アルギニン/ほう酸)

引用文献

- 1) JIS K 0214:2013 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門)
- 2) H. Mikami, Y. Ishida, *BUNSEKI KAGAKU*, 32, E207-E210 (1983)

Products

分取精製LCシステム“Nexera Prep”シリーズ フラクションコレクター FRC-40

グローバルアプリケーション開発センター
河野 慎一



1. 特長

①効率化：分取精製ワークフローの効率化

LabSolutionsの分取シミュレーション機能により、分画したいピークの区間を選択するだけで、分画パラメータを自動で設定することができます（特許申請中）。また、最大4チャンネルの検出器信号を用いた分画の開始/終了で目的成分を高純度に回収することができます。

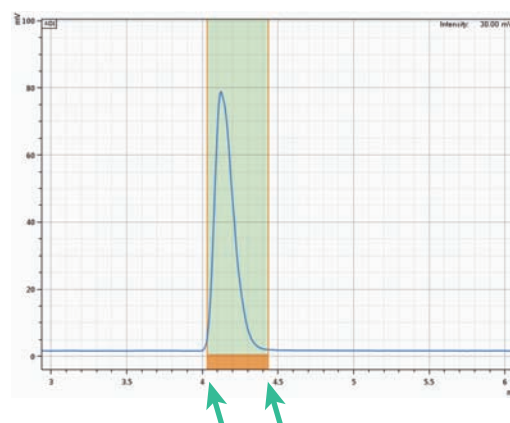
②使いやすさ：日々の業務のためのユーザビリティ向上

FRC-40は、回収量に応じた様々なサイズの試験管、大容量ボトル、MTP、バイアルをセットすることが可能です。また、オープンアクセスユースに対応しており、使用するラックをソフトウェア上で指定できるため、複数の使用者が同一システムを使用しても分画先が混在することはありません。さらに、分取操作中でもラックの取り外しが可能であるため、複数の分取作業を1台のシステムに集約することができます。

③省スペース：ラボ資産の有効活用

FRC-40は、搭載可能なサンプル・フラクション数に対して設置面積を小さく抑えています。このため、限られたラボスペースを有効活用することができます。最大6台のフラクション

コレクターを同時接続でき、内径10 mmの試験管を最大3240本收容することが可能です。



分画したいピーク区間の選択



分画パラメータの自動設定完了

2. サンプルラック

MTP、バイアル、各種試験管、50 mL 試薬ビンなど様々な容器を設置することができます。6色をご用意していますので、使用者ごとに色を使い分けることで、サンプルなどの混同を防ぐことができます。



3. マルチフラコレキット

FRC-40を最大6台まで接続することにより、分画数を増やすことができます。



4. 最大設置本数

FRC-40に設置可能な容器、最大設置本数は以下の通りです。

P/N	最大設置本数	
	FRC-40 1台	FRC-40 6台
10 mm径試験管	540本	3240本
16 mm径試験管	216本	1296本
18 mm径試験管	216本	1296本
25 mm径試験管	108本	648本
35 mm径試験管	54本	324本
250 mL 容器	20本	120本
4 mL バイアル	252本	1512本
500 mL/1000 mL 容器	12本	72本
MTP/DWP 96穴	9枚	54枚

5. Shim-pack Sceptor LCカラムシリーズ

Shim-pack Sceptor LCカラムシリーズは、有機シリカハイブリッド基材を用いており、幅広い条件で卓越した耐久性と性能を実現します。分離選択性の異なる豊富なカラムケミストリーのラインアップにより、様々な化合物に対応します。さらに、幅広い粒子径、カラムサイズのラインアップにより、分取HPLC⇔分析HPLC⇔UHPLC間でのシームレスな分析法移管が可能になります。

Shim-pack Sceptor	逆相					HILIC
	C18	HD-C18	C8	Phenyl	PFPP	Diol-HILIC
官能基タイプ	トリファンクショナル結合 C18	トリファンクショナル結合 C18	トリファンクショナル結合 C8	トリファンクショナル結合 Phenylbutyl	トリファンクショナル結合 Pentafluorophenylpropyl	トリファンクショナル結合 Dihydroxypropyl
	汎用タイプ	高官能基密度タイプ				
基材	有機シリカハイブリッド					
粒子径	1.9 μ m、3 μ m、5 μ m					
ポアサイズ	12 nm	8 nm	12 nm			
エンドキャッピング	独自				なし	
使用 pH 範囲	1 - 12			1 - 10	1 - 8	2 - 10
水 100 % 移動相での使用	○	×	×	○	○	—
USP 分類	L1	L1	L7	L11	L43	L20

Applications

環境省有害大気分析マニュアルに準拠した 大気粉じん中六価クロム分析法

グローバルアプリケーション開発センター
家氏 淳

六価クロムは、環境基準（環境基本法）、廃水基準（水質汚濁防止法）、RoSH指令等において基準値等が定められており、「JIS K 0102:2016 工場排水試験方法—65.2.1 ジフェニルカルバジド吸光光度法」などにより測定されている成分です。

大気粉じん中の総クロム（三価と六価の合計）については、平成23年に環境省 水・大気環境局 大気環境課より、「有害大気汚染物質測定方法マニュアル 第5部 第1章 大気粉じん中の重金属類の測定方法」により測定されてきましたが、平成30年3月「有害大気汚染物質測定方法マニュアル 大気粉じん中の六価クロム化合物測定方法」が新たに追加され、測定方法として「アルカリ含浸フィルタ捕集—イオンクロマトグラフ—ポストカラム吸光光度法」が収載されました。

本法では、JIS K 0102と同様にクロムと特異的に反応するジフェニルカルボノヒドラジド（図1）と反応させて吸光光度検出しますが、クロムの三価と六価をカラムで分離する点異なります。測定法として必要とされる感度については、環境基準、排水基準が0.05～0.5 mg/Lを基準値としているのに対し、大気粉じんの捕集試料では、前処理後の試料溶液で0.1～5 ng/mLとなり、100～500倍の高感度化が要求されています。

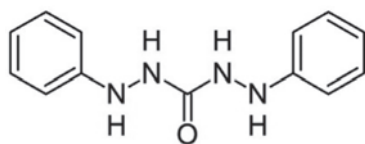


図1 ジフェニルカルボノヒドラジド

ここでは、本法による大気粉じん中六価クロム分析例をご紹介します。

1. 測定方法の概要

大気粉じんの捕集は、流量 5 L/min で24時間捕集しますが、この時六価のクロムが大気中の化学物質により還元され、

六価のクロムを低く見積もることを防ぐため、捕集用のセルロースフィルタは炭酸水素ナトリウムを含浸後、乾燥させたものを使用するとされています。このフィルタを超純水5 mLで溶出し試料溶液とします。WHOのガイドライン0.25 ng/m³の大気を捕集した場合、試料溶液中の六価クロム濃度は0.36 ng/mLとなり、検量線の範囲0.1～5 ng/mLに入っていることがわかります。

$$5 \text{ L/min} \times 0.001 \times 60 \text{ min} \times 24 \text{ h} \times 0.25 \text{ ng/m}^3 = 1.8 \text{ ng}$$

$$1.8 \text{ ng} / 5 \text{ mL} = 0.36 \text{ ng/mL}$$

参考までに、検量線の濃度から大気中濃度を逆算すると、大気粉じん中の六価クロムは0.069～3.47 ng/m³となります。

この試料溶液中の六価のクロムイオンを陰イオン交換カラムで分離後、ジフェニルカルボノヒドラジド/硫酸水溶液をポストカラム反応させ、520～540 nmの波長で吸光光度検出することとなっています。図2に、今回用いたポストカラム誘導体化システムの流路図に示します。

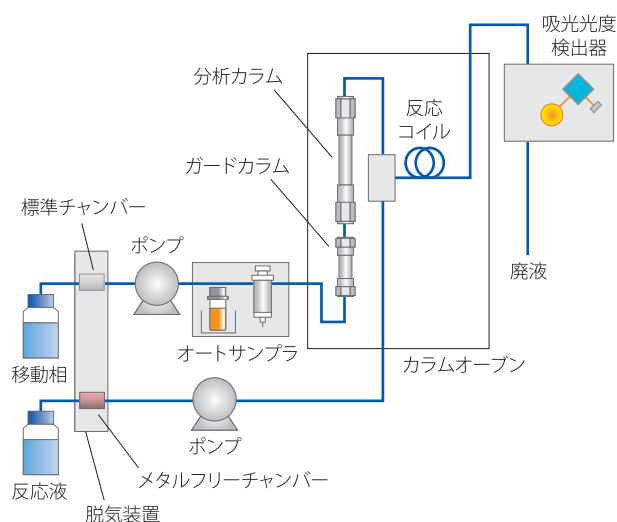


図2 ポストカラム誘導体化システムの流路図

反応液のジフェニルカルボノヒドラジドが六価クロムイオンと接触し、ジフェニルカルバゾンを経てジフェニルカルバジド-クロム錯体を生成します。本法では、0.5 mol/L 硫酸を含む反応液を送液することから、反応液送液ポンプ以後、検出器を含む接液部としてPEEK等の樹脂基材が必要です。また、検出器の光源には、可視域での測定に適したタングステン (W) ランプを用います。

2. 標準液の測定

図3に、ニクロム酸カリウム (JIS K 8005) を用い、超純水で調製した標準液0.1 ~ 5.0 ng/mLのクロマトグラムを、表1に分析条件を示します。

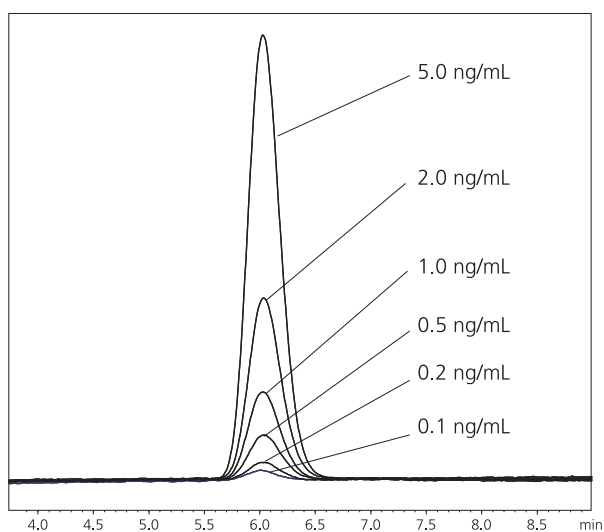


図3 標準液のクロマトグラム

表1 分析条件

装 置	: Prominence HPLC
分離部	
分析カラム	: Shim-pack IC-SA2 (内径 4.0 mm、長さ 250 mm)
ガードカラム	: Shim-pack IC-SA2 (G) (内径 4.6 mm、長さ 10 mm)
流 量	: 1.0 mL/min
温 度	: 40 °C
ポストカラム反応部	
反応コイル	: 内径 0.5 mm、長さ 8 m (PTFE製)
反応液	: 2 mmol/L ジフェニルカルボノヒドラジド、 10 % メタノール、0.5 mol/L 硫酸
流 量	: 0.2 mL/min
温 度	: 40 °C
検出器	: 吸光光度検出器 (540 nm) (PEEK製セル)
注入量	: 250 μL

3. 検量線の直線性

図4には、図3に示す濃度の標準液で作成した検量線を示します。0.1 ~ 5.0 ng/mL の範囲で $r^2 = 0.99997$ 以上と良好な直線性が得られました。

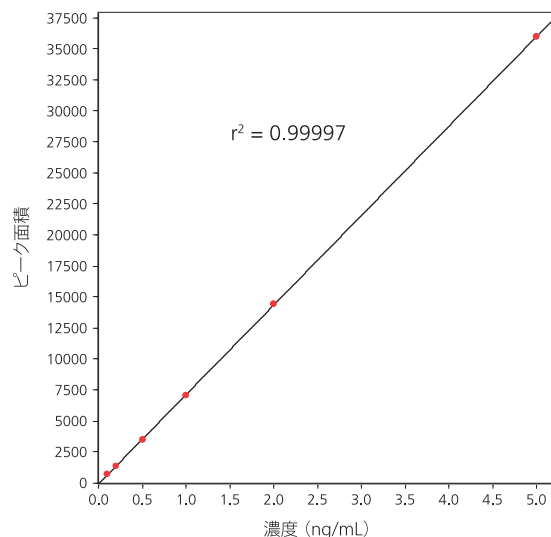


図4 検量線の直線性

4. 標準液の併行精度と真度

図5に、標準液0.1 ng/mLを250 μL、5回繰り返し注入した時のクロマトグラムを示します。また、表2にピーク面積および図4の検量線より求めた標準液0.1 ng/mLの定量結果（濃度）と真度を示します。S/N約15、%RSDが2 %以下と良好な結果が得られました。

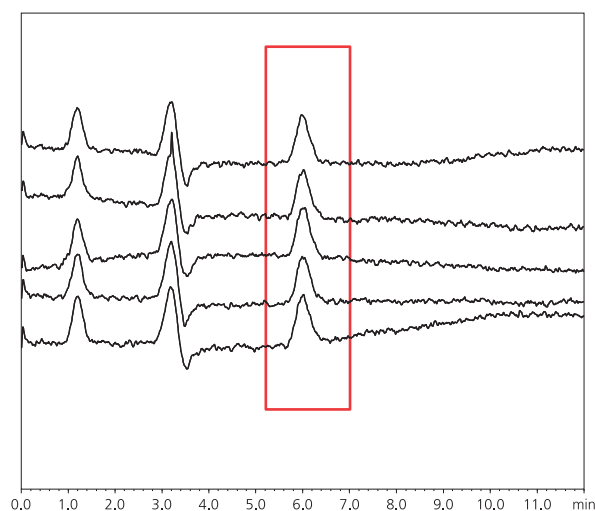


図5 標準液 0.1 ng/mL 繰り返し分析のクロマトグラム

表2 標準液 0.1 ng/mL の繰り返し分析結果

分析	面積	濃度 (ng/mL)	真度 (%)
1	724	0.099	99.1
2	719	0.098	98.5
3	743	0.102	101.7
4	731	0.100	100.0
5	736	0.101	100.8
平均	731	0.100	
%RSD	1.3	1.6	

5. 試料マトリックスの影響

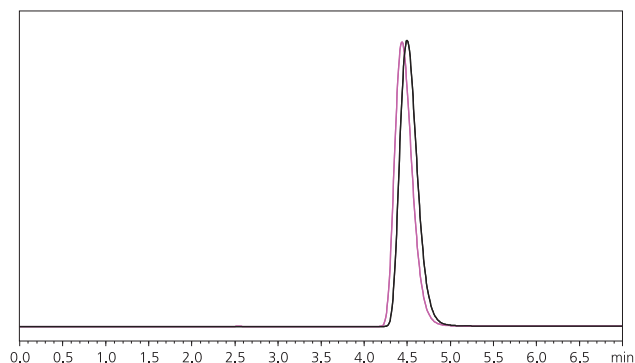
測定マニュアルでは、標準液の調製において、試料溶媒をアルカリ含浸フィルタとマトリックスマッチングした溶液（例えば操作ブランク用し検液と同様な溶液）で希釈するとされています。

図6は、標準液を超純水で希釈した場合と、炭酸水素ナトリウム溶液で希釈した場合のクロマトグラムを比較したものです。標準液調製時の炭酸水素ナトリウムの添加量については、セルロースフィルタを120 mmol/L 炭酸水素ナトリウム溶液に浸漬した場合の重量変化を元に検討しました。アルカリ含浸処理は数回行なわれ、この重量変化にはばらつきがあると考えられるため、実際にフィルタを浸漬したときの重量変化を確認し、その3倍量の炭酸水素ナトリウム溶液を過剰に吸収したと仮定して標準液を調製しました。

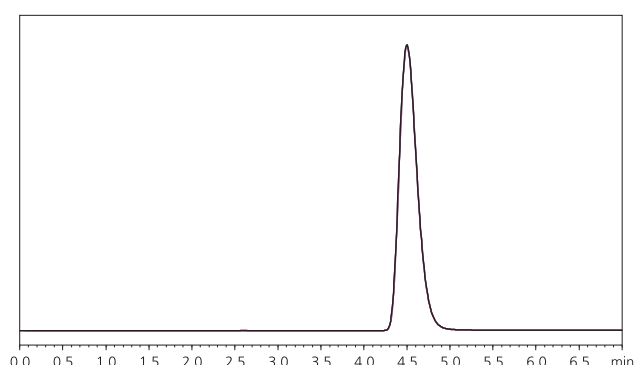
炭酸水素ナトリウムを含む標準液では、超純水で調製した標準液に対して、炭酸水素イオンが存在することで試料溶媒の溶出力が若干ですが高くなります。

図6 (a) は、2種類の標準液のクロマトグラムを比較した結果です。ピークトップの位置が数秒ずれていますが、クロマトグラムの時間軸をずらすと、ピーク形状はほぼ一致していることが図6 (b) からわかり、定量結果（濃度）に影響していないと判断することができます。

実際の測定では、標準液を超純水で調製することではなく、マトリックスマッチングを行なうため、ここで示した時間のずれは、無視できると考えられます。



(a) 時間軸補正なし



(b) 時間軸補正あり

希釈溶媒 ———— : 超純水
————— : 炭酸水素ナトリウム溶液

図6 標準液 1000 ng/mL の希釈溶媒の比較