

LC TALK

Vol. 106
January 2019



Talk 液体クロマトグラフィー研究懇談会に関わる最近の話題 …… P. 2

in the LAB よくあるトラブルと対処法 感度の低下 …… P. 4

Applications 食品中総プリン体量の測定 …… P. 6

Products 新たなレベルの分離を実現するLCカラム Shim-pack Arata …… P. 9

Q&A 「ブリーディング」について …… P. 12

Talk

液体クロマトグラフィー研究懇談会に
関わる最近の話題東京理科大学
中村 洋

2019年の干支は己亥（つちのとい）です。己は成熟・完成したものが次の発展を目指して準備する意、亥はエネルギーが蓄えられた意味があるので、「2019」の語呂合わせで「ブレイク」する年にしたいものである。奇しくも今年はクロマトグラフィーの創始（Tswett、1903～1906）から約115年、HPLCの誕生（Kirkland、1969）から50年、液体クロマトグラフィー（LC）研究懇談会の創設（1974）から45年の節目に当たる。この度、執筆の機会を戴いたので、LC研究懇談会（LC懇と略記）の活動を通してLCに関する最近の動きを以下にご紹介したい。

先ず、2018年度から新規事業として取り挙げた下記①～③、及びその他の事業④～⑦についてその要点を説明する。なお、①～③の何れについてもLC懇が主催する第24回LC & LC/MSテクノプラザ（2019年1月17日・18日、横浜情報文化センター）において関係者から講演が行われる。詳細については、LC懇ホームページの該当する項目をご覧ください。

① LC科学遺産

我が国に海外のLC装置が導入されて以来、国産化と関連製品の高度化、手法開発の努力が継続され、その成果として世界に誇るハード・ソフトが日本に誕生している。人の記憶や資料の保存も概ね50年が限界であるので、将来のために温故知新の材料として、優れたLC科学遺産を認定する事はLC懇の使命でもある。LC科学遺産は、「日本における液体クロマトグラフィーの発展にとって、歴史的な観点から顕著な貢献があったと認められるもの」との定義に則り、選考委員会で選考の結果、1991年2月に上市された「高速液体クロマトグラフLC-10Aシリーズ」（島津製作所）がその第1号に認定された。

私共の今回の科学遺産認定制度の発足が契機となり、同様の動きが（公社）日本分析化学会（JSAC）或いは他の研究懇談会にも広がる事を願っている。

詳細：<https://www.lckon.org/event/event039.html>

② CERIクロマトグラフィー分析賞

本賞は、（一財）化学物質評価研究機構のご厚意で「液体クロマトグラフィーを利用した研究分野で優秀な研究成果を挙げた者」を年間1件表彰し副賞（10万円）を差し上げる制度に基づくものであり、今回がその第1回目に当たる。複数の候補者を慎重に選考した結果、三上博久氏（島津総合サービス）が栄えある初の受賞者と決定した。研究業績は、「誘導体化HPLC検出法の開発と装置化」である。

詳細：<https://www.lckon.org/event/event043.html>

③ 優良企業認定制度

本制度は、LC及びLC/MSに関連する企業を対象に、その製品の性能・品質並びに社会的責任（CSR）の達成度や持続性などの観点を総合して優良企業を認定するものであり、専門家集団の立場から信頼に足る企業を提示し、ユーザーが製品を選択・購入する際に有益な判断基準を提供する事を目的としている。現在、2019年度の優良企業を3月上旬に発表すべく、LC懇内に設置した優良企業認定委員会において、i) HPLC装置、ii) LC/MS装置、iii) カラム・充填剤、iv) 前処理器材、v) 試薬・溶媒・水、vi) その他の6分野において認定作業を開始している。

詳細：<https://www.lckon.org/event/event051.html>

④ 創立45周年記念事業

本年12月3日（LC懇談会制定によるLCの日）に記念式典、記念講演会、記念祝賀会を開催し、参加者にLC懇創立45周年記念誌を無料で差し上げる予定で準備を進めている。10章から構成される本記念誌の第10章には、LC懇会員の方々による記念寄稿を掲載するので、奮って投稿戴ければ幸いです。

詳細：<https://www.lckon.org/event/event042.html>

⑤ その他のLC懇主催事業

年間12回行う例会、LC & LC/MSテクノプラザ（2日間の発表会）、LC- & LC/MS-DAYS（1泊2日の研修会）、年に2回程度実施される液体クロマトグラフィー特別講演会・見学会、LC/MS, LC/MS/MSに関する実用書の出版（オーム社）についてはLC懇のホームページをご覧ください。なお、上記の主要な活動に参加された役員・準役員以外の一般会員のうち、ポイントが多かった方を対象に最優秀一般会員賞を2017年度から創設し、2017年度は6名の方を表彰した。

詳細：<https://www.lckon.org/event/event044.html>

⑥ 他機関への協力事業

JSAC 関東支部主催の機器分析講習会における第2コース「LC, LC/MSの基礎と実践」講習会、JAIMAセミナー（これでもあなたも専門家— LC編、これでもあなたも専門家—セパレーションサイエンス編）、JISにおける高速液体クロマトグラフィー通則、高速液体クロマトグラフィー質量分析通則などの原案作成委員会（日本規格協会）などへもLC懇から積極的に講師・委員の派遣を行っている。

⑦ JSAC 分析士認証制度

第1回目の2010年度LC分析士初段認証試験以来、島津製作所東京支社イベントホール等を今日まで無料で拝借し、2017年度からは同社京都本社でも試験会場を拝借出来る事になり、LC分析士初段試験とLC/MS分析士初段試験の東京と京都での同時開催が初めて実現した。更に、2018年度からは初段に加えて二段についてもLC分析士とLC/MS分析士の東西同時開催が実現した。これは島津製作所の絶大なご協力により実現出来たものであり、感謝に堪えない。お蔭様で、LC、LC/MS、IC（イオンクロマトグラフィー）の3分野の何れかで登録された分析士は、現在までに2,300名程に達している。

2018年12月3日（月）、久しぶりに分析士会総会・研修講演会が五反田文化会館で開催され、全国から参加した17名

が幹事に就任した。なお、LC及びLC/MS分野における分析士認証試験解説書は現在17冊目を印刷中であり、合計30冊（初段から三段までを5年間分）を出版する予定である。

詳細：<https://www.lckon.org/bunsekishi/index.html>



分析士会新幹事（2018年12月3日）

さて、最近の例会で頻りに飛び交う用語は、分離ではコアシェル充填剤・カラム、HILIC、検出ではMSである。中でもMSは、他の検出器と比較して格段に多機能・高感度・高選択的であり、LC用万能検出器として爆発的な普及を遂げている。所で、筆者が助教授であった1980年代後半、科学新聞の対談前後の時間に石田泰夫氏（当時島津製作所技術部長、後に事業部長）と雑談した折、『島津はトップランナーを目指さないんですか』と質問したところ、『それをやるとリスクが大きいので、行けると分かったら追い抜き実力を普段から蓄えておくのが当社のポリシー』と切り返された。島津製作所初のLC-MS/MSであるLCMS-8030を上市した折には、大阪と東京のキャンペーンにお付き合いしたが、最新のLCMS-9030の実力を拝見すると石田氏の言葉を想い出す。やれば出来る企業力、技術力は流石という外ない。昨近、学協会の会員減少が顕著であるが、LC懇は2018年度までに会員増強小委員会、活性化小委員会を立ち上げ、会員数を維持出来ている。島津製作所にはLC懇に今後も変わらぬご支援をお願いして筆を擱く。

執筆者紹介

東京大学大学院博士課程中退（1971）後、直ちに東京大学薬学部教務職員（1971）、助手（1973）、米国NIHのResearch Fellow（1974～1976）、助教授（1986）を経て、東京理科大学薬学部教授（1994）、同・嘱託教授（2011）、同・名誉教授（2015）。現在、（公社）日本分析化学会分析士会会長、同・液体クロマトグラフィー研究懇談会委員長など。

専門分野

分析科学、分離科学

将来の夢

人財育成

趣味

植物育成と旅行

よくあるトラブルと対処法 感度の低下

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3弾として、感度の低下について解説します。

日常分析において、「感度が低くなった・・・？」と思うのは、以前の分析結果（例えば、昨日の結果、先週の結果）と比べて「ピーク高さが低い」、「ピーク面積が小さい」ことに気が付いた時でしょう。また、高感度分析時では、ノイズ上昇でSN比が低下した時でしょう。このように感じたら、まずは分析条件の設定（例えば、注入量、感度設定）が正しいか確認の上、何度か繰り返し分析を行い、再現性のある現象なのかどうか調べてみます。やはり、感度が低下している・・・ということなら、その主な原因としては、図1に示すようなことが考えられます。

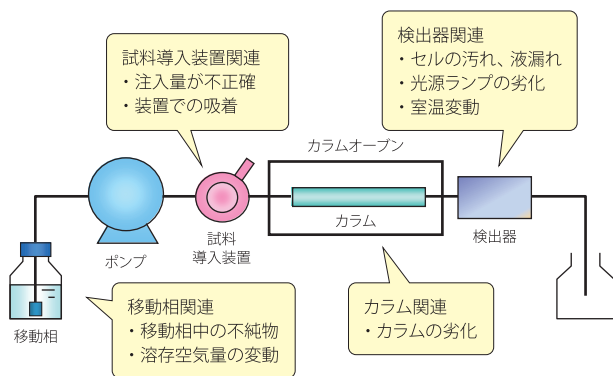


図1 感度低下の主な原因

1. 移動相関連

● 移動相中の不純物

ノイズ上昇によるSN比の低下では、移動相調製に用いた溶媒や試薬類中の不純物が原因することがあります。溶媒や試薬類のメーカー、グレードを変更した時、短波長域での吸光光度検出、蛍光検出では要注意です。さらに、移動相調製に用いたガラス器具や移動相容器の汚れの可能性もあります。これらを確認の上、再調製してチェックしてみましょう。

● 溶存空気量の変動

蛍光検出では、移動相溶存空気が感度に影響を与えることがあります。酸素分子は、一般に蛍光物質に対し消光作用を示すことが知られており、移動相の脱気が不十分であれば、蛍光強度が低下する可能性があります。

図2は、移動相の脱気状態が蛍光物質であるビスフェノールAの感度（蛍光強度）に与える影響を示した例です。脱気の有無により、感度が変化していることがわかります（本誌Vol.102、P.9参照）。

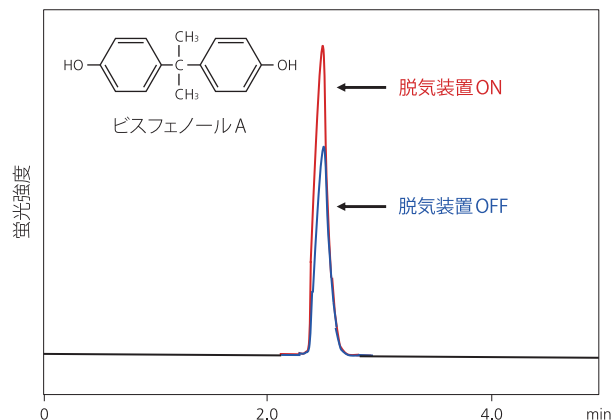


図2 脱気の有無による感度の違い

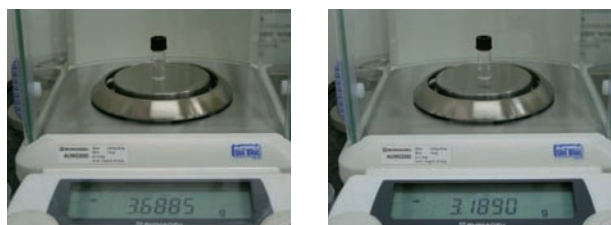
溶存空気量の変動は、脱気装置の不調時、オフライン脱気（アスピレーターによる脱気など）における移動相への空気の再溶解時に起こります。これらをチェックをしましょう。

2. 試料導入装置関連

● 注入量が不正確

そもそも、試料注入量が設定値より少なくなっているのかもしれないので、注入量の正確さを確認してみましょう。図3に、その一例を示します。まず、試料バイアルに水を1 mL入

れて質量を測定します。次に、オートサンプラで50 μL ずつ10回注入後、この試料バイアルの質量を測定します。この質量変化から、オートサンプラの流入量正確さを求めます。基準を満たしていない場合には、試料計量ポンプの不調、流路の液漏れや詰りなどが考えられますので、メンテナンスを行います。



注入前の質量
(読み: 3.6885 g)

50 μL ずつ 10回注入後の質量
(読み: 3.1890 g)

図3 オートサンプラの注入量正確さチェック例

● 装置での吸着

一般にイオン性成分、塩基性成分では、オートサンプラ流路材質とのイオン性相互作用、配位性相互作用などによる吸着が起こりやすくなります。成分の吸着箇所は、試料成分が通過するニードル、注入ポート、試料ループ、切換バルブなど多岐に渡ります (図4)。

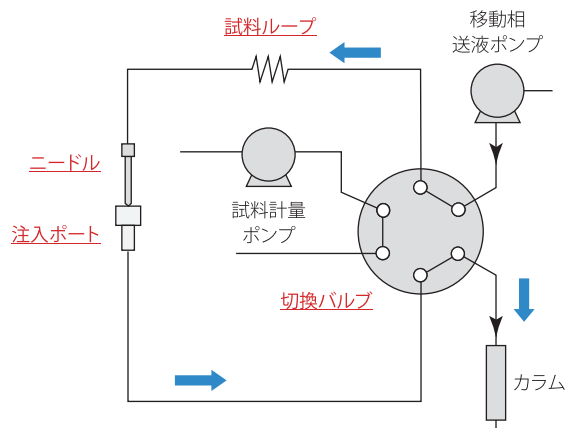


図4 オートサンプラにおける吸着箇所

しかし、これまで同じ装置で分析していて問題がなかったのに…という場合は、ニードルや注入ポートなどに付着した試料成分による吸着が考えられます。まずは、取扱説明書に準じて、これらを重点的に洗浄することになります。

3. カラム関連

● カラムの劣化

ピーク高さで感度低下と判断した場合、見た目では気が付かないピークの広がりやテーリング、リーディングが起きていることも考えられます。以前得られた理論段数やシンメトリー

係数と比べてみましょう。カラムの劣化は、固定相の劣化、充填状態の変化 (カラム内に隙間が発生) などにより起こります。また、夾雑成分が入口の充填剤に吸着し、分析種がその成分に二次吸着してピーク形状が変化したり、小さくなることもあります。劣化が確認されれば、取扱説明書に準じて洗浄し、回復しない場合は交換となります。ガードカラムを付けている時には、まずはガードカラムを外して確認します。ガードカラムを外すと回復するようなら、ガードカラムが原因であると特定できます。

4. 検出器関連

● セルの汚れ、液漏れ

セルの汚れでは、光量の減少によるノイズ上昇が見られます。多くの装置では、光量がチェックできます。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、取扱説明書で確認してセルの分解が可能であれば、分解して超音波洗浄などを行います。

液漏れは、リークセンサーが付いていればわかりますが、念のためセル周りをチェックします。

● 光源ランプの劣化

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、必ず確認しましょう。

● 室温変動

蛍光検出では、測定温度が上昇すると分子間衝突の増大によるエネルギー損失などのため、一般に蛍光強度が減少します (本誌Vol.102、P.9参照)。冬場室温変化が大きい部屋では、早朝の室温が低い状態から室温上昇に伴い、ピークが小さくなることもあります。つまり、冬場になってはじめて、室温変化による感度低下に気が付くというパターンです。室温一定時に分析するか、セル温調できる装置 (例えば、RF-20A_{XL}) を使いましょう。また、部屋が温調されていても、風が当たりやすい場所で、感度変化が起こることもあります。蛍光検出器にエアコンなどの風が当たっている場合、風除け対策を行います。ただし、温度変化の蛍光強度への影響は、物質によって差があります。

以上、吸光光度検出器、蛍光検出器における感度低下を中心に話しましたが、検出器によっては特有の原因もありますので (例えば、電気化学検出器など)、取扱説明書でしっかり確認してください。

Applications

食品中総プリン体量の測定

グローバルアプリケーション開発センター
岩田 奈津紀

プリン体はプリン骨格をもつ核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン塩基の総称であり、体内では最終的に尿酸に代謝されます。また、食事で摂取するプリン体は2割程度で、残りの8割は体内で作られています。

尿酸の体外への排出と生成のバランスが取れず体内に蓄積される（尿酸値が上がる）と、高尿酸血症（痛風を含む）などを引き起こすことがわかっています。一方で、近年精神疾患において、血清尿酸値が低いことがわかってきています。従って、高尿酸血症患者の食事療法での摂取制限を含め、食生活においてプリン体量をコントロールすることは重要です。

ここでは、一体型高速液体クロマトグラフ“Prominence-i”を用いた食品中に含まれる総プリン体量の分析例をご紹介します。

1. プリン塩基混合標準液の分析

プリン塩基5成分（アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、尿酸、キサンチン）の混合標準液を分析しました。分析カラムには、マルチモードカラムAsahipak GS-320HQ（昭和電工）を使用しました。移動相は、りん酸二水素ナトリウム二水和物とりん酸をモル比で4対1になるように混合したりん酸塩緩衝液を使用しました。図1に、プリン塩基混合標準溶液（各10 mg/L）のクロマトグラムを、表1にその分析条件を示します。

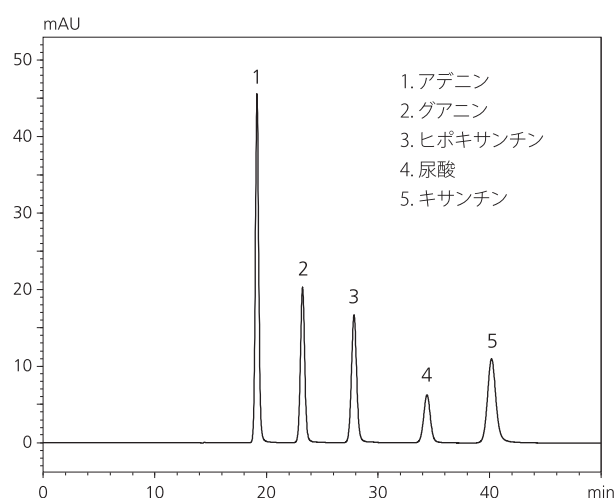


図1 プリン塩基混合標準溶液のクロマトグラム

表1 分析条件

装置	Prominence-i 3D
カラム	Shodex Asahipak GS-320HQ (内径 7.5 mm、長さ 300 mm、粒子径 6 μm)
流量	0.6 mL/min
移動相	150 mmol/L リン酸（ナトリウム）緩衝液（pH 2.6）
温度	35 °C
検出器	フォトダイオードアレイ検出器 260 nm (セル温度 40 °C)
注入量	10 μL

2. 検量線

図2に、検量線を示します。プリン塩基5成分について、0.1 ~ 20 mg/Lの範囲で検量線を作成したところ、いずれの成分においても寄与率0.9999以上と良好な直線性が得られました。

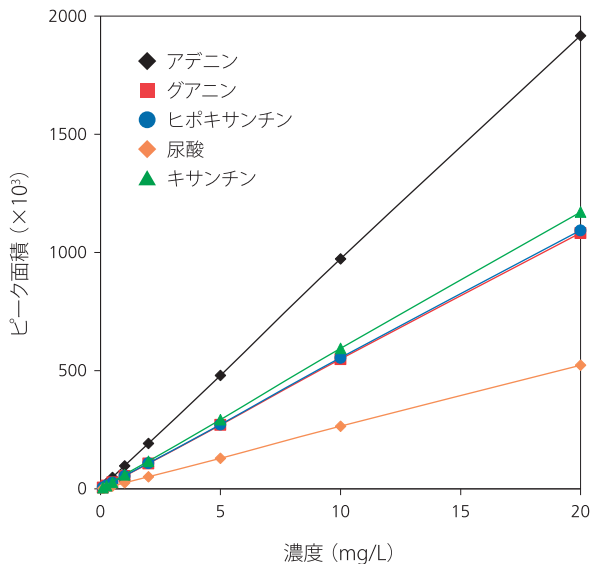
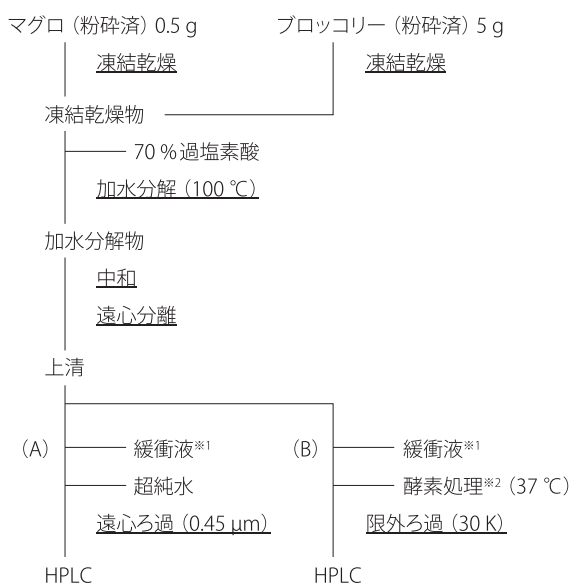


図2 検量線

3. 前処理

試料としては、マグロおよびブロッコリーを用いました。マグロは市販の切り身を、ブロッコリーは可食部を切り分けたものを使用しました。

図3に、前処理プロトコルを示します。粉碎済の試料を凍結乾燥し、過塩素酸 (70 %) で加水分解後、中和を行いました。得られた上清は、酵素処理を施さない前処理 (未処理液、図3 (A)) と酵素処理を行う前処理 (処理液、図3 (B)) に分け、未処理液は遠心ろ過、処理液は限外ろ過したものをHPLCに供しました。なお、過塩素酸での加水分解によりプリン塩基まで分解されます。



※1: グリシルグリシン緩衝液、※2: キサンチンオキシターゼ

図3 前処理プロトコル

4. マグロ試料の分析

畜水産物は筋肉を多く含むため、野菜、果物に比べ、プリン体が多く存在することが知られています。

図4に、マグロ試料を測定した結果を示します。黒線は標準液、赤は未処理液、青は処理液です。プリン塩基は酵素処理により酸化体となり、ピーク位置がシフトします。つまり、未処理液と処理液のクロマトグラムを比較し、処理液でピークの消失が確認されるとプリン塩基のピークであることになります。また、未処理液と処理液のピーク面積の差分から定量を行います¹⁾。

本マグロ試料からは、アデニン、グアニン、ヒポキサンチンが分離検出されました。得られた結果から、総プリン体量はマグロ試料 100 g 中 205.0 mg でした。また、仮にこれらのプリン塩基が全て尿酸に代謝された際の尿酸量、つまり尿酸換算値は 251.9 mg/100 g でした。各塩基の含有量、総プリン体量、尿酸換算値を表2にまとめます。

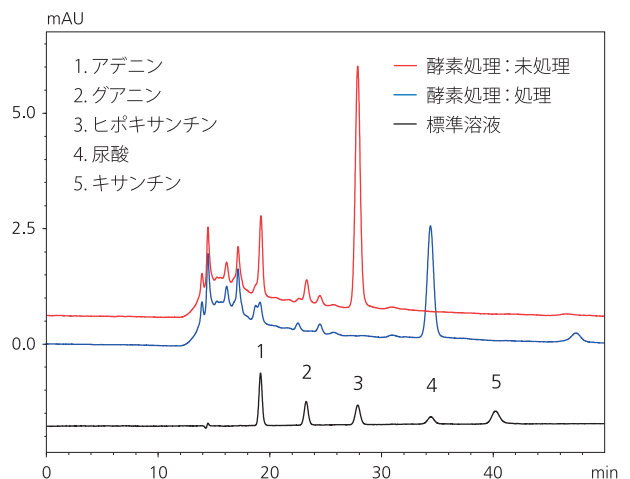


図4 マグロ試料のクロマトグラム

表2 マグロ試料、ブロッコリー試料の各塩基含有量、総プリン体量、尿酸換算値 (mg/ 100 g)

	マグロ	ブロッコリー
アデニン	17.0	25.9
グアニン	12.4	32.0
ヒポキサンチン	175.6	0.4
キサンチン	0.0	0.0
総プリン体量	205.0	58.3
尿酸換算値	251.9	68.3

5. ブロッコリー試料の分析

図5に、ブロッコリー試料を測定した結果を示します。黒線は標準液、赤は未処理液、青は処理液です。

本ブロッコリー試料からアデニン、グアニン、ヒポキサンチンが分離検出されました。得られた結果から、総プリン体量はブロッコリー試料 100 g 中 58.3 mg でした。このとき、尿酸換算値は 68.3 mg/100 g でした。各塩基の含有量、総プリン体量、尿酸換算値を表2に示します。

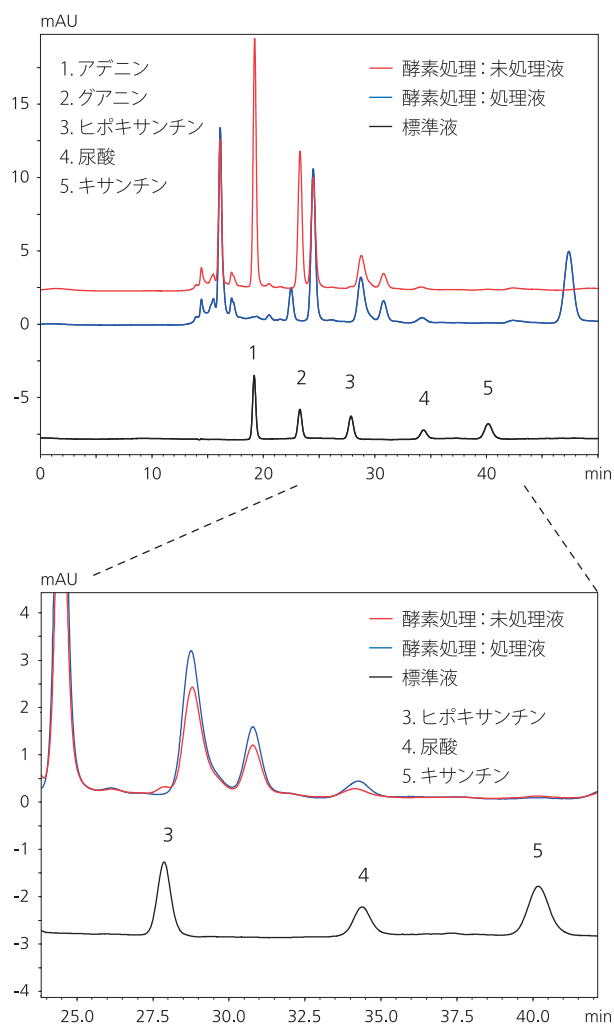


図5 ブロッコリー試料のクロマトグラム

6. 紫外吸収スペクトルでの確認

Prominence-i内蔵のフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器により、酵素処理反応の進行を確認できます。

図6は、図4中で約20分に溶出しているアデニンの溶出位置の紫外吸収スペクトルです。黒線は標準液、赤は未処理液、青は処理液です。図4より、処理液のアデニンの保持時間に検出されたピークにおいて、紫外吸収スペクトルからアデニンは

確認されませんでした。すなわち、処理液のアデニンの保持時間に溶出しているピークは夾雑物と考えられます。

このように、酵素処理が進んだこと、あるいはプリン塩基が含まれていることの確認には、PDA 検出器を利用することが有効です。

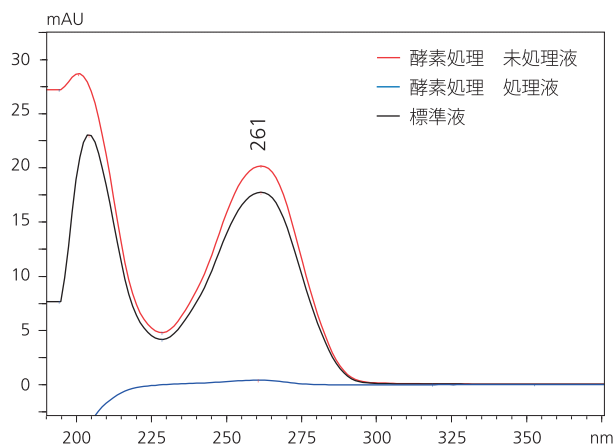


図6 アデニン溶出位置の紫外吸収スペクトル

7. まとめ

Prominence-iを用い、ブロッコリーとマグロ中の各プリン塩基含有量を定量し、総プリン体量を算出しました。その結果、ブロッコリー試料よりマグロ試料の方がプリン体が多い結果が得られました。また、装置内蔵のPDA検出器を用いることにより、紫外吸収スペクトルからプリン塩基が夾雑成分かの判別ができ、より正確なピーク同定が可能となりました。

参考文献

- 1) K. Kaneko, T. Yamanobe, and S. Fujimori, *Biomed. Chromatogr.*, 23, 858-864 (2009)

※ 本アプリケーションの作成には、帝京大学薬学部 金子希代子教授より多大なご協力を賜りました。

Products

新たなレベルの分離を実現するLCカラム Shim-pack Arata

島津ジーエルシー 研究開発課
山口 努

近年、HPLCカラムの高性能化が進展して来ていますが、今なお高極性塩基性化合物や酸性化合物でのピーク形状の悪化や、希薄酸性移動相条件においてカラムの平衡化に長時間を要するなどといった課題に直面することがあります。

Shim-pack Arataは、基材との相互作用をマスキングする設計コンセプトからこれら課題を解決し、新たなレベルの分離を実現するカラムです。

Shim-pack Arata C18

粒子径 (μm)	内径 (mm)	長さ (mm)
2.2	2.0	50, 75, 100, 150
	3.0	50, 75, 100, 150



1. 卓越したピーク形状

● アミトリプチリンと安息香酸の分析

アミトリプチリン（塩基性化合物）と安息香酸（酸性化合物）の分析例を図1に、その分析条件を表1にそれぞれ示します。Shim-pack Arata C18は、塩基性化合物のピーク形状が悪化

しやすい0.1% ぎ酸移動相においても、各成分とも良好なシンメトリー係数が得られています（表2）。

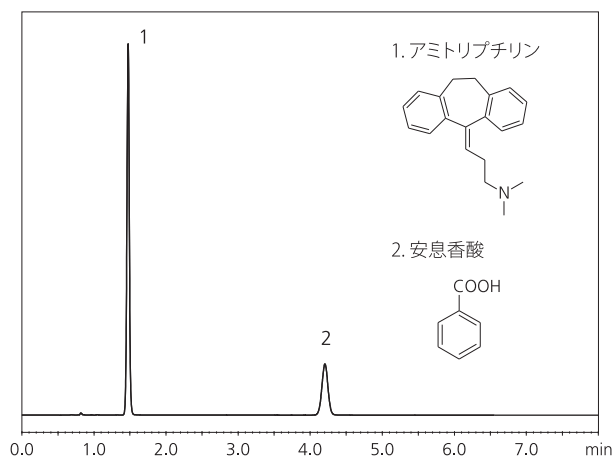


図1 アミトリプチリンと安息香酸の分析例

表1 分析条件

カラム : Shim-pack Arata C18
(内径 3.0 mm、長さ 75 mm、粒子径 2.2 μm)
移動相 : 0.1 % ぎ酸水溶液 / アセトニトリル = 70/30 (v/v)
流 量 : 0.4 mL/min
温 度 : 40 °C
検出器 : 吸光光度検出器 254 nm

表2 各成分のシンメトリー係数

成分	シンメトリー係数
アミトリプチリン	1.01
安息香酸	1.00

● ペプチド (アンジオテンシン I) の分析

一般的に正電荷を有するペプチドの逆相分析では、良好なピーク形状を得るために、イオン対効果の高いトリフルロ酢酸 (TFA) 含有の移動相が用いられます。しかしながら、TFA には LC/MS におけるイオンサプレッションの原因となるなど課題があります。Shim-pack Arata C18 は、LC/MS に適した酸含有移動相条件でも、ペプチドの良好なピーク形状を実現します。

アンジオテンシン I を Shim-pack Arata C18 と一般的な C18

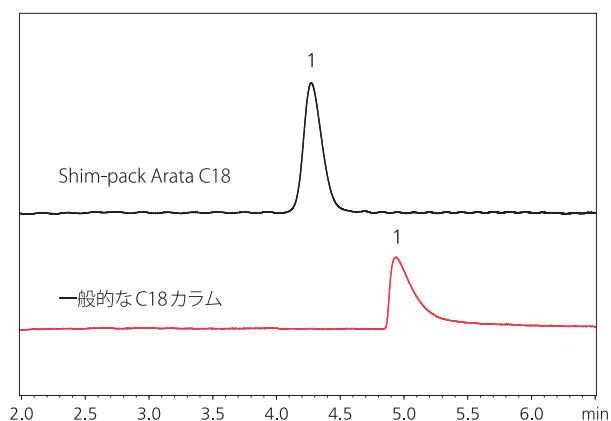


図2 アンジオテンシン I の分析例

カラム (粒子径: sub 2 μm) で分析した例を図2に示します。通常、ペプチドはグラジエント溶離で分析されますが、ここではカラムによる違いを比較するために、イソクラティック溶離 (表3) で評価しました。なお、保持時間が近くなるようにカラムによってアセトニトリル濃度を調整しました。各カラムにおけるシンメトリー係数を表4に示します。Shim-pack Arata C18 においては、良好なピークが得られていることがわかります。

1. アンジオテンシン I

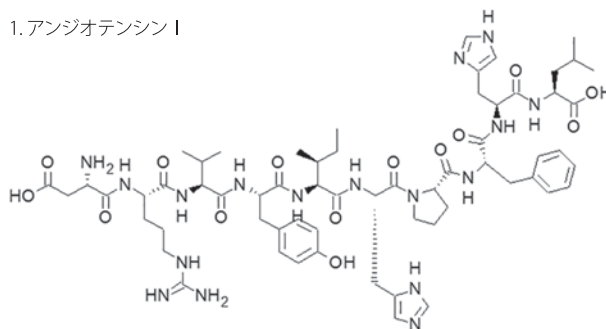


表3 分析条件

カラム : 内径 3.0 mm、長さ 75 mm
 移動相 : A 0.1 % 酸水溶液
 B 0.1 % 酸アセトニトリル溶液
 • Shim-pack Arata C18 A/B=88/12 (v/v)
 • 一般的なC18カラム A/B=85/15 (v/v)
 流 量 : 0.4 mL/min
 温 度 : 40 °C
 検出器 : 吸光光度検出器 214 nm

表4 アンジオテンシン I のシンメトリー係数

カラム	シンメトリー係数
Shim-pack Arata C18	1.26
一般的なC18カラム	6.94

ペプチドの分析に適した低吸着バイアル

TORAST-H™ Bio Vial

ペプチド分析においては、分析種のバイアルへの吸着に注意する必要があります。ペプチドがバイアルに吸着する主なメカニズムは、疎水的吸着およびイオンの吸着と言われています。ガラス製バイアルでは、主にガラス表面のシラノールとのイオンの吸着が、またポリプロピレン (PP) 等の樹脂製バイアルでは、主に樹脂表面との疎水的吸着が生じます。

“TORAST-H™ Bio Vial” は、樹脂製バイアルに非イオン性の親水性物質を固定化した低吸着バイアルです。“TORAST-H™ Bio Vial” は、ペプチドに対し極めて不活性度が高いという結果が得られています。特に、濃度の低い試料を取り扱う場合に適したバイアルです。(図2では、“TORAST-H™ Bio Vial” を用いています。)



2. 迅速なカラム平衡化

● リン酸移動相による平衡化時間の比較

Shim-pack Arata C18と一般的なC18カラム（粒子径：sub 2 μm）を用いた0.1 %リン酸移動相によるアミトリプチリンの平衡化時間の比較例（いずれも新品カラム）を図3に、その

分析条件を表5にそれぞれ示します。Shim-pack Arata C18では、平衡化がはやく、ピーク形状も良好なことがわかります。

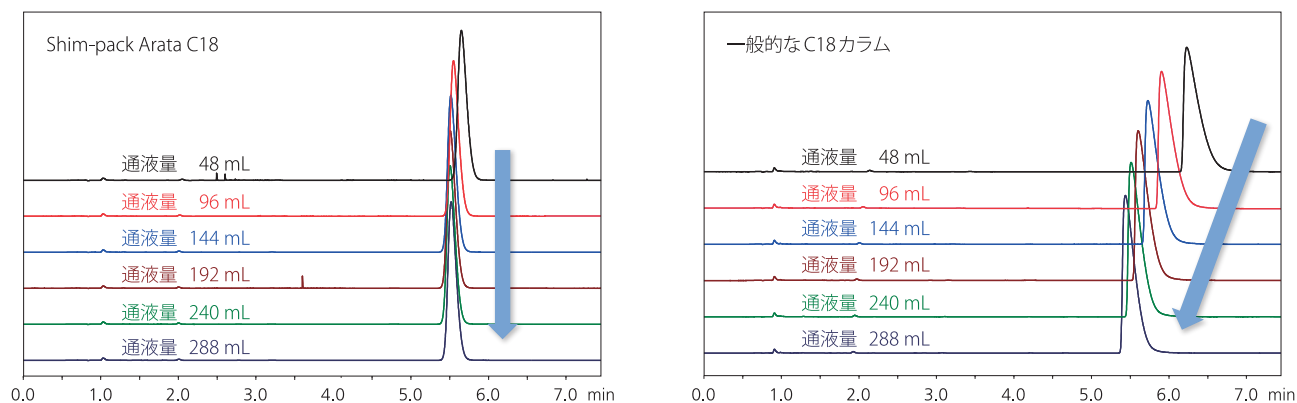


図3 0.1 %リン酸移動相によるアミトリプチリンの平衡化時間比較例

表5 分析条件

カラム：内径 3.0 mm、長さ 75 mm	流 量：0.4 mL/min
移動相：A 0.1 %リン酸水溶液、B アセトニトリル	温 度：40 °C
・ Shim-pack Arata C18 A/B=76/24 (v/v)	検出器：吸光度検出器 214 nm
・ 一般的なC18カラム A/B=70/30 (v/v)	

※ 移動相組成は、アミトリプチリンの保持時間が同じになるように調製

● ぎ酸移動相による平衡化時間の比較

Shim-pack Arata C18と一般的なC18カラム（粒子径：sub 2 μm）を用いた0.1 %ぎ酸移動相によるデキストロメトルフアンとアミトリプチリンの平衡化時間の比較例（いずれも新品カラム）を図4に、その分析条件を表6にそれぞれ示します。

Shim-pack Arata C18では、通液量 12 mL（カラム容量の約 25 倍）で平衡に達しました。一方、一般的な ODS カラムでは、288 mL（カラム容量の約 540 倍）通液しても平衡には至りませんでした。

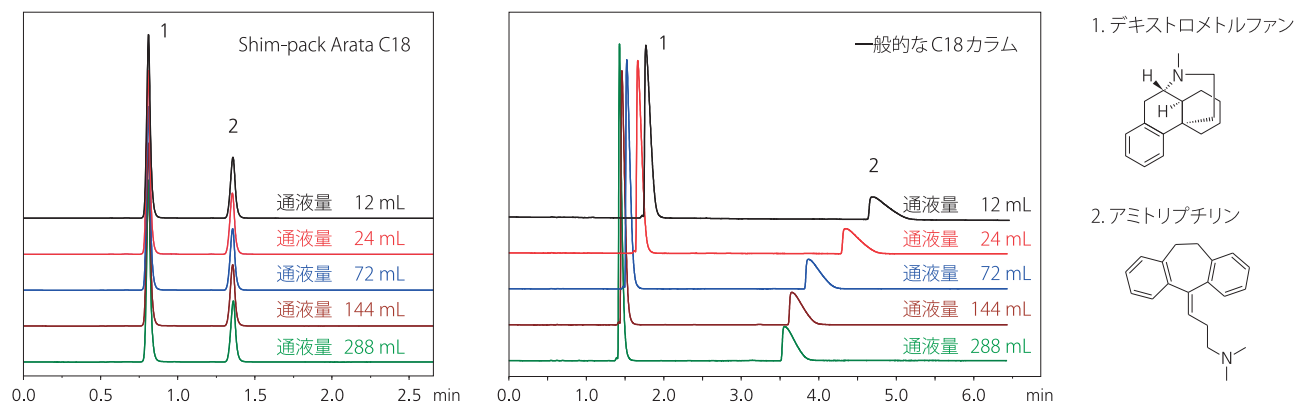


図4 0.1 %ぎ酸移動相によるデキストロメトルフアンとアミトリプチリンの平衡化時間比較例

表6 分析条件

カラム：内径 3.0 mm、長さ 75 mm	温 度：40 °C
移動相：0.1 %ぎ酸水溶液/アセトニトリル=70/30 (v/v)	検出器：吸光度検出器 280 nm
流 量：0.4 mL/min	

Q&A

Q 最近、カラムの「ブリーディング」という言葉をよく耳にしますが、詳しく教えてください。

A 「ブリーディング」とは、JISでは「固定相およびカラム素材に由来する成分がカラムから徐々に溶出する現象」¹⁾と定義されています。また、注記として「カラムの製造に起因するもの、使用中に温度および移動相条件（例えば、GCでは水分量、酸素量などによるもの、LCではpH、塩濃度、有機溶媒濃度など）によるもの、固定相などが劣化して生じるものなどがある。これらをブリードと総称し、ブリード量の大小でカラム性能を評価する」¹⁾と記載されています。GCにおいては、ベースライン上昇や検出器汚染の原因となるため、低ブリーディングカラムであることが重要なポイントとなっています。

一方、HPLCにおいては、これまでブリーディングはあまり問題視されませんでした。近年のLC/MSの急速な普及に伴い低ブリーディングカラムが注目されるようになりました。これはLC/MSにおいて、カラム由来の不揮発性成分の溶出がバックグラウンドノイズ増大の原因となり、時には分析種のイオン化を抑制し、大幅な感度低下を招くことがあるからです。

HPLCカラムからの溶出成分としては、以下のものが考えられます²⁾。

- 充填剤製造時の副生成物、試薬不純物の残渣
- 酸性移動相などにより劣化し、剥がれた固定相（化学結合相）成分
- 水移動相（特に、塩基性移動相）によって溶解したシリカゲル基材

これらのうち、充填剤製造時由来の成分については、洗浄によってある程度溶出レベルを下げるすることができます。しかし、洗浄で十分な効果が得られない場合や移動相条件により徐々に固定相やシリカゲルが溶出する場合には、合成方法や洗浄などを工夫した低ブリーディングカラムを試してみるのが良いでしょう。

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) 中村 洋企画・監修、LC/MS, LC/MS/MS Q&A100 獅子の巻、オーム社（2018）

（島津総合サービス リサーチセンター 三上 博久）

情報コーナー

公益社団法人日本分析化学会 液体クロマトグラフィー分析士認証試験

2019年度は、以下の日程で実施されます。

- | | | |
|-------------------------|------------------------|---------------------|
| ■ 五段認証試験：3月4日（月）、東京 | ■ 四段認証試験：4月17日（水）、東京 | ■ 三段認証試験：5月9日（木）、東京 |
| ■ 二段認証試験：6月21日（金）、東京・京都 | ■ 初段認証試験：8月1日（木）、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。順次掲載される予定です。