

LC TALK

Vol. 114
January 2021



Talk HPLCは薬物治療と薬剤師の可能性を拓ける …… P. 2

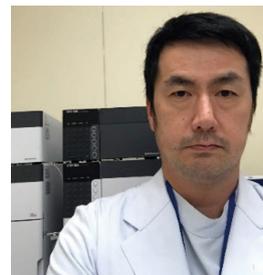
Applications 蛍光検出HPLCによるD/L-アミノ酸37成分
分析自動化の検討と酒類への応用 …… P. 4

Products 一体型高速液体クロマトグラフ
i-Series (LC-2050/LC-2060) …… P. 8

Introductory 吸光光度検出の基礎 …… P. 11

Talk

HPLCは薬物治療と薬剤師の可能性を拡げる



独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター
矢倉 裕輝

● はじめに

私が液体クロマトグラフィーと深く関わるようになったのは学生時代ではなく、卒後、現在の施設で勤務するようになってからです。現在、私は病院薬剤師として主に感染症領域の薬物治療に携わっており、特にヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症の日常診療において日々患者さんと面談を行いながら、抗HIV薬を用いた薬物治療の個別最適化を目指して研究を行っています。この研究目的を達成するために、如何にLCが臨床現場ならびに研究において活躍しているかご紹介したいと思います。

● 薬剤の溶出挙動の相違が副作用を変える

抗HIV薬は新規化合物をいち早く患者さんに届けるために、まず設計しやすい剤型で製剤化され、販売されます。その後、検討が加えられ、より服薬しやすい剤型に変更が行われます。エファビレンツと呼ばれる薬剤が、当初非常に大きいカプセル剤から錠剤に変更された際に、同薬剤の特徴的な副作用であるめまい、ふらつき症状を呈する患者さんが続出しました。薬剤の崩壊および溶出挙動の相違の可能性を考え、当時は病院にLCがなかったため、母校の製剤学研究室で溶出試験をすることとなりました。各剤型を胃および腸を想定した環境下に暴露し、経時的な薬剤の溶出率をHPLCで測定しました。私が考えていたとおり、剤型間で溶出挙動が異なり、それは患者さんが訴える症状とリンクするものでした。

● 薬剤を懸濁した際の有効成分の安定性

抗HIV薬はほぼ一生涯の投与が必要であるため、簡便な服薬ができるように、販売されている剤型は殆どが錠剤もしくはカプセル剤です。しかしながら、偶発的な事故等でそのままでの投与が難しい場合はお湯等で崩壊、懸濁させた上で投与しますが、懸濁した際の有効成分の安定性が懸念

されます。そのため、前述の検討同様、再度母校でHPLCを用いて、懸濁時の熱安定性について検討を行うこととしました。殆どの薬剤は問題がありませんでしたが、当時頻用されていたテノホビルジソプロキシルフマル酸塩（TDF）は追加で行ったLC/MSを用いた検討と併せて、経時的にエステルの加水分解が進行することがわかりました（図1）。

● 抗HIV薬の血中濃度測定

現在の抗HIV薬はウイルスの増殖プロセスをブロックすることで、ウイルスの増殖を抑制する薬剤です。そのため、体内からのウイルスの完全な駆逐は難しく、常に標的細胞内に必要最低レベル以上の薬剤を維持する必要があります。また、抗HIV薬は市販前の臨床試験、いわゆる治験を国内で実施することなく、海外データのみで承認されることから発売時点での日本人の薬物動態に関するデータはほとんどありません。そのため、抗HIV薬の投与開始後は血中の薬物濃度を測定する必要がありますが、様々な問題から現時点では保険診療の範囲では測定ができません。臨床研究として研究班のシステムを利用することで測定はできますが、外部での測定になるため、検体提出と結果報告に一定の時間差があり、早く結果が必要な臨床現場のニーズに応えることができていない現状があります。

● 念願のHPLCが来た

このようにHPLCを用いた検討を行いたい場合は大学に出入りしていました。しかしながら、HIV感染症患者さんの血液を用いた検討は、感染のリスクがあるため大学では実施できず、臨床現場のニーズに応えることができていませんでした。

何とか、製剤学的な検討結果と臨床現場における客観的な評価指標となる、薬物血中濃度測定結果をリンクさせていきたいと考えていたある日、上司から他の施設でHPLCを

更新するため、現在使用しているHPLC不要となるとの話が出ているが必要か?との話が舞い込んできました。私は二つ返事で、是非お願いしますと返答しました。

後日、コントローラー、ポンプ、脱気装置、オートサンプラー、カラムオープン、UV検出器、蛍光検出器からなる「Shimadzu LC-10A VPシリーズ」が運ばれてきました。島津アクセスのサービスマンの方に据え付け、セッティングをして頂き、血液検体の前処理を行った上で、逆相系カラムを用いていざ測定へ。初めて測定を行った薬剤は、頻用されている薬剤の一つであるラルテグラビルでした。再現性もよく、安定した測定ができると確認できた時、研究だけでなく、必要時にすぐに測定が行うことができるため、実際の医療現場におけるニーズにも対応できるようになったと実感した瞬間でした。その後、測定薬剤も増やし、現在では主要な薬剤の殆どを測定することが可能になるに至っています。更に測定を続けていく中で、タイミングよく機器の更新についても許可があり、すべての機器をLC-20シリーズに更新して頂くことができ、非常に快適な環境で測定をさせて頂いております。現在は日々の測定を行いつつ、少しでも多くの施設で測定が可能となるよう、MSによる測定方法のみが報告されている薬剤について、HPLCでの測定が可能となるよう検討を行なっています。また、現在の新型コロナウイルス感染症の流行を鑑み、効果が期待されている薬剤

の一つであるファビピラビルについて、暴露のリスクを最低限にできるよう、極力簡便な手技で前処理が済む血中の薬物濃度の測定系の確立についても検討を行なっています。

● さいごに

医療の現場では様々な薬剤の効果、副作用モニタリングの指標として血中の薬物濃度のモニタリングが行われています。患者さんの背景はそれぞれ異なるため、測定結果はもちろん異なります。しかしながら、同一の薬剤を投与した際に患者背景がほぼ同様であるにも関わらず、異なる現象が起こることがあります。その際、製剤学的観点からのアプローチを行うことは薬剤師が発揮すべき職能の一つであり、LCは原因究明のための強力なパートナーであると考えます。更にLCは、コマーシャルベースでは利用できない薬剤の血中の薬物測定についても検討を加えることで測定できる可能性があり、薬物治療の可能性を拡げる有用なツールと考えます。このようにLCは臨床現場における「不確かさ」を「確かさ」に変える可能性を持っていると思います。

最後になりましたが、今回私のようなものに様々分野でHPLCを活用され、活躍されている方々が愛読されているLCtalkへの寄稿の機会を頂きましたことにつきまして、深く感謝申し上げます。

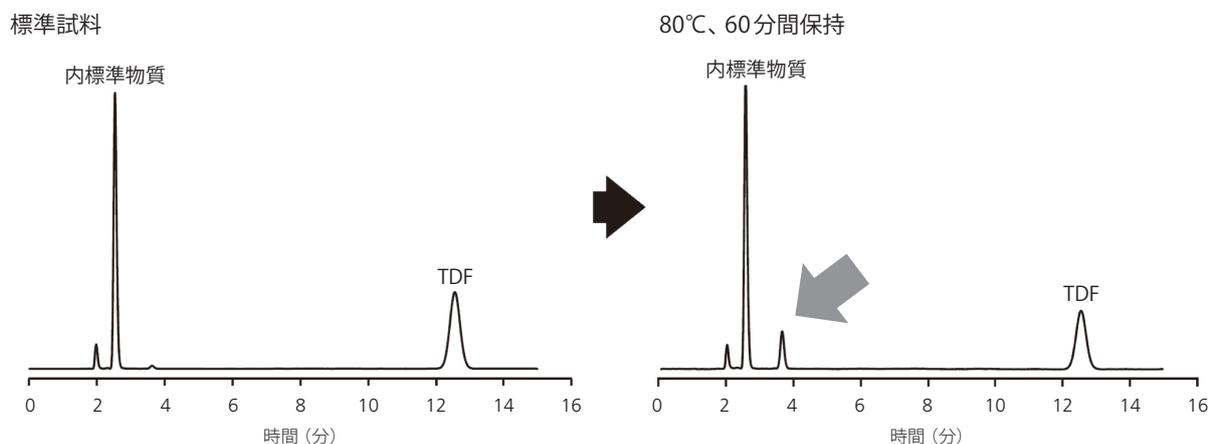


図1 TDFのクロマトグラム

執筆者紹介

神戸薬科大学大学院薬学研究科博士課程修了。現在、国立病院機構 大阪医療センター 薬剤部 研究教育主任、同 臨床研究センター エイズ先端医療研究部 副HIV感染制御研究室長。日本エイズ学会 理事。

専門分野

HIV感染症

将来の夢

薬物治療の個別最適化、子供の結婚式に出席する

趣味

車いじり、お酒など

Applications

蛍光検出 HPLC による D/L-アミノ酸 37 成分 分析自動化の検討と酒類への応用

グローバルアプリケーション開発センター
岩田 奈津紀

アミノ酸は、L体およびD体の鏡像異性体をもちます（不斉炭素を分子内にもたないグリシンを除く）。L-アミノ酸とは対照的に、D-アミノ酸に関する研究は少なく、食品や食材の呈味性、保存性、香気性などに対するD-アミノ酸の役割は最近までほぼ不明でした。しかしながら、最近では発酵食品や生体試料には、多くのL-アミノ酸以外に数種のD-アミノ酸が含まれていることが知られるようになり、それに伴ってアミノ酸のD/L分離の需要が高まっています。さらに、D-アミノ酸はL-アミノ酸に比べ食品中や生体内において微量であるため、高濃度に存在するL-アミノ酸と分離し定量することが求められます。現在、D/L-アミノ酸をHPLCで分析する際には、単一の分析条件では全ての成分の分離が困難なため、LC/MSや二次元LCなどが用いられています。しかしながら、LC/MS分析はマトリクス効果の影響を受けやすく、LCで用いる他の検出器に比べ定量性に乏しく、また二次元LC法では分析に長時間を要することが知られています。そのため、短時間かつ簡単な操作で分離定量する手法が求められています。ここでは、キラル構造をもつ誘導体化試薬を用いて、ジアステレオマーにしたD/L-アミノ酸を逆相モードで分離し、蛍光検出した結果をご紹介します。併せて、誘導体化および分析の自動化検討についてもご紹介します。

1. キラル誘導体化

キラル誘導体化するため、*N*-アセチル-L-システイン（NAC）と*N*-イソブチリル-L-システイン（NIBC）の2種類のキラルチオールを用いました。NACあるいはNIBCの存在下で、*o*-フタルアルデヒド（OPA）を反応させることにより、D/L-アミノ酸をジアステレオマー蛍光誘導体化しました。

表1 対象成分

1	D-Asp	8	D-Arg	15	D-Ile	22	L-Ser	29	L-Tyr	36	L-Leu
2	D-Glu	9	D-Ala	16	D-Phe	23	L-Gln	30	L-Val	37	L-Lys
3	D-Asn	10	D-Tyr	17	D-Leu	24	L-His	31	L-Met		
4	D-Ser	11	D-Val	18	D-Lys	25	L-Thr	32	L-(Cys) ₂		
5	D-Gln	12	D-Met	19	L-Asp	26	Gly	33	L-Trp		
6	D-His	13	D-(Cys) ₂	20	L-Glu	27	L-Arg	34	L-Ile		
7	D-Thr	14	D-Trp	21	L-Asn	28	L-Ala	35	L-Phe		

※背景色（赤：OPA/NAC誘導体化、青：OPA/NIBC誘導体化）

2. 分析条件と自動化検討

対象成分は、D/L-アミノ酸37成分（タンパク構成アミノ酸のうち、D/L-プロリンを除く）です（表1）。

食品中のD/L-アミノ酸を分析する際には、高濃度に存在するL-アミノ酸や夾雑成分と高分離分析するため、微粒子カラムを用いました。それに伴い、システム負荷圧が高くなるため、システム耐圧130 MPaを備えるUHPLC Nexera™ X3を用いました。

図1に、自動化システムの模式図を示します。本検討では、送液ポンプの移動相ブレンディング機能を用いて移動相を自動調製し、併せて2種類の分析条件を自動で切り替えました。また、オートサンプラーの自動前処理機能を用いてD/L-アミノ酸の誘導体化を行いました。表2に示す2つの分析条件の異なる点は、移動相の有機溶媒比率とグラジエントタイムプログラムです（太字部分）。移動相ブレンディング機能を用いれば、有機溶媒の原液をセットするだけで済み、移動相調製と分析条件切替時の移動相置換にかかる作業時間を削減できました。また、自動前処理機能を用いることにより、OPA/NAC溶液、OPA/NIBC溶液および試料を入れたバイアルをオートサンプラーにセットするだけでニードル内で自動的に混合する前処理プログラムを実行できますので、誘導体化された試料をそのまま分析に供しました（表3、4）。

以上のように、オートサンプラーによる自動プレカラム蛍光誘導体化を行うことで、手動による煩雑な前処理が不要になり、誘導体化から分析開始までの時間を一定にできました。また、誘導体化を行うバイアルも不要となるため、コストダウンが図れました。なお、今回20試料を分析したところ、手動に比べ作業時間を1時間以上削減できました（表5）。

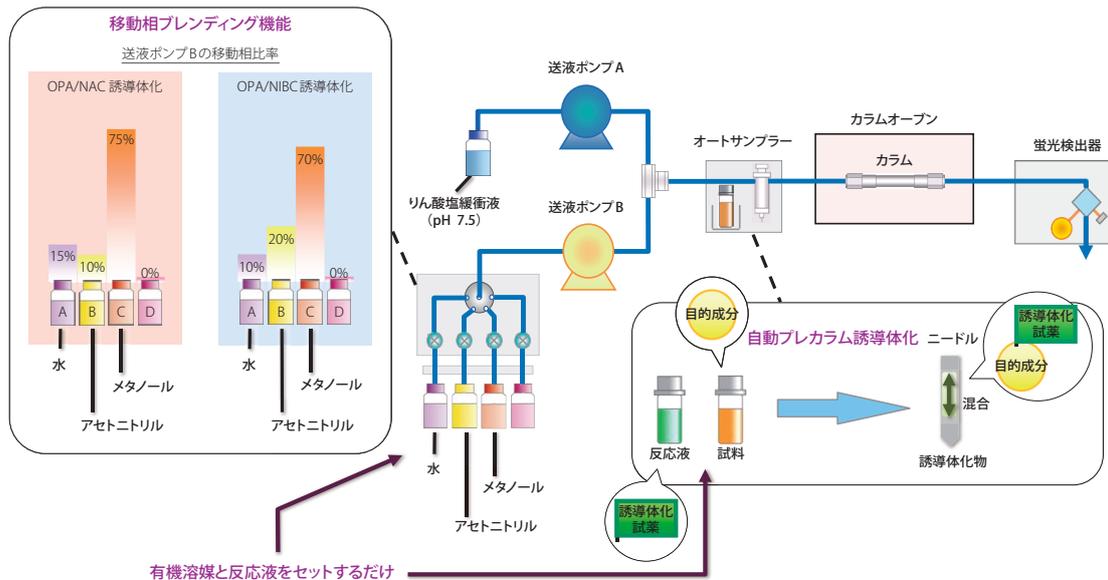


図1 移動相ブレンド機能と自動プレカラム誘導体化

表2 分析条件

システム	Nexera X3	
カラム	<OPA/NAC 誘導体化> Shim-pack Scepter™ 1.9 μm C8*1 (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)	<OPA/NIBC 誘導体化> Shim-pack Scepter 1.9 μm C8 (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)
流量	0.6 mL/min	
移動相	<ポンプ A> 10 mmol/L りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) <ポンプ B> 移動相ブレンド A) 水 B) アセトニトリル C) メタノール A/B/C=15:10:75	<ポンプ A> 10 mmol/L りん酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) <ポンプ B> 移動相ブレンド A) 水 B) アセトニトリル C) メタノール A/B/C=10:20:70
タイムプログラム	4%B (0-3 min)→11%B (13 min)→14%B (22 min)→ 25%B (30 min)→30%B (35 min)→41%B (61 min)→ 80%B (61.01-63 min)→4%B (63.01-67 min)	10%B (0 min)→15%B (3-15 min)→20%B (25 min)→ 52%B (57 min)→80%B (57.01-59 min)→ 10%B (59.01-63 min)
カラム温度	35 °C	
注入量	1 μL	
バイアル	島津製作所 LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*2	
検出	蛍光検出器 (RF-20Axs) 励起: 350 nm、蛍光: 450 nm	

*1 P/N: 227-31034-04, *2 P/N: 227-34001-01

表3 誘導体化試薬の調製

OPA 試薬	o-フタルアルデヒド 10 mg をエタノール 0.3 mL に溶解し、0.1 mol/L ほう酸緩衝液 0.7 mL と超純水 4 mL を加えて混合
NAC 溶液	0.1 mol/L ほう酸緩衝液 10 mL に N-アセチル-L-システイン 20 mg を加えて混合
NIBC 溶液	0.1 mol/L ほう酸緩衝液 10 mL に N-イソブチリル-L-システイン 20 mg を加えて混合
OPA/NAC 溶液	OPA 試薬と NAC 溶液を等量混合
OPA/NIBC 溶液	OPA 試薬と NIBC 溶液を等量混合

表4 オートサンプラーによる自動プレカラム誘導体化の概要

<OPA/NAC 誘導体化>		OPA/NIBC 誘導体化	
①	OPA/NAC 溶液 4 μL	①	OPA/NIBC 溶液 4 μL
②	試料 1 μL	②	試料 1 μL
③	攪拌	③	攪拌
④	注入	④	注入

表5 自動と手動の比較 (20 試料の分析)

		自動		手動	
移動相調製	緩衝液	5分			
	有機溶媒	○	0分 ※送液ポンプによる移動相ブレンド機能	×	10分
分析条件切替に伴う移動相置換		○	0分 ※送液ポンプによる移動相ブレンド機能	×	10分
誘導体化試薬調製		10分			
誘導体化反応		○	0分 ※オートサンプラーによる自動プレカラム誘導体化	×	50分
合計		○	15分	×	85分

3. D/L-アミノ酸標準溶液の分析

図2に、D/L-アミノ酸標準溶液（各5 μmol/L）のクロマトグラムを示します。2種類のキラルチオールを用いることにより、合計約120分で37成分を分離できました。

対象の37成分について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 $r^2=0.999$ 以上と良好な直線性が得られました。

各2 μmol/Lの標準溶液について、6回繰り返し分析における保持時間と面積の再現性（%RSD）を確認しました。保持時間、面積ともに再現性はそれぞれ0.1%以下、1.5%以下の結果が得られました。

4. 酒類への応用

サンプルは、ビール2種、日本酒および赤/白ワイン（計5種類）を用いました。ビールAおよび日本酒は10 mmol/L塩酸水で5倍希釈、ビールBおよび赤/白ワインは10倍希釈した後、0.2 μmのメンブランフィルターでろ過を行いました。

今回試料に用いた5つの酒類全てに含まれていたD-アミノ酸は、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-セリン、D-ヒスチジン、D-アラニン、D-ロイシンでした。また、ワインにだけ含まれている成分は、D-グルタミン、D-トリプトファンであり、ビールにだけ含まれている成分は、D-フェニルアラニンでした。ビールAはビールBに比べ、D-アミノ酸の含有量が約2倍異なりました。さらに、L体に比べD体が微量であることも確認できました（図3～6）。

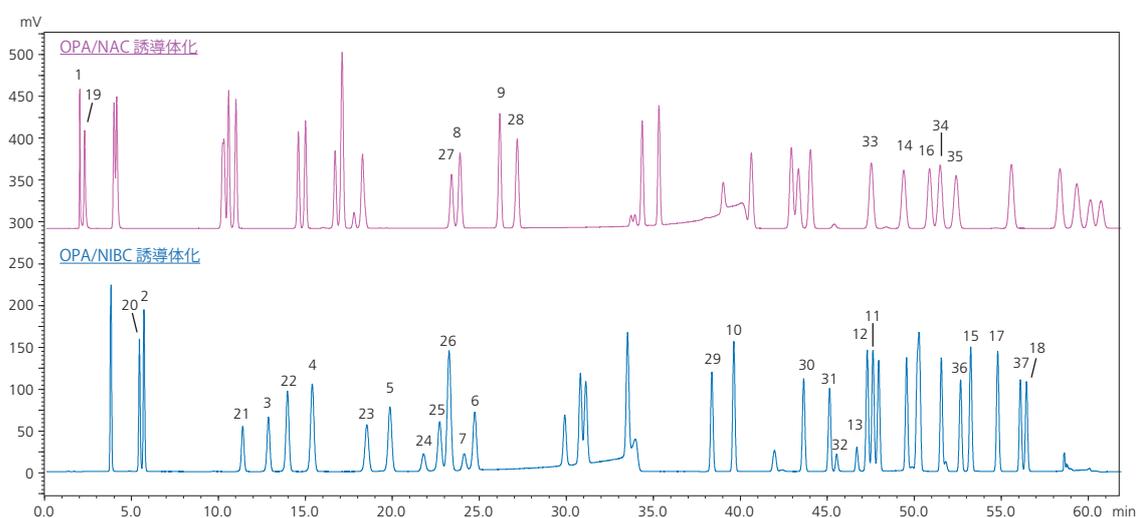


図2 D/L-アミノ酸標準溶液（各5 μmol/L）のクロマトグラム

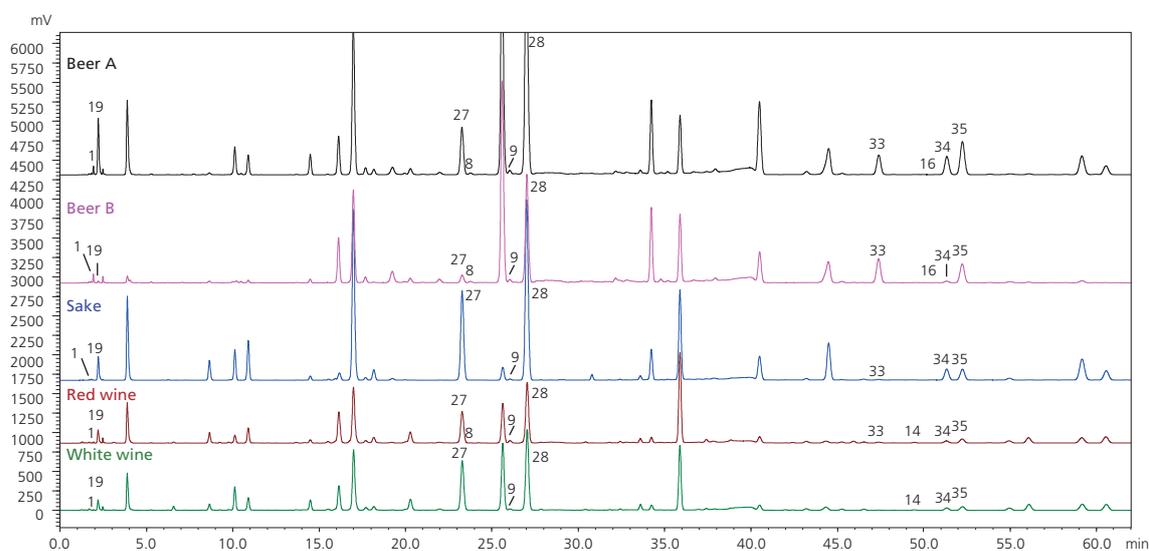


図3 酒類のクロマトグラム（OPA/NAC誘導体化）

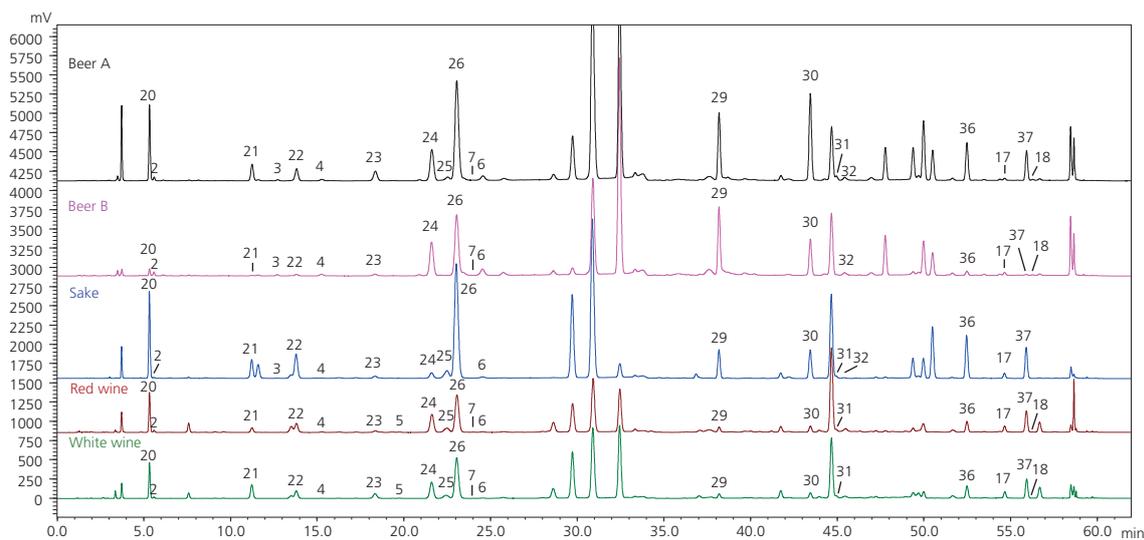


図4 酒類のクロマトグラム (OPA/NIBC誘導体化)

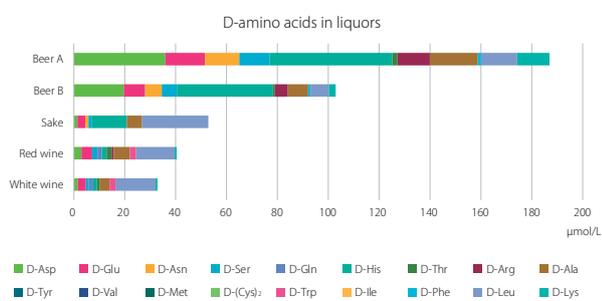
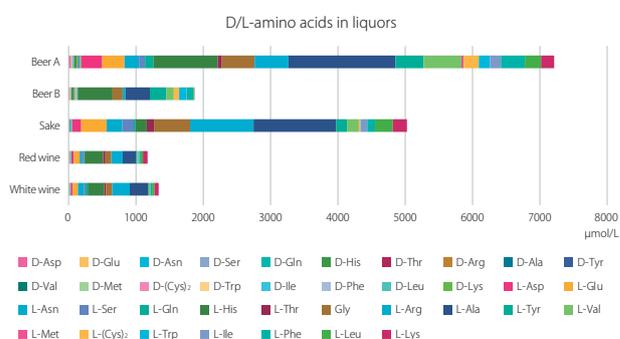


図5 酒類中のD-アミノ酸含有量



*一部のL体は高濃度に含まれていたため、定量範囲外の成分があります。

図6 酒類中のD/L-アミノ酸含有量

5. まとめ

キラル構造をもつ誘導体化試薬を用いて、ジアステレオマーにした37成分のD/L-アミノ酸を逆相モードで分離し、蛍光検出しました。

送液ポンプの移動相ブレンド機能とオートサンプラーの自動前処理機能を用いて、自動化を検討しました。2種類の分析条件を自動で切り換え、実行することで移動相調製、誘導体化反応および移動相置換にかかる時間や労力を合計1時間以上(20試料の分析)削減できました。同時に、誘導体化から分析開始までの時間を一定にできました。

また、2種類のキラルチオールを用いることにより、酒類中のD/L-アミノ酸37成分の分離が可能となりました。酒類中のD-アミノ酸の種類、含有量はお酒の種類により異なり、ビールにおいては種類によってD-アミノ酸の含有量が約2倍異なることがわかりました。

●本内容につきましては、アプリケーションニュース No. L592もご覧ください。

本稿に関する発表は、第31回クロマトグラフィー科学会議^{*1}および新アミノ酸分析研究会第10回学術講演会^{*2}において、それぞれBest Presentation Award、優秀発表賞を受賞しました。



*1: クロマトグラフィー科学会議主催
<http://scs31.moon.bindcloud.jp/event.html>

*2: 新アミノ酸分析研究会主催
<http://jsa3.s2.weblife.me/>

Products

一体型高速液体クロマトグラフ i-Series (LC-2050/LC-2060)

LCビジネスユニット
藤村 大樹

在宅勤務・リモートワークというワークスタイルが浸透し、業務のさらなる効率化の推進はあらゆる職場での課題となっています。デジタル技術やネットワーク技術の発展により、分析機器の遠隔操作や遠隔での稼働状況の確認というニーズが高まっています。この市場の変化に応えるため、一体型高速液体クロマトグラフ i-Series は生まれ変わりました。高い基本性能、分析の高速化、作業者の負担を軽減するユーザビリティなどで好評いただいている性能はそのままに、在宅勤務・リモートワーク時も分析業務の効率を維持できるように自動化や遠隔操作支援機能を追加し、用途や環境の自由度を広げました。

ここでは、在宅勤務、リモートワークを支援する新しい i-Series の特長や機能をご紹介します。



1. i-Series の開発コンセプト

● 新しい i-Series が実現する新しい分析スタイル

新しい i-Series は、従来の卓越した性能を継承しながら、働く人、場所、スタイルが多様化する分析現場の要望に応え、常に信頼性の高い分析結果を提供します。

- 装置の遠隔操作・モニタリングによりラボ外からでも分析業務を実施し、ラボ滞在時間の短縮を実現 (Innovative : 革新的)

i-Series に搭載された各機能は、装置起動からシャットダウンまでの一連の操作において人がラボに滞在する時間を最小限にし、オフィスや自宅など、どこからでも分析業務を自在に行う新しい働き方を提案します。



- ソフトウェアとの連携により、データ信頼性と分析業務効率化の両方を実現 (Intelligent : 知的)

得られたデータの正確な解析には、熟練した知識と技術が必要になる場合があります。島津独自の解析技術である i-PeakFinder や i-PDeAll を使用すれば、分析者の熟練度によらず、誰でも信頼性ある解析結果を導くことができます。また、ACTO 機能は、他機種で最適化された分析メソッドを i-Series でも使用できるよう薬局方で許容されている範囲内で自動調整し、他機種と同等のクロマトグラムを提供する支援を行います。



- 直感的な操作性とメンテナンス性、卓越した装置性能で常に安定した分析を提供 (Intuitive : 直感的)

装置前面に配置された液晶タッチパネルは、装置ステータスや分析状況をリアルタイムで確認することができます。加えて、優れた装置の基本性能が分析者の熟練度によらないシステムの運転を支援し分析業務を支援します。また消耗品の使用状況や部品交換作業のナビゲーションなどメンテナンス作業を支援する機能により機器管理者の負担を軽減します。



2. LC分析業務スタイルの改革 (Innovative : 革新的)

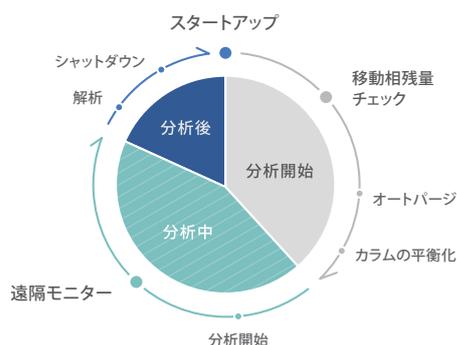
● 自動化と遠隔操作・モニタリングによる

新たなラボワークの提案

以下にご紹介するAnalytical Intelligenceの機能やLabSolutions Direct*により、装置起動から分析終了までの自動フローと遠隔操作、モニタリングを実現します。

自動フローに熟練分析者のノウハウを取り込み、長期にわたり安定したデータ採取を実現するとともに、ラボでの必要な作業量を減少させながらも、業務の生産性を向上します。

* LabSolutions Directは LabSolutions LC/GCの標準機能です。

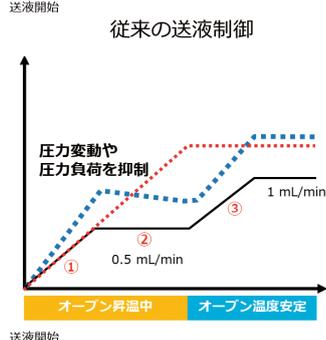
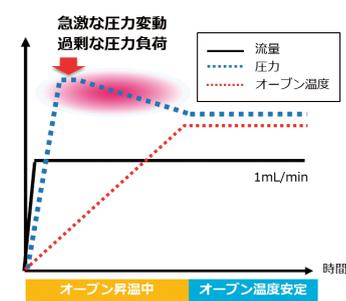


● カラムを保護しながらシステムを自動起動



新しいi-Seriesの自動スタートアップは、設定日時にシステムが起動し、FlowPilot機能がカラム温度と連動して徐々に移動相流量を上げ、平衡化を開始します。

熟練分析者が手動で行ってきた操作方法を自動化することでラボワークの負荷を軽減します。



- ① 設定流量の1/2まで徐々に流量を上げる
- ② オープン温度が安定するまで待機
- ③ 設定流量まで徐々に流量を上げる

FlowPilot

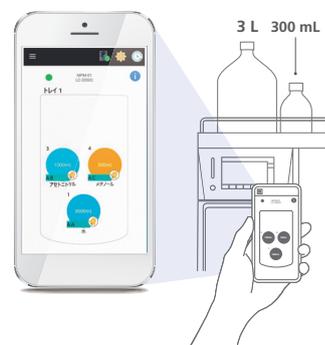
● 移動相枯渇リスクをゼロに：



移動相モニター

移動相モニターを用いるとにより、移動相残量のリアルタイム測定ができ、LabSolutionsや専用ソフトウェアMPMChecker™から移動相残量の確認が可能です。

重量センサーとコントローラーを搭載した移動相モニターは、実際の移動相重量に基づいた残量を計測します。また、移動相ボトル内の溶液の量をリアルタイムでLANネットワークを通じてPCやスマートフォンに送信し、MPMChecker™が残量レベルをグラフィカルに表示します。移動相の残量が設定値まで減少すると、警告やエラーを発信しユーザーに知らせます。設定条件に応じてLCシステムを停止することもできます。



● ラボ以外からも装置の操作、管理

LabSolutions Directの活用により、ラボから離れた場所から装置を遠隔操作し、予め設定したメソッドやバッチ分析を実行することができます。また、LabSolutions CSの導入により、データ解析を含むすべてのPCワークを遠隔で行えます。装置状況やクロマトグラムも遠隔モニタリングでき、ラボと居室を行き来する時間のロスと手間を低減し、分析従事者の業務効率化を支援します。



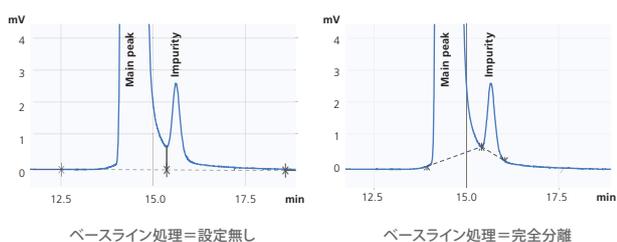
Analytical Intelligenceは、島津製作所が提案する分析機器の新しい概念です。システムやソフトウェアが、熟練技術者と同じように操作を行い、状態・結果の良し悪しを自動で判断し、ユーザーへのフィードバックやトラブルの解決を行います。また、分析機器に対する知識や経験の差を補完し、データの信頼性を確保します。

3. 誰でも信頼性の高いデータ採取が可能 (Intelligent : 知性的)

● 大量のデータを高精度に一括処理



ベースラインのうねりや、ノイズに埋もれたピークなどを1つ1つ処理するのは手間がかかる上、手動波形処理は個人差が生じます。当社独自の波形処理アルゴリズムi-PeakFinderは、全自動積分機能によりこのような厄介なクロマトグラムを簡単に、再現性良く処理でき、多成分一斉分析データなどにおいて、誰でも同様に解析結果を得ることができます。



● 分離不十分な成分の見逃しを防止

ピーク分離が不十分な場合、通常は分析条件の再検討を行い、完全分離できるメソッドを探索します。この作業はLCの高い経験値と労力を必要とします。MCR-ALS (Multivariate Curve Resolution Alternating Least Square) 法を用いたピークデコンボリューション機能i-PDeAllは、カラムで完全分離できないピークを、波長範囲と時間範囲を指定するだけで複数成分の吸収スペクトルとクロマトグラムに分離し、定性・定量することが可能です*。

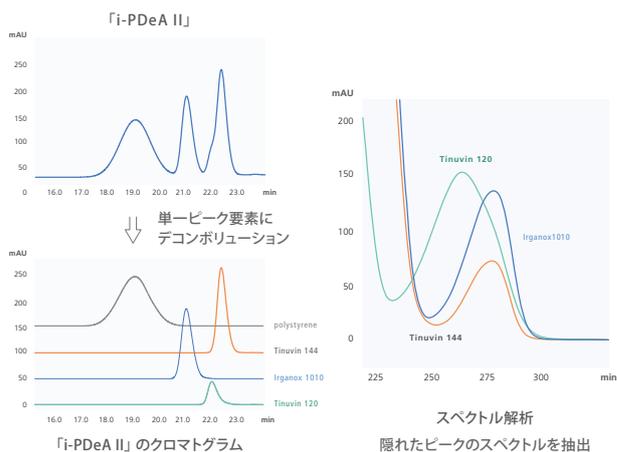
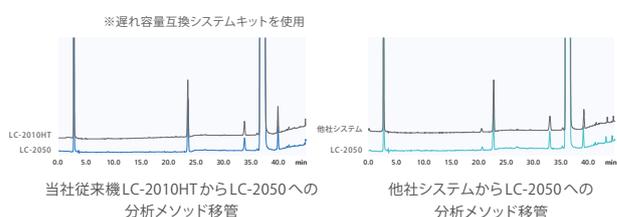
* 当社のPDA検出器とLabSolutionsを用いた場合のみ使用可能。

● 装置の置き換えやメソッド移管を支援



他の装置で使用していた試験法(分析条件、メソッド)を別の装置に移管して同じクロマトグラムを得るためにはシステムの遅れ容量を合わせる必要があります。i-Seriesは当社従来機種や一部の他社製品と同等の内部容量を有し(※)、更にその他のモデルに対しても、LabSolutionsのACTO (Analytical Condition Transfer and Optimization) 機能を用いた簡単な設定で同等のクロマトグラムを再現し、メソッド移管業務の負担を軽減します。

(※) オプションが必要な場合があります。詳しくは当社販売員にお尋ねください。(詳しくはテクニカルレポートC190-0529を参照ください。)



4. 直感的な操作と卓越した性能により分析業務の負荷を低減 (Intuitive : 直感的)

● i-Seriesの操作を簡便化

LCの流路を模したユーザーインターフェイスにより、視認性良く、直感的に操作をすることが可能です。操作の教育に時間を要さず、初めてLCに触れる分析者の負担を軽減します。



● 消耗品の交換をサポートし、装置のダウンタイムを低減

i-Seriesのタッチパネルに表示された二次元コードを、スマートデバイスで読み取ることで、メンテナンスの操作説明Webサイトをご覧いただけます。解説動画が取扱説明書の操作説明を補完し、メンテナンス作業を視覚的にサポートします。システムの稼働率を上げ、分析業務を一層効率化します。



Introductory

吸光光度検出の基礎

島津総合サービス リサーチセンター
三上 博久

吸光光度検出器は、HPLCで最も広く用いられている検出器です。今回は、吸光光度検出の基礎として、光吸収の原理と化合物の構造について解説したいと思います。

1. 光の吸収とは

分子内の電子は、軌道上で飛び飛びの値をもつ連続したエネルギー状態をとります。これをエネルギー準位と呼び、最も低いエネルギー準位を基底状態、それよりも高い準位を励起状態（低い方から、第一励起状態、第二励起状態…）と呼びます。また、電子の各エネルギー準位には、さらに原子間の振動運動に伴う振動エネルギー準位があります。

分子に基底状態と励起状態のエネルギー差に相当する光のエネルギーが与えられると、電子がこのエネルギーをもらって基底状態から励起状態へと飛び上がります（図1）。紫外可視光の吸収は、この電子遷移により起こります。

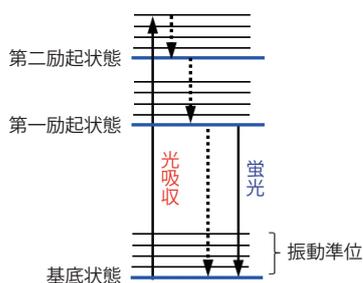


図1 光エネルギーの吸収

光は固有のエネルギーをもつ粒子（光子）と考えることができ、そのエネルギー（ E ）は式（1）で表されます（ ν ：振動数、 λ ：波長、 h ：プランク定数、 c ：光の速度）。

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

分子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をもつため、吸収する光エネルギー、すなわち吸収する波長が分子により異なることになります。なお、不安定な励起状態に上がった励起電子は、エネルギーを熱として放出しながら（図1、点線矢印）、すみやかに安定な基底状態に戻ろうとします。この過程で、第一励起状態の最低振動準位（図1、青線）からエネルギーの一部が光子となって放出される場合があります。これが蛍光です（詳しくは、本誌Vol.101、p.10をご参照ください）。

2. 電子遷移のいろいろ

有機化合物の電子遷移について、もう少し詳しく見てみましょう。基底状態にある電子は、結合性軌道である σ 軌道（単結合）および π 軌道（多重結合）、非結合性軌道である n 軌道（非共有電子が入っている軌道）に存在し、それぞれ σ 電子、 π 電子、 n 電子と呼びます。 σ 軌道、 π 軌道には、反結合性軌道（基底状態では、電子が入っていない空軌道）である σ^* 軌道、 π^* 軌道が付随しており、光エネルギーを受けた電子は、このエネルギー状態が高い反結合性軌道に遷移します。この時許される電子遷移には、図2に示す $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 、

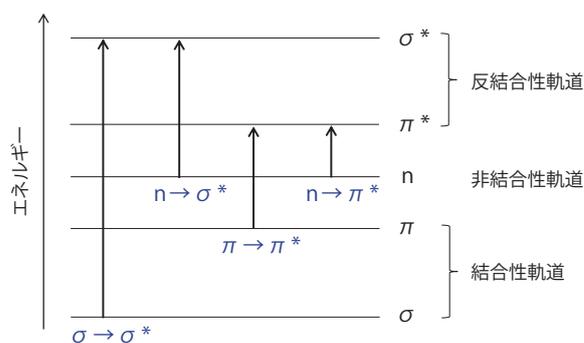


図2 分子軌道のエネルギー準位と各電子遷移

$n \rightarrow \pi^*$ 遷移の4種類があります。 $\sigma \rightarrow \pi^*$ 、 $\pi \rightarrow \sigma^*$ は禁制遷移であり、観察されません。

3. 電子遷移と化合物の構造

● $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 遷移

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ 遷移は、基底状態と励起状態のエネルギー差が最も大きい遷移です。式(1)は波長が短い光ほどエネルギーが高いことを示しており、 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 遷移は短波長域の光でないことと起こらないことがわかります。従って、 σ 結合だけの化合物は、吸光光度検出の対象から外れます。例えば、メタン(CH₄)の吸収極大波長は、122 nm¹⁾という極めて短い波長になります。

● $n \rightarrow \sigma^*$ 遷移

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ 遷移に次いで高い遷移エネルギーが必要な $n \rightarrow \sigma^*$ 遷移は、 n 電子をもつ酸素、窒素、イオウ、ハロゲンなどの原子を含む化合物に見られます。例えば、メタンの水素1個がヒドロキシ基(OH)に置換したメタノール(CH₃OH)は、酸素原子の n 電子による $n \rightarrow \sigma^*$ 遷移により、184 nm¹⁾に吸収極大が現れます。同じくメタンの水素1個が臭素に置換したブロモメタン(CH₃Br)は、204 nm¹⁾に吸収極大があります。しかし、特長的な吸収が得られないことが多く、通常吸光光度検出に適しません。

● $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移

$\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移は多重結合(C=C、C≡C、C=N、C=O、N=Oなど)で起こる遷移であり、強い吸収を示し吸光光度検出において最も重要なものです。特に、二重結合が1個の単結合に隔てられて繰り返される共役系では、 π 電子が4個の炭素原子に非局在化するため励起に必要なエネルギーが小さくなり、吸収が長波長側にシフトします。表1に、エチレンを含むポリエンの吸収極大波長を示す。共役系が長くなるにつれて、

表1 ポリエンの吸収極大波長

化合物	吸収極大波長 ¹⁾
H-CH=CH-H	180 nm
H-CH=CHCH=CH-H	217 nm
H-CH=CHCH=CHCH=CH-H	268 nm
H-CH=CHCH=CHCH=CHCH=CH-H	304 nm

π 電子の非局在化が進み、長波長側へ移動していくのがわかります。さらに共役が進むと、可視領域の光を吸収するようになります。 β -カロテン(図3)は長い共役系を有し、450 nmという可視領域に吸収をもちます。

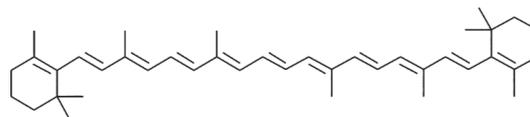


図3 β -カロテンの構造

芳香族化合物の強い吸収は $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移によるものです。例えば、ベンゼンは204 nm、254 nmに、ナフタレンは275 nm、312 nmなどに吸収極大波長があります。なお、ベンゼンに置換基が一つ付くと、一般に吸収は長波長側にシフトします。特に、非共有電子対や π 電子をもつ置換基では顕著です。例えば、ベンゼンにヒドロキシ基が付いたフェノールは270 nm¹⁾に、アミノ基(NH₂)が付いたアニリンは280 nm¹⁾に吸収極大があります。

● $n \rightarrow \pi^*$ 遷移

$n \rightarrow \pi^*$ 遷移は、非共有電子対をもつカルボニル基(C=O)などで見られます。アセトン(CH₃COCH₃)では、 $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移による188 nm¹⁾の吸収がありますが、その他279 nm¹⁾にも $n \rightarrow \pi^*$ 遷移に基づく吸収極大があります。ただし、カルボニル基にヒドロキシ基やアミノ基などが付くと、 $n \rightarrow \pi^*$ 遷移に基づく吸収極大波長が短波長側に移動します。例えば、酢酸(CH₃COOH)は208 nm¹⁾、アセトアミド(CH₃CONH₂)は205 nm¹⁾です。

以上のように、吸光光度検出では多重結合による $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移と $n \rightarrow \pi^*$ 遷移が対象となりますので、化合物の構造ではこれらに注目します。ただし、遷移の強度は $\pi \rightarrow \pi^* > n \rightarrow \pi^*$ となり、高感度検出という点では $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移、特に共役系が重要となります。

引用文献

1) 日本分析化学会編, 分析化学便覧 改訂5版, 714, 丸善(2001)