

# LC *talk*

VOL. **100**



2017 July

## LCtalk の 100 号刊行を祝して

～思い出すままに

公益社団法人日本分析化学会分析士会  
会長 中村 洋  
(液体クロマトグラフィー研究懇談会 委員長,  
東京理科大学名誉教授)



### ■はじめに

まず、この度LCtalkが100号を迎えられることにつき、関係者の皆様には祝意を表したいと思う。本誌の編集長をされている三上博久氏によれば、LCtalkは1984年の秋に創刊されたとのことで、LCtalkには30余年の歴史があり、その歩みは日本におけるHPLCの発展の軌跡そのものと言える。この間、LCtalkはHPLCおよび関連技術に関する最新情報をユーザーに提供し続けてきた訳であり、我が国における分離科学のトップメーカーとしての島津製作所には、弛まぬ努力に敬意を表する。

さて、筆者は1970年代前半からHPLCを使用した方法論の開発に携わり、2011年に大学を定年になってからもHPLCと関連技術の普及に努めていることもあり、LCtalkには数度にわたり執筆する機会を得た。本稿では、編集人が希望する失敗談を交え、筆者のHPLC研究を振り返ってみたい。

### ■1970年代

筆者は東大薬学部薬品分析化学教室(田村善藏教授)に配属され、卒研の1年間はピフィズ菌のバイオオートグラフィー検出法を開発した。修士時代(1968-1970)には、ピフィズ菌の栄養源となる各種糖類のガスクロマトグラフィー(NaBH<sub>4</sub>還元後、TMS化またはTFA化)を開発し、この手法をヒトにおける二糖類代謝研究に応用した。その時に使用したのがGC-1B、GC-1C(何れもFID装着)とGC-4APE(ECD装着)のガスクロマトグラフ(島津製作所)であった。このうち、GC-1Bは筆者が最初に接したGC装置であったが、背丈よりも大きい洋服ダンスのようなサイズであったことを覚えている。この装置はチャート用紙にフェルトペンでクロマトグラムを記録する方式であったが、都合が悪いピークが出現する場合はチャートを止めてペンを持ち上げた状態にし、ピークが出終わってからチャートとペン書きをオンにする先輩の高等技術に感心したことを懐かしく思い出す。

博士課程の2年になった1971年、教授からのお誘いで中退し、10月から教務職員としてピフィズ菌グループに属する研究員、大学院生、卒研生などのお世話をすることとなった。2年経って助手に昇進し、研究を楽しんでいたが、先輩の助手が突然帰国することになり、そのポストを空けるため急遽留学することが決まった。慌てて博士論文を纏めた11月から2年間、NIHのJohn J. Pisano博士のラボにVisiting Fellowとして留学した。NIHの1年目はHPLC装置がラボに1台しかな

かったため、TLCと蛍光分光計を使って仕事をするしかなかった。2年目に入った1975年11月あたりから漸くDuPontのHPLC装置をラボの米国人2名と交代で使用させて貰うことができた。この装置は、移動相貯槽を2つ内蔵し、大型の楕円筒のような形状であり、移動相を吸引するごとに物凄く五月蠅い音がした。後に、島津製作所が初めて市販したLC830 HPLC装置(1972)の原型となった装置と聞いた。装置は共用であったが、神経伝達に関わるアミン類やペプチド類をPartisil 10 SCXカラムとクエン酸リチウム系移動相で分離する系を創ることができ、貴重な経験となった。

1976年11月に帰国後、市販のHPLC装置が購入できなかったため、バラ買いしたポンプ、圧力計、ダンパー、ステンレス配管などを組み上げてHPLC装置を自作した。しかし、1日の1/3から1/2はポンプヘッドや配管の接続部からの液漏れに追われ、右手の指先が酷く荒れていた記憶がある。この頃、ペプチドやタンパク質をポストカラム蛍光誘導体化する系を劇的に増感する工夫として、カラム溶出液をコイル中で(後には瞬間加水分解装置)加熱してアミノ酸にまで加水分解し、OPA-チオール試薬を添加するシステムの開発を行っていた。恒温槽を買う費用が無いため、プラスチックの洗面器に水を張り、投げ込みヒーターを入れてポストカラム加水分解を毎日試みていた。或る日、実験が終わり御茶ノ水駅から自宅に向かう車内で、投げ込みヒーターのプラグを抜いたかどうか気がになり始め、秋葉原駅で引き返し大学まで戻ったこともあった。当時は、研究費漬けの現在と違い、大半が文部省の科学研究費に依存していた時代背景があるものの、今、考えれば随分と乱暴な実験をしたものである。大学を燃やさずに済んだ幸運に感謝するのみである。

### ■1980年代

当時は現在のように質量分析計(MS)が普及していなかったため、生体試料を扱うバイオメディカル領域ではHPLCの検出器に高感度・高選択的な蛍光検出器や電気化学検出器を使用するのが一般的であった。実際には発蛍光物質や電気化学活性物質はそれほど多くはないので、有機化合物の官能基に対する誘導体化試薬の開発が大倉洋甫研究室(九大薬)、南原利夫研究室(東北大薬)、民間では石田泰夫グループ(島津製作所)などを筆頭に全国で盛んに行われていた。筆者も助手を務めていた頃、第1アミン、第2アミン、チオール、カルボニル化合物などに対するプレカラム・ポストカラム蛍光誘導体化試薬の開発に夢中になって

いた。蛍光検出HPLC法の初期の仕事の殆どは、フィルターで励起光を選択できる細長い箱形のFLD-1蛍光検出器（島津製作所）、その後は分光型のRF-535蛍光検出器（島津製作所）のお世話になった。

1986年、恩師の田村教授が東大を定年退職となり、後任に同じ教室の先輩である中嶋暉躬教授が着任された。その年、筆者は助教授となり教授が生理活性天然物の探索、助教授が分析化学を主に担当することになった。助教授になってからは、中嶋教授の名代として外回りの会議に出席する機会が増えた。当時の厚生省が組織した「乱用薬物鑑定法班」もその一つであり、毛髪中の覚醒剤をメタノール-塩酸の混液で超音波抽出し、蒸発乾固後にダンシルクロリド（DNS-Cl）で蛍光標識して蛍光検出逆相HPLCで分離定量する手法を開発した。この方法は、既にLC/MS法が主力となっていた当時の状況にあって、MSを購入できない施設でも実施できるように工夫したものであった。その際、DNS標識覚醒剤の抽出にSFE/SFCシステムを使用すると選択性が高まることを見出した。

助手の時代から、薬科大学から卒研究生を毎年派遣して戴いていたが、助教授になってからは新たに2つの私大の理学部と工学部から卒研究生の派遣を戴き、4大学の4年生が交流できる場ができた。彼らにはそれぞれ立派な卒論を書いて貰ったが、武勇伝も残してくれている。即ち、ポンプシールの交換時にプランジャーを折ったり、カラムの焼結フィルターの詰まりを硝酸溶液で洗浄した後、よく洗わずにカラムに取り付けて高価なChiral-AGPカラム（ $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質固定化カラム）の光学分離能を喪失させたり、ポンプの吐出口のネジをポンペ用の自在スパナでネジ切ってしまった、などである。「装置や機械は壊してみないと本当には分からない」という趣旨の言葉があるが、その通りであり、失敗のお蔭で筆者自身の身になったものが多い。

中嶋教授が陸棲小動物の毒や生理活性物質に興味をもっておられたので、卒研究生と一緒に「ウジクロマトグラフィー」の開発を試みた。即ち、センチクバエの幼虫（ウジ）の第3節にマイクロシリンジで試験液を注入し、軟質ガラス管の中を何cm移動するかを指標として、新規活性物質の探索を行う手法の開発も行った。

#### ■1990年代以降

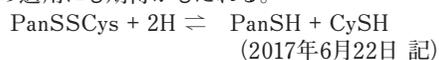
筆者は理研の本間春雄先生（HPLCコースのオーガナイザー）のお誘いにより、関東支部主催の第25回機器分析講習会（1984）の講師を鈴木義仁先生（山梨大工）、及川紀久雄先生（新潟薬科大）らと一緒に務めていたが、やがてオーガナイザーを務めることとなった。講習会に初めてLC-MSを採り挙げた「高速液体クロマトグラフィーとLC-MSの実際」（第32回、1991）では、講師の寺正成さん（島津製作所）が理研に1週間程、泊まり込んでMSの実機調整に当たってくれたことを想い出す。また、1995年ごろには日立製作所のMSが東京理科大学薬学部10号館（新宿区船河原キャンパス）のエレベーターに入り切らず、急遽クレーンで吊上げて2階実習室の窓を外して搬入した珍事もあった。筆者がオーガナイザーになってからは、実習講

師には毎年新たに実験をして貰い、そのデータに基づいて実習をお願いする方式としていた。今でもよく覚えている実習は、牧田睦彦さん（島津製作所）をお願いしたもので、カラムと検出器の間にユニオンを10数個繋ぎ、ユニオンの数に応じてピークの広がりや理論段数の低下が見られ、カラム外拡散が一目瞭然となる見事なデータであった。

筆者が1994年の春、東京理科大学薬学部教授として転出した頃、日本にも本格的なLC-MS時代が到来する魁が感じられた。そこで、当時、大学から支給される研究室予算の4.5倍（正価）もするLC-MSを数年後に何とか購入したが、ポンプオイルの逆流、ファンの飛び外れ、などのハプニングで修理代が嵩むことになった。1998年度、幸いにも日本分析化学会（JSAC）学会賞を受賞できたのを契機として、卒研究生・院生の研究テーマは本人が希望するものとした。こうした理由は、理大生は各自やってみたいテーマをもっており、またそれを遂行する能力があることが分かったからである。その結果、数年後には研究室のテーマが美白、化粧品、保存剤、環境汚染、水虫、遺伝子組み換え食品、テロメア、DNAによる個人識別など多岐にわたり、指導する立場の筆者と助教1名にとっても、その分野の先端研究の現状を強制的に勉強させられる有難い結果となった。こうした状況は定年まで続いたが、2000年度にはJSAC関東支部長、2009-2012年度にはJSAC会長となったことから、筆者の注力も研究から教育に次第にシフトして行くことになった。新世紀賞（関東支部）やJSAC分析士認証制度の創設がその代表例である。後者はLC、LC/MS、ICのスキルを初段から五段に分けて学会が認証評価する制度であり、2010年にスタートして以来、2016年度までに2000名近くの有資格者が誕生している。島津製作所には、スタート時よりLCとLC/MSの初段等の試験場を提供戴いているが、2017年度からは東京に加えて京都においても初段試験会場を提供して戴けることになり、感謝に堪えない。また、LCtalkには試験情報をその都度案内戴いており、重ねて御礼申し上げたい。

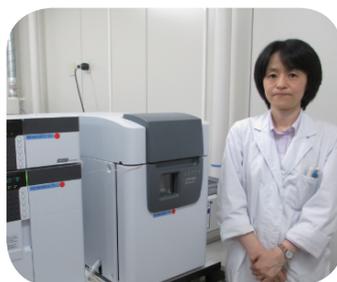
#### ■おわりに

最近、高圧ガス保安法が緩和されたことに伴い、SFE/SFCに再び大きな関心が寄せられている。筆者は、1980年代にはバイオイナートな二酸化炭素超臨界流体の特性に鑑みて、液体抽出では濃縮時に分解ないし失活してしまう新規活性物質（存在量：現在知られている最小濃度物質の1ケタ下）がSFEによって発見できるのではないかと発想したが、雑用に追われて実現できなかった。どなたかに本気でチャレンジして貰えば幸いである。また、ピフィズ菌の必須栄養素となるパンテイン（PanSH）とシステイン（CySH）のミックストジルスフィド（PanSSCy）の単離精製は、当該画分を濃縮する過程で再開裂（下式）と2種の生成チオールの対応するジルスフィドへの酸化など複雑な反応により困難を極めたが、このような平衡反応系へのSFCの適用にも期待がもたれる。



## プレカラム誘導体化法を用いたジペプチドの網羅的分析法

味の素株式会社  
イノベーション研究所  
陰山 直子



■ジペプチドは、アミノ酸単体にはない物理的性質や機能を持つためポストアミノ酸として注目され、幅広い応用も可能ではないかと期待されている。しかし、アンセリンやカルノシンなど一部のジペプチドを除いてその多くは、存在意義や動態、機能が十分に調べられていない。これは、網羅的に分析できる方法がなかったことが一因である。また、特定のジペプチドについては、HPLC-紫外吸収/蛍光法で分析したり、プレ/ポストカラム誘導体化を利用したHPLC法で分析したりしてきたが、生体試料の分析においては特異性や感度も低く、さらには、複雑な前処理が必要であったり、時間がかかるなどの欠点があった。

■一方、当社では、独自の誘導体化試薬 (3-amino-pyridyl-N-hydroxysuccinimidylcarbonate) と検出器に質量分析を用いた高感度・短時間アミノ酸分析法を開発してきた。プレカラム誘導体化反応でアミノ基を修飾することにより逆相カラムでのピーク分離能を向上させ、さらにカラムでは分離できない成分を質量分析計の質量軸で分離することにより、高精度と高速化を両立させた手法である。本法の専用装置として、株式会社島津製作所より自動プレカラム誘導体化機能が付いたLC/MS高速アミノ酸分析システム (UF-Amino Station) が販売されており、併せて、和光純薬工業株式会社から販売されている誘導体化試薬 (APDS タグ® ワコー)、専用の緩衝液 (APDS

タグワコー用ほう酸緩衝液)、溶離液 (APDS タグワコー用 溶離液)、内標準混合溶液 (APDS タグワコー用アミノ酸内部標準混合液) を使用することで、簡単にアミノ酸を分析ができるようになっている。我々は、本原理をジペプチドに応用し、四重極タンデム質量分析装置 (MS/MS) の各種測定モード組み合わせることによって、高感度・高分解能が得られ、かつ、網羅的に分析する方法を開発した。本論では、プレカラム誘導体化 LC/MS/MS を原理とするジペプチドの網羅的分析法について述べる。

■ジペプチドの種類は、アミノ酸に比べてはるかに多いことに加えて、Alanyl-Leucine (Ala-Leu) と Leucyl-Alanine (Leu-Ala) などのアミノ酸の順序が入れ替わって質量が一致するものも数多く存在する。そこで、ジペプチドを網羅的に分析する為には、「クロマトグラムでの分離」「質量分析計での検出」の双方での工夫が必要である。我々は誘導体化試薬に着目して、種々試薬の評価を行い、ジペプチド分析に適した Phenyl isocyanate (PIC) を選定した。評価は、「類似しているペプチド類を分離するため、嵩高くないもの」、「MSでの検出に有利な構造をもつもの」、「ペプチド構造が推定できる、規則的な開裂パターンを持つもの」の3つの観点で行った。PICを用いたジペプチド誘導体は、MS/MS分析によって図1に示すとおり規則的に開裂する。

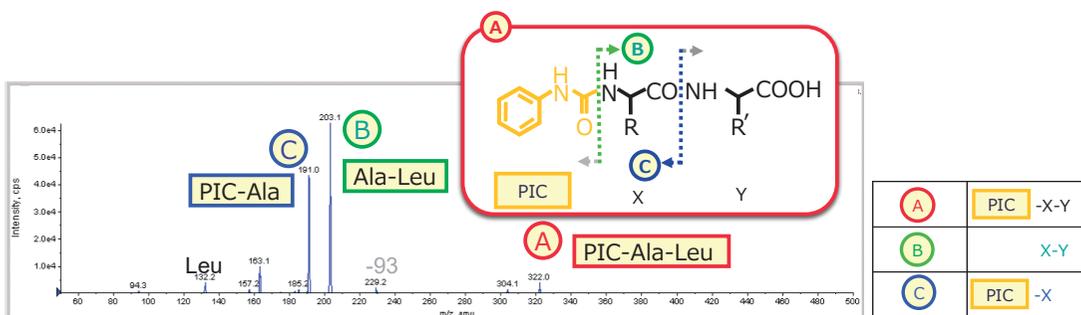


図1 アミノ基を誘導体化したジペプチドが示す MS/MS 分析での規則的な開裂 (例 Ala-Leu)

■この規則的な開裂パターン（図1の①, ②, ③）を選択的に活用できるMS/MSの測定モードにより、目的に応じた以下の3つの手法を構築した（図2）。

- ① ジペプチドを網羅的に検出：①と②の質量差を利用
- ② N末が同じジペプチドを網羅的に検出：③を利用
- ③ 特定のジペプチドを選択的、高感度に検出：①と②の組み合わせを利用

さらに、所有する400種類以上のジペプチド標品で検証したところ、理論どおりに検出されたことから、本手法が有効であることが確認された。

■実際の分析では、まず理論上の質量数（図1の①と③）を設定して③の手法で測定を行い、標準品がある場合は、標品との保持時間の照合によって同定する。標準品がない場合は、さらに①の手法を用いて、PICの構造を持つかどうか（すなわちアミノ基を持つ化合物かどうか）、②の手法を用いてN末のアミノ酸が何であるかを特定し、あわせて②と③の手法から、C末のアミノ酸を推定する。これにより、質量数の同じ成分の区別は難しいものの、ジペプチドの特定がある程度可能となる。

■実サンプルへの応用として食品に活用し、熱水抽出したチーズを誘導体化して本法で測定したところ、100種以上のピークが検出された。標品と照合することで検出された成分を同定することができ、本法はジペプチドの探索に有用であることが示された（図3）。

■近年では解析ソフトを用いて差分解析を行い、精密質量分析データなどから、差が認められた成分の構造推定もある程度可能である。しかし、高価な装置と膨大な解析が必要であり、手軽に測定ができるわけではない。本法はペプチドにターゲットを絞ったことで、特別なソフトウェアがなくても比較的簡単に目的に応じた網羅的分析が可能である。

■今後は、現在では難しい質量数と同じジペプチドを分離できる方法や、トリペプチドに応用した分析法を提供することで、食品や生体内でのジペプチドの存在を発見し、その有用性や生理学的意義の解明など、様々な研究への展開の一助としていきたいと考えている。

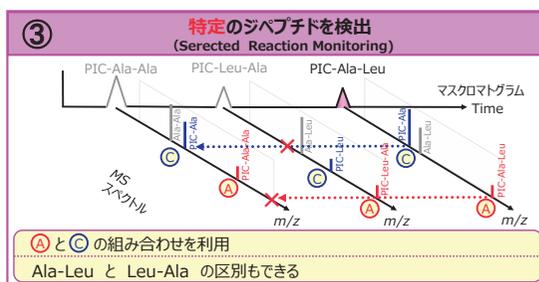
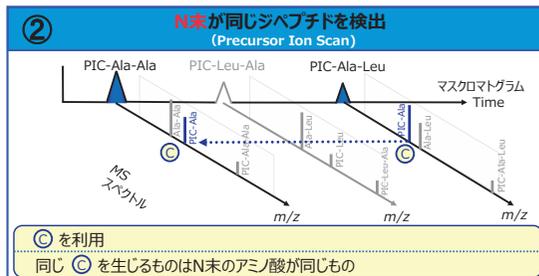
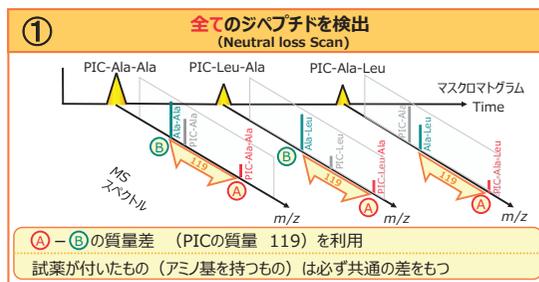


図2 ペプチド測定における3つの手法—混合ペプチド (Ala-Ala, Leu-Ala, Ala-Leu) の分析におけるイメージ図

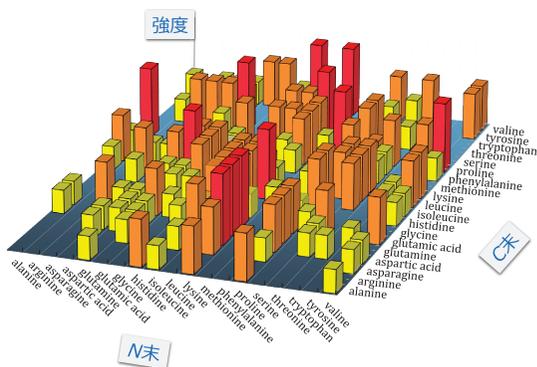


図3 チーズ中のジペプチド分析

参考文献：

- 1) Shimbo, K., et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 1483-1492(2009).
- 2) Yoshida, H., Kondo, K., et al., *J. Chromatogr. B*, 998, 88-96(2015).
- 3) Miyano, H., *LCTalk* vol.59(2005).
- 4) Mizukoshi, T., *LCTalk* vol.97(2016).

# Products

LabSolutions LCMS 用

## LC/MS/MSメソッドパッケージ DLアミノ酸



タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸は、グリシンを除いて D/L の光学異性体が存在します。L-アミノ酸は、タンパク質の構成要素や栄養源として体内に多量に存在します。一方、D-アミノ酸は L-アミノ酸に比べると、その存在は極めて少ないですが、発酵食品の成分、脳神経系における生理機能やバイオマーカー、さらには健康や美容に関与する成分として、様々な分野で注目されています。D-アミノ酸分析では、多種多様なペプチドやアミノ化合物の妨害を受けることが多く、正確な分析のためには高感度で高選択的な分析法が必要となります。

本メソッドパッケージでは、D/L の分離にキラルカラムを用い、検出に質量分析計を用いることで、誘導体化を不要とした高速・高分離かつ高感度な D/L アミノ酸の分析メソッドをご提供します。また、カラムスイッチング技術により、広範囲な D/L アミノ酸を全自動で分析することが可能となります。

\*本メソッドパッケージの分析法は、大阪大学大学院工学研究科福岡研究室で開発されました。

### ■ D/L アミノ酸の全自動分析

従来、D/L アミノ酸を分析するためには、アミノ酸の誘導体化や長時間の分離が必要でした。また、一般的に D-アミノ酸は L-アミノ酸に比べ、その存在量が極めて少ないため、高感度の分析法が求められます。本メソッドパッケージでは、キラル固定相を有するキラルカラムで D/L アミノ酸を光学分離させ、検出に質量分析計を用いることで、高選択、高感度の D/L アミノ酸分析が可能です。本メソッドパッケージには、D/L アミノ酸を分析するための、LC および MS の分析条件が含まれ、対応可能なアミノ酸は表 1 に示す通りです。

図 1 に、カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析システムの流路図を示します。本分析では、2 種類のキラルカラム CROWNPAK CR-1 (+) および CR-1 (-) (ダイセル製) を使用します。対象アミノ酸の内、一部のアミノ酸は一方のカラムで分離できないため、それらのアミノ酸については、もう一方のカラムで分離させます。また、ポンプ A を CR-1 (+) に、ポンプ B を CR-1 (-) に接続し、高圧流路切換バルブ 2 台を用いて、2 種類のカラムを自動的に切り換えることで、広範囲の D/L アミノ酸を全自動で分析できます。図 2 に、D/L アミノ酸標準混合液の MRM クロマトグラムを示します。(詳細につきましては、アプリケーションニュース No.C149 をご参照ください。)

表 1 対象アミノ酸一覧

D/L-Alanine	D/L-Glutamine	D/L- <i>allo</i> -Isoleucine	DL-Proline	D/L-Tyrosine
D/L-Arginine	D/L-Glutamic acid	D/L-Leucine	D/L-Serine	D/L-Valine
D/L-Asparagine	Glycine	D/L-Lysine	D/L-Threonine	
D/L-Asparatic acid	D/L-Histidine	D/L-Methionine	D/L- <i>allo</i> -Threonine	
D/L-Cysteine	D/L-Isoleucine	D/L-Phenylalanine	D/L-Tryptophan	

\* DL-Proline は、第二級アミンのため、本メソッドパッケージでは分離できません。

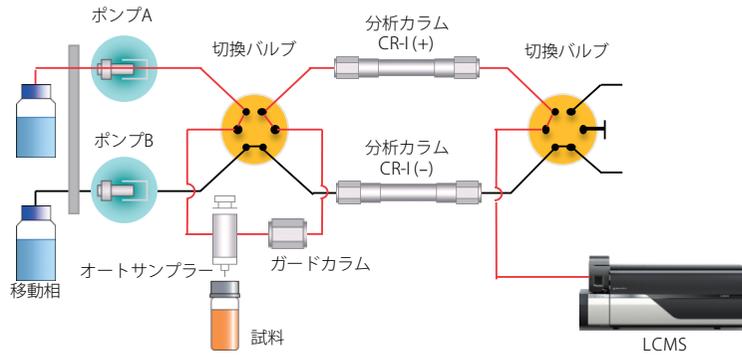


図1 カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析システム

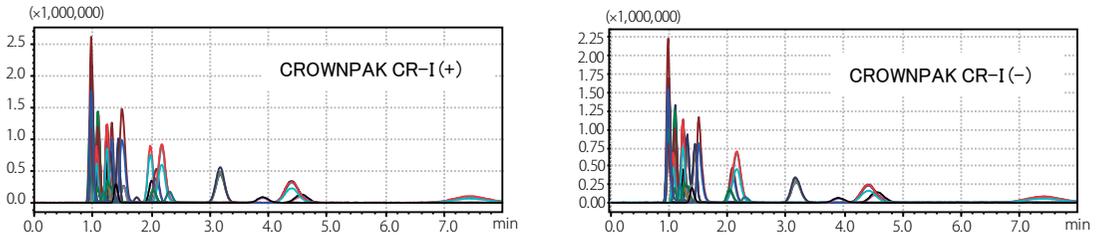


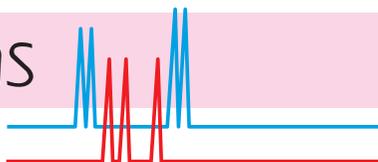
図2 D/Lアミノ酸標準混合液のMRMクロマトグラム（試料濃度：1 ng/μL）

## ■ 発酵飲料中の D/L アミノ酸分析

発酵食品には、数種類のD-アミノ酸が存在することが知られています。D-Ala, D-Leu, D-Pheは、L体比べて甘みが強いことが知られています。そのため、D-アミノ酸の含量は発酵食品の味に影響を与えられ、発酵食品中のD-アミノ酸分析が注目されています。表2に、本メソッドパッケージを使用し、2種類のヨーグルト飲料を分析した結果を示します。どちらのヨーグルト飲料にもD-アミノ酸が含まれていました。D/L存在比を確認したところ、Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Lys, SerでD-アミノ酸が比較的多く含まれることがわかりました。特に、D-Gluはどちらのヨーグルト飲料にも、L-Gluの40倍以上含まれていました。（本分析の詳細につきましては、アプリケーションニュース No.C156 をご参照ください。）

表2 ヨーグルト飲料に含まれるアミノ酸のD/L比

成分	ヨーグルト飲料 A		ヨーグルト飲料 B	
	ピーク面積	D/L比	ピーク面積	D/L比
D-Ala	140959	164.00%	37900	40.20%
L-Ala	85940		94190	
D-Arg	81779	6.90%	95602	36.50%
L-Arg	1192614		262060	
D-Asn	60836	43.20%	3209	16.50%
L-Asn	140872		19416	
D-Asp	47149	38.10%	2441	15.30%
L-Asp	123860		16003	
D-Cys	(N.D.)	-	(N.D.)	-
L-Cys	(N.D.)		(N.D.)	
D-Gln	4743	0.60%	5157	19.80%
L-Gln	856603		26021	
D-Glu	412572	4091.10%	163715	5096.60%
L-Glu	10085		3229	
Gly	957	-	1106	5.20%
D-His	(N.D.)		9030	
L-His	839834	0.80%	175326	1.00%
D-Ile	1428		1366	
L-Ile	176626	130832		
D-allo-Ile	2225	59.40%	1247	39.30%
L-allo-Ile	3744		3172	
D-Leu	4042	1.00%	(N.D.)	-
L-Leu	403567		132923	
D-Lys	1151264	73.50%	24797	3.50%
L-Lys	1565451		698677	
D-Met	463	0.90%	(N.D.)	-
L-Met	54490		(N.D.)	
D-Phe	1600	0.50%	1799	1.50%
L-Phe	313615		117732	
DL-Pro	2094819	14.40%	888155	29.30%
D-Ser	14619		8332	
L-Ser	101651	28395		
D-Thr	1711	1.50%	3314	4.60%
L-Thr	112074		71653	
D-allo-Thr	1973	42.50%	1020	23.70%
L-allo-Thr	4647		4294	
D-Trp	3039	1.90%	1879	13.30%
L-Trp	155899		14086	
D-Tyr	4882	2.10%	5876	107.40%
L-Tyr	230926		5470	
D-Vai	1241	0.40%	1277	0.90%
L-Vai	285792		148323	



## pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法による 有機酸分析システムの腸内細菌叢研究への応用

近年、腸管内の腸内細菌叢が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになりつつあります。すなわち、腸内細菌叢による宿主への影響を考える上で、腸内細菌叢が産生する代謝物が関係していると考えられます。

こうした代謝物には数多くの物質が含まれることから、LC/MS による分析が考えられますが、LC/MS では有機酸であるギ酸や酢酸を移動相に用いるため、代謝物としてのこれら有機酸を検出することが困難となります。

このような場合、HPLC によるイオン排除モードと pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法を組み合わせた島津有機酸分析システムを用いると、ギ酸や酢酸を含む有機酸を高感度かつ選択的に検出することができます。

ここでは、マウス糞便から代謝物を抽出し、腸内細菌叢が産生する代謝物中に含まれる短鎖脂肪酸を有機酸分析システムにより分析した例をご紹介します。

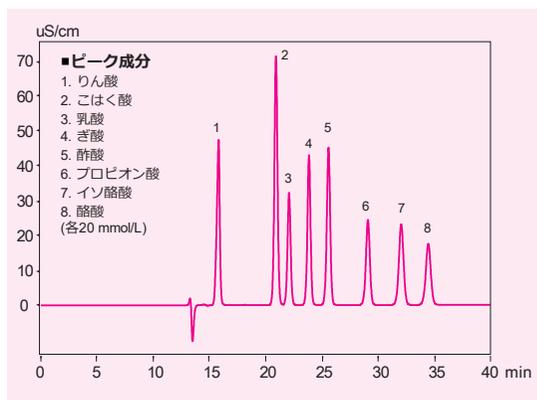


図 1 有機酸標準混合液のクロマトグラム

### ■ 有機酸標準混合液の分析

表 1 に、本分析システムの分析条件を示します。カラムにはイオン排除用 “Shim-pack SCR-102H” を、移動相には芳香族スルホン酸である *p*-トルエンスルホン酸を用います。(調製済の移動相と pH 緩衝液をセットにした便利な「有機酸分析移動相試薬セット」をご用意しております。次頁をご覧ください。)

図 1 に、有機酸 8 成分標準混合液 (各濃度 20 mmol/L) を 10  $\mu$ L 注入した結果を示します。

### ■ 検量線

表 1 の条件で、0.1 ~ 2.0 mmol/L および 1.0 ~ 20 mmol/L の範囲で検量線を作成しました。各成分とも、寄与率 ( $R^2$ ) 0.999 以上と良好な直線性が得られました。図 2 に、0.1 ~ 2.0 mmol/L における乳酸の検量線を示します。

表 1 分析条件

カラム	: Shim-pack SCR-102H, 2本 (内径 8.0 mm, 長さ 300 mm) ガードカラム SCR-102H (内径 6.0 mm, 長さ 50 mm)
移動相	: 5 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸
流量	: 1.0 mL/min
pH 緩衝液	: 5 mmol/L <i>p</i> -トルエンスルホン酸 20 mmol/L Bis-Tris 0.1 mmol/L EDTA
流量	: 0.8 mL/min
温度	: 45 $^{\circ}$ C
検出器	: 電気伝導度検出器 (CDD-10Avp)
注入量	: 10 $\mu$ L

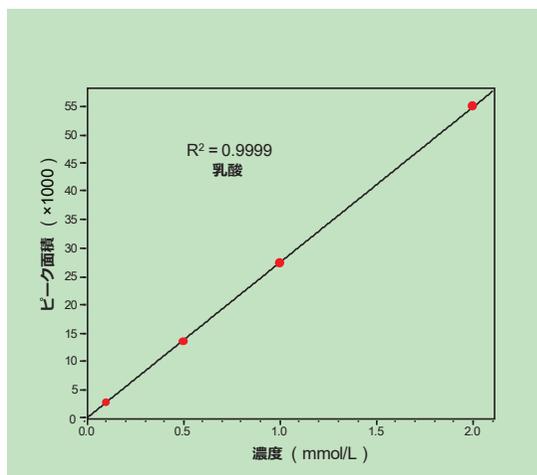


図 2 乳酸の検量線

## ■ マウス糞便抽出液の分析

図3に、マウス糞便から代謝物を抽出するための前処理フローチャートを示します<sup>1)</sup>。通常環境下で飼育したC57BL/6Jマウス糞便を回収し、新鮮糞便50 mgにりん酸緩衝生理食塩水450  $\mu$ Lを添加後、攪拌し、その上清を遠心分離、限外濾過したものを分析用試料としました。<sup>2)</sup>

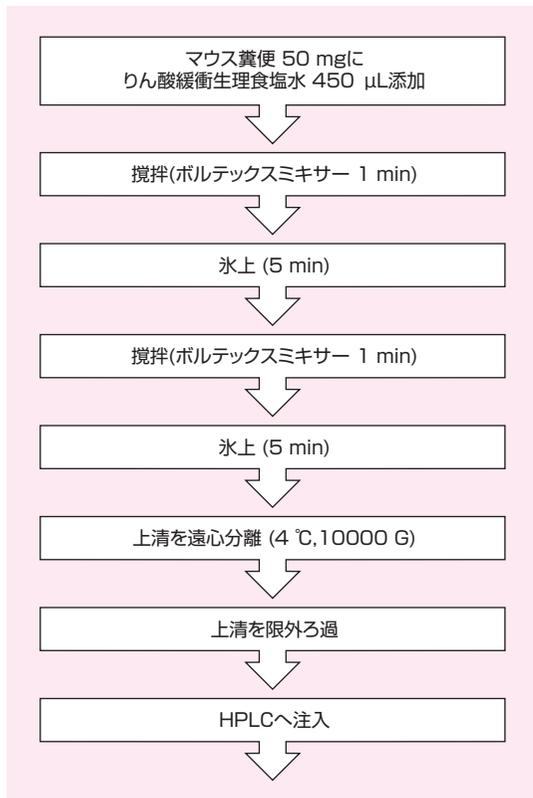


図3 前処理フローチャート

図4に、図3で前処理したマウス糞便抽出液10  $\mu$ Lを注入した結果を示します。LC/MSでは検出困難な酢酸やギ酸を含む有機酸7成分が検出されました。表2に、各有機酸の定量結果を示します。

なお、本分析では分析時間として40分程度が必要ですが、オートサンプラーSIL-30ACの前処理機能を用いたオーバーラップインジェクションを行うことにより、分析時間を短縮することが可能です。詳細につきましては、アプリケーションニュースNo.L515をご参照ください。

(Ok)

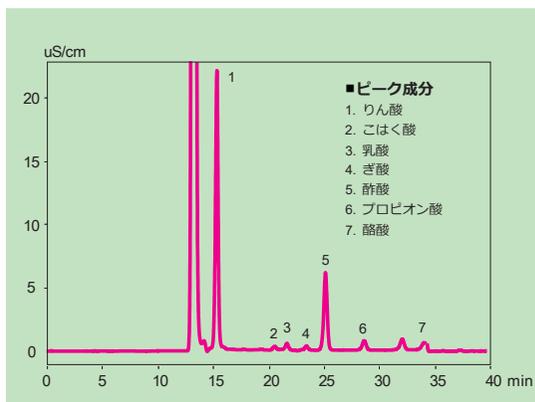


図4 マウス糞便抽出液のクロマトグラム

表2 定量結果

No.	成分	定量値 (mmol/L)
1	りん酸	7.88
2	こはく酸	0.07
3	乳酸	0.26
4	ギ酸	0.13
5	酢酸	2.69
6	プロピオン酸	0.59
7	酪酸	0.61

### [参考文献]

- 1) M. Matsumoto, R. Kibe, T. Ooga, Y. Aiba, S. Kurinara, E. Sawaki, Y. Koga, Y. Benno: Scientific Reports, 2, 223 (2012).
- 2) 星 清子, 大腸内容物の有機酸測定方法: 消化管の栄養・生理と腸内細菌, 11-25 (2011).

注) 糞便が均一に攪拌しない場合は、ホモジナイゼーション用のベッスルを用いて粉碎した後、ボルテックスミキサーにて攪拌します。

※本測定に際し、協同乳業株式会社 松本様より試料をご提供いただきました。

### 【有機酸分析移動相試薬セット】

有機酸分析移動相試薬セットは、島津有機酸分析システム用の調製済み移動相およびpH緩衝化液のセットです。開封後すぐにお使いいただけます。溶液調製にかかる時間やコストを削減できます\*。さらに、調製ミスのリスクを低減し、常に安定した分析が可能となります。



※年間約7万円のコスト削減(当社試算値)

# Introductory



HPLC 分析においては、高い圧力で多種多様の溶媒を用いるため、装置の基材には耐圧性、耐食性、耐薬品性などが求められます。また、基材への試料成分の吸着や基材からの不純物の溶出などにも留意する必要があります。今回は、ステンレス鋼、合成樹脂などの基材についてのおはなしです。

## ■ ステンレス鋼

ステンレス鋼は、耐圧性、耐食性共に優れ、送液ポンプ(図 1)、試料導入装置、切換バルブ、クロマトグラフィー管、各種流路配管をはじめ HPLC 装置を構成する多くの部品で不可欠な基材です。



図 1 ステンレス鋼製ポンプヘッド  
(ポンプ本体から外した状態、正面側)

では、ステンレス鋼とはどのようなものなのでしょうか? ステンレス鋼は、日本工業規格 (JIS G 0203:2009) において、クロム含有率を 10.5 % 以上、炭素含有率を 1.2 % 以下とし、耐食性を向上させた合金鋼と定義されており、一般には「SUS」(steel use stainless) という記号が用いられます。ステンレス鋼には、オーステナイト系(クロムニッケル系)、オーステナイト・フェライト系(クロムニッケル系)、フェライト系(クロム系)、マルテンサイト系(クロム系)、析出硬化系(クロムニッケル系)の 5 分類、計 61 種類があります。

HPLC 装置で用いられるステンレス鋼は、オーステナイト系に属する「SUS316」及び「SUS316L」(SUS316 の低炭素タイプ、「L」は「Low」の意味)であり、一般用途で広く用いられている SUS304 (「18-8 ステンレス」とも呼ばれる)に、モリブデンを添加して耐食性を向上させたものです。表 1 に、参考のため SUS316 / 316L、SUS304 の化学成分を示します。

SUS316 および 316L は、HPLC で用いられる各種溶媒に対して耐食性の高い基材ですが、ハロゲンイオン(特に塩化物イオン)により腐食することがあります。例えば、生

## HPLC装置で用いる 基材のはなし

体高分子分析などで高濃度の塩化ナトリウムを含む移動相を用いる場合、ポンプシール洗浄機構(ポンプヘッド裏側のプランジャーとポンプシール部に自動あるいは手で水を流す機構, Vol. 97, p.10 参照)を利用し、使用後は全流路を十分に水洗いすることが大切です。また、このような移動相を常時使用する時には、「Prominence イナート LC システム」のように接液部の基材として合成樹脂を用いた装置を選びます。合成樹脂基材では、金属への親和性の高い分析種の流路への吸着を抑制することもできます。

## ■ 合成樹脂

合成樹脂(プラスチック)には、数多くの種類があります。HPLC 装置で主として使用されるは、以下のものです。

- ・ ポリエーテルエーテルケトン (PEEK)
- ・ ポリプロピレン (PP)
- ・ ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)
- ・ ポリエチレン (PE)
- ・ エチレン-テトラフルオロエチレン共重合体 (ETFE)
- ・ ポリイミド

## ● PEEK

PEEK は、1980 年代に開発されたスーパーエンジニアリングプラスチックの一種で、耐熱性、耐薬品性、広い pH 適用範囲 (0 ~ 14) に加えて機械的強度、耐摩耗性が高く、さらに加工性も優れた樹脂です。前述のイナート LC システム(メタルフリー LC システム)の主要な接液部基材となっています。

PEEK は、一般の HPLC 装置においても、配管チューブや配管接続部品(フィッティングなど)の基材として馴染み深い樹脂です。PEEK 製配管チューブは、樹脂用チューブカッター(図 2)を用いて誰にでも簡単に直角断面に切断できる点、PEEK 製フィッティング(図 3)は、手締めにより工具なしでの配管接続(カラムの取り付けなど)ができる点など、ステンレス鋼に比べて扱い易いため、近年広く普及するようになりました。



図 2 樹脂用チューブカッター

表 1 SUS316および316L,SUS304の化学成分(JIS G4303:2012)

	C	Si	Mn	P	S	Ni	Cr	Mo
SUS316	≤0.08	≤1.00	≤2.00	≤0.045	≤0.030	10.00~14.00	16.00~18.00	2.00~3.00
SUS316L	≤0.030	≤1.00	≤2.00	≤0.045	≤0.030	12.00~15.00	16.00~18.00	2.00~3.00
SUS304	≤0.08	≤1.00	≤2.00	≤0.045	≤0.030	8.00~10.50	18.00~20.00	-



図3 PEEK製手締めフィッティング

なお、PEEK製チューブには、図4のように着色してある製品があります。これは内径による色分けで(表2)、小さい内径のチューブの場合、目では判別しにくいので大変便利です。



図4 PEEK製着色チューブ

表2 PEEK製チューブの色分け

内径 (mm)	色	内径 (mm)	色
0.05	橙	0.18	黄
0.075	緑	0.25	青
0.100	黒	0.50	橙
0.13	赤	0.75	緑

その他 PEEK は、クロマトグラフィー管(図5)、切換バルブ(ローターシール)、オートサンプラー(ニードルシール)など種々の部品に用いられています。



図5 PEEK製クロマトグラフィー管

PEEKの注意点は、テトラヒドロフラン (THF)、アセトン、クロロホルムなどで劣化が起ることです。これら溶媒の使用に際しては、取扱説明書などをご確認ください。

● PP

PPは、オートサンプラー用試料バイアルとして、ガラスバイアルに吸着する分析種の分析やガラスからの溶出成分が問題になる時などに用いられます。ただし、疎水性成分が吸着する場合がありますので注意が必要です。



図6 PP製バイアル

● PTFE

PTFEは、耐薬品性、耐熱性が最も優れたフッ素樹脂で、添加剤や不純物の溶出も少ないのが特長です。強酸などを用いるポストカラム誘導体化用の反応チューブとして適していますが、耐圧性が低いため背圧がかかる部分には使用できません。添加剤を含有させた強化 PTFE は、送液ポンプのプランジャーシールに用いられます。

● PE, ETFE, ポリイミド

超高分子量 PE が送液ポンプのプランジャーシールの基材として、また ETFE やポリイミドはバルブローターシールなどの基材として用いられています。

■ ガラス

ガラスの組成は多種多様ですが、HPLC 装置ではほうけい酸ガラスが移動相容器、オートサンプラー用試料バイアルなどに用いられています。表3に、ほうけい酸ガラスの組成の一例を示します。

表3 ほうけい酸ガラスの組成例

SiO <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
80.9	12.7	2.3	4.0	0.04	0.03

(単位%)

ほうけい酸ガラスは、有機溶媒による浸食がほとんどありませんが、水溶液では表3中の元素や不純物元素が溶出する可能性があります。このため、イオンクロマトグラフィーでは、試料バイアルとして一般に合成樹脂製 (PP など) が用いられます。また、試料バイアル内壁への塩基性物質の吸着にも注意が必要です。これは、主としてバイアル表面に存在するシラノール基への吸着であり、含有している微量金属イオンが影響することもあります。これらの吸着は、試料溶媒の工夫により抑えることができる場合もありますが、強く吸着する時には、表面処理や製法の工夫により吸着を抑制したバイアルや合成樹脂製バイアルを選択してください。

その他、吸光度検出器や蛍光検出器などのセル基材として幅広い波長における光透過性に優れる石英ガラス (シリカガラス) が用いられます。石英ガラスは、純粋な二酸化ケイ素 (SiO<sub>2</sub>) から成っており、不純物の量が極めて少ないのが特長です。

■ その他の基材

HPLC 装置関連では、その他シリカゲル (充填剤)、セラミック (切換バルブなど)、サファイア (プランジャー、チェックバルブ)、ルビー (チェックバルブ) などが用いられています。さらに、各種検出器においては、それぞれの原理に基づき上記以外の基材も種々使用されています。

(Mk)

[参考文献]

- 1) JIS G 0203:2009 鉄鋼用語(製品及び品質),日本規格協会(2009)
- 2) JIS G 4303:2012 ステンレス鋼棒,日本規格協会(2012)
- 3) 島津GLC総合カタログ100号,島津ジーエルシー(2013)

## talk 執筆者

### 中村 洋先生

「LCtalkの100号刊行を祝して～思い出すままに」

なかむら ひろし=公益社団法人日本分析化学会分析士会会長、  
液体クロマトグラフィー研究懇談会委員長、  
東京理科大学名誉教授

- ▶ 1968年東大薬学部卒業、1970年東大大学院薬学系研究科修士課程修了、1971年東大大学院薬学系研究科博士課程中退、同年東大薬学部教務職員、1973年東大薬学部助手、1974-1976年米国NIH留学、1976年東大薬学部助手（復職）、1986年東大薬学部助教授、1994年東京理科大学薬学部教授、1996年東京理科大学薬学部長・同大学院薬学研究科長、1996-2002年東京理科大学評議員、2005-2008年同理事、2015年同名誉教授、2009-2012年度（公社）日本分析化学会会長。

**専門分野** 分析化学、分離科学

**将来の夢** 日本分析化学会分析士資格の国家資格化

**趣味** 旅行、植物栽培



LCtalkが遂に（！）100号となりました。創刊されました1984年当時から、情報提供のあり方も随分変わって来ました。今後の展開が楽しみです……。

(Mk)

## 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

・2017年度は、以下の予定で実施されます。

■ LC/MS分析士五段認証試験

… 2017年8月3日（木）、東京

■ LC/MS分析士四段認証試験

… 2017年9月26日（火）、東京

■ LC/MS分析士三段認証試験

… 2017年10月11日（水）、東京

■ LC/MS分析士二段認証試験

… 2017年11月15日（水）、東京

■ LC/MS分析士初段認証試験

… 2017年12月19日（火）、東京・京都

・詳細は、(公社)日本分析化学会のホームページをご覧ください。

## NOW

### 執筆者

### 陰山 直子先生

「プレカラム誘導体法を用いたジペプチドの網羅的分析法」

かげやま なおこ=味の素株式会社 イノベーション研究所

- ▶ 1997年味の素株式会社入社。分析部門においてアミノ酸アナライザーを用いた検体評価、アミノ酸関連物質の分析法開発などを担当した後、現在はUF-Amino Stationを用いたメタボローム研究などに従事。

**専門分野** メタボロミクス、分離分析

**将来の夢** 世界遺産めぐり

**趣味** 旅行、映画鑑賞

**LCtalk**  
Vol. 100

発行日：2017年7月25日

編集・発行：株式会社島津製作所 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター  
編集長 三上 博久

連絡先：分析計測事業部事業企画部 “Shim-Solutions Club” 事務局  
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1  
E-mail : analytic@group.shimadzu.co.jp