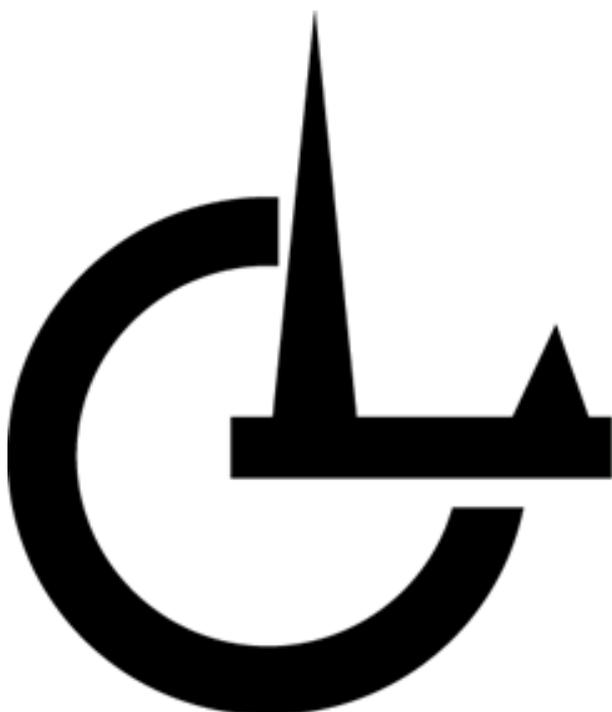


LCとLC/MSの知恵 2020年第1号(通巻第1号) 令和2年12月15日発行 ISSN 2436-1194

LCとLC/MSの知恵

Wisdom for LC and LC/MS

**The Division of Liquid Chromatography
The Japan Society for Analytical Chemistry**



(公社) 日本分析化学会

液体クロマトグラフィー研究懇談会

<https://www.lckon.org/>

LC と LC/MS の知恵

第 1 号
2020 年 12 月

目 次

巻頭言

電子ジャーナルの発刊に当たって

(LC 懇委員長、編集委員長) 中村 洋 3

祝辞

開門!!を祝す

(特定非営利活動法人・病態解析研究所) 星野忠夫 6

総合論文

シリカ系逆相固定相の姿・状態・相互作用等に関する考察 その 1

(クロマニックテクノロジーズ) 長江徳和 8

報文

タンパク質の LC/MS 分析へ向けたモノリス形シリカマイクロトラップカラム
の開発

(信和化工) 小林宏資 28

技術論文

HPLC による 1-アリアルエチルアミン類の鏡像異性体分離におけるキラル固
定相の性能比較

(住化分析センター) 西岡亮太 41

解説

テレワーク時代の HPLC システム

～ マルチメソッド LC による自動化・省力化とリモートワーク

(アジレント・テクノロジー) 郡 明雄、熊谷浩樹 50

トピックス

- スキルギャップを埋める新しいベンチマーク Analytical Intelligence
(島津製作所) 小寺澤功明、尾坂裕輔、松本恵子、渡邊京子 62

シリーズ「試料分析の定石とコツ」

企画の趣旨について

(編集委員長) 中村 洋 69

総論 (前処理編)

(東京理科大学) 中村 洋 70

会員動向

忙しいながら楽しい田舎暮らし

(元 JX 金属) 松崎幸範 77

当社における液クロ分析の状況

(フマキラー) 嶋口 翔 82

団体会員紹介

サンスターと分析技術

(サンスター) 藤田深咲 84

新会員紹介

液体クロマトグラフィーとのかかわり

(三菱ケミカル) 前中佑太 89

投稿規程

90

LC 懇話会カレンダー

92

奥付

93

【巻頭言】

電子ジャーナル「LC と LC/MS の知恵」の創刊に当たって

LC 懇委員長、「LC と LC/MS の知恵」編集委員長 中村 洋

液体クロマトグラフィー研究懇談会 (LC 懇) は、液体クロマトグラフィーに関する情報の交換、文献の紹介、見学会、講演会などを通じて、主として液体クロマトグラフオペレーターの知識及び技術の向上を図る事を目的として、1974 年に日本分析化学会 (JSAC) の下部組織として創設されました。実は、その年にいきなり LC 懇が立ち上がった訳ではなく、創設に携わった方々を中心として 1960 年代から LC 懇の前身となる任意団体 (液体クロマトグラフィー懇談会など) としての活動が有りましたので、LC 懇のルーツは半世紀以上も前に遡る事が出来ます。今年 2020 年は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の蔓延が世界中の活動を停滞させ、新型コロナウイルスと共存 (with corona) するための新しい生活様式 (new normal) への移行を余儀なくされた歴史的な年に成りました。LC 懇の活動も未だ嘗て無い壊滅的な打撃を受け、殆どの活動が中止や延期に追い込まれました。皮肉な事に、この様な混乱がこれ迄には無かった考える時間を生み、電子ジャーナル刊行の引き金を与えて呉れました。LC 懇の DNA を若い会員の方々に引き継いで戴くためにも、この機会に LC 懇が行っている活動の概略を、改めて順次ご紹介しておきたいと思えます。

筆者が星野忠夫先生 (当時、慶應義塾大学医学部) の後任として、LC 懇第 3 代目の委員長に就任したのは 1992 年の事でした。上記 LC 懇の創設目的を実現する手段として、当初は年に数回の研究懇談会 (例会) を開催していましたが、時代と共に徐々に増加し最近では 8 月を除く毎月と JSAC 年会時の計 12 回の例会を開催しています。今年はコロナ禍の影響で第 344 回例会 (2020 年 2 月 26 日) の開催を最後に、それ以降の例会は残念ながら中止 (名古屋工業大学での JSAC 年会時の第 350 回例会は WEB 形式で開催) にしました。これ迄、節目の例会は記念例会として開催して来ました {第 100 回記念例会 (1994 年)、第 200 回記念例会 (2006 年)、第 250 回記念例会 (日本における HPLC 発展の歴史と将来; 2012 年)、第 300 回記念例会 (2016 年)}。又、これとは別に、創立 30 周年記念シンポジウム (2005 年)、創立 40 周年記念式典・祝賀会 (2014 年)、創立 45 周年記念式典 (2019 年) を開催し、功労者表彰や記念誌の発行を行って LC 懇の活性化を図って来ました。

例会と同じく、定期的 (年に 1 回) な事業としては、1996 年から開始した LC テクノプラザ (2017 年から LC & LC/MS テクノプラザと改称)、2001 年から開始した 1 泊 2 日の研修会 LC-DAYs (2017 年から LC & LC/MS-DAYs と改称) の 2 大事業が有ります。又、JSAC 関東支部主催の機器分析講習会には 1980 年代から本格的に協力し、HPLC や LC/MS の基礎と応用の講習を行っています。最近では、JASIS 期間中に開催される JAIMA セミナーの中で、「これであなたも専門家—LC 編」を担当し、ガスクロマトグラフィー研究懇談会とイオンクロマトグラフィー研究懇談会と一緒に「これであなたも専門家—セパレーション

ョンサイエンス編」を共同運営しています。更に、会員相互の親睦を図る目的で 1995 年から開始した特別講演会・見学会は、関連機関の協力を得て年に 2-3 回実施しています。

一方、LC や LC/MS の普及には、座学に加えて書籍の貢献が大きいので、LC に関する様々な Q & A を LC 懇の運営委員が中心となって解説した「液クロ虎の巻」(2001 年)、「液クロ龍の巻」(2002 年)、「液クロ豹の巻」(2003 年)、「液クロ犬の巻」(2004 年)、「液クロ武の巻」(2005 年)、「液クロ文の巻」(2006 年) を初心者用の実務書として出版しました(何れも筑波出版会)。更に、アドバンストコースとして「液クロを上手に使うコツ」(2004 年)、「ちょっと詳しい液クロのコツ—前処理編」(2006 年)、「ちょっと詳しい液クロのコツ—検出編」(2006 年)、「ちょっと詳しい液クロのコツ—分離編」(2007 年)(何れも丸善)、「液クロ実験 *How to* マニュアル」(2007 年)、「動物も扱える液クロ実験 *How to* マニュアル」(2011 年)(何れもみみずく舎)を発行しました。そうこうするうち、1990 年代以降、LC の時代は LC/MS 或いは LC/MS/MS の時代に移行して行きました。そこで、時代の要請に応えるべく、「LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用」(2014 年)に始まり、「LC/MS, LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決」(2015 年)、「LC/MS, LC/MS/MS Q&A 虎の巻」(2016 年)、「LC/MS, LC/MS/MS Q&A 龍の巻」(2017 年)、「LC/MS, LC/MS/MS Q&A 獅子の巻」(2018 年)、「LC/MS, LC/MS/MS におけるスペクトル解析」(2020 年)に至る LC/MS, LC/MS/MS シリーズ(何れもオーム社)を出版しました。

一方、資格社会を反映して JSAC は 2010 年度から分析士認証制度を創始し、LC 懇が液体クロマトグラフィー分析士と LC/MS 分析士に関する試験問題の作成、並びに初段、二段、三段の試験問題の解説書の製作を担う事と成りました。解説書の作成に当たっては、1 冊ごとに 2 日に渡って査読会を開催して内容の正確性を期し、現在迄に 20 冊を刊行しています。解説書も含め、LC 懇が行う全ての出版事業は、原稿執筆と査読を原則として運営委員(現在の呼称では役員と准役員)にお願いしています。その理由は、問題作成、解説書の作成、査読作業を経た関係者が、用語に関する正しい知識と的確な表現力を自然に身に付けて呉れる様にとの配慮からです。同様に、LC 懇の役員、会員を活性化するための褒章制度として、液体クロマトグラフィー努力賞、CERI クロマトグラフィー分析賞、ベストオーラルプレゼンテーション賞、ベストポスタープレゼンテーション賞、ベストテーマ賞、ベストオーガナイザー賞、最優秀一般会員賞などを設け、優秀な個人の表彰を行っています。同じく、関連企業の育成についても CSR 的な評価を加味して、2018 年度から優良企業認定と液体クロマトグラフィー科学遺産認定を実施しています。

以上、LC 懇の主要事業についてご紹介しましたが、この度、LC 懇の広範な活動で唯一欠けていた機関誌を整備すべく、会員の発表の場として電子ジャーナル「LC と LC/MS の知恵」(「Wisdom for LC and LC/MS」)を会員誌として発行する運びとなりました。その切っ掛けは、COVID-19 の影響拡大で暫くは対面形式での例会開催が見込めない事を補填する発想でした。しかし、刊行迄に準備しなければならない内容を煮詰めて見ると、予想以上に負担が大きく、“繋ぎ”ではなく寧ろ定期刊行物として継続的な事業とした方

が、長い目で見て会員のためになるとの判断に達した次第です。

本誌は、LC、LC/MS 或いは関連手法に関する有らゆる内容を対象としており、投稿戴けるジャンルとしては報文、ノート、技術論文、速報、総合論文、解説、人物紹介、トピックス、提言、などが有ります。この他にも、巻頭言、シリーズ「試料分析の定石とコツ」、LC 懇事業カレンダーなど（原稿は募集せず）も随時掲載して行く予定です。本誌の内容に関するご意見・提言を、奥付に記載した編集委員にお知らせ戴ければ幸いです。又、本誌は所謂オープンアクセスジャーナルですので、どなたでも制限なく閲覧出来ます。当面は、年間に 2 回（秋季と春季）の発行ですが、軌道に乗り次第、編集委員会を拡大し季刊を目指す計画です。会員の皆様のご支援とご投稿を心よりお願い申し上げます。

最後に、LC 懇の活動は以下に掲げる各種小委員会（五十音順、カッコ内は責任者、敬称略）に所属する役員・准役員のご尽力の賜物である事を明記し、心より御礼申し上げます；Web 対応（小林宣章）、会員増強（熊谷浩樹）、会場予約（伊藤誠治）、活性化（三上博久）、見学会（東日本：小林宣章、西日本：小林宏資）、書記（竹澤正明）、褒賞（岡橋美貴子）、例会受付（坂 真智子）。

2020 年 11 月吉日

引用文献

- 1) 中村 洋企画・監修、創立 45 周年記念誌「日本における LC, LC/MS 発展の歴史」、(公社) 日本分析化学会・液体クロマトグラフィー研究懇談会 (2019) .

<執筆者略歴> 中村 洋 (Hiroshi NAKAMURA)

1968 年東京大学薬学部製薬化学科卒業（田村善藏教授）、1970 年同・大学院薬学系研究科修士課程修了、1971 年同・大学院薬学系研究科博士課程中退、1971 年同・薬学部教務職員、1973 年同・薬学部助手、1974 年薬学博士（東京大学）、1974 年-1976 年米国 NIH Visiting Fellow、1976 年東京大学薬学部助手（復職）、1979 年日本分析化学会奨励賞、1986 年東京大学薬学部助教授（中嶋暉躬教授）、1984 年度-1985 年度「分析化学」編集理事、1987 年度-1988 年度



「Analytical Sciences」編集理事、1994 年東京理科大学薬学部教授、1996 年-2000 年同・薬学部長・研究科長、1996 年-2002 年同・評議員、2005 年-2008 年同・理事、1998 年日本分析化学会学会賞、1996 年-1997 年同・庶務理事、1999 年度同・筆頭副会長、2000 年度同・関東支部・支部長、2009 年度-2012 年度同・会長、2007 年度-2008 年度私立大学環境保全協議会・会長、2010 年度-2011 年度日本化学連合・理事、ICAS2001 組織委員会副委員長。現在、ISO/TC47 (chemistry) 国際議長・国内委員長、分析士会・会長、生涯分析談話会・会長、千葉県分析化学交流会・会長など。

【祝辞】

開門!!を祝す

特定非営利活動法人・病態解析研究所 理事長 星野忠夫 (Tadao HOSHINO)

Don't miss the coming issue plan of "Wisdom for LC and LC/MS" by the LC Research Meeting. Mark it on mind! 自分へのメモである。

やっと開門と嬉しく感じた。永い間実現できなかった液クロ研究懇談会の会員誌「LC と LC/MS の知恵」(Wisdom for LC and LC/MS) の発刊である。事情に縛られ実現出来なかった積年の夢がやっと実現する。会員誌の発刊が出来ない背景には、会に発刊能力が無い場合と会に発刊能力があっても何らかの制約が有る場合の二つがある。本会の場合は後者であった。300 回記念誌「年を重ねた厚み-会誌だけ無い」で触れたが、その経過をあらためて振り返って見る。

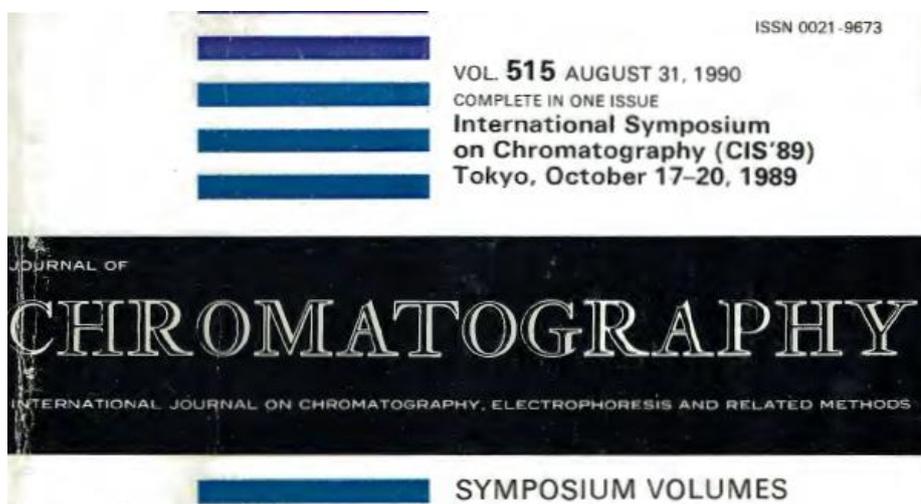
創始の「液体クロマトグラフィー談話会」は、共存分析に無い分離分析の利点に魅せられた同好の志が、日常に実戦的に役立つ液クロ情報を交換会する目的で 1966 年に始まった。物質の測定は真値を求めて行なうが叶わない。観察値は測定での不確かさを含み、表示される数値は真値を含むと期待される測定幅の内に在る。測定法・測定機器・測定環境・測定者など、測定諸条件に起因する測定の系統誤差や無作為誤差でその幅が示される。その中で、夾雑物質を除き測定目標物質を単離し測定する分離分析には、共存分析に期待出来無い利点があると魅せられた仲間が参集し、時に応じて、ホテルのロビー・喫茶店・大学の研究室や用務員室で分離分析に関わる情報を交換し合った。

談話会/1966、懇談会/1970 と変身していく中で、本会への参加者が増え事務量も増大した。研究懇談会/1974 への移行では日本分析化学会へ事務を渡し、研究懇談会会員は、原則日本分析化学会会員としてその傘下で活動することに成った。

1979 年、研究懇談会は、東京以外の地域で原則開催の小討論会を企画、年 4 回の研究懇談会例会、討論会、小討論会を開催することになった。世話人会内部で会誌や刊行物の出版を望む声が挙がったが、一方で、分析化学会本部の意向として、研究懇談会の会誌発行にブレーキが掛かかり、他の研究懇談会とのバランス上、大きな負担と成っている研究懇談会事務を省きたいと云う申し入れがあった。日本分析化学会の研究懇談会受託業務の破棄は、研究懇談会の存続に乗り越えざるを得ない大きな曲がり角となった。

これを受け、研究懇談会世話人会で、①研究懇談会事務局を慶応大学に移転させること、②研究懇談会とは別組織の「クロマトグラフィー科学会クロマト科学会」を設立すること、③研究懇談会の活動内容を再検討することとを方針としたが、研究懇談会としての会員誌の発行は見送られた。研究懇談会は、日本分析化学会の傘下として残り、事務局を小生所属の慶応大学に移し、運営委員長を兼任した。この時にも液クロ研究懇談会の会員誌発刊は実現しなかった。

1984 年頃は、研究懇談会は日本分析化学会の下部組織として HPLC に関する情報交換、文献紹介、講演会等を通じて、主として液体クロマトグラフオペレーターの知識・技術の向上を目的として活動した。会合参加者には研究懇談会年会費と会場費を負担して頂いたが定着し、例会には 200 人超え、討論会には 700 人超えの参加者が見られるようになっていた。1988 年 10 月、小討論会を継続するとして、奥山氏を会長にクロマトグラフィー科学会(クロマト科学会)が発足し、1989 年に機関紙「CHROMATOGRAPHY」Vol. 11、No.1 を創刊した。クロマトグラフィー科学会との分離後、研究懇談会は、年 4 回の研究懇談会例会、討論会、を開催する傍ら、積年の国際会議 CIS'89 の準備を行い、日本都市センターを会場に 1989 年 10 月開催し、745 名の参加者を得て成功裏に閉会、ドル建て会議録で(写真)、可成りの為替差収益を得た。



1992 年、運営委員長を現委員長中村洋氏と交代した。彼の D51 と思われる牽引力は相当で、会議録出版為替差収益の有効利用、液クロ虎の巻(2001 年)を初めとする啓蒙書籍の発刊や LC-Days の発足で感じられる。

”開門!! ”、遅きに失する感はあるが、液クロ研究懇談会の会誌「LC と LC/MS の知恵」が発刊される。ISSN 登録は必須。大歓迎である。D51 の健在を知り、次の D51 出現を期待している。

特定非営利活動法人・病態解析研究所 理事長



【 総合論文 】

シリカ系逆相固定相の姿・状態・相互作用等に関する考察 その 1

株式会社クロマニックテクノロジーズ 長江徳和

Consideration on appearance, state, interaction, etc. of silica-based reversed phase stationary phase - Part 1

Norikazu NAGAE

ChromaNik Technologies Inc., 6-3-1 Namiyoke, Minato-ku, Osaka 552-0001, Japan

(Received August 3, 2020 ; Accepted August 27, 2020)

要旨

逆相クロマトグラフィーで用いられるシリカ系逆相固定相について、以下の事柄を考察した。固定相の種類により、分離の選択性は変わるが、保持そのものは炭素含有量により決まる事が多く、炭素一個分の差がある化合物の分離係数は、保持時間が同じになる様に移動相中の有機溶媒濃度を調整すると、C1 から C30 の全てのアルキル基固定相で同じであった。有機溶媒濃度が 5 %以下の移動相を用いた時の保持の減少は充填剤細孔内から移動相が抜け出す事により起こり、これは毛管作用が働いている。逆相固定相は移動相の有機溶媒の種類により膨潤度合いが異なり、メタノールでは殆ど膨潤しないが、テトラヒドロフランではアルキル基が立ち上がる程膨潤した。有機溶媒の種類による分離は移動相の変化と共に固定相の変化も寄与していると考えられ、膨潤による固定相の容量が増える事により、保持は増加した。

1. はじめに

1969 年にカーランドにより発表された HPLC (high pressure liquid chromatography)¹⁾は半世紀以上の歳月が経過し、様々な改良がなされ高性能化が進み、医学・薬学、食品、環境、工業製品等多くの分野での分離分析の手法として欠かす事の出来ないものとなっている。HPLC の分離モードは順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等があり、用途によって使い分けされている。これらの分離モードのなかでも逆相クロマトグラフィーは様々な分野で最も多用されており、シリカ系逆相固定相も日々開発・改良され続けている。シリカ充填剤表面に逆相の代表的な固定相である C18 を結合した後もシリカ表面には 2/3 程度のシラノール基が残っている。この残存シラノール基の影響による塩基性化合物のテーリング等が問題視されてきた。1970 年代は移動相にトリエチルアミンを添加する事により残存シラノール基の影響を防ぐ事が主流であったが、1980 年代に入ると、残存シラノール基にトリメチルシラン(TMS)を結合させ、残存シラノール基の影響を少なくする(エンドキャッピングと言われる)事が多くのカラムメーカーで行われるようになった。しかしこの様にエンドキャッピングを施したとしてもシリカ表面のシラノール基はまだ半分程度残っている²⁾と言われていた。1990 年代以降エンドキャッピング技術は進化を遂げ、エンドキャッピ

ングによるシリカ表面の疎水化により、pH 10 程度のアルカリ性移動相条件でも、シリカ系逆相カラムは使用出来る様になった³⁾。又 C18 固定相 (カラム) は水の割合が高い水系移動相条件では、保持時間が安定せず、時間の経過と共に C18 アルキル基がシリカ表面に倒れ込み、保持時間が減少する事が 1980 年に報告⁴⁾された。その後 2000 年までの 20 年間に多くの研究者が、アルキル基が立ち上がって、移動相に濡れている状態から、アルキル基が倒れ込み、移動相に濡れなくなる事による保持時間の減少を報告した。この現象を Dewetting という言葉を用いて説明する論文も出て来た。筆者は、2000 年に水系移動相条件における保持時間の減少について、アルキル基の倒れ込みは関係なく、充填剤細孔内からの移動相の抜け出しが原因である事を発表した⁵⁾。その後アルキル基が倒れ込む事により固定相表面と移動相が濡れなくなり、その結果充填剤細孔内から移動相が抜け出すとする論文⁶⁾も出て来た。2000 年以前はアルキル基の倒れ込み論が盛んに議論されていたが、2005 年以降はコンピューターシミュレーションによるアルキル基の存在状態が考察され⁷⁾、アルキル基は立ち上がっている事はなく固まった状態である事が示された。2000 年以前は、多くのクロマトグラファーはアルキル基が立ち上がって移動相に濡れた状態でないと、相互作用が起こらず、分離出来ないと考えていた。しかし分液ロートを用いてヘキサンと水との間で溶質を分配する場合には、ヘキサンと水は混ざり合う事なく、それぞれの界面が 0.2 から 0.3 nm 離れて接しているだけであるが、溶質が両溶媒に分配する事を考慮すれば、逆相クロマトグラフィーにおいても同様に固定相と移動相がある隙間を維持した界面で接していれば分配は問題なく起こる事になる。つまり、固定相と移動相は濡れる必要はなく、ヘキサンと水の様に界面で接触していれば溶質は分配し、分離が達成される事になる。この様に二十数年前に常識的に語られていた事柄が、実はそうではない事は、科学の進歩に伴い多々出現すると考えられる。逆相クロマトグラフィーにおける固定相又は移動相の状態や溶質との相互作用等、従来とは異なった観点から見れば、新しい発見、考え方や見え方が出来る可能性がある。本報告ではシリカ系逆相充填剤・逆相カラムに関わる事項として、「アルキル基の長さの分離への影響」、「水系移動相使用時の保持の変化」、「メタノール/水移動相の C18 固定相への濡れ性」、「アルキル基の有機溶媒和と分離特性」を「その 1」として本稿で考察し、「C18、C8、C30、Phenyl-hexyl、Phenethyl、Biphenyl、PFP 固定相の分離特性」、「アルキル基シリル化試薬のモノ・ジ・トリ官能基による耐久性への影響」、「コアシェル粒子の特徴：摩擦熱・カラム外死容積の影響」、「新しい考え方によるエンドキャッピング」は「その 2」として次の機会に報告する。

2. アルキル基の長さの分離への影響

2.1 アルキル基固定相の保持力

逆相クロマトグラフィーで使用されるアルキル基固定相は C30、C18、C8、C1 (TMS、トリメチルシリル化) 等があり、それぞれのアルキル基の疎水性により保持力が決まると多くのクロマトグラファーが考えている。「C18 固定相は C8 固定相より疎水性が高いので、C18 カラムの方が C8 カラムより保持が大きい。」ともしばしば言われている。実際に同じ平均細孔径 12 nm、比表面積 340 m²/g のシリカ基材から製造されエンドキャッピングを施した C18 カラムと C8 カラムを比較すると、ほぼ C18 カラムの方が C8 カラムよりも保持が大きくなる。しかし同様に C30 カラムと C18 カラムを比較すると、C30 トリアコンチル基は嵩高く、結合密度が上がらず、結果として C30 充填剤は C18 充填剤とほぼ同じ炭素含有量となり、C30 カラムと C18 カラムの保持はほぼ同じであった。それぞれの充填剤の炭素含有量を比較すると、C30 充填剤は 18 %、C18 充填剤も 18 %、C8 充填剤は 11 %であった。又、C18 オクタデ

シル基の結合密度を敢えて低くし、炭素含有量を 11 %とした C18 充填カラムは、炭素含有量 11 %の C8 カラムとほぼ同じ保持であった。以上の事から保持力はアルキル鎖長ではなく充填剤の炭素含有量でほぼ決まる事が分かる。

表 1 にメタン、オクタン、オクタデカン及びトリアコンタンの疎水性 ($\text{Log}P$) と水への溶解度を示す。 $\text{Log}P$ は n -オクタノールと水への分配濃度比の対数である。オクタンとオクタデカンの $\text{Log}P$ の差は 4、オクタデカンとトリアコンタンの $\text{Log}P$ の差は 4.91 である。これは n -オクタノールと水への分配濃度比が 10,000 倍以上異なる事を示しており、非常に大きな疎水性の差になる。しかし水への溶解度がオクタデカン及びトリアコンタンは極端に低い事から、この水への溶解度の低さが疎水性に大きく反映していると考えられる。実際の逆相クロマトグラフィーの保持はブチルベンゼンの様な溶質の移動相と固定相への分配量比により決まるのであって、オクタデシル基固定相自体の水への分配や溶解度は溶質の保持には無関係である。

表 1 メタン、オクタン、オクタデカン、トリアコンタンの疎水性と水への溶解度

	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
疎水性($\text{Log}P$)	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	22.6	0.66	0.006	8.84×10^{-10}

固定相と移動相への溶質の分配が主な分離機構とされる逆相クロマトグラフィーにおける保持係数 k と溶質の固定相と移動相への分配比 K_D は以下の式で示される。

$$k = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M}$$

$$K_D = \frac{S_D}{M_D}$$

$$k = K_D \times \frac{V_S}{V_M}$$

S は固定相中の溶質の存在量、 M は移動相中の溶質の存在量、 S_D は固定相中の溶質の分配濃度、 M_D は移動相中の溶質の分配濃度、 V_S は固定相の体積 (容積)、 V_M は移動相の容積である。保持係数 k は分配比 K_D とは異なり、保持係数は固定相と移動相への溶質の分配量の比であるのに対し、分配比は固定相と移動相への溶質の分配濃度比である。従って、上記の保持係数の式にある様に保持係数は分配比に固定相の体積 (容積) を乗じ、移動相の容積を除いたものである。異なる炭素含有量の C18 充填剤を製造し

表 2 C18 カラムと C8 カラム物性値

固定相	炭素含有量	結合密度	固定相体積	移動相体積
C18 (A)	18 %	$2.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.4 mL	1.6 mL
C18 (B)	11 %	$1.2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL
C8	11 %	$2.4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL

★固定相：シリカ基材の細孔径、12nm、一官能性試薬+エンドキャッピング、
移動相：メタノール/水=70/30、温度：30 °C

た場合、同じ C18 固定相であるので、分配比は同じであると仮定すると、固定相と移動相の体積（容積）比が保持係数に関わって来る。つまり固定相と移動相の体積比（固定相体積/移動相体積）が 1/2 になると保持係数も 1/2 になる。表 2 に炭素含有量 18 % と 11 % の C18 充填剤と 11 % の C8 充填剤の結合密度、固定相体積及び移動相体積を示す。これらの値から表 2 の 3 種の充填剤の保持係数と分配比の関係を以下に示す。

$$\text{C18 と C8 固定相分配比 } (K_D) \text{ は } K_{D_{C18}}, K_{D_{C8}} \quad K_D = \frac{S_D}{M_D}$$

$$\text{C18 (A) の場合} \quad k_{C18} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.4}{M_D \times 1.6} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.25 = 0.25 K_{D_{C18}}$$

$$\text{C18 (B) の場合} \quad k_{C18} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_{D_{C18}}$$

$$\text{C8 の場合} \quad k_{C8} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_{D_{C8}}$$

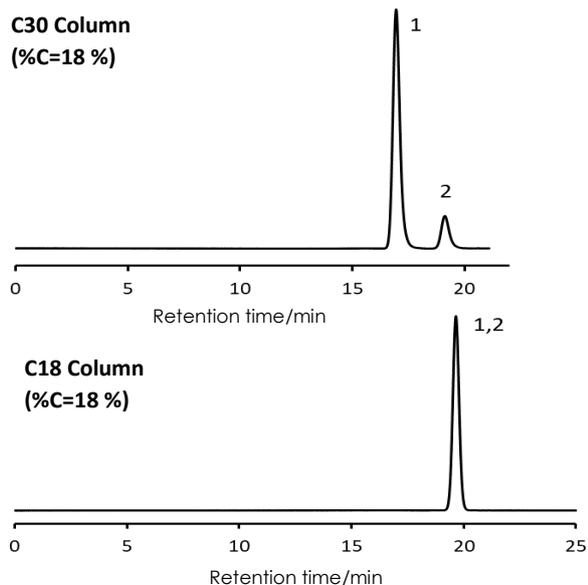
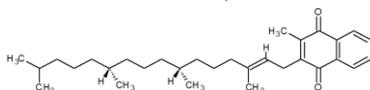
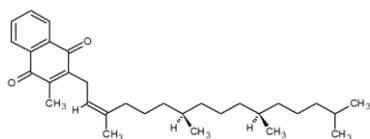


図 1 異性体（ビタミン K1）の分離
Column, Sunrise C30 3 μ m, 150 x 4.6 mm, company A C18 3 μ m, 150 x 4.6mm; mobile phase, methanol/water=99/1; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 15 $^{\circ}$ C; detection, UV at 250 nm; peaks, vitamin K1 isomers (*trans* and *cis*),

1 = *trans*,



2 = *cis*.



炭素含有量 18 % と 11 % の C18(A) と C18(B) の保持係数 k はそれぞれ $0.25K_{D_{C18}}$ と $0.13K_{D_{C18}}$ となり、同じ C18 固定相であれば炭素含有量が異なっても $K_{D_{C18}}$ 値は同じであるとすると、保持係数については、C18(A) は C18(B) のほぼ 2 倍になり、これは実験結果と一致する。又、同じ炭素含有量 11 % の C18(B) と C8 を比較すると、保持係数はそれぞれ $0.13K_{D_{C18}}$ と $0.13K_{D_{C8}}$ となる。実験結果は両カラムでほぼ同じ保持係数を示したことから、C18 と C8 の分配比 $K_{D_{C18}}$ と $K_{D_{C8}}$ はほぼ同じ値となる。これは例えば溶質としてのベンゼンにペンチル基が結合したアミルベンゼンから見れば、メタノール/水移動相と C18 固定相への分配比率は、メタノール/水移動相と C8 固定相への分配比率と同じであり、オクタデカンとオクタンの疎水性を比較すれば、当然ながらオクタデカンの方が高いが、アミルベンゼンの分配比率から比較した場合には、C18 固定相と C8 固定相には大きな差がない事になる。同じ炭素含有量 18 % の C30 充填剤と C18 充填剤も保持がほぼ同じ事から、同様に、C30 固定相と C18 固定相もアミルベンゼンの分配比率から比較した場合には、大きな差がない事になる。極端な例として、同じシリカ基材を用い炭素含有量が 11 % になる様に結合量を調整した C30 カラム、C18 カラム、C8

カラムは、全てのカラムでアミルベンゼンはほぼ同じ保持を示す事になる。アルキル鎖長の異なる固定相は、炭素含有量が同じであれば、アミルベンゼンの様な溶質の保持はほぼ等しいが、当然の事ながら分離における選択性は異なる。図 1 には炭素含有量 18% の C30 カラムと C18 カラムを用いたビタミン K1 の分離を示す。ビタミン K1 は *trans* 体と *cis* 体の異性体成分が混ざっており、C18 カラムでは分離出来ないが、C30 カラムでは分離している。これは C30 固定相と C18 固定相の選択性が大きく異なる一例である。ここで留意すべきは、後の項目で詳しく述べるが、メタノール/水移動相の場合、アルキル基固定相は倒れ込みほぼ固まった状態である事、及び、移動相中のメタノールの一部は固定相に溶媒和しており、この溶媒和したメタノールも固定相の一部と考えられる事であるが、この溶媒和したメタノールは保持には殆ど影響していないものとして考察した。

2.2 アルキル基固定相の炭素一個分の差の認識力

逆相固定相(カラム)の疎水性を比較するパラメーターとして、アミルベンゼンの保持係数(保持時間)や炭素一個分の差の有るアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数を用いて分離特性等の議論がされている。表 3 には同じシリカ基材に一官能性シリル化試薬を結合後、同じエンドキャッピングを施した C30、

表 3 C30、C18、C8、C1 固定相の炭素含有量と疎水性

固定相	炭素含有量	分離係数	保持係数
		α (アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	アミルベンゼンの保持係数
C30	18 %	1.72	18.9
C18	18 %	1.68	19.7
C8	11 %	1.55	9.4
C1	4.5 %	1.43	2.3

★固定相：シリカ基材の細孔径、12nm、一官能性試薬+エンドキャッピング、移動相：メタノール/水=70/30、温度：30℃

C18、C8 及び C1 固定相の炭素含有量、疎水性としてアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数、更にアミルベンゼンの保持係数を示す。前項で記述している様に C30 固定相と C18 固定相は炭素含有量が同じ 18% であり、アミルベンゼンの保持係数もほぼ同じであった。C8 固定相は炭素含有量が 11% で保持係数は C18 固定相に比べ約半分であった。疎水性のもう一方の指標であるアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数は、アルキル鎖長が短い程小さくなった。これはアルキル鎖長が長い程疎水性が高い事を示している様に見える。これはアミルベンゼンの保持係数が固定相毎に異なっており、保持時間が大きく異なる条件でのアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数を比較している。保持係数(k)と分離度(R)の関係を以下に示す。

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k+1} \right)$$

N は理論段数、 α は分離係数である。この式は保持係数 k の値により分離度が変わる事を示している。そこで同じ移動相条件ではそれぞれの固定相で保持時間が大きく異なるので、移動相の有機溶媒濃度を変え、同じ保持時間で比較を行った。C30、C18、C8 及び C1 カラムを用いエチルベンゼンの保持時間が約 8.2 分になる様に移動相中のメタノール濃度を調整した時の標準試料のクロマトグラムを図 2 に示す。炭素一個分の差であるエチルベンゼン (ピーク 6) とトルエン (ピーク 4) のピークを比較すると、全てのカラムではほぼ同じ溶出時間であった。この事は同じ保持時間になる様に調整した条件下では、どの固定相でも炭素一個分の差をもつ化合物の分離係数は同じになり、炭素一個分の差を認識する能力は同じである事を意味している。炭素一個分の差をもつ化合物の分離係数を疎水性のパラメーターとした場合、

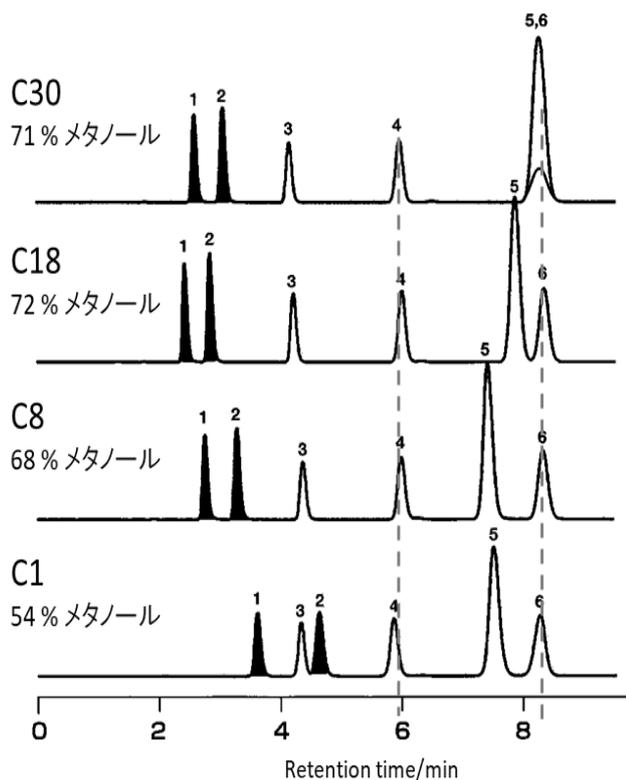


図 2 エチルベンゼンの保持時間を合わせた場合の標準試料の分離

Column dimension, 150 x 4.6 mm; Mobile phase, methanol/water, 有機溶媒濃度は図中に表示; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 30 °C; peaks, 1 = methylparaben, 2 = ethylparaben, 3 = benzene, 4 = toluene, 5 = naphthalene, 6 = ethylbenzene.

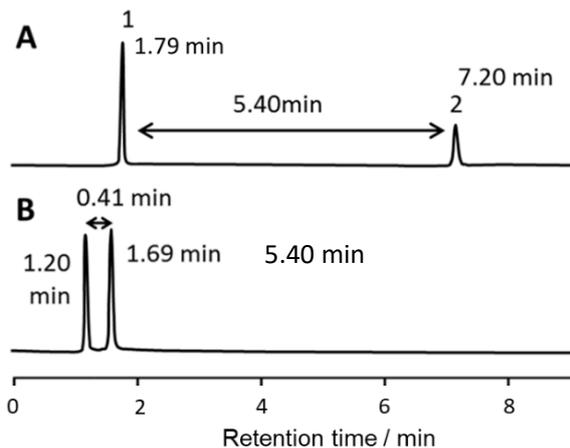


図 3 水移動相条件下の C18 カラムの保持挙動 (A)は初期状態、(B)は 1 時間送液停止後再度測定; Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μm dp C18, 10-nm pore size; mobile phase, water; flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 40 °C; detection, refractive index; peaks, 1 = sodium nitrite (t_0), 2 = 2-propanol. カラムの出口と検出器の間に 1.7 MPa の背圧をかける。

同じ移動相条件では炭素含有量が高く保持時間が長くなる程、疎水性が高い傾向があるが、保持時間が一定になる様に移動相条件を調節すると、炭素含有量やアルキル鎖長に関係なく、疎水性は全ての固定相で同じであった。前項でも述べたが、それぞれの固定相で分離選択性は異なるため、図 2 に示されている極性の高いメチルパラベンやエチルパラベン及び二重結合の多いナフタレンの保持時間や溶出パターンは固定相間で異なっている。特に C1 固定相ではエチルパラベンがベンゼンより長い保持時間であり、溶出順序が逆転した。

これまで述べてきた様に、固定相の疎水性について、*n*-オクタノールと水にオクタデカンやオクタンが分配する場合 (疎水性のパラメータ $\text{Log}P$) とアミルベンゼンの様な溶質がメタノール/水移動相とオクタデカンやオクタンに分配する場合(保持係数)、つまり、オクタデカンやオクタンが分配する場合と、分配される場合とでは全く異なる結果となった。従来とは異なる視点で逆相固定相を眺めた時には、「C18 固定相は C8 固定相より疎水性が高いので、C18 カラムの方が C8 カラムより保持が大きい。」は間違っている事になる。今までの議論はメタノール/水移動相を用いており、固定相と移動相との相溶性が高くない場合であったが、後の項目で述べる様に、オクタデカンを溶かしてしまうような有機溶媒を用いた有機溶媒/水移動相を用いると、アルキル鎖長に関係した保持挙動を示すようになる。

3. 水及び緩衝液を移動相として用いた場合の逆相固定相

3.1 水を移動相として用いた場合の C18 カラムの保持挙動

C18 固定相を代表とする逆相固定相において、100 %水系の移動相を用いた場合、保持が減少する事はよく知られている。従来 90 %以上の、特に 95 %以上の水を含む移動相は保持の再現性が低くなるため、これらの移動相は逆相固定相では避けるべき移動相として扱われて来た。図 3 には細孔径 10 nm の

C18 固定相と水移動相を用いた場合の亜硝酸ナトリウムと 2-プロパノールの 40 °C での保持の変化を示す。ホールドアップタイム(t_0)を測定する成分として亜硝酸ナトリウムを用いた。C18 カラム内を水移動相に置換し、更に保持を測定する間、カラム出口と検出器の間 (以後カラム出口以降と称す) に背圧を掛けた。1 時間以上送液しカラムが安定した後、試料を注入して得られたクロマトグラムを上段の A に示す。又、その後 1 時間送液ポンプを停止し、その後再度送液開始し得られたクロマトグラムを下段の B に示す。1 時間の送液停止後の亜硝酸ナトリウムの溶出時間(t_0)と 2-プロパノールの保持時間が両方共減少した。1 時間の送液停止前のクロマトグラム A ではホールドアップタイムから 2-プロパノールが溶出する迄 5.40 分掛かったが、1 時間の送液停止後のクロマトグラム B では 0.41 分であった。一般にはホールドアップタイムの減少は考えられないが、ホールドアップタイムの減少が起こった。

3.2 アルキル鎖長及び充填剤細孔径の影響

細孔径の異なる 5 μm のシリカゲルにアルキル鎖長の異なる、C30、C18、C8 及び C1 (TMS、トリメチルシラン) の一官能性シリル化試薬を過剰量で反応させ、更に TMS でエンドキャッピングを施した各充填剤について、1 時間の送液停止前後の保持時間の減少を 10 mmol/L リン酸塩緩衝液移動相で測定^{5, 8, 9)}した。その結果を図 4 に示す。横軸の細孔径はシリカ基材ではなく、それぞれの固定相 (アルキル基) が結合した後の窒素ガス吸着法により測定した充填剤の細孔径である。アルキル鎖長が異なっても、細孔径が大きい程ポンプ停止後の相対保持時間は 100 % 近くになり、細孔径が小さい程相対保持時間は減少した。細孔径 15 nm の比較では C18 より C8 の方が保持時間の減少率は大きく、又 C18 が 80 % の保持時間減少を示す細孔径 10 nm

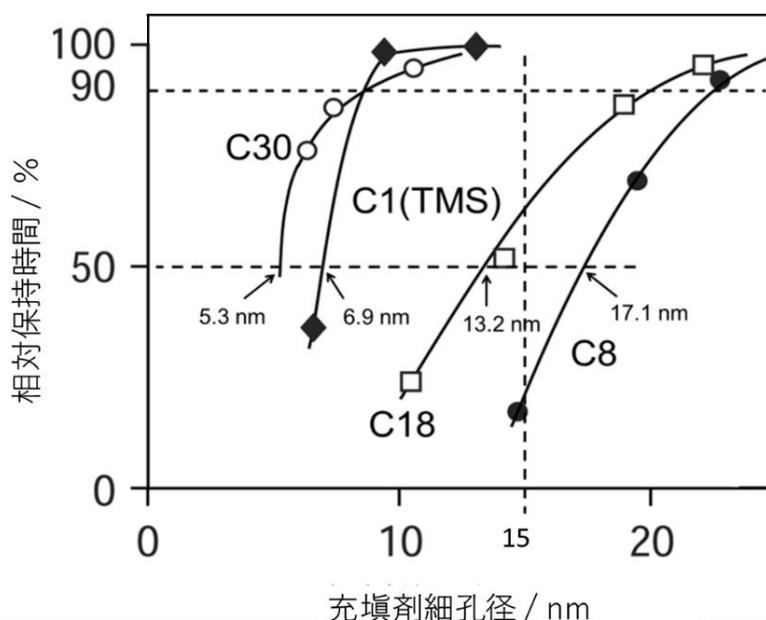


図 4 充填剤細孔径と水移動相条件下の相対保持時間との関係
Column, C30 (○), C18 (□), C8 (●), and TMS (Tri-methylsilyl silica) (◆); column dimensions, 150 mm x 4.6 mm; mobile phase, 10 mmol/L phosphate buffer (pH7.0); flow rate, 1.0 mL/min; column pressure, 6.0 MPa; temperature, 40 °C; detection, UV at 250 nm; sample, thymine. 相対保持時間は初期に対する 1 時間送液停止後の相対値とする。

nm でも C30 は数%のみの保持時間の減少であり、C8 からアルキル鎖長が長くなる程、保持時間の減少し始める細孔径が小さくなった。アルキル鎖長の最も短い C1 は 8 nm 以下の細孔径で急激に保持時間は減少した。相対保持時間が 90 % 以上になるそれぞれの固定相の細孔径は、C8 が 22 nm 以上、C18 は 20 nm 以上、C30 と C1 は 8.5 nm 以上であった。

3.3 保持時間が減少する原因

アルキル基の寝込みにより保持時間が減少するのであれば、細孔径が 22 nm 以上の C8 や C18 固定相

の保持時間の減少度合いが少ない事は、アルキル基が寝込んでいない事になるのか。又、C18 は物理的にアルキル基の寝込みは起こり得ないが、8 nm 以下の細孔径では保持時間は減少した。これらの結果によりアルキル基の寝込みでは保持の減少を説明出来ない事が確認された。図 3 での実験において、ポンプ停止後ポンプ出口での圧力表示が 0 MPa になった後、直ぐにカラム in 側のカラムエンドに密栓をし、カラム出口を観察すると移動相の溶出が認められた。その移動相の溶出量を測定すると、初めの 1 分間で 0.3 mL、その後の 9 分間で 0.29 mL の移動相がカラムからの溶出する事が確認された。溶出量は合計で 0.59 mL であり、図 3 の 1 時間ポンプ停止後に亜硝酸ナトリウムの溶出時間(ホールドアップタイム)が短くなった分(容量)に一致した。つまり、ポンプを停止し放置している間にカラム内から移動相が抜け出ている。カラム内部の粒子間隙又は充填剤細孔内部のどちらか、又は両方から移動相が抜け出ている事になるが、次項以降に述べられている様に、毛管作用により充填剤細孔内部の移動相が抜け出たと結論¹⁰⁾付けられた。図 5 にポンプ停止後の充填剤細孔内からの水(移動相)の抜け出す状態の概略図を示す。充填剤の周りに圧力が掛かっている場合には水は充填剤細孔内に浸透しているが、送液ポンプを停止し、充填剤の周りに圧力が掛かっていないと水は抜け出てしまう。溶質は固定相と移動相とに分配して保持されるが、充填剤細孔内に移動相が存在しておらず、固定相の大部分は充填剤細孔内にあり、移動相が抜け出た細孔内では固定相と移動相との相互作用が起こらないため、保持時間が減少したと考えられる。

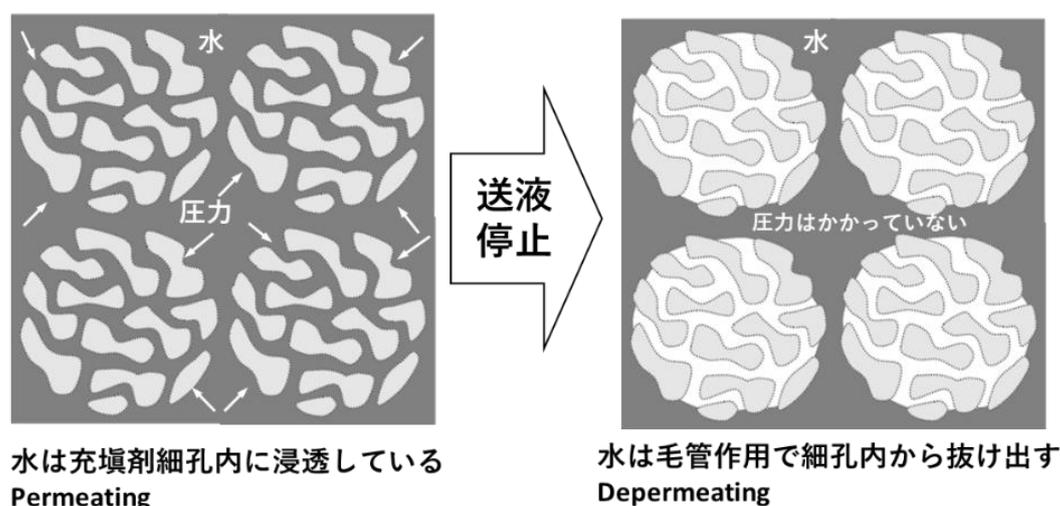


図 5 C18 充填剤の細孔内の水の存在状態の概略図

3.4 毛管現象

毛管作用は次式で表される。

$$h=2\gamma\cos\theta/r\rho g$$

ここで h は毛管の内外の液面の高さ、 r は管の半径、 ρ は液体の密度、 γ は液体の表面張力、 θ は接触角、 g は重力加速度である。ガラス製の細管は水に濡れる、即ち接触角が 90 度以下であるため、水にガラス細管を接触させると重力に反して細管内を水面は上昇する。又、ポリテトラフルオロエチレン (polytetrafluoroethylene、PTFE) 細管は水に濡れない、即ち接触角が 90 度以上であるため PTFE 細管を水に接触させるとガラス細管とは逆に水面は下がる様になる。逆相充填剤の細孔内部は C18 等のアル

キル基が結合しており、PTFE 細管と同様に水に濡れないために、毛管現象により、細孔から水を抜け出させる力が働く。図 4 に示されている様に、充填剤細孔径が小さくなる程保持が減少しているのは毛管現象によるもので、毛管作用の式が表している液面の高さの管の半径は反比例関係であり、充填剤細孔径が小さい程、毛管作用により発生する細孔内から移動相を抜け出させる力が大きくなる事を示している。又、毛管作用の式の他のパラメーターとして、液体の密度 ρ と液体の表面張力 γ が作用しているが、移動相の塩の種類・濃度やカラム温度を変える事により、これらのパラメーター値は変化する。例えば水のみ、10 mmol/L 酢酸アンモニウム及び 100 mmol/L 酢酸アンモニウム移動相を用いて、40 °C でポンプ停止 1 時間後の保持時間の減少率を比較すると、塩濃度が高い程保持時間の減少率は低く、水のみ移動相では 90 % 以上であるが、100 mmol/L 酢酸アンモニウム移動相は 70 % であった。更に 1-オクタンスルホン酸ナトリウム等のイオン対試薬を 10 mmol/L のリン酸塩緩衝液と共に移動相として用いると、1 mmol/L の 1-オクタンスルホン酸ナトリウムの場合には保持時間は 50 % 減少するが、10 mmol/L の 1-オクタンスルホン酸ナトリウムでは保持時間の減少率は 0 % で、保持時間の変化は認められなかった。塩やイオン対試薬の添加は移動相の表面張力を下げるために、毛管作用が減少したと考えられる。又イオン対試薬の場合にはこのイオン対試薬の極性部が表面に出る様な状態で固定相に吸着するため、イオン対試薬を吸着した固定相は水との接触角が 90 度に近付き毛管作用が減少したとも考えられる。図 3 で示したクロマトグラムは 40 °C のカラム温度での保持時間の減少を表しているが、カラム温度を下げる事によりこの減少率は下がる。30 °C では 50 % の、10 °C では 10 % の保持時間の減少になり、5 °C では保持時間の減少率は 10 % 以下となり、ほぼ問題なく使用出来る様になる。温度を下げると移動相の表面張力は上がるので、毛管作用は増大し、充填剤細孔内から移動相は抜け出し易くなり、保持時間の減少は大きくなる筈であるが、実際にはその逆であった。これは温度が下がる事による固定相と移動相との接触角の減少の方が毛管作用に、より大きく寄与するためだと推察される。

3.5 毛管現象のヒステリシス

自然界ではヒステリシスが起こる事がよく知られている。例えば外部磁場（横軸）と磁化（縦軸）の関係を示したグラフはヒステリシス曲線と言われている。又、物質の融点測定においても、温度を融点以下から上げて測定した値と、融点以上から下げて測定した値は異なる事もヒステリシスとして知られてい

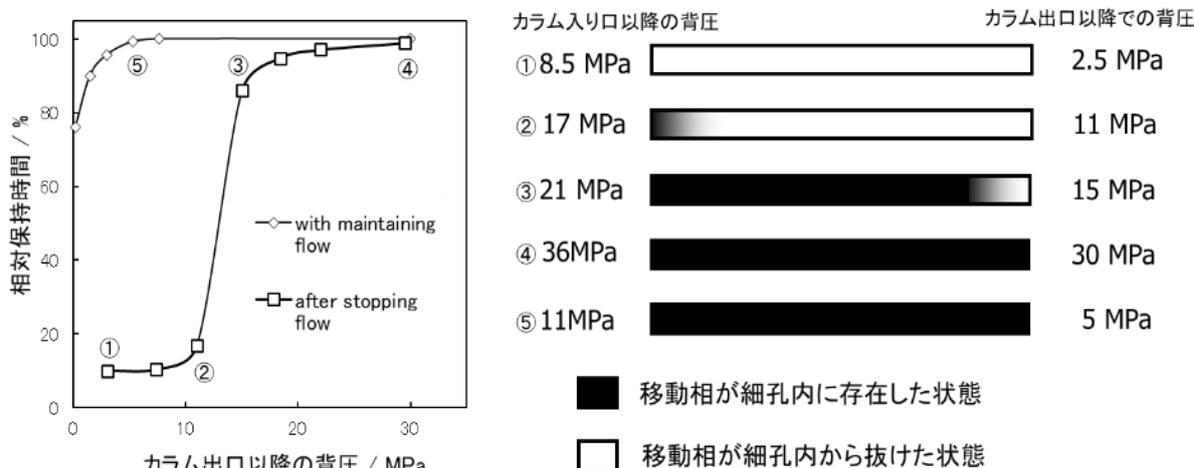


図 6 カラム出口以降の背圧と相対保持時間の関係とカラム内の充填剤細孔内の水の存在状態
 Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp C18, 10-nm pore size. 他の条件は図 3 と同じ。

る。図 6 には毛管作用による充填剤細孔内からの移動相の抜け出し（相対保持時間の減少）とカラム出口以降の背圧との関係、及びカラム内の充填剤細孔内の移動相の存在状態を示す。クロマトグラフィーの条件は図 3 と同じである。ポンプを 1 時間停止した後、相対保持時間は 8 %まで下がっている。この状態からカラム出口以降に内径 0.1 mm の配管を接続し、カラム出口以降に背圧を掛けた。2.5 MPa の背圧時が①で 11 MPa、15 MPa 及び 30 MPa は②、③及び④である。30 MPa の背圧を掛け、相対保持時間が 100 %になった状態から送液を止めずにカラム出口以降の背圧を 5 MPa まで下げた状態が⑤である。②のカラム出口以降の背圧が 11 MPa の場合はカラム自身に 6 MPa の圧力が掛かるため、カラム入口の圧力は 17 MPa となる。カラム出口以降の背圧を上げている曲線から、一度充填剤細孔内から移動相が抜け出した後は 16 MPa の圧力が掛かった状態で初めて充填剤細孔内に水移動相が入り込んでいる。②の状態はカラム入口から数パーセントの充填剤細孔内に移動相が入り込み、その分相対保持時間が上昇した。③の状態ではカラム内の 90 %近くの充填剤細孔内に移動相が入り込み、相対保持時間は約 90 %まで回復した。④の様に 30 MPa 以上の圧力が掛かった状態では全ての充填剤細孔内に移動相は入り込んでいる。⑤の状態は④と同じで充填剤細孔内には移動相は抜ける事なく全て入り込んでいる。つまり、一旦充填剤細孔内から移動相が抜けた状態では細孔内に移動相が入り込むためには 16 MPa の圧力が必要となるが、細孔内に移動相が入り込んでいる状態では 5 MPa の圧力が掛かっているだけで細孔内から移動相は抜け出す事はない。これが充填剤細孔内部で起こっている毛管作用のヒステリシスである。充填剤細孔内に移動相が入り込んでいる状態で、カラム出口以降の背圧を 0 MPa にしても直ぐには細孔内から移動相は抜け出さず、数時間かけてカラム出口付近の低い圧力しか掛かっている充填剤細孔内から移動相が抜け出す。その結果相対保持時間は 77 %になった。

C18 固定相でもカラム出口以降に背圧を加える事により水移動相でも十分な分離が達成される。これらの固定相と移動相は濡れる事はなく、0.2 nm から 0.3 nm の隙間が空いた状態の界面で接していると考えられる。お互いが混ざり合わないヘキサソールと水を用いて溶質を液液分配させる事と同様に、C18 固定相と水移動相はある界面で接していれば溶質はそれぞれの相に分配する事が出来る。固定相に溶質が分配出来れば保持出来、分離する事が出来る。従来言われて来た「固定相は移動相に濡れないと分離出来ない」は、実は「固定相が移動相で濡れていても、濡れていなくとも分離には関係なく、充填剤細孔内に移動相が存在していないと分離出来ない」と表現すべきであると考えられる。

3.6 各固定相と水との接触角

図 6 の結果からここで用いた C18 充填剤の細孔内に水移動相が入り込む圧力を 16 MPa とした場合、実測の平均細孔半径 5.2 nm と 40 °C の水の表面張力 69.6 dyne cm⁻¹ を用いて、毛管作用の式からこの C18 固定相と水との接触角を計算すると、126 度の値が導き出された。又、図 4 の相対保持時間が 50 %の時のそれぞれの固定相の平均細孔径を求めると、C30 は 5.3 nm、C1(TMS)は 6.9 nm、C18 は 13.2 nm 及び C8 は 17.1 nm となる。図 4 の相対保持時間が 50 %になったときのそれぞれの平均細孔径と接触角の余弦関数値($\cos\theta$)が比例すると仮定すると、毛管作用の式を用いて C18 固定相と水との接触角 126 度から、他の固定相の接触角を逆算する事が出来る。その結果は C8 固定相は 140 度、C1(TMS)固定相は 108 度、C30 固定相は 104 度となった。又この接触角はあくまでもシリカ表面にそれぞれのアルキル基を結合させ、TMS エンドキャッピングを施した状態の固定相表面と水の接触角であり、シリカ表面の影響を全く受けていないとは言い切れず、オクタデカンやオクタンそのものと水との接触角とは多少は異

表 4 トリフルオロメタン、メタン、オクタン、オクタデカン及びトリアコンタンの物性

	Trifluoromethane	Methane	Octane	Octadecane	Triacontane
水の接触角(θ)	120°	108°	140°	126°	104°
分配係数(Log P)	0.64	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	4090	22.6	0.66	0.006	8.84×10^{-10}

なる可能性はある。この接触角については C8 固定相が最も大きく、C8 よりもアルキル鎖長が長くなると小さくなり、水に濡れ易くなる事が示された。疎水性はアルキル鎖長が長くなる程大きくなるため、撥水性（水との濡れ難さ）も同様に大きくなると考えがちであるが、実際にはその逆であった。疎水性は水との混ざりにくさであり、 n -オクタノールと水との分配比の対数 (Log P) で定義されるが、撥水性は水との接触角で定義される。定義自体が異なる両パラメーターに対して相関性が無い事は決して不自然ではない。表 4 にトリフルオロメタン(CHF₃)、メタン (CH₄)、オクタン (C₈H₁₈)、オクタデカン (C₁₈H₃₈)及びトリアコンタン (C₃₀H₆₂) の水の接触角、疎水性及び水への溶解度を示す。トリフルオロメタンは疎水性が低いにも関わらず、水との接触角は大きく、オクタデカンと同程度の撥水性を示している。海外では “Dewetting” という言葉で保持時間の減少を説明する事が多く、水・緩衝液移動相を用いると、固定相のアルキル基が立ち上がっている状態 (Wetting) から寝込んでしまい、固定相が移動相と濡れない状態 (Non-wetting) に変化し、保持時間は減少する。そして同時に細孔内からも移動相が抜け出すと主張するクロマトグラファーが殆どである。固定相は移動相と濡れていれば固定相と移動相への溶質の分配が起り、その結果溶質は保持されるが、アルキル基が寝込み濡れなくなると固定相と移動相への溶質の分配が起らず、溶質は保持されなくなると解釈されている。この解釈に則ると、図 3 の A のクロマトグラムは 2-プロパノールを保持しているのも、安定化のための 1 時間以上の送液時には C18 アルキル基は立ち上がって移動相に Wetting している状態であり、送液ポンプを停止すると C18 アルキル基は寝込みだし Non-wetting の状態に変化する事になる。図 5 に示されている様に、水移動相は固定相に濡れていないが、毛管作用で働く圧力以上の圧力が充填剤周りに掛かっているため、充填剤細孔内に留まっており、送液を停止し、充填剤周りの圧力が毛管作用で働く圧力以下の大気圧まで下がると、移動相は充填剤細孔内から抜け出す。つまり固定相は最初から水移動相に濡れておらず、濡れていないからこそ送液停止すると移動相が充填剤細孔内から抜け出す。後の項目で詳細に述べるが、充填剤細孔内から移動相が抜けた後、メタノール/水=30/70 又は 50/50 の移動相を通液しても、充填剤細孔内にこの移動相は入り込まなく、保持は回復しない。メタノール/水=30/70 又は 50/50 移動相が C18 固定相に濡れるのであれば、毛管作用により充填剤細孔内へ移動相を入り込ませる力が働くが、実はメタノール/水=30/70 又は 50/50 移動相も C18 固定相には濡れない。メタノール濃度を 70%まで上げたメタノール/水=70/30 移動相は C18 固定相を濡らすため、この移動相は充填剤細孔内に入り込み、保持は回復する。この事から水移動相は最初から C18 固定相に濡れておらず、wetting 状態にはなっていない。従って Dewetting が Wetting 状態から Non-wetting 状態に変化する事であるならば、水移動相を C18 カラムに通液した場合の保持時間の減少に対して Dewetting と表現する事は適切ではないと考えられる。図 5 に表されている様に、水移動相は C18 固定相に濡れていないが細孔内に存在している。これは浸透している(Permeating)と言うべきであり、更に充填剤細孔内から抜け出す事は Depermeating という表現がこの事象をよりの確に表していると考えられる。又、細孔内に水移動相が存在している事を Wetting と称し、更に細孔内から水移動

相が抜け出した状態を **Non-wetting** と称し、水移動相が細孔から抜け出す事を **Dewetting** と言い表す事もあるが、この現象は正に毛管現象であり、**Capillarity** 又は **Capillary phenomenon** と称すべきである。細孔内に水移動相が存在していても、固定相と水移動相が濡れた状態で存在しているのではなく、濡れていないが、毛管作用で働く圧力以上の圧が充填剤周りに掛かっている事で、細孔内に水移動相が留まっているのであるため、これを **Wetting** と称する事は出来ないと考えられる。

3.7 水及び緩衝液を移動相として用いた逆相分離の再現性

今迄に述べて来た様に、水・緩衝液移動相を用いた場合の保持時間の減少は充填剤細孔内からの移動相の抜け出しが原因であった。この移動相の抜け出しを抑えるためには固定相への水の接触角を小さくすれば良く、**C1 (TMS)** や、**C30** 等のアルキル鎖長の長い固定相を用いる事である。又細孔径の大きな充填剤を用いても保持の再現性は高くなるが、細孔径が大きくなる程充填剤の比表面積は小さくなり、保持が小さくなるので、保持時間を長くするために移動相の有機溶媒比率をゼロ近くに下げている場合には、細孔径が大きく保持の小さい充填剤は適さない。通常の **C18** 固定相でも充填剤細孔内から水移動相を抜け出さないように条件設定で出来れば保持時間の再現性を上げる事が出来る。一例として内径 **4.6 mm** の **C18** カラムを **40 °C** で水移動相を用い、流速 **1 mL/min** で送液した場合、カラム出口以降に **5 MPa** 背圧が掛かる様に内径 **0.1 mm**、長さ **500 mm** の配管を接続し、測定開始前にはカラム内に有機溶媒濃度が **70 %** 以上のメタノール/水又はアセトニトリル/水移動相が入った状態にして、その後水移動相を通液開始し、送液を止める事なく、カラム圧を維持し続ければ再現性のある分離が可能となる。これはカラム内が水移動相に切り替わり始める時点から **5 MPa** 以上の圧力が掛かり続ける事により、毛管作用による充填剤細孔内からの移動相の抜け出しを抑えるためである。また測定後に有機溶媒濃度の高い移動相でカラム洗浄を毎回行えば、水移動相でも連続して送液している限り、保持の再現性の高い分離が出来る。

近年は **C18** 固定相でも水移動相を用いても保持時間の再現性が高い **AQ** タイプが入手出来るが、この **AQ** タイプの **C18** 固定相は **C18** アルキル基 (ステアリル基) の結合密度を下げ、エンドキャッピングである **TMS** の結合密度を上げ、固定相の性質を **TMS** に近づけたり、極性の高い試薬を用いてエンドキャッピング処理をしたり、極性基埋め込み型のアルキル基を結合したりし、水との接触角を小さくしている。これらの処理を施した **C18** 固定相は通常の **C18** 固定相より固定相自身の疎水性が下がる事から、移動相中の水がシリカ表面に接触し易くなり、酸によるアルキル基の加水分解やアルカリによるシリカ自身への加水分解が起こり易く、カラム寿命が短くなる欠点がある。その点 **C30** のような長鎖アルキル基固定相は極性を上げるような処理を施していないため、水移動相条件での保持時間の再現性を維持しつつ、且つ高い耐久性を示す。

4. メタノール/水移動相の **C18** 固定相への濡れ性

水が **C18** 固定相に濡れない事は、水移動相を用いると保持時間が減少する事から確認出来たが、メタノール/水=**70/30**、**50/50** 及び **30/70** の移動相は **C18** 固定相に濡れるのか濡れないのか。これらの移動相を用いて保持時間が変化する事は無いため、又従来は濡れていないと固定相と移動相に溶質は分配出来ないと考えられていたため、当然 **C18** 固定相にこれらの移動相は濡れると考えられていた。図 7 にはメタノール/水の混合溶液を用いた時の **C18** 充填剤の分散状態を示す。A はメタノール/水=**70/30**、B はメ

メタノール/水=50/50、Cはメタノール/水=30/70 溶液を用いた。図 3 で用いた C18 カラムに用いられた充填剤と同じ C18 充填剤を十分乾燥してそれぞれの溶液に投入し、超音波振動を加えながら掻き混ぜた。A は充填剤が溶液に分散し沈降し始めていた、B は一部の充填剤が分散したが、多くの充填剤は液面上に浮いていた。C では全く分散せず、全ての充填剤が液面上に浮いていた。つまり A のメタノール/水=70/30 溶液は C18 固定相に濡れる事を示しており、毛管作用により充填剤細孔内へ溶液が簡単に入り込み溶液中に分散した。C のメタノール/水=30/70 溶液は C18 固定相には濡れず、液面上に浮いており、B のメタノール/水=50/50 溶液は超音波振動のエネルギーで一部の C18 充填剤は分散したが、殆どの C18 充填剤が液面上に浮いている事は C18 固定相はこの溶液にも濡れない事を示している。図 3 に示されている様に送液停止すると充填剤細孔内から移動相が抜け出し保持時間が減少するが、その後メタノール/水=50/50 移動相を流しても保持時間は回復しない。これはメタノール/水=50/50 溶液は C18 固定相に濡れず充填剤細孔内に入り込まないためであり、逆にメタノール/水=70/30 移動相を流せば保持時間が回復するのは、メタノール/水=70/30 溶液は C18 固定相を濡らすため、充填剤細孔内に入り込むためである。メタノール/水=50/50 溶液は C18 固定相に濡れないのであれば、この溶液を移動相として用いると毛管作用により充填剤細孔内から移動相を抜け出させる力が働く筈であるが、実際には充填剤細孔内から移動相は抜け出さず、保持時間の減少は起こらない。これは図 6 で示されている様に細孔内へ浸透させる力と細孔内から排除させる力が大きく異なっているため、メタノール/水=50/50 溶液を C18 充填剤細孔内へ浸透させるには大気圧では



図 7 メタノール/水の混合溶液中で超音波振動を加えた状態で攪拌した C18 充填剤の分散状態
 Packing material, 5 μ m dp C18, 10-nm pore size; solution, A = methanol/water=70/30, B = methanol/water=50/50, C = methanol/water=30/70.

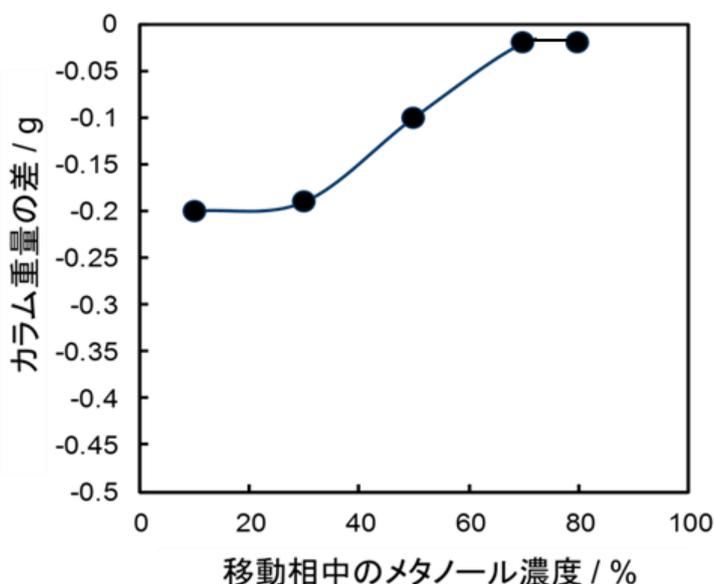


図 8 移動相中のメタノール濃度とカラム重量の関係
 Column, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp C18, 10-nm; pore size; enclosed solution, methanol/water = 10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 80/20; temperature, 40 $^{\circ}$ C. カラム重量の差として、初期と 20 分間 0.01 MPa の圧力に維持した後の重量差を測定した。

不十分で、メタノール/水=50/50 溶液が C18 充填剤細孔内に予め入っている場合に細孔内から抜け出させる圧力（力）は大気圧より低いためである。充填剤周りの圧力を真空乾燥器内で 0.01 MPa（約 0.1 気圧）にしてカラムから抜け出した移動相の重量をカラムの重量減として測定した結果を図 8 に示す。メタノール/水=10/90、30/70、50/50、70/30 及び 80/20 の溶液を封入したカラムを温度 40 °C に設定した真空乾燥器に入れ 0.01 MPa の圧力下に 20 分間静置し、カラムの重量減を測定した。メタノール/水=70/30 及び 80/20 溶液は C18 固定相に濡れるため、カラムの重量減は殆ど無かった。しかし、他の溶液はカラム重量が下がっており、C18 充填剤細孔内から溶液が抜け出している事を示している。つまりこれらの溶液は C18 固定相に濡れず、毛管作用により働く細孔内から溶液を抜け出させる圧力（力）は大気圧より低く、0.01 MPa より高い事を示している。もし 0.01 MPa の気圧の環境（高地）で HPLC を操作し、C18 カラムとメタノール/水=30/70 移動相を用いた場合、送液を停止すると、その後は保持時間が減少してしまう。

細孔径 10 nm の C30 充填剤は水との接触角が 104 度で 90 度より大きく、水には濡れないが、水移動相を用いても保持時間が減少しないのは、C18 カラムのメタノール/水=30/70 移動相使用時と同じで、毛管作用により働く C30 充填剤細孔径内から水移動相を抜け出させる圧力が大気圧より低いため、大気圧によって水移動相は C30 充填剤細孔内に押し込まれているためである。

5. アルキル基の有機溶媒和と分離特性

5.1 アルキル基の状態についての推測

これ迄は水移動相を用いた場合の逆相カラムの保持時間減少の原因や、固定相及び充填剤細孔内の移動相の存在について述べて来たが、固定相のアルキル基の状態については言及して来なかった。2000 年以前の保持時間の減少についての説明では、アルキル基が立ち上がって移動相と濡れている場合は保持があり、寝込む事により保持は無くなるとされていた。又最近の特に欧米のクロマトグラファーの間では、充填剤細孔内から移動相が抜け出る事を肯定しているが、アルキル基が寝込む事により移動相は固定相に濡れなくなり、保持しなくなるが、それと同時に充填剤細孔内から移動相が抜け出すと解釈されている事が多い。ではアルキル基の状態はどの様になっているのであろうか。水移動相で C18 固定相のステアリル基が立ち上がっている事は有るのか。炭素数 6 のヘキサン(C_6H_{14})ですら、メタノールとは混ざらない。オクタデカン($C_{18}H_{38}$)はロウソクのロウの様な状態であり、オクタデカンはヘキサン以上にメタノールとは混ざらない。C18 カラムにメタノールを移動相として通液した場合に C18 固定相は隣接するステアリル基の間にメタノールが入り込んでステアリル基自身が立ち上がるのか。実際にはそうではなく、ステアリル基はメタノールとの接触面積が最低になる様なコンフォメーションをとり、シリカ表面でステアリル基は折れ曲がった状態で固まっていると推測され

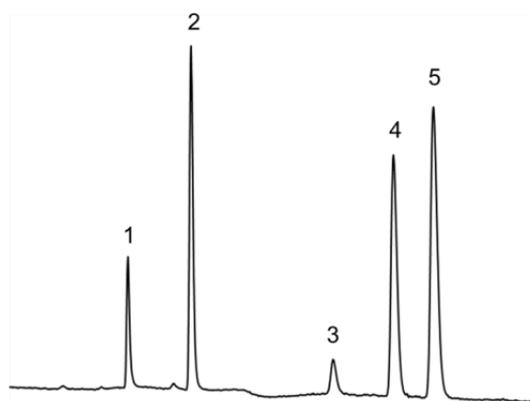


図 9 C18 カラムを用いたアルコールとアセトニトリルの分離
Column, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm dp C18, 10-nm pore size;
peaks, 1 = methanol, 2 = ethanol, 3 = acetonitrile, 4 = 1-propanol, 5 = 2-propanol. 他の条件は図 3 と同じ。

る。又テトラヒドロフラン (THF) と水との混合溶液を移動相として用いた場合には、THF はオクタデカンを溶かすため、ステアシル基の塊の中に入り込み、C18 固定相は THF で膨潤し、THF がある濃度以上になると、隣接するステアシル基間に THF は十分入り込み、ステアシル基は立ち上がる様になると推測される。

5.2 逆相固定相への有機溶媒和

図 9 に示されているように C18 カラムに水移動相を用いるとメタノール、エタノール、アセトニトリル、プロパノールは保持し分離される。アセトニトリル/水=1/99 移動相を用いた場合にもアセトニトリルは保持し、保持係数(k)は 0.62 となる。同様にアセトニトリル/水=10/90 及び 20/80 移動相でもアセトニトリルの保持係数(k)はそれぞれ 0.36 と 0.32 となる。保持係数 (k) は固定相中の溶質成分の存在量 (S) と移動相中の存在量 (M) の比として表される。

$$k = S/M$$

移動相には決まった濃度のアセトニトリルが常時含まれているため、アセトニトリル/水=1/99 移動相での保持係数 0.62 は移動相中の 1%のアセトニトリル量の 0.62 倍の量のアセトニトリルが固定相中に分配されている事になる。内径 4.6 mm、長さ 150 mm カラムで計算すると、C18 固定相へは 0.011 mL のアセトニトリルが分配されている。同様にアセトニトリル/水=10/90 及び 20/80 移動相では 0.059 mL と 0.101 mL のアセトニトリルが分配されている。この分配量は固定相への溶媒和量

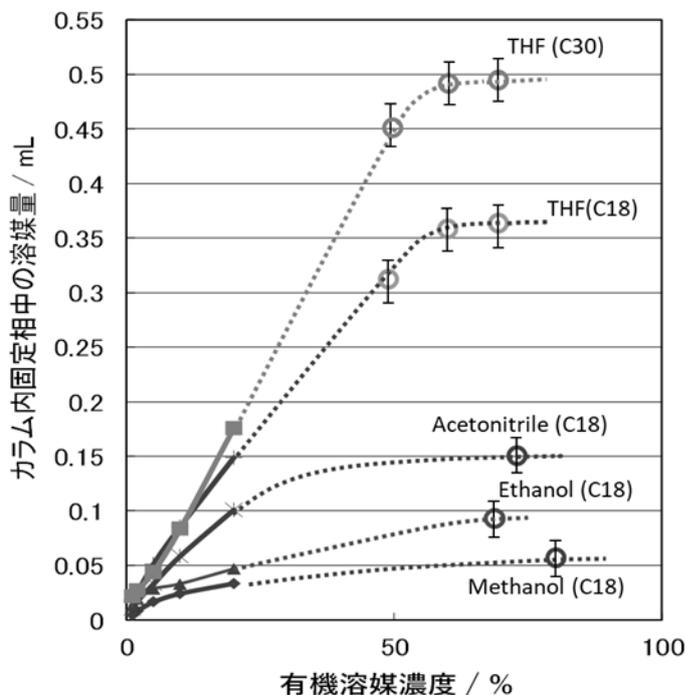


図 10 移動相中の有機溶媒濃度と固定相への有機溶媒の溶媒和の関係

Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp C18 and C30, 10-nm pore size; temperature: 40 $^{\circ}$ C.

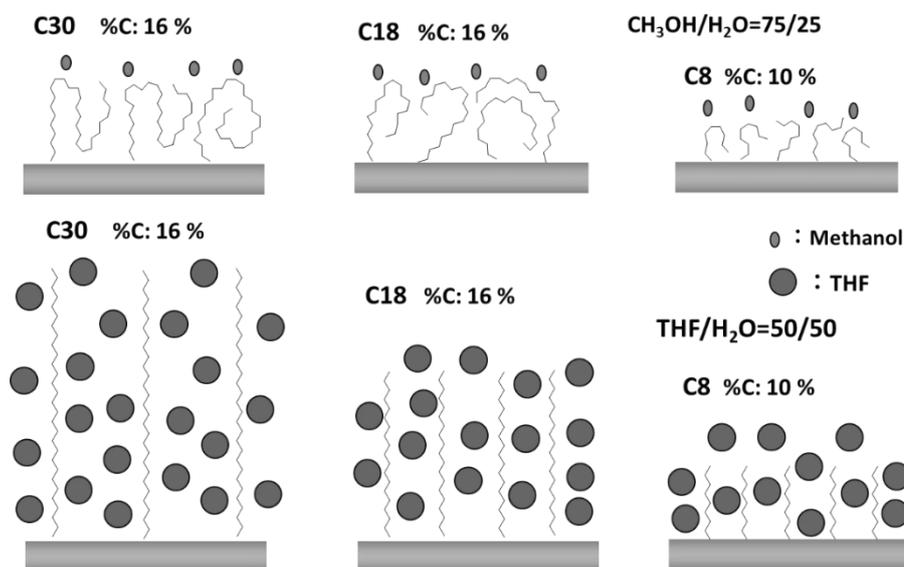


図 11 メタノールとテトラヒドロフラン(THF)の固定相への溶媒和

と同一であると考えられる。メタノール、エタノール及びテトラヒドロフラン(THF)について同様に溶媒和を求めた。溶媒和した有機溶媒は固定相として働くため、溶媒和量の増加量分がカラム内の移動相量(ホールドアップボリューム)の減少分と一致した。有機溶媒量の多い移動相では保持係数の測定誤差が大きくなるため、ホールドアップボリュームの減少分を溶媒和量の増加分として総溶媒和量を求めた。移動相中の有機溶媒濃度と固定相への溶媒和量の関係を図 10 に示す。この図のメタノール/水=82/18 の溶媒和量を 0.06 mL と仮定し、他の有機溶媒の溶媒和量を決定した。内径 4.6 mm、長さ 150 mm カラム内には C18 及び C30 充填剤は約 1.5 g 充填されており、炭素含有量 16% の C18 と炭素含有量 16% の C30 の固定相の容積は両方とも約 0.35 mL と計算される。各有機溶媒の固定相への溶媒和は移動相中の有機溶媒のある濃度で飽和している。又、THF の溶媒和量については、C18 固定相では固定相の容積とほぼ同じ量の有機溶媒が溶媒和しており、C30 固定相では固定相容積の 1.5 倍の有機溶媒が溶媒和している。これらの結果と前項の推測からアルキル基の状態は図 11 に示されている様に、メタノールは固まった固定相上に溶媒和しているが、THF はアルキル基の間に入り込みアルキル基は立ち上がった状態になっていると考えられる。同じ炭素含有量の C30 と C18 固定相でもアルキル鎖長の違いにより THF の溶媒和量は異なり、アルキル基の長い C30 固定相の方が溶媒和量は多くなる。Schure ら¹¹⁾ はコンピューターシミュレーションの手法を用いメタノール/水及びアセトニトリル/水移動相中での C18 固定相のアルキル基の存在状態を考察している。温度 50 °C の条件で、有機溶媒 0% の水のみ移動相では殆どアルキル基は固まっており、メタノール/水=82/18 移動相中でも 70% 以上アルキル基は固まっていると結論付けており、本稿の溶媒和量からのアルキル基の状態の推論を肯定する内容となっている。

図 12 にはメタノール/水=75/25 移動相とテトラヒドロフラン/水=50/50 移動相を用いた標準試料の分離を示す。ピーク 6 のアミルベンゼンの保持時間を比較すると、メタノール

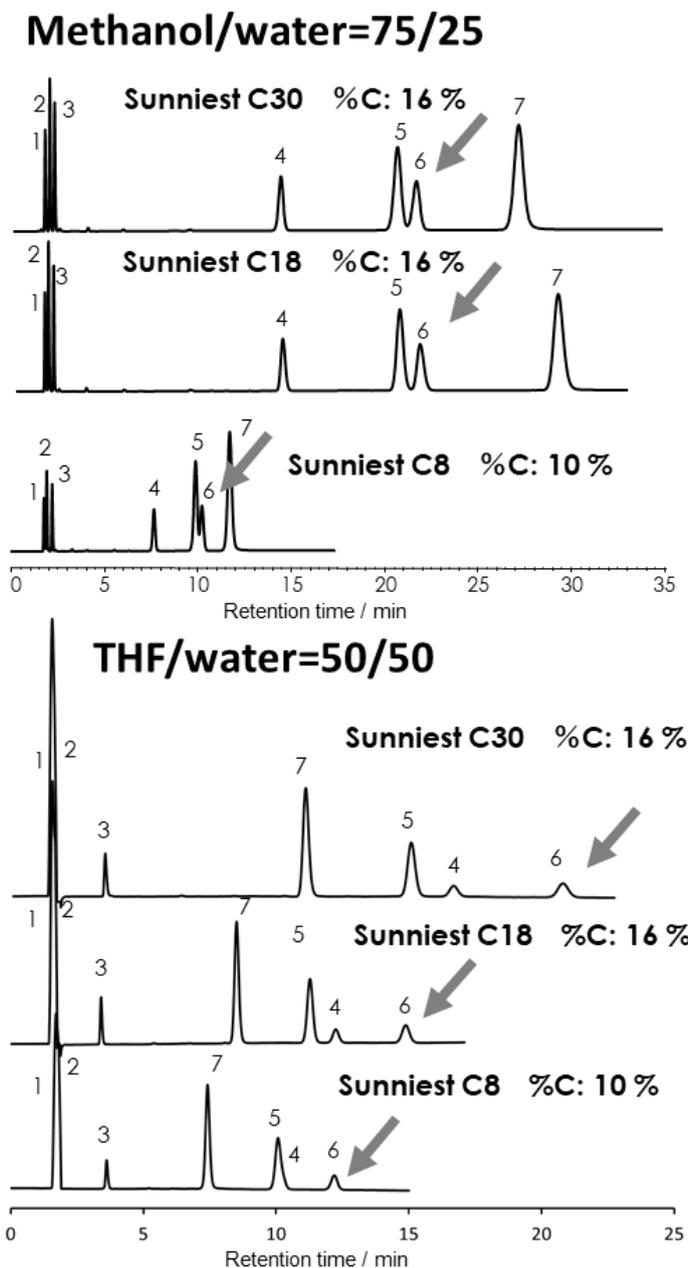


図 12 標準試料の分離

Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μm dp, Sunniest C30, C18 and C8; mobile phase, methanol/water = 75/25 and tetrahydrofuran/water = 50/50; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV at 250 nm; peaks, 1 = uracil, 2 = caffeine, 3 = phenol, 4 = butylbenzene, 5 = o-terphenyl, 6 = amylbenzene, 7 = triphenylene.

/水=75/25 移動相では、炭素含有量が同じ C30 と C18 はほぼ同じ保持時間となり、炭素含有量の低い C8 は C18 の 1/2 以下の保持時間であったのに対し、テトラヒドロフラン/水=50/50 移動相ではアルキル鎖長の最も長い C30 が最も長い保持時間を示し、アルキル鎖長が短くなる程保持時間は短くなった。メタノールとテトラヒドロフランではアミルベンゼンの各固定相の相対的な保持時間は大きく異なった。メタノール/水=75/25 移動相では図 11 に示されている様に炭素含有量が同じ C30 と C18 は固まった状態で表面に少量のメタノールが溶媒和しており、溶媒和している有機溶媒を含めた固定相の体積は C30 と C18 はほぼ同じであるため、同じ保持時間になったと考えられる。一方、テトラヒドロフラン/水=50/50 移動相ではテトラヒドロフランの溶媒和量は非常に多く、図 11 に示されている様にアルキル鎖長の長い固定相程多く溶媒和しており、溶媒和している有機溶媒を含めた固定相全体では C30 が最も大きな体積になる。固定相体積が大きい程アミルベンゼンの保持時間は長くなったと考えられる。メタノールとテトラヒドロフランによる保持時間の差は溶媒和量が異なり、固定相の体積が大きく変化する事に起因していると推察される。しかしながらアミルベンゼンより極性が高いピーク 3 のフェノールの保持時間を比較すると、両移動相において固定相に関係なく保持時間はほぼ同じであった。メタノール/水=75/25 移動相ではフェノールの保持時間が短く比較し辛いですが、メタノール/水=30/70 移動相を用いるとフェノールの保持係数は約 3 になり、十分保持する様になる。この条件での比較でも、C30、C18 及び C8 の保持時間はほぼ同じであった。この様にアミルベンゼンとフェノールは大きく異なる保持挙動を示した。この現象はフェノールに限った事ではなく、極性が高い他の化合物でも同様であった。フェノールはアミルベンゼンよりも極性が高いため、アミルベンゼンはオクタンやオクタデカンに溶解、固定相全体と相互作用するのに対し、フェノールはオクタン等に難溶で固定相内部に入り込む事がなく、固定相の表面付近でのみで相互作用していると推測される。固定相の表面は炭素含有量の大小に関係なく、シリカ基材が同じであれば、ほぼ同じ表面積であるため、保持時間はどの固定相でも同じになったと考えられる。

6. 高極性化合物と脂溶性化合物の分離

核酸と有機酸の分離を図 13 と図 14 に示す。何れも C30 固定相カラムと有機溶媒を含まない緩衝液移動相を用いた。前述した様に長鎖アルキル基は緩衝液のみの移動相でも安定した保持時間を示し、なお且つ高い耐久性を示すため、高極性化合物の分離には適している。核酸分析においては、ピークテーリングを抑えるために高濃度のリン酸塩緩衝液を用いる事が多く、一般的に 100 mmol/L リン酸塩緩衝液が移動相として用いられるが、図 13 の分離例では、エンドキャッピングが十分施され、残存シラノール基の影響が殆ど無いカラム

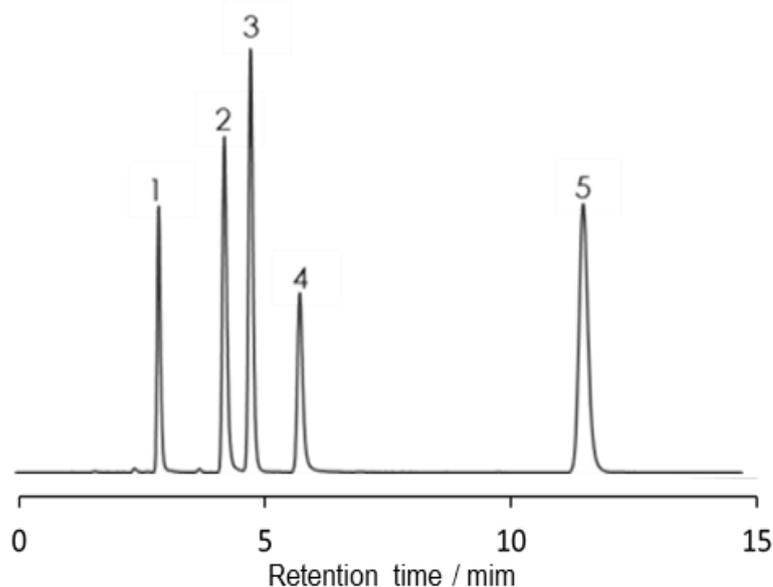


図 13 核酸の分離

Column, Sunniest RP-AQUA (C30) 3 μ m, 4.6 x 150 mm; mobile phase, 20mmol/L phosphate buffer pH 6.0; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 $^{\circ}$ C; detection, UV at 250 nm; peaks, 1 = 5'-GDP, 2 = 5'-GMP, 3 = 5'-ATP, 4 = 5'-ADP, 5 = 5'-AMP.

を用いているため、20 mmol/L 濃度のリン酸塩緩衝液を用いてもテーリングしていない。有機酸の分離には粒子径 2.6 μm の表面多孔質充填剤 (Superficially porous particle、Core shell particle、コアシェル形充填剤) カラムを用いており、高理論段数で高速分離を達成している。コアシェル形充填剤は従来の全多孔性充填剤と比較し、1.5 倍の理論段数を発揮する。コアシェル形充填剤の特徴は、充填剤粒子の内部に無孔性の核を有する事と粒度分布が狭く粒子径が揃っている事により、試料成分の拡散が抑えられる事であり、この試料成分の拡散抑制が高理論段数を導き出す。

図 15 と図 16 にはトコフェロールとカロテンの分離を示す。通常 C18 カラムと C30 カラムの分離比較も同時に行った。トコフェロールの分離は逆相 C18 カラムではベータトコフェロールとガンマトコフェロールの分離が出来ないため、従来はシリカカラムを用い順相モードで行われていたが、C30 カラムを用いれば逆相モードでも分離可能である。アルキル長鎖の長い C30 固定相は C18 固定相に比べ立体選択性が高く、異性体の分離に優れているため、ベータトコフェロールとガンマトコフェロールが分離出来た。又これ以外に C30 固定相が C18 固定相より優れる点として、C18 のステアリル基よりも大きな分子サイズの成分が C30 固定相で分離が良くなる傾向が強い。例えば糖が 2~3 個結合した配糖体等は C30 固定

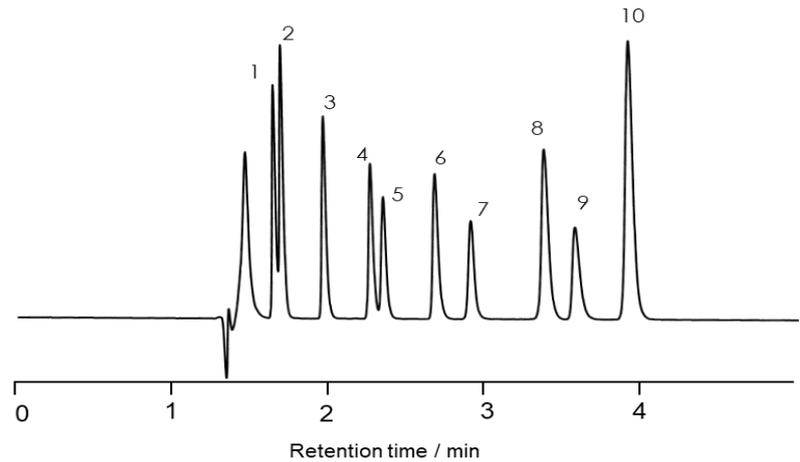
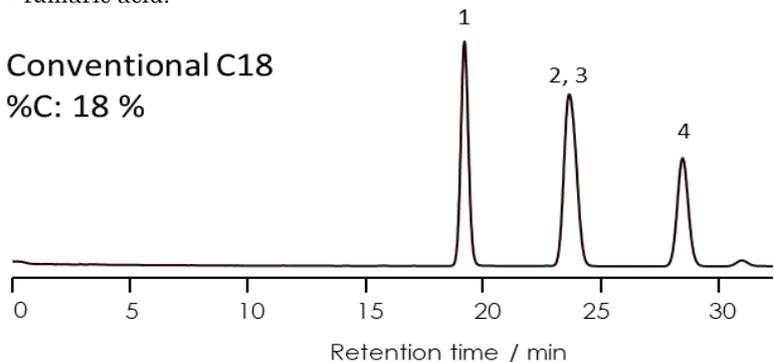


図 14 有機酸の分離

Column, SunShell RP-AQUA (C30) 2.6 μm, 150 x 4.6 mm; mobile phase, 0.025 mol/L KH₂PO₄, pH 2.5; flow rate, 1.5 mL/min; temperature, 25 °C; detection, UV at 210 nm; Peaks, 1 = tartaric acid, 2 = formic acid, 3 = malic acid, 4 = lactic acid, 5 = acetic acid, 6 = diglycolic acid, 7 = maleic acid, 8 = citric acid, 9 = succinic acid, 10 = fumaric acid.

Conventional C18
%C: 18 %



Sunrise C30
%C: 18 %

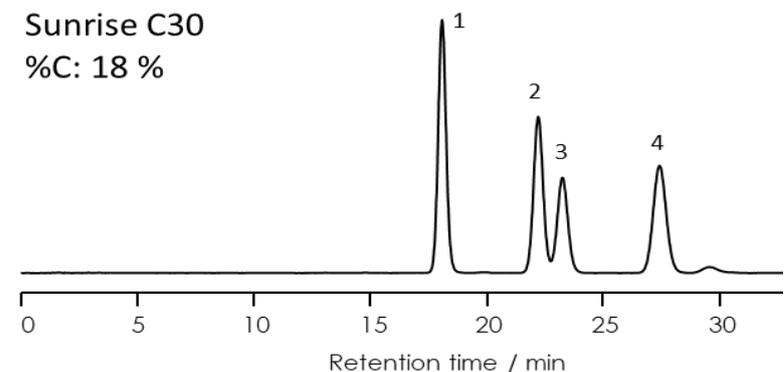
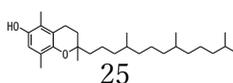
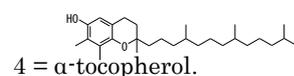
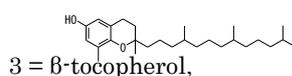


図 15 トコフェロールの分離

Column, Conventional C18, Sunrise C30, C%, 18%; column size, 250 x 4.6 mm; mobile phase, methanol/water = 97/3; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 25 °C; detection, UV at 295 nm;

Peaks, 1 = δ-tocopherol, 2 = γ-tocopherol,



相を用いると大きく分離が改善される。アルファーカーロテンとベータカロテンは C18 固定相でも C30 固定相でも分離出来るが、同じ炭素含有量の固定相であるにも関わらず、C30 固定相は C18 固定相の 2 倍の保持を示し、アルファーカーロテンとベータカロテンの分離度(R_s)は大きく改善され、C18 固定相は 1.15 であるのに対し C30 固定相では 5.50 であった。天然物の分離ではアルファーカーロテンとベータカロテンの間に溶出する成分の存在が知られており、C30 固定相ではこれらの成分が分離可能となる。トコフェロールとカロテンの分離では同じカラムを用いているが、メタノール/水移

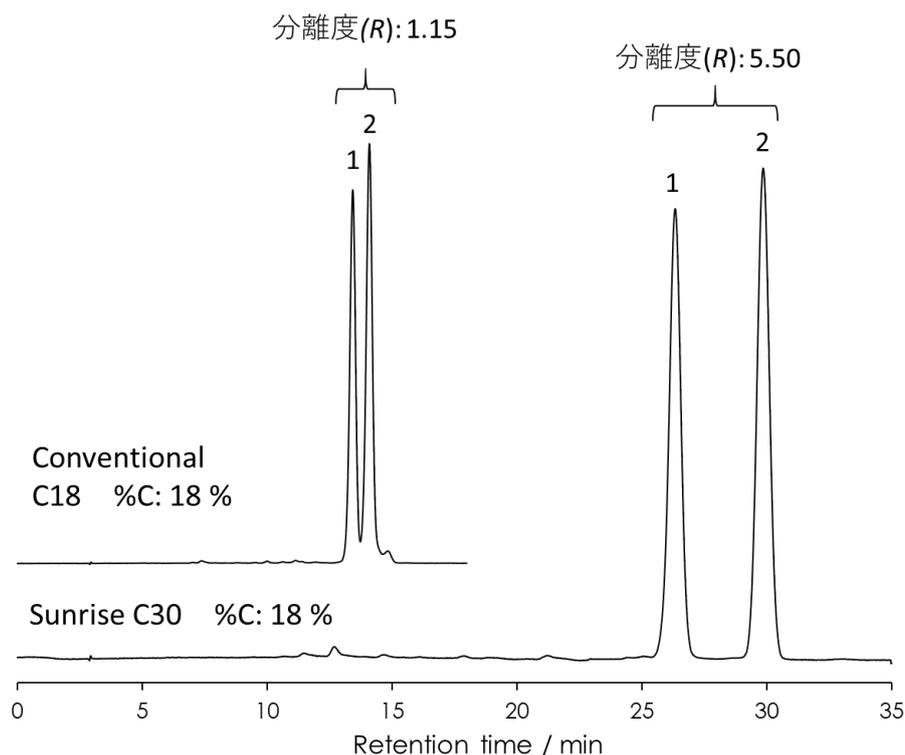
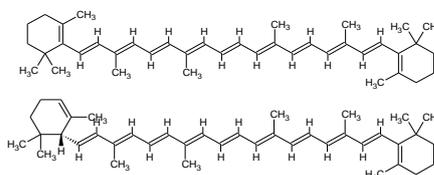


図 16 カロテンの分離

Mobile phase, acetonitrile/chloroform = 80/20; temperature, 30 °C; detection, UV at 450 nm, 他条件は図 15 と同じ。

Peaks, 1 = α -carotene,

2 = β -carotene.



動相を用いたトコフェロールの分離では C18 カラムと C30 カラムで保持時間の差は殆ど無いが、アセトニトリル/クロロホルム移動相を用いたカロテンの分離では両カラムで 2 倍の保持時間の差が生じた。これは今まで述べて来た様に疎水性の高いクロロホルムの溶媒和量は非常に多く、それぞれの固定相はクロロホルムにより膨潤し、アルキル基が立ち上がった状態になり、溶媒和した有機溶媒を含めた C18 固定相と C30 固定相の体積が大きく異なるためであると考えられる。

7. まとめ

アルキル基固定相の保持力や炭素 1 個分の差の分離について考察した。又、高極性化合物を保持させるために、移動相中の有機溶媒比率を下げ、最終的に有機溶媒を含まない移動相を用いる事になった場合に起こる現象について述べて来た。更に移動相中の有機溶媒の溶媒和について考察し、この溶媒和が分離に与える影響についても述べて来た。クロマトグラフィーは結果としての分離に重きが向けられがちであるが、本稿では二十数年前には常識的に言われていた事柄について懐疑的に見る事により、違った見え方や考え方が示した。従来とは異なった視点から分離について考える切っ掛けになれば幸いである。逆相クロマトグラフィーでは C18 固定相が主流であるが、C30 固定相は高極性化合物分離のための水・緩衝液のみの移動相使用時でも保持時間の再現性が高く、なお且つ耐久性も優れており、

有機溶媒のみの移動相で脂溶性化合物分離する場合にも、C18 固定相より優れている。今後、長鎖アルキル基の C30 カラムは C18 カラムと同様に逆相分離には欠かせないものになると思われる。

引用文献

- 1) J.J. Kirkland, *J Chromatogr. Sci.*, **7**, 13-16 (1969).
- 2) G. E. Berendsen, L. Galan, *J. Chromatogr. A*, **196**, 21-37 (1980).
- 3) N. Nagae and D. Ishii, *American Laboratory*, **27**, 20 (1995).
- 4) R. P. W. Scott, C. F. Simpson, *J. Chromatogr.*, **197**, 11-20 (1980).
- 5) N. Nagae, T. Enami, *Bunseki Kagaku*, **49**, 887-893 (2000).
- 6) M. Przybyciel, R. E. Majors, *LCGC North America*, **20** Number 6 (2002).
- 7) K. A. Lippa, L. C. Sander, and R. D. Mountain, *Anal. Chem.*, **77**, 7852-7861 (2005).
- 8) T. Enami, N. Nagae, *Chromatography*, **22**, 33-39 (2001).
- 9) N. Nagae, T. Emani, S. Doshi, *LCGC North America* **20**, 964-972 (2002).
- 10) T. Enami, N. Nagae, *Bunseki Kagaku*, **53**, 1309-1313 (2004).
- 11) M. R. Schure, J. L. Rafferty, L. Zhang, J. I. Siepmannet, *LCGC North America*, **31**, 630-637 (2013).

< 執筆者略歴 >

長江徳和 (Nagae Norikazu)

(株)クロマニクテクノロジーズ (〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。

名古屋大学工学部応用化学卒。工学博士 (熊本工業大学)。

《主な著書》“LC/MS、LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決” (分担執筆)
(オーム社)

E-mail: nagae@chromanik.co.jp



【報文】

タンパク質の LC/MS 分析へ向けたモノリス形シリカマイクロトラップカラムの開発

Development of a Monolithic Silica Micro Trap Column for LC/MS Analysis of Proteins

小林宏資

Hiroshi KOBAYASHI

信和化工株式会社

Shinwa Chemical Industries Ltd.

(Received November 9, 2020 ; Accepted December 10, 2020)

要旨

タンパク質の安定した LC/MS 分析へ向けて、モノリス形シリカを利用したナノフロー LC 用マイクロトラップカラムを開発した。開発したマイクロトラップカラムは、内径 0.2 mm、長さ 35 mm、容積は約 1.1 μ L である。シリカ表面へブチル基 (C4) 修飾を施した C4 修飾モノリス形シリカキャピラリーカラムは、イソクラティック溶離により、タンパク質可溶化に使用される界面活性剤 (CHAPS) とタンパク質が容易に分離される事から、トラップカラムとして有用であると考えられる。本トラップカラムを使用する事で、インタクトなヒト血清アルブミンリコンビナント (human serum albumin recombinant、rHSA) と還元処理を施した rHSA の分離挙動に違いが認められ、ピークを比較する事により、還元反応の追跡も可能であると考えられる。高濃度のタンパク質可溶化溶媒 (10 mmol/L CHAPS、1 mmol/L EDTA \cdot 2Na、6 mol/L グアニジン緩衝液) に溶解したタンパク質試料においても、トラップカラムを使用する事で、直接 LC/MS 分析が可能であった。

1. 緒言

近年の高速液体クロマトグラフ (high performance liquid chromatograph、HPLC) 並びに質量分析計 (mass spectrometer、MS) の技術の進展は著しく、これらを組み合わせた LC/MS は、低分子化合物から、核酸やペプチド等の中分子、更に消化処理等を施していないインタクトなタンパク質迄、幅広い分析種に利用されている。LC/MS を使用するタンパク質分析法としては、ペプチドレベルで分析を行うボトムアップ法(ショットガン法)とタンパク質レベルで分析をするトップダウン法が知られている¹⁾。

ボトムアップ法では、タンパク質試料をゲル電気泳動により分画した後、画分の切り出しとタンパク質の抽出、還元並びにアルキル化処理、トリプシン消化によるペプチド断片化、そして LC/MS/MS によるペプチドマッピングとデータベース検索によりアミノ酸配列 (一次構造) が決定され、即ちタンパク質が同定される²⁾。一方、課題としては、ゲル

電気泳動にてタンパク質の部分的な構造変化（翻訳後修飾等）に基づく分画がされない場合、LC/MS へ導入される断片化ペプチドはこれらの混合物であるため、構造変化についての量的な解析が難しく、翻訳後修飾の情報を得る事が困難である³⁾。

トップダウン法では、タンパク質を直接 MS へ導入する。実際のタンパク質に則した質量情報、更にはインソース分解や電子移動解離等、タンパク質に適したフラグメンテーション法によって直接的な情報が得られる⁴⁾。免疫グロブリンを主体とする抗体医薬品の糖鎖パターン比較、抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate、ADC) の薬物抗体比 (drug-antibody ratio、DAR) 等、ボトムアップ法と異なる構造情報が得られる。一方、質量分析におけるタンパク質の検出感度はペプチドに対して著しく低く、又、インタクトなタンパク質は容易に凝集・変性するため高濃度の界面活性剤や緩衝液で安定化した試料溶液とする必要がある等、MS との相性が悪い。従って、LC/MS を使用したトップダウン法にて安定した分析系を構築するためには、MS の前段である LC の役割（脱塩・分離・濃縮）が大きい。

LC の原理上、高分子化合物の高精度分離には、薄い吸着層を有する基材が適しており、又、LC/MS における検出感度向上には内径が細かいカラムが適している。これらの条件を満たすため、我々は、タンパク質分離に適した C4 並びにフェニル基を結合したシリカ骨格径約 1 μm のモノリス形シリカキャピラリーカラム（内径 0.1 mm、長さ 250 mm 並びに 700 mm）を開発した⁵⁾。更に、トラップカラムを用いて試料溶液からの脱塩処理を自動化する事により、測定効率化と精度の向上を図る事が出来る。本報では、インタクトタンパク質の LC/MS 分析に向け、モノリス形シリカキャピラリーカラムの開発で培った技術を展開させた、自動前処理システムに適したモノリス形シリカマイクロトラップカラムの開発について報告する。

2. 実験

2.1 試薬及びカラム

モノリス形シリカキャピラリーを利用したマイクロトラップカラムの開発に当たり、モノリス形シリカキャピラリーである Ultron HF-MBS（ベアシリカ、内径 0.1 mm、外径 0.375 mm、長さ 750 mm、信和化工）の技術を展開し、内径 0.2 mm のモノリス形シリカキャピラリーを作製した。その他の表面修飾法は既報⁵⁾と同じである。マイクロトラップカラムへの加工として、0.15 mm ボアのユニオンセットを IDEX 社より入手した。

LC 並びに MS 測定では、PURELAB flex 3（ヴェオリア・ジェネッツ）による超純水を用いた。又、LC/MS グレードのアセトニトリルは富士フイルム和光純薬、トリフルオロ酢酸（TFA）は東京化成工業から、其々入手した。タンパク質溶液の調製用に、界面活性剤 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]propanesulfonate（CHAPS）とキレート剤 ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate（EDTA \cdot 2Na）を同仁化学研究所、6 mol/L グアニジン緩衝液（pH 8.7）を東京化成工業、還元剤 tris(2-

carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP·HCl) を富士フイルム和光純薬より其々入手した。4 種標準タンパク質混合試料 (リボヌクレアーゼ A ; 13.7 kDa、シトクロム c ; 12.4 kDa、ホトランスフェリン ; 80 kDa、アポミオグロビン ; 16.9 kDa) はシグマアルドリッチ、IBUKI ヒト血清アルブミンリコンビナント (IBUKI human serum albumin recombinant (rHSA)) はフナコシより其々入手した。モノクロナール抗体標準試料はウォーターズより入手した。

分析カラムには、C4 並びにフェニル修飾モノリス形シリカキャピラリーカラム (Ultron HF-C4 並びに Ultron HF-phenyl、内径 0.1 mm、長さ 250 mm、信和化工) を使用した。

2.2 装置

モノリス形シリカキャピラリーの構造は電子顕微鏡 (JSM-5900LV、JEOL) により観察した。ナノフロー LC システムには Ultimate 3000 RSLCnano を、質量分析計には Exactive plus (共にサーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。質量スペクトルの解析には BioPharma Finder 1.0 SP1 を使用した。

2.3 モノリス形シリカトラップカラムの作製

既報 ⁵⁾ と同じ方法にてモノリス形シリカキャピラリーへの表面修飾を行った。得られた内径 0.2 mm の C4 修飾モノリス形シリカキャピラリーを長さ 35 mm へ切断後、内径 0.5 mm、長さ 35 mm の PEEK チューブへ挿入した。この両端を IDEX 製 SUS ユニオンへ挿入し、適度なトルクにて絞める事で、C4 修飾モノリス形シリカマイクロトラップカラム (内径 0.2 mm、長さ 35 mm、容積 1.1 μ L) を得た。

2.4 表面修飾の耐久性評価

トラップカラムの疑似的耐久性評価として、同法にて作製した C4 修飾モノリス形シリカキャピラリーカラムに対し、4 種標準タンパク質混合試料の 1,000 回連続注入分析を行った。クロマトグラフィー条件は以下の通りである。移動相 A ; 0.1 % TFA-H₂O、移動相 B ; 0.1 % TFA-CH₃CN、流量 ; 1.5 μ L/min、グラジエント溶離 ; 10-55 %B (0-5 分)、55-90 %B (5-5.5 分)、90 %B (5.5-6.8 分)、90-40 %B (6.8-7 分)、40 %B (7-8 分)、40-10 %B (8-8.2 分)、10 %B (8.2-11 分)、カラム温度 ; 50 $^{\circ}$ C、サンプル ; 4 種混合タンパク質 (0.01 mg/mL)、サンプル注入量 ; 1.0 μ L、検出 ; UV 214 nm。

2.5 界面活性剤を含むタンパク質試料の分析

2.5.1 LC による界面活性剤とタンパク質の分離

界面活性剤を含むタンパク質試料のナノフロー LC システムを用いた分析条件を検討した。4 種標準タンパク質混合試料並びにモノクロナール抗体を、0.01 mg/mL の濃度になる様、1 mmol/L CHAPS 水溶液に溶解したものを試料とした。クロマトグラフィー条件は、

次の項目を除いて 2.4 節と同一である。流量；0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、カラム；フェニル修飾モノリス形シリカキャピラリーカラム、グラジエント溶離；(a) 15-55 %B (0-30 分)、及び (b) 15 %B (0-15 分)、15-55 %B (15-45 分)。

2.5.2 界面活性剤添加によるタンパク質溶液の安定性評価

タンパク質の凝集やバイアルへの吸着に対する界面活性剤の抑制効果を評価した。4 種標準タンパク質混合試料並びにモノクロナール抗体を 0.01 mg/mL となる様、(a) 0.1 %TFA 水溶液、(b) 1 mmol/L CHAPS を含む 0.1 %TFA 水溶液にて溶解した試料を調製し、1 時間毎に LC 分析を行った。サンプルラック温度は 5 $^{\circ}\text{C}$ とした。

2.6 界面活性剤等を含むタンパク質試料の LC 測定におけるトラップカラムの効果

2.6.1 rHSA を用いたトラップカラムの脱塩条件の検討

C4 修飾モノリス形シリカマイクロトラップへのタンパク質導入・洗浄条件の検討の評価試料として、rHSA を (a) 濃度 0.01 mg/mL となる様に 0.1 %TFA 水溶液にて調製、(b) 濃度 1 mg/mL になる様に調製した 10 mmol/L CHAPS、1 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L TCEP、6 mol/L グアニジン緩衝液溶液を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間処理(還元化)した後、10 mmol/L CHAPS を含む 0.1 %TFA 水溶液を用いて 0.01 mg/mL に希釈調製した。分析条件は以下の通りである。

分析ライン: 移動相 A; 0.1 % TFA- H_2O 、移動相 B; 0.1 %TFA- CH_3CN 、流量; 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、カラム; フェニル修飾モノリス形シリカキャピラリーカラム、グラジエント溶離; 10 %B (0-3 分)、10-55 %B (3-33 分)、55-85 %B (33-35 分)、85 %B (35-40 分)、85-10 %B (40-42 分)、カラム温度; 50 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプル注入量; 1.0 μL 、検出; UV 214 nm。

トラップライン: 移動相 A; 0.1 % TFA- H_2O 、移動相 B; 0.1 %TFA- CH_3CN 、流量; 2、5、10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、トラップカラム; C4 修飾モノリス形シリカキャピラリーカラム (内径 0.2 mm、長さ 35 mm)、グラジエント; 10 %B (0-5 分)、10-80 %B (5-7 分)、80 %B (7-17 分)、80-10 %B (17-19 分)。

2.6.2 4 種標準タンパク質混合試料の LC/MS 分析

評価試料として 4 種標準タンパク質混合物を、濃度 0.01 mg/mL となる様に 10 mmol/L CHAPS、1 mmol/L EDTA、6 mol/L グアニジン緩衝液へ溶解した。LC 条件は次の通りである。

分析ライン: 移動相 A; 0.1 % TFA- H_2O 、移動相 B; 0.1 %TFA- CH_3CN 、流量; 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、カラム; フェニル修飾モノリス形シリカキャピラリーカラム、グラジエント溶離; 15 %B (0-5 分)、15-60 %B (5-35 分)、60-85 %B (35-36 分)、85 %B (36-41 分)、85-15 %B (41-45 分)、カラム温度; 50 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプル注入量; 1.0 μL 、検出; UV 214 nm。

トラップライン: 移動相 A; 0.1 % TFA- H_2O 、移動相 B; 0.1 %TFA- CH_3CN 、流量; 5

$\mu\text{L}/\text{min}$ 、トラップカラム；C4 修飾モノリス形シリカキャピラリーカラム（内径 0.2 mm、長さ 35 mm）、グラジエント；5%B（0-5 分）、5-80%B（5-7 分）、80%B（7-17 分）、80-5%B（17-19 分）。MS 条件は、キャピラリー温度；295 °C、スプレー電圧；2.15kV、CID；20 eV、 m/z 範囲；1,000-3,500。質量スペクトルの解析に行ったデコンボリューションのパラメーターは、Minimum Adjacent Charges；4-10、Noise Rejection；95 %、Relative Abundance Threshold；50 %、Output Mass Range；10,000-160,000、Target mass；50,000 Da、Change State Range；6-100 である。

3. 結果と考察

3.1 モノリス形シリカトラップカラムの作製

内径 0.2 mm のフューズドシリカキャピラリー管内で作製したモノリス形シリカの電子顕微鏡画像を図 1 に示す。この様に、モノリス形シリカが管全体に均一に形成された事が確認された。これを使用し作製したトラップカラムの外観を図 2 に示す。この C4 修飾モノリス形シリカトラップカラムを用い、ナノフロー LC/MS によるインタクトタンパク質分析を検討した。

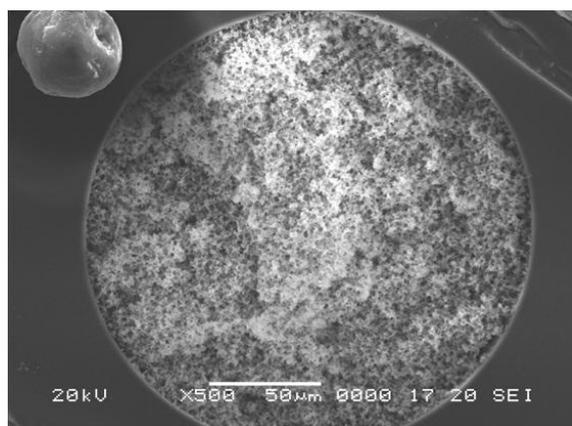


図 1 作製したモノリス形シリカ断面の電子顕微鏡画像（倍率：500）



図 2 開発したモノリス形シリカマイクロトラップカラムの外観

3.2 表面修飾の耐久性評価

C4 修飾モノリス形シリカキャピラリーカラムへ 4 種標準タンパク質混合試料を 1,000 回注入する事で得られたクロマトグラムを図 3 に示す。各試料の平均保持時間と RSD%（何れも $n=1,000$ ）は其々、リボヌクレアーゼ A；3.77 分（0.44 %）、シトクロム c；4.51 分（0.34 %）、ホロトランスフェリン；4.75 分（0.20 %）、アポミオグロビン；5.13 分（0.17 %）であった。又、図 4 は 1,000 回測定後の 6 回連続測定で得られたクロマトグラムである。同様に、リボヌクレアーゼ A；3.74 分（0.025 %）、シトクロム c；4.49 分（0.022 %）、ホロトランスフェリン；4.73 分（0.008 %）、アポミオグロビン；5.11 分（0.015 %）となり、

クロマトグラムの重ね書きも良好であった。又、通流量はカラム容積の 8,250 倍以上であり、C4 修飾モノリス形キャピラリーカラムはインタクトタンパク質の分析条件において高い耐久性を有する事が示された。

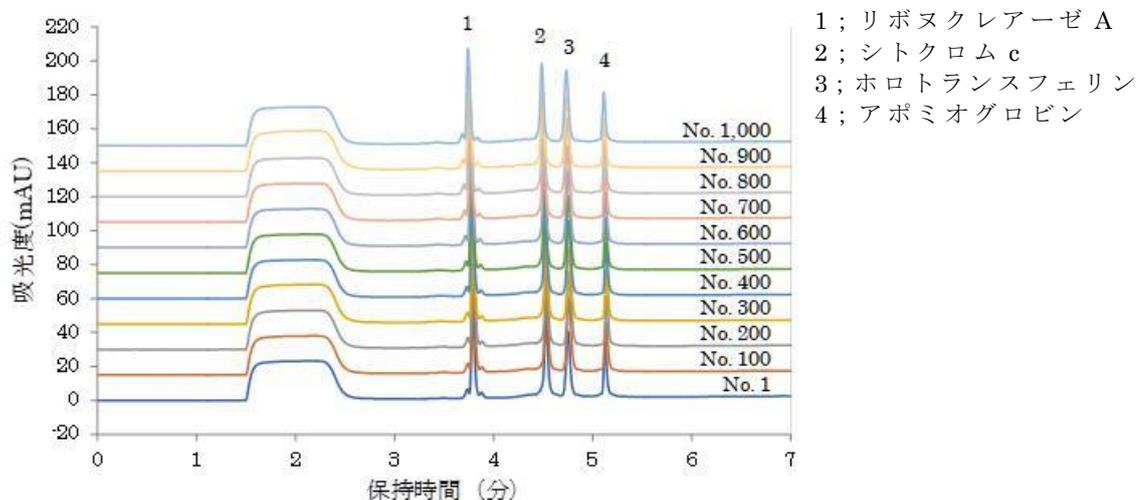


図 3 4 種標準タンパク質混合試料の 1,000 回連続注入で得られたクロマトグラムの重ね書き (100 回注入毎)

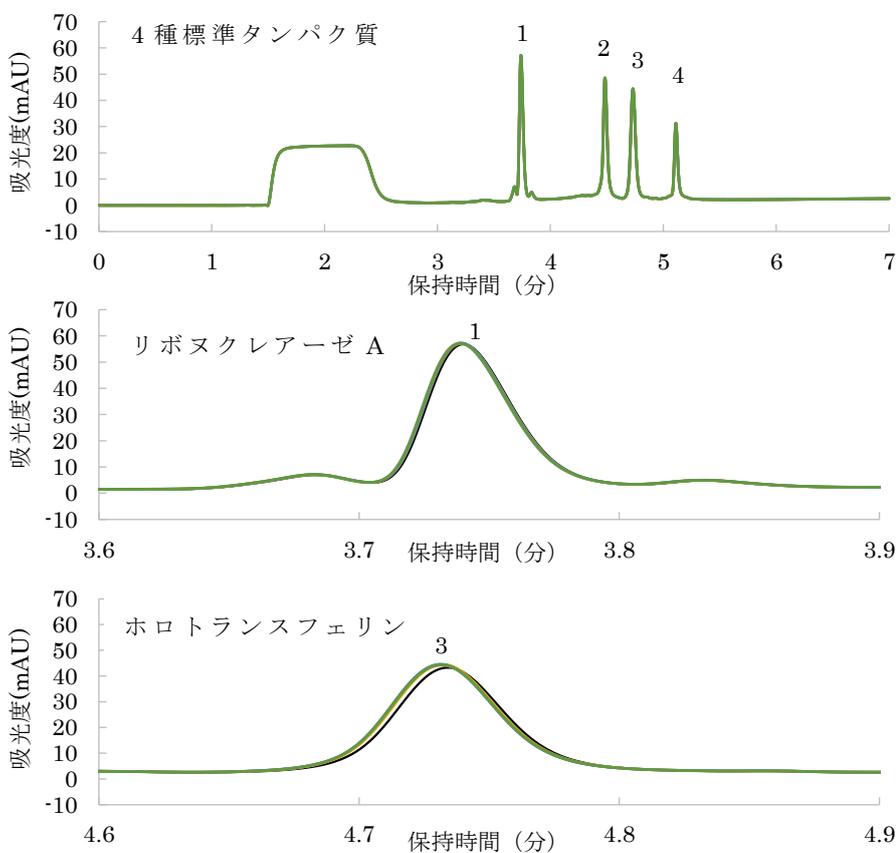


図 4 1,000 回連続測定後に行った 6 回測定で得られたクロマトグラムの重ね書き (ピークの帰属は図 3 と同一)

3.3 界面活性剤を含むタンパク質試料の LC 分析

界面活性剤が含まれる事で LC におけるタンパク質分離は複雑になる。即ち、界面活性剤とタンパク質の共溶出を防ぐ手段が必要となる。図 5(a)は、4 種標準タンパク質混合試料とモノクロナール抗体を CHAPS 水溶液で調製し、単純なリニアグラジエント溶離で分離した結果である。この図から、CHAPS はリボヌクレアーゼ A と同等の保持を有する事が分かり、MS 分析を行う場合には事前の除去が必要である。図 5(b)は同試料に対し、15 分間のイソクラティック溶離の後、グラジエント溶離を行ったクロマトグラムである。イソクラティック溶離を加える事で、タンパク質と CHAPS が容易に分離した。

この理由としてモノリス形シリカの構造的特徴が挙げられる。モノリス形シリカはシリカ含有量が少なく、粒子充填形カラムに対して低分子化合物のイソクラティック溶離における保持が約 1/3 程度と小さい。しかしながら、タンパク質など生体高分子の溶出は主に溶離液の組成で決まるため、水の多いイソクラティック溶離では溶出しない。この特性により、低分子の界面活性剤のみが水の多い条件でもイソクラティック溶離に溶出し、タンパク質と分離されたと考えられる。この特性により、生体高分子試料溶液からの緩衝剤や界面活性剤の脱塩・除去を目的とするトラップカラムとして適していると言える。

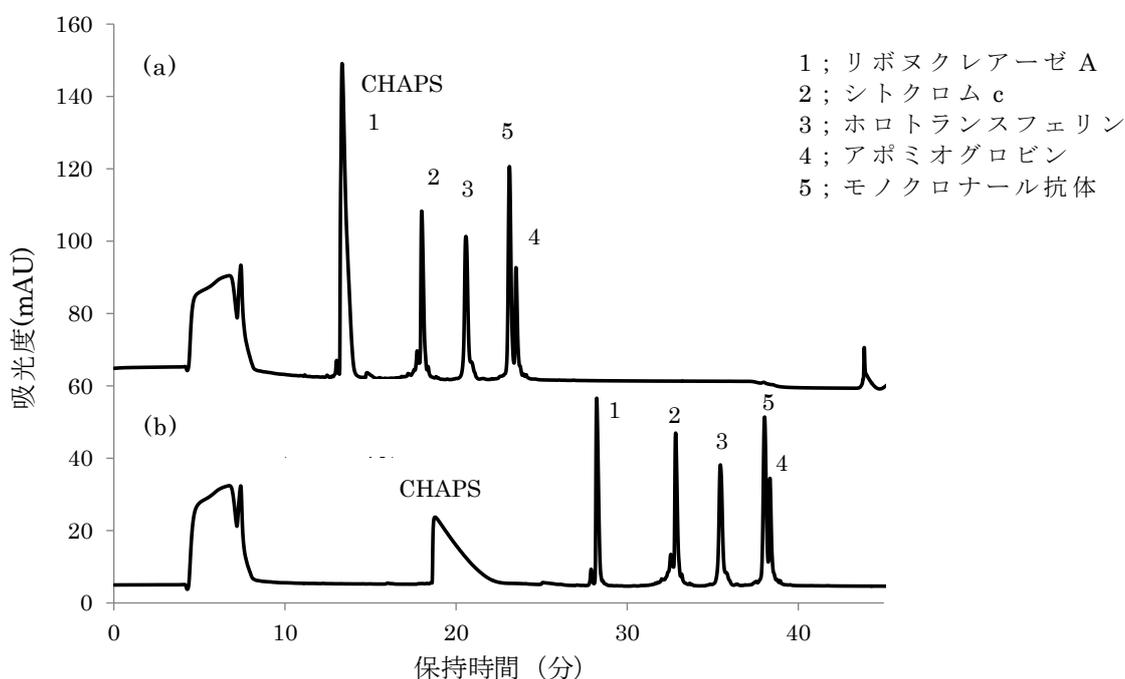


図 5 界面活性剤とタンパク質試料の分離検討結果
 (a) 注入と同時にグラジエント溶離を開始
 (b) 注入後、イソクラティック溶離を行った後にグラジエント溶離を開始

一方、タンパク質溶液からの界面活性剤除去の影響を評価するため、界面活性剤を含まない 0.1 %TFA 水溶液のみで溶解したタンパク質試料と安定性を比較した。図 6(a)は 0.1 %TFA に溶解したタンパク質試料の分析結果であり、サンプル調製直後から 1 時間後にモノクロナール抗体のピークが著しく減少した。元々希薄溶液である事とサンプルラック温度を低く設定した事で、バイアルへの吸着・沈殿が生じたのではないかと考えられる。一方、1 mmol/L と少量であるが CHAPS を含む試料 (図 6(b)) では 24 時間経過しても概ね同等のクロマトグラムが得られた。これは、界面活性剤を除去したタンパク質試料には経時的な変化が生じる事を示唆しており、LC 分析前の緩衝剤や界面活性剤の脱塩・除去には十分な注意が必要と言える。

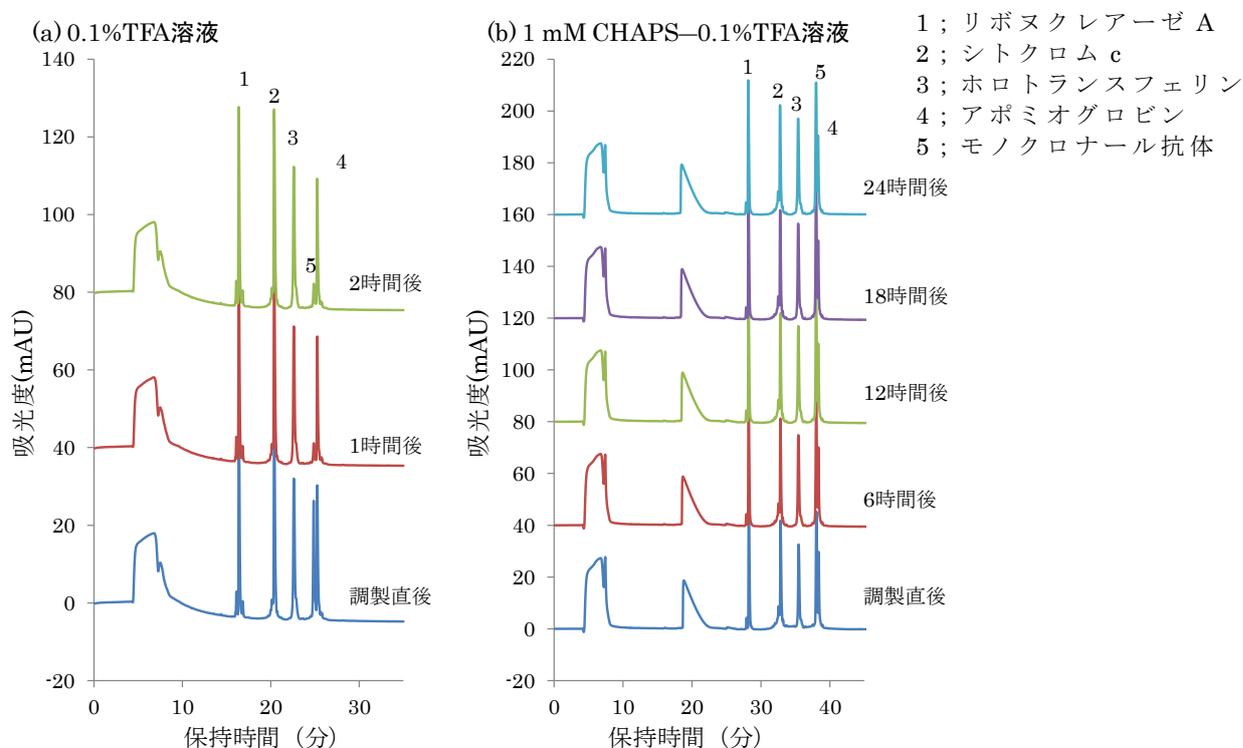


図 6 各種溶媒へ溶解したタンパク質試料の経時変化
 (a) 界面活性剤を含まない溶媒 (0.1 % TFA 水溶液)
 (b) 界面活性剤を含む溶媒 (1 mmol/L CHAPS を含む 0.1 % TFA 水溶液)

3.4 rHSA を用いたマイクロトラップカラムの脱塩条件の検討

マイクロトラップを使用する条件検討として、トラップカラムへの送液流量の影響を確認した (図 7)。流量が少ない場合、サンプルループからトラップカラムへの輸送が十分ではなく、一方、流量が多い場合には破過している可能性があった。従って、以降の検討では、送液流量を 5 μ L/min とした。

同一試料を用いたトラップカラムの有無によるピーク面積の影響を確認した (図 8)。本条件下では、rHSA のトラップカラムへの特異的な吸着が見られなかった。但し、タンパ

ク質はその特性が多様多様であり、吸着特性など継続的な試験が必要と考えられる。

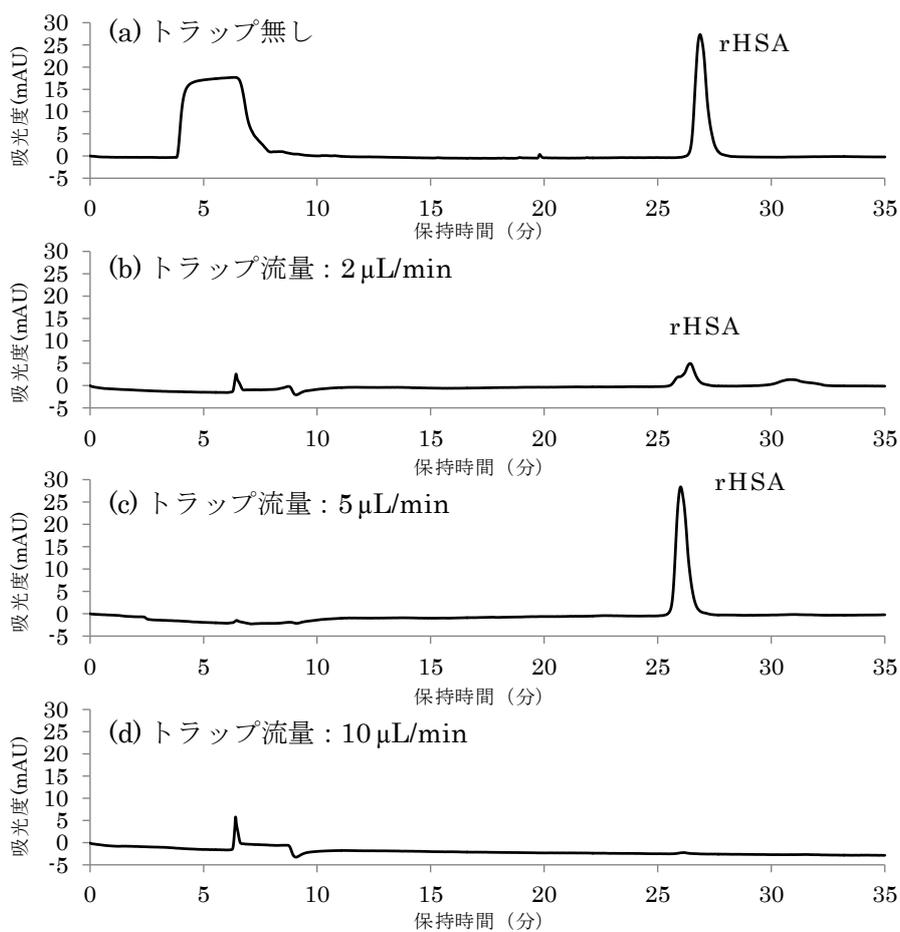


図 7 トラップカラムへの送液条件の影響

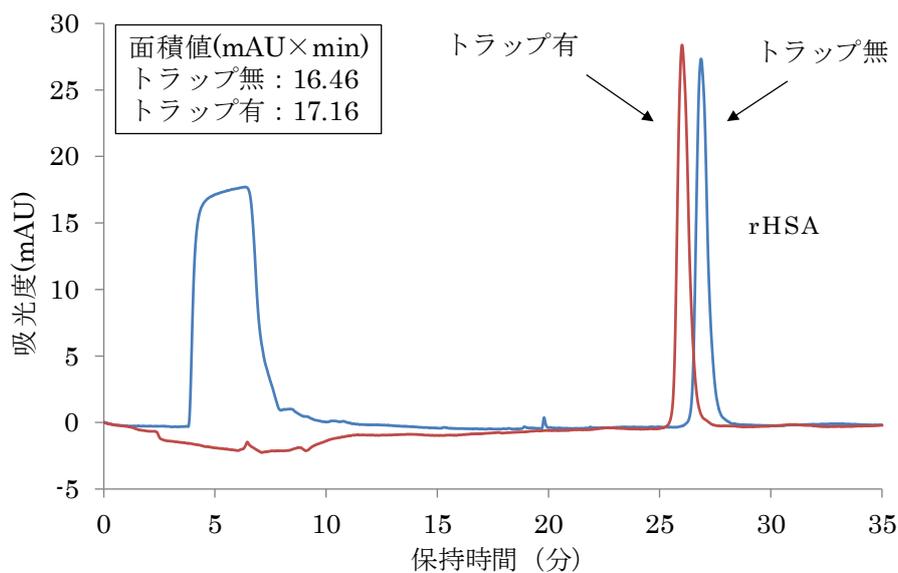


図 8 トラップカラムの有無でのクロマトグラムの比較

図 9 に、本トラップシステムを用いたインタクト rHSA と還元化 rHSA のクロマトグラムを示す。還元化処理により保持時間に違いが生じた。又、還元化処理した試料においても、インタクトな rHSA と同じ時間に溶出する成分がある事から、還元処理の進んでいない rHSA の存在が示唆された。界面活性剤や緩衝剤をオンラインで除去する事で、このようなタンパク質の反応を追跡する事が可能となる。又、MS での検出が出来れば、UV での定量と MS での成分同定が可能であり、様々なタンパク質研究に役立つものと思われる。

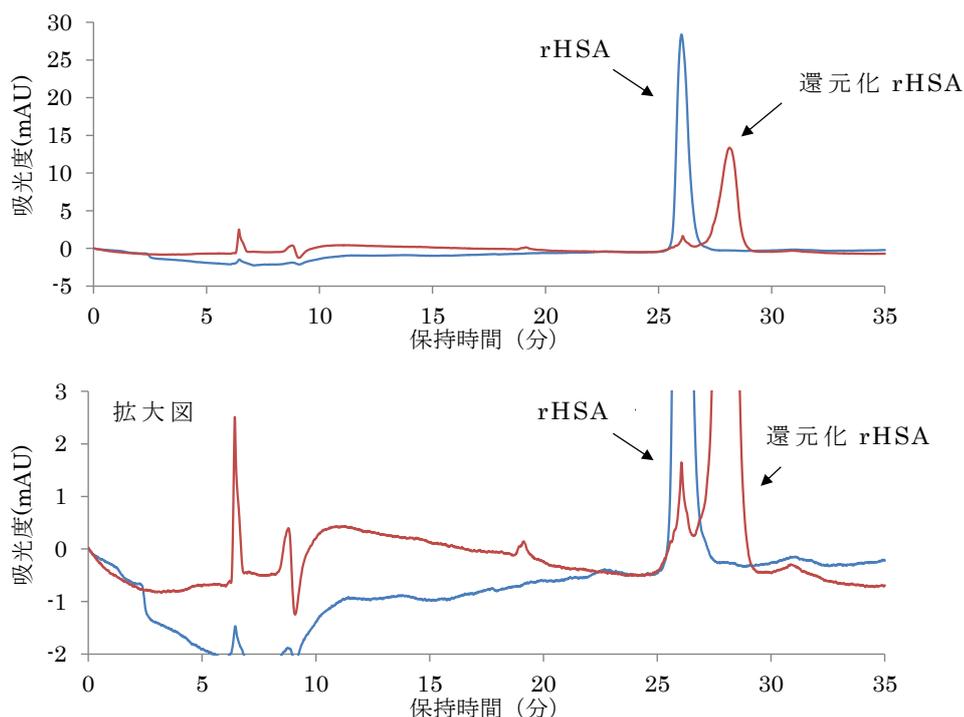


図 9 インタクト rHSA と還元 rHSA のクロマトグラムの比較

3.5 4 種混合タンパク質の LC-UV 並びに LC/MS 分析

タンパク質可溶性溶媒 (10 mmol/L CHAPS、1 mmol/L EDTA・2Na、6 mol/L グアニジン緩衝液) に溶解させた 4 種標準タンパク質混合試料 (0.01 mg/mL) の測定における、トラップカラムの有無による UV クロマトグラムの比較を図 10 に示す。なお、CHAPS の臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration、CMC) は 8 mmol/L であり、本溶媒は細胞等からのタンパク質抽出に汎用されている。トラップカラムを使用しない場合、タンパク質可溶性溶媒中の添加剤による UV 吸収が非常に大きいため、タンパク質の分析が困難であったが、トラップを使用する事で、添加剤をオンラインで除去する事が出来た。

同システムを用いて、タンパク質の LC/MS 分析を行った。同試料について、トラップカラムの有無で得られた全イオン電流 (total ion current、TIC) の対比を図 11 に示す。トラップカラム無しでは添加剤由来のイオンの影響により、タンパク質が検出されなかったが、トラップカラムを使用する事で、UV 検出器の場合と同様に各タンパク質の MS 検

出が可能であった。

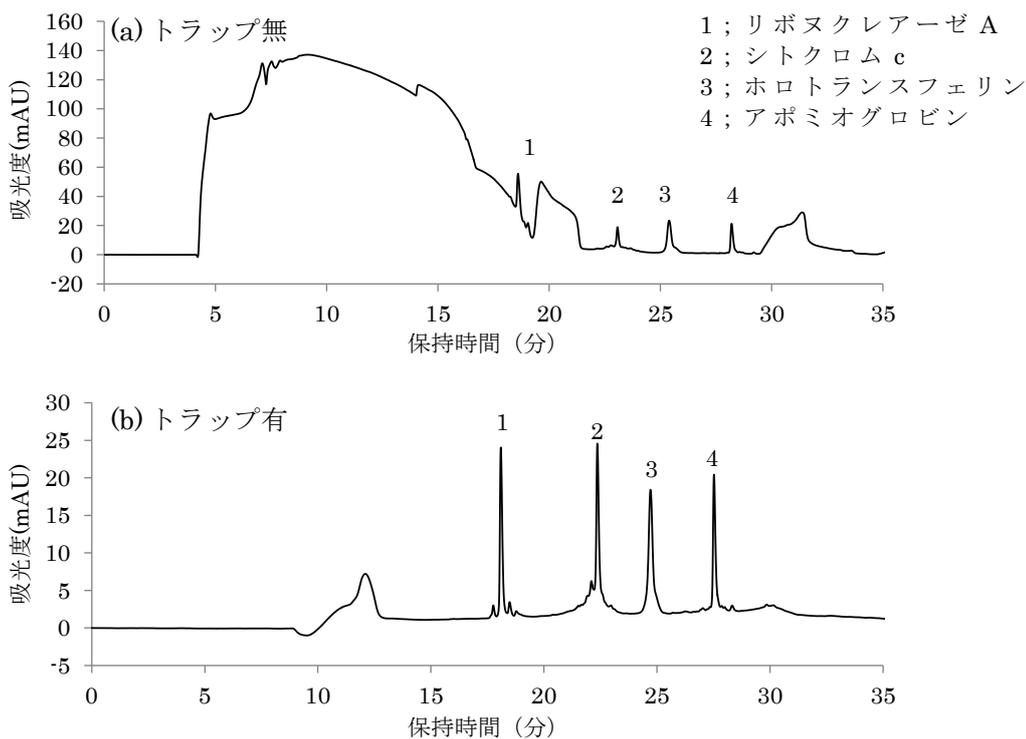


図 10 タンパク質可溶化溶媒に溶解させた試料の測定におけるトラップカラムの有無でのクロマトグラムの比較 (UV 検出)

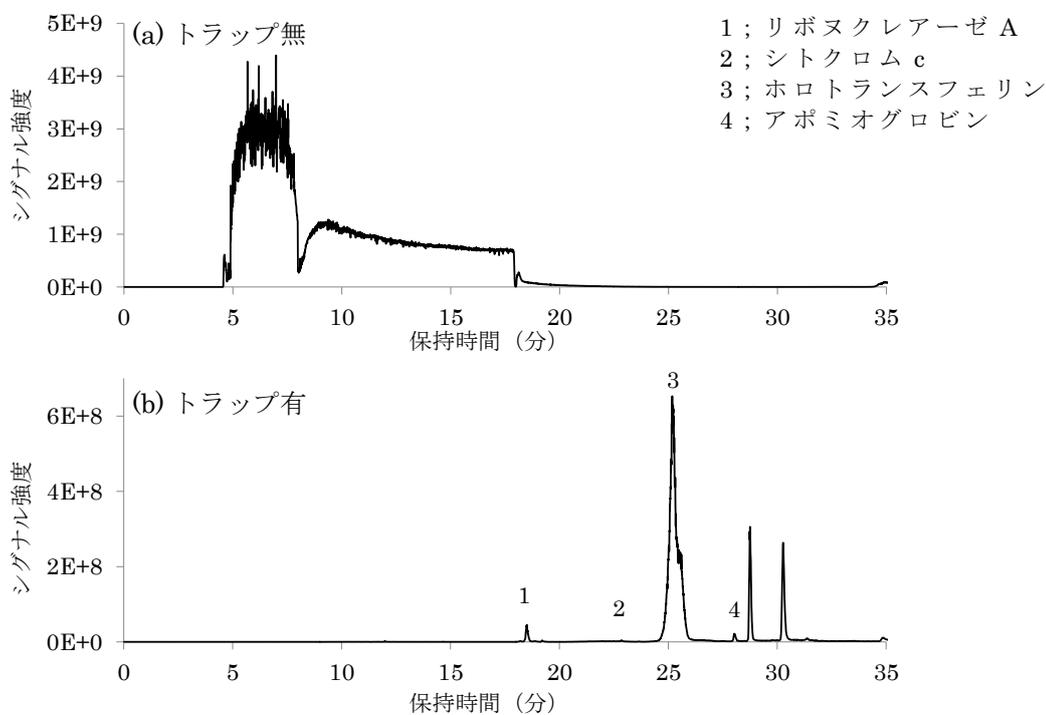


図 11 タンパク質可溶化溶媒に溶解させた試料の測定におけるトラップカラムの有無での TIC の比較

図 11(b)に示す各ピークのマススペクトル並びにデコンボリューションにより得られた分子量を図 12 に示す。各タンパク質の負荷量は 10 ng 程度の少量であったが、明瞭なマススペクトルが得られている。デコンボリューションの結果、各タンパク質の分子量として、ピーク 1 ; 13.7 kDa、ピーク 2 ; 12.2 kDa、ピーク 3 ; 75.5 kDa、ピーク 4 ; 16.9 kDa が算出され、ピーク 3 のホロトランスフェリンを除き、理論値と同等であった。

これらの結果より、トラップカラムの使用は、可溶化剤に溶解されたインタクトなタンパク質の LC/MS 測定に有用であると考えられる。更に、MS/MS による解析を行う事により、タンパク質の精緻な構造解析に繋げる事が可能である。

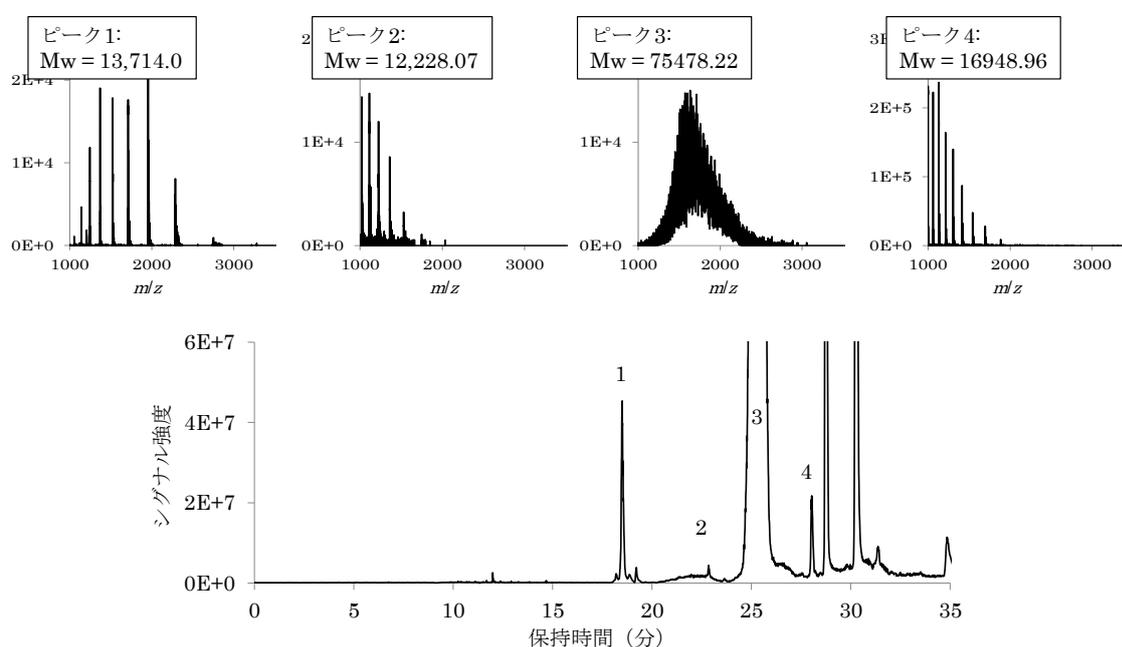


図 12 TIC から抽出した各タンパク質のマススペクトルとデコンボリューションにより得られた分子量情報 (ピークの帰属は図 11 と同一)

4 結論

多くの界面活性剤や塩類を含むタンパク質試料の脱塩・濃縮の自動化のため、C4 修飾を施したモノリス形シリカトラップカラム(内径 0.2 mm、長さ 35 mm)を開発した。

rHSA を用いた検討の結果、本トラップカラムへの送液流量は 5 μ L/min が最適であった。トラップカラムを使用する事で、インタクトの rHSA と TCEP による還元化を行った rHSA との分離が可能となり、還元アルキル化等のタンパク質の反応状態追跡にも利用出来る事が分かった。10 mmol/L CHAPS、1 mmol/L EDTA \cdot 2Na、6mol/L グアニジン緩衝液の組成に代表される高濃度の添加剤を含むタンパク質可溶溶媒に溶解させたインタクトのタンパク質の LC/MS による直接分析を行った結果、トラップカラムを使用しない場合は、各種添加剤の影響で MS 検出が不可能だったが、トラップカラムを使用する事で、明

瞭なマススペクトルを得る事が可能であった。

以上の検討結果より、今回開発したトラップカラムは、タンパク質の反応追跡のみでなく、高濃度の添加剤を含むタンパク質可溶溶媒に溶解させたままのインタクトなタンパク質の LC/MS 分析を容易にする等、より複雑で精緻なタンパク質研究に非常に有用であるものと考えられる。

引用文献

- 1) 平野 久、ぶんせき(*Bunseki*)、 348-353 (2005).
- 2) 川村 猛、*J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*、 64、 75-79 (2016).
- 3) 原園 景、*J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*、 64、 93-96 (2016).
- 4) 林原加代子、榎本敢太、内山 進、*J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*、 66、 161-163 (2018).
- 5) 小林宏資、大田雪姫、和田啓男、*分析化学*、 69、 97-104 (2020).

< 執筆者略歴 >

小林宏資 (Kobayashi Hiroshi)

信和化工株式会社 R&D グループ (〒612-8307 京都市伏見区景勝町 50-2)

京都工芸繊維大学にて田中信男教授を師事し、クロマトグラフィー技術について学ぶ。

信和化工株式会社にて分離剤開発に従事 (2007 年～)。

現在、液体クロマトグラフィー研究懇談会役員として活躍中。

LC 分析士三段、LC/MS 分析士初段。



【 技術論文 】

HPLC による 1-アリールエチルアミン類の鏡像異性体分離におけるキラル固定相の性能比較

西岡亮太

株式会社住化分析センター・テクニカルソリューション本部・大阪ラボラトリー

Performance comparison of chiral stationary phases in the enantiomeric separation of 1-arylethylamines by HPLC

Ryota Nishioka

Osaka Laboratory, Technical Solution Headquarters, Sumika Chemical Analysis Service Ltd.

(Received September 11, 2020 ; Accepted October 14, 2020)

要旨

HPLC によるキラルアミンの鏡像異性体分離において、2 種類の異なるキラル固定相の分離性能を 1-アリールエチルアミン類を試料として比較した。クラウンエーテル形キラル固定相 (CSP-1) は、1 位のアリール基に嵩高い置換基を持つアミン類に対して優れたキラル分離能を示した。一方、水酸基をアセチル化した β -シクロデキストリン形キラル固定相 (CSP-2) は、1-フェニルエチルアミンとそのモノ置換体及び 1、2-ジアリールエチルアミン類のキラル分離に有効であった。CSP-1 と CSP-2 は、置換基の異なる 1-アリールエチルアミン類に対して、互いに相補的なキラル分離能を有する事が認められた。両固定相で共に分離したキラルアミンの鏡像異性体の溶出順は同じであった。これら 2 種のキラル固定相をそれぞれの特性を考慮して選択する事により、多くのキラルアミンに対するキラル分離メソッド開発が可能になる事が期待される。

Abstract

In the separation of enantiomers of chiral amines by HPLC, two different chiral stationary phases were compared using 1-arylethylamines as samples. The crown-ether based chiral stationary phase (CSP-1) showed excellent chiral separation ability for chiral 1-arylethylamines having bulky substituents on the 1-aryl group. The β -cyclodextrin type chiral stationary phase with acetylated hydroxyl group (CSP-2) was effective for chiral separation of 1-phenylethylamine and its mono-substituted

derivatives and 1, 2-diarylethylamines. It was confirmed that CSP-1 and CSP-2 have complementary chiral separation ability for 1-arylethylamines having different substituents. The elution order of enantiomers of chiral amines separated in both stationary phases was the same. It is expected that the enantiomeric separation method for many chiral amines can be developed by selecting these two chiral stationary phases in consideration of their respective characteristics.

1. 緒言

鏡像異性体の分離分析において、キラル固定相を用いる HPLC 法は精度が高く且つ迅速な方法として汎用され、これまで様々なタイプのキラル固定相が報告されて来た^{1)~5)}。キラル化合物の中でもアミノ基を有する化合物は、アミノ酸誘導体の他、生理活性物質や医薬中間体等の重要な化合物が多く、医薬品開発やその他の研究分野において、キラル分離の必要性が高い。筆者らはこれまで、キラルアミンの鏡像異性体分離に有効なキラル固定相として、キラルセクターの異なる 2 種類の固定相を報告した。その 1 つは擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体をキラルセクターとする固定相 (CSP-1) である^{6)~8)}。クラウンエーテル誘導体を用いたキラル固定相は 1970 年代から報告されていた^{9)~11)}。これらはアミノ酸等の第一級アミノ基を有するキラル化合物の分離に利用されて来たが、初期に市販された固定相はキラルセクターを担体にコーティングしたタイプであった¹¹⁾。CSP-1 は、擬 18-クラウン-6 エーテル誘導体を担体のシリカゲルに化学結合し耐久性を向上させた固定相で、コーティングタイプと比べて移動相中の有機溶媒濃度に制約が少なくなり、分離対象となるキラルアミンの範囲が広がった。もう 1 つは水酸基をアセチル化した β -シクロデキストリン誘導体をキラルセクターとする固定相 (CSP-2) である^{12)~13)}。シクロデキストリン誘導体を用いたキラル固定相も従来から報告され^{14)~16)}、多くの固定相が実用化されている。筆者らは、 β -シクロデキストリン環の水酸基未修飾の固定相と水酸基をアセチル化した固定相の分離性能を詳細に比較した結果、両者のキラル分離における選択性は大きく異なり、水酸基をアセチル化した固定相がアミノ基を有するキラル化合物の鏡像異性体分離に優れた性能を有する事を報告した¹³⁾。

これら 2 種類のキラル固定相は共に、試料と固定相間のホストゲスト相互作用に基づいてキラル識別が達成されると推察されるが、その分離メカニズムや使用する移動相の条件が異なる。それぞれキラルアミン類の鏡像異性体分離に利用されているが、同じ試料を用いた両固定相の性能比較は報告されていない。そのため、それぞれの分離特性を明らかにし、キラル分離メソッド開発の際のキラル固定相選択の指標とする目的で、代表的なキラル第一級アミンである 1-アリアルエチルアミン類を試料として、CSP-1 と CSP-2 のキラル分離能の比較を行ったので報告する。

2. 実験

2.1 装置・カラム

島津製作所製の HPLC ポンプ (LC-10AT)、デガッサー (GDU-14A)、紫外分光光度検出器 (SPD-10A) 及びデータ処理装置 (C-R6A) から構成される HPLC システム及びレオダイン製サンプルインジェクター (7725i) を用いた。

キラル固定相として、住化分析センター製 SUMICHIRAL[®] OA-8000 (CSP-1) 及び SUMICHIRAL[®] OA-7700 (CSP-2) のそれぞれ内径 4.6 mm、長さ 250 mm のカラムを用いた。CSP-1 はキラルな擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体を、CSP-2 は水酸基をアセチル化した β -シクロデキストリン誘導体を、それぞれ粒子径 5 μm のアミノプロピルシリカゲルにアミド結合を介して化学結合させた固定相である。各キラル固定相の化学構造を Fig. 1 に示す。

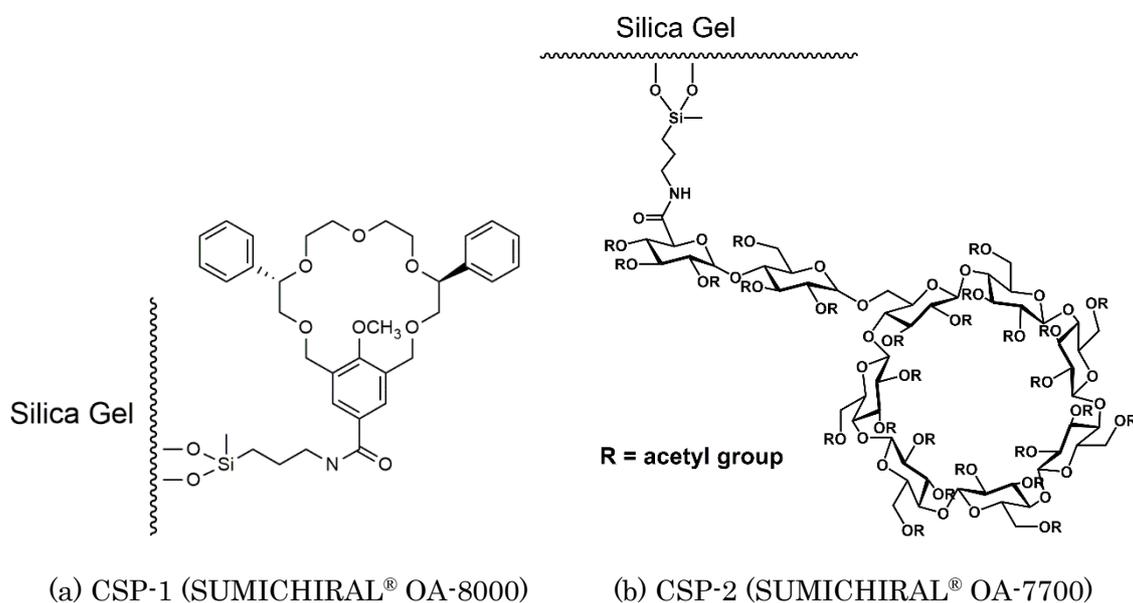


Fig.1 Structures of chiral stationary phases used in this study

2.2 試料・試薬

キラル分離能評価のための試料として、1-フェニルエチルアミン、1-(*p*-トリル)エチルアミン、1-(4-ブロモフェニル)エチルアミン、1-(2, 4-ジクロロフェニル)エチルアミン、1、2-ジフェニルエチルアミン、1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミン (以上東京化成工業製) 及び 1-(3-クロロフェニル)エチルアミン、1-(4-クロロフェニル)エチルアミン、1-(1-ナフチル)エチルアミン (以上 Combi-Blocks 製) の各ラセミ体を用いた。これらの試料の化学構造を Fig. 2 に示す。溶出順の確認のため、(*R*)-1-フェニルエチルアミン及び(*S*)-1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミン (以上東京化成工業製)、(*R*)-1-(*p*-トリル)エチルアミン (富士フィルム和光純薬工業製) 及び(*R*)-1-(1-ナフチル)エチルアミン (関東化学製) を用いた。

移動相及び試料溶液調製のため、蒸留水、メタノール、リン酸、リン酸二水素ナトリウム及び過塩素酸 (何れも富士フィルム和光純薬工業製) を用いた。移動相は、CSP-1 において

は、メタノールと pH 1.8 に調整した過塩素酸水溶液の混液、CSP-2 においては、メタノールと 20 mmol L⁻¹ リン酸二水素ナトリウム水溶液にリン酸を加えて pH 3 に調整したリン酸塩水溶液の混液を用いた。移動相の組成は図表中に記載した。

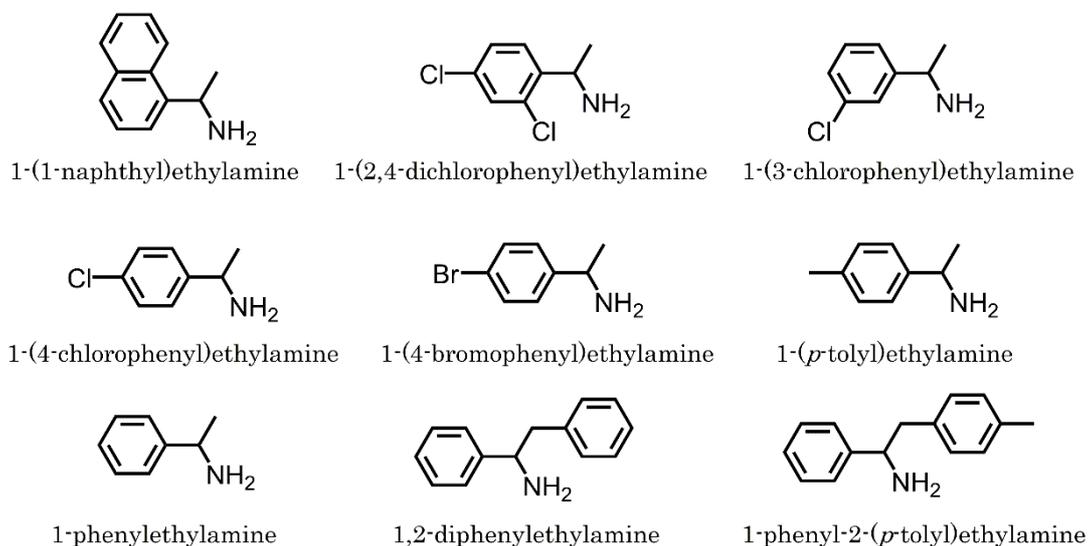


Fig.2 Structures of racemates as analyte used in this study

2.3 実験操作

各試料をメタノールに溶解してそれぞれ約 2 mg mL⁻¹ の溶液とし、その 1 μ L を HPLC 装置に注入した。紫外分光光度検出器の検出波長は 254 nm、流速は 0.5 mL min⁻¹ に設定し、カラム温度は室温 (約 25°C) として測定を行った。キラル固定相の性能評価値として分離係数 (α) 及び先に溶出する成分の保持係数 (k_1) を算出した。計算方法は日本産業規格 (JIS K0214) ¹⁷⁾ に従った。

3. 結果と考察

3.1 CSP-1 のキラル分離能

Table 1 に 9 種類の 1-アリアルエチルアミン類に対する α と k_1 の値を示す。CSP-1 は、1-(1-ナフチル)エチルアミン及び 1-(2, 4-ジクロロフェニル)エチルアミンに対して α が 1.2 以上の優れたキラル分離能を示したが、1-フェニルエチルアミンとそのモノ置換誘導体に対しては α が 1.1 未満となり、十分なキラル分離能は認められなかった。1-アリアルエチルアミンの 1 位の置換基がモノクロロフェニル基の場合とジクロロフェニル基の場合で α の値に大きな差があった。CSP-1 の場合、1-アリアルエチルアミンの 1 位の不斉炭素にジクロロフェニル基やナフチル基のような高高いアリアル基が結合する化合物ほど、 α が大きくなる傾向があると推察される。又、1-アリアルエチルアミンの 2 位にもアリアル基を有する 1, 2-ジフェニルエチルアミン及び 1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンは、保持時間が長

くなるものの、この条件ではキラル分離は出来なかった。この結果は、1-アリールエチルアミン類の 2 位の置換基は、キラル分離能の向上に寄与しない事を示唆している。

Table 1 Enantiomeric separation ability of CSP-1

compounds	mobile phase (v/v) methanol/HClO ₄ aq. ^{a)}	k ₁	α	elution order
1-(1-naphthyl)ethylamine	40/60	1.18	1.56	<i>S-R</i>
1-(2,4-dichlorophenyl)ethylamine	20/80	1.89	1.24	
1-(3-chlorophenyl)ethylamine	20/80	1.31	1.04	
1-(4-chlorophenyl)ethylamine	20/80	1.29	1.07	
1-(4-bromophenyl)ethylamine	20/80	1.86	1.05	
1-(<i>p</i> -tolyl)ethylamine	5/95	1.40	1.09	<i>S-R</i>
1-phenylethylamine	5/95	0.76	1.09	<i>S-R</i>
1,2-diphenylethylamine	40/60	1.29	1.00	
1-phenyl-2-(<i>p</i> -tolyl)ethylamine	40/60	2.12	1.00	

a) perchloric acid aqueous solution adjusted to pH 1.8

3.2 CSP-2 のキラル分離能

Table 2 に、Table 1 と同じ 1-アリールエチルアミン類に対する α と k₁ の値を示す。1、2-ジフェニルエチルアミン及び 1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンに対して、CSP-1 の結果とは異なり、α の値が 1.4 以上となって顕著に優れたキラル分離能を示した。又、1-フェニルエチルアミンのモノ置換誘導体に対しても 1.1 以上の α が得られ、これらのアミン類のキラル分離における有効な選択肢になる事が示された。一方、CSP-1 で大きな α の値を示した 1-(1-ナフチル)エチルアミン及び 1-(2,4-ジクロロフェニル)エチルアミンは、CSP-2 ではその分子量の大きさの割に保持が小さく、CSP-1 と CSP-2 の分離能には大きな差が認められた。1-フェニルエチルアミンの塩素置換体の保持時間を同じ移動相組成で比較した場合、1-(4-クロロフェニル)エチルアミンより 1-(2,4-ジクロロフェニル)エチルアミンの方が早くなった。これらの結果から、CSP-2 においては、1-アリールエチルアミンの 1 位に嵩高い置換基を有する化合物に対してはホストゲスト相互作用が十分に行われず、その結果、保持が小さくなり十分なキラル分離能が得られないと推察される。

CSP-2 における移動相中のメタノール含量と α 及び k₁ の関係について、1-(3-クロロフェニル)エチルアミンを試料として検討した結果を Fig. 3 に示す。保持挙動は一般的な逆相カラムに近く、α はメタノール濃度に依らずほぼ一定の値を示した。この事から、CSP-2 を用いてアミン化合物のキラル分離を行う場合、移動相のメタノールとリン酸塩水溶液の組成比を変えて保持時間を調整するだけで、比較的容易にキラル分離メソッド開発が可能であると言える。

Table 2 Enantiomeric separation ability of CSP-2

compounds	mobile phase (v/v) methanol/phos.aq. ^{b)}	k_1	α	elution order
1-(1-naphthyl)ethylamine	30/70	1.15	1.00	
1-(2,4-dichlorophenyl)ethylamine	30/70	1.33	1.00	
1-(3-chlorophenyl)ethylamine	30/70	1.10	1.22	
1-(4-chlorophenyl)ethylamine	30/70	2.64	1.14	
1-(4-bromophenyl)ethylamine	30/70	4.75	1.11	
1-(<i>p</i> -tolyl)ethylamine	30/70	0.92	1.11	<i>S-R</i>
1-phenylethylamine	4/96	1.15	1.17	<i>S-R</i>
1,2-diphenylethylamine	50/50	1.58	1.78	
1-phenyl-2-(<i>p</i> -tolyl)ethylamine	50/50	1.84	1.42	<i>S-R</i>

b) 20 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄ aqueous solution adjusted to pH 3.0 by adding H₃PO₄.

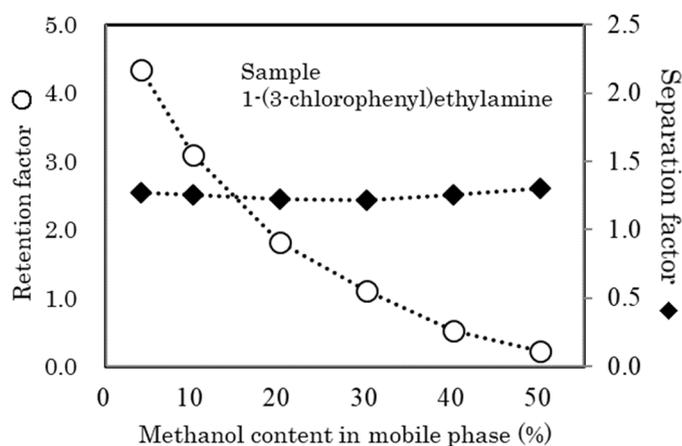


Fig.3 Effect of methanol content in mobile phase on chiral separation of CSP-2

3.3 2種のキラル固定相の性能比較

今回評価した2種のキラル固定相を比較した場合、CSP-1とCSP-2は、ゲストとなる1-アリアルエチルアミン類の置換基の違いによってキラル分離の選択性が大きく異なった。CSP-1は1位にジクロロベンゼン基やナフチル基の様な嵩高い置換基がある化合物に対して優れた分離能を示す一方、CSP-2は1-フェニルエチルアミンとそのモノ置換誘導体及び1、2-ジアリアルエチルアミンに対して有効であった。1-アリアルエチルアミン類のキラル分離において、同じ化合物に対するCSP-1とCSP-2の分離能に顕著な差が認められる場合があり、互いに相補的なキラル分離特性を有する事が示された。これは、それぞれのホストゲスト相互作用のメカニズムの相違に起因すると推察されるが、今回検討した1-アリアルエチルアミン類以外のキラルアミンの分離においても同様の分離傾向を示す事が示唆される。それぞれの固定相を用いたキラル分離クロマトグラムの例をFig. 4に示す。

CSP-2は、カテコールアミン等のキラルアミノアルコールや第二級アミンのキラル分離

も可能であり¹³⁾、分離対象となるアミン化合物の種類が多く、キラルアミンの分離メソッド開発におけるキラル固定相の主要な選択肢となり得る。しかし、対象化合物の化学構造によっては CSP-1 の方が有効な場合があるので、それぞれの固定相の特性を考慮して選択する事によって、分離対象となるアミン化合物の範囲が広がる事が期待される。

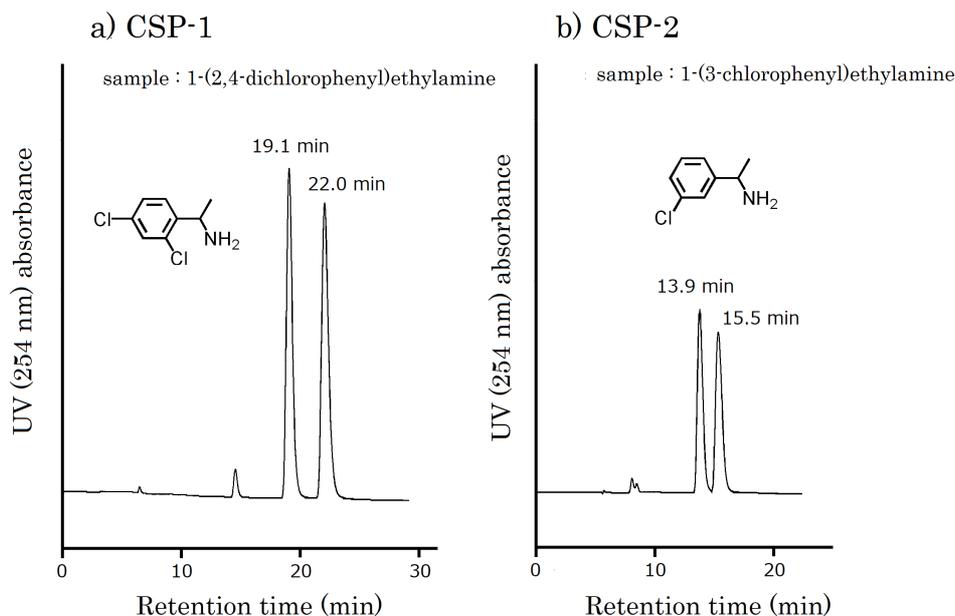


Fig.4 Typical chromatograms of enantiomeric separation using CSP-1 and CSP-2
 The mobile phases are shown in Table 1 and Table 2, respectively. Retention times of each enantiomer are indicated on the peak tops.

3.4 鏡像異性体の溶出順

光学活性体が市販されている化合物を用いて鏡像異性体の溶出順を確認した結果を Table 1 及び Table 2 に示す。CSP-1、CSP-2 共に分離した 1-フェニルエチルアミン及び 1-(*p*-トリル)エチルアミンは、どちらも *S* 体、*R* 体の順で溶出した。又、CSP-1 における 1-(1-ナフチル)エチルアミン、CSP-2 における 1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンは何れも *S* 体が先に溶出した。これらの結果から、アミン類のキラル分離における両固定相の溶出順は同じ傾向であると考えられる。

キラルクラウンエーテルをホストとした際のキラル認識能を定量的に評価する方法として、エナンチオマーの一方 (*S* 体) を重水素標識したラセミゲストを用いて、FAB/MS におけるホストゲストコンプレックスイオンのピーク強度比 (IR/IS-d3) をキラル認識能の尺度とする方法が報告され、ピーク強度比 (IR/IS-d3) が 1.0 以上の場合、ホストがゲストの *R* 体とより強く結合する事を意味するとされている^{18)~19)}。その中で、CSP-1 のキラルセクターと同じ構造の擬 18-クラウン-6 エーテル誘導体をホストとした場合、1-(1-ナフチル)エ

チルアミンの IR/IS-d3 は 1.53 となる事が示されている¹⁸⁾。この事は、*S*体より *R*体の方がホストゲストコンプレックススイオンのピーク強度比が大きい、即ちホストとの親和性が大きい事を示唆しているが、HPLC において *S*体より *R*体の保持が大きい結果と相関性がある。CSP-1 の 1-(1-ナフチル)エチルアミンに対するエナンチオ選択性と NMR の相関性について既に報告されている⁸⁾が、クラウンエーテル形のキラル固定相においては、HPLC 以外の物理化学的情報から、HPLC における溶出順を予測出来る可能性がある事を示している。

4. 結言

HPLC によるキラルアミンの鏡像異性体分離において、1-アリールエチルアミン類を試料として 2 種類の異なるキラル固定相の分離性能比較を行った。CSP-1 と CSP-2 は、1-アリールエチルアミン類の置換基の違いによってキラル分離の特性が大きく異なり、互いに相補的なキラル分離能を有する事が認められた。それぞれのキラル固定相の分離特性を考慮して選択する事により、より多くのキラルアミンに対して効果的なキラル分離メソッド開発が可能になると期待される。

引用文献

- 1) 大井尚文、“キラルクロマトグラフィーのあゆみ”、丸善 (2001).
- 2) Y. Okamoto, T. Ikai, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 2593 (2008).
- 3) Y. Okamoto, Y. Kaida, *J. Chromatogr. A*, **666**, 403 (1994).
- 4) V. A. Davankov, A. S. Bochkov, A. A. Kurganov, P. Roumeliotis, K. K. Unger, *Chromatographia*, **13**, 677 (1980).
- 5) N. Oi, *Chromatography*, **14**, 61R (1993).
- 6) 西岡亮太、上重哲郎、中村 崇、廣瀬敬治、戸部義人、第 11 回クロマトグラフィー科学会議要旨集、p.294 (2000).
- 7) K. Hirose, T. Nakamura, R. Nishioka, T. Ueshige, Y. Tobe, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 1549 (2003).
- 8) K. Hirose, J. Yongzhu, T. Nakamura, R. Nishioka, T. Ueshige, Y. Tobe, *Chirality*, **17**, 142 (2005).
- 9) L. R. Sousa, G. D. Y. Sogah, D. H. Hoffman, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4569 (1978).
- 10) G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3035 (1979).
- 11) T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Sugiura, *J. Chromatogr.*, **405**, 145 (1987).
- 12) 西岡亮太、原田修治、梅原一宏、第 27 回クロマトグラフィー科学会議要旨集、p. 55 (2016).

- 13) R. Nishioka, S. Harada, *Chromatography*, **37**, 65 (2016).
- 14) D. W. Armstrong, W. DeMond, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 411 (1984).
- 15) W. L. Hinze, T. E. Riehl, D. W. Armstrong, W. DeMond, A. Alak, T. Ward, *Anal. Chem.*, **57**, 237 (1985).
- 16) A. M. Stalcup, S-C. Chang, D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, **513**, 181 (1990).
- 17) JIS K0214 : 2013、分析化学用語 (クロマトグラフィー部門)、日本規格協会 (2013).
- 18) 澤田正實、萩田耕司、今村浩之、田淵啓之、淀谷真也、梅田真記、高井嘉雄、山田 等、山岡寛史、広瀬敬治、戸部義人、田中壽一、高橋成年、*J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **48**, 323 (2000).
- 19) 澤田正實、*J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **45**, 439 (1997).

< 執筆者略歴 >

西岡亮太

株式会社住化分析センター・テクニカルソリューション本部・
大阪ラボラトリー

岐阜薬科大学大学院修士課程修了 (薬品分析化学)

技術士 (化学)、薬剤師、液体クロマトグラフィー分析士三段

現在の担当業務 : HPLC カラムの開発、製造、販売

E-mail: nishioka@scas.co.jp



【 解説 】

テレワーク時代の HPLC システム ～ マルチメソッド LC による自動化・省力化とリモートワーク

郡 明雄、熊谷浩樹

アジレント・テクノロジー株式会社

(Received October 29, 2020 ; Accepted November 11, 2020)

1. 緒言

コロナ禍では、ラボへ出かける回数を出来るだけ減らし、且つ、従来通りのパフォーマンスを出す事が出来るかが要求されている。分析ラボでは、カラムや移動相などが異なる様々な分析メソッドが 1 台の HPLC システム上で実行されており、その都度カラム、移動相、検出器を手作業で変更し、分析メソッドを切り換えている。近年の高速分析法の進歩により、変更作業の所要時間が分析ラボの効率を低下させる要因となっている。又、配管の変更を繰り返す事でフィッティングが徐々に摩耗して行き、トラブルの要因となる恐れも考えられる。又、1 メソッド 1 HPLC 装置という運用法では、装置台数が増え、設置スペースや初期コスト、ランニングコストの増大だけでなく、管理者の負担増も免れない。

アジレントでは、各種自動化機能やバルブソリューションを搭載した Agilent 1260 Infinity II Prime LC や 1290 Infinity II LC とクロマトグラフィーデータシステムのネットワーク化による働き方改革を提案して来た。このシステムは、現在のテレワークにも有効である。

そこで、本稿では、マルチメソッド LC の概要及びその例と、テレワークによるラボ分析に欠かせないネットワーク化について紹介する。

2. マルチメソッド LC ソリューションの概要

Agilent 1260/1290 Infinity II マルチメソッド LC ソリューションは、カラム及び溶媒切替バルブ等を組み込み、複数の分析メソッドを連続的に効率良く実行出来るように開発された LC システムである。マルチメソッド LC ソリューションでは、図 1 に示す様に、

- ・ 最大 8 本のカラムと 26 溶媒を選択可能
- ・ 1 台のマルチカラムサーモスタットで左右独立した 2 つのカラム温度ゾーンを設定可能
- ・ 様々な圧力流量範囲、検出要件、予算に応じて、50 を超える LC モジュールの中から最適なものを選択可能

であり、その結果、カラムの取り外しや溶媒ボトルの交換を行わずに 1000 を超えるメソッ

ドを実行する事が可能である。なお、既存の Agilent 1100/1200 HPLC に、カラム及び溶媒
 切換バルブの増設とソフトウェアのアップグレードを行う事により、低コストでマルチメ
 LC を構築する事も出来る。

複数のユーザーが異なるプロジェクトの分析を行うマルチユーザー環境にも、マルチメ
 ソッド LC が有効である。多くの場合、それぞれのユーザーが特定のカラム、移動相、分離
 条件を設定する必要がある。Agilent 1260/1290 Infinity II マルチメソッド LC は、多くの
 カラムや溶媒に容易にアクセスする事で、この問題を解決する。

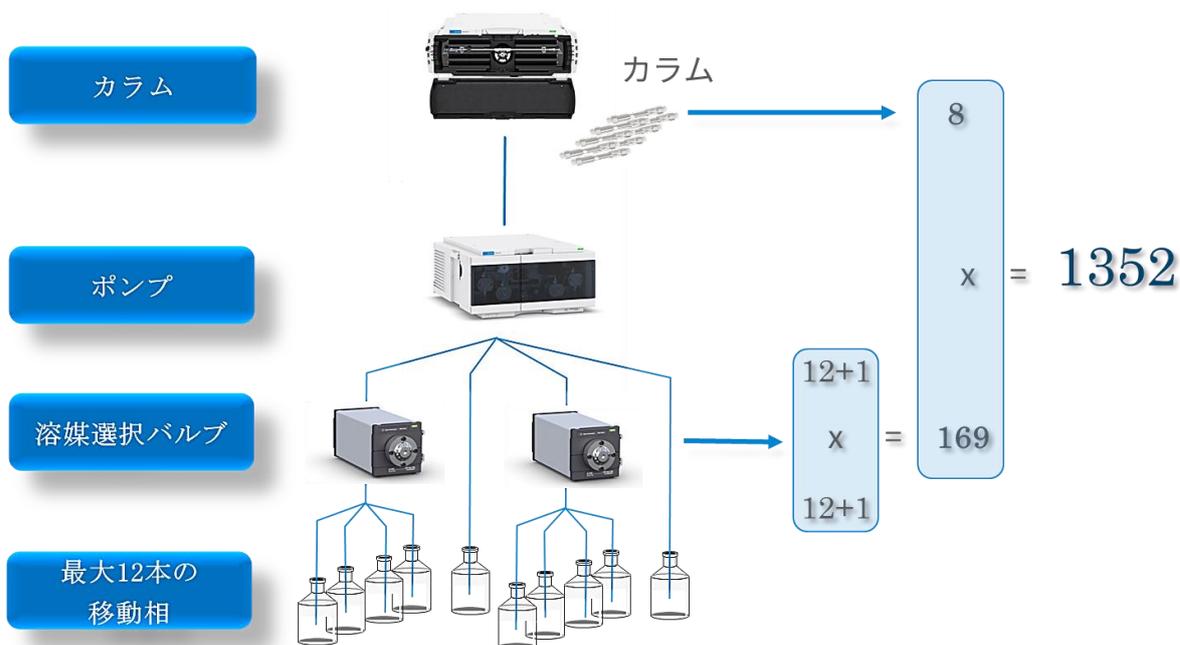


図 1 Agilent 1260/1290 Infinity II マルチメソッド LC の構成例

マルチメソッド LC の適用事例としては以下のものがある。

- ① HPLC と UHPLC をワンシステムで切り換え
- ② 医薬品の品質管理で複数メソッドを切り換えて連続運転
- ③ バイオ医薬品プロセスでの重要品質特性試験¹⁾
- ④ プレガバリン (USP) の純度と光学純度試験をワンシステムの HPLC で実施²⁾
- ⑤ ワンシステムの HPLC でメソッド開発とマルチメソッドを兼用
- ⑥ 食品添加物分析のマルチメソッド LC³⁾
- ⑦ 農薬分析 (Ultivo トリプル四重極 LC/MS を使用)⁴⁾

重要工程パラメーター (critical process parameters、CPP) 及び重要品質特性 (critical quality attribute、CQA)の分析は、バイオ医薬品の製造時に、製品品質をモニターし、恒常性と頑健性のあるバイオプロセスの確立に重要な役割を果たす。CQA 分析には複数の HPLC メソッドが使用されるため、コスト、ラボスペース、作業負荷を考慮する必要がある

る。ここでは、マルチメソッド LC の活用事例として、③に挙げたバイオ医薬品プロセス開発において従来 2 システムで行っていた分析を 1 システムで行う”2-in-1”のバイオプロセス分析について紹介する。モノクローナル抗体の抗体価測定(Protein A)と細胞培養培地分析(HILIC) と言う 2 分析を 1 台の LC/MS で、内蔵バルブでカラムを切り換えて行った例である。

3. 実験

3.1 装置

1260 Infinity II バイオイナート LC を LC/MSD iQ (何れも Agilent Technologies 製) と組み合わせた (図 2)。マルチカラムコンパートメントにはバイオイナート 4 ポジション/10 ポートカラム切換バルブ (図 3) を内蔵し、2 本のカラムを接続し、異なる温度に設定した。ポジション 3 は、配管のみでシステム洗浄用とした。ソフトウェアは、OpenLab CDS 2 を用いた。

カラムは以下の通りである。

- ・ Agilent Bio-Monolith protein A、長さ 5.2 mm、内径 4.95 mm、モノリス形カラム (5069-3639)
- ・ Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、長さ 100 mm、内径 2.1 mm、粒子径 ; 2.7 μm (685775-601)



図 2 Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC と LC/MSD iQ

バイオイナート LC は、腐食耐性のあるチタン送液システムとメタルフリーのサンプル流路をもつバイオ医薬品分析に適した HPLC である。LC/MSD iQ は直観的に使えるコンパクトな質量検出器で、ルーチンラボに適している。

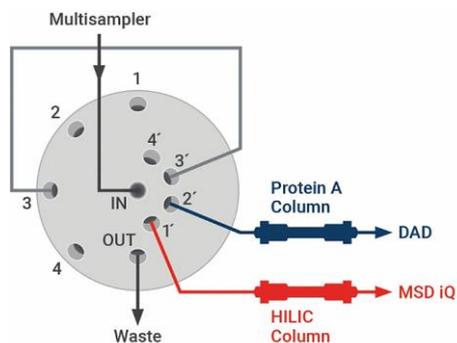


図 3 バイオイナー 4 ポジション/10 ポートカラム選択バルブ

3.2 標準と測定試料

標準溶液又は培養上澄み (Institute of Biochemical Engineering, University of Stuttgart, Germany より提供) を、遠心分離 ($12,100 \times g$, 2 分) した後に HPLC 装置に注入して Protein A クロマトグラフィーにより抗体価測定分析する。水を加えて 1:10 に希釈し、遠心分離した後に 60 % (v/v) アセトニトリル/30 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0) となる様に調整して HILIC で分析した。

3.3 培養

開始容量 1.0 L のバッチモードで、IgG₁モノクローナル抗体 (抗-IL-8) 産生 CHO DP12 細胞株のバイオリアクター培養を実施した。培地は、L-グルタミン、L-アラニン-L-グルタミン、D-グルコース、成長因子及びその他の様々なアミノ酸で構成されている。サンプルは毎日抽出し、0.2 μm PES シリンジフィルターでろ過し、得られた上澄みは、分析を実施する迄 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ で保管した。

3.4 分析メソッド

分離に関しては、InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラム及び低 pH の緩衝液としてギ酸アンモニウムを使用した (表 1)。更に、有機溶媒として 5 % (v/v) 2-プロパノールを移動相 A 及び B に加え、HILIC 分離でのピーク形状を最適化した。

プロセス変数を詳細にモニタリングするために、その後同じ 1260 Infinity II バイオイナー LC システムで、Protein A (アフィニティクロマトグラフィー) 分析を実施した。このシステム全体がバイオイナー流路であり、特に吸着性の高い生体分子や代謝物に最適である。

表 1 細胞培地分析用の HILIC メソッド

パラメーター	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1×100 mm、2.7 μm
溶離液	A) アセトニトリル/2-プロパノール/30 mM ギ酸アンモニウム水溶液=85/5/10、pH 3 B) アセトニトリル/2-プロパノール/30 mM ギ酸アンモニウム水溶液=10/5/85、pH 3
グラジエント	0.00 分 - 0 % B 1.00 分 - 0 % B 11.00 分 - 10 % B 12.00 分 - 100 % B 12.01 分 - 0 % B 20.00 分 - 0 % B
流量	0.6 mL/min
温度	20 °C
MS 検出	自動取り込みモード/SIM (表 3 を参照)
注入	注入量：1 μL サンプル温度：4 °C ニードル洗浄：5 秒、90 % アセトニトリル水溶液 (S1)

使用可能な 4 つの溶媒チャネル (HILIC の場合は A + B チャネル、Protein A の場合は C + D チャネル) を使用する事により、溶媒を手動で切り換える事なく、両方のメソッドを実施出来た。更に、2 本のカラムを同時に設置し、異なる温度で制御し、内部カラム選択バルブで切り換える事により、手動操作を更に減らす事が出来た。最適化した Protein A メソッドを表 2 に示す。

表 2 mAb 抗体価測定分析用の Protein A メソッド

パラメーター	設定値
カラム	Agilent Bio-Monolith Protein A、4.95 × 5.2 mm (モノリス形カラム)
溶媒	C) 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4 D) 500 mM 酢酸、pH 2.6
グラジエント	0.0 分 - 0 % D 0.5 分 - 0 % D 0.6 分 - 100 % D 1.7 分 - 100 % D 1.8 分 - 0 % D 3.5 分 - 0 % D
流量	1 mL/min
温度	30 °C
UV 検出	280 nm/4 nm、リファレンス 360 nm/100 nm、20 Hz
注入	注入量：50 μL サンプル温度：4 °C ニードル洗浄：5 秒、水 (S2)

4. 結果と考察

CHO 細胞の培養に用いた細胞培地の組成は、HILIC カラムで誘導体化しなくても分析可能な極性化合物で構成されている。これらの化合物の大部分は UV 吸収をもたないため、UV 検出は適していない。LC/MSD iQ システムに備えられている質量検出を使用する事により、選択性が向上する。自動取り込みモードにより、各化合物について、イオン源のパラメーターとフラグメンター電圧を自動的に調整した。適切な SIM チャンネルのみを手動で構成した。

図 4 は、有機酸、アミノ酸、ジペプチドで構成される細胞培地に通常存在する 16 種類の極性化合物を示している。

全ての化合物に対して、濃度 1~200 μM の 10 点による検量線を作成し、検出下限 (LOD、 $S/N = 3$) を求めた。表 3 は、大部分の分析対象成分において、良好な直線性 ($R^2 > 0.99$) とオンカラム 1 pmol 未満の LOD が得られている事を示している。2 つの CHO 細胞培養 (A+B) を実施し、バイオリアクターから毎日抽出する事により、細胞培地分析に対しては HILIC メソッドが適している事が分かった。

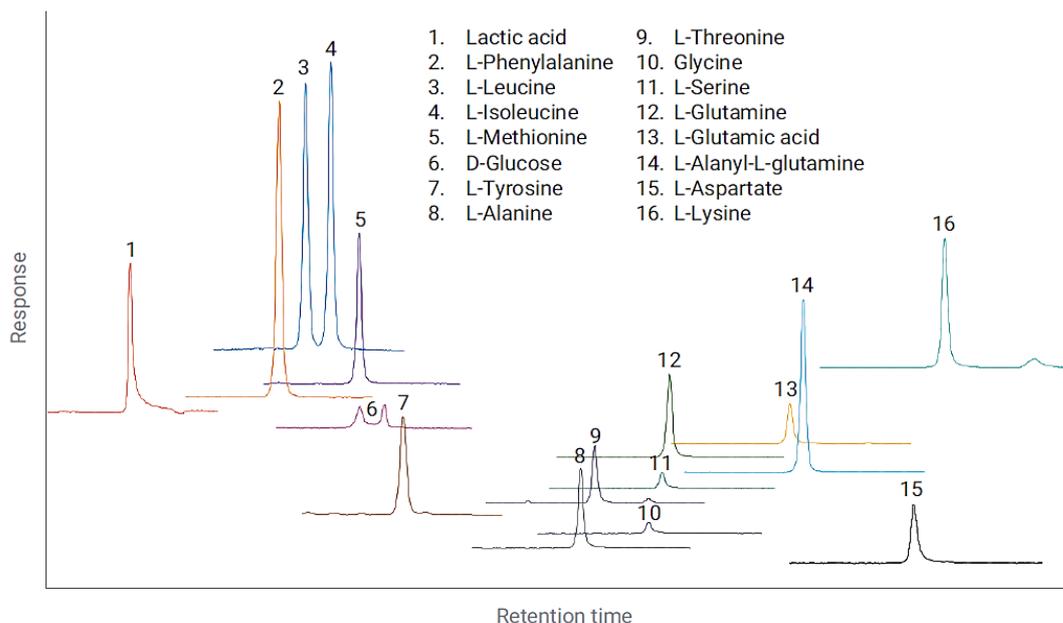


図 4 細胞培地化合物のクロマトグラム (標準溶液 各 200 $\mu\text{mol/L}$)
分析条件は表 1 に記載。

表 3 HILIC 細胞培地分析を実施した各化合物標準の MS 及び定量のパラメーター

化合物	SIM (m/z)/極性	フラグメンター (V)	保持時間 (分)	キャリブレーション範囲 (μM)	R ²	LOD (pmol オンカラム)
乳酸	89 / -	90	1.734	1~200	0.9979	0.63
L-フェニルアラニン	166 / +	100	3.611	1~200	0.9956	0.41
L-ロイシン	132 / +	90	3.951	1~200	0.9964	0.86
L-イソロイシン	132 / +	90	4.274	1~200	0.9964	0.67
L-メチオニン	150 / +	100	4.615	1~200	0.9966	0.23
D-グルコース	179 / -	100	4.917	20~200	0.9934	12.24
L-チロシン	182 / +	100	5.134	2~200	0.9997	1.09
L-アラニン	90 / +	90	7.358	1~200	0.998	0.88
L-トレオニン	120 / +	90	7.534	1~200	0.9984	0.9
グリシン	76 / +	90	8.218	5~200	0.9991	3.72
L-セリン	106 / +	90	8.387	5~200	0.9982	2.8
L-グルタミン	147 / +	90	8.512	2~200	0.9989	1.72
L-グルタミン酸	148 / +	90	10.1	2~200	0.9996	1.46
L-アラニル-L-グルタミン	218 / +	100	10.158	1~200	0.9952	0.54
L-アスパラギン酸	132 / -	90	11.537	2~200	0.9958	1.19
L-リシン	147 / +	90	11.969	1~150	0.9901	0.29

栄養素の動的プロファイルを図 5 に示した。図の左側には、培養時に濃度が減少している化合物を、右側には濃度が増大している化合物を示した。培地成分は、典型的な挙動を示している。例えば、D-グルコース（炭素源）と L-グルタミン/L-アラニル-L-グルタミン（窒素源）の消費、又はオーバーフロー代謝時の副産物としての乳酸の形成である。

IgG1 の生成と培地成分の消費率に多少の違いがある事により、CHO 細胞培養の性能が異なる事が分かる (A 対 B)。この HILIC メソッドを使用して工程内測定を実施する事により、工程を制御して培養終了時の歩留まりを最適化出来た。

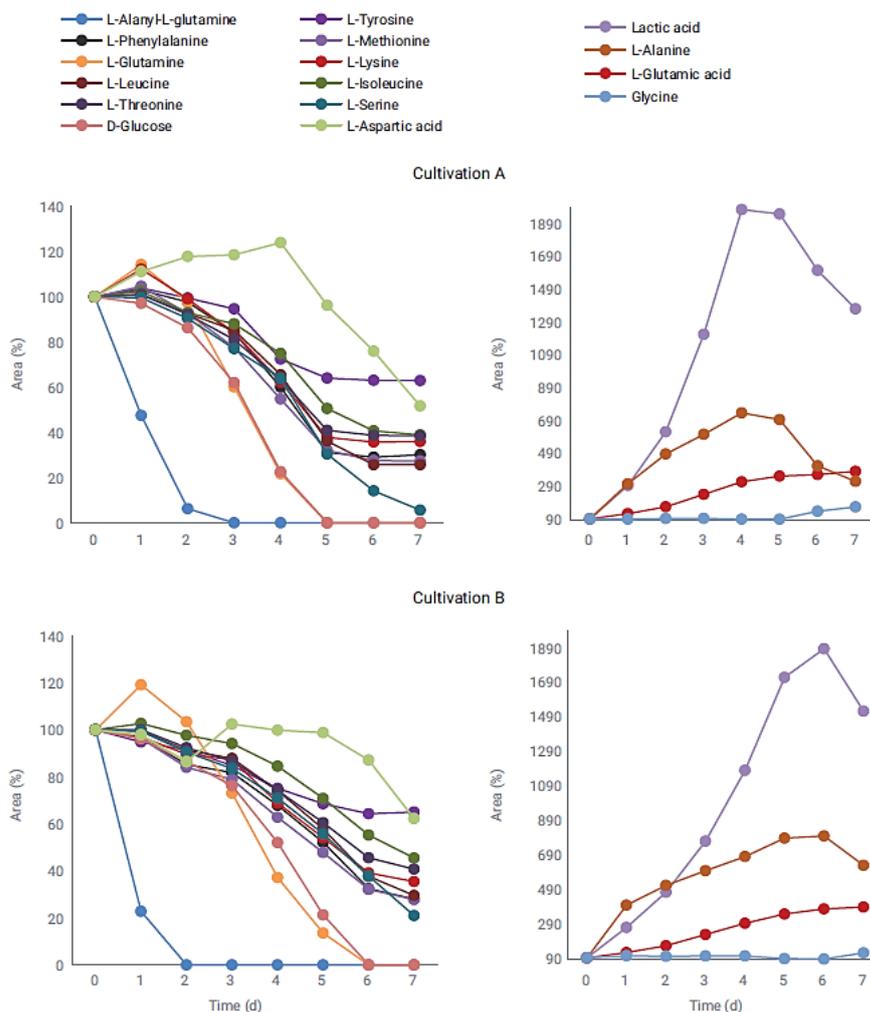


図 5 細胞培地培養時に HILIC により分析した培地化合物のプロファイル

図 6 に、6 日間の培養期間における、培養 A の Protein A メソッドの UV クロマトグラムを示す。mAb 抗体価測定値は 6 日目に最大に達し、その後減少した。これは、Protein A に結合している mAb の Fc 領域が、熱分解又は酵素分解した事が原因と考えられる。

OpenLab は、mAb ピークの積分後、ピークエクスプローラーと呼ばれる機能を実行する。図 7 に、ピークエクスプローラー表示例を示す。ここで、縦軸は個々の注入を示しており、横軸は mAb の保持時間を示している。mAb のピーク面積が円の大きさで表示されており、mAb の生成量を一目で確認する事が出来る。CHO 細胞 A 及び B の mAb の生産量の変化を比較した所、mAb の増加に大幅な違いが有る事が明らかになった (図 8)。

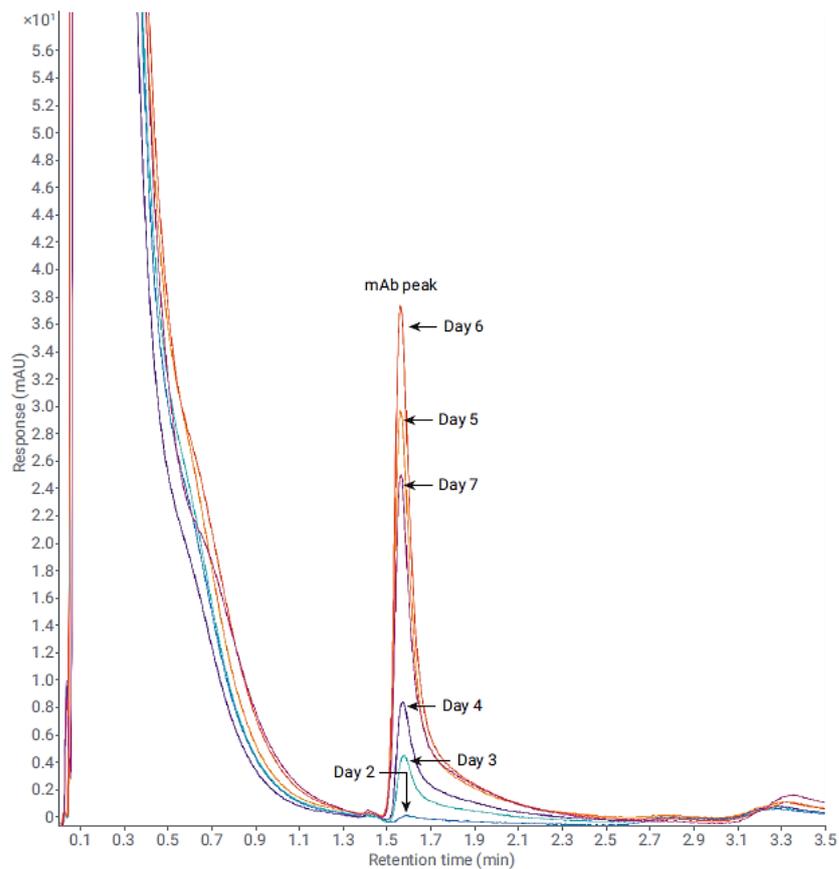


図 6 6 日間の発酵期間にわたる培養 A の上澄みサンプルのクロマトグラム

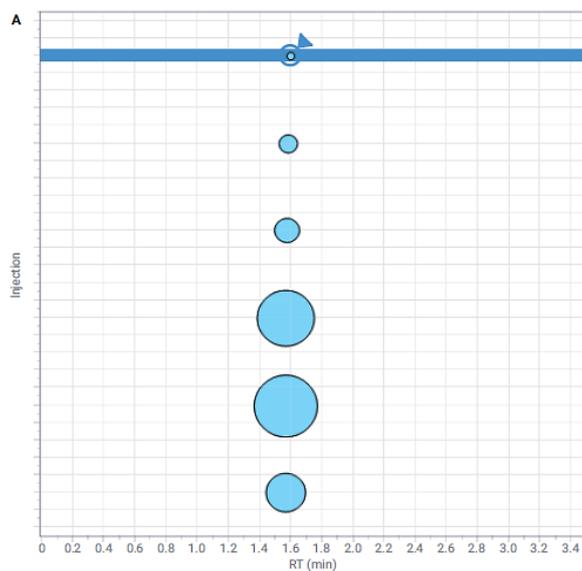


図 7 Agilent OpenLab CDS での培養 A のピークエクスプローラーの表示例

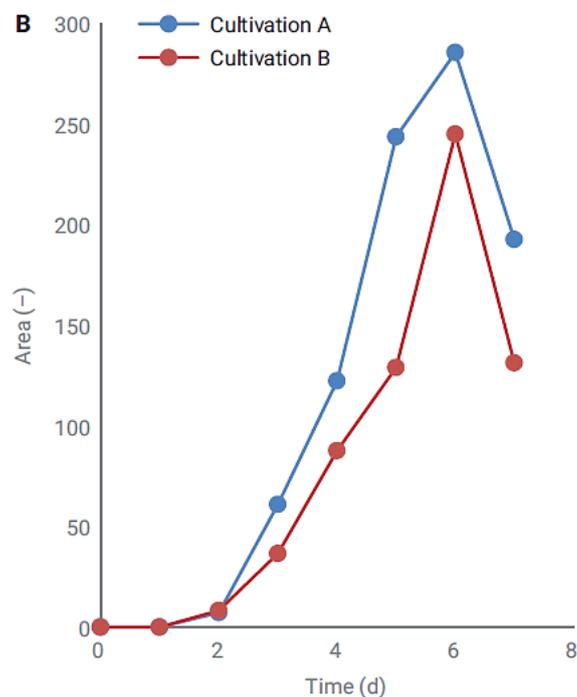


図 8 培養期間中の mAb の生産量の推移

5. 分析ラボのネットワーク化とリモートアクセス

ここ迄マルチメソッド LC によるバイオプロセスの効率化について述べた。

このシステムに OpenLab ネットワーク (クライアント/サーバー) を導入する事により、社内や自宅の PC からデータ解析出来るだけでなく、リモートで分析装置を動かす事が可能となる。

サーバーへのデータアップロードは自動で行われ、セキュリティーも高いシステムである。社内のシステムとクライアント PC を接続する際、それぞれの個人を特定し、その個人がどのような操作を行ったのかを自動で残す機能も備わっている。

このようなネットワークを導入すると、様々なメリットが生まれる。ラボの分析装置の傍に PC を置く必要が無くなり、省スペース化に繋がる。

ラボの PC で行っていた作業を他の場所で行う事が出来、ラボの騒音や有害な溶媒への暴露時間が減り、社員の健康に対するリスクをも削減する事が出来る。

サーバーを置く事により、バックアップやバリデーションに掛る時間と労力が減る。更に、データに対する全ての操作が自動保存され、不正や改ざんを監視出来、会社としての信頼性を高める事が出来る。

データが全てサーバーに保存される事により、そのデータを社員同士で共有出来、ペーパーレス化に繋がる。結果的に、会社に出勤する頻度が少なくなり、出社するメンバーとテレワークメンバーの分担により、生産性と安全性の高い研究開発環境を構築出来る。

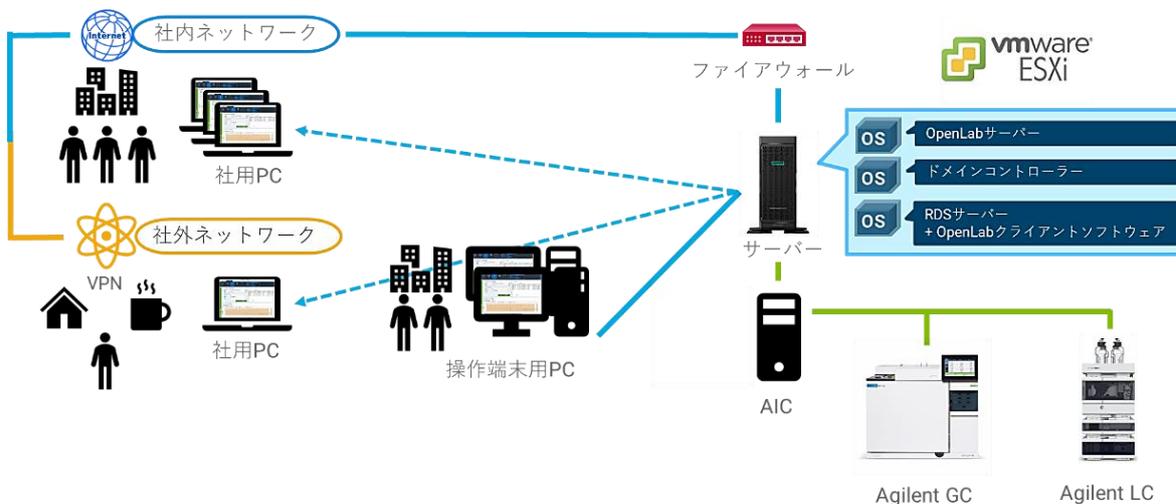


図 9 分析ラボのネットワーク化構築例

- ① 許可された社内端末から OpenLab CDS クライアントを操作
- ② デスクで別の作業をしながら、モニタリング・解析・レポート可能
- ③ ラボ内の出入り・移動時間が減少
- ④ 居室・外出先・自宅どこからでも OpenLab CDS の操作が可能

6. 総括

Process analytical technology (PAT) は、製造工程時に歩留まり、製品品質などのバイオペロセスパラメーターを調整して改良するための強力なツールである。本稿では、前提条件として、工程管理の手段となる HPLC 測定アプリケーションについて示した。検出器として LC/MSD iQ を使用した HILIC 分析では、主要な細胞培地栄養素の直線性、感度、選択性が優れている事を示した。

1260 Infinity II バイオイナート LC と LC/MSD iQ を組み合わせて自動カラム切換機能を用いたシステムで、細胞培地分析と Protein A を組み合わせる事により、効率化、省力化に繋がった。

このマルチメソッド LC ソリューションは、21 CFR Part 11 やデータインテグリティに関する FDA の要件を満たす適格性評価が可能である。更に、OpenLab CDS 2 をネットワーク化する事により、分析、解析、レポート作成、データ管理や共有などをリモートで行う事が容易になり、テレワークを効率良く、しかもデータのセキュリティーも確保しながら促進する事が出来る。

参考文献

- 1) アプリケーションノート: 5994-2082JAJP、2-in-1 バイオプロセス分析、アジレント・テクノロジー (2020 年) .
- 2) アプリケーションノート: 5994-2173JAJP、1 台の LC によるプレガバラビンの 2 つの USP 分析、アジレント・テクノロジー (2020 年).
- 3) アプリケーションノート: 5991-7622JAJP、食品添加物分析のマルチメソッド LC、アジレント・テクノロジー (2020 年) .
- 4) アプリケーションノート: 5994-1889JAJP、Ultivo LC/MS トリプル四重極による農薬多成分分析、アジレント・テクノロジー (2020 年) .

< 執筆者略歴 >

郡 明雄 / Akio KORI

1993年 名古屋大学理学研究科 物理学専攻 博士前期課程修了

1994年 横河アナリティカルシステムズ株式会社入社

現在、アジレント・テクノロジー株式会社 市場開発部にて

製薬ビジネスディベロップメントとLCマーケティングに従事



熊谷浩樹 / Hiroki KUMAGAI

1982 年 上智大学大学院理工学研究科化学専攻修了

1982 年 株式会社横河電機製作所入社

2000 年 山梨大学大学院工学研究科学士後期課程修了

博士 (工学)

現在、アジレント・テクノロジー株式会社 クロマトグラフィー・

質量分析営業部門にて HPLC のアプリケーション開発、セールス

サポートに従事



【トピックス】

スキルギャップを埋める新しいベンチマーク Analytical Intelligence

小寺澤功明、尾坂裕輔、松本恵子、渡邊京子
株式会社島津製作所 分析計測事業部

(Received November 9, 2020 ; Accepted November 19, 2020)

1. 要旨

液体クロマトグラフの発展に伴い、より簡易な操作で LC 分析が達成出来る様になって来ている。一方で、研究スピードの向上を求められるために液体クロマトグラフのトレーニングの時間が減少し、熟練者の知識の継承が難しくなっている。この様な状況の変化を背景に、個人の機器分析の知識・経験の差をシステムやソフトウェアが補完し、データの信頼性を確保する、分析支援機能の重要性が増して来ている。本稿では、これらの新たな分析支援機能とこれらを活用する新しい LC 分析スタイルの提案について紹介する。

2. はじめに

液体クロマトグラフィー (LC) の歴史は、1900 年初頭、植物学者 Mikhail S. Tswett により提唱された、炭酸カルシウム粒子を詰めたカラムで植物色素を分離した技術に始まる。以降、高圧力下でカラムに強制的に送液し分離を達成する高速液体クロマトグラフが開発され、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は急速に広まった。更に、検出技術や分離の要となるカラムや分離モードの多様化に加え、自動試料注入装置を含むシステムとソフトウェアによる分析の自動化などユーザビリティを改善する様々な技術が開発された事で、LC を使用するハードルは大きく下がり、HPLC の活躍の場は拡大を続けている。

一方で、誰もが容易に LC 分析が出来る様になった事、又昨今の社会情勢の変化で業務の効率化が益々求められる様になった事で、機器分析に関する教育を十分に受けられないまま分析業務に携わる分析者が増えて来ている。加えて、熟練者の機器分析に関する知識・経験が次の世代を担う若い世代へ受け継がれないと言う現象も引き起こしている。これは、分析条件構築などの高度な知識・技術を要する作業は勿論、カラムの扱い方など、正しいデータを得るために必要なコツや留意点を学ぶ機会も減りつつある事を意味している。「分析に不慣れな分析者であっても熟練者と同じ結果が得たい」と言う要求は、この様な現代の社会情勢を反映して生じた、機器分析に求められる新しい側面である。言い換えれば、これ迄は長い時間と学習を元に分析者自身が習得する必要があった機器分析のコツやノウハウを要する作業を、HPLC 装置やソフトウェアに代行させたい、と言う考え方である。例えば、カラムに急激な圧力ショックを与えない通液開始操作、分析開始前に点検しておくべき HPLC 装置や消耗品の状態、クロマトグラムから読み取る装置不良の可能性の推測と適切な処置、などが含まれる。誰もが「習熟」を必要とする事無く常に正しいデータを得られる

実験環境があれば、研究・開発などの業務へ専念度向上が期待出来る。

我々は知識経験に関係無く、どの様な分析者でも等しく LC 分析業務を遂行出来る支援機能が必要と考え、「Analytical Intelligence」と言う概念を新たに構築した。Analytical Intelligence は、HPLC 装置やソフトウェアが熟練者の操作と同じ様に稼働し、状態・結果の良し悪しを自動で判断し、分析者へのフィードバックやトラブルの解決を行う、又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する。Analytical Intelligence に基づく HPLC 装置およびソフトウェアの機能を用いる事で、不慣れな分析者も熟練者も等しく正しいデータを得る事が出来る様になる。本稿では、LC 分析に関係する Analytical Intelligence 機能¹⁾について、以下で詳細を述べる。

3. Analytical Intelligence に基づいた分析支援機能

3.1 熟練者の手作業を自動化する FlowPilot 機能

通常、長期に渡って正しいデータを得るためには、カラムの劣化により起こり得るエラーを排除する必要がある。カラムの劣化を引き起こす要因の一つに、カラムへの過度な圧力印加が挙げられる。特に陥りがちなものとして、カラムが使用温度まで上昇する前に設定流量で移動相を送液する事によって、カラムに過度な圧力が掛る事が挙げられる。この過度な圧力は、カラムの充填状態に影響を及ぼし、カラムの寿命短縮、劣化を引き起こす恐れがある。そのため、カラムに過剰な負荷が掛らない様に、カラムオープン温度の上昇に合わせて移動相流量を調整するという方法がノウハウとして継承されて来た。

そのノウハウを自動化した FlowPilot 機能により誰でも意識せずに実行出来る様になっている。以下に、FlowPilot 機能の動作について説明する (図 1)。

- ① システム起動時にカラムオープン温度が設定値になっていない場合、移動相流量を設定値の半分にして、その流量に向かって徐々に上げる。
- ② カラムオープン温度が設定値で安定する迄、移動相流量は設定値の 1/2 で送液する。
- ③ オープン温度が安定すると、移動相流量を改めて徐々に上昇し設定値で送液する。

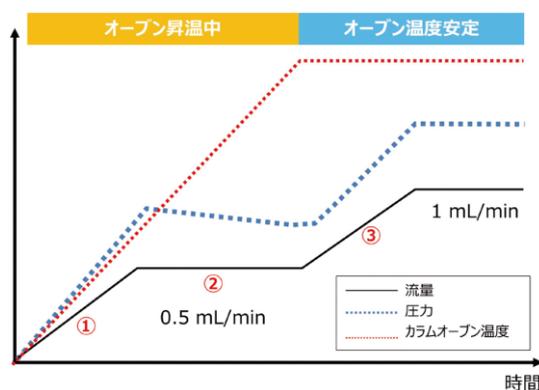


図 1 FlowPilot 機能を用いたスタートアップの流量、カラムオープン温度、圧力変化のプロファイル

本機能は、LC を自動で起動する際同時に実行する事も出来るため、LC に不慣れな分析者でも意識する事無く利用する事が出来る。

3.2 連続分析中に移動相を枯渇させない移動相モニター

連続分析中の移動相の枯渇は分析の失敗だけでなく、時には高価なカラムの破損を引き起こす事もあり、適切に管理する必要がある。陥りがちな原因として、必要移動相量の見積もりを誤る、分析後に送液し続けたまま放置するなどが挙げられる。しかし、常に装置の前で移動相を確認する事は現実的ではない。この様な移動相の枯渇を防ぐために、移動相の残量管理を行う移動相モニター MPM-40 (図 2) がある。この移動相モニターは、(1) 移動相残量のリアルタイム測定、(2) LabSolutions™ ソフトウェアと連動した一連の分析に要する移動相残量の不足警告を行うものである。

(1) 移動相残量のリアルタイム測定

移動相モニターは、重量センサーを搭載したボトルホルダで計測された移動相重量から移動相残量を算出する。移動相残量のリアルタイム計測の最大の特長は、移動相の消費量から逆算した残量予測値ではなく、実際の移動相残量を計測している点にある。この残量測定は、ボトル設置部に内蔵された重量センサーを移動相に合わせて予め校正する事によって行われる。そのため、複数の液体を混合した移動相の比重などを考慮する事無く、簡便に移動相量を管理する事が出来る。又、移動相残量が少なくなった場合には、エラー信号を発生し送液を中断し移動相の空送液を未然に防ぐ事が出来る。又、移動相モニターは、スマートデバイスと連携しラボ外から移動相残量を確認する事が出来、移動相残量が設定値以下になった際に移動相モニターからスマートデバイスに通知を送る事も可能である (図 2)。そのため、いち早く移動相不足に気づき、エラーにより分析を中断する事無く対応する事も可能である。



図 2 MPM-40 とスマートデバイスによる連携による移動相残量のモニタリング

(2) 分析に要する移動相残量の不足警告

システム制御用ソフトウェア LabSolutions と連動させる事で、分析条件（流量、グラジエント濃度、分析時間、洗浄時間、パーズ時間）を元に計算された、一連の分析に要する必要移動相量と、移動相モニターにより計測された移動相残量を比較し、足りない場合は分析者に不足警告する事が出来る（図 3）。これにより、複雑なグラジエント条件で連続分析する事があっても移動相を枯渇させる事無く分析する事が可能となる。



移動相名	使用量	トータル使用量	残量
水 (Pump A)	55mL	55mL	1000mL
アセトニトリル (Pump B)	165mL	165mL	100mL

図 3 分析開始前の警告表示例

3.3 送液ポンプの自己診断・自己復帰機能

HPLC 装置を使用中、ごく稀に流路内に気泡が発生する事がある。これは、溶液組成や温度、圧力など溶液の状態変化によって、溶解する気体の飽和量が増え気体が溶解している量はその飽和量を超えた時に発生する気泡によって引き起こされる。気泡が発生し送液ポンプの内部に達すると送液不良を引き起こし、保持時間やピーク面積の変動やベースラインの不安定化、ピーク形状の崩れなどを誘引する。この問題が発生した場合、気泡を取り除くために手動で進行中の分析を停止させて流路をパーズするなどの対策を行う必要がある。しかし、分析中に圧力をモニターしていないと現象に気が付き難く、又分析者が発生した問題に対して流路をパーズすると言う判断を下す事は上記エラーに関する知識、解決した経験が無いと困難である。そのため、上記の気泡発生を自動で検知し、エラーと判断した上で解決のための動作を行う自己診断・自己復帰機能がある（図 4）。

(1) 自己診断機能

送液ポンプにはポンプヘッドと呼ばれる送液を行う箇所があり、ポンプヘッド内ではプランジャーが前後方向に動く事で液体を吸引・吐出している。ポンプよりも上流の流路内で生じた気泡はこのポンプヘッド内に流入するが、気泡は液体よりも伸縮、膨張の影響が大きいため、プランジャーの動きにより気泡が伸縮・膨張されて液体が吸引・吐出されなくなる。そのため、移動相流量が欠損し、圧力降下が発生する。つまり、プランジャーが吸引動作から吐出動作に移り、吐出動作を続けている間に圧力降下が見られる場合、気泡混入のため吐

出出来ていないと判断する事が出来る。この圧力降下量を、異なる溶媒条件、圧力条件、流量条件、グラジエント条件下で測定し、圧力降下量の閾値と検知条件を最適化する事によって、自動で気泡混入による圧力低下を判断出来る様になっている。この圧力値の変位によって気泡の混入を検知する機能が自己診断機能である。

(2) 自己復帰機能

自己復帰機能とは、自己診断機能によって気泡混入と判定された場合、システムを正常に戻す機能である。気泡混入の検知後、一旦送液を止め、自動でパージ動作を行い気泡を取り除く。その後、カラム内の残留物を除くためカラムを洗浄し、サンプル注入せず設定条件で再度移動相送液を行い、再度圧力値の変位を確認する。その時、変位量が閾値を下回れば排出されたと判断し、中断した分析から連続分析を再開する。

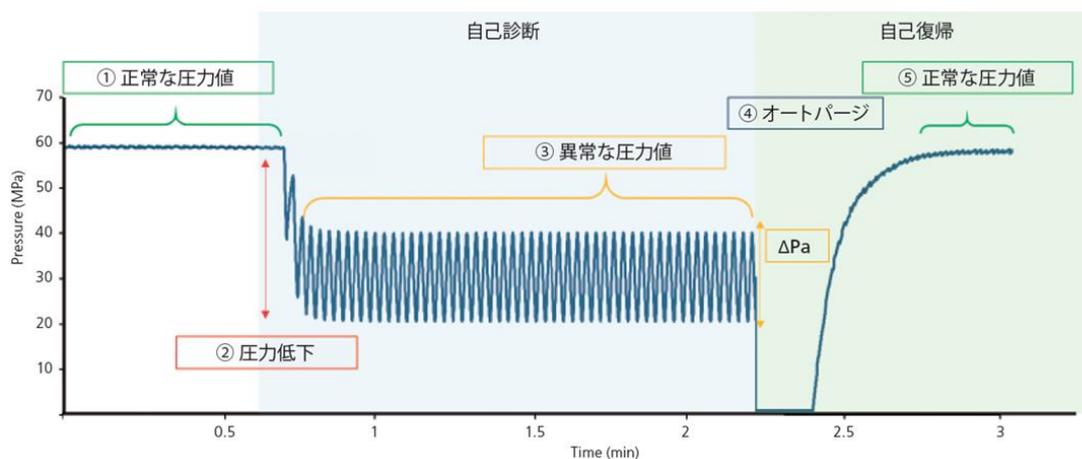


図 4 自己診断・自己復帰機能のスキーム

3.4 クロマトグラムの自動波形処理機能 i-PeakFinder™

夾雑成分や目的成分のピークが多数出現するクロマトグラムの場合、ベースラインの変動や未分離ピークの影響を排除した適切な波形処理が求められる。しかし、波形処理プログラムの設定操作が煩雑な場合があり、又手動波形処理は個人差が生じ易いため定量値の統一性が損なわれる。

そこで、手動波形処理を行わなくても様々な形状のクロマトグラムを目的に合わせて自動波形処理出来る様にするために、LabSolutions の波形処理アルゴリズムの一つである i-PeakFinder がある。i-PeakFinder は、全自動積分機能により特別なパラメーター設定をする事無く、高精度にピーク検出を行う事が出来る。例えば、大きなベースライン変動があるクロマトグラムであっても、ベースラインドリフトに追従して波形処理を行う事が出来、ピークに対して遅い周波数をもつ、うねりやドリフトに対して正しくピークを認識する事が可能である (図 5)。

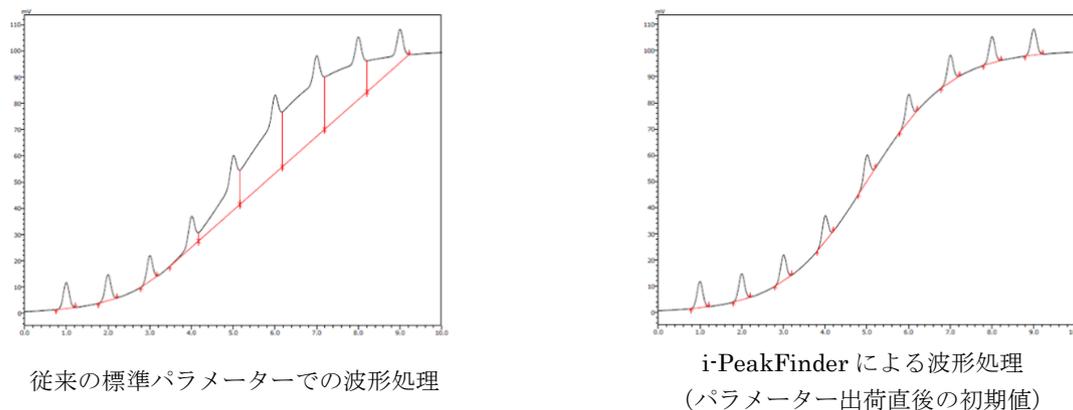


図 5 i-PeakFinder によるベースラインのうねり上の波形処理例

又、複雑なクロマトグラムのパターンに応じたパラメーターが用意されており、大量のデータに対して一括適用しても、精度の高い波形処理結果を出力する事が可能である。例えば、巨大ピークの裾野に微小ピークが乗っている場合、様々な波形処理が考えられるが、i-PeakFinder ではその波形処理を選択する事が可能である (図 6)。

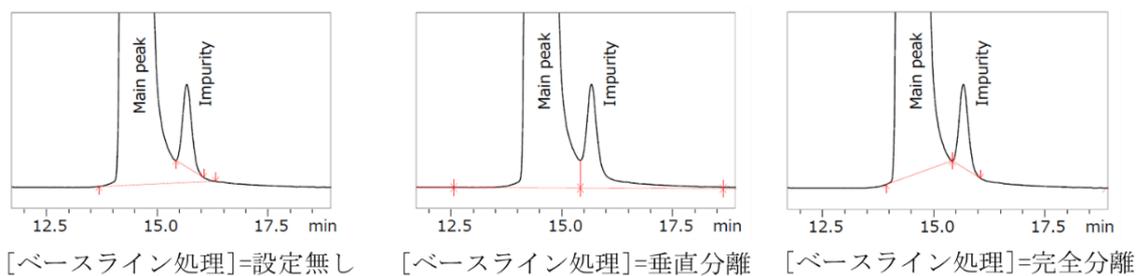


図 6 i-PeakFinder によるピーク裾野に乗った微小ピークの分離

以上の機能により、ベースライン変動や波形処理時に手動波形処理をする必要を無くす事でデータ処理の個人差を排除し、一律な定量結果を得る事が出来る。

4. むすび

不慣れな分析者も熟練者も等しく正しいデータを得る事が出来るようになる事を目的とした、全く新しい概念である **Analytical Intelligence** の概念に基づき、種々の支援機能を開発した。熟練者の手動操作を模した進化した自動運転が、システムのトラブル発生のリスクを低減し、更に万が一のトラブル時には機器自体が解消する。又、データ解析時は個人差が出る操作を自動化する事で一律の解析結果を提供するなど、分析業務を支援する機能を充実させた。

今後も、分析条件のスマートな最適化、前処理操作や種々のトラブル対応、データ信頼性

の自動判断など、依然分析者の技量に大きく依存する作業の効率改善や自動化を目指し、新機能を開発して行く必要があると考えている。

引用文献

- 1) 細井千尋、今村信也、八重口直樹、渡邊京子、Analytical Intelligence による LC 分析の新展開：超高速 LC システム新 Nexera™ シリーズの開発、島津評論 77、39~46 (2020) .

< 執筆者略歴 >

小寺澤 功明 (Katsuaki KOTERASAWA)

株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 LC ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)。液体クロマトグラフィー分析士初段。京都大学大学院工学研究科修士課程。修士 (工学)。



尾坂 裕輔 (Yusuke OSAKA)

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 (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1) 近畿大学大学院農学研究科応用生命科学専攻修士課程。修士 (農学)



松本 恵子 (Keiko MATSUMOTO)

株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 LC ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)。LC/MS 分析士初段。京都大学大学院エネルギー科学研究科修士課程。修士 (エネルギー科学)



渡邊 京子 (Kyoko WATANABE)

株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 LC ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)。液体クロマトグラフィー分析士四段。大阪大学大学院基礎工学研究科修士課程、University of Geneva, Pharmaceutical Sciences, Ph.D. 博士 (薬学)



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

企画の趣旨について / Aim of the Planning

編集委員長 中村 洋 / Editor-in-Chief Hiroshi NAKAMURA

LC 懇は 2020 年 11 月に標記電子ジャーナルを創刊する事となりました。本誌の目的は、有益で迅速な学術情報交換を通して LC 懇と会員の活性化を図る事に在り、論文誌と会員情報誌の機能を併せもつジャーナルとして企画しました。即ち、本誌には各種研究論文・技術論文に加えて解説、トピックス、会員動向、団体企業紹介、新会員紹介、LC 懇事業カレンダーなど、LC や LC 懇に関連する様々な情報が掲載されます。

更に、本誌にはシリーズ「試料分析の定石とコツ」を設け、現場の方々が実試料を分析される際に役立つ様、専門家の先生方をお願いして当該分野の分析における定石（基本、原理）と操作上のコツを具体的に平易に解説して戴きます。この欄は分析者の良きバイブルとして、本誌のユニークな特長に成るものと期待されます。

実試料の分析では、分析の 3 要素と言われる「試料」・「分析種」・「分析法」の全てが重要ですので、本シリーズでは、以下の 3 つの観点から各方面の専門家に執筆戴きます。どの観点から執筆戴いても、結局は他の 2 つの観点にも触れる事になります。従って、多少の重複は止むを得ない所と割り切った上で、それぞれのケースに記載した要点に準拠した構成が原則となる様、執筆をお願いしております。読者の皆様から、本シリーズにご希望のジャンルや執筆者がございましたら、編集委員にお聴かせ下さる様、宜しくお願い致します。

観点 1：試料を対象とする場合（生体試料分析、土壌分析、食品分析など）

- ・始めに、当該試料の性状や取り扱いに関する注意点・定石を紹介
- ・当該試料中に含まれる代表的な分析種につき、前処理・分離・検出の具体例を概説
- ・操作法などにコツがあれば、そのノウハウを紹介

観点 2：分析種を対象とする場合（アミノ酸分析、脂質分析、農薬分析、など）

- ・始めに、当該分析種に適用される代表的な分析法を紹介戴き、それぞれの特徴に触れる
- ・代表的な試料と分析種について、前処理・分離・検出の定石とコツを具体的に紹介

観点 3：分析法を対象とする場合（HPLC 分析、LC/MS 分析、など）

- ・始めに、当該分析法の原理・装置の基本構成・特徴（長所、短所、応用性など）などを紹介
- ・取り上げた分析法の真価が発揮される実試料の分析例を紹介

【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

総論（前処理編）／General Remarks（Pretreatment）

中村 洋／Hiroshi NAKAMURA

東京理科大学／Tokyo University of Science

（Received November 13, 2020 ; Accepted November 16, 2020）

要旨

実試料を分析する上で肝要な事は、分析種（analyte）と試料マトリックス（matrix）を知る事に尽きる。事前に知っておくべき基礎的な情報としては、分析種については試料中の推定存在濃度、分析種の化学的・生物学的性状（特に安定性）、又、マトリックスについては妨害成分の種類と濃度である。分析種が化学的に特定出来る場合には、試料中の濃度を勘案して検出法を或る程度絞る事が出来、適した前処理法と分離法的设计が可能になる。総論では、試料を LC や LC/MS で分析する場合の化学操作ごとに主な定石とコツを紹介するが、本稿では前処理について解説する。

1. 分析種及び試料の安定性

試料中に含まれる特定の分析種を定性又は定量する場合、通常は図 1 に示す順序で化学操作が行われる。ここで、最終試料を直接測定する A) の操作は原子吸光分析などの分光学的手法で行われ、最終試料をクロマトグラフィーや電気泳動で分析種の精製を行う B) の操作は所謂分離分析法で行われる。一般に、定量分析においては上流側のサンプリング（sampling）や前処理（pretreatment）が分析値に大きく影響する事が知られている。LC 分析、LC/MS 分析、LC/MS/MS 分析の対象となる主な分析種は、生体成分、薬物及びその代謝物、食品添加物、環境汚染物質などであり、化合物としては有機化合物が圧倒的に多い。又、これらの分析種を定量する際に扱う試料としては、生体試料、医薬品試料、食品試料、環境試料などが多い。従って、分析種、試料の何れについても、化学的・生物学的安定性の観点から懸念が残るものが多く、それらの取り扱いに当たっては分析種の分解や試料の変質を極力抑える工夫が必要となる。

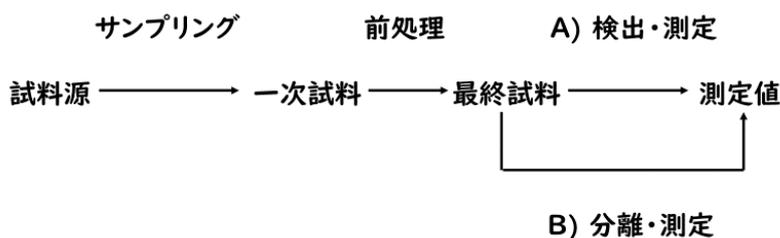


図 1 化学分析における一般的な操作手順

実試料の分析で注意しなければならないのは、サンプリングした一次試料が操作中に変質し、分析種の濃度が変わってしまう事である。即ち、分析種の安定性を担保しつつ操作する事が、分析値の信頼性にとっては必須である。分析種の安定性に影響する主な因子を表 1 に示す。分析種の安定性は、主に化学的な安定性と生物学的な安定性に分けて理解する必要がある。化学的な安定性に関しては、分析種自身並びに分析種と試料中の成分との有機化学的な反応に留意し、反応が極力進行しない様な環境で操作する必要がある。一般に、化学反応は温度が 10℃上昇すると反応速度が 2 倍程度大きくなるので、成る可く低温で操作する事が肝要である。又、分析種の生物学的な安定性に関しては、生体試料の様に試料中に細胞や酵素が含まれる可能性が有る場合には、サンプリングする段階から生物学的な反応が起こらない様な工夫を凝らす事が欠かせない。この様な“生きている試料”を扱う場合には、細胞や酵素が測定値に影響しない様、細胞除去、酵素の失活や阻害を的確に行う必要がある。

表 1 分析種の安定性に影響する主な因子			
安定性	因子	具体例(アンダーラインは分析種)	対策
化学的	酸化	<u>RSH</u> + (O ₂ +重金属) → RSSR	除酸素、キレート剤の添加
		<u>フェノール性水酸基</u> → キノン	
	付加	<u>GSH</u> + N-エチルマレイミド → 付加体	拮抗剤(HSO ₃ ⁻)を添加、低温操作
	縮合	<u>RNH₂</u> + R'COOH → RNHCOR'	加熱を避け低温に保つ
	環開裂	<u>インドール</u> + 酸 → インドール環の開裂	液性を中性に調整
	酸加水分解	<u>配糖体</u> → 糖 + アグリコン	液性を中性～弱アルカリ性に保つ
		<u>硫酸抱合体</u> → ステロイド + 硫酸根	液性を中性～弱アルカリ性に保つ
<u>ペプチド</u> → アミノ酸		液性を中性にし、加熱を避ける	
アルカリ加水分解	<u>RCOOR'</u> + H ₂ O → RCOOH + R'OH	液性を中性～酸性に調整	
生物学的	酵素的加水分解	<u>グルクロナイド</u> → グルクロン酸 + アグリコン	酵素阻害剤を添加、低温操作
	酵素分解	L-Glu → <u>GABA</u> + CO ₂	代謝阻害剤を添加、低温操作
	リン酸化	<u>グルコース</u> → グルコース-6-リン酸	酵素阻害剤を添加、低温操作
	取り込み	<u>栄養素、血糖</u>	細胞・細菌などを除去
	生合成	<u>キノノーゲン</u> → キニン	代謝阻害剤を添加

次に、試料の安定性を確保する際に考慮すべき因子と有効な対策を表 2 に示す。即ち、一般に試料の変質は化学反応や生物学的反応を伴うため、その 3 因子と言われる「温度」、「酸素」、「水」に留意して対策を立てるのが定石である。これらの 3 因子に加えて、変質が時間と共に進行するので、操作や保管の時間を出来るだけ短くする工夫が求められる。又、大気環境からの汚染や分子状酸素による酸化にも留意する必要がある。即ち、試料・分析種を安定に保つための定石は図 2 に示す通りであり、各妨害因子に有効な手立てを採るのがコツとなる。最近では、試料の前処理から測定迄を自動的に行う装置が普及しているが、環境大気から閉ざされた条件で短時間に再現性良く分析を行う事が出来るので、現状では最も優れた方法論と言える。

因子	区分	目安	影響	対策
温度	高温	加温・加熱	分析種の濃度が増加。各種反応が促進	密閉して低温で操作・保存
	室温	15℃～25℃	密閉しないと外部大気が混入し汚染する可能性	
	低温	冷蔵庫(4℃)	密閉しないと乾燥する可能性	
	極低温	冷凍庫(-20℃～-60℃)	密閉しないと乾燥する可能性	
液体窒素(-192℃)		密閉しないと内容物が流出		
酸素			還元形が酸化形に変化する可能性	密閉し、必要に応じて除酸素
			酸化分解が起きる可能性	
湿気		吸湿	加水分解など、各種化学反応が起きる可能性	密閉し、必要に応じて除湿
			微生物が繁殖し、各種の生物学的影響が出る	
			分析種の濃度が減少する	
乾燥			揮発性分析種が消失ないし減少	密閉する
			不揮発性分析種の濃度が増加する	
時間			時間と共に因子の影響が増大する	出来るだけ短時間とする

試料と分析種を安定に保つための定石

1. 変質の3大因子(温度、酸素、水)に注意
2. 変質の補助因子(時間、大気環境)に注意

図2 物質の安定性を保つための定石

更に、材質、大きさ、形状などの点で不適当な実験器具類を使用すると、分析種が非特異的に吸着されたり(表3)、操作に余計な時間が掛かったりして、後述するアーティファクトの生成など想定外の結果になる可能性が有るので、実験準備の段階から十分に気を付ける必要がある。非特異的な吸着を防ぐ際の定石は図3の様に単純化する事が出来、この原則を具体化する事がコツとなる。

要因	分析種の性状	接液部面積	器具類の素材	ロス	対策
非特異的吸着	疎水性		ガラス	小	特に無し
			ステンレス	小	特に無し
			プラスチック	大	ガラス製の器具類に変更
	親水性		ガラス	大	プラスチック製の器具類に変更
			ステンレス	小	特に無し
			プラスチック	小	特に無し
器具類のサイズ		過大		大	適正なサイズに変更
		適正		最小限	特に無し
揮散	昇華性			大	密閉・閉鎖系で操作
	揮発性			大	密閉・閉鎖系で操作
	不揮発性			無し	特に無し

物質の吸着ロスを防ぐための定石

1. 器具類の材質には、吸着し難いものを選ぶ
2. 疎水性物質には、ガラスなどの親水性素材を使う
3. 親水性物質には、プラスチックなどの疎水性素材を使う

図 3 分析種の非特異的吸着を防ぐための定石

2. 試料の前処理法

試料源の一部を抜き取る操作はサンプリングと呼ばれ、その善し悪しは分析を行う意味すら左右し兼ねない。サンプリングの基本は、ランダムサンプリング (random sampling) に在り、そのコツは試料源の状態を忠実に反映出来る一次試料を得る事である。一定の区画に有る土壌などの“死んでいる試料”については、対象物が均一になる様に十分に混合すればランダムサンプリングが可能にある。しかし、生体試料など“生きている試料”については、ランダムサンプリングは不可能に近い。例えば、ネズミの血液中カテコールアミン濃度は、サンプリングの方法 (睡眠時カテーテル採血、覚醒時カテーテル採血、ガムテープ固定採血、ギロチン採血) によって最大 83 倍も違って来る事が報告されている¹⁾。更に、生体から直接サンプリングする手法は、季節、時刻、体位、サンプリング部位、性差など多くの因子によって影響を受けるため、ケースバイケースで最善の手法を採用しているのが実情であり、一律に定石を確立する事は困難である。この様に、サンプリングについてはランダムサンプリングという概念以外には、定石らしいものが確立されていないのが現状である。

サンプリングの次に行われる操作が前処理であるが、ほぼ 1980 年代から始まった LC 分析全盛時代からのデータの蓄積によって、これ迄に幾つかの定石が出来上がっている。前処理の目的は、実試料の分析ごとに多岐に渡るが、前処理の 2 大目的は分析種の濃縮と妨害成分の除去である (表 4)。

優れた前処理法は、その両方の目的を同時に達成している事が多い。最近の LC 分析、LC/MS 分析では総じて固相抽出 (solid phase extraction, SPE) が普遍的に利用されているのが目立つ。ルーティン化された分析では、固相抽出とその後の操作が自動化されているものも少なくない。嘗て汎用された有機溶媒抽出は、主として地球環境への負荷を低減する目的で、特殊な場合を除いて固相抽出に切り替えられている。更に、街路樹に沈着した多環芳香族化合物など、疎水性に富む分析種については超臨界流体抽出 (supercritical fluid extraction, SFE) の適用が便利である。又、生体試料の分析には一般に除タンパク (deproteinization) が不可欠であるが、嘗ての酸変性法は条件が厳しいため最近では影を潜め、有機溶媒変性法或いはカラムスイッチング法に取って替わられている (図 4)。

試料の前処理には、検出感度の向上を始めとする利点 (光の部分) がある一方、器具類への吸着或いは材質成分の漏出、操作中に元々試料中に存在しなかった成分が生成する、所謂

アーティファクト (artifact、人工生成物) の生成など、影の部分も存在する事に留意しておく必要がある (表 5)。現在、実試料分析の殆どで当たり前の様に前処理を行っているが、元来、前処理には影の部分のリスクが有り、一步間違うと測定値に大きな影響を与えるので、可能であれば前処理はしないに越した事はない。現在、試料中に存在する分析種を直接測定出来る理想的な分析法が開発されていなため、止むを得ずサンプリングや前処理を行っている訳である。

表4 前処理の主な目的			
目的	手法	器具・手法類	備考
分析種の濃縮	減圧濃縮	ロータリーエボレーター	
		遠心エボレーター	
	窒素気流濃縮	窒素気流噴出装置	
	溶媒抽出	分液ロート	
	固相抽出	固相カラム・フィルター	
	超臨界流体抽出	超臨界流体抽出装置	主として疎水性物質用
	クロマトグラフィー	非選択的カラム	目的ピーク・画分を分取
		抗体カラム	捕捉された画分を溶出
		キレートカラム	捕捉された金属イオンを溶出
		配位子交換カラム	捕捉されたリガンドを溶出
		アフィニティーカラム	捕捉されたリガンドを溶出
		ケモアフィニティーカラム	捕捉されたリガンドを溶出
	電気泳動	ゲル電気泳動装置	バンド画分を分取
		キャピラリー電気泳動装置	ピークを分取
凍結乾燥	凍結乾燥機	タンパク質などの不揮発性物質	
加水分解	加水分解装置 (酸、アルカリ)	構成アミノ酸、構成糖	
遠心分離	超遠心分離機	目的画分を分取	
分析種の検出感度向上	蛍光誘導体化	(レーザー励起) 蛍光検出器	
	高感度比色誘導体化	誘導体化試薬、吸光光度検出器	モル吸光係数 (ϵ) $\geq 10^5$
	イオン化誘導体化	誘導体化試薬、質量分析計	
不安定分析種の安定化	誘導体化	誘導体化試薬	
揮発性分析種の捕捉	誘導体化	誘導体化試薬、密閉容器	
相互分離能の向上	誘導体化	誘導体化試薬	
妨害物質の除去	ろ過	ろ過器、フィルター	
	遠心分離	遠心分離機	ゴミや沈殿物を除去
	溶媒抽出	分液ロート	不要な層を廃棄
	除タンパク	酸変性法	過塩素酸、トリクロロ酢酸
		有機溶媒変性法	アセトニトリル、エタノール
		オンライン捕捉法	ヒドロキシアパタイトカラム
	クロマトグラフィー	非選択的カラム	妨害ピーク・画分を廃棄
		サイズ排除カラム	不要な高分子画分を廃棄
煮沸	煮沸装置	不要な酵素を失活させる	

試料中の分析種濃縮の定石

1. 固相抽出が一般的
 - ・疎水性分析種には逆相抽出 (C18, C8 など)
 - ・親水性分析種には順相抽出 (フロリシル、シリカゲル など)
 - ・イオン性分析種にはイオン交換
2. 超臨界流体抽出は乾燥試料中の疎水性分析種に最適
3. 生体試料には有機溶媒で先ず除タンパク

図 4 分析種濃縮の定石

前処理の特徴	要素	備考
長所	検出感度の向上	誘導体化
	不安定分析種の安定化	誘導体化
	揮発性分析種の捕捉	誘導体化、ヘッドスペース
	分離性能の向上	誘導体化
	妨害成分の除去	クロマトグラムの単純化
	自動化	省力化、再現性向上
	分析信頼性の向上	
短所	分析種の吸着ロス	材質の選択
	素材成分の漏出	耐溶媒性
	試薬・溶媒類からの汚染	副産物、添加剤、分解物
	環境からの汚染	大気、室内塗装
	操作・保管中の分解・劣化	
	アーティファクトの生成	
	生体反応	取り込み、代謝
	分析信頼性の低下	

最近でこそ各種の便利な前処理用器具類が市販され、講習会などで前処理に関する知識や情報を得る事が普通に出来るが、1980年代以前は「前処理が出来れば一人前」と言われたものである。特に、バイオメディカル領域の前処理には化学的な素養に加え、生物学的な知識・経験が必要であり、現場で前処理技術が伝承されずに研究者や技術者が自分で習得するものであるとする風潮が強かったからである。しかし、この様な職人気質的な姿勢は現在でも必要であり、実験者の創意工夫無しには技術の進歩は無い。LC、LC/MS 以外の分析法も含めて試料の前処理を総合的に学習したい方は、ハンドブック²⁾や成書^{3)・5)}をご覧戴きたい。

おわりに

主として LC 分析時代の分析のコツについては、Q & A 方式の実務書^{6)~11)}、成書¹²⁾¹³⁾などが参考になる。又、論文、報告書などの執筆、或いは学会、講演会などでの発表に際しては、斯界の公用語としての関連 JIS^{14)~16)}に準拠して戴ければ幸である。なお、本稿に続く 3. 分析種の分離法、4. 分析種の検出法については、次号以降に掲載の予定である。

引用文献

- 1) C. W. Popper, C. C. Chiueh, I. J. Kopin, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **202**, 144-148 (1977).
- 2) 中村 洋監修、分析試料前処理ハンドブック、丸善 (2003).
- 3) 中村 洋監修、ちょっと詳しい液クロのコツ—前処理編、丸善 (2006).
- 4) 中村 洋企画・監修、動物も扱える 液クロ実験 *How to* マニュアル、みみずく舎 (2011).
- 5) 中村 洋監修、実務に役立つ 食品分析の前処理と実際、日刊工業新聞社 (2020).
- 6) 中村 洋監修、液クロ虎の巻、筑波出版会 (2001).
- 7) 中村 洋監修、液クロ龍の巻、筑波出版会 (2002).
- 8) 中村 洋監修、液クロ豹の巻、筑波出版会 (2003).
- 9) 中村 洋監修、液クロ犬の巻、筑波出版会 (2004).
- 10) 中村 洋監修、液クロ武の巻、筑波出版会 (2005).
- 11) 中村 洋監修、液クロ文の巻、筑波出版会 (2006).
- 12) 中村 洋監修、液クロを上手に使うコツ、丸善 (2004).
- 13) 中村 洋企画・監修、液クロ実験 *How to* マニュアル、みみずく舎 (2007).
- 14) JIS K 0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則、日本規格協会 (2011).
- 15) JIS K 0214:2013 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門)、日本規格協会 (2013).
- 16) JIS K 0136:2015 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則、日本規格協会 (2015)

<執筆者紹介> 中村 洋 (Hiroshi NAKAMURA)

現在、(公財) 日本分析化学会分析士認証委員会・委員長、同・液体クロマトグラフィー分析士認証専門委員会・委員長、同・LC/MS 分析士認証専門委員会・委員長、同・液体クロマトグラフィー研究懇談会・委員長、ISO/TC47 (Chemistry) ・Chairman 及び国内委員会・委員長。

分析士資格：液体クロマトグラフィー分析士五段、

LC/MS 分析士五段。

連絡先：電子メール nakamura@jsac.or.jp



【 会員動向 】

忙しいながら楽しい田舎暮らし

元 JX 金属 (株) 松崎幸範 / Yukinori Matsuzaki

(Received November 19, 2020 ; Accepted November 20, 2020)

私は北海道札幌育ち、今は大都市札幌ですが子供の頃は近所を馬車が往来し、冬は馬ソリを引いて走っているような田舎でした。家はリンゴ畑に囲まれ (リンゴ農家ではありません)、冬になると 1m を超える雪が積もり、近くの小さな山 (丘) に登ってスキーで遊んでいました。

そんな環境で育ったので暑いのは苦手、スキーや登山などアウトドアが好きで、以前から山があって雪の降るところで暮らしたいと思っていました。リタイヤしたら田舎でノンビリ、小説の主人公、三屋清左衛門 (藤沢周平著) のような暮らしを思い描いていました。しかし現実はやることが多く忙しい日々です。そんな私の暮らし振りを紹介したいと思いますが、、LC とあまりと言うかほとんど関係の無い話に始終しますので、まったく興味の無い人は読まずに、少しだけ興味ある方は飛ばしながら読んでいただけると幸いです。

自宅は長野県原村、八ヶ岳の裾野標高 1200 m、60 歳で移住して 7 年 (うち定住は 5 年) がたちます。原村は八ヶ岳の西麓、標高 800~1600 m (最高地点は八ヶ岳の阿弥陀岳 2805 m) に広がる高原、主な産業は高原野菜の農業です。村は長野県の中でも南側で、わりと積雪が少なく晴日が多く、雲一つない真青な空を“八ヶ岳ブルー” (写真 1) と呼んでいます。キーンと晴れた夜は家の近くから天の川が見え、夏はたまにですが蛍も来ます。

近くの諏訪湖 (車で 30 分) では花火大会があり 4 万発余りの花火が打ち上げられ、湖上スターマインが有名です。ほかに特産はセロリ、高原野菜、ルバーブ (赤い西洋フキ)、諏訪神社では 7 年に一度の御柱祭、6 月には赤岳・阿弥陀岳で開山祭がおこなわれ、村ではクラフト祭、星空祭、星空の映画祭が開かれます。このような観光てきな話はネットで知ることができるので、ネットで知ることのできない“私の田舎暮らし”を紹介します。

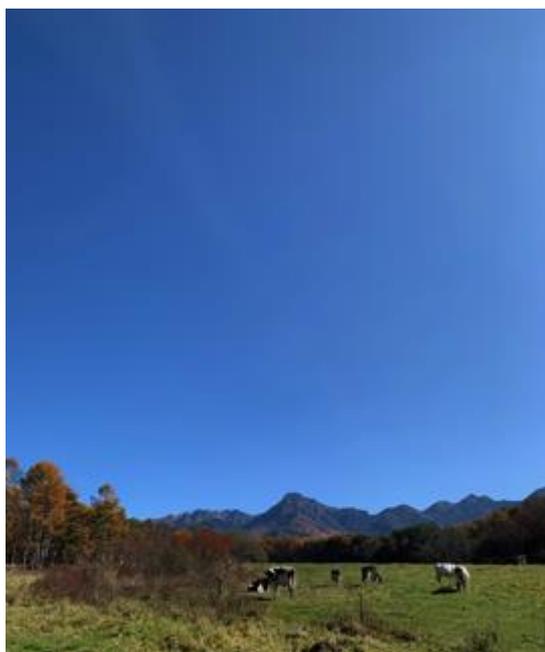


写真 1 八ヶ岳ブルー
(農場から八ヶ岳遠望)

物置と薪小屋を DIY

はじめに物置、冬は薪ストーブを使うので次に薪小屋が必要でした。引っ越して最初の 2 年間は、会社 (茨城県日立市 JX 金属) に勤め単身赴任をしていたので、毎週のように片道 5 時間かけて原村の自宅に帰宅。物置 (大きさ 3×4×高 3 m、写真 2) と薪小屋 (写真 3) を建てました。材料は家を建てたときに残り材とホームセンターとネットから購入し、約 1 年かかりで完成しました。最近、物置は田舎暮らしの道具が増えて手狭になり、薪小屋も薪を多めにストック (薪は 2 年乾燥が理想的) したいので手狭になり、両小屋とも増築を

予定していますが中々着工できないのが現状です。



写真 2 物置



写真 3 薪小屋（薪割り中）

ハローワーク

私は外で働いている方が性に合うので、退職して直ぐにハローワーク行きました。所定の書類に経験した仕事“液体クロマトグラフィー”と書き窓口へ提出したところ、窓口の担当者は不思議そうに「クロマトグラフィーは何ですか？」私は「色々な成分が混合した溶液をカラムに通すと、、、」担当者は益々不思議顔、ハローワークにクロマトグラフィーの仕事はありませんでした。取りあえず近く（車で 15 分）で紹介された仕事は隣町の児童クラブ（学童）の支援員、仕事は子供が下校してからの半日、夏休みなど長期休みがありそうと気楽に考えて勤めました。

児童クラブの建物は学校に隣接して、小学 1～6 年生の子供が 50 人前後、支援員は 6 人程度でした。主な仕事は体育館・校庭でドッチボール、バドミントン、サッカー、三角ベースボールなど児童と遊びます。ここの子供達は数キロの坂道を歩いて通学するので、都会の子と違って元気一杯！仕事を始めた頃はクタクタになり、さらに学校の長期休みも児童クラブがあり半日交替の勤務、これは予想外でした。私は児童に“マツザキ”と呼んでもらうのは固いと思い「マッチャンと呼んで！」と自己紹介、徐々に子供たちも慣れて、マッコ、マツ子など色々と呼ぶようになりました。子供はフレンドリイで純粹で遊んでいると心が和みました。昨年退職しましたが良い思い出になりました。

田舎暮らしはお金がかかります

田舎暮らしは少ない生活費で暮らせるように思いますが、以外とお金がかかります。ここは街暮らしと違うのはわかりますが、どんな暮らしか？どのような道具が必要か？具体的にわかりませんでした。事前勉強する暇も無く予備知識のないまま引っ越しました。LC 懇のような“田舎暮らし懇”やコツ本などは無く、隣人に教えてもらったり、バイト先の仲間に聞いたり、模索しながら田舎暮らしはスタートしました。

先ず購入したのは軽トラ（軽自動車のトラック）。街ではあまり見かけないですが、座席は 2 つ、後に露天の荷台が付いている車です。軽トラは薪、砂利、日曜大工の材料を運び、畑仕事など作業&普段使いとして重宝で“村のベンツ”と言われています。

ほかの田舎暮らしの道具（相棒）を紹介します。

野良仕事は、ツルハシ、一輪車（土方仕事で使う手押車）、ジョレン、レーキ、刈り払い機（草刈り）エンジン式と電動の 2 台、落葉掃除に使うブロワー
木工など DIY は、インパクトドライバー、丸ノコ（電動）、その他大工道具など沢山。
薪作りは、チェーンソー（写真 4）は大小 2 台、エンジン式薪割り機（写真 5）など、ほかにも様々な道具を買いましたがリストアップすると切りが無いので、紙面の都合で割愛します。



写真 4 チェンソー作業



写真 5 エンジン式薪割り機

山友

移住したら地元、身近な友人大切です。

八ヶ岳は裏山と言うには大きいですが、自宅から八ヶ岳の頂上は日帰り圏内。例えば赤岳の登山口、美濃戸口まで車で 30 分ほど、早朝出発すれば赤岳頂上をピストンして夕方には帰宅できます。他にも甲斐駒ヶ岳など南アルプスも近く、北アルプスもアクセスが良く山好きにたまらない環境です。

しかし、山が好きで移住した人の多くが“ここで暮らし始めたら忙しくて山に行って無い！”と言います。私も物置小屋・薪小屋を建てたり野良仕事に翻弄され、山に行く時間が無い日が続きました。

そんなとき近くの（若い）友人から“山と一緒に行かない？”と声がかかり、山好きの私にとって渡りに山？船、野良仕事は後回し人生は一回やりたいことを優先！しかしこれは簡単なようで難しい。時々“あれはいつ片付けるの？！”の声が近くから聞こえてきます。ともあれお陰で今年は、八ヶ岳、薬師岳、雲ノ平、蝶ヶ岳～常念岳、瑞牆山など充実した山行（写真 6,7,8）が続いています。



写真 6 赤岳（八ヶ岳）

趣味と実益兼ねて

子供の頃（札幌）からスキーが好きで、社会人になってからも休暇をとって主に志賀高原、白馬、野沢など長野県北部のスキー場に行きました。移住してから知りましたが、八ヶ岳の周辺にも多くのスキー場（一部人工雪）があり、都心から 2～3 時間とアクセスが良いので日帰りのスキーヤー、ファミリーを多く見かけます。

一番近いスキー場は車で 20 分、スキー好きにとって絶好の環境、もう少しスキーが上達したいと思い、まずは 2 級（基礎スキー検定）を受験、自信は有ったのですが、、、みごと不合格！でした。やはり我流は駄目、基礎から教わることが大切と思い（当たり前です）、レッスンに通い 2 級合格。しかし上達が遅く歳々鈍くなってレッスン費用もバカになりません。いっその事スキースクールでインストラクター（イントラ）として働いた方が上達の近道ではと考え、募集年齢を超えていた

のでスクールに電話、面談後に採用されました。

スクールには地元や首都圏から小中学生がスキー教室に来ます。首都圏（主に 2 泊 3 日）の子供のほとんどは初心者、スキーは初めて雪も初めての生徒 10 人くらいを受け持ちます。初日はスキーで歩くのがやっとですが 2 日目は少し上達してリフトに乗って、緩斜面ですが上からブルークファーレン（スキーをハの字にして滑る）やボーゲンで滑るようになり、生徒はもうスキーに夢中です。レッスン最終日「これが最後の滑走ですよ！」と子供たちに言うと「エ～先生（またはマッチャン）だめだめもう 1 回滑ろう！」なんて言われるときもあってイントラ冥利につきます。昨シーズン校内検定で 1 級合格、3 回目のシーズンを迎えます。レッスンやスクールで知り合った友人とは、互いに競いながら楽しいスキー友です。

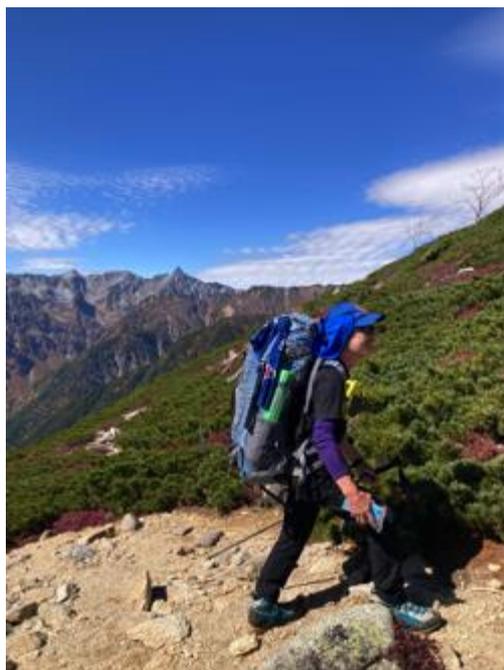


写真 7 蝶ヶ岳～常念岳をテント泊
（後ろは槍ヶ岳）



写真 8 槍ヶ岳の
モルゲンロード（朝焼け）

たまたま始めた畑

数年前、隣のご主人から「畑やらない？」と声がかかり、近くの畑を数人で共同で借りることになりました。しかし野菜作りは未経験、隣の畑の先輩に教えてもらい、教科書やネットを見ながら今年で 4 年目です。野菜が上手く育たないことが多く、理由が解らず畑の隣人に聞いたり、まるで液クロを始めたときのような感じです。

畑は標高 1000 m にあるので、市販の“野菜の育て方”なんて言う本通りにはいきません。一般的な時期と方法で植えると、寒くて早霜や遅霜で野菜が凍みて（凍ること）失敗します。一般の時期より遅くて暖かくなってから、秋は寒くなるのが早いので早め（お盆）に植える。春はカッコウが鳴いて遅霜の心配が無くなってからと教えられ「カッコウ鳴いたね！」が合言葉になっています。寒冷地は色々工夫が必要ですが、反対に涼しいので害虫

被害が少ないなど野菜に適した面もあります。無農薬、有機肥料で作っています。虫食いが多く野菜の見た目は奇麗ではありませんが、自分で育てた野菜は安心して新鮮で美味しいです（写真9）。

私達は豆が好きで春に大豆、茶豆、青豆、黒豆を植え、夏から秋は枝豆（写真10）でビールと一緒に、晩秋には豆を乾燥して大豆として収穫します。収穫した大豆は煮豆したり、味噌も作ります。大豆は少し残して翌年の種にします。豆は上手く育てると60年サイクルできるそうですが、見届けるのは難しそう？です。

脱穀して残った枯枝は良く燃えるので、薪ストーブの焚きつけに、無駄なゴミはでません。

村は小さな地域（コミュニティ）なので野菜作っていると、自然と畑の知り合いが増えました。最近では家庭の野菜クズ、落ち葉、ストーブの灰、米糠（精米所から貰います）を肥料にしています。畑の先輩に教わりながら野菜作りをするうちに自然に、肥料をなるべく買わないゴミを出さない循環する畑になりました。今はLINEなどで畑の人脈、ヒューマンネットワークができ、まるでLC懇のようで情報交換会を懐かしく思い出します。

移住して7年経ち暮らしにも慣れ、近くの友人も増え山歩き、畑、ランニング、スキーなど遊びながら、野良仕事と仕事をやりながら生活ができるようになりました。村にはバスなど公共交通機関がほとんど無いので、車による移動がほとんどです。村（田舎）には問題も多くありますが、ここには最高の風景があります。この自然を大切にしながら、いままでの経験を生かして自然豊かな魅力ある地域にしたいと思っています。

最後になりましたが、貴重な紙面に“田舎暮らし”を書かせていただき、液体クロマトグラフィー研究懇談会の中村先生はじめ皆様に感謝いたします。



写真9 トマト（ハウス）8月



写真10 畑の枝豆 8月

<執筆者略歴>

前職：1971年日本鉱業日立精錬所分析課入社、1976年同社中央研究所（埼玉県戸田）、2010年JX日鉱日石エネルギーに社名変更、2011年JX金属技術開発センター（茨城県日立）、2015年退職

2013年長野県原村に移住、原村エコツアーリズムガイド、富士見パノラマスノーアカデミーインストラクター非常勤、SUWA YATSU 認定3級サイクリングガイド、趣味は山歩き、スキー、野菜作り、ランニング、DIY、蕎麦打ち



【 会員動向 】

当社における液クロ分析の状況

フマキラー株式会社 開発本部開発研究部 嶋口 翔

(Received October 30, 2020 ; Accepted November 4, 2020)

液体クロマトグラフィー研究懇談会会員の皆様、初めまして今日は。私は液体クロマトグラフィー研究懇談会(以下 LC 懇)運営委員会の見習いメンバーとして活動させて頂いておりますフマキラー株式会社の嶋口と申します。この度の LC 懇会員さま向け電子ジャーナル「LC と LC/MS の知恵」(「Wisdom for LC and LC/MS」) 第一号発行に際し、僭越ではございますが会員動向記事執筆のご指名を頂きました。本日は弊社事業内容と私の業務内容及び弊社における液クロ分析の現状について、簡単に紹介させて頂きたいと思っております。

弊社は広島県発祥の会社です。主要な商品カテゴリーとしては殺虫剤、園芸用品及び家庭用品の3つが有ります。代表的な商品ブランドは蚊取り・蚊よけ等の「ベープ」シリーズ、園芸用品の「カダン」シリーズ、又新型コロナウイルス対策でもご好評頂いております家庭用品の「アルコール除菌」「ウイルシャット」シリーズ等有ります。弊社は液体クロマトグラフィーのユーザー企業に当たり、専ら自社製品の開発・製造を目的として液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー等を用いた試験を日常的に行っております。私は開発本部に所属しており、試作品の安定性評価や、新製品の分析手法の開発、薬事申請に伴う理化学試験の実施とその報告書作成を中心に従事しています。又、所属する分析グループの業務全般の管理もしており、所属メンバーそれぞれの能力を最大限に引き出し、グループとして最大のアウトプットを実現出来る様、日々業務に勤しんでいます。

さて、当社における液クロ分析の現状について、端的に纏めますと次の通りとなります。

- ①「液クロ分析が必要となるケースの増加」
- ②「複数成分一斉分析が必要となるケースの増加」
- ③「出来るだけシンプルな分析法が求められる傾向」

①「液クロ分析が必要となるケースの増加」については、以前は必要無かった試験が必要となったり、顧客ニーズの変化によりガスクロよりも液クロを用いた方が簡便に分析出来る製品が増えて来たためです(ガスクロで分析出来るケースも多いのですが、試料調製の簡便さ、検出器の選択性の高さから液クロを選好するケースが多いです)。こうした傾向は今後も強まる事は有れど、弱まる事は無いと予想されるため、当社における液クロ分析のニーズは今後も増大すると考えています。

②「複数成分一斉分析が必要となるケースの増加」については、一例として水を主体とし親水性成分と疎水性成分を界面活性剤で分散させた製品が挙げられます。こうした製品の分析の場合、開発部門だけの分析であれば固相抽出法などの前処理を用いて、個々の成分に最適化した調製法とする事も考えられます。しかし、製造部門での出荷検査を考慮すると煩雑で時間の掛かる調製法は回避する必要があると有ります。そのため、複雑な前処理が不要な一斉分析メソッドを設定する必要があり、こうしたケースで液クロが活躍します。

③「出来るだけシンプルな分析法が求められる傾向」については、社内や外注先の方にとって試料調製が簡便で分析結果の処理が出来るだけシンプルとなる分析法が求められています。例えば当社においてもご多分に漏れず熟練のオールドクロマトグラファーが一線を退くケースも見られるようになりました。その代わりに若い人が分析機器を扱う機会が増えて来ており、彼らの業務負担を減らして余暇時間を増やし、リフレッシュした状態で実力を発揮し更なる成長を遂げられるよう願って、検出器の選択性や多検体処理と言った液クロの特性を活用した分析法を設定しています(早めに帰宅し8月に生まれた息子に会いたいためではありません！)。

以上の通り、当社における液クロ分析のニーズは様々な要因から増加傾向にあり、そのノウハウを蓄積し業務効率化を図る必要があると有ります。しかし、社内で得られる知識・ノウハウには限界があり、そこで LC 懇における会員の方々との情報交換が重要となります。勿論、お互い業務上の機密が有り、余り核心に言及した話が出来ないケースも有ります。それでも液クロ分析を熟知した方々からのアドバイスは、分析方針を立てる際に非常に参考となっております。年始からのコロナ禍により会員の皆様と直接お会いする事も儘なりません、この度発行となったこのオンラインジャーナルを通じて、少しでも LC 懇会員の皆様との交流を深められる事を切に願っています。

< 執筆者略歴 >

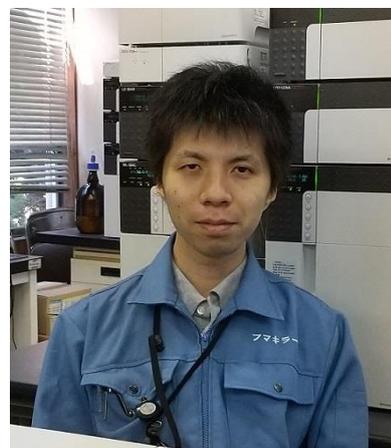
嶋口 翔 (Sho SHIMAGUCHI)

開発部門における分析担当者。

東京工業大学大学院生命理工学研究科修了。修士(理学)。
同大学院在学中はカテコールアミンやその代謝関連物質の評価・研究に従事。

修了後は保険会社、自動車部品メーカーを経て、2016 年にフマキラー株式会社に入社。

同年より同社開発部門にて分析業務に従事し、開発品の評価や薬事申請に伴う理化学試験の担当者を務める。



【団体会員紹介】

サンスターと分析技術

サンスター株式会社・研究開発本部・研究推進部（安全性・分析） 藤田深咲

Sunstar and Analytical Technology

Misaki Fujita

R&D Promotion (Safety Analysis), R&D Department, Sunstar Inc.

(Received October 22, 2020 ; Accepted November 4, 2020)

本稿では、サンスター株式会社で分析業務を担当している藤田深咲より、弊社概略と商品ブランドの紹介、私が所属する分析部門の業務内容及び LC、LC/MS、LC/MS/MS の活用事例についてご紹介させていただきます。

弊社は、1932 年に創業者金田邦夫が自転車向けのパンク修理用ゴム糊の製造販売を行った事を創業としています。その後、ゴム糊を入れていた金属チューブ容器を自社で製造していた事もあり、そのチューブを用いてもっと一般のお客様の役に立つものを作って提供出来ないかと考え、その当時主流だった粉状の歯磨剤を練歯磨きにしてチューブ容器に入れる事を検討し、1946 年にチューブ容器入りの練歯磨剤を開発・発売しました。その練歯磨きの商品名が、「サンスター」であり、「サン」が太陽、「スター」が星の合成語ですが、「朝の太陽の光と共に歯を磨き、夜に星と共に歯を磨いて健康に」との願いが込められています。サンスター練歯磨きは好評を頂き、現在のサンスター株式会社のオーラルケア事業、更にはヘルス&ビューティ事業へと消費財関連の事業カテゴリーを広げて来ました。一方、一般の消費者の方には馴染みが薄いですが、工業材分野ではサンスター技研株式会社というグループ会社があり、こちらは創業時ゴム糊を充填していた金属チューブの加工技術を応用した、プレスによるバイクのスプロケット製造を起源とした二輪車用金属部品等のモーターサイクル事業と、ゴム糊から発展した高分子開発技術を起源とした自動車や建築、電子機器に使う接着剤・シーリング材等のケミカル事業を展開しています。オーラルケア、ヘルス&ビューティ、ケミカル、モーターサイクルの 4 つの事業分野を発展させながら、各事業分野で培われた技術・知見を活用して新事業の創出を目指しています。

サンスター株式会社の代表的な商品ブランドは、オーラルケア事業では歯周病を予防する G・U・M、ステインの除去と付着を予防する Ora2、ヘルス&ビューティ事業では、サンスター独自の美白有効成分「リノレック S」を配合した美白ケアラインを中心としたスキンケアブランドのエクイタンス、メントールによる爽快感を特徴とした男性用シャンプーで最近では頭皮のべたつきやニオイの原因除去を機能追加したサンスタートニックシャンプー、雨・風の日も一日中ヘアスタイルをキープするヘアスプレーや白髪用スタイリング剤をもつヘアケアブランドの VO5、野菜飲料・青汁・サプリメント等の食品や特定保健用食

品・機能性表示食品を展開する健康道場等が有ります。一方、サンスター技研株式会社のケミカル事業では、消費者向けのビジネス拡大の一環として、住環境の向上を図るため UV-C と光触媒による脱臭方式を搭載した空間除菌脱臭機 QAIS を新たに開発し上市しています。これらの商品をドラッグストアやスーパーでの店頭販売、お客様へのダイレクト販売となる通信販売、法人向け販売等の幅広いチャンネルに展開しています。

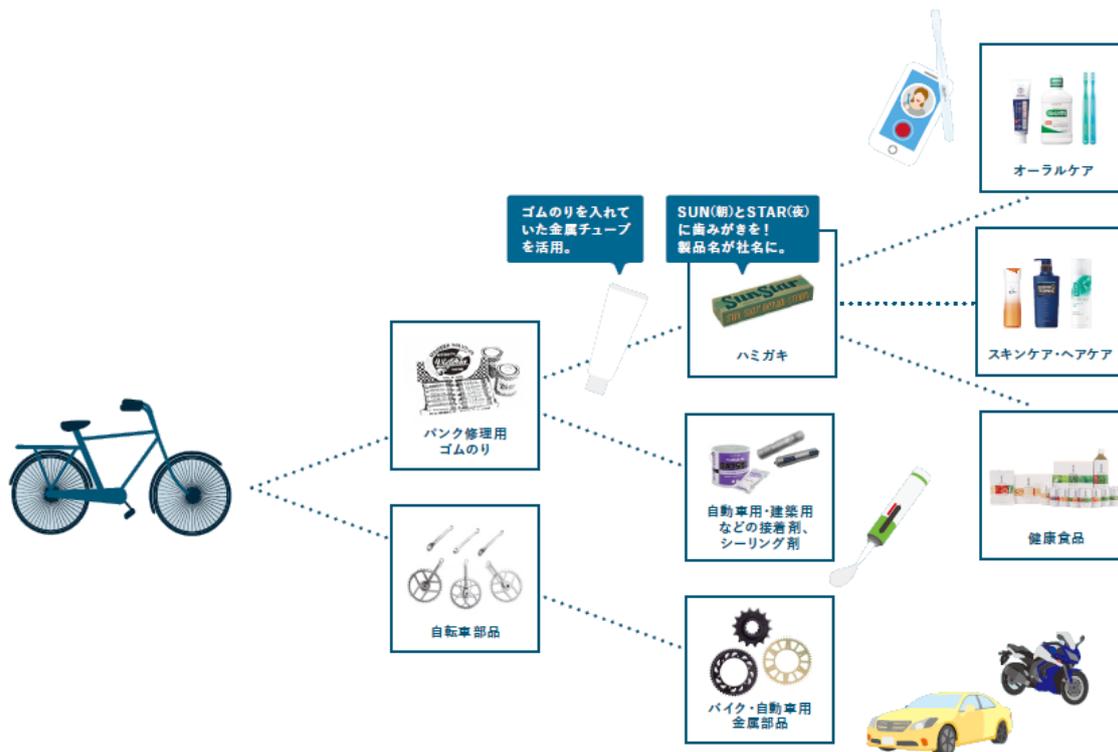


図 1 事業分野の変遷

今年 3 月には G・U・M の新シリーズとして歯周病菌の歯茎細胞への侵入を防ぐ G・U・M ウェルプラスシリーズが新発売されました。又今年 4 月には、妊娠前から幼少期の「おくち」「おなか」「おはだ」の環境をバランス良く整える事に注目した新ブランド SODATECO (ソダテコ) を立ち上げ、タブレットやスムージー、ミルクローション等の販売を開始しました。QAIS についても、これまでは機器が大型なため介護施設や病院向けの販売が中心でしたが、家庭用向けの小型機を開発し販売を開始しました。今年から弊社では企業スローガンとして「100 年 mouth100 年 health」を掲げ、人生 100 年時代、人々の健康寿命の延伸に寄与する製品・情報・サービスの提供を事業の核として展開して行く事を目標に、様々な研究に取り組み、様々な新製品を生み出して行く予定です。その基礎となるお口の健康から、全身の健康へ、という事で以前から学会や自社主催のセミナーで紹介を続けて来た歯周病と全身疾患の関連については、弊社の大きなテーマでも有ります。

私が所属する分析部門は、サンスター株式会社に所属しておりオーラルケア・ヘアケア・スキンケア・食品等、様々な分野の製品の研究開発や基礎研究の支援、製品トラブルの解

決等を目的に、幅広い分野の分析を行っています。更に工業材を扱っているサンスター技研株式会社の接着剤等の分析業務についても連動した業務を行っています。

例えば、製品中の成分分析や、有効成分の安定性、透過性や溶出挙動の確認、原料中の不純物測定、異物・異臭トラブルの解決等、製品や原料、生体試料、容器、樹脂等の様々な検体について、LC、LC/MS をはじめとする様々な分析機器を駆使し、より良い製品を作る手助けとなれるよう日々業務を行っております。中でも、LC/MS は最も使用頻度が高く、特にノンターゲットの定性分析の場合は、最初に LC/MS で網羅的にピークを確認し、化合物の推定結果を足掛かりに、そこから適切な分析方法を選択して行きます。

ここで、私が主に担当している LC/MS による化粧品原料の分析法開発について紹介させていただきます。化粧品に使用される原料には、UV 吸収をもたない成分が多く存在します。これらに関して、弊社では何十年も前から RI 検出器での分析を行っており、多くの分析データも蓄積して来ました。しかし RI 検出器は、汎用的である一方、感度が低い事や、グラジエント分析が出来ない等、分析における課題も多いため、微量成分分析や夾雑成分が多い分析には不向きです。中でも、界面活性剤の分析には非常に苦労していたため、LC/MS での分析法開発に着手しました。

界面活性剤は、アニオン系、カチオン系、ノニオン系、両性、アミノ酸系等、様々な種類があります。そして、洗剤や化粧品等、日用製品の多くに配合されており、使用感にも非常に影響しやすい成分でもあるので、界面活性剤の定量が求められる場面が数多く有ります。しかし、分析が難しい事が課題でした。界面活性剤分析がなぜ難しいかという点、界面活性剤原料には、原料の種類にもよりますがアルキル基の鎖長違いやエチレンオキシド (EO) の付加モル数違い等複数成分が含まれている事が少なくないためです。脂肪酸エステル系の界面活性剤であれば、例えばヤシ油から作られた場合、C8~C18 までのアルキル鎖をもつ成分が混在しています。出発原料やメーカーが異なれば、アルキル組成分布にも違いが生じます。ポリオキシエチレン (POE) を含むエーテル型の界面活性剤は更に複雑です。原料に POE-10 と記載されていた場合、EO が平均で 10 モル付加している事を表していますが、実際の付加モル数には分布が存在します。更に、UV 吸収をもたない成分が多く、RI 検出器で分析しようとした場合、グラジエント分析が出来ず、感度が低いため、一回の分析で脂肪酸エステルは主成分の C12 と C14 が辛うじて検出出来るレベルで、POE を含むエーテル型は、複数成分がブロードの山として検出されるだけでした。この様に、一つの原料に複数成分が混在する界面活性剤が、更に製品中では複数の原料と混合されているので、RI 検出器では分析が困難でした。しかし、LC/MS を使用する事で、界面活性剤の分析も非常に簡便になり、脂肪酸エステルも短時間で C8~C18 まで高感度に分離して検出され (図 2)、POE を含むエーテル型も、EO に相当する分子量を確認すれば、何モル付加した成分が含まれているかはっきりと分かるため (図 3)、原料のロット違いやメーカー違いによるこれらの分布の違いの比較も容易に出来るようになり、製品中の界面活性剤の定性も可能になりました。

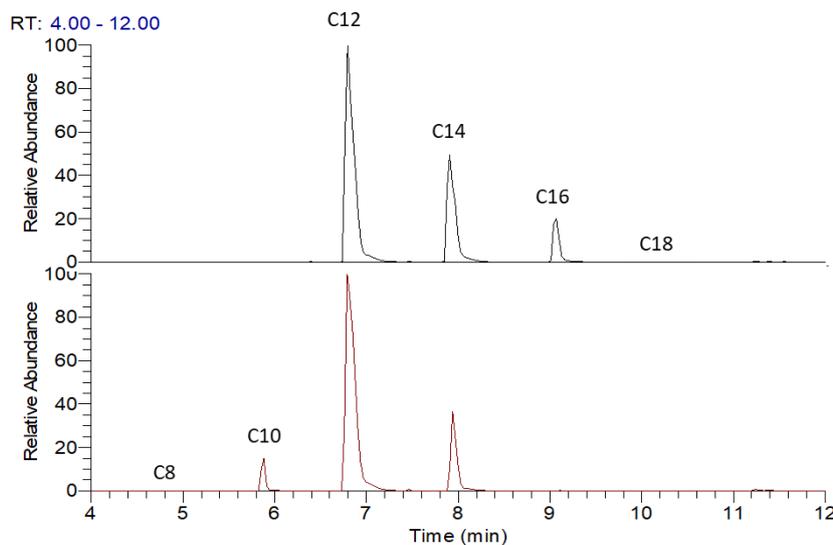


図 2 メーカーの異なる 2 種類のラウリル硫酸塩原料の Base Peak クロマトグラム

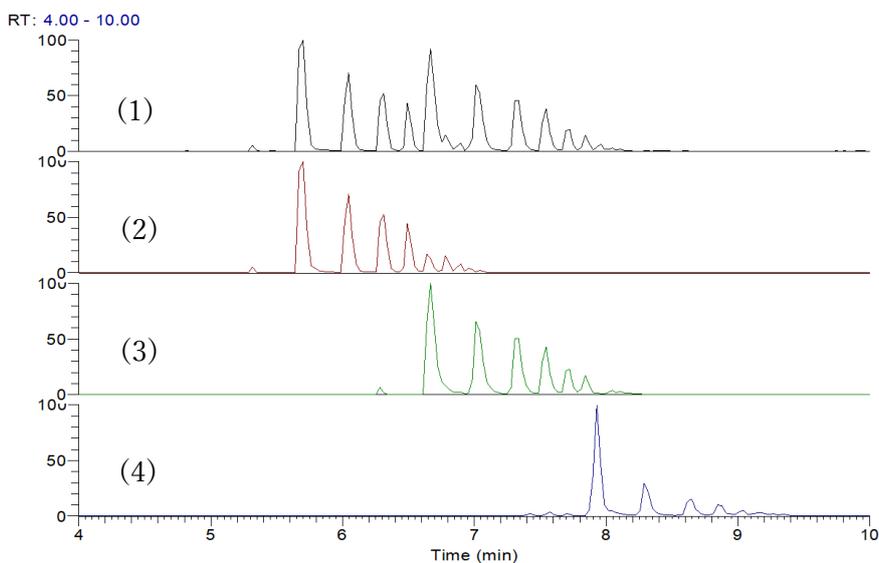


図 3 POE アルキルスルホコハク酸塩原料のクロマトグラム

- (1) Base-Peak クロマトグラム
- (2) C12 のアルキル鎖をもつ EO 分布を示す抽出イオンクロマトグラム
- (3) C14 のアルキル鎖をもつ EO 分布を示す抽出イオンクロマトグラム
- (4) C16 のアルキル鎖をもつ EO 分布を示す抽出イオンクロマトグラム

ここまで紹介した界面活性剤の例のように、LC/MS を用いる事で複数成分を含む分析が非常に容易になりました。又、PDA 検出器や RI 検出器では、LC で如何に分離出来るかが重要であったので、メソッド開発が最も時間が掛かり苦勞する部分でしたが、LC/MS ではその様な分離性能向上の検討が必須ではなくなったので、メソッド開発が非常に楽になりました。しかしその一方で、前処理等の操作ひとつひとつが結果に与える影響がシビアに

なったのも確かです。PDA 検出器や RI 検出器ではさほど気にならなかったレベルのキャリアオーバー、コンタミネーション等も、LC/MS では結果に顕著に現れてしまうので、高感度が故の問題に頭を抱える事が増えました。特に微量成分を分析する際には、それらの問題は定量結果に大きく影響してしまうため、何度も試験をやり直さなければならない場面が有りました。その度にキャリアオーバーを減らすため配管や洗浄条件を見直し、又コンタミネーションをなくすため自分のサンプリング方法を見直し、メスフラスコ等のガラス器具の汚れにも敏感になりました。分析部門が出した結果は、今後の製品開発の方針を左右し、有効性や安全性の指標となる事が多いので、分析結果の信頼性を高め、自信をもって報告出来るようにするにはどうすればよいか、先輩からアドバイスを頂きながら、最近では分析機器メーカーによるウェビナーも聴講させて頂き、日々模索しております。

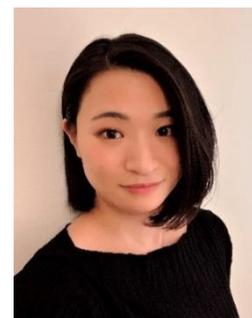
更に、微量成分やノンターゲットの分析案件が増えて来た事もあり、更なる高感度化と定性能力を求めて、高分解能タイプの MS/MS を導入しました。微量分析に関しては、LC/MS に比べ、約 50 倍の高感度化を達成出来た成分も有ります。LC/MS/MS データを解析ソフトで処理する事で、主成分解析やボルケーノプロット、KMD プロット、ヒートマップ等、これまで以上に詳細なデータが得られ、新たな視点でデータを解釈出来るようになりました。しかしデータの解釈も含め、まだまだ使いこなせているとは言い難い状態ですので、更に知識・技術を習得する事が目下の課題ではある一方で、LC/MS/MS の可能性は非常に実感しています。今後、弊社が人々の健康寿命の延伸に寄与する製品・情報・サービスの提供をするために、LC/MS/MS がどのように活用出来るか検討しており、今後の展開が非常に楽しみです。

弊社のブランドと分析技術について紹介させて頂きましたが、読者の皆様には、サンスターと商品、又商品と分析技術がどのように結びついているか、少しでも興味をもって頂けると幸いに存じます。LC/MS(MS)についても、今後知見を広げて行きたい分野が沢山有りますので、装置メーカー様やカラムメーカー様、ユーザー様と情報交換を通じて交流を広げて行けたらと存じますので、何卒宜しくお願い致します。

最後になりましたが、この度は、LC 研究懇談会の電子ジャーナル「LC と LC/MS の知恵」の発刊に当たり、中村 洋先生より投稿の機会を頂き、記念すべき創刊号に寄稿させて頂ける事を大変嬉しく思います。この場をお借りし御礼申し上げます。又、LC 研究懇談会と「LC と LC/MS の知恵」の更なる発展を心からお祈り申し上げます。

<執筆略歴>

平成 2 年 (1990 年) 11 月 6 日生まれ。兵庫県神戸市出身。平成 28 年、大阪市立大学大学院理学研究科修了後、化粧品 OEM メーカーに入社し分析業務に従事。令和元年、サンスター株式会社に入社し、分析業務に従事。



【新会員紹介】

液体クロマトグラフィーとのかかわり

前中 佑太 / Yuta MAENAKA

三菱ケミカル株式会社 / Mitsubishi Chemical Corporation

(Received October 8, 2020 ; Accepted October 8, 2020)

今年 4 月より、入会させていただいた三菱ケミカルの前中と申します。少しだけ自己紹介させていただきたいと思います。2012 年に三菱化学 (現三菱ケミカル) に入社して以来、一貫して有機材料の分析に携わっています。主に液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを用いた分離分析、NMR や ESR、FT-IR などを用いた構造解析などを行っております。手法は有機分析がメインですが、扱う材料は様々 (原料から製品、基礎材料から高機能材料) で悪戦苦闘の毎日です。

数ある分析手法の中でも液体クロマトグラフィーは社会人になってから初めて取り扱った分析装置ということもあり、特に思い入れが強いです。使い始めた頃はカラムの接続がうまくできず、リークセンサーを何度も作動させていました。実は今でもたまに失敗してしまうのですが、以前は横浜の研究所におりましたので、地の利を活かして、研究懇談会の聴講や分析士試験受験など液体クロマトグラフィー研究懇談会のイベントに足繁く参加し、勉強させていただきました。2016 年の異動により関東から離れたことで足が遠のいておりましたが、多種多様の素材を扱う現場において改めて分離技術の重要性を感じておりましたところタイミングよくお声掛けいただき、運営委員心得として参加させていただく運びとなりました。

まだまだ、経験は浅いですが、液体クロマトグラフィー技術の現状と行く末をしっかりと勉強していきたいと思います。特に注目しているのは分析技術のデジタル化です。LC 分離メソッド開発の自動化や、装置の遠隔操作、分析 DB の構築など、どうにかして日常業務を効率化したいと考えております。最近は外出する機会の減少に伴い、休日は海外ドラマばかり観ています。特に犯罪捜査 (科学捜査) のシリーズものが大好きです。パズルのピースを集めて仮説を証明するといった内容にもすごく親近感を覚えます。いつも使っているマススペクトルや吸収スペクトルが出てきたりすると一時停止をしてみたり・・・。ただ、やはりフィクション、分析の内容に関してはたまに怪しかったりするので、一人でツッコミを入れています。

< 執筆者略歴 >

2012 年大阪大学工学研究科生命先端工学専攻・修士課程修了、同年三菱化学株式会社 (現三菱ケミカル株式会社) 入社、入社以来有機構造解析に従事。現在、分析物性研究所・広島グループに所属。



「LC と LC/MS の知恵」 (「Wisdom for LC and LC/MS」) 投稿規定

本誌は、(公社)日本分析化学会・液体クロマトグラフィー研究懇談会(LC懇)が発行するオープンアクセス電子ジャーナル(掲載料無料)で、LC、LC/MS 或いは関連手法に関する有らゆる内容を対象とします。本誌に掲載される原稿は、投稿を募集するジャンルと投稿を募集しないジャンルに大別されますが、何れも 2 審制(主査と副査)による審査を経る必要が有ります。当面は年間に 2 回(秋季と春季)発行しますが、軌道に乗り次第、年間発行回数を増やす予定です。

投稿を募集するジャンル

専門性が特に高い以下のジャンルのもので、新しい知見を含み、且つ、速報を詳報として発表する場合を除き、ジャーナルに未発表のものに限ります(カッコ内は A4 サイズ 1 枚を 1 行 40 文字、36 行に設定した時の最大原稿枚数)。

- ・報文(基礎又は応用に重点を置いた論文で、独創性・新規性が有り、且つ、価値ある事実或いは結論を含むもの。15 枚)
- ・ノート(内容が断片的であるが、新しい知見を報告するもの。8 枚)。
- ・技術論文(技術に重点を置いた論文で、有用性を示す事実或いは結論を含むもの。10 枚)。
- ・速報(速やかに報告すべき内容を含む論文。後に詳細を報告する事が出来る。6 枚)

投稿を募集しないジャンル

- ・総合論文(著者の研究業績を体系的に記述した論文。20 枚)
- ・解説(重要な装置、技術、手法等の基礎或いは応用についての要点を解説。10 枚)
- ・シリーズ「試料分析の定石とコツ」(試料の取り扱い方、分析法等を具体的に解説。10 枚)
- ・トピックス(学会・行政などの動向や新しい手法・技術に関する紹介。6 枚)
- ・提言(建設的な主張や意見。6 枚)
- ・団体会員紹介(LC 懇団体会員からの紹介記事。6 枚)
- ・会員動向(LC 懇個人会員からの近況報告。6 枚)
- ・新会員紹介(LC 懇個人会員紹介。4 枚)
- ・LC 懇事業カレンダー
- ・その他

「LC と LC/MS の知恵」投稿規定

1. 代表著者は、LC 懇の個人会員又は LC 懇団体会員の所属である事。
2. 投稿原稿には、所定の投稿カード (ppt) を添付し、必要事項を明記する。
3. 投稿論文（速報を除く）には、要旨（日本語 400 字程度で必須。英語 200 語程度は任意）を本文の前に配置する。
4. 投稿原稿は、日本語で書き、その形式は「投稿の手引き」に従う。
5. 原稿は、本誌編集委員会宛にワード版で電子メール (nakamura@jsac.or.jp) への添付で送付する事とし、編集委員会到着の日を受付日とする。
6. 原稿の採否は、編集委員会が決定する。編集委員会は、字句その他の加除修正を行い、或いは著者にそれを要求する事が出来る。
7. 原稿の修正などのために、編集委員会から原稿を返却された場合は、1 か月以内に編集委員会に返送する事とし、これより遅れた場合は、新しい投稿として取り扱う事がある。
8. 本誌に掲載された論文等についての著作権は、LC 懇に属する。

「LC と LC/MS の知恵」投稿の手引き

1. 日本語は MS 明朝、英数字は Century で入力し、フォントサイズ (FS) は原則として何れも 10.5 とする。
2. 表題（強調文字、FS : 14）、氏名（強調文字、FS : 12）、所属（FS : 10.5）は何れも日本語と英語で表記し、続けて要旨（FS : 10.5）、本文（FS : 10.5）の順に配置する。
3. 和文には「句読点（、。）」、英文には「カンマとドット（,.)」を使用する。
4. 図表には夫々通し番号を付け、本文中に配置する。
5. 本文中の引用文献には算用数字に丸カッコの右側を付けて上付きとし、その全てを末尾に番号順に配置する。
6. 国際単位系 (SI) の単位を使用し、クロマトグラフィー、LC/MS 及び関連する分野の用語については JIS に準拠する。
7. 原稿末尾に、< 執筆者略歴 >を記載する。略歴には分析士資格を含める（例えば、分析士資格 : LC/MS 分析士二段、無し、取得予定、〇〇分析士〇段手続き中等）。
8. 著者全員の顔写真（カラー、横 10 文字、縦 7 行が標準）を< 執筆者略歴 >に配置する。
9. 投稿先 : 投稿カード (ppt) に必要事項を記入し、原稿と共に「LC と LC/MS の知恵」編集委員会宛、ワード版（5 MB 以内）で電子メール (nakamura@jsac.or.jp) に添付する。
10. その他については、「分析化学」誌の最新の「投稿の手引き」に準拠する。

2021年度(2021年3月1日~2022年2月28日)LC懇カレンダー		
Month	Date	Event
(2月)	2月1日(月)	「第4回LC/MS分析士二段試験解説書」(通算23冊目)査読会
3月		2021年度CERIKロマトグラフィー分析賞募集会告(締切:8月末日) 2021年LC科学遺産認定推薦募集会告(締切:8月末日) 2022年度液体クロマトグラフィー努力賞募集会告(締切:9月末日)
4月	3月25日(木)	第357回例会(オーガナイザー:澤田 豊) 分析条件設定のために知っておきたいLC,LC/MSの基礎知識 第358回例会(オーガナイザー:戸谷昭善) UHPLCの全て~基礎と応用、現状と関連情報
5月		第359回例会(オーガナイザー:嶋口 翔) 上手い、易い、速い! LC及びLC/MS分析効率化の方法について
6月		第360回例会(オーガナイザー:中村和雄) LC及びLC/MSにおける分析メソッド開発へのヒント 電子ジャーナル「LCとLC/MSの知恵」第2号発行
7月		第361回例会(オーガナイザー:藤田深咲) 親水性化合物の分析法最前線
8月		「第4回LC/MS分析士三段試験解説書」(通算24冊目)査読会
9月		第362回例会 第363回例会
10月		第364回例会
11月		第365回例会 LC- & LC/MS-DAYS 2021
12月	12月3日(金)	LCの日 第366回例会 電子ジャーナル「LCとLC/MSの知恵」第3号発行
1月		第367回例会 第27回LC & LC/MS テクノプラザ
2月		「第5回LC分析士初段試験解説書」(通算25冊目)査読会 第368回例会

編 集 後 記

- [SI] 創刊号を最後迄お読み頂き有難うございます。有意義な情報交流の場となる様、皆様の積極的なご投稿をお待ちしております。
- [KE] 本誌が LC や LC/MS に携わる皆様にとって役に立つジャーナルとなる様、編集委員として微力ながらお手伝いして行きたいと思えます。
- [MO] 本会初の会員誌に編集委員として関わる事が出来て嬉しいです。今後の発展のためにも皆様のご投稿、ご意見をお待ちしています。
- [MT] 本ジャーナルの発刊にご尽力頂きました皆様方に深く御礼を申し上げます。有益な情報が満載ですので、ご活用頂けると幸いです。
- [HN] ひと月遅れの創刊となりましたが、今後とも会員の皆様のご支援を宜しくお願い致します。
- [HM] 編集委員長の力強い指揮の元、編集委員一丸となり無事創刊号を発行出来ました。今後とも、多くの投稿をお待ちしております。

編 集 委 員 会

編集委員長	中村 洋	(東京理科大学)
編集委員	伊藤誠治	(東ソー株式会社)
	榎本幹司	(栗田工業株式会社)
	岡橋美貴子	(特定非営利活動法人病態解析研究所)
	竹澤正明	(株式会社東レリサーチセンター)
	三上博久	(株式会社島津総合サービス)

LC と LC/MS の知恵 2020 年第 1 号 (通巻第 1 号)

2020 年 12 月 15 日発行 (©2020, 無断複写・転載厳禁)

編集責任者 中村 洋 (E-mail: nakamura@jsac.or.jp)

発行所 〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2
五反田サンハイツ 304 号

(公社) 日本分析化学会・液体クロマトグラフィー研究懇談会
The Division of Liquid Chromatography
The Japan Society for Analytical Chemistry (JSAC)