

LCとLC/MSの知恵 2021年第1号(通巻第2号) 令和3年6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 2 号
2021 年 6 月

目 次

巻頭言

禍福は糾える縄のごとし

(LC 研究懇会委員長、本誌編集委員長) 中村 洋 4

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 2

(クロマニックテクノロジーズ) 長江徳和 6

ノート

発蛍光誘導体化細胞由来全タンパク質の高精度分離と可視化技術の開発

(信和化工) 小林宏資、今井一洋 26

CERI クロマトグラフィー分析賞受賞業績

2018 年度：誘導体化 HPLC 検出法の開発と装置化

(島津総合サービス) 三上博久 35

2019 年度：高速アミノ酸分析計及び超高速液体クロマトグラフに関する研究と開発～3 次元グラフの方法とその利用法

(日立) 伊藤正人 45

2020 年度：分析ラボの効率向上の手法としての HPLC システムの高機能化

(アジレント・テクノロジー) 熊谷浩樹 53

液体クロマトグラフィー努力賞受賞業績

2020 年：メタルフリーカラムの開発とその応用

(化学物質評価研究機構) 坂牧 寛 64

2021 年：規制下の生体試料分析におけるクロマトグラフィーの活用～

バイオアナリシスガイドラインの実研究への活かし方

(味の素) 中山 聡 70

LC 科学遺産認定業績

- 2018 年：高速液体クロマトグラフ LC-10A シリーズ
(島津総合サービス) 三上博久 78
- 2019 年：「HP/Agilent 1100 シリーズ HPLC」について
(アジレント・テクノロジー) 熊谷浩樹 88
- 2020 年：「835 形日立高速アミノ酸分析計」について
(日立ハイテク) 清水克敏、伊藤正人 96

シリーズ「試料分析の定石とコツ」

- HPLC 分析
(島津総合サービス) 三上博久 102
- SEC 分析
(東ソー) 伊藤誠治 121

先達に学ぶ

- 企業からの留学のお勧め
(元 静岡理科大学) 常吉俊宏 131

提言

- 日頃思う事
(アルクサイエンス) 臼井 睦 133

会員動向

- 官民人事交流を終えて
(ハウス食品グループ本社) 神山和夫 137

団体会員紹介

- 日本分光と HPLC、SFC
(日本分光) 寺田明孝 140
- 日本電子と質量分析計
(日本電子) 山本敏人 146

富士フィルム和光純薬とクロマトグラフィー関連試薬 (富士フィルム和光純薬) 昆 亮輔	153
(株) 東レリサーチセンター ～ライフサイエンス分野の紹介～ (東レリサーチセンター) 竹澤正明	156
新役員紹介 運営委員心得に就任して (農研機構) 高橋亜紀子	162
閑話休題 第 1 回 LC 懇クロスワードクイズ (東京理科大学) 中村 洋	164
投稿規程	166
2021 年度 LC 懇事業カレンダー	168
奥付	169

【巻頭言】

禍福は糾える縄のごとし

LC 研究懇談会・委員長、「LC と LC/MS の知恵」・編集委員長 中村 洋

Good Luck and Bad Luck alternate Like the Strands of a Rope

Chairman of the Division of Liquid Chromatography

The Japan Society for Analytical Chemistry

Editor-in-Chief of *Wisdom for LC and LC/MS*

Hiroshi NAKAMURA

いつ終わるとも知れぬコロナ禍の日々、頭に浮かぶのは表題に示す慣用句である。広辞苑には以下の解説がある。[史記（南越伝、賛）「禍に因（よ）りて福と為（な）す、成敗の転ずるは、譬うれば糾える縄（なわ）の若（ごと）し」]この世の幸不幸は、より合わせた縄のように、常に入れかわりながら変転する意。

2019 年暮れに報告された新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、2021 年 6 月 3 日時点の新聞発表によれば、感染者数（全世界：1 億 7119 万人超、日本：75 万人超）、死者数（全世界：356 万 5000 人超、日本：1 万 3000 人超）共、近来にない大きな数字となっている。自前のワクチンが無い日本では輸入ワクチンに依存せざるを得ず、国民はひたすら外出・会食を控えながらコロナの猛威が下火になるのを待つしかない。LC 懇にとって被害は甚大で、2020 年度に計画した例会、見学会などの対面形式での全ての事業が中止に追い込まれた。それでも、分析士試験解説書の 2 回の査読会（5 月と 8 月）は、急遽メール会議に切り換えて乗り切った。又、異常に長い「おうち時間」の御蔭で普段はもてない「考えるゆとり」を生み、極端に落ち込んだ LC 懇のアクティビティをカバーする苦肉の策として、苦し紛れに決断した本誌の発行（2020 年 12 月 15 日）に繋がった。電子ジャーナルではあるものの、創刊号の存在を実感し、結果的には会員の皆様との格好のコミュニケーションツールが出来上がったものと期待している。

更に、長引くコロナ禍への対応として LC 懇に Web 対応小委員会を発足させ、リモート形式（Zoom）で 1 年振りに再開した第 357 回例会（3 月 25 日）、第 358 回例会（4 月 22 日）、第 359 回例会（5 月 27 日）も情報伝達手段としては概ね満足出来るものであった。この種のリモート形式による例会は LC 懇始まって以来のものであり、従来の対面形式での東京一極化開催の縛りが解けた為、遠隔地の方々のご参加と LC 懇へのご入会を戴ける結果に繋がっている。正に、「不幸中の幸い」と言える。

さて、本誌第 2 号では、幾つかの新しいジャンルの記事を掲載した。即ち、1 つ目は LC 懇が最近の数年間に選考した「CERI クロマトグラフィー分析賞」、「液体クロマトグラフィー努力賞」の受賞業績、並びに LC 懇が認定する「LC 科学遺産」の認定内容である（褒賞類の定義については LC 懇のホームページ参照）。これらは、優れた研究業績・製品開発の結晶であり、読み応えがある。2 つ目は、会員或いは LC 懇に大所高所からアドバイスを戴く「先達に学ぶ」欄、「提言」欄の新設である。何れの欄も人生の先輩からの貴重な人生訓である。前途洋々たる若い会員の皆様には、是非ともじっくりお読み戴きたい。又、巻末にはクロスワードパズルを掲載したので、気楽に頭の体操をして戴ければ幸いである。

所で、コロナ禍が思いの外、長引いている昨今、気になる事が有る。リモート会議、電子ジャーナル等、最近の電子情報技術の急激な発展には隔世の感があり、デジタル情報の恩恵は計り知れない。しかし、その便利さの陰で、同一空間での息遣いや人の表情等、対面でしか得られぬアナログ的な微妙な感覚（情報）が失われている現実がある。そこに、追い打ちを掛けたのが、最近の新型コロナウイルス騒ぎである。ウイルスの運び屋である人間が、「君子は危うきに近寄らず」で互いに避け合う風潮が、ニューノーマルとなりつつある。「リモート」に象徴されるデジタル感、バーチャル感に違和感を抱く人々が出始めてはいるが、本質の全てが現出されてはいない点に注意が要る。ワクチン接種でコロナ禍が収束し、安心して生の会話が出来る日の復活を願っている。

2021 年 6 月吉日

<執筆略歴> 中村 洋 (Hiroshi NAKAMURA)

1968 年 東京大学薬学部卒業
1970 年 東京大学大学院薬学系研究科修了
1986 年 東京大学薬学部助教授
1994 年 東京理科大学薬学部教授
2009 年 日本分析化学会・会長 (2012 年迄)
2010 年 日本分析化学会・分析士認証制度創設
2015 年 東京理科大学名誉教授

現職：ISO/TC47(Chemistry) Chairman

同上国内委員会・委員長

日本分析化学会分析士会・会長

私立大学環境保全協議会顧問

分析士資格：LC 分析士五段、LC/MS 分析士五段

E-mail：nakamura@jsac.or.jp



【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 2

株式会社クロマニクテクノロジーズ 長江徳和

Consideration on appearance, state, interaction, etc. of silica-based reversed phase stationary phase - Part 2

Norikazu NAGAE

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

(Received January 26, 2021 ; Accepted February 12, 2021)

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。逆相固定相 C18、C30、C8、Phenyl-hexyl、Biphenyl、PFP (pentafluorophenyl)、PFP&C18 の水素結合性、疎水性及び立体選択性を調べ、メチル馬尿酸やスチルベン等の分離を比較する事によって、各固定相の分離特性を評価した。シリカ表面へのアルキル基シリル化試薬のモノ・ジ・トリ官能基による結合について、加水分解による劣化を考察した。酸性条件ではトリ官能基による結合が最も加水分解を受け難い事を電子密度の観点から考察した。高背圧でカラムを使用した場合に問題になる摩擦熱について、3種類のシリカ基材について比較した。内部に核をもつ表面多孔性シリカ基材が最も摩擦熱の影響を受けない事が確認された。カラム外容積によるピークの広がりを比較し、カラム外拡散の影響を極力減らした場合には、早く溶出するピーク程、理論段数が高くなる事が確認された。

キーワード 逆相固定相 ; 分離特性 ; 摩擦熱 ; カラム外容積

1. 始めに

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中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、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 を結合した後でも、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来た。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(trimethylsilane、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様になった。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、アルキル基の倒れこみは関係なく、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はなく、其の界面が 0.2 から 0.3 nm 離れて接しているだけであるが、溶質は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、ヘキサンと水のよう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、考え方や見方が出来る可能性がある。前報告の「その 1」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」を考察したが、本報告の「その 2」は「C18、C8、C30、Phenyl-hexyl、Biphenyl、PFP&C18、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・カラム外容積の影響」を考察する。

2. C18、C30、C8、Phenyl-hexyl、Biphenyl、PFP&C18、PFP 固定相の分離特性

2.1 標準試料の分離による比較

図 1 に各固定相の概略図を示す。其の固定相は三官能性シリル化試薬を用いているので、シリル化試薬のケイ素原子には 3 個の酸素と 1 個の炭素が結合している。フェニル基系固定相はケイ素原子とフェニル基の間にスペーサーとしてアルキル基を入れる事が多いが、Biphenyl 固定相はケイ素原子に直にビフェニル基が結合している。図 2 にコアシェルシリカに三官能性シリル化試薬を結合後、エンドキャッピング処理を行った C18 固定相、C30 固定相、C8 固定相、Phenyl-hexyl 固定相、Biphenyl 固定相、

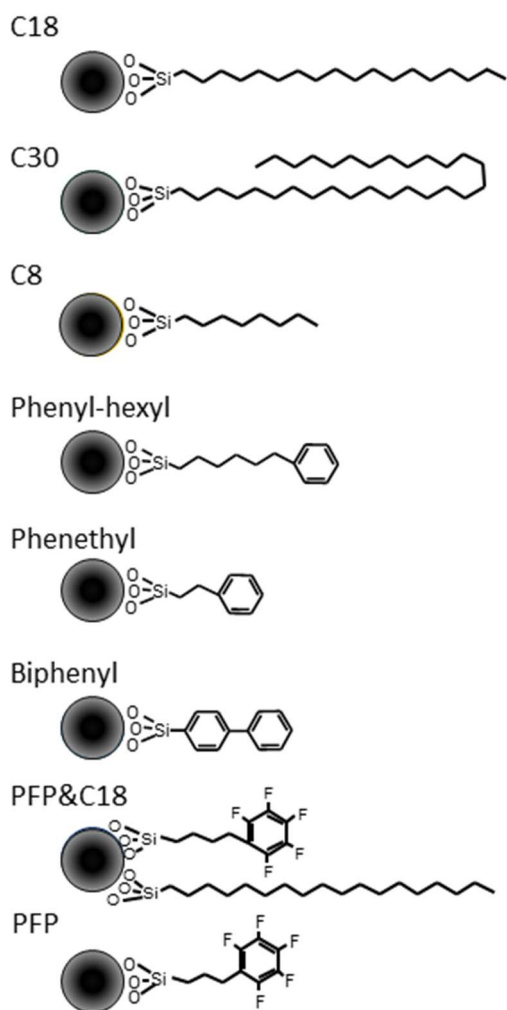


図 1 固定相の概略図

PFP 固定相及び PFP&C18 固定相による標準試料の分離と、其の充填剤の炭素含有量、カフェインとフェノールの分離係数としての水素結合性、アミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数としての疎水性及びトリフェニレンと σ -ターフェニルの分離係数としての立体選択性を示す。ウラシルの溶出時間をホールドアップタイムとして計算した。C18、C30 及び C8 のアルキル基固定相は炭素含有量の多い順番で保持が大きく、前論文 (その 1) で述べた結果と同じであるが、フェニル基、ペンタフルオロフェニル基固定相では炭素含有量の保持への効果がアルキル基固定相より低い。C8 固定相と Biphenyl 固定相との比較では、C8 固定相の方が、炭素含有量は低いアミルベンゼンの保持は大きい。水素結合性はフェノールを基準としたカフェインの保持割合であり、水素結合性が高いと極性の高い (水素結合性が強い) 化合物の保持が大きくなる。これは、エンドキャッピングを施していない C18 充填剤では残存シラノール基とカフェインの水素結合性による二次的相互作用が強く働く為、カフェインの保持は大きくなるが、フェノールは残存シラノール基による二次的相互作用を受け難く、大きな保持の変化がない特性を利用したものである。様々なエンドキャッピングを施したアルキル基固定相の水素結合性に差があるのは、エンドキャッピング効率が異なる事により、シリカ表面上に残存するシラノール基量が変わる為であると考えられる。

アルキル鎖長が長くなる程、立体障害で結合密度が低くなり、シリカ表面付近ではエンドキャッピング (例えば TMS 化) の割合が増えて来る。TMS 化のみの固定相は水素結合性が他のアルキル基固定相より高く、この TMS の疎水性の低さと TMS 固定相の嵩が小さい事が、水素結合性を高くしている要因になっていると考えられる為、3 種のアルキル基固定相の中で最も結合密度が高くなり、その結果としてエンドキャッピングの割合の少ない C8 固定相が最も水素結合性が低くなった。又、ここでは示していないが、エンドキャッピング割合を敢えて低くし、残存シラノール基の影響を残した固定相も水素結合性は高くなる。PFP 固定相、PFP&C18 固定相、Phenyl-hexyl 固定相及び Biphenyl 固定相は、アルキル基固定相よりも水素結合性が高い値となった⁸⁾。特に Biphenyl 固定相は C18 固定相と同じエンドキャッピングを施しており、残存シラノール基の影響は少ない筈であるが、エンドキャッピングを施していない C18 固定相と同等か、それ以上の高い水素結合性を示した。フェノール基やビフェニル基の特性として、ベンゼン環に由来する π 電子の存在により環の中心部が最もマイナスに偏っていると考えられ、この電子の偏りが水素結合性を大きくしており、カフェインのような極性化合物をより強く保持するようになると推察される。Biphenyl 固定相はベンゼン環が 2 つ結合しており、固定相としては結晶状態になっておらず、液体に近い状態であると考えられ、二つのベンゼン環は約 45 度傾いて結合している。

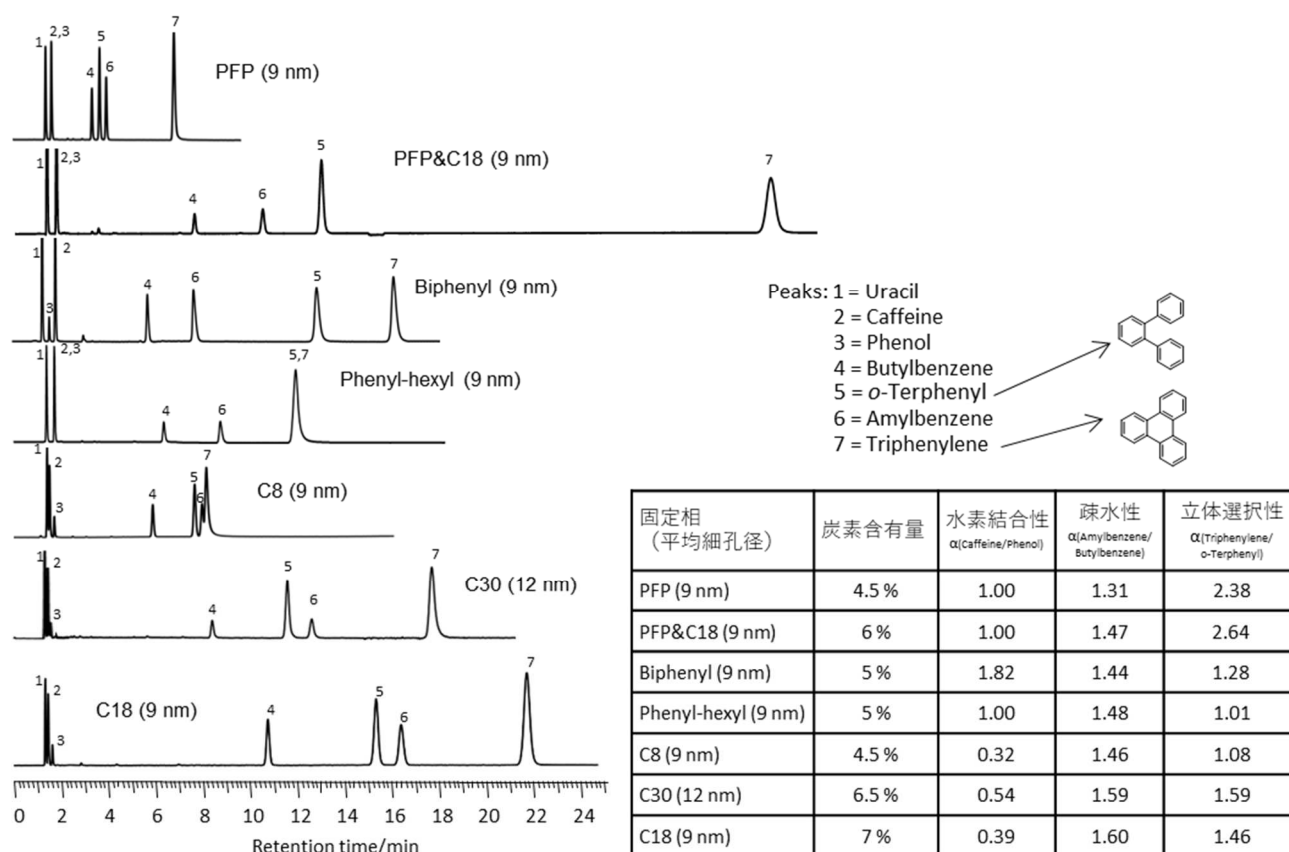


図 2 標準試料の分離と水素結合性・疎水性・立体選択性

Column, SunShell PFP, SunShell PFP&C18, SunShell Biphenyl, SunShell Phenyl, SunShell C8, SunShell C30, SunShell C18 4.6 mmI.D.×150 mm, 2.6 μ m; mobile phase, methanol/water=75/25; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV250 nm; peaks, 1=uracil, 2=caffeine, 3=phenol, 4=butylbenzene, 5=o-terphenyl, 6=amylbenzene, 7=triphenylene.

この隣接した 2 つのベンゼン環の相乗効果により水素結合性がより強くなっていると思われる。立体選択性の評価に用いられたトリフェニレンと σ ターフェニルは 3 つのベンゼン環が結合しており、トリフェニレンは 3 つのベンゼン環が平面的に配置しているのに対し、 σ ターフェニルは其其のベンゼン環は捩じれた状態になっている。この立体的な差の認識（分離）度合いを立体選択性としている。アルキル基固定相ではアルキル鎖長の長い固定相程、立体選択性は高くなり、メチル基の位置異性体である β -トコフェロールと γ -トコフェロールは立体選択性の高い C30 固定相の方が C18 固定相より良い分離を示す⁹⁾。ここで用いた C8 固定相は三官能性オクチルシリル化試薬を用いていたが、一官能性オクチルジメチルシリル化試薬を用いた C8 固定相はトリフェニレンが σ ターフェニルより先に溶出し、立体選択性は 1 未満の値になる。つまり、トリフェニレンと σ ターフェニルの溶出順序は逆転する。一官能性と三官能性のシリル化試薬の差であるジメチルの有無の違いによる選択性の差は決して小さくないので、一官能性、二官能性及び三官能性のシリル化試薬を用いた固定相の区別は重要になる。ここで比較している固定相は、前述されている様に全て三官能性シリル化試薬を用いている。Biphenyl 固定相及び Phenyl-hexyl 固定相については立体的な差の認識よりも、 π - π 相互作用が強く発揮されてトリフェニレンと σ ターフェニルが保持されていると考えられる。アルキル基固定相では σ ターフェニルの溶出後にアミルベンゼンが溶出するが、フェニル基固定相では π - π 相互作用により σ ターフェニルの保持が大きくなり、アミルベンゼンとの溶出順序が逆転した。トリフェニレンの保持について、Phenyl-hexyl 固定相では σ ター

フェニルとトリフェニレンは同じ時間に溶出したが、Biphenyl 固定相はアルキル基固定相と同様にトリフェニレンの保持が大きくなった。Phenyl-hexyl 固定相と Biphenyl 固定相は、共にフェニル基型の固定相として分類されるが、水素結合性と立体選択性の値が大きく異なった。PFP 固定相はフェニル基に 5 つのフッ素原子が結合し、疎水性相互作用、水素結合性、双極子相互作用、 $\pi-\pi$

相互作用及び静電的相互作用が働くとされており、他の固定相と大きく異なる。PFP 固定相と PFP&C18 固定相については、ここで用いた立体選択性の値は 2 以上になった。これは他の固定相に比べ非常に大きな値であり、 σ -ターフェニルとトリフェニレンの保持についてはフェニル基型固定相と同様にアルキル基固定相とは異なる相互作用が働いていると推察される。又、PFP&C18 固定相は PFP 固定相に C18 固定相を加えたもので、疎水性の値は C18 固定相が加わった事で増加し、保持は大きくなったが、水素結合性や立体選択性の値は PFP 固定相とほぼ同じであり、PFP&C18 固定相も PFP 固定相と同様な分離特性を有していた。PFP 固定相は PFP 独自の分離挙動を示し、特にフッ素原子の電子吸引性により、構造中の電子の偏りが生じる為、カチオンの保持が大きくなる。図 3 に C18 固定相と PFP 固定相の塩基性化合物の分離を示す。移動相 pH は 7 であり、これらの塩基性化合物はプロトン化したカチオンとして存在する。移動相中のアセトニトリル濃度は 80% であり、C18 固定相では塩基性化合物を殆ど保持していないのに対し、PFP 固定相は 5 分から 8 分に溶出し、大きな保持を示した。これは静電的相互作用による保持の増大であると考えられる。このカチオンの保持を大きくしている相互作用を陽イオン交換相互作用であるとする報告¹⁰⁾もあるが、PFP 固定相のフッ素原子はイオン化しておらず、イオン交換は起こり得ない。又、この静電的相互作用は移動相中有機溶媒濃度が高くなる程、大きく作用し、塩基性化合物の保持時間が長くなる。この現象を HILIC モードの分離挙動であると説明される事¹¹⁾もある。HILIC モードは順相モードの一部であり、移動相に有機溶媒と水溶液の混合溶媒を用いた場合を特に HILIC モードと表現している。順相モードでは移動相よりも固定相の方の極性が高く、極性の高い溶質程、保持が大きくなり、逆相とは反対になる。しかし、PFP 固定相は有機溶媒と緩衝液の混合溶媒の移動相より疎水性が高く、更に、塩基性化合物の保持は疎水性の高いもの程、保持時間が長くなっており、逆相の分離挙動を示している (図 3)。移動相中の有機溶媒濃度の増加と共にカチオンの保持が大きくなるのは、静電的相互作用が移動相中の有機溶媒濃度が高い程、相対的に強くなる事が理由である推察され、逆相分配

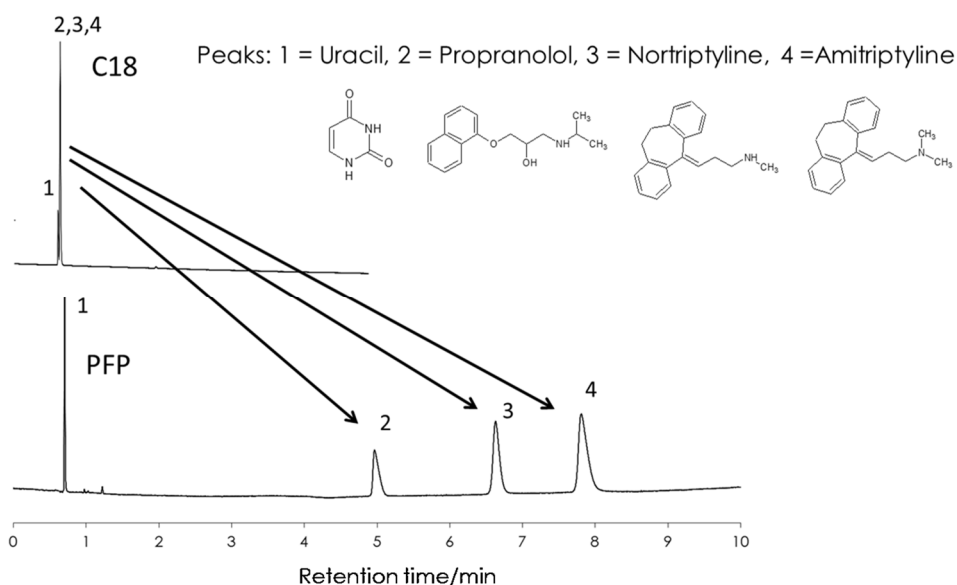


図 3 C18 と PFP 固定相による塩基性化合物の分離

Column, SunShell C18, PFP 4.6 mm I.D.×150 mm, 2.6 μ m; mobile phase, acetonitrile/10 mmol/L phosphate buffer pH 7.0=80/20; flow rate, 1.8 mL/min; temperature, 25 °C; Peaks, 1=uracil, 2=propranolol, 3=nortriptyline, 4=amitriptyline.

相互作用に二次的に静電的相互作用が加味されているものと考えられる。

2.2 メチル馬尿酸異性体の分離による比較

図 4 に種々の固定相と移動相を用いて得られたメチル馬尿酸異性体の分離を示す。固定相として C18、C30、Phenyl-hexyl 及び Biphenyl を用い、移動相中の有機溶媒としてメタノール、2-プロパノール、アセトニトリル及びテトラヒドロフラン(THF)を用いて、其の固定相の分離を比較した。メチル馬尿酸は

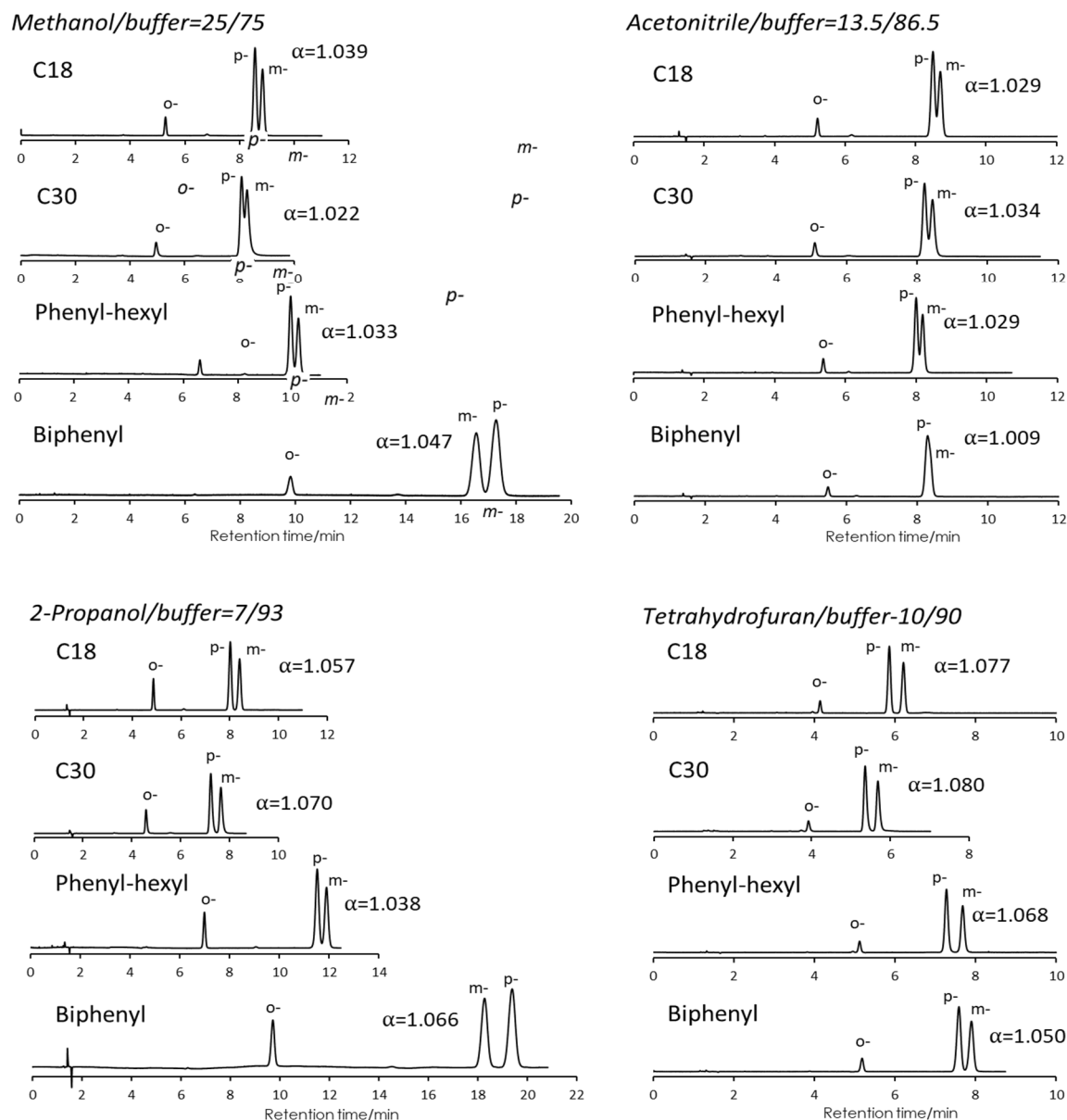
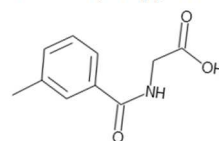


図 4 メチル馬尿酸異性体の分離

Column, SunShell C18, SunShell C30, SunShell Phenyl, SunShell Biphenyl
 4.6 mmI.D.×150 mm, 2.6 μ m; mobile phase, organic solvent/25 mmol/L phosphate
 buffer pH3.0; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 $^{\circ}$ C; detection, UV230 nm; peaks,
 o-, m-, p-methylhippuric acid.

m-methylhippuric acid



メタ体とパラ体の異性体の分離が難しく、近接して溶出される。其其のクロマトグラム上にメタ体とパラ体の異性体の分離係数 α を示した。移動相中の有機溶媒が 25 %メタノールと 13.5 %アセトニトリルの場合を比較すると、25 %メタノールは固定相により保持時間が大きく異なり、Phenyl-hexyl 固定相は C18 固定相より保持時間は長くなり、Biphenyl 固定相は更に保持時間が長く、C18 固定相と比較し約 2 倍の保持時間となった。しかし、13.5 %アセトニトリルでは全ての固定相でほぼ同じ保持時間となった。更に、Biphenyl 固定相におけるパラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の溶出順序に関しては、25 %メタノールでは他の固定相とは溶出順序が逆転したが、13.5 %アセトニトリルでは他の固定相と同じ溶出順序であった。25 %メタノールで Phenyl-hexyl 固定相や Biphenyl 固定相においてメチル馬尿酸の保持が大きくなったのは、 π - π 相互作用によるものであると考えられる。アセトニトリルの CN の三重結合が固定相と溶質の間の π - π 相互作用を弱める為、13.5 %アセトニトリルではフェニル基の特徴が発揮されず、保持時間は其其の固定相で大差なく、Biphenyl 固定相でのパラ・メタ-メチル馬尿酸の溶出順序は逆転しなかったと推察される。図 4 では示されていないが、ケイ素原子にアルキル基スペーサーがなく、直接フェニル基が結合している固定相でも 25 %メタノール条件では Biphenyl 固定相と同様にパラ・メタ-メチル馬尿酸の溶出順序は逆転する。Phenyl-hexyl 固定相はヘキシル基を含んでおり、このヘキシル基の疎水性が固定相に加味され、フェニル基の π - π 相互作用や水素結合性が相対的に弱くなったと推察される。又、スペーサーとしてエチル基を用いたフェネチル(Phenethyl)固定相においてもパラ体・メタ体の順にメチル馬尿酸は溶出するが、パラ-メチル馬尿酸の保持が大きくなり、パラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の分離係数は 1 に近くなった。これらの事からパラ体・メタ体の順にメチル馬尿酸が溶出するのは疎水性相互作用が強く働いている為であると考えられる。次に移動相中の有機溶媒が 25 %メタノールと 7 % 2-プロパノールを比較すると、其其の固定相間の保持時間や溶出順序等の溶出パターンはよく似ている。しかし、パラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の分離係数は、全ての固定相について 7 % 2-プロパノールの方が大きくなった。25 %メタノールと 7 % 2-プロパノールでは C18 固定相のメタ-メチル馬尿酸の保持は殆ど同じであるが、Phenyl-hexyl 固定相や Biphenyl 固定相は 7 % 2-プロパノールの方が保持は 10 %以上大きくなっており、これは移動相中の有機溶媒としてはメタノールより 2-プロパノールの方が π - π 相互作用やフェニル基による水素結合性を強める働きがあると推察される。10 %THF の場合には 13.5 %アセトニトリル程ではないが、其其の固定相における保持時間の差は少なくなった。又、Biphenyl 固定相以外の固定相について、パラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の分離係数は最も大きな値となった。Biphenyl 固定相は 13.5 %アセトニトリルと同様に 10 %THF でもメチル馬尿酸はパラ体・メタ体の順に溶出した。この事により、10 %THF でも 13.5 %アセトニトリルと同様に π - π 相互作用やフェニル基による水素結合性を弱める働きがあるものと推察される。THF は二重結合や三重結合を有していないので、アセトニトリルとは異なる相互作用が働いていると思われる。THF はオクタデカン⁹⁾を溶かす事が出来、C18 固定相や他の固定相を膨潤させる。つまり、C18 固定相、C30 固定相や C8 固定相は、メタノール/水系移動相ではアルキル基が固まった状態で存在し、その固まった状態の上部に有機溶媒が溶媒和して存在し、溶質は固まっている固定相のみと相互作用するのに対し、THF/水系移動相では THF は固まった固定相内部に入り込む事が出来、THF と元の固定相と混在している状態で固定相として働いているものと考えられる⁹⁾。この様に固定相自体が変化している為、Biphenyl も Biphenyl 単独としてではなく、Biphenyl と THF の両方が固定相として働いた為、パラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の溶出順序も C18 固定相と同じになったものと考えられる。図 4 には PFP 固定相は入っていない

いが、PFP 固定相では全ての有機溶媒条件においてメタ-メチル馬尿酸とパラ-メチル馬尿酸が分離せず、一本のピークとして検出された。以上述べて来た様に、オルト-、メタ-、パラ-メチル馬尿酸の 3 種の位置異性体の分離を比較しただけでも、固定相の違いや移動相中の有機溶媒の種類で分離自体が大きく変化する事が明らかとなった。

2.3 核酸塩基の分離による比較

図 5 に C18、C30 及び Biphenyl 固定相による核酸塩基類の分離を示す。核酸塩基は極性が高い為、メタノールを 20 %程度含む移動相では保持係数が 1 以下になる。有機溶媒を含まない緩衝液の移動相では、例えばチミンの保持係数は 3~5 程度に増大する。逆相カラムは有機溶媒濃度が 5 %を下回るような移動

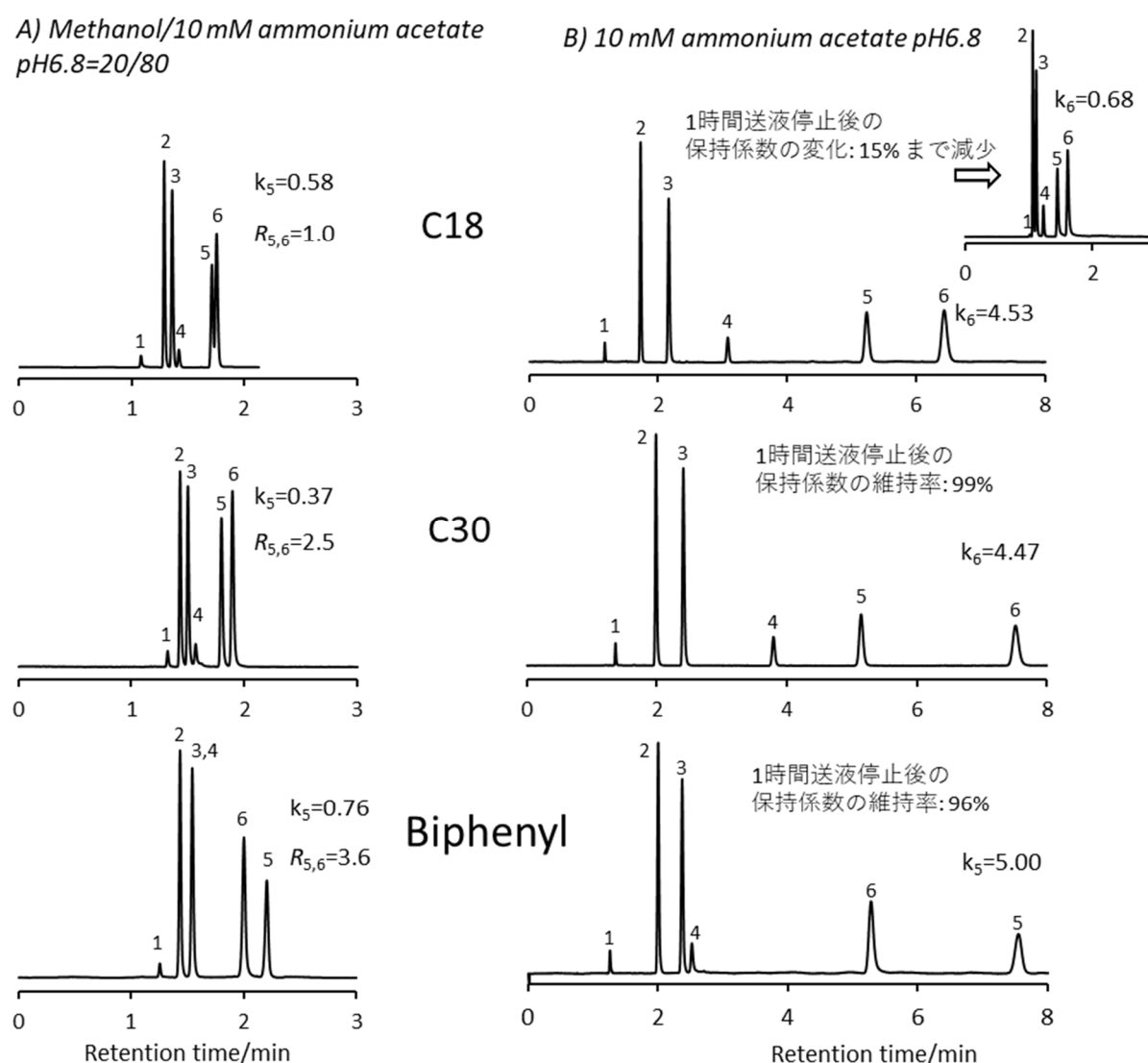


図 5 核酸塩基の分離

Column, SunShell C18 (pore size, 9 nm), SunShell RP-AQUA (C30, pore size, 16 nm), SunShell Biphenyl (pore size, 9 nm), 4.6 mm I.D.×150 mm, 2.6 μ m; mobile phase, A) methanol/10 mmol/L ammonium acetate pH 6.8=20/80, B) 10 mmol/L ammonium acetate pH 6.8; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV250 nm; Peaks, 1 = sodium nitrite, 2 = cytosine, 3 = uracil, 4 = guanine, 5 = thymine, 6 = adenine.

相では保持時間の再現性が低くなる事が知られており、これ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により起こるものと報告されている¹²⁾。原因が分かれば、対処方法も自ずと分かる。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圧力が働くが、この圧力以上の背圧をカラム出口以降に掛ければ移動相の抜け出しは起こらない。流速 1 mL/min で送液する場合には内径 0.1 mm、長さ 500 mm の配管をカラム出口以降に接続すれば、約 5 MPa の背圧が掛かり、この状態で送液を停止しなければ一般的な細孔径 10 nm の逆相充填剤の細孔内から移動相は抜け出す事なく、保持時間の再現性の有る分離が可能となる¹³⁾。図 5 の C18 カラムの有機溶媒を含まない 10 mmol/L の酢酸アンモニウム水溶液を移動相とした分離は、カラム出口以降に 5 MPa の背圧を掛け、充填剤細孔内からの移動相が抜け出ない様になっている。3 種類の固定相を比較すると、最後に溶出する成分は Biphenyl 固定相が最も大きな保持を示した。又、チミン (ピーク 5) とアデニン (ピーク 6) は Biphenyl 固定相のみ溶出順序が逆

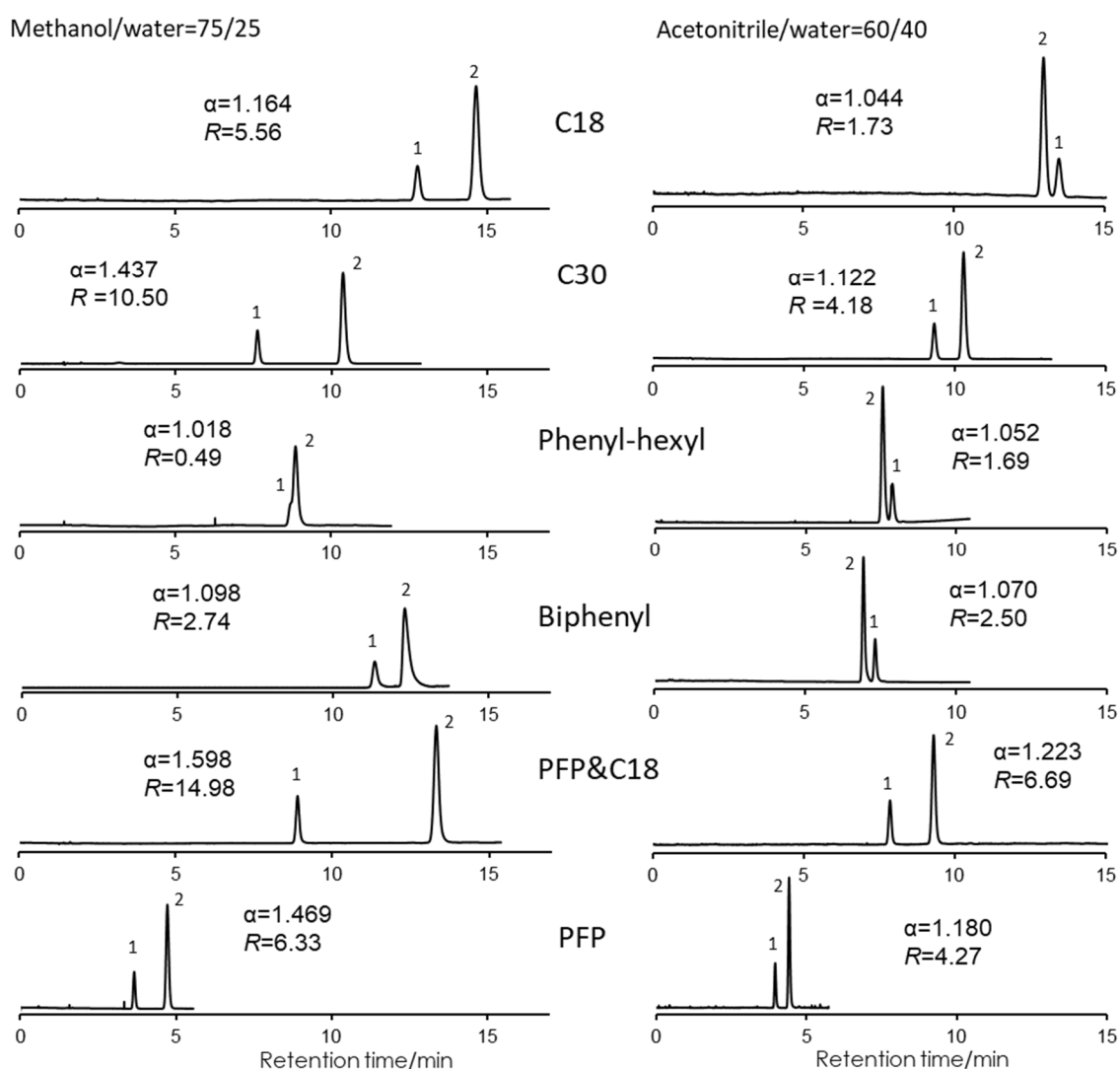


図 6 スチルベンの分離

Column, SunShell C18, SunShell C30, SunShell Phenyl, SunShell Biphenyl, SunShell PFP&C18, SunShell PFP4.6 mmI.D.×150 mm, 2.6 μm; mobile phase, methanol/water=75/25, acetonitrile/water=60/40; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV230 nm; peaks, 1 = *cis*-Stilbene, 2 = *trans*-Stilbene.



転した。更にグアニンの相対的な保持は Biphenyl 固定相が特に小さく、ウラシルと近い保持時間となった。これらの現象は 20 %のメタノールを移動相に加えた時も、100 %水系移動相と同様であった。図 2 で示されている水素結合性が最も高い Biphenyl 固定相は、核酸塩基の保持や、溶出順序に水素結合性が大きく寄与していると考えられる。Biphenyl 固定相は π - π 相互作用や CH/ π 相互作用¹⁴⁾が働くと言われているが、これらの相互作用も加味され、カフェインの保持を大きくする水素結合性が増大したと考えられる。100 %水系移動相を用いた場合のポンプ停止前後の保持時間の安定性は、C30 と Biphenyl 両固定相とも高く、ポンプ停止後再度通液して得られた保持時間はポンプ停止前の 96 %以上であった。しかし、C18 固定相ではポンプ停止後は 15 %まで保持間は減少した。

2.4 スチルベンの分離による比較

図 6 にスチルベンの分離を示す。移動相はメタノール/水=75/25 とアセトニトリル/水=60/40 を用い、C18、C30、Phenyl-hexyl、Biphenyl、PFP&C18 及び PFP 固定相の比較を行った。*cis*-スチルベンと *trans*-スチルベンの分離係数(α)と分離度(R)をクロマトグラム上に記載した。メタノール/水移動相では全ての固定相で *cis*-スチルベンが *trans*-スチルベンより先に溶出したが、Phenyl-hexyl 固定相は殆ど分離出来ておらず、 π - π 相互作用が強く働く Biphenyl 固定相はピークがテーリングした。PFP&C18 固定相が最も分離度が高く、次に高い分離度を示したのは C30 固定相であった。アセトニトリル/水移動相では C18、Phenyl-hexyl 及び Biphenyl 固定相は *cis*-スチルベンと *trans*-スチルベンの溶出順序が逆転し、*trans*-スチルベンが先に溶出した。これらの固定相での分離係数は 1.07 以下であり、分離度も高くなかった。溶出順序が変わらない C30、PFP&C18 及び PFP 固定相は図 2 で示された立体選択性の値の高い固定相であり、この 3 つの固定相では、図 2 の分離でトリフェニレンの保持が最も大きい PFP&C18 固定相が、スチルベンの分離でも最も高い分離係数及び分離度を示した。*cis*-スチルベンと *trans*-スチルベンの分離では立体選択性と疎水性の両効果が分離に寄与していると推察される。

2.5 副腎皮質ステロイド類の分離による比較

図 7 に副腎皮質ステロイドであるプレドニゾン、コルチゾン、プレドニゾロン及びヒドロコルチゾンの分離を C18、C30、Phenyl-hexyl、Biphenyl、PFP&C18 及び PFP 固定相を用いて比較した結果を示す。移動相は、THF/水=20/80 及びメタノール/水=50/50 を用いた。THF/水=20/80 移動相では、PFP&C18 固定相はコルチゾンとプレドニゾロンを分離出来なかったが、C18、C30、Phenyl-hexyl 及び Biphenyl 固定相は 4 本のピーク共、十分な分離が達成された。この 4 種の固定相はよく似た分離パターンで、固定相による分離の差が余り認められなかった。これは、前述のメチル馬尿酸の THF/緩衝液移動相を用いた分離比較の時と同様であった。メタノール/水=50/50 移動相では、PFP 以外の固定相では 4 成分の分離が出来ず、特にプレドニゾロンとヒドロコルチゾンピークが重なる事が多かった。4 成分の溶出順序は固定相により大きく異なり、アルキル基固定相(C18、C30)では、分離出来ないピークを含めて、プレドニゾン、コルチゾン、プレドニゾロン、ヒドロコルチゾンの順に溶出した。フェニル基系の固定相(Phenyl-hexyl、Biphenyl)では、プレドニゾン (ピーク 1) 及びコルチゾン (ピーク 2) の溶出が遅れ、Biphenyl 固定相ではプレドニゾロン (ピーク 3)、ヒドロコルチゾン (ピーク 4) より遅く溶出した。PFP 固定相のみ 4 本のピークは分離されたが、溶出順序はアルキル基固定相と逆になった。更に、PFP&C18 固定相は PFP 固定相と C18 固定相の両特性を有しており、其の固定相で溶出順序が逆になっている

為、4本のピークは分離する事なく重なったと推察される。スチルベンの分離では PFP 固定相と C18 固定相の相乗効果で分離は向上したが、副腎皮質ステロイド類ではその逆であった。副腎皮質ステロイド類をメタノール/水移動相で分離した場合には、固定相の種類により分離が大きく異なった。これは、メタノール/水移動相では其其の固定相の特徴が強く発揮される事を意味している。アセトニトリルは π - π 相互作用を弱め、THF は固定相の一部となり、其其の固定相の特性を弱めると考えられる。副腎皮質ステ

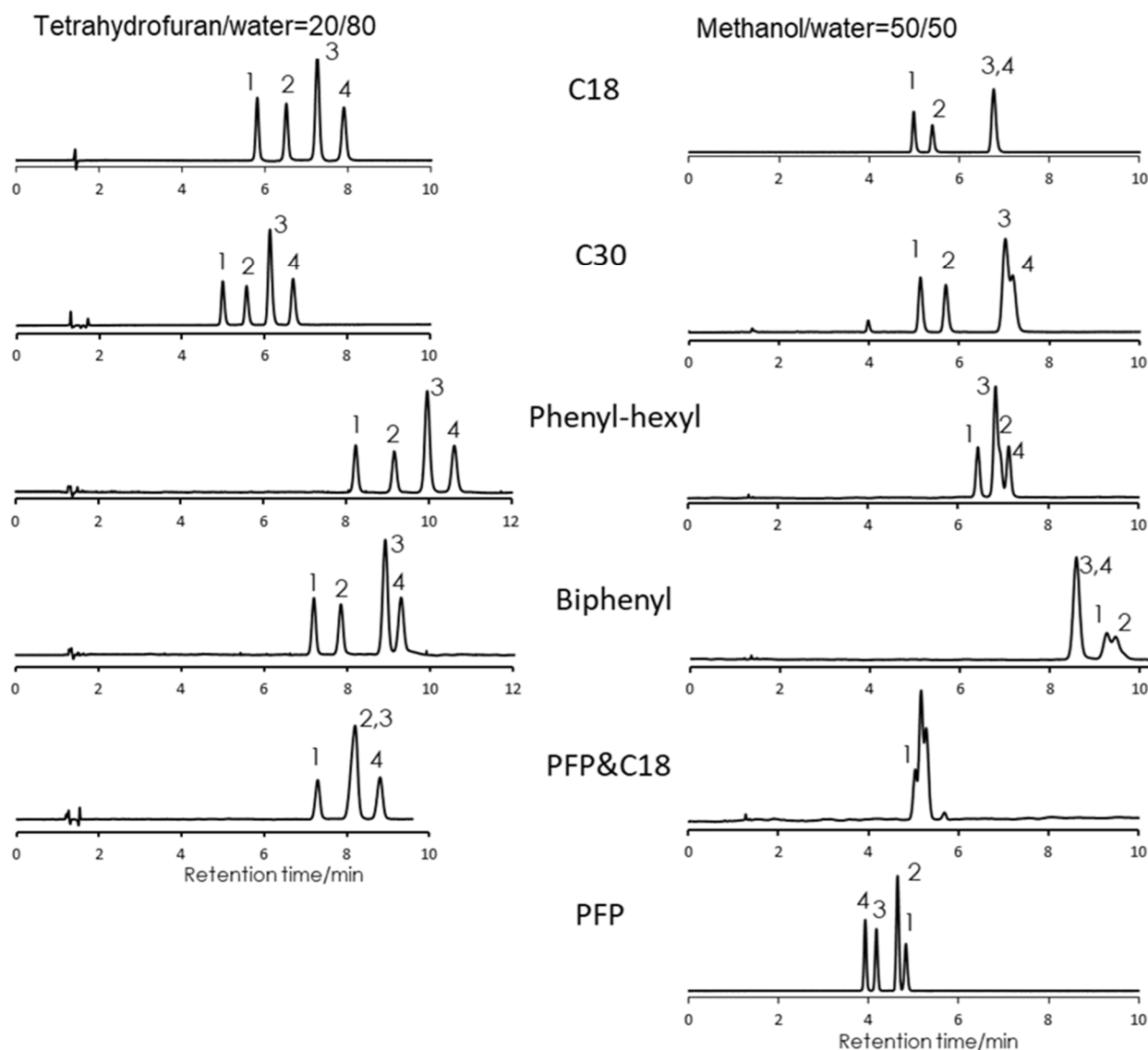
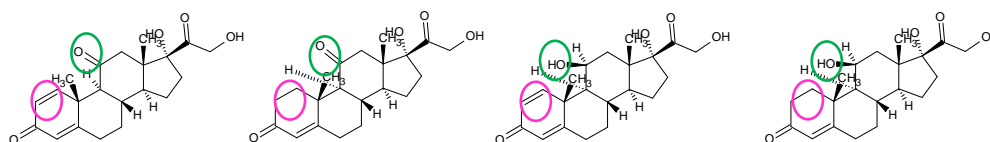


図 7 副腎皮質ステロイド類の分離

Column, SunShell C18, SunShell C30, SunShell Phenyl, SunShell Biphenyl, SunShell PFP&C18, SunShell PFP 4.6 mmI.D.×150 mm, 2.6 μ m; mobile phase, A) THF/water = 20/80, B) methanol/water = 50/50; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 25 °C; detection, UV250nm;

Peaks, 1= Prednisone, 2 = Cortisone, 3 = Prednisolone, 4 = Hydrocortisone.



ロイド類は、THF を移動相の有機溶媒として用いる事により、多くの固定相で分離出来る事が確認された。

3. 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

シリカ系充填剤の劣化は、酸性条件でもアルカリ性条件でも加水分解により起こる。図 8 に酸性条件下及びアルカリ性条件下での加水分解過程の概略図を示す。酸性条件下ではプロトン(H^+)が求電子試薬として働き、電子密度の高い酸素原子に対して、求電子反応が起こる。シリル化試薬がシリカ表面にシロキサン結合しているが、このシロキサンの酸素原子を起点とした加水分解によりシロキサン結合が切れ、アルキル基等がシリカ表面から脱離する。シリカゲルの最も安定な pH は 1.7 であり、酸性条件下ではシリカゲル基材は安定であるが、結合しているアルキル基等が加水分解により脱離する。一方、アルカリ性条件下では水酸化物イオン(OH^-)が求核試薬として働き、電子密度の低いケイ素原子に対して、求核反応が起こる。シリカ (二酸化ケイ素) 骨格の表面のシラノール基の根元のケイ素原子に対して求核反応が起こり、結果として加水分解が起こりシロキサン結合の切断によりシリカが溶け出す。

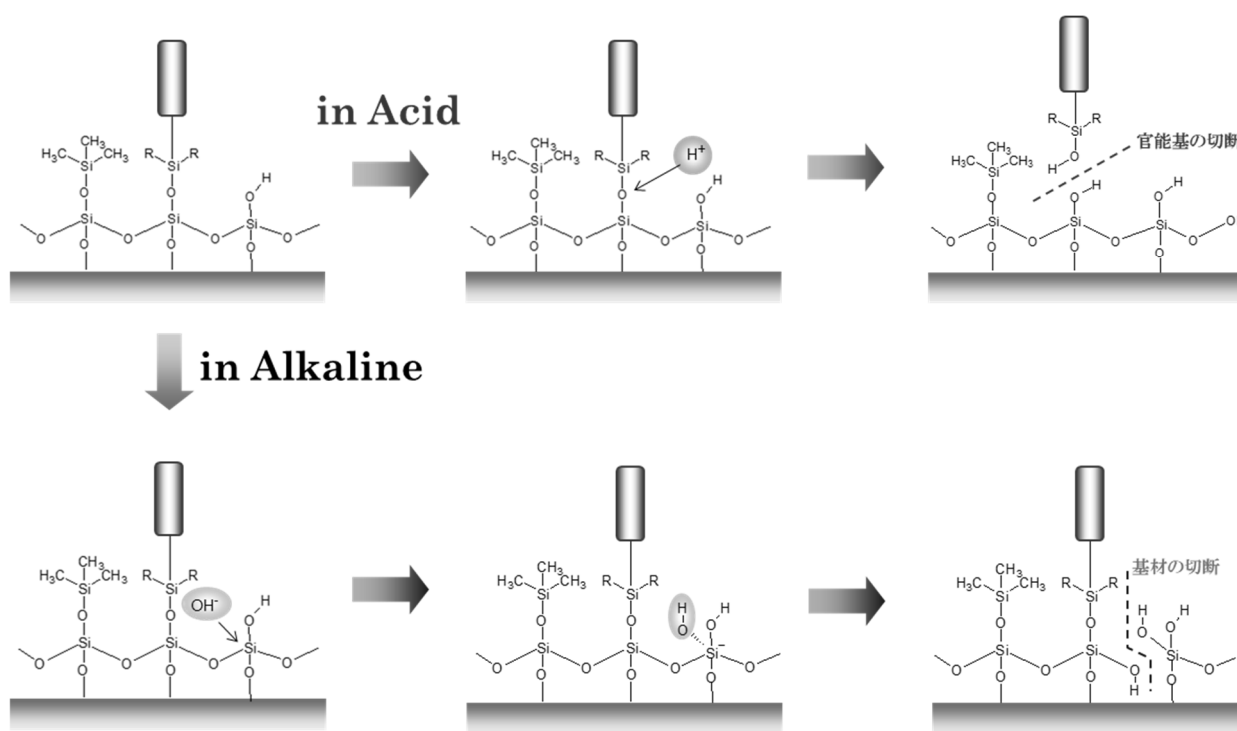


図 8 酸性/アルカリ性下でのシリカゲルの分解

図 9 にシリル化試薬とシリカ表面との結合状態の模式図を示す。モノ、ジ及びトリクロロシラン試薬がシリカ表面に 1 か所のシロキサン結合をした場合の結合状態である。結合後、水を含む溶媒で洗浄する事によりクロロシランの塩素はシラノール基に変換される。図中に示したデルタマイナス(δ^-)は電子の偏りを示している。モノ (一官能性) の試薬の場合、シリル化試薬のケイ素原子には 3 つの炭素原子と 1 つの酸素原子が結合しており、電気陰性度の関係から、炭素原子よりも酸素原子の方がケイ素原子から強く電子を吸引する。シリル化試薬のケイ素原子に結合している酸素の数が最も少ないモノシリル化試薬のケイ素にシロキサン結合している酸素は最も電子が偏っており、酸性条件下で起こる求電子反応が起こり易く、加水分解し易い。逆にトリ (三官能性) 試薬は酸素 3 つがシリル化試薬のケイ素に結合してお

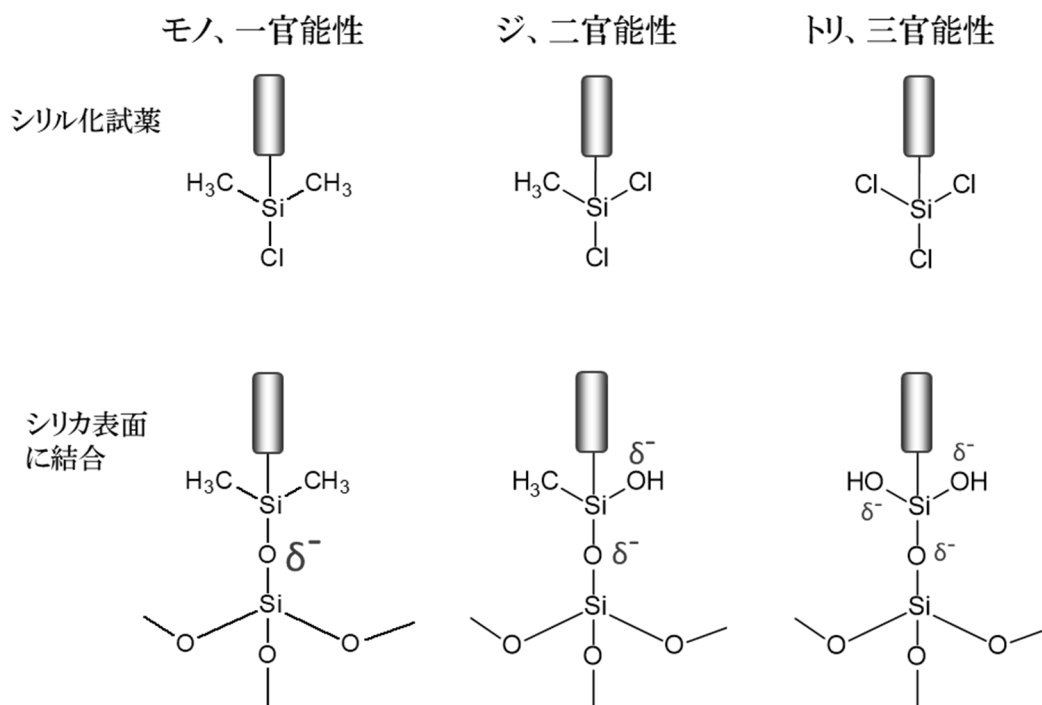


図 9 シリル化試薬とシリカ表面の結合

り、3つの酸素が1つのケイ素原子から電子を吸引する為、シロキサン結合している酸素原子への電子の偏りは、モノやジ（二官能性）試薬の場合に比べ小さくなり、求電子反応が起こり難く、加水分解も起こり難くなる。図 9 ではクロロシリル化試薬を示しているが、トリクロロシリル化試薬の結合がたとえ 1 か所のシロキサン結合だけでも、酸性条件では最も切れ難く、酸性条件下での耐久性は最も高くなる。シリカ基材とのシロキサン結合の数が増える事により耐久性は向上する。又、エンドキャッピングを強化して、シリカ表面近くの疎水性を上げ、水分子の接近を妨げる事でも、加水分解そのものが起こり難くなる為、耐久性は向上する。図 9 では 3 種類の官能性のシリル化試薬は 1 か所のシロキサン結合しかしていない様に記されているが、実際にはジ又はトリのシリル化試薬は全てではないが 2 か所以上シロキサン結合をしている。²⁹Si CP-MAS NMR 法を用いて、C18 充填剤の結合状態を測定した結果³⁾からも 2 か所以上のシロキサン結合が確認され、更にエンドキャッピングを施す事により、シリル化試薬のケイ素原子のシラノール基へもエンドキャッピングシリル化剤（トリメチルシラン、TMS）が結合し、シロキサン結合が生成している事も確認されている。

前述の様に、アルカリ性条件下では水酸化物イオン(OH⁻)が求核試薬として働き、電子密度の低いケイ素原子に対して、求核反応が起こり加水分解によりシロキサン結合が切れるが、ケイ素原子の電子の偏りにより、どの様に結合しているケイ素原子に求核反応が起こるかを説明する事が出来る。ケイ素原子は電子を吸引する酸素原子が多く結合している程、強くプラスに偏り、求核反応・加水分解が起こり易くなる。シリカ骨格内のケイ素は 4 つの酸素原子と結合しているが、シリル化剤のケイ素原子は 1 つから 3 つの酸素原子と結合している。シリカ骨格内部には求核試薬（水酸化物イオン）や水分子は入り込む事が出来ないと考えられる為、シリカ表面に存在するシラノール基の根元のケイ素原子に対して求核反応・水分解が起こると考えられる。1990 年代までのエンドキャッピングでは、シリル化試薬のケイ素原子にメチル基が 2 つ結合しているモノ（一官能性）の試薬を結合し、その後 TMS でエンドキャッピングを施した固定相の方が、ジ・トリ（二・三官能性）の試薬を用いてエンドキャッピングを施した固定相よりシリ

カ表面の残存シラノール基が少なくなる事が多く、アルカリ性条件下では酸性条件下と逆にモノの試薬の方が耐久性は高くなると言われていた。又、モノ・ジ・トリ官能基のシリル化試薬のケイ素原子は1つから3つの酸素が結合しており、このケイ素原子の電子の δ^+ への偏りは、1つの酸素が結合したモノ（一官能性）のシリル化試薬が最も少ない事から、モノ（一官能性）シリル化試薬を結合した固定相が最も耐アルカリ性が高いと考えられていた。しかし、2000年以降、200℃以上の高温条件下での高効率なエンドキャッピングが行われる様になり、高温反応でも安定なトリ（三官能性）のシリル化試薬を用いたものが、従来のモノ・ジ（一・二官能性）シリル化試薬を用いてエンドキャッピングを施した固定相よりもアルカリ性条件下での耐久性が高くなった事から、アルカリ性条件下での劣化は、シリル化試薬のケイ素原子ではなく、シリカ表面のケイ素原子が起点となって加水分解が起こるものと推察されている。更にシリカ基材の骨格内部にメチル基を組み込んだハイブリッドタイプのシリカ基材がアルカリ性条件下での耐久性が大きく改善した事^{15,16}からも、シリカ表面のケイ素原子が起点となり、加水分解が起こる事が裏付けられる。

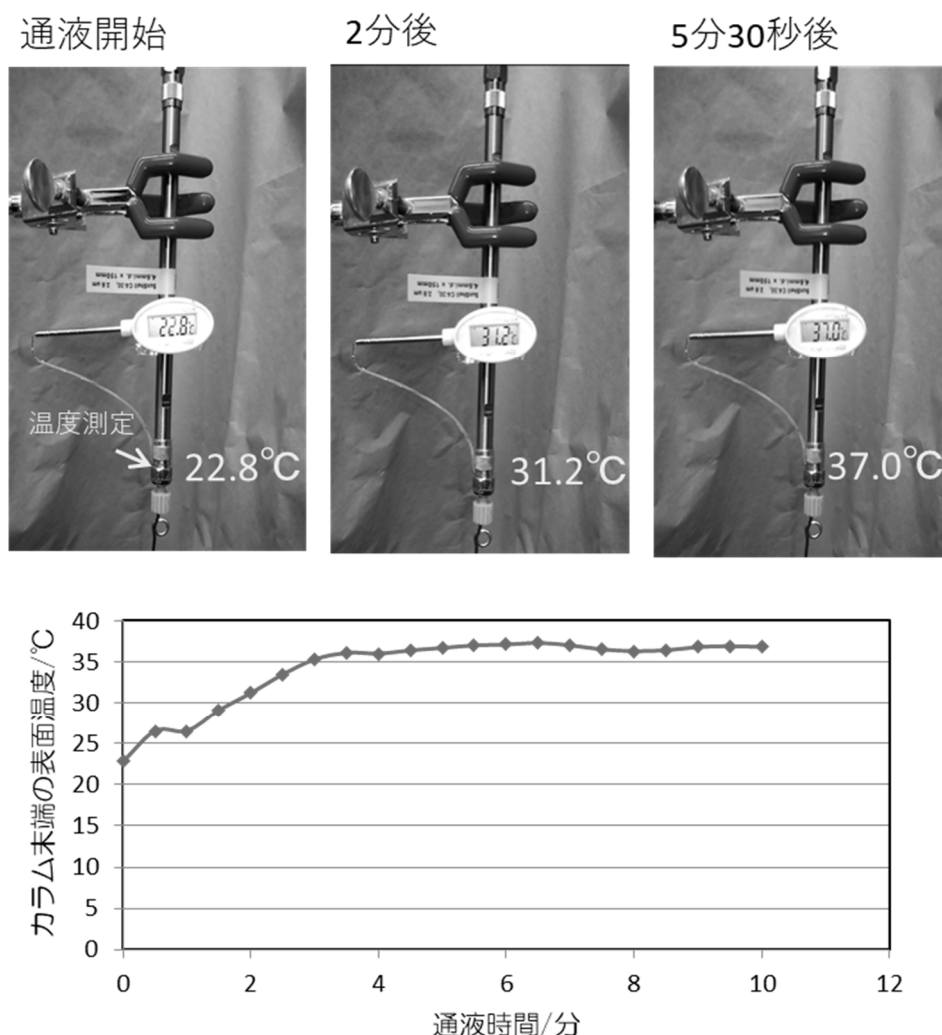


図 10 摩擦熱によるカラムの温度上昇

Column, SunShell C18 4.6 mmI.D.×150 mm, 2.6 μm; mobile phase, methanol; flow rate, 5 mL/min; back pressure, 70 MPa; temperature, room temperature, 22.8°C.

4. コアシェル粒子の特徴：摩擦熱・カラム外容積の影響

4.1 摩擦熱の影響

HPLC は、命名初期には high pressure liquid chromatography と言われており、文字通り高压化での LC であった。2000 年以降サブ 2 μm 粒子の登場と共に、更なる高耐压の装置が開発され、100 MPa 以上の高压下でも使用出来る様になった。1980 年以降、粒子径 5 μm の充填剤が一般的になると、耐久性を上げる為、50 MPa 以上の圧力を掛けて充填される様になった。充填時に 50 MPa 以上の圧を掛けると、カラム内で摩擦熱が発生し、カラム管の温度が上がる事は知られていたが、通常分離分析時には 20 MPa 以下での使用が推奨されており、20 MPa 以下ではカラム自体の発熱も少なく、問題になる事は無かった。図 10 に摩擦熱によるカラムの温度上昇を示す。粒子径 2.6 μm の充填剤を充填した内径 4.6 mm、長さ 150 mm カラムにメタノールを 5 mL/min の流速で通液した時のカラム出口の表面温度を、出口に接触させた温度センサーにより測定した。この時のカラム背圧は 70 MPa であった。通液前は室温と同じ 22.8 $^{\circ}\text{C}$ であり、5 分 30 秒後には 37 $^{\circ}\text{C}$ まで上昇し、その後は 37 $^{\circ}\text{C}$ を維持した。70 MPa の背圧で送液する事により発生した摩擦熱で 14 $^{\circ}\text{C}$ 以上温度が上がる事が確認された。サブ 2 μm 粒子カラムは 50 MPa を超える高压で使用される事も珍しくなく、摩擦熱の影響でピーク幅が広がり、段数が低下する。ピーク幅が広がるメカニズムについて以下に述べる。摩擦熱によりカラム内充填剤及び移動相の温度がカラム出口に向け徐々に上昇する。又、カラム管表面はカラムオープン中で一定温度に保たれている。従って、カラム管内部の温度が上昇するとカラム管外との温度差が生じ、カラム管外部からカラム管内部に向け温度勾配が出来る。カラム管中心部の移動相は温度が高く粘度が下がる為に移動速度が上がり、カラム管内部の移動相の移動速度が中心部と外側で異なる為ピーク幅は広がる。Gritti ら¹⁷⁾は、炭素鎖をシ

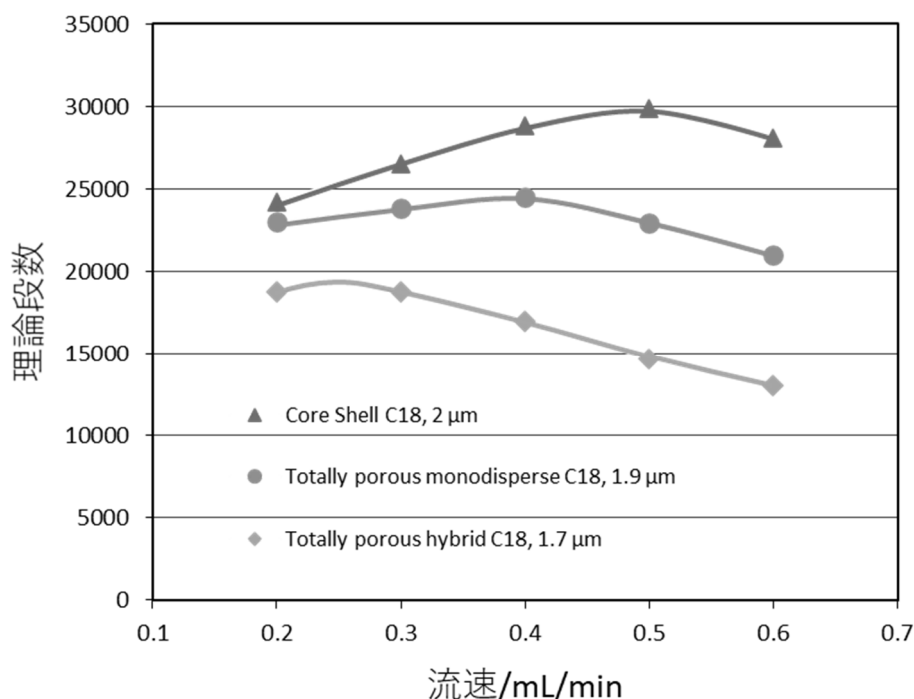


図 11 流速と理論段数の関係

Column, core shell C18, 2 μm , totally porous monodisperse C18, 1.9 μm , totally porous hybrid C18, 1.7 μm ; column dimension, 2.1 mm I.D. \times 100 mm; mobile phase, acetonitrile/water=60/40; temperature, 40 $^{\circ}\text{C}$; sample, acenaphthene; flow rate is described in the figure.

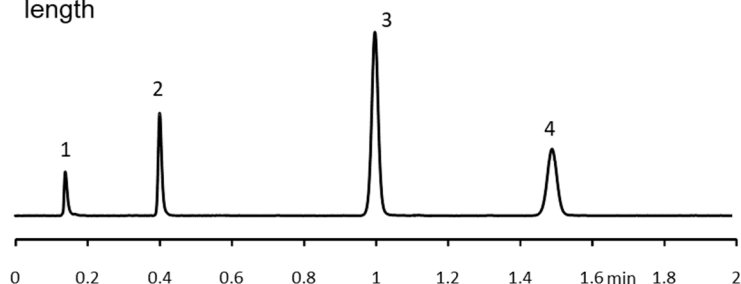
リカ骨格に入れたハイブリッドタイプの全多孔性 C18 カラムと内部にフーズドシリカの核をもった表面多孔性 (Superficially porous, コアシェル、Core shell) C18 の 2 種類のカラムについて、摩擦熱の影響がどのように異なるかを考察した。両カラムは粒子径が同じで、同条件での送液では摩擦熱は同じ様に発生するが、ピークの広がり方はコアシェル C18 カラムの方がハイブリッド全多孔性 C18 より少なく、その結果コアシェル C18 カラムの方が高い段数を示した。又、充填剤の熱伝導率を測定し、コアシェル C18 充填剤はハイブリッド全多孔性 C18 充填剤の 3 倍の熱伝導率を有している事が確認された。この高い熱伝導率により、コアシェル C18 充填剤は摩擦熱により発生するカラム中心部から外側への温度勾配が緩やかになり、ピークの広がり方が抑えられたと説明された。図 11 は筆者の実験データであるが、内径 2.1 mm、長さ 100 mm カラムを用いたコアシェル C18、粒子径分布の狭い全多孔性 C18 及び全多孔性ハイブリッド C18 の流速と理論段数の関係を示す。用いたカラムは全てシリカ系充填剤であり、移動相としてアセトニトリル/水=60/40 を用いた。カラム長さが 100 mm である為、カラム背圧は多用される長さ 50 mm カラムの 2 倍になり、摩擦熱の影響は大きくなる。粒子径 2 μm 以下で内径 2.1 mm、長さ 50 mm カラムの場合、流速は 0.5 mL/min から 0.6 mL/min で理論段数は極大値となる事が多い。図 11 の結果では、コアシェル C18 カラムは 0.5 mL/min の流速で理論段数は極大値となり、この時のカラム背圧は 49 MPa であった。同様に全多孔性 C18 カラムと全多孔性ハイブリッド C18 カラムでは其其 0.4 mL/min と 0.25 mL/min で理論段数は極大値になり、その時のカラム背圧は其其、35 MPa と 27 MPa となった。カラム背圧が高い程、発生する摩擦熱量が多くなる為、コアシェル C18 カラムは最も摩擦熱の影響を受け難く、逆に全多孔性ハイブリッド C18 カラムは最も摩擦熱の影響を受け易い事が確認された。全多孔性ハイブリッド C18 カラムでも、カラム長さが半分の 50 mm であれば、摩擦熱の影響が顕著になり始める 27 MPa 背圧では流速は 0.5 mL/min となる為、余り摩擦熱の事を意識する事はない。しかし、メタノール/水移動相を用いるとアセトニトリル/水移動相の約 2 倍の背圧がかかる為、長さ 50 mm でも摩擦熱の影響を考慮すべきである。コアシェル C18 充填剤の熱伝導率が高く、摩擦熱の影響が少ない理由は、充填剤基材としてのシリカの熱伝導率の高さに在り、充填剤中心部に無孔性のシリカ (フーズドシリカ) の核を有し、全多孔性シリカに比べカラム中に存在するシリカの割合が高くなっている為であると考えられる。逆に全多孔性ハイブリッド C18 充填剤はシリカ骨格中に炭素鎖が埋め込まれており、炭素はシリカに比べ熱伝導率が低い為、全多孔性シリカ充填剤より熱伝導率が低く、摩擦熱の影響が大きくなる。コアシェル充填剤は内部にフーズドシリカの核がある為、全多孔性充填剤に比べ理論段数が 50 %程度高くなる^{18,19)}だけでなく、今迄述べて来た様に摩擦熱の影響も少なく、高背圧下での理論段数低下も起こり難い。

4.2 カラム外容積の影響

コアシェルカラムは全多孔性カラムより理論段数が高くなり、ピーク容量 (幅) が小さくなる為、カラム以外の配管やフローセル等の容量が理論段数に大きく影響する。図 12 にインジェクター以降の配管の内径を細くする事によるピーク形状の変化を示す。粒子径 2 μm コアシェル C18 (SunShell C18) を充填した内径 2.1 mm、長さ 50 mm のカラムを用いた。上段は内径 0.1 mm のステンレススチール (SUS) 及び内面フーズドシリカ (PEEKsil) の配管を、下段は内径 0.075 mm の内面 PEEK (MarvelX) の配管を用いた。配管の全長は両配管とも同じ 500 mm である。配管の内径が 0.1 mm から 0.075 mm に細くなる事により、最初に溶出するウラシル (ピーク 1) の理論段数は 1208 段から 3593 段に向上した。

SUS 0.1mm i.d. tubing

Connecting tube
 Injector→Column: SUS, 0.1 mm i.d., 300 mm length
 Column→Flow cell of UV: PeekSil, 0.1 mm i.d., 200 mm length



Peaks, 1=Uracil
 2=Ethylbenzene
 3=Acenaphthene
 4=Butylbenzene

SunShell C18 2 μm, 50 x 2.1 mm

	Peak No.	SUS	MarvelX	
Theoretical plate	1	1208	3593	197% up
	2	7720	12625	64% up
	3	13589	15153	12% up
	4	13936	14733	6% up
Tailing factor	1	2.326	1.445	
	2	1.401	1.286	
	3	1.048	1.006	
	4	0.997	0.972	
Peak width, h _{0.5} (min)	1	0.0094	0.0051	
	2	0.0107	0.0083	
	3	0.0201	0.0194	
	4	0.0297	0.0295	

MarvelX 0.075 mm i.d. tubing

Connecting tube
 Injector→Column: MarvelX, 0.075 mm i.d., 350 mm length
 Column→Flow cell of UV: Marvel X, 0.075 mm i.d., 150 mm length

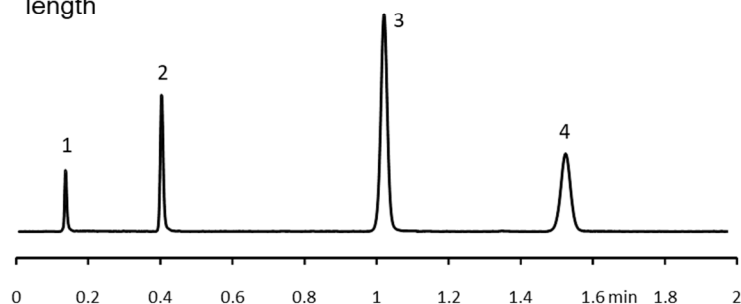


図 12 配管の内径と段数の関係

Column, SunShell C18, 2.1 mm I.D. x 50 mm, 2 μm; mobile phase, acetonitrile/water=60/40; flow rate, 0.6 mL/min; temperature, room temperature; detection, UV250 nm; injection volume, 0.4 μL; Peaks, 1=uracil, 2=ethylbenzene, 3=acenaphthene, 4=butylbenzene.

ピークの半値幅は 0.0094 分から 0.0051 分へと 0.0045 分狭くなった。又、アセナフテン（ピーク 3）も同様に理論段数は 13589 段から 15153 段へと 12% 向上した。4 本のピークとも理論段数は向上し、テーリングファクターは減少した。特に早く溶出するピーク容量の小さいピーク程、顕著であった。カラム外の配管の容積が減少する事により、この配管内での成分の拡散が抑えられ、ピーク幅が狭くなると同時にテーリングも抑制されたと考えられる。内径 2.1 mm のカラムは通常は内径 0.1 mm の配管が使用されるが、カラム長さ 50 mm で 15000 段近い理論段数を発揮するカラムでは内径 0.1 mm の配管でも大き過ぎ、内径 0.075 mm 配管を使用する事でそのカラムのもつ本来の性能に近づく。ここで用いた内径 0.075 mm の MarvelX 配管は、内径 0.025 mm 迄利用出来るが、配管のみに掛かる背圧は内径の 4 乗に反比例する為、内径を 0.075 mm から 0.025 mm に 1/3 のサイズに変更すると配管に掛かる背圧は 81 倍になる。配管の容積を減らす目的で内径を細くし過ぎると、配管に掛かる背圧が大きくなり過ぎる事があるので注意が必要である。図 12 の下段の内径 0.075 mm の条件では、合計 500 mm の長さの配管のみで 7.8 MPa の背圧が掛かっており、仮に内径 0.025 mm の配管にすると、81 倍の 631 MPa の背圧が配管のみに掛かる事になる。図 13 に、通常仕様とセミマイクロ仕様の HPLC を用いた時の理論段数の比較を示す。内径 4.6 mm、長さ 250 mm のカラム管に粒子径 5 μm のコアシェル C18 を充填したカラムを用い、アセトニトリル/水=70/30 を移動相として通液した。通常仕様として内径 0.25 mm 配管と容量 13 μL のフ

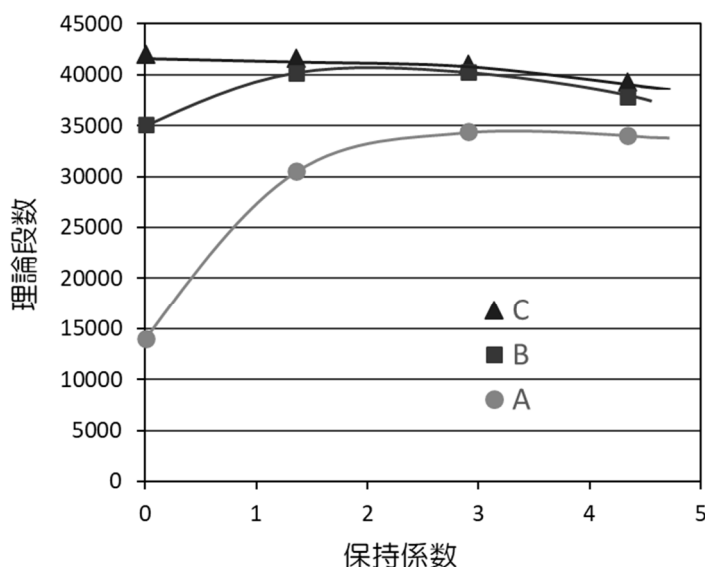
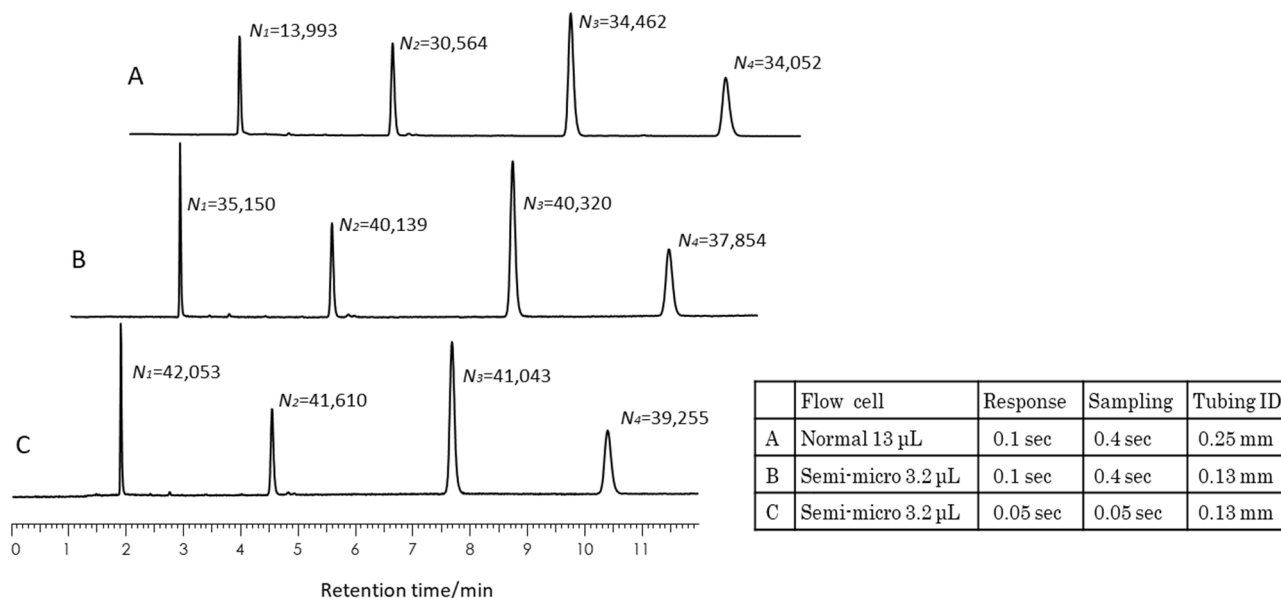


図 13 通常仕様とセミマイクロ仕様の HPLC を用いた時の理論段数の比較

Column, SunShell C18, 4.6 mm I.D. \times 250 mm, 5 μ m; mobile phase, acetonitrile/water = 70/30; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 $^{\circ}$ C; pressure, 6.7 MPa; detection, UV250 nm; peaks, 1 = Uracil, 2 = Toluene, 3 = Acenaphthene, 4 = Butylbenzene; HPLC, Hitachi LaChrom ELITE.

ローセルを用い、検出器のレスポンスタイムとサンプリングタイムを其其 0.1 秒と 0.4 秒に設定した条件を A、セミマイクロ仕様として内径 0.13 mm 配管と容量 3.2 μ L のフローセルを用い、検出器のレスポンスタイムとサンプリングタイムを其其 0.1 秒と 0.4 秒に設定した条件を B、セミマイクロ仕様でレスポンスタイムとサンプリングタイムを其其 0.05 秒と 0.05 秒に設定した条件を C とした。これらの条件で得られたクロマトグラムの各ピークの横に理論段数を示した。又、各条件での保持係数と理論段数の関係をグラフにした。保持係数はウラシルの溶出時間をホールドアップタイムとして計算した。図 12 で得られた結果とほぼ同じであり、カラム外のフローセルを含めた容積を減らす事により理論段数は 10 %から

150 %上昇した。更に、条件 B と条件 C は検出条件のみ異なるが、最初に溶出するウラシルのピークは 35150 段から 42053 段に理論段数が上昇した。このピークはフローセルへ流れ込むピーク容量は同じであるが、ピーク検出する時の応答速度や波形として出力する時の出力間隔の違いから、条件 B では実際のピークより幅広いピークになっている。条件 C の様にレスポンスタイムとサンプリングタイムを短くする事のデメリットとして、ベースラインのノイズの増大が挙げられる。保持係数と理論段数の関係で、通常仕様の HPLC を用いた場合の A のグラフでは保持係数が 3 付近で理論段数の極大値を示している。従来、或る程度保持が有るピークの方が理論段数は高くなり、保持係数が 3 から 5 で極大値となると言われていたが、この A のグラフはこの説を肯定する結果となった。しかし、カラム外容積を減らす事によりピークの拡散を減らし、更に検出条件のレスポンスタイムとサンプリングタイムを短くし、本来のピークに近い状態を検出する事により、C のグラフの様に早く溶出するピーク程理論算数は高くなった。Van Deemter の式²⁰⁾の B 項はカラム軸方向への拡散の項であり、理論段高さの B 項は移動相の線流速に反比例する。つまり、B 項は線流速が低いと理論段高さは高くなり、理論段数は下がる。これは、カラム内に留まっている時間が長いと、ピーク成分はカラム軸方向への拡散が大きくなり、その結果ピーク幅が広がり、理論段数は低くなる事を意味している。逆に、カラム内に留まっている時間が短いと、ピーク成分のカラム軸方向への拡散は小さくなり、ピーク幅の広がりが少なく、理論段数の低下が少ない事になる。図 13 の条件 C の理論段数は早く溶出するピーク程高く、これは上述のように Van Deemter の式の B 項より説明出来る。

5. 纏め

本報告では、C18、C8、C30、Phenyl-hexyl、Biphenyl、PFP&C18、PFP 固定相の分離特性として、水素結合性、疎水性、立体選択性を比較した。更にオルト-、メタ-、パラ-メチル馬尿酸、核酸塩基、スチルベン及び副腎皮質ステロイド類の分離比較をし、各固定相の特徴を考察した。又、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や摩擦熱・カラム外容積の影響も考察した。摩擦熱の影響は 27 MPa 以上で顕著になったが、コアシェル充填剤は構造上この摩擦熱の影響を受け難い事が明らかとなった。前報告のその 1 と本報告のその 2 でタイトルの「シリカ系逆相固定相の姿・状態・相互作用等に関する考察」を完了するが、基礎的ではあるものの、LC の実務では余り考えた事のない事柄を中心に考察しており、これらの内容がクロマトグラファーの一助になれば幸いである。

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, D. Ishii, *American Laboratory*, **27**, 20-30 (1995).
- 4) R. P. W. Scott, C. F. Simpson, *J. Chromatogr.* **197**, 11-20 (1980).
- 5) 長江徳和、榎並敏行、*分析化学*, **49**, 887 (2000).
- 6) M. Przybyciel, R. E. Majors, *LCGC NORTH AMERICA*, **20**, NUMBER 6 (2002).
- 7) K. A. Lippa, L. C. Sander, R. D. Mountain, *Anal. Chem.*, **77**, 7852-7861 (2005).
- 8) H. Cramer, D. S. Bell, D. Shollenberger, *LCGC Europe*, **30**, 6, 314-320 (2017).
- 9) 長江徳和、*LC と LC/MS の知恵*、第 1 号、8-27 (2020).

- 10) J. Nichthausser, P. Stepnowski, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 247-253 (2009).
- 11) D. S. Bell, A. D. Jones, *J. Chromatogr. A*, **1073**, 99-109 (2005).
- 12) 榎並敏行、長江徳和、*分析化学*, **53**, 1309-1313 (2004).
- 13) 長江徳和、*分析化学*, **59**, 195-205 (2010).
- 14) A. Fujii, H. Hayashi, J. W. Park, T. Kazama, N. Mikami, S. Tsuzuki, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 14131-14141 (2011).
- 15) U. D. Neue, T. H. Walter, L. Ziling, R. J. Crowley, B. A. Alden, J. Zhipng, R. P. Fisk, J. T. Cook, K. H. Glosk, J. L. Carmody, J. M. Grassi, Y. F. Cheng, *American Laboratory*, **31**, 36-39 (1999).
- 16) Y. F. Cheng, T. H. Walter, R. P. Fisk, L. Ziling, P. Iraneta, B. A. Alden, C. Gendreau, U. D. Neue, J. M. Grassi, J. L. Carmody, J. E. O'Gara, *LC GC North America*. **18**. 1162-1172 (2000).
- 17) F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1217** 5069 (2010).
- 18) J. J. Kirkland, F. A. Truszkowski, C. H. Dilks, G. S. Engel, *J. Chromatogr. A*, **890**, 3-13 (2000).
- 19) J. J. Kirkland, T. J. Langlois, J. J. DeStefano, *American Laboratory*, **39**, 18-21 (2007).
- 20) J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271-289 (1956).

< 執筆者略歴 > 長江徳和 (Norikazu NAGAE)

- ・ (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)。
- ・ 分析士資格 : LC 分析士二段。
- ・ 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



【ノート】

発蛍光誘導体化細胞由来全タンパク質の高精度分離法と

可視化技術の開発

小林宏資*^{1,2}、今井一洋²

¹信和化工株式会社 R&D グループ

²武蔵野大学薬学研究所 プロテオアナリシス客員研究部門

Development of High-Resolution Separation Method and
Visualization Technique for Fluorogenic Derivatized Whole-Cell
Proteins

Hiroshi KOBAYASHI*^{1,2}, Kazuhiro IMAI²

¹R&D group, Shinwa Chemical Industries, Ltd.

²Laboratory of Proteomics Analysis, Research Institute of Pharmaceutical Sciences,
Musashino University

(Received May 20, 2021; Accepted June 4, 2021)

要旨

生体タンパク質の一斉定量定性分析法の一つとして、蛍光誘導体化 (fluorogenic derivatization, FD) -LC-MS/MS 法が利用される。本手法の分析能力は、LC における分離に依存する事から、カラム分離能の向上を目的とし、フェニル修飾モノリスシリカキャピラリーカラムを用いるナノフローLC-蛍光検出システムを構築した。構築したシステムでは、発蛍光誘導体化した酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 並びにヒト細胞 (K562) 抽出タンパク質試料に対し、1,400 分のグラジエント溶離において其其 1,300 を超えるピークを与えた。一方、LC における分離能の向上により近接する多数のタンパク質ピークが発現する為、試料間比較における視認性が低下すると考えられた。この課題解決の為、多タンパク質分離クロマトグラムの比較描写法として、通常のデカルト座標系から円座標系へ変換したクモの巣クロマトグラムを考案した。

キーワード 発蛍光誘導体化タンパク質 ; FD-LC-MS/MS 法 ; モノリスシリカキャピラリーカラム ; クモの巣クロマトグラム

1. 始めに

タンパク質は細胞の代謝など生体の活動に密接に関わる物質であり、その構造や機能性に関する網羅的な理解と活用が、医薬学だけでなく農芸化学や食品化学、工学分野において求められている。一方、細胞全体から発現したインタクトなタンパク質を高性能且つ高感度に液体クロマトグラフィー (LC) で分離・検出する事は通常難しく、上記プロテオミクス研究分野の要求に応える事が出来ていない。LC/MS を利用したプロテオミクス手法として、増田らは、新規の蛍光試薬 7-クロロ-N-[2-(ジメチルアミノ)エチル]-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール-4-スルホンアミド(DAABD-Cl)を用いて、FD-LC-MS/MS 法を開発した^{1),2)}。この方法では、生体試料中のインタクトなタンパク質を DAABD-Cl でシステイン残基を誘導体化し、逆相液体クロマトグラフィーのコンベンショナルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm) で分離し、蛍光検出器により定量的に検出する (検出波長 : 503 nm、励起波長 : 395 nm)。その後、分離した発蛍光誘導体化タンパク質 (FD タンパク質) を分画し、酵素消化後に MS/MS 分析で同定する。この技術は、ヒトの癌細胞株、癌のバイオマーカー^{3),4)}、肝炎モデルマウスの肝臓等、様々な生体試料のディファレンシャルプロテオミクス解析に使用されている⁵⁾。更に、この技術は、HepaRG 細胞を特徴付けるプロテオミクスフィンガープリント解析にも有用である⁶⁾。

本手法の能力はカラムによるタンパク質分離に依存する為、よりシャープなタンパク質ピークを得る為に、吸着層が薄く、実数として高理論段数を与えるカラムの適用が望ましい。この要求に該当するカラムとしてモノリスシリカベースのキャピラリーカラムがある。モノリスシリカキャピラリーカラムは、約 1 μm の薄い吸着層と高い空隙率を有しており、長いカラムの構築に使用する事で、高い理論段数を得る事が出来る⁷⁾⁹⁾。そこで、FD-LC-MS/MS 法の将来的な性能向上へ向けて、高分解能が期待される 700 mm フェニル結合モノリスシリカキャピラリーカラムを用いたナノフロー蛍光検出 LC システムの開発を行った。本稿では、このシステムについて、標準的なタンパク質混合物での検証、モデル細胞タンパク質試料として誘導体化したヒト細胞由来タンパク質 (K562) と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来タンパク質を用いた分離、更に、多タンパク質ピークが出現する複数の細胞プロファイルの視覚的比較の容易化を目指し、クロマトグラムを通常のデカルト座標系から円座標へ変換したクモの巣クロマトグラムと呼ぶ新規表記法の検討について報告する。

2. 実験

2.1 試薬類

タンパク質分離には、フェニル結合モノリスシリカキャピラリーカラム (Ultron HF-Phenyl、内径 : 0.1 mm、長さ : 700 mm、信和化工) を使用した。HPLC 分析では、Milli-Q Advantage A10 (メルクミリポア) による超純水、LC/MS グレードのアセトニトリル (和光純薬)、トリフルオロ酢酸 (TFA、東京化成) を使用した。

タンパク質標準試料として、リボヌクレアーゼ A とリゾチーム (メルク) 並びにヒト血清アルブミン (HSA, BioVerde) を用いた。ヒト細胞 (K562) 及び酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) タンパク質抽出物は、プロメガから購入した。発蛍光誘導体化反応には、何れも東京化成から購入した、6 mol/L グアニジン-塩酸緩衝液 (pH 8.7)、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP)、4-[2-(ジメチルアミノ)エチルアミノスルホニル]-7-クロロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール (DAABD-Cl)、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート (CHAPS)、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を使用した。誘導体化反応には、BIOSAN 社サーモシェーカー (TS-100) を使用した。

2.2 装置

ナノフロー LC システムとして、Ultimate 3000 RSLCnano (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を主体とし、蛍光検出器として、自作の内径 30 μm のキャピラリーセルを組み込んだ FP-4025 蛍光検出器 (日本分光) を用いた。クロマトグラムの取得には、エルエイソフト製 CDS Plus データロガーシステムを使用した。

2.3 タンパク質の発蛍光誘導体化反応

FD タンパク質溶液の調製は、以下の手順で行った。最終濃度は、標準タンパク質は約 0.01 mg/mL, ヒト細胞及び酵母抽出タンパク質では約 1 mg/mL である。

(1) 標準タンパク質試料 (1 mg/mL, 6 mol/L グアニジン-HCl 緩衝液を用いた 50 mmol/L CHAPS 溶液) では其其 10 μL 、ヒト細胞 (K0562) 及び酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 抽出タンパク質溶液 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 6.5 mol/L 尿素/ 50 mmol/L トリス-HCl 緩衝液 (pH 8)) では 100 μL を、6 mol/L グアニジン-HCl 緩衝液 (pH 8.7) に溶解し、総量 570 μL とした。

(2) 50 mmol/L CHAPS (6 mol/L グアニジン-HCl 緩衝液)、10 mmol/L EDTA (6 mol/L グアニジン-HCl 緩衝液)、2.5 mmol/L TCEP (6 mol/L グアニジン-HCl 緩衝液) を各 200 μL と、140 mmol/L DAABD-Cl (アセトニトリル) を 50 μL を加えて混合した。

(3) この反応混合物を、サーモシェーカーを用いて 800 rpm にて 40°C で 10 分間インキュベートした後、氷水冷下で 30 μL の 20% TFA 水溶液を加えて反応を停止した。

2.4 インタクトタンパク質を用いたクロマトグラフィーシステム評価

FD-LC-MS/MS 法の性能として、カラムによる分離に加え、再現性並びに検出感度は重要な要素である。その為、モノリスシリカキャピラリーカラムを用いた LC システムの性能評価として、非誘導体化/発蛍光誘導体化標準タンパク質混合物 (リボヌクレアーゼ A (13.7 kDa)、リゾチーム (14.3 kDa) 及びヒト血清アルブミン (66.5 kDa), 各 0.01 mg/mL) の再現性並びに検出感度について評価した。

クロマトグラフィーの条件は次の通りである。移動相 A : 0.1 %TFA 水溶液、移動相 B : 0.1 %TFA アセトニトリル溶液、流量 : 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、グラジエント溶離条件 : 10 %-55 %B

(60 分)、カラム温度 : 60 °C、注入量 : 1.0 μ L、UV 検出波長 : 280 nm、蛍光検出器設定 : 検出波長 505 nm、励起波長 395 nm、ゲイン 1,000。

2.5 細胞抽出タンパク質を用いたナノフローFD-LC 分離

FD 化細胞抽出タンパク質のクロマトグラフィー条件は次の通りである。

移動相 A:0.1 %TFA 水溶液、移動相 B:0.1 %TFA アセトニトリル溶液、流量:0.5 μ L/min、カラム温度 : 60 °C、蛍光検出器設定 : 検出波長 505 nm、励起波長 395 nm、ゲイン 1,000、注入量 : 1.0 μ L (酵母抽出タンパク質) / 2.0 μ L (ヒト細胞タンパク質)、グラジエント溶離条件 : 25 %-45 %B (1,400 分) (酵母抽出タンパク質) / 29 %-49 %B (1,400 分) (ヒト細胞抽出タンパク質)。

3. 結果と考察

3.1 インタクトタンパク質を用いたクロマトグラフィーシステム評価

図 1 に、700 mm 長のフェニル結合モノリスシリカキャピラリーカラムを使用して、UV 検出器により得られた非誘導体化タンパク試料の分離クロマトグラムを示す。各タンパク質の溶出時間は其其、リボヌクレアーゼ A (29.7 分)、リゾチーム (39.6 分)、ヒト血清アルブミン (45.8 分) であり、繰り返し測定の再現性 (RSD, n=5) は其其 0.06%、0.05%、0.04%であった。又、ピークの高さの再現性 (RSD, n=5) は、リボヌクレアーゼ A で 1.14%、リゾチームで 0.79%、ヒト血清アルブミンで 1.97%と良好な結果が得られた。これらより、フェニル結合モノリスシリカキャピラリーカラムを用いたナノフローLC システムはインタクトタンパク質分離分析に適用出来ると考えられた。

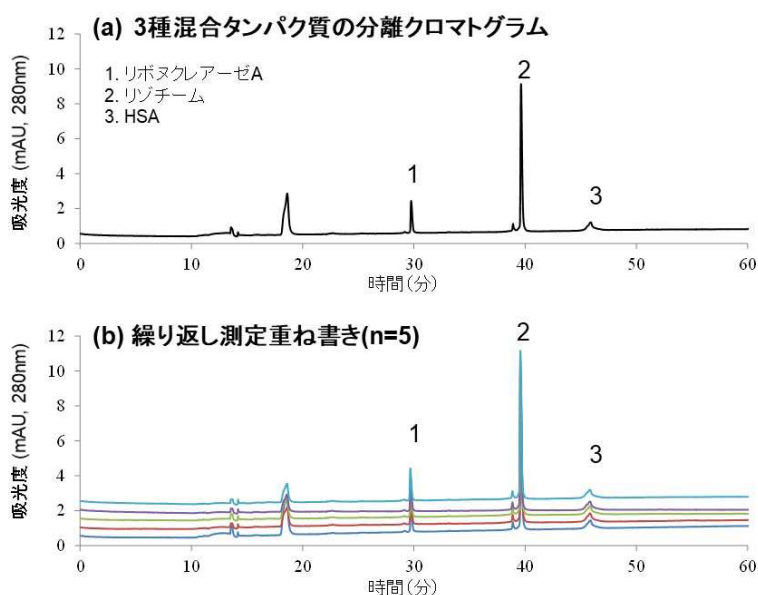


図 1 非誘導体化タンパク質試料のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相 A : 0.1 %TFA 水溶液、移動相 B : 0.1 %TFA アセトニトリル溶液
 流量 : 0.5 μ L/min、グラジエント溶離条件 : 10 %-55 %B (60 分)
 カラム温度 : 60 °C、注入量 : 1.0 μ L、UV 検出波長 : 280 nm

次に、検出器をキャピラリー型蛍光検出器へ変更して得られたクロマトグラムを図 2 に示す。非誘導体化タンパク試料と同様、FD タンパク質混合物でも明確な分離と検出がされた。其のタンパク質の溶出時間は、リボヌクレアーゼ A (32.3 分)、リゾチーム (40.3 分)、ヒト血清アルブミン (46.9 分) であり、其の 0.03%、0.02%、0.02% の高い再現性 (RSD、 $n=5$) が得られた。又、ピークの高さの再現性 (RSD、 $n=5$) も、リボヌクレアーゼ A で 0.93%、リゾチームで 1.11%、ヒト血清アルブミンで 0.68% と良好であった。検出感度について、各タンパク質の定量限界 ($S/N=10$) は、リボヌクレアーゼ A、リゾチーム、ヒト血清アルブミンで、其々 1.89、3.26、0.48 fmol であった。従来の FD-LC システムでは、FD タンパク質及びペプチドの検出限界は 0.5~30 fmol の範囲であると報告されており¹⁰、自作のキャピラリーフローセルを使用した本システムでも汎用 LC を用いた蛍光検出システムと同等の検出感度が得られた。これらより、開発したナノフローFD-LC システムは、細胞抽出タンパク質を対象とした分離・検出に適用出来ると考えられた。

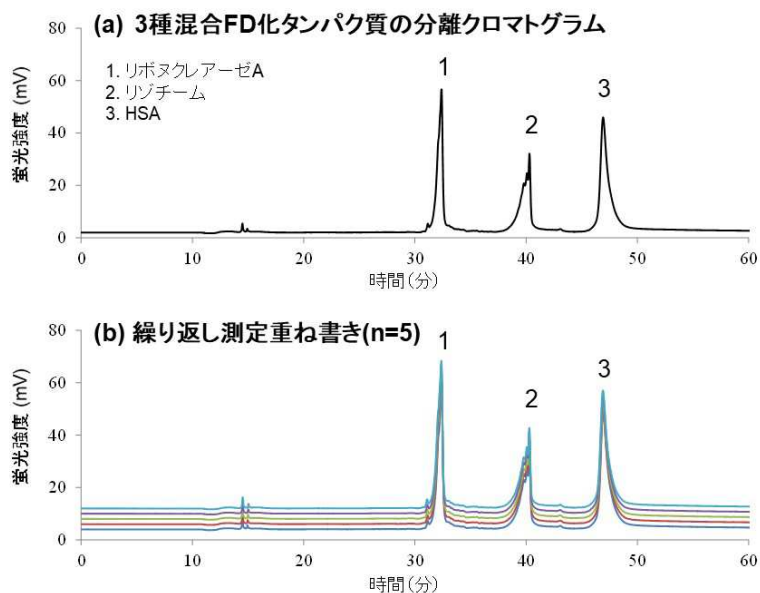


図 2 FD 化タンパク質試料のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相 A : 0.1 %TFA 水溶液、移動相 B : 0.1 %TFA アセトニトリル溶液
 流量 : 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、グラジエント溶離条件 : 10 % - 55 %B (60 分)
 カラム温度 : 60 $^{\circ}\text{C}$ 、注入量 : 1.0 μL
 蛍光検出器設定 : 検出波長 505 nm、励起波長 395 nm、ゲイン 1,000

3.2 細胞抽出タンパク質を用いたナノフローFD-LC 分離

ヒト細胞 (K562) 及び酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来 FD タンパク質から、1,400 分のリニアグラジエント溶離 (ヒト細胞抽出タンパク質 : 29%B - 49%B、酵母抽出タンパク質 : 25%B - 45%B) によって得られたクロマトグラムを図 3 に示す。検出されたピーク数は、其の 1,362 及び 1,469 であった。使用した検出器が蛍光検出器である事、又、蛍光体がシステイン残基へ結合した DAABD である事から、これらのピークは全てタンパク質

と考えられる。粒子充填型カラムを用いた FD-LC-MS/MS 法で報告されている検出ピーク数が 500~600 である事⁶⁾から、モノリスシリカキャピラリーの使用は FD-LC-MS/MS 法の高度化に繋がる一つのアプローチと考えられる。又、より高理論段数のカラムを使用する事で、更なる高分解能化が期待される。

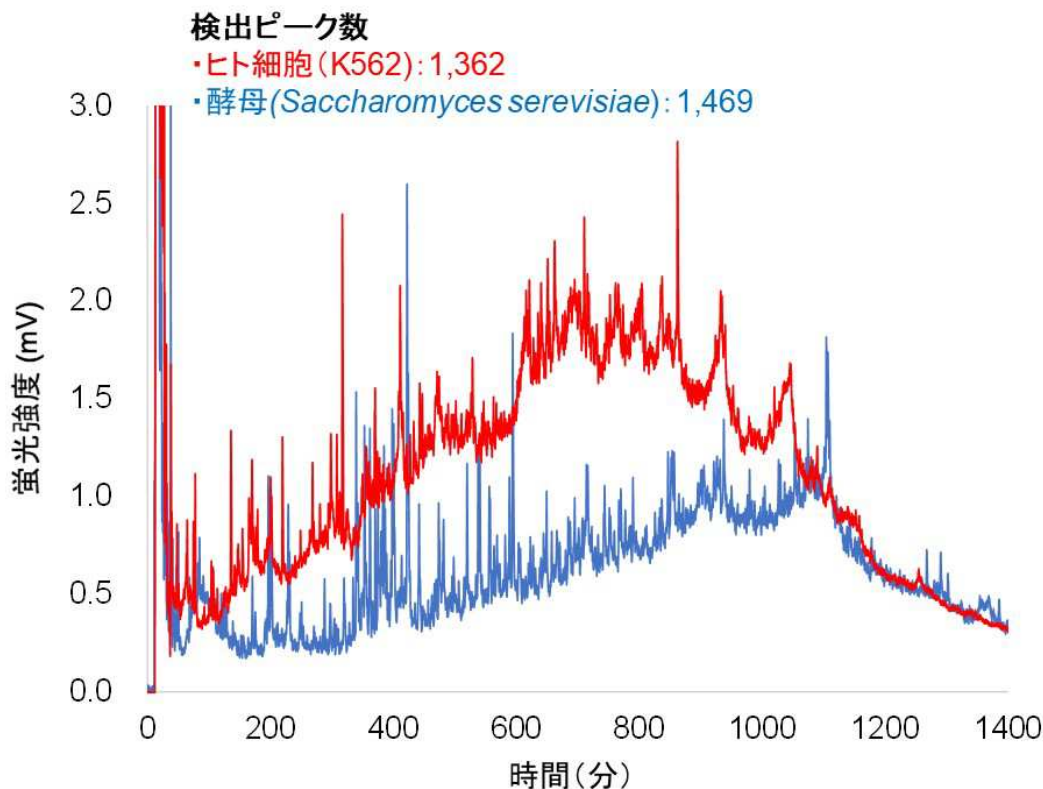


図 3 ヒト細胞(K562)並びに酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)抽出タンパク質を発蛍光誘導体化した試料のクロマトグラム (赤:ヒト細胞, 青:酵母)

HPLC 条件

移動相 A : 0.1 %TFA 水溶液, 移動相 B : 0.1 %TFA アセトニトリル溶液
 流量 : 0.5 μ L/min, カラム温度 : 60 $^{\circ}$ C

蛍光検出器設定 : 検出波長 505 nm, 励起波長 395 nm, ゲイン 1,000
 (ヒト細胞タンパク質)

グラジエント溶離条件 : 29 %-49 %B (1,400 分), 注入量 : 2.0 μ L
 (酵母抽出タンパク質)

グラジエント溶離条件 : 25 %-45 %B (1,400 分), 注入量 : 1.0 μ L

3.3 新規クロマトグラムによる多タンパク質含有試料の視覚的比較検討

上記の通り、高分解能モノリスシリカキャピラリーカラムを用いたナノフローFD-LC は細胞発現タンパク質の一斉分離・検出に有用な手段と考えられる。タンパク質発現の差異によるターゲットタンパク質の絞り込みやその変動追跡では蛍光検出器で得られるクロマトグラムが用いられる。しかしながら、カラム分解能の向上により新たに検出されるピークは非常に近接しており、視覚的なターゲット探索が非常に困難である。視覚的な差異判

別を容易にするにはピーク間の距離を広くする必要があるが、より一層の分離能向上が必要であると共に、分離能向上は新たな近接ピークを生じさせる為、適切なアプローチと言えない。そこで、描写的にピーク間距離を広げる方法として、クロマトグラムを通常のデカルト座標系から円座標系（レーダーチャート、クモの巣図）へ置き換えた。図 4 に図 3 のデカルト座標系のクロマトグラムを円座標へ置き換えたクモの巣クロマトグラムを示す¹⁾。なお、酵母タンパク質については、試料量補正の為、蛍光強度のスケールを 2 倍とし、検出範囲は 0~3.0 mV とした。

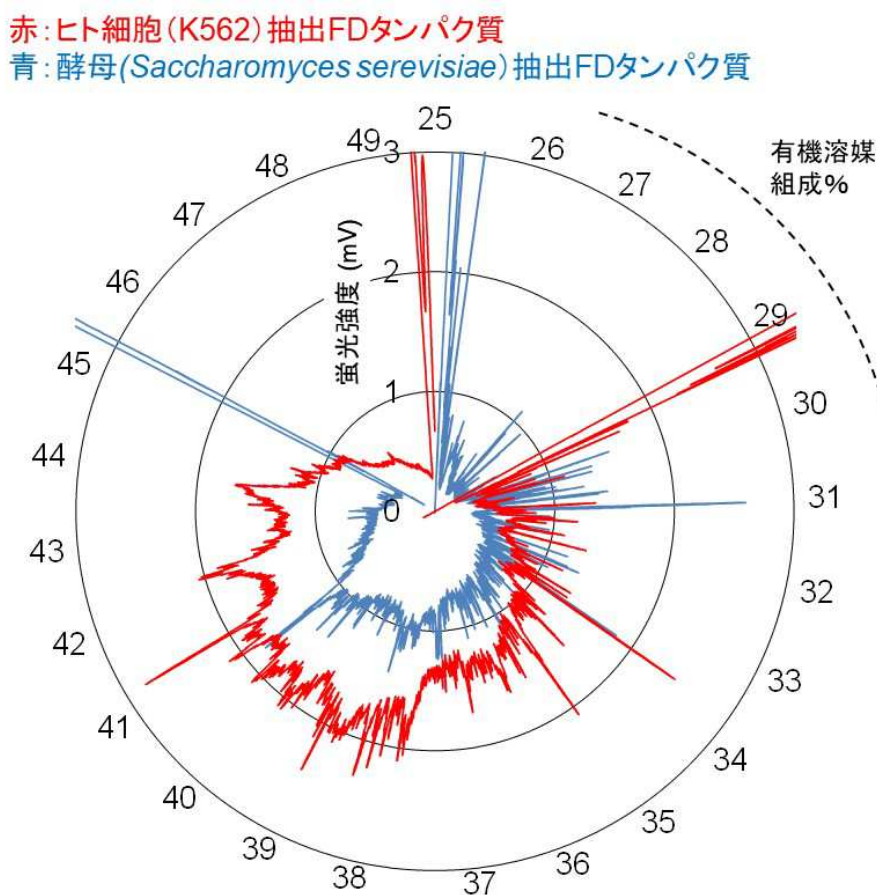


図 4 クロマトグラム (図 3) を元に作製したクモの巣クロマトグラム
 (赤: ヒト細胞抽出 FD タンパク質, 青: 酵母抽出 FD タンパク質)

円の外周は溶離液の有機溶媒組成(%B)に、径は蛍光強度(mV)に対応する

クモの巣クロマトグラムでは、座標の円周が有機溶媒の組成に、半径方向の軸が蛍光強度に対応している。図 4 に示された様に、クモの巣クロマトグラムでは異なる細胞試料により得られた多タンパク質の分離クロマトグラムを指紋 (フィンガープリント) として比較描写がされた。円の外周の定義から、円周は直径の約 3 倍の長さがある。従って、クモの巣クロマトグラムではピークトップ間距離が広がる。これにより、クモの巣クロマトグ

ラムは従来のクロマトグラムと比較して、細胞全タンパク質試料から得られたタンパク質ピークの溶出パターンや高さの僅かな変化を視覚的に認識し易くなると考えている。又、逆相クロマトグラフィーにおけるタンパク質溶出は溶離液組成に強く依存する性質を有する事から、円周を有機溶媒組成にする事で、試料の比較分析が可能と考えている。逆相クロマトグラフィーにおけるタンパク質溶出の溶離液組成の誤差確認や各ピーク成分の同定など未確認の事柄が残るものの、視覚的にピーク間距離が広がる事、又、分離パターンとして円周も活用がされる事から、クモの巣クロマトグラムは、多種多様な細胞で発現した全タンパク質パターンのフィンガープリント分析として、比較描写に有用となるものと考えている。

4. 結論

フェニル修飾モノリスシリカキャピラリーカラムを用いて、ナノフローFD-LC システムを開発した。ヒト (K562) 及び酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の全細胞抽出タンパク質を分析した所、1,300 以上のタンパク質ピークが分離検出された。組織間或いは細胞間での発現タンパク質の差異比較をクロマトグラムにて容易にする為に、クロマトグラムをデカルト座標系から円座標系への変換を試みた。円座標系では、円周を移動相の有機溶媒組成に、放射状の軸を各ピークの検出高さとして表示する事で、発現タンパク質がクモの巣状のパターンとして表示されるクモの巣クロマトグラムを考案した。ナノフローFD-LC とクモの巣クロマトグラムを用いたフィンガープリント分析は、プロテオミクス分析や細胞タイプの同定に役立つと考えられる。

引用文献

- 1) M. Masuda, C. Toriumi, T. Santa, K. Imai, *Anal. Chem.*, **76**, 728–735 (2004).
- 2) A. Koshiyama, T. Ichibangase, K. Imai, *Quantitative Proteome Analysis: Methods and Applications.*, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., pp. 1-16 (2013).
- 3) K. Imai, T. Ichibangase, R. Saitoh, Y. Hoshikawa, *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 1304–1314 (2008).
- 4) A. Koshiyama, T. Ichibangase, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **27**, 440–450 (2013).
- 5) T. Ichibangase, K. Moriya, K. Koike, K. Imai, *J. Proteome Res.*, **6**, 2841–2849 (2007).
- 6) K. Nakata, T. Ichibangase, R. Saitoh, M. Ishigai, K. Imai, *Analyst*, **140**, 71–73 (2015).
- 7) N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, *J. Chromatogr. A*, **965**, 35–49 (2002).
- 8) H. Kobayashi, M. Sukegawa, K. Fujimura, T. Kubo, K. Otsuka, *CHROMATOGRAPHY*, **3**, 133–139 (2016).
- 9) M. Iwasaki, S. Miwa, T. Ikegami, M. Tomita, N. Tanaka, Y. Ishihama, *Anal. Chem.*, **82**, 2616–2620 (2010).

10) K. Imai, United States Patent, US 8,796,037B (2014).

11) H. Kobayashi, H. Wada, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **35**, e5078 (2021).

< 執筆者略歴 >

小林宏資 (Hiroshi KOBAYASHI)

- ・ 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に師事し、
クロマトグラフィー技術について学ぶ。
- ・ 2007 年より信和化工株式会社にて分離剤開発に従事。
- ・ 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。
- ・ 分析士資格：LC 分析士三段、LC/MS 分析士初段。



今井一洋 (Kazuhiro IMAI)

- ・ 武蔵野大学薬学研究所
(〒202-8585 東京都西東京市新町 1-1-20)
- ・ 東京大学薬学部、武蔵野大学薬学部を経て、
現在、武蔵野大学薬学研究所客員教授。
- ・ 新分野: Bio-Analytical Chemistry(生命分析化学)を
提唱中。



【2018 年度 CERI クロマトグラフィー分析賞受賞業績】

誘導体化 HPLC 検出法の開発と装置化

Development of HPLC Derivatization Methods and Systems

三上博久／Hirohisa MIKAMI

株式会社島津総合サービス リサーチセンター／

Research Center, Shimadzu General Services, Inc.

キーワード ポストカラム誘導体化；蛍光検出；糖；反応試薬；アルギニン

(Received May 11, 2021; Accepted May 19, 2021)

1. 始めに

今日の HPLC の目覚ましい発展において、分離技術も然る事ながら検出技術の進歩が果たした役割は極めて大きい。その中でも誘導体化検出法は、ライフサイエンス分野を中心に HPLC の応用性拡大に多大な貢献をして来た。ライフサイエンス分野では、複雑なマトリックス中の微量分析種を選択的に検出する必要があり、蛍光検出器や電気化学検出器が主として用いられて来たが、適用可能な分析種に限界があった。この為、分析種を誘導体化して別の化学種に変換して検出する誘導体化検出法が、1970 年代後半頃から盛んに研究される様になった。

筆者らのグループでは、この誘導体化検出法に逸早く着目し、種々の分析種に対する手法開発と装置化を進め、筆者も多くのテーマに取り組んで来た。本稿では、筆者が誘導体化法の黎明期に開発した糖のポストカラム誘導体化法に関し、開発から現在に至る迄の流れについて概説したい。

2. 開発の背景

糖の LC 分析については、糖が紫外吸収性に乏しい為、1960 年代半ば頃から検出手段としてオルシノールー硫酸法、フェノールー硫酸法などコンベンショナルな発色法を利用したポストカラム誘導体化法が検討されて来た。しかし、これらの方法は、強酸を用いるが故に装置の腐食や反応試薬の取り扱いに難点があり、感度的にも不十分なものであった。1960 年代末 HPLC 時代に入り、専用の示差屈折率検出器 (RID) が開発され、糖の検出には専ら RID が用いられる様になった。しかし、RID は、感度が低く検出選択性も乏しい為、生体試料や天然物試料の様に夾雑成分が多く、糖含有量が少ない試料には適さなかった。

この様な中、1970 年代後半頃から 1980 年代に掛けて、強酸を使用しない条件下で糖を高感度に検出する為の誘導体化法の探索が盛んとなり、エタノールアミン¹⁾、シアノアセトアミド²⁾、エチレンジアミン³⁾、タウリン⁴⁾などを反応試薬として用いるポストカラム蛍光

誘導体化法が開発されるに至った。糖分析に興味をもっていた筆者も、同時期に新しい反応試薬の探索に取り掛かっていた。

3. アルギニン法の開発と装置化

反応試薬の探索を種々進めて行く中、1980 年代初めに筆者らは、塩基性アミノ酸であるアルギニンがホウ酸塩水溶液中、還元糖との加熱反応 (150 °C) により、強い蛍光誘導体 (励起波長 : 320 nm、蛍光波長 : 430 nm) を与える事を見出した^{5)・7)} (図 1)。

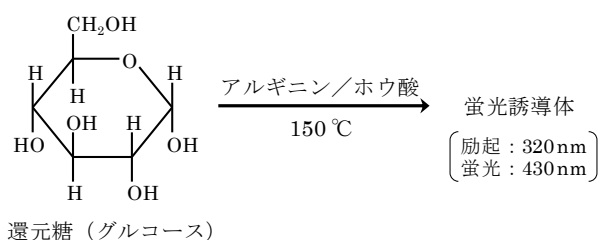


図 1 還元糖とアルギニン/ホウ酸の反応

この誘導体化法は、反応試薬が中性から弱塩基性と温和であり、且つ汎用性の高い市販試薬により、還元糖を高感度に検出出来る事が特長であった。筆者らは、本法を単糖及び二糖の相互分離に優れるホウ酸錯体陰イオン交換クロマトグラフィーと組み合わせて、反応条件 (アルギニン及びホウ酸濃度、移動相と反応試薬の混合比、反応管容量、反応時間等々) の最適化を図り、糖のポストカラム蛍光誘導体化分析システム (製品名 : 還元糖分析システム) として上市した。図 2 に、本システムの流路図を示す。

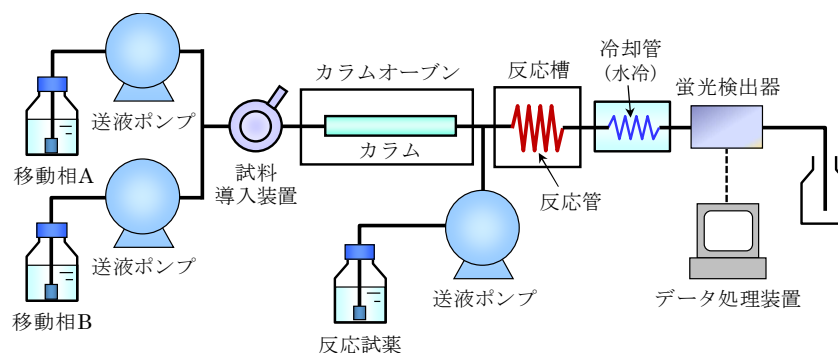
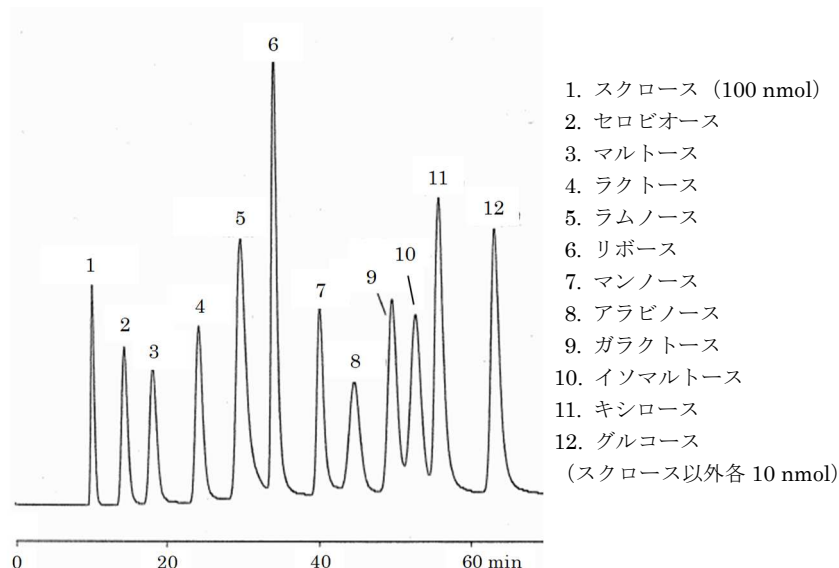


図 2 還元糖システムの流路図

カラムには、強塩基性陰イオン交換カラムを用い、濃度と pH が異なる 2 種類のホウ酸カリウム緩衝液で糖をグラジエント分離した後、カラム溶出液に反応試薬であるアルギニン/ホウ酸水溶液を連続的に添加し、反応槽内で加熱反応させて蛍光検出器で検出した。本システム用に開発した反応槽は、反応管 (ステンレス製) をヒーター及び温度センサーと共に錫で固めてブロック化し、断熱容器に組み込んだものであり、設定温度範囲は室温 + 15 °C

～150 °C、温調精度±0.2 °Cであった。反応槽からの高温の溶出液は、水浴中の冷却管（ステンレス製）で冷却後、蛍光検出器に導いた。図 3 に、本システムによる単糖及び二糖 12 成分標準混合液のクロマトグラムを示す。



[分離条件] カラム：Shim-pack ISA-07 (内径 4.0 mm, 長さ 250 mm), 移動相：A-0.1 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 8.0), B-0.4 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9.0), 直線グラジエント溶離, B 0% → 100% (50 min), 流量：0.6 mL/min, 温度：65 °C
 [検出条件] 反応試薬：1%アルギニン/3%ホウ酸水溶液, 流量：0.5 mL/min, 反応温度：150 °C, 検出：蛍光検出器 (励起波長 320 nm, 蛍光波長 430 nm)

図 3 糖 12 成分標準混合液のクロマトグラム

本システムでは、非還元糖であるスクロースも検出可能であり、感度はマルトースの概ね 1/10 程度と低いながらも還元糖と同時定量出来る点が、他法に対して大きなメリットであった。これは、反応時スクロースの一部が定量的にグルコースとフルクトースに分解し、検出されたものと考えられた。本システムは、還元糖を 10 pmol オーダーで検出可能とした為、糖の高感度且つ選択的検出法を求めていた生化学や天然物化学分野を中心に、食品、医薬品、環境など広い分野で応用されるに至った^{8)・15)}。

その後、HPLC 装置の技術進歩を取り入れ、又市場から寄せられる要望に応えるべく、システムの改良を行った。その一つは、新たな反応槽への変更であり、LC-6A シリーズ (1984 年) からは、カラムオープンと同様、ヒーターとファンを用いる空気循環方式を採用した。これにより、従来の錫ブロック式では困難であった反応管の交換が容易に出来る様になり、メンテナンス性が大幅に向上した。又、反応管サイズを自由に設計して収納可能な為、様々な反応系の実験に利用出来る様になった。

次に、反応液の冷却方式を従来の水冷から空冷へと変更した。LC-10A シリーズ (1991 年) では、冷却機能付きカラムオープンがラインアップされた為、冷却管をカラムオープン

内に設置にする事により、反応液をカラム温度まで冷却し、検出器へ送る方式を考案した。図 4 に、空冷方式による還元糖分析システムの流路図を示す。この方式により、水冷設備が不要となり、操作性が向上し自動化も容易になった。

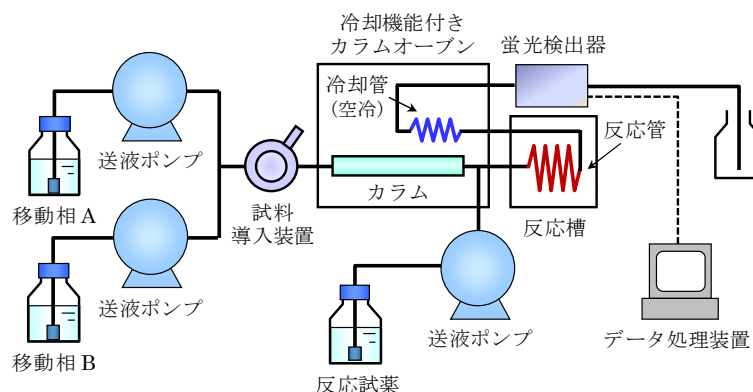


図 4 空冷方式による還元糖分析システムの流路図

検出感度に関しては、蛍光検出器の高感度化に伴い向上して行った。特に、Prominence シリーズで新たに開発された蛍光検出器 (RF-20Axs) により、pmol オーダーの還元糖を検出する事が可能となった。又、この蛍光検出器には、セル温調機能が搭載されており、分析精度及び感度向上が期待された。一般に蛍光強度は、温度上昇と共に減少する事が知られている為、本反応で生成する蛍光誘導体がどの程度温度の影響を受けるかを調べた。図 5 に、セル温度を 20 °C、30 °C、40 °C と変化させた時のクロマトグラムを示す¹⁶⁾。

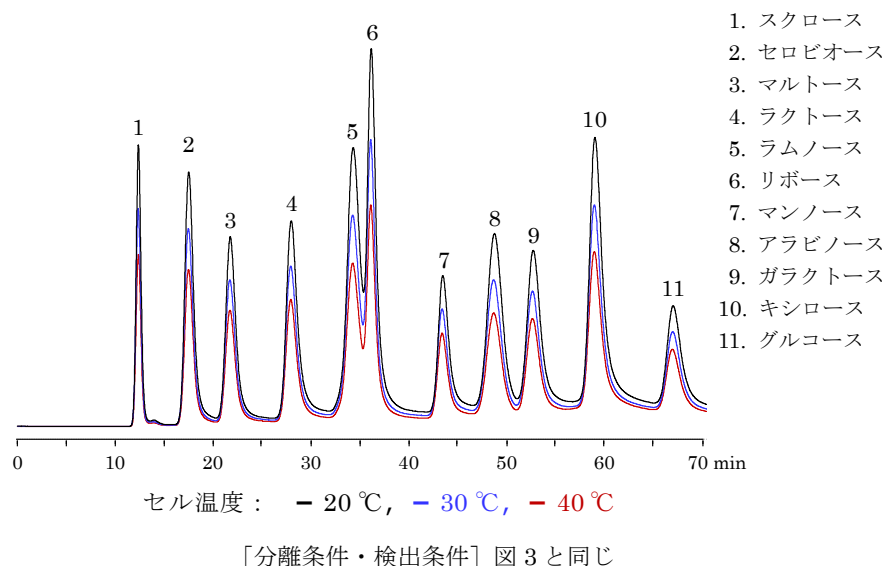


図 5 セル温度を変化させた時のクロマトグラム

セル温度を 20 °C から 40 °C まで変化させると、蛍光強度が概ね 40 % 程度変動した。こ

の事から、本システムでの分析精度向上にセル温調が効果的であり、又セル温度を下げる事による感度向上が期待出来る事が分かった。

この様に還元糖分析システムは、時代と共に新しい技術を導入し、現在に至るまで進化して来た。アルギニン／ホウ酸試薬による糖のポストカラム誘導体化法の開発及び還元糖分析システムの上市から 40 年近く経過する現在、最新装置として Nexera 還元糖分析システム (図 6) が活躍している。

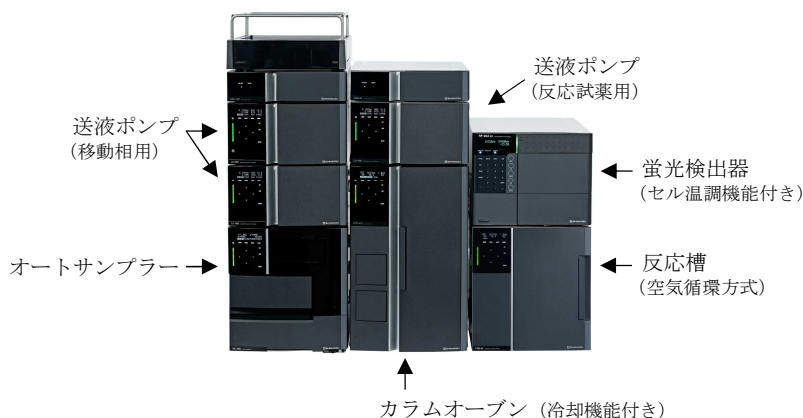


図 6 Nexera 還元糖分析システム

本法については、上述の標準分析法の他、これを発展させた新たな試みにも挑戦したので、以下に紹介したい。

4. アルギニン添加移動相の検討

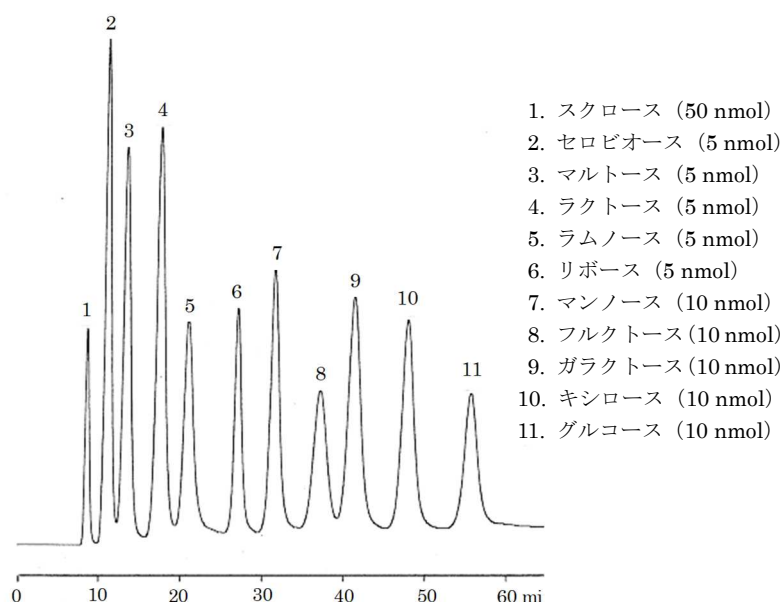
本システムでは、元々移動相としてホウ酸緩衝液を用いる為、移動相にアルギニンを添加する事により、反応試薬用送液ポンプを不要に出来ないかと考えた。そこで、アルギニンを移動相に予め添加した状態で糖を分離後、そのままカラム溶出液を加熱する事により移動相中のアルギニンと還元糖を反応させ、蛍光誘導体化する方法を検討した^{17)・20)}。

反応試薬を移動相に添加する方法では、以下の課題が考えられた。

- ① 反応試薬が分離に影響を与えない事
- ② 反応試薬が移動相中で安定である事
- ③ 反応試薬がカラム充填剤を劣化させない事
- ④ 最適反応条件と移動相条件が出来る限り近い事
- ⑤ 反応試薬がカラム内で試料成分と反応せず、加熱する事によって初めて分析種と反応し、誘導体を与える事

①については、ホウ酸カリウム緩衝液の 0.1 mol/L (pH 8.0) 及び 0.4 mol/L (pH 9.0) にアルギニンを添加し、各々無添加の場合と糖の分離状態を示差屈折率検出器により比較した。その結果、何れの移動相でも、アルギニン添加が分離に影響を与えない事が分かった。

②及び③については、数週間の連続運転で問題が無い事を確認した。④については、移動相自体が最適反応条件に近い為問題にならなかった。⑤については、加熱無しでは全く蛍光検出されなかった。以上の結果から、アルギニン添加移動相が実用的に使用可能と判断した。図 8 に、アルギニン添加移動相による糖 11 成分標準混合液のクロマトグラムを示す。



[分析条件] カラム : Shim-pack ISA-07 (内径 4.0 mm, 長さ 250 mm), 移動相 : A-0.1 %アルギニン添加 0.1 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 8.0), B-0.1 %アルギニン添加 0.4 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9.0), 直線グラジエント溶離, B 0 % → 100 % (50 min), 流量 : 0.6 mL/min, 温度 : 65 °C, 反応温度 : 150 °C, 検出 : 蛍光検出器 (励起波長 320 nm, 蛍光波長 430 nm)

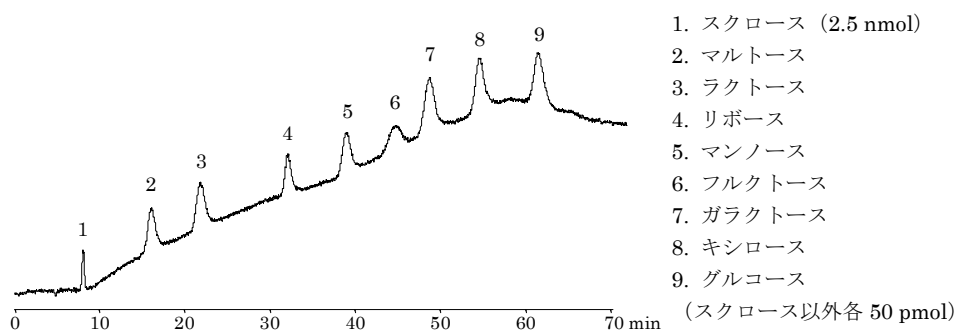
図 8 糖 11 成分標準混合液のクロマトグラム (アルギニン添加移動相)

アルギニン添加移動相を用いる事により、反応試薬用送液ポンプが不要となり、更にカラム溶出液と反応試薬の不均一な混合に起因するノイズを低減する事が出来た。

5. 吸光光度検出の検討

アルギニン添加移動相によりシステムの簡素化が可能になったが、更に汎用性を高める為、基本としていた蛍光検出の代わりに、吸光光度検出を用いる方法を検討した。アルギニンと還元糖との反応生成物の吸収極大波長が 320 nm である事から、吸光光度検出でもある程度の検出選択性が得られると考えられ、又近年の吸光光度検出器の高感度化に伴い、検出感度においても一定の期待がもてた。

そこで、吸光光度検出器付きの HPLC 装置に反応槽を追加して、反応条件の最適化を行った^{21),22)}。図 9 に、糖 9 成分標準混合液の高感度クロマトグラムを示す。図から分かる様に、グラジエント溶離によるベースライン変動が大きいものの、10 pmol オーダーの還元糖の検出が可能であり、吸光光度検出器も試料によっては十分実用的に使える事が分かった。

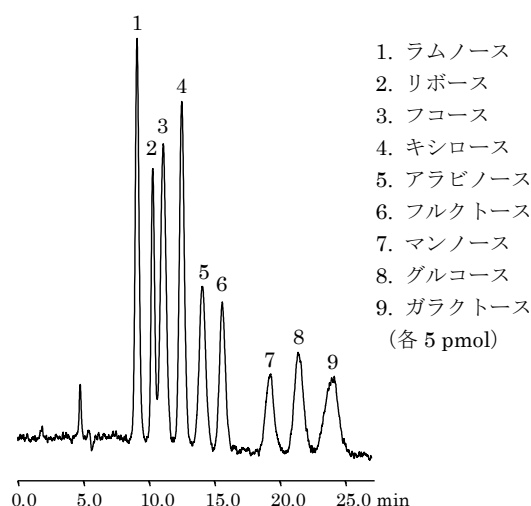


[分析条件] カラム : Shim-pack ISA-07 (内径 4.0 mm, 長さ 250 mm), 移動相 : A-10 mmol/L アルギニン添加 0.1 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 8.0), B-10 mmol/L アルギニン添加 0.4 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9.2), 直線グラジエント溶離, B 0% → 100% (50 min), 流量 : 0.6 mL/min, 温度 : 65 °C, 反応温度 : 150 °C, 検出 : 吸光光度検出器 (320 nm)

図 9 糖 9 成分標準混合液の高感度検出クロマトグラム (吸光光度検出)

6. 親水性相互作用クロマトグラフィーの検討

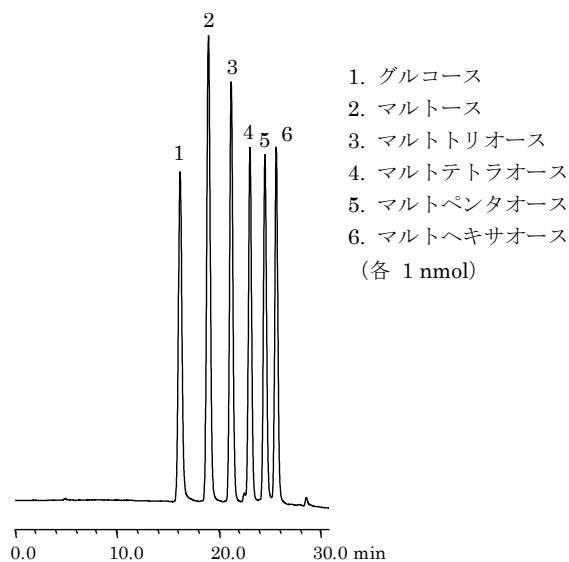
ホウ酸錯体陰イオン交換クロマトグラフィーは、単糖及び二糖の相互分離に適した分離モードであるが、分析に長時間を要した。そこで、アルギニン法を親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) に適用する事を試みた。HILIC では、ホウ酸錯体陰イオン交換クロマトグラフィーに比べてピーク容量が遙かに小さく、移動相にはアセトニトリル/水/リン酸混合液を用いる為、反応条件の最適化が必要であった²³⁾。図 10 に、糖 9 成分標準混合液の高感度クロマトグラムを示す。



[分離条件] カラム : Shodex Asahipak NH2P-50 (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm), 移動相 : 水/アセトニトリル/リン酸 (15/85/0.3, v/v/v), 流量 : 0.8 mL/min, 温度 : 45 °C
 [検出条件] 反応試薬 : 0.5 % アルギニン含有 0.3 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9.3), 流量 : 0.5 mL/min, 反応温度 : 150 °C, 検出 : 蛍光検出器 (励起波長 320 nm, 蛍光波長 430 nm)

図 10 糖 9 成分標準混合液の高感度クロマトグラム (HILIC)

次に、オリゴ糖の分離に優れる HILIC の特長を活かす為、グラジエント溶離を用いてオリゴ糖の条件検討を行った。図 11 に、グルコース及びマルトオリゴ糖 5 成分標準混合液のクロマトグラムを示す。



[分離条件] カラム : Shodex Asahipak NH2P-50 (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm),
移動相 : A-0.05 %リン酸水溶液, B-0.05 %リン酸アセトニトリル溶液, 直線グラジエント溶離,
A/B 15/85 → 50/50 (20 min), 流量 : 0.8 mL/min, 温度 : 45 °C
[検出条件] 反応試薬 : 0.5 %アルギニン含有 0.3 mol/L ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9.3),
流量 : 0.5 mL/min, 反応温度 : 150 °C, 検出 : 蛍光検出器 (励起波長 320 nm, 蛍光波長 430 nm)

図 11 グルコース及びマルトオリゴ糖 5 成分標準混合液のクロマトグラム (HILIC)

アルギニン法と HILIC とを組み合わせる事により、0.1 pmol オーダーで還元糖の検出も可能となり、又グラジエント溶離を用い、オリゴ糖の高感度で効率の良い分析が可能である事が分かった。

7. 終わりに

筆者の HPLC 歴は 45 年以上になるが、その中でも検出への関わりが最も深く、又思い入れも強い。特に、誘導体化検出法については、数々のポストカラム誘導体化法の開発と装置化に携わり、更に光化学反応、固定化酵素、酸化還元などを利用した手法の研究も手掛けて来た。近年、MS が汎用化され、誘導体化検出法の影が幾分薄くなって来た感もするが、高感度で高い選択性と定量性が求められる分析において、誘導体化検出法が重要な手段である事には変わりはない。今後、一層の高感度化に加え、前処理や分離を不要化出来る様な究極の検出選択性を有する誘導体化法の開発など、未だ未だ興味は尽きない。

最後に、筆者の一連の誘導体化検出法に関する研究開発に対し、栄えある第 1 回「CERI クロマトグラフィー分析賞」を授かり、関係各位には心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) K. Kato, T. Kinoshita, Fluorometric Detection and Determination of Carbohydrates by High-Performance Liquid Chromatography Using Ethanolamine, *Anal. Biochem.*, **106**, 238-243 (1980).
- 2) S. Honda, Y. Matsuda, M. Takahashi, K. Kakehi, S. Ganno, Fluorometric Determination of Reducing Carbohydrates with 2-Cyanoacetamide and Application to Automated Analysis of Carbohydrates as Borate Complexes, *Anal. Chem.*, **52**, 1079-1082 (1980).
- 3) K. Mopper, R. Dawson, G. Liebezelt, H-P, Hansen, Borate Complex Ion Exchange Chromatography with Fluorometric Detection for Determination of Saccharides, *Anal. Biochem.*, **52**, 2018-2022 (1980).
- 4) K. Kato, F. Inuma, T. Kinoshita, Fluorometric Detection and Determination of Carbohydrates in Thin-layer Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography Using Taurine-Borate Reagent, *NIPPON KAGAKU KAISHI*, **10**, 1603-1608 (1982).
- 5) H. Mikami, Y. Ishida, Post-column Fluorometric Determination of Reducing Sugars in High Performance Liquid Chromatography Using Arginine, *BUNSEKI KAGAKU*, **32**, E207-E210 (1983).
- 6) 三上博久, 石田泰夫、高速液体クロマトグラフィーにおけるアルギニンを用いた糖類の蛍光検出、島津評論、**40**、63-66(1983)。
- 7) 三上博久、石田泰夫、糖類の分析法及びその装置、日本国特許第 1471088 号
- 8) N. Takahashi, T. Watanabe, K. Kojima, M. Ito, S. Shimizu, Analysis of Asparagine-linked Oligosaccharides from Plasma Membranes of Rat Normal Liver Ascites Hepatoma Cells, *Biochemistry International*, **8**, 639-645 (1984).
- 9) N. Takahashi, I. Ishii, H. Ishihara, M. Mori, S. Tejima, R. Jefferis, S. Endo, Y. Arata, Comparative Structural Study of the N-linked Oligosaccharides of Human Normal and Pathological Immunoglobulin G, *Biochemistry*, **26**, 1137-1144 (1987).
- 10) A. Yokota, T. Hasegawa, Analysis of Madurose, an Actinomycete Whole-cell Sugar, by HPLC after Enzymatic Treatment, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 445-449 (1988).
- 11) 高橋禮子 編著、生物化学実験法 23—糖蛋白質糖鎖研究法、学会出版センター(1989)。
- 12) H. Ogawa, M. Ueno, H. Uchibori, I. Matsumoto, N.Seno, Direct Carbohydrate Analysis of Glycoproteins Electroblotted onto Polyvinylidene Difluoride Membrane from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel, *Anal. Biochem.*, **190**, 165-169 (1990).
- 13) H. Tanaka, R. Hamada, A. Kondoh, K. Sakagami, Determination of Component

- Sugars in Soil Organic Matter by HPLC, *Zentralbl. Mikrobiol.*, **145**, 621-628 (1990).
- 14) S. Ebina, K. Matsubara, K. Nagayama, M. Yamaki, T. Gotoh, Carbohydrate Gluing, an Architectural Mechanism in the Supramolecular Structure of an Annelid Giant Hemoglobin, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7367-7371 (1995).
 - 15) S. Sawada, R. Ono, T. Sato, S. Suzuki, O. Arakawa, M. Kasai, Determination of Sugar Phosphates and Nucleotides Related to Photosynthetic Metabolism by High-performance Anion-exchange Liquid Chromatography with Fluorometric and Ultraviolet Detection, *Anal. Biochem.*, **314**, 63-69 (2003).
 - 16) 渡邊京子、平尾美子、三上博久、アルギニンを用いる糖類のポストカラム誘導体化法における高感度化、第 20 回クロマトグラフィー科学会議(2009)。
 - 17) 三上博久、石田泰夫、アルギニンを用いた高速液体クロマトグラフィーによる糖類の蛍光検出法—アルギニンの移動相の添加について、第 45 回分析化学討論会(1984)。
 - 18) 三上博久、石田泰夫、糖類の分析法及びその装置、日本国特許第 1985927 号
 - 19) 三上博久、石田泰夫、反応試薬含有移動相による糖類のポストカラム蛍光検出法—グラジエント法への適用、日本分析化学会第 34 年会(1985)。
 - 20) H. Mikami, Y. Ishida, Anion-exchange Chromatography of Sugars with Fluorometric Detection Using Mobile Phase Containing Arginine, *HPLC 1986* (1986).
 - 21) K. Watanabe, A. Yamamoto, Y. Watabe, H. Mikami, Post-column UV Photometric Determination of Carbohydrates by HPLC Using Arginine, *Pittcon 2006* (2006).
 - 22) 渡邊京子、三上博久、ポストカラム吸光誘導体化 HPLC 法による糖類の高感度分析、島津評論、**64**、197-204(2007)。
 - 23) K. Watanabe, T. Goto, H. Yamamoto, H. Mikami, Highly Sensitive Analysis of Carbohydrates by Hydrophilic Interaction Chromatography with Postcolumn Fluorometric Detection, *HPLC 2008 Kyoto* (2008).

<執筆略歴> 三上博久 (Hirohisa MIKAMI)

- ・ 1975 年株式会社島津製作所入社、HPLC の応用技術開発及びマーケティングを担当、HPLC マーケティングマネージャーとして約 3 年半米国駐在後、HPLC 応用技術開発グループマネージャー、2018 年 1 月より株式会社島津総合サービスリサーチセンターマネージャー。
- ・ 分析士資格：LC 分析士五段、LC/MS 分析士初段。



【2019 年度 CERI クロマトグラフィー分析賞受賞業績】

高速アミノ酸分析計及び超高速液体クロマトグラフに
関する研究と開発～3次元グラフの方法とその利用法／
**Research and Development on
High-Speed Amino Acid Analyzer and UHPLC:
Three-Dimensional Graphing Method and Its Usage**

伊藤正人／Masahito ITO

株式会社日立ハイテクサイエンス／Hitachi High-Tech Science Corporation

(Received May 20, 2021; Accepted May 26, 2021)

誌面の都合により、最近特に注目を集めている UHPLC に焦点を絞り高性能化について述べる。高速アミノ酸分析計に関しては、本誌本号の LC 科学遺産の紹介記事を参照頂ければ幸いである。

要旨

UHPLC の技術導入以降、流速を引き上げカラムの圧力損失を増大させて、高速化を図って来た。一方、カラムを伸ばし、高分離化する事も可能である。この場合も圧力損失は増大する傾向にある。こう見ると、分析システムの高圧化は、分離法の高速化にも高分離化にも寄与しそうである。本稿では、圧力損失と高速性、高分離性の 3 者の性能関係を一目で見ることが出来る 3 次元グラフについて述べた。それを等高線図で表す事により、最適流速により得られる分離性能から成る直線、及び上限圧力の境界線によって囲まれる三角領域が俯瞰出来た。その三角領域内の性能を獲得する流速とカラム長さの各設定条件は、どれも有用であると考えられた。結果として圧力を増加する事に成る各設定条件が、高速化又は高分離化の性能改良に対しどの程度寄与するのかについて、等高線図が示す丘陵地形の勾配に基づく圧力印加係数を規定する事により、圧力増加分の有効性を定量的に示す事が出来た。

キーワード ホールドアップタイム；理論段数；等高線図；三角領域；圧力印加係数

1. 高速性と高分離性

HPLC の P は Performance を表し、高速性と高分離性の両側面を統一する用語として性能を意味する。高速性と高分離性は相反する性能であり、高速性をホールドアップタイム t_0 (s) で、高分離性を理論段数 N で代表させると、 t_0 と N には何らかの相関関係が有りそうである。本稿では、性能の両面を可視化する事を目的として、高速性と高分離性が一目で俯瞰出来る 3 次元グラフの方法を紹介する。更に、その利用法についても詳しく説明する。

簡単の為に、周辺の要素を固定化する。即ち、議論をイソクラティック溶離に限定し、分離度 R の式 1 に現れる N 以外の構成因子を固定する¹⁾。

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

ここで、 α は分離係数、 k は保持係数である。 α と k を固定する事により、 R が N だけの関数に成り、 R 、 N 何れの変数を用いても分離性能を同等に考察する事が出来る。そもそも前者は 2 成分、後者は 1 成分を扱う指標である為、本稿では 1 成分の方が便利であると考えて、 N を分離性能の指標として採用する。因に α と k を固定するとは、分析種、移動相、固定相を固定化する事であって、必然的にカラムの温度も固定しなければならない。後ほど、3 次元グラフの軸の 1 つとして、圧力損失 ΔP (MPa) を採用する。性能改良の駆動源である ΔP を幾ら変化させても、 α や k は変化しない為、 R の代わりに N を用いても議論に影響が無い事が分かる。 N は、後述する通り線速度 u_0 (mm/s) を変数とする関数の形で表す事が出来、カラム長さ L (mm) に比例する良い性質も有している。又本稿では、カラム断面積も固定化し、流量に比例する線速度 u_0 を流速の代わりに使用する。以上、3 次元グラフを描く際に使用する変数群 ΔP , t_0 , N , u_0 及び L が揃った。

高速性は t_0 で代表させる。保持時間 t_R (s) は式 2 の様に表せて、 k は固定なので t_0 が高速性を示す時間の基準と成っている事が理解出来る。

$$t_R = t_0(k + 1) \quad (2)$$

流速 u_0 を設定すれば t_0 は式 3 より導かれる。

$$t_0 = \frac{L}{u_0} \quad (3)$$

ここで L はカラム長さの設計値を用いても良い。これで、高速性は t_0 で測る事として、性能評価の準備が出来た。

2. モデル計算

高分離性を代表する N を計算から求める為に、先ず理論段相当高さ H (μm) を導く van Deemter の式 4 を用いる²⁾。 H は u_0 の関数 $H(u_0)$ である。

$$H(u_0) = A + B \frac{1}{u_0} + C u_0 \quad (4)$$

ここで A , B , C は、実験的に測定される分析法に固有の係数である。本稿では、充填剤の粒子径 $2 \mu\text{m}$ の係数を用いて $A = 5.1 \mu\text{m}$, $B = 3.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, $C = 2.7 \times 10^{-4} \text{ s}$ を定数として

扱う³⁾。 N は、式 5 から得られ、 u_0 と L の 2 つの変数をもつ 2 変数関数 $N(u_0, L)$ と見做せる。

$$N(u_0, L) = \frac{L}{H(u_0)} \quad (5)$$

即ち、式 5 から u_0 と L を入力変数として、 N が出力される仕組みが理解出来る。この関数は、入力の底面座標 (u_0, L) から z -軸 N を出力する 3 次元グラフとして表示出来る⁴⁾。図 1 は粒子径 $2 \mu\text{m}$ のグラフであり、前述の係数を用いた。 L に比例して、 N が増加する様子が見られる。又、 u_0 に沿って N の極大値が存在し、それが稜線のような地形を生み出している事も分かる。これは、最適な流速 u_{opt} (式 6) の場合に、式 4 には最小値 H_{min} (式 7) が有る事として知られている。

$$u_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (6)$$

$$H_{\text{min}} = A + 2\sqrt{BC} \quad (7)$$

カラムの長さ L を最大限に有効活用する為には、 H_{min} に成っている事が望ましいと言う考えから最適流速 u_{opt} を設定する訳である。今、ここに有るカラムで最大の N を得る方法を Opt (Optimal linear velocity) 法と呼ぶ。

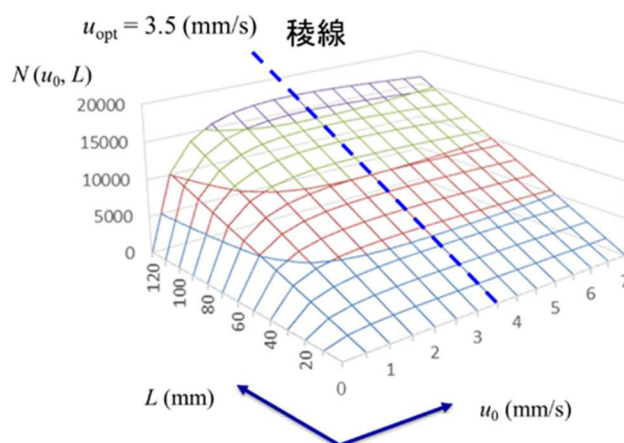


図 1 粒子径 $2 \mu\text{m}$ の $N(u_0, L)$ グラフ

分析種：安息香酸ブチル、移動相：60%アセトニトリル 40%水 (v/v)、カラム温度：40 °C、UV 検出：270 nm

3. 圧力、時間、理論段数を表す 3 次元グラフ

Opt 法には、1 つの限界が来る。即ち、 u_{opt} のまま N をどんどん大きくしようとして L を

伸ばして行くと、何れ圧力の上限に達してしまう。従って、圧力損失 ΔP は、高分離性を向上する為には考慮しなければならない因子である (式 8)。

$$\Delta P = \frac{\eta}{K_V} u_0 L \quad (8)$$

ここで、 η (Pa·s) は移動相の粘度、 K_V (m²) はカラム透過率である⁵⁾。本稿では、前述の係数が掲載された論文の値 $\eta = 0.001$ Pa·s、 $K_V = 7.0 \times 10^{-15}$ m² を使用する³⁾。

又、UHPLC の技術導入以降、 u_{opt} よりも速い流速を設定し、分析を高速化する方法が広く利用される様になった。2 μm など粒子径を小さくすると、式 4 において比較的 C 項の傾きが緩やかに成り、流速を速くしても H_{min} をほぼ維持する様な特性が得られる。上限圧力まで流速を引き上げる方法を、特に KPL (Kinetic Performance Limit) 法と呼ぶ⁶⁾。Opt 法と KPL 法は、それぞれ最適流速や上限圧力を一定の基準として利用する最適化法である。実際は、必ずしもその基準と成る分離条件で使用される訳ではない。その為、近年両方の基準を可視化し、それらの中間条件も考慮出来る最適化法が必要に成って来た。

前述の 5 つの変数群 ΔP 、 t_0 、 N 、 u_0 及び L の関係式が定式化出来たので、詳しく見る事が出来る。式 5 から、操作に関する変数 u_0 と L をそれぞれ自由に入力する事により、図 1 に表示される様に $N(u_0, L)$ が z -軸に出力される。この時に ΔP がどの程度の圧力なのかは不明であり、もしかしたら上限圧力を超えているかも知れない。しかし、底面座標 (u_0, L) が指定されているのだから、 ΔP は見えていないだけで式 8 から計算出来る。同様に、 t_0 も式 3 から計算出来る。結局、底面座標 (u_0, L) を指定すれば、 ΔP 、 t_0 及び N は何れも一義的に出力される為、高速性の t_0 、高分離性の N 、そして駆動源の ΔP を 3 つの軸にもつ 3 次元グラフが描ける (図 2)。

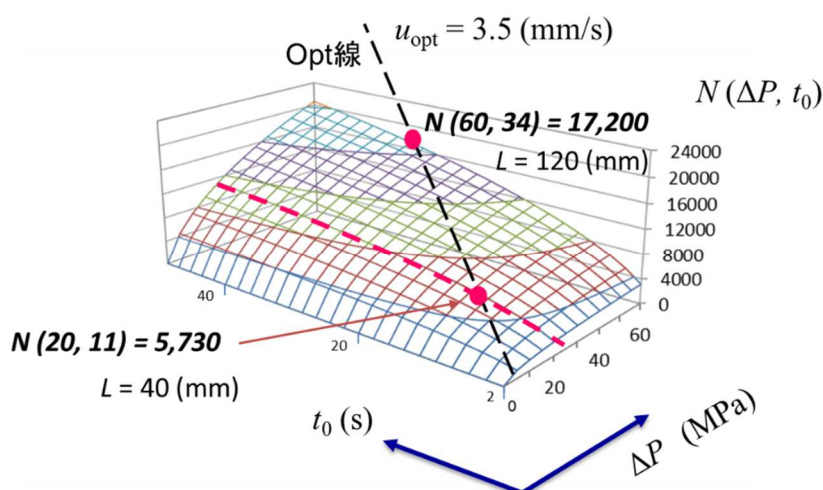


図 2 粒子径 2 μm の $N(\Delta P, t_0)$ グラフ

分離条件は図 1 と同じ。最適流速が Opt 線として現れ、 ΔP が 20 と 60 MPa の時、 N と t_0 がそれぞれ読み取れる。

u_{opt} 一定の条件で ΔP を増すと、 N の丘陵地形を登る。背景で増加する L に伴って、 ΔP も t_0 も N も全て比例している (式 8、式 3、式 5)。これが基本の Opt 法であり、流速一定の直線を Opt 線と呼ぶ。Opt 線上で N に 5,000 段を要請すれば、 ΔP を 20 MPa 掛ける事により $t_0 = 11$ s の高速性が得られると読む。更に、60 MPa まで圧力を掛けると、17,200 段まで理論段数が得られるが、時間も比例して 34 s 掛かってしまう訳である。

4. 等高線図の利用法 7)

図 2 の 3 次元グラフを上から見ると等高線図に成る (図 3(a))。前述の通り u_0 と L は、見えていないが、等高線図の背景で入力変数として作用している。

KPL 法では、例えば 30 MPa の上限圧力を固定し t_0 を振って、 N の丘陵地形を等高線図面内で垂直に登る。 t_0 に応じて N は増加するが、その増加は平方根に比例する様に緩やかである (図 3(b))。KPL 法では、その時間で得られる最大の N が見出せる。逆に言うと、要請する N が獲得出来る最短の t_0 が示されている。従って、圧力一定の条件の下で、 t_0 と N との或る種の相関関係を表していると見る事が出来る。背景には、それ相応の u_0 と L が設定されている事を忘れてはならない。

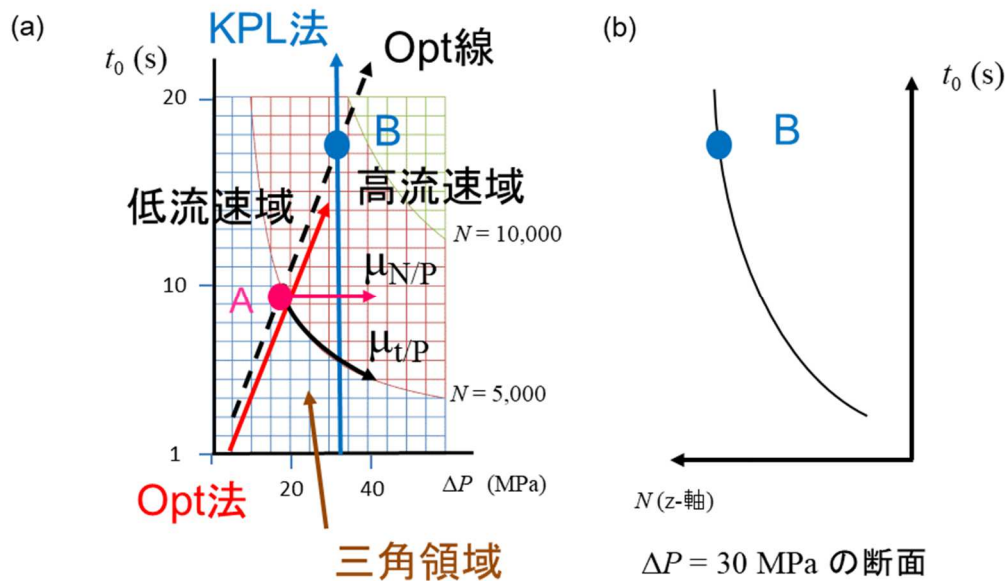


図 3 等高線図

- (a) : 図 2 の俯瞰図の位置付け。Opt 線の左右に其其低流速域と高流速域がある。Opt 法は Opt 線に沿って丘陵地形を登る事が出来、KPL 法は上限圧力上で最適化が図られる。等高線図面内で水平に丘陵地形を登る N の CPA $\mu_{N/P}$ と、5,000 段の等高線に沿う t_0 の CPA $\mu_{t/P}$ が其其図示されている。
- (b) : 等高線図を右側から見た 30 MPa での断面。 N は t_0 の平方根に概ね比例する。
- 図 3(a) の Opt 線上の点 A から出発して高速化が狙える。 $N = 5,000$ の等高線に沿って、

圧力を印加する事により高速性を改良するアプローチである。これとは別に、圧力印加により等高線図面内を水平方向へ丘陵地形を登る高分離化アプローチもある。先ず、圧力を印加して獲得出来る高速性の改良アプローチが、どの位有効かを測る指標が規定出来る。それを t_0 の圧力印加係数 CPA (Coefficient of Pressure-Application、 $\mu_{t/P}$) と呼ぶ。

$$\mu_{t/P}(u_0) = \frac{Au_0 + 2B}{Au_0 + 2Cu_0^2} \quad (9)$$

式 9 は、丘陵地形の勾配を、圧力増分に対する時間の減少分として計算している。特に、Opt 線上の勾配を 1.0 に規格化した。

図 3(a)に戻り、点 A から $N=5,000$ の等高線に沿って、徐々に ΔP を上げてみる。 $\mu_{t/P}$ を図 4(a)に示す。等高線に沿って、 $\mu_{t/P}$ が、Opt 線上の 1.00 から、40 MPa の 0.65、60 MPa の 0.54 に急激に減少して行く。この事は、 ΔP を印加する事が高速化アプローチとして、どの程度有効に寄与するかを見ている訳なので、 ΔP を上げ過ぎると然程有効では無い事が分かる。

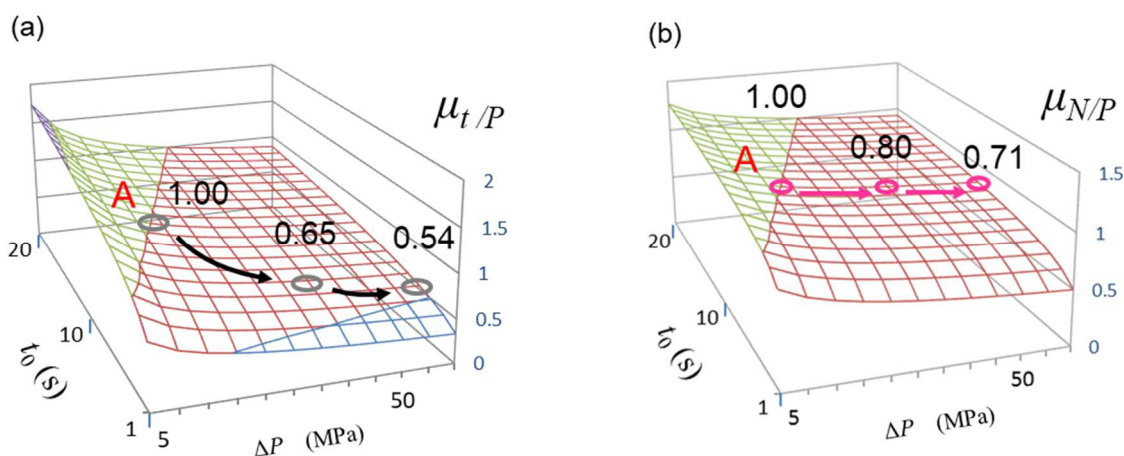


図 4 圧力印加係数 CPA

底面座標 ($\Delta P, t_0$) を等高線図と同じで、CPA を z-軸にして、その曲面を表す。

(a) : 高速化アプローチの有効性は t_0 の CPA $\mu_{t/P}$ から見出せる。

(b) : 高分離化は N の CPA $\mu_{N/P}$ から読み取れる。圧力を上昇するのであれば、 N を改良する事に利用する方が、有効性が高い事が伺える。

高分離化の有効性を示す N の CPA $\mu_{N/P}$ も同様に定義出来る (式 10)。

$$\mu_{N/P}(u_0) = \frac{Au_0 + 2B}{Au_0 + B + Cu_0^2} \quad (10)$$

図 4(b)に高分離アプローチの有効性を示す $\mu_{N/P}$ の曲面を表した。こちらは、図 3(a)の等高

線図面内で水平に丘陵地形を登るアプローチであり、 μ_{tP} に比べ圧力が有効に利用されている事が分かる。これは、高速化アプローチより高分離化する為に、単に流速を上げるだけでなく、 L も増加する分離条件に成っている事による。

このアプローチの差異は、 μ_{tP} の式 9 と μ_{NP} の式 10 を見比べると、分母の $2Cu_0^2$ 、又は $B+Cu_0^2$ の違いだけである。 B は定数なので、前者の方が流速の増加に対して 2 倍応答が大きく、結果として前者の $CPA_{\mu_{tP}}$ がより急速に減衰する事が理解出来る。

5. 纏め

分離法の最適化を図る為、圧力、時間、理論段数を軸にもつ 3 次元グラフが有用である。この底面座標である圧力と時間の背景では、流速とカラム長さがそれ相応に対応している。3 次元グラフは、最適な流速でカラム長さを調整する Opt 法と、上限圧力に固定し流速とカラム長さを連動させる KPL 法を同時に示す事が出来る。時間軸からは高速性を、理論段数軸からは高分離性が読み取れる。

更に、3 次元グラフは、等高線図で表す事が出来、俯瞰する事により Opt 法と KPL 法に囲まれる三角領域が存在する事に気が付く。三角領域は、Opt 法と KPL 法の間接的な高流速域であり、所謂 van Deemter の式の C 項が支配的である。最適流速の Opt 線から圧力の高い側へ離れて行く手法は、高速化又は高分離化のアプローチに区分出来る。分離条件を最適化するに当たり、圧力を増加する事が高速性の改良にどの程度寄与するのか。この疑問に答える為に丘陵地形の勾配を検討し、有効性を示す指標として圧力印加係数 CPA を導入した。高速性の評価には t_0 の $CPA_{\mu_{tP}}$ を、高分離性には N の $CPA_{\mu_{NP}}$ を規定し、其の有効性を比較した所、圧力を印加するなら高分離化のアプローチを採用する方が有効である事が判明した。

謝辞

名誉ある CERI クロマトグラフィー分析賞を戴き、中村委員長を始め関係者の皆様に厚く御礼申し上げる次第である。

引用文献

- 1) 長江徳和、LC と LC/MS の知恵、**1**, 8-27 (2020).
- 2) J J van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271-289 (1956).
- 3) M. Ito, K. Shimizu, K. Nakatani, *Anal. Sci.*, **34**, 137-142 (2018).
- 4) S.R. Groskreutz, S.G. Weber, *Anal. Chem.*, **88**, 11742-11749 (2016).
- 5) P. A. Bristow, J. H. Knox, *Chromatographia*, **10**, 279-289 (1977).
- 6) G. Desmet, D. Cabooter, K. Broeckhoven, *Anal. Chem.*, **87**, 8593-8602 (2015).
- 7) M. Ito, K. Shimizu, K. Nakatani, *J. Chromatogr.*, **1637**, 461778 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461778>.

<執筆略歴> 伊藤正人 (Masahito Matt ITO)

1982 年 筑波大学第一学群自然科学類卒業
物理学専攻

1984 年 同・大学院理工学研究科修士課程
修了 理学修士

1984 年 (株)日立製作所入社

2001 年 (株)日立ハイテク

2010～2013 年 LC 研究懇談会運営委員

2013 年 (株)日立ハイテクサイエンス、
現在に至る

2018 年 博士 (理学) 取得 (筑波大学)

2020 年 LC 分析士五段 取得



趣味：素粒子と場の物理学、科学哲学

【2020 年度 CERI クロマトグラフィー分析賞受賞業績】

分析ラボの効率向上の手法としての HPLC システムの高機能化／ HPLC system with advanced features for improving efficiency in analytical laboratory

熊谷浩樹／Hiroki KUMAGAI

アジレント・テクノロジー株式会社／Agilent Technologies Japan, Ltd

(Received May 1, 2021; Accepted May 12, 2021)

キーワード HPLC 装置；自動化；省力化；流路切換バルブ

1. 始めに

今日、HPLC は製薬、食品、環境、化学工業等多彩な分野で、研究、開発、品質管理、法規制対応等様々な目的で利用されている。HPLC が商品化されて以降、検出感度や分析速度の向上や適用分野の拡大が図られて来たが、HPLC の利用が拡大するに連れて、HPLC 分析を効率化するニーズが高まって来ている。HPLC 分析には、サンプルを HPLC システムに注入するだけでなく、サンプルの前処理、分析条件の開発・最適化等が含まれる為、HPLC 分析を行う分析ラボ全体の効率向上には HPLC システムの効率化が必須である。

本稿では、ラボ分析の効率化に寄与する高機能化 HPLC システムについて解説する。

2. バルブを用いた自動メソッド開発システムによる省力化¹⁾

HPLC の分離条件の開発は、HPLC の分析メソッドの良し悪しを決定付ける重要なステップである。分離条件開発は、主に分離カラムと移動相を変えながら最適な組み合わせを探索して行く作業であり、経験値が上がれば試行錯誤の回数が減り多少効率は上がるが、カラムの付け換えや移動相の交換など手間の掛かる作業である。そこで、流路切換バルブを活用してカラムや移動相の変更を自動化し、最適な分離条件を効率的に探索出来るシステムを開発した (Method Development Solution, MDS)。MDS は、グラジエントポンプ+溶媒切換バルブ、オートサンプラー、カラム恒温槽+カラム切換バルブ、検出器から構成されている (図 1)。取付けるバルブの種類や使用するカラムにもよるが、最大で 8 本のカラム、26 種類の有機溶媒や水溶液をセット出来る。カラム、移動相、グラジエント条件、カラム温度の探索はシーケンス分析として実行され、カラム切換時、及び移動相切換時のシステムのフラッシングや安定化は、シーケンスに自動的に組み込まれる。夜間でも無人で実行される為、分離条件開発の効率が大きく向上する。更に、UHPLC で分離条件の探

索を行い、6.で解説するメソッド移管法でコンベンショナル HPLC へ分析条件を移管する事で、既存システムを活かしつつ、ラボの効率を飛躍的に向上させる事が出来る。

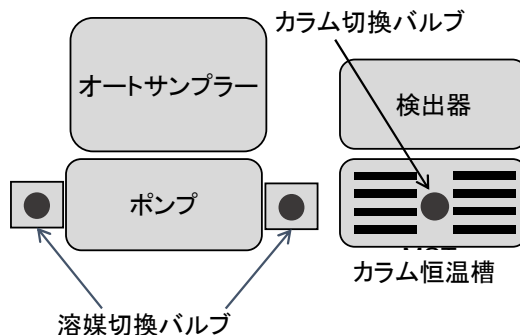


図 1 Method Development Solution の概略図

図 2 に MDS を用いてメトプロロールの代謝物の分離条件を探索した結果を示す。図 2 の様に、カラムと移動相の組み合わせごとに最終ピークの溶出時間と検出出来たピークの総数を分かり易く表示出来る為、最適な組み合わせを簡単に判断する事が出来る。

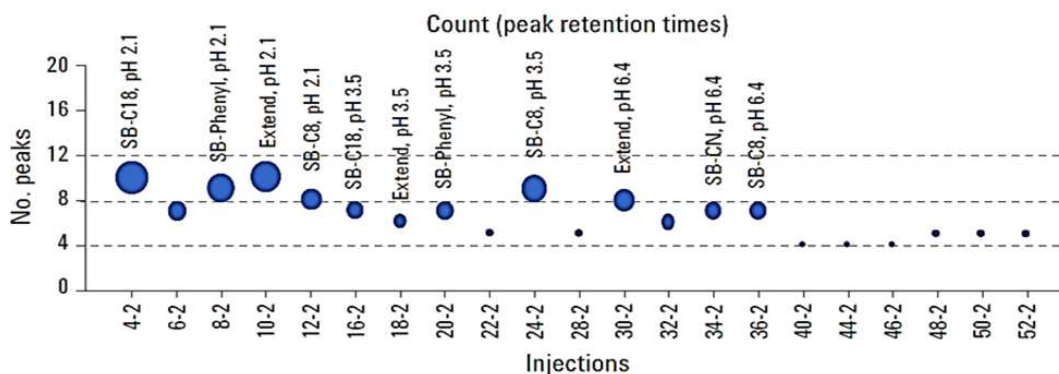


図 2 MDS によるメトプロロールの代謝物の分離条件探索の結果

3. バルブを用いたマルチメソッドシステムによる省力化²⁾

2. で紹介した MDS は、カラムと移動相を自動的に切り換える事が出来るので、分析メソッドの異なる複数の分析を 1 つの HPLC システムで連続して行うマルチメソッドシステムとして使用する事も可能である。表 1 に、酸化防止剤、合成甘味料、保存料をそれぞれ異なる分析メソッドでマルチメソッドシステムを用いて分析した時の再現性を示す。各分析で良好な再現性が得られた。図 3 は、飲料中の合成甘味料を分析した時のクロマトグラムである。ここで示した様に、カラムや移動相が異なる分析メソッドを 1 つの HPLC システムで連続して実施する事により、分析精度を維持しつつラボ分析の省力化と効率化を図る事が出来る。

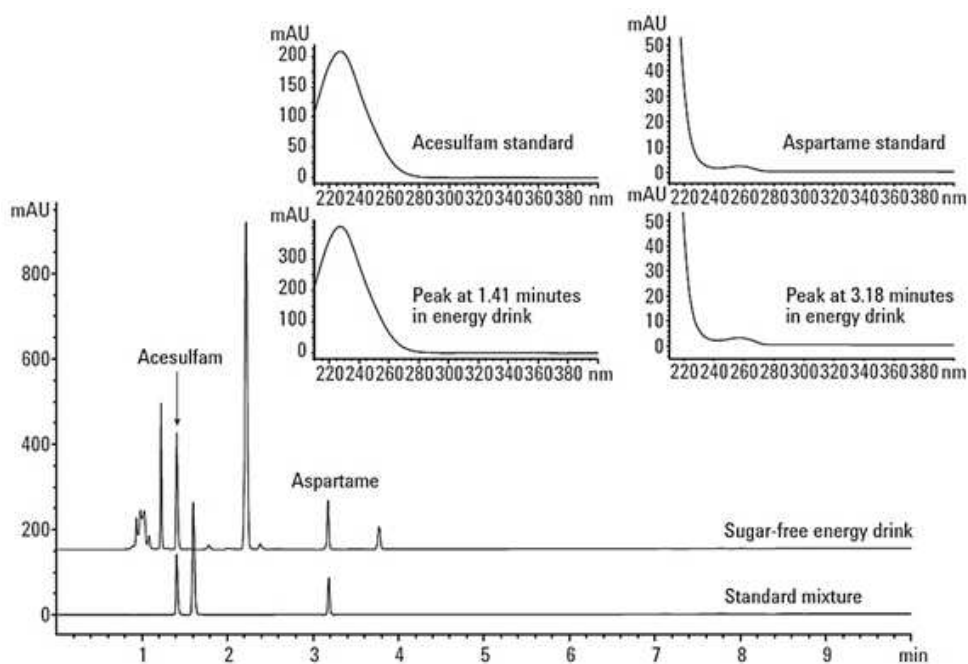


図 3 飲料中の合成甘味料の分析例

表 1 マルチメソッドシステムにおける分析の再現性

Compound	RT RSD (%)	Area RSD (%)
酸化防止剤		
没食子酸プロピル (PG)	0.09	0.92
4',5'-トリヒドロキシブチロフェノン (THBP)	0.07	0.67
t-ブチルヒドロキノン (TBHQ)	0.05	0.56
ブチルヒドロキシアニソール (BHA)	0.03	0.11
ブチルヒドロキシトルエン (BHT)	0.03	2.18
合成甘味料		
アセスルファム	0.10	0.08
サッカリン	0.14	0.09
アスパルテーム	0.12	0.08
保存料		
ソルビン酸	0.08	0.03
安息香酸	0.08	0.04
サリチル酸	0.07	0.18

4. バルブを用いたオンライン固相抽出システムによる省力化 3, 4)

クロマトグラフィーを用いる分析において、サンプル採取からデータ解析迄のワークフローの中で、全体の所要時間の 60 % 前後、分析結果の誤りの原因の 30 % はサンプル前処理に起因すると言われている。つまり、サンプル前処理はクロマトグラフィー分析におけるボトルネックとなっている。

固相抽出は、効率的なサンプル前処理法として様々なサンプルの前処理に広く利用されている。固相抽出の操作の大部分を自動化した装置が販売されているが、HPLC システムに組み込む事でサンプル前処理からデータ解析迄を自動化する事が出来る。図 4 は、オンライン固相抽出システムの概略図である。表 2 はオンライン固相抽出システムを用いて、河川水中の医薬品を LC/MS/MS で分析した結果である。再現性、回収率、直線性の何れも良好な結果が得られている。

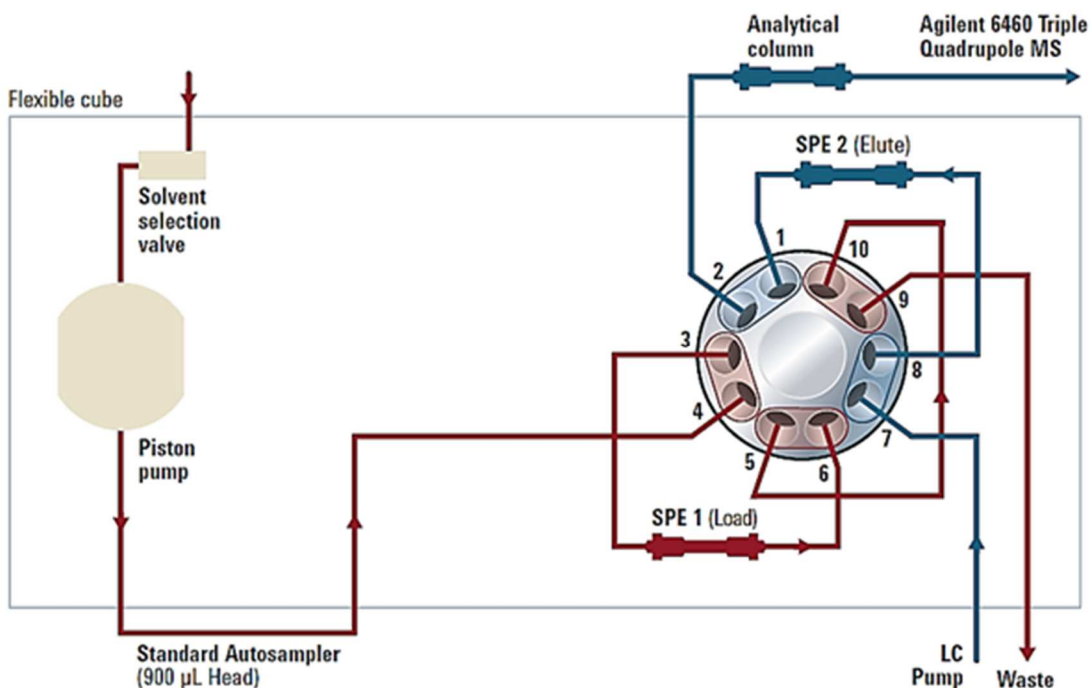


図 4 オンライン固相抽出システムの概略図

表 2 オンライン固相抽出システムを用いた河川水中の医薬品の分析結果

Compound	RT (min)	RSD (%), RT	RSD (%), Area	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Linearity, R ²	Recovery (%)
Vancomycin	10.25	0.1	4.15	2	5	0.9991	76
Trimethoprim	11.37	0.05	2.31	0.5	1	0.9995	97
Ormetoprim	11.88	0.03	2.95	0.5	1	0.9991	95
Cefotaxime	12.27	0.14	5.66	2	5	0.9994	99
Tetracycline	12.44	0.07	5.64	2	5	0.9993	41
Ornidazole	13.01	0.07	1.45	1	2	0.9998	94
Chlorotetracycline	14.31	0.1	12.6	2	5	0.995	45
Sulfamethoxazole	15.11	0.07	1.33	2	5	0.9994	99
Oxolinic acid	16.08	0.02	4.42	2	5	0.9992	81
Erythromycin	16.79	0.07	1.66	0.5	1	0.9991	106
Tylosin	17.55	0.09	7.96	5	10	0.999	69
Nalidixic acid	18.19	0.03	2.99	0.5	1	0.9994	109
Flumequine	18.66	0.04	3.31	1	2	0.9998	103

5. 2次元 LC による高分解能分離、LC/MS 向け脱塩システム 5-15)

2次元 LC (2D-LC) は、バルブを介して2つの分離系を接続する事により、ピークキャパシティーを増大させ分離能力を高めたシステムである。2D-LC システムの概略図を図 5 に示す。

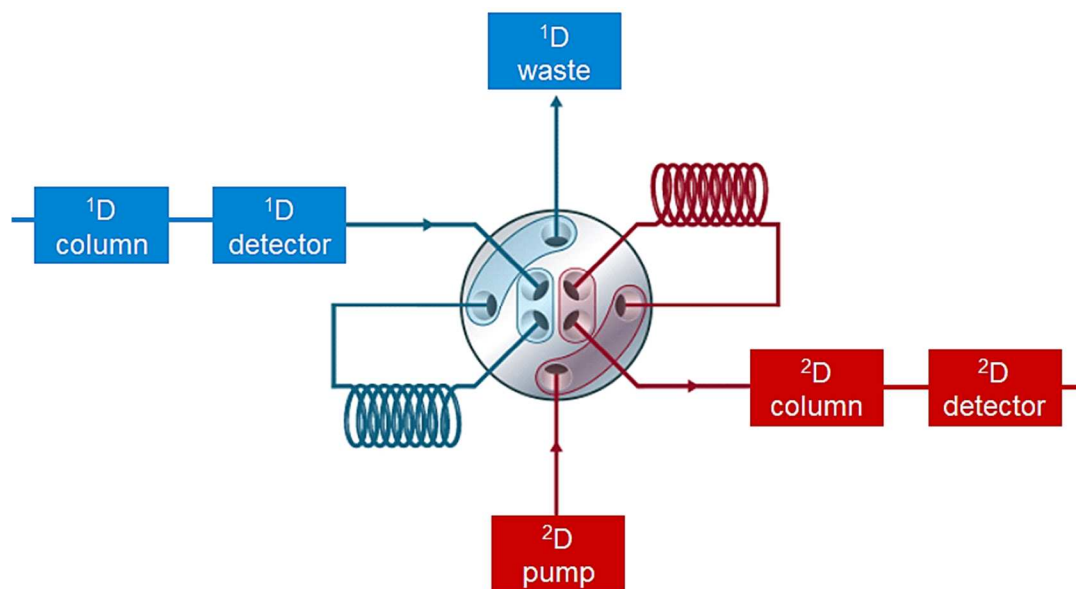


図 5 2D-LC システムの概略図

イオン交換 - 逆相、HILIC - 逆相、逆相 - キラル分離など種々の組み合わせで高分離分析を実現出来、天然物中に含まれる化合物の網羅的解析、タンパク質の特性解析、医薬品の不純物分析、合成高分子の特性解等、様々なアプリケーションに応用されている。一般に、2D-LC の目的は 1 次元目の分離系では分離出来ない化合物同士を 2 次元目で分離する事であるが、選択性の異なるクロマトグラフィーからは異なる化学的情報を得る事が出来る為、サンプルの特性解析にも有用である。例えば、サイズ排除とグラジエントポリマー溶離クロマトグラフィーの 2D-LC では、合成ポリマーの末端基の違いや共重合体の組成情報（モノマーの種類や組成比等）と分子量情報を、1 回の分析で得る事が可能である。2D-LC には、1 次元目 (1D) の溶出液を全て 2 次元目 (2D) に導入するコンプリヘンシブ 2D-LC (LC×LC) と、1D で検出された特定のピークのみを 2D に導入するハートカット 2D-LC (LC-LC) がある。LC×LC はサンプル中の化合物を網羅的に俯瞰する事が出来るが、2D を超高速分離条件にする必要があり分離度に制限が生じる。一方、LC-LC では、1D の特定の部分のみを 2D に導入する為 2D の分離条件の制限が少ないものの、2D に導入出来るフラクション数に制限があり、得られる情報量が少なくなる。この問題を解決する手段として、2D へ導入するフラクションを貯留するループ数を増やしたシステム（マルチハートカット (MHC) 2D-LC、mLC-LC) を開発した。mLC-LC では、数多くのピークを 2D で精密に分離出来るので、多くの情報を 1 回の分析で得る事が出来る。又、1D の特定の範囲を連続的にループに貯留し 2D で精密に分離するハイレゾリューションサンプリング (HRS) 2D-LC (selective LC×LC、sLC×LC と呼ばれる) も可能である。mLC-LC の流路構成を図 6 に示す。

2D-LC では、1D と 2D の分離条件の直交性（分離条件の選択性の差異）を、なるべく大きくする様に分離条件を設定する。直交性を大きくするには、一般に異なる分離モードを組み合わせる事が有効であるが、それぞれの分離モードで使用する移動相の適合性を考慮しないと、2D の分離度が著しく低下する場合がある。移動相の不適合性を解決する手法として、オンラインでループ内の 1D のフラクションを 2D の移動相で希釈しながら 2D へ導入する手法（active solvent modulation、ASM）を開発した。ASM に使用するバルブを図 7 に、ASM によるピーク形状の改善例を図 8 に示す。

2D-LC は、不揮発性移動相を用いた HPLC 分析を、移動相条件を変更せずに LC/MS に接続する脱塩システムにも有効である。

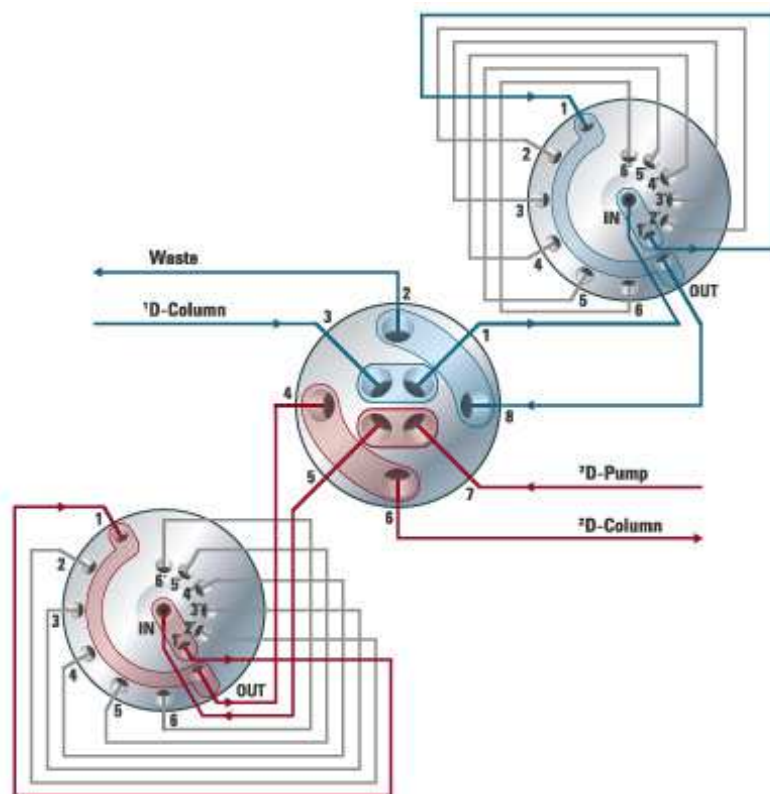


図 6 MHC 2D-LC の流路図

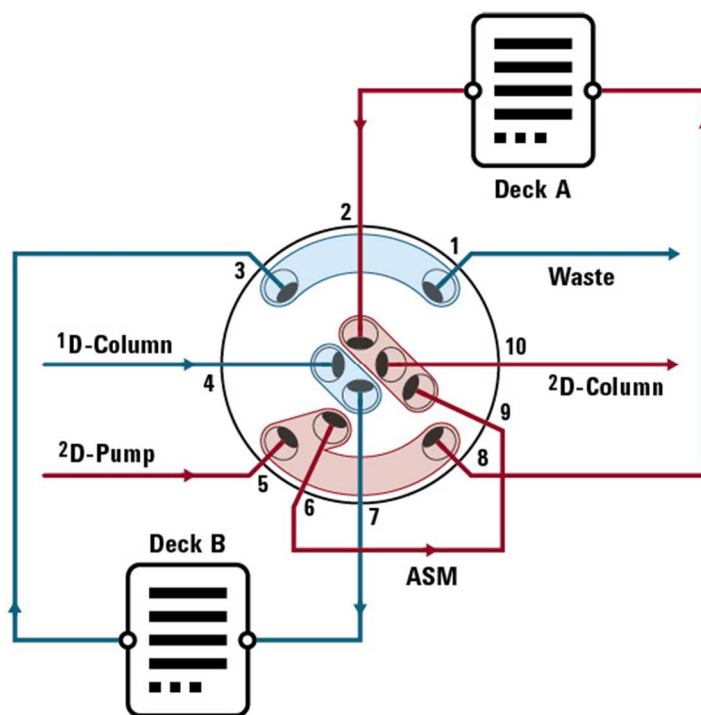


図 7 ASM バルブの構造

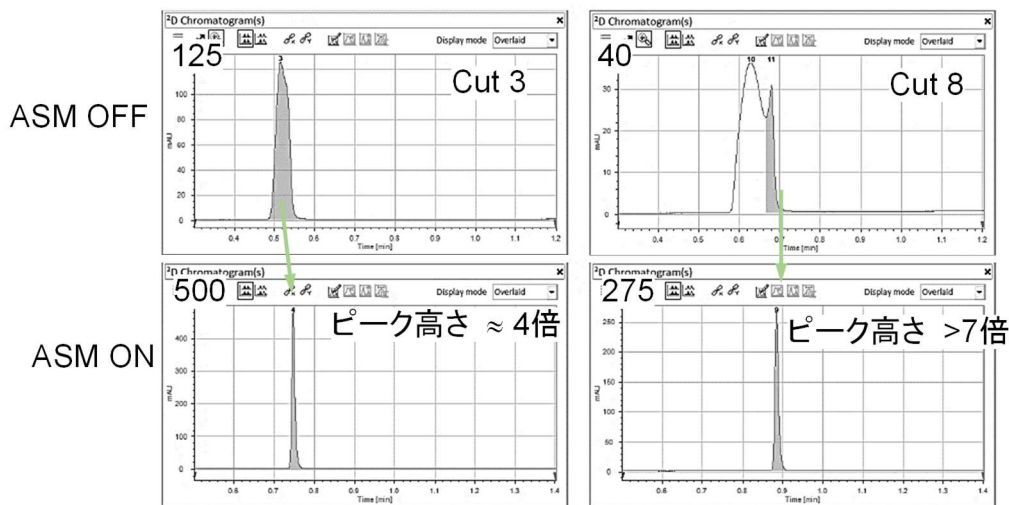


図 8 ASM によるピーク形状の改善例

6. システムエミュレーションによる簡易かつ確実なメソッド移管 16, 17)

ラボ内、或いはラボ間で分析メソッドを移管する際、同一の分析結果が得られない事はしばしば発生する。この原因は主に、分析メソッドの頑健性の問題と HPLC システム固有の特性の差異に分けられる。HPLC システム固有の特性の差異には、ドゥエルボリュームやカラム外のデッドボリューム等があるが、特にグラジエント溶離におけるドゥエルボリュームの差異は大きな問題となる。HPLC システム間でドゥエルボリューム差異があり、ドゥエルボリュームの小さいシステムへ分析メソッド移管する場合は、不足しているボリュームを物理的に追加する、或いはグラジエントプログラムに初期移動相のイソクラティックホールドを追加する手法が知られている。しかし、これらの手法では実際のグラジエントプロフィールに差異は補正出来ない(図9)。メソッド移管をより完全に近い形で行う為には、グラジエントプロフィールの補正が必要であるが容易ではない。

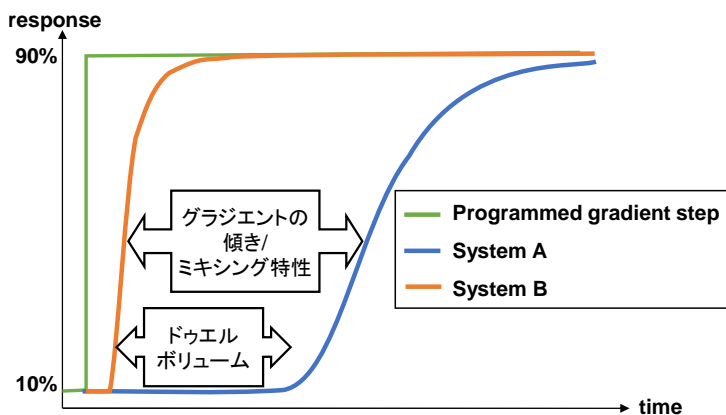


図 9 HPLC システム間のグラジエントプロフィールの差異

そこで、ドゥエルボリュームとグラジエントプロフィールを HPLC システム固有の特性として数値化し、メソッド移管元の HPLC システムをエミュレーションする手法 (intelligent system emulation、technology、ISET) を開発した。ISET では、メソッド移管元の HPLC システムを選択するだけで移管先の HPLC システムでクロマトグラムを再現する事が出来る為、メソッド移管に関わる手間を大幅に削減する事が出来る。ISET によるメソッド移管の例を図 10 に示す。

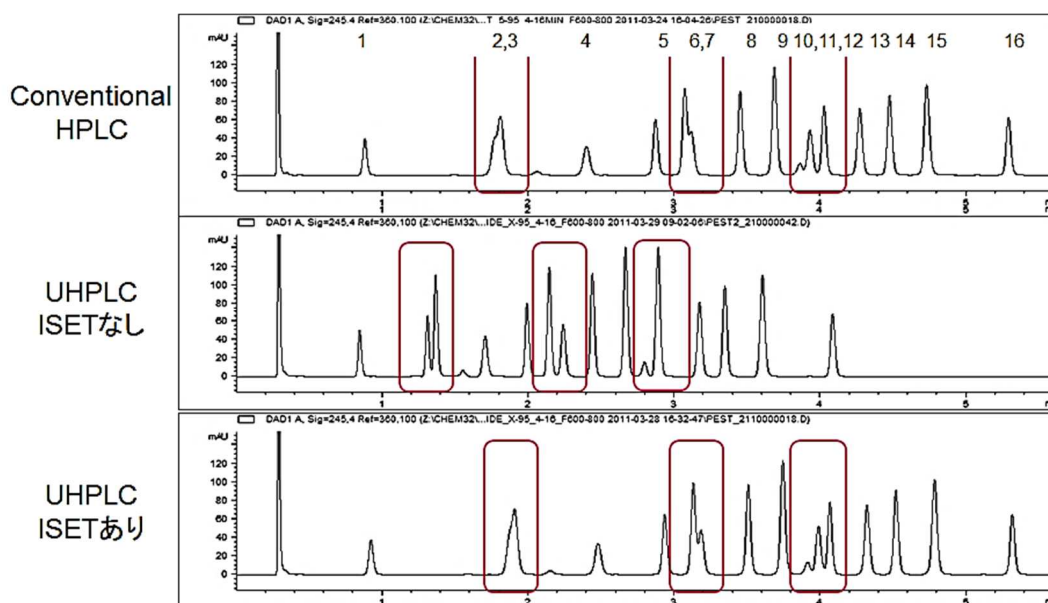


図 10 ISET を利用したメソッド移管の例

7. 検出器のリニアリティーレンジ拡大による分析時間の短縮 18, 19)

紫外可視吸光度検出器 (UV-VIS 検出器) は HPLC で最も広く利用されている。検出感度の向上によって微量不純物の分析にも利用されているが、測定対象となる不純物の濃度の低下に伴って、不純物と主成分の同時定量が難しくなっている。これは、不純物を定量出来る様に注入量を設定すると、主成分のシグナルが検出器のリニアリティーレンジを超えてしまう事による。この様な場合は、注入量或いはサンプル濃度を変えて 2 回注入する必要がある。

そこで、光路長の異なるセルをセットした 2 台のフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を直列に接続し、2 台の PDA 検出器のシグナルを演算処理する事でリニアリティーレンジを大幅に拡大する手法 (high dynamic range、HDR) を開発した。一般的な PDA 検出器のリニアリティーレンジは 2 AU 前後だが、HDR を用いると 6 AU に達する。その結果、主成分と微量不純物を 1 回の注入で定量する事が可能となり、分析時間の短縮を図る事が出来る (図 11)。

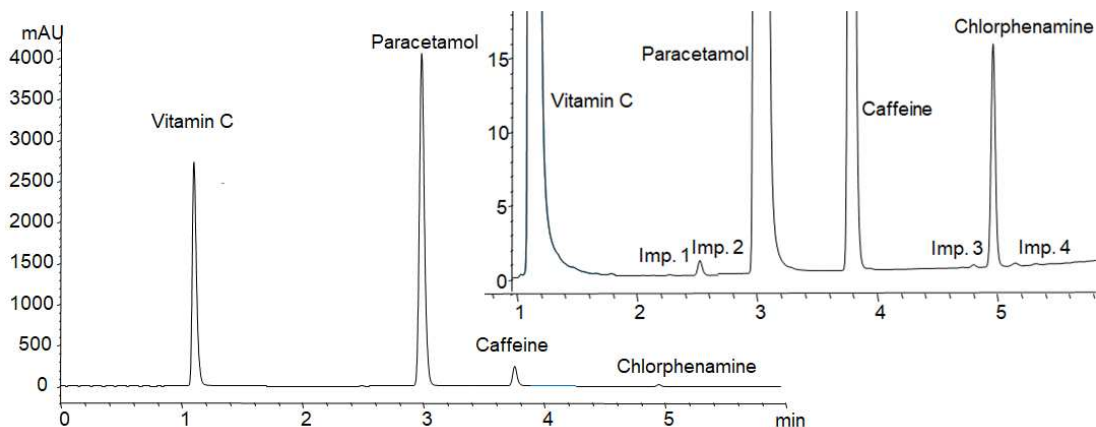


図 11 HDR を用いた主成分と微量不純物の分析例

最後に、「分析ラボの効率向上の手法としての HPLC システムの高機能化」を 2020 年 CERI クロマトグラフィー分析賞に選んで頂いた関係各位に深謝する。

引用文献

- 1) 熊谷浩樹、第 287 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2015).
- 2) 熊谷浩樹、見勢牧男、第 77 回分析化学討論会講演要旨集, 141 (2017).
- 3) 熊谷浩樹、第 19 回 LC テクノプラザ講演要旨集, 57-58 (2014).
- 4) 熊谷浩樹、第 280 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2014).
- 5) 熊谷浩樹、見勢牧男、内藤厚子、第 20 回 LC テクノプラザ講演要旨集, 25 (2015).
- 6) 熊谷浩樹、第 297 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2016).
- 7) 熊谷浩樹、第 298 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2016).
- 8) 熊谷浩樹、第 307 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2017).
- 9) 熊谷浩樹、第 22 回 LC テクノプラザ講演要旨集、p. 5 (2017).
- 10) 熊谷浩樹、野田莉帆、野上知花、澤田浩和、第 23 回高分子分析討論会講演要旨集, pp. 57-58 (2018).
- 11) 熊谷浩樹、第 330 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2018).
- 12) 熊谷浩樹、林慶子、澤田浩和、日本分析化学会第 67 年会講演要旨集、p. 372 (2018).
- 13) 熊谷浩樹、野田莉帆、野上知花、澤田浩和、第 24 回 LC&LC/MS テクノプラザ講演要旨集、p. 1 (2019).
- 14) 熊谷浩樹、野上知花、澤田浩和、第 24 回高分子分析討論会講演要旨集, pp. 165-166 (2019).
- 15) 熊谷浩樹、澤田浩和、*分析化学*, **69**, pp. 135-139 (2010).

- 16) 熊谷浩樹、第 272 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2014).
- 17) 熊谷浩樹、第 287 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2015).
- 18) 熊谷浩樹、内藤厚子、中村慶子、見勢牧男、日本分析化学会第 61 年会講演要旨集、p. 239 (2012).
- 19) 熊谷浩樹、第 274 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2014).

<執筆者略歴> 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)
- ・ 分析士資格 : LC 分析士四段、LC/MS 分析士二段
- ・ 現在、アジレント・テクノロジー株式会社 LC・LC/MS
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



【2020 年液体クロマトグラフィー努力賞受賞業績】

メタルフリーカラムの開発とその応用／

Development of Metal-Free Columns and Their Applications

坂牧 寛／Hiroshi SAKAMAKI

一般財団法人化学物質評価研究機構／

Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

(Received May 25, 2021; Accepted May 28, 2021)

キーワード メタルフリーカラム、LC/MS/MS、キャリアオーバー

1. 始めに

液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) や液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いた生体試料の微量分析が広く行われている。しかし、一部の化合物、特にペプチドや低分子のリン酸化化合物の分析では、配管やバルブ等の金属材料と相互作用し、それらのピークが大きくテーリングする。これらの対策として、移動相の工夫、システムのメタルフリー化や洗浄・マスキング等が講じられている。例えば、キャピラリー LC ではフリットを使用しないモノリスカラムやフューズドシリカキャピラリーカラムによりメタルフリー化が図られている。一方、一般的に使用されるセミマイクロ LC/MS(MS) では、高圧のメタルフリー LC 装置が発売されているが、それに対応する ODS 等の逆相のメタルフリーのカラムは少ない。又、LC/MS(MS) を用いてクロマトグラフィー管やフリット等のカラムハードウェアの評価もされていない。そこで本稿では、2010 年当時入手可能な 2 種のクロマトグラフィー管 (ステンレス、ガラスライニングステンレス) と 4 種のフリット (ステンレス、チタン、ポリエーテルエーテルケトン、ポリマー) を評価した。更にその応用例として、DNA を構成するデオキシリボヌクレオチドの定量、透析患者の骨粗鬆症治療薬であるアレンドロン酸の定量及びリン脂質の高感度分析法を示した。

2. メタルフリーカラムの開発

2.1 ガラスライニング管とポリマーフリットを用いたメタルフリーカラムの開発¹⁾

ステンレス製のクロマトグラフィー管 (S-S カラム) とホウケイ酸ガラスが内面にコーティングしてあるガラスライニングステンレス管 (GL-S カラム) にステンレスフリットを装着し、L-column2 ODS 5 μm を高圧充填し、カラムを作製した。クロマトグラフィー管の比較として、500 $\mu\text{g/L}$ のアデノシンリン酸 (AMP) (注入量: 5 μL)、10 mg/L のフ

ラビンアデノシンジヌクレオチド (FAD) (注入量: 5 μL) 及び 10 mg/L の炭素鎖が 17 のリゾフォスファチジン酸 (LPA) (注入量: 1 μL) を LC/MS で分析し、そのピークの *S/N* を表 1 に示した。GL-S カラムは *S/N* 及びテーリング係数 (*TF*) 共最も良い値を示した。

表 1 クロマトグラフィー管がピークに及ぼす影響

カラム	AMP		FAD		LPA	
	<i>S/N</i>	<i>TF</i>	<i>S/N</i>	<i>TF</i>	<i>S/N</i>	<i>TF</i>
S-S カラム	91	3.88	4	-	60	2.56
GL-S カラム	181	2.34	24	7.15	104	2.21

これは移動相中の金属イオンとの相互作用、若しくはカラム管内面に存在する金属との相互作用が減少した事が原因と仮説を立てた。そこで、先ず、カラムから溶出した 0.1 % ギ酸移動相に含まれる金属イオンの濃度を ICP-MS で定量した。GL-S カラムから溶出した移動相に含まれる最も多いイオンは Fe イオンで、その濃度は 1.8 $\mu\text{g/L}$ であった。他のステンレスを構成している金属は、サブ $\mu\text{g/L}$ オーダー以下の濃度であった。この濃度の Fe イオンがリン酸化化合物と相互作用し、分析結果に影響を及ぼすか否かを確認する為、LPA と Fe イオンの金属標準液を混合したものを試料として LC/MS で分析した。その結果を図 1 に示す。

10 $\mu\text{g/L}$ 以下の濃度の Fe イオンでは LPA のピーク形状は変わらなかったが、200 $\mu\text{g/L}$ の Fe イオンではピークテーリングとブロードピークが観測された。これにより、移動相中の Fe イオンの濃度が 10 $\mu\text{g/L}$ 以下では Fe イオンの影響を受けない事が確認された。ステンレスは Fe を 50 % 以上含んでおり、ホウケイ酸ガラスは 2 % の Al を含んでいる。

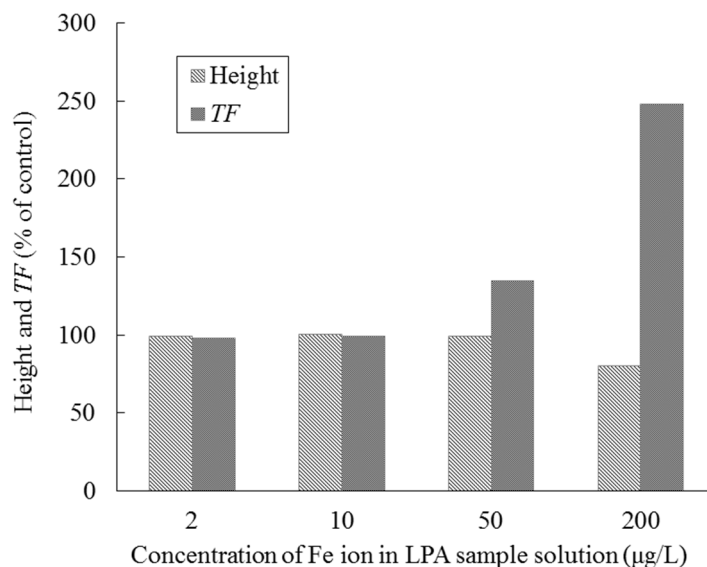


図 1 サンプル溶媒中の Fe イオン濃度が LPA に及ぼす影響

リン酸化化合物との錯安定度係数は、Al イオンより Fe イオンの方が大きいので吸着が起こり易く、その結果、各種パラメーターが悪化したと考えられる。これにより、カラムを含む流路内の Fe イオンとの相互作用によって強度や *S/N* の低下が起こったと結論付けた。

次に、ガラスライニングステンレス管に材質の異なる 4 つのフリットを使用したカラム (ステンレス: GL-S カラム、チタン: GL-Ti カラム、ポリエーテルエーテルケトン: GL-PEEK カラム、ポリマー: メタルフリーカラム) を作製し、フリットの比較としてクロマトグラフィー管と同じ試料を LC/MS で分析し評価した。その結果を表 2 に示す。

表 2 フリットがピークに及ぼす影響

カラム	AMP		FAD		LPA	
	<i>S/N</i>	<i>TF</i>	<i>S/N</i>	<i>TF</i>	<i>S/N</i>	<i>TF</i>
GL-S カラム	181	2.34	24	7.15	104	2.21
GL-Ti カラム	686	-	46	6.11	442	1.55
GL-PEEK カラム	792	1.57	551	2.76	368	2.02
メタルフリーカラム	825	1.1	701	2.59	696	1.49

メタルフリーカラムの *S/N* 及び *TF* が最も良い値を示した。メタルフリーカラムは金属を含まない為、リン酸化化合物との吸着が発生しなかった。又、GL-PEEK カラムもメタルフリーカラム同様に金属が含まれていないが、両者に明確な違いが見られた。特に、LPA の *S/N* の差は大きい。これは、フリットと化合物の極性の差の違いの影響と推測される。3 種の化合物の中で最も極性の高い AMP の *S/N* の差が小さく、極性の低い LPA の *S/N* の差が大きかった。又、PEEK とポリマーフリットの極性は、ポリマーフリットの方が低い。つまり、試料とフリットの極性に近いと疎水性相互作用により吸着が発生し、GL-PEEK カラムの *S/N* が低く成ったと考えられる。このガラスライニングステンレス管とポリマーフリットを用いたカラムが、L-column2 メタルフリーカラムである。

2.2 メタルフリーカラムのキャリーオーバーの低減²⁾

3 種のカラム (S-S カラム、GL-PEEK カラム、メタルフリーカラム) を 1 mg/L のフモニシン (フモニシン B₁: FB₁、フモニシン B₂: FB₂、フモニシン B₃: FB₃) (注入量: 3 µL) 及び 500 µmol/L のリン酸化ペプチド (NVPLYpK: T18p、HLADLSpK: T19p) (注入量: 2 µL) のキャリーオーバー (CO) により評価した。オートサンプラーの注入動作の CO を除外し、カラム内の CO を評価する為、重複溶媒グラジエント法を用いた。フモニシン及びリン酸化ペプチドの結果を表 3 に示した。

表 3 カラム材料がフモニシンとリン酸化ペプチドの CO(%) に及ぼす影響

カラム	FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB ₂ +FB ₃	T18p	T19p
S-S カラム	1.90	-	-	2.76	1.31	4.28
GL-PEEK カラム	0.18	0.56	0.36	0.49	0.24	0.67
メタルフリーカラム	0.20	0.68	0.47	0.67	0.21	0.42

一般的な S-S カラムに比べて、メタルフリーカラムはリン酸化ペプチド及びフモニシンの CO を減少した。メタルフリーカラムの CO ピークは、対称性の良いピーク形状をしていた。これは、オートサンプラーの出口からカラムの入口迄の流路の CO であると考えられる。一方、S-S カラムの CO ピークはリーディングが見られた為、カラム内での CO と流路の合算したものと考えられた。仮に、メタルフリーカラム内での CO が発生していないとするなら、S-S カラムの FB₁、T18p 及び T19p の CO は其其 1.7%、1.1%及び 3.9% と見積もる事が出来る。

3. メタルフリーカラムの応用

3.1 LC/MS を用いたデオキシリボヌクレオチドの定量

LC/MS 及びメタルフリーカラムを用いたデオキシリボヌクレオチドリン酸 (dNMP) の分析の為の高感度メソッドを開発した。メタルフリーカラムは、dNMP のリン酸基がカラムの金属部分と相互作用すると言う問題を解決すると期待される。分析条件の最適化後、図 2 にその 900 ng/g の濃度の 4 種 dNMP の抽出イオンクロマトグラムを示す。dNMP の検出下限 (LOD) は、5.4 ng/g~6.3 ng/g であった。これらの値は、既報の HPLC-ICP-MS や μ HPLC-ICP-MS での定量法と比較して LOD の 10 倍低かった。この方法を、塩基組成の決定と 20-mer オリゴヌクレオチドの定量に適用した所、14.5 ng という非常に少量のサンプルから、基本組成を決定する事が出来、理論値と一致した³⁾。

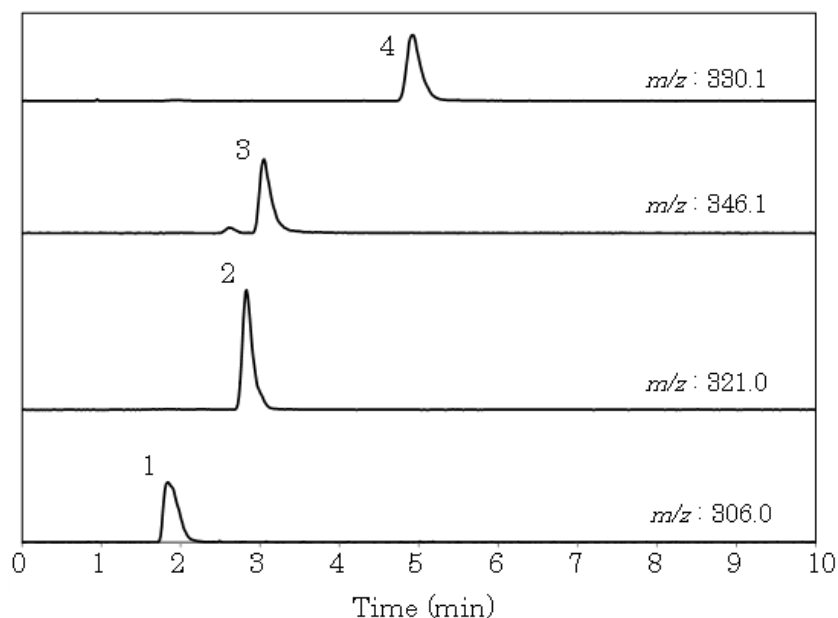


図 2 4 種 dNMP の抽出イオンクロマトグラム

3.2 アレンドロン酸の高感度分析

トリメチルシリルジアズメタンによる誘導体化と L-column2 メタルフリーカラムを用いた LC/MS/MS によるヒト血漿及び透析液中のアレンドロン酸の高感度分析メソッドを

開発した。その抽出イオンクロマトグラムを図 3 に示す。誘導体化されたアレンドロン酸及び内標準であるアレンドロン酸- d_6 (IS) は 1 分以内に明確なピークが観察され、直線性は血漿及び透析液で其其 2.0~100 ng/0.5 mL 及び 1.0~100 ng/0.5 mL の範囲内で良好な結果を示した。検出下限は、血漿及び透析液で其其 1.0 ng/0.5 mL 及び 0.5 ng/0.5 mL であった。血漿及び透析液の抽出効率、其其 41.1~51.2% 及び 63.6~73.4% であり、変動係数 (CV) は 8.5% 以下であった⁴⁾。

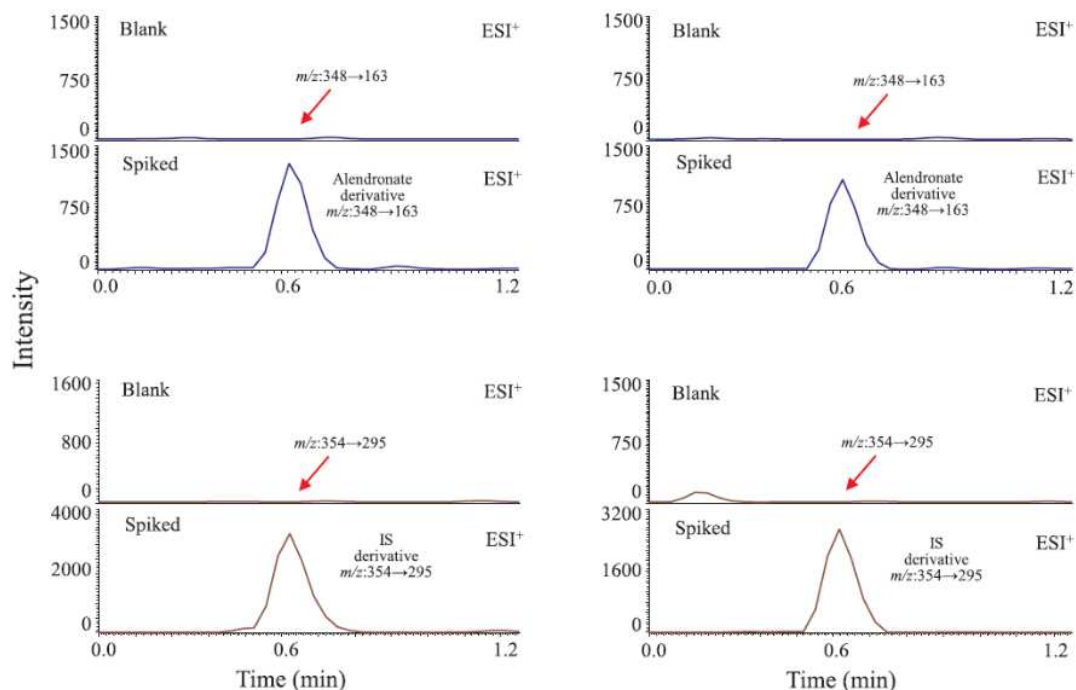


図 3 トリメチルシリルジアゾメタン化アレンドロン酸の抽出イオンクロマトグラム
(右上) 血漿、(左上) 透析液、(右下) 血漿 IS、(左下) 透析液 IS

3.3 リン脂質の高感度分析

LC/MS において、一般的なギ酸等を含有した移動相を用いると、リン脂質は吸着によりピークテーリングを起こし、場合によっては検出されない事がある。L-column2 メタルフリーカラム及びバイオイナートな HPLC システムを使用する事により、リン酸化された化合物の吸着を抑え、ピーク形状の改善や感度の向上が認められる事を見出した。更に、揮発性のキレート剤を添加した移動相を使用する事により、ピーク形状や感度が改善する事が確認された。ステンレス製カラムではホスファチジン酸 (PA) やホスファチジルセリン (PS) が大きくテーリングしていたのに対し、メタルフリーカラムでは良好なピーク形状で溶出し、PA 及び PS のピーク強度は其其 7.9 倍、3.1 倍向上した。揮発性のキレート剤を移動相に無添加から 2% まで添加して分析した所、1% 添加時に無添加と比べ PA 及び PS のピーク強度は其其 2.7 倍、2.8 倍向上した。

4. 終わりに

本稿ではメタルフリーカラムの開発及び評価、並びにこれらに係るアプリケーションの一部を示した。メタルフリーカラムを使用する事により、金属と相互作用し易い化合物の感度の向上、ピーク形状の改善及びキャリーオーバーの低減等の大きな効果が得られた。この開発の成果が L-column2 メタルフリーカラムである。今後は HPLC 及びカラムが更に進化し、メタルフリーカラムが広く普及する事を切に願う。

5. 謝辞

本稿は、(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の 2020 年液体クロマトグラフィー努力賞の受賞講演に基づき、纏めたものである。この様な栄えある賞を頂き、これ迄ご指導下さった皆様並び私の勤めている (一財) 化学物質評価研究機構の皆様がこの場を借りて深く感謝申し上げたい。

引用文献

- 1) H. Sakamaki, T. Uchida, L. W. Lim, T. Takeuchi, *J. Chromatogr. A*, **1381**, 125–131 (2015).
- 2) H. Sakamaki, T. Uchida, L. W. Lim, T. Takeuchi, *Anal. Sci.*, **31**, 91-97(2015).
- 3) S. Shibayama, H. Sakamaki, T. Yamazaki, A. Takatsu, *J. Chromatogr. A*, **1406**, 210–214(2015).
- 4) M. Yamada, Xiao-Pen Lee, M. Fujishiro, K. Iseri, M. Watanabe, H. Sakamaki, N. Uchida, T. Matsuyama, T. Kumazawa, H. Takahashi, A. Ishii, K. Sato, *Legal Medicine*, **30**, 14–20(2018).

< 執筆者略歴 > 坂牧 寛 (Hiroshi SAKAMAKI)

- ・一般財団法人化学物質評価研究機構 クロマト技術部
(〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 番地)
- ・岐阜大学大学院工学研究科終了。博士 (工学)。
- ・分析士資格 : LC 分析士二段、LC/MS 分析士初段。
- ・2021 年度『ぶんせき』誌編集委員。
- ・主な著書 : “医薬/化粧品/食品分野での HPLC・GC 分析
テクニックと解析事例” (分担執筆)
(株式会社技術情報協会)。
- ・E-mail : sakamaki-hiroshi@ceri.jp



【2021 年液体クロマトグラフィー努力賞受賞業績】

規制下の生体試料分析におけるクロマトグラフィーの活用～バイオアナリシスガイドラインの実研究への活かし方／

Utilization of Chromatography in Regulated Bioanalysis ~ Tips for Using Bioanalysis Guidelines in Your Research

中山 聡／Akira NAKAYAMA

味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所 評価・分析室／Evaluation & Analysis Section,
Research Institute for Bioscience Product & Fine Chemicals, Ajinomoto Co., Inc.

(Received May 10, 2021; Accepted May 15, 2021)

要旨

現在、医薬品開発の世界において生体試料中の薬物濃度測定（バイオアナリシス）を対象にした規制文書が多く、国・地域で公示されており、又、間もなく国際的にハーモナイズされたガイドライン（ICH M10）も制定される見通しである。一連の規制文書には適切な生体試料分析を実施する為のナレッジが詰め込まれており、医薬品開発以外の領域でも役に立つ内容に成っている。本稿では、バイオアナリシスの規制内容を理解する為の基礎的な事項を品質試験と対比させて説明する。又、医薬品開発の限定された試験のみに適用されるバイオアナリシスガイドラインを、対象外の試験や医薬品開発以外の領域に活用する為の考え方についても解説したい。

キーワード BMV ガイドライン；分析法バリデーション；バイオアナリシス

1. 始めに

医薬品開発においては有効性、安全性、品質を担保する為に、数多くのガイドライン/ガイドダンスが存在する。その内容は国際的にハーモナイズされる動きが活発であり、医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH）の中で議論がされ、多くの統一ガイドラインが制定されている。その中で、分析技術が関連するのは品質（Quality）の領域であり、2021 年 1 月段階で ICH Q1~Q11 のガイドラインが発出され、Q12~14 のガイドラインが議論中である¹⁾。又、この領域とは別に複合領域（Multidisciplinary）において、生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイドライン（ICH M10）が議論中であり、制定迄もう少しと言

う状況にある。

本稿では、ICH M10 がカバーしている「規制下の生体試料中薬物濃度分析 (Regulated Bioanalysis)」と呼ばれる領域で 10 年以上に渡り産官の多くの有識者によって議論されて来た内容を、医薬品開発に関わる方は勿論、それ以外の領域で生体試料分析に関わる多くのクロマトグラファーにも役立てて頂く事を目標としている。先ず、生体試料中薬物濃度分析、一般的にバイオアナリシスと言われている領域のガイドラインを読み込む為の基礎的な知識として、品質分析とバイオアナリシスの管理の考え方の違いを説明する。その後、ガイドラインの内容を実際の研究にどの様に生かして行くかと言う考え方について解説したい。

なお、ICH M10 や国内ガイドラインの詳細については、ガイドライン本文^{2),3)}、解説書⁴⁾や関連ウェブサイト⁵⁾に譲る事とし、本稿では概要の紹介に留める。

又、本稿での記載内容は公開されている情報を除いて、あくまで私個人の意見/見解である事を始めにお断りしておく。

2. バイオアナリシスガイドラインの構成と適用範囲

医薬品開発におけるバイオアナリシスとは、生体試料 (血漿や尿など) 中の薬物濃度を対象としている分析の事である。ガイドラインでは、主にバリデーション試験の内容を規定している事から Bioanalysis Method Validation (BMV) ガイドラインと呼ばれるが、標準物質への要求事項や実試料測定時の妥当性検証方法まで記載内容が及んでいる。

日米欧の BMV ガイドラインの対象は、GLP 下で実施される安全性試験で動物曝露量を測定する「トキシコカインेटィクス (TK) 試験」とヒトを対象とした臨床試験での薬物濃度測定に限定される。非臨床の薬物動態試験、酵素や細胞などを用いた vitro 試験、バイオマーカー測定などはバイオアナリシスであっても、BMV ガイドラインの対象外である。但し、FDA ガイダンスではバイオマーカー測定への言及がされており、ICH M10 Step2 版 (2019 年 2 月 26 日)²⁾では主要な非臨床薬物動態試験も対象となるなど、適用範囲は拡大基調にある。この為、適用外試験であっても BMV ガイドラインの内容を意識せざるを得ない状況になっている。

一方、一般的にバイオアナリシスと言った場合は、生体由来のサンプル測定全般を指す場合が多い。培養細胞、発酵サンプル、場合によっては、食品分析も分析化学的にはバイオアナリシスと考える事が出来る。一般に生体試料分析は複雑であり、分析法に要求される要件も測定値の使用目的によってまちまちである。この為、医薬品開発や臨床検査などの医療分野以外の領域では詳細を定めているルールは少なく、内容が具体的な医薬品の BMV ガイドラインが引用される事も多い。実際、BMV ガイドラインの考え方を理解していれば、目的に合わせて評価項目や判断基準等を変更し、過不足の無い説得力の有る分析法妥当性検証が可能となるだろう。

3. BMV ガイドラインにおける評価項目

医薬品開発の分析法バリデーションの規制としては、ICH Q2A「分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について」が 1995 年、ICHQ2B「分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について」が 1997 年に制定されている。その中で定量分析として、「真度」「精度」「特異性」「定量限界」「直線性」「範囲」が評価事項として挙げられている（表 1）。本ガイドラインは、主に品質分析向けの分析法が対象であるが、バイオアナリシスのガイドラインが制定される迄は本内容を基にバリデーション試験が設定されていた事も有り、考え方の基本と成っている。

BMV ガイドラインとしては、2001 年に公開された FDA ガイダンスが事実上最初の規制文書である。その後、2011 年に EMA、2013 年には日本のガイドラインが制定され、2018 年に FDA ガイダンスが大幅改定されている。又、ICH M10 ガイドラインとして現在議論が進行中である（2021 年 5 月現在 Step3）。BMV ガイドラインにおけるバリデーション試験での要求項目は ICH Q2 に準じているが、バイオアナリシスでは LC-MS を使用した高感度分析が想定されている事も有り、マトリックス効果、キャリアオーバー、希釈の妥当性などの項目が追加されている。パブリックコメントの募集があった ICH M10 の Step2 版²⁾においても、バリデーション項目自体は大きな変更はない（表 1）。但し、測定値の妥当性に影響する様々な変動要因（個体差、溶血/高脂血漿や併用薬の影響など）を考慮して、選択性やマトリックス効果などで評価事項が大幅に増えており、BMV ガイドラインの独自性が強く現れる様に成っている。

表 1 医薬品開発の分析法バリデーション規制文書での要求事項

	ICH Q2	BMVガイドライン (日本)	ICH M10 (Step2版)
特異性/選択性	●	●	●
直線性/検量線	●	●	●
範囲/定量下限	●	●	●
真度	●	●	●
精度/併行精度	●	●	●
/室内再現精度	●		
/注入再現精度			●
マトリックス効果		●	●
キャリアオーバー		●	●
希釈の妥当性		●	●
安定性		●	●

4. 分析法の妥当性確認についての考え方 ～バイオアナリシスと品質分析での違い～

原薬や製剤の評価を行う品質試験用の分析法と生体試料を測定するバイオアナリシス用の分析法では、同じ原理の装置（HPLC など）を使用する事も多く、分析法開発では同じ様な手順を採る。分析法バリデーション試験でも、試験手順や判断基準に違いはあるものの、評価項目自体は共通のものも多い。しかしながら、同じ様な試料を正確に測定する事が求め

られる品質試験と試料構成要素（マトリックス）が複雑でターゲットとなる薬物濃度も試料ごとに大きく異なるバイオアナリシスでは、分析法/測定値の検証方法の基本的な考え方に違いが有る。それは、実試料測定時の妥当性検証方法や分析法を別の装置/施設に移管する際の手順の中に見る事が出来る。

バイオアナリシスでは妥当性検証の為に、実試料測定時に再度ブランク測定（特異性/選択性評価）、多点検量線（直線性評価）、濃度既知試料：QC 試料測定（真度・精度評価）が行われている。検量線も QC 試料もブランクマトリックス（薬物を含まない血漿や尿）に薬物を添加して調製され、マトリックスの影響をなるべく軽減する設計がされている。実施方法の詳細は BMV ガイドラインの中で規定されており、『分析法の妥当性を再確認しながら実試料測定を行うデザイン』となっている（図 1）。一方、品質試験において特徴的なのは、既定濃度の試料（通常は、規格値相当や定量下限の標準溶液を測定する）を実試料の前後で測定するシステム適合性試験（SST：System Suitability Test）を実施する事にある。SST の判断基準は分析法バリデーションのデータを基に設定されており、『測定系の状態がバリデーション実施時と同等であることを確認するデザイン』となっている。実測定では多点検量線を用いず（1点検量線）、ブランク試料の確認なども行わない事も多い（図 2）。

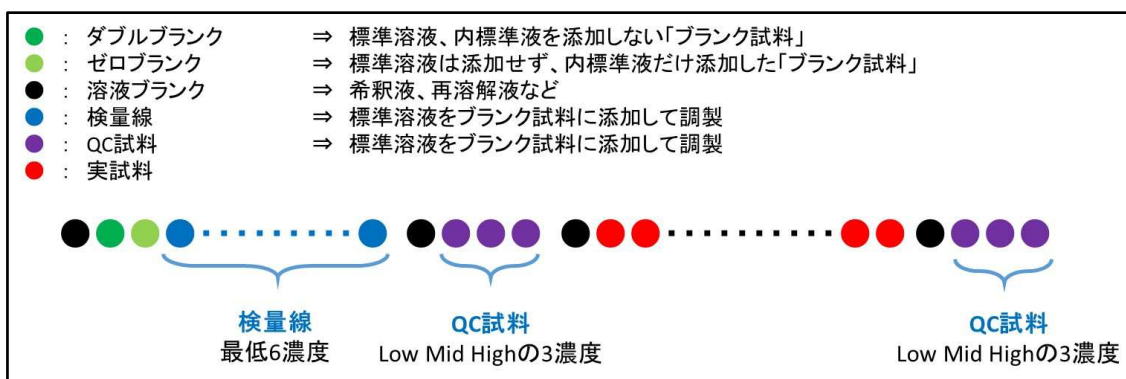


図 1 バイオアナリシスにおける実測定での測定シーケンス例
実測定ごとに特異性/選択性（●●）、直線性/範囲（●●）、真度・精度（●●）を確認

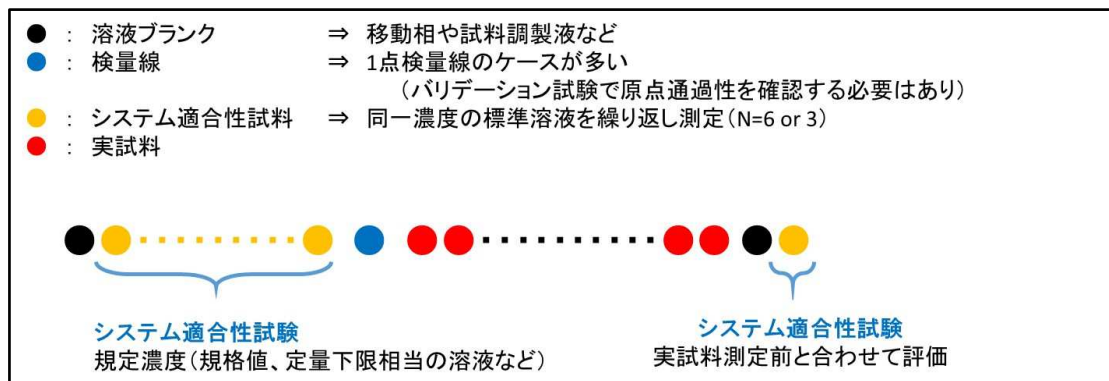


図 2 品質分析における実測定での測定シーケンス例
システム適合性試験（●）でバリデーション試験時と同等品質で評価出来る事を確認

分析法を他施設へ移管する際にも両者の考え方が大きく異なる。バイオアナリシスの場合は施設/装置が変わるごとにバリデーション試験をやり直し、分析系（装置+分析法）ごとに妥当性検証を繰り返すデザインと成っている。施設/装置間の同等性を確認する試験（クロスバリデーション）は特別なケースでのみ実施される（図 3）。一方、品質分析においては分析法が移管される事も想定し、室内再現性（測定者、装置、カラムなどを変更して真度・精度への影響を評価）迄バリデーション試験で確認する。別施設に分析法を移管する場合は、技術移管（Technical Transfer）を実施して同等性能の分析法を立ち上げる。分析法自体の妥当性検証は移管元で完了しているの、移管先において分析法バリデーションは必須ではない。但し、装置状態を含めた分析系の状態は測定毎にシステム適合試験で確認し、バリデーション実施時と同等の性能を有している事を示す必要がある（図 4）。

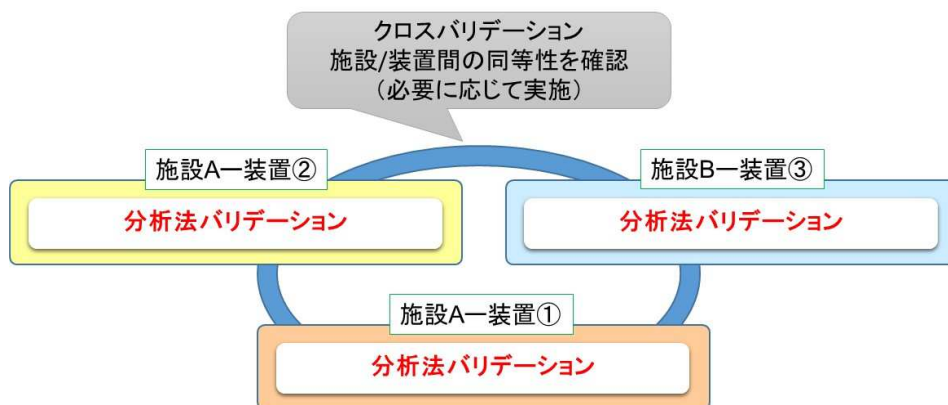


図 3 分析法を他装置/施設に移管する手順（バイオアナリシス）
分析系（装置+分析法）ごとに分析法バリデーションを実施して妥当性を検証

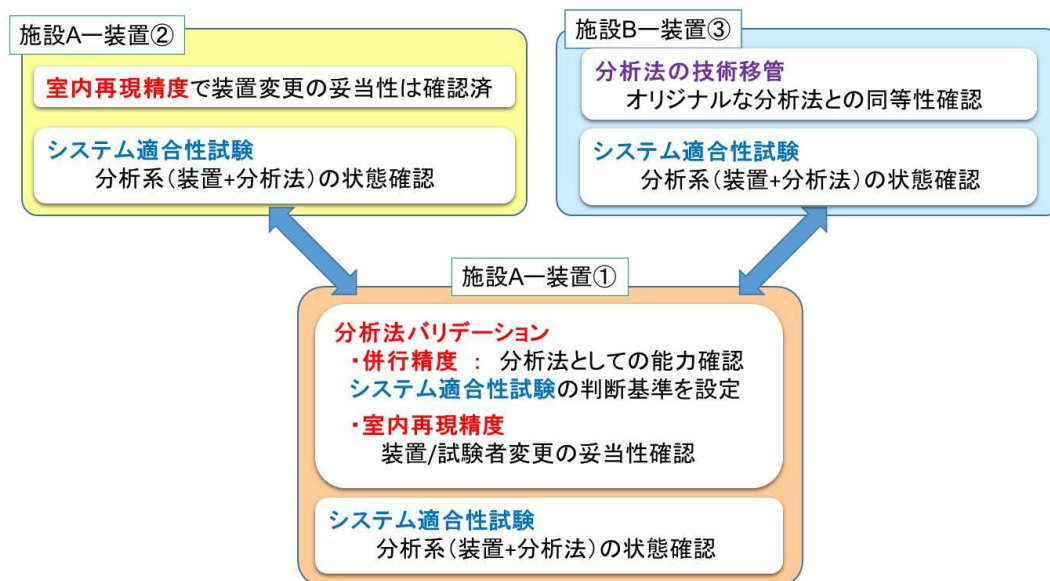


図 4 分析法を他装置/施設に移管する手順（品質試験）
室内再現精度試験で装置変更の影響を評価。技術移管により同等性が確認された分析法を立ち上げシステム適合性試験でバリデーション実施時と同等の性能を有する事を確認

近年、分析法妥当性確認に対する評価が厳しくなる傾向が有り、品質試験においても個々の装置・施設でバリデーションを取り直したり、バイオアナリシスにおいても SST や施設間のバイアスを検証するクロスバリデーション（技術移管の評価項目に相当）を求められたりして、両者の検証方法の差は少なくなっている。しかしながら、分析法の妥当性検証を行う中で評価すべき項目は何なのかを理解しておく事は、「過不足のない対応」をする上でとても大切な事である。又、ガイドラインの対象外の試験で定量分析の妥当性検証を行う際に、品質分析とバイオアナリシスで異なる検証方法が活用されている事を知っておけば、試験デザインを考える際の参考になると思われる。使用する装置ごとに妥当性を検証するか、他の装置（例えば、装置メーカーなど）で取得されたデータと紐づける事を念頭に置くかで、分析法バリデーションのデザインは変わって来ると考えられる。

5. 測定目的に応じた妥当性評価項目の変更 ～絶対値評価と相対値評価を例に～

BMV ガイドラインの対象となっている TK 試験や臨床での薬物濃度測定では、異なる時期に実施した試験データを比較する事が前提となっており、測定値に絶対値としての正確さが要求されている。絶対値が必要になる試験では標準物質の品質、標準溶液の安定性、日間再現性などに対する重要度が高くなる（表 2）。又、導入時には賛否両論があった実試料を使った再現性評価（ISR : Incurred Sample Reanalysis）の様なバイオアナリシス独特の評価項目も既に定着している。更に、ICH M10 (Step2 版) においては溶血、高脂血漿、併用薬などの共存成分の影響評価や、試験間でのデータのバイアスを検証するクロスバリデーションが要求されるケースが増えるなど規制強化の方向に動いている。

一方、BMV ガイドラインの対象になっていない *vitro* 試験などは、同時に測定したデータの相対比較を行う事が前提となっている事から、分析法の妥当性を評価する場合でも評価項目は軽減出来ると考えられる。但し、明確な記載があるガイドラインは存在しない事から、研究者自身が評価内容を考えて分析法バリデーション試験や実試料測定時の妥当性検証方法を決定する事が求められる。少なくとも、表 2 で記載した内容については評価の要否を検討する必要があるだろう。仮に予想と異なる試験結果が得られた時に「測定値自体には問題ない」と言い切れるだけのロジックがもてるなら、評価は不要と言える。

逆に、BMV ガイドラインの対象外であっても、事前に定められた基準値との比較が研究目的上重要になる場合やデータベース登録を目的とする場合は絶対値が重要となって来る事から、表 2 に示した内容を加味した分析法妥当性評価を行う事が大切となる。

表 2 絶対値が必要な測定で重要視される項目とリスク対処法

項目	想定されるリスク	対処法
標準物質の品質、安定性	ロット差、分解などによる含量変化	安定性評価、ロット間差の確認
標準溶液の安定性	分解/吸着などによる濃度変化	安定性評価
日間再現性	測定系の状態などによる 測定値の変動	日間再現性評価
		ISR評価
選択性/マトリックス効果	試料を構成する成分差による 測定値の変動	想定される要素の検証 (溶血、高脂血漿、併用薬)
装置/施設間差	施設間・装置間のバイアス	クロスバリデーション試験
標準溶液の調製誤差	秤量誤差などによる、ロット差	調製法検討、ロット間差の確認

6. 纏め ~BMV ガイドラインを多くの研究に生かすために~

2013 年の国内の BMV ガイドライン、ICH M10 対応の流れの中で、国内でも規制下でのバイオアナリシスについて多くの議論が行われる様になった。LC-MS/MS や UHPLC などのクロマトグラフィー技術の進歩に伴い、見掛け上は簡単に、高感度・高速化が可能になったが、行き過ぎた高感度・高速化はリスクが伴う事が知られている。ガイドライン制定の議論ではそうしたリスクも織り込まれており、バイオアナリシスでの規制要件は厳格化される傾向にある。

一方、BMV ガイドラインが余りにも複雑になった事から、医薬品開発の時系列に合わせて少しずつデータを追加する様なやり方も目にする様になった。臨床試験 Phase I パッケージ、臨床試験 Phase III パッケージ(あくまでも通称。ガイドラインの公式表現ではない。)などと言われるもので、リスクに応じて必要なデータのみ取得して、医薬品申請の最終段階で全てのデータを揃えると言う考え方である。この考え方は、評価方法や評価基準の記載が具体的な BMV ガイドラインを医薬品開発以外の分析法妥当性検証に応用する際にも役立つと思われる。BMV ガイドラインにおいてリスクとして考えられている内容を理解して、目的とする試験内容に合わせて評価項目を増減したり、評価数や判断基準を変更したりする事で、妥当性のある過不足の無い対応を取る事が出来る。

長年に渡って多くの有識者によって議論されて来た BMV ガイドラインは、間もなく制定される ICH M10 ガイダンスをもって一つのマイルストーンを迎える。このガイドラインは、生体試料分析を適切に実施する為の教科書の様なものだと筆者は考えており、多くのクロマトグラフィー研究者が活用出来るものと思っている。本稿がその切っ掛けになれば幸いである。

7. 謝辞

本稿は、2021 年液体クロマトグラフィー努力賞を頂いた研究成果の中から、クロマトグラファーにも役に立ちそうな内容を抜粋したものである。受賞に当たり、液体クロマトグラフィー研究懇談会委員長 中村 洋先生、及び、運営委員の先生方に御礼申し上げたい。

そして、規制下でのバイオアナリシスと言う領域において献身的な働きをされている、

ICH M10 EWG、厚生労働省研究班メンバー、及び、バイオアナリシスフォーラム (JBF) のメンバーに改めて感謝の意をお伝えしたい。

参考文献・資料

- 1) PMDA ウェブサイト <https://www.pmda.go.jp/files/000238766.pdf>
(2021 年 5 月 6 日確認)。
- 2) ICH M10 Step2 版 (2019 年 2 月 26 日版)
<https://public-comment.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000187479>
(2021 年 5 月 6 日確認)。
- 3) BMV ガイドライン (日本) 薬食審査発 0711 第一号 (平成 25 年 7 月 11 日)。
- 4) バイオアナリシスフォーラム編、生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイドライン解説、じほう (2015)。
- 5) BMV ガイドライン比較表 (バイオアナリシスフォーラム まとめ)
http://bioanalysisforum.jp/common/pdf/topics/regulation/1-1_BMV_guideline.pdf
(2021 年 5 月 6 日確認)。

<執筆者略歴> 中山 聡 (Akira NAKAYAMA)

- ・現職：味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所 評価分析室長
- ・1994 年に東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了
味の素株式会社に入社後、医薬品開発の分析業務(薬物動態/規格設計)に 20 年ほど従事。
現在は、開発品の分析や安全性評価を実施するグループのマネージャーを担当。
- ・専門分野：クロマトグラフィー、Regulated Bioanalysis。
- ・液体クロマトグラフィー研究懇談会 運営委員心得。
- ・分析士資格：LC 分析士初段、LC/MS 分析士初段。



【2018 年液体クロマトグラフィー科学遺産認定業績】

高速液体クロマトグラフ LC-10A シリーズ

High Performance Liquid Chromatograph LC-10A Series

三上博久／Hirohisa MIKAMI

株式会社島津総合サービス リサーチセンター／
Research Center, Shimadzu General Services, Inc.

(Received May 18, 2021; Accepted May 21, 2021)

キーワード モジュラー形 HPLC 装置；省スペースデザイン；光ファイバー接続；
マイクロランジャー技術；高感度検出

1. 始めに

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が誕生したのは 1960 年代末の事であり、これ以降、次々と新しい高速液体クロマトグラフ（HPLC 装置）が開発され、急速に普及、進化して来た。島津製作所は、1972 年から HPLC 市場に参入し、現在に至る迄の間、多くの HPLC 装置を世に送り出して来ている。高速液体クロマトグラフ LC-10A シリーズ（図 1）は、1991 年 2 月に島津が上市したモジュラー形 HPLC 装置の新シリーズであり、島津においてその後登場する HPLC 装置の礎と成ったものである。LC-10A シリーズでは、各コンポーネントの殆ど全てが新設計であり、当時の最新技術を駆使する事により、数々の特徴を有していた。

本稿では、LC-10A シリーズ開発に至る迄の島津における HPLC 装置開発の流れと LC-10A シリーズの概要及び特徴について述べる。



図 1 高速液体クロマトグラフ LC-10A シリーズ (1991 年)

2. 島津製作所における HPLC 装置開発の流れ¹⁾

2.1 HPLC 登場迄

1900 年代初頭に Tswett によって創始されたクロマトグラフィー²⁾は、1941 年の Martin と Synge による液-液分配クロマトグラフィーの発明³⁾を経て、1952 年、Martin と James による気-液分配クロマトグラフィー、即ちガスクロマトグラフィー (GC) の考案⁴⁾へと繋がった。1955 年には、米国で GC 装置が市販化され、日本では 1956 年に島津が国産初の GC 装置を開発、翌 1957 年、GC-1A (図 2) の市販を開始した。GC は、折しも勃興期を迎えていた石油化学産業に多大な貢献を果たし、躍進を遂げた。

一方、ガラス管に充填剤を詰め、重力で移動相を流す古典的 LC が分析計として花開いたのは、1958 年の Stein、Moore らによるアミノ酸分析計の開発⁵⁾である。更に、1960 年代始めに合成高分子の分子量分布測定を行うゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) が開発され⁶⁾、1964 年には米国で GPC 装置が市販化された。日本においては、1966 年に島津が GPC-1A (図 3) を完成させている。



図 2 GC-1A (1957 年)

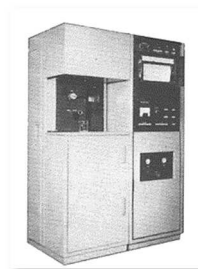


図 3 GPC-1A (1966 年)

アミノ酸分析計や GPC 装置は専用装置であった為、様々な分析種に対応出来る汎用 LC 装置の開発に目が向けられ始めた。特に、GC では応用に限界があったライフサイエンス分野からは、分離効率が悪く、時間の掛る古典的 LC の高速・高分離化が強く求められた。この様な状況の下、1960 年代半ば頃から GC によって確立された理論や技術が LC へ適用され、古典的 LC の高性能化が本格的に研究され始めた。そして、1969 年にデュポン社 Kirkland が LC の高性能化を可能とする表面多孔性充填剤を開発、市販化した⁷⁾。これが 1 つの契機となり、高耐圧な送液ポンプや汎用検出器を装備した HPLC 装置が開発される様に成り、今日の HPLC 時代へ突入したのである。

2.2 LC-10A シリーズ開発迄

HPLC 市場への参入を進めていた島津は、日本での販売パートナーを探していたデュポン社と提携する事になり、1972 年 3 月より DuPont 830 などの輸入販売を開始した。しかし、DuPont 830 は、非常に高価な装置であった為、普及の壁となっていた。そこで、1973 年国産化による大幅なコストダウンが図られ、島津・デュポン 830 を上市した。更に、1975 年には島津で設計した LC-1 が、又 1976 年にはコンパクトタイプの LC-2 が登場した。こ

れら装置に、島津が独自技術で開発した吸光光度検出器や蛍光検出器などを組合せる事により、島津 HPLC 装置は充実したものとなった。

LC-1、LC-2 共、デュポン社との提携に基づき空気圧増幅ポンプを採用していた。このポンプは、無脈流送液が可能であるが、空気圧供給源としてエアコンプレッサーが必要となり、販売上不利な面もあった。そこで、島津独自のプランジャーポンプの開発が急ピッチで進められ、1978 年に LC-3A を上市した。LC-3A の登場により、島津 HPLC 装置は、汎用分析機器として広く浸透して行く事と成った。続いて、1981 年に本格的な自動分析を目指したマイコン制御一体形装置 LC-4A、マイクロ化へのニーズの高まりから 1982 年にマイクロボア LC 装置 LC-5A の上市へと繋がって行った。

HPLC 市場の拡大に伴い、様々な目的にフレキシブルに対応出来る装置が求められる様になって来た。この様なニーズに対応する為、1984 年にモジュラー形 LC-6A シリーズを開発した。LC-6A シリーズは、新規開発された種々のコンポーネントを目的に応じて組み合わせ、最適なシステムを組み上げる事が出来、それらをシステムコントローラーで集中制御すると言うものであった。LC-6A シリーズは、国内に加えて欧米でもヒット製品となり、島津 HPLC 装置の普及に多大な貢献を果たした。又、1985 年の第 52 回ポズナン国際産業見本市（1920 年よりポーランドで毎年開催されている権威ある見本市）で金賞を受賞した事もあり、欧米における島津 LC の知名度が一気に向上した。以後、分取用 LC-8A、イナーナート形 LC-7A の開発、新たなマイクロプランジャー技術による超低脈流送液ポンプ LC-9A と時代のニーズに対応した装置開発へと繋げて行った。図 4 に、1970～1980 年代における島津 HPLC 装置の変遷を示す。

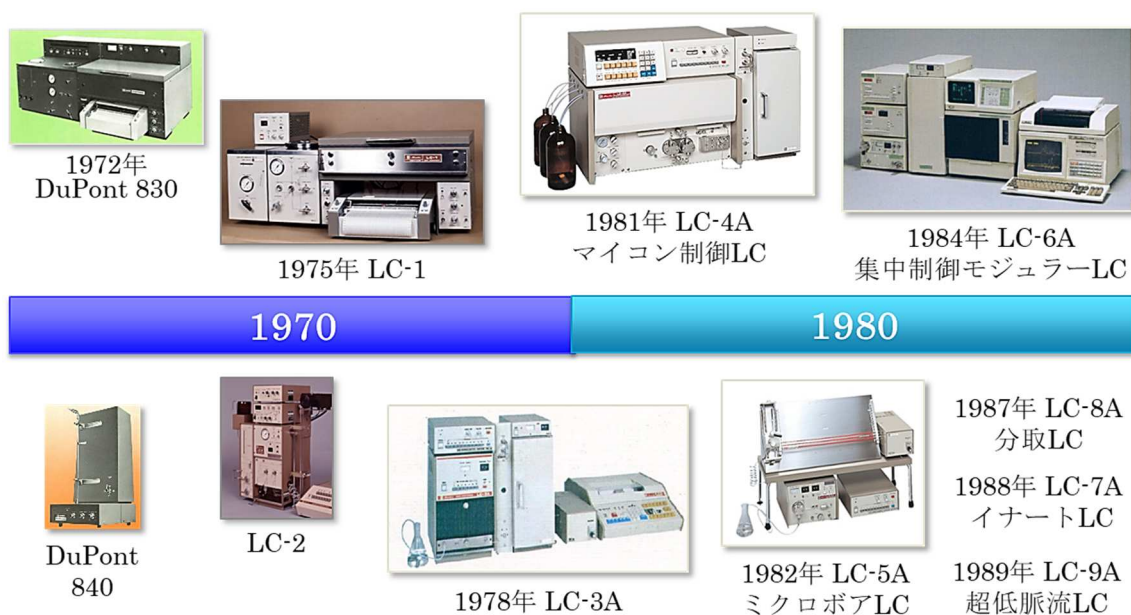


図 4 1970～1980 年代における島津 HPLC 装置の変遷

3. LC-10A シリーズの開発

HPLC が普及するに連れ、特に医薬品分野における GMP/GLP への対応を中心に、如何にデータの信頼性を高めるかがポイントとなって来た。この為、HPLC 装置に対して高感度化や高機能化に加えて一層の信頼性向上が求められ、更には分析目的の多様化に伴い、システム構成の自由度向上への要求も一段と高まった。

この様なニーズに対応するには、LC-6A シリーズでは限界があった為、新たなコンセプトに基づく装置開発が始まった。そして、1991 年 2 月、当時の最新技術を駆使して開発した LC-10A シリーズを上市した。図 5 は、発売時のカタログであり、その斬新さが当時注目された。特に、「The 未来…ing LC」という漢字交じりのキャッチフレーズ（筆者が考案）は、米国業界誌において興味深いフレーズとして、そのまま漢字入りで紹介されていた。



図 5 LC-10A シリーズカタログ (1991 年発売時)

LC-10A シリーズの特徴を纏めると、以下の様になる。なお、本稿で使用している図は、LC-10A シリーズ発売時のカタログから取ったものであり、不鮮明な部分をご容赦願いたい。

3.1 先進のデザインコンセプト

当時、一般的なモジュラー形 HPLC 装置は、各コンポーネントのサイズが必ずしも統一されていなかった。この為、様々なシステムを組み上げる際、その配置が制約される場合があり、又設置面積が大きく成ってしまう事があった。

LC-10A シリーズでは、図 6 に示す様にコンポーネントの基本ディメンションを「幅 260 mm、奥行 420 mm、高さ 140 mm」と設定した。主要コンポーネントサイズを基本ディメンションの整数倍（一部 1/2 倍）とする事により、システムコンフィグレーションの自由度を高め、又積み上げ設置による省スペース化を可能とした。

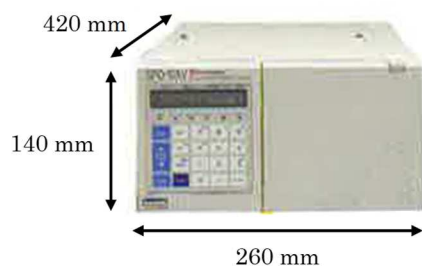


図 6 LC-10A シリーズの基本ディメンション

図 7 に、LC-10A シリーズの設置バリエーション例を示す。左のシステムは、5 段 3 列タイプの高圧グラジエントシステム (2 ポンプ) であり (基本ディメンションが 1 段)、標準的な自動化フルシステムである。一方、右のシステムは、5 段 1 列タイプのイソクラティックシステムであり、マニュアルインジェクターによるシンプルな構成である。この他、2 列タイプのシステムも含め、様々な構成が可能であった。

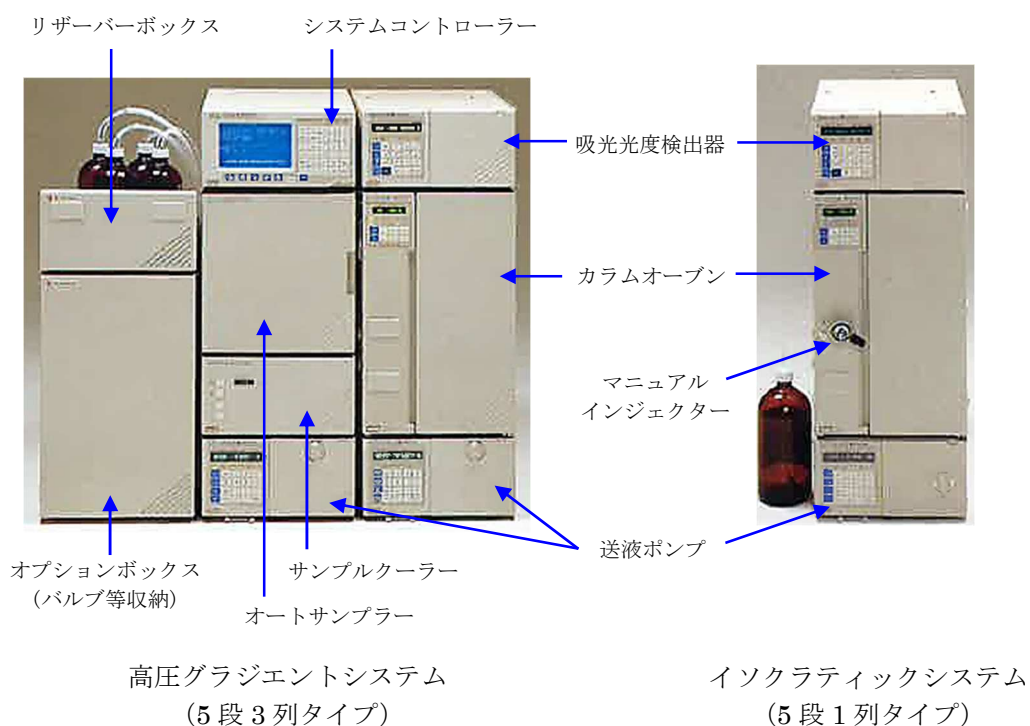


図 7 LC-10A シリーズの設置バリエーション例

LC-10A シリーズのモジュラー形でありながら一体形を思わせるデザインコンセプトは、その後のモジュラー形 HPLC 装置開発に多大な影響を与えた。なお、主要コンポーネントには、自己診断機能やメンテナンスモードが内蔵されていた。

3.2 世界初の光ファイバーコミュニケーション

システムコントローラーを用いて各コンポーネントを集中制御する方法は、LC-6A シリーズから引き継がれたものであるが、LC-10A シリーズではシステムコントローラー SCL-10A (図 8) と各コンポーネントとの接続を業界初となる光ファイバーケーブルにより実現した (図 9)。



図 8 システムコントローラー SCL-10A



図 9 システムコントローラー背面と光ファイバーケーブル

ラボの分析装置などが増えるに連れ、外部からのノイズがデータ伝送に影響を与える事が懸念される様になっていたが、この光ファイバーコミュニケーションの採用により、耐ノイズ性に優れた高速データ伝送が可能と成り、システムの信頼性が大幅に向上した。

3.3 独自のマイクロプランジャー送液技術

送液ポンプの低脈流化は、検出器の高感度化にとって極めて重要な要素である。取り分け、当時生化学分野や医薬品分野などでその高感度、高選択性から盛んに用いられていた電気化学検出器においては、低脈流化によるノイズ低減が検出感度を左右すると言っても過言では無かった。又、同様に示差屈折率検出器、電気伝導度検出器、吸光光度検出器 (特に短波長域)、更にはポストカラム誘導体化検出などの高感度化においても、一層の低脈流化が求められていた。



図 10 送液ポンプ LC-10AD

LC-10A シリーズの 4 種類ある送液ポンプの中で、その核となる並列ダブルプランジャー形 LC-10AD (図 10) では、独自のマイクロプランジャー送液技術 (1 ストローク約 10 μ L) により、脈流値そのものと脈流の生じる周期を大幅に低減させる事に成功した。又、ステッピングモーターのマイクロステップ駆動により、1 ステップ約 6 nL という高分解能を達成し、セミマイクロ流量域における高精度なグラジエント溶離を可能とした。

図 11 に、LC-10AD のマイクロプランジャー送液技術による脈流低減効果を示す。従来の送液ポンプに比べて、圧力変化が著しく小さく成っている事が分かる。

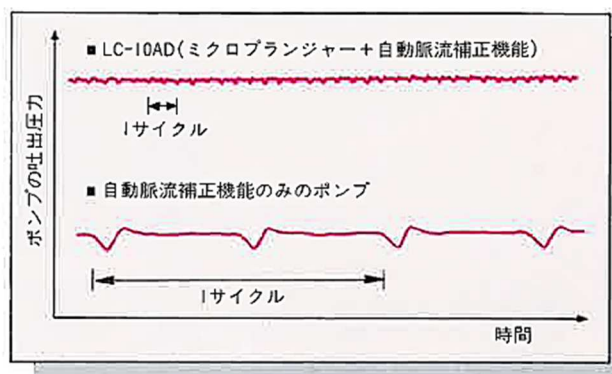


図 11 ミクロプランジヤー送液技術による脈流低減効果

3.4 最高の低ノイズレベル性能、世界初の 2 波長同時測定機能と温調セル

LC-10A シリーズには、吸光光度検出器として SPD-10A (重水素ランプ搭載、波長範囲：190 nm～370 nm) と SPD-10AV (重水素及びタンゲステンランプ搭載、波長範囲：190 nm～900 nm) が用意されていた (図 12)。



図 12 吸光光度検出器 SPD-10A (右) 及び SPD-10AV (左)

SPD-10A /10AV は、新設計の明るい光学系、高次デジタルフィルターの採用により、当時最高の低ノイズレベル性能 ($\pm 0.5 \times 10^{-5}$ AU) を有していた。又、ランプハウスと分光器の完全分離、ランプハウスの冷却機能などにより、分光器の温度上昇を最小限に抑え、ベースラインの安定性を一段と高めた。図 13 に、アントラセン (10 pg) の高感度検出例を示す。

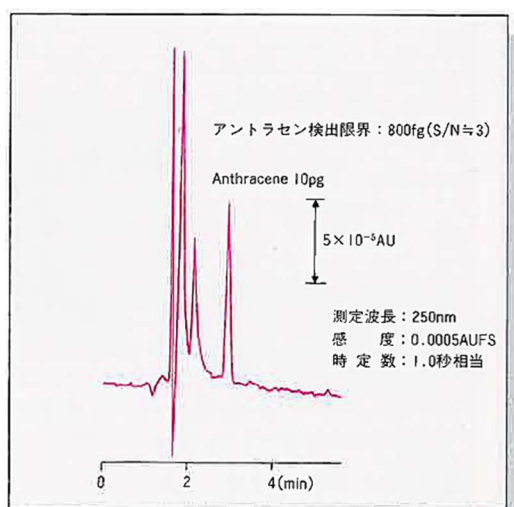


図 13 高感度検出例 (アントラセン)

SPD-10A/10AV のもう 1 つのポイントは、汎用吸光度検出器で業界初の 2 波長同時測定機能を標準搭載した事である。図 14 に、2 波長同時測定例を示す。この 2 波長同時測定機能を用いると、図 15 に示す様なレシオクロマトグラムに基づくピークの純度情報が得られ、データの信頼性向上に貢献した。

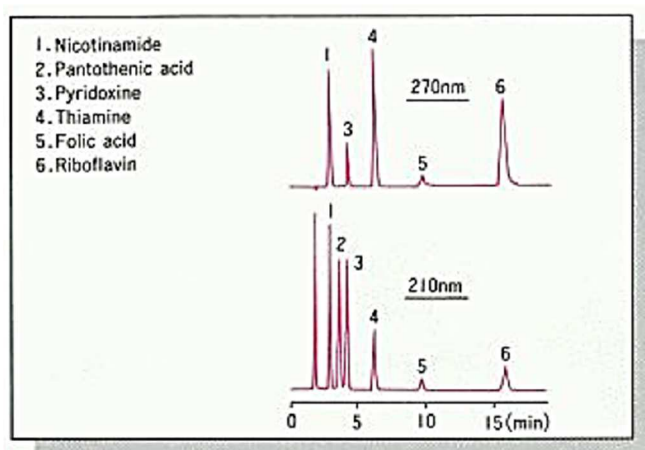


図 14 2 波長同時測定例 (水溶性ビタミン)

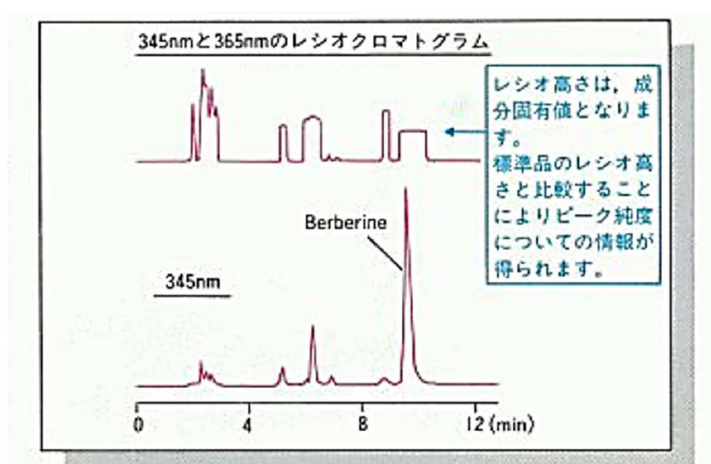


図 15 レシオクロマトグラム例 (オウレン末)

更に、検出器の高感度化に伴い、温度変化により微妙にスペクトルが変化する分析種への対応や周囲温度の影響を受け易い波長や移動相条件でも安定したベースラインが得られる様に、セル温調機能を装備した装置 (SPD-10A super) もラインアップした。このセル温調技術は、後に蛍光検出器に应用され (RF-10A_{XL} super)、温度による蛍光強度変化を低減し、データの精度向上に大きな役割を果たす事と成った。

4. LC-10A シリーズの構成

LC-10A シリーズは、一連の多種に渡るコンポーネントから構成される HPLC 装置である。図 16 に、1991 年 2 月発売時のコンポーネント群を示す。



図 16 LC-10A シリーズのコンポーネント群 (1991 年発売時)

発売後、送液ポンプや検出器、オートサンプラーのラインアップが順次充実して行き、程無く島津独自のワークステーションソフトウェア (CLASS-LC10) が登場し、GMP/GLP サポート機能が強化された。図 17 に、LC-10A ワークステーションシステムを示す。



図 17 LC-10A ワークステーションシステム

このフルラインアップ化により、LC-10A シリーズは、各応用分野の幅広い様々なニーズに対応する HPLC 装置となり、世界規模で広く市場に浸透する事に成った。この為、生産

については、日本に加えて米国、ドイツ、オーストラリアの世界 4 拠点で行われる様になった。そして、4 年後には、LC-10A シリーズ生産累計が 50 000 台を突破するに至った。

5. 終わりに

LC-10A シリーズは、高感度化や高機能化に加えて分析の品質及びデータの信頼性向上、システム構成の自由度拡大への貢献、各種規制対応及び支援機能の充実などにより、その後の HPLC 装置開発の方向性に大きな影響を与えた歴史に残る装置と言える。又、LC-10A シリーズは、その後登場する島津の HPLC 装置、LC-VP シリーズ、Prominence シリーズ、Nexera シリーズの基盤となった装置である。

最後に、LC-10A シリーズを 2018 年液体クロマトグラフィー科学遺産に選考して頂いた事に対し、関係各位には心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 三上博久、中村 洋企画・監修 液体クロマトグラフィー研究懇談会創立 45 周年記念誌、pp.3-13(2019).
- 2) M. Tswett, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **24**, 384-393 (1906).
- 3) A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.*, **35**, 1358-1368 (1941).
- 4) A.T. James, A.J.P. Martin, *Biochem. J.*, **50**, 679-690 (1952).
- 5) D. H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.*, **39**, 1190-1206 (1958).
- 6) J.C. Moore, *J. Polymer Sci.*, **A2**, 835-843 (1964).
- 7) J.J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 7-12 (1969).

<執筆者略歴> 三上博久 (Hirohisa MIKAMI)

- ・ 1975 年株式会社島津製作所入社、HPLC の応用技術開発及びマーケティングを担当、HPLC マーケティングマネージャーとして約 3 年半米国駐在後、HPLC 応用技術開発グループマネージャー、2018 年 1 月より株式会社島津総合サービスリサーチセンターマネージャー。



- ・ 分析士資格：LC 分析士五段、LC/MS 分析士初段。

【2019 年液体クロマトグラフィー科学遺産認定業績】

「HP/Agilent 1100 シリーズ HPLC」について／

Profile of HP/Agilent 1100 series

熊谷浩樹／Hiroki KUMAGAI

アジレント・テクノロジー株式会社／Agilent Technologies Japan, Ltd

(Received April 29, 2021; Accepted May 2, 2021)

キーワード HPLC 装置；バリデーション；3次元蛍光検出；キャピラリーHPLC

1. 始めに

1100 シリーズ HPLC は表題にある様に、Hewlett-Packard (HP) 社と Agilent Technologies (Agilent) 社の 2 つの会社で製造、販売された装置である。そこで、最初に HP 社と Agilent 社の関係、及び Agilent 社のビジネスについて簡単に紹介する。

1999 年、HP 社はコンピューターと関連製品以外の事業を分社化する事になり、その結果誕生したのが Agilent 社である。当初の Agilent 社は、ラボ用分析機器に加えて電子計測機器や半導体、医療機器等の事業を展開していたが、その後事業の再構築を進め、現在はライフサイエンス研究支援機器、ラボ用分析機器、体外診断用医薬品等の開発、製造、販売等を行っている。ラボ用分析機器は HP 社から続く事業で、1100 シリーズは HP 社で開発、販売され、分社後に Agilent 社に引き継がれた。

HP 社は 1973 年から LC ビジネスに参入し、HPLC の開発、製造の拠点をドイツに置いて、世界初のフォトダオードアレイ検出器や PC ベースのワークステーション等を製品化し、1983 年には HP 1090 を製品化した。HP 1090 は、当時としては画期的な流量精度とピークの低拡散を実現し、その性能が高く評価された。1980 年代後半になると



図 1 HP/Agilent 1100 シリーズの外観

HPLC の利用分野が広がり始め、特に製薬業界で急速に利用が進んだ。HPLC に関する様々な技術の進歩に伴い、保持時間の再現性や検出感度が向上する事で分析結果の信頼性も向上したが、1990 年代に入ると新たに GLP、GMP 対応が必須となって来た。

HP/Agilent 1100 シリーズは、この様な背景の中で新しいコンセプトに基づいて開発された (図 1)。

2. HP /Agilent 1100 シリーズの特長

2.1 ハードウェアバリデーションのサポート機能

クロマトグラフィー機器のハードウェアバリデーションのうち、システム導入後も定期的実施される OQ と PQ を自動化し、メーカーのエンジニアだけでなくユーザーでも OQ、PQ を実施出来る機能を搭載した。試験のプロトコルと分析シーケンスをワークステーションに搭載し、試験に必要なサンプル、カラムも供給する事でハードウェアバリデーションを簡便、確実に実施出来る様になった。

2.2 ハードウェアの自動診断機能

ポンプ、オートサンプラ、検出器が、正常に動作しているかどうかを自動診断出来る機能を搭載し、ユーザーが何時でもハードウェアの状態を確認出来る様にした。更に、システムの不具合が生じた時、モジュール毎に動作が正常であるかどうかを診断する事が出来た。この機能は HPLC システムの信頼性向上、ダウンタイム低下に大いに役立った。

2.3 消耗品の使用履歴の管理と交換時期の告知 (EMF)

HPLC はプランジャーシールやインジェクターのローターシール、UV 検出器のランプ等消耗品の多い装置である。消耗品交換を適切に行わなければ、分析結果の信頼性に悪影響を及ぼすが、部品の使用履歴を記録する事は意外と面倒である。そこで、1100 シリーズ HPLC では、Early Maintenance Feedback (EMF) 機能を搭載する事で、消耗品の使用履歴の記録や交換時期の告知を HPLC システムで行う様にして、部品の消耗が原因で測定不能となる事態や測定結果に対する疑義が生じる前に、消耗品交換を行う“予防保全”を実現した。

2.4 グラフィカルユーザーインターフェイス採用のワークステーション

フォトダオードアレイ検出器が使われる様になると、3次元クロマトグラム処理や UV-VIS スペクトルの照合、ピーク純度検定、ライブラリー検索などコンピューターによるデータ処理が必須となった。ピークの積分、検量線作成、定量、モジュールの操作パネルで行っていた分析条件の設定を含めて、装置の制御とデータ処理を PC 上で全て行うワークステーションは 1983 年に HP 社から販売されたが、当時はコマンド入力による操作であ

った。1100 シリーズに合わせて開発されたワークステーションは、グラフィカルユーザーインターフェイスを分析機器では初めて採用し、操作性が大幅に向上した (図 2)。

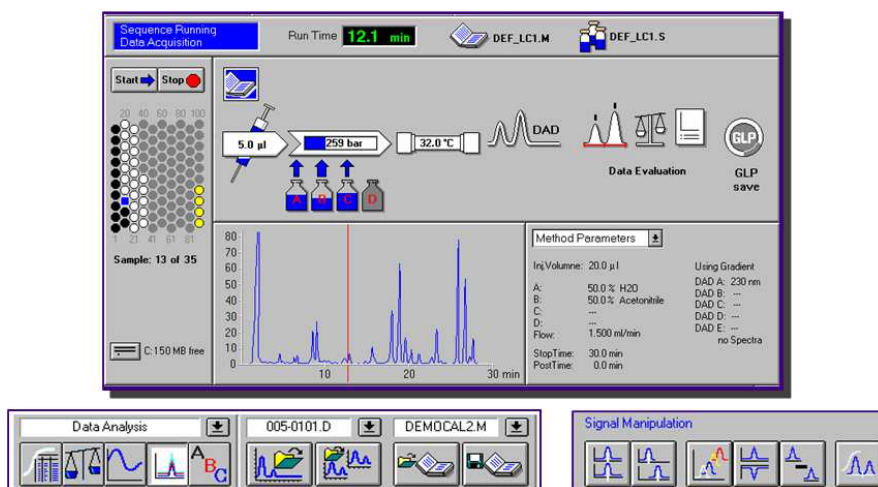


図 2 グラフィカルユーザーインターフェイスとアイコンの画面例

2.5 高感度フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器

フォトダイオードアレイ検出器 (PDA 検出器、HP 社/Agilent 社ではダイオードアレイ検出器、DAD) の歴史は、1982 年に HP 社が世界で初めて HPLC 用検出器として販売した HP 1040 から始まる。周知の通り、PDA 検出器のメリットはオンラインでピークの UV-VIS スペクトルが取れる事である。その結果、3 次元クロマトグラムやピーク純度の確認、UV-VIS スペクトルによるピーク同定などが可能となり、HPLC の定性能力を飛躍的に高めた一方で、単波長形の紫外可視吸光度検出器と比較して感度が劣ると言う欠点もあった。

1100 シリーズで開発した PDA 検出器は、高感度化を実現し PDA 検出器をルーチンの定量分析に使用する事を可能とした。又、UV-VIS スペクトルの分解能を高めた事で、スペクトル照合によるピーク同定の精度が向上した。更に、内蔵ホルミウムオキシドフィルタ

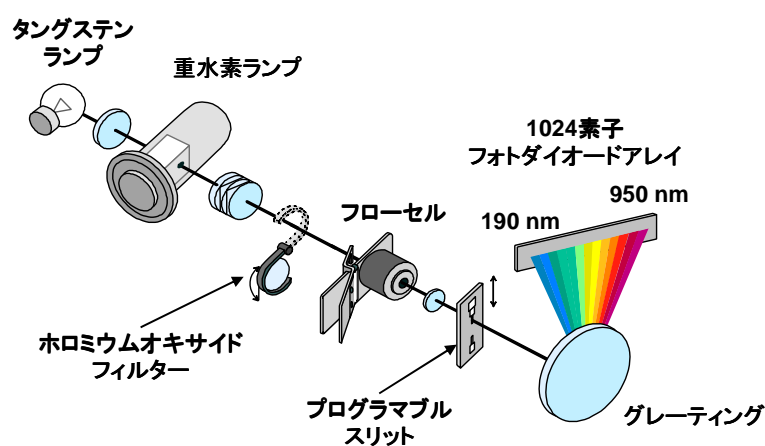


図 3 1100 シリーズ DAD の光学系

による波長校正、可変スリットによる感度と分解能の最適化を簡便に行える機能も開発、搭載した (図 3)。

2.6 オンラインスペクトル採取および多波長励起/蛍光測定が可能な蛍光検出器

蛍光検出は選択性と感度に優れた検出法として知られているが、蛍光検出による多成分分析では、成分毎に異なる最適な励起波長と蛍光波長を設定する為にタイムプログラムを利用する。しかし、ピーク間の溶出時間が近い場合等ではタイムプログラムによる対応は困難になる。

1100 シリーズ蛍光検出器は、励起側、蛍光側のグレーティングの駆動法を工夫する事により、4つの励起波長若しくは4つの蛍光波長を選択出来る多波長蛍光検出を可能にした。又、励起波長若しくは蛍光波長のスペクトルをオンラインで採取する事も可能とし、蛍光スペクトルの照合によるピーク同定を可能とした (図 4、図 5)。

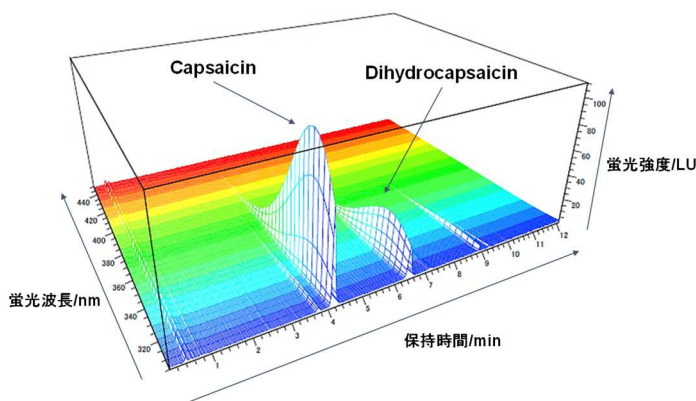


図 4 3次元蛍光検出 HPLC 分析の例

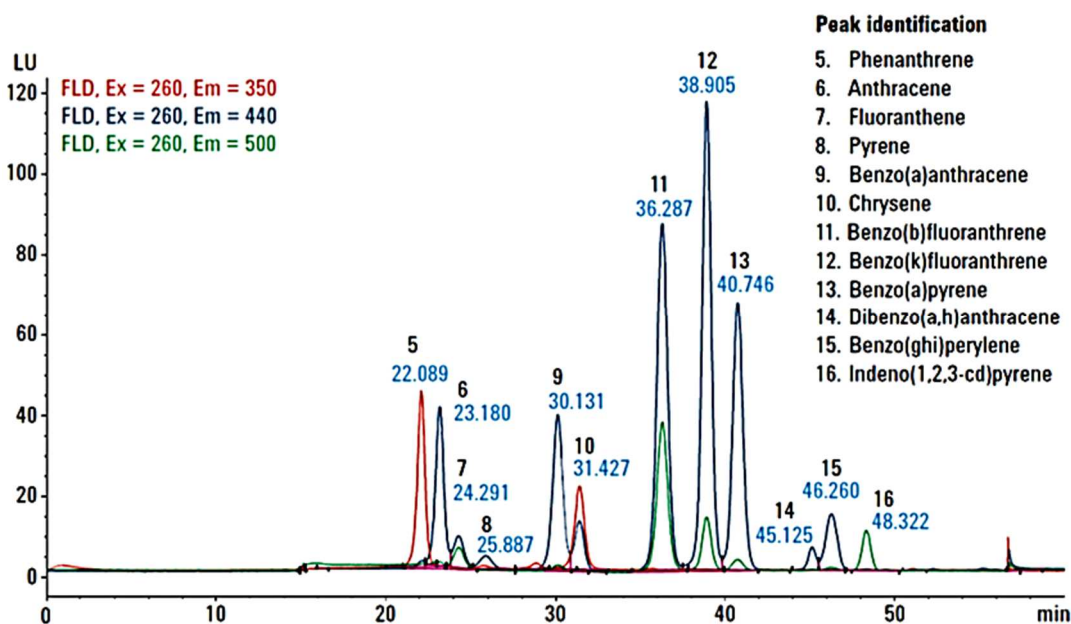


図 5 多波長蛍光検出分析の例

2.7 フローセンサーによる実流量計測—電磁制御スプリッターを用いたキャピラリー HPLC システム

キャピラリーHPLC は、微量サンプルをより高感度で測定する手段の一つであるが、その流量は数十 $\mu\text{L}/\text{min}$ レベルであり、一般的なポンプで精度良く送液する事は困難である。数十 $\mu\text{L}/\text{min}$ レベルの流量を得る方法の一つとして、スプリッターを用いてコンベンショナル LC レベルの流量から微量流量を得る方法が昔から用いられて来た。一般的なスプリッターは、背圧の異なる 2 つの抵抗管における背圧比に応じて微少な流量を得ているが、背圧比は流路の僅かな詰まりや室温にも影響を受ける為、安定した流量を得るのは困難である。

そこで、1100 シリーズキャピラリーHPLC システムでは、実流量をマスフローメーターで測定し、実流量をフィードバックしながらスプリット比を調整する電磁制御スプリッターを開発した (図 6)。このスプリッターを搭載したポンプの流量は、背圧の変化に影響される事無く安定しており (図 7)、長時間に亘って再現性の良い分析が可能となった。又、キャピラリーカラムの分析に適した DAD 用フローセル (容積 500 nL) も開発し、高感度で安定したキャピラリーHPLC 分析を実現した。

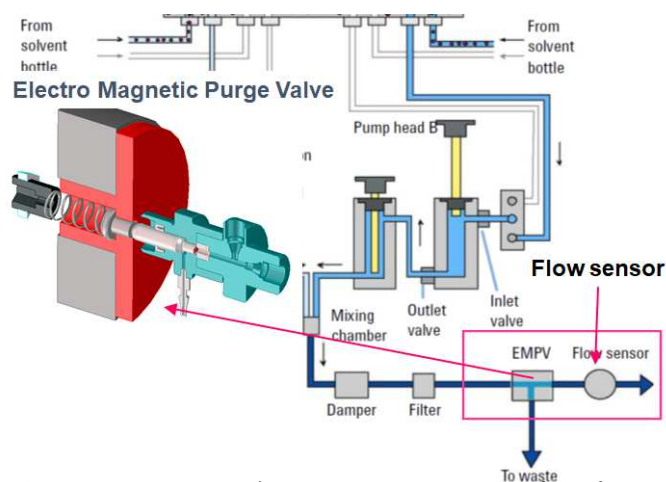


図 6 1100 シリーズキャピラリーHPLC ポンプの流路図

図 7 異なる背圧における保持時間の変化 (1100 キャピラリーポンプ)

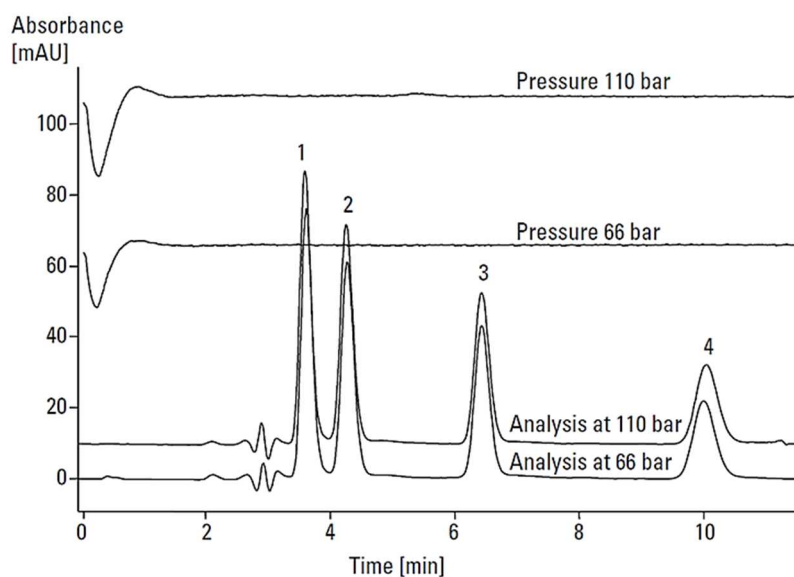


図 7 異なる背圧における保持時間の変化 (1100 キャピラリーポンプ)

2.8 1100 シリーズのポンプ及びオートサンプラーの特長について

2.8.1 ポンプ

1100 シリーズのポンプは、プランジャーの駆動法としてスクリュードライブ方式を採用し、スクリューとプランジャーをボールで接触させる事により (図 8)、長期間に亘る安定した送液を実現した。又、スクリュードライブ方式を採用した事で、プランジャーのストロークを可変にする事が出来、送液流量に応じた最適なストロークを設定する事で脈流の低減やプランジャーシールの長寿命化が実現した。インレットバルブはプランジャーの動きに合わせて電磁弁を開閉するアクティブインレットバルブを採用し、精密で精度の良い送液を実現した。

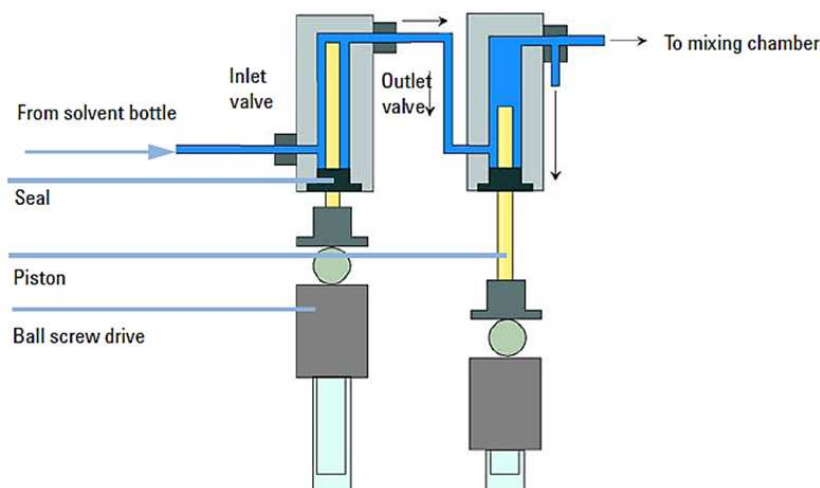


図 8 スクリュードライブ方式によるプランジャーの駆動 (1100 シリーズ ポンプ)

2.8.2 オートサンプラー

1100 シリーズのオートサンプラーは、ラインインジェクト方式と呼ばれる注入法を採用した (図 9)。この注入方法は、サンプリングのニードルが高圧流路の一部となっており、サンプル吸引時にニードルシートとニードルが大気圧になり、サンプル注入時は再び高圧になる。その為、高圧 → 大気圧 → 高圧 が繰り返されるニードルとニードルシートのシール性を長期間に亘って保つ技術が必要である。ラインインジェクション方式は、サンプルロスが無くキャリーオーバーが小さい等の特長が有り、今日では(U)HPLC の標準的な注入方式となっている。前項で紹介したポンプをサンプルの計量デバイスとして使用しており、精密で再現性の良い注入が可能である。

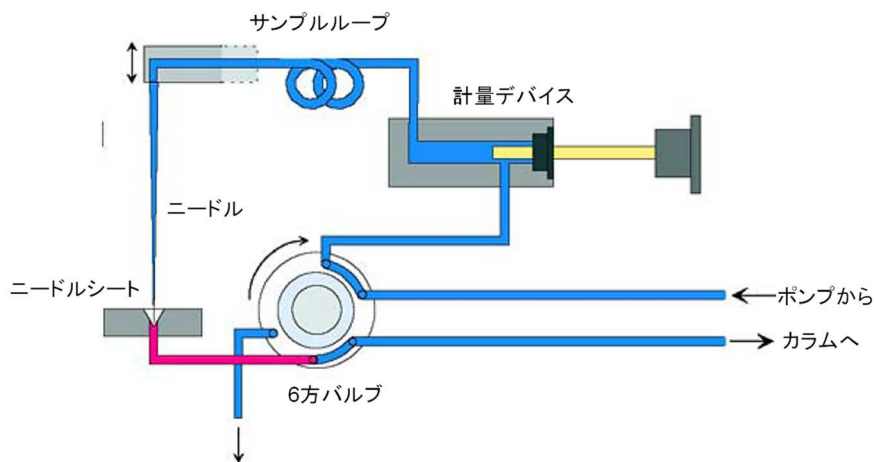


図 9 1100 シリーズオートサンプラの流路図

3. 終わりに

以上紹介した様に、今日の(U)HPLC システムで標準的な機能と認識されている機能の多くが、HP/Agilent 1100 シリーズで実現された。又、PDA の高感度化や FLD のオンラインスペクトル採取、実流量フィードバック制御によるキャピラリーLC などは、開発当時の最先端技術を駆使して HPLC の新しい可能性を切り開いたと言える。

Agilent 社は現在、1100 シリーズを発展させた高性能、高機能な Infinity II シリーズ (図 10) を販売している。



図 10 Infinity II シリーズ

最後に、HP/Agilent 1100 シリーズを 2019 年液体クロマトグラフィー科学遺産に認定して頂いた関係各位に御礼申し上げます。

〈執筆者略歴〉 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)
- ・ 分析士資格 : LC 分析士四段、LC/MS 分析士二段
- ・ 現在、アジレント・テクノロジー株式会社 LC・LC/MS
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



【2020 年液体クロマトグラフィー科学遺産認定業績】

液体クロマトグラフィー科学遺産認定第 3 号

「835 形日立高速アミノ酸分析計」について

Liquid Chromatography Science Heritage No. 3

“Model 835 Hitachi High Speed Amino Acid Analyzer”

清水克敏、伊藤正人 / Katsutoshi SHIMIZU, Masahito ITO
株式会社日立ハイテクサイエンス / Hitachi High-Tech Science Corporation
(Received May 20, 2021; Accepted May 26, 2021)

キーワード LC 科学遺産 ; アミノ酸分析計 ; 835 形

はじめに

「液体クロマトグラフィー科学遺産」とは、「日本における液体クロマトグラフィーの発展にとって、歴史的な観点から顕著な貢献があったと認められるもの」を指すと定義されており¹⁾、835 形日立高速アミノ酸分析計は 2020 年に液体クロマトグラフィー科学遺産第 3 号として認定された。ここでは、835 形日立高速アミノ酸分析計を中心に日立アミノ酸分析計の歴史を含めて紹介する。

アミノ酸分析計前夜

1948 年、後にノーベル化学賞を受賞する事になる米国の Moore と Stein がニンヒドリン光度法を報告した^{2),3)}。分配クロマトグラフィーを利用し、フェニルアラニンやバリンなど 6 種類の中性アミノ酸を分析種とした。ジャガイモのでん粉を固定相に、移動相にはブタノールとベンジルアルコールに若干の水を含ませて用いていた。ニンヒドリンと各アミノ酸との反応生成物 Ruhemann's purple の吸光度スペクトルを測定し、アミノ酸成分の種類によらず測定出来る事を確認している。又、成分ごとの反応特性も詳細に検討し、アミノ酸分析計の素地を培った。

1958 年 Spackman は米国の両博士と共に記念すべき論文を公表した⁴⁾。その題名は「アミノ酸のクロマトグラフィー利用の為の自動記録装置」であり、今のアミノ酸分析計につながる進歩の起源である。分析種はプロリンを含むタンパク質加水分解物のアミノ酸であり、固定相はスルホン酸が修飾された粒径 40 μm 程度のポリスチレン系陽イオン交換樹脂である。移動相は 0.2 mol/L のクエン酸ナトリウム緩衝液を流量 0.5 mL/min で送液した。2 本のカラムを使用していて、酸性・中性アミノ酸 15 成分には長さ 1.5 m、内径 9 mm のガラスカラムを用いて、pH 3.25 と 4.25 の緩衝液のステップワイズ溶離法により 17 時間を掛けて分離した。塩基性アミノ酸 6 成

分は 150 mm の第 2 のカラムで 0.35 mol/L, pH 5.28 の緩衝液を 5 時間送液し、分離した。両カラム共、注入ごとに最後には 0.2 mol/L の水酸化ナトリウム再生液で洗浄した。

検出はニンヒドリン反応液を 0.25 ml/min で送液・合流し、沸騰水槽中を内径 0.7 mm、長さ約 29 m のテフロンチューブ内で 15 分間加熱し、Ruhemann's purple を生成させた。570 nm の吸光度を測定するが、プロリンだけは Ruhemann's purple にならない為、440 nm で検出する。現在のアミノ酸分析計は、プロリンの反応検出対策法を含めてイオン交換クロマトグラフィー法の装置原理をそのまま踏襲していると言える。

初期のアミノ酸分析計

Spackman らのアミノ酸分析法が発表されたと同じ年の 1958 年、日本では京都大学理学部で、自記分光光度計を検出器とする、自動液体クロマトグラフの開発の為、日立にその試作を依頼し、1960 年に完成した KLF-1 形液体クロマトグラフが日本の液クロの始まりと成った。

この技術を基にして日立でも早速アミノ酸分析計の開発を行い、KLA-1 形試作機を経て、1962 年国産第一号の KLA-2 形が北海道大学に納入された。

開発当初は正確で再現性の良い結果を得る為に、常に安定した定流量で吐出するポンプの設計や、充填剤の詰め方、溶離液の調製、サンプリング法など幅広い技術が必要であった。図 1 に KLA-2 形アミノ酸分析計とそのクロマトグラムを示す。1 分析当たりほぼ 1 日間掛かったが、全アミノ酸を分析するには短長の 2 本のカラムが必要で、短いカラムは、塩基性アミノ酸分析用、長いカラムは中・酸性アミノ酸分析用である。試料の添加やカラムの切り替えは手で繋ぎ替えた。この時期のガラスカラムは中の様子が良く見えた。1.5 m と長かった為、空気の抜け易さを考慮してカラムを鉛直に立てる事になり、ほぼ必然的に背の高いアミノ酸分析計の形態に成った。この様にアミノ酸分析計は、分析法を付加した総合システム製品として発展して行く事に成った。

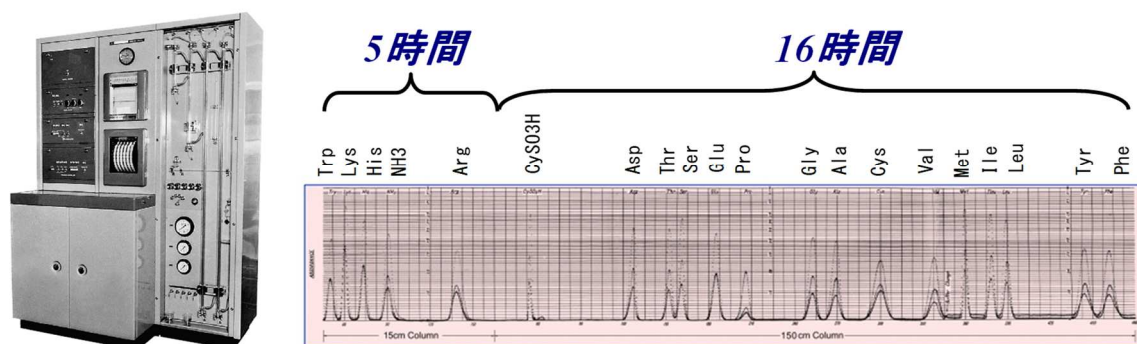


図 1 KLA-2 形アミノ酸分析計とそのクロマトグラム

835 形日立高速アミノ酸分析計の開発

アミノ酸分析計の普及と共に、タンパク質化学など生化学分野の研究用に使われていたが、食品や薬品、尿、血液など成分分析や臨床分野にも利用される様に成って来た。その為、分析の迅

速化と分析感度の向上が課題となった。又、マイクロコンピューターによる装置の自動化、省力化としてオートサンプラーなどの付属装置の要求が高まる様に成った。これを受けて、その後も 1964 年に KLA-3 形、1971 年に KLA-5 形と其其背の高い床置型装置が次々と開発された。

1970年代には高速液体クロマトグラフィーの技術を取り入れて、アミノ酸20種を1時間で分析する研究が始められていた。イオン交換樹脂の粒径は従来の20 µmから5 µmへと超微粒子化出来た事が高速化のキー技術であった。ハードウェアでは高圧、定流量の新形ピストンポンプの設計、カラム内面の研磨、溶離液の脱気装置、反応槽、オートサンプラーの試作に取り掛かり、1975年、835形日立高速アミノ酸分析計の試作が開始された。835形アミノ酸分析計の試作プロジェクトはスピードアップが命題であり、様々な部門が有機的に動く事が求められていた。連日、試験や実験結果のフォロー、部品の手直しなどが続いていた。装置全体の性能評価は、やはり総合性能、即ち分析結果である。部品の品質や寿命試験、温度対策など、時間の掛かる事と並行して、連日24時間分析した。

こうして開発された 835 形日立高速アミノ酸分析計(図 2、図 3)は、全アミノ酸成分を初めて 1 本のカラムで分析する事が出来る様に成った画期的な装置であった。10 MPa(100 気圧)以上の HPLC 高圧技術を取り込む事により微粒子化が進められ、直径 5 µm のイオン交換樹脂カラムを採用する事が出来た。これにより、クロマトグラムデータの時間は 50 分間に高速化され、KLA-2 形と比較し 1,000 倍以上高感度に成った。又、この頃からマイクロコンピューターが導入され始め、キャッシュカードに分析法のタイムプログラムを記録するなど、時代を先取りするユニークな機能も搭載した。

装置拡販 PR の為のキャンペーンなど色々考えていた矢先、願っても無いチャンスが訪れた。1977 年 4 月下旬、ニュージーランド沖の漁場で、大洋漁業のトロール漁船の網に大きなひれの有る爬虫類らしい死体が掛かり、ネッシーではないか、日本では、プレシオサウルス(首長竜)ではないか、と古生物学者や魚類学者などが集まって、検討するなど、怪獣の話で世界中が騒ぎ立てた。

この時に持ち帰られた唯一の物的証拠が、ひげ状の前びれであった。その貴重なひげが日立に持ち込まれ、835 形日立高速アミノ酸分析計でアミノ酸組成分析が行われた⁵⁾。試料は、乾燥したひげを 2 ml の 6N-塩酸で 110°C23 時間加水分解後乾涸した後、1 ml の 0.02 N 塩酸に溶かしたものを原液とし、それを 25 倍に希釈したものを測定した。クロマトグラムを図 4 に示す。結果はコラーゲン特有のオキシプロリン、プロリン、オキシリジンが含まれており、そのアミノ酸組成値から、サメのひれである事が判明し、怪獣の夢は発見から僅か 3 か月後、水泡に帰してしまった。然しながらこの内容は朝刊一面に『サメのひれに似る主成分たんぱく質』「怪獣の“ひげ”化学分析で判明」という見出しで取り挙げられた。これらのニュースは直ぐ全世界に広まり、話題となった。そこで 835 形アミノ酸分析計は予定を繰り上げて、製品発表を実施、その年末には、日刊工業新聞社十大新製品賞も受賞した。835 形日立高速アミノ酸分析計は国内外とも順調な販売をスタートし、国内シェアは 50%を超えた。



図 2 835 形日立高速アミノ酸分析計



図 3 835 形日立高速アミノ酸分析計と開発責任者の鴈野重威博士(左)

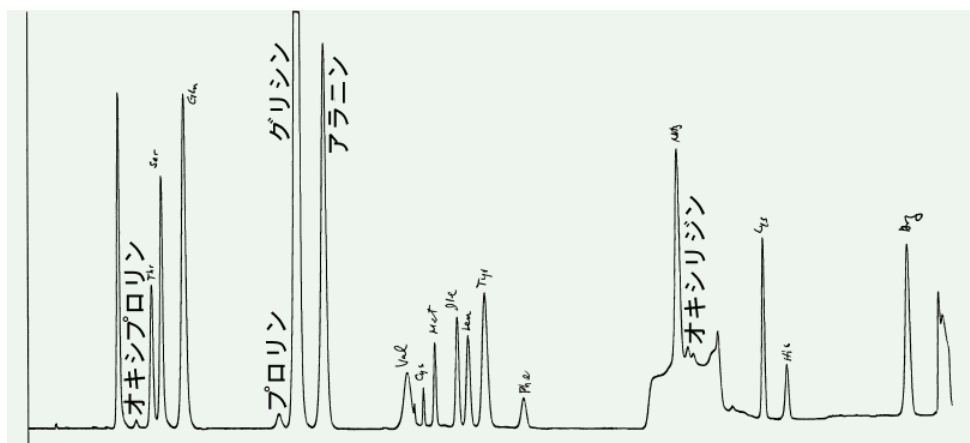


図 4 835 形日立高速アミノ酸分析計による“怪獣のひげ”のクロマトグラム

現在のアミノ酸分析計

835 形日立高速アミノ酸分析計以降は、1986 年 L-8500 形、1997 年 L-8800 形、2005 年 L-8900 形と発表され、2017 年、現在の LA8080(図 5)を公表した。最新であっても測定原理は Moore 博士らのニンヒドリン法装置そのままである。クエン酸緩衝液の溶離液はカラム再生液の 1 本を

含めて試薬ボックスに 6 本まで載せる事が出来る。タンパク質加水分解物であるアミノ酸約 20 成分の分析法にはナトリウム系緩衝液を、生体液由来の約 40 成分にはリチウム系緩衝液を用い、ステップワイズ溶離法又はグラジエント溶離法により分離する。後者のリチウム系緩衝液は溶出能力が比較的穏やかであり、保持時間や分離度の微妙な調整が出来る特徴が有る。

カラム(内径 4.6 mm、長さ 60 mm)はスルホン酸基が導入された強酸性のイオン交換樹脂 2622 が充填されている。充填剤担体はポリスチレンジビニルベンゼン系の粒径 3 μm のポリマーであり、この微細な粒子を用いて高速高分離性能を実現する。この時の圧力損失は 6~9 MPa である。

各成分 2 nmol を注入して得られたタンパク質加水分解物分析法 (カラム温度 57°C 一定) の場合、イソロイシンとロイシンの分離度は 1.2 以上、SN 比 2 でアスパラギン酸の検出限界 2.5 pmol 以下、グリシンとヒスチジンのピーク面積再現性 RSD は 1.0% 以下の結果であった。図 6 に LA8080 による高分離クロマトグラムを示す。



図 5 LA8080 高速アミノ酸分析計 AminoSAAYA™

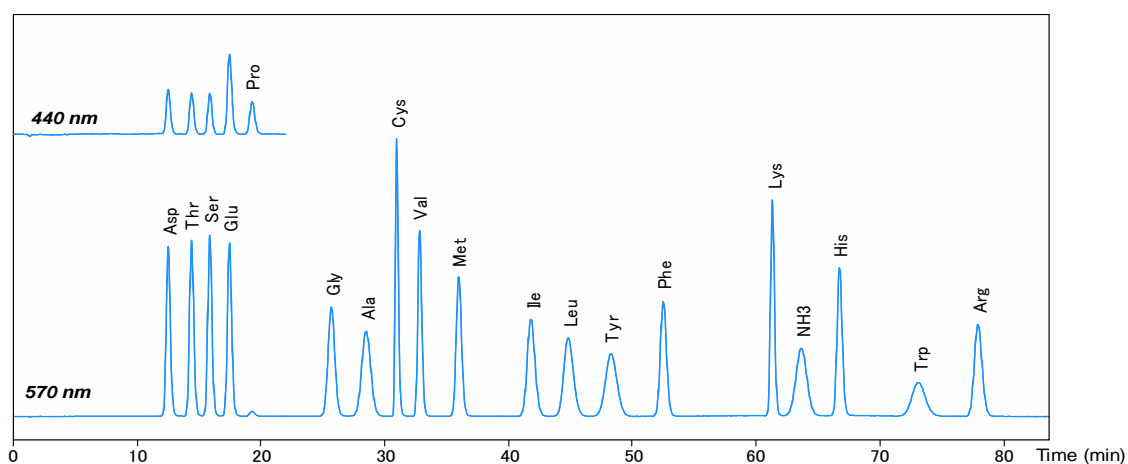


図 6 LA8080 による高分離タンパク質加水分解物分析法のクロマトグラム

今後のアミノ酸分析計

第 17 改正日本薬局方には 8 つのアミノ酸分析法が記載されているが、アミノ酸の多様性の為、ニンヒドリン法にはプロリン検出の難しさが有った様に、各分析法にも一長一短が有る⁶⁾。一般

に逆相クロマトグラフィーはイオン交換クロマトグラフィーよりも高速化高分離化に向いていると言われている。逆相クロマトグラフィーは、Martin 博士らの研究した分配クロマトグラフィーに分類され、溶質の溶解度の差異により分離する事が出来る。一方、イオン交換クロマトグラフィーは吸着クロマトグラフィーの一種であり、アミノ酸イオンがイオン交換サイトに一回一回脱着される相互作用の程度の差異に基づく分離である。この分離モードの違いが高速化・高分離化に向いているか否かの 1 つの理由と成り得るかも知れないが、他にも理由が考えられる。昨今 UHPLC が台頭しているが、UHPLC 技術の実体はシリカ系充填剤を用いる逆相クロマトグラフィーである。装置の最大圧力を 100 MPa 以上に引き上げ、充填剤粒子の直径をサブ 2 μm に迄微細化し、成し得る技術である。イオン交換クロマトグラフィーは主にポリマー系充填剤を使用しており、耐圧力においても微細化技術の観点においても、シリカ系充填剤の方が優れているのかも知れない。

引用文献

- 1) 液体クロマトグラフィー研究懇談会ウェブサイト(2021年5月現在)
https://www.lckon.org/_userdata/topix017-2.pdf
- 2) W. H. Stein, S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 176, 337-365 (1948).
- 3) S. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, 176, 367-388 (1948).
- 4) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.*, 30, 1190-1206 (1958).
- 5) 伊藤正人、ぶんせき、145-146 (2010).
- 6) 伊藤正人、和光純薬時報、Vol. 86, No. 3, 15-17 (2018).

<執筆者略歴>

清水克敏 (Katsutoshi SHIMIZU)

- ・(株)日立ハイテクサイエンス アプリケーション開発センタ
- ・分析士資格：LC 分析士二段、LC/MS 分析士初段
- ・現在の業務：HPLC のアプリケーション開発、ユーザーサポート
- ・E-mail : katsutoshi.shimizu.wp@hitachi-hightech.com



伊藤正人 (Masahito Matt ITO, Ph.D.)

- ・(株)日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 FS 第二設計部
- ・分析士資格：LC 分析士五段
- ・研究テーマ：高速アミノ酸分析計と UHPLC の開発
- ・主な著書：“ちょっと詳しい液クロのコツ 分離編”、
“LC 分析士試験解説書”各種、
“LC/MS, LC/MS/MS”シリーズ 2 種 (分担執筆)
- ・E-mail : masahito.ito.zv@hitachi-hightech.com



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

HPLC 分析／HPLC Analysis

三上博久／Hirohisa MIKAMI

株式会社島津総合サービス リサーチセンター／

Research Center, Shimadzu General Services, Inc.

(Received April 13, 2021 ; Accepted April 26, 2021)

キーワード HPLC 原理；基本パラメーター；分離モード；HPLC 装置

1. 始めに

1900 年代初頭に始まったクロマトグラフィーの歴史は、1940 年代の分配クロマトグラフィーの発明、1950 年代のガスクロマトグラフィー (GC) の考案とその装置化へと進歩して行った。GC の成功を背景に、1960 年代半ば頃から古典的な液体クロマトグラフィー (LC) の高性能化の研究が盛んとなり、GC におけるカラム理論に基づく LC 用表面多孔性充填剤が 1960 年代末に商品化された。これを契機に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が誕生し、急速な発展を遂げて来た。現在、HPLC は幅広い分野で不可欠な分離分析法として、不動の地位を築いている。ここでは、HPLC 分析の基礎として、HPLC の原理、分離機構及び HPLC 装置について解説する。

2 HPLC の原理

2.1 段理論と溶出曲線

クロマトグラフィーの基本原理は、段理論 (plate theory) を用いて説明される。段理論では、図 1 に示す様にカラムを多数の等価な理論段 (仮想容器) に分けて、各段で溶質が分配係数に基づき移動相、固定相間で相平衡を繰り返しながら移動して行くと考えられる。

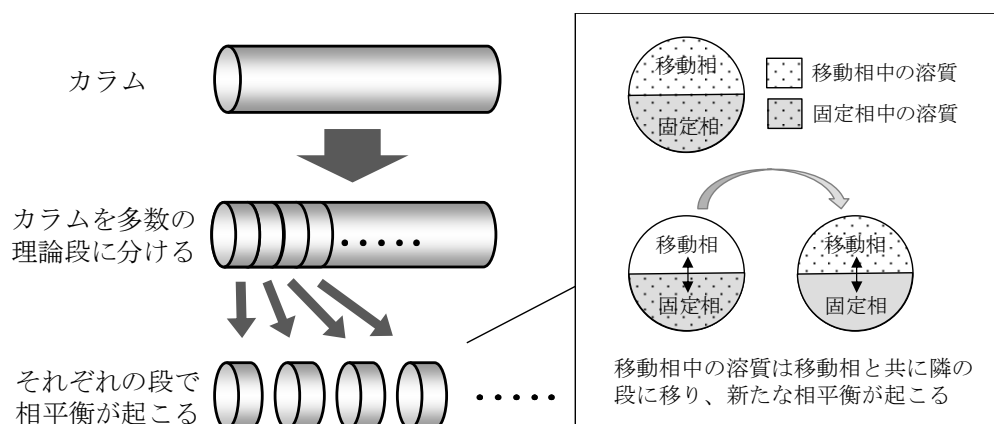


図 1 段理論の考え方

この相平衡が連続的に行われるとカラムからの溶質の溶出曲線は、式 1 に示すガウス分布 (正規分布) のピーク (ガウスピーク) となる。ここで、 σ は標準偏差、 t_R は溶質濃度が最大となる時間、即ち次に述べる保持時間である。

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-(t-t_R)^2/(2\sigma^2)} \quad (1)$$

この溶出曲線がクロマトグラムであり、HPLC で得られるクロマトグラムからは、図 2 に示す情報を読み取る事が出来る。

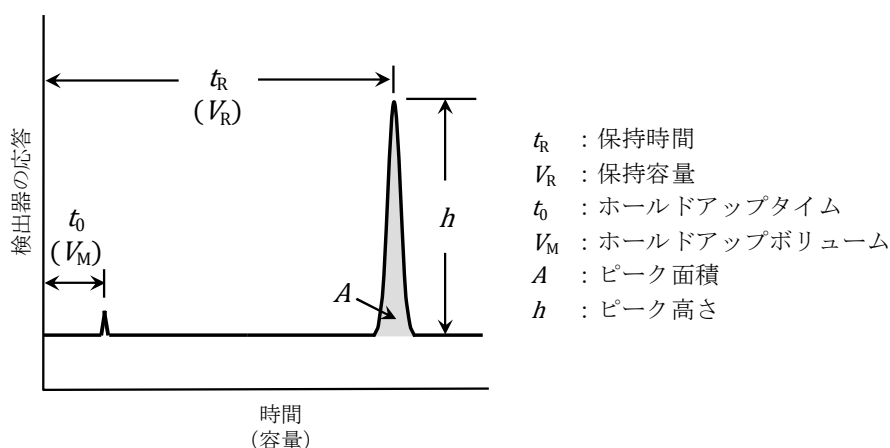


図 2 クロマトグラム

保持時間 (retention time : t_R) は、試料をカラムに導入した時点から成分ピークの頂点が現れる迄に要した時間である。この保持時間に移動相流量 (F) を乗じ、容量単位で表したものが保持容量 (V_R) である。保持容量は、或る条件下で或る成分をカラムから溶出させるのに必要な移動相の体積であり、移動相体積 (V_M)、固定相体積 (V_S)、分配係数 (K) より、式 2 で表される。

$$V_R = V_M + KV_S \quad (2)$$

ホールドアップタイム (holdup time : t_0) は、試料導入時点から固定相と何ら相互作用をせず、全く保持されずにカラムを素通りする成分のピーク頂点が現れる時間である。ホールドアップボリューム (holdup volume) は、ホールドアップタイムに移動相流量を乗じたもので、カラム内の空隙体積、即ち移動相が占める体積であり、式 2 の V_M に相当する。

ピーク面積は、ピーク両側の裾を結んだ直線とで囲まれた面積である。ピーク高さは、ピーク頂点からピークの両側の裾を結んだ直線に対し、垂直に下した直線の長さである。

2.2 基本パラメーター

HPLC では、分離やカラム効率の評価の為、次の基本パラメーターが定義されている。

① 保持係数 (retention factor, k)

固定相中の溶質量と移動相中の溶質量の比である。保持の程度を表すパラメーターであり、式 3 で表される。

$$k = K \frac{V_S}{V_M} \quad (3)$$

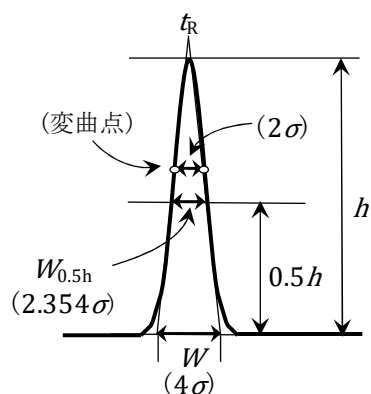
式 2、式 3 より、 $V_R = (1 + k) V_M$ が得られ、保持係数は式 4 で表せる。

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

保持係数は、日常分析で頻繁に用いるパラメーターであり、カラム、移動相、温度などのクロマトグラフィー条件が一定であれば、その成分に固有の値である。

② 理論段数 (theoretical plate number, N)

カラム効率を表すパラメーターであり、大きいほどピークが鋭い。理論段数は、図 3 で示す様に標準偏差を用いて式 5 で表せるが、実際の算出にはピーク幅 (W) 若しくはピーク半値幅 ($W_{0.5h}$) を利用する。ピーク幅は、ピーク両側の変曲点における接線 (変曲点の幅が 2σ になる) がベースラインと交わる幅 (ピークの裾幅ではないので注意) であり、 $W = 4\sigma$ の関係がある。ピーク半値幅は、ピーク高さの $1/2$ 地点のピークの幅であり、 $W_{0.5h} = 2.354\sigma$ の関係がある。式 5 に $\sigma = W/4$ 、 $\sigma = W_{0.5h}/2.354$ を代入すると、式 6 (接線法)、式 7 (半値幅法) が得られる。一般には、日本薬局方を始め、式 7 を用いる事が多い。



$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (5)$$

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (6)$$

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{W_{0.5h}} \right)^2 \quad (7)$$

図 3 理論段数

ガウスピークの場合、理論的には何れの式を用いても、同じ理論段数が得られる事になる。しかし、実際の HPLC で得られるピークは、必ずしもガウス分布 (左右対称) ではない為、計算式により理論段数の値が異なる事も多い。従って、どの計算式を用いたのかを明確にしておく必要がある。又、理論段数は分析種や分析条件によって異なるので、一定の条件下で測定する。これらの計算法の他、ピーク面積と高さを用いる面積高さ法などもある。

③ 理論段相当高さ (height equivalent to a theoretical plate : HETP、 H)

理論段 1 段に相当するカラム長さで、カラムの単位長さ当たりの効率を表し、カラム長さ (L) と理論段数を用いて式 8 で与えられる。小さいほどカラム効率が良い。

$$H = \frac{L}{N} \quad (8)$$

④ 分離度 (resolution、 R)

近接する 2 つのピークがどの程度分離しているかを示すパラメーターであり、式 9 若しくは式 10 で与えられる ($t_{R2} \geq t_{R1}$)。

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (9)$$

$$R = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}} \quad (10)$$

式 9 から、分離度が 2 つのピークの保持時間の差をピークの幅の平均で除したものである事が分かる。分離度は、ピークの幅とピーク間距離 (保持時間の差) に依存し、値が大きいほど 2 つのピークは良く分離している事になる。 $R=0$ の時、2 成分のピークは重複している。日本薬局方では、2 つのピークの見度分離度が 1.5 以上で完全分離されたと見做される。

⑤ 分離係数 (separation factor、 α)

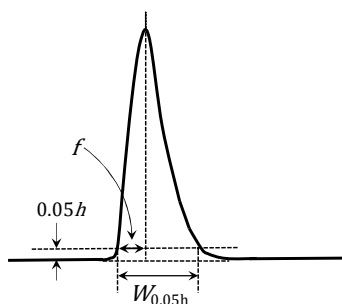
2 つのピークの保持係数の比であり、式 11 で与えられる。

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (11)$$

分離係数は、2 つのピークの位置関係、分離選択性を表し、分離係数が大きいほど 2 つのピークが離れている事になる。 $\alpha=1$ の時、2 成分は全く分離していない。

⑥ シンメトリー係数 (symmetry factor、 S)

ピーク対称性の度合いを示すパラメーターであり、テーリング係数とも呼ぶ。シンメトリー係数の算出は、図 4、式 12 で行う。



$$S = \frac{W_{0.05h}}{2f} \quad (12)$$

$W_{0.05h}$: ベースラインから 1/20 の高さにおけるピーク幅
 f : ピーク頂点から下ろした垂線で $W_{0.05h}$ を 2 分した時のピークの立ち上がり側の幅

図 4 シンメトリー係数

HPLC で得られるピークは、必ずしも左右対称なガウスピークではなく、テーリングピークになる事が多く、時にはリーディングピークとなる。式 12 より、 $S=1$ がガウスピーク (左右対称)、 $S>1$ がテーリングピーク、 $S<1$ がリーディングである事が分かる。

2.3 分離の最適化と基本パラメーター

分離の最適化に対する保持係数、理論段数、分離係数の寄与を模式的に表すと、図 5 の様になる。

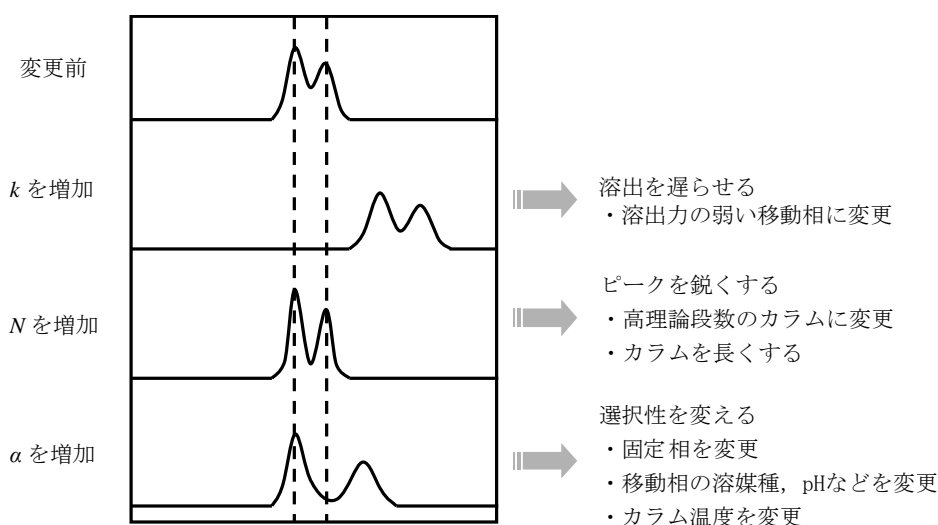


図 5 分離の最適化における各基本パラメーターの寄与

分離度とこれらパラメーターの関係は、式 14 で表される。式 14 は式 9 において隣接する 2 つのピーク幅が同じ ($W_1 = W_2$) と見做し、式 4、式 6、式 11 から導かれ、各パラメーターの寄与の度合いが分かる。分離の最適化を考える際、基本的な式として有用である。

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right) \quad (14)$$

① 保持係数の寄与

保持係数は、溶出力の弱い移動相組成に変更する事によって大きく出来る。保持係数を大きくする事は、分離度向上の為の第一ステップとして多用される。但し、保持係数が分離度向上へ寄与するのは、溶出が或る程度早い場合である。例えば、保持係数を 3 から 9 に変更しても、分離度は 1.2 倍 (式 14 より $0.9/0.75=1.2$) にしかならない反面、分析時間が長くなりピークが幅広く、ピーク高さが低くなってしまふ。

② 理論段数の寄与

理論段数は、カラムを長く (複数本接続) する事、充填剤を微小化する事によって高く出来る。分析条件を変更する事なく、分離度向上させたい時などでは有効である。但し、理論

段数は、平方根でしか分離度に寄与しない。例えば、理論段数 10 000 段のカラムを用いた時、分離度 1.0 の 2 成分を分離度 1.5 に向上させるには、理論段数は $1.5^2=2.25$ 倍、即ち 22 500 段必要となる。同じ充填剤の場合、理論段数を 2.25 倍にするにはカラム長さを 2.25 倍にする必要があり、分析時間とカラム圧力も 2.25 倍になってしまう。充填剤の微小化については、理論段数を高めると共に線速度を上げる事による分析時間の短縮が可能である。但し、カラム圧力が充填剤粒子径の二乗に反比例する為、微小化するほどカラム圧力が上昇し、装置の耐圧性に配慮が必要である。

③ 分離係数の寄与

分離係数は、固定相の種類・特性、移動相組成（溶媒種、pH、塩濃度など）、カラム温度などの条件により変化する。分離係数は、1.2 程度までほぼ直線的に分離度向上に寄与する。例えば、分離度 1.0 の 2 成分の分離係数が 1.1 であれば、分離度 1.5 を得るには分離係数を 1.16 程度にすればよく（式 14 より $0.138/0.091 \div 1.5$ ）、効率的な分離度向上が可能である。しかしながら、条件の最適化には相応の知識や経験、検討時間が必要となる。

3. HPLC の分離機構

HPLC における分離は、溶質の固定相及び移動相に対する様々な相互作用を利用して行う。この分離を支配する作用様式を分離モード（separation mode）と呼ぶ。主な分離モードには、吸着、分配、イオン交換、サイズ排除クロマトグラフィーがある。

3.1 吸着クロマトグラフィー（adsorption chromatography）

吸着平衡の差に基づき分離を行うモードである。固定相である吸着剤としては、一般にシリカゲルを用いるが、グラファイトカーボンなどを用いる事もある。図 6 に、シリカゲル充填剤を用いる吸着モードの原理を示す。

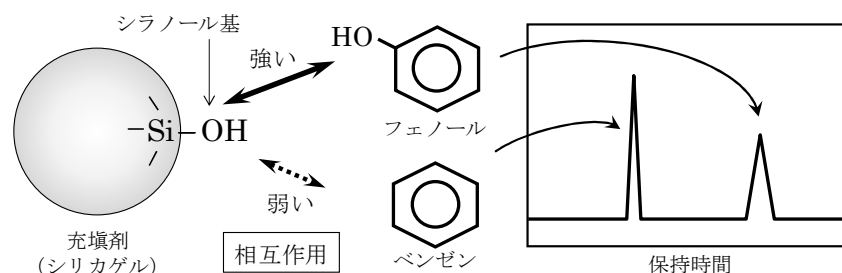


図 6 吸着モードの原理

シリカゲルによる吸着モードでは、シリカゲル表面の吸着活性点であるシラノール基（silanol group、SiOH）と分析種の極性部位との間に静電相互作用（水素結合や双極子相互作用など）が働き、一般に極性基を有する物質ほど保持が強くなる。図 6 の例では、水酸基を有するフェノールの方がベンゼンより強く保持される。移動相としては、*n*-ヘキサンやクロロホルムなどの非極性有機溶媒（弱溶媒）をベースに、2-プロパノールやエタノールな

どの極性有機溶媒（強溶媒）を添加する事により溶出をコントロールする。これら極性有機溶媒の添加量が増えると溶出が早まる。吸着モードは、極性官能基に基づく異性体分離など、アプリケーションは限られている。

3.2 分配クロマトグラフィー (partition chromatography)

分配平衡の差に基づき分離を行うモードである。分配モードでは、一般に化学結合形シリカゲル充填剤（シリカゲル表面のシラノール基に固定相とする官能基を共有結合させた充填剤）を用いる。

分配モードは、固定相と移動相との極性の関係により、順相（normal phase）と逆相（reversed phase）がある（それぞれ、順相分配、逆相分配とも呼ぶ）。順相モードは、固定相の極性が移動相に比べて高いもので、固定相としてアミノ基（NH₂）やジオール基（(OH)₂）などの極性基（親水基）を導入した充填剤を用いる。図 7 に、順相モードの原理を示す。

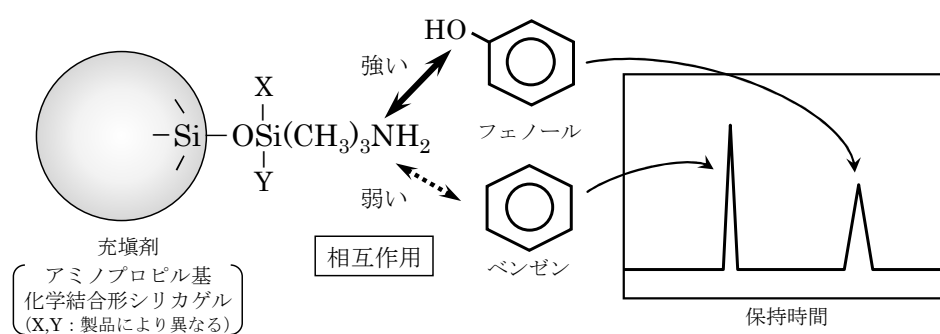


図 7 順相モードの原理

順相モードにおいては、固定相の分配相との静電相互作用に基づき分析種を保持させる。図 7 の例では、親水基である水酸基をもつフェノールの方が疎水基だけのベンゼンより固定相の親水基（アミノ基）に保持される事になる。移動相としては、吸着モードと同様、非水系有機溶媒（弱溶媒）にアルコール類（強溶媒）を加える。順相モードは、作用様式こそ異なるが移動相組成や分析種が吸着モードと類似している事から、順相・吸着モードとして一緒に扱う事もある。又、扱い易さから吸着モードに代わって用いる事が多い。なお、最近では、水溶性分析種（糖類、核酸関連物質、水溶性医薬品など）の分析に親水性相互作用クロマトグラフィー（hydrophilic interaction chromatography、HILIC と略）と言うモードをしばしば用いる事がある。HILIC は、順相モードの一種であり、通常の場合と同様、アミノ基などの親水性固定相に対して、移動相としてアセトニトリルなどの水溶性有機溶媒（弱溶媒）に水（強溶媒）を加えて用いる。

逆相モードは、順相モードとは逆に移動相の極性が固定相に比べて高いもので、固定相としてアルキル基の様な非極性基（疎水基）を導入した化学結合形充填剤を用いる。固定相に

は、オクタデシル基 (octadecyl group、 $C_{18}H_{37}$) を導入したシリカゲルが圧倒的に多く用いられ、ODS (octadecylsilyl silica) 或いは C18 充填剤と呼ぶ。ODS の表面は、炭素数 18 の炭化水素で覆われた油の様な状態であると考えると分かり易い。図 8 に、逆相モードの原理を示す。

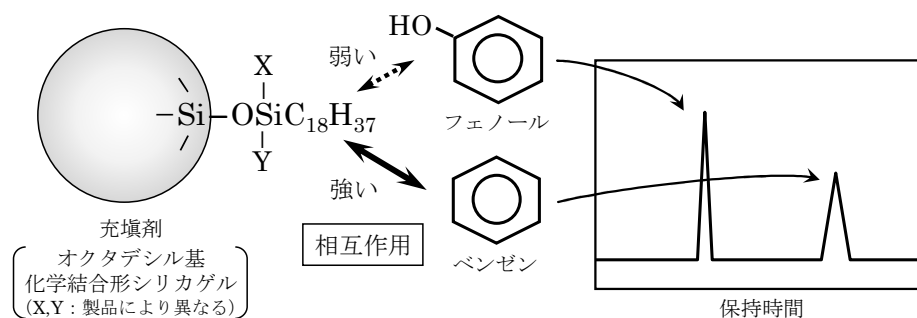


図 8 逆相モードの原理

逆相モードにおいては、分析種の非極性部位と非極性 (疎水性) 固定相との間に働く疎水性相互作用によって保持が起こる。移動相には、水や緩衝液 (弱溶媒) とメタノールやアセトニトリル (強溶媒) などの水溶性有機溶媒の混合溶液を用い、有機溶媒の添加量が増えると溶出が早まる。逆相モードは、移動相を種々工夫する事により、実に幅広い極性の成分に適用が可能であり、HPLC で最も広く用いる分離モードである。但し、逆相モードは、水溶性が高い高極性分析種の保持が苦手であり、これを補完するモードとして上述の HILIC を用いる。逆相モード、HILIC 共に移動相としてアセトニトリルと水の混合液を用いるが、強溶媒と弱溶媒の関係が逆であるので注意が必要である。

3.3 イオン交換クロマトグラフィー (ion exchange chromatography)

イオン交換平衡の差に基づき分離が行われ、吸着点がイオン交換基である吸着モードの一種と考えられる。分析種の保持は、クーロン力 (正負の点電荷間に働く力) に基づくイオン相互作用によって起こる。イオン交換モードは、陽イオン交換クロマトグラフィー (cation exchange chromatography) と陰イオン交換クロマトグラフィー (anion exchange chromatography) に分けられる。図 9 に、イオン交換モードの原理を示す。

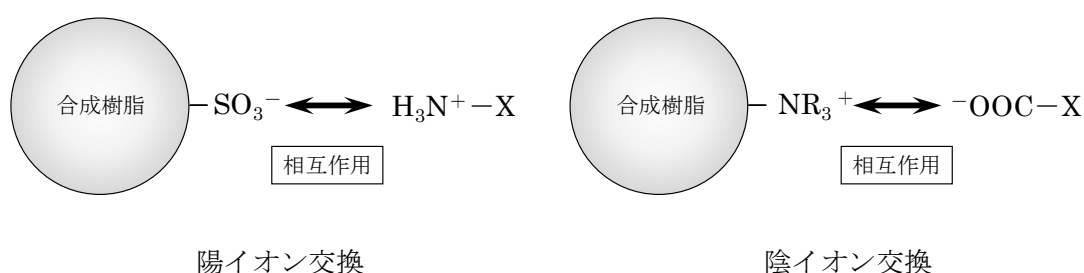


図 9 イオン交換モードの原理

陽イオン交換モードでは、スルホ基 (SO_3^-) やカルボキシ基 (COO^-) など負電荷をもつ陽イオン交換基により、正電荷を有する分析種を分離する。又、陰イオン交換モードでは、四級アンモニウム基など正電荷をもつ陰イオン交換基により、負電荷を有する分析種を分離する。充填剤としては、一般に合成樹脂製を用いる事が多い。

イオン交換モードでは、移動相として各種緩衝液を用い、塩濃度や pH を変化させる事により、溶出をコントロールする。イオン交換モードは、無機イオンの分析に用いるイオンクロマトグラフィーやトラディショナルなアミノ酸分析において欠かせない分離モードである。又、生化学分野では、タンパク質やペプチドなどの分離に用いる。

3.4 サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography、SEC)

分子サイズによって分離を行うモードである。図 10 に、サイズ排除モードの原理を示す。サイズ排除モードでは、多孔性充填剤 (一般に合成樹脂製) の細孔 (ポア) に対する分子ふるい効果により、分析種の分子サイズに基づいて分離する。即ち、小さな分子ほど充填剤の細孔に奥深く入り込む為、溶出が遅れる。一方、細孔に全く入り込めない大きな分子は、充填剤の外側を通る為、先に溶出する事になる。そして、中位の大きさの分子は、その間に溶出する。

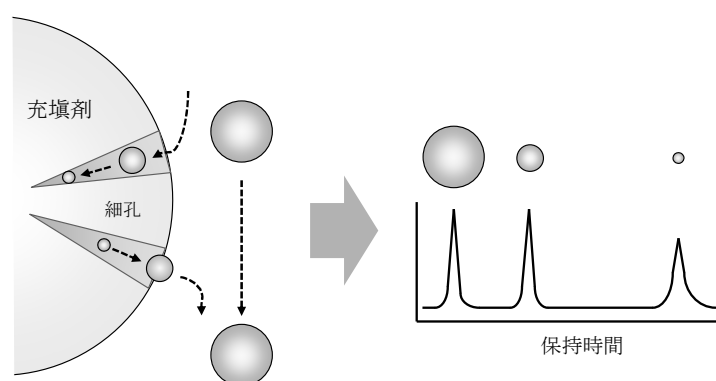


図 10 サイズ排除モードの原理

サイズ排除モードでは、移動相における分子サイズの違いのみで分離される必要があり、他の分離モードとは大きく異なり、固定相と分析種間に相互作用を一切生じない事が必須である。又、サイズ排除モードは、化学工業分野においてはゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography、GPC)、生化学分野においてはゲルろ過クロマトグラフィー (gel filtration chromatography、GFC) という慣用名で呼ぶ事も多い。

3.5 その他の分離モード

その他、特殊な分離モードとして短鎖有機酸 (酢酸、クエン酸など) の分離に有力なイオン排除クロマトグラフィー (ion exclusion chromatography)、生物由来の分子認識能 (例

例えば、タンパク質同士の特異的親和力) に基づくアフィニティークロマトグラフィー (affinity chromatography)、光学対称体の光学分割の為のキラルクロマトグラフィー (chiral chromatography) などがある。

4. HPLC 装置

一般的な HPLC 装置は、移動相 (溶離液) を送液する為の送液ポンプ、移動相中の溶存空気を除去する脱気装置、試料溶液をカラムに導入する試料導入装置、分離の場であるカラム、カラムの温調を行うカラムオーブン (カラム槽)、カラム溶出液中の成分を検出する検出器、そして検出器からの信号を取り込み、クロマトグラムの表示や定量計算を行うデータ処理装置などから構成される (図 11)。

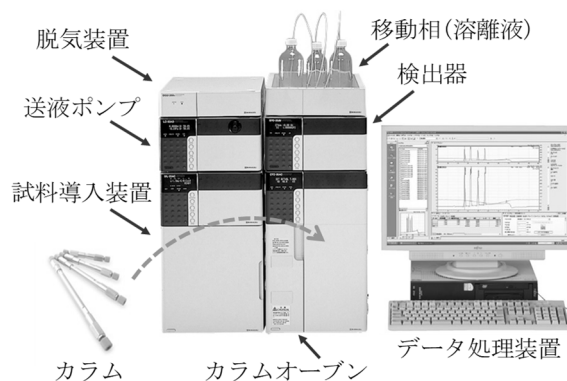


図 11 HPLC 装置の例

4.1 送液ポンプ

送液ポンプは、移動相を正確に一定流量で精度良く送液する為の装置で、性能的には耐圧性、流量安定性、低脈流などが求められる。図 12 に、現在一般的に用いる往復運動形ポンプ (プランジャーポンプ) の基本構造 (模式図) を示す。

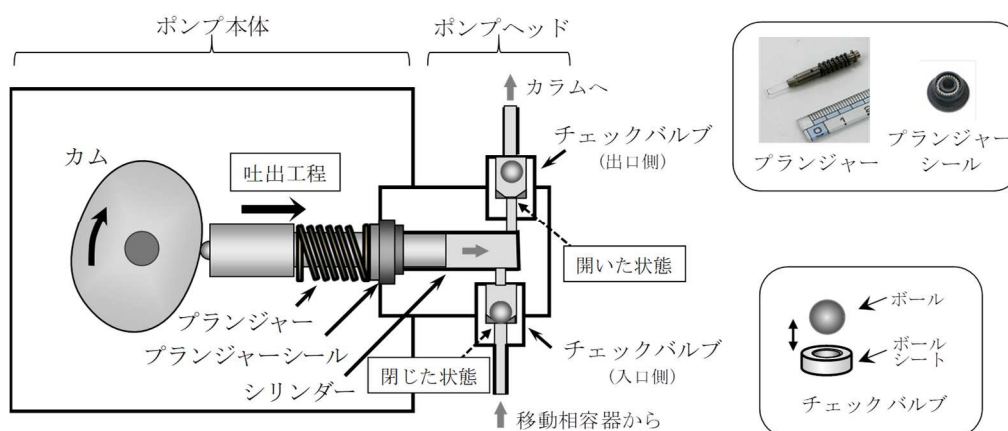


図 12 往復運動形ポンプの基本構造

プランジャー (plunger) は、パルスモーターに付けられたカムにより往復運動を行い、移動相を吸引・吐出する。ポンプシリンダーの内容量は、機種により異なるが概ね 10~100 μL である。ポンプで重要な役割を果たしている部品に、プランジャーシール (plunger seal) とチェックバルブ (check valve、逆止弁) がある。プランジャーシールは、ポンプシリンダー内の移動相が漏れない様にする樹脂製の部品である。駆動時プランジャーと常に摩擦状態にあり劣化する為、定期的に交換する必要がある。チェックバルブは、移動相の逆流を防ぐ為の部品で、ポンプヘッドの入口・出口に付いている。ボールとボールシート (弁座) から成っており、移動相吸引時入口側が開き出口側が閉じる。一方、移動相吐出時には出口側開き入口側が閉じる (図 12)。プランジャーシールからの液漏れやチェックバルブの動作不良は、流量低下や脈流の増大などに繋がる。

送液ポンプに関わる条件設定に、単一組成の移動相によって溶出させるイソクラティック溶離 (isocratic elution) と移動相組成を連続的に変化させながら溶出させるグラジエント溶離 (gradient elution、GE) の選択がある。グラジエント溶離は、多成分や保持に差がある成分の一斉分析に有用である。グラジエント溶離を行う為の送液システムには、高圧グラジエント方式と低圧グラジエント方式がある (図 13)。

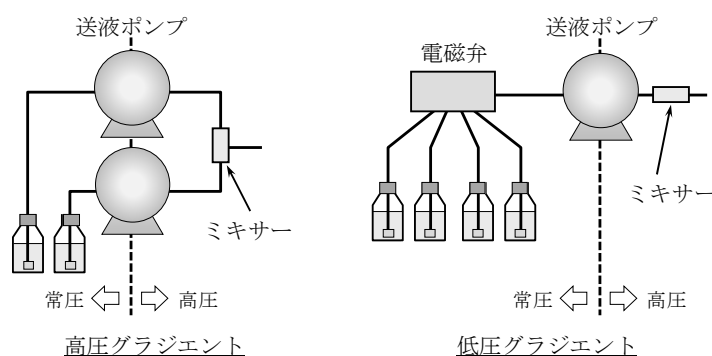


図 13 グラジエント溶離の方式

高圧方式と低圧方式は、異なる移動相が出会う地点が高圧状態か常圧 (低圧) 状態かの違いである。高圧方式では、各々の移動相は別々のポンプにより混合比率分の流量で送液された後 (例えば、流量 1.0 mL/min で 2 液を 1 : 1 で送液する場合、各ポンプの流量は 0.5 mL/min)、加圧 (高圧) 状態で出会う。一方、低圧方式では移動相吸引時、ポンプの手前に設置された電磁弁の開閉時間により混合比率を制御する為、移動相は常圧 (低圧) 状態で出会う事になる。高圧方式と低圧方式とでは、移動相が出会った後の容量が異なり、これがグラジエント遅れ (プログラム上での混合比率に対する実際の混合状態の遅れ) に影響を与える。高圧方式では、移動相はポンプを出た後直ぐにミキサーで出会い混合される。一方、低圧方式においては、電磁弁で出会った移動相は電磁弁の配管、ポンプ内などを通る為、これら容量の分だけグラジエントの掛かりが遅れる事になる。グラジエント遅れは分離パターンに微妙に影響を与える事がある為、特に分析法の移管時などでは、どちらの方式を用いて

いるかの確認が肝要である。

4.2 脱気装置

脱気装置は、移動相中の溶存空気を除去する為に用いる装置である。脱気装置を用いる一番の目的は、ポンプシリンダー内での気泡発生を防ぐ事である。ポンプシリンダー内は、吸引時に陰圧となる為に気泡が発生し易く、発生した気泡は送液不良の原因となる。又、気泡が検出器セル内で発生するとベースラインノイズの原因となる。更に、検出器によっては溶存空気がベースラインドリフトや感度低下などのトラブルを引き起こす事がある。

脱気装置は、気体のみを透過する樹脂膜チューブを減圧したチャンバー中に入れ、チューブに移動相を通液しながら吸引ポンプで減圧して、オンライン脱気するものが主流である。移動相の脱気は、アスピレーターや超音波洗浄を用いてオフラインで行う事も出来るが、空気の再溶解が起こる為、トラブルの原因となり易く、オンライン脱気装置の使用が望ましい。

4.3 試料注入装置

試料導入装置は、試料溶液を一定量、正確に精度良くカラムに導入（注入）する為の装置で、手動式のマニュアルインジェクターと自動注入式のオートサンプラーがある。

マニュアルインジェクターでは、一般にはマイクロシリンジにより任意量の試料溶液を計量、高圧 6 方バルブに取り付けられた試料ループに導入し、バルブ切換えにより試料をカラムに導入する。

オートサンプラーには幾つかの方式があり、装置メーカーや同じメーカーでも機種によって方式や構造が異なる場合がある。図 14 に、一般に広く用いる方式での注入動作例を示す。この方式では、ニードルを介し計量ポンプを用いて試料溶液を吸引・計量し、試料ループに保持した後、バルブ切換えにより移動相流路に接続してカラムへ導入する。

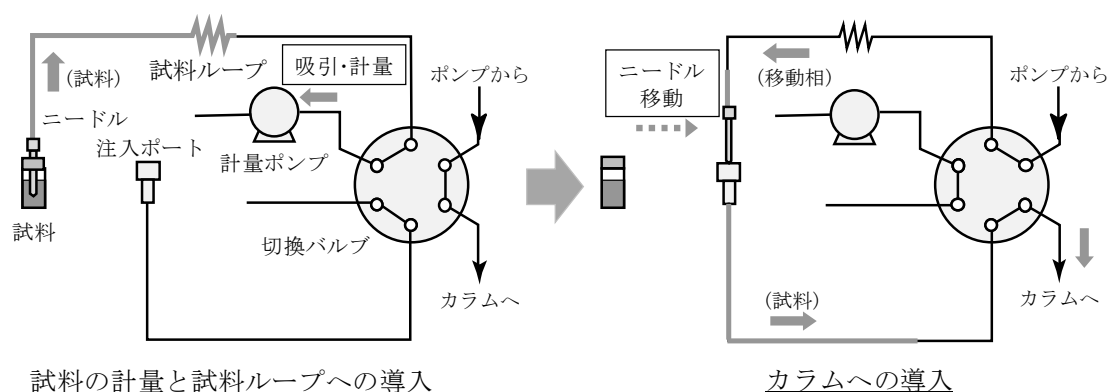


図 14 オートサンプラーの注入動作例

オートサンプラーの性能としては、注入量の正確さや注入精度に加えて、注入動作の速さ、処理検体数などが求められる。又、最近では検出器の高感度化に伴い、キャリーオーバー

(carry over) (先に導入した成分がオートサンプラー内に残存して、後の分析で検出される現象) の低減も重要なポイントとなっている。キャリーオーバーの原因としては、ニードル内面及び外面への吸着、注入ポートにおける試料残渣、試料ループ内面への吸着、切換バルブ内の接液部材質への吸着、試料が通過する配管内面への吸着などがあり、その低減には種々の工夫がなされている。

4.4 カラム

カラムは、充填剤がクロマトグラフィー管に密に詰められたものである。クロマトグラフィー管は、充填剤を詰める管と両端に付けるカラムエンドから成っている。クロマトグラフィー管の材質としては、耐食性、耐圧性に優れるステンレス鋼 (SUS) が一般的であるが、SUS はハロゲンイオン (例えば、塩化物イオン) による腐食に対して注意が必要である。SUS が適さない移動相条件や金属を嫌う分析 (イオンクロマトグラフィーや生体高分子分離など) では、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 樹脂を用いる。PEEK 樹脂は、耐圧性が高く、SUS より取り扱い易い為、HPLC 装置の各部を接続する配管やコネクター類の基材としても用いる。但し、SUS に比べると耐圧には限界がある。

充填剤の基材としては、シリカゲルが最も一般的であり、直径 2~5 μm の球状全多孔性シリカゲルを中心に、表面多孔性形 (コアシェル形) なども用いる。シリカゲル以外では、合成樹脂 (ポリマー) 基材がイオン交換モードやサイズ排除モードなどで多用される。又、粒子状ではなく、シリカゲルや合成樹脂の連続した骨格構造をもつモノリスカラム (monolithic column) という特殊なものもある。

4.5 カラムオープン

カラムオープンとは、カラム温度を一定に保つ事による精度の向上、加温によるカラム効率の向上や移動相粘度低下によるカラム負荷の低減、更に加温や冷却による分離選択性の改善などの目的で用いる。カラムオープンには、空気循環方式とブロックヒーティング方式がある。空気循環方式は GC 装置のカラムオープンと同様にヒーターとファンを用いるものであり、オープン内に複数本のカラムや切換バルブ、グラジエントミキサー、種々の反応管などが収納出来、多用途に使用出来る。反面、サイズが大きくなり高価になる。一方、ブロックヒーティング方式は、熱源とカラムに接するアルミブロック (ブロックヒーター) を用いるもので、コンパクトで低価格であるが、収納出来るカラムのサイズや本数は制限される。何れの方式でも、温調精度は同等である。

4.6 検出器

HPLC において、検出器には感度、選択性、汎用性、ダイナミックレンジ、頑健性、操作性、メンテナンス性、価格など多くの要件が求められる。この中で、通常感度が最も重要な要件であるが、分析種を夾雑成分から特異的に検出する為には、高い検出選択性が必要であ

る。一方、汎用性は対象物質が多いという意味であり、幅広い分析種に適用出来るが、一般に汎用性と選択性は相反するものである。

HPLC 用検出器には、種々の測定原理を利用したものがあり、分析種や分析目的によって選択する。表 1 に、HPLC で用いる主な検出器を示す。

表 1 HPLC で用いる主な検出器

吸光光度検出器	紫外（可視）領域における分析種の吸収を検出	
	特長	<ul style="list-style-type: none"> ・紫外（可視）領域で何らかの吸収をもつ分析種が検出出来る為、適用範囲が広く汎用性が高い ・温度や流量変化の影響を受け難く、安定性が高い
	注意点	・複雑なマトリックスでは、夾雑物の影響を受ける（特に短波長域）
フォトダイオードアレイ検出器	紫外（可視）領域における分析種の吸収を検出	
	特長	<ul style="list-style-type: none"> ・紫外（可視）領域で何らかの吸収をもつ分析種が検出出来る為、適用範囲が広く汎用性が高い ・一度の分析で分析種の吸収スペクトル情報も得る事が出来、分析後様々な解析が出来る ・温度や流量変化の影響を受け難く、安定性が高い
	注意点	<ul style="list-style-type: none"> ・複雑なマトリックスでは、夾雑物の影響を受ける（特に短波長域）。 ・データ解析に専用ソフトウェア、ワークステーションが必須
蛍光検出器	分析種の蛍光を検出	
	特長	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光物質に対し、感度が高い ・蛍光物質に対し、選択性が高く、夾雑物の影響を受け難い
	注意点	・応用範囲が蛍光物質に限られる
示差屈折率検出器	分析種と移動相の屈折率の差を検出	
	特長	<ul style="list-style-type: none"> ・一般に移動相と分析種には屈折率の差がある為、汎用性が極めて高い ・物質による感度差が小さい
	注意点	<ul style="list-style-type: none"> ・温度や流量変化の影響を受け易い ・他の検出器より感度が低く、グラジエント溶離が適用出来ない
蒸発光散乱検出器	移動相を蒸発させた後、分析種の光散乱強度を検出	
	特長	<ul style="list-style-type: none"> ・殆どの不揮発性物質に適用出来、汎用性が高い ・物質による感度差が小さい ・グラジエント溶離が適用出来る
	注意点	<ul style="list-style-type: none"> ・吸光光度検出器などより感度が低く、検量線が直線にならない ・不揮発性移動相が使用出来ない
電気化学検出器	分析種の電極上での酸化還元電流を検出	
	特長	<ul style="list-style-type: none"> ・酸化還元性物質に対し、感度が高い ・酸化還元性物質に対し、選択性が高く、夾雑物の影響を受け難い
	注意点	<ul style="list-style-type: none"> ・移動相組成、温度、流量変化などの影響を受け易い ・電極の汚れなどにより感度変化し易い ・応用範囲が酸化還元性物質に限られる
電気伝導度検出器	分析種による電気伝導度変化を検出	
	特長	<ul style="list-style-type: none"> ・イオン（主に無機イオン）に対し、感度が高い ・イオンに対し選択性が高く、夾雑物の影響を受け難い
	注意点	<ul style="list-style-type: none"> ・温度、流量変化などの影響を受け易い ・応用範囲がイオンに限られる

なお、これら検出器では十分な感度或いは選択性が得られない時、分析種を何らかの試薬と反応させて誘導体に変換して検出する誘導体化検出法を用いる事もある。

① 吸光光度検出器

物質に光を照射すると、その物質固有の波長の光を吸収する。吸光光度検出器 (absorption detector) (UV 検出器、紫外可視吸光光度検出器、UV-VIS 検出器) は、カラム溶出液をフローセルに導き、分析種に応じた波長の光を照射し、分析種に吸収された光の量を測定する検出器である。又、吸光光度検出器の一種に、フォトダイオードアレイ検出器 (photodiode array detector、PDA 検出器と略) がある。

吸光光度検出器の基本原理は、式 15 に示すランバート・ベール (Lambert-Beer) の法則である。ここで、 I_0 : 入射光強度、 I : 透過光強度、 A : 吸光度、 ϵ : モル吸光係数、 c : 濃度、 l : セル光路長である。

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon cl \quad (15)$$

セル光路長を一定で測定すれば、吸光度が濃度と比例する事から (モル吸光係数は物質の固有値であり、同じ条件下では一定)、カラム溶出液中の分析種による吸光度を入射光強度と透過光強度から測定して、その濃度を算出する (I/I_0 を透過率と呼ぶ)。但し、濃度が高くなると比例関係が失われるので、直線性の確認が必要である。

図 15 に、吸光光度検出器及び PDA 検出器の基本構造 (模式図) を示す。

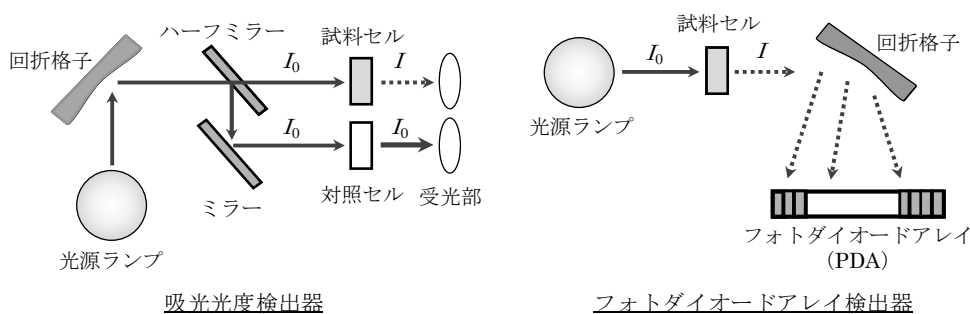


図 15 吸光光度検出器の基本構造

吸光光度検出器では、光源である重水素ランプ (紫外域)、タングステンランプ (可視域) からの光を回折格子 (グレーティング) で設定波長に分光する (例えば、250 nm)。分光された光は、セルに入る前に 2 系統に分けられ、一方は試料セルを、もう一方は対照セル (通常、光を通すだけの穴が開いている) を通過し、受光部に入る。この試料セルと対照セルの光の強度から測定データが得られる。一方、PDA 検出器では、光源からの全ての光をそのままフローセルに照射し、その透過光を回折格子で分光し、フォトダイオードアレイ素子で各波長 (例えば、1 nm ごと) の光強度を測定する。PDA 検出器により得られた情報は、通

常の時間-吸光度の 2 次元データに波長軸を加えた 3 次元データとして取り扱われ、専用ソフトウェアにより解析される。PDA 検出器では、リアルタイムでのスペクトル測定が可能となり、又ピーク純度の検定、スペクトルによるピーク同定などの解析も出来る。

吸光光度検出器が適用出来る物質としては、紫外波長域 (190 ~ 370 nm 付近) から可視波長域 (370 ~ 800 nm 付近) に何らかの光吸収特性をもつ物質である。有機化合物の多くがこの様な波長域で吸収をもつ為、この検出器の適用範囲は広い。感度面では、吸光係数が十分であれば ng オーダーの検出が可能であり、安定した使い易い検出器である。この事から、HPLC の標準検出器として選択され、最も一般的に使用されている。

② 蛍光検出器

光エネルギーを吸収した状態 (励起状態) にある物質が、熱放射を伴わず光放射 (発光) により元の状態 (基底状態) に戻る事がある。蛍光検出器 (fluorescence detector) は、この時の蛍光発光量を測定する検出器である。

蛍光強度 (F) は、吸光度 (ϵcl) が十分小さいならば式 16 で表せる。ここで、 I_0 : 励起光 (入射光) 強度、 Φ_f : 蛍光量子収率 (吸収した励起光の光子数に対する蛍光発光した光子数の比)、 k : 定数である。

$$F = kI_0\Phi_f\epsilon cl \quad (16)$$

図 16 に、蛍光検出器の基本構造 (模式図) を示す。光源としては、通常キセノンランプを用いる。光源からの光は、励起側回折格子で分光され (励起波長)、試料セルに入射する。蛍光物質から発せられた蛍光は、蛍光側回折格子で分光され (蛍光波長)、検出部 (光電子増倍管) でその強度が測定される。

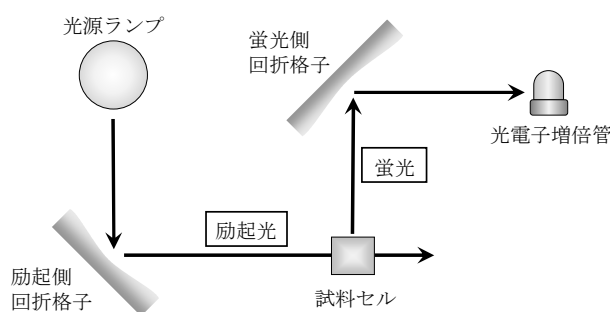


図 16 蛍光検出器の基本構造

蛍光検出器は、蛍光物質から発せられる光エネルギーを直接検出する方法である為、高い感度 (場合によっては、吸光光度検出器の 1000 倍以上) が得られる。又、光吸収をもつ物質が発蛍光性とは限らない上、分析種に固有の励起波長と蛍光波長で検出する為、高い検出選択性が得られる。但し、検出出来るのが蛍光物質に限られる。この為、非蛍光性分析種を蛍光性物質に変換して検出する蛍光誘導体化検出法を用いる事も多い。

蛍光検出器の注意点は、蛍光強度が種々の因子（光源強度、溶媒種、pH、溶存酸素、温度、溶質濃度、溶媒不純物など）による影響を受け易い事である。例えば、イオン性物質においては、pH が蛍光の有無、蛍光強度、励起及び蛍光スペクトル変化などに大きく影響する場合があるので、移動相 pH が重要になる。又、移動相溶存酸素の増加、室温の上昇などにより消光（クエンチング）する事もあるので、これらへの配慮も必要である。

③ 示差屈折率検出器

示差屈折率検出器（refractive index detector、RID と略）は、試料セルと対照セルに光を当て（両方のセルが移動相で満たされている時、信号の差はゼロ）、物質が試料セルを通過する際の屈折率の変化を測定するものである。図 17 に、RID の基本構造（模式図）を示す。光源には、タングステンランプや発光ダイオードランプなどを用いる。

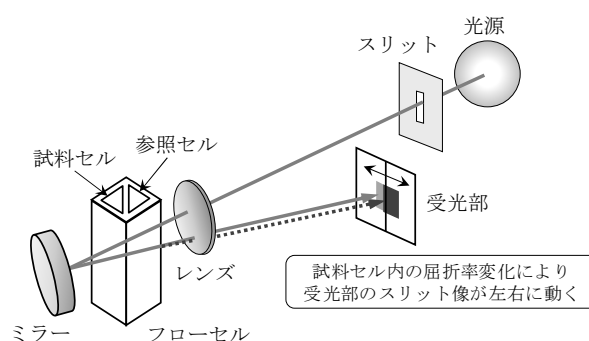


図 17 示差屈折率検出器の基本構造

RID は、移動相と屈折率の差がある物質なら原理的に全て検出出来る為、汎用性が高く万能検出器と言える。又、物質の特性により感度が左右される吸光度検出器や蛍光検出器などに比べ、物質による感度差が少なく、試料中の成分濃度比についての大雑把な情報が得られる事も利点である。反面、検出の選択性が無く、試料中の夾雑物の妨害を受け易く、感度面でも吸光度検出器より 2~3 桁劣る。一般に、光吸収性に乏しい分析種に用いる。

RID の難点は、ベースラインが室温変化、流量変動、更に移動相の溶存空気量の影響を受け易い点、試料セルと対照セルの極めて微小な屈折率の差を測定している為、移動相組成が連続的に変化するグラジエント溶離が適用出来ない点である。

④ 蒸発光散乱検出器

蒸発光散乱検出器（evaporative light scattering detector、ELSD と略）は、カラム溶出液を噴霧して移動相を蒸発させ、生じた物質の微粒子による光散乱を測定する検出器である。ELSD は、移動相の蒸発温度で蒸発又は分解しない化合物であれば原理的に全て検出出来る為、RID と同様、汎用性が高い検出器であり、光吸収性の乏しい分析種に用いる事が多い。RID との比較では、感度面で 5 倍若しくはそれ以上勝る点、グラジエント溶離が使用可能な点が大きな利点である。図 18 に、ELSD の基本構造（模式図）を示す。

ELSD における検出過程は、噴霧、蒸発、検出の 3 段階に分ける事が出来る。カラム溶出

液は、ネブライザーガス（窒素や空気）により噴霧され、ドリフトチューブと呼ばれる温度調節（加熱）された管の中に送られ、揮発性の移動相が蒸発、排出される。不揮発性物質（厳密には加熱温度で蒸発しない物質）は、移動相が蒸発した後も微粒子として残り、検出部で散乱光の強度が測定される。

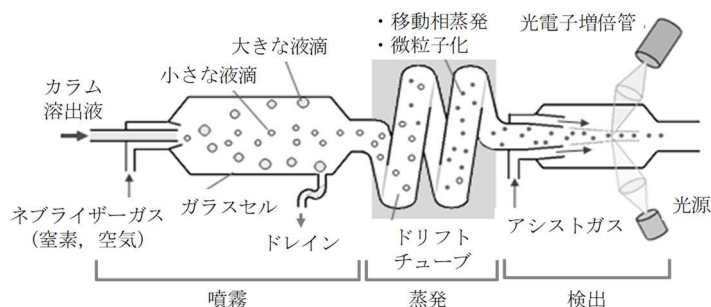


図 18 ELSD の基本構造

ELSD の注意点は、移動相にリン酸塩緩衝液などの不揮発性緩衝液は使用出来ない点、原理上検量線が直線ではない点などである。

⑤ 電気化学検出器

電気化学検出器 (electrochemical detector、ECD と略) は、電極における酸化還元反応を利用した検出器であり、酸化還元され易い物質を選択的且つ高感度に検出可能である。図 19 に、ECD の基本構造 (模式図) を示す。ECD では、セル内の作用電極と参照電極間に電圧を印加し、作用電極と対電極の間に流れる物質の酸化・還元電流を測定する。

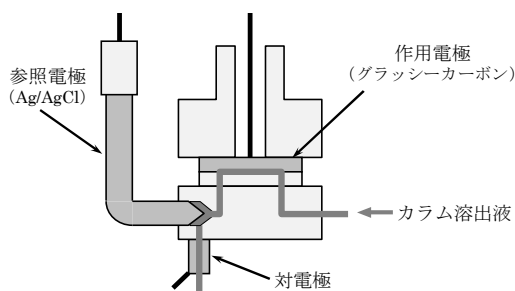


図 19 ECD の基本構造

電極の材質としては、グラッシーカーボンを始め、白金、銀、金、導電性ダイヤモンドなどがある。嘗ては、微量生体関連物質や医薬品代謝物分析などに有力な検出器として用いられて来たが、質量分析計の普及により需要は減少している。

ECD の難点は、取り扱いがやや面倒な事である。これは、移動相中の不純物や室温変化によるベースライン変動、或いは電極の汚れなどによる感度変化が発生し易い為である。

⑥ 電気伝導度検出器

電気伝導度検出器 (electric conductivity detector) は、電気の流れ易さを検出し、イオ

ンを選択的に高感度検出する事が出来る。主として無機イオンの分析に用いるイオンクロマトグラフィーで必須の検出器である。この検出器では、移動相中のイオンも検出するので、バックグラウンド電気伝導度の小さな移動相（例えば、芳香族カルボン酸）を用いるか、移動相中のイオンを除去しバックグラウンド電気伝導度を低減する目的で、サプレッサーと呼ぶ装置をカラムの後に設置して用いる。前者をノンサプレッサー方式、後者をサプレッサー方式と呼ぶ。電気伝導度検出器は、温度、流量変化などの影響を受け易く、特にセル部の温調が大切である。

4.7 データ処理装置

データ処理装置としては、専用装置も市販されているが、現在では多くの場合、パーソナルコンピュータを用いたクロマトグラフィーワークステーションが使われる。クロマトグラフィーワークステーションでは、装置の制御、データ処理、レポート作成まで行う事が出来る。メーカーによって、操作性や機能は異なるが、最近では各種分析装置を統合したソフトウェアも開発されており、同じ操作性で各種分析装置を扱える様になって来ている。

5. 終わりに

HPLC 分析を行う上で知っておくべき基礎として、基本原理、分離機構、装置の概要について述べた。これらについて、更に詳しくは、参考文献に挙げた書籍などをご覧頂きたい。

参考文献

- 1) 中村 洋 監修、ちょっと詳しい液クロのコツ－検出編、丸善(2006).
- 2) 中村 洋 監修、ちょっと詳しい液クロのコツ－分離編、丸善(2007).
- 3) 中村 洋 企画・監修、LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用、オーム社(2014).
- 4) 中村 洋 企画・監修、LC/MS, LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決、オーム社(2015).
- 5) 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).
- 6) 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).

<執筆者略歴> 三上博久 (Hirohisa MIKAMI)

- ・1975年株式会社島津製作所入社、HPLCの応用技術開発及びマーケティングを担当、HPLCマーケティングマネージャーとして約3年半米国駐在後、HPLC応用技術開発グループマネージャー、2018年1月より株式会社島津総合サービスリサーチセンターマネージャー。
- ・分析士資格：LC分析士五段、LC/MS分析士初段。



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

SEC 分析／Size Exclusion Chromatography

伊藤誠治／Seiji ITO

東ソー株式会社／Tosoh corporation

(Received May 17, 2021; Accepted June 4, 2021)

要旨

サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography、SEC) とは、分子サイズを基に分離が行われる HPLC の分離モードの 1 つであり、主に、高分子化合物の分離分析及び物性評価に用いられている。1964 年に J.Moore が架橋ポリエチレンゲルを用いて合成高分子の分子量分布を測定した事が始まりであるとされ、現在でも高分子分析における必須の手法である。本稿では、SEC 分析に用いる装置構成、分離原理、分子量測定方法、条件設定のコツ等を説明し、併せて、応用例を紹介する。

キーワード サイズ排除クロマトグラフィー；高分子；分子量測定；細孔分布；校正曲線

1. SEC 分析の目的

SEC 分析の主な目的は、高分子の分子量及び分子量分布測定である。一般的にプラスチックや樹脂とも呼ばれる高分子は、成形が容易で適度な機械的強度を有する事から日常製品にも多用されている。それら製品の品質管理においては、高分子材料の物性値（熔融温度、誘電率、破断強度等）が評価されるが、物性値の多くは重合度の影響を受ける為、併せて平均分子量（重合度）及び分子量分布を測定する事は重要である。SEC 以外の高分子の分子量測定法には、浸透圧法、極限粘度法、光散乱法（バッチ式）等があるが、何れも分子量分布の測定は出来ない。SEC は、簡便な条件で平均分子量と分子量分布の情報が同時に得られる為、様々な分野で広く利用されている。

なお、合成高分子を分析種として移動相に有機溶媒を用いる条件をゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography、GPC)、天然・生体高分子を分析種として移動相に水溶液（緩衝液）を用いる条件をゲル濾過クロマトグラフィー (gel filtration chromatography、GFC) と区分して呼ぶ事もあるが、JIS K0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則及び JIS K0214:2013 分析化学用語（クロマトグラフィー部門）では、HPLC の分離モードの呼称として SEC が用いられている。

2. SEC による分析

2.1 装置の基本構成

SEC 分析に用いる代表的な HPLC 装置構成の例を図 1 に示す。検出器には、示差屈折率検出器 (RI 検出器) が汎用される。RI 検出器の光学セルは、三角柱状の石英 (ガラス) セルを 2 本圧着した構造であり、サンプルセル (試料溶液) とリファレンスセル (移動相) の間の屈折率変化を検出する。検出感度は高くないが、屈折率の異なる全ての成分が検出対象となり、信号強度に分子量依存性が少ない特長を有している事から SEC の検出器には適している。RI 検出器には、その構造として、サンプルセルとリファレンスセルの両方に同時通液可能な構造をもつタイプとリファレンスセルをパージするタイプの 2 種類が有る。図 1 の流路図は、両方に通液可能なタイプの検出器を使用した例である。このタイプにはポンプが 2 台必要となるが、両方のセル内に同時に通液される為にベースライン安定性が優れており、SEC 専用 HPLC 装置等で採用されている。SEC 分析では、溶出時間の安定性が測定結果に与える影響が大きいため、溶離液槽とポンプとの間に脱気部を接続する事が推奨される。同様に、溶出時間を安定させ、溶媒の粘性を低下させる目的でカラム恒温槽の使用が適当である。

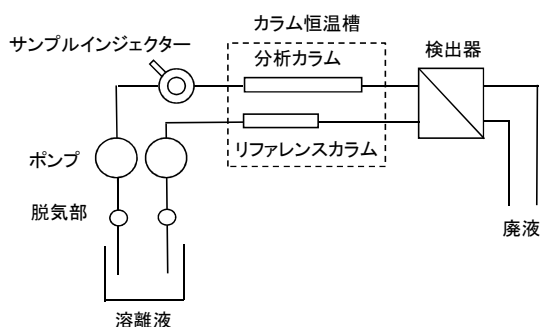


図1 SEC分析に用いるHPLC装置構成の例
サンプルセルとリファレンスセルの両方に
通液可能なRI検出器を使用した例

表 1 に、SEC で用いられる検出器とその特性を示す。RI 検出器以外の汎用的な検出器として、紫外吸光度検出器 (UV 検出器)、光散乱検出器及び粘度検出器が有る。UV 検出器は、その構造に UV 吸収をもつ分析種を選択的に検出出来る為、RI 検出器と併用する事で共重合体解析等にも利用される。RI 検出器を濃度計として併用し、光散乱検出器や粘度検出器を用いる事で、絶対分子量及び分岐度等の情報を得る事も可能である。赤外分光光度計を用いると、共重合体の組成分布等の情報が得られる。質量分析計を用いた例として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser desorption/ionization、MALDI) -MS を用いた絶対分子量測定²⁾ や光散乱検出器と MALDI-MS の併用による絶対分子量測定³⁾ の報告等が有る。

表1 SECで用いられる検出器

検出器	測定原理	得られる情報	備考
示差屈折率検出器(RI)	屈折率差 (変化)	濃度	汎用的。安定性に難。
紫外吸光度検出器 (UV)	官能基の紫外吸収	濃度	汎用的。吸収をもたない試料は適用不可。
光散乱検出器 (LS)	散乱光強度	絶対分子量、回転半径、分岐度	絶対分子量測定。低分子には適用不可。
粘度検出器 (VIS)	圧力差 (変化)	比粘度	LS よりも低分子量に適用可。
赤外分光光度計 (IR)	官能基の赤外吸収	濃度、分子構造	構造由来の定量性に優れる。
質量分析計 (MS)	イオン化した試料を電界・磁界で分離	電荷した物質の質量	定性定量性に優れる。

2.2 分離原理

HPLC の他の分離モードでは、分析種は、充填剤表面との間の相互作用（疎水性や静電的相互作用による分配や吸着、親和性）により分離される。一方、SEC では、分析種と充填剤表面との間の相互作用を利用せず、分子サイズのみを分離パラメーターとして分離される。言い換えれば、分析種と充填剤表面との間に、サイズ効果以外の相互作用が無い状態で分離させる必要が有る。スチレンジビニルベンゼン共重合体を基材とした多孔性充填剤表面の走査型電子顕微鏡（SEM）写真を図 2 に、SEC の分離メカニズムの模式図を図 3 に其其示す。

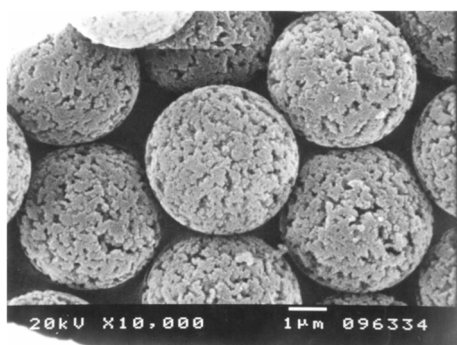


図2 充填剤表面のSEM写真
倍率：10,000倍

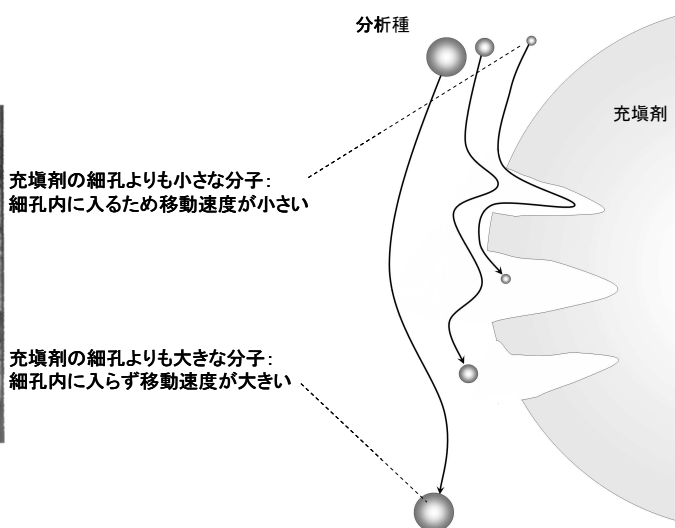


図3 SECにおける分離メカニズム

多孔性充填剤表面には無数の細孔が存在しており、この細孔の大きさ及び細孔分布が充填剤の分離性能を決定する。移動相をカラムに通液した場合、充填剤表面に存在する細孔内部の溶媒は静止或いは静止に近い状態となる。細孔より大きなサイズの分子は細孔内部に浸透する事が出来ない為、充填剤の外側を移動する溶媒と共に移動し、その平均移動速度は速くなる。一方、細孔より小さなサイズの分子は細孔内部の奥深く迄浸透/拡散する事が出来る為、細孔内部での滞留時間が長く成り平均移動速度は遅くなる。この分離機構に基づき、サイズの大きな分子程早く溶出し、サイズの小さな分子程遅く溶出する。

溶解状態の分子は、分子の周囲を溶媒分子が取り囲んだ溶媒和の形で存在している（図 4）。実際には、分子は溶媒和の状態では移動する為、SEC による分離は、この溶媒和のサイズに基づいて行われる。この溶媒和の大きさは、分析種の固有粘度 η と

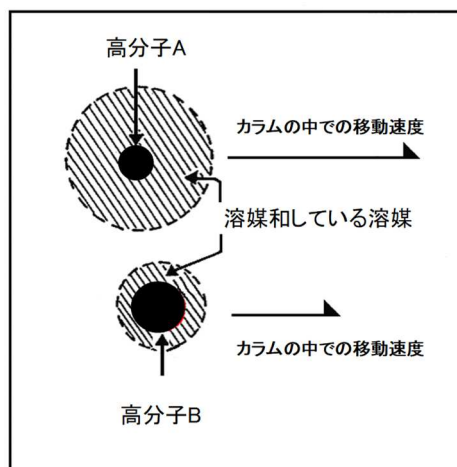


図4 溶質分子と溶媒和

分子量に比例し、固有粘度は、その分子構造に依存している。従って、実際の分子量が同じ高分子であっても、そのモノマー単位が異なると溶媒和の分子サイズが異なり、カラム内での溶出挙動／溶出順も異なって来る。

SEC の分離原理をカラムに当て嵌めたものが図 5 である。細孔の最大サイズより大きな分子がカラムから溶出する迄に要する移動相の溶出容量を排除限界溶出容量 (V_0) と呼ぶ。一方、全ての細孔に浸透出来る小さな分子がカラムから溶出して来る溶出容量を全浸透限界溶出容量 (V_0+V_i) と呼ぶ。ここで、 V_i は、全細孔容量である。SEC における分離は、 V_0 と V_0+V_i の間で行なわれる為、分析時間は、カラムサイズと移動相流速によって決定される。この点が HPLC の他の分離モードと大きく異なる点である。

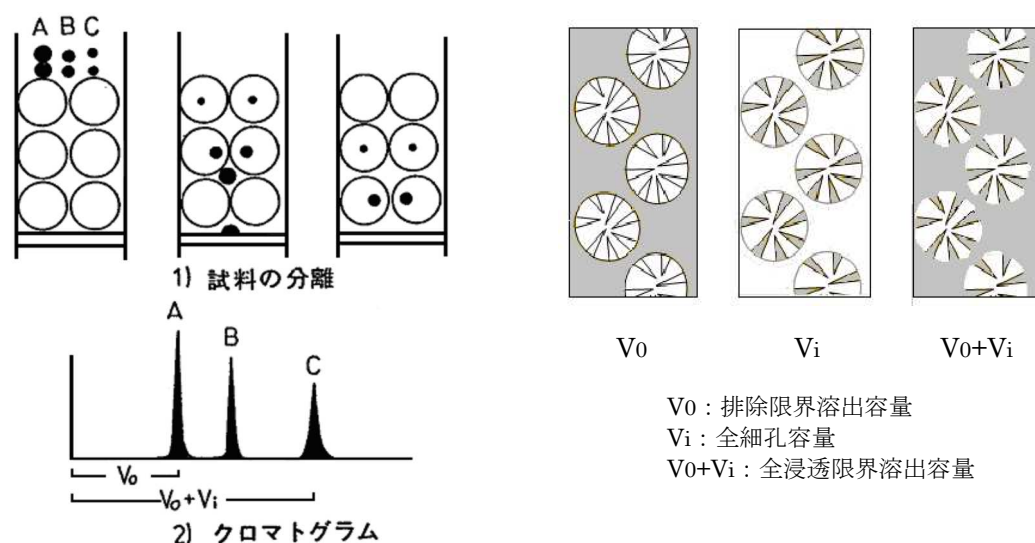


図5 V_0 、 V_i 、 V_0+V_i の模式図

2.3 校正曲線

SEC を用いて平均分子量及び分子量分布を測定する場合、予め使用するカラムにおける標準物質の溶出時間と分子量との関係を確認しておく。SEC での標準物質とは、分子量既知且つ分子量分布が狭い単分散の高分子試料を指す。ポリスチレンやポリメチルメタクリレート、ポリエチレンオキシド等の種類があり、分子量値が値付けされたもの（ポリスチレンの例では、分子量 $3 \times 10^2 \sim 2 \times 10^7$ ）が市販されている。これらの溶出時間と分子量との関係が校正曲線（calibration curve）である。市販されている種々のグレードの SEC カラムによる校正曲線の例を図 6 に示す。校正曲線の

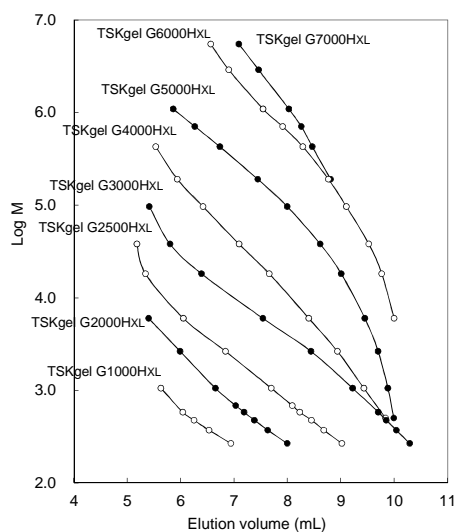


図6 市販SECカラムの校正曲線の例
 マーカー：標準ポリスチレン

傾きが緩やかな分子量域において、そのカラムの分離性能が高い事を表している。例えば、TSKgel G5000HXL カラムは、分子量 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 程度の分子量域の分離が良好となる。市販の SEC カラムには、校正曲線情報が添付されており、分析種の分子量分布や目的に応じて適切なカラムを選択する。

この校正曲線の傾きは、充填剤表面の細孔特性を反映している。図 7 に、充填剤の細孔特性分布と校正曲線との関係を示す。図 7(1)は、充填剤の表面細孔サイズとその存在頻度の関係を表したものである。一般的な充填剤 A は $0.05 \mu\text{m}$ 付近を極大とした正規分布に近い細孔分布であるのに対し、細孔多分散型充填剤と呼ばれる充填剤 B は、 $0.02 \sim 0.1 \mu\text{m}$ の範囲で頻度一定の細孔分布をもっている。この場合、充填剤 A の校正曲線は、中心付近の狭い分子量域に最も良好な分離能をもつ 3 次式を描く。一方、充填剤 B では、広範囲で一定の傾きをもつ 1 次式を描く。分子量分布が広い試料を測定する場合、広い分画範囲と高分離を必要とする為、複数のグレードのカラムを直列に接続する場合や事前に異なるグレードの充填剤を混合したカラム（ミックスグレード）を用いる事が多い。最近では、充填剤 B の様な細孔多分散型充填剤も多用されている。広範な分子量域において校正曲線が 1 次式で近似される為、近似誤差が低減される。

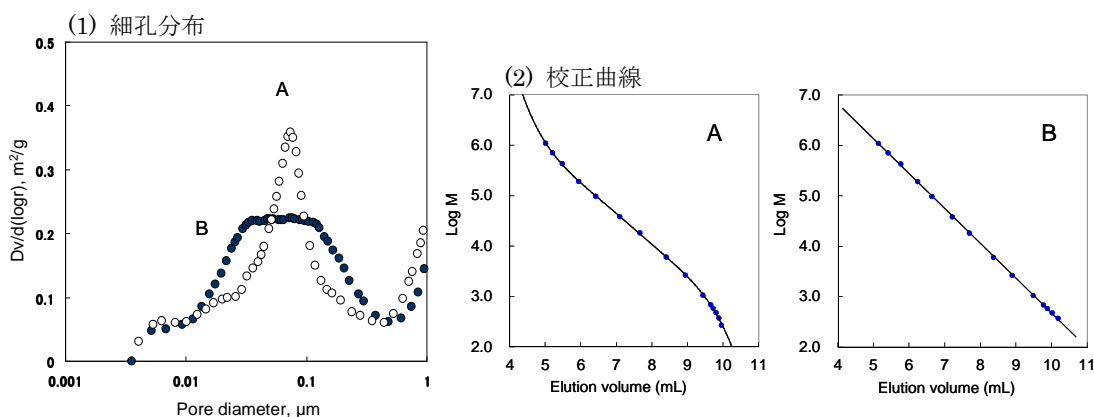


図7 細孔特性と校正曲線との関係

2.4 平均分子量及び分子量分布の計算

高分子試料のクロマトグラムと校正曲線の重ね書きの例を図 8(1)に示す。校正曲線から溶出時間を分子量に換算し、ピーク面積のスライスデータを用いて全体を積分する事で、平均分子量及び分子量分布が計算される。平均分子量には、重量平均分子量 M_w 、数平均分子量 M_n 、 z 平均分子量 M_z 等の種類が有る。このうち、重量平均分子量計算の概念図を図 8(2)に示す。RI 検出器や UV 検出器のみを使用した SEC 分析によって得られる結果は、標準物質との比較で得られる相対分子量値である。測定対象と標準物質の分子構造が異なると溶媒和のサイズが異なる為、真の分子量値ではなく、用いた標準物質の分子量に換算した分子量が計算される。例えば、標準物質としてポリスチレンを使用した場合、“ポリスチレン換算の相対分子量値”となる。

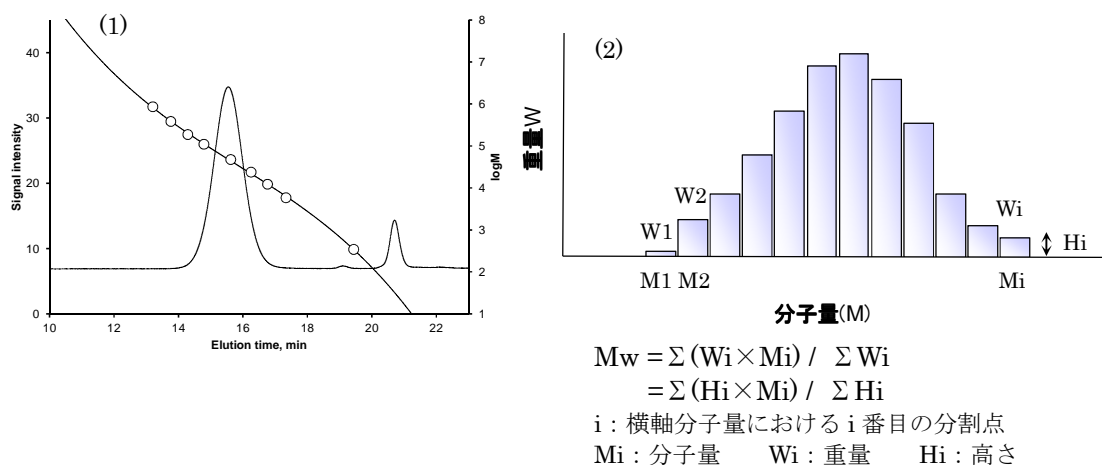


図8 クロマトグラムと校正曲線の重ね書き、及び重量平均分子量計算の概念図

3. SEC の条件選択のコツ

3.1 カラム

SEC 用カラムを選択する際のポイントは、充填剤の基材と表面細孔分布特性である。

充填剤の基材は、分析種が溶解する移動相溶媒に対して化学的安定性が高いものが選択される。代表的な基材を表 2 に示す。合成高分子の分析に多用されているのが、スチレンジビニルベンゼン共重合体である。機械的強度や化学的安定性が高い為、テトラヒドロフラン (THF) やトルエンに代表される低極性溶媒を移動相として広く用いられている。合成高分子の SEC 分析では、THF を移動相とする条件が主流であるが、高分子の多様化・多機能化に伴い、溶解性の理由からジメチルホルムアミド (DMF) やヘキサイソプロパノール (HFIP) 等の高極性溶媒の使用頻度も高まっており、それに適した基材としてポリアクリレート基材が開発されている。ポリアクリレート基材は、天然高分子を対象とした水系移動相でも使用される。タンパク質等の生体高分子の測定では、表面の疎水性の低いシリカゲルやアガロースゲルが用いられる。

表2 SECで使用される充填剤の基材の種類

分析種	基材の種類	移動相
合成高分子	スチレンジビニルベンゼン共重合体 ポリアクリレート	有機溶媒
生体高分子 タンパク質	シリカゲル アガロース	水系緩衝液
天然高分子 多糖類	ポリアクリレート	水 水系緩衝液

表面細孔分布特性に関しては、測定対象の分子量分布に適したカラムを選択し、特に、排除限界分子量を超えない様にする必要が有る。同一のエポキシ樹脂を異なる 5 種類のグレードのカラムを用いて分離したクロマトグラムを図 9 に示す。TSKgel G1000HHR~

G2500HHR の排除限界分子量の小さいカラムを使用した場合、排除限界分子量を超えて分離されていない高分子成分が立ち上がりの急なピークとして現れており、この試料の分子量測定には適していない事が分かる。TSKgel G3000HHR 及び G4000HHR では、何れもカラムの分子量分画内に溶出しているが、比較として分子量分画範囲を有効に使用出来ている G3000HHR が最も適したカラムとなる。なお、分子量測定目的ではなく、前処理的に SEC を利用して低分子成分の定量等を行う場合は、排除限界分子量の小さいカラムを選択する事がある。又、校正曲線の項でも述べたが、分子量分布が広い試料を測定する場合、複数のグレードの連結の他、ミックスグレードや細孔多分散型充填剤が使用される。

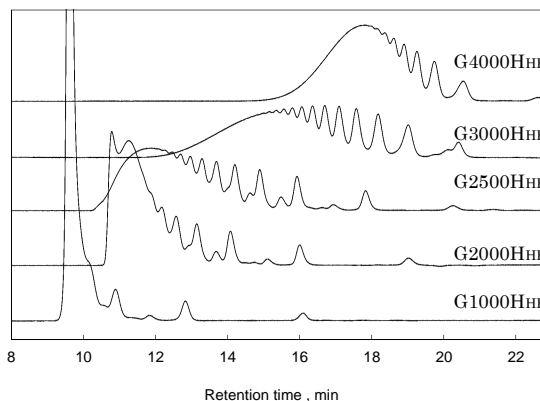


図9 エポキシ樹脂のクロマトグラムの比較

3.2 移動相組成

SEC 分析の条件選択において最も重要な項目は、移動相組成の選択である。移動相を選択する基準として、(1) 測定対象の溶解性が高い事、(2) 測定対象と充填剤との間の 2 次的相互作用が抑制されている事、(3) 高感度に検出可能である事、(4) 溶媒の粘性が低い事、(5) コストが低い事、等が列挙されるが、このうち最も重要視されるのは基準 (1) (2) である。溶解性については、種々の溶媒を用いた溶解試験を実施した結果により、ベースとなる良溶媒を選択する。2 次的相互作用の抑制については、ピーク形状の異常や再現性の悪化、回収率の低下等の現象に注意しながら、組成の調整や添加剤の使用等の工夫が必要である。

測定対象と充填剤との間の主な 2 次的相互作用は、静電的相互作用 (イオンの相互作用) と疎水的相互作用である。模式図を図 10 に示す。ポリマー系充填剤の表面には、弱酸性の官能基が若干残存している為、塩基性官能基を有する高分子は静電的相互作用により充填剤表面に吸着し、酸性官能基を有する高分子は反発して排除される。これは、シリカ系充填剤でも同様である。これらの相互作用の抑制には、水系移動相の場合、移動相の pH の調整や塩濃度を高める等の手法が用いられる。一方、THF 等の有機溶媒系移動相の場合、塩基性高分子の測定に際してはトリエチルアミン等の低級アミン類が、酸性高分子の測定に際してはリン酸やクエン酸等の酸類が其々移動相に添加さ

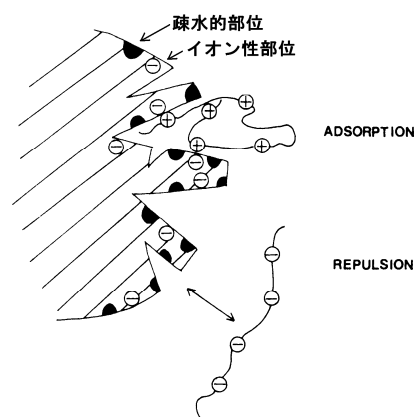


図10 充填剤表面の2次的相互作用の模式図

れる事がある。又、ポリマー系充填剤は、基材（スチレンジビニルベンゼン共重合体、ポリアクリレート基材）の種類に関わらず、表面に疎水性を有しており、シリカ系充填剤に関しても、製造工程の表面処理の段階で導入された官能基に由来した疎水性を示すものも有る。その場合、疎水的相互作用の影響が大きい水系移動相では、アセトニトリルやメタノール等の水溶性有機溶媒を移動相に添加する等の方法が用いられる。

SEC 分析における移動相組成の影響を評価した事例を示す。図 11 は、ポリアクリル酸ナトリウムを測定試料として、塩濃度の異なる移動相を用いて測定した結果である。ポリアクリル酸ナトリウムは、カルボキシ基を有する酸性ポリマーである。この結果から、移動相に塩を添加しない場合、反発の作用を受けてピーク形状が異常に成るが、塩濃度を上げて行く事で正常に溶出する様に成り、50 mmol/L 以上で安定している事が分かる。この場合、塩濃度が低い方が RI 検出器のベースラインノイズが低減される為、50 mmol/L が選択される。図 12

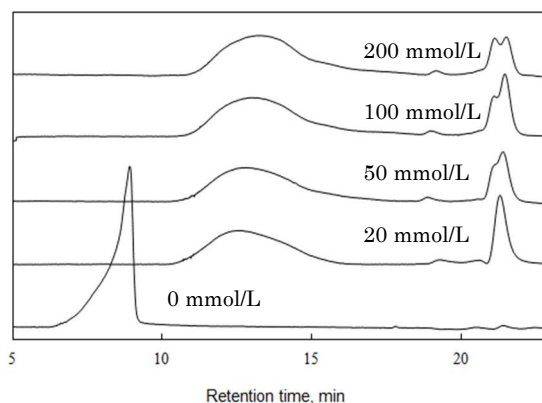


図11 ポリアクリル酸ナトリウムの測定例

カラム：TSKgel GMPWXL×2
 (内径；7.8 mm、長さ；30 mm×2、粒子径；13 μm)
 移動相：xx mmol/L 硝酸ナトリウム水溶液
 流速：1.0 mL/min 注入量：100 μL 濃度：2.0 g/L
 検出器：RI

は、ポリナフタレンスルホン酸ナトリウムを測定試料として、アセトニトリル濃度の異なる移動相を用いて測定した結果である。ポリナフタレンスルホン酸ナトリウムは、酸性ポリマーであると同時に高い疎水性を有するポリマーである。移動相のベースを 50 mmol/L 濃度の塩水溶液とする事により静電的相互作用は抑制されるが、移動相中のアセトニトリル濃度が低い場合は吸着が認められる。アセトニトリルを 30%以上添加する事で、回収率が向上して再現性も得られている。この様に、SEC 分析では、特徴の有る官能基や構造を有する高分子を測定する場合、測定試料の溶解性に注意しながら、移動相組成について複数の条件での検討を行って最適化する方法が推奨される。

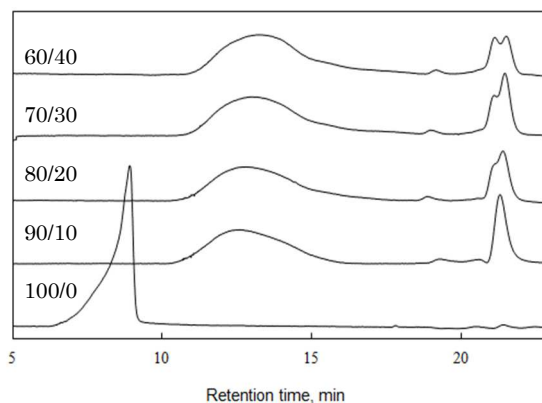


図12 ポリナフタレンスルホン酸ナトリウムの測定例

カラム：TSKgel G6000+3000PWXL
 (内径；7.8 mm、長さ；30 mm×2、粒子径；13/7 μm)
 移動相：50 mmol/L 硝酸ナトリウム水溶液/アセトニトリル
 =xx/yy
 流速：1.0 mL/min 注入量：100 μL 濃度：2.0 g/L
 検出器：RI

4. SEC 分析の応用例

SEC は、高分子の物性評価の手法としての適用分野が拡がりつつある。高分子を溶解する為の前処理法や新規移動相の開発が進み、従来測定が困難或いは測定精度が低いとされていたセルロースやナイロンの他、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) やポリアセタール (POM) 等のエンジニアリングプラスチックも分子量測定が出来る様になった。本章では更に、HPLC の分離モードのうちでも独特である SEC の特長を生かした応用例を紹介する。

4.1 高分子添加剤の分析

SEC の大きな特長の 1 つが、高分子から低分子迄の幅広い物質を一度にカラムへ負荷して分離出来る点である。この優位性を生かした高分子添加剤の分離例を紹介する。高分子製品には、加工性の改良や耐候性・耐久性の向上、界面性能の改良等を目的として、可塑剤、酸化防止剤や紫外線吸収剤、帯電防止剤等の添加剤が複数組み合わせられて添加されている。その定量には、ソックスレー抽出や沈殿法等による前処理と組み合わせて、GC/MS や逆相クロマトグラフィーを用いた LC 及び LC/MS による測定が用いられている。

この分析に SEC を応用する事で、煩雑な前処理を必要としない LC/MS による測定が可能となる。図 13 の高分子試料の UV 検出器によるクロマトグラムを用いて、本手法について説明する。分離カラムには、排除限界分子量 10,000 程度のオリゴマー分離用のカラムを使用した。カラムの直後に流路切替バルブを接続し、先ず、排除限界溶出容量 (V₀) 付近に溶出させた高分子成分をドレイン側に廃棄する。その後、流路を切り替えて、分子量 1,500 以下の低分子画分のみを MS 検出器に導入するものである。MS 検出器のイオン化法には、THF のみを移動相とした低極性化合物のイオン化に適した APCI を用いた。

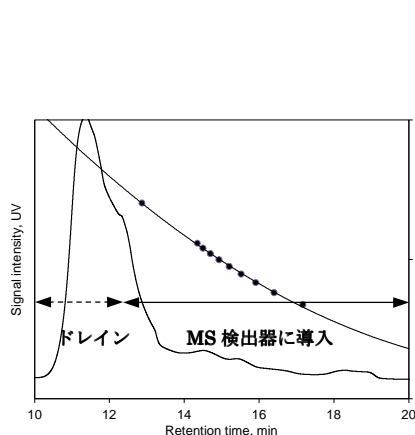


図 13 高分子の UV クロマトグラム

カラム : TSKgel SuperHZ2000×4
 (内径 ; 6.0 mm、長さ ; 150 mm×4、
 粒子径 ; 3 μm)
 移動相 : THF
 流速 : 0.6 mL/min 注入量 : 5 μL
 検出器 : UV 254 nm

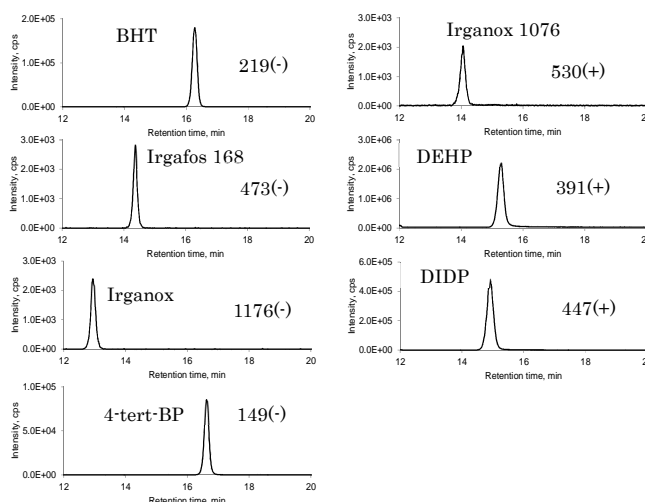


図 14 高分子添加剤 (標準物質) の SIM クロマトグラム
 カラム、移動相条件は、図 13 と同一
 各図における数字及び記号は、検出イオンの
m/z 及びポラリティーを表す

本条件において得られた酸化防止剤及び可塑剤の SIM クロマトグラムを図 14 に示す。逆相クロマトグラフィー程の分離能は望めないが、この手法では、溶解以外の前処理を必要とせず、貧溶媒の使用等による回収率低下の懸念も少ない。実際に、市販ラップフィルム (polyvinylidene chloride-polyvinyl chloride、PVDC-PVC 製) やカップ麺のカップ (ポリスチレン製) の分析を行った結果、可塑剤や酸化防止剤が検出され、従来の沈殿法-RPC/MS 法よりも高回収率の結果が得られている。

4.2 2D-LC への利用

SEC モードは、高分子材料の組成解析の手法の 1 つとして、HPLC の他の分離モードと組み合わせた所謂 2D-LC として応用されている。従来、高分子の組成解析の方法として、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) や核磁気共鳴分光法 (NMR)、元素分析法等が用いられて来たが、これらの手法単独では分子量分布と組成分布を同時に評価する事は困難であった。SEC モードは、移動相条件や分離機構が他のモードより比較的単純である為、逆相クロマトグラフィーや順相クロマトグラフィー等の分配・吸着モードを 1 次元目とし、SEC モードを 2 次元目として組み合わせる事が比較的容易である。この組み合わせにより、分子量分布の情報と共に、組成 (極性) 分布の情報も同時に得る事が出来る⁴⁾。

まとめ

以上、SEC 分析についての定石とコツについて纏めた。実際に測定するに当たっての一助にでもなれば幸いである。

引用文献

- 1) JC Moore, *J. Polym. Sci.*, A2, 835(1964).
- 2) H. Sato, N. Ichieda, H. Tao, H. Ohtani, *Anal. Sci.*, 20, 1289-1294 (2004).
- 3) H. Kawagoe, Y. Takai, M. Oishi, H. Sato, H. Tao, *Proceedings of 11th National Symposium on Polymer Analysis and Characterization*, 79 (2006).
- 4) 香川信之, 色材協会誌 93, 189-193, 2020.

<執筆者略歴> 伊藤誠治 (Seiji ITO)

- ・ 1993 年 東ソー株式会社 科学計測事業部 (現バイオサイエンス事業部) 入社、HPLC のアプリケーション開発及びカスタマーサポートを担当。
- ・ 分析士資格 : LC 分析士五段、LC/MS 分析士二段。



【先達に学ぶ】

企業からの留学のお勧め／

Recommendation of Research Abroad to Company Researchers

常吉俊宏／Toshihiro TSUNEYOSHI

元・静岡理科大学／Former Professor at Shizuoka Institute of Science and Technology

(Received March 15, 2021 ; Accepted March 16, 2021)

キーワード 海外留学；ラインポスト；収益事業；博士研究員

最近は留学に出掛けて、科学技術的・人間的に一回り大きくなって帰って来ようと言う若者が少なくなって来ている様です。分野にもよるでしょうが、技術的には欧米との差は少なくなっています。留学希望者が大学勤務の場合、期限付きポストで短期的な成果を求められていて余裕が無いかも知れません。そこで今回ご案内するのは企業の研究開発者で、経営者の要望を満たして来た人を想定しています。

大卒院卒の新入社員を 100 名近く以上採用する企業の場合、将来の幹部コースへの振り分けで研究開発のラインポストや技術専門職ポストから外れてしまう人が多数出て来ます。この時迄に本人の希望により大学へ応募して採用されると、企業、本人双方がハッピーになります。この為に必要なのが本人著となる多数の良い論文と人脈であり、その分野のリーダーたる世界的研究者の研究室に留学して指導を直接受けるのが理想的です。勿論その分野が当該企業の収益事業と切っても切れない関係に有るのが更に理想的です。企業によっては入社から間もなく将来の海外勤務、或いは海外留学の希望の有無を書かせる所も有ります。

様々な理工系分野の研究者を見ていると、数学などは別ですが、凡そ 40 から 50 歳間、多分 45 歳位に生涯で最も研究開発者としての油が乗っている時期を迎えると思われれます。各大学共に経営側から見て一番融通の効く准教授を採用したい様ですけれど、候補者としては 50 歳に達すると准教授として採用されるには壁が高くなる様です。機会が有る度に留学希望を出しておいて、成る可く早めに担当事業関連分野を牽引する大学に留学し精力的に共同研究、出来れば筆頭著者の論文多数を携えて 40 代半ば迄に准教授として採用される様、各大学にアプライする事をお勧めします。

留学のメリットとして長年利用されて来たのが、現地でじっくり修得し持ち帰って来た新技術のお土産でしょう。分野と技術のレベル、機器の価格等に依りますが、少なくとも数年、運が良ければ 10 年近くは先行利益を享受出来ると思います。

外国語でのコミュニケーションが苦手の方もいらっしゃると思いますが、英語を代表と

して効率的な修得法が現在巷で話題を呼んでいます。或いは伝統的な方法ですが、同志 7～8 名で指導経験者を招き、英会話レッスンを週 1 回開催するのも有効と思います。現地へ行けば止むに止まらず単語だけでも話し始め、上達が進みます。英語の場合通常であれば、1 年半で頭の中で日本語に変換する事なく英語だけで応答を考えられる様になります。英語が上達するのも留学の大きなメリットです。

若い時こそ冒険のチャンスです。それも安全な冒険です。是非、一步を踏み出して下さい。ひょっとしたら現地で働き続ける事も出来る可能性が有ります。大志を抱いて下さい。企業の場合、それ迄に結婚している事が望ましく前提ですが、家族連れで留学すると苦楽を共にする事が出来、夫婦で協力する事により壁を難なく乗り越え、それが家族の経験・思い出・絆になると思います。

企業に入社する前に博士号を授与された人と、企業の新事業の研究開発などで共同研究を行った教授に論文を提出して博士号を授与される人が有ると思いますが、入社前に博士号を既にもっている人は留学先のポストドクターフェロー、即ち博士研究員に応募し、時間を掛けて納得して留学して行く事が出来ると思います。

海外留学は世界観を変えます。海外旅行とはスケールが違います。経験するとしないとでは大違い。留学時代は研究人生の中の特筆すべきハイライトになると思います。狭い日本から抜け出して、是非一度試される事をお勧めします。

＜執筆者略歴＞ 常吉俊宏 (Toshihiro TSUNEYOSHI)

- ・ 1974 年大阪大学理学部化学科卒業、1976 年同・大学院理学研究科修士課程修了 (千原秀昭教授)、1981 年同・大学院理学研究科博士課程修了 (音在清輝教授)、理学博士 (大阪大学)、1981 年(株)東芝・医用機器事業部入社、1982 年同社・総合研究所・化学材料研究所、1989 年～1991 年米国 Thomas Jefferson 大学分子医学研究所 (JIMM)・博士研究員、1991 年静岡理工科大学 (SIST) 理工学部助教授、2000 年同大学理工学部教授、2020 年同大学定年退職。
- ・ (株)東芝・総研では通産省工業技術院委託“神経障害診断・治療支援システム”の開発として、小児における抗てんかん薬治療モニタリング (TDM) の HPLC 本体部の分析設計を担当、東大薬学部・中村 洋助教授 (当時) のご指導を受け、米国留学のご支援を賜りました。JIMM では骨形成不全症患者のコラーゲン遺伝子の新規変異を見出し、出生前診断で正常を確認後正常出産に繋げました。SIST では地域特産の農水産物である緑茶、ウナギ、黒大豆 (当時特産化中) などについて緑茶のがん抑制効果の解明 (浜医大と共同)、DNA 鑑定によるウナギの産地偽装解明 (業界依頼) や、丹波黒大豆のブランド偽装解明 (メディア依頼) などを行いました。



【 提言 】 日頃思う事／What I think

アルクサイエンス有限会社／Aruku Science, Inc.

臼井 睦／Mutsumi USUI

(Received April 12, 2021 ; Accepted April 20, 2021)

キーワード 科学機器業界；超臨界流体；学会発表；理系スタッフ；輸出入

1. 始めに

分析業界内で半世紀働いて来て、今まで思った事の中から、幾つかを纏めてみました。個人的には柔らか頭だと思っていますが、爺なので考えが古いと言われるかも。でも、折角分析と言う業界に居るのですから、少しでも前に進んで行きたいと思っています。周りは凄いスピードで走っています。前に進んでいても周りより遅ければ、それは後退と思っています。

2. 超臨界流体クロマトグラフの台数が世界に比して少ない。何故？

超臨界流体クロマトグラフィーを使用した文献は多いが、日本からの文献は少ない。日本では、装置の製造、設置に関して法的に制約を受け過ぎています。合法的に設置し、日常的に分析に使用するとなると、海外に比べて多大な費用と人的制約を受ける事に成りません。

分析分野では、超臨界流体抽出装置、超臨界流体クロマトグラフィー、超臨界流体キャピラリークロマトグラフィー等が使われていますが、国内での台数が、台湾、韓国に比べても桁違いに少ない。これは、高圧ガス取締法の厳格運用と言えます。

分析化学会、分析機器工業会から、この問題を経済産業省（通産）に提議して、弾力的な運用をして呉れていますが、経済産業省（通産）が相手にする経済規模に 2 桁少なく、殆ど改善の余地が無い、と言うか無視されています。

根性の有る研究者と、根性の有る会社が、日本での研究を続けていると言うのが現実です。為に、日本でのこの分野の研究レベルが低い。分析の分野では、超臨界流体抽出装置は、高速溶媒抽出装置に駆逐されたと言えます。

超臨界流体クロマトグラフィーが紹介されて 40 年、装置の事故が諸外国で起きたと聞いていません。日本だけです、便利な装置を使えないのは。研究者も声を上げましょう。液クロでも多環芳香族が出来る云々、負け惜しみに聞こえます。政治の世界へ理系の議員を！！ ラボ用に例外規定を！！ 声を上げなければ話しが前に進みません。声を上げて簡単に使える様にしませんか？

3. 日本分析化学会

日本の分析技術に多大な貢献をして来た事は、確かな事と理解します。では、現在は何をすべきなのか？ 多々すべき事が有るのに・・・。

会員のレベル向上、海外での発表が出来るレベルに、オーラルの練習は原稿を丸暗記で出来ますが、質問が聞き取れない。英国の英語、豪州の英語では同じ英語でも発音が違う、米国内でも加州と東部、南部と北部では違っています。又、母国語がスペイン、イタリア、ドイツでも違いが有ります。其の問い掛けに応じて、壇上から降りるのは難しいと言えます。

15 年ほど前、日本企業の社員がオーラルで発表をしていました。発音もイントネーションも素晴らしく、帰国子女かと思うほどでしたが、質疑応答で躓きました。質問が理解出来なかったのです、バックアップスタッフも理解していない様子、暫しの静寂。アドバイスだったのです。Thank you と言えば良いのに、とっていたら、座長が、質問ではなく貴女に対するアドバイスですよ、とフォローをして呉れたのです。

私が米国に駐在していた時には、学会に参加する先生方のオーラルのリハーサルを現地人（博士）にアドバイスを受け、想定質問を練習して壇上に上がらせました。2 時間程度の即席でしたが、するとしないでは全く違います。特に初めての方には、敷居が高い感があり、サポートを検討すべきなのかも知れません。

日本ペプチド学会の討論会は全て英語です、質疑応答もアドバイスも英語です。講演要旨集もプログラムも英語です。従って、海外からも研究者が参加します。欧米からの招待講演でも、問題は有りません。小さな学会ですが討論会には 300 名ほど集まります（懇親会では、日本語の方が多い感じですが）。

学会でも英語での講演をもっと増やす、海外からの演者を招待する、英語に対する親しみを感じる程度まで慣れさせて欲しい。

若手研究者へのサポート。Pittcon で講演をする人をバックアップする体制を作って頂きたい、若手研究者の育成という名目で、その費用は海外の学会を手本にし、日本に向いている所を取捨選択すればと思っています。

Pittcon は分析からバイオに移行している最中、講演募集内容の移行が既に始まっています。開催地が、バイオ関連都市に移行します。来年はアトランタ（従来通り）ですが、2023 年フィラデルフィア、2024 年サンディエゴ、2025 年ボストンに成ります。日本分析化学会も世界の潮流を見て、衰退しない様に舵取りをして頂きたい。欧米では、高齢者の会費/参加費にシニア料金があります。日本でも検討をして頂きたい。

4. 政治と新聞の世界へ理系スタッフを

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)、管理されている国は、ニュージーランド、台湾、韓国、に次いで、日本、人口が世界の 11 番目に多い国で感染者数、死亡者数が少ない。医療従事者の頑張りも有るが、管理が良かった、とも言えます。政府の管理なのか、市民

の自己管理なのかは置いておいて、新聞の世界は理系が少ない。多い、少ないは、比較対象が無いと言えないが、文系に比べて少ないと言えます。少なくとも問題が無ければ良いが、問題は多々出ています。少なくともブランク値、閾値、平均値などの、観念を新聞記者、政治家にもたせたい。専門家は記者が当然知っているものと、改めて説明をしない（時間が少ないのか?）。従って、結果しか放映 (TV)、放送、新聞に出て来ない。

新型コロナで、ベースラインは此处、ブランク値は此处です、と説明したメディア（人も）は無い、ピークだけを強調しています。閾値がここで、この値を越えると次のピークの始まりですと説明が欲しい。理系の記者（アナウンサー）を増やせば一般市民の理解が深まるのでは、と強く思っています。

政治の世界にも理系をもっと増やす、道路が作れないなら、信号機のシステムを改良する。米国加州では、80 年代の始めにセーブエナジーで、常時右折可（米国は右側に車が走る）にしました、全ての信号にコンピューターを組み込み、メイン通りを優先的に走れるシステムを導入しました。脇道に車が来ない限り、メイン通りは青信号です。赤になっても脇道の車が通過すれば直ぐに青に変わります。夜間にタイマーで信号を変える日本とは大違いです。車が来ないのに赤信号になる不合理の共感は不思議ではないでしょう。

日本からは毎年視察団（市会議員、県会議員、国会議員）が米国を訪問し、何を見て帰国しているのか？ と疑問に感じます。道路を作るのに比べて、コンピューターシステムを導入する方が如何に安価かを知って欲しい。

5. 輸出と輸入、もっと輸出を

日本は 10 t 輸入をして、2 t を輸出して、8 t を日本国内で消費をしています。鉄鉱石、石炭などは万トン単位ですが、加工して車にすると、1 台単位になり、重量は 1~1.5 t 程度になります。輸入する時は万円/トンが輸出する時は数十万円/トンになり、付加価値は数十倍になり、その御蔭で食料、衣料などを輸入出来る、と言えます。輸出する物は付加価値が高いほど、効率が良く、日本経済の健康に貢献する事に成ります。

科学機器の世界の市場は日本市場の 6~8 倍とされています。日本で 10 億円/年売れるなら、世界では 60 億~80 億円が売れると言う事です。便利な物を考えた時や、創意工夫をした時には、輸出する事を前提に考えましょう。

日本市場だけを考えてデザインすると、輸出をする際に多大の経費が掛かります。例えば、電源です。世界は 110 V から 220 V まで有り、安定していない国も多々有ります。CE マークや、UL 規格を視野に入れて最初に考えておけば、直ぐにも輸出の話が出来ます。科学機器は単語が世界にそのまま通じる場合が多いのですが、マニュアルを作る時の事を考えて、専門家の意見を含めて下さい。単に日本語を訳せば良い、と言うものではなく、事故が有った場合に、記述の有無で全く異なります。欧米のマニュアルは、同じ記述を数回繰り返します。これは 3 回も書いてあるのに、何故気を付けなかったか？ と言う、事故が起きた場合の裁判に、有利になる様に繰り返すのです（一説です）。

面白い製品が出来たら、最初に米国へ販売しましょう、米国は評価が公平です。オリジナルを尊重して呉れます (但し、同じ米国人ならばの話です)。日本人が同じ扱いを受けるかと言うと、30 年前より良くなっていますが、若干不平等が残っている感が有ります。

マーケティングの専門家と市場の攻略をする為の戦略を立てましょう。学会発表、展示会、専門誌への広告、ダイレクトメールなどで認知度を高めましょう。戦略が大事です。米国で売れ始めたら、次に、欧州のマーケティングです。米国で売れ始めている時がチャンス！ 英、独、仏で販売を基本戦略に基づいてスタートしましょう。イタリア、スペインまで、次いで中国、ロシアですが、商習慣が違うだけではなく、一般常識も異なります。専門家のアドバイスを利用しましょう。

多くの科学機器の製造販売会社が欧米に輸出をしています、最初から現地法人を作って市場に割り込んで行けた会社は少なく、多大な労力と、時間を費やしていました。近年は、JETRO (Japan External Trade Organization) のサポートからこぼれ落ちる中小企業の為に、中小企業基盤整備機構 (独立行政法人) の販路支援部でサポートをして呉れます。中小企業でも海外のデストリビューターのネットワークを使えます。

輸出は容易です。サイドビジネス程度から、売り上げの拡大を目指して、面白い物、面白い創意、工夫を輸出しましょう。輸出のマインドをもたないと日本という国が成り立ちません。分析に携わっている皆さんの、ちょっとしたアイデアが世界の研究者に影響を与えます。便利グッズが世界で販売出来ます。

LC、GC、IC、MS は米国で開発され世界中で使われています。市場占有率は、未だに海外製品が大多数を占めています。LC/MS では国産の比率は 20 % 程度です (台数、金額とも)。海外製品に負けない技術力が有りながら、50 % に達しないのは残念です。マーケティングの実力差を認めて、長期の戦略を立てて頂きたい。長期戦略は日本の方が米国より優位に在るのですから (米国は 3 カ月単位で評価する為)。

<執筆者略歴> 臼井 睦 (Mutsumi USUI)

- ・東京薬科大学・薬学部卒、薬剤師
- ・1968 年-1981 年 安部商事・分析機器営業部
- ・1982 年-1987 年 Abetech International Co.,
(米国)President
- ・1988 年 安部商事・分析機器営業部
営業部長
- ・1989 年 Dionex Corporation
- ・1990 年-2003 年 日本ダイオネクス株式会社
東京支社長
- ・2004 年～ アルクサイエンス有限会社
代表取締役



【会員動向】

官民人事交流を終えて

At the Expiration of My Government and Private Sector Personnel Exchange

神山和夫 / Kazuo KOYAMA

ハウス食品グループ本社 / House Food Group Inc.

(Received April 29, 2021; Accepted May 5, 2021)

キーワード 官民交流；食品安全委員会；リスクコミュニケーション；リスク評価

私は、食品会社に入社以来、分析化学を用いて製品の品質や安全衛生の確保に関する仕事を行って来ました。2008 年には LC 研究懇談会の会員となり、運営委員を務めておりました。2019 年秋から 2021 年 3 月迄、官民人事交流制度を活用し、内閣府食品安全委員会事務局に出向しておりました。今回は出向の経験についての感想を記します。

食品安全委員会については積極的な情報公開がされていますので 1、ここでは短く紹介します。食品安全委員会は、国民の健康の保護が最も重要であると言う基本的認識の下、規制や指導などのリスク管理を行う関係行政機関から独立して、科学的知見に基づき客観的且つ中立公正にリスク評価を行う機関として 2003 年に設立されました。食品安全委員会は 7 名の委員で構成され、その下に専門調査会が設置されています。専門調査会は、企画等専門調査会に加え、添加物、農薬、微生物などのハザードごとに設置されています。事務局は、局長以下の常勤職員及び技術参与などで構成され、リスク評価に必要な科学的知見の整理、リスク管理機関との連絡調整、及びリスクコミュニケーションを行っています。

食品のリスク評価とは何をしているの？と思われる方もおられるでしょう。かく言う私も、過去に一度だけ傍聴した事は有るものの、ピンとは来ていませんでした。食品安全委員会では、「食品の安全性に関する用語集」を公表しています（令和 2 年 2 月、第 6 版）。リスクアナリシスの考え方では、ヒトの健康に有害影響を及ぼすおそれがある食品中の物質又は食品の状態をハザードとしています。食品中にハザードが存在する結果として生じるヒトの健康への悪影響が起きる可能性と影響の程度をリスクとしています。食品に含まれるハザードの摂取（ばく露）によるヒトの健康に対するリスクを、ハザードの特性などを考慮しつつ、付随する不確実性を踏まえて、科学的に評価することをリスク評価としています。リスク評価は、①ハザードの特定、②ハザードの特性評価、③ばく露評価、④リスクの判定の 4 段階を含みます。①ハザードの特定では、ヒトの健康に有害影響を及ぼすおそれがある生物的、化学的及び物理的な要因・物質を特定し、それらについての既知の科学的情報を整理します。②ハザードの特性評価では、摂取されたハザードに起因して生じる健康への有害影響の性質と程度を定性的・定量的に評価します。③ばく露評価では、ヒトが食品を通じてハザードをどの程度摂取しているのかを定性的・定量的なデータから推定します。④リス

クの判定では、①～③に基づき、ある集団における既知の又は今後起こり得る健康への有害影響が生じる可能性と影響の程度について、付随する不確実性を含めて判定します。

読者の皆様からは、分析はリスク評価のどこに貢献しているの？という疑問が有ると思います。リスク評価では、化学的又は生物学的な分析の成果であるデータを扱いますので、国内外の評価書から分析の方法及び結果を伺う事が出来ます。

①ハザードの特定では、ヒトの健康に有害影響を及ぼすおそれがある微生物や化学物質が分析により同定された結果になります。特に、2000 年代以降、質量分析、ELISA 及び PCR などの分析法や分析機器の進歩が大きく貢献したと言えます。②ハザードの特性評価では、用量反応による有害影響の程度が毒性試験や血中成分の分析により確認されています。③ばく露評価では、多種類の食品中のハザードが分析されます。食品中のハザードの同定・定量には、マトリックスを分離除去出来る LC 及び LC/MS が活用されています。特に、化学物質の異性体や代謝物の分析には大きく貢献していると言えます。

多くの評価書は国内外とも長文です。分析については、分析法の一般名称、定量下限、及び定量に関する課題について短めに記載されています。最初にハザードの特定がされてから、リスク評価又は再評価が完了する迄に 10 年、20 年が経過する事も有り、分析が実施された年代と共に分析法の進展が伺えます。詳細な分析方法、装置及びクロマトグラムを読もうとすると、評価書の引用文献又は孫文献まで遡る必要が有り少し難儀しますが、多くの専門家によって厳選された文献リストという側面も有ります。

私は事務局の常勤職員として、情報・勧告広報課の情報 1 係長を拝命していました。情報班として、(1)食品安全関係情報の発信、(2)自ら評価のための情報収集、(3) ファクトシートの更新作成、(4)調査事業などを担当していました。

(1)食品安全関係情報の発信では、翻訳担当の技術参与と共に、食品の安全性の確保に関する国際機関、諸外国の政府関係機関、及び学術雑誌の科学文献を収集します。これらの海外情報を国民やリスク管理機関などの要望に対応する様に整理・分析し、ホームページへの掲載、リスク管理機関などへの情報共有を行っています。食品安全委員会の情報収集の特徴は、英語だけでなくドイツ語などの多言語の文献についても収集している事と、毒性学的な知見を分かり易く提供している事です。世界の食品安全関係情報の最先端にいると実感する業務でした。

(2)食品安全委員会が行うリスク評価には、リスク管理機関から諮問された案件の他に、案件を自らの判断により選定する評価（自ら評価）も有ります。私の担当は、公募などによる案件候補を取り纏め、リスク評価に資する基礎的な情報を整理して、企画等専門調査会での審議に供する事でした。

(3)ファクトシートとは、食品の安全性に関するハザードについて科学的知見に基づく概要書です。国内外のリスク評価の情報を纏めた総説文献とも言えます。ファクトシートの作成には、国際機関や欧米諸国の評価書を解読する事に難儀しました。読者層が私の様な食品事業者やトキシコロジーの初学者である事から、原文よりも分かり易い文章に成る様に心

掛けました。

(4)食品安全確保の為の調査事業では、「食品中の化学物質への複合ばく露に関する情報収集調査」などを担当しました。有識者及び請負業者の方々と共に、各国の最新の評価書及び学術文献を集め、絞り込みを行い、内容及び用語を整理しました。食品分野での複合ばく露の評価手法は、各国で様々であり、取り纏めに苦労しましたが、遣り甲斐が有りました。

(1)~(4)の何れの業務も結果をホームページで公開する事が前提です。主に扱う海外の原文が語学的・科学的に難解である事も多いため、整理した文章が正確且つ明確であるかを職員皆で確認し合い、練り上げて行く日々でした。

食品安全委員会では、国際会議等への参画、及び海外のリスク評価機関との連携強化を実施しています。情報班では、海外の情報源はインターネット公開文献を基本としていますが、海外機関の意図は伺えない事も有ります。この様な時はやはり対面での情報交換が有効です。2019年には、食品安全委員会での国際専門家の招聘講演や、欧州食品安全機関(EFSA)への出張を経験する事が出来ました。日本で言う全国会議の様なものが、EFSAでは最初から欧州全体の会議になっており、多国間協議が迅速に行われる現状を見る事が出来ました。

業務外にはなりますが、食品安全委員会が実施している食品安全モニターの意識調査結果を考察した論文を執筆する機会を頂きました^{2,3)}。日本からの食品安全のリスクコミュニケーションに関する論文は、海外に比べて少ないので、更に発信して行くべきと思います。

食品安全委員会事務局に出向して、リスク評価、リスク管理、及びリスクコミュニケーションから成るリスクアナリシスは、科学的根拠を基に、国内外で有機的に結び付いている事を実感しました。最初は、毒性学の用語が飛び交う職場には戸惑いましたが、委員長始め委員及び事務局の皆様から親切なご指導を頂き、2年半を乗り切る事が出来ました。何よりも出向で得られたヒューマンネットワークは私の財産です。今後は、この貴重な経験を微力ながら食品業界に貢献して行く所存です。

引用文献

- 1) 食品安全委員会: <<http://www.fsc.go.jp/>> 2021年4月29日現在。
- 2) K. Koyama, A. Hirakawa, C. Uehara, I. Horiguchi, *Food Safety*, **8**, 59-63 (2020).
- 3) A. Abe, K. Koyama, C. Uehara, A. Hirakawa, I. Horiguchi, *Food Safety*, **8**, 90-96 (2020).

<執筆者略歴> 神山和夫 (Kazuo KOYAMA)

- ・ハウス食品グループ本社株式会社研究開発本部基礎研究部
- ・分析士資格: LC分析士二段、LC/MS分析士二段。
- ・学位: 博士(薬学)。

【編集委員会からの注釈】著者の希望により、「食品の安全性に関する用語集」に搭載されている表記法を本稿の一部で採用しています。



【団体会員紹介】

日本分光と HPLC、SFC

寺田明孝 / Akitaka TERADA

日本分光株式会社 / JASCO Corporation

(Received April 23, 2021; Accepted 26, 2021)

キーワード HPLC ; SFC ; アミノ酸 ; 水道水質 ; 旋光度検出器

私は、日本分光株式会社 LC ソリューション技術課の寺田明孝と申します。この度、本電子ジャーナル編集委員長であり、LC 研究懇談会の委員長でもある中村 洋先生よりこのような機会を頂きましたので、僭越ながら弊社及び私が所属する LC 部門等の紹介をさせていただきます。

設立迄の歴史

日本分光は、1949 年の戦後間もなくに設立された東京教育大学（現 筑波大学）附属光学研究所が源流となっています。その初代所長である藤岡由夫博士が設立した財団法人応用光学研究所から、1958 年に赤外分光光度計部門が分離独立したのが日本分光工業株式会社であり、現在の日本分光です。当初、日本分光は“赤外の日本分光”として発展して来ましたが、1960 年代初頭を境に紫外可視領域にも事業を展開し、吸光分析や発光分析を手掛けるようになりました。そしてその後、高速液体クロマトグラフ (HPLC) や 質量分析計 (MS) を始めとする分離分析や質量分析の分野にも挑戦した事から、今では“赤外の日本分光”から“総合分析機器の日本分光”となっています。

現在の主力製品

現在弊社には、大きく分けて 2 つの主力製品群があります。1 つは、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) やレーザーラマン分光光度計、紫外可視分光光度計や分光蛍光光度計等の光分析機器です (写真 1)。近年では、赤外顕微鏡、ラマン顕微鏡及び顕微紫外可視近赤外分光光度計の何れにも適用出来るシェアリングホルダーや、試料の観察画像の最適化や測定位置の自動認識、測定後の定性分析が自動的に行われる IQ IR/Raman NAV、高いパフォーマンスと使い易さを両立した新型分光蛍光光度計等をリリー



写真 1 日本分光の光分析機器群
左上: 赤外顕微鏡
右上: ラマン顕微鏡
下: 分光蛍光光度計

スしています。その他、円二色分散計や旋光計等、日本分光ならではの特徴的な分析機器も取り扱っています。

もう 1 つは、HPLC や超臨界流体クロマトグラフ (SFC) (写真 2) 等の分離分析機器です。これらの製品群についての詳細は後述しますが、自社ブランドとしての開発・製造・販売は勿論、MS や 蒸発光散乱検出器 (ELSD)、電気伝導度検出器等は他社とコラボレーションし、制御ドライバーを充実させています。



写真 2 日本分光の超臨界流体クロマトグラフィーシステム例
左: SFC システム、右: 分取 SFC システム

LC 部門の歴史

主力製品群の片翼を担う LC 関連製品の開発系譜についてご紹介します。弊社は今から半世紀も前の 1970 年代初頭に本格的に HPLC の自社開発をスタートさせ、1972 年には HPLC 第一号となる FLC-1A を発表しました。次いで 1976 年には TRI ROTAR I 及び FAMILIC、1982 年には FAMILIC-300 を発表し、世界最高の技術賞でもある R&D100 賞 (旧: IR 100 賞) を受賞しました。TRI ROTAR に関しては「I」に続き、II (1979) から VI (1983) 迄、毎年のようにバージョンアップを行いました。技術者達がコツコツと HPLC を進化させてきた様子が伺えます。そして、その技術やノウハウは LC 800 シリーズ (1986 ~)、LC 900 シリーズ (1991 ~)、LC 1500 シリーズ (1998 ~) へと継承されて行きました。

一方、超臨界流体システムはと言うと、1985 年、当時は珍しかったマルチチャンネル UV 検出器と超臨界流体抽出 (SFE) を組み合わせた SUPER-100 (写真 3) を発表しました。SUPER-100 を使用した実験に関する論文は、現在でも頻繁に引用される論文の一つとなっています。その後も SUPER-200 (1987)、更にその後継機である SUPER-201 (1995) をリリースして来ました。これらの開発で培った技術もやはり、現在の SFC システムの礎となっています。



写真 3 SUPER-100

近年の動向

大学や官公庁を中心として、多くのお客様に永らくご愛顧頂いた日本分光の HPLC である LC-2000 シリーズ (2001 ~) 及び UHPLC 対応の LC-3000 シリーズ (通称 *XL*) (2005 ~) がその使命を終え、約 13 年振りとなる HPLC システム、EXTREMA (写真 4) を JASIS 2014 にて発表しました。更に翌 2015 年には SFC システムである EXTREMA UFC を発表しました。この EXTREMA シリーズにおける検出器のラインアップは業界最多と言っても過言では無く、紫外可視吸光度検出器、PDA 検出器、蛍光検出器、示差屈折率検出器、円二色性検出器、旋光度検出器等 6 種、計 11 品目有ります。その後、2016 年には Advion 社のシングル MS と接続した EXTREMA-MS を、2017 年には大量分取が可能な SFC システム、そして 2018 年には LC-2000 シリーズを彷彿とさせる幅 15 cm のコンパクト HPLC である EXTREMA 4500 Model (写真 5) を発表する等、継続して新商品をリリースして来ました。



写真 4 EXTREMA



写真 5 EXTREMA 4500 Model

近年では、大々的な新製品こそ有りませんが、高感度測定が可能な CL (化学発光) 検出器や多彩なラインアップで HPLC の為に最適化された自社製バルブ、安定したベースラインを実現する Dual Flow GPC システムや世界唯一となる分取 SFC 用 OR (旋光度) 検出器セル等、お客様のニーズに対応すべく、様々なソリューションを提供し続けています。

HPLC、SFC と MS、MS/MS を自由に繋ぐ

HPLC の検出器に関して弊社は古くより、UV や蛍光等の「光学」の原理を利用した検出器に特化した所があり、MS や MS/MS 等の「質量」検出に関しては、過去に開発した実績は有るものの継続した自社開発は行って来ませんでした。反対に質量分析計メーカーの中には、MS や MS/MS を開発・販売していても、HPLC ましてや SFC をも取り扱っているメーカーは多く有りません。HPLC、SFC 等の分離装置と MS、MS/MS 等の質量検出器を同一メーカーで統一すると言うのは、データ管理や制御、サービス面や経費等において多くのメリットが有るの確かです。一方で HPLC、SFC と MS、MS/MS を、メーカーに縛られずに自由に選びたい、と言うユーザーも少なからず存在します。

近年では、他社メーカーの HPLC 装置又は MS を制御出来るドライバーの開発が進んでおり、前述した弊社の EXTREMA-MS はその手法を採用したものになります。例えば、Advion 社製のシングル MS を接続する際には、弊社のクロマトグラフィータシステム (CDS) である ChromNAV にドライバーをインストールする事で MS の制御が可能となります (図 1)。又、SCIEX 社製の MS 制御ソフトウェアである Analyst® に弊社の HPLC、SFC を制御可能な JASCO LC/SFC Drivers for SCIEX Analyst® をインストール

する事で、LC/MS/MS や SFC/MS/MS のシステムとして利用出来る様になります。

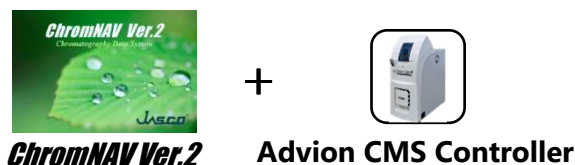


図 1 LC/MS 制御方法 (シングル MS の場合)

アプリケーション関連

次に、アプリケーションの面からソリューションを紹介します。ここでは①アミノ酸分析及び②水質分析の 2 テーマについて触れようと思います。

①アミノ酸分析は近年、LC/MS や LC/MS/MS による分析法が開発され、より高感度化・高速化されて来ています。一方、導入コストが抑えられる点や、光学検出でも十分な感度が得られる点等を理由に、誘導体化と光学検出を組み合わせたシステムは今もなお、多くの引き合いを頂いています。又アミノ酸分析システムと言うと、どうしても「専用機」というイメージが強いかも知れません。しかし、日本分光の HPLC は予めからモジュールタイプであると言う強みを生かし、お客様のニーズに合わせたアミノ酸分析システムを提案する事が出来ます。例えば、ポンプ、オートサンプラー、オープン及び検出器で構成される汎用 HPLC システムを使用する場合は、スポットでの測定が可能なプレカラム誘導体化法を、多検体の為ルーチンで使用される場合にはポストカラム誘導体化法による分析が可能なシステムを、「専用機」として提供する事が出来ます。又目的分析種に合わせて、OPA (o-フタルアルデヒド) やニンヒドリン、DABS-Cl (ダブシルクロリド) 等の誘導体化試薬及び最適な検出器を選択する事が出来ます。例えば、ポストカラム誘導体化法に関しては、移動相にリチウム塩を使用する事で生体中遊離アミノ酸の分析が可能です。しかし、目的分析種がタンパク質構成アミノ酸に限定されているのであれば、ナトリウム塩を用いた移動相に変更する事で、より短い時間での測定が可能となります。システム選択に関しては、弊社 Web サイトのアミノ酸特設ページを参考にして頂ければと思います。

アミノ酸分析ページ: <https://www.jasco.co.jp/jpn/technique/topics/amino/LCguide.html>
(2021 年 4 月 12 日現在)。

②厚生労働省令である水道水質基準は毎年 4 月 1 日に逐次改正が施行され、基準値の変更や項目の追加等が行われています。特に近年では LC/MS/MS を使用して測定する項目が徐々に増えており、前処理の簡便化や検出の高感度化が進んでいます。私達メーカーとしては、それらの変更に対応し、アプリケーションを発信して行く必要が有ると考えています。例えば、イオンクロマトグラフ-ポストカラム吸光光度法によるシアン化物イオン及び塩化シアン分析は、これ迄シアン化物と塩化シアンをそれぞれ別の試料として各々測定しなければなりませんでした。令和 2 年度からは 2 成分を同時に測定出来る様に前

処理法が変更されました。加えて弊社では、従来使用していた 250 mL のカラムを 100 mL のカラムに変更する事で、測定時間を 1/2 に短縮する事が出来、トータルの測定時間が従来の 1/4 となりました (図 2)。この様に、ただ改正案に則したデータを出すのでは無く、一工夫を加えると言う事も私達メーカーの使命と考えています。その他、水質分析に関しては、弊社 Web サイトの水道水質分析特設ページを参考にして頂ければと思います。

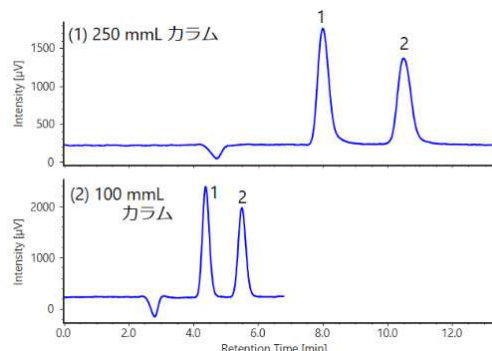


図 2 シアン化物イオン及び塩化シアンのカロマトグラム
1: シアン化物イオン, 2: 塩化シアン
(1) 250 mL カラム, (2) 100 mL カラム

水道水質ページ : <https://www.jasco.co.jp/jpn/technique/topics/waterquality/index.html>
(2021 年 4 月 12 日現在)。

LC 部門紹介と私の仕事

私が所属する LC 部門は 2021 年現在、約 40 人が在籍しており、LC ソリューション技術 (システム、アプリケーション)、LC ソフト設計、LC メカトロ (電気、機械) 設計及び LC 生産技術の 4 つの課に分かれて業務を行っています。主となる業務は HPLC や SFC の開発と製造になりますが、その他にも営業サポートや納品、トラブル対応等お客様と直接関わる業務も行っています。

その中でも私は、LC ソリューション技術課に所属しており、主業務はアプリケーション開発となっています。又他にも周辺モジュール開発、製品評価、セミナー・学会発表・執筆、依頼分析、問い合わせ・トラブル対応、営業サポート等、多岐に渡っています。最近では、SFC や SFE 関連でお客様から頂いた要望を元に、新たな製品を具現化する“ものづくり”の業務も増えて来ています。又依頼分析においても、SFC や SFE に纏わるものが多く、前例も無く、一筋縄では行かない案件にもチャレンジしています。

最近行った業務の中から一件、前述した分取 SFC 用 OR (旋光度) 検出器セルについてご紹介します。OR 検出器は、旋光性をもっている分析種を検出する事が出来ます。旋光性をもつ分析種の代表的なものとして、グルコースやスクロース等の糖類が挙げられます。又キラル特性は有っても UV 検出が出来ない天然物や医薬中間体等の検出も可能です。感度こそ UV や CD (円二色性) 検出器には劣りますが、開発した OR セルは光路長を最大限に伸ばした事で、主に高濃度試料が注入される「分取用」として利用出来る様になりました。例として、図 3 に示した構造をもつメントールのキラル分離及び検出を行った結果を示します (条件の詳細は割愛)。図 4 に示す様に、緑と赤で示した UV 及び CD 検出器では検出する事が出来ていませんが、OR 検出器によってプラスとマイナスのピークをきちんと検出する事が出来ています。エナンチオマーの面積対称性も良好です。

この様に、用途としては決して汎用的とは言えませんが、キラル分離と相性の良い SFC で、UV 吸収が無くともキラル検出が可能な唯一の検出器であると言う点では、存在価値は十分に有るのではないかと考えています。

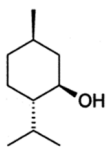


図 3 メントールの構造式

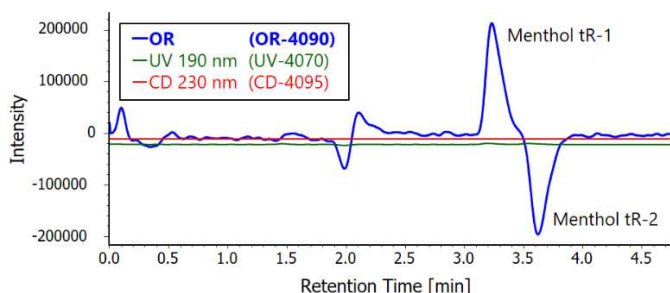


図 4 各種検出器によるメントールのクロマトグラム
青：OR 検出，緑：UV 検出，赤：CD 検出

終わりに

以上、弊社の歴史から近年の新製品、私が所属する部門や業務の紹介等をさせていただきました。HPLC は、分離や検出の原理原則が或る程度確立されているものですので、突然に画期的な新製品が出るというものでもありません。しかし、技術者の試行錯誤の積み重ねにより、長い年月を掛けて少しずつではありますが着実に進化しています。勿論それだけではなく、ユーザー様からの要望、ご指導ご鞭撻が非常に大きなモチベーションになっています。

さて、今私たちを取り巻く世界の情勢を考慮すると、LC 研究懇談会等の学会で直接お会いして情報交換する、と言うのは中々難しいと思われまます。少し先になるとは思いますが、コロナ禍が落ち着いた頃に又、学会やセミナー、情報交換会等がリアル開催され、皆様の忌憚の無いご意見を聞かせて頂ければ幸いです。

最後になりますが、この度は本電子ジャーナルの投稿の機会を頂きまして、誠に有難うございました。中村先生始め、編集委員の皆様がこの場を借りて深く御礼申し上げます。今後 10 号、20 号、・・・100 号、と発刊される事を心よりお祈り申し上げます。

<執筆者略歴> 寺田明孝 (Akitaka TERADA)

- ・日本分光株式会社 LC ソリューション技術課
- ・2009 年 3 月 中央大学理工学研究科応用化学専攻修了
- ・2009 年 4 月 日本分光株式会社に入社、LC システム課 (ハードウェア開発) にてハードの勉強
- ・2010 年 4 月 LC ソリューション技術課にてアプリケーション開発等に従事、現在に至る
- ・LC 研究懇談会事業委員
- ・分析士資格：LC 分析士三段、LC/MS 分析士二段、IC 分析士初段。



【団体会員紹介】

日本電子と質量分析計／JEOL and Mass Spectrometers

山本敏人／Toshihito YAMAMOTO

日本電子株式会社 科学・計測機器営業本部 SI 販売推進室 MS グループ／
MS Group, SI Sales Promotion Department, SI Sales Division, JEOL Ltd.

(Received May 13, 2021 ; Accepted May 17, 2021)

キーワード 質量分析計の開発；質量分析計の歴史；二重収束質量分析計；飛行時間質量分析計

本稿では、日本電子株式会社の山本敏人より、弊社概略と事業セグメントの紹介、弊社質量分析計の歴史についてご紹介させていただきます。

1947 年に弊社の前身である株式会社電子科学研究所にて、科学技術の発展無くして戦後日本の復興は無いと言う思いから、創業者 風戸健二を中心に集まった若い技術者らの手により、電子顕微鏡の開発がスタートしました。終戦直後の物資と情報が不十分な中で無謀とも思われる挑戦と成りましたが、科学を通じて社会に貢献したいと言う熱意に動かされたメンバー全員が力を合わせた結果、一年半と言う開発期間で電界型電子顕微鏡 DA-1 (図 1) を完成させる事に成功しました。当時珍しかった電子顕微鏡の製作は全国区でのニュースとなり、天皇陛下 (昭和天皇) や皇太子殿下 (上皇陛下) が当該装置をご覧に成りました。2010 年には電子顕微鏡発展のマイルストーンとして、国立科学博物館より未来技術遺産に認定されています。

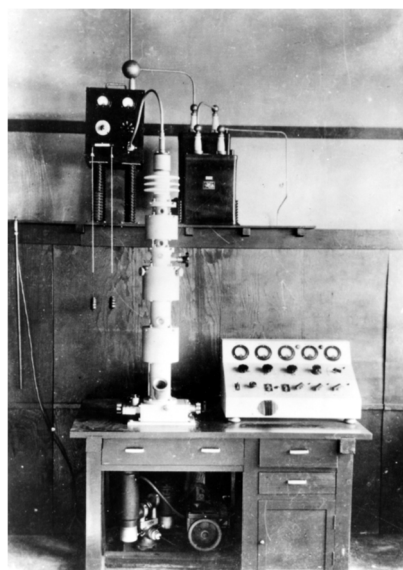


図 1 DA-1

弊社は、1949 年に電子顕微鏡の開発製造会社として創立されましたが、日本電子の英文社名は創立時の名称である「日本電子光学研究所 (Japan Electron Optics Laboratory)」の頭文字を取り、JEOL と命名されました。JEOL は世界で通用するブランドとして”ジオル”の愛称で現在も呼ばれています。1950 年代には当時は極めて特殊な研究用機器と認識されていた核磁気共鳴装置 (NMR) の開発にも着手しました。参入企業が少なく市場のニッチ性が高い事を逆手に取った弊社は、1956 年に国産第 1 号と成る JNM-1 を発売しました。JNM-1 の発売以降、弊社は NMR 技術に磨きを掛け続ける事で科学の進歩と社会の発展に貢献して来ました。経営環境が変化する中であっても、社会的責任から NMR 事業を継承した結果、NMR メーカーとして現存するのは弊社を含めて世界に 2 社のみと成っています。

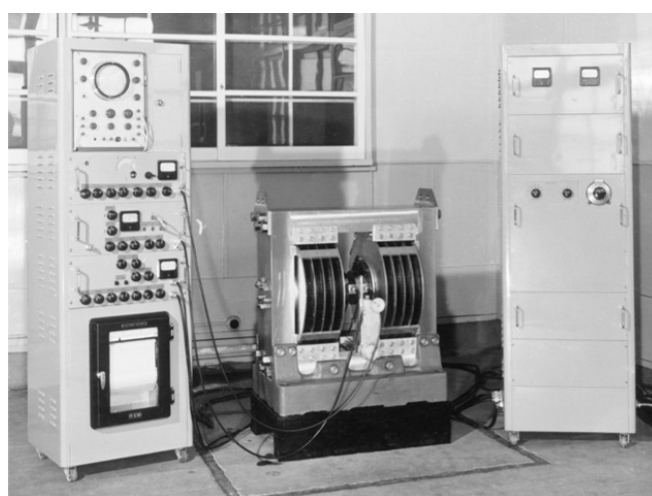


図 2 JNM-1

現在では、弊社は創業時以来の事業である電子顕微鏡や核磁気共鳴装置などの理科学・分析機器事業で培った技術と人脈を核に、桁違いに大きな半導体機器などの産業機器市場や医用機器市場向けの機器とサービスを提供する事により、更なる事業展開 (図 3) を図っています。以下に各事業セグメントについてご紹介致します。

理科学・計測機器事業

電子顕微鏡の開発を起源にもつ弊社は、理科学・計測機器事業を創業時からの DNA として深耕、拡大して来ました。電子顕微鏡を筆頭に、電子ビームやイオンビーム、X 線などの技術を応用した電子光学機器・計測検査機器を数多く展開しています。又、電子光学機器・計測検査機器が物質の外側からアプローチをするのに対し、物質の内側からその本質に迫る核磁気共鳴装置や質量分析計と言った分析機器も取り扱っています。世界最高レベルの理科学・計測機器を通じて、ノーベル賞受賞者を始めとしたトップサイエンティストや先端研究の最前線を支えています。

産業機器事業

創業から 3 年後の 1952 年、電子顕微鏡の開発で得た知見を応用した高周波焼入装置を端緒に、産業機器分野へ進出しました。現在は、理科学・計測機器事業のコア技術として培った電子線制御や高周波電源のノウハウを発展させ、電子ビーム描画装置や電子ビーム蒸着用電子銃、高周波誘導熱プラズマ装置など、半導体や電子デバイス、光学部品の製造に必要な産業用機器を供給しています。又、新領域への事業展開として、2021 年には電子ビーム技術を応用した金属 3D プリンターの市場導入を行いました。航空宇宙や医療、自動車など、高いレベルの品質が求められる分野での利用が期待されています。

医用機器事業

分析検査装置の開発で磨き上げた計測技術を医用分野に応用する事で、1972 年に初の生化学自動分析装置を市場導入しました。「クリナライザ」と名付けられた当シリーズは、生化学自動分析装置が社会へ普及するのに伴ってラインアップを拡充し、ニーズにマッチした製品を展開する事で、医療の発展と人々の健康維持に貢献して来ました。1996 年には更なる経済性と処理能力向上の為、それ迄の分析方式を刷新した「BioMajesty™」シリーズにバトンタッチし、現在に至ります。血液や尿などの体液成分を検体とし、その中に含まれる糖やコレステロール、タンパクなどの各種成分を測定する事で、疾病の発見や健康状態の管理に役立てられています。

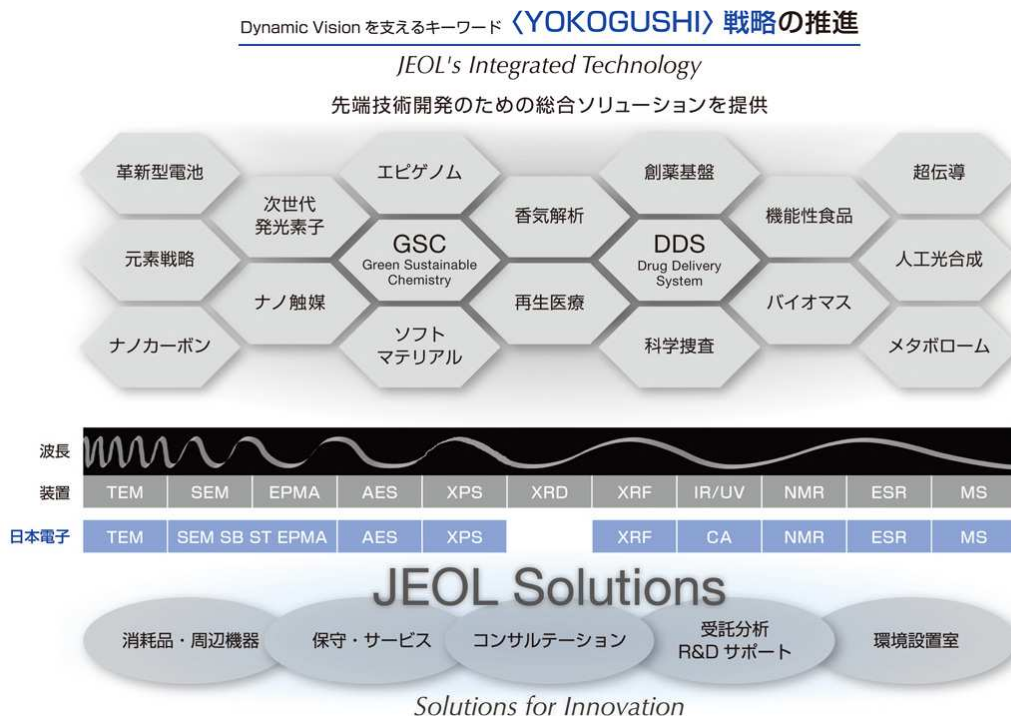


図 3 日本電子の事業展開

次に LC 研究懇談会との関係も深い、弊社の質量分析計の歴史をご紹介致します。弊社の質量分析計の歴史は、1960 年 2 月 10 日に理化学研究所との間で結ばれた受託研究開発契約によって始まりました。受託研究開発の内容は、佐々木申二先生（京都大学理学部を 1958 年に定年退官）が、大阪大学・緒方惟一教授、三菱電機研究所の協力を得て 1956 年～1958 年に製作された質量分析器を、より高度化して企業化する、と言うものでした。開発は困難を極め、一時は日本電子側から契約の解除を求める事も有りましたが、佐々木先生の熱心なご指導の下、1963 年にスパークイオン源と Mattauch-Herzog 配置の二重収束質量分析器を組み合わせた、無機分析用高分解能質量分析計 JMS-01 (図 4) として製品化する事に成功しました。JMS-01 型は、その後、電子イオン化 (EI) イオン源を搭載した JMS-01S、JMS-01SG (図 5) へと発展し、弊社高分解能有機 MS の礎と成りました。

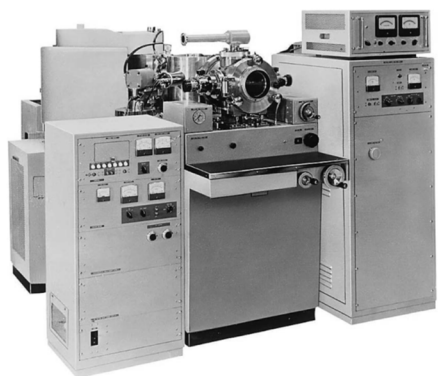


図 4 JMS-01

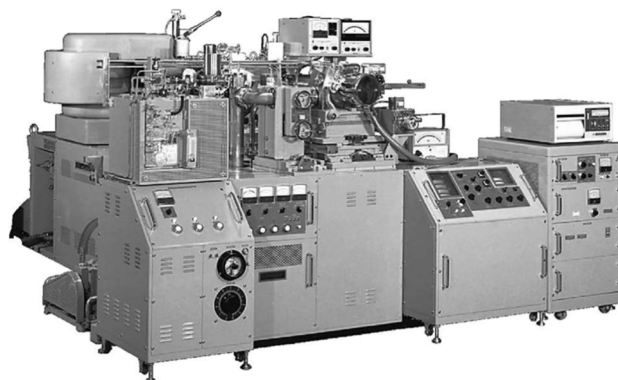


図 5 JMS-01SG

その後は大阪大学・松田久先生が考案された虚像型イオン光学系を採用した MS を開発し、1976 年に製品化した JMS-D300 は欧米へも多数輸出され、弊社が世界的に MS メーカーとして認知される切っ掛けと成りました。1980 年には FAB イオン化法が発見され、生体高分子の為に、より高い加速電圧で広い質量 (m/z) 範囲をもつイオン光学系が求められる様に成りました。松田先生の設計により大阪大学で製作された CQH 質量分析計 (1972 年) をベースに、1985 年に弊社がイオン光学系を設計した JMS-HX110 は、加速電圧 10kV で m/z 14,000 迄の測定を実現し、その 1 号機は 4-sector タンデム MS 構成 (図 6) として MIT の Klaus Biemann 教授の研究室へ納められ、ペプチドのシーケンシングを実用的に行える世界で最初のタンデム MS として認められました。1999 年 2 月には、狭山茶に含まれるダイオキシンのテレビ報道を切っ掛けにダイオキシンの広範囲な環境汚染問題が定義され、大きな社会問題に発展しました。高質量分解能時に高いイオン透過率が得られる装置を目指して、松田先生が考案された QQHQC イオン光学系をベースとして開発された JMS-700 及びその後継機としてダイオキシン分析に最適化された JMS-700D、JMS-800D は、爆発的に広がった分析需要に的確に応える事が出来る装置として数多くのユーザーに支持され、

現在も日本国内のダイオキシンの汚染実態の解明と発生源の究明、その他の環境汚染問題の改善に大きく貢献しています。

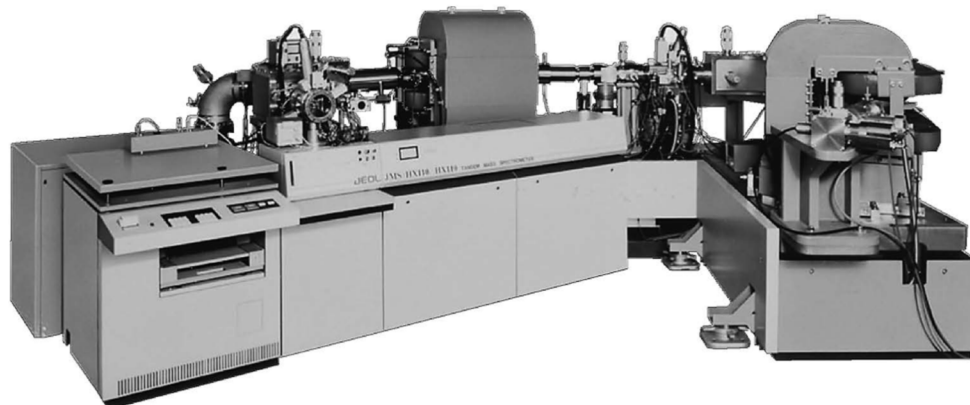


図 6 JMS-HX110/HX110

磁場セクターMS に次ぐ第 2 の高分解能 MS としては、直交加速飛行時間質量分析計を開発し、2001 年に液体クロマトグラフ飛行時間質量分析計 JMS-T100LC AccuTOF™ (図 7) を上市しました。AccuTOF™ は 2002 年 3 月に開催された Pittsburg Conference において世界市場へ導入され、当時市販されていた LC-TOFMS の最大の問題点であったダイナミックレンジの狭さを克服し、実用性の高い LC-MS と成った事が評価され Pittcon Editors' Award を受賞しました。AccuTOF™ の堅牢でシンプルな大気圧イオン化インターフェイスは、その後の DART™ イオン源の発明と開発を促進する事に成りました。



図 7 JMS-T100LC AccuTOF™



図 8 JMS-T100GC AccuTOF™ GC

2004 年には、AccuTOF™の共通の質量分析部に EI、CI、FI、FD の真空イオン源を搭載したガスクロマトグラフ飛行時間質量分析計 JMS-T100GC AccuTOF™ GC (図 8) を上市しました。AccuTOF™ GC は、質量分解能 5,000 (FWHM) と 25 スペクトル/秒のスペクトル記録速度を同時に両立させ、世界で初めて包括的 2 次元 GC と接続して精密質量測定が可能な GC-MS と成りました。

AccuTOF™シリーズで採用したリフレクトロンを超える、超高質量分解能を実現可能な TOFMS として、イオンの飛行距離を伸ばして質量分離能を高くする研究を大阪大学の松尾武清教授と共同で行い、その結果として同一軌道を多数周回させるマルチターン型のイオン光学系を提案しました。しかし、マルチターン型では周回回数を増やすと早いイオンが遅いイオンを追い越してしまうという問題点がありました。この問題に対する解決策として松田先生がスパイラル型のイオン光学系を提案されていましたが、最終的に松田先生からの助言もあって、大阪大学が開発した MULTUM II イオン光学系を基にスパイラルイオン光学系へ展開する事と成り、その研究を進め、2010 年にマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) イオン源と組み合わせた JMS-S3000 SpiralTOF™ (図 9) を上市しました。SpiralTOF™は限られた空間の中で 17 m という長いイオン軌道距離を確保する事に成功し、市販の MALDI-TOFMS で最高と成る質量分解能 75,000 を達成しました。

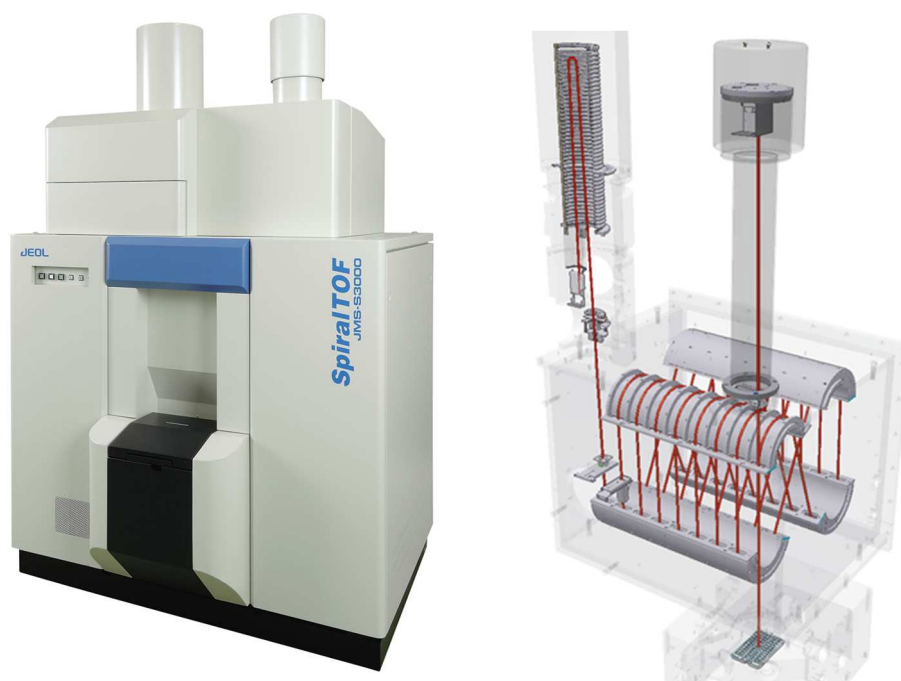


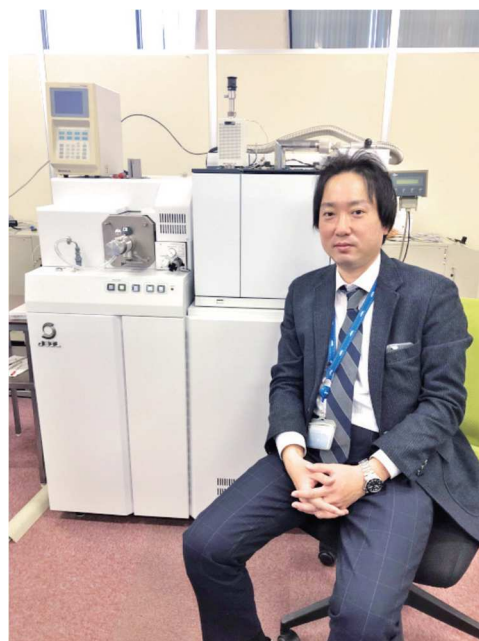
図 9 JMS-S3000 SpiralTOF™

ここ迄、弊社概略と事業セグメント、質量分析計の歴史をご紹介しましたが、日本電子の経営理念「科学の進歩と社会の発展に貢献します」の通り、SDGs が注目される前から弊社は最先端の科学研究に深く関与し、社会の課題解決や発展に貢献して来ました。今後も豊かな未来に科学で貢献出来る様、取り組んで参りたい所存です。又、読者の皆様には少しでも日本電子と弊社質量分析計に興味をもって頂けると幸いに存じます。

最後に成りますが、この度は LC 研究懇談会の中村 洋先生に投稿の機会を頂き、この場をお借りして御礼申し上げます。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> 山本敏人 (Toshihito YAMAMOTO)

- ・ 日本電子株式会社 科学・計測機器営業本部
SI 販売促進室 MS グループ
(〒100-0004 東京都千代田区大手町 2-1-1
大手町 野村ビル 13 階)。
- ・ 2004 年芝浦工業大学大学院工学研究科応用
化学専攻修士課程修了、同年日本電子株式
会社入社、現在は質量分析計の販売促進に
従事。
- ・ 分析士資格 : LC 分析士二段、LC/MS 分析士
初段。



【団体会員紹介】

富士フイルム和光純薬とクロマトグラフィー関連試薬

富士フイルム和光純薬株式会社 試薬化成品事業部 事業推進本部 学術部 昆 亮輔

FUJIFILM Wako Pure Chemical and Related Reagents for Chromatography

Ryosuke KON

Technical Marketing Dept., Laboratory & Specialty Chemicals Div.,
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

(Received May 18, 2021; Accepted May 21, 2021)

キーワード 試薬 ; 溶媒 ; 溶離液 ; HPLC ; LC/MS

1. 始めに

科学技術の進展には試薬が欠かせません。又、試薬は科学技術の進展と共に進化をしています。私たち富士フイルム和光純薬は「次の科学のチカラとなり、人々の幸せの源を創造する」という経営理念の元、創業当初から、科学者の皆様と共に歩んで参りました。本報では当社の成り立ちとクロマトグラフィーとの関わりをご紹介致します。

まずは当社の成り立ちからご説明します。大正初期、我が国の研究活動が盛んに成るに伴い実験用純良化学薬品(試薬)の需要が急増していましたが、国産試薬が乏しく、多くの研究者は実験に不可欠な試薬の入手に苦勞していました。そんな折、五代目武田長兵衛の「研究者のお役に立ちたい」という想いから、武田長兵衛商店(現 武田薬品工業(株))に化学薬品部を設け、試薬の輸入を始めました。1922年(大正11年)に化学薬品部が分離独立し、武田化学薬品(株)を設立しました(写真1)。後に和光純薬の前身となる同社では、国産初の試薬製造を成功させ、試薬メーカーとしての基礎を築きました。

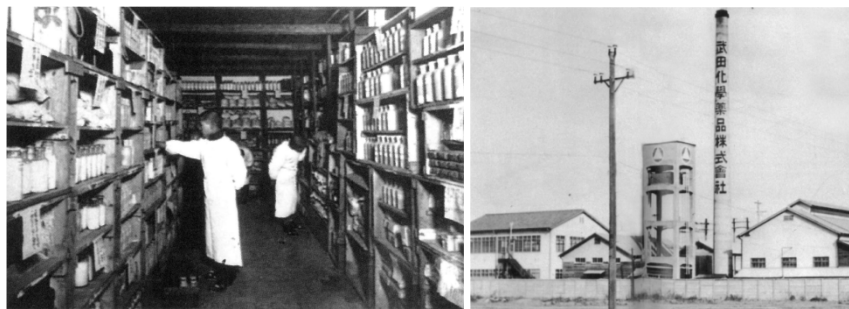


写真1 創業間もない頃の武田化学薬品の様子

戦後、1947 年に社名を和光純薬工業(株)に変更しました。この頃から試薬製造で培った有機合成技術を見込まれ、様々な企業から写真用薬品を始めとした原料薬品の製造を依頼される様に成り化成品事業を開始しています。更に、高純度試薬を臨床検査薬用に販売したのを切っ掛けに臨床検査薬事業が始まり、現在の事業形態と成り、2018 年に富士フィルム和光純薬に社名を変更して、現在に至ります。

2. クロマトグラフィー用試薬の登場

販売当初の試薬製品は、試薬特級や試薬 1 級などの分類のみでしたが、分析技術の進歩と共に、用途、目的に合わせた用途別の試薬が開発、販売されました。クロマトグラフィー用の試薬もその一つです。

クロマトグラフィーには標準品や各種塩類など様々な試薬が用いられますが、今回は溶離液（溶媒）に注目します。

1972 年発行の弊社総合カタログ CHEMICALS 第 19 版（写真 2）に既にクロマトグラフ用と言う規格名でメタノールなど 9 製品が掲載されていました。クロマトグラフ用溶媒は、薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーの展開溶媒として使用出来る様、試薬特級よりも水分が少ない事を保証している溶媒です。当製品は現在も販売しており、発売以来 49 年経過した超ロングセラー製品です。蛇足では有りますが、クロマトグラフ用溶媒の販売から凡そ 12 年後 1983 年に TLC プレートの販売も開始しております。

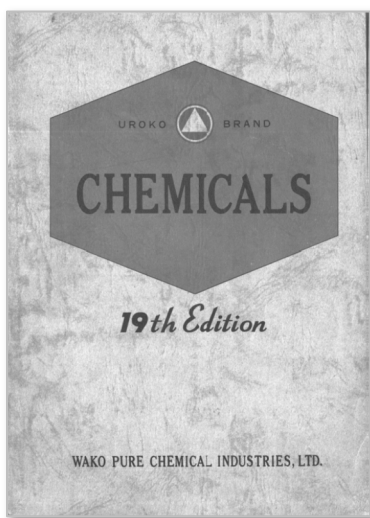


写真 2 総合カタログ CHEMICALS 19th Edition

3. HPLC 用溶媒の登場

液体クロマトグラフィー用溶媒の保証項目の基本思想は販売開始時にほぼ固まっており、試薬特級の保証項目に吸光度、蛍光を追加したものでした。製品発売後、各種検出器の登場とその性能の向上に合わせ、保証値の見直しが行われ、1990 年、規格名が液体クロマトグラフ用から“高速液体クロマトグラフ用(HPLC 用)”に改められました。その後も、細かな規格の見直しをしつつ、現在も販売を続けています。

2015 年には GPC に特化した GPC 用グレードも登場し、ユーザーニーズに細かに応えています。

現在、HPLC では ppt オーダーの濃度の化合物でも測定可能と成っており、超低濃度の化合物の測定の邪魔をしない高純度な移動相は分析化学者に無くてはならない存在と成っています。

4. LC/MS 用溶媒の登場

LC/MS の普及と共に本用途に特化した溶媒のニーズが高まり、2003 年に LC/MS 用溶媒が登場しました。発売当初は m/z 150 ~ 2,000 のノイズレベルを保証し、キャップからの溶出物の心配が無いアルミキャップを採用し、品質の長期的な安定性を確保していました。こちらの製品も、発売以降、お客様のご要望にお応えする為に規格を見直しています。特に、細かい粒子径が充填されたカラムに高圧で溶離液を流す事が多い LC/MS では、カラムの目詰まりを心配する声が多く、溶媒中のパーティクル(微粒子)数の保証を加えた事は大きな改良点と考えています。

5. QTofMS 用溶媒の登場

LC/MS の普及と共に、検出器の感度も向上し LC/MS 用溶媒の品位では、測定に影響を及ぼす様な事例が出て来ました。更に高純度な溶媒の要望の高まりに対応し、超高感度、高分解能の MS 用溶媒として、2015 年に QTofMS 用溶媒の販売を開始しました。特長としては、幅広い質量範囲のノイズ保証(質量範囲 50~3000)と不純物の溶出を抑える為に特殊処理したガラス瓶を使用している点です。こちらの製品はメタボロミクスやプロテオミクスの研究者より好評を頂いています。

私達は試薬メーカーとして、これからも皆様の研究・開発の伴走者で在り続ける事を使命として、進化し続ける様々な科学技術に対応した試薬の製品開発、供給を通して、次の科学のチカラとなる為、邁進して参ります。

引用文献

- 1) 社団法人日本分析化学会関東支部編集、高速液体クロマトグラフィーハンドブック 改訂 2 版、pp. 3-13、丸善株式会社 (2000).

<執筆者略歴> 昆 亮輔 (Ryosuke KON)

- ・岩手大学大学院農学研究科農業生命科学専攻
- ・富士フイルム和光純薬株式会社 試薬化成品事業部 事業推進本部 学術部 学術課
- ・分析士資格：LC 分析士二段。
- ・E-mail：ryosuke.kon@fujifilm.com



【団体会員紹介】

(株) 東レリサーチセンター

～ライフサイエンス分野の紹介～／

Introduction of Life Science Field in Toray Research Center, Inc.

竹澤正明／Masaaki TAKEZAWA

株式会社東レリサーチセンター／Toray Research Center, Inc.

(Received June 1, 2021; Accepted June 3, 2021)

キーワード 受託分析；ライフサイエンス；創薬；CMC；バイオアナリシス

1. 始めに

(株) 東レリサーチセンターは、東レ (株) から 1978 年 6 月に分社化・発足し、「高度な技術で社会に貢献する」という基本理念に基づき、研究開発や生産技術における「新製品・新機能の創出」、「原因解析」や「課題解決」と言った要請に対して、分析や物性解析による技術支援を行っています。創業以来一貫して、皆様のお役に立ち、信頼を得る事を第一の目標として、「信頼性の高い技術を提供させていただくこと」(Technology)、「機密保持を厳守すること」(Trust) をモットーに努力を続けています^[注]。事業分野は「自動車・航空機・宇宙」、「電池」、「IT 機器」、「環境」、「材料・素材」、「半導体・実装」、「ライフサイエンス」及び「医薬・バイオ」と多岐に渡っています。本稿では、当社の「医薬・バイオ」分野を中心にご紹介します。

【注】本誌の表記法と異なる表記は、著者が所属する企業のモットーを尊重したものです。

2. 創薬

2.1 構造解析

溶液 NMR や質量分析計を用いて、薬効主成分や、そこから派生した不純物、代謝物について構造解析を行っています。低分子薬の場合、対象と成る不純物は薬効主成分に対して 0.1 %程度の含有量しか無い事がしばしば有り、詳細な構造解析を実施する場合は微量成分を分取・精製して分析します。長年の経験で蓄積して来たノウハウや保有する複数の分取・精製方法から、不純物毎に最適な手法を選択する事により、分取・精製から構造解析迄、迅速に実施します。一方、分取物が不安定、濃縮や乾固の際に分解してしまうなど分取が難しい場合は、LC-NMR が有用です。含有量が或る程度多ければ、分取せずにそのまま NMR 測定が可能に成ります。又、新しいモダリティであるペプチドや核酸についても溶液 NMR、MS、円偏光二色性分析などを用いて構造解析や新たな分析技術の開発に

取り組んでいます。その他、医薬品以外にも、天然物や糖鎖、脂質など生体物質についても様々な手法を組み合わせることで総合的な構造解析を行っています。

2.2 特性解析

質量分析計や、プロテインシーケンサー、アミノ酸分析計等を駆使して、バイオ医薬品の特性解析を行っています。バイオ医薬品（タンパク質医薬品）は、細胞培養で生産される為、図 1 に示す様に、糖鎖修飾の種類の違いや、他の化学修飾、アミノ酸残基の欠損などの分子構造的な多様性・不均一性がどの程度有るかを評価し、生物活性や毒性との関係を解析する事が求められます。

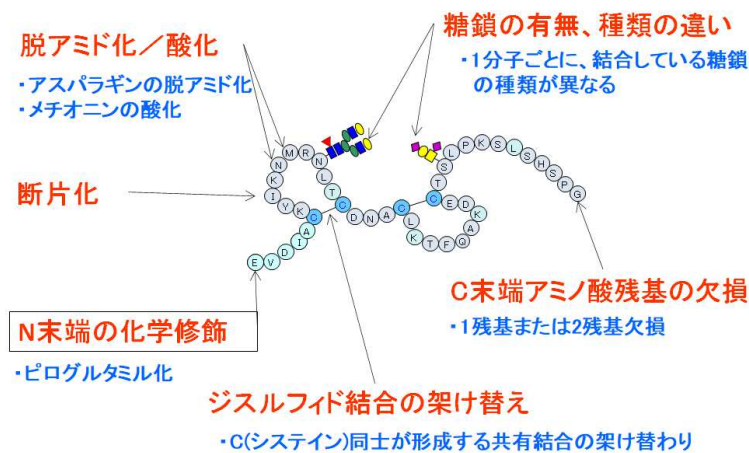


図 1 バイオ医薬品（タンパク質）の不均一性

これらの不均一性は非常に僅かな化学的変化である為、高感度な手法を用いて、明らかにする必要があります。当社ではこの目的の為に、最先端の質量分析計（図 2）を複数台導入し、これ迄に培って来た試料前処理の経験・ノウハウと組み合わせる事で、高品質の解析データを取得し、お客様へご提供しています。又、2.1 項の構造解析を含めて、これらの試験は全て信頼性基準試験で実施しています。



超高分解能質量分析計
Orbitrap Fusion Lumos
(Thermo Fisher Scientific)



イオンモビリティ機能搭載
Q-TOF 質量分析計
timsTOF Pro (Bruker)

図 2 特性解析に用いている質量分析計

2.3 相互作用

標的タンパク質と医薬品候補物質との相互作用解析について、NMR (核磁気共鳴) 法、SPR (表面プラズモン共鳴) 法、ITC (等温滴定カロリーメトリー) など複数の物理化学的手法を取り揃えて実施しています。図 3 に STD-NMR (saturation transfer difference NMR、飽和移動差 NMR) による相互作用解析結果を示します。

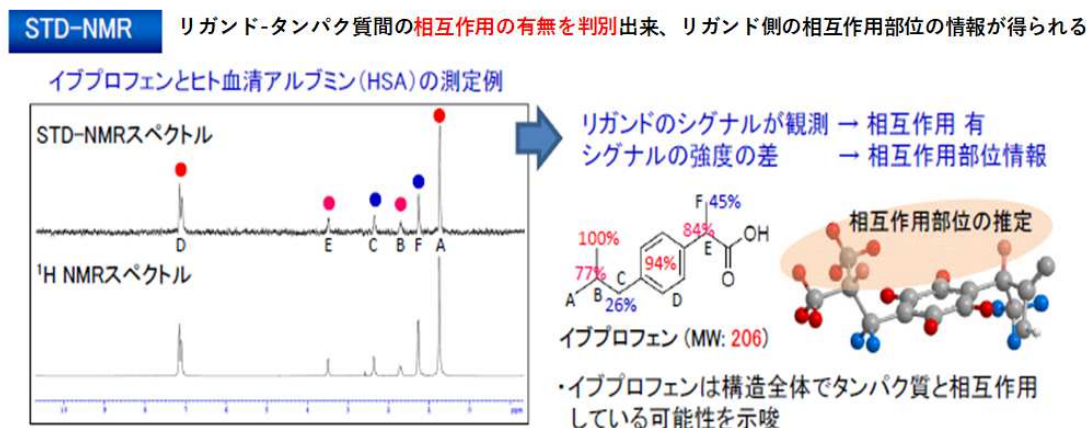


図 3 STD-NMR によるリガンド-タンパク質間の相互作用解析例

又、本年 4 月には SPR を利用した業界トップクラスの高感度、スループット性を有する最新の分析装置 (図 4) を導入しました。標的タンパク質に対する低分子化合物のスクリーニングやカイネティクス解析、バイオ医薬品のスクリーニングと特性評価、その他種々の分子間相互作用解析が可能になります。各種解析手法は得られる情報や特長が其其異なります。創薬の研究ステージや分析目的によって使い分けたり、複数の手法で多面的に評価したりする必要になって来ます。NMR、SPR、ITC に加え、質量分析、円偏光二色性分析、世界初の高速 AFM (atomic force microscope、原子間力顕微鏡) と言った当社が保有している他の手法と組み合わせる事により、構造情報を含む総合的な分子間相互作用解析に取り組んでいます。



図 4 Sierra SPR-24 Pro (Bruker)

3. CMC 分野

3.1 バイオ医薬品

抗体医薬品を中心に、20 年以上に渡るバイオ医薬品の品質試験・安定性試験の豊富な受注実績を有しています。全分析機能を GMP 体制で運用している他、試験法の開発も行っています。各種クロマトグラフィーによる試験は当然の事ではありますが、当社では特に、

キャピラリー電気泳動 (PA 800 Plus、iCE3) や ELISA に関する実績が非常に多く、最近ではセルベースアッセイを試験項目に含めた安定性試験も数多く実施しています。特徴のある技術としては、SEC-MALS (サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱法) による抗体医薬の凝集体の検出が挙げられます。既に経験を有している ADC (抗体薬物複合体) に加え、バイスペシフィック抗体やナノボディーなどの、次世代抗体医薬の分析にも取り組んでいます。

3.2 再生医療製品など

新モダリティーとして発展が期待されている、細胞医薬品や遺伝子治療薬の品質試験・安定性試験に積極的に取り組んでいます。細胞医薬品では、細胞表面分子の検出にフローサイトメーター (図 5、左) は勿論の事、分子の特性に応じて ELISA や LC-MS/MS も活用し、低分子からタンパク質迄、分析を行っています。遺伝子治療薬では、キャピラリー電気泳動装置 (図 5、右)、定量 PCR などによる分析を行っている他、製造工程中の不純物に関して、残留 DNA、残留タンパク質、残留溶媒などを、定量 PCR、ELISA、GC/MS と言った手法を駆使して分析しています。上述の分析は全て GMP 体制で行っており、承認申請に向けた信頼性の高い試験を実施しています。細胞医薬品や遺伝子治療薬は最先端分野である為、試験法が成熟していませんが、試験法の開発の受託実績も豊富で、お客様との打合せも活発に行っています。



図 5 CMC 分野で用いているフローサイトメーター (左) 及び
キャピラリー電気泳動装置 (右)

4. バイオアナリシス

4.1 バイオマーカー

バイオマーカーは、疾病の診断や経過の予測に用いられる他、医薬品候補化合物の安全性の評価や有効性治療効果の予測などに用いられ、医薬品開発の効率化に役立てられています。当社で展開しているバイオマーカー測定サービスには、多様な生理機能を果たす D-アミノ酸の網羅的な測定を始め、診断や治療のマーカーに利用される遊離アシルカルニチ

ン類の多成分一斉分析などのクロマトグラフィーを利用した分析の他、ECL (electrochemical luminescence、電気化学発光) を用いたサイトカイン類の multi-plex アッセイなどが有ります。又、超高分解能質量分析計を利用してオミクスデータを収集したマーカー探索にも取り組み、お客様からの幅広いご要望にお応えしています。表 1 に測定例を示します。

表 1 バイオマーカーの測定例

サイトカイン	インターロイキン, 腫瘍壊死因子, 増殖因子, ケモカイン
アミノ酸	D,Lアミノ酸
ペプチド	アンジオテンシン類, グルタチオン
脂肪酸	エイコサペンタエン酸 (EPA), ドコサヘキサエン酸 (DHA), ドコサペンタエン酸 (DPA), アラキドン酸 (AA)
脂質メディエーター	プロスタグランジン類, スフィンゴシン-1-リン酸(S1P), アナンダマイド, コレステロール, オキシステロール, エストラジオール, アルドステロン, 胆汁酸
ビタミン	VA レチノール, VB1 チアミン, VB2 リボフラビン, VB6, VD, VE α -トコフェロール, VK
核酸	miRNA, アデノシンーリン酸類
ムコ多糖	コンドロイチン4-硫酸
その他	カテコールアミン, L-DOPA, カルニチン類, 一酸化窒素

4.2 バイオ医薬品

医薬品の開発では、その有効性や安全性を評価する為に、ヒトや動物における薬物動態を把握する事は重要且つ不可欠です。その為、血液や尿中等の薬物や代謝物の濃度を正確に定量する事が求められています。最新の高感度 LC-MS/MS を用いて、分析法の開発から TK 測定や PK 測定迄、信頼性の高いデータを提供しています。又、近年では、病気に対する理解や創薬技術の進展が進むにつれ、医薬・医療技術も進化し、様々な新しいモダリティ（抗体医薬、タンパク質ペプチド医薬、核酸医薬など）が登場しています。例えば、タンパク質医薬品を動物やヒトに投与すると、それが異物と認識されて免疫反応が生じ、抗薬物抗体が産生される事が有ります。抗薬物抗体が中和活性をもったり、薬物動態を変化させ有効性や安全性に影響を及ぼしたりする可能性が有り、抗薬物抗体の測定は重要です。当社では、抗薬物抗体や活性の測定を、LBA (ligand binding assay、リガンド結合試験 ; ELISA や ECL、In-Cell ELISA) により行っています。

5. ペプチド合成

上述の受託分析業務のみならず、皆様の創薬研究支援の一環として、研究試薬用のペプチドの受託合成を行っています。豊富なノウハウと実績を有しており、高品質（高純度）のペプチドを短納期でお届けする事が出来ます。有機合成化学の専門家により様々な化学修飾を位置選択的に行う事が可能であり、環状ペプチドや非天然アミノ酸含有ペプチドなど、特殊なペプチドの合成にもスピーディーに対応しています。2021 年はヒーター機能搭載の最新の合成装置を導入し、更なる短納期化と合成高難度のペプチドの成功率向上を目指しています。又、関連する各種分析（構造解析や相互作用解析など）サービスをワンストップでご利用頂く事が可能です。

6. 最後に

私たち東レリサーチセンターは、「先端分析」には、新たな「科学」を切り拓く力が有ると信じています。新素材・新機能・新製品・新プロセスの創出と、製品・製造トラブルにおける高度分析による課題解決支援こそが、東レリサーチセンターの存在意義であると私達は考えております。ライフサイエンス分野では、上述の分析法の提案や測定を通じてお客様の新医薬品の創出を支援して参ります。今後共、ご愛顧頂ければ幸いです。

〈執筆者略歴〉 竹澤正明 / Masaaki TAKEZAWA

- ・ 1989 年 東京理科大学 薬学研究科修士修了
- ・ 1989 年 東レ株式会社入社
- ・ 1989 年 株式会社東レリサーチセンター出向
- ・ 現職：理事、研究副部門長（ライフサイエンス担当）、
バイオメディカル分析研究部長
- ・ 分析士資格：LC 分析士三段、LC/MS 分析士五段
- ・ 専門：生体試料中の薬物濃度測定、
医薬品の安定性試験、質量分析
- ・ 趣味：小物集め、温泉、読書、お酒
- ・ E-mail：masaaki.takezawa.f9@trc.toray



【新役員紹介】

運営委員心得に就任して

高橋亜紀子 / Akiko TAKAHASHI

農研機構 / National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

(Received May 20, 2021; Accepted May 21, 2021)

キーワード LC 初心者；勉強会；タンパク質同定；質量分析

運営委員心得就任に当たり、どんな情熱が必要かと考えた時、初めて LC/MSMS に出会った時の事を思い出しました。タンパク質同定の為の分析でした。分子生物学系の私は、「LC」や「質量分析」という言葉や「非常に繊細な実験操作」という事は知っていましたが、装置実物を真面に見た事は有りませんでした。先輩同僚から分析方法を丁寧に教えて頂き、分析すればするほど、奥深さと、「知らずしてデータを出す事」の怖さや脆さを感じた事をよく覚えています。

自己研鑽と応用方法を学ぶ為に参加した LC 研究懇談会例会は、いつも満席。講義テーマは新人から玄人向け迄、幅広いのに其其ディープで熱い。まるで有名塾の様で、初心者同然の私でも「何とか成りそうだ…！」と心強く感じたのでした。

私を含め周囲は、「LC や質量分析を使えたら便利」、「専門的な知識が必要」、「機器が高額」という印象を抱いていました。何れの印象も正しいと思います。それ故、正しい知識と最新事情、多方面からのアプローチ方法を仕入れる事は当然で、何より「実験にフィードバック出来る情報で在るか」が重要です。各研究分野の目線を擦り合わせて正直に意見を交わし切磋琢磨する場として LC 研究懇談会は位置している、と私は考えています。

生物に関わればタンパク質は必ず通る道です。現在行っているウイルス研究分野においてもタンパク質は未知な部分が多く、実験方法も日々進歩を求められています。

「未知に挑む」

LC 研究懇談会員の方々の中にはこの言葉が魅惑に聞こえる方、多くいらっしゃる事と 생각합니다。2021 年度はオンライン例会と成りますが、通常例会同様、参加する皆様が未知に挑む探求心を曝け出せる LC 研究懇談会で在れるよう、努めて参りたいと思います。

〈執筆者紹介〉 高橋亜紀子 (Akiko TAKAHASHI)

- ・ 2004 年 東海大学海洋学部卒。東京大学医科学研究所・定量生命科学研究所を経て 2019 年より農研機構動衛研海外病研究拠点にてウイルス研究業務に従事。
- ・ 分析士資格：LC 分析士初段、LC/MS 分析士初段。



第 1 回 LC 懇クロスワードパズル (出題者：中村 洋)

次の升目に 1 つずつローマ字を入れ、あ～この 10 文字に入る文字をこの順に繋げて出来る言葉は何でしょう。正解者を抽選の上、3 名に「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) を贈呈します。①住所、②氏名、③LC 懇個人会員番号と④答えを明記の上、メールで 2021 年 8 月 31 日迄にご応募下さい。正解と当選者は LC 懇ホームページと本誌第 3 号 (2021 年 12 月発行予定) で発表し、贈呈品は 2021 年 9 月中にお送りします。

応募先：CWP 係 (E-mail : nakamura@jsac.or.jp)

1	17	18	20	22	24		26	27
2	け		あ				3	
4	こ					5		く
6		お	21	23			う	
7			8			9		
10		え	い			11		28
12			13			14		き
		19		15	25			
	16			か				

ヨコのカギ

1 HPLC 分離の原理、2 hell の対義語、3 イタリア最長の川の名前、4 芸術、5 最古のものは犬、6 照射線量の単位、7 有機化合物の HPLC には最強の検出器、8 ヒドロキシ基、9 今はこの社会、10 ベトナム女性の民族服、11 米国のケーブル TV 局、12 化学発光、13 ハッシウム、14 留守番電話応答用メッセージ、15 電子メール用語、16 twice a week の意味も有る。

タテのカギ

1 薬局、5 孔雀、17 くしゃみでも発生、18 割合、19 ケイ素、20 地上波、衛星放送などが有る、21 箱舟を作ったとされる、22 that is、23 Pyramus と相愛の少女、24 テネシー州、25 キャピラリー電気泳動、26 an —— speech、27 否定をつくる論理演算子、28 波長の単位。

「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論文で、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、価値有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。10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)
- ・先達に学ぶ(学識経験者による教訓・人生訓、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・新役員紹介(LC懇個人会員・新任役員紹介。4枚)
- ・閑話休題(クロスワードパズルなど、2枚程度)
- ・LC懇事業カレンダー、など

「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）を本文の前に配置し、要旨の下に 1 行空けて**キーワード**（英文要旨の場合は **Keywords**）を 3～5 個セミコロンで区切って記載する。
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. 原稿の修正などの為に、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。
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研究懇談会事業カレンダー		
Month	Date	Event
(2月)	2月1日(月)	2015年度LC/MS分析士二段試験→「第4回LC/MS分析士二段試験解説書」(通算23冊目)メール査読会
3月		2021年度CERIク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年液体クロマトグラフィー努力賞募集会告(締切:9月末日)
	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
4月	4月22日(木)	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	5月27日(木)	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	6月24日(木)	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
	6月15日(火)	電子ジャーナル「LCとLC/MSの知恵」第2号発行
7月	7月21日(水)	第361回例会(オーガナイザー:中村 洋) 親水性化合物の分析法最前線
8月	8月2日(月)	2016年度LC/MS分析士三段試験→「第4回LC/MS分析士三段試験解説書」(通算24冊目)メール査読会
9月	22(水)-24(金)	日本分析化学会第70年会(神戸大学) 第362回例会(オーガナイザー:中村 洋) LC研究懇談会講演会(年会併設) 水処理におけるクロマトグラフィー分析技術の活用(栗田工業㈱)○榎本幹司
	9月28日(火)	第363回例会(オーガナイザー:伊藤誠治) 逆相クロマトグラフィーの基礎と実際、最新事情
10月	10月12日(火)	LC分析士五段試験(日本分析化学会・会議室)
	10月19日(火)	LC/MS分析士五段試験(日本分析化学会・会議室)
	10月21日(木)	第364回例会(オーガナイザー:寺田明孝) LC, LC/MS にまつわる比較と選択のコツ
11月	11月16日(火)	LC分析士四段試験(日本分析化学会・会議室)
	11月17日(水)	第365回例会(オーガナイザー:海老原卓也) ODS以外の便利な固定相
	25日(木)26日(金)	LC- & LC/MS-DAYS 2021(世話人:大塚克弘、箱根パークス吉野)
	11月30日(火)	LC/MS分析士四段試験(日本分析化学会・会議室)
12月	12月3日(金)	LCの日 LC分析士三段試験(東京・京都) LC/MS分析士三段試験(東京・京都)
	12月14日(火)	第366回例会(オーガナイザー:長江徳和) HPLC・UHPLCの進展:新規固定相,アプリケーションなど
	12月15日(水)	電子ジャーナル「LCとLC/MSの知恵」第3号発行
2022年 1月		LC分析士二段試験(東京・京都) LC/MS分析士二段試験(東京・京都)
	1月21日(金)	第367回例会(オーガナイザー:石井直恵) 意外と知らない HPLC, LC/MS分析の効率化・デジタル化の手法
	27日(木)28日(金)	第27回LC & LC/MS テクノブラザ(世話人:中山 聡、大田区産業プラザPIO)
2月	2月1日(火)	2014年度LC分析士初段試験→「第5回LC分析士初段試験解説書」(通算25冊目)査読会 LC分析士初段試験(東京・京都) LC/MS分析士初段試験(東京・京都)
	2月17日(木)	第368回例会(オーガナイザー:前中佑太) UHPLC, HPLCを用いた高分子分析の最前線

編 集 後 記

- [SI] 何とか編集締切に間に合わせる事が出来て安堵しています。
引き続き、多くの皆様の御意見、御投稿をお待ちしております。
- [KE] オンラインでの例会も始まりました。コロナ禍に負けない様、頑張りますので、例会共々、本ジャーナルを宜しくお願い致します。
- [MO] 第 2 号も多彩な内容と成りました。執筆頂いた皆様に感謝申し上げます。今後とも多くのご投稿をお待ちしております。
- [MT] 創刊号に続き、第 2 号も皆様方のご協力により発刊出来ました。
有益な LC に関する情報が満載ですので、是非お役立て願います。
- [HN] 投稿者・編集委員の力強いご支援を得て、十七条憲法第一条「和を以て貴しと為す」の時代を超えた普遍性を実感しています。
- [HM] 第 2 号の発信です。今号も投稿論文を始め、多彩な内容でお届けします。皆様のお役に立つ事を編集委員一同、願っております。

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 2021 年第 1 号 (通巻第 2 号)

2021 年 6 月 15 日発行 (©2021, 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)