

LCとLC/MSの知恵 2021年第2号(通巻第3号) 令和3年12月15日発行 ISSN 2436-1194

# LCとLC/MSの知恵

**Wisdom for LC and LC/MS**

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



(公社) 日本分析化学会  
液体クロマトグラフィー研究懇談会

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

# LC と LC/MS の知恵

第 3 号  
2021 年 12 月

## 目 次

### 巻頭言

「LC と LC/MS の知恵」第 3 号の発行に当たって  
(LC 研究懇談会委員長、本誌編集委員長) 中村 洋 4

### 報文

LC/MS 用オンライン脱塩チューブの開発  
(エムエス・ソリューションズ) 清水幸樹、高橋 豊 6

### ノウハウ

塩基性化合物をテーリングさせないシラノール基とは？ 更に進化したエン  
ドキャッピングとは？  
(クロマニックテクノロジーズ) 長江徳和 20

### 解説

LC/MS 分析に求められる HPLC 及び UHPLC の性能  
(島津製作所) 渡邊京子、伊藤友紀 29

### トピックス

LC/MS/MS による親水性代謝物の一斉分析及び考察をサポートするマルチオ  
ミクス解析手法の紹介  
(島津製作所) 伊藤友紀、荒尾洋平、堀江征司、岡本真美、渡邊 淳 38

### シリーズ「試料分析の定石とコツ」

環境分析  
(ムラタ計測器サービス) 大塚克弘 46

### 原薬分析

(エーザイ) 柿田 穰 61

臨床分析	(病態解析研究所) 岡橋美貴子	66
健康食品及び危険ドラッグ等に含有される医薬品成分等の分析	(東京都健康安全研究所) 坂本美穂	81
水質分析	(栗田工業) 榎本幹司	89
LC/MS 分析の基礎	(東レリサーチセンター) 竹澤正明	98
会員動向		
愛媛生活 4 年+9 年	(住友金属鉱山) 児玉竜二	111
団体会員紹介		
クロマニックテクノロジーズと HPLC/UHPLC カラム	(クロマニックテクノロジーズ) 長江徳和	117
CERI と HPLC カラム	(化学物質評価研究機構) 坂牧 寛	122
新役員紹介		
LC 研究懇談会准役員に就任して	(ジーエルサイエンス) 松岡秀雄	127
新会員紹介		
バイオアナリシスとクロマトグラフィー	(東レリサーチセンター) 櫻井 周	128

**閑話休題**

第 2 回 LC 懇クロスワードパズル

(東京理科大学) 中村 洋 132

第 1 回 LC 懇クロスワードパズル・正解と当選者発表 134

投稿規程 137

2021 年度 LC 懇事業カレンダー 139

奥付 140

【巻頭言】

「LC と LC/MS の知恵」第 3 号の発行に当たって

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

In Issuing *Wisdom for LC and LC/MS*, No.3

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

昨年 12 月に創刊した本電子ジャーナルは、本号で第 3 号となる。日本では「三」という漢数字は、単なる数を数える手段以外に、「短い」とか「飽きっぽい」とか兎角ネガティブなニュアンスを表現する場合に使われる嫌いがある。例えば、前述した其の典型例が「三日天下」、「三日坊主」、「貸家と唐様で書く三代目」であり、新しい所ではヒロシ&キーボーの「三年目の浮気」などであろうか<sup>注1)</sup>。その意味では、鬼門となる第 3 号を無事に発行出来た事に正直、安堵している。

さて、コロナ禍も第 5 波が綺麗に収束したかに見え始めた途端、南アフリカ共和国で報告されたオミクロン株が世界を再び汚染し始め、憂鬱な気分が漂い始めている。或る専門家が言っている様に、コロナ禍の終息には本当に 5~6 年掛かるのであろうか。既に、多くの方が気付かれている様に、ポストコロナの時代はもう少し先で、暫らくはウイズコロナの時代を経験せざるを得ないのかも知れない。

LC 研究懇談会も 2020 年度は時代の変化に即応出来ず、コロナ禍が明ける日を期待して月日を浪費し、結果的には全ての例会、見学会を開催出来なかった。この苦い経験が基になって、2020 年 12 月には電子ジャーナルの発行を実現し、翌 2021 年度からは Zoom ウェビナ

---

注 1) 日本では「三」が入った名字が少なくない。多い順に示すと、「三浦」「三宅」「三上」「三好」「三木」「三輪」「三井」「三村」「三島」などと続く。「三浦」については、現在の三浦半島に由来し、東西南の 3 方向が海(浦)に囲まれているとする数詞的な意味も有りそうであるが、日本書紀に記載された「御浦」(「御」は美称)を天皇家に憚って「三浦」としたとする説が有力である。何れにしても、上述の名字にはネガティブな意味は無いと思われる。因みに、LC 研究懇談会にも「三」の字が入った名字の運営委員が居られる。本誌の編集委員でもある三上博久氏である。短気、飽きっぽいなどを全く感じさせない、穏健できちっとした性格の重鎮である。念の為。

一を用いる LC 研究懇談会月例運営委員会、例会、関東支部機器分析講習会第 2 コース「HPLC と LC/MS の基礎」、などのリモート事業を実施した。又、年明け早々には、LC & LC/MS テクノプラザ (2022 年 1 月 27 日-28 日) をリモート形式で開催予定である。更に、今年の年末からは LC 分析士及び LC/MS 分析士認証試験 (三段、二段、初段) を対面形式で実施する予定である (表 1)。今年度はコロナ禍の影響により、試験場が東京会場のみとなってしまった。西日本在住の方々にはご不便をお掛けするが、発行済の 22 冊の分析士解説書等を参考に、是非とも実力を試して戴きたい。2019 年暮れから始まったコロナ禍は満 2 年間も続いており、誰しも飽き飽きしている。来年こそは、LC 研究懇談会の運営委員会、例会、情報交換会、見学会、査読会、分析士認証試験など、全ての事業を対面形式で実施出来る事を希望して止まない。

表 1 2021 年度日本分析化学会・分析士認証試験 (2022 年実施分)				
認証試験	申し込み締め切り	試験日	試験時間	試験場
LC 分析士三段	12 月 23 日 (木)	1 月 14 日 (金)	14 時-16 時	五反田文化会館
LC/MS 分析士三段	12 月 28 日 (火)	1 月 20 日 (木)	14 時-16 時	五反田分工会館
LC 分析士二段	1 月 11 日 (火)	1 月 24 日 (月)	14 時-16 時	北とびあ
LC/MS 分析士二段	1 月 18 日 (火)	2 月 1 日 (火)	14 時-16 時	北とびあ
LC 分析士初段	1 月 28 日 (金)	2 月 11 日 (金)	10 時-12 時	北とびあ
LC/MS 分析士初段	1 月 28 日 (金)	2 月 11 日 (金)	14 時-16 時	北とびあ

<執筆者略歴> 中村 洋 (Hiroshi NAKAMURA)

1968 年 東京大学薬学部製薬化学科卒業 1970 年  
同・大学院薬学系研究科修士課程修  
1971 年 同・大学院薬学系研究科博士課程中退  
1971 年 同・薬学部教務職員  
1973 年 同・薬学部助手  
1974 年 米国 NIH 留学 (2 年間)  
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



現在の公職

(公社) 日本分析化学会・分析士認証委員会委員長  
同・LC 分析士認証専門委員会委員長  
同・LC/MS 分析士認証専門委員会委員長  
同・LC 研究懇談会委員長  
「LC と LC/MS の知恵」編集委員長、など

【報文】

LC/MS 用オンライン脱塩チューブの開発／

Development of a Desalination Tube for an On-line LC/MS  
Analysis

清水幸樹／Sachiki SHIMIZU、高橋 豊／Yutaka TAKAHASHI

エムエス・ソリューションズ株式会社／MS-Solutions Co. Ltd.

(Received November 23, 2021; Accepted December 2, 2021)

キーワード LC/MS ; 不揮発性緩衝液 ; 脱塩チューブ

要旨

不揮発性緩衝液条件での LC/MS 分析を可能にする、オンライン脱塩チューブを開発した。リン酸塩を始めとする不揮発性緩衝液は、低波長の UV 検出でもバックグラウンドが低い為に高感度検出が可能で、且つ分離能力が高い事から、従来 HPLC の移動相溶媒として汎用されて来た。しかし LC/MS には、大気圧のイオン化部で塩が析出して極度に汚染される事、イオンの真空領域への導入部で塩が析出してイオンの導入が困難になる事、分析種のイオン化を抑制する事等の問題が有る事から、事実上、不揮発性緩衝液を移動相として用いる事が出来ない。

我々は、PTFE (polytetrafluoroethylene) チューブにイオン交換樹脂を充填した脱塩チューブを開発し、それを HPLC 装置と MS 装置の間に配置する事で移動相中の不揮発性塩を除去し、不揮発性緩衝液条件下での LC/MS 分析を可能とした。

1. 緒言

高速液体クロマトグラフィー質量分析(liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS)は、HPLC と MS を組合せた複合的な機器分析法であり、生体試料中のタンパク質や医薬品・代謝物等を中心に、その高い定性能力と検出感度から、定性・定量の両分析において威力を発揮している。LC/MS に用いられるイオン化法は、エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI)、大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)、大気圧光イオン化法 (atmospheric pressure photoionization, APPI) 等の大気圧イオン化法 (atmospheric pressure ionization, API) が、市販装置のほぼ 100% を占めている。中でも ESI は、その汎用性の高さから、3 種類の中で最も使用頻度が高いと推測される。

HPLC の検出法としては、紫外可視吸光光度法 (ultraviolet-visible absorption spectroscopy, UV/Vis) が最も汎用的である。HPLC 分析用の移動相溶媒には、低波長の UV 検出でもバックグラウンドが低い為に高感度検出が可能で、且つ分離能力が高い事から、従来

リン酸塩緩衝液が汎用されて来た。しかし、リン酸塩緩衝液は不揮発性である為、大気圧のイオン化部で塩が析出して極度に汚染される事、イオンの真空領域への導入部で塩が析出してイオンの導入が困難になる事、分析種のイオン化を抑制する事等の問題が有る事から、オンラインで LC/MS 測定に用いる事は事実上不可能である。

しかし、MS が HPLC の検出法として利用されている歴史は、UV 等他の方法と比較すると新しく、LC/UV で構築された不揮発性緩衝液条件をそのまま LC/MS に用いたいと言う分析現場での要求は、以前から根強く存在している。不揮発性緩衝液条件で検出された注目ピークの定性分析の為に、その質量分析を行う際、従来、主に以下の 3 つの方法が用いられている。

1. オフラインで脱塩する方法<sup>1)2)</sup>

目的ピークを分取、その溶液を、C<sub>18</sub>カートリッジ等を用いて脱塩し、インフュージョン試料導入や揮発性移動相条件の LC/MS によって測定する。この方法では、特殊な装置等が必要でない為、手軽に行う事が出来ると言う利点がある一方、一連の操作に莫大な時間と労力が必要と言う欠点がある。

2. 二次元 HPLC/MS を用いる方法<sup>3)</sup>

流路切換バルブを介してプレカラムと分析用のカラムを接続し、注目ピークをプレカラムにトラップし超純水を中心とした洗浄溶媒を通液して脱塩後、揮発性移動相を用いたグラジエント溶離条件でプレカラムにトラップした成分を溶出させ分析用カラムで分離してオンラインで MS 装置に導入する。一連の操作はシステムによって自動化されている為に面倒な操作は必要ないが、高価な専用の二次元 HPLC システムが必要である為、経済的な制限がある。又、不揮発性塩を用いた HPLC 分析の時間軸と LC/MS 分析の時間軸が一致しないと言う問題も有る。

3. イオンサプレッサーを用いる方法<sup>1)2)</sup>

イオンクロマトグラフに用いるイオンサプレッサーは、イオン交換膜やイオン交換ゲルによってイオンクロマトグラフィーの不揮発性緩衝液に含まれる不揮発性の酸又は塩基を水に交換する事で、電気伝導度検出器を用いた場合の塩によるバックグラウンドレベル上昇を抑え高感度検出を可能にする。このイオンクロマトグラフ用のイオンサプレッサーを、逆相 LC/MS に用いる方法である。イオンクロマトグラフィーで用いる溶離液は基本的には塩類等を含んだ水であり、有機溶媒は含まれない。よって、イオンクロマトグラフ用イオンサプレッサーは、一般的に有機溶媒への耐性が低い。従って、有機溶媒を用いる逆相 LC/MS へ応用する事は、有機溶媒を殆ど含まない条件に限定されてしまい、汎用的でないと言う問題がある。

そこで、我々は、有機溶媒に耐性の有るイオン交換樹脂に独自の修飾を施した専用のイオン交換樹脂を用い、リン酸塩等の不揮発性塩を揮発性のイオンに変換する事で、不揮発性塩緩衝液を用いた条件においてもオンラインで LC/MS 測定を可能とする方法を開発したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 装置及び条件

質量分析計には ESI イオン源を装着した LC-TOFMS, JMS-T100LP (日本電子) を、高速液体クロマトグラフには Agilent 1200 (Agilent Technologies) を用いた。ESI におけるニードル電圧は 2 kV、脱溶媒室温度は 250 °C、リングレンズ電圧は 10 V、オリフィス 1 電圧は 40~50 V、イオンガイド電圧は 1,000~2,500 V に設定した。マススペクトル取得  $m/z$  範囲は 10~1,000、マススペクトル記録スピードは 1 秒に設定した。脱塩チューブは、内径 1 mm のタイプを用いた。

LC の移動相と脱塩チューブは、測定試料に応じて其其以下を用いた。カラムは YMC Triart C18 (内径 2.0 mm、長さ 100 mm ; 粒子径 3  $\mu\text{m}$ )、TSKgel ODS-100V 3 $\mu\text{m}$  (内径 2.0 mm、長さ 100 mm ; 粒子径 3  $\mu\text{m}$ )、或いは Waters BEH C18 (内径 2.1 mm、長さ 50 mm ; 粒子径 1.7  $\mu\text{m}$ ) を用いた。カラム温度は 40 °C、移動相流量は 0.3 mL/min、UV 検出波長は 215 nm とした。

### 2.2 測定試料と測定条件

(1) サルファ剤 (サルファメラジン、サルファジミジン、サルファモノメトキシシ、サルファジメトキシシ、各 20  $\mu\text{g/mL}$ )

移動相 A: 10 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液、B: アセトニトリル

A/B=80/20→20/80 (5 min, リニアグラジエント)

脱塩チューブ CFAN (両イオン交換タイプ: ギ酸型アニオン交換樹脂/アンモニウム型カチオン交換樹脂)

(2) 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド (イオン液体)

移動相 A: 10 mmol/L ドデシル硫酸アンモニウム水溶液、B: アセトニトリル

A/B=50/50→20/80 (5 min, リニアグラジエント)

脱塩チューブ COO (アニオン交換タイプ: OH 型アニオン交換樹脂)

(3) トリプトファン, 20  $\mu\text{g/mL}$

移動相 A: 0.1% TFA/超純水、B: 0.1% TFA/アセトニトリル

A/B=98/2→20/80 (10 min, リニアグラジエント)

脱塩チューブ CFOO (アニオン交換タイプ: ギ酸型アニオン交換樹脂)

(4) ヌクレオチド (アデノシン一リン酸 (adenosine monophosphate, AMP)、アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate, ADP)、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP)、各 50  $\mu\text{mol/L}$ )

移動相 A: 0.1% TEA/超純水、B: アセトニトリル

A/B=100/0→80/20 (2-5 min, リニアグラジエント)

脱塩チューブ OOAN (カチオン交換タイプ: アンモニウム型カチオン交換樹脂)

## 2.3 試薬

アニオン交換樹脂は三菱ケミカル (東京都) 製の 4 級アンモニウム基を導入したスチレンージビニルベンゼン共重合体 (商品名「MCIGEL CA08P」、Cl 型) を、カチオン交換樹脂は三菱ケミカル製のスルホ基を導入したスチレンージビニルベンゼン共重合体 (商品名「MCIGEL CK08P」、H 型) を用いた。PTFE チューブはフロム (東京都) 製を、フリットはトーメイ工業 (兵庫県) 製超高分子量ポリエチレンを用いた。

イオン交換樹脂の調製に使用する超純水は、富士フィルム和光純薬 (大阪府) 製・LC/MS 用を、水酸化ナトリウム水溶液、ギ酸及びアンモニア水は富士フィルム和光純薬製・特級を用いた。

LC/MS の移動相に用いるアセトニトリル及び超純水は富士フィルム和光純薬製・LC/MS 用を、リン酸二水素カリウムは富士フィルム和光純薬製・特級を用いた。

## 2.4 脱塩チューブの作製

### 2.4.1 イオン交換樹脂の調製 (対イオンの交換)

Cl 型アニオン交換樹脂 20 mL を入れたカラムに 2 mol/L NaOH 水溶液 2,000 mL を 30 mL/min で流した後、超純水 500 mL を 10 mL/min で流し、通液後 pH が中性であることを確認し OH 型アニオン交換樹脂を調製した。その後、1 % ギ酸水溶液 2,000 mL を 30 mL/min で流した後、超純水 200 mL を 5 mL/min で流し、通液後 pH が中性であることを確認しギ酸型アニオン交換樹脂を調製した。

H 型カチオン交換樹脂 20 mL を入れたカラムに 2 mol/L アンモニア水溶液 2,000 mL を 30 mL/min で流した後、超純水 200 mL を 5 mL/min で流し、通液後 pH が中性であることを確認しアンモニウム型カチオン交換樹脂を調製した。

### 2.4.2 脱塩チューブの作製

ギ酸型アニオン交換樹脂、OH 型アニオン交換樹脂又はアンモニウム型カチオン交換樹脂を超純水に分散させ、其々の分散液を調製した。分散液をシリンジで吸引し、内径 1.0 mm 又は 1/16 インチの PTFE チューブ内に導入した。

(1) アニオン交換樹脂とカチオン交換樹脂を同時に使用する両イオン交換タイプ

内径 1.0 mm、長さ 100 mm 又は内径 1/16 インチ、長さ 200 mm の PTFE チューブの長さの 4 分の 1 の位置にフリットを詰めてから、長い側にギ酸型アニオン交換樹脂を詰め末端をフリットで栓をする。更に、短い側にアンモニウム型カチオン交換樹脂を詰め末端をフリットで栓をして作成した。

(2) アニオン交換樹脂を使用するタイプ

内径 1.0 mm、長さ 100 mm 又は内径 1/16 インチ、長さ 150 mm の PTFE チューブの末端にフリットを詰めてからギ酸型アニオン交換樹脂又は OH 型アニオン交換樹脂を詰め末端をフリットで栓をして作製した。

(3) カチオン交換樹脂を使用するタイプ

内径 1.0 mm、長さ 50 mm 又は内径 1/16 インチ、長さ 100 mm の PTFE チューブの末端にフリットを詰めてからアンモニウム型カチオン交換樹脂を詰め末端をフリットで栓をして作製した。

両イオン交換タイプの脱塩チューブの模式図と実物写真を図 1 に示す。

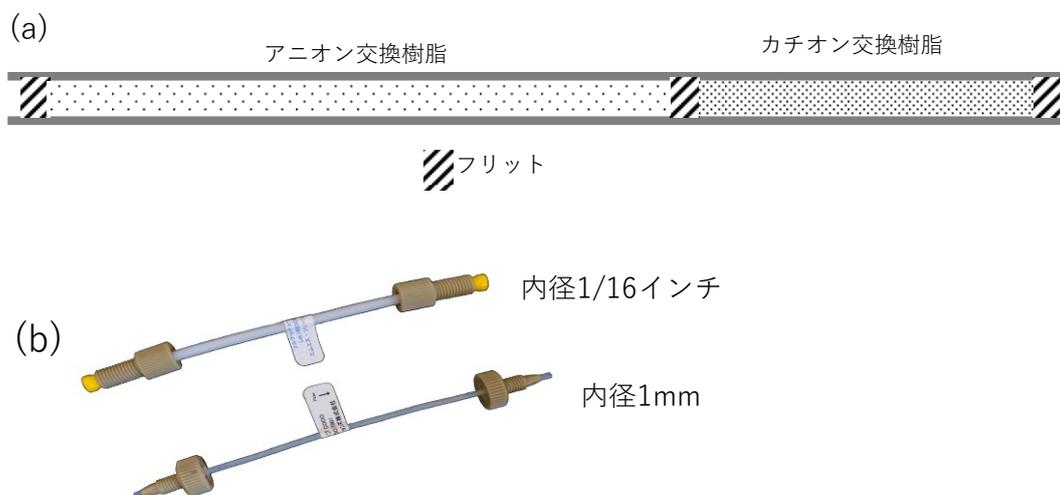


図 1 脱塩チューブの(a)模式図 (両イオン交換)、(b)写真

## 2.5 脱塩チューブを用いる LC-MS

脱塩チューブは、前述した様に内径 1 mm (外径 1/16 インチ) と内径 1/16 インチ (外径 1/8 インチ) の 2 種類が有り、其其移動相流量は、前者が 0.2~0.3 mL/min、後者は 0.5~

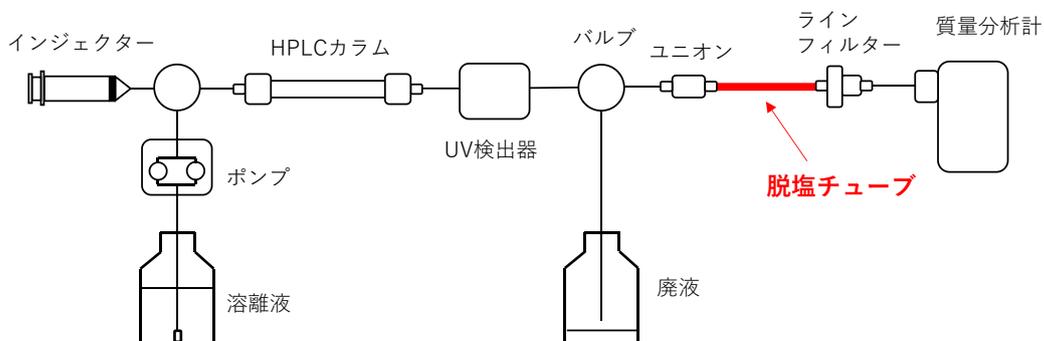


図 2 脱塩チューブを接続した LC-MS の模式図

0.8 mL/min である。本研究では、LC/MS 測定には内径 1 mm、外径 1/16 インチのチューブを、リン酸塩吸着能の評価には両サイズのチューブを用いた。PTFE 製の配管と同様、図 2 に示す様に MS 装置に市販のフィッティングによって接続して用いる。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 脱塩チューブによる吸着能の評価

10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を含む溶液（超純水／アセトニトリル=50/50 又は超純水のみ）を、0.8 mL/min の流量で内径 1/16 インチ、長さ 200 mm の両イオン交換タイプの脱塩チューブに通液し、一定時間毎に出口液を回収した。イオンクロマトグラフィーを用いて、回収液中に含まれるリン酸イオン及びカリウムイオンの濃度を測定し、脱塩チューブにおける吸着率を計算した。2 本の脱塩チューブを用いた実験結果を表 1 に示す。

表 1 脱塩チューブの吸着率

脱塩チューブ		流量 (mL/min)	溶媒組成	N	リン酸吸着率(%)				カリウム吸着率(%)		
内径 (inch)	長さ (mm)				0-10(min)	10-15(min)	15-20(min)	20-25(min)	0-10(min)	10-20(min)	20-25(min)
1/16	200	0.8	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=50/50 +$ 10 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	100.0	99.9	99.5	98.0	100.0	98.3	88.2
				2	100.0	99.8	99.5	97.4	100.0	99.5	94.8
			$\text{H}_2\text{O} +$ 10 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	99.8	98.2	94.3	84.1	100.0	98.6	89.0
				2	99.8	98.1	93.8	82.2	100.0	98.6	88.8

有機溶媒を含まない超純水のみ組成では、超純水／アセトニトリル=50/50 の組成より若干吸着率が低下する傾向が見られたが、20 分までは実用的な吸着率を示した。同じ溶液を 0.3 mL/min の流量で内径 1.0 mm、長さ 100 mm の脱塩チューブに通液して同様な実験を行い、10 分までは、両イオンの吸着率は凡そ 95%以上であった。

移動相に少量のリン酸塩を、濃度を変えて添加した予備実験において、0.5 mmol/L 濃度までは、リン酸塩が分析種のイオン化を抑制する効果は低い事が確認出来ている為、凡そ 95 %以上の吸着率を示す時間範囲を、脱塩チューブの使用時間とした。

#### 3.2 物理的空間によるピークの拡散

脱塩チューブは、図 2 に示した様に、LC カラムより後ろに配置される。従って、カラムで分離された成分が、脱塩チューブ内の物理的空間において拡散される事は、或る程度避けられない。脱塩チューブの有無で測定した LC/MS の抽出イオンクロマトグラム (extracted ion chromatogram, EIC) のピーク半値幅を比較する事により、拡散の程度を評価した (図 3)。脱塩チューブを用いる事によって、ピーク半値幅は約 25 %広がった。分析種の性質によっては、脱塩チューブ内のイオン交換樹脂に吸着して著しいテーリングを起こす場合

が有るが、図 3 のクロマトグラムピークには吸着によるテーリングは見られない為、このピークの広がり、脱塩チューブ内の物理的空間によるものであると考えられる。

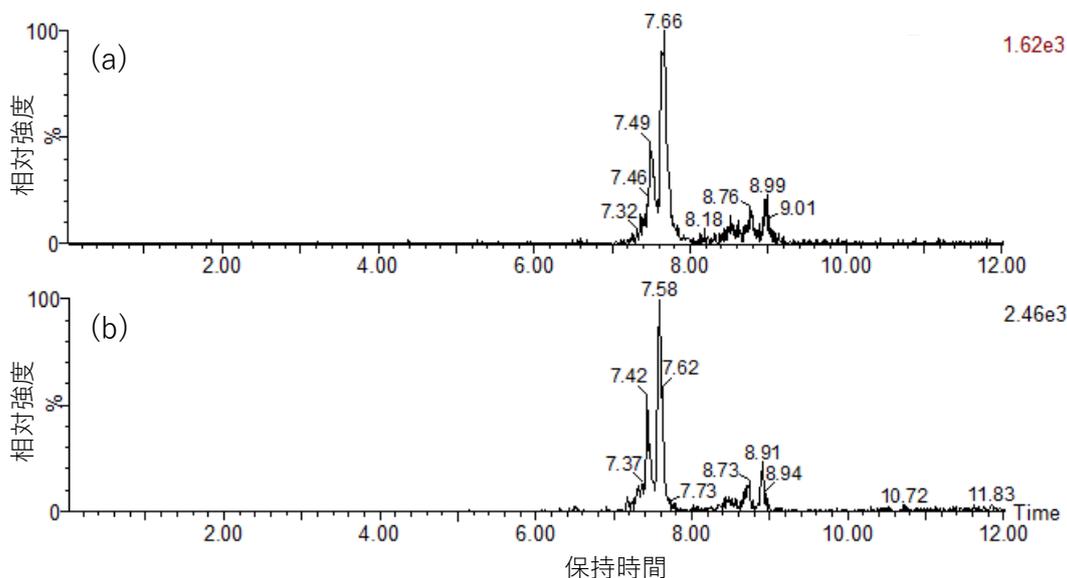


図 3 LC/MS における或る成分の EIC

(a)脱塩チューブを接続した場合 (b)脱塩チューブを接続していない場合

### 3.3 両イオン交換チューブを用いた分析

リン酸ナトリウムやリン酸カリウム等の不揮発性塩は、カチオン、アニオン共に不揮発性である為、両イオン交換タイプの脱塩チューブを用いた。測定例として、サルファ剤 4 種混合物のデータを図 4 に示す。脱塩チューブによってリン酸塩を除去する事で、リン酸塩緩衝液条件でのオンライン LC/MS 分析が可能であった。各成分のマスペクトルにおいては、プロトン付加分子  $[M+H]^+$  が明瞭に観測され、同イオンの  $m/z$  値によりトレースした EIC において、各成分のピークが確認出来た。リン酸塩共存下においては、分析種のイオン化は著しく抑制される為、この分析においては、リン酸塩は脱塩チューブに殆ど吸着されている事が示唆される。表 1 で示した様に、脱塩チューブによる高いリン酸塩吸着率により得られた結果である。

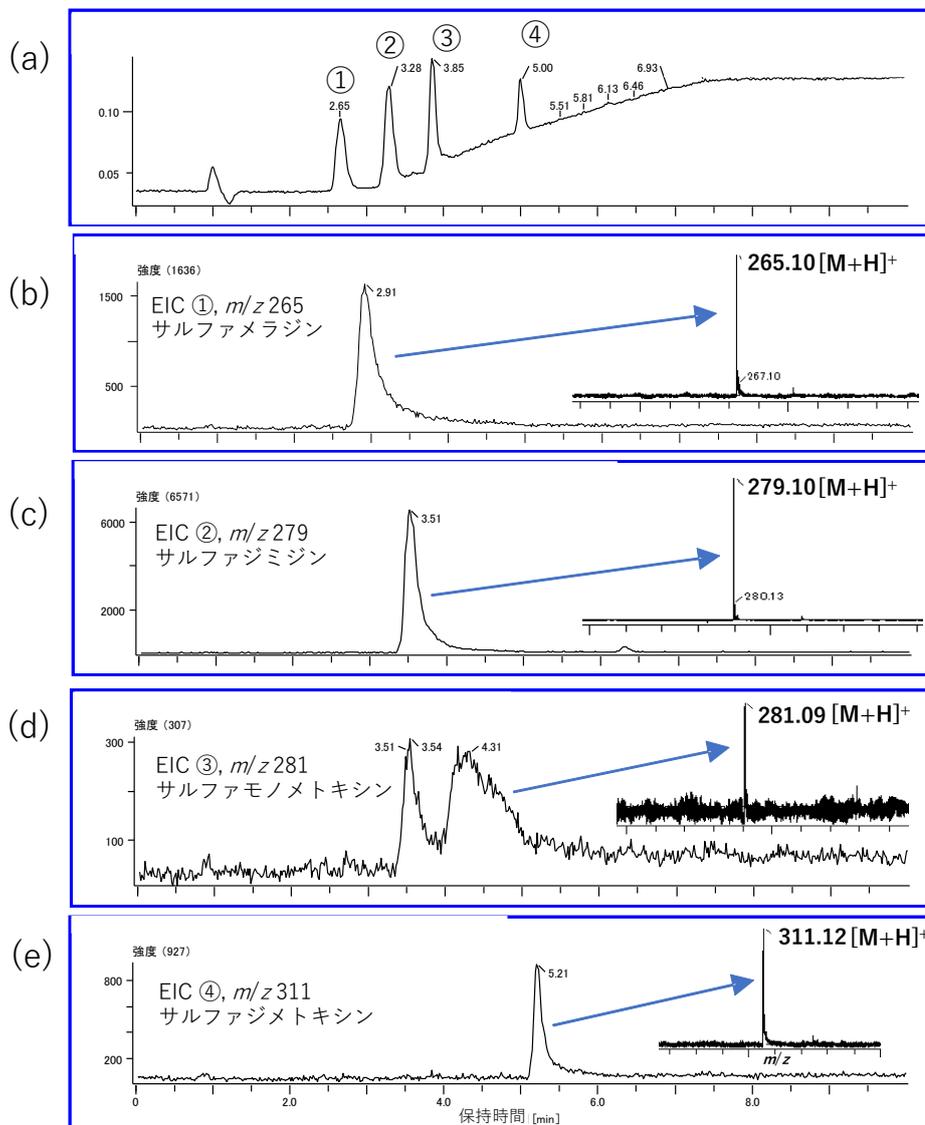


図 4 4 種類のサルファ剤の(a)UV クロマトグラム  
(b)~(e)プロトン付加分子の  $m/z$  値でトレースした EIC 及びマススペクトル

4 成分のサルファ剤のうち、図 4(d)ピーク③のサルファモノメトキシニンについては、EIC ピークが著しくブロードニングした。(a)の UV クロマトグラムにおいては、③のピークは他のピークと同様に対称性の良いシャープな形状を示している為、EIC におけるピークのブロードニングは、脱塩チューブ内のイオン交換樹脂への吸着であると考えられる。

サルファ剤 4 種の構造と  $pK_a$  を図 5 に示す。 $pK_a$  が小さい程、アニオン交換樹脂に吸着し易く、 $pK_a$  が大きい程、カチオン交換樹脂に吸着し易いが、今回の実験で最も吸着して EIC ピークがブロードニングしたのは③サルファモノメトキシニンであり、 $pK_a$  は 4 種の中

では中間的な値である。同じ  $pK_a$  をもつサルファジメトキシンは比較的シャープなピークを示しており、両者の構造はメトキシ基 1 個の違いのみである。この構造の違いがイオン交換樹脂への吸着の程度に影響を及ぼすとは考え難い。この現象が起こった理由については現在不明であり、今後検討する予定である。

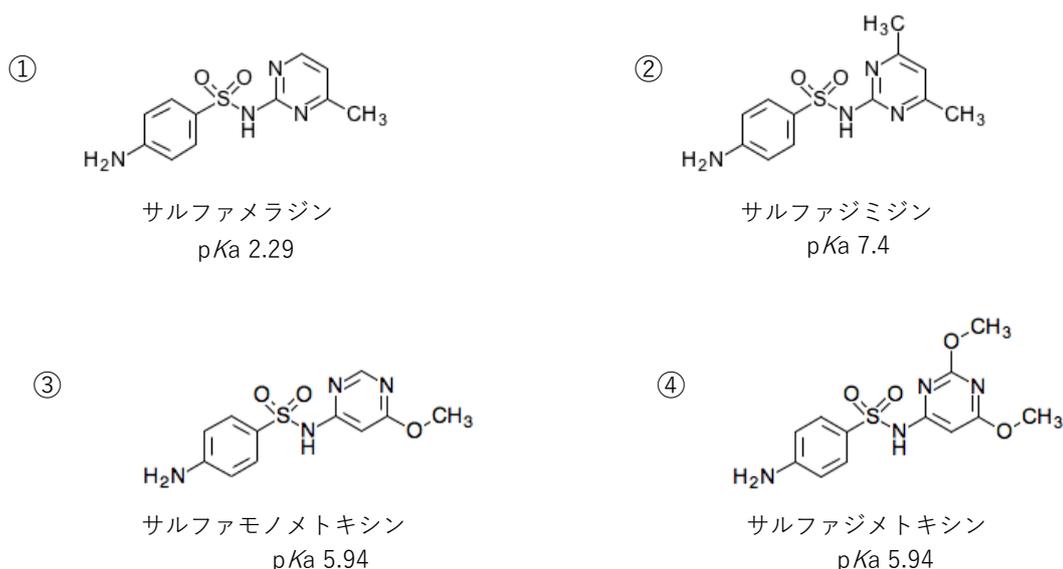


図 5 4 種類のサルファ剤の構造式と  $pK_a$  値

### 3.4 アニオン交換チューブを用いた分析例

#### 3.4.1 ドデシル硫酸アンモニウム (イオン対試薬) を用いたイオン液体の分析

イオン対試薬は、逆相クロマトグラフィーにおいて、高極性化合物を分析する際に用いられる。塩基性化合物の逆相クロマトグラフィーにおいては、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) 等が用いられる。SDS を含む移動相は不揮発性である為、リン酸塩緩衝液と同様、そのままでは LC/MS に用いる事は出来ない。脱塩チューブがイオン対試薬に応用可能か検討した。SDS の場合、ドデシル硫酸イオン (アニオン) とナトリウムイオン (カチオン) の両方が不揮発性なので、脱塩チューブには両イオン交換タイプを用いる必要がある。しかし、SDS を用いる時の分析種は、前述した様に塩基性化合物が殆どである。そして、両イオン交換タイプの脱塩チューブを用いると、塩基性化合物はカチオン交換樹脂に吸着されてしまう。そこで、カチオンが除去不要なアンモニウムイオンであるドデシル硫酸アンモニウムを用いる事とした。測定例として、イオン液体であるイミダゾリウム塩の構造とデータを図 6 に示す。5  $\mu\text{g/mL}$  (注入量 5  $\mu\text{L}$ ) の試料濃度で、(b) の UV クロマトグラムより遥かに S/N の良い EIC (c) が得られた。又、EIC のピーク形状は、僅か

にテーリングが見られるものの、良好であった。分析種のイオン交換樹脂への吸着が、殆ど起こっていない事が示唆される結果である。マスペクトル(d)においては、イミダゾリウム塩のカチオン部分の構造に相当する  $m/z$  139 イオンが観測された。

ドデシル硫酸アンモニウムは、ドデシル硫酸イオンが不揮発性である為、通常 LC/MS に用いるのは困難である。アニオン交換タイプの脱塩チューブを用いる事で、カチオン性の化合物を高感度に測定する事が出来た。その他の強塩基性で親水性の高い化合物の分析も、この脱塩チューブを用いる事で可能である。

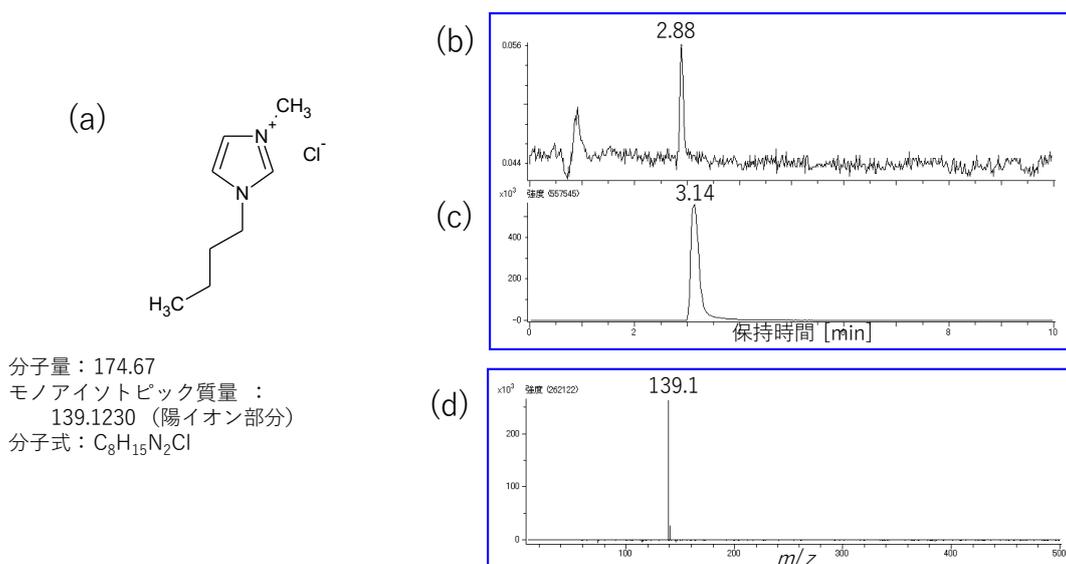


図 6 イミダゾリウムクロリドの(a) 構造と化合物情報、(b) UV クロマトグラム、(c)  $m/z$  139 でトレースした EIC、(d) 保持時間 3.14 分のマスペクトル

### 3.4.2 TFA を用いたメチオニンの負イオン検出

逆相クロマトグラフィーで高極性化合物を分析する方法として、主に以下の二つが知られている。

- ① イオン対試薬を使う方法
- ② 移動相の pH 調整による解離抑制を用いる方法

例えば、 $pK_a$  4.5 の弱酸性化合物を逆相クロマトグラフィーで分析する場合、移動相の pH を 2.5 以下にするとほぼ 100% 解離していない状態即ち分子型の構造をもち、移動相の pH を 6.5 以上にするとほぼ 100% 解離した状態即ちイオン型の構造をもつ。同一化合物であっても、分子型とイオン型を比較すると、分子型の方が、疎水性が高くなる為、逆相カラムへの保持が大きくなる。弱酸或いは弱塩基性で且つ比較的親水性が高い化合物を逆相クロマトグラフィーで分析する場合、弱酸性化合物には強酸を、弱塩基化合物には強塩基を移動相に添加して pH を調整し、解離抑制によってカラムへの保持を強くして分離挙動を制御

する事が出来る。

この方法は、UV 検出器等を用いる HPLC では問題ないが、LC/MS に使うのは難しい。何故なら、例えば弱酸性化合物を分析する場合、解離抑制の為に移動相には TFA 等の強酸を添加する。TFA は揮発性なので LC/MS に用いる事は可能であるが、強酸である為に負イオン検出におけるイオン化効率が非常に高い。又、分析種も弱酸性化合物である為に検出するのは負イオンが適している。負イオン検出の観点から、強酸である TFA 等の添加剤は、弱酸である分析種よりイオン化効率が高い為、解離抑制を用いる移動相条件においては、分析種のイオン化抑制が起こってしまう事になる。これは、弱塩基化合物の場合も極性が反対になるだけで、同様な事が起こる。

この解離抑制の条件に、脱塩チューブの応用を試みた。アニオン交換樹脂に対しては、弱酸性の分析種より強酸の添加剤の方が吸着し易い。又、カチオン交換樹脂に対しては、弱塩基性の分析種よりも強塩基性の添加剤の方が吸着し易い。一例として、TFA 移動相条件下において、アミノ酸の一種であるトリプトファンを負イオン検出によって測定した。トリプトファンの構造と測定データを図 7 に示す。20  $\mu\text{g/mL}$  溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入し、脱塩チューブを用いない場合即ち 0.1 %TFA を含む溶離液をそのまま LC-MS に導入した場合、(b) に示す様にトリプトファン由来のシグナルは検出されなかった。一方、アニオン交換タイプの脱塩チューブを用いた場合、(c) に示す様にトリプトファンのピークが検出された。そのマスペクトルにおいては、トリプトファンの脱プロトン分子  $[\text{M}-\text{H}]^-$  に相当する  $m/z$  203 イオンと、塩素イオン付加分子  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$  に相当する  $m/z$  239 イオンが検出された。トリプトファンは、TFA 移動相条件下では、カルボキシ基は解離抑制によって分子型となり、アミノ基は TFA イオンとイオン対を形成し、良い保持挙動を示したと考えられる。

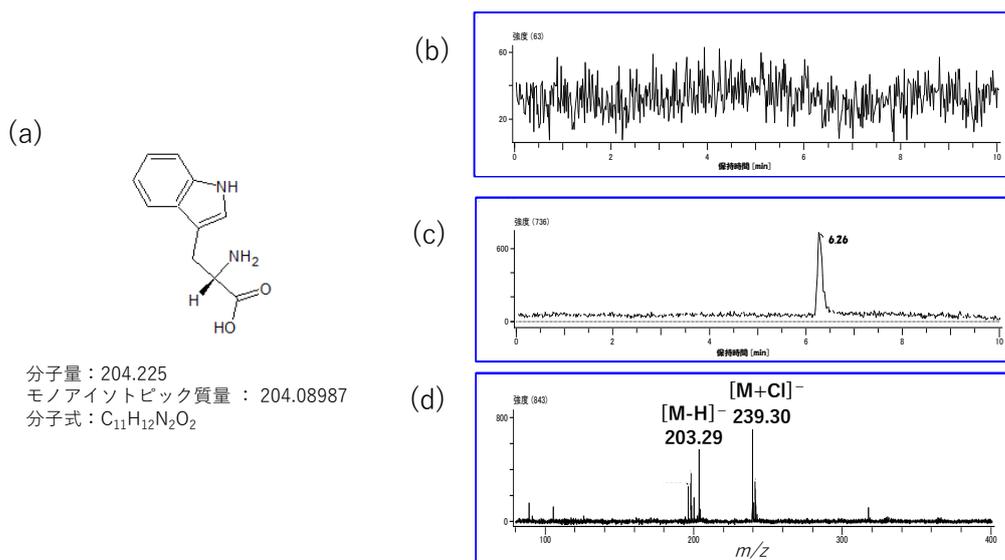


図 7 メチオニンの(a) 構造と化合物情報、(b) 脱塩チューブを用いていない場合の EIC、(c) 脱塩チューブを用いた場合の EIC、(d) 保持時間 6.26 分のマスペクトル

### 3.5 カチオン交換チューブを用いた分析例

近年、製薬企業において新規に開発される医薬品の中で、核酸医薬品の占める割合が多くなって来ている。それに伴い、核酸医薬品やその代謝物の LC/MS 分析に対する要求が高まっている。核酸を逆相 LC/MS で分析する場合、移動相にトリエチルアミン (triethylamine, TEA) を添加する条件が一般的に用いられる。TEA は揮発性である為、0.1% 程度であればそのまま MS 装置に導入しても大きな問題にはならない。又、核酸は負イオン検出で測定される場合が多く、TEA は負イオンでは殆ど検出されない為、分析上も問題にはならない。しかし、核酸の分析を行った後、同一装置で直ぐに正イオン検出による測定を行う様な場合、系内に残存する TEA が分析を妨害する可能性がある。TEA の様な添加剤は、出来るだけ質量分析計には導入しない事が望ましい。TEA を添加した移動相条件において、核酸の最小単位であるヌクレオチドを正イオン検出により測定した。カチオン交換チューブの有無によるマススペクトルを図 8 に示す。

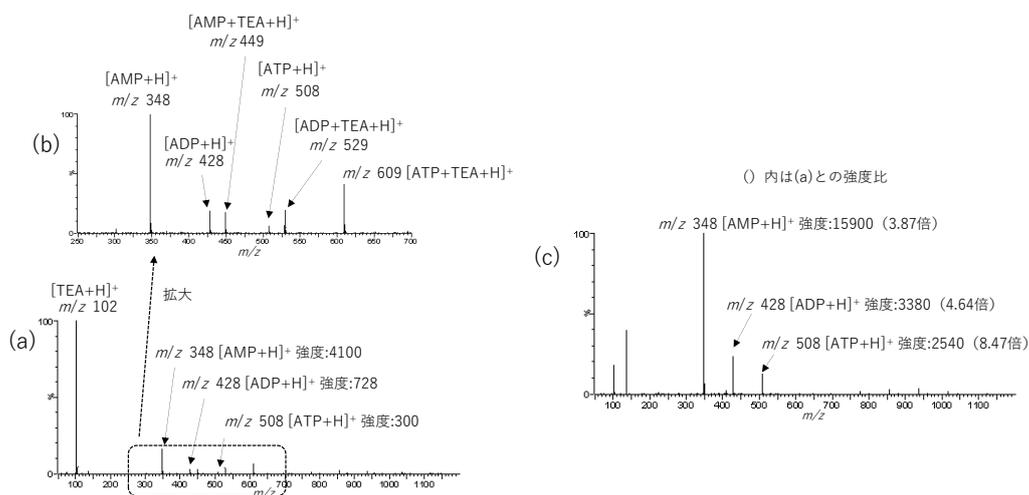


図 8 ヌクレオチドのマススペクトル、(a) 脱塩チューブを用いない場合、  
(b) (a)のスペクトルの拡大、(c) 脱塩チューブを用いた場合

(a) 及び (b) マススペクトルにおいては、各ヌクレオチドの [M+H]<sup>+</sup> イオンの他に [M+TEA+H]<sup>+</sup> イオンが検出されている。又、m/z 102 には、TEA の [M+H]<sup>+</sup> イオンが高強度で検出されている。(c) のマススペクトルにおいては、m/z 102 イオン強度は減少し、[M+TEA+H]<sup>+</sup> イオンは殆ど検出されていない。又、[M+H]<sup>+</sup> イオン強度は、(a), (b) に比べて平均で 5.66 倍増加した。(a) 及び (b) では TEA が高濃度で共存している為各ヌクレオチドのイオン化が抑制されており、(c) では TEA がチューブで除去された事によってイオン化抑制の効果が減少したと考えられる。

#### 4. 結論

リン酸塩に代表される不揮発性塩、不揮発性イオン対試薬、イオン化抑制の原因となる揮発性の添加剤 (TFA や TEA) 等を吸着出来る脱塩チューブを開発した。それらの添加剤を添加した移動相を用いて LC/MS 測定を行い、通常では不可能な、不揮発性塩やイオン対試薬を添加した移動相条件におけるオンライン LC/MS 測定が可能であった。又、揮発性で分析種のイオン化を抑制する添加剤を用いた移動相条件においては、それらの添加剤を脱塩チューブによって除去する事で、分析種の検出感度が向上した。脱塩チューブは、LC カラムと MS 装置との間に接続し、移動相に含まれる不揮発性塩等を一定時間・一定量吸着させ、分析種は通過させる事で、通常 LC/MS では不可能な不揮発性移動相条件を用いる事を可能とする。カラムで分離された成分が、脱塩チューブ内での物理的空間で拡散する事は或る程度避けられず、その拡散の程度は半値幅で約 25 %であった。分析種によっては、イオン交換樹脂への吸着によって、クロマトグラムピークがブロードニングやテーリングを起こす場合があった。

幾つかの使用上の制限は有るものの、従来不可能であった不揮発性緩衝液条件下でのオンライン LC/MS が可能になる等、本技術は LC/MS の応用範囲の拡大に大きく寄与する事が期待される。

#### 謝辞

LC/MS 測定にご協力頂いた、日本電子株式会社の山口様、笠置様に深謝致します。

#### 引用文献

- 1) 清水幸樹、第 309 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2017).
- 2) 清水幸樹、第 318 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2017).
- 3) 林 慶子、第 303 回液体クロマトグラフィー研究懇談会要旨集 (2016).

< 執筆者略歴 >

**清水幸樹 (Sachiki SHIMIZU)**

- ・1991 年 3 月 東京理科大学卒業
- ・1991 年 4 月 三協化学株式会社 (現富士フイルム和光純薬株式会社) 入社
- ・2016 年 3 月 富士フイルムファインケミカルズ株式会社 (現富士フイルム和光純薬株式会社) 退職
- ・2017 年 1 月 エムエス・ソリューションズ株式会社入社
- ・分析士資格 LC 分析士初段、LC/MS 分析士二段、IC 分析士初段



**高橋 豊 (Yutaka TAKAHASHI)**

- ・1990 年 3 月 群馬大学大学院工学研究科博士前期課程修了
- ・1990 年 4 月 日本電子株式会社入社
- ・2000 年 3 月 群馬大学より博士 (工学) を授与
- ・2010 年 6 月 日本電子株式会社退職
- ・2010 年 8 月 エムエス・ソリューションズ株式会社設立、代表取締役
- ・2019 年 2 月 株式会社プレッパーズ設立、代表取締役社長
- ・現在、液体クロマトグラフィー研究懇談会役員として活動中
- ・分析士資格 LC 分析士二段、LC/MS 分析士五段
- ・主な書籍 高橋 豊著、LC/MS 定量分析入門 (2021)、情報機構



## 【ノウハウ】

塩基性化合物をテーリングさせないシラノール基とは？

更に進化したエンドキャッピングとは？

**What is a silanol group which doesn't make a basic compound tailing ?**

**What is more advanced end-capping ?**

長江徳和 / Norikazu NAGAE

株式会社クロマニックテクノロジーズ / ChromaNik Technologies Inc.

(Received June 17, 2021 ; Accepted June 28, 2021)

キーワード シリカ系逆相充填剤 ; シラノール基 ; 塩基性化合物 ; エンドキャッピング

### 1. 始めに

液体クロマトグラフィー (liquid chromatography) を高速化した HPLC (high performance liquid chromatography) は、1969 年に J.J.Kirkland<sup>1)</sup>らにより開発された。発表当時に使用されていたカラムには、直径 30  $\mu\text{m}$  から 40  $\mu\text{m}$  のガラスビーズなどの表面に 0.5  $\mu\text{m}$  程度の厚みの多孔質層が存在する粒子が充填されていた。これは、当時ペリキュラー (pellicular)<sup>2)</sup>、或いは CSP (controlled surface porosity) 充填剤<sup>3)</sup>と呼ばれていた。その後、粒子径 10  $\mu\text{m}$  以下の全多孔性シリカ (シリカゲル) による高性能化<sup>3)</sup>が進み、現在ではサブ 2  $\mu\text{m}$  の粒子迄利用可能となった。シリカの表面に存在するシラノール基は活性が高く、このシラノール基を介して様々なシリル化試薬を結合する事が出来、逆相の C18 (ODS) など多くの固定相が開発された。しかし、シリカ表面に存在する全てのシラノール基に C18 などのシリル化試薬が反応する訳ではなく、1/2 から 2/3 のシラノール基はシリカ表面に残っていた。この残存シラノール基は極性化合物の分離に寄与したり、塩基性化合物を吸着し、テーリングさせたりした為、嵩の小さなトリメチルシリル化 (TMS) 試薬を反応させ、残存シラノール基を少なくする、所謂エンドキャッピングが行われるようになった。本稿では、この残存シラノール基の分離への役割や、最新のエンドキャッピング技術について紹介する。

### 2. シラノール基の影響

#### 2.1 固定相としてのシラノール基の役割

HPLC 用のシリカゲル充填剤は、シリカ表面に何も修飾しないシリカゲルそのものを吸着クロマトグラフィーに、又水やアルコールなどの極性溶媒をシリカ表面に保持させ、順相分配による分離を行う順相クロマトグラフィーに使用する。或いは、シリカ表面にシラノール基を介して極性の高いアミノプロピルシリル基などを結合し順相クロマトグラフィーに、又オクタデシルシリル基やフェニルシリル基などを結合し逆相クロマトグラフィーに使用する場合がある。其其の分離モードによりシラノール基の役割は変わるが、吸着クロマトグラフィーでは文字通り吸着点として働き、逆相モードやヒリック (HILIC) モードの様に移動相に水が含まれる分離モードでは、カチオンに対してイオン交換、アニオンに対して

イオン排除、極性化合物に対して水素結合が働く。シリカ表面に存在するシラノール基の  $pK_a$  は 2.6 前後であると言われており、シラノール基 ( $\equiv\text{SiOH}$ ) が解離し、 $\equiv\text{SiO}^-$  の状態になる pH 3 以上の移動相条件において、イオン交換やイオン排除が起こる。

## 2.2 シラノール基による塩基性化合物のテーリング

一般的な C18 などの逆相カラムを用いて塩基性化合物を分離した場合にピークがテーリングする事が知られており、特に移動相有機溶媒にアセトニトリルを用いるとテーリング度合いが酷くなる。このテーリングはエンドキャッピングの効率が悪く、シリカ表面に未だ残っているシラノール基が原因であると言われている。エンドキャッピング率が高い C18 カラムほど塩基性化合物のテーリングが抑えられる為、高効率のエンドキャッピングが求められ、HPLC カラムメーカーは高効率エンドキャッピングを競って来た。

さて、イオン交換クロマトグラフィーにおいて、溶質と固定相との間でイオン交換が起こり、溶質は保持される。しかし、保持されたピークは基本的にテーリングする事は無い。言い換えれば、イオン交換そのものはテーリングの原因では無い事になる。では、シリカ系逆相 C18 カラムでは何故塩基性化合物はテーリングピークとなるのか。アセトニトリルと 20 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.8) を或る比率で混合した移動相は、逆相クロマトグラフィーでの代表的な移動相である。この移動相を用いて未修飾のシリカゲルを充填したカラムと C18 又はシアノプロピル (CN) を修飾したシリカ系 C18 カラムとシリカ系 CN カラムを用い、塩基性化合物であるアミトリプチリンピークを観察すると、シリカカラムとシリカ系 CN カラムはテーリングの無い対称性の良いピークとなったが、シリカ系 C18 カラムはテーリングピークを示した。シリカカラムではシリカ表面に水和層が出来、この水和層が固定相として働きヒリックモードの順相分配が起こり、溶質を保持する。ヒリックモードのシリカ固定相は、シラノール基とシラノール基に水和した水分子から成り、pH 6.8 の移動相条件ではシラノール基は解離し、プロトン化した塩基性化合物とイオン交換も起こる。同様に、シリカ系 C18 カラム及びシリカ系 CN カラムの固定相は、C18 又は CN、エンドキャッピングを施した場合にはエンドキャッピング剤 (TMS など) と溶媒和した有機溶媒そしてシリカ表面の残存シラノール基から成っており、シラノール基は解離し、イオン交換が起こっている。図 1 に、アミトリプチリンのクロマトグラムとシラノール基の水和状態を示す。ここに示されている様に、十分に水和されているシラノール基と水和不足のシラノール基では塩基性化合物のイオン交換吸着性が異なる。つまり、シリカ系 C18 カラムでは C18 アルキル鎖の高い疎水性が影響し、C18 アルキル鎖の近くに存在するシラノール基は水和不足になり、塩基性化合物とイオン交換をした時に脱離がスムーズに起こらず、吸着したままの状態に成ってピークテーリングを起こすと考えられる。シリカ系 CN カラムのシアノプロピル基は、ヘキサン/アルコール系などの溶媒を移動相に用いれば順相モードの分離も可能となる事からも分かる様に、疎水性が余り高くなく、逆相カラムの中では CN は非常に極性の高い固定相である。従って、固定相内のシラノール基は全て水和が十分であったと考えられ、シリカカラムと同様に十分水和したシラノール基は塩基性化合物との間で吸着状態のままになる事はなく、テーリングの無いピークが得られたと考えられる。1982 年に発表された論文<sup>4)</sup>ではアミトリプチリンの分析に移動相として有機溶媒と pH 7 の緩衝液が、又分析カラムとして CN カラムが用いられた。当時は殆どの C18 カラムで、pH 7 の条件ではアミトリプチリンピークはテーリングしたが、この論文では CN カラムを用いて、テーリングの無いピークが得られている。しかし、CN カラムが塩基

性化合物に対しテーリングを示さない理由の言及は無かった。

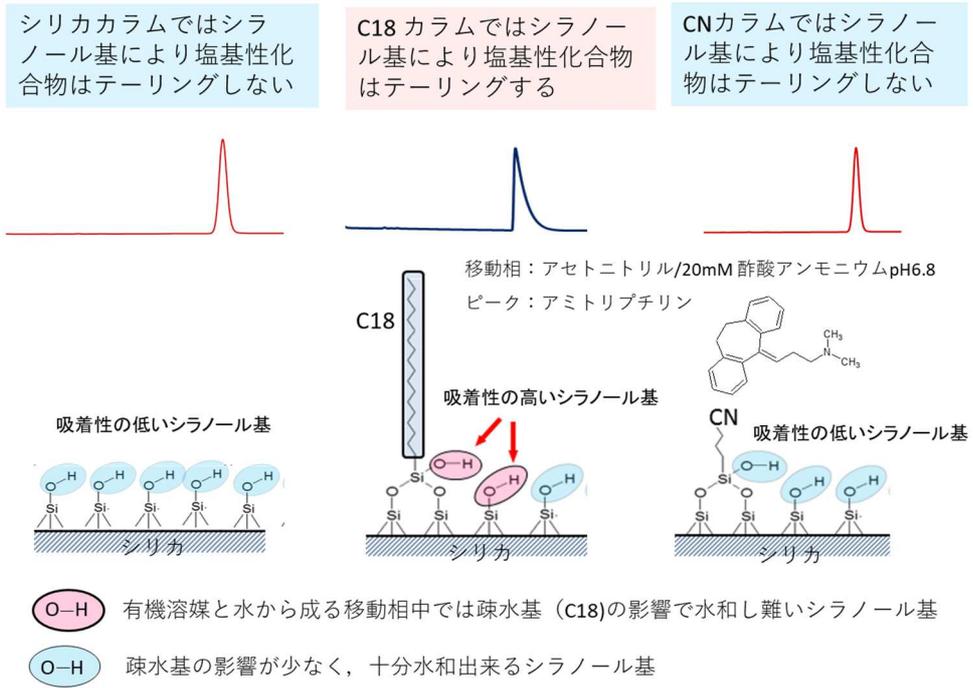


図 1 アミトリプチリンとシラノール基の水和状態

### 2.3 シラノール基を活かした C18 カラム

C18 カラムの固定相内に存在するシラノール基が全て十分水和していれば、シラノール基と塩基性化合物のイオン交換が起こってもテーリングしない筈である。この様な C18 充填剤は、熱処理を施し二つのシラノール基を脱水縮合によりシロキサン結合に変換させる事により調製可能である<sup>5)</sup>。図 2 に、C18 が結合した シリカ充填剤の脱水縮合の模式図を示す。シリカゲルはアモルファスで結晶構造を有していない為、200 °C以上の熱を掛けるとケイ素原子が動き、2つのシラノール基が近づく事により脱水縮合

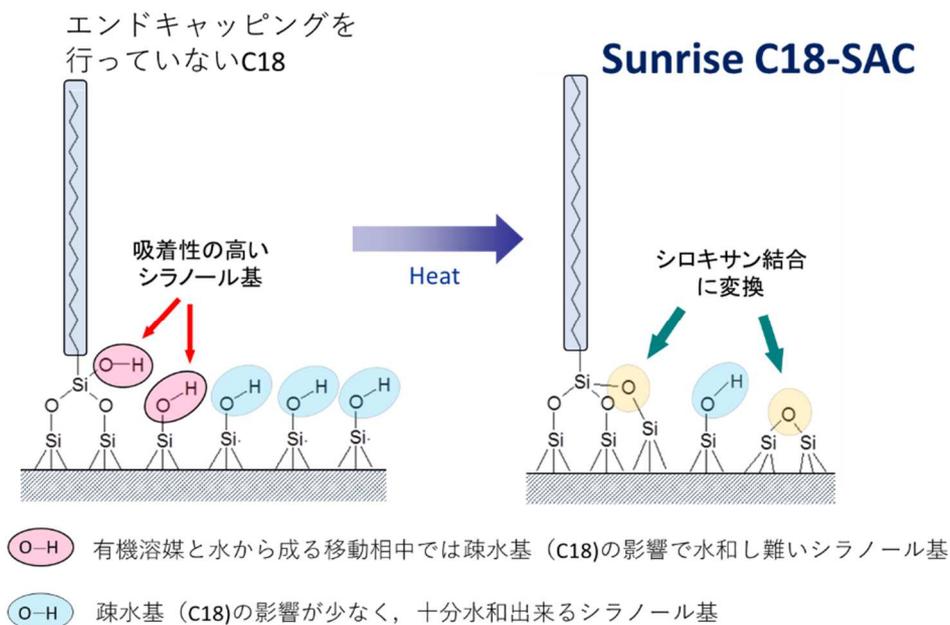


図 2 熱処理によるシロキサン結合への変換

が可能と成り、シロキサン結合に変換される。その後、水処理する事により、疎水部分の影響を受けず水分子が接触し易い場所のシロキサン結合のみが加水分解され、再びシラノール基に戻る。つまり、再生成されたシラノール基は水和が十分なもののみとなる。クロマニックテクノロジー社の Sunrise C18-SAC はこの様にして製造された C18 カラムであり、このカラムを用いて塩基性化合物を分離した結果を図 3 に示す。

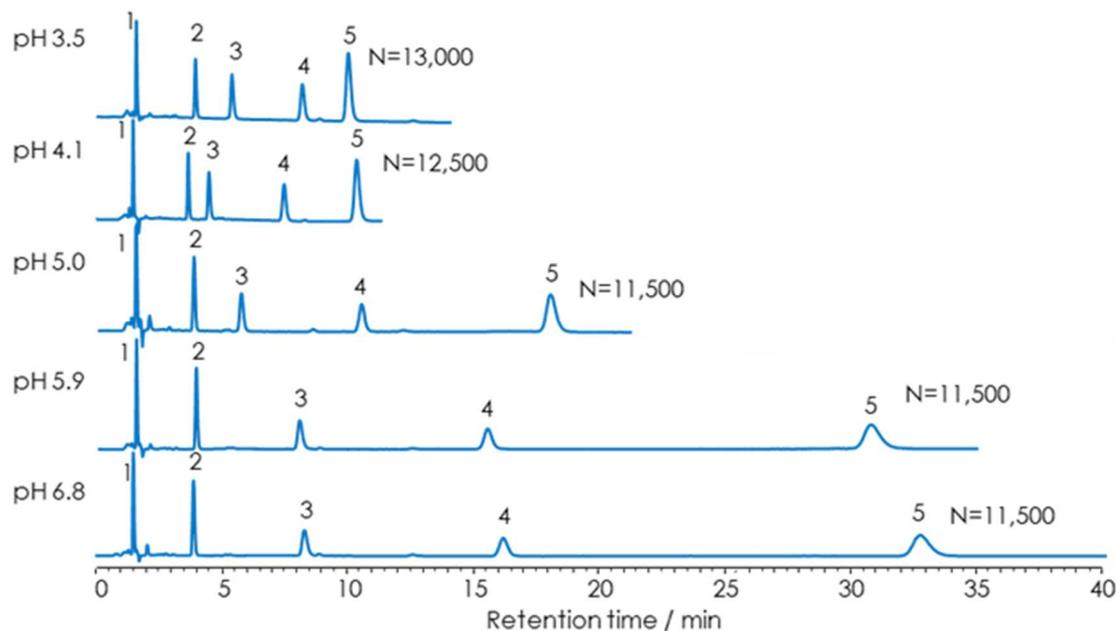


図 3 塩基性化合物の分離

測定条件：カラム，Sunrise C18-SAC，4.6 mm I.D.×150 mm，5 μm；移動相，アセトニトリル/100 mmol/L 酢酸アンモニウム（酢酸で pH 調整，pH は図中に記載）=70/30；流量，1.0 mL/min；カラム温度，40 °C；検出；UV250 nm；ピーク，1=ウラシル，2=トルエン，3=プロプラノロール，4=ノルトリプチリン，5=アミトリプチリン。

移動相の pH を 3.5 から 6.8 まで変化させているが、pH が高いほど保持時間は長くなった。又、5 番ピークのアミトリプチリンの理論段数を図中に示しているが、全てのクロマトグラムで 11,000 段以上の高い段数でテーリングの少ないピークが得られた。更に、図 4 では塩濃度を 10 mmol/L から 200 mmol/L に増加させた時の分離を示す。ホールドアップタイム測定用のウラシルと中性化合物のトルエンは塩濃度に依存せず、一定の溶出時間であった。しかし、塩基性化合物であるプロプラノロール、ノルトリプチリン及びアミトリプチリンは、塩濃度が高いほど保持時間は短く成った。図 5 ではウラシル以外のピークについて緩衝液の塩濃度の対数を横軸、保持係数の対数を縦軸としてプロットした。又、図 5 にはイオン交換クロマトグラフィーにおける溶離液イオン濃度と保持の関係式も示している。プロプラノロール、ノルトリプチリン及びアミトリプチリンは、この図から分かる様に保持係数の対数と塩濃度の対数の関係がマイナスの傾きの直線となり、イオン交換クロマトグラフィーにおける溶離液イオン濃度と保持の関係式に当て嵌まる分離挙動であった。これは正に、イオン交換が作用する事により保持時間が変化している事を示している。シラノール基の影響がほぼ無いエンドキャッピングの優れたシリカ系 C18 カラムに比べ、水和が十分なシラノール基を残した Sunrise C18-SAC カラムは塩基性化合物の保持が 10 倍以上大きく、逆相分配とイオン交換の両相互作用が働いた分離が達成されている。

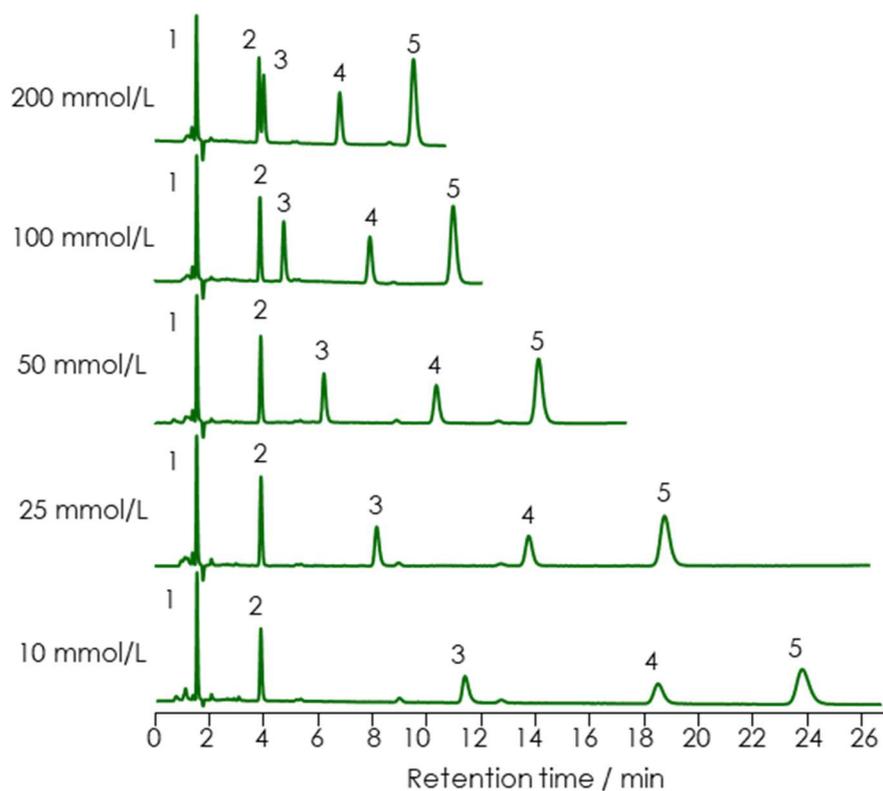
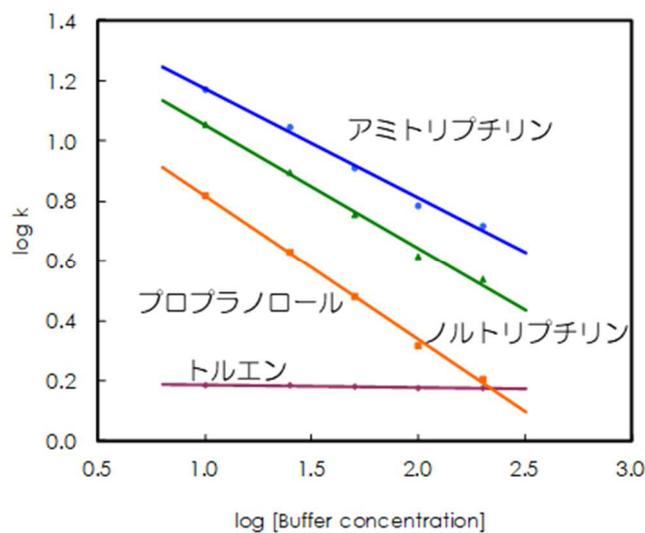


図 4 異なる緩衝液濃度でのクロマトグラム

測定条件：移動相，アセトニトリル/酢酸アンモニウム pH 4.1（緩衝液濃度は図中に記載）  
=70/30；流量，1.0 mL/min；他の条件は図 3 と同じ。



$$\log k = -\frac{Z_B}{Z_A} \log[A] + \frac{Z_B}{Z_A} \log[\bar{A}] + \log \frac{V_r}{V_m} + \frac{1}{Z_A} \log K_A^B$$

$A$ ：溶離剤イオン， $B$ ：測定イオン， $k$ ： $B$ の保持指数， $K$ ：選択係数  
 $Z_A, Z_B$ ：各イオンの電荷， $V_r, V_m$ ：カラム内の樹脂体積と移動相体積

図 5 移動相のイオン濃度と保持の関係

### 3. 新規エンドキャッピング

#### 3.1 従来のエンドキャッピングとの差

従来のエンドキャッピングは C18 などのアルキル基をシリカ表面に結合後、残ったシラノール基に嵩の小さなシリル化試薬、例えば TMS などを結合させ、シラノール基を少なくしていた。シリカ表面にはシラノール基が 8 ~ 9  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  存在すると言われていたが、1980 年に発表された論文<sup>6)</sup>ではシリカゲルに C18 アルキル基を結合後、TMS によるエンドキャッピング処理を行った後でも、シリカ表面には 50 % 程度のシラノール基が残っていると結論付けられた。その後、エンドキャッピング手法は改善されたが、残存シラノール基の影響が最も少ないシリカ系 C18 充填剤でも 30 % 以上のシラノール基が残っていると推察される。熱処理によりシラノール基はシロキサン結合に変換される為、エンドキャッピング処理を高温で行う事により、シリル化試薬の結合でシラノール基が減少すると共にシラノール基のシロキサン結合への変換が起こり、更にシラノール基は減少する。又、高温でのエンドキャッピング処理でも、前述の様にケイ素原子は動いていると考えられ、ケイ素原子の移動によりエンドキャッピングでのシリル化試薬の結合密度は高くなると考えられる。従って、高温エンドキャッピング処理により、シリカ表面上のシラノール基は 10 % から 20 % 程度まで減少していると推察される。

#### 3.2 高温エンドキャッピング

様々なエンドキャッピング方法が HPLC カラム各社で試みられているが、近年の傾向として、殆どの HPLC カラムメーカーはシリル化試薬や反応条件を開示しておらず、シリカ系逆相カラムのユーザーにとってエンドキャッピングはブラックボックス化している。ここでは、クロマニックテクノロジーズ社で行っているエンドキャッピング方法<sup>7)</sup>について簡単に記述する。逆相固定相としてのアルキル基やフェニル基は三官能性シリル化試薬を用い、トルエン中で還流する事によりシリカゲルに結合させる。エンドキャッピング処理は 2 回行い、エンドキャッピング試薬として 1 回目は 1,5-ジクロロヘキサメチルトリシロキサンを、2 回目はトリメチルクロロシランを用い、トルエン中で還流した後、窒素封入した密閉容器内で 12 時間 200 °C 以上の温度を維持した。表 1 に、コアシェルシリカを用い、C18 アルキル基を結合後、200 °C 以上である X °C と (X-40) °C でエンドキャッピングを行った時の炭素含有量、アミルベンゼンの保持係数などを示す。

表 1 異なる温度でのエンドキャッピングの差

エンドキャッピングの反応温度	X °C	(X-40) °C
C18結合後の炭素含有量	7.0 %	7.0 %
エンドキャッピング後の炭素含有量	7.3 % (熱によりC18が一部切断)	7.7 % (熱によるC18の切断はない)
シロキサン結合への変換	Yes	No
アミトリプチリンのピーク形状	良好	良好 (X °C と同じ)
保持係数(k)	10.4	9.5

\*基材シリカ：コアシェルシリカ (比表面積 150  $\text{m}^2/\text{g}$ )

\*保持係数の測定条件：移動相，メタノール/水=7/3；カラム温度，40 °C；試料，アミルベンゼン。

エンドキャッピング後の炭素含有量は、X °C の反応温度の方が (X-40) °C よりも低く成った。これは、

X °C の反応温度では一部の C18 アルキル基が切断する事が原因であると推察される。又、塩基性化合物であるアミトリプチリンのピーク形状は両反応温度でも同程度に良好であり、残存シラノール基の影響はほぼ認められなかった。一般的に同じシリカ基剤を用いた場合、炭素含有量の高い充填剤の方が保持は大きく成るが、アミルベンゼンの保持係数は炭素含有量の低い X °C の方が逆に 10 % 程度大きく成った。

図 6 に、エンドキャッピング後のシリカ表面のシラノール基の存在状態の模式図を示す。X °C の反応ではシラノール基はシロキサン結合に変換されるのに対し、(X-40) °C の反応ではシラノール基はシロキサンに変換されず、残っていると推察される。固定相の疎水性は、シリカ表面に残っているシラノール基を含め C18 アルキル基及びエンドキャッピング剤全体が関与していると考えられ、シラノール基の存在が疎水性を低減し、保持を小さくしていると考えられる。炭素含有量が低いにも関わらず保持が大きい事は、シリカ表面に残るシラノール基が少ない事を肯定している。アルカリ性条件でのシリカ系逆相カラムの劣化は、アルカリによるシリカの加水分解により促進される。エンドキャッピングの高効率化でシリカ表面近くの疎水性が上がり、水分子のシリカ基剤への接触頻度も少なくなる為、シリカの加水分解も遅くなる。しかし、シリカのアルカリによる加水分解はシリカ表面に存在するシラノール基のケイ素原子に対する求核反応が起点と成り起こる為、シリカ表面に存在するシラノール基が少ないほど劣化は遅くなる。シラノール基の存在量を少なくする高温エンドキャッピングは、塩基性化合物のテーリングを抑えるだけでなく、耐久性、特にアルカリ性条件での耐久性を向上させる。

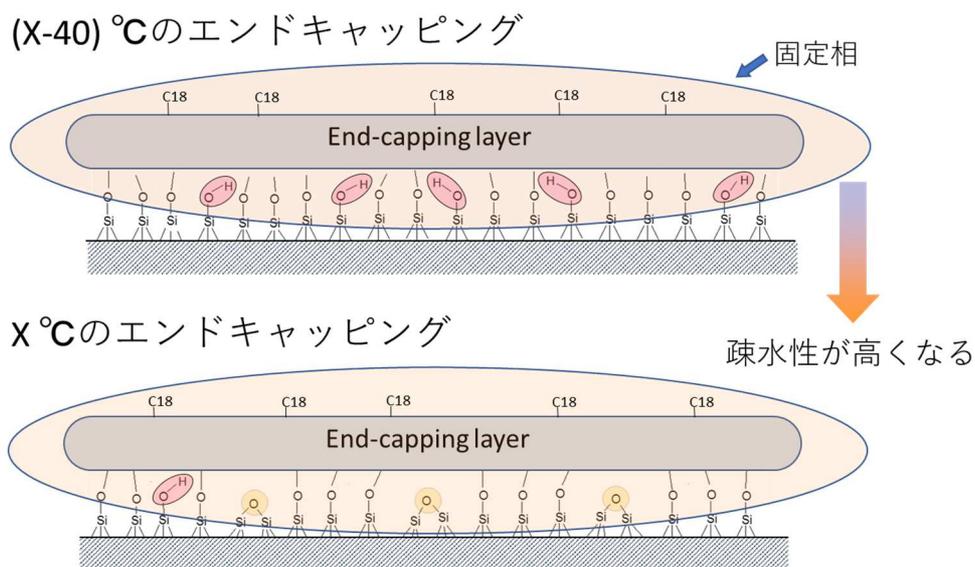


図 6 エンドキャッピング後のシリカ表面のシラノール基の存在状態の模式図

### 3.3 塩基性化合物のピーク形状

前述の高温エンドキャッピング処理を施した全多孔性シリカ C18 である Sunniest C18 カラムを用いた塩基性化合物の分離を図 7 に示す。比較として、通常の TMS によるエンドキャッピングの E 社 C18 の分離も示す。A 条件のメタノールとリン酸塩緩衝液 (pH 7.5) を移動相に使い、カラム温度 40 °C での 4 番のアミトリプチリンピークは E 社 C18 カラムでも、シャープなピーク形状であったが、B 条件の様

にカラム温度を 22 °C に下げた場合、C 条件の様に移動相有機溶媒をメタノールからアセトニトリルに変更した場合には、E 社 C18 カラムではアミトリプチリンピークは酷くテーリングした。一方、Sunniest C18 カラムでは LC/MS 用の揮発性緩衝液を移動相に用いた条件 D も含め、全ての移動相条件でテーリングの少ないシャープなピークが得られた。

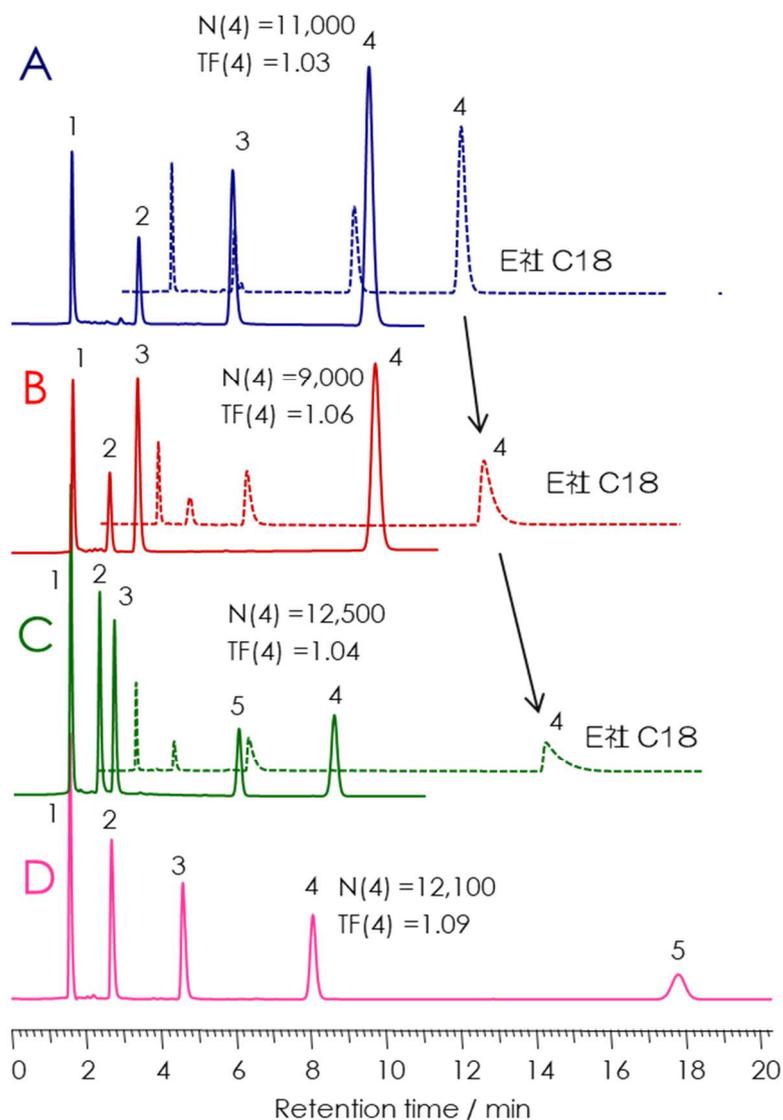


図 7 塩基性化合物の分離

測定条件：カラム，Sunniest C18, 4.6 mmI.D.×150 mm, 5 μm (実線)，E 社 C18, 4.6 mmI.D. ×150 mm, 5 μm (破線)；移動相，A) メタノール/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) = 80/20, B) メタノール/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) = 80/20, C) アセトニトリル/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) = 60/40, D) アセトニトリル/10 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.8) = 40/60；流量，1.0 mL/min；カラム温度，A), C), D), 40 °C, B), 22 °C；検出；UV250 nm；ピーク，1=ウラシル，2=プロプラノロール，3=ノルトリプチリン，4=アミトリプチリン，5=トルエン。

#### 4. 纏め

本稿では、シラノール基の分離への影響を考察した。多くのクロマトグラファーはシリカ系逆相カラムでの塩基性化合物のテーリングは残存シラノール基が原因であると認識していると思われるが、実際にはシラノール基の水和状態により塩基性化合物のテーリング度合いは変わり、十分水和したシラノール基は塩基性化合物のテーリングの原因では無い事を解説した。又、シラノール基のイオン交換及び C18 固定相の逆相分配が塩基性化合物に同時に作用して分離が達成される事を明らかにした。更に、シリカゲルはアモルファスであり、ガラスと同じ様に高温では原子が動き、結合状態が変化する事や、高温によるシラノール基のシロキサン結合への変換もエンドキャッピングの手法の 1 つである事も紹介した。現在でも HPLC/UHPLC カラムメーカーの研究者により、新しい知見が見出され、新たな技術開発が進んでおり、クロマトグラフィーの分野でも更なる発展が期待される。

#### 引用文献

- 1) J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 7 (1969).
- 2) C. Horvath, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967).
- 3) J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 593 (1972).
- 4) P. Koteel, R. E. Mullines, R. H. Gadsden, *Clin. Chem.*, **28**, 466 (1982).
- 5) N. Nagae, *Pittcon2008*, 830-6P (2008).
- 6) G. E. Berendsen, L. D. Galan, *J. Chromatogr. A*, **196**, 21 (1980).
- 7) N. Nagae, E. Shearer, T. Tsukamoto, *HPLC2019*, P 391 (2019).
- 8) 長江徳和、LC と LC/MS の知恵、第 2 号、6-25 (2021).

#### < 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



【解説】

## LC/MS 分析に求められる HPLC 及び UHPLC の性能／ Performances of HPLC and UHPLC Required for LC/MS Assay

渡邊京子、伊藤友紀／Kyoko WATANABE, Yuki ITO

株式会社島津製作所／Shimadzu Corporation

(Received November 19, 2021; Accepted December 5, 2021)

キーワード HPLC ; UHPLC ; LC/MS 分析 ; 送液ポンプ ; 試料注入装置 ; スループット

### 1. 要旨

LC/MS 分析において、カラム分離を担う LC システムの性能は、特に定量分析の結果や作業効率に大きな影響を与える事がある。LC システム構成を柔軟に選択出来る中で、其のコンポーネントに要求される性能を正しく理解し、適切な LC システムを構築すれば、より一層信頼性の高い分析結果を得る事が出来る。本稿では、LC/MS システム用の HPLC 及び UHPLC において考慮すべき主要な性能・特徴を紹介する。

### 2. 始めに

LC/MS はその優れた検出選択性と感度から、製薬、食品、環境、臨床、化学等の分野において、定量及び定性分析に欠かせない技術となった。特に定量分析においては、カラム分離が不十分であっても質量分離部がこれを補完する事で、多成分一斉分析や夾雑の多い複雑な試料の定量分析を可能にした。更に、適切な安定同位体を内標準とし定量精度を確保する限り、分析時間を大幅に短縮出来る可能性もある。この特徴は、薬物動態試験や臨床検査等、多検体の迅速分析が求められる現場では大いに威力を発揮する。

これらの側面から、LC/MS システムにおける LC 部は試料を質量分離部に注入する役割を重視される一方、その他の性能について深く議論される機会が少ない。しかしながら、より精確な定量・定性情報を得るには、カラム分離の精度や安定性等、LC システムが MS データに与える影響を理解する事は重要であり、その根幹となる LC システムの性能は決して無視出来ない。ここでは、LC/MS システム用の HPLC 及び UHPLC において、送液ポンプ、試料注入装置（オートサンプラー）、システム全体に求められる性能・特徴について述べる。

### 3. 送液ポンプ

送液ポンプはカラムに移動相を供給し、更にカラム溶出液を連続的に検出器に導入する装置であり、設定流量を精度良く送液出来る流量安定性の他、カラムに応じた耐圧性や低

脈流性能なども重要である。これらの仕様の重要性やこれを実現する技術については、三上の報告<sup>1)</sup>に詳しい。

LC/MS が得意とする多成分一斉分析や夾雑の多い試料の分析では、クロマトグラフィーの分離と分析サイクル時間とのバランスが良く、又夾雑成分と分離する事で定量精度を改善出来る為、移動相組成を変化させながら送液するグラジエント溶離がよく用いられる。三上の報告にある通り、グラジエント溶離には高圧グラジエント方式と低圧グラジエント方式が有る（其其の流路構成は引用文献 1）を参照）。高圧グラジエント方式の利点は、試料導入部手前に設置されたミキサーを起点として移動相を混合する為、グラジエント遅れ容量が小さく、短時間でグラジエント溶離を行う超高速分離に適している事である。一方、低圧グラジエント方式は、単一の送液ポンプが複数の移動相を混合し送液する。移動相の混合はポンプ直前に設置された電磁弁を起点として行われ、更にポンプ内部の容量やミキサー迄の配管がグラジエント遅れ容量に追加される。この為、高圧グラジエント方式に比べグラジエント遅れ容量が大きくなり、超高速分離には不向きな場合が有るが、ポンプ台数の少ないコンパクトな LC システムを構築出来ると言う利点を有する（図 1）。

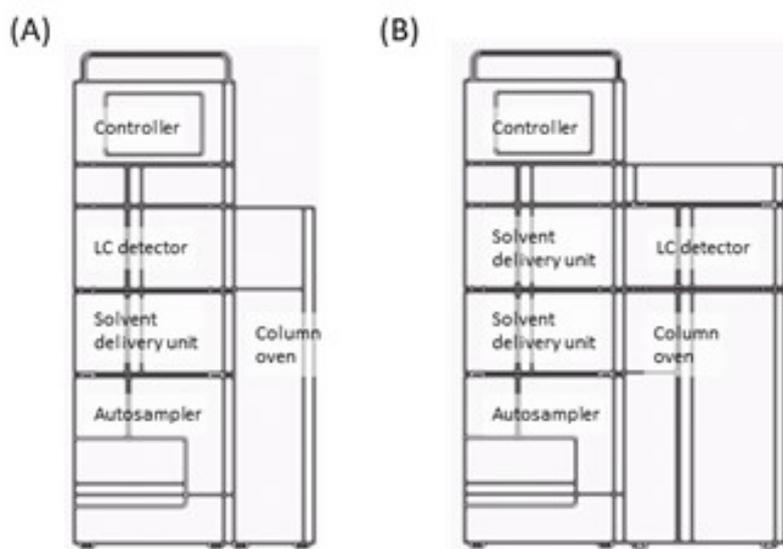


図 1 低圧グラジエント方式 (A) と高圧グラジエント方式 (B) の LC システム構成例 (島津 Nexera シリーズの場合)

注意すべきは、高圧グラジエント方式と低圧グラジエント方式でグラジエント遅れ容量が異なると、グラジエント勾配に敏感な分離では両システムで同じ分離パターンが得られない事が有る点である。参考にするデータと保持時間が一致しない、分離パターンが異なる等の場合は、参考データ採取時のシステム構成をよく確認し、ミキサー容量の変更や配管の調整などでグラジエント遅れ容量を一致させる事が望ましい。

又、分析業務の効率化の目的で、移動相ブレンディングを用いた高圧グラジエント方式も用いられる。其其のポンプが送液する溶液を設定に従い自動混合する事で、移動相組成

や濃度、pH等を任意に変更出来る。このシステムは、事前に手技で調製した多数の移動相を1つずつ交換する手間を削減し、作業者の負担を大いに削減する。又、カラムスイッチング流路と組み合わせれば、分離条件のスクリーニングや最適化、頑健性評価を自動化するメソッド開発支援システムとしても活用出来る(図2)。

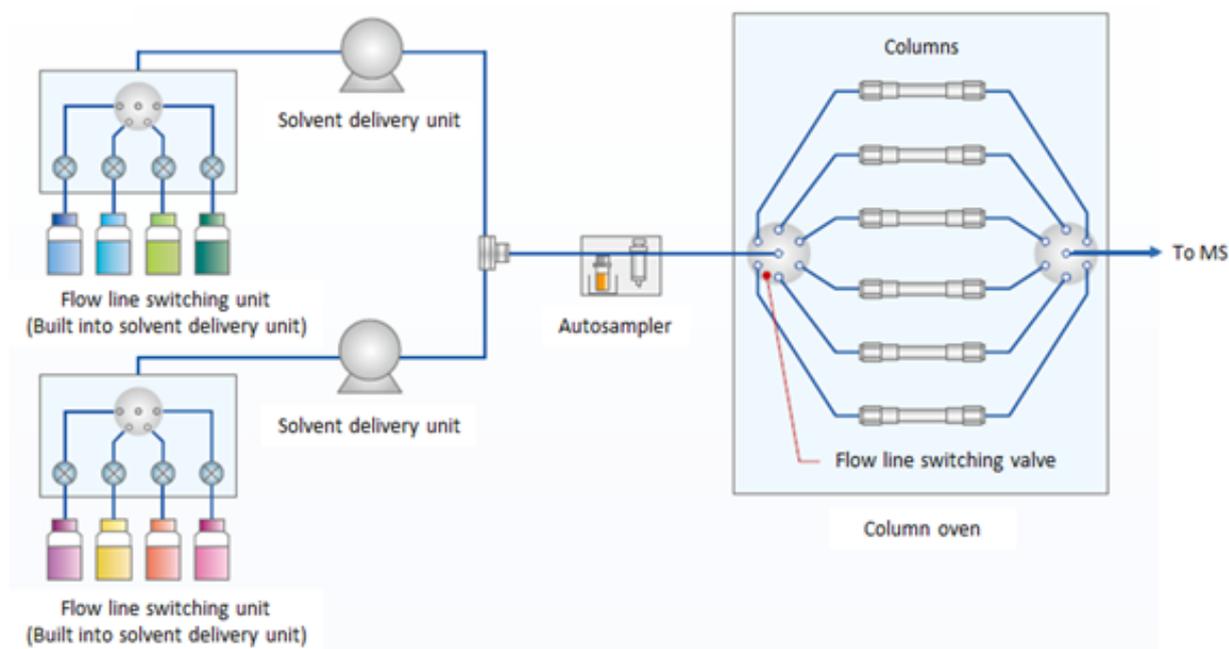


図2 移動相ブレンド、高圧グラジエント方式、カラムスイッチング流路の構成

#### 4. 試料注入装置

試料導入装置は、試料を一定量、精確に精度良くカラムに導入するデバイスであり、様々な注入方式が存在するが<sup>1) 2)</sup>、ここでは自動注入式のオートサンプラーを対象に、LC/MS分析において重要な性能について解説する。

##### 4.1 キャリーオーバー

トリプル四重極質量分析計は、汎用的なLC検出器に比べ高感度、高選択性である為、より優れた定量下限 (lower limit of quantification : LLOQ) を提供すると期待される事が多いが、適切な試料注入装置の選定及び設定を行わねば、実試料の定量試験法において良好なLLOQを得られない事が有る。

注入した試料中の分析種がカラムを含むLC流路内部に残存し、次回以降の分析にその残渣がピークとなって溶出する現象をキャリーオーバーと呼ぶ。注入した試料のクロマトグラムにキャリーオーバー由来のピークが重複し、実際よりもピーク面積値が増加して定量誤差を生じる。更に、分析種を含まない試料の測定でキャリーオーバー由来のピークが検出されると、本来含有されない筈の分析種が含有されていると誤判定するリスクをも有する。図3に高濃度の標準溶液を注入した後、続けてブランク試料を注入した事例を示す。

(A)の分析条件では、1回目のブランク試料注入時には11.7% (直前の標準溶液注入時のピーク面積に対する、ブランク試料注入時のピーク面積の割合) のキャリーオーバーが観察された。これは標準溶液濃度を100%とした場合、ブランク試料が対象化合物を約11.8%の濃度で含有すると誤判定されたのと同義である。試験法の頑健性評価のフェーズにおいて、LLOQはQC試料のAccuracyが±20%、Precisionが±20%を達成する濃度と定義される場合<sup>3)</sup>、キャリーオーバーを含む面積値の増減率が±20%に収まる濃度がLLOQと設定される為、クロマトグラムのSN比に十分余裕が有るにも拘わらず、LLOQは大きな値となり、実際には「感度の悪い」試験法となってしまう。

なお、図3では、その後2回目、3回目と続けてブランク試料を注入すると、そのピーク面積値が段階的に減少したが、これは注入の度に残渣が流路に流出している為である。(A)の条件下では、3回目の注入においても未だ0.45%のキャリーオーバーが観察された。

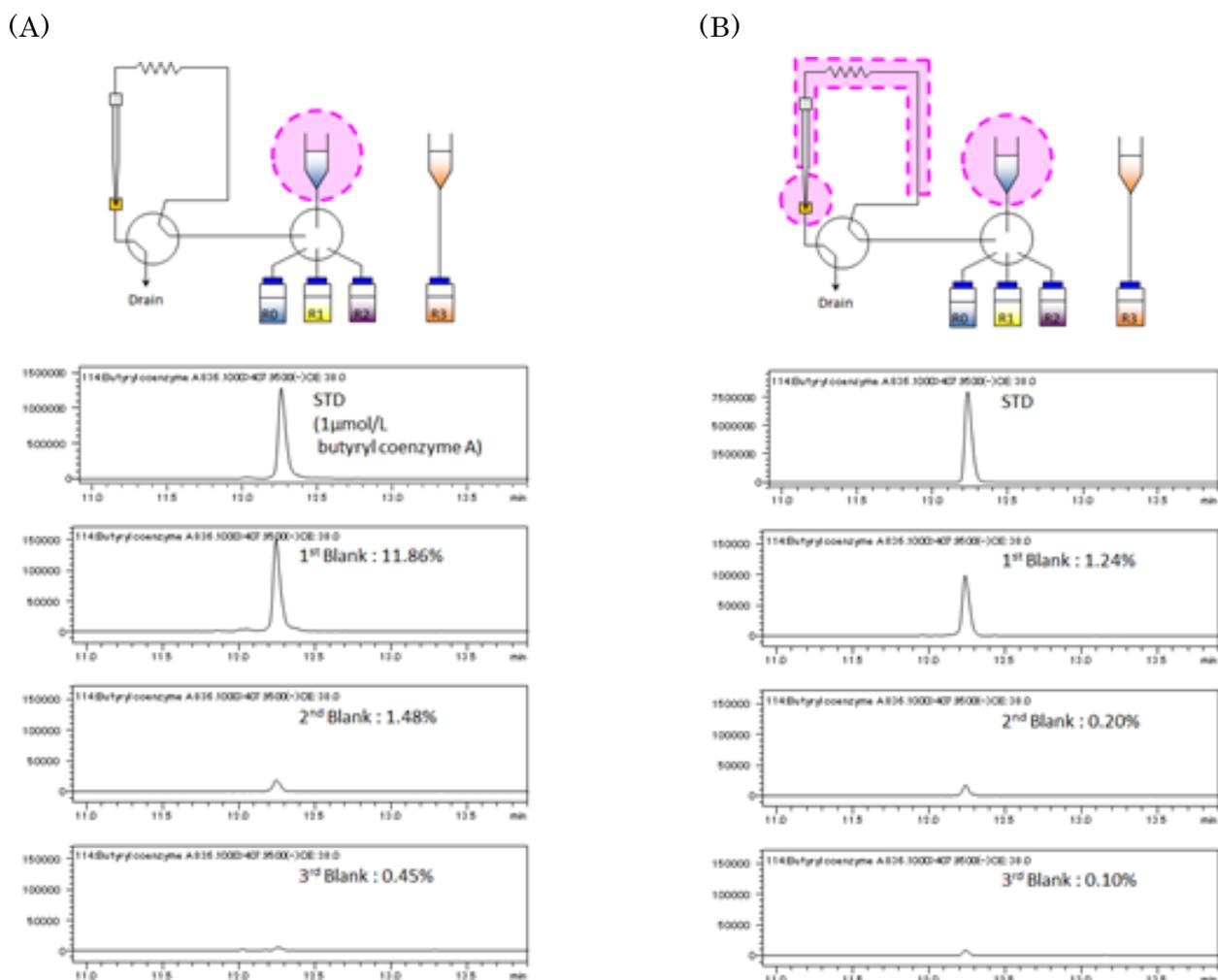


図3 洗浄方法とキャリーオーバーの例：(A)ニードル外壁を浸漬洗浄のみ、  
(B)ニードル外壁の浸漬洗浄、ニードル内壁及び試料ループ内部の洗浄

LCシステム内でキャリーオーバーが発生する箇所は、試料通過流路とその周辺、及びカラムである。特に、オートサンプラーの試料通過流路は移動相で希釈されない原液の試料溶液が触れる箇所であり、最も汚染され易い。図4に全量注入方式のオートサンプラーの構造を示す(参考文献1より引用)。バイアルやウェルプレート内の試料溶液は、オートサンプラーのニードルから計量ポンプにより一定量吸引され、試料ループ(サンプルループ)に達する。続いてニードルは注入ポートに移動し、オートサンプラー内の高圧バルブが切り換わると、試料ループとニードルの内部に溜められていた試料溶液が移動相に押されてカラムに導入される。

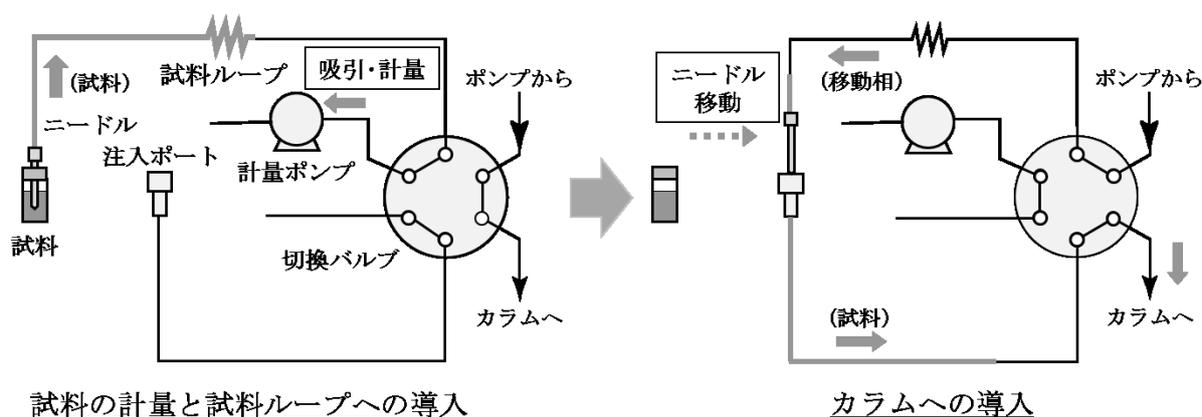


図4 オートサンプラーの注入動作例(参考文献1より引用)

この際、カラムを除くLCシステムにおいては、試料溶液が触れるニードル外壁、ニードル内部、試料ループ内部、注入ポート内壁、高圧バルブ内部の溝、高圧バルブとカラムの間の流路等が汚染源となり得る。

キャリーオーバーを防ぐには、(1)吸着の抑制と(2)試料溶液が触れる箇所の洗浄が有効である。(1)吸着の抑制は、化合物の化学的特性を考慮し、化合物との相互作用を抑制する材質を流路に採用する事で実現出来る。例えば、化合物と金属材質の間に金属配位性やイオン性の相互作用が生じる可能性があれば、ニードルや試料通過流路に非金属材料の採用や非金属被膜でコーティングする等の対策が有効である。

(2)試料溶液が触れる箇所の洗浄には、様々な方法が提案されている。ニードルの外壁は対象化合物に対する溶解性の高い洗浄液を満たしたポート(リンスポート)へのニードルの浸漬や、同洗浄液を高速で短時間外壁に流す等の方法で洗浄出来る。又、全量注入方式の場合、ニードルや試料ループ内部には常に移動相が流れる事で、特にグラジエント溶離条件では内部の洗浄も同時に行われる事となるが、移動相では洗浄し切れない化合物の場合は、試料注入後にニードルと試料ループ内部を洗浄する事も効果的である。更に、試料吸引後のニードル外壁の洗浄が不十分だった場合、注入ポートのニードル挿入部周辺や注

入ポート内壁が汚染される為、この部分の洗浄も有効である(図5)。

洗浄方法に加え、対象化合物に対し溶解性の高い洗浄液(水溶液、有機溶媒、pHなど)を選定する事も重要なポイントである。しかしながら、特に多成分一斉分析の場合、単一の洗浄液で全ての化合物の洗浄を効果的に行う事は難しい。島津 Nexera シリーズの SIL-40 シリーズオートサンプラーは、複数の洗浄液を設置して多様な化学的特性の化合物の洗浄を効果的に行う事が出来る。これらの技術を使用して、キャリーオーバーを 1/10 迄、低減する事が出来た(図3(B))。

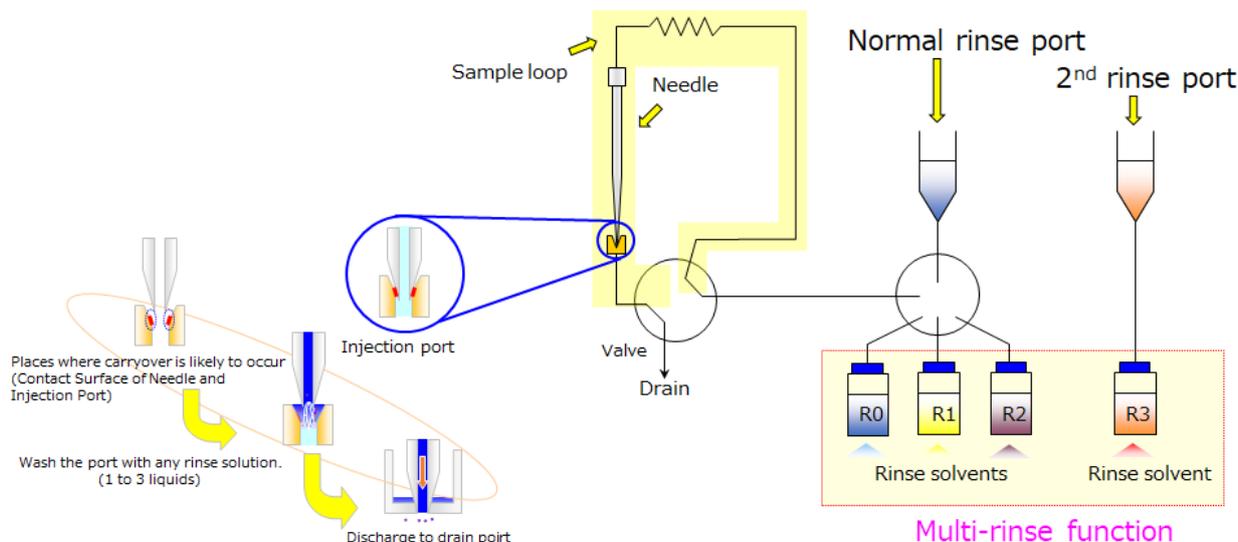


図5 Nexera SIL-40 シリーズの洗浄デザイン

これに加え、(3)LC 流路内での試料の物理的な残存もキャリーオーバーの一因となる事が有る。例えば、カラム入口側の配管が正しく接続されず、カラム入口側にデッドボリュームが出来た場合、デッドボリュームに滞留した試料溶液中の化合物が次回以降の注入時にピークとなって出現する事が有る。これは人為的なミスに起因する一時的なトラブルで、カラム入口側の配管を適切に接続し直す事で解消出来るが、同じ理由から全ての配管接続部において隙間や試料の滞留を排除した LC の流路設計がキャリーオーバー対策として有効である。SIL-40 シリーズが採用した試料ループとニードルを直線上に接続するデザインは、両部品の接続部のデッドボリュームを理論上ゼロにした。更に適切な洗浄液と洗浄メソッドを適用する事で、卓越したキャリーオーバー性能を達成した(図6)。

キャリーオーバーには、ここに記した通り幾つかの有効な対策は有るが、洗浄による対策は、しばしば本来の分析時間に洗浄時間を追加する必要があるが、次項で述べる多検体分析のスループットを低下させる事が有る。吸着抑制及びデッドボリュームを無くする流路設計を実施した上で、短時間で効果的に吸着した化合物を除去出来る洗浄メソッドを構築する方針が、最も効率良く LC/MS 分析を運用出来ると考える。

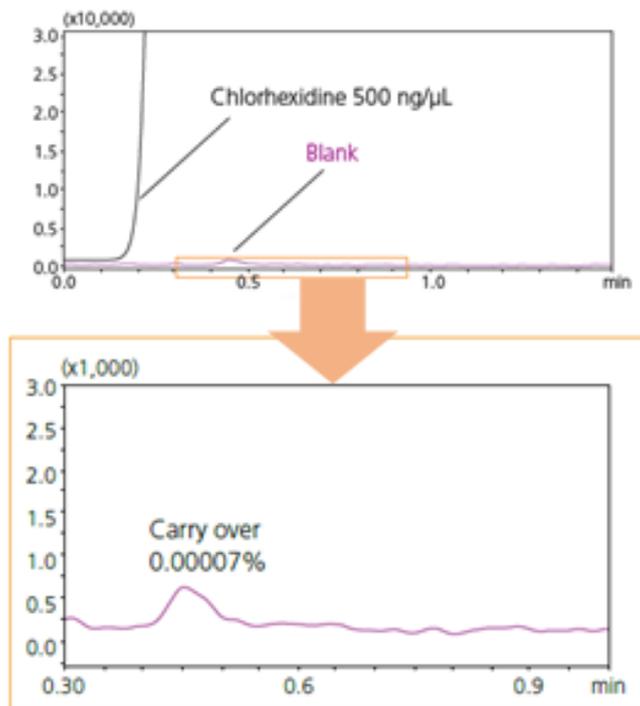


図 6 クロルヘキシジンのキャリーオーバー評価

#### 4.2 スループット

分析のスループット (throughput) は単位時間当たりの測定検体数と定義する事が出来、創薬や薬物動態、臨床検査など膨大な数の検体を扱う分野では重要な指標である。LC/MSにおいて良好なスループットを実現するには、(1)1 検体当たりの測定時間が短い事、(2)LCシステムに大量の検体を一度に搭載出来る事、(3)分析前後の準備時間が無い、又は短い事、が必要である。

(1)は、サブ 2  $\mu\text{m}$  の超微粒子充填剤や表面多孔性充填剤などを用いる超高速高分離分析によって実現出来る。(2)は、オートサンプラーに搭載出来る検体数に依存するが、近年は多くの試料プレートやバイアルラックを格納し、プログラム通りにオートサンプラーに自動搬送する装置も一般化し、検体搭載数を容易に拡張出来る様になった (図 7)。(3)には、オートサンプラーが試料を吸引・注入する時間や、オンライン前処理や誘導體化等の反応時間の他、「4.1 キャリーオーバー」の最後に述べた流路の洗浄も含まれる。キャリーオーバーの少ない LC システムがスループットの向上に貢献する事が分かる。



図7 SIL-40シリーズとプレートチェンジャーによる試料搭載数の拡張

## 5. システム全体

LC/MS分析に使用されるLCシステムは、カラムのサイズや背圧に応じ、適切な配管内径や耐圧を有する必要がある。例えば、粒子径 $5\ \mu\text{m}$ の全多孔性粒子充填剤のカラムを用いる分析では、システムの耐圧上限は $20\sim 40\ \text{MPa}$ 程度で良く、システムに使用される配管も内径 $0.3\ \text{mm}$ 程度で概ね問題無い。一方、粒子径 $2\ \mu\text{m}$ 以下の超微粒子充填剤のカラムを用いる場合は、カラムの長さにもよるが、耐圧上限が高いUHPLCシステムを選定する必要がある。又、超微粒子充填剤で濃縮されたシャープなピークのカラム外拡散を抑制する為に、流路配管には内径 $0.1\ \text{mm}$ 程度の配管を使用すべきであろう。但し、配管を必要以上に細くすると、背圧上昇や流路詰まりを招くので注意が必要である。

近年は、LCシステムを柔軟に選定出来る様、各メーカーが様々な耐圧や流路構成の製品ラインナップを提供している。「3. 送液ポンプ」や「4. 試料注入装置」の項で述べたユニットの特徴も参考に、試験法に合ったシステムを選定すれば、LC/MSによる定量分析の精度は一層向上すると期待する。

## 6. 結び

本稿では、LC/MS分析、特に定量分析を精度良く行うに当たり必要なLCシステムの性能や特徴について述べた。質量分析計の高感度・高選択性と言う特徴を最大限に活用する為に、フロントのLCの性能についても是非関心をもって頂きたい。

## 引用文献

- 1) 三上博久、シリーズ「試料分析の定石とコツ」：HPLC分析、LCとLC/MSの知恵、2021年第1号（通巻第2号）、102-120 (2021).
- 2) C. Paul, F. Steiner, and M. W. Dong, HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices, *LCGC North Am.*, **37**(8), 514-529 (2019).
- 3) FDA, Bioanalytical Method Validation; Guidance for Industry (2018).

## <執筆略歴>

### 渡邊京子 (Kyoko WATANABE)

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



### 伊藤友紀 (Yuki ITO)

- ・株式会社島津製作所分析計測事業部  
ライフサイエンス事業統括部 MS ビジネスユニット  
(〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1)
- ・大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所  
招へい研究員
- ・LC/MS 分析士初段。
- ・岐阜大学大学院自然科学技術研究科修士課程  
修士 (工学)



## 【トピックス】

### LC/MS/MS による親水性代謝物の一斉分析 及び考察をサポートするマルチオミクス解析手法の紹介／

Introduction of Simultaneous Analysis of Hydrophilic Metabolites by LC/MS/MS and  
Multi-omics Analysis Methods to Support the Discussion

伊藤友紀、荒尾洋平、堀江征司、岡本真美、渡邊 淳／

Yuki ITO, Yohei ARAO, Seiji HORIE, Mami OKAMOTO, Jun WATANABE

株式会社島津製作所 分析計測事業部／

SHIMADZU CORPORATION

(Received November 19, 2021 ; Accepted December 6, 2021)

キーワード メタボロミクス ; イオン対法・非イオン対法 ; 代謝マップへの可視化解析

#### 1. 要旨

近年、生物の代謝に着目した様々な分野においてメタボロミクスを活用する場面が多くなっている。本稿では、メタボロミクスの分析方法や、分析結果について考察をサポートするマルチオミクス解析法を用いた代謝マップへの可視化方法について述べる。医学研究分野での応用例としてラット、合成生物学研究分野での応用例として大腸菌と酵母を、其其実試料として使用した。

#### 2. 始めに

メタボロミクスとは、生体内に存在する低分子代謝物を網羅的に解析する技術を指し、幅広い分野で活用されている。島津製作所はトリプル四重極質量分析計の MRM トランジションをベースとした一斉分析法「LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 3」を開発した。この手法は、イオン対法（対象成分数 112）と非イオン対法（対象成分数 141）の 2 種類から構成されており、延べ 198 成分の代謝物分析が可能である。イオン対法は、従来法でよく使用されるトリブチルアミンをジペンチルアミンに変更する事で、主要代謝経路である解糖系やペントース・リン酸回路に含まれる糖リン酸の分離を改善した。イオン対試薬を用いた分析メソッドは、糖リン酸化合物について効果的であるが、試薬の取り扱いには注意を要する。一方、サンプルや目的によっては有機酸、アミノ酸、核酸関連物質等にフォーカスした分析が必要とされる場合も少なくない事から、PFPP カラムを用いた非イオン対分析メソッドも有用である。本稿では、近年メタボロミクスの活用が多くなっている医学研

究分野からラット脳、合成生物学分野から大腸菌と酵母を実試料として用い、各サンプル中の一次代謝物を網羅的に分析した事例を紹介する。

一斉分析で得られた分析結果は、対象成分数×サンプル数から成る膨大なマトリックスとして出力されるが、そのデータ解析は時間を要する。そこで、解析支援ツール「マルチオミクス解析メソッドパッケージ」を用いれば代謝経路図へと簡単に投影する事が可能であり、考察の一助となる。ここでは、ラット脳のサンプルを使用した解析ワークフローを通じて、一斉分析結果の可視化解析例を示す。

### 3. 分析手法の例示

#### 3.1. イオン対・非イオン対法でのラット脳中一次代謝物の分析

イオン対法・非イオン対法の其其でラット脳に含まれる一次代謝物を分析した結果について述べる。イオン対法ではラット脳抽出液から 87 種類の一次代謝物が、非イオン対法では 94 種類の一次代謝物が検出された。図 1 にイオン対法・非イオン対法で得られたクロマトグラムを示した。

イオン対法で特筆すべきは、分子構造が類似した代謝物の分離能力である。例えば、以下 5 種の糖リン酸 Glucose 6-phosphate (G6P)、Fructose 6-phosphate (F6P)、Mannose 6-phosphate (M6P)、Glucose 1-phosphate (G1P)、Fructose 1-phosphate (F1P) は MRM トランジションが同一の為、LC での分離が重要である。図 2 に、イオン対法で分析したラット脳中の上記 5 種の糖リン酸のクロマトグラムを示した。本分析法を用いる事で、MRM トランジションが同一の 5 種の糖リン酸を分離・検出出来る事が示された<sup>1)</sup>。

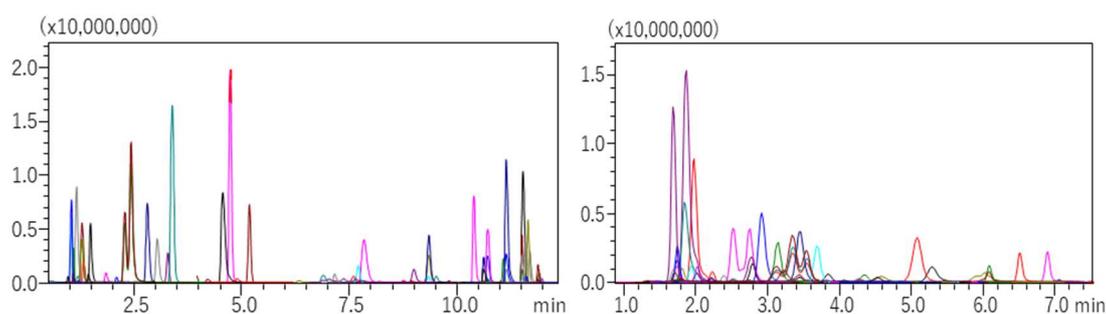


図 1 イオン対法 (左) と非イオン対法 (右) で得られたマスクロマトグラム

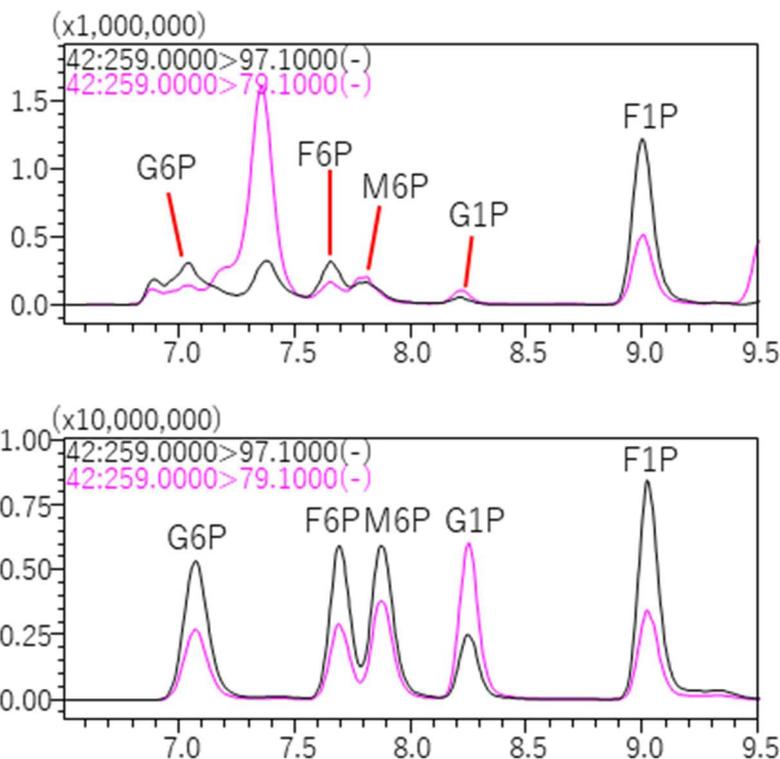


図 2 ラット脳における糖リン酸の MRM クロマトグラムと (上) と 10 μM 混合標品における糖リン酸の MRM クロマトグラム (下)

### 3.2. 大腸菌と酵母抽出物を用いた非イオン対法の安定性について

この項では、合成生物学分野でも利用頻度の高い大腸菌と酵母について、非イオン対法を用いた分析事例を紹介する。まず、非イオン対法による分析の再現性を検討する為、大腸菌及び酵母の抽出サンプルを其其 3 回ずつ分析し、検出された成分の保持時間と面積値の変動係数 (CV) を算出した。検出された成分のうち、有用物質生産に繋がる Phenylalanine、その類縁体である Phenylpyruvic acid、ヒスチジン生合成前駆体の Histidinol についての再現性を表 1 に纏めた。大腸菌、酵母、何れのサンプルにおいても、保持時間の CV %は 0.5 %未満、面積値は 7 %未満であり、高い再現性を有する分析系である事が示された。図 3 には、Phenylalanine、Phenylpyruvic acid、Histidinol の MRM クロマトグラムを例示する。大腸菌、酵母に関わらず、安定した分離・検出を確認した<sup>2)</sup>。

表 1 保持時間と面積の平均値と再現性 (n=3)

成分名	生物種	保持時間(分)		面積値	
		大腸菌	酵母	大腸菌	酵母
Phenylalanine		4.66 (0.50)	4.66 (0.44)	74,244,748 (0.9)	86,733,835 (1.4)
Phenylpyruvic acid		3.73 (0.51)	3.73 (0.45)	5,106,830 (4.8)	774,303 (6.7)
Histidinol		5.08 (0.07)	5.10 (0.08)	608,365 (1.5)	2,556,348 (1.5)

※ ( ) 内の値は cv %

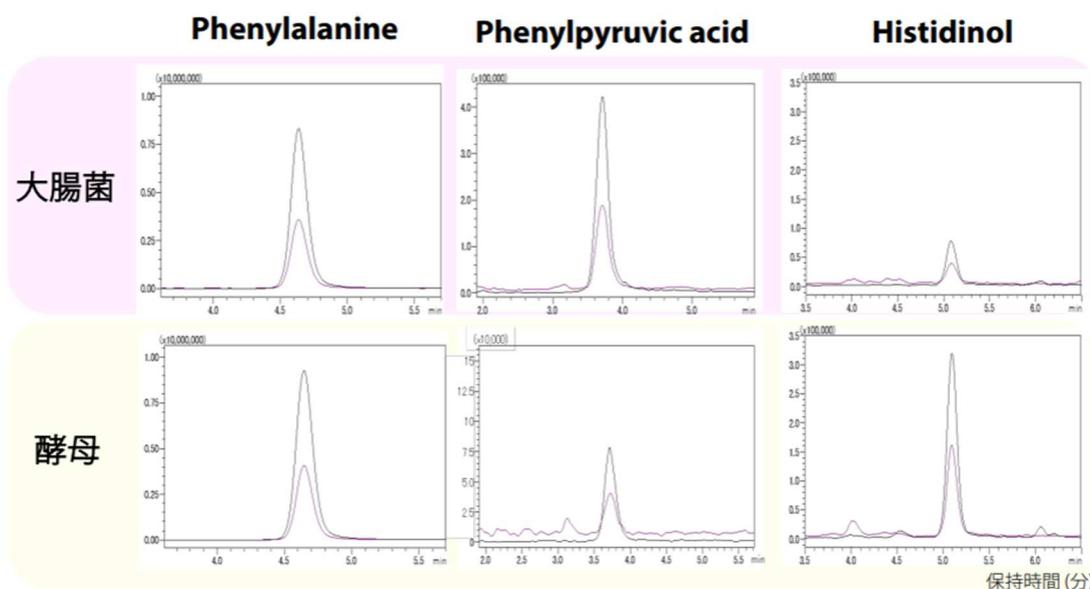


図 3 検出された代表的成分の MRM クロマトグラム

#### 4. 一斉分析結果の解析例

##### 4.1. ラット脳抽出液から検出された一次代謝物について

3.1 の分析結果を用いた解析例について述べる。図 4 に、ラット脳抽出液からイオン対法・非イオン対法で検出された一次代謝物の一覧を示した。イオン対法では、3.1 で述べた MRM トランジションが同一で分離が難しい 5 種の糖リン酸に加え、非イオン対法では検出が難しい解糖系やペントース・リン酸経路の代謝物を含む 87 成分の代謝物が検出された。非イオン対法ではイオン対法では収載されていない TCA 回路やメチオニン回路及びトランススルフェーション経路の代謝物を含む 94 成分の代謝物が検出された。2 種類の分析法を合わせる事で計 135 成分の代謝物を検出する事が出来た<sup>1)</sup>。

成分名	イオン対, 非イオン対		成分名	イオン対, 非イオン対	
	イオン対	非イオン対		イオン対	非イオン対
2,3-Bisphosphoglyceric acid	○		2-Isopropylmalic acid	○	
3-Phosphoglyceric acid_2-Phosphoglyceric acid	○		Creatine		○
Dihydroxyacetone phosphate	○		Glyceric acid		○
Glucose 6-phosphate	○		Glycerol 3-phosphate	○	
Lactic acid	○		Glycolic acid	○	○
Phosphoenolpyruvic acid	○		Glyoxylic acid	○	○
Pyruvic acid	○	○	Indole 3-acetic acid	○	○
Fructose 1,6-bisphosphate	○		Orotic acid	○	○
Fructose 6-phosphate	○		Pantothenic acid	○	
Glyceraldehyde 3-phosphate	○		Urocanic acid		○
6-Phosphogluconic acid	○				
Ribose 1-phosphate	○		Dopamine		○
Ribulose 5-phosphate	○		Norepinephrine		○
Sedoheptulose 7-phosphate	○		Serotonin		○
Xylulose 5-phosphate	○				
			Pantothenic acid		○
Fructose 1-phosphate	○		Adenine	○	
Glucose 1-phosphate	○		Adenosine	○	○
Mannose 6-phosphate	○		Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	○	○
			Adenosine diphosphate	○	○
2-Ketoglutaric acid	○	○	Adenosine monophosphate	○	○
Acetyl coenzyme A	○		Adenosine triphosphate	○	○
Aconitic acid	○		Adenylsuccinic acid	○	
Citric acid	○	○	AICAR	○	○
Fumaric acid	○	○	Cytidine	○	○
Isocitric acid	○	○	Cytidine diphosphate	○	○
Malic acid	○	○	Cytidine monophosphate	○	○
Succinic acid	○	○	Cytidine triphosphate	○	○
			Cytosine	○	○
Argininosuccinic acid	○	○	Guanine	○	○
Ornithine	○	○	Guanosine	○	○
Arginine	○	○	Guanosine diphosphate	○	○
Citrulline	○	○	Guanosine monophosphate	○	○
2-Aminobutyric acid	○		Guanosine triphosphate	○	○
4-Aminobutyric acid	○		Inosine	○	○
4-Hydroxyproline	○		Inosine monophosphate	○	○
Alanine	○		Thymidine diphosphate	○	○
Asparagine	○		Thymidine monophosphate	○	○
Aspartic acid	○		Thymidine triphosphate	○	○
Asymmetric dimethylarginine	○		Uracil		○
Dimethylglycine	○		Uridine	○	○
Glutamic acid	○		Uridine diphosphate	○	○
Glutamine	○		Uridine monophosphate	○	○
Glycine	○		Uridine triphosphate	○	○
Histidine	○		Xanthosine monophosphate	○	
Isoleucine	○				
Leucine	○		ADP-glucose	○	
Lysine	○		UDP-glucose	○	
Methionine sulfoxide	○				
Phenylalanine	○		Allantoin		○
Proline	○		Hypoxanthine	○	○
Serine	○		Uric acid	○	○
Symmetric dimethylarginine	○		Xanthine	○	○
Threonine	○				
Tryptophan	○		Mevalonic acid		○
Tyrosine	○		MVA-P		○
Valine	○				
Cystathionine	○		4-Hydroxybenzoic acid		○
Homocysteine	○		Acetylcarnitine		○
Methionine	○		Acetylcholine		○
5-Glutamylcysteine	○		Carnitine		○
Glutathione	○		Carnosine		○
Oxidized glutathione	○		Choline		○
S-Adenosylhomocysteine	○		Citicoline		○
S-Adenosylmethionine	○		Creatinine		○
			Dihydroxyphenylacetic acid		○
Coenzyme A	○		Ergothioneine		○
FAD	○		Histamine		○
FMN	○		Kynurenine		○
NAD	○		Salicylic acid		○
NADH	○		Vanillin		○
NADP	○				
NADPH	○				
Niacinamide	○				

図 4 イオン対法・非イオン対法其其でラット脳抽出液から検出された一次代謝物

#### 4.2. 代謝マップへの可視化解析

得られた化合物の数値データを考察する時、どのような方法があるだろうか？本稿のターゲットである一次代謝物の場合、代謝マップ上に分析結果を投影する事が出来れば、視覚的に代謝経路上での差異や変化に着目する事が出来る。そこで、マルチオミクス解析パッケージを用いた可視化解析のワークフローについて述べる。

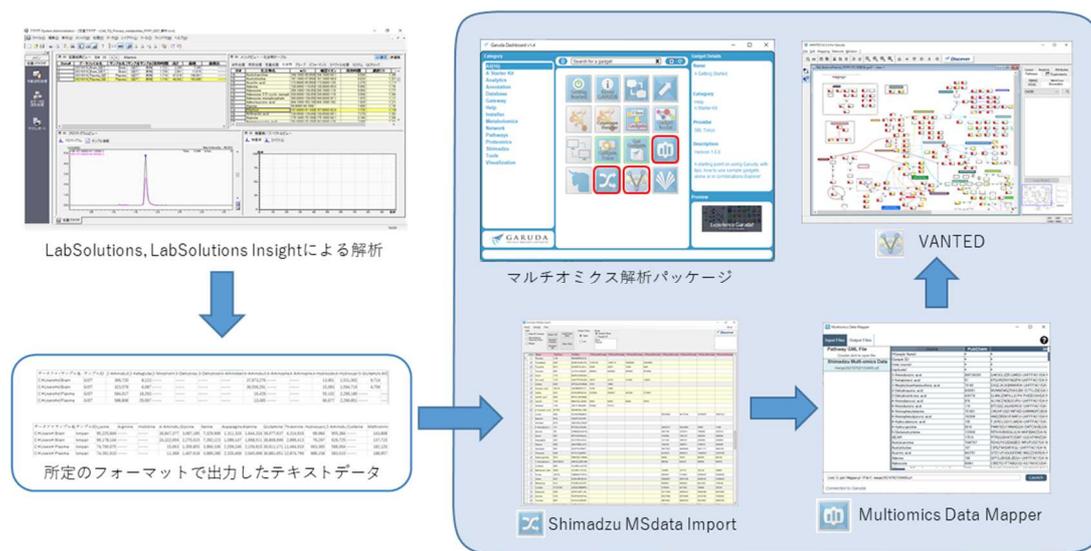


図 5 簡単操作で行うマルチオミクス解析パッケージのワークフロー

LabSolutions や LabSolutions Insight と言った LCMS データ処理システムでの解析後に其其出力されたテキストデータは、複数のメソッドで得られた別々の測定結果であったとしても、島津製作所が開発した解析支援ツールであるマルチオミクス解析パッケージの Shimadzu MS data Import 上で統合する事が出来る。更に、Shimadzu MS Data Import から Multiomics Data Mapper を経由し、マップ描画ツールである VANTED にて全ての結果を纏めて代謝マップへ可視化させる事が可能である。各メソッドで共通している化合物については、クロマトグラムを比較してピーク形状や感度の良好な結果を得ているメソッドを確認し、Shimadzu MS data Import 上で使用するメソッドの結果を選択して代謝マップ上へ反映させる事が可能である。

図 6 に、ラットの脳と血漿サンプルを、イオン対法と非イオン対法で分析した結果を統合し、代謝マップへ可視化した結果を示した。どちらかの分析法でのみ検出される化合物として、2 化合物を拡大して例示する。Ribose 5-phosphate はイオン対法では検出可能であるが、非イオン対法では検出する事が出来ない。逆に Isocitric acid は、非イオン対法で検出されるがイオン対法では検出されない。この様に 2 つのメソッドを統合する事で、より多くの代謝物を 1 つの代謝マップ上で可視化する事が出来た。

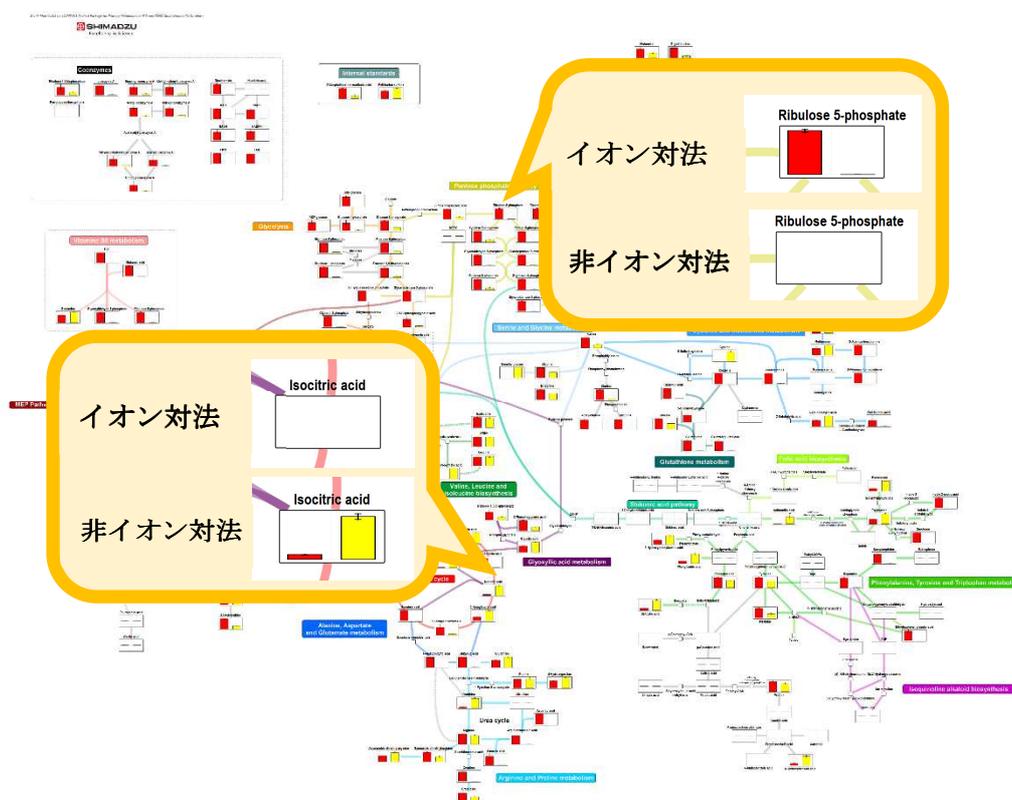


図 6 イオン対法と非イオン対法の結果を統合した代謝マップ

## 5. 結び

目的に応じて分析手法を組み合わせたたり選択したりする事で、サンプル中に含まれる一次代謝物の一斉分析は手軽に安定して実施出来る。今回の例ではラット脳や大腸菌、酵母と言うサンプルのバリエーションを示したが、同一サンプルの経時的な変化を追跡する方向に展開する事も可能である。この様に、代謝物の一斉分析は、簡単に大量のデータが得られる一方で、解析がボトルネックになる事が多い。本稿で示した様なマルチオミクス解析支援ツールを利用する事で、ボトルネックが解消され、より考察に時間を掛ける事が可能となるであろう。一斉分析から代謝経路への可視化解析ワークフローは、本稿で示したラットのみならず、大腸菌、酵母等を用いた様々な研究分野にも適応可能であり、メタボロミクスで得られた膨大なデータから着目すべき代謝物への絞り込みや、ひいては一斉分析をベースとした研究推進の為の有効な手段となる事が期待される。

## 引用文献

- 1) Application News 01-00192-jp-A、LC/MS/MS メソッドパッケージ 一次代謝物 Ver. 3 によるラット脳中の一次代謝物の分析、島津製作所

2) Application News 01-00209-JP、主要水溶性代謝物 141 成分一斉分析法による微生物中の代謝物分析と代謝経路への可視化、島津製作所

<執筆者略歴>

伊藤友紀 (Yuki ITO)

株式会社島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部  
MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)  
大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所 招へい研究員  
LC/MS 分析士初段 岐阜大学大学院自然科学技術研究科修士課程  
修士 (工学)



荒尾洋平 (Yohei ARAO)

株式会社島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部  
MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)  
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 修士課程 修士 (工学)



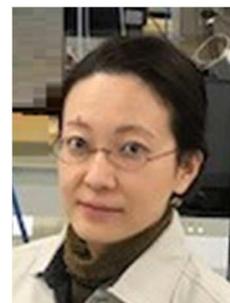
堀江征司 (Seiji HORIE)

株式会社島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部  
MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)  
大阪市立大学理学研究科修士課程 修士 (理学)



岡本真美 (Mami OKAMOTO)

株式会社島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部  
MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)  
LC/MS 分析士三段 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科  
博士課程 博士 (理学)



渡邊 淳 (Jun WATANABE)

株式会社島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部  
MS ビジネスユニット (〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1)  
大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所 招へい研究員  
LC 分析士初段 京都大学大学院農学研究科修士課程 修士 (農学)



## 【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

### 環境分析/Environmental Analysis

大塚克弘/Katsuhiko OHTSUKA

ムラタ計測器サービス株式会社/MURATA Keisokuki Service Co., Ltd.

( Received October 31, 2021 ; Accepted November 25, 2021 )

キーワード 大気；水質；アルデヒド；多環芳香族；チウラム；LAS；PFOS；PFOA

#### 1. 始めに

日本では数々の公害問題を発端に、1967 年に公害対策基本法が公布された。翌年 1968 年に大気汚染防止法、更に 1970 年に水質汚濁防止法などが制定された。その後、環境基準が設定され、改正を繰り返して現在に至る。

環境基準が設定された項目は、基準値と共に測定方法が指定され、その方法は「公定法」と呼ばれる。

HPLC 法や LC/MS/MS が採用されている環境基準等項目（表 1）の基準値等は低い濃度であり、水質分析の場合は、0.00005～0.006 mg/L である。更に基準値の凡そ 1/10 の濃度の測定するのが望ましいとされている。その為、試料量も多く、溶媒抽出や固相抽出などで 100～1000 倍濃縮する事もある。それと共に試料によっては夾雑物の影響を大きく受け、分析に苦慮する事がある。

本稿では環境分析のうち、大気と水質の HPLC 及び LC/MS/MS を用いる分析についてコツを含め紹介する。

表 1 LC 法が採用されている環境基準等項目及び分析方法

	項目	分析方法
大気分析	アルデヒド類	有害大気汚染物質等測定方法マニュアル (HPLC/Vis)
	多環芳香族炭化水素	有害大気汚染物質等測定方法マニュアル (HPLC/FL) 微小粒子状物質 (PM2.5) の成分分析ガイドライン (HPLC/FL)
水質分析	チウラム	水質汚濁に係る環境基準について (HPLC/UV)
	直鎖アルキルベンゼン スルホン酸及びその塩	水質汚濁に係る環境基準について (LC/MS/MS)
	PFOS、PFOA	水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の施行等について (LC/MS 又は LC/MS/MS)

#### 2. 大気分析

大気は、我々が生活し、呼吸をする上で、直接人体に関わるものである。その為、大気

分析は大変重要である。

大気分野では、環境基準項目の他、「有害大気汚染物質」(hazardous air pollutants, HAPs) が大気汚染防止法 第 2 条第 13 項において、「継続的に摂取される場合には人の健康を損なう恐れがある物質で大気の汚染の原因となるもの」と定義されている。この HAPs については、現在「有害大気汚染物質に該当する可能性のある物質」として 248 物質がある。そのうち「優先取組物質」として 23 物質が選定されている。この「優先取組物質」については、「有害大気汚染物質等測定方法マニュアル」(平成 31 年 3 月 環境省 水・大気環境局 大気環境課) (以下「有害大気測定方法マニュアル」) が発行されており、これが「公定法」とされる。「優先取組物質」の 23 物質のうち、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、ベンゾ[a]ピレンは公定法として HPLC 法が記載されている。

又、微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) については、環境基準以外に、平成 22 年 3 月 31 日に、「大気汚染防止法第 22 条の規定に基づく大気の汚染の状況の常時監視に関する事務の処理基準について」が改正され、PM<sub>2.5</sub> の質量濃度測定が追記された。その後、「微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) の成分分析ガイドライン」(平成 23 年 7 月 29 日環水大大発 110729001 号) (以下「PM<sub>2.5</sub> 成分測定マニュアル」) が策定され、この中では多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) については、HPLC 法も記載されている。

以下、アルデヒド類とベンゾ[a]ピレンを含めた PAH の HPLC 法について、其々整理した。

## 2. 1 アルデヒド類

有害大気汚染物質に指定されているアルデヒド類の項目は、ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドである。指針値として、アセトアルデヒドは、年平均値 120  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  以下と定められ、ホルムアルデヒドは設定されていない。

有害大気測定方法マニュアルでは、目標定量下限値を設定しており、ホルムアルデヒドは 0.08  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (暫定値 0.8  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) \* であり、アセトアルデヒドは 0.5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  である。

\* 捕集剤のブランクが高いために暫定値を設けている。

### 2. 1. 1 試料採取

アルデヒド類の試料採取は、シリカの担体に反応試薬として、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) を含浸させた捕集剤に誘導体を生成させる固体捕集法と、反応試薬 (DNPH) を含む吸収液中で誘導体を生成させる溶液吸収法がある。

一般的には、前者の固体捕集法が選定される。この方法では、DNPH が含まれたカートリッジ型の固相に、大気質サンプリングポンプによって大気を通気させる事により、図 1 に示すアルデヒド類と DNPH の反応を起こし、ヒドラゾン誘導体を生成させる。このヒドラゾン誘導体は黄色を呈色し、HPLC の吸光光度検出器で測定する。

アセトアルデヒドでは、DNPH 反応において、*E* 体と *Z* 体のヒドラゾン誘導体が生成される (図 2)。

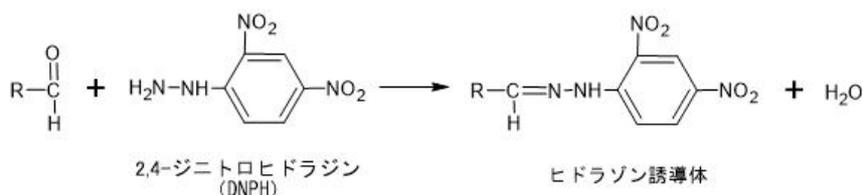


図 1 アルデヒド類と DNPH の反応

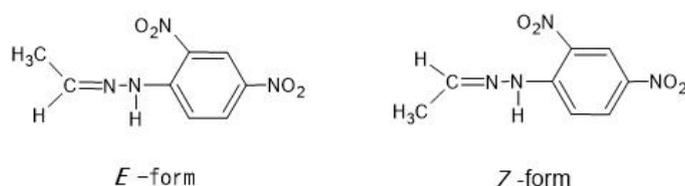


図 2 アセトアルデヒドの *E* 体、*Z* 体

DNPH による誘導体化は、大気中に含まれるオゾン ( $\text{O}_3$ ) によって、DNPH とヒドラゾン誘導体の両方と反応し負の妨害を受ける。そこで、カートリッジ型のオゾンスクラバーを DNPH カートリッジの前段に取付け、 $\text{O}_3$  の影響を受けない様にする。オゾンスクラバーにヨウ化カリウムを用いている場合は、大気の湿度が高い時、水蒸気によりヨウ化カリウムが潮解、溶解時の吸熱反応により冷却する。その結果、オゾンスクラバー内に水が凝縮し、その水に溶解したヨウ化カリウムが DNPH カートリッジに流れ込む様になる。又、ヒドラゾン誘導体は、光分解し易い。これらを防止する為に、オゾンスクラバーと DNPH カートリッジを遮光加温装置で覆い、気温よりやや高めにする。

図 3 にサンプリング時のカートリッジの接続を示した。

DNPH カートリッジは、2 段で接続し、1 段目 (前段) だけ検出されれば、1 段目だけの濃度を算出するが、両方とも検出された場合は、其々の濃度を算出して合量値とする。2 段目 (後段) のカートリッジの濃度が前段の濃度より高い場合は、2 段目で完全に捕集出来ているとは限らない為、再採取する。

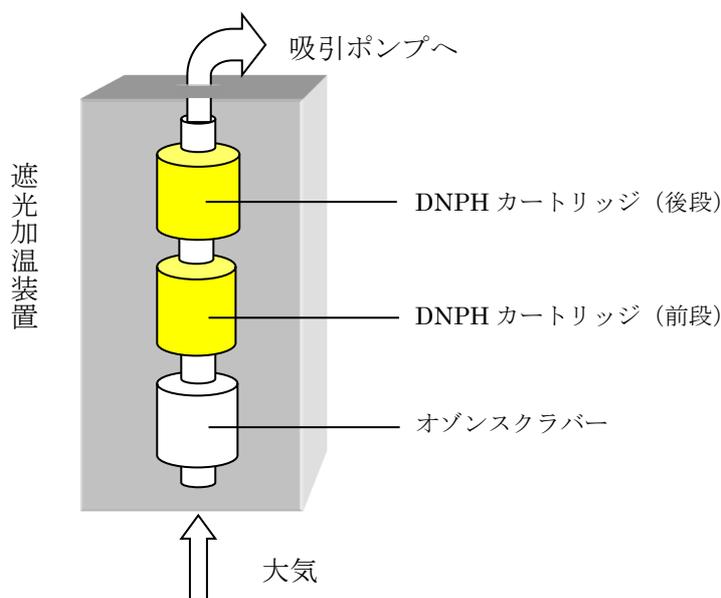


図 3 固相カートリッジの接続法

### 2. 1. 2 HPLC 法

試料捕集した捕集管を図 4 の前処理操作フローに沿って前処理を行い試験液とする。

HPLC 分析は、クロマトグラムの一例とその HPLC 条件を図 5 と表 2 に示した。

クロマトグラム中のアセトアルデヒドのピークがややリーディング気味になっている (図 5 の赤い矢印)。これは、2. 1. 1 に記載した異性体の *Z* 体と *E* 体のピークが重なり合っていると推定される。

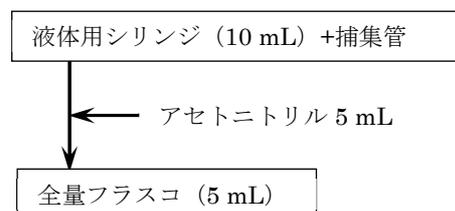


図 4 前処理操作フロー

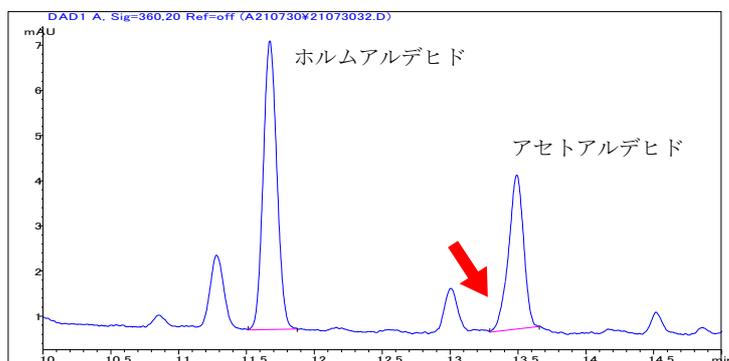


図 5 ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドのクロマトグラム

表 2 HPLC 条件

装置	1100 シリーズ (Agilent)
カラム	Shim-pack GIST(島津) 内径 3.0mm 長さ 150mm, 粒径 3 $\mu$ m
注入量	5 $\mu$ L
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
流量	0.4 mL/min
移動相	A: アセトニトリル B: 超純水 30% - 65% (13 min) - 100% (14 - 18 min) - 30% (18 - 22 min)
検出器	紫外可視吸光度検出器 (360nm)

湿度が高い時に加温装置を使わない場合、オゾンスクラバー内で水が凝縮してヨウ化カ

リウムが溶け出し、DNPH カートリッジ内で、ヨウ化カリウムと DNPH が反応する。その結果、2,4-ジニトロヨードベンゼン (DNIB) が生成され、DNIB のピークがアセトアルデヒドのピークと近接するという報告<sup>1)</sup>がある。又、DNPH は、カルボニル化合物と反応する為、複数の未知ピークが検出され、分析種のピークに重なる可能性があるため、十分に分離出来るカラムの選択などを考慮する必要がある。

## 2. 2 PAH

優先取組物質 23 種には、ベンゾ[a]ピレンが指定されているが、有害大気測定方法マニュアルでは、ベンゾ[a]ピレンを含んだ PAH として記載されており、目標検出下限値も示されている。表 3 に纏めると共に、図 6 に構造式を示した。

PM2.5 成分測定マニュアルにおいては、例として表 3 の他、フルオランテン、ピレン、ベンゾ[a]アントラセン、クリセンが示されているが、分析対象として推奨するものではなく、地域の実情に応じて選定する事が求められている。

表 3 PAH 名及び目標定量下限値

PAH 名	目標定量下限値	PAH 名	目標定量下限値
インデノ[1,2,3-c,d]ピレン	0.05 ng/m <sup>3</sup>	ベンゾ[a]ピレン	0.011 ng/m <sup>3</sup>
ジベンゾ[a,h]アントラセン		ベンゾ[e]ピレン	0.05 ng/m <sup>3</sup>
ジベンゾ[a,e]ピレン		ベンゾ[b]フルオランテン	
ジベンゾ[a,h]ピレン		ベンゾ[j]フルオランテン	
ジベンゾ[a,i]ピレン		ベンゾ[k]フルオランテン	
ジベンゾ[a,l]ピレン		ベンゾ[ghi]ペリレン	

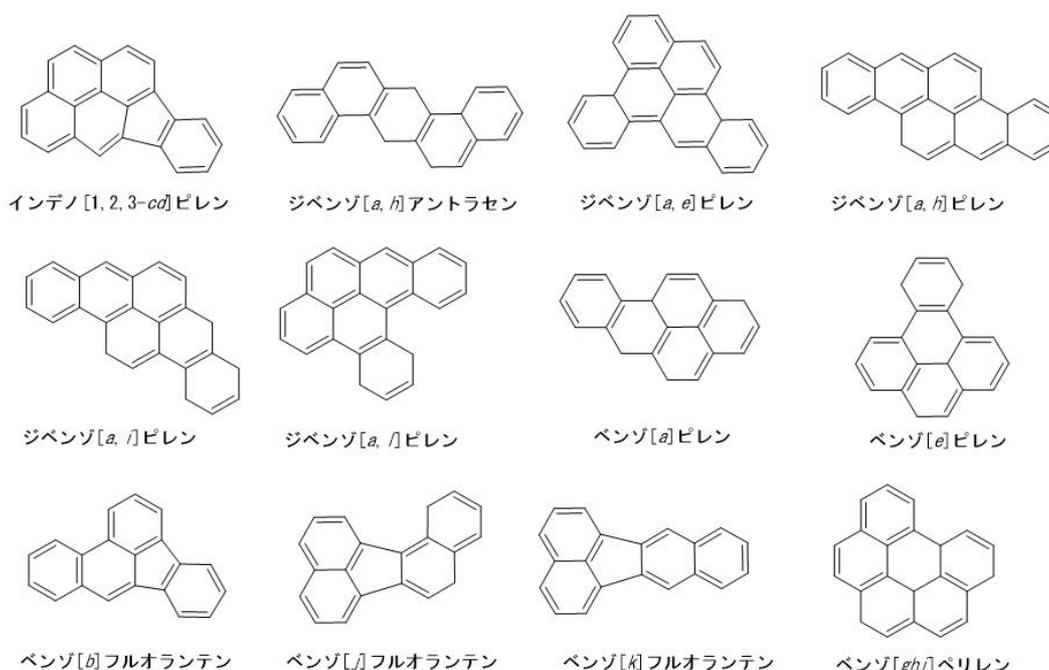


図 6 有害大気汚染物質等測定方法マニュアルに採用されている PAH の構造式

## 2. 2. 1 試料採取

PAH は、大気をフィルターに一定時間、一定流量に捕集された試料を用いて分析を行う。試料の捕集方法には、ハイボリウムエアサンプラ (HV) 法とロウボリウムエアサンプラ (LV) 法がある。

### ① HV 法

HV 装置の外観を図 7 に示す。また、HV 装置の屋根の部分を開けると図 8 の様なフィルターが設置されている。有害大気測定方法マニュアルに記載されている HV 法は、約 20×25 cm のフィルターで粒径 0.3 μm の粒子状物質に対し 99 %以上の捕集率を有する、通常、石英繊維製フィルター、四ふっ化エチレン樹脂 (polytetrafluoroethylene, PTFE) フィルター、ガラス繊維製フィルターが用いられる。

このフィルターの下にポンプがあり、0.7~1.5 m<sup>3</sup>/min で吸引して 24 時間捕集をする。



図 7 HV 装置

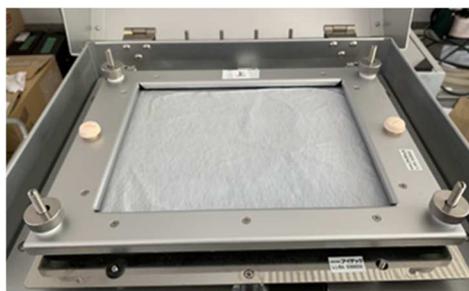


図 8 HV 装置内のフィルター

### ② LV 法

有害大気測定方法マニュアルに記載されている LV 法は、0.3 μm の粒子状物質に対し 99 %以上の捕集率を有する、直径 110 mm 又は 47 mm のフィルターを 10~30 L/min で通気して 24 時間捕集する。

### ③ PM2.5 LV 法

PM2.5 とは、大気中に浮遊する粒子状物質のうち、粒径 2.5 μm で 50 %分粒された小粒径側の粒子状物質である。50 %分粒の為、粒径 2.5 μm 以上も含まれる。

PM2.5 成分測定マニュアルに記載されている捕集方法は、0.3



図 9 PM2.5 LV 装置

μm の粒子に対して 99.7 %以上の捕集効率を有するフィルター (PTFE 又は石英繊維製) に捕集するものである。捕集流量は、サンプラーにより異なり、分析種により適切なサンプラーを使用する必要がある。

LV 装置の外観を図 9 に示す。

## 2. 2. 2 HPLC 法

有害大気測定方法マニュアル 第 3 部 第 1 章には、前処理操作は、ソックスレー抽出と超音波抽出があるが、簡便な方法の超音波抽出を図 10 に前処理操作フローとして示した。

PM2.5 成分測定マニュアルの分析方法は、有害大気測定方法マニュアルとほぼ同じである。

ベンゾ[a]ピレンは強力な発がん性物質であるので、十分取り扱いには注意をする。又、他の PAH も発がん性の強いものがあるので注意する。

全ての PAH は紫外部から可視部にかけて、強い光吸収帯が有り、光分解を受ける可能性があるため、標準溶液の調製、保存には注意をする。

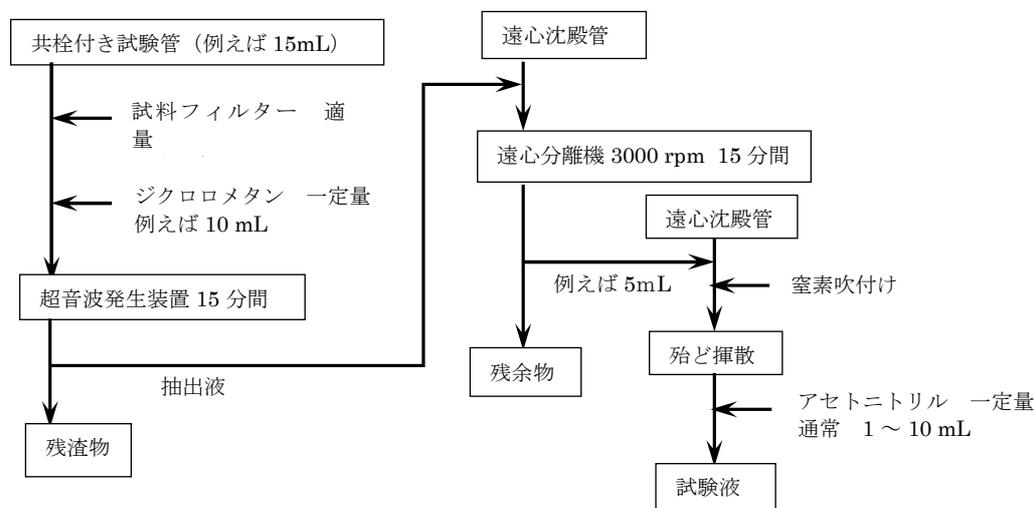


図 10 前処理操作フロー

HPLC で測定したクロマトグラムの一例を図 11 に示し、クロマトグラムに符ってある番号の化合物名を表 4 に示した。検出器は、蛍光検出器である。クロマトグラムが 4 種類有るのは、全ての PAH を感度良く分析する為に、最適な励起波長と 蛍光波長の組み合わせが選定されているからである。

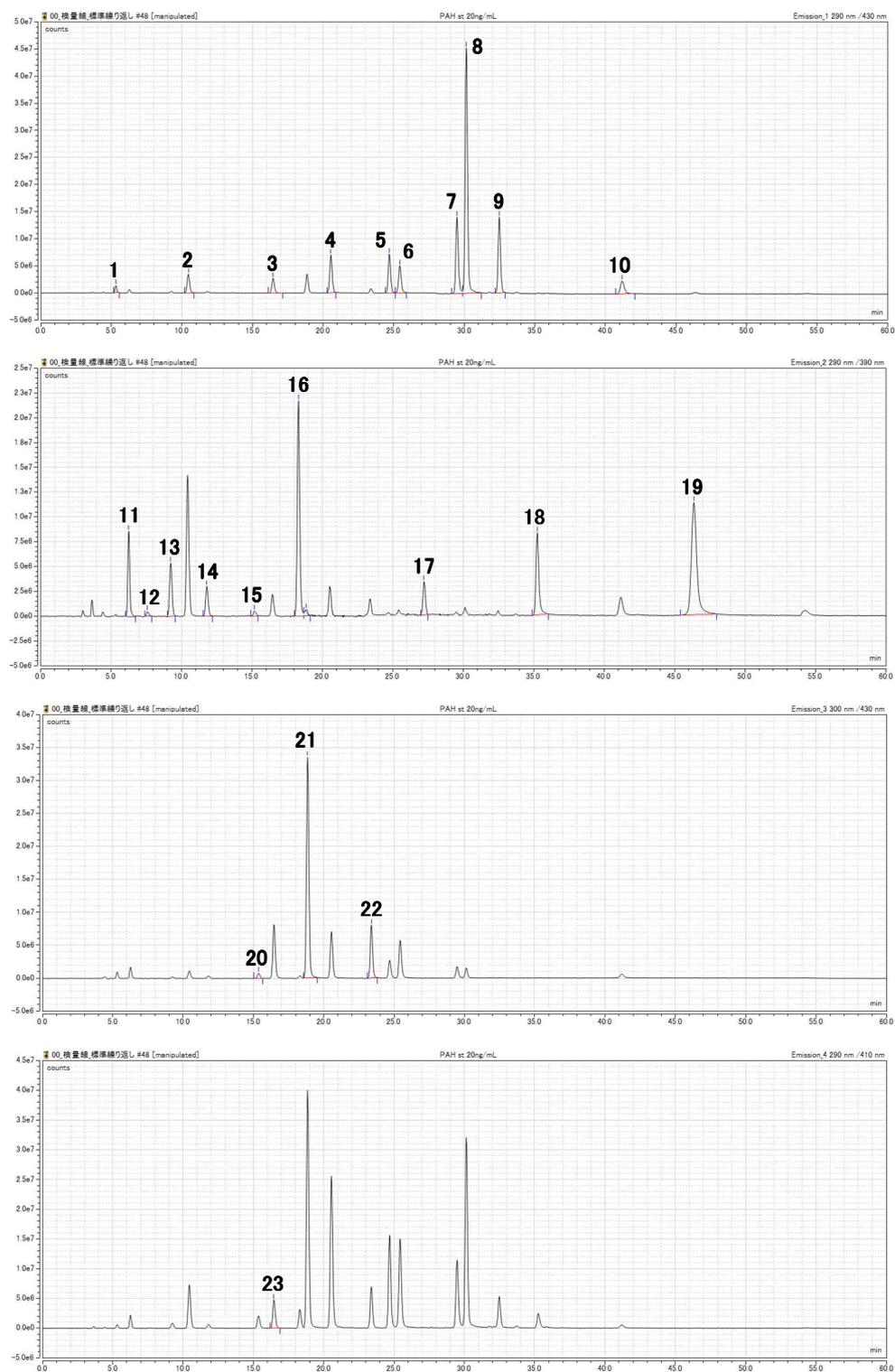


図 11 PAH のクロマトグラム

表 4 図 11 の番号と化合物名

1	フルオランテン	9	ピセン	17	インデノ[1,2,3- <i>cd</i> ]ピレン
2	ベンゾ[ <i>a</i> ]アントラセン	10	ジベンゾ[ <i>a,i</i> ]ピレン	18	コロネン
3	ペリレン	11	ピレン	19	ジベンゾ[ <i>a,h</i> ]ピレン
4	ベンゾ[ <i>a</i> ]ピレン	12	トリフェニレン	20	ベンゾ[ <i>e</i> ]ピレン
5	ジベンゾ[ <i>a,b</i> ]アントラセン	13	p-ターフェニル	21	ベンゾ[ <i>k</i> ]フルオランテン
6	ベンゾ[ <i>ghi</i> ]ペリレン	14	クリセン	22	ジベンゾ[ <i>a,l</i> ]ピレン
7	ジベンゾ[ <i>ae</i> ]ピレン	15	ベンゾ[ <i>j</i> ]フルオランテン	23	ベンゾ[ <i>b</i> ]フルオランテン
8	ベンゾ[ <i>b</i> ]クリセン	16	ジベンゾ[ <i>ac</i> ]アントラセン		

### 3. 水質分析

水質項目に関して、HPLC 法が指定されているのは、「水質汚濁に係る環境基準について」(昭和 46 年環境庁告示第 59 号)の「人の健康の保護に関する環境基準」にチウラムがあり、「生活環境の保全に関する環境基準」に直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩 (linear alkylbenzene sulfonate, LAS) がある。

又、平成 5 年 1 月の中央公害対策審議会答申(水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準の項目追加等について)を受け、「人の健康の保護に関連する物質ではあるが、公共用水域等における検出状況等から鑑みて、直ちに環境基準とはせず、引き続き知見の集積に努めるべきもの」として「要監視項目」が、平成 5 年 3 月に設定された。令和 2 年 5 月にペルフルオロオクタンスルホン酸 (perfluorooctanesulfonic acid, PFOS) 及びペルフルオロオクタン酸 (perfluorooctanoic acid, PFOA) が、加えられている。

#### 3. 1 チウラム

チウラム (thiuram) は、農薬の一種で、ジチオカルバメート系の殺菌剤である。チラム (thiram) とも言う。環境基準値は、0.006 mg/L である。

チウラムの構造式を図 12 に示す。「産業廃棄物分析マニュアル」(監修 環境庁水質保全局海洋汚染・廃棄物対策室)によると、チウラムはジスルフィド結合 (S-S) が不安定であり、H の供与によってこの結合が切断され、メルカプタン (R-S-H) を生成して分解される。又試料水、器具、固相カートリッジ基材などの金属イオンと反応する事によって金属塩を形成する。反応性が高く、回収率や再現性が低下し易く、分析が困難な化合物である。

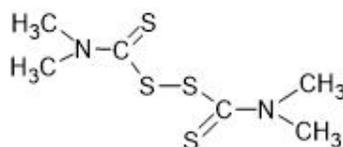


図 12 チウラムの構造式

### 3. 1. 1 固相抽出法 (前処理)

「水質汚濁に係る環境基準について」付表 5 では、前処理として、溶媒抽出と固相抽出が有る。固相抽出の方法 (図 13) は、有機溶剤の使用量が少なく作業負担が少ない為、推奨されている。

公定法には、EDTA・2Na の添加は記載されて無いが、前述の試料中や固相カートリッジに金属イオンが含まれている場合、金属塩を形成する為、回収率を上げるために EDTA・2Na の添加が推奨される。

EDTA・2Na の添加量の目安であるが、固相カラムのコンディショニング及び試料量が 200 mL の時は、其々 10 % EDTA・Na 4 mL を添加すると良い。

又、10 % EDTA・Na を調製する時、常温の水では溶解し難い為、80 °C 程度で攪拌しながら加熱をすると容易に溶解する。

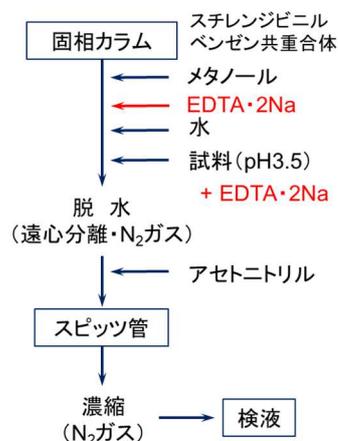


図 13 前処理操作フロー

### 3. 1. 2 HPLC 法

チウラムの HPLC 測定のカロマトグラムの一例を図 14 に示す。又、HPLC の条件を表 5 に示す。

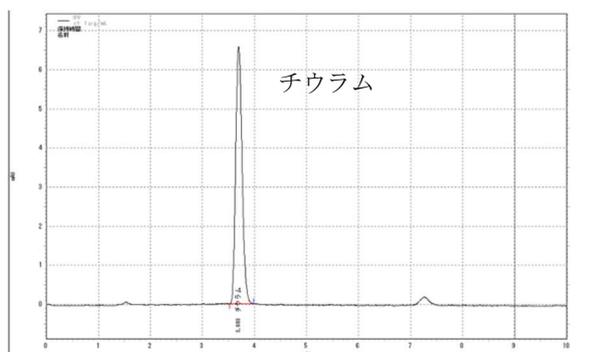


図 14 チウラムのカロマトグラム

表 5 チウラムの HPLC 条件

装置	LaChrom Elite L2000 (日立)
カラム	Wakosil II 5C18HG (Wako) 4.6×150 mm; 粒径 5 μm
注入量	20 μL
カラム温度	40 °C
流量	1 mL/min
移動相	アセトニトリル: 50 mM リン酸緩衝液 (pH3.0)=55:45
検出器	紫外可視吸光度検出器 (272 nm)

検出器に紫外可視吸光度 (UV) 検出器を用いている為、検液に有機物等の夾雑物が多く含まれている場合、多くのピークが検出され、チウラムのピークと区別出来なくなる。産業廃棄物分析マニュアルによれば、以下の様な対処方法が考えられる。

- 1) 分離性能の異なる分離カラムを用いて確認する。
- 2) 移動相を変えて保持時間を確認する。
- 3) 試験溶液に酸化剤又は還元剤を添加してピークの消失の有無を観る。
- 4) フォトダイオードアレイ検出器で UV 吸収スペクトルを確認する。

5) 活性アルミナカラムを用いてクリーンナップをする。

しかし、何れも時間が掛かったり、解析や経験が必要になったり、又は試料によっては効果が無いものも少なくはない。

公定法では採用されていない LC/MS/MS で測定すれば、UV 検出器より感度が良く、試料量を少なくする事が出来 (例えば 1/100 程度)、選択性が高い為、夾雑物の影響を排除する事が出来る場合が多い。又、検液を直接注入して、夾雑物を或る程度除去する事が出来る、チウラムのクリーンアップ用固相カートリッジが市販されている。

### 3. 2 LAS

LAS は、陰イオン界面活性剤であり、主に洗剤として用いられている。構造式を図 15 に示す。

環境基準値は、河川、湖沼、海水の水生生物の生息類型により、0.006~0.05 mg/L の範囲で設定されている。

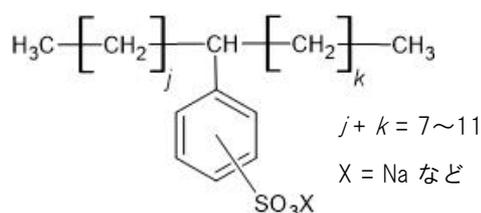


図 15 LAS の構造式

公定法の対象である分析種は、アルキル鎖長として C<sub>10</sub>、C<sub>11</sub>、C<sub>12</sub>、C<sub>13</sub>、C<sub>14</sub> をもつものである。

化学物質の環境リスク評価 第 6 巻 (平成 20 年 5 月 環境省環境リスク評価室) によれば、商用 LAS のアルキル鎖長分布は、C<sub>10</sub> が 7~16 %、C<sub>11</sub> が 19~39 %、C<sub>12</sub> が 20~50 %、C<sub>13</sub> が 5~27 %、C<sub>14</sub> が <1~3 % であり、アルキル鎖長の C 数が 10 未満、14 超過のものは 1 % 未満である。

この様に、試料中に LAS が含まれる場合、C<sub>11</sub>、C<sub>12</sub> が多く含まれ、次に C<sub>10</sub>、C<sub>13</sub> が含まれ、C<sub>14</sub> は、検出されない場合が多い。

#### 3. 2. 1 固相抽出

「水質汚濁に係る環境基準について」(昭和 46 年環境庁告示第 59 号) 付表 12 に分析方法が採用されている。前処理では固相抽出が採用されており、前処理操作フローは、図 16 に示す。

公定法では、内標準物質にアルキル鎖長 C<sub>8</sub> をもつ LAS が用いられている。前述の通り試料から検出される事は殆どないが、試料によっては、C<sub>8</sub> のピークが夾雑物のピークの影響を受け、イオン化抑制を受けたり、夾雑物のピークが重なったりする事がある。

C<sub>8</sub> は、シリンジスパイクである為、なるべく標準物質溶液中でのピーク面積と試料検液に添加した時のピーク面積が同程度の方が良い。C<sub>10</sub>~C<sub>14</sub> において、C<sub>8</sub> が受けたイオン化抑制

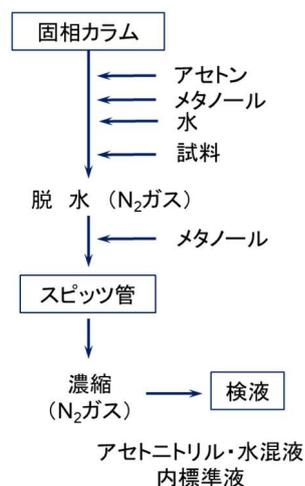


図 16 前処理操作フロー

と同程度の影響を受ける場合は、シリジンスパイクの役目を果たすが、そうでない場合は役目を果たさなくなるので注意が必要である。

逆相カラムを使用する為、C<sub>8</sub> は保持時間が早い為、塩類などの影響を受け易い。例えば、試料が海水や汽水の場合、又は夾雑物が多い場合、固相カラムで試料を通水した後、十分な量の水で洗う必要がある (例えば、200 mL)。又、定量下限値は上がる可能性は有るが、試料を少なくして夾雑物の影響を少なくする事も効果的である。或いは HPLC の移動相の流量を変える事で影響が小さくなる場合がある。この様に、何れも或る程度の効果は見込まれる。

### 3. 2. 2 LC/MS/MS

図 17 にクロマトグラムの一例を示し、表 6 に LC/MS/MS 条件を示す。

図 17 のクロマトグラムは、固定相に C<sub>8</sub> を用いた逆相カラムを分離カラムとして用いており、C<sub>10</sub>~C<sub>14</sub> のピークが其其 1 本になっているので、波形処理が簡単である。

図 18 では、固定相に C<sub>18</sub> を用いた逆相カラムを分離カラムとして用いた場合のクロマトグラムの一例を示す。図 18 の検出器は、蛍光検出器であるが、ピークの分離は LC/MS/MS でも同様である。C<sub>10</sub>~C<sub>14</sub> のピーク形状が異性体も分離されている。波形処理は、ピーク数が増えるので手間が掛かるが、試料を測定して検出した時は、定性し易い。

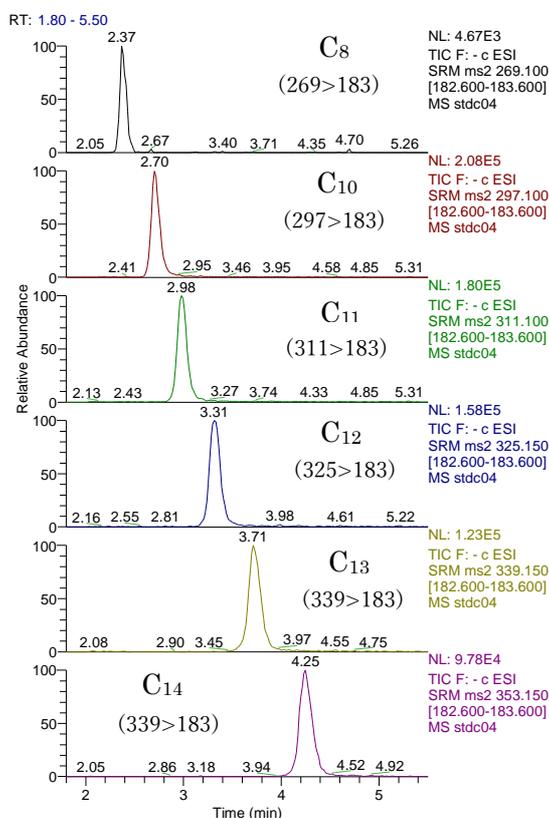


表 6 LC/MS/MS の条件

HPLC	Ultimate3000 (Thermo)
MS/MS	TSQ Quantum Discovery MAX (Thermo)
カラム	Inertsil C <sub>8</sub> -4 (GL Science) 2.1 × 150 mm ; 粒子径 3 μm
カラム温度	40 °C
流量	0.2 mL/min
移動相	アセトニトリル:50 mM ギ酸アンモニウム・0.1%ギ酸水溶液 = 65:35
イオン化モード	ESI negative

図 17 LAS のクロマトグラム (C<sub>8</sub> 逆相カラム、MS/MS 検出)

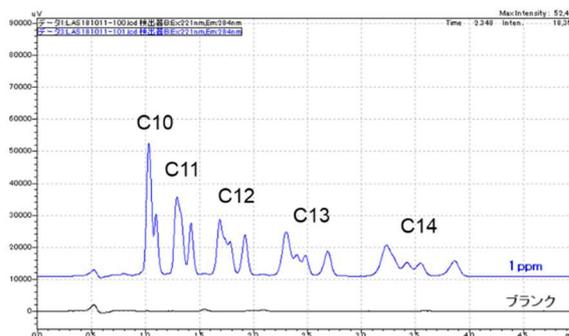


図 18 LAS のクロマトグラム (C18 逆相カラム、蛍光検出)

### 3. 3 PFOS 及び PFOA

PFOS 及び PFOA は、有機フッ素化合物の界面活性剤であり、従来の界面活性剤より界面活性作用が高い。強い撥水性、撥油性であり、化学的安定性も優れている。

指針値 (暫定) は、PFOS 及び PFOA の合計値で 0.00005 mg/L である。

図 19 に PFOS の構造式、図 20 に PFOA の構造式を示す。

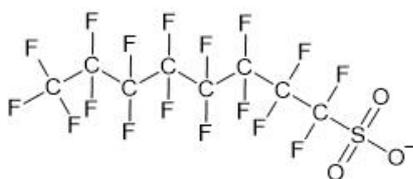


図 19 PFOS の構造式

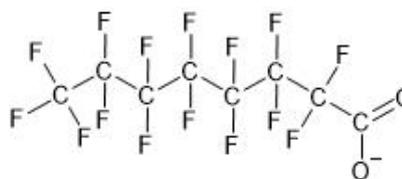


図 20 PFOA の構造式

#### 3. 3. 1 固相抽出

「水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の施行等について」(令和 2 年環水大発第 2005281 号、環水大土発第 2005282 号) 付表 1 に分析方法が採用されている。前処理では固相抽出が掲載されており、前処理操作フローを図 21 に示す。

試料容器や分析器具には、PTFE 製は使用しない。PTFE から PFOS、PFOA が溶出する可能性があり、ガラス製も PFOS、PFOA が吸着する可能性がある為、使用しないのが望ましい。JIS K 0450-70-10 には、使用する器具にポリプロピレン製が記載されている。

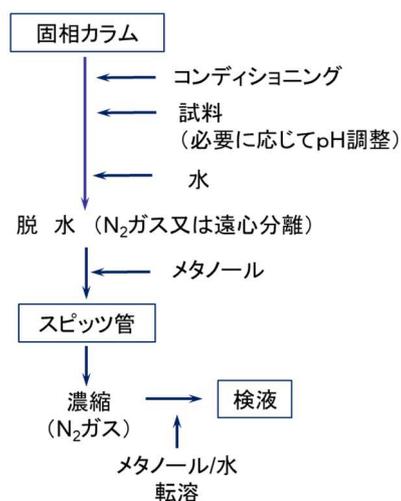


図 21 前処理操作フロー

### 3. 3. 2 LC/MS/MS

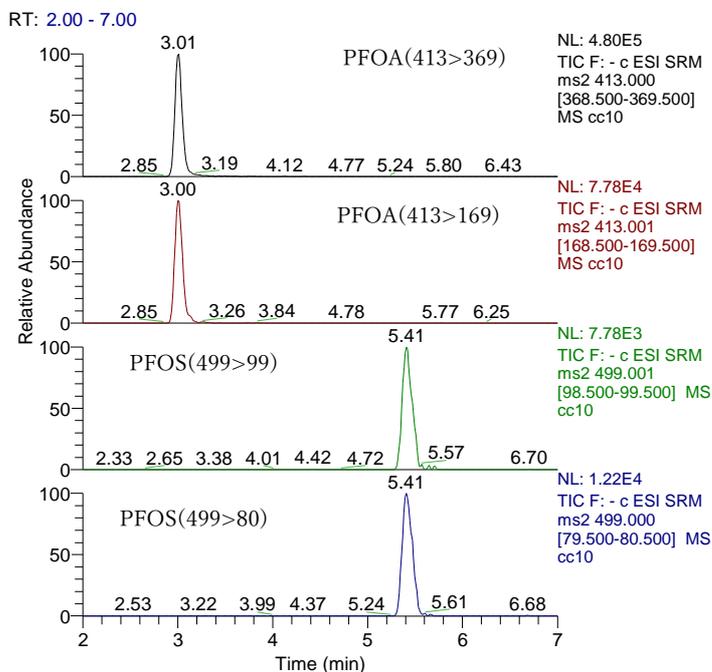


図 22 PFOS、PFOA のクロマトグラム

図 22 にクロマトグラムを示す。  
又、表 7 に HPLC 条件を示す。

図 22 のピークは、PFOS、PFOA の直鎖体であるが、試料では分枝異性体のピークが存在する。分枝異性体の標準入手は、困難なので、直鎖体と同等の感度として濃度を算出する。

表 7 LC/MS 条件

HPLC	Ultimate3000 (Thermo)
MS/MS	TSQ Quantum Discovery MAX (Thermo)
カラム	Inertsil C8-4 (GL Science) 2.1×150mm;粒子径 3 μm
カラム温度	40 °C
流量	0.2 mL/min
移動相	アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム水 = 50:50
イオン化モード	ESI negative

### 4. 最後に

大気、水質中の有機化合物を対象とした環境分析の分野において HPLC、LC/MS/MS を必要とする物質への適用は GC、GC/MS に比べ歴史が浅い。今後は多くの有機化合物が環境基準や要監視項目など規制の対象になると思われるが、GC 等では測定出来ない熱分解性化合物や難揮発性化合物への分析に HPLC、LC/MS/MS の適用が期待される。

又、LC/MS/MS によるチウラム測定の事例の様に公定法を改良する事で作業効率の向上、迅速測定を可能にする事が出来る。しかし、環境分析では公定法に縛られる事が多い為、新技術を導入した公定法の改定や他の試験方法が選択出来る仕組みが望まれる。

環境分析について簡単に紹介したが、皆様の参考になれば幸いである。

### 引用文献

- 1) 大貫 文、菱木麻佑、斎藤育江、鈴木俊也、保坂三継、東京健安研セ年報、**67**、pp.233-239 (2016)

### 参考文献

- 1) 環境省 水・大気環境局 大気環境課、有害大気汚染物質等測定方法マニュアル（平成 31 年 3 月）
- 2) 微小粒子状物質（PM2.5）の成分分析ガイドライン、平成 23 年 7 月 29 日環水大大発 110729001 号
- 3) 環境庁水質保全局海洋汚染・廃棄物対策室 監修、産業廃棄物分析マニュアル、日本環境測定分析協会（1997）
- 4) 環境省環境リスク評価室、化学物質の環境リスク評価 第 6 巻、（平成 20 年 5 月）

### <執筆者略歴> 大塚克弘（Katsuhiko OHTSUKA）

- ・ ムラタ計測器サービス株式会社 分析部
- ・ 分析士資格：LC 分析士二段、LC/MS 分析士三段
- ・ Email：ohtsuka1209@murata-s.co.jp



## 【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

### 原薬分析／Analysis of Active Pharmaceutical Ingredients

柿田 穰／Minoru KAKITA

エーザイ株式会社メディスン開発センターPST 分析研究部／Analytical Research, Pharmaceutical Science & Technology Core Function Units, Medicine Development Center, Eisai Co., Ltd.

(Received October 28, 2021 ; Accepted November 29, 2021)

キーワード 医薬品の分析；高感度分析；HPLC；誘導体化

#### 1. 始めに

医療用医薬品の開発には分離分析は必須の技術であるが、その中でもクロマトグラフィーは必要不可欠な分析手段である。原薬とは医療用医薬品の有効成分であるが、その分析法に求められる視点は医薬品の開発段階において大きく異なって来る。各段階で求められる事象、及び開発段階において分析法で求められる内容をガイドラインに基づいて紹介した後、最後に開発後期段階の高感度分析事例と今後の展望について解説する。

#### 2. 原薬の開発段階によるクロマトグラフィーの役割

医薬品の開発には、大きく分けて探索研究と開発研究とがあり、開発研究の中でも開発初期段階と後期段階の其其で分析法に求められる要素が異なる。探索研究とは医薬品候補化合物を見出す研究である。合成部門では骨格構造や置換基の種類・位置違い等、非常に多種類の化合物を合成し薬理活性を評価する。スループットを重視する為、化合物ごとに分析条件は最適化をせず簡便性を重視する。その為、薄層クロマトグラフィーにて原料と生成物をモニターする。又は、簡易的な液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて純度を確認する。これらの手法では分離が難しい立体選択的合成や光学純度の評価ではキラルカラムの利用、そして単離・精製には超臨界クロマトグラフィー等も活用されている。

合成された候補化合物は効能が有るかを確認する為、評価系に移され評価される。細胞であれば形態評価や、特異的に結合若しくは発光する蛍光色素を用いてターゲットとしているタンパク質の定量評価を行い、候補化合物がどの程度影響を与えるかを評価する。又、これらを指標として化合物の薬効をより高くする為に候補化合物の構造は最適化されて行く。更に細胞からマウスやラット等の小動物に評価系が移ると、薬物動態の研究では、候補化合物の血中濃度や対象タンパク質の生体中での濃度を測定する。この場合は ppb レベルの極微量成分の定量評価が求められる為、除タンパク等の前処理に加え、LC/MS や TOF MS などの高い特異性と感度をもつ装置が使用されている。この様に、小動物の評価系において安全性や有効性が確認されると、いよいよヒトへの投与に向けた開発段階へ移行して行く。

開発段階では、候補化合物をヒトに投与する為に各種レギュレーションに準拠するデータを揃える必要がある。投与する国により基準が異なると、該当する国ごとに試験を行う・再解析をする、など開発の負担が大きくなり、薬を必要とする患者様に新薬を届ける事が遅れるドラッグラグに繋がる。その為、国際的な基準を設定する為に ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use、医薬品規制調和国際会議) という枠組みが有る。この ICH のガイドラインには品質 (Quality)、安全性 (Safety)、有効性 (Efficacy)、複数領域 (Multidisciplinary) に関わるものと言ったカテゴリーに分類されている。ICH のガイド

ラインには各項目で満たすべき水準が明記されているが、手法については明記されていない。しかしながら、品質を満たす為の測定手法として、クロマトグラフィーは必須とも言える技法である。その理由はクロマトグラフィーのもつ定性性と定量性、頑健性と簡便性に有ると考える。

### 3. 開発研究の原薬分析

例として原薬品質について記述する。Quality のカテゴリーにある ICH Q3A ガイドラインでは、不純物の混入量と対応法について記載されている。要約すると原薬中に 0.15 % 以上含まれる不純物は安全性を担保するデータが必要となり、0.10 % を超える不純物は不純物の構造を明らかにしなければならず、0.05 % 以下の不純物は確認する必要が無い。この事から、原薬中に 0.05 % 混入する不純物の定量性を確保出来る分析法で有れば、後述する ICH M7 のガイドラインが出来る前は品質を管理出来ていた。分離に優れたクロマトグラフィーと、定量性に優れた紫外可視吸光光度計を組み合わせた HPLC は、品質を確認する分析法としては最適である。過去には、順相 LC の分析も有ったが、複雑な化合物の分離に向けたグラジエント分析やカラム充填剤の進化に伴い、逆相条件が主流となっている。近年は更なる逆相カラムの充填剤や保持メカニズムの進歩に伴い、分離技術は更に向上している。

一方で、分析法は評価の妥当性を担保しなくてはならず、ICH Q2 ガイドラインには分析法の妥当性検証 (Validation) が記載されている。要約すると、分析法に関しては再現性、特異性、直線性、真度、精度が担保される事が明記されている。注入再現性を高めるには、HPLC 機器のサンプルユニットの最適化が必要となり、ループボリューム、カラム内径、などが最適化されて行った。その結果、今日の HPLC の主流である内径 4.6 mm のカラムを用いて約 10  $\mu$ L の試料溶液を注入し、van Deemter の線速度と分離段数の関係式から、最も分離能が出る 0.6~1 mL/min の流速を選んでいる条件が選ばれて行ったと考える。近年は更に装置やカラムの進化から、より高速で分離能が高い UHPLC にシフトが進んで来ており、この手法も日進月歩の進歩で発展している。

他方、安全性に関する知見や技術の日々の進歩により、ICH のガイドラインは都度更新されて行く。2000 年に制定された Multidisciplinary のカテゴリーにある ICH M7 ガイドラインは不純物に変異原性が有る場合、ICH Q3A ガイドラインで規定されていた 0.05 % レベルではなく、投与量や投与期間に応じた管理値を設定する必要がある。投与量が高容量で且つ長期に渡って服用する薬剤の場合は、ICH Q3A ガイドラインの報告閾値である 0.05 % よりも遥かに低い管理値以下であることを保証する必要がある。例として、1 日 160 mg 投与時の 10 年間の様に、長期に渡り服用する薬剤の場合は、原薬中の残留量は 71 ppm (0.0071 %) 以下でなければならない。この様に、ppm レベルの管理を求められる様になり、HPLC (LC) と紫外可視吸光光度計 (UV) を組み合わせた分析機器では要求される感度を満たす事が出来なくなって来た。

そこで使われる様になったのが、質量分析計 (MS) である。HPLC 装置と組み合わせた LC-MS はそれ迄、主に使用されて来た LC-UV から検出器を変更しただけと言う利便性に加え、特異性も高く、従来の方法で感度が満たされない場合の手法として採用されて来た。一方で、有機化合物で電子共役が有れば、或る程度のモル吸光係数が期待出来、結果的に大半の有機化合物が検出可能であった UV に対し、MS はイオン化しないと検出出来ない事から、有する官能基によっては同一濃度でも極端に強度が変わる可能性がある。その為、低分子化合物では未知不純物を含めた全ての不純物評価法に対して MS が使われる事は少なく、特定の不純物に焦点を当てた定量評価方法として用いられる事が多い。

最後に開発後期になると、商業生産に向けた準備が必要となる。ラボで確立した分析法を工場へ技術移転を行い、生産工場で行う事を目的としている。ラボで非常に高度な装置を用いた分析法を開発しても、工場が装置を保有していないと試験が実施出来ない、若しくは再現出来ない事になる。つまり、開発後期になるほど装置の性能に依存した評価

法ではなく、より汎用的な手法が求められる。

#### 4. 原薬中の不純物の高感度分析例

ここ迄、医薬品の開発段階に応じた原薬の分析について、HPLC と分析法に求められる事項について簡単に記載した。次に実際の具体例を紹介する。

原薬や中間体などの試料は、水に対する溶解度が著しく低い場合を除いて、ICH Q3A ガイドラインで規定している感度及び安定性が確認出来れば前処理を必要としない事が多い。一方で、ICH M7 ガイドライン対応の分析法の場合はその限りではない。汎用的な HPLC-UV 法を用いて原薬中の 0.0001 % (1 ppm) の不純物を測定しようとする、化合物をデザインする際に要求される水への溶解度を遥かに超える溶解度が必要になり、試料濃度を高める為、何らかの前処理をして測定する事も多々ある。又、ICH M7 ガイドラインで規定される変異原性不純物は、不純物の性質上反応性が高く、安定性が悪い事が往々にしてある為、不純物を安定化させる処理が必要となる場合も有る。その為、固相抽出や液相抽出で対象の不純物を抽出し、測定系中で蛍光色素と反応させた後に高感度で分析する、若しくは不純物を選択的に反応させて安定化させた上で測定する等の手法が一般的に使われる。一例として、不純物を安定化させる手法を設定する上で、ICH Q2 ガイドラインに規定のバリデーションを行う注意点を以下に記載する。

前処理の方法を確立する上で、最も難易度が高い項目は対象化合物の回収率である。回収率とは、原薬に対し対象化合物を規定濃度添加した時の理論量に対する実測値の割合を意味し、例えば、一致した場合は 100 % 回収したと判断する。固相抽出であれば、固相へ初めに対象化合物をアプライした時の固相への吸着率が必ずしも 100 % にはならず、又、固相による分離が不十分であると対象化合物の純度が悪くなる。その為、原薬と対象化合物の特異性を十分に確保しながら、展開溶媒や固相を選択する必要がある。誘導体化であれば、対象化合物が完全に誘導体になっているか、又、原薬も同様の反応で誘導体化される可能性が有るか、その際の誘導体化試薬の量は適切か、と言った点がポイントになる。

一方、インラインで蛍光色素を付ける手法は、紫外可視領域に電子吸収をもたないアミノ酸などで使われる手法である。化合物によっては、ラインの温度や流量を最適化する必要があるが、機器メーカーより専用の予めセットアップされた機器が販売されている。アプリケーションも充実して来ている為、上記 2 つの手法に比べればやや難易度は低いと言われている。

誘導体化法を用いて液相抽出を行う具体例として、アルデヒドの分析例を示す。アルデヒド化合物は変異原性を示す事が多く、又、不安定で直接評価が難しい事が多い為、誘導体化については多くの文献が報告されている<sup>1,2)</sup>。本稿では変異原性が報告されているグリコールアルデヒドを PFBOA (ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン) を用いて誘導体化し、液相抽出後に HPLC で評価する試験法開発を紹介する。

グリコールアルデヒドは水を介した互変異性体が複数存在し<sup>3)</sup>、単体での溶液安定性が極めて悪い性質をもつ。その為、初期に行った直接評価の試験法開発は難航し、測定の直前に試料を用時調製する必要がある有り、シーケンシャルに分析出来ない検討状況が続いた。最終的に評価対象化合物を安定化させる為に誘導体化法を採用したが、誘導化試薬として 2 種類の方法を最終的に候補とした。又、上述した様に本試験法は自社だけではなく、他社に技術移転を行う必要があった。その為、より汎用的な装置で評価を行う事を想定し、検出器に MS ではなく UV を使用した場合でも十分な感度が得られると言う観点から、最終的に誘導化試薬として PFBOA を選択した。

誘導化の検討の概要は試料溶液に対し PFBOA 溶液を滴下、反応後にクエンチングを行い、液相抽出をして HPLC で測定する内容である。その為、検討項目として PFBOA の等量、反応時間、失活後から液相抽出迄の時間、及び HPLC での特異性を最適化した。特に失活後から液相抽出迄の時間の検討においては、単品でサンプル調製を行う場合には顕在化せず、複数サンプルを同時に調製する際に回収率が安定して得られなかった。この為、

検討パラメーターとして顕在化した要素であり、1つ1つの操作に幅をもたせて実績を取る検討が必要となる。又、反応機構から誘導体は図 1 に示す様にジアステレオマーとして得られる事が分かっていた。これら異性体は HPLC ではピーク分離されたが、濃度や添加溶液によって誘導物の幾何異性体比率を一定にする事が難しかった為、両誘導体を合算して評価する解析法としている。

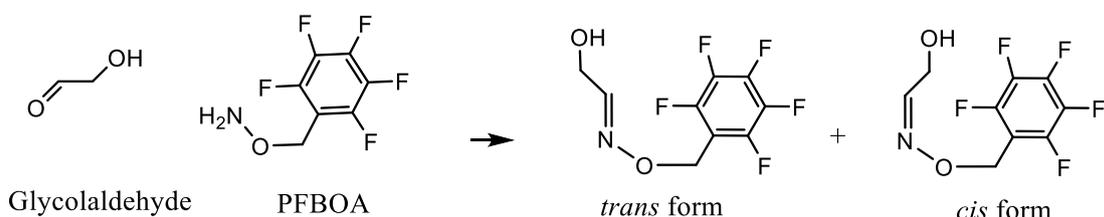


図 1 グリコールアルデヒドと PFBOA の誘導化

グリコールアルデヒドは事前検討の GC/MS により、分解物としてグリオキサールが含まれている事が分かっていた。又、グリコールアルデヒドを合成する際の前駆体は、クロロアセトアルデヒドである事が分かっていた為、特異性の対象として図 2 の 2 化合物を選択した。又、製造工程で使用する溶媒や試薬が残留しても評価に影響が無い事を確認し、試験法を最終化した。

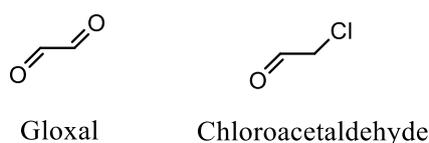


図 2 グリコールアルデヒドと特異性を担保した化合物

バリデーションの結果、試料濃度 5 mg/mL に対しグリコールアルデヒドの定量限界は 9.86 ppm、直線性は 10~200 ppm に対して相関係数 (r) =1.00、真度 (回収率) は 3 濃度で 100 ± 5 % 以内に入り、精度 (併行精度) は相対標準偏差 6 % と非常に良好な結果であった。又、溶液安定性は誘導化後 72 時間安定である事から、評価法として十分な性能を有している事を確認した。又、この試験法は技術移転先でも問題無く結果を再現し、滞りなく技術移転は完了した。

## 5. 原薬分析の今後

この様に、原薬の分析には様々なクロマトグラフィーが用いられており、その技術進歩も日進月歩である。本稿は原薬として低分子化合物の例を念頭に記載したが、抗体やペプチド、核酸等により手法や求められる性能は大きく変わって来る。SFC、2D-LC 等のクロマトグラフィーに加え、近年は MS の汎用化や高性能化が大きく進んでいる。評価に使われる装置はより多岐に広がり、場合によっては吸着等も考慮し、評価する化合物に対して装置を専用化して評価を実施する必要性もある。又、核酸については開発における指針となるガイドラインが未だ十分には整備されておらず、分離対象不純物やその管理値に関しても明確には定まっていない。このような流動的な環境においても、特異性・精度・感度等の分析法性能の向上を追求し、原薬の品質を担保して行く事が不可欠であり、今後の課題と認識している。

引用文献

- 1) J. Zhang, H. Zhang, M. Li, D. Zhang, Q. Chu, J. Ye、*J. Chromatogr. A*, **1217**, 5124–5129 (2010).
- 2) G. Zurek, U. Karst、*J. Chromatogr. A*, **864**, 191–197 (1999).
- 3) S. So, U. Wille, G. da Silva、*J. Phys. Chem. A*, **119**, 9812–9820 (2015).

参考文献

- 1) 日本分析化学会編、創薬の分析化学、開発タイムラインにそった全過程、丸善出版 (2011) .

< 執筆者略歴 > 柿田 穰 (Minoru KAKITA)

2007 年 3 月 東京大学大学院理学系研究科化学専攻修了  
2007 ~ 2009 年 武田薬品工業 CMC 研究センター開発分析研究所  
2012 年 3 月 東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了  
2012 年 4 月 エーザイ株式会社メディスン開発センター原薬研究部  
2018 年 4 月 エーザイ株式会社メディスン開発センター分析研究部

分析士資格 : LC 分析士二段、LC/MS 分析士初段



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

臨床分析／Clinical Analysis

岡橋美貴子／Mikiko OKAHASHI

特定非営利活動法人病態解析研究所／Institute of Biopathological Medicine

(Received November 20, 2021 ; Accepted December 1, 2021)

キーワード 臨床検査；生体試料；サンプリング；基準測定法

1. 始めに

臨床検査分野では、病気の診断、治療方針の決定及び予防などを目的とし、生体成分の量の変動や質の変化を測定する。血液、尿などを試料とし、低分子から高分子に渡る分析種が対象となる。臨床分析ではヒトの生体試料を用いるが、非生体試料とは異なる特徴があり、その取り扱いには多様な注意を必要とする。

臨床検査の現場では、多数の検体を処理する必要がある事、採取した試料は経時変化を受け易い事、緊急測定の必要時もある事などから、分析法は迅速で簡便でなければならない。その為、多くの項目は自動分析装置により測定されている。しかし、HPLC や LC/MS は、同一試料から多成分を同時に測定出来る、複雑な混合物から分析種を選択的に分離測定出来る、再現性に優れるなどの利点があり、それらの利点を生かし臨床検査分野でも有効利用されている。

本稿では、ヒト生体試料の特徴、取り扱いにおける基礎的事項や注意点について解説し、臨床検査分野における HPLC、LC/MS の分析例を紹介する。

2. 生体試料について

2.1 検査材料の種類

臨床において検査材料として扱われる物を表 1 に示した。これら検体からは、多くの情報を得る事が出来るが、生体内の状態を反映する分析値を得る為には、適切な取り扱いをする必要がある。これらのうち、一般に臨床分析の対象となるのは、全血、血清、血漿、尿である。

表 1 検査材料

検査材料	例
血液	全血、血漿、血清
体液	胃液、十二指腸液、脾液、唾液、脳脊髄液、胸水、心嚢水、陰嚢水、関節液、腫瘍内容液
排出物	尿、便、呼気、汗
組織片	生検材料、病理組織、細胞
分泌物	涙、乳汁、鼻汁、精液、膣分泌液
結石	胆石、腎結石、尿路結石、膀胱石

2.2 取り扱いの為のルール

ヒトの生体試料を取り扱う為には、法律・倫理上の遵守事項に留意しなければならない。

人体からの採血は、医師法やその他関連法規によって規定される有資格者でないと行えない。又、ヒト試料を研究目的に使用する場合には、インフォームドコンセントによる被験者の同意や所属機関における倫理委員会の承認が必要であり、検体は、特定の個人を識別出来ない様に匿名化、プール化するなど、個人情報保護に関する法律に準拠して適切に扱う必要が有る<sup>1)</sup>。又、論文報告においては、これらにルールに準拠している旨の記載が必要となる事もある。

### 2.3 感染対策

臨床検体からは、肝炎ウイルス、エイズウイルスなどの感染が問題となるが、感染源は現在知られているものに限らない。従って、臨床検体を取り扱う場合には、原則として「全ての検体が感染性微生物を含んでいる可能性が有る」として慎重に取り扱う必要がある。感染は、図 1 に示す様に「感染源」「経路」「宿主」の 3 要素により成立するが、其其への対策が必要となる。



図 1 感染対策

「感染源」を除去する為には、滅菌、消毒操作を行う。滅菌とは、全ての微生物を対象として殺滅又は除去する手段であり、火炎滅菌法、高圧蒸気滅菌法（オートクレーブ）、放射線滅菌法などがある。消毒とは、感染症を起こし得ないレベルまで対象微生物を殺滅又は減少させる手段であり、薬剤消毒、煮沸消毒、紫外線消毒などが有る。又、廃棄物は適正に処理する必要が有る。臨床試料の分析に使用した容器や器具、HPLC の廃液などは、環境省監修の「廃棄物処理法に基づく感染性廃棄物処理マニュアル」<sup>2)</sup>に従って処理する必要が有る。

「経路」における対策としては、針刺し、試料の皮膚粘膜への直接接触などには十分注意し、个人防护具（手袋、マスク、ゴーグル、フェイスシールド、ガウン、エプロンなど）の使用、手指衛生、環境管理などを行う。

「宿主」における対策としては、臨床分析に携わる者は、健康管理、ワクチン接種を行い、感染に対する抵抗力を維持して行く事が大切である。万が一、操作ミスなどで感染の危険に曝された場合は、直ちに医師に相談する。

### 2.4 臨床検査値に影響を与える因子

生体成分の量は、採取部位や採取時間によって一定ではない。採血は、安静空腹時が一般的であるが、分析種によっては部位、時間や時期、食事、運動、体位などにより変動す

る事が有る。臨床検査値に影響を与える因子を表 2 に示した。臨床検査値の変動には、病態の変化による変動以外にも、生理的変動や検体採取後の要因も有るので、検査値の判断には注意が必要である。生理的変動の例を表 3 に示した。個体間変動としては、性別、年齢、生活環境、生活習慣などが有り、個体内変動としては、日内リズム、食事、運動、ストレス、体位などが有る。

表 2 臨床検査値に影響を与える因子<sup>3)</sup>

変動の種類		因子
病態変動	病態の変化や医療行為による変動	病態変化、手術、輸血、透析、薬物投与
生理的変動	個体間変動	性別、年齢、人種、環境 生活習慣（運動、喫煙、飲酒、肥満、食事嗜好）
	個体内変動	季節差、気温差、妊娠、月経周期 食事、運動、日内リズム、体位、ストレス、飲酒、喫煙
検体採取時及び採取後の変動	採取時の変動	採血方法、駆血帯、クレンジング、採血部位、採血時の体位 採血管の選択、採血量、採血のタイミング、抗凝固剤の種類、 全血・血漿・血清の違い 尿の種類（随時尿、蓄尿）
	検体の取り扱いによる変動	採血後処置（攪拌など）、遠心分離条件 溶血、無栓放置、容器の形状 保存条件（温度、時間）

表 3 検査値の生理的変動<sup>3)</sup>

個体間変動

変動要因	検査項目例
性別	男>女：Hb、Ht、赤血球、クレアチニン、尿酸、血清鉄 女>男：LH、FSH、HDL-C
年齢	小児で低値：コリンエステラーゼ、AST、ALT、LD、CK、ビリルビン 小児で高値：総蛋白、免疫グロブリン、アミラーゼ、総コレステロール、白血球 閉経後高値：総コレステロール、TG、ALP
生活習慣	高脂肪食：総コレステロール、LDL-C、TG 高タンパク食：UN、アルブミン、アミノ酸 飲酒により高値：γGT、TG、AST、尿酸 喫煙により高値：WBC、CRP、フィブリノーゲン、CEA 喫煙により低値：HDL-C

個体内変動

変動要因	検査項目例
日内変動	朝>夜：ACTH、コルチゾール、血清鉄 昼>夜：総蛋白、尿酸、カリウム 夜>昼：UN、アミラーゼ
日差変動	TG、ビリルビン、鉄
食事	食後で高値：血糖、TG、インスリン、ALP 空腹時に高値：遊離脂肪酸
運動	運動後に高値：CK、AST、LD、ミオグロビン、乳酸、クレアチニン、白血球
体位	立位で高値（仰臥位に比して）：総蛋白、レニン、アルドステロン、エピネフリン

### 3. 生体試料の取り扱い

生体成分は、体外へ採取されると代謝や分解などを受け変化する事が有る。従って、適切な採取や取り扱いの後に測定されないと、検査結果の正しい解釈は出来ず、正しい診断や治療に繋がらない。測定前の検体採取、保存、前処理などの過程も大変重要となる。

#### 3.1 血液の採取

臨床分析に用いられる血液試料としては、主に静脈血が用いられるが、必要に応じて動脈血や毛細管血が用いられる。動脈血は、生死に直接関わる血液ガスや酸塩基平衡の測定に用いられ、毛細管血は、血糖値の自己測定などに用いられる。静脈血、動脈血、毛細管血で差が認められる成分もある。

静脈血は、通常肘静脈から採取するが、採血針は一般的に 21~24G (内径 0.5~0.3 mm) が用いられる。針は細い方が痛みは少ないが、溶血や血小板の活性化を起こし易く、採血に時間が掛かる事により血液が凝固してしまう事も有るので注意が必要である。採血時の体位も分析結果に影響を与える事が有る。殆どの細胞や高分子成分は仰臥位より立位で濃度が高くなる事が知られている。又、駆血帯の使用や、掌をグーパーさせるクレンチングによりカリウム濃度が上昇する事が知られている。

#### 3.2 尿の採取

尿は、非侵襲的検査として容易に採取出来る検体である。しかし、食事や飲水量などの日常生活での変動、検体放置による目的成分の変化などが有るので注意を要する。尿の採取には、目的に応じて早朝第一尿、随時尿、24 時間尿 (蓄尿)、負荷後尿を選択する。早朝第一尿は濃縮しており成分が安定している為、尿定性検査に適している。外来受診時の随時尿は早朝尿に比して一般に希釈されている。畜尿はタンパク質やホルモンなどの定量に用いられる。

#### 3.3 全血、血漿、血清と採血管

血液は、有形成分である赤血球、白血球、血小板と液性成分である血漿、血清に分けられる。採取した血液そのものを全血と言う。抗凝固剤の入った採血管で採血して遠心分離すると、血球成分が沈降するが、その上清が血漿 (plasma) であり、血漿は凝固因子を含む。一方、抗凝固剤の入っていない採血管で採血して放置すると血球成分は凝血する。これを血餅と呼び、その上清が血清 (serum) であり、血清は凝固因子を含まない (図 2)。血漿と血清は、目的とする検査項目によって使い分けられ、血漿を得る際に用いる抗凝固剤も検査項目によって使い分けられている。採血管の種類を表 4 に示した。

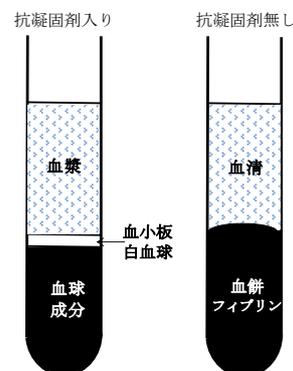


図 2 血漿と血清

表 4 採血管の種類<sup>4)</sup>

抗凝固剤の有無	添加剤	目的試料	分析項目
抗凝固剤無し	無し	血清	一般生化学項目
	凝固促進剤	血清	一般生化学項目
抗凝固剤有り	EDTA塩	全血、血漿	血液学的検査
	ヘパリン	全血、血漿	一般生化学項目、電解質、薬物濃度、pH
	クエン酸ナトリウム	全血、血漿	凝固系検査、赤血球沈降速度
	フッ化ナトリウム	血漿	血糖

### 3.4 血液の分離操作

血漿や血清を得る為には、遠心分離を行う。血清を得る際は、遠心分離の前に 10 分～30 分静置して凝固反応を終了させる必要がある。凝固反応が不十分であると血清中にフィブリンが析出し、正確な血清の分取が出来なくなる事がある。又、不安定な分析種の場合には冷却遠心機を用いる。

### 3.5 サンプルング操作

試料の分取には、マイクロピペットが使用されるが、血液試料を一定容量分取する際には注意が必要である。全血、血漿、血清は水溶液に比して粘性が高い為、ピペットの設定量よりも分取量が少なくなり易く、再現性も悪くなり易い。分注精度を保つには取扱説明書の基本的な

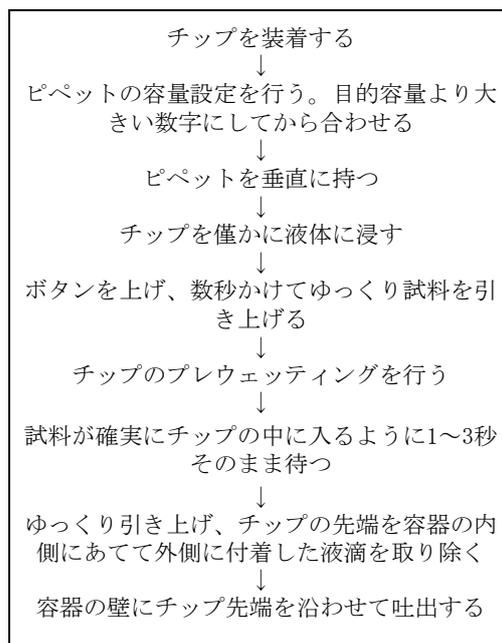


図 3 マイクロピペットの基本的操作例

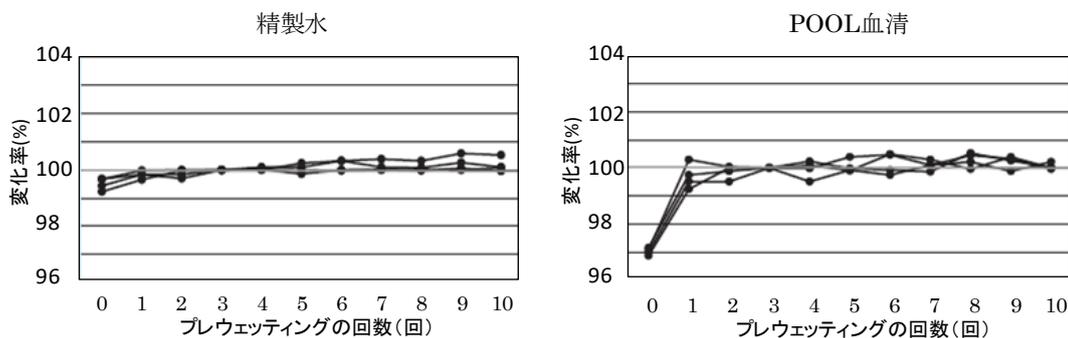


図 4 プレウエットの回数による違い<sup>5)</sup>

精製水と POOL 血清 500  $\mu$ L をプレウエットの回数を 0～10 回まで変化させ、分注した。プレウエットを 3 回行った時の重量を基準(100%)とし、各プレウエット回数における 4 名其々の変化率を示した。

操作方法に従って使用する必要がある。マイクロピペットの基本的操作例を図 3 に示す。粘性の高い血液試料では、プレウェッティング及びリバースピペッティングが有用である。血清試料におけるマイクロピペットの分注精度を検討した報告<sup>5)</sup>において、プレウェッティングを行う事で分注精度が高まる事が示されている (図 4)。又、血清では、リバースピペッティングの方がフォワードピペッティングより良好な再現性が得られた事が示されている。

### 3.6 溶血

血液試料の場合は、溶血を起こさない様に注意する必要がある。溶血とは、赤血球が壊れ赤血球中からヘモグロビンが出て来る事により、血清や血漿が赤くなる事である。採血中やピペッティング時の泡立ち、細い採血針による吸引、採血量不足による真空採血管内の陰圧、容器の濡れ、容器の激しい振り混ぜ、全血での長時間放置などにより溶血する。血漿や血清を用いる分析において、溶血は赤血球中に多く含まれる成分の正誤差をもたらす、又赤く着色する事により測定系に影響を及ぼす事が有る。溶血による血液成分の変化を表 5 に示した。原則的には溶血した検体は検査に用いる事は出来ない。

表 5 溶血による血清測定値の変化

理由	成分	溶血による変化
血清・血漿中よりも血球内の濃度が高い成分の漏出	カリウム	↑
	LDH	↑
	AST(GOT)	↑
	アルドラーゼ	↑
	鉄	↑
ヘモグロビンによる測定系への影響	尿酸	偽高値
	ビリルビン	偽高値
溶血で漏出したプロテアーゼの影響	インスリン	↓
	BNP	↓

### 3.7 保存

採取した試料は、採取後の放置、搬送、保存により、化学的、生物学的変化を受ける可能性が有るので、採取後の試料は適切な取り扱いや保存をする必要がある。分析種の安定性に影響を及ぼす主な化学的因子としては、酸化、付加、縮合、環開裂、酸加水分解、アルカリ加水分解が有り、生物学的因子としては、酵素的加水分解、酵素分解、リン酸化、取り込み、生合成が有る<sup>6)</sup>。表 6 に採血後放置による血清成分の変化、表 7 に採尿後放置による尿検査の変化を示した。採取した試料は直ちに分析を行うのが理想であるが、実際には或る期間保存した後に分析する事も多い。試料を保存する際には、化学的な安定性及び生物学的な安定性の 2 点から、変質の 3 因子と言われる温度、酸素、水に留意して対策を講じる<sup>6)</sup>。

表 6 放置による血清成分の変化<sup>4)</sup>

成分	検査値の変化	原因
アンモニア	↑	アミノ酸の異化
ピルビン酸	↑	解糖
乳酸	↑	解糖
グルコース	↓	解糖
カリウム	↑	赤血球中からの放出により血清濃度上昇
遊離脂肪酸	↑	リポプロテインリパーゼ、ホスホリパーゼの作用
コレステロールエステル	↑	レシチン-コレステロールトランスフェラーゼの作用
遊離コレステロール	↓	レシチン-コレステロールトランスフェラーゼの作用
各種酵素	↓	失活による
ビリルビン	↓	光による化学変化
ビタミンA,B,C,E	↓	光による化学変化

表 7 放置による尿検査の変化<sup>3)</sup>

項目	変化	原因
色調	濃黄褐色化	ウロビリノゲンの酸化
混濁	増強	塩類析出、細菌増殖、腐敗
pH	アルカリ性	細菌増殖による尿素の分解
ブドウ糖	減少	細菌増殖による消費
ウロビリノゲン	減少	酸化されてウロビリニン体に変化
ビリルビン	減少	酸化されてビリベルジンに変化 光による化学変化
ケトン体	減少	アセトン、アセト酢酸の蒸発、細菌による消費
潜血反応	亢進後陰性化	
亜硝酸塩	増加後陰性化	
沈査成分	観察困難	

化学的安定性を保つ為には、低温保存、pH 調整、抗酸化剤の添加などが有効である。生物学的変化には、酵素や微生物による分析種の分解、代謝産物や繁殖による汚染などが有るが、安定性を保つ為には、酵素や微生物の活性を止める事が必要となる。低温保存、pH 調整、酵素阻害剤や防腐剤の添加、ろ過、熱処理、乾燥などが有効である。添加剤を使用する場合は、分析種への影響やクロマトグラムへの影響についても考慮する必要がある。

低温保存には、冷蔵庫、冷凍庫などが用いられる。試料が余り不安定でなく期間が短い場合には冷蔵保存が可能であるが、全血の場合、氷水に漬ける氷冷での保管が望ましい。 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下では多くの項目を安定して長期保存する事が可能である。温度が低い程安定に保存出来ると考え易いが、例外が有るので注意する。例としては、室温より冷蔵下で失活し易い酵素乳酸デヒドロゲナーゼ、凍結融解により粒子が破壊されるリポタンパク、 $-10^{\circ}\text{C}$ より冷蔵の方が安定な HbA1c が有る。

凍結した試料の融解は、冷蔵庫内、室温下、流水中などで行うが、試料に適した方法を用いる。水分が先に融解して上部に移動する事から、融解後は濃度勾配が生じる。又、固形成分が析出する事も有るので、良く混和する必要がある。遠心機でスピンドウンしてから分析に供する事が望ましい。

### 3.8 前処理

#### 3.8.1 前処理の目的

血漿や血清は、約 90 %は水分で、約 7~8 %がタンパク質であり、その他約 1~2 %にグルコース、無機物質、ビタミン、ホルモンなど様々な物質が含まれる。この様に複雑なマトリックスをもつ試料の分析には、全血から血清及び血漿に分離した後、更に前処理を行う必要が有る場合が多い。前処理の主な目的は、妨害物質の除去と分析種の濃縮である。

#### 3.8.2 除タンパク

血清や血漿中に存在するタンパク質は、分析を妨害する事がある。又、酵素などが分析種と反応して分析種の濃度を減少させたり、採血後に分析種を産生したりして濃度を上昇させる事も有る。更に、HPLC 注入試料に多くのタンパク質が含まれているとカラムに吸着し、カラムの劣化に繋がる。これらの問題を解決する為に除タンパク操作が行われる。有機溶媒であるエタノール、アセトニトリル等、酸であるメタリン酸、過塩素酸等を試料に加えてタンパク質を不溶化させる方法やカラムスイッチング法などが用いられる。

#### 3.8.3 抽出

分析種の濃縮と妨害物質の除去の両方を目的として、溶媒抽出や固相抽出が行われる。溶媒抽出は操作性や環境への影響から固相抽出に置き替えられつつある。

溶媒抽出は、試料水溶液と混じり合わない酢酸エチルやベンゼンなどの有機溶媒を用いて、分析種を有機溶媒に抽出する方法である。固相抽出は、選択性のある充填剤を詰めたカートリッジを用いて、分析種と妨害物質を分離する方法である。溶媒抽出に比較して、操作が容易で回収率や再現性も優れており、自動化システムも有る。

## 4. 臨床検査分野における HPLC、LC/MS を用いた分析

臨床検査の現場では、自動分析装置による分析が主流で、HPLC や LC/MS が用いられる項目は少ない。血清や血漿をそのままセットするだけで、短時間に多数の検体を処理する事が出来る自動分析装置に対し、HPLC や LC/MS は操作性や処理能力で劣る。しかし、HPLC や LC/MS は、分離分析法としての利点がある為、精度、正確さを求める基準測定法への利用、研究や診断支援への活用がなされている。日常測定法としては、自動分析装置ではカバー出来ない項目の専用装置が用いられており、自動化された装置の開発も進んでいる。

### 4.1 基準測定法としての HPLC、LC/MS の利用

基準測定法は、標準物質やコントロール試料の値付け、日常測定法の評価などに利用される。日本臨床化学会の勧告法として HPLC、LC/MS が用いられているのは、HbA1c、GA (グリコアルブミン)、尿酸、クレアチニン、25 ヒドロキシビタミン D の 5 項目である。

ここでは、HbA1c、GA、25 ヒドロキシビタミン D について紹介する。

#### 4.1.1 HbA1c

HbA1c はヘモグロビンの  $\beta$  鎖にグルコースが結合した糖化タンパク質で、過去 1~2 ヶ月の平均血糖値を反映する事から糖尿病の指標として使用されている。HbA1c の日常測定法としては、HPLC による専用装置の他、免疫法や酵素法が用いられており、測定値の測定法間差や施設間差が問題となっていた事から国際的な標準化が行われた。HPLC の KO500 法が日本臨床化学学会の実用基準法として用いられており、LC/MS が IFCC (国際臨床化学連合) 基準測定法として用いられている。

KO500 法<sup>7)</sup>は、陽イオン交換カラムによりヘモグロビンを細分画し、安定型 HbA1c を分析する方法である。全血より分離した赤血球を希釈溶血させ、遠心分離した上清を HPLC 注入試料とする。常用参照標準物質により校正し HbA1c 値を算出する (図 5)。精度・再現性が良好であり、日本国内における HbA1c の標準化に活用されている。

IFCC 基準測定法<sup>8)</sup>は、全血を試料とし、endproteinase Glu-C を用いた酵素消化で生成したヘモグロビン由来の糖化ペプチドと非糖化ペプチドを ODS カラムにより分離し、MS で検出する方法である。一次校正物質で校正し HbA1c 値を算出する (図 6)。国際的な HbA1c の標準化に活用されている。

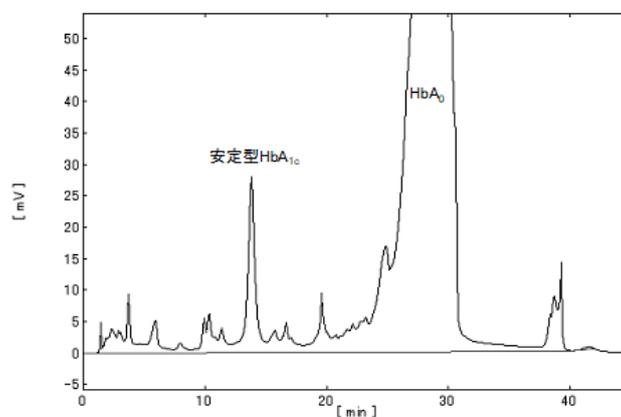


図 5 KO500 法による健常人血液のクロマトグラム

カラム : TSKgel Glyco Hsi (内径 4.6 mm、長さ 100 mm、東ソー)  
 移動相 A : 20 mmol/L MES, 20 mmol/L HEPES, 0.01 % NaN<sub>3</sub> (pH 5.20)  
 移動相 B : 20 mmol/L MES, 20 mmol/L HEPES, 400 mmol/L NaCl, 0.01 % NaN<sub>3</sub> (pH 7.0)  
 流速 : 0.4 mL/min  
 カラム温度 : 25 °C  
 リニアグラジエント (移動相 B の%)  
 18 % (0 min) - 19 % (10 min) - 23 % (16 min) - 24 % (17 min) - 27 % (35 min) - 80 % (36 min)  
 - 80 % (38 min) - 18 % (38.1 min) - 18 % (50 min)  
 検出 : 415 nm

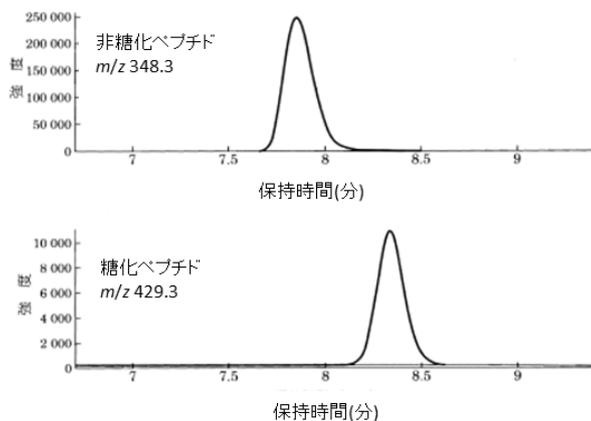


図 6 IFCC 法における SIM クロマトグラム

カラム : Develosil ODS-HG-5 (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、野村化学)  
 移動相 A : 0.1 % 酢酸 / 水  
 移動相 B : 0.1 % 酢酸 / アセトニトリル  
 リニアグラジエント (移動相 B の%)  
 6.5 % (0 min) - 12.5 % (6 min) - 12.5 % (12 min) - 80 % (12.8 min) - 80 % (21 min)  
 流速 : 0.3 mL/min  
 カラム温度 : 50 °C  
 イオン化法 : ESI (+)  
 測定モード : SIM  
 測定イオン :  $m/z$  348.3 (NG-B) 、  $m/z$  429.3 (G-B)

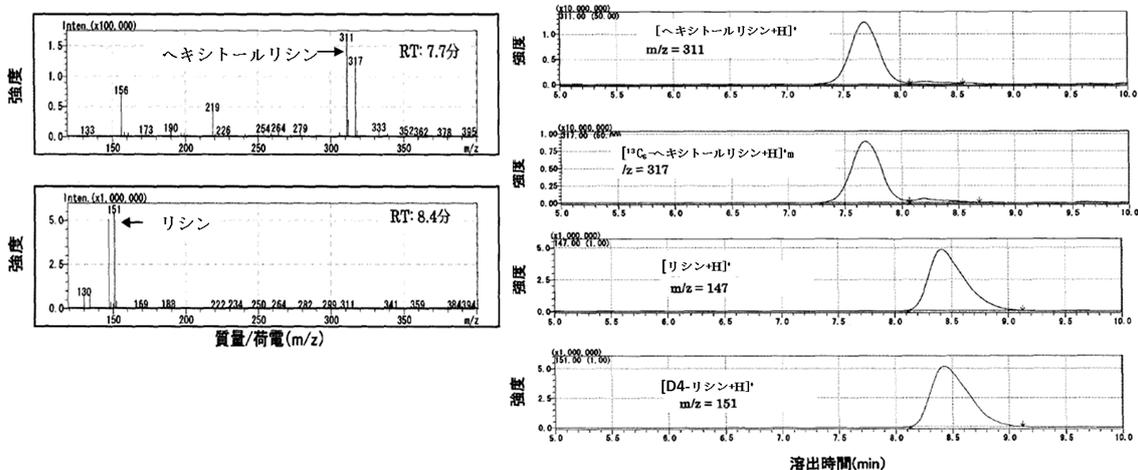


図 7 GA の基準測定操作法における糖化リシンと非糖化リシンのマススペクトルと SIM クロマトグラム 9)

カラム : Shim-pack VP-ODS (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、島津製作所)  
 移動相 A : 0.08 % ヘプタフルオロ酢酸  
 移動相 B : アセトニトリル  
 リニアグラジエント (移動相 B の%) :  
 3 % (0 min) - 8 % (8 min) - 80 % (8.1 min) - 80 % (10 min) - 3 % (10.1 min) - stop (22 min)  
 流速 : 0.2 mL/min  
 カラム温度 : 室温  
 イオン化法 : ESI (+)  
 測定モード : SIM  
 測定イオン :  $m/z$  311、 $m/z$  317、 $m/z$  147、 $m/z$  151

#### 4.1.2 GA (グリコアルブミン)

GA は血中のアルブミンにグルコースが結合したもので、過去 2 週間程度の血糖平均値を反映する糖尿病の指標である。日常測定法として以前は、陰イオン交換カラムとホウ酸アフィニティーカラムによるカラムスイッチング法が用いられていたが、現在では自動分析装置による酵素法が主流となっている。基準測定法として、LC/MS を用いた同位体希釈質量分析法が用いられている<sup>9)</sup>。この方法は、血清を試料とし、陰イオン交換カラムによりアルブミンを分取した後、加水分解し、遊離した糖化リシン及び非糖化リシンを測定対象物質とする。糖化リシンと非糖化リシンを ODS カラムで分離し、同位体希釈質量分析法により GA 値 (mmol/mol) を算出する (図 7)。

#### 4.1.3 25 ヒドロキシビタミン D

25 ヒドロキシビタミン D は、ビタミン D 欠乏に伴って起こる疾患の診断に重要な指標である。日常測定法は免疫法であるが、複数のキットの存在から測定法間差が問題となっている。基準測定法として LC/MS/MS が用いられている。

血漿又は血清をメタノールで除タンパクした後、固相抽出を行い注入試料とする。ビタミン D<sub>2</sub> (エルゴカルシフェロール) とビタミン D<sub>3</sub> (コレカルシフェロール) の 25 位が水酸化された 25-OH-D<sub>2</sub>、25-OH-D<sub>3</sub>、24,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> を測定対象とし、[2H<sub>6</sub>]-25-OH-D<sub>3</sub> を内標準物質とする測定法である (図 8)。

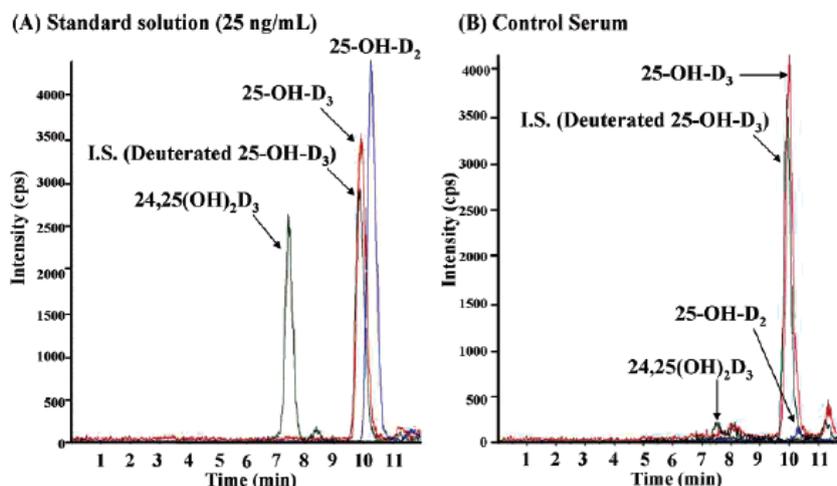


図 8 25 ヒドロキシビタミン D 測定法における SRM クロマトグラム<sup>10)</sup>

カラム : CAPCELL PAK C18 UG120 (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、資生堂)  
 移動相 : メタノール : 水 (95:5、v/v)  
 流速 : 0.5 mL/min  
 イオン化法 : APCI (+)  
 測定モード : SRM  
 測定イオン (*m/z*) : 25-OH-D<sub>3</sub> 401/4 → 257.0  
 25-OH-D<sub>2</sub> 413.4 → 355.4  
 [2H<sub>6</sub>]-25-OH-D<sub>3</sub> 407.4 → 263.4

#### 4.2 日常測定法としての HPLC、LC/MS の利用

日常測定法として HPLC、LC/MS が用いられている項目には、HbA1c、アミノ酸、カテコールアミン類、リポタンパク質、薬物血中濃度などがある。HPLC、LC/MS は、分離分析法の利点を生かして用いられているが、日常測定法として普及するには、複雑な前処理操作が無い事、人手をなるべく使わない自動化システムである事、設定されている保険点数に見合ったコストである事なども必要となる。ここでは、HbA1c、アミノ酸、薬物血中濃度について紹介する。

##### 4.2.1 HbA1c

陽イオン交換カラムを用いた HPLC 法による専用装置が臨床検査の現場で用いられている。代表的な 2 装置<sup>11)12)</sup>の測定結果レポートの印字例を図 9 に示す。試料の前処理は不要で、採血管のまま全血をセットする事で分析が出来る。1 検体の処理時間は 30 秒以内であり、安定型 HbA1c は単離されていないが、標準物質による校正を行う事により標準化された HbA1c 値を得る事が出来る。

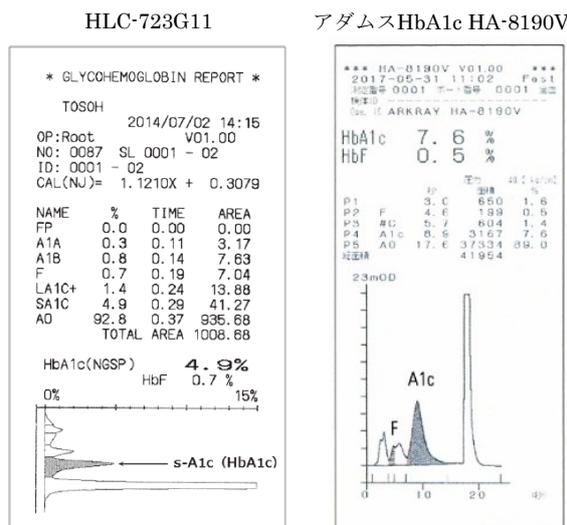


図 9 HbA1c 分析装置の結果レポート<sup>11),12)</sup>

##### 4.2.2 アミノ酸

血中アミノ酸は、先天的アミノ酸代謝異常症の診断、肝機能不全の重症度判定や治療の指標、栄養状態不良の患者の病態把握、各種癌のリスク評価などに用いられ、HPLC による自動分析計や LC/MS が用いられている。

アミノ酸自動分析計では、陽イオン交換カラムにより分離し、ニンヒドリンポストカラム誘導体化により検出する。この方法は伝統的な方法で、安定性及び信頼性をもって現在でも使い続けられている。40 種の生体アミノ酸をベースライン分離で精度良く分離測定する事が出来る (図 10)<sup>13)</sup>。

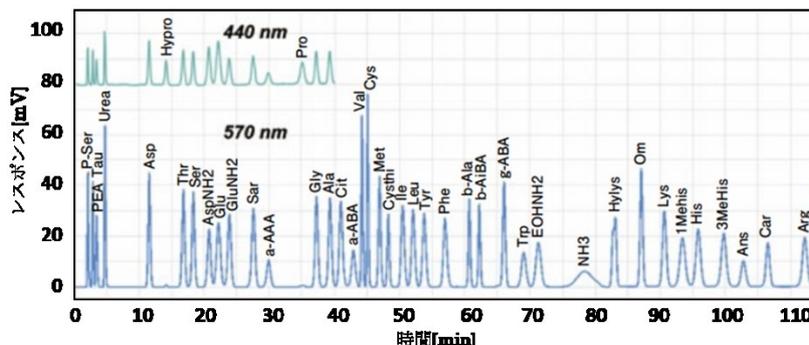


図 10 アミノ酸自動分析計による 40 成分の分析例<sup>13)</sup>

近年、プレカラム誘導体化法による LC/MS が開発され、短時間で感度の良い測定が可能となった (図 11)<sup>14)</sup>。この方法は、日本臨床化学会のプロジェクトとして行われた血漿アミノ酸濃度の基準範囲の設定に使用された。血液の採取、試料の調製、保管などの管理方法から濃度測定に至る迄の有らゆる工程における変動因子について詳細に検討された後に実施された。又この方法は、疾病などのリスクスクリーニングにも用いられている。短時間の分析法であると共にプレカラム誘導体化を自動化して複雑な前処理操作を省いた事により臨床応用が可能となったと言える。

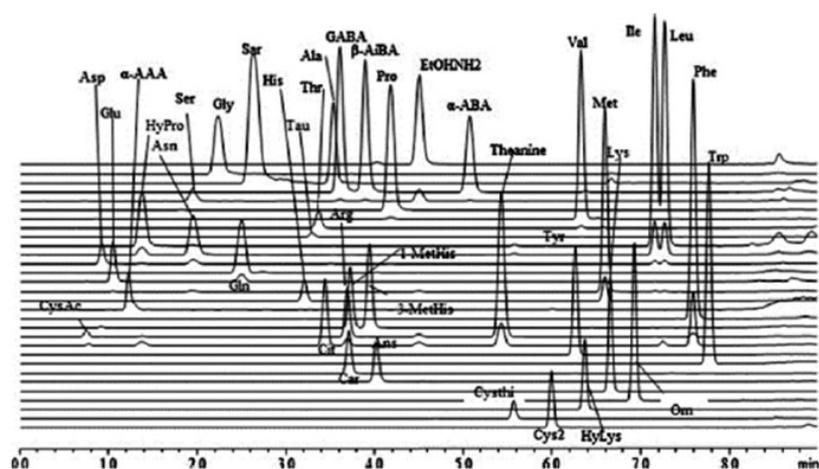


図 11 アミノ酸自動分析用プレカラム誘導体化 LC-MS による分析例<sup>14)</sup>

#### 4.2.3 薬物血中濃度

薬物血中濃度は、個々の患者に適した投与設計を行い、適正な薬物療法を行う事を目的として測定され、薬物動態学的な解析を基に最適な薬用量、投与法を設定する為に利用される。測定には自動分析装置による免疫法が汎用されているが、免疫法は、多くの検査試薬の存在による試薬間差・施設間差の問題、抗体の継続的な供給が難しいなどの問題を有するのに対し、HPLC や LC/MS は、施設間差の小さい継続性のある測定が可能であると言う利点がある。又、HPLC、LC/MS は、代謝物或いは併用薬物を同時にモニタリングする場合にも有用である。しかし、汎用 HPLC や LC-MS による自施設測定を行える施設は限られているのが現状である。又、前処理や装置の操作において分析者の手技に由来するばらつきが問題となる場合も有る。この様な課題を解決するべく、医療現場向けの HPLC システムや全自動前処理装置付き LC-MS/MS システムが開発されている。

医療現場向けの HPLC システムとして開発された装置では、オペレーターの知識・経験に左右される事なく安定した測定結果を出す事を目的として、分析前のコンディショニング、分析条件の設定、日常的な装置の性能確認などを自動で実施するソフトウェアが搭載されている。抗てんかん薬や抗菌薬 (カルバマゼピン、フェニトイン、ラモトリギン、ポリコナゾール) の分析に応用されている<sup>15)</sup>。

全自動前処理装置付き LC-MS/MS システムとして開発された装置では、採血管をセットするだけで前処理から質量分析まで自動で分析する事が出来る。自動前処理装置で有機溶媒による除タンパクを行った後、LC-MS/MS で分析される。キャリブレーター、精度管理試料、内標準物質としての安定同位体、カラムセット、移動相が含まれる分析キットを用いた免疫抑制薬 4 種（シクロスポリン、タクロリムス、エベロリムス、シロリムス）の分析結果が報告されている（図 12）<sup>16)</sup>。この装置の開発は、2020 年度に日本臨床化学会の学会賞を受賞した。

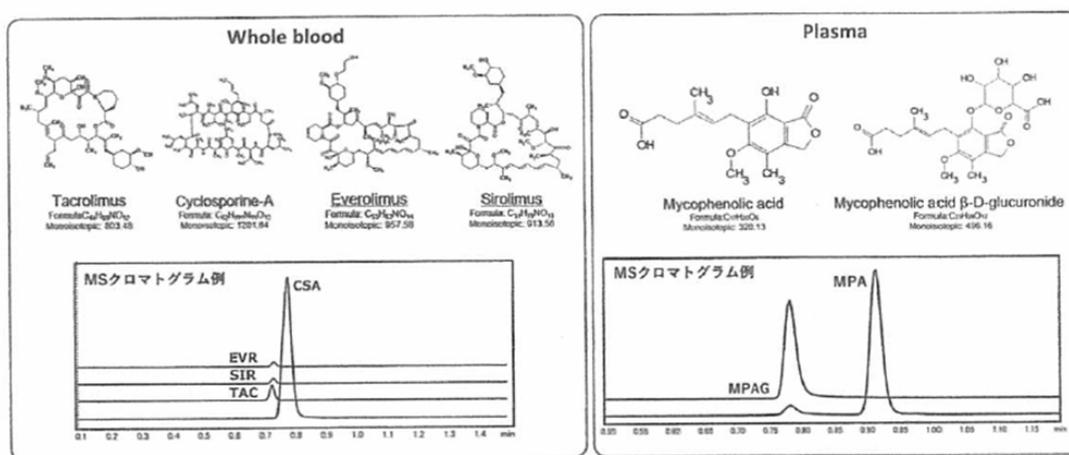


図 12 自動前処理装置付き LC-MS/MS システムを用いた免疫抑制薬の分析 <sup>16)</sup>

## 5. 終わりに

生体試料は、その特徴を十分理解した上で取り扱い、分析結果を判断する必要がある。臨床検査分野において、HPLC や LC/MS はその利点を生かして有効利用されている。自動化された装置の開発も進んでおり、HPLC や LC/MS の臨床検査分野への更なる貢献が期待される。

## 引用文献

- 1) 臨床検査を終了した既存試料（残余検体）の研究、業務、教育の為の使用について一日本臨床検査医学会の見解－2021 年改訂、日本臨床検査医学会 HP より  
<https://www.jslm.org/committees/ethic/zanyokentai20211016.pdf>（2021 年 11 月確認）
- 2) 廃棄物処理法に基づく感染性廃棄物処理マニュアル、環境省 環境再生・資源循環局監修、環境省 HP より、<https://www.env.go.jp/recycle/kansen-manual1.pdf>（2021 年 11 月確認）
- 3) 日本臨床医学会ガイドライン作成委員会、臨床検査のガイドライン、日本臨床医学会（2018）。
- 4) 大川龍之介、ぶんせき、**1**、2-8 (2020)。
- 5) 古川聡子ら、医学検査、**67**、44-51 (2018)。

- 6) 中村 洋、LC と LC/MS の知恵、**1**、69-76 (2021).
- 7) 日本臨床化学会糖尿病関連指標専門委員会、臨床化学、**38**、163-176 (2009).
- 8) P. Kaiser, *et al.*, *Clin Chem*, **54**, 1018-1022 (2008).
- 9) 日本臨床化学会糖尿病関連指標専門委員会、臨床化学、**37**、178-191 (2008).
- 10) N. Tsugawa, *et al.*, *Anal. Chem.*, **77**, 3001-3007 (2005).
- 11) TOSOH Research & Technology Review、**59**、51-56 (2015).
- 12) アークレイ(株)HP より(2021年11月確認)  
[http://www.arkray.co.jp/japanese/products/lab/hba1c/ha-8190v\\_2.html](http://www.arkray.co.jp/japanese/products/lab/hba1c/ha-8190v_2.html)
- 13) 伊藤正人、和光純薬時報、**86**、15-17 (2018).
- 14) 宮野 博、*BUNSEKI KAGAKU*、**69**、329-339 (2020).
- 15) 森川 剛、THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS、**63**、5564-5571 (2020).
- 16) 川上大輔、臨床化学、**50**、373-379 (2021).

#### 参考文献

- 1) 分析化学ハンドブック編集委員会、分析化学ハンドブック、朝倉書店 (1992).
- 2) 日本分析化学会関東支部、高速液体クロマトグラフィーハンドブック改訂第 2 版、丸善 (2000).

#### <執筆者略歴> 岡橋美貴子 (Mikiko OKAHASHI)

- ・ 特定非営利活動法人病態解析研究所・理事  
(〒243-0813 神奈川県厚木市妻田東 2-10-6)
- ・ 東京薬科大学大学院薬学研究科修士課程修了後、慶応義塾大学医学部薬化学研究所に勤務、1997年病態解析研究所に移籍
- ・ 分析士資格：LC 分析士三段



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

健康食品及び危険ドラッグ等に含有される医薬品成分等の分析／  
Determination of Pharmaceutical Adulterants in Health Foods  
and New Psychoactive Substances-Containing Drugs

坂本美穂／Miho SAKAMOTO

東京都健康安全研究センター／Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

(Received November 19, 2021 ; Accepted December 5, 2021)

キーワード 健康食品；危険ドラッグ；医薬品成分；分析；定量；HPLC

要旨

健康食品の中には効果を高め、商品価値を上げる目的で医薬品成分等が含有されている事が有り、この様な医薬品成分等による健康被害が懸念されている。又、危険ドラッグは飲用や吸引等により多幸感や陶酔を高めるものとして販売され、麻薬や覚せい剤等に作用が類似する薬物が含有されている事から、社会問題になっている。この様な健康食品や危険ドラッグ等は含有されている化合物が未知である事、品質が一定ではない事、分析に使用出来る試料量が場合によって僅少である事等の特徴が有る。そこで、本稿では上記の様な特徴を踏まえ、健康食品や危険ドラッグ等を分析試料として取り扱う際の留意点等を紹介する。

1. 外観・性状の確認

様々な分野の分析で共通と考えられるが、健康食品及び危険ドラッグ等に含有される医薬品成分等の分析は、試料の写真撮影など外観や性状を記録する所から始まる。その際、試料が入っている外箱や外袋から有効な情報を得られる事がある。例えば、写真 1 は PDE-5 阻害作用を有する化合物が含有された健康食品のものであるが、外箱に「NEW」というシールが貼られていた。この写真の製品からは thioquinapiperifil という PDE-5 阻害作用を有する化合物が検出されたが、

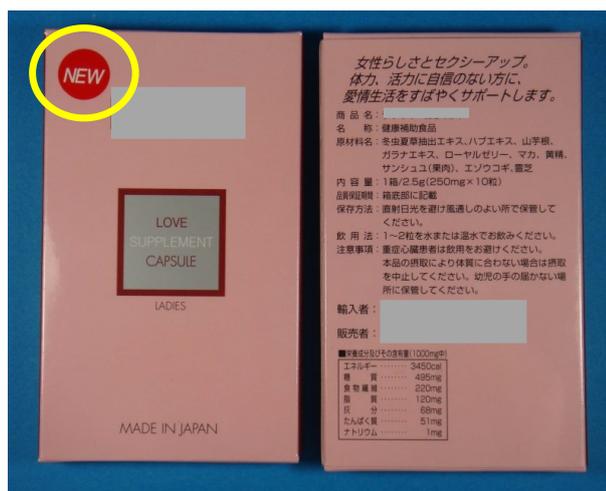


写真 1 PDE-5 阻害作用を有する化合物が検出された健康食品  
写真左上の黄色の枠で囲んだ部分に「NEW」のシールが貼られている。

「NEW」というシールが貼られていない製品からは homosildenafil という PDE-5 阻害作用を有する別の化合物が検出された。この様な健康食品では、同じ外観で同じ名称の製品でも入手時期の違い等により含有される化合物が異なる事がよく有る。その為、外箱や外袋の僅かに異なる点に含有される化合物の違いが反映されている事が有り、試験を実施する上で有用な情報となる。



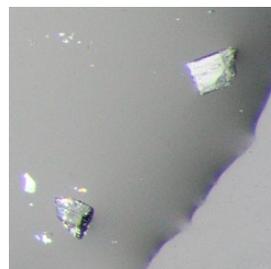
**写真 2** ダイエットを目的として個人輸入された医薬品  
錠剤表面に「CHINTA」という刻印が認められる。

又、錠剤やカプセルの場合、試料そのものに含有成分を示す刻印や印字を確認出来る事が有る。写真 2 は、ダイエットを目的として個人輸入された医薬品の錠剤のものであるが、「CHINTA」という刻印が認められた。インターネットで調べると、有効成分として緩下薬の *bisacodyl* 及び *dioctyl sodium sulfosuccinate* を含有する医薬品である事が分かった。この錠剤は、

使用により消費者に健康被害が生じて、試験依頼されたものであるが、この様な場合、消費者が使用した試料の残りが僅かである為、分析に使用出来る試料が 1~2 錠程度しか入手出来ない事が有る。その為、試験前に可能な限り、含有成分に関する情報を得ておく事が大切である。

一方、試料が粉末の場合、目視で食塩の様な無機物の粉末が疑われる場合がある。この様な粉末では、通常、薬物等のスクリーニングで用いる LC 条件ではピークが認められない事が多い。この様な場合、FT-IR や蛍光 X 線等を用いる事により、ミョウバンの結晶と判明した事例が報告されている<sup>1)</sup>。通常、外観だけで何の粉末かを判断する事は困難であるが、分析対象試料の観察により、場合によっては、或る程度、当たりが付く事も有る。

又、粉末試料を顕微鏡で観察すると、X 線装置で構造解析可能な単結晶が含まれている事が有る (写真 3)。危険ドラッグから検出された新規薬物の構造解析に関する論文では、危険ドラッグとして販売された粉末中の単結晶をそのまま測定している報告が有る<sup>2), 3)</sup>。実際に、我々の研究室でも粉末中に含有された 2 種類の単結晶について、X 線構造解析を実施し、図 1 の様に、含有された薬物を明らかにする事が出来た。この様に単結晶を用いた X 線構造解析は、薬物の同定にとって強力なツールであるが、その結果は測定した単結晶の構造解析結果ではない。従って、危険ドラッグとして販売された粉末の試験結果としては、粉末全体を反映する様にサンプリングした試料溶液を用いて LC 等で分析する必要がある。



**写真 3** 危険ドラッグとして販売された粉末中の単結晶

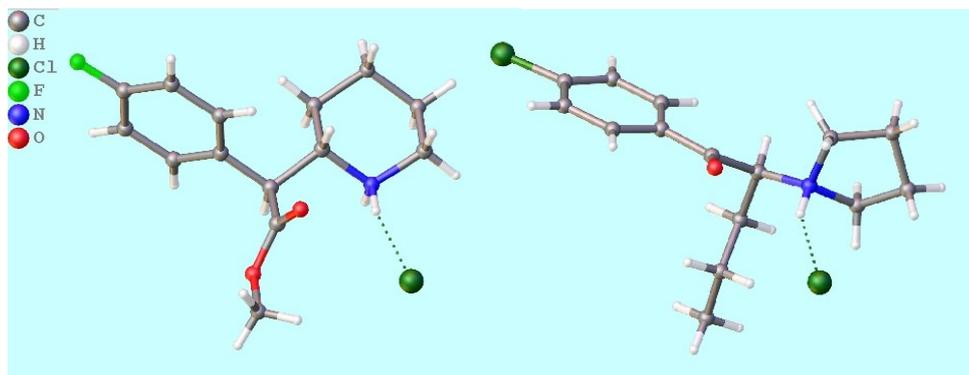


図 1 危険ドラッグとして販売された粉末中に含有された 2 種類の単結晶の X 線構造解析結果

## 2. 試料のサンプリング

試料の外観や性状を確認した後、サンプリングを実施する。危険ドラッグとして販売される粉末は、標準品として使用出来る程、高純度の薬物から成る事も有るが、複数の薬物が混合されている事も有る。図 2(a)は、複数の薬物が検出された粉末の試料溶液の LC クロマトグラムであるが、検出された薬物のピーク高さは、薬物 A > 薬物 B > 薬物 C の順であった。一方、図 2(b)は、同じ粉末から 2 回目にサンプリングした試料溶液のクロマトグラムであるが、検出された薬物のピーク高さは、薬物 B > 薬物 A > 薬物 C と 1 回

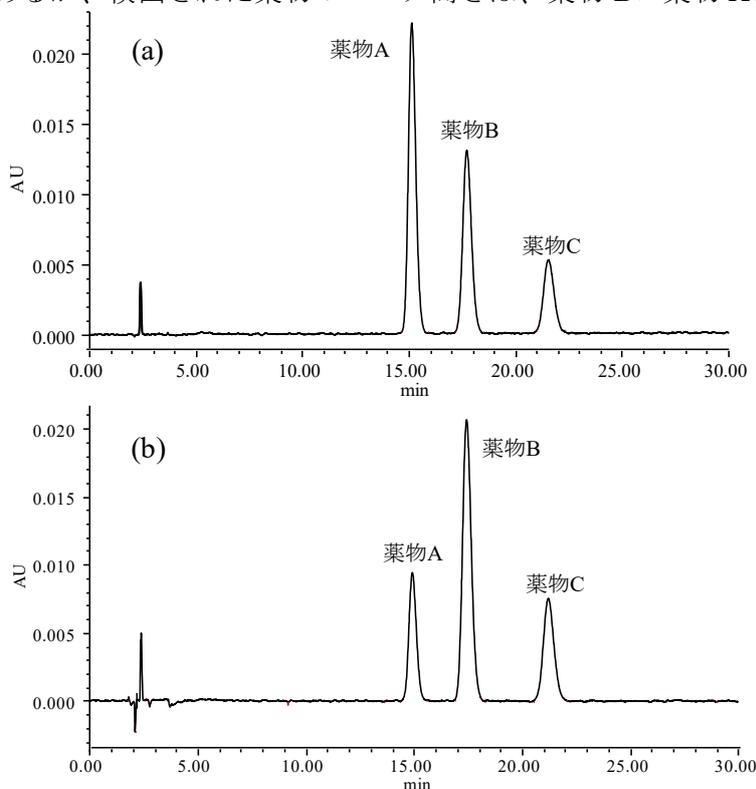
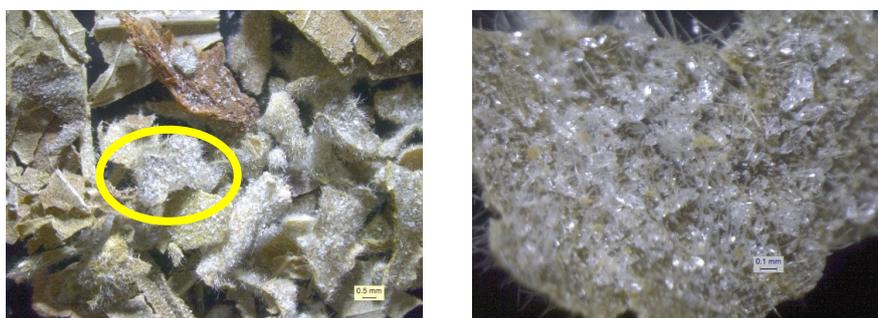


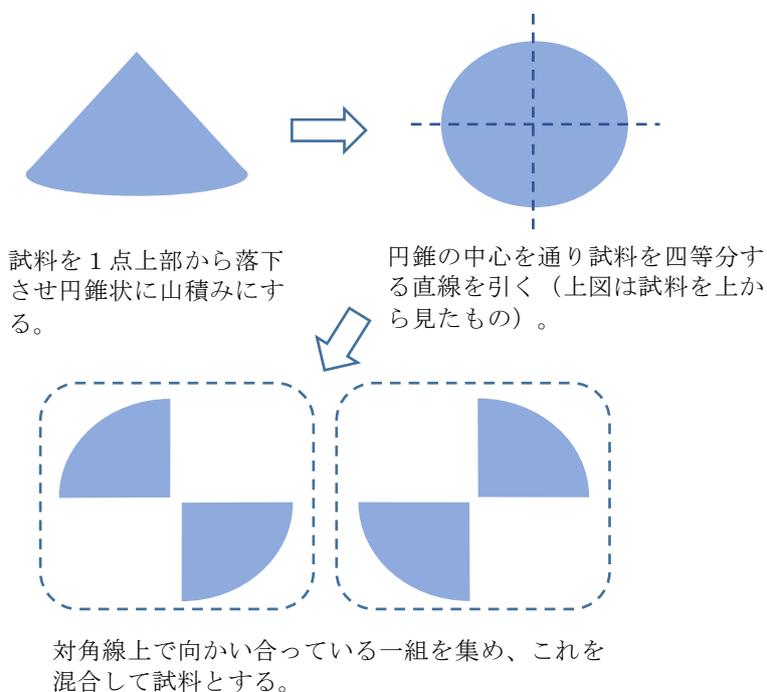
図 2 複数の薬物が検出された危険ドラッグの粉末の LC クロマトグラム  
(a) 当初サンプリングした試料溶液、(b) 2 回目にサンプリングした試料溶液

目のサンプリング時と異なっていた。危険ドラッグとして販売される粉末は、一見、均一に成っている様に見えるが、複数の薬物の粉末から成る場合は、均一に混合されていない可能性が有る事から、定量する際には注意を要する。

又、危険ドラッグの販売形態の 1 つに植物片がある。危険ドラッグとして販売される植物片には、薬物の溶液を吹き付け、これを乾燥させて作られるものが有り、顕微鏡で観察すると、写真 4 の様に植物片の毛に薬物の結晶が付着しているのを確認出来る。この様な植物片の大きさや付着している薬物は、均一で無い事から、当センターでは、四分法で得られた平均試料からサンプリングしている。なお、四分法は、図 3 に示す通り、不均一な固体試料の平均試料を得る為に用いられる方法である。



**写真 4** 危険ドラッグとして販売された植物片  
植物片の毛に薬物の結晶が付着している。右図は左図の黄色で囲まれた部分を拡大したもの。



**図 3** 四分法による平均試料の調製

日頃の分析経験が仇になる事も有る。図 4 は、健康食品として販売された硬カプセルの分析結果であるが、内容物の粉末からピークが検出されず、硬カプセル被膜から PDE-5 阻害薬の *tadalafil* が検出された。通常、医薬品の確認試験や定量では、カプセルの内容物を取り出して試験を実施する為、カプセル被膜は試験対象外である。その為、健康食品のカプセル被膜については、当初、試験対象にしていなかったが、海外で健康食品として販売された硬カプセル被膜から *tadalafil* が検出された事例が報告<sup>4)</sup>されて以降、カプセル被膜についても試験を実施する様になった。現在迄に健康食品の硬カプセル被膜、軟カプセル被膜の何れからも医薬品成分が検出されており<sup>4), 5)</sup>、違法な成分を含有する可能性が有る健康食品等では、ヒトが摂取する可能性が有る部分は、試験対象にする必要が有ると考えられる。

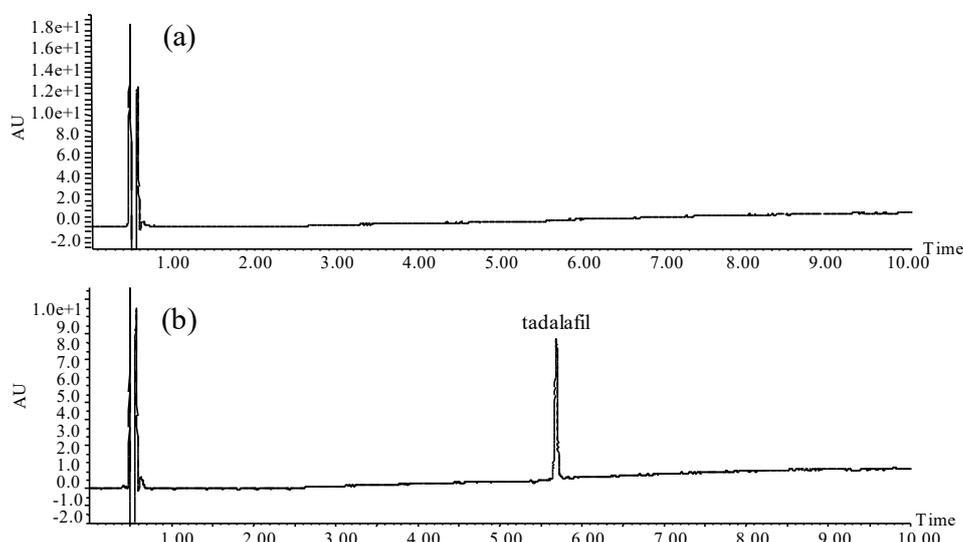


図 4 PDE-5 阻害薬 *tadalafil* が検出された硬カプセルの LC クロマトグラム  
(a) 硬カプセル内容物のクロマトグラム、(b) 硬カプセル被膜のクロマトグラム

### 3. 試料溶液調製

試料に含有される化合物が未知の場合、成る可く多くの化合物を抽出出来る前処理法が求められる。その為、健康食品や危険ドラッグ等の分析では、有機溶媒等で抽出しただけの簡便な前処理法が用いられる。抽出溶媒としては、メタノール、アセトニトリル、水等が単独若しくは混合して用いられる事が多いが、抽出溶媒としてメタノールや水を使用した場合、エステル結合を有する化合物で、エステル交換や加水分解が起きる。図 5 は、向精神薬の構造類似体 4-fluoromethylphenidate が含有された危険ドラッグの粉末を 50%メタノールに溶解した試料溶液の調製直後と調製 4 日後の LC クロマトグラムである。調製直後のクロマトグラムでは 4-fluoromethylphenidate のピークしか認められていないのに対して、調製 4 日後のクロマトグラムでは 4-fluoromethylphenidate の加水分解物のピークが認められている。試料量が十分に確保されている場合、再度、試料溶液を調製する事

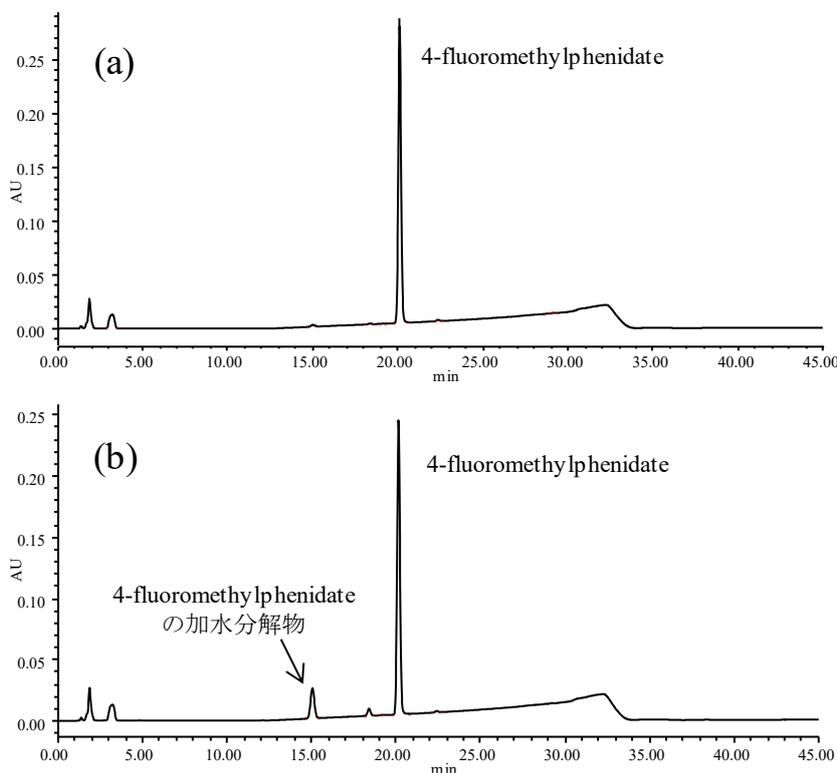


図 5 向精神薬の構造類似体 4-fluoromethylphenidate が含有された危険ドラッグの LC クロマトグラム  
 (a) 調製直後の 50%メタノール試料溶液、(b) 調製 4 日後の 50%メタノール試料溶液

が出来るが、試料量が少ない場合、試料溶液の再調製が困難になる為、抽出溶媒の選択には注意が必要である。

又、試料をメタノールで調製した溶液を GC で分析すると、一部の薬物で熱分解が顕著に認められる事が論文で報告されている<sup>6)</sup>。論文では、LSD の構造類似体が含有された紙片状危険ドラッグのメタノール試料溶液を GC-MS で分析した所、LSD のピークが検出されたと報告している。一方、LC-MS では LSD のピークは検出されず、含有された構造類似体のプロトン付加分子のピークが検出された事から、GC-MS では測定中に LSD の構造類似体が分解し、LSD に変化したと論文では述べられている。LSD は麻薬である事から、GC-MS のデータだけで麻薬が検出されたと誤認する事は避けなければならない。この様な誤認を避ける為には、LC など他の分析装置から得られたデータを踏まえて総合的に結果を判断する事が必要である。

メタノールで問題になるエステル交換や先に述べた GC での熱分解は、アセトニトリルを用いて試料溶液を調製する事で回避可能な事も有る。先に紹介した論文では、LSD の構造類似体が含有された紙片状危険ドラッグの試料溶液調製にアセトニトリルを用いた所、GC での熱分解が抑えられたと報告している<sup>6)</sup>。但し、LSD の構造類似体は、アセトニトリルでは抽出効率が悪い事から、抽出効率の良いメタノールを用いて試料から薬物を抽出

し、メタノールを蒸発乾固した後、再度、アセトニトリルに溶解する方法が論文中で提唱されている。

抽出溶媒の選択では、試料から分析対象化合物を抽出出来る溶媒を選ぶ事が重要である。先に紹介した硬カプセル被膜に含有された PDE-5 阻害薬 *tadalafil* の抽出には、アセトニトリルが使用される事が多い。しかし、アセトニトリルを直接、硬カプセル被膜に加えると変性を起こす為、定量の際は、変性沈殿物への取り込みによる抽出効率の低下が懸念される。通常、硬カプセル被膜は体内で溶解する事から、アセトニトリルを加える前に、硬カプセル被膜に 40 度の水を加えて溶解させる事で、変性による抽出効率の低下を回避する事が出来る。

又、PDE-5 阻害薬の *tadalafil* が健康食品として販売されたハチミツに含有されていた事が有った。ハチミツは糖分の含有率が約 8 割と粘度が高い事から、試料溶液調製の際に水を加えて粘度を下げ、抽出溶媒と混和し易くした後、アセトニトリルを加えて抽出を実施した。ハチミツに関しては、過去の分析経験を元に試料溶液を調製したが、近年、医薬品成分が検出される健康食品は、錠剤やカプセルだけではなく、ガムや飴など多岐に渡る事から、分析経験が無い試料を取り扱う場面が想定される。その様な分析対象試料に遭遇した場合、関連する分析法の文献や資料等が参考になる事は勿論であるが、文献等には載っていないノウハウが存在する事も有り、分析経験者に直接、話を聞く事が一番である。LC 研究懇談会や日本分析化学会には、様々な分析対象試料や分析対象化合物を取り扱っている会員が集まっており、分析者同士のネットワークを広げる事が可能である。又、様々な分野の分析者との交流は、日常業務の問題点を解決する糸口が見つかる可能性も有る事から、LC 研究懇談会や日本分析化学会のイベントへの参加は非常に有意義であると考えられる。

## 引用文献

- 1) 外館史祥、羽田千香子、熊坂謙一、甲斐茂美、宮澤真紀、危険ドラッグから検出されたミョウバンの同定について、平成 29 年度地方衛生研究所全国協議会 関東甲信静支部 第 30 回理化学研究部会研究会 (2018).
- 2) M. P. Dybowski, P. Holowinski, R. Typek, A. L. Dawidowicz, *Forensic Toxicology*, **39**, 230–239 (2021).
- 3) P. Kuś, M. Rojkiewicz, J. Kusz, M. Książek, A. Sochanik, *Forensic Toxicology*, **37**, 456–464 (2019).
- 4) Health Sciences Authority, HSA warns against consuming “XP TONGKAT ALI SUPREME” capsules found to contain undeclared potent substance (2009) .  
<https://www.hsa.gov.sg/announcements/press-release/hsa-warns-against-consuming-xp-tongkat-ali-supreme-capsules-found-to-contain-undeclared-potent-substance> Accessed 15 Nov 2021

- 5) T. Doi, K. Takahashi, M. Yamazaki, A. Asada, A. Takeda, K. Kiyota, T. Tagami, Y. Sawabe, T. Yamano, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **161**, 61-65 (2018).
- 6) R. Tanaka, M. Kawamura, T. Hakamatsuka, R. Kikura-Hanajiri, *YAKUGAKU ZASSHI*, **140**, 739-750 (2020).

<執筆者紹介> 坂本美穂 (Miho SAKAMOTO)

- ・東京都健康安全研究センター 医薬品研究科  
(〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1)
- ・東京都に入都後、東京都立衛生研究所 (現：東京都健康安全研究センター) 乳肉衛生研究科に配属。その後、残留物質研究科を経て、現所属に至る。
- ・分析士資格：LC 分析士初段

## 【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

### 水質分析/Water Analysis

榎本幹司/Kanji ENOMOTO

栗田工業株式会社/Kurita Water Industries Ltd.

( Received November 20, 2021 ; Accepted December 9, 2021 )

キーワード 地下水 ; PFOS ; PFOA ; 有機フッ素化合物 ; 土壤汚染対策法

#### 1. 始めに

PFAS (per and polyfluoroalkyl substances) は、有機フッ素化合物の総称で、分解性が低く環境中に長期間残存すると言われており、欧米を中心に規制の強化の動きが加速している。特に、PFAS のうち、パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) やパーフルオロオクタン酸 (PFOA) は安定な構造をしている為 (図 1)、環境中で分解され難く、高い蓄積性も有する為、環境水中や野生生物中に広範囲に存在している事が知られる様になっている。

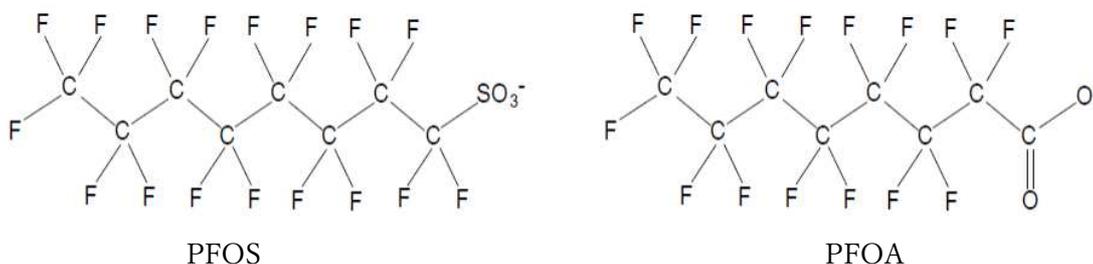


図 1 PFOS と PFOA の構造式 (直鎖型イオン)

国内においては、水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の見直しについて、令和 2 年 5 月 27 日付けで、中央環境審議会会長から環境大臣に対し、PFAS のうち、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 及びペルフルオロオクタン酸 (PFOA) を要監視項目に追加する答申が提出された (暫定目標値 : 50 ng/L [PFOS 及び PFOA の合計値])<sup>1)</sup>。

数年後には、PFOS、PFOA は土壤環境基準及び土壤汚染対策法の特定期有害物質に規定される可能性が高く、既に多くの計量証明事業所では PFOS、PFOA の分析業務を開始している。弊社は 1990 年代より土壤・地下水浄化事業を行っており、PFOS、PFOA の浄化対策を検討する上で、分析技術の保有が重要と考え、自社で分析出来る様、既に準備を進めている。

PFOS、PFOA の分析においては、定量下限値が ng/L オーダーと言う比較的低濃度に設定されており、濃縮装置や内標準の使用が必要となるのみならず、固相抽出濃縮装置や HPLC システムで使用されているフッ素樹脂からの溶出物が分析を妨害する可能性がある

など、これ迄に類を見ない難易度の高い分析と言える。

この様な難易度の高い PFOS、PFOA の分析は、公定法<sup>1)</sup>に分析条件が記載されてはいるものの、実際には固相抽出と言う手分析に近い操作が必要となり、必要な器材の選定や、LC-MS/MS との組み合わせにおいて、経験や情報が必要と考える。

本稿では、水質分析の中でも比較的ホットな話題である PFOS、PFOA の分析条件検討について、著者が実際に取得したデータを紹介しながら、注意すべき点について紹介する。

## 2. 分析概要と課題

### (1) 分析フロー

幾つかのメーカーから公定法<sup>1)</sup>に準じた分析方法に関する情報がセミナー等でも示されており、分析条件の検討にあたっては、それらの方法のうちの一つを参考にした<sup>2)</sup>。今回採用した分析フロー<sup>2)</sup>を図 2 に示す。

LC-MS/MS での定量範囲は、0.1~100 µg/L (機種によっては 0.01 µg/L~) であり、固相抽出により最大 1000 倍の濃縮操作を行う事で、暫定目標値 50 ng/L よりも低い濃度まで定量が可能となる。本稿では、目標定量下限値を 1 ng/L に設定して (固相抽出で 1000 倍濃縮)、分析条件の検討を行った事例を紹介する。

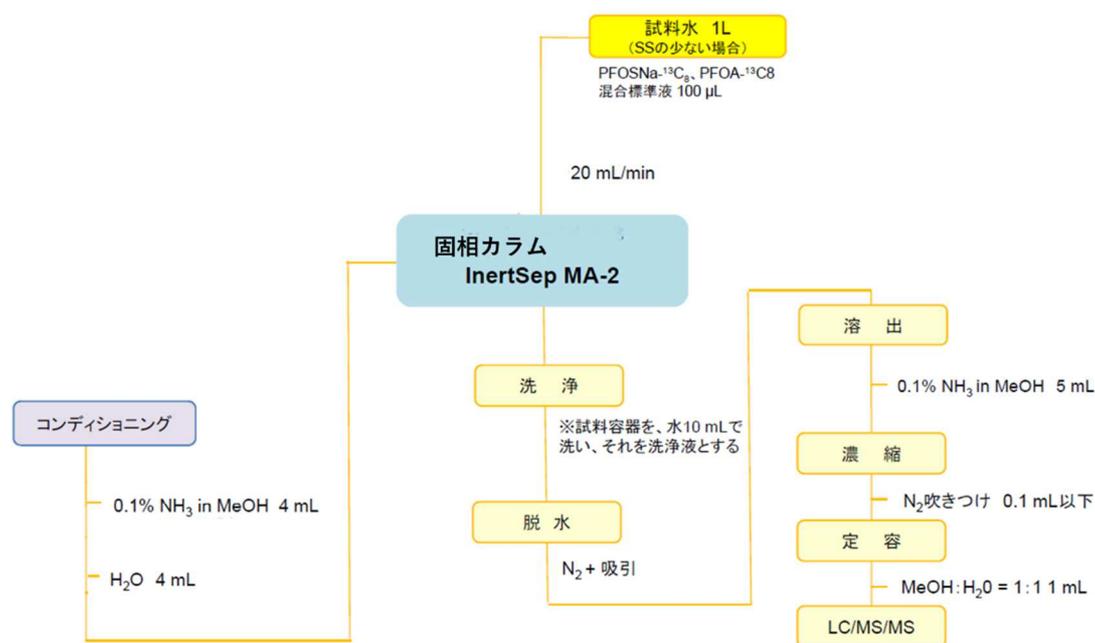


図 2 分析フロー (メーカーの承諾を得て、メーカー推奨のフロー<sup>2)</sup>を改変)

公定法<sup>1)</sup>においては、固相カラムとして、逆相カラムや陰イオン交換カラムなどが選定可能である。固相カラムの選定については、実際の試料に共存する夾雑物の種類によって使い分ける事が推奨されるが、今回は陰イオン交換カラムを用いて検討した事例を示す。

## (2) 分析上の課題

PFOS、PFOA の分析では、以下の課題が有るとされている。

- ① LC-MS のシステム由来の有機フッ素化合物による妨害
- ② 固相カラムへの濃縮過程での配管、シリンジ由来の有機フッ素化合物による妨害

①に関しては、移動相溶媒送液ポンプと試験液注入口の間に固相カラムを装着して不純物のピークを試験液の PFOS 及び PFOA のピークから分離する等により、定量結果に影響しない様に対処する事が望ましい旨、公定法<sup>1)</sup>にも記載されている。

この様な目的に使用する目的で開発された市販の固相カラム (Delay カラム) を導入し、具体的な効果、保有の HPLC システムに使用する場合の装着箇所など、実際に検討した結果について紹介する。

②に関しては、試料水が配管やシリンジに触れる事なく固相カラムを通過する事で、妨害となる有機フッ素化合物の影響を除外出来る工夫をした市販の固相抽出濃縮装置を導入し、取得したデータや使い勝手について紹介する。

## 3. 方法

### (1) 使用した機器

- ・機器：島津製作所製 Nexcela X2 [HPLC システム]、LCMS-8040 [質量分析計 (LC-MS/MS)]
- ・カラム：ジーエルサイエンス製 InertSustain C18 3  $\mu\text{m}$  (内径 2.1 mm、長さ 150 mm)
- ・Delay カラム：ジーエルサイエンス製 Delay Column for PFAS (内径 2.1 mm、長さ 30 mm)
- ・バイアル：ジーエルサイエンス製ポリプロピレンバイアル (1.5 mL) + アルミディスク付きスクリュウキャップ青
- ・固相カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep mini MA-2 280 mg
- ・固相濃縮装置：ジーエルサイエンス製アクアローダー (一体型 AL898-U)
- ・濃縮管 (固相カラムからの溶出、濃縮に使用)：ジーエルサイエンス製 GL-SPE 試験管 5.0 mL
- ・シリンジ (シリンジろ過、固相カラムのコンディショニング、洗浄、溶出に使用)：テルモ製テルモシリンジ<sup>®</sup>ラテックスフリー 5 mL (外筒：ポリプロピレン製、ガスケット：エラストマー製、潤滑剤：シリコン油)
- ・シリンジフィルター：メルクミリポア製 Millex<sup>®</sup>-GP13 mm、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  (フィルター：Hydrophilic Milipore Express<sup>®</sup>PES 製、ハウジング：ポリプロピレン製)

### (2) 試薬

- ・移動相：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社製高速液体クロ

- マトグラフ用)、アセトニトリル (関東化学製アセトニトリル -Plus- 99.9% LC/MS 用 3 L)、純水 (水系移動相調製用の純水) : クリタ開発センターで製造されている超純水
- 標準液: ジーエルサイエンス製 PFOS(ナトリウム塩)/PFOA MIX 5000 ng/mL メタノール溶液 1.2 mL
- 内標準液: ジーエルサイエンス製  $^{13}\text{C}_8$ -PFOS(ナトリウム塩)/ $^{13}\text{C}_8$ -PFOA MIX (13C8, 99%) 2000 ng/mL メタノール溶液 3 mL
- 標準液希釈用メタノール: 関東化学製残留農薬試験・PCB 試験用(5000 倍濃縮)メタノール 1 L
- ブランク水: 富士フイルム和光純薬工業製高速液体クロマトグラフィー用蒸留水
- 固相抽出用アンモニア水: 25%アンモニア水 (メルクミリポア製アンモニア溶液 25% LC-MS 用 LiChropur®)

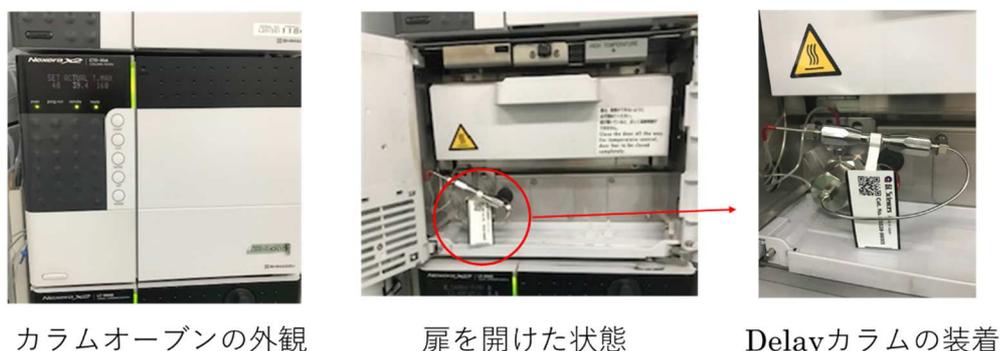
### (3) 分析条件 (LC-MS/MS)

- カラム温度: 40°C
- 溶離液条件: 流量 0.2 mL/min A 液: 10mM/L 酢酸アンモニウム、B 液: アセトニトリル (グラジエント溶離)  
B 液: 30 % (0 min) → 30 % (0.7 min) → 100 % (10 min) → 100 % (15 min) → 30 % (15.1min) → 30 % (20 min)
- 流量: 0.2 ml/min
- 注入量: 10  $\mu\text{L}$
- 測定モード: ESI (ネガティブモード、選択反応モニタリング)

物質名	プリカーサーイオン ( $m/z$ )	プロダクトイオン ( $m/z$ )
PFOS	499	80
PFOA	413	369
PFOS- $^{13}\text{C}_8$	507	80
PFOA- $^{13}\text{C}_8$	421	376
- 目標定量下限値: 1 ng/L

### (4) Delay カラムの装着

Delay カラムの装着箇所は、フロー図で示される事が多いが、HPLC 装置のどの部分に装着するのかはメーカーや機種により異なり、分かり難い為、メーカーに確認した上で、図 3 の様にラインミキサーの出口に装着した(島津製作所製 HPLC システム Nexcela X2 での事例。カラムオープン CTO-30A の下部にラインミキサーがある。)



コラムオープンの外観

扉を開けた状態

Delayカラムの装着

図 3 Delay カラムの装着

### (5) 固相抽出

今回使用した濃縮装置を図 4 に示す。本装置は、2 本のシリンジのプランジャーが交互に稼働し、試料が吸引されて固相抽出カラムに導入されるが、この時、試料はポリエチレンの配管を介して直接固相抽出カラムに導入される為、試料がシリンジ内のテフロン製プランジャーチップに触れる事が無く、有機フッ素化合物の試料への溶出を防止する構造となっている。パネルには、設定流量、設定容量、通液済み容量、残時間が表示される（正確な試料容量は予め計量しておく。）。

回収率を把握する為、ブランク水 1000 mL に内標準液（PFOS-<sup>13</sup>C<sub>8</sub>、PFOA-<sup>13</sup>C<sub>8</sub>）10 μg/L を 100 μL スパイクした試料を空試験とし、標準液（PFOS、PFOA）1 ng/L（ブランク水 1 L に標準液 1 μg/L を添加）に、内標準液 10 μg/L を 100 μL スパイクした試料に対して、固相抽出を実施し、回収率を算出した。

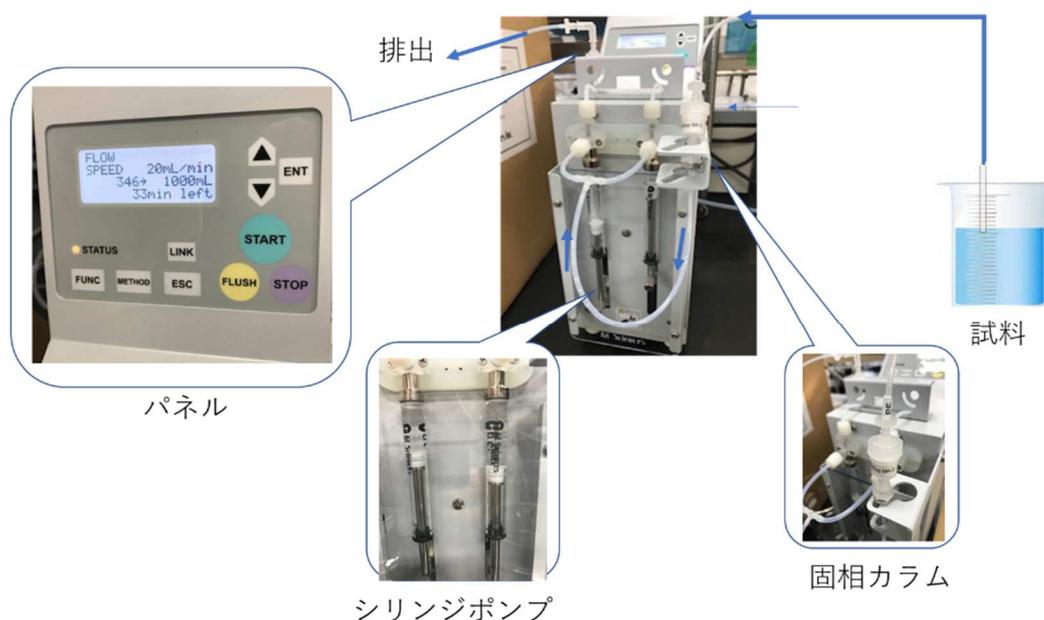


図 4 固相抽出濃縮装置

#### 4. 結果

##### (1) 検量線

図 5 に PFOS、PFOA の検量線の一例を示す (0.1~100 µg/L。縦軸は、内標準物質に対する標準物質のピーク面積比)。図 5 に示した様に PFOS、PFOA 共に良好な直線性を示している。

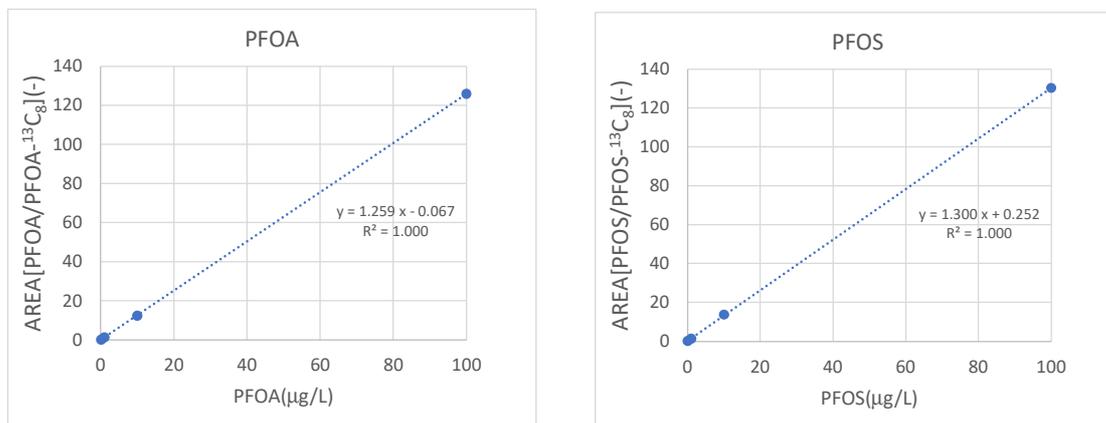


図 5 PFOS、PFOA の検量線

又、表 1、2 に 5 回繰り返し分析による再現性の結果を示す。

表 1 PFOA の標準液再現性 (n=5。PFOA-<sup>13</sup>C<sub>8</sub> に対する PFOA のピーク面積比)

PFOA濃度 (µg/L)	No.					平均 (-)	標準偏差 (-)	CV値(%)
	1	2	3	4	5			
0.1	0.147	0.148	0.149	0.142	0.144	0.146	0.00265	1.8
1.0	1.29	1.26	1.24	1.26	1.24	1.26	0.0200	1.6
10	12.3	12.5	11.4	12.0	12.0	12.0	0.413	3.4
100	126	123	119	126	114	122	5.19	4.3

表 2 PFOS の標準液再現性 (n=5。PFOS-<sup>13</sup>C<sub>8</sub> に対する PFOS のピーク面積比)

PFOS濃度 (µg/L)	No.					平均 (-)	標準偏差 (-)	CV値(%)
	1	2	3	4	5			
0.1	0.138	0.137	0.140	0.151	0.140	0.141	0.00549	3.9
1.0	1.37	1.41	1.45	1.39	1.34	1.39	0.0428	3.1
10	13.7	13.9	13.5	13.1	13.6	13.6	0.281	2.1
100	130	130	129	138	136	133	4.02	3.0

表 1、2 に示した様に PFOA、PFOS 共に、良好な再現性を示した。

## (2) ろ過の影響

公定法<sup>1)</sup>には、試料水の前処理後の抽出液（水：メタノール=1：1）について、ろ過の有無の記載は無いが、HPLC に導入する試料については、カラム保護の為、ろ過（孔径 0.22 μm）をするケースが多い。シリンジフィルターの使用に当たっては、フィルターへの吸着或いは溶出物による PFOS、PFOA 分析への阻害要因が無い事を確認する事が推奨される。図 6 に、標準液 0.1、1.0、10 μg/L について、ろ過の有り無しのピークを示す。

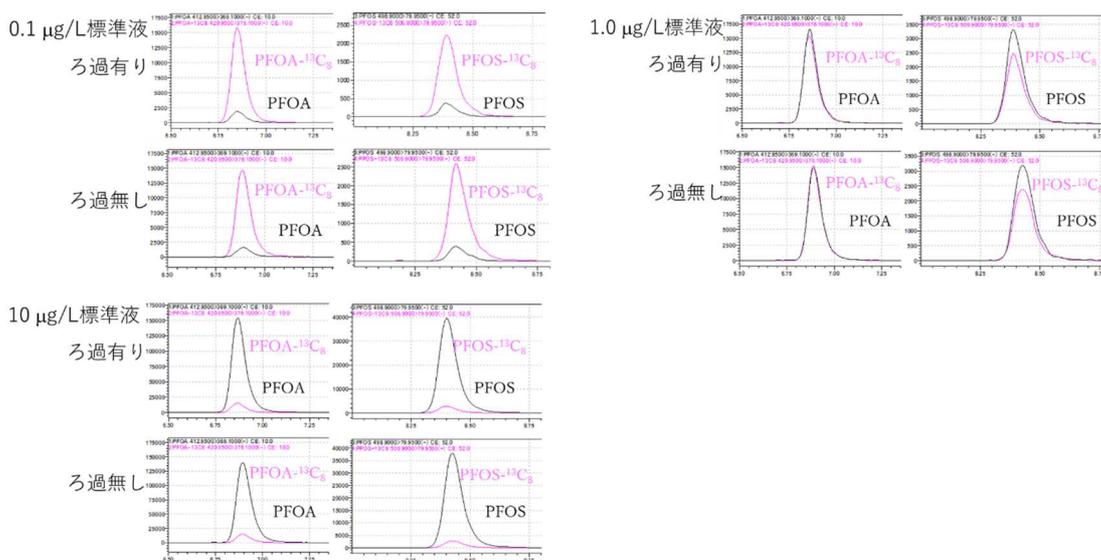


図 6 PFOS、PFOA 標準液のろ過の有り無しによるピークの比較

何れの濃度でもろ過有り無しで、PFOS、PFOA、PFOS-<sup>13</sup>C<sub>8</sub>、PFOA-<sup>13</sup>C<sub>8</sub>の何れの物質についても、ピーク形状、ピーク面積に差はなく、HPLC 導入時のろ過への本シリンジフィルターの使用には問題無いと判断された。

## (3) Delay カラムの効果

Delay カラムの効果を確認する為、PFOS、PFOA 標準液のブランクについて、Delay カラムを装着した場合としない場合のクロマトグラムを比較した結果を図 7 に示す。

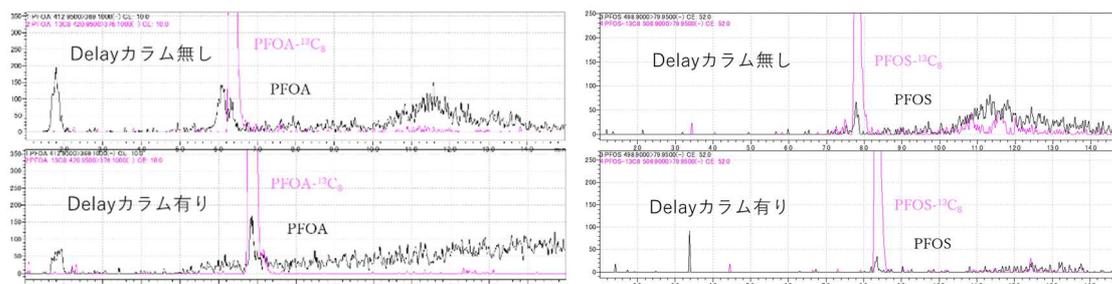


図 7 Delay カラム有り無しの PFOA (左)、PFOS (右) のクロマトグラムの比較

PFOA については、PFOA-<sup>13</sup>C<sub>8</sub> のピークの保持時間が試料由来の PFOA の保持時間と考えると、HPLC システムや移動相由来と推定される PFOA (分岐異性体を含む) のシグナルがノイズ状に全体に検出されている。又、Delay カラム無しでは試料由来の PFOA の保持時間の直前に認められるピークが、Delay カラム有りでは認められていない。

PFOS については、同様に PFOS-<sup>13</sup>C<sub>8</sub> のピークの保持時間が試料由来の PFOS の保持時間と考えると、明らかに Delay カラム有りの方が、HPLC システムや移動相由来と推定される PFOS (分岐異性体を含む) のノイズ状のシグナルが小さく、S/N を下げる効果が期待される。

今回は、直前に HPLC システム内のフッ素樹脂製のパーツを交換していないが、交換した直後は更にノイズの影響が大きくなる事が推定され、特に低濃度で安定して分析する為には、Delay カラムの効果が重要と考える。

尚、PFOA、PFOS 共に、Delay カラム有りの方が、保持時間が後ろにずれているのは、Delay カラムを装着した場合、装着しない場合と比較して、グラジエント溶離におけるアセトニトリル組成比の上昇がカラムに到達する迄のタイムラグが生じる事で、ピークの保持時間が後ろにシフトした為と考える。Delay カラムは日常的に装着したままでも問題無いとされるが、他の分析においてグラジエント溶離を実施する場合は、保持時間のずれに留意する必要がある。

#### (4) 回収率

表 3 に標準液 (PFOS、PFOA) 1 ng/L (ブランク水 1000 mL に標準液 1 µg/L 添加、内標準液 10 µg/L を 100 µL スパイク) に対して、固相抽出を実施し、回収率を算出した結果を示す。

表 3 1 ng/L 標準試料の回収率 (n=1)

	1 ng/L
PFOA	89%
PFOS	89%

今回は繰り返し試験をしていないので、定量下限値の確定には至っていないが、良好な回収率を得ており、目標とする定量下限値 1 ng/L を得る目途が得られたと考える (1 ng/L に調製した試料 1000 mL を 1 mL に 1000 倍濃縮した試料、即ち 1 µg/L を LC-MS/MS で分析し、89 %の回収率を得た。)。今後、再現性評価、妥当性評価等を行ない、定量下限値を確認する予定である。

#### 5. 纏め

PFOS、PFOA の分析において

- ・HPLC システムに Delay カラムを装着する事で、移動相やシステム由来と推定される S/N の低減が期待された。
- ・0.1~100 µg/L の範囲で検量線を作成し、良好な直線性、再現性を得た。
- ・LC-MS/MS 分析に供する際に用いるシリンジフィルターを評価し、吸着や溶出による分

析への影響が無い事を確認した。

・ PFOS、PFOA 1 ng/L について、固相濃縮装置を用いて固相カラムへの濃縮操作を実施し、其其回収率 89 %を得、定量下限値 1 ng/L を確保出来る目途を得た。

この様に、土壌・地下水分野で、今後、特定有害物質に規定される可能性の有る PFOS、PFOA の分析条件を検討する場合の肝となると思われる部分について、紹介した。今後、PFOS、PFOA の分析に関わる方が、分析条件検討や器材選定を行う際に少しでも参考になれば幸いである。

#### 引用文献

- 1) 水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の施行等について（令和 2 年 5 月 28 日環境省通知）。
- 2) 固相抽出-LC/MS/MS による水中 PFOS、PFOA 分析のポイント、水質分析セミナー 2020 配布資料（2020 年 1 月 23 日）、ジーエルサイエンス。

#### <執筆者略歴> 榎本幹司 (Kanji ENOMOTO)

- ・ 1987 年 栗田工業株式会社入社  
主に、排水処理、土壌・地下水処理の技術開発に従事。
- ・ 分析士資格：LC 分析士三段、LC/MS 分析士三段
- ・ その他資格：環境計量士（濃度関係）、土壌環境監理士、  
土壌環境リスク管理者、土壌環境保全士
- ・ Email : k.enomoto15@kurita-water.com



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

LC/MS 分析の基礎 / Foundation for LC/MS Assay

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 December 7, 2021 ; Accepted December 9, 2021)

キーワード 質量分析計の原理 ; イオン化 ; 質量分離 ; 構造解析 ; 定量分析

1. 始めに

LC/MSは、近年目覚ましい発展を遂げ、医薬品、食品、工業や環境分野等の様々な研究開発に利用されている。LC/MSによって、図1に示す様にマススペクトル、TICクロマトグラム、抽出イオンクロマトグラム等を得る事が出来、構造解析、定性や定量分析において欠かせない分析ツールである。本稿では、LC/MSの基礎として、その原理や特徴について解説する。

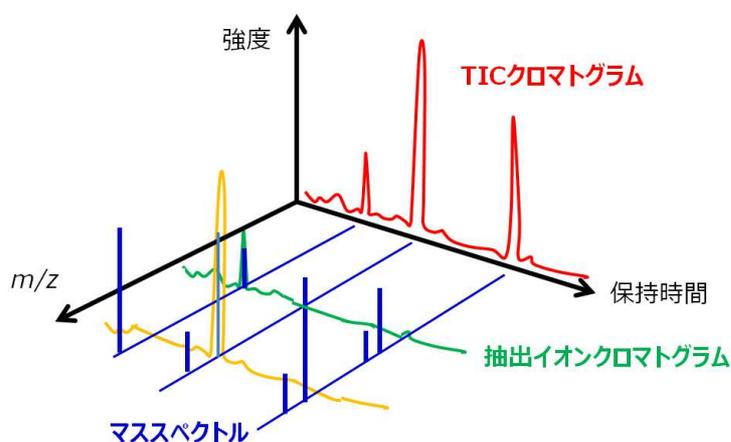


図 1 LC/MSにより得られる情報

2. 質量分析計の構成

質量分析計の基本的な構成を図2に示す。高速液体クロマトグラフ (HPLC) により分離された分析種は、試料導入部から質量分析計へと導かれる。具体的には、イオン化部、イオン輸送部を経て、質量分離部へ導かれ、検出部にてイオンとして検出される。

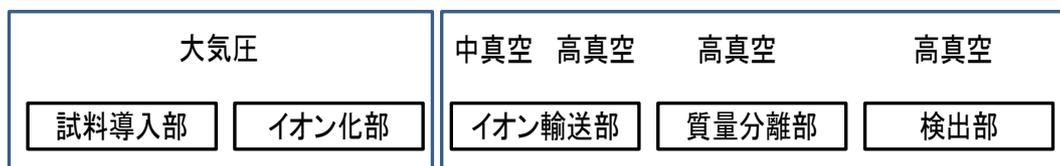


図 2 質量分析計の構成 (模式図)

代表的なイオン化法としては、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI)、大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)や大気圧光イオン化 (atmospheric pressure photoionization, APPI) 等の大気圧イオン化法が知られ

ている。図3に示した様に、分析種の極性や分子量によって、イオン化法の適用範囲が或る程度異なる事が知られている。言う迄も無いが、全ての分析種をイオン化出来る手法は現在、世の中に存在しない為、分析種の性質に応じて、適切なイオン化法を選択する必要が有る。

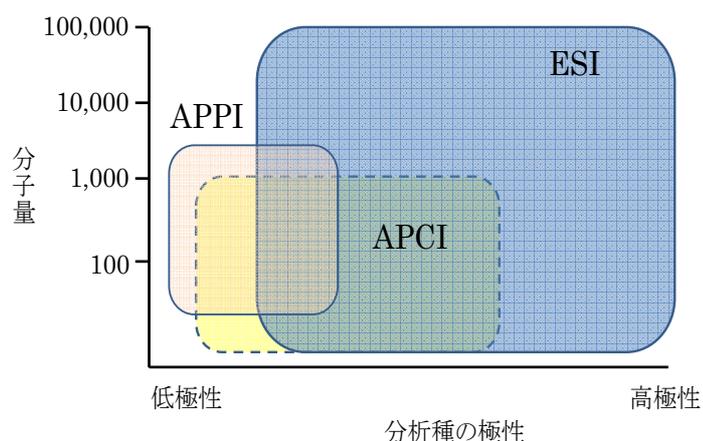


図 3 イオン化法を選択

LC-MS は LC と MS の間にあ  
るインターフェイスの他に、イオンを質量毎に分離する機構、即ち、質量分離部 (表 1) が備わっている。本稿では、代表的な質量分離部として、四重極及び飛行時間について紹介をする。

表 1 質量分析計の主な質量分離部とその原理<sup>1)</sup>

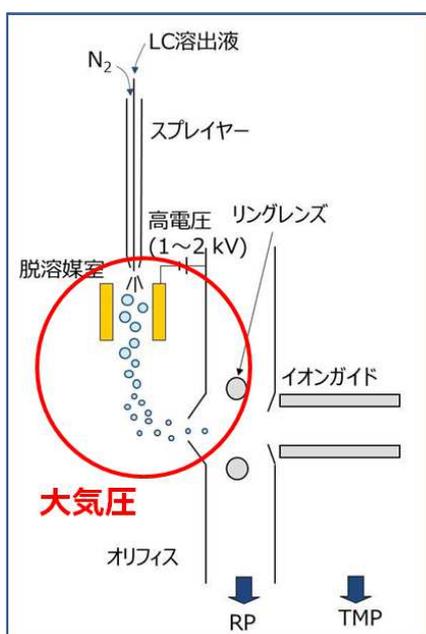
形式	略号	原理
四重極	Q	連続したイオンビームの高周波二次元四重極電場中の軌道安定性に基づく分離
二重収束 (磁場形)	EB (BE)	偏向した連続イオンビームの磁場中でのローレンツ力に基づく運動量による収束と電場による運動エネルギーによる収束を組み合わせた分離
飛行時間	TOF	パルス状イオンビームの飛行時間による分離
イオントラップ	IT	トラップされたイオンの高周波三次元四重極電場中における軌道安定性による分離
イオンサイクロトロン共鳴	ICR	トラップされたイオンの磁場中でのサイクロトロン周波数による分離。検出にフーリエ変換を利用

### 3. イオン化法

図 4 に示した ESI は汎用されているイオン化法の一つとして知られている。JIS によると、ESI は「カラムからの溶出液などを、数 kV の高電圧が印加されたキャピラリーチューブに通し、噴霧するとキャピラリー先端に円すい (錐) 状の液体コーン (テイラーコーン) が形成される。テイラーコーン内の高電界の為に正・負イオンの分離が起こり、テイラーコーン先端より高度に帯電した液滴が生成する事に依って、試料溶液は荷電した霧状の液滴となる。試料溶液は、溶出液の蒸発を促進する目的でネブライザーガス (通常、窒素) と共に噴霧される。溶媒の気化に起因する液滴の体積収縮に伴って液滴の電荷密度が増大し、電

荷密度がレイリー極限を超えると液滴が自発的に分裂する。液滴が更に小さくなると、ついには帯電液滴からイオンの蒸発が起こり、気相イオンが大気圧下で生成する。生成したイオンを、イオン輸送部を経由して質量分離部へ導く。」<sup>2)</sup> と定義されている。

ESI は電子イオン化 (EI) よりもイオン化エネルギーが低く、ソフトなイオン化法である事から複雑なフラグメントイオンが生じ難く、低極性～高極性の分析種に対して有用で、タンパク質、糖質、核酸等、生体高分子に適用可能である。帯電液滴の生成効率は、溶離液の流量、電気伝導度、表面張力や pH 等に依存する。例えば、トリフルオロ酢酸を含んだ電気伝導度の高い溶離液や、水を多く含んだ表面張力の大きい溶離液、粘性の高い溶離液は、イオン化効率を低下させ、その結果、感度低下を招くので注意を払う必要がある。



### イオン化過程 (液相イオン化)

1. 高電界の作用による静電噴霧 + 高圧ネブライジングガスによる液滴生成
2. 帯電液滴の生成
3. 加熱による脱溶媒
4. イオン蒸発

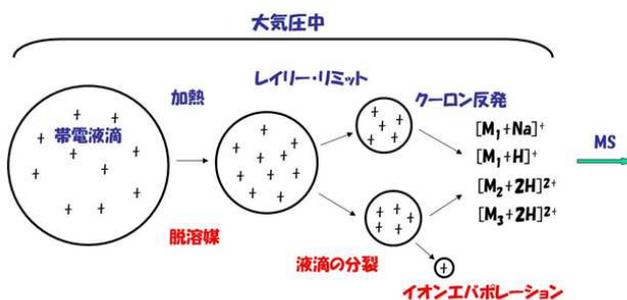
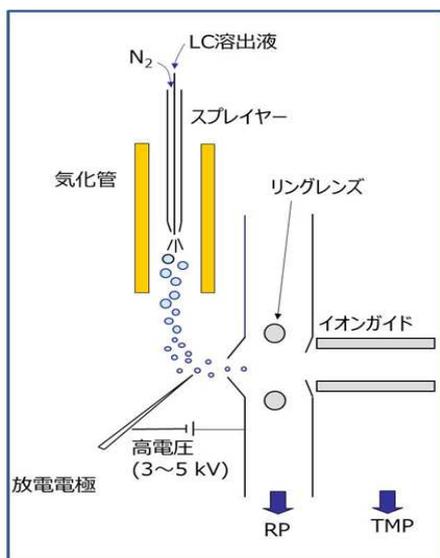


図 4 ESI の模式図<sup>3)</sup>

一方、図 5 に示した APCI は、ESI ではイオン化し難い、より低極性を有する分析種に適している。APCI は、「コロナ放電によって大気圧で行われるイオン化法であり、化学イオン化法の一つである。まず、イオン化部に導入された溶液がヒーター及び乾燥ガスの加熱によって気化された後、コロナ放電に依って生じる溶媒イオンと試料分子とがイオン分子反応を起こして試料分子がイオン化される。この方法は気化した移動相溶媒を試薬ガスとする化学イオン化 (CI) 法で、プロトン及び電子の移動によるソフトなイオン化が行われる。」<sup>5)</sup> と JIS に記述されており、ESI と比較して分子量が小さく (通常、2,000 以下)、溶離液中において電離し難い低極性成分がイオン化され易い。イオン分子反応は、反応するイオンと分析種との衝突により大気中、又は低真空領域で起き、分析種とプロトンとの親和性を示すプロトン親和力が大きい分析種ほどプロトン付加分子になり易い傾向

にある。APCI は分析種の気相反応に基づいている為、感度は ESI に比べると溶離液の影響を受け難い。加熱により液滴は脱溶媒されるが、分析種のイオン化効率を高める為には、ESI よりも脱溶媒温度を高く設定する必要がある。その為、熱に不安定な分析種では、分解する恐れが有る為に注意が必要である。



### イオン化過程 (気相イオン分子反応)

1. 高圧ネブライジングガスによる液滴生成
2. 加熱による液滴乾燥
3. コロナ放電による移動相溶媒分子のイオン化
4. イオン化した溶媒分子と試料分子とのプロトン移動や電荷交換によるイオン化

#### 主な特徴

- ・熱に不安定な化合物には向いていない
- ・タンパク質等の高分子の分析には向いていない
- ・移動相の影響を受け難く、極性溶媒から無極性溶媒まで幅広く対応が可能

図 5 APCI の模式図 4)

その他のイオン化法としては、ESI や APCI でイオン化し難い低極性又は、非極性物質のイオン化が可能である APPI、やマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) や高速原子衝撃法 (fast atom bombardment, FAB) 等が知られている。

## 4. 質量分離部

### 4.1 四重極 (Q)

四重極の模式図を図 6 に示す。イオン化した分析種は始めに Z 軸方向に加速され、細孔を通過して四重極領域に進入する。四重極には、互いに対向する電極に同じ極性の電圧が、又、隣接する電極に正負逆の電圧が印加されており、各々の電極に直流電圧  $U$  と高周波交流電圧  $V \cos \omega t$  ( $\omega$ : 高周波の振動数  $t$ : 時間) とが重ね合わせて印加され、四重極の中には高速で位相の変化する電場が生じている。分析種は X、Y 軸方向に振動する事になるが、この時に特定の条件 ( $U$ ,  $V$ ,  $\omega$ ) が与えられる事により、或る特定範囲の  $m/z$  のイオンが四重極を通過出来る様な安定した振動状態になり、範囲外の  $m/z$  のイオンは不安定な状態で電極に衝突したり、系外に飛び出したりする事を原理としている。

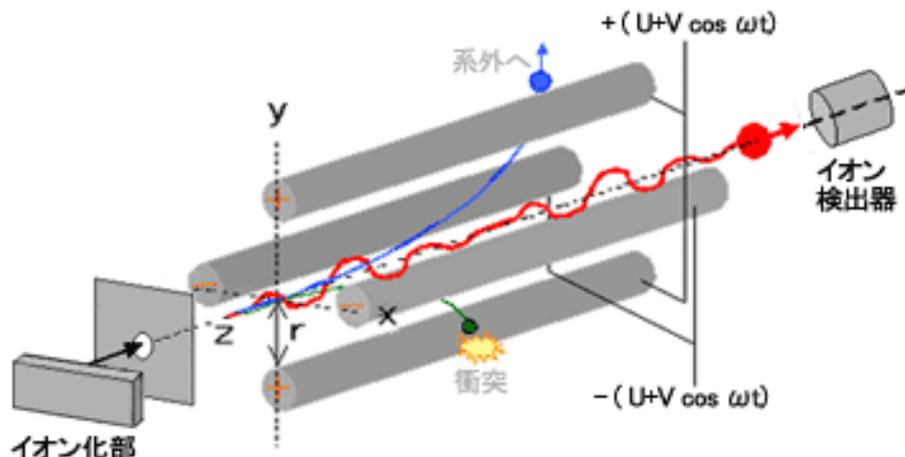


図 6 四重極型 MS の模式図 6)

四重極内でのイオンの振動は式 1 の Mathieu の方程式に従っている。

$$m/z = K \times V / (r^2 \omega^2) \quad (1)$$

$K$ : 定数、 $r$ : 電極の距離

この式から、イオンが安定に振動する条件は、イオンの質量  $m$  と振動数  $\omega$  が決まると、図 7 の線で囲む領域として表す事が出来る。例えば、質量  $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$  のイオンが安定領域を通る様に直流電圧と高周波交流電圧の比を一定に保って電圧を変化させる事により、低質量から高質量までのイオンのマススペクトルが得られる。

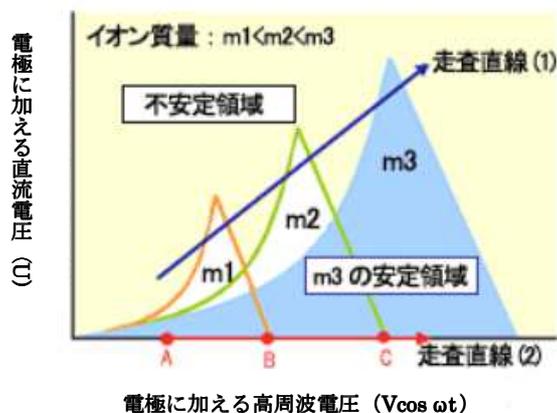


図 7 四重極のイオン安定領域 6)

#### 4.2 飛行時間 (TOF)

飛行時間質量分析計 (TOF-MS) の模式図を図 8 に示す。イオンの飛行時間が  $m/z$  によって異なる事を利用した質量分析計で、電気素量を  $e$ 、電荷数を  $z$ 、装置の加速電圧を  $V$ 、イオンの質量を  $m$ 、フライトチューブ内の速度を  $v$  とすると、イオンの運動エネルギー  $E$  は式 2 として表す事が出来る。

$$E = ezV = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2)$$

イオン化したイオンは、パルス状に引出され、電極間の高い加速電圧により加速後、電場や磁場が存在しない所謂、ドリフト領域を一定の速度で飛行し、検出器に到達する事が出来る。一定の電圧によりイオンを加速すると、電圧に応じた運動エネルギーが全てのイオンに与えられる為、一定の運動エネルギーが与えられたイオンの速度  $v$  は、質量が小さいイオン程速く、質量が大きいイオンは遅くなる。この事は、式 2 を変形すると、速度  $v$  は式 3 の様になり、イオンの実行飛行距離を  $L$  とすると、イオンの飛行時間  $t$  は  $t = L/v$  であるので、 $m/z$  の 1/2 乗に比例する事からも理解出来る。

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \quad (3)$$

一定の飛行距離では、 $m/z$  が小さいイオンは早く、 $m/z$  が大きいイオンは遅く検出器に到達する。従って、この時間差を質量差に変換する事により、マススペクトルを得る事が出来る。

### 5. 使用する溶離液について

LC-MS の溶離液が不揮発性の塩を含んでいると、イオン導入口であるオリフィスや溶離液噴霧部付近に不揮発性の塩が付着・析出し、目詰まりする。ESI のイオン化部近傍を図 9 に示すが、例えば、不揮発性の塩を含んだ溶離液を使用すると、イオン導入口であるオリフィスや溶離液噴霧部付近に不揮発性の塩が付着・析出し、目詰まりする。その結果、イオン輸送部や質量分離部へ導入されるイオン量が減少し、感度低下を引き起こす。又、不揮発性の塩は、溶離液の沸点を上昇させる事から、溶離液のスムーズな気化を妨げ、微細な液滴形成に悪影響を与える。LC 分析ではリン酸塩緩衝液が用いられるが、これらは不揮発性の塩である為、LC-MS では酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウム等の揮発性塩を用いる。又、溶離液の pH 調整が必要な場合には、ギ酸、酢酸、アンモニア水等の揮発性の酸や塩基を選択しなければならない。表 2 に一般的に用いられる移動相の例を示す。尚、近年では、LC-MS の溶離液に不揮発性の塩を用いた場合においても、MS の手前で脱塩する手法、例えば

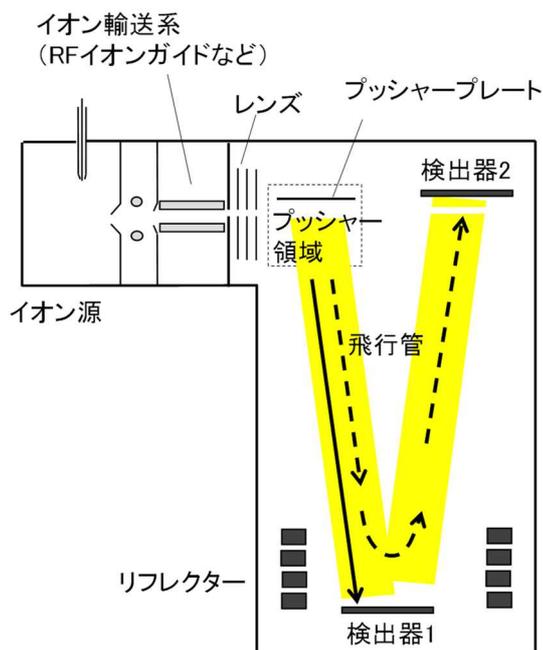


図 8 飛行時間質量分析計の模式図

二次元 LC の二次元目で脱塩カートリッジを用いたり、直接、脱塩カラムを利用したりする手法<sup>7)</sup>等が報告されている。

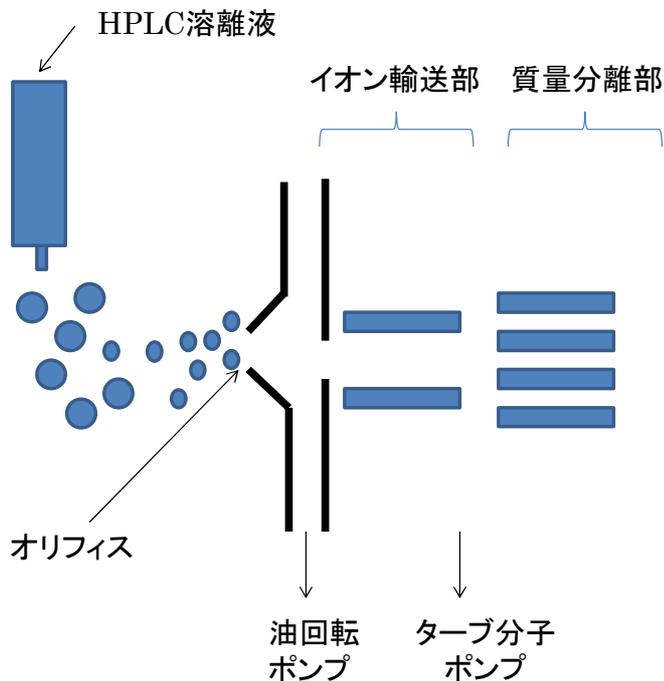


図 9 ESI のイオン化部近傍

表 2 LC/MS に用いられる移動相の例<sup>8)</sup>

一般的な溶媒	水、アセトニトリル メタノールやエタノール等のアルコール
その他の有機溶媒	ヘキサン、ジクロロメタン、アセトン、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド、 <i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド、酢酸エチル
酸・塩基	酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、アンモニア水
塩	ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム

イオン性の分析種の場合には、イオン対試薬を溶離液へ添加し、逆相分配モードで分析出来るが、LC/MS では不揮発性のイオン対試薬の使用を避け、表 3 に示す様な揮発性のイオン対試薬を用いる。

表 3 代表的な LC/MS 用イオン対試薬<sup>9)</sup>

塩基性溶質の場合	酸性溶質の場合
トリフルオロ酢酸	酢酸ジプロピルアンモニウム
ペンタフルオロプロピオン酸	酢酸ジブチルアンモニウム
ヘプタフルオロブタン酸	酢酸ジアミルアンモニウム
ノナフルオロペンタン酸	酢酸ジヘキシルアンモニウム
ウンデカフルオロヘキサン酸	
トリデカフルオロヘプタン酸	
ペンタデカフルオロオクタン酸	

## 6. LC/MS の基本

### 6.1 構造解析

構造解析には、タンデム質量分析計が用いられる。マススペクトロメトリー関係用語集<sup>10)</sup>ではMS/MS (エムエスエムエス) は、「一段目の質量分析においてプリカーサーイオン (前駆イオン) を選択し、イオンを解離させた後に二段目の質量分析でそのプロダクトイオンの  $m/z$  分離を行い検出する技法、及びそれらの結果を利用する研究分野、タンデム質量分析 (tandem mass spectrometry) の同意語。」と定義されている。技法には、プロダクトイオンスペクトル、プリカーサーイオンスペクトル、コンスタントニュートラルロスマスゲインスペクトルを取得する手法、及び選択イオンモニタリングがある。二つ以上の質量分析部を備えた装置を用いる空間的タンデム質量分析 (tandem mass spectrometry in space) 及びイオントラップタイプの装置を用いる時間的タンデム質量分析 (tandem mass spectrometry in time) が有る。空間的タンデム質量分析計としては、三連四重極 (QqQ)、四重極-飛行時間 (Q-TOF)、飛行時間-飛行時間 (TOF-TOF) 等が有り、一方、時間的タンデム質量分析計としては、イオントラップ (IT)、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FTICR) が有り、多段階質量分析 (MS<sup>n</sup>) が可能である。

MS/MSの測定では、プロダクトイオン分析 (product ion analysis)、プリカーサーイオンスキャン (precursor ion scan) 及びコンスタントニュートラルロススキャン (constant neutral loss scan) 等が有り、これらのマススペクトルから分析種の構造解析が可能である。マススペクトルから概ね、分子の質量や元素の情報、組成や構造情報が得られる。

#### (1) 分子の質量

分子の質量の情報に役立つ関連したイオンが検出される。ESIやAPCIでは、表4に示す、 $[M+H]^+$  (プロトン付加分子) や  $[M-H]^-$  (脱プロトン分子) が観察される。

表4 LC/MSで一般的に観測されやすいイオン<sup>11)</sup>

イオン化法	移動相溶媒	生成しやすいイオン(正イオン検出)
ESI	メタノール	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ , $[M+Na]^+$ , $[M+K]^+$
	アセトニトリル	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ , $[M+Na]^+$ , $[M+K]^+$
	含酢酸アンモニウム	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ ,
	トリエチルアミン等	$[M+H]^+$ , $[M+H+N(CH_2CH_3)_3]^+$
APCI	メタノール	$[M+H]^+$ , $[M+H+CH_3OH]^+$
	アセトニトリル	$[M+H]^+$ , $[M+H+CH_3CN]^+$
	酢酸アンモニウム	$[M+H]^+$ , $[M+NH_4]^+$ ,
	トリエチルアミン等	$[M+H]^+$ , $[M+H+N(CH_2CH_3)_3]^+$
イオン化法	移動相溶媒	生成しやすいイオン(負イオン検出)
ESI	酸を含まない系	$[M-H]^-$ , $[M+Cl]^-$
	含酢酸, 酢酸アンモニウム	$[M-H]^-$ , $[M+CH_3COO]^-$
	含ギ酸	$[M-H]^-$ , $[M+HCOO]^-$
	含トリフロロ酢酸	$[M-H]^-$ , $[M+CF_3COO]^-$
APCI	酸を含まない系	$[M-H]^-$ , $[M+Cl]^-$
	含酢酸, 酢酸アンモニウム	$[M-H]^-$ , $[M+CH_3COO]^-$
	含ギ酸	$[M-H]^-$ , $[M+HCOO]^-$
	含トリフロロ酢酸	$[M-H]^-$ , $[M+CF_3COO]^-$

溶離液の組成によっては、ナトリウム、カリウム、アンモニア、塩素、ギ酸等が付加したイオンが観察されるが、質量差から分子の質量を決定する事が出来る。又、窒素ルール、即ち、分子に含まれる窒素原子の数が偶数の場合は、その分析種のノミナル質量は偶数、奇数の場合は、ノミナル質量は奇数となる事から、プロトン付加分子或いは脱プロトン分子であるかを把握出来、分子の質量の確認に役立つ。

## (2) 元素の情報

自然界では、多くの元素に同位体が存在する(表5)。同位体比から、その分析種の炭素数や特定の元素が含まれているかが推測出来る。例えば、塩素や臭素を含んだ分析種の場合、同位体存在比から特徴的なマススペクトルが得られる為、構造決定する上で重要な情報源となる。

表 5 元素の同位体組成<sup>12)</sup>

原子番号	記号	質量数	原子質量	同位体存在比	原子番号	記号	質量数	原子質量	同位体存在比
1	H	1	1.007825	99.9885	15	P	31	30.973762	100
		2	2.014102	0.0115			16	S	32
6	C	12	12	98.93					33
		13	13.003355	1.07			34	33.967867	4.25
7	N	14	14.003074	99.636			36	35.967081	0.01
		15	15.000109	0.364	17	Cl	35	34.968853	75.76
8	O	16	15.994915	99.757					37
		17	16.999132	0.038	35	Br	79	78.918338	50.69
		18	17.999160	0.205					81
9	F	19	18.998403	100					

### (3) 組成、構造情報

四重極-飛行時間 (Q-TOF) や飛行時間-飛行時間 (TOF-TOF) 質量分析計では、TOFが高分解能を有する為、精密質量数から組成式や構造情報を得る事が出来る。この様な質量分析計では、モノアイソトピック質量 (各元素について天然存在比が最大の同位体の質量を用いて計算したイオン) が観測される為、高い確からしさで、分析種の組成式を決定出来る。例えば、酸素やメタノールの分子量はノミナル質量では何れも32であるが、モノアイソトピック質量では、表5の原子質量から酸素は31.9898、メタノールは32.0262となり、識別する事が出来る。

### (4) 分解能

分解能は、イオンのピークの  $m/z$  の測定精度、組成決定、同位体の識別等において重要である。同位体の識別が不要な測定等では整数質量までが得られる低分解能な質量分析計で十分であるが、同位体を識別する必要がある場合には、小数点以下数桁の精密質量が測れる高分解能質量分析計を用いる。特に、高分解能質量分析計の強みは、ピークの質量から元素の組成を推定する定性的な能力が高い点であり、しばしば構造解析に利用されている。

分解能は、マススペクトル上の近接した  $m/z$  のピーク同士がどの程度分離され、別々のピークとして検出されるかと言うパラメーターを表し、質量分析計の性能の中でも重要な指標である。分解能の定義としては、隣り合う2本のピークが互いに10%の谷で分離している時の質量差  $\Delta m (=m_2 - m_1)$  を使う方法 (10%谷法) と、1本のピークの半値幅 (full width at half maximum, FWHM) を  $\Delta m$  に使う方法 (半値幅法) がある。

## 6.2 選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) による定量分析

定量分析では、三連四重極質量分析計を用いた選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) がよく用いられる (図10)。プリカーサーイオンを質量分離部 (MS1) で選択し、コリジョンセル内でアルゴンや窒素等の不活性ガスと衝突させる事で、フラグメントイオンを生成させ、分析種に特徴的なフラグメントイオンを質量分離部 (MS2) で選択し、検出する手法である。選択イオンモニタリング (selected ion monitoring, SIM) の様

な特定の  $m/z$  を有するイオンのみを選択して測定するモードに比べて、SRMの特徴は、検出部に到達する絶対的なイオン量は少なくなるが、飛躍的に選択性や感度が向上する点にある。

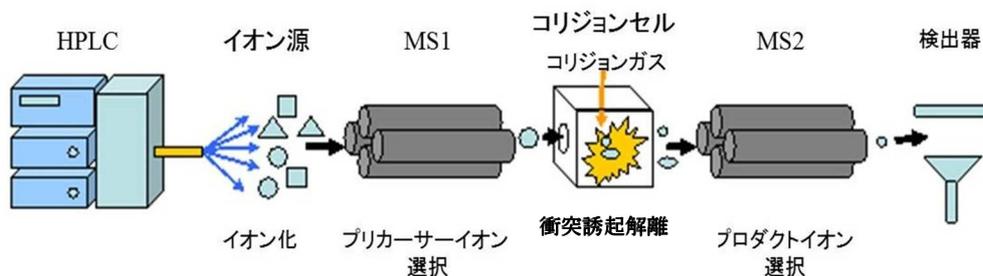


図 10 三連四重極質量分析計の模式図

例として、アルキル化剤の一つであるメタンサルホン酸メチル (methyl methanesulfonate, MMS) について紹介する。

正イオン検出ESIにおけるマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトルからMMSのプロトン付加分子  $[M + H]^+$  に相当するイオン、即ち、分子Mにプロトン $H^+$ が付加して生成したイオン (MMS:  $m/z$  111) が基準ピークとして観測された。又、このプロトン付加分子をプリカーサーイオンとした時のプロダクトイオンスペクトルから、MMSは $m/z$  79 が基準ピークとして観測された。図11には、SIMでは $m/z$  111を、SRMでは $m/z$  111 (プリカーサーイオン) から衝突誘起解離して生じた $m/z$  79 (プロダクトイオン) を選択し、測定した比較例を示す。SRMではバックグラウンドノイズを低く抑える事が出来、分析種の感度向上が認められた。その為、夾雑成分が含まれる、例えば生体試料や食品などのマトリックス中の分析種を高感度に検出出来る。

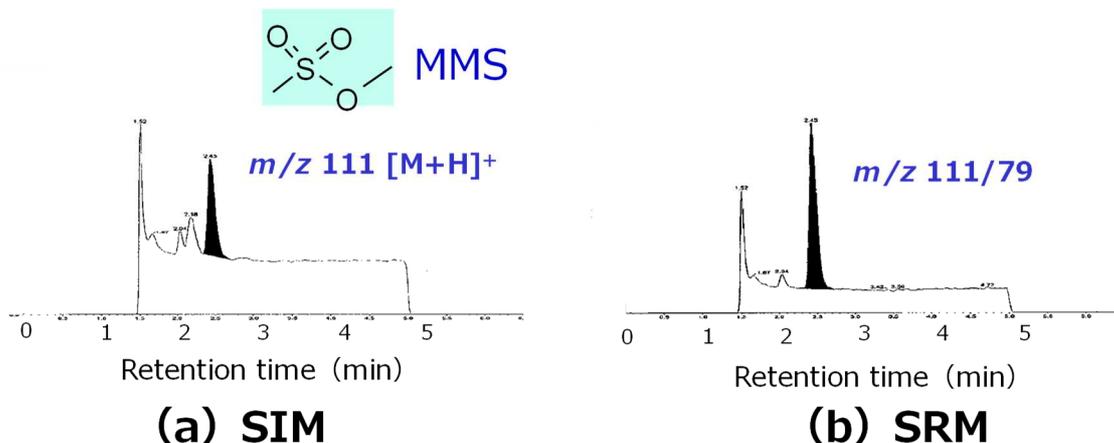


図11 SIM及びSRMにより測定したクロマトグラム

## 7. 用語について

最後に、液体クロマトグラフィー研究懇談会の中村委員長が指導している質量分析の用語に関して度々注意されている点を記載する。発表の際の参考にして頂きたい。

### 7.1 LC/MS、LC-MS

LCとMSを繋ぐハイフン(-)とスラッシュ(/)には意味が有り、区別をして使用する。液体クロマトグラフ質量分析計は、分析装置を意味するので、一般的にハイフン(-)を用いてLC-MSと表記する。一方、液体クロマトグラフィー質量分析(法)は、分析手法を意味するので、スラッシュ(/)を用いる。発音は、エルシーマスではなく、エルシーエムエスと言う。但し、LC-MSをLC/MSとして、LC/MSをLC-MSとして表記する事も可能であるが、どちらか一方を、略語としてLC-MS及びLC/MSとして同時に用いる事は適切ではない。

### 7.2 $m/z$

マススペクトルは横軸が  $m/z$ 、縦軸が相対強度比で表される。 $m/z$ には単位は無く、無次元量である。 $m/z$ の  $m$  と  $z$  は必ず斜体で表記し、読み方は、「エムオーバージー」が正式名称である。

### 7.3 ノミナル質量、モノアイソトピック質量及び相対分子質量

ノミナル質量 (Nominal mass) は、各元素について、それぞれの天然存在比が最大の同位体の質量に最も近い整数値を用いて計算した、イオン又は分子の質量を示す。

モノアイソトピック質量 (Monoisotopic mass) は、各元素について天然存在比が最大の同位体の質量を用いて計算したイオン又は分子の計算精密質量を示す。

相対分子質量 (Relative molecular mass) は、各元素の各同位体質量に其其の存在度を重率として掛けて求めた加重平均値 (原子量) を用いて計算したイオン又は分子の質量を示す。マススペクトルからは、相対分子質量を有するイオンは検出されない。

## 引用文献

- 1) 一般社団法人日本分析機器工業会、質量分離法の原理、  
<https://www.jaima.or.jp/jp/analytical/basic/mass/method/> (2019年9月21日現在)。
- 2) JIS K0136:2015 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則、p.9、日本規格協会 (2015)。
- 3) 中村 洋 監修、(公社)日本分析化学会編、LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用、p.140-142、(公社)日本分析化学会 (2014)。図 5・1 及び図 5・3 を改変。
- 4) 中村 洋 監修、(公社)日本分析化学会編、LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用、p.146、(公社)日本分析化学会 (2014)。図 5・6 を改変。

- 5) JIS K0136:2015 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則、p.9、日本規格協会 (2015).
- 6) 株式会社島津製作所ホームページ、<https://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/support/lib/ltalk/61/61intro.htm> (2019 年 9 月 21 日現在).
- 7) エムエス・ソリューションズ株式会社ホームページ、<https://www.sitsuryobunsekiya.com/download/> (2021 年 12 月 9 日現在).
- 8) 中村 洋 監修、(公社) 日本分析化学会編、第 1 回 LC/MS 分析士二段試験解説書、pp.88-89、(公社) 日本分析化学会 (2014).
- 9) 中村 洋 監修、(公社) 日本分析化学会編、LC/MS, LC/MS/MS の基礎と応用、p.48、(公社) 日本分析化学会 (2014).
- 10) 日本質量分析学会用語委員会編：マスペクトロメトリー関係用語集 (第4版)、p.55、国際文献印刷社 (2020).
- 11) 高橋 豊、川畑慎一郎、ぶんせき 7 号、p.332、(公社) 日本分析化学会 (2007). の表 1 を改変.
- 12) 日本分析化学会編、分析化学便覧 (改定六版)、p.764、丸善 (2011).

〈執筆者略歴介〉 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



【 会員動向 】

愛媛生活 4 年 + 9 年 / Ehime Life 4 Years + 9 Years

児玉竜二 / Ryuji KODAMA

住友金属鉱山 (株) / Sumitomo Metal Mining Co., Ltd.

(Received November 9, 2021 ; Accepted November 10, 2021)

キーワード 愛媛 ; みかん ; 紅まどonna ; だるま夕日

殆どテレビに出なくなった芸能人や、学校の同窓会で音信不通になると、「あいつ死んだらしいで」と知らない所で死んだ事にされてしまいます。事実、中学生時代の剣道部では、つい最近まで私は死んだ事になっていて、初めて同窓会に出席した時に、私を殺した(死んだと思い込んでいた)後輩から、発注を間違えて顧客に大迷惑を掛けてしまった営業マンの如く、誠心誠意謝られました。「短くて分らんかも知れんけど、一応足有るから生きてるで。」と笑って返し、無事生き返る事が出来ました。その時の後輩の顔は一生忘れないと思います。

と、言う事で、液体クロマトグラフィー研究懇談会に参加しなくなって約 3 年が経ちましたが、ちゃんと個人会員費も支払っていますし、短いながらも一応足も有りますので生きております。大変ご無沙汰して申し訳ございません。

液体クロマトグラフィー研究懇談会との関係は、2010 年 3 月 17 日から始まりました<sup>1)</sup>。中村先生に振り向いて戴きたく、三重県から例会に出来る限り出席し、帰りの新幹線の関係で途中退席する事が殆どでしたが、必ず情報交換会にも参加しました。そして、液体クロマトグラフィー分析士初段試験にも挑戦し、三重県第一号の LC 分析士となりました<sup>2)</sup>。そして、忘れもしません、オルガノ株式会社さんで開催された 2010 年 12 月 17 日の第 236 回例会後の情報交換会の時に、中村先生から「君は三重から熱心に参加して呉れているから、運営委員にならないか」とのお言葉を戴いたのを切っ掛けに<sup>1)</sup>、運営委員(現名称:役員)を約 7 年間務めました。運営委員初日が何と 2011 年 3 月 11 日、そうです、東日本大震災の日でした。例会の休憩時間の時に起きた長く続いた本震の凄まじさと、大きな余震の中、普段と殆ど変わらない姿勢で発表した坂さんの姿がつい昨日の様に思えます。

現在の私ですが、今年の 4 月から分析業務を卒業(退学?)し、弊社技術本部・知的財産部(新居浜)で特許関連の仕事をしています。言葉、文章だけ(図面を添付する事は有りませんが)で特許権を取得出来るか出来ないかが決まる、分析とは違ったきめ細かさが必要で、日々勉強の毎日です。

仕事の事を書くとき堅苦しくなるので、東京から 500km 以上離れ(JR で私がいる愛媛県新居浜市の新居浜駅と東京駅との距離は 856km)、運営委員会出席ポイントが 3 倍になっていた(今もこのシステムは続いていますか?)、愛媛での生活についてお話しします。

2012 年 7 月に、三重県にある住鋳潤滑剤 (株) から、愛媛県新居浜市にある弊社新居浜評価技術センター (現 新居浜評価技術室) に異動となったので、愛媛県での生活が 9 年となりました。実は、愛媛県松山市にある愛媛大学に 4 年間 (1988 年 4 月～1992 年 3 月) 在籍していましたので、愛媛県での生活は 4 年+9 年の計 13 年になり、私の人生の約 1/4 は愛媛県にいる事になります。

さて問題です。皆さんは愛媛県と聞いて何を想像しますか？

愛媛県の偽物？ (愛媛大学は地元では愛大-あいだい-と呼ばれています。しかし、愛大-あいだい-と聞いたら、殆どの人は愛知大学を想像すると思われれます)

それはさておき、恐らく皆さんが想像するであろう“みかん”のお話と、殆ど想像しないであろう“だるま夕日”のお話をしたいと思います。

### ●みかんのお話

みかんと言えば、やっぱり「炬燵でみかん」でしょうか。因みに、物真似タレントのみかんさんは愛媛県今治市出身です。

「炬燵でみかん」のみかんは、温州みかんと言われるもので、実は、温州みかんの収穫量は和歌山県が 17 年連続でトップ、愛媛県は長らく 2 位でしたが、平成 30 年産の集計では静岡県にも抜かれてしまい 3 位になってしまいました (平成 30 年の西日本豪雨の影響でみかん山が大きな被害を受けた事が原因と言われています)。しかし、柑橘類の種類になると愛媛県が日本一です。

次の問題です。愛媛県の柑橘類は何種類有るでしょうか？

答えは 41 種類です。なお、愛媛県が独自に行っている統計調査では、名称が確認されたものは 48 種類だそうです<sup>3)</sup>。柑橘王国・愛媛たる所以です。

温州みかん以外で先ず思い浮かぶのは、愛媛県の旧国名の伊予が名前についた“伊予柑 (いよかん)”でしょうか。伊予柑の生産量は勿論日本一で、何とシェアが 92.3%です。

次の問題です。温州みかん、伊予柑以外に知っている柑橘類を挙げて下さい。図 1 に温州みかん及び伊予柑を含めた愛媛県で収穫している 29 種類の柑橘類が記載されています。全部知っている方がいらっしゃったら、何かプレゼントしますのでご連絡下さい。ご連絡者が多数の場合は抽選にさせて戴きます (笑)。因みに、私は 2 つ分かりませんでした。

図 1 の通り、1 年中何らかの愛媛県産の柑橘類が食べられる事が分かります。意外に思っている方が多いと想像していますが、愛媛県では 2 月～3 月上旬頃に多くの種類の柑橘類が入手出来ます。この時期に、のま果樹園松山大街道店 noma-noma さん<sup>4)</sup>に行くと、多くの柑橘類が有る事に驚き、其の柑橘類の香りが素敵なハーモニーを奏でる様に、店内がとても良い香りに包まれ、お店に行くたびに癒されています。これから本格的なみかんのシーズンになるのですが、一番のお勧めは 11 月下旬から販売が開始される“紅まどんな”です。品種名は“愛媛果試第 28 号”で、全国農業協同組合連合会 (以下、JA 全農と表記します) では一定の品質基準及び外観基準をクリアしたもののみ“紅まどんな”として販売しています。

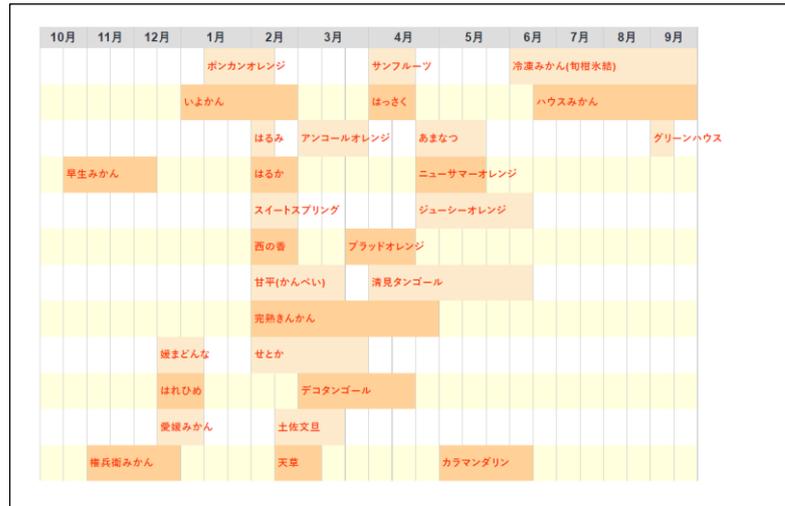


図 1 柑橘類カレンダー (愛媛県で収穫している柑橘類)

出典：のま果樹園 HP より抜粋 (<https://www.kajuen.co.jp/introduction/>)

なお、「紅まどんな」は JA 全農の登録商標になっています。果樹園等が独自で販売するものは、「媛まどんな (株式会社乃万青果の登録商標)」、「愛媛まどんな」、「あいか」、「愛果 28 号」などの名称で販売されています。味は変わりません。ゼリーのような食感で、甘みと酸味のバランスが絶妙で果汁もたっぷりでジュシー！一度食べたら絶対にハマります。



図 2 媛まどんなについて

出典：のま果樹園 HP より抜粋 (<https://www.kajuen.co.jp/introduction/item34.htm>)

愛媛県でしか栽培が出来ないので、生産量が少なく、首都圏や関西圏では大手百貨店に行かないと入手出来ないと思われます。ただ、最近はインターネット経由で簡単に入手出来ま

すので、ご興味がある方は「紅まどんな」や「媛まどんな」をググってみてください。

松山市には、のま果樹園松山大街道店 noma-noma さん以外にも柑橘類を取り扱っているお店が点在しており、お店によって其其特徴があり、そのまま味わえたり、生ジュースとして飲む事が出来たり、パフェやソフトクリームとして食べる事も出来ます。松山市と言えば、道後温泉と松山城が観光スポットですが、柑橘類のお店をハシゴするのも楽しいですよ。

それから、昔々20世紀のお話、大学生の時のエピソードを2つ紹介します。

1つ目は、住んでいたアパートの大家さんがみかん農家で、冬に家賃を支払いに行くと、必ずみかんと伊予柑を貰った良い思い出があります。美味しかったなあ。

もう1つは、愛媛県宇和島市出身の先輩に、

私：「南予<sup>5)</sup>の人の親指は冬になると黄色くなるって聞いたのですが、先輩の親指はどうなんでしょうか？」

先輩：「そんな筈ないだろう。」

私：「じゃあ見せて下さいよ。」

親指を見せる事に少し躊躇う先輩の右手を掴んで親指を見ると、見事に黄色。

私：「やっぱり。」

先輩：「ばれた…。」

右利きの方がみかんの皮を剥く時には右手の親指を使うので、みかんの色素が着くのでしょう。どんだけみかんが好きやねん！？愛媛出身の友人から、「実家からみかん送って来たから」、と言ってよくお裾分けをして貰ったのも良い思い出です。

### ●だるま夕日のお話

こんな夕日をご覧になった事はありますか？

蜃気楼の一種で、水平線に沈む夕日が“だるま”の様に見える現象で、少なくとも水平線に太陽が沈まないとは起こりません。瀬戸内海には島が沢山点在しているので、愛媛県では“だるま夕日”は無縁、高知県辺りに行かないと見られないものだと思っていました。所が、或る写真コンテストで、撮影した“だるま夕日”の写真が入賞しているのを見てビックリし、自分も撮りたいな！と思うようになりました。



図3 だるま夕日①

当時は、前記三重県に住んでいましたが、プライベートで行ったり、年に数回愛媛に出張する事が有り、出張が金曜日迄の時には日曜日に戻る様にして、土曜日にだるま夕日を狙いに行きました。実は、三重県の東側は太平洋に面しているのですが、南に行けば“だるま朝日”が見られる環境なのですが、朝起きるのが苦手です…。上記の通り、“だるま夕日”は水平線に太陽が沈まないとは見られないので、撮影場所としている伊予市(松山市の南に在ります)では、10月上旬～3月上旬がチャンスです。それ以外の期間は、図4の様に島に向かって

太陽が沈み“だるま夕日”を見る事が出来ません。10月上旬～3月上旬の間でも、島が全く無い訳ではない為、図 5 の様になってしまう事が有ります。



図 4 日曜日午後 7 時の TV 番組で出て来る某 D 島に向かって沈む夕日



図 5 島に向かって沈む夕日  
(2019/11/23 撮影)

勿論、晴れていても水平線の近くに雲が有ったり、霞んで見通しが悪かったりすると見られませんし、気象条件によって“だるま夕日”にならない事も有ります。



図 6 雲に邪魔された夕日



図 7 だるまにならなかった夕日

新居浜市では西側に山が在る為、“だるま夕日”の撮影スポットは無く、休日のお天気が良い日には、ドライブを兼ねて、撮り慣れた伊予市へ“だるま夕日”を撮りに行っています。色々な“だるま夕日”の写真を載せておきます。



図 8 だるま夕日②



図 9 だるま夕日③



図 10 だるま夕日④



図 11 だるま夕日⑤

最後になりましたが、貴重な紙面に私の近況や愛媛県の話を書かせていただき、液体クロマトグラフィー研究懇談会の中村先生を始め皆様に感謝申し上げます。

#### 参考文献、追加コメント等

- 1) (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 創立 40 周年記念誌, “液体クロマトグラフィー研究懇談会と私”, (2014).
- 2) 株式会社島津製作所で開催された例会の休憩時間の時に、中村先生に確認しました。確か、トイレだったと記憶しています。
- 3) 愛媛県 HP より (<https://www.pref.ehime.jp/h35500/kankitsu/toukei.html>, 2021 年 11 月 9 日確認)。
- 4) のま果樹園さんが経営している、愛媛県松山市の中心街、大街道に在るフレッシュジュースとギフトのお店です。佐藤店長は、私の柑橘類についての師匠で、分らない事を質問すると、いつも即答して呉れます。ここで飲める柑橘類のジュースは絶品です！松山に行った際には是非お立ち寄りください。
- 5) 愛媛県は、東予（新居浜市が含まれます）、中予（松山市周辺）、南予（宇和島市周辺）の 3 つに分けて呼ばれる事が有ります。天気予報では東予地方、中予地方、南予地方と紹介されます。

#### <執筆者略歴> 児玉竜二(こだま りゅうじ)

住友金属鉱山(株) 技術本部 知的財産部 (新居浜)

〒792-0002 愛媛県新居浜市磯浦町 17-5

E-mail : ryuji.kodama.y8@smm-g.com

- ・ LC 分析士 二段
- ・ LC/MS 分析士 初段
- ・ 書道 四段
- ・ 剣道 初段
- ・ 顔 冗談



赤丸が私です

## 【団体会員紹介】

### クロマニクテクノロジーズと HPLC/UHPLC カラム/

### ChromaNik Technologies Inc. and HPLC/UHPLC Column

長江徳和 / Norikazu NAGAE

株式会社クロマニクテクノロジーズ / ChromaNik Technologies Inc.

(Received June 21, 2021; Accepted June 23, 2021)

キーワード シリカ系逆相充填剤 ; C18 ; C30 ; エンドキャッピング

#### 1. 会社設立

クロマニクテクノロジーズは 2005 年 12 月 2 日に商業登記し、会社としての活動が始まりました。クロマニクテクノロジーズは、20 年以上の実績をもつポリマー充填剤の専門家とシリカ充填剤の専門家が一緒に成り、ポリマー系固相抽出剤とシリカ系逆相カラムの二つの柱を立てた 4 名での船出でありました。しかし、世の中良い事ばかりは続かず、途中嵐に遭遇し、一本の柱が折れ、沈没寸前に成りましたが、協力者の支援を得て何とか立て直し、現在に至っております。お蔭様で、今では順風満帆です。現在の主力商品はシリカ系充填カラムであり、日本のみならず全世界に供給しております。会社の規模は決して大きくありませんが、現在 8 名の少数精鋭で、地道に活動しております。

#### 2. Sunrise 逆相カラム

Sunrise C18 及び C18-SAC の両カラムは 2007 年 7 月に発売開始しました。Sunrise C18 は通常の C18 アルキル基結合後、トリメチルシリル(TMS)化によるエンドキャッピングを施した充填剤で、一般的な性能の C18 ですが、Sunrise C18-SAC は Silanol activity control (シラノール活性の制御) の頭文字をとって SAC と名付けた特殊なカラムです。この Sunrise C18-SAC はエンドキャッピング試薬を結合させおらず、シラノール基が残っていますが、特殊な処理を加える事により、塩基性化合物の吸着を抑えております。従いまして、残存シラノール基によるイオン交換相互作用は起こりませんが、塩基性化合物を吸着しないので、テーリングの無い分離が出来ます。その後長鎖アルキル基を導入した Sunrise C28、Sunrise C30 をラインナップに加えておりま



図 1 Sunrise 逆相カラム

す (図 1)。C30 固定相は他の固定相には無い特徴が有ります。極性の高い化合物から脂溶性の高い化合物迄、非常に幅広い極性 (疎水性) の化合物を分離分析する事が出来ます。C30 カラムは 100 %水系移動相を用いても、C18 カラムの様な保持の減少が起こらず、再現性の高い保持時間を示します。又、カロテンの様な高脂溶性化合物の分離の場合 C18 カラムに比べ、C30 カラムでは保持が大きく成り、分離も改善されます。移動相中有機溶媒濃度が 10%から 100%迄の移動相条件では C30 カラムは C18 カラムとほぼ同じ保持時間となり、よく似た分離を示しますが、異性体の分離が改善されます。キシレンのメタ体とパラ体の分離や、ビタミン E である  $\beta$  体と  $\gamma$  体のトコフェロールの分離は C18 カラムでは非常に難しいですが、C30 カラムでは簡単に分離出来ます。

### 3. Sunniest 逆相カラム

Sunniest C18 カラムはエンドキャッピングを極めたカラムとして 2008 年 9 月に発売開始しました (図 2)。エンドキャッピング処理方法については、詳しくは本ジャーナルの「ノウハウ」の記事を参照して頂ければと思いますが、簡単に説明しますと、従来のエンドキャッピングに用いますシリル化試薬の結合だけでなく、シリカゲルのアモルファス状態を利用して、ケイ素原子を動かす事の出来る高温状態で、シラノール基をシロキサン結合に変換させる事でもシラノール基を減少させております。このようなエンドキャッピングの考え方は今迄無かったと思います。新しいコンセプトに基づくエンドキャッピングの登場です。弊社ではこのエンドキャッピング処理を Sunniest end-capping (サニエストエンドキャッピング) と命名しております。その後 C18 以外



図 2 Sunniest 逆相カラム

の RP-AQUA、C8、Phenyl、Cyano、PFP、PFP&C18、Biphenyl 固定相を上市しました。特に PFP&C18 や Biphenyl 固定相は独自の固定相であります。Biphenyl カラムは他に 4 社から供給されております。弊社は三官能性 Biphenyl 試薬を結合後、Sunniest end-capping を施しておりますが、他社は全て一官能性 Biphenyl 試薬を用いております。三官能性試薬と Sunniest end-capping の組み合わせにより Sunniest Biphenyl は耐久性・シラノール基の不活性度が他社の Biphenyl より高く成っております。

### 4. SunShell カラム

コアシェル (表面多孔性、superficially porous) シリカを用いた SunShell C18 カラムを 2011 年 4 月に発売開始しました。コアシェルカラムは Advanced Materials Technology 社の Halo とシグマアルドリッチ社の Ascentis Express が 2007 年に、Phenomenex 社の

Kinetex が 2009 年に発売開始しており、SunShell は国内メーカーとして最初のコアシェルカラムに成ります。コアシェルシリカは製造上 600°C に加熱する工程が含まれており、シリカ表面に存在するシラノール基の状態や存在比率が、180°C 以下で製造される全多孔性シリカとは異なる為、エンドキャッピングを含め同じ表面処理を行っても、全多孔性シリカと同じ様に成りません。多くのコアシェル C18 は全多孔性 C18 よりも残存シラノール基の影響が出易く成っています。SunShell カラム (図 3) はコアシェルシリカ表面のシラノール基の状態を考慮した Sunniest end-capping を含めた表面処理を行っており、他社コアシェル C18 に比べ、塩基性化合物のテーリングは非常に少なく成っております。固定相は全多孔性の Sunniest 同様に多くの種類を取り揃えております。SunShell 独自の固定相は、超臨界流体クロマトグラフィー用として 2-EP (2-エチルピリジン)、ヒリック用として HILIC-Amide 及び HILIC-S (シリカ) が有ります。コアシェルシリカの細孔径は低分子用として 9 nm、ペプチド用として 16 nm、タンパク質用として 30 nm と 100 nm を取り揃えております。又、粒子径は 2.0  $\mu\text{m}$ 、2.6  $\mu\text{m}$ 、3.4  $\mu\text{m}$ 、3.5  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$  の 5 種類が有ります。昨年上市しました 3.5  $\mu\text{m}$  の SunShell C18、4.6 mmID  $\times$  150 mm カラムは、汎用 HPLC 装置を用いて測定した理論段数が 28,000 段で、カラム背圧は通常の 3  $\mu\text{m}$  に比べて低く成り、高理論段数・低背圧を特徴としたカラムです。

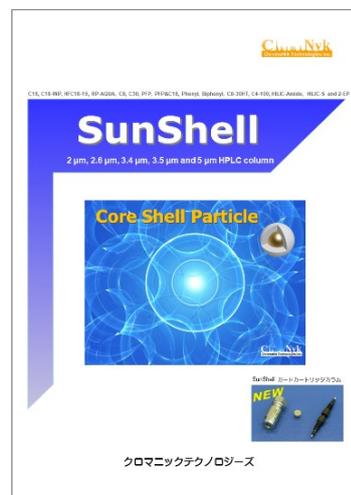


図 3 SunShell カラム

## 5. SunArmor カラム

SunArmor シリーズは耐アルカリ性を高めたカラムで、エンドキャッピングに通常のシリル化試薬に加えエチレン鎖を含む特殊な試薬も添加しております (図 4)。固定相は C18 と RP-AQUA (C30) 及び NH<sub>2</sub> (アミノプロピル) の 3 種類が有ります。NH<sub>2</sub> カラムは固定相自身のアミノ基によりカラム内でアルカリ雰囲気 (約 pH 11) を作り出してしまふ為、カラム寿命が短い事が欠点であります。SunArmor NH<sub>2</sub> カラムは特殊なエンドキャッピングにより通常の 3 倍程度の耐久性を有しております。

カラムサイズは分析用のものは全ての固定相にほぼ共通ですが、内径 0.075 mm、0.10 mm のナノカラム、0.3 mm、0.5 mm のマイクロカラム、1.0 mm、2.1 mm のセミマイクロカラム、3.0 mm、4.6 mm の分析カラムが有ります。更に、



図 4 SunArmor カラム

SunShell 以外のカラムは 10 mm、20 mm の分取カラムを取り揃えております。

## 6. 学会発表

クロマニックテクノロジーは学会発表を積極的に行っております。クロマトグラフィー科学会、日本薬学会、海外の Pittcon (図 5)、HPLC、EAS などほぼ毎年参加しております。製品開発に直接関わっていない社員も一度は海外の学会に参加してもらい、海外の学会の雰囲気を知ってもらう事と共に、クロマニックテクノロジーと海外のディーラー・ユーザーとの関係なども肌で感じてもらっております。筆者は前職の 1993 年以来、Pittcon には今年のヴァーチャルイベントを除き、毎年参加しており、Conference と EXPO の四半世紀に渡る移り変わりを見て、世界的な分析関連の流れの変化を実感しております。海外を含め学会に参加し、最新情報を得る事により、新規商品へのヒントが得られたり、新たなアイデアが浮かぶ事が多いだけでなく、世界中の業界人が集まる学会や展示会を、Face to Face でのコミュニケーションの場とし、エンドユーザーやディーラーとの出会いの機会が得られる事も非常に有益であると感じております。

## 7. 会社内の親睦

少数の会社ですので、一泊の社員旅行などはなかなか出来なく、毎月の売上げが一定以上になった時に社員全員で、「頑張ろう会」と名付けた食事会を行っております。昨年はコロナ禍と言う事も有り、残念ながら頑張ろう会は



図 5 Pittcon 2014 シカゴ (米国ディーラーの Mr Silver とクロマニックテクノロジー社員 3 名)



図 6 串本での体験ダイビング

殆ど開く事が出来ませんでした。2016 年 7 月には会社設立 10 周年記念として特別に社員と共に紀伊半島の最南端の串本迄行き、体験ダイビングを楽しみました (図 6)。水の中でも「息が出来る」と言う或る意味不思議な実感と、水中での中性浮力 (浮きも沈みもしない状態) で、無重力に近い体験が出来ました。又、イカやクマノミ等を間近で見る事が出来、こちらから危害を加え無い限り、逃げて行く事は無く、海中の生物同士としての一体感を楽しむ事が出来ました。

## 8. 最後に

私たちクロマニクテクノロジーは小さな会社ではありますが、逆相カラムの基礎的な事や、新しい発想に基づく新技術などの情報発信と共に、今後も独創性のある商品の研究開発を進めて行き、皆様のご要望に沿える様、頑張る所存です。特徴の有る HPLC/UHPLC カラムの製造販売を通して微力ではありますが、皆様の分離分析のお役に立つ事が出来ましたら幸いです。

### < 執筆者略歴 > 長江徳和 (Nagae Norikazu)

- ・ (株)クロマニクテクノロジー  
(〒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)
- ・ 連絡先 : E-mail: nagae@chromanik.co.jp



## 【団体会員紹介】

### CERI と HPLC カラム / CERI and HPLC Columns

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

(Receive November 19, 2021 ; Accepted November 25, 2021)

キーワード HPLC ; ODS カラム ; エンドキャッピング ; メタルフリーカラム ;  
耐アルカリ性カラム

#### 1. はじめに

一般財団法人化学物質評価研究機構 (CERI) は、化学物質等に関する試験・検査、評価、研究・開発等を行う事により、化学物質等の品質の向上及び安全性の確保並びに環境保全及び衛生保持を図り、もって産業の健全な発展と国民生活の向上に寄与する事を目的として活動している機関です。1949 年にゴム製品検査協会として発足し、ゴム・化成品検査協会、化学品検査協会、化学物質評価研究機構と名称変更して、2010 年 4 月 1 日に「一般財団法人」となり、2019 年 2 月 8 日に創立 70 周年を迎える事が出来ました。この間、事業内容は、高分子技術部門、環境技術部門、化学標準部門、クロマト技術部門、化学物質安全部門及び安全性評価技術研究所まで充実、拡大し、現在、本部、及び東京、名古屋、大阪、久留米、日田の 5 事業所に渡って事業を展開しています。

本稿では筆者の所属するクロマト技術部門の HPLC カラムを中心に紹介します。

#### 2. L-column の開発

CERI は、1980 年代にクロマトグラフィーのユーザーとしての豊富な知見を基に各種クロマトグラフィー用カラムの開発を行っていました。1986 年に既存のガスクロマトグラフ用として当時は主流であったパックドカラムより高い性能が得られ、再現性に優れたカラムとして、G-column (大口径オープンチューブカラム、図 1 (左)) を開発しました。次のターゲットは HPLC 用のカラムでした。その主流は当時から ODS カラムであり、既に各メーカーから ODS カラムは数多く市販されてい



図 1 G-column (左) 及び L-column (右) のリーフレット(発売当時)

ましたが、どれも再現性が得られ難く、耐久性も低いと言う問題が有りました。これは、液相中でのシリカゲルへの化学修飾方法では反応効率が低い事に原因が有りました。そこで、*G-column* の気相中での化学修飾方法を HPLC 用カラムに応用した所、反応効率は飛躍的に改善し、基材に残る吸着点 (シラノール基) が殆ど無い ODS カラムの開発に成功し、1990 年に販売を開始しました (図 1 (右))。当時、群を抜いた性能はパイオニアのカラムとして位置付けられ、CERI の HPLC カラムの歴史が始まりました。又、発売当初は粒子径 5  $\mu\text{m}$  の *L-column ODS* のみで、カラムサイズは内径 4.6 mm、長さ 150 mm 及び 250 mm を中心に少数のラインナップでしたが、C8 や粒子径 3  $\mu\text{m}$  の充填剤とラインアップを徐々に増加する事が出来ました。更に、当時では市販しているメーカーが少なかった内径 0.075 mm のナノ・マイクロカラムを 2006 年から販売しました。

### 3. *L-column2* の開発

2007 年に発売された *L-column2 ODS* (図 2) は、新規エンドキャッピング法により *L-column ODS* を超えた性能をもち、酸性物質から塩基性物質、配位性化合物まで幅広い化合物に対応します。LC-MS/MS の普及や分析精度向上が求められる今日、従来であれば問題とならなかった微量な残存シラノールが分析に影響をもたらす様になり、より残存シラノールの少ない ODS カラムへの要求が高まって来ました。これに応える為に新規エンドキャッピング法を開発し、*L-column* を超えた理想的なカラムが、*L-column2* です。残存シラノールが驚異的に少ない充填剤が、HPLC カラムの高性能化を実現させました。メソッド開発のファーストチョイスカラムとして期待を裏切らない、次世代高性能 ODS カラムです。

- 塩基性物質の吸着が無くピーク形状が向上
- 配位性化合物の微量分析における再現性の向上
- 耐久性の向上

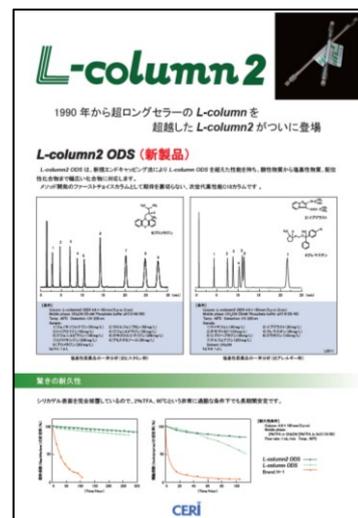


図 2 *L-column2* のリーフレット(2007年)

*L-column2 ODS* では充填剤ロットごと及びカラムごとの規格値を設定し、徹底した品質管理により、製品ロット間のばらつきを低減しています。各カラムの成績証明書以外にそのロットの成績証明書も添付されています。更に ODS 以外にも C8 や C6-Phenyl の充填剤、UHPLC 用カラムに用いる粒子径 2  $\mu\text{m}$  の充填剤も開発しました。カラムサイズも内径 0.075 mm のナノ・マイクロカラムから内径 50 mm の分取カラムまで取り揃えるようになりました。又、革新的なメタルフリーカラムも他社に先駆け、発表しています (図 3)。

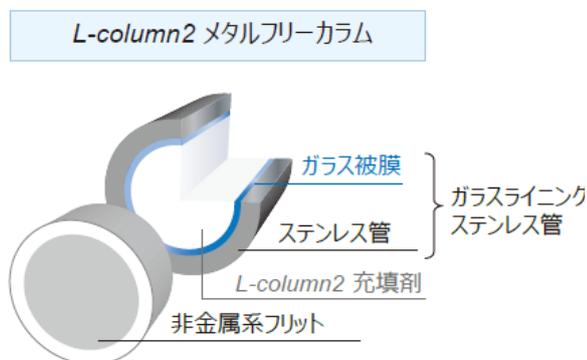


図 3 メタルフリーカラムの構造

#### 4. *L-column3* の開発

2017 年に発売された *L-column3* は、卓越した化学的耐久性とトップレベルの低吸着性の両立を実現した比類なき高性能なオールラウンドカラムです。シリカ系カラムは、高い分離効率や機械的強度が得られるなど多くの利点がある為、現在、逆相クロマトグラフィー用カラムにおいて、最も汎用されています。その一方、アルカリ性溶液に晒されると、シリカは簡単に浸食されてしまう為、使用出来る溶離液の pH 範囲が制限されます。*L-column3* は新開発の耐アルカリ性の非常に高い PCS シリカ (Perfect chemical stable silica) と、*L-column2* の性能を更に進化させた耐久型高度エンドキャッピングにより、充填剤の化学的耐久性(耐酸性、耐アルカリ性)が飛躍的に向上したオールラウンドカラムです (図 4)。

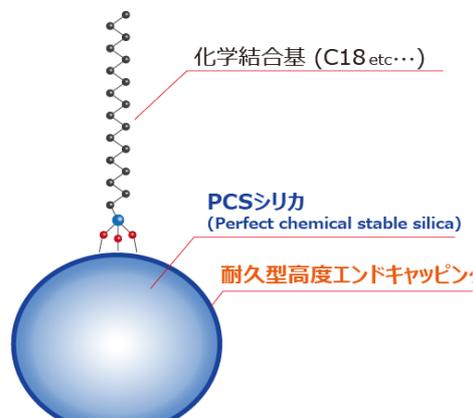


図 4 *L-column3* のイメージ

- 耐アルカリ性が高く、pH 1~pH 12 まで使用可能
- あらゆる化合物において低吸着性はトップクラス
- 溶離液の pH を自由に選択出来るので、分離やピーク形状が改善
- 水系 100%溶離液でも安定した分析が可能

使用出来る溶離液の pH 範囲が広がると、格段に分析メソッドの幅が広がります。特にアルカリ性溶離液を用いれば、塩基性物質の解離を抑制した状態での分析が可能となり、保持や負荷量の増加等のメリットが得られます (図 5)。

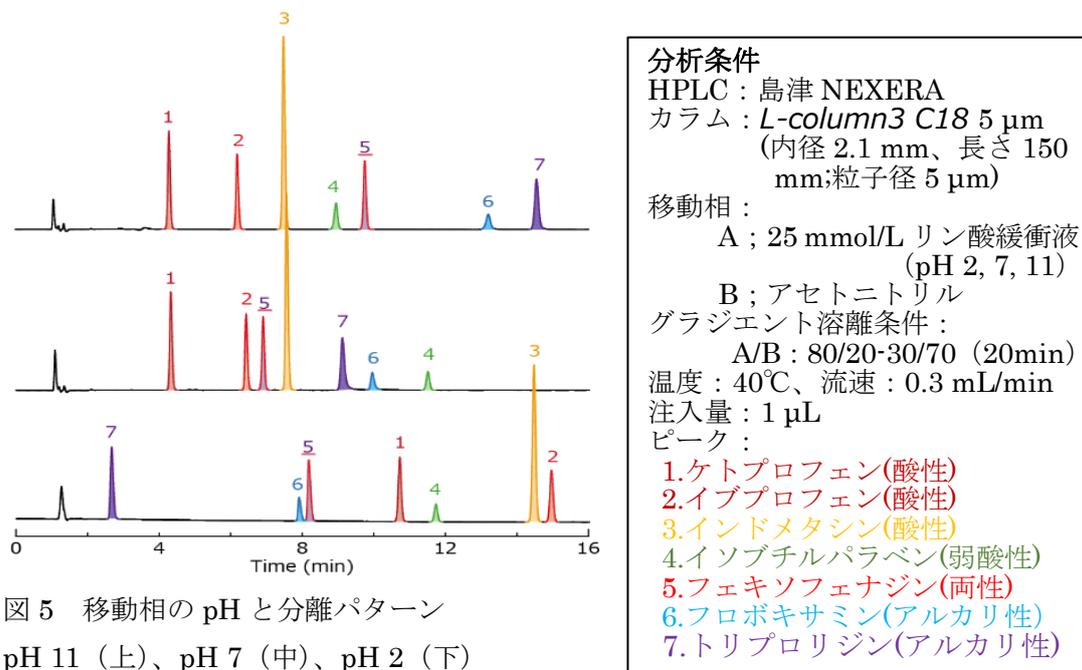


図 5 移動相の pH と分離パターン  
pH 11 (上)、pH 7 (中)、pH 2 (下)

## 5. おわりに

L-column シリーズのコンセプトは、一貫して分かり易い分離機構のカラムを目指しています。ODS カラムでの化合物の保持は疎水性相互作用が主たる作用です。従って、化合物の疎水性 (例えば log Pow で表される) と保持係数との間にはほぼ相関関係があり、本来、溶出挙動は非常に分かり易く、保持時間も容易に予測出来る筈です。しかし、疎水性相互作用以外の基材シリカゲルのシラノール基や金属不純物との二次的な相互作用が溶出挙動を複雑にし、それを是正する為に移動相のメソッド開発に熟練が必要になって来ます。CERI では、充填剤を改善してこれらの二次的な相互作用を排除する事により、分かり易い分離機構のカラムの販売・開発を目指しています。

### 【本機構基本理念】

「人と化学と環境の調和、それが私たちの仕事です」

私たちは、中立公正な立場で化学物質と化学製品の評価及び管理に関する最良のソリューションを提供し、人と化学と環境が調和した安全・安心な社会づくりに貢献します。

< 執筆者略歴 > 坂牧 寛 (Sakamaki Hiroshi)

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修了。博士 (工学)。
- ・ 液体クロマトグラフィー分析士二段、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/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

## 【新役員紹介】

### LC 研究懇談会准役員に就任して

松岡秀雄 / Hideo MATSUOKA

ジーエルサイエンス株式会社 / GL Sciences Inc.

(Received November 19, 2021 ; Accepted November 24, 2021 )

この度、ご縁が有り LC 研究懇談会のお手伝いをさせて頂く事になりました。今思い返してみると、同研究懇談会との繋がりは私がジーエルサイエンスに就職して初めての仕事内容でした。神楽坂の東京理科大学で行われた「分析機器講習会」、実習部分の資料作成と関連データ採りを行い、講習会当日は先輩社員に連れられてオドオドと手伝いをした事をよく覚えています。業界の一部に身を置いたものの、「液クロ」について知識もない為、その後暫くは例会や LC テクノプラザなどを貴重な勉強の場として活用させて頂きました。

当時の HPLC はセミマイクロへ移り変わろうかと言う風潮で、カラムについても粒径 3  $\mu\text{m}$  から 5  $\mu\text{m}$  の全多孔性シリカゲルを用いたもので占められていました。その後、検出器としての質量分析計の普及、多検体を取り扱う高速分析への要求も高まり、それらに合わせた装置やカラムなどの研究開発も進んで来ました。

LC 研究懇談会におかれましては、毎月のように開催される例会、関連する様々な催し、出版、分析士制度など、非常に精力的に活動されていると感じます。これも中村先生を始めとする役員の方々のご尽力有っての事と思います。今回このような機会を賜り、微力ながら委員会活動のお手伝いが出来ればと思います。個人的には本研究懇談会の活動が、曾ての自分もそうであった様に、若い方の学びの場として活用して頂ける事を願っております。

#### < 執筆者略歴 > 松岡秀雄 (Hideo MATSUOKA)

- 1997 年 東京都立大学工学研究科修士課程修了、同年ジーエルサイエンス株式会社入社、クロマトグラフィー用充填剤開発に従事。
- 分析士資格：無し。LC 分析士初段、LC/MS 分析士初段を取得予定



## 【新会員紹介】

### バイオアナリシスとクロマトグラフィー／

### Bioanalysis and Chromatography

櫻井 周／Amane SAKURAI

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

キーワード バイオアナリシス；バイオマーカー；新モダリティ；LC-MS/MS

( Received November 20, 2021; Accepted November 25, 2021 )

#### 1. 始めに

今年 9 月に LC 研究懇談会に入会させて頂いた、東レリサーチセンターの櫻井と申します。これ迄に、LC 研究懇談会の例会や LC & LC/MS テクノプラザでは何度か発表の機会を頂きましたが、入会する時機を逸しており、今回、新会員と言う事で自己紹介させて頂きます。

私は、検査・診断分野で機器分析業務に従事し、クロマトグラフィーを利用する様になりました。現在の職場に異動してからは、医薬品開発に関わる受託分析で主に LC-MS/MS を利用しております。機器分析に携わって来た 20 余年を失敗や転機、及び私が携わって来た分析事例から振り返ります。

#### 2. 新人時代の失敗

検査・診断の分野では、施設間のデータの誤差を極小化する事が求められます。そこで、私が最初に入社した職場では定期的に外部機関の精度管理調査（サーベイ）に参加していました。測定結果から施設の品質や技能等が評価される事から、検体測定施設として選定を受ける為には常に高い水準を維持する事が望まれます。サーベイはオープン方式とブライント方式があり、前者は予め調査用検体である事が通知されて実施されるのに対し、後者は調査である事が伏せられ、医療機関から通常通り出検されます。その為、日々の測定では、 $\bar{X}$ -R 管理図等を用いて精度管理データの変動を監視し、適切に対応する事が重要になります。例えば、管理基準内ではあるけれども平均値よりも常に上方或いは下方で推移する検査項目や、管理限界線を超える回数が頻発している機器等を適格に読み取り、必要に応じて実験器具や測定機器のメンテナンスを実施します。測定機器のメンテナンスには測定原理の理解や装置の構造を把握する事が欠かせません。当時の上司は入社して間もない私に対し、担当していたガスクロマトグラフィーを分解し、元通りにする事を課題として与えました。私は大失態を犯し、注入口や検出器の細部まで分解しましたが、復元する事が出来ませんでした。原因は準備不足に他なりません。知識や経験が乏しいにも拘わらず最初の状態を

記録に残さずに分解を始めた事に在ります。以降、不慣れな作業を行う前には初期状態をスケッチする事で再発の防止に努めています。今では携帯電話やスマートフォンが普及し、咄嗟の場面でもカメラで簡便且つ、鮮明に記録を残す事が出来ますが、スケッチに限らず「書く」と言う行為は記録だけでなく記憶に残す非常に有効な手段です。与えられた課題の意味は、単に装置を分解して組立てるだけでなく、装置の構造を深く理解する事や、事前準備の重要性など、多くの事を吸収させる事が目的であったと理解しています。

## **2. 発想の転換？**

本格的に HPLC を使い始めたのはヘモグロビン分画測定からです。使用機器はヘモグロビン測定の専用機で、各ヘモグロビンがもつ電荷と、イオン交換カラムの充填剤の官能基との静電相互作用によって分画されます。分画の 1 つに糖尿病の診断や治療のバイオマーカーであるグリコヘモグロビン (HbA1c) が有ります。糖尿病患者数は食の欧米化などの変化によって増加の一途を辿り、HbA1c の検査数は増加しています。当時は全国の医療機関から毎日、少ない時で 500~600 本、繁忙期では 1,000 本を超える検体を受領し、翌日午前には報告しなければならず、多検体を遅滞なく処理する為に HPLC の分離状態を常に良好に保つ事が重要でした。業務にも慣れて来た頃に、装置の老朽化から新機種への更新が行われました。モデルチェンジした装置は測定時間を短縮する為に移動相の流速を上げ、ピーク分離は垂直分割するという物でした。これ迄、ベースライン分離こそが最高の状態であると言う認識の下、日々の機器のメンテナンスに注力していた自分にとっては、考え方や視野の狭さを痛感させられました。結果として、測定時間が短縮する事により、データの生産性は向上し、労務時間の削減や設備投資費用の抑制などメリットが多い事に気付かされました。この機器の更新を契機に、固定観念に囚われず、多角的な視点で考察する事が発想の転換を生み、技術開発への推進力になる事を実感しています。

## **3. LC-MS/MS 法での挑戦**

現職の東レリサーチセンターについては「LC と LC/MS の知恵、第 2 号、156-161 (2021)」で紹介されている為、詳細は割愛します。私が所属するバイオメディカル分析室では医薬品開発における有効性や安全性を評価する為、規制環境下でのバイオアナリシスやその分析法開発に加え、疾病の診断や経過予測、更には医薬品の効率的な開発に役立てられるバイオマーカー測定を主要業務としております。主な分析手法は LC/MS/MS やリガンド結合法です。その中から LC/MS/MS によるバイオマーカーと近年、創薬技術の進展によって開発が著しい新モダリティの分析例を簡単に紹介します。

### **血中脂肪酸測定**

血中の必須脂肪酸のバランスは疾患リスクを知る為の指標であり、バイオマーカーとして注目されています。そこで、代表的な脂肪酸として、炭素間に二重結合が存在する不飽和

脂肪酸の中から  $\omega$ -6 脂肪酸のアラキドン酸 (AA)、 $\omega$ -3 脂肪酸のエイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) の分析を例に挙げます。脂肪酸は試料から Bligh-Dyer 法によって脂質を抽出し、メタノリシスによって得られた脂肪酸メチルを GC で定量する方法が主として用いられます。この手法は生体試料中に多数存在する内因性の脂肪酸から測定対象を分離する必要がある為、緩やかな昇温プログラムを設定して測定します (図 1)。そこで、2009 年にハイスループット化を目的として、高い選択性と高い感度を有する LC-MS/MS 法による分析法開発に着手しました。前処理は脂質の抽出までは同様に実施し、有機層を採取後留去して鹼化、精製して血中総脂肪酸を測定します。一方、鹼化を行わずに血中の遊離脂肪酸を抽出して定量するメニューも揃え、用途に応じたサービスを展開しています。本法は測定時間が 6 分に短縮され、血漿使用量は従来法と比較して 1/10 まで減らす事が可能です。更に分析法を改良し、測定対象を増やす事で適用範囲の拡大に繋がるものと考えています (図 2)。

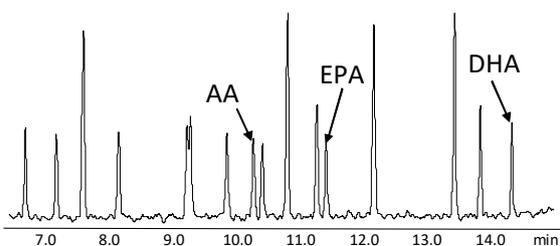


図1 GC (検出器 : FID) を用いた測定

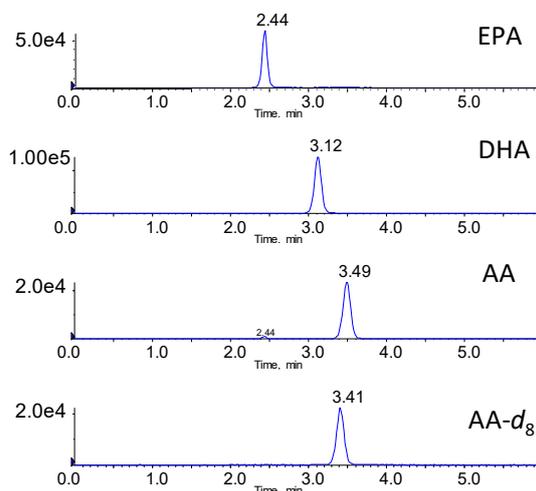


図2 LC-MS/MS法 (ESI) を用いた測定

### 血中抗体医薬品測定

アンメットメディカルニーズに対して抗体医薬品が期待されています。2019年5月の時点で70品目以上の抗体医薬品が承認されており、新薬開発における抗体医薬品の割合は今後更に増加する事が予想されます。抗体医薬品の安全性や有効性の評価には従来、ELISAなどのリガンド結合法によって生体試料中の抗体医薬品濃度測定が行われています。リガンド結合法は高い親和性や特異性を有する一次抗体を用いる事で高感度な分析を可能としています。内因性抗原や中和抗体などの妨害物質が分析精度に影響を及ぼす事が知られています (表 1)。そこで、リガンド結合法の短所を補完する手法として、2013年に当社が得意とするバイオ医薬品の特性解析とバイオアナリシスの前処理技術を融合させて LC-MS/MS を用いたトラスツズマブ (以下、抗体医薬品) の定量法開発に着手しました。LC-MS/MS 法で抗体医薬品を定量する場合、サロゲートペプチドが利用されます。サロゲート

ペプチドは、マトリックス由来のペプチドとは異なるアミノ酸配列を有し、分子量変化を伴うメチオニン（酸化）やアスパラギン及びグルタミン（脱アミド）を含まない事が良好な定量性を得る為に必要な条件となります。マウスを用いた *in vivo* 試験では血清からアフィニティーを利用して抗体医薬品を含む内因性 IgG を単離し、酵素消化した試料からサロゲートペプチドを検出しました。その結果、内因性 IgG の影響を受けずに血清中の抗体医薬品を定量する事に成功しました（図 3）。この技術を応用して 2015 年にはアダリムマブ、2019 年には抗体薬物複合体（antibody-drug conjugate; ADC）であるトラスツズマブエムタンシンの分析法を開発し、基本的なストラテジーを確立して抗体医薬品の LC-MS/MS 法によるアプリケーションデータを積み重ねています。

表1 各分析法の長所と短所

	ELISA法	LC-MS/MS法
長所	<ul style="list-style-type: none"> <li>■高感度 (pmol/mL)</li> <li>■簡便な実験設備</li> <li>■豊富な背景データ(信頼性)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■一次抗体の取得が不要</li> <li>■高い選択性</li> <li>■定量レンジが広い</li> <li>■内因性妨害物質の影響を回避</li> </ul>
短所	<ul style="list-style-type: none"> <li>■高親和性、特異性を有する一次抗体の取得が困難</li> <li>■定量レンジが狭い</li> <li>■妨害物質の影響(内因性抗原、中和抗体など)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■低感度</li> <li>■低い再現性(酵素消化反応、精製工程)など</li> <li>■大型機器が必要 (ToF, QqQなど)</li> </ul>

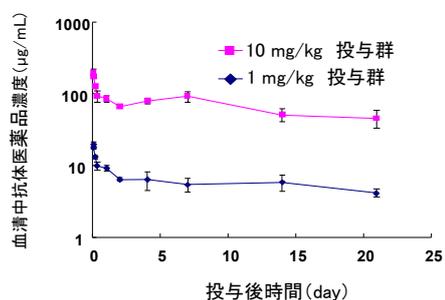


図3 マウス血清中抗体医薬品濃度の経時推移

#### 4. 最後に

次世代医薬品として抗体、ADC、更にはオリゴ核酸などの開発が活発です。これら中・高分子化合物は革新的な試薬の開発によって、一昔前までは困難とされていた前処理や分離が可能となり、LCやLC-MSの利用範囲が拡大しています。益々、複雑化する新モダリティーに対し、生体試料から単離、精製する為には有機化学だけでなく、免疫学や分子生物学などの知識や技術融合を無くしては、分析法の開発は成し得ないと考えます。LC 研究懇談会会員の先生方のご経験やご助言を頂きながら今後も技術開発を続け、社会貢献に努めて行きたいと思っております。今後ともどうぞ宜しくお願い致します。

<執筆者略歴> 櫻井 周 (Amane SAKURAI)

- ・ 2004年 東レ株式会社入社
- ・ 2004年 株式会社東レリサーチセンター出向
- ・ 現職：バイオメディカル分析室長
- ・ 分析士資格：LC 分析士初段、LC/MS 分析士二段
- ・ Email : amane.sakurai.d5@trc.toray



【閑話休題】

第 2 回 LC 懇クロスワードパズル (出題者：中村 洋)

次の升目に1つずつ平仮名を入れ、黄色く着色した A~Z の 26 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 (平仮名では読み難いので、出来るだけ漢字で解答)。正解者を抽選の上、2 名に「第 4 回 LC/MS 分析士初段試験解説書」(LC 研究懇談会、2021) 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 2022 年 2 月 28 日迄にご応募下さい。正解と当選者は LC 懇ホームページ並びに本誌第 4 号 (2022 年 6 月発行予定) でも発表しますが、贈呈品は 2022 年 3 月中にお送りします。

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

1	19	21	24		2	26	28	30
3	B	C	D		4	P	Q	X
5	M				6	Y	A	
7		22		8			9	
R		10	25	E				
11	20	L	W		12	27		S
13	Z		14	J	K			T
15		23			16	G	29	H
17	I	N	O		18	V	F	U

### ヨコのカギ

1 中国地方の県、2 **tofu** の丁寧語、3 たより、4 柑橘類、5 食ったり取ったりする、6 神奈川・山梨・静岡県に跨る山地、7 カリンの果実の生薬名、8 樹脂、9 イタリアの旧貨幣単位、10 コガネムシ科の甲虫、11 やくざ・香具師など、12 合併してさいたま市となった旧市名、13 椀の蓋、14 御用新聞、15 ツバキ科の常緑樹、庭木の王様、16 **peaceful**、17 **earth**、18 法隆寺がある町名。

### タテのカギ

1 万葉集の歌数が最多の歌人、2 **MLB** で **HR** ダービーに初出場日本人、8 **stop**、19 乾きと湿り、20 ユリ科の多年草、21 私撰の歴史、22 賃金一、23 こえるの文語、24 千の 10 倍、25 怪猿、26 自民党東京一、全建総連東京一など、27 味を付けたすめを薄く伸ばしたもの、28 げんなり、29 悪党、30 平安中期の貴族。

第 1 回 LC 懇クロスワードパズル (本誌通巻第 2 号の掲載問題)

正解と当選者の発表 (別途、LC 懇 HP に 9/26 掲載済)

1P	17A	18R	20T	22I	24T	I	26O	27N
2H	けE	A	あV	E	N		3P	O
4A	こR	T				5P	E	くT
6R	O	おE	21N	23T	G	E	うN	
7M	S		8O	H		9A	I	
10A	O	えD	いA	I		11C	N	28N
12C	L		13H	S		14O	G	きM
Y		19S		15B	25C	C		
	16B	I	W	かE	E	K	L	Y

上記の様に、「あ〜こ」に対応するローマ字は、「VANDEEMTER」となります。理論段相当高さと移動相線速度の関係を表す、van Deemter の式、van Deemter プロット、van Deemter のカーブなどで著名なオランダの科学者です。期日 (2021 年 8 月 31 日) 迄に応募戴き正解された下記の方に、「実務に役立つ食品分析の前処理と実際」(中村 洋監修、日刊工業新聞社、2020) 1 冊を贈呈致しました。 当選者：小林宏資 様 (信和加工株式会社、京都市伏見区)

第 1 回 LC 懇クロスワードパズル (出題者 : 中村 洋、通巻第 2 号掲載)

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。正解と当選者は本誌第 3 号 (2021 年 12 月発行予定) で発表しますが、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](mailto: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、ノウハウ** (技術又はノウハウ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](mailto: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](mailto: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CERIKロマトグラフィー分析賞募集会告(締切:8月末日) 2021年LC科学遺産認定推薦募集会告(締切:8月末日) 2022年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) 開催中止
	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
	12月5日(日)	2021年POTY賞推薦締切
	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	1月14日(金)14時~	LC分析士三段試験(東京都品川区・五反田文化会館)
	1月20日(木)14時~	LC/MS分析士三段試験(東京都品川区・五反田文化会館)
	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
	1月24日(月)14時~	LC分析士二段試験(東京都北区・北とびあ)
	27日(木)28日(金)	第27回LC & LC/MS テクノプラザ(世話人:中山 聡) Zoomウェビナー
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)メール査読会
	2月1日(火)14時~	LC/MS分析士二段試験(東京都北区・北とびあ)
	2月11日(金)10時~	LC分析士初段試験(東京都北区・北とびあ)
	2月11日(金)14時~	LC/MS分析士初段試験(東京都北区・北とびあ)
	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] 皆様のお蔭により、今年も計画通りに発行する事が出来ました。来年も皆様のお役に立つ情報誌になります様、精進致します。
- [KE] 今回、初めて自身の投稿も有り、原稿を仕上げながらの編集作業が間に合っただけで済んでいます。是非ご活用下さい。
- [MO] 創刊から 1 年、通巻第 3 号をお届けする事が出来て嬉しく思います。投稿や査読等にご協力下さった皆様に感謝致します。
- [MT] 中村委員長のご尽力により 3 回目の編集を無事に終わりました。多くの情報を皆様に提供していますので、自己研鑽をお願いします。
- [HN] 本誌発行は年 2 回でも編集事務作業が大変。専従者を雇うか外注にしないと年 4 回は愚か、6 回、12 回発行はとても無理そう。
- [HM] コロナ禍の中、例会のオンライン開催も定着化し、編集委員一丸となって本誌定期発行に取り組んでおります。

## 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 2 号 (通巻第 3 号)

2021 年 12 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)