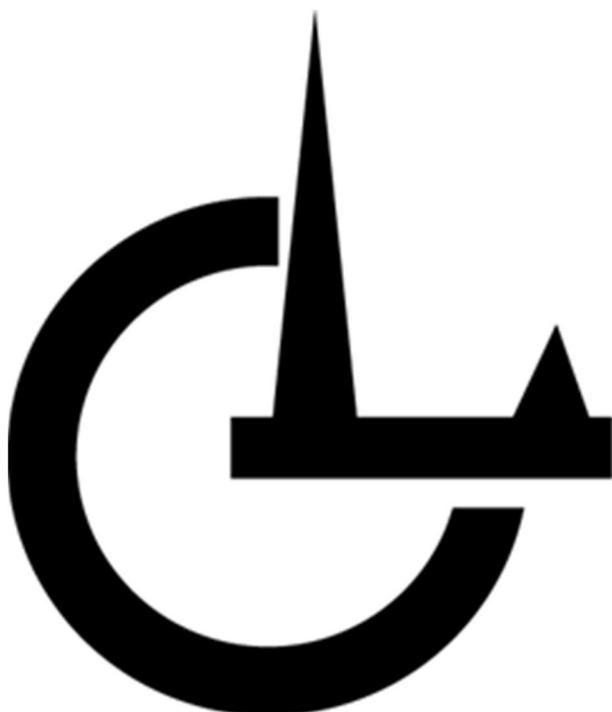


LCとLC/MSの知恵 2022年第1号(通巻第4号) 令和4年6月15日発行 ISSN 2436-1194

LCとLC/MSの知恵

Wisdom for LC and LC/MS

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



(公社) 日本分析化学会
液体クロマトグラフィー研究懇談会

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

LC と LC/MS の知恵

第 4 号
2022 年 6 月

目 次

巻頭言

漢字は脳の栄養素

(LC 研究懇談会委員長、本誌編集委員長) 中村 洋 3

ノート

ビフェニルカラムを用いたカテキン類及びテアフラビン類の分離

(¹) 横浜薬科大学、²) (株) 島津製作所) 小野寺翔太 ¹)、
春田真由子 ¹)、岡本真美 ²)、渡邊 淳 ²)、望月直樹 ¹) 6

総合論文

ホストゲスト相互作用形 HPLC キラル固定相の開発とそのエナンチオ分離
特性の評価

((株)住化分析センター) 西岡亮太 14

2021 年度 CERI クロマトグラフィー分析賞受賞業績

生体試料中医薬品の極微量質量分析法の開発

((株) 東レリサーチセンター) 竹澤正明 33

2022 年液体クロマトグラフィー努力賞受賞業績

光学活性検出器を利用した HPLC と SFC の応用開発

(日本分光(株)) 寺田明孝 41

2021 年液体クロマトグラフィー科学遺産認定業績

超純水製造装置 Milli-Q Gradient

(メルク (株)) 石井直恵 55

2021 年 POTY 賞受賞業績

LC 研究懇談会各種事業のリモート開催への貢献

(東洋合成工業 (株)) 小林宣章 61

シリーズ「試料分析の定石とコツ」

最新の 2 次元 LC システムとアプリケーション

(アジレント・テクノロジー (株)) 熊谷浩樹 66

ペプチド分析

(第一三共 (株)) 合田竜弥 80

食品分析

((一財) 日本食品検査) 橘田 規 94

新役員紹介

東洋合成工業と私の紹介

(東洋合成工業 (株)) 加藤幸一郎 105

LC 研究懇談会准役員に就任して

(関東化学 (株)) 坂本和則 109

団体会員紹介

日立ハイテクサイエンスと分析装置

((株) 日立ハイテクサイエンス) 清水克敏 110

ウォーターズの LC システムとカラム

(日本ウォーターズ (株)) 島崎裕紀 115

Restek の企業文化とクロマト製品

((株) Restek) 海老原卓也 119

閑話休題

第 4 回 LC 懇クロスワードパズル

(東京理科大学) 中村 洋 124

第 3 回 LC 懇クロスワードパズル・正解と当選者発表

126

第 2 回 LC 懇クロスワードパズル・正解と当選者発表

127

投稿規程

128

2021 年度 LC 懇事業カレンダー

130

奥付

131

【巻頭言】

漢字は脳の栄養素 / Kanji is Nutrient for Human Brains

中村 洋 / Hiroshi NAKAMURA

LC 研究懇談会・委員長、「LC と LC/MS の知恵」・編集委員長 /
Chairman of the Division of Liquid Chromatography
The Japan Society for Analytical Chemistry
Editor-in-Chief of *Wisdom for LC and LC/MS*

今年 2 月 24 に実行されたロシアによるウクライナ侵攻と、いつ終わるとも知れぬ悲惨な戦況には心を痛めざるを得ない。その後も知床観光船の沈没、山口県阿武町の給付金 4,630 万円誤送金騒動、持続化給付金 10 億円詐取事件と続くネガティブなニュースの連続には、梅雨空の中、長引くマスク生活も相俟って心が晴れない。

一方、暗い世相に明るい話題を提供して呉れたのが、メジャーリーグ・エンゼルス在籍の大谷翔平選手や今年 4 月 10 に完全試合を達成したロッテ・佐々木朗希選手の活躍である。又、小惑星リュウグウからはやぶさ 2 が地球に持ち帰った砂から、岡山大学が 23 種類のアミノ酸を検出したニュース (6 月 10 日) にはワクワクする感覚を覚えた。筆者は現役時代、DL 分割の方法論開発にも携わっていたので、地球上の高等動物における L-アミノ酸の優位性の謎の解明の為にも、リュウグウの砂のアミノ酸の DL 比を是非知りたい所である。

今般、本誌 (J-STAGE 登載済) は LC 研究懇談会会員のご協力により、通巻第 4 号の発行に辿り着いた。本号には通常通りの掲載内容に加え、各種褒賞関係の業績を掲載した。若手・中堅の方々には大変参考になる内容であるので、じっくりお読み戴きたい。本誌は論文に加えて新役員紹介、団体紹介などの欄の充実にも力を入れている。創刊号の巻頭言でも触れたが、本誌は LC、LC/MS など分離科学に関連する論文誌であると同時に、LC 研究懇談会の会員誌でもある。これ迄の所、年に 2 号の発行に止まってはいるが、LC 研究懇談会のホームページと併せ、LC 研究懇談会会員の皆様にはプラットフォームとして活用戴ければ幸いである。

所で、本誌に投稿された方はお気付きの事と思うが、2 名の審査員からのコメントには、必ずと言ってよい程、『本誌で使用する表記法に従い、平仮名を漢字で表記して下さい。』と

言う趣旨の記述が有る筈である。一例を挙げると、「イオンの到達時間をはかり、」は「イオンの到達時間を計り、」とする類の修正である。因みに、「はかる」には「計る」「測る」「量る」「図る」「諮る」「謀る」等の漢字が有る。そこで、表意文字としての漢字本来の機能に基づき、正しい意味を素早く伝達する為の修正要求である。この様に、本誌では極力平仮名の漢字化を奨励しているが、この流れとは反対に、漢字を平仮名に修正して欲しいとする例外的なコメントも有る。例えば、「・・・分子内に 1 個のカルボキシを持っている」は、「・・・分子内に 1 個のカルボキシをもっている。」とする修正であり、審査員によっては「・・・分子内に 1 個のカルボキシを有している。」と言い換えを勧める場合も有る。上記、投稿論文に記載された表現は、新聞を始め世間的には何の問題も無い。しかし、理系専門誌である本誌では「持つ」は実際に物理的に手などを使う場合に限って使用する方針としているので、ご承知戴きたい。

先日 (6 月 9 日)、参議院選挙を控えた自民党所属議員の会合で、安倍晋三元首相が首相の座を射止める為に必要な素養を問われ、「運と多少の人柄」と発言した事が話題を集めている。安倍氏自身の「人柄」がどうであるかについてはここでは触れないが、どの様な分野でも「運」と「人柄」は成功への必須要素である事については筆者も同感である。「運」で思い出すのは、大学 4 年生になって入室した薬品分析化学教室・ビフィズス菌グループの鮫島啓次郎助手 (後に城西大学薬学部教授) から、度々耳にした「運・鈍・根」の話である。大きな仕事をするには、この三つが必要であると鮫島助手も先輩に教えられたと言うのであった。筆者は自分の性分から、「鈍」である事は必ずしも得意ではないが、当時は「気付かぬ振りをして動じない印象を周囲に与える事」と勝手に解釈した覚えがある。当時、研究室を主宰する田村善藏教授は、数十の「田村語録」を作られたが、筆者の好みは「運命とは自分の物だ」であった。自分の運命は、受動的に待つのではなく、自ら切り拓けという趣旨と伺った。大学研究室での生活は、高校時代迄と違って初めて濃厚な上下関係が発生する環境であるので、そこで吸収した考え方や価値観は、所謂刷り込み効果により、生涯に大きな影響を与える。因みに、筆者が教授となり研究室紹介のプレゼンで強調したのは、「遣る気・元気・根気などの、覇気がある学生さん、大歓迎」であった。正に、研究室で初めて接した「運・鈍・根」に根差した「三つ子の魂百まで」であった。

さて、根気よく精進しながら自分の運命を切り拓く為には、適切な環境とツールが不可欠である。LC 研究懇談会は、例会開催、(公社) 日本分析化学会・分析士認証制度の運営、出版活動、本誌の発行などを通じて斯界の人財育成に注力しているので、ホームページをご覧ください。なお、今年度の分析士認証試験 (対面形式) は、表 1 に示す日程で実施するので、一連の「分析士認証試験解説書」(現在 24 冊) を携えて挑戦戴きたい。

2022 年 6 月 11 日 記

認証試験	試験日	試験会場	受験者定員
LC初段	6月8日(水)	五反田文化会館	65名
LC/MS初段	6月17日(金)	五反田文化会館	65名
LC二段	7月6日(水)	五反田文化会館	65名
LC/MS二段	7月15日(金)	五反田文化会館	65名
LC三段	8月4日(木)	五反田文化会館	無し
LC/MS三段	8月12日(金)	五反田文化会館	無し
LC四段	10月3日(月)	日本分析化学会・会議室	無し
LC/MS四段	10月6日(木)	日本分析化学会・会議室	無し
LC五段	10月4日(火)	日本分析化学会・会議室	無し
LC/MS五段	10月7日(金)	日本分析化学会・会議室	無し
*注意 同一年度にはLC分析士、LC/MS分析士の試験はそれぞれ1種類しか受験出来ません。			

<執筆者略歴> 中村 洋 (Hiroshi NAKAMURA)

nakamura@jsac.or.jp

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)
 1976年 東京大学薬学部助手復職
 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
- ◆ ISO / TC47 国際議長・国内委員長
- ◆ 「LC と LC/MS の知恵」 編集委員長、など

【ノート】

ビフェニルカラムを用いたカテキン類及びテアフラビン類の分離／

Separation of Catechins and Theaflavins Using Biphenyl Column

小野寺翔太¹⁾、春田真由子¹⁾、岡本真美²⁾、渡邊 淳²⁾、望月直樹¹⁾／

Shota ONODERA, Mayuko HARUTA, Mami OKAMOTO, Jun WATANABE,
Naoki MOCHIZUKI

¹⁾ 横浜薬科大学、²⁾ 株式会社島津製作所／

¹⁾ Yokohama University of Pharmacy, ²⁾ Shimadzu Corporation

(Received May 20, 2022 ; Accepted June 3, 2022)

要旨

茶に含有される渋味成分であるカテキン類は、抗酸化活性や抗菌活性等の生理活性が認められている。更に、テアフラビン類は、紅茶等の発酵茶に含まれるカテキン類が酸化縮合して生成される化合物で、最近抗ウイルス活性が注目されて来た。今回、紅茶成分であるカテキン類 8 種、テアフラビン類 4 種、更にカフェインを含めた 13 化合物の LC-MS/MS を用いた分析法を構築した。本分析では、分離カラムとしてビフェニルカラムを使用する事で、13 化合物の分離を達成した。

キーワード カテキン ; テアフラビン ; LC-MS/MS ; ビフェニルカラム

1. 緒言

茶に含まれるカテキン類は、構造に多数のフェノール性水酸基を有するポリフェノールの一種で、茶に含まれる渋味成分である。生体に対する抗酸化作用や血糖上昇抑制作用、コレステロール吸収抑制作用等の研究が多く報告され、機能性食品の成分として注目を浴びている¹⁻³⁾。更に、紅茶には酸化発酵工程で得られるテアフラビン類が含有される⁴⁾。近年、紅茶のテアフラビン類は、抗ウイルス活性を有すると報告され、生理活性でも注目されている⁵⁾。

紅茶含有の主なカテキン類として、遊離形カテキン類の gallic catechin (GC) と catechin (C)、及びエピ体である epigallocatechin (EGC)、epicatechin (EC)、ガロイル基結合形カテキン類の catechin gallate (CG) と gallic catechin gallate (GCG)、及びエピ体である epigallocatechin gallate (EGCG)、epicatechin gallate (ECG) の 8 種類が挙げられる。

又、紅茶では、発酵工程でカテキン類の 2 分子が酸化重合して 7 員環構造を有するテアフラビン類が生成する。カテキン類の組合せの違いにより、theaflavin (TF)、theaflavin

3-gallate (TF3G)、theaflavin 3'-gallate (TF3'G)、theaflavin 3,3'-digallate (TFDG) の 4 種類が主に存在する⁶⁾。

更に、苦味成分として、キサンチン誘導体であるカフェイン (CAF) が含有されている。

以上、紅茶の代表的な成分として、カテキン類 8 種、テアフラビン類 4 種、CAF の計 13 化合物を分析種として選出した (図 1)。

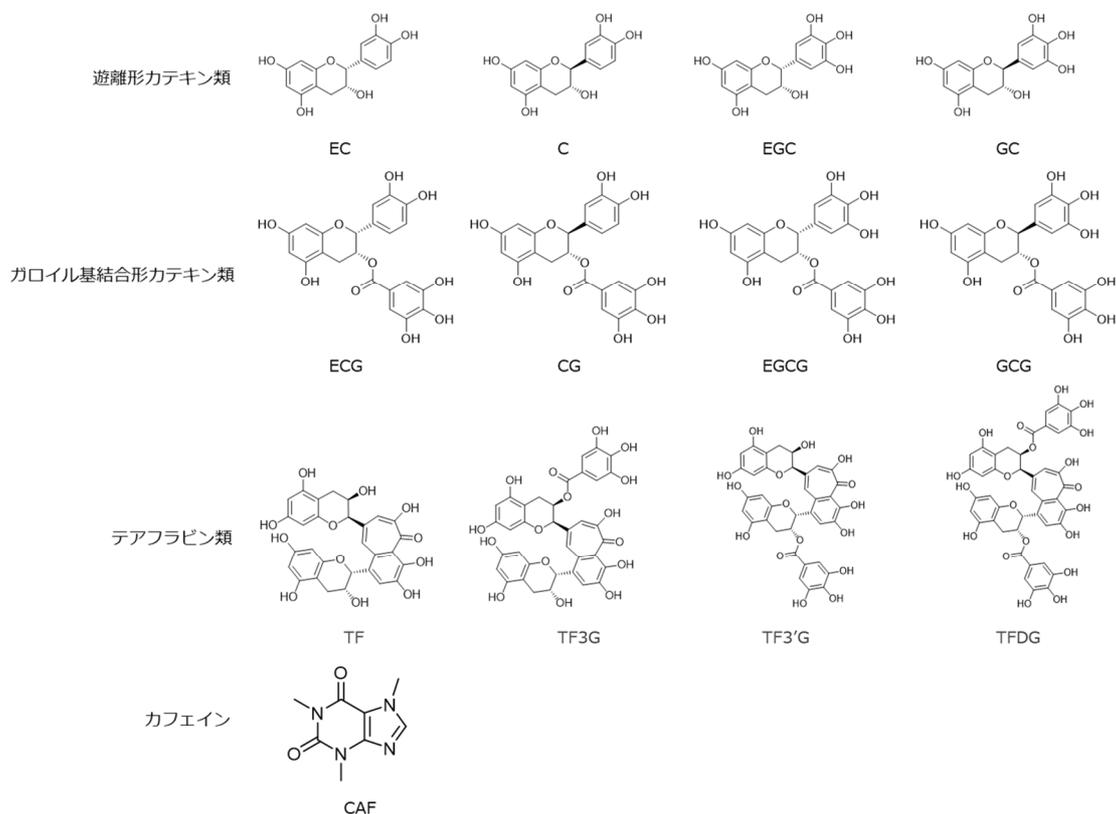


図 1 カテキン類とテアフラビン類及びカフェインの化学構造式

これらの紅茶の苦渋味成分の分析法を開発する目的は、紅茶の苦渋味バランスの解明だけに留まらず、紅茶の生理活性を解明する上で重要である。

従来から、カテキン類やテアフラビン類の HPLC-UV を用いた分析方法が開発されて来た。分離カラムには、主にオクタデシル基結合形シリカゲルカラム (ODS カラム) が用いられ、移動相にはリン酸塩緩衝液を用いる事で、分離が成されている⁷⁻⁹⁾。

今回、分析に用いた LC-MS/MS は、高感度並びに高選択的に測定出来る機器であるが、LC-MS/MS での高感度測定を行うには、イオン化効率を上げる目的で、質量分析計へ導入前に HPLC で十分に分離する必要がある。又、LC-MS/MS では、イオン化工程が有る為、移動相にリン酸等の不揮発性溶媒を使用出来ない。現在迄、LC-MS/MS を用いた分析法も開発されているが、HPLC 分離においてテアフラビン類のピークが重なり、完全には分離されていない¹⁰⁻¹²⁾。

そこで今回、LC-MS/MS を用いたカテキン類、テアフラビン類、CAF の 13 化合物の分

離を目標に検討した。

2. 実験方法

2.1 試薬及び標準液の作成

標準物質として、EGC、EC、C、EGCG、GCG、ECG、CG、TF、TF3G、TF3'G、TFDG は長良サイエンス製、GC はフナコシ製、CAF は東京化成工業製を使用した。カテキン類 8 種、テアフラビン類 4 種、CAF を LC/MS 用メタノール（富士フィルム和光純薬）20 % 水溶液で溶解後、各溶液を混合攪拌して、標準試薬混合液を調製した。

2.2 装置及び LC-MS/MS 分析条件

LC-MS/MS は、HPLC に Nexera X2 システム（島津製作所）、MS/MS に LCMS-8060（島津製作所）を用いた。分離カラムとして、ビフェニルカラムである Raptor Biphenyl（内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μm 、Restek）を採用し、カラムオープン温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ 、移動相 A は超純水（ピューリック ω : オルガノ）とギ酸特級（キシダ化学）を混合した 0.1 % ギ酸水溶液を用い、移動相 B は LC/MS 用アセトニトリル（富士フィルム和光純薬）と LC/MS 用メタノールの 1 : 1 混合液を用いた。グラジエント溶離は、0~7 分は移動相 B を 8 % で維持し、7~14 分で 8 % から 16 % まで上昇させる。14~30 分の間は移動相 B を 16 % で維持し、30~41 分で 35 % まで上昇させる。41 分から 5 分間移動相 B を 80 % とし、その後 46~50 分で再平衡化する。移動相の流速は 0.4 ml、試料の注入量は 10 μl とした。

質量分析部におけるイオン化には ESI 法を用い、カテキン類とテアフラビン類は全てネガティブイオンモードで検出し、CAF のみポジティブイオンモードで検出した。

分析条件を表 1 から表 3 に示す。

表 1 HPLC 条件

HPLC: Nexera™ X2 system (島津製作所)	
カラム	Raptor Biphenyl (RESTEK) (内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径1.8 μm)
移動相	A; 0.1 % ギ酸水溶液 (超純水、ピューリック ω) B; アセトニトリル/メタノール=1/1
グラジエント条件	移動相B濃度 8 % (0-7 min) 8 %→16 % (7-14 min) 16 % (14-30 min) 35 % (30-41 min) 80 % (41-46 min) 8 % (46-50 min)
流速	0.4 mL/min
注入量	10 μL
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$

表 2 MS/MS 条件

MS: LCMS-8060 (島津製作所)	
イオン化法	ESI法 (ポジティブ/ネガティブイオンモード)
測定モード	MRM
脱溶媒部温度	200 °C
ヒートブロック温度	200 °C
インターフェイス温度	200 °C
ドライビングガス流量	10 L/min
ヒーティングガス流量	10 L/min
ネブライザーガス流量	2 L/min

表 3 MRM 条件

化合物名	ESI(+/-)	MRMトランジション (<i>m/z</i>)	保持時間 (min)	分子量
CAF	+	195.4>138.4	13.24	194.19
GC	-	305.3>125.2	2.75	306.27
EGC	-	305.3>125.2	5.56	306.27
C	-	298.4>245.3	6.755	290.27
EC	-	289.4>245.3	12.44	290.27
EGCG	-	457.3>169.2	14.90	458.37
GCG	-	457.3>169.2	16.50	458.37
ECG	-	441.3>169.3	24.11	442.37
CG	-	441.3>169.3	26.26	442.37
TF	-	563.1>241.4	35.65	564.49
TF3G	-	715.1>563.3	37.59	716.60
TF3'G	-	715.1>407.3	38.45	716.60
TFDG	-	867.1>697.3	39.05	868.70

3. 結果及び考察

ビフェニルカラムは、ビフェニル基を結合させたシリカゲルを充填剤としたビフェニル基化学結合形シリカゲルカラムである。このカラムは、芳香環を有する分析種に対して、ビフェニル基の π - π スタッキング相互作用効果が強く働き、ODSカラムには無い分離挙動を示す¹³⁻¹⁴。

今回 LC-MS/MS の固定相にこのビフェニルカラムを用いて、種々分離条件を検討した。移動相に 0.1 %ギ酸水溶液及びアセトニトリルとメタノールが 1 : 1 の混合液を用い、グラジエント溶離条件を検討し、13 化合物の分離を達成した。この分離条件では、先ず遊離形カテキン類の GC、EGC、C、EC、そして CAF、次にガロイル基結合形カテキン類である EGCG、GCG、ECG、CG が溶出し、最後にテアフラビン類の TF、TF3G、TF3’G、TFDG の順で、其固定相と分析種の疎水性相互作用の弱い順に溶出している事が理解される。

この分離は、ODS カラムでは不完全であったが、図 3 に示す様なビフェニルカラムと分析種との π - π スタッキング相互作用が関与して分離が成されたと考察した。又、移動相に用いる有機溶媒は、アセトニトリルにメタノールを 50 % 添加する事で良好な分離が達成された。この分離は、有機溶媒にアセトニトリル単独で用いる場合では良好な結果が得られなかった。これはアセトニトリル構造中の π 電子がカラムと分析種の π - π スタッキング相互作用に対し競合的に働き、カラムと分析種の相互作用を弱めた為であると予想される。そこに、メタノールを添加する事で、アセトニトリルの π 電子の影響が抑えられ、十分な分離が可能となったと考察した。本分析の特徴は、移動相にリン酸系水溶液を使用していない事である。

以上、LC-MS/MS によるカテキン類、テアフラビン類、CAF の 13 化合物の分離分析に関して、ビフェニルカラムを用いる事で達成した。

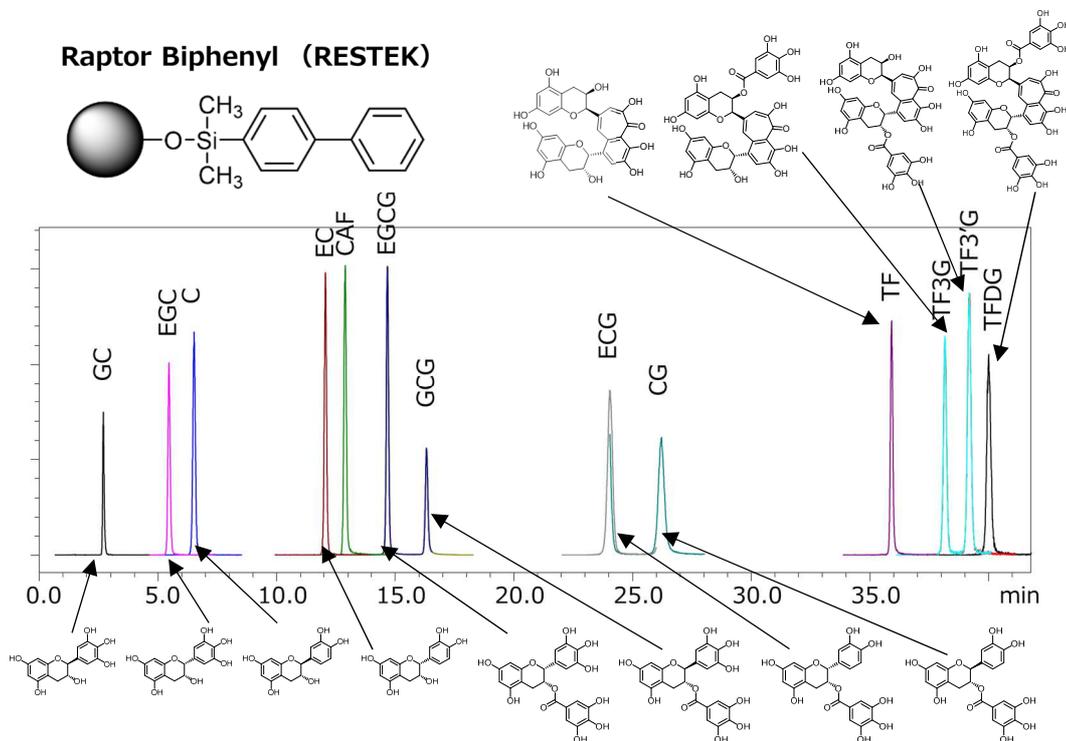


図 2 Biphenyl カラムを用いた標準物質混合液のクロマトグラム

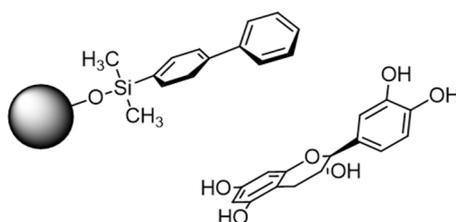


図 3 ビフェニルカラムとカテキンとの相互作用の概念図

4. 纏め

紅茶に含有する渋味成分であるカテキン類とテアフラビン類、苦味成分であるカフェインの計 13 化合物の LC-MS/MS を用いた分離を検討した。LC-MS/MS では、イオン化工程を経る為にリン酸等の不揮発性溶媒を用いる事が出来ず、従来の研究では 13 化合物の分離は不十分であった。今回、分析対象物の化学構造に着目し、固定相として π - π スタッキング相互作用を有するビフェニルカラム選択し、移動相としてアセトニトリルとメタノールの等量混合物を用いる分析法を開発した。本分析法により、13 化合物に対して、充分な分離を達成する事が出来た。

5. 引用文献

- 1) 中川致之、緑茶の味と化学成分、茶業研究報告、**40**、1-9 (1973).
- 2) 宮瀬敏男、緑茶に含まれるカテキンの化学特性、*Functional Food*、**8**、4-9 (2014).
- 3) 村松敬一郎、茶の機能性、茶の化学、pp.124-14、朝倉書店 (2000).
- 4) Yoshinori Takino, Hiroshi Imagawa, Hiroaki Horikawa, Akira Tanaka, Studies on the Mechanism of the Oxidation of Tea Leaf Catechins: Part III. Formation of a Reddish Orange Pigment and its Spectral Relationship to Some Benzotropolone Derivatives, *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 64-71(1964).
- 5) Mai Ohba, Tomoichiro Oka, Takayuki Ando, Saori Arahata, Asaka Ikegaya, Hirotaka Takagi, Naohisa Ogo, Chelsea Zhu, Kazuhiro Owada, Fumihiko Kawamori, QiuHong Wang, Linda J. Saif, Akira Asai, Antiviral Effect of Theaflavins against Caliciviruses, *J. Antibiotics*, **70**, 443-447 (2017).
- 6) Masumi Takemoto, Hiroaki Takemoto, Synthesis of Theaflavins and Their Functions, *Molecules*, **23**, 918 (2018).
- 7) Yuanyuan Wang, Xiaorong Yang, Kaikai Li, Chengren Li, Linlin Li, Jiaxian Li, Hualin Huang, Yumei He, Chuangxing Ye, Xiaohong Song, Simultaneous Determination of Theanine, Gallic Acid, Purine Alkaloids, Catechins, and Theaflavins in Black Tea Using HPLC, *Food Sci. Tec.*, **45**, 1263-1269 (2010).
- 8) Ryoyasu Saijo and Yoshiyuki Takeda, HPLC Analysis of Catechins in Various Kinds

- of Green Teas Produced in Japan and Abroad, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **46**, 138-147 (1999).
- 9) Isao Murakami, Takumi Nakamura, Yukiko Ishibashi, Ryo Shibuya, Yuko Morita-Murase, Yoshiko Nagata, Hideko Kanazawa, Simultaneous Determination of Catechins and Procyanidins in Bottled Tea Drinks by LC/MS, *Chromatography*, **27**, 27-33 (2006).
 - 10) Wuqun Tao, Zhiguang Zhou, Bin Zhao, Tongyu Wei, Simultaneous Determination of Eight Catechins and Four Theaflavins in Green, Black and Oolong Tea Using New HPLC-MS-MS Method, *J. Pharm. Bio. Anal.*, **131**, 140-145 (2016).
 - 11) Souradipta Ganguly, Taposh Kumar G, Sudarshan Mantha, Koustubh Panda, Simultaneous Determination of Black Tea-Derived Catechins and Theaflavins in Tissues of Tea Consuming Animals Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *PLOS ONE*, **3**, 1-18 (2016).
 - 12) Hitomi S.Kikkawa, Manami Kobayashi, Ayaka Minamimoto, Hiromi Ono, Kouichiro Tsuge, Simultaneous Determination of Eight Catechins and Four Theaflavins in Bottled Tea by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Forensic Analysis, *J. Forensic Sci.*, **67**, 309-320 (2021).
 - 13) RESTEK ホームページ, Force Performance LC Columns: Apply Force to Your LC Methods, <https://www.restek.com/ja/technical-literature-library/brands/force-performance-LC-columns/> (2022 年 4 月 30 日現在).
 - 14) クロマニックテクノロジーズホームページ, SunShell Core Shell Particle Sunniest Fully Porous Particle Biphenyl, http://chromanik.co.jp/pdf/biphenyl_catalog_40.pdf (2022 年 4 月 30 日現在).

<執筆者略歴>

小野寺翔太 (Shota ONODERA)

横浜薬科大学 薬学部 健康薬学科 (2016 年 4 月入学～2022 年 3 月卒業)、学士 (薬学)、資格 : 薬剤師、分析士無。



春田真由子 (Mayuko HARUTA)

横浜薬科大学 薬学部 健康薬学科 (2016 年 4 月入学～2022 年 3 月卒業)、学士 (薬学)、資格 : 薬剤師、分析士無。



岡本真美 (Mami OKAMOTO)

株式会社島津製作所 分析計測事業部 MS ビジネスユニット、博士 (理学)、資格 : LC/MS 分析士三段。



渡邊 淳 (Jun WATANABE)

株式会社島津製作所 分析計測事業部 MS ビジネスユニット、修士 (農学)、資格 : LC 分析士初段。



望月直樹 (Naoki MOCHIZUKI)

横浜薬科大学 薬学部 教授 (2016 年 4 月就任～2022 年 3 月定年退官)、博士 (薬学)、資格 : LC 分析士二段、LC/MS 分析士二段。



【 総合論文 】

ホストゲスト相互作用形 HPLC キラル固定相の開発と
そのエナンチオ分離特性の評価

西岡亮太

株式会社住化分析センター 大阪ラボラトリー

Development of Host-guest Interaction Type HPLC Chiral
Stationary Phases and Evaluation of Their Enantioselectivity

Ryota NISHIOKA

Osaka Laboratory, Sumika Chemical Analysis Service Ltd.

(Received March 24, 2022 ; Accepted April 7, 2022)

要 旨

新規に開発したホストゲスト相互作用形 HPLC キラル固定相 3 種について、そのエナンチオ分離特性の評価と考察を纏めて論述する。β-シクロデキストリンと担体シリカゲルとの間に糖鎖を含む新規キラル固定相 (SUMICHIRAL® OA-7000) が、従来のシクロデキストリン形固定相とは分離特性が異なる事を見出し、更に、水酸基をアセチル化した β-シクロデキストリン形固定相 (OA-7700) が、多くの芳香族キラルアミンに対して優れたエナンチオ分離能を有する事を示した。それらの要因について、分離メカニズムの観点から考察した。又、擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体をシリカゲルにアミド結合で固定化したキラル固定相 (OA-8000) を設計し、その分離特性を評価した。キラル第一級アミンの分離において、OA-7700 と OA-8000 が、ゲスト化合物の置換基の違いに対して相補的なエナンチオ分離能を有する事を見出し、その要因を考察した。開発したキラル固定相は、逆相系移動相を用いてキラル分離が可能で、キラル医薬品の分析に有効活用される事が期待される。

Abstract

The evaluation and consideration of the enantioselectivity of three newly developed host-guest interaction type HPLC chiral stationary phases are summarized in this paper. It was found that the novel chiral stationary phase containing a sugar chain between β-cyclodextrin and silica gel support (SUMICHIRAL® OA-7000) has different enantioselectivity from conventional cyclodextrin-type stationary phases. Furthermore, it was shown that the β-cyclodextrin stationary phase with acetylated hydroxyl groups

(OA-7700) has excellent enantiomeric separation ability for many aromatic amines. These factors were considered from the viewpoint of the separation mechanism. We also designed the chiral stationary phase in which a pseudo-18-crown-6-ether derivative was immobilized on silica gel with an amide bond (OA-8000) and evaluated its enantioselectivity. In the separation of chiral primary amines, we found that OA-7700 and OA-8000 have complementary enantioselectivity to the difference in substituents of guest compounds and considered this factor. The developed stationary phases can perform chiral separation using a reverse phase mobile phase and is expected to be effectively used for analysis of chiral drugs.

keywords chiral stationary phase; host-guest inclusion; β -cyclodextrin; pseudo-18-crown-6-ether; enantioselectivity

1. 緒言

鏡像異性体は、薬理活性の点では全く別の化合物と言っても過言ではない。その為、キラル医薬品の研究開発においては正確なキラル分離分析法の開発が不可欠で、その分析法の中で、HPLC 法は特に重要な技術と位置付けられている。HPLC によるキラル分離法には、キラル固定相或いはキラル移動相を用いて分析種を誘導体化せずに直接キラル分離する方法と、分析種にキラルな試薬を反応させジアステレオマーとした後、アキラルな固定相を用いて分離する方法が有る¹⁾。そのうち、キラル固定相 (chiral stationary phase, CSP) を用いる直接法は、精度が高く且つ迅速な分析法として、現在、最も汎用されている方法である。

キラル固定相は、キラル識別能を有する化合物 (キラルセクター) を、担体のシリカゲル等に担持又は共有結合させたものである。キラルな低分子化合物やキラル配位子、タンパク質や多糖の様な高分子化合物等、これ迄に様々なタイプのキラルセクターが報告されている²⁾。現在、市販されている主なキラル固定相とそのキラルセクターの種類を Table 1 に示す。これらの中で、ホストゲスト相互作用形キラル固定相は、包接能の有るキラルホスト、例えばシクロデキストリンの様な化合物をキラルセクターとする固定相である。これらは、環境負荷の低い逆相系移動相を使用出来ると言う特長が有り、比較的極性の大きな化合物が多いキラル医薬品や医薬中間体の分離分析に適していると言える。

筆者は長年、HPLC キラル固定相の開発研究に従事し、従来の固定相とは異なる分離特性を有する新規キラル固定相を開発して来た³⁾⁻¹³⁾。そのうち、本論文では β -シクロデキストリン誘導体をキラルセクターとする SUMICHIRAL[®] OA-7000、SUMICHIRAL[®] OA-7700 (以下 OA-7000, OA-7700) 及び擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体をキラルセクターとする SUMICHIRAL[®] OA-8000 (以下 OA-8000、何れも株式会社住化分析センター製) について、それらのエナンチオ分離特性の評価結果と考察を論述する。

Table 1 Main commercially available CSPs

Type of CSP	Typical chiral selector
polysaccharide type	cellulose or amylose derivative
protein type	α_1 -acid glycoprotein, human serum albumin
Pirkle type	3,5-dinitrobenzoyl phenylglycine
ligand exchange type	copper complex of amino acid
glycopeptide type	teicoplanin, vancomycin
host-guest interaction type	cyclodextrin or crown ether derivative

なお、本論文中で使用したカラムは、全て内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm である。「 α 」は鏡像異性体の分離係数、「 k_1 」は前出異性体の保持係数を表し、JIS K 0214 : 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門)¹⁾ に従って算出した。又、キラル固定相は分離メカニズムが複雑で、分配クロマトグラフィーにおける「逆相」、「順相」に単純には当て嵌まらない場合があるが、本論文中では、極性有機溶媒と水を主成分とする移動相を「逆相系移動相」、*n*-ヘキサンを主成分とする移動相を「順相系移動相」と記した。図表中のキラル分析種 (ラセミ体) の化学構造式において、不斉炭素を「*」で示した。

2. β -シクロデキストリン誘導体をキラルセクターとする新規キラル固定相

2.1 開発の背景

シクロデキストリンは、D-グルコース数分子が α -1,4 グリコシド結合した環状オリゴ糖である。その分子内側の空孔にゲスト分子を包接する事が出来る為、可溶化、徐放化、マスキング等の目的で、様々な用途に用いられている。シクロデキストリン分子は光学活性体であり、キラルなゲスト分子の鏡像異性体に対する包接親和性が異なる。その為、シクロデキストリン誘導体は、キラルユニットを結合しなくてもそのままキラルセクターとして利用する事が可能で、古くから、GC や HPLC のキラル固定相として用いられて来た。これ迄に、シリカゲル等の担体にシクロデキストリン誘導体を共有結合させた HPLC キラル固定相が数多く報告されている¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。シクロデキストリン形 HPLC キラル固定相の大きな特長として、ODS カラムの測定条件に近い逆相系移動相を使用出来る事が挙げられる。又、グルコース 7 個から成る β -シクロデキストリンは、ベンゼン環 1~2 個を有する低分子芳香族化合物をゲストとして包接し易い為、特に、低分子系医薬品やその中間体のキラル分離に適する場合が多い。

筆者らは以前の研究で、パークル形キラル固定相において、キラルセクターの構造が同じでも、キラルセクターと担体とを結合するスペーサー部分の構造が異なれば、保持やエナンチオ分離特性に有意差が生じる事を報告した^{3),4)}。シクロデキストリン形キラル固定相においても、スペーサーの構造がエナンチオ分離能に影響を与えると言う報告も有る¹⁷⁾。これらの知見から、新規キラル固定相の設計において、シクロデキストリン誘導体と担体の

シリカゲルとを結合するスペーサー部分の構造を変化させれば、分離性能が更に向上する可能性があると考えた。筆者らは、分岐鎖 β -シクロデキストリン (グルクロニルグルコニック- β -シクロデキストリン) をキラルセクターとし、分岐鎖部分のカルボキシル基をリンカーとして、担体のアミノプロピルシリカゲルのアミノ基と結合させる事により、スペーサー部分に糖鎖を有する新たなキラル固定相を設計した。アミド結合を介してキラルセクターを担体に共有結合する方法は、パークル形キラル固定相でもよく用いられている^{18),19)}。キラル固定相においてアミド結合による固定化が用いられる理由は、逆相 HPLC で汎用される酸性移動相中での安定性が高い事、そして、固定相と分析種との相互作用としての水素結合サイトと成り得る事が主たる要因と考えられる。Fig. 1 に固定相構造を示すが、OA-7000 は、水酸基未修飾のシクロデキストリンをキラルセクターとしている。

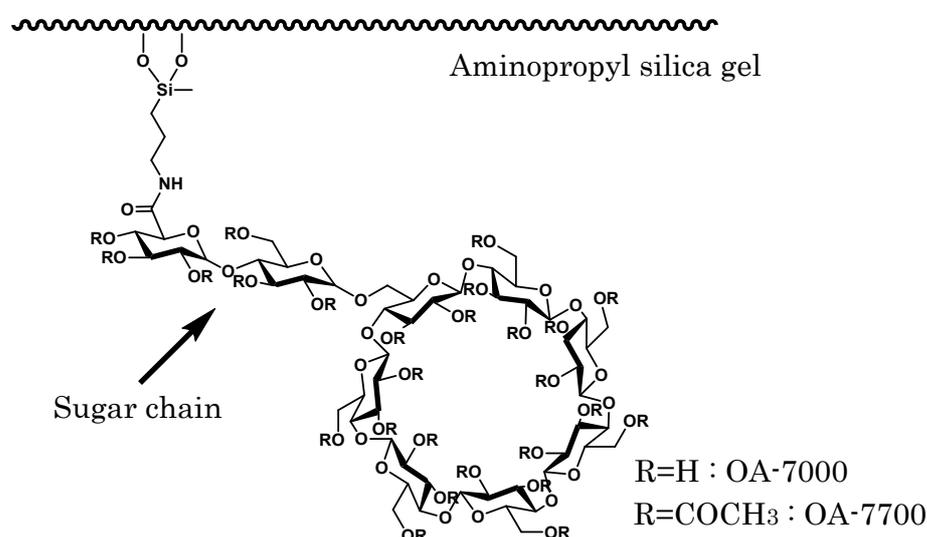


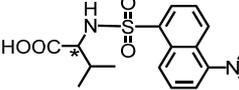
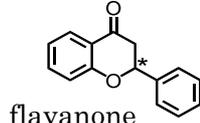
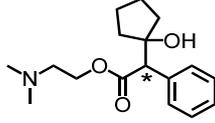
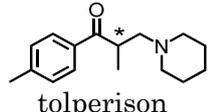
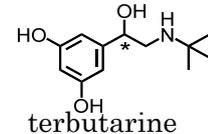
Fig. 1 Structures of β -cyclodextrin type chiral stationary phases

2.2 糖鎖スペーサーの効果^{4),5)}

OA-7000 のエナンチオ分離特性を従来の固定相と比較する為、アルキル鎖をスペーサーとする市販のシクロデキストリン形キラル固定相 (CSP-1) との比較を行った。その結果を Table 2 に、シクロペントラートのクロマトグラムの比較を Fig. 2 に示す。

カルボキシル基をもつ N-ダンシルバリンでは、両者はほぼ同等の分離係数と成ったが、中性化合物のフラバノンの場合には、OA-7000 では非常に大きな分離係数が得られ、エナンチオ分離能に顕著な差が認められた。第三級アミノ基を有するトルペリゾン、シクロペントラート及びテルブタリンでも、両者はほぼ同等の分離係数となったが、Fig. 2 のシクロペントラートのクロマトグラムを比較すると、OA-7000 を用いると良好なピーク形状が得られたのに対し、アルキル鎖スペーサーの CSP-1 の場合はピークのテーリングが大きく成った。トルペリゾンとテルブタリンも同様の傾向を示した。又、何れの分析種も同じ組成の移動相で測定した場合、OA-7000 の保持係数が小さく成った。

Table 2 Comparison of enantioselectivity between OA-7000 and CSP-1

Analyte	OA-7000	CSP-1	Analyte	OA-7000	CSP-1
 N-dansylvaline	$\alpha=1.19$ $k_1=2.29$	$\alpha=1.23$ $k_1=2.91$	 flavanone	$\alpha=1.88$ $k_1=1.73$	$\alpha=1.00$ $k_1=9.24$
 cyclopentolate	$\alpha=1.33$ $k_1=0.94$	$\alpha=1.21$ $k_1=4.47$	 tolperison	$\alpha=1.15$ $k_1=1.45$	$\alpha=1.17$ $k_1=2.37$
			 terbutarine	$\alpha=1.17$ $k_1=2.11$	$\alpha=1.19$ $k_1=10.85$

Mobile phase, acetonitrile/20 mmol/L KH_2PO_4 in water (30/70, v/v) ; flow rate, 0.7~1.0 mL/min ; detection, UV 254 nm.

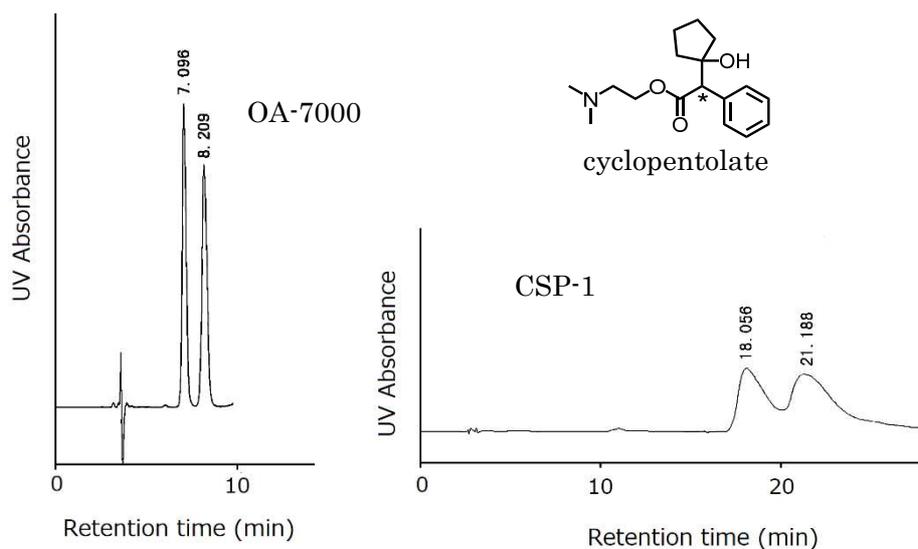


Fig. 2 Comparison chromatograms of cyclopentolate
The conditions are shown in Table 2.

OA-7000 と CSP-1 はどちらも未修飾 β -シクロデキストリンをキラルセクターとしているが、担体と結合するスペーサー部分の構造が異なる。その為、両者のエナンチオ分離能やピーク形状、保持係数の差は、スペーサー部分の構造に起因すると考えられる。これらの現象が生じる要因に関して、以下の様に推察した。

- (1) アルキル鎖スペーサーの方が、糖鎖スペーサーより保持係数が大きく成る点に関しては、アルキル鎖による逆相分配相互作用が保持に寄与していると推察される。

(2) 糖鎖スペーサーの場合にエナンチオ分離能が向上するのは、スペーサーの糖鎖部分がキラル識別に関与している為と推察される。但し、その効果は、分析種の化学構造によって異なり、分離能の向上が顕著に認められる場合と、有意の差が無い場合があった。

(3) 塩基性化合物のテーリングが抑えられる要因として、極性の高い糖鎖スペーサーが、サンプルと担体シリカゲルのシラノール基との相互作用（水素結合）を抑制している可能性が考えられる。類似の現象に、極性基内包形（embed 形）固定相の例が有る。ODS カラムを使用する際、分析種が塩基性化合物の場合は担体のシラノール基との相互作用により、しばしばピークがテーリングする。極性基内包形固定相は、担体シリカゲルと疎水性アルキル鎖の間にアミド結合等の極性基を挿入した構造で、通常の逆相カラムと比べて塩基性化合物のテーリングが抑制されるという報告が有る²⁰⁾。これは、担体近傍の極性基の効果と考えられるが、OA-7000 におけるスペーサーの糖鎖が、これと同様の効果を発現していると推察している。

OA-7000 を用いたフラバノンのキラル分離において、非常に大きな分離係数が得られたが、これは糖鎖スペーサーがキラル識別に直接関与している効果と考えられる。OA-7000 を用いた分析法として、例えば、イソフラボン誘導体²¹⁾、エピカテキン²²⁾、グラブリジン²³⁾等のキラル分離が報告されている。このうち、エピカテキンはフラボノイドの一種で茶の渋み成分カテキンの異性体、グラブリジンはメラニン合成抑制効果が有ると言われる甘草由来のイソフラボン誘導体である。フラバノンの分離結果及びこれらの文献報告から考察すると、OA-7000 は、キラルなフラボノイド化合物に対して、特異的に優れたエナンチオ分離能を示すと考えられる。フラボノイドは、Fig. 3 に示すフラバンを基本骨格とする植物二次代謝物の総称で多彩な生物活性が認められているが、不斉炭素をもつキラル化合物が多く、その立体異性体間の生理作用の違いに関する研究も盛んに行なわれている。OA-7000 は、この分野の研究にも貢献出来ると期待される。

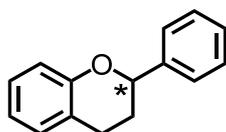


Fig. 3 Basic chemical structure of flavonoids (flavan)

以上の様に、シクロデキストリン形キラル固定相においても、スペーサー部分の構造がエナンチオ分離特性に大きく影響する事を確認した。スペーサーに糖鎖を導入する事で、従来から知られている β -シクロデキストリン形キラル固定相の性能を向上させ、実用的に優れたキラル固定相を設計する事が出来た。

2.3 水酸基修飾の効果^{6),7),13)}

キラル固定相は、キラルセクターと分析種の間様々なジアステレオメリックな相互

作用に基づいてキラル分離が達成される。その際、キラルセクターの官能基が相互作用に
関与する場合が多い。その為、同じ化合物系統のキラルセクターでも、化学修飾して構造
を少し変えただけで、エナンチオ分離特性が大きく変化する事が知られている。例えば、多
糖系キラル固定相では、糖の置換基の影響を強く受ける事が報告されている^{24,25)}。又、シ
クロデキストリン形キラル固定相においても、シクロデキストリンの水酸基を化学修飾す
ればエナンチオ分離能が変化する事が知られていて、修飾基が異なる様々なタイプの固定
相が市販されている²⁶⁾。

OA-7000 は、従来のシクロデキストリン形キラル固定相とは分離特性が異なり、特に、
フラボノイド等の中性化合物に対して優れたエナンチオ分離能を有する事を述べたが、一
方で、キラルアミンに対するエナンチオ分離能は不十分な場合も有った。そこで、分離対象
となるキラル分析種の範囲拡大を目的として、OA-7000 と基本骨格は同じで、シクロデキ
ストリンの水酸基をアセチル化した新規キラル固定相 OA-7700 (Fig. 1) を設計した。筆者
らは、様々な構造の芳香族キラル化合物を分析種として、OA-7000 と OA-7700 のエナンチ
オ分離特性を詳細に比較した⁶⁾。その結果を、化合物群ごとに纏めて Table 3 に示す。又、
両者のエナンチオ分離特性の違いが明確な典型的クロマトグラムを Fig. 4 に示す。

OA-7700 を用いた場合、評価した第一級及び第二級アミンの分析種 15 化合物全てが分
離係数は 1.07 以上と成ったが、OA-7000 の場合は、分離係数 1.07 以上を示したのは 3 化
合物のみであった。アミノ酸に対しても同様に OA-7700 の方が優れた分離能を示した。一
方、中性キラル化合物を分析種とした場合は逆の傾向を示し、OA-7000 の方が分離係数の
大きい化合物が多かった。この様に、OA-7000 と OA-7700 のエナンチオ分離特性は大きく
異なり、OA-7700 はアミノ基を有する芳香族キラル化合物に対して汎用的に優れた分離能
を示す事が認められた。これ迄にも水酸基をアセチル化したシクロデキストリン形キラル
固定相は報告されている²⁷⁾ が、キラルアミンに対する系統的な分離特性は示されていない。
今回の結果から、OA-7700 はアミン化合物に対するキラル固定相として有力な選択肢とな
る事が示された。

Table 3 Summary of comparative enantioselectivity between OA-7000 and OA-7700

	Enantioselectivity ^a	
	OA-7000	OA-7700
Primary amine and amino alcohol	3/11 (27 %)	11/11 (100 %)
Secondary amine and amino alcohol	0/4 (0 %)	4/4 (100 %)
Amino acid	0/3 (0 %)	2/3 (67 %)
Neutral compound	3/4 (75 %)	1/4 (25 %)

^a Number of separated compounds (at $\alpha > 1.07$)/investigated compounds.
The HPLC conditions of individual analyte are described in the previous report⁶⁾.

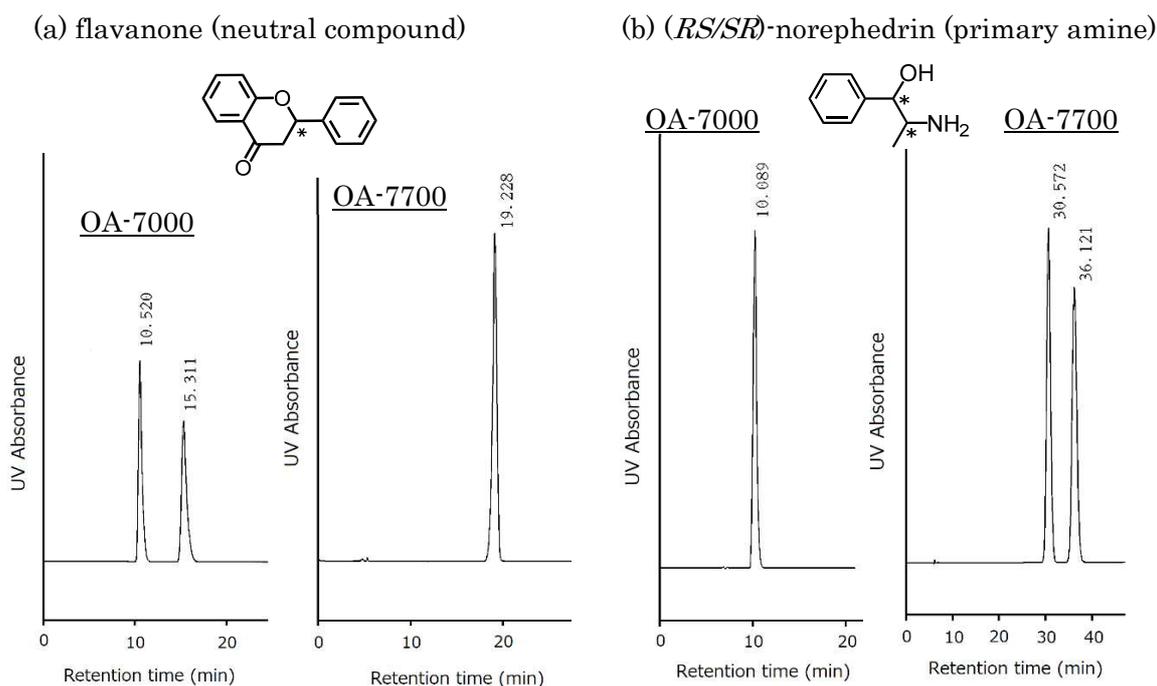


Fig. 4 Comparison chromatograms between OA-7000 and OA-7700

Mobile phase, (a) acetonitrile/water (40/60, v/v), (b) methanol/20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (2/98, v/v) ; flow rate, 0.5 mL/min ; detection, UV (a) 254 nm, (b) 210 nm.

Fig. 4 (a)と(b)は、其其同じ移動相を用いて比較したクロマトグラムである。保持係数はOA-7700の方がOA-7000より大きく成っているなので、この場合、固定相とキラル分析種との間の相互作用は、OA-7700の方が強く発現していると考えられる。OA-7000とOA-7700は、シクロデキストリン水酸基のアセチル化の有無のみが異なり、他の化学構造は同じである。両者のエナンチオ分離特性に大きな差が生じる要因について、以下の様に考察した。

(1) 水酸基をアセチル化する事によって、シクロデキストリン空孔の入口付近が少し小さくなり、比較的分子サイズの小さい分析種が空孔に包接され易く成って、相互作用が強く発現すると言う要因が考えられる。しかし、中性化合物に対しては、OA-7700で保持係数が大きく成っても、エナンチオ分離能が低下する傾向を示す為、空孔サイズの要因だけでは合理的な説明は出来ない。

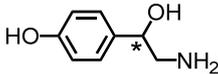
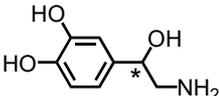
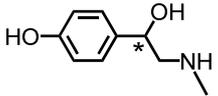
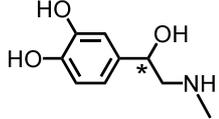
(2) シクロデキストリン形キラル固定相においては、分析種とのホストゲスト相互作用が主な分離メカニズムであるが、シクロデキストリン表面と分析種との間の水素結合も、保持やエナンチオ分離に関与していると推察した。アミノ基や水酸基は水素結合のドナーと成る為、シクロデキストリン環の表面に未修飾の水酸基が多く存在していると、分析種のアミノ基との水素結合は発現し難い。水酸基をアセチル化すると、水素結合のアクセプターが増加する為、分析種のアミノ基との間の水素結合が強く発現し易くなり、保持や分離に関与して、ホストゲスト相互作用を増強している可能性が有る。

これらの結果は、シクロデキストリン水酸基の化学修飾がエナンチオ分離特性に大きな影響を与える事を示している。分析種の化学構造に応じて、最適のキラル固定相を選択する事が重要である。

2.4 アミノアルコールの化学構造に対する OA-7700 のエナンチオ分離特性

更に、分析種の芳香族アミノアルコールの化学構造と OA-7700 のエナンチオ分離特性の関係について考察した。化学構造の類似した 4 種のキラルアミノアルコール誘導体に対する OA-7700 の分離係数を Table 4 に示す。

Table 4 Enantioselectivity of OA-7700 for chiral amino alcohols of similar structure

	4-hydroxy phenyl group	3,4-dihydroxy phenyl group
primary amine	 octopamine ($\alpha=1.21$)	 noradrenaline ($\alpha=1.38$)
secondary amine	 synephrine ($\alpha=1.21$)	 adrenaline ($\alpha=1.32$)

Mobile phase used was 20 mmol/L KH_2PO_4 in water. Other conditions are described in the previous report ⁶⁾.

オクトパミンとシネフリンは、他の部分の構造が同じ第一級アミンと第二級アミンの関係であるが、同等の分離係数が得られた。又、ノルアドレナリンとアドレナリンも、分離係数に大きな差は認められなかった。これらの結果から、ゲストとなるキラルアミノアルコールのアミノ基近傍の構造は、OA-7700 のエナンチオ分離能に大きくは影響しないと考えられる。一方、オクトパミンとノルアドレナリンは共に第一級アミンであるが、カテコール構造 (3,4-ジヒドロキシ体) を有するノルアドレナリンの分離係数が有意に大きく成った。同様に、第二級アミンのシネフリンとアドレナリンを比較しても、カテコールアミンのアドレナリンの分離係数が大きく成った。これらの結果から、OA-7700 によるキラルアミノアルコールに分離においては、フェニル基の置換基の数や位置がエナンチオ分離能に影響する事が示唆される。シクロデキストリン形キラル固定相では、ゲストのアリール基の部分がシクロデキストリン空孔に包接されると考えられているが、OA-7700 が示すエナンチオ分離特性も、この事実と合致する結果と言える。

キラルなアミノアルコールには医薬品として重要な化合物が多く、例えば、血管収縮薬や気管支拡張薬として用いられるアドレナリンや、 β 作動薬のイソプロテレノールも日本薬局

方に記載されている²⁸⁾。Fig. 5 に、OA-7700 を用いたアドレナリンとイソプロテレノールキラル分離クロマトグラムを示す。日本薬局方における光学純度試験法の多くは旋光度法と成っている²⁸⁾ が、OA-7700 を用いると、逆相 HPLC 法で良好なキラル分離が可能となる。キラル固定相による HPLC 法は精度が高く簡便、迅速である為、旋光度法に替わる光学純度試験法としての活用が期待される。

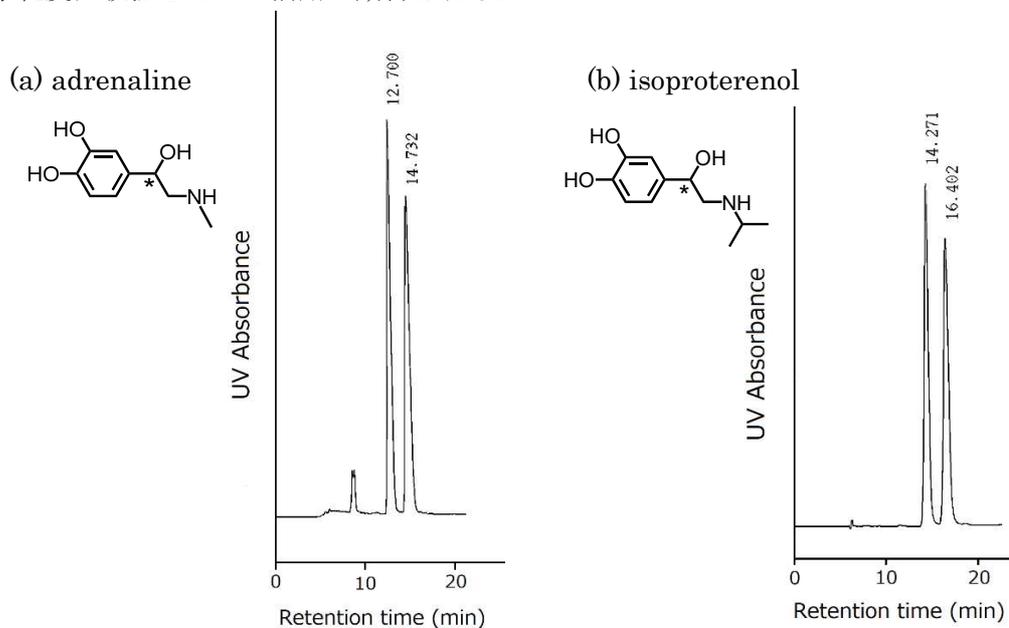


Fig. 5 Chromatograms of adrenaline and isoproterenol using OA-7700

Mobile phase, 20 mmol/L KH_2PO_4 in water ; flow rate, 0.5 mL/min ; detection, UV 254 nm.

3. 擬 18-クラウン-6-エーテルを用いた新規化学結合形キラル固定相

3.1 開発の背景

アミノ酸等の第一級アミノ基を有するキラル化合物の分離には、クラウンエーテル誘導体をキラルセクターとする固定相が有効である事が知られている。Fig. 6 に 18-クラウン-6 エーテルの基本骨格を示す。クラウンエーテルは、その大環状ポリエーテルの空孔に、一級アンモニウムカチオンや金属カチオンを包接する特性を有する。未修飾のクラウンエーテルは非光学活性であるが、キラルユニットを置換基として導入した光学活性クラウンエーテルはエナンチオ認識能をもち、キラルセクターとして利用出来る。

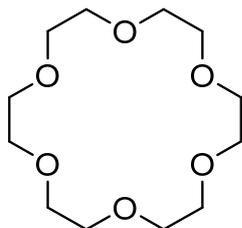


Fig. 6 Basic structure of 18-crown-6-ether

1970 年代に、Cram らは光学活性クラウンエーテルを担体に共有結合させた新しい HPLC キラル固定相を報告した^{29),30)}。Cram は、それらの業績により 1987 年にノーベル化学賞を受賞している。その他にも、早くからキラルクラウンエーテル固定相の報告は有ったが、当初は研究報告のみで多くは製品化されなかった。量産化や製造コスト面での課題も有ったと推察される。製品化された固定相としては、ビナフチルを不斉源とするキラルクラウンエーテルを ODS 固定相にダイナミックコーティングしたタイプのキラル固定相が報告されている³¹⁾。これは、アミノ酸等のキラル第一級アミンの分離に有用な事が示されているが、キラルセクターをコーティングで吸着させている為、移動相として使用可能な有機溶媒濃度に制約が有った。その為、例えば、逆相系で保持の強い疎水性置換基をもつアミン化合物は、測定が困難な場合が有った。

その後、クラウンエーテル環の一部にベンゼン環を含むキラル擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体が、第一級アミンに対してキラル識別能を示す事が報告された³²⁾⁻³⁴⁾。これらは比較的量产化し易い合成ルートで製造出来るが、HPLC キラル固定相への応用は報告されていなかった。筆者らは、このキラル擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体をキラルセクターとして、これを担体のシリカゲルに共有結合させた新規キラル固定相の設計を試みた。その際、キラルセクターの擬 18-クラウン-6-エーテルに、リンカーとしてのカルボキシル基を導入し、それを、OA-7000 の場合と同様に、担体のアミノプロピルシリカゲルのアミノ基とアミドカップリングして、シリカゲルに固定化した (Fig. 7)。

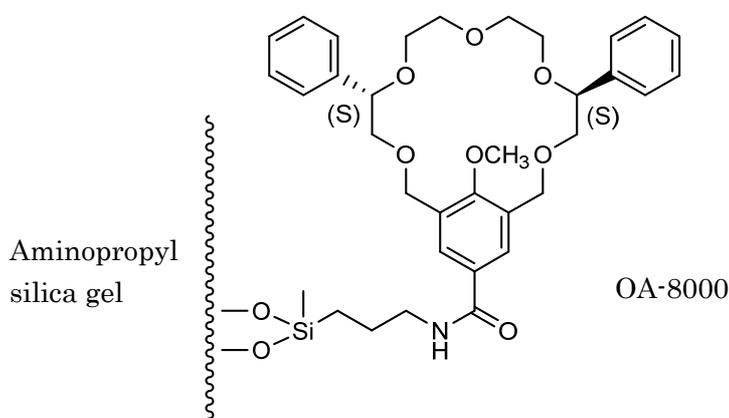


Fig. 7 Structure of crown ether type chiral stationary phase

3.2 OA-8000 のエナンチオ分離特性とアプリケーション⁸⁾⁻¹⁰⁾

OA-8000 の耐溶媒性確認の為、分析種として 1-(1-ナフチル) エチルアミンを用い、30% アセトニトリルを含有する過塩素酸水溶液 (pH 2.0) を連続通液した所、少なくとも 150 時間迄は、保持時間及び分離係数の変化は認められなかった。クラウンエーテルを担体に共有結合させた事により、実用的に十分な耐久性を付与する事が出来た。現在迄、クラウンエーテル化学結合形のキラル固定相は幾つか市販されているが、当時、製品化したのは OA-8000

が最初であった。

キラルセクターを担体に共有結合した実用的なメリットとして、先ず、移動相中の有機溶媒濃度の制約が無くなる為、保持の強い疎水性キラルアミンにも適用が広がる事が挙げられる。疎水性キラルアミンの分離例として、1-(1-ナフチル)エチルアミン及びアラニン- β -ナフチルアミドのクロマトグラムを Fig. 8 に示す。クラウンエーテル形キラル固定相では、逆相系移動相として、通常、有機溶媒と過塩素酸水溶液の混合液が用いられるが、OA-8000 の場合、疎水性の高い分析種でも、移動相の有機溶媒濃度を最適化して適度な保持時間に調整する事によって、キラル分離メソッドの作成が可能であった。なお、移動相に添加する酸として、トリフルオロ酢酸、リン酸、酢酸を用いた場合は、酸濃度を上げてても保持係数が小さい為、過塩素酸水溶液が最も適当であった。

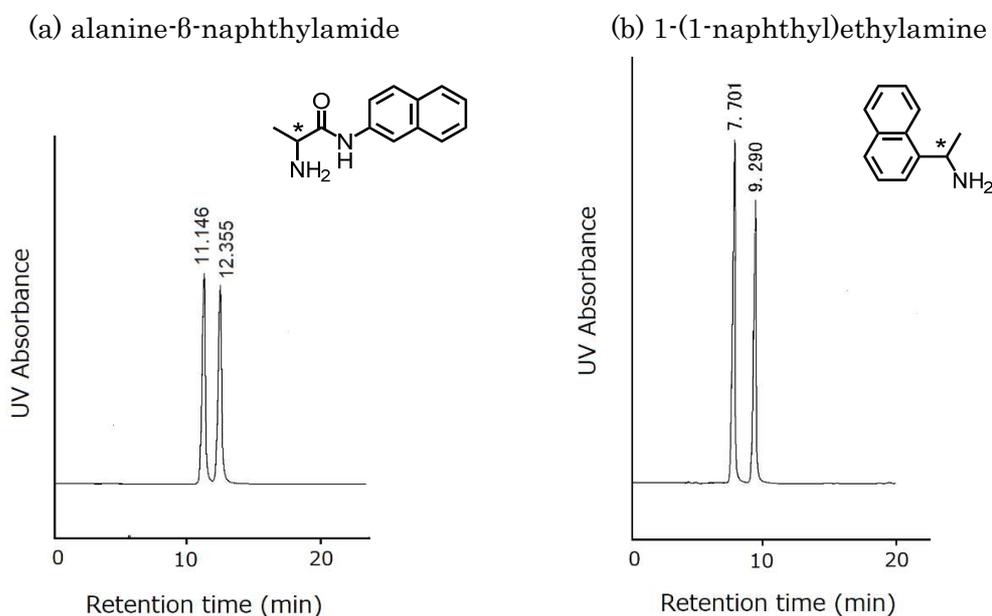


Fig. 8 Chromatograms in reversed phase mode using OA-8000

Mobile phase, (a)acetonitrile/perchloric acid in water (pH 2.0) (20/80, v/v), flow rate, 0.7 mL/min, (b)acetonitrile/perchloric acid in water (pH 2.0) (30/70, v/v), flow rate, 0.8 mL/min ; detection, UV 254 nm. The pH of perchloric acid aqueous solution was adjusted by changing the concentration of perchloric acid, this is same for later tables and figures.

キラルセクターを担体に共有結合した事のもう一つのメリットは、順相系移動相が使用出来る事である。順相系移動相を使用する実用的な利点として、分取目的や超臨界流体クロマトグラフィーへの適用が挙げられる。Fig. 9 に、OA-8000 を用いて、エタノール/*n*-ヘキサン混合液にトリフルオロ酢酸を添加した溶液を移動相として測定した場合のクロマトグラムを示す。又、同じ分析種を逆相系と順相系移動相で測定し、比較した結果を Table 5 に示す。

順相系と逆相系の移動相を比較すると、アミノ酸の DOPA は、順相系では可成り大きな

分離係数が得られたが、逆相系では分離係数がやや小さくなった。アミノアルコール誘導体であるノルエフェドリンも同様の傾向を示した。アミノ酸やアミノアルコール類等、比較的極性の高い分析種に対しては、順相系移動相の方が適していると言える。一方、1-(1-ナフチル)エチルアミンは、逆相系移動相を用いた場合に分離係数が大きく成った。Fig. 8 (b)及び Fig. 9 (b)のクロマトグラムを比較すると、順相系移動相ではややピークのテーリングが認められた。この様な疎水性の高いアミン類に対しては、逆相系移動相の方が適していると考えられる。分析種の構造によって、移動相の使い分けが必要になると考えられる。なお、1-(1-ナフチル)エチルアミン鏡像異性体の溶出順は、順相系、逆相系移動相の何れも、*S-R*の順であり、移動相の違いによる溶出順の逆転は認められなかった。

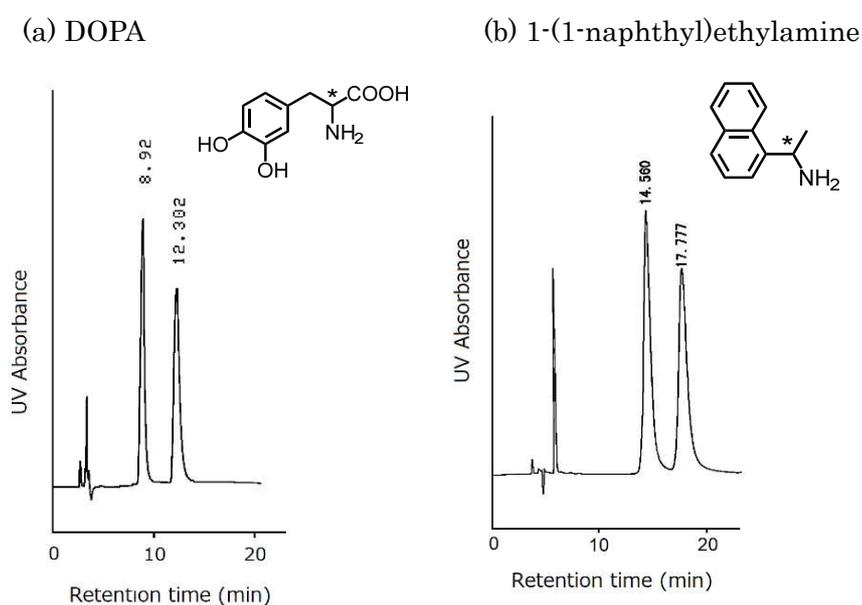


Fig. 9 Chromatograms in normal phase mode using OA-8000

Mobile phase, (a) ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid (35/65/1, v/v/v), (b) ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid (30/70/0.5, v/v/v) ; flow rate, 0.7 mL/min ; detection, UV 254 nm.

Table 5 Comparison of normal and reversed phase modes using OA-8000

Analyte	normal phase mode			reversed phase mode		
	k_1	α		k_1	α	
DOPA	0.89	1.80	a)	1.18	1.13	c)
1-(1-naphthyl)ethylamine	2.09	1.33	b)	0.86	1.44	d)

Mobile phase, a) and b) are shown in Fig. 9, c) acetonitrile/perchloric acid in water (pH 1.3) (10/90, v/v), flow rate, 0.7 mL/min, d) acetonitrile/perchloric acid in water (pH 2.0) (30/70, v/v) ; flow rate, 0.8 mL/min, ; detection, UV 254 nm.

アミノ酸を誘導体化する事無く直接キラル分離する為には、配位子交換形キラル固定相を用いる方法^{35),36)}も有るが、クラウンエーテル形キラル固定相も有力な選択肢である。OA-8000 は、DOPA の他、フェニルアラニンやトリプトファンの様な芳香族アミノ酸、或いはそのエステルキラル分離に適用出来る。Fig. 10 にトリプトファンのクロマトグラムを示す。順相系移動相を使用する場合、エタノール/*n*-ヘキサン/トリフルオロ酢酸にごく少量の水を添加すると、ピーク形がシャープに成る効果が認められた。

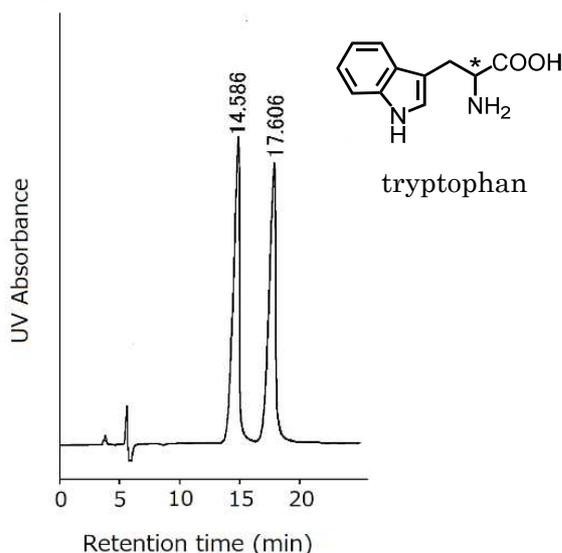


Fig. 10 Chromatogram of tryptophan using OA-8000

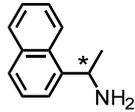
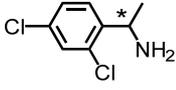
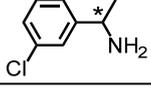
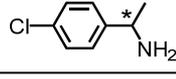
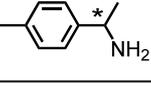
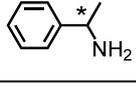
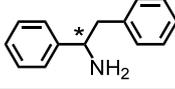
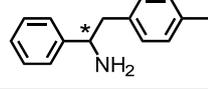
Mobile phase, ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid/water (30/70/0.5/0.5, v/v/v/v) ; flow rate, 0.7 mL/min ; detection, UV 254 nm.

以上の様に OA-8000 は、キラルセクターのクラウンエーテルを担体と共有結合を介して連結して耐久性を向上させた事により、コーティング形の固定相と比べて、適用化合物の範囲や使用条件が広がった。OA-8000 は、米国薬局方の HPLC カラムリストに掲載されている (USP L-127)³⁷⁾。

3.3 第一級アミンに対する OA-7700 と OA-8000 のエナンチオ分離特性の比較¹¹⁾

アセチル化シクロデキストリン形の OA-7700 及びクラウンエーテル形の OA-8000 は、共に第一級アミノ基を有する芳香族キラルアミンの分離に有効である。何れも、ゲストアミンとキラルセクターの間のホストゲスト相互作用に基づいてキラル識別が達成されるが、その分離メカニズムは大きく異なると推察される。又、最適の移動相条件も違っている。そこで、両者のキラルアミンに対するエナンチオ分離特性の相違を明らかにし、分離メソッド作成時におけるキラル固定相選択の指標とする目的で、代表的なキラル第一級アミンである 1-アリールエチルアミン類をゲストとしてエナンチオ分離能を比較した¹¹⁾。Table 6 にその結果を示す。

Table 6 Comparison of enantioselectivity between OA-7700 and OA-8000

Analyte	OA-7700	OA-8000	Analyte	OA-7700	OA-8000
	$\alpha=1.00$ $k_1=1.15$	$\alpha=1.56$ $k_1=1.18$ e.o. <i>S-R</i>		$\alpha=1.00$ $k_1=1.33$	$\alpha=1.24$ $k_1=1.89$
	$\alpha=1.22$ $k_1=1.10$	$\alpha=1.04$ $k_1=1.31$		$\alpha=1.14$ $k_1=2.64$	$\alpha=1.07$ $k_1=1.29$
	$\alpha=1.11$ $k_1=0.92$ e.o. <i>S-R</i>	$\alpha=1.09$ $k_1=1.40$ e.o. <i>S-R</i>		$\alpha=1.17$ $k_1=1.15$ e.o. <i>S-R</i>	$\alpha=1.09$ $k_1=0.76$ e.o. <i>S-R</i>
	$\alpha=1.78$ $k_1=1.58$	$\alpha=1.00$ $k_1=1.29$		$\alpha=1.42$ $k_1=1.84$ e.o. <i>S-R</i>	$\alpha=1.00$ $k_1=2.12$

Mobile phases, methanol/20 mmol/L NaH₂PO₄ in water (pH is adjusted to 3.0 by adding H₃PO₄) for OA-7700 and methanol/ perchloric acid in water (pH 1.8) for OA-8000 ; flow rate, 0.5 mL/min ; detection, UV 254 nm. Mobile phase compositions for each analyte were described in the previous report ¹¹⁾, and "e.o." means elution order.

1-アリアルエチルアミン類のキラル分離において、同じ化合物に対する OA-7700 と OA-8000 のエナンチオ分離特性には顕著な差が認められ、ゲストアミンの置換基に対して、互いに相補的な分離能を示した。これは、両者のホストゲスト相互作用の相違に起因すると推察される。この考察の根拠を分かり易く示す為、Fig. 11 にクラウンエーテルとシクロデキストリンの空孔サイズとゲスト分子の大きさを、ほぼ同縮尺となる様に図示した。シクロデキストリン分子は、片方の端が少し狭く成った円筒形状なので、イメージ図として示している。

OA-8000 は、1-アリアルエチルアミンの 1 位不斉炭素にナフチル基やジクロロフェニル基の様な嵩高いアリアル基が結合するゲストに対して、分離係数 1.2 以上の優れたエナンチオ分離能を示した。クラウンエーテルはゲストのアンモニウム塩部位を包接してホストゲスト錯体を形成するが、アミノ基が結合する 1 位不斉炭素に嵩高い置換基があると、ホスト側フェニル基との立体障害により、鏡像異性体間でホストゲスト錯体の安定性に差異が生じ、その結果、大きなエナンチオ分離能を示すと考えられる。1 位不斉炭素の置換基が、塩素 1 個以下のアミンに対しては、鏡像異性体間でホストゲスト錯体の安定性に差が生じ難く成り、エナンチオ分離能が低下している。

一方、OA-7700 の場合は 1-フェニルエチルアミンとそのモノ置換誘導体に対して良好な分離能を示したが、1 位不斉炭素の結合した置換基が嵩高く成ると、OA-8000 とは逆に、エナンチオ分離能が低下した。シクロデキストリン形固定相では、2.4 項のアミノアルコールの分離特性で考察した様に、ゲストアミンの 1 位不斉炭素に結合したアリアル基を包接してホストゲスト錯体を形成すると推察される。OA-7700 では、1 位不斉炭素に嵩高い置換

基が結合すると、平面上に広がった芳香環の立体障害により、シクロデキストリンの空孔にゲスト分子を取り込み難く成ると考えると、これらの結果を合理的に説明出来る。同じ移動相で測定した場合、1-(4-クロロフェニル)エチルアミンより、塩素原子が 1 個多い 1-(2,4-ジクロロフェニル)エチルアミンの方が、保持時間が短く成る事実もその根拠の一つである。又、1-アリールエチルアミンの 2 位に更にアリール基を導入した 1,2-ジフェニルエチルアミンと 1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンの場合、OA-7700 では顕著に優れたエナンチオ分離能が示した。逆に、OA-8000 では保持時間は長く成るもののエナンチオ分離能が低下し、1-アリールエチルアミン類 2 位への置換基導入は、クラウンエーテル形固定相の分離能の向上に寄与しないと考察される。

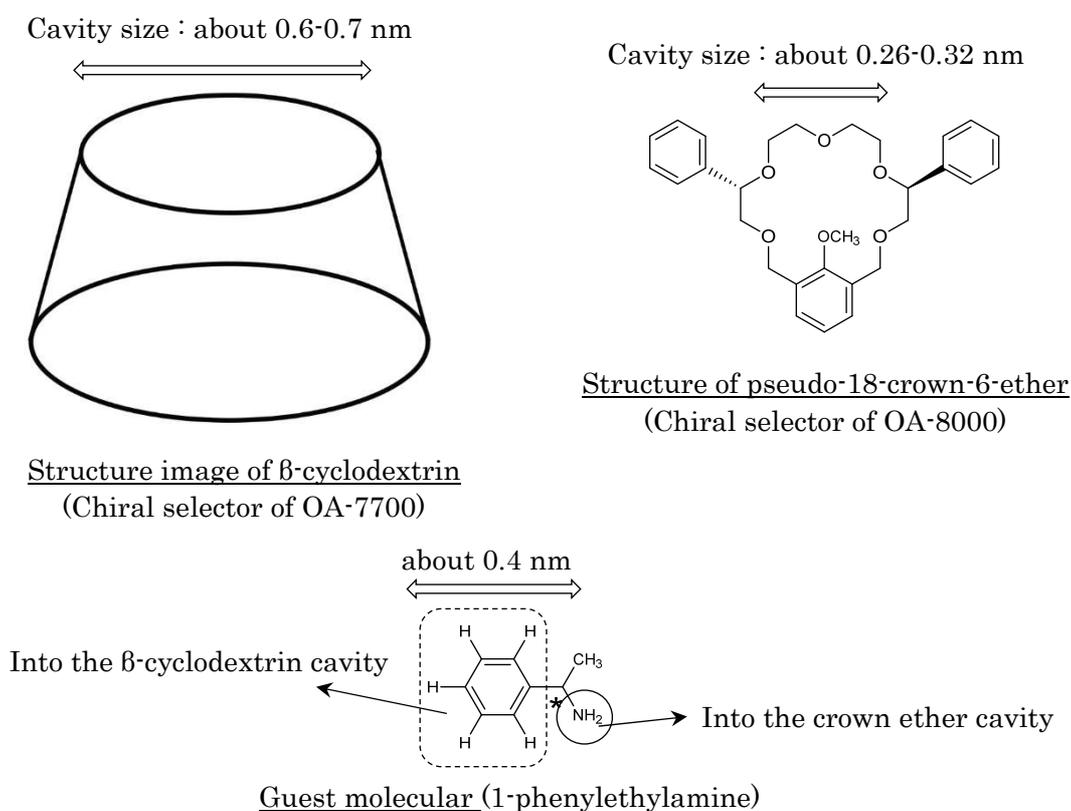


Fig. 11 The molecule images of β -cyclodextrin, pseudo-18-crown-6 ether and guest compound described at the same scale

以上の様に、1-アリールエチルアミン類のキラル分離では、ゲスト分子の置換基構造に対して明らかな差が認められ、互いに相補的なエナンチオ分離能を示した。これは、分析種が 1-アリールエチルアミン誘導体のみの結果ではあるが、キラルアミンの分離メソッド開発において、分析種に応じてキラル固定相の効果的な選択が重要である事を示唆している。

芳香族キラルアミンには、医薬品やその中間体、カテコールアミン等の生物活性物質、光学分割剤等、多くの重要な化合物が含まれている。この様なアミン化合物のキラル分離メソ

ッドを迅速に開発する事は、医薬品開発を初め様々な分野の研究開発において、重要な課題である。OA-7700 は、カテコールアミン等のキラルアミノアルコールや第二級アミンのキラル分離も可能で、分離対象となるアミン化合物の種類が多く、キラルアミンの分離メソッド開発における主要な選択肢となる。一方で、第一級アミンでは分析種の化学構造によって OA-8000 の方が分離し易い場合があるので、其々の固定相の特性を考慮して選択する事で分離対象となるアミン化合物範囲の拡大が期待される。

4. 結 言

本論文では、筆者らが開発してきた新規キラル固定相のうち、ホストゲスト包接作用を分離メカニズムとするキラル固定相 3 種 (OA-7000、OA-7700 及び OA-8000) について、様々なキラル分析種に対するエナンチオ分離特性を詳細に検討した上で、その固定相構造と分離能の関係を考察した。以下にその内容を要約する。

- (1) スペーサーに糖鎖を有する OA-7000 は、従来のアルキル鎖スペーサー形固定相と比較して、ピーク形状やエナンチオ分離能が向上する事を示した。その要因を、スペーサー構造の分離への関与の点から考察し、極性の高い糖鎖スペーサーが塩基性分析種のテーリングを抑制している可能性を示した。
- (2) シクロデキストリン形キラル固定相において、水酸基の化学修飾によりエナンチオ分離特性が大きく異なる事を示し、水酸基をアセチル化した OA-7700 は、多くの芳香族キラルアミンに対して優れたエナンチオ分離能を示す事を明らかにした。その要因について、シクロデキストリンと分析種との間の水素結合の関与の点から考察した。
- (3) キラル第一級アミンの分離において、OA-7700 と OA-8000 が、ゲスト化合物の置換基の違いに対して相補的なエナンチオ分離能を有する事を見出し、その要因をホストゲスト相互作用のメカニズムの違いから考察した。

本論文で述べた以外に、筆者らは、らせんポリマーを用いた新規キラル固定相¹²⁾や分析種の官能基に着目したキラル固定相の選択法¹³⁾を報告した。キラル固定相による HPLC 法は精度が高く簡便である為、特にキラル医薬品の分析において、旋光度法に替わる光学純度試験法としての展開が期待される。キラル分離メソッドの開発においては、キラル分析種に対して最適のキラル固定相を選択する事が重要である。近い将来、人工知能 (AI) に膨大なキラル分離データを学習させ、AI によるキラル固定相選択法も実用化されると思われる。その様な新しいシステムを活用する段階でも、固定相の構造と分離特性の関係を様々な相互作用の観点から考察する分析化学的視点が、分離メソッド開発の為の基礎に成ると考える。本論文で述べた考察の検証には更にデータの追加が必要と考えられるが、これらの知見が、キラル分離メソッド開発におけるキラル固定相選択の指標に成れば幸いである。

引用文献

- 1) JIS K 0214, 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門), 日本規格協会 (2013).
- 2) 大井尚文, キラルクロマトグラフィーのあゆみ, 丸善 (2001).
- 3) M. Kato, T. Fukushima, T. Santa, K. Nakashima, R. Nishioka, K. Imai, *Analyst*, **123**, 2877-2882 (1998).
- 4) 西岡亮太, 上重哲郎, 杉原輝一, 中島憲一郎, 加藤 大, 福島 健, 今井一洋, シンポジウムモレキュラー・キラリテイ 2001 講演要旨集, p. 117-120 (2001).
- 5) 西岡亮太, *SCAS NEWS*, **2000-II**, 7-11 (2000).
- 6) R. Nishioka, S. Harada, *Chromatography*, **37**, 65-71 (2016).
- 7) 西岡亮太, 原田修治, 梅原一宏, 第 27 回クロマトグラフィー科学会議講演要旨集, p. 55 (2016).
- 8) 西岡亮太, 上重哲郎, 中村 崇, 廣瀬敬治, 戸部義人, 第 11 回クロマトグラフィー科学会議講演要旨集, p. 294-295 (2000).
- 9) K. Hirose, T. Nakamura, R. Nishioka, T. Ueshige, Y. Tobe, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 1549-1551 (2003).
- 10) K. Hirose, J. Yongzhu, T. Nakamura, R. Nishioka, T. Ueshige, Y. Tobe, *Chirality*, **17**, 142-148 (2005).
- 11) 西岡亮太, LC と LC/MS の知恵, **1**, 41-49 (2020).
- 12) R. Nishioka, S. Harada, K. Umehara, *Chromatography*, **40**, 169-173 (2019).
- 13) 西岡亮太, 第 25 回 LC & LC/MS テクノプラザ講演要旨集, p. 6-7 (2020).
- 14) D. W. Armstrong, W. DeMond, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 411-415 (1984).
- 15) W. L. Hinze, T. E. Riehl, D. W. Armstrong, W. DeMond, A. Alak, T. Ward, *Anal. Chem.*, **57**, 237-242 (1985).
- 16) A. Berthod, H. L. Jin, T. E. Beesley, J. D. Duncan, D. W. Armstrong, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8**, 123-130 (1990).
- 17) A. Berthod, C-D. Chang, D. W. Armstrong, *Talanta*, **40**, 1367-1373 (1993).
- 18) N. Oi, H. Kitahara, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 511-517 (1986).
- 19) 大井尚文, *Chromatography*, **14**, 61R-70R (1993).
- 20) J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. D. Martosella, B. A. Bidlingmeyer, J. V-Russell, J. B. Adams, *LC GC*, **17**, 634-639 (1999).
- 21) M. Kim, S-I. Kim, J. Han, X-L. Wang, D. G. Song, S-U. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3062-3068 (2009).
- 22) X. Tzounis, J. Vulevic, G. G. C. Kuhnle, T. George, J. Leonczak, G. R. Gibson, C. K-Urube, J. P. E. Spencer, *Br. J. Nutr.*, **99**, 782-792 (2008).
- 23) M. Kim, S-U. Kim, Y. Kim, J. Han, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **30**, 415-418 (2009).
- 24) Y. Okamoto, T. Ikai, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 2593-2608 (2008).

- 25) 岡本佳男, *ファルマシア*, **50**, 105-107 (2014).
- 26) メルク, "Astec CYCLOBOND™", <<https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/large-molecule-hplc/cyclobond>>, (2022.3.24 現在).
- 27) B. Grüner, J. Holub, J. Plešek, T. Vaněk, H. Votavová, *J. Chromatogr. A*, **793**, 249-256 (1998).
- 28) 第 17 改正日本薬局方, 厚生労働省(2016).
- 29) L. R. Sousa, G. D. Y. Sogah, D. H. Hofmann, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4569-4576 (1978).
- 30) G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3035-3042 (1979).
- 31) T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Sugiura, *J. Chromatogr.*, **405**, 145-153 (1987).
- 32) K. Naemura, K. Nishioka, K. Ogasahara, Y. Nishikawa, K. Hirose, Y. Tobe, *Tetrahedron Asymmetry*, **9**, 563-574 (1998).
- 33) K. Naemura, Y. Nishikawa, J. Fuji, K. Hirose, Y. Tobe, *Tetrahedron Asymmetry*, **8**, 873-882 (1998).
- 34) K. Naemura, K. Matsunaga, J. Fuji, K. Ogasahara, Y. Nishikawa, K. Hirose, Y. Tobe, *Anal. Sci.*, **14**, 175-182 (1998).
- 35) V. A. Davankov, A. S. Bochkov, A. A. Kurganov, P. Roumeliotis, K. K. Unger, *Chromatographia*, **13**, 677-685 (1980).
- 36) N. Oi, H. Kitahara, R. Kira, *J. Chromatogr.*, **592**, 291-296 (1992).
- 37) U.S. Pharmacopeial Convention, "The United States Pharmacopeia and The National Formulary", <<https://www.usp.org/>>, (2022.3.24 現在).

< 執筆者略歴 >

西岡亮太

株式会社住化分析センター 大阪ラボラトリー

岐阜薬科大学大学院修士課程修了 (薬品分析化学)

博士 (薬学)、技術士 (化学)、液体クロマトグラフィー分析士三段

現在の担当業務: HPLC カラムの開発, 製造, 販売

E-mail: nishioka@scas.co.jp



【2021 年度 CERI クロマトグラフィー分析賞受賞業績】

生体試料中医薬品の極微量質量分析法の開発

Development of Ultramicro LC/MS Assay Methods
for Pharmaceuticals in Biological Samples

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 May 24, 2022 ; Accepted May 30, 2022)

要旨

LC/MS の飛躍的な発展により、今まで検出困難であった極微量なバイオマーカー（内因性物質）の検出及び定量が可能となった。医薬品開発や医療現場では、医薬品の作用機序の解明、疾患の診断、疾病の経過予測及び治療効果の予測等に、今後益々バイオマーカーの利用が期待される。本稿は、2021 年度 CERI クロマトグラフィー分析賞受賞業績の一部を纏めたものであり、生体試料中のバイオマーカーであるアミノ酸やプロスタグランジン (PGs) を LC/MS を用いて定量分析する方法の開発について概説する。一つ目は、ラットの腎疾患及び精神性疲労モデルを用いて、LC/MS による D-アミノ酸を一斉に定量し、その挙動を評価した結果であり、幾つかのアミノ酸がバイオマーカーとして利用出来る事を見出した。二つ目は、様々な生理活性を有する化合物として知られている PGs に着目し、酸化ストレスマーカーとして知られている 8-epi-プロスタグランジン F_{2α} (8-epi-PGF_{2α}) のヒト尿中の定量分析を確立した結果であり、高感度で迅速な多検体分析を可能とした。

キーワード LC/MS ; 質量分析計 ; 生体試料 ; 医薬品 ; バイオマーカー ; 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。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の情報をLC/MSから得る事が出来、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。生体試料中のバイオマーカーに焦点を当て、LC/MSによる定量分析について紹介する。

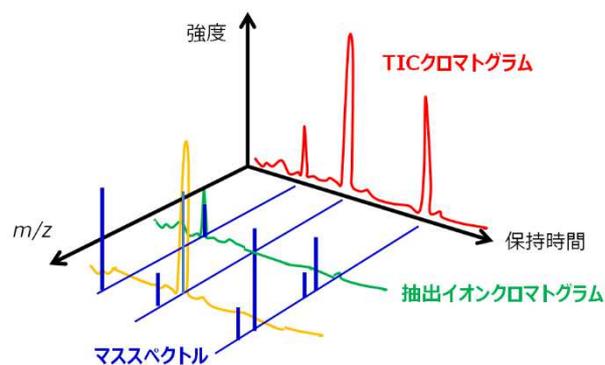


図1 LC/MSにより得られる情報

2. 選択反応モニタリングによる定量分析

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 (SRM: selected reaction monitoring) モードが良く用いられる (図2)。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 (SIM: selected ion monitoring) 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、飛躍的に選択性が向上し、その結果、検出感度が向上する点に特徴が有る。ここでは、SRMを利用した分析法を紹介する。

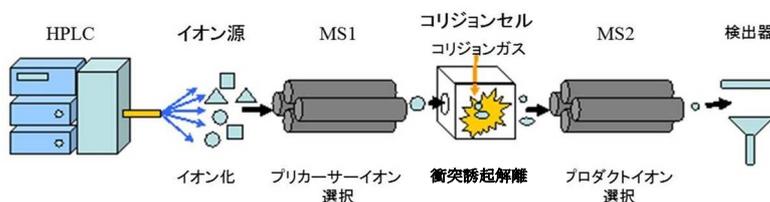


図2 三連四重極質量分析計の模式図

3. D, L-アミノ酸をバイオマーカーとした探索研究—腎疾患, 疲労への適用—

アミノ酸はアミノ基とカルボキシ基から成る有機化合物で、タンパク質を構成するアミノ酸の内、グリシンを除く19種類に光学異性体であるD体とL体が存在する。筆者は、味の素株式会社が開発した図3に示す様な新規軸不斉キラル誘導体化試薬 (BiAC-tag, biaryl axially chiral-tag) を用いたLC/MS/MSによるD及びL-アミノ酸の一斉分析法¹⁾により、ラット腎疾患モデルにおける血清及び疲労モデルにおける血漿中D及びL-アミノ酸の定量を行った。定量結果を解析し、其のモデルに影響を及ぼすアミノ酸を解析し、バイオマーカーとしての可能性を見出したので報告する。

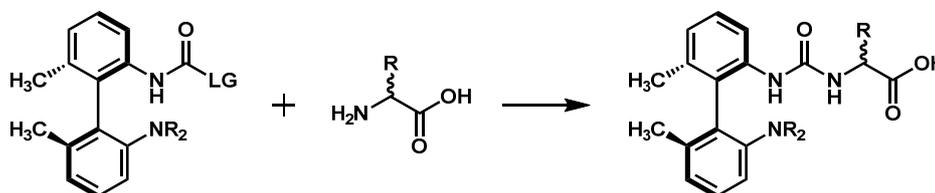


図3 D, L-アミノ酸のプレカラム誘導体化反応

3.1 方法

ラット 5/6 腎摘除腎不全モデル及び水浸疲労モデルを作製し、経時的に採血して得たラット血清又は血漿中の D-アミノ酸及び L-アミノ酸の濃度を算出し、コントロール群との比較

検討を行った。分析は、ラット血漿若しくは血清に内標準溶液を添加し、アセトニトリルを用いて除タンパク後、遠心分離し、その上清に上述の BiAC-tag 試薬を加えプレカラム誘導体化し、HPLC に供した。HPLC 条件は、分離カラムにフェニルカラムを、溶離液としてギ酸アンモニウムとアセトニトリルを用いたグラジエント溶離分析とした。MS は三連四重極質量分析計を用い、エレクトロスプレーイオン化 SRM モードで分析を行った。

代表的な D, L-アミノ酸のクロマトグラムを図 4 に示す。

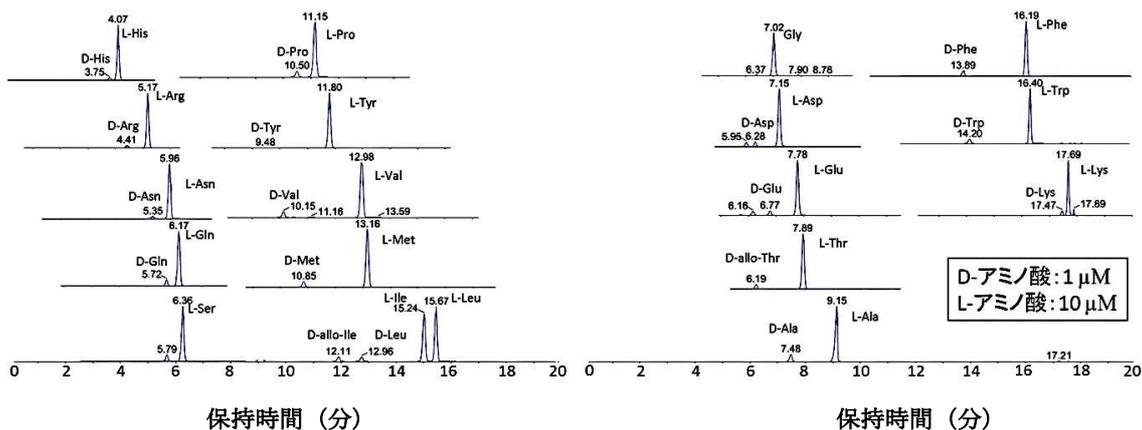


図 4 代表的な D, L-アミノ酸のクロマトグラム

3.2 ラット 5/6 腎摘除腎不全モデルの結果及び考察

表1に、コントロール群及び腎摘除腎不全モデルのD, L-アミノ酸の定量値及びヒートマップを示す。コントロール群に比べ腎疾患群の血清及び尿中D-Ser、D-Asp、D-Alaの濃度は高値と成り、又、D, L-アミノ酸濃度比も有意な差が認められた。

表1 コントロール群及び腎摘除腎不全モデルのD, L-アミノ酸の定量値

Isomer	Amino acid	Serum (μmol/L)																	
		Normal model 1			Normal model 2			Normal model 3			Disease model (Low)			Disease model (Middle)			Disease model (High)		
		Day 8	Day 22	Day 70	Day 8	Day 22	Day 70	Day 8	Day 22	Day 70	Day 8	Day 22	Day 70	Day 8	Day 22	Day 70	Day 8	Day 22	Day 70
D	His	0.10	0.10	0.08	0.11	0.07	0.08	0.10	0.12	0.08	0.22	0.19	0.23	0.19	0.21	0.23	0.07	0.07	0.28
	Arg	0.25	0.22	0.21	0.23	0.18	0.17	0.24	0.22	0.17	0.68	0.47	0.90	0.58	0.58	0.75	0.13	0.13	0.84
	Asn	0.18	0.11	0.11	0.12	0.11	0.11	0.18	0.18	0.11	0.17	0.15	0.18	0.24	0.20	0.20	0.21	0.16	0.21
	Ser	1.59	1.50	1.22	1.51	1.31	1.23	1.58	1.55	1.28	3.81	3.27	2.49	4.92	4.33	3.95	4.56	2.60	4.76
	Asp	0.46	0.80	0.68	0.68	0.76	0.54	0.75	0.59	0.59	1.12	0.72	0.64	0.67	0.59	0.61	0.62	0.58	0.58
	Ala	0.11	0.11	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.11	0.08	0.27	0.18	0.18	0.27	0.27	0.23	0.28	0.18	0.23
	Val	0.84	0.38	0.23	1.32	2.15	2.39	5.05	2.81	2.18	18.20	19.40	12.90	4.52	5.53	17.80	5.55	1.18	11.50
	Tyr	0.09	0.08	0.08	0.11	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.20	0.28	0.13	0.32	0.15	0.24	0.08	0.08	0.17
	Met	0.13	0.08	0.11	0.08	0.18	0.07	0.13	0.13	0.14	0.58	0.39	0.32	0.38	0.31	0.25	0.39	0.13	0.35
	Leu	0.25	0.18	0.22	0.18	0.31	0.15	0.27	0.27	0.23	1.33	0.89	0.70	0.70	0.82	0.84	0.79	0.19	0.89
	Ile	0.96	0.40	0.54	0.38	1.03	0.25	0.89	0.68	0.67	3.89	1.35	1.00	1.80	1.52	1.05	1.94	0.84	1.77
	Phe	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.18	0.09	0.08	0.09	0.07	0.08	0.12	0.04	0.12
	Trp	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.03	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.02	0.04
	Lys	0.07	0.08	0.05	0.09	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.20	0.22	0.17	0.25	0.25	0.32	0.29	0.08	0.41
L	His	60.89	65.55	70.56	69.25	72.14	107.32	62.13	69.65	72.60	56.40	69.46	69.52	65.01	77.19	83.93	54.03	78.37	69.98
	Arg	312.91	326.83	281.27	312.12	328.29	306.29	318.78	325.40	282.48	368.24	312.90	259.65	333.49	137.72	190.26	252.26	220.90	234.47
	Asn	95.90	101.00	96.90	101.00	97.70	91.70	97.90	98.10	87.00	111.80	96.00	93.40	81.00	100.00	88.80	97.10	72.90	96.00
	Ser	246.00	256.00	268.00	257.00	278.00	271.00	248.00	274.00	258.00	233.00	248.00	261.00	225.00	263.00	262.00	188.00	201.00	208.00
	Asp	38.29	37.28	43.30	30.25	43.30	42.29	31.36	41.87	46.07	37.81	117.65	98.99	47.47	47.78	36.40	191.00	87.85	87.85
	Glu	120.00	210.00	164.00	166.00	262.00	166.00	210.00	169.00	122.00	373.00	222.00	171.00	207.00	115.00	265.00	196.00	265.00	196.00
	Ala	320.37	358.80	298.83	310.31	322.29	314.55	285.89	330.03	283.24	304.46	274.27	278.99	334.71	351.37	383.88	243.31	186.70	267.32
	Val	302.00	493.00	514.00	595.00	498.00	492.00	504.00	513.00	442.00	549.00	582.00	520.00	542.00	629.00	602.00	419.00	366.00	439.00
	Pro	233.30	254.79	229.84	269.10	248.38	253.26	227.79	256.60	210.89	302.36	244.89	263.22	270.59	307.72	303.93	180.98	130.93	231.80
	Tyr	78.48	97.06	87.43	147.25	102.73	95.18	83.80	105.05	91.44	71.87	87.65	81.35	99.92	86.30	84.16	89.65	80.33	81.68
	Met	77.80	91.06	79.19	92.38	80.83	83.71	75.86	84.09	78.74	82.91	73.08	78.52	81.53	87.43	87.42	71.74	83.40	83.42
	Ile	140.10	162.82	169.30	179.33	150.53	161.05	133.46	157.51	155.36	133.08	118.98	141.06	127.23	136.71	160.87	113.26	205.17	150.20
	Phe	75.20	85.70	83.30	102.28	88.87	90.01	69.76	89.37	84.10	76.76	80.79	85.88	78.65	77.20	87.82	81.18	118.45	88.88
	Trp	145.97	158.22	139.77	166.65	146.07	144.8	137.6	148.8	138.0	134.1	94.8	104.0	155.9	122.0	160.0	197.2	84.8	81.4
Gly	326.43	385.04	286.77	335.84	398.34	368.40	381.23	449.14	397.68	492.34	480.84	453.77	521.26	591.56	484.19	412.29	314.44	416.30	

一例として、Serに着目して考察すると、図5 (左) に示す様に、D-Serの濃度はコントロール群 (正常ラット) に比べ、腎摘除腎不全モデル (軽度、中度、重度) では高値を示

した。又、図5 (右図) に示す様に、各時点のD-Ser/L-Ser (%) においても、コントロール群に比べ高値を示した。

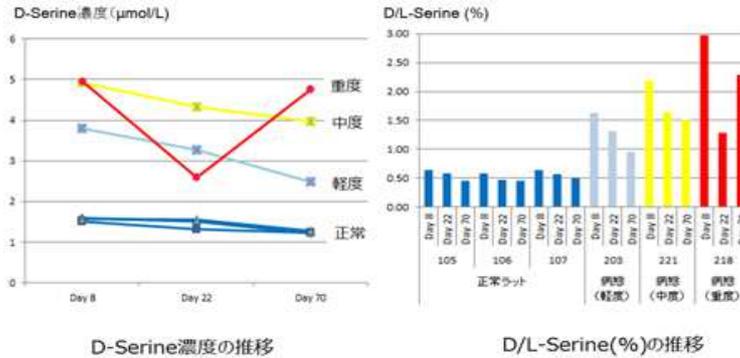


図 5 ラット血清中の D-Ser 濃度推移 (左) 及び D-Ser/L-Ser の推移 (右)

腎疾患マーカーとしてクレアチニン、尿中蛋白排泄量やN-acetyl-β-glucosaminidase等が知られているが、新たなマーカーとしてD-アミノ酸の利用が期待出来る。

3.3 水浸疲労モデルの結果及び考察

コントロール群 (床敷を敷いた状態で飼育)、疲労群 (床に水を浸した状態で飼育) 及び回復群 (疲労状態後に、カテキンを投与した回復群) のラットを各群6匹準備し、5日間飼育後、血液を採取し、血漿中のD, L-アミノ酸を定量した。表2に定量値及びヒートマップを示す。

表2 コントロール群、疲労群及び回復群のD, L-アミノ酸の定量値

Isomer	Amino acid	Serum (µmol/L)						Serum (µmol/L)						Serum (µmol/L)						
		Normal model						Fatigue model						Recovery model						
		101	102	103	104	105	106	201	202	203	204	205	206	301	302	303	304	305	306	
D	His	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.04	0	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04
	Arg	1.57	2.00	1.92	2.39	1.36	2.27	1.54	0.24	0.98	1.13	1.70	1.29	0.38	1.51	1.23	0.22	0.35	0.35	
	Asn	0.13	0.09	0.06	0.09	0.11	0.11	0.10	0.08	0.07	0.13	0.12	0.11	0.09	0.07	0.15	0.07	0.13		
	Gln	1.33	1.75	1.49	1.47	1.31	1.56	1.13	1.07	1.05	1.01	1.39	1.14	0.94	0.92	0.83	1.03	1.00	1.16	
	Ser	0.18	0.24	0.15	0.19	0.14	0.29	0.24	0.23	0.09	0.10	0.12	0.10	0.14	0.11	0.11	0.10	0.10	0.12	
	Asp	0.17	0.12	0.02	0.08	0.09	0.25	0.20	0.23	0.10	0.07	0.15	0.11	0.10	0.00	0.03	0.09	0.12	0.12	
	Glu	0.07	0.14	0.11	0.12	0.07	0.09	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05	
	allo-Thr	8.98	5.06	6.20	6.51	7.07	9.47	2.38	1.24	2.18	2.18	3.66	3.29	1.21	1.36	2.71	2.95	1.30	1.49	
	Ala	0.39	0.10	0.35	0.52	0.43	0.62	0.07	0.14	0.12	0.06	0.12	0.06	0.08	0.05	0.07	0.17	0.08	0.08	
	Pro	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	
	Tyr	0.13	0.11	0.17	0.15	0.13	0.16	0.09	0.07	0.10	0.08	0.12	0.10	0.07	0.06	0.12	0.10	0.06	0.07	
	Val	2.32	3.08	3.28	2.63	2.62	4.16	2.12	4.83	5.28	3.62	7.01	4.96	4.97	3.77	3.38	4.59	8.58	4.42	
	Met	0.24	0.14	0.23	0.23	0.15	0.25	0.11	0.12	0.12	0.11	0.16	0.12	0.11	0.08	0.14	0.10	0.13	0.11	
	allo-Lie	0.52	0.26	0.36	0.50	0.39	0.61	0.38	0.22	0.24	0.19	0.49	0.39	0.17	0.11	0.42	0.28	0.31	0.14	
	Leu	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.05	0.04	
Phe	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02		
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
L	His	74.66	63.05	63.56	55.00	88.71	77.85	51.43	60.31	53.23	58.69	77.96	65.28	55.02	53.88	56.85	78.44	80.89	72.93	
	Arg	130.55	168.23	129.77	131.09	168.68	181.32	96.32	54.58	71.26	89.89	133.32	98.84	102.20	82.82	77.89	117.82	105.00	158.01	
	Asn	44.41	44.36	39.24	36.12	64.08	47.60	26.85	33.18	33.56	39.51	47.11	32.32	31.90	34.16	25.81	35.62	47.82	47.77	
	Gln	473.92	459.56	398.96	454.89	532.57	484.95	458.78	436.91	372.37	426.11	467.88	397.35	407.84	422.46	355.32	443.48	489.98	496.19	
	Ser	141.19	178.23	156.71	150.08	166.29	152.67	118.88	97.17	96.05	120.03	130.45	104.44	108.12	105.74	96.90	106.94	111.19	129.87	
	Asp	7.28	7.47	4.83	5.71	6.82	9.36	9.07	12.58	4.47	4.16	5.66	4.22	5.19	3.90	3.58	4.24	4.92	7.20	
	Glu	51.79	76.22	48.49	75.38	41.34	73.60	74.17	82.44	36.48	54.95	36.02	28.31	55.45	47.76	23.03	22.74	20.95	34.30	
	allo-Thr	151.71	238.62	193.19	185.46	205.87	208.56	114.45	94.00	107.02	119.48	145.62	115.44	93.48	94.84	81.21	101.92	113.35	130.01	
	Ala	280.11	315.39	233.24	264.80	425.70	413.80	166.38	253.99	168.85	184.63	454.37	312.92	182.85	164.80	215.38	257.77	446.24	397.95	
	Pro	126.97	176.47	135.98	136.20	196.44	200.60	88.38	110.61	110.77	129.42	206.72	141.59	84.84	96.12	90.86	128.54	196.22	161.92	
	Tyr	77.48	79.52	86.44	75.04	121.53	94.65	87.82	89.08	76.77	81.93	108.50	89.78	86.21	70.76	78.40	88.33	82.51	101.90	
	Val	256.72	254.56	181.42	185.84	281.94	228.52	331.42	330.75	380.16	287.97	364.93	306.20	338.31	291.70	305.08	300.79	388.34	315.61	
	Met	57.11	55.59	53.34	55.69	74.72	59.51	39.95	48.91	42.46	46.41	60.17	54.94	46.46	43.97	43.02	49.40	56.74	59.65	
	allo-Lie	121.18	120.88	88.63	93.75	155.43	107.18	151.10	141.07	152.47	128.90	159.49	137.01	151.85	130.26	126.95	144.32	178.23	151.71	
	Leu	163.86	162.49	127.39	125.20	218.06	148.07	194.49	190.92	217.61	176.48	222.65	195.06	202.25	175.38	180.98	208.87	246.93	205.52	
Phe	47.26	49.14	40.76	42.74	64.80	50.11	52.77	70.32	56.00	51.12	70.70	60.22	63.36	51.01	52.20	60.24	82.42	82.27		
Trp	62.31	102.11	70.71	71.93	89.89	85.58	99.78	77.67	75.05	76.32	91.15	80.49	82.85	78.24	71.90	74.41	87.24	88.67		
Lys	308.27	345.99	279.59	268.75	483.92	369.32	252.90	262.85	213.30	241.22	374.88	322.68	226.23	199.18	265.20	338.23	298.84	409.49		
Gly	110.80	164.83	110.81	122.91	161.71	119.77	105.17	108.24	87.37	98.45	106.69	81.13	90.12	89.78	85.09	86.69	107.32	106.139		

コントロール群と疲労群の間でD-アミノ酸やL-アミノ酸の濃度に有意な違いが認められた。表3に示す様に、Val、Ile及びMetについては、疲労によりL-アミノ酸とD-アミノ酸の増減が逆方向に変化する結果が得られ、疲労のバイオマーカーと成り得る可能性が示された。又、疲労状態では分岐鎖アミノ酸の血中濃度が上昇する等、アミノ酸濃度の変化が認められる事が知られているが、D-アミノ酸の挙動に関する知見は初めてであり興味深い。又、図6にコントロール群、疲労群及び回復群に対する多変量解析結果を示す。コントロール群と疲労群でグルーピングが可能であった。

表3 D, L-アミノ酸の濃度変化

	L体	D体
Arg	↓	↓
Ser	↓	↓
Thr	↓	↓
Ala	↔	↓
Pro	↔	↓
Val	↑	↓
Leu	↑	↔
Ile	↑	↓
Phe	↑	↔
Met	↓	↑

正常に比し

↓ 減少

↑ 増加

↔ 不変

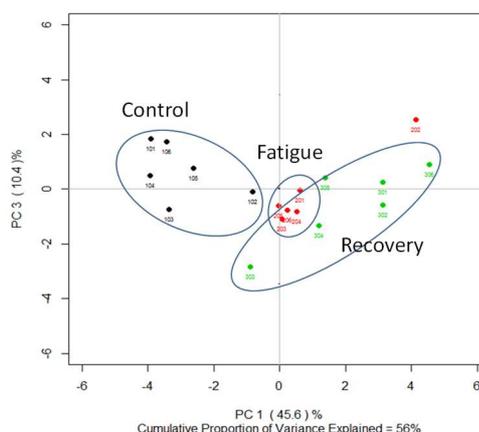


図6 多変量解析結果

4. 生体試料中8-epi-PGF_{2α}の定量分析法の開発²⁾

プロスタグランジン (PGs) は、生体膜リン脂質の構成成分である脂肪酸 (主としてアラキドン酸) から生合成されるエイコサノイドの一つで、生体内の組織において細胞レベルで産生され、様々な生理活性を有する化合物として知られている。PGsのうち酸化ストレスマーカーとして知られる8-epi-プロスタグランジン F_{2α}(8-epi-PGF_{2α}) (図7) は、組織障害や病態の悪化に関与している一方、酸化ストレスマーカーとして知られている。8-epi-PGF_{2α}の定量には、負イオン化学イオン化検出によるGC/MSやELISA等が利用されているが、筆者はエレクトロスプレーイオン化(ESI)を用いたLC/MS/MSによるヒト尿中8-epi-PGF_{2α}の定量法の開発を試みた。

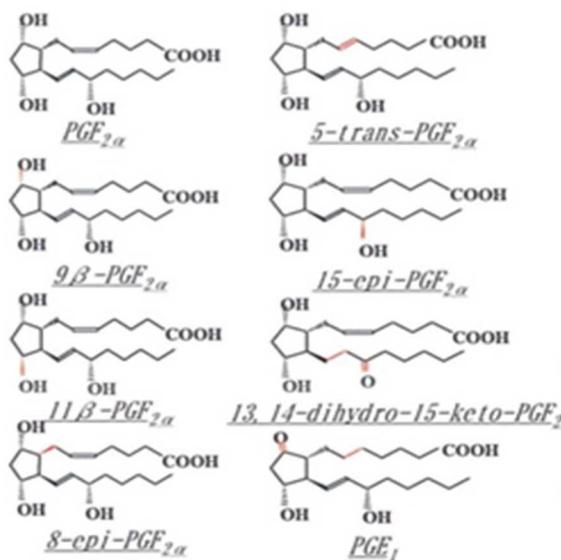


図7 代表的なPGs (質量数354)の構造式

8-epi-PGF_{2α} のマススペクトルから、脱プロトン化分子に相当する *m/z* 353 が検出された。表 4 に、脱プロトン化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のイオン強度を示す。同じ質量数を有する他の PGs も多数尿中には存在するが、プロダクトイオンの違いから 8-epi-PGF_{2α} と他の PGs を区別する事が出来ないか検討したが、難しい事が分かり 8-epi-PGF_{2α} とこれらの PGs を分析カラムで分離する事とした。

表 4 各 PGs のプロダクトイオンスペクトルのイオン強度

<i>m/z</i>	9β-PGF _{2α}	8-epi-PGF _{2α}	11β-PGF _{2α}	5-trans-PGF _{2α}	PGF _{2α}	15-epi-PGF _{2α}	PGE ₁	13, 14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}
165	68.4	29.3	25.4	20.2	30.9	14.7	2.8	11.7
171	23.1	34.7	24.1	7.1	23.3	17.1	-	0.8
173	49.5	11.7	39.8	9.6	14.5	9.2	0.6	1.4
183	4.1	2.8	7.5	2.0	3.5	1.6	0.1	42.0
191	43.2	28.2	26.6	11.6	14.7	8.9	26.7	18.6
193	97.0	100.0	100.0	62.9	100.0	100.0	2.2	3.0
195	7.6	1.0	1.8	0.2	2.7	0.5	0.3	32.0
209	64.4	14.8	16.7	21.3	21.3	12.7	18.8	11.6
223	-	-	0.2	0.4	2.8	0.1	33.7	10.0
235	43.1	12.6	20.8	11.4	6.8	5.8	50.2	2.5
247	66.3	46.7	57.1	80.1	48.3	27.0	0.4	1.4
255	59.8	25.1	26.4	12.6	28.9	7.4	3.9	0.4
273	37.0	33.9	22.7	13.2	19.0	12.1	100.0	7.4
291	100.0	85.1	25.4	34.4	29.4	35.8	0.1	17.2
309	21.9	35.2	39.0	100.0	50.4	44.7	0.3	1.4
317	15.7	10.9	6.8	2.6	7.6	2.1	73.7	7.5
353	57.7	40.2	54.8	41.5	60.4	21.4	1.4	100.0

図 8 に、最適化した分離条件にて得られた標準溶液のクロマトグラムを示す。なお、13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} 及び PGE₁ は、保持時間 20 分以降に溶出される為、8-epi-PGF_{2α} に影響を及ぼさなかった事を確認した。

ヒト尿へ適用するべく、前処理を検討した。生体試料中の目的成分の定量には、除タンパクや夾雑成分の除去等の前処理が必要である。その為、中性条件下で酢酸エチル及びヘキサンをを用いてヒト尿を洗浄した後、塩酸酸性下、酢酸エチルを用いて 8-epi-PGF_{2α} 及び PGF_{2α} を抽出した。酢酸エチルを濃縮乾固後、再溶解を行い、LC/MS/MS 測定を行った。図 9 に、ブランク尿及びブランク尿に 200 pg/mL 相当の 8-epi-PGF_{2α} 及び PGF_{2α} を添加した時のクロマトグラムを示す。内標準物質は 8-epi-PGF_{2α} の

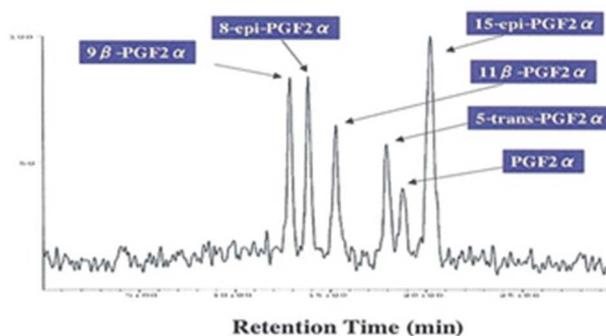


図 8 各 PGs のクロマトグラム (Q1: *m/z* 353, Q3: *m/z* 193)

α 側鎖の 3 位、4 位が重水素ラベルされた標識体を用いた。LC/MS/MS は選択性の高い分析法として知られているが、試料中に目的物質と同じプリカーサーイオン及びプロダクトイオンを有する物質が共存する場合には、MS/MS で直接これらを識別する事が出来ない為、

分析カラムで分離する事により解決出来た。

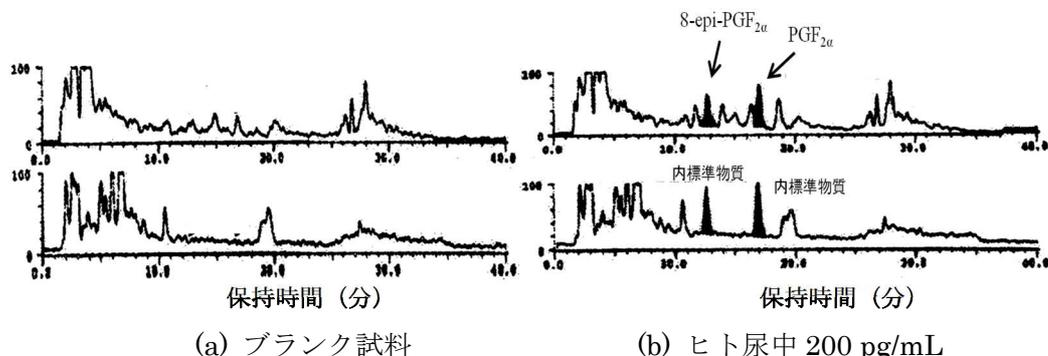


図 9 尿中の 8-epi-PGF_{2α} 及び PGF_{2α} のクロマトグラム

従来、8-epi-PGF_{2α} の GC/MS 分析では水酸基やカルボキシ基を揮発性誘導体化する必要があったが、LC/MS/MS ではその必要は無く、又 2~5 倍程度の感度の向上が認められた。分析時間は、従来に比べ約 1/10 に短縮する事が出来、迅速な多検体の分析が出来た。

5. 最後に

筆者の質量分析計 (GC/MS や LC/MS) を用いた分析歴は約 30 年以上と成るが、その間に質量分析メーカーからは次々と、高感度且つ、高性能な装置が市販された。この間、今まで検出困難であった極微量な成分が発見され、疾患の診断や疾病の経過予測、薬剤の作用機序の解明、治療効果の予測等に、バイオマーカーとして利用可能となった。

近年では、LC/MS が汎用化され、前処理や分離に対する重要性が幾分薄れて来ている感が有る。しかしながら、生体試料から如何に効率良く、目的物質を抽出出来るか、更に目的に応じた最適な誘導体化法を見出せるかが分析法を開発する上で重要な鍵と成る事には変わりはない。前処理法の善し悪しが、その分析方法自体の良し悪しを決定付けると言っても過言ではない。

最後に、筆者の一連の研究等に対し、2021 年度「CERI クロマトグラフィー分析賞」を賜った。(一財) 化学物質評価研究機構 (CERI) 及び (公社) 日本分析化学会・液体クロマトグラフィー研究懇談会の関係各位に心より感謝申し上げる。

引用文献

- 1) 原田ら、新アミノ酸分析研究会第 7 回学術講演会要旨集、p.31 (2018).
- 2) 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、pp.219-222、オーム社 (2014).

<執筆者略歴>

竹澤正明 (Masaaki TAKEZAWA)

1989 年 東京理科大学・薬学研究科修士修了

1989 年 東レ株式会社入社

1989 年 株式会社東レリサーチセンター出向

現職：バイオメディカル分析研究部長（理事）

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



【2022 年液体クロマトグラフィー努力賞受賞業績】

光学活性検出器を利用した HPLC と SFC の応用開発／

Application Development of HPLC and SFC
Using Optical Activity Detectors

寺田明孝／Akitaka TERADA

日本分光株式会社／JASCO Corporation

(Received April 13, 2022 ; Accepted April 26, 2022)

キーワード 円二色性検出器; 旋光度検出器; キラル医薬品; スクリーニング; g -factor

1. 要旨

本稿では、鏡像異性体（光学異性体）の分離（以下キラル分離）と検出を目的とした HPLC 及び超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）における光学活性検出器の利用法について、光学活性検出器の特徴（3.1）、SFC-CD システムによるキラルスクリーニング（3.2）、CD 検出器を利用した分取（3.3）及び分取 SFC-OR (PrepSFC-OR) システムによる分取（3.4）の 4 箇所で紹介する。

2. 始めに

キラリティーとは、右手と左手の様に、互いに重ね合わす事が出来ない性質を意味し、互いに鏡像である 1 対の立体異性体をキラル化合物或いは単にキラル分子と言う。そしてこれら 2 つの異性体は、互いにエナンチオマー或いは鏡像異性体であると言う（図 1）。なお、「鏡像異性体」「エナンチオマー」「光学異性体」は基本的には同義であるが、筆者は表 1 の様に文面によって使い分けている。

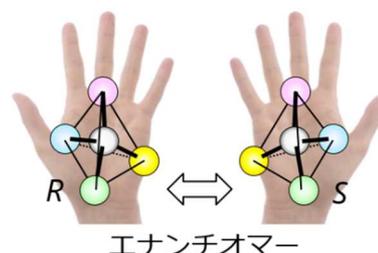


図 1 鏡像異性体

表 1 語句の使い分け

呼び方	使用例
鏡像異性体	一般的な記述で使用。
エナンチオマー	一般的な記述で使用するが、特に「片方の」や「R 体, S 体」等、鏡像異性体である 2 つの異性体を個々に扱う記述で使用。
光学異性体	円二色性検出、光学検出等、HPLC における検出に関する記述で使用。余り推奨されていない表現でもある。

キラリティーによる効果は、糖やアミノ酸等の食品分野、有機 EL ディ스플레이等の材料分野においても活用されている。又本稿で取り上げるキラリティーをもつ医薬品(以下キラル医薬品)として良く知られている化合物の一つに^{サリドマイド}Thalidomide が有る。この Thalidomide には、*R* 体、*S* 体の 2 種のエナンチオマーが存在し、*R* 体には睡眠導入剤等の用途が有る。一方 *S* 体には非常に高い催奇性が有り、胎児に異常を引き起こす。これは一例ではあるが、一般的に鏡像異性体には、物理化学的性質は同じでも生理活性が異なる事が多い。近年では、医薬品や農薬の開発に当たり、表 2 に示す様に鏡像異性体の片方のエナンチオマーのみを使用する事で薬効を高めたり副作用を低減出来たりする例^{1)~4)}が報告されている。

キラル医薬品の開発に必須となるキラル分離は実際の所、アキラル分離と異なり分離条件の予測が立て難い。これは、キラル化合物とキラルカラムに充填されている固定相との相互作用について解明されていない部分が多い事に起因している。それ故、最適と思われる条件を見付ける為には、個々のキラル化合物に対して多種の溶媒と多様なカラムとを網羅的に組み合わせた複数の条件にて測定を行う必要が有る。以降この操作をスクリーニング(又はスカウティング)と言う。

このスクリーニングは、これまで順相系の HPLC で行われる事が多かった。しかし近年では、後述する理由により SFC へと移行するケースが増えている。但し、利用される検出器は依然として UV 検出器のみである場合が多く、光学活性検出器である円二色性(CD)検出器や旋光度(OR)検出器を組み込んで実施しているユーザーは多いとは言えない。そこで本稿では、CD 検出器や OR 検出器の特徴及びキラル分離のスクリーニングやキラル分取において、これらの光学活性検出器を利用するメリットや有効な利用方法について紹介する。

表 2 鏡像異性体の片方のエナンチオマーのみを利用したキラル医薬品例

No.	分類	一般名	光学異性体	商品名	特長
1	局所麻酔薬	Bupivacaine ¹⁾	S+R	マーカイン注	
		Levobupivacaine ²⁾	S	ポプスカイン注	副作用の低減
2	H1受容体拮抗薬	Cetirizine ²⁾	S+R	ジルテック錠	
		Levocetirizine ²⁾	R	ザイザル錠	効果の増強
3	プロトンポンプ阻害薬(胃酸分泌の抑制等)	Omeprazole ³⁾	S+R	オメプラゾール錠	
		Esomeprazole ³⁾	S	ネキシウムカプセル	効果の増強 薬物代謝酵素の影響減少
4	睡眠薬	Zopiclone ⁴⁾	S+R	アモバン錠	
		Eszopiclone ⁴⁾	S	ルネスタ錠	効果の増強 半減期の延長

3. 光学活性検出器の利用

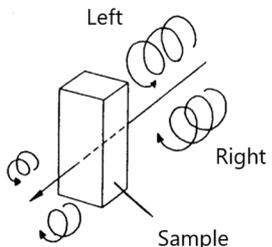
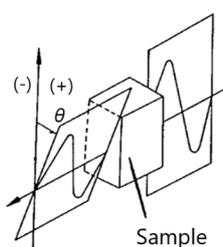
3.1 光学活性検出器の特徴

表 3 に、CD 及び OR 検出器の特徴を示す。CD 検出器は、UV 吸収が有るキラル化合物の右円偏光と左円偏光の信号強度の差を検知する事が出来、CD、UV 信号及び後述する *g*-factor の出力が可能である。一方 OR 検出器は、試料に偏光を当てた時に傾いた偏光面の角度(表 3 中 $[\theta]$)を検知する事が出来、旋光性が有れば UV 吸収の有無は問わない。

原理・光学系等の詳細については本稿では割愛するが、任意の光学活性物質の *R* 体及び *S* 体

を、「+」或いは「-」ピークとして検出出来ると言うのが両検出器最大の特徴と言える。その他、何れの検出器もグラジエント溶離の適用が可能であり、其其 CD 検出器は UV 検出器、OR 検出器は RI 検出器と同等の検出感度である点等が特徴である。

表 3 CD 及び OR 検出器の特徴

	CD Circular Dichroism	OR Optical Rotation
名称	円二色性検出器	旋光度検出器
原理	右円偏光と左円偏光の信号強度の差	試料に偏光を当てた時に傾いた偏光面の角度
UV 吸収	必要	旋光性が有れば無くても可能
感度	~ ng (≒ UV)	~ μg (≒ RI)
出力	CD, UV, g-factor (CD/UV)	OR
利用例	<ul style="list-style-type: none"> ◆ UV 吸収が有る光学異性体のキラル検出 ◆ 光学異性体の存在比算出 等 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 旋光性が有る光学異性体のキラル検出 ◆ 糖類のアキラル分析 等
概略図		

3.2 SFC-CD システムによるキラルスクリーニング

3.2.1 SFC の有用性

前述の様に、これ迄キラル分離のスクリーニングには、順相系 HPLC が利用される事が多かった。しかし順相系 HPLC は、安定する迄の時間の長さや分取の際に大量の有機溶媒が必要になる等の問題点が有った。一方 SFC は、臨界温度 31.1 °C、臨界圧力 7.4 MPa という比較的穏やかな条件で超臨界状態となる二酸化炭素を主溶媒としている。超臨界状態となった二酸化炭素はヘキサンに近い溶媒特性をもつ事から、順相系 HPLC から SFC への移行は比較的容易であると考えられている。SFC の利用により、分離検討の高速化や分離・分取時の省溶媒化及び回収液濃縮の時短化が期待出来る為、適用するメリットは大きい。

3.2.2 CD 検出の有用性

キラル分離のスクリーニングの際、稀ではあるが溶媒やカラムの組み合わせによって R 体、S 体の溶出順序が逆転する事が有る。図 2 に示す様に、UV 検出器のみを使用している場合や R 体、S 体が等量含まれるラセミ体の分離をしている場合等は特に、その逆転に気付くのは困難である。その為、溶出順序を確認する場合には、必ず何れか片方のエナンチオマーのみを測定する必要がある。一方前述の様に、CD 検出器は R 体と S 体のピークを、「+」或いは「-」のピークとして検出する事が可能な為、溶出順序の情報を常に得る事が出来る。

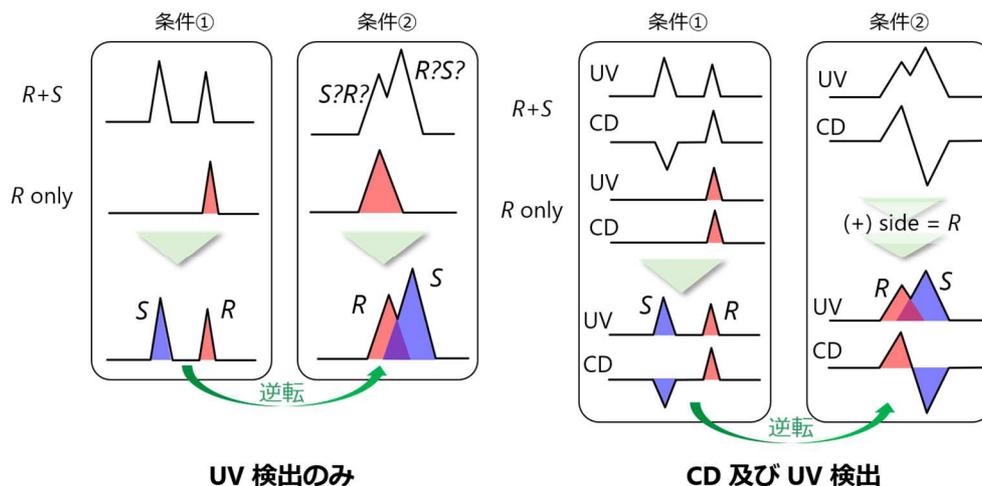


図 2 UV 検出器による検出 (左) 及び CD 検出器による検出 (右)

3.2.3 SFC-CD システムによるキラルスクリーニング例

SFC-CD システムを使用してキラルスクリーニングを行った例を紹介する。図 3 にキラル分離のスクリーニングシステムの流路図を示す。日本分光製 EXTREMAUFC のメソッドスカウティングシステムでは、バルブの利用により最大 10 種の溶媒と 10 本のカラムを平行に設置出来る。又専用のオプションソフトウェアにより、複数の測定条件を一括生成する事も可能であるが、詳細について本稿では割愛する。なお、CD 検出器のみでも UV 信号の出力は可能であるが、同時に検出出来る CD と UV の波長は同一の値に限られる。各検出法で波長を変更したい場合や PDA 検出器を用いて多波長でモニターしたい場合には、図 3 に示す様に PDA/UV 検出器と CD 検出器を直列に接続する事も可能である。

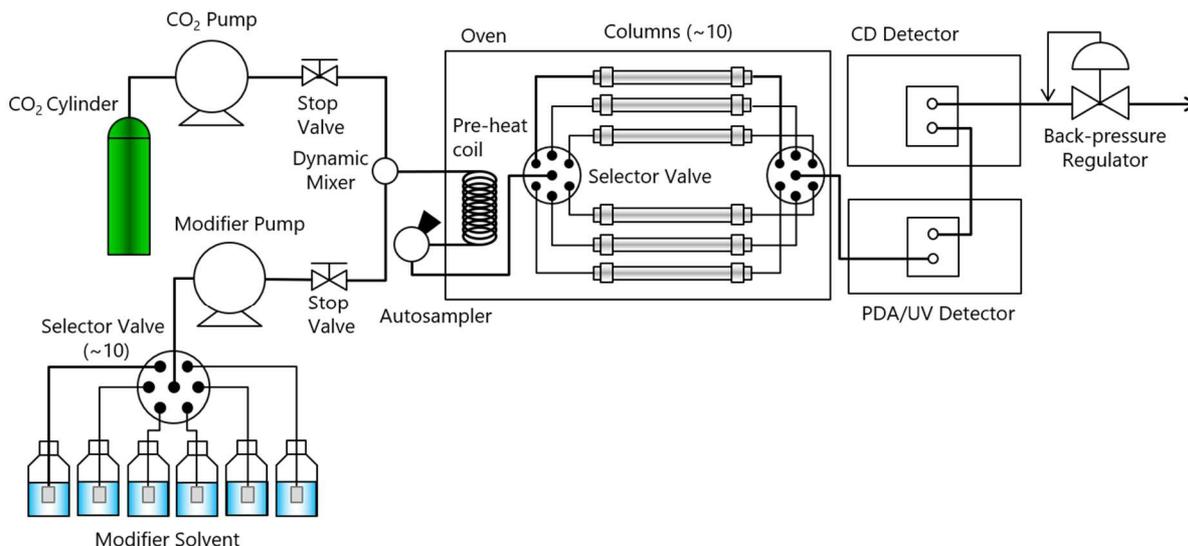
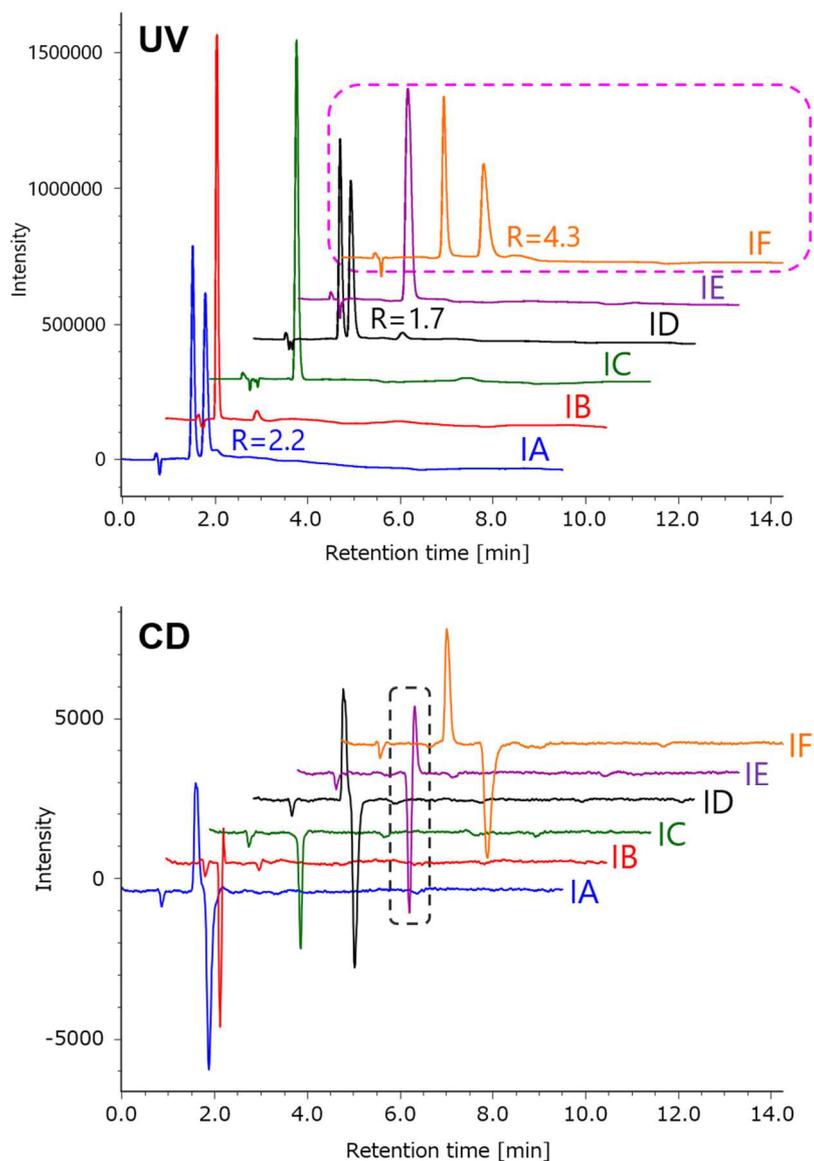


図 3 SFC キラルスクリーニングシステム (6 溶媒 × 6 カラムの場合)

図 4 に示したクロマトグラムは、移動相として $\text{CO}_2 / (\text{Methanol} / \text{DEA} = 100 / 0.4) = 60 / 40$ を、カラムにはダイセル社製の CHIRALPAK IA / SFC から IF / SFC 迄の 6 本のカラムを使用して得た Cetirizine のスクリーニング結果である。分離度 $R = 4.3$ が得られた CHIRALPAK IF/SFC を使用した条件 (図 4 (上) 中ピンク破線) が、最も分離が良好であったと言う事が分かる。又 CHIRALPAK IE / SFC で得られた CD クロマトグラム (図 4 (下) 中黒破線) を見ると、分離こそ出来てはいないものの、IA、ID 等のカラムと溶出順序が逆転している事が分かる。この現象は UV クロマトグラムを見ただけでは気付く事が出来ない。



<SFC Conditions>

Column: CHIRALPAK IA, IB, IC, ID, IE and IF/SFC (4.6 mmI.D. x 150 mmL, 5 μm) (Daicel Corporation), Mobile phase: $\text{CO}_2 / (\text{Methanol} / \text{DEA} = 100 / 0.4) = 60 / 40$, Flow rate: Conditioning : 5 mL/min, Analysis : 3 mL/min, Column temp.: 40°C, Wavelength: UV 210 nm, CD : 235 nm, Pressure: 15 MPa, Sample: Cetirizine 2000 ppm

図 4 Cetirizine のキラルスクリーニング結果 (上 : UV、下 : CD)

3.3 CD 検出器を利用した分取

3.3.1 *g*-factor をトリガーとする分取

CD 検出器の最大の特徴は、CD クロマトグラム、UV クロマトグラムに加え、それらの比 (CD / UV) である *g*-factor をリアルタイムに出力する事が可能な点である。*g*-factor には、「濃度や注入量に依存せず、*R* 体 / *S* 体の存在比が変わらなければ (つまり、*R* 体と *S* 体が混ざっていない場合や、その他の不純物ピークが重なっていない場合) 一定の値を示す」と言う特長が有る。その為、キラル分離が不十分であっても一定の値を示す *g*-factor を分取トリガーとする事によって、高純度領域を選択的に回収する事が出来る (図 5)。

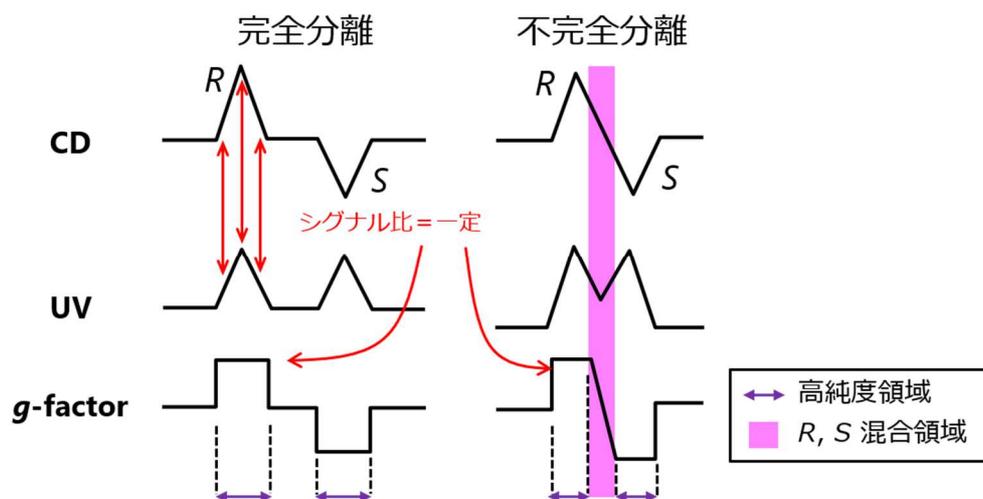


図 5 高純度領域を示す *g*-factor

3.3.2 CD スペクトルの測定方法

検出に用いる波長が最適であるか否かを確認する場合には、CD スペクトルの測定が有効である。HPLC、SFC 等何れの分離モードにおいても、CD スペクトルを得る為には目的分析種のピークが検出されるタイミングに合わせてスキャン操作を行う必要が有る。スペクトルスキャンには表 4 に示す 2 種の手法が有るが、バルブを切替え、目的分析種をセル内に封じ込めた状態でスキャンを行う手法がストップフロー測定 (図 6、流路 A)、セル内の移動相の流れを止めずにスキャンを行う手法がオンフロー測定である。なお、日本分光製 EXTREMA の CD 検出器、CD-4095 のスキャンスピードは、10、300 nm/sec の 2 種から選択可能であり、スピード重視か分解能重視かによる使い分けが可能となっている。

表 4 スペクトルスキャンの手法

スペクトルスキャン法	推奨スキャンスピード	追加で必要なモジュール	用途、メリット	方法	その他
ストップフロー	10 nm/sec	2 way 6 port バルブ	分解能重視 比較的綺麗なスペクトルが得られる	1) ピーク溶出を確認 2) バルブを切替え、目的成分をセル内に閉じ込める 3) スペクトルスキャン実行	スキャン実行はオートスキャン (閾値設定)、マニュアルスキャン (任意のタイミング) から選択
オンフロー	300 nm/sec	特に無し	バルブ不要 分解能は低いがスペクトルの極大は分かる	1) ピーク溶出を確認 2) スペクトルスキャン実行	

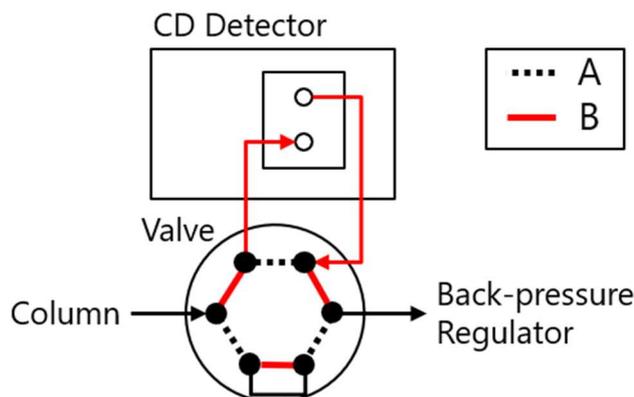


図 6 ストップフロー測定時の流路 (流路 A: セル封入時、流路 B: セル通過時)

図 7 にストップフロー測定時のクロマトグラムを示す。ピーク溶出が確認されたタイミングでバルブを切替え、スペクトルのスキャンを行う。スキャン時は検出器内の回折格子 (グレーティング) が動いている為、正しいクロマトグラムが得られない点に注意が必要である。

図 8 にストップフロー測定によって得た Omeprazole のスペクトルを示す。因みに g -factor は、CD、UV 信号の比が一定且つ大きな値となる場合に綺麗な矩形となり、分取トリガーとして利用し易くなる。その為には、①CD 強度が大きく UV 吸収が小さい波長、②強度の変化が小さい波長を選択するのが理想と考えている。Omeprazole の場合、230 nm 或いは 270 nm 辺りが妥当である。

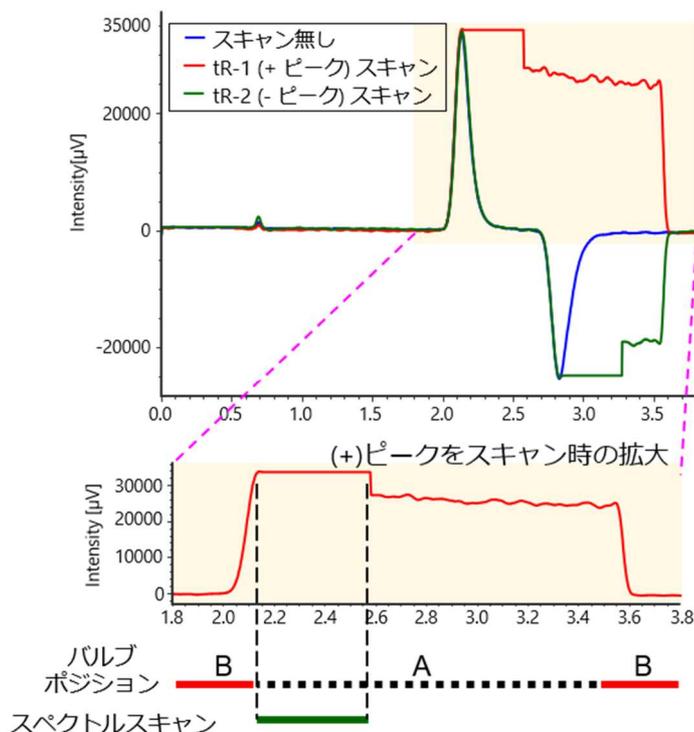


図 7 ストップフロー測定時のクロマトグラム

(上: スキャン無し、tR-1 及び tR-2 スキャン時のクロマトグラム
下: tR-1 スキャン時の拡大)

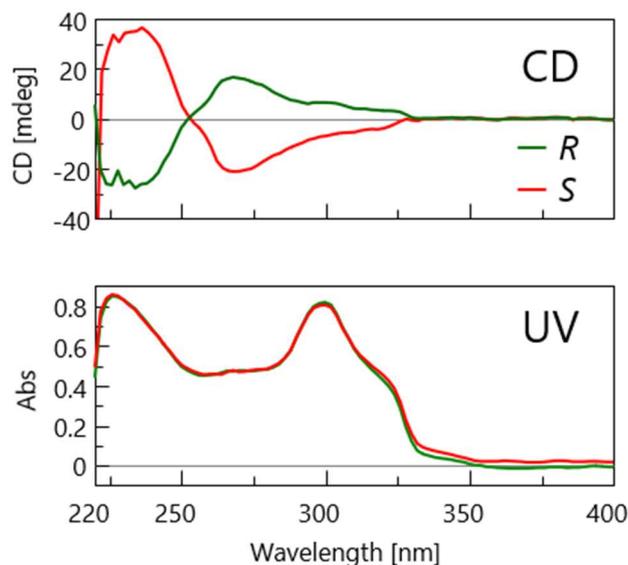
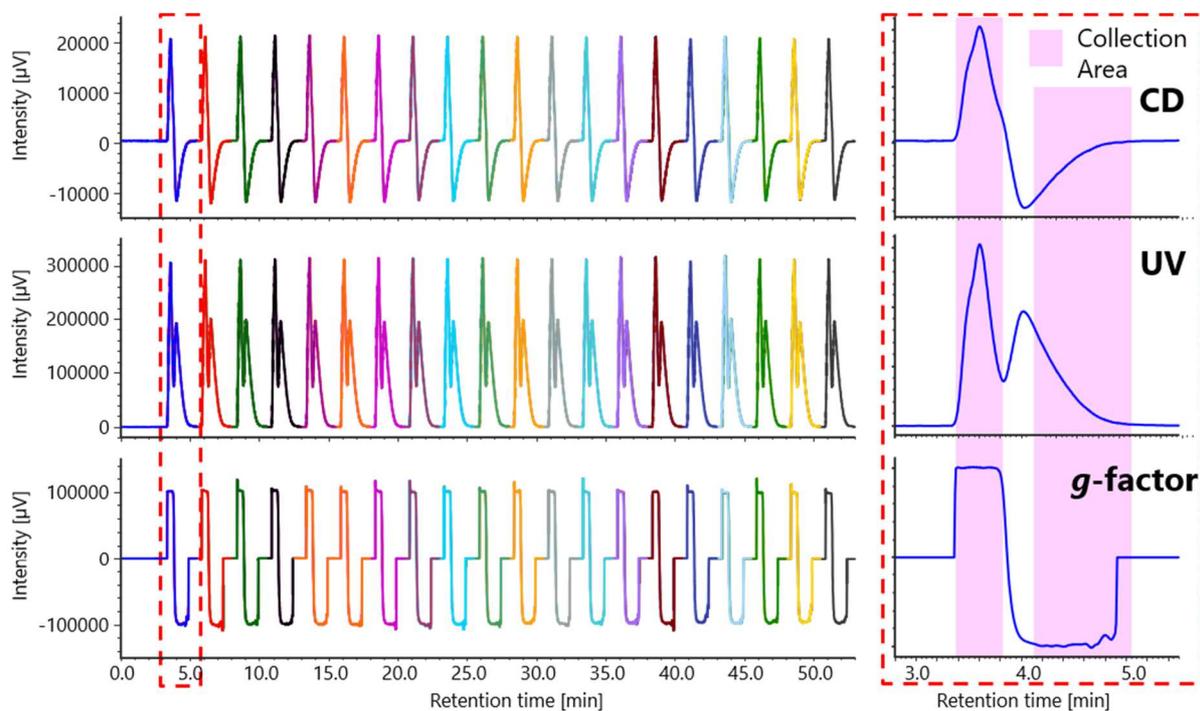


図 8 得られた Omeprazole の CD、UV スペクトル

3.3.3 不完全分離ピークの選択的分取

図 9 に、Omeprazole のスタック注入（分取のスループットを上げる為のオーバーラップ連続注入法）結果及び分画結果を示す。図 9 中赤破線枠で示す様に、目的分析種は分離が不完全である為、CD や UV クロマトグラムだけでは高純度領域を判断出来ない。



<SFC Conditions>

Column: CHIRALPAK IA (20 mmI.D. x 250 mmL, 5 µm) (Daicel Corporation) , CO₂ flow rate 39 mL/min, Methanol flow rate: 21 mL/min, Column temp.: 40°C, Wavelength: 230 nm, Pressure: 10 MPa, Sample: Omeprazole 5000 mg/L, Injection vol.: 1000 µL

図 9 Omeprazole のスタック注入結果（左）及び分画結果（右）

一方、*g*-factor を見ると、「+」、「-」の両極性で一定値を示すエリア（＝高純度領域）が一目瞭然である。この *g*-factor が示すエリアに従って分取を行い、各分画物の鏡像体過剰率（%ee, enantiomeric excess、光学純度を示す）を算出した。その結果、*g*-factor を利用する事によってより高い %ee の分画物を得られる事が示された（表 5）。

表 5 分画物の鏡像異性体過剰率比

<i>g</i> -factor	%ee	
	tR-1	tR-2
不使用	100	89.4
使用	100	97.3

$$\%ee = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \times 100 [\%]$$

3.3.4 化学構造と CD, *g*-factor の関係

キラル化合物が発色団をもっている場合に CD 特性を示す事が多く、その強度は構造に依存する^{5,6)}。そこで、化学構造と CD 強度及び UV 吸収との関連性について調査する為、図 10 に示す 6 種の化合物 (Flurbiprofen、Propranolol、Zopiclone、Warfarin、Cetirizine、Omeprazole) について、CD 強度が極大となる波長を用いて分析スケールで測定を行い、1 mg 当たりの CD 強度 (mdeg)/1 mg 当たりの UV 吸収 (Abs.) (以下、単位質量当たりの *g*-factor: *g*-factor/unit mass) を算出する事で、濃度に依存しない CD と UV の強度比を比較した。その結果を図 11 に示す。

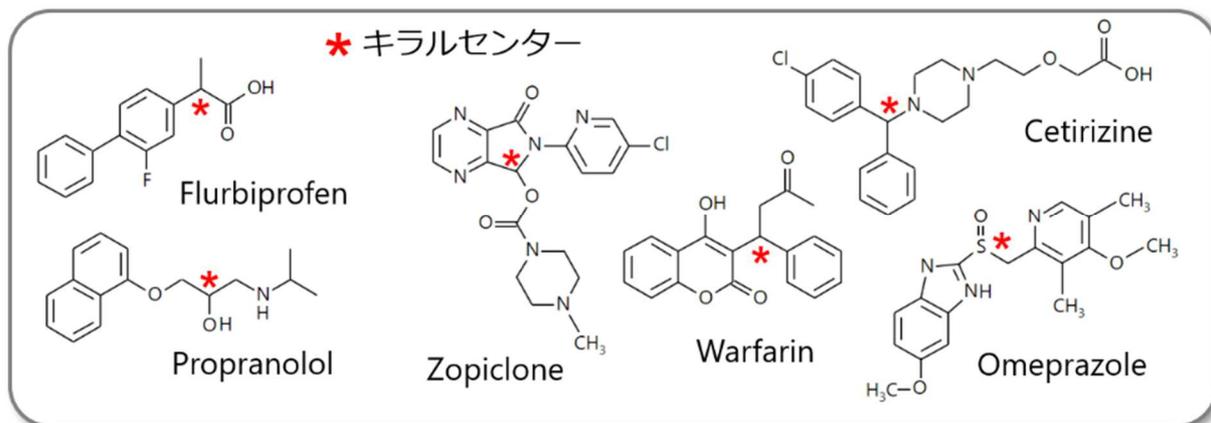


図 10 6 種のキラル化合物

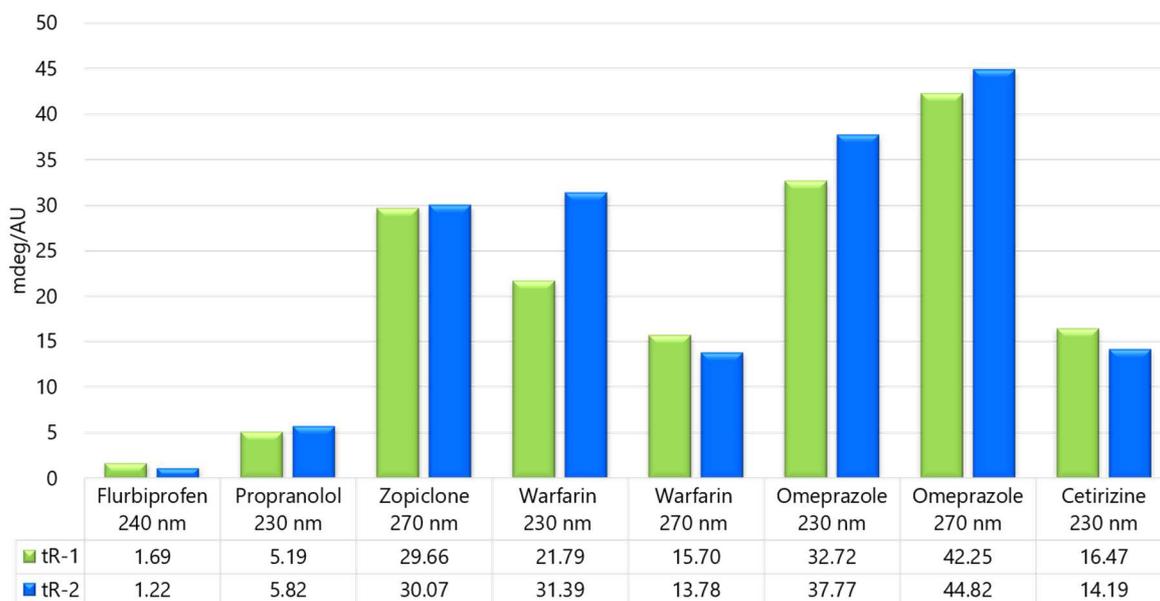


図 11 6 種の化合物の g -factor / unit mass

g -factor / unit mass の値が小さい Flurbiprofen 及び Propranolol は「誘起型⁷⁾」に分類される。これらは CD 特性を示す能力の無い化合物の発色団が、キラルな媒質 (溶媒その他) によって CD 特性を示す様になるもので、CD 強度は比較的弱い。一方 g -factor / unit mass の値が大きい Zopiclone, Warfarin, Cetirizine 及び Omeprazole は「励起子型⁸⁾」に分類される。これらはキラルセンターを挟んだ 2 つ以上の発色団の相互作用 (励起子相互作用) によるもので、CD 強度は比較的強い。なお、誘起型か励起子型かを判断する為の g -factor / unit mass の境界値についてここでは一概には言えない為、引き続き様々なキラル化合物についてのデータを蓄積する必要が有ると考えている。

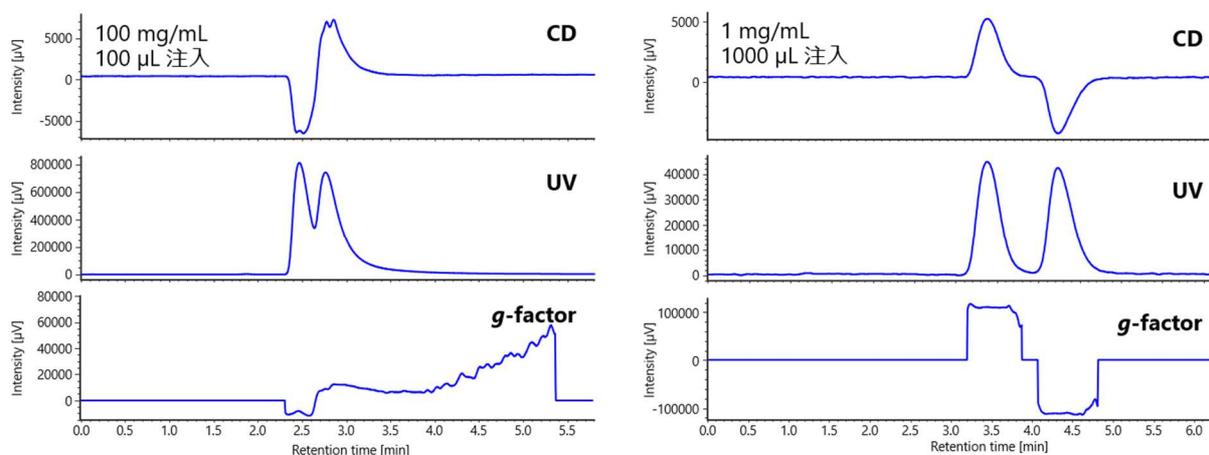


図 12 誘起型構造をもつ Flurbiprofen (左)、励起子型構造をもつ Omeprazole (右) の CD、UV クロマトグラム及び g -factor

図 12 に、誘起型構造をもつ Flurbiprofen、励起子型構造をもつ Omeprazole の CD, UV クロマトグラム及び g -factor を示す。Flurbiprofen と Omeprazole の CD 強度は同程度であるが Flurbiprofen の UV 吸収が Omeprazole の約 20 倍の値を示している。 g -factor は値の性質上、ピークスタートやピークエンドで大きく変動する傾向が有り、Flurbiprofen においては、信号値が下がった 4.0 min 以降の領域で g -factor の出力が乱れている事が分かる。一方 Omeprazole は、比較的綺麗な矩形の g -factor が得られており、分取トリガーとして大変利用し易い。

3.3.5 CD 波長の決め方

ここ迄の内容を振り返った時、実は一点、明らかに検討プロセス上の矛盾が有る事に気付く。それは、分離する条件を見付ける為にスクリーニングしているにも関わらず、キラル成分が分離していなければ CD 検出波長が最適かどうか分からない (スペクトル測定が出来ない)、と言う点である。この矛盾を解消する為には、スペクトルの測定をする事なく、スクリーニングで使用する CD 検出波長を決める必要が有る。そこで、以下に構造式や筆者の経験を元にした CD 波長を決める為の検討フローを紹介する (図 13)。

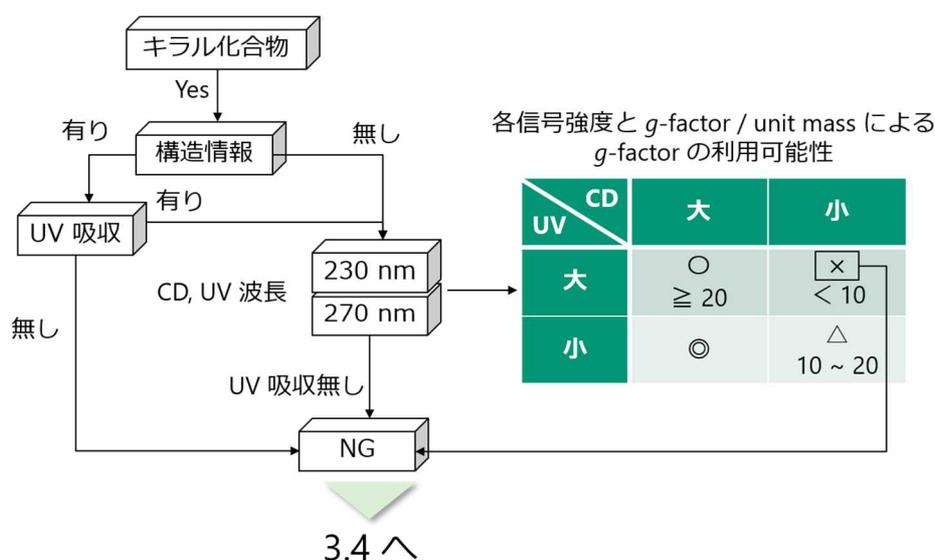


図 13 CD 波長決定の為の検討フロー

まず、大前提として目的分析種がキラル化合物である必要が有り、次いで構造情報が有るか否かを確認する。構造情報が有っても UV 吸収が無い又は非常に小さいと予想される場合には、CD 検出は難しい。一方、情報が有り且つ UV 吸収が有ると判断される場合、及び依頼サンプルである等の事情により構造情報が開示されない場合の何れにおいても、先ず 230 nm での検出を行う。もし 230 nm で良好な結果が得られない場合には、270 nm でも同様の測定を行う。但し、CD 特性は有るにも関わらず UV 吸収が極端に大きい場合 (目安: g -factor / unit mass < 10) 等は、目的分析種が誘起型の構造である事が予想され、CD 信号を検出・利用する事は難しい。なお、同じ波長領域で溶媒に UV 吸収が有る場合には当然 CD 検出も難しくなる為、注意が必要である。

得られたクロマトグラムの CD 信号と UV 信号の強度の比によって *g*-factor の利用可能性を判断出来る。つまり、目的分析種の構造や移動相について、一定の条件を満たす化合物だけが CD、*g*-factor を有効利用出来るという事である。

では、目的分析種に UV 吸収が無い場合、UV 吸収や CD 特性が有っても誘起型の構造をもっている場合、或いは移動相による UV 吸収の影響が大きい場合にはどうすれば良いのか、最後にその解決法について記す。

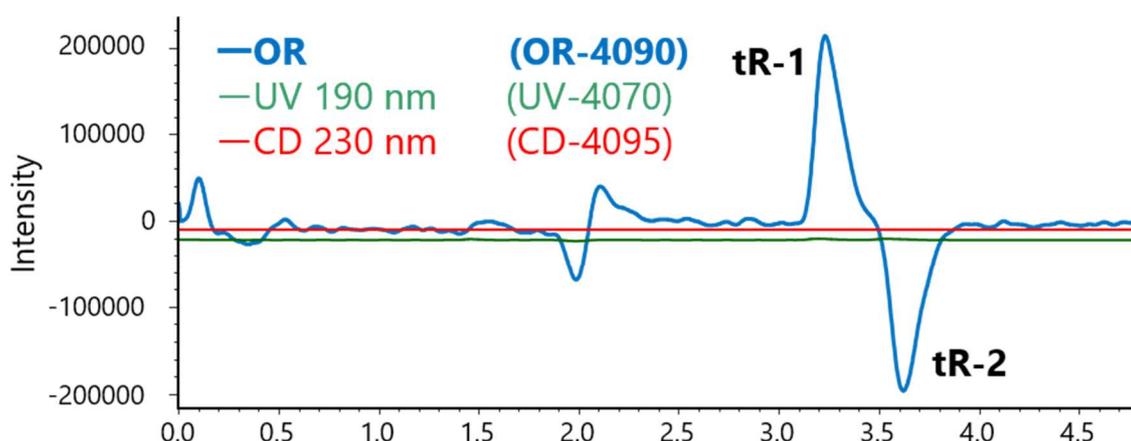
3.4 PrepSFC-OR システムによる分取

天然物中のキラル化合物や医薬品の中間体の中には、旋光性を示すが UV 吸収が無い物質や、UV 吸収・CD 特性は有っても見掛け上検出出来ない物質がある。この「見掛け上」と言うのは、実際には 200 nm 以下の真空紫外域の波長であれば円二色性が有るにも関わらず、HPLC では溶媒吸収が大きく検出が困難である、と言う意味である。これらに該当する場合及び前述の 3.3.5 において CD を利用出来なかった場合の解決法の一つに、OR 検出器を利用する方法が有る。

弊社の SFC システムである EXTREMA UFC は、UV、PDA、CD 及び FP (蛍光) 検出器の 4 機種をラインアップしているが、OR 検出器はこれ迄 SFC には対応していなかった。もし、この OR 検出器がスクリーニングや分取と相性の良い SFC でも使用出来れば、対象化合物の網羅性が向上するのではないかと考えた。

OR 検出器のフローセルの開発においては、①セルの高耐圧化、②感度確保、③ベースライン安定性の 3 点の課題が有った。①、②に対しては、構造が似ている CD 検出器用高耐圧セルを応用、セルパスを最大限に拡張、と言う方針で解決した。③に関しては、ポンプや自動圧力調整弁を含む SFC システムの性能向上に伴って改善した事を確認した。

その結果、感度としては UV や CD 検出器に劣るものの、主に高濃度試料が注入される事が前提の「分取用」として SFC で利用する事が可能となった。ここでは、新たに開発した PrepSFC-OR システムを用いて Menthol の分離、検出及び分取を行った結果を示す。

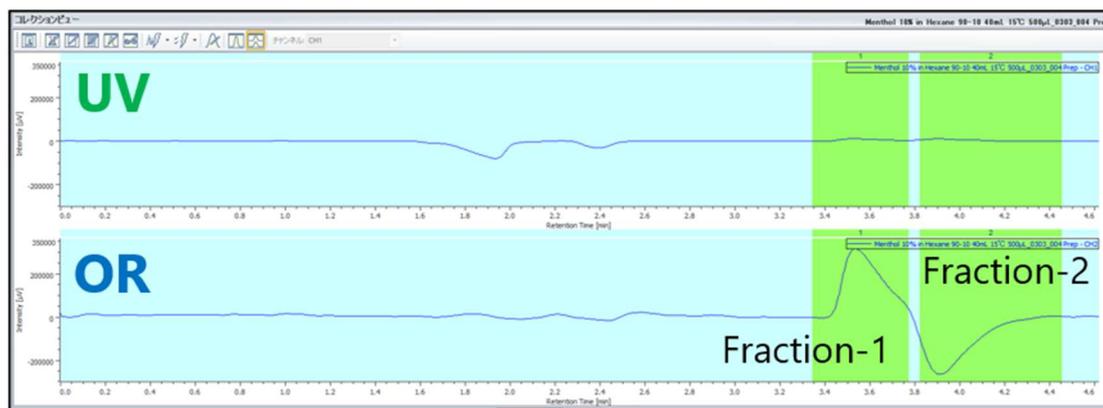


<SFC Conditions>

Column: Alcyon SFC Amylose-C (20 mmI.D. x 250 mmL, 5 μm) (YMC CO.) , Eluent: CO₂/IPA(90/10), Flow rate: 40 mL/min, Column temp.: 15°C, Detector: OR range High, CD 230 nm, UV 190 nm, Pressure: 15 MPa, Injection vol.: 250 μL, Sample: D,L-Menthol 10% in n-Hexane

図 14 Menthol のクロマトグラム

図 14 に、各検出器を使用して得た Menthol のクロマトグラムを示す。UV 及び CD 検出器では検出する事が出来なかったが、OR 検出器では、良好な対称性 (tR-1: 50.6%、tR-2: 49.4% (Peak area)) をもったピークとして検出出来た。又図 15 に、Menthol のキラル分取を行った際のコレクション結果を示す。OR クロマトグラムをトリガーとして分取を行い、回収率を算出した。その結果、Fraction-1, Fraction-2 は其其 96.5%、91.3% と良好な回収率が得られた。以上より、PrepSFC-OR の存在価値を示す事が出来たのではないかと思う。



<SFC Conditions>

Column: Alcyon SFC Amylose-C (20 mmI.D. x 250 mmL, 5 μm) (YMC CO.) , Eluent: CO₂/IPA(90/10), Flow rate: 40 mL/min, Column temp.: 15°C, Detector: OR range High, UV 190 nm, Pressure: 15 MPa, Injection vol.: 500 μL, Sample: D,L-Menthol 10% in n-Hexane

図 15 Menthol のコレクション結果

4. おわりに

CD、OR 検出器の特徴に始まり、キラルスクリーニングにおける CD 検出の意義、CD & *g*-factor の利用可能性の判断方法、CD 波長の検討フロー及び SFC 用 OR セルの活用について紹介した。本稿にて、少しでも光学活性検出器に興味をもって頂ければ幸いである。

今回は低分子医薬品の分析にスポットを当てたが、光学活性検出器は、タンパク質等の二次構造や核酸の構造解析等、バイオ医薬品開発にも応用出来ると言う事も追記しておく。

5. 謝辞

本稿は、液体クロマトグラフィー研究懇談会主催の第 27 回 LC&LC/MS テクノプラザ (2022.1.27-28 開催) における 2022 年液体クロマトグラフィー努力賞受賞講演に基づいて執筆したものである。この様な身に余る賞を頂き、委員長の中村 洋先生を始め、選考委員会や役員の皆様に変感謝申し上げます。又、長きに渡りご指導ご鞭撻頂いた、本賞の推薦者でもある坊之下雅夫氏並びに日本分光 (株) の LC 関係者の皆様にも、この場を借りて感謝申し上げます。

引用文献

- 1) G.A. McLeod, D. Burke, *Anaesthesia*, **56**, 331-341 (2001).
- 2) M. Gillard, et al., *Mol. Pharmacol.*, **61**, 391-399 (2002).
- 3) P. Kahrilas, et al., *Aliment Pharmacol. Ther.*, **14**, 1249-1258 (2000).
- 4) G.K. Zammit, et al., *Curr. Med. Res. Opin.*, **20**, 1979-1991 (2004).
- 5) N. Kobayashi, A. Muranaka, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **64**, 735-743 (2006).
- 6) 原田宣之、*化学と生物*, **22**, 261-270 (1984).
- 7) B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6143-6148 (1967).
- 8) N. Harada, *J. Synth. Org. Chem.*, **41**, 914-924 (1983).

< 執筆者略歴紹介 > 寺田明孝 (Terada AKITAKA)

現職 日本分光株式会社 工場 LC ソリューション技術課
略歴

- ・ 2009 年 3 月 中央大学理工学研究科応用化学専攻修了
- ・ 2009 年 4 月 日本分光株式会社に入社、LC システム課に配属
- ・ 2010 年 4 月～ LC ソリューション技術課にて HPLC, SFC
のアプリケーション開発等に從事
- ・ 2014 年 5 月～ LC 研究懇談会事業委員



分析士資格 LC 分析士三段、LC/MS 分析士二段、IC 分析士初段

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)、
先端の分析法第 2 版 (分担執筆、NTS 社)

【2021 年液体クロマトグラフィー科学遺産認定業績】

**超純水製造装置 Milli-Q Gradient/
Ultrapure Water System Milli-Q Gradient**

石井直恵 / Naoe ISHII

メルク株式会社 / Merck Ltd. Japan

(Received May 19, 2022; Accepted May 24, 2022)

キーワード 超純水 ; 超純水製造装置 ; TOC ; UV ランプ

1. 始めに

超純水は HPLC の移動相やサンプル調製、ブランク等に広く使用されている。超純水の水質は HPLC 分析の良否に影響し、中でも有機物濃度はバックグラウンド等に直接的な影響を及ぼす¹⁾。

1996 年に超純水製造装置 Milli-Q Gradient (ミリキューグラジエント) が上市される迄は、超純水の水質管理は無機イオン量を測定する比抵抗計が主であった。その為、超純水製造装置では、HPLC で使用される水の水質の良否が事前に判断出来ず、実際の HPLC 測定の結果から判断する必要が有った。又、有機物量のモニターとして、一部 TOC (全有機体炭素、Total Organic Carbon) 濃度を推測する方式の超純水製造装置が有ったが、分解能は凡そ 5 ppb と精度が低く、超純水の HPLC への適用可否の判断をする為には不十分であった。

超純水製造装置 Milli-Q Gradient は、新技術として有機物量を計測する TOC 計を搭載した。これは、紫外線酸化-導電率測定方式であり、分解能も 1 ppb と精度も高く、HPLC 試験前に超純水の水質を確認出来、多くの HPLC ユーザーに信頼性と利便性に優れた超純水製造装置を提供した。

本稿では、Mill-Q Gradient の概要について述べる。



図 1 Milli-Q Gradient

2. Milli-Q Gradient 概要

2.1 精製技術の発展

超純水製造装置が開発された当時の超純水の精製方法は、イオン交換樹脂による無機イオンの除去・活性炭による有機物の除去及びメンブレンフィルターによる微粒子・微生物の除去であった。本技術は現在も継承されている超純水精製の為のベースとなる技術である。

続いて、HPLC、LC/MS の高感度化に寄与する超純水精製技術として、1990 年に有機物酸化分解用 UV ランプ（低圧水銀灯、波長 185/254 nm）が開発され、一部の超純水製造装置に搭載された。従来、有機物除去には活性炭による吸着除去技術が用いられていたが、有機物酸化分解用 UV ランプにより、活性炭に吸着除去され難い有機物の除去が可能となり、超純水に残存する有機物濃度は 20 ppb 程度から 4 ppb 程度と約 5 分の 1 にまで低減させる事が可能となった。この有機物酸化分解用 UV ランプは Milli-Q Gradient では標準搭載される様になり、超純水の水質向上を実現した（図 2）。

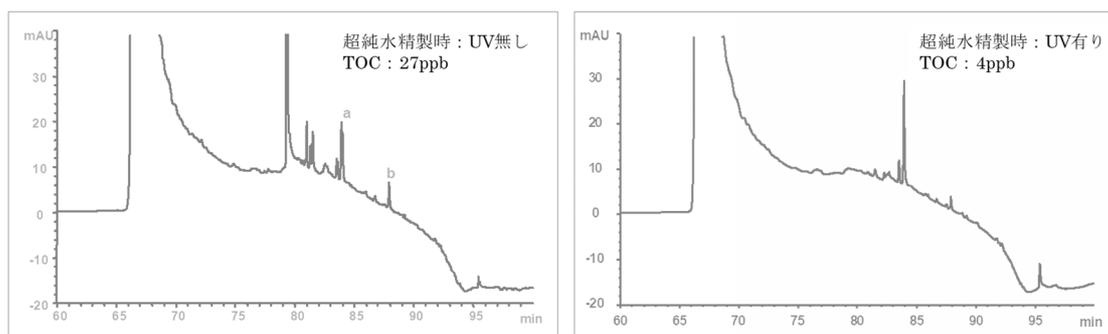


図 2 超純水精製時の UV ランプの有無・TOC 値と HPLC でのゴーストピークの関係²⁾

2.2 水質管理の発展

1969 年に開発された超純水製造装置では、水質管理は比抵抗（単位： $M\Omega \cdot cm$ ）を用いて行われていた。比抵抗は、水質管理指標としては非常に有効なものであるが、含有イオン量の管理しか出来なかった。

そこで、有機物濃度の管理として、TOC が用いられる様になった。日本ミリポア（現メルク）は 1990 年に世界で初めて、超純水製造装置 Milli-Q SP TOC に TOC モニター（以下、ライン酸化 UV 利用方式 TOC モニター）を搭載した。これは超純水精製ラインの UV ランプ（波長 185/254 nm）を利用する簡易的・予測式のもので、精度・信頼性も高くななく、「0-5ppb」「5-10ppb」「10-15ppb」「15ppb 以上」等 5ppb 刻みのアナログ方式の表示であった。

そこで、TOC 値の信頼性向上を目的として 1996 年にインライン TOC 計が新たな技術として超純水製造装置 Milli-Q Gradient に搭載された。この TOC 計は、紫外線酸化-導電率測定方式を用い、超純水製造装置組み込み用に小型に開発されたものであるが、従来か

ら各種サンプルの分析に使用されている燃焼触媒酸化方式 TOC 計や紫外線酸化-導電率測定方式 TOC 計と比較して同等の測定結果が得られ (図 3)、又分解能も 1ppb と精度も高い非常に画期的なものであった (図 4)。

超純水製造装置 Milli-Q Gradient では、本 TOC 計の搭載により、HPLC 試験前に超純水の有機物濃度を確認する事が出来る様になった。これにより、従来は、実際に HPLC 分析を実施するまで良否を判断する事が出来なかった分析用水の水質を、超純水採水時点で確認する事が出来る様になり、多くの HPLC ユーザーに信頼性と利便性に優れた超純水の提供を可能とした。

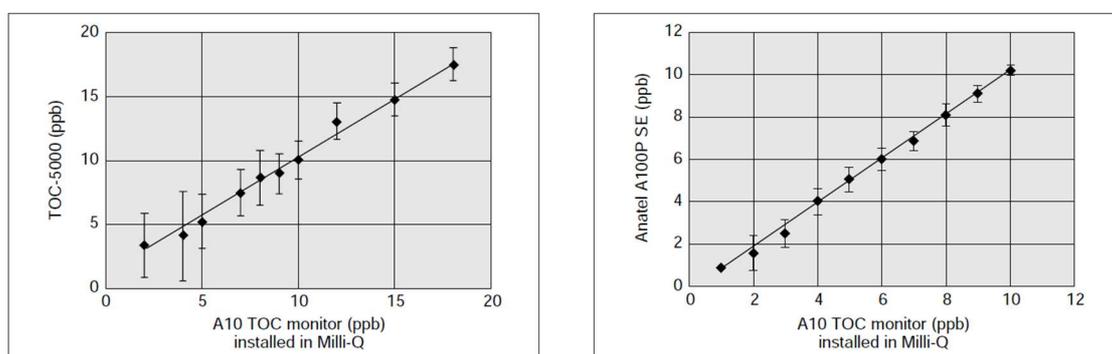


図 3 Milli-Q Gradient 搭載 TOC 計 (オンライン測定) と燃焼触媒酸化方式 TOC 計 (TOC-5000、オフライン測定; 左図)、紫外線酸化-導電率測定方式 TOC 計 (A100P SE; 右図) との比較³⁾



図 4 Milli-Q Gradient のモニター画面 (下段 : TOC 値表示)

TOC 計とライン酸化 UV 利用方式 TOC モニターの精度の違いを確認する為、両方式での超純水の TOC 測定結果を比較した (図 5)。供給水による影響を比較する為、供給水は、RO 水 (純水製造装置 RiOs150 (メルク) で精製) 及び本 RO 水に TOC が 100ppb 程度になる様にメタノールを添加したものをを用いた。メタノールは超純水精製過程での活性

炭やイオン交換樹脂では除去されず、紫外線での酸化分解も困難な物質である事から、メタノールを添加した超純水の TOC を測定する事により、得られた TOC 値の妥当性を評価する事が出来る。

RO 水を供給した場合の超純水の TOC 測定結果は、TOC 計では 3 ppb 程度、ライン酸化 UV 利用方式 TOC モニターでは 1~2 ppb の値であった (図 5 左図)。一方、TOC を 100ppb 程度に調製した RO 水を供給した場合の超純水の TOC 測定結果は TOC 計では 90ppb 程度、ライン酸化 UV 利用方式 TOC モニターでは 9~10ppb であった (図 5 右図)。メタノールは紫外線での酸化分解が困難な物質である事、又完全酸化分解方式 TOC 計はキャリブレーション実施済である事から、ライン酸化 UV 利用方式 TOC モニターでは TOC を低く見積もったり、メタノールの様な紫外線で酸化分解し難い物質を含む時には、大きく異なる TOC を示したりする事が確認された。

一方で、メタノールは紫外線での酸化分解が困難な物質であり、超純水中には 100 ppb 程度の TOC が存在していると予想される。この事から、TOC 計はより正確に超純水中の有機物含量を捉える事が出来、TOC 計による水質管理が優れている事が確認出来る。

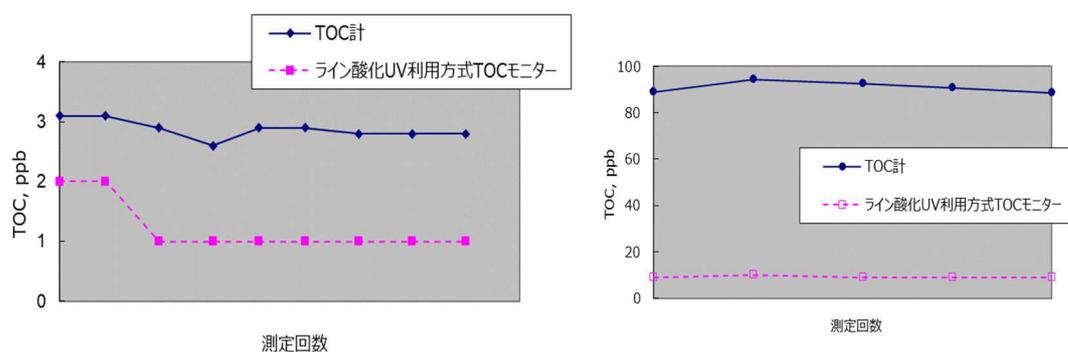


図 5 TOC 計とライン酸化 UV 利用方式 TOC モニターの比較⁴⁾

【左図】超純水精製方法：水道水ーRO 水ー超純水製造装置

【右図】超純水精製方法：水道水ーTOC が 100ppb となる様にメタノールを添加した RO 水ー超純水製造装置

又、本 TOC 計は測定精度が高く、且つキャリブレーションも可能な為、GxP 管理も可能とした。この技術革新により、超純水製造装置は単に水質が高い水を精製するだけではなく、その信頼性も高まった。現在、超純水は HPLC を始めとする様々な分析において重要な基本要素となっている。

3. おわりに

超純水の精製方法は時代と共に進化して来た。超純水製造装置の発展の過程には、初めに水質の向上が有り、次に水質管理指標の進化が加わった。その後、近年では、ラボの効率化に寄与する為に使い易さの向上が図られた。そして、最新技術として環境に配慮した水銀を含有しない紫外線技術が開発された。超純水及び超純水製造装置は、LC、LC/MS 測定を実施する研究室のみならず、化学、ライフサイエンス等の広い分野で使用されている為、それらが影響を及ぼす範囲は広い。

各研究所や民間企業においても、水銀を含有する製品の購入や使用に制限を設けているケースも増えつつある (図 6)。今後、水銀を含有しない紫外線ランプ及び本紫外線ランプを使用した超純水製造装置の重要性は、益々高まると思われる。メルクでは、水銀を含有しない紫外線ランプを開発し、現在水銀を含有しない紫外線ランプ搭載した超純水製造装置 Milli-Q IQ 7000 シリーズ (図 7) を販売している。

水銀は水俣条約・水銀汚染防止法などによる規制物質です。近年は各所において水銀規制の動きが有りますが、貴社・貴所では、物品購入時に水銀含有に関する規定は有りますか？

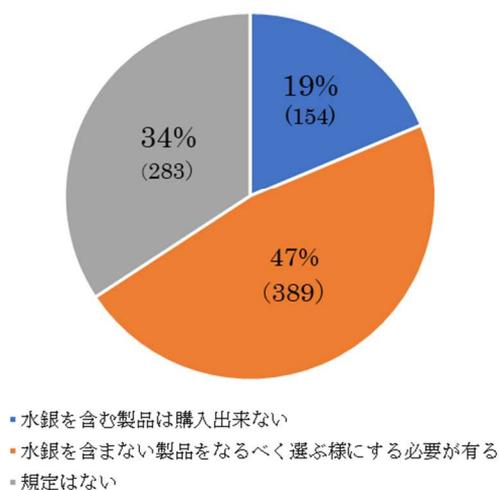


図 6 所属機関における水銀含有製品の規定に関するアンケート結果 (2020 年メルク調べ)



図 7 Milli-Q IQ 7000 シリーズ

最後に、Milli-Q Gradient を 2021 年液体クロマトグラフィー科学遺産に認定して頂いた事に対し、関係各位に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 日本ミリポア Technical Sheet、Vol.7 (1998).
- 2) 下位典子、熊谷浩樹、石井直恵、Ichiro Kano、日本ミリポア Application Notebook、Vol.15、“分析用水の水質が LC、LC/MS 分析に及ぼす影響とその検証”、(2002).
- 3) 石井直恵、加納一郎、金沢旬宣、日本ミリポア R&D Notebook、Vol.2、“Milli-Q Gradient の TOC 分析装置による評価”、(1998).
- 4) 石井直恵、メルク Application Notebook、Vol.39、“超純水装置の TOC 測定方法と精度の違い”、(2013).

<執筆者略歴> 石井直恵 (Naoe ISHII)

メルク株式会社 ライフサイエンス ラボアウォーター
事業部 シニアフィールドマーケティング

(153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー
5F)

横浜国立大学工学部物質工学科卒

分析士資格：LC 分析士二段

E-mail : naoe.ishii@merckgroup.com



[2021 年度 POTY 賞受賞業績]

LC 研究懇談会各種事業のリモート開催への貢献 /

Contribution to Remote Meeting Holdings of Various Projects in the Division of Liquid Chromatography

小林宣章 / Noriaki KOBAYASHI

東洋合成工業株式会社 / TOYO GOSEI Co., Ltd.

(Received May 14, 2022 ; Accepted May 30, 2022)

キーワード COVID-19 ; Web ツール ; オンライン例会

1. 始めに

2019 年 12 月に中国・武漢にて報告された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の影響により、2020 年 3 月より LC 研究懇談会の例会が中止となり、以降 1 年間に渡り例会開催は見送られました。COVID-19 により例会が中止となる直前に LC 研究懇談会委員長の中村 洋先生より、「例会の申込みを Web ツールである Google Forms を用いて実施出来ないか?」と打診を受けていたので、少しだけ Google Forms を用いて試行錯誤をしている中、例会が中止となり、暫くの間放置しておりました (図 1)。Google Forms の使い方を忘れかけていた 2020 年の秋頃、再度中村先生より、「オンラインでの例会開催を検討する様に」との打診を受けました。結果として 2021 年 3 月よりオンラインでの例会を実施する事が出来ましたが、以下オンライン例会開催に向けての取組みを一部ご紹介致します。

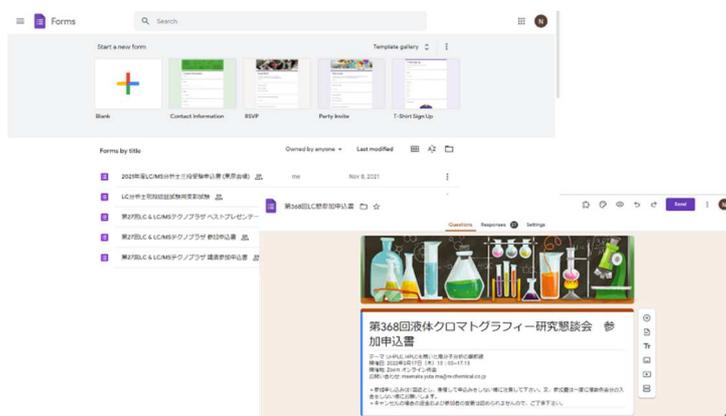


図 1 Google Forms による申込み画面

2. Web ツールの選択

既に他学会では先行してオンラインでの学会を開催していた事もあり、それを参考に幾つかのオンラインツールを用いての「参加申込書」及び「ウェブ会議ツール」について検討しました(図 2)。Google Forms については無料で使用出来る事が分かっておりましたので、問題有りませんでした。Web 会議ツールに関しては、1. コスト, 2. 使用感, 3. 拡張機能を重視して選定致しました。その結果、広くオンライン会議で使用されている Zoom ビデオコミュニケーション社が提供する Zoom ウェビナーを用いて実施する事と致しました。Zoom ウェビナーはその名の通り、ミーティング形式ではなく、ウェビナー形式で開催する事が魅力的でありました。何故ならミーティング形式では、聴講者が誤って音声ボタン若しくはビデオボタンを押してしまい、講演中に雑音等が入る懸念が有った為です。一方、ウェビナー形式は聴講者画面ではその様なボタンが有りませんので、上述の懸念点が払拭され、毎月の様に実施される例会に相応しいと思ひ、最終的に中村先生とご相談した上で決定致しました。

一方で例会の申込みに関する準備事項については、再度 Google Forms の使い方を学び SOP へ展開する必要が有りました(図 2)。



図 2 オンライン例会に向けての準備事項

3. Web ツールの SOP 作成と申込みの開始

Web ツールが 2020 年 12 月に決定してからは、各種 Web ツール SOP 作成に追われました(図 3)。LC 研究懇談会では 2021 年 3 月の第 357 回例会開催が決定しておりましたので、それ迄に作成しなくてはならなかったのです。Google Forms に関しては「オーガナイザー等例会関係者向け SOP」、ウェビナーに関しては「聴講者向け」、「オーガナイザー向け」、「講演者向け」の SOP を作成しなければならず、一人 3 役で、PC やタブレットを用いて Zoom ウェビナー画面のキャプチャーを繰り返しながら、SOP を作成致しました。作成後は、後に発足される Web 対応小委員会のメンバーにチェックしてもらい修正を加えながら完成に至りました。



図 3 オンライン例会における SOP 作成

一方、第 357 回例会の申込みは 2020 年 12 月より開始しておりました。こちらは初期の申込者から「参加申込したが、連絡が無い」との声を受けて、急遽自動返信メールに対応致しました(図 4)。当初自動返信メールを想定していなかった為、Google Forms で出来るのか不安ではありましたが、インターネットで調べると、自動返信メール機能がアドオン機能で可能と言う事が判明したので、直ぐに設定に取り掛かりました。自身のメールアドレスを用いて、自動返信メールが受信出来るか、メールの表示名等細部に渡り何度も試行錯誤繰り返しながら設定致しました。Web ツールの準備が一通り終了した時点で初回の第 357 回例会まで 1 カ月を切っておりました。



図 4 自動返信メールの設定画面

4. 第 357 回例会の実施とその後

さて、いよいよ LC 研究懇談会にとって初めてのオンライン例会です。この日迄にオーガナイザーと複数回に渡りウェビナーの事前練習を繰り返し、当日の午前には講演者も交えて練習会を実施致しました。又、上述の作成した SOP やウェビナー URL の配布等のやらなければならない事が待っておりましたが、発足された Web 対応小委員会のメンバーによって、担当を決めて実施したので、スムーズに行う事が出来ました(図 5)。

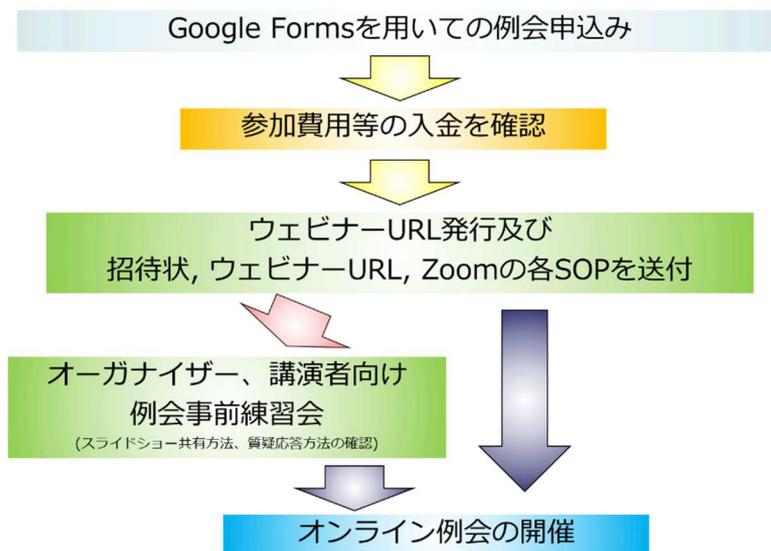


図 5 オンライン例会までの流れ

1年振りの例会であった事もあり、申込者数は65名に上りました。例会開始の13時迄は私の中で緊張感が漂っていましたが、中村先生による最初のご挨拶で何となく安堵感が湧いてきました。実際には小トラブルや反省点等も有りましたが、例会直後の情報交換会では達成感が湧いておりました(図6)。

その後、Web対応小委員会にてSOPやオンライン例会の反省点に対して微修正が加えられ、よりスムーズに運営されて行く様になりました。現在ではウェビナーの録画機能を活かしてYouTube小委員会が発足され、各例会の一部を録画し、それをYouTubeにて公開する事により、会員増強を図ろうと言った活動にも繋がっております。又、オンラインでの例会のみならず、運営委員会のミーティング、分析士認証試験受験申込書や日本分析化学会関東支部による機器分析講習会に使用される等、活用の幅は当初から広がっております(図7)。

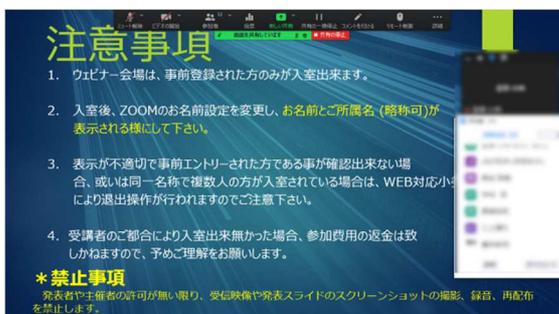


図 6 オンライン例会の様子

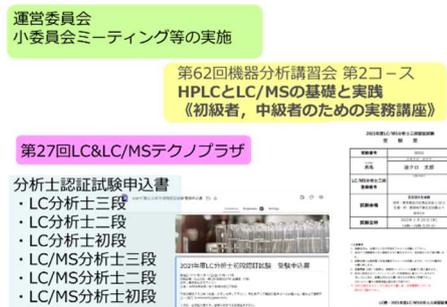


図 7 Web ツールによる各種事業への活用

5. 最後に

対面形式での例会とオンライン例会では、其其一長一短が有ります。対面形式では実際に講演者に講演後にも質問等を行う事が出来、ヒューマンネットワーク構築をし易い反面、東京地区から離れた地域で分析業務を実施されている方は参加し難いと言った面も有ります。一方で、オンライン例会は遠方の方にとって参加し易い反面、対面形式の良さを得る事が難しいと言ったデメリットが有ります。コロナ禍が明け、是非対面形式とオンライン形式のハイブリッド形式の例会が行われ、更なる LC 研究懇談会の発展に繋がる事を切に願います。

6. 謝辞

この度 2021 年度 POTY 賞と言う名誉な賞を頂き、ご推薦頂きました(株)島津総合サービスの三上博久様、並びに中村先生を始めとする選考委員の方々及び Web 対応小委員の皆様にご感謝申し上げます。

<執筆者略歴> 小林宣章 / Noriaki KOBAYASHI

- ・ 2011 年 3 月 東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命化学専攻博士課程修了
- ・ 2011 年 4 月 東洋合成工業株式会社入社
研究開発部にて材料開発に従事
現在は研究企画室

学位：博士（農学）

専門：有機合成化学、構造解析

資格：LC/MS 分析士四段



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

最新の 2 次元 LC システムとアプリケーション /
Recently Advanced 2D-LC Systems and Their Applications

熊谷浩樹 / Hiroki KUMAGAI

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

(Received May 10, 2022 ; Accepted May 16, 2022)

キーワード 2 次元 LC ; LC/MS ; 脱塩 ; 医薬品分析 ; バイオ医薬品 ; ポリマー

1. 要旨

実用的な 2 次元 LC (2D-LC) システムが商品化されてから約 10 年が経過したが、この間に測定モードの多様化や 1 次元目と 2 次元目の移動相の不適合性を緩和する方法の開発などシステムが大きく進歩し、それに伴って 2D-LC の利用分野も拡大して来た。本稿では、2D-LC システムの最近の進歩とそのアプリケーションを紹介する。

2. 始めに

2D-LC は分析条件の異なる 2 つの LC 分析をオンライン、若しくはオフラインで連続して行う手法である^{1,2,3)}。理想条件では、1 次元目 (1D) と 2 次元目 (2D) の其のピークキャパシティーの積が 2D-LC で得られるピークキャパシティーと成る為、分離度を飛躍的に高くする事が出来る。又、1D 及び 2D の分離モードの違いに基づいた異なる化合物情報を一度の測定で得る事も出来る。

2D-LC は古くから行われて来た手法であり、例えば分取 LC における採取フラクションの再分析はオフライン 2D-LC と言う事が出来る。オフライン 2D-LC は、フラクションコレクターが有れば一般的な HPLC システムで実施する事が出来、1D のフラクションを転溶、濃縮等の処理をしてから 2D へ導入出来るメリットも有る。しかし、オフライン 2D-LC の実施には長時間を要する事が多く、データ解析も容易ではない上に自動化も出来ない。

これに対して、オンライン 2D-LC はバルブを介して 1D と 2D を直結している (図 1)。1D のピークは自動的に 2D へ導入される為、自動測定が出来る。しかし、システムとその制御は複雑であり、分析条件の制約も有る。特に、次に述べるコンプリヘンシブ 2D-LC においては 2D の超高速分析が必要と成るため為、実用的なシステムは UHPLC の実用化以降に漸く登場した。実用的な 2D-LC システムの登場からほぼ 10 年が経過したが、この間、1D と 2D のインターフェイスと成るバルブや装置制御のソフトウェアの進歩に加え、測定モードの多様化や関連技術の開発が進み、それに伴って利用分野も拡大して来た。

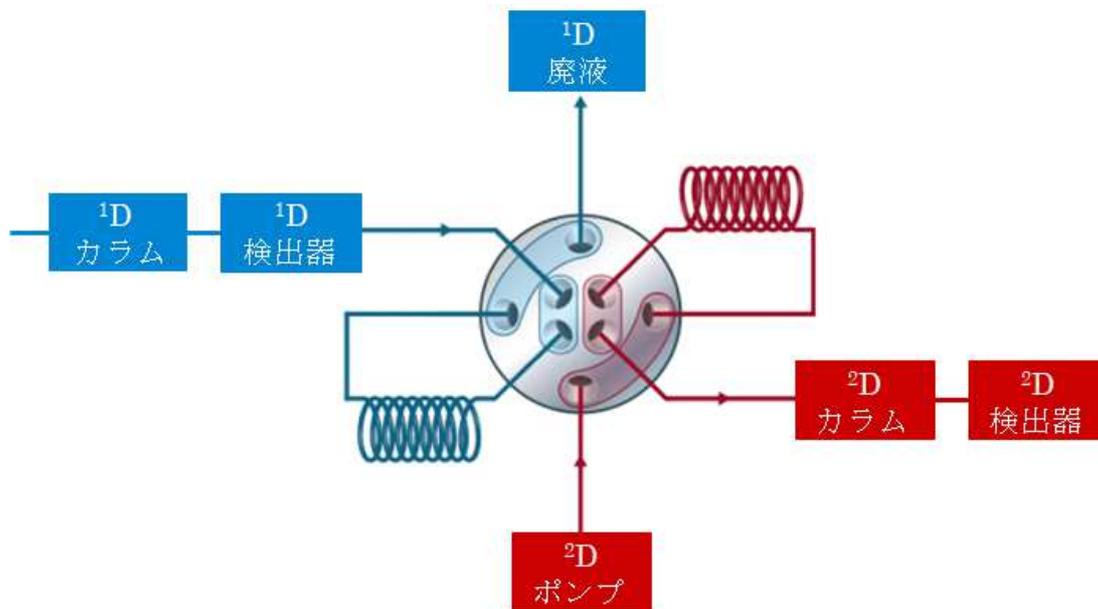


図 1 オンライン 2D-LC の流路構成

ここでは、オンライン 2D-LC システムにおける装置の進歩とそれを利用したアプリケーションを紹介する。

3. コンプリヘンシブ 2D-LC

コンプリヘンシブ 2D-LC は 1D の溶出液を全て 2D へ導入する手法で、サンプルに含まれる多様な化合物の全体像を把握するのに有効である。コンプリヘンシブ 2D-LC では、1D の溶出液を貯留するループの容量が 2D の分析条件を左右する。ループ容量は通常 40~80 μL 程度なので、1D は低流速とする一方で 2D では超高速分析とする必要が有る。その為、1D では低流速でも流速やグラジエント精度の優れたシステムが、2D では超高速分析が可能な UHPLC が必要である。

図 2 に、トラスツズマブのペプチドマッピング (陽イオン交換 (SCX) \rightarrow 逆相 (RPC)) を示す⁴⁾。SCX 単独、或いは RPC 単独では分離出来ない多くのピークを、2D-LC で分離出来ている事が分かる。

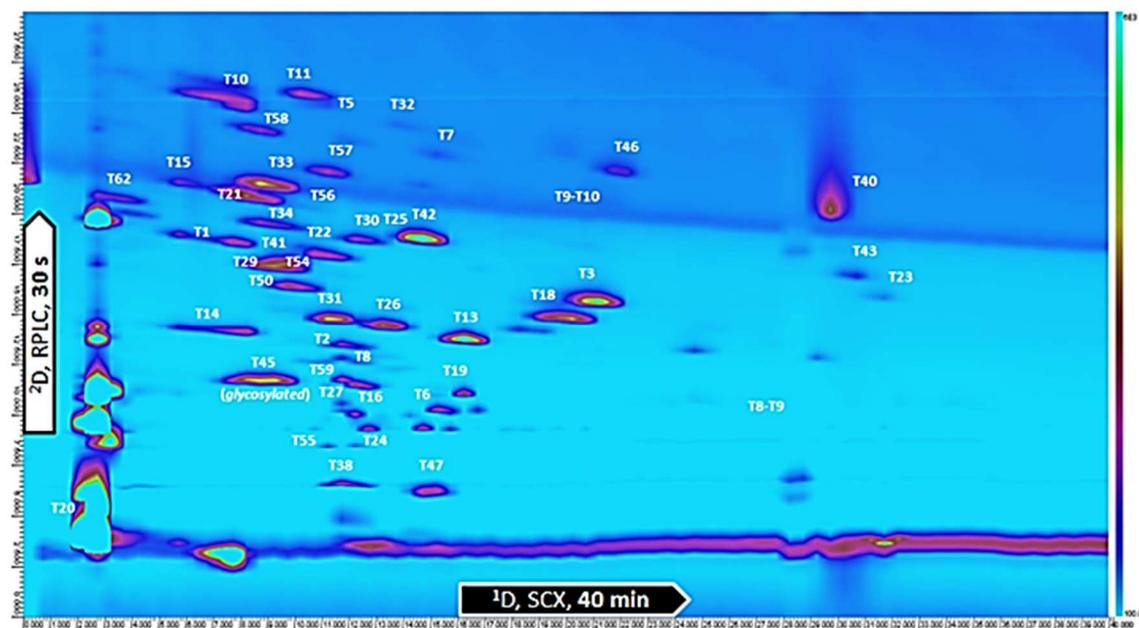


図 2 コンプリヘンシブ 2D-LC によるトラスツズマブのペプチドマッピング

1D カラム : MIC-15-Polysulfoethyl-Asp (内径 1.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 、PolyLC Inc.)、移動相 : A ; 5 mM リン酸塩緩衝液 (pH 3) / アセトニトリル=95 / 5、B ; A + 400 mM 塩化ナトリウム、グラジエント溶離、流速 : 0.065 mL / 分。

2D カラム : ZORBAX Eclipse Plus C18 (内径 4.6 mm、長さ 50 mm、粒子径 3.5 μm 、Agilent)、移動相 : A ; 0.1 % リン酸水溶液、B ; アセトニトリル、グラジエント溶離、流速 : 3.5 mL / 分、検出 : UV、214 nm。

図 3 は、漢方薬の分析例である⁵⁾。漢方薬は複数の薬草の抽出物 (生薬) の混合物である事が多く、多くの成分を含んでいる。このようなサンプルではピークキャパシティーの大きい 2D-LC による分析が有効である。図 3 では、基準と成る漢方薬に使用する薬草抽出物のピークと市販品から得られるピークを照合して、含有成分の確認や真贋の確認を行う事が出来る。

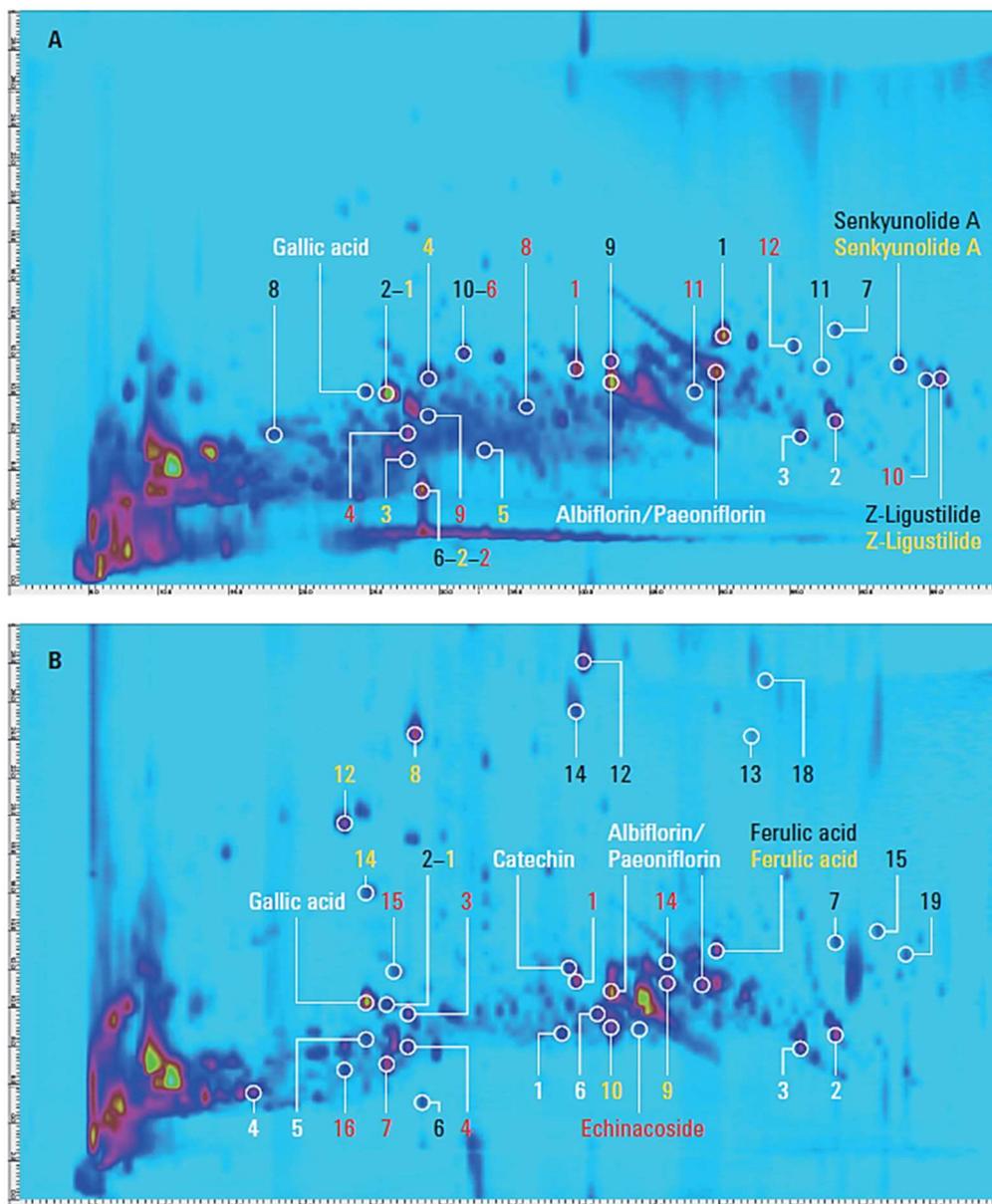


図 3 コンプリヘンシブ 2D-LC による漢方薬 Shi-Wu-Tang の分析

数字：トウキ由来 (黄色)、センキュウ由来 (黒)、シャクヤク由来 (白)、ジオウ由来 (赤)

¹D カラム：ZORBAX RRHT SB-Aq (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.8 μm, Agilent),
 移動相：A: 0.1% ギ酸水溶液, B: 0.1% ギ酸 / メタノール, グラジエント溶離,
 流速：0.05 mL / 分。

²D カラム：Poroshell 120 Bonus-RP (内径 3.0 mm, 長さ 50 mm, 粒子径 2.7 μm, Agilent),
 移動相：A: 0.1% ギ酸水溶液, B: 0.1% ギ酸 / アセトニトリル, グラジエント溶離,
 流速：2.5 mL / 分。

検出：MS, ESI (上段 positive、下段 negative)。

図 4 は、スチレン-アクリロニトリル共重合体を gradient polymer elution chromatography (GPEC) →サイズ排除 (SEC) で分析した例である⁶⁾。GPEC は、ポリマーの貧溶媒から良溶媒へグラジエント溶離を行う事によりポリマーを化学的組成の違いにより分離する手法で、共重合体の組成比やポリマーの末端基の違い等を識別する事が出来る。図 4 の例では、組成比の異なるスチレン-アクリロニトリル共重合体を GPEC で組成比毎に分離し (1D)、組成比毎の分子量と分子量分布を SEC で分析 (2D) している。共重合体の特性解析に重要な組成比と分子量の情報を 1 回の分析で得る事が出来る。

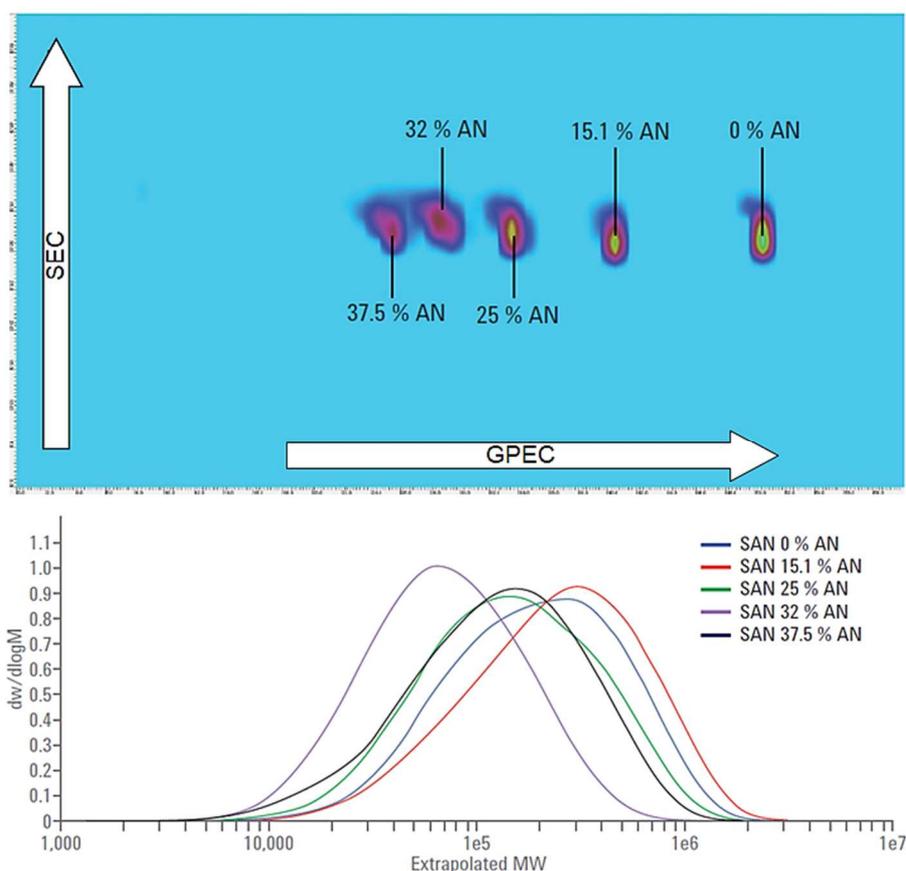


図 4 コンプリヘンシブ 2D-LC によるスチレン-アクリロニトリル共重合体の分析と各共重合体の分子量分布

¹D カラム : PLRP-S 100 Å (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μm, Agilent), 移動相 : A ; アセトニトリル, B ; テトラヒドロフラン, グラジエント溶離, 流速 : 0.064 mL / 分。

²D カラム : ResiPore (内径 10 mm, 長さ 50 mm, 粒子径 3 μm, Agilent), 移動相 : テトラヒドロフラン, イソクラティック溶離, 流速 : 4.0 mL / 分。

検出 : ELSD。

4. ハートカット 2D-LC

ハートカット 2D-LC は、1D の溶出液の 1 部分を 2D へ導入する手法である。コンプリヘンシブ 2D-LC と異なり、サンプルに含まれる成分の全体像を把握する事は出来ないが、特定のピークを詳細に分析する事が出来る。ハートカット 2D-LC は、コンプリヘンシブ 2D-LC に比べると、1D、2D 共に分析条件の制約が小さく実現し易い利点がある。

ハートカット 2D-LC を用いた医薬品のキラル分析例を図 5 に示す⁷⁾。図 5 では、イブプロフェンと不純物を RPC で分離後、キラルカラムを用いてイブプロフェンのキラル分離を行っている。キラルカラムだけでは、主成分と不純物を分離出来ない事が多く、主成分のキラル分離を精密に行うには、この様なハートカット 2D-LC が有効である。

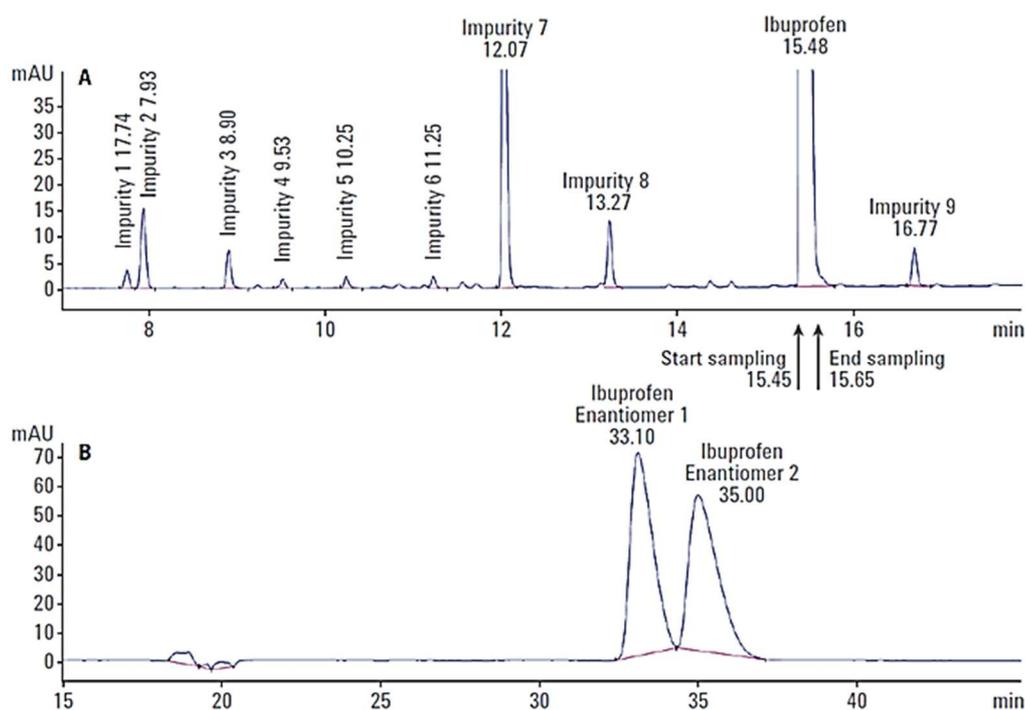


図 5 ハートカット 2D-LC によるイブプロフェンの不純物分析とキラル分離

1D カラム : ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 1.8 μm 、Agilent、移動相 : A ; 0.1 % ギ酸水溶液、B ; 0.1% ギ酸 / アセトニトリル、グラジエント溶離、流速 : 0.025 mL / 分。

2D カラム : Chiral column (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm)、移動相 : 0.1 % ギ酸 (水 / メタノール=35 / 65)、イソクラティック溶離、流速 : 1.0 mL / 分。

検出 : UV、 264 nm。

5. マルチハートカット 2D-LC

マルチハートカット (MHC) 2D-LC は、1D からの溶出液を貯留するループを増やした

ハートカット 2D-LC である⁸⁾。流路図を図 6 に示す。ループを増やす事で、²D へ導入出来るピーク数を増やす事が出来、効率良くハートカット 2D-LC を行う事が出来る。

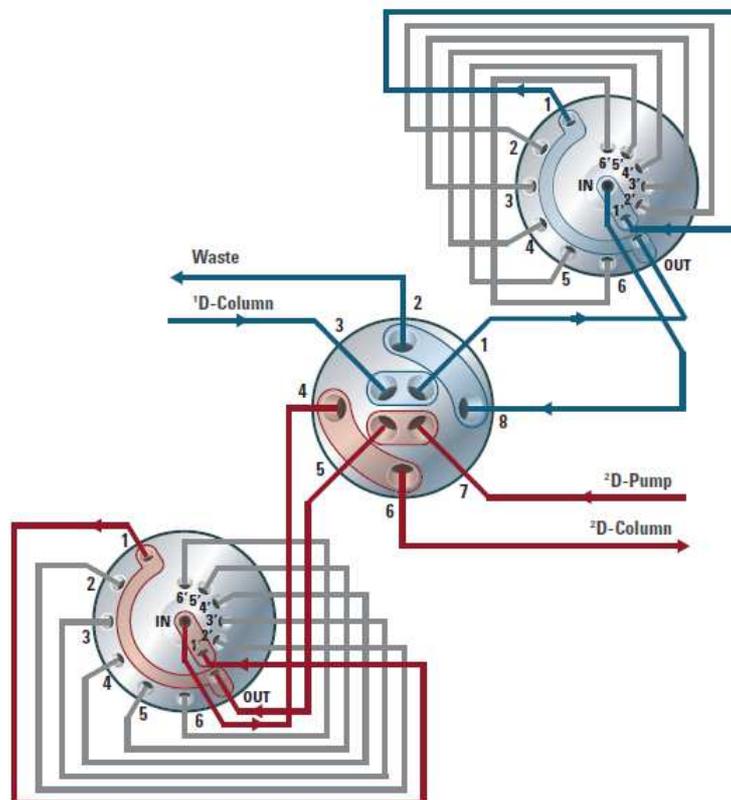


図 6 MHC 2D-LC の流路図

図 7 は、モノクローナル抗体を MHC 2D-LC (疎水性クロマトグラフィー (HIC) → RPC) で分析した例である⁹⁾。HIC はタンパク質の解析に有用で、抗体やその変異体、ADC の分析に利用されている。しかし、HIC は高塩濃度の移動相を用いる為、そのまま MS へ接続する事が出来ない。そこで、MHC 2D-LC を利用して、分析種ピークを²D の RPC へ導入、脱塩する事で MS による解析を可能としている。図 7 では、主ピークの前後に不純物と思われるピークが溶出しており、各ピークをハートカットした後 RPC で分離し-TOF-MS により解析している。

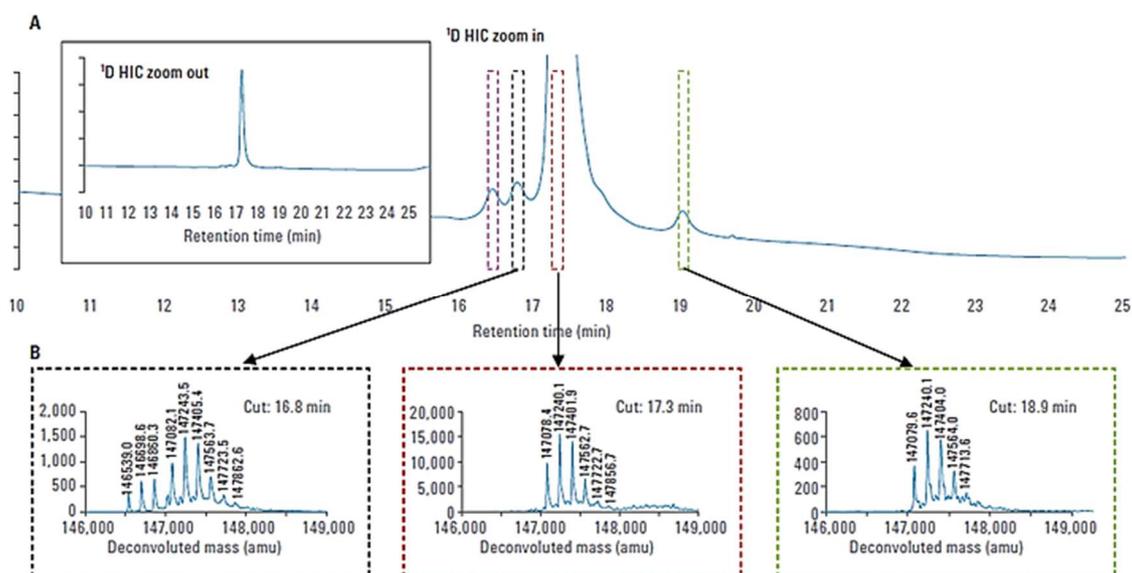


図 7 MHC 2D-LC によるモノクローナル抗体の分析

¹D カラム : HIC カラム (シリカゲル基材) (内径 4.6 mm、長さ 100 mm)、移動相 : A ; 50 mM リン酸ナトリウム水溶液 (pH 7.0)、B ; A + 2 M 酒石酸アンモニウム、グラジエント溶離、流速 : 0.4 mL / 分。

²D カラム : Advance Bio RP-mAb C4 column (内径 2.1 mm、長さ 50 mm、Chiral、Agilent)、移動相 : A ; (0.5 % 酢酸 + 0.05 % TFA) 水溶液、B ; (0.5 % 酢酸 + 0.05 % TFA) / (アセトニトリル / 1-プロパノール / 水 = 80 / 10 / 10)、グラジエント溶離、流速 : 0.2 mL / 分。

検出 : TOF LC/MS、ESI。

6. ハイレゾリューションサンプリング 2D-LC

MHC 2D-LC システムは、¹D の特定のピーク全体をループに貯留し、²D へ導入する事も可能である。この様な手法は、ハイレゾリューションサンプリング (HRS) 2D-LC、若しくは選択的コンプリヘンシブ 2D-LC と呼ばれている³⁾。図 8 に、HRS 2D-LC の概念図を示す。

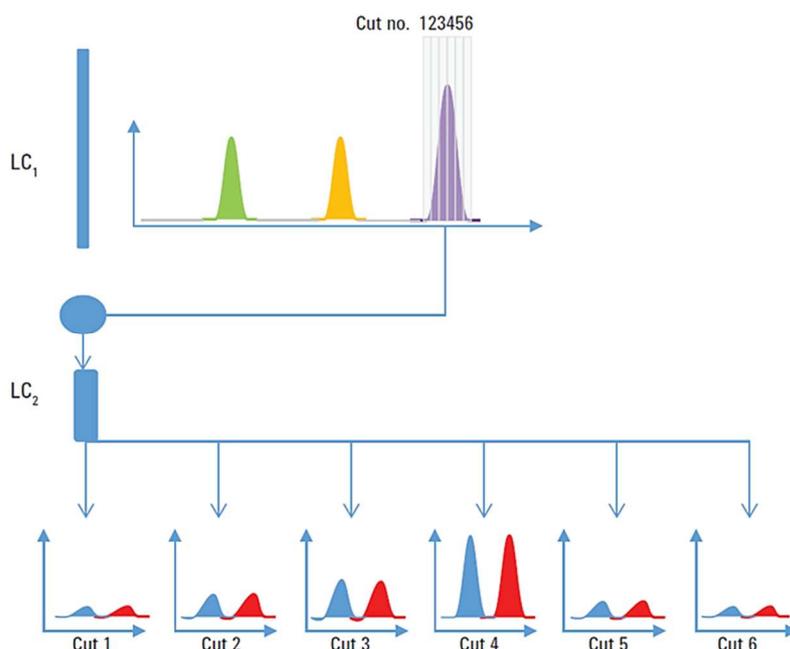


図 8 HRS 2D-LC の概念図

図 9 は、ポリマーの混合物を HRS 2D-LC (SEC → GPEC) で分析した例である¹⁰⁾。分子量 30,000 程度のポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリスチレン (PS)、PMMA と PS のブロック共重合体 (PMMA-*b*-PS) の混合物を SEC で分離すると 1 つのピークが観測される。一方、この混合物を GPEC で分離すると 3 種類のポリマーを其其分離する事が出来る。HRS 2D-LC で分析すると、SEC にピーク中のどの位置にどのポリマーが溶出しているかを簡単に確認する事が出来た。

ここまで解説した 2D-LC の分析モードについて、表 1 に纏めた。

表 1 2D-LC の分析モードの比較

マルチハートカット	ハイレゾリューション サンプリング	コンプリヘンシブ
<ul style="list-style-type: none"> ピークを複数のループに貯留 → ²D の分析時間に制限が無い 	<ul style="list-style-type: none"> ピークを複数のループに貯留 → ²D の分析時間に制限が無い 	<ul style="list-style-type: none"> ²D は超高速分析 (例えば 30 秒程度) と成る為、²D の分離条件に制限が有る
<ul style="list-style-type: none"> ピークの頂点付近を ²D へ導入する 	<ul style="list-style-type: none"> ピークの全部若しくは大部分を ²D へ導入する 	<ul style="list-style-type: none"> ¹D の溶出液を全て ²D へ導入出来る
<ul style="list-style-type: none"> ピークの限定された範囲しか ²D へ導入出来ない (数十 μL) 	<ul style="list-style-type: none"> ピークを広範囲にわたって ²D へ導入出来る (約 4 ~ 320 μL) 	<ul style="list-style-type: none"> ピークの限定された範囲しか ²D へ導入出来ない (数十 μL)
<ul style="list-style-type: none"> 1 ループ当たりのピーク採取時間を長くすると ¹D の分離度が低下する 	<ul style="list-style-type: none"> 1 ループ当たりのピーク採取時間は短くても良いため、¹D の分離度が変わらない 	<ul style="list-style-type: none"> 1 ループ当たりのピーク採取時間を長くすると ¹D の分離度が低下する
<ul style="list-style-type: none"> 定量には向かない 	<ul style="list-style-type: none"> 精度の良い定量が可能 	<ul style="list-style-type: none"> 定量は可能だが操作性は良くない

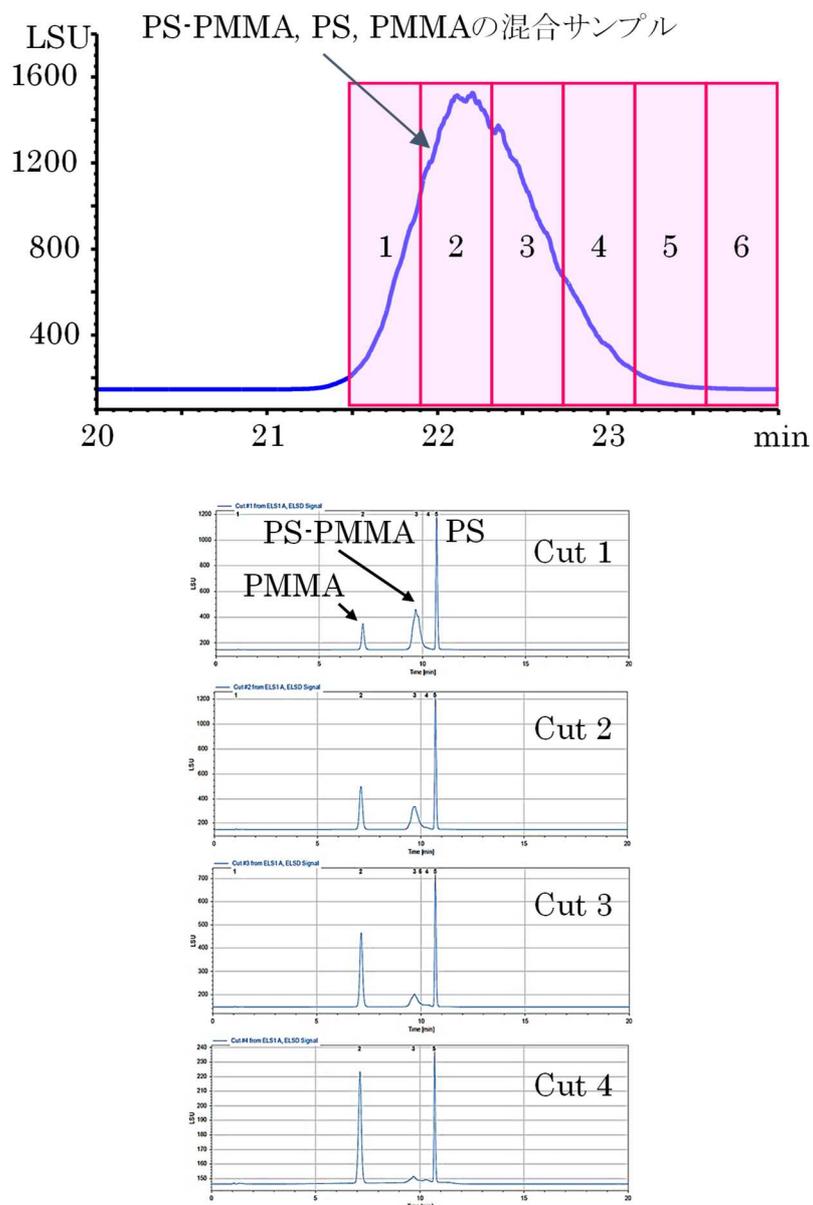


図 9 HRS 2D_LC による共重合体混合物の分析
上段：1D のクロマトグラム、下段：2D のクロマトグラム

1D カラム：PLgel MiniMIX C (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、Agilent)、移動相：テトラヒドロフラン、イソクラティック溶離、流速：0.1 mL/分。

2D カラム：Triart C18 ExRS (内径 3.0mm、内径 150 mm、粒子径 3 μm、YMC)、移動相：A；アセトニトリル、B；テトラヒドロフラン、グラジエント溶離、流速：0.5 mL/分。
検出：ELSD。

7. Active solvent modulation

オンライン 2D-LC では、1D の移動相が必ず 2D へ導入される。一般的に用いられるループの容量は 40~80 μL なので、可成り大量の 1D の移動相が 2D へ導入される事に成る。2D-LC でピークキャパシティーをより大きくするには、1D と 2D で異なる分析条件を設定する事が必要であり、中でも分離モードを変える事は非常に有効である。しかし、異なる分離モードを組み合わせる場合、移動相の適合性が問題と成る事がある。例えば、アセトニトリルは RPC では強溶媒であるが、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) では弱溶媒である。1D に HILIC、2D に RPC を用いた場合、RPC の強溶媒であるアセトニトリルが大量に 2D へ導入される為、2D においてブレイクスルーやピーク形状の悪化が引き起こされる。この問題を解消する方法としてトラップカラムを用いる方法が知られているが、装置が複雑に成る等のデメリットが有る¹¹⁾。一方、1D からの溶出液を適当な移動相で希釈しながら、2D のカラムへ導入する事でも移動相の不適合性を緩和する事が出来る。

最近、2D の移動相をスプリットし、その一部で 1D からの溶出液を希釈する機能をもつ 2D-LC 用 active solvent modulation (ASM) バルブが開発された^{12,13,14)}。このバルブを用いると、1D からの溶出液を希釈する溶媒やそれを送液するポンプを用意する必要が無く、簡便に移動相の不適合性を緩和する事が可能と成った。ASM バルブの概念と構造を図 10 に示す。

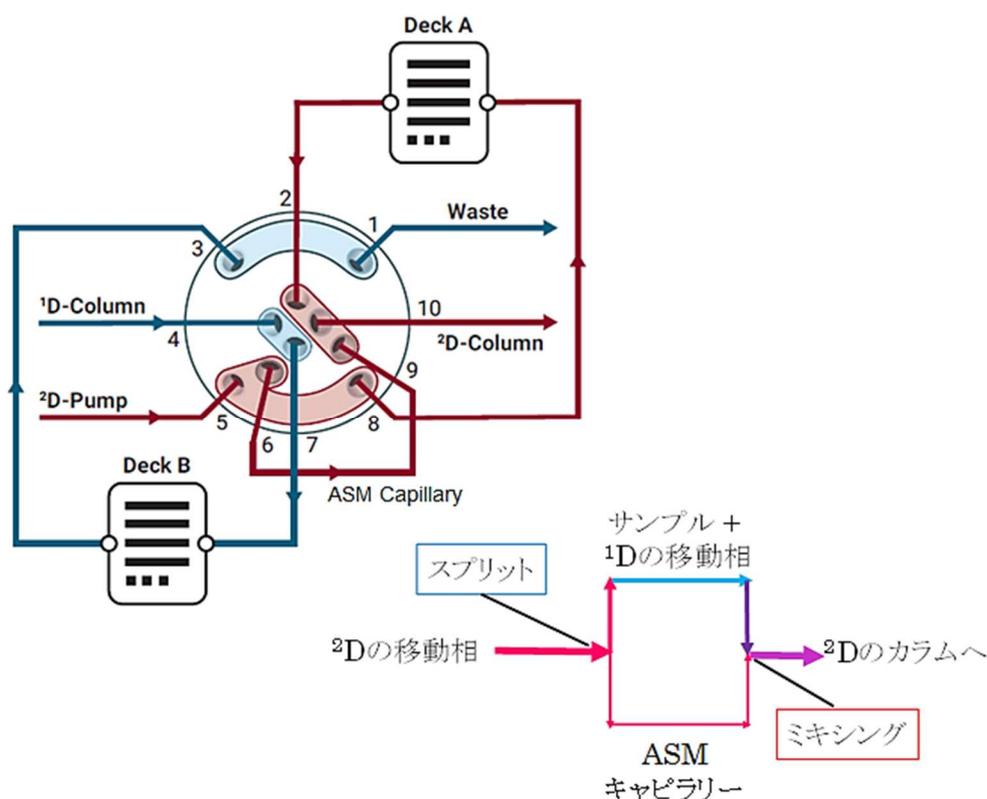


図 10 ASM の概念と ASM バルブの構造

図 11 は、ペプチドを MHC 2D-LC (HILIC → RPC) で分析し、ASM 有り無しを比較した結果である¹³⁾。ASM の使用により、ブレイクスルーが解消しピーク形状も改善している事が分かる。

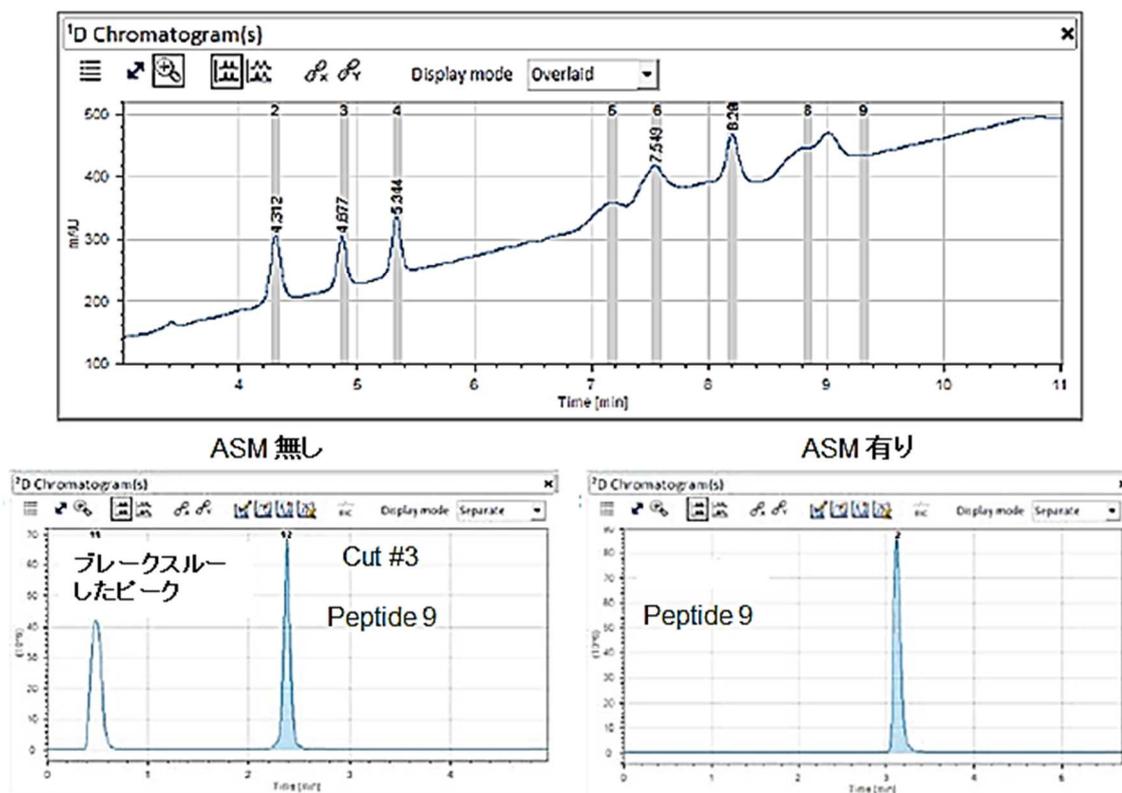


図 11 ASM を用いた MHC 2D-LC によるペプチドの分析

1D カラム : ZORBAX HILIC Plus (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3.5 μm、Agilent)、
 移動相 : A ; 50 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 4)、B ; アセトニトリル、グラジエント溶離、
 流速 : 0.5 mL / 分。

2D カラム : AdvanceBio Peptide Mapping (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.7 μm、
 Agilent)、移動相 : A ; 0.1% ギ酸水溶液、B ; 0.1% ギ酸 / アセトニトリル、グラジエント溶
 離、流速 : 0.5 mL / 分。

検出 : MS、 positive

ASM は 1D と 2D の全ての溶媒の不適合性を解消出来る訳ではないが、複雑なシステムを
 用いる事無く溶媒の不適合性を緩和する簡便で有効な手法である。

8. バイオ 2D-LC

近年、抗体医薬や核酸医薬 (バイオ医薬) が広く用いられる様に成り、その研究も活発に

行われている。バイオ医薬の研究には HPLC や LC/MS が欠かせないが、バイオ医薬の中には一般的な(U)HPLC に多く使用されているステンレス鋼 (SUS) に吸着するものがある。その対策として SUS を使用しないシステムが開発され、バイオイナート LC 或いはバイオ LC と呼ばれている。2D-LC が生体サンプルの解析に有用な事は既に紹介したが、SUS を使用したシステムを利用している例が殆どである。最近、バイオ LC をベースとした 2D-LC (バイオ 2D-LC) が抗体医薬の分析などに応用され始めた¹⁵⁾。

9. 終わりに

オンライン 2D-LC について、最近の進歩とアプリケーション例を紹介した。オンライン 2D-LC は装置の進歩と共に利用分野が拡大しており、今後は生体分子、特にバイオ医薬品を対象としたバイオ 2D-LC の関連技術の進歩と、生体分子を含む幅広いサンプルへの応用が期待される。

引用文献

- 1) D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, *J. Chromatogr., A* **1168**, 3-43 (2007).
- 2) P.W. Carr, D.R. Stoll, TWO-DIMENSIONAL LIQUID CHROMATOGRAPHY - PRINCIPLES, PRACTICAL IMPLEMENTATION AND APPLICATIONS, Primer, 5991-2359EN, Agilent Technologies (2015).
- 3) D.R. Stoll, P.W. Carr, *Anal. Chem.*, **89**, 519-531 (2017).
- 4) Application Note: 5991-2880EN, Analysis of Monoclonal Antibody Digests with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, Agilent Technologies (2013).
- 5) Application Note: 5991-5555EN, Authentication of Traditional Chinese Prescriptions Using Comprehensive 2D-LC, Agilent Technologies (2013).
- 6) Application Note: 5991-6699EN, Characterization of Styrene-Acrylonitrile Copolymers Using Comprehensive 2D-LC - Investigation of Two Mutually Dependent Distributions, Agilent Technologies (2015).
- 7) Application Note: 5991-4664EN, Achiral-Chiral Heart-Cutting 2D-LC Analysis of Chiral Pharmaceutical Substances Impurity Analysis and Simultaneous Determination of Enantiomeric Composition Using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, Agilent Technologies (2014).
- 8) M. Pursch, S. Buckenmaier, *Anal. Chem.*, **87**, 5310-5317 (2015).
- 9) Application Note: 5991-6376EN, Analysis of Monoclonal Antibodies Using Multiple Heart-cutting Hydrophobic Interaction/Reversed Phase 2D-LC/MS, Agilent Technologies (2016).

- 10) アプリケーションノート: LC-201810KG-001, Active Solvent Modulation バルブを用いたハイレゾリューションサンプリング 2D-LC による共重合体の分析、アジレント・テクノロジー (2018).
- 11) A. Ramzi, H. Ahmadi, I. Sadiktsis, U. Nilsson, *J. Chromatogr. A*, **1566**, 102-110 (2018).
- 12) B.W.J Pirok, D.R. Stoll, P.J. Schoenmakers, *Anal. Chem.*, **91**, 240-263 (2019).
- 13) Technical Overview: 5991-8785EN, The Agilent InfinityLab 2D-LC Solution with Active Solvent Modulation, Agilent Technologies (2017).
- 14) 熊谷浩樹、澤田浩和、*分析化学*, **69**, 1-5 (2020).
- 15) Application Note: 5994-4309EN, Automated Monoclonal Antibody Subunit Analysis by Online Reduction Using 2D-LC/MS, Agilent Technologies (2021).

< 執筆者略歴 > 熊谷浩樹 / Hiroki KUMAGAI

博士 (工学)

アジレント・テクノロジー株式会社 LC・LC/MS 営業部門アプリケーショングループで HPLC のアプリケーション開発、セールスサポートに従事

分析士資格 : LC 分析士四段、LC/MS 分析士二段

E-mail: hiroki_kumagai@agilent.com



【シリーズ「試料分析の定石とコツ」】

ペプチド分析／Peptide Analysis

合田竜弥／Ryoya GODA

第一三共株式会社 研究開発本部 薬物動態研究所／Drug Metabolism & Pharmacokinetics Research Laboratories, R&D Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd.

(Received May 20, 2022 ; Accepted June 1, 2022)

要旨

ペプチド及びタンパク質の固体に対する吸着は、溶液中の有機溶媒によって惹起される高次構造変化に伴うものであり、或る特定の有機溶媒含量（臨界値）を境に急激且つ可逆的に変化（相転移）する事が見出された。これらの知見に基づくと、ペプチド及びタンパク質は、カラム充填剤に対する吸着能を可逆的に変化させ、カラム充填剤に対する吸脱離を繰り返しながら、最終的に臨界値を示す溶離液によってカラムから溶出されると考えられた。一方、この吸着能の可逆性を利用したペプチド吸着制御 LC が開発された。このペプチド吸着制御 LC は、取り扱い時のペプチド及びタンパク質の容器等への吸着回避を目的として、高有機溶媒含量の溶液を LC 装置に導入した場合に問題となるカラム非保持ピークの発生を抑制する事が出来、非保持ピーク発生によって生じる測定精度の損失を回避する事が可能である。加えて、ペプチド吸着制御 LC に対する試料導入量は理論上無制限である事から、試料の大量導入による精度の高い高感度定量も可能である。

キーワード ペプチド；吸着；有機溶媒；相転移；べき乗則；ペプチド吸着制御 LC

1. 始めに

ペプチド及びタンパク質（以後、ポリペプチドと略）は、遺伝子の最終産物であり、細胞の形態や機能を直接制御している。しかし、疾患等により、その発現量や翻訳後修飾等が変化する事から、この変化を利用した疾患の原因解明、疾患の早期診断等が行われ、医薬品開発においては患者層別化、薬効評価等のバイオマーカーとして積極的に研究されている。更に、抗体医薬品に代表される様に、ポリペプチドは新しい創薬モダリティとしても活用されている。

これら内因性及び医薬品としてのポリペプチドの生体試料中濃度測定には、従来、特異的な抗体を使用するリガンド結合法（ligand binding assay, LBA）が用いられて来た。しかし、抗体作成の難しさや、抗体の交差性等の問題を有している事から、高い選択性を有する LC/MS 法が代替法として積極的に検討されている。LBA 法で得られる様な高い測定感度を得る為には、ポリペプチド取り扱い時の容器等に対する吸着回避法や、高精度での検出法、更に夾雑成分と目的ポリペプチドとの分離法の開発等が鍵となる。ここで

は、LC によるポリペプチド分析の為の定量的な操作及び測定の方策について、ポリペプチドの吸着能に関する知見を基に解説する。

2. ペプチドの吸着について

ポリペプチドを分析種とする際に大きな問題となるのが、容器やピペットチップ等の固体に対するポリペプチドの吸着である。図 1 の urocortin (アミノ酸残基数 40、分子量 4,696) を例に示す様に、ポリペプチドの吸着の影響は低濃度領域でより顕著になり、取り扱い時の定量性を損失させ、正確な定量を困難とする。

LC (LC/MS も含む) 測定以外の場面では、この吸着の回避を目的として、アルブミンの様な高分子ポリペプチドや界面活性剤の試料溶液への添加等が多用される。しかし、LC 測定においては、これらの添加物は測定トラブルの要因となり得る事から、これ迄 LC 測定に使用可能な界面活性剤の検討等が行われて来た。しかし、分析種毎にその効果を検証する必要がある事等から普遍的な活用には至っていない。

一方、低分子化合物の容器等への

吸着が認められる場合には、アセトニトリル等の有機溶媒を試料溶液等に加える事により、その吸着を回避する方策が一般的である。この有機溶媒を用いた吸着回避の方法が、ポリペプチドに対しても有効である事が報告されている。しかし、試料溶液中の有機溶媒含量がポリペプチド自身の溶出にも影響を与える事が同時に報告されており、低分子化合物の場合とは異なる考え方が必要である。例として、urocortin の容器に対する吸着に与えるアセトニトリルの効果を評価した結果を図 2 に示す。

試料溶液中のアセトニトリル含量が 0% から 30% に増加するに伴って、urocortin の容器等に対する吸着をより回避出来る事から、カラムに保持した urocortin のピーク面積は急激に増加している。しかし、アセトニトリル含量が 40% 以上となった場合には、カラムに保持しない urocortin ピーク (以後、非保持ピーク) が発生し、結果としてカラムに保持する urocortin のピーク面積は急激に減少している。本来、urocortin の容器等への吸着が完全に回避出来ている条件下においては、カラム保持ピークの面積は一定となる事が期待される。しかし、サンプルループ後の流路内径と導入された urocortin 溶液量との関係から、導入された urocortin 溶液の大部分がその溶液組成を保ったままカラムに到達していると考えられる場合においては、試料溶液中の有機溶媒の影響によってカラム充填剤と全く相互作用せず通過する非保持ピークを発生させると考えられる。この為、例え

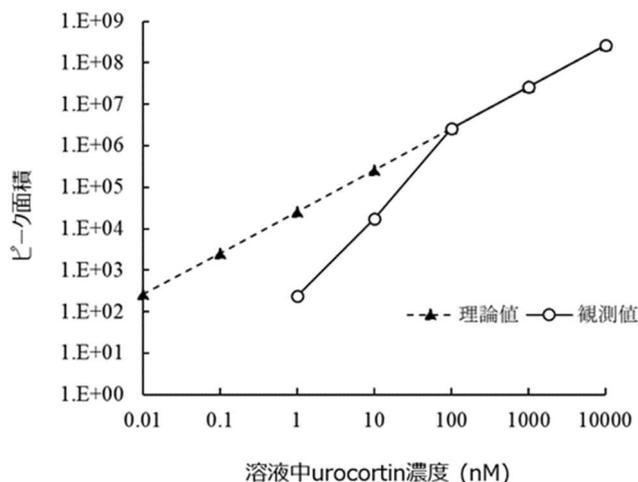


図 1 水溶液で調製された urocortin 希釈系列を測定した際に得られるピーク面積値

ば、urocortin を定量的に測定したい場合には、試料溶液中のアセトニトリル含量を 30% 付近に限定する必要がある事に加えて、その含量変化に影響を与える他の因子が無い事を検証する事も必要となる。この様に極めて限られた条件下での測定を強いられる事が、LC によるペプチド分析を困難とさせていた要因の一つでもある。

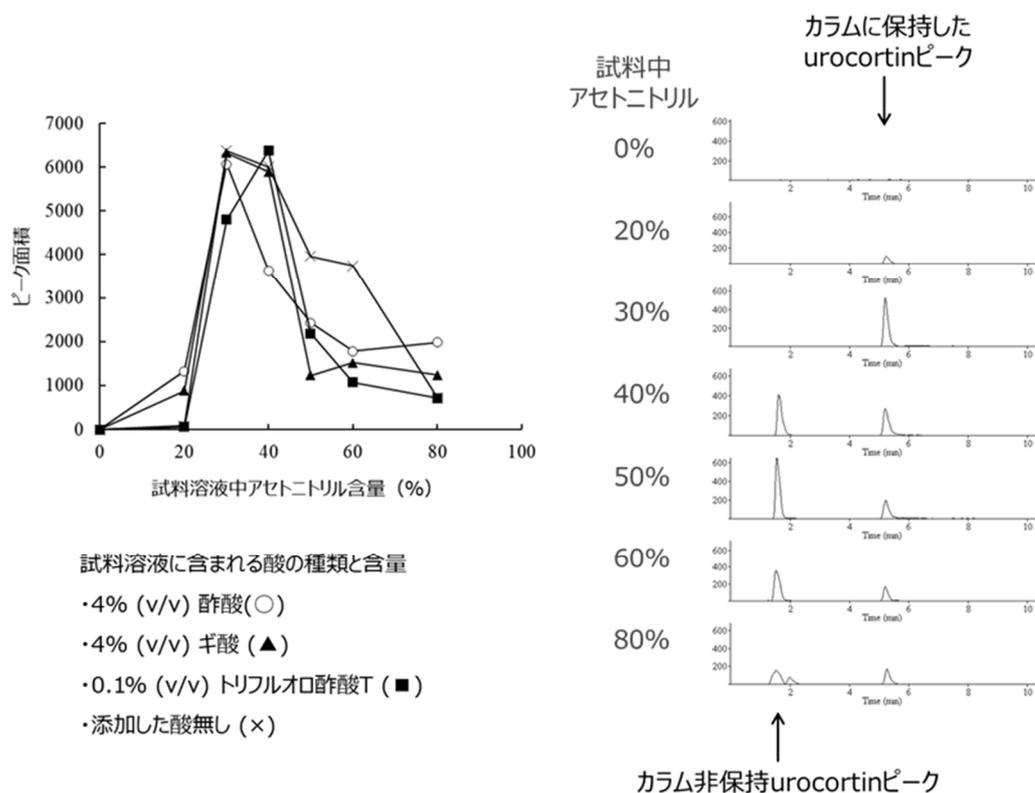


図 2 試料溶液中アセトニトリル含量の異なる urocortin 溶液 (1 nmol/L) を測定した時に得られるカラムに保持した urocortin のピーク面積及びクロマトグラム

一方、この様なカラムに保持及び非保持の 2 本のピークが共に良好な形状として現れる現象は、分子量約 1,000 から約 45,000 迄の検討に用いた全てのポリペプチドにおいて、有機溶媒種に関係無く認められている²⁾。この様なポリペプチド特有の現象を従来の逆相分離理論を用いて説明する事は困難である事から、図 3 に示す様に、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能が特定の有機溶媒含量(臨界値 μ 値については後述)を境に急激且つ可逆的に変化する (urocortin の吸着能の相転移現象) と考える必要性がある。つまり、LC 導入後に移動相と混合して、有機溶媒含量が臨界含量以下となった移動相に含まれるポリペプチドは、その吸着能を回復させてカラム保持ピークとして現れる一方で、臨界含量より高い有機溶媒含量の試料溶液に含まれるポリペプチドは、その溶液組成が変化しない限り、カラムと相互作用出来ずに非保持ピークとして現れる事となる。



$$f_n = \sum_{i=1}^n x_i / X_i$$

x_i : 溶液中有機溶媒 (i) の含量 (%)
 X_i : 単独有機溶媒 (i) が示す臨界含量 (%)

図 3 ポリペプチドの吸着能の相転移現象

この相転移現象の特徴である臨界含量については、CD スペクトル解析で得られる有機溶媒によって惹起されるポリペプチドの高次構造変化の臨界含量と一致する事が示され、同時に、有機溶媒によって惹起されるポリペプチドの高次構造変化が可逆的である事も確認されている¹⁾。

従って、有機溶媒含量変化によって惹起されるポリペプチドの吸着能の変化は、ポリペプチドの高次構造変化に伴うものであり、この高次構造変化がポリペプチドにとって普遍的な現象である事から、有機溶媒によって惹起される吸着能の変化もポリペプチドにとって普遍的な現象と考えられる。

3. 逆相 LC におけるポリペプチドの溶出機構

グラジエント勾配 (r , %/min) とポリペプチドの保持時間(min)の間には、図 4 の urocortin の例が示す通り、移動相として用いた有機溶媒の種類に関わらず、べき乗則が認められている²⁾。この事実は、イソクラティック溶出 ($r=0$) 条件下では、理論上ポリペプチドの保持時間は無限大、つまり、カラムに一旦保持されたポリペプチドは、 $r=0$ の条件下ではカラム内を移動しない事を示している (実際には、臨界値近辺の移動相を用いた場合には、イソクラティック溶出で溶出される事がある)。

ここで、前述のポリペプチドの吸着能の可逆性も考慮すると、ポリペプチドは、グラジエント溶出法によって生じる有機溶媒勾配中に存在する臨界値を中心に、カラム充填剤に対する吸着能を可逆的に変化させて、カラム充填剤に対する吸脱離を繰り返しながら、最終的に臨界値 ($f_n = 1$) を示す溶離液によってカラムから溶出されていると考えられる。

従来、ポリペプチドは、カラム入り口の充填剤担体表面に強く保持された後、溶離液中の有機溶媒含量が或る程度上昇しても全くその場から脱離せず、特定の有機溶媒含量に達した時に固定相から初めて脱離し、一旦脱離したポリペプチドは、それ以降固定相とは何ら相互作用もせずカラムから溶出するものと説明されて来た。ここで、van Deemter の式に含まれる軸方向拡散や、ポリペプチドの吸着能の可逆性に加え、数メートルと言った長さのカラムを用いた場合に得られるポリペプチドピークの形状が短いカラムを用いた場合とほぼ同じである事実に基づくと、ポリペプチドはカラム充填剤に対する吸脱離を繰り返しながら溶出していると考えられ、この点が従来の溶出機構の考え方と異なる点となる。

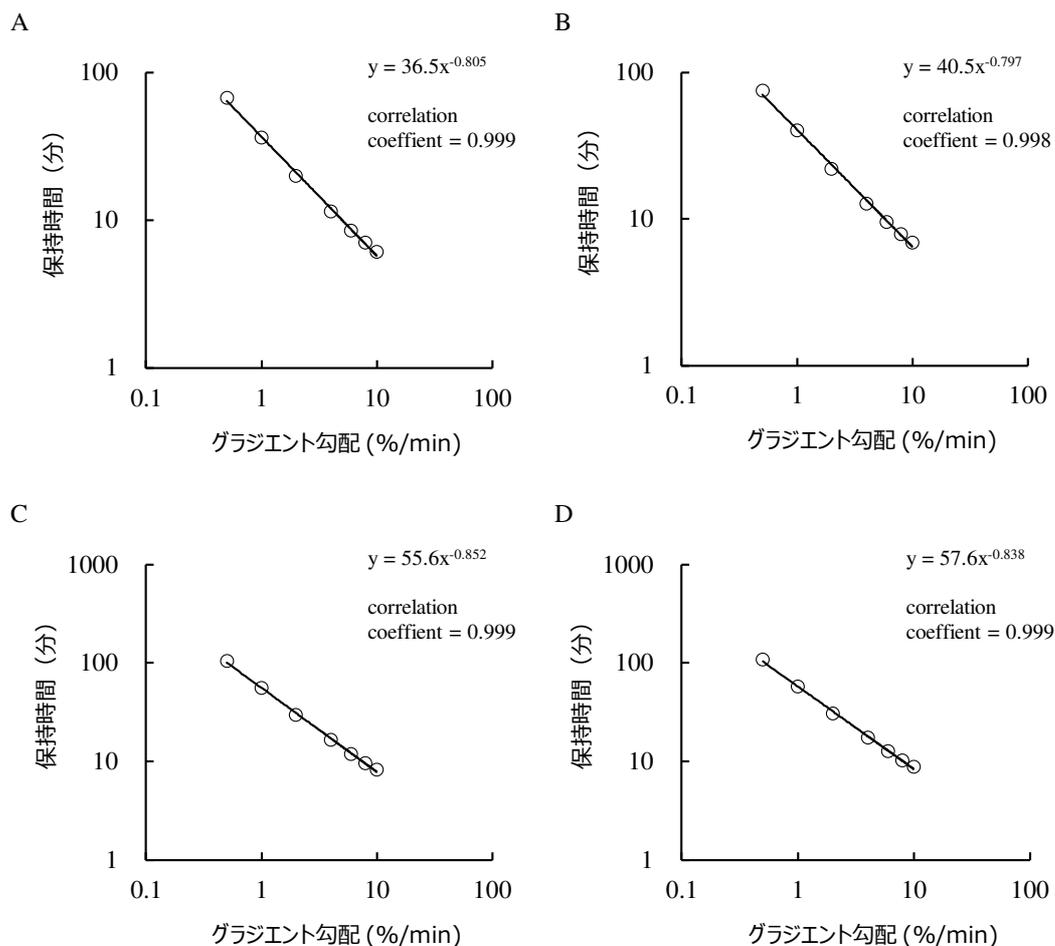


図 4 グラジエント勾配と保持時間との間のべき乗則

移動相有機溶媒 : A、アセトニトリル ; B、エタノール ; C、メタノール ; D : 酢酸

4. ポリペプチドの吸着能に対する単独有機溶媒の臨界含量の求め方

ポリペプチドの定量的な取り扱い及び測定条件の妥当性を考える上で、カラム充填剤を含む固体に対するポリペプチドの吸着能の状態を知る事は極めて重要である。ここでは、先ず各ポリペプチド対して各有機溶媒が示す臨界含量 (X_i) を簡便に推定する方法について述べる。

臨界含量を簡便に評価す為には、酸等の有機溶媒含量が微量である水系移動相、添加された酸が微量である単独有機溶媒系移動相、及び 100%水系移動相条件下から測定が開始する事が好ましい。この条件下、ポリペプチドの非保持時間 t_0 (min) を無視出来ると仮定した場合、各ポリペプチドが溶出される迄に溶離液中で増加した有機溶媒含量 ΔV (%) は、式 1 に示す通りグラジエント勾配 (%/min) とその時の保持時間 (min) との積により算出出来る。

$$\Delta V(\%) = r \cdot T(r) \quad (1)$$

ここで得られた $\Delta V(\%)$ は、ポリペプチド溶出時の溶離液中の総有機溶媒含量 $V_T(\%)$ に相当、つまり、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化を惹起する有機溶媒の臨界含量 ($f_c = 1$) と等しいと考えられる。従って、 $r = 1$ (%/min) のグラジエント溶出で得られた保持時間 $T(1)$ をその有機溶媒の臨界含量として見做す事が可能と考えられる。この方法は、1 回の測定で複数のポリペプチドの臨界含量を同時に推定する事が出来る長所を有している。

一方で、異なる方法でも臨界含量を推定する事も可能である。例えば、ポリペプチドがグラジエント勾配に関わらず或る特定の有機溶媒含量の溶離液によってカラムから溶出されている事に基づくと、各ポリペプチドが溶出される迄に溶離液中で増加した有機溶媒含量 $\Delta V(\%)$ は、異なるグラジエント勾配 r_1 及び r_2 の時の保持時間 $T(r_1)$ 及び $T(r_2)$ 、及び t_0 を用いて式 2 で表す事が出来る。

$$\Delta V(\%) = r_1 \cdot [T(r_1) - t_0] = r_2 \cdot [T(r_2) - t_0] \quad (2)$$

この式 2 から、 t_0 は式 3 で表され、又、式 3 を式 2 に代入する事により、 $\Delta V(\%)$ は式 4 として表される

$$t_0 = [T(r_1) \cdot r_1 - T(r_2) \cdot r_2] / (r_1 - r_2) \quad (3)$$

$$\Delta V(\%) = -r_1 \cdot r_2 \cdot [T(r_1) - T(r_2)] / (r_1 - r_2) \quad (4)$$

測定条件が前述の条件を満たしている場合、この計算で得られる $\Delta V(\%)$ は総有機溶媒含量 $V_T(\%)$ であり、臨界含量に相当する事となる。

更に別の方法としては、図 4 に示すグラジエント勾配と保持時間との間に認められるべき乗則を活用する方法も存在する。べき乗則は、べき乗定数 C 及びべき乗指数 γ を用いて式 5 で表され、この式 5 を式 1 に代入する事で、式 6 となる。

$$T(r) = C \cdot r^{-\gamma} \quad (5)$$

$$\Delta V(\%) = r \cdot T(r) = r \cdot C \cdot r^{-\gamma} \quad (6)$$

ここで、 $r = 1$ (%/min) の場合、べき乗指数に関わらず必ず $\Delta V(\%) = T(1) = C$ となる事から、前述の測定条件下で得られたべき乗定数 C も $T(1)$ と同様に臨界含量に相当する事となる。

実際に、水系移動相として 4%(v/v)酢酸水溶液、移動相 B として 4%(v/v)酢酸を含むアセトニトリルを用い、①グラジエント測定 ($r = 4, 6$ 及び 8 %/min) で得られた各保持時間を用いて、式 4 に従って算出 (但し、計算にあたって移動相 A 及び B に含まれる酢酸含量を無視) した $\Delta V(\%)$ 、②グラジエント測定 (0.5、1、2、4、6、8 及び 10 %/min)

で得られた各保持時間を用いて図 4 の様にして得られるべき乗定数 C 、③保持時間 $T(1)$ と比較した所、何れのポリペプチドにおいてもほぼ同じ値を示している (表 1)。

表 1 各種方法で算出された各種ポリペプチドに対するアセトニトリル臨界含量

ポリペプチド	アミノ酸 残基数	分子量	ΔV (%) 平均 \pm SD	べき乗定数 C	$T(1)$	非保持ピークの有 無から推定される 臨界含量範囲
Oxytocin	9	1007	10.7 \pm 1.2	11.0	11.0	10 - 20
Angiotensin II	8	1046	10.3 \pm 0.6	10.8	10.8	10 - 20
Neuromedin C	10	1120	8.3 \pm 1.2	9.3	9.3	0 - 5
[Tyr(PO ₃ H ₂) ⁴]-angiotensin II	8	1126	11.3 \pm 0.6	11.6	11.6	10 - 20
Isoleucyl-seryl-bradykinin	11	1260	10.7 \pm 1.2	11.7	11.6	5 - 10
Ovalbumin (323-339)	17	1774	5.9 \pm 1.2	5.1	5.0	0 - 5
ACTH (1-24)	24	2934	7.9 \pm 0.6	9.2	8.7	0 - 5
ANP (1-28)	28	3080	10.7 \pm 1.2	12.9	12.6	5 - 10
Amyloid β -protein (1-28)	28	3263	11.3 \pm 0.6	13.3	13.1	10 - 20
BNP-32	32	3464	7.6 \pm 1.8	9.3	9.1	0 - 5
Amyloid β -protein (1-38)	38	4132	20.9 \pm 0.6	22.0	21.6	20 - 30
Neuropeptide Y (NPY)	36	4272	25.1 \pm 1.2	26.7	26.3	20 - 30
Amyloid β -protein (1-40)	40	4330	22.7 \pm 1.2	24.3	23.9	20 - 30
Amyloid β -protein (1-42)	42	4514	24.4 \pm 1.8	25.9	25.5	20 - 30
Amyloid β -protein (1-43)	43	4615	24.7 \pm 0.6	26.0	25.6	20 - 30
Urocortin	40	4696	34.9 \pm 1.2	36.5	36.1	30 - 40
GRF	44	5040	22.7 \pm 1.2	24.1	23.7	20 - 30
CNP-53	53	5802	14.4 \pm 0.0	17.4	17.0	10 - 20
Insulin	51	5808	25.1 \pm 1.2	26.8	26.4	20 - 30
Midkine (60-121)	62	6789	5.9 \pm 1.2	8.3	8.0	0 - 5
CINC-1/gro	72	7845	24.0 \pm 0.0	25.5	25.0	20 - 30
PTH (1-84)	84	9425	21.6 \pm 0.0	23.3	22.9	20 - 30
Midkine	121	13240	8.9 \pm 0.6	12.0	11.5	5 - 10
Interferon- γ	143	17kD	29.5 \pm 0.6	32.5	32.0	20 - 30
Ovalbumin	385	45kD	38.8 \pm 1.8	40.9	40.1	40 - 50

更に、これらの値とアセトニトリル含量の異なるポリペプチド溶液を測定した際に確認出来る非保持ピークの有無から推定出来る臨界含量範囲と比較した場合、保持の弱いポリペプチドでは少し乖離がする場合も認められるが、大半のポリペプチドでは推定臨界含量範囲内に含まれていた。同様の結果は、アセトニトリル以外の有機溶媒 (エタノール、メタノール、酢酸) を用いた場合にも得られており、従って、前述した様な条件下で得られる $T(1)$ を、その有機溶媒の臨界含量 (X_i) として見做す事は妥当であり、最も簡便な方法であると考えられる。

更に、今回の結果は、ポリペプチド試料調製に汎用されている 50%アセトニトリル溶液が、ほぼ全てのポリペプチドの吸着能を喪失させ、定量的な取り扱いをする上で妥当な溶媒で有る事も示している。

一方、話が逸れるが、式 3 を用いて算出された k は、或るポリペプチドに対して有機溶

媒の種類に関わらずほぼ同じ値を示す事に加えて、ポリペプチドの分子量が大きくなるにつれて、 k_f が小さくなる傾向が認められており、分子量のより小さなポリペプチドが、カラム充填剤細孔内により深く入り込んでいる事も示されている²⁾。

5. ポリペプチドの吸着能の状態を表す臨界値 (k_f)

続いて、図 3 に示すポリペプチドの吸着能の状態を表す k_f 値について述べる。移動相及び試料溶液に用いる有機溶媒種が単独の場合、その臨界値は前述した臨界含量 (X_i) として表す事が出来るが、複数の有機溶媒を含む溶液を用いる場面には、臨界含量として表現する事は困難である。そこで、複数の有機溶媒を含む溶液中での各ポリペプチドの臨界値を表す為に考案されたのが k_f 値である。

例えば、アセトニトリル及びエタノールを共に含み、其其の含量の異なる urocortin 溶液を測定した際に認められるカラム非保持ピークの有無から、複数の有機溶媒を含む場合の吸着能の臨界線 ($k_f=1$) を確認したのが表 2 である。

表 2 試料溶液中アセトニトリル及びエタノール含量の異なる urocortin 溶液を測定した際に認められるカラムへの非保持ピークの面積値及び k_f 値

	試料溶液中 アセトニトリル 含量	試料溶液中エタノール含量									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
非保持ピーク 面積値	0	0	0	0	0	0	69,479	124,283	177,267	188,804	130,798
	10	0	0	0	0	88,019	230,550	268,011	293,100	148,695	-
	20	0	0	0	16,951	162,425	189,540	277,111	164,651	-	-
	30	0	0	93,965	136,457	220,466	195,184	213,015	-	-	-
	40	73,008	nt	nt	nt	nt	nt	-	-	-	-
k_f 値	0	0.00	0.22	0.44	0.67	0.89	1.11	1.33	1.56	1.78	2.00
	10	0.29	0.51	0.73	0.95	1.17	1.40	1.62	1.84	2.06	-
	20	0.57	0.79	1.02	1.24	1.46	1.68	1.90	2.13	-	-
	30	0.86	1.08	1.30	1.52	1.75	1.97	2.19	-	-	-
	40	1.14	nt	nt	nt	nt	nt	-	-	-	-

表 2 に示す有機溶媒の組み合わせ以外においても同様の結果が示されている事から、個々の有機溶媒は独立して urocortin の吸着能に影響を与えている事が判明した。これらの結果より、複数 (n) の有機溶媒を含む溶液中の urocortin の吸着能を表す式として図 3 に示す k_f 値が考案された。

実際に、urocortin の吸着能に対して、アセトニトリル及びエタノールが単独で示す臨界含量 (%) を、表 2 から其其 35 %、45 % と見做し、2 種の有機溶媒を含む溶液の k_f 値を算出した結果、 k_f 値が 1 となる線を境界線として急激に変化する事が表 2 に示す様に示されている。又、 k_f 値の妥当性を評価する為に、3 種の有機溶媒 (アセトニトリル、メタノール及び酢酸) を含む溶液中の urocortin を測定した結果においても、 k_f 値は同様の結果を示しており、複数の有機溶媒を含む溶液中の urocortin のカラム充填剤に対する吸着能は、 k_f 値が 1 となる点を臨界値として急激に変化する事が示されている²⁾。

この k_f 値を用いる事で図 3 に示す様にポリペプチドの吸着能の状態を表す事が可能と

なり、これにより複雑な溶液組成中でのポリペプチドの定量的な取り扱いを判断出来る事に加えて、測定条件についても評価する事が可能となる。

例えば、ポリペプチドが溶出される時の溶離液中の総有機溶媒含量から個々の有機溶媒含量を求め、各有機溶媒が各ペプチドに対して示す臨界含量 (X_i) を用いて k_f 値を計算すると、ポリペプチドは $k_f = 1$ (臨界値) を示す溶離液にてカラムから溶出されている事が示されている²⁾。

6. ペプチド吸着制御 LC (PAC-LC)

これ迄述べて来たポリペプチドの吸着能の変化は、取り扱い時の定量性の問題を引き起こすだけでなく、測定時のカラム非保持ピークの発生による定量性の問題も引き起こし、ポリペプチド定量を困難として来た。

そこで、ポリペプチドの吸着能の性質を利用した LC システム、ペプチド制御 LC (peptide adsorption-controlled-LC, PAC-LC) が高精度なポリペプチドの高感度定量の為に開発された^{2,3)}。

図 5 に示す通り、標準 LC に対する PAC-LC の特徴は、オートサンプラーからの流路に対してカラム直前で水系移動相を混合させるポンプが存在する事である。これにより、高有機溶媒含量溶液中で吸着能を失った状態 ($k_f > 1$) のポリペプチドを LC に大量導入した場合でも、ポリペプチド周辺の有機溶媒含量を強制的に低下させ得る事で、ポリペプチドの吸着能を瞬時に回復 ($k_f < 1$) させ、カラムへ全て保持させ得る事が可能となる。その後、グラジエント溶出法で作成された臨界値 ($k_f = 1$) を示す溶離液によって其々々 1 本の保持ピークのみとして溶出される。

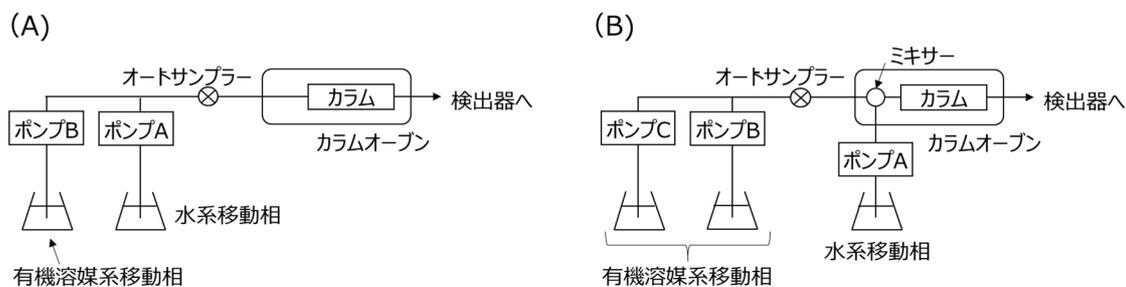


図 5 標準 LC (A) 及び PAC-LC (B)

つまり、PAC-LC を用いる場合、取り扱い時には高有機溶媒含量 ($k_f > 1$) の溶液を用いる事で、ポリペプチドの吸着を回避して定量性を担保しつつ、その様な高有機溶媒含量の試料を標準 LC に導入した場合に認められる非保持ピーク発生による測定精度及び感度の低下を回避した再現性の高い測定が可能で有る事を意味する。

実際に、アセトニトリル含量が異なる溶液中の urocortin を、カラムに保持する様に設定された条件下で測定した場合、試料溶液中のアセトニトリル含量に関わらず、カラムに保持した urocortin のピークのみが認められ、アセトニトリル含量が臨界値以上の

urocortin 溶液を測定して得られたカラムに保持した urocortin のピーク面積はほぼ同じ値を示している (図 6)。

又、試料中アセトニトリル含量及び urocortin 濃度の異なる溶液を 3 回繰り返し測定する事で、試料中アセトニトリルが測定精度に与える影響を評価した例を表 3 に示す。

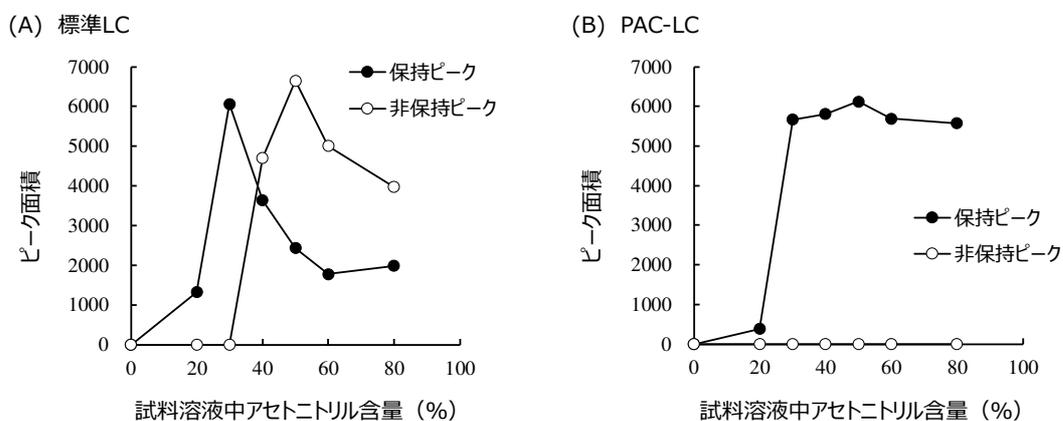


図 6 試料溶液中アセトニトリル含量の異なる urocortin 溶液を測定した場合に得られるカラム保持及び非保持 urocortin ピーク面積

表 3 試料中アセトニトリル含量の異なる urocortin を測定した時の測定精度

	試料中 アセトニトリル含 量 (%)	Urocortin濃度					
		0.1 nmol/L		1 nmol/L		10 nmol/L	
		平均 ピーク面積 (n=3)	変動係数 (%)	平均 ピーク面積 (n=3)	変動係数 (%)	平均 ピーク面積 (n=3)	変動係数 (%)
標準LC	0	200	64.8	238	63.4	17861	32.1
	20	1679	15.4	19004	18.1	226518	6.8
	30	2660	4.9	27910	4.0	263502	5.5
	40	1729	17.6	24817	44.3	153628	2.4
	50	994	20.9	8345	19.9	82437	5.8
	60	762	24.8	7511	7.4	67222	11.5
	80	748	37.4	5817	10.5	55178	7.2
	PAC-LC	0	84	15.8	614	26.5	43641
20		1656	7.9	20477	9.8	206180	1.4
30		2665	2.5	28394	4.9	254617	0.9
40		2900	1.8	28606	2.2	284122	3.0
50		3059	4.7	31331	4.6	274426	4.8
60		3077	5.6	30818	7.9	294642	0.7
80		3099	5.0	30882	4.6	285681	2.4

試料溶液中アセトニトリル含量が 0 % から 20 % 迄 ($k_f < 1$) の場合に得られるピーク面積は、LC システムに関係無く、導入前に urocortin が容器へ吸着している為に、臨界値

($k_f=1$) 付近であるアセトニトリル含量が 30 % の時に得られるピーク面積と比較して小さく、又、ピーク面積の変動係数 (%) は、殆どの場合で 15 % 以上を示している。この事は、容器への吸着が測定精度を低下させ得る大きな要因の一つで有る事を示している。

一方、試料溶液中アセトニトリル含量が 30 % 以上 ($k_f \geq 1$) の試料を PAC-LC を用いて測定した時に得られる urocortin のピーク面積は、ほぼ一定であり、ピーク面積の変動係数 (%) は、アセトニトリル含量に関わらず 10 % 以下である。又、得られたピーク面積値は濃度にも比例していた事から、高い測定精度での定量が可能で有る事を示している。

この様に本来定量的に取り扱っている試料を標準 LC にて測定した場合、アセトニトリル含量が 30 % の場合を除き、非保持ピークの発生によるピーク面積の減少が認められ、又、カラム保持ピークと非保持ピークの割合が不規則に変化する為にピーク面積の変動係数が高くなる場合が有る事が示されている。従って、標準 LC を用いる場合には、臨界値近辺の溶液を用いなければ精度の高い測定は出来ない事が分かる。

この様に、幅広い有機溶媒含量の試料溶液に対して高精度での測定を可能とする PAC-LC は、複数ペプチドの同時測定を行う場合において非常に強力なツールとなる。つまり、図 7 に示す様に、最も吸着能の高いポリペプチドに適した溶液を用いる事で全てのポリペプチドの吸着を回避した取り扱いが可能となる一方で、最も吸着能の低いポリペプチドに適した測定条件を設定する事で、全てのポリペプチドの再現性の高い測定が可能となる。又、夾雑成分や添加物等がポリペプチドの吸着能に影響を与える場合が有るが、PAC-LC では、取り扱い時の有機溶媒含量をより高めに設定しつつ測定条件をより保持し易い条件に設定する事で、こうした影響を容易に回避する事も出来る。

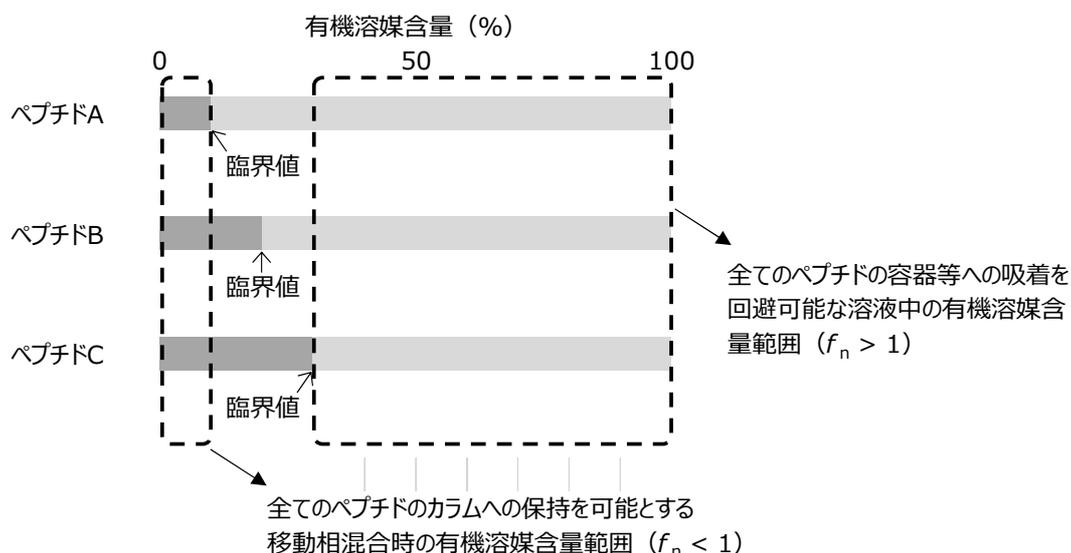


図 7 複数ポリペプチドの定量的な取り扱い及び測定を可能とする有機溶媒含量範囲

又、このような特徴を有する PAC-LC は、生体試料中濃度測定においては、除タンパク操作後の上清時又は固相抽出時の溶出液サンプルを乾固及び再溶解する事無く、そのまま

測定に供する事が可能となり、前処理操作の簡便化、時間の短縮、自動化等を可能とする。

更に、ポリペプチドの保持時間とグラジエント勾配との関係のべき乗則に基づくと、PAC-LC ポリペプチドをカラムに保持させ得る初期移動相混合比を維持し続けた場合、理論上無制限の試料導入が可能である。実際に、10 mL のペプチド溶液を導入した例では、グラジエント開始位置からの溶出時間及びピーク形状に変化は無く、導入量に比例したピーク面積が得られていた⁴⁾。従って、LC/MS 測定の場合ではマトリックス効果が認められない範囲で、導入量に比例した高感度化が可能となる。

一方で、これ迄述べて来た各有機溶媒が示す臨界含量 (X_c) 及び吸着能の状態を表す f_b 値を用いる事で、PAC-LC 条件の妥当性を以下の通りに評価する事が出来る。例えば、移動相 A 及び移動相 B の混合により生じる溶離液が示す f_b 値 ($= f_{AB}$) は、移動相 A 及び B の混合比が $\alpha_{AB}:1$ の場合、式 7 で表す事が出来る。

$$f_{AB} = f_A \cdot \alpha_{AB} / (\alpha_{AB} + 1) + f_B / (\alpha_{AB} + 1) \quad (7)$$

ここで、 f_A 及び f_B は、移動相 A 及び B が示す f_b 値を示す。

一方、移動相 B の流路の中を流れる試料溶液と移動相 A との混合により生じる溶離液が示す f_b 値 ($= f_{Asol}$) は、移動相 A 及び試料溶液の混合比が $\alpha_{Asol}:1$ の場合、試料溶液が示す f_b 値 ($= f_{sol}$) も用いて式 8 で表す事が出来る。

$$f_{Asol} = f_A \cdot \alpha_{Asol} / (\alpha_{Asol} + 1) + f_{sol} / (\alpha_{Asol} + 1) \quad (8)$$

この式 7 及び 8 から、 f_{AB} 及び $f_{Asol} = 1$ の時の α_{AB} 及び α_{Asol} は、其其式 9 及び 10 で表される。

$$\alpha_{AB} = (f_B - 1) / (1 - f_A) \quad (9)$$

$$\alpha_{Asol} = (f_{sol} - 1) / (1 - f_A) \quad (10)$$

PAC-LC に導入したポリペプチドをカラムに保持させる為には、式 7 及び 8 で求められる f_{AB} 及び f_{Asol} が共に 1 より小さい、つまり、式 9 及び 10 で求められる α_{AB} 及び α_{Asol} のうち、大きい値を示す α 値を採用すればよい事となる。つまり、移動相 A 及び B の混合溶液と、ポリペプチド溶液と移動相 A の混合溶液の何れもが、対象となるポリペプチドの臨界値より小さくなる為に、適切に保持される事となる。

実際に、或る測定条件下で 12 種のポリペプチド試料を測定した所、nociceptin 及び midkine 60-121 については上手く検量線が作成出来なかった為、前述の計算に従い、カラムに保持させ得る移動相 A の最小割合を算出した所、nociceptin 及び midkine 60-121 の測定に必要な移動相 A の割合は他のポリペプチドよりも高い値を示していた (表 4)。

表 4 移動相組成、試料溶液組成及び臨界含量を用いて算出した各ポリペプチドをカラムに保持させ得る移動相 A の割合

ポリペプチド	移動相A	移動相B			試料溶液		f_A	f_B	f_{sol}	Q_{AB}	Q_{Asol}	測定開始時に必要となる移動相Aの最小割合
	酢酸	アセトニトリル	メタノール	酢酸	アセトニトリル	酢酸						
Oxytocin	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.30	8.11	4.67	10.2	5.2	91%
Neuromedin C	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.36	9.81	5.53	13.8	7.1	93%
Isoleucyl-seryl-bradykinin	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.25	6.99	4.40	8.0	4.5	89%
Nociceptin	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.86	24.37	15.01	166.9	100.1	99%
ACTH (1-24)	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.33	9.36	5.86	12.5	7.3	93%
BNP-32	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.32	8.87	5.61	11.6	6.8	92%
NPY	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.09	2.66	1.92	1.8	1.0	64%
Amyloid β -protein (1-40)	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.10	2.88	2.11	2.1	1.2	68%
Urocortin	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.07	1.91	1.40	1.0	0.4	50%
GRF	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.10	2.85	2.13	2.1	1.3	68%
CNP-53	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.14	3.97	2.97	3.5	2.3	78%
Midkine (60-121)	3.8	70	15	15	48.1	3.8	0.38	10.47	6.39	15.3	8.7	94%

この時の測定で用いた初期の移動相混合比は A:B=95:5 であったことから、midkine 60-121 についても保持する事が考えられたが、ここでの計算に用いる臨界含量には保持が弱いポリペプチドほど大きな誤差が含まれる事、又、臨界値に近い移動相を用いた場合には、特に保持の弱いポリペプチドの場合、イソクラティック溶離で溶出される事もある為に、この計算で得られた値が絶対的なものではない事には注意が必要である。

以上の通り、有機溶媒によって惹起されるポリペプチドの吸着能の相転移現象を利用した PAC-LC は、標準 LC と比較して、高精度測定を可能とする試料中有機溶媒範囲が広く、且つ試料導入量に制限が無い事に加え、臨界値の異なる複数のポリペプチド測定においても高精度及び高感度な測定維持するが出来る長所を有しており、ポリペプチド定量において強力なツールとなりつつある。

7. 終りに

有機溶媒によって惹起されるポリペプチドの吸着能の変化を見出す事で、ポリペプチドの適切な取り扱い条件の妥当性を評価する事が可能となり、又、定量的な測定を実施可能となる PAC-LC が開発された。定量的に取り扱われたポリペプチド試料を PAC-LC で測定する事により、高精度及び高感度なペプチド定量をより簡便に実施出来る様になって来ており、更に、最近では、PAC-LC を用いた抗体医薬品定量も報告されている⁵⁾。

今後の課題としては、夾雑成分としてのポリペプチド群から微量の目的ポリペプチドを分離する為の前処理法や、より低濃度なポリペプチド群のみを網羅的に評価する為の前処理法の開発が挙げられる。これ迄にも様々な検討が実施されているが、ポリペプチド間の相互作用の強さが時に前処理時の目的ポリペプチドの回収を困難とする事が知られている⁶⁾。しかし、現在においても、様々な技術が常に進歩しており、こうした課題が解決される事で、更なる発展が期待出来る。今後、これらの技術の発展と共に PAC-LC が疾患やバイオマーカーに関する新規知見の獲得に役立つ事を期待したい。

引用文献

- 1) R. Goda, K. Sudo, Highly sensitive and quantitative analysis of polypeptides using a new gradient system based on an abrupt change in adsorption of polypeptide to the reversed-phase column packing. *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 1005-1015 (2007).
- 2) R. Goda, K. Sudo, Elution mechanism of polypeptides in reversed-phase liquid chromatography based on the critical threshold of organic solvent to induce abrupt change in adsorption capacity to the column packing. *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 81-91 (2008).
- 3) R. Goda, N. Kobayashi, Evaluation of peptide adsorption-controlled liquid chromatography-tandem mass spectrometric (PAC-LC-MS/MS) method for simple and simultaneous quantitation of amyloid β 1-38, 1-40, 1-42 and 1-43 peptides in dog cerebrospinal fluid. *J Chromatogr. B*, **895-896**, 137-145 (2012).
- 4) R. Goda, H. Masumoto, O. Okazaki., K. Sudo, Superiority of a new gradient system utilizing a critical threshold for the adsorption capacity of polypeptides to column packing when compared with a standard gradient system for the simultaneous and quantitative analysis of polypeptides. *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 857-866 (2008).
- 5) N. Hashii, Y. Tousaka, K. Arai, Y. Enoki, S. Fukuda, R. Goda, N. Inoue, M. Kawabata, K. Murata, M. Nakatsuji, T. Okuzono, T. Shigeyama, H. Tachiki, T. Yamaguchi, S. Yamane, M. Yamaoka, Y. Saito, A. Ishii-Watabe, Bioanalysis of therapeutic monoclonal antibody by peptide adsorption-controlled LC-MS., *Bioanalysis*, **13**, 265-276 (2021).
- 6) R. Goda, H. Masumoto, O. Okazaki., K. Sudo, Development of a pretreatment method for amyloid beta-protein analysis based on the effect of acetic acid on the dissolution of plasma polypeptides. *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 1279-1287 (2008).

<執筆略歴> 合田 竜弥 (Ryoya GODA)

1996年3月 東京大学大学院薬学系研究科薬学専攻修了
1997年4月 第一製薬株式会社代謝分析研究所
2007年4月 第一三共株式会社薬物動態研究所
2009年4月 博士(薬学) 東京大学(論文博士)
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」】

食品分析／Food Analysis

橋田 規／Tadashi KITTA

一般財団法人日本食品検査／Japan Food Inspection Corporation

(Received May 24, 2022; Accepted June 3, 2022)

要旨

食品分析に限らず「分析」と名の付くものには必ず分析対象（母集団）が存在する。食品分析の場合、母集団全体を分析に供すると人が食べるものが無くなるので、通常、母集団の一部を抜き出して標本を作製（サンプリング）し、更にその標本の一部を分析に供する。食品分析を難しくする要因としては、食品中で分析種が不均一に分布する事と食品マトリックスが複雑である事が挙げられる。従って、食品分析においては、適切なサンプリング法と分析法を選択する事が最も重要である。

本稿では、食品分析の実務を行う上で知っておきたい事柄、即ち、サンプリングの重要性、我が国の食品分析法の特徴、食品分析における抽出法の注意点、定量法の使い分けについて解説する。

キーワード サンプリング；Criteria アプローチ；QuEChERS 法；代替検量線法

1. 食品分析の目的

分析の対象となる食品の種類は多岐に渡り、日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）¹⁾ では、表 1 に示す通り 18 種類もの食品群に分類されている。記載された成分項目は、タンパク質、脂質などの一般成分、ナトリウム、亜鉛などの無機質、ビタミン A、葉酸などのビタミンなど 54 項目にも上る。これらの食品成分は健康の維持、増進を図る上で極めて重要であり、これらの基礎データは給食管理・食事制限を行う学校や病院、食事療法を必要とする一般家庭で用いられるほか、教育・研究・行政などで広く利用されている。

食品には健康の維持、増進に有効な成分だけでなく、健康に悪影響を与える可能性のあるハザード（危害要因）も含まれている。ハザードの代表例（表 2）としては、食品の生産過程で意図的に使用される農薬や食品添加物、意図せず食品に混入するカビ毒、異物などが有る。ハザードによって健康に悪影響が生じる確率とその程度の事をリスクと言い、リスクの大きさはハザードの毒性とハザードの体内への吸収量によって決まる。従って、食品中のハザードの量（濃度）を分析により決定する事は、ハザードの摂取量を推定する上で大変重要である。食品安全委員会は、食品中のハザードが人の健康に与える影響についてリスク評価（食品健康影響評価）を行い、厚生労働省、農林水産省、消費者庁などのリスク管理機関はその評価結果に基づき、農薬使用基準（平成十五年農林水産省・環境省

令第五号)、食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号) などの各種基準を定めている。又、リスク管理機関は規格基準への適合性を判定する為の分析法 (一般的に公定法と言われる) を公示し、この分析法により輸入される食品や市場に流通する食品を収去検査し、各種規格基準への適合性を判定している。

表 1 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂) における食品群及び収載食品数

食品群	食品数	食品群	食品数
穀類	205	魚介類	453
いも及びでん粉類	70	肉類	310
砂糖及び甘味類	30	卵類	23
豆類	108	乳類	59
種実類	46	油脂類	34
野菜類	401	菓子類	185
果実類	183	嗜好飲料類	61
きのこ類	55	調味料及び香辛料類	148
藻類	57	調理済み流通食品類	50
		合計	2,478

表 2 食品中のハザードの例

分類	ハザード
有害微生物等	サルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ、リステリア・モノサイトゲネス、腸管出血性大腸菌 O157、セレウス菌、薬剤耐性菌、ノロウイルス、異常プリオンタンパク質など
食品の生産過程で意図的に使用されるもの	食品添加物 (ソルビン酸、亜硝酸ナトリウムなど)、農薬 (アセフェート、アセタミプリドなど)、動物用医薬品 (テトラサイクリン、エンロフロキシシンなど)、飼料添加物など
自然毒	カビ毒 (アフラトキシン、パツリンなど)、海洋性自然毒 (下痢性貝毒、麻痺性貝毒、テトロドトキシンなど)、植物性自然毒 (シアン化合物、トロパンアルカロイド類など)
加工食品の製造過程で生じる汚染物質	アクリルアミド、トランス脂肪酸、グリシドール脂肪酸エステル、多環芳香族炭化水素類など
環境からの汚染物質	重金属 (カドミウム、鉛、六価クロムなど)、ダイオキシン類、パーフルオロ化合物など
物理的要因	物性 (餅、こんにやく入りゼリーなど)、異物 (石、虫、金属片など) など
その他	カフェイン、ビタミン A、健康食品、サプリメントなど

食品メーカーにおいても、原料の受入時や製品の出荷時に品質管理を目的として検査が行われているが、自社で分析する場合には必ずしも公定法を用いる必要はない為、低コスト且つ迅速簡便な分析法が使用されている。

この様に、食品分析は、食品成分の基礎データの取得、ハザードによる汚染実態の調

査、輸入食品・流通食品の監視指導、原料・製品の品質管理など様々な目的で行われている。分析者はその目的に応じて、日本の公定法、ISO 法、AOAC 法、業界基準法、自社開発法など多種多様な分析法の中から適切な分析法を選択しなければならない。

2. サンプルングの重要性

規格基準への適合性を判定する事を目的として分析を行う場合、抜き取り検査が行われる。即ち、個々の製品に対して適否の判定を行うのではなく、ロット (lot) 又はコンサインメント (consignment) の単位を検査の対象とする。抜き取り検査では、予め定めた方法に従ってサンプルング、縮分、均質化して試験室試料 (laboratory sample) を調製し、試験室試料から測定試料 (test portion) を分取して分析を行い、その結果に基づきロット又はコンサインメントの適否が判定される。ロットとは、一時に引き渡される食品のうち、原産地、生産者、品種、梱包業者、梱包形態、表示、荷主などの特徴から等しい条件下で生産されたものと見なせる集まりの事を言う²⁾。コンサインメントとは、一時に引き渡される食品の集まりの事を言い、複数のロットから成る場合も、ロットの一部である場合も有る²⁾。

輸入食品のモニタリング検査や命令検査においては、梱包形態、表示、荷主などの特徴が等しい食品の集まりに対して規格基準への適合性が判定されており、母集団の特性がどのように分布しているのか想定可能なロットに対する検査と解釈されている。その為、命令検査では、表 3 に示す様な統計学的に妥当と考えられるサンプルング法が設定されている。実際には、同じロットと見なされる製品 (貨物) の中に原産地や生産者が異なるものが混在する事が有り、この場合にはコンサインメントに対して規格基準への適合性が判定される事になる。コンサインメントの場合は、母集団の分布を想定する事が出来ない為、必ずしも既定のサンプルング法が統計学的に妥当な方法とは限らない。しかし、原産地や生産者を確認しロット毎に検査する手間、コストなどを勘案すると、コンサインメントに対しても現在のサンプルング法を一律に運用する事が妥当と考えられる。

日本に輸入される食品の多くは、輸出前に検査を行い規格基準への適合性を確認後、輸入されている。又、これらの市場に流通している食品の多くは、HACCP による工程管理に基づき製造され、食品メーカー、商社、量販店などで出荷時に検査され規格基準に適合した為に出荷されている。従って、この様に適切な品質管理の基で製造、出荷された食品を収去検査し、規格基準不適合 (違反) の判定を行う場合、その分析結果の妥当性を巡って紛争になる事が有る。通常は、分析法の妥当性確認と内部品質管理がなされているので、分析操作の過誤が発見される事は殆どなく、多くの場合、サンプルングに起因する誤差が原因であったと結論付けられる。現実的に母集団の分布が明らかにされる事は無く、本当にサンプルング誤差が原因であったかどうかは神のみぞ知る訳である。しかし、違反の判定をされた製品を扱う事業者には、回収、廃棄などで多大な経済的な損失が発生するので、最悪の場合、裁判沙汰となる可能性が有る。従って、分析者としては定められた通

りにサンプリングを行い、その記録を確実に残す事が重要となる。

表 3 命令検査（食品衛生法第 26 条第 3 項）におけるサンプリング法³⁾（一部抜粋）

	ロットの大きさ (N)	検体採取の為の開 梱数 (n)	検体採取量 (kg)	検体数 ^{※1}
1	≥ 1	1	0.3	1
2	≤ 50	2	0.5	1
	51 ~ 500	3	0.5	1
	501 ~ 3,200	5	0.5	1
	≥ 3,201	8	0.5	1
3	≤ 50	3	1 ^{※2}	1
	51 ~ 150	5	1 ^{※2}	1
	151 ~ 500	8	1 ^{※2}	1
	501 ~ 3,200	13	1 ^{※2}	1
	3,201 ~ 35,000	20	1 ^{※2}	1
	≥ 35,001	32	1 ^{※2}	1

※1 複数の検体について、1 検体でも基準値を超える場合は違反とする。

※2 乾燥えび、乾燥野菜、乾燥果実及び茶（抹茶を除く。）にあつては 0.3 とする。

3. 食品分析法の特徴

我が国で公示されている食品分析法の一般的な分析手順を図 1 に示した。水、緩衝液、アセトニトリル、メタノールなどの溶媒、又はこれらを混合した溶媒を用いて試料中の分析種を抽出し、固相抽出などで夾雑物を除去した後、GC-MS、LC-MS(MS/MS)などの分析機器で測定し、定性・定量を行う。

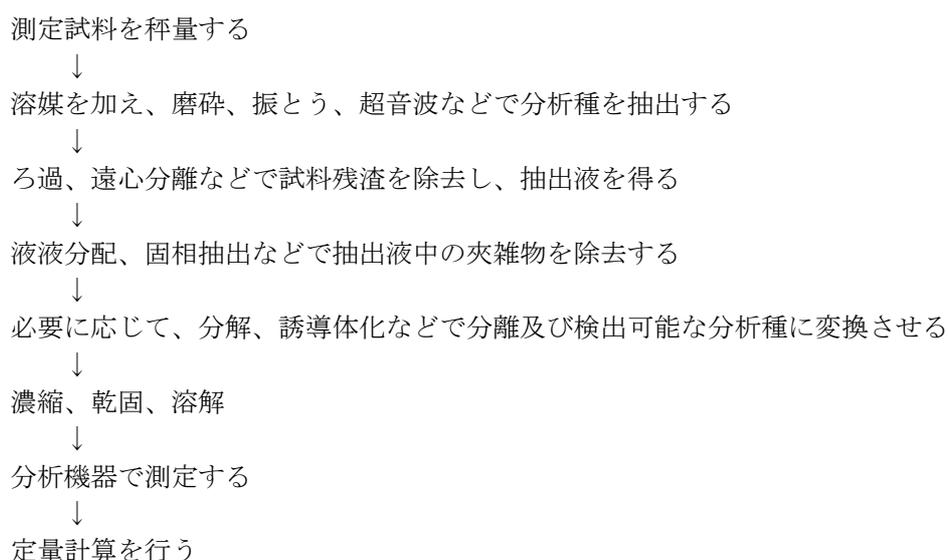


図 1 食品分析の一般的な分析手順

食品添加物、残留農薬、カビ毒、貝毒などのカテゴリーが異なっても概ね同様の分析手順が採られているが、特に抽出工程においてはカテゴリーによって採用される操作方法が大きく異なる（表 4）。

試料をフードミキサーで攪拌し均質化する際は、分析対象化合物が食品中で均質に分布している程、又、食品の組織が柔らかくて粉碎し易い程、より均質なホモジネート（試験室試料）を得る事が出来る。ホモジネートの均質性が高い場合、試料採取量が少なくても試料の代表性は損なわれないが、均質性が低い場合、試料採取量をより多くしなければ試料の代表性を担保する事が出来ない。従って、組織が固い穀類、豆類及び種実類を不均一に汚染するカビ毒の一種であるアフラトキシンの分析法では、試料採取量が他のカテゴリーよりも多く 50.0 g とされている。

食品添加物及び貝毒では、分析法が異なると抽出回数、抽出操作、定容操作が異なる。一方、残留農薬では、特に近年公示された分析法では、ホモジナイズによる 2 回抽出、吸引ろ過、定容操作有が基本的な手順として統一されている。カビ毒では、主に食品の表面付近を汚染するものである事、及び汚染される食品は乾燥品として流通しており、乾燥品に対して抽出操作を行っても抽出溶媒の液量は殆ど変化しない事から、1 回抽出、定容操作無が基本的な手順となっている。

表 4 カテゴリーの異なる分析法間での操作方法の比較

カテゴリー	食品添加物	残留農薬	カビ毒	貝毒
試験項目	L-アスコルビン酸 パルミチン酸エステル ⁴⁾	LC/MS 一斉試験 法 I ⁵⁾	総アフラトキシシン ⁶⁾	下痢性貝毒（オカダ酸群） ⁷⁾
対象食品	植物油、牛脂等	農産物	穀類、豆類及び種実類	二枚貝
抽出				
試料採取量	約 5 g	20.0 g	50.0 g	2.00 g
溶媒量	20 mL、15 mL	50 mL、20 mL	200 mL	9 mL、9 mL
抽出回数	2 回	2 回	1 回	2 回
抽出操作	振とう	ホモジナイズ	ホモジナイズ又は振とう	ホモジナイズ又はボルテックス
残渣除去操作	遠心分離	吸引ろ過	ろ過又は遠心分離	遠心分離
定容操作	有	有	無	有
精製	固相抽出	固相抽出	固相抽出（多機能カラム）	固相抽出
測定	LC-UV	LC-MS(MS/MS)	LC-FL	LC-MS/MS

又、表 5 に示した通り、カテゴリーによって、同等以上の性能（真度、精度など）をもつ分析法の使用が許されるもの、分析法の妥当性評価ガイドラインが示されているもの（後述する **Criteria** アプローチの事）、任意の分析法での結果に疑義が有る場合の最終判定を公定法で行う必要性が有るものなどの違いがある。その為、規格基準への適合性判定を目的として分析を行う際は、これらカテゴリーによる分析法の違いに注意を払い、分析法の選択、改良、妥当性評価を行う必要が有る。特に、残留農薬・動物用医薬品・飼料添加物のカテゴリーでは、厚生労働省から公示された分析法は妥当性確認されていないとの立場を取るため、公示分析法に従って分析する場合であっても、分析者（試験所）自らが妥当性確認を行った上で、その分析法を使用する必要が有る事に注意を要する。

表 5 日本の公示分析法の特徴

	同等以上の 分析法の使用	妥当性評価 ガイドライン	公定法で 最終判定	その他の特徴
食品添加物 ⁴⁾	○	×	○	
農薬・動物用医薬品・飼料 添加物 ^{5), 8)}	○	○	×	抽出法は変更不可 ⁹⁾
総アフラトキシン ⁶⁾	○	○	×	
アフラトキシン M1 ¹⁰⁾	×	×	○	
デオキシニバレノール ¹¹⁾	○	○	×	
パツリン ¹²⁾	○	×	×	
下痢性貝毒 ⁷⁾	—	○	×	分析法は例示
麻痺性貝毒 ¹³⁾	×	×	○	

分析法の性能基準を定め、その性能基準を満たす任意の分析法の採用を可能とする手法を **Criteria** アプローチと言う。国際食品規格の策定を行っているコーデックス委員会が、**Criteria** アプローチをコーデックス分析法に採用したことから、日本の公定法でも **Criteria** アプローチが採用されるようになった（表 5 の妥当性評価ガイドラインが○のもの）。表 6 に示す様に、コーデックス委員会では分析法をタイプ I～タイプ IV に分類しており、タンパク質、総脂質などの栄養成分関連の分析法の殆どがタイプ I、即ち分析法の定義自体により分析値を決定付けるもので、その分析項目の値が得られる唯一の方法とされている。コーデックス委員会が分析法をタイプ I に分類した食品/分析種の組合せでは、日本においても概ね独自に開発した分析法を用いる事は許されないため注意を要する。

表 6 コーデックス委員会における分析法の分類¹⁴⁾

分類	定義	分析法の例 ¹⁵⁾
タイプ I 定義法 (Defining Methods)	<ul style="list-style-type: none"> 分析法の定義自体により分析値を決定づけるもので、その分析項目の値が得られる唯一の方法 1つの食品/分析種の組合せについて1分析法のみ承認 	<ul style="list-style-type: none"> 小麦粉/タンパク質の滴定法 (Kjeldahl) 乳児用調製乳/総脂質の重量法 (Röse-Gottlieb)
タイプ II 参照法 (Reference Methods)	<ul style="list-style-type: none"> タイプ I が適用されていない場合にタイプ III の分析法の中から1つ選択 紛争や校正に使用される 1つの食品/分析種の組合せについて1分析法のみ承認 Criteria アプローチが採用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 全食品/アセスルファム K の HPLC 法 生落花生/総アフラトキシンのイムノアフィニティークラム法
タイプ III 代替承認法 (Alternative Approved Methods)	<ul style="list-style-type: none"> 室間共同実験による妥当性確認を実施済み 複数の方法を承認可能 Criteria アプローチが採用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 魚醬/pH の電位計 魚油/脂肪酸組成の GC 法
タイプ IV 暫定法 (Tentative Methods)	<ul style="list-style-type: none"> 室間共同実験による妥当性確認が未実施 	<ul style="list-style-type: none"> 活二枚貝/麻痺性貝毒のマウスアッセイ

4. 抽出法の注意点

海外では、試料中の農薬をアセトニトリルで振とう抽出し、分散固相抽出 (dispersive SPE) により精製を行う QuEChERS (キャッチャーズと発音する) 法を公定法として採用する国、地域が多い。そして、輸出時の検査で QuEChERS 法を用いた為に、本来、規格基準不適合 (違反) とするべき検体を規格基準適合とし、日本への入国時の検査で違反になった事例が散見される。実際に発生した輸入時の違反事例を題材に、見落としがちな抽出法の注意点を解説する。

事例 1 活鰻中のフェニトロチオン

フェニトロチオンは $\log P_{ow}$ 3.43 (20 °C)、水溶解度 19.0 mg/L (20 °C) の有機リン・有機硫黄系殺虫剤である¹⁶⁾。輸出向け活鰻を生産している或る国の検査機関では、QuEChERS 法が鰻の様に脂肪含量の多い食品から一部の農薬を抽出する事が困難である事を知らずに、活鰻の残留農薬の分析に QuEChERS 法を採用していた。この検査機関では、分析法の妥当性確認と内部品質管理に添加回収試験を行っていたが、添加回収試験では分析種の抽出効率の評価が出来ない事にも気付いていなかった。活鰻の組織中に浸透した農薬を抽出する為には、アセトン、アセトン及びヘキサン混液の様に脂肪を溶解し易い溶媒を用いて、脂肪と共に抽出する方法を採用しなければならない。又、妥当性確認の際、陽性試料を用いて抽出効率を評価しておく事が望ましいが、現実的に陽性試料を入手する事は困難である。従って、加温して融解させた脂肪に標準溶液を添加、均質化した後、再凝固させて疑似陽性試料を調製し、この試料を用いて抽出効率の確認を行うと良い。

事例 2 香辛料中のトリアゾホス

トリアゾホスは $\log P_{ow}$ 3.34 (20 °C)、水溶解度 39 mg/L (20 °C) の有機リン系殺虫剤である¹⁷⁾。香辛料の生産量が多い或る国の検査機関では、香辛料中の残留農薬の分析に QuEChERS 法を採用していた。この検査機関は、乾燥した試料中の農薬を抽出する為には予め試料に水を加えて膨潤させておかなければならない事を知らずに、試料を秤量した後、直ぐにアセトニトリルを加えて振とう抽出していた。その為に、違反検体を見逃した訳である。元々、QuEChERS 法は生鮮野菜・果実を対象として開発された分析法であるので、少なくとも生鮮状態での水分含量以上になる様に水戻しをしておく必要がある。農薬の種類によっては、試料に水を加えて長時間放置すると残留した農薬が分解する事が有るので、水を加えてから抽出する迄の時間を一定にする事が分析値の再現性を高める上で重要なポイントである。又、農薬の種類によって、分析値が最大になる放置時間が異なる事が知られているので、実際に圃場で使用されている農薬については最適な放置時間を検討しておく事が望ましい。添加回収試験では最適な放置時間を評価する事は出来ないのので、可能であれば、農薬散布後の休薬期間中に生鮮状態の香辛料を採取して陽性試料を確保しておくが良い。

比較的、安定性の高い分析種においては、上述した通り、マトリックスと共に分析種を抽出可能な抽出溶媒を選択する事、試料を抽出可能な状態に調製する事、陽性試料又は疑似陽性試料を用いて抽出効率を評価しておく事が、抽出を成功させる重要なポイントである。

5. 定量法の使い分け

検量線による定量法には、絶対検量線法、代替検量線法、内標準法、標準添加法などが用いられる。回収率の良否、マトリックス効果の有無などの状況に応じて、適切な定量法を選択しなければならない。何れの定量法においても、検量線の直線性が得られる範囲、検量線の決定係数、定量上限、定量下限、検出限界などは予め確認しておく必要がある。

絶対検量線法は、定量分析において最も広く用いられている手法である。GC や LC などのクロマトグラフィーにおいては、原点を含めず回帰式を作成する。分析法の妥当性確認を行う際は、定量する濃度に対して 0 %~150 %又は 50 %~150 %を検量線の範囲として 6 濃度以上の検量点を設け、其々等間隔に配置する¹⁸⁾。ルーチン分析においては、必要に応じて検量点の数を減らしても良い。各検量点の重心付近が不確かさの大きさが最小になる為、検量線の範囲を超えた場合には、高濃度側の検量点を追加するよりも、重心付近の濃度になる様に希釈して測定する方が定量値の不確かさは小さくなる。分析機器に LC-MS(MS/MS)を用いる場合には、固相抽出などにより精製操作を施しても十分にマトリックス効果を抑制する事が出来ない事が有る。その時は、マトリックス効果を補正する事を

目的として、マトリックス添加標準溶液による絶対検量線（マトリックス検量線）を用いる。マトリックス検量線は、脂溶性貝毒¹⁹⁾や麻痺性貝毒²⁰⁾の LC-MS(MS/MS)法においては一般的な手法である。

代替検量線法は、標準物質が市販されていない又は標準物質が入手し難い分析種が存在する場合に用いられる手法である。代替検量線は、分子骨格及び物理化学的性質に与える影響が大きい官能基が共通する化合物群内で用いる事が出来る。この様な化合物群に属する分析種では、LC-MS(MS/MS)の感度を左右するインターフェイス・イオン化部（ガス流量、温度、電圧など）の最適条件がほぼ一致する為である。Yessotoxine (YTX) 群の定量分析では、標準品が市販されていない homo-YTX、45-OH-YTX 及び 45-OH-homo-YTX の定量に、YTX の検量線を用いた事例¹⁹⁾が知られている。LC-ESI-MS(MS/MS)で代替検量線法を採用する際は、イオン源に導入される移動相の有機溶媒比率が高い程、イオン化効率が高まる事に注意を要する。従って、HPLC の移動相条件にはイソクラティック溶離が望ましいが、グラジエント溶離を用いなければならない場合は、代替検量線を適用する分析種の保持時間に近い分析種の検量線を選択するなどの検討が必要となる。

内標準法は、絶対検量線法で十分な回収率が得られない場合（70 %未満）に採用される手法である。試料に一定量の内標準物質である安定同位体標識標準物質を添加して分析し、試験溶液を調製する。検量線用標準溶液にも一定量の内標準物質を添加しておき、分析種と内標準物質何れも検出可能な条件で測定を行う。分析種と内標準物質の強度比を用いて回帰式を作成する。特に十分な回収率が得られ難い動物用医薬品では、内標準法が使用される頻度が高い。内標準法では、内標準物質の回収率は 40 %以上得られなければならない。内標準物質の回収率が 40 %未満の場合には、40 %以上の回収率が得られる分析法を構築する。標識に用いる安定同位体には、主に重水素 (D) と炭素 13 (¹³C) のものが市販されているが、D では分析種と内標準物質の保持時間がずれる為、¹³C を用いた方が良い。但し、¹³C を用いた場合、¹³C で置換された数が少ないと、分析種の安定同位体と内標準物質の *m/z* が一致して内標準法が使えない事が有る。その為、内標準法を採用する場合には、分析種の同位体パターンを確認し、安定同位体の影響が殆どない数の ¹³C で置換された標準品を入手する必要がある。

標準添加法は、海外では一般的に用いられている手法である。標準品を一定濃度添加した数点の試料と無添加の試料を同時に分析して回帰式を作成し、その x 軸切片を定量値とする。通常、十分な回収率が得られない場合には内標準法が用いられるが、安定同位体標識標準物質は高価である為、特に東南アジアでは内標準法の代わりに標準添加法が用いられる事が多い。又、安定性が低い為十分な回収率が得られない分析種では、簡易、迅速な抽出、精製のみで測定せざるを得ない事が有るが、その様な場合、標準添加法は有効な定量法となる。

6. おわりに

食品分析を行う上で知っておきたいサンプリングの重要性、食品分析法の特徴、抽出法の注意点、定量法の使い分けについて解説した。分析実務の参考になれば幸いである。

引用文献

- 1) 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂), 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会 (2020).
- 2) Recommended Methods of Sampling for the Determination of Pesticide Residues for Compliance with MRLs CAC/GL 33-1999, Codex Alimentarius Commission (1999).
- 3) 食品衛生法第 26 条第 3 項に基づく検査命令の実施について (薬生食輸発 0330 第 1 号) 別表 1 試験品採取の方法
- 4) 食品中の食品添加物分析法について (平成 12 年 3 月 30 日付け衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知) 別添 第 2 版食品中の食品添加物分析法
- 5) 食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号)
- 6) 総アフラトキシンの試験法について (平成 23 年 8 月 16 日付け食安発 0816 第 1 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 7) 下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について (平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 3 号・食安監発 0306 第 1 号厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査・監視安全課長連名通知)
- 8) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について (平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 9) 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について (食安発 1224 第 1 号平成 22 年 12 月 24 日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部長別紙 1)
- 10) 乳に含まれるアフラトキシニンM1 の試験法について (平成 27 年 7 月 23 日付け食安発 0723 第 5 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 11) 小麦中のデオキシニバレノール試験法について (令和 3 年 9 月 30 日付け生食発 0930 第 1 号厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知)
- 12) 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について (平成 15 年 11 月 26 日付け食安基発第 1126001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 13) 貝毒の検査法等について (昭和 55 年 7 月 1 日付け環乳第 30 号厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知) 別添 麻痺性貝毒検査法
- 14) Codex Alimentarius Commission – Procedural Manual. 27 ed, p75, FAO (2019).
- 15) Recommended Methods of Analysis and Sampling CXS 234-1999, Codex

Alimentarius Commission (2019).

- 16) 水質汚濁に係る登録基準の設定に関する資料 フェニトロチオン (MEP)
<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/MEP.pdf> (最終アクセス 2022 年 5 月 20 日)
- 17) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 農薬・動物用医薬品部会報告について トリアゾホス
<https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000023q7g-att/2r98520000023qkz.pdf>
(最終アクセス 2022 年 5 月 20 日)
- 18) Michael Thompson, Stephen L. R. Ellison, Roger Wood, *Pure Appl. Chem.*, **74**, p. 846 (2002).
- 19) EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS Version 5, European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (2015).
- 20) A. D. Turner, et al., *J. AOAC Int.*, **103**, 533-562 (2020).

<執筆者略歴> 橘田 規 (Tadashi KITTA)

- ・ 化学工業メーカーで品質管理業務などを経験した後、財団法人日本冷凍食品検査協会（現在の一般財団法人日本食品検査）に入会、理化学試験業務、試験法開発業務に従事。事業本部試験部門 副部長。
- ・ 分析士資格：LC 分析士二段、LC/MS 分析士四段。



【新役員紹介】

東洋合成工業と私の紹介

加藤幸一郎 / Koichiro KATO

東洋合成工業株式会社 / Toyo Gosei Co., Ltd.

(Received May 20, 2022 ; Accepted May 24, 2022)

キーワード 高純度 ; 感光材 ; 微量分析

この度、LC 研究懇談会の運営委員心得と成りました東洋合成工業株式会社感光材研究所技術革新グループの加藤幸一郎と申します。LC 研究懇談会の委員長の中村先生より、本電子ジャーナルへ寄稿する機会を賜りましたので、僭越ながら弊社及び私の紹介を致します。

東洋合成工業株式会社の紹介

東洋合成工業は 1954 年に創業した日本アセチレン化学工業株式会社を前身とし、麻酔薬などの医薬品用化学製品の製造と精製を行って 5 年後に東洋合成工業株式会社へと社名を改

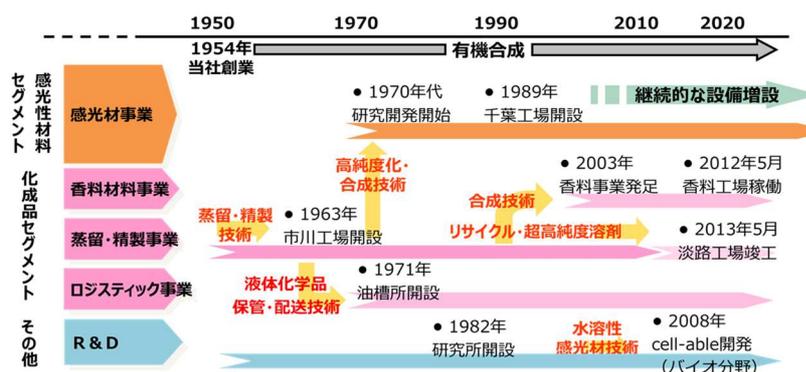


図 1 東洋合成工業株式会社の沿革

め、輸入合成繊維原料の蒸留精製によって成長しました。1970 年代の日本の電子デバイス産業へのシフトに伴って、半導体製造に欠かせないフォトレジストに含まれる感光材の研究開発に着手し、感光材事業が主力事業と成りました (図 1)。現在の弊社は、感光材事業に加えて合成と蒸留精製をコア技術とした化成品事業、ロジスティック事業で「お客様に提供する価値」として、製品に留まらず開発から販売迄の全ての工程の高品質化に取り組んでおります。

当社感光材事業の紹介

続いて、当社の主力事業である感光材事業についてご紹介致します。当社では半導体やフラットパネルディスプレイ (flat panel display, FPD) 製造のリソグラフィ工程に使用されるフォトレジストのキーマテリアルとなる感光材を製造販売しております。フォトリソグ

ラフィ工程は、シリコン基板等の表面に塗布したフォトレジストに、原板となるフォトマスクを介して光を照射する事で基板上に電子回路パターンを描写する工程になります(図 2)。

この工程は半導体の微細化を実現し、高性能化に寄与する重要なプロセスになります。

弊社の感光材事業は、ナフトキノンジアジドを用いた g 線、i 線のポジ型レジスト用感光材やビズアジド型のネガ型レジスト用感光材に始まり、半導体の微細化の要求に応じて

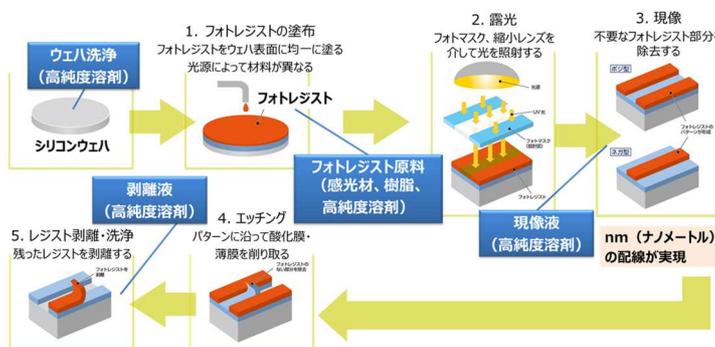


図 2 フォトリソグラフィの模式図

化学増幅型レジスト用の光酸発生剤 (photo acid generator, PAG) を主力に KrF、ArF、更には EUV (extreme ultraviolet, 極端紫外線) 向けのレジスト材料を製造して参りました。現在は 20 nm 以下のパターン寸法を求められる領域に到達しており、極めて僅かな不純物がデバイスの欠陥になるリスクとなる為、高度な高純度化技術と徹底した管理体制によって不純物レベル ppb から ppt となる高品質な製品を提供しております。

自己紹介

大学では光触媒材料と炭素材料をキーワードに研究しておりましたが、既存事業の強化に加えて、ライフサイエンス、ナノテクノロジー、エネルギー分野をキーワードに有機合成以外の技術分野の人材を積極的に取り入れて、新規事業創出する方針に賛同して入社致しました。入社後、新規事業創出を目指した研究開発部門に所属して開発品の分析及び物性評価手法の開発を行っておりましたが、分析に関わる業務を通して高性能な装置を用いた分析及び解析に魅了され、現在の分析部門へ昨年 9 月に異動致しました。

担当業務紹介

前述の通り、半導体関連の製品には高純度のニーズが日々増しており、弊社ではそのニーズに応えるべく製品の高純度化技術の開発と LC-MS や ICP-MS



図 3 左) ICP-MS8900 (Agilent 社製)

右) 6530C Q-TOF LC/MS システム (Agilent 社製)

等の高感度・高分解能の装置を筆頭とする様々な分析装置を用いた微量不純物分析技術の

向上を行っております (図 3)。私の所属する技術革新グループの分析部門では、自社製品の品質の向上と安定化への貢献を使命の一つとし、製品中の不純物同定、及び定量分析技術の向上に努めております。業務の具体例は以下の通りです。

- ・ 開発品に含まれる微量不純物を LC-QTOF/MS を用いた精密質量分析結果と反応機構より推定し、多変量解析を用いた生成量の反応条件依存性分析による合成条件改良。
- ・ 化成品事業の高純度溶媒に含まれる微量金属不純物を高精度に ppt レベルの定量をすすめる分析条件の開発を通じて製品の高品質化と安定供給への貢献。

LC 研究懇談会への入会の切っ掛けは先輩社員による紹介を戴いた事ですが、分析の専門家を目指して知識を習得するには最適と考えております。LC 研究懇談会で得た知識を参考に LC/MS 分析の業務 (図 4) を行う等、日々精進しております。

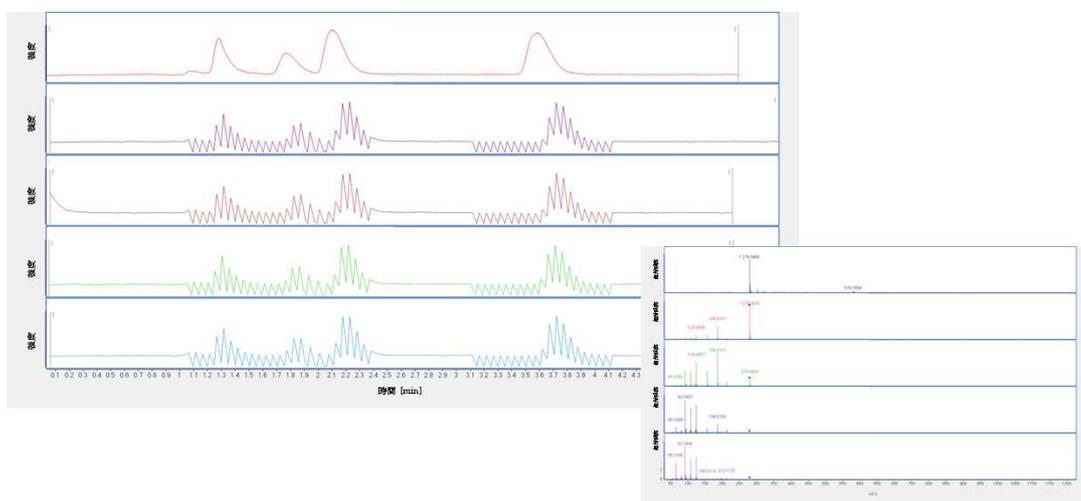


図 4 LC/MS 分析一例

終りに

以上、弊社及び私が所属する感光材研究所の紹介をさせて頂きました。弊社は有機合成技術と精製技術をコアとした研究開発と分析技術により、厳しい品質を求められる半導体産業に製品を提供しております。グローバルニッチトップ企業の研究員として世界の技術革新を支え続ける為に、LC 研究懇談会でも知識の習得を真摯に取り組んで参りたい所存です。

最後に成りますが、この度は本ジャーナルへ投稿する機会を頂戴し、誠に有難う御座いました。中村 洋先生始め、編集委員の皆様には深く御礼申し上げます。

<執筆者略歴> 加藤幸一郎 (Koichiro KATO)

- 2014 年 中央大学工学部応用化学科卒業
2016 年 北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科マテリアルサイエンス専攻修了
同年 東洋合成工業株式会社入社
感光材研究所先進技術研究グループにて
硬化性樹脂組成物の物性評価等に従事
2021 年 技術革新グループにて、SEC 及び、LC/MS、ICP-MS による定量分析・定性分析等に従事、現在に至る。



液体クロマトグラフィー研究懇談会・運営委員心得
分析士資格：LC/MS 分析士初段取得予定
趣味：料理
特技：Excel

[新役員紹介]

LC 研究懇談会准役員に就任して

坂本和則 / Kazunori SAKAMOTO

関東化学株式会社 / KANTO CHEMICAL CO., INC.

(Received May 11, 2022 ; Accepted May 12, 2022)

2022 年 3 月より、入会及び准役員に就任させて頂きました関東化学の坂本と申します。私の「液体クロマトグラフィー」との初めての出会いは大学生の時、研究テーマでイオンクロマトグラフィーによる水試料中のハロ酢酸の分析に取り組んだ事でした。当時を振り返ってみると、マニュアル通りの抽出方法・測定条件のみを行っていた為、流れ作業の様になってしまい、機器トラブルの際にも先生・先輩方に頼ってばかりであった為、奥深さを知る前に卒業してしまっただ事を思い返します。入社後も営業職に従事していた為、実務を経験する事無く現在に至っていますが、試薬を通じて LC 関連製品の販売に携わっている事を含む「液体クロマトグラフィー」との付き合いは長く、今後も末永く向き合っていきたいと思っています。

近年は LC/MS の普及に伴い、分析システムの高感度化が進んでおり、入社以来 LC 溶媒を売り歩いて来た営業の立場でも、試薬の「高純度化と保証項目の追加」の必要性を身に染みるほど感じていました。それら要望に対して弊社では、数年前迄は保証していなかった項目も多数増えており、溶媒中のパーティクル（微粒子）、金属不純物、PFOS・PFOA 試験適合性と言った追加保証など、ニーズに応じて適応可能な範囲を拡大しています。

LC 研究懇談会への入会は、基礎知識を一から学ばせて頂ける貴重な機会とっております。私自身の勉強の場として活用させて頂くのみならず、試薬メーカーとして本研究懇談会のお力になれる様、微力ながら努めて参りたいと思います。

< 執筆者略歴 > 坂本和則 (Kazunori SAKAMOTO)

- ・ 2011 年 日本大学理工学部物質応用化学科卒業、同年関東化学株式会社入社、入社以来技術営業に従事。現在、試薬学術部 学術一課に所属。
- ・ 分析士資格：無し。LC 分析士初段を取得予定。



【団体会員紹介】

日立ハイテクサイエンスと分析装置
Hitachi High-Tech Science Corporation
and Its Analytical Systems

清水克敏/ Katsutoshi SHIMIZU

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

(Received May 19, 2022 ; Accepted May 23, 2022)

キーワード HPLC ; アミノ酸分析計 ; リン酸フェニルヒドラジン法 ; 糖類

1. 日立ハイテクサイエンスについて

日立ハイテクグループは、「ハイテクプロセスをシンプルに」という企業ビジョンを掲げ、「私たちは、最先端分野でのお客様の飛躍と成長をお手伝いします」をミッションとして、ナノテクノロジー・ソリューション、アナリティカル・ソリューション、インダストリアル・ソリューションの3つのセグメントにおいて事業を展開しています。筆者が所属する日立ハイテクサイエンスは、日立ハイテクグループの分析計測装置メーカーです。図1に示す沿革の様に、2013年に日立ハイテクノロジーズ（現:日立ハイテク）とエスアイアイ・ナノテクノロジーが一つに成り、長い歴史の中で様々な技術や知見を継承し、表面分析、元素・物性分析、分光・分離分析などの各領域で製品やソリューションを提供しています。

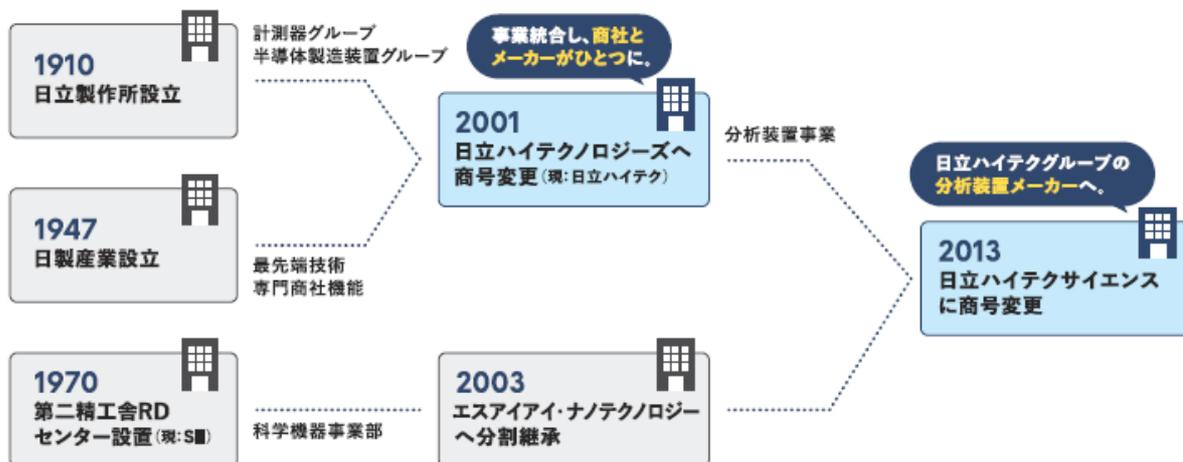


図1 日立ハイテクサイエンスの沿革

2. 日立ハイテクサイエンスの分析装置

日立ハイテクサイエンスでは静岡県富士小山事業所と、茨城県那珂事業所の 2 つを製造拠点とし、HPLC 装置を含めた図 2 に示す様な製品を主に生産しています。

試料観察熱分析 Real View[®]を機能強化した示差熱熱量同時測定装置 NEXTA[®] STA や、リチウムイオン二次電池や燃料電池で課題とされる 20 μm 級の微小な金属異物などを自動で高速検出、元素同定する検査装置の X 線異物解析装置 EA8000A、偏光ゼーマン原子吸光光度計 ZA3000 シリーズなど、様々な製品を通じて広がる事業領域での最先端の観察、検査ニーズにお応えしています。



図 2 日立ハイテクサイエンスの主な生産品 (2022 年 3 月現在)

3. HPLC 装置とアミノ酸分析計

3.1 HPLC 装置

日立では、1970 年代に HPLC 向けにポリマー充填剤開発を進め、日立ゲル#3000 シリーズと共に、最初の HPLC 装置である 634 形高速液体クロマトグラフを上市しました。ポンプはシングルプランジャー、検出波長は 254 nm の 1 波長固定と言う単純な装置でした。以降、貴重で微量なサンプル分析の増加や迅速なサンプル処理などに対応した様々な機能が HPLC 装置に求められており、現在ではそれらに応える日立の HPLC 装置として、Chromaster[®] シリーズが旗艦機種として幅広く使用されています。Chromaster[®]は、基本性能の向上、簡単操作と容易なメンテナンス、頑健性の確保と言った HPLC 装置に求められている性能、機能を搭載しています。

ここでは、Chromaster[®]シリーズの応用例としてポストカラム誘導体化法による糖類の分析例を紹介します。糖類は特異的な紫外・可視吸収や蛍光をもたず、HPLC では示差屈折率検出器或いはプレカラム誘導体化法、ポストカラム誘導体化法が用いられています。日立では、誘導体化

試薬としてリン酸フェニルヒドラジンを用いました。リン酸フェニルヒドラジンは糖類の還元末端或いは非還元糖のカルボニル基と反応して蛍光を発する為、糖類を選択的に検出する事が可能です。リン酸フェニルヒドラジン法で測定したシステムを図 3 に示します。

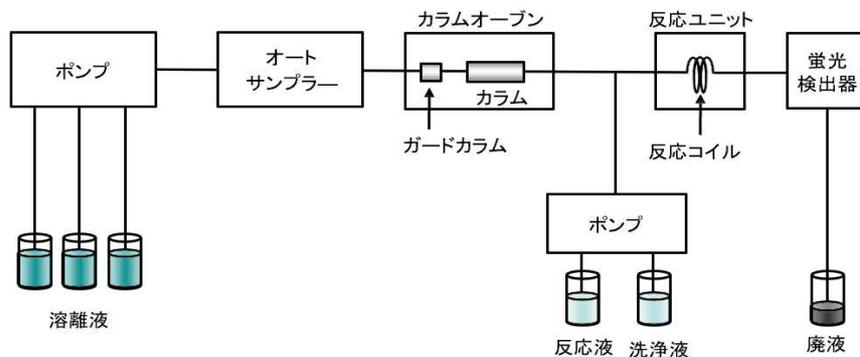


図 3 リン酸フェニルヒドラジン法による糖類の分析システム

検出器に蛍光検出器を用いる事により、示差屈折率検出法と比較して高感度な分析が可能です。又、グラジエント溶離により、高分離分析が実現出来ます。図 4 と図 5 に、糖類の標準試料とビール中の糖類のクロマトグラムを示します。

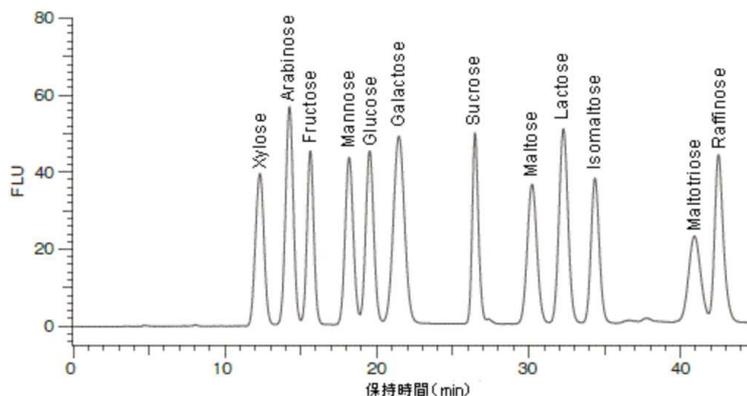


図 4 糖類標準試料のクロマトグラム

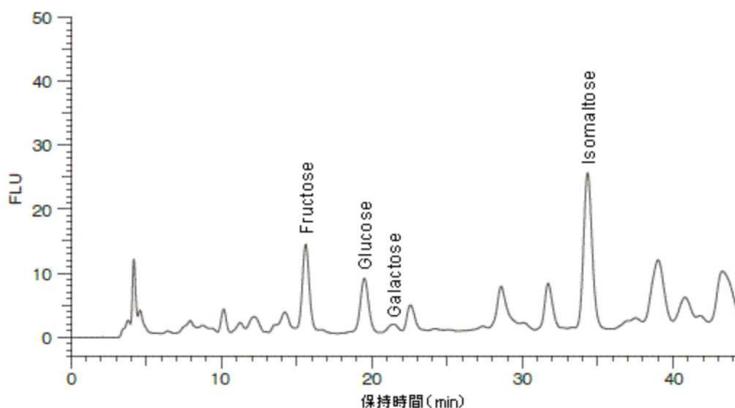


図 5 ビール中糖類のクロマトグラム

3.2 アミノ酸分析計

835 形日立高速アミノ酸分析計 (LC 研究懇談会「液体クロマトグラフィー科学遺産」第 3 号に認定) を 1977 年に上市して以降、1986 年 L-8500 形、1997 年 L-8800 形、2005 年 L-8900 形を発表し、2017 年、現在の LA8080 (図 6) を開発しました。これら装置の測定原理は、Moore 博士らのニンヒドリン法そのままです。クエン酸塩緩衝液の溶離液は、カラム再生液の 1 本を含めて試薬ボックスに 6 本まで載せる事が出来ます。タンパク質加水分解物であるアミノ酸約 20 成分の分析法にはナトリウム系緩衝液を、生体液由来のアミノ酸約 40 成分にはリチウム系緩衝液を用い、ステップワイズ溶離法又はグラジエント溶離法により分離します。後者のリチウム系緩衝液は溶出能力が比較的穏やかであり、保持時間や分離度の微妙な調整が出来る特長があります。

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

各成分 2 nmol を注入して得られたタンパク質加水分解物分析法 (カラム温度 57°C) の場合、イソロイシンとロイシンの分離度は 1.2 以上、SN 比 2 でアスパラギン酸の検出限界 2.5 pmol 以下、グリシンとヒスチジンのピーク面積再現性は RSD は 1.0 %以下の結果でした。図 7 に、LA8080 による高分離タンパク質加水分解物分析法のクロマトグラムを示します。



図 6 LA8080 高速アミノ酸分析計 AminoSAAYA™

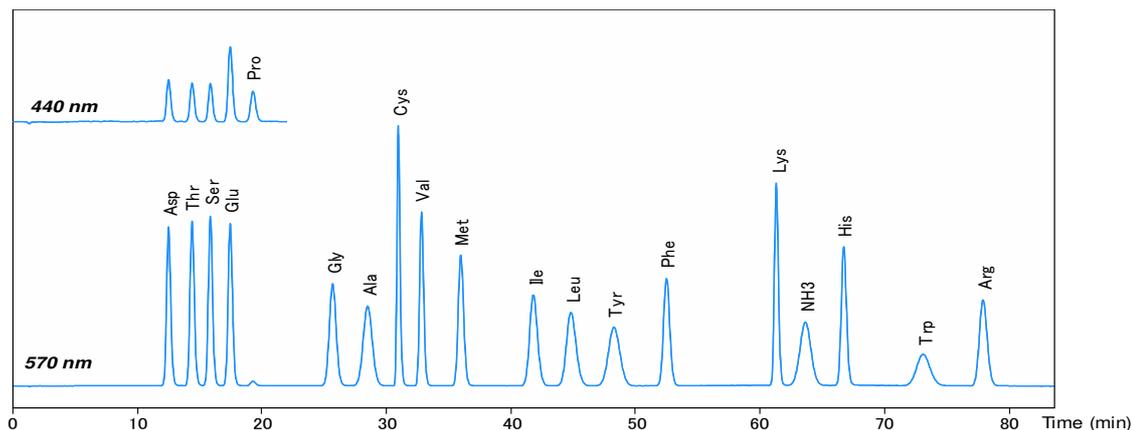


図 7 LA8080 による高分離タンパク質加水分解物分析法のクロマトグラム

4. 終わりに

ここ迄、弊社の概要と分析装置についてご紹介しました。日立は HPLC の長い歴史の中で様々な製品を開発して来ました。今後も日立は、HPLC 用のハードウェア、データ処理ソフトウェア、及びカラム技術の改良、開発に取り組んで参ります。最後になりますが、今回 LC 研究懇談会の中村 洋先生に投稿の機会を頂き、誠に有り難うございました。LC 研究懇談会の更なる発展を心よりお祈り申し上げます。

<執筆者紹介> 清水克敏 (Katsutoshi SHIMIZU)

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



[団体会員紹介]

ウォーターズの LC システムとカラム/

Waters LC Systems and Analytical Columns

島崎裕紀 / Youki SHIMAZAKI

日本ウォーターズ株式会社 / Nihon Waters K. K.

(Receive May 19, 2022 ; Accepted May 23, 2022)

1. ウォーターズの略歴

ウォーターズは、「Deliver benefit」というポリシーに基づいて 60 年以上に渡りクロマトグラフィー、質量分析、及び熱分析の分野でイノベーションを続けて来ました。新しい医薬品の探索、世界の食品及び飲料水の安全性の確認、製造中の化学物質の真正性の確認など、当社は何千ものお客様と協力して世界を変えています。

世界中に 7,800 名を超える従業員を擁するウォーターズは、14 の製造施設を含む 35 か国に支社を構え、100 を超える国々で製品を販売しています。その原点は 1958 年に遡ります。

創業者の Jim Waters (1925/10/7~2021/5/17) はマサチューセッツ州フランミンガムの警察署地下にオフィスを構え、分析機器の製作を始めました。その後、ダウ・ケミカル社との協働により GPC100 液体クロマトグラフを発売して以来、LC 業界のリードカンパニーとして新技術を提供して参りました。その一部を年表として纏めました。因みに、日本ウォーターズは 1973 年に設立され、来年で 50 周年を迎えます。



図 1 ウォーターズ主力製品の年表

2. ウォーターズの LC システム

ウォーターズは 1963 年に GPC システムを市販して以降、LC 業界のリーダーシップを

執って参りましたが、そのポジションを決定付けた製品として Alliance HPLC システムが挙げられます。1996 年の発売以降、全世界で 7 万台以上・国内でも累計 7,000 台以上販売しています。Alliance システムが世界的なゴールドスタンダードとして受け入れられている理由として「安定性」、「再現性」、「メンテナンス性」、「拡張性」が評価されている為と認識しています。この、送液の再現性については、ウォーターズ製品としてのオリジナリティが寄与しています。Alliance システムはポンプヘッドの 2 か所のプランジャーが独立に制御されています。一般的なダブルプランジャー式の LC ポンプは 2 本のプランジャーが 1 つのギアやカムで制御されており、これらと比較すると独立制御のプランジャーはより小さい脈流を実現します。そして、この機構は後に開発された ACQUITY UPLC やその後続の ACQUITY Arc、Arc HPLC にも継承されています。

続く 2004 年に ACQUITY UPLC (ultra performance LC) を発売し、従来の HPLC よりも更なる高速・高分離を求める世界中の科学者に貢献しました。そして暫くは Alliance と ACQUITY がウォーターズの主力 LC システムでしたが、2020 年に 24 年振りの新モデル HPLC として Arc HPLC システムを、2021 年にバイオイナート・低吸着 LC として ACQUITY Premier システムを続けざまに発売しました。

このうち Premier システムは、後述する Premier カラムと共通の表面処理を施した部材を使用する事で、サンプルの吸着やキャリーオーバーを抑え、酸性ペプチド・オリゴ核酸・リン酸化合物などの金属吸着し易いサンプルに対して感度・定量性の向上、データ品質の改善を提供します。

高分子分析への需要から 60 年前に GPC システムを、分析対象の多様化・複雑化や LC/MS の台頭に合わせて UPLC システムを、そして従来の UPLC では困難な分析を達成する為に Premier システムを、と言った風に、ウォーターズは時流に沿った市場のニーズにお応え出来る様、LC 業界のパイオニアとして率先して新技術を提供しています。

3. Waters の LC カラム

1973 年に μ Bondapak を発売して以来、多様化・複雑化する分析への要請に応える為に、常に新しいカラムを開発して参りました。特徴的なカラムを開発して参りましたが、特にクロマトグラファーに対してインパクトを与えた 2 つのカラム製品について紹介させていただきます。

一つ目はハイブリッドシリカゲルベース基材を採用した BEH シリーズです。シリカゲルは塩基性条件下では溶解してしまう為、移動相が塩基性の場合カラム劣化が著しい事は分析者の悩みでした。そこで、シリカゲル骨格にポリマー的な要素を加えた有機シリカハイブリッド基材の第一世代として XTerra シリーズを開発しました。これに更なる改良を加え、シリカ骨格内にエチレン架橋構造をもたせた BEH (bridged ethylene hybrid) を 2005 年に開発しました。

耐アルカリ性の向上 (上限 pH 12)、シラノール活性抑制に加え、丁度前年に発売した

UPLC システムで使用可能な高耐圧性 (18,000 psi) をもった BEH シリーズは、現在に至る迄ウォーターズカラムのファーストチョイスとしてご愛顧頂いています。

なお、BEH と同じ材質で粒子径が $2.5 \mu\text{m}$ 以上の HPLC 用、UHPLC 用カラムは XBridge という製品名でご提供しております。偶に「名前が分かり難い」とお叱りを頂く事もありますが、拙稿をご一読頂いた暁には「UPLC は BEH」「HPLC は XBridge」と覚えて頂ければ幸いです。

もう一つは、全く新しいバイオナートカラムである Premier シリーズです。

多くの HPLC カラム (クロマトグラフィー管及び先端のフリット) はステンレス製であり、酸～中性条件では金属表面は正電荷を帯びている為、ルイス塩基性を示します。ここに多価カルボン酸やリン酸、それらが連なったペプチド、オリゴ核酸、タンパク質などの分析種が接すると、ピークテーリング・感度低下・回収率低下・キャリーオーバーなど分析結果に対して悪影響を及ぼす恐れがあります。

Premier シリーズはカラムハードウェアの材質を見直し、独自の表面加工処理である MaxPeak High Performance Surface(HPS)処理を施した部材を使用する事で、分析種と部材表面の吸着を大幅に低減し、クロマトグラムの改善を達成しました。充填剤は従来の物を使用しておりますので、カラムとしての分離選択性は変化させずに金属吸着し易い化合物のクロマトグラムのみを改善します。

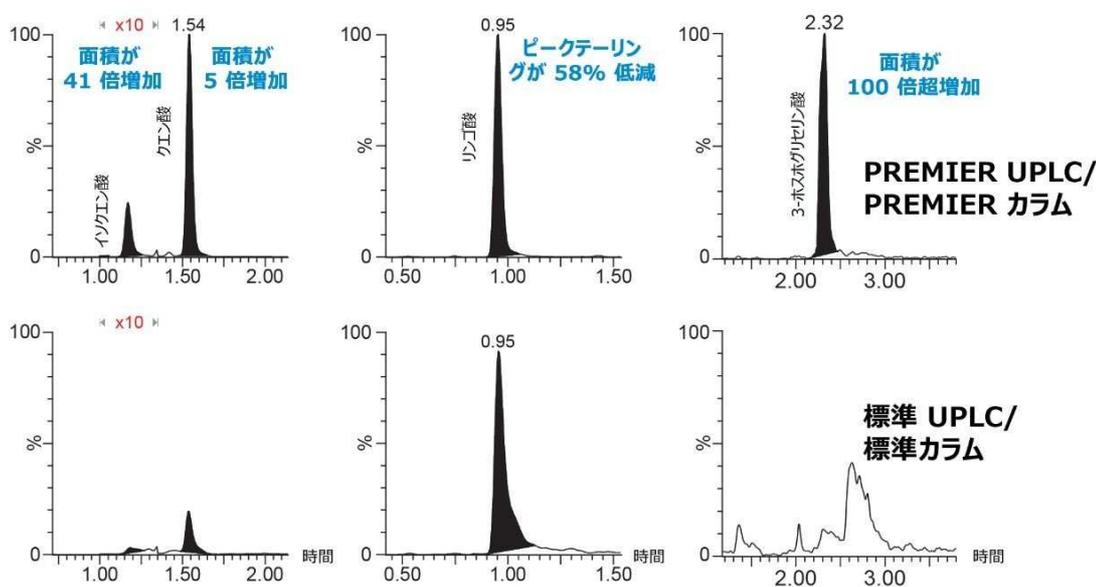


図 2 血漿サンプル中の TCA 回路関連物質の分析 (クロマトグラムの縦軸は相対強度、横軸は保持時間 (分) を示す)

下記の年表に有る通り、半世紀に渡り幾つものカラムファミリーを送り出して参りました。カタログ上の数字ですが、サイズ違いなども含めて 5000 点以上のカラムをラインアップしております。時折「古いカラムファミリーは製造終了ですか？」とお問い合わせを頂く事も有りますが、最初の μ Bondapak から Premier シリーズ迄、全て販売継続中です。

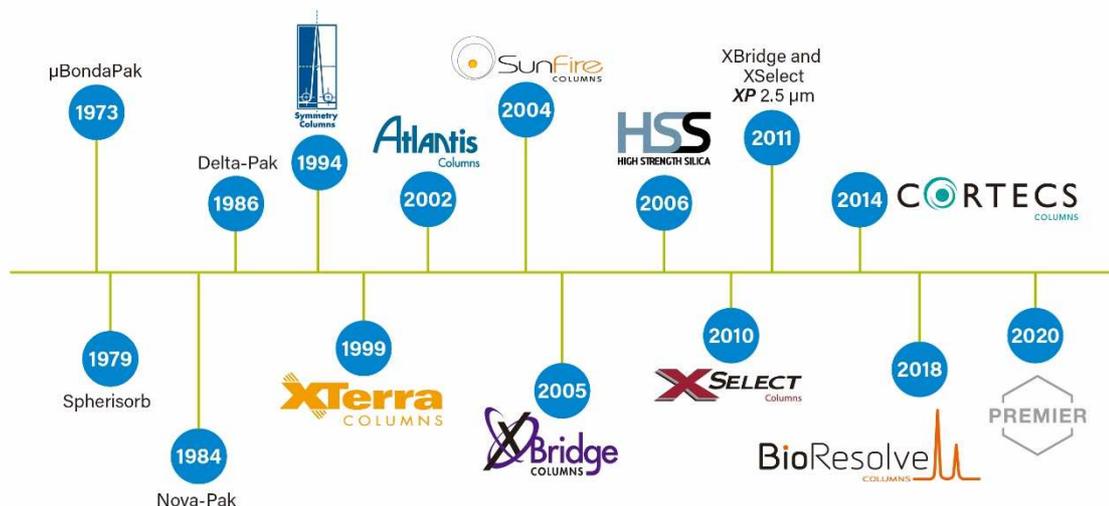


図 3 カラム製品の年表

ウォーターズがこれ程カラムに拘り、安定供給しながら新製品を開発し続けられるのは、「基材の合成」「化学修飾」「充填」「販売管理」の全てを自社内で行っている為です。又、充填剤の調製については敢えて小ロット（数 kg）で生産しています。一見すると効率が悪い様に思えますが（大きなロットで纏めて調製した方が製造コストは抑えられる）、ウォーターズは「充填剤調製のノウハウ」を蓄積する事に意味を見出しています。充填剤調製のノウハウを蓄積する事で、高品質なカラムの安定供給と、新たな性能のカラムファミリー開発への知見に繋がります。

<執筆略歴> 島崎裕紀 (Youki SHIMAZAKI)

2016年3月 立教大学大学院 理学研究科 化学専攻 前期課程修了
 2016年4月 ジャスコエンジニアリング(株) 技術部 入社
 2019年12月 同 退職
 2020年1月 日本ウォーターズ(株) マーケティング本部 入社
 現職にて LC 研究懇談会 事業委員 (2021年～)
 LC 分析士三段、LC/MS 分析士二段
 youki_shimazaki@waters.com



【団体会員紹介】

Restek の企業文化とクロマト製品／

The Culture of Restek Corporation and Chromatographic Products

海老原卓也/Takuya EBIHARA

Restek 株式会社 セールス&ビジネスディベロップメント/ Restek Japan Inc.

(Received May 19, 2022 ; Accepted May 30, 2022)

キーワード 企業文化 ; カラム ; Biphenyl 固定相

1. 始めに

Restek は、クロマトグラフィーカラム、サンプル前処理、捕集製品、リファレンススタンダード、及び機器アクセサリーの開発や製造をしている企業で、世界中の分析者と協力し、大気、水、土壌、食品、ボタニカル、医薬品、化学、石油製品の品質をモニターする為のツールを提供しています。

Restek 株式会社は Restek 日本支社を前身とし、米国 Restek Corporation の日本法人として 2020 年 1 月に登記されました。日本法人としての歴史が浅い事もあり、本稿では主に米国 Restek Corporation の歴史や思想と文化、及び業界に先駆けて発売した Biphenyl 固定相カラムについて、Restek 株式会社の海老原より紹介させていただきます。

2. Restek の歴史

Restek は創設者であり創業時唯一のスタッフだった Paul Silvis により、1985 年に米国ペンシルベニア州にあった小学校の一部屋を使用してキャピラリーGC カラムのメーカーとしてスタートしました (図 1)。2 年後の 1987 年には SilcoSteel というステンレス製キャピラリーカラムをガラス製カラムと同程度に不活性化する技術を発明しました。この事から分かる様に、Restek 設立当時はガスクロマトグラフィーカラムが開発と製造の中心であり、液体クロマトグラフィーカラムの販売はそれよりも約 10 年経った 1996 年から開始されました。



図 1 Restek 設立当時の Paul Silvis (左) と事務所 (右)

なお、Restek 創設者である Paul Silvis はクロマトグラフィー分野以外で不活性化コーティングのニーズが拡大した事から、2009 年に Restek のコーティング部門をスピノフした SilcoTek 社の創業者となりました。

Restek のクロマトグラフィーに関わる製品、技術サービスの取り組みは世界中に及んでおり、米国以外に現在では、英国、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、中国そして日本にも拠点を構え、クロマトグラフィーによる分析ニーズの向上によりグローバル企業へ急速に成長しました。米国本社のメインキャンパスは現在では最先端の製造及び研究機能を備えた約 12,000 m²の施設へ拡張しました (図 2)。



図 2 現在の米国コーポレート本社の概観

一方で日本国内においては、国内輸入商社様やお客様への技術サポート、国内市場のマーケティング調査を目的として、2009 年に Restek 日本支社を開設しました。その後、2020 年に日本法人へと登記した事で、より深く国内のクロマトグラフィー事業を展開しています。

3. Restek の思想と文化

Restek の創業者である Paul Silvis は「人々が家に帰る事を楽しみにしているのと同じ位、仕事に行く事を楽しみにする様な職場を作る事」と言う将来のビジョンをもっていました。更に「従業員がまるで家族である事を願い全ての人に尊厳と敬意をもって接し、包括的且つ安全な職場作りに取り組む」と言う行動指針が有ります。外資系企業と言うと一般的にドライな印象が有りますが、Restek 米国本社はサークル活動や頻繁な褒章制度が有る事からも、一昔前の日本企業的なウェットな企業文化をもっていると言えるでしょう。

現ヘッドコーチの Bryan Wolcott は「成功した起業家が、大企業へ自社企業を売却し最終的にはアイデンティティーと従業員を失い、企業文化が失われる他の地元企業を見て来ました」と言っています。この事から Restek の思想と文化を維持し継続する為、2009 年に 100%従業員持株制を採用しました。この事により、自らの行動原則と文化に忠実であり続ける事が出来ています。

4. Restek の液体クロマトグラフィー用カラム

Restek と言うと、特に日本国内においては LC カラムよりも GC カラムのメーカーとイメージされる方が多くいらっしゃると思います。しかし、ここ数年で Restek の LC カラムは多くのお客様へ採用頂ける様になりました。これは Restek のポリシーである「品質と納期」、「常に Plus1」、「継続的な改善」に取り組んでいる事を評価頂いていると自負しております。具体的には Restek が 2005 年に販売開始した Biphenyl 固定相が好評を博しています。

Biphenyl 固定相は、ODS や他のフェニル固定相で分離困難な化合物や初期に溶出する化合物の分離に特に優れています。Biphenyl 固定相を LC に利用した発想は GC カラムメーカーならではのと言えるでしょう。例えば、GC カラムにおけるファーストチョイスカラムは 1 系の液相 (dimethyl polysiloxane) ではなく、5% phenyl を含む 5 系の液相 (diphenyl dimethyl polysiloxane) です。これは phenyl 基により液相が微極性を有する事で極性化合物の保持が向上する為、汎用的に採用されています。Biphenyl 固定相は、ODS よりも極性化合物を保持し易いと言う点で、薬物や代謝物など生体試料分析のアプリケーションに適しています (図 3)。

当社では、既に Biphenyl 固定相を採用したカラムを 17 年間製造販売しています。再現性に優れる製造方法と品質管理のノウハウ、そして技術的専門知識を有するベテランスタッフによるサポートで安心してご利用頂く事が出来ます。



図 3 Biphenyl 固定相 (左) とカラム相互作用プロファイル (右)

Biphenyl 固定相を上手に使いこなすコツを一つ紹介します。Biphenyl は ODS から選択性と保持を向上する点で有用な固定相です。逆相クロマトグラフィーにおいて、一般的に移動相の有機溶媒はカラム圧や低波長側の UV 吸収で優位であるアセトニトリルが汎用されます。しかし、Biphenyl 固定相や phenyl 固定相では、メタノール移動相を使用した場合に選択性が增大する事が有ります (図 4)。この事から、Biphenyl 固定相を使用して分析法を開発する際には、移動相の有機溶媒にアセトニトリルだけではなく、メタノールも検討に含めて頂く事を推奨します。

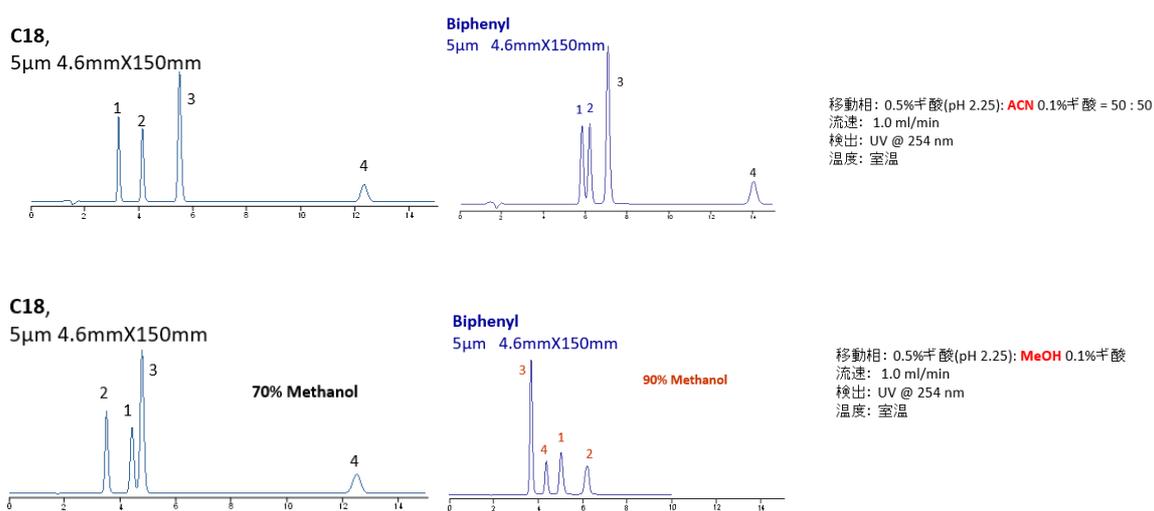


図 4 ODS と Biphenyl 固定相における移動相の有機溶媒種による選択性の違い
(上段：アセトニトリル、下段：メタノール)

5、最後に

クロマトグラフィーはお客様にとってはビジネスに必要なツールですが、当社にとってはビジネスそのものです。今後もクロマトグラフィーの発展に貢献出来る様に、私達は高度な技術革新と製品サポートを途切れなく続けてお客様にとって長期的な良きパートナーとなれる様努めます。

この度は通巻第 4 号となる本電子ジャーナルに投稿の機会を頂き、誠に有難うございました。

〈執筆者略歴〉 海老原卓也 (Takuya EBIHARA)

- Restek 株式会社 セールス&ビジネスデベロップメント
- LC 研究懇談会事業委員
- 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 : takuya.ebihara@restek.com



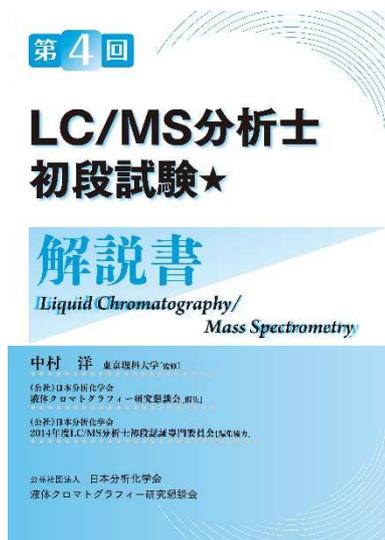
【閑話休題】

第 4 回 LC 懇クロスワードパズル～四文字熟語プラスワン(四季編)

(出題者：中村 洋)

下記 $7 \times 7 = 49$ マスに入った全ての漢字を使って、12 組の四字熟語を作ってください。四字熟語は春・夏・秋・冬の何れかを 1 文字以上含んでいます。次に、出来上がった 12 組の四字熟語を色分けした 2 番目の 49 マスに当て嵌めると、48 文字が使われますので、1 文字が残ります。この漢字を A のマスに入れてください。それが答えです。

今回、出題したクロスワードパズルは $7 \times 7 = 49$ 個の漢字の中から、 $4 \times 12 = 48$ 語を使って四字熟語を 12 組作りますので ($49 = 48 + 1$)、プラスワンと名付けました。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、写真左) 1 冊と HILICON 社の L サイズの T-シャツ (株式会社クロマニックテクノロジーズ提供、写真右) 1 枚を贈呈します。正解と当選者は LC 懇ホームページ並びに本誌第 5 号 (2022 年 12 月発行予定) でも発表しますが、贈呈品は 2022 年 9 月中にお送りします。



応募方法 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 9 月 15 日 (木) 迄にご応募下さい。

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

春	夏	秋	大	中	小	日
春	秋	冬	葉	烈	風	日
春	秋	冬	和	駘	月	日
春	秋	一	霜	刻	虎	蘭
春	秋	一	名	知	刻	扇
春	秋	一	菊	蕩	尾	宵
夏	秋	一	千	千	炉	冰

Start ⇒

春	√		春	←	冬	秋
↓	秋	√	春		↖	夏
秋			√	冬	秋	春
↓			A	↑		秋
春	↓	↳	秋	夏		
	↳	秋		→	↗	
↳	→	春			→	↗

第 3 回 LC 懇クロスワードパズル～三文字熟語プラスワン (漢数字編)

正解発表

LC 研究懇談会のホームページ (2022 年 3 月 12 日付) で出題した三文字熟語プラスワン CWP の正解発表です。升目に入る 16 組の三文字熟語は以下の通りです。最後に残る漢字は「保」で、これが A のマスに入りますので、正解は「保」です。

残念ながら、今回も正解者は居られませんでした。 (中村 洋)

一	鴻	郎	八	鳥	面	七
発	九	百	夜	三	十	羅
芸	官	日	鏡	華	単	波
二	鳥	咳	A	万	二	六
輪	十	千	人	力	十	塔
草	字	軍	十	一	月	重
三	毛	猫	四	角	錐	五

第 2 回 LC 懇クロスワードパズル～正解発表

「LC と LC/MS の知恵」通巻第 3 号（2021 年 12 月 15 日発行）で出題した標記 CWP の正解は以下の通りです。

升目に入る平仮名は以下の通りです。黄色く着色した A～Z をこの順に続け、漢字を使って書くと「**斬新無類な器用さ修練の道が肝心さ**」となり、これが正解です。今回は、残念ながら正解者はおられませんでした。

1お	19か	21や	24ま		2お	26と	28う	30ふ
3お	Bん	Cし	Dん		4お	Pれ	Qん	Xじ
5と	Mし				6た	Yん	Aざ	わ
7も	つ	22か		8や	に		9り	ら
Rの		10く	25そ	Eむ	し			の
11や	20あ	Lさ	Wん		12よ	27の		Sみ
13か	Zさ		14ご	Jよ	Kう	し		Tち
15も	つ	23こ	く		16へ	Gい	29わ	Hな
17ち	Iき	Nゆ	おう		18い	Vか	Fる	Uが

「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) への添付で送付する事とし、編集委員会到着の日を受付日とする。
6. 原稿の採否は、編集委員会が決定する。編集委員会は、字句その他の加除修正を行い、或いは著者にそれを要求する事が出来る。
7. 原稿の修正などの為に、編集委員会から原稿を返却された場合は、1 か月以内に編集委員会に返送する事とし、これより遅れた場合は新しい投稿として取り扱う。
8. 本誌に掲載された論文等についての著作権は、LC 懇に属する。

「LC と LC/MS の知恵」投稿の手引き

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

2022年度(2022年3月1日~2023年2月28日) LC研究懇談会 主催・共催・事業カレンダー		
Month	Date	Event
3月		2022年度CERIクロマトグラフィー分析賞受賞候補者推薦会告 (締切:8月末日)
		2022年LC科学遺産認定候補推薦会告 (締切:8月末日)
		2023年液体クロマトグラフィー努力賞授賞者推薦会告 (締切:9月末日)
		2022年POTY賞受賞候補者推薦会告 (締切:10月末日)
	3月29日(火)	第369回例会(オーガナイザー:中村 洋) HPLCとLC/MS~基礎と応用~
4月	4月27日(水)	第370回例会(オーガナイザー:三上博久) HPLCとLC/MSにおける最適化の基礎と実際
5月	5月26日(木)	第371回例会(オーガナイザー:榎本幹司) ウイズコロナ時代に求められる機器分析環境
6月	6月8日(水)	LC分析士初段試験(五反田文化会館、東京都品川区)
	6月15日(水)	電子ジャーナル「LCとLC/MSの知恵」通巻第4号発行
	6月17日(金)	LC/MS分析士初段試験(五反田文化会館、東京都品川区)
	6月23日(木)	第372回例会(オーガナイザー:竹澤正明) バイオ医薬品分析におけるMSの挑戦
7月	7月6日(水)	LC分析士二段試験(五反田文化会館、東京都品川区)
	7月15日(金)	LC/MS分析士二段試験(五反田文化会館、東京都品川区)
	7月27日(水)	第373回例会(オーガナイザー:高橋 豊) LC/MS/MS装置や関連技術の最新動向
8月	8月1日(月)	2015年度LC分析士二段試験→「第5回LC分析士二段試験解説書」(通算26冊目)メール査読会開始
	8月4日(木)	LC分析士三段試験(五反田文化会館、東京都品川区)
	8月12日(金)	LC/MS分析士三段試験(五反田文化会館、東京都品川区)
9月		日本分析化学会第71年会(岡山大学、9/14~9/16)
	9月14日(水)	①生涯分析談話会(共催:LC研究懇談会) 16-17時 話題提供者(島根大学・名誉教授) 奥村 稔
	日程未定	②LC研究懇談会講演会 液体クロマトグラフィーによる核酸医薬品の分離技術の進歩(東ソー(株))○伊藤誠治
	9月29日(木)	第375回例会(オーガナイザー:高橋亜紀子) タンパク質同定のための質量分析
	9月30日(金)	第26回液体クロマトグラフィー(LC)研究懇談会 特別講演会・見学会(株)日立ハイテクサイエンス
10月	10月3日(月)	LC分析士四段試験(日本分析化学会・会議室)
	10月4日(火)	LC分析士五段試験(日本分析化学会・会議室)
	10月6日(木)	LC/MS分析士四段試験(日本分析化学会・会議室)
	10月7日(金)	LC/MS分析士五段試験(日本分析化学会・会議室)
	10月20日(木)	第376回例会(オーガナイザー:神山和夫) 食品分析におけるLC、LC/MSの基礎から最新技術
11月	11月22日(水)	第377回例会(オーガナイザー:西岡亮太) キラル分離 -メソッド開発とアプリケーション-
	24日(木)25日(金)	LC- & LC/MS-DAYS 2022(世話人:大塚克弘、箱根パークス吉野)
12月	12月3日(金)	LCシニアクラブ設立総会
	12月15日(木)	電子ジャーナル「LCとLC/MSの知恵」通巻第5号発行
	日程未定	第378回例会(オーガナイザー:松岡秀雄) 分離分析に関わる温度
2023年	1月	19日(木)20日(金) 第28回LC & LC/MS テクノプラザ(世話人:中村 洋)
1月	日程未定	第379回例会(オーガナイザー:柿田 穰)
	2月1日(火)	2016年度LC分析士三段試験→「第5回LC分析士三段試験解説書」(通算27冊目)メール査読会開始
2月	日程未定	第380回例会(オーガナイザー:加藤幸一郎)

編 集 後 記

- [SI] 第 4 号にもなると内容も網羅され、かなり有用な知恵本になりました。これからも、知恵を追加していければと思います。
- [KE] 今回は例会の準備と重なり、更に連絡メールの見落とし等もあって編集作業が遅くなり、関係者にはご迷惑をお掛けしました。
- [MO] 本号も充実した内容となりました。私も熟読し勉強したいと思います。今後とも皆様のご投稿よろしくお願いいたします。
- [MT] 第 4 号の記事も有益な情報が満載です。是非ご覧下さい。投稿や査読等にご協力下さった皆様に感謝致します。
- [HN] 次号迄に、COVID-19 の実質的な収束、ウクライナ停戦、新規漢字クイズ創案の何れか一つでも実現する事を期待しています。
- [HM] 通巻第 4 号と言う事で、年 2 回発行の手順も確立して来ました。今後、一層誌面の充実に取り組みたいと思っています。

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 2022 年第 1 号 (通巻第 4 号)

2022 年 6 月 15 日発行 (©2022, 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)