

### 分離科学, 分光学, 計算科学

筆者が逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) の分離機構に取り組みはじめてから、すでに 25 年になろうとしている。ずいぶん古くから続けているように感じられるが、RPLC が現在の HPLC の主流になる発端となったのが 1969 年のアルキル基を表面化学修飾したシリカゲルの開発であることを考えると、スタートはかなり立ち遅れたものであったといえる。

ご承知のように、水溶液中の化学物質の分離や濃縮の多くは逆相系で行われている。HPLC はもとより、水溶液試料の前処理に多用される固相抽出においても、疎水性多孔質材料を用いた逆相系を利用することが多い。その汎用性のゆえに、アルキル結合型シリカ充填剤の開発直後から世界中の多くの研究者がいろいろな戦略で分離機構の解明に取り組んできた。最も多用されたのは、当然と言えば当然であるが、クロマトグラフィーそのものを用いる方法である。すなわち、構造の異なる多種類の化合物をプローブとし、移動相溶媒の種類あるいは組成、アルキル基の鎖長や修飾密度、さらにはカラム温度等によってその保持挙動がどのように変化するかを観測し、その結果を解析して分離機構が推測された。それに続いて用いられたのが、各種の分光法である。特に、逆相系の分離場が水溶液/アルキル結合層界面とアルキル結合層自体の複合したものであることが明らかになるにともなって、FT-IR、ラマン、NMR、和周波発生分光法 (SFG) などを駆使して、アルキル結合層内でのアルキル鎖の折れ曲がり構造や運動性、水溶液/アルキル結合層界面における有機溶媒の吸着挙動などの解明が進められ、それと物質分離との関係が考察された。

RPLC の固定相は単一相ではなく、アルキル結合層と水溶液/アルキル結合層界面、さらにシリカ表面 (残存シラノール基を含む) もこれらに加わる不均質な分離場である。しかも、それぞれが溶質分子を異なる選択性で保持する。したがって、一つの溶質分子がどれだけの時間、あるいはカラムに注入された分子集団のどれだけの割合が、カラム内でどの場所 (どの固定相) に滞在しているのかを知るすべがなくは、分離機構の解明、そして溶質分子の保持時間の予測は難しい。これに関する知見を得ることに最初に成功したのが分子動力学計算 (MD シミュレーション) であり、今世紀に入ってこのアプローチによる研究が急速に行われるようになった。MD シミュレーション

によって示された結果のうち、特筆すべきなのは、溶質分子がその構造によって、水溶液/アルキル結合層界面にのみ保持されるものと界面およびアルキル結合層内部の両方に保持されるものとの二つに分かれることを示したことである。これは、それまでのクロマトグラフィーを用いる方法や分光法によってはわからなかったことであり、これを最初に発表した研究者らは、RPLC の分離機構を分子レベルで解明することはクロマトグラフィーや分光法では不可能である (可能なのは計算科学のみである) と主張した<sup>1)</sup>。

一方筆者らが、アルキル結合層、水溶液/アルキル結合層界面、そしてシリカ表面における溶質分子の滞在時間の割合を決定する実験法を開発したのは、MD シミュレーションによる研究の最初の発表に 10 年余りも遅れた比較的最近のことである<sup>2)</sup>。開発した方法は、彼らの主張に反して、クロマトグラフィーを用いる方法であった。すなわち、気体をアルキル結合型シリカ充填剤内部に固定化し、水/アルキル結合層界面の面積を圧力によって自在に変えることができる方法、表面気泡変調液体クロマトグラフィー (SBMLC) である。これによって、アルキル結合層自体と水/アルキル結合層界面の溶質保持への寄与を個別にかつ定量的に評価することが可能になったのである。

SBMLC により明らかになったことは、溶質分子がカラム内でほとんどの時間を水溶液/アルキル結合層界面で費やすものから界面および結合層内部の両方に同程度保持されるものまで幅広いスペクトルで存在することであり、これは MD シミュレーションによる研究から導かれた結果をほぼ追認するものであった。シミュレーションではなく、実験測定によってこの事実を明らかにすることができたことは重要な成果であると思うが、できれば計算科学に先んじて発見したかったというのが偽らざる気持ちである。

しかし、一方では、これによって遅ればせながら計算科学の威力を知ることになった。筆者の恩師の一人である John H. Knox 教授は、晩年のインタビューで「地球温暖化の問題に直結する大気中の反応の速度論的解析に取り組みたいと思ったことがあったが、分光学の知識が不足していることを悟って諦めた」と述べている<sup>3)</sup>。筆者もそのときの Knox 教授の年齢に近づきつつある現在、意味合いは少し異なるが、専門としてきた分離科学とは別のアプローチである分光学や計算科学の理解ももっと深めておくべきであったと少々後悔している。分光法や計算科学に詳しい何人かの共同研究者と多くはないがいくつかの研究論文を発表できたことは嬉しいことであったが、筆者自身の知識がもう少しあれば違った世界が見えたかもしれないと考えることがある。

また、現在は定年退職したにもかかわらず、幸いにして実験環境を与えられているが、それも残された時間は短い。化学物質を実際に扱うことなく化学の研究ができるのは計算科学だけであることを考えると、費用はともかく、定年後も続けられるのはこれしかないかもしれないと思ったりもしている。

- 1) A. R. Schure, J. L. Rafferty, L. Zhang, J. I. Siepmann: *LCGC North America*, **31**, 630 (2013).
- 2) K. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa: *J. Phys. Chem. C*, **122**, 4409 (2018).

## インフォメーション

### 第 361 回液体クロマトグラフィー研究懇談会

標記研究懇談会が、2021 年 7 月 21 日 (水)、Zoom によるオンライン形式で開催された。講演主題は、「親水性化合物の分析法最前線」であり、総括を含め 7 件の講演が行われた。アミノ酸、有機酸、糖、水溶性ポリマーなどの親水性化合物は、食品、医薬品、化粧品など様々な分野で使用されているが、逆相カラムにおける保持が弱いため、HPLC あるいは LC/MS 分析に苦戦する局面も少なくない。本例会では、親水性化合物分析法の現状と分析法開発のヒントとなる 6 件の講演が行われた。最後に、本研究懇談会の中村 洋委員長による総括講演が行われた。参加者は 35 名であり、例会終了後の情報交換会には 7 名が参加した。

なお、今回のプログラムは藤田深咲氏(サンスター㈱)がオーガナイザーとして第 349 回研究懇談会(昨年 7 月 21 日に開催予定)用に作成したものであるが、同氏が社内事情により LC 懇の准役員を退任されたため、筆者がオーガナイザーを引継ぎ、演者・講演題目とも全く同じ内容で今回開催した。以下、当日行われた講演の概要を紹介する。

1. 「親水性化合物分析の為のカラム選択」(日本ウォーターズ㈱・島崎裕紀氏) 親水性化合物を HPLC で分離する場合には、逆相、イオン対逆相、イオン交換、HILIC など多様な分離モードが使用可能である。演者は、逆相モードで親水性化合物の分離を試みる際の要点を解説した。まず、解離基を有する場合は、移動相の pH 調整が重要であり、酸性化合物は低 pH、塩基性化合物は高 pH として、それぞれ保持を大きくした分子形として分離する事が定石である。いずれの場合もカラムの耐 pH 性に注意する必要があるが、アンモニア/アセトニトリルの高 pH 移動相でモルヒネ類のグラジエント溶離を行うと、モルヒネ類の保持の増大によって分離能が向上し、ESI-MS の感度も向上する事が示された。また、金属吸着の低減を目的とした新規 LC システムとカラムハードウェアにより、吸着に起因する諸々のリスクが回避できた例も紹介された。

2. 「逆相カラムと HILIC カラムの親水性化合物分析における特性」(㈱クロマニックテクノロジーズ・塚本友康氏) 親水性化合物の分離に逆相カラムを使用する場合には、細孔から移動相が抜け出して保持が減少する弊害があるが、充填剤表面の親水性を高めるか、長鎖アルキル基を用いるかの 2 つの対策があることが説明された。後者の場合、移動相の抜け出しの要因である毛細管現象に寄与するのは主に撥水性であり、その強さは C8>C18>C28 の順である事が示された。次に、最近親水性化合物の分離に汎用されている HILIC カラムの使用上のノウハウについて解説があり、市販カラムは分離選択性が大きく異なるので分析種に適したカラムを選択する重要性が示された。また、試料注入後のベースラインを示差屈折率検出器でモ

ニターすると、安定するまでには 15 分程度掛かる事が示された。この事から、HILIC で問題となる保持時間の再現性の低さが、充填剤表面の水和層の乱れによることが示唆された。

3. 「有機シリカハイブリッド系 HILIC カラムについて」(㈱ワイエムシィ・渡部 毅氏) 渡部氏が 5 月上旬に自転車事故に遭遇し、数か月の入院加療となったため、残念ながら講演中止となった。

4. 「HILIC-QQQ-MS を用いた代謝産物分析」(アジレント・テクノロジー㈱・澤田有司氏) テトロドトキシン (TTX) はフグ毒として知られ、その定量は食品衛生上重要な課題である。TTX は高極性化合物であるため、ODS カラムを用いた逆相分離では保持が十分ではない。そこで、同社の Poroshell シリーズに含まれる 3 種の HILIC カラム、すなわち HILIC (ヘアシリカ)、HILIC-OH5 (ポリヒドロキシフルクタン固定相)、HILIC-Z (両性イオン型固定相) で TTX を分離し、タンデム四重極質量分析装置 (QQQ-MS) で検出した。移動相 A (10 mM ギ酸アンモニウム+0.1% ギ酸)、移動相 B (10 mM ギ酸アンモニウム+0.1% ギ酸の 90% アセトニトリル) を用いて 70, 80, 90% B で TTX のイソクラティック溶離を行ったところ、HILIC-Z>HILIC-OH5>HILIC の順に高い保持力が得られ、0.1-1000 ppb で良好な直線関係が示された。本講演では、その他 HILIC-Z カラムによるアミノ酸分析、有機酸分析、メタボローム解析、有機リン酸系農薬分析についても報告があった。

5. 「イオン対試薬を用いた親水性化合物の分析」((一財)化学物質評価研究機構・坂牧 寛氏) 本講演は、イオン対試薬用いて強解離性親水性化合物を中性化合物に変え、逆相イオン対クロマトグラフィー分析を行う際の注意とコツに関するものである。イオン対試薬の濃度が不足すると、解離性化合物が中性化合物に完全には変換されないため、保持時間やピーク形状が変化する結果を招く。また、保持時間の再現性確保にはカラムの再平衡化が重要であるが、C18 カラムと 100 mM トリエチルアミン-酢酸 (pH 7) 移動相の組み合わせでは、0.1% ギ酸/アセトニトリル (1/1) をカラム容量の 50 倍ほど送液し、LC/MS でトリエチルアミンをモニタリングしたところ、ほとんど検出されなかった。この結果から、カラムの洗浄・再平衡化には 30 分程度が必要であることが分かった。以上の基礎検討に基づき、C18 カラムと 100 mM トリエチルアミン-酢酸 (pH 7) 移動相を用いてオリゴヌクレオチドの分離を試みたところ、保持時間の CV 値 0.4% 以下で良好に分離できた。なお、イオン対試薬は緩衝液に溶解することが肝要で、アルキルスルホン酸ナトリウムを使用する場合は移動相を pH 3 程度、アルキルアンモニウム塩を使用する場合には pH 7 程度に調整することが勧められた。

6. 「アミノ酸及びアミノ酸代謝物の一斉分析法の事例紹介」(味の素㈱・唐川幸聖氏) アミノ酸の一斉分析法としては、陽イオン交換後にニンヒドリン発色で検出するアミノ酸分析計を利用する方法が、歴史的には最も古くかつ一般的である。この方法は、現在の分類ではポストカラム誘導体化法に属するが、その後オルトフタルアルデヒド・チオールをポストカラム試薬に用いる高感度蛍光検出法も開発されている。一方、親水性のアミノ酸を Fmoc, NBD-F, AccQ・Tag<sup>TM</sup> などで蛍光誘

導体化し、生成した疎水性誘導体を逆相カラムで一斉分離するプレカラム誘導体化法も多数報告されている。演者は、味の素(株)が質量分析用に開発したアミノ基のプレカラム誘導体化試薬(3-aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate, AP-DSTAG®)を用いたアミノ酸分析例を紹介した。APDSTAG®は緩和な条件で短時間に疎水性誘導体を生成するため、逆相カラムでの分離が可能であり、質量分析計で高感度・高選択的な検出が可能であるなどの特長を有する。講演では、アミノ酸及びその代謝物47成分の一斉分離例(15分)、D-アミノ酸分析への展開例などが解説された。

7. 総括「親水性化合物の分析法最前線」(東京理科大学・中村 洋氏) 最後に筆者により、総括講演が行われた。講演は、恒例になっている各講演に対するQ&A形式で進められた。すなわち、会場から質問やコメントがなかった事項について、演者と質疑応答を行い、参加者の理解が深まる手助けとした。また、今回の例会では触れられなかった疎水性化合物分析法とその選択法の要点などについて、俯瞰的な視点を紹介した。さらに、総括講演の終盤では、これまで日本分析化学会が運営していた分析士認証試験が2021年度からLC研究懇談会(LC分析士、LC/MS分析士)とIC研究懇談会(IC分析士)に移管されたことに伴い、2021年度にLC研究懇談会が実施する分析士認証試験の実施予定、並びに2024年秋に予定されている第400回記念例会、LC研究懇談会創立50周年記念行事を紹介した。

講演終了後、情報交換会が演者を囲んで引き続きZoomオンライン形式で行われた。想い返せば、コロナ禍で中止していた例会を再開したのは今年の3月であったので、今回で5回目のオンライン情報交換会となる。今回も全員が簡単に自己紹介をした後、初めての参加者と演者を中心に多方面の話題が広がり、有益かつ愉快的な時間を過ごした。

最後に、本例会の演者の皆様、事前準備と当日のオペレーションにご協力いただいたWeb対応小委員会の方々に御礼申し上げます。

〔東京理科大学 中村 洋〕



## 第358回液体クロマトグラフィー研究懇談会

2021年4月22日、「UHPLCの全て～基礎と応用、現状と関連情報」を講演主題として表題の研究懇談会がオンライン(Zoom)で開催された。

UHPLCは従来のHPLCと比較して、分析時間の画期的な短縮及びそれに伴う分析効率の向上を可能とし、現在、様々な分野の分析現場で活用されている。また、上市されて15年以上経過し、装置本体及びその関連機器の進歩、そして分析例及びHPLCからのメソッド移管等の分析技術の蓄積も充実しつつある。本例会では、UHPLCの基礎的な事柄からその応用、最新の装置及び技術情報等まで、UHPLC全般に関して総括を含めて7題の講演があり、参加者は約30名であった。以下、各講演の概要を紹介する。

1 題目は、(株)日立ハイテクの伊藤正人氏(LC分析士五段)による「UHPLCはなぜ高速で高分離なのか?」の演題で、数

学的な分離条件探索法によりUHPLCの速さと分離の両側面を説明された。序論でKozeny-Carmanやvan Deemter等の関係式を紹介した上で、理論段数を等高線で表した3次元グラフ法の紹介と新たな変数として線速度とカラム長の積である速長積 $\Pi$ の導入を提案された。この速長積 $\Pi$ の導入により3次元グラフの底平面の対数的な変換が可能となり、2つの異なる底平面座標で表せることが示された。さらに底平面とOpt法とKPL法から得られる三角領域をもって、理論段数、分析時間と圧力の其々一定の条件探索とその各評価を説明された。これらの評価には圧力印加係数と時間延長係数を導入して説明された。

2 題目は、日本ウォーターズ(株)の朝日優介氏(LC分析士初段、LC/MS分析士初段)による「HPLC⇔UHPLC メソッド移管 虎の巻」の演題で、HPLCからUHPLCへの分析法移管の手順、その際の注意点、及び移管例を説明された。移管手順として選択性の近いカラムを分離効率が一定になるよう選定し、そのカラムサイズから流速や注入量を調整することにより、分析時間の短縮と溶媒消費量の削減が可能となることを移管例と共に説明された。注意点としては、注入量やカラム温度の他にシステム拡散やグラジエント遅延容量を挙げられ、システムボリュームにあった内径のカラム選定やグラジエント勾配を描いた上でデュエルボリュームを考慮したグラジエントテーブルを設定する等を説明された。

3 題目は、日本分光(株)の寺田明孝氏(LC分析士三段、LC/MS分析士二段、IC分析士初段)による「UHPLCを用いたメソッド開発のコツ～ルーチン分析のために～」の演題で、UHPLCでのルーチン分析の際の様々なリスク対策と積極的な改善について講演された。リスク対策ではサンプル溶解溶媒、データ取得レート、レスポンス、圧力のモニタリング、移動相溶媒の保管方法及びシステムの最適化に関しての条件記載の追記や修正を提案された。さらに、詳細な移動相調整方法、サンプルろ過とインラインフィルターの併用や分析種の安定性の確認に関して補足された。積極的改善では消耗品選択によるコストダウン、コンディショニング時間の短縮による分析の効率化、及びデータ処理からレポート作成までの一連操作の合理化を提案された。

15分の休憩を挟み、4 題目は、アジレント・テクノロジー(株)の熊谷浩樹氏(LC分析士四段、LC/MS分析士二段)による「UHPLCを使用した超高速分析の基礎と2D-LCへの応用」の演題で、Comprehensive 2D-LCの紹介、その分析例やバイオ分析での流路の非金属化等を講演された。Comprehensive 2D-LCでは、1次元目の溶出液をすべて2次元目に導入するため、2次元目で超高速分析が必要となるが、UHPLCの登場によりこの実用的なシステムが実現した旨をその分析例と共に説明された。また、タンパク質や核酸関連化合物には金属の影響を受ける試料も多く、耐圧のためステンレスの流路を多用するUHPLCでは分析が上手くできないが、流路内部の非金属化によりペプチドマッピング等も含めて可能になっていると説明された。

5 題目は、(株)島津製作所の吉岡拓哉氏(LC分析士初段)による「分析メソッド高速化に関する最近の動向と注意点」の演題で、UHPLCの登場から現在までの動向や分析メソッド高速

化に関する注意点を講演された。UHPLCは登場後の10年間でメーカーの高耐圧競争を経て、新カテゴリーとしてUHPLC-likeの需要が高まってきている。ユーザーの実用に加えてコアシェルカラムの登場によりこの流れが加速し、今後はUHPLC-likeの方が標準になり、より需要が伸びることを提唱された。また、UHPLC分析での注意点として、注入量、試料溶媒、データ取得レート、レスポンス、カラム温度及びフィッティングについてそれぞれ説明された。さらに、UHPLCシステムでの汎用分析を行う際の注意点として、グラジエント遅延容量の影響、最適な注入量、試料溶媒及び試料吸引速度の調整についてそれぞれ説明された。

6題目は、(株)ワイエムシの渡部 毅氏(LC分析士二段)による「キラル分離メソッド開発の現状：UHPLCでの運用について」の演題で、キラルカラムの充填剤の中で多糖誘導型が圧倒的に使用されているという調査結果、そして自社の同型のキラルカラム、その分析例と適用実績の紹介、さらにメソッドスクリーニング及び自社の幅広い規模の事業領域を併せて紹介された。UHPLC用のキラルカラムも市販されているが、自社では粒径3 $\mu\text{m}$ 、内径3mm、長さ75mmのカラムを標準仕様にして、分離条件の探索を効率化していると紹介された。

最後に東京理科大学の中村 洋委員長(LC分析士五段、LC/MS分析士五段)より「UHPLCの全て～基礎と応用、現状と関連情報」についての総括講演があった。各講演者に対して講演内容についての質問や補足が行われ、参加者はより理解を深めることができた。

講演終了後、オンラインにて講演者を囲んだ情報交換会が開催され、9名が参加し交流を深める場となった。

最後に本例会開催に当たり、講演依頼を快諾していただいた講演者の皆様、オンライン例会開催を準備していただいたWeb対応小委員会の皆様、そして視聴していただいた参加者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

[近畿大学 戸谷昭善]



## 高分子分析研究懇談会第405回例会報告

第405回例会は例年であれば夏季合宿を開催しているが、本年度はコロナ禍であるため8月5日(木)～8月6日(金)にオンラインにて開催された。

今回は9時45分より招待講演3件と分科会を1日目に5コンテンツ、2日目に4コンテンツを実施した。参加者は計60名と大変盛況であった。

1件目の招待講演1は、東京工業大学の久保内昌敏教授に「熱硬化性樹脂の劣化機構と深さ方向の解析事例」と題して講演をいただいた。軽量かつ化学的、物理的に強固な素材である繊維強化プラスチック(FRP)を対象として基本的な劣化の

メカニズムから具体的な事例にまで言及する非常に幅の広い講演であった。実際の実験とシミュレーションの結果が多くの場合で良い一致を示しており、このような研究に基づいて製品の寿命が計算されている事がよく分かり化学工学の重要性を感じた講演であった。

2件目の招待講演2は、(一社)化学物質評価研究機構の仲山和海様より「ゴム材料の劣化分析の対象になる劣化現象」と題してご講演いただいた。ゴムという幅広い場面で利用されている材料について、豊富な分析事例を元に劣化因子ごとにそのメカニズムと具体的な事例の紹介が行われた。身の回りで使われている材料にとってその「寿命の予測」は非常に重要であるが、それを明らかにすることがいかに難しいことなのかをあらためて実感させられる内容であった。

3件目の招待講演3は北海道大学の川村秀憲教授に「人工知能最前線と応用事例」と題してご講演いただいた。高分子分析の分野において様々な分析結果を、有用な情報として利用するために数々の解析手法が使われている。その中でも昨今非常に盛んな人工知能やディープラーニングを解析に応用している。今回はそのような人工知能が成り立つまでの歴史や定義から今現在行われている具体的な応用事例についてご講演いただいた。「このような人工知能の研究を行うのは人間であるが、そのような人材を発掘し育てることをいかにして推し進められるか。」ということは大学教員として感じさせられる内容であった。

1日目の分科会は1)耐食FRPの劣化とその評価、2)ゴム材料の劣化分析の対象になる劣化現象、3)AIの部屋、4)高分子分析の諸問題I～成分分離分析を中心とした～、5)高分子分析の諸問題II～スペクトル解析を中心とした～の五つのテーマで、Webex Meetingsのブレイクアウトセッションを用いて実施した。いずれのテーマにおいても同じ分野に関して興味のある参加者同士で活発な議論が行われた。とくに成分分離分野は盛況であり、高分子分析にかかわる以上避けて通れない「成分の単離」がいかに難しいかを感じさせられた。さらに夜にはオンライン懇親会も開催し、講師の先生方を交えた研究の話題や、コロナ禍をいかに乗り越えていくかなど多彩な話題に関する情報交換ができて、大いに盛り上がった。

2日目の分科会は1)参加者アンケート、2)組織運営、3)高分子分析の諸問題I～成分分離分析を中心とした～、4)高分子分析の諸問題II～スペクトル解析を中心とした～の4テーマで実施した。2日目は成分分離とスペクトル解析が特に盛況で、熱い議論が交わされた。

当懇談会において大変重要な会員の交流の場である夏季合宿が、今年度はこのようなオンライン形式での開催となったが、来年こそは、今まで通りの夏季合宿が開催できることを切に望みます。

[明治大学 本多貴之]