

HPLCを用いた微分スペクトルクロマトグラフ法の基礎的検討 ～機器附属ソフトを計算に利用した実試料からのカフェイン回収～

小林 淳^{1,2)}, 池田啓一³⁾, 望月真理子¹⁾, 杉山英男⁴⁾

¹⁾日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科

²⁾国立保健医療科学院生活環境研究部

³⁾北陸大学薬学部生体環境薬学講座

⁴⁾松本大学人間健康学部健康栄養学科

要 約 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、多くの施設で汎用される様々な試料中の多成分同時分析を可能とする機器分析法である。一般にHPLCで目的物質を測定する場合には、妨害となる共存物質と分離可能な条件を探索する必要がある。従って同じ成分の測定でも試料の組成が大きく異なる場合には、別の測定条件を用いなければならない。

今回我々はフォトダイオードアレイ検出器を備えたHPLCの3次元データ (吸光度, 保持時間, 波長) を標準附属ソフトで取得・演算 (時間方向における微分処理) することにより, 目的物質の分離・検出の改善について検討した。測定対象としてカフェインを用いた結果, 微分処理はピークが鋭敏になり近接する他の物質との分離が改善し, 溶離液吸光度の変動も減少する一方で, 目的物質のピーク本数が増え, ピーク高さが低下し, 感度が低下する傾向が認められた。今回の検討では, 3次微分処理が回収率の点で適切と思われた。

キーワード: 微分スペクトルクロマトグラフィー, フォトダイオードアレイ

日獣生大研報 62, 82-88, 2013.

緒 言

現在, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は多くの分野で非常に汎用されている。その分析対象は, 生体・食品・環境中の主・微量成分など多岐にわたり, 人における健康の維持や栄養管理のみならず, 新規代謝物質の検索, 食品の品質管理, 薬剤のバイオアベイラビリティの測定など広く利用されている。HPLCの基本構成は, 試料を導入するインジェクター, 分離能の本体であるカラム, カラムとの相互作用を利用し再現性のある分離を実現するための溶離液, その溶離液を送液するためのポンプ, カラムで分離された目的物質を定性/定量的に検出するための検出器からなる。このHPLCにおける分析条件は, 分析対象とする物質の性質 (カラムへの保持や光吸収など) に基づいて分離モードや検出方法 (検出器の種類) が決定されることは当然であるが, 試料に共存するマトリックス成分も検出器応答する場合が多いため, それらの物質との分離も考慮しなければならない。従って測定試料の種類ごとに分析条件を変更することが一般的であり, 結果として分析時間が長くなることや複雑な分析条件を要する場合がある。また類似物質やバックグラウンドの影響除去・軽減のために前

処理を行うことがあるが, それにも多くの時間や試薬を要する¹⁾。これらを改善する1つの方法はカラムの改良であり, 現在様々な製造会社により開発が継続して行われている。しかし残念ながらその細かい性質は製造会社が選択・決定するため, 必ずしもすべての使用者が満足できるものではない。例えば, ある分野で触媒効果を持つような試料中のごく微量成分の検出は, 品質管理上非常に重要な意味を持つが, 同じ成分・同様なマトリックスでの測定を多くの分野で行う必要があるわけではない。このような物質を測定対象とするためには, 仮に最新鋭で高品質なカラムを用いたとしても, 前処理で大部分の夾雑物質を除き, マトリックスを考慮した独自の分析条件を確立せざるを得ない。このことは手間を要するのはもちろんであるが, 測定者の熟練も必要とすることを意味する。以上のことから, 我々はカラム特性に寄らない分析方法の改善が技術的に必要であると考えている。

近年山本らにより報告された微分スペクトルクロマトグラフ法¹⁻⁶⁾は, 多波長を同時に検出できるフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器の吸収スペクトル (横軸: 波長, 縦軸: 吸光度) の描画による定性や同時多波長検出による条件検討の簡便化という本来の使用方法とはまったく異なる

る。また分光光度計で標準的に行えるスペクトルの微分^{7,8)}とも軸方向的に異なっている。近接して溶出する目的物質をクロマトグラムの微分(時間方向での)により検出物質の相互分離の改善を行う^{5,9)}。PDA検出器が連続したデータ(波長・時間・吸光度の3次元スペクトル)を取得できるため、測定後の演算で波長や微分の度合いを最適化可能で、正味の測定時間や試薬を節約できるという利点がある¹⁾。通常、目的物質とマトリックス成分の分離が不十分な場合には、別な溶離液等の条件検討を行う必要があるが、微分スペクトルクロマトグラフ法に適用するだけならば、クロマトグラム上のピークを微分により幅の狭いより鋭敏なピークとして検出するため、測定時間が長くなったり、新たな条件設定に苦慮する必要がない。今回我々は、この方法が山本らの検討した検出時間の近接した物質同士の分離のみならず、マトリックス成分を含むバックグラウンドノイズの軽減や目的物質の感度上昇に有効かどうかについて、モデル物質としてカフェインを用い、環境水及び生体試料マトリックスからの回収について検討した。山本らの方法では、得られたデータを別なコンピューター言語に変換し、PCに取り込んでから解析を行っているが¹⁻⁶⁾、複雑な再計算によるデータ処理は多くの使用者の不得手とするところと思われるので、標準で附属するLC制御ソフトのみで今回は検討を行った。

方 法

試薬

目的物質の標準品は、和光純薬工業製特級のカフェインを使用した。アセトニトリルはナカライテスク製特級品を使用し、水は蒸留水を超純水製造装置(SimpliLab, Merck Millipore)により18MΩ・cm以上まで精製したものを使用した。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。標準原液として250mg/mLカフェイン水溶液を調製し、検量線作成用あるいは検出感度測定用標準溶液は、およそ3倍ごとに0.001-100mg/mLとなるように超純水で希釈して調製した。

試料溶液

実試料は、著者一人の入浴後の浴槽水及び蓄尿を使用した。添加回収試験溶液は、試料を浴槽水の場合はそのまま、尿の場合は超純水で100倍希釈後、メンブランフィルター(Millipore HA, 0.22μm pore size, Merck Millipore)でろ過し、そのろ液とカフェイン標準液を9:1の割合で混合することにより調製した。

装置

装置は島津製作所製高速液体クロマトグラフProminenceシステムを使用し、送液ユニットLC-20AT(全体の送液量1mL/min, 水とアセトニトリルの混合)、低圧グラジエントユニットLC-20AD/T、脱気装置DGU-20A3、カラムオーブンCTO-20AC(40℃)、PDA検出器SPD-M20A(190-400nmを1nm, 640msごとに検出)、オートサンブラSIL-10AF(サンプル注入量10μL)で構成し、システムコ

ントローラーCBM-20AとLCワークステーションLCSolution Multi-PDA(以下、制御ソフト)で制御した(1分析10分)。また特に断りのない限り、カッコ書きで書いた条件を用いた。なお制御ソフトは、1μAUまで表示・検出が可能であった。

HPLCの測定条件

カラムは日立製作所製Lachrom C18(100 mm × 4.6 mm i.d.)を使用した。今回行った測定は、目的物質であるカフェインが溶媒先端(カラム未保持物質の検出時間)以降でなるべく早期に検出されるイソクラティック条件(20%アセトニトリル)とベースライン変動の激しいリニアグラジエント条件(0.1→100%アセトニトリル)の2つである。溶離液条件を決めるに当たり、夾雑物質の影響やグラジエントによるバックグラウンドの変動は特に考慮せず、結果として得られたクロマトグラムの微分処理によりそれらとピーク分離が可能か、また検出感度にどう影響するかを検討した。

微分スペクトルクロマトグラム解析

微分スペクトルクロマトグラム法の概要は、連続性を持った光吸収スペクトルを微分処理することで幅広いバンドを持つ吸収スペクトルから、よりバンド幅の狭いスペクトル(微分スペクトル)を得、さらにこの微分スペクトルの微分値を時間軸に対してプロットすることで、その物質の特徴的な吸収を反映したクロマトグラムを得るものである。10mg/mLのカフェイン標準溶液10μLを注入し、得られたクロマトグラムのピークトップの吸収スペクトルデータを微分処理して1-5次の微分スペクトルを描画した。次に、各次数において得られた微分値を経時的にプロットして微分スペクトルクロマトグラムを作成した。今回の検討では、制御ソフトにより自動的に描画される。

使用した制御ソフト

本研究においては、すべての演算処理は制御ソフトにより行った。近似微分処理は、Savitzky-Golay法^{1-6,9,10)}を原理とする。本ソフトは、簡単な手技で0次のクロマトグラムからの極大値の算出、1, 2次微分スペクトル(時間方向及び波長方向)は可能であるが、2次以降の波長や吸光度の極大値の算出は直接にはできない¹⁰⁾。また現時点で自動的に演算が可能なのは最大ピーク1つのデータの高さのみに限られる。このため、3-5次微分スペクトルクロマトグラムは2-4次微分されたクロマトグラムをさらに1次微分処理することにより求めた。定量分析は、0-5次微分されたクロマトグラムの最大吸光度を持つピーク高さを求め、計算に利用した。

なお2012年時点で、島津製作所以外のHPLC発売メーカーのLC制御ソフトについて調査したが、同様に微分処理が行えるものは見当たらなかった。

結果及び考察

HPLCの適用

溶媒吸収変動の影響を受けないアイソクラテック溶出条件下でのカフェインの極大吸収波長は205nmと273nmに認められた (Fig. 1)。またこの2つの波長では、リニアグラジエント条件下における273nmでは影響が観察されないのに対して、205nmでは大きなベースライン変動が認められた (Fig. 2)。通常このような場合には、273nmを検出波長として条件を組み立てるべきであるが、今回の研究では微分等の処理によりピーク分離の可能性を見極めることが目的であるため、以下205nmを主検出波長とし、確認の為に273nmを用いて、データ解析を行うことにした。

微分スペクトルクロマトグラムの作成

Fig. 3には、205nmでのクロマトグラムを0-5次微分した微分スペクトルクロマトグラムを示す。先行研究^{1,4,5,11)}においては、微分後の定量演算は、微分スペクトル（波長方向の微分）の吸収極大/極小を持つ波長で行われていた。これはピーク高さが高い波長を検出に用いた方が、定量感度が改善されると考えられるからである。しかしながら本研究では、前項と同様の理由で、バックグラウンドの吸収との分離をデータ処理により行うことを主眼としているため、205nmのみを解析に利用した。

検量線の作成

0.001-100mg/mLカフェインの微分スペクトルクロマトグラムの最大ピーク高さから定量演算を試みた。なお微分

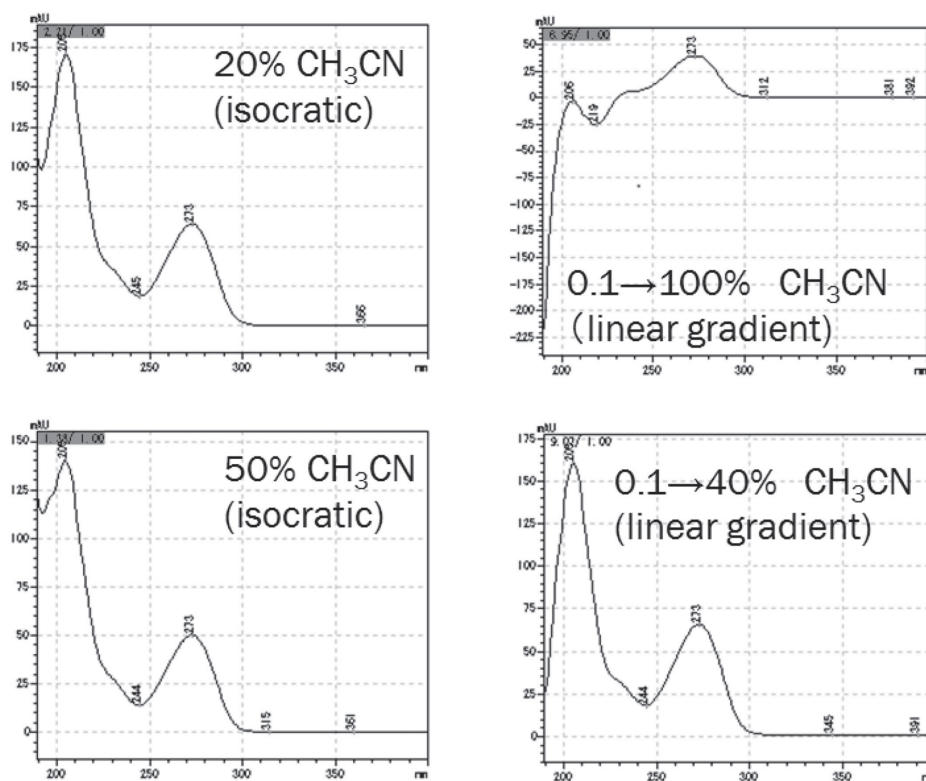


Fig. 1. Adsorption Spectra of Caffeine by Using Different Elution Programs

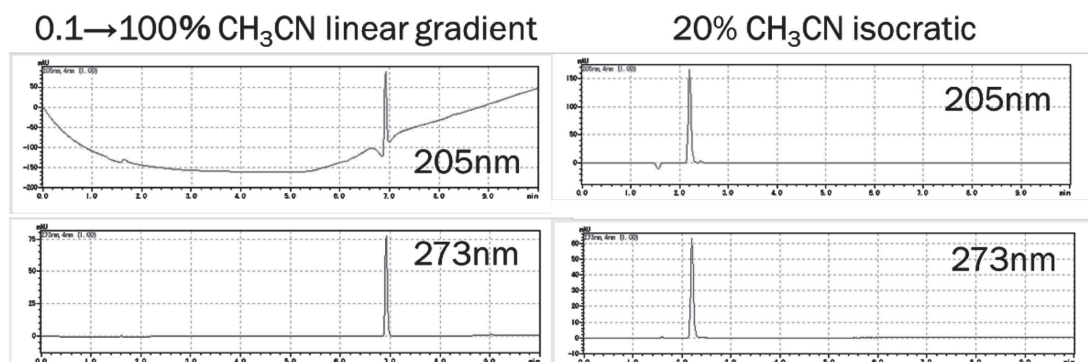


Fig. 2. Chromatograms of Caffeine by Using Different Elution Programs

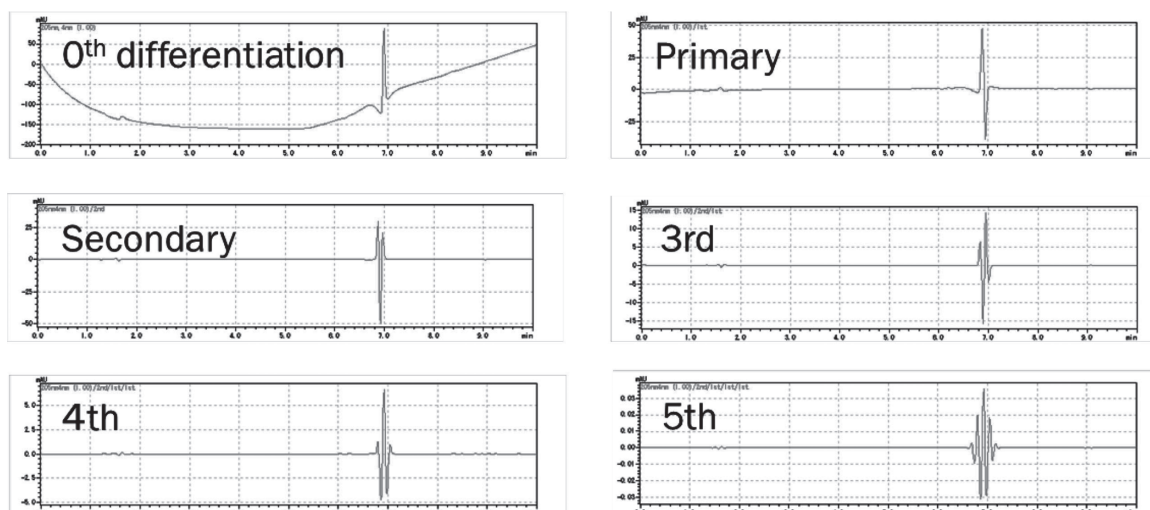


Fig. 3. Derivative Spectrum Chromatograms by using an Elution Program
 Elution condition: 0→10min (0.1→100 % AcCN)
 Measurement wavelength: 205nm

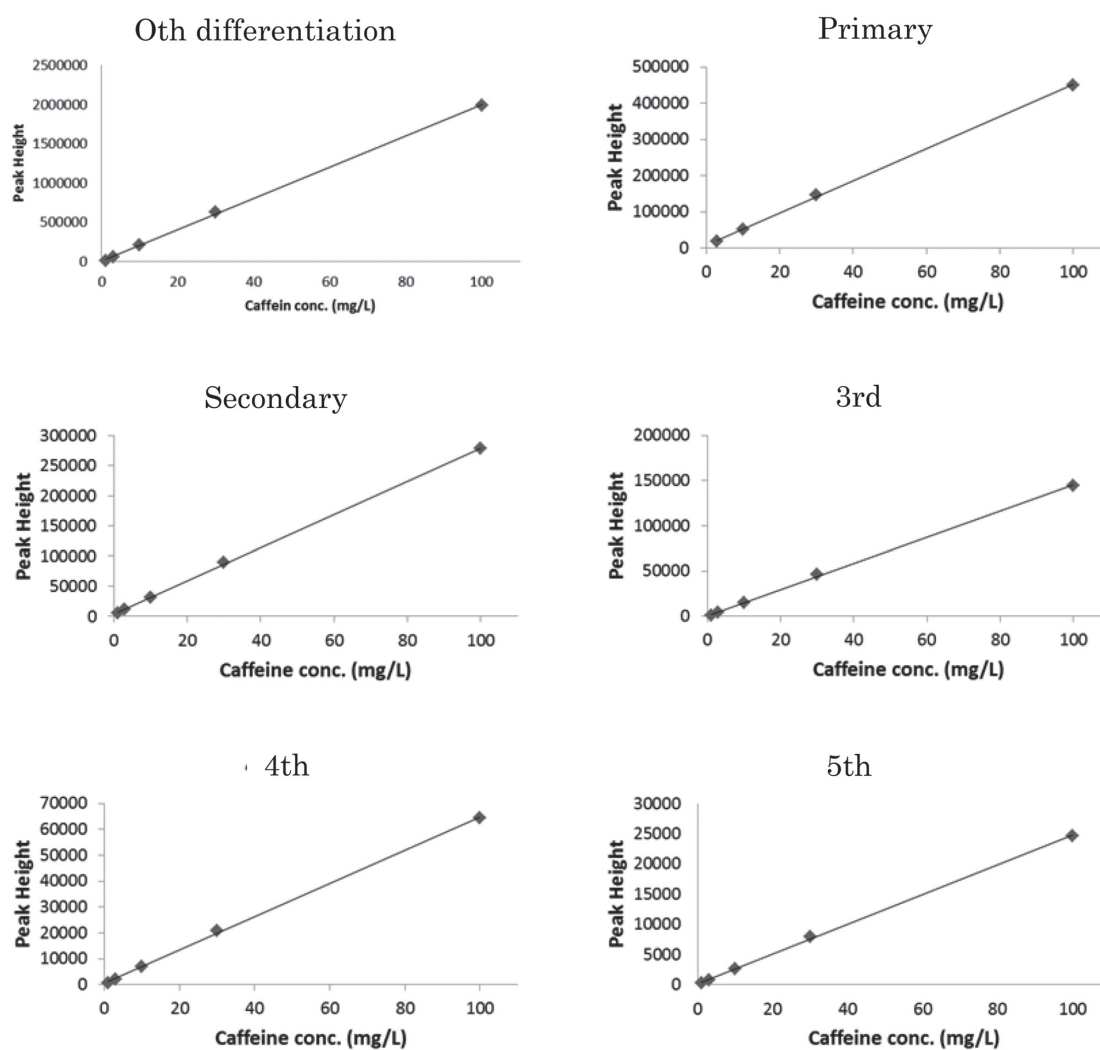


Fig. 4. Calibration Curves of Caffeine by Using with Different Derivative Orders
 Conditions were the same in Fig. 3.

Table 1. Calibration data

| Differentiation degree | 20% CH ₃ CN (isocratic) | | | | 0.1→100% CH ₃ CN (gradient) | | | |
|------------------------|------------------------------------|----------------|----------------------|----------------|--|----------------|--------------|------------|
| | Regression curve*1 | R ² | Linear range (mg/mL) | Average CV (%) | Regression curve*1 | R ² | Linear range | Average CV |
| 0 | 15633X + 5259.3 | 0.9997 | 0.1-100 | 1.22 | 19905X + 7434.6 | 0.9997 | 1-100 | 1.91 |
| 1 | 3594.1X + 1258.1 | 0.9997 | 0.1-100 | 0.81 | 4444.3X + 7793.9 | 0.9997 | 3-100 | 1.32 |
| 2 | 1870.1X + 677.13 | 0.9996 | 0.1-100 | 0.99 | 2754.8X + 3534.1 | 0.9997 | 1-100 | 1.49 |
| 3 | 1030.7X + 367.54 | 0.9996 | 0.1-100 | 0.78 | 1444.9X + 620.16 | 0.9996 | 3-100 | 1.31 |
| 4 | 486.63X + 134.15 | 0.9997 | 0.03-100 | 1.21 | 643.43X + 462.53 | 0.9995 | 1-100 | 2.44 |
| 5 | 188.79X + 50.849 | 0.9997 | 0.01-100 | 0.83 | 245.12X + 199.31 | 0.9996 | 1-100 | 2.18 |

*1 : f (X), peak height ; X, caffeine conc. (mg/mL).

の結果、複数のピークが得られた場合にはその中で最も大きいものを今回の検討では使用した。得られた検量線を Fig. 4に示す。また式や精度などの詳細を Table 1に示す。この検量線は、およそ濃度とピーク高さとの間に比例関係がある範囲を判断して作図及び表に示したものである。アイソクラティック溶出条件においては、高次微分した時に直線検量範囲が広がる傾向が認められた。データのばらつきに関しては微分における影響は特に認められなかった。一方リニアグラジエント溶出条件においても、相関係数、直線範囲、変動係数において、微分の効果は特に認められなかった。しかしながら、検出感度は高次微分するほど検量線の傾きは大きく低下し、結果として減少した。今回の実験結果からすると、特にベースラインの変動は微分により抑制されるが、ピークの絶対値も減少するため、結果して検出感度の改善が見られなかったと考えられた。

実試料からの回収

尿及び浴槽水に3mg/mLのカフェインを添加し、ピーク高さの増加より添加回収率を算出した。Fig.5には実試料のクロマトグラムを示す。今回用いた試料では、浴槽水の

場合は205/273nmのクロマトグラムにおいて目的物質以外に目立ったピークは見られず、尿の場合にはカフェインの溶出位置では、尿などに含まれる主な妨害成分とは分離されて溶出していた。演算処理した結果を Table 2に示すが、アイソクラティックな条件では多少ばらつきが大きいものの、回収率に差は見られなかった。一方、グラジエント溶出時には0次微分と比べ、回収率は低下する傾向が認められ、特に1次微分を行った場合には60%以下の回収率しか得られなかった。この理由としては、バックグラウンドの吸光度変化が微分処理により鋭敏なピークになり、それがカフェインのピークと重なることで無添加の実試料のピークが見かけ上増大することによって考えられる。このことはアイソクラティック溶出時の結果とも矛盾がない。バラつきは、微分時の方が改善する傾向があり、ピーク高さそのものは、ベースラインの傾斜がなくなる分、より正確に測定できると思われるが、前にも述べたように高さの絶対値そのものは微分するほど大幅に減少し、今回用いたソフトの特性上精密さ(有効桁数)も損なわれていた。またピークがシャープになるとともに本数が増大するため、演算に

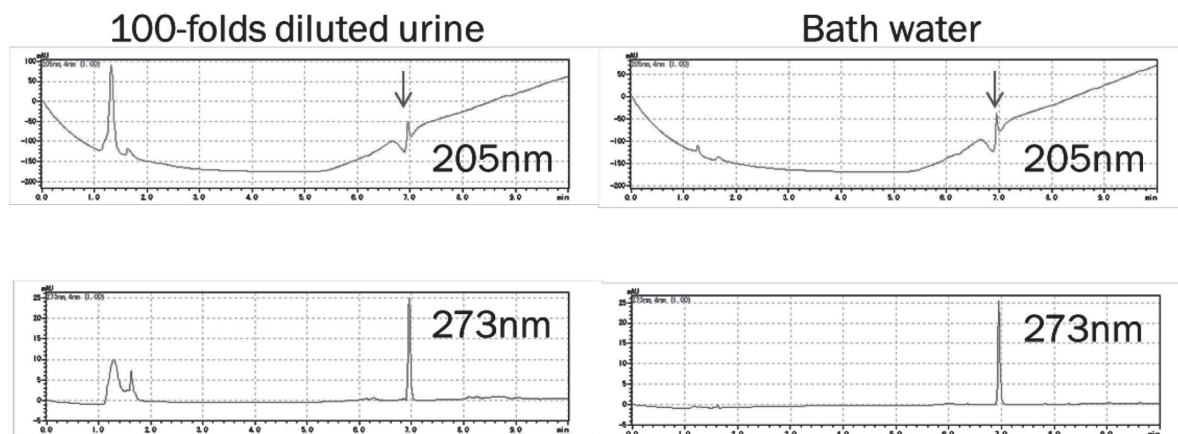


Fig. 5. Detection of Caffeine from Real Samples

Samples : a) 100 folds-diluted stock urine, b) bath water

Elution condition : 0→10min (0.1→100 % AcCN)

Table 2. Recovery Tests

| Differentiation degree | 3mg/mL caffeine added (Upper : 100-folds diluted urine-1,2 / Lower : bath water-1,2) | | | |
|------------------------|--|------------|---------------|------------|
| | Isocratic | | Gradient | |
| | Recovery (%) | CV (%) | Recovery | CV |
| 0 | 100.91, 101.54 | 0.42, 0.19 | 97.14, 96.83 | 4.12, 4.33 |
| | 101.62, 103.28 | 0.07, 0.31 | 94.51, 104.90 | 4.34, 4.18 |
| 1 | 103.48, 101.52 | 0.57, 1.00 | 58.17, 59.34 | 1.70, 3.58 |
| | 100.06, 102.75 | 1.24, 0.43 | 56.91, 67.20 | 2.13, 1.03 |
| 2 | 98.35, 103.14 | 1.94, 0.83 | 82.29, 82.66 | 1.81, 1.60 |
| | 101.63, 103.23 | 0.49, 2.56 | 86.68, 81.64 | 2.14, 1.72 |
| 3 | 100.90, 103.12 | 1.24, 0.79 | 91.51, 93.75 | 2.13, 3.01 |
| | 101.74, 103.44 | 0.56, 1.85 | 91.51, 102.21 | 0.53, 0.72 |
| 4 | 101.00, 102.11 | 0.68, 0.31 | 89.38, 89.50 | 6.71, 2.59 |
| | 101.00, 102.92 | 0.35, 0.78 | 87.16, 94.83 | 2.00, 1.07 |
| 5 | 100.84, 102.25 | 0.74, 0.28 | 86.87, 87.26 | 1.17, 1.57 |
| | 101.18, 103.15 | 0.35, 0.84 | 85.30, 91.08 | 1.73, 1.10 |

Real sample used were two diluted urines and two bath waters.

The urines were diluted to 100-folds by water and filtered, then mixed with caffeine (30mg/mL) at the ratio of 9 : 1.

用いるピークを複数の波長で確認して見誤らないことが必要であると考えられた。

金沢) で発表した。

ま と め

今回、微分スペクトルクロマトグラフ法により、夾雑ピークとの分離や定量性の改善について検討した。定量に用いるピークは微分により幅が狭まるだけでなく、高さも減少し、逆に本数は増加する。ピークの幅は理論上狭く、隣接するピークと重なることはないと考えられるが、溶離液の吸光度変化が微分処理により鋭敏なピークになるため、このことがピーク演算を不正確にする場合があると考えられた。また今回は微分やその他の演算に分析機器に標準で付属するソフトウェアのみを使用したため、有効桁数の減少が起こり一見精度が上がったかのように見えても、定量感度が減少してしまう可能性があると考えられた。

今回の結果では、ピーク高さ、ベースラインのスムージングが中間的な3次微分処理の場合が、検量線データ・添加回収の結果より最適であると考えられた。実試料(尿、浴槽水)そのものに含まれるカフェインの定量は行わなかったが、今後より複雑なマトリックスの試料を含めて検討したいと考える。また微分後のピーク面積値による定量⁹⁾も検討課題である。

将来的には、HPLCを用い、生体や環境など多種の試料からマトリックスに寄らず薬剤など同一の目的成分を同一条件で全自動分析可能にすることが期待され^{6,11)}、今回の結果はその一助になるのではないかと期待する。

本論文の要旨は、日本分析化学会第61年会(2012年9月、

参 考 文 献

- 1) 大浦 徹・山本 敦・小玉修嗣・松永明信(1998). 微分スペクトルクロマトグラム法を用いたHPLCによるかんきつ類中のイマザリルの分析. 食衛誌, **39**, 426-430.
- 2) 山本 敦(1995). フォトダイオードアレイ検出器による高選択的HPLC分析法. ぶんせき, **2**, 144-145.
- 3) YAMAMOTO, A., MATSUNAGA, A., OHTO, M., MIZUKAMI, E. (1995). Real-time analysis of multicomponent chromatograms -Applications to high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **120**, 377-380.
- 4) 小玉修嗣・山本 敦・齋藤行雄・高柳信孝・松永明信(1996). スペクトルの微分解析を用いる高速液体クロマトグラフィーによる水中の除草剤の分析. 分析化学, **45**, 259-263.
- 5) 内山一寿・近藤万莉・横地里香・伊藤 宏・田嶋一郎・利根川 幸・行谷義治・山本 敦(2011). 微分スペクトルクロマトグラム法による類似構造を持つ臭素系難燃剤の分析. 分析化学, **60**, 171-174.
- 6) UCHIYAMA, K., KONDO, M., YOKOCHI, R., YAMAMOTO, A., INOUE, Y. (2011). Derivative spectrum chromatographic method for the determination of trimethoprim in honey samples using an on-line solid-phase extraction technique. *J. Sep. Sci.*, **34**, 1525-1530.
- 7) 北村桂介(2007). : 紫外・可視微分分光法及び核磁気共鳴法による分光分析学的薬学研究. 分析化学,

- 127, 1621-1642.
- 8) HAN, Y., LI, Y., SI, W., WEI, D., YAO, Z., ZHENG, X., DU, B., WEI, Q. (2011). Simultaneous determination of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} by using second-derivative spectrophotometry method. *Spectrochim. Acta Part A* (Molecular and Biomolecular Spectroscopy), **79**, 1546-1551.
- 9) HARUTA, T., SHINZAWA, H., OZAKI, Y. (2009). Practical method for the detection of tetracyclines in honey by HPLC and derivative UV-Vis spectra. *Anal. Sci.*, **25**, 1149-1153.
- 10) SAVITZKY, A., GOLAY, M.J.E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.*, **36**, 1627-1639.
- 11) 小玉修嗣・松永明信・大戸幹也・山本 敦・水上英一 (1995). 水道水中シマジン, チウラムおよびチオベンカルブの全自動HPLC分析システムの構築. *環境化学*, **5**, 81-86.

Basic Study of Derivative Spectrum Chromatographic Method for High-performance Liquid Chromatography ~Recovery of Caffeine from Real Samples by Using Calculating Software~

Jun KOBAYASHI^{1,2)}, Keiichi IKEDA³⁾, Mariko MOCHIZUKI¹⁾, Hideo SUGIYAMA⁴⁾

¹⁾School of Veterinary Nursing and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University

²⁾Department of Environmental Health, National Institute of Public Health

³⁾Department of Bioenvironmental Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University

⁴⁾Department of Health and Nutritional Science, Faculty of Human Health Science, Matsumoto University

Abstract

High-performance liquid chromatography (HPLC) is a major instrumental analysis which is able to analyze multi-components. In general, when the purposed components were analyzed by HPLC, we need to decide analytical conditions that separable from other impurities. Therefore, when two samples that have different composition such as urine and environmental water were analyzed, users have to change another condition.

We considered the improvement of separation and detection of the purpose compound by acquiring and calculating the three-dimensional data in the absorbance/retention time/wavelength of HPLC equipped with the photo-diode array detector (PDA) and standard attached software. In the two-dimensional chromatogram of absorbance and detection time, differential processing in the direction of time was performed. In this study, we analyzed caffeine in real samples by HPLC and compared those different derivative chromatograms by standard attached software.

The derivative processing show that absorbance of eluate decreased, peaks became sharp, and the peak derived from object was separated from other impurities. However additional differential processing was not suitable because of increase of peak number, and decrease of peak height and sensitivity. We conclude that 3rd differential processing in the analyses is suitable.

Key words : derivative spectrum chromatography, photodiode array detector, HPLC

Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ., **62**, 82-88, 2013.