

られたとしている。さらに、通常はその発色団の性質を利用してFLを用いて検出する天然のトコフェロールとトコトリエノールの8種の異性体についてもCADを用いた分析を検討しているが、FLでは検出されなかった未知物質に由来するピークが出現し、複雑なクロマトグラムを得ている。

脂質酸化は高度不飽和脂肪酸の連鎖的分解反応であり、活性酸素などのフリーラジカルによって容易に引き起こされ、結果、食肉製品の品質低下や人体（細胞、皮膚）の老化などをもたらす。通常、脂質酸化は過酸化物質の測定により判定されるが、その精度には疑問が持たれている。Casconeらは¹⁹⁾、空気酸化によって引き起こされる食肉製品中のリン脂質組成変化の分析手法を、GC-FID、マロンジアルデヒド（MDA）測定などと共にHPLC-CADを用いて行っている。7種のリン脂質標準品を用いた順相グラジエント条件での分析では、移動相中の水濃度が高くなるにつれてベースラインの上昇が見られるものの、検出限界（LOD）が7.85～17.55 $\mu\text{g/mL}$ 、検量限界（LOQ）が23.55～52.65 $\mu\text{g/mL}$ であった。実際の食肉では、ホスファジルイノシトール（PI）、PEおよびPCが検出され、脂質抽出物のこれら3つの合計濃度は、0.98%±0.17（W/W±SD）であり、酸化の時間経過によりその値は下がっていく傾向が見られたとされる。この結果、CADによる分析は、脂質研究において良い相補的技術であるとしている。

Lisaらは¹⁹⁾、非水系逆相HPLC（non-aqueous reversed-phase HPLC：NARP-HPLC）にCADを組み合わせることで、植物油中のトリアシルグリセロール（TG）の定量分析を行っている。彼らの手法は、2本の25 cm長の逆相カラムをタンデムに繋ぎ、移動相としてアセトニトリル：2-プロパノール：ヘキササン混液をグラジエント組成で用い、さらに移動相補整（mobile-phase compensation）として同等の2本のカラムに真逆のグラジエント組成を流したものをポストカラムとして混合し、CADで検出している。16種の飽和（C7：0～C22：0）および3種の不飽和（C18：1、C18：2、C18：3）脂肪酸からなる単一脂肪酸TGを標品として用いて、それらのレスポンスファクターを求めているが、最も一般的なTG（炭素鎖がC12～C19の脂肪酸からなるもの）では、その変動は大凡5%以内であったとしている。またこの条件を用いて、オリーブ油、ひまわり油、パーム油、ダイズ油、グレープ油、ゴマ油および亜麻仁油について、その各TG量を求めており、さらにその値から構成する各脂肪酸量についても計算により求めている。

(2) 医薬品

医薬品の製造管理において、HPLCを用いた迅速な定性・定量分析手法の開発は日々求められている。この目的に使用されるいわゆる汎用型検出器として、RI、短波長でのUV、MS、そしてELSDなどが用いられてきた。ここにもCADによるメソッド開発が進められている。

抗生物質の中には還元型ポリケチドのグループに属するものも多く、これらは多くの場合に特定のUV吸収を持たない。PistorinoとPfeiferは¹⁹⁾、エリスロマイシンの生合成前駆体でありマクロラクトン骨格を有する6-デオキシエリスロノリドB（6-deoxyerythronolide：6dEB）をモデル化合物として用い、MS、ELSDおよびCADによる分析比較を行っている。その結果、ダイナミックレンジはMSが最も広がったが、エアロゾル検出器の方が精確で測定範囲全般にわたって精度が高かったとしている。しかし、LODはELSDが0.091 mg/Lであるのに対してMSおよびCADはそれぞれ0.019 mg/Lと0.012 mg/Lであり、費用対効果を考えてもMSと同レベルのダイナミックレンジを持つCADはポリケチド生産過程の検査に有用であるとしている。

Novakovaらは¹⁹⁾、臨床で用いられている主要なスタチン系抗高脂血症薬であるシンバスタチン、ロバスタチンおよびアトルバスタチンのCADを用いた分析手法の開発をDAD（238 nm）と比較して報告している。移動相への各種添加剤、濃度、pH、および流速などの詳細な条件検討を行って最適な条件を設定し、さらに錠剤中のアトルバスタチンとシンバスタチンの分析を行っている。その結果、CADによるLODは0.1 $\mu\text{g/mL}$ であり、UVのその倍以上感度が高かったとしている。

Pfizer社のグループは¹⁹⁾、超臨界クロマトグラフィー（SFC）にCADを繋げた医薬品分析について報告している。カラムとしてエチルピリジンシリカカラムを用い、圧力調節弁の後にライン加温装置を経てCADを直接接続し、また移動相は二酸化炭素中のメタノール濃度のグラジエント溶出し、さらに移動相流速補整（mobile-phase flow compensation）としてメタノールを量減速的にポストカラムで加える工夫をしている。これにより9種類の医薬品や7種類のステロイド類の検出が可能となり、スルファメトキサゾール原体に対しては0.05%レベルの不純物の検出が可能となったとしている。

(3) 生薬

サポニンなどの生薬成分に見られるようにUVの吸収極大が200 nm付近以下で通常のUV/VISでは安定した検出が困難な化合物を分析する場合、近年ではELSDを適用した報告が増えていた。この分野においてもCADによる検出が有効である。

Baiらは¹⁹⁾、生薬ニンジン（人参：*Panax ginseng* C. A. Meyer）の主要なトリテルペンサポニンである7種のギンセノシド類について、CADによる分析をUVおよびESLDと比較している。それによると、CADによる方法はLODが6.57～15.0 ng、LOQが17.5～40.1 ngであるのに対し、UV（203 nm）およびESLDではそれぞれLOD（UV：36.0～85.0 ng、ELSD：24.2～60.2 ng）、LOQ（UV：101.0～142.0 ng、ELSD：72.6～150.3 ng）共にそれを下回っていた。さらに産

地別のニンジンについてCADにより定量分析を行っており、いくつかの試料においてとりわけギンセンノシドRb₁の量が中国薬典に沿わず、多分異なった採取場所や異なった成長年数のものであったのであろうと推測している。

同様に、Baiらは^{21,22)}、田七人參 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 中のギンセンノシド類の分析も行っている。

(4) 糖類

セルロースの熱分解によってグルコースから水一分子取れて生成するレボグルコサン (levoglucosan: 1,6-anhydro- β -D-glucopyranose) などの無水単糖は、抗ガン剤、抗エイズウイルス剤、人工生体材料、キラル分子の分離剤などの原料としての利用価値が高い。反面、レボグルコサンはゴミ焼却、森林火災や焼畑などのバイオマス燃焼時に排出される指標物質として用いられる化合物でもあり、バイオマス燃焼は地球環境に影響を与えることと関係している。Dixonらは²³⁾、バイオマス燃焼煙からレボグルコサンとその他の無水単糖をCADにて検出している。通常はGC-MSなどで分析されるが、燃焼煙の直接分析は対象物質が水溶性物質であるため感度の低下を引き起こすので、実際にはトリメチルシリルエーテル化などの誘導化後に分析される。彼らのCADを用いた方法では、陽イオン交換カラムと移動相に純水を用いることで、レボグルコサンとマンノサン (mannosan: 1,6-anhydro- β -D-galactopyranose) を他の燃焼煙構成成分から分離し、レボグルコサミンをLOD約90 ng/mL (5 ng/injection) で検出することに成功している。

糖鎖は核酸やタンパク質に次ぐ重要な鎖状分子であり、生体内において重要な生理作用を担っている。Inagakiらは²⁴⁾、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) 用のアミドシリカカラムを使用し、CADによりサンプルの誘導化無しでオリゴ糖の検出を行っている。それによると、まず、シアリルグリコペプチド (SGP) のHILIC-CAD分析を試み、LODが0.40 pmol、LQDが1.34 pmolであることを確認している。さらに、SGPの酸加水分解物についてHILIC-CAD分析を行い、シアリ酸 (NeuAc) は比較的ブロードピークとして現れたものの、シアリ酸が二つ外れたアシアロ糖鎖と一つ外れたモノシアリル糖鎖とを直接検出することに成功している。

(5) 無機イオン

多くの医薬品は、その溶解性や物理化学的安定性のため、または生産過程での性質上、もしくは生物医薬品のように基本的な化学構造に由来して、「塩」の形で開発される。この医薬品塩の対イオンは、通常は臨床に供給される前に決定しておく必要がある。無機対イオンの分析には、電位差滴定法、LCにおける間接紫外吸光検出 (indirect UV) とELSD、CEにおけるindirect UVまたは電気伝導度検出 (CD)、イオンクロマトにおけるCD、そして誘導結合プラズマ発光分光法

(ICP-AES) などが用いられている。中でもイオンクロマトが最も一般的に医薬品対イオンの定量に用いられているが、これは対象医薬品が変わることに新しい条件設定が必要となり、また分析には比較的長い時間を要する。そこでBristol-Meyers Squibbのグループは²⁵⁾、HILICカラムとして両性イオン型官能基をポリマー基材に有した充填剤を用いたカラムを使い、CADにより医薬品塩の各種の対イオンを定量分析している。移動相として酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリル混液を用いることで、NO₃⁻、Cl⁻、Br⁻、Na⁺、K⁺、PO₄³⁻およびSO₄²⁻を15分以内に検出することに成功している。Cl⁻とBr⁻、およびNa⁺とK⁺のそれぞれのピークは互いにほぼ共溶出したが、緩衝液として酢酸アンモニウム (pH 3.5) を用いて分析を行うことで分離を達成している。また、特に多価イオン (Ca²⁺、Mg²⁺、PO₄³⁻およびSO₄²⁻) の分析には、50 mmの短いカラムを用いることで分離できるとしている。なお、同じ両性イオン型官能基をシリカゲル基材に有した充填剤をカラムに用いた場合、ベースラインノイズが非常に高く、シリカの溶解かカラムブリードが起きているものと推測している。

(6) その他

CADの非揮発性物質を高感度、非選択性で、物質量をそのまま検出可能であるという特徴は、単なる定量分析のみならず、その特徴を利用した研究もなされている。

光学活性物質の鏡像異性体比 (er: enantiomeric ratio) の決定は、通常、キラルな固定相を有するカラムを用いて各鏡像異性体を分離し、その存在比を求める。対象となる物質がUV吸収などの発色団を有する場合にはUV検出により決定できるが、そうでない場合にはELSDを用いることがある。Wipfらは²⁶⁾、モデル化合物として保護基を導入したアルドイミンを用い、UV、ELSD、およびCADでのer値を比較している。その結果として、UVから求めた値とELSDから求めた値には大きなズレが生じ、erが95:5の化合物はELSDでは純粋な鏡像異性体となってしまうことを見出した。これに対し、CADではUVとほぼ同等程度に正確な値を導くことができたとし、発色団を持たない化合物の鏡像異性体比決定はELSDを用いるべきではなく、CADを用いることを推奨するとしている。

二次代謝産物である含有化学成分の組成により植物などの分類を行うことをケモタキソノミー (chemotaxonomy) というが、現在では分子遺伝学的手法が進歩しており、あまり試みられなくなってきた。しかし、表現型である二次代謝産物の成分組成分析は、遺伝子解析がまだ進んでいないものや形態的特徴による判断が難しい場合、さらには分類を裏付けする証拠としては有効である。BrondzとHøilandは²⁷⁾、フウセンタケ属 (*Cortinarius*) のキノコについて、分離技術としてSFCを用い、これにMS、UV、およびCADを検出技術として

用いることで、化学成分によるキノコの識別化を検討している。フウセンタケ属は巨大な属を形成し、その中で*C. infractus*と*C. subtortus*は分類上離れた位置を占めているとされるが、それらの担子器果 (basidiocarp) の形態学的特徴の類似性より、両種は*Plegmacium*亜属に属すると考えるべきであるとするなど、論争的となっていた。また、リボソームRNAをコードする核DNAのITS領域などにおける遺伝子解析の結果では、両者を異なった位置に置くことを支持していた。今回、これらのキノコが含有するインドールアルカロイド類をSFC-CAD-MSおよびSFC-UV-MSにより分析したところ、*C. infractus*に見られるβ-カルボリン-1-プロピオン酸類が*C. subtortus*では観測されないことが判明したという。このことより二つの種は分類学上別々の位置に置かれるべきであるという遺伝子解析の結果がさらに支持されたとしている。

4. おわりに

このようにCADは揮発性物質の検出に広範な応用性がある。市販モデルのCADは、現在までに全世界で千台、日本においても二百台以上の普及と思われるが、最近UHPLC (RRLC) に対応したモデルも発売された²⁰⁾。なお、開発元のESA Biosciences社は、2009年9月にDionex社²⁰⁾に買収され、その傘下となっている。

CADは、その検出感度がRIの約100倍、ELSDの約10倍もあり、10 ngから100 μg程度までという広範囲での検出が可能であり、化合物の種類による検出感度の変動は小さく、安定し、また再現性にも優れている。そのため、主にこれまで揮発性物質の検出に用いられてきたELSDに取って代わる汎用型検出技術であると言える。今後も食品や天然物などの分野を含めた多方面へのさらなる応用が期待される。

引用文献

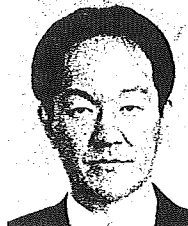
- 1) Y. Goda, O. Shirota and T. Maruyama, *Bunseki*, 308-314 (2003).
- 2) B. Zhang, X. Li and B. Yan, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 299-301 (2008).
- 3) R. W. Dixon and D. S. Peterson, *Anal. Chem.*, 74, 2930-2937 (2002).
- 4) M. Ganzera and H. Stuppner, *Curr. Pharm. Anal.*, 1, 135-144 (2005).
- 5) K. Mojsiewicz-Pienkowska, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 39, 89-94 (2009).
- 6) M. Senda, K. Fukushima, K. Hashiguchi, T. Matsumoto, P. H. Gamache, J. C. Waraska and D. Asa, *Chromatography*, 27, 119-124 (2006).
- 7) L. B. Allen and J. A. Koropchak, *Anal. Chem.*, 65, 841-844 (1993).
- 8) URL: <http://www.quanttechnologies.com>

- 9) URL: <http://www.esainc.com>
- 10) URL: <http://www.lms.co.jp>
- 11) T. Gorecki, F. Lynen, R. Szucs and P. Sandra, *Anal. Chem.*, 78, 3186-3192 (2006).
- 12) N. Vervoort, D. Daemen and G. Toeroek, *J. Chromatogr., A*, 1189, 92-100 (2008).
- 13) URL: <http://coronacac.com/>
- 14) R. A. Moreau, *Lipids*, 41, 727-734 (2006).
- 15) A. Cascone, S. Eerola, A. Ritieni and A. Rizzo, *J. Chromatogr., A*, 1120, 211-220 (2006).
- 16) M. Lisa, F. Lynen, M. Holcapek and P. Sandra, *J. Chromatogr., A*, 1176, 135-142 (2007).
- 17) M. Pistorino and B. A. Pfeifer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 1189-1193 (2008).
- 18) L. Novakova, S. A. Lopez, D. Solichova, D. Satinsky, B. Kulichova, A. Horna and P. Solich, *Talanta*, 78, 834-839 (2009).
- 19) C. Brunelli, T. Gorecki, Y. Zhao and P. Sandra, *Anal. Chem.*, 79, 2472-2482 (2007).
- 20) C.-C. Bai, S.-Y. Han, X.-Y. Chai, Y. Jiang, P. Li, P.-F. Tu and J. Liq, *Chromatogr. Relat. Technol.*, 32, 242-260 (2009).
- 21) C. Bai, X. Chai, H. Wang, X. Cui, P. Li and P. Tu, *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 40, 54-58 (2009).
- 22) C. Bai, X. Chai, X. Gao, P. Li and P. Tu, *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 34, 677-680 (2009).
- 23) R. W. Dixon and G. Baltzell, *J. Chromatogr., A*, 1109, 214-221 (2006).
- 24) S. Inagaki, J. Z. Min and T. Toyo'oka, *Biomed. Chromatogr.*, 21, 338-342 (2007).
- 25) Z. Huang, M. A. Richards, Y. Zha, R. Francis, R. Lozano and J. Ruan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50, 809-814 (2009).
- 26) P. Wipf, S. Werner, L. A. Twining and C. Kendall, *Chirality*, 19, 5-9 (2007).
- 27) I. Brondz and K. Høiland, *Trends Chromatogr.*, 4, 79-87 (2008).
- 28) URL: <http://www.corona-ultra.com>
- 29) URL: <http://www.dionex.com>

PROFILE

代田 修

徳島文理大学香川薬学部
准教授
博士 (薬学)



1988年東京薬科大学薬学部薬学科卒業、1994年同大学大学院薬学研究科薬学専攻博士後期課程修了、同年科学技術庁特別研究員、1997年国立衛生試験所厚生技官、1998～2000年米国・コロンビア大学化学科客員研究員、2001年国立医薬品食品衛生研究所生薬部主任研究官、2004年徳島文理大学香川薬学部創薬学科助教、2007年同准教授、現在に至る。

