

低濃度領域の測定に基づく HPLC の定量性評価

Evaluation of Quantitiveness in High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

新田 有^{1,2)}

指導教員 上本 道久²⁾

1) 明治大学 理工学部 応用化学科

2) 明星大学 理工学部 環境科学系

キーワード：機器分析，HPLC，定量分析，信頼性，ばらつき

1. 緒言

正しく「はかる」という行為は、現在の暮らしや社会活動には必要不可欠なものと言っても過言ではない。私達が日常的に使用する水道水も日々検査が行われていることは周知であるが、鉄やカドミウムなど水質基準値が 0.1 mg/L 以下の物質も多く、微量に含まれる元素を正確にはかる必要がある。ここで、分析成分の量を測定する操作を定量と言う。¹⁾質量を測定する天秤や、温度計など多くの「はかる」機械は、この定量のための分析装置である。

定量分析において分析値の信頼性は欠かせない。ここで考えるのは検出限界(Limit of Detection, LOD)と定量下限(Limit of Quantitation, LOQ)である。LOD は検出できる最小量(値)であり、LOQ とはある分析結果を指定された信頼性で記述しうる最小量又は最小濃度とされている。²⁾つまり、この定量下限を上回る値のみが分析値として意味のある値となり、定量下限以下の値は検出の有無を示す意味しか持たない。LOQ は信頼性(ばらつき)と共に示す必要があり、低濃度領域における目的物質の定量にとって非常に重要な特性値である。この定量下限を算出する方法として、濃度の異なる試料を繰り返し測定して濃度と繰り返し測定の相対標準偏差(RSD)との関係線から求める方法が提案されている。両者を対数でプロットした時の関

係線から必要な信頼性の水準に合わせて、LOQ を算出する手法である。³⁾図1に一例を示す。例えば RSD が 10% の信頼性での定量を要求する時、マトリックス中の亜鉛濃度の LOQ は 0.02 g cm^{-3} となる。

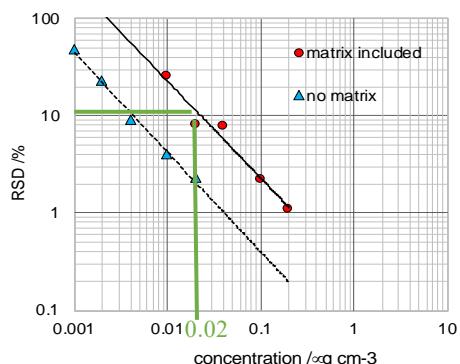


図1 アルミニウムマトリックス中の亜鉛のLOQ推定⁴⁾

本実験では代表的な分離分析用機器である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を検討した。本装置は共存する物質から目的成分を分離するための性能の確保に重きを置かれることが多く、実験値がどのようなばらつきの傾向を持つのか、定量性について評価されていない現状がある。そこで本研究では HPLC のばらつきの発現特性及び定量性を調べる目的で濃度と RSD を両対数プロットすることで検討を行った。

2. 実験

2. 1 試薬

試料用として、酢酸(和光純薬、特級)、安息香

酸(関東化学, 特級)、カフェイン(和光純薬, 和光特級)を用いた。

移動相溶液調製には二水素リン酸ナトリウム(関東化学, 鹿特級)、二水素リン酸カリウム(関東化学, 特級)、アセトニトリル(関東化学, HPLC 用)、メタノール(関東化学, 特級)、超純水(Milliipore, Milli-Q システム)を用いた。

2. 2 装置

シリジンジェクション式の HPLC(島津 20A システム, 送液ユニット, カラムオーブン, UV-VIS 検出器, システムコントローラー)を使用した。カラムは GL Science の InertSustain AQ-C18(内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μm)を使用した。

2. 3 実験方法

試料(酢酸, 安息香酸, カフェイン)を個別に超純水にて 7 段階の濃度の溶液として調製した。HPLC の測定パラメーターである温度(27–45 °C)、流速(0.5–4 mL min⁻¹)、溶離液 pH(2–7)などの条件を変更させて各濃度の試料ごとに 10 回の繰り返し測定を行った。得られたピークの保持時間、高さ強度、面積強度から強度値の平均値及び RSD を算出した。RSD を測定濃度に対して両対数プロットした。

3. 結果と考察

まず、信号の再現性についてはクロマトグラムで常用される面積強度の方が、多くの場合において高さ強度よりも良好であることが確認された。

測定した温度の範囲ではピークの形状は大きく変化せず、関係線の傾きはほとんど変化しなかった。流量を大きくすると強度は低下したもの直線の傾きは変わらず、関係線は RSD が小さくなる方に平行移動した。この結果からピークの形状がシャープな方が RSD は良好になると考えられる。

また、多くの結果において濃度と RSD の両対数グラフは直線性が悪いことが確認された。図 2 に酢酸について pH を変化させたときの濃度と RSD の両対数グラフの変化を示す。pH により RSD の直線の傾きが変化している。これは、解離度が変化したことによる、カラムとの相互作用の変化が影響している可能性がある。

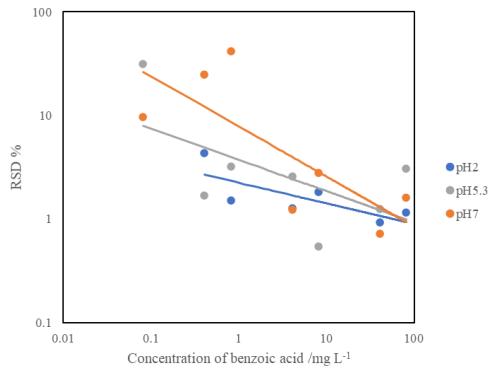


図2 安息香酸の濃度とRSDの関係

一方で、濃度と強度との関係線(検量線)についてはいずれの場合も決定係数が 0.99 以上の値を示していた。図 3 に同試料の濃度対面積強度の検量線を示す。

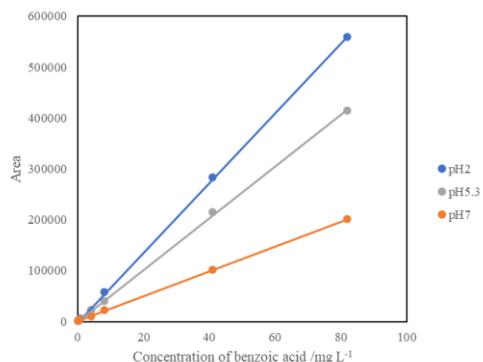


図3 安息香酸の濃度対面積強度の検量線

図 2 の結果は図 1 に示した ICP 発光分析の結果とは大きく異なっている。これは HPLC の信号は試料とカラムとの間の様々な相互作用による吸着脱離の結果であり複雑であるためと予想される。今後はこれらの相互作用について考察して、HPLC の定量性の評価を進めていきたい。

4. 参考文献

- 1) 今任稔彦訳：“クリスチャン分析化学 I 基礎編”，p. 17 (2016), (丸善出版); G.-D. Christian, P.-K. Dasgupta, K.-A. Schug: “Analytical Chemistry 7th Edition”, (2014), (J. Wiley & Sons, Inc).
- 2) 上本道久: ぶんせき(Bunseki), 2010, 5.
- 3) J.-M. Mermet: Spectrochim. Part B, 63, 166, (2008).
- 4) M. Uemoto, M. Makino, Y. Ota, H. Sakaguchi, Y. Shimizu, K. Sato: Anal. Sci., 34, 719 (2018). Supporting Information