

第3の検出器「Laser Counter “NQAD”」 ～未知サンプルへの挑戦～

株式会社 大阪ソーダ

TEL: 06-6110-1598 FAX: 06-6110-1612

E-mail: silica@osaka-soda.co.jp

URL: <https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/>

| 本日の内容

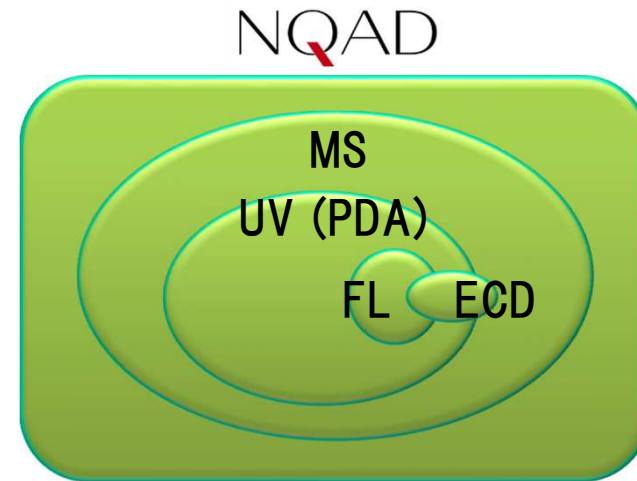
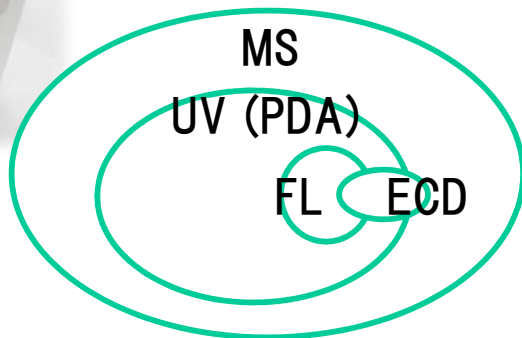
I. NQADとは...

- ・検出器内部の構造と測定原理について
- ・特長の解説

II. 応用(アプリケーションデータ紹介)

- ①化粧品中のトラネキサム酸
- ②無機イオン(Na^+ , K^+ , Cl^- , ClO_4^- , PO_4^{3-})
- ③NQAD及びMSによる検出の比較
 - ・PEG4000
 - ・ヒト皮質中の脂質
 - ・胆汁酸添加尿試料

I. NQADとは

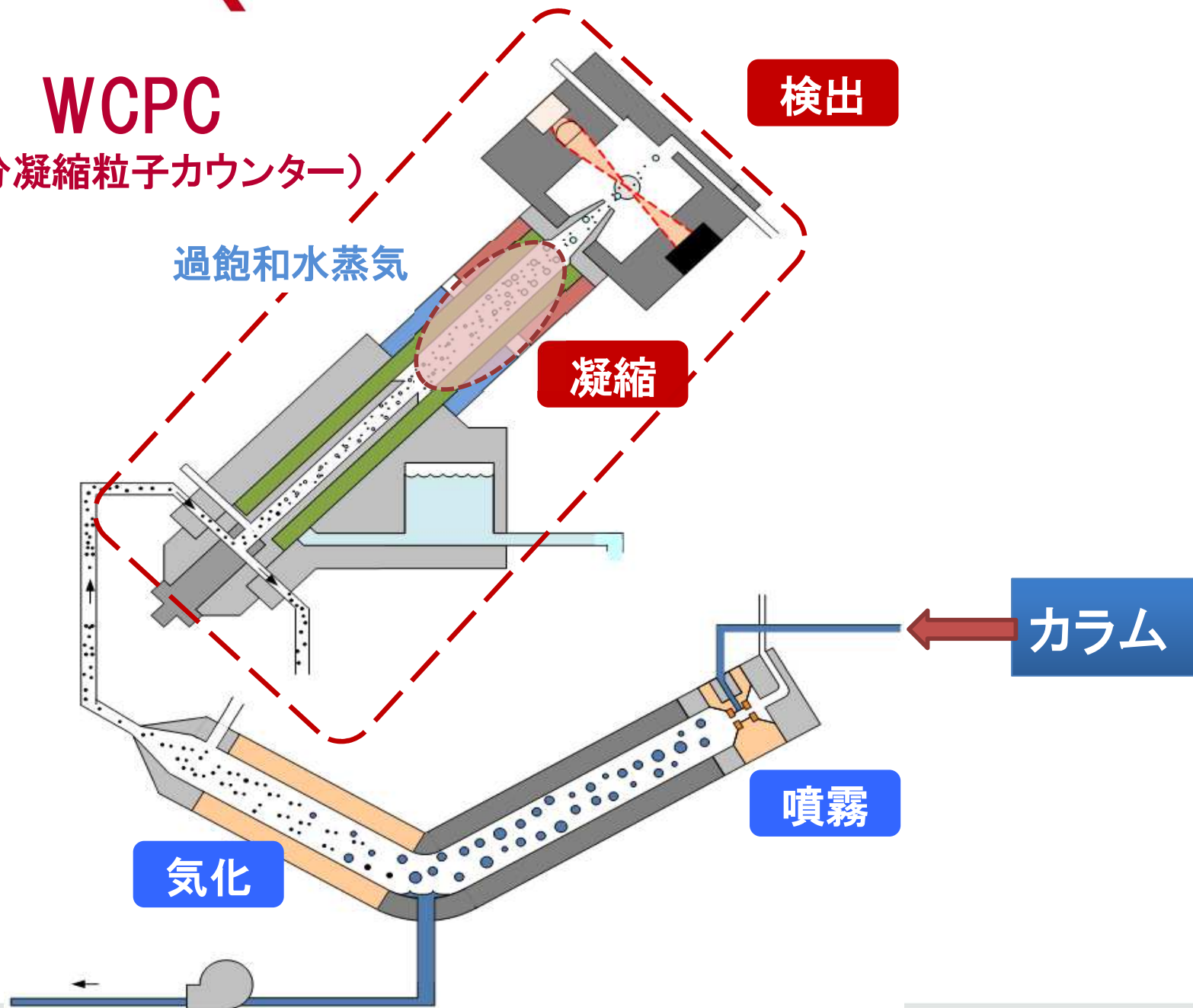


測定対象物質の概念図
(揮発性物質を除く)

NQAD (Nano Quantity Analyte Detector)は移動相を噴霧・気化し、残ったエアロゾル状態の微粒子をレーザーでカウントするHPLC/UHPLC用検出器です。UV検出器では確認しきれなかった物質も検出し、さらに従来の検出器の対象物もカバーし、全ての不揮発性・半揮発性物質の分析に最大限の効果を発揮する検出器です。

NQADの内部構造

WCPC
(水分凝縮粒子カウンター)



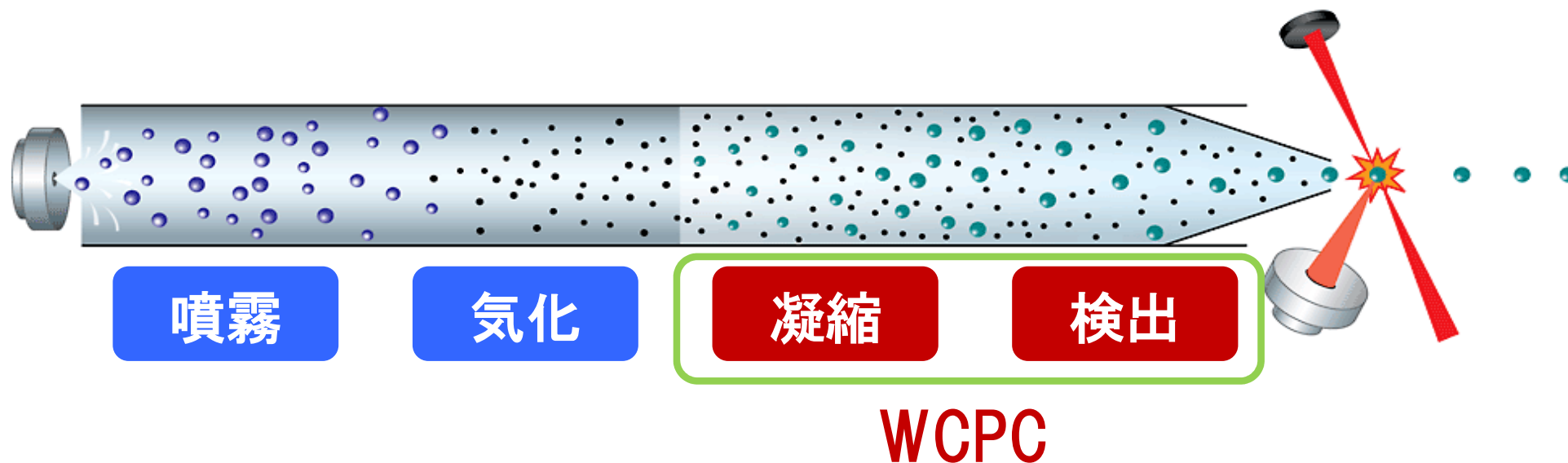
WCPC(水分凝縮粒子カウンター)

(Water-based Condensation Particle Counter)

過飽和状態の水蒸気雰囲気中にエアロゾル粒子を通過させ、水分を凝縮させながら液滴を成長させ、レーザーでカウントする技術です。

液滴として検出するので測定対象物質の物性の影響を受けません。

測定原理まとめ



噴霧

ドライエア(もしくは窒素)を用いたネブライザーにより噴霧します。

気化

エバポレーターにより移動相および揮発性成分を蒸発させます。

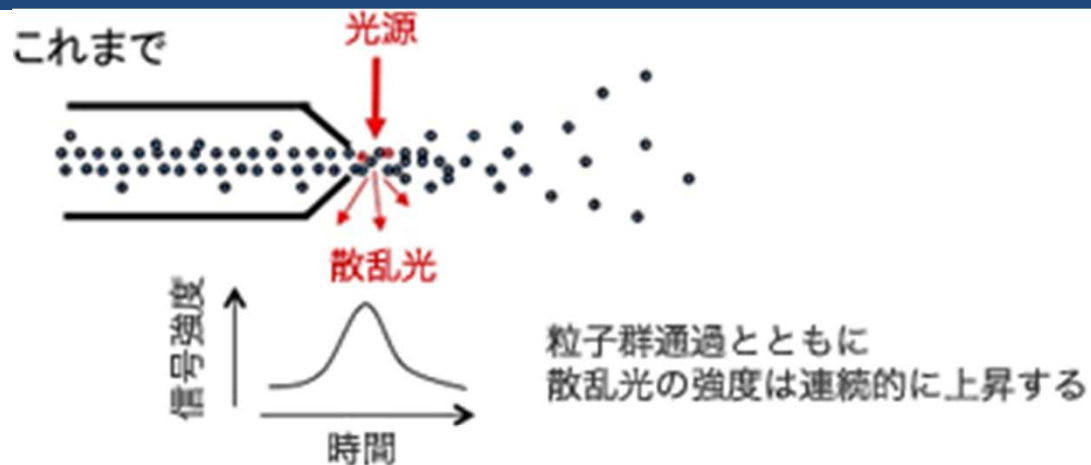
凝縮

残存した不揮発性物質・半揮発性物質はWCPC内部へ導入されます。
過飽和水蒸気の中で、不揮発性・半揮発性物質を核とした水分凝集体を形成させ、液滴が μm オーダーになるまで成長させます。

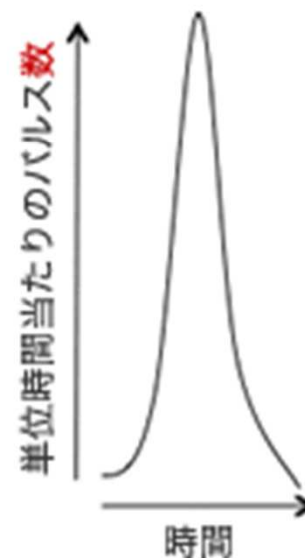
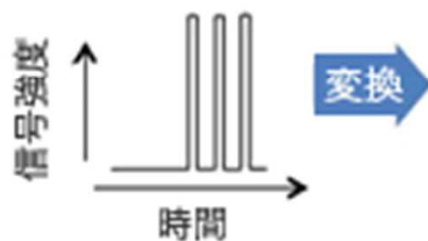
検出

粒子カウンター(レーザー)にて、液滴をカウントします。

測定原理(補足)



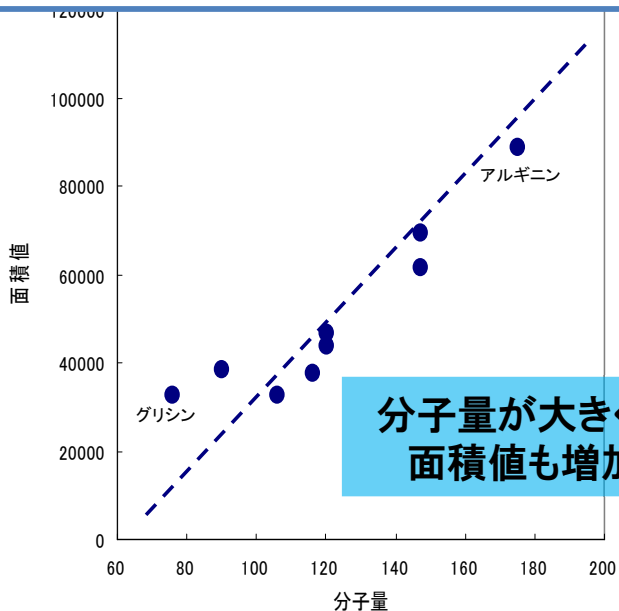
- ① 粒子成長
- ② 強い散乱光
- ③ パルスカウント



- * 高感度検出
- * 広いダイナミックレンジ

特長1 重量依存型検出器

モル濃度 (0.05 $\mu\text{mol/mL}$) 一定



重量 (10 $\mu\text{g/mL}$) 一定

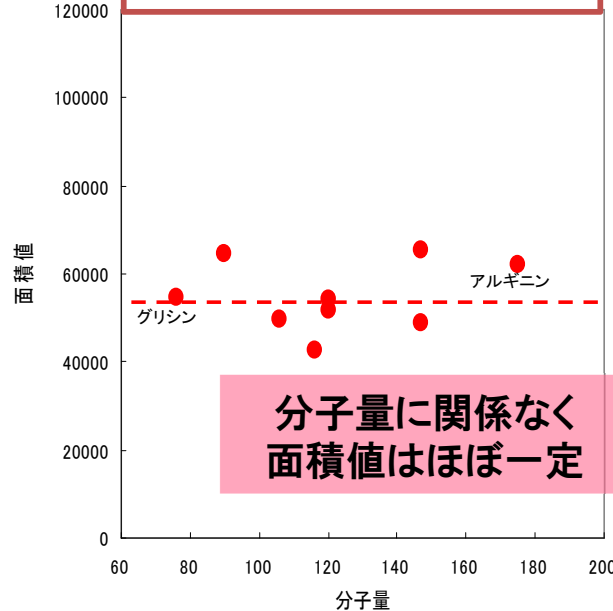
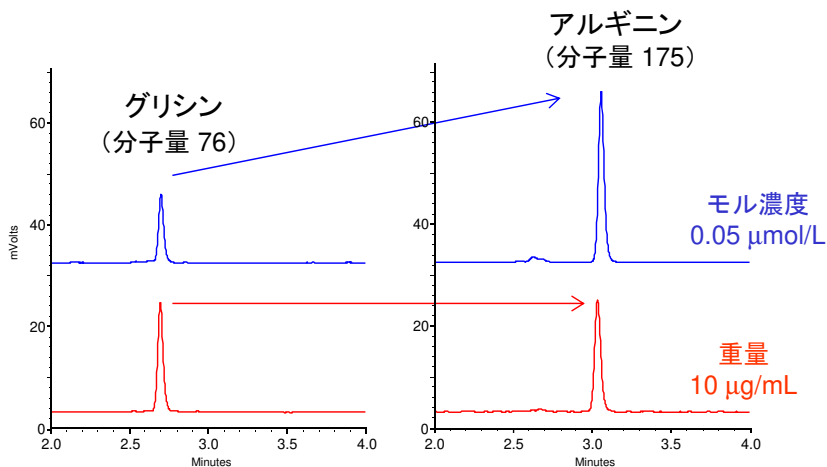


図1 重量濃度及びモル濃度とピーク面積比較

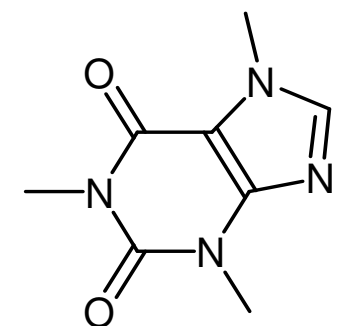


アミノ酸	分子量
グリシン	76
アラニン	90
セリン	106
プロリン	116
トレオニン	120
ホモセリン	120
グルタミン	147
リジン	147
アルギニン	175

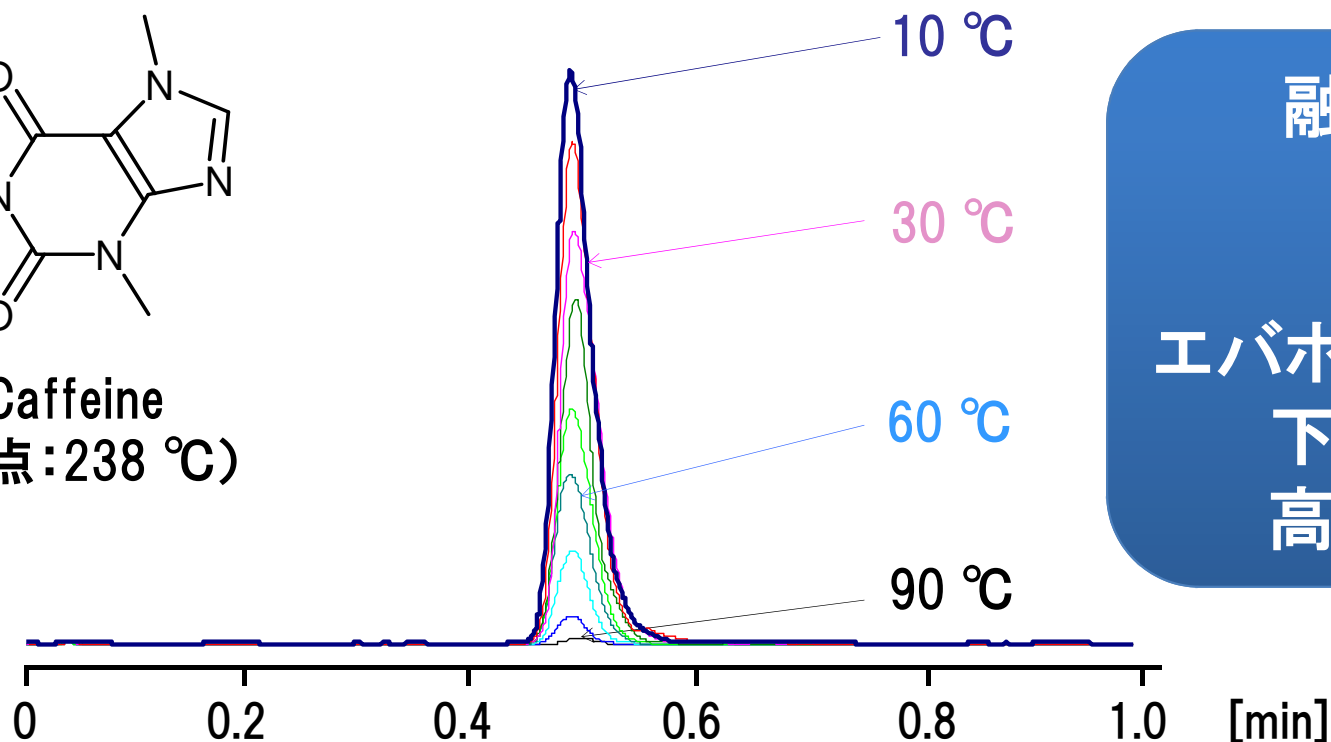
オンカラム上の
重量に依存

図2 クロマトグラム (上段;モル濃度, 下段;重量サンプル)

| 特長2 昇華性物質の検出



Caffeine
(融点: 238 °C)



融点前に昇華



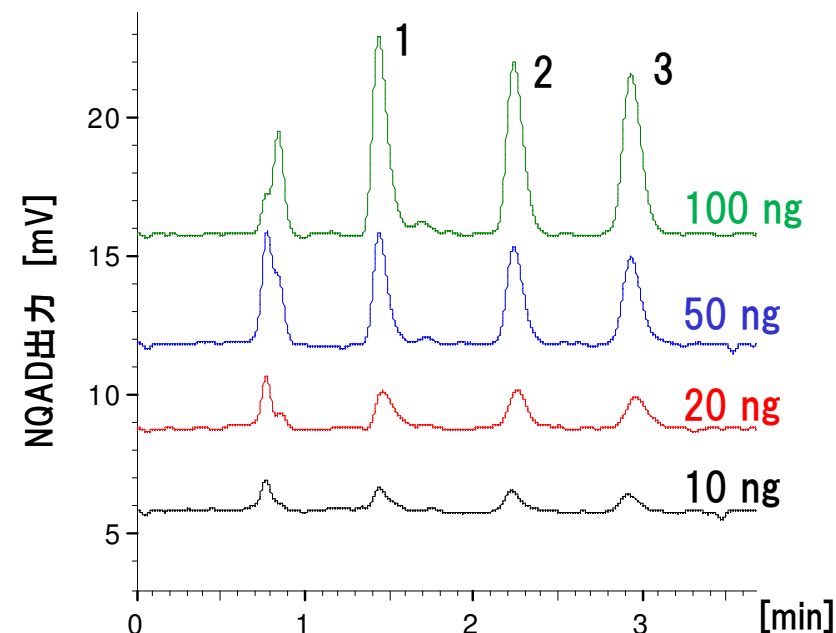
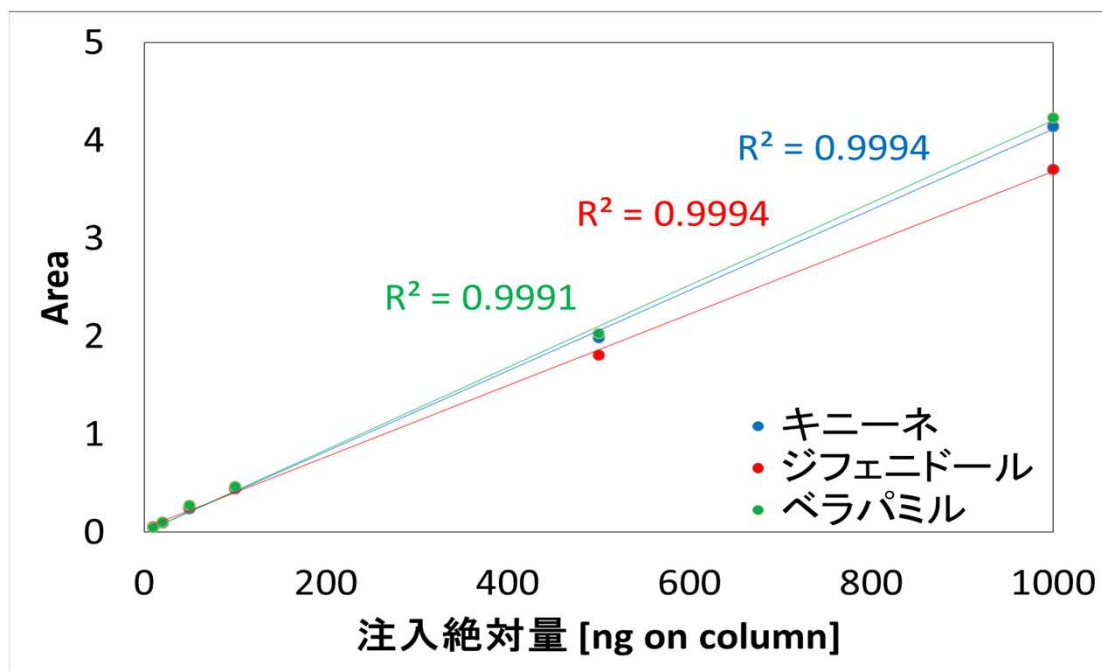
エバポレーターの温度を
下げることにより
高感度化が可能

■ HPLC Conditions ■

Column	: CAPCELL PAK C ₁₈ MGIII S3 ; 2.0 mm i.d. x 10 mm
Mobile. Phase	: H ₂ O / CH ₃ CN = 90 / 10
Flow rate	: 300 μL/min
Temp.	: 40 °C
Detector	: NQAD (Nebulizer 30 °C, Filter 1.3 s)
Inj. vol.	: 2 μL
Sample	: Caffeine 100 μg/mL

特長3 ダイナミックレンジ① ~塩基性化合物~

相関係数は0.999以上

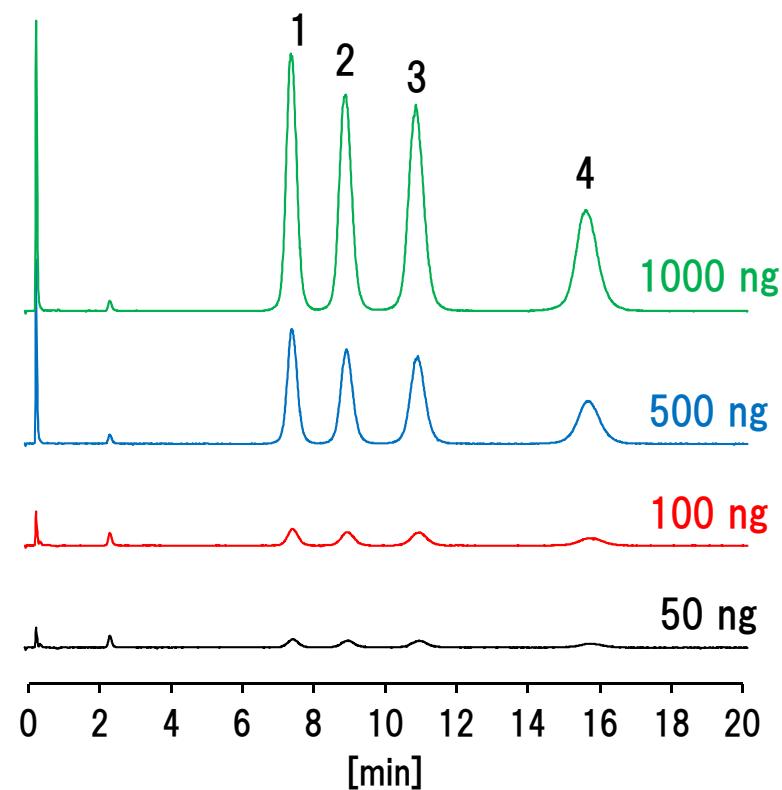
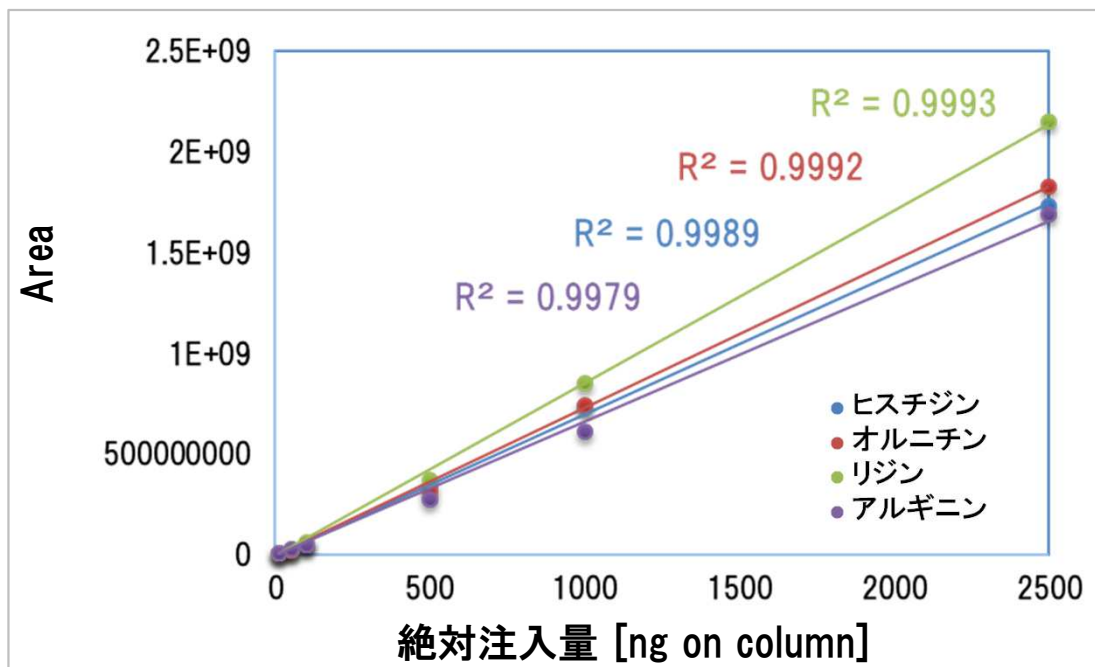


■ HPLC Conditions ■

Column : CAPCELL PAK C₁₈ MGIII S5; 3.0 mm i.d. x 75 mm
Mobile phase : 10 mmol/L HCOONH₄ (pH 3, HCOOH) / CH₃OH = 50 / 50
Flow rate : 500 μL/min
Temperature : 40 °C
Detection : NQAD (Evaporation 35 °C, Nebulizer 30 °C)
Inj. vol. : 10 μL
Sample : 50 vol% CH₃OH (10 - 1000 ng on column)
1. キニーネ 2. ジフェニドール 3. ベラパミル

特長3 ダイナミックレンジ② ~塩基性アミノ酸~

相関係数は0.997以上



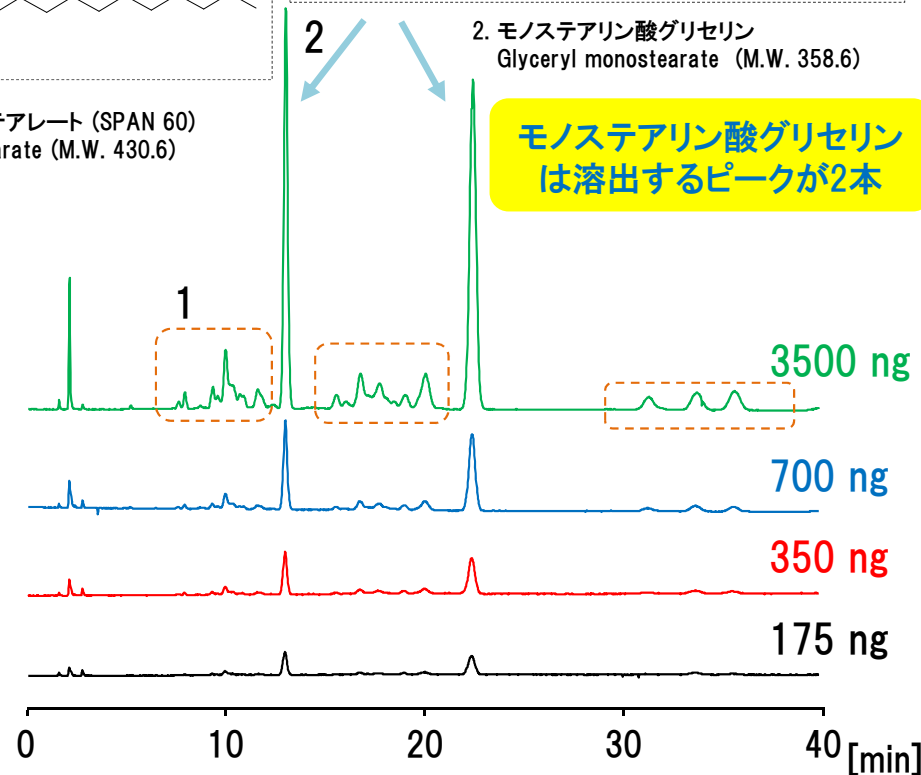
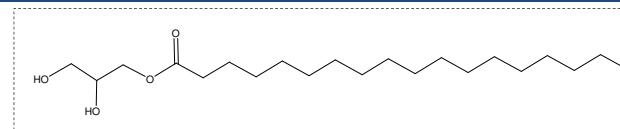
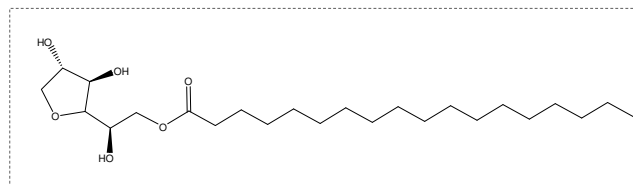
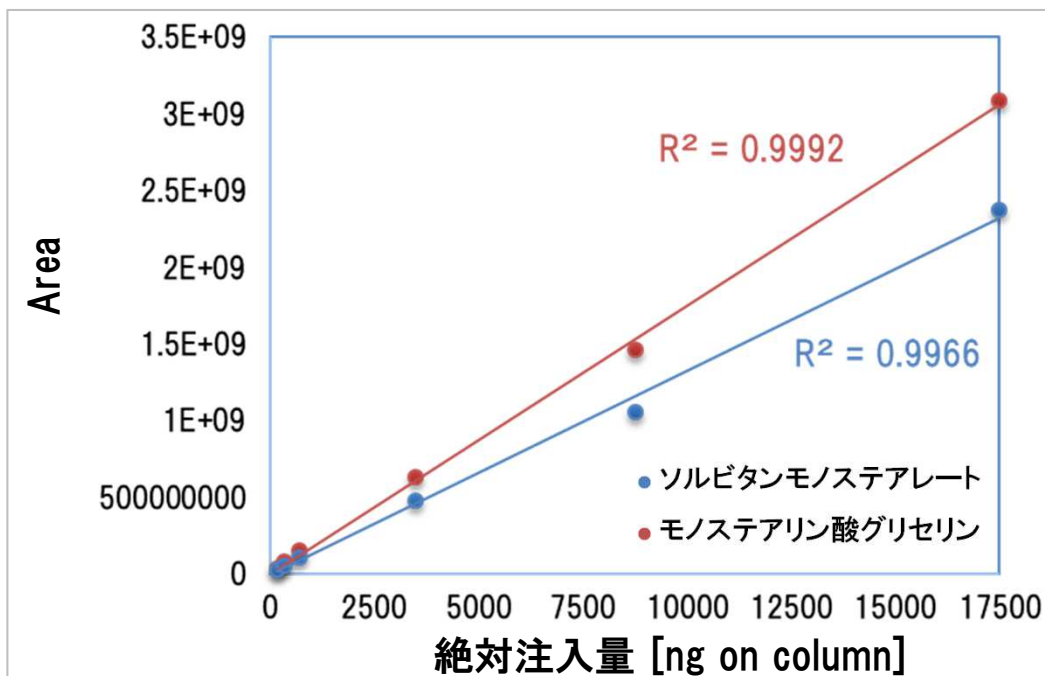
■ HPLC Conditions ■

Column : CAPCELL PAK SCX UG80 S5 ; 4.6 mm i.d. x 35 mm
Mobile phase : 50 mmol/L HCOONH₄ (adjusted at pH 3.0 with formic acid) / CH₃CN = 70 / 30
Flow rate : 1 mL/min
Temperature : 40 °C
Detector : NQAD (Evaporation 60 °C, Nebulizer 30°C)
Inj. vol. : 10 μL
Sample : H₂O (10 - 2500 ng)
1. Histidine 2. Ornithine 3. Lysine 4. Arginine

イオン交換カラムを用いることで
負荷量が増大

特長3 ダイナミックレンジ③ ~ノニオン型界面活性剤~

相関係数は0.996以上



モノステアリン酸グリセリンは溶出するピークが2本

■ HPLC Conditions ■

- Column : CAPCELL PAK C₁₈ MGII S3 ; 4.6 mm i.d. x 150 mm
- Mobile phase : A) 0.1 vol% HCOOH / THF = 90 / 10, B) 0.1 vol% HCOOH, CH₃CN / THF = 90 / 10, A / B = 30 / 70
- Flow rate : 1 mL/min
- Temperature : 40 °C
- Detector : NQAD (Evaporation 60 °C, Nebulizer 30 °C)
- Inj. vol. : 7 μL (175 - 17500 ng)
- Sample : 1. Sorbitan monostearate (SPAN60) 2. Glycerol monostearate

| 特長まとめ

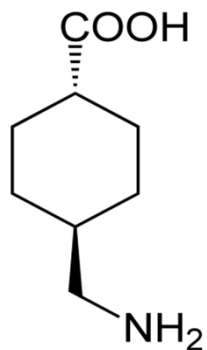
- 化学構造に寄らず含有量(重量)に基づいた強度が得られる。
⇒重量依存型検出器
- 不揮発性物質・半揮発性物質が対象となる。
- ngオーダーの高感度を有し、ngから μg までの幅広いダイミックスレンジをもつ。

Ⅱ. 応用(アプリケーションデータ)

- ① 化粧品中のトラネキサム酸
- ② 無機イオン(Na^+ , K^+ , Cl^- , ClO_4^- , PO_4^{3-})
- ③ NQAD及びMSによる検出の比較
 - PEG4000
 - ヒト皮膚中の脂質
 - 胆汁酸添加尿試料

化粧品中のトランスキサム酸の分析

トランスキサム酸



MSによる同定

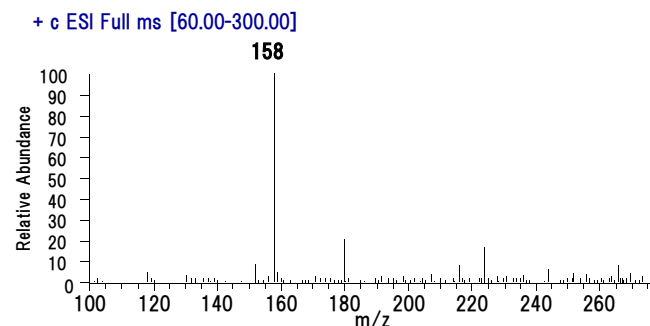
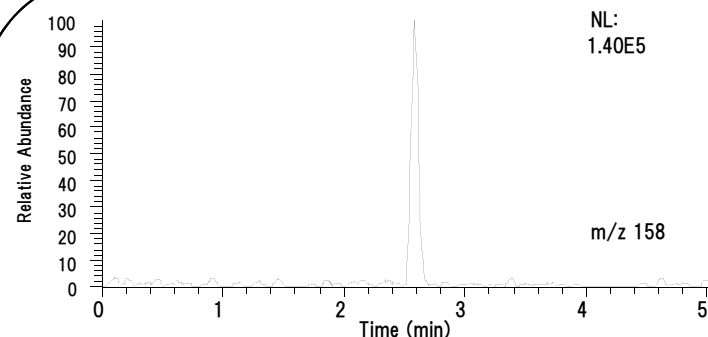
UV吸収のない化合物も
測定可能

配合されているPEG

NQAD

PDA 210 nm

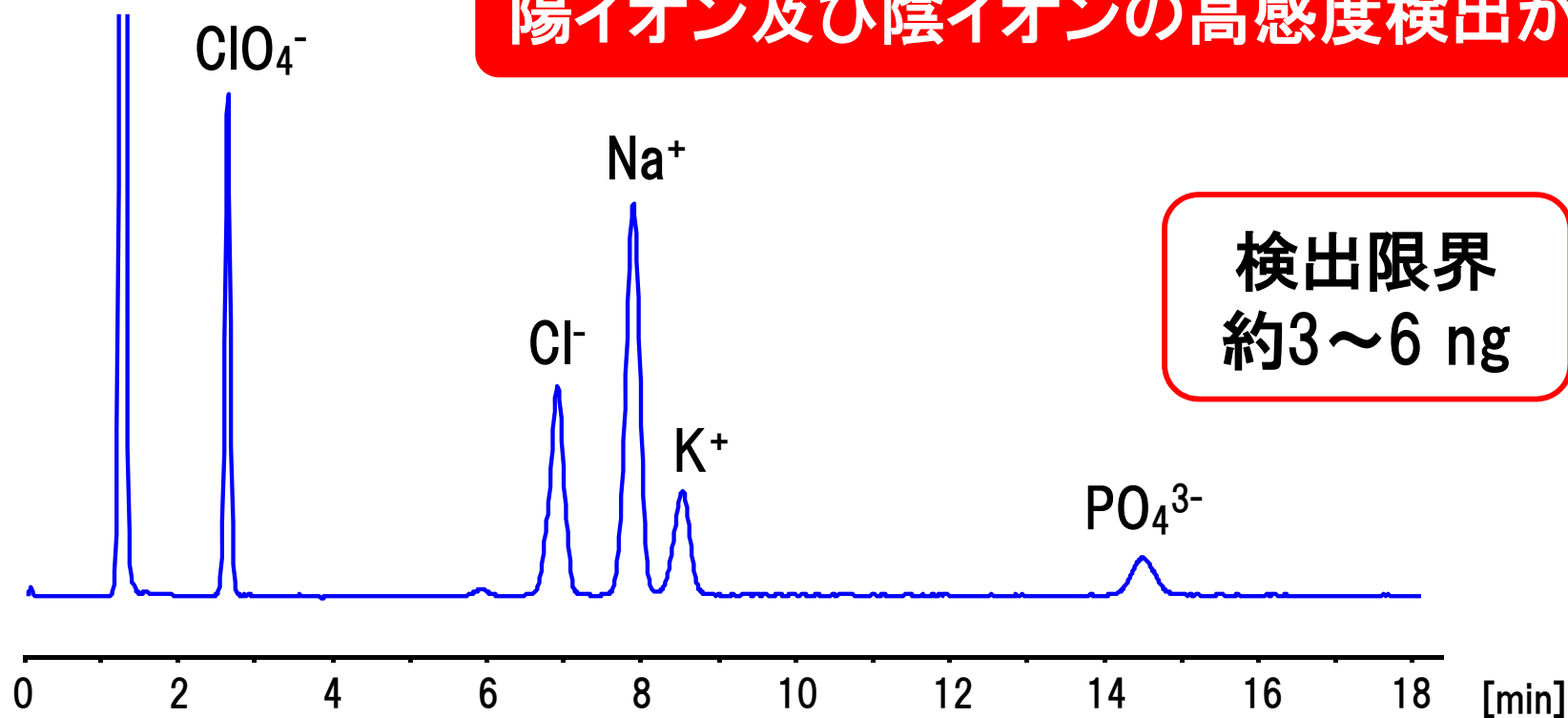
0 2 4 6 8 10 12 14 16 [min]



無機イオン(Na^+ , K^+ , Cl^- , ClO_4^- , PO_4^{3-})の分析

検出 : NQAD (Evaporation 35 °C, Nebulizer 30 °C, Filter 5 s)
移動相 : 100 mmol/L HCOONH_4 / CH_3CN = 25 / 75
試料 : 水で溶解後、80 %アセトニトリル溶液で希釈調製

陽イオン及び陰イオンの高感度検出が可能



| NQAD及びMSにおけるPEG4000の分析

重量分布の中央値

NQAD

→ 分子量増大

MSにおいては分子量の増加とともに感度が低下

TOF-MS
(TIC)

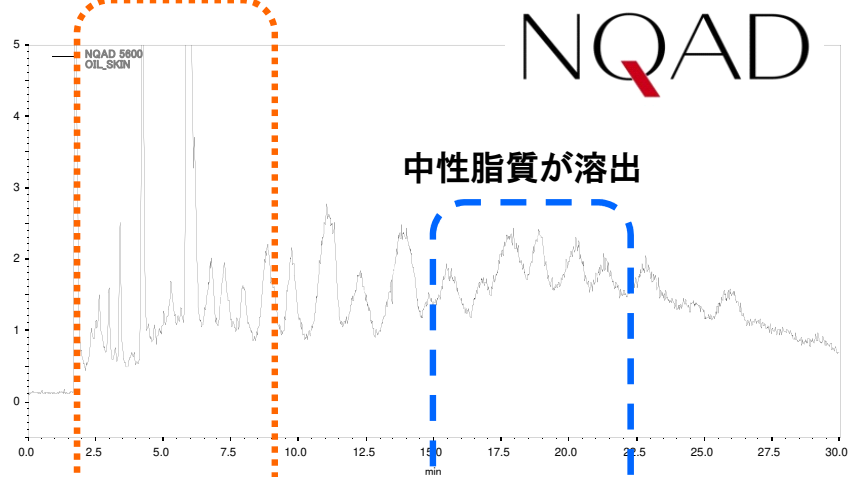
■ HPLC Conditions ■

Column : CAPCELL CORE MP S2.7 ; 2.1 mm i.d. x 50 mm
Mobile Phase : A) H₂O, B) CH₃CN
B 20 % (0 min) → 40 % (10 min) → 20 % (10.1 min) Grd.
Flow rate : 400 µL/min
Temp. : 40 °C
Detector : NQAD 5600 (Evaporation 35 °C, Filter 1.3 s)
Inj. vol. : 2 µL
Sample dissolved in : 20 % CH₃CN

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 [min]

NQAD及びMSにおけるヒト皮脂中の脂質の分析

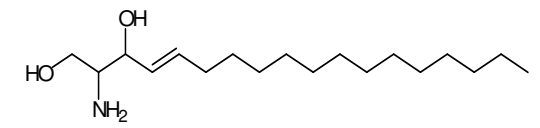
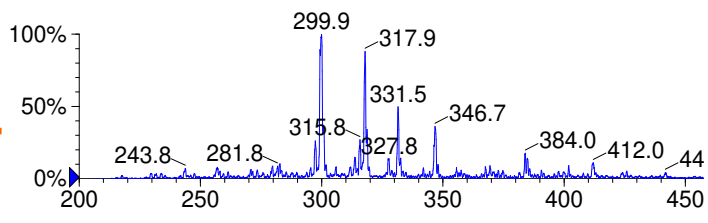
スクワレン
スフィンゴ脂質等が溶出



NQAD

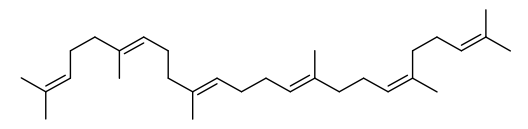
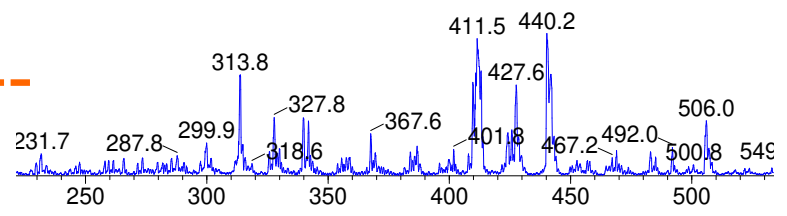
MSではスフィンゴ脂質等が中性脂質に比較して強度が高かったが、NQADでは中性脂質の強度が相対的に高い

+Q1: 2.785 to 2.935 min from Sample 11 (H-TGA Q1 Scan) of 20130829-TGA-std.wiff (Heated Nebulizer, Smoothened)

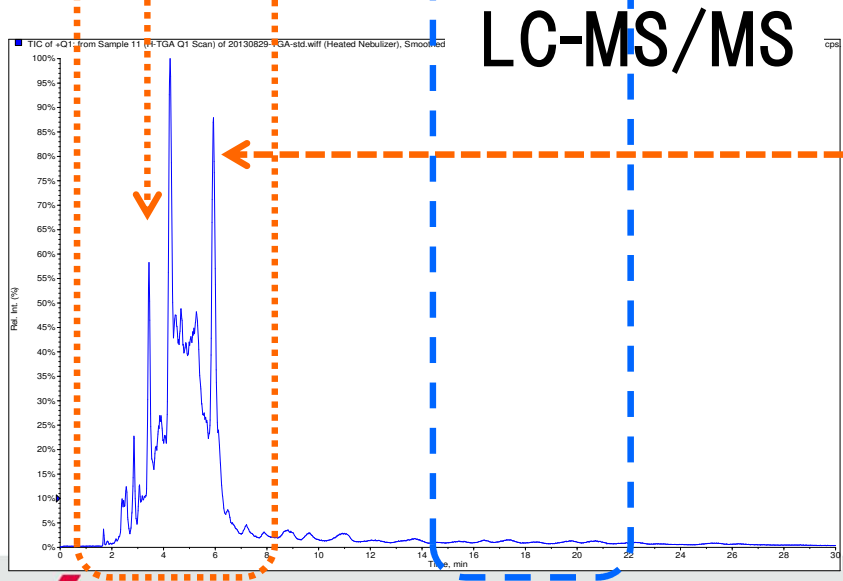


Sphingosine
C₁₈H₃₇NO₂
Exact Mass: 299.28

o 6.094 min from Sample 11 (H-TGA Q1 Scan) of 20130829-TGA-std.wiff (Heated Nebulizer, Smoothened)



Squalen
C₃₀H₅₀
Exact Mass: 410.39

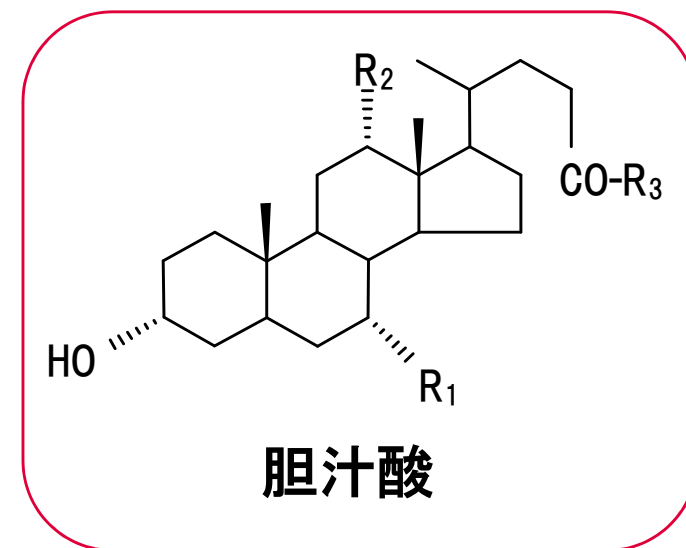


LC-MS/MS

- HPLC Conditions ■
- Column : CAPCELL PAK C₈ DD ; 2.0 mm i.d. x 150 mm
 - Mobile phase : CH₃CN
 - Flow rate : 0.2 mL/min
 - Temperature : 35 °C
 - Detector : NQAD
- (Evaporation 35 °C, Nebulizer 30 °C, Filter 5 s)
- MS, APCI positive (API 5000, AB Sciex)
 - Inj. vol. : 2 µL
 - Sample dissolved in : ヒト皮膚からのAcetone抽出物

NQAD及びMSによる胆汁酸添加尿試料の分析

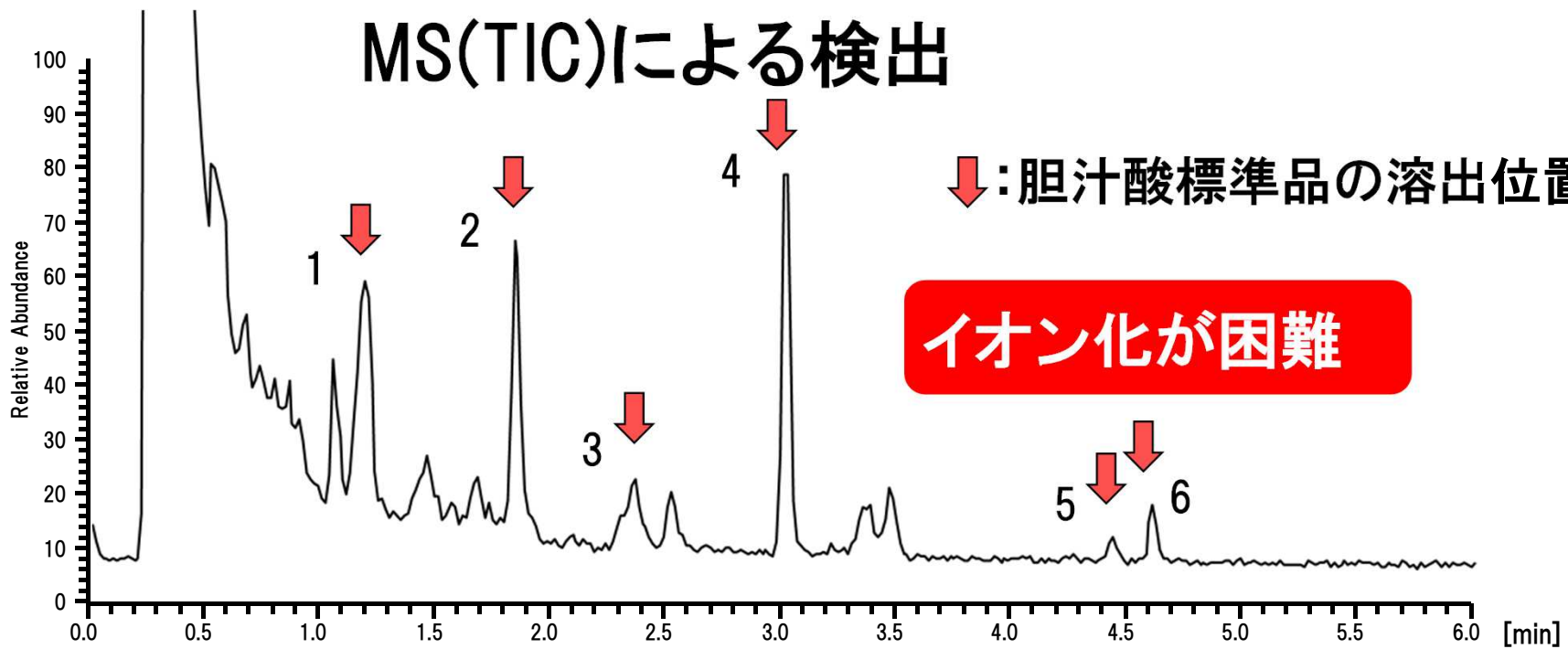
	化合物名 (略称)	R ₁	R ₂	R ₃	分子量
遊離体	コール酸 (CA)	-OH	-OH	-OH	408.58
	デオキシコール酸 (DCA)	-H	-OH	-OH	392.57
	ケノデオキシコール酸 (CDCA)	-OH	-H	-OH	392.57
抱合体	グリココール酸 (GCA)	-OH	-OH	-NHCH ₂ COOH	465.63
	タウロコール酸 (TCA)	-OH	-OH	-NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H	515.71
	タウロケノデオキシコール酸 (TCDCa)	-OH	-H	-NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H	499.71



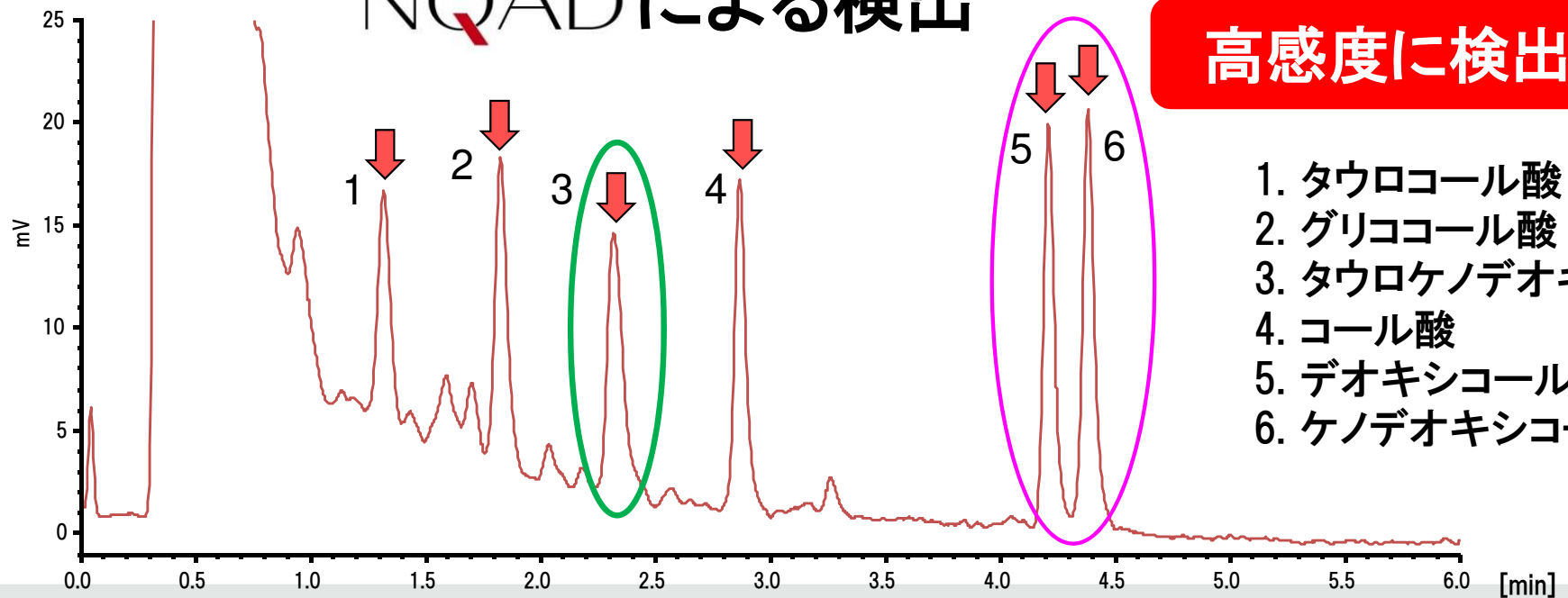
■ HPLC Conditions ■

- Column : CAPCELL CORE C₁₈ S2.7 ; 2.1 mm i.d. x 50 mm
- Mobile phase : A) 0.1 vol% HCOOH
B) CH₃CN
B 30 % (0 min) → 60 % (5 min) → 60 % (6 min) → 30 % (6.1 min) Gradient
- Flow rate : 400 μL/min
- Temperature : 50 °C
- Detector : MS (ESI positive, LCQ DECA, Thermo Fisher Scientific)
: NQAD (Evaporation 35 °C, Nebulizer 30 °C, Filter 2.5 s)
- Inj. Vol. : 2 μL (10 μg/mL)
- Sample dissolved in : 尿に胆汁酸6種を添加し(尿/胆汁酸6種混合(100 ppm each)= 9/1),
遠心した後, 上清をフィルターでろ過処理したサンプルを用いた.

MS(TIC)による検出



NQADによる検出



1. タウロコール酸
2. グリココール酸
3. タウロケノデオキシコール酸
4. コール酸
5. デオキシコール酸
6. ケノデオキシコール酸

INQAD活用分野

糖類

- 単糖
- 二糖・オリゴ糖
- 多糖類
- 糖アルコール など

医薬品

- 不純物試験
- 抗生物質
- 分解物 など

脂質

- リン脂質
- 脂肪酸
- ステロイド
- トリグリセリド など

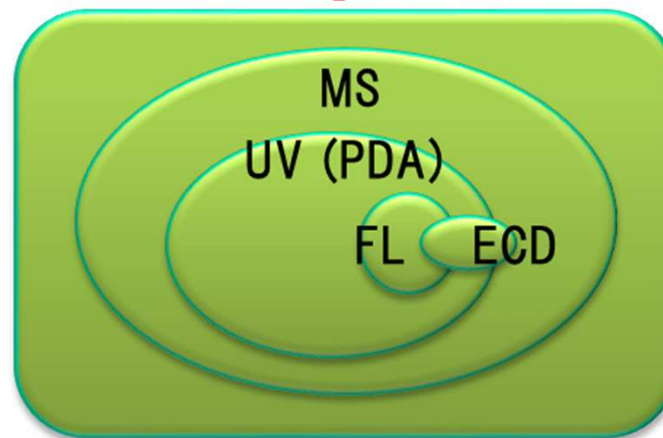
界面活性剤

- 陽イオン性界面活性剤
- 陰イオン性界面活性剤
- 非イオン性界面活性剤
- 両性界面活性剤 など

イオン

- アニオン
- カチオン など

INQAD



測定対象物質の概念図
(揮発性物質を除く)

アミノ酸・タンパク

- アミノ酸
- ペプチド
- タンパク質
- 糖タンパク質 など

高分子

- ポリマー
- 添加剤 など

まとめ

NQAD は

- 物質の重量に応答するため、紫外部吸収の弱い化合物や無機イオンの分析に有用であった。
- エバポレーターの温度を下げることにより、昇華性の化合物の検出が可能であった。
- MSではイオン化しにくい化合物の検出も可能であった。
- 幅広いダイナミックレンジを有していた。
- 化合物の物性に寄らず、重量比に依存した応答であった。



生体試料や未知混合物試料の分析や、全体的な組成を観測する場合において、LC-MSやPDA(UV)の相補的な検出手段として NQAD を併用することは有用と考えられる。

ご清聴、ありがとうございました。

お問合せ先 株式会社 大阪ソーダ

クロマトグラフィー営業部

TEL : 06-6110-1598

e-mail : silica@osaka-soda.co.jp