Technical Review

荷電化粒子検出器 CoronaCAD の技術と応用

福島　景子、橋口　九州男、鈴木　隆弘、大河原　正光、関口　陽子

Recent Developments in Charged Aerosol Detection Technology and Applications

Kyoko Fukushima, Kusuo Hashiguchi, Takahiro Suzuki,
Masamitsu Okawara and Yoko Sekiguchi

NIPPON DIONEX K.K

Abstract

Corona Charged Aerosol Detector (CAD) has become standard for many applications in a variety of industries. The Corona is a mass sensitive universal detector for non-volatile and some semi-volatile analytes and response is independent of chemical structure, unlike absorbance, fluorescence, or electrochemical detectors. CAD is an evaporative technique and is based on the charging of aerosol-borne analyte particles by nitrogen gas and corona discharge, with subsequent measurement of the charged analyte particles by a high sensitivity electrometer.

The next-generation Corona *ultra* detector which supported super-high-speed liquid chromatography (UHPLC) in 2009 was developed. This detector can effectively analyze a wide diversity of chemical structures and important classes of molecules.

Keywords: Corona, Charged Aerosol Detector , CAD, Corona *ultra*, UHPLC

1．はじめに

高速液体クロマトグラフィーの汎用型検出器として紫外吸光度検出器（UV）が主に使用されている。しかし吸光光度検出器で得られる応答性は一様ではなく、紫外吸収を持たない分析種は検出できない。このような紫外吸収を持たない分析種には示差屈折率検出器（RI）や蒸発光散乱検出器（ELSD）などが用いられている。RI は感度が低く、また、グラジエント分析では移動相の屈折率が変化するために実質、測定が困難である。ELSD は RI に比べ感度は高く、グラジエント分析にも対応できる。しかし、検出器の温度条件等を分析種や移動相条件に応じて最適化する必要がある。

2004年に米国、ESA 社が開発した荷電化粒子検出器（CAD: Charged Aerosol Detector）は、紫外吸収を持たない分析種も検出でき、応答性は分析種に関係なく同等の感度が得られるのが特徴である。RI や ELSD に比べて高感度であり、グラジエント分析が可能である。CAD は検出器の最適化が不要であり、非常に使いやすい検出器である。2009年には超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）にも対応した Corona *ultra* 検出器が開発され、2011年には最大200Hz のサンプリングレートを持つ Corona *ultra* RS が開発され、より幅広いアプリケーションに対応可能となった。主な汎用型検出器の比較を Table 1 に示す。

日本ダイオネクス株式会社
〒110−0015　東京都台東区東上野4−24−11　NBF 上野ビル12階
Tel: 03−5826−2201
Fax: 03−5826−2202
E-mail: kyoko.fukushima@thermofisher.com

Table 1 Corona CAD vs. Other Detection Methods.

Detector	Applicability	sensitivity* g	Dynamic Range	Gradient	Ease of use	Consistency of Response
CAD	☆☆☆	10^{-9}	10^{4}	○	☆☆☆	☆☆☆
UV	☆☆	10^{-11}	10^{4}	○	☆☆☆	☆
RI	☆☆	10^{-6}	10^{3}	×	☆☆☆	☆
ELSD	☆☆☆	10^{-8}	10^{3}	○	☆☆	☆☆

*JIS K 0124:2011

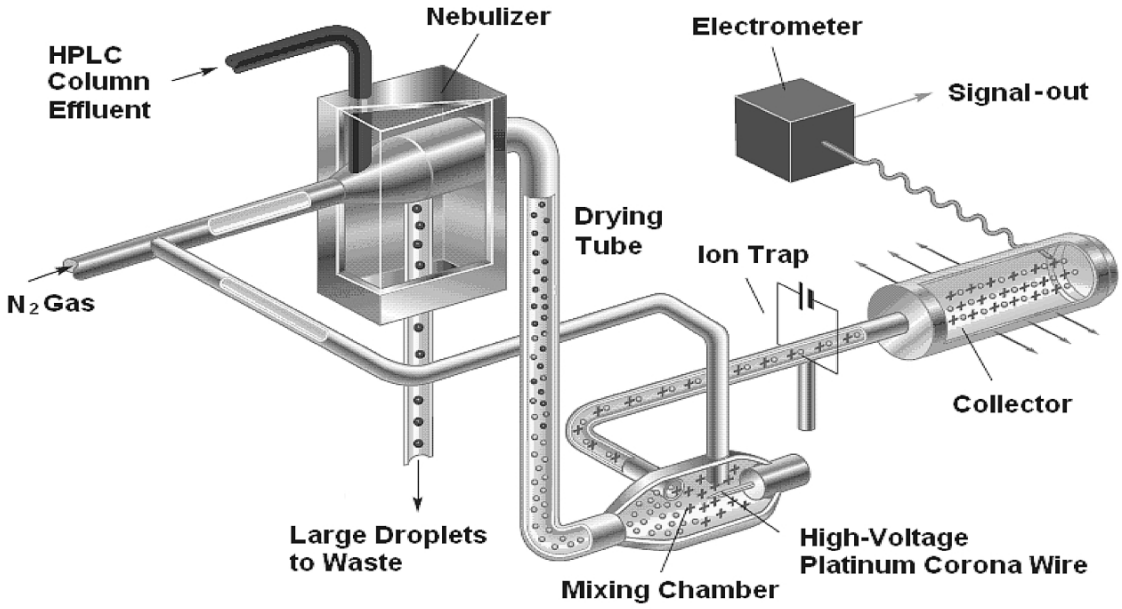


Figure 1 Schematic Diagram of Corona CAD.

2．原理

荷電化粒子検出器は全ての半揮発性及び不揮発性分析種の検出に用いられる汎用型検出器である。検出方法は噴霧・粒子化・荷電化・検出の 4 つの工程からなる（Figure 1）。

噴霧：カラムからの溶出液はネブライザーに入り、加圧された窒素ガスにより噴霧されインパクターに衝突し液滴となる。衝突により大きな液滴は排液される。

粒子化：微小な液滴はドライングチューブに入る。ここで加温せずに移動相溶媒は蒸発し除去され、不揮発性成分は中性微粒子を形成する。

中性微粒子の大きさはカラムに注入した試料の重量に比例する。

この時、揮発性成分は気化して粒子を形成することが出来ない。

荷電化：形成された中性微粒子はミキシングチャンバーに入る。

入口で分岐し一定流量に調整された窒素ガスは、高電圧の白金コロナ電極を通過する際にプラスに荷電化される。ミキシングチャンバー内で、この荷電化された窒素と中性微粒子が激しく衝突し、電荷を中性微粒子に転移する。電荷の量は、微粒子の表面積に応じて増減する。

検出：過剰の荷電化された窒素はマイナスに荷電した低電圧のイオントラップにより完全に除去される。荷電化した微粒子はイオントラップを通過し、コレクターで電流量を測定し、その信号が増幅され検出器の出力となる。

3．特徴

CAD はドライングチューブ内で揮発しない分析種、即ち半揮発性及び不揮発性分析種の検出に用いる。例えば酢酸、ナフトールのような揮発性分析種は検出できない（Table 2）。検出原理から応答性は形成された中性微粒子の表面積に準じた電荷量により得られる。一方、中性微粒子の大きさはカラムに注入された不揮発性分析種の重量に比例するため、分析種の分子構造や物性に依存しない応答性が得られる。このような特徴から、同一条件下で不揮発性分析種をフローインジェクションで分析した場合にほぼ同等の応答が得

Table 2　Broad Applicability.

High MW -	Albumin, Dextrin
Neutral, nonpolar -	Estradiol, Umbelliferone
Neutral, polar -	Glucose, Fructose, Lactose, Sucrose
Acidic -	Propranolol, Nortriptyline, Amitriptyline, Caffeine
Zwitterionic -	Homocysteine, Methionine, Glutathione

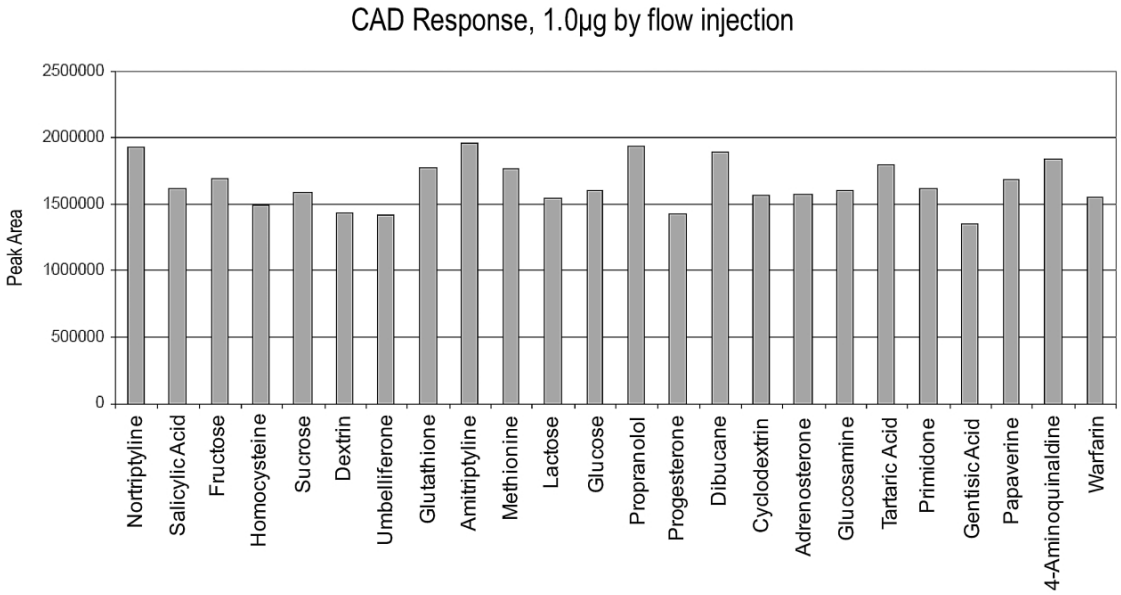


Figure 2　CAD Response among non-volatile analytes.

られる。これにより既知成分のピーク面積から未知成分の定量も可能となる（Figure 2）。

荷電化粒子検出器の検量線は、中性微粒子の総表面積に依存するので直線ではない。その為、両対数もしくは二次式で作成する必要がある。

CAD の検出下限は数 ng であり、その検出範囲は 4 桁レベルと広い。再現性は構造上、供給する窒素ガスを既定の圧力に一定状態で保つ事で再現性も 2％以下の性能を示す。

4．Corona *ultra*

従来の CoronaCAD は3.5Hz のサンプリングレートであり、UHPLC を用いた場合、データポイントが不足する場合がある。Corona *ultra* は、最大100Hz のサンプリングレートを持ち UHPLC 分析にも対応する。これにより UHPLC 条件下での検出下限は数百 pg と向上した（Figure 3、Figure 4）。また、Corona *ultra* はネブライザー温度を 5 ～35℃に設定できる。ネブライザー温度を一定に保つことで、蒸気圧が一定となりより良い再現性が得られる。移動相にテトラヒドロフランのように気化熱で、ネブライザーが冷却する溶媒を使用する場合には、ネブライザー温度を30～35℃に加温して用いる。

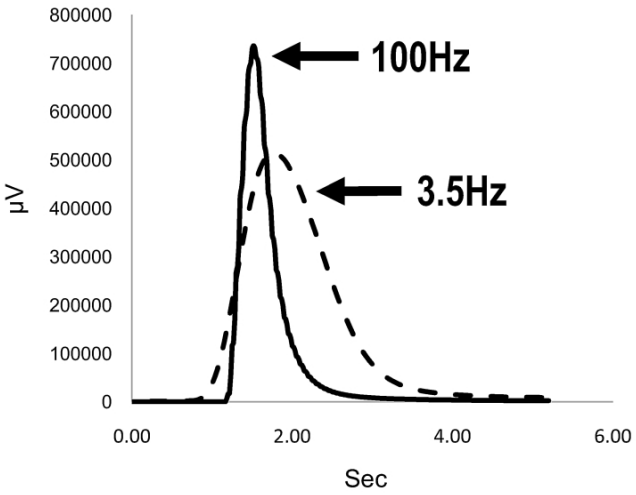
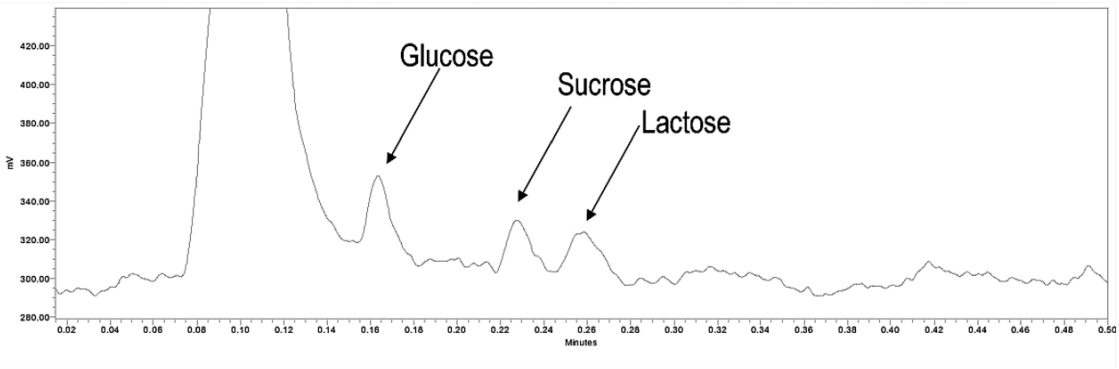


Figure 3　Sampling Rate.

2011年に新しく開発された Corona *ultra* RS のサンプリングレートは最大200Hz である。検出器の導入部にバルブを内蔵し、不要な成分は検出器に導入せず、選択的に目的の成分を検出することが可能になった。



Column ：HILIC, 1.7 μm 2.1 x 50 mm
Mobile Phase ：Acetonitrile / 5 mM Ammonium Formate pH=3 (91:9)
Flow Rate ：1.8 mL/min
Column Temperature: 40ºC
Sample ：0.5 ng glucose, sucrose, lactose (2μL injection)

Figure 4 Isocratic HILIC separation and CAD of simple carbohydrates.

5．使用上の注意点

CAD は全ての半揮発性及び不揮発性分析種を検出するため、移動相には質量分析計（MS）と同様に揮発性の高純度溶媒を使用し、緩衝剤を用いる場合は揮発性のギ酸アンモニウムや酢酸アンモニウムなどを使用する（Table 3 ）。必要であれば、移動相に使用する超純水や緩衝液を0.2μm ナイロンフィルターでろ過する事により移動相中の不純物を除去し、高感度に検出できる。使用するカラムは不揮発性溶媒の使用歴がないもの、カラムブリードの少ないものを用いるのが望ましい。また、ネブライザーの噴霧やコロナ電極で荷電化される窒素の比率は、窒素ガスを一定圧力に維持する事で保たれる。送液する時は常に窒素ガスが供給し、ガス漏れなどない事を確認する。ネブライザーで排液された溶媒が滞留すると、圧変動が生じ、ノイズの原因となるため、排液が滞留しないように気をつける。カラム温度を高温で設定した場合、ネブライザーでの移動相温度が上昇し、ドリフトや応答が悪くなる場合があるためポストカラムクーラーやネブライザー温度（Corona *ultra*）を下げて使用する。

以上のように、CAD で高感度に分析するには HPLC 装置や移動相、カラムなどから不揮発性成分を可能な限り除去し、既定の圧力で一定状態に維持することが重要である。

6．逆グラジエント法

CAD はグラジエント分析にも対応しているが、有機溶媒比率により応答性が変化する。例えば、超純水100%を移動相とした場合には表面張力が大きく、ネブライザーで噴霧されるときに微小な液滴になりにくいため、排液される量が増加して得られる応答が小さくなる。同重量に調製した標準試料をイソクラティック条件とグラジエント条件で分析すると、イソクラティック条件では同等の応答が得られるが、グラジエント条件では応答が変化する（Figure 5 ）。

Table 3 Compatible Volatile Mobile Phase Constituents.

Additive/Buffer	pKa	Buffer Range
Trifluoroacetic Acid (TFA)	0.3	
Formic Acid	3.75	2.8-4.8
Ammonium Formate	3.75	2.8-4.8
Acetic Acid	4.76	3.8-5.8
Ammonium Acetate	4.76	3.8-5.8

未知成分の定量やグラジエント分析において同一感度で検出したい場合には、設定したグラジエント条件とは逆の移動相条件を設定してポストカラム添加する事で、検出器に導入される溶媒組成が常に一定になり改善される。これを逆グラジエント法（Inverse Gradient）という（Figure 6 ）。

逆グラジエント法には 2 つの方法がある。分離カラムと同容量のダミーカラムを逆グラジエントラインに取付け、ディレイボリュームを補正する方法と、逆グラジエントラインにダミーカラムを使用せず、分離カラムや配管のディレイボリュームをプログラム上で補正する方法がある。ダミーカラムを使用する場合は、プログラム作成時にディレイボリュームを考慮する必要がないが、ダミーカラムの不揮発性成分も充分に除去する必要がある（Figure 7 ）。

Figure 8 、Figure 9 にカテキン類を逆グラジエント法で測定した例を示す。応答は改善され、検量線の傾きも改善された。

絶対検量線法で定量する場合には、同一条件下で検量線を作成し定量するため、逆グラジエント法は必ずしも必要はない。

Mobil phase: A) 0.1% TFA
B) 0.1% TFA in CH3CN

Gradient

min	%A	%B
0.00	100	0
5.00	100	0
20.00	60	40
23.00	60	40
23.01	100	0
30.00	100	0

Flow Rate : 0.6ml/min
Column : Shiseido MG100 C18 4.6×250mm; 5μm
Column Temp : 25℃
INJ : 10μL

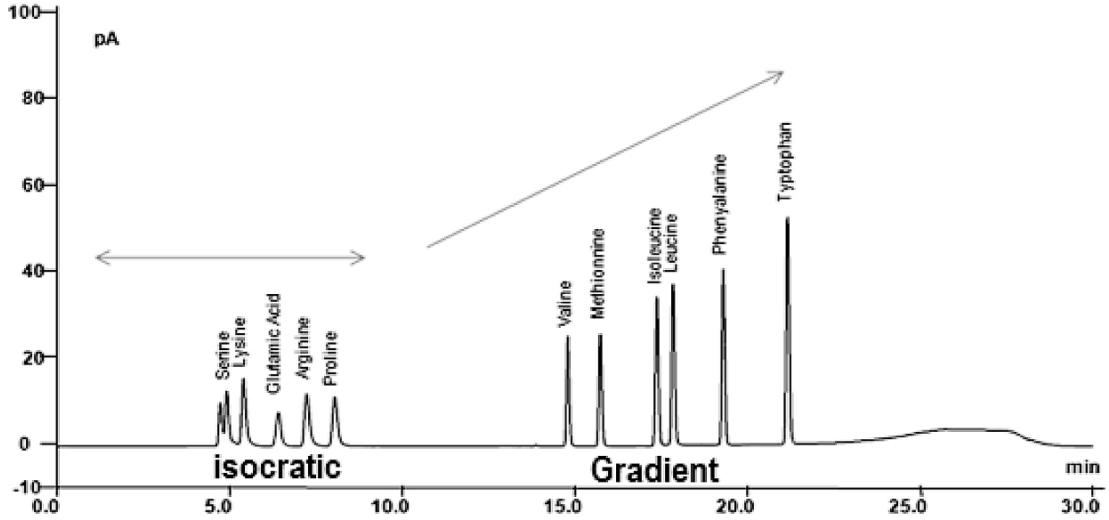


Figure 5 Gradient reversed-phase separation and detection of amino acid with CAD (1μg each on column).

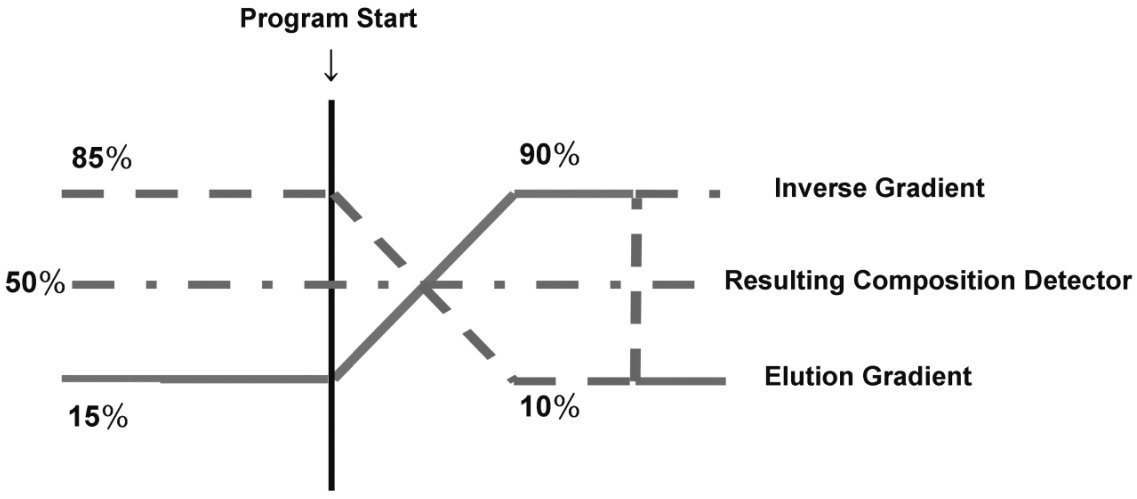
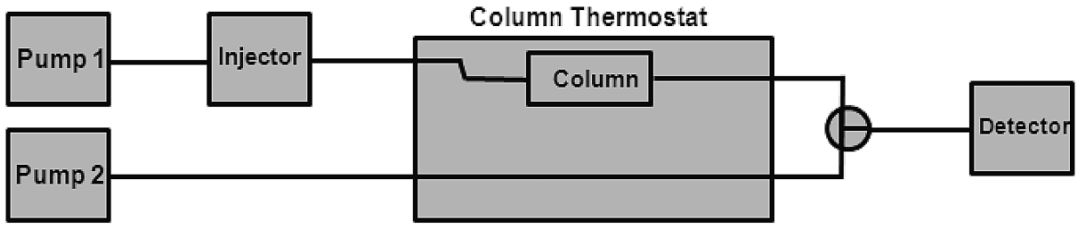


Figure 6 The Principle of Inverse Gradient.

1.Second liquid branch with given tubing volume and delayed gradient profile(to compensate for column)



2.Second liquid branch includes identical column

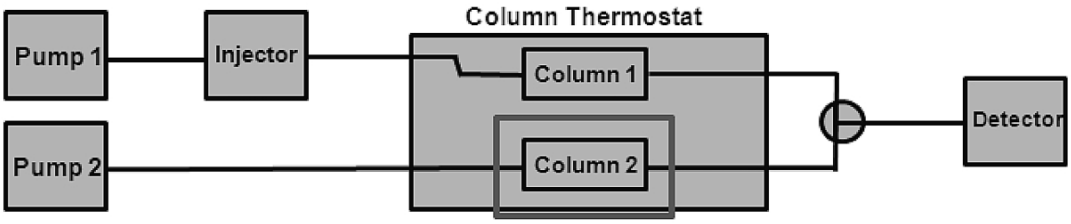


Figure 7 Two Ways of Instrumental Implementation of Inverse Compensation Gradient.

Column : Acclaim C18, 2.1 x 50 mm, 2.2 µm
Mobile phase A : 0.1%TFA, Water
Mobile phase B : 0.1%TFA, CH_3CN
Column temp : 40℃
Flow Rate : 0.6 mL/min
Detector : CAD＝Filter : None 、Neb Temp : 20℃

Gradient

Time(min)	%B
0.00	5
5.00	30
5.00	5
7.00	5

Inverse gradient

Time(min)	%B
0.00	95
5.00	70
5.00	95
7.00	95

1. Gallocatechin
2. Epigallocatechin
3. Catechin
4. Caffeine
5. Epigallocatechin gallate
6. Gallocatechin gallate
7. Epicatechin gallate
8. Catechin gallte

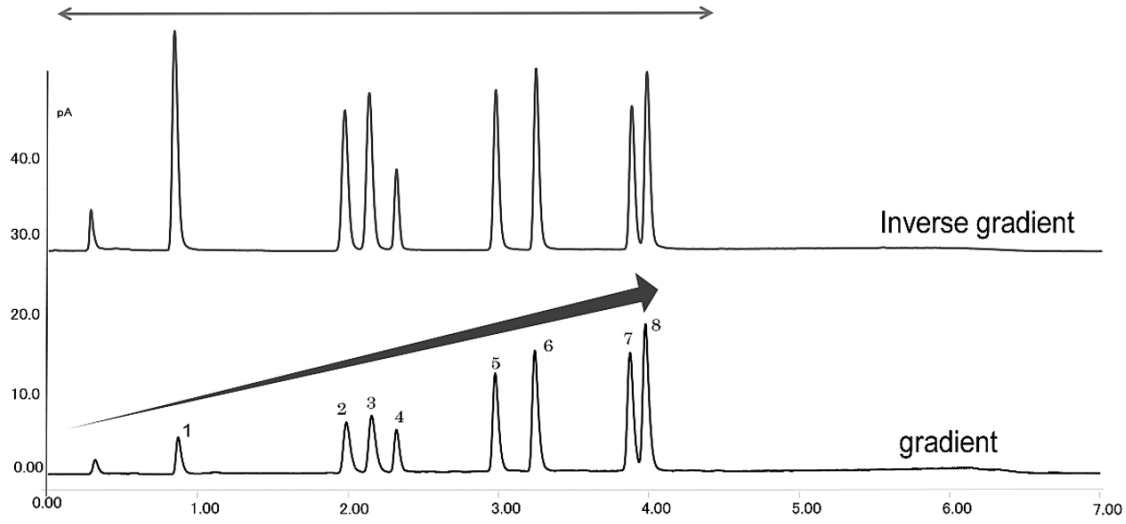


Figure 8 Inverse gradient analysis of catechin.

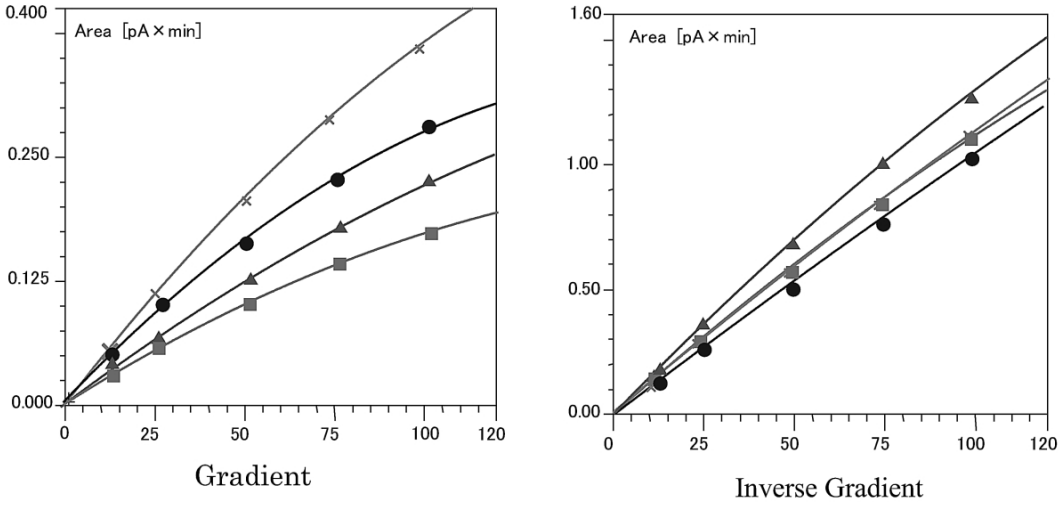


Figure 9　The Influence of the Inverse Gradient on Detector Response - Calibration Curves.
(▲Epigallocatechin, ■Gallocatechin, ●Catechin gallte, ×Gallocatechin gallate)

7．応用例

CAD は糖質、脂質、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、医薬品、界面活性剤、無機イオンなどの半揮発性・不揮発性分析種を広く検出できる。分析種の構造や物性によらず同等の応答性が得られることから、食品分野や医薬製薬分野、化学工業分野の研究・品質保証において幅広く使用されている。Figure 10～12に分析例を示す。

8．まとめ

CoronaCAD は高感度な汎用型検出器であり、UV や MS の補完検出装置として使用される。2005年には本検出器は PITTCON 2005において Editor's　Award の銀賞、2005 R&D 100 Award を受賞した。国内でも2004年の販売から、医薬品分野を中心に化成品や食品分野で広く普及している。今後も様々な分野での幅広い活用が期待される。

引用文献

[1] Dixon, R. D.; Person, D. S. *Anal. Chem*., **2002**, *74*, 2930-2937.

[2] Macarthy, R.; Gamache, P.; Asa, D. *LabPlus international June*, **2005**.

[3] Senda, M.; Fukushima, K.; Hashiguchi, K.; Matsumoto, T.; Gamache, P. H.; Waraska, J. C.; Asa, D. *Chrmatography*, **2006** , *27*, 119-124.

[4] Gorki, T.; Lynen, F.; Szucs, R.; Sandra, P. *Anal. Chem.*, **2006**, *78(9)*, 3186-3192.

Column : Acclaim Trinity P1, 3 μm 3.0 x 50 mm
Mobile Phase : A) 0.2 M Ammonium formate, pH 4.0
B) D.I. H_2O
C) CH_3CN
Temperature : 30 °C
Flow Rate : 0.8 mL/min
Inj. Volume : 10 μL
Corona *ultra* : Filter = med、Neb Temp = 20℃
Gradient:

Gradient				Inverse Gradient		
min	%A	%B	%C	min	%B	%C
0.0	2	38	60	0	60	40
1.0	2	38	60	1.4	60	40
7.0	30	20	50	7.4	50	50
15.0	90	5	5	15.4	5	95
16.0	90	5	5	16.4	5	95
16.0	2	38	60	16.4	60	40

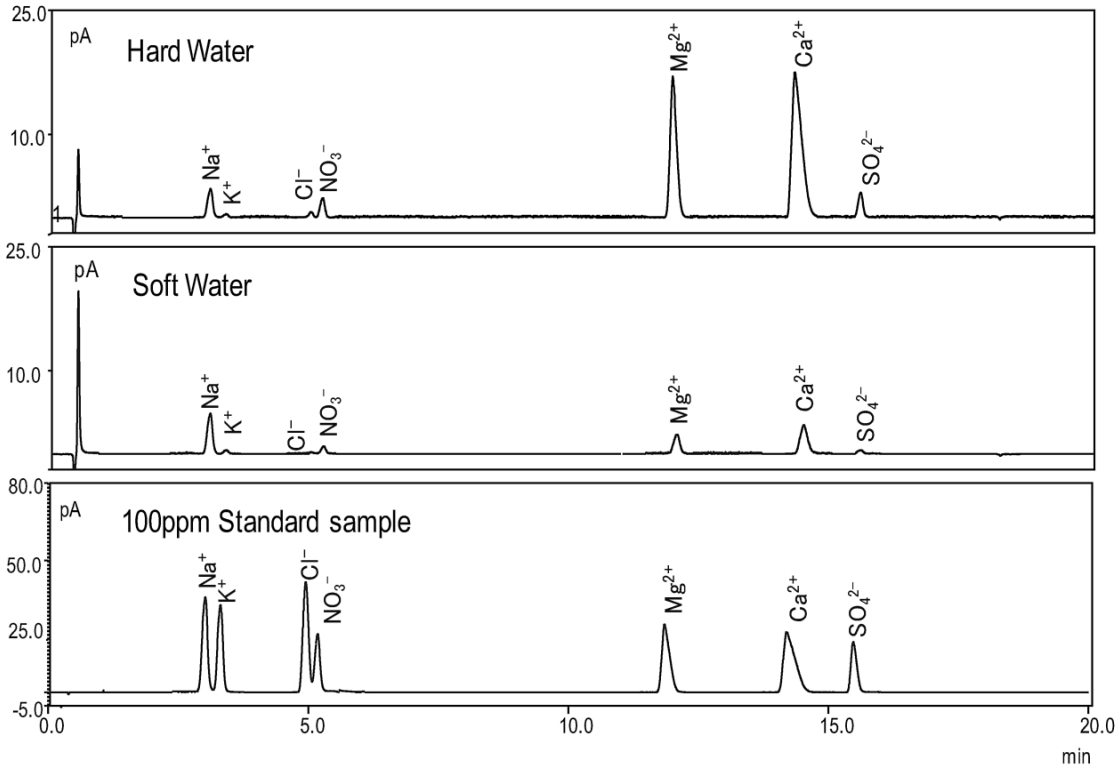


Figure 10 HPLC-CAD chromatograms of Anions and Cations (Mineral Waters).

Column : C30, 5 μm 4.6x150 mm
Mobile Phase : A) Acetinitrile
B) Iso-propanol
C) Ammonium Acetate (0.1 M, pH5.0)
Temperature : 40°C
Flow Rate : 1.0 mL/min
Inj. Volume : 2 μL
Corona *ultra* : Filter =medium ; Neb. Temp = 25 °C
Sample : Egg Lecithin – PL30S(5 mg/mL in iso-propanol)
Gradient

Time (min)	%A	%B	%C
-15	70	0	30
0	70	0	30
0.1	70	0	30
10	90	0	10
35	10	80	10
50	0	95	5
60	0	95	5

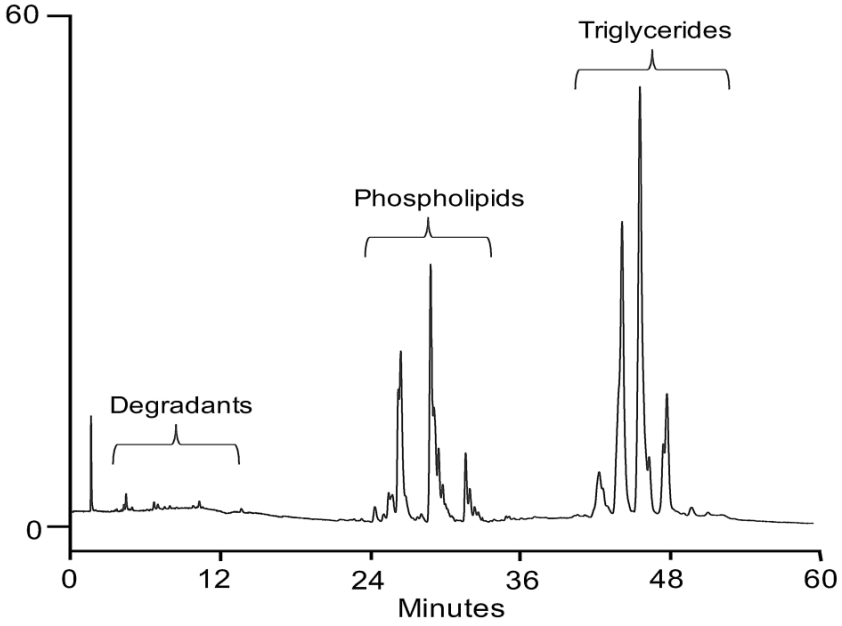


Figure 11 Analysis of Egg Lecithin.

Column : Acclaim Trinity P1, 2.1 x 100 mm and guard
Mobile Phase: 81/19 acetonitrile / 10 mM ammonium formate, pH = 3.00
Flow Rate : 0.3 mL/min
Temperature : 20 °C
Inj. Volume : 5 µL
CAD*ultra* : Neb temp. 10 °C
Sample : A) Brand A extracted sweetener
B) Steviol glycoside standards

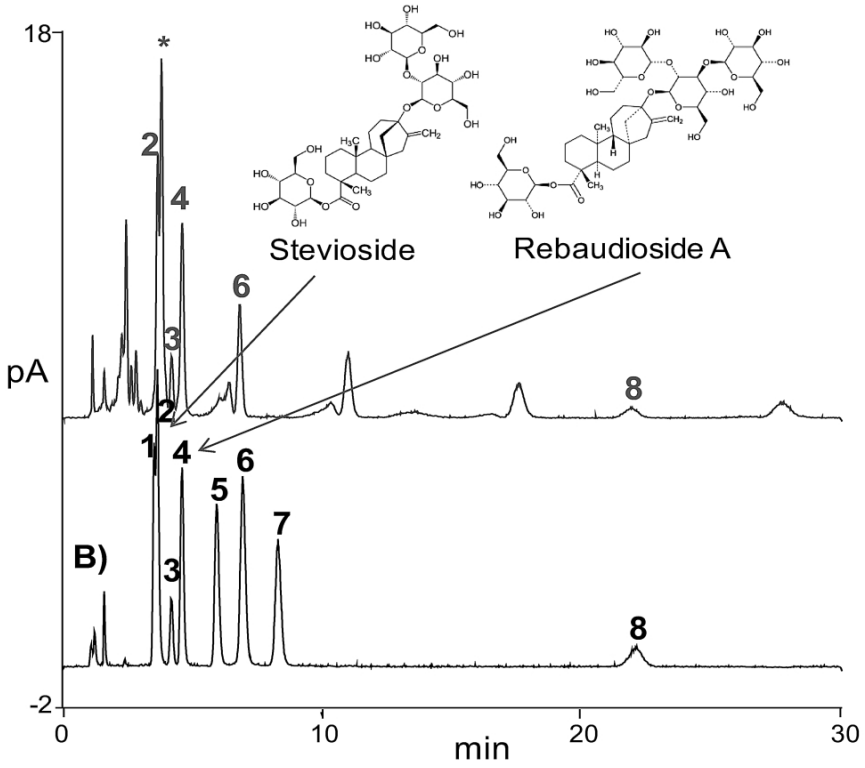


Figure 12 Analysis of the Steviol glucoside in the stevia sweetener.