

## ▶ 汎用LCを応用した微量不純物・微量有効成分の高感度定量分析

### 1. 微量物質の高感度定量分析

分析対象物質の微量化が進むにつれ、従来法では対応できない分析が増えています。例えば、製品中の不純物は、その品質を左右するだけでなく、安全性にも影響を及ぼす事例が増えていることから、各企業における不純物管理は一段と厳しさを増しているものの、極微量不純物の定量分析には苦慮しているのが現状です。一方、有効成分が分析対象物質である場合も、その含有量が極微量であるほど、定量法の確立が難しくなっています。

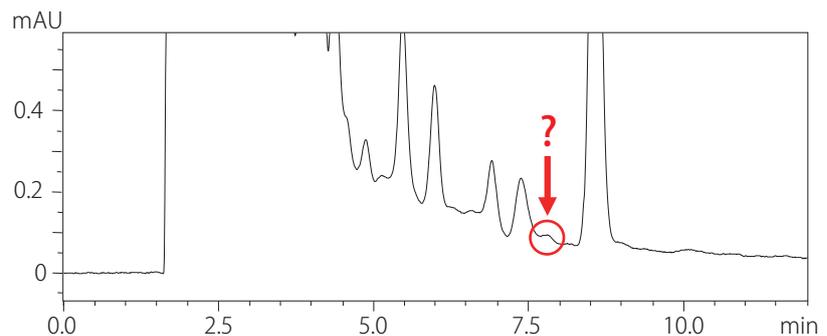


Fig.1: 不純物ピークの例

このような場合、感度の向上を目的として、試料濃度を上げるなどの対応が考えられますが、その結果として目的成分の濃度は増加するものの、主成分の溶解度不足が生じたり、試料中に共存する多量の妨害成分との間で分離不良が生じたりする恐れがあります (Fig.1参照)。そこで、抽出や濃縮などの前処理をおこなうこととなりますが、手作業の工程が煩雑になることに加えてその作業時間も長くなることから、効率性が大きなネックとなります。

このように、微量成分の定量では、「測定の高感度化」と「作業の迅速化」という相反する要求を満たす必要があり、その実現にあたっては、目的成分の分取 (分画) とその濃縮および定量に至るまでの自動化がキーポイントになります (Fig.2参照)。



Fig.2: 微量不純物定量分析の自動化

## 2. 微量成分に対する定量分析の自動化

Fig.2で示した3つのステップ(①分取、②濃縮、③定量)の自動化については、日常的に使用しているHPLCあるいはUHPLC(超高速LC)の延長線上で実施できれば、コストや操作性、メンテナンス性の点で大きなメリットが生まれます。

こうした要求の実現は、高い拡張性を有するHPLCやUHPLCであれば実現可能であり、そのユニークなシステムとして「Co-Sense for Impurities システム」があります(注1)。

## 3. Co-Sense for Impurities システム

Co-Sense for Impuritiesシステムは、カラムスイッチング技術と2次元分離技術とを融合することにより、分取～濃縮～定量の3ステップからなる工程の自動化を実現しました。このシステムの構築は、Prominenceだけではなく、UFLC(XR)やNexeraによっても可能であり、いずれの場合も、微量成分に対する定量の高感度化・自動化を実現できます。ここでは、その原理と応用例についてご紹介いたします。

### 《システム全体の流路》

Fig.3にはCo-Sense for Impuritiesシステムの流路図を示しています。本システムは、下記の3流路から構成されています。

- ①分取用の流路(赤色の流路)
- ②濃縮用の流路(青色の流路)
- ③定量用の流路(緑色の流路)

### 《ステップ①：分取》

分析開始の指示に従い、オートサンプラが試料を注入すると、カラム I による分離が始まります。目的成分がカラムから溶出するまでの間、バルブ A の流路はFig.3の赤色方向であり、目的成分以外のピークと移動相は、廃液ビンに排出されます。

目的成分がカラムから溶出して検出器 A を通過すると、バルブ A の流路が切り替わります。これにより、目的成分は黄色色で示している「分画」の方向に進みます。なお、バルブ A の切替開始・終了時間は、事前に試行した分析結果より算出しておきます。

### 《ステップ②：濃縮》

「分画」方向へ送り込まれた目的成分(およびその近傍)は、バルブ B を経由した後、カラム II に向かって進みます(Fig.5参照)。カラム II に到達する手前(T地点)において、送液ポンプ II が新たな移動相を流路内へ大量添加します。ここで「新たな移動相」とは、カラム II において「目的成分の保持力を強める移動相」です。例えば逆相分析であれば、

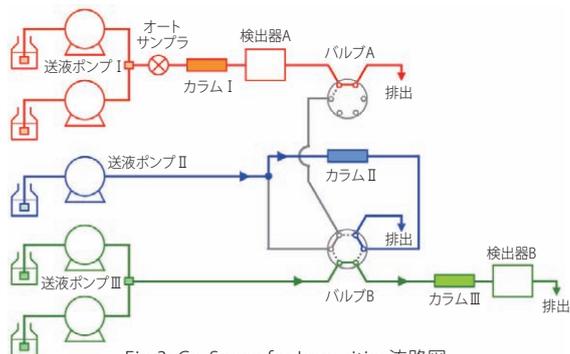


Fig.3: Co-Sense for Impurities 流路図

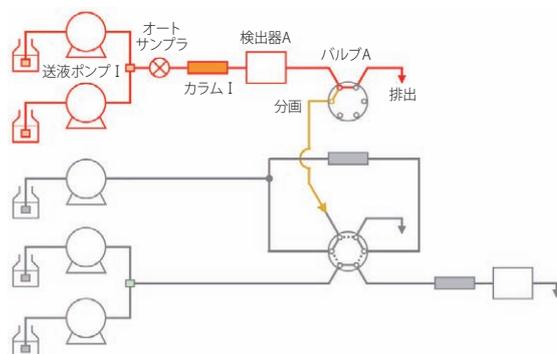


Fig.4: ステップ① 分取

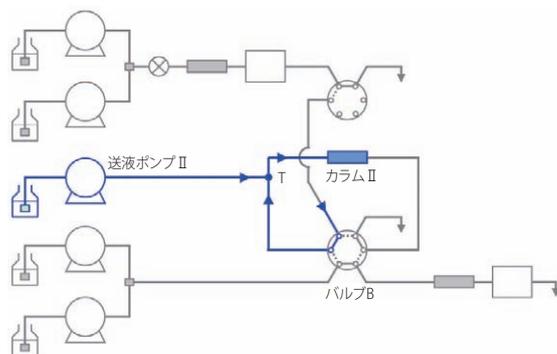


Fig.5: ステップ② 濃縮

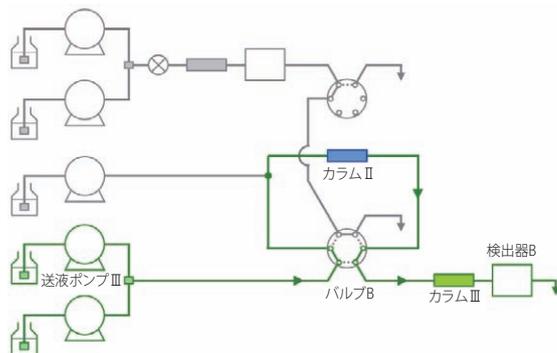


Fig.6: ステップ③ 定量

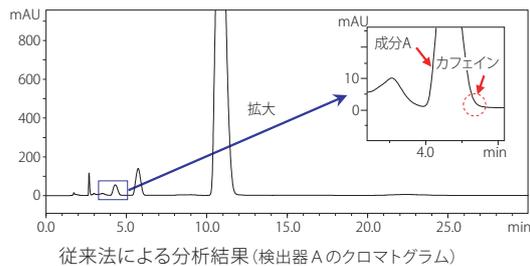
水リッチな組織であり、これにより、目的成分（およびその近傍）は、カラムⅡへ濃縮トラップされます。

《ステップ③：定量》

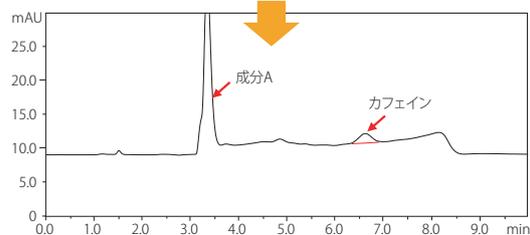
目的成分のトラップが完了すると、送液ポンプⅡが送液を停止するとともに、バルブBの送液方向がFig.6の緑色流路に切り替わります。カラムⅡに対し、送液ポンプⅠ・Ⅱによる送液から送液ポンプⅢによる送液へと切り替わるため、目的成分（およびその近傍）はカラムⅡから溶出し、カラムⅢに向かって進みます。

最終的に、目的成分およびその近傍は、カラムⅢを通過する過程でさらに分離がおこなわれた後、検出器Bが目的成分を検出します。

以上のように、本システムは、2つの分離工程①③と1つの濃縮工程②を有していることから、感度向上を目的として試料注入量を増やした場合でも、十分な分離を得ることが可能です。



従来法による分析結果（検出器Aのクロマトグラム）



Co-Sense for Impurities システムによる分析結果

- 《ステップ① -- 分取条件》  
 カラム : Shim-pack VP-ODS (150 mm L. × 10.0 mm I.D., 5 μm)  
 移動相 : A; 20 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH2.5)  
           B; アセトニトリル  
           イソクラティック溶離 B.CONC 15%  
 流速 : 4.7 mL/min  
 カラム温度: 40 °C  
 注入量 : 1.5 mL  
 波長 : 272 nm  
 分画区間 : 目的ピーク周辺(4.21 ~ 4.86 min.)
- 《ステップ② -- 濃縮条件》  
 カラム : Shim-pack GPRC-ODS (15 mm L. × 8.0 mm I.D., 5 μm)  
 添加移動相: 100 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液  
 流速 : 12.0 mL/min  
 カラム温度: 40 °C
- 《ステップ③ -- 定量条件》  
 カラム : Synergi Hydro-RP (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.5 μm)<sup>(注2)</sup>  
 移動相 : A; 100 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液  
           B; メタノール  
           グラジエント溶離  
           B.CONC 20%(0 min)→65%(5 min)→20%(5.01-10 min)  
 流速 : 0.4 mL/min  
 カラム温度: 40 °C  
 波長 : 272 nm

Fig.7: Co-Sense for Impurities システムの応用例 (1)

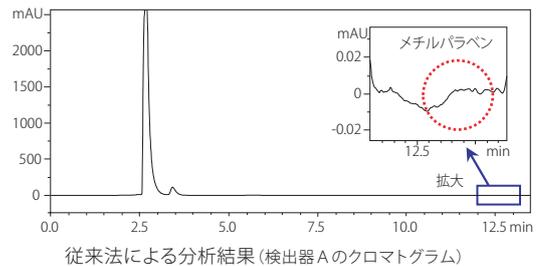
## 4. Co-Sense for Impuritiesシステム応用例

Co-Sense for Impuritiesシステムを応用した微量成分の分析例をFig.7・8に示します。

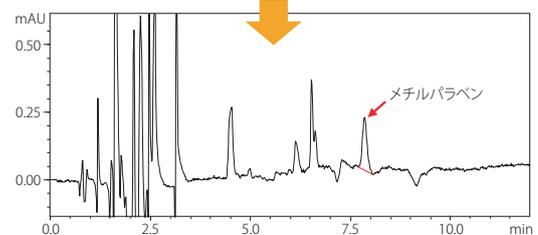
Fig.7では、医薬品（セファゾリン 0.5 mg/mL）にカフェインを模擬不純物として添加（0.0008%不純物に相当）し、これを試料として分析しました。ここで、ステップ③では高速分析用カラムを採用することにより、分析の高速化を図っています。一方、Fig.8では、医薬品（リトドリン注射液 10 mg/mL）にメチルパラベンを模擬不純物として添加（0.00001%不純物に相当）し、これを試料として分析しました。

Fig.7・8の両分析とも、2つの分離モード（ステップ①と③）に対し、異なる組成の移動相を使用する、あるいは異なる分離特性のカラムを使用することにより、高分離を実現しています。

これらの効果により、従来法では不可能だった微量成分の定量が可能になりました。



従来法による分析結果（検出器Aのクロマトグラム）



Co-Sense for Impurities システムによる分析結果

- 《ステップ① -- 分取条件》  
 カラム : Shim-pack VP-ODS (150 mm L. × 10.0 mm I.D., 5 μm)  
 移動相 : A; 20 mmol/L リン酸(ナトリウム)緩衝溶液(pH2.5)  
           B; メタノール  
           イソクラティック溶離 B.CONC 35%  
 流速 : 4.0 mL/min  
 カラム温度: 40 °C  
 注入量 : 200 μL  
 波長 : 254 nm  
 分画区間 : 目的ピーク周辺(12.0 ~ 13.2 min.)
- 《ステップ② -- 濃縮条件》  
 カラム : Shim-pack GPRC-ODS (15 mm L. × 8.0 mm I.D., 5 μm)  
 添加移動相: 50 mmol/L リン酸(アンモニウム)緩衝溶液(pH6.8)  
 流速 : 8.0 mL/min  
 カラム温度: 40 °C
- 《ステップ③ -- 定量条件》  
 カラム : Shim-pack VP-ODS (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)  
 移動相 : A; 20 mmol/L リン酸(ナトリウム)緩衝溶液(pH2.5)  
           B; アセトニトリル  
           グラジエント溶離  
           B.CONC 10%(0 min)→55%(7 min)  
 流速 : 1.0 mL/min  
 カラム温度: 40 °C  
 波長 : 254 nm

Fig.8: Co-Sense for Impurities システムの応用例 (2)

## 5. Co-Sense for Impuritiesシステムの操作

HPLCあるいはUHPLCと同等な操作性を実現するために、Co-Sense for Impuritiesシステムでは、GUI(グラフィカルユーザーインターフェイス)を採用したソフトウェアを用意しています。Fig.10からわかるように、必要な設定項目を一画面に集約していることに加え、システムの稼働状態がグラフィカルに確認できることから、誰にでも簡単に微量成分の分析がおこなえます。

## 6. 質量分析計の活用

微量成分の定量に関し、Co-Sense for Impuritiesシステムの活用とは異なるアプローチ方法として、質量分析計の活用があります。ここで、フロントエンドLCとして超高速LCを接続すれば、より迅速な定量分析が可能になります。

トリプル四重極型LC/MS/MS「LCMS-8030」およびシングル四重極型LC/MS「LCMS-2020」は、正負イオン化切替時間15msec、スキャンスピード15000u/secという超高速性能を有することから、フロントエンドLCとしてNexeraを採用すれば、Nexeraの持つ超高速LC性能を最大限に発揮した超高速質量分析が可能です。

微量成分の定量に関し、Co-Sense for ImpuritiesシステムのようにHPLC(あるいはUHPLC)をベースとしたシステム

を採用するのか、それともLC/MS/MS(あるいはLC/MS)システムを採用するのかについては、イニシャルコストや維持コスト、分析の頻度や感度などを考慮した上で選択することになります。



Fig.9: Co-Sense for Impurities システム

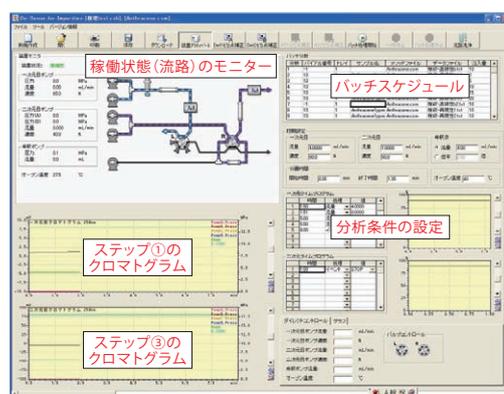


Fig.10: Co-Sense for Impurities システムの操作画面



Fig.11: トリプル四重極型LC/MS/MSシステム  
Nexera + LCMS-8030



Fig.12: シングル四重極型LC/MSシステム  
Nexera + LCMS-2020

(注1) Co-Senseとは Collaboration of Shimadzu Eisai New Systematic Efficiencyの略で、エーザイと島津製作所が共同開発で進めている応用システムです。これまでに、LCMS および NMR のための LC による自動前処理システム (Co-Sense for MS および NMR)、洗浄バリデーション支援システム (Co-Sense for CV)、生体試料分析用システム (Co-Sense for BA) を発売しています。

(注2) Synergi™ は、Phenomenex 社の米国およびその他の国における商標または登録商標です。本カラムの詳細につきましては、(株)島津ジーエルシーのフェノメネクスサポートセンター (e-mail: psc@glc.shimadzu.co.jp)、または弊社営業にご相談ください。

本レポートの掲載情報は著作権により保護されています。本情報を商業利用を目的として販売、複製または改ざんして利用することはできません。また、掲載情報については充分検討を行っていますが、正確性や完全性を当社は保証するものではありません。従って掲載情報に関連して何らかの業務もしくは契約を行おうとされる場合は、別途あらためて当社営業担当と打ち合わせして、ご確認や契約をいただく必要があります。

本レポートは発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2011年2月



分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>