C190-0464

SHIMADZU
Excellence in Science

LC talk

特集号 “知って得する技術情報”

Special Issue XI

2017

LCtalk のバックナンバーがご覧になれます。

- Shim-SolutionClub 会員の方は，会員サイト SolutionsNavigator から LCtalk のバックナンバーがご覧いただけます。
- 現在，Vol.1（1984 年 10 月発行）から Vol.50（2003 年 4 月発行）までが，PDF ファイルで掲載されています。

https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/n/talk/lc.htm

目　次

内　　容	ページ
1. メソッド開発の効率化（Vol.74 TEC）	4
2. 前処理機能付きオートサンプラーの活用 ･･･ 標準液・試料溶液の自動希釈調製分析法（Vol.79 TEC）	6
3. 前処理機能付きオートサンプラーの活用 ･･･ 内標準溶液添加の自動化（Vol.80 TEC）	8
4. 多変量解析（主成分分析）を活用したクロマトデータ解析（Vol.82 TEC）	10
5. 前処理機能付きオートサンプラーによる アミノ酸の自動プレカラム誘導体化（Vol.85 TEC）	12
6. 恐ろしい ･･･ 試料の容器吸着（前編）（Vol.96 TEC）	14
7. 恐ろしい ･･･ 試料の容器吸着（後編）（Vol.97 TEC）	16
8. 恐ろしい ･･･ 試料の容器吸着（続編）（Vol.99 TEC）	18

※ いずれも各号発行当時の情報に基づいています。

LC talk Special Issue

メソッド開発の効率化

（LC talk Vol.74 TEC より）

分析メソッドの開発では，pH や緩衝能，有機溶媒種といった移動相条件の最適化を行いますが，その検討には専門的知識や経験が求められることから，多くの時間や労力を要することになります。ここでは，メソッド開発の効率化を実現する高速メソッド開発システムについて解説します。

■ハイブリッド型メソッド開発システム

●本システムは，複数の移動相を自動的に切り換えできる「移動相自動切換型システム」と超高速・汎用の両分析が可能な「超高速分析・コンベンショナル分析自動切換型システム」とを組み合わせたハイブリッド型メソッド開発システムです。図３はその流路図であり，超高速分析を利用して「移動相の選択とグラジエント条件の最適化」を行うことに加え，これまでの超高速分析システムでは難しいとされていた「高速メソッドから汎用メソッドへの移行」についても実現しています。（図１参照）

●超高速分析条件から汎用分析条件への移行をサポートしている理由は，例えば，開発したメソッドは自社内あるいは委託先の工程管理部門や品質管理部門などへ移管しますが，そうした部門が超高速分析システムを所有しているとは限らず，このような場合は，超高速分析用メソッドを汎用分析用メソッドへ移行する必要があるからです。

■メソッド構築の流れ

●メソッドの構築は，右ページのように，４つの Step に従って進めます。Step1 では独自の評価式を用いてクロマトグラムパターンを数値化し，この数値（評価値）より最適な移動相を選択します。また，Step2 においても，分析結果に対して評価式を適用し，最適なグラジエント条件を選択します。Step3 では，質量分析計 LCMS-2020 を用いてピークの同定を行います。Step4 では，確立した超高速分析条件を基に，メソッド移行プログラム Ver.2（図５参照）を利用して同様の分離パターンを持つ汎用分析条件への移行を図ります。

■自動化がもたらすメソッド開発効率の向上

●分析作業を効率的に進めるためには，自動化が不可欠です。本システムは，図２のように，オートパージ機能を使って移動相の置換作業を自動実行できるため，移動相の交換毎にドレインバルブを手動で空けてパージする必要はありません。また，ベースラインチェック機能でベースラインの状態を自動判定し，合格であれば（ベースラインが安定しているならば），分析が自動的にスタートします。このように人の手を煩わすことなく，異なった複数の分析を連続的に実行できるため，メソッド開発の効率化が実現できます。

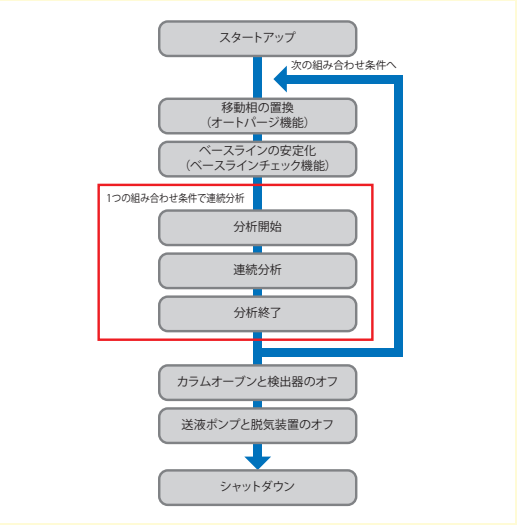


図2　自動分析の流れ

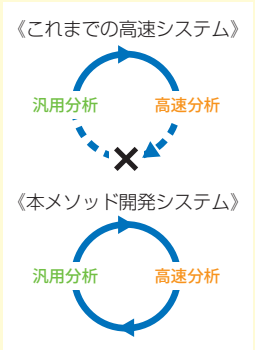


図1　システムの比較

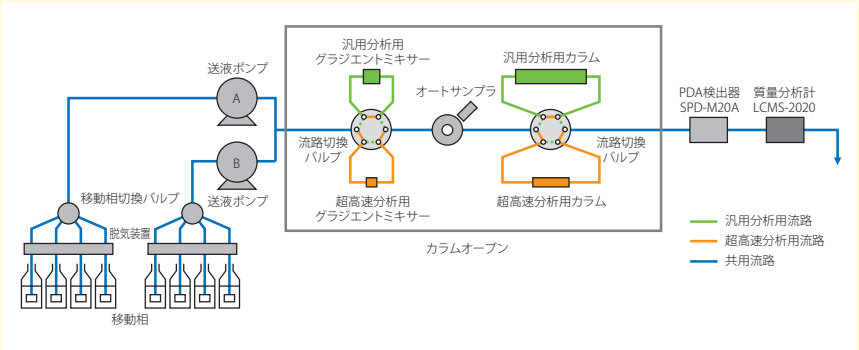
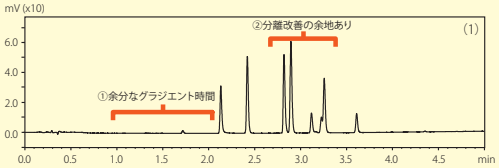


図3　高速メソッド開発システムの流路図

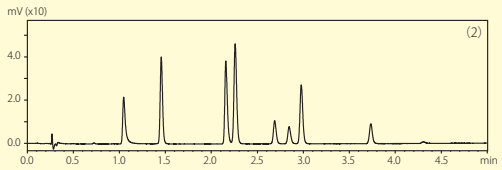
■ Step 1：移動相の最適化（超高速分析）

●送液ポンプに各々４種類の移動相をセットし，最大16通りの移動相を自動検討。
●独自の評価式を用いてすべての分析結果（クロマトグラム）のパターンを数値化し，この数値（評価値）により最適な移動相条件を選定。
➡図は最も高い評価値を得たクロマトグラム例です。



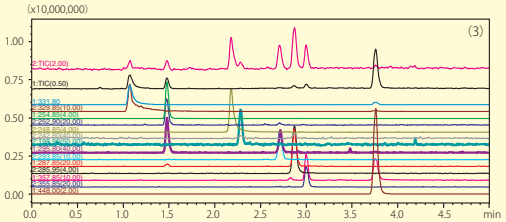
■ Step 2：グラジエント条件の最適化（超高速分析）

●Step2では，グラジエント条件を検討。（例：（1）における①と②の領域を改善）
●さまざまなグラジエント条件から得られたクロマトグラムのパターンを数値化し，最適条件を選定。
➡図は最も高い評価値を得たクロマトグラム例で，（1）の①と②の両領域が改善されています。



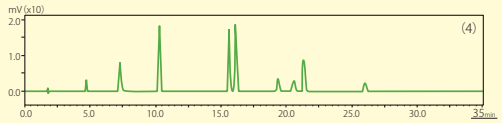
■ Step 3：LCMS-2020 によるピーク同定（超高速分析）

●Step3では，シングル四重極質量分析計質量分析計LCMS-2020を用いて，質量情報を用いた確度の高いピーク同定を実施。
➡LCMS-2020は，正負イオン切換時間が15 msであるなど，超高速分析に対応。



■ Step 4：汎用分析条件の確立（汎用分析）

●Step4では，（2）と同等な分離タパーンを持つ汎用分析条件へ移行。
●メソッド移行プログラムVer.2（図４参照）に超高速分析条件を入力し，算出した汎用分析条件に基づいて分析。
➡図は（2）を移行した結果で，分析時間は約７倍に引き延ばされていますが，分離についてはほぼ同等なパターンを維持しています。



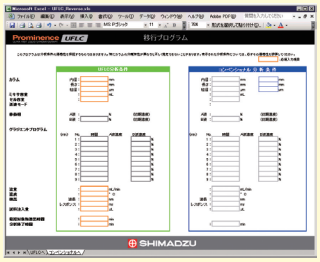


図4　メソッド移行プログラムVer.2

以上，本システムを利用すれば，効率的なメソッド開発が可能になり，さらには消費溶媒の大幅な削減（省溶媒化）を図ることができます。

本システムの詳細につきましては「テクニカルレポートNo.33/34：メソッド開発の高速化によるR & D効率の向上（1）/（2）」をご参照ください。　（Km）

LC talk Special Issue

前処理機能付きオートサンプラーの活用

…標準液・試料溶液の自動希釈調製分析法

（LC talk Vol.79 TEC より）

HPLC 分析において，標準液や試料溶液の希釈調製は通常手作業で行われますが，このような作業には経験や知識が必要な上，手間と時間がかかることも少なくありません。このプロセスを自動化できれば，分析のスループットを大きく向上させることが期待できます。

ここでは，超高速 LC “Nexera” 用 SIL-30AC オートサンプラーの前処理機能を活用して，標準液や試料溶液を自動希釈調製することにより，絶対検量線法による定量分析を省力化した例をご紹介します。

■絶対検量線法における標準液･試料溶液の調製

● HPLC による定量分析で広く用いられる絶対検量線法では，既知濃度の分析種標準液を数点調製し，これらを分析することにより，濃度とピーク面積あるいはピーク高さとの関係式，つまり検量線を得ます。そして，この検量線を用いて試料溶液を分析して得られたピーク面積あるいはピーク高さから分析種の濃度を算出します。この時，基本的に検量線は直線となる濃度範囲で設定し，試料溶液もその範囲に収まるように希釈操作などを行います。

●このような場合，SIL-30AC オートサンプラーの前処理機能を用いることにより，分析種標準原液のみを SIL-30AC にセットするだけで，任意倍率の希釈標準液を自動調製して，そのままカラムへ注入することが可能となります。また，同様に試料溶液についても，試料原液を任意の倍率に自動希釈して注入することができます。

●以下に，絶対検量線法によるコーヒーおよび紅茶中のカフェイン分析に応用した事例を示します。

■希釈標準液の自動調製とカラムへの導入

●以下の手順で，標準液を自動希釈し，カラムへ導入しました。（図 1）

①カフェイン標準原液（500 mg/L，水溶液）を調製し，SIL-30AC にセットする。

②このカフェイン標準原液バイアルから希釈率に応じた量を吸引し，混合用バイアル（空バイアル）に希釈液（精製水）と共に吐出する。

③混合用バイアルの中で，吸引吐出によるミキシングを行う。

④自動調製された希釈標準液を指定した注入量分だけ吸引し，カラムへ導入する。

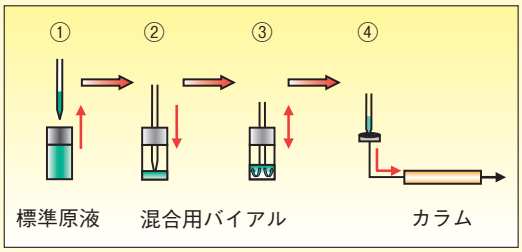


図1　希釈標準液の自動調製手順

■標準液の分析結果

●カフェイン標準原液を SIL-30AC を用いて，1/100，1/50，1/20，1/10，1/5 および 1/2（各標準液の最終濃度 5 mg/L，10 mg/L，25 mg/L，50 mg/L，100 mg/L および 250 mg/L）となるように自動調製した※1 希釈標準液を分析しました。

●分析条件を表 1 に，各標準液のクロマトグラムを図 2 に，またこれら標準液の分析結果より得られた検量線を図 3 に示します。

●自動希釈操作の再現性を確認するため，自動希釈された各標準液を 6 回繰り返し分析し，ピーク面積の再現性（%RSD）を算出しました。それらの結果を表 2（左）に示します。

表 1　分析条件

カ ラ ム	Shim-pack XR-ODSⅡ（内径 2.0 mm, 長さ 75 mm, 2.2 μm）
移 動 相	10 mmol/L りん酸(ナトリウム)緩衝液(pH 2.6)/アセトニトリル = 88/12
流 量	0.6 mL/min
温 度	40 ℃
検 出	紫外 270 nm
注 入 量	2 μL

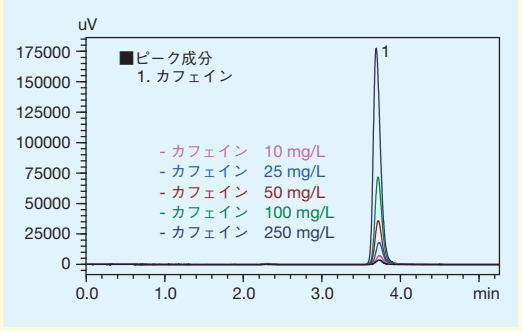


図2　カフェイン標準液のクロマトグラム

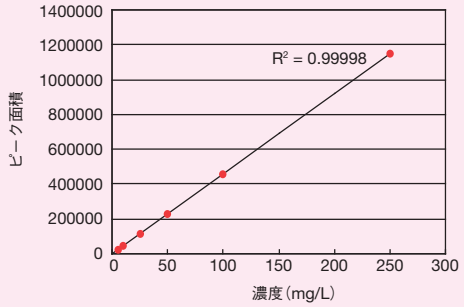


図3　カフェインの検量線

●また，SIL-30AC による希釈正確さ※２を確認するため，熟練技術者が手作業により調製した希釈標準液を対照として，SIL-30AC で自動調製した希釈標準液のピーク面積を比較しました。それらの結果を表２（右）に示します。

※１ 希釈倍率と最終容量を設定すれば，吸引量と吐出量は自動計算されます。

※２ 希釈正確さ（%）
= SIL-30AC による希釈標準液中カフェインのピーク面積
÷手作業による希釈標準液中カフェインのピーク面積× 100

表２　標準液繰り返し再現性結果（左）と
各希釈倍率における希釈正確さ（右）

濃度 (mg/L)	ピーク面積 (%RSD)
5	0.425
10	0.505
25	0.167
50	0.297
100	0.068
250	0.145

(n=6)

希釈倍率 (倍)	希釈正確さ (%)
2	100
5	100
10	101
20	101
50	101
100	102

■試料溶液の分析結果

●標準液と同様に，SIL-30AC の自動前処理機能を用いて，試料原液（コーヒーおよび紅茶を 0.2 μm メンブランフィルターでろ過）を 1/10 に自動希釈して分析を行いました。

●コーヒーのクロマトグラムを図４に，紅茶のクロマトグラムを図５に示します。　（Tn）

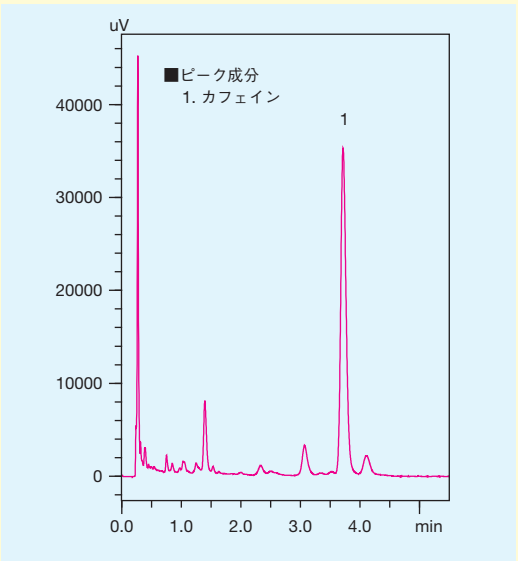


図4　コーヒー（1/10希釈）のクロマトグラム

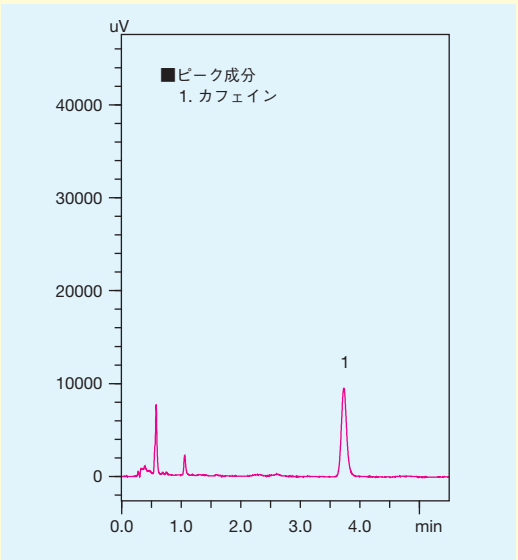


図5　紅茶（1/10希釈）のクロマトグラム

LC talk Special Issue

前処理機能付きオートサンプラーの活用

…内標準溶液添加の自動化

（LC talk Vol.80 TEC より）

前号では，超高速 LC “Nexera” 用 SIL-30AC オートサンプラーの前処理機能を活用して，標準液や試料溶液を自動希釈調製することにより，絶対検量線法による定量分析を省力化した例をご紹介しました。

ここでは，SIL-30AC オートサンプラーの前処理機能を活用した，内標準法における内標準溶液添加の自動化についてご紹介します。

■内標準法とその自動化

●内標準法では，内標準物質（Internal Standard，IS と略）と分析種の相対比から定量を行うため，注入量の補正を行うことができます。また，それ以外にも分析環境の変化（例えば，移動相流量，検出器の感度，試料溶媒の蒸発，移動相組成など）に対して補正を行うこともできます。なお，IS の選定には，以下のような要件があります。

・試料中に含まれている他の成分ピークと完全に分離されていること
・元々試料中に存在していないこと
・分析種の近くに溶出すること
・分析種と化学構造が類似していること（注入量補正が目的の場合は不要）

●しかしながら，内標準法は予め試料に IS を添加する必要があるため，分析試料数が多い時には分析のハイスループット化に問題があります。このような場合，SIL-30AC オートサンプラーの前処理機能を使えば，あらかじめ IS を試料に添加しておく必要がなく，分析の直前に自動で添加できるようになります。

●以下に，内標準法の「内標準同時注入」と「内標準混合 / 希釈注入」の 2 つの手法についての事例を示します。

■「内標準同時注入」の例

●「内標準同時注入」は，IS 吸引後，そのまま続けて試料溶液を吸引し，両方をまとめてカラムへ導入する手法です。この方法の利点は，室温などの環境変動によるピーク面積の変動を補正することが可能な点です。

●例えば，温度の影響を受けやすい分析種の場合，注入量が正しくても，室温変動に伴うピーク面積の変動により正確な濃度が求められません。このような時，IS を同時に注入，分析しておくと，分析種と IS の面積比から正確な濃度が算出できます※。

※ただし，IS は分析種と同じ温度特性を持つ必要があります。

●本手法における SIL-30AC の動作手順を，図 1 に示します。

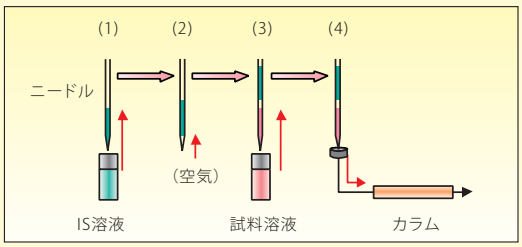


図1 「内標準同時注入」の動作手順例

●本手法を用いた例として，分析種にエチルパラベン（50 mg/L，100 mg/L，200 mg/L，40 mg/L），IS にメチルパラベン（40 mg/L）を用いて，6 回繰り返し再現性を調べました。分析条件 を表 1 に，エチルパラベン濃度 100 mg/L による 6 回繰り返し注入時のクロマトグラムを図 2 に，再現性を表 2 に示します。

表1 分析条件

カラム	Shim-pack XR-ODSII (内径 2.0 mm, 長さ 50 mm, 2.2 μm)
移動相	水/アセトニトリル = 75/25
流量	0.5 mL/min
温度	40 ℃
検出	紫外 254 nm
注入量	試料溶液およびIS溶液各 1 μL

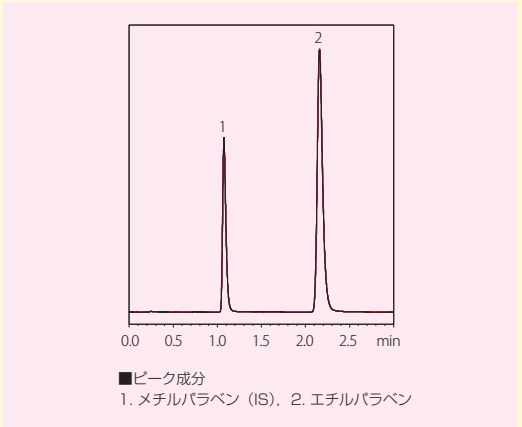


図2 内標準同時注入による分析例
（6 回繰り返しの重ねがきクロマトグラム）

表2　「内標準同時注入」の再現性例

濃度（mg/L）	ピーク面積比（%RSD）
50	0.248
100	0.212
200	0.148
400	0.201

■「内標準混合 / 希釈注入」の事例

●「内標準混合 / 希釈注入」は，IS 溶液と試料溶液を一度別のバイアルで混合するため，室温などの環境変動を補正できる上，注入量の誤差も補正可能です。

●例えば，10 µL 注入したつもりが 9 µL しか注入できていなかった場合でも，IS と分析種の面積比は注入量にかかわらず一定ですので，濃度を正しく計算できます。

●本手法における SIL-30AC の動作手順は，以下の通りです。（図 3）

1）IS 溶液を吸引する。
2）空気をはさむ。（任意）
3）試料溶液を吸引する。
4）空バイアルに，IS 溶液および試料溶液を吐出する。
※この時，希釈液（リンス液を使用）を同時に吐出しますので，希釈率を決めることができます。
5）混合（吸引・吐出動作）
6）カラムへ注入

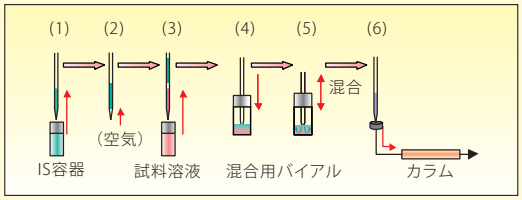


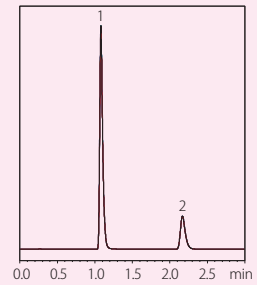
図 3　「内標準混合 / 希釈注入」の動作手順例

●本手法を用いた例として，「内標準同時注入」と同様，分析種にエチルパラベン（50 mg/L，100 mg/L，200 mg/L，400 mg/L），IS にメチルパラベン（400 mg/L）を用いて，6 回繰り返し再現性を調べました。分析条件を表 3 に，エチルパラベン濃度 100 mg/L による 6 回繰り返し注入時のクロマトグラムを図 4 に，再現性を表 4 に示します。

●なお，希釈率は IS 溶液および試料溶液とも 10 倍としました。この時，希釈液は予めバイアルに用意するのではなく，SIL-30AC のリンス液のひとつを割り当てました。SIL-30AC では最大 3 液のリンス液が使用できますので，希釈液以外の 2 液でのリンスが可能です。

表 3　分析条件

カ　ラ　ム：Shim-pack XR-ODSⅡ
　　（内径2.0 mm, 長さ 50 mm, 2.2 µm）
移　動　相：水/アセトニトリル = 75/25
流　　量：0.5 mL/min
温　　度：40 ℃
検　　出：紫外 254 nm
注　入　量：希釈混合後溶液 5 µL



■ピーク成分
1. メチルパラベン（IS），2. エチルパラベン

図 4　「内標準混合 / 希釈注入」による分析例
（6 回繰り返しの重ねがきクロマトグラム）

表4　「内標準混合/希釈注入」の再現性例

濃度（mg/L）※	ピーク面積比（%RSD）
5	0.142
10	0.270
20	0.074
40	0.093

※希釈後の最終濃度

以上，SIL-30AC の自動前処理機能を活用して，内標準法における内標準溶液添加を自動化した例をご紹介しました。なお，これらの条件設定は，テンプレートを用いることにより簡単に行うことができます。

（Mk）

LC talk Special Issue

多変量解析（主成分分析）を活用したクロマトデータ解析

（LC talk Vol.82 TEC より）

製品開発において競合品との差異を解析する場合，あるいは，品質管理においてクレーム品と良品との違いを調査する場合，クロマトグラム上のピーク数が多くなると，定性・定量という従来からの解析手法だけでは，両者の差異を明確に知ることは困難です。こうした問題を解決する手法のひとつとして，多変量解析があります。ここでは，多変量解析の中でもよく知られている主成分分析（PCA：Principal Component Analysis）について，基本的な考え方と作業の流れについてご紹介します。

■主成分分析とは

●におい識別装置 FF-2020 による香りの測定を例にして，主成分分析を考えてみましょう。 FF-2020 は特性の異なる 10 個のガスセンサーを内蔵しており，ひとつの試料に対して 10 個の測定値を収集することから，複数の変数を持っている（＝多変量である）といえます。

●例えば，4 つの試料を測定すると，測定値の数は合計で 40 個になりますが，主成分分析では，そのひとつひとつの測定値を独立して解析するのではなく，全ての測定値を総合的に取り扱い，その中にある違いを視覚化します。測定値は 10 個の変量からなり，10 次元空間の 1 点になるため，こうした多次元空間を表現することは，数学的には可能であっても視覚的には不可能です。そこで主成分分析では，違いを大きく表すための重み付けをして合成することにより，視覚的に読み取れる 2 次元（または 3 次元）に投影します。

●図 1 には，FF-2020 でお茶の香りを測定した主成分分析の結果を示しています。測定対象試料として，玉露，高級煎茶，中級煎茶，安い煎茶の計 4 種類を分析しました。主成分分析では，プロット位置が近いものは類似していると評価できることから，似たものをグループ化したり，目的試料に近いもの（あるいは違いが大きなもの）をみつけることができます。

●このように，主成分とは，対象試料の中に含まれる主要成分を指すのではなく，比較対象との違いを最も良く示す特徴（座標軸）のことを意味します。

■クロマトデータに対する主成分分析

●クロマトデータに対する主成分分析の一般的な作業手順を STEP1 ～ 3 として図 2 に示します。ここでは，対象商品として，

（a）通常のビール
（b）発泡酒
（c）第 3 のビール
（d）ノンアルコールビール

について，それらに含まれている有機酸に注目し，差異を解析した例を挙げています。また，多変量解析用ソフトウェアとして SIMCA-P+ を使用しました（注 1）。

（注 1）SIMCA-P+ は，Umetrics 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。

●《STEP1：クロマトデータの採取》分析データは，液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2020 を使用して，（a）～（d）のいずれも n=3 で分析しました。
なお，ピークの同定に関し，
（1）ピーク同定した後，多変量解析にかける。
（2）未同定のまま多変量解析にかけ，特徴的な違いがあるピークを見つけ出した後，これを同定する。
という 2 つのアプローチ方法があります。本例では，理解を容易にするため（1）を採用していますが，未知の化合物を網羅的に調べるには（2）が適しています。

●《STEP2：クロマトデータから表を作成》このステップでは，クロマトデータから表を作成します。この表は，次のステップにおいて，SIMCA-P+ に読み込んで多変量解析するためのものです。ここでは，Profiling Solution（プロファイリング・ソルーション）が表の作成を担っています。
この表の精度は，STEP3 での解析精度に大きな影響を及ぼします。解析精度が低くなると誤った判定を下す恐れがあることから，本ステップの精度は非常に重要です。Profiling Solution は，独自のアルゴリズムにより高い精度を誇っており，多変量解析に与える誤差を抑制することが可能です。

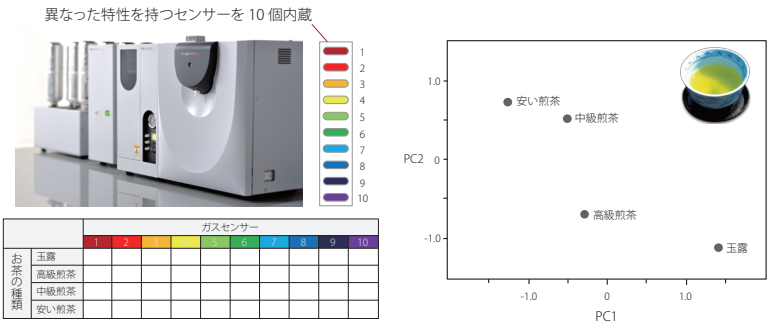


図1　お茶の香りに対する主成分分析

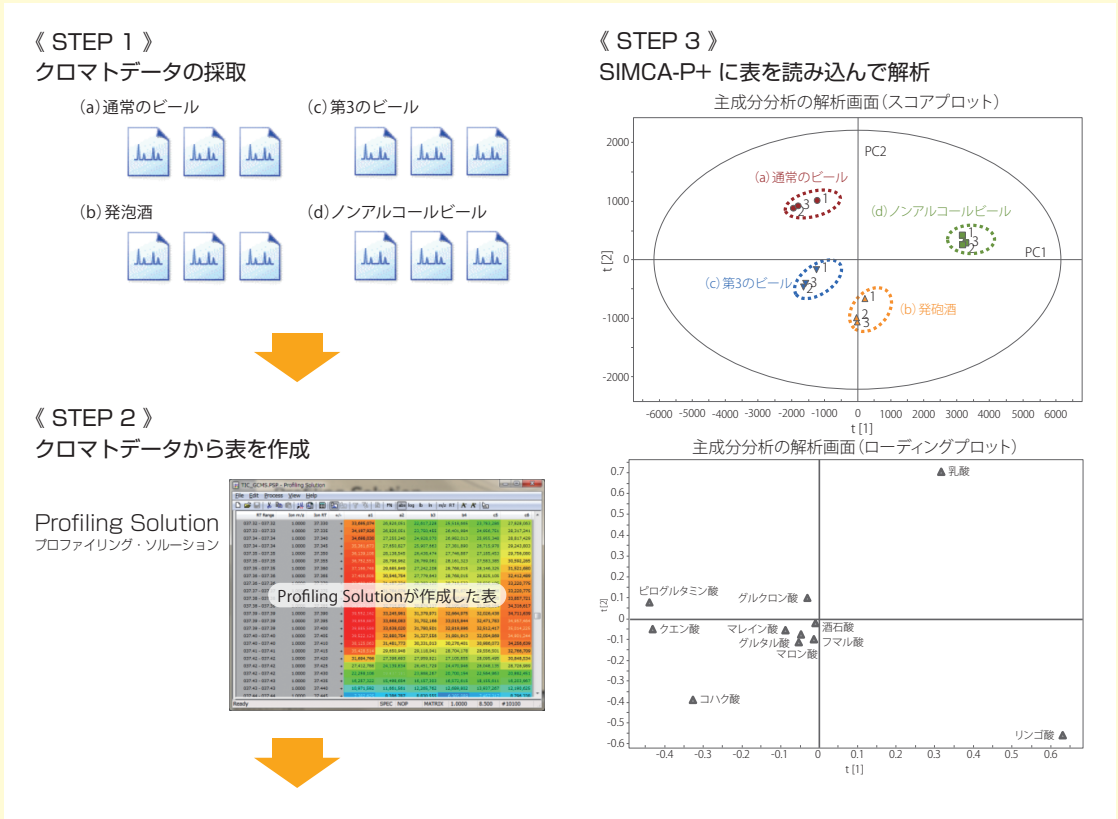


図2　クロマトデータに対する多変量解析

●《STEP3：SIMCA-P+ に表を読み込んで解析》
STEP3 は，多変量解析（主成分分析）した結果であり，この上図はスコアプロットと呼ばれています。計 12 個の分析データが 4 つのグループに分類できており，(a) ～ (d) の差が現れています。ここで，PC1 軸から見た場合，(d) ノンアルコールビールが他と大きく異なっていることが理解できます。

●次に，スコアプロットで視覚化できた差異に対し，試料中に含まれているどの成分が影響を及ぼしているのかをローディングプロットで確認します。酒石酸やフマル酸，マレイン酸などは，直交する軸の中心付近に集まっていることから，差異に大きな影響を及ぼしていないことを意味します。一方，大きな差異を生み出している成分は，離れたところに位置しているリンゴ酸や乳酸などであることがわかります。

■多変量解析を活用したクロマトデータ解析

●今回は有機酸を例として取り上げましたが，他の成分や未知のものなどさまざまな化合物を対象とした多変量解析にチャレンジするためには，柔軟対応できるシステムが必要であることから，All-round LC である Nexera が適しています。

●一方，質量分析計に関し，LCMS-2020 や LCMS-8030，LCMS-IT-TOF は，正負イオン化切替時間が世界最高クラスであることから，フロントエンド LC として Nexera を搭載すれば，多数のピークをシャープに測定することが可能になります。

多変量解析（主成分分析）の詳細につきましては「テクニカルレポート No.52：多変量解析（主成分分析）を活用したクロマトデータ解析の基礎」をご参照ください。
http://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/prominence/tec.htm

また，弊社主催の講習会「ケモメトリックス入門講習会 - 分析化学のための多変量解析 -」もご活用ください。
http://www.an.shimadzu.co.jp/spectro/support/training/spc/chemometric.htm

（Km）

LC talk Special Issue

前処理機能付きオートサンプラーによるアミノ酸の自動プレカラム誘導体化

（LC talk Vol.85 TEC より）

アミノ酸のプレカラム誘導体化を手動操作で行う場合，操作の煩雑性に加えて，反応時間のばらつきなどにより十分な精度が得られないことがあります。このような場合，SIL-30AC オートサンプラーの前処理機能を応用することにより，精度が高い誘導体化反応を行うことが可能になります。

今回は，SIL-30AC を用いた *o*- フタルアルデヒド（OPA）およびクロロぎ酸 9- フルオレニルメチル（FMOC）によるアミノ酸の自動プレカラム誘導体化法についてご紹介します。

■アミノ酸の自動誘導体化手順

●図 1 に，SIL-30AC を用いたアミノ酸の自動プレカラム誘導体化手順を示します。空バイアルを用意し，このバイアルに誘導体化試薬とアミノ酸を含む試料を分注･混合することにより，アミノ酸を誘導体化します。

●一級アミノ酸は，OPA および 3- メルカプトプロピオン酸により蛍光誘導体化されます（図 2）。これら試薬で誘導体化されない二級アミノ酸は，次に添加する FMOC により蛍光誘導体に変換します（図 3）。

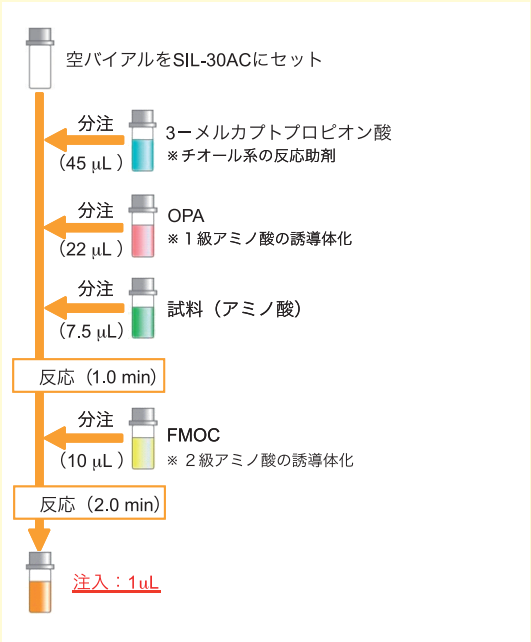


図1　アミノ酸の自動プレカラム誘導体化手順

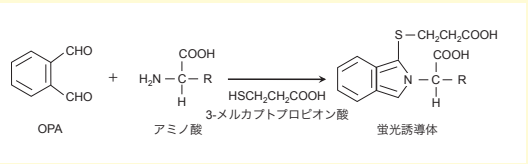


図２　OPA/3- メルカプトプロピオン酸による一級アミノ酸の誘導体化

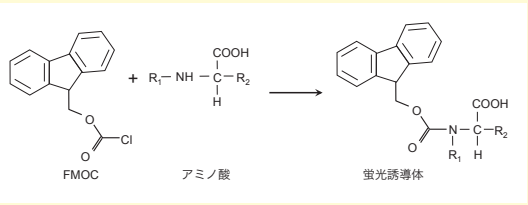


図３　FMOC による二級アミノ酸の誘導体化

■アミノ酸標準液の分析

● SIL-30AC を用いた自動プレカラム誘導体化により，アミノ酸 22 成分混合標準液を超高速 LC（UHPLC）分析しました。表 1 に分析条件を，図 4 に誘導体化されたアミノ酸 22 成分のクロマトグラムを示します。

● OPA と FMOC とでは誘導体化されたアミノ酸の励起および蛍光波長が異なりますが，蛍光検出器 RF-20Axs の波長切換機能を使用することにより，一級アミノ酸と二級アミノ酸を一斉分析することができます。

●表 2 に本分析におけるピーク面積再現性を，図 5 に検量線を示します。いずれも良好な結果が得られました。

表 1　分析条件

装　置	Nexera UHPLC（SIL-30AC）
カラム	YMC Triart C18 1.9 μ （内径 3.0 mm, 長さ 75 mm, 1.9 μm）
移動相	A:20 mmol/L りん酸（カリウム）緩衝液（pH 6.9） B:アセトニトリル / メタノール / 水 =45/40/15 グラジエント溶離
流　量	0.8 mL/min
温　度	35 ℃
検　出	RF-20Axs Ex 350 nm，Em 450 nm → Ex 266 nm，Em 305 nm（9.0 min）
注入量	1 μL

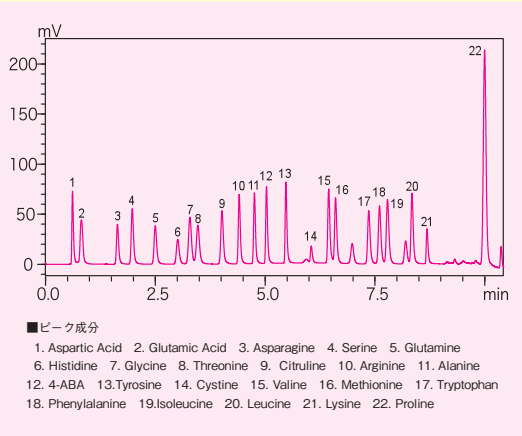


図4　アミノ酸22成分混合標準溶液のクロマトグラム

表２　アミノ酸標準液によるピーク面積再現性（n=6）

	%RSD
Aspartic Acid	0.50
Glutamic Acid	0.48
Asparagine	0.51
Serine	0.41
Glutamine	0.56
Histidine	0.57
Glycine	0.29
Threonine	0.55
Citruline	0.46
Arginine	0.45
Alanine	0.46

	%RSD
4-ABA	0.41
Tyrosine	0.55
Cystine	0.46
Valine	0.71
Methionine	0.71
Tryptophan	0.70
Phenylalanine	0.73
Isoleucine	0.63
Leucine	0.55
Lysine	0.56
Proline	2.35

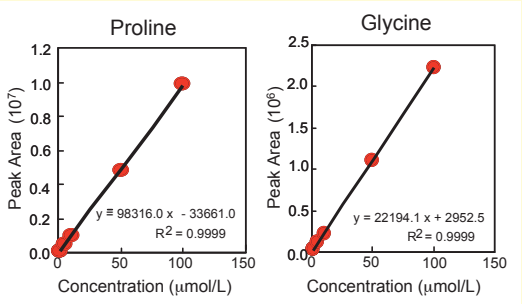


図5　検量線

■実試料の分析

●標準液と同様の手順により，実試料の分析を行いました。図６に清涼飲料水，図７にサプリメントのクロマトグラムを示します。

●清涼飲料水は 0.1 mol/L 塩酸で希釈し，孔径 0.2 μｍメンブランフィルターでろ過後分析しました。サプリメントは粉砕，水溶解し，同様にメンブランフィルターでろ過後分析しました。

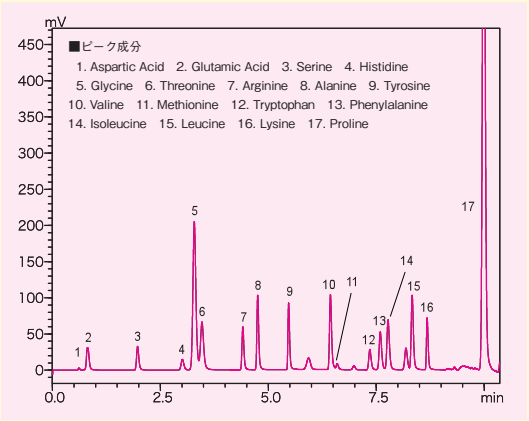


図6　清涼飲料水のクロマトグラム

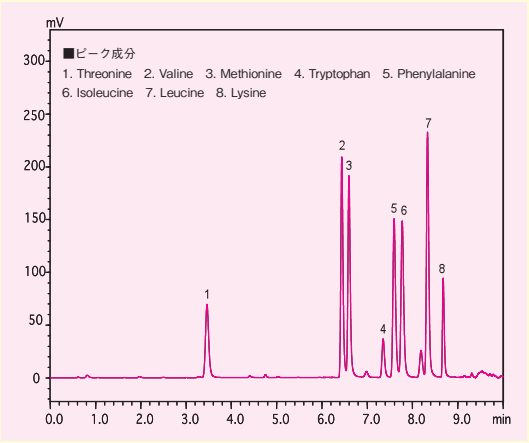


図7　サプリメントのクロマトグラム

以上のように，従来手作業で行っていたアミノ酸のプレカラム誘導体化を，前処理機能付き SIL-30AC オートサンプラーを用いて自動化することにより，作業の省力化だけでなく，分析精度を高めることができます。　（Hr）

LC talk Special Issue

恐ろしい…試料の容器吸着（前編）

島津製作所 技術顧問　浅川直樹

（LC talk Vol.96 TEC より）

●近年の LC/MS は，装置開発および分離技術の目覚ましい進歩と共に，生命現象の解明，病態の診断，医薬品開発，環境および食品関連などの分野で魅力ある分析手段として広範に用いられてきている。中でも，高選択性および高感度検出に威力を発揮することから，試料中の微量成分の定量法として不可欠な分析手段になってきている。

●反面，この LC/MS を微量成分の定量法に適用する際に，本質的な一つの課題が浮かび上がってくる。それは，LC/MS が高感度検出力を有するがために，試料は極めて低濃度となる。この低濃度試料であるがゆえに生じる試料の容器・器具への吸着は，定量結果の信頼性を損なう致命的な要因になり得ると言う点である。分析化学に携わる者の使命として，“信頼性の高い分析結果を，如何に簡便かつ迅速に確保するかを追究する”との立場であるならば，どれほどの分析者がこの容器への吸着に配慮しているかは極めて疑問である。

●今後，LC/MS が高感度定量法として重要な役割を果たすことは，誰もが容易に予想できる。そのためには LC/MS による高感度定量法の信頼性を高めることは極めて意義深い。本誌では，多くの分析者が見過ごし易い試料の容器への吸着に焦点を当て，これからの LC/MS 分析の一助になれば幸いである。

●今回の寄稿にあたり，試料の容器への吸着で苦い経験を思い起こす。今から３５年前に遡る。２０残基程のペプチド製剤の分析を HPLC で行っていた時のことである。当時の HPLC 装置は，現在のような自動化された高性能の HPLC 装置とはほど遠く，マイクロシリンジ（内面はガラスの擦り状）で一定量の試料（数 μg/mL）を採り，手動でインジェクターに注入していた。その際の分析結果は何度繰り返してもバラツキは大きく，結果を見るたびに愕然とした。試行錯誤での原因究明の中，マイクロシリンジを洗浄すればするほど，さらに採った試料を秒刻みで放置すればするほど検出されるピークは小さくなることに着目した。

●このバラツキの原因がマイクロシリンジへの吸着であることにやっと辿り着いた。たかがマイクロシリンジへの吸着でさえ，分析結果の信頼性に極めて大きな影響を及ぼすと言う“恐ろしさ”を実感し，試料調製から HPLC 注入に至るプロセスの吸着対策の必要性を痛感した。昨今の自動化された HPLC 装置では，吸着現象を見過ごしていたかも知れないことを憶えば，この苦い経験は，私の吸着に対する意識を高め，容器・器具への吸着対策の貴重な機会へと化した。これを機に容器や器具への吸着を意識するようになり，試料調製時の容器・器具への試料の吸着現象を，まず把握することを常としてきた。

●さらに，最近になって LC/MS 分析者から“血漿試料溶液では目的成分ピークは検出されるが，標準試料溶液はピークが検出されない”とか，“調製した標準試料溶液を翌日に分析すると，ピークが検出されない”とか，何度か耳にすることがある。このような現象は，試料の安定性に基づく分解も考えられるが，大半は容器への吸着であると容易に推察できる。特に血漿試料溶液の場合，試料中の夾雑物が優先的に容器に吸着し，目的成分の吸着を抑制する役割をしているとの理解であり，BSA（bovine serum albumin）を吸着防止剤として用いるのと同じである。いずれにせよ，これからの LC/MS による分析評価が重要な役割と大きな期待を担う以上，試料の容器への吸着現象を十分に把握し，信頼性の高い結果の獲得に向けて努力する必要がある。

●私は，この一連の経験から試料の吸着メカニズムを HPLC の分離メカニズムに置き換えて解釈してきた。すなわち，HPLC による分離メカニズムは固定相への溶質の吸着強度を移動相で制御しているに他ならない。これを試料の容器への吸着現象に置き換えると，固定相を容器の材質に，移動相を試料調製溶液に，また保持挙動を吸着強度にそれぞれ対応すると考えた。

●一般に，試料調製に用いる容器は主に２種類ある。その容器の材質として一つはガラス容器，もう一つはポリ容器（PP：ポリプロピレン，PE：ポリエチレン）が相当する。ガラス容器の表面は，親水性の高いシラノール基と疎水性のシロキサン（シリカゲルを高温で溶融・成形する際のシラノール基の脱水）で覆われている。従って，ガラス容器ではシラノール基によるイオン的吸着（陽イオン交換モード）とシロキサンによる疎水的吸着（逆相モード）が同時に引き起こされる。このイオン的吸着現象は，塩基性化合物が HPLC カラムの残存シラノールによりピークのテーリングや保持の増大を引き起こす現象と同じ解釈である。一方，ポリ容器では高分子ポリマーに基づく疎水的吸着のみが生じる。すなわち，容器への吸着メカニズムは容器の材質によりそれぞれ異なる（図 1）。このことから，p*K*a（酸解離定数）の高い塩基性化合物などはガラス（シラノール基）に吸着し易く，log*P*（オクタノール / 水分配係数）の大きい化合物はガラスにもポリ容器にも吸着し易いことになる。試料調製の際には，試料の物性情報（化合物の p*K*a と log*P*）に基づいて容器を選択することは吸着対策の一つになる。

●以上のように，かつての苦い経験を振り返れば，容器への吸着現象は低濃度試料において顕著に現れるた

め，この際の容器・器具への吸着を抑制する試料調製条件を見いだすことは分析法の信頼性を確保する上で極めて重要となる。

●そこで，私の容器への吸着を抑制する試料調製法を以下に紹介する。まず，目的成分が塩基性化合物，酸性あるいは中性化合物に該当するかを確認する。次に，用いる試料調製容器はガラス容器あるいは PP 容器なのかにより，それぞれ異なった試料調製を行う。

1) 酸性化合物および中性化合物

酸性化合物および中性化合物のガラスおよび PP 容器への吸着は，疎水的吸着が主となる。従って，これら吸着の抑制には，試料調製液に有機溶媒（メタノール，アセトニトリルなど）あるいは非イオン性界面活性剤を添加する。目的成分の log*P* によるが，有機溶媒の場合の添加量は，一般的に 10 ～ 50 %，界面活性剤の場合では，0.1 % 程度の添加が効果的な吸着抑制の試料調製となる。

2) 塩基性化合物

塩基性化合物はガラス容器および PP 容器により，それぞれ吸着メカニズムが異なるため，試料調製容器の材質の選択には留意する必要がある。例として，塩基性化合物の吸着抑制法の概要を図 2 に示す。

a) ガラス容器

ガラス容器では，イオン的吸着および疎水的吸着が同時に生じるため，それぞれの吸着メカニズムに対応した試料調製が必要となる。イオン的吸着の抑制には，シラノールとの相互作用を抑制するために，塩（NaCl など）を添加し，塩の陽イオン（Na^+ など）でシラノールをブロックする。あるいはシラノールの解離を抑制するために，試料調製液を酸性条件（りん酸および酢酸などの添加）にする。一方，疎水的吸着の抑制には，酸性・中性化合物と同様に，試料調製液に有機溶媒や非イオン性界面活性剤を添加する。

b)PP 容 器

PP 容器では疎水的吸着が生じるため，この疎水性吸着を抑制するために，試料調製液に有機溶媒や非イオン性界面活性剤を添加する。

従って，試料調製液中に塩と有機溶媒あるいは非イオン性界面活性剤を共存させることは，ガラスおよび PP 容器双方の吸着抑制法として効果的である。

●とは言え，HPLC および LC/MS による高感度定量には，吸着抑制した試料調製液に由来する分離への影響や MS でのイオンサプレッションに対する影響を考慮する必要がある。また，最近では HPLC および LC/MS のパフォーマンスの向上を図るために，充塡剤の粒径と内径を小さくした分析カラムが汎用されてきているため，試料溶液（注入溶液）の有機溶媒量が分離に及ぼす影響についての配慮も併せて求められる。このように高感度定量における容器への吸着を抑制する試料調製液の最適化条件の設定には，多くの検討を要するのが実態である。

●そこで，容器表面で生じる試料のイオン的吸着と疎水的吸着を抑制する容器表面の処理条件の最適化に向け，汎用性に優れた HPLC オートサンプラーに適用可能な低吸着バイアルの開発に注力してきた。後編では，開発したバイアルの吸着抑制効果の具体例として，ペプチドおよび塩基性化合物などを取り上げて紹介する。

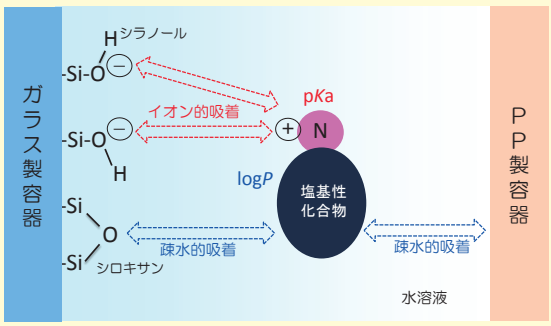


図1　塩基性化合物の容器への吸着メカニズム

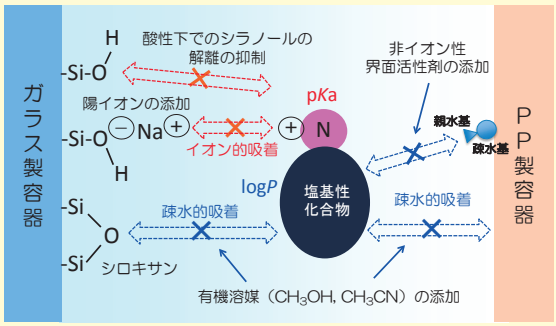


図2　塩基性化合物の容器への吸着抑制法

LC talk Special Issue

恐ろしい…試料の容器吸着（後編）

島津製作所 技術顧問　浅川直樹

（LC talk Vol.97 TEC より）

●前編では，試料の容器吸着のメカニズムとその抑制法の概略について紹介した。後編では，容器への吸着メカニズムに基づき開発した低吸着バイアル“LabTotal Vial”（ガラス製）と“TORAST-H™ Bio Vial”（ポリプロピレン製）について，その特徴とこれらバイアルにおける塩基性化合物およびペプチド等の吸着抑制効果について紹介する。

① LabTotal Vial

● LabTotal Vial は，ガラスバイアル表面への塩基性化合物吸着を抑制したバイアルである。図１に，LabTotal Vial と市販ガラス製バイアル（A，B）に中性化合物と塩基性化合物の混合液を分注し，その効果を検討した際のクロマトグラムを示す。

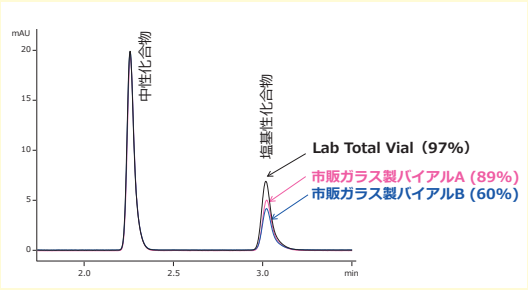


図1　LabTotal Vial の効果

●ポリプロピレン (PP) 製バイアルを 100 %としたときの各バイアルにおけるピーク面積の割合を括弧内に示した。この結果，市販ガラス製バイアルでは，塩基性化合物のピーク面積低下が確認された。前編で紹介した通り，塩基性化合物は，ガラス表面のシラノールとの相互作用により吸着しやすい。この吸着は，試料溶媒の工夫により抑制することは可能であるが，LabTotal Vial ではバイアル表面の吸着が抑えられているため，試料溶媒への配慮が不要となる。

●表１に，４種の塩基性化合物による LabTotal Vial と市販ガラス製バイアル（A，B）との比較例を示す。複数の塩基化合物において，LabTotal Vial の吸着抑制の有用性を確認することができた。

表１　４種の塩基性化合物による各バイアルの比較例

化合物※	アミトリプチリン	アテノロール	イミプラミン	プロプラノロール
LabTotal Vial	51376 (100 %)	8638 (100 %)	64990 (100 %)	32249 (100 %)
バイアルA	45376 (88 %)	7620 (88 %)	55531 (85 %)	31496 (97 %)
バイアルB	21788 (42 %)	6137 (71 %)	24131 (37 %)	27327 (84 %)

（上段：ピーク面積，下段：LabTotal Vial の面積を 100 %としたときの各バイアルでの割合）

●前編では，目的成分の物性に基づいた吸着を抑制する方法について紹介したが，未知の化合物や複数の化合物を分析する場合，試料溶媒による吸着抑制の対処は一般的に困難となる。

●図２に，疎水性基と塩基性基を有するアミオダロンを LabTotal Vial，市販 PP 製バイアルおよび市販ガラスバイアル B でのクロマトグラムを比較した結果を示す。

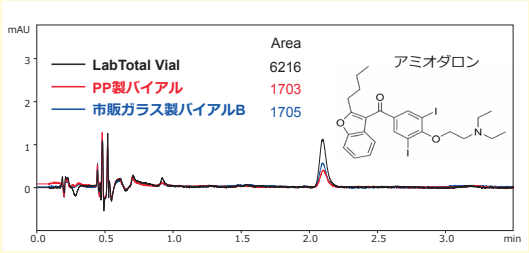


図2　アミオダロンによる比較クロマトグラム[1)]

●アミオダロンは，PP 製バイアルでは疎水的吸着，ガラス製バイアルではイオン的吸着と疎水的吸着により，ピーク面積が低下したものと考えられる。バイアルに吸着する目的成分が一定量であれば（バイアル間の差が少なく，均一に製造されていれば），低濃度試料であるほど吸着による顕著な濃度低下が観察され，結果として検量線の直線性を低下させる要因となる。LabTotal Vial は，吸着を抑えることで，目的成分の物性，試料濃度に合わせたバイアルの使い分けを必要とせず，第一選択肢として使用可能なバイアルと位置付けることができる。

● LabTotal Vial は，成形条件の最適化により，ガラス表面形状を安定化し，吸着を抑制したためと考えられる。図３に，LabTotal Vial と市販ガラス製バイアルの表面観察を行った結果を示す。

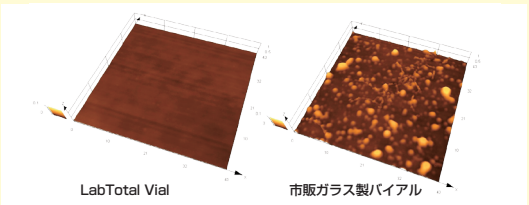


図3　ガラス表面観察の結果

●両バイアルの表面形状を比較すると，LabTotal Vial の表面が滑らかであることがわかる。一方，市販ガラス製バイアルは，試料の接触面積が大きいため，吸着が起きやすくなっていることが推察される。今後，表面の化学的解析をさらに進め，吸着抑制のメカニズム解明を目指したい。

② TORAST-H™ Bio Vial

● TORAST-H™ Bio Vial は，親水基を容器表面に化学結合させた低吸着バイアルである。例えば，ペプチドのバイアルに吸着する主なメカニズムは，疎水的吸着とイオン的吸着である言われている。ガラス製バイアルでは，主にガラス表面のシラノールとのイオン的吸着を，また PP 等のポリマー製バイアルでは，主にポリマー表面との疎水的吸着を生じることが知られている。

●図 3 に，ミオグロビンのトリプシン消化物による各バイアルの比較例を示す。保持時間約 7 ～ 8 分に検出される極性の高いペプチドは，ガラス製バイアルに顕著な吸着が，また約 12 ～ 17 分に検出される疎水性の高いペプチドは，PP 製バイアルに顕著な吸着がそれぞれ確認された。一方，TORAST-H™ Bio Vial では，これらの吸着が抑制されていることが確認された。

●※ 1 のピークにおいて，TORAST-H™ Bio Vial はガラス製バイアルに比べ，約 40 % の回収率の改善 (ピーク面積比較) が確認された。また，※ 2 のピークにおいては，PP 製バイアルではピークがほとんど確認できなかったが，TORAST-H™ Bio Vial ではピークの検出が可能となった。

●以上，近年の LC/MS を始めとする高感度定量が追究されてきている中，試料調製時の容器への吸着現象は分析法の信頼性確保に深刻な課題となることは言うまでもない。本稿が多くの分析者の参考になれば幸いである。なお，島津グループでは分析法の信頼性確保に向け，試料調製から測定に至る一連のプロセスでの吸着抑制検討を継続中であり，逐次，その成果を紹介していきたい。

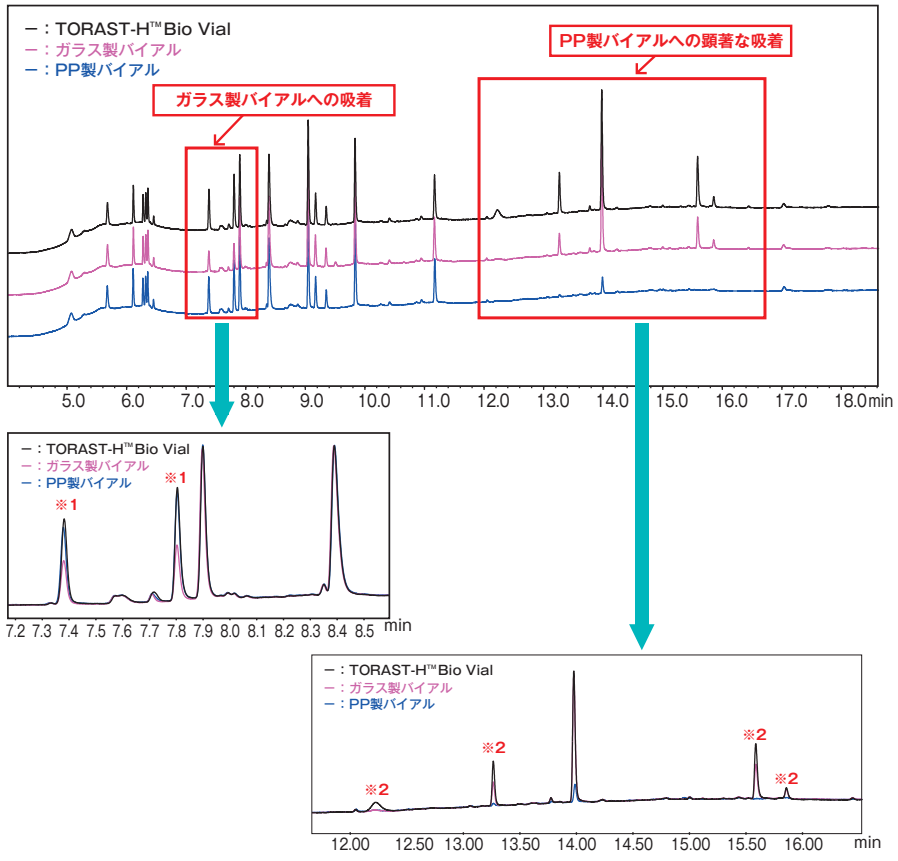


図4　ミオグロビンのトリプシン消化物による各バイアルの比較例

1）アミオダロンによる比較クロマトグラムは，国立研究開発法人 国立循環器病研究センター薬剤部様との共同研究で得られたデータ

LC talk Special Issue

恐ろしい…試料の容器吸着（続編）

島津製作所 技術顧問　浅川直樹

（LC talk Vol.99 TEC より）

●前編および後編では，試料の容器吸着のメカニズムならびに既に商品化した低吸着バイアル（LabTotal Vial, TORAST -H™ Bio Vial）の吸着抑制効果について述べた。この間，バイアルへの吸着のみならず，試料のサンプリングや試料の希釈など試料調製に多用されている PP（ポリプロピレン）製ピペッターチップ（PP 製チップ）への吸着も分析結果の信頼性を損なう要因と認識しているユーザーから，低吸着 PP 製チップの開発の要請が数多く寄せられた。

●そこで島津グループでは，TORAST-H™ Bio Vial に引き続き PP 製チップへの吸着現象を把握すると共に，低吸着 PP チップの開発に着手し，世界に先駆けて TORAST-H™ Tip の商品化に至った（JASIS 2016 において発表）。本編では，PP 製チップへの吸着現象，TORAST-H™ Tip の概要と吸着抑制効果について紹介する。

■ PP 製チップへの吸着現象

● PP 製チップへの吸着は疎水的吸着が主であるため，吸着抑制法として試料溶液に有機溶媒（メタノール，アセトニトリルなど）を添加することが一般的である（前編参照）。しかし，近年の LC および LC/MS 分析の高速化に伴い，充填剤粒子径およびカラムサイズは微小化してきている。このため，有機溶媒の多い試料溶液を逆相モードの LC カラムに適用すると，試料中の有機溶媒によるピークのブロード化を引き起こし，十分な分離が得られないことが多々ある。

●この場合には，試料中の有機溶媒の添加量や試料注入量を制限するなどして対応するものの，LC および LC/MS の本来の高分離力および高感度検出力を十分に発揮できていないのが現状である。従って，LC および LC/MS の性能を最大限発揮させるためにも，有機溶媒フリーの試料液が好ましく，この際に懸念される PP 製チップへの疎水的吸着を抑制するチップの開発は極めて意義深い。

■ TORAST-H™ Tip の開発

●島津グループでは，昨年より低吸着の PP 製バイアル TORAST-H™ Bio Vial を商品化し，多くのユーザーより支持を得てきた。このチップは，PP 製チップ（未処理）表面に超親水性／非イオン性の高分子ポリマーを化学結合させることにより，PP 製チップ表面での疎水的吸着を抑制するものである（図 1）。しかも，この化学結合は極めて安定であることから，広範な溶媒での試料調製が可能であることを特徴とする。

■ TORAST-H™ Tip の吸着抑制効果

● TORAST-H™ Tip の吸着抑制効果を検証するために，ペプチドおよび塩基性薬物をモデル試料として，本チップ，未処理チップおよび市販チップへの吸着について検討した。

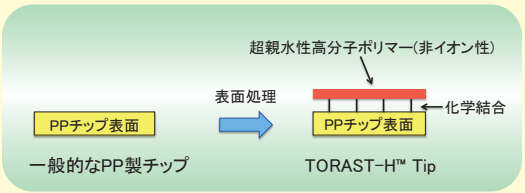
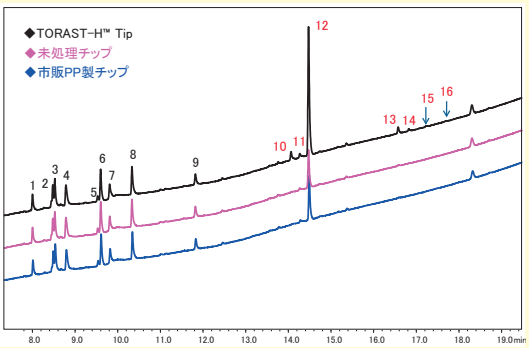


図1　TORAST-H™ Tip の概要

1) ペプチド

ペプチドは，容器への吸着が顕著であることを紹介した（後編参照）。そこで，ミオグロビンをトリプシン消化した試料（≒ 1.9 pmol/mL）を TORAST-H™ Tip，未処理チップ（TORAST-H™ Tip のベースチップ）および市販 PP 製チップを用い て TORAST-H™ Bio Vial にそれぞれ採取し，試料溶液とした。各試料溶液について，HPLC で得られたクロマトグラムを図 2 に示す。



分析条件
カラム：Aeris Peptide（内径 2.1 mm，長さ 150 mm，粒子径 1.7 μm）
移動相：0.1 %TFA 水溶液 /0.1 %TFA アセトニトリル溶液，グラジエント溶離
検　出：紫外 216 nm

図2　ミオグロビントリプシン消化物のPP製チップへの吸着

各ペプチドのピーク（No1 ～ 16）において，親水性ペプチド（保持の小さい No.1 ～ 9）のピーク面積はチップによる差は認められなかった（図 3）。

一方，疎水性のペプチド（保持の大きい No.10 ～ 16）のピーク面積は，チップにより顕著な差が認められ，TORAST-H™ Tip に対し未処理チップおよび市販チップでは 60 ～ 90 %超のピーク面積が減少した（図 4）。このことは，PP 製チップへの吸着は疎水的吸着に起因

することが示唆されると同時に，UV 検出が可能な試料濃度でさえ，ペプチドは顕著に PP 製チップに吸着することが明らかとなった。一方で，TORAST-H™ Tip は未処理チップおよび市販チップと比較し，顕著な吸着抑制効果を示した。

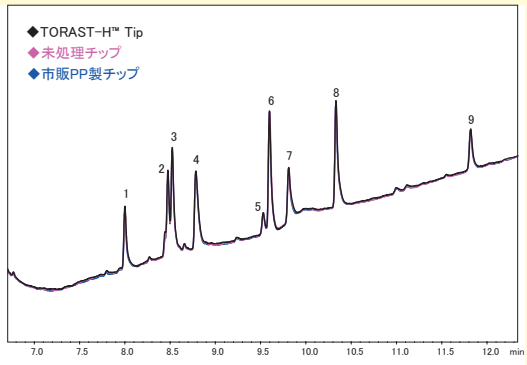
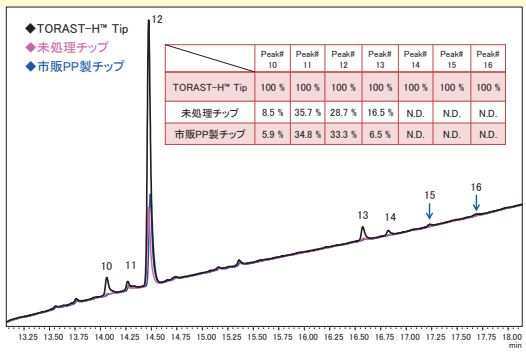


図３　ミオグロビントリプシン消化物の PP 製チップへの吸着（拡大クロマトグラム：ピーク No.1 ～ 9）



	Peak# 10	Peak# 11	Peak# 12	Peak# 13	Peak# 14	Peak# 15	Peak# 16
TORAST-H™ Tip	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
未処理チップ	8.5 %	35.7 %	28.7 %	16.5 %	N.D.	N.D.	N.D.
市販PP製チップ	5.9 %	34.8 %	33.3 %	6.5 %	N.D.	N.D.	N.D.

図４　ミオグロビントリプシン消化物の PP 製チップへの吸着（拡大クロマトグラム：ピーク No.10 ～ 16）

2) 塩基性薬物

疎水性の高い抗うつ剤であるイミプラミンおよび親水性の高いβブロッカーであるアテノロールをモデル化合物として，LC/MS（NexeraX2, LCMS-8050）により，低濃度試料（1 ng/mL および 10 ng/mL 水溶液）での TORAST-H™ Tip と未処理チップへの吸着を比較した。

i) イミプラミン

イミプラミン（log*P* : 4.28）は，疎水性が高く PP 表面への吸着が懸念される薬物の一つである。未処理チップは，TORAST-H™ Tip に対し，10 ng/mL で 66 %，1 ng/mL で 74 % のピーク面積がそれぞれ減少した。この結果は，イミプラミンが PP 製チップ表面に容易に吸着することを示すものである。一方で，この結果は，TORAST-H™ Tip の顕著な吸着抑制効果を示唆したことになる（図 5）

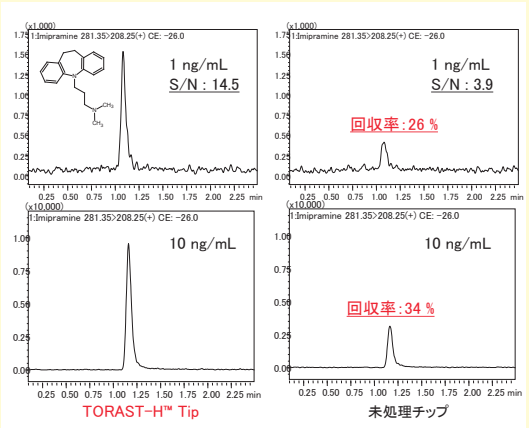


図５　イミプラミン（1，10 ng/mL）の PP 製チップへの吸着（LC/MS によるクロマトグラム）

ii) アテノロール

アテノロール（log*P* : 0.43）は親水性の高い薬物の一つであり，PP 製チップ表面への吸着は小さいことは容易に推察できる。アテノロール 1 ng/mL 水溶液を TORAST-H™ Tip および未処理チップでそれぞれサンプリングした後，TORAST-H™ Bio Vial に移し，試料液とした。この試料につき LC/MS でピーク面積を比較した。未処理チップは TORAST-H™ Tip に対し，僅かなピーク面積の減少を認めた。そこで，低濃度試料を想定したモデル実験として，さらにチップとの接触面積を 5 倍および 10 倍に増やしたところ，TORAST-H™ Tip に対する未処理チップでのピーク面積は，それぞれ 17 および 30 %の減少を認めた。この結果は，アテノロールに代表される親水性の高い化合物でさえ，低濃度試料において PP 製チップに吸着することが示唆された。

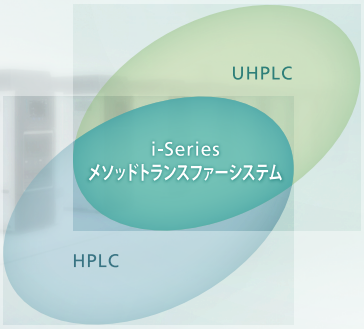
●本編での一連の紹介は，低濃度試料における PP 製チップへの吸着の実態を把握した初めての結果であり，低濃度試料の調製の際の PP 製チップの安易な使用が分析バラツキの一因となり得ることへの警告でもある。併せて，TORAST-H™ Tip は，低濃度試料の調製における PP 製チップへの吸着抑制効果を発揮することから，TORAST-H™ Bio Vial との併用により，LC/MS を始めとする高感度分析の信頼性確保への貢献が大いに期待される。

高速液体クロマトグラフ メソッドトランスファーシステム

i-Series Method Transfer System

Nexera-i MT

i-Series



1台のシステムでHPLCとUHPLCの両立を実現

― 2つの流路で煩わしいメソッド移管作業を低減

UHPLCとHPLCの遅れ容量を持つ2流路での分析が1台のシステムで可能です。HPLCを用いたお客様の分析試験法の移管を用意にすると共に、HPLCでお客様の分析試験法をUHPLCの高速分析に変換する作業がスムーズに行えます。

― 精度の高い再現性を実現するACTO機能

LabSolutionsに搭載した新開発のACTO（Analytical Condition Transfer add Optimization）機能は、既存のメソッドから濃度グラジエントプログラムの編集作業をすることなく、装置館のシステム容量差にあわせて注入タイミングを移動させることができます。

― シームレスなメソッド移行を実現

LabSolutionのACTO機能には、HPLCからUHPLCへのメソッド移行機能も備わっています。既存の装置で構築されたメソッドファイルを読み込み、使用するカラム情報を入力するだけで最適な高速分析条件にシームレスに変換することができます。また流路の選択により、UHPLCからHPLCへのメソッド移行も可能です。

LC talk
Special Issue XI

発　行　日：2017年4月20日
編集・発行：株式会社島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
"LC talk club" 編集長　三上 博久
連　絡　先：分析計測事業部 "LC talk club" 事務局
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
E-mail：analytic@group.shimadzu.co.jp

3212-03751-1ebTD