

LC TALK

Vol. 102
January 2018



Talk アセトニトリルと残留農薬分析 …… P. 2

in the LAB よくあるトラブルと対処法 保持時間の変動 …… P. 4

Products 超高速分取精製LCシステム Prominence UFPLC …… P. 6

Introductory 蛍光検出法のはなしーその2 測定の実際と留意点 …… P. 8

Applications 欧州薬局方に準拠した医薬品中不純物分析の高速化 …… P. 10

Talk

アセトニトリルと残留農薬分析



東海コープ事業連合商品検査センター
技術顧問 齋藤 勲

アセトニトリル (CH_3CN) は、分子量41、沸点82℃の有機溶媒で、現在残留分析などの抽出溶媒としてよく使用されている。アセトニトリルは、水と任意に混ざり、HPLCの移動相としてメタノールと共によく使用されている。しかし、アセトニトリルは値段が高く、HPLC用だと値段もメタノールの3,4倍してしまう。そのため、大学ではなかなか使いづらい溶媒でもあるが、C18カラムからの溶出力はメタノールに比べ少量でも優れており捨てがたい溶媒である。薬品管理としては、劇物で化管法上規制物質（吸入、皮膚より吸収、皮膚又は目の炎症）である。20年位前の話だが、オランダの分析ラボを訪問した際、HPLC移動相のアセトニトリルのガロン瓶が後ろに換気ホースがついた木箱の容器に入れられ、分析者への暴露を防ぐ手立てをしていたが、自分たちのずさんな管理との違いを感じた記憶がある。

残留農薬分析では、脂質成分を除去するため、ヘキサン/アセトニトリル分配による精製溶媒として日常的に使われてきた。しかし、当時はLogP（オクタノール/水分係数）の大きな非水溶性の農薬類はヘキサン層への分配率が高く、ヘキサン/アセトニトリル分配を2,3回繰り返す必要があった。

アセトニトリルの特徴として、水で任意に混ざる性質と食塩など塩濃度を高くしていくと、なんと水層と分離してくれる（7%位は含水状態であるが）という性質を持った溶媒であり、抽出・分離精製するには理想的な溶媒であった。

1990年代から2000年初めの頃は、食品から微量農薬成分をアセトンで抽出し、食塩水とジクロロメタンを加えて振とうしてジクロロメタン層に農薬を転溶する方法が採用されていた。ジクロロメタンは、水との分離もよく、分液ロートで振とうした場合下層に来るので再抽出も容易であり、沸点40℃のため濃縮しやすく、抽出効率もよく広く農薬分析に使用されていた。米国FDA（食品医薬品局）で輸入食品検査の現場では、大量のジクロロメタンを抽出、精製溶媒として用いていた。操作性は良いが、ドラフト内でジクロロメタンをK-D濃縮器（通常は

減圧しながら冷却器で気化した溶媒を液化して捕集するが、スチーマーで加熱しそのまま揮散）で濃縮していた。気化したジクロロメタンはそのまま大気中に放出されるので、大気汚染の一因でもあった。

カルフォルニア州残留農薬分析機関CAC（Center for Analytical Chemistry）では、食品からアセトニトリルを用いて粉碎抽出、塩化ナトリウム添加で水層分離（塩析）し、アセトニトリル層を濃縮して精製する方法を提案していた。どちらも自らの方法の利点を強調し、論争にもなっていたが、その後の流れとしては濃縮操作が少なくジクロロメタンが環境汚染で問題となる中で、アセトニトリル抽出、塩析する方法が主流となっていった。ただし、アセトニトリルの性質として、脂質成分などLogPの大きな化合物の抽出は悪いので、その点は利点でもあり欠点でもあるので留意する必要がある。

2002年 Michelangelo Anastassiades, S. Lehotay (USDA) が発表（論文は2003年）したQuEChERS（Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe、呼び方はキャッチャーズ）法が、残留農薬分析の抽出精製の代表的なものとなってくると、世界的にもアセトニトリル抽出が主流となってきた。Michelangeloさんがポストドクを終えてドイツシュトゥットガルトCVUA、EURM-SRMに戻り、USDA（AOAC法）とは塩類など抽出操作の少し異なるEN法を中心に展開している。欧州は世界各国、発展途上国などの関連も強く、QuEChERS法というEN法が主流となっている¹⁾。2006年島津製作所の協力を得てMichelangeloさんを招聘して、大阪と東京でQuEChERS法を紹介するセミナーを開催することができ、感謝している。

残留農薬分析における抽出精製の標準的方法として広く使われるようになったQuEChERS法であるが、手振り1分（Shake by hand 1min.）による簡易な抽出方法という非常に魅力的な方法としてアピールされてきたが、実残留サンプルincurred residuesからの農薬抽出率の問題が浮かび上がってきた（2010年）²⁾。

通常私たちは検査方法の評価は、妥当性評価ガイドラインに従い添加回収試験で評価し、その分析方法を用いている。しかし、均一に粉碎した試料に一定量の標準品溶液を添加して抽出精製する場合（試料に標準品がonした状態）、抽出効率は良好な場合が多く、抽出時の実サンプルでの残留状況を反映しているわけではない。以前は、サンプル50 g、100 gと大量に測り取り、溶解力の高い大量のアセトンなどで抽出する分には、多少粉砕が荒くてもその抽出誤差は相殺される状況があった。しかし、QuEChERS法は、脂溶性物質が溶けにくいアセトニトリルを用いて、基本サンプリング量10 gであり、それより少量での試みもある。そのため、できるだけ細切均一化され、農薬が残留している皮などを粉砕するサンプル調製が求められ、高性能の粉砕機やドライアイス添加凍結粉砕などが推奨されてくる。しかし、凍結粉砕サンプルからアセトニトリル抽出をする場合、当初0℃度付近からの抽出となり抽出効率が悪い。そのため、機械的な振とう器で20～30分振とうする方法が推奨されている。1分が30分になる!という、簡易分析法ではないようなイメージを持たれるかもしれないが、日常分析では一回に数件から十何件の試料を一斉に処理することが多く、一度に振とう器にセットするならそれほど問題ではなく、その振とう時間中に容器内の温度は常温付近まで上昇するので、抽出効率も高まる。さらに、硫酸マグネシウムなどの塩類を入れることにより40℃位まで上昇し、抽出効率がさらに高まる。このように、簡易迅速で有名になったQuEChERS法であるが、日進月歩の歩みの中変化しているので注意する必要がある。

島津製作所の製品に、ミニカラムのゲル浸透クロマトグラフィ（GPC）とGC/MSを一体化した装置オンラインGPC-GCMSシステムPrep-Qがある³⁾。1980年代から脂質の多い食品などの残留農薬分析に汎用されてきたGPCは、基本的には分子量の違いにより分離する方法であり、食品中の分析夾雑物となる分子量の大きい脂質、色素などを効率的に分離し、農薬分画を集めて分析に供する方法である。日本では、畜水産物の残留農薬分析の通知法に採用されている。GPCがルーチン分析で用いられるようになると当然自動化の研究は進み、当時大阪府公衆衛生研究所食品化学課（現在大阪健康安全基盤研究所）と島津製作所分析計測事業部が協同でGPC

とGC/MSをオンライン化しGPC-GC/MS（商品名Prep-Q）を開発販売した⁴⁾。当時ルーチン分析でそれぞれの機器をそれぞれにを使って仕事をしていたものにとっては、新しい流れであった。しかし、その装置が爆発的に売れたわけではなく、国内外で導入されたところを見学する機会もあったが、残念ながらその機能を十分使いこなしているところは少なかった。そのような中、近年中国ではGPC-GC/MSに関心を示す研究者なども多く、特に抽出精製操作をQuEChERS法で行い、GPC-GC/MSで分析する報告が、中国から多数報告されている。その影響もあり、中国ではPrep-Qが日本よりはるかに売れているという。QuEChERS法とPrep-Qをうまく組み合わせ、吸着・分配と分子量分離で精製度を上げ迅速分析を行うという今風の考え方が、Prep-Qを支えているのだろう。分析装置は現場では単品で使用するわけではなく、一連の流れの中で使用される。そういった面では、装置メーカーはアプリケーションも含めユーザーが如何に負担なく精度の高い安定した分析を行うことができるかを一連の流れの中でユーザーと共に考え、装置の発展を進めてほしい。そのためには、当然ながら現場の応用発展力は必須である。

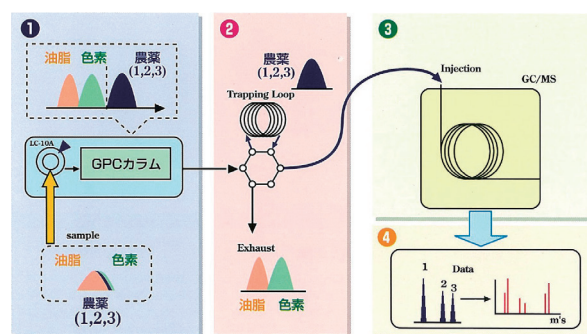


図1 GPC-GC/MS (Prep-Q) の仕組み

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/food/e8o1ci00000002y1.htm>

参考文献

- 1) 永井雄太郎 実験技術講座「QuEChERSを見直してみよう」、日本農業学会誌、37巻（4号）、362–371（2012）
- 2) http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/2010_EurlFvSrmWorkshop_Quechers_Extractability.pdf
- 3) <https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/food/e8o1ci00000002y1.htm>
- 4) 北川幹也、堀伸二郎、宮川治彦、田中幸樹、中川勝彦、島津評論、59巻、15–23（2002）

執筆者紹介

薬学部修士課程を修了後、製薬会社化学研究所勤務を経て、愛知県衛生研究所で30年間食品中の残留農薬、重金属、カビ毒、添加物などの微量分析に従事、その後東海コープ事業連合商品検査センターに勤務、現在同技術顧問。2012年から4年間愛知県科学技術交流財団知の拠点重点研究プロジェクトに参加。日本農業学会評議員、農薬レギュラトリーサイエンス研究会委員長、残留農薬分析国際交流会代表幹事。

専門分野

食品中残留農薬分析
農薬などの生物学的モニタリング

将来の夢

できるだけ楽しく思える
仕事・活動にかかわった
人生が送りたい

趣味

海外の学会や研究会で
いろいろな人に会い、
いろいろな所を見聞すること

in the LAB

よくあるトラブルと対処法 保持時間の変動

島津総合サービス リサーチセンター
三上 博久

HPLCによる日常分析において、ちょっとしたトラブルで悩み込んでしまい、仕事が進まなくなることがあります。今回は、保持時間の変動について、その原因と対策について解説します。

図1に、保持時間変動の主な原因をまとめます。原因として最も多いのは、ポンプの動作不良による流量変動です。ただし、他にもいくつかの落とし穴がありますので、頭に入れておきましょう。

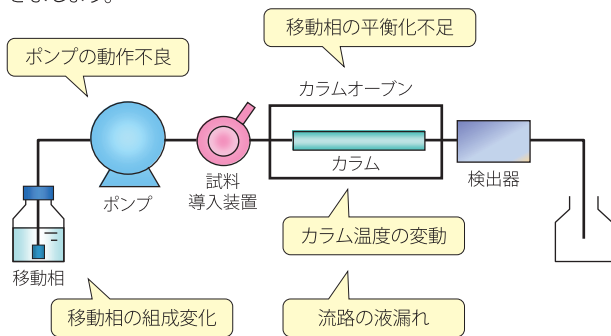


図1 保持時間変動の主な原因

1. ポンプの動作不良

ポンプの動作不良は、ポンプ内の気泡、チェックバルブの動作不良、プランジャーシールの劣化やプランジャーの傷などにより起こります。まずは、ポンプの圧力変動幅や流量の確認を行います。装置のポンプ圧力表示を見て、圧力が上下に変動していないか確認します。圧力の変動幅は、ポンプの取扱説明書などに記載されている基準値（バリデーション管理基準など）が参考にできます。流量測定は、例えば容量5 mLのメスフラスコやメスシリンダーを用いて、移動相5 mLが溜まる時間をストップウォッチで測定します。

● ポンプ内の気泡

ポンプ内に気泡が入り、滞留すると流量が不安定になり、時として全く送液なくなります。ダブルプランジャーポンプでは、

片方のシリンダー内に気泡が滞留すると圧力変動幅が大きくなります。ポンプ内の気泡は、移動相交換時のパージが不十分、脱気装置の不具合（特に、低圧グラジエント方式で水と有機溶媒を用いている時に顕著）などに起因しますが、案外気が付かないのが以下の2点です。

● 室温上昇により発生した移動相容器内の気泡

これは、移動相に溶存している空気が室温上昇に伴い、サクシオンチューブ外側や移動相容器内壁に気泡となって現れたものです。気が付かないと、ポンプに吸い込まれてしまいます（図2）。特に、冬場の夜に暖房が切れ、翌朝暖房が入った時に起きやすいので、ポンプをONにする前に移動相容器内を確認しましょう。気泡があれば軽く振動を与え、気泡を浮き上がらせてください。

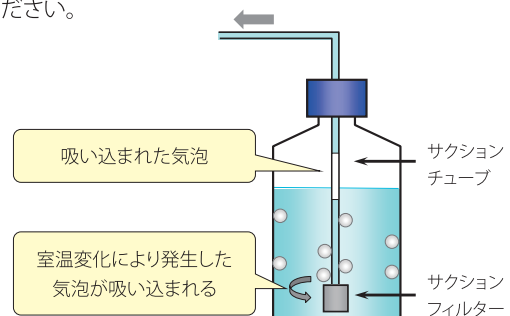


図2 移動相容器内で発生した気泡の吸い込み

● サクシオンチューブの目詰まり

サクシオンフィルターが目詰まりすると、吸引時（陰圧時）にサクシオンチューブ内で移動相溶存空気が気泡として発生することがあります。この場合、サクシオンフィルターを外せば気泡が出なりますので確認は容易です。フィルターを超音波洗浄してみても、回復しない時には新品と交換します。

ポンプ内の気泡を抜くには、ドレインバルブを開けてパージ操作をします。抜けにくい時には、図3に示すようにドレインチューブに注射器を取り付けて吸引除去します。

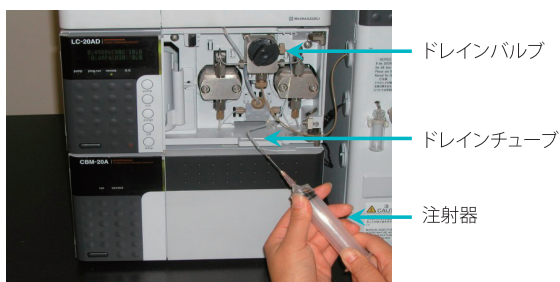


図3 注射器による気泡の吸引除去

● チェックバルブの動作不良*

チェックバルブは、ポンプの吸引・吐出時における移動相の逆流を防ぐ部品です。チェックバルブに微粒子（塩の結晶、ポンプシールの削りかすなど）が入り込んだり、不純物が蓄積すると動作不良を起こし、流量が不安定になります。超音波洗浄を行い、回復しなければ新品と交換です。

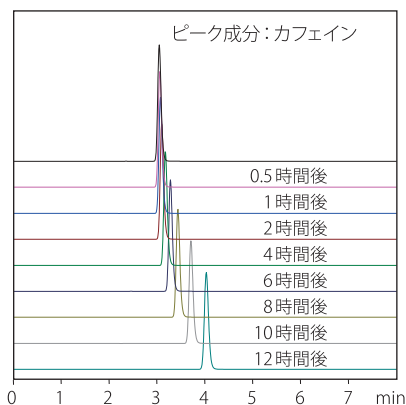
● プランジャーシールの劣化、プランジャーの傷*

プランジャーシールの劣化やプランジャーの傷により液漏れを起こしますので、ポンプヘッド周りに移動相がにじみ出ているか確認します。通常、プランジャーシールの交換で漏れは止まりますが、漏れが続く場合はプランジャーに傷がないか確認します。

※ 詳しくは、“Special Issue X” p.5-7をご参照ください。

2. 移動相の組成変化

移動相容器が開放状態の場合、有機溶媒の揮発により移動相組成が変化し、保持時間が変動することがあります。図4は、移動相容器を解放状態で放置して、カフェインの保持時間変動を調べた結果です。この場合、水比率が高い移動相ですが、時間経過に伴って保持時間が遅れているのがわかります。移動相容器は、密閉しない程度にしっかり蓋をしましょう。

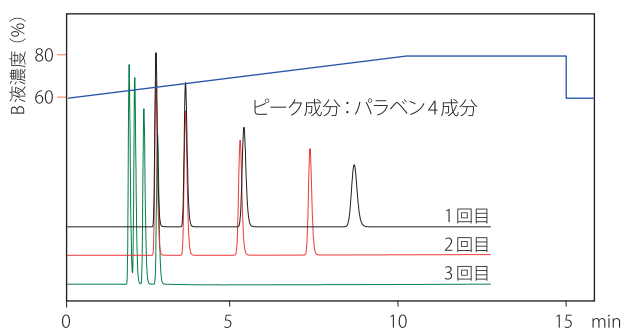


カラム：ODS、移動相：水/アセトニトリル=8/2 (v/v)、
流量：1.0 mL/min、検出器：吸光度検出器 275 nm

図4 移動相組成変化による保持時間変動例

3. 移動相の平衡化不足

分離モードや移動相組成によっては、移動相変更後の平衡化に思ったより時間がかかることがあります。例えば、逆相イオン対モードでは、移動相に添加したイオン対試薬を固定相に平衡化させるのに、通常の逆相モードより長い時間が必要です。また、グラジエント溶離においては、最終混合比率から初期混合比率に戻してから平衡化時間が不十分な場合や一定でない場合、保持時間が安定しません。これは、初期混合比率と最終混合比率の差が大きいほど起こりやすくなります。図5に、逆相モードにおいて平衡化時間が不十分な場合の保持時間の変動例を示します。ここでは、最終濃度（80%）から初期濃度（60%）に戻した後の平衡化時間を1分にしています。初期濃度での平衡化が不十分なため、メタノール比率が高い移動相のまま次の注入を行うため、各成分の保持時間が徐々に短くなっているのがわかります。特に、HILIC（親水性相互作用クロマトグラフィー）モードや逆相イオン対モードでは、このことが顕著に起こります。これらのことを念頭に置いて、条件設定を行きましょう。



カラム：ODS、移動相：A) 水、B) メタノール、
流量：1.0 mL/min、検出器：吸光度検出器 260 nm

図5 移動相組成変化による保持時間変動例

4. カラム温度の変動

室温変化、カラムオープン温度の変動を確認します。また、設定温度によっては、カラムオープンの仕様から外れていないかの確認もします。例えば、「室温+10℃」という仕様の場合、室温20℃における温度設定は、30℃以上にする必要があります。

5. 流路の液漏れ

各接続部分をチェックしていきます。付け外しの頻度が高く、圧力がかかるカラム入口部が要注意です。特に、樹脂製の手締めフィッティングは、変形がないか確認しましょう。

Products

超高速分取精製LCシステム Prominence UFPLC

グローバルアプリケーション開発センター
中嶋 康介

LCによる分取精製は、医薬品の合成や天然物に含まれる有効成分の探索、微量の未知化合物の構造解析といった、医薬、食品、化学などの研究開発で広く用いられる手法です。

“Prominence UFPLC※”は分取に加え、濃縮、カウンターイオン（対イオン）の除去といった精製に関わる操作を全て自動化し、サンプルをセットすれば本システム1台で一連の作業をシームレスに行います。また、専用ソフトウェア“Purification Solution”は、分取条件の設定から目的物の液体回収までの全行程をシンプルな画面で設定できます。

※ UFPLC: Ultra Fast Preparative and Purification Liquid Chromatograph



1. 目的化合物の分取精製プロセスを自動化、蒸発乾固にかかる時間を大幅短縮

Prominence UFPLCは、分取から濃縮、精製、回収までの分取工程をオンライン化することにより、分取精製工程の大幅な省力化を可能としました（図1）。専用のトラップカラムを利用した独自の濃縮精製技術は、合成品に含まれる微量成分を高濃度かつ高純度に回収できます。また、目的成分の回収には高揮発性の有機溶媒を使用するため、回収溶液に水を含む従来の分取LCシステムに比べ、蒸発乾固に必要な時間が1/10以下に短縮されます。

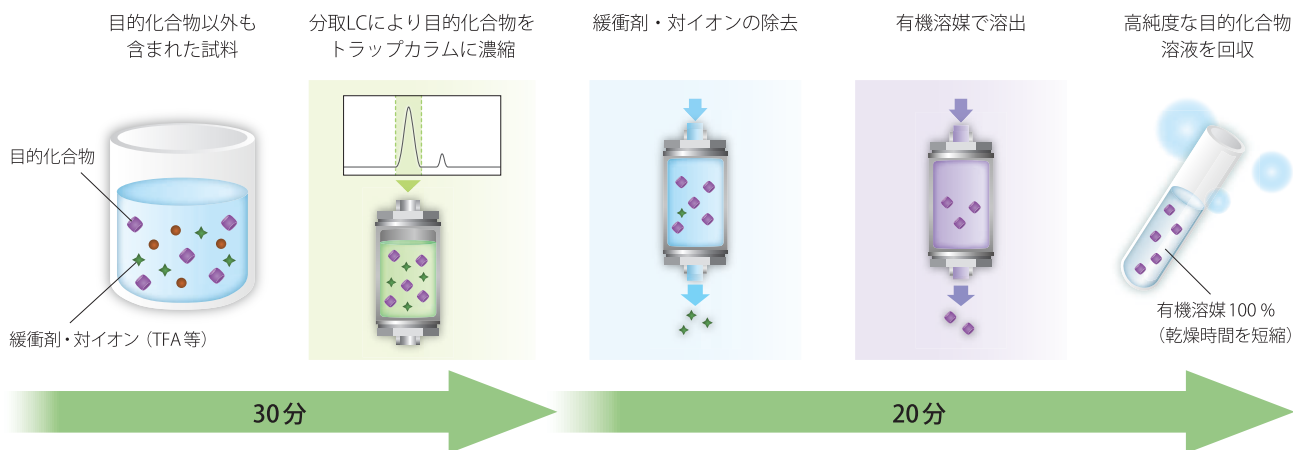


図1 Prominence UFPLCによる分取・濃縮・精製・溶出の流れ

2. 溶媒由来成分を除去し高純度の試料溶液を回収

塩基性化合物の分離を改善するため、トリフルオロ酢酸 (TFA) のように目的成分とイオン対を形成するカウンターイオンを移動相に加えるケースがあります。これらは、目的化合物とともに不純物として分画液中に残ったり塩を形成することで、次工程の試験に影響を与えることがあります。

Prominence UFPLCシステムは、アンモニア水などをカラムへ送液することで、目的化合物をフリーベース (遊離塩基) として回収できます (図2)。フリーベースの目的化合物を用いることにより、粉末化が容易になる上、医薬品候補の薬効スクリーニングや薬物動態試験など、新薬の探索研究のクオリティを大幅に改善します。

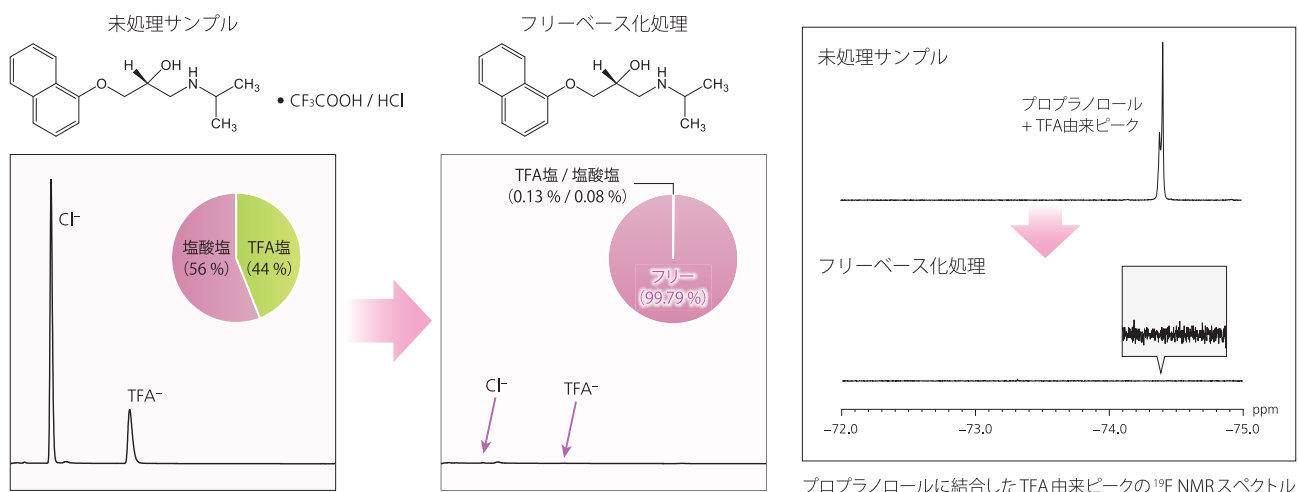


図2 目的化合物に含まれるカウンターイオンの測定結果
(左: イオンクロマトグラフィー 右: ¹⁹F-NMRスペクトル)

3. 専用ソフトウェアによる簡便な操作を実現

Prominence UFPLCシステムでは、専用ソフトウェアを用いることによって、分析の状況をひと目で確認することができます (図3)。また、貴重なサンプルを確実に分取するため、ピークを自動認識し分画を行う自動分画モード、分析画面を見ながらマウス操作でピーク分画をする手動分画モード、予め採取したデータの保持時間をもとに分取を行う時間指定分画モードの3つを備えています。



図3 専用ソフトウェア Purification Solution

Introductory

蛍光検出法のはなし—その2 測定の実際と留意点

島津総合サービス リサーチセンター
三上 博久

前回、蛍光検出法の原理と特長についてお話ししました。今回は、蛍光検出法による測定の実際と留意点について解説したいと思います。

1. 蛍光検出器の仕組み

まず、蛍光検出器の仕組みを見てみましょう。図1に、蛍光検出器の光学系（模式図）を示します。

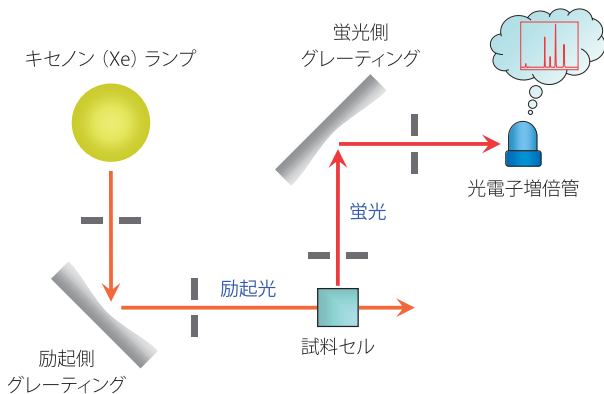


図1 蛍光検出器の光学系（模式図）

蛍光検出器の光源としては、一般に広い波長領域で高輝度を得られるキセノン (Xe) ランプが用いられます。光源ランプからの光は、励起側グレーティング（回折格子）で設定波長に分光され（励起光）、石英製の試料セル（フローセル）に入射します。そして、試料セル中の蛍光物質から発せられた蛍光は、励起光の光路に対して直角方向に置かれた蛍光側グレーティングにより測定波長に分光され、受光部である光電子増倍管で、その強さに応じた電気信号に変換されます。

2. 測定波長の選択

では、励起波長と蛍光波長は、どのようにして決めればよいのでしょうか？吸光度検出法においては、分析種の構造から

検出の可否や検出波長の推測がある程度可能です。しかし、蛍光発光と分子構造の関係については、いくつかの経験則があるのみであり、分析種が蛍光性かどうかを構造から判断することは、多くの場合困難です。一般には、書籍や文献などの情報を基にすることが多くなります。実際のHPLC分析条件における波長を設定する際には、以下の手順で励起極大波長と蛍光極大波長を決めます。

- (1) 分析種の吸収スペクトルをフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器などを用いて採取する。
- (2) 得られた吸収スペクトルから吸収極大波長を求める。
- (3) この吸収極大波長を蛍光検出器の励起波長に設定し、蛍光スペクトルを採取する。
- (4) 得られた蛍光スペクトルから蛍光極大波長を決める。
- (5) この蛍光波長により励起スペクトルを採取し、励起極大波長を決める。
- (6) ここで得られた励起極大波長が(2)における吸収極大波長と異なっている場合、この励起波長により再度蛍光スペクトルを採取する。
- (7) 得られた蛍光スペクトルから蛍光極大波長を決める。

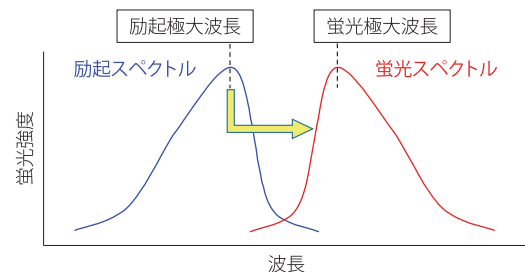


図2 励起極大波長と蛍光極大波長の選択

3. 蛍光検出法の留意点

励起された電子が第一励起状態 (S_1) の最低振動準位から基底状態 (S_0) に戻る過程では（前号図1参照）、放射遷移（蛍

光発光)と無放射遷移(熱放出)が競合しています。この過程は、いろいろな因子の影響を受けやすく、分子間衝突などによってエネルギーが熱放出で失われるほど、蛍光強度が減少します。このようにして、蛍光強度が減少する現象を「消光(クエンチング)」と呼びます。HPLCにおける蛍光検出では、移動相溶媒種、移動相中の不純物、移動相pH、移動相溶存酸素、蛍光物質濃度、測定温度などの因子に留意する必要があります。

● 移動相溶媒種

蛍光発光は、溶媒特性の影響を受け、蛍光物質と溶媒分子の間に働く相互作用によって蛍光強度や蛍光スペクトルが変化することがあります。例えば、移動相に用いる有機溶媒種を変更した時などには、感度変化を確認しておきます。

● 移動相中の不純物

移動相に使用する溶媒、酸・塩基、塩類などに含まれる不純物が蛍光発光を阻害することがあります。溶媒や試薬のロット、メーカーが変わったら感度も変わってしまった・・・などという場合、不純物が原因していることも考えられます。

● 移動相pH

蛍光物質がイオン性で、解離・非解離状態によって蛍光性が異なる場合、移動相pHに要注意です。移動相pHの変化により、蛍光発光の消滅や蛍光強度、励起・蛍光スペクトルの変化などが観測されることがあります。

● 移動相溶存酸素

酸素分子は、一般に蛍光物質に対し消光作用を示します。特に芳香族化合物などでは、移動相溶存酸素が原因で蛍光強度が大きく減少することが知られています。図3に、移動相溶存酸素が蛍光強度に与える影響の例を示します。ここでは、ビスフェノールAを逆相クロマトグラフィーで分析していますが、脱気装置をOFFからONにすることにより、ビスフェノールA

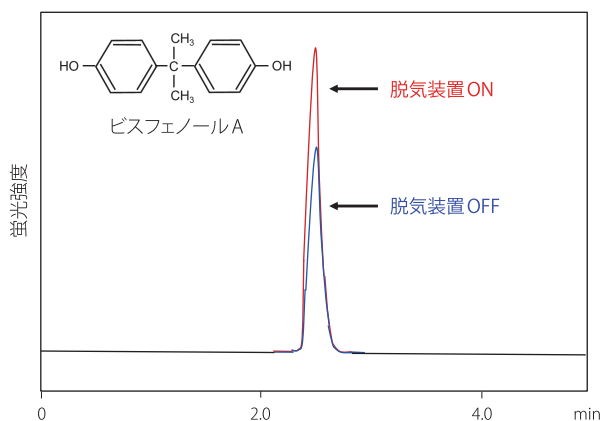


図3 移動相溶存酸素が蛍光強度に与える影響

の蛍光強度が1.4倍以上増加しています。蛍光強度(ピーク面積)が一定にならない時には、脱気装置の不具合やオフライン脱気(アスピレーターによる吸引脱気など)での空気の再溶解も原因の一つとして考えられます。

● 蛍光物質濃度

蛍光物質がある濃度以上になると、多くの場合、蛍光強度が減少します(濃度消光)。分析目的によっては、高濃度での直線性を確認しておくことが大切です。

● 測定温度

測定温度が上昇すると分子間衝突の増大によるエネルギー損失などにより、一般に蛍光強度は減少します。このため、室温変動が感度や再現性を低下させる可能性があります。図4は、測定温度が蛍光強度に与える影響の例で、室温を25℃から30℃に変動させた時のアクリジンの蛍光強度変化を示しています。ここでは、セル温調機能付きの蛍光検出器 RF-20Axs を用いて、恒温室内で実験しています。図4上のクロマトグラムは、温調なしの結果であり、アクリジンの蛍光強度(ピーク面積)が室温変化の変動と共に18%変化しています。一方、図4下のクロマトグラムは、セルを温調した場合の結果で、蛍光強度が安定していることがわかります。このように、セルを温調することにより、室温変動に影響されない高い精度の分析が可能になります。

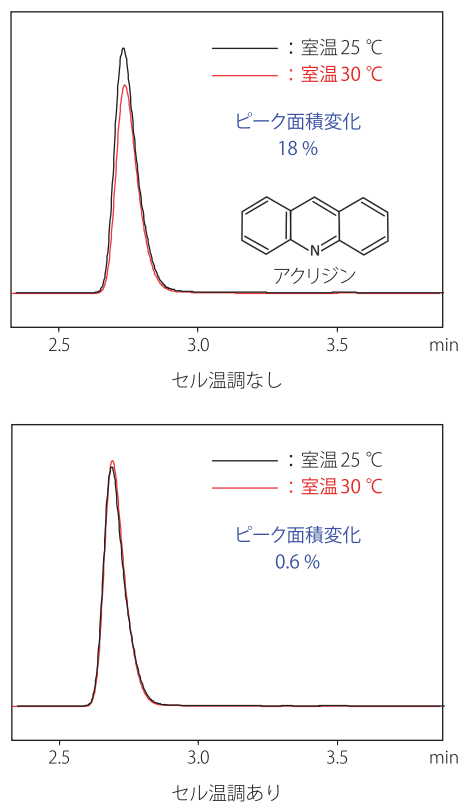


図4 室温変動が蛍光強度に与える影響

Applications

欧州薬局方に準拠した 医薬品中不純物分析の高速化

グローバルアプリケーション開発センター
岩田 奈津紀

近年、分析業務の効率化や生産性の向上を目的とした短時間分析法の開発が進展してきており、製薬分野の研究開発部門では高速分析技術の導入が進められています。この風潮は薬局方にも適用されており、例えば欧州薬局方（EP）第8版に記載されている“Adjustment of chromatographic condition 1)”によると、システム適合性基準を満たした場合のみ、TLC、LC、GC、SFCで各種パラメーターの変更が許容されています。この場合、再バリデーションは不要とされています。

ここでは、一体型高速液体クロマトグラフ“Nexera-i MT”を用い、EPに準拠した医薬品類縁物質分析の高速化例をご紹介します。

1. HPLCの変更許容範囲

“Adjustment of chromatographic condition”のLC項は、イソクラティック溶離とグラジエント溶離に大別されています。グラジエント溶離では、移動相の濃度勾配によるピークシフトが原因で誤同定、複数ピークの重複などの可能性があるため、イソクラティック溶離とはメソッドの変更許容範囲が異なります。例えば、カラム粒子径について、イソクラティック溶離では最大50%の減少が可能ですが、グラジエント溶離では変更不可となります。さらに、グラジエント溶離の場合、主成分の溶出位置は、試験法に提示されている保持時間の前後15%以内になることと記載されています。従って、グラジエント溶離では変更を制限される項目が多く、分析の高速化は実質不可能となり、イソクラティック溶離のみ高速化が可能となります。

2. イベルメクチン類縁物質分析の高速化

イベルメクチンは、マクロライド類に属する腸管糞線虫症治療薬、疥癬治療薬として知られており、抗寄生虫薬の動物用医薬品としても使用されています。また、イベルメクチンは、

H₂B_{1a}（分子量：875）とH₂B_{1b}（分子量：861）の2種類の主成分があり、組成の90%以上はH₂B_{1a}（図1）で構成されています。

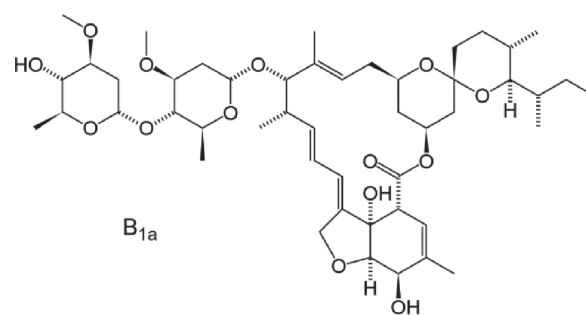


図1 イベルメクチン（H₂B_{1a}）

ここでは、EPの変更許容範囲を満たす条件で、分析時間の短縮を検討しました。表1に、EP記載のイベルメクチン類縁物質試験項²⁾と変更許容範囲に準拠した分析条件を示します。分析カラムとして、Shim-pack GIST C18を用い、汎用分析には粒子径5 μmを、高速分析には3 μmを選択しました。分析カラムと流量以外の分析条件は、EP記載条件と同じです。今回、分析に使用したNexera-i MTは、HPLCとUHPLCの両方の流路をもつ装置であり、1台で汎用から高速分析の移行を容易に行うことが可能です。

表1 イベルメクチン分析条件

装置	: Nexera-i MT
カラム 1	: Shim-pack GIST C18
(汎用分析)	(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm)
流量 1	: 1.0 mL/min
カラム 2	: Shim-pack GIST C18
(高速分析)	(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm)
流量 2	: 1.5 mL/min
移動相	: A) 水、B) メタノール、C) アセトニトリル
	A/B/C=15/34/51 (v/v/v)
温度	: 25 °C
検出器	: 吸光度検出器 254 nm
注入量	: 20 μL

図2に、イベルメクチン標準液 (0.8 mg/mL) のクロマトグラムを示します。表2に、システム適合性試験結果を示します。汎用、高速分析のいずれもシステム適合性試験に合格しました。今回の高速化により、分離を維持したまま分析時間を約2/5に、移動相消費量を約3/5に抑えることができました。

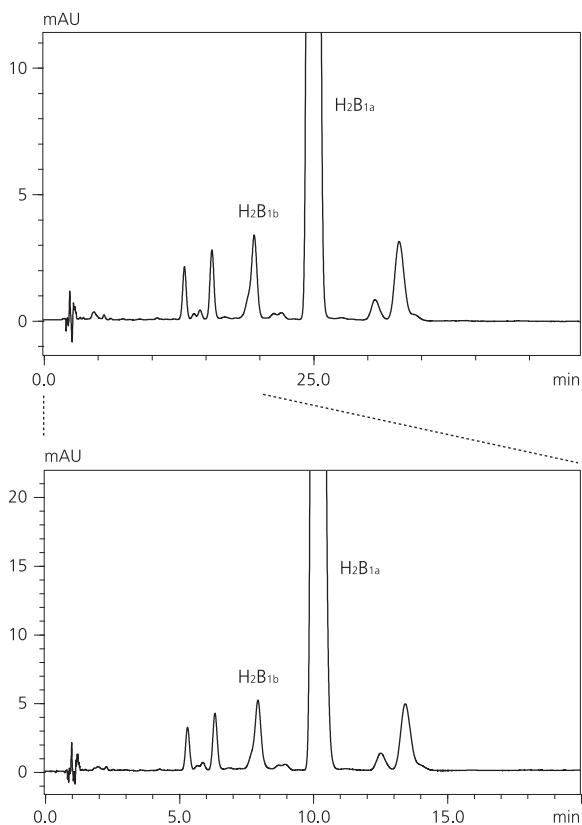


図2 イベルメクチン標準液のクロマトグラム
上段：HPLC 流路による汎用分析 (カラム1使用)
下段：UHPLC 流路による分析 (カラム2使用)

表2 システム適合性試験結果

システム適合性試験		結果		判定
		汎用分析	高速分析	
分離度 (H ₂ B _{1a} とH ₂ B _{1b})	≥ 3.0	5.1	4.7	PASSED
SN比 (0.4 μg/mL)	≥ 10	40	38	PASSED
シンメトリー係数	≤ 2.5	1.1	1.2	PASSED

3. ジクロフェナクナトリウム類縁物質分析の高速化

ジクロフェナク (図3) は、解熱剤や鎮痛剤として多く利用されています。ここでは、Nexera-i MTを用いて、EPに基づいたジクロフェナクナトリウム類縁物質分析の高速化を検討しました。

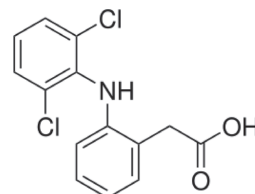


図3 ジクロフェナク

EP収載のジクロフェナクナトリウム類縁物質試験項³⁾と変更許容範囲に準拠した分析条件を表3に示します。分析カラムとしては、汎用分析、高速分析ともにイベルメクチン分析と同じものを用いました。標準品には、システム適合性試験用として市販されている試薬を使用しました。EP収載の移動相流量は1.0 mL/minですが、ここではカラム耐圧を考慮して、変更許容範囲を満たす0.8 mL/minに変更しました。

表3 ジクロフェナク分析条件

装置	: Nexera-i MT
カラム1	: Shim-pack GIST C18 (汎用分析) (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm)
流量1	: 0.8 mL/min
カラム2	: Shim-pack GIST C18 (高速分析) (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm)
流量2	: 1.4 mL/min
移動相	: A) リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) B) メタノール A/B=34/66 (v/v)
温度	: 25 °C
検出器	: 吸光光度検出器 254 nm
注入量	: 20 μL

図4に、ジクロフェナク標準溶液 (1.0 mg/mL) のクロマトグラムを、また表4に本分析のシステム適合性試験結果を示します。

汎用分析、高速分析ともに、システム適合性試験に合格しました。今回の高速化検討により、分離を保ったまま分析時間を約1/3に、移動相消費量を約5/8に抑制することができました。

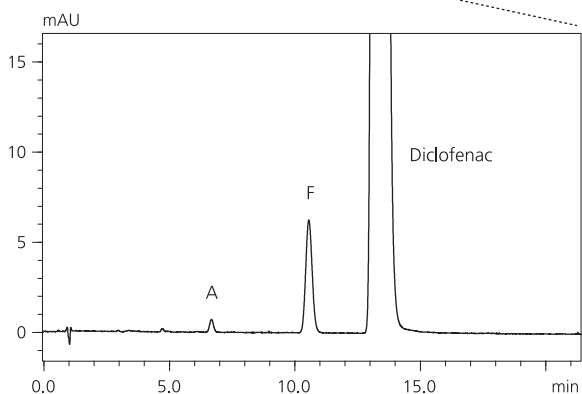
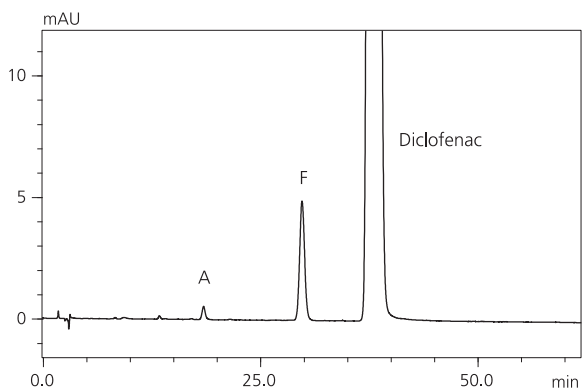


図4 ジクロフェナク標準液のクロマトグラム
 上段：HPLC 流路による汎用分析（カラム1使用）
 下段：UHPLC 流路による分析（カラム2使用）

以上、Nexera-i MTを用いることにより、汎用分析から高速分析への移行が容易に行えただけでなく、同等の結果を得ることができました。



i-Series Plus
 Nexera-i MT

参考文献

- 1) European Pharmacopoeia 8.0, 04/2009:20246
 2.2.46. Chromatographic separation techniques
- 2) European Pharmacopoeia 8.8, 04/2016:1336 "Ivermectin"
- 3) European Pharmacopoeia 8.8, 07/2014:1002 "Diclofenac sodium"

表4 システム適合性試験結果

システム適合性試験		結果		判定
		汎用分析	高速分析	
分離度 (不純物Fと ジクロフェナク)	≥ 4.0	6.8	5.1	PASSED

情報コーナー

公益社団法人日本分析化学会 液体クロマトグラフィー分析士認証試験

2018年度は、以下の日程で実施されます。

- 五段認証試験：3月5日（月）、東京
- 四段認証試験：4月18日（水）、東京
- 三段認証試験：5月8日（火）、東京
- 二段認証試験：6月26日（火）、東京・京都
- 初段認証試験：8月1日（水）、東京・京都

詳しくは、日本分析化学会のホームページをご覧ください。順次掲載される予定です。