

LC TALK

Vol. 103
April 2018



Talk 水処理は分析に始まり、分析に終わる ―水処理に欠かせないLC技術― …… P. 2

TEC データインテグリティ対応の具体的な進め方 …… P. 4

Applications オートサンプラの自動前処理機能（共注入）を活用したピーク形状の改善 …… P. 7

Products オンライン溶出試験用超高速液体クロマトグラフ Nexera FV …… P. 10

Q&A 「ホールドアップタイム (t_0)」について …… P. 12

Talk

水処理は分析に始まり、分析に終わる
— 水処理に欠かせないLC技術 —

栗田工業株式会社
主任研究員 榎本 幹司

私が社会人となった以前に創刊された歴史あるLCtalkに寄稿させていただける機会をいただき、ありがとうございます。これまでに登場された先生方のような、高尚なお話はできませんが、水処理業界ならではのtalkにしばらくお付き合いください。

栗田工業は、さまざまな水処理に関する技術、商品をお客様に提供しています。水処理では、まず原水の中の処理対象となる物質の濃度を知らするために分析を行い、次に処理がうまく行っているかどうかを判断するために処理水の分析を行います。うまく行かない場合は、水処理条件を再検討し、再度処理水の分析を行うということを繰り返すわけですから、まさに「水処理は分析に始まり、分析に終わる」と言えます。

私の主な業務は、汚染地下水や排水の処理条件の技術的な検討です。入社して数年後に土壌・地下水処理事業が立ち上がり、その頃から携わっていますので、20年以上携わっていることになります。地下水の場合、トリクロロエチレンなどの十数種の揮発性有機化合物が処理対象の汚染物質となり、物質ごとに基準が設けられていますので、物質ごとに定量する必要があります。これらの物質は極性が低いので、分析には島津製作所製GCMS-QP2010を後継機を含め、十数年来、継続して使っています。

地下水処理では、物質ごとに基準が定められていますが、排水処理の場合は、物質ごとではなく、COD（化学的酸素要求量）やBOD（生物学的酸素要求量）が基準の指標となります。これらの分析は比較的、手間と時間が掛かるため、排水処理条件の検討においては、まずTOC（全有機炭素）を分析します。このため、当社には島津製作所製TOC計が何台もあり、ほぼフル稼働しているので、排水処理条件の検討はTOC計さえあれば十分で、LCは要りませんね。いえいえ、そうではありません。近年、お客様の産業も多様化し、排水中の有機物成分も多岐に渡るようになり、以下のようなケースでは、TOC濃度の分析だけでは排水処理条件の検討が行き詰ってしまい、各有機物を分別定量しなくてはならないケースが増えてきました。

- ① 排水中のある有機物は分解するけれど、別の有機物が分解しない
- ② 排水中のある有機物が阻害となり、別の有機物が分解しない
- ③ 排水中のある有機物は分解しているけれど、代謝物が蓄積してしまう
- ④ 排水中の含窒素有機物が分解して遊離したアンモニアが、窒素規制にも掛かる場合もあり、また生物処理において必要な窒素源になる場合もある

ここで、ようやくLCの出番です。特に、近年LC-MSの性能が格段に向上したため、飛躍的に定量可能な物質が増えました。排水処理の対象となる物質のほとんどは、極性の高い親水性物質です。LC-MS導入前は、GC-MSを利用していましたが、GC-MSで分析できる物質は、アルコール類など一部の物質に限られ、アルデヒドなど誘導体化すればGC-MSで分析できる物質もありますが、操作は煩雑になります。LC-MSの進歩、普及によって、排水に含まれる親水性有機物のほとんどの物質を簡単に分析できるようになり、まさに水処理業界において、待ちに待った大きな技術革新であったと思います。

具体的な水処理業界におけるLC活用事例をご紹介します。紙面の都合上、③のケースのみですが、メラミンを含む排水の生物処理検討時に行う分析の事例をご紹介します。図1に示したように、メラミンは、アンメリン、アンメリドを経由してシアマル酸まで分解することが知られています。単一の微生物がメラミンからシアマル酸まで分解する事例も報告されていますが、一般にはシアマル酸は、メラミンを分解する微生物とは別の微生物系により分解するケースが多く、メラミンを分解するとシアマル酸が蓄積する傾向が認められる場合があります。生物処理は、通常は混合微生物系なので、様々な種類の微生物の働きをうまく組み合わせられるように、生物処理の条件を整えることで、シアマル酸を蓄積することなく、メラミンを処理することができます。

図2に、島津製作所製LCMS-8040で測定したクロマトグラムの一例を示します。メラミンとその代謝物を一斉分析できるので、効率良くメラミンの代謝挙動を把握することができます。メラミンは含窒素有機物であり、アンモニアを遊離しながら分解するので、実は③の事例のみならず、④の事例にもなっていましたね。このように、排水中有機物の代謝物の挙動を効率的に把握して、最適な生物処理条件を検討する際の判断を効率良く行う上で、LC-MSが非常に役立っています。医薬分野で薬物の人体中での代謝を把握するために、LC-MSが活用されているのと同じように思っています。

話は遡りますが、学生時代、環境系の研究室に所属していた私は、毎日分析三昧ではあったものの、手分析ばかりで、LCを見たこともありませんでした。その後、新入社員として、今の会社の総合研究所に配属されましたが、当時新規事業として分取クロマト事業を始めたばかりであったこともあり、研究所の一室に入ると島津製作所製のLCシステムが6、7セットくらい並んで稼働していて、ウィーンウィーンとプランジャーポンプの音がこだましていたのをよく覚えています。今思えば、

この時が私とLCとの出会いでした。

以来、フェノールなどの芳香族や有機酸などの分析のために、自分でLCを扱うようになりました。LCMS-8040導入後は、もっぱらLC-MSを使用していますが、MSの検出条件を決めた後のLC条件の検討は、LC-MS導入以前と同様に自分でメソッド開発しながら、想定通りの保持時間でシャープなピークが出てきた時の感動を楽しんでいます。この感動は、LCを扱う誰もが経験することと思いますが、水処理業界では、処理水をLCで測定する時には処理がうまく行っていないとやり直しになりますから、ピークが立ち上がらないことを願いながらクロマトグラムを眺めています。それでもピークが出現してしまった時の落胆は、水処理業界の人しか理解できないかもしれませんね。ピークの立ち上がりに一喜一憂しながらも、これからも、LCのメソッド開発を楽しみたいと思います。

参考文献

- 1) 高木 和広, 農環研ニュース, No.83, 5 (2009)
- 2) 杉山英彦ら, 日本水処理生物学会誌別巻, 第31号, 52 (2011)

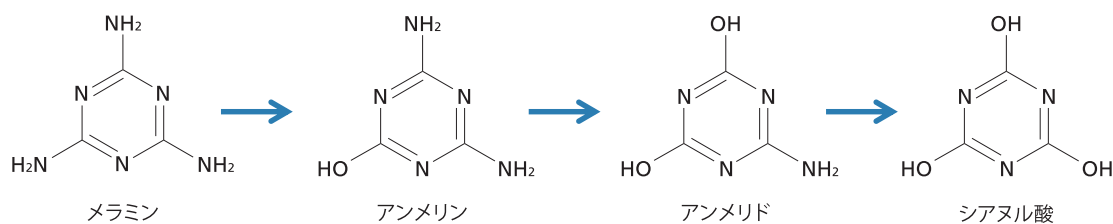


図1 メラミンの代謝経路

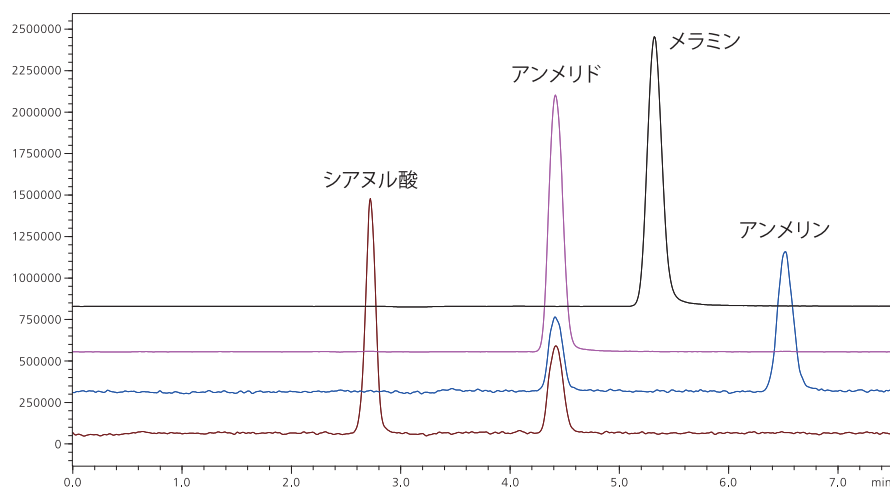


図2 メラミン及び代謝物のクロマトグラム

執筆者紹介

筑波大学大学院修士課程環境科学研究科修了後、栗田工業株式会社に入社し、新規事業探索、土壌・地下水処理、排水処理などを担当。現在、(公社)日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会に所属し、専門委員としても活動中。

専門分野 排水処理、土壌・地下水処理

将来の夢 世界放浪の旅

趣味 野球、カメラ

データインテグリティ対応の具体的な進め方

営業統括部
菊本 守

分析データに関する最近のトピックスとして、データの改ざんや差し替えなどによるデータインテグリティ（Data Integrity：データの完全性）の欠落があります。分析ラボにおいては、データインテグリティ対応を進めることが喫緊の課題となっている一方で、データインテグリティの概念がつかみにくいために、どこから手を付ければ良いのか迷いが生じてしまうケースが少なからずあります。

そこで、今回はソフトウェア“LabSolutions DB/CS※”を例にして、データインテグリティ対応の具体的な進め方についてご紹介します。

※LabSolutions DBはスタンドアロンで運用するためのソフトウェアであり、LabSolutions CSはネットワークで運用するためのソフトウェアになります。

1. 3つのステップ

LabSolutions DB/CSのデータインテグリティ対応の具体的な進め方については、次の3つのステップに従って実施することをお勧めします（図1参照）。

ステップ①

ワークフローの見える化

ステップ②

セキュリティやユーザー権限の明文化（運用規定などへの明記）

ステップ③

明文化した内容に基づいた設定文書（設定仕様書など）の作成とコンピュータへの反映

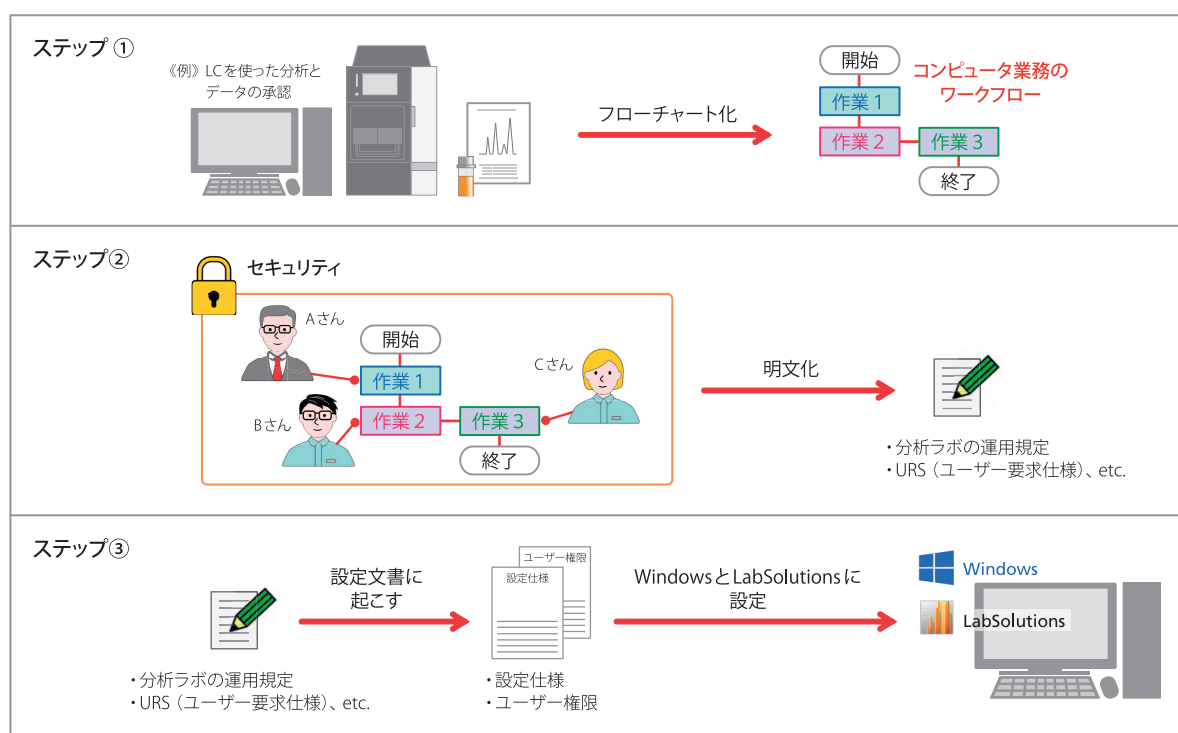


図1 データインテグリティ対応を進めるための3つのステップ

ステップ①では、コンピュータ業務のフローチャートを作成することで、ワークフローの「見える化」を行います。ステップ②では、ステップ①で作成したフローチャートを利用して、「どのようなセキュリティが必要なのか?」「誰にどの権限を割り振

るべきか?」などを明文化（運用規定やURS（要求仕様）へ明記）します。ステップ③では、ステップ②で明文化した内容を元に設定文書（設定仕様・ユーザー権限）を作成した後、その内容をWindowsとLabSolutions DB/CSに設定します。

2. ワークフローの見える化

図1のステップ①でご紹介しているように、コンピュータ業務のフローチャートを作成してワークフローの「見える化」を行うことにしましょう。

図2には、LabSolutions DB/CSが推奨するワークフローの例を示しています。

ここで、ワークフローを考えるためには、ユーザー権限グループが必要になります。ユーザー権限グループとは役職のようなものであり、コンピュータ業務上のさまざまな役割、すなわち「ユーザー権限」をいくつかのグループに割り振ったものがユーザー権限グループになります。図2では、I～Vの5つユーザー権限グループを提案しています。

ユーザー権限グループを提案しています。

ユーザー権限グループへのユーザー権限の割り振りについては、データインテグリティの観点から、それが適正かどうかを確認しながら進めることが大切です。例えば、「試験責任者に権限が集中していないか?」「オペレータが必要以上の権限を有していないか?」「役職上は分析するはずがないのに、分析実行の権限を有していないか?」などについて確認します。

以上により、図1のステップ②に従ってセキュリティやユーザー権限等を明文化（運用規定やURS（要求仕様）へ明記）します。

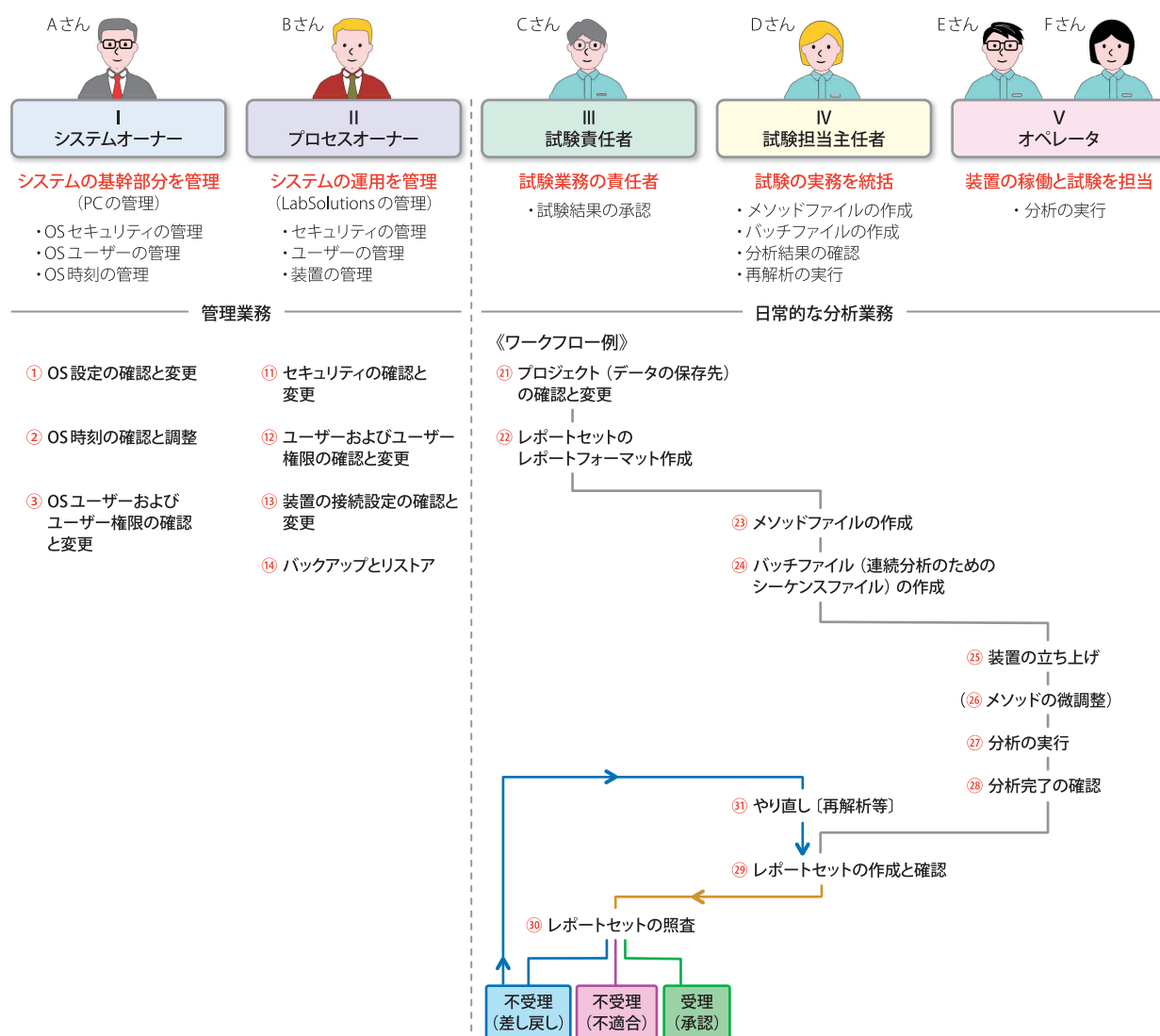


図2 LabSolutions DB/CSが推奨するユーザー権限グループとワークフロー例

3. LabSolutionsとWindows への設定の反映

ステップ①と②に従って設定文書（設定仕様・ユーザー権限）を作成したら、ステップ③に進み設定文書の内容をWindowsとLabSolutions DB/CSに反映させます。

ステップ③の具体的な作業としては、下記2つをPCへ反映させることになります。

(a) 設定仕様（セキュリティ等の設定）

(b) ユーザー権限

設定仕様については、これまでも島津製作所で通常的に有償支援しているものです。ユーザー権限については、お客様の業務内容や職制に深く関わる作業になるため、お客様側での対応となりお客様側での対応となります。これにつきまして

は、有償での支援が可能ですので、必要に応じてご相談ください（運用規定やSOPの作成は対象外です）。

(a) と (b) の有償対応では、それぞれLabSolutions DB/CS 設定仕様（セキュリティポリシー）の推奨設定値とユーザー権限の推奨設定値を掲載した資料を用意していますので、この推奨設定値を参考にしながらステップ③を実施することで、スムーズなデータインテグリティ対応を進めることが可能になります。

本件に対してご質問等は、島津製作所営業もしくは代理店までお問い合わせください。

設定仕様（セキュリティポリシー）の推奨設定値

No.	項目	デフォルト設定	推奨設定	設定後の変更	Projectでの追加設定
1	データファイルを版数管理する	■	■	×	—
2	メソッド/バッチレポートフォーマットファイルを版数管理する	□	□		
3	装置のファイルを開くときにデータベースの最新版と同期する	□	□		
4	データベースの最新版と同期するときに確認する	■	■	○	○
5	その他ファイルを版数管理する	□	□	×	○
6	ファイルのロールバックを禁止する	□	■	○	○
7	データファイルの操作を制限する ※(1)1-1	■	■	×	—
8	データ情報の変更を禁止する	■	■	○	○

推奨設定値を提示したページ（設定仕様編より）

ユーザー権限グループⅠ～Ⅴに対する推奨設定値

No.	項目	内容（有効(■)のときに実行できる主な機能）	権限グループ				
			I	II	III	IV	V
1	システムの管理	・セキュリティポリシーの設定。 ・ログブラウザの印刷フォーマット編集。 ・バックアップとリストアの実施。	□	■	□	□	□
2	システム設定の変更	・[管理ツール][システムの設定]に含まれる項目（下記参照）： ・テーブルの定義 ・分析プリンタの設定 ・データ処理の設定 ・レポートセットの設定 ・レポート確認の設定 ・データマネージャの印刷フォーマット編集。	□	■	□	□	□
3	装置の管理	・装置の追加と削除、および無効化の実施。 ・装置名の変更。 ・装置一覧画面のレイアウト表示の変更。	□	■	□	□	□
4	バリデーションの実行		□	■	□	□	□
5	手動ログの読み込み		□	■	□	□	□
6	データマネージャのフォーマット編集		□	■	□	□	□
7	ログブラウザのフォーマット編集		□	■	□	□	□
8	プロジェクトの作成		□	■	□	□	□
9	プロジェクトの削除		□	■	□	□	□

推奨設定値を提示したページ（ユーザー権限編より）

設定項目の解説ページ

[A5]-1 レポートセットの作成

本権限を持つことで、レポートセットを作成することができます。

(注) Version 6.82未満のバージョンでレポートセットを作成するためには、[A3]-10の[ファイルのインポート]の権限が必要でしたが、Version 6.82以上では、レポートセットを作成する上で、この[A3]-10の[ファイルのインポート]の権限は不要になりました。

[A5]-2 マルチデータレポートの作成

本権限を持つことで、マルチデータレポートを作成することができます。

マルチデータレポートは、スプレッドシート(表計算シート)に分析結果を自動転記するためのオプションソフトウェアです。これを利用すれば、手作業の転記を廃止することができます。生成されたレポートもデータベース内に保管されるので改ざん防止できます。

図3 LabSolutions DB/CSに対する設定仕様（セキュリティポリシー）の推奨設定値とユーザー権限の推奨設定値の例

Applications

オートサンプラの自動前処理機能（共注入）を活用したピーク形状の改善

グローバルアプリケーション開発センター
尾坂 裕輔

超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）では、HPLCよりもさらに低拡散が求められ、試料が通過する配管内径については0.1 mm 前後が採用されています。これは、UHPLCで使用するカラム内径の主流が2.0～3.0 mm 程度と小さく、HPLCに比べカラム外拡散の影響をより大きく受けやすいからです。しかし一方で、配管内径が小さくなるほど試料と移動相が配管内で混合されにくくなります。このため、例えば逆相クロマトグラフィーにおいて、試料溶媒中の有機溶媒濃度が移動相よりも高い場合、分析種ピークが試料溶媒の影響を受けてブロードになることがあります。この現象は、一般にカラム内径が小さいほど顕著に表れます。

ここでは、一体型LC “i-Series Plus” の “Nexera-i MT” に標準装備の自動前処理機能のうち「共注入」モードを用い、サンプル溶液と希釈溶媒（共注入試薬）を自動的に混合させて分析することにより、ピーク形状を改善した事例をご紹介します。

1. オートサンプラの自動前処理機能

i-Series Plus には、オートサンプラの自動前処理機能が搭載されており、「希釈」「添加」「共注入」の3つのモードがテンプレートで用意されています。このうち「共注入（簡易）」モードでは、特定のバイアルから共注入試薬を吸引し、サンプル溶液と共に分析カラムへ導入させることが可能です。その際、混合動作をさせたり、待ち時間を設定することも可能です。図1に、「共注入（簡易）」の流れの例を、図2にその設定画面を示します。

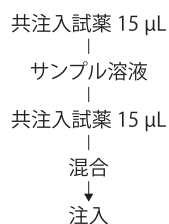


図1 「共注入（簡易）」の流れの一例

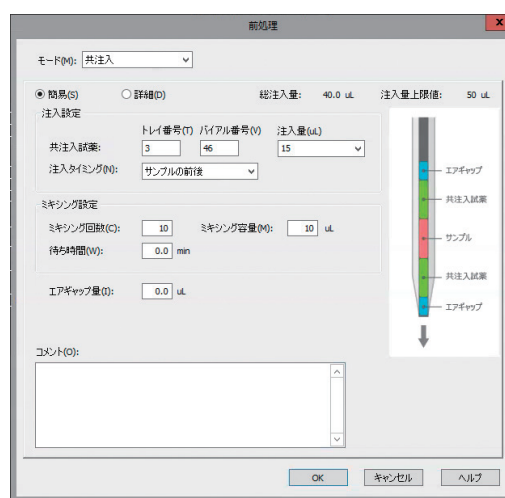


図2 自動前処理機能の「共注入（簡易）」設定画面

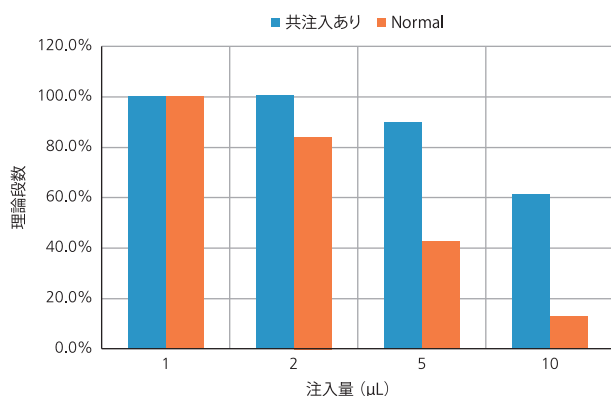
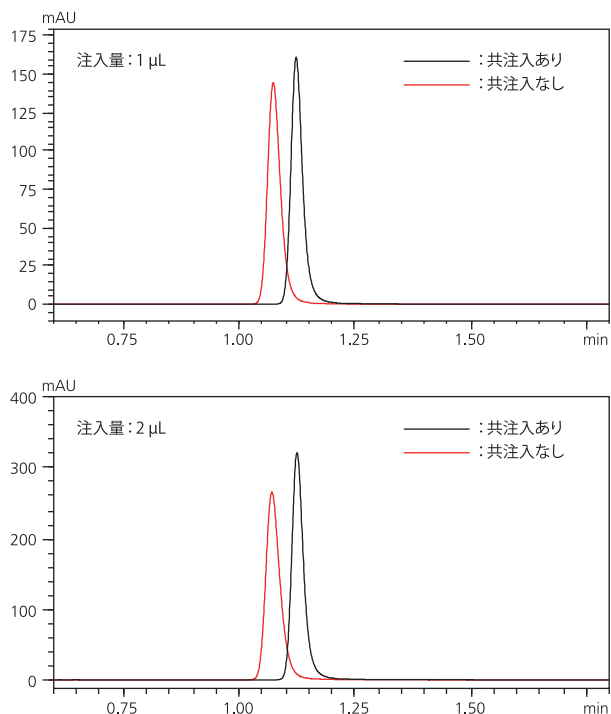
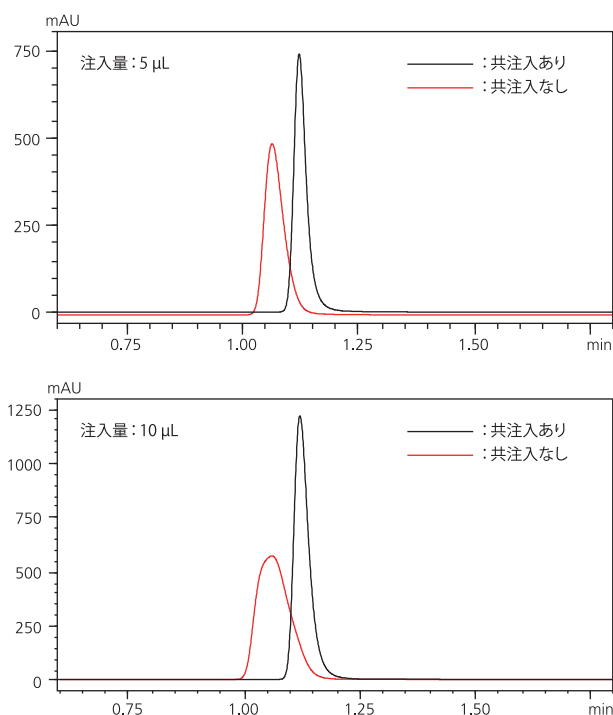
2. 共注入による効果—メタノール濃度の差

試料溶媒と移動相のメタノール濃度に差がある場合の共注入の効果、カフェイン標準液を用いて調べました。表1に、分析条件を示します。試料溶媒のメタノール濃度を移動相より高くしています。共注入の流れは、図1の通りです。

図3に、「共注入なし」と「共注入あり」とで、1 μL 注入時の理論段数を100%とした時の各注入量における理論段数を比較した例を示します。図4、図5は、この時のクロマトグラムです。共注入なしの通常注入では、注入量の増加に伴い試料溶媒の影響を受けるようになり、明らかにピーク形状が悪化していくことがわかります。理論段数で確認すると、2 μL では1 μL と比較して84%に低下し、また10 μL 注入では13%にまで低下しています。一方、共注入溶媒である水を共注入した場合では、5 μL 注入時で90%、10 μL でも61%と共注入なしに比べると低下は緩やかであり、かつピーク形状も十分に定量可能な状態を維持しています。

表1 分析条件

装 置	: Nexera-i MT
カラム	: Shim-pack XR-ODS II (内径 3.0 mm、長さ 75 mm、粒子径 2.2 μm)
移動相	: 水/メタノール = 7/3 (v/v)
流 量	: 1.0 mL/min
温 度	: 40 °C
検出器	: 吸光度検出器 272 nm
試 料	: カフェイン
試料溶媒	: 水/メタノール = 4/6 (v/v)
注入量	: 1、2、5、10 μL
共注入試薬	: 水

図3 共注入の有無によるカフェインの理論段数の比較
(1 μLを100%とした場合)図4 共注入の有無によるカフェインの
クロマトグラムの比較 (1 μL、2 μL)図5 共注入の有無によるカフェインの
クロマトグラムの比較 (5 μL、10 μL)

3. 共注入の効果ーイオン対分析

イオン対クロマトグラフィーにおいても、配管内径が小さい場合、試料溶液とイオン対試薬を含む移動相が十分に混ざらないためにイオン対を形成できず、結果としてピーク形状の崩れ、あるいはピーク割れを起こす場合があります。このような場合、イオン対試薬を含む溶媒を共注入することで、ピーク形状を改善させることができます。

イオン対分析の例として、塩基性化合物であるベルベリンの標準液をイオン対試薬ラウリル硫酸ナトリウムを含む移動相で分析を行い、共注入の効果を調べました。表2に、分析条件を示します。共注入の設定は、図6の通りです。

表2 分析条件

装 置	: Nexera-i MT
カラム	: Shim-pack XR-ODS II (内径 3.0 mm、長さ 75 mm、粒子径 2.2 μm)
移動相	: 水 1000 mL にりん酸二水素カリウム 3.4 g と ラウリル硫酸ナトリウム 1.7 g を溶解した溶液 /アセトニトリル = 1/1 (v/v)
流 量	: 0.8 mL/min
温 度	: 40 °C
検出器	: 吸光度検出器 345 nm
試 料	: 塩化ベルベリン (水溶液)
注入量	: 15 μL
共注入試薬	: 移動相

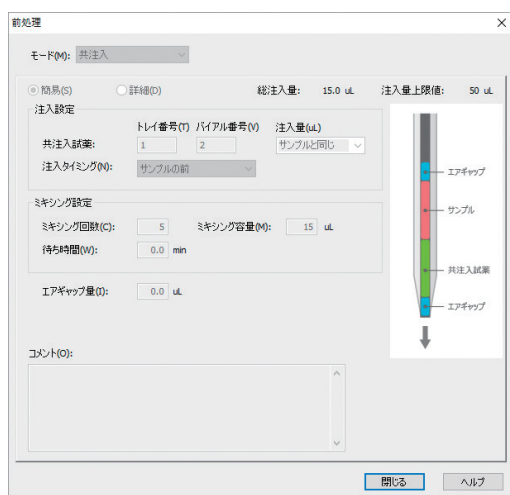


図6 ベルベリン分析における「共注入（簡易）」設定画面

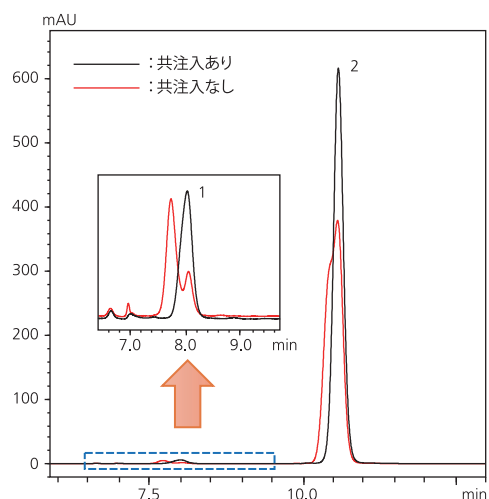


図7 共注入の有無によるベルベリン標準液のクロマトグラムの比較

図7に、共注入の有無によるクロマトグラムの比較を示します。共注入なしの通常注入では、ピーク1（不純物）とピーク2（ベルベリン）の両方がピーク割れを起こしていることがわかります。これは、イオン対試薬を含む移動相と試料成分がカラムに到達するまでに十分に混合されず、成分の一部のみがイオン対を形成しているためと思われます。一方、イオン対試薬を含む移動相を共注入試薬として共注入し、ニードル内で試料と移動相を混合させた場合では、正常なピーク形状が得られています。

以上のように、Nexera-i MTの自動前処理機能による共注入は、UHPLCのように配管内径が小さいため試料溶液と移動相の混合不足により起こるピーク形状悪化の改善に効果的であることがわかりました。また、Nexera-i MTを用いると、このような共注入のための設定を画面一つで簡単に設定することが可能です。

i-Series Plus
Nexera-i MT



Products

オンライン溶出試験用超高速液体クロマトグラフ Nexera FV

グローバルアプリケーション開発センター
渡部 悦幸、豊田 悠介

溶出試験は、製剤における開発・品質管理、ジェネリックにおける生物学的同等性試験などで広く用いられています。“Nexera FV”は、溶出試験機からの試験液分注、分析、結果解析に至るまでの工程を自動化し、大幅な省力化を可能にします。また、スピード、感度、安定性に定評のあるUHPLC“Nexera X2”をベースとしたシステム構成となっており、迅速に信頼性の高い溶出試験結果を得ることができます。通常のUHPLCとしても使用でき、例えば合成物のスクリーニング分析用途と溶出試験用途などで使用することにより試験現場での高速分析を可能とし、ラボでの装置稼働率の向上も期待できます。

※ FV: Flow Vialの略



1. オンライン溶出試験のシステム構成

Nexera FVは、溶出試験機とオートサンブラ部でオンラインに接続するため、サンプリングや希釈などの前処理、分析、解析、レポート作成に至るまでを自動化します。これにより、作業者が試験に取られる手間を省力化し、業務のスループット向上をサポートします。さらに、ハンドリングによる試料の分注操作がないことからサンプリングミスなく、安全に試験を行うことができます。

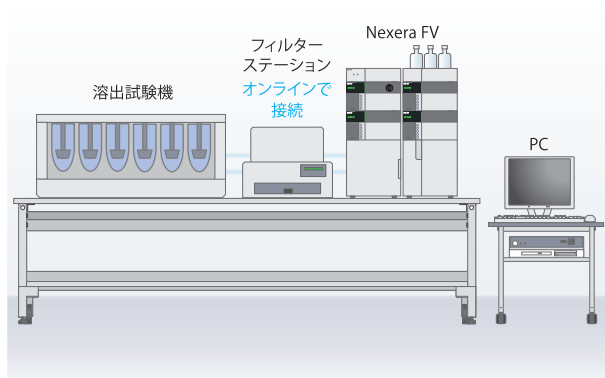


図1 システムレイアウト例

2. 溶出試験の高速化と省力化を同時に実現

溶出試験機から送られた試験液は、オートサンブラに搭載のフローバイアルに直接流れます。このフローバイアルは、気泡発生抑制構造を採用しており、精度良く試験液をサンプリングすることができます。使用する溶出試験機に合わせて8、12本のフローバイアルを搭載することができ、さらにフローバイアル部をあえて温調しない機構にすることで、試験液の塩析を抑制します。

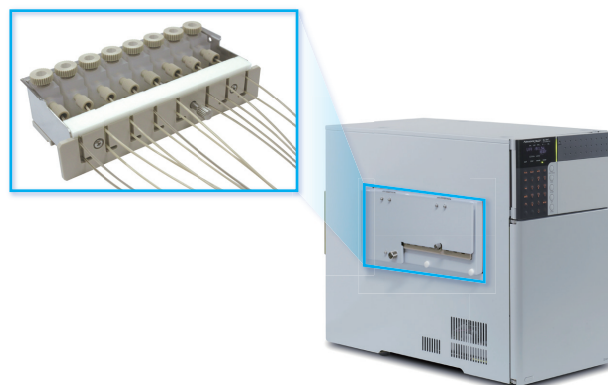
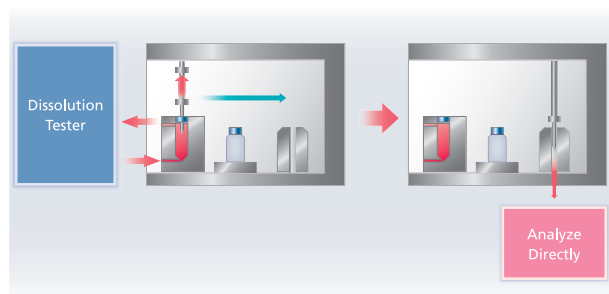


図2 オートサンブラに収納されるフローバイアルユニット

3. 溶出試験の迅速化を促進する2つの分析モード

●ダイレクト注入分析モード

溶出試験機からサンプリングしたベッセル数分の分析が次のサンプリング時間までに終わる場合に、溶出試験機と接続されたフローバイアルから直接注入し分析にかけることができるモードです。UHPLC分析に対応するNexera FVであるからこそ選択できる分析モードです。



●フラクション分析モード

溶出試験機からのサンプリング間隔が細かい試験において使用する分析モードです。最大で768検体をフラクションしておくことができます。また、溶出量が多く希釈が必要となる場合にも有効です。Nexeraが誇るオートサンプラの高速動作により、最短5分のサンプリング間隔に対応します。溶出量の多いサンプルにおいて本分析モードを活用すれば、サンプルの希釈も可能です。

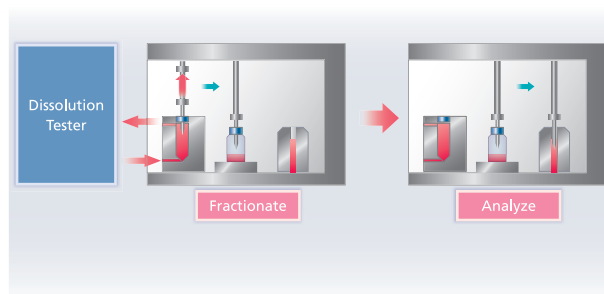


図3 選択可能な2つの試料注入モード

4. 専用ソフトウェアで試験準備の作業を効率化

●スケジュールの作成支援ソフトウェアDT Solution

LC溶出試験を行う際、最も手間のかかる作業のひとつが、試験用のバッチスケジュールを立てることです。このような作業は、専用ソフトウェア“DT Solution”が強力にサポートします。ひとつの画面上で必要な情報を設定し、後はボタンをひとつ押すだけでLabSolutions上にバッチスケジュールを自動生成し、試験を始められる状態になります。そのため、Nexera FVで行う溶出試験では準備に大きな時間を取られることはありません。

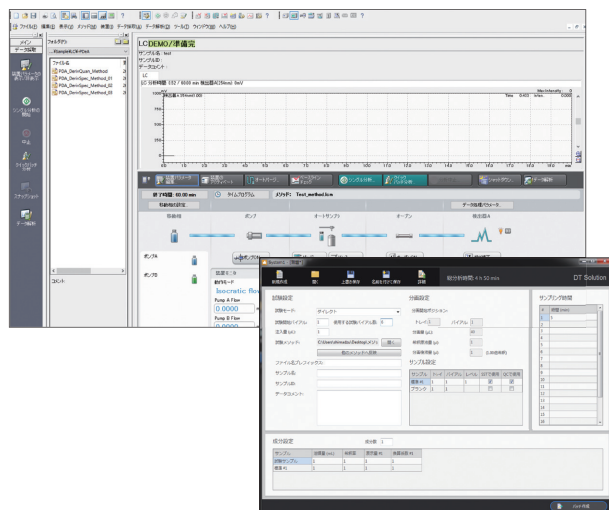


図4 DT Solution操作画面

●試験結果の迅速確認とレポートの自動生成

クロマトグラムの経時変化確認には、LabSolutionsに搭載されたブラウザ機能が便利です。複数のデータをひとつの画面に同時に開くことができ、一挙にデータの比較をすることが可能です。また、試験結果のレポート作成は、マルチデータレポート機能ですべて自動化することができます。成分毎に溶出率をまとめたテーブルやピボットグラフ、試験の合否判定などが試験終了と同時に作成されるため、試験結果を即時に知ることができます。

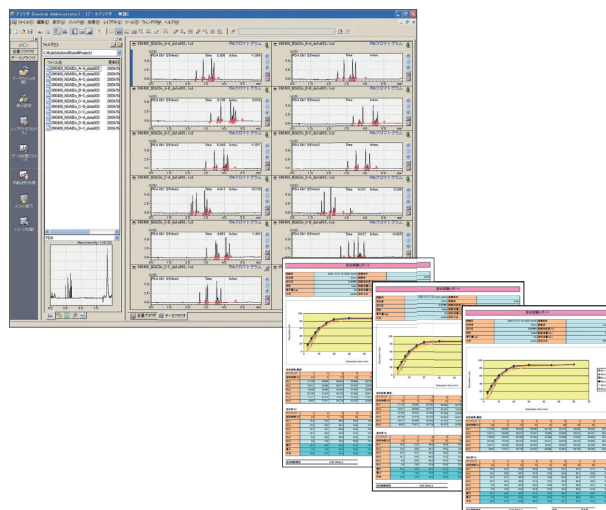


図5 分析結果表示とレポート出力例

Q&A

Q 「ホールドアップタイム (t_0)」について、詳しく教えてください。また、どのようにして求めるのでしょうか？

A 「ホールドアップタイム (t_0)」は、保持係数 (k)、分離係数 (α) などの基本パラメーターの算出に用いるため (図1)、馴染み深いことと思います。

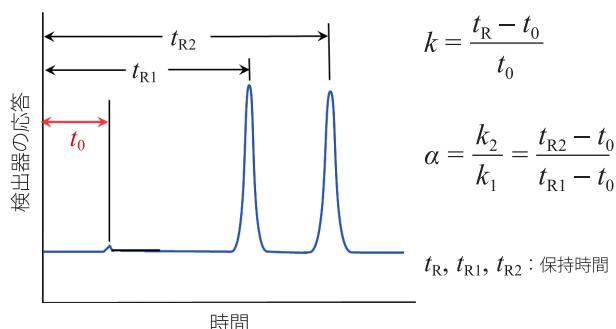


図1 保持係数と分離係数の算出

ホールドアップタイムは、JISでは「試料導入時からカラムに保持されない成分のピークの頂点が現れるまでの時間」¹⁾と定義されています。同様に「カラムに保持されない成分の保持容量」¹⁾に対しては「ホールドアップボリューム」という用語があり、ホールドアップタイムはホールドアップボリュームを流量で除したものです。このホールドアップボリュームは、概ね次のように表すことができます。

ホールドアップボリューム

- = カラム内で移動相が占める体積
- = カラム内の空隙体積
- = 充填剤細孔内の体積 + 充填剤間の体積
- = クロマトグラフィー管の体積 - 充填剤が占める体積

ホールドアップタイムは、一般的にクロマトグラム上に現れる非保持成分の保持時間ということになります。では、どのような成分の保持時間をホールドアップタイムと見なせばよいのでしょうか？いわゆる溶媒ピークの位置をホールドアップタイムと考えればよいのでしょうか？

実は、ホールドアップタイムを求めるのはそう容易なことではなく、特に逆相クロマトグラフィーにおいてはかなり複雑になります。例えば、移動相に水とアセトニトリルの混合溶媒を用いてアセトニトリルのみを注入しても、その保持時間（溶媒ピークの位置）がこれらの混合比率によって変動することが知られています。これは、移動相の混合比率が変わることにより、充填剤の疎水性固定相表面の溶媒相が変化し、注入されたアセトニトリルの保持が変動しているものと考えられます。また、ホールドアップタイムは、充填剤固定相に全く保持されず充填剤細孔の奥まで（移動相溶媒分子が浸透するところまで）浸透して溶出する成分の保持時間と言えます。従って、充填剤固定相に全く保持されなくても、分子サイズが大きいために充填剤細孔の途中までしか浸透できない成分は、本来のホールドアップタイムよりもはやく溶出することになります。また、イオン性成分においては移動相 pH や塩濃度がその溶出時間に影響を与え、場合によってはイオン排除的な効果が作用して、ホールドアップタイムよりもはやく溶出することも観察されます。

ホールドアップタイムの求め方については、いろいろな方法が提案され、議論されてきましたが、現状でも決定的な方法はないと言えます。逆相クロマトグラフィーにおける簡便なホールドアップタイムの求め方としては、吸光光度検出器で検出が容易なウラシルや硝酸ナトリウムなどを用いる方法があります。ただし、移動相組成によるこれら成分の保持時間の変動などを確認しておくことも必要です。

なお、クロマトグラム上のホールドアップタイム（保持時間も同様）には、厳密に言えば試料導入装置内、試料導入装置からカラムの配管、カラムから検出器までの配管、検出器内の配管やセルを通過する時間なども含まれます。しかし、多くの場合、これらは無視できるためクロマトグラムから得られる時間がホールドアップタイムとして用いられています。

引用文献

- 1) JIS K 0214:2013 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門)

(島津総合サービスリサーチセンター 三上 博久)