

LC TALK

Vol. 108
July 2019



Talk ピラーアレイカラムが誘うLCの近未来 …… P. 2

Applications 魚肉中核酸関連物質の分析と
マルチデータレポートを用いた鮮度（K値）の自動計算 …… P. 4

Products 超高速液体クロマトグラフ
新Nexeraシリーズ（1）… Analytical Intelligence …… P. 8

TEC 送液ポンプの自己診断・自己復帰機能
（新Nexeraシリーズ… Analytical Intelligence） …… P. 10

Talk

ピラーアレイカラムが誘う
LCの近未来

東京大学大学院 薬学系研究科
角田 誠

LCは多様な固定相が使用でき、再現性が高いことから、生体分子分析において最も使われている分離分析法である。私は学部生のときに分析の研究室に配属されてから、一貫してLCを用いた研究に従事してきた。

このLCtalkを読まれている方には、面白くない書き出しであろうか。そう思われた方にも、是非読み進めていただきたい。本稿を通して、LCの近未来をお見せしたい。

近年、生体試料の分析をクレジットカードほどの大きさのマイクロチップ上で行う「マイクロ化学分析システム」の研究開発が盛んに行われている。試料の前処理部、試薬反応部、分離部、検出部などの機能部位を1枚のチップに集積化することで、生体分子分析の簡便化、迅速化がもたらされると期待されているためである。マイクロ化学分析システムに不可欠な機能部位の一つである分離部についても、私たちを含め多くの研究者が、その分離性能を向上させるための研究に取り組んでいる。

これまでに、マイクロ化学分析システムにおけるLCを用いた分離部について、4つのアプローチで開発が行われてきた。マイクロチップに作製した中空のマイクロ流路表面を固定相として利用する方法、マイクロ流路内に粒子充填剤を詰める方法（このカラムは既に市販されている）、マイクロ流路内にモノリスカラムを合成する方法、そして最後の一つが、私たちの研究しているピラーアレイカラムである。ピラーアレイカラムが如何に優れた分離媒体であるかについて、私たちの研究成果を含めて以下に述べたい。

はじめに、ピラーアレイカラム開発の背景に触れる。現在LCにおいて最も汎用されている粒子充填型カラムには、分離効率に限界があることが理論的に示されていた¹⁾。これは、カラム内部構造（充填粒子の大きさや充填状態）の不均一性によるものである。このことは一方で、均一な内部構造を有するカラムを作製することができれば、従来のカラムの分離効率を格段に向上させられることを示唆していた。これを実現し

たのが、ピラーアレイカラムである。ピラーアレイカラムは図1に示すように、数 μm 四方の支柱（ピラー）状の構造体がマイクロ流路内に規則的に並んだカラムである。柱の表面を固定相として利用することで、クロマトグラフィーを行う。高度に均一な内部構造の作製は、 μm オーダーの構造を設計図通りに作製可能な半導体微細加工技術の利用により実現できる。

私たちは、フォトリソグラフィーとドライエッチングの手法を用いて、一辺20 mmのシリコン基板上にピラーアレイカラムを作製した（図1）。ピラー構造を有する分離流路と中空の試料注入流路を作製し、この2つの流路が交差する部分を試料注入部として利用した。ピラーは一辺が3 μm の正方形で、ピラー間隔が2 μm となるように設計した。ピラー表面にoctadecylsilyl基を化学的に結合させることで、逆相分離用の分離媒体として利用した。

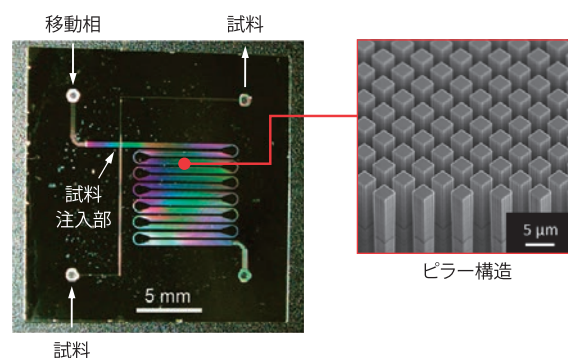


図1 ピラーアレイカラム

ピラーアレイカラムの分離性能を、直線の分離流路を用いて評価した。2種のクマリン色素の分離を蛍光顕微鏡にて検出したところ、注入から数秒で分離される様子が確認された（図2）。これにより、理論的に予想されていたピラーアレイカラムの高い分離効率を、実験的に示すことができた。しかし、小さな基板に作製できる直線流路の長さには限界があり、生体分子の多成分分析は難しい。より高い分離性能を得るためには、曲線流路を伴う長い分離カラムを作製する必要があった。

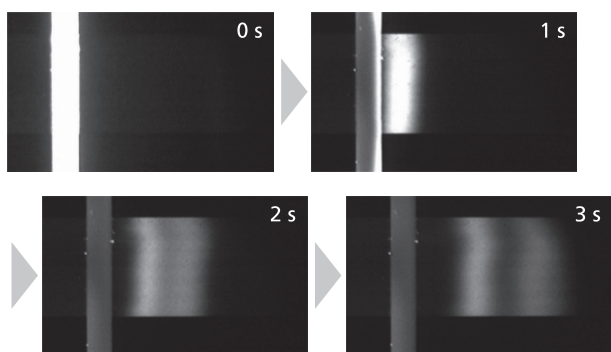


図2 ピラーアレイカラムを用いた
2種クマリン色素 (C525とC545) の分離

そこで私たちは、内部にピラー構造を有する曲線流路構造の開発を行った²⁾。単純な曲線構造では、曲線部に起因する拡散がカラムの分離性能を悪化させてしまう。この拡散を抑制するには、図3 (A) に示すような内周と外周の距離を等しくした曲線構造が有効であることを見出した。この曲線構造を導入することにより、一辺20 mmのマイクロチップに110 mmの長さのピラーアレイカラムを作製し、蛍光誘導体化7種アミノ酸を100秒以内で分離することができた (図4)。さらに、このピラーアレイカラムを用いて、ヒト血中分岐鎖アミノ酸の定量に成功し、ピラーアレイカラムが生体試料の分析に適用可能であることを世界で初めて示した³⁾。

上述の曲線構造は、曲線部の流路幅が狭いために流路抵抗が大きく、高流速での高速分離が困難であった。そこで新たに、図3 (B) に示すような低拡散かつ低流路抵抗の曲線構造を開発した⁴⁾。曲線部のピラー密度を調整し、曲線部内外における移動相の速度分布を制御したことで、流路幅を一定にしたまま拡散を抑えることに成功した。この曲線構造をピラーアレイカラムに導入することで、高流速での分離が可能となり、蛍光誘導体化6種アミノ酸を24秒以内で分離できるようになった。

この他にもさらに、オンチップミキサーを利用した迅速グラジエント溶離システムの開発⁵⁾、親水性相互作用クロマトグラフィーマードのためのピラーアレイカラムの開発⁶⁾などを行い、ピラーアレイカラムの生体分子分析への応用可能性を広げる研究を続けている。具体的には、文献を参照されたい。

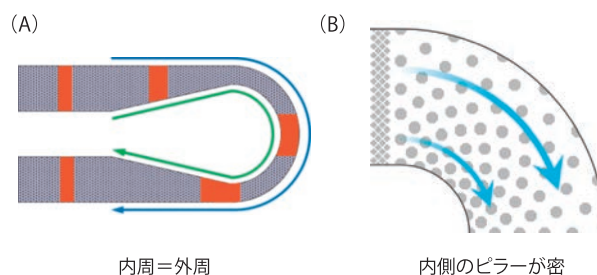


図3 開発した曲線構造

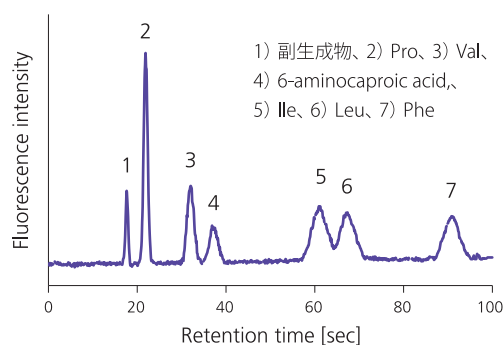


図4 ピラーアレイカラムを用いた蛍光誘導体化アミノ酸の分離

また私たちは、ピラーアレイカラムを用いた分離部だけでなく、試料の前処理部や試薬反応部の開発も行っている。様々な要素技術を開発し、1枚のマイクロチップ上に集積化していくことで、生体分子分析の工程すべてを可能にするマイクロ化学分析システムの構築を目指している。近い将来、皆さんにこの優れたカラムを利用していただくことを夢みている。大学の一研究室で出来ることは限られており、その実現のためには、カラムやチップのみならず、周辺機器等の開発も不可欠である。島津製作所をはじめとした産業界のご協力やご支援をお願いするとともに、私たちも引き続き夢に向かって研究に邁進していきたい。

参考文献

- 1) Eijkel, J., *Lab Chip*, 7, 815-817(2007)
- 2) Aoyama, C., et al., *Anal. Chem.*, 82, 1420-1426(2010)
- 3) Song, Y., et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 7993-7999(2013)
- 4) Isokawa, M., et al., *Anal. Chem.*, 88, 6485-6491(2016)
- 5) Song, Y., et al., *Anal. Chem.*, 84, 4739-4745(2012)
- 6) Isokawa, M., et al., *Proceedings of MicroTAS 2016*, 583-584(2016)

執筆者紹介

東京大学大学院薬学系研究科博士課程中退。同研究科助手、米国アイオワ州立大学博士研究員。帰国後、東京大学大学院薬学系研究科講師を経て、現在、同研究科准教授。

専門分野

生体分析化学

将来の夢

ピラーアレイカラムを多くの研究者に利用してもらうこと、娘とお酒を飲むこと

趣味

MLB観戦、スキー、旅行など

Applications

魚肉中核酸関連物質の分析とマルチデータレポートを用いた鮮度（K値）の自動計算

グローバルアプリケーション開発センター
岩田 奈津紀

魚介類の筋肉は畜産動物に比べ、組織が軟弱で水分が多いため、腐敗が早いことで知られています。これら魚介類の鮮度を正確に判定することは、食の安心安全の面で非常に重要となります。

一般に、消費者は魚の目の色や魚体のハリなどの見た目で鮮度を判断しますが、動物の筋肉のエネルギー源であるATP（アデノシン三リン酸）の変化を筋肉の鮮度低下の指標とする方法も広く利用されています。この魚介類の鮮度を数値で評価する指標にK値があり、K値によって刺身用、焼き魚用のように調理方法が使い分けられています。

ここでは、Nexeraを用いて生マグロおよび解凍マグロのK値を測定し、その鮮度の経時変化について、マルチデータレポートを作成した例をご紹介します。

1. ATP 関連物質の分析

ATP関連物質として、ヒポキサンチン（Hx）、イノシン（HxR）、IMP、AMP、ADP、ATPの6成分混合標準液（各10 μmol/L）を分析しました。図1にクロマトグラム、表1に分析条件を示します。一般にATP関連物質はりん酸塩緩衝液を用いたイソクラティック溶離で分離されますが、分析時間が長くなります。ここでは、移動相へのイオン対試薬の添加とグラジエント溶離

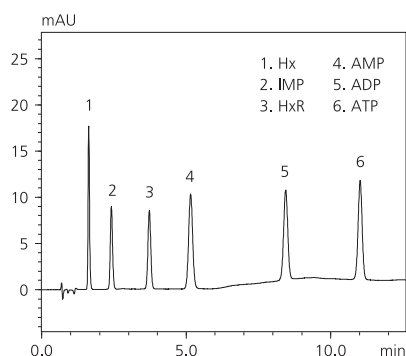


図1 ATP関連物質混合標準液のクロマトグラム

IMP : Inosine 5'-monophosphate, AMP : Adenosine 5'-monophosphate,
ADP : Adenosine 5'-diphosphate, ATP : Adenosine 5'-triphosphate

により分離の効率化と分析時間の短縮を図りました。また、夾雑成分のカラムへの吸着による圧力上昇を防ぐために、カラム洗浄工程を追加し、多検体処理を行う場合でも繰り返し安定して分析できるようにしました。

表1 分析条件

装 置 : Nexera		
カラム : Shim-pack GIST C18 AQ (内径 3.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm)		
流 量 : 0.8 mL/min		
移動相 :	A	B
水	1000	800
アセトニトリル	10	200
りん酸	10.2	10.2
トリエチルアミン	31	31
グラジエント溶離 (各mL)		
B濃度 0 % (0-3.5 min) → 12 % (11 min)		
→ 100 % (11.01- 18 min) → 0 % (18.01-28 min)		
温 度 : 30 °C		
検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 260 nm		
注入量 : 10 μL		

2. 再現性

表2に、ATP関連物質混合標準液（各2 μmol/L）の6回繰り返し分析における保持時間と面積の変動係数（%RSD）を示します。いずれの成分においても、保持時間、面積ともに変動係数1 %以下の結果が得られました。

表2 6回繰り返し分析における各成分の変動係数（%RSD）

化合物名	保持時間	面積
Hx	0.14	0.33
IMP	0.00	0.21
HxR	0.09	0.20
AMP	0.04	0.32
ADP	0.05	0.50
ATP	0.05	0.68

3. 魚肉の鮮度測定

魚介類など動物は、筋肉中のエネルギー源としてATPを利用しています。しかしながら、死後はそれを再生産する機能が失われるため、ATPはATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hxの順に逐次酵素的に分解することにより、減少し消失します。一方で魚介類の筋肉のK値は、次式に示すようにATP関連物質総量に占めるりん酸を分子内に持たない成分（ヒポキサンチン、イノシン）の和の百分率と定義されています。

$$K \text{ 値} = \frac{Hx + HxR}{Hx + HxR + IMP + AMP + ADP + ATP} \times 100$$

この式は、値が小さいほど新鮮であることを示しています。また、ATPの変化速度やK値の上昇は、温度履歴（貯蔵温度等）や時間に依存すると言われています。

4. 検量線

ATP関連物質6成分について、検量線を作成した結果、いずれの成分においても寄与率 $R^2=0.9999$ 以上と良好な直線性が得られました。図2に検量線、表3に各成分の検量線濃度範囲と寄与率を示します。

表3 各成分の検量線濃度範囲と寄与率 (R^2)

化合物名	濃度範囲 ($\mu\text{mol/L}$)	寄与率 (R^2)
Hx	2-100	0.9999972
IMP	100-600	0.9999905
HxR	10-400	0.9999822
AMP	1-50	0.9999917
ADP	1-50	0.9999960
ATP	1-20	0.9999931

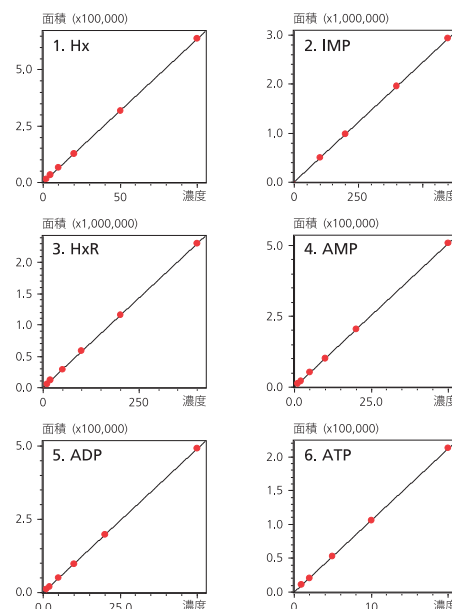


図2 各成分の検量線

5. 前処理

試料には、市販の生びんちょうマグロと解凍きはだマグロを使用しました。前処理法は、「冷凍及び生鮮クロカジキのK値

による鮮度変化の比較について¹⁾を参考にしました。粉碎済の試料を10%過塩素酸水溶液で抽出後、5%過塩素酸水溶液で2回抽出しました。3回分の抽出液の上清を氷冷し、水酸化カリウム水溶液(10N、1N、0.1N)で中和した後、フィルターろ過し、HPLCに供しました。図3に、前処理手順を示します。

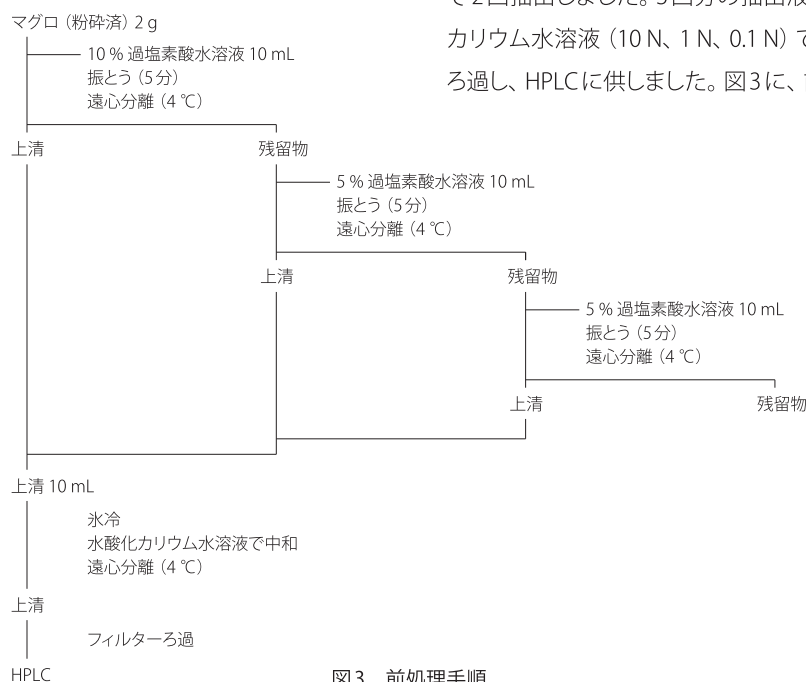


図3 前処理手順

6. マグロの鮮度測定

購入直後に前処理したもの（購入後0日）と、1～3日間、冷蔵保存後に前処理したもの（購入後1～3日）を分析し、K値の変化を確認しました。図4に生びんちょうマグロのクロマトグラムを、図5に解凍きはだマグロのクロマトグラムを示し

ます。図4および図5下段の図は、上段の図を拡大したものです。また、表4にK値の経時変化と各成分の定量値を示します。生より解凍の方が鮮度が良い結果となりました。

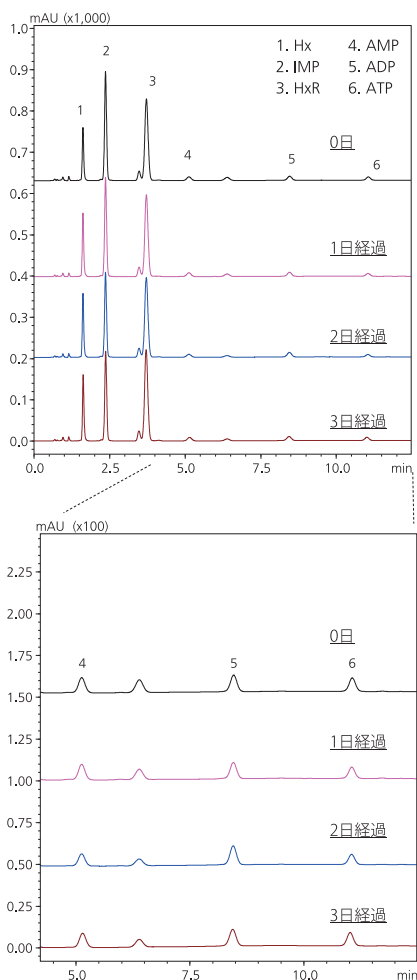


図4 生びんちょうマグロのクロマトグラム

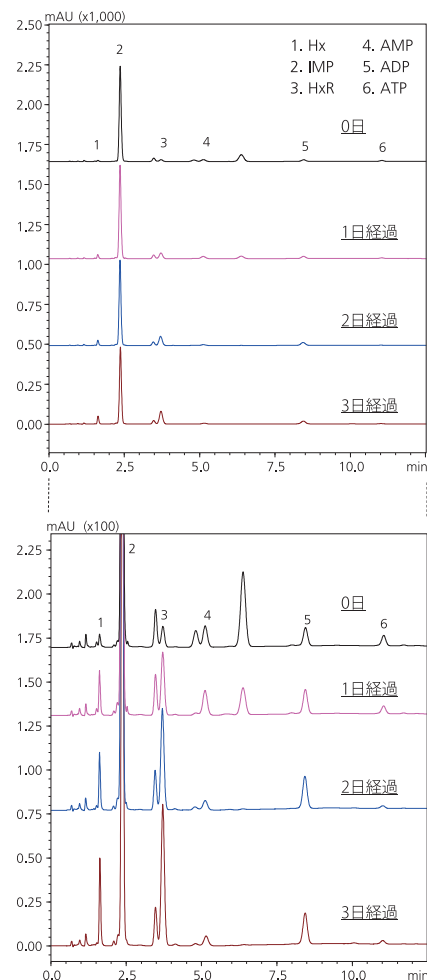


図5 解凍きはだマグロのクロマトグラム

表4 K値の経時変化と各成分の定量値

生びんちょうマグロ

経過日数	K値 (%)	定量値 (μmol/L)					
		Hx	IMP	HxR	AMP	ADP	ATP
0	53.8	68.970	252.281	256.739	9.052	10.552	7.882
1	56.9	83.502	229.872	254.640	9.286	9.962	6.728
2	60.2	83.825	195.520	249.527	7.197	12.054	5.841
3	61.5	87.607	203.348	279.969	8.561	10.889	7.659

解凍きはだマグロ

経過日数	K値 (%)	定量値 (μmol/L)					
		Hx	IMP	HxR	AMP	ADP	ATP
0	2.5	3.619	582.971	12.103	10.156	10.657	5.724
1	8.7	12.794	559.034	43.472	13.641	14.310	4.413
2	14.5	17.020	496.849	71.427	4.992	19.459	1.574
3	20.9	26.589	451.304	99.401	5.299	18.558	1.926

7. カラム耐久性

Shim-pack GIST C18 AQは、逆相クロマトグラフィーで高極性化合物を保持するのに適したカラムです。今回のような水リッチな移動相条件でも、良好な耐久性、再現性が得られます。

本分析方法におけるカラム耐久性を調べるために、実サンプルであるマグロを300回注入後、カラム負荷圧、理論段数、シンメトリー係数を確認しました。表5に、その結果を示します。カラム負荷圧の上昇はなく、理論段数の減少率およびシンメトリー係数の悪化率とも10%未満と良好な結果が得られました。

表5 実サンプル注入前と300回注入後の各パラメータの変化率

カラム負荷圧 (MPa)

	注入回数		上昇率 (%)
	0回	300回後	
最大圧	22.15	22.15	0

理論段数

	注入回数		減少率 (%)
	0回	300回後	
Hx	7692	7413	3.63
IMP	5692	5256	7.66
HxR	7679	7416	3.42
AMP	7057	6410	9.17
ADP	17048	16408	3.75
ATP	31533	28970	8.13

シンメトリー係数

	注入回数		悪化率 (%)
	0回	300回後	
Hx	1.165	1.163	-0.17
IMP	1.021	1.097	7.44
HxR	0.990	1.036	4.65
AMP	0.997	1.054	5.72
ADP	0.970	0.994	2.47
ATP	0.971	0.996	2.57

8. マルチデータレポートの活用

マルチデータレポート*は、分析結果を表計算ファイルに自動転記する機能です。バッチ分析が終了すると同時にその結果を自動転記します。バッチ再解析でも使えるので、既に分析が終了したデータを使って自動転記することも可能です。この機能は、手作業による転記によって時間がかかること、および転記ミス等へのあらゆるリスクを排除することができます。

ここでは、マグロ中のATP関連物質の測定結果から自動的にマルチデータレポートを作成しました(図6)。自動的にK値を算出しグラフ化することにより、K値の経時変化をモニター

することが可能になります。

今回の生びんちょうマグロは、購入当日(0日経過)に53.8%と焼き魚として調理した方が良くとされるまで鮮度が落ちていました。冷蔵保存で2日を経過した頃には、60%を超え腐敗していました。また、解凍きはだマグロは、購入当日(0日経過)に2.5%と刺身で食べることでできる鮮度でした。しかしながら、冷蔵保存で3日経過した頃には、生で食べることをお勧めしない鮮度となっていました。

※ マルチデータレポートはLabSolutions DB/CS 対応

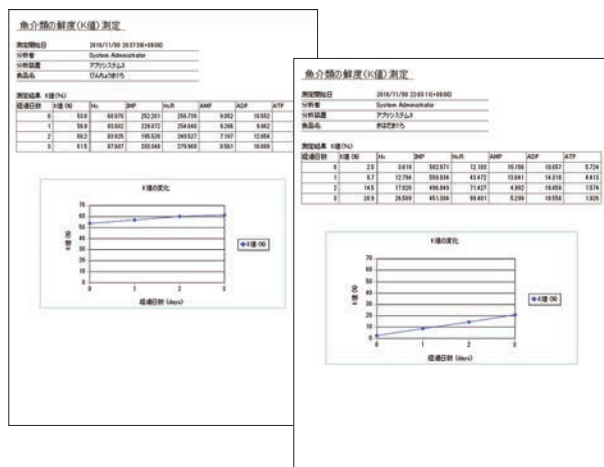


図6 マグロの鮮度測定結果を示したマルチデータレポート

9. まとめ

NexeraとShim-pack GIST C18 AQ カラムを用い、移動相組成の工夫、グラジエント溶離の適用により、分析時間を短縮でき、多検体処理において繰り返し安定した分析が可能となりました。本法でマグロの鮮度測定を行ったところ、生マグロと解凍マグロでは鮮度が大きく異なる結果となりました。また、マルチデータレポート機能を用いることで、定量結果を自動転記し、K値を自動算出することにより、K値の変化率をモニターすることができました。

近年、ヒスタミンによる食中毒からアレルギーを発症する事例も報告されています。マグロなどの赤身魚が腐敗すると、ヒスタミン(アミノ酸の一種であるヒスチジンの代謝物)が高濃度に蓄積されます。HPLCでヒスタミンを分析することは可能ですが、前処理(誘導体化)が煩雑であったり、自動前処理をする場合にはシステムが大掛かりになります。今回のようにシンプルな構成のHPLCを用いてATP関連物質を分析することにより、簡易的に腐敗の状態を測定することも可能となります。

参考文献

- 1) 白井一茂, 渡辺悦生. 冷凍及び生鮮クロカジキのK値による鮮度変化の比較について, 神奈川県水産技術センター研究報告, 5号, 11-14 (2012)

Products

超高速液体クロマトグラフ

新Nexeraシリーズ (1) … Analytical Intelligence

LCビジネスユニット

渡邊 京子

超高速液体クロマトグラフ (Ultra High Performance Liquid Chromatograph: UHPLC) の需要は拡大を続けていますが、近年この市場にいくつかの変化が見えはじめています。2019年3月発表の「新Nexeraシリーズ」は、この市場の変化に応え誕生したUHPLCです。技術者の知識経験の差を補完し常に信頼性の高いデータを提供する「Analytical Intelligence (AI)」の概念に基づく多数の支援機能と、基本性能向上とデータインテグリティ対応強化をさらに追求した設計が、新しい業務スタイルを提案します。

本誌では、今号と次号の2回に分けて新Nexeraシリーズの特長をご紹介します。1回目は、新Nexeraシリーズの開発背景とAnalytical Intelligenceについてです。



1. 新Nexeraシリーズの開発背景

● HPLCからUHPLCの市場変化と島津HPLCの歴史

島津初のオリジナルLC「LC-3A」が誕生したのが1978年。今日までの41年で、島津LCは製薬、CRO、食品、化学、環境、臨床などの各市場において、分析検査装置の主力の一つとして欠かせない存在となりました。この間、分析業界では何度か技術的革新が起きましたが、特に2000年代半ばのUHPLCの誕生は、LC分析に大きな変化をもたらしました。2 μ m以下の粒子径の充填剤を用いるUHPLCは、卓越した分離性能がカラム長さの短縮を可能とし、また移動相線速度を大きくしても分離性能が維持される性質もあることから、100 MPaを超える高い負荷圧に耐えられる頑強なUHPLCハードウェアと組み合わせた分析メソッドの超高速化が進んでいます。一方で、近年の3 μ m以下の表面多孔性充填剤 (Superficially Porous Particles: SPP、いわゆるコアシェル充填剤) の急速な普及に伴い、「UHPLC-like (UHPLCのような)」と呼ばれる60 ~ 80 MPa程度の圧力帯のシステムの需要も急速な拡大を見せています¹⁾。島津もUHPLCやUHPLC-likeシステムを用い分析メソッドの高速化、ひいてはLCデータ採取に要する時間短縮を促進し、分析業務の効率化に貢献してきました。

● ユーザーの課題や需要の変化

一方、ユーザーである皆様の課題やご要望はどのように変化しているのでしょうか。

① データ信頼性、データインテグリティへの重要性増加

データの信頼性 (正しい結果かどうか) とデータインテグリティ (データに一貫性があるかどうか、改ざんがないかどうか) を確保する重要性が加速。製薬業界だけでなく、受託分析機関などにも拡大している。

② 業務効率化改善の要求が一層加速

分析の高速化によるLCデータ採取時間の短縮だけでなく、ワークフロー全体の効率化・時間短縮が必要とされて来ている。

③ ラボ運営効率と設備投資効率の最大化

装置稼働率改善、ランニングコスト削減などのラボ運営効率と、購入した設備を無駄なく最大限活用し成果を出す設備投資効率の両方を最大化するような、投資と運営方針が求められるようになって来ている。

④ 熟練分析技術者の減少と次世代への技術継承の課題が顕在化

業務効率化が過熱するあまり、教育に十分な時間が取れないことで、熟練分析技術者が蓄積した分析ノウハウが次世代の技術者に継承されないケースが増加している。

2. 新Nexeraの誕生

● 業界の新標準となる新しいワークフローを提案：EXPERIENCE NEW BENCHMARKS

新Nexeraシリーズは、このようなお客様の新たな課題やご要望にお応えするために誕生した新しいUHPLCです。島津LCのDNAとでも言うべき卓越したハードウェア性能と、IoTやM2Mなど最新のデジタル技術とを融合させ、下記3点を基軸に、真の「高い信頼性」、業務効率改善」を実現しました。新しい業界標準となることを目指し、LC分析業務の新体験をご提案します。

● A New Benchmark of Intelligence (知性の新標準)

後述のAnalytical Intelligenceを実現する新機能です。分析ワークフローを支援する様々な自動機能が信頼性向上と効率化改善を促進します。

● A New Benchmark of Efficiency (効率化の新標準)

超高速注入性能を有するオートサンプラと大容量サンプル搭載機能プレートチェンジャが、超多検体高速分析を加速します。

● A New Benchmark of Design (デザイン・設計の新標準)

島津LCの根幹である卓越したハードウェア性能をさらに進化させ、データ信頼性向上を強力にサポートします。(次号で詳細にご紹介します。)

3. Analytical Intelligence (AI)

● ユーザーのスキル/経験によらず、常に信頼性の高いデータを採取するための支援技術

Analytical Intelligence (AI) は、島津が定義した新しい概念です。これまで分析データの質や信頼性は各分析技術者のスキルや経験に大きく影響を受けていました。AIは誰でも等しく質の高いデータが得られるよう、陥りがちな落とし穴を回避する熟練分析技術者のノウハウを自動化し、支援機能としてユーザーに等しく提供するというものです。新Nexeraシリーズには、AIを実現する新機能として下記が搭載されています。

- 自己監視/制御/診断/(トラブルからの) 復帰の機能が、システムコンディションや連続分析の進行状況の管理からユーザーを解放
 - まるで熟練の分析技術者が操作しているように、トラブルのリスクを低減しながら自動運転
- これらの新機能のうち2つの機能を以下にご紹介します。他の機能やそれぞれの詳細解説は「テクニカルレポート」や本誌「TEC」にてご紹介していますので、併せてご参照ください。



● 移動相枯渇リスクをゼロに：移動相モニター

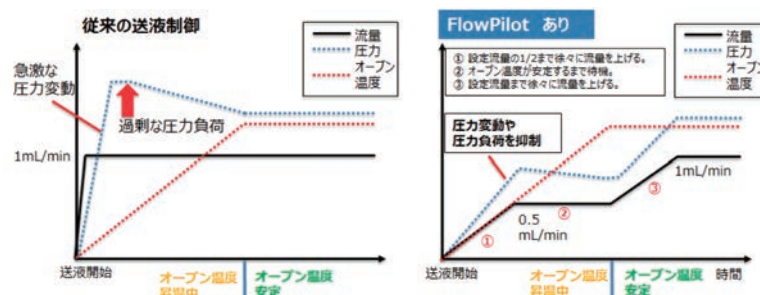
重量センサーがボトル内溶液量をリアルタイムで測定し、分析開始前に予測消費量から不足の警告※、スマートデバイスやPCに現在の残量とステータス表示を行います。移動相枯渇によるデータ採取失敗やカラム破損、またオートサンプラリンス液の枯渇による注入不良のリスクを排除し、安定したデータ採取を実現します²⁾。

(※) LabSolutionsが必要



● カラムを保護しながらシステムを自動起動

新開発の「FlowPilot (フローパイロット)」機能は、スタンバイ状態からのシステム自動起動時に、カラムに過剰な負荷を与えないようカラム温度と連携して移動相流量を自動で調整します。これまで、熟練分析技術者が手動で行っていたカラムを保護する操作法を、新Nexeraシリーズが代わりに実行します³⁾。



参考文献

- 1) Strategic Directions International (SDi) Report
- 2) テクニカルレポート「移動相消費量のリアルタイム測定機能が推進する分析業務効率の最大化」(C190-0484)
- 3) テクニカルレポート「FlowPilot 機能による自動スタートアップが推進するワークフローの完全自動化」(C190-0486)

TEC

送液ポンプの自己診断・自己復帰機能 (新Nexeraシリーズ… Analytical Intelligence)

基盤技術研究所⁽¹⁾、LCビジネスユニット⁽²⁾五味 朋寛⁽¹⁾、Davide Vecchietti⁽²⁾、小寺澤 功明⁽²⁾、渡邊 京子⁽²⁾

昨今の分析ラボでは、生産性向上や分析業務の効率化を目的として、分析時間の短縮や定期的なメンテナンスによるシステム稼働率の向上が図られています。しかし、予測不能なトラブルによる分析業務の中断は、今なお解決すべき課題です。液体クロマトグラフ流路内でごく稀に発生する気泡は、圧力変動による保持時間の再現性不良やベースラインのうねり、ピーク形状の崩れなどさまざまな問題を引き起こす厄介なトラブルとして知られています。

本稿では、新Nexeraシリーズの送液ポンプに搭載した自己診断と自己復帰機能¹⁾により、流路内で発生した気泡を自動で検知し、システムを正常な状態に復帰させるまでの流れについて解説します。気泡トラブルによる分析のやり直しを含めたシステムのダウンタイムを最小化し、ラボの生産性効率向上に貢献します。

1. 流路内の気泡形成

液体に溶解可能な気体の最大量は、温度や圧力、溶液の種類によって異なります^{2) 3)}。そのため、溶液組成や温度、圧力など溶液の状態変化によって、溶解する気体の飽和量に変化し、気体が溶解している量がその飽和量を超えた時、気泡が発生します(図1)。HPLC/UHPLCでも流路内に気泡が発生することが稀にあり、これが送液ポンプの内部に達すると送液不良を引き起こし、流量の不安定化が保持時間やピーク面積の変動やベースラインの不安定化、ピーク形状の崩れなどを誘引します。これらの現象は、分析対象成分の同定や定量、検出限界近くの対象成分の検出を困難にするなど分析結果に大きな影響を与え、正確なデータ採取を阻害します。

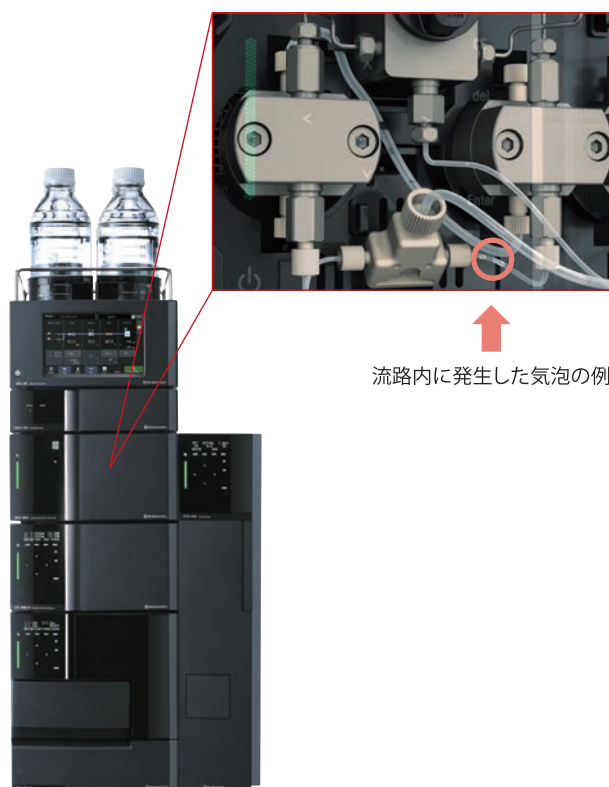


図1 新Nexera送液ポンプの流路

2. 自己診断・自己復帰機能とは

分析中に流路内に気泡が発生する理由として、移動相への界面活性剤の添加や室温の急激な変動などが挙げられます。流路内に気泡が発生した時には、ユーザーが手動で進行中の分析を停止させ流路をパージするなどの対策を行う必要があります。そのため、装置の無人運転中に流路内に気泡が発生すると、正常なデータが得られず結果を正しく解析できなくなり、同じサンプルを再度分析する必要が生じます。

近年は脱気装置の脱気性能や送液ポンプの送液安定性が向上し、気泡は脱気装置で除去されるか、送液に影響を及ぼさない程度に圧縮されて押し出されてしまうなどで、気泡由来の送液不良トラブルは減少しつつありますが、それでも時々突発的に発生し、突発的であるが故に事前に予防策を講じることが困難です。

新NexeraシリーズのAnalytical Intelligence (AI) を実現する機能の一つである自己診断・自己復帰機能は、送液ポンプに搭載された新機能です。

● 自己診断機能

ポンプ圧力は常に自動でモニターされていますが、流路内に発生した気泡により特徴的な圧力変動が生じると、独自のアルゴリズムがこれを検知し、さらに異常な圧力変動であるかどうかを判断します。異常圧力変動と判定された場合、一旦送液を止め、ポンプの自動パージを行ってから送液を再開し、システムを正常な状態に戻します（自己復帰）。

● 自己復帰機能

異常圧力変動と判定された場合、一旦送液を止め、ポンプの自動パージを行ってから送液を再開し、システムを正常な状態に戻します。

3. 自己診断・自己復帰機能の動作

自己診断・自己復帰は、以下のように行われます。

- [1] 気泡がポンプ内に混入すると急激な圧力低下が生じ（図2、②）、その後、異常な圧力変動が継続します（図2、③）。
- [2] 自己診断機能では、この時の圧力変動値（ ΔPa ）が基準値と異なることを検知して、異常が発生していると認識して、自己復帰機能を開始します。
- [3] 自己復帰機能が開始されると、進行中の分析後、自動でパージ動作が行われ、流路から気泡を取り除きます（図2、④）。
- [4] その後、残留物を除くためカラムを洗浄し、再度サンプル注入せずメソッド条件で一度分析を行い、その時の圧力変動を基準値と比較します（図2、⑤）。
- [5] その圧力変動値が基準値と同等であれば、システムが正常になったと判断し、停止した分析を再度行い連続分析を再開します。なお、自己復帰後、中断した分析を再度実行するか、これをせずバッチの次の行から開始するかは、ソフトウェアで選択することができます。

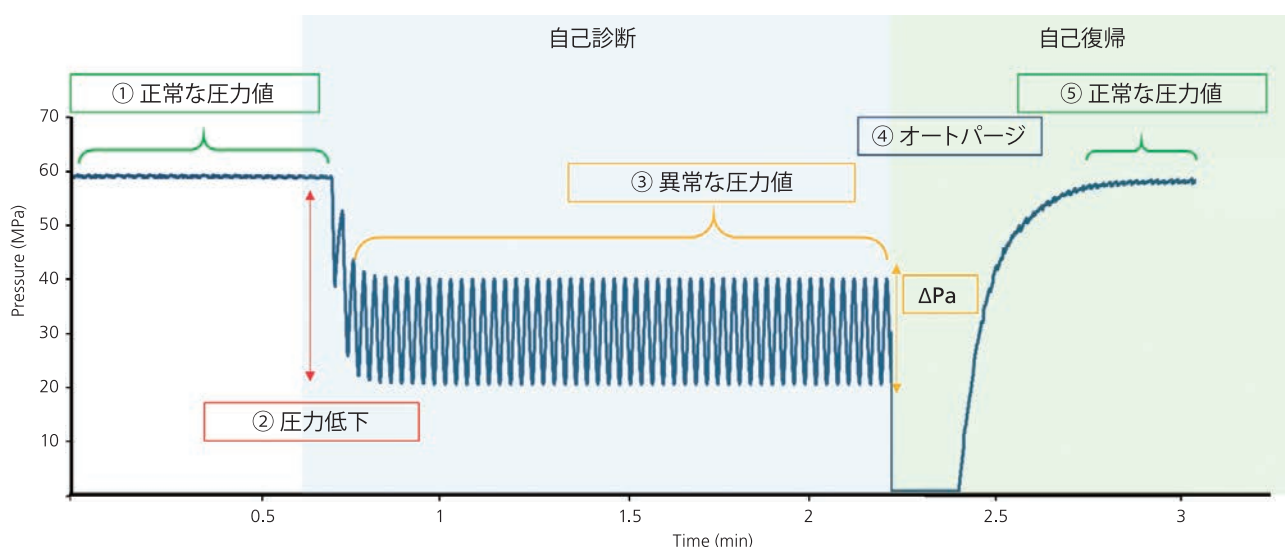


図2 自己診断・自己復帰機能のスキーム

4. 設定方法

自己診断・自己復帰機能の動作は、LabSolutionsで簡単に設定できます。まず、システムが圧力異常を検知した場合に、以下のどのような動作を行うのかを選択します。

- 自己復帰する：オートパーズが実行されます。
- そのまま分析を継続する：何も実行されません。
- バッチ分析を中止する：分析は停止し、システムは待機状態になります。

その上で、自己復帰の際のパーズ時間、リトライ回数や復帰後の動作など、自由にカスタマイズすることが可能です（図3）。

5. まとめ

自己診断・自己復帰機能は、新Nexeraシリーズの送液ユニットで使用でき、LabSolutionsで機能をカスタマイズすることができます。

また、両機能は完全自動で行われ、手動操作を一切必要としないため、無人分析による分析業務全体の効率を向上します。

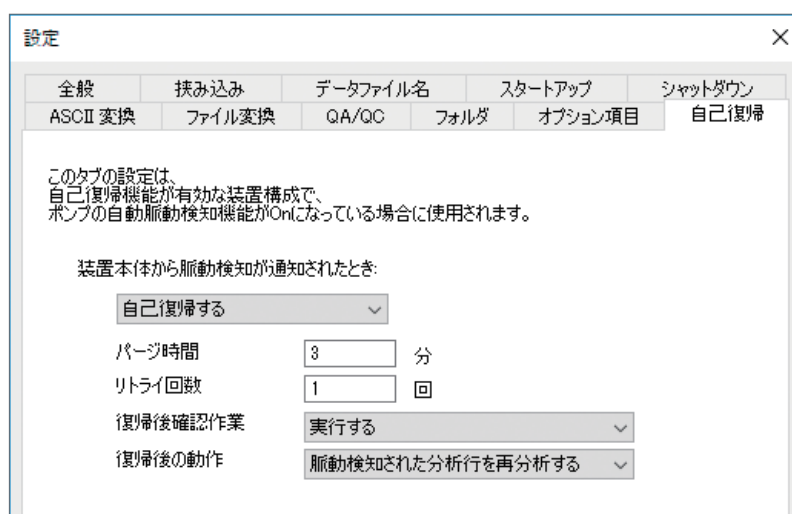


図3 LabSolutions 自己復帰の設定ウィンドウ

※ 本技術は特許出願中です。

参考文献

- 1) テクニカルレポート「新Nexeraシリーズ送液ポンプの自己診断・自己復帰機能によるラボの生産性向上」(C190-0483)
- 2) S.R. Bakalyar, M.P.T Bradley, and R. Honganen, *J. Chromatogr.*, 158, 277-293 (1978)
- 3) 日本化学会編, 化学便覧 基礎編 II, 8.7 溶解度, 丸善 (1984)