

LC TALK

Vol. 109
October 2019



Talk LC-MS/MSの食品分析への展開 …… P. 2

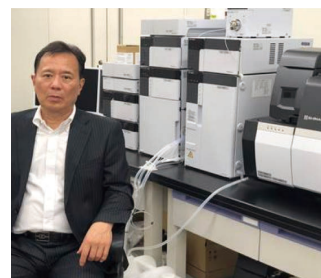
Applications 米国薬局方に準拠したメロキシカムの分析 …… P. 4

Products 超高速液体クロマトグラフ
新Nexeraシリーズ (2) … 卓越した性能を実現する新技術 …… P. 7

TEC フォトダイオードアレイによる定量性の向上
(新Nexeraシリーズ … SPD-M40) …… P. 9

Talk

LC-MS/MSの食品分析への展開



横浜薬科大学 食品有機化学研究部門

望月 直樹

LC-MS/MSの進化発展は著しい。LCとの出会いから、LC-MS/MSの食品分析への展開、そして現在の課題について紹介する。

① LCとの出会い

大学の卒業研究で天然物化学を専攻し、ショウガ科植物に含まれるセスキテルペンの単離精製に、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを使用した。これがLCとの最初の出会であった。分離するスポットが、TLCの R_f 値で0.3付近になる様な展開溶媒を探し、その溶媒をオープンカラムクロマトグラフィーの溶離液に使用することで、切れの良い分離が可能となった。更に、2重結合と錯体を形成する銀イオンクロマトグラフィーを用いることで、2重結合の数の位置等が異なる各種セスキテルペンの分離に成功した。大学院に進み、合成化学を専攻したが、天然物で鍛えた分離のテクニックが大いに役立ち、合成した化合物を効率的に単離精製することができた。

最初の就職先である化粧品会社では、天然由来の界面活性剤の開発に携わり、各種植物からイオン交換樹脂を用いてトリテルペン配糖体を分離精製した。転職した化学会社では、構造活性相関を用いた抗菌剤の開発に従事した。合成の傍ら、化合物のオクタノール/水分配係数 $\log P_{ow}$ とHPLC保持時間との相関性に興味を持ち、HPLCの分析にのめり込んだ。

ビール会社に移り、酵母を用いた立体選択的変換反応に着手し、キラルカラムクロマトグラフィーを用いた光学異性体の分離分析に没頭した。本研究を酵母代謝物の研究に進展させ、ビール醸造中の香気成分の変化を、GC/MSを用いて解析した。その後、工場で品質管理部長を2年間経験し、HPLCやGCを用いたビール製品の品質管理分析法を構築した。

② 食の安全とLC-MS/MS

2000年に工場から研究所に戻ったが、当時は食品の安全性の問題が、世の中で大きな注目を集めていた。食の安全性を検証する分析は、デリケートな部分が多く、最先端かつオーソライズされた分析手法を用いる必要がある。こうした課題に

対応するため、LC-MS/MSを分析に取り入れた。LC-MS/MSは、2段階の m/z 選択で高い選択性が確保できる為、分析種を誘導体化することなく、食品の複雑なマトリクスから目的とする物質を分析することができる。最初のターゲットは、環境ホルモン（内分泌かく乱物質）のビスフェノールAであった。分析の前処理には、固相担体を充填したカートリッジカラムを用いた。こうした固相カートリッジを用いることで、多検体を迅速に処理することが可能となり、夾雑物を除くことでLC-MS/MS分析におけるイオンサプレッションを防いだ。

2006年に残留農薬等のポジティブリスト制度が施行され、LC-MS/MSの食品分析への活用に拍車が掛かった。食品の残留農薬分析では、何百種類の農薬を一斉に分析することが求められる。前処理には、操作が簡易であるQuEChERS法を用いた。

③ HPLCカラムの進歩

食品分析におけるLC-MS/MSの活用と共に、高速・高分離のニーズが高まり、高耐圧形HPLCであるUHPLCが広く用いられるようになった。UHPLCの普及は、分析時間の短縮だけでなく、使用する溶媒量の削減にも大いに貢献した。使用するカラム充填剤の微粒子化に伴い、ODSカラムのエンドキャッピング技術や、カラム充填精度が改良され、カラムの品質は格段に向上した。更に、ODS以外の種類のカラムも数多く開発された。

2008年には、中国の粉ミルクにメラミンが混入される事件が起こった。このメラミンのLC-MS/MSによる分析では、水溶性化合物の分析に適するHILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) を用いた。HILICは、移動相の有機溶媒比率が高い為、MSの感度を高められるという利点が挙げられる。HILICを用いた分析を水溶性のヒスタミン等の芳香族アミンや、Trp-P-1等の発癌性ヘテロサイクリックアミンの分析に展開した。

④ マイコトキシンの分析

マイコトキシン（カビ毒）は、カビが生産する2次代謝産物であり、健康被害をひき起こすことが問題となっている。アフラトキシンは*Aspergillus*属菌により産生され、ナッツや穀物を汚

染し、強い発癌毒性を有する。アフラトキシン関連物質の一斉分析では、従来は誘導体化してHPLC-FLで分析が行われていたが、LC-MS/MSを用いることで、誘導体化なしに分析することが可能となった。

フモニシンは、*Fusarium*属菌が産生するカビ毒であり、世界中のトウモロコシを汚染し、食道癌の原因物質として注目されている。フモニシンのLC-MS/MSを用いた分析では、キャリアオーバーが問題視された。その原因は、HPLC流路内におけるフモニシンの金属部分への吸着であった。対策として、オートサンプラーのニードル部の洗浄工程の最適化と、金属フリーカラムの使用が有効であった。

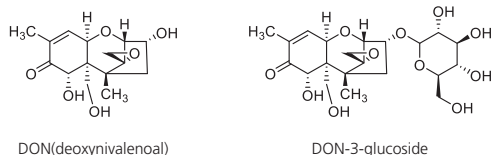
マイコトキシンの分析には、化合物の特徴に合わせて、特殊なカラムを活用した。ゼアラレノンは、*Fusarium*属菌が産生するカビ毒で、女性ホルモン作用を有している。ゼアラレノン誘導体の一斉分析では、フェニル基結合形カラムを用いた。フェニル基結合形カラムは、ゼアラレノンの様な芳香環を有する化合物に対して、高い分離能を示した。

トリコテセン系カビ毒は、*Fusarium*属菌が産生するカビ毒で、麦類を汚染し、消化器系や免疫機能に毒性を示す。トリコテセン系カビ毒の一斉分析には、ペンタフルオロフェニル(PFP)基結合形カラムを用いた。PFP基結合形カラムは、3-acetyldeoxynivalenol (3-acetylDON) と 15-acetylDON の位置異性体の分離に対して、十分な効果を発揮した。

⑤ 現在の課題

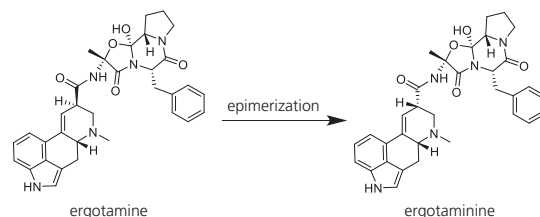
大学では、次の様な課題に取り組んでいる。カビ毒に関しては、一般財団法人日本食品検査と共同で、研究を進めている。

昨今、カビ毒の研究分野では、モディファイドマイコトキシンが大きな話題となっている。トリコテセン系カビ毒のDONは、植物体内で配糖体(DON-3-glucoside)のモディファイドマイコトキシンに変換されることが報告された。それらの配糖体は、人体に取り入れられると加水分解され毒性を発揮することが示唆されている。現在、配糖体を含めた一斉分析を構築している。

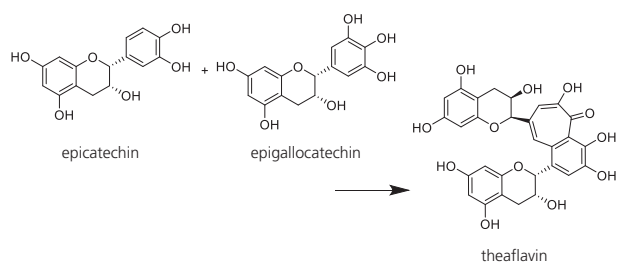


麦角は、麦角菌 (*Claviceps* 属菌) が産生する菌核で、ライ

麦や小麦に寄生し、麦角アルカロイドを産生する。中毒症状として、精神錯乱や四肢末端の壊疽等が知られており、食品衛生上も注目すべきカビ毒である。麦角アルカロイドの代表的な化合物として、エルゴタミン (ergotamine) が挙げられる。これは、環状トリペプチド由来のN末端アミノ基が、リセルグ酸とアミド結合した化合物である。エルゴタミンは、抽出工程で一部がエピ化を起こし、エピマーに変換される。麦角アルカロイドの一斉分析法開発の一環として、前処理でエピ化を起こさせない分析法の構築を検討している。



身近な食品の化学として、日常的な嗜好品の茶類の成分分析に注目している。日本の伝統的な茶飲料には、抗酸化作用を示すカテキン類が豊富に含まれている。カテキン類は、フラバン-3-オール骨格を持つフラボノイド類の総称である。茶を発酵(酸化)させて作られる紅茶には、カテコール型カテキン(epicatechin)と、ピロガロール型カテキン(epigallocatechin)が酸化的縮合したテアフラビン(theaflavin)が含有されている。テアフラビンは、部分構造に特徴的な7員環トロポロン構造を有し、化学的に興味深い化合物である。現在、テアフラビン類及びカテキン類に関して、LC-MS/MSを用いた一斉分析法の開発に取り組んでいる。



以上、LC-MS/MS技術の発展に伴い、食品分析の精度は著しく向上した。更に、LC-MS/MSを用いた分析の分野では、続々と新しい技術が開発されている。日常の分析法を見直し、新しい技術を取り入れることで、より正確な食品の分析が可能となる。特に、食品を有機化学的な視点から考察し、食品分析を行うことが重要である。

執筆者紹介

東京薬科大学大学院博士課程前期修了後、鐘紡(株)化粧品研究所、日本ゼオン(株)生物科学研究所、アサヒビール(株)中央研究所、同酒類研究所醸造科学部課長、同福島工場品質管理部長、同分析化学研究所食の安全評価部長、アサヒグループホールディングス(株)理事食の安全研究所長を経て、定年退職後、横浜薬科大学教授。

専門分野

食品有機化学

将来の夢

文楽鑑賞、映画鑑賞

趣味

食品を有機化学で大いに語ること

Applications

米国薬局方に準拠したメロキシカムの分析

グローバルアプリケーション開発センター
吉岡 拓哉

メロキシカム（図1）はプロスタグランジン合成阻害活性を有し、関節炎などの消炎・鎮痛に用いられています。米国薬局方（USP）¹⁾では、メロキシカムの試験法として、紫外可視吸光度検出器を用いたHPLC法が採用されています。

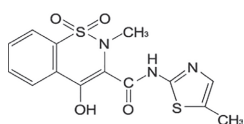


図1 メロキシカム

ここでは、“Nexera XR”によるUSPに準拠したメロキシカムの分析例とワークステーションLabSolutionsの“ACTO (Analytical Condition Transfer and Optimization) 機能”を用いたグラジエント遅れの補正例をご紹介します。

1. システム適合性試験（定量法）

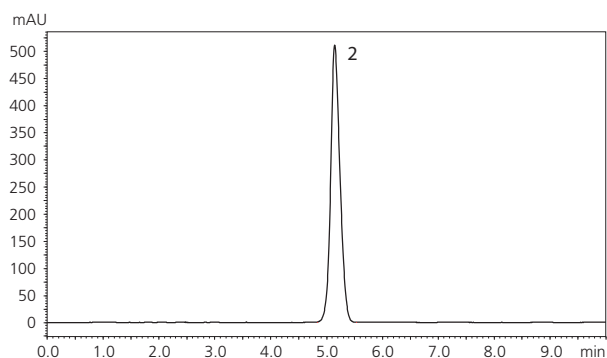
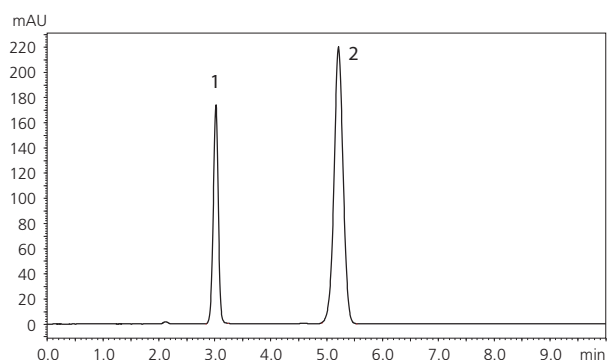
メロキシカムのシステム適合性試験（定量法）における溶液調製法を表1に示します。また、本法に準じた分析条件を表2に、システム適合性試験結果のクロマトグラムを図2に示します。

表1 溶液調製法（定量法）

- 溶液 A：
0.1 % (w/v) 酢酸アンモニウム水溶液を 10 % アンモニア水にて pH 9.1 に調整
- 希釈液：
メタノール：1 N 水酸化ナトリウム = 250：1
- システム適合性試験溶液：
0.08 mg/mL メロキシカム、メロキシカム類縁物質 A* 溶液
… フラスコ容量の半量のメタノールにて化合物を溶解し、希釈液にて定容
※ Isopropyl-4-hydroxyl-2-methyl-2H-1, 2-benzothiazine-3-carboxylate-1, 1-dioxide
- 標準液：
0.2 mg/mL メロキシカム溶液
… フラスコ容量の半量のメタノールにて化合物を溶解し、希釈液にて定容

表2 分析条件（定量法）

装置：Nexera XR
カラム：Shim-pack GIST C18
(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、5 μm)
移動相：メタノール/溶液 A = 21/29
流量：1.0 mL/min
温度：45 °C
検出器：フォトダイオードアレイ検出器 360 nm
注入量：10 μL



1. メロキシカム類縁物質 A、2. メロキシカム

図2 システム適合性試験（定量法）のクロマトグラム
(上段：システム適合性試験溶液、下段：標準液)

システム適合性試験の基準値および今回の結果を表3に示します。メロキシカム類縁物質Aとメロキシカムの相対保持時間は0.6で、参考値の0.7に近い値でした。また、全ての項目においてシステム適合性試験を満たしていることが分かりました。

表3 システム適合性試験の基準値および結果（定量法）

	基準	結果	判定
メロキシカムとメロキシカム類縁物質Aの分離度	≥ 3.0	9.37	合格
シンメトリー係数*	≤ 2.0	1.14	合格
ピーク面積の相対標準偏差 (n=6)	≤ 2.0 %	0.046 %	合格

※ テーリング係数

2. システム適合性試験（不純物分析）

メロキシカムのシステム適合性試験（不純物分析）における溶液調整法を表4に示します。また、本法に準じた分析条件を表5に、システム適合性試験結果のクロマトグラムを図3に示します。

システム適合性試験の基準値および今回の結果を表6に示します。メロキシカム類縁物質Bおよびメロキシカム類縁物質Aとメロキシカムの相対保持時間はそれぞれ0.5、1.3で、参考値の0.4、1.4に近い値でした。また、全ての項目においてシステム適合性試験を満たしていることが分かりました。

表4 溶液調製法（不純物分析）

溶液A：
0.1 % (w/v) リン酸二水素カリウム水溶液を1 N 水酸化ナトリウムにてpH 6.0に調整

希釈液：
メタノール：1 N 水酸化ナトリウム = 50 : 3

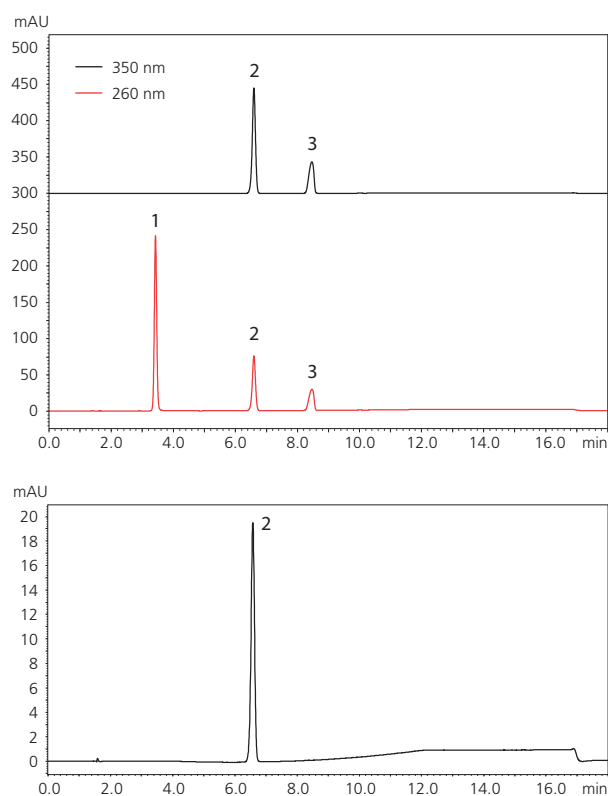
システム適合性試験溶液：
0.08 mg/mL メロキシカム、メロキシカム類縁物質A、メロキシカム類縁物質B*溶液
… フラスコ容量の10 %の希釈液にて化合物を溶解し、メタノールにて定容
※ 2-Amino-5-methyl-thiazole

標準原液：
0.6 mg/mL メロキシカム溶液
… フラスコ容量の25%の希釈液にて化合物を溶解し、メタノールにて定容

標準液：
0.012 mg/mL メロキシカム溶液
… 標準原液をメタノールにて50倍に希釈

表5 分析条件（不純物分析）

装置：Nexera XR
カラム：Shim-pack GIST C18
(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、5 μm)
移動相：A) 溶液A
B) メタノール
グラジエント溶離
B濃度 40 % (0 min) → 40 % (2 min)
→ 70 % (10 min) → 70 % (15 min)
→ 40 % (15.01 min) → 40 % (18 min)
流量：1.0 mL/min
温度：45 °C
検出器：フォトダイオードアレイ検出器 350 nm、260 nm
注入量：5 μL



1. メロキシカム類縁物質B、2. メロキシカム
3. メロキシカム類縁物質A

図3 システム適合性試験（不純物分析）のクロマトグラム
(上段：システム適合性試験溶液、下段：標準液)

表6 システム適合性試験結果（不純物分析）

	基準	結果	判定
メロキシカムとメロキシカム類縁物質Aの分離度	≥ 3.0	7.18	合格
メロキシカムとメロキシカム類縁物質Bの分離度	≥ 3.0	17.6	合格
ピーク面積の相対標準偏差 (n=6)	≤ 10 %	0.30 %	合格

3. ACTO 機能によるグラジエント遅れの補正

グラジエント分析において、機種間によるグラジエント遅れ容量の違いから、クロマトグラムに差が生じる場合がありますが知られています。

図4に、Nexera XR (ミキサー容量 180 μ L) と Prominence (ミキサー容量 0.5、1.6、2.7 mL) を用いてシステム適合性試験溶液 (不純物分析) を分析した際のクロマトグラム (260 nm) の比較を示します。システムの違いによって溶出時間が変化することが分かります。このような場合、ACTO 機能を用いてグラジエント開始タイミングを調整することにより、配管やミキサーなどの部品を交換することなくスムーズなメソッド移管が可能になります。

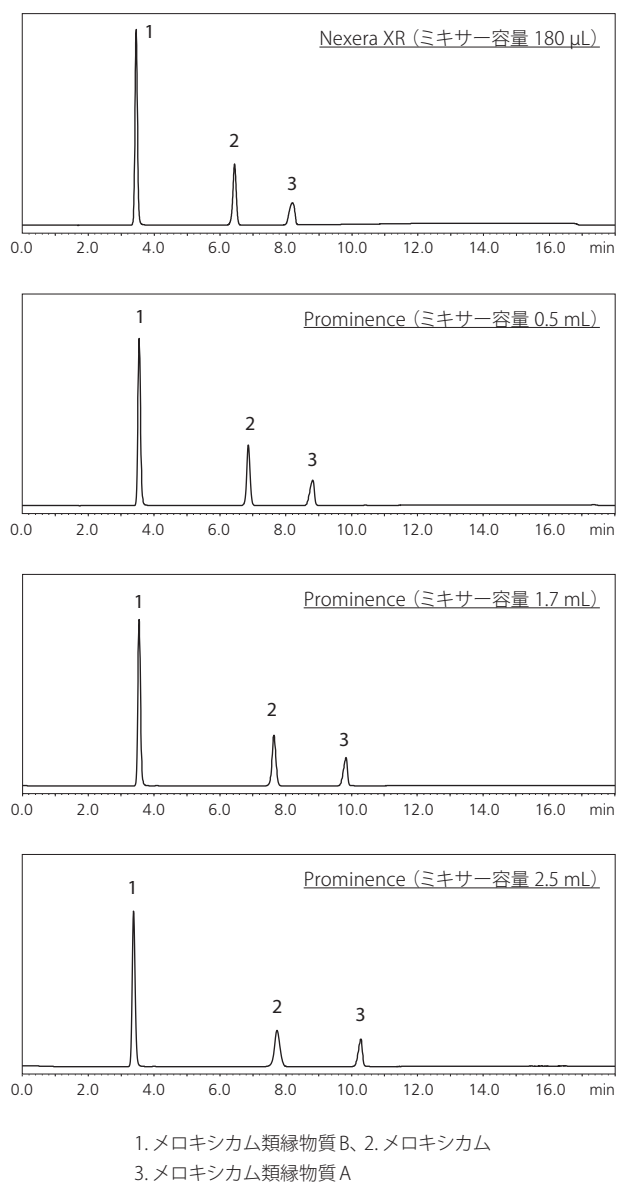


図4 Nexera XRとProminenceとのクロマトグラム比較

図5に、ProminenceとACTO機能を利用したNexera XRによる互換性確認の結果を示します。この結果から、ACTO機能を用いることにより、異なる機種間でも同様のクロマトグラムが得られることが分かります。

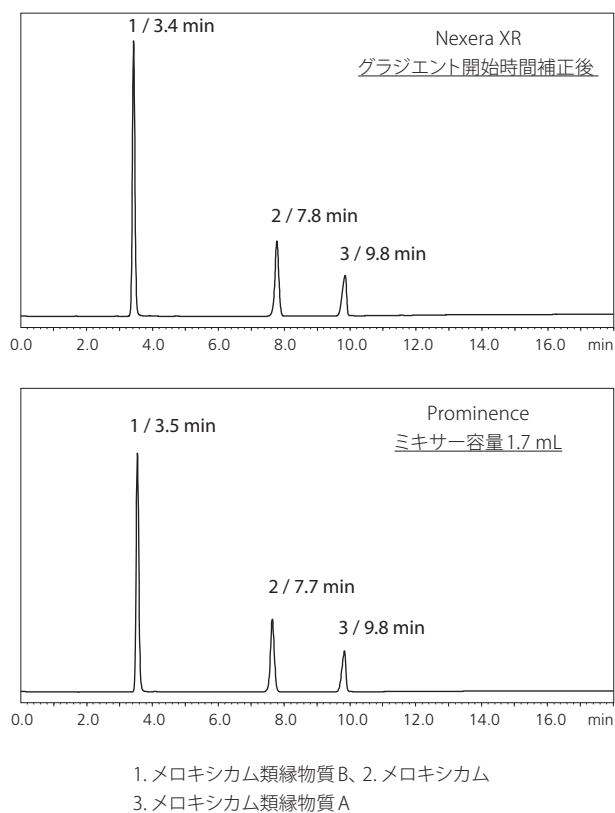


図5 ACTO 機能による遅れ容量の補正

4. まとめ

Nexera XRを用いたUSPに準拠したメロキシカムの分析例をご紹介しました。グラジエント遅れ容量異なる既存のシステムで分析をされている場合でも、ACTO機能を用いてグラジエント遅れ容量を補正することにより、配管やミキサーなどの部品を交換することなく従来と同様の分析を行うことが可能です。

参考文献

- 1) United States Pharmacopeia 40-NF 35 (2017)

Products

超高速液体クロマトグラフ

新 Nexera シリーズ (2)

… 卓越した性能を実現する新技術

LCビジネスユニット

渡邊 京子

2019年3月に発表した島津の新しいUHPLC「Nexeraシリーズ」は、卓越した装置性能と新しい概念の分析業務の支援機能「Analytical Intelligence」を機軸に誕生しました。本誌Vol.108では、Nexeraの開発背景と「Analytical Intelligence」についてご紹介しました。今号ではNexeraの卓越した装置性能とこれを支えるハードウェアの新技術についてご紹介します。



1. 島津製作所のLCの歴史と開発精神

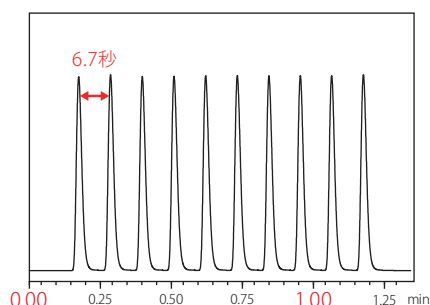
前号で述べましたように、島津最初のオリジナルLC製品「LC-3A」が誕生したのは1978年のことです。1984年には、送液ポンプ・オートサンプリング・カラムオープン・検出器を独立したユニットで構成し、これをコントローラで制御する世界初のモジュラータイプHPLCシステム「LC-6Aシリーズ」を開発しました。次いで1997年発表のLC-VPシリーズからは、当時普及しはじめたLC/MSシステムのフロントLCとしての性能追求へと進展させました。2004年のProminence、2010年のNexeraはあらゆる用途において感度、安定性、頑健性などの最高の装置性能が提供できるように、微細な部分にも妥協せず工夫を凝らした設計を追求し続けました。島津にとって、ハードウェアの性能向上とそのための新技術の開発・探求は、もはやDNAであると言っても過言ではありません。

新Nexeraシリーズにも、最高の性能を追求する島津の開発精神が受け継がれています。今号では、Nexeraシリーズの新しいオートサンプリングSIL-40シリーズと、フォトダイオードアレイ検出器SPD-M40の卓越した性能を実現した新技術をご紹介します。

2. 進化したオートサンプリングの機能群

● 超高速注入

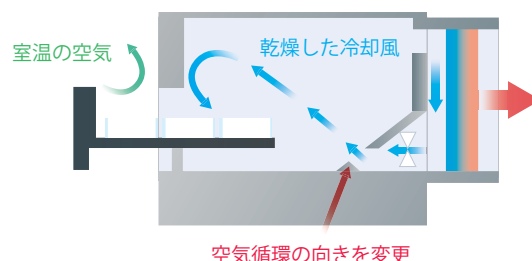
超高速分析やスクリーニングにおいて、オートサンプリングの注入速度を最大化することは重要なことです。SIL-40シリーズのオートサンプリングは、注入速度を従来比2倍の最高6.7秒にまで改善、多検体分析の効率化を支援します。



1分間に8回注入を実現（カフェイン）

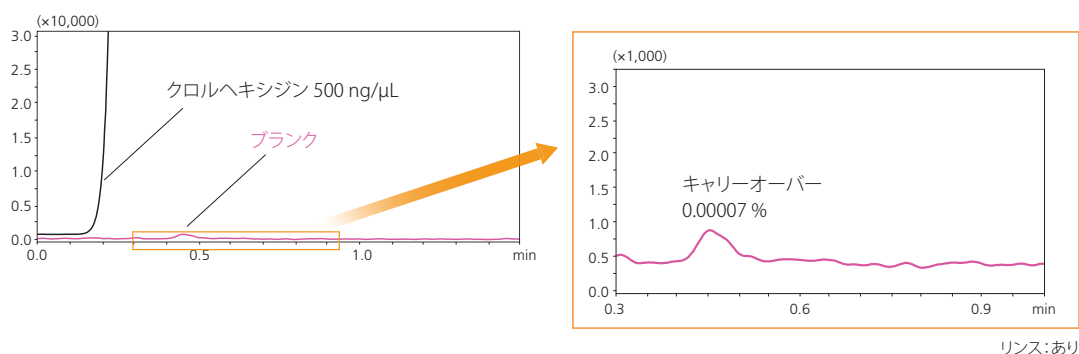
● 新しい冷却方式により結露フリーに

SIL-40シリーズのオートサンプリングは、冷却方法を従来方針から大きく変更しました。“Dry air flow control機構”（特許出願中）により、オートサンプリング内部には設定温度の乾燥空気が循環しており、試料バイアルやプレートを一様に冷却し、さらに結露水の発生がありません。また、独自の設計でラック引出時に外気の侵入を防ぎ、温度変化や結露発生を防ぎます。



● 超高感度分析の定量精度向上：極低キャリアオーバー

従来より島津製作所のオートサンプラは、優れた低キャリアオーバー性能でお客様のご支持をいただけてきました。SIL-40シリーズのオートサンプラは、これまでのキャリアオーバー低減技術の継承に加え、注入部分周辺のゼロデッドボリューム化を極め、キャリアオーバーのさらなる抑制に成功しました。



リンス：あり

3. 定量精度向上のためのフォトダイオードアレイ検出器の新技術

● 室温変動の影響を排除した安定したベースライン

SPD-M40に搭載されたフローセル、分光器、光源ランプの三重温調機構“Advanced TC-Optics”により、室温変動があっても安定なベースラインを得られます。エアコンや出入口、窓の付近など、室温が安定しにくい環境においても再現性の良い分析が可能となり、設置環境の心配がなくなります。



SPD-M40には、2.5 AUまで拡張されたダイナミックレンジや、光安定性のない化合物の光分解を防ぐUVカットオフフィルタなど、定量精度を向上させる新機能が多数搭載されています。詳細は、本誌「TEC」の頁をご参照ください。

Nexeraシリーズは、島津の40年以上に渡るLC開発の歴史において蓄積された技術を継承し、さらに新たに開発された技術を搭載して、これまでにない卓越した基礎性能で分析データの信頼性を確保します。それだけでなく、設置環境を選ばない安定性能、またMSフロントに適した特長など、幅広い用途に合わせ柔軟に対応します。

前号でご紹介しました「Analytical Intelligence」による自動化支援と併せ、Nexeraシリーズは皆様の分析業務の信頼性確保と効率化推進に貢献します。

詳細は・・・、[Nexeraseries.com](https://www.nexeraseries.com)



TEC

フォトダイオードアレイによる定量性の向上 (新Nexeraシリーズ… SPD-M40)

LCビジネスユニット
渡邊 真人、寺田 英敏

フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) は、その原理上、主に以下3点の課題があります。

- 1) 室温変動の影響を受けやすい
- 2) ダイナミックレンジが狭い
- 3) 試料が光分解することがある

新Nexeraシリーズの“SPD-M40”では、これらの課題解決のため、検出器セルや分光器に加えて光源ランプも温調する三重温調の採用、試料の光分解を防止するためのUVカットフィルターの内蔵といった対策を講じ、定量性能をさらに向上させています。

本稿では、フォトダイオードアレイ検出器の定量性向上に向けた技術について解説します。

1. 室温変動の影響を排除

● SPD-M40の温調方式

SPD-M40では、従来製品 (SPD-M20A) で実施していたセル温調に加え、周囲の温度変動の影響を受ける光源ランプと分光器についても個別に温調する三重温度調節機能“Advanced TC-Optics”を採用しました (前項参照)。

各部を温調することで得られる効果を表1にまとめます。いずれの効果も周囲温度変動に伴う検出器の吸光度変動の低減に寄与し、仮に周囲温度が変動しても、安定したベースラインでHPLC分析を実施できます。

表1 温調箇所とその効果

	温調箇所	効果
①	光源ランプ	光源ランプの光量の安定化
②	セル	移動相や目的成分の温度変化による吸収スペクトルの変化を抑制
③	分光器	分光スペクトルのシフトによる吸光度変化を抑制

● 周囲温度の変動による定量性への影響

ベースライン変動の定量精度への影響を確認するため、周囲温度を5℃変動させながら試料を連続注入して繰り返し分析を行いました。分析条件を表2に、得られたクロマトグラムを図1に示します。

表2 分析条件

カラム : Shim-pack HRC-ODS (内径 3.0 mm、長さ 250mm)
 移動相 : 水/メタノール=3/7 (v/v)
 流量 : 0.2 mL/min
 温度 : 40℃
 検出器 : SPD-M40 273 nm
 セル温度 : 40℃
 試料 : 5 mg/L カフェイン
 注入量 : 1 μL
 周囲温度 : 20 ~ 25℃ (図1に記載)

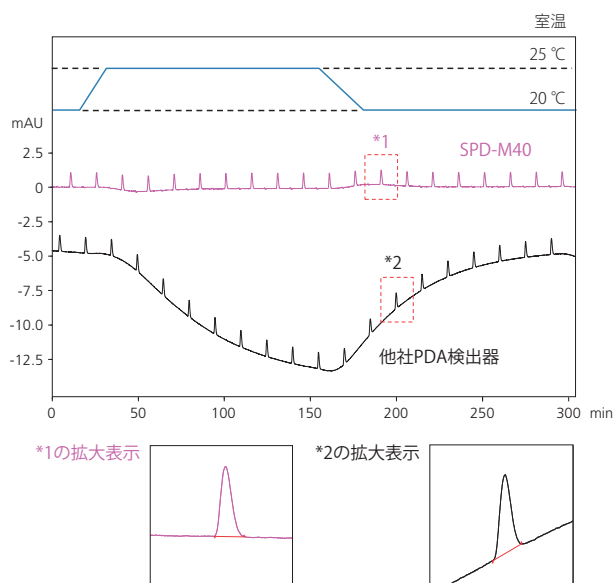


図1 周囲温度変化のピーク波形処理への影響

SPD-M40は安定したベースラインでピークを検出しますが、ベースライン変動が大きい場合はベースラインがドリフトした状態でピークを検出することになります。

表3に、ピーク面積再現性を示します。SPD-M40では安定したベースラインが正確な波形処理が可能であり、良好な再現性が得られます。

表3 周囲温度変動時のピーク面積再現性

	SPD-M40	他社PDA
ピーク面積再現性 (%RSD, n=20)	0.62	1.87

2. ダイナミックレンジの拡大

● 吸光度検出器とPDA検出器の原理

吸光度検出器は、光源からの光を分光し特定波長だけをフローセルに照射して目的成分の吸光度を測定します。一方、PDA検出器では様々な波長を含む光源からの光（白色光）をそのままフローセルに照射し、フローセル通過後分光し検出を行います。図2に、吸光度検出器とPDA検出器の測定原理を示します。

PDA検出器は、目的成分の吸光度と吸収スペクトルの両方を同時に測定でき、分析の定性的な情報だけではなく、吸光度から検量線を作成して定量用途にも使用することが可能です。しかし、通常の吸光度検出器と比べ、別波長の光の周り込みなどで迷光が発生しやすく、それが直線性を悪化させてしまいます。

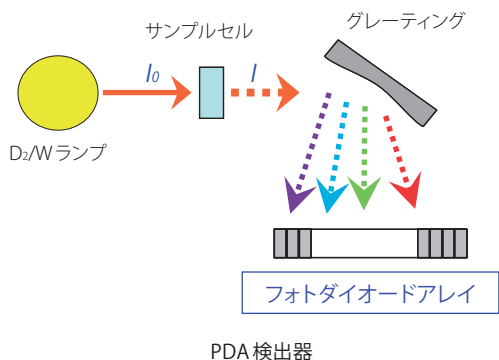
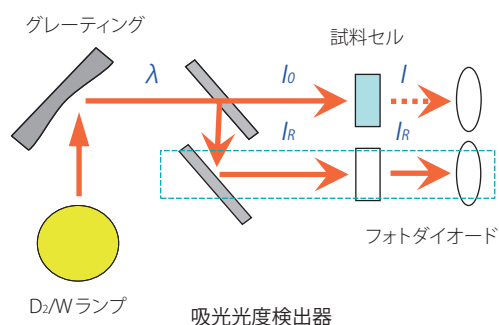


図2 吸光度検出器とPDA検出器の測定原理

● 吸光度に対する迷光の影響

一般的に吸光度は、ランベルトベールの法則に基づきフローセルへの入射光の強度と試料セル透過光の強度を用いて以下の式で表現されます。

$$A = -\log \frac{I}{I_0}$$

A : 吸光度
I : リアルタイムのフローセル透過光強度
I₀ : フローセル入射光強度

もし指定波長以外の光が検出部（フォトダイオードやフォトダイオードアレイ）に入ると、正しい吸光度の測定ができません。このような検出時に意図しない光を一般に「迷光（stray light）」と呼びます。迷光による影響を考慮すると、吸光度は以下の式で表されます。

$$A = -\log \frac{I + \Delta}{I_0 + \Delta}$$

Δ : 迷光強度

フローセルでの吸光度が高い領域ではセルからの透過光強度が小さくなり、上記の式において迷光強度Δの影響が大きくなるため、迷光の影響がより顕著に現れます。図3では、入射光に対する迷光強度の比率を0～0.5%まで変化させて、迷光の吸光度への影響を確認しています。迷光強度が大きくなると算出される吸光度は理想値よりも小さくなり、特に2 AUを超える領域で直線性に影響を与えていることが分かります。

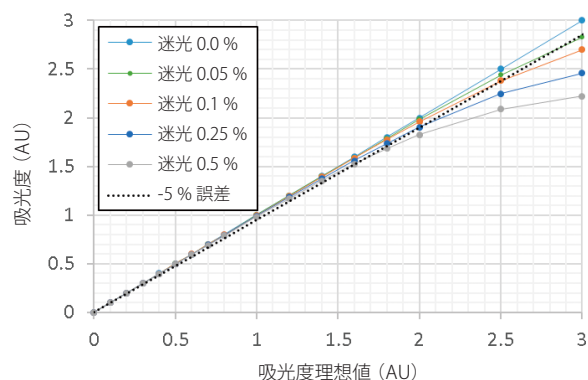


図3 迷光の吸光度直線性への影響

● 迷光発生要因と低減

迷光の発生原因には、光学素子の汚れによる光の反射や散乱、分光器内部での光の反射や散乱、グレーティングでの想定外の光の反射や分散などが挙げられます。特にPDA検出器では、ランプからの白色光をセルに照射し透過光を分光し検出するため、一般的に吸光度検出器よりも迷光が大きくなる傾向があります。SPD-M40は、これらの迷光要因を排除する設計で迷光量を従来の3分の1以下に低減することで、PDA検出器でありながら吸光度検出器と同等の直線性仕様値2.5 AU（実力値はそれ以上）を実現しました。

● ノイズの低減

吸光度の直線性上限を決める要素は、前述の迷光が支配的です。一方で下限を決めるのは、検出器レスポンスのノイズになります。SPD-M40は電気系の改良などにより、ノイズ低減を図りました。図4は、従来機との検出器ノイズ比較を示しています。特に時定数が小さい場合、大幅にノイズ値を低減できていることが分かります。

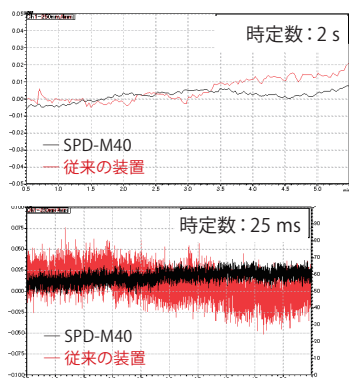


図4 従来機との検出器ノイズの比較

● ダイナミックレンジの向上

図5に、ピーク高さが約2.5 AUとなるように分析条件と濃度を調整したケトプロフェン標準液のクロマトグラムを、図6に0.5 ~ 800 mg/Lの広い濃度範囲内における検量線を示します。

SPD-M40では直線性の仕様値は2.5 AUですが、実力的にはそれ以上の直線性が得られています。より低ノイズを実現したことにより、高濃度主成分と1 mAU以下の微量不純物を高精度に同時分析することが可能になりました。面積百分率で含有量が0.1 % 程度の不純物成分ピークについても面積変動係数は1 % 以下となり、良好な再現性が得られました。

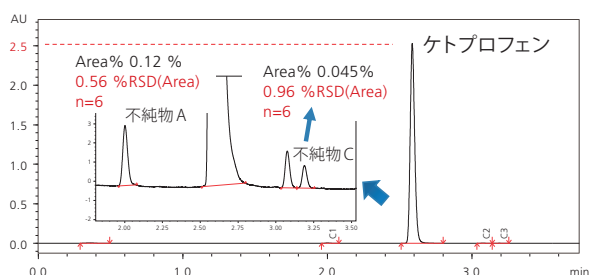


図5 ケトプロフェンと不純物の分析

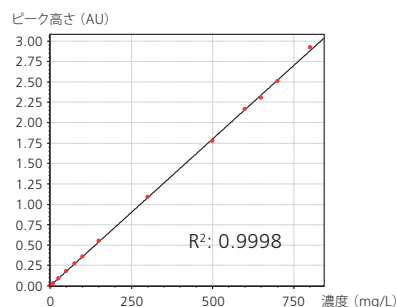


図6 ケトプロフェンの直線性

検出過程で発生する迷光は、直線性範囲条件に大きく影響を与えます。SPD-M40は、迷光の影響を徹底的に軽減する設計を行い、広い直線性範囲を実現しました。低ノイズ化も合わせて実現することで、低濃度から高濃度まで幅広い濃度範囲の分析に有効となりました。

3. 試料の光分解を防止

イブプロフェンは非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs) の一種で、解熱や鎮痛剤として広く使用されていますが、貯蔵時の安定性試験において温度や酸化、光照射などで分解物を生じる事が報告されています。例えば、4-イソブチルアセトフェンにおいては、面積百分率が加速試験前は10 %以下であったのに対し、72時間の光照射加速試験後は約40 %に増加したことが示されています¹⁾。イブプロフェンのように光分解しやすい化合物をより正確に定量するため、紫外領域の光を除くUVカットオフフィルタを標準装備しました。

※ 全ての成分に対しUVカットオフフィルタが有効という訳ではありません。

● UVカットオフフィルタについて

PDA検出器は、紫外線領域を含む白色光を試料セルに照射し、その透過光を分光して特定の波長の吸光度を測定するため、エネルギーの大きな短波長のUV光も照射されます。

図7に、UVカットオフフィルタを使用しない場合のフローセル内のイメージを示します。イブプロフェンのような光分解性を有する化合物は、UV光の照射によって光分解物を生じることがあります。

図8に、UVカットオフフィルタを使用した場合のフローセル内のイメージを示します。エネルギーの大きな短波長UV光はフローセルに照射されないため、目的成分の分解を予め抑制することができます。

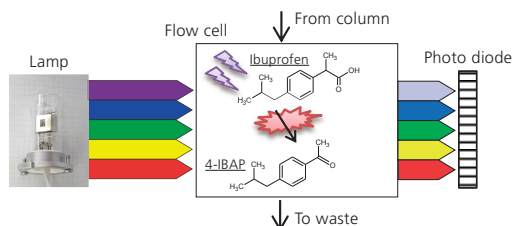


図7 UVカットオフフィルタを使用しない場合のフローセル

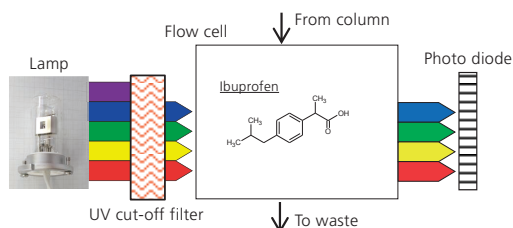


図8 UVカットオフフィルタを使用した場合のフローセル

● UVカットオフフィルタによる定量性への影響

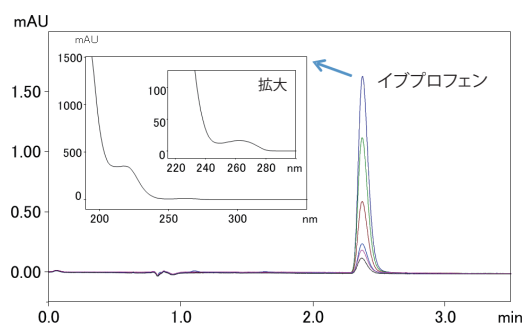
イブプロフェン標準溶液を用いてUVカットオフフィルタの有無による定量性への影響を検証しました。表4に、分析条件を示します。

表4 分析条件

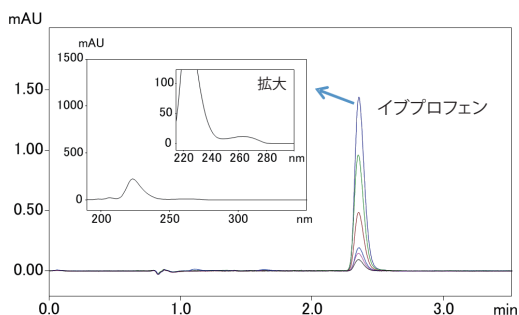
カラム : Shim-pack Velox C18
(内径 3 mm、長さ 100 mm、2.7 μ m)
移動相 : 0.1 % 塩酸水溶液/アセトニトリル=2/3 (v/v)
流量 : 0.4 mL/min
温度 : 40°C
波長 : SPD-40 264 nm (190 – 400 nm)
注入量 : 10 μ L

① イブプロフェンのUV吸収スペクトルの比較

イブプロフェン標準液を分析した紫外吸収スペクトルを図9に示します。UVカットオフフィルタを使用することにより、240 nm以下の短波長紫外光が大幅に低減されていることが確認されました。



UVカットオフフィルタ未使用時



UVカットオフフィルタ使用時

図9 イブプロフェン標準液のクロマトグラムと紫外吸収スペクトルの比較

② 直線性の比較

イブプロフェン標準液 (5 ~ 75 mg/L) について、UVカットオフフィルタ無しの検量線と誤差率を図10に、UVカットオフフィルタ有りの検量線と誤差率を図11に示します。これら結果の比較から、低濃度領域において吸光係数の大きな分解物の影響を受けていることが考えられます。

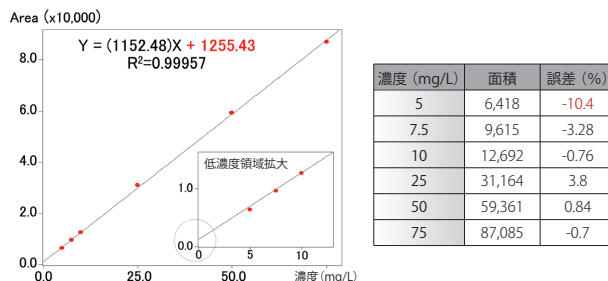


図10 UVカットオフフィルタ無しの検量線と誤差率

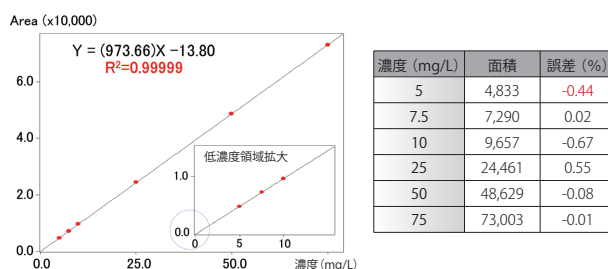


図11 UVカットオフフィルタ有りの検量線と誤差率

UVカットオフフィルタを光分解性化合物であるイブプロフェンの定量分析に適用することにより、幅広い濃度での検量線で良好な直線性を得られることが示されました。

4. まとめ

- Advanced TC-Optics による安定なベースラインが波形処理の精度を向上させ、ピーク面積の確度と精度が向上します。
- ダイナミックレンジの拡大により、より低濃度から高濃度まで幅広い濃度範囲の分析が可能となりました。
- UVカットオフフィルタは、短波長UV光で分解しやすい成分の定量分析に非常に有効です。

参考文献

- 1) S. Farmer et al., "Forced Degradation of Ibuprofen in Bulk Drug and Tablets and Determination of Specificity, Selectivity, and the Stability Indicating Nature of the USP Ibuprofen Assay Method", *Pharmaceutical Technology North America*, 26 (5), 28-42 (May 2002)