

LC *talk*

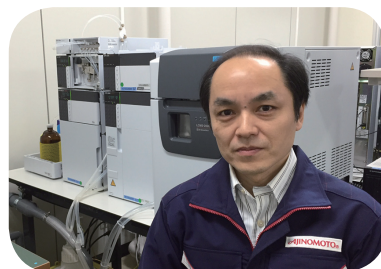
VOL. **97**



2016 *April*

新規アミノ酸分析技術で切り拓く 「アミノインデックス技術」の臨床応用

味の素株式会社
イノベーション研究所
水越 利巳



■本稿では、血漿中の遊離アミノ酸（単独のアミノ酸分子）の濃度バランスにより、身体の状態を統計的に解析・指標化する「アミノインデックス技術」と、この技術を事業化するにあたり必須であった、新規なアミノ酸分析技術について紹介します。

■ご存知のように、アミノ酸は「アミノ基」と「カルボキシル基」の両方を有する化合物の総称です。私たちの身体の20%はアミノ酸で構成されており、その殆どはタンパク質として存在します。そのタンパク質の約0.01%は遊離アミノ酸として細胞内や血漿中などに存在し、「アミノ酸プール」とよばれています。食べ物から摂取したアミノ酸は「アミノ酸プール」に蓄えられ、タンパク質の合成や、分解、尿などからの排泄などを通じて常に平衡状態にあり、健康な人の血漿中アミノ酸濃度は恒常性により一定濃度に保たれています。一方、がんや糖代謝異常、肝臓疾患などの患者さんでは体内のアミノ酸代謝が変化し、その影響で血漿中のアミノ酸濃度バランスが変化することが古くから知られていました。しかしながら多くの場合、アミノ酸濃度の変化はダイナミックではなく、単独のアミノ酸濃度の観測だけでは疾患の判別が不十分でした。それ故、アミノ酸分析の臨床応用は一部の先天性代謝異常など、アミノ酸濃度の変化が大きい疾患などに限られていたと考えられます。

■「アミノインデックス技術」は上記の課題を解決するものとして期待しております。バイオインフォマティックス手法により、血漿中の複数のアミノ酸濃度を多変量解析して解析性能を向上させ、更に「アミノインデックス値」として疾病リスクをスコア化することができました^{1) 2)}。例として、がん患者と健康な人の血漿中アミノ酸濃度プロファイルの違いを車輪図に示しました（図1a）。健康人と比較した場合、がん種

ごとに濃度バランスの変化が異なり、一度の検査で複数のがんリスクが解析できる可能性が示されました。また、胃がんの進行度を例に、ステージIからIVまでの患者さんの血漿中アミノ酸プロファイルの変動を示しました（図1b）。がん進行の早い段階からアミノ酸濃度が変動する事がわかり、がんの早期発見への期待が高まっています。この「アミノインデックス技術」を臨床応用するにあたり、アミノ酸分析の分析時間に大きな課題がある事が分かりました。

■これまで臨床分野では信頼性の高いポストカラム誘導体化法（ニンヒドリン試薬とイオン交換カラムを用いるアミノ酸分析）が用いられてきましたが、血漿中に検出される全てのアミノ酸ピークを分離するためには約120分の分析時間が必要であり、検診などで多検体に対応するには課題がありました。そこで我々は、独自のアミノ酸誘導体化試薬と、検出器に質量分析計を用いた高感度・短時間アミノ酸分析法を開発しました³⁾。誘導体化試薬（3-aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate）によるプレカラム誘導体化反応でアミノ基を修飾し、逆相カラム上でのピーク分離を向上させることができました。また、質量分析計での検出により、カラムで分離できない成分も質量軸での分離が可能となり、分析時間を大幅に短縮することができました。更に本試薬によるアミノ酸誘導体はMS/MS分析で特異的なプロダクトイオンが生じるため、MRM（Multiple Reaction Monitoring）分析も可能です。約10分で100種類のアミノ酸を分離した例も報告しています。

■この新しいアミノ酸分析法を島津製作所様のご協力で、LC/MS高速アミノ酸分析システム（UF-AminoStation）として装置化していただきました。自動プレカラム誘導体化機能により煩雑な前処理がな

く、またユーザー視点で一緒に開発させていただいた AmiNavi[®] ソフトウェアも搭載しています。誘導体化試薬（アミノタグ[®] ワコー）や専用の溶離液、内標準混合溶液は全て和光純薬株式会社から販売していただき、血漿のみならず培地や食品等のサンプルでも、簡単にアミノ酸を分析が出来るようになりました。図2に38種類のアミノ酸を約8分で分離した例を示します。

■血漿中のアミノ酸分析を行うための前処理から分析までのプロトコルについては、既報では前処理法や検体保管法が明記されていない、血清や血漿の分析データが混在するなど、情報の信頼性のないものが数多く存在していました。そこで、採血後のアミノ酸の安定性の確認⁴⁾や、採血から除タンパク質操作までのプロトコル作成を行いました。更に、臨床化学のパリデーショニング指針を参考に、UF-Amino Stationを用いて血漿中の代表的な21種類のアミノ酸分析（分離に7分）を検証し、分析の信頼性が高い事も確かめています⁵⁾。定量下限値は0.39～7.55 μ M、検量線の相関係数は0.998以上、添加回収試験による正確度は96～103%，ニンヒドリン法によるアミノ酸分析値との相関は傾きが0.91～1.04、相関係数は0.96以上でした。

■以上のプロトコルを用い、大規模な人臨床研究（1890例の日本人基準個体（男性901例、女性989例

を使用）をもとに収集した、統計的に意味のある健康人の血漿中アミノ酸濃度の基準範囲を世界で初めて提唱し、論文文化しました⁶⁾。年齢や性別、BMIと血漿中アミノ酸濃度との関連も解析しています。論文文化に向けては、臨床化学会やアミノ酸学会のご協力もいただきました。

■古くから栄養学的にも注目されてきたアミノ酸ですが、近年のアミノ酸メタボロミクス研究の発展により多くの重要な役割が明らかになりつつあります。今回紹介させていただきました手法が一般化され、血中アミノ酸濃度の変動と健康状態との関連が一層明らかになっていけば、人々の健康な生活に役立てるものと期待しております。がんリスクにとどまらず、アミノ酸が大きく関与すると考えられる栄養状態の評価や、運動・美容のサポートなど、様々な領域にもチャレンジしたいと考えています。

参考文献

- 1) Miyagi, Y., *et al.*, *PLoS ONE*, e 0024143(2011).
- 2) Fukutake, N., *et al.*, *PLoS ONE*, e 0132223(2015).
- 3) Shimbo, K., *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 1483-1492(2009).
- 4) Takehana, S., *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, **455**, 68-74(2016).
- 5) Yoshida, H., Kondo, K., *et al.*, *J. Chromatogr. B*, **998**, 88-96(2015).
- 6) Yamamoto, H., *et al.*, *Ann. Clin. Biochem.*, Mar 31(2015), pii:0004563215583360. [掲載予定]

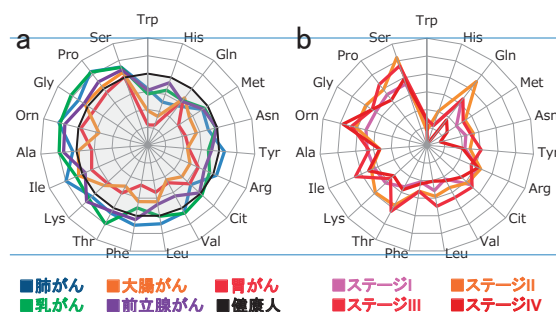


図1 a: 各種がん患者の血漿中アミノ酸プロファイルの変化（健康人に対するROC曲線下面積）
b: 胃がん患者（進行ステージI～IV）における血漿中アミノ酸プロファイルの変化

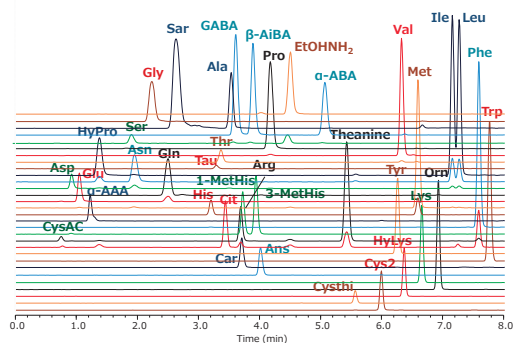
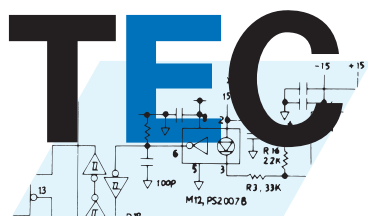


図2 プレカラム誘導体化LC-MS（SIM）法をもちいた代表的アミノ酸38成分の一斉分析例（アミノ酸略語は文献5参照）



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

●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。

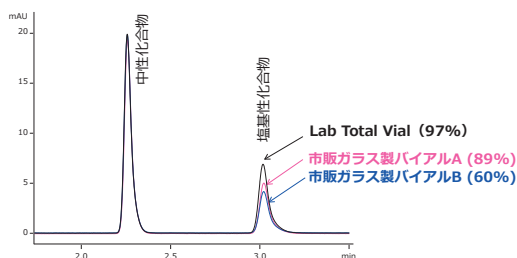


図1 LabTotal Vial の効果

●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

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*	アミロプチリン	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）

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。

●前編では、目的成分の物性に基じ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。

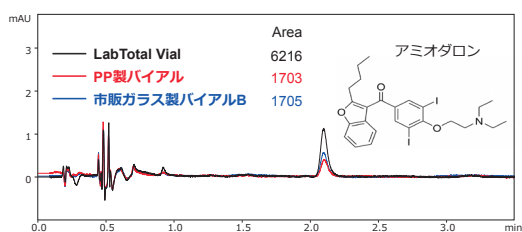


図2 アミオダロンによる比較クロマトグラム¹⁾

●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の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

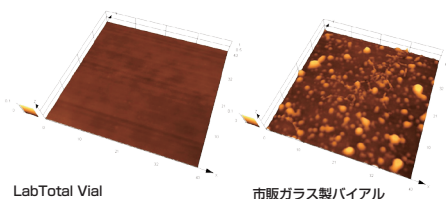


図3 ガラス表面観察の結果

バイアルの表面観察を行った結果を示す。

● 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の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の吸着を、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。

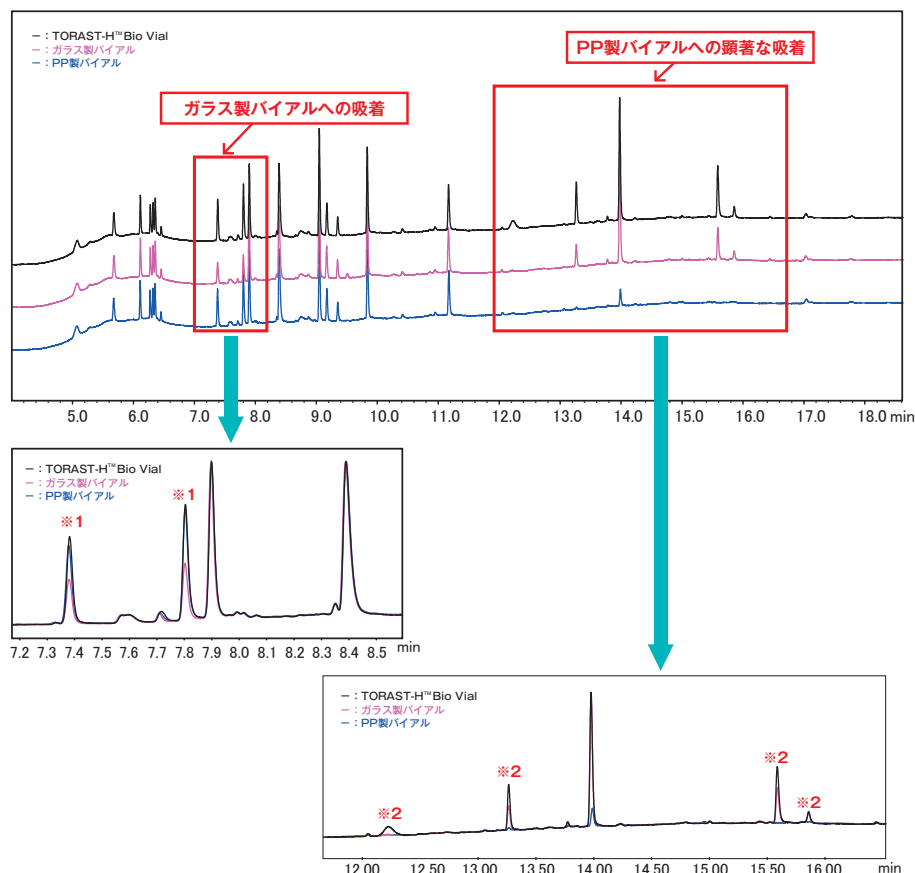
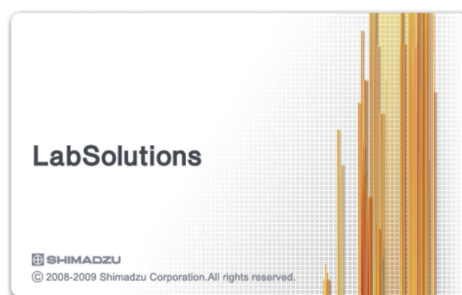
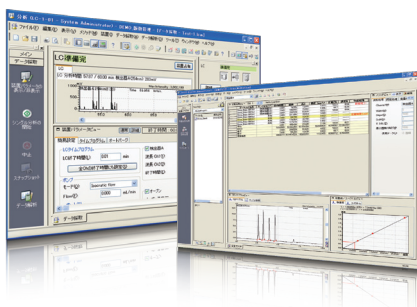


図4 ミオグロビンのトリプシン消化物による各バイアルの比較例

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



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。

その原因は、意図的であれ偶発的であれ、多くの場合は誤まった操作によって引き起こされていることから、分析データの信頼性を確保するためには、分析によって得られるデータの正確さに加え、分析結果を得るに至った手順などに誤りや不正が無いことを担保する必要があります。すなわち、試験結果と的確な分析操作ログ（操作記録）の確認が求められています。

LabSolutions DB/CS ver.6.50 * は、従来から実装されている高度なセキュリティ機能に加え、新搭載のレポートセット機能により、ソフトウェア操作の「見える化」を実現。分析ラボで求められる分析データの信頼性を確保するとともに、各種結果の確認業務に要する時間を 1/2 ～ 1/3 に短縮することができます。

今回は、LabSolutions レポートセットが実現する3つの特長についてご紹介します。

■ 特長1：一連の分析操作の「見える化」による確認作業の負担軽減と信頼性の確保

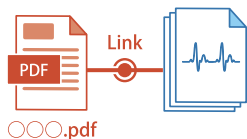


バッチ（連続分析）レポート、操作ログレポート、クロマトレポートなどの各種レポートは、新たに搭載されたレポートセット機能により、ひとつの PDF ファイルとして電子的に綴じられます。ここで、バッチレポートとは、実際に行われた一連の分析とその再解析を一覧表（リスト）に記した「分析の台帳」になります。また、操作ログレポートとは、分析作業の開始から終了までの操作（および再解析時の操作）を記録した「分析（および再解析）の PC 操作ログ」です。

レポートセットには、必要な情報がひとつの PDF ファイルとして綴じられていることから、一連の分析（および再解析）操作の「見える化」が可能となりました。また電子書籍と同じような感覚で、ページをめくりながら内容確認が行えるため、これまでのように、画面やタブをいくつも切り替えながら操作・設定の確認を行う必要がありません。

このように、レポートセットは、確認作業の負担軽減と信頼性の確保を実現しています。

■ 特長2：一連の分析結果は自動的に改ざん防止



「見える化」の対象となった一連の分析結果（電子データ）とレポートセットとの間には、電子的なリンクが生成されると共に分析結果は自動的に編集不可（ロック）の状態になります。これにより、分析結果の差し替えや破棄などの改ざんに対する抑制が可能になります。

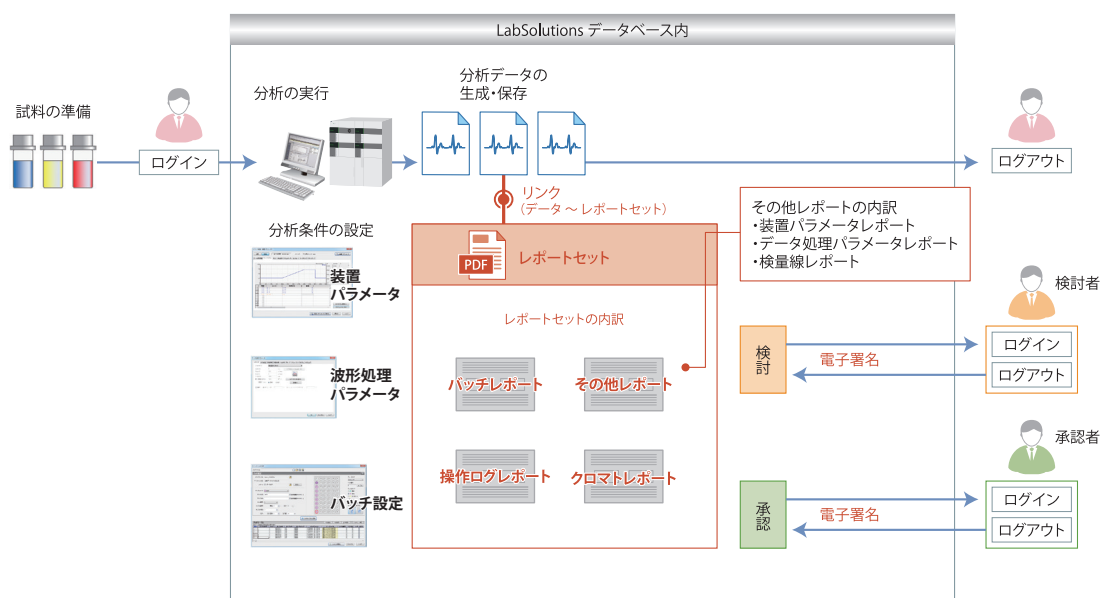
電子的なリンクが生成されることで、レポートセットとその分析結果（電子データ）との間には、一意性が確保されることに加え、分析結果（電子データ）の検索と確認も素早く行えるようになりました。

■ 特長3：分析結果レポートの確認作業の電子化による業務の効率化



PDF ファイルとして出力されたクロマトレポートについては、その内容を確認した証拠を残すことができます（レポート確認機能）。これは、プリントアウトの場合と同じようにクロマトレポート上の任意の場所へ記すことができます。確認し忘れの項目があった場合は、エラーを通知してレポート確認の漏れを知らせてくれる確認支援機能が備わっていますので、確実な内容確認が行えます。

また、PDF レポートセットに対する検討・承認作業では電子署名が利用できますが、ここでは、元となる電子データ（分析結果）の検討・承認も併せて行えます。電子署名を利用すれば、電子署名済みレポートをプリントアウトして改めて手書き署名することが必ずしも必要ではなくなることから、ペーパーレスへの移行による業務の効率化が実現できます。



- ・レポートセットは、ソフトウェア内に散在する操作情報（人の手が介在する操作・設定）、バッチ（連続分析）レポート、クロマトレポートなどをひとつのレポートにまとめた PDF ファイルです。レポートセットの作成は、1 回の操作で行えます。
- ・レポートセットは、分析データやメソッドファイルなどと同じく、セキュリティ管理されているデータベース内で生成・保管されるので安心です。
- ・レポートセット機能は、LabSolutions に内蔵されているため、別途バリデーションを行う必要はありません。
- ・レポートセットの詳細は、テクニカルレポート「LabSolutions レポートセットを活用した Data Integrity（データの完全性）への対応」（C191-0076）をご覧ください：
UHPLC/HPLC, LC/MS Technical Report（テクニカルレポート）
<http://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/prominence/tec.htm>

※ LabSolutions レポートセット の対象は、LabSolutions CS および LabSolutions DB です。
LC/GCsolution または LabSolutions LC/GC から LabSolutions CS（および LabSolutions DB）への移行については、別途ご相談ください。

HPLC による有機酸分析 … 分離と検出の最適化

有機酸の分析は、風味香気成分の測定を目的として、醸造製品や発酵製品で行われてきました。近年では、バイオエタノールの製造過程におけるモニタリングや培養細胞・バイオプロダクションの研究、医薬品中のカウンターイオンの分析など幅広い分野で有機酸が分析されています。有機酸は種類が多く、短波長域での紫外吸収しか有しないため、HPLC により有機酸を精度良く分析するには、分離と検出の最適化が重要です。

①分離の最適化

有機酸は、逆相クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーでは十分な保持や分離が得られません。図 1 は、イオン交換クロマトグラフィーによるモノカルボン酸の分析例ですが、これらの分離が困難なことがわかります。

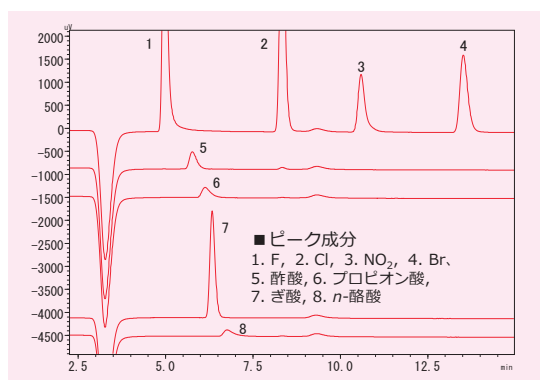


図 1 イオン交換クロマトグラフィーによる分析例

表 1 分析条件 (図 1)

カラム	: Shim-pack IC-SA3
移動相	: 3.6 mmol/L 炭酸ナトリウム水溶液
流量	: 0.8 mL/min
温度	: 45 °C
検出器	: 電気伝導度検出器 (サブレッサー)

有機酸の効率的な分離には、イオン排除クロマトグラフィーが適しています。図 2 に、イオン排除クロマトグラフィーの原理を示します。イオン排除クロマトグラフィーは、主として有機酸の解離度 (pKa) により保持の強さが決まります。負電荷をもった充填剤表面に対し、強酸は電気的反発力のため細孔内に入ることができず早く溶出するのに対し、有機酸のような弱酸は反発力が弱いいため、その電荷の大きさにより細孔に浸透できる度合いが決まります。つまり、解離度が小さい有機酸ほど細孔に深く浸透して保持されるため、分離の選択性を高めることができます。

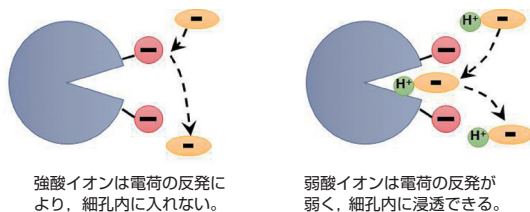


図 2 イオン排除クロマトグラフィーの原理

図 3 に、イオン排除クロマトグラフィーによる有機酸標準液の分析例を、図 4 に医薬品 (クレマスチンフマル酸塩) の有機酸カウンターイオン (フマル酸) の分析例を示します。

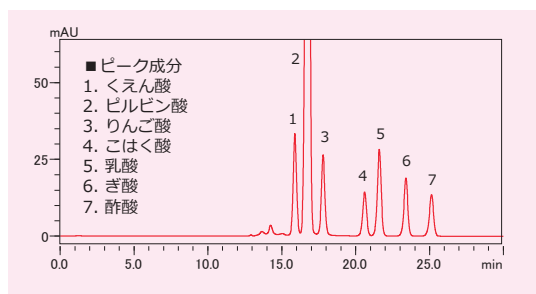


図 3 イオン排除クロマトグラフィーによる分析例

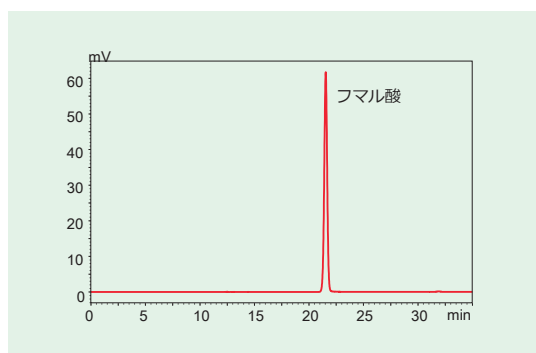


図 4 クレマスチンフマル酸塩の分析例

表 2 分析条件 (図 3, 図 4)

カラム	: Shim-pack SCR-102H, 2 本 (内径 8.0 mm, 長さ 300 mm) ガードカラム SCR-102H (内径 6.0 mm, 長さ 50 mm)
移動相	: 5 mmol/L 過塩素酸水溶液
流量	: 0.8 mL/min
温度	: 40 °C
検出器	: 吸光光度検出器 (210 nm)

②検出の最適化

有機酸を吸光光度検出器を用いて検出する場合、基本的にはカルボキシル基に基づく短波長域（200～210 nm）での検出となります。しかし、このような短波長域においては、多くの有機化合物が吸収をもつようになるため、複雑なマトリックスの試料を分析する場合、有機酸ピークが夾雑成分に妨害されて検出できないことが起こります。

島津が提案しますポストカラム pH 緩衝化—電気伝導度検出は、イオン排除クロマトグラフィーと組み合わせて、有機酸を選択性良く、高感度に検出できる独自の方法です。図 5 に、この方法の基本原則となる pH と有機酸のイオン化の関係を、図 6 には本有機酸分析システムの流路図を示します。

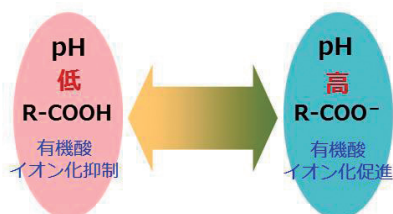


図 5 pH と有機酸のイオン化

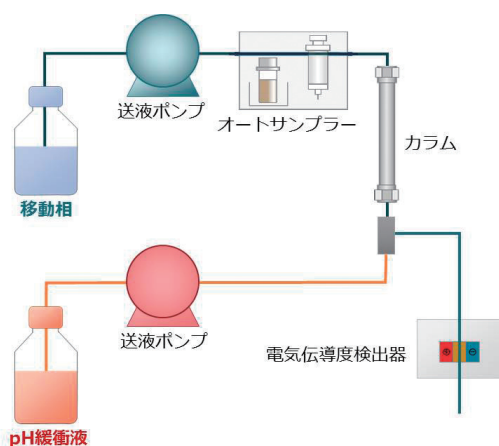


図 6 ポストカラム pH 緩衝化—電気伝導度検出有機酸分析システムの流路図

イオン排除クロマトグラフィーによる有機酸の分離では、酸性の移動相を用いますので、カラム内での分離時、有機酸のイオン化は抑制されています。この非解離状態では電気伝導度検出器による検出ができないため、分離後、カラム溶出液に塩基性 pH 緩衝化試薬を添加・混合し、有機酸のイオン化を促進します。これにより、電気伝導度検出器による高感度検出を可能としています。また、基本的に導電性のある夾雑成分しか検出しなため、吸光光度検出器に比べて検出選択性が高くなります。

図 7 に、ビール中の有機酸分析における吸光光度検出とポストカラム pH 緩衝化—電気伝導度検出との比較を示します。表 1 に、ポストカラム pH 緩衝化—電気伝導度検

出法の分析条件を記します。図 4 の医薬品中の有機酸を分析する場合とは異なり、醸造製品のように多くの夾雑成分が含まれる試料を分析する場合には、吸光光度検出ではこれらの影響が避けられません（図 7 下段）。一方、ポストカラム pH 緩衝化—電気伝導度検出では、夾雑成分の内、導電性がない成分（非イオン性成分）は検出されないため、選択性の高い有機酸分析が可能であることがわかります（図 7 上段）。

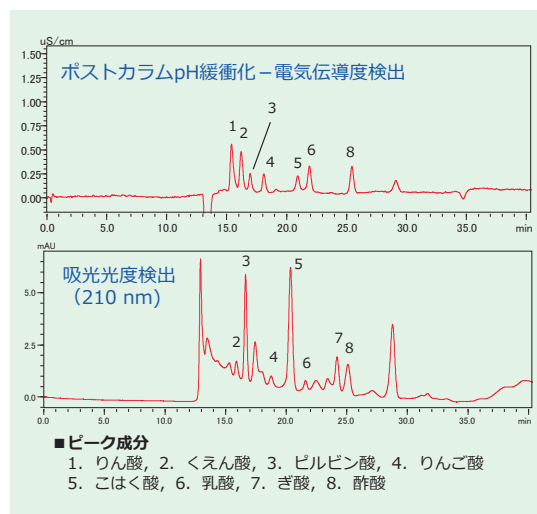


図 7 ビール中の有機酸分析例

表 3 分析条件（図 7 上段）

カラム	Shim-pack SCR-102H, 2 本 (内径 8.0 mm, 長さ 300 mm)
ガードカラム	SCR-102H (内径 6.0 mm, 長さ 50 mm)
移動相	5 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液
流量	0.8 mL/min
温度	40 °C
pH 緩衝液	20 mmol/L Bis-Tris, 0.1 mmol/L EDTA・4H を含む 5 mmol/L p-トルエンスルホン酸水溶液
流量	0.8 mL/min
検出器	電気伝導度検出器

以上のように、有機酸分析の分離（イオン排除クロマトグラフィー）と検出（ポストカラム pH 緩衝化—電気伝導度検出）の最適化を図った有機酸分析システムは、幅広い分野におけるアプリケーションが期待できます。
(Hr)

Introductory



送液ポンプのはなし その2－メンテナンスとトラブル対処

95号では、送液ポンプの基本構造についてお話ししましたが、いかがでしたでしょうか？本号では、送液ポンプのメンテナンスとトラブル対処のポイントについて解説したいと思います。

■ メンテナンス

送液ポンプは、HPLC装置の中で最も忙しく、長い時間稼働していますので、安定した送液のためのメンテナンスが大変重要です。図1で、送液ポンプの構造を復習しながら、メンテナンスのポイントを具体的に見ていきましょう。(95号の「その1」で示した図では「吐出工程」でしたが、ここでは比較のため「吸引工程」にしました。)

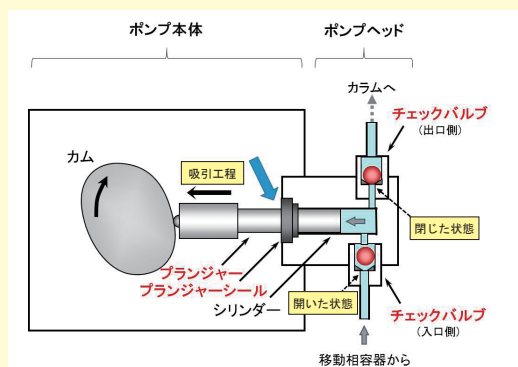


図1 送液ポンプの構造(模式図)

● プランジャーシール

送液ポンプの各部品の中で最も交換頻度が高いものがプランジャーシールです。プランジャーシールは、送液ポンプ駆動時、プランジャーと常に摩擦状態にありますので、定期的な交換が必須です。通常のダブルプランジャーポンプでは、左右のポンプヘッドのプランジャーシールを同時に交換します。

プランジャーシールの交換周期は、装置の取扱説明書に記載されていますが、あくまで一定条件下での目安であることにご注意ください。一般に、高圧、高流量で送液するほど、劣化が早くなります。また、移動相の塩濃度が高いほど、早目の交換がおすすめです。これは、プランジャーシールからポンプヘッド後側(図1の青矢印の部分)へにじみ出た移動相が乾燥し、析出した塩がシールを傷付けるためです。特に、りん酸塩緩衝液は、乾燥すると硬い結晶となりますので、最悪の場合、シールのみならずプランジャーを傷付けることがあります。

このようなことを防ぐため、送液ポンプには、通常プランジャーの後側を水で自動もしくは手動で洗浄できる専用の洗浄ラインがあります。お使いの装置でご確認ください。

プランジャーシールの交換手順は、以下の通りです。ただし、機種によって細かい部分が異なることがありますので、お使いの装置の取扱説明書で確認してください。交換作業は、慣れればそれほど難しくありません。

[プランジャーシール交換手順]

- ① プランジャーが一番奥に引っ込んだ状態で、ポンプを停止します。これは、ポンプヘッドを取り外す際、プランジャーが折れるのを防ぐためで、絶対忘れないようにしてください。通常、このようなサービス機能が装置に装備されていますので、ご確認ください。
- ② ポンプヘッドに接続されている配管類を外します。
- ③ ポンプヘッドを取り外します(図2)。この時、ポンプヘッドは、プランジャーに沿って水平にゆっくり引き抜いてください。

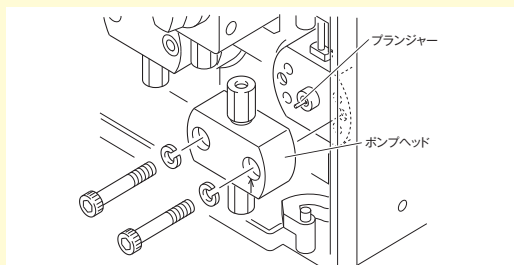


図2 ポンプヘッドの取外し

- ④ シール脱着用治具(機種により形状が異なります)を用いて古いシールを取り出します(図3)。シール脱着用治具は、両端の形状が異なり(古いシール用と新しいシール用)、間違えないようにしてください。
- ⑤ 清潔なガーゼに2-プロパノールを浸して、ポンプヘッド内側とシール取付部に付着しているシールカスなどを拭き取ります。ただし、緩衝液使用時には、最初に水で拭き取ってください。
- ⑥ 新しいシールをシール脱着用治具に取り付けてポンプヘッドに垂直に差し込み、シール脱着用治具をゆっくり引き抜きます(図4)。新しいシールを扱う時には、先の尖ったピンセットを絶対に使わないようにしてください。

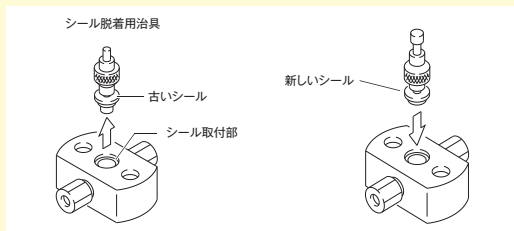


図3 古いシールの取出し 図4 新しいシールの取付け

- ⑦ ポンプヘッドを取り付け、配管類を接続します。
- ⑧ ポンプを駆動させ、圧力が安定しているか、液漏れがないかを確認します。

● ブランジャー

ブランジャーのメンテナンスは、定期的な傷の確認と汚れの拭き取りです。ブランジャーを取り外し、その表面を肉眼もしくはルーペで確認します。傷が確認されれば交換、傷がなければ、清潔なガーゼに2-プロパノールなどを浸して、ブランジャー表面の汚れ（付着物）を拭き取ります（緩衝液使用時、水→2-プロパノール）。

● チェックバルブ

チェックバルブのメンテナンスは、基本的には超音波洗浄です。各チェックバルブをポンプ本体から取り外し、2-プロパノール（緩衝液使用時は、水→2-プロパノール）などを入れたビーカーに浸して超音波洗浄を行います。取り付ける時には、入口側と出口側を間違わないようにご注意ください。なお、チェックバルブは、非常に精密な部品ですので、一般的に分解洗浄は不可です。

● フィルター類

送液ポンプに付いているフィルター類としては、ポンプ出口に付いているラインフィルター（ブランジャーシールの削りかすやポンプ部品や移動相由来の微粒子などをトラップ）、移動相吸引チューブ（サクシオンチューブ）の先に付いているサクシオンフィルター（移動相中の微粒子をトラップ）があります。これらも定期的に超音波洗浄します。

■ トラブル対処

日常的にHPLC分析を行っているとき、いろいろなトラブルに遭遇します。よくあるトラブルの症状には、以下のものがあります。

- | | |
|--------------|-------------|
| a) 圧力の上昇 | f) 感度のふらつき |
| b) 圧力の変動 | g) 保持時間の変動 |
| c) ノイズの増大 | h) ピーク面積の変動 |
| d) ベースラインの変動 | i) ピーク形状の異常 |
| e) 感度の低下 | j) 不明ピークの出現 |

これらの症状の中で、通常送液ポンプが原因として関係するのは、a)、b)、c)、g)です。（もちろん、他の症状に対して間接的に関わっていることもあります）

● 圧力の上昇

圧力上昇は、ポンプの圧力上限リミッタの警告音ではじめて気が付くことが多々あります。圧力上昇は、急に起こる場合と徐々に起こる場合とがありますが、その主な原因は詰まりです。詰まっている箇所の特定は、ポンプヘッドの下流側から順次配管を外して圧力変化を確認して行います。一般的には、カラム入口、配管類、検出器セルでの詰まりが多いのですが、送液ポンプのラインフィルターが詰まっていることもあります。ラインフィルターが原因であれば、取り外して超音波洗浄を行います。洗浄では回復しない場合には、フィルター部（フリット）を交換します。

● 圧力の変動

圧力の変動は、なかなか気付きにくいものです。お使いの装置に圧力モニタ値をクロマトグラム上に表示できる機能があれば、ぜひ活用しましょう。圧力変動の原因としては、第一に送液ポンプが疑われ、ポンプ内の気泡、ポンプの液漏れ、チェックバルブの動作不良が挙げられます。

ポンプ内の気泡は、ドレインバルブを開き、ドレインチューブに注射器を取り付け、ポンプをパージしながら吸引除去します。何度パージしても気泡が溜まる場合、サクシオンフィルターが詰まっている可能性があります。この場合、ポンプ吸引時、サクシオンチューブ内が陰圧になり、気泡が発生します。サクシオンフィルターを超音波洗浄しても回復しない時には、新品と交換します。

ポンプの液漏れでは、ブランジャーシールを交換します。ブランジャーシールを交換しても改善されない場合には、ブランジャーに傷が付いている可能性がありますので、表面を確認し、必要な場合、交換します。

チェックバルブの動作不良は、主として図5に示すような原因により、入口側チェックバルブで起こります。超音波洗浄で回復しなければ交換です。

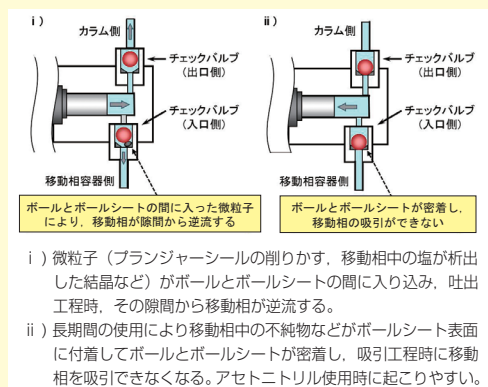


図5 チェックバルブ動作不良の原因

● ノイズの増大

ノイズ増大の原因の多くは検出器関連ですが、送液ポンプに関わるノイズの上昇もあります。これは、主に示差屈折率検出器や電気伝導度検出器など圧力変動の影響を受けやすい検出器で起こります。ただし、吸光光度検出器の短波長域でも起こることがあります。ノイズ周期がポンプの動作と一致する場合、ポンプが疑われますので、圧力変動の対処に従います。

● 保持時間の変動

保持時間変動には、種々の原因が考えられます。その中で、送液ポンプの送液不良もよくある原因の一つです。これについても、圧力変動の対処に従います。

以上、送液ポンプのメンテナンスとトラブル対処のポイントについてお話ししましたが、トラブルにはいろいろなケースがあり、語り出すととても紙面が足りません。また、別の機会に詳しくお話ししたいと思います。（Mk）

水越 利巳 先生

『新規アミノ酸分析技術で切り拓く「アミノインデックス技術」の臨床応用』
みずこし としみ=味の素株式会社 イノベーション研究所

- ▶ 1992年3月 慶應義塾大学大学院 理工学研究科 修士課程修了, 1992年4月 味の素株式会社入社 中央研究所 分析研究所配属, 1997年7月 株式会社生物分子工学研究所 (BERI) 出向, 2002年4月 味の素株式会社 ライフサイエンス研究所, 2003年3月 博士号取得 (薬学博士), 2005年4月 主任研究員, 2011年4月 味の素株式会社イノベーション研究所, 2013年4月 主席研究員, 2013年7月 分析応用研究グループ長

専門分野 メタボロミクス, ケミカルバイオロジー, 構造解析, 構造生物学
将来の夢 ゆったりと子供たちに科学を教えつつ, 色々なところを旅行する
趣味 家族旅行



今年も京都の春は賑わっています。従来からの観光名所はもちろんのこと、結構知られていない(…と京都生まれの私が思っていた)所にも、外国からのお客様が多数訪れているようです。
(Mk)



読者のみなさまから …

● 「カラム外体積」とは何でしょうか？

「カラム外体積 (カラム外容積)」(extra-column volume) は、日本工業規格 (JIS) では、「ピークバンドの広がる要因となるクロマトグラフのカラム充填部以外の容積。試料導入部、検出器、配管、カラムフィッティングなどの容量の合計で、装置の性能に関わる指標の一つ。」¹⁾と定義されています。

HPLC 装置に当てはめると、図 1 に示ようになります。HPLC で得られるクロマトグラムには、このカラム外体積に起因するピークの広がりが含まれます。従って、いくら高理論段数のカラムでも、装置のカラム外体積が大きければ、その性能をできないことになります。特に、カラム容量が小さい場合 (例えば、内径 2

mm のカラムなど) や保持容量 (保持時間) の小さい成分の場合、この影響が顕著となります。配管チューブの内径や長さ、接続部 (フィッティング) の内容量やデッドボリュームに注意してください。

【引用文献】
1) JIS K0214: 2013 分析化学用語
(クロマトグラフィー部門)

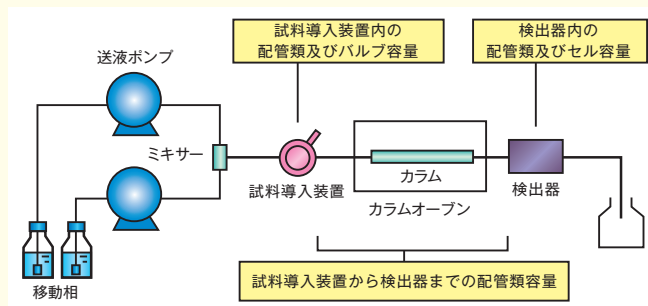


図 1 カラム外体積