

LC *talk*

VOL. **99**



2017 January

医薬品の研究開発と クロマトグラフィー

株式会社東レリサーチセンター
医薬営業部 兼 医薬・バイオ事業企画部
部長 竹澤 正明



■私は学生時代に薬学部薬品分析化学教室に所属し、島津製作所製の高速液体クロマトグラフ（HPLC）LC-4A 及び LC-6A と初めて出会いました。当時の研究室には数台の HPLC しかありませんでしたので、諸先輩方の研究に占有され、私自身は殆ど利用できませんでした。その後、大学院へ進み、蛍光検出 HPLC によるオルトフタルアルデヒド（OPA）や新規発蛍光試薬 2,3-ナフタレンジアルデヒド（NDA）を用いたシアニオンの微量定量分析法の開発に取り組みました。以後、HPLC とは何らかのかたちで約 30 年間付き合ってきましたが、今なお、HPLC がめざましい進化を続け、医薬品、食品、環境等様々な分野の研究開発に寄与していることに対して歴史のようなものを感じているところです。

■さて、私の業務を簡単に紹介したいと思います。東レリサーチセンターはエレクトロニクス、材料、素材、エネルギー、環境、医薬、バイオ、ライフサイエンス分野のお客様から貴重なサンプルをお預かりし、弊社にて分析機器に供して定性、定量や解析等をし、お客様へ得られた結果をご提供する受託分析会社です。

私は、入社後、血液、尿、組織等の生体試料中の医薬品分析を中心としたバイオアナリシスに約 20 年間、その後、品質試験や安定性試験を中心とした CMC 分野の分析に 4 年間従事してきました。携わった分析手法は、UV や蛍光、ECD 検出 HPLC、GC/MS 及び LC/MS/MS 等で、クロマトグラフィーを中心に医薬品の定量分析業務に従事してきました。入社当初、HPLC や GC/MS による高感度分析法の開発・分析に多大な時間を費やしていましたが、今から 20 年程前の LC/MS/MS の発展・実用化に伴って、医薬品の開発支援が効率的にできるようになりました。

具体的には、HPLC や GC/MS では高感度分析や揮発性誘導体化等のために各種の前処理を施してきましたが、LC/MS/MS によりその時間を 1/10 位に省略できました。まさに、革新的な分析手法である LC/MS/MS の登場により、短時間で、高選択的かつ高感度に分析種を定量できる時代が到来したのではないかと思います。今では、医薬品の研究開発に LC/MS/MS は欠かせない分析手法と言っても過言ではないでしょう。

■質量分析計の感度は、過去、新しい製品が発売されるたびに 5 倍、10 倍、100 倍・・・と飛躍的に高くなっていきました。超微量分析を志す者としては有り難い出来事ではありましたが、一方で最も頭を悩ました問題としてキャリーオーバーによる定量値の過大評価が生じたことです。バイオアナリシスや CMC 分野において定量値の正確性は、極めて重要であることから、キャリーオーバー対策として、HPLC のオートサンプラーの洗浄溶媒の種類や洗浄時間、配管の器材等の検討に多くの時間を費やしました。特に、LC/MS/MS を用いた高感度分析では、HPLC からのキャリーオーバーには特に注意しなければなりません。最近では、分析機器メーカーからキャリーオーバーの様々に低減化を図った HPLC が市販されていますので、その洗浄機構をよく把握し、超高感度分析を達成していくことが肝要かと思います。

■上記の観点から、弊社で定期的にキャリーオーバーの検討を行っていますので、その一例をご紹介します。キャリーオーバーを評価する分析種としては、器材等に吸着が生じやすい酸性及び塩基性物質があります。誌面の都合上、広く知られている塩基性物質であるクロルヘキシジンを用いたキャリーオーバーの検討結果について示します。

■評価方法は、洗浄機構が異なる3機種（“A、B、Cタイプ”）のHPLCへ高濃度のクロルヘキシジン（図1、1 mg/mL）を注入し、その後、ブランク試料（クロルヘキシジンが含有していない試料）を3回連続注入し、その時のクロルヘキシジンの保持時間に溶出されるピーク面積値からキャリーオーバー率【ブランク試料のピーク面積値×100／クロルヘキシジンのピーク面積値（%）】を算出することとしました。

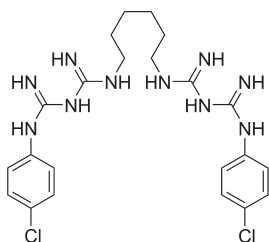


図1 クロルヘキシジンの構造式

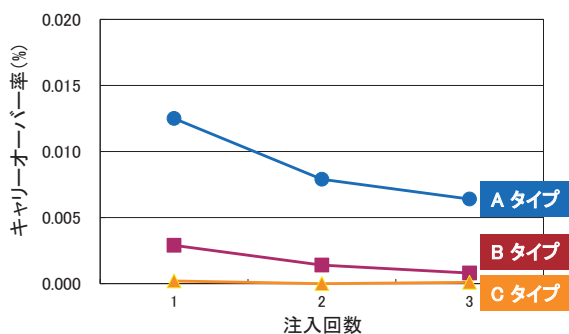


図2 各種HPLCにおけるキャリーオーバー率

■図2に結果を示しますが、キャリーオーバー率が最も高値を示し、さらに高止まりした“Aタイプ”に対して、“Cタイプ”のProminence（島津製作所製）はキャリーオーバー率が最も低いことがわかりました。参考までに、最もキャリーオーバー率が高い“Aタイプ”のクロマトグラムを図3に示します。これらの結果から“Aタイプ”及び“Bタイプ”と比較すると、“Cタイプ”のProminenceはブランク試料1回目の注入時からキャリーオーバー率が低値で推

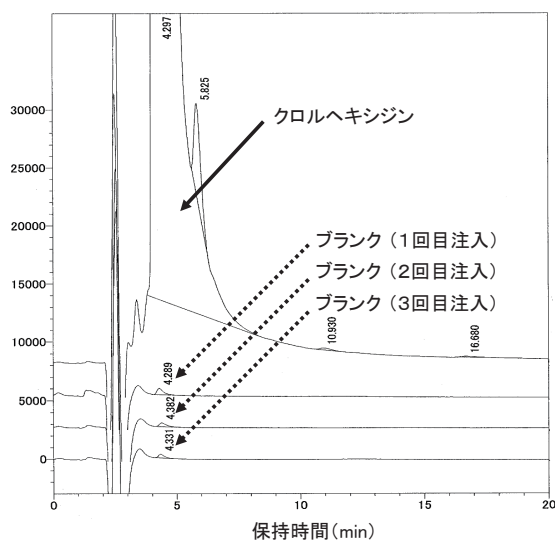
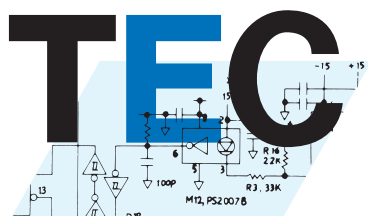


図3 “Aタイプ”のクロマトグラム

移していることがわかります。

■このことから当時、高薬理活性を有する医薬品の定量分析法の開発や低含量の製剤中の主成分（医薬品）及び類縁物質を定量する際には、積極的にProminenceを利用するようにしました。冒頭記述した質量分析計を検出器としたLC/MS/MS分析では、比較的広いダイナミックレンジの中でfg～pgオーダーの分析種を定量する必要があります。そのため、さらなるキャリーオーバー低減化に向けたHPLCの開発に期待を寄せています。

■最後になりますが、現在、私は（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て中村 洋委員長長の指導の下、懇談会や研修会を通じ、HPLCや質量分析計のメーカーの方々や、多くの第一線の研究者の皆さんと定期的に接し、日々勉強に励んでおります。島津製作所をはじめとして、国内外のほぼすべてのメーカーの方が役員として参加しています。最新情報の入手をしたい、あるいは実務でお困りの読者には、とても有益な懇談会だと思います。加えて、中村先生が提唱されているヒューマンネットワークの構築に役立ちますので、ぜひご参加いただければ幸いです。



恐ろしい…試料の容器吸着（続編）

島津製作所 技術顧問 浅川直樹

●本誌Vol.96および97では、試料の容器吸着のメカニズムならびに既に商品化した低吸着バイアル (LabTotal Vial, TORAST-H™ Bio Vial) の吸着抑制効果について述べた。この間、バイアルへの吸着のみならず、試料のサンプリングや試料の希釈など試料調製に多用されているPP (ポリプロピレン) 製ピペッターチップ (PP製チップ) への吸着も分析結果の信頼性を損なう要因と認識しているユーザーから、低吸着PP製チップの開発の要請が数多く寄せられた。

●そこで島津グループでは、TORAST-H™ Bio Vial に引き続きPP製チップへの吸着現象を把握すると共に、低吸着PP製チップの開発に着手し、世界に先駆けてTORAST-H™ Tipの商品化に至った (JASIS 2016において発表)。本編では、PP製チップへの吸着現象、TORAST-H™ Tipの概要と吸着抑制効果について紹介する。

■ PP製チップへの吸着現象

●PP製チップへの吸着は疎水的吸着が主であるため、吸着抑制法として試料溶液に有機溶媒 (メタノール、アセトニトリルなど) を添加することが一般的である (Vol.96参照)。しかし、近年のLCおよびLC / MS分析の高速化に伴い、充填剤粒子径およびカラムサイズは微小化してきている。このため、有機溶媒の多い試料溶液を逆相モードのLCカラムに適用すると、試料中の有機溶媒によるピークのブロード化を引き起こし、十分な分離が得られないことが多々ある。

●この場合には、試料中の有機溶媒の添加量や試料注入量を制限するなどして対応するものの、LCおよびLC / MSの本来の高分離力および高感度検出力を十分に発揮できていないのが現状である。従って、LCおよびLC / MSの性能を最大限発揮させるためにも、有機溶媒フリーの試料液が好ましく、この際に懸念されるPP製チップへの疎水的吸着を抑制するチップの開発は極めて意義深い。

■ TORAST-H™ Tipの開発

●島津グループでは、昨年より低吸着のPP製バイアルTORAST-H™ Bio Vial を商品化し、多くのユーザーより支持を得てきた。このチップは、PP製チップ (未処理) 表面に超親水性 / 非イオン性の高分子ポリマーを化学結合させることにより、PP製チップ表面での疎水的吸着を抑制するものである (図1)。

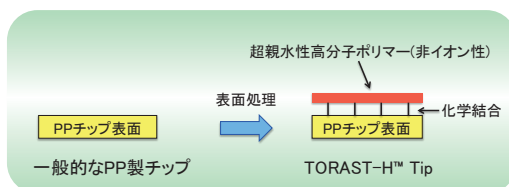


図1 TORAST-H™ Tip の概要

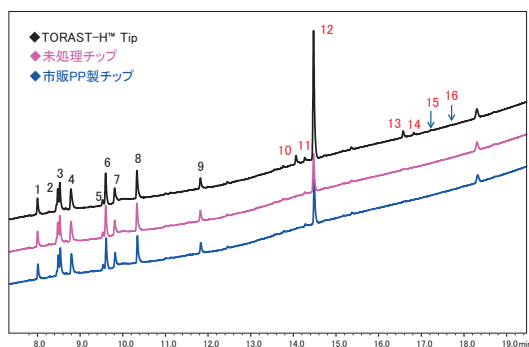
しかも、この化学結合は極めて安定であることから、広範な溶媒での試料調製が可能であることを特徴とする。

■ TORAST-H™ Tip の吸着抑制効果

●TORAST-H™ Tipの吸着抑制効果を検証するために、ペプチドおよび塩基性薬物をモデル試料として、本チップ、未処理チップおよび市販チップへの吸着について検討した。

1) ペプチド

ペプチドは、容器への吸着が顕著であることを紹介した (Vol.97参照)。そこで、ミオグロビンをトリプシン消化した試料 (≒ 1.9 pmol/mL) をTORAST-H™ Tip、未処理チップ (TORAST-H™ Tipのベースチップ) および市販PP製チップを用いてTORAST-H™ Bio Vial にそれぞれ採取し、試料溶液とした。各試料溶液について、HPLCで得られたクロマトグラムを図2に示す。



分析条件
カラム: Aeris Peptide (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 1.7 μm)
移動相: 0.1 %TFA 水溶液 / 0.1 %TFA アセトニトリル溶液, グラジエント溶離
検出: 紫外 216 nm

図2 ミオグロビントリプシン消化物のPP製チップへの吸着

各ペプチドのピーク (No1 ~ 16) において、親水性ペプチド (保持の小さいNo.1 ~ 9) のピーク面積はチップによる差は認められなかった (図3)。

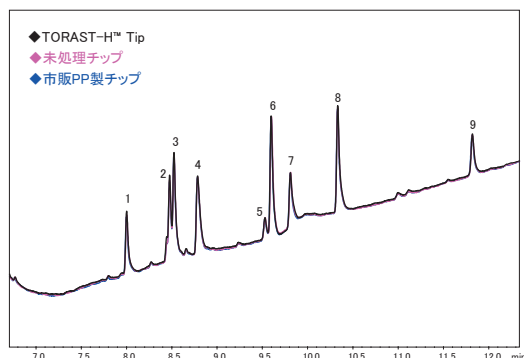


図3 ミオグロビントリプシン消化物のPP製チップへの吸着 (拡大クロマトグラム: ピークNo.1~9)

一方、疎水性のペプチド (保持の大きいNo.10 ~ 16) のピーク面積は、チップにより顕著な差が認められ、TORAST-H™ Tipに対し未処理チップおよび市販チップでは60 ~ 90 %超のピーク面積が減少した (図4)。このことは、PP製チップへの吸着は疎水の吸着に起因することが示唆されると同時に、UV検出が可能な試料濃度でさえ、ペプチドは顕著にPP製チップに吸着することが明らかとなった。一方で、TORAST-H™ Tipは未処理チップおよび市販チップと比較し、顕著な吸着抑制効果を示した。

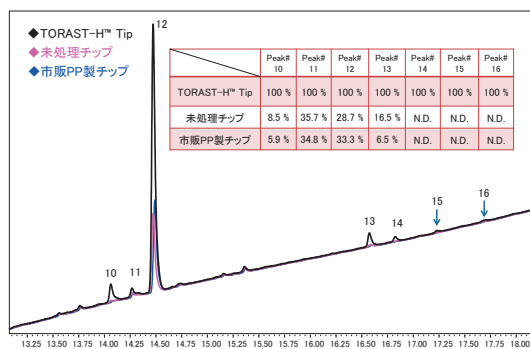


図4 ミオグロビントリプシン消化物のPP製チップへの吸着 (拡大クロマトグラム: ピークNo.10~16)

2) 塩基性薬物

疎水性の高い抗うつ剤であるイミプラミンおよび親水性の高いβブロッカーであるアテノロールをモデル化合物として、LC/MS (NexeraX2, LCMS-8050) により、低濃度試料 (1 ng/mL および 10 ng/mL 水溶液) でのTORAST-H™ Tipと未処理チップへの吸着を比較した。

i) イミプラミン

イミプラミン ($\log P$: 4.28) は、疎水性が高くPP表面への吸着が懸念される薬物の一つである。未処理チップは、TORAST-H™ Tipに対し、10 ng/mL で66 %, 1 ng/mL で74 %のピーク面積がそれぞれ減少した。この結果は、イミプラミンがPP製チップ

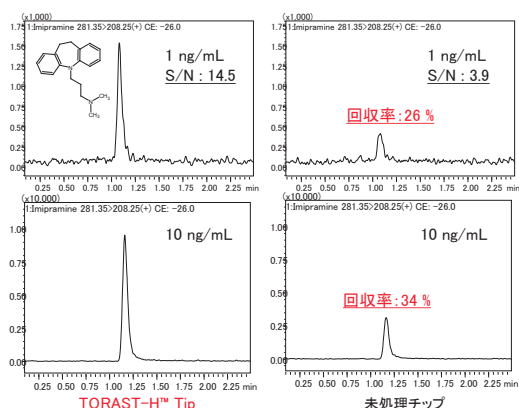


図5 イミプラミン (1, 10 ng/mL) のPP製チップへの吸着 (LC/MSによるクロマトグラム)

表面に容易に吸着することを示すものである。一方で、この結果は、TORAST-H™ Tipの顕著な吸着抑制効果を示唆したことになる (図5)

ii) アテノロール

アテノロール ($\log P$: 0.43) は親水性の高い薬物の一つであり、PP製チップ表面への吸着は小さいことは容易に推察できる。アテノロール 1 ng/mL 水溶液をTORAST-H™ Tipおよび未処理チップでそれぞれサンプリングした後、TORAST-H™ Bio Vialに移し、試料液とした。この試料につきLC / MSでピーク面積を比較した。未処理チップはTORAST-H™ Tipに対し、僅かなピーク面積の減少を認めた。そこで、低濃度試料を想定したモデル実験として、さらにチップとの接触面積を5倍および10倍に増やしたところ、TORAST-H™ Tipに対する未処理チップでのピーク面積は、それぞれ17および30 %の減少を認めた。この結果は、アテノロールに代表される親水性の高い化合物でさえ、低濃度試料においてPP製チップに吸着することが示唆された。

●本編での一連の紹介は、低濃度試料におけるPP製チップへの吸着の実態を把握した初めての結果であり、低濃度試料の調製の際のPP製チップの安易な使用が分析バラツキの一因となり得ることへの警告でもある。併せて、TORAST-H™ Tipは、低濃度試料の調製におけるPP製チップへの吸着抑制効果を発揮することから、TORAST-H™ Bio Vialとの併用により、LC/MSを始めとする高感度分析の信頼性確保への貢献が大いに期待される。

Products

超高速液体クロマトグラフ /
超臨界流体クロマトグラフ

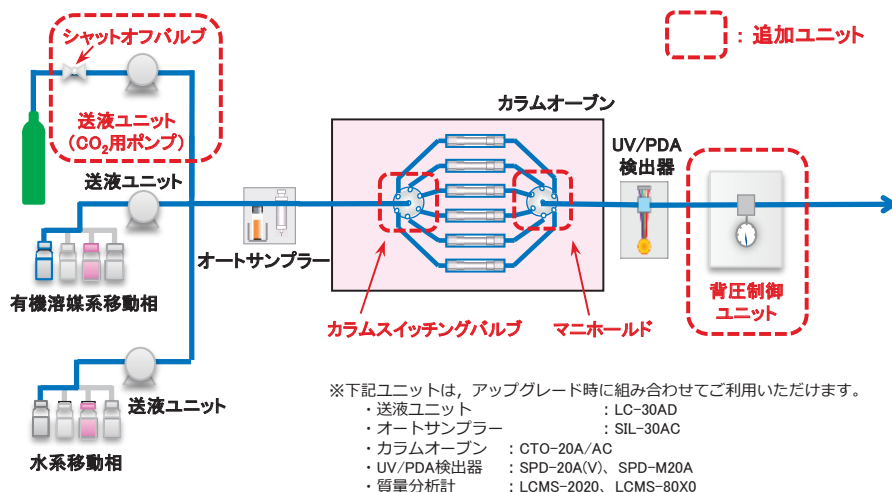
Nexera UC/s UHPLC/SFC 切替システム



キラル化合物や構造異性体の分離では、さまざまな分野で多様な分離手法が求められています。超臨界流体 CO_2 を移動相に用いる超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は、溶出順序の逆転など、超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) とは異なる分離挙動を示すため、メソッド開発時に UHPLC と SFC の 2 種類の分離手法を用いてスクリーニングすることにより、短時間でより良い結果を得ることができます。

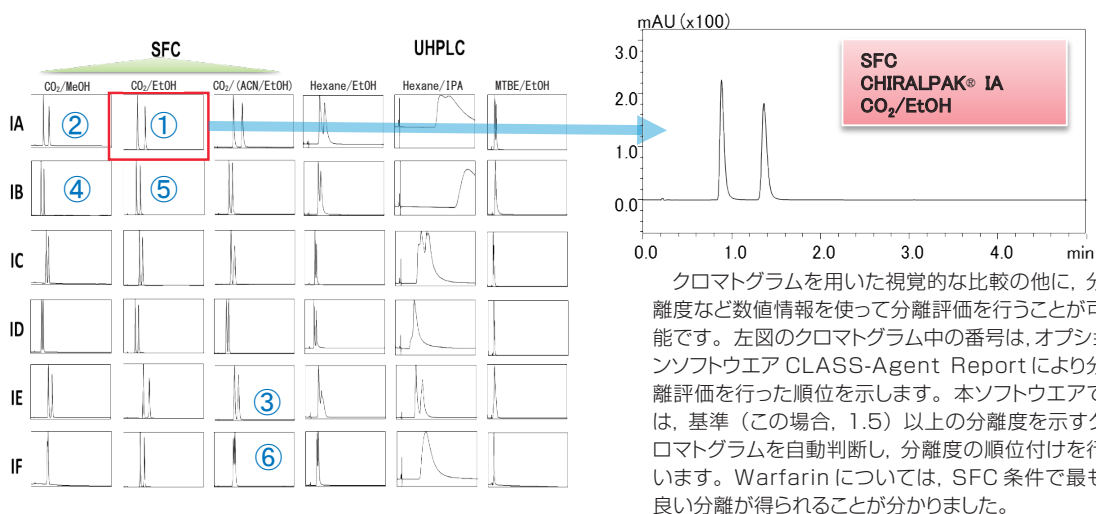
■ ラボスペースと装置導入コストの削減

標準的な UHPLC システムに SFC 用ユニット (CO_2 用ポンプ、背圧制御弁他) を追加するだけで、1 台のシステムで UHPLC 分析、SFC 分析両方を行うことができます。送液ユニット 1 台 (有機溶媒送液用)、オートサンプラー、カラムオープン、検出器を UHPLC 分析と SFC 分析で共有できるため、スペースと導入コストが抑えられるとともに装置稼働率の向上が図れます。UHPLC の場合の水と SFC の場合の二酸化炭素という主たる移動相成分に相溶性がある有機溶媒 (メタノール等) で残存移動相の置換・洗浄を行うことにより、両モードを約 10 分で切替えることができます。流路切換などがすべて自動で行えるため、迅速に UHPLC と SFC の両方のモードを用いたシーケンシャルな分析が可能になります。



■ UHPLC と SFC を用いた光学異性体の分離条件のスカウティング

本システムを用いてメソッドスカウティングの迅速化を図った事例をご紹介します。キラル化合物である Warfarin(抗凝固剤)について、本システムを用い分離条件の自動最適化を行いました。UHPLC、SFC 共に 6 種のキラルカラム (CHIRALPAK® シリーズ)、3 種の移動相、UHPLC、SFC それぞれ 18 種類計 36 種の組み合わせについて、自動かつ網羅的に連続測定を行いました。



クロマトグラムを用いた視覚的な比較の他に、分離度など数値情報を使って分離評価を行うことが可能です。左図のクロマトグラム中の番号は、オプションソフトウェア CLASS-Agent Report により分離評価を行った順位を示します。本ソフトウェアでは、基準（この場合、1.5）以上の分離度を示すクロマトグラムを自動判断し、分離度の順位付けを行います。Warfarin については、SFC 条件で最も良い分離が得られることが分かりました。

■ UHPLC/SFC 切換に対応した専用ソフトウェア

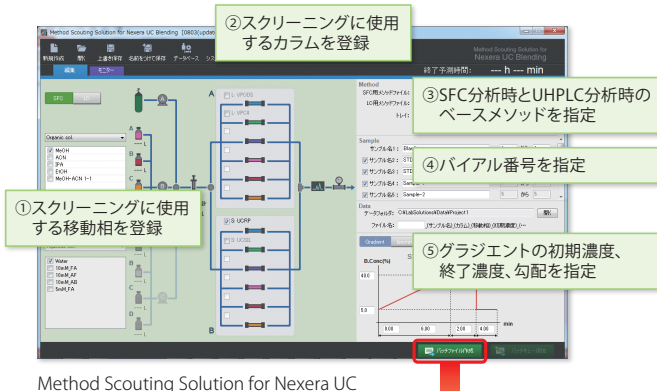
本システムでは、流路を接続し直す必要がなく、UHPLC 分析と SFC 分析を両立できます。一方、連続的に UHPLC 分析と SFC 分析を行うために、以下を自動実行できる機能を備えています。

- 1) 前分析モードの移動相を流路から排出する
- 2) 流路を切換えて、次の分析モードの移動相でカラムを液置換、平衡化する

UHPLC/SFC 切換に対応した専用ソフトウェア Method Scouting Solution for Nexera UC は、ソフトウェアが自動生成するパッチテーブルを実行するだけで、切換のために必要になる前移動相の排出や移動相の置換を実施できます。

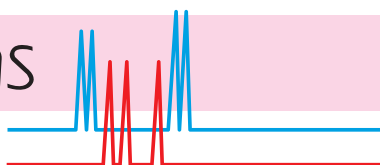
カラムと移動相の組み合わせごとにメソッドを作成するなど煩雑な操作をすることなく、使用する①移動相、②カラム、③分析時のベースにするメソッド、④バイアルを指定し、⑤グラジエントの条件（初期濃度、終了濃度、勾配）を指定するとメソッドスカウティングに使用するパッチテーブルが自動生成されるため、初めての方でもスムーズに UHPLC/SFC 分析の自動切換が行えます。

また、使用するカラムや移動相はデータベース管理できるため、管理効率が向上すると共に複数のオペレーターが使用する場合も操作ミスを低減することができます。



分析	バイアル番号	サンプル名	メソッドファイル	データファイル	
1	1	Blank	Blank_VPODS MeOH Water 5.40.018.icd	EquilDataSwitch_0111.icd	UHPLC→SFC切換
2	1	Blank	Blank_VPODS MeOH Water 5.40.018.icd	EquilDataSwitch_0111.icd	SFC分析
3	1	STD-1	STD-1_VPODS MeOH Water 5.40.018.icd	EquilDataSwitch_0111.icd	SFC→UHPLC切換
4	1	STD-2	STD-2_VPODS MeOH Water 5.40.018.icd	EquilDataSwitch_0111.icd	UHPLC分析
5	1	Sample-1	Sample-1_VPODS MeOH Water 5.40.018.icd	EquilDataSwitch_0111.icd	
6	1	Sample-2	Sample-2_VPODS MeOH Water 5.40.018.icd	EquilDataSwitch_0111.icd	

自動生成したパッチファイル



マイコトキシンスクリーニングシステムによる 穀類・牛乳・りんご中のマイコトキシンスクリーニング分析

マイコトキシン（かび毒）とは、かびが産生する化学物質のうち、人や動物、作物に対して毒性を有するものを指します。特に、アフラトキシンは天然物質中でも最も強い発がん性物質の1つであり、他のマイコトキシンと共に世界中の多くの国や地域で厳しい規制が行われています（表1）。昨今、食品安全の立場から原材料中のかび毒の自主検査が増加しています。

ここでは、マイコトキシンスクリーニングシステムによる穀物、牛乳、りんご中のマイコトキシン 10 成分のスクリーニング分析例をご紹介します。

表1 各国・地域のマイコトキシンの規制状況

マイコトキシン	含有リスクの高い食品	EU (μg/kg)	Codex (μg/kg)	日本 (μg/kg)
アフラトキシン B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	穀類 (小麦など)	Total 4-15 B1 2-12	Total 10-15	Total 10
アフラトキシン M1	牛乳	0.05	0.5	0.5
オクラトキシン A	小麦など	2-10	5	設定なし
パツリン	りんご	25-50	50	50
デオキシニバレノール	小麦	500-1750	1000	1100 (暫定基準値)
ニバレノール	小麦		設定なし	
ゼアラレノン	穀類	20-400 (飼料:2-3)	設定なし	設定なし (飼料:1)

(乳幼児向け食品を除く)

■マイコトキシンスクリーニングシステム

マイコトキシンスクリーニングシステムは、小麦粉や米粉などの穀物、りんご、牛乳を対象試料としたマイコトキシン 10 成分の迅速スクリーニングシステムです。

●特長

- 1) 世界的に最も厳しいEU基準値濃度のマイコトキシンを高感度に検出可能
- 2) マイコトキシン 10 成分を 14 分で迅速スクリーニングを実現
- 3) 分析終了と同時にスクリーニング結果やレポートを確認可能

●システム構成

一体型 HPLC "Nexera-i 3D(PDA)" および高感度蛍光検出器 "RF-20Axs" から構成されます（図1）。

●キット内容

夾雑成分の影響を抑えた最適な前処理法と規制対象成分の分析条件、分析レポート、UV スペクトルライブラリーを収載した CD-ROM、分析カラムが同梱されています。本キットにより、システム設置後すぐに測定が開始できます※1。

●スクリーニング判定結果

Labolutions のデータブラウザで PC 画面で迅速に判定を確認できます。マルチデータレポート機能を活用し、使用複数サンプルの合否判定結果を表一覧に出力することも可能です（図2）。

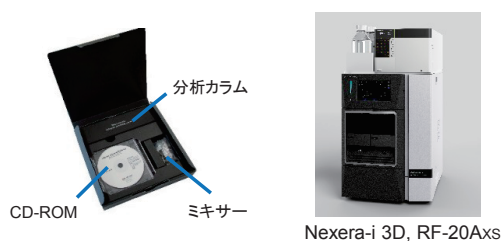


図1 マイコトキシンスクリーニングシステム

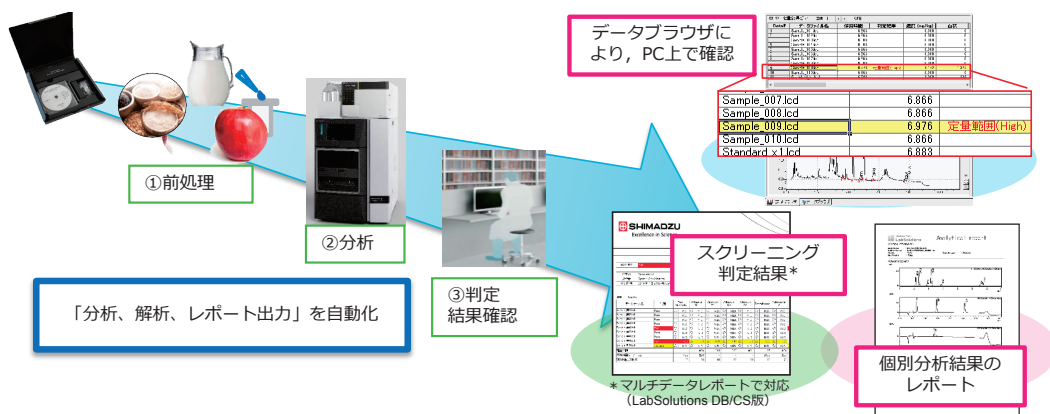


図2 スクリーニング分析の流れ

■分析条件と標準試料の分析

表 2 に、分析条件を示します。スクリーニングキットには、メソッドファイルが収載されていますので、設定は不要です。図 3 に、EU 基準値相当濃度^{※2}の標準液のクロマトグラムを示します。

表2 分析条件	
カラム	Shim-pack GIST C18 (内径 3.0 mm, 長さ 75 mm, 粒子径 2 μm)
移動相	A) 20 mmol/L りん酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH 2.5) B) アセトニトリル, C) メタノール グラジエント溶離
流量	1.0 mL/min
温度	55 °C
注入量	10 μL
検出器	蛍光 AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ (励起 365 nm, 蛍光 450 nm) OTA, ZON : (励起 320 nm, 蛍光 465 nm) : PDA NIV, DON : (220 nm) PAT : (276 nm)

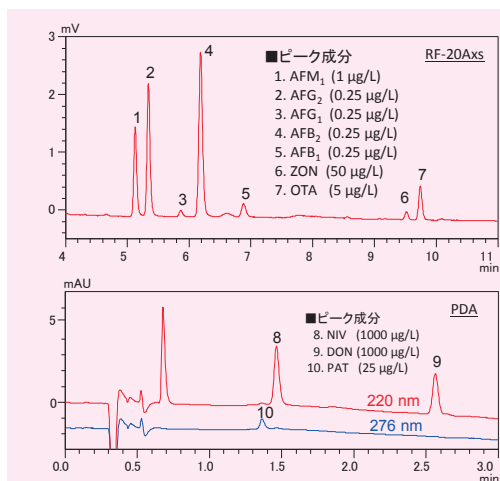


図3 標準液のクロマトグラム

■穀類・牛乳・りんごのスクリーニング分析例

図 4 に、穀類 (薄力粉), 牛乳, りんご果汁に EU 基準値相当濃度を標準添加, 前処理後の分析例を示します。

図 5 に、前処理方法の概略を示します。食品により産生するカビ毒が限られており、各試料に対してそれぞれ最適化した前処理方法となっています。詳細については、スクリーニングキットの取扱説明書をご参照ください。

一般にアフラトキシン B₁ および G₁ は、蛍光強度を増大させるために、トリフルオロ酢酸 (TFA) を用い蛍光誘導体化されますが、高感度蛍光検出器 RF-20Axs により、直接蛍光での検出を実現しています。これにより、作業の省力化を図ることができます。(Ud)

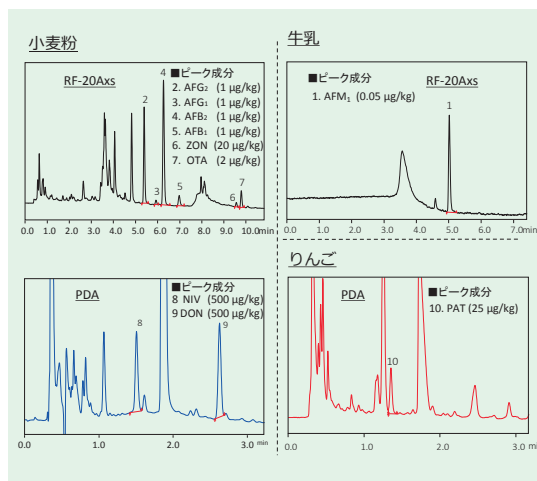


図4 試料の分析例

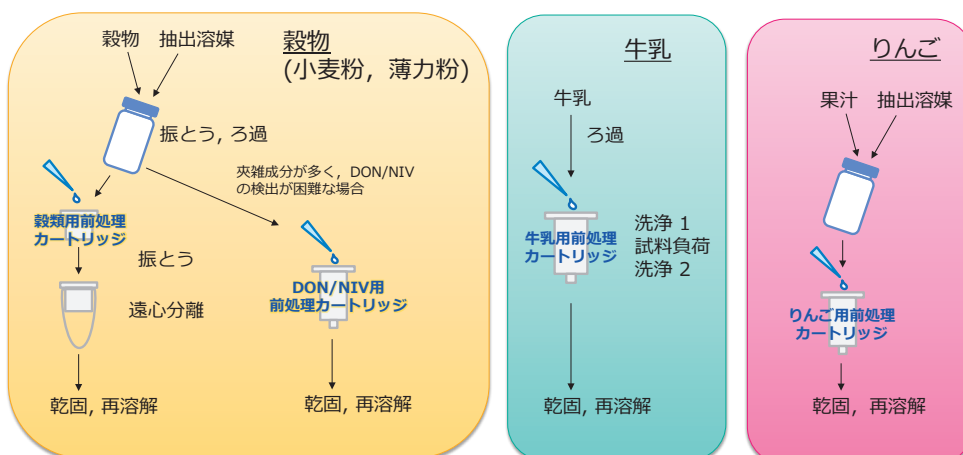


図5 試料の前処理方法

※ 1 スクリーニングキットと Nexera-i に加えて、規制対象成分の標準試料、前処理カートリッジ、移動相の準備が必要です。
※ 2 マイコトキシンスクリーニングキット取扱説明書の前処理方法に従った場合の標準液中換算濃度となります。

Introductory



試料導入装置のはなし(その2)

… オートサンプラー

前回は、マニュアルインジェクター（手動試料導入装置）のについてお話ししました。今回は、昼夜を問わず試料溶液を自動注入してくれるオートサンプラー（自動試料導入装置）についての解説です。

■ オートサンプラーの仕組み

オートサンプラーは、基本的にはマニュアルインジェクターの動作を自動化したのですが、機器メーカーによって、また同じ機器メーカーでも機種によって方式や細部の構造・機構が異なる場合があります。ご自分がお使いになる装置の取扱説明書などを読み、構造・機構を知っておくことが大切です。オートサンプラーは、大きく2つの方式に分けることができます。

● 試料ループのみがカラム流路につながる方式

計量ポンプ（もしくは計量シリンジ）を用いてニードルから吸引された試料溶液が試料ループ内に保持され、次にバルブ切換えによって試料ループのみが移動相流路に接続されて試料溶液がカラムに導入される方式です。図1に、模式図を示します。

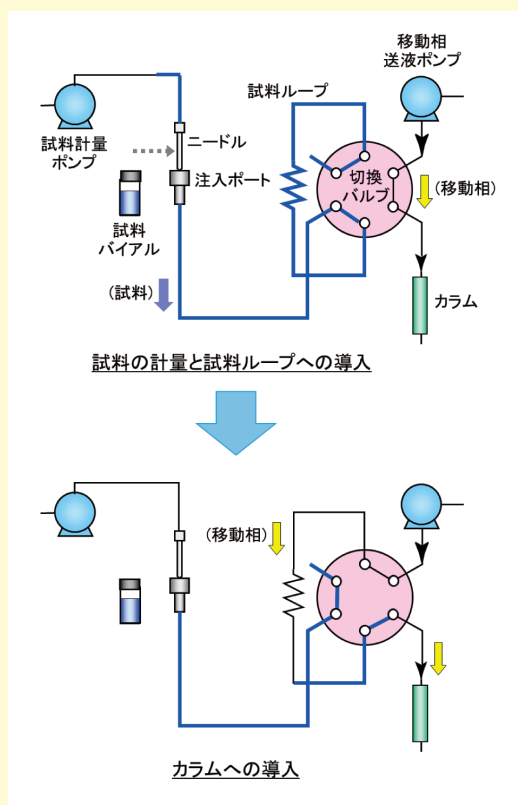


図1 試料ループのみがカラム流路につながる方式

試料溶液の計量は、計量ポンプの吸引量で行う方法もありますが、一般には一定容量の試料ループに計量ポンプによって試料溶液を満たして行います。この方式では、ニードルや注入ポートは移動相流路から切り離されているため、これらには圧力がかからず、構造をシンプルにできます。しかし、通常試料吸引量は実際のカラム導入量より多く必要となり、試料溶液が少量の場合には適しません。また、導入量を変更する場合には、試料ループの交換が必要です。一方で、試料がカラムに導入される際、移動相が流れるのは小容量の試料ループのみであり、グラジエント溶離における遅れ時間を少なくできます。

● 試料ループおよびニードルがカラム流路につながる方式

計量ポンプを用いてニードルから吸引された試料溶液がニードルと試料ループ内に保持され、バルブ切換えにより、これらが移動相流路につながり（移動相流路の一部となり）、試料がカラムに導入される方式で、図2に模式図を示します。試料溶液は、導入量の分だけ計量ポンプで計量されますので、試料を無駄なく使えて微量試料に有利です。また、導入量を装置仕様の範囲内で試料毎に任意に選ぶことがで

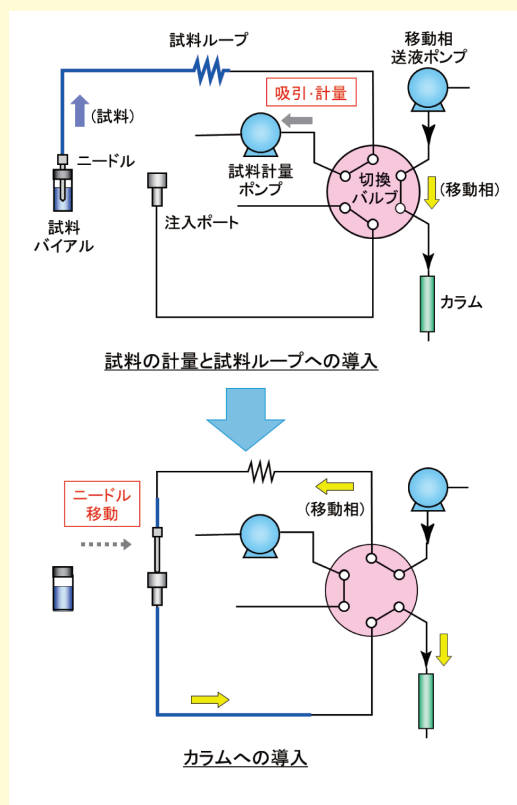


図2 試料ループおよびニードルがカラム流路につながる方式

きます。なお、吸引された試料溶液がそのまま全量カラムに導入されるため、全量注入方式と呼ばれることもあります。現在、一般分析に用いられるオートサンプラーの多くは、この方式を採用しています。図3に、この方式のオートサンプラーの例を示します。

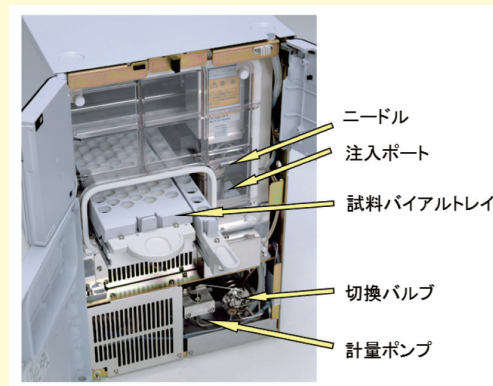


図3 オートサンプラーの例

■ オートサンプラーに求められる性能

オートサンプラーの基本性能としては、導入量の再現性、直線性、正確さが良好であること、試料の残存量や最少必要量が少ないことが求められます。さらには、注入動作の速さ、処理検体数、試料溶液の冷却機能、試料溶液の自動希釈や自動誘導体化に対応した前処理機能などが求められる場合もあります。また、最近では分析の微量化、検出器の高感度化、LC/MS装置の普及に伴い、キャリーオーバー（先に導入した成分がオートサンプラー内に残存して、後の分析で検出される現象：JIS K 0214）の抑制性能が特に重要視されています。

■ メンテナンス

オートサンプラーは、駆動部が多く、性能維持のためにはしっかりした日常点検、定期点検が大切です。オートサンプラーの主要なメンテナンス箇所としては、注入ポート、切換バルブになります。その他の箇所としては、ニードル、試料ループ、計量ポンプ（計量シリンジの場合、シリンジチップ）などがあります。これらは、機種によって異なる場合がありますので、お使いの装置の取扱説明書を確認してください。

● 切換バルブ

切換バルブは、バルブ本体に取り付いているステーターとモーター駆動によりシャフトと共に回転するローターとのすり合わせ構造になっています。これらは、バルブが切り換わる毎に摩耗しますので、定期的な交換が必要です。

ステーターの摺動面の基材には、ステンレス鋼やセラミックなどが、またローター（ローターシール）の基材には、PEEK（ポリエーテルエーテルケトン）、ポリイミド（商品例：ベスベル[®]）、ETFE（エチレン-テトラフルオロエチレン共重合体、商品例：テフゼル[®]）などの合成樹脂が使用されています。

ローターは、使用移動相（有機溶媒種、pH など）によっては交換する場合がありますので、取扱説明書に従って



図4 ローターの例

ください。例えば、PEEKは、高い耐摩耗性と広いpH適用範囲（0～14）から好ましい基材ですが、テトラヒドロフランやクロロホルムでは劣化しますので、これら移動相を用いるサイズ排除クロマトグラフィーでは、ポリイミド製に交換する必要があります。

通常、ローターの方がステーターより交換頻度が高くなります。いずれの場合もバルブの積算回転数が交換の目安になりますので、積算回転数を記憶できる装置では点検時などに確認します。ただし、移動相、圧力などにより摩耗度にかなり差が出ますので、あくまでも目安として考えてください。また、日常点検時、液漏れチェックも行います。ステーターやローターシールの交換は、ユーザーで交換可能な装置では、慣れればそれほど難しい作業ではありません。

● 注入ポート

注入ポートのニードルシールは、分析流路（図2のカラムにつながった状態）では高圧がかかり、試料溶液が接する部分であるため、定期的に交換します。

ニードルシールの基材には、PEEKなどの合成樹脂が用いられています。なお、PEEKの場合、サイズ排除クロマトグラフィーでは、ローターと同じ注意が必要です。

ニードルシールの交換は、機器メーカーが指定する注入回数を目安にしますが、漏れやキャリーオーバーが見られた際にも交換が必要です。図2に、ニードルシールの交換例を示します。この例では、ニードルシールが切換バルブ上部に付いており、手締めで交換できますが、専用工具が必要な場合もあります。

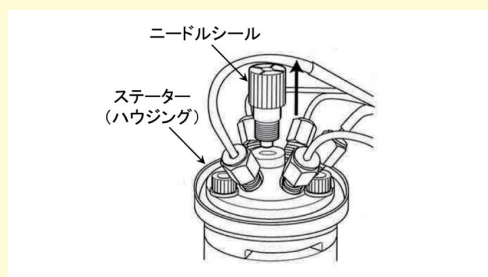


図5 ニードルシール（交換時）の例

以上、オートサンプラーの仕組み、求められる性能、メンテナンスの概要についてお話しましたが、如何でしたでしょうか？オートサンプラーのトラブルは、定量精度に大きな影響を与えますので、ポイントを押さえ、日頃から十分なチェックを行ってください。オートサンプラーのトラブル対処につきましては、また別の機会にお話ししましょう。（Mk）

竹澤 正明 先生

『医薬品の研究開発とクロマトグラフィー』

たけざわ まさあき=株式会社東レリサーチセンター, 医薬営業部
兼 医薬・バイオ事業企画部 部長

- ▶ 1989 年 東京理科大学薬学研究科 (修士修了)
(公社) 日本分析化学会 LC 分析士三段, LC/MS 分析士五段

専門分野	バイオアナリシス, CMC の分析
将来の夢	全都道府県の温泉めぐり (実現までは道遠い)
趣味	小物集め, 焼酎 (麦), 読書



今年の秋の京都は、いつも以上に大変な賑わいでした。海外を含め多くの方々に、京都の素晴らしさを味わっていただきたいのですが、あれだけ集中すると地元民は結構大変です……。 (Mk)

読者のみなさまから・・・

●蒸発光散乱検出器 (ELSD) を使うことになりました。ELSD の基本的な測定原理と使用上の留意点を教えてください。

ELSD は、カラム溶出液を窒素や空気 (ネブライザーガス) を使用して噴霧し、移動相溶媒を蒸発させて除去後、残った不揮発性成分に光を照射して、その散乱強度を測定する検出器です (図 1)。

ELSD は、移動相の蒸発温度で蒸発または分解しない物質であれば、原理的にすべて検出できるという高い汎用性が特長です。ELSD は、紫外吸収がない、あるいは吸収が乏しい分析種に用いる点など、示差屈折率検出器と類似している部分が多いですが、感度面で 5 ~ 10

倍 (場合によっては数十倍) 高いことに加えて、グラジエント溶離が適用できるという大きな利点があります。

ELSD では、移動相が蒸発することが大前提ですので、不揮発性溶媒や試薬を移動相に用いることはできません。HPLC で多用するりん酸およびりん酸塩緩衝液は、使用できませんのでご注意ください。移動相調製を行う際には、器具類などからの微粒子混入にも留意する必要があります。また、別の分析で使用していたカラムを使う際には、移動相の履歴を必ず確認してください。りん酸塩緩衝液などを使用していたカラムの場合、いつまでもベースラインノイズが下がらないことがあります。カラムは、できる限り本検出専用にするのが望ましいと言えます。使用する装置も事前によく洗浄し、流路から不揮発性移動相を除去しておくことが大切です。その他、詳しくは下記文献をご参照ください。

【参考文献】

- 1) 中村 洋監修, ちよっと詳しい液クロのコツ 検出編, pp.79-85, 丸善 (2006)
- 2) 中村 洋企画・監修, LC/MS, LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決, pp.86-88, オーム社 (2015)
- 3) LCtalk Special Issue VII, 特集号 "HPLC 入門", p.24 (2004)

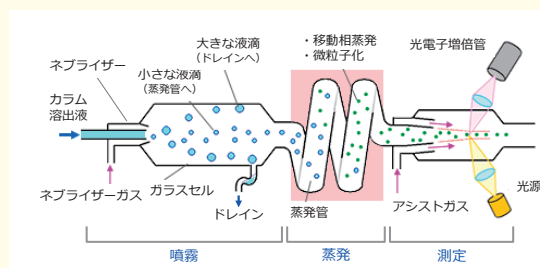


図 1 ELSD の測定原理