

逆相HPLCにおけるゴーストピークの原因と対策について

Causes and Measures for Addressing Ghost Peaks

○佐藤友紀¹, 山口忠行², 金野貴行³, 早川禎宏²

株式会社島津ジーエルシー¹, 株式会社島津製作所 応用技術部², 第一三共株式会社 製剤技術本部 分析評価研究所³

Yuki Sato¹, Tadayuki Yamaguchi², Takayuki Konno³ and Yoshihiro Hayakawa²

1 SHIMADZU GLC Ltd. 2 SHIMADZU CORPORATION 3 Analytical & Quality Evaluation Research Laboratories, Daiichi Sankyo CO.,LTD. 株式会社 島津ジーエルシー 

1. はじめに

- HPLCグラジエント溶離法による逆相分析において発生する問題の1つとして、分析試料に由来しないピーク、いわゆる「ゴーストピーク」の出現が挙げられる。近年では製薬分野における医薬品中類縁物質試験における微量成分の定量や構造推定など、従来よりも微量な成分の検出が要求されるケースも多く、ゴーストピークによるこれら微量成分の同定や定量の妨害、データ信頼性の低下が懸念されている。
- ゴーストピークの原因としては 1) 装置, 2) 移動相, 3) 分離カラム, 4) サンプル, 5) 実験室の環境などの汚染が挙げられるが、これら原因究明と除去には多大な労力や時間を要することが多い。
- 今回我々はこれらの要因のうち移動相および装置に着目し、これらの不純物を除去する前処理カートリッジ「ゴーストトラップ®DS」を開発した。このゴーストトラップ®DSを使用して、ゴーストピークの原因追求とその効果について評価したのでここに報告する。

2. ゴーストトラップ®DSについて

- 新規のカーボンテクノロジー技術で開発した前処理カートリッジで、ゴーストピークの原因となる移動相中の不純物を除去することができる(特許申請中)。
- コンベンショナル分析用ゴーストトラップ®DSと、セミマイクロ分析用ゴーストトラップ®DS がラインナップされている。
- グラジエントミキサーの後ろに取り付けることにより、逆相系分析条件で使用する移動相中の不純物やシステムの汚れを除去することができる。

Table1 Specifications of Ghost Trap®DS

| 品名 | サイズ | 内部容量 (μL) | 耐圧 (MPa) |
|----------------------------|---------------------|-----------|----------|
| コンベンショナル分析用 ゴーストトラップ®DS | 7.6 mmI.D. × 30 mmL | 700 | 35 |
| セミマイクロ分析用 ゴーストトラップ®DS | 4.0 mmI.D. × 20 mmL | 150 | |



Fig.1 Aspect of the Ghost Trap®DS

3. 逆相分析におけるゴーストピークの原因について

ゴーストピークの原因は、目的成分以外の夾雑物やLC装置内の汚れ、移動相中の不純物など様々ではあるが、1) 装置由来, 2) 試料由来, 3) 移動相由来, の3項目に大別できる。

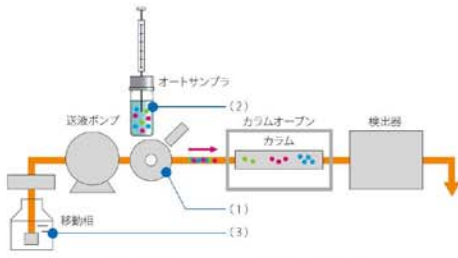


Fig.2 Sources of Ghost Peaks

3-1. 装置由来のゴーストピーク

装置由来のゴーストピークの原因箇所として、オートサンプラ(または、マニュアルインジェクタ)が挙げられる。ニードルはサンプルを吸引するためにバイアル瓶の中に浸かるが、この際ニードルの外表面および内面にキャリアオーバーの原因となる試料中の成分が吸着する可能性がある(Fig.3)。ニードルに付着した成分が次の分析時に持ち越され、これがゴーストピークの原因となる。クロルヘキシジンのように吸着性の強い成分は、ブランク分析(サンプル溶媒もしくは移動相を注入した分析)を何度か繰り返しても出現するため、オートサンプラに起因していると気づきにくい。



| | Carryover |
|---------------|-----------|
| ブランクテスト (1回目) | 0.0006% |
| ブランクテスト (2回目) | 0.0003% |
| ブランクテスト (3回目) | 0.0004% |

Fig.3 Evaluation of Carry Over

3-2. 試料由来のゴーストピーク

目的化合物と同じ吸収波長を持つ夾雑物が試料中に含まれると、これがゴーストピークとなる場合がある。試料由来のゴーストピークは、ブランク分析では出現しないため、原因究明は比較的簡単である。その対策としては、1) ディスポーザブルフィルターを使用する、2) サンプルの前処理を工夫する、などにより試料中の夾雑物を除去できる。また、ゴーストピークの発生が試料の分解性に起因する場合は、バイアル瓶の冷却機能が備わっているオートサンプラを使用することにより、その分解を抑制することも可能である。

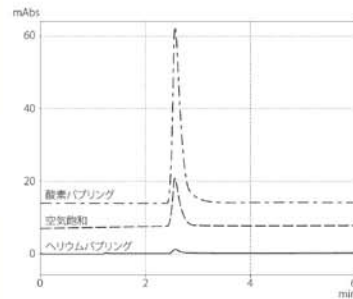


Fig.4 Chromatograms Under Various Conditions

一方、試料そのものに由来するものではなく試料溶媒中の溶存空気量(UV検出の場合は溶存酸素量)がゴーストピークの原因となる場合がある。Fig.4には移動相として水とメタノールの混合液をオンライン脱気した状態に、サンプルとして溶存酸素濃度を変えて注入したクロマトグラムを示した。この結果からも移動相と試料溶液中の溶存酸素量の違いがゴーストピークを出現させることがわかる。

Table2 Analytical Conditions

| | |
|--------------|--|
| Mobile Phase | : Water / Methanol = 15 / 85 (vol/vol) |
| Column | : Shim-pack STR ODS II (4.6mmI.D. × 150mmL.) |
| Flow Rate | : 1 mL / min |
| Temperature | : 40 °C |
| Detection | : UV @ 210 nm |

3-3. 移動相由来のゴーストピーク

移動相由来のゴーストピークの原因として下記の項目が挙げられる。

- 移動相を長期使用することにより、移動相中に有機物が発生する、または空気中の有機物が溶け込む
- 移動相を継ぎ足して長期使用することにより移動相ビンが汚染される
- 移動相で使用する有機溶媒や水に由来する不純物
- 移動相試薬由来の不純物

移動相の場合は消費量が多く、しかも比較的長期間使用し続けることから、試料の場合のようにフィルタや前処理での除去は現実的ではない。また、そうした汚れが装置内部や配管等に付着し、これが送液の過程において、わずかながらではあるものの移動相と共にカラムに送り込まれ、ゴーストピークとして検出される場合がある。とりわけグラジエント溶離による逆相分析では、そうしたゴーストピークの原因物質は、分析開始時にカラムに保持され、そして有機溶媒比率が上がったときに溶出するため、目的化合物と似た挙動を示す場合は分離が非常に難しくなる。このように、移動相由来のゴーストピークは原因の特定が難しく、しかもメソッド上の変更では対応が難しいというのが現状である。

4. ゴーストトラップ®DSによるゴーストピーク除去の検討

前述した通りゴーストピークの原因を特定することは難しい。また抜本的な防止策が難しい場合はその原因となる物質をトラップすることによって、ゴーストピークの出現を抑制する方法が有効である。今回開発したゴーストトラップ®DSを移動相流路の4箇所(b)~(e)の位置に接続し、ゴーストピークの抑制効果を比較検討した。Fig.5にゴーストトラップ®DSの接続位置を、Fig.6に各々の位置におけるクロマトグラムを示した。また、分析条件をTable3に示した。

今回の試験条件下では、送液ポンプAの流路由来(もしくは送液ポンプAで使用している移動相由来)のゴーストピークが多く出現することが示された。また、ゴーストトラップ®DSをグラジエントミキサーの前または後ろに接続した場合においてゴーストピークの出現パターンがわずかに異なることから、グラジエントミキサーの汚れに由来するゴーストピークも存在することが示唆された。

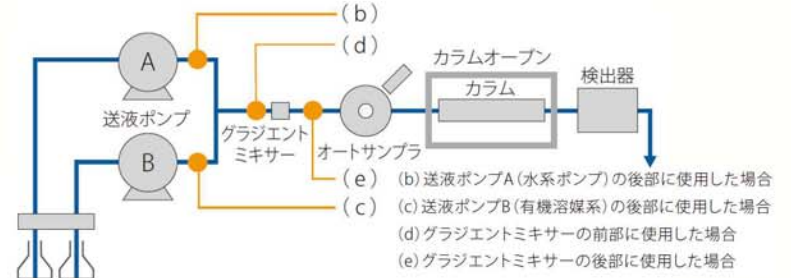


Fig.5 Ghost Trap®DS Test Connection Positions

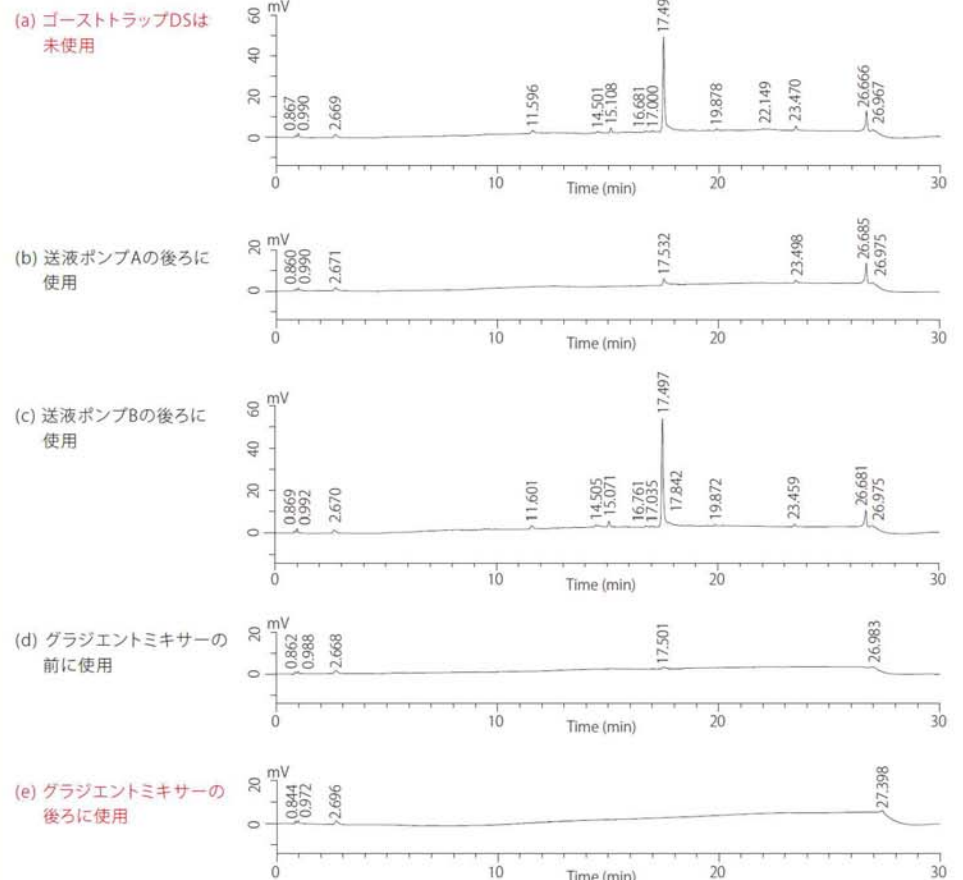


Fig.6 Example of Ghost Peak Removal Using Ghost Trap®DS

Table3 Analytical Conditions

| | |
|--------------|--|
| Mobile Phase | : A ; 25 mmol / L (Potassium) phosphate buffer (pH 4.0) / Acetonitrile = 9/1(vol/vol) B ; Water / Acetonitrile = 1/ 9 (vol/vol) |
| Column | : ODS |
| Flow Rate | : 0.65 mL / min |
| Temperature | : 45 °C |
| Detection | : UV @ 210 nm |

5. ゴーストトラップ®DSの耐久性について

Table 4の条件でゴーストトラップ®DSの耐久性試験を行った結果をFig.7に示した。移動相A液には、不純物として10ppbのp-ヒドロキシ安息香酸エステル(C1~C5)水溶液を用いた。

この結果より、13L以上の移動相を通過しても初回と500回目のクロマトグラムに変化は見られなかった。

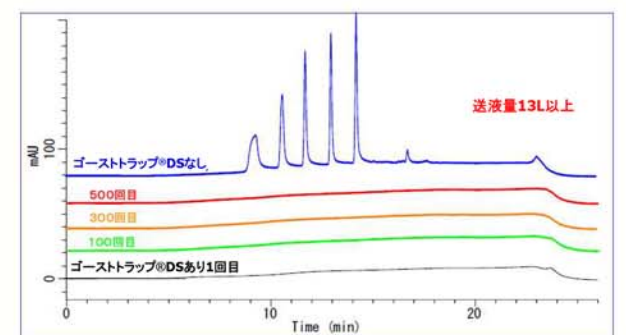


Fig.7 Endurance Test of Ghost Trap®DS

Table4 Analytical Conditions

| | |
|--------------|--|
| Mobile Phase | : A ; 10ppb p - hydroxybenzoate in Water B ; Methanol |
| Time Prog. | : B Conc. 10%(0min) → 90%(20min) |
| Column | : ODS (4.6 mmI.D. × 150 mmL , 5 μm) |
| Flow Rate | : 1 mL / min |
| Temperature | : 40 °C |
| Detection | : UV @ 210 nm |

6. 結果・考察

- ゴーストトラップ®DSをグラジエントミキサーの後ろに接続することにより、ゴーストピークの原因となり得る移動相由来の不純物やグラジエントミキサー由来の微量な汚れを除去できることが示された。
- p-ヒドロキシ安息香酸エステルを用いて耐久性試験を行った結果、使用開始時と13Lの移動相通過後のクロマトグラムに変化が見られなかったことから、ゴーストトラップ®DSによる微量不純物のトラップ効果の高さを示すことができた。