

自動化・省力化が進む次世代の HPLC

林 慶 子

1 はじめに

分析ラボにおける課題の一つに信頼性・精度向上が挙げられる。その解決方法には手作業を最小化し、自動化・省力化を進めることが挙げられる。本稿ではオートサンプラーを高性能化して実現した事例を紹介する。

前処理工程では希釈や試薬添加が一般的に行われている。手作業で実施される場合には、作業者の熟練度による結果のばらつきが懸念となる。前処理を自動化することは、信頼性向上や並行精度の向上のみならず、作業者の化学物質の暴露リスクやコストの低減につながる。

初期溶媒組成による試料調製はクロマトグラフィー性能にとって非常に重要な要素となるが、抽出溶媒が異なる場合や測定成分の安定性の観点から強溶媒を使用しなければならないことがある。しかし、強溶媒で試料を調製するとピーク形状の悪化やブレイクスルー（非保持）が引き起こされるため、追加の処理を行い、溶出強度を下げるなどの処理が必要となる。したがって、クロマトグラフィー性能と結果の信頼性を両立させることが求められる。

反応プロセスモニタリングや Process Analytical Technology (PAT) のためのデータ取得では、サンプル取得の属人性が課題となる。オートサンプラーを高性能化しサンプリングからデータの処理までを完全に自動化することによって操作ミスの低減化を図り、分析結果の信頼性向上のみならず、意思決定の速度を更に向上させることが可能になる。

また、上述のようにラボにおける作業負担軽減のニーズは高まっている。そこで、本稿の後半では最小限の手作業負担で実験者スキルに依存せずに信頼性の高い結果を得ることができる次世代の HPLC について述べる。

2 オートサンプラーによる分析精度の向上

2.1 プログラミングによるサンプル希釈の自動化

HPLC で一般的なフローズルーニードル注入の利点である注入量可変のフレキシビリティを応用し、簡易の前処理をオートサンプラーで実行することができる機能がインジェクタプログラムである¹⁾。このプログラムによ

り、希釈や添加などのピペッティング作業を自動化することができるため、ミス低減による信頼性向上ばかりでなく前処理の負担軽減や消耗品や工数などのコスト削減の効果が得られる。

希釈操作をプログラムする場合、先行事例を参照してメソッド設定できるが、汎用的に使われる「希釈」、「段階希釈」、「添加」、「OPA (*o*-phthalaldehyde) や FMO (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 試薬によるアミノ酸のプレカラム誘導体化」の典型的なプログラム機能も追加した。この機能のテンプレートをを用いると、LC の習熟レベルに依存せずに誰でも簡易前処理の設定が可能になり、プログラムの間違いによる試行錯誤の手間を削減しつつ結果の信頼性を防止することができる。

インジェクタプログラムを活用し段階希釈を行って作成した検量線の結果を比較すると、手作業で調製したキャリブレーション溶液の分析で得られた回帰式が $y = 27.85x + 0.53$ (決定係数 R^2 0.99999) であるのに対し、インジェクタプログラムで調製した試料の分析では $y = 27.64x - 0.18$ (決定係数 R^2 1.00000) であり、同等の検量線が得られた。なお、コントロールサンプル (9 mg/L) での二つの検量線での定量値の偏差は 1.08 % であった²⁾。

2.2 新規注入方式によるサンプル前処理の省力化

サンプルを極性の高い有機溶媒に溶解した場合に、試料溶媒との相互作用によってピーク形状の悪化、特にフロンティングやピークのブロードニングが引き起こされる場合がある（溶媒効果）。そこで、試料溶媒の溶媒強度を下げるため、水などによる希釈や乾固及び再溶解による溶媒転溶を行うことが考えられるが、多くの場合、手作業の負担が増える。

そこで、この問題を解決するため、溶媒効果を低減する Feed 注入TM を新規に開発した。この方法は、HPLC で汎用されるフローズルーニードル注入（以下フローズルー注入）とは異なり、アジレント独自の注入機構である。

図 1 に Feed 注入の流路図を示す。Feed 注入は、元々は超臨界流体クロマトグラフィーのために開発された注

入機構である。CO₂の液化状態を維持しながら大気圧の液体サンプルの注入を両立するために、計量デバイスで調製したサンプルを加圧しながら注入する。この方法では、サンプルは移動相に希釈されながらカラム先端に到達するため、フロースルー注入よりも溶媒効果を抑制する効果が期待される。

しかし、実試料の分析では、止むを得ず有機溶媒に溶解しなければならない場合が多い。一例として有機フッ素化合物（PFAS）が挙げられる。水で調製すると回収率が低下する懸念や固相抽出に有機溶媒が用いられるこ

となどから有機溶媒での調製となるが、一方で、高感度定量が必要とされるため、注入量の最大化と溶媒効果の低減が必要である。

フロースルー注入による PFAS 分析の結果と Feed 注入による結果（図 2）を示す³⁾。フロースルー注入ではサンプル中の有機溶媒が初期移動相組成の溶媒と十分混和されないためピーク形状の悪化が溶出時間の短いピークで顕著に確認されたが、Feed 注入では、サンプル注入量が 2 倍であるにもかかわらず良好なピーク形状が得られた。

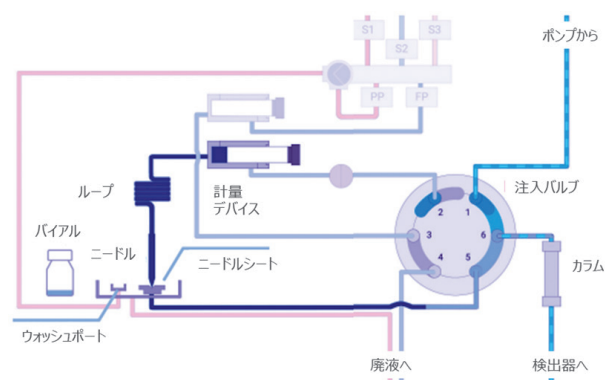


図 1 Feed 注入の際の流路図

2.3 サンプリングと HPLC 分析の自動化

近年 PAT が実用化され、医薬品、工業製品の生産における合成反応や培養過程を可視化するニーズが高まっている。PAT は、可視化によりプロセスの理解を促進し、意思決定の速度を飛躍的に向上することができる。一般的な HPLC システムではユーザーがサンプルを手作業でオートサンプラーにセットする必要があるため、サンプルを製造プロセス中から自動的に採取しシームレスに注入できる新規バルブを搭載したオンラインサンプルマネージャーを開発した。リアクターから反応液や培養液を直接オートサンプラー内の計量シリンジで吸引

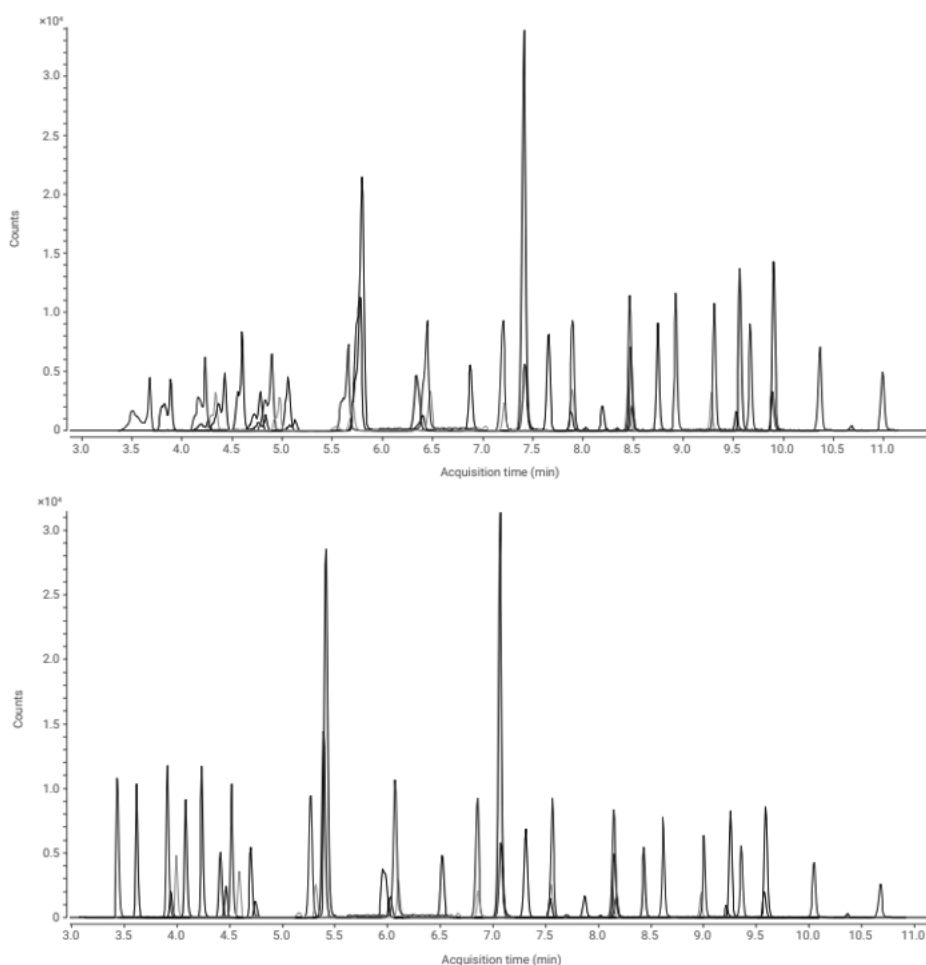


図 2 フロースルーニードル注入による PFAS のクロマトグラム（上、2.5 μL 注入）と Feed 注入のクロマトグラム（下、5 μL 注入）

し、分析カラムに直ちに注入できるように、図3に示すように注入バルブのほかに反応液のサンプリング用のバルブを備えたモジュールである、この注入システムを用いたオンラインLCでは、サンプリングのタイミングを設定しておくだけで、反応液や培養液の経時変化を全自動でモニタリングすることが可能となる。また、この注入システムは、反応のクエンチや反応液といった前処理を自動で実施してから注入することもできる。

図4には自動合成装置とオンラインLCの接続図及びコハク酸モノビニルエステルの加水分解反応への応用例を示す。反応槽からポンプを用いてサンプリング専用バルブに反応溶液を送液し、サンプリングのタイミングごとに自動的にサンプルを注入しHPLC分析をシームレ

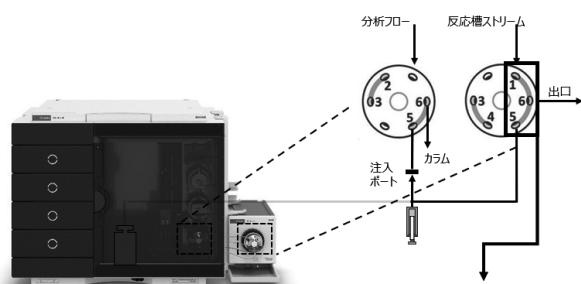


図3 オートサンプラーを活用したサンプリング装置

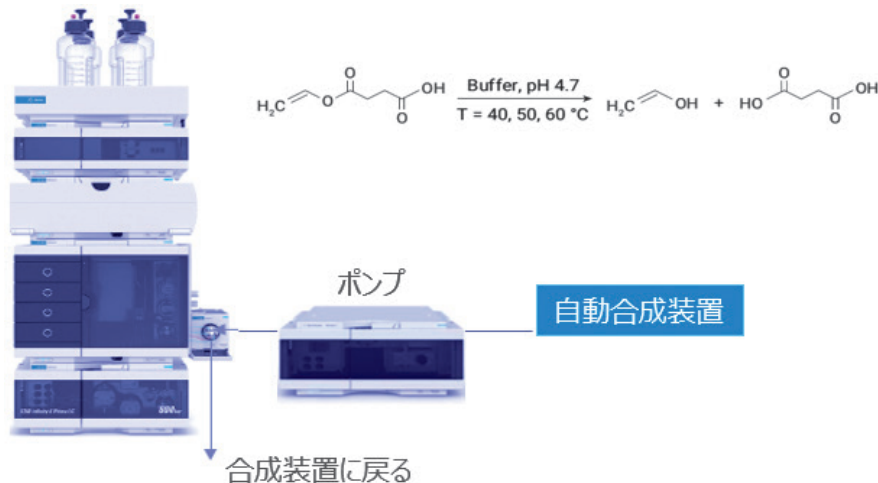


図4 自動合成装置とオンラインLCの接続図及びコハク酸モノビニルエステルの加水分解

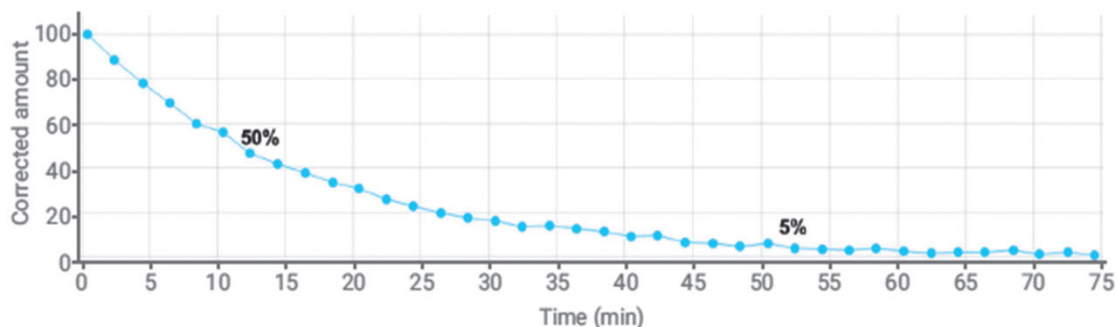


図5 コハク酸モノビニルエステルの加水分解のトレンドプロット

スに行った。また、経時変化を可視化するために横軸に時間、縦軸にピーク強度や面積値をプロットしたトレンドプロットを得ることができる。通常のワークフローでは表計算ソフトウェアを使用してトレンドプロットを作成する必要があるが、オンラインLCの専用ソフトウェアではピークの積分処理、ピーク同定、面積値やピーク高さなどの処理をデータの取得後即時に実行し、トレンドプロットへのデータポイントを経時的に追加することができる。図5に示すように出発化合物のコハク酸モノビニルエステルが減少していく反応の推移を可視化することができた⁴⁾。

2・4 サンプル位置を自動認識するオートサンプラー

オートサンプラーは連続的に分析を行うための装置で、シーケンスやワークリストといった連続分析テーブルの通りに指定されたサンプル位置から順に繰り返し注入動作を行う。サンプルの位置と連続分析テーブルで指定する位置が一致しないと注入エラーや結果の取り違えのリスクがある。サンプルの取り違えを防ぐためにバイアルへのラベル徹底やサンプル位置のダブルチェック、得られた結果のレビューなど多段階にわたり注意を払う必要があり、結果の信頼性確保は作業者の負担となっている。



図6 バーコード印字済みバイアル（右下）とバーコードリーダー（右上）を搭載したシステム

これらの問題を解決するため、オートサンプラーがサンプルの位置と情報を読み取るためのバーコードリーダーを開発した。図6の右下に示したバイアル底面にあらかじめ印字された二次元バーコードを右上のデバイスで読み取り、バイアル位置情報を取得する。これによって連続分析テーブルにはサンプルの位置を入力する必要はなくなり、分析結果の信頼性を向上することが可能になった⁵⁾。

2.5 新規パージ方法による移動相切り替え省力化

HPLCでは移動相の調製が日々必要とされる。新しい移動相に交換する際には新しい移動相でポンプヘッドを満たすポンジパージが必要である。この反復作業の負担を軽減するため、オートサンプラーを活用したスマートパージを開発し、Agilent Infinity III LCシリーズに実装した。これにより、パージバルブの閉め忘れや開閉に伴う待ち時間や手作業を軽減することが可能になった。また、パージの際の圧力変動をモニターし、適切に実施さ

れているか評価しながら実施するため、ユーザーの判断や確認の手間を最小限にすることができた。図7にはスマートパージの動作中の圧力モニタリングの一例を示す。なお、スマートパージは最新のAgilent Infinity III LCシリーズのみならず、2014年に販売を開始したAgilent Infinity II LCシリーズにも追加可能である。

3 まとめと展望

前処理の自動化や省力化がインジェクタプログラムや新規注入機構による溶媒効果の低減などオートサンプラーの機能を拡張することによって達成できることを示した。

スマートパージや反復作業を低減するタスク機能を実装した次世代のHPLCの一層の発展が期待される。

文 献

- 1) 林 慶子, 熊谷浩樹: LCとLC/MSの知恵, 6, 6 (2023).
- 2) Technical Overview: 5994-1704JAJP, オートサンプラーによるピペッティングの自動化, Agilent Technologies (2020).
- 3) Application Note: 5994-6994EN, More Sensitive Quantification of PFAS by LC/MS with the Agilent 1260 Infinity II Hybrid Multisampler, Agilent Technologies (2024).
- 4) Application Note: 5994-4706JAJP, エステル加水分解の温度依存反応モニタリング Agilent Technologies (2022).
- 5) Technical Overview: 5994-7560JAJP, サンプル位置の特定と測定の確認, Agilent Technologies (2024).



林 慶子 (HAYASHI Keiko)
アジレント・テクノロジー株式会社 (〒191-8510 東京都八王子市高倉町 9-1), 広島大学生物圏科学研究科博士課程前期修了。
《趣味》料理と旅行。
E-mail: keiko_hayashi@agilent.com

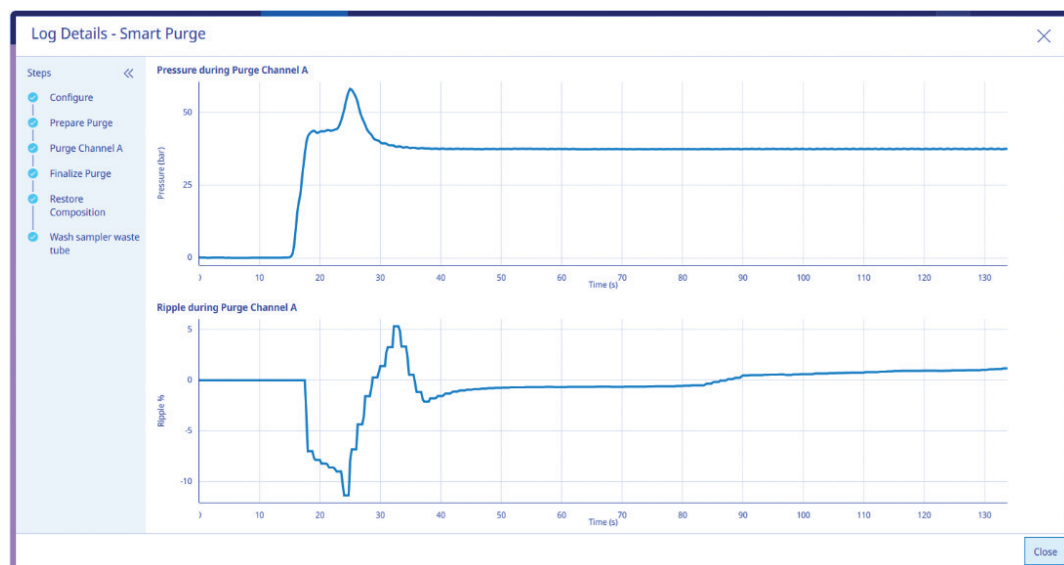


図7 スマートパージ実行中のモニタリング画面
上: 圧力; 下: 圧力リップル

会社ホームページ URL :

<https://www.chem-agilent.com/>

関連製品ページ URL :

<https://explore.agilent.com/hplc-assistance-jp?elqTrackId=4bebabf82bc845d2b3a6d8735d0f35b4&elq=00000000000000000000000000000000&elqaid=17415&elqat=2&elqCampaignId=&elqak=8AF5D8B03C9F95FCD990B773FE6B97004D3A71615A886548B877DCCFA650313F777B>

原 稿 募 集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象：以下のような分析機器、分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術、2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術、3) 分析機器および分析手法の応用例、4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説、5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項、6) その他、分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情

報など

新規性：本記事の内容に関しては、新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく、既存の装置や技術に関わるもので構いません。また、社会的要求が高いテーマや関連技術については、データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先：

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]