

Technical Review

新汎用型HPLC用検出器、コロナ荷電化粒子検出器の紹介

* 千田正昭、福島景子、橋口九州男、松本 勉、P. H. Gamache、J. C. Waraska、D. Asa

A New Universal Detector, Corona Charged Aerosol Detection

Masaaki Senda^{*1,2}, Kyouko Fukushima¹, Kusuo Hashiguchi¹, Tsutomu Matsumoto¹,
P. H. Gamache³, J. C. Waraska³ and D. Asa³¹MC Medical, Inc., ² Senda Analytical Technology Lab., ³ESA Biosciences, Inc.

15-25, 7-chome, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, 22841-2 Kusahana, Akiruno-sh, Tokyo 322 Alpha Road Chelmsford, MA, USA

Abstract

A universal detector for high performance liquid chromatography has been a dream for a long time. UV detector has been one of the most popular in HPLC field. For molecules like carbohydrates and lipids, which have neither UV chromophores nor fluorescence, refractive index detector (RI) and an evaporative light scattering detector (ELSD) have been used. These techniques, however, are not always satisfactory particularly in terms of sensitivity. Recently, ESA Biosciences, Inc. has developed the corona charged aerosol (CAD) detector. This universal detector is highly sensitive and gives consistent and reliable response, as well as wide dynamic range. It has been found that CAD detector is the most suited for determination of impurities and degradants testings in natural products and synthetic compounds.

Keywords : universal detector ; HPLC ; charged aerosol detector (CAD)

1. 緒言

高速液体クロマトグラフィーにおける検出器は紫外吸収検出器 (UV)、蛍光検出器 (FL) 等選択的検出器が主に使用されてきた。GCの分野では熱伝導度検出器 (TCD)、水素炎イオン化検出器 (FID) など汎用検出器が使用され、またGC-MSも早くから実用化された。液体クロマトグラフィーの分野でも古くから、紫外吸収や蛍光を持たない化合物や容易に高感度な誘導体化ができない化合物に対して高感度な汎用型検出器が望まれていた。以前から使われている示差屈折計 (RI) は周囲温度に影響を受けやすいこと、感度が低いこと、更にグラジエント溶出には使えないという欠点を有している。一方1970年代後半に開発され、最近普及してきた蒸発

光散乱検出器 (ELSD) がRIよりも高感度でグラジエントが可能とのことで、近年糖質や脂質の分析、コンビナトリアルケミストリーにおけるモニター検出器、ポストゲノム研究におけるLC/MSとの同時使用機器として普及して来ている。2004年10月、米国ESA Biosciences, Inc. (Chelmsford, MA, USA) が開発した荷電化粒子検出法を用いた最新鋭の汎用型高感度HPLC用検出器Corona CAD (charged aerosol detector) がELSDより高感度で、均一な応答性を示し、広いダイナミックレンジをもつ検出器として登場してきた。本検出器は2005年、PITTCON 2005にてEditor's Awardの銀賞、また同年の100件の優れた開発装置に贈られる2005 R&D 100 Awardも合わせて受賞した。

〒160-8355 東京都新宿区西新宿7丁目5番25号 西新宿木
村ビル11階
エム・シー・メディカル株式会社 ライフサイエンスグループ

TEL : 03-5330-7863
FAX : 03-5330-0499
E-mail : m.senda@mcmed.co.jp

2. コロナCADの外観と仕様

コロナCAD検出器の外観

Physical specifications :



Figure 1. Corona CAD

20.5 (L) x 9 (W) x 11.25 (H)

(52.5 cm x 23 cm x 28.6 cm)

22 lbs (10 kg)

3. 原理 [1-3]

本検出器では、まず揮発性のカラム溶出液が窒素ガスなどの不活性ガスで噴霧される。大きな液滴は半球形のインパクターに衝突し、しずくとなり排液として捨てられる。溶質を含んだより小さな液滴のみがインパクターを通り抜け、更に乾燥管を通り蒸発乾燥される。移動相溶媒は蒸発除去され、乾燥された溶出物微粒子が中性の球状微粒子を生成する。一方、別の窒素ガスの気流は高電圧の白金コロナ電極を通る際にプラスに荷電され、 N^+ イオンを生成する。ミキシングチェンバーにて、この N^+ イオンの流れが溶出物球状微粒子の流れに衝突し、電荷を球状の溶質粒子表面に転移してプラスに帯電させる。球状の溶質粒子の大きさに応じて電価の数も増加する。高い移動度の過剰な N^+ イオンはマイナスに荷電した低電圧のイオントラップにより除去される。低い移動度の荷電した大きな粒子はイオントラップを通過する。荷電した粒子は導電性の膜フィルター（コレクター）に突き当たり、電子は集められる。その結果、高感度な電流計にインプットされる。その出力電流は溶質粒子の増加に相当して増加する。そこで次々に信号を生じ検出器の出力として記録される。このため、これまで高感度に精度良く検知することが不可能であった種々の不揮発性及び半揮発性物質を、本器により、高感度で分析することが可能となった。検出感度は試料分子の構造や特性に関係なくほぼ一定である。また、移動相溶媒は蒸発除去されるためグラジエント溶出が可能である。

Table 1. Instrumental Specifications

General operating specifications

Operating mode	Charged aerosol Detection
Mobile phase flow rate	Up to 2 ml/min
Full scale output range	1 pA to 470 pA
Filter time constants	None, Low, Medium, High
Signal output	0.1 V DC
Output resolution	0.12 μ at 1 V full scale (24 bit bipolar)
Function keys	Autozero, Event Marker, Gas ON/Off
Remote control	Via RS 232
Method storage	Up to methods
Programmable	Gas(on/off), Set Output Contact Closures (4), Autozero, Filter, Marker, Current Range, Hold, Loop, Reset Parameters

External requirements

Power	100-240 VAC, 50/60 Hz, 100 VA
Gas	Nitrogen (recommended)
Operating gas pressure	35 psi (2.4 bar)
Operating gas flow rate	Up to 5 L/min

Specifications subject to change without notice

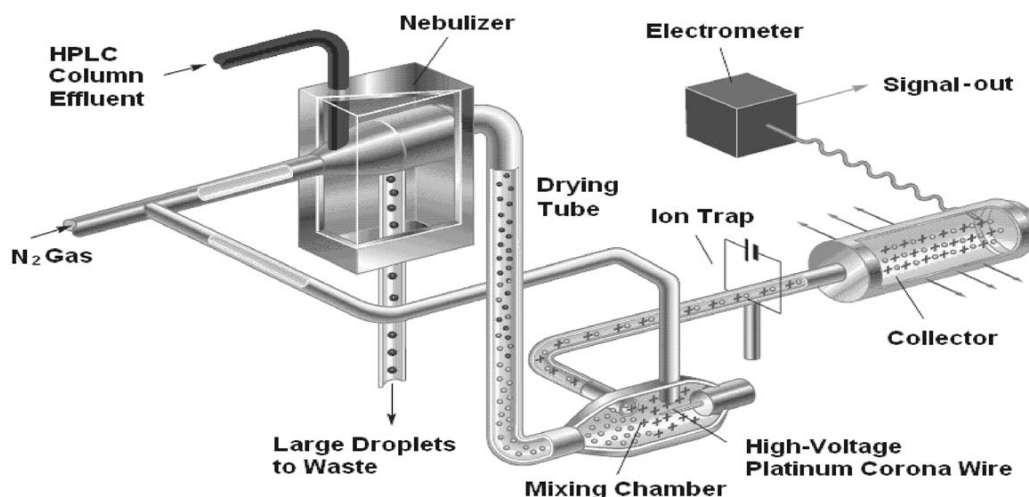


Figure 2. Schematic Diagram of Corona CAD

ダイナミックレンジは4桁の広い応答性を示す。Figure 2に検出器の構造の概略を示す。本装置のHPLCの揮発性移動相を蒸発除去するところはELSDと同じであるが、検出段階でELSDが光散乱を利用するのに対して粒子に荷電化を行いその電荷を測定する方式である。この検出原理は環境大気のアエロゾル測定にElectrical Aerosol Detector (TSI Inc. Shoreview MN, USA)として以前より利用されていた。HPLCへ最初の実用を試みたのはDixonたちの論文 [1] である。

4. 応用

コロナ検出器は不揮発性、半揮発性の試料成分を広く検出するため、糖質、脂質、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、医薬品、フラボノイド、非イオン性界面活性剤など、酸性、塩基性、中性、分子の大きさ、イオン性などの物質の構造・性質にかかわらず均一な応答性がある。そのため多くの応用例がある。UV吸収の無い、あるいはUV吸収の弱い成分でも高感度に検出できることと、広いダイナミックレンジにより、従来見落とすことのあった合成、発酵、天然物等の不純

物分析や微量成分の追跡分析が可能である。特に医薬品製造企業における原材料、賦活剤の純度検定、不純物測定、分解物測定、クリーニングバリデーションの分析等に広く利用され、Pittcon 2005、Pittcon 2006、HPLC 2005、HPLC 2006などの最近の学会・シンポジウムにて報告されている [4-9]。コロナ検出器単独でも使用されているが、LC/MS(MS)、UV検出器との共存分析により相互補完効果があり、総合解析が行われている。

Figure 3 - Figure 7に応用例の一部を示した。

5. 他の検出器との比較

コロナ検出器はTable 2のように他の検出器と比較して検出感度、定量範囲、感度一定性、分析対象物質の広さ、再現性、操作性に優れている。特に原理的に類似しているELSDと比較されるが、移動相溶媒の除去までは類似しているが、検出段階がELSDは光散乱、CADは電荷の転移により電気的な検出を行うところが異なっている。ELSDの場合には溶媒蒸発後の粒子径が100 nm程度が検出限界であるが、CADで

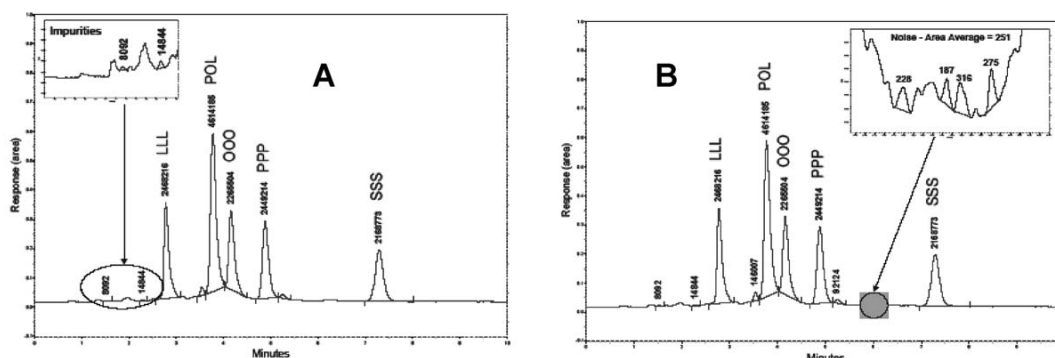


Figure 3. Impurity Testing A) Separation of triglyceride standards (2µg each on column). Inset – two contaminants (area responses – 8092 and 14844) B) Separation of triglyceride standards (2µg each on column). Inset – typical noise (average 251).

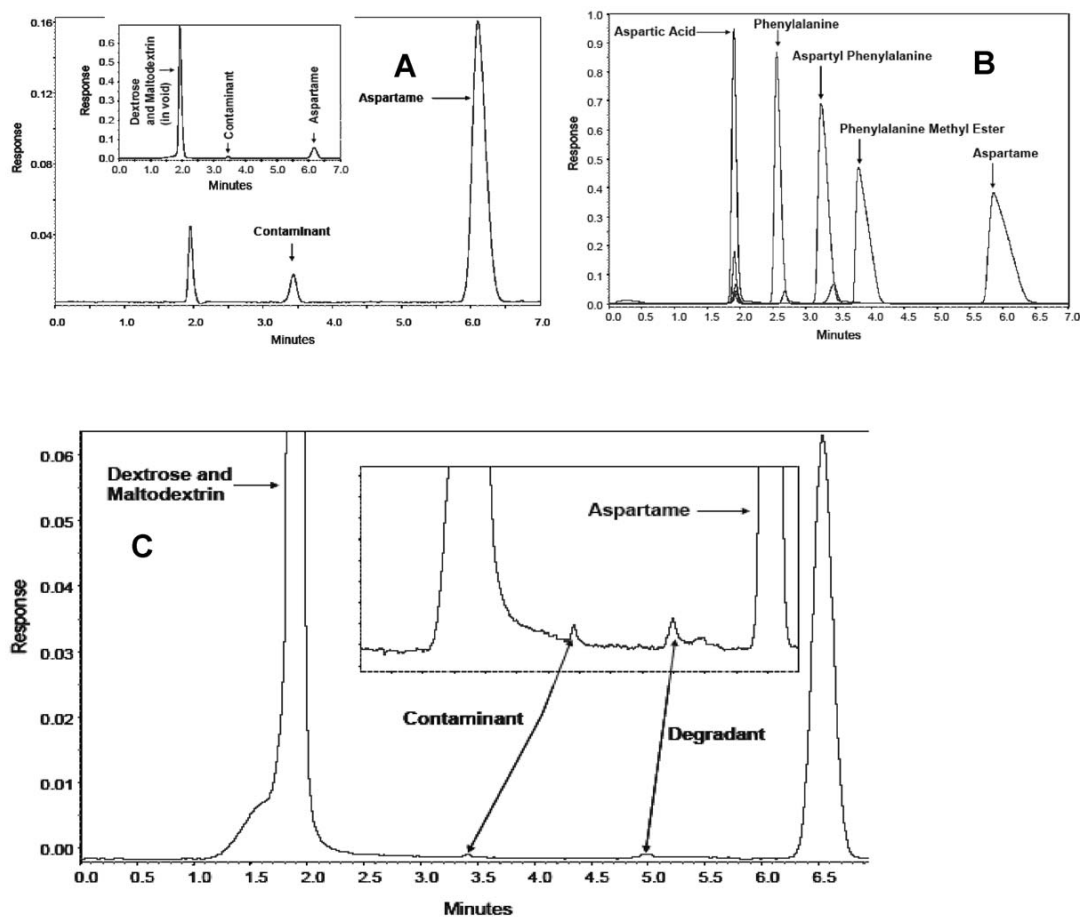


Figure 4. Contaminants and Degradants. A) Detection of a contaminant in both the aspartame standard and Equal[®] (inset). B) Aspartame and several possible precursors and degradants (10 μ g each, on column) C) Detection of contaminants and degradants (10 μ g Equal[®] on column). Inset – at $\sim 20 \times$ sensitivity.

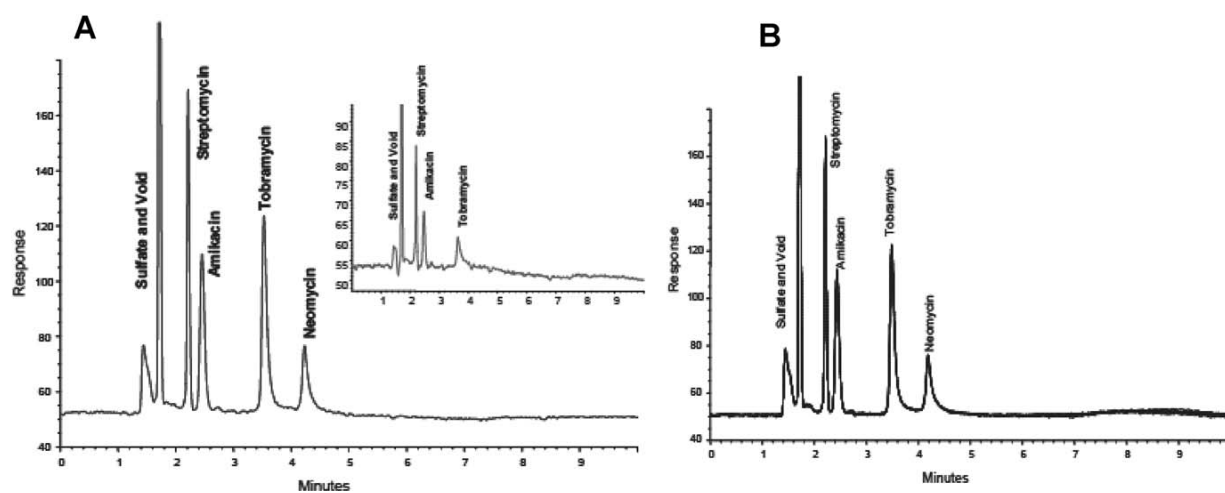


Figure 5. Antibiotics A) Antibiotic standards 200 ng each on column, Inset– 50 ng , B) Reproducibility (5 replicates of 200 ng standard)

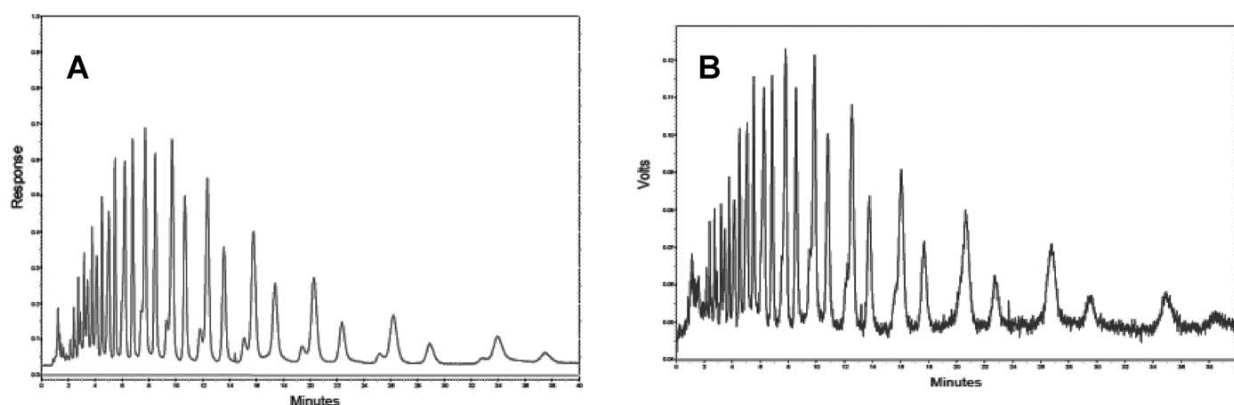


Figure 6. Non-ionic surfactants A) Tween 80 stock diluted 1 : 100 (v/v) in mobile phase. (Gain range = 2 pA full scale), B) Tween 80 stock diluted 1 : 1000 (v/v) in mobile phase. (Gain range = 1 pA full scale)

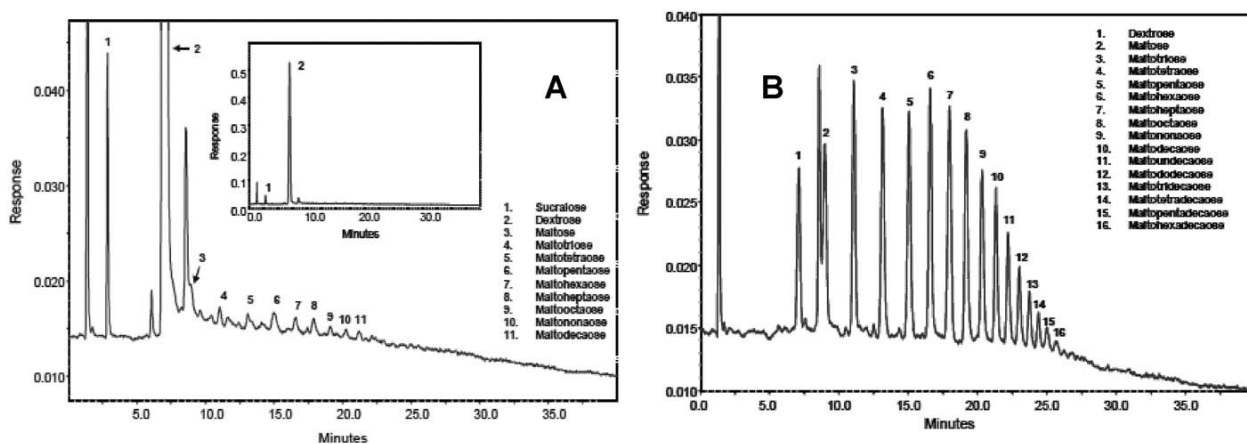


Figure 7. Artificial Sweeteners Splenda, A) Analysis of Splenda® (10 µg on column). Inset is at -10 x less sensitivity. B) Analysis of Maltodextrin (10 µg on column)

は10 nmレベルまで検出可能である [1]。また検量線が曲線と成るがCADの場合にはダイナミックレンジが4桁あり、比較的直線に近く、限られた範囲ではほとんど直線とみなせるところが異なる [4]。

6 . 結論

コロナ検出器は高感度な汎用型検出器で、多くの可能性を有している。特徴を下記した。

* 高感度である。検出限界は低ngオーダーまで。

Table 2. Comparison of HPLC Detectors

	Sensitivity	Dynamic Range	Consistency of Response	Applicability	Reproducibility	Chromatographic Compatibility	Ease of Use
CAD							
UV							
ELSD							
CLN							
RI							

CLN : Chemiluminescence Nitrogen (化学発光窒素検出器)

- * 分析成分に影響されない一定な応答係数。
- * ダイナミックレンジが4桁と広い (ng ~ µg)。
- * 再現性が良い (RSD 2 %以内)。
- * 応用性が広範である、ほとんどの不揮発性成分に対応する。
- * 簡単な操作性：セットアップから分析まで15～30分程度。
- * アイソクラティック、グラジエント溶出法に適応する。
- * 合成、発酵、天然物等の成分の純度検定、汚染物質レベルの測定に有用。

7. 引用文献

- [1] Dixon, R.W., Peterson, D.S. : *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2930–2937
- [2] Gamache, P.H. MacCathy, R.S. : HPLC analysis of non-volatile analytes using charged aerosol detection. *LCGC* **2005**, 23 (2)
- [3] Macarthy, R., Gamache, P., Asa, D. : Development and evaluation of corona charged aerosol detection (CAD) : a new universal detector for HPLC. *LabPlus international*–June **2005**.
- [4] Gorecki, T., Lynen, F., Szucs, R. Pat Sandra. : *Anal. Chem.* **2006**, in press.
- [5] Mororeau, R.A. : The Analysis of Lipids via HPLC with a Charged Aerosol Detector. *Lipids* **2006**, 41 (7)
- [6] Gallagher, R., et al. AstraZeneca : Evaluation of Charged Detection for use as a relative or absolute purity indicator and its application in Protein–Ligand binding studies. *HPLC* **2005** Abstract.
- [7] Baretshi, S., et al, Eli Lilly and Company. : Evaluation of a new “Universal” HPLC Detector : ESA’s Corona Charged Aerosol Detector. *Forced Degradation* **2005** Abstract.
- [8] Carlson, E., et al, Eisai Research Institute. : Automated Microwave Synthesis in Focused Library Production. *ACS* **2005**, November.
- [9] Forsatz, B.J., et al, : Schering. HPLC with Corona Charged Aerosol Detection for Cleaning Validation in Pharmaceutical Company. *HPLC* **2006** Abstract.