

# ダイヤモンド電極型電気化学検出器を用いたHPLC分析システムの構築 ～含硫アミノ酸の高精度定量分析法～

Junichi Isegawa<sup>1</sup>, Akira Nakayama<sup>1</sup>, Naoko Arashida<sup>1</sup>, Izumi Miyazaki<sup>2</sup>, Takao Tamura<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>AJINOMOTO CO., INC. Pharmaceutical Research Lab. <sup>2</sup>GL Sciences Inc.

## Summary

電気化学検出の作用電極として、特殊な安定化処理を施した導電性ダイヤモンド電極を使用し、従来法と比較し、精度、安定性、選択性及び効率面で極めて優れた電気化学検出器-HPLCシステムを構築した。

従来、電気化学検出器の作用電極として広く用いられてきたグラッシーカーボンもしくはグラファイト電極には、以下のような欠点があった。

- ① サンプルや移動相中の不純物が電極に吸着されることにより、安定性が悪く、感度変化が大きく、定量分析には向きでない。
- ② 電極に高電圧をかけられないことにより、シスチンのように高印加電圧が必要な化合物の感度が低い。

これらの欠点を克服する電極として、導電性ダイヤモンドが注目されており、良好な安定性で使用できると報告されているが、導電性ダイヤモンドにおいても、含硫アミノ酸などの一部の化合物では、徐々に感度変化を起し、定量精度に欠けることが判明した。

そこで、我々は導電性ダイヤモンドにさらに特殊な処理をすることにより、極めて優れた電気化学検出器を開発した。

本検出器とカラムスイッチング法を組み合わせることにより、医薬品（輸液製剤）開発分野に応用した。

従来、輸液製剤中の含硫アミノ酸分析法は、SH基を持つシスチンとSS基を持つシスチンとを同時に定量できる方法がなく、それぞれ別々に分析しており、効率面で煩雑であった。本システムにより同時にしかも短時間（20分）で、高精度、高選択的に分析できるようになった。

また、生体試料中含硫アミノ酸の分析法としては、カーボン電極を用いた電気化学検出法や蛍光誘導体化法があるが、前者は前述のように感度変化が大きく定量性に欠け、後者は煩雑な前処理工程が多く安定性に欠けていた。このシステムにより生体試料中のチオール・ジスルフィド化合物などの含硫アミノ酸を同時、高精度に分析することが可能となり、生体試料中の微細なアミノ酸の変動も測定できるようになった。

①

## Back Ground

### ●分析の意義

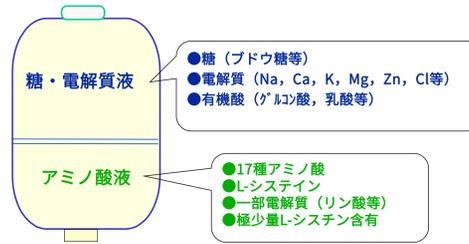
輸液製剤の研究・開発において、輸液中での安定性を確認するため、含有成分のシスチン及びその酸化物であるシスチン含量を定量している。

### ●輸液製剤の現行法

シスチン：比色法、シスチン：アミノ酸分析法  
 現行法の特徴：①同一分析でない②長時間分析③分析操作煩雑  
 ⇒ **分析効率のアップが課題**

### ●輸液製剤中シスチン、シスチン分析の特性

- ① **分析上の特性：シスチンの不安定さ**  
 中性、弱アルカリ条件下で容易にシスチンへ変換  
 輸液製剤のPH、弱酸性・中性
- ② **製品特性：糖・電解質・アミノ酸・有機酸等を含む多成分系**  
 多成分中の少量シスチン、シスチンを定量  
 分離定量が煩雑



### ●輸液製剤中のシスチン、シスチン分析を効率化したい!

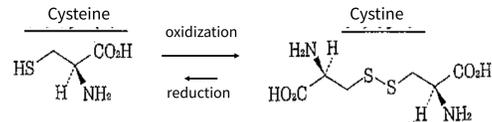
#### 要求事項

- ① シスチンとシスチンの同時分析
- ② 高い堅牢性
- ③ 分析サイクルの短縮
- ④ 前処理の簡素化

ファーストチョイスはHPLC-ECDシステムであるがカーボン電極では堅牢性が良くない。そこでダイヤモンド電極を搭載した新しいECD検出器で分析を試みた。

②

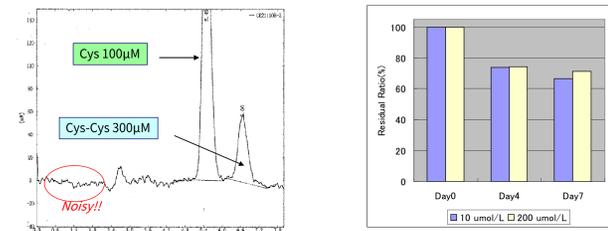
## シスチン・シスチンの変換



③

## 従来法の評価

カーボン電極を用いたECDによるラット血漿中のシスチン、シスチンの分析



ラット血漿中のシスチン、シスチンの分析 (applied voltage: 900 mV)  
 ノイズが大きくシスチンの感度が低い!

シスチンの感度変化 (applied voltage: 500 mV)  
 感度が1週間で30%も落ちてしまう!

Column : Inertsil ODS-3 3 mm i.d. x 150mm 3μm (GL-Science)  
 Column temp. : 40°C  
 Solvent : 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-5mM OSA \*Buffer pH2.2 / MeOH = 95/5 (v/v)  
 Flow rate : 0.8mL/min  
 Pretreatment : deprotonation using HClO<sub>4</sub>  
 \*OSA: Octanesulfonic Acid

### 問題点!

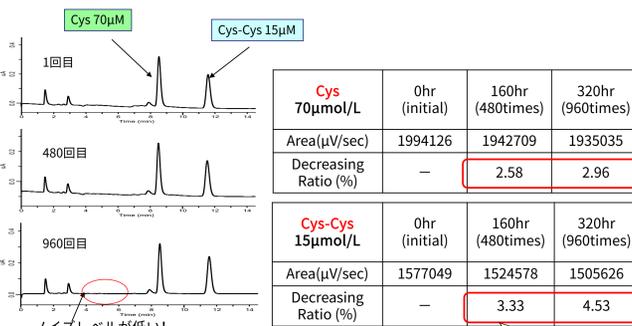
- ① シスチン分析には高い印加電圧が必要 ⇒ S/Nが悪い!
- ② 低い印加電圧によるシスチン分析でも耐久性がない!

⑥

## 新分析法の評価

ダイヤモンド電極を用いたECDによるラット血漿中のシスチン、シスチンの分析

### 「連続分析時」のベースライン変動とピーク面積変動(over 13 days)



分析条件: ⑭参照

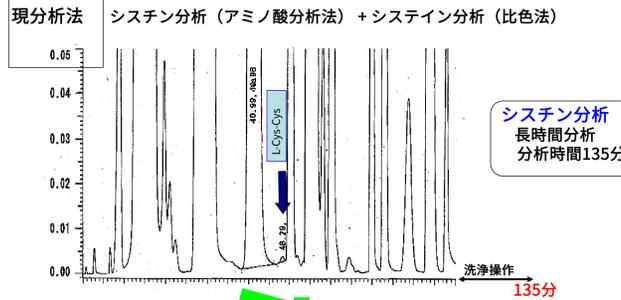
電気化学検出器としては「驚異的」な耐久性!!

ベースラインもほとんど変動がない SH基、-S-S-基とも面積値に変動はほとんど認められない

⑦

## 新規シスチン、シスチン分析法の構築

ダイヤモンド電極とカラムスイッチング法を組み合わせた分析法

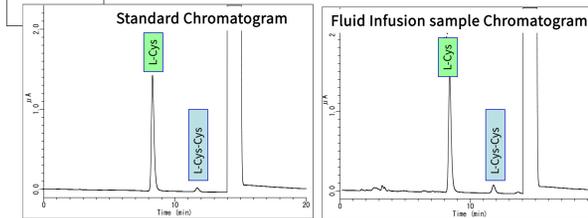


シスチン分析  
操作が煩雑

同時分析を実現  
(分析時間短縮化・操作簡略化)

## 新分析法

ベースラインの安定性、ピーク形状とも問題なし

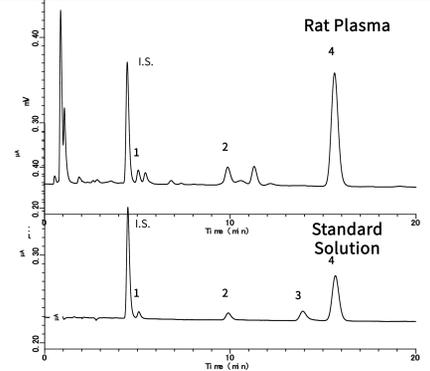


分析条件: ⑭参照

④

## 実サンプルへの応用

ラット血漿中Cys、Cys-Cys、ホモシスチン (Hcy)、還元型グルタチオン (GSH) 同時分析法  
 Bio-Analysisに関するFDAガイダンス (2001 May)に準じたバリデーション試験



Column : Inertsil ODS-3 3.0mm i.d. x 100mm 3μm (GL Science)  
 Pre-Column : Inertsil ODS-3 3.0mm i.d. x 10mm 3μm (GL Science)  
 Column temp. : 45°C  
 Solvent : 25mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-20mM Heptanesulfonic Acid/CH<sub>3</sub>CN = 98.5/1.5 (v/v)  
 Flow : 0.75 mL/min  
 Detect : ECD with Diamond electrode, Applied voltage 1600mV (On-Line Reproduction 4000mV for 1min.)  
 injection : 10μL  
 Pre-Treatment : deprotonation using HClO<sub>4</sub> + diluted with solvent

### <内在成分の正確度の算出・定量下限の設定>

定量下限は、内在成分の濃度に応じた値 (通常1/3~1/2程度) となる。



### <直線性の評価 : 血漿添加検量線>

Criteria of FDA Guidance : Accuracy 100±15%

Cys		GSH		Hcy		Cys-Cys	
Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)	Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)	Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)	Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)
6	98.3	3	100.4	6	103.9	15	99.4
12	104.3	6	99.7	12	96.3	30	102.4
30	104.0	15	100.2	30	99.0	75	97.0
60	102.4	30	100.2	60	102.0	150	86.8
120	96.9	60	98.8	120	99.4	300	---
300	91.0	150	100.5	300	100.0	750	108.4
Weight 1/X <sup>2</sup>		Weight 1/X		Weight 1/X		Weight 1/X <sup>2</sup>	

### <精度の評価 : 血漿添加サンプルでの日内再現性データ>

Criteria of FDA Guidance : Accuracy 100±15%, Precision <15%

Cys			GSH			Hcy			Cys-Cys		
Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)	Precision (%)	Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)	Precision (%)	Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)	Precision (%)	Conc. (μmol/L)	Accuracy (%)	Precision (%)
12.0	99.7	6.9	6.0	86.0	7.5	12.0	96.2	3.7	30.0	100.5	6.7
60.0	103.2	2.2	30.0	99.4	3.5	60.0	103.5	2.5	120.0	112.0	9.7
300.0	93.0	5.5	150.0	101.8	3.5	300.0	100.9	3.4	750.0	110.3	3.6

マウス血漿サンプル中の各成分の濃度レベル

Cys: 10~15μmol/L, GSH: <10μmol/L, Hcy: <1μmol/L (Under LOD), Cys-Cys: 20~30μmol/L

Cys、GSH、Cys-Cysについては、ラット血漿におけるフリー濃度域での定量性が証明された。  
 ⇒ 病態や薬剤投与等による微小な変動を精度良く定量することが可能

⑧

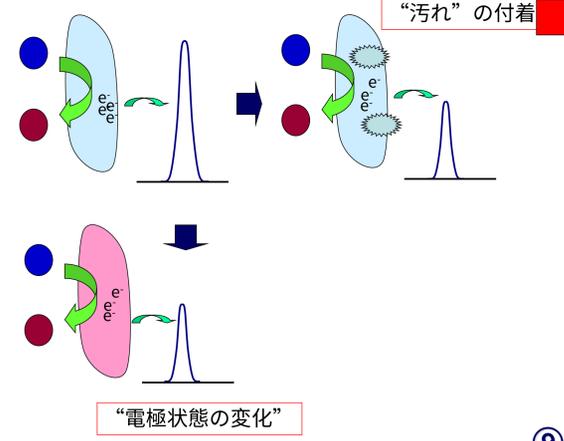
# 新技術により従来の問題点を克服!

## 旧タイプの電気化学検出器の定量性が悪い理由

### 電気化学検出器の特性

電気化学検出器の宿命として、サンプルを測定すると次第に電極表面の状態が変化したり、電極表面にサンプルや移動相などに由来する汚れが付着し、レスポンスが変化する現象がある

電気化学検出器の不安定さの原因  
電極劣化と感度変化の模式図

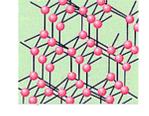


⑨

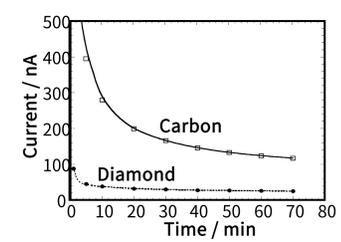
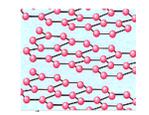
## New technology 1: 高電圧による電極のOn-Line洗浄

### ダイヤモンド電極の特長: 高電圧に対する耐久性がある!!

**Diamond**  
炭素が正四面体を形成  
⇒ 高電圧に耐えられる



**Carbon**  
炭素が層を形成  
⇒ 層間の結合は弱い  
⇒ 高電圧に耐えられない

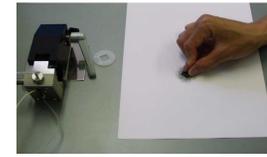


<http://www.courtside.co.jp/racket/dunlop/rim40.htm>  
よりイラスト引用

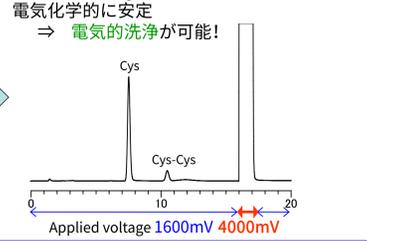
### 再生後のベースラインの安定が早い!

#### 電極再生法

従来のカーボン電極  
研磨などの機械的洗浄



ダイヤモンド電極  
電気化学的に安定  
⇒ 電気的洗浄が可能!



面倒な作業、時間がかかる・・・  
電極をセルから取り外す必要あり・・・  
研磨後の安定性が悪い・・・

**On-Line洗浄**  
分析毎に最後のピークが溶出後1分間高電圧をかけるだけ!  
しかもタイムシーケンスにより自動的に!

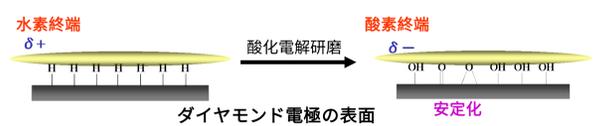
⑩

## New Technology 2 On-Line 酸化電解研磨処理による、電極表面の安定化

### ダイヤモンド電極の表面処理

ダイヤモンド電極の表面状態には水素終端と酸素終端の2種類がある。一般的に初期状態は水素終端であるが、徐々に酸化されて酸素終端に変化する。この計時変化により目的成分によってはピーク面積が徐々に減少して、感度のバラツキの原因となる。

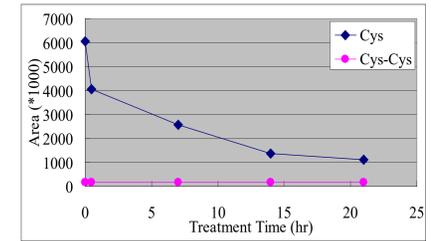
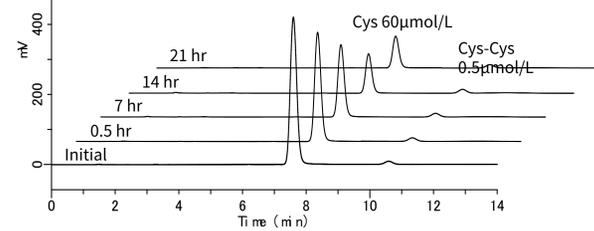
そこで水素終端のダイヤモンド表面に酸化電解研磨処理を加え、電極表面状態を高度に酸素終端にして安定化させることにより、長期にわたり再現性の良い分析結果が得られるようになる。



Diamond electrode oxidizing condition: Applied voltage 5000mV

### 表面処理時間とピーク面積

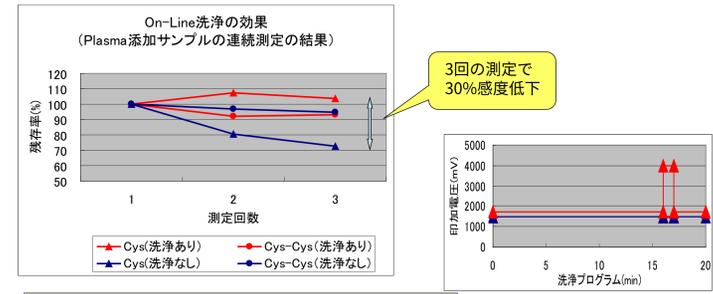
酸化電解研磨処理の時間とCysの面積値の関係をみると最初に急激な面積値の減少がみられ、徐々に安定化して20時間を越えたとほとんど変化がみられなくなる。



Column: Inertsil ODS-3 3 mm i.d.×150mm 3µm (GL Sciences)  
\*プレカラムによるカラムスイッチングなし。その他の条件: ⑩参照

⑫

## ON-Line洗浄の効果



On-Line洗浄無しでは、Cysの感度が顕著に低下している。  
⇒ 生体成分由来の物質によって電極が劣化している可能性大

⑪

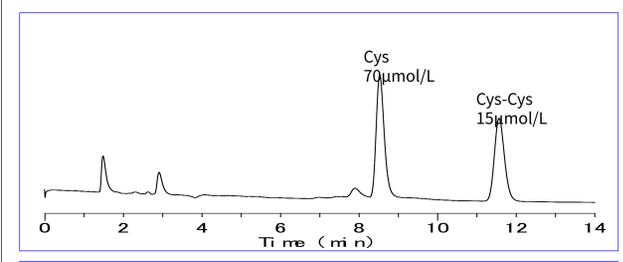
## Conclusion

- ① 導電性ダイヤモンド電極電気化学検出器とカラムスイッチング法を組み合わせることにより、システイン、システインの同時分析法を確立した。
- ② 本分析に用いる導電性ダイヤモンド電極の堅牢性を確保する手段として表面処理法(安定化法)およびOn-Line洗浄法を確立した。これにより、電気化学検出器としては驚異的な堅牢性が確保できた。
- ③ 本法を用いて、生体試料を用いた連続測定(約2週間)をしたところ、感度がほとんど変動せず、堅牢性の高さが証明された。
- ④ 本法を製剤中のシステイン・システイン規格試験法に応用した。輸液製剤中のシステイン・システインを同時に、高精度、高選択的に短時間で分析することが可能となった。
- ⑤ 本法を生体試料中のチオール・ジスルフィド化合物を含む含硫アミノ酸分析に応用、同時に高精度、短時間で分析することが可能となった。

⑬

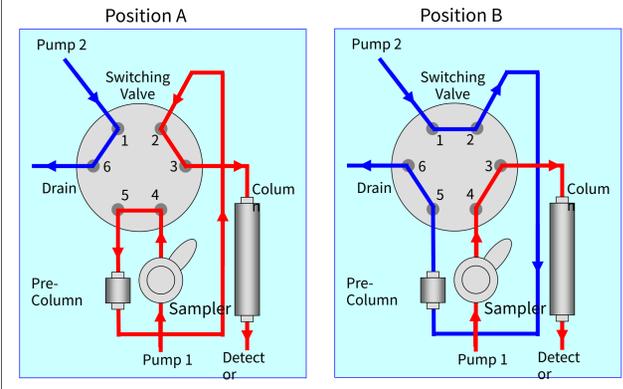
## 基本分析システムの紹介

—除タンパク後のラット血漿に添加したシステイン、システインの分析—



**Conditions**  
Column : Inertsil ODS-3 3 mm i.d.×33mm 3µm (GL Sciences)  
Pre-Column : Inertsil ODS-3 3 mm i.d.×150mm 3µm (GL Sciences)  
Column temp. : 40°C  
Solvent : 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-5mM OSA\* Buffer pH2.2 /CH<sub>3</sub>CN = 97.5/2.5 (w/w)  
Flow rate : 0.4mL/min  
Detect : ECD with Diamond electrode, Applied voltage 1600mV  
\* On-Line Reproduction 4000mV for 1min. (15-16min)  
Valve Switching: Initial position A  
Program 2min position B  
Pretreatment : deprotonation using HClO<sub>4</sub>  
\*OSA: Octanesulfonic Acid

### 流路図

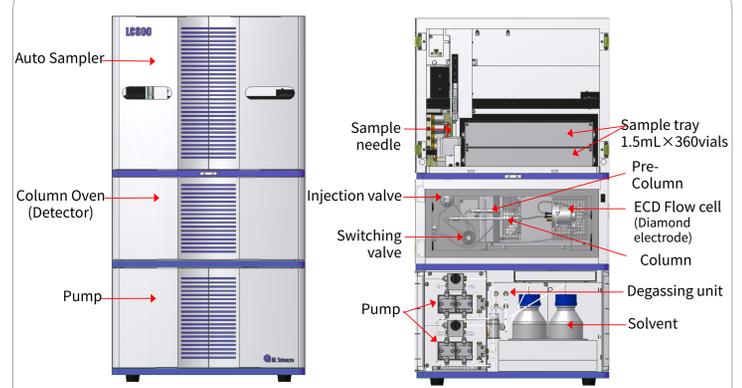


## Electro chemical detector ED703 pulse (GL Sciences)



- Measuring method: Pulsed amperometric, Amperometric, Scan
- Working electrode: Diamond, Gold,
- Reference electrode: Ag/AgCl
- Oven : 20 to 45 degree C

## HPLC System LC800 (GL Sciences)



この新しいHPLCシステムはインジェクションバルブ、スイッチングバルブ、カラムとECDのフローセルのすべてをオープンに内蔵したことによって、より安定した分析結果をもたらします。

⑭