

## よりよい分析メソッドへ –メタルフリー環境への提案–

近年、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いた微量分析が広く行われています。一部の生体試料や配位性化合物は、金属と相互作用し、ピークがテーリングする問題があり、メタルフリー環境での分析が注目されています。

**Keywords** メタルフリー環境 カラムハードウェア クロマトグラフィー管 フリット 充填剤  
バイオイナート バイオコンパチブル キャリーオーバー

### カラムのメタルフリー化

金属と相互作用するため分析が難しいとされているのは、次のような物質です。

- ・ペプチド
- ・低分子リン酸化化合物
- ・金属との相互作用を生じやすい官能基(-COOH基、又は-OH基)を複数有する物質

これらの微量分析では、吸着によるピークのテーリングやキャリーオーバーを防止するために、溶離液の工夫や配管の洗浄、金属表面のマスキングなどの対策が講じられています。

#### ■ カラムハードウェアをメタルフリー化する

カラムハードウェアとは、カラムを構成するクロマトグラフィー管及びフリットで、一般にステンレスが用いられます。

クロマトグラフィーにおけるカラムは試料が接触する箇所です。金属と相互作用を起こす試料の分析には、LCの流路において比表面積が大きいカラムのメタルフリー化が有効です。

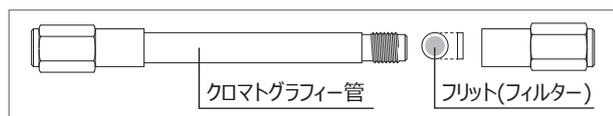
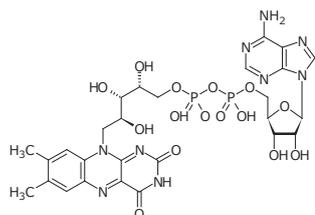


Fig.1 カラムの構造

FAD(フラビンアデニンジヌクレオチド)(Fig.2)は、ビタミンB<sub>2</sub>の代謝物で、補酵素としてクエン酸回路などの多くの代謝に関わり、生体の酸化還元系に重要な役割を果たしています。ここでは、同じ充填剤にて、異なる材質のカラムハードウェアを比較しました(Fig.3, Fig.4)。



FAD(Flavin adenine dinucleotide)

Fig.2 FAD(フラビンアデニンジヌクレオチド)の構造

#### 「クロマトグラフィー管の影響」

カラム内壁の金属と接触しないガラスライニングステンレス管の方が、FADのピーク高さ、ピーク面積、S/Nが向上します。

クロマトグラフィー管材質：

ステンレス管

ガラスライニングステンレス管



フリット : ステンレス  
充填剤 : L-column2 ODS, 5 μm

Fig.3 カラムハードウェアの材質比較(クロマトグラフィー管)

#### 「フリットの影響」

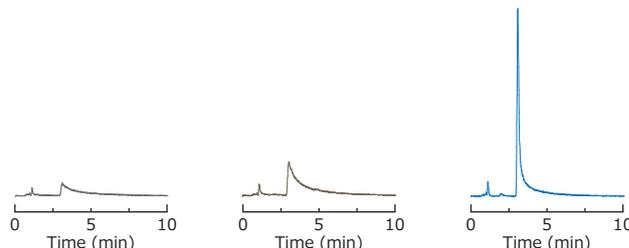
吸着性はフリットの材質に大きく影響されます。ポリマー系のフリットではステンレスと比較して、FADのピーク高さ、ピーク面積、S/Nが大きく向上します。

フリット材質：

ステンレス

チタン

ポリマー系



クロマトグラフィー管 : ガラスライニングステンレス管  
充填剤 : L-column2 ODS, 5 μm

Fig.4 カラムハードウェアの材質比較(フリット)

[Analytical conditions] (Fig.3, Fig.4)  
Column: L-column2 ODS, 5 μm  
Size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: CH<sub>3</sub>CN/0.1% HCOOH in H<sub>2</sub>O (10/90)  
Flow rate: 0.3 mL/min  
Temp.: 40°C; Detection: ESI(+); Inj. vol.: 5 μL(10 mg/L)

## ■ 低吸着な充填剤を用いる

カラムの要である充填剤が、より低吸着でなければ、カラムハードウェアをメタルフリー化しても、吸着の影響は排除できません。

アデノシンリン酸類(AMPs)(Fig.5)は、リン酸基を有するヌクレオチドで、DNAやRNAを構成する生体分子で多くの生命現象に関わっています。ここでは、同じメタルフリーのハードウェアにて、エンドキャッピング密度の異なる充填剤を比較しました(Fig.6)。

低密度なエンドキャッピングでは、充填剤表面の被覆は十分ではありません(Fig.7)。充填剤表面に露出した金属との相互作用により、吸着を起こし、低濃度の検出が困難になります。高密度にエンドキャッピングされている **L-column2 ODS** ではAMP及びdAMPがシャープなピークで検出されています。

このように、ガラスライニングステンレス管にポリマー系フリットを装着したハードウェアと、基材シリカゲルの金属不純物が少なく、エンドキャッピングの表面被覆が高密度な **L-column2** の充填剤により、高性能なメタルフリーカラムが実現しました。

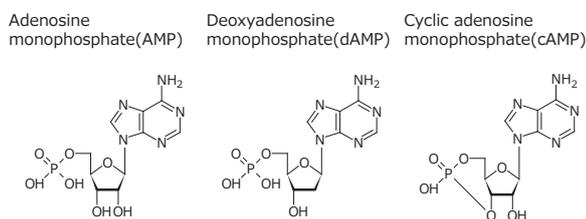
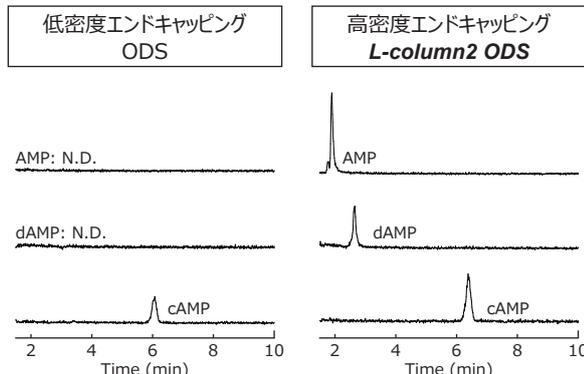


Fig.5 アデノシンリン酸類の構造

充填剤：



クロマトグラフィー管：ガラスライニングステンレス管  
フリット：ポリマー系

[Analytical conditions]  
Column: C18, 5 µm; Size: 2.0 mm I.D.×150 mm L.  
Eluent: CH<sub>3</sub>CN/0.1% HCOOH in H<sub>2</sub>O (1/99)  
Flow rate: 0.3 mL/min  
Temp.: 40°C; Detection: ESI(+); Inj. vol.: 5 µL(0.05 mg/L)

Fig.6 充填剤比較

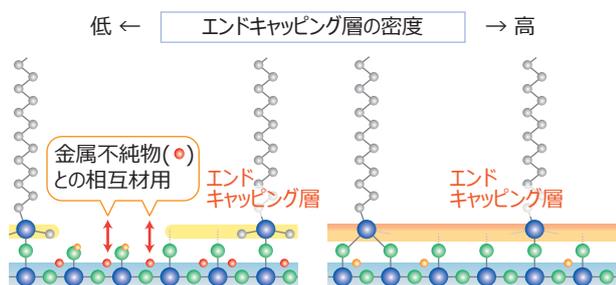


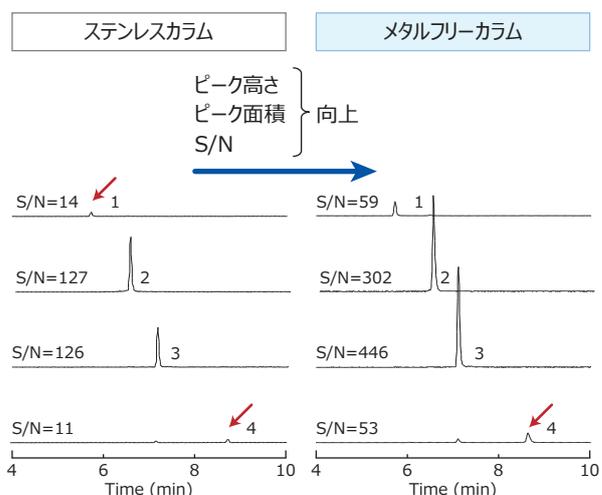
Fig.7 充填剤表面のイメージ

## ■ キャリーオーバー

キャリーオーバー(Carryover)とは、先に導入した試料成分が装置内に残存し観察される現象です(JIS K 0214:2013より引用)。

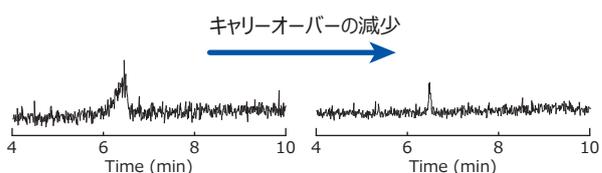
Fig.8は、リン酸化ペプチド1 pmolを注入した後、ブランクとして水を注入して、カラムへのキャリーオーバーを観察したマスクロマトグラムです。メタルフリーカラムは、カラムハードウェア及び充填剤への試料の吸着を抑えることができ、ピーク形状、キャリーオーバーの改善や、検出の向上に大きく寄与します。

| No. リン酸化ペプチド                           | 配列                      |
|--|-------------------------|
| 1. Kinase Domain of Insulin Receptor-1 | TRDI-pY-ETD-pY-pY-RK    |
| 2. Kinase Domain of Insulin Receptor-3 | TRDIYETD-pY-YRK         |
| 3. Bovine β-casein                     | FQ-pS-EEQQQTEDELQDK     |
| 4. PKA Regulatory Subunit 2 Substrate  | DLDVPIPIGRFDRRV-pS-VAEE |



ブランク

リン酸化ペプチド(試料No.2)注入後



[Analytical conditions]  
Column: **L-column2 ODS**, 5 µm  
Size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: A: 0.1% CHOOH in CH<sub>3</sub>CN; B: 0.1% HCOOH in H<sub>2</sub>O  
A/B, 5/95-50/50(0-10 min)  
Flow rate: 0.3 mL/min  
Temp.: 40°C; Detection: ESI(-); Inj. vol.: 1 µL

Fig.8 リン酸化ペプチド分析でのメタルフリーカラムの評価

Fig.8は、配管をステンレスからPEEKに変更した汎用LCシステムを使用して分析しています。インジェクション needles やバルブ等に試料が残存しているため、メタルフリーカラムを用いても、キャリーオーバーを無くすことはできません。

更なる高感度化、高再現性を得るためには、システムの最適化等が求められます。

# ワンランク上の分析メソッド

## ■ システムを最適化する

システムの最適化も重要です。

生体分析では、試料と相互作用を起こさないバイオイナート(生体不活性)なシステム※1が必須です。試料と金属接触をさせないためには、流路のメタルフリー化が有効です(Fig.9)。

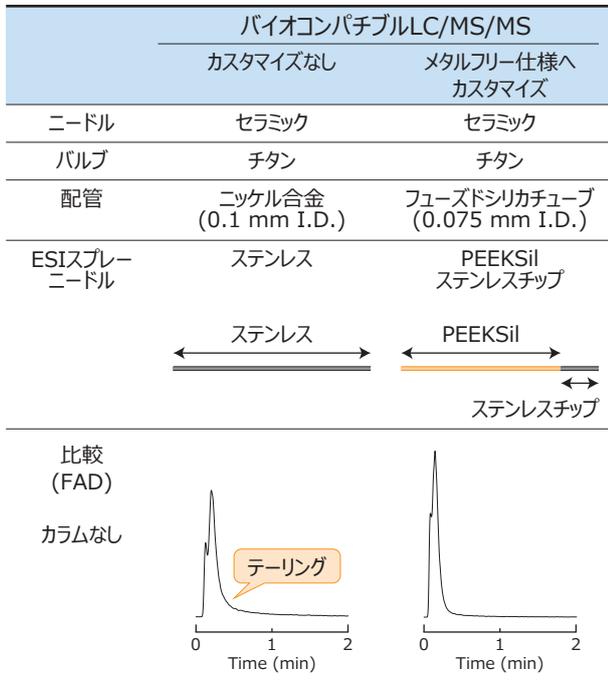


Fig.9 システムのメタルフリー化

Fig.10①は、Fig.8で使用した汎用システム(配管をPEEKに変更)、Fig.10②は、Fig.9でメタルフリー仕様にカスタマイズしたバイオコンパチブルLC/MS/MSです。最適化したシステムでは、流速を落とし保持時間が遅いにも関わらず、シャープなピークが得られます。

より高精度な分析のために、メタルフリーカラムを用いるときは、その性能を十分発揮するためにシステムの最適化は重要です。

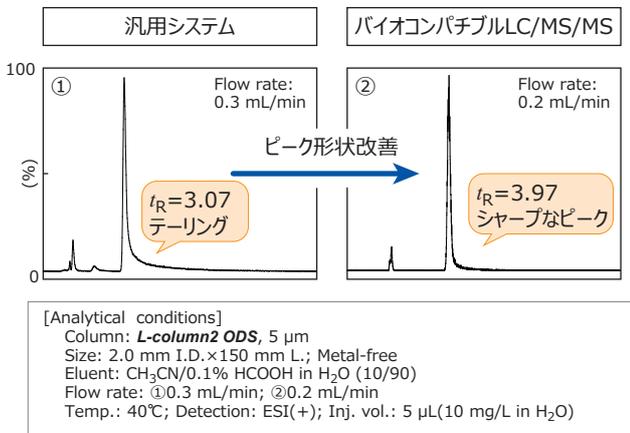


Fig.10 システムの比較※2

※1 バイオコンパチブルLC、バイオイナートLC、イナートLCなどと呼ばれます  
※2 異なる機器での比較のため、縦軸のフルスケールをFADのピーク高さに合わせています  
※3 IPA=インプロパノール

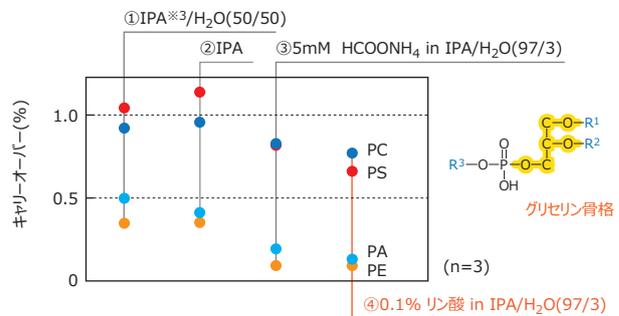
## ■ 分析条件を最適化する

オートサンプラーのニードル由来のキャリーオーバーを抑えるには、洗浄方法や洗浄溶媒の変更を最適化します。一般に溶出力が高く、溶離液と相溶性のある洗浄溶媒を選択します。

ニードル洗浄溶媒の違いによるグリセリン脂質のキャリーオーバーは、極性の違い(Fig.11①と②)、溶離液に近い組成(Fig.11③)よりも、金属との相互作用を抑制するリン酸を添加したもの(Fig.11④)が効果的な結果となりました。

システムや洗浄溶媒を最適化し、メタルフリーカラムを使用したマスキロマトグラムは再現性の良い結果が得られます(Fig.12)。

| グリセリン脂質            |            | R1     | R2     | R3           |
|--------------------|------------|--------|--------|--------------|
| PC(ホスファチジルコリン)     | Fatty acid | (16:0) | (16:0) | Choline      |
| PS(ホスファチジルセリン)     | Fatty acid | (16:0) | (16:0) | Ser          |
| PE(ホスファチジエタノールアミン) | Fatty acid | (16:0) | (16:0) | Ethanolamine |
| PA(ホスファチジン酸)       | Fatty acid | (16:0) | (16:0) | H            |



$$\frac{\text{メタノール注入時のピーク面積}}{\text{試料注入時のピーク面積}} \times 100 = \text{キャリーオーバー(%)}$$

Fig.11 ニードルの洗浄溶媒とキャリーオーバー

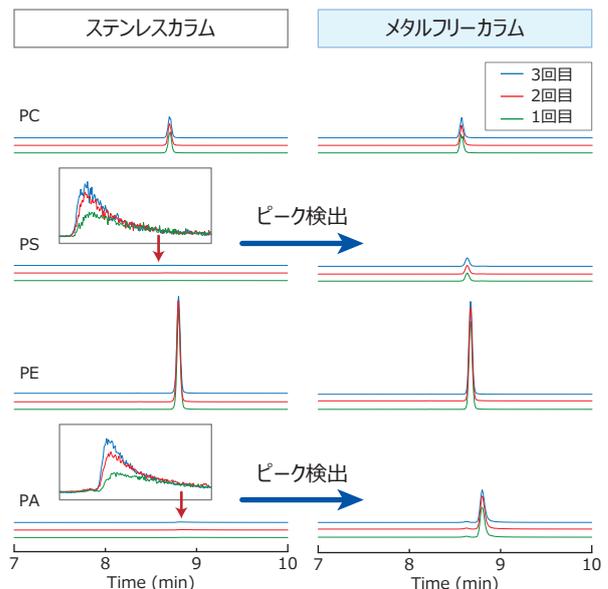


Fig.12 分析再現性の比較(n=3)

[Analytical conditions] (Fig.11, Fig.12)  
Column: L-column2 ODS, 3 μm  
Size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D.×50 mm L.  
Eluent: A: CH<sub>3</sub>CN/IPA(10/90)  
B: CH<sub>3</sub>CN/5mM HCOONH<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O(50/50)  
A/B, 0/100-98/2(0-10 min)  
Flow rate: 0.3 mL/min  
Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(-); Inj. vol.: 5 μL(0.2 mg/L)

■ より高性能なカラムを選択する

メタルフリーカラムは各メーカーから出ています。その性能は「充填剤」と「カラムハードウェア」の組合せが重要です。

**L-column2** メタルフリーカラムは、金属やシラノール基と相互作用を起こしやすいピークがシャープに検出できます(Fig.13, Fig.14)。

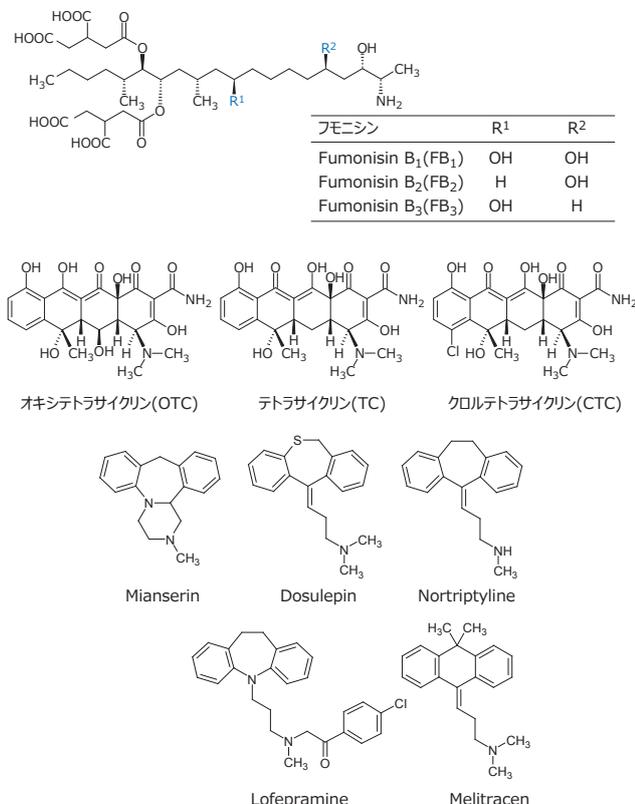


Fig.13 フモニシン類、テトラサイクリン類、塩基性医薬品の構造

[Analytical conditions]  
 Column: C18, 3 μm  
 Size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.  
 Eluent: A: CH<sub>3</sub>CN; B: 0.1% HCOOH in H<sub>2</sub>O  
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(+)  
 ① Eluent: A/B, 20/80-70/30(0-10 min); Inj. vol.: 3 μL(1 mg/L)  
 ② Eluent: A/B, 5/95-50/50(0-10 min); Inj. vol.: 5 μL(1 mg/L)  
 ③ Eluent: A/B, 5/95-80/20(0-10 min); Inj. vol.: 5 μL(1 mg/L)  
 ④ Eluent: A/B, 10/90-50/50(0-10 min); Inj. vol.: 10 μL(10 mg/L)

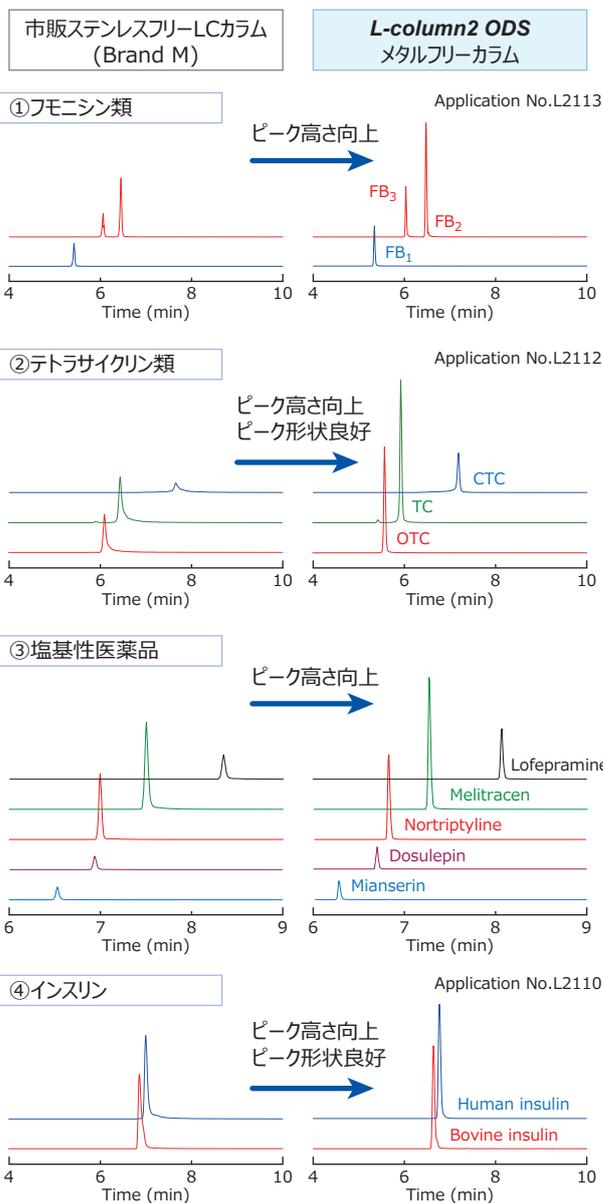


Fig.14 市販カラムとの比較

\*\*\*\*\*



L-column2 メタルフリーカラム

内径: 2.0 mm  
 長さ: 30 mm, 50 mm, 100 mm, 150 mm, 250 mm  
 充填剤: L-column2 ODS, L-column2 C8, L-column2 C6-Phenyl  
 粒子径: 3 μm, 5 μm

(2016年11月現在)

リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店までご連絡ください。

**CERI** 一般財団法人 化学物質評価研究機構  
 Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan  
<http://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部  
 e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521  
 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地