

メタルフリーカラムの特徴とそのアプリケーション

坂 牧 寛

1 はじめに

液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した微量分析は広く普及している。特に、分子内にリン酸基があるリン酸化ペプチドや低分子のリン酸化化合物の分析では、試料と接液するカラム、配管、バルブなどの金属材料と相互作用し、それらのピークが大きくテーリングする問題がある。この問題を解決するため、メタルフリーカラムが注目されている。リン酸化化合物以外でも、分子内にカルボキシル基が複数存在する化合物でも同様の問題が発生しており、分析化学者を悩ませている。

一般的な HPLC カラムは、C18 などの充填剤が高圧充填されているステンレス製のクロマトグラフィー管とその両端にステンレス製の焼結フリットによって構成されている。一方、メタルフリーカラムは、接液部であるクロマトグラフィー管及びフリットに金属を使用していないカラムである。その接液部の材質は、熔融シリカ、ガラス、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK)、コーティングなどがあり、各社から販売されている¹⁾²⁾。本機構では、ガラスライニング管とポリマー系フリットからなる *L-column2* メタルフリーカラムと PEEK ライニングステンレス管と PEEK フリットからなる *L-column3* メタルフリーカラムを販売している。メタルフリーカラムの構造を図 1 に示した。

メタルフリーカラムの主な特徴は *S/N* の向上、ピーク形状の改善、キャリアオーバーの低減等が挙げられる。しかし、カラムをメタルフリーカラムに変更するだけでは、改善されない場合がある。そこで、本稿では、メタ

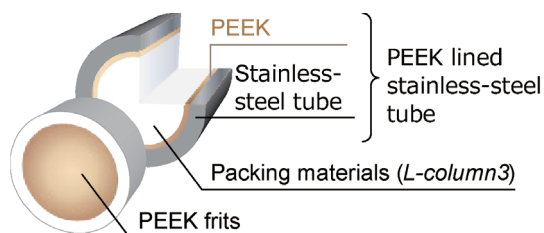


図 1 メタルフリーカラム

ルフリーカラムの性能を最大限引き出すためにシステムの最適化について紹介する。さらに、一般的なステンレスカラムとメタルフリーカラムを比較し、最後にアプリケーション例を示す。動画によりこれらを紹介する。

https://www.cerij.or.jp/ceri_channel/channel_detail_05.html

メタルフリーカラムの最適化



2 システムの最適化

2-1 流 路

メタルフリーカラムの性能を引き出すためには、LC-MS/MS の流路の最適化が重要である。特に、試料と金属の接触を避けるためには、試料が導入されるオートサンプラーからカラム、カラムから ESI のエレクトロードの流路をメタルフリー化することが有効である。ここでは、カラムを使用しないで HPLC の配管と MS のエレクトロードを比較した。使用した試料は分子内にリン酸基があるフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) である。図 2 に示すように標準的な流路の LC-MS/MS では、FAD のピークが大きくテーリングしている。さらに、エレクトロードをステンレス製から PEEKsil[®] チューブとステンレスで構成されるハイブリッドエレク

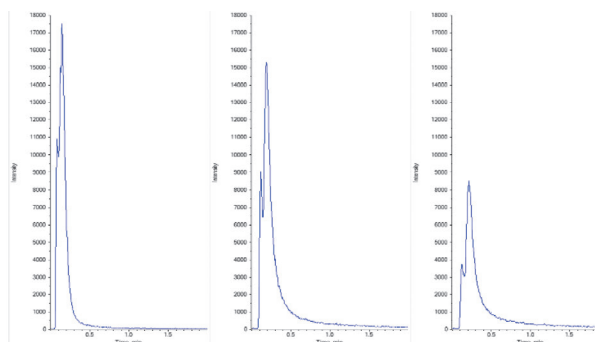


図 2 流路の比較

左) ハイブリッドエレクトロードと PEEKsil[®] チューブ、
中) ステンレスエレクトロードと PEEKsil[®] チューブ、
右) ステンレスエレクトロードと MP35N[®] チューブ。

トロードに変更すると、テーリングが大幅に改善された。PEEKsil[®] チューブは、熔融シリカをPEEKでコーティングしたチューブであり、高い耐圧性を持つため、高圧下でも使用することができる。また、PEEKチューブでも同様の効果が得られる。流路内の金属部分を減らすことは、メタルフリーカラムの効果を最大限に活かすための第一歩と言える。さらに、熔融シリカやNanoViper[®] (内部は熔融シリカ)、MarvalXACT PLS[®] (内部はPEEK) など、金属を使用していない配管も代替として利用できる。

2.2 ニードル洗浄液

ニードル洗浄液は、オートサンプラーにおける試料吸引用のニードルを洗浄するための洗浄液である。洗浄が不十分だとキャリーオーバーが発生する。キャリーオーバーとは、前回の試料注入時の化合物が次の分析時に検出される現象であり、定量性に影響を及ぼすため、できる限り低減させることが望ましい。その原因はカラムや流路での試料の吸着やオートサンプラーでの洗浄不足などが挙げられる。ここでは、分子内にリン酸基を含むリン脂質のキャリーオーバーを低減するために、オートサンプラーのニードル洗浄液を検討した。使用したニードル洗浄液は、2-プロパノール (IPA) を使用して極性やpHの違いにより6種類を選定した。試料としては、リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジン酸 (PA) をメタノールで5 mmol/Lに調製した標準溶液を使用した。この標準溶液を注入した後に、ブランクとしてメタノールを注入した際のピーク面積からキャリーオーバー

表1 ニードル洗浄液の違いによるリン脂質のキャリーオーバー (n6)

ニードル洗浄液	PA (%)	PE (%)	PS (%)
IPA/水 (1/1)	1.03	0.34	0.49
IPA	1.13	0.35	0.41
0.1 % ギ酸 in IPA/水 (97/3)	0.84	0.10	0.16
5 mmol/L ギ酸アンモニウム in IPA/水 (97/3)	0.81	0.09	0.19
5 mmol/L 重炭酸アンモニウム in IPA/水 (97/3)	0.83	0.08	0.18
0.1 % リン酸 in IPA/水 (97/3)	0.66	0.09	0.13

分析条件は図3と同様

を算出し、比較した。その結果、洗浄液に酸や塩基を添加することでキャリーオーバーが改善された。さらに、金属とのキレート作用のあるリン酸を添加することで、PAのキャリーオーバーが改善された (表1)。ただし、実際の分析には影響がないと考えられるが、長期的な使用によりニードルポート周辺にリン酸が析出する可能性があるため、リン酸をニードル洗浄液に使用する際には注意が必要である。また、使用するオートサンプラーによって洗浄方法や洗浄液の数が異なるため、それぞれの特有の最適化が必要である。ただし、リン酸洗浄液がカラムに注入されないようにすることは重要である。

3 ステンレスカラムとメタルフリーカラムの比較

3.1 リン脂質によるピーク形状の改善

一般的に使用されるステンレスカラムと、メタルフリーカラムを比較した。使用した試料はリン脂質で、注

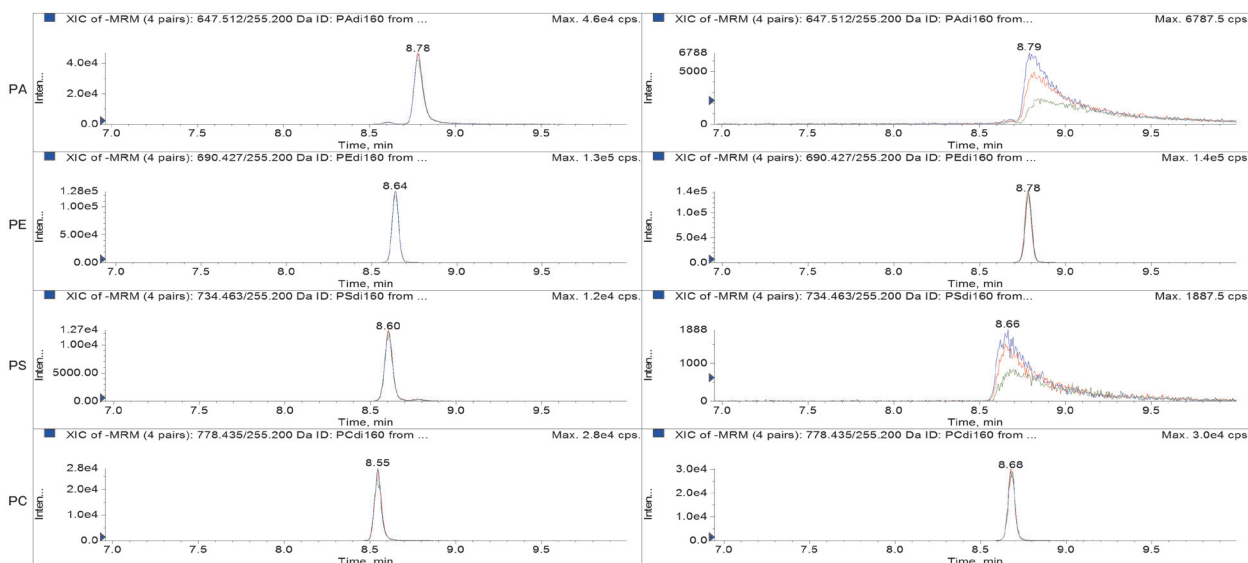


図3 リン脂質によるメタルフリーカラムとステンレスカラムの比較

【分析条件】メタルフリーカラム (左) : *L-column2 ODS* メタルフリー (2×50 mm, 3 μm), ステンレスカラム (右) : *L-column2 ODS* (2.1×50 mm, 3 μm), 移動相 : A : 5 mmol/L ギ酸アンモニウム/アセトニトリル/(50/50, v/v), B : IPA/アセトニトリル (90/10, v/v), A/B=100/0 ~ 2/98 (0 ~ 10 min), カラム温度 : 40 °C, 流速 : 0.3 mL/min, 注入量 : 5 μL, サンプル : 200 ng/mL PA di16 : 0, PE di16 : 0, PS di16 : 0 及び PC di16 : 0.

入1回目から3回目のマスクロマトグラムを図3に示した(1回目の注入:緑, 2回目の注入:赤, 3回目の注入:青)。

ステンレスカラムでは, ホスファチジルコリン(PC)とPEのピーク高さには注入回数による差はみられないが, PAとPSのピーク高さは注入回数が増えるに従って増加した。これは, 試料の反復注入によりカラム内の活性点に試料が吸着し, 活性点の数が減少したことによるものと考えられる。その結果, ピーク高さが増加したと考えられる。また, これらのピークは大きくテーリングしており, 試料注入を繰り返しても改善されない。

一方, メタルフリーカラムでは注入回数によるピーク高さの変化は見られない。メタルフリーカラムの3回目の注入におけるPAとPSのS/Nはそれぞれ2600及び780であり, ステンレスカラムと比較してそれぞれ7倍及び8倍に改善された。このように, メタルフリーカラムの使用によりS/Nが改善されることから, 従来では検出されなかった化合物が検出される可能性も考えられる。

3.2 フモニシンのキャリアオーバーの低減

フモニシンはフザリウム属菌から産生されるカビ毒であり, 分子内に四つのカルボキシ基が存在する。これらのカルボキシ基が金属と強力なキレート作用を引き起こす³⁾。3種のフモニシン(フモニシンB₁:FB₁, フモニシンB₂:FB₂, フモニシンB₃:FB₃)により, キャリーオーバーを評価した(図4)。

ステンレスカラムのFB₁のキャリアオーバーは, 1.90%で, キャリーオーバーによる生じるリーディングピークが検出される。この原因はカラム内での試料の

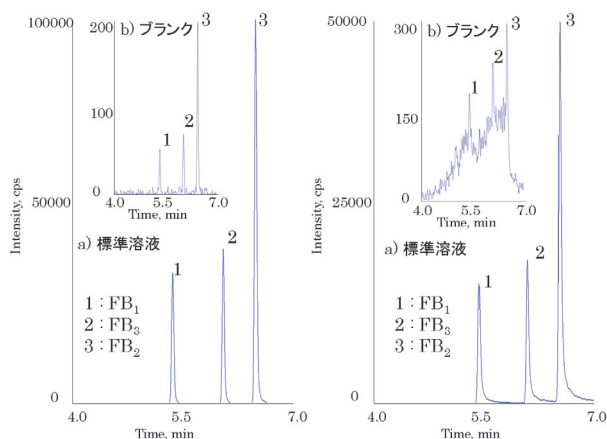


図4 フモニシンによるメタルフリーカラムとステンレスカラムの比較

【分析条件】メタルフリーカラム(左): *L-column2* ODS メタルフリー (2×150 mm, 3 μm), ステンレスカラム(右): *L-column2* ODS (2.1×150 mm, 3 μm), 移動相: A: 0.1% ギ酸, B: アセトニトリル, A/B=80/20 ~ 30/70 (0 ~ 10 min), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 3 μL。

吸着によるもので, 前回の分析の試料がステンレスカラムの内面に吸着され, 次のブランク注入のグラジエント溶離により, 徐々に溶出されたと考えられる。FB₃とFB₂のキャリアオーバーピークは, 分離できなかったため, キャリーオーバーが算出されない。一方, メタルフリーカラムのFB₁のキャリアオーバーは0.20%であり, 対称性の良いピーク形状をしていた。これは, オートサンプラーのニードルからカラムの入口までの流路のキャリアオーバーであると考えられる。FB₂及びFB₃も同様の結果が得られている。つまり, フモニシンのキャリアオーバーは, オートサンプラーとステンレスカラムで発生し, メタルフリーカラム内では発生しない。

4 メタルフリーカラムを使用したアプリケーション

4.1 リン脂質

リン脂質は, 生物の細胞膜や細胞内膜の主要な構成要素で, グリセロールにリン酸基と脂肪酸が結合した構造を持っており, 両親媒性分子である。細胞膜の主要な構成要素であり, 細胞内と外を区切る機能, 細胞内外のシグナル伝達, 細胞膜内に存在する輸送タンパク質やチャネルの機能を持っている。

ガラスライニングステンレス管とポリマーフリットからなる *L-column2* メタルフリーカラムと最適化した LC-MS/MS を使用することにより, リン脂質の吸着を抑え, ピーク形状の改善や感度の向上を見いだした。さらに揮発性のキレート剤であるアセチルアセトンを添加した移動相を使用することにより, PA や PS のピーク形状や感度が改善することが確認された。

試料は, マウスの各組織から Bligh & Dyer 法によりリン脂質を抽出した。腎臓では100種類, 肝臓では99種類のリン脂質が検出された(図5)。18分までに検出されたピークは一つの脂肪酸が結合しているリゾリン脂質である。検出されたピークの80%以上で, 連続3回の分析におけるピーク面積値の変動係数は15%未満

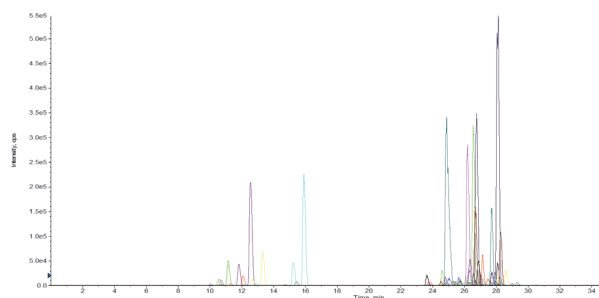


図5 マウス肝臓中のリン脂質

【分析条件】カラム: *L-column2* ODS メタルフリー (2×150 mm, 3 μm), 移動相: A: 1 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール (100/10, v/v), B: アセトン/アセチルアセトン (100/1, v/v), A/B=50/50 ~ 2/98 (0 ~ 35 min), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 3 μL。

で、PE、PC、ホスファチジルイノシトール、PA、PS、リゾホスファチジルエタノールアミン及びリゾホスファチジルコリンが検出された。

このように、リン脂質の分析において、網羅性、堅牢性、再現性の高いメソッドを構築することができた。詳細な情報については、本機関のホームページに掲載されているアプリケーションデータを参照されたい⁴⁾。

4・2 脂肪酸アシル CoA

脂肪酸アシル CoA は、脂肪酸代謝の中心的な化合物であり、エネルギー産生や生体機能の維持に欠かせない役割を持っている。また、分子内にリン酸基を含むことから金属との相互作用の強い物質として知られている。LC-MS/MS を使用した脂肪酸アシル CoA の分析については、カラムや流路内での吸着により、ピーク形状のテーリング、再現性の悪化、キャリアオーバーなどの問題がある。

L-column2 メタルフリーカラムと最適化した LC-MS/MS を使用し、さらに重炭酸アンモニウムを含む移動相を使用することにより、脂肪酸アシル CoA の吸着を抑え、ピーク形状の改善や感度の向上を見いだした。CoA から C20:5-CoA までの 23 種類のマウス肝臓由来の脂肪酸アシル CoA がシャープなピーク形状で 15 分以内に検出された (図 6)。試料は、マウス肝臓からリン酸緩衝液/メタノール (1/1) で脂肪酸アシル CoA を抽出したものをを使用した。その中で S/N 10 以上であった 20 種中 19 種類で、連続 6 回の分析におけるピーク面積値の変動係数は 15 % 以下となり良好な再現性が得ら

れた。また、300 回以上の QC サンプルの注入でもピーク形状が変わることはなかった。このように短鎖から長鎖の脂肪酸アシル CoA の網羅性、再現性の高いメソッドが構築できた。ここでは、網羅性を重視して C8 カラムを使用した。特定の溶出位置の化合物を分析する際は、C18 カラムを推奨する。

詳細は本機関のホームページに記載されているアプリケーションデータを参照されたい⁵⁾。

4・3 テトラサイクリン

テトラサイクリン類では、広範な細菌感染症の治療に使用される抗生物質で細菌の成長を妨げる作用を有している。細菌のリボソームと結合し、タンパク質の合成を阻害することで細菌の増殖を抑制する。テトラサイクリン系抗生物質は、金属イオンとキレート反応を起こす傾向があり、二価及び三価の金属とキレートを生じやすく、前処理から分析に至るまで注意する必要がある。*PEEK* ライニングステンレス管と *PEEK* フリットからなる *L-column3* メタルフリーカラムと最適化した LC-MS/MS を使用することにより、テトラサイクリン類の吸着を抑え、ピーク形状の改善や感度の向上を見いだした。ここでは、4 種のテトラサイクリン類 (テトラサイクリン:TC, ドキシサイクリン:DC, クロルテトラサイクリン:CTC, オキシテトラサイクリン:OTC) を一斉分析した。

テトラサイクリン類は、ケト・エノール互変異性により、ケト体とエノール体が検出され、ピーク形状がテーリング又はリーディングとなることがある。特に CTC

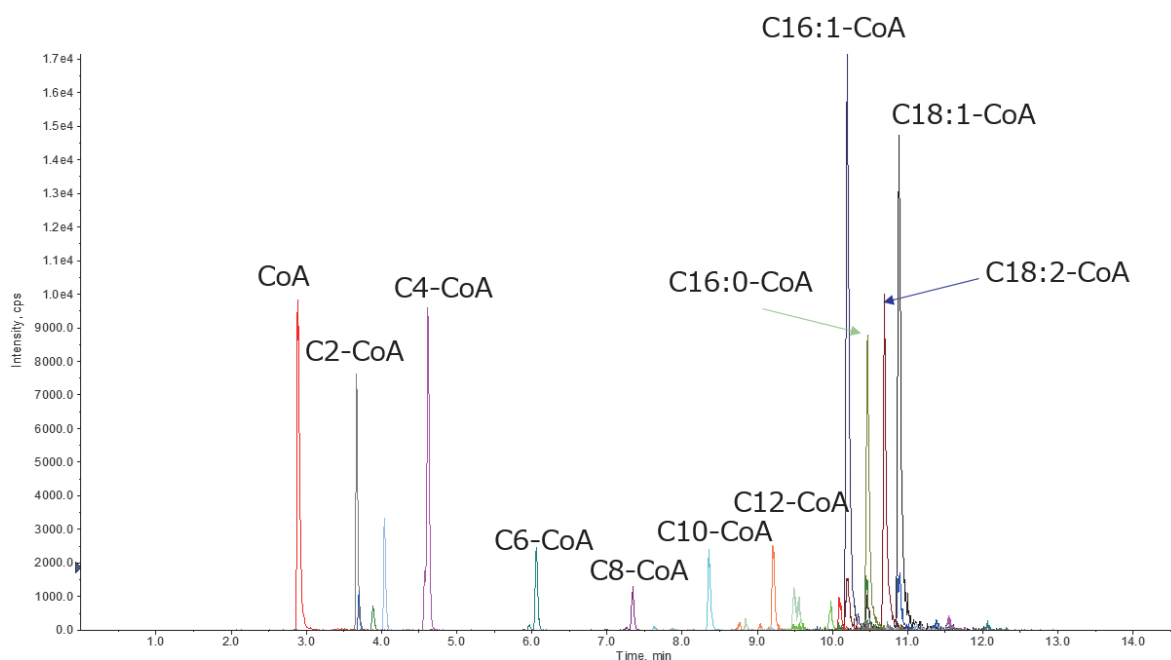


図 6 マウス肝臓中の脂肪酸アシル CoA

【分析条件】カラム：*L-column2* C8 メタルフリー (2×150 mm, 3 μm), 移動相：A: 10 mmol/L 重炭酸アンモニウム, B: アセトニトリル, A/B=98/2 ~ 5/95 (0 ~ 15 min), カラム温度：40 °C, 流速：0.2 mL/min, 注入量：5 μL.

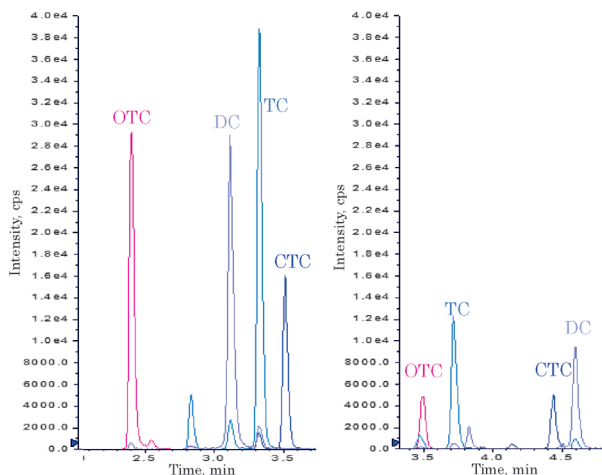


図7 テトラサイクリンによる移動相の比較

左) アンモニア溶液, 右) 枸橼酸溶液

【分析条件】カラム: L-column3 C18 メタルフリー (2×50 mm, 3 μm), 移動相: A: 5 mmol/L 枸橼酸溶液 or アンモニア溶液, B: アセトニトリル, A/B=99/1 ~ 60/40 (0 ~ 5 min).

や DC で起こり易く, 分析中のカラム内で互変異性化が起こる⁶⁾. カラム温度を 15 °C に設定することにより, カラム内での互変異性化を最小限にすることができ, ピーク形状や感度が改善できる.

ここで使用した L-column3 は pH1 から pH12 の移動相で使用することができる. 移動相としてアンモニア溶液と枸橼酸溶液を比較した (図 7). その結果, アンモニア移動相での S/N が枸橼酸と比較して, すべてのテトラサイクリン類で約 2 倍向上した. メタルフリーカラムとアルカリ移動相を使用することにより, S/N が改善される.

詳細は本機構のホームページに記載されているアプリケーションデータを参照されたい⁷⁾.

5 おわりに

本稿では, メタルフリーカラムの性能を引き出すための LC-MS/MS の最適化, 比較及びそのアプリケーションを示した. メタルフリーカラムを使用することにより, 金属と相互作用し易い化合物の S/N の向上, ピーク形状の改善, キャリーオーバーの低減等の大きな効果が得られる. 今後は HPLC 及びカラムが更に進化し, メタルフリーカラムが広く普及することを期待する.

文 献

- 1) H. Sakamaki, T. Uchida, L. W. Lim, T. Takeuchi : *J. Chromatogr. A*, **1381**, p.125 (2015).
- 2) M. DeLano, T. H. Walter, M. A. Lauber, M. Gilar, M. C. Jung, J. M. Nguyen, C. Boissel, A. V. Patel, A. Bates-Harrison, K. D. Wyndham : *Anal. Chem.*, **93**, p.5773 (2021).
- 3) 望月直樹 : *CHROMATOGRAPHY*, **33**, p.167 (2012).
- 4) 坂牧 寛, 尾崎博道, 中野裕太, 赤坂裕也, 内田丈晴 : 第 64 回質量分析総合討論会, p.106 (2016).
- 5) L-column2 Application Data Sheet No. 2155, (https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/L-column_application_data/L2155.pdf).
- 6) M. Cherlet, S. Croubels, P. De Backer : *J. Chromatogr. A*, **1102**, p.116 (2006).
- 7) L-column3 Application Data Sheet No. 3020, (https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/L-column_application_data/L3020.pdf).



坂牧 寛 (Hiroshi SAKAMAKI)

一般財団法人化学物質評価研究機構
(〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 番地). 《現在の研究テーマ》オリゴヌクレオチドの分析法開発. 《趣味》ランニング, スキー.

E-mail : sakamaki-hiroshi@cerij.jp

会社ホームページ URL :

<https://www.cerij.or.jp/>

関連製品ページ URL :

https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/index.html

CERIホームページ



L-columnシリーズ

