

LCやLC/MS分析における 試料吸着の仕組みと対策

Mechanism and Reduction of adsorption in LC and LC/MS analysis

大矢知佳、尾坂 裕輔、藤村 大樹、松本 恵子（島津製作所）

はじめに

- LCやLC/MS分析では試料吸着によって、ピーク形状の異常、感度の低下、定量不良、キャリーオーバーなどを引き起こす。
- 試料吸着には複数の要因があるため、原因を把握したうえで対処することが重要。
- 今回は、試料吸着がどこで、どのようにして発生しているかを実際の分析例を用いて報告する。

目次

1. 試料吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアルで発生する試料吸着
3. カラムで発生する試料吸着
4. オートサンプラーで発生する試料吸着

目次

1. 試料吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアルで発生する試料吸着
3. カラムで発生する試料吸着
4. オートサンプラーで発生する試料吸着

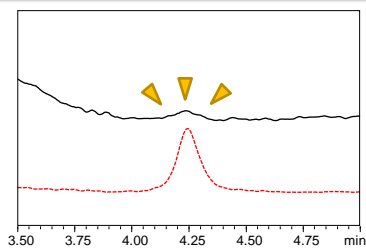
吸着とは

- 物体の界面（例：液相/固相）において、物質が化学的に引き寄せられ、濃度が周囲よりも高くなること。
- カラム内の充填剤に試料が保持されるのも吸着現象の一つであるが、意図しない試料吸着が起きてしまうことが問題。
- HPLC分析で問題となる試料吸着として、
疎水性相互作用による吸着（疎水性吸着）
イオン性吸着
金属イオンへの吸着（金属吸着）
が挙げられる。

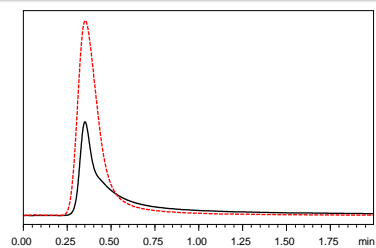
5

試料吸着が分析に及ぼす影響

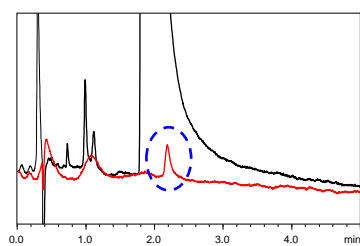
① 微小ピークの未検出



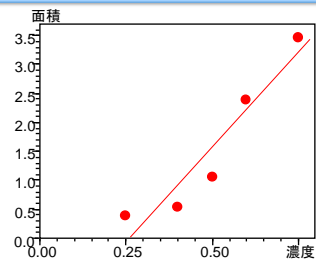
② ピーク形状の悪化



③ キャリーオーバー、再現性がない

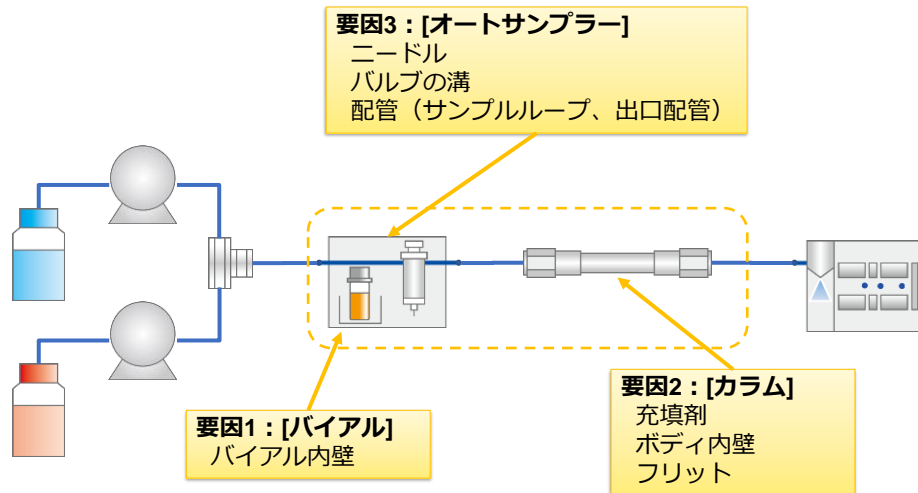


④ 検量線が曲がる（微量成分の定量不可）



6

試料が吸着する可能性の高い箇所

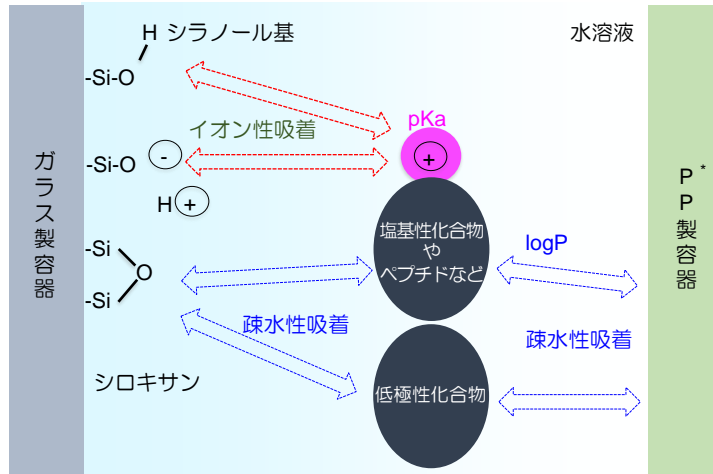


目次

1. 試料吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアルで発生する試料吸着
3. カラムで発生する試料吸着
4. オートサンプラーで発生する試料吸着

バイアルで発生する試料吸着

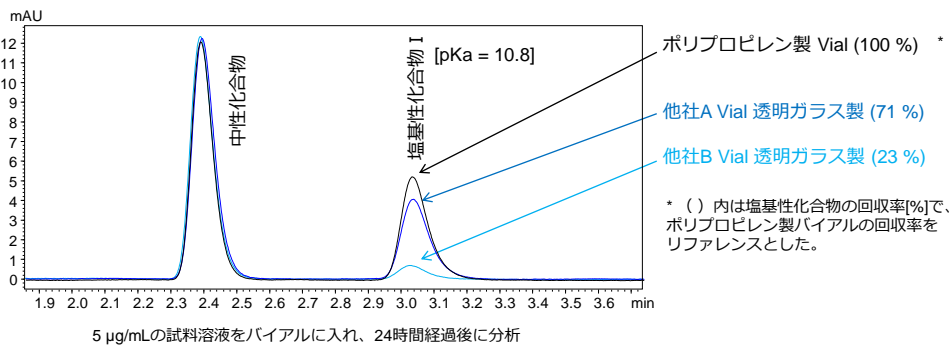
- ガラスバイアルは疎水性吸着、イオン性吸着のいずれも発生する可能性があり、樹脂製バイアルは主に疎水性吸着が発生しやすいと考えられる。
- 樹脂製のピペットチップなど、前処理中に使用する器具も注意が必要。



9

バイアルへの試料吸着 塩基性化合物によるイオン性吸着

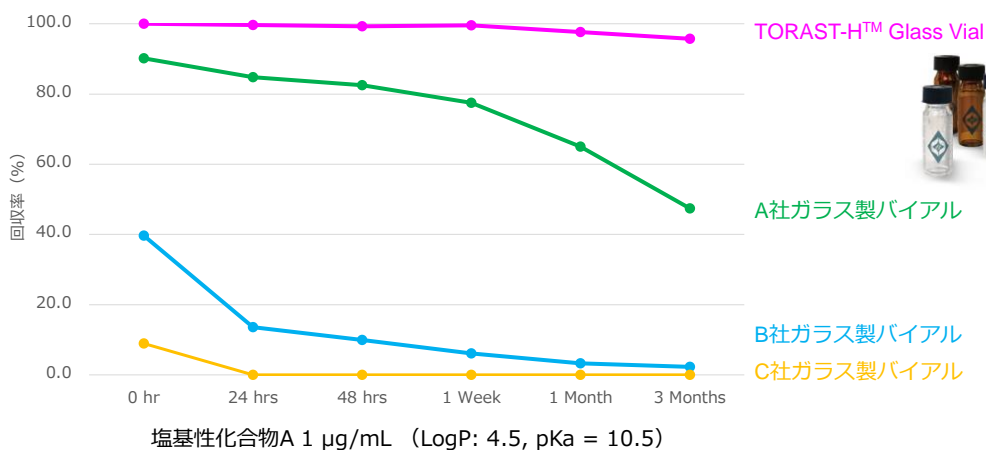
- 塩基性化合物はガラスバイアルに吸着しやすい。
- 正しい定量値が得られない場合がある。



10

バイアルへの試料吸着 塩基性化合物によるイオン性吸着

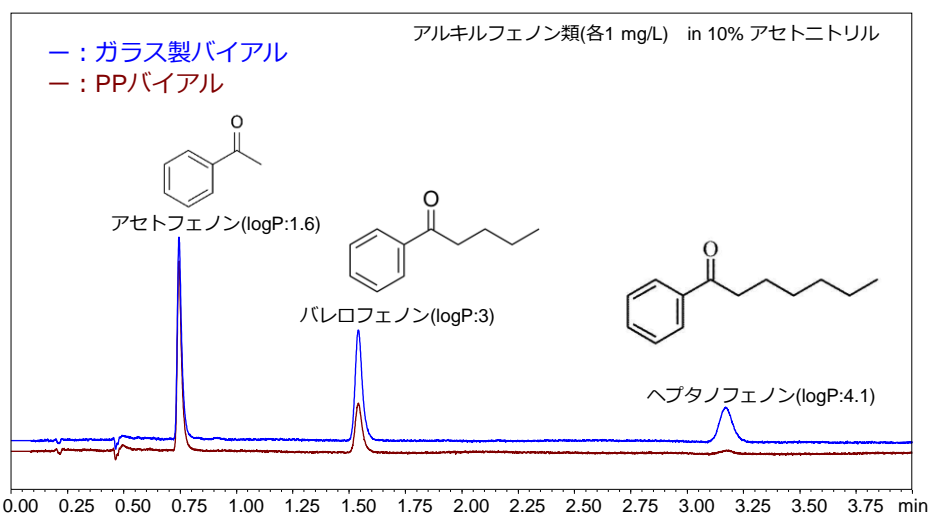
- 試料吸着が発生すると回収率が低くなる。
- 時間とともに回収率が低下する様子も確認される。
- PPバイアル、または吸着対策をされたガラスバイアルを使うことでこれらを回避。



11

バイアルへの試料吸着 PPバイアルへの疎水性吸着

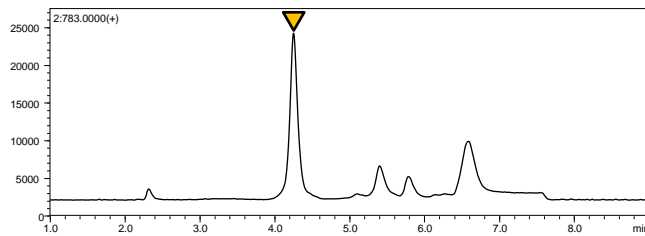
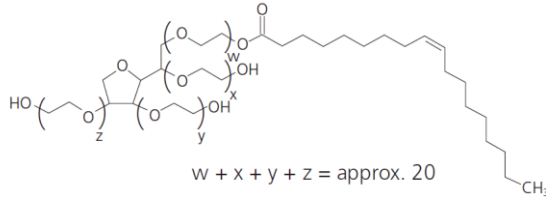
- 分配係数 (logP) が大きいほど疎水性が高く、PPバイアルへの試料吸着の影響も大きくなる。



12

バイアルへの試料吸着 ポリソルベート80の分析

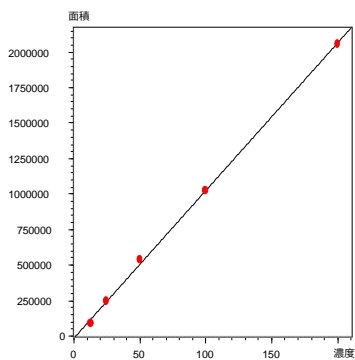
- タンパク質製剤の添加剤に用いられるポリソルベート80のLC/MS分析例。
- 一見、ピーク形状は正常で、試料吸着が生じていない分析結果に見えるが...



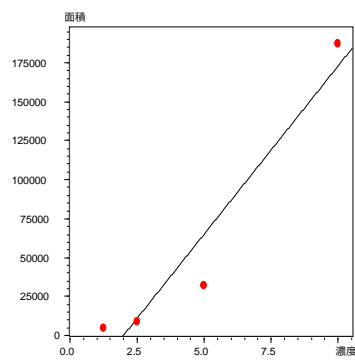
13

バイアルへの試料吸着 ポリソルベート80の分析

- 濃度が高い場合は直線性が得られたが、低濃度領域では直線性が得られない。



12.5~200 µg/mL



0.625~10 µg/mL

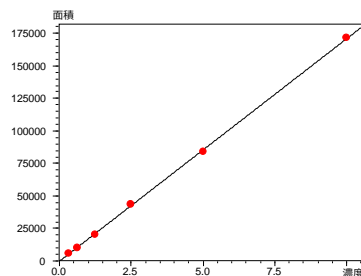
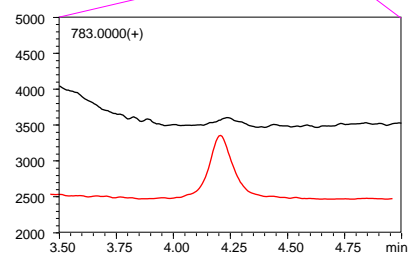
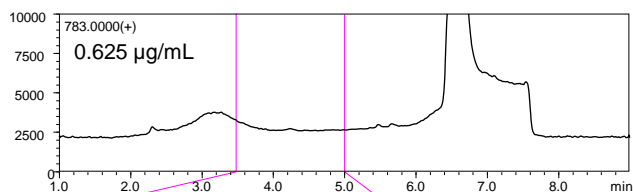


このような現象が発生した時は吸着を疑う

14

バイアルへの試料吸着 ポリソルベート80の分析

- 試料吸着の影響は試料濃度が低いほど顕著に表れる。
- この分析例では希釈溶媒を水から水/2-プロパノール(IPA)混合液にすることで改善。



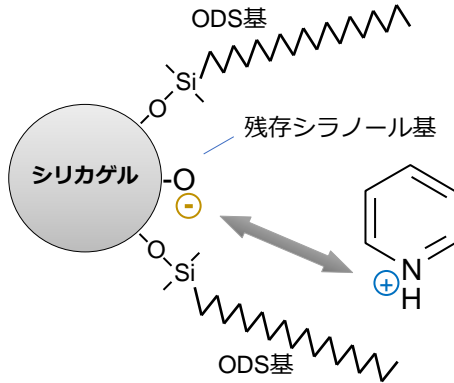
希釈溶媒を水から
水/2-プロパノール=1/1溶液へ変更
(または試料吸着を抑制したバイアルを試す)

目次

1. 試料吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアルで発生する試料吸着
3. カラムで発生する試料吸着
4. オートサンプラーで発生する試料吸着

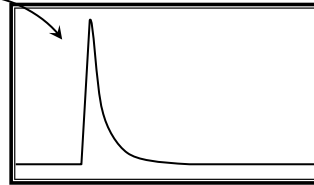
カラムで発生する試料吸着① カラム充填剤へのイオン性相互作用

残存シラノール基との相互作用



塩基性化合物がシリカゲルの残存シラノール基と相互作用

ピークの歪みやテーリングの発生



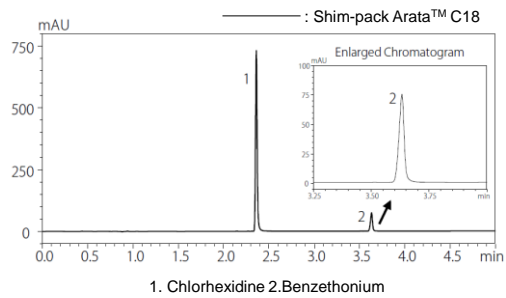
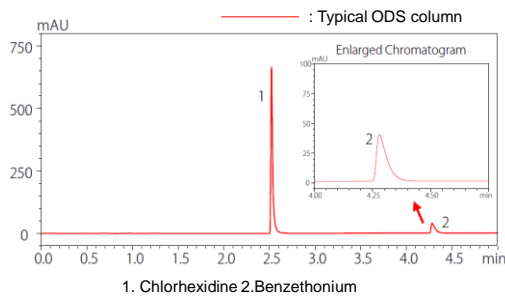
※ 残存シラノール基：シリカゲルに固定相官能基を化学結合させる際、未反応で残ったシラノール基

一般的な対策

- 酸性移動相にすることでシラノール基の解離を抑制する。
- 酸性条件下では塩基性化合物は解離しているため、イオンペア試薬を使用する。

カラム充填剤へのイオン性相互作用 塩基性化合物の分析

- シラノール基との相互作用を抑制するように設計されたカラムを用いれば、イオンペア試薬を用いない移動相でも試料吸着の影響を受けずに分析が可能。

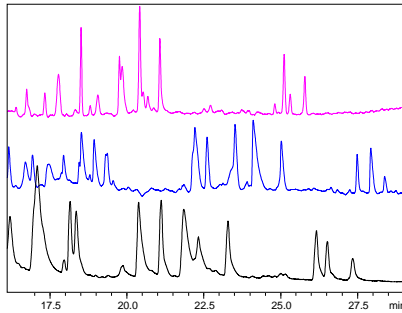


System : Nexera™ X3
 Column : Shim-pack Arata C18 (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
 Typical ODS column (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
 Mobile Phase : A) 0.1% Formic acid in water
 B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
 Flow Rate : 0.7 mL / min
 Oven : 40 °C
 Detection : UV 258 nm
 Injection Vol. : 1 μL



カラム充填剤へのイオン性相互作用 ペプチドの分析

- 残存シラノール基とペプチドがイオン性相互作用をしていると考えられるため、塩基性化合物同様、シラノール基との相互作用を抑制するカラムが有効。
- 同じODSカラムでも挙動が異なる。



Mobile Phase : A) 0.1% Formic acid in water
B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Flow Rate : 0.2 mL / min
Oven : 60 °C
Detection : UV 215 nm
Injection Vol. : 5 μ L
Sample : Trypsin-digested BSA 50 pmol/ml

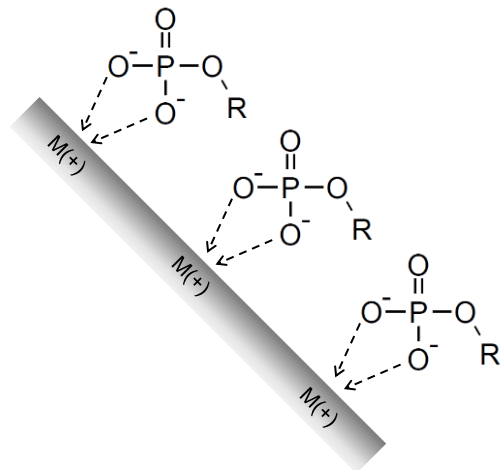
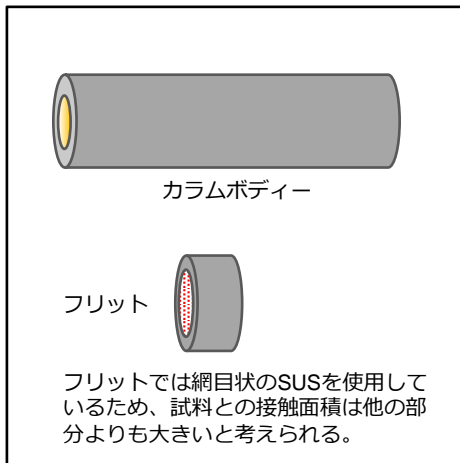


- Shim-pack Arata : ピーク検出数が最も多く、かつピーク形状も良好
- カラムA : 強度も小さく分離も悪い
- カラムB : ピーク検出数は多いものの、分離、テーリング共に△

19

カラムで発生する試料吸着② カラムボディー/フリットへの金属吸着

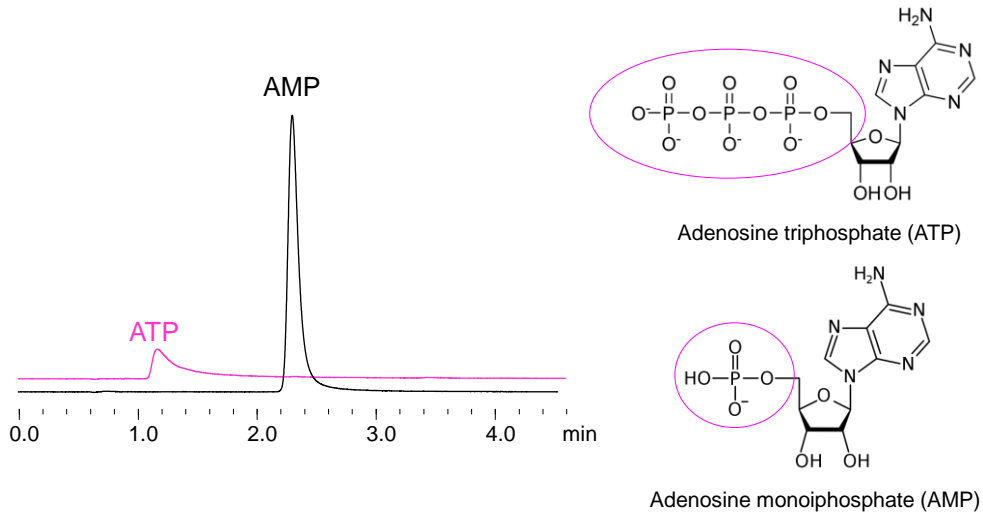
- カラムの多くはカラムボディーやフリット部分でステンレス (SUS) が使用されている。
- カラム内の金属イオンと試料中の成分が相互作用することで、ピークがテーリングする場合がある。



20

カラムボディー/フリットへの金属吸着 ATPの分析

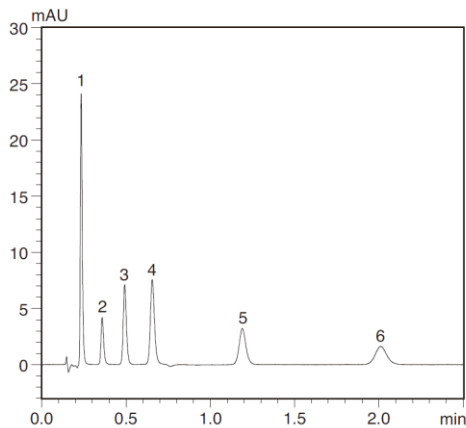
- ATPはりん酸基を有するため、金属イオンへ吸着しやすい代表的な化合物。
- ATPはカラム内の金属部分へ吸着してしまう。



21

カラムボディー/フリットへの金属吸着 ATPの分析

- 金属吸着は、りん酸を添加した移動相を使用することで改善可能。
- ただしりん酸を添加する移動相はLC/MS分析には不適...



■ Peaks

1. Hypoxanthine, 2. IMP, 3. Inosine, 4. AMP, 5. ADP, 6. ATP

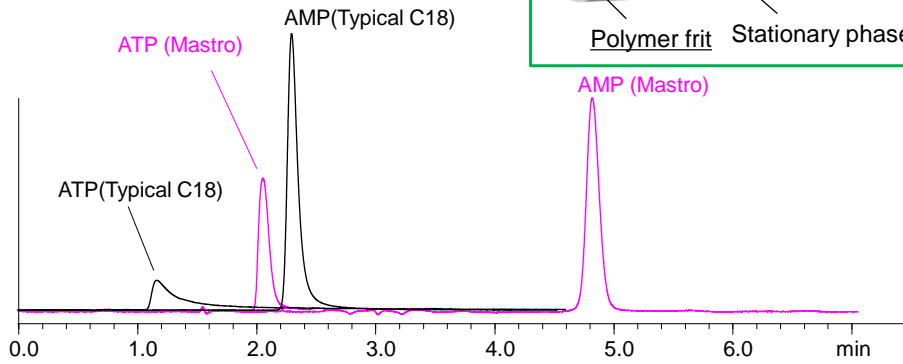
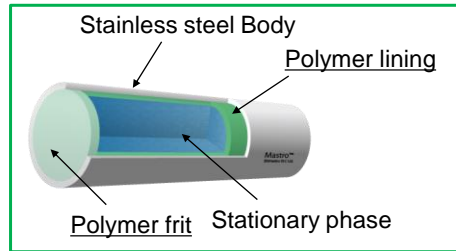
Column : Shim-pack™ XR-ODSⅢ (50 mm x 2.0 mm I.D., 1.6 μm)
 Mobile Phase : 100 mmol/L Phosphoric acid, 150 mmol/L Triethylamine aq.
 / Acetonitrile = 100:1
 Flow Rate : 0.9 mL / min
 Oven : 40 °C
 Detection : 260 nm (SPD-20AV)
 Injection Vol. : 1 μL
 Flow Cell : Semi-micro Cell

22

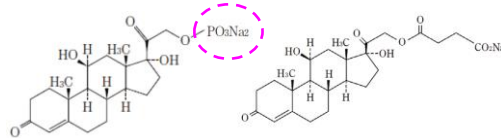
カラムボディー/フリットへの金属吸着 ATPの分析

- メタルフリーカラムでピーク形状を改善し、さらにLC/MSでも使用可能な移動相にて分析が可能。

Column : 100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm (メタルフリーカラム)
Instruments : Nexera
Mobile Phase : 10 mmol/L Ammonium Formate in Water / ACN = 99:1 Isocratic flow
Flow Rate : 0.2 mL / min
Oven : 40 °C
Detection : UV 256nm
Injection Vol. : 1 μL

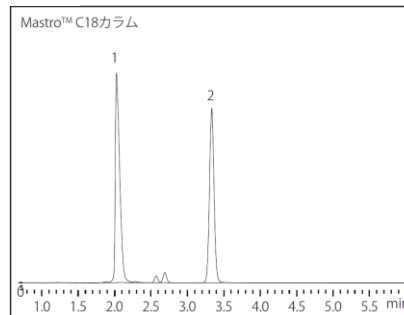
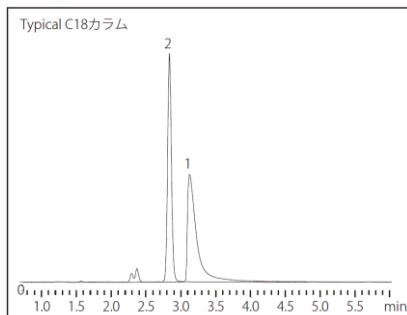


カラムボディー/フリットへの金属吸着 製剤の分析



■ Peaks

1. Hydrocortisone Sodium Phosphate
2. Hydrocortisone Sodium Succinate



Column : Mastro™ C18(100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm)
 Typical C18C18(100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm)
Mobile Phase : 0.1% Formic Acid in Water/0.1% Formic Acid in Acetonitrile=50:50
Flow Rate : 0.2 mL / min
Oven : 40 °C
Detection : 254 nm (SPD-20AV)
Injection Vol. : 1 μL

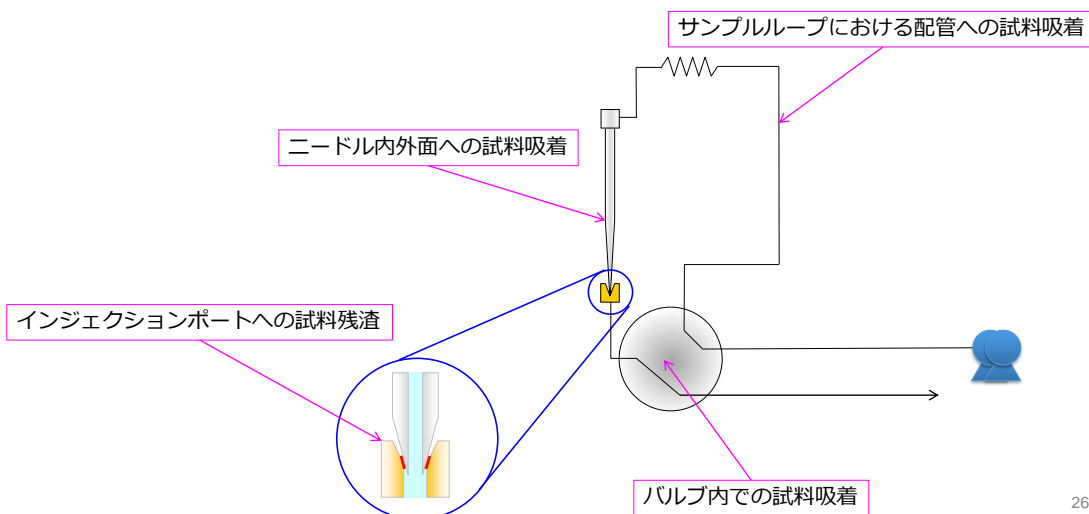
副腎皮質ホルモン製剤、水溶性ヒドロコルチゾン製剤の分析例は、静岡県立大学薬学部 生体機能分子分析学分野 轟木堅一郎先生との共同研究により得られたデータです。24

目次

1. 試料吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアルで発生する試料吸着
3. カラムで発生する試料吸着
4. オートサンプラーで発生する試料吸着

オートサンプラーで発生する吸着

- 金属吸着やイオン性吸着、ローターなど樹脂製部品への疎水性吸着が考えられる。
- 試料吸着および試料残渣がキャリーオーバーの原因となる。



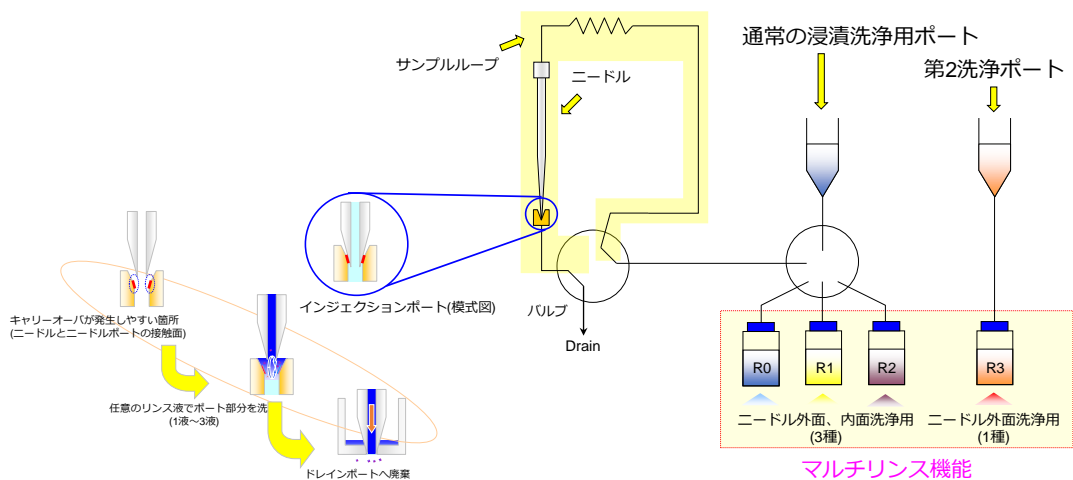
原因箇所がオートサンプラー と思われる場合

- 複数成分すべてがキャリーオーバーするのであれば、部品の摩耗やフィッティングを見直す。
 - フィッティングについては液漏れが発生していない場合でも確認する。
 - フィッティングの過剰な締め付けもフェルールの変形を発生させるため注意。
- リンス設定を見直す。
 - 金属吸着が疑わしい時はキレート効果のある溶媒を使用する。
 - 試料が塩基性化合物の時は酸性溶媒を使用する。

27

リンス動作について

- Nexeraシリーズではニードルの浸漬洗浄、またはニードルおよびサンプルループ内、インジェクションポートの洗浄が選択できる（内部リンス機能）。
- リンス液を複数セットすることも可能（マルチリンス機能）。

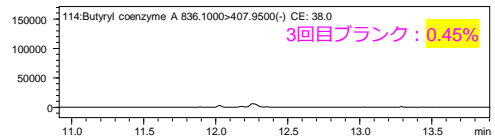
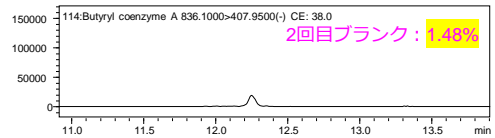
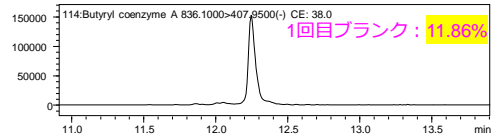
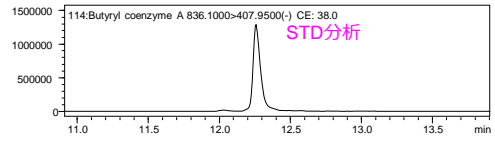
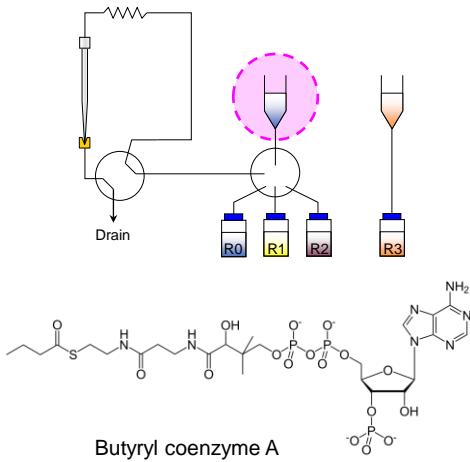


28

リンスによるキャリーオーバー対策 金属吸着性物質の分析

- 通常のリンスでは洗浄が不十分でキャリーオーバーが発生している。

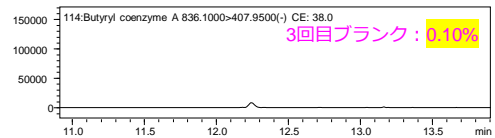
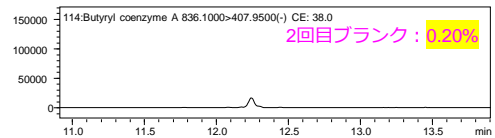
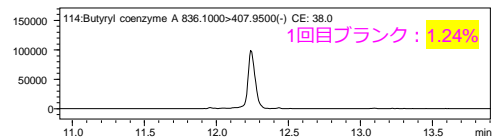
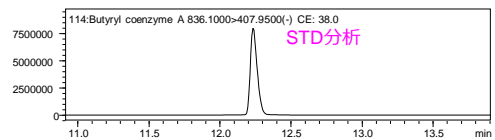
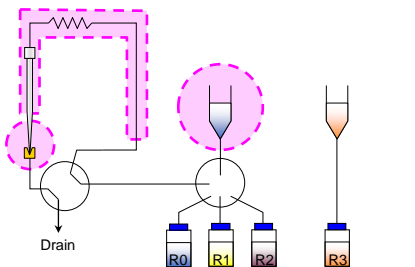
リンス液 : 水/メタノール = 1:1
リンスモード : 通常の浸漬洗浄のみ



リンスによるキャリーオーバー対策 金属吸着性物質の分析

- 内部洗浄をONにすることでキャリーオーバーは大きく改善。
- インジェクションポート洗浄の効果が大きいと推測。

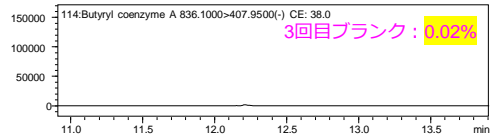
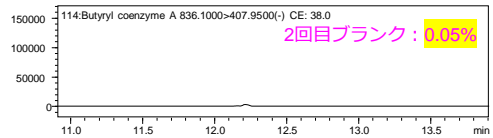
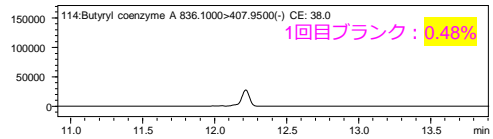
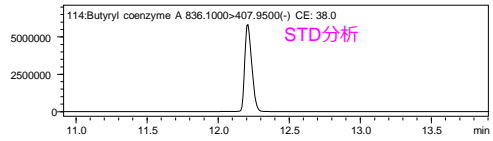
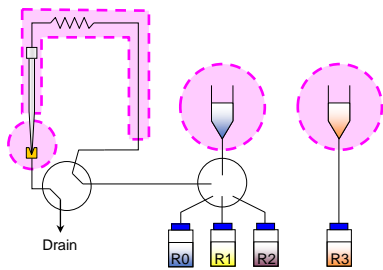
リンス液R0 : 水
リンス液R1 : 1%ギ酸水/メタノール/アセトニトリル/IPA = 1:1:1:1
リンスモード : 内部洗浄ON (インジェクションポート洗浄ON)



リンスによるキャリーオーバー対策 金属吸着性物質の分析

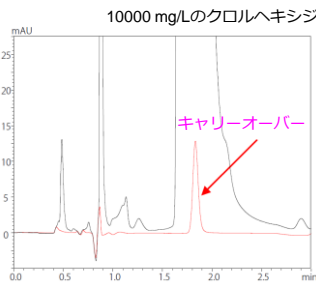
- キレート作用のあるクエン酸ナトリウムを洗浄液に追加。
- インジェクションポートをクエン酸ナトリウム水溶液で洗浄すると、キャリーオーバーがさらに改善した。

リンス液R0 : 水
 リンス液R1 : 1% ぎ酸水/メタノール/アセトニトリル/IPA = 1:1:1:1
 リンス液R2 : 20 mmol/Lクエン酸ナトリウム水溶液
 リンス液R3 : 1% ぎ酸水/メタノール/アセトニトリル/IPA = 1:1:1:1
 リンスモード : 内部洗浄ON (インジェクションポート洗浄ON)

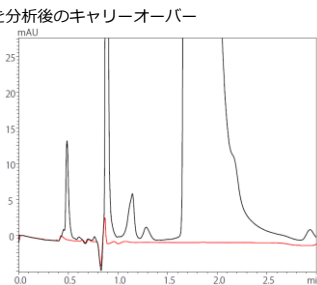


リンスによるキャリーオーバー対策 塩基性化合物の分析

- 塩基性化合物もオートサンプラーでキャリーオーバーが発生しやすい物質。
- インジェクションポートの洗浄によってキャリーオーバーが改善した。



通常のリンス動作のみ
 1回目ブランク : 0.0231%



内部リンス動作あり
 1回目ブランク : 0.0001%

System : Nexcera X3
 Column : Shim-pack Arata C18(100 mm x 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
 Mobile Phase : A)0.1% Formic Acid in Water
 B)0.1% Formic Acid in Acetonitrile
 Oven : 40 °C
 Detection : UV 258 nm
 Injection Vol. : 5 μL
 Rinse solution R1 : Water/Acetonitrile=50:50
 Rinse solution R2 : 0.1% Formic Acid in Acetonitrile

まとめ

- 試料吸着が発生しやすい箇所はバイアル、カラム、オートサンプラー。
- 低濃度試料ほど試料吸着の影響は大きくなる。
- バイアルに対して、疎水性吸着とイオン性吸着が生じる可能性がある。
- カラムに対して、充填剤へのイオン性吸着カラムボディーへの金属吸着が生じる可能性がある。
- オートサンプラーに対して、リンス機能によって金属吸着が改善する可能性がある。

吸着の種類	試料の特徴や主な発生箇所	対策例
疎水性吸着 (疎水性相互作用)	logPの大きい疎水性化合物 (ガラスバイアル、PPバイアル、ピペットチップなど)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試料溶媒を有機溶媒にする ・ 移動相に非イオン界面活性剤を添加する ・ 疎水性吸着を低減するバイアルを使用する
イオン性吸着	pKaの高い塩基性化合物 (ガラスバイアル、カラム充填剤)	<ul style="list-style-type: none"> ・ PPバイアルを使用する ・ 酸性移動相を使用しシラノール基の解離を抑制する ・ 残存シラノール基への対策が施されたカラムを使用する
金属吸着	りん酸基含有化合物など、配位結合する化合物 (カラムボディー、オートサンプラー)	<ul style="list-style-type: none"> ・ メタルフリーカラムを使用する ・ りん酸やEDTAなど、マスク効果のある移動相やリンス液を使用する

TORAST-H、Nexera、Shim-pack Arata、Shim-pack、Mastroは株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

本発表内に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、株式会社島津製作所もしくは各社の商標および登録商標です。
 なお、本発表中では「TM」、「®」を明記していません。