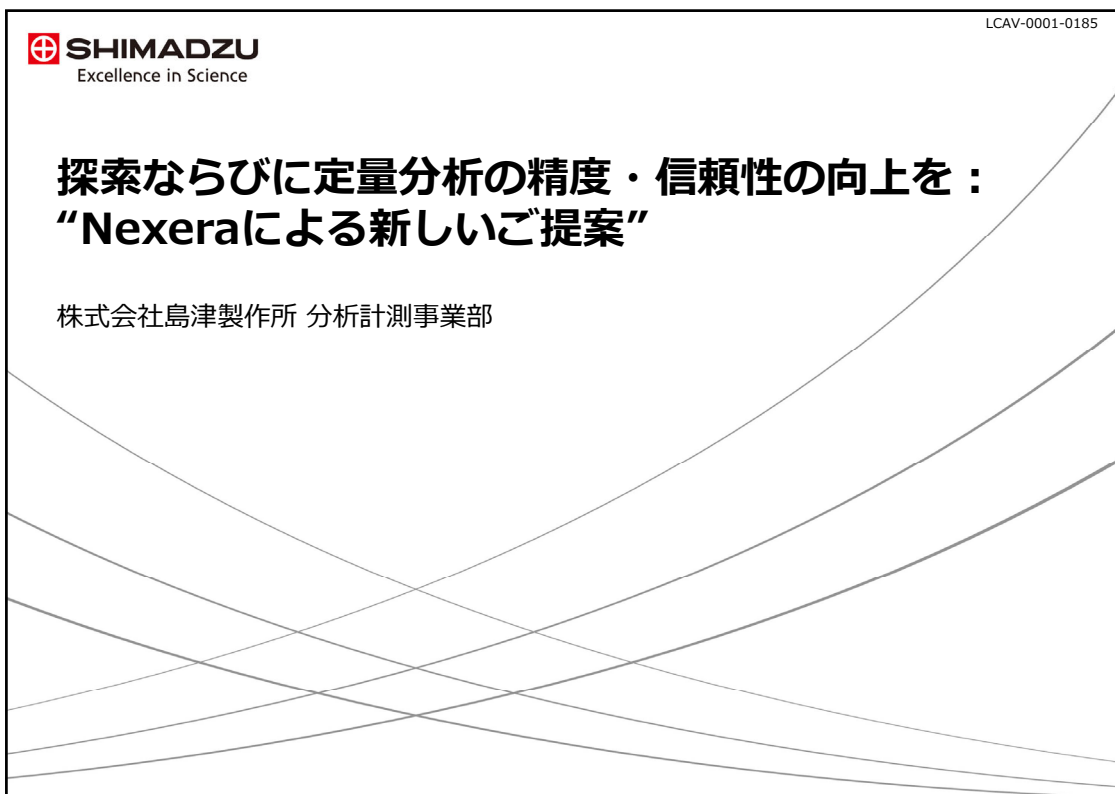


SHIMADZU
Excellence in Science

LCAV-0001-0185

探索ならびに定量分析の精度・信頼性の向上を： “Nexeraによる新しいご提案”

株式会社島津製作所 分析計測事業部



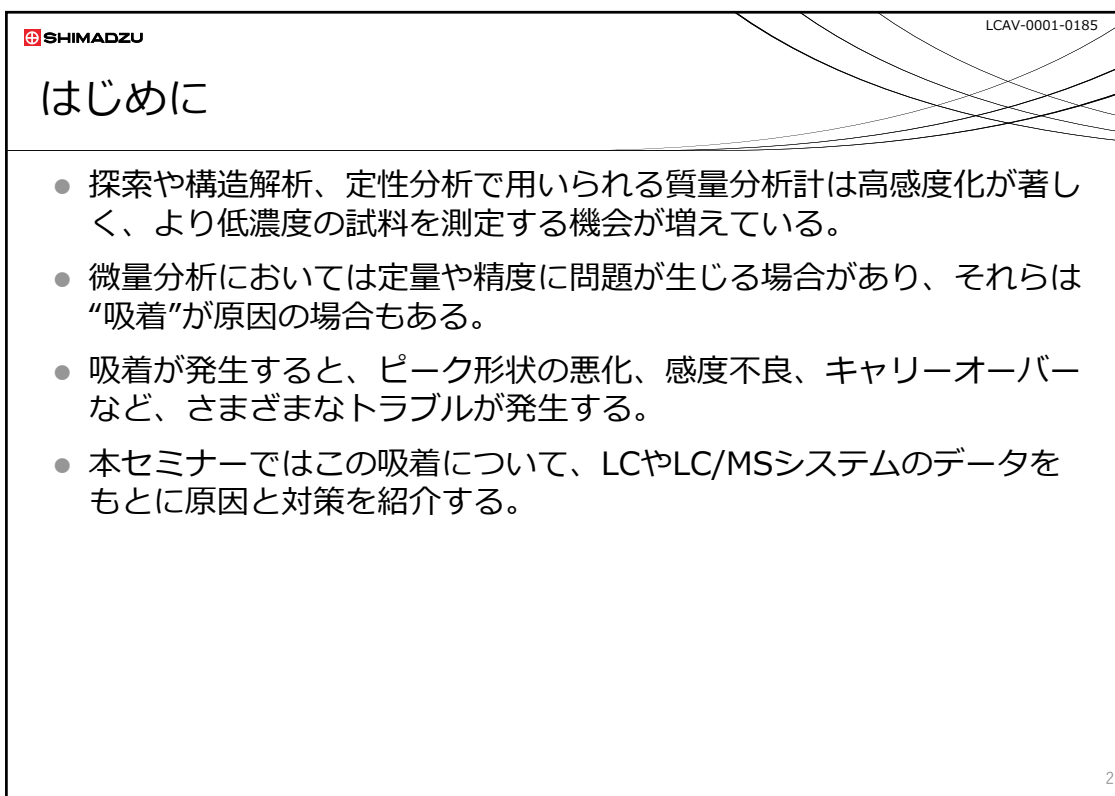
SHIMADZU

LCAV-0001-0185

はじめに

- 探索や構造解析、定性分析で用いられる質量分析計は高感度化が著しく、より低濃度の試料を測定する機会が増えている。
- 微量分析においては定量や精度に問題が生じる場合があり、それらは“吸着”が原因の場合もある。
- 吸着が発生すると、ピーク形状の悪化、感度不良、キャリーオーバーなど、さまざまなトラブルが発生する。
- 本セミナーではこの吸着について、LCやLC/MSシステムのデータをもとに原因と対策を紹介する。

2



SHIMADZU LCAV-0001-0185

セミナーの内容

1. 吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアル（またはピペットチップ）で発生する吸着
3. カラムで発生する吸着
4. オートサンプラーで発生する吸着

3

SHIMADZU LCAV-0001-0185

1. 吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアル（またはピペットチップ）で発生する吸着
3. カラムで発生する吸着
4. オートサンプラーで発生する吸着

4

SHIMADZU LCAV-0001-0185

吸着とは

- 界面（例：液相/固相）にある物質が化学的に引き寄せられて、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、意図しない吸着が起きてしまうことが問題。
- HPLC分析で問題になる吸着は、疎水性相互作用による吸着（疎水性吸着）、イオン性吸着、および金属吸着。

5

SHIMADZU LCAV-0001-0185

吸着が分析に及ぼす影響

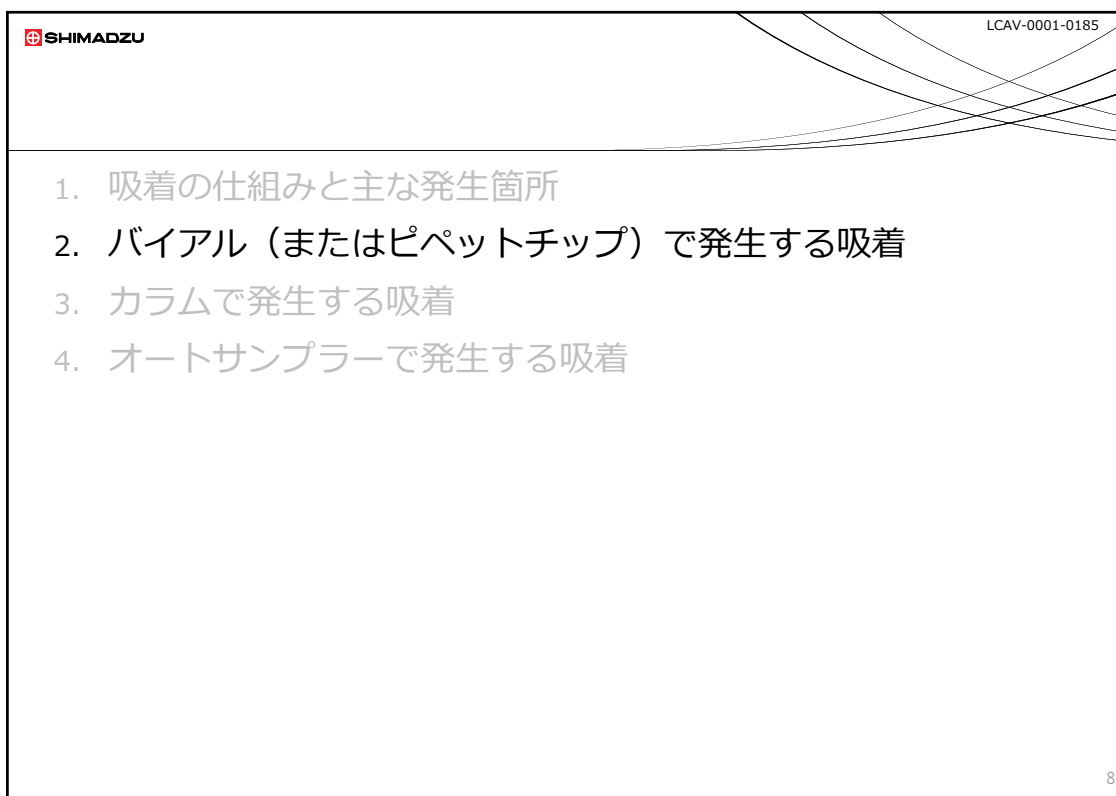
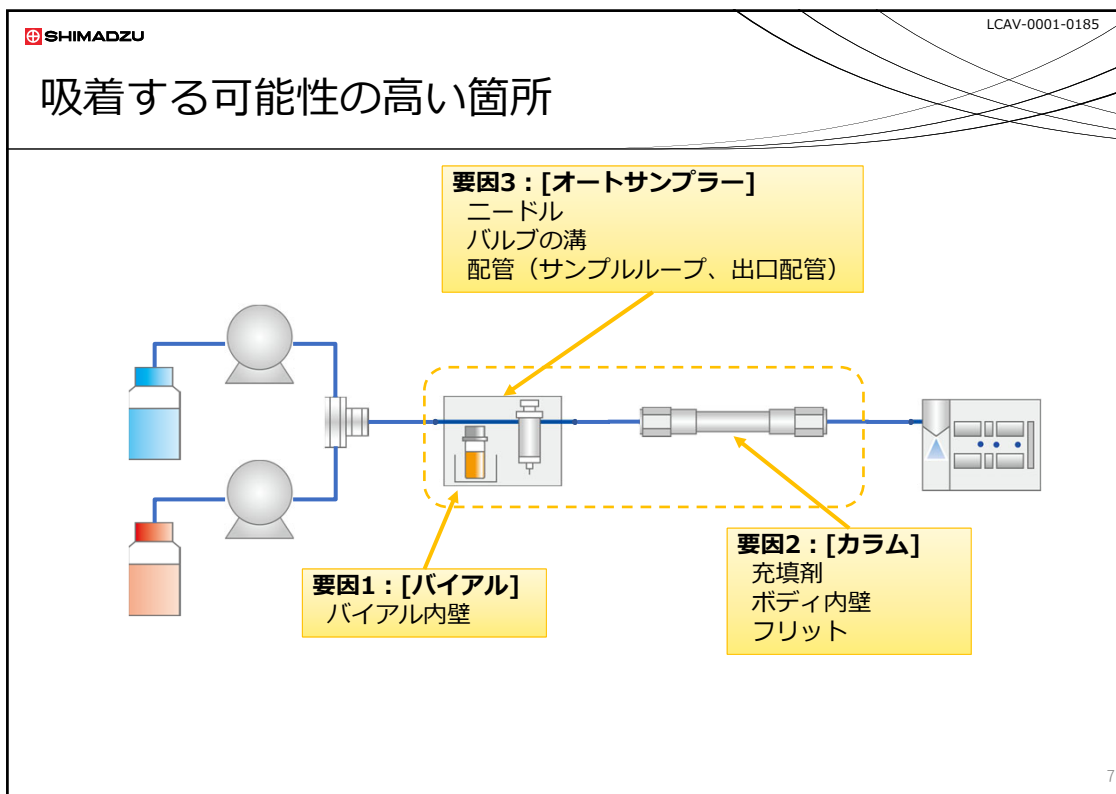
① 微小ピークの未検出

② ピーク形状の悪化

③ キャリーオーバー、再現性が出ない

④ 検量線が曲がる（微量成分の定量不可）

6



LCAV-0001-0185

SHIMADZU

バイアル（またはピペットチップ）で発生する吸着

- ガラスバイアルは疎水性吸着、イオン性吸着の両方があり、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。
- 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。

*PP: ポリプロピレン

9

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

バイアルへの吸着 塩基性化合物によるイオン性吸着

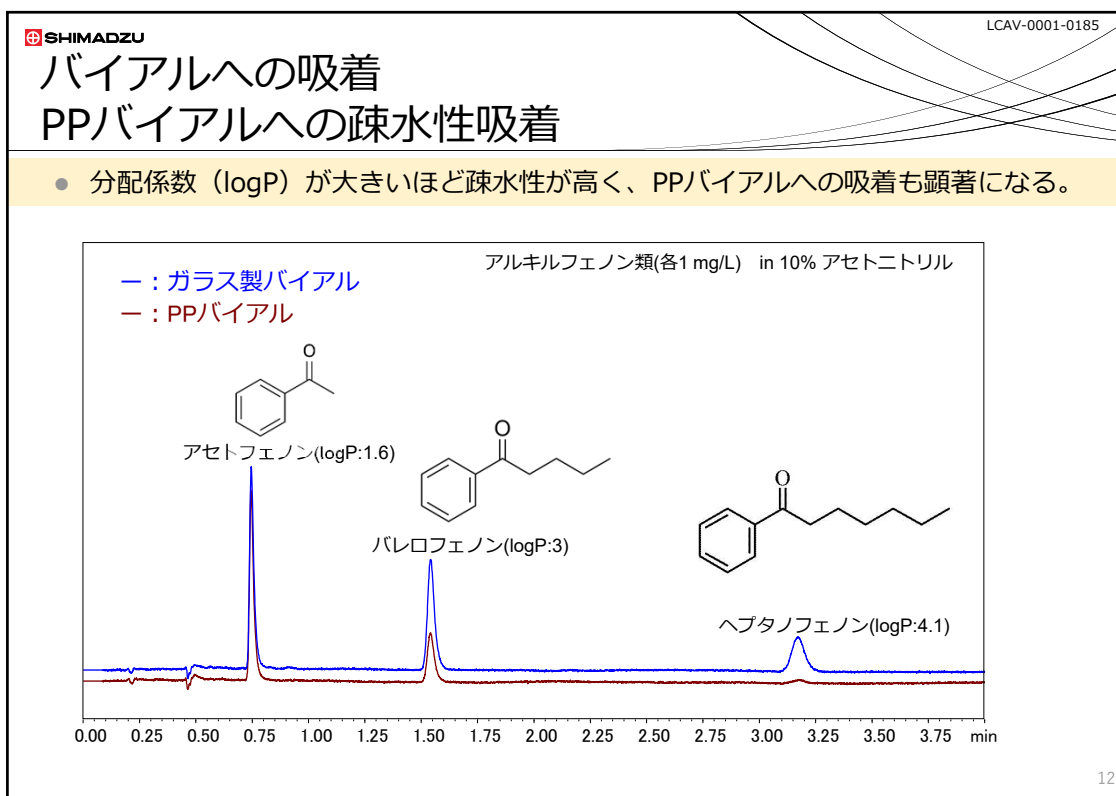
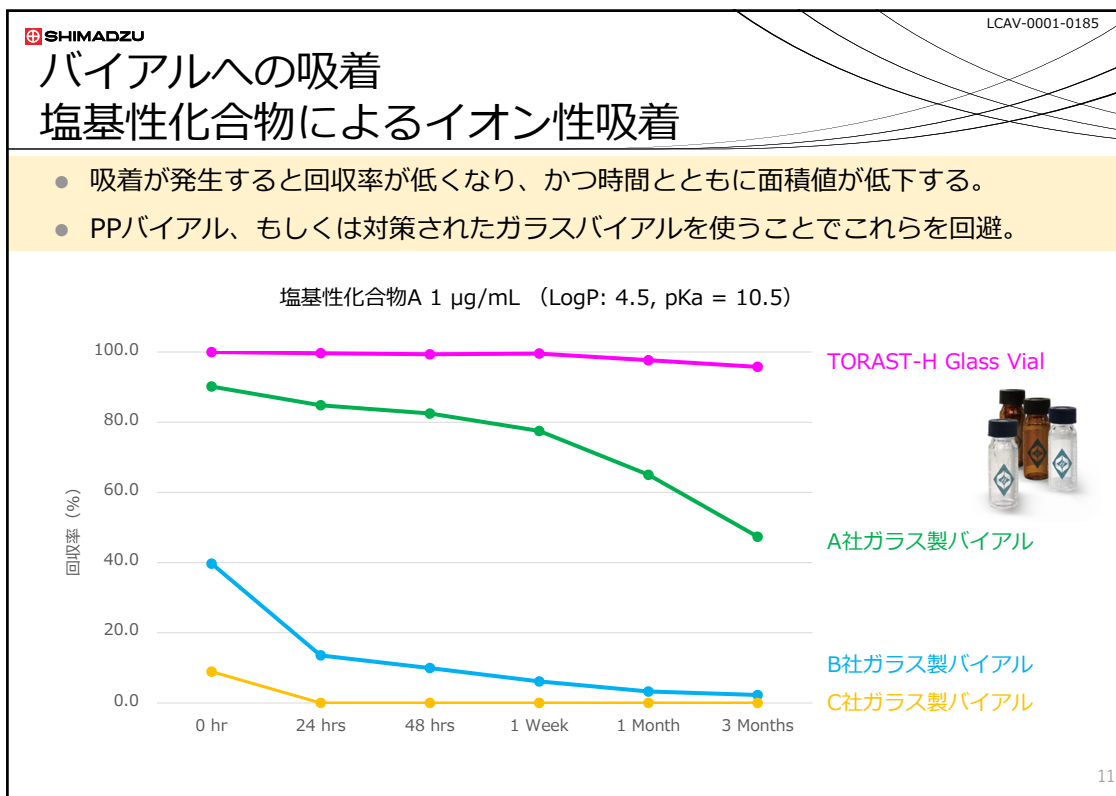
- 塩基性化合物はガラスバイアルに吸着しやすい。
- 正しい定量値が得られなくなったり、再現性不良が生じる場合がある。

5 $\mu\text{g/mL}$ の試料溶液をバイアルに入れ、24時間経過後に分析

ポリプロピレン製 Vial (100 %)
 他社A Vial 透明ガラス製 (71 %)
 他社B Vial 透明ガラス製 (23 %)

カッコ内は塩基性化合物の回収率で、PPバイアルの回収率をリファレンスとした。

10



LCAV-0001-0185

バイアルへの吸着 ポリソルベート80の分析

- たんぱく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。
- ピーク形状も正常な範囲で特に問題ないように思える分析だが…

$w + x + y + z = \text{approx. } 20$

https://www.an.shimadzu.co.jp/aplnotes/lc/an_1486.pdf

13

LCAV-0001-0185

バイアルへの吸着 ポリソルベート80の分析

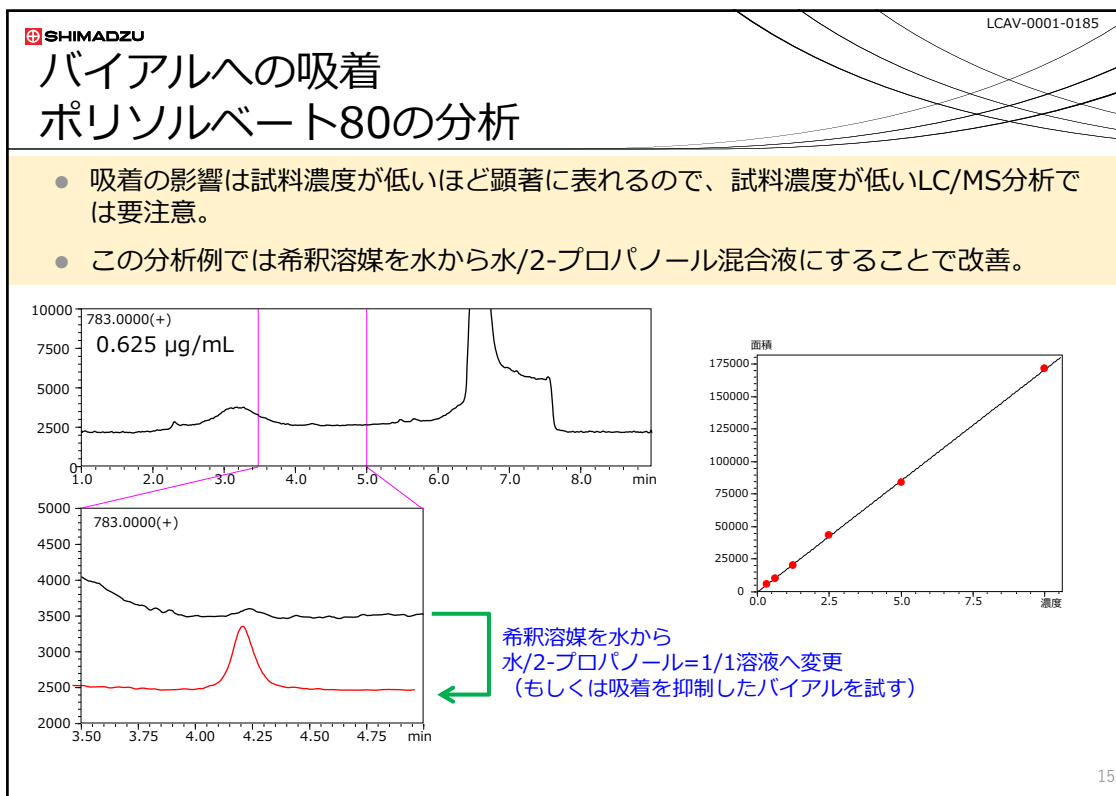
- 濃度が高い場合は問題なく直線性が得られるが、低濃度領域だと上手くいかない。

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



- SHIMADZU LCAV-0001-0185
1. 吸着の仕組みと主な発生箇所
 2. バイアル（またはピペットチップ）で発生する吸着
 3. カラムで発生する吸着
 4. オートサンプラーで発生する吸着
- 16

LCAV-0001-0185

SHIMADZU カラムで発生する吸着① 残存シラノールとの相互作用

シリカゲル

残存シラノール基

塩基性物質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乖離を抑制する。
- 酸性条件下では塩基性物質は解離しているため、イオンペア試薬を使用する。

17

LCAV-0001-0185

SHIMADZU 残存シラノールとの相互作用 塩基性物質の分析

● シラノール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吸着の影響を受けずに分析が可能。

1. Chlorhexidine 2. Benzethonium

System	: Nexera X3
Column	: Shim-pack Arata C18 (100 mm × 3.0 mm ID, 2.2 μm) Typical ODS column (100 mm × 3.0 mm ID, 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
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 1 μL
Detection	: UV 258 nm

18

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

残存シラノールとの相互作用 ペプチドの分析

- 残存シラノール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、塩基性物質同様、シラノールとの相互作用を抑制するカラムが有効。
- 同じODSカラムでも挙動が全く異なるので注意。

流量 : 0.2 mL/min
 移動相 : A 0.1% 酢酸水
 : B 0.1% 酢酸含むアセトニトリル
 カラム温度 : 60 °C
 注入量 : 5 µL
 検出 : UV 215 nm
 試料 : トリプシン消化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

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

カラムで発生する吸着② カラムボディー（フリット）への吸着

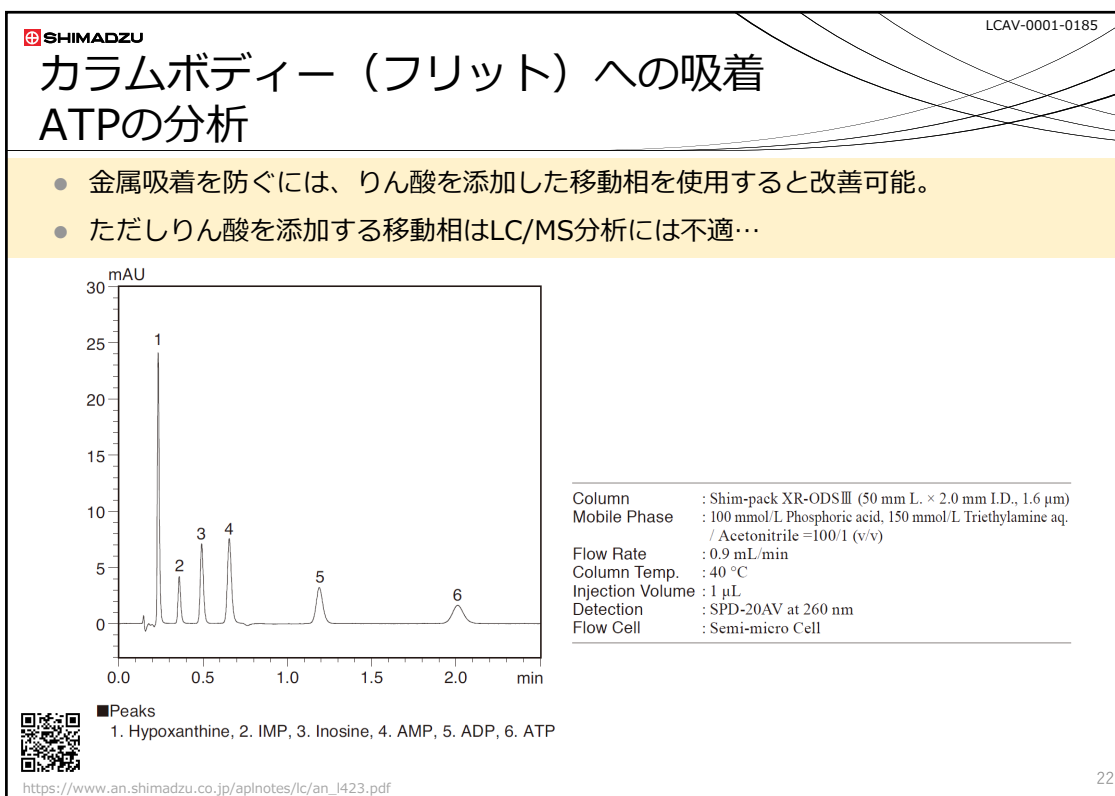
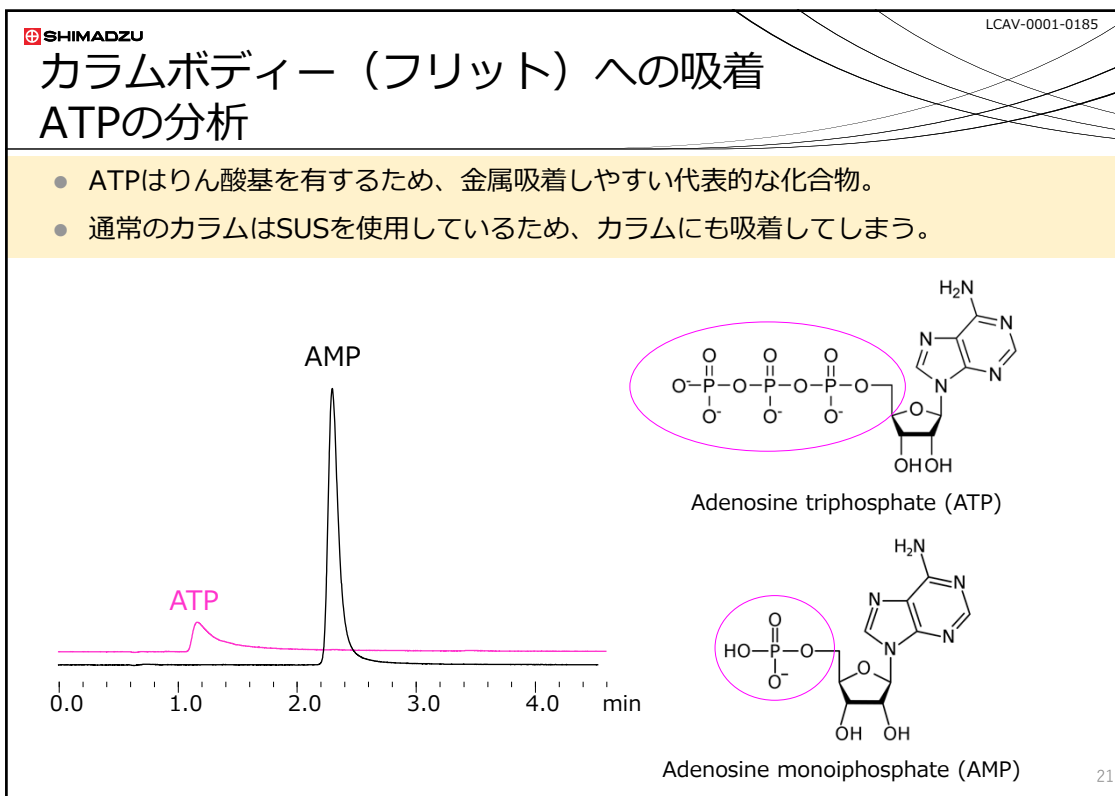
- HPLCカラムの多くはカラムボディーやフリットがSUSでできている。
- 金属吸着するような成分を分析すると、カラム内の金属と相互作用することでピークがテーリングする場合がある。

カラムボディー

フリット

網目状のSUSを使用しているため、試料との接触面積は他の部分よりも大きいと考えられる。

20



LCAV-0001-0185

SHIMADZU カラムボディー（フリット）への吸着 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 : **メタルフリーカラム100 mmL x 2.1 mmI.D., 3 μm**
 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

https://www.an.shimadzu.co.jp/aplnotes/lc/an_1447.pdf 23

LCAV-0001-0185

SHIMADZU カラムボディー（フリット）への吸着 製剤の分析

■ Peaks

1. Hydrocortisone Sodium Phosphate
2. Hydrocortisone Sodium Succinate

Typical C18カラム

Mastro™ C18カラム

Column : Mastro™ C18 (100 mm L x 2.1 mm I.D., 3 μm)
 Typical C18 (100 mm L x 2.1 mm I.D., 3 μm)
 Instrument : Nexera
 Mobile Phase : 0.1 % Formic Acid in Water: 0.1 % Formic Acid in Acetonitrile= 50:50
 Flow Rate : 0.2 mL/min
 Column Temp. : 40 °C
 Detection : SPD-M20A at (254 nm)
 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

https://www.an.shimadzu.co.jp/aplnotes/lc/an_1447.pdf

SHIMADZU LCAV-0001-0185

1. 吸着の仕組みと主な発生箇所
2. バイアル（またはピペットチップ）で発生する吸着
3. カラムで発生する吸着
4. オートサンプラーで発生する吸着

25

SHIMADZU LCAV-0001-0185

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。
- 吸着および残渣がキャリーオーバーの原因となる。

26

SHIMADZU LCAV-0001-0185

キャリーオーバー発生時に把握しておきたいこと

- どのようなキャリーオーバーが発生している？
- Blank（溶媒）注入を繰り返すとどのような傾向を示す？
- 原因箇所はどこか？
- キャリーオーバー？ゴーストピーク？
 - キャリーオーバー：試料分析に続いてブランク分析した時に、残っていた試料がブランク分析上にピークとして観察される。基本的に試料と同じ位置に溶出。
 - ゴーストピーク：移動相の汚れなど、試料以外の意図しないピークが観察される。試料と異なる位置に溶出する場合が多い。

27

SHIMADZU LCAV-0001-0185

どのようなキャリーオーバーが発生している？

- 複数の成分が含まれた試料の場合、それら全てがキャリーオーバーするときは吸着ではない能性が高い。
 - フィットティングやバルブが摩耗していないか確認する。
- 特定成分のみキャリーオーバーしている場合は、吸着などによってキャリーオーバーが発生している可能性が高い。
 - 試料の特性をチェックする。
 - 金属配位しやすい？塩基性化合物？などなど…

28

LCAV-0001-0185

Blank (溶媒) 注入を繰り返すと どのような傾向を示す？

- Blankの確認は次の2種類があるため、情報共有時には注意が必要。
 - 非注入によるBlank確認と溶媒を注入するBlank確認。
- グラジエント分析のときは、必ず分析と同じグラジエントを実行する。

ゴーストピークによくある傾向

Blank注入を繰り返しても全く減らないときは試料以外の原因を考える。
移動相：試薬、溶媒
器具：移動相ボトルなど

キャリアオーバーによくある傾向

試料由来の場合は、Blank注入分析を繰り返すと徐々にピーク面積値は減少する。

29

LCAV-0001-0185

原因箇所はどこか？

オートサンプラー（配管）とカラムのどちらが原因か調べるのが重要

カラムを接続し、試料を分析する
(キャリアオーバーは極力無くしておく)

↓

ポンプとカラムを直結する
(オートサンプラーをバイパスする)

↓

非注入モードで分析を行う

キャリアオーバー無し

オートサンプラー
もしくは配管を疑う

キャリアオーバーあり

カラム以降を疑う

30

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

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要確認ポイント。
 - 締め付け過ぎもフェールールが変形したりするので注意。
- 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してみる。
 - 塩基性物質の時は酸性溶媒を使用してみる。

31

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

島津オートサンプラーの 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だけではなく、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可能（内部リンス機能）。
- オプション（一部は標準）でリンス液を複数セットすることも可能。

サンプルループ ニードル

通常の浸漬洗浄用ポート 第2洗浄ポート

キャリーオーバーが発生しやすい箇所 (ニードルとニードルポートの接界面)

インジェクションポート(模式図)

任意のリンス液でポート部分を洗 (1液~3液)

ドレインポートへ廃棄

ハレバ Drain

R0 R1 R2 R3

ニードル外面、内面洗浄用 (3種) ニードル外面洗浄用 (1種)

マルチリンス機能

32

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

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。

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

Butyryl coenzyme A

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
STD分析

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
1回目ブランク : 11.86%

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
2回目ブランク : 1.48%

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
3回目ブランク : 0.45%

33

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

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%苛性水/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)

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
STD分析

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
1回目ブランク : 1.24%

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
2回目ブランク : 0.20%

114:Butyryl coenzyme A 836.1000>407.9500(-) CE: 38.0
3回目ブランク : 0.10%

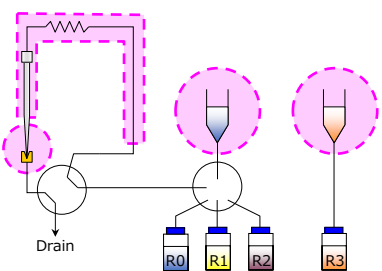
34

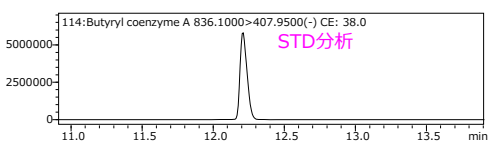
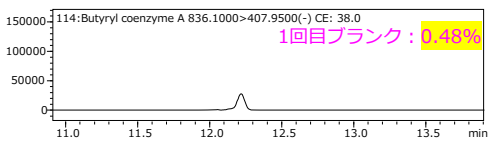
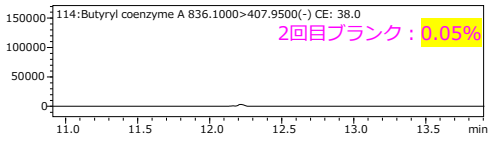
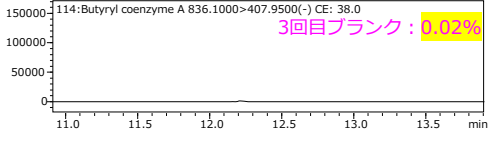
LCAV-0001-0185

SHIMADZU 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、顕著な効果が確認された。

リンス液R0 : 水
 リンス液R1 : 1% 酢酸水/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% 酢酸水/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)



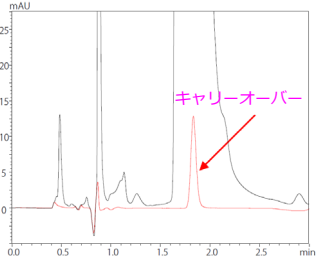





35

LCAV-0001-0185

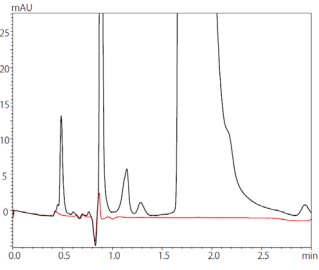
SHIMADZU リンスによるキャリーオーバー対策 塩基性物質の分析

- 塩基性物質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化合物。
- インジェクションポートが原因箇所となると、通常のリンスでは除去が困難。
- Nexeraシリーズは内部リンス機能により、インジェクションポートの洗浄が可能。



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%**

— : Standard solution
— : Blank

10000 mg/Lのクロルヘキシジン二酢酸塩を分析後のキャリーオーバー

System	: Nexera 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
Flow rate	: 0.7 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 5 μL
Detection	: UV 258 nm
Rinse solution R1	: Water/acetonitrile=50/50 (v/v)
Rinse solution R2	: 0.1% Formic acid in acetonitrile



https://www.an.shimadzu.co.jp/aplnotes/lc/an_I560.pdf

36

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

まとめ

- 吸着が起きやすい箇所はバイアル、カラム、オートサンプラー。
- 低濃度試料ほど吸着の影響は大きくなる。
- バイアルは疎水性吸着とイオン性吸着に注意。
- カラムは充填剤のイオン性吸着とカラムボディーへの金属吸着に注意。
- キャリーオーバーが発生した時は、原因箇所を落ち着いて探す。

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 ・ 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 ・ 酸性条件下にしてシラノールの解離を抑制する ・ 残存シラノール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、マスキング効果のある移動相やリンス液を使用する

37

LCAV-0001-0185

SHIMADZU

ご清聴ありがとうございました

Nexera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。

38