

ガラスライニングステンレス管に非金属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、メタルフリーカラムが実現しました。

金属の影響を受けやすいタンパク質やペプチド、配位性化合物などのLC/MS分析では、ピーク形状、SN比及び定量性の向上、キャリアオーバーの低減により、ワンランク上の分析ができます。



■ L-column2メタルフリーカラムの構造

金属材料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。クロマトグラフィー管の材質には、ステンレス鋼、ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)、ガラスライニングステンレス鋼、PEEKライニングステンレス鋼、フューズドシリカ(熔融シリカ)チューブなどが用いられます。フリットの材質には、ステンレス鋼、PEEKなどが用いられます。



Fig.1 クロマトグラフィー管の材質

これらのうち、流路内で金属材料と接触しないカラムハードウェアを用いたカラムが、メタルフリーカラムとして市販されています。一般に樹脂材質を用いたカラムハードウェアは金属製に比較し強度が劣り、使用できる溶媒の種類が制限されるので、分析条件が限定されます。

L-column2メタルフリーカラムは、ガラスライニングステンレス鋼のクロマトグラフィー管に非金属系フリットを装着したカラムハードウェアを用いています。充填剤は、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を充填しています。カラムハードウェアと充填剤、共に金属との相互作用を抑えました。

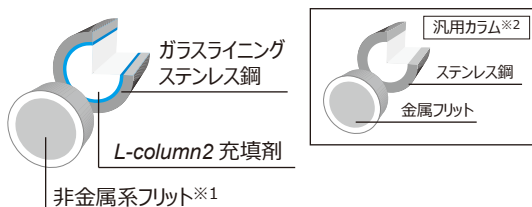


Fig.2 L-column2メタルフリーカラムの構造

■ 耐久性

L-column2メタルフリーカラムも従来のL-column2と同等の耐久性を示します。Fig.3のように送液のOn-Offを繰り返し、圧力変化を与えても、初期性能を維持しています。

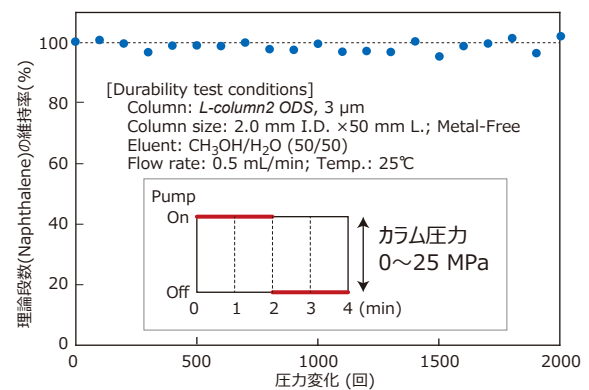


Fig.3 繰り返し圧力変化での耐久性

推奨する使用圧力は次のとおりです。

Table 1 L-column2メタルフリーカラムの推奨使用圧力(抜粋)

| 粒子径 | カラムサイズ | 推奨使用圧力*3 |
|------|-------------------------|----------|
| 3 μm | 2.0 mm I.D. × 150 mm L. | ~25 MPa |
| 3 μm | 2.0 mm I.D. × 250 mm L. | ~30 MPa |

■ 汎用カラムとの比較

L-column2メタルフリーカラムと汎用カラム*2で金属材料と相互作用を起こす試料のクロマトグラムを比較しました。ステンレスカラムでは試料が吸着して、大きなピークテーリングを引き起こします。それに対しメタルフリーカラムではシャープなピークが得られました。特に微量成分での差は顕著です。

*1 L-column2メタルフリーカラムのフリットは非金属系ですが、一般的な逆相クロマトグラフィーに用いられる有機溶媒は使用可能です。

*2 JIS K 0124:2011ではカラムの内径による分類として内径3 mm以上、10 mm未満を「汎用カラム」としていますが、ここではステンレス鋼のクロマトグラフィー管に金属フリットを装着した一般的なカラムハードウェアを用いたカラムのことを示します(次ページ以降、注釈表記は省略します)。

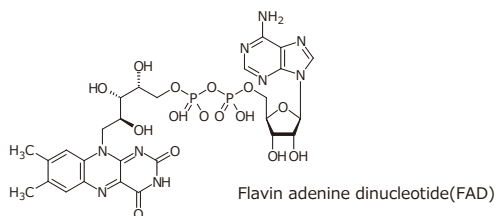
*3 数値は2015年4月現在のものです。性能向上により変更の可能性がございます。

フラビンアデニンジヌクレオチド(システムの最適化)

フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)は代謝に必要な補酵素の一つで、ビタミンB₂から誘導されます。

システムの配管やニードルなどのメタルフリー化も重要な要素です。Fig.4は、カラムを付けない状態でフラビンアデニンジヌクレオチドのピーク形状を比較しました。汎用システムではピークがテーリングすることから、システム流路の金属材料に吸着していることが分かります(Fig.4)。

メタルフリーなシステム環境と、L-column2メタルフリーカラムの組合せで、SN比及び定量性が大幅に向上します(Fig.5, Fig6)。



[Analytical conditions] (Fig.4, Fig.5, Fig.6)
 Column: L-column2 ODS, 5 μ m
 Column size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: CH₃CN/0.1% HCOOH in H₂O (10/90)
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(+)
 Inj. vol.: 5 μ L(in H₂O)

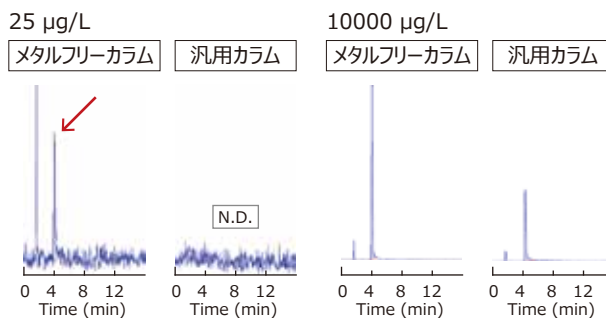
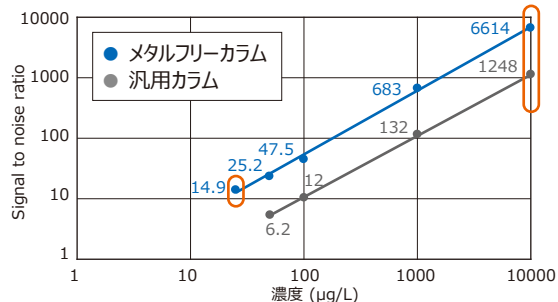


Fig.5 フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の分析 (上: SN比, 下: クロマトグラム)

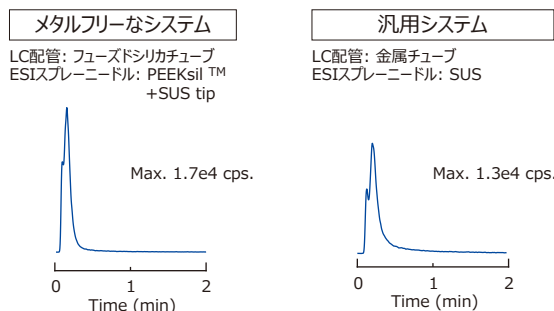


Fig.4 システムの比較(カラム接続なし)

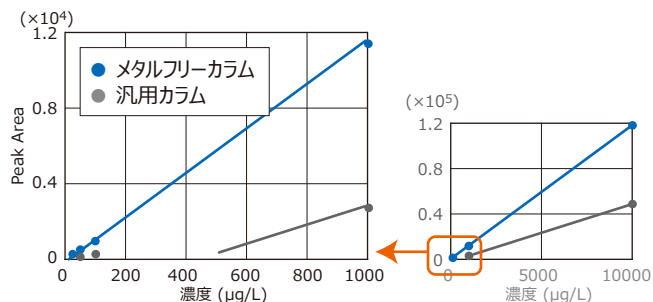


Fig.6 フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の分析(検量線)

リン酸化ペプチド

タンパク質の可逆的なリン酸化は生体内でのシグナル伝達系において様々な役割を担っています。このリン酸化タンパク質の解析には、酵素消化後にリン酸化ペプチドを分析する方法が多く用いられています。T18p(NVPLpYK)とT19p(HLADLpSK)は、エラーゼトリプシン消化物由来のリン酸化ペプチドです。

[Analytical conditions]
 Column: L-column2 ODS, 3 μ m
 Column size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A: CH₃CN; B: 0.1% HCOOH in H₂O
 A/B, 5/95-50/50(0-10 min)
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(+)
 Inj. vol.: 3 μ L(500 fmol/ μ L each)
 Sample: MassPREP™ by Waters Co.

Table 2 SN比とキャリーオーバー(リン酸化ペプチド)

| Sample | メタルフリーカラム | | 汎用カラム | |
|--------|-----------|-----------|-------|-----------|
| | SN比 | Carryover | SN比 | Carryover |
| T19p | 2250 | 0.44% | 517 | 6.21% |
| T18p | 2151 | 0.11% | 725 | 3.00% |

(n=6)

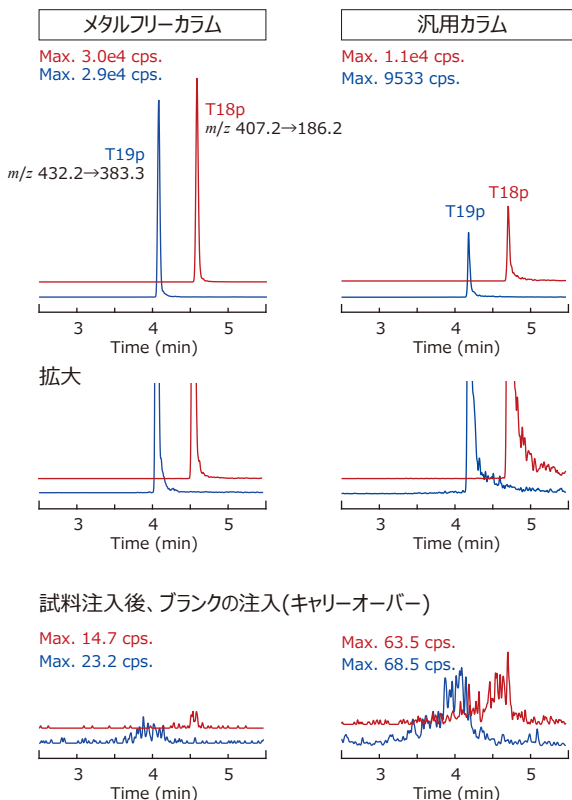
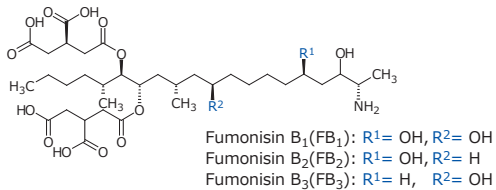


Fig.7 リン酸化ペプチドの分析

マイコトキシン(かび毒)

フモニン類は、フザリウム属(*Fusarium*)に由来するマイコトキシン(かび毒)の一種です。穀類、特にとうもろこしやその加工品を汚染することがあります。



[Analytical conditions]
 Column: *L-column2 ODS*, 3 μm
 Column size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A: CH₃CN; B: 0.1% HCOOH in H₂O
 A/B, 20/80-70/30(0-10 min)
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(+)
 Inj. vol.: 3 μL(1 mg/L each in H₂O)

Application No.L2113

Table 3 SN比とキャリーオーバー(フモニン)

| Sample | メタルフリーカラム | | 汎用カラム | |
|-----------------|-----------|-----------|-------|-----------|
| | SN比 | Carryover | SN比 | Carryover |
| FB ₁ | 2677 | 0.10% | 1212 | 3.62% |
| FB ₃ | 2998 | 0.14% | 1371 | 7.83% |
| FB ₂ | 7900 | 0.13% | 3671 | 2.00% |

(n=6)

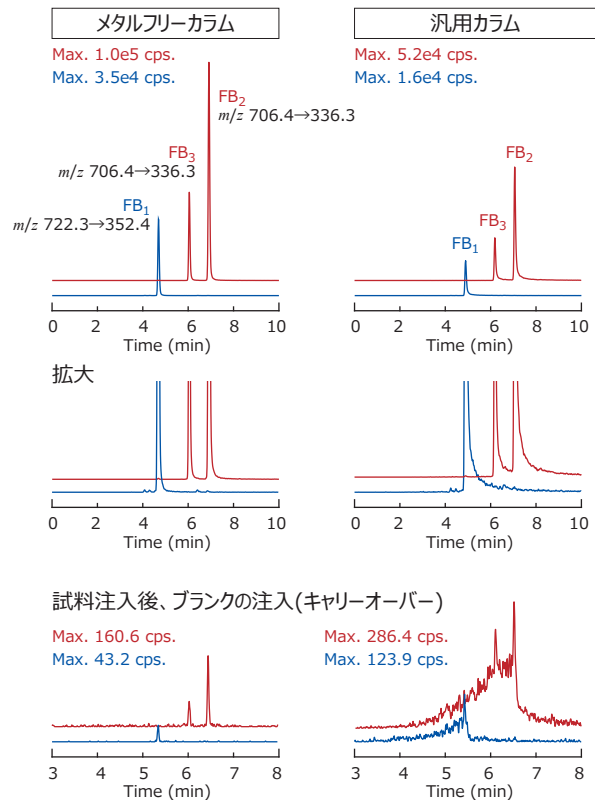


Fig.8 フモニン類(FBs)の分析

リン脂質

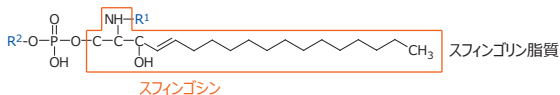
リン脂質は脂質二重層を形成し、細胞膜の主要構成成分で、生体内でのシグナル伝達にも関わっています。

リン脂質はリン酸エステルを持つ複合脂質で、グリセリン骨格を有するグリセロリン脂質とスフィンゴシン骨格を有するスフィンゴリン脂質に分類されます。

- リソホスファチジンセリン(LPS) : R¹= Fatty acid(13:0), R²= H, R³= Ser
- リソホスファチジンエタノールアミン(LPE) : R¹= Fatty acid(13:0), R²= H, R³= Ethanolamine
- リソホスファチジングリセロール(LPG) : R¹= Fatty acid(13:0), R²= H, R³= Glycerol
- リソホスファチジンコリン(LPC) : R¹= Fatty acid(17:0), R²= H, R³= Choline
- リソホスファチジン酸(LPA) : R¹= Fatty acid(17:0), R²= H, R³= H
- ホスファチジンコリン(PC) : R¹= Fatty acid(16:0), R²= Fatty acid(16:0), R³= Choline
- ホスファチジンエタノールアミン(PE) : R¹= Fatty acid(14:0), R²= Fatty acid(14:0), R³= Ethanolamine
- ホスファチジンセリン(PS) : R¹= Fatty acid(16:0), R²= Fatty acid(16:0), R³= Ser
- ホスファチジン酸(PA) : R¹= Fatty acid(16:0), R²= Fatty acid(16:0), R³= H



- スフィンゴミエリン(SM) : R¹=Fatty acid(17:0), R²=Choline



[Analytical conditions]
 Column: *L-column2 ODS*, 3 μm
 Column size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A: CH₃CN/CH₃CH(OH)CH₃(10/90)
 B: CH₃CN/5mM HCOONH₄ in H₂O(50/50)
 A/B, 0/100-98/2(0-60 min)
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(-)
 Inj. vol.: 2 μL(50 μg/L~250 μg/L in CH₃OH)

Application No.L2114

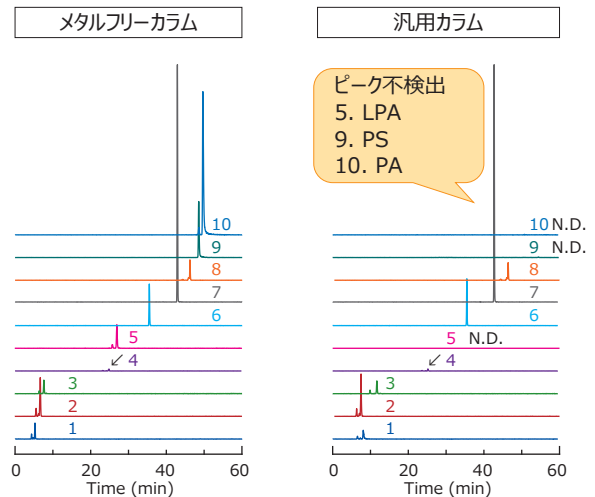
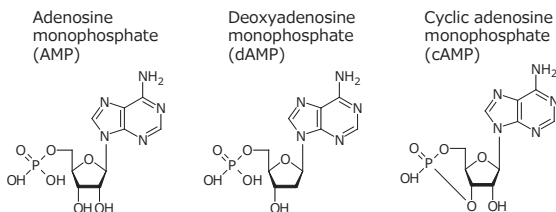


Fig.9 リン脂質の分析

ヌクレオチド

アデノシン一リン酸類(AMPs)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。



[Analytical conditions]
 Column: *L-column2 ODS*, 3 μm
 Column size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: CH₃CN/0.1% HCOOH in H₂O (1/99)
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(-)
 Inj. vol.: 3 μL (5 mg/L each in H₂O)

Application No.L2111

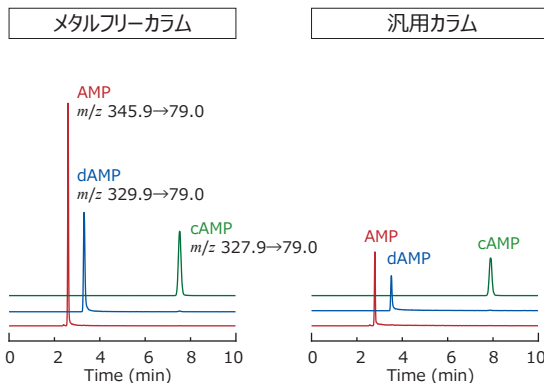
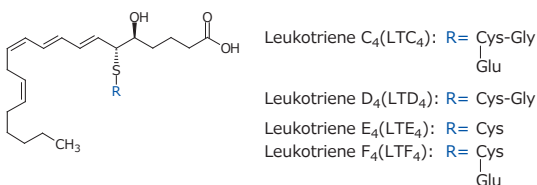


Fig.10 アデノシン一リン酸類(AMPs)の分析

ロイコトリエン

ロイコトリエン類(LTs)はエイコサノイドの一種で、アラキドン酸から生合成される生理活性物質です。中でもアミノ酸が結合したLTC₄、LTD₄及びLTE₄はシステニルロイコトリエンと呼ばれ、気管支喘息と深く関連しています。



[Analytical conditions]
 Column: *L-column2 ODS*, 3 μm
 Column size: 2.0 mm I.D. or 2.1 mm I.D., 150 mm L.
 Eluent: A: CH₃CN; B: 0.1% HCOOH in H₂O
 A/B, 35/65-55/45(0-10 min)
 Flow rate: 0.2 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: ESI-MS/MS(-)
 Inj. vol.: 10 μL (50 μg/L each in CH₂H₅OH/H₂O(50/50))

Application No.L2109

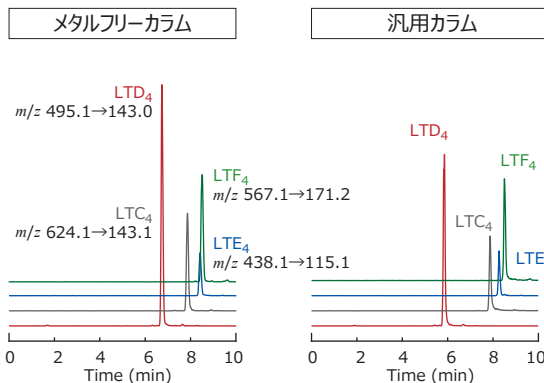


Fig.11 ロイコトリエン類(LTs)の分析

参考 高速液体クロマトグラフィー通則(JIS K 0124:2011)

主要ラインアップ

充填剤は *L-column2 ODS*, *L-column2 C8*, *L-column2 C6-Phenyl* の粒子径3 μm, 5 μmからお選びください。

| 充填剤 | 修飾基 | USP category | 粒子径 | カラムサイズ | Cat.No. | 価格 |
|----------------------|---------|--------------|------|-------------------------|---------|---------|
| <i>L-column2 ODS</i> | オクタデシル基 | L 1 | 3 μm | 2.0 mm I.D. × 50 mm L. | 731140 | 77,000円 |
| | | | | 2.0 mm I.D. × 100 mm L. | 731170 | 82,000円 |
| | | | | 2.0 mm I.D. × 150 mm L. | 731020 | 87,000円 |
| | | | | 2.0 mm I.D. × 250 mm L. | 731220 | 99,000円 |

(2015年4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