

リン酸基含有化合物分析に対する 新規高耐圧ステンレスフリーカラムの有用性について

○佐藤友紀^{1,3}, 山口忠行², 尾坂裕輔², 山本祝久¹

(株式会社島津ジーエルシー¹, 株式会社島津製作所²,
独立行政法人国立循環器病研究センター薬剤部³)

はじめに

リン酸基含有化合物や金属キレート性のある化合物は、分析を行う際にテーリング現象や吸着現象が起こる事が一般的に知られている。この種の化合物は代謝物・薬物等に多く存在し、HPLCによる分析時には溶離液に塩やキレート剤を添加する事で吸着現象を軽減できる。しかしながら、これらの溶離液は質量分析計には使用できないものが多く、また、HPLCシステム流路に残存しゴーストピークの原因となる事も懸念される。

これらの吸着現象は、カラムを含めたHPLCシステム流路全体の金属部分が影響しており、根本的な改善が広く求められているところである。

そこで我々は、カラムボデーに着目し開発・検討を行った。PEEK製のボデーはこれらの物質に対し不活性度が非常に高いが、耐圧性が低い。そのため、ステンレススチールのカラムボデー内面を特殊コーティングし、フリットは高耐圧性の樹脂素材を採用することで不活性と高耐圧の両立を目指した。本報告ではリン酸基含有化合物を用い、新開発したボデーのカラムの評価を行ったのでここに報告する。

講演概要

- リン酸基含有化合物の金属吸着について
- 新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて
- 分析例

講演概要

- **リン酸基含有化合物の金属吸着について**
- 新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて
- 分析例

リン酸基含有化合物について

➤ **ヌクレオチド**

ATP,ADP,AMP,GMP,UDP,CTPなど・・・

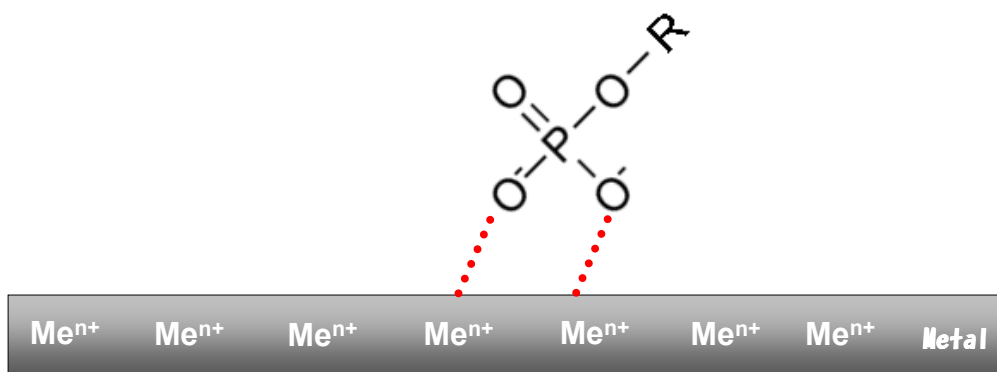
➤ **代謝物**

➤ **医薬品（有効成分）**

➤ **農薬**

など・・・

リン酸基含有化合物の金属吸着について



例えば、下記のHPLC条件でヌクレオチド（ATP、AMP）を分析してみると・・・

Instruments : Nexera

Column : Typical C18 100mmL*2.1mmI.D., 3 μ m

Mobile Phase : 10 mM Ammonium Formate in Water
:ACN = 99:1_Isocratic flow

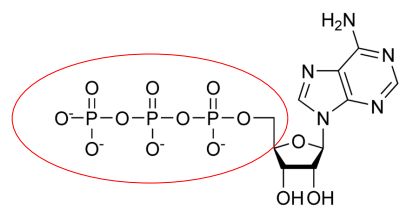
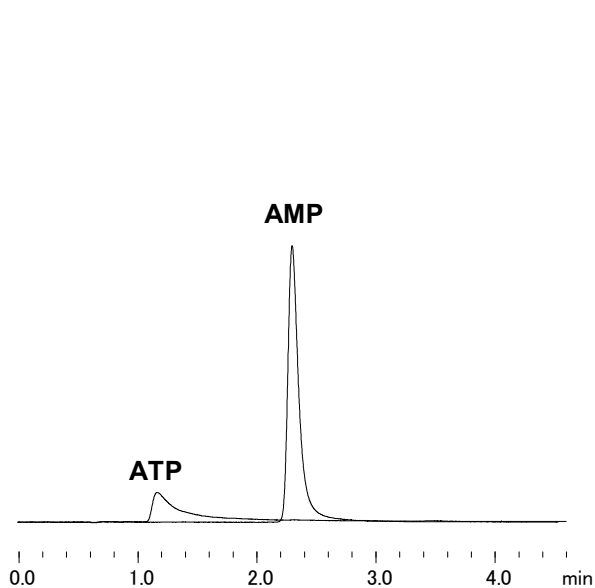
Flow Rate : 0.2 mL / min

Oven Temperature : 40 °C

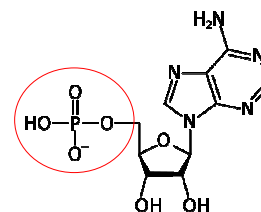
Detection : SPD-M20A at 256nm , Slit Width 1.2nm

Injection Vol. : 1 μ L

ヌクレオチドの分析例

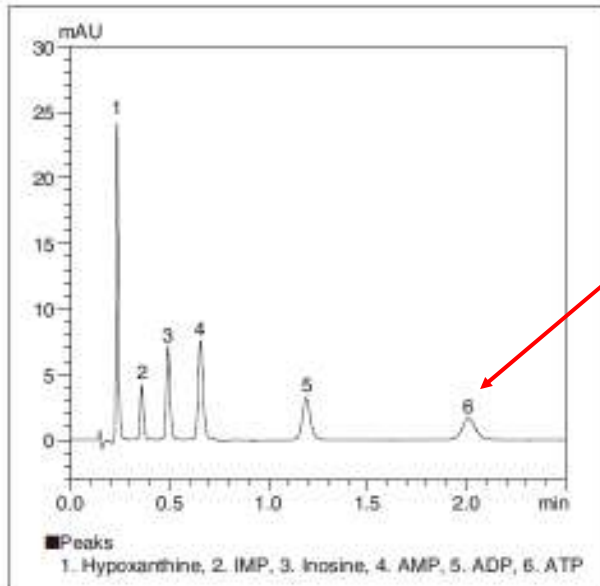


Adenosine triphosphate (ATP)



Adenosine mono-phosphate (AMP)

ヌクレオチドの分析例



Analytical Conditions	
Column	: Shim-pack XR-ODSII (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 1.6 μm)
Mobile Phase	: 100 mmol/L Phosphoric acid, 150 mmol/L Triethylamine aq. / Acetonitrile = 100:1 (v/v)
Flow Rate	: 0.9 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 1 μL
Detection	: SPD-20AV at 260 nm
Flow Cell	: Semi-micro Cell

島津アプリケーションニュース No.L423より抜粋

リン酸基含有化合物の金属吸着について

配管素材の影響

- : Stainless steel配管(600mm)
- : PEEK配管(600mm)

Column	: Typical C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 μm)
Instrument	: Nexera
Mobile Phase	: Mobile Phase : 10 mM Ammonium Formate in Water : MeCN=99:1
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M20A at (254 nm)
Injection Vol.	: 1 μL

リン酸基含有化合物の金属吸着について

配管素材の影響



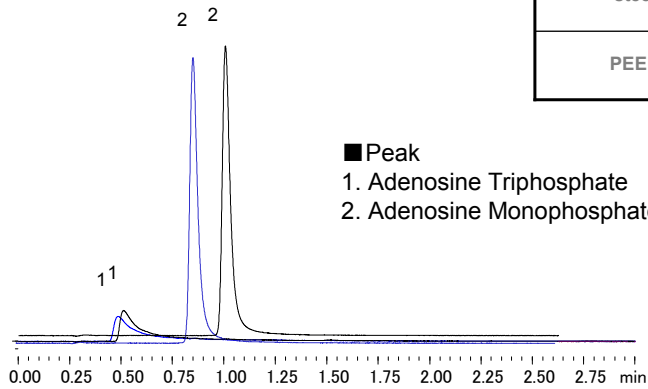
————— : 600mL

リン酸基含有化合物の金属吸着について

配管素材の影響

— : Stainless steel配管(600mm)
 - : PEEK配管(600mm)

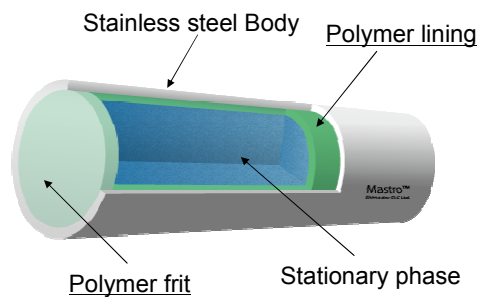
	Peak 1	Peak 2
Stainless steel	5.10	1.49
PEEK	4.67	1.48



講演概要

- リン酸基含有化合物の金属吸着について
- **新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて**
- 分析例

新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて



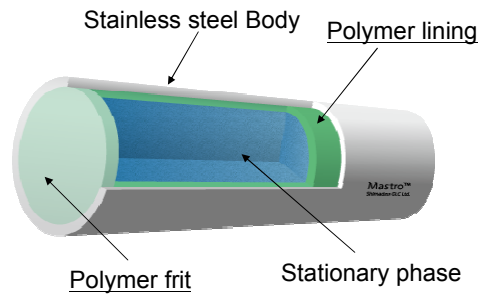
Mastro™
Multi Stroma:多層

新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて

Mastro (マストロ) カラム 耐圧

Mastro C18 100mmL×2.1mmI.D., 3 μ m

耐圧
: 50MPa (7250psi)



新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて



Mastro™

講演概要

- リン酸基含有化合物の金属吸着について
- 新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて
- **分析例**

新規高耐圧ステンレスフリーカラムについて

Column : Mastro C18 100mmL*2.1mmI.D.,3μm
Instruments : Nexera

Mobile Phase : 10 mM Ammonium Formate in Water
:ACN = 99:1_Isocratic flow

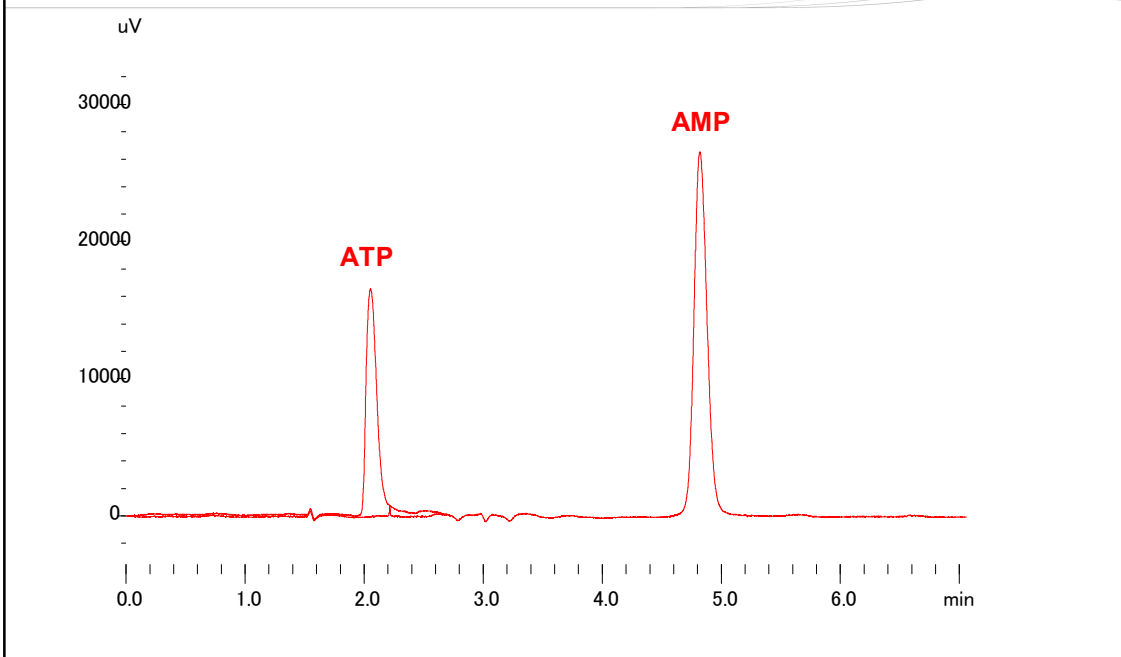
Flow Rate : 0.2 mL / min

Oven Temperature : 40 °C

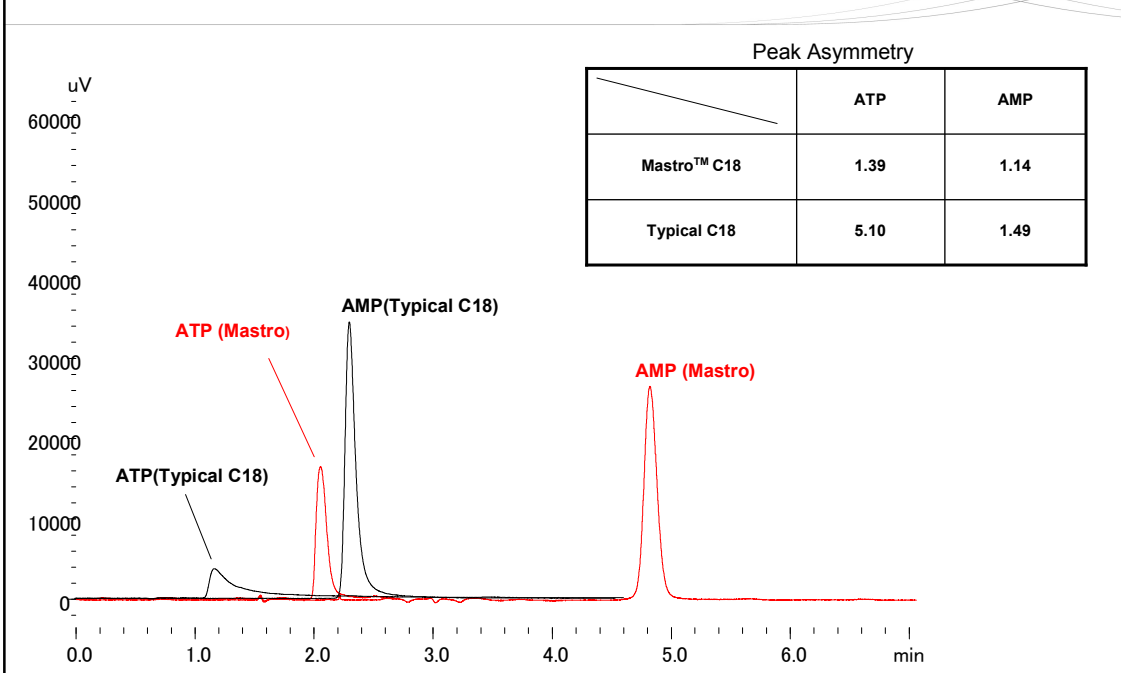
Detection : SPD-M20A at 256nm , Slit Width 1.2nm

Injection Vol. : 1μL

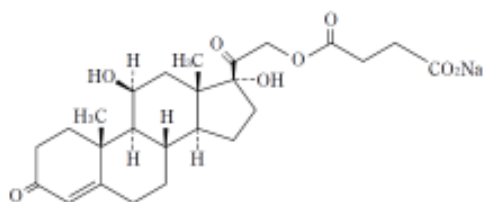
新規高耐圧ステンレスフリーカラムによる ヌクレオチドの分析例



ヌクレオチドの分析例（カラム比較）

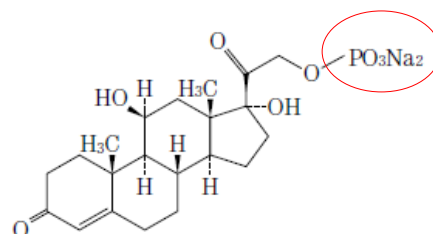


副腎皮質ホルモン製剤, 水溶性ヒドロコルチゾン製剤の分析



水溶性ヒドロコルチゾン製剤 (有効成分)

Hydrocortisone Sodium Succinate



副腎皮質ホルモン製剤 (有効成分)

Hydrocortisone Sodium Phosphate

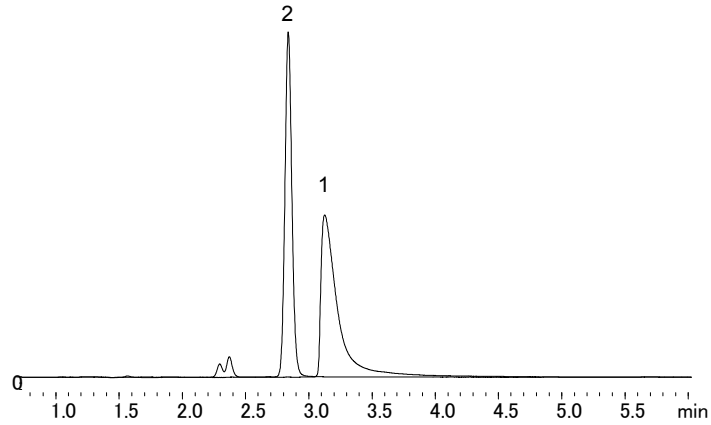
副腎皮質ホルモン製剤, 水溶性ヒドロコルチゾン製剤の分析

Column	: Mastro™ C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3μm) Typical C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3μm)
Instrument	: Nexera
Mobile Phase	: 0.1 % Formic Acid in Water : 0.1 % Formic Acid in MeCN=50:50
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M20A at (254 nm)
Injection Vol.	: 1μL

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

Typical C18カラム

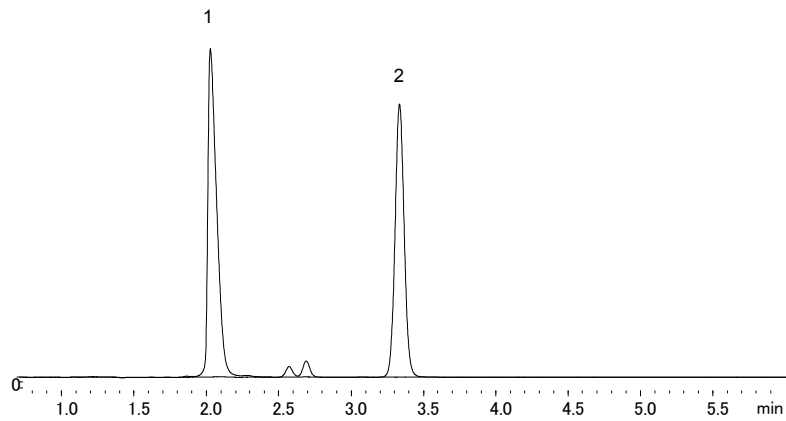
- Peak
- 1. Hydrocortisone Sodium Phosphate
 - 2. Hydrocortisone Sodium Succinate



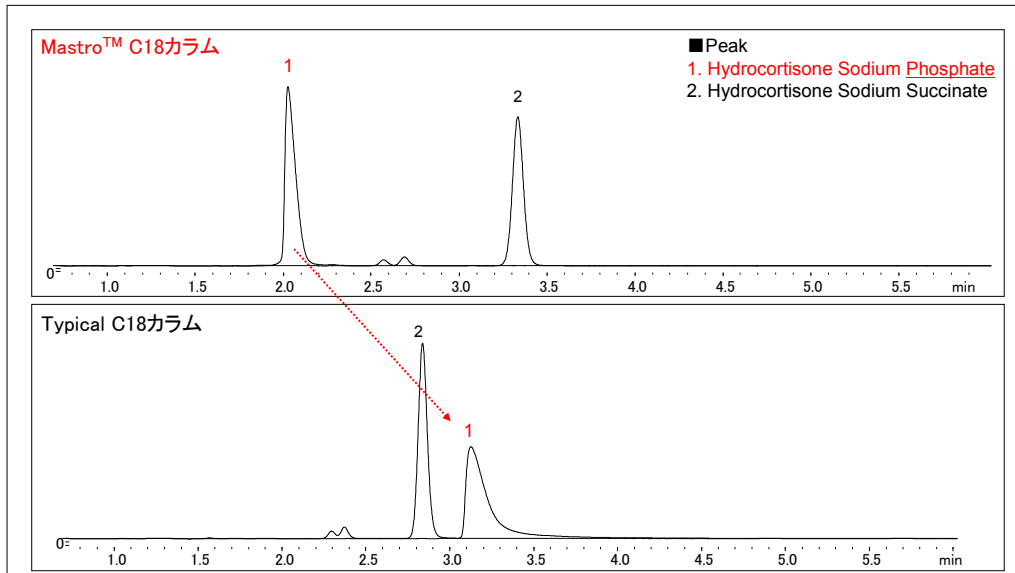
副腎皮質ホルモン製剤, 水溶性ヒドロコルチゾン製剤の分析

Mastro™ C18カラム

- Peak
- 1. Hydrocortisone Sodium Phosphate
 - 2. Hydrocortisone Sodium Succinate



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



副腎皮質ホルモン製剤の分析

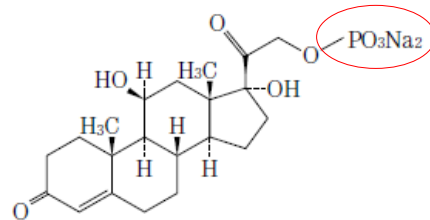
Column : Mastro™ C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3μm)
 Typical C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3μm)

Instrument : Prominece UFLCxR + LCMS - 2020

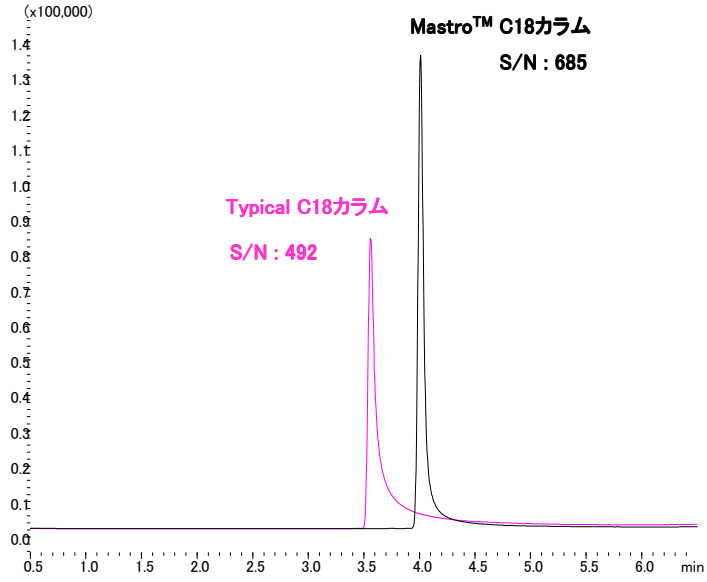
Mobile Phase : A: 0.1 % Formic Acid in Water
 B: 0.1 % Formic Acid in MeCN

0.01min	ポンプ	B.Conc 10%
5.00	ポンプ	B.Conc 80
5.01	ポンプ	B.Conc 10
6.50	ポンプ	B.Conc 10

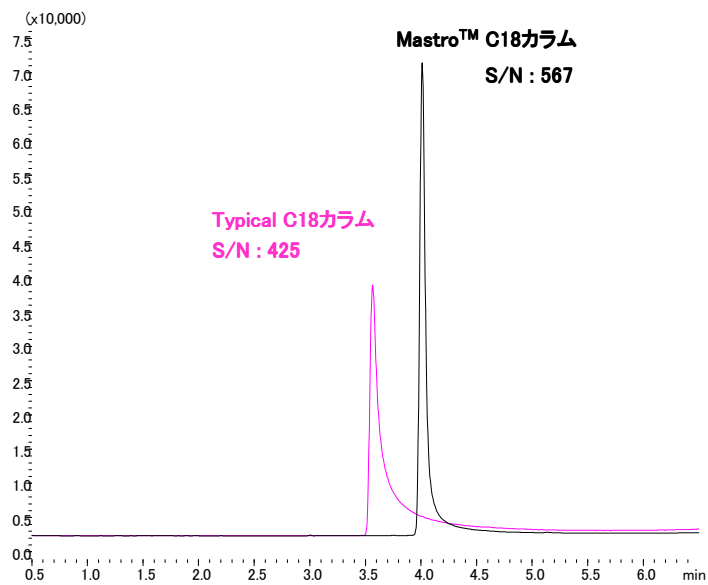
Flow Rate : 0.2 mL/min
 Column Temp. : 40 °C
 Detection : MS (SIM mode)
 Injection Vol. : 2μL



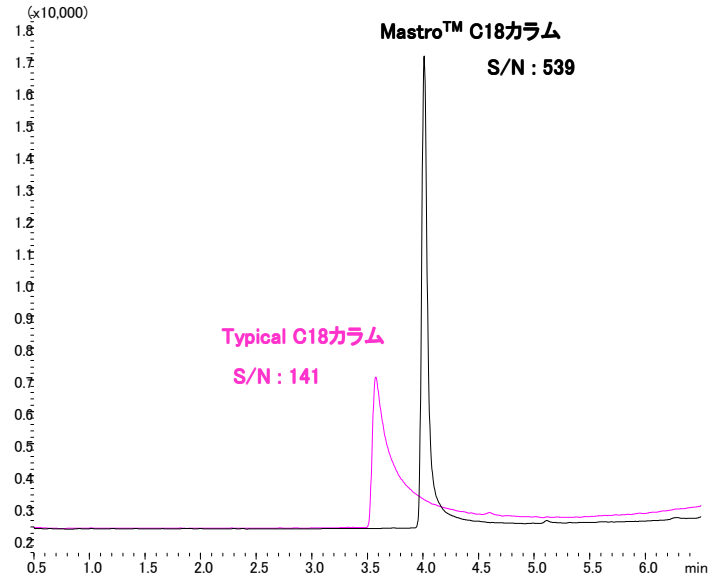
副腎皮質ホルモン製剤の分析 10ppm



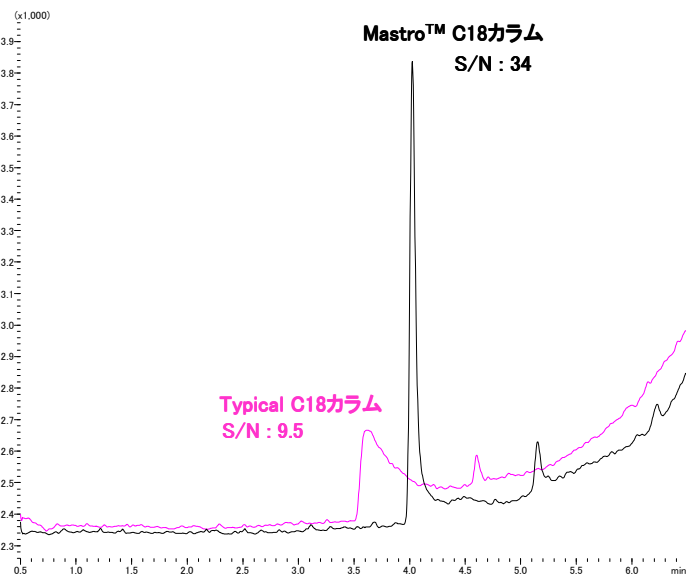
副腎皮質ホルモン製剤の分析 5ppm



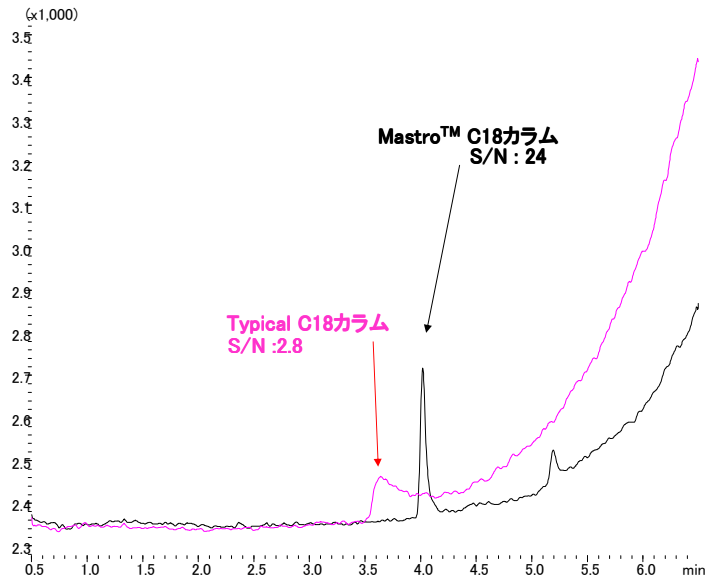
副腎皮質ホルモン製剤の分析 1ppm



副腎皮質ホルモン製剤の分析 0.1ppm



副腎皮質ホルモン製剤の分析 25ppb



まとめ

- リン酸基含有化合物の分析において新規高耐圧ステンレスフリーLCカラム“Mastro™”が有効である事が示唆された。
- ギ酸、ギ酸アンモニウム等の揮発性の塩を用いリン酸基含有化合物を分析したところ、一般的なステンレスポデーカラムに比べ良好なピーク形状となった事より、LC/MS(/MS)分析において有効である事が示唆された。

終わりに

本資料は静岡県立大学 薬学部 生体機能分子分析学分野 轟木堅一郎准教授との共同研究により得られたデータを使用しております。