

技術論文

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法で使用する器具からの汚染物質の分析

芳本 有史¹, 西本ゆかり², 石原千津子², 川崎 英也¹, 荒川 隆一^{®1}

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を用いて分析を行う際に、様々な汚染物質のイオンが検出される場合がある。このことは、LC/MS の高精度な定性・定量分析を困難にする。汚染物質の混入を防ぐには、汚染物質の同定とそのイオンの出所を知っておく必要がある。今回、著者らは LC/MS で使用するバイアルとセプタム、そして汜過用膜フィルターに着目した。LC/MS 及び MSⁿ 分析により、幾つかの汚染物質を同定し、その原因を特定した。

1 緒言

高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) は高感度な分析機器であるために、微量の汚染物質の混入によって、目的試料の定性及び定量分析が困難になる可能性がある^{1)~6)}。特に、LC 移動相に汚染物質が含まれていると試料の同定が困難になるだけでなく、MS の検出感度の低下を招くので、汚染物質が混入しないように細心の注意を払う必要がある^{7)~9)}。LC/MS にオートサンプラーを利用する際に、移動相が汚染される原因として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用バイアル、そのセプタム、そして移動相に含まれる不純物を取り除くために用いる汜過用膜フィルターなどが考えられる。

本研究では、LC 移動相への汚染源として HPLC 用バイアル、セプタム、汜過用膜フィルターに着目し、それらに含まれている不純物が移動相に溶出する可能性を検討した。これら LC/MS に使用される器具の材質は、酢酸セルロース、ポリテトラフルオロエチレン、ナイロン、オレフィン系ポリマー、フッ素系ポリマー、セルロースなどである。そこで、市販されている様々な種類の器具から汚染物質が移動相に混入する有無を調べ、それらの汚染成分の同定を行った。その結果、汚染物質の混入経路が明らかとなり、汚染の軽減と迅速な LC/MS 分析が可能になるだろう。

2 実験

2.1 試料及び試薬

メタノール (LC/MS グレード) は和光純薬製、酢酸ア

ンモニウム (特級グレード) はキシダ化学製を使用した。超純水は Milli-Q SP TOC 超純水製造装置 (Millipore 製) で製造したものをを使用した。使用した HPLC 用のバイアルとセプタムを Table 1, 2 に示す。バイアルはすべてガラス製のものをを用いた。シリンジフィルターは ϕ 0.45 μ m の汜過用膜フィルターを用いた 13 mm 径タイプを使用した。使用したシリンジフィルターを Table 3 に示す。表中の大文字 A~K は、市販されている製品の会社名を示す。

2.2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフィーはフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器付き 1100 シリーズ (Agilent Technologies 製) を使用し、質量分析装置は LCQ Deca XP MAX (Thermo Electron 製) を使用した。イオン化法は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) の正負両モードを用い、窒素ガスと補助ガスの流量はそれぞれ 35 arb と 5 arb、スプレー電圧が 5 kV、キャピラリー温度は 350°C、質量範囲 m/z 100~2000 で測定した。MS²、MS³ 測定にはデータディペンデントモードを使用した。

分析カラムとして YMC-Pack ODS-A (3.0 mm i.d. \times 100 mm, 5 μ m: ワイエムシイ製) を使用した。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (溶媒 A) とメタノール (溶媒 B) を用い、グラジエントは溶媒 B を 15 分で直線的に 75% から 95% に増やした。流量 0.4 mL/min で送液し、カラム温度は 30°C、注入量は 5 μ L とした。

2.3 試料調製

各 HPLC 用バイアルに HPLC 用メタノールを加えた溶液を HPLC 用バイアルの試料 (V 溶液) とした。V 溶液の実験に使用したバイアルとセプタムは Table 1 に示した。また、各セプタムをメタノールに 1 時間以上浸し、その溶液

¹ 関西大学化学生命工学部化学・物質工学科: 564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35

² 日本合成化学工業株式会社: 567-0052 大阪府茨木市室山 2-13-1

Table 1 Contaminants in the V solution of HPLC vials detected using LC/MS

Vials (manufacturer)	Septum material	Contaminants
crimp vial (A)	polytetrafluoroethylene (PTFE)/rubber	not detected (ND)
screw clear vial (A)	PTFE/silicon/PTFE	ND
screw brown vial (A)	rubber/PTFE	ND
screw clear vial (B)	rubber/tetrafluoroethylene-ethylene copolymer (TEF)	2,2-methylenebis(4-methyl-6- <i>t</i> -butylphenol)

Table 2 Contaminants in the S solution of septa detected using LC/MS

Manufacturer	Septum color	Septum material	Contaminants
A	red/white/red	PTFE/silicon/PTFE	silicon resins
B	Mars yellow/Mars yellow	rubber/TEF	2,2-methylenebis(4-methyl-6- <i>t</i> -butylphenol)
	red/white	PTFE/silicon	silicon resins
	blue/white	PTFE/silicon	silicon resins
C	white/beige	PTFE/silicon	silicon resins
D	blue/white	PTFE/silicon	silicon resins

Table 3 Contaminants in the F solution of syringe filters detected using LC/MS

Manufacturer	Material			Contaminants
	type	filter	housing	
A	aqueous	regenerated cellulose		unknown compounds (UC)
B	aqueous	polyolefin	polypropylene (PP)	EO-PO compound (ADEKA Pluronic L61)
	both	fluorine polymers	PP	not detected (ND)
	organic solutions	PTFE	PP	ND
F	both	polyvinylidene fluoride (PVDF)	PP	ND
	both	PP	PP	UC
	organic solutions	PTFE	PP	ND
	aqueous	nylon 66	PP	cyclonylon dimers and trimers
G	both	hydrophilic PTFE	PP	ND
	both	hydrophilic PTFE	PP	ND
	organic solutions	PTFE	PP	ND
H	aqueous	hydrophilic PVDF	High Density Polyethylene (HDPE)	ND
	aqueous	hydrophilic PTFE	HDPE	ND
	both	nylon	HDPE	cyclonylon dimers and trimers
	organic solutions	PTFE	HDPE	ND
I	both	cellulose	PP	ND
J	both	nylon	PP	cyclonylon dimers and trimers
K	both	nylon		cyclonylon dimers and trimers

をA社の crimp vial 内に入れたものをセプタムの試料 (S 溶液) とした。更にシリンジフィルターにメタノール 1 mL を通液した溶液をフィルターの試料 (F 溶液) とした。S 溶液と F 溶液には、V 溶液で汚染物質のなかった A 社の crimp vial と polytetrafluoroethylene (PTFE)/rubber 製のセプタムを使用した。

3 結果及び考察

3.1 バイアル

各種バイアルの V 溶液を用いた汚染物の分析結果を Table 1 に示す。LC/MS の測定結果より、A 社のバイアルから汚染物は検出されなかった。しかし、B 社のスクリーバイアルからは保持時間 (RT) = 15.8 min の汚染物が検出された (Fig. 1)。この汚染物は、その負イオンマススペ

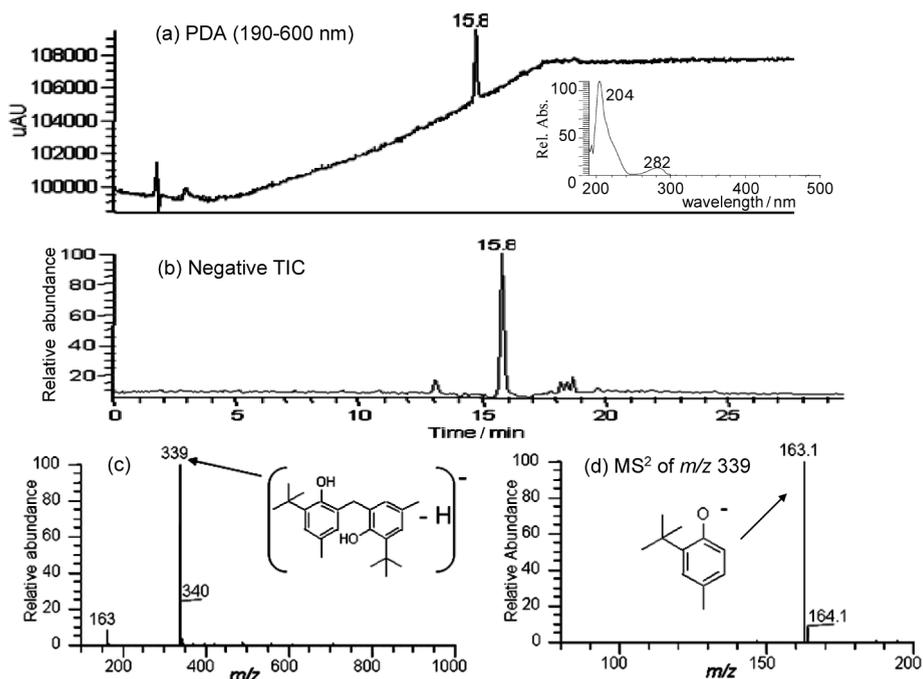


Fig. 1 LC/MS results of the V solution for a screw clear vial of company B
 (a) chromatogram with PDA (190 ~ 600 nm) and UV spectrum at RT = 15.8 min (insert), (b) negative TIC, (c) negative ion mass spectrum at RT = 15.8 min, and (d) MS² spectrum of *m/z* 339

クトルと MS² スペクトル (Fig. 1c-d) からフェノール系酸化防止剤である 2,2-メチレンビス(4-メチル-6-*t*-ブチルフェノール) と推定した。更にこの標品のマススペクトルと一致したので、この汚染物質は 2,2-メチレンビス(4-メチル-6-*t*-ブチルフェノール) であることを確認した。また、測定回数が増えるとともにそのイオン強度が大きくなったので、この汚染物はバイアルの容器自身からではなく、セプタムからの汚染物であると考えられる。セプタムに含まれる成分がサンプリング時にオートサンプラーのニードルに附着し、試料溶液に溶け込む可能性があるからである。

3・2 セプタム

そこで、市販されている各種セプタムの S 溶液中の汚染物の LC/MS 測定の結果を Table 2 に示す。セプタムの材質、例えば PTFE/rubber で示されるのは、ゴムの片面を PTFE 加工しているもので、PTFE/silicon/PTFE は両面を PTFE 加工しているものを表す。各種セプタムの中で B 社のセプタムを用いたときのみ、2,2-メチレンビス(4-メチル-6-*t*-ブチルフェノール) が検出された。

A, C 及び D 社のセプタムを用いた結果の一例として、D 社のセプタムを用いたときの結果を Fig. 2 に示す。PDA 検出器では汚染物を捕捉できないが、正負両イオントータルイオンクロマトグラム (TIC) ではシリコン樹脂に由来するオリゴマー成分が検出されている。正イオン TIC スペクトルの保持時間 RT = 19, 21, 23 付近のそれぞれマススペ

クトル (Fig. 2d-f) は、*m/z* 74 間隔のイオンを示している。したがって、これらのイオンは HO-(Si(CH₃)₂O)_n-H (*n* = 9, 10, 11) の NH₄⁺ 付加イオンに相当するので、シリコン樹脂のオリゴマー成分が溶出したと考えられる。シリコンゴム製のセプタムすべてからこのオリゴマー成分が検出された (Table 2)。これらの汚染成分は通常のオートサンプラーの使用条件では、セプタムからオートサンプラーのニードルを通して検出されることはない。したがって、S 溶液中の汚染成分が検出されたのは、セプタムの側面部分から溶出した成分と考えられる。それゆえに、バイアル内にセプタムが落ち込んだ場合は、セプタムからの溶出汚染が発生することに注意する必要がある。

3・3 シリンジフィルター

Fig. 3 は、B 社の水系 (Table 3 に aqueous type と記す) フィルターを用いたときの F 溶液の LC/MS のクロマト及びマススペクトルを示す。S 溶液のときと同様に PDA 検出器では汚染物を捕捉できなかった。正負両イオン TIC では RT = 16 ~ 27 min の範囲でブロードなピークが観測された (Fig. 3b, c)。その範囲の正イオンマススペクトル (Fig. 3d) では、*m/z* 700 ~ 2000 の質量範囲で 58 Da 間隔のイオン群が検出された。また、RT = 17.6 ~ 18.0 min の正イオンスペクトル (Fig. 3e) では、44 Da 間隔のイオン群がはっきりと観測されている。したがって、この汚染成分はエチレンオキシド-プロピレンオキシド (EO-PO) 系界面活

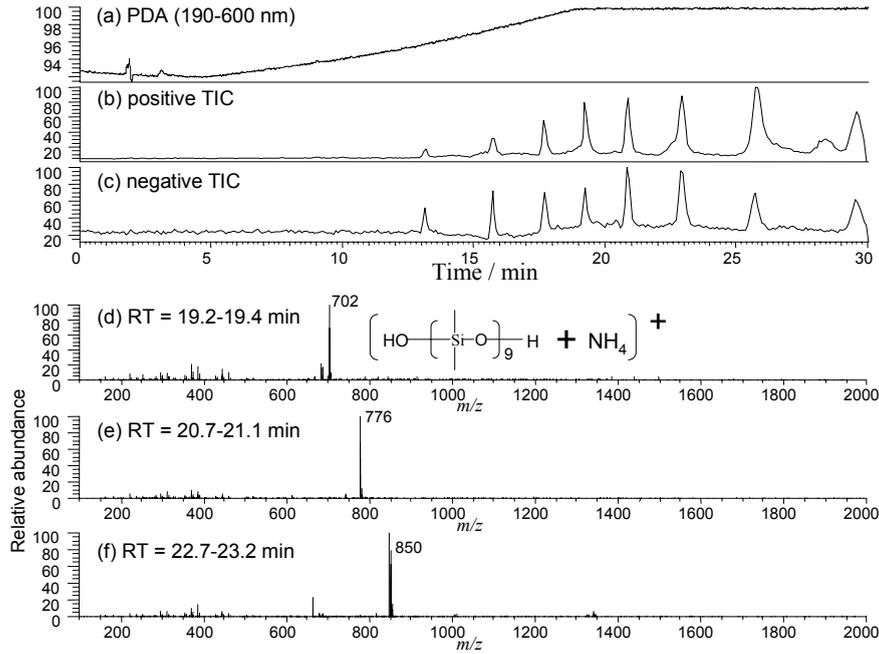


Fig. 2 LC/MS of the S solution for a septum of company D
(a) PDA (190 ~ 600 nm), (b) positive TIC, (c) negative TIC, and positive ion mass spectra of (d) RT = 19.2 ~ 19.4 min, (e) 20.7 ~ 21.1, and (f) 22.7 ~ 23.2

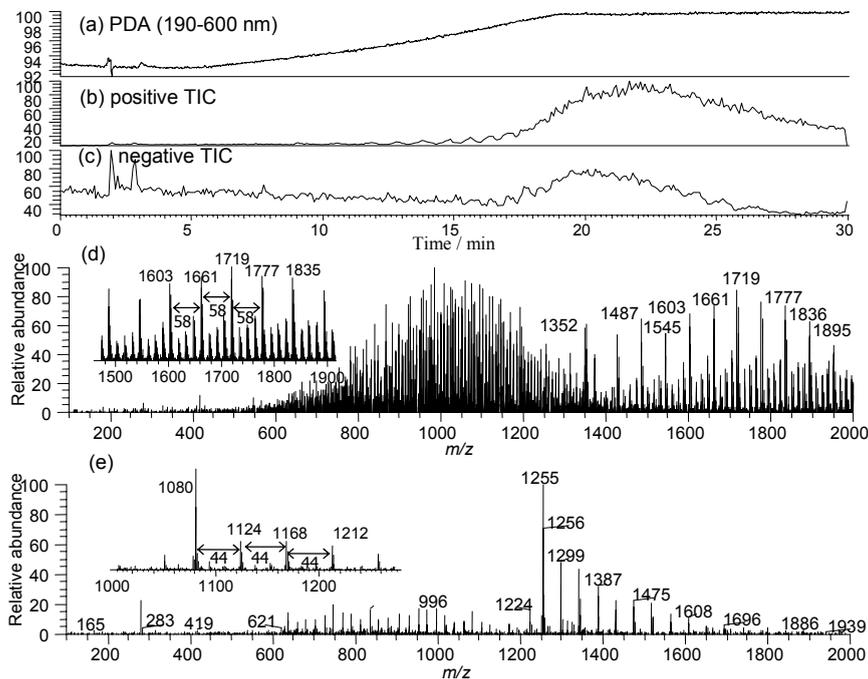


Fig. 3 LC/MS of the F solution for an aqueous filter of company B
(a) PDA (190 ~ 600 nm), (b) positive TIC, (c) negative TIC, and positive ion mass spectra of (d) RT = 16.1 ~ 27.0 min, and (e) 17.6 ~ 18.0

性剤であると考えられる。検出されたEO-PO界面活性剤のクロマトパターンとマススペクトルは、界面活性剤ADEKA Pluronic L61のもと同じであったので、汚染成分はそれの相当品と推定した。

また、水系と有機系の両方の溶媒で使用できる (both type) ナイロンフィルターとF社の水系ナイロンフィルターのF溶液からは同じナイロン成分の汚染物が検出された。Fig. 4aは、F社のナイロンフィルターを用いたF溶液

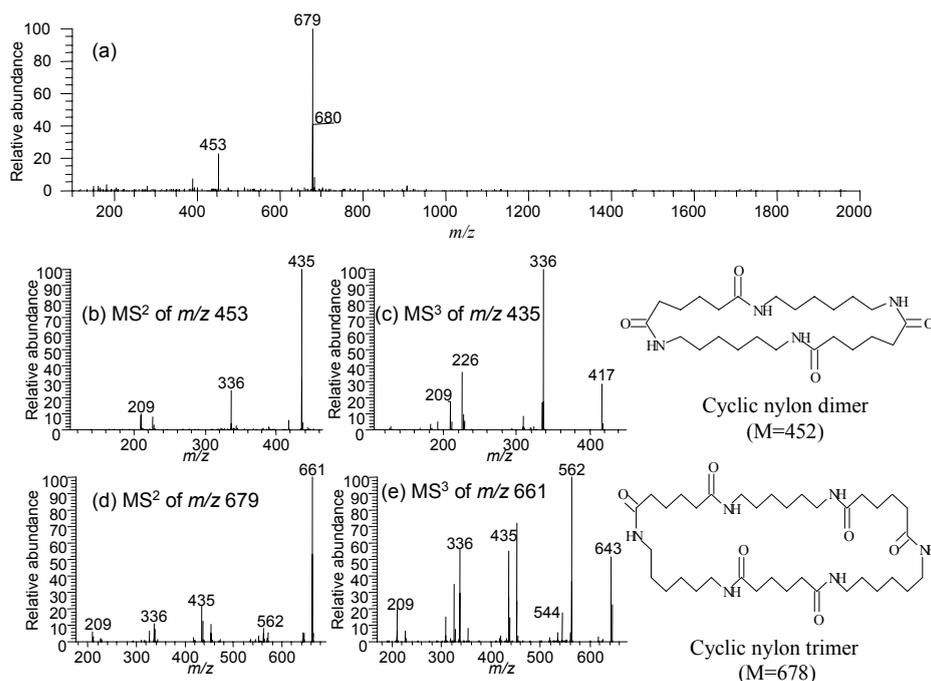


Fig. 4 ESI-MS of the F solution for a nylon filter of company F
 (a) the positive ion mass spectrum, (b) MS² spectrum of m/z 453 (c) MS³ spectrum of m/z 435 (d) MS² spectrum of m/z 679 (e) MS³ spectrum of m/z 661

のESI-MSのマスペクトルである。 m/z 453と679のイオンは、シクロナイロンダイマー ($M = 452$) と三量体 ($M = 678$) のプロトン付加に相当する。Fig. 4b, cはそれぞれ m/z 453イオンのMS² (453 →) とMS³ (453 → 435 →) スペクトルである。また、Fig. 4d, eは同様に m/z 679イオンのMS² (679 →) とMS³ (679 → 661 →) スペクトルである。 m/z 435はシクロナイロンダイマーからのH₂O脱離イオン、 m/z 417は更にH₂Oが脱離したイオン、 m/z 336はC₆H₁₃N(99)が脱離したイオン、 m/z 226は m/z 336からC₆H₆O₂(110)が脱離したイオン、 m/z 209は更に m/z 226からNH₃が脱離したイオンである。シクロナイロン三量体のMS²とMS³スペクトルからも同様の結果が得られた。したがって、ナイロン系シリンジフィルターからの汚染物はシクロナイロンダイマーと三量体である。これらの汚染物は、TranとDoucette¹⁰⁾が報告したナイロンディスクフィルターからの汚染物と同じ結果である。したがって、LC/MSの測定において、ナイロンフィルターを使用する場合には注意が必要である。シリンジフィルターのF溶液の結果をTable 3に示す。A社のフィルターの材質で再生セルロース (regenerated cellulose) のシリンジフィルターから、正負両イオンマスペクトルに複数のイオンが、またF社のフィルターの材質がPPのシリンジフィルターから、負イオンマスペクトルに m/z 321のイオンが検出されたが、これらのイオンについては同定できなかった。

4 結 言

市販されている汎用のHPLC用バイアル、セプタム、シリンジフィルターからメタノールで溶出する汚染物質の成分を検出・同定した。その結果、バイアルから汚染成分は検出されなかった。セプタムの材質がゴム/tetrafluoroethylene-ethylene copolymer (TEF) の場合のみ、汚染物2,2-メチレンビス(4-メチル-6-*t*-ブチルフェノール)が検出された。シリンジフィルターの汚染物は、polyolefin製からはEO-PO系界面活性剤が、ナイロン製からはシクロナイロンダイマーと三量体フィルターが同定できた。しかし、その他の汚染物は同定できなかった。今回、メタノールで溶出する汚染物に焦点を当てたが、他の溶媒では異なる汚染物が検出される可能性がある。また、すべての試料溶液からオレイン酸アミドが検出されており、これは実験室内での環境中の汚染成分と推定した。オレイン酸アミドはプラスチック材料の滑剤として広く使用されているため、実験室内のプラスチック材料製品由来の汚染物質と推定されるが、確認にはいたらなかった。

LC/MSなどの高感度な測定装置を使用するときは、汚染成分が溶出しにくい器具を用いる、もしくは器具からの汚染成分を前もって把握しておく必要がある。

本研究は、基盤研究(B)(19350045)の援助を受けて一部実施しました。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) M. L. Manier, D. S. Cornett, D. L. Hachey, R. M. Caprioli : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**, 666 (2008).
- 2) B. Aebi, J. D. Henion : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 947 (1996).
- 3) Y. Q. Xia, S. Patel, R. Bakhtiar, R. B. Franklin, G. A. Doss : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 417 (2005).
- 4) T. Shemesh, C. Karschimkus, K. G. Rowley : *J. Chromatogr. B*, **826**, 277 (2005).
- 5) B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng : *Anal. Chem.*, **70**, 882 (1998).
- 6) R. W. Purves, W. Gabrielski, L. Li : *Rev. Sci. Instrum.*, **68**, 3252 (1997).
- 7) S. Williams : *J. Chromatogr. A*, **1052**, 1 (2004).
- 8) C. Regnault, I. Kano, D. Darbouret, S. Mabic : *J. Chromatogr. A*, **1030**, 289 (2004).
- 9) D. E. Hughes, A. M. Bramer : *J. Chromatogr. A*, **408**, 296 (1987).
- 10) J. C. Tran, A. A. Doucette : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**, 652 (2006).

Analysis of Contaminants Eluted from Vials, Septa and Syringe Filters in High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Arifumi YOSHIMOTO¹, Yukari NISHIMOTO², Chizuko ISHIHARA²,
Hideya KAWASAKI¹ and Ryuichi ARAKAWA¹

¹ Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, 3-3-35, Yamatecho, Suita-shi, Osaka 564-8680

² The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., LTD, 2-13-1, Muroyama, Ibaraki-shi, Osaka 567-0052

(Received 31 October 2008, Accepted 19 December 2008)

Various contaminants might be frequently detected in high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) experiments. This makes highly accurate qualitative and quantitative analyses of LC/MS difficult. It is necessary to know the identification and origin of the contaminants to prevent them from being mixed. In the present work, we paid attention to any contaminants eluted from vials, septa and syringe filters used for an automatic sampling device and filtration preparation in LC/MS experiments. Some contaminants were identified by LC/MS and MS/MS analysis. In addition, we could specify the contaminant source.

Keywords : LC/MS ; contaminant ; ESI (electrospray ionization); MSⁿ.