COMMENTARY

液体クロマトグラフィー質量分析における
キャリーオーバー問題と解決法

Carry-Over Troubleshooting in Liquid Chromatography Mass Spectrometry

山垣 亮*・山崎堯嗣・木村優佳

Tohru YAMAGAKI*, Takashi YAMAZAKI, and Yuka KIMURA

公益財団法人 サントリー生命科学財団 *Suntory Foundation for Life Sciences*

We showed how to troubleshoot carry-over in liquid chromatography mass spectrometry. We used a sample of neuropeptide Y which is sticky and has troubles in LC-MS.

(Received August 28, 2020; Accepted September 1, 2020)

1. はじめに

液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) で試料を分析する際、試料によってはキャリーオーバー (Carry-over) が発生することがあります。簡単に言えば試料分析に続いてブランク分析 (試料を含まない水や溶媒のみの分析) を行ったときに、前回の試料が LC-MS 系中に残っており、ブランク測定したスペクトルや溶出プロファイル上に前の分析試料成分が観測されてしまう現象で、メモリー効果 (memory effect) などとも呼ばれています。定量分析であれば、2 回目の分析には 1 回目の分析のキャリーオーバーが上乗せされるので、正確な分析ができません。定性分析でも含まれていないはずの試料が観測されてしまうことは大きな問題になります。試料の物性や濃度、LC-MS 装置の設定や組み合わせによってキャリーオーバーの程度は変化しますし、全くない状態はあり得ないので、LC-MS で試料を分析する研究者であれば必ずブランク測定を行い、キャリーオーバーが検出下限以下であることを確認することが多いと思います。

ブランク測定でキャリーオーバーが発生したらどうするか? どの程度の値であれば、許容できるか? 無視できるか? あるいは、どうすればキャリーオーバーを削減できるか? はそれぞれの研究内容や目的にも依存します。まずはキャリーオーバーがどの程度起こるのか? を把握することは肝要です。キャリーオーバーは (1) のように表されます。

キャリーオーバー:

$$\frac{[\text{ブランク分析で観測される (前回の試料の) ピークの面積}]}{[\text{試料分析で観測されるピークの面積}]} (\%)$$

(1)

キャリーオーバーをどのように軽減させるか? を考える上で、まずは LC-MS 装置のどの部分にキャリーオーバーが発生しているのか? を明らかにしなければなりません。系統的に検証実験を行い、それぞれの部位ごとに対策を行ってキャリーオーバーが減少しているか? を順々に検証する必要があります。LC-MS を利用している研究者であれば、多かれ少なかれ経験しているキャリーオーバーをどのように軽減するか? を実際に経験した実験例から解説します。なお本稿は *Mass Spectrometry* 誌 Vol. 8, (2) S0083 (2019) に Technical Report として報告した内容をベースにわかりやすく解説しました¹⁾。

2. 試料 神経ペプチド Y について

本稿で分析した試料には、脳や神経系組織に含まれている神経ペプチドホルモン Neuropeptide Y (NPY) を用いました。NPY は 1978 年立元一彦らに脳内から発見された神経ペプチドで 36 残基のアミノ酸からなる大きなペプチドホルモンです²⁾。名前の通りチロシン (Y) 残基が多く含まれており、C-末端がアミド化されているのが特徴です (図 1)。神経ペプチドの多くは C-末端アミド構造を持っていることが知られていたため、立元らはこのアミド構造に注目し、脳内のペプチドを分画・精製を進め、この NPY を発見しました。発見された当時は C-末端アミド構造を持つ新規ペプチドとして報告されましたが、ほどなく摂食や食欲亢進作用や生殖制御、血圧の恒常性とも深く関わる重要な神経ペプチドであることが明らかになりました^{3)~7)}。NPY (組成式: $C_{189}H_{285}N_{55}O_{57}S$, 分子量 4271.7) のマスマス

図 1. 神経ペプチド Y の構造。

*連絡先: yamagaki@sunbor.or.jp

図2. 神経ペプチドYの質量分析スペクトル。
6価の水素付加分子 $[M+6H]^{6+}$ のスペクトル。(文献1より内容を変更して転載.)

トルを図2に示します。NMR解析などから両親媒性構造を持ち、二量体形成⁸⁾や生体膜への相互作用なども行うペプチドであることがわかっています^{9)~11)}。

3. LC-MS分析

3.1 LC

LC部分にはNexera UPLC/HPLCシステム(島津製作所, 京都)を用いました。逆相クロマトグラフィー分離を行い、オクタデシルシリル基(ODS)を修飾した充填剤を用いたカラムAeris PEPTIDE XB-C18 (2.1×250 mm, 2.6 μm)(Phenomenex Inc., CA, USA)とガードカラムをLC-MS分析に用いました。ODSカラム充填剤比較としてCOSMOSIL 5C18-AR-II (2.0×150 mm, 5 μm)(ナカライテスク, 京都)も一部用いました(6.2)。水系溶媒Aには0.1%ギ酸水溶液を、有機溶媒Bには0.1%ギ酸を含むアセトニトリル溶液を用いました。図3で使用したグラジエント溶出プログラムは以下の通りです。初期組成を10%B溶媒とし、0~27分で10→50%B溶媒、27~28分で50→70%B溶媒、28~30分で70%B溶媒、30~31分で70→10%B溶媒、31~40分で10%B溶媒としました。6.3に出てくる図8で使用したグラジエント溶出プログラムは以下の通り。初期組成を10%B溶媒、0~7分で10→40%B溶媒、7~8分で40→80%B溶媒、8~13分で80%B溶媒、13~14分で80→10%B溶媒、14~22分で10%B溶媒としました。グラジエント溶出プログラム変更によるキャリーオーバーへの影響はありませんでした。オートサンプラー内で使用したサンプル・ニードル洗浄には50%アセトニトリル水溶液を用いました。

3.2 質量分析計

質量分析計にはフーリエ変換オービトラップ-リニアイオントラップ ハイブリッド質量分析計(FT-Orbitrap linear ion-trap hybrid MS) Orbitrap Elite MS (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA)を用いました。実験条件は以下の通

りとししました。ESI, 正イオン測定を行い, 検出 m/z は350~2,000, MS分解能は120,000, キャピラリー温度は250°C, ソースヒーター500°C, シースガス, AUXガスはそれぞれ装置固有の値で50, 15を設定しました。

NPYのマスクロマトグラムには, モーストアバンダントイオン(most abundant ion)を指標に表示させました。すなわち6価 $[M+6H]^{6+}$ で観測されている強度の最も高い同位体イオン m/z 712.8561(図2)のイオン強度を表示させるため m/z 712.84~712.87の範囲のイオンを表示させました。

4. キャリーオーバーの問題

図3は1 μM-NPY標品を1 μL用いて分析したマスクロマトグラムです。NPYは多価イオンとして観測され, NPYの6価 $[M+6H]^{6+}$ は図2のように観測されています。NPYとして観測されているイオンピークを指標としてマスクロマトグラムを表示させると, NPYは16分に溶出されました(図3(A)。次に水をブランクとして測定を行うと, 図3(B, C拡大図)のようにNPYのキャリーオーバーが観測され, 1回目の分析で得られたNPYのシグナル面積に比較して約4%のシグナル強度を示していることがわかりました(表1)。NPYの濃度を10 μM-NPY, 5 μM-NPY, 1 μM-NPYと変化させると, 濃度の高い10 μM-NPYではキャリーオーバーが0.47%であり, 少し濃度を下げた5 μM-NPYでは0.36%とキャリーオーバーが減少しているのに対し, 1 μM-NPYでは4.05%と大きく上昇していました(表1)。

キャリーオーバー現象には大きく2つの要因があります。1つは「希釈要因」, もう一つは「吸着要因」です。「希釈」の方は濃度に左右される要因で, 濃度が高くなればなるほど試料が残りにやすいというのは感覚的にもわかりやすいかと思います。NPYの場合, 5 μM-NPYよりも10 μM-NPYの時の方がキャリーオーバーは高く観測されています。試料

Mass Chromatogram of NPY.

図3. 神経ペプチドYのマスクロマトグラム。

(A) 1 μ L-1 μ M-NPYのLC-MSマスクロマトグラム, (B) 水ブランク測定結果のマスクロマトグラム, (C) スペクトルBの拡大図。(文献1より内容を変更して転載.)

分析の次に水を分析して「希釈」(or洗浄)され、試料NPYが減ったとしても、濃度の高い10 μ M-NPYでは、系中に残存するNPYの量は多く残ります。また、希釈要因では、ブランク測定を繰り返し行くと、キャリーオーバーは速やかに減少する傾向を示します。表1の10 μ M-NPY, 5 μ M-NPYのキャリーオーバーは1回目よりも2回目の方が明らかに減少しています。一方、濃度がさらに低い1 μ M-NPYの分

析では「希釈」要因でのキャリーオーバーはさらに減少するはずですが、逆にキャリーオーバーが4.0%と高くなっています。また、2回目のキャリーオーバーも3.8%とあまり減少していません。1 μ M-NPYの分析では「吸着」要因が大きく影響していると思われます。図4にキャリーオーバーのイメージ図を載せました。「希釈」的の要因の方は濃度が低くなればなるほどキャリーオーバーは飛躍的に減少

表1. NPYのLC-MS分析中におけるキャリーオーバー

試料	面積	(%)
10 μ M NPY*	105,213,348	
ブランク_1	495,444	0.47
ブランク_2	247,591	0.24
5 μ M NPY*	64,748,513	
ブランク_1	232,271	0.36
ブランク_2	114,521	0.18
1 μ M NPY*	2,691,442	
ブランク_1	108,924	4.05
ブランク_2	103,325	3.84

*The injection volume is 1 μ L.

(文献1より内容を変更して転載.)

図4. キャリーオーバーの希釈要因, 吸着要因と濃度の関係イメージ図.

縦軸は正確な値ではありません。バー全体の高さがNPY分析時の強度、薄青色バーと濃紺色部分がキャリーオーバー、薄青色バーが希釈要因のキャリーオーバー、濃紺色バーが吸着要因のキャリーオーバー

します。一方、「吸着」的要因は濃度に拠らずある一定程度常に吸着します。もしくは溶媒への拡散が非常に遅い。極微量の場合、「希釈」的要因は無視できますが「吸着」が起こると一定量吸着が進むので、キャリーオーバーは非常に大きく観測されるようになります。「吸着」は疎水性など試料の物性に大きく影響されます。NPYはキャリーオーバーの「希釈」「吸着」という二つの要因が明瞭に観測される典型的な化合物でした。

5. キャリーオーバー発生箇所の特定

キャリーオーバーへの対策を行う上で、まず発生場所を特定する必要があります。もちろん分析の上では各部分を洗浄等十分に行い、コンタミネーションを抑えた状態で分析する必要があります。キャリーオーバーの発生箇所は試料を通った場所すべて可能性があります。その中でもキャリーオーバーが起こりやすいところはいくつかあります。表2にはLC-MS装置の中でキャリーオーバーが起こりやすい箇所をまとめました。

表2. LC-MS装置中のキャリーオーバーが発生しやすい箇所リスト

MS部分

1. イオン源内

LCからの試料がスプレーされるので、汚染される可能性がある。事前にきれいに拭きとっておく
コーン部分、トランスファーチューブも事前に洗浄する

LC部分

1. オートサンプラー

1-1) サンプル・ニードル

サンプルが直接触れる。ニードルの内側、外側の洗浄プログラムあり

1-2) インジェクション ループ

試料が直接触れる。洗浄プログラムあり。

1-3) 配管, ニードルシール, 高圧バルブシール

ニードルシール等には試料が直接触れる可能性あり。
高圧バルブシール部分では試料が付着する可能性あり

2. カラム (column frits)

ガードカラムの有無を検討
カラム・フリットには試料が吸着、固化することがある
全多孔性充填剤と表面多孔性充填剤などの選択

3. 配管全体, 高圧バルブ

全体の流路にはステンレスなど金属配管が一部含まれており、吸着する可能性がある
流路をPEEK樹脂などの非金属素材にすることもある
(バイオフィナート配管)

(文献1より内容を変更して転載.)

LCのカラムには試料が保持されて分離が起こるので潜在的に吸着が起こる可能性があります。オートサンプラーは試料溶液がそのままの濃度で直接触れる箇所、可能性も高くなります。その中でもサンプル・ニードル部分やサンプル・ループなどは可能性があります。質量分析計の方ではESIのイオン源はLCからの溶媒がスプレーされるので、汚染箇所になりえます。サンプル・コーン部分やキャピラリー・チューブ、トランスファー・チューブも試料が残りやすく汚染しやすい部分です。

6. キャリーオーバー発生箇所特定戦略

キャリーオーバー発生箇所の特定は、可能性のある部分を一つ一つ除いてキャリーオーバーがどれくらい残るのか?を測る検証実験を順番に行います。当たり前ですが、LC-MSはLC部分とMS部分とから構成されています(図5)。まずはMS部分でキャリーオーバーが発生しているのか?を特定します。キャリーオーバー発生箇所の戦略概要を図5にまとめました。MS部分にキャリーオーバーが発生するのであれば、イオン源における試料の汚染ですので、表2に示した部分を十分に洗浄、交換を行う必要があります。MS部分のチェック方法ですが、試料の分析を行った後、LCを外し、LCの溶出溶媒、ここでは50%アセトニトリル/0.1%ギ酸溶液のみをシリンジとシリンジポンプで流し測定を行います(インフュージョン分析)。NPYの場合はMS部分ではキャリーオーバーが観測されませんでしたので、LC部分で発生することがわかりました。

LC部分でのキャリーオーバーは、オートサンプラー、

表3. 検証実験におけるLC-MS装置内NPYのキャリーオーバー

試料	検証実験1		検証実験2		検証実験3		検証実験3.2	
	面積	(%)	面積	(%)	面積	(%)	面積	(%)
NPY*	10,377,850		9,558,834		25,473,844		26,815,969	
ブランク_1	249,890	2.41	291,689	3.05	539,610	2.12	54,851	0.20
ブランク_2	112,685	1.09	126,647	1.32	238,756	0.94	13,010	0.05
ブランク_3	70,871	0.68	74,606	0.78	150,251	0.59	4,598	0.02
ブランク_4	47,219	0.45	49,724	0.52	96,845	0.38	3,135	0.01

(文献1より内容を変更して転載.)

図5. キャリーオーバーの発生場所の特定戦略。(文献1より内容を変更して転載.)

カラム、配管のいずれかと思われます(表2)。LC-MS装置の特定の部分を除いて検証実験を行います。キャリーオーバーが発生しなかった場合、除いた部分でキャリーオーバーが発生していることになります(図5)。検証実験では、図3で示したキャリーオーバーと同じ測定、すなわち1 μ M-NPYを1 μ L分析してその後、水によるブランク測定を行い、キャリーオーバーを見積もりました。

6.1 検証実験1: カラムを除く

カラム(ガードカラム+分析カラム)を外し、分析を行ったところ、表1の4.0%のキャリーオーバーは2.4%にまで減少しました(表3)。主要なキャリーオーバー発生箇所の一つはカラム部分であることがわかりました。また、ガードカラムのみを外して(表4、ガードカラム無)キャリーオーバーを見積もったところ、4.35→2.15%にキャリーオーバーが減少していました。すなわちカラム分のキャリーオーバーはほぼガードカラム部分で発生していたことがわかりました。

ガードカラムには分析カラムよりも少ない充填剤しか入っておらず、充填剤自体に吸着しているのであれば、分析カラムの方にキャリーオーバーが発生するはずですが、カラムの構造を考えてみましょう(図6)。直径数マイクロメートルの極微量粒子である充填剤を詰めるために、流路の前後には充填剤よりさらに目の細かいフリットと呼ばれ

表4. ガードカラム有無検証実験におけるNPYのキャリーオーバー

試料	ガードカラム 有		ガードカラム 無	
	面積	(%)	面積	(%)
1 μ M NPY	6,113,020		10,019,987	
ブランク_1	265,968	4.35	215,547	2.15
ブランク_2	89,783	1.47	88,002	0.90
ブランク_3	114,167	1.87	52,749	0.54
ブランク_4	78,973	1.29	49,113	0.50

*The needle seal and valve seals have been switched for new ones in this LC-MS system.

分析カラムはいずれも装着している状態(文献1より内容を変更して転載.)

図6. カラムの構造。

るフィルターがあります。試料が配管からカラムに入る直前には非常に目の細かいフリットを通過する必要があり、溶解した試料が微小空間における流体変化を最も起こしやすい場所とも考えられます。カラムでのキャリーオーバーはフリット部分で発生しやすく、ガードカラムは分析カラムの前段に通過すること、また短いガードカラムの中に2か所フリットが含まれていることから、キャリーオーバーが発生しやすいと考えられます。

6.2 分析カラムの充填剤はキャリーオーバーに影響するか?

分析カラムの充填剤はキャリーオーバーに影響はないのでしょうか? ODSカラムであるAeris PEPTIDEに対して、一般的なODSカラムCOSMOSIL 5C18-AR-IIを用いて比較分析を行いました。COSMOSIL 5C18-AR-IIではNPYへのキャリーオーバーは1回目のブランク測定20.5%、2回目11.1%、3回目8.6%、4回目6.4%となりキャリーオーバーは非常に高く観測されました。COSMOSIL 5C18-AR-IIは有機小分子、天然物、短いペプチドなど幅広い化合物の分離を目的として作られており、樹脂担体表面へのC18鎖の固定化度が比較的高いと思われます。一方、Aeris PEPTIDE XB-C18カラムはペプチド分離を目的として製作されており、

樹脂担体表面のC18鎖の密度は低く抑えられています。そのため大きなペプチドであるNPYのカラム充填剤への吸着、キャリアオーバーも低いと考えられます。またCOSMOSIL 5C18-AR-IIは全多孔性型充填剤カラムであり、充填剤の中心近くまで試料が入り込むため固定相への分配、吸着頻度も高く、キャリアオーバーも発生しやすい。一方、Aeris PEPTIDEの方はコアシェル型（表面多孔質型）と言われる充填剤の構造をしており（図7）、表面のみで固定相への分配、吸着が起こるため、一般に拡散も抑えられると言われているのですが、キャリアオーバーについても効果的に抑制されていると思われます。

6.3 検証実験2：オートサンプラー内のサンプル-ニードルへの吸着

オートサンプラー内のサンプル-ニードルへの吸着によるキャリアオーバー発生の可能性を検証するために、ブランク測定ではサンプル-ニードルを使用せず分析する方法を検討しました。すなわち、図8に示すような有機溶媒濃度勾配を繰り返し組み込んだグラジエント溶出プログラムを組み、NPYのLC-MS分析を行いました。LC-MSによる天然物の分析でキャリアオーバーを見積もる方法としても

図7. 試料が異なるカラム充填剤中を通過する模式図。
全多孔性型充填剤とコアシェル型充填剤

使われています¹²⁾。図8の方法では初めのNPY分析でのみサンプル-ニードルを利用してNPYをインジェクションしますが、ブランク分析自体は行わず、有機溶媒濃度勾配プログラムを何度か繰り返してブランク測定の代用（疑似ブランク測定）を行いました。ブランクである水自体はインジェクションされていませんが、それ以外は他のブランク測定と同じ実験を行うことになります。この実験での1回目疑似ブランク測定でのキャリアオーバーは3.0%となり、それほど大きく減少されていません（表3）。そのためNPYのサンプル-ニードルへの吸着はそれほど小さくなく、ニードル洗浄が有効であったと思われます。

検証実験2ではNPYに対して、キャリアオーバー低減のための実践的で有効な方策を見いだしました。表3に示すように、図8の繰り返し行なった疑似ブランク測定が他のブランク測定と同じようにキャリアオーバーを効果的に低減しており、3, 4回の繰り返しグラジエントプログラム実施後では、キャリアオーバーは1%以下になっています（表3）。

6.4 検証実験3：配管、シール材、高圧バルブシール等

検証実験1, 2を組み合わせることで、カラムおよびオートサンプラー（サンプル-ニードル）の影響を除き、残りのLC部分でキャリアオーバーを見積もりました（実証実験3）。残念ながらキャリアオーバーは2.1%程度残っており、LC部分のカラム、オートサンプラー以外の部分にもキャリアオーバーが発生していることがわかりました（表3実証実験3）。すなわち、配管、シール材、高圧バルブシール等の部分に試料が吸着しキャリアオーバーが発生していることを疑いました。その中で高圧バルブシールを新しいものに交換して分析を行うと、表3、検証実験3.2にあるように、キャリアオーバー値が0.2%と劇的に低減されました。高圧バルブシールは分析ごとに何度もスイッチングしその表面には細かい傷が形成されます。吸着性が低い試料であれば問題はありませんが、試料の物性によっては表面

図8. 疑似ブランク測定のための溶出溶媒グラジエントプログラム。
(文献1より内容を変更して転載。)

の細かい傷に吸着されることもあります。この高圧バルブシールは消耗品であり、通常の保守点検時には交換部分であります。ただし通常の約半分の分析回数（約3,000回程度）であってもNPYの場合では、高圧バルブシール表面のわずかな傷に吸着されやすく、それがキャリーオーバーの大きな原因となりました。この一連の実験から、キャリーオーバー発生箇所を一つ一つ丁寧に、系統的に検証実験を行うことで、通常ではわからないキャリーオーバーの発生部位を特定することができます。

7. ま と め

キャリーオーバーへの対策は対象となる物質の物性に大きく依存します。また目的にも依存します。今回の試料のように、吸着性の高い物質でなおかつ微量分析を目指しているような場合はいろいろな対策を講じる必要がありました。キャリーオーバーはLC装置のオートサンプラー、カラムの種類、などに注意を払う必要があり、各メーカーごとにいろいろな工夫をしておりますので、それぞれの担当者に相談するのも一つの方法と思います。キャリーオーバーは基本的な問題でもありますので、Webでも資料などを紹介している方がいるのでご参考になさってください¹³⁾。

謝 辞

LCに関する技術的なアドバイスをいただいた星大海氏（株式会社島津製作所，京都）に感謝します。

文 献

- 1) T. Yamagaki and T. Yamazaki, *Mass Spectrom.*, **8**, S0083 (2019).
- 2) K. Tatemoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5485–5489 (1982).
- 3) J. T. Clark, P. S. Kalra, W. R. Crowley, and S. P. Kalra, *Endocrinology*, **115**, 427–429 (1984).
- 4) J. T. Clark, P. S. Kalra, and S. P. Kalra, *Endocrinology*, **117**, 2435–2442 (1985).
- 5) A. S. Levin and J. E. Morley, *Peptides*, **5**, 1025–1029 (1984).
- 6) B. G. Stanley and S. F. Leibowitz, *Life Sci.*, **35**, 2635–2642 (1984).
- 7) K. Fuxe, L. F. Agnati, and A. Harfstrand, *Acta Physiol. Scand.*, **118**, 189–192 (1983).
- 8) D. J. Cowley, J. M. Hoflack, J. T. Pelton, and V. Saudek, *Eur. J. Biochem.*, **205**, 1099–1106 (1992).
- 9) H. Darbon, J. M. Bernassau, C. Deleuze, J. Chenu, A. Roussel, and C. Cambillau, *Eur. J. Biochem.*, **209**, 765–771 (1992).
- 10) I. Glover, I. Haneef, J. Pitts, S. Wood, D. Moss, I. Tickle, and T. Blundell, *Biopolymers*, **22**, 293–304 (1983).
- 11) A. Nordmann, M. J. Blommers, H. Fretz, T. Arvine, and A. F. Drake, *Eur. J. Biochem.*, **261**, 216–226 (1999).
- 12) D. H. Vu, R. A. Koster, A. M. A. Wessels, B. Greijdanus, J. W. C. Alfenaar, and D. R. A. Uges, *J. Chromatog. B*, **917–918**, 1–4 (2013).
- 13) 例 え ば http://bioanalysisforum.jp/images/2016_7thJBFS/05_DG2015-14_HP.pdf