



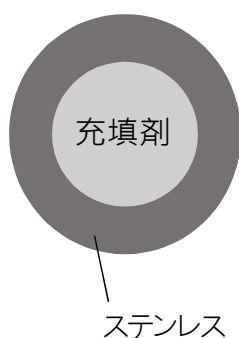
FlexFire メタルフリーカラム

ハードウェアの変更で可能になる分析があります!!

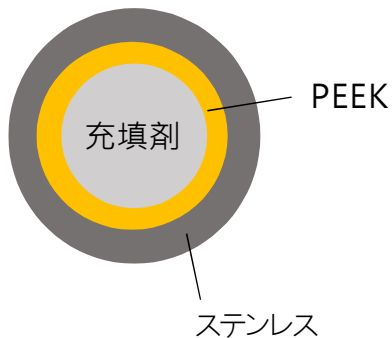
近年、ペプチドやたんぱく質の分析のみならず、あらゆる分野においてメタルフリーカラムが大変注目されています。このメタルフリーカラムは金属との接触を回避することにより吸着を防ぎ、ストレートに化合物を溶出させることが可能となるため、リン酸基、金属配位などの化合物に大きな効果があります。

従来より、これらの化合物はステンレス製カラムを用いて、リン酸系緩衝液のメソッドによって分析されてきましたが、メタルフリーカラムの使用によりギ酸系緩衝液でのメソッド構築が可能で、LC/MSへの導入も容易となります。

ステンレスカラム



メタルフリーカラム

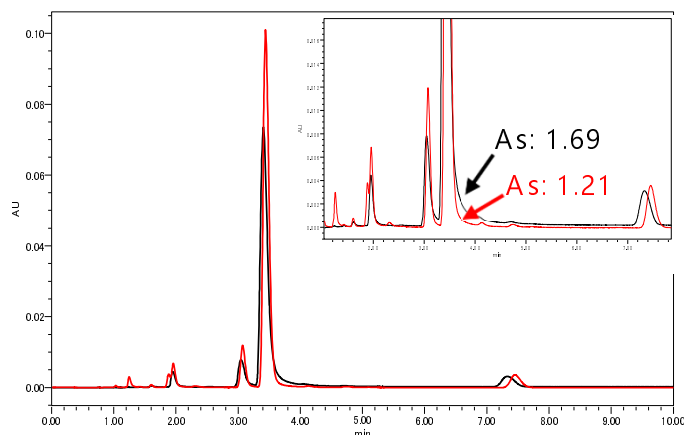


■ハードウェアの違い

Develosilのメタルフリーカラムはステンレス管の中にPEEKチューブが内蔵されています。これにより、1.6 μ m粒子径などのUHPLCカラムの高圧下においても高い耐久性を示します。

また、フリットにもPEEK製を採用しているため、カラム自体は金属パーツと接することはありません。

フラビンモノヌクレオチドの分析



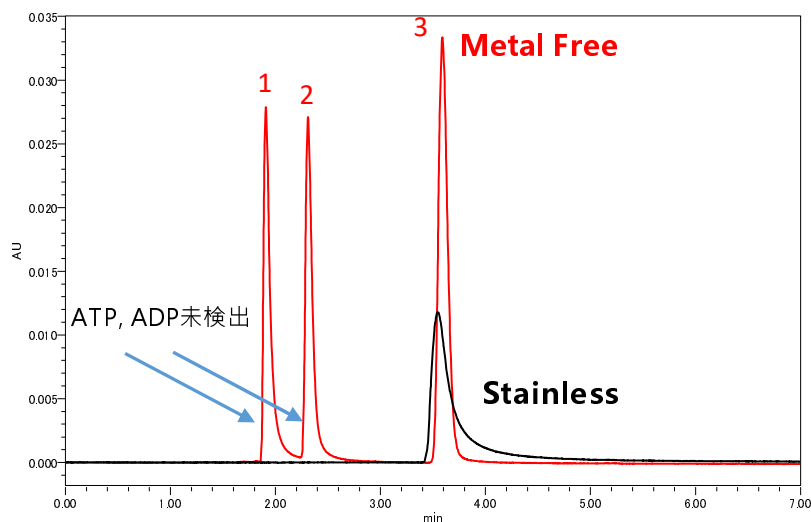
Conditions;

Column: FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x100mm) : Stainless
 FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x100mm) : Metal Free
 Mobile phase: Acetonitrile/25mM HCOONH₄=10/90
 Flow rate: 0.3mL/min
 Temperature: 40°C
 Detection: UV254nm
 Sample: Flavin mononucleotide (0.52mg/mL)
 Injection volume: 0.2 μ L

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

フラビンモノヌクレオチドはリボフラビンにリン酸基が結合した化合物です。ステンレスカラムではテーリングが目立ちますが、メタルフリーに変更することでピーク形状の改善、これに関連してピーク高さもアップします。

アデノシン一リン酸(AMP)、二リン酸(ADP)、三リン酸(ATP)の分析



Conditions:
Column: FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x100mm) : Stainless
FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x100mm) : Metal Free 10mM
Mobile phase: HCOONH₄
Flow rate: 0.3 mL/min
Temperature: 40°C
Detection: UV260nm
Sample: 1. ATP (0.16mg/mL)
2. ADP (0.17mg/mL)
3. AMP (0.16mg/mL)
Injection volume: 0.2 μ L
System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

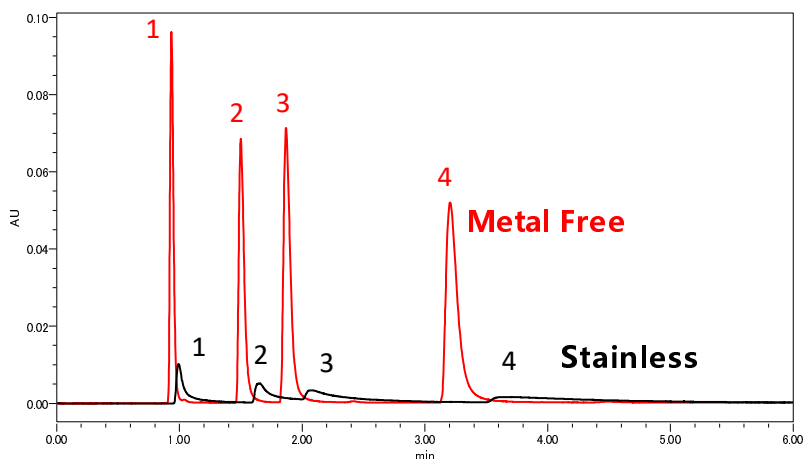
同一条件下において、カラム材質の違いによる影響を比較しました。AMP、ADP、ATPはリン酸基を含有する化合物で、金属への吸着が懸念されています。

ステンレスカラムでは、ADPおよびATPは未検出で、AMPはブロードピークとして溶出されていますが、カラム材質をメタルフリーに変更することで全てのピークはシャープに溶出されています。

このように金属の影響を受けやすい化合物はメタルフリーカラムを用いることにより、劇的な変化を遂げます。

※AMP,ADP,ATPはリン酸緩衝液を移動相にすることでステンレスカラムでもシャープなピークを得ることができます。

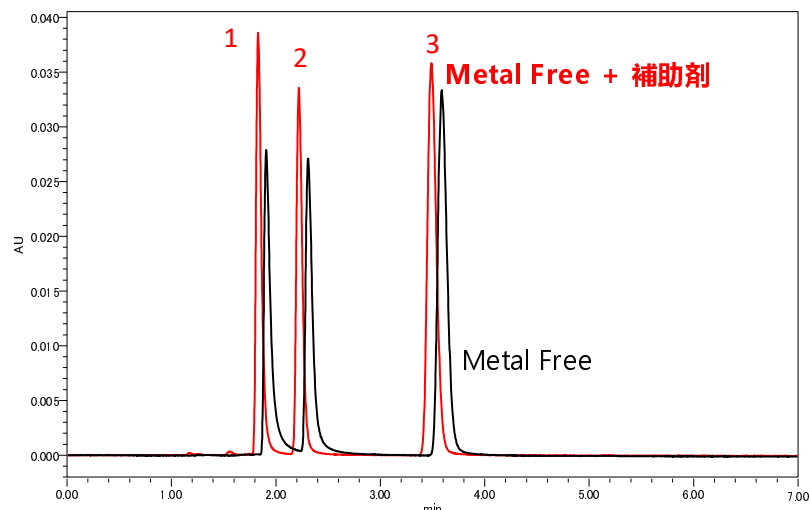
dNTP(デオキシヌクレオシド三リン酸)の分析



Conditions:
Column: FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x100mm) : Stainless
FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x100mm) : Metal Free 10mM
Mobile phase: HCOONH₄
Flow rate: 0.3 mL/min
Temperature: 40°C
Detection: UV260nm
Sample: 1. dCTP (13 μ M)
2. dTTP (13 μ M)
3. dGTP (13 μ M)
4. dATP (13 μ M)
Injection volume: 0.2 μ L



さらなるピーク形状の改善



Conditions:

Column: FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x100mm) : Metal Free

Mobile phase: 10mM HCOONH₄
10mM HCOONH₄ + 0.1% 補助剤

Flow rate: 0.3mL/min

Temperature: 40°C

Detection: UV260nm

Sample: 1. ATP (0.16mg/mL)
2. ADP (0.17mg/mL)
3. AMP (0.16mg/mL)

Injection volume: 0.2 μ L

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

材質の変更だけでは完全なメタルフリー化にはなりません。金属が影響するのはカラムだけではなく、試料が通る配管やオートサンプラーニードルなど細部にも徹底する必要があります。

左図のクロマトは補助剤の有無による比較をしたものです。システムはバイオイナートではなく通常のシステムを使用しています。

メタルフリーカラムで良好な結果は得られていますが、補助剤を添加することでよりシャープなピークを得ることができます。

また、バイオイナートLCの導入など、さらなる改善方法はありますが、大前提として、**金属不純物の少ない充填剤**を選択する必要があります。

本カタログ以外のデータも、弊社ホームページにて随時アプリケーションデータを更新しています

。その他、FlexFireシリーズやテクニカルレポートもホームページよりダウンロードでき

ます。

HPLC ⇄ UHPLC をもっと身近に

HPLC/UHPLC用カラム



FlexFire