

SPEC 96 ウェルメソッド 開発キットを使用した 迅速な生体分析メソッド開発

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Jennifer Massi
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

トリプル四重極 MS 検出システムを使用した生体サンプル (血清、血漿) の LC 分析によって、対象化合物の幅広い濃度範囲で大量のデータが得られ、自動化やデータ管理システムにより分析の生産性が向上しました。一方、タンパク質の除去や希釈、注入は迅速かつ容易に行うことができますが、このような非特異的なメソッドによるサンプル前処理は、特に対象化合物の濃度がきわめて低い場合には適切な前処理法であるとはいえ、より特異的で複雑なアプローチが必要になります。これに対し、固相抽出 (SPE) は、最も選択性の高いサンプル前処理メソッドの 1 つとして広く認識されています。SPE を使用すれば選択性は向上しますが、SPE メソッドの開発は困難で時間がかかる作業です。このアプリケーションノートでは、SPEC 96 ウェルメソッド開発プレートを使用した、簡単に短時間にできる新しい SPE メソッドの開発アプローチについて説明します。Solid Phase Extraction Concentrator (SPEC) は、(粉体の充填剤を詰めたカラムと比較して) 小さいボイドボリュームを持つモノリス様抽出ディスクであり、短時間で、少ない溶媒量での溶出が可能になります。



Agilent Technologies

材料および試薬

HPLC グレードの水、メタノール (CH₃OH) およびアセトニトリル (CH₃CN)、試薬グレードのギ酸、水酸化アンモニウム、酢酸アンモニウム、SPEC メソッド開発プレート (p/n A59630)

サンプル前処理

Agilent SPEC 96 ウェルメソッド開発プレートには、C2、C8、C18、C18 AR (耐酸性)、CN、PH、MP1 (ミックスモード C8 +SCX)、および MP3 (MP1 に類似し、極性保持機能が向上) の 8 種の官能基の充填剤が 1 列 (12 ウェル) ずつ充填されています。多様な固相の官能基を 1 枚のプレート上で試すことができ、多様な結果が得られることから、最適な結果が得られる官能基と条件を迅速かつ容易に特定することができます。

1. 表 1 に示す溶液を調製します。
2. サンプル希釈のための緩衝液を調製します (100 μ L の血漿サンプル用に 200 μ L の緩衝液)。

対象化合物の解離を抑制する適切な緩衝液を選択します (塩基性物質には pKa を超える pH、酸性物質には pKa 未満の pH)。対象化合物の pKa が不明な場合、塩基性物質には pH 約 10~12 のアンモニウム緩衝液を、酸性物質には pH 約 2~3 のギ酸緩衝液を、中性化合物には pH 約 6~8 の酢酸緩衝液を使用します。MP1 および MP3 が使用できる対象化合物は塩基性物質 (正電荷を持つことができるもの) に限られます。中性または酸性化合物には、これらのミックスモードは使用しません。サンプル調製と、コンディショニングおよび洗浄ステップに十分な量の緩衝液を調製します (疎水性の官能基と CN 官能基では 10 個のサンプルと 1 つのブランク、ミックスモードでは 2 つのサンプルと 2 つのブランク。使用する各ウェルのコンディショニングおよび洗浄ステップに 2 x 200 μ L)。

3. 対象化合物 (必要に応じて内部標準 (IS) も) を含む血漿と緩衝液の混合液 300 μ L を調製します (サンプル 62 + ブランク 14)。
4. MP1 および MP3 を使用する場合は、さらに 2 % ギ酸溶液で希釈した 2 つのサンプルを追加します。
5. ゆっくりと非常に低い真空条件で (< 2 in Hg)、疎水性官能基および CN 官能基のウェル 1~11 と MP1 および MP3 相のウェル 1 を、最初に 200 μ L のメタノール、次に 200 μ L のサンプル希釈緩衝液でコンディショニングします。MP1 および MP3 相のウェル 2 を 200 μ L のメタノールで、次に 200 μ L の 2 % ギ酸緩衝液でコンディショニングします。

6. サンプルを低真空 (2 in Hg) でプレートにロードします。ギ酸で希釈した MP1 および MP3 のサンプルは対応する列のウェル 2 にロードします。
7. すべてのウェルを 200 μ L のサンプル希釈緩衝液で洗浄します (MP1 および MP3 のウェル 1 を含む)。MP1 および MP3 のウェル 2 を 200 μ L の 2 % ギ酸緩衝液で洗浄します。
8. MP1 および MP3 のウェル 1 を 200 μ L の 2 % ギ酸緩衝液で洗浄します。
9. MP1 および MP3 のウェル 1 および 2 をギ酸で酸性化したメタノールで洗浄します。
10. この段階で、洗浄が完了したら、すべてのウェルを 15 秒間高真空 (> 10 in Hg) にします。
11. ゆっくりと、中程度の真空で (2~5 in Hg)、図 1 に示した 200 μ L のメタノールおよびアセトニトリル溶液を使用して疎水性官能基のウェルから溶出させ、回収します。さらに 200 μ L の溶液を使用して同じコレクションプレートに溶出させ、溶出液を混合します。ブランク (カラム 11 および 12) を 100 % のメタノールまたはアセトニトリルで溶出させます (図 1)。
12. ステップ 11 と同時に、塩基化したメタノール溶液を 200 μ L x 2 回使用してすべての MP1 および MP3 ウェルから溶出させます。
13. 加熱窒素気流下で、すべての溶出液を蒸発乾固させ、LC 分析に適した量の適切な緩衝液に再溶解させます。サンプルを分析し、標準物質の結果と比較します。

表 1. Agilent SPEC メソッド開発プレートを使用した血漿の分析で使用する溶液

溶液	濃度
メタノール	10、30、50、70、および 90 % 水溶液 (v/v)
アセトニトリル	10、30、50、70、および 90 % 水溶液 (v/v)
ギ酸	2 % 水溶液 (v/v) 2 % メタノール溶液
水酸化アンモニウム	5 % メタノール溶液

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	10 %		30 %		50 %		70 %		90 %		Blank	
	CH ₃ OH	CH ₃ CN										
C18AR												
C18												
PH												
C8												
CN												
C2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MP1	中性 サンプル	イオン性 サンプル	使用しない									
MP3	中性 サンプル	イオン性 サンプル										

図 1. Agilent SPEC メソッド開発キットを使用したときの 96 ウェルプレートのレイアウトと溶出条件

結果と考察

疎水性官能基

疎水性官能基による対象化合物の保持は、ファンデルワールス/疎水性相互作用に基づくものです。弱い疎水性相互作用に加えて、シアノプロピル相は、極性、双極子-双極子メカニズムにより対象化合物を保持します。有機溶媒強度の上昇により対象化合物-吸着剤間の相互作用が壊れ、溶離液の親和性が吸着相の親和性を超えると、対象化合物が溶出します。

ピーク面積 (濃度) を有機溶媒のパーセンテージ濃度に対してプロットすると、溶出のプロファイルがわかります。通常、有機溶媒レベルが低い場合には、対象化合物の溶出はほとんど、またはまったく見られません。有機溶媒の濃度パーセンテージが上がると、一部溶出が見られます。その後、溶出濃度が急激に上昇し、最後にほとんどの、またはすべての対象化合物が溶出されるとグラフは平坦になります。図 2 に一般的な溶出プロファイルを示します。疎水性および極性相互作用の程度に応じて、CN 官能基では保持がほとんど、またはまったく見られないことがあります (ロード時の漏出)。図 2 のデータに基づいて、40~50 % での洗浄と、その後の 70 % での溶出を使用するメソッドを選択します。

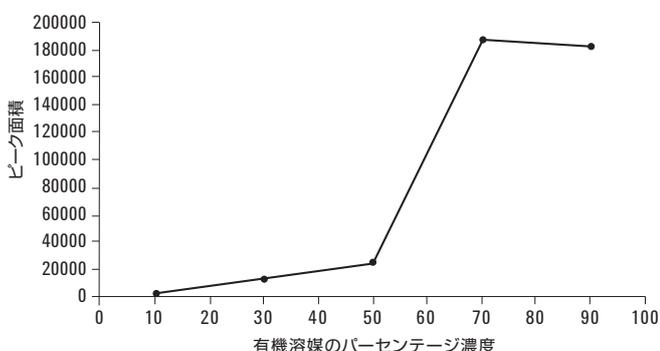


図 2. Agilent SPEC メソッド開発キットを使用して取得した一般的な溶出プロファイル

ミックスモード官能基

MP1 および MP3 への保持は、疎水性およびイオン交換相互作用によるものです。ウェル 1 では分子は中性の状態にあるため、初期保持メカニズムは純粋に疎水性のものです。水溶性溶液での洗浄により、充填剤から極性の夾雑物が洗い流されます。ギ酸の添加により対象化合物が帯電し、その結果、モードがイオン交換に切り替わるため、100 % の有機溶媒洗浄が可能になり、非極性の夾雑物が溶出します。

ウェル 2 では、疎水性とイオン交換の両方のメカニズムを同時に使用します。これは、一部の化合物の保持が疎水モードだけでは不十分だからです。両方のモードを同時に使用した結果、S/N 比が上昇します。メタノールによって疎水性相互作用が壊れ、同時に高い pH で中和状態が崩れるため、対象化合物が充填剤から溶出します。

結論

このアプリケーションノートで説明したシンプルな手順により、比較的短時間で大量のデータを得ることができます。SPEC メソッド開発プレートの 6 つの異なる疎水相は、ここで説明した複数の条件を使用すると、ほとんどの場合に大きく異なる性能と応答を示します。溶出プロファイルを目で確認し、回収率を計算することにより、最適な SPE の洗浄および溶出条件を決定することができます。ここでは、有機溶媒の濃度を低くして溶出させると、多くの場合は回収率を損なわずにクリーンに抽出することに注意してください。同じプレート上のミックスモード相は、比較のための便利な代替メソッドとして使用することができます。さらに別のプレートを使用して条件を変更すると、SPE メソッドを確認し、さらに最適化することができます。

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。
アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレント
の Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的
または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、
翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2011

Printed in Japan

December 23, 2011

5990-9673JAJP



Agilent Technologies