

現在の「十分な」サンプル前処理で 本当に十分か？

脂質と次善のマトリックス除去の隠れた危険性

はじめに

ラボでは長年、ワークフローの管理性と効率の向上に向けた改善が進められてきました。生体サンプルの前処理にはタンパク質沈殿 (PPT) が、食品サンプルの前処理には QuEChERS がよく用いられます。これらは、簡単な方法で複雑なサンプルを前処理できるという好例です。分析者に現在のワークフローについて尋ねてみると、おそらく十分に作業をこなせると答えるでしょう。しかし、そのようなサンプル前処理で本当に十分なのでしょうか。

ラボのワークフローは多くの課題に直面しており、効率やスループットの指標の改善を常に求められています。一般的なワークフローは、サンプル収集、サンプル前処理、機器への導入、分析、データ確認、最終的なデータ報告という構成です。このうちサンプル前処理は、常にボトルネックとなり速度低下につながる手順と見なされてきました。最新の高度な機器では、複雑なサンプル試験において必要な感度、選択性、信頼性、実現可能性を考慮しながら、さまざまなサンプルを分析できるようになっています。そのため、サンプル前処理手順を最小限に減らして、時間短縮、コスト削減、複雑さの解消、汎用性の向上を実現し、これで十分と言えるまでに省力化が進みました。

最も重要なワークフローは、ラボによって異なります。次善のサンプル前処理には、時間の浪費、機器のメンテナンス/故障の問題、不正確なデータなど、複数の危険性が潜んでおり、これらの問題が発生すると全体の成功に影響する可能性があります。このような隠れた危険性は、適切なサンプル前処理ワークフロー戦略によって、大幅に低減できます。この改善を実現するために、科学者の再教育や、大規模な投資、標準操作手順書 (SOP) の書き直しは必要ありません。

このホワイトペーパーでは、日常的に直面する既知のサンプル干渉の概要と、サンプル前処理ワークフローでマトリックス除去を最適化しない場合に発生しうる、認知度の低い隠れた障害について説明します。また、既知および未知の結果について説明するとともに、生産性を向上させ、技術者の効率を高め、分析機器の汚染リスクを軽減するための新しいソリューションも紹介します。これにより、SOP を大幅に変更することなく、またスループットの低下やワークフローの複雑化を招くことなく、回収率と再現性の向上が可能になります。それでこそ、本当の意味で十分なサンプル前処理と言えるでしょう。

サンプルクリーンアップが必要な理由

サンプル前処理が必要な理由は、主に 2 つあります。

- 不要なマトリックスの除去
- 分析対象物の濃縮

このホワイトペーパーでは、マトリックス除去作業を可能な限り効率的に実行しない場合に発生し得る明白な問題と、潜在的な問題について説明します。

不要なマトリックス成分を処理しない場合、または十分に除去しない場合、流路の汚染につながる可能性があります。GC、GC/MS、GC/MS/MS 分析では、非揮発性マトリックス共溶出物によって、注入口、ゴールドシール、カラムなどの GC フロー部品に悪影響が出る



図 1. 「十分な」サンプル前処理ルーチンによる GC システムの部品の汚染



場合があります (図 1)。LC、LC/MS、LC/MS/MS 分析では、マトリックス微粒子と塩によって、バルブ、オンラインフィルタ、LC カラムが損傷する可能性があります。マトリックス共溶出物によって MS ソースのイオン抑制が大きくなり (図 2)、メソッドの信頼性が大幅に低下する可能性があります。多くの分析科学者はサンプルをフローシステムに注入する前にろ過して、前述のような既知の危険性を回避します。またろ過によって微粒子のマトリックス効果を最小化することもできますが、溶解した不要なマトリックスについてはどうでしょうか。また、ろ過だけの場合はどうなるでしょうか。

図 2 は、溶解した不要なマトリックス共溶出物 (溶解した塩、色素、タンパク質、脂質など) を除去しないと、分析ハードウェアに悪影響を与える可能性があることを示しています。

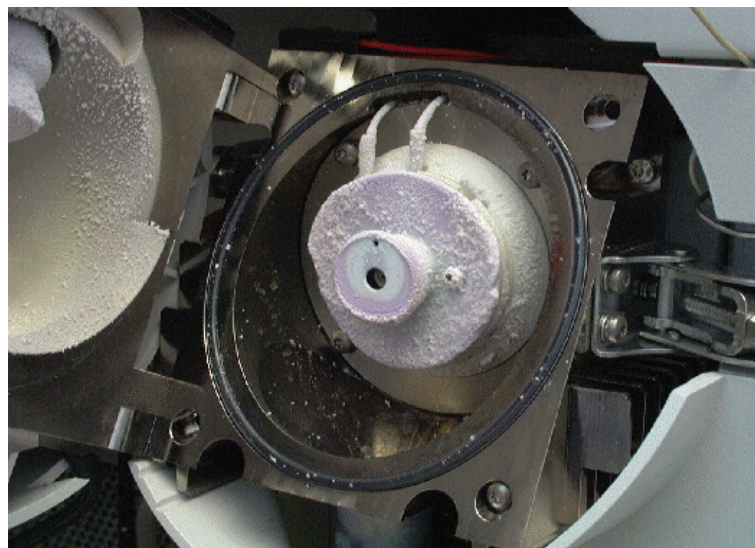


図 2. 「十分な」サンプル前処理ルーチンでの塩の残留による LC/MS イオン源の塩の蓄積

質量分析は感度と選択性が高いため、幅広いアプリケーションでよく使用される分析手法です。ただし、マトリックス成分によるイオン抑制やイオン増感が、(高い相対標準偏差 (RSD) が示すように) 真度、精度、堅牢性に悪影響を与える可能性があります。ポストカラムインフュージョンは、マトリックスによるイオン抑制やイオン増感を同定する手法です。図 3 はこの実験の一般的な設定方法です (アプリケーションノート 5991-8007JAJP³ を参照してください)。

この比較実験によって、「十分な」サンプル前処理の効率性が、必要なレベルに達していないことがわかる場合もあります。アジレントのサンプル前処理ソリューションなら、現在の「十分な」サンプル前処理の効率と信頼性をさらに高めることができます。

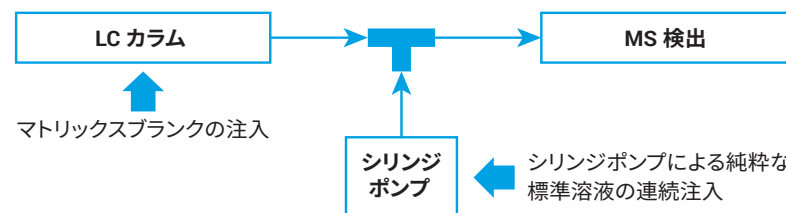


図 3. マトリックスイオン抑制の評価および比較研究における標準ポストカラムインフュージョンの設定図

脂質による重大な影響

すべてのサンプルマトリックス共溶出のうち、最も重大であるにもかかわらず見過ごされがちな成分は、脂質かもしれません。脂質は効率的に除去ににくく、蓄積しても目視で判別しにくいからです。(図3のような)ポストカラムインフュージョンの実験では、MS信号での例えば血清や血漿によるマトリックス効果を、マトリックスブランクの連続的なインフュージョンによって評価できます。信号強度が変化する場合、イオン抑制またはイオン増大の原因となるマトリックスからの物質が存在する可能性があります。

この例(図4のゾーン2および3)は、脂質がデータ品質に多大な影響を与えることを示しています。タンパク質沈殿は生体マトリックス

中の余分なタンパク質の除去には効果的ですが、重大なイオン抑制の原因となりうるリン脂質を除去することはできません(アプリケーションノート 5991-8007JAJ³を参照してください)。

データ品質が低いと、ラボ全体の生産性が大幅に低下します。

LC/MS/MS分析またはGC/MS/MS分析でマトリックス除去が不十分であると、生産性に次のような影響を与える可能性があります。

メソッドの信頼性とデータ品質

- メソッドの感度と選択性が許容範囲外となる
- 検量線の直線性が許容範囲外となる
- メソッドの真度と精度の低下
- ピークの識別と積分が困難になる

メソッドの適用性

- メソッドの開発と最適化の長期化
- メソッドのトラブルシューティングの増加
- マトリックスによる検出結果のばらつき
- サンプル再分析の増加

質量分析計の清浄度

- MSイオン源のクリーニング頻度の増加
- キャピラリのクリーニングまたは交換頻度の増加
- 真空レベルを確立または維持できない
- トラブルシューティングの増加

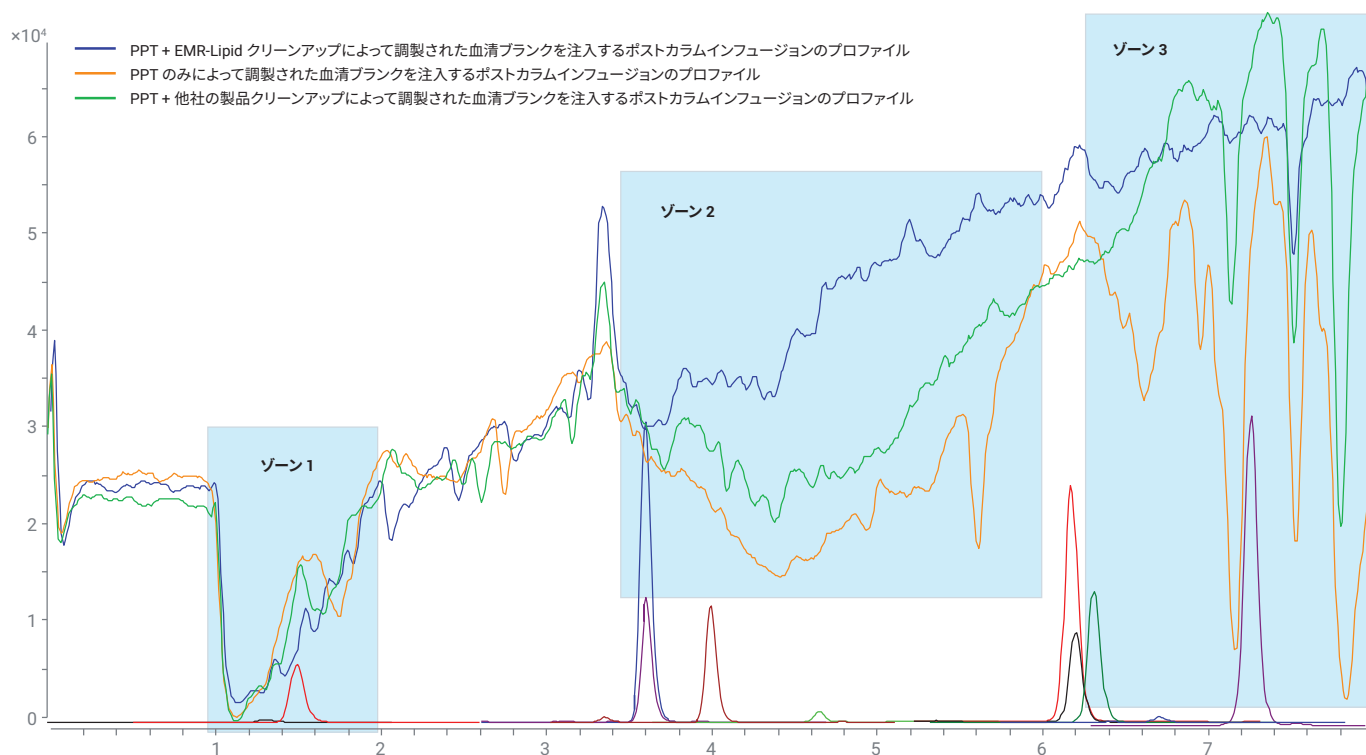


図4. 標準ポストカラムインフュージョンのプロファイルの比較とターゲット化合物に対するマトリックスイオン抑制の実証

カラムへの脂質の蓄積

- LC および GC カラム試験寿命の短縮
- GC 注入口のメンテナンス頻度の増加
- GC カラムのクリッピング頻度の増加
- LC カラムの背圧上昇
- システムの洗浄や平衡化の頻度の増加
- 分析時間の長期化

脂質除去のワークフローは存在しますが、現行のサンプルクリーンアップメソッドでは一部のターゲット化合物が脂質とともに除去されてしまい、分析対象物の回収率が低下することがあります。多くの分析者は、メンテナンス回数や消耗品の交換頻度を増やしたり、より包括的なサンプル前処理方法を実践したりすることで、このような状況に対応しています。後者の方法を使用するとデータ品質は上がりますが、コスト、時間、専門性が大幅に上がるため、生産性が下がります。

「十分な」サンプル前処理
だけでは有効な解決方法に
ならない理由

データ品質を高め、生産性を大幅に向上させるには、脂質と一般的なマトリックスを除去するための有効かつシンプルな手法が必要です。これが Captiva EMR-Lipid を開発した理由です。この製品では、簡単なワークフローでサンプルを効率的にクリーニングできます。Captiva EMR-Lipid によるアプローチはサンプルで汎用性が高く、脂質ベースのマトリックス効果を低減でき、分析対象物の回収率も良好です。

食品マトリックスや生体マトリックスなどの、分析困難で複雑なサンプルを分析する場合は、ターゲット化合物に最適なサンプル前処理法を決定する必要があります。多くの手法は困難で手間と時間がかかり、化合物回収率やマトリックス干渉などの問題も残っています。サンプル前処理は一般的に、簡単なプロトコルと少ない手順で実行できることが求められます。サンプルクリーンアップによって効率的にマトリックス干渉を除去し、さまざまな成分の回収率への影響を最小限に抑える必要があります。

表 1. 遠心分離主体のプレート上の従来型 PPT (96 ウェルプレート) と、ろ過主体の PPT + Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ (96 ウェルプレート) との比較

従来 PPT (96 ウェルプレート) (遠心分離)			PPT + Captiva EMR-Lipid クリーンアップ (96 ウェルプレート) (ろ過)		
ステップ	所要時間 (分)	必要な消耗品	ステップ	所要時間(分)	必要な消耗品
プレートラベリングおよびサンプル分注	30	96 チップ (サイズ小) 1 コレクションプレート	プレートラベリングおよびサンプル分注	30	96 チップ (サイズ小) 1 コレクションプレート 1 EMR-Lipid プレート
内部標準添加	5	1 リピーターチップ	内部標準添加	5	1 リピーターチップ
サンプルの混合	2	プレートカバー	サンプルの混合	2	プレートカバー
変性溶媒の添加	5	1 リピーターチップ	変性溶媒の添加	5	1 リピーターチップ
サンプルの混合	5	プレートカバー	サンプルの混合	5	プレートカバーは攪拌による混合にのみ必要
遠心分離	10		ろ過	10	
上澄み移送、コレクションプレートラベリング	30	96 チップ (サイズ中) 1 コレクションプレート		条件により異なる	1 プレートマット
サンプルの後処理	条件により異なる	1 プレートマット	サンプルの後処理		
必要なサンプル前処理合計時間	87 分間の後処理		必要なサンプル前処理合計時間	57 分間の後処理 (およそ 30 % の時間節約)	
機器の分析時間および溶媒の使用	100 %		機器の分析時間および溶媒の使用	<90 % (時間および溶媒使用の 10 % 以上の節約)	
マトリックス除去	タンパク質のみ		マトリックス除去	タンパク質および脂質	

大量のマトリックス成分が存在する中で分析対象化合物を同定する場合を考えてみましょう。図 5 は後処理なし (未処理)、C18 クリーンアップ (不十分な処理)、EMR-Lipid クリー

ンアップ (最適な処理) を実行した後の、アボカド抽出物の GC フルスキャンクロマトグラムを比較したものです。

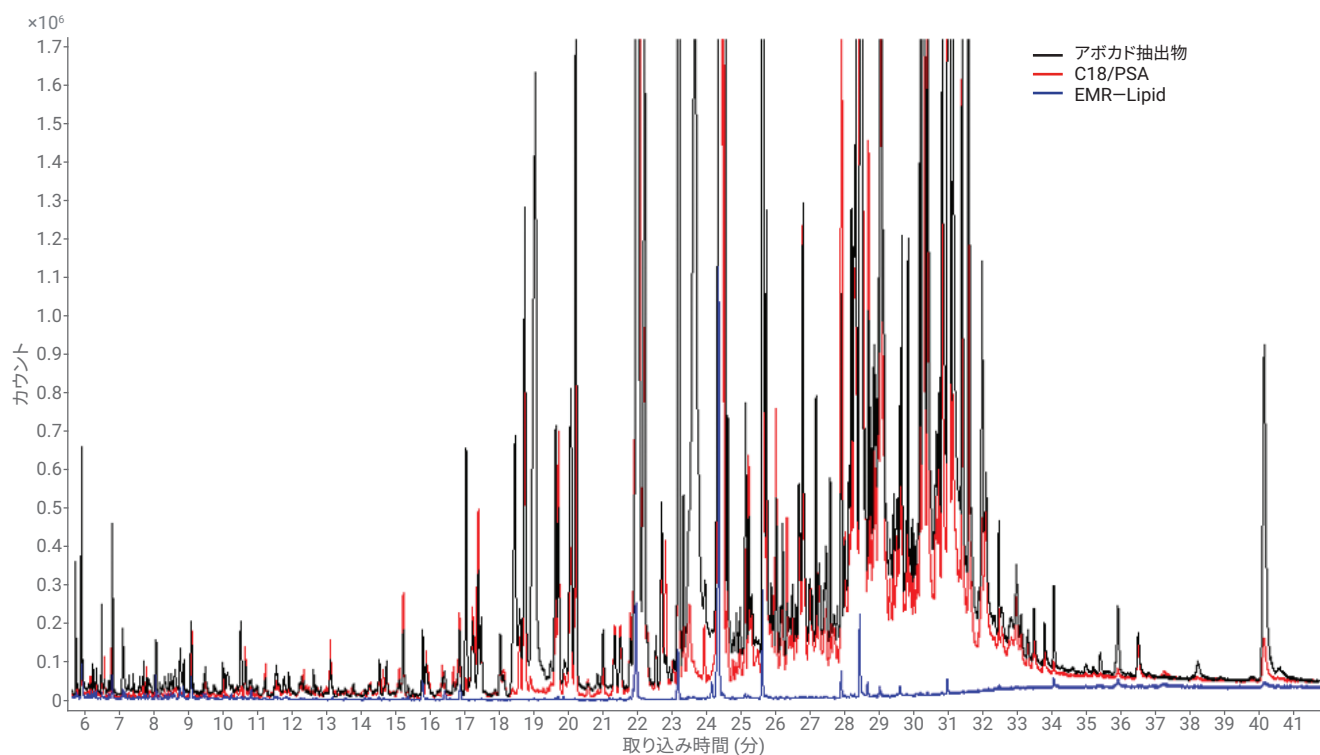


図 5. QuEChERS アボカド抽出液 (黒) を従来の C18/PSA 分散 SPE (赤) と Agilent EMR-Lipid で処理した抽出液 (青) を比較した GC/MS フルスキャンクロマトグラムの重ね表示

脂質によってマトリックスイオン抑制が非常に大きくなり、検出感度やメソッド再現性が下がる可能性があります。生体マトリックスに含まれるリン脂質は、マトリックス効果が大幅に上がる原因となるため、よく分析の妨げとなります。図 6 は、ビタミン D 代謝物の分析において、Captiva EMR-Lipid でクリーンアップしたサンプルの方が、PPT のみで処理したサンプルよりも、分析対象物のレスポンスと RSD が優れていることを示しています。

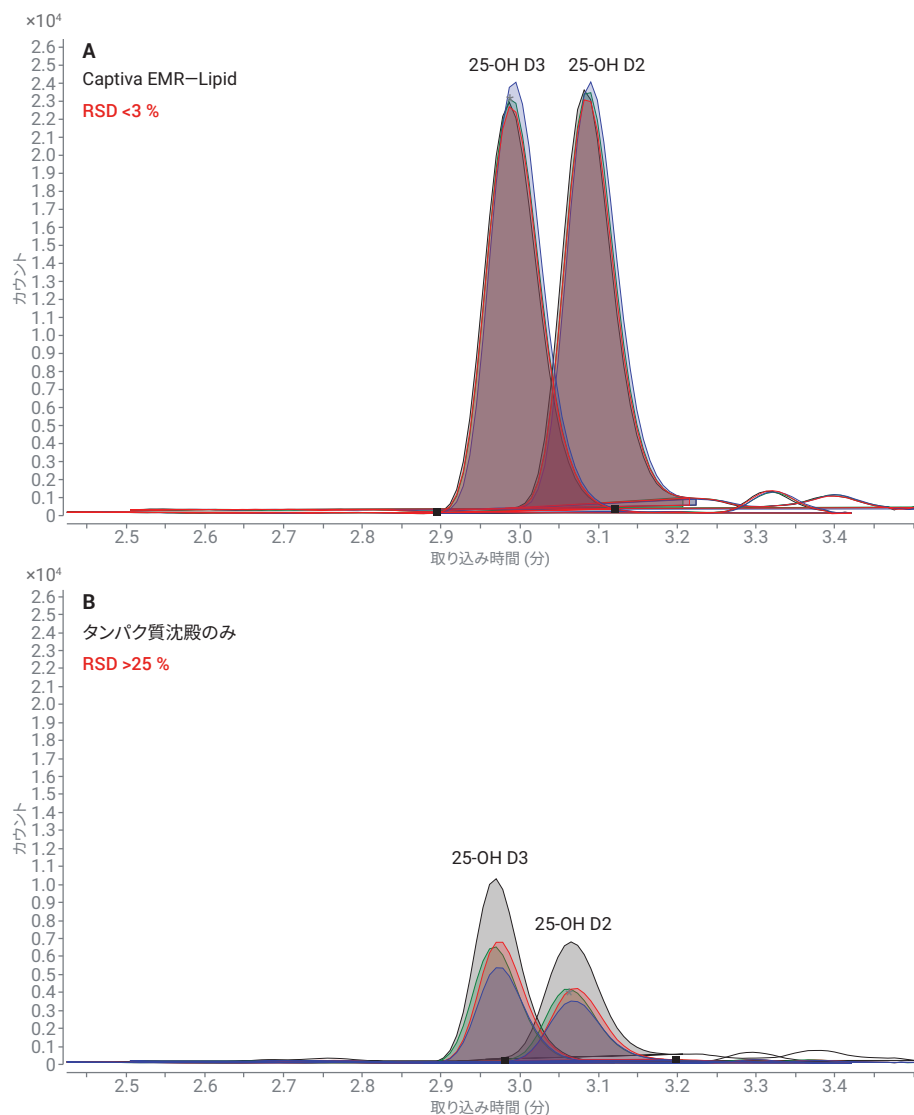


図 6. PPT のみと、EMR-Lipid と PPT を組み合わせて処理した場合の、分析対象物のレスポンスおよび RSD 値の比較

脂質の効率的な除去がもたらす 分析速度の向上

Captiva EMR-Lipid を用いることで、分析メソッドの信頼性とデータ品質の向上だけでなく、分析時間の短縮やラボの生産性向上も可能になります。図 7 のグラフは、サンプル導入前にリン脂質を十分除去したため、逆相クロ

マトグラフィーでこれらの疎水性化合物が溶出するのを待つ必要がなく、機器の使用時間を短縮できたことを示しています。

サンプルがクリーンになると、分析時間を短縮でき、システムの洗浄頻度も減らすことができます。また、所定の点検サービス回数の間に分析できるサンプル数も増加します。つまりラボの現在の能力で、サンプルスループットを高

められるということです。これは、ラボのサンプルスループットが向上し、より大きな経済的成果をあげられることを意味します。

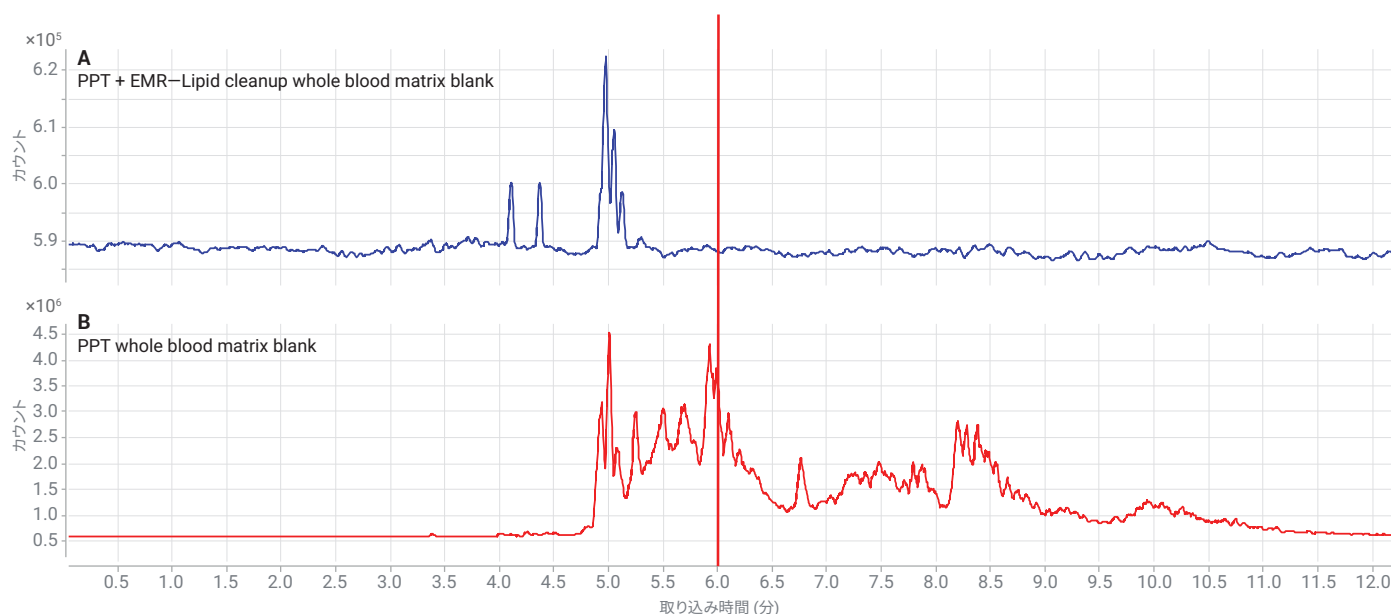


図 7. サイクル時間の短縮の実現可能性を示す、マトリクスブランクのリン脂質プロファイルの比較

結論

サンプルクリーンアップが重要なのは、複雑なサンプルに脂質、タンパク質、塩、色素など、分析の妨げとなる多くのマトリクス成分が含まれているためです。脂質は、いくつかの理由から最も問題のあるマトリクス成分の 1 つです。

サンプル前処理ワークフローにおいて、十分なワークフローより優れたワークフローを使用する利点は、ラボにおける機器の稼働時間を延ばし、分析者のベンチワーク時間を短縮し、潜在的なクロマトグラフィー分析時間を短縮して、日常的に分析できるサンプルを増やせることです。メンテナンスを頻繁に実施しなければならない場合の最大の要因は、マトリクスによる汚染です。マトリクスの除去量が増えれば、メンテナンス作業の間隔を延ばすことができます。このために SOP を変更したり、ワー

クフロー時間を延ばしたりする必要はありません。サンプル前処理を実行しないと、対象成分のピークがわかりにくくなり、正確に定量できなくなる可能性があります。実際に、ピークがまったくわからない場合もあります。このような影響によって、データ処理時間が延び、データ品質の不良により再分析が必要なサンプルやバッチの数が増える可能性があります。

Agilent Captiva EMR-Lipid の詳細

www.chem-agilent.com/contents.php?id=1004776



Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ

推奨アプリケーションノート

1. Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いた LC/MS/MS によるヒト全血中の依存性薬物の定量、アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、publication number 5991-9251JAJP.
2. Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートを用いた生体サンプルのタンパク処理、アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、publication number 5991-9222JAJP.
3. Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いたヒト血清中薬物の LC/MS/MS 定量分析、アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、publication number 5991-8007JAJP.
4. Agilent Captiva EMR-Lipid を用いた生体サンプル中のビタミン D 代謝物の分析、アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、publication number 5991-7956JAJP.
5. 牛肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析、アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、publication number 5991-8598JAJP.

動物用医薬品分析については、**Journal of Chromatography A** の学術論文も参照してください。

Multiclass multiresidue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1549, 14-24.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, August 6, 2018
5994-0110JAJP