

Instructions & Troubleshooting for HybridSPE™ – Precipitation (HybridSPE-PPT)

96-well Plates & Cartridges

製品概要

LC-MS-MSで生体成分中の低分子を分析する際に、リン脂質汚染がイオン化抑制の主要な原因の一つであることが知られています。リン脂質の化学特性(一方が疎水性官能基で、もう一方が極性イオン官能基)のため、リン脂質はサンプル前処理において目的物質としばしば一緒に溶出し、LC-MS分析を難しくしています。このことはLC-MSを用いて、より短い分析条件を追及するとき更に問題となります。特許出願中の HybridSPE-Precipitation 技術は、簡単に汎用のサンプル前処理製品としてデザインされて、LC-MSやLC-MS-MS分析前に血漿や血清から、内因性タンパク質とリン脂質干渉を取り除きます。最初に、血漿や血清は酸性化アセトニトリルを混合して除タンパク(アセトニトリル沈殿)を行います。次に、遠心分離で沈殿しているタンパク質を取り除きます。そして、上澄みをHybridSPE 96ウェルプレートカートリッジにかけます。これらはケミカルフィルターとして作用し的確にサンプル中のリン脂質を除去します。リン脂質保有メカニズムは、選択性の高いイース酸塩基の相互作用に基づき、HybridSPE固定相にコーティングしたジルコニウムイオンとリン脂質リン酸基で作用します。その結果、溶出液はLC-MSやLC-MS-MS分析用に調整されています。“ウェル内-除タンパク(アセトニトリル沈殿)法”の代用としてHybridSPE 96ウェルプレートが有効です。初めに生体の血漿や血清を96ウェルプレートに添加し、続いてギ酸で酸性としたアセトニトリル(沈殿剤)を加えます。その後、vortexingで簡易な混合を行ない、96ウェルプレートを真空引きします。HybridSPE 96ウェルプレートのフィルターやフリッツは疎水性であるため、充填剤・フィルター・フリッツは抽出の過程でリン脂質と沈殿タンパクの両方を取り除く強いフィルターとして働きます。

お勧めの手順 (利用可能な2つのメソッド)

“ウェル内-除タンパク質(アセトニトリル沈殿)法” 96-ウェル用 :

1. 血漿 / 血清のサンプルを用意します。必要に応じて内部標準物質を加えます。
2. 100-300µL血漿 / 血清のサンプルをHybrid-SPE-PPT 96-ウェルプレートへ加えます。続いて沈殿剤として1%ギ酸 / アセトニトリル1:3 (v/v)を加えます。(このとき、真空を適用しません)。Note: 100µL血漿 / 血清 + 300µL 1%ギ酸 / アセトニトリルを推奨します。
3. 1分間の攪拌がvortexingでウェル内のタンパク質沈殿を実行します。
Note: 100µL血漿/血清+300µLの1%のギ酸 / アセトニトリルで処理するとき、ウェルプレートのカバーや密封マットは必要ありません。ただし、サンプル量を多くする場合や、クロスコンタミを避けるとき、しぶきを避けるときなどはウェルプレートのカバーで密封する必要があります。また、タンパク質沈殿は汎用のハンドルポットと0.5-1mLのピペットチップを利用して自動化が出来ます。
4. 96-ウェルプレートは専用バキュームマニホールドで減圧吸引(-10 to -15 inHg)します。吸引前に、バキュームマニホールド内に受け皿を用意してください。Note: サンプルが充填層を通り抜けるにはおよそ3分以上必要です。また、粘性のサンプルではより長い時間が必要となります。
5. 96-ウェルの受け皿に受けた溶出液は、直接LC-MSやLC-MS-MSで測定可能です。Hybrid-SPEの溶出液は濃縮が必要な場合を除き、LC-MS分析の前に更なる処理(乾固/再構成)を必要としません。

Note: この「ウェル内-除タンパク質(アセトニトリル沈殿)法」は96-ウェルプレートのみでのアプリケーションです。HybridSPEカートリッジは抽出の時に、沈殿しているタンパク質を取り除くのに必要なフリッツ/フィルターを含んでいません。カートリッジをご利用の場合には「オフライン-除タンパク質(アセトニトリル沈殿)法」を使用してください。

“オフライン-除タンパク質(アセトニトリル沈殿)法”

96-ウェルとカートリッジ用 :

1. 血漿 / 血清のサンプルを用意します。必要に応じて内部標準物質を加えます。
2. 血漿/血清のサンプルを適切な遠心チューブか深い96-ウェルリザーバープレートに移してください。続いて、100-300 µL血漿 / 血清のサンプルと沈殿剤として1%ギ酸 / アセトニトリル1:3 (v/v)を加えタンパク質を沈殿させます。Note: 100µL血漿 / 血清 + 300µL 1%ギ酸 / アセトニトリルを推奨します。
3. 1分間の攪拌がvortexingで沈殿を促します。または、遠心分離(3000rpmで2-5分間)で沈殿しているタンパク質を取り除いてください。
4. その後、上澄みをHybrid-SPE 96-ウェルもしくはカートリッジに移しバキュームマニホールドで減圧吸引(-10 to -15 inHg)します。Note: サンプルが充填層を通り抜けるには1-2分以上必要です。また、粘性のサンプルではより長い時間が必要となります。
5. 溶出液は、直接LC-MSやLC-MS-MSで測定可能です。Hybrid-SPEの溶出液は濃縮が必要な場合を除き、LC-MS分析の前に更なる処理(乾固/再溶解)を必要としません。

トラブルシューティング とFAQ

1. 血漿量が少なくても (10~50 μ Lの血漿) HybridSPE-PPT法が使えますか？

使用可能です。少量の血漿の手順は、脱イオン水で希釈し100 μ Lとします。例えば20 μ Lの血漿では80 μ L脱イオン水を添加した後、300 μ L沈殿溶液を加えます。感度が必要な場合にはHybridSPE-PPTの溶出液を乾固し、少量のLC移動相に再溶解させてください。

2. なぜ、アセトニトリルとギ酸がHybridSPE-PPT法の沈殿液として使用されているのか？

LC-MS分析では、血漿のタンパク質沈殿剤として一般的にアセトニトリルが用いられます。タンパク質沈殿物は「除タンパク (アセトニトリル沈殿法)」により容易にフィルターにかけられ、遠心分離「オフライン-除タンパク (アセトニトリル沈殿法)」により容易にタンパク質のペレットを形成します。

沈殿剤として加える 1-2%のギ酸/アセトニトリルの利点は次の2点です。

- 1) ギ酸は、ほとんどのカルボニル(-COOH)グループより強いLewis塩基としてZr酸性基と関係します。(HybridSPEフェーズ表面に目的物が保有されるのを抑制します) ただし、リン脂質のリン酸塩部分より弱い塩基であるためリン脂質の保持を妨害しません。
- 2) ギ酸による低いpH環境では、シリカ表面の活性シラノールを中和し、塩基成分に対する2次的な陽イオン作用を排除します。

3. もし、対象成分がアセトニトリルに溶解しないときはどうするか？

たとえ対象成分がアセトニトリルに溶解しなくても、タンパク質沈殿後に Hybrid-SPEの溶出液を 75%アセトニトリル (ギ酸を含む) / 25% 水 (生体サンプル由来)とします。水の濃度はLC-MS分析の前に適切な溶解度へ調整する必要があります。

また、1%ギ酸/メタノールが1%ギ酸/アセトニトリルの代用としてHybridSPE-PPT処理に使用できるかもしれません。しかしながら、メタノールでのタンパク質沈殿はアセトニトリルと異なった細かい綿状の沈殿を形成しますので「オフライン-除タンパク (アセトニトリル沈殿法)」を利用して沈殿をペレット状にしてください。「ウェル内-除タンパク (アセトニトリル沈殿法)」ではアセトニトリルと同等の流速が得られないと思われます。

4. 目的物質の分析感度を増加させるため、サンプル量を増やしたり、HybridSPE溶出液を濃縮(乾固と再溶解)させてもよいですか？

300 μ Lを超える生体試料も適用可能です。しかしながら、いくらかのリン脂質が充填剤の許容量を超えブレイクスルーを起こし、目的物質へ影響を起こすかも知れません。300 μ L以下の血漿をHybridSPEフェーズに適用したとき 98-100%のリン脂質を除去します。サンプルボリュームを増加させる際には、必ず沈殿剤 (ギ酸/アセトニトリル) のボリュームをそれに従い増加させてください。血漿:沈殿剤比は1:3(v/v)が最適です。他の目的物質の感度増加法は、HybridSPE溶出液を乾固させ、わずかのLC-MS移動相に再溶解する方法です。HybridSPE溶出液であるアセトニトリルは乾固に適しています。37°Cの窒素気流下で300-400 μ Lは10分未満で乾固します。

5 なぜHybridSPE-PPT処理後でもLC-MSでイオン抑制が残る場合があるのか？

HybridSPE技術は生体サンプルからほとんどのリン脂質とタンパク質沈殿物を取り除きます。生体サンプル中の他の一般的な化学物質もLC /MS/MS分析でイオン化抑制につながる場合があります。

非リン脂質化合物でイオン化抑制に通じる例；

- 抗凝血剤として血中に使用されているクエン酸ナトリウム
- フタレート、可塑剤、およびプラスチックの商品でみられる離型剤
- 多くの薬で一般的媒体であるポリエチレングリコール
- 生体サンプルの保管容器に使われるo-リング、プラスチック、およびシール剤からの抽出物

6. なぜ、HybridSPE-PPTからの溶出ボリュームは、HybridSPE-PPT充填層への添加量より少くなるのか？

また、コンディショニングは必要無いのですか？

HybridSPE充填層のデットボリュームは < 80 μ L です。また、バキュームマニホールドを使用の際に溶出液が揮発します。HybridSPEを-50 Hgで3分間真空引きします (ウェルプレートが通過する時間)。このとき、10-20 μ L のSPE溶出液は真空処理の為に失われる場合があります。したがって、400 μ L (100 μ L 血清 + 300 μ L沈殿剤) の沈殿物を含むサンプルをHybridSPEに通過させた場合、結果として溶出液は300 μ L 程度となります。SPE処理の間に液量の減少はあるものの目的物質の量には大きな影響はみられません。ただし、内部標準物質 (IS) の添加はHybridSPEの処理前にしてください (これは、通常のサンプル前処理の通りです)。サンプル添加前に80 μ L 以上の溶離液でコンディショニングを行うことはデットボリュームの抑制効果があります。最後の溶出量はコンディショニング無しに比べ80 μ L 多くなるでしょう。その結果、希釈され絶対回収率は実際により低く見えます。正しく液量を補正するためには、メスアップや内部標準物質を添加して補正してください。もし、LC-MS分析で対象化合物の感度増加が必要ならば、溶出液を揮発させ少量のLC-MS移動相へ再溶解させることをお勧めします。

7. なぜ100%以上の絶対回収率になるか？

HybridSPE の溶出液には揮発性のあるアセトニトリルを含みます。よって、沈殿するサンプルがHybridSPE 充填層を通過した後は直ぐに真空を開放します。更なる真空を続けるとアセトニトリルが揮発して濃縮される為、LC-MS分析における目的物質の応答を誤って高くさせます。

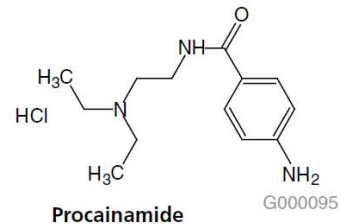
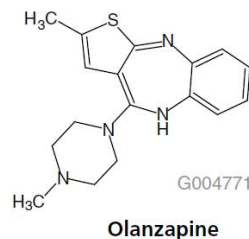
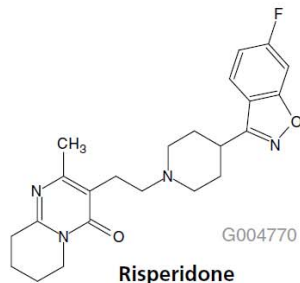
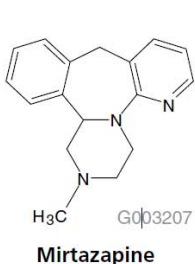
8. なぜ50%以下の、回収率になるか？

80%のケースではギ酸/アセトニトリルを沈殿剤として使い「ウェル内-除タンパク (アセトニトリル沈殿) 法」もしくは「オフライン-除タンパク (アセトニトリル沈殿) 法」で上手くいくでしょう。しかしながら、20%のケースでは目的物質がリン脂質と共に保持され、回収率を50%以下とします。以下へ回収率が低い化合物への対処法を示します。

回収率低下につながる塩基成分(アミン官能基)を含む場合：

- 標準のメソッド (100 μ L血漿 + 300 μ L 1%ギ酸 / アセトニトリル) では、いくつかの成分が低い回収率になる可能性があります。

化合物例:



- 塩基性化合物の回収率が下がるケース
 - HybridSPEシリカ表面のシラノール基 (Si-O) との2次的陽イオン交換作用
 - HybridSPEシリカ表面と対象化合物の2次的HILIC交換作用

対処方法：

- “100 μ L血漿 + 300 μ L 1%ギ酸アンモニウム塩/メタノール溶液”を用いてHybridSPE-PPTの手順に従います。

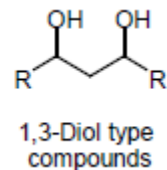
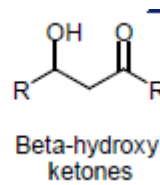
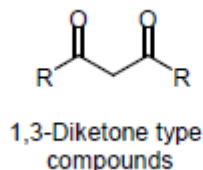
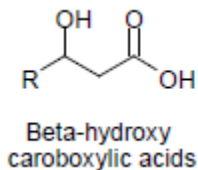
Note:

- 塩基や中性化合物の回収率は40%以下から89%以上に向上します。
- NH₄⁺(ギ酸アンモニウム塩)はH⁺(蟻酸)より強い対イオンで、塩基性化合物がHybridSPEシリカ表面のシラノール基(Si-O)へ保持されるのを抑制します。
- メタノールはアセトニトリルより極性が高くシリカ表面の2次的HILIC相互作用を抑制します。
- “300 μ L 1%ギ酸アンモニウム塩/メタノール溶液”はタンパク質沈殿剤として96-ウェルもしくはカートリッジ手法に従いご利用ください。

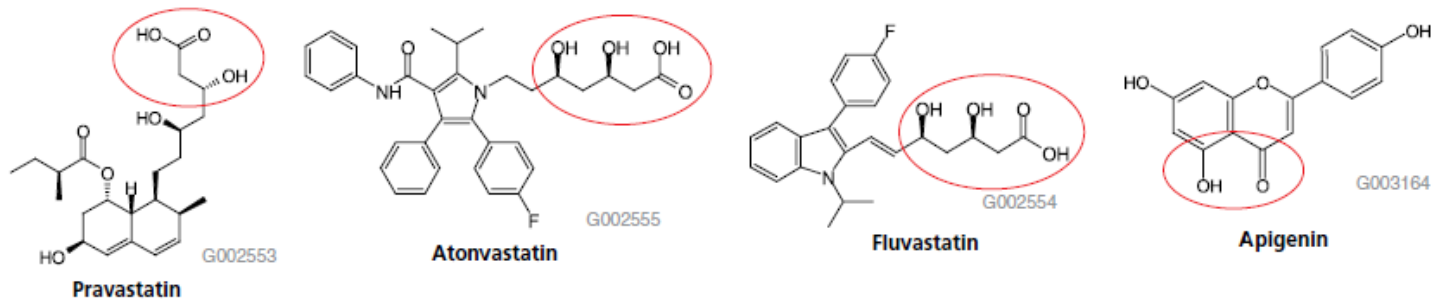
回収率低下につながる酸性の錯体化剤や錯体化剤化合物を含む場合：

- 100 μ L血漿 / 血清 + 300 μ L 1%ギ酸 / アセトニトリルでは、酸性の錯体化剤や錯体化剤化合物は低い回収率になる可能性があります。

HybridSPE-PPTで低い回収率となりえる酸性の錯体化剤例：



錯体化剤を含む化合物例：



対処方法：

- ギ酸より強いルイス塩基であるクエン酸をアセトニトリルに添加し、沈殿剤として使用すると目的成分の保持を抑制すると同時に、一方でリン脂質の保持を可能とします。
- 最初に“400μL 0.5%クエン酸/アセトニトリル溶液”でコンディショニングした後、100μL 血漿 に“100μL 0.5%クエン酸/アセトニトリル溶液”を用い96-ウエルもしくはカートリッジ手法に従いご利用ください。

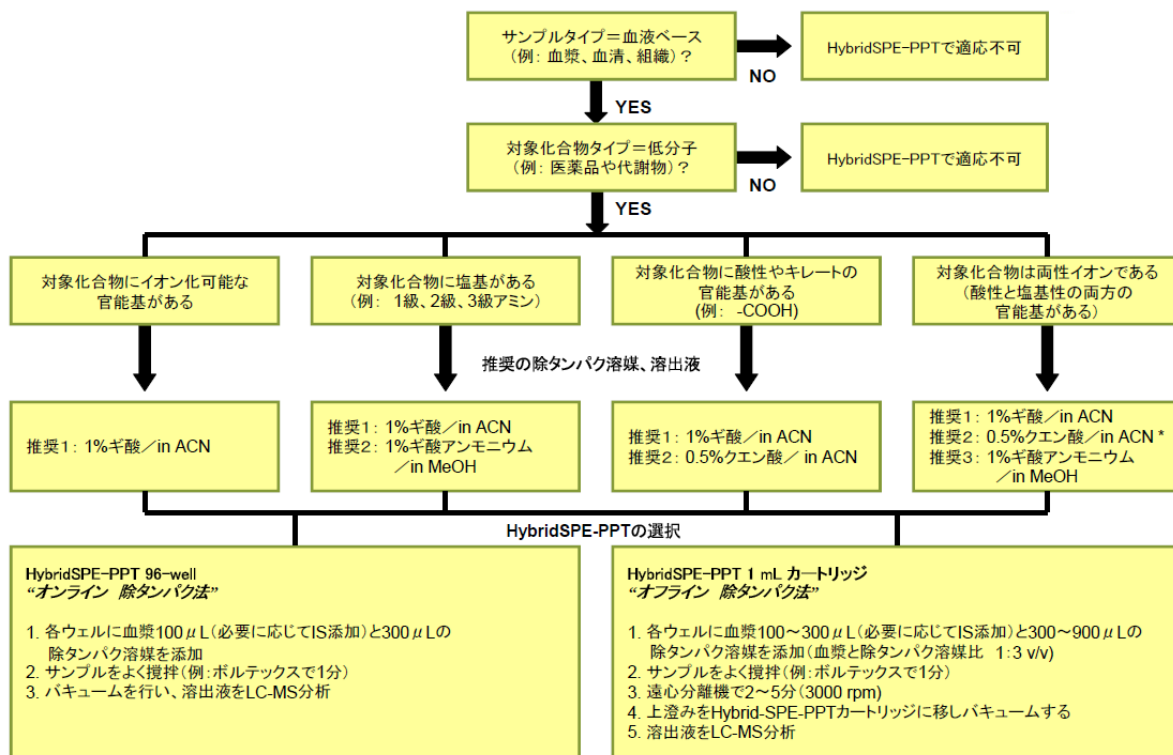
Note:

- 錯体化剤化合物の回収率は40%以下から65~95%以上に向上します。
- クエン酸はギ酸より強いルイス塩基で錯体化剤化合物の保持を抑制します。
- クエン酸は磷酸塩(リン脂質)より弱いルイス塩基なのでHybridSPEフェーズで磷酸塩(リン脂質)が保持されます。

Featured Products

| Description Pkg. | Qty. | Cat. No. |
|--|------------|-------------|
| HybridSPE – Precipitation 96-well Plate, | 50 mg/well | 1 575656-U |
| HybridSPE – Precipitation Cartridge, | 30 mg/1 mL | 100 55261-U |

HybridSPE-PPT メソッド開発フローチャート



*注: 0.5%クエン酸/in ACNを使うとき、事前にHybrid-SPE-PPTウェルもしくはカートリッジを400μLの0.5%クエン酸/in ACNでコンディショニングしてください。Reference, T400005 page10