

親水性ポリマーベース固相抽出カラム&プレート

EVOLUTE® User Guide



EVOLUTE® ユーザーガイド

EVOLUTE充填剤のケミストリー
メソッド開発と最適化

EVOLUTE ABN

EVOLUTE CX

EVOLUTE WCX

EVOLUTE AX

EVOLUTE WAX

流速とボリュームのガイドライン

適切な充填剤の選択方法

EVOLUTE EXPRESSセクションプレート

サンプル前処理用機器& アクセサリー

EVOLUTE注文情報

For more information, please contact Biotage

バイオタージ・ジャパン株式会社

本 社：〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F
TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121

西日本：〒532-0003 大阪市淀川区宮原5-1-28, 4F
TEL 06-6397-8180 FAX 06-6397-8170

URL: <http://www.biotage.co.jp/>
E-mail: Japan_info@biotage.com

© 2012-2013 Biotage. All rights reserved. All brand and product names are trademarks or registered trademarks of their respective companies. The information contained in this document is subject to change without notice.

Part Number:
EVO_UG180216o

親水性ポリマーベース固相抽出カラム&プレート

EVOLUTE® User Guide

Contents	page
EVOLUTE充填剤のケミストリー	3
メソッド開発と最適化	8
EVOLUTE ABN	10
EVOLUTE CX	14
EVOLUTE WCX	16
EVOLUTE AX	18
EVOLUTE WAX	20
流速とボリュームのガイドライン	22
適切な充填剤の選択方法	23
EVOLUTE EXPRESSセクションプレート	25
EVOLUTE EXPRESSセクションプレートのケーススタディ	26
Appendix	
EVOLUTEアプリケーションリスト	28
2pH単位ルールについて	29
Biotage® サンプル前処理用機器& アクセサリ	30
EVOLUTE 製品フォーマット	33
EVOLUTE 注文情報	34



EVOLUTE充填剤のケミストリー

EVOLUTE ABN	あらゆるニーズに対応する親水性ポリマーベース充填剤
EVOLUTE CX	ミックスモード強陽イオン交換充填剤 (塩基性化合物の抽出)
EVOLUTE WCX	ミックスモード弱陽イオン交換充填剤 (強塩基性化合物の抽出)
EVOLUTE AX	ミックスモード強陰イオン交換充填剤 (酸性化合物の抽出)
EVOLUTE WAX	ミックスモード弱陰イオン交換充填剤 (強酸性化合物の抽出)

創 薬研究におけるバイオ分析、臨床サンプル分析または法医学的分析の分野において、あるいは食品検査や環境検査で多様な試料を扱う場合にも、サンプル前処理に用いる製品やメソッドは、メソッド開発とバリデーション、そしてルーチン分析における生産性を確実に左右します。EVOLUTE 充填剤および抽出メソッドは、LC-MS 分析でイオン抑制を引き起こす可能性のあるマトリックス成分を低減あるいは除去しつつ、さまざまな分析ターゲットを抽出するために開発されました。



迅速なメソッド開発 - EVOLUTEのアプローチ

EVOLUTE は、充填剤のパワフルな化学的性質と、さまざまな分析に応用できるジェネリックメソッド (一般メソッド) の組み合わせにより、最適なサンプル前処理を提供します。

本ユーザーガイドの前半部分では、各 EVOLUTE 充填剤についてジェネリックメソッドの詳細を説明しています。これらのジェネリックメソッドは、多様な官能基を持つさまざまな分析ターゲットのための固相抽出メソッド開発を、速やかに進めていただけるよう広範に検証されたものです。さらに、バイオタージ R&D グループによるメソッド最適化のヒントも記載しています。

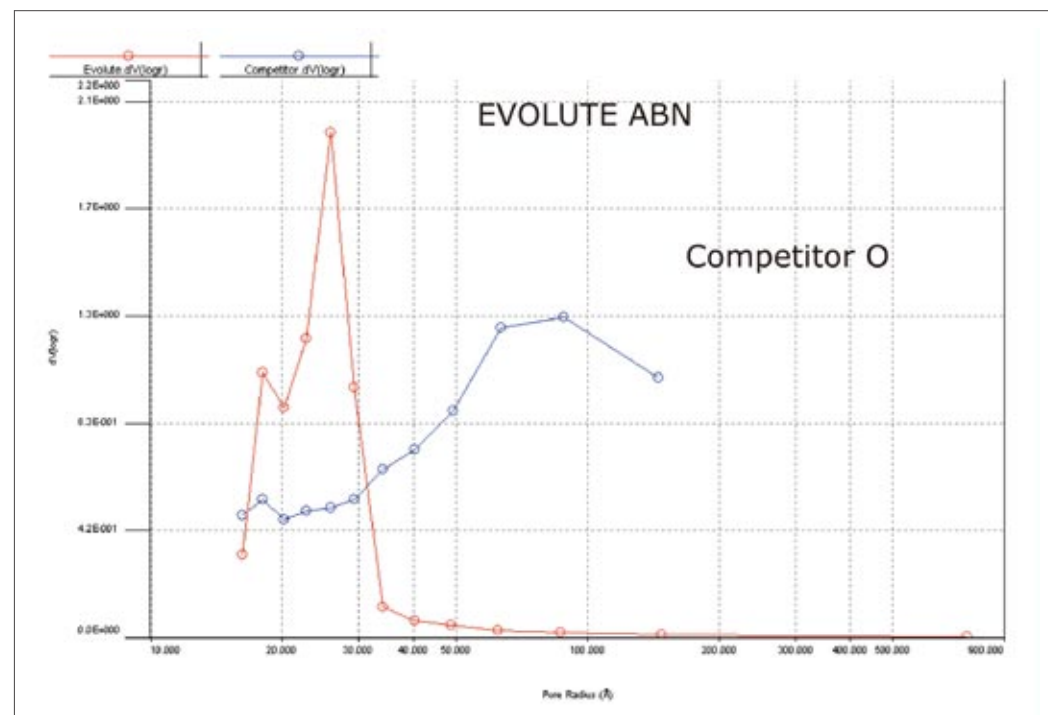
後半部分では、物性が未知の分析ターゲットやペプチドの抽出など、サンプル前処理の複雑な課題において適切な充填剤をスクリーニングできる、EVOLUTE EXPRESS セクションプレートについて説明しています。最も有望な充填剤を選択し、必要に応じて前半部分で説明しているメソッドを参照して、メソッド最適化を進めます。

EVOLUTE充填剤のケミストリー

EVOLUTE 充填剤は、確実に信頼できる固相抽出を実現するために開発されました。極性の水酸基を組み込んだ修飾ポリスチレンジビニルベンゼンポリマーをベースとしています。この非イオン性水酸基がベースポリマーを可湿性に行しているため、EVOLUTEによる固相抽出は処理中の充填剤乾燥による影響を受けません。

EVOLUTE 充填剤のポアサイズ分布は非常に狭く(図1)、血漿タンパク質などを確実に除去し、分析用のクリーンな抽出物が得られるように最適化されています。

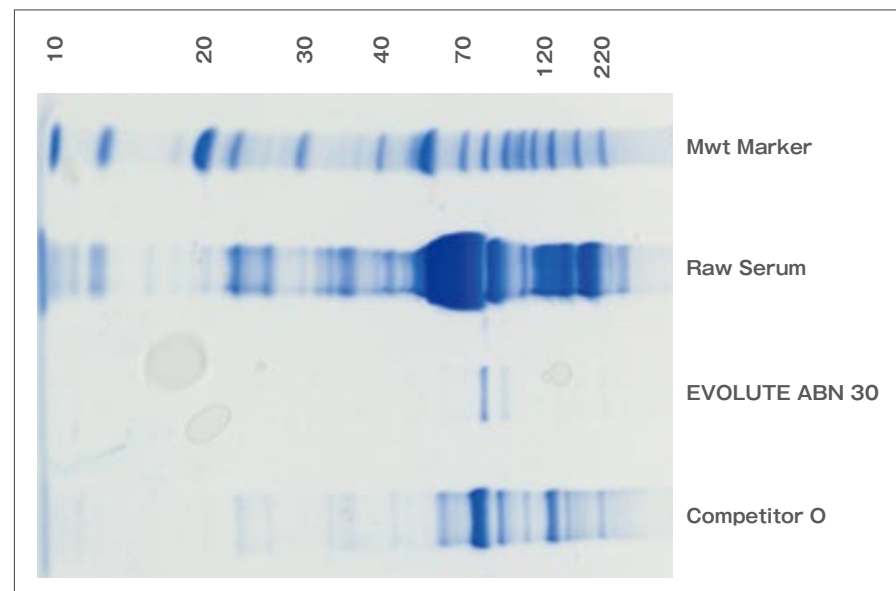
図1 EVOLUTEのポアサイズ分布(他社製ポリマーベースSPE製品との比較)



未処理の血清は、クマシーブルーで染色すると多数のタンパク質バンドを示します。血清をEVOLUTE ABNで処理した後、ゲル電気泳動で解析するとタンパク質のバンドがほとんど見えなくなります。これは、EVOLUTE ABNが生体サンプルからタンパク質を除去していることを示しています(図2)。

タンパク質を除去したサンプルでは、LC-MS分析でのマトリックス効果が抑制されます。また、UPLCシステムの背圧上昇もなくなり、カラムのバックフラッシュや、ガードカラムを頻繁に交換する必要がなくなります。

図2 EVOLUTE ABNによる血清タンパク質の除去(ゲル電気泳動法)



あらゆるニーズに対応するEVOLUTE ABN

EVOLUTE ABNは、非極性保持メカニズムを提供する表面修飾ポリスチレンジビニルベンゼンポリマーをベースとしており、二次相互作用のない優れた水和性をもたらす非イオン化水酸基が組み込まれています(図3)。酸性、塩基性、および中性のさまざまな分析ターゲットを、生体サンプルなどの水系マトリックスから抽出できます。

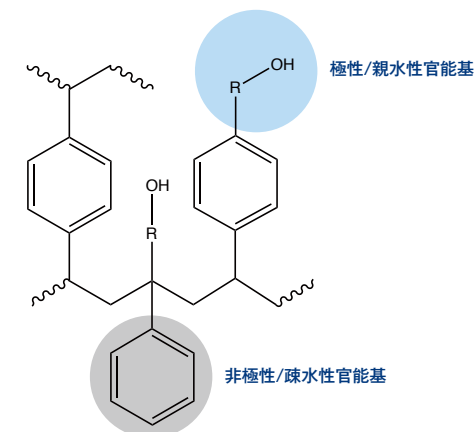


図3 EVOLUTE ABNの構造

選択性の向上とウルトラクリーンな抽出を実現するミックスモード充填剤

EVOLUTEミックスモード充填剤を適切に使用することで、EVOLUTE ABNで抽出できる化合物を、さらに高い選択性で保持し、ウルトラクリーンに抽出することができます。EVOLUTEミックスモード充填剤は、EVOLUTEのベースポリマーをイオン化官能基で修飾したもので、複雑なサンプルの前処理において選択性およびクリーンアップを向上する2重の保持メカニズムを提供します。ミックスモード充填剤は、主にイオン性ターゲットの抽出に用いますが、イオン化マトリックス成分を充填剤ベッドに保持させて、非イオン性ターゲットの抽出に使用することもできます。

EVOLUTE CX

非極性相互作用と強陽イオン交換官能基(-SO₃⁻)¹の作用により、水系サンプルから塩基性化合物を抽出します。交換容量は~0.5mmol/gです。

EVOLUTE WCX

非極性相互作用と弱陽イオン交換官能基(-COOH/-COO⁻, pK_a~5)²の作用により、水系サンプルから強塩基性化合物を抽出します。交換容量は~0.4mmol/gです。

EVOLUTE AX

非極性相互作用と強陰イオン交換官能基(-N(CH₃)₃⁺)¹の作用により、水系サンプルから酸性化合物を抽出します。交換容量は~0.7mmol/gです。

EVOLUTE WAX

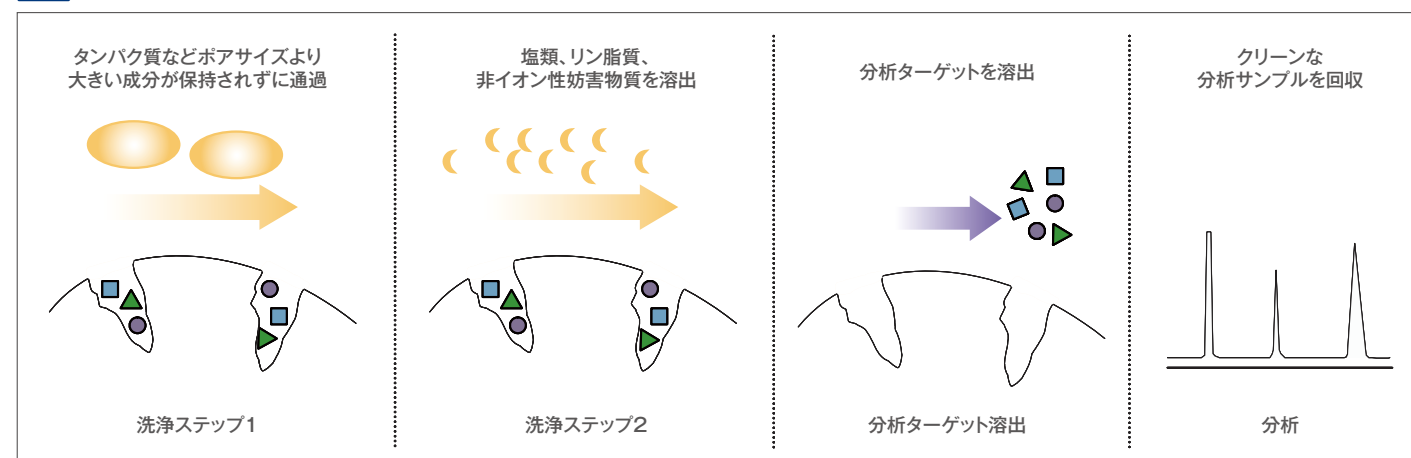
非極性相互作用と弱陰イオン交換官能基(-NH₂/NH₃⁺, pK_a~10)²の作用により、水系サンプルから強酸性化合物を抽出します。交換容量は~0.3mmol/gです。

¹ 強イオン交換充填剤はあらゆるpHコンディションにおいて、常にイオン化しています(永久荷電: permanent charge)。

² 弱イオン交換充填剤はpHコンディションにより非イオン化状態にすることができます。

EVOLUTEミックスモード充填剤では2重の保持メカニズムでターゲットを保持するため、単体の有機溶媒による洗浄が可能です。分析ターゲットの回収率を下げることなく夾雑成分を除去できます(図4)。

図4 EVOLUTEミックスモード充填剤による固相抽出



強イオン交換と弱イオン交換の違い

強イオン交換充填剤がpHにかかわらず常に電荷を帯びているのに対し、弱イオン交換充填剤はpH条件によりイオン化したり、中和されたりします。多くのイオン性分析ターゲットは、強イオン交換充填剤あるいは弱イオン交換充填剤を用いて問題なく抽出できます。分析ターゲットのpK_aと2pH単位ルール(Appendix 参照)により、使用可能な充填剤を選定することができます。

EVOLUTE CXは、-SO₃⁻基により強陽イオン交換能を持ちます。EVOLUTE CX充填剤は、あらゆるpH条件下で常に負電荷を帯びており、幅広い正電荷を帯びた塩基種／陽イオン種の抽出に使用できます。ただし、強塩基(第4級塩)はEVOLUTE CXに不可逆的に結合してしまうため、pH調整による溶出ができません(図5参照)。

EVOLUTE WCXは、カルボン酸基により弱陽イオン交換能を持ちます。EVOLUTE WCX充填剤のpK_aは約5で、pH7以上で完全に負電荷を帯び、pH3以下で完全に中和されます。EVOLUTE WCXは、強塩基や第4級アミンを含む正電荷を帯びた塩基種／陽イオン種の抽出に幅広く使用でき、低いpH条件で強塩基や第4級アミンを溶出できます(図5参照)。

EVOLUTE AXは、-N(CH₃)₃⁺基により強陰イオン交換能を持ちます。EVOLUTE AXは、あらゆるpH条件下で常に正電荷を帯びており、幅広い負電荷を帯びた酸性種／陰イオン種の抽出に使用できます。ただし、スルホン酸のような強酸はEVOLUTE AXに不可逆的に結合してしまうため、pH調整による溶出ができません(図6参照)。

EVOLUTE WAXは、アミン基により弱陰イオン交換能を持ちます。EVOLUTE WAX充填剤のpK_aは約10で、pH8以下で完全に正電荷を帯び、pH12以上で完全に中和されます。EVOLUTE WAXは、強酸を含む酸性種／陰イオン種の抽出に幅広く使用でき、高いpH条件で強酸を溶出できます(図6参照)。

サンプルロードおよび洗浄ステップでのpH調整は、弱イオン交換充填剤を用いる場合には特に重要となります。例えば、pHが充填剤pK_aと同じ場合、充填剤の50%が電荷を帯びます(イオン交換能は最大交換能の半分)。

弱陽イオン交換充填剤は、そのpK_aより2単位上のpHで最大のイオン交換能を示します(EVOLUTE WCXの場合はpH7以上)。また、弱陰イオン交換充填剤は、そのpK_aより2単位下のpHで最大のイオン交換能を示します(EVOLUTE WAXの場合はpH8以下)。

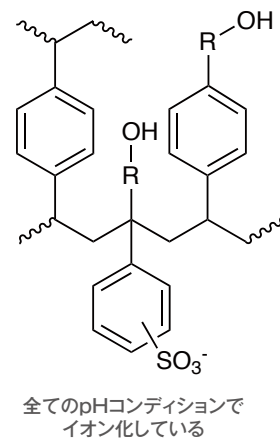
弱イオン交換充填剤と強イオン交換充填剤のいずれかを選択する際は、溶出溶媒のpH条件におけるターゲット化合物の安定性や、溶出溶媒と抽出後の分析手法との適合性を考慮して検討してください。例えば、塩基性分析ターゲットがEVOLUTE CX充填剤の高pH条件下で不安定な場合には、EVOLUTE WCXを使用した酸性溶媒での溶出を検討してください。

図5 EVOLUTEミックスモード陽イオン交換充填剤による塩基性化合物の抽出

塩基性化合物抽出のための選択肢

EVOLUTE CXはスルホン酸基で修飾されています。このマイナスに帯電した充填剤は、非極性相互作用と陽イオン交換により塩基性化合物を保持します。保持された化合物は、**化合物側の**ポジティブチャージを解除する高いpH環境で溶出されます。

EVOLUTE CX



EVOLUTE WCXはカルボキシル基で修飾されています。この充填剤は、非極性相互作用と弱陽イオン交換により塩基性化合物を保持します。保持された化合物は、**充填剤側の**ネガティブチャージを解除する低いpH環境で溶出されます。

EVOLUTE WCX

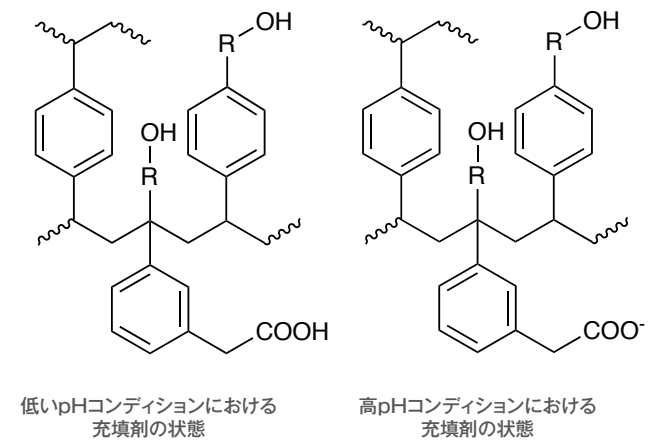
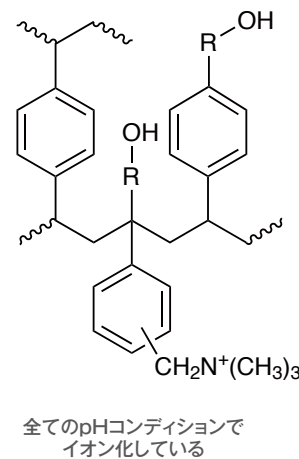


図6 EVOLUTEミックスモード陰イオン交換充填剤による酸性化合物の抽出

酸性化合物抽出のための選択肢

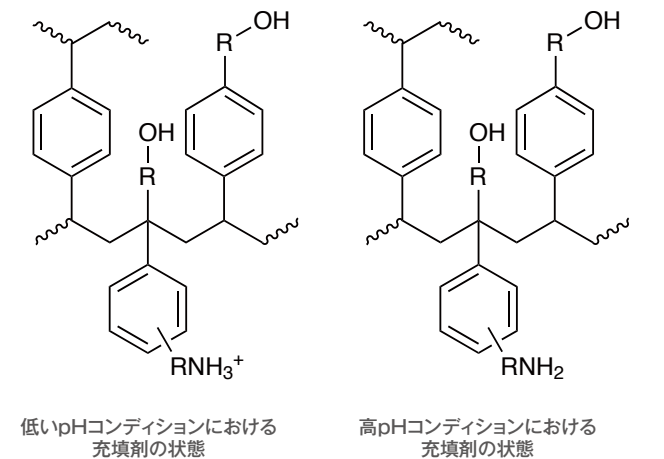
EVOLUTE AXは第4級アミンで修飾されています。このプラスに帯電した充填剤は、非極性相互作用と強陰イオン交換により酸性化合物を保持します。保持された酸性化合物は、**化合物側の**ネガティブチャージを解除する低いpH環境で溶出されます。

EVOLUTE AX



EVOLUTE WAXはアミノ基で修飾されています。この充填剤は、非極性相互作用と弱陰イオン交換により酸性化合物を保持します。保持された化合物は、**充填剤側の**ポジティブチャージを解除する高いpH環境で溶出されます。

EVOLUTE WAX



EVOLUTEのフォーマット

EVOLUTE 充填剤は、幅広いアプリケーションに対応するため、96 ウェルプレートから6mL カラムまで豊富なフォーマットで提供しています。EVOLUTE EXPRESS 96 ウェルプレートフォーマットは、生体サンプルのハイスループット処理に特に理想的です。ウェル間で非常に均一なフローを保ち、血漿、血清、および尿サンプルを速い流速で処理することができます。また、ウェルの詰まりが起こらず、分析ターゲットの回収率を高め、データのばらつきを低減します。EVOLUTE 固相抽出プレート及びカラムの処理には、バキュームマニホールドや加圧マニホールドをお使いください。なお、自動固相抽出装置でもスムーズにお使い頂けるよう、EVOLUTE 充填剤の粒径は厳しく管理されています。



EVOLUTE EXPRESSのLoad-Wash-Eluteメソッド

EVOLUTE EXPRESS プレートは多くのアプリケーションにおいて、一般的な固相抽出メソッドに必要なコンディショニングステップと平衡化ステップが不要です。処理時間を短縮し、生産性を向上させることができます。本ユーザーガイドに記載しているEVOLUTE ジェネリックメソッドでは、EVOLUTE EXPRESS プレートを使用する際に省略できる処理ステップを明記しています。適切な充填剤の選択には「EVOLUTE EXPRESS セレクションプレート」を活用でき、その後のメソッド最適化についても本ユーザーガイドに記載しています。

EVOLUTE充填剤で抽出可能な化合物

EVOLUTE は、非極性（疎水性）保持メカニズムやイオン交換保持メカニズム（表 1）により、下に示す化合物を水系サンプルから抽出できます。単一化合物の抽出のみでなく、複数化合物の一斉抽出にも対応できます。

EVOLUTE 充填剤で抽出可能な化合物

- ☐ 中性化合物
- ☐ 弱酸性化合物 (pKa 2-8)
- ☐ 弱塩基性化合物 (pKa 2-10)
- ☐ 両性化合物 (酸性官能基と塩基性官能基の両方を持つ化合物)
- ☐ 酸性、塩基性及び中性化合物の混合サンプル (分別も可能)
- ☐ 強酸性化合物 (pKa < 2)
- ☐ 強塩基性化合物 (pKa > 10)

表 1 EVOLUTE 充填剤の保持メカニズム

充填剤	保持メカニズム	非極性	強陽イオン交換	弱陽イオン交換	強陰イオン交換	弱陰イオン交換
EVOLUTE ABN	非極性	●				
EVOLUTE CX	非極性/-SO ₃ ⁻	●	●			
EVOLUTE WCX	非極性/ -COO ⁻ /-COOH	●		●		
EVOLUTE AX	非極性/- (CH ₃) ₃ ⁺	●			●	
EVOLUTE WAX	非極性/ -NH ₃ ⁺ /-NH ₂	●				●

適切な充填剤の選択

サンプル前処理において、正しい充填剤を選択し、適切なメソッドを採用することは非常に重要です。複数の選択肢が存在するケースもしばしばありますが、バイオタージはターゲット化合物とサンプルクリーンアップのニーズに基づいて、適切な充填剤の選択肢と処理メソッドを提案します。疎水性（非極性）相互作用が可能な化合物を水系サンプルから抽出するには、単一の非極性保持メカニズムを持つ EVOLUTE ABN 充填剤が推奨されます。疎水性の程度およびマトリックスの複雑さに基づいて処理メソッドを最適化することで、マトリックス成分を最小限まで除去できます。イオン性官能基を持つ酸性あるいは塩基性化合物については、非極性およびイオン交換保持メカニズムを組み合わせたミックスモード充填剤を用いることで、ターゲットに対する選択性が高まり、よりクリーンな抽出物が得られます。ミックスモード充填剤は、ターゲット化合物に対する 2 重の保持メカニズムを持ち、夾雑物質を強力に除去する溶媒洗浄が可能となるため、リン脂質などを含む生体サンプルからの化合物抽出に特に役立ちます。表 2 に、化合物の官能性に基づく、適切な充填剤の選択肢を示しています。それぞれの充填剤には速やかにメソッド開発が行えるようジェネリックメソッドがあります（10-21 ページ）。

塩基性化合物の抽出

塩基性化合物の抽出には 2 種類のミックスモード充填剤を検討します。一つは EVOLUTE CX で、pKa 2-10 のターゲット化合物に使用できます。EVOLUTE CX は非極性保持と強陽イオン交換保持メカニズムを提供し、両性化合物の抽出や混在する複数のターゲット化合物を分画（フラクション）も可能です。強塩基性化合物（第 4 級アミンまたは pKa > 10）の抽出には EVOLUTE WCX が選択肢となります。

酸性化合物の抽出

酸性化合物の抽出には 2 種類のミックスモード充填剤を検討します。一つは EVOLUTE AX で、pKa 2-8 の酸性ターゲット化合物に使用できます。EVOLUTE AX は非極性保持と強陰イオン交換保持メカニズムを提供します。強酸性化合物（pKa < 2）の抽出には EVOLUTE WAX が選択肢となります。

表 2 EVOLUTE 充填剤選択表

充填剤	ABN (10 ページ)	CX (14 ページ)	WCX (16 ページ)	AX (18 ページ)	WAX (20 ページ)
中性化合物	●				
弱酸性化合物 (pKa 8)	●			●	
強酸性化合物 (pKa < 2)	●				●
弱塩基性化合物 (pKa 2-10)	●	●			
強塩基性化合物 (pKa > 10)	●		●		
両性化合物	●	●		●	
酸性/中性/塩基性化合物の混合サンプル	●				
酸性/中性/塩基性化合物の分画抽出		●			

EVOLUTE ABN

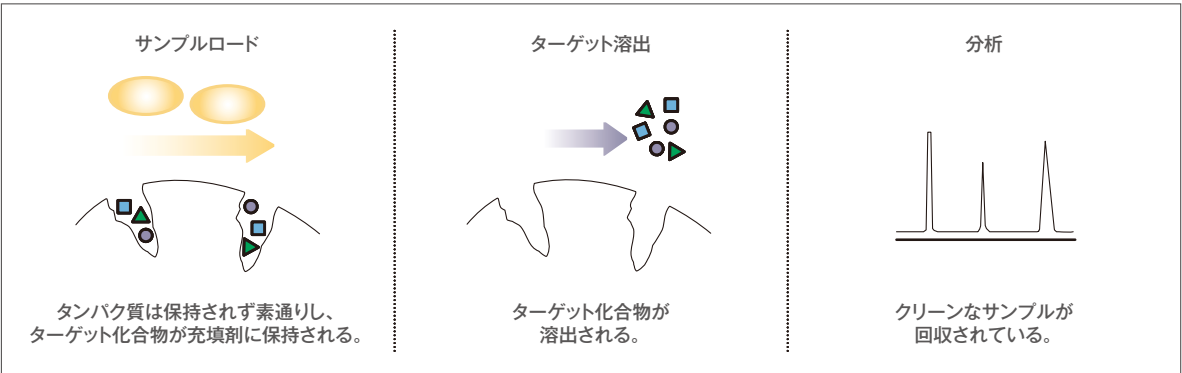
EVOLUTE ABNメソッド開発と最適化

EVOLUTE ABNは、頑強な非極性(疎水性/逆相)保持メカニズムを用いて、多様な酸性、塩基性、あるいは中性分析ターゲットを水系サンプルから抽出するために開発されました。二次相互作用が起こらないため、シンプルな溶媒系を用いて高回収率で分析ターゲットを抽出できます。ボアサイズが狭い範囲に分布しているため、主に生体サンプルの抽出でタンパク質を効果的に取り除くことができます(図7)。

EVOLUTE ABNが適しているケース

- ☐ シンプル/迅速/頑強な固相抽出メソッドが求められるとき
- ☐ 複雑なサンプルを処理するとき(例. 生体サンプルなど)
 - 中性化合物
 - 酸性/中性/塩基性化合物の混合サンプル
- ☐ サンプルが比較的クリーンなとき(例. 飲料水)
 - 複数のターゲット化合物を抽出するとき
 - 酸性/中性/塩基性化合物の抽出
- ☐ ターゲット化合物が不安定な場合(高いpH条件あるいは低いpH条件を避ける必要があるとき)
- ☐ シンプルな溶媒交換ステップが必要なとき(水系→有機溶媒)メソッドが求められるとき

図7 EVOLUTE ABNによる固相抽出



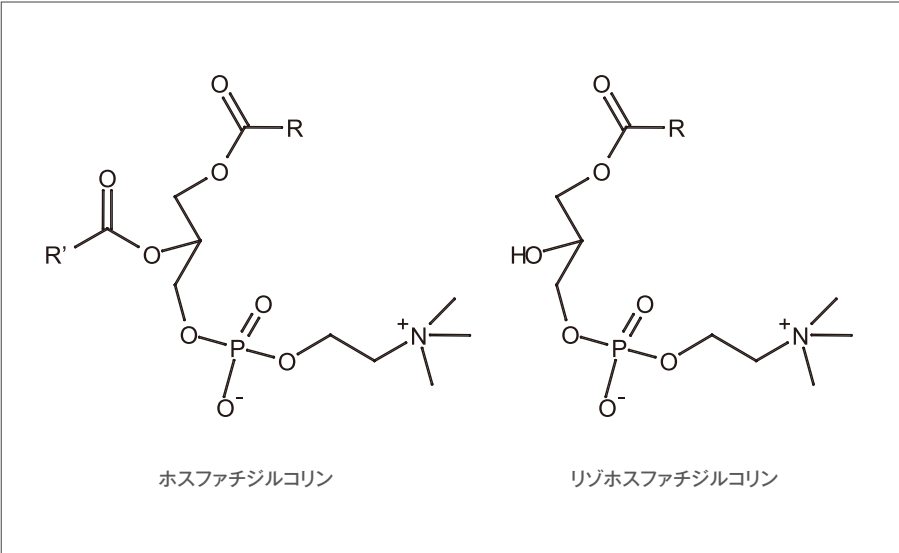
EVOLUTE ABN ジェネリックメソッド バイオサンプルからの酸性/塩基性/中性化合物の抽出		
ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	サンプルを2%ギ酸で希釈する(1:3, v/v)	タンパク結合を解除する
コンディショニング*	メタノール(1mL)	
平衡化*	0.1% ギ酸(1mL)	酸性で不安定な化合物の場合には、中性または塩基性条件下で処理可能
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする(400μL-2mL)	
洗 淨	水/メタノール(95/5, v/v, 1mL)	極性夾雑物質の除去(塩、タンパク質、大きなリン脂質)
溶 出	メタノール(500μL)	ターゲットの溶出
必要に応じて溶媒留去および再溶解		

記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22 ページの表4をご覧ください。
*EVOLUTE EXPRESSのLoad-Wash-Eluteメソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

EVOLUTE ABNを用いたリン脂質除去の最適化

生体サンプルから薬物を抽出するアプリケーションでは、非極性(疎水性)保持メカニズムを利用したポリマーベースの固相抽出製品が汎用されていますが、これらの製品に使用されているポリマーの非選択性により、リン脂質などサンプルに含まれる夾雑成分が高レベルで同時抽出されてしまう可能性があります。

リン脂質は、その保持特性のため、LC-MS 分析のサンプル前処理でしばしば問題となります。リン脂質分子種はサンプル前処理の段階で取り除かれない限り、LC-MS 分析中に分析ターゲットと共に溶出され、イオンサプレッションやイオンエンハンスメントを引き起こす原因になります。除タンパク法との比較においては、EVOLUTE ABNのジェネリックメソッドでは高分子量のリン脂質(PL)の90%以上が除去されますが、リゾリン脂質(Lyso PL)の除去率は35%程度に止まります。このジェネリックメソッドを分析ターゲットの性質に合わせて改良することで、リン脂質の除去率は著しく改善されます。その結果、純度の高い抽出物が得られ、信頼性の高い定量が可能となります。



ケースA：非極性(疎水性)化合物の場合

ターゲット化合物が充填剤に強く保持されている場合には、洗浄ステップで水/アセトニトリル(60/40, v/v)を使用することで、リン脂質及びリゾリン脂質の96%を除去することができ、ターゲット化合物の回収率に影響を与えることなくリン脂質除去を大幅に改善することができます(図9-1)。

ケースA：EVOLUTE ABN ジェネリックメソッド 非極性ターゲット化合物抽出時のリン脂質除去強化メソッド		
ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	サンプルを2%ギ酸で希釈する(1:3, v/v)	タンパク結合を解除する
コンディショニング*	メタノール(1mL)	
平衡化*	0.1% ギ酸(1mL)	酸性で不安定な化合物の場合には、中性または塩基性条件下で処理可能
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする(400μL-2mL)	
洗 淨	水/アセトニトリル(60/40, v/v, 1mL)	極性夾雑物質の除去(塩、タンパク質、及びリン脂質) リン脂質除去率: 94% リゾリン脂質除去率:96%
溶 出	メタノール(500μL)	ターゲットの溶出
必要に応じて溶媒留去および再溶解		

記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22 ページの表4をご覧ください。
*EVOLUTE EXPRESSのLoad-Wash-Eluteメソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

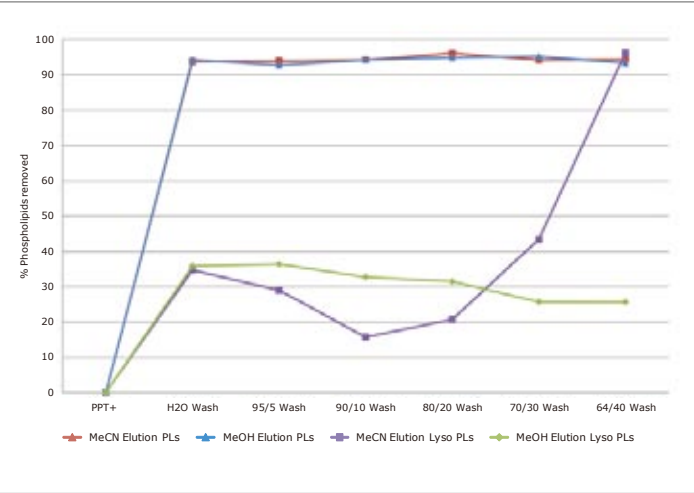
ケースB：極性化合物の抽出ケース

ターゲット化合物の極性が高く、充填剤への保持が弱い場合には、溶出溶媒に20%以上の水が含まれるよう調整することで、ターゲット化合物の回収率に影響を与えることなくリン脂質の溶出を最小限に抑えることができます(図9-2)。

ケースB：EVOLUTE ABN ジェネリックメソッド 極性ターゲット化合物抽出時のリン脂質除去強化メソッド		
ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	サンプルを2%ギ酸で希釈する(1:3, v/v)	タンパク結合を解除する
コンディショニング*	メタノール(1mL)	
平衡化*	0.1% ギ酸(1mL)	酸性で不安定な化合物の場合には、中性または塩基性条件下で処理可能
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする(400μL-2mL)	
洗 浄	水/メタノール(95/5, v/v, 1mL)	極性夾雑物質の除去(塩、タンパク質、大きなリン脂質)
溶 出	メタノール/水(80/20, v/v, 500μL)	ターゲットの溶出(リゾリン脂質の溶出を抑えることができる)
必要に応じて溶媒留去および再溶解		

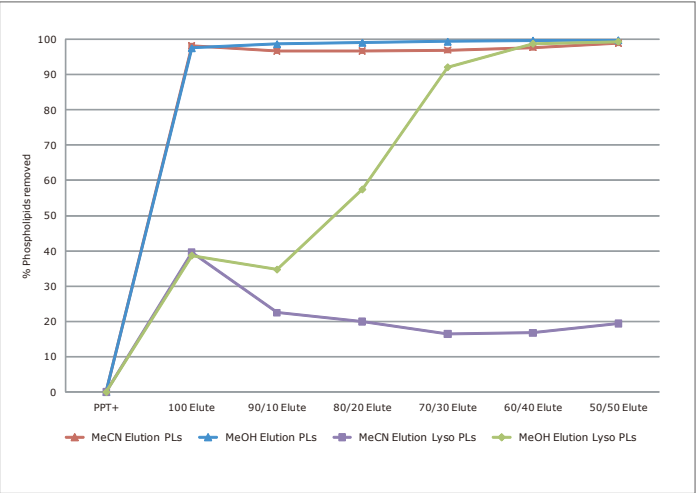
記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22 ページの表4をご覧ください。
*EVOLUTE EXPRESS のLoad-Wash-Eluteメソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

図9-1 洗浄溶媒がリン脂質除去に与える影響



アセトニトリル/水(60/40, v/v)を洗浄ステップで用いるEVOLUTE ABN ジェネリックメソッドでは、タンパク質沈殿法(PPT+)と比較して94%のリン脂質、96%のリゾリン脂質を除去することができる。

図9-2 溶出溶媒がリン脂質除去に与える影響



メタノール/水(80/20, v/v)を溶出溶媒として用いるEVOLUTE ABN ジェネリックメソッドでは、タンパク質沈殿法(PPT+)と比較して60%弱のリゾリン脂質を除去することができる。

EVOLUTE ABNメソッド最適化のヒント

極性化合物や酸性化合物の弱い保持を、サンプルロードステップや洗浄ステップで改善する方法:

処理中のpH環境がターゲット化合物のpKaより2単位下²になるよう、平衡化ステップや洗浄ステップでバッファーを使用することを検討してください。

酸性ターゲット化合物の溶出を改善する方法:

ターゲット化合物の溶出は、ターゲット化合物の溶出溶媒への溶解性に依存しています。揮発性の酸性物質を添加することで回収率が改善します。酸性ターゲット化合物は、ターゲット化合物のpKaより2単位下のpHで最大の溶解性を示します。～ 0.1%程度 of ギ酸-メタノールの使用を検討してください。

極性化合物や塩基性化合物の弱い保持を、サンプルロードステップや洗浄ステップで改善する方法:

処理中のpH環境がターゲット化合物のpKaより2単位上²になるよう、平衡化ステップや洗浄ステップでバッファーを使用することを検討してください。

塩基性化合物の溶出を改善する方法:

ターゲット化合物の溶出は、ターゲット化合物の溶出溶媒への溶解性に依存しています。揮発性の塩基性物質を添加することで回収率が改善します。塩基性ターゲット化合物は、ターゲット化合物のpKaより2単位上²のpHで最大の溶解性を示します。～ 5%程度 of アンモニア-メタノールの使用を検討してください。

粘性の高いサンプルの取り扱い:

特に粘性の高いサンプルは、サンプルフローの特性を改善するため、希釈倍率を上げてください。

酸に不安定な化合物の場合:

血漿など、内因性タンパク質を高濃度を含むバイオサンプルにおいては、サンプル希釈の際にギ酸を用いることで、タンパク質に強く結合した化合物の回収率を改善させることができます。しかし、ターゲット化合物が酸に不安定な場合(ラクトン類など)には中性条件でも対応可能です。このようなケースには、0.1M酢酸アンモニウムを使用したサンプル希釈を推奨します。尿サンプルの中和が必要な場合には、サンプル希釈とカラムの平衡化にイオン強度の弱いバッファー(20-50mM)を使用してください。

² "2pH単位ルール" についての詳細についてはAppendixをご覧ください。

EVOLUTE CX

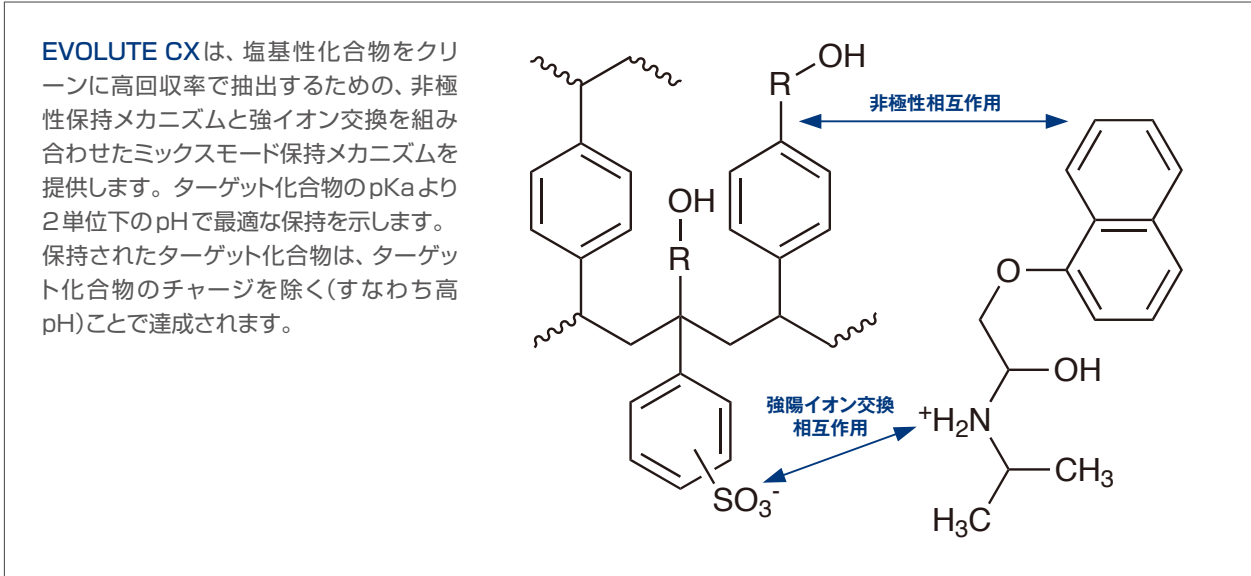
EVOLUTE CXを用いた塩基性化合物抽出のためのメソッド開発と最適化

EVOLUTE CXは、スルホン酸官能基で表面修飾されたEVOLUTE 骨格を持ち(交換容量約0.5mmol/g)、ミックスモード非極性/強陽イオン交換保持メカニズムを提供します(図10)。塩基性分析ターゲットが選択的に保持され、EVOLUTE CX ジェネリックメソッドに示したシンプルな洗浄ステップで、タンパク質、塩、非イオン性干渉成分、およびリン脂質などのマトリックス成分が除去され、信頼性の高い定量分析が可能になります。血漿サンプルを処理した場合には、タンパク質とリン脂質の98%以上が除去されます。

EVOLUTE CXが適しているケース

- ☐ 塩基性化合物(pKa 2-10)
- ☐ EVOLUTE ABN による非極性保持メカニズムのみで保持するには極性が高すぎる塩基性化合物の抽出
- ☐ 両性化合物
- ☐ 複雑なサンプルの分画(塩基性化合物から中性化合物と酸性化合物を分離)
- ☐ 高いpHの溶出溶媒に安定な化合物の抽出
- ☐ 塩基性夾雑物の選択的な保持

図10 EVOLUTE CXの構造と相互作用



EVOLUTE CXジェネリックメソッド バイオサンプルからの塩基性化合物の抽出		
ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	サンプルを0.05M酢酸アンモニウムpH6.0で希釈する(1:3, v/v)	タンパク結合を解除あるいは弱める。 ターゲット化合物が血漿や血清中でタンパク質に結合している場合には2%ギ酸で希釈する。
コンディショニング*	メタノール(1mL)	
平衡化*	0.05M酢酸アンモニウムpH6.0(1mL)	
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする(400μL-2mL)	ターゲット化合物は非極性保持メカニズムで保持される。
洗浄 1	0.05M酢酸アンモニウムpH6.0(1mL)	極性夾雑物質の除去(塩、タンパク質、及びリン脂質)。
洗浄 2	メタノール(1mL)	ターゲット化合物は陽イオン交換保持メカニズムで保持されている。 残存しているリン脂質と中性及び酸性の夾雑物を除去する(中性及び酸性の化合物の回収が可能)。
溶出	メタノール/水酸化アンモニウム(95/5, v/v, 500μL-1mL)	ターゲット化合物のチャージをキャンセルしてターゲットを回収する。

必要に応じて溶媒留去および再溶解

記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22 ページの表4をご覧ください。
*EVOLUTE EXPRESS のLoad-Wash-Elute メソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

試薬の調整

- 0.05M 酢酸アンモニウム pH6.0：酢酸アンモニウム3.854gを脱イオン水(950mL)に溶解する。
酢酸(ACS reagent grade)でpH 6.0に調整し、脱イオン水で1Lまでメスアップして完全に混和する。
- メタノール/水酸化アンモニウム(95/5, v/v)溶液：水酸化アンモニウム(28%)5mLにメタノール95mLを加え、完全に混和する。

EVOLUTE CXメソッド最適化のヒント

両性化合物:回収率で妥協することなく、カルボキシル基とアミン基を共にもつ両性化合物を抽出する方法(ベンゾイルエクゴニンなど)	洗浄 1 ステップの後に、2% ギ酸による洗浄ステップを追加してください。アミン基を中和し、陽イオン交換保持が確実に起こるようにします。
極性塩基性化合物:回収率で妥協することなく、pKa8以上程度の化合物を、よりクリーンに抽出する方法	洗浄 1 ステップの後に、2% ギ酸による洗浄ステップを追加してください。リン脂質を除去し、同時にアミン基を固定("lock on")することで、次のメタノール洗浄ステップで溶出されないようにします。
全血サンプルの処理方法:	0.05M 酢酸アンモニウム pH6.0 で希釈した後、ソニケートし、遠心分離してください。2% ギ酸は、サンプルを変色させるので使用しないでください。
非常に極性の高い塩基性化合物の抽出:	ターゲット化合物の極性が非常に高く、且つ、サンプルマトリックスの性質(ミルク、全血など)により2% ギ酸によるサンプル希釈が行えない場合には、中程度の pH(例えば pH5 程度)のバッファーをサンプル希釈、平衡化及び洗浄 1 ステップに用いてください。

EVOLUTE WCX

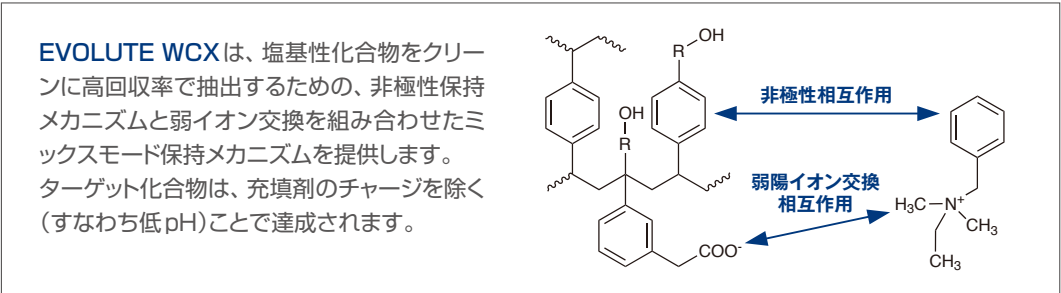
EVOLUTE WCXを用いた強塩基性化合物抽出のためのメソッド開発と最適化

EVOLUTE WCXは、カルボン酸官能基で表面修飾されたEVOLUTE 骨格を持ち(交換容量約0.4mmol/g)、ミックスモード非極性/弱陽イオン交換保持メカニズムを提供します(図 11)。弱酸性の溶出条件との組み合わせにより、生体サンプルや他の水系サンプルから強塩基性ターゲット化合物(第4級アミンを含む)を抽出できるため、EVOLUTE CX 充填剤で塩基性化合物に対する保持が強すぎる場合に、有効な選択肢となります。塩基性溶出条件下で不安定な塩基の抽出にも有用です。EVOLUTE WCX ジェネリックメソッドに示したシンプルな洗浄ステップで、タンパク質、塩、非イオン性干渉成分、およびリン脂質などのマトリックス成分が除去され、信頼性の高い定量分析が可能になります。

EVOLUTE WCXが適しているケース

- ☐ 第4級アミン
- ☐ 強塩基性化合物(pKa > 10)：ジェネリックメソッド 1 を利用
- ☐ 強塩基を含む塩基性化合物の混合物：ジェネリックメソッド 2 を利用
- ☐ 高いpH環境で不安定な塩基：メソッド 2 を利用
- ☐ 塩基性化合物で、LC-MS/MS 分析との互換性により酸性の溶出条件が望ましい場合
- ☐ EVOLUTE CXからの溶出が難しい塩基性化合物

図 11 EVOLUTE WCXの構造と相互作用



EVOLUTE WCXジェネリックメソッド1
バイオサンプルからの強塩基の抽出 (pKa > 10、第4級アミンを含む)

ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	サンプルを水酸化アンモニウム (95:5,v/v) で希釈する (1:3, v/v)	タンパク結合を解除あるいは弱める。ターゲット化合物が血漿や血清中でタンパク質に結合している場合には2%ギ酸で希釈する。
コンディショニング*	メタノール (1mL)	
平衡化*	水/水酸化アンモニウム(95:5, v/v)(1mL)	
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする (400μL-2mL)	ターゲット化合物は非極性保持メカニズムで保持される。
洗 浄 1	水/水酸化アンモニウム(95:5, v/v)(1mL)	極性夾雑物質の除去 (塩、タンパク質、及び分子量の大きなリン脂質)。
洗 浄 2	メタノール (1mL)	ターゲット化合物は陽イオン交換保持メカニズムで保持されている。残存しているリン脂質と中性、酸性及び弱塩基性の夾雑物を除去する。
溶 出	メタノール/ギ酸 (98/2, v/v, 500μL-1mL)	充填剤のチャージをキャンセルしてターゲットを回収する。

必要に応じて溶媒留去および再溶解

記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22 ページの表 4 をご覧下さい。
*EVOLUTE EXPRESS の Load-Wash-Elute メソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

EVOLUTE WCXジェネリックメソッド2
バイオサンプルからの弱塩基、強塩基及び高pHで不安定な塩基性化合物の抽出

ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	0.05M 酢酸アンモニウムpH7.0でサンプルを希釈する (1:3, v/v)	タンパク結合を解除あるいは弱める。ターゲット化合物が血漿や血清中でタンパク質に結合している場合には2%ギ酸で希釈する。
コンディショニング*	メタノール (1mL)	
平衡化*	0.05M 酢酸アンモニウムpH7.0 (1mL)	
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする (400μL-2mL)	ターゲット化合物は非極性保持メカニズムで保持される。
洗 浄 1	0.05M 酢酸アンモニウムpH7.0 (1mL)	極性夾雑物質の除去 (塩、タンパク質、及び分子量の大きなリン脂質)。
洗 浄 2	メタノール (1mL)	ターゲット化合物は陽イオン交換保持メカニズムで保持されている。残存しているリン脂質と中性及び酸性の夾雑物を除去する。
溶 出	メタノール/ギ酸 (98/2, v/v, 500μL-1mL)	充填剤のチャージをキャンセルして塩基性ターゲットを回収する。

必要に応じて溶媒留去および再溶解

記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22 ページの表 4 をご覧下さい。
*EVOLUTE EXPRESS の Load-Wash-Elute メソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

試薬の調整

- 水 / 水酸化アンモニウム (95:5, v/v)：28% 水酸化アンモニウム溶液 5mL に水を加え、100mL までメスアップし、完全に混和する。
- 0.05M 酢酸アンモニウム pH7.0：酢酸アンモニウム 3.854 g を脱イオン水 (950mL) に溶解する。脱イオン水で 1L にメスアップして完全に混和し、水酸化アンモニウムで pH 7.0 に調整する。
- メタノール / ギ酸溶液 (98/2, v/v)：98% ギ酸 2mL にメタノール 98mL を加え、完全に混和する。

EVOLUTE ECXメソッド最適化のヒント

弱塩基性の夾雑物を含むサンプルの処理

EVOLUTE WCX ジェネリックメソッド 1 で処理してください。洗浄 2 ステップで弱塩基が溶出され、最終回収サンプルには混入しません。

pKa 9 以下のターゲット化合物は pH の高い溶媒で溶出できます (たとえば、メタノール / 水酸化アンモニウム (95/5, v/v) など)。酸性条件で夾雑物が溶出される場合には、この方法により最終回収サンプルの清浄度が向上する可能性があります。

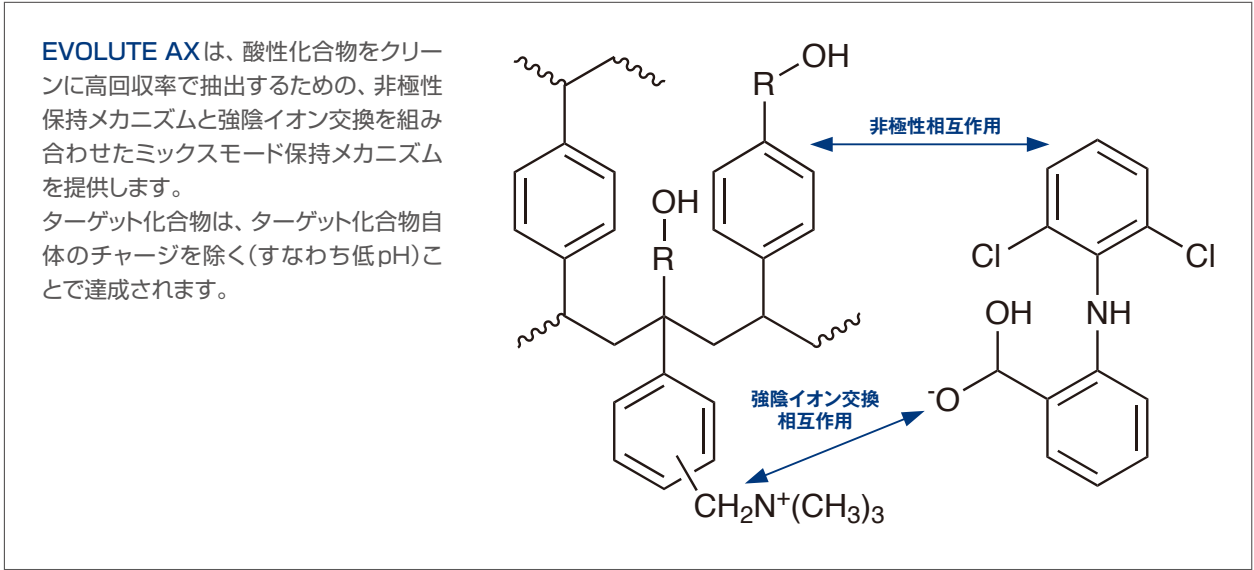
EVOLUTE AXを用いた酸性化合物抽出のためのメソッド開発と最適化

EVOLUTE AXは、塩化物対イオンを持つ第4級アミン官能基で表面修飾されたEVOLUTE 骨格を持ち(交換容量約0.7mmol/g)、ミックスモード非極性/強陰イオン交換保持メカニズムを提供します(図 12)。酸性分析ターゲットが選択的に保持され、EVOLUTE AXジェネリックメソッドに示したシンプルな洗浄ステップで、タンパク質、塩、非イオン性干渉成分、およびリン脂質などのマトリックス成分が除去されます。

EVOLUTE AXが適しているケース

- ☐ 酸性化合物の抽出(pKa 2-8)

図12 EVOLUTE AXの構造と相互作用



EVOLUTE AXジェネリックメソッド バイオサンプルからの酸性化合物の抽出		
ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	サンプルを2%ギ酸で希釈する (1:3,v/v)	タンパク結合を解除あるいは弱める。
コンディショニング*	メタノール (1mL)	
平衡化*	水 (1mL)	
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする (400μL-2mL)	ターゲット化合物は非極性保持メカニズムで保持される。
洗 浄 1	0.05M 酢酸アンモニウムpH7.0/ メタノール (95/5, v/v, 1mL)	極性夾雑物質の除去(塩、タンパク質、及び分子量の大きなリン脂質)。
洗 浄 2	メタノール (1mL)	ターゲット化合物は陰イオン交換保持メカニズムで保持されている。 残存しているリン脂質と中性及び塩基性の夾雑物を除去する。
溶 出	メタノール/ギ酸 (98/2, v/v, 500μL-1mL)	ターゲット化合物のチャージをキャンセルして酸性ターゲットを回収する。

必要に応じて溶媒留去および再溶解

記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22 ページの表 4 をご覧下さい。
*EVOLUTE EXPRESSのLoad-Wash-Elute メソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

試薬の調整

- 0.05M 酢酸アンモニウム pH7.0：酢酸アンモニウム 3.854g を脱イオン水 (950mL) に溶解する。脱イオン水で 1L にメスアップして完全に混和し、水酸化アンモニウムで pH 7.0 に調整する。
- メタノール/ギ酸溶液 (98/2, v/v)：98% ギ酸 2mL にメタノール 98mL を加え、完全に混和する。

EVOLUTE AXメソッド最適化のヒント

尿サンプルの処理

サンプルを50mM 酢酸アンモニウム pH 7.0 で希釈してください(サンプルが酸性化しないようにする)。これにより、尿中に含まれる極性の高い酸性物質の溶出を防ぐことができ、最終回収サンプルの清浄度を向上させることができます。

サンプルを希釈する際、アセトニトリルなど非プロトン性で極性の高い溶媒を用いると、極性化合物(たとえばエチルグルクロニド：EtG など)の保持を高め、よりクリーンな抽出が可能になる場合があります。

極性の高い酸性化合物の場合には、サンプルロードと洗浄ステップで含まれる塩及び酸の量を減らすことで、保持性の改善が期待できます。

EVOLUTE WAX

EVOLUTE WAXを用いた強酸性化合物抽出のためのメソッド開発と最適化

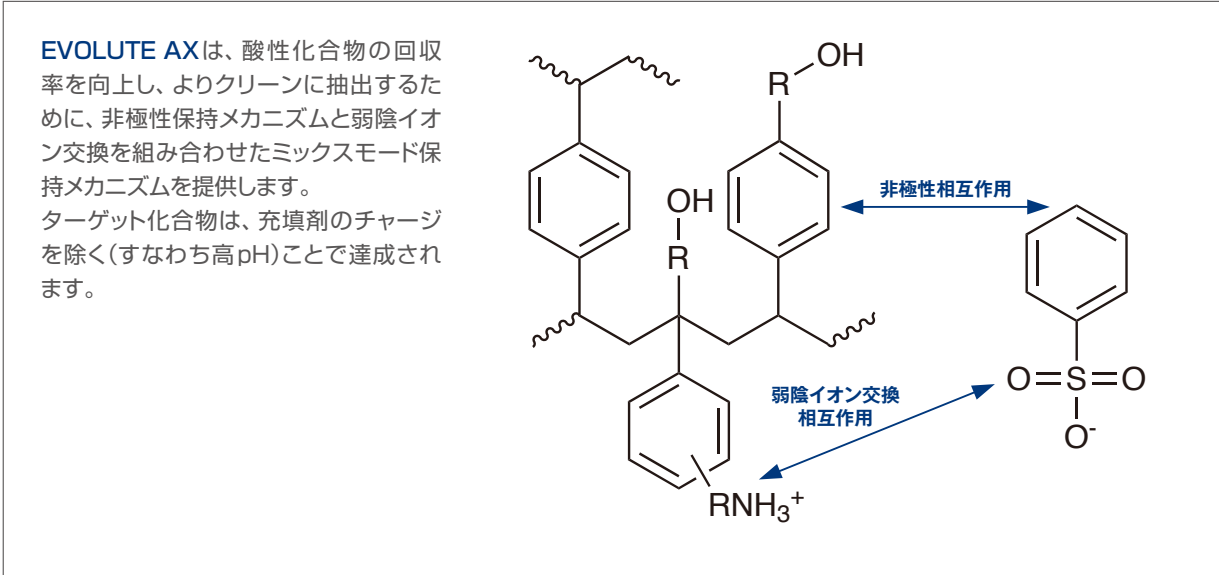
EVOLUTE WAXは、遊離塩基の第1-第2級アミン官能基で表面修飾されたEVOLUTE 骨格を持ち(交換容量約0.3mmol/g^{*})、ミックスモード非極性/弱陰イオン交換保持メカニズムを提供します(図13)。EVOLUTE WAX ジェネリックメソッドに示したシンプルな洗浄ステップで、タンパク質、塩、非イオン性干渉成分、およびリン脂質などのマトリックス成分が除去され、信頼性の高い定量分析が可能になります。

※ 粒径50μmのEVOLUTE WAX充填剤では0.7mmol/g

EVOLUTE WAXが適しているケース

- ☐ リン酸アルキルやスルホン酸アルキルなどの強酸性ターゲット化合物(pKa<2)
- ☐ EVOLUTE AX の溶出ステップで用いられる低pH環境に不安定だが塩基性pH環境で安定な酸性化合物の抽出
- ☐ EVOLUTE AX で溶出が難しい酸性化合物の抽出

図12 EVOLUTE WAXの構造と相互作用



EVOLUTE WAXジェネリックメソッド バイオサンプルからの酸性化合物の抽出		
ステップ	条件	効果
サンプルの希釈	サンプルを2%ギ酸で希釈する(1:3,v/v)	タンパク結合を解除あるいは弱める。 このpH条件でも、強酸はネガティブチャージを保つ。
コンディショニング*	メタノール(1mL)	
平衡化*	2%ギ酸(1mL)	
サンプルロード	希釈したサンプルをロードする(400μL-2mL)	ターゲット化合物は非極性保持メカニズムで保持される。
洗 浄 1	2%ギ酸(1mL)	極性夾雑物質の除去(塩、タンパク質、及び分子量の大きなリン脂質)。
洗 浄 2	メタノール(1mL)	ターゲット化合物は陰イオン交換保持メカニズムで保持されている。 残存しているリン脂質と中性及び塩基性の夾雑物を除去する
溶 出	メタノール/水酸化アンモニウム (95/5, v/v, 500μL-1mL)	充填剤のチャージをキャンセルして酸性ターゲットを回収する。

必要に応じて溶媒留去および再溶解

記載した液量は25mgまたは30mg 充填剤に適しています。他のフォーマットにおける推奨液量については22ページの表4をご覧ください。
*EVOLUTE EXPRESSのLoad-Wash-Eluteメソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

試薬の調整

- 2%ギ酸：98%ギ酸2mLを水で100mLにメスアップし、完全に混和する。
- メタノール/水酸化アンモニウム(95/5, v/v) 溶液：28%水酸化アンモニウム5mLにメタノール95mLを加え、完全に混和する。

EVOLUTE WAXメソッド最適化のヒント

低分子の酸性化合物の回収率を最大にする方法

ターゲット化合物の破過を防ぐために脱イオン水によるサンプル希釈、平衡化及び洗浄を検討してください。

流速とボリュームのガイドライン

10 ～ 21 ページに記載されたEVOLUTE ジェネリックメソッドをベースにして、表3に示した流速と表4に示したサンプル/溶媒量を参考に、メソッド開発を行ってください。

流速のガイドライン

バイオタージのプレート製品及びシリンジカラム製品は、一般的なバキュームマニホールド、加圧マニホールド及び遠心装置で処理することができます。

表3 カラムサイズによる流速の目安

カラムサイズ	96ウェルプレート	1mL カラム、 10mL “G” カラム	3mLカラム、 10mL “H” カラム	6mL “C” カラム
流 速	1mL/min	1mL/min	3mL/min	7mL/min

流速最適化のヒント

カラムやプレートを実際に処理する前に、適切な流速になるようバキュームマニホールドや加圧マニホールドをセットしてください。可能であれば、サンプルロード時には減圧や加圧を停止してください。これにより、一定の流速で通液することが可能になり、分析の正確度が向上します。最適な前処理条件が分かったのち、流速はスループットを最大にするよう調整できます。最終的には、破過が起こる限界流速よりの10-20% 遅い流速で処理するようにしてください。

100mg/3mLフォーマットであれば、-1 "Hgの減圧で2mL/minの流速となります。

粒径50μmの充填剤の場合、サンプルや溶媒の流速は、重力下で1mL/min 以上となります。しかし、粘性の高いサンプルを処理する場合には、特にサンプルロードや1 回目の水系溶媒での洗浄の際に、減圧や加圧を強める必要がある場合があります。

ボリュームのガイドライン

表4 充填剤の充填量によるサンプル/溶媒量の目安

ステップ	充填量					
	10mg	25mg & 30mg	50mg	100mg	200mg	500mg
コンディショニング**	500μL	1mL	2mL	3mL	6mL	6mL
平衡化**	500μL	1mL	2mL	3mL	6mL	6mL
サンプルロード	200μL	200-400μL	サンプル中のターゲット化合物の濃度によりアプリケーションごとに異なる			
洗浄1 & 2	500μL	1mL	2mL	3mL	6mL	6mL
溶 出	200μL	500μL-1mL	ターゲット化合物と使用する溶媒により異なる (最低でも充填剤容量の2-5倍の溶媒が必要*)			

※ 充填剤容量：充填剤 100mg当たり溶媒約200μL
※※ EVOLUTE EXPRESSのLoad-Wash-Eluteメソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

ボリューム最適化のヒント

溶出回数を分けることで溶出ボリュームの総量を削減できる場合があります。

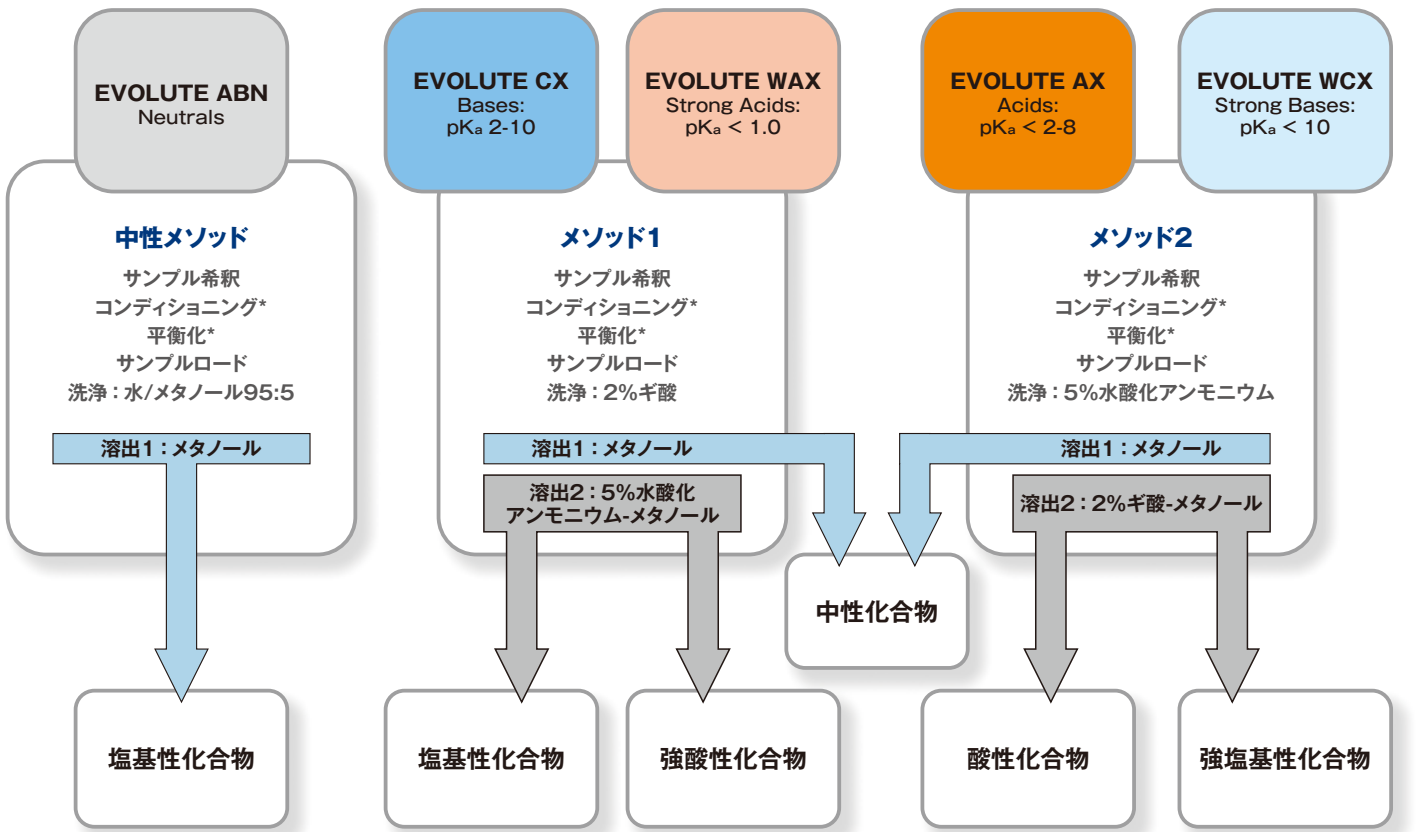
例：2mL×1 回抽出⇔1mL×2回抽出

一度、ターゲット化合物を高回収率で抽出する条件が分かった後に溶媒ボリュームを検討すると、溶媒使用量を削減できる場合があります。

適切な充填剤の選択方法

複雑な分析ターゲットの混合物、未知の物質、あるいは双性イオンの分析では、どの充填剤を最初に評価するべきかが分かりかねる場合があります。このセクションでは、メソッド開発を迅速に行うためのシンプルなアプローチ(図14)を説明します。

図14 充填剤の選択とメソッド評価の概要



*EVOLUTE EXPRESSのLoad-Wash-Eluteメソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

保持メカニズムの選択

大きく分けて、非極性保持メカニズムとイオン交換保持メカニズムがあります。

充填剤の選択肢1
EVOLUTE ABNによる非極性保持

多くの場合、非極性保持メカニズムによる固相抽出は良い結果を示します。10-13 ページに記載した方法で検討してください。

充填剤の選択肢2
ミックスモードイオン交換保持

シンプルなアプローチで4種類のミックスモードイオン交換充填剤を評価することができ、複雑なサンプルの前処理に適切な充填剤を特定することができます。24 ページを参照して、使用する充填剤の選択と評価を行ってください。

イオン交換充填剤の選択と評価

ターゲット化合物の官能基に着目して充填剤と評価メソッド(メソッド 1 またはメソッド 2)を選定します。

EVOLUTE CXによる塩基の抽出 EVOLUTE WAXによる強酸の抽出	メソッド1で評価
EVOLUTE AXによる酸の抽出 EVOLUTE WCXによる強塩基の抽出	メソッド2で評価

メソッド1：EVOLUTE CXによる塩基の抽出またはEVOLUTE WAXによる強酸の抽出

EVOLUTE CX 塩基性ターゲット (pKa 2-10)	Method 1	EVOLUTE WAX 強酸性ターゲット (pKa<2)
中性化合物と酸性化合物が溶出 ターゲット化合物のチャージを取り除くことにより塩基性ターゲットを溶出	サンプルの希釈： 4%リン酸 (H ₃ PO ₄) で1:1で希釈する コンディショニング*：メタノール 平衡化*：水 サンプルロード 洗浄：2% ギ酸水溶液 溶出1：メタノール 溶出2：5%水酸化アンモニウム-メタノール	中性化合物と塩基性化合物が溶出 充填剤のチャージを取り除くことにより強酸性ターゲットを溶出

- 中性ターゲット化合物または未知の化合物については溶出 1 を回収し分析する
- 塩基性ターゲット化合物または強酸性ターゲット化合物については溶出 2 を回収し分析する

*EVOLUTE EXPRESS のLoad-Wash-Elute メソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

メソッド2：EVOLUTE AXによる酸の抽出またはEVOLUTE WCXによる強塩基の抽出

EVOLUTE AX 酸性ターゲット(pKa 2-8)	Method 2	EVOLUTE WCX 強塩基性ターゲット(pKa>10)
中性化合物と塩基性化合物が溶出 ターゲット化合物のチャージを取り除くことにより酸性ターゲットを溶出	サンプルの希釈： 4%リン酸 (H ₃ PO ₄) で1:1で希釈する *コンディショニング：メタノール *平衡化：水 サンプルロード 洗浄：5% 水酸化アンモニウム水溶液 溶出1：メタノール 溶出2：2%ギ酸-メタノール	中性化合物と酸性化合物が溶出 充填剤のチャージを取り除くことにより強塩基性ターゲットを溶出

- 中性ターゲット化合物または未知の化合物については溶出 1 を回収し分析する
- 酸性ターゲット化合物または強塩基性ターゲット化合物は溶出 2 を回収し分析する

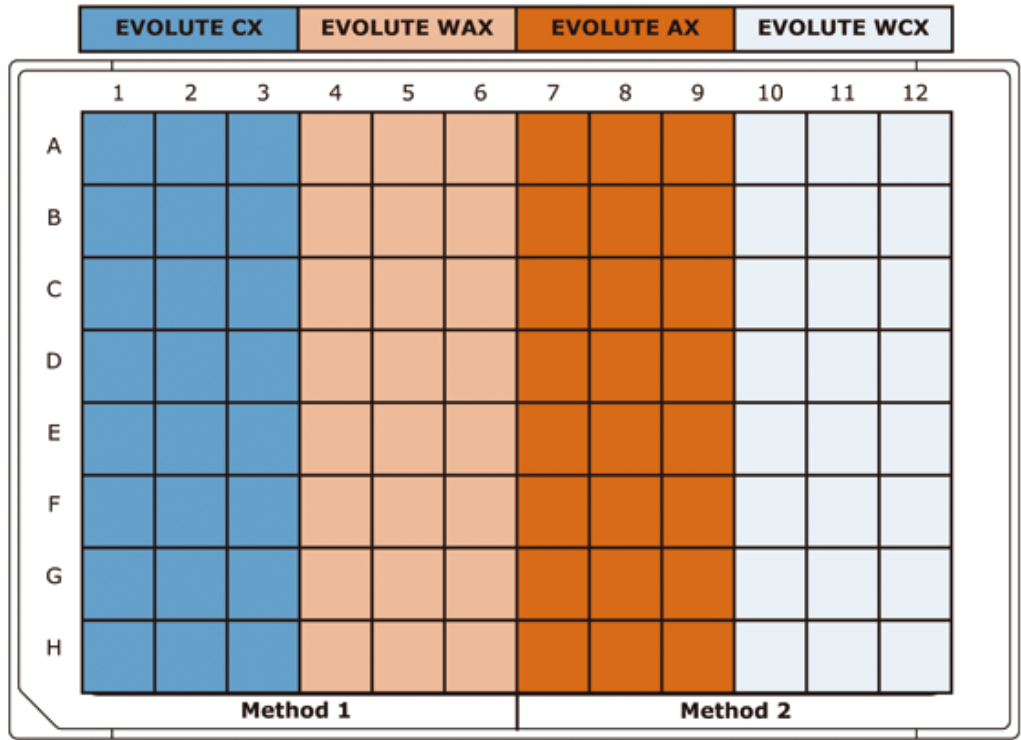
*EVOLUTE EXPRESS のLoad-Wash-Elute メソッドでは、コンディショニングと平衡化のステップは不要です。

中性化合物は2通りのメソッドのいずれでも、「溶出 1」で溶出します。中性化合物が含まれる場合や物性が不明の化合物が抽出されている場合には回収し、分析してください。

EVOLUTE EXPRESSセレクションプレート

EVOLUTE EXPRESS セレクションプレートは、4 種類の EVOLUTE ミックスモードイオン交換充填剤を 1 枚のプレートで評価できます。各ウェルの充填量は 30mg です。24 ページに記載した 2 通りのメソッドを参考にして、最適な充填剤の検討にお役立てください。

図15 EVOLUTE EXPRESSセレクションプレートのレイアウト



EVOLUTE EXPRESS セレクションプレートを使用する際には、下に示すメソッドで処理してください。

- 1-3列 EVOLUTE CX：メソッド1**
 - 溶出1：酸性化合物、中性化合物及び未知の化合物
 - 溶出2：塩基性化合物
- 4-6列 EVOLUTE WAX：メソッド1**
 - 溶出1：塩基性化合物、中性化合物及び未知の化合物
 - 溶出2：強酸性化合物
- 7-9列 EVOLUTE AX：メソッド2**
 - 溶出1：塩基性化合物、中性化合物及び未知の化合物
 - 溶出2：酸性化合物
- 10-12列 EVOLUTE WCX：メソッド1**
 - 溶出1：酸性化合物、中性化合物及び未知の化合物
 - 溶出2：強塩基性化合物

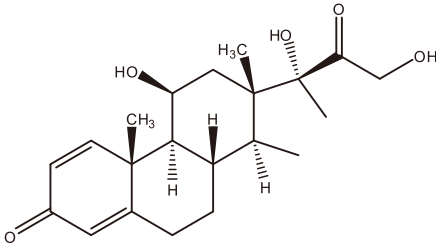
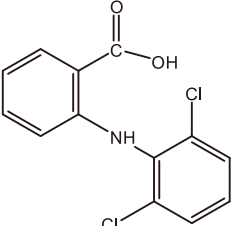
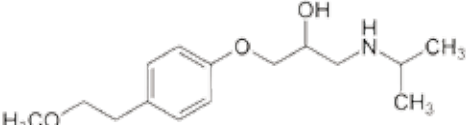
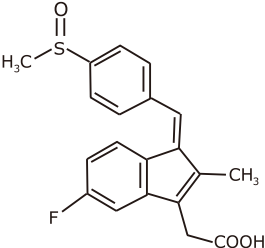
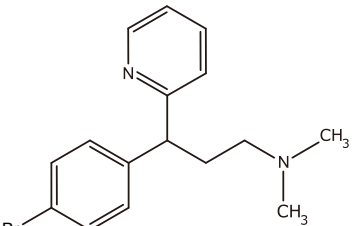
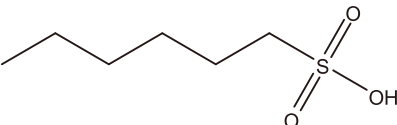
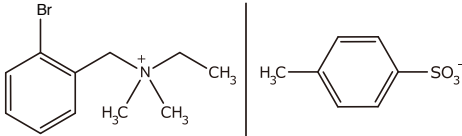
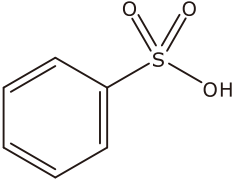
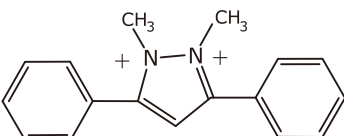
この方法で適切なメソッド/充填剤が選択された後、ターゲットの回収率と清浄度を向上するために、さらにメソッド最適化が必要な場合があります。14-21 ページに記載したジェネリックメソッドや、メソッド開発におけるヒントを参考にしてください。

EVOLUTE EXPRESS

セレクションプレートのケーススタディ

EVOLUTE EXPRESS セレクションプレートと評価メソッド 1 及び 2 を、典型的な官能基を持つ一連の化合物を用いて評価し、得られた結果を表 5 にまとめました。なお、結果は 24 ページに記載したメソッドにより得られたもので、メソッド最適化は行っていません。

評価に使用した化合物の構造

ターゲット化合物の官能基	構 造	ターゲット化合物の官能基	構 造
中 性	 プレドニゾン	酸	 ジクロフェナク pKa=4.0
塩 基	 メトプロロール pKa=9.5	酸	 スリダク pKa=4.7
塩 基	 ブロムフェニラミン pKa=3.5	強 酸	 ヘキサンスルホン酸 pKa<1
強塩基	 ブレチリウムトシレート pKa>10	強 酸	 ベンゼンスルホン酸 pKa<1
強塩基	 ジフェンゾコート pKa>10		

結果

表 5 EVOLUTE EXPRESSセレクションプレートを用いて前処理した代表的な化合物の回収率

ターゲット	クラス/官能基	充填剤	メソッド	回収率 (%, n=7)	RSD
プレドニゾン	中性 (溶出1ステップで溶出)	いずれでも可	1 or 2	97.6 (n=21)	3.9
メトプロロール	塩基	EVOLUTE CX	1	95.8	5.4
ブロムフェニラミン	塩基	EVOLUTE CX	1	108.7	4.5
ブレチリウムトシレート	強塩基	EVOLUTE WCX	2	102.0	4.8
ジフェンゾコート	強塩基	EVOLUTE WCX	2	99.6	3.9
スリダク	酸	EVOLUTE AX	2	93.2	4.3
ジクロフェナク	酸	EVOLUTE AX	2	92.6	2.4
ヘキサンスルホン酸	強酸	EVOLUTE WAX	1	88.1	6.9
ベンゼンスルホン酸	強酸	EVOLUTE WAX	1	93.9	3.3

結論

EVOLUTE EXPRESS セレクションプレートとシンプルに効率化された評価用メソッドが、さまざまな分析ターゲットを高回収率で抽出するサンプル前処理メソッドとして有用であることが、複雑なメソッド開発を行うことなく確認された。

EVOLUTEアプリケーションリスト

EVOLUTE 固相抽出製品は、血漿、尿、全血、水、ミルク、組織抽出液を含む多様なサンプルマトリックスからの、幅広い薬物を良好に抽出できることが確認されています。バイオタージでは、今後も継続してアプリケーションを開発します。最新のアプリケーション情報は、サンプル前処理メソッドデータベース(www.biotage.com/applications)にて随時ご提供いたします。

EVOLUTEで抽出した化合物の例

Acetazolamide (アセタゾラミド)	Fluoxetine (フルオキセチン)
Amiloride (アミロライド)	Fluvoxamine (フルボキサミン)
Amitriptyline (アミトリプチリン)	Furosemide (フロセミド)
Anhydroecgonine methyl ester (アンヒドロエクゴニンメチルエステル)	Hexanesulfonic acid (ヘキサンスルホン酸)
Atenolol (アテノロール)	Hydrochlorothiazide (ハイドロクロロサザイド)
Bendroflumethiazide (ベンドロフルメチアジド)	Hydroflumethiazide (ヒドロフルメチアジド)
Benzenesulfonic acid (ベンゼンスルホン酸)	Ibuprofen (イブプロフェン)
Benzoylecgonine (ベンゾイルエクゴニン)	Labetalol (ラベタロール)
Bretylum tosylate (ブレチリウムトシレート)	Mefenamicacid (メフェナム酸)
Brompheniramine (ブロムフェニラミン)	Melamine (メラミン)
Bumetanide (ブメタニド)	Mephedrone (メフェドロン)
Carbamazepine (カルバマゼピン)	Methazolamide (メタゾールアミド)
Chlormequat (クロルメコート)	Metoprolol (メトプロロール)
Citalopram (シタロプラム)	Mianserin (ミアンセリン)
Cocaethylene (コカエチレン)	Naltrexone (ナルトレキソン)
Cocaine (コカイン)	Neostigmine (ネオスチグミン)
Diclofenac (ジクロフェナク)	Norcocaine (ノルコカイン)
Diethyldithiophosphate (DEDTP)	Norepinephrine (ノルエピネフリン)
Diethylphosphate (ジエチルリン酸)	Oxprenolol (オクスプレノロール)
Diethylthiophosphate (DETP)	Paroxetine (パロキセチン)
Difenzoquat (ジフェンゾコート)	Procainamide (プロカインアミド)
Dimethyldithiophosphate (DMDTP)	Propranolol (プロプラノロール)
Dimethylphosphate (DMP)	Quinidine (キニジン)
Dimethylthiophosphate (DMTP)	Ranitidine (ラニチジン)
Dopamine (ドーパミン)	Salbutamol (サルブタモール)
Ecgonine methyl ester (エクゴニンメチルエステル)	Sotalol (ソタロール)
Epinephrine (エピネフリン)	Spironolactone (スピロラクトン)
Erythromycin (エリスロマイシン)	Sulfamethoxazole (スルファメトキサゾール)
Ethacrynic acid (エタクリニック酸)	THC-COOH (テトラヒドロカナビノール)
Ethyl glucuronide (エチルグルクロニド)	Trimethoprim (トリメトプリム)

2012年9月現在

2pH 単位ルールについて

分子の官能基のpKaは、その官能基が溶液中で50%がチャージされ、残りの50%のチャージがないときのpHと定義されています。pHが1変化すると、このチャージ状態の割合は10倍ずつ変化します。したがって、pKaより2pH単位離れた条件で抽出を行うことは、官能基の95.5%が望ましいイオン化状態になるという点で理にかなっています。

例 弱酸性化合物 (pKa 4.0) の酸解離率に対するpHの影響

pH	% 遊離酸	% 解離
2.0	99.5	0.5
3.0	95	5.0
4.0	50	50
5.0	5.0	95
6.0	0.5	99.5

pKa 4.0の弱酸性化合物を最も強く充填剤に保持させるには

- 非極性保持メカニズム：サンプルをpH2に調整する(pKaより2pH単位下に設定する)
- 陰イオン交換保持メカニズム：サンプルをpH6に調整する(pKaより2pH単位上に設定する)

例 弱塩基性化合物の共役酸 (pKa 9.0) における解離率に対するpHの影響

pH	% 遊離塩基	% 解離
11.0	99.5	0.5
10.0	95	5.0
9.0	50	50
8.0	5.0	95
7.0	0.5	99.5

pKa 9.0の強塩基性化合物を最も強く充填剤に保持させるには

- 非極性保持メカニズム：サンプルをpH11に調整する(pKaより2pH単位上に設定する)
- 陽イオン交換保持メカニズム：サンプルをpH7に調整する(pKaより2pH単位下に設定する)

Biotage® サンプル前処理用機器 & アクセサリ

PRESSURE+ 加圧式サンプル処理マニホール



PRESSURE+は、96ウェルプレートまたは1mL、3mLおよび6mLサイズのSPEカラムを処理できる、加圧式サンプル処理マニホールです。従来のバキュームマニホールと異なり、個々に独立したユニークな加圧機構を採用しているため、サンプルの粘性を問わず均一なフローを提供します。簡単に使用できるので、日々のワークフローに速やかに導入できます。

PRESSURE+ 96

96ウェルプレート処理用の加圧マニホールです。固定ウェルプレートと、アレイウェルプレートを処理できます。

PRESSURE+ 48

1mL、3mLおよび6mLサイズのSPEカラムに対応する、加圧式サンプル処理マニホールです。48本まで同時処理でき、使用するポートを選択できるポートセクターにより、ガスの使用量を最小限にすることができるため経済的です。カラムにロードしたサンプルや溶媒がニードルを介することなく回収チューブに回収されるため、コンタミネーションのリスクが最小限で、使用後の清掃等も簡単です。なお、一般的な試験管を回収チューブとして使用できます。

自動固相抽出装置



RapidTrace® +

RapidTrace® +は、モジュール構成を採用したハイスループット自動固相抽出処理プラットフォームです。最大でRapidTrace+10台まで連結し、1台のコントロールPCで制御可能で、一時間にSPEカラムを最大100本まで処理できます。また、シリンジポンプによる加圧送液機構により、サンプルおよび溶媒流速は正確にコントロールされており、データの再現性を向上させます。

LC-MS/MSやGC-MS分析において、サンプル前処理やサンプル・クリーンアップで利用する固相抽出処理を最大限に効率化し、今日のパワフルな分析装置の利点を最大限に生かすことができます。

窒素吹き付け濃縮装置



SPE Dry™ 96

ウェル間のコンタミネーションを起こすことなく水性溶媒および有機溶媒を迅速に乾燥するために、回収プレートの上下に加温ガスを吹き付けます。24ウェルプレート、384ウェルプレートにも対応可能です(384ウェルプレート対応仕様はオプション)。揮発性の酸あるいは塩基を用いるアプリケーション向けに、テフロン(PTFE)コートニードル(オプション)もご用意しています。

窒素吹き付け濃縮装置



TurboVap® 96 & LV

ガスボルテックスシアリング技術(特許技術)と、適切な温度管理、ガスフローコントロールにより、迅速かつ最適なサンプル濃縮を行うことができます。使用前の煩雑な準備が不要で、稼働時間をセットできるタイマーを内蔵しており、常に状態を監視しなくてはならなかった時間のかかる従来の濃縮手法に代わる、優れた濃縮装置です。

TurboVap® 96は、96ウェル-マイクロプレートまたは96ウェル-ディープウェルプレートを処理することができます。同時にプレート2枚までセットでき、濃縮時間や温度などの濃縮条件は各プレート個別に設定できます。

TurboVap® LVは、最大50本までの試験管を同時処理できます。ウォーターバス(標準)もしくはアルミブロック(オプション)により均一に加熱しながら、セットした時間経過後にガスフローを自動停止します。ガスラインは10サンプル毎にスイッチでオン/オフでき、濃縮終了時にはアラームで知らせることもできます。

サンプル前処理アクセサリ

VacMaster™ サンプル処理マニホールド

VacMasterはコンパクトで使いやすいバキュームマニホールドです。安全性や抽出物の純度の面で要求される厳しい基準を満たすようにデザインされています。



VacMaster-96

VacMaster-96 サンプル処理マニホールドはEVOLUTE 96 ウェルプレートのみならず、全ての市販の抽出/濾過プレートおよび回収プレートと互換性があります。インサートやスパーサーによりプレートの位置を最適化でき、ウェル間のコンタミネーションやサンプルのロスを防ぎます。設置面積が小さく、軽量構造で、マニュアル処理または自動リキッドハンドリングシステムに組み込んで使用することもできます。

VacMaster-10, -20

固相抽出カラムを用いて、10サンプル (VacMaster-10) または20サンプル (VacMaster-20) まで同時に並行して処理できます。バキュームコントロールユニットや、さまざまなストップコック、スペアパーツなど備品も充実しています。

EVOLUTE 製品フォーマット

96ウェルプレートフォーマット

生体試料など少量のサンプルをハイスループットで処理する96ウェルプレートフォーマットです。バイオタージでは、一般的な固定ウェルタイプとモジュール式アレイタイプの2種類を提供しています。



固定ウェルプレート

サンプル数が多いアッセイに理想的です。1ウェルの容量は2mLです。バイオタージで提供するプレートは、一般的に使用されるすべてのリキッドハンドリングシステムと互換性があります。バキュームマニホールドや加圧マニホールドによる処理も、もちろん可能です。



モジュール式アレイプレート

メソッド開発、充填剤スクリーニング、そしてさまざまなサンプル数のアッセイにお使いいただけます。ウェルを必要な数だけベースプレートにセットして使用できるため、コストを抑え、固定ウェルプレートの一部のみが使用済みとなる問題を解決します。1mLまたは2mLタイプからお選びいただけるモジュラーアレイプレートのフォーマットは、多くのリキッドハンドリングシステムと互換性があり、バキュームマニホールドや加圧マニホールドによる処理も可能です。また、アレイウェルはPTFEアダプターを用いてカラム処理用のバキュームマニホールドでもお使いいただけます。

カラムフォーマット

従来より用いられているシリンジバレル型フォーマットです。



カラムに充填できる充填剤の容量は、微量サンプル向けの10mgから大容量アプリケーション向けの10g程度までです。一般的なバキュームマニホールドや加圧マニホールドで処理できます。カラムアダプターを使用して空のリザーバーを連結したり、大容量抽出キットを用いることで、カラム自体の容量による制限を受けず、大容量のサンプルをロードできます。

EVOLUTE 注文情報

EVOLUTE® EXPRESS ABN

製品番号	製 品	入 数	定 価
EVOLUTE EXPRESS ABN 30μm SPE Columns			
600-0001-AXG	EVOLUTE EXPRESS ABN 10mg/1mL (Tabless)	100	¥24,000
600-0003-AXG	EVOLUTE EXPRESS ABN 30mg/1mL (Tabless)	100	¥29,000
600-0003-AXG-1000	EVOLUTE EXPRESS ABN 30mg/1mL (Tabless)	1000	¥260,000
EVOLUTE EXPRESS ABN 50μm SPE Columns			
610-0006-BXG	EVOLUTE EXPRESS ABN 60mg/3mL (Tabless)	50	¥17,000
610-0010-BXG	EVOLUTE EXPRESS ABN 100mg/3mL (Tabless)	50	¥24,900
610-0015-CXG	EVOLUTE EXPRESS ABN 150mg/6mL (Tabless)	30	¥22,000
610-0050-CXG	EVOLUTE EXPRESS ABN 500mg/6mL (Tabless)	30	¥31,000
EVOLUTE EXPRESS ABN 30μm Fixed Well Plates			
600-0010-PX01	EVOLUTE EXPRESS ABN 10mg Fixed Well Plate	1	¥27,100
600-0030-PX01	EVOLUTE EXPRESS ABN 30mg Fixed Well Plate	1	¥27,100

EVOLUTE® EXPRESS CX

製品番号	製 品	入 数	定 価
EVOLUTE EXPRESS CX 30μm SPE Columns			
601-0001-AXG	EVOLUTE EXPRESS CX 10mg/1mL (Tabless)	100	¥29,000
601-0003-AXG	EVOLUTE EXPRESS CX 30mg/1mL (Tabless)	100	¥34,000
601-0003-AXG-1000	EVOLUTE EXPRESS CX 30mg/1mL (Tabless)	1000	¥310,000
EVOLUTE EXPRESS CX 50μm SPE Columns			
611-0006-BXG	EVOLUTE EXPRESS CX 60mg/3mL (Tabless)	50	¥20,000
611-0010-BXG	EVOLUTE EXPRESS CX 100mg/3mL (Tabless)	50	¥28,400
611-0015-CXG	EVOLUTE EXPRESS CX 150mg/6mL (Tabless)	30	¥24,000
611-0050-CXG	EVOLUTE EXPRESS CX 500mg/6mL (Tabless)	30	¥34,000
EVOLUTE EXPRESS CX 30μm SPE Fixed Well Plates			
601-0010-PX01	EVOLUTE EXPRESS CX 10mg Fixed Well Plate	1	¥32,300
601-0030-PX01	EVOLUTE EXPRESS CX 30mg Fixed Well Plate	1	¥32,300
601-0060-PX01	EVOLUTE EXPRESS CX 60mg Fixed Well Plate	1	¥34,700

EVOLUTE® EXPRESS WCX

製品番号	製 品	入 数	定 価
EVOLUTE EXPRESS WCX 30μm SPE Columns			
602-0001-AXG	EVOLUTE EXPRESS WCX 10mg/1mL (Tabless)	100	¥29,000
602-0003-AXG	EVOLUTE EXPRESS WCX 30mg/1mL (Tabless)	100	¥34,000
EVOLUTE EXPRESS WCX 50μm SPE Columns			
612-0006-BXG	EVOLUTE EXPRESS WCX 60mg/3mL (Tabless)	50	¥20,000
612-0010-BXG	EVOLUTE EXPRESS WCX 100mg/3mL (Tabless)	50	¥28,400
612-0015-CXG	EVOLUTE EXPRESS WCX 150mg/6mL (Tabless)	30	¥24,000
612-0050-CXG	EVOLUTE EXPRESS WCX 500mg/6mL (Tabless)	30	¥34,000
EVOLUTE EXPRESS WCX 30μm SPE Fixed Well Plates			
602-0010-PX01	EVOLUTE EXPRESS WCX 10mg Fixed Well Plate	1	¥36,000
602-0030-PX01	EVOLUTE EXPRESS WCX 30mg Fixed Well Plate	1	¥36,000

EVOLUTE® EXPRESS AX

製品番号	製 品	入 数	定 価
EVOLUTE EXPRESS AX 30μm SPE Columns			
603-0001-AXG	EVOLUTE EXPRESS AX 10mg/1mL (Tabless)	100	¥29,000
603-0003-AXG	EVOLUTE EXPRESS AX 30mg/1mL (Tabless)	100	¥34,000
EVOLUTE EXPRESS AX 50μm SPE Columns			
613-0006-BXG	EVOLUTE EXPRESS AX 60mg/3mL (Tabless)	50	¥20,000
613-0010-BXG	EVOLUTE EXPRESS AX 100mg/3mL (Tabless)	50	¥28,400
613-0015-CXG	EVOLUTE EXPRESS AX 150mg/6mL (Tabless)	30	¥24,000
613-0050-CXG	EVOLUTE EXPRESS AX 500mg/6mL (Tabless)	30	¥34,000
EVOLUTE EXPRESS AX 30μm SPE Fixed Well Plates			
603-0010-PX01	EVOLUTE EXPRESS AX 10mg Fixed Well Plate	1	¥36,000
603-0010-PX03※1	EVOLUTE EXPRESS AX 10mg Fixed Well Plate	3	¥102,000
603-0030-PX01	EVOLUTE EXPRESS AX 30mg Fixed Well Plate	1	¥36,000
603-0030-PX03※2	EVOLUTE EXPRESS AX 30mg Fixed Well Plate	3	¥102,000
603-0060-PX01	EVOLUTE EXPRESS AX 60mg Fixed Well Plate	1	¥39,000

※1 603-0010-PX01を3箱で納品いたします。
※2 603-0030-PX01を3箱で納品いたします。

EVOLUTE® EXPRESS WAX

製品番号	製 品	入 数	定 価
EVOLUTE EXPRESS WAX 30μm SPE Columns			
604-0001-AXG	EVOLUTE EXPRESS WAX 10mg/1mL (Tabless)	100	¥29,000
604-0003-AXG	EVOLUTE EXPRESS WAX 30mg/1mL (Tabless)	100	¥34,000
EVOLUTE EXPRESS WAX 50μm SPE Columns			
614-0006-BXG	EVOLUTE EXPRESS WAX 60mg/3mL (Tabless)	50	¥20,000
614-0010-BXG	EVOLUTE EXPRESS WAX 100mg/3mL (Tabless)	50	¥28,400
614-0015-CXG	EVOLUTE EXPRESS WAX 150mg/6mL (Tabless)	30	¥24,000
614-0050-CXG	EVOLUTE EXPRESS WAX 500mg/6mL (Tabless)	30	¥34,000
EVOLUTE EXPRESS WAX 30μm Fixed Well Plates			
604-0010-PX01	EVOLUTE EXPRESS WAX 10mg Fixed Well Plate	1	¥36,000
604-0030-PX01	EVOLUTE EXPRESS WAX 30mg Fixed Well Plate	1	¥36,000

EVOLUTE EXPRESS セレクションプレート

製品番号	製 品	入 数	定 価
650-0010-PX01	EVOLUTE EXPRESS SORBENT SELECTION 10mg Fixed V	1	¥22,000
650-0030-PX01	EVOLUTE EXPRESS SORBENT SELECTION 30mg Fixed V	1	¥22,000