

ISOLUTE® HYDRO DME+

尿サンプル前処理用 デュアルモード抽出ウェルプレート/カラム ユーザーガイド

LC-MS/MS分析における尿サンプルを手早く効果的にクリーンアップ

ISOLUTE® HYDRO DME+はシンプルなパススルー・ワークフローで、尿から水溶性マトリックス成分と加水分解酵素を除去します。

“DME (Dual mode Extraction)”とは、バイオタージが開発した新しい前処理技術です。これは液液分配モードとスカベンジングモードを組合せた手法で、尿に含まれる色素、塩、尿素、クレアチニンおよび残留加水分解酵素のような夾雑成分を速やかに、且つ簡単に除去します。尿サンプルを視覚的にも効果的にクリーンアップし(図1)、マトリックス効果を減少させます。尿を希釈のみで分析する場合(Dilute & Shoot, D&S)と比較して、ISOLUTE HYDRO DME+で前処理したサンプルでは分析感度が向上し、インジェクションを繰り返した場合にもその感度が維持されます。安定した分析が可能になり、分析器のダウンタイムを削減します(図2)。



図1. 加水分解尿のISOLUTE HYDRO DME+によるクリーンアップの前(左)と後(右)

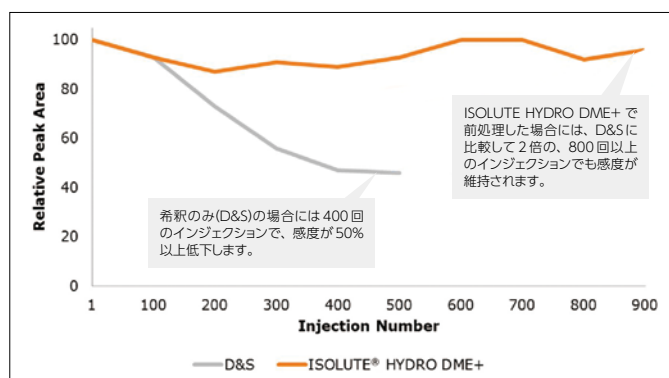


図2. 尿中6-モノアセチルモルヒネのLC-MS/MS分析における感度比
ISOLUTE HYDRO DME+で前処理した場合にはサンプルインジェクションを繰り返しても分析感度(エリアカウント)が維持されますが、希釈のみ(D&S)の場合には400回のインジェクションで分析感度が50%以上低下します。これはISOLUTE HYDRO DME+が効果的にマトリックス除去していることを示しており、ISOLUTE HYDRO DME+を使用することで、D&Sに比較してイオン源の洗浄頻度が少なくとも2分の1に減ることを示唆しています。

素早く簡単な前処理

自動化しやすいパススルーのみのワークフローで、メソッド開発をほとんど必要としません。

独自のHYDRO フリット技術により、尿をウェルまたはカラム内インキュベーションで加水分解することができるため、加水分解処理の後は分注操作を必要とせず、直接ウェルまたはカラムに通液できます。

サンプルはISOLUTE HYDRO DME+によるクリーンアップ後、直接分析することができます。時間のかかるエバポレーションの工程は必要ありません。

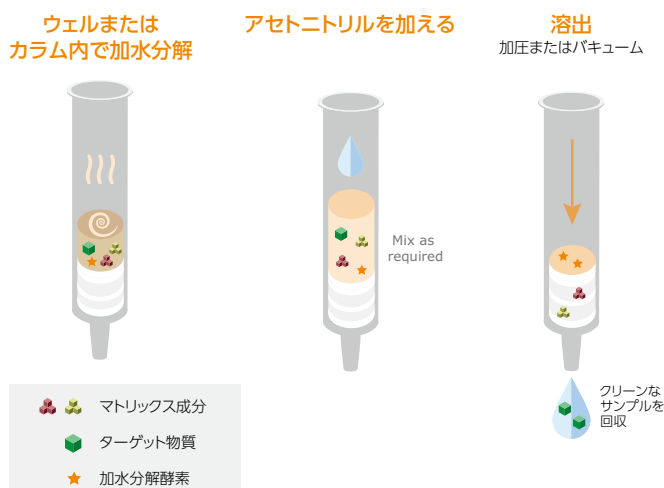


図3. ISOLUTE® HYDRO DME+ の尿クリーンアップワークフロー (ウェルまたはカラム内で加水分解を行う場合)

加水分解効率を妥協しません

バイオタージのHYDRO フリット技術は、インキュベーションプロセスの間、サンプルを確実にウェルまたはカラム内に保持します。ISOLUTE HYDRO DME+を使用する場合の加水分解効率、同じ条件下でのオフライン加水分解と同等です。既存の加水分解手順をISOLUTE HYDRO DME+に容易に移行できます。

ISOLUTE® HYDRO DME+ 使用方法

処理できる尿の量

最適処理尿サンプル量は100µLです。最大150µLまで処理できます。

プロトコル1:

ウェルまたはカラム内で尿を加水分解する場合

サンプルの準備

適切なpHに調整したバッファー+ 加水分解酵素溶液と尿を混和する。(一般的に1:1, v/v*)

※これはHelix pomatia タイプの酵素による消化条件です。B-gluc タイプのリコンビナント消化酵素を使用する場合には、それぞれの使用ガイドラインに従って処理してください。

ISOLUTE® HYDRO DME+での処理

1. 加水分解酵素を含む尿サンプル 100-150µL(求める感度により異なる)をウェルまたはカラムに入れる。
2. 使用する酵素試薬に適した条件でインキュベートする。
3. アセトニトリル600-900µLをウェルまたはカラムに加え、ピペッターで5回混和する。(尿サンプル:アセトニトリルの比率を1:6, (v/v)に保ってください)
4. 加圧またはバキュームで通液し、サンプルを回収する。(Biotage® Pressure+ を使用する場合は5 PSIで2分間)

プロトコル2:

尿をそのまま用いる場合/予め加水分解した尿を用いる場合

1. 尿サンプル100-150µL(求める感度により異なる)をウェルまたはカラムに入れる。
2. アセトニトリル600-900µLをウェルまたはカラムに加え、ピペッターで5回混和する。(尿サンプル:アセトニトリルの比率を1:6, (v/v)に保ってください)
3. 加圧またはバキュームで通液し、サンプルを回収する。(Biotage® Pressure+ を使用する場合は5 PSIで2分間)

Frequently Asked Questions

1. どのようなターゲット物質を抽出できますか?

バイオタージでは、ISOLUTE HYDRO DME+による前処理で、様々な物性の96種類の薬剤/薬物について良好な回収を示すことを確認しました。

詳細はバイオタージ・ジャパンまでお問い合わせください

2. 尿中の色素は除去されますか?

はい。尿中の色素は効果的に除去されます。

3. ISOLUTE® HYDRO DME+で血液サンプルを処理できますか?

ISOLUTE HYDRO DME+は尿サンプルの前処理用にデザインされています。血液由来のサンプル(全血、血漿、血清)の前処理には、血中に含まれる夾雑成分を除去する目的でデザインされている製品の使用をお勧めします。

4. 加圧またはバキュームの推奨条件は?

加圧による処理を推奨します。5 PSIで約2分間、加圧してください。

5. ウェル/カラムから回収される液量はどの程度ですか?

ロードする液量が700µLの場合(尿100µL+アセトニトリル600µL)、350-375µLのサンプルが回収されます。

6. 抽出後のエバポレーションは必要ですか?

いいえ。ISOLUTE HYDRO DME+で回収されるサンプルは、ほぼアセトニトリルです。逆相UHPLCまたはHPLCにそのままインジェクトできます。

しかし、GC-MS分析を行う場合や、UHPLCやHPLCの分離向上の観点等からアセトニトリル以外の溶媒が望ましい場合には、窒素ガス吹付けなどで乾固し(加温40℃程度)、適切な移動相で再溶解してください。

また、分析感度を改善したい場合にも、乾固/再溶解が有用な場合があります。

7. 内部標準を使う必要がありますか?

ISOLUTE HYDRO DME+では内部標準物質の使用を推奨します。尿を加水分解する前に内部標準物質を加えてください。また、内部標準物質は水溶性が高いものが望ましく、添加する液量はできるだけ少なくしてください。(10µL程度)

8. ISOLUTE® HYDRO DME+で回収したサンプルは、そのままLC-MS/MS分析できますか?

はい。抽出されるサンプルは、ほぼアセトニトリルです。逆相

UHPLCまたはHPLCにそのままインジェクトできます。求められる濃度になるようアセトニトリルや水を加えて濃度調整してもかまいません。

9. GC-MS分析の前処理にも使えますか？

はい。ISOLUTE HYDRO DME+はLC-MS/MS分析を想定して開発された製品ですが、GC-MS分析の前処理にもお使いいただけます。

ISOLUTE HYDRO DME+でサンプルを抽出した後、窒素ガス吹付けなどで乾固して適切な移動相で再溶解してください。誘導体化が必要な場合にも、乾固／再溶解にて対応してください。

10. 希釈のみで分析する場合と比べて、どのくらい感度の向上が見込めますか？

ターゲット物質に強く依存しますが、バイオタージで検討した範囲では希釈のみでの分析と比較して、概ね2-5倍の感度向上が認められました。

11. どの程度の検出限界が期待できますか？

分析の検出限界は、用いた尿サンプルの量や、回収したサンプルを直接インジェクトしているか、あるいは乾固／再溶解などで濃縮しているかどうかによって強く影響されます。

バイオタージにて検討した範囲では、以下の方法で10-400ng/mLの範囲で検量線を引くことができました。

- ・ウェル内で加水分解を行う
- ・尿200μLにアセトニトリル600μLを加えて処理
- ・回収サンプルを直接インジェクト(乾固／再溶解なし)

多くのターゲット物質において定量限界は10ng/mL以下、最小濃度キャリブレーションのシグナルノイズ比に基づく推定では定量限界1ng/mLを示す化合物もありました。

#13回収率改善に関する記載、#14感度改善に関する記載も合わせてご確認ください。

詳細はバイオタージ・ジャパンまでお問い合わせください。

12. クリーンアップのメカニズムを教えてください。

ISOLUTE HYDRO DME+の構成は次のとおりです。

上の層から順に：

- Biotage® HYDRO フリット

サンプルをウェルまたはカラム内に保持し、加水分解を

行えます。

- スカベンジ充填層
- 吸湿性塩層

Dual Mode Extraction (DME) メカニズム：

1. 尿サンプル(尿、加水分解尿もしくはウェルまたはカラム内で加水分解した尿)をロードする。
→HYDRO フリットにより、尿サンプルがフリット上に保持される。
2. アセトニトリルを加えて混和する。
→加水分解酵素と尿中に含まれるタンパク質が沈殿する。
3. 加圧またはバキュームにより通液する
→沈殿したタンパク質はHYDRO フリットで物理的に除去される。
→尿中色素は、極性非プロトン性溶媒(アセトニトリル)リッチな環境下では、スカベンジ充填層により強く保持され、除去される。
→尿中の親水性成分(クレアチニン、尿素、塩)は、吸湿性層塩により水分と共にウェルまたはカラム中に保持され、除去される。
→ターゲット物質はアセトニトリル相に分配され、回収される。
4. LC-MS/MSに導入し、測定。

【重要】

ISOLUTE HYDRO DME+は、本ユーザーガイドに記載されたとおりの用法でご使用ください。使用方法を誤ると、塩が溶解して回収サンプルに混入する場合があります。

13. 回収率を改善したい場合はどうすれば良いですか？

極性の高い低分子ターゲット物質の回収率を改善したい場合には、次の方法を検討してください。

- ・アセトニトリルに対する尿試料の比率を上げる
通常100μLの尿または加水分解尿にアセトニトリル600μL加えているところを、尿または加水分解尿の使用量を200μLに増やし、そこにアセトニトリル600μLを加えて検討してください。(サンプルのクリーンアップに影響を及ぼす場合があります。)
- ・尿／加水分解尿100μLあたりギ酸10μLを加える。
- ・サンプルを通液後、追加でアセトニトリルあるいはメタノールを100μL追加で加えて通液する。

14. 感度を改善したい場合はどうすれば良いですか？

分析の感度を改善したい場合には、次の方法を検討してください。

- ・アセトニトリルに対する水の比率を上げる
通常 100 μ L の尿または加水分解尿にアセトニトリル 600 μ L 加えているところを、尿または加水分解尿の使用量を 200 μ L に増やし、そこにアセトニトリル 600 μ L を加えて検討してください。(サンプルのクリーンアップに影響を及ぼす場合があります。)
- ・回収したサンプルを一度乾固し、少量の移動相で再溶解する

15. ISOLUTE HYDRO DME+で上手く前処理できなかったのですが、どうすれば良いですか？

バイオタージでは様々な前処理製品を提供しており、前処理法開発をサポートする体制を整えています。

ISOLUTE HYDRO DME+で望ましい結果が得られなかった場合にも、別の前処理法をご提案できます。ご相談ください。

16. 塩が析出した尿は、そのまま使えますか？

冷却保存等により塩が析出した場合は、一旦加温するなどして塩を再溶解して使用してください。

塩が析出したままの尿を用いると、回収率低下など影響が出る場合があります。

17. 上手く抽出できない物質はありますか？

極性が高く分子量の小さい物質は、回収率が低い場合があります。

18. ISOLUTE HYDRO DME+は再利用できますか？

ISOLUTE HYDRO DME+は使い捨て(disposable)での使用を前提としてデザインされています。再利用はできません。

注文情報

製品番号	製品	数量	定価(消費税別)
970-0400-PZ01	ISOLUTE [®] HYDRO DME+ 400 mg Plate	1	¥17,400
970-0040-BZ	ISOLUTE [®] HYDRO DME+ 400 mg/3 mL Columns	50	¥12,600

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

西日本営業所: 〒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