

AFFINILUTE MIP – β -アゴニスト

分子認識ポリマー (Molecular Imprinted Polymer: MIP) は、ターゲット化合物や類似の構造を持つ化合物のグルーブを高い選択性で捕足することを目的と設計された、高度に架橋された特殊なポリマーです。MIPはターゲット化合物と構造の似た鋳型分子を導入して合成し、構造的かつ化学的にターゲット化合物と補完的な空洞を形成することで大変優れた選択性を実現しています。MIPを用いた化合物抽出を行う場合は、このアプリケーションノートに記載するメソッドを実践することが大変重要です。

生体サンプルからの β -アゴニスト抽出

生体サンプルから β -アゴニストを選択的に抽出するために開発されたメソッドです。このメソッドは、組織サンプル(例:ウシの筋組織)と体液(例:尿)の両方に適用できます。再現性が高く、35-90%の β -アゴニスト回収率を実現します(複数の β -アゴニスト抽出に使用されるため、回収率にばらつきがあります)。以下の手順をスクリーニングとして行い、サンプル中に存在する β -アゴニストを特定することを推奨します。その後、コンディショニング、洗浄、溶出のステップを最適化することで、より高い回収率を実現することができます。

抽出手順：流速 \sim 0.5mL (ターゲット溶出は \sim 0.2mL/min)を推奨

アプリケーション	ウシ筋肉等の組織サンプルからの β -アゴニスト抽出 ¹	尿やその他の水性生体サンプルからの β -アゴニスト抽出 ²
ターゲット	β -アゴニスト	β -アゴニスト
サンプルマトリックス	ウシ筋組織(ウサギ、カモ、七面鳥、肝臓、魚にも適用可能)	尿
一般事項	シマテロール、シンブテロール、ラクトバミン、クレンプロパロール、クレンプテロール、プロムブテロール、マブテロール、マベンテロール、イソクスプリンの定量が可能(スクリーニングは $1\mu\text{g}/\text{kg}$ まで可能)	リトドリン、クレンプテロール、フォルモテロール、サルメテロール、ラクトバミン、ツロブテロール、プロムブテロール、マベンテロールの平均的な回収率は70%以上、テルブタリン、メタプロテレノール、シンブテロールの回収率は40-70%。イソプロテレノール、サルブタモール、フェネテロール、イソクスプリンは干渉ピークが原因でHPLC-UVでは検出できない。
サンプルの準備	<ul style="list-style-type: none"> すりつぶした筋肉5gに、$0.1\text{ng}/\mu\text{L}$の内部標準(重水素化した類似化合物をメタノールに溶解したもの)$50\mu\text{L}$、トリスバッファー(pH9.5)5mL、プロテアーゼ\sim5mgを混合。 60°Cで一晩分解させる。 室温に戻した後、高濃度酢酸$15\mu\text{L}$、酢酸バッファー(2M, pH5.2)1mL、suc d'Helix Pomatia (ロシュダイアグノスティクス社製)$40\mu\text{L}$を添加。 $37^\circ\text{C}/2$時間インキュベート 10M水酸化ナトリウム水溶液でpHを>12に調整 酢酸エチル10mLで液液抽出 上澄みの有機層を分離し、再度5mLの酢酸エチルで抽出。 2度の抽出で分離した有機層を合わせ窒素存在下/55°Cで溶媒留去 20%メタノール水溶液4mLで再溶解し高濃度HClでpH1に調整 ヘプタン1mLを添加、激しく振とうした後、$4000\times\text{g}$で遠心分離し、上澄みと中間層を廃棄(脂肪分を除去)³更に1mLのヘプタンを添加し 脂肪除去のプロセスを繰り返す 10M水酸化ナトリウム水溶液$50\mu\text{L}$と、リン酸バッファー(0.1M, pH6)2mLでサンプルを中和 	<ul style="list-style-type: none"> 尿(遠心分離:$3000\times\text{g}/10$分間)を脱イオン水で1:1(v/v)に希釈 β-グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ$50\mu\text{L}$を加え室温で4時間静置 <p>β-グルクロニダーゼ処理についてはWidstrand, 2004, Fiori., 2005を参照してください</p>

1.コンディショニング/平衡化	<ul style="list-style-type: none"> • 1mL メタノール • 1mL 脱イオン水 • 1mL 酢酸アンモニウム (25mM, pH6.7) 	
2.サンプルロード 推奨流速: ~0.5mL/min	サンプルをアプライ	
3.洗浄(干渉成分の溶出) 注意事項:各洗浄ステップ間に軽く吸引を行ってください	<ul style="list-style-type: none"> • 2分間カラムを十分に吸引し残留水分を除去 • 1mL アセトニトリル • 1mL 0.5%酢酸/アセトニトリル溶液(疎水性干渉成分の選択的除去)⁴ • 1mL 50 mM, pH 6.7の酢酸アンモニウム(イオン結合干渉成分の選択的除去)⁴ • 1mL 60%アセトニトリル水溶液(水素結合干渉成分の選択的除去)⁴ • 2分間カラムを十分に吸引し残留溶媒を除去 	<ul style="list-style-type: none"> • 1mL 脱イオン水(塩および親水性マトリクス成分の選択的溶出・除去) • 2分間カラムを十分に吸引し残留水分を除去 • 1mL 1%酢酸/アセトニトリル溶液(疎水性干渉成分の選択的除去)⁴ • 1mL 50mM, pH 6.7の酢酸アンモニウム(イオン結合干渉成分の選択的除去)⁴ • 1mL 60%アセトニトリル水溶液(水素結合干渉成分の選択的除去)⁴ • 2分間カラムを十分に吸引し残留溶媒を除去
4.ターゲット溶出 推奨流速: ~0.2mL/min	10%酢酸/メタノール5mL×2回 各溶出ステップ間に軽く吸引を行う 溶媒除去後にLC移動相で再溶解	10%酢酸/メタノール1mL×2回 各溶出ステップ間に軽く吸引を行う 溶媒除去後にLC移動相で再溶解

推奨分析手法: HPLC またはLC-MS

Column:	Ascentis® Express C18, 5 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm particle size (53822-U)		
Instrument:	Applied Biosystems 3200Q-TRAP		
Mobile phase:	10mM ammonium acetate (pH unadjusted) in methanol (A) and MS-grade water (B)		
Flow rate:	0.2mL/min (B) methanol		
Temperature:	35°C		
Detection:	MS/MS		
MRM transitions:	1. Metaproterenol	212.19/152.10	
	2. Terbutaline	226.21/152.20	
	3. Formeterol	345.21/121.00	
	4. Salmeterol	416.33/91.20	
	5. Salbutamol	240.23/148.30	
	6. Ritodrine	288.14/121.20	

Ion mode:	Positive		
Ion source:	TurboSpray		
Ion spray voltage:	2700V		
Source temp:	400°C		
Collision gas:	40psi		
Injection volume:	30µL		
Gradient:	Min	A%	B%
	0.0	25	75
	2.0	100	0
	4.0	100	0
	4.1	25	75
	8.0	25	75

1.手順の引用

The analysis of beta-agonists in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LCMS screening,

Kootstra PR, CJPF Kuijpers, KL Wubs, D van Doorn, SS Sterk, LA van Ginkel and RW Stephany, 2005, Anal. Chim.

Acta, 529:75-81

2.手順の引用

Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecularly

imprinted polymers. Van Hoof et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005; 19: 2801-2808 Evaluation of MISPE for

the multi-residue extraction of beta-agonist from calves urine. Withstrand et al., J Chromatogr B Analyt Technol

Biomed Life Sci. 2004, May 5; 804(1):85-91 Evaluation of two different clean-up steps, to minimize ion suppression

phenomena in ion trap liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of beta

agonists in calves urine. Fiori M. et al., Analytica Chimica Acta 529 (2005) 207-210

3.中間層の粘度が高い場合は最上層のみを除去し、ヘプタン1mLで抽出を行う前に再度4mLの20%メタノール水溶液を加えてください。

4.洗浄手順は分析前のサンプルクリーンアップ効果を最大化するために最適化されています。回収率を高めるためには、酢酸/アセトニトリル洗浄ステップにおける酢酸量を低減してください。また、50mM酢酸アンモニウムと60%アセトニトリル水溶液を用いた洗浄ステップを省くことで、回収率を更に向上させることが可能です。

オーダーインフォメーション

品番	製品	クラス選択性※	数量	定価(税別)
M02-0002-G	AFFINILUTE MIP - β -アゴニスト 25mg/10mL	○	50	¥45,600
M02-0002-B	AFFINILUTE MIP - β -アゴニスト 25mg/3mL	○	50	¥45,600

関連製品

品番	製品	クラス選択性※	数量	定価(税別)
M18-0002-G	AFFINILUTE MIP - β -ブロッカー 25mg/10mL	○	50	¥45,600
M18-0002-B	AFFINILUTE MIP - β -ブロッカー 25mg/3mL	○	50	¥45,600

※クラス選択性:類似構造を持つ複数の化合物を補足する性質

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

大阪: 〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29, 6F

TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312

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



www.biotage.com