AFFINILUTE MIP – クロラムフェニコール

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プ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。

様々なマトリックスからのクロラムフェニコール抽出

LC-MS/MS分析を目的として様々なマトリックスのサンプル(例:ミルク、血漿、蜂蜜、尿、小エビ)からクロラムフェニコールを抽出するために開発されたメソッドです。このメソッドは再現性が高く、また低い検出限界を達成できます。LC-MS-MSを使用して分析した際の検出限界は下表の通りです。

サンプル	検出限界
ミルク	0.1ng/mL
血漿	0.02ng/mL
尿、蜂蜜	0.02μg/kg
小エビ	7ng/kg

ミルクおよび血漿からのクロラムフェニコール抽出

サンプルの準備:
スキムミルクは下準備不要。
通常のミルクの場合、5000rpmで15分間遠心分離し、上部の脂質層と蛋白質の沈殿物の中間層を回収する。
血漿の場合、3000rpmで10分間遠心分離し、上澄みを回収する。

注意:ミルク、血漿サンプルに1μg/Lクロラムフェニコール-D5を内部標準を添加する。
酢酸またはアンモニアを用いてサンプルpH7に調整する。

↓

コンディショニング/平衡化:
1mL メタノール
1mL 超純水

注意:乾燥させないでください。
乾燥した場合は再調整してください。

↓

推奨流速:~0.5mL/min
サンプルロードは重力下で行う

サンプルロード:
サンプル(~1mL)を流す

注意:サンプルpH7に調整しておく。
酢酸またはアンモニアをpH調整に使用する。

↓

推奨流速:0.5-1mL/min
洗浄ステップは記載順序に従う

洗浄 #1:
1mL 超純水 x 2回
1mL 5%アセトニトリル/酢酸(0.5%)
1mL 超純水 x 2回
1mL 20%アセトニトリル/アンモニア(1%)[1]

各洗浄ステップ間に5-10秒間軽く吸引(-0.4 barまたは-12 inHg)する。

↓

重要:最低5分間カラムを強く吸引し、残留溶媒を除去してカラムが乾燥していることを確認する(-0.7 bar、-20 inHgまたは-70 kPa)。

洗浄 #2:
1mL ジクロロメタンx 3回[2]

重要:1分間吸引し残留溶媒を除去(-0.7 bar、-20 inHgまたは-70 kPa)。

↓

推奨流速:~0.2mL/min

ターゲット溶出:
1mL メタノール:酢酸:超純水(89:1:10, v/v/v)x2回[3]

各溶出ステップ間に、5-10秒間軽く吸引(-0.4 barまたは-12 inHg)する。

↓

溶媒を留去し、分析前に100-150 μLのLC-MS移動相で再溶解する。

GC-MS分析には、溶出溶媒を1mLメタノールx2回に変更できる。

1. 洗浄効果を高めるために、1mL20%アセトニトリル/アンモニア(1%)x3回までに置き換えることができる
2. 洗浄効果を高めるために、1mL2%酢酸/ジクロロメタンx 3回に置き換えることができる
3. よりクリーンな抽出のために、1mLメタノール:ジクロロメタン(90:10)x2回に置き換えることができる

Application Note

蜂蜜および尿からのクロラムフェニコール抽出のプロトコル

サンプルの準備:
1gの蜂蜜を1mLの脱イオン水に溶解する。サンプルを45℃まで温めると溶解度が増す。尿はpH7に調整する。粒子を含む尿サンプルは3000g/10分間遠心分離し、上澄みを回収する。

注意:　蜂蜜、尿サンプルに1μg/Lのクロラムフェニコール-D5内部標準を添加する。
酢酸またはアンモニアを用いてサンプルpH7に調整する。

↓

コンディショニング/平衡化:
1 mL　メタノール
1 mL　超純水

注意:　乾燥させないでください。
乾燥した場合は再調整してください。

↓

推奨流速: ～1mL/min
サンプルロードは重力下で行う

サンプルロード:
サンプル(～1mL)を流す

注意:　サンプルpH7に調整しておく。
酢酸またはアンモニアをpH調整に使用する。

↓

推奨流速: 0.5-1mL/min

洗浄　#1:
1 mL　超純水 x 2回
1 mL　5%アセトニトリル/酢酸(0.5%)
1 mL　1%アンモニア水 x 2回
1 mL　20%アセトニトリル/アンモニア(1%)[1]

各洗浄ステップ間に5-10秒間軽く吸引
(-0.4barまたは-12inHg)を行う。

↓

重要:最低5分間強く吸引し、残留溶媒を除去して乾燥させる
(-0.7bar、-20inHgまたは-70kPa)。

洗浄　#2:
1 mL　2%酢酸/ジクロロメタン

↓

重要:　1分間吸引し残留溶媒を除去
(-0.7bar、-20inHgまたは-70kPa)。

↓

推奨流速: ～0.2mL/min

ターゲット溶出:
蜂蜜の場合
1mL　10%メタノール/ジクロロメタン(v/v)x2回2
尿の場合
1mL　メタノール x 2回

各溶出ステップの間に5-10秒間軽く吸引
(-0.4barまたは-12 inHg)する。

GC-MS分析には溶出溶媒を1mL
メタノールx2回に変更できる。

↓

溶媒を留去し分析前に100-150 μLのLC-MS移動相で再溶解する。

1.洗浄効果を高めるために、1mL20%アセトニトリル/アンモニア(1%)x3回までに置き換えることができる
2.蜂蜜の場合、回収率を高めるために溶出溶媒をメタノール:ジクロロメタン(10:90, v/v)で希釈した1%酢酸に変更できる。
　但し、この方法は溶出液中の干渉成分を増加させる可能性があるので注意する。

Application Note

小エビからのクロラムフェニコール抽出

サンプルの準備:
殻をとった小エビ（生またはボイルしたもの）5gをホモジナイズし、酢酸エチル20mLを加える。2分間ボルテックスし、2000rpm/5分間遠心分離または150μmのフィルターでろ過する。上澄みから溶媒を留去し、残った成分を10mLの超純水で再溶解する。必要に応じて、さらにろ過する。

注意:　小エビサンプルのホモジナイズを行う前に、200ng/Kgのクロラムフェニコール-D5内部標準を添加する。

必要に応じ、上澄みのpHを7に調整する。酢酸、またはアンモニアをpH調整剤として使用する。

↓

コンディショニング/平衡化:
1mL　メタノール
1mL　超純水

注意:　乾燥させないでください。
乾燥した場合は再調整してください。

↓

推奨流速:～0.5mL/min
サンプルロードは重力下で行う

サンプルロード:
サンプル（～2mL）をアプライ

注意:　サンプルpH7に調整しておく。
酢酸またはアンモニアをpH調整に使用する。

↓

推奨流速:0.5-1mL/min

洗浄　#1:
1mL　超純水 x 2回
1mL　アセトニトリル: 0.5%酢酸水(5:95, v/v)
1mL　1%アンモニア水 (v/v)x 2回
1mL　アセトニトリル:1%アンモニア水(20:80, v/v)

各洗浄ステップ間に5-10秒間軽く吸引
(-0.4barまたは-12inHg)を行う。

↓

重要:　最低10分間強く吸引し、残留溶媒を除去して乾燥させる
(-0.7bar、-20inHgまたは-70kPa)。

洗浄　#2:
1mL　ジクロロメタンx3回

各溶出ステップの間に5-10秒間軽く吸引
(-0.4 barまたは-12 inHg)する。

↓

重要:　2分間吸引し、残留溶媒を除去
(-0.7bar、-20inHgまたは-70kPa)。

推奨流速: ～0.2mL/min

ターゲット溶出:
1mL　メタノール:ジクロロメタン(10:90, v/v)x2回

各溶出ステップの間に5-10秒間軽く吸引
(-0.4barまたは-12inHg)する。

↓

GC-MS分析には溶出溶媒を1mL
メタノールx2回に変更できる。

溶媒を留去し分析前に100-150μLのLC-MS移動相で再溶解する。

Application Note

推奨分析手法: LC-MS-MSまたはLC-MS

Column:	Ascentis® C18,10cm x 2.1mm I.D., 3μm particle size (581301-U)
Instrument:	Sciex API 3200
Mobile phase:	10mM ammonium acetate (pH6.7):acetonitrile (70:30)
Flow rate:	0.2mL/min.
Temperature:	ambient
Detection:	MS/MS, MRM transitions
	Quantification (321.00/152.00)
	Identification (321.00/257.00
	I.S. (326.00/157.00)
Polarity:	Negative
Ion source:	Turbospray
Ion spray voltage:	-200V
Decluster potential:	-35V
Source temperature:	500°C
Collision gas:	4psi
Ion source gas 1:	70psi
Ion source gas 2:	40psi
Curtain gas:	10psi
Dwell time:	150msec
Run time:	5min.
injection volume:	20μL

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)
M10-0002-G	AFFINILUTE MIP - クロラムフェニコール 25 mg/10 mL	—	50	¥51,100
M10-0002-B	AFFINILUTE MIP - クロラムフェニコール 25 mg/3 mL	—	50	¥51,100

※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

Biotage | IST
www.biotage.com

© 2011 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.