

固相カートリッジを内蔵したシリンジ針とデジタルシリンジを用いた自動前処理からMS (質量分析計) への直接導入による迅速分析の検討

Naza Lahoutifard, Peter Dawes, Andrew Gooley, Kayte J. Parlevliet
SGE Analytical Science

概要

固相抽出(SPE)のような近年のサンプル前処理技術は、濃縮やクリーンアップに対して非常に優れた手法ですが、自動化で行うか手動で行うかによって多くのコストまたは時間がかかってしまうことがあります。また、サンプル調整の過程で溶液を窒素パーズして濃縮することは、時間を短縮することが難しく、多くの時間が費やされてしまいます。SPEを用いる多くの分析者では、サンプル前処理の生産性を向上させ且つ廃棄溶媒など最小限に抑えることが強く望まれています。

自動もしくは半自動化の前処理装置を導入することは、これらの効率や使い勝手を大きく改善してくれますが、自動装置は一般的に大幅なコストが必要となってきます。

そこで今回、我々は固相カートリッジを内蔵したシリンジ針MEPS (メップス)とデジタルシリンジeVol(イーボル)を組み合わせ、サンプル量や使用溶媒量を低減することも含めて、安価に行えるSPE前処理の半自動化と効率改善に関して検討を行いました。

この半自動化/小容量化された手法は、生物学的細胞分野で使用されるような少量の貴重なサンプルを扱う場合に有効と考えます。

背景

MEPS™は、カートリッジ型のSPEと比べていくつかの利点があります。(表 1参照)

ただ、MEPSは、シリンジ針に内蔵されたSPEカートリッジを用いる手法であり、シリンジの吸引/吐出動作によってSPEカートリッジへの溶液のロードや排出を行うため、この作業における流量の制御は作業者のスキルに依存して、作業者が変わると前処理条件が変わってしまう恐れがあります。





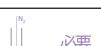





	SPE	MEPS™
サンプル量	 3 mL	 50 µL
時間		
コスト		
溶媒	 10 mL	 500 µL
N ₂ パーズ	 必要	 不要

表 1. MEPS™ と、SPEとの比較



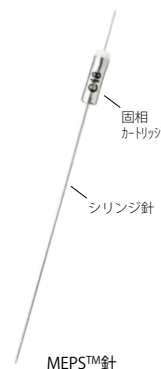
図 1. デジタルシリンジ - eVol® XR

そこで、MEPS™とデジタルシリンジeVol®(図 1)を組み合わせることで、半自動化でMEPS動作を行って、個人差による再現性の悪化を抑制し、さらに作業の効率化(作業時間の短縮化)を実現しました。

MEPS™とは

MEPSとは、シリンジニードルの途中に少量化された固相カートリッジ(SPE)が配置された専用針を用いることにより、シリンジプランジャーの押し引きで通液などのSPE工程を迅速に行うことの出来る製品です。

MEPS™ 針を専用シリンジに取り付け



分析条件と結果

唾液中のカフェイン (オペレーターに依存する再現性の確認)

・サンプル：カフェインと唾液をバイアルに捕集後、1mL分取した溶液をpH9.5になるように飽和四ホウ酸ナトリウム溶液で調整し、次に試料をろ過し、その後の評価のために凍結した。

・MEPS™によるカフェインの抽出：抽出条件は、流量・抽出量・抽出回収の最適化を行い決定した。固相充填剤はC18を用いた。eVol®による動作は、8つの工程(メタノールでのコンディショニング、水でのコンディショニング、サンプルロード、水での洗浄、pH調整、水での洗浄、エアードライ、溶出)を33回のステップで行い、作業時間は3分であった。(表 2 参照)

最適条件化作業は2人のオペレーターで繰り返し実施した。

ステップ	モード	量(µL)	スピード
① メタノール コンディショニング			
1	吸引	20	4
2	吐出	20	4
3	吸引	20	4
4	吐出	20	4
5	吸引	20	4
6	吐出	20	4
② 水 コンディショニング			
7	吸引	20	4
8	吐出	20	4
9	吸引	20	4
10	吐出	20	4
11	吸引	20	4
12	吐出	20	4
③ サンプル ロード			
13	吸引	50	4
14	吐出	50	4
15	吸引	50	4
16	吐出	50	4
17	MIX (x8)	50	4
④ 水 洗浄			
18	吸引	20	4
19	吐出	20	4
⑤ 飽和四ホウ酸ナトリウム			
20	吸引	20	4
21	吐出	20	4
⑥ 水 洗浄			
22	吸引	20	4
23	吐出	20	4
⑦ エアードライ			
24	吸引	50	4
25	吐出	50	10
26	吸引	50	4
27	吐出	50	10
28	吸引	50	4
29	吐出	50	10
⑧ メタノール 溶出			
30	吸引	20	4
31	吐出	20	4
32	吸引	20	4
33	吐出	20	4

図 2. eVol®とMEPS™によるカフェインの抽出メソッド

・ガスクロマトグラフィー：

3人のオペレーターで抽出試験を行った溶液をGC/MSへ導入。
 GC/MS：Agilent 6890/5973、分析カラムは：SGE BPX5(30m x 0.25mmID x 0.25µm df)
 注入量：1.0µL、Splitless注入、注入口温度：250℃、GCライナー：
 テーパーフォーカスライナー、パージフロー：50mL/min、
 GCオープン条件：45℃(4min)-10℃/min-300℃(10min保持)、
 キャリアガス：ヘリウム、定流量モード：1.2mL/min
 MS スキャンレンジ：40-500Da、スキャン速度：2scan/sec、
 トランスファーライン温度：280℃、四重極温度150℃、
 イオンソース温度：230℃

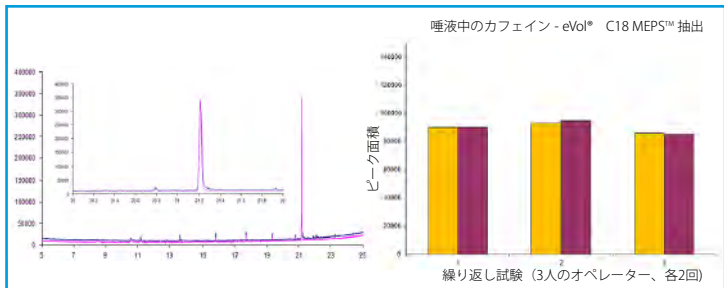
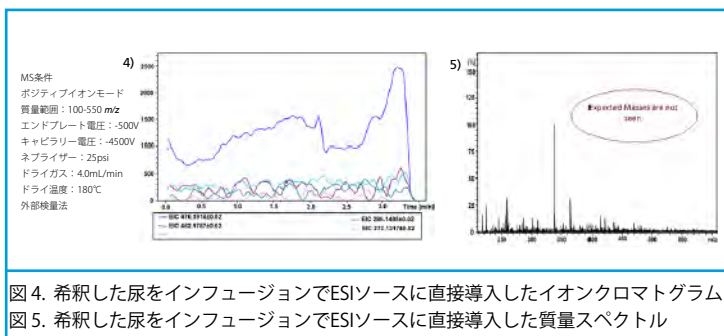


図2. eVol®-MEPS™によるカフェイン抽出試験における重ね書きクロマトグラム
 3人のオペレーターが同じ日に同じMEPS™カートリッジを使用して2回繰り返し
 作業を実施。合計6回測定で4.07%RSDであった。(オートインジェクターでの
 6回の標準溶液の測定は2.94%RSDであった)

尿中のアヘン剤

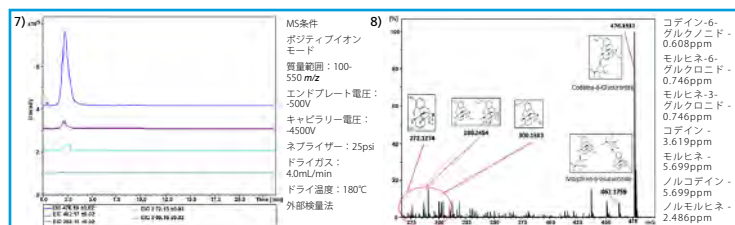
・通常、尿サンプルでは高濃度の塩を含んでおり、そのままMS
 (質量分析計)に導入するのは適しません。 何の処理もして
 いないコデインとその代謝物のモルヒネはイオン化抑制により
 その検出を制限されます。 簡易的な希釈と直接導入試験では、
 各イオン(476.16 コデイン-6-グルクノニド由来、460.18 モル
 ヒネ-6-グルククロニド由来、286.15 モルヒネとノルコデイン由来、
 272.13 ノルモルヒネ由来)を検出することができませんでした。
 (図4と5)



eVol® MEPS™でのESIソースへの直接導入

・デジタルシリンジeVol® MEPS™で簡単/迅速に脱塩を行って、
 デジタルシリンジでそのままMSへ直接導入行いました。
 MEPS™充填剤は開発中の逆相樹脂(ジビニルベンゼン系)充填剤を
 用いました。

- 50 µL メタノール + 0.1 % 酢酸
 吸引 400µL/min
 吐出 400µL/min
- 2 x 50 µL 水 + 0.1 % 酢酸
 吸引 400µL/min
 吐出 400µL/min
- 40µL 1:1 尿:水 + 0.1 % 酢酸
 20 x 吸引 100µL/min
 20 x 吐出 100µL/min
- 2 x 50µL 水 + 0.1 % 酢酸
 吸引 400µL/min
 吐出 400µL/min
- 2 x 50µL エア
 吸引 400µL/min
 吐出 400µL/min
- 20µL 60:40 メタノール:水 + 0.1 % 酢酸
 吸引 100µL/min
 吐出 5µL/min



まとめ

MEPS™は、強固なマイクロSPE技術で、ハイスループットなアプリ
 ケーションに適応可能であることが分かりました。 また、デジタル
 シリンジと組み合わせることで繰り返し再現性の良い流量制御と吸引
 容量の作業が可能となり、異なる作業員間での誤差も最小に抑えること
 が可能となりました。

このeVol®-MEPS™という組合せは、MSに直接導入することも可能
 ですが、GCやLCに導入することも出来るため、様々なアプリケー
 ションに対して簡易化迅速化を図る上で有効な手法であると考えら
 れます。

謝辞

アヘン剤分析のデータをご提供くださいましたタスマニア大学
 Australian Centre for Research on Separation Science (ACROSS)
 Esme Candish氏に御礼申し上げます。

MEPS 及び eVol の製品詳細や消耗品に関しましては、別途お問い合わせください。



エス・ジー・イー・ジャパン株式会社
 〒231-0011 横浜市中区太田町6-85 RK CUBE 3F
 TEL: 045 222 2885 / FAX: 045 222 2887
 e-mail: japan@sge.com