

Three white squares of varying sizes arranged in a staircase pattern to the left of the title.

# 機器分析における試料前処理

ジーエルサイエンス株式会社

千葉営業所

鈴木 健一

[suzuki@glsc.co.jp](mailto:suzuki@glsc.co.jp)

The background features several overlapping circles in shades of grey, red, and blue, with white circular cutouts. The circles are arranged in a way that they appear to be part of a larger, abstract design.

# Contents

1. 試料前処理の総論
2. 分野別試料前処理
3. まとめ

# 試料前処理の総論

# 試料前処理

実施されている様々な前処理

- フィルトレーション（濾過）
- 液-液抽出
- 膜透析
- 除タンパク処理
- カラムクロマトグラフィー
- 超臨界抽出
- ソックスレー抽出
- マイクロ波分解・抽出
- 遠心分離
- 固相抽出
- 脱塩
- 蒸留
- 酵素消化
- ラベル化
- 誘導体化
- 分解

ホモジネートや粉碎、溶解なども前処理とも言える。

# 試料前処理

試料前処理はなぜ行わなければならないか？

- 分析の妨害する物質の除去
- 測定できる濃度まで濃縮
- 分析できるように試料を調整する

# 試料前処理

試料前処理はなぜ行わなければならないか？

- 分析の妨害する物質の除去
  - 抽出時の不要物質の除去
  - 生体試料中の薬物などのLC/MS/MS前処理におけるタンパク質除去（除タンパク処理におけるリン脂質の除去）
  - プロテオミクスにおける脱塩
  - 食品中の残留農薬測定などにおける色素・脂質の除去
  - ICP-MSにおける有機物の分解

# 試料前処理

試料前処理はなぜ行わなければならないか？

- 測定できる濃度まで濃縮
  - 溶媒除去
  - 固相抽出
  - プロテオミクスにおけるマイクロ固相抽出
  - 元素分析における目的元素のカラム濃縮
  - 環境試料中の汚染物質などの濃縮

# 試料前処理

試料前処理はなぜ行わなければならないか？

- 分析できるように試料を調整
  - GC/MSにおける誘導体化
  - MALDI/MSにおけるマトリクスとの混合
  - 酵素消化
  - 気相、液相からの目的物の捕集
  - 同位体ラベル化
  - 結晶化
  - 乾固・溶媒除去



# 前処理を行う上での注意点

試料前処理を行う際の注意点は？

- ▶ 試料ロスを最小限に
- ▶ 前処理の条件を合わせる
- ▶ 分析データの変動要因の除去

# 前処理を行う上での注意点

試料前処理を行う際の注意点は？

- 試料ロスを最小限に
  - 前処理工程は極力少なく
  - 容器への吸着の影響（疎水吸着、イオン吸着、金属吸着）
  - 除タンパク処理時の変性タンパク質への巻き込み
  - 分解

# 前処理を行う上での注意点

試料前処理を行う際の注意点は？

- ▶ 前処理の条件を合わせる
  - ▶ 処理工程の条件（流速、温度、処理終了後から測定までの時間・・・）
  - ▶ 輸送、保管条件
  - ▶ サンプルング
  - ▶ 自動化の積極的な活用
  
- ▶ 分析データの変動要因を除去
  - ▶ 保管・輸送時における酵素などの失活・除去
  - ▶ カラムの状態

# 試料前処理

実施されている様々な前処理

- フィルトレーション（濾過）
- 液-液抽出
- 膜透析
- 除タンパク処理
- カラムクロマトグラフィー
- 超臨界抽出
- ソックスレー抽出
- マイクロ波分解・抽出
- 遠心分離
- 固相抽出
- 脱塩
- 蒸留
- 酵素消化
- ラベル化
- 誘導体化
- 分解

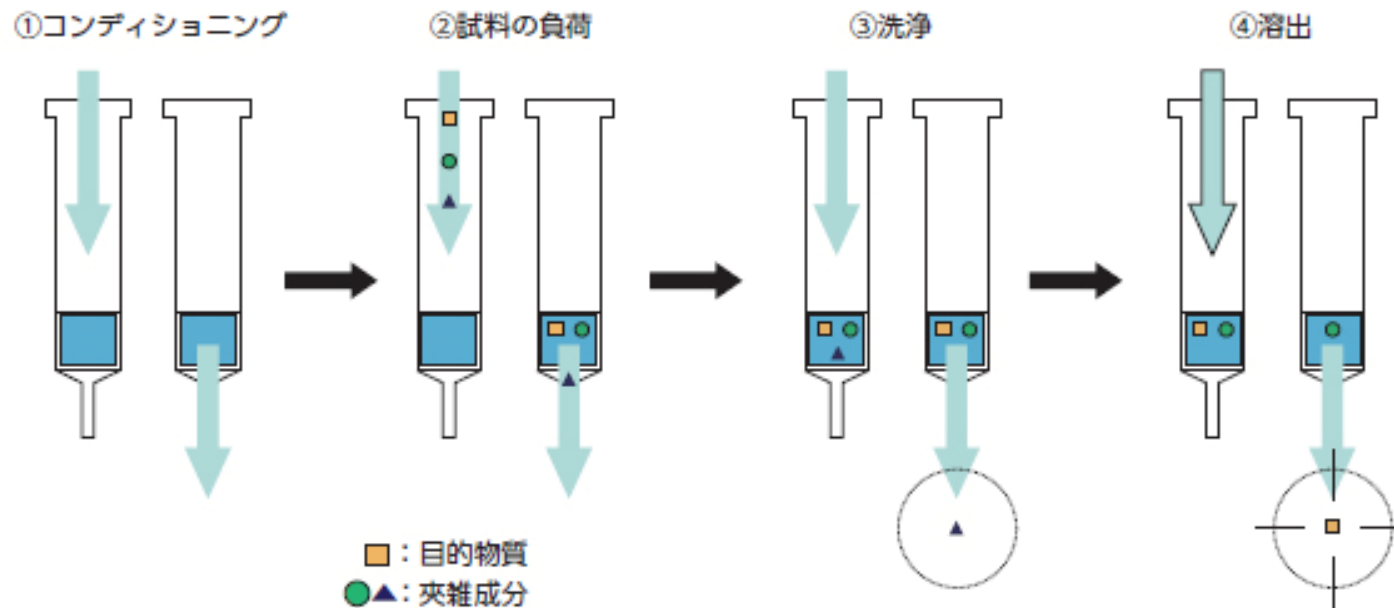
ホモジネートや粉碎、溶解なども前処理とも言える。

# 固相抽出

# 固相抽出法とは？

シリカやポリマーなどの機能性担体を樹脂製ミニカラムに充填し、ミニカラムに試料を通液させることで試料中の目的成分を抽出・精製する方法。

機能性担体を固相と呼び、試料（気体や液体）中の目的成分を固相との相互作用により抽出するため固相抽出法と呼ばれている。



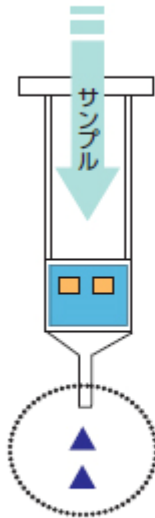
固相抽出の使用方法

# 固相抽出法とは？

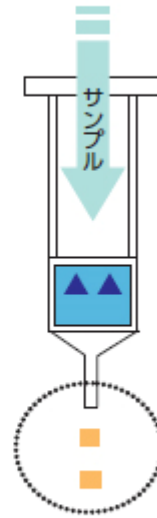
固相抽出ミニカラムの利用方法としては、二通りの使い方がある。

- 1つ目は抽出を目的とした前スライドの使用 방법에沿った使い方。固相抽出の特長である夾雑物の除去と濃縮を実現。図中A
- 2つ目としては、目的成分を保持させず、夾雑物を固相に保持させるクリーンナップカラムとしての使い方。濃縮はできない。図中B

A. 目的成分を保持させる方法



B. 夾雑成分を保持させる方法



■ 目的成分

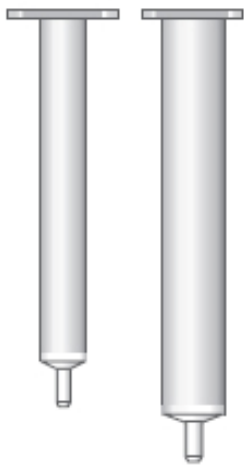
▲ 夾雑成分

固相抽出の利用目的

# 固相抽出カラム

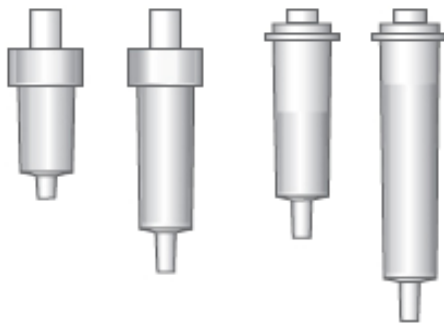
固相抽出カラムには目的に応じた様々な形態がある。

シリンジパレル型



ルアーデバイス型 (コマ型)

容器寸法: Slim : φ 8.8、長さ32 mm、21 mm  
 SlimJ : φ 8.8、長さ51 mm、31 mm  
 容器材質: ハウジング / PP製、フリット / PE製  
 用途: タンデム固相抽出処理、各種自動化システムなど



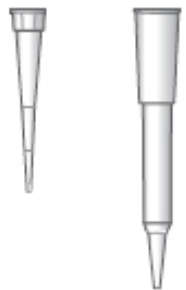
膜型 (ディスク型)

寸法: ディスク径47 mm、90 mm  
 材質: ハウジング / PTFE繊維  
 用途: 環境水、排水、大気の大気濃縮



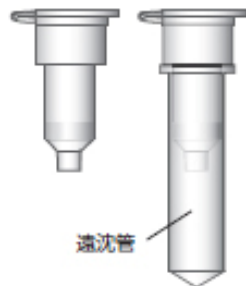
ピペットチップ型

容器容量: 10 μL、200 μL  
 容器材質: ハウジング / PP製  
 用途: ピペッターによる抽出処理



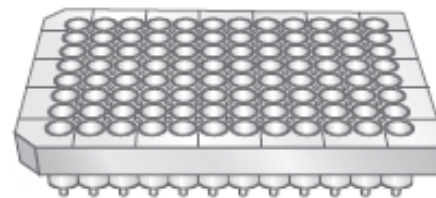
スピнкаラム型

容器容量: 1 mL  
 容器材質: ハウジング / PP製  
 用途: 遠心分離機による抽出



96ウェル標準プレート型

容器容量: 1.2 mL  
 容器材質: ハウジング / PP製、フリット / PE製  
 用途: 多検体試料の迅速処理  
 96ウェルプレート対応ワークステーション



固相抽出製品の形態の一例



# 固相抽出カラム

固相抽出カラムには目的に応じた様々な結合様式があり、それに応じた官能基が用意されている。

## 無極性固相

疎水性官能基と化合物の疎水性官能基における分子間力。  
水系マトリクス中からの疎水性化合物の抽出に有効

## 極性固相

極性官能基と化合物の極性官能基間での水素結合や双極子モーメント。疎水性マトリクスからの親水性化合物の抽出に有効

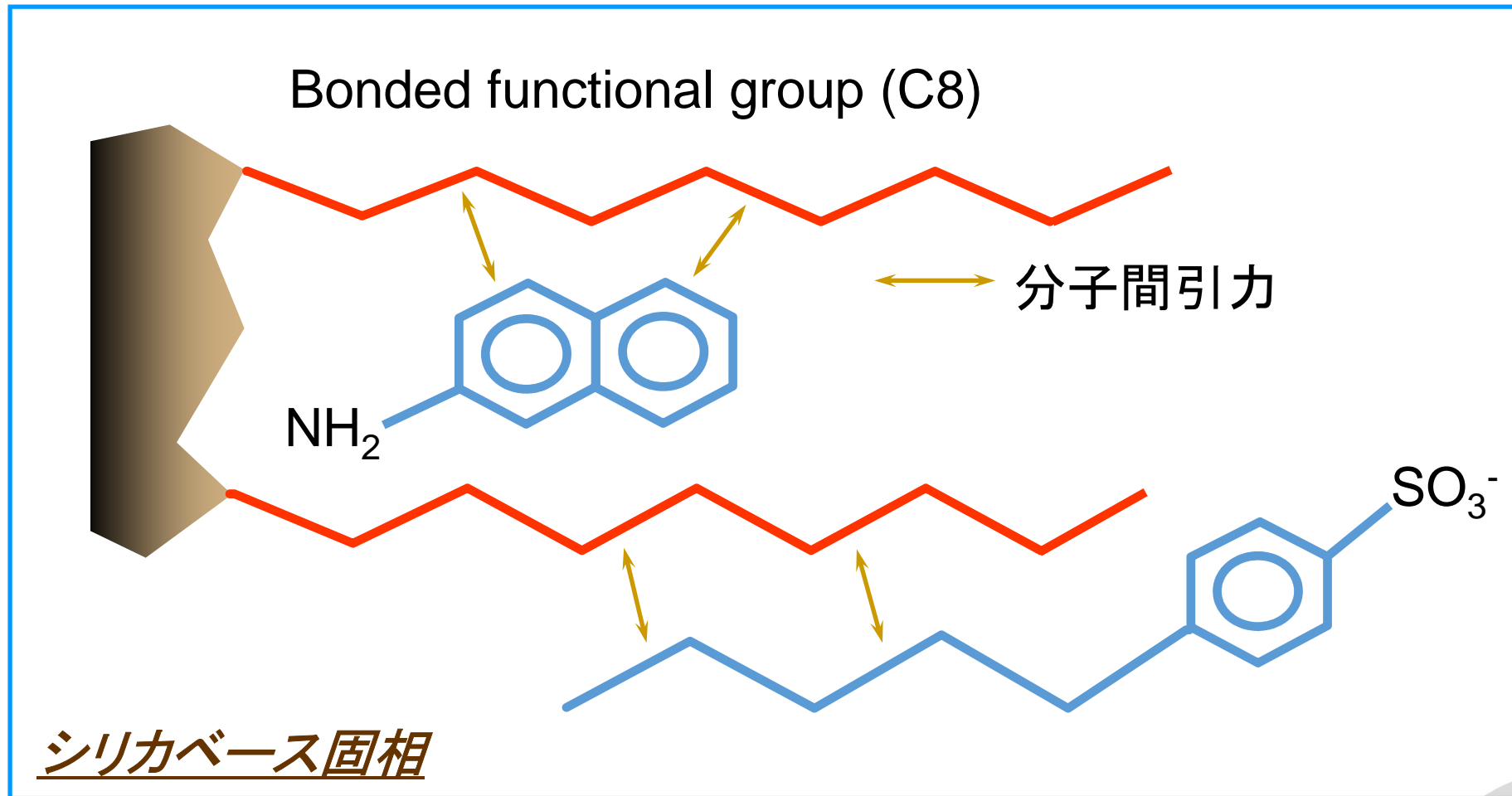
## イオン交換固相

固定相のイオン交換基と化合物の固定相と対をなすイオン交換基とのイオン結合。イオン性の低いマトリクスにおける特定の化合物を抽出する場合に有効。

固定相の基材としては、シリカの他にSDBなどのポリマーを用いたものもある。

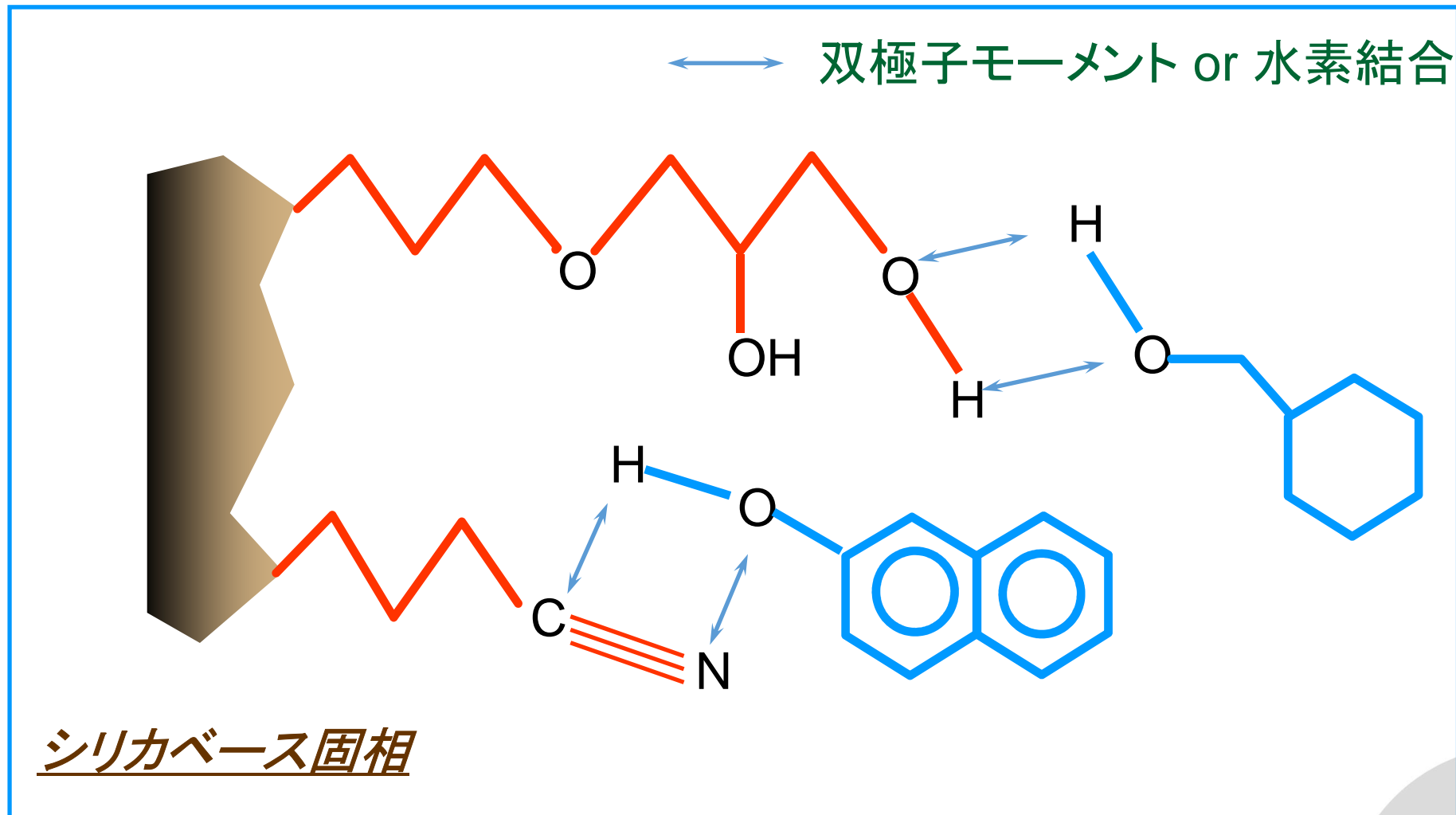
# 固相抽出カラム

固相抽出カラムの結合メカニズム（無極性固相）



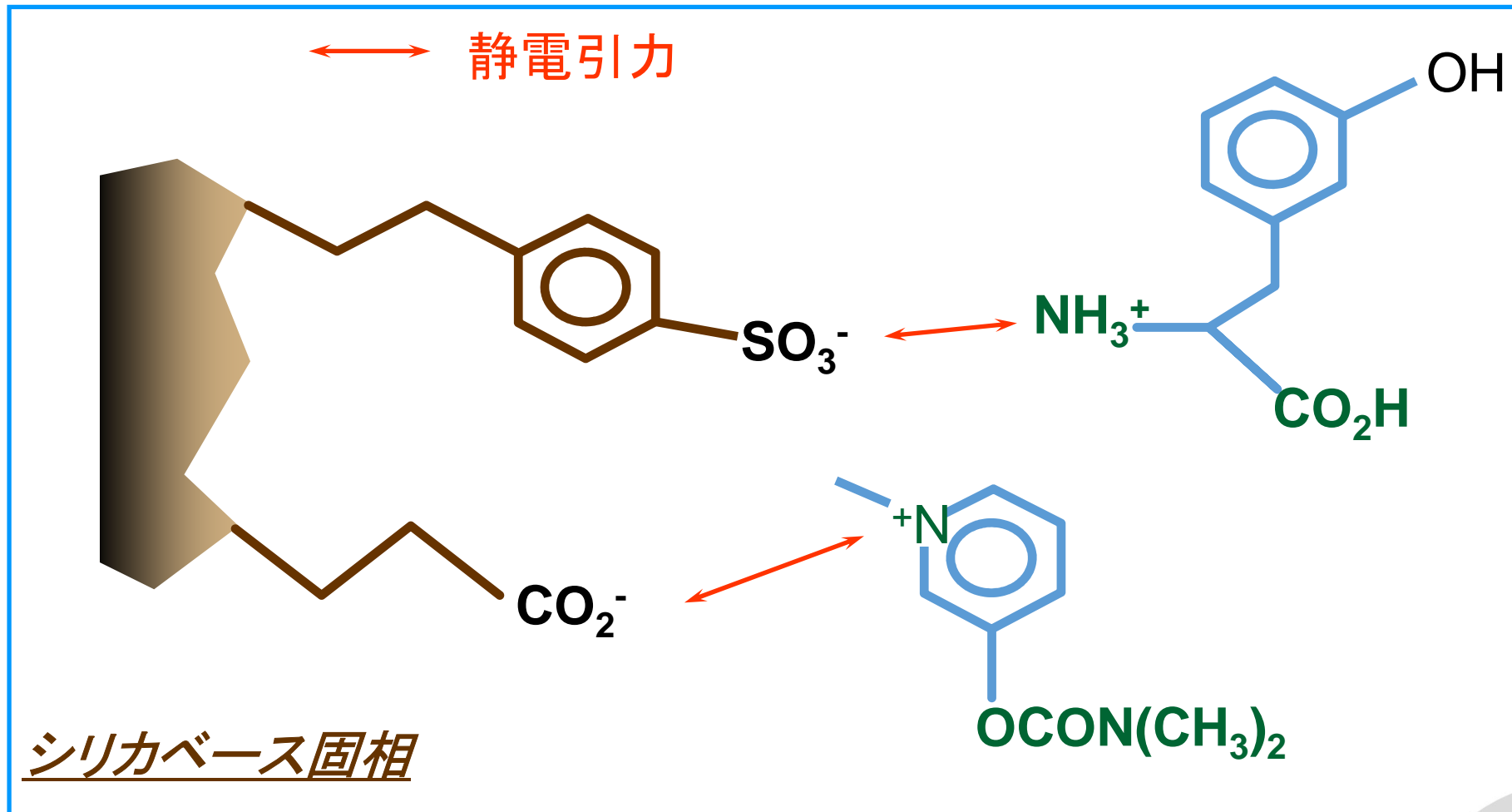
# 固相抽出カラム

固相抽出カラムの結合メカニズム（極性固相）



# 固相抽出カラム

固相抽出カラムの結合メカニズム（イオン交換固相）



# 固相抽出カラム

イオン交換固相を用いる際の基本的な考え方。

結合時：

固定相、化合物の官能基がともに解離している状態にする。

脱着時：

固定相もしくは化合物の官能基のどちらかが非解離状態にする。

固定相と化合物の官能基のイオン性は対をなすものを選定する。

強イオン交換 ⇔ 強イオン性官能基 ×


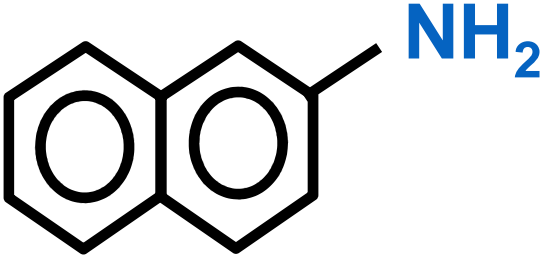
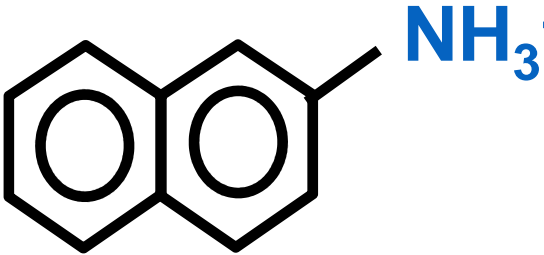
弱イオン交換 ⇔ 弱イオン性官能基 ×

強イオン交換 ⇔ 弱イオン性官能基 ○

弱イオン交換 ⇔ 強イオン性官能基 ○

# 固相抽出カラム

メソッドの選定には目的化合物が何かでは決められない。

マトリクス例	化合物 (アミノナフタレン)	推奨相互作用
生理食塩水		疎水性相互作用
オリーブオイル		極性相互作用
上水		イオン交換

# 分野別試料前処理

# 分野別試料前処理

- ケミカル・合成分野
- 生体試料の前処理（低分子化合物）
- 生体試料の前処理（生体高分子化合物）
- 食品分析の前処理



# ケミカル・合成分野

# ケミカル・合成分野

試料前処理で考えられる困りごとあれこれ

- 分液における処理
- 単一成分へ精製する
- 強い溶媒の使用
- GC分析での前処理
- 元素分析における精製

合成分野においては、目的成分は存在比が高いため、あまり吸着などは気にしなくても良いのでは・・・

# 分液処理

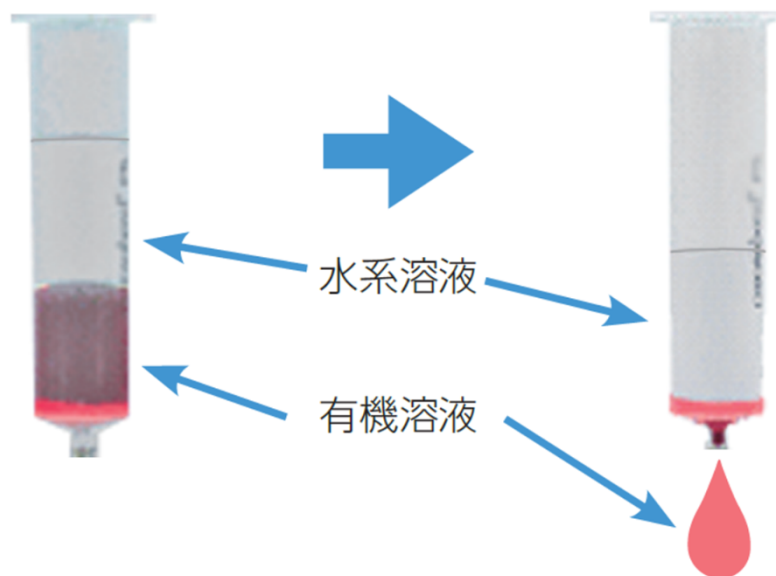
有機合成の際の反応停止に水を添加などにより分液処理が必要になる場合

一般的には分液ロートを用いての分液を実施。

検体が多い場合などには、効率的な分液ツールの使用も検討



フェーズセパレーターなども活用できる。

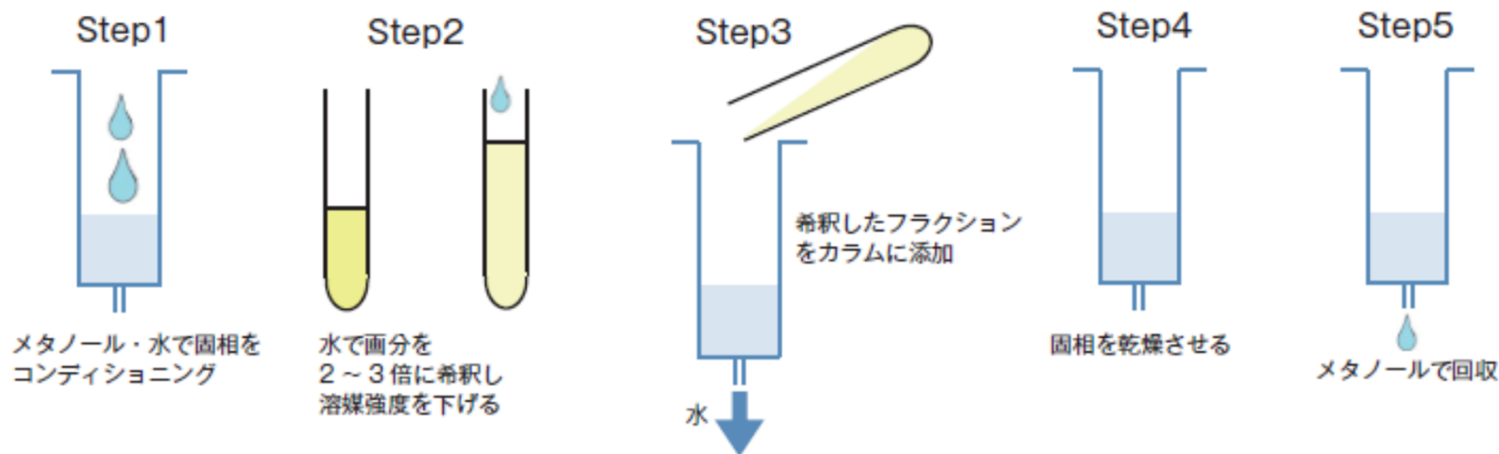


# 単一成分への精製

混合物になっている場合、分離精製を行う。

- 再結晶
- カラム精製（フラッシュクロマト、HPLC分取など）

HPLC分取を行った際の効果的な転溶

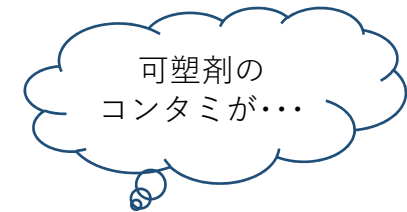


水が混入した回収液を有機溶媒100%溶液に転溶が可能

# ケミカル・合成分野

## 強い溶媒の使用

樹脂チューブを使用すると容器のポリマーから可塑剤などが溶出



表面処理チューブの使用

樹脂内壁をガラス化することで可塑剤の溶出を抑制

## GC分析の前処理

合成結果の確認などにGCを活用

試料に水分の混入



ボウショウカラムで簡便に脱水

回収率（再現性）  
が悪い



注入口ライナーの交換  
スプリットベントの詰まり



# 元素分析の前処理

有機物を分解する際の灰化処理

- ▶ 常圧下での湿式灰化
- ▶ マイクロウェーブ分解
- ▶ マッフル炉などを用いた灰化

湿式灰化

一般的には市販のホットプレートを用いてその上にビーカーを置き、硝酸加熱分解



専用の分解装置の使用がコンタミのリスクを軽減



# 元素分析の前処理

夾雑元素が分析の邪魔をする。

- 脱塩
- イオン交換樹脂処理
- 専用前処理カラム処理
- ケミカルアフィニティカラム処理

ケミカルアフィニティカラム

クラウンエーテルを用いた特定の元素を吸着する樹脂を使用（AnaLigなど）

- 海水中のナトリウムなどアルカリ金属除去（アルカリ金属保持）
- 貴金属類の保持
- 特定の元素群の抽出 など



# 元素分析の前処理

## AnaLig

### MetaSEP AnaLig アプリケーションガイド

MetaSEP AnaLig は、一部の製品を除いて再生使用が可能です。（Ha-01, Cr-01 は再生不可です。）

品名	適用可能な元素	適用マトリックス	適用 pH	AnaLig 樹脂 提供可能母体の種類				溶出溶液など
				Si	ポリアクリレート	ポリスチレン	チタニア	

#### アルカリ金属向け AM、AE シリーズ

AM-01	Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	水溶液	< 0 - 10.5	○				water, EDTA elutable
AM-02	Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	水溶液	7.5 - 10.5	○				acid elutable
AM-03	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> (Mg <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> weakly)	水溶液	< 0 - 10.5	○		○		water, EDTA elutable
AM-04	K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Rb <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup>	水溶液	7.5 - 10.5	○				acid elutable
AM-05	Li <sup>+</sup>	水溶液	7.5 - 10.5	○				acid elutable
AM-06	Ba <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Tl <sup>+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup>	水溶液	9.0 - 10.5	○				acid elutable
AM-07	Cs <sup>+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Tl <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup>	水溶液	9.0 - 10.5	○		○		acid elutable
AE-01	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , other +2 and +3 cations	水溶液	> 6.0	○				acid elutable
AE-02	Ca <sup>2+</sup>	水溶液	6.0 - 10.5	○				acid elutable
AE-03	All alkali and alkaline earths except Li <sup>+</sup> , Mg <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup>	水溶液	< 0 - 10.5	○		○		water, EDTA elutable
AE-04	Sr <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cs <sup>+</sup>	水溶液	< 0 - 10.5	○				water, EDTA elutable

#### アニオン、ハロゲン類向け AN, Ha, F シリーズ

AN-01	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> > SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> > NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> > Cl <sup>-</sup> , Cr	mM 酸	< 0 - 10.5	○	○	○		Base elutable
AN-02	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SeO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> > SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> > NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> > Cl <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Cr	水溶液	< 0 - 10.5	○	○	○		Base elutable
Ha-01	Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> (一回使用のみ)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	< 0 - 2.0	○				removal 100 ppb
F-01	F <sup>-</sup> > SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> > Cl <sup>-</sup>	水溶液	< 0 - 4	○		○		Base elutable
F-02	F <sup>-</sup>	水溶液	2 - 8				○	Base elutable

#### 放射性元素

Pu-01	Pu <sup>4+</sup>	>2 M 酸	< 1 - 10.5	○				6 M HCl elutable
Pu-02	Pu <sup>4+</sup>	2 M 酸	< 0 - 10.5	○	○	○		>6 M HCl elutable



# 生体試料の前処理 (低分子化合物)

# 生体試料の前処理（低分子化合物）

## 生体試料の前処理のあれこれ

- 目的化合物が微量
- 測定方法がLC/MS/MSを用いるケースが多い
- 多様なマトリクス
- ターゲット分析と網羅的解析



- 夾雑物の除去
- 濃縮

前処理法のステップだけではなく、測定行為全般において吸着のリスクを考える必要がある。

# 生体試料におけるマトリクス

生体試料には分析に不都合な成分が含まれている

	塩類	脂質	タンパク質	細胞構成成分
肝細胞	+	△	+	+++
血漿	+	+	+++	△
尿	+++	△	—	—
胆汁	+++	△	—	—
脳組織	+	+++	++	+++

必要なものをロスなく、かつ不要なものを効率よく除去することが重要

# 生体試料の前処理法

一般的に実施されている前処理法

➤ 除タンパク処理

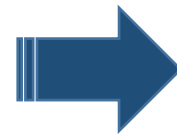
➤ 液液抽出

➤ 固相抽出

# 生体試料の前処理法

近年LC/MS/MSの普及や高感度化により、生体試料前処理にも影響を与えている。

- 検出の選択性向上
- 感度の向上



- 選択的抽出の不要
- 濃縮不要

液液抽出  
固相抽出

除タンパク処理

# 除タンパク処理

マトリクスに含まれているタンパク質を変性させて除去する方法

一般的な除タンパク処理のプロセス

1. 試料に3~4倍量の変性剤を添加  
有機溶媒にはアセトニトリル、メタノールなどを使用  
酸にはトリクロロ酢酸などを用いる
2. 変性剤を添加した試料を攪拌し、タンパク質を変性させる。
3. 遠心分離装置にてタンパク質の変性物と上清を分離する。
4. 分離された上清をシリンジフィルターなどで濾過をし、分析試料とする。

# 除タンパク処理

## 除タンパク処理の長所・短所

### 長所

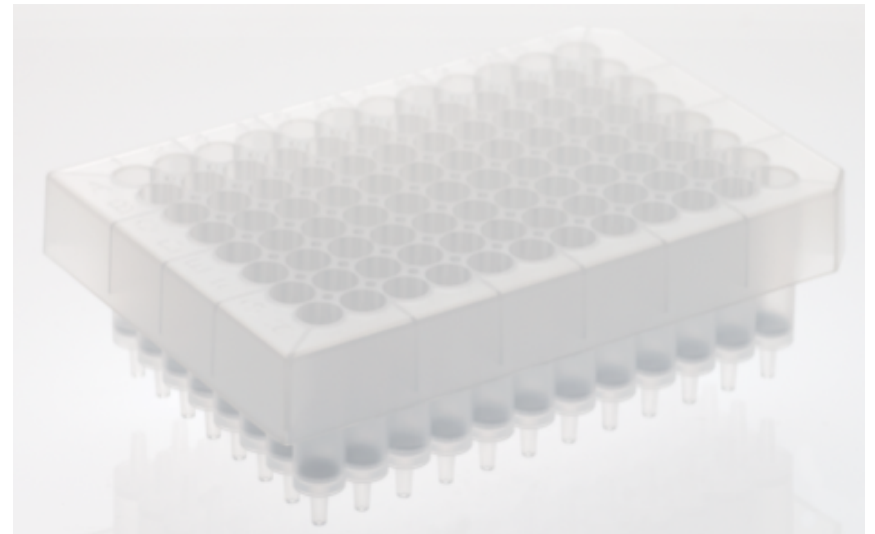
- マトリクス・ターゲットを比較的選ばないユニバーサルなメソッド
- 簡便な操作

### 短所

- 全量回収が困難
- 多検体には不向き
- リン脂質などの除去ができない

# 除タンパク処理

全量回収が困難  
多検体処理には不向き



フィルトレーション法：  
96WellPlateフォーマットにフィルターを挿入し、ろ過を行うことにより、変性させたタンパク質を除去する方法



# 除タンパク処理

## フィルタープレート

### 単層メンブレン フィルター

- 安価だが詰まり易い
- ショートノズルの製品が中心
- コンタミしやすい

### 多層機能 フィルター

- 多層の膜が様々な大きさの凝集物を多段階に止めるので、詰まりづらい
- ロングノズルがコンタミを防止

# 除タンパク処理

## リン脂質除去

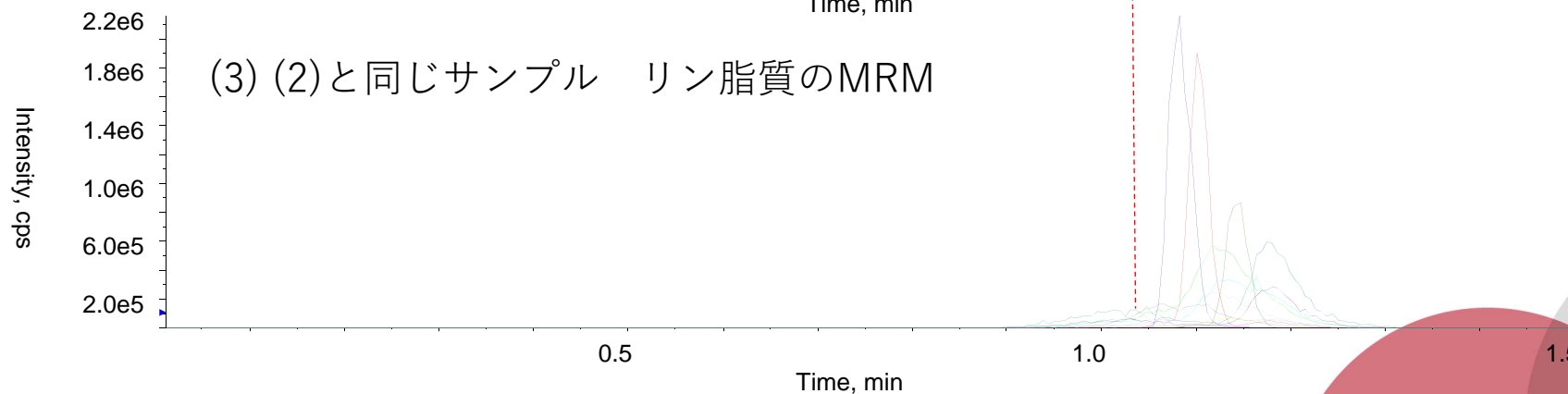
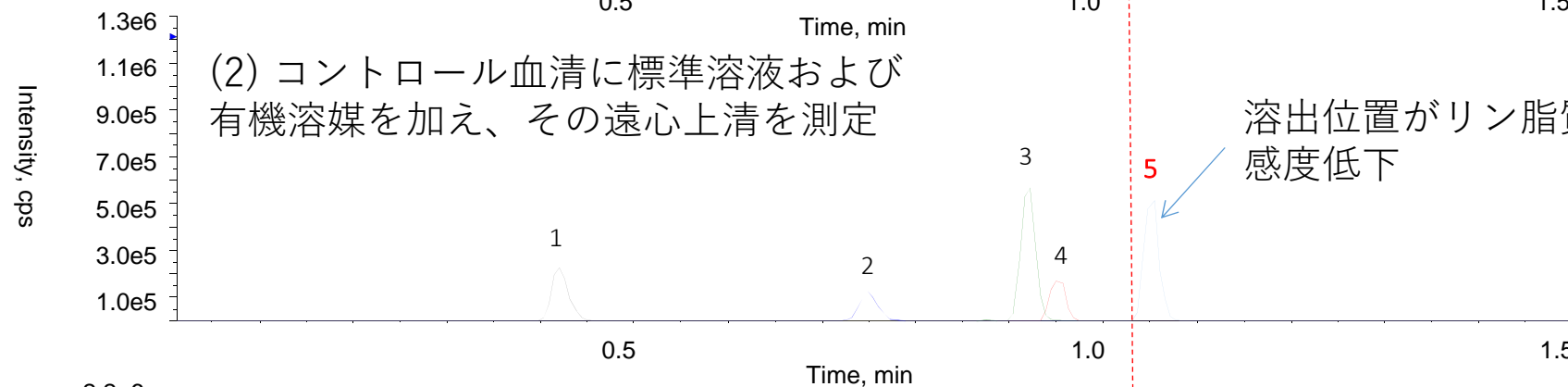
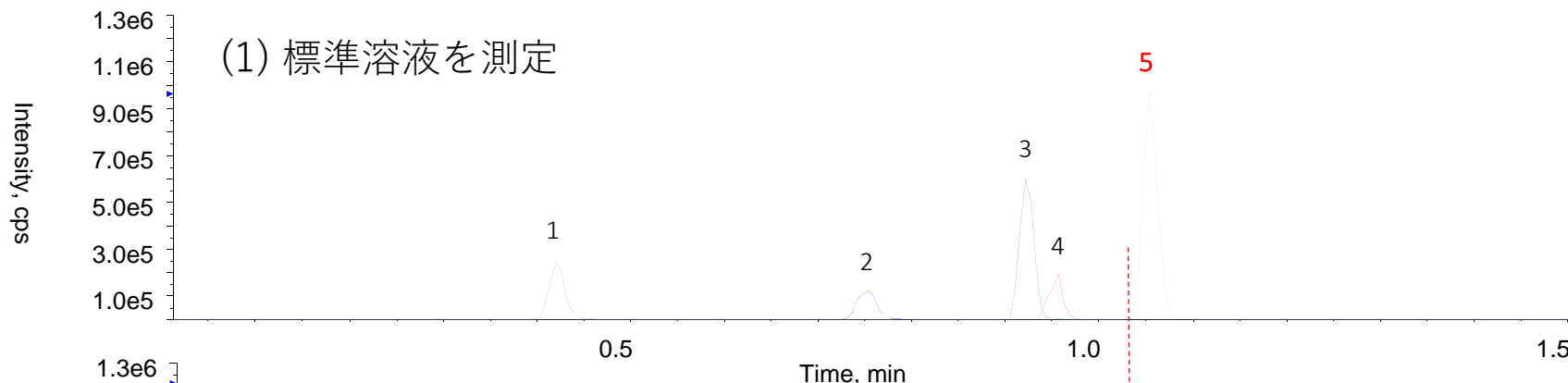
高機能フィルターを用いてもリン脂質は除去できない



リン脂質はカラムに保持され、溶出される。  
条件によっては断続的に溶出されることもある。  
→イオン化への影響が懸念される。

# リン脂質の影響

生体試料中の化合物を分析する際に、標準サンプルと実サンプルの感度差が生じた際、**試料に含まれるリン脂質が原因と推測される。**



# 除タンパク処理

## リン脂質除去

高機能フィルターを用いてもリン脂質は除去できない



高機能フィルターにリン脂質を除去する充填剤を充填

- 逆相タイプ
- ケミカルアフィニティタイプ

# リン脂質の除去

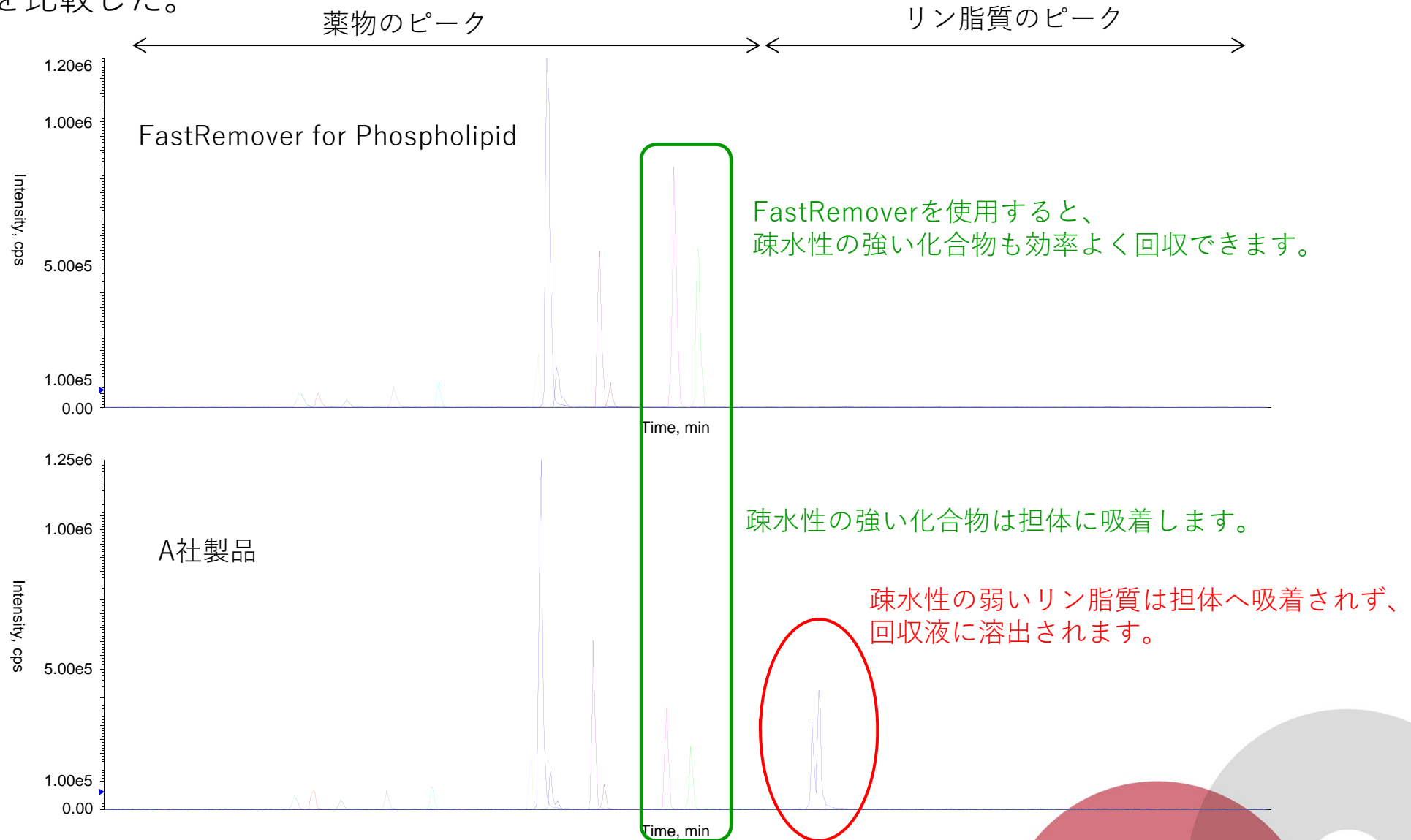
リン脂質を取り除くことにより、その影響を低減させることが可能。



# リン脂質の除去

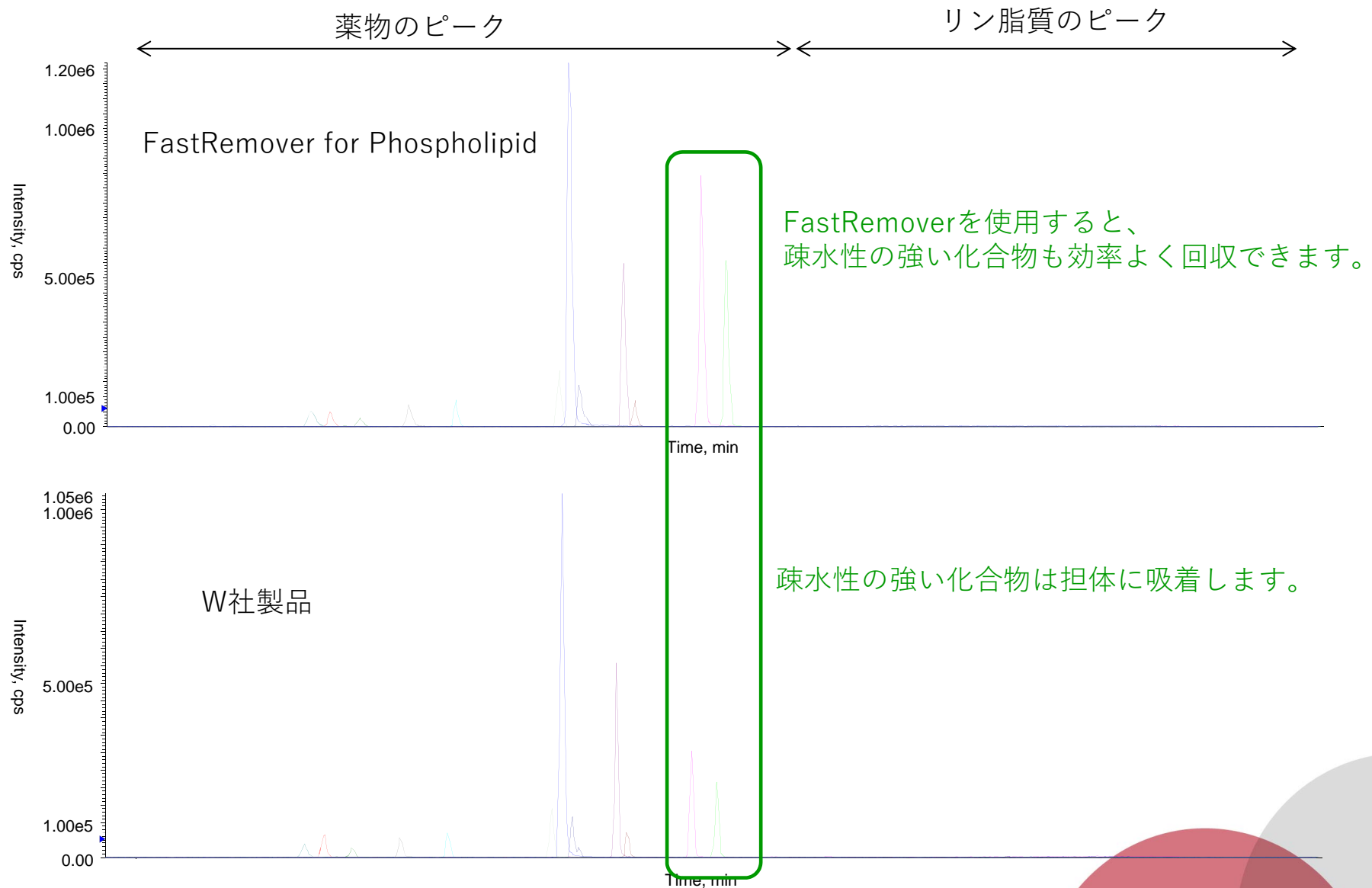
リン脂質の除去能と化合物の吸着比較

FastRemover for PhospholipidおよびA社製品について、リン脂質の除去能および化合物の吸着を比較した。



# リン脂質の除去

FastRemover for PhospholipidおよびW社製品について、リン脂質の除去能および化合物の吸着を比較した。



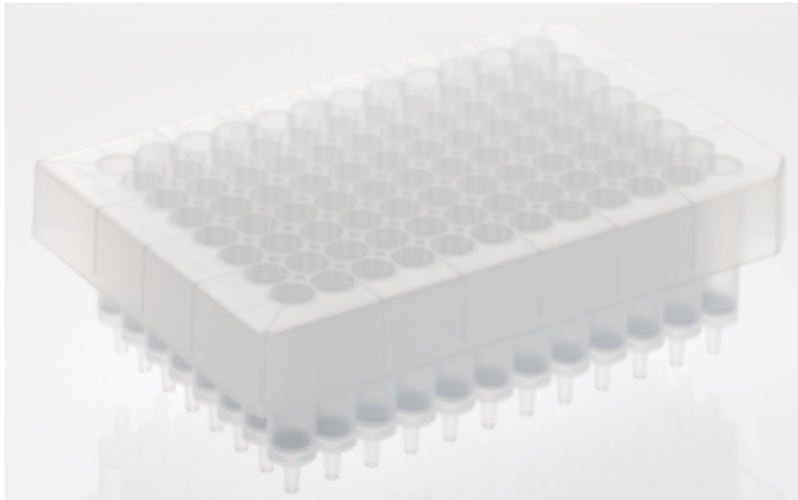
# リン脂質の除去

FastRemover for PhospholipidおよびS社製品について、リン脂質の除去能および化合物の吸着を比較した。





# FastRemover for Phospholipid



- 4層のグラジエントフィルターが詰まりを防ぐ。
- 最下層のメンブランフィルターが微粒子の流出を防ぐ
- ノズルが長くコンタミのリスクを低減
- 自動化にも対応可能
- チタニアとジルコニアがリン酸及びリン酸エステルを選択的に除去
- 化合物のロスを最小限に

メタノールやアセトニトリルで変性させた試料を効率的に濾過し、分析効率を向上。

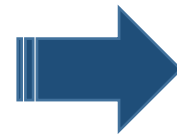
生体試料の迅速な前処理に最適。

リン脂質を除去し、イオンサプレッションを低減。

# 生体試料の前処理法

近年LC/MS/MSの普及や高感度化により、生体試料前処理にも影響を与えている。

- 検出の選択性向上
- 感度の向上



- 選択的抽出の不要
- 濃縮不要

液液抽出  
固相抽出

除タンパク処理

# 固相抽出法

生体試料の前処理で固相抽出法が向いている主なケースは以下のよう  
な場合が考えられる。

- ▶ 網羅的測定ではなくターゲットが明確な場合
- ▶ 目的化合物に異性体が多く含まれている場合
- ▶ 同一ターゲットの検体数が多い場合
- ▶ タンパク質以外のマトリクスが多い場合

近年の生体試料の前処理では、LC/MS/MSの高感度化などに伴い、試料の微少  
化が進んでいる傾向がある。

# 固相抽出法

近年の生体試料の前処理では、LC/MS/MSの高感度化などに伴い、試料の微少化が進んでいる傾向がある。



微少化された試料において、適応できる固相抽出カートリッジを使用する必要がある。

Waters社：OASIS マイクロエリューションプレート  
ジーエルサイエンス社：MonoSpin など



Waters社  $\mu$ Elution  
Websiteより画像引用



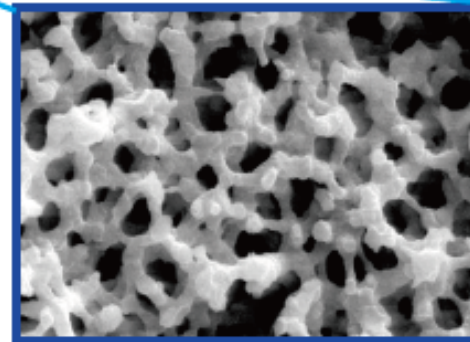
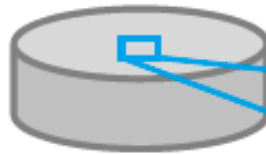
MonoSpin

# 固相抽出法

MonoSpin：シリカモノリスディスクに様々な官能基を結合させ、  
スピнкаラムに装着させた前処理カラム。  
吸引処理と遠心処理で使用可能



MonoSpin



モノリス写真



# MonoSpin Series

## 特長

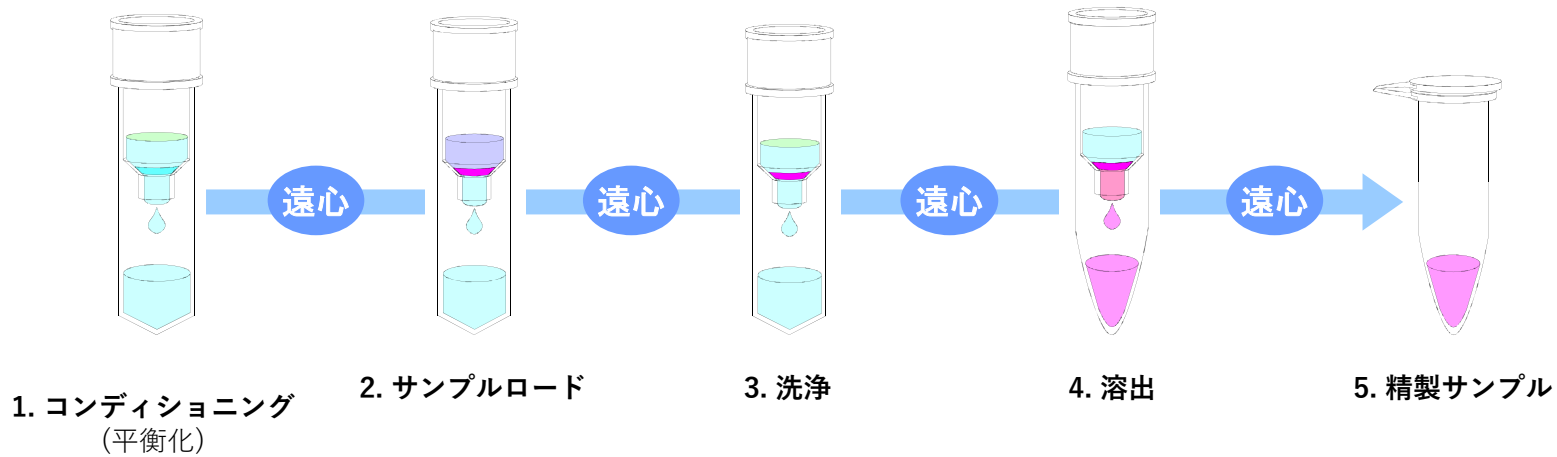
- 少ない溶出溶媒で対応可能 (50uL)
- 遠心機での処理
- 幅広い官能基ラインナップ

逆相	C18、C18FF、Ph、C18-CX、C18-AX
HILIC	NH <sub>2</sub> 、Amide
カチオン交換	CBA、SCX
アニオン交換	NH <sub>2</sub> 、SAX
特殊結合相	PBA、TiO <sub>2</sub> 、Trypsin、ME
アフィニティ	Protein A,G,L、Phospholipid

# MonoSpin Series

遠心チューブにスピncラムを装着し、遠心力を利用して通液させる。

## Typical Procedure for MonoSpin



遠心 : 3,000~10,000 rpm for 30msec~2 min



精製工程を15分以内に終わることができる。

# 生体試料の前処理（低分子化合物）

## 吸着を考える

目的化合物の量も少なくなることに比例し、吸着によるロスも考慮しなければならない。

測定装置の高感度化が吸着を目立たせるようになってきた!?

## 例えば・・・

HPLC測定における注入量は？ 数10ng～数 $\mu$ g

LC/MS/MS測定における注入量は？ 数10pg～数ng

吸着量が50pg/分析だとしたら・・・



# 化合物の吸着

目的化合物の量も少なくなることに比例し、吸着によるロスも考慮しなければならない。

- 疎水吸着
- 金属吸着
- イオン吸着
- タンパク結合

具体的な吸着リスク

- バイアルビン
- HPLCシステム由来（配管、オートサンプラーニードル、バルブ）
- HPLCカラム
- 前処理などに使用する容器類 他

# 化合物の吸着

吸着について：サンプル容器への吸着  
イオン吸着のリスクのある化合物の場合は、一般的にポリマーバイアルを使用。

ポリプロピレンの疎水性内壁に対しての疎水性相互作用及び可塑剤として混入している分子によるイオン吸着

高純度なポリプロピレンを使用

表面改質により吸着を改善

- 親水性化
- 撥水処理 etc.

# 化合物の吸着

## 低吸着PPバイアルの使用

高純度なポリプロピレンを用いたバイアルに表面処理を施し、バイアル表面の疎水性を低減させた製品

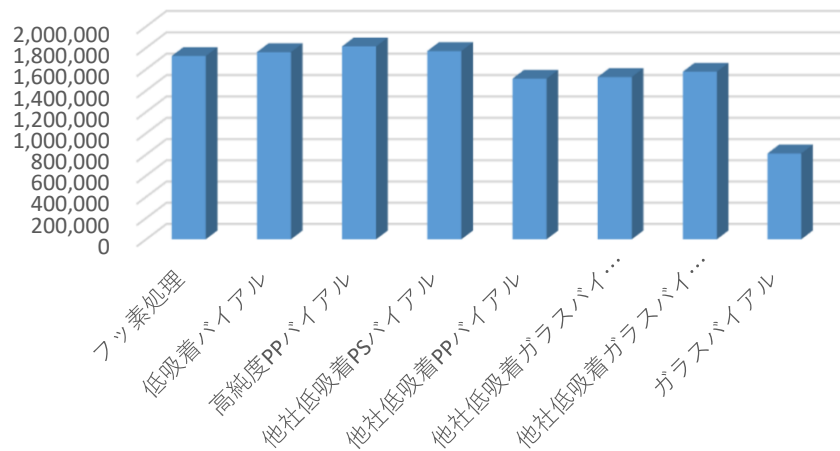


## 吸着評価

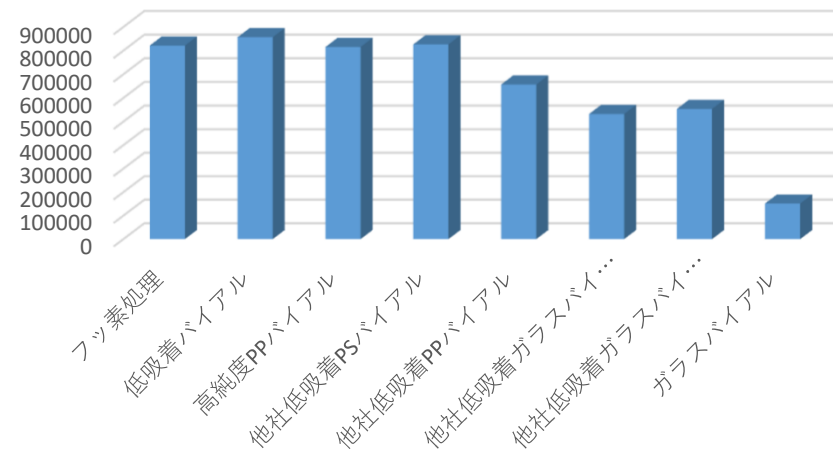
1. 各試料を50ng/mL水溶液になるように調整
2. 各試料を各バイアルに80  $\mu$ L分注。  
(1.5mLバイアルは800  $\mu$ L)
3. 4°Cで冷蔵し、24時間後にLC/MS/MSで分析

# 吸着評価

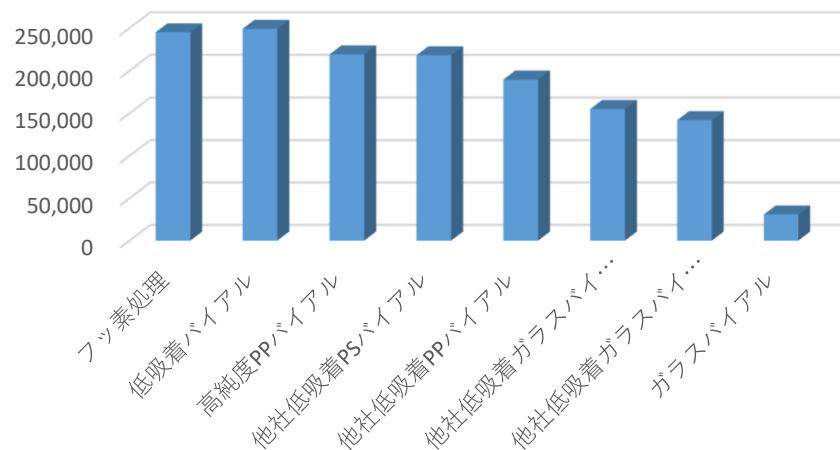
## Diphenhydramine



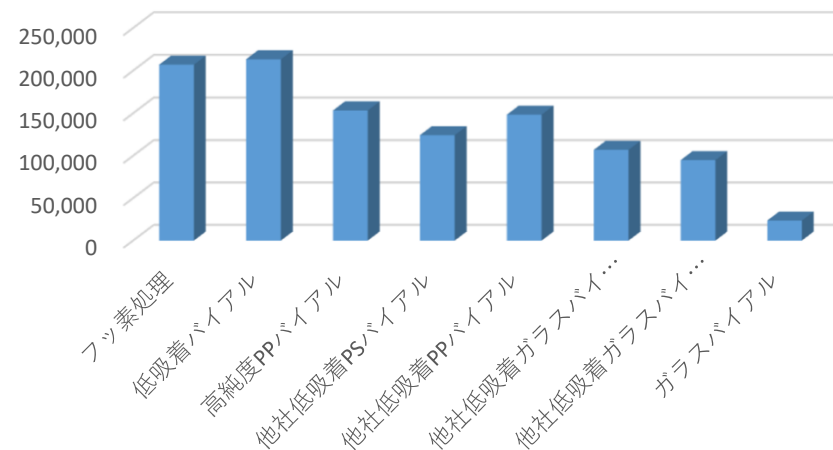
## Doxepin



## Amitriptyline



## Chlorpromazine

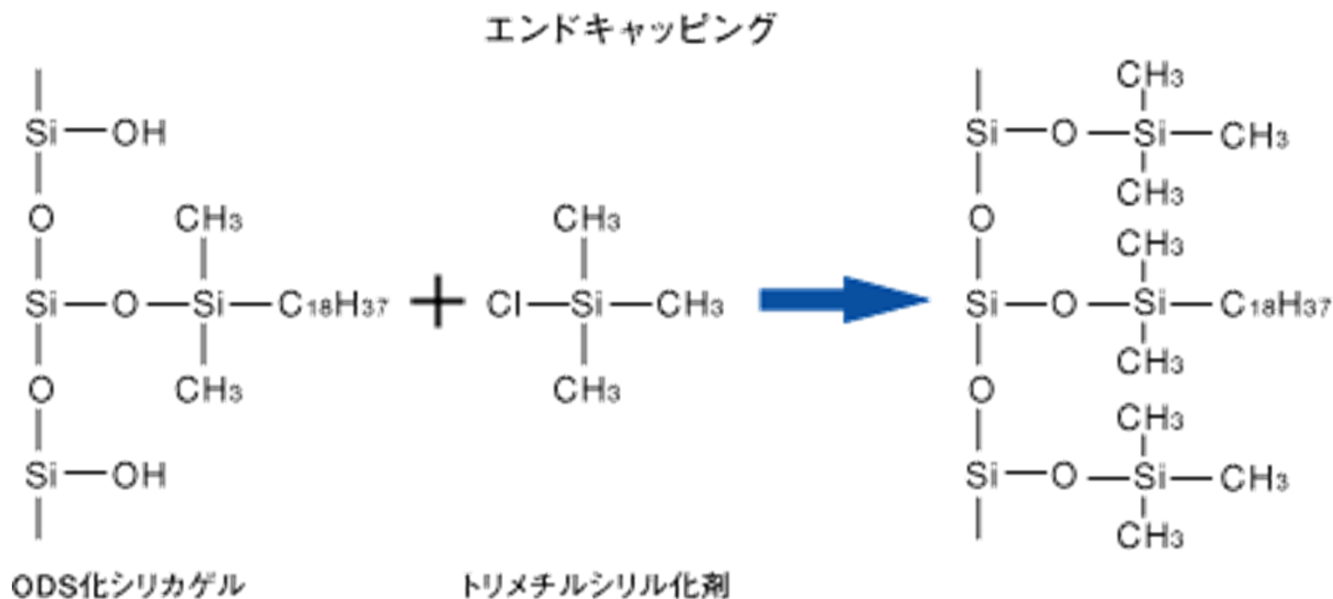


# 化合物の吸着

## HPLC充填剤の吸着

吸着のメカニズム

- 塩基性化合物の吸着
- 酸性化合物の吸着
- 金属配位性化合物の吸着



# 化合物の吸着

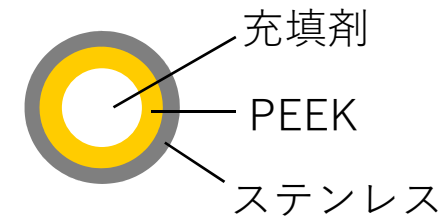
## カラム容器に対する吸着

金属錯体を形成するような化合物では、充填剤だけでなく、SUSカラムの内壁及びフィルターに吸着を起こしてしまう。

### PEEKカラム



### 高耐圧PEEKカラム



### UHPLC-PEEK カラム

# 化合物の吸着

## カラム容器に対する吸着

しかし、このような影響が発生するのは充填剤に含有する金属がしっかり処理されている場合のみ

例えば・・・

InertSustain C18 カラムサイズ2.1φ×150Lの場合  
充填剤表面積：350m<sup>2</sup>/g カラム充填剤量：240mg  
カラム当り充填剤表面積：85m<sup>2</sup>/カラム

管部の表面積：0.001m<sup>2</sup>、  
入り出口フィルター部表面積：0.04m<sup>2</sup>程度  
カラムハードウェアの表面積：0.041m<sup>2</sup>

# 金属への吸着

1. オキシテトラサイクリン
  2. テトラサイクリン
- 各2 mg/L

## 測定条件

**カラム** : InertSustainSwift C18  
(1.9  $\mu$ m, 50 x 2.1 mm I.D.)

他社カラム  
(1.7  $\mu$ m, 50 x 2.1 mm I.D.)

**移動相** : A) 0.1 % HCOOH in CH<sub>3</sub>CN

B) 0.1 % HCOOH in H<sub>2</sub>O

A/B = 10/90 – 1.5 min –  
10/90 – 2.5 min – 90/10 , v/v

**流量** : 0.4 mL/min

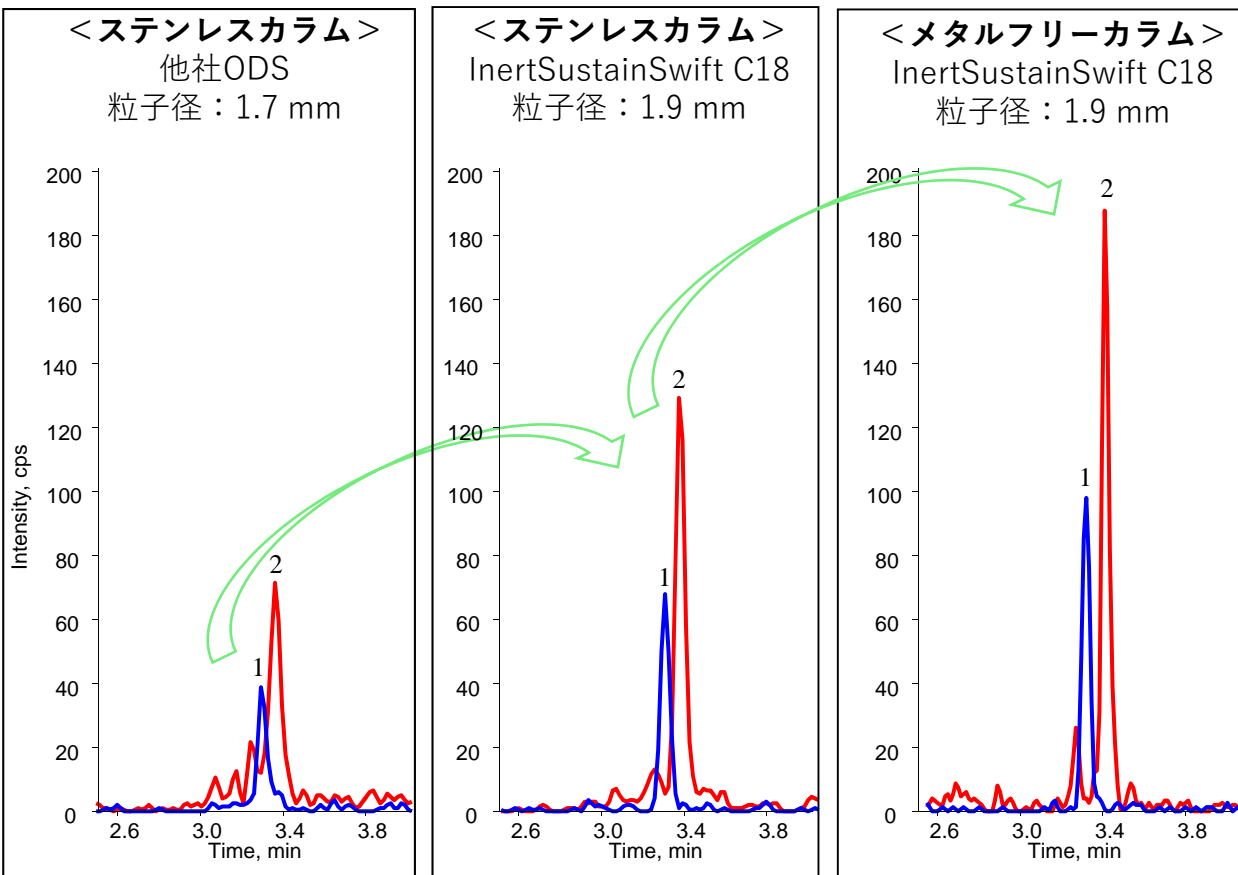
**カラム温度**: 40 °C

**検出** : LC/MS/MS

(ESI, Positive, MRM)

**注入量** : 10  $\mu$ L

**サンプル濃度**: 2.0 mg/L



充填剤の不活性度違い

カラムホルダーの違い



# 生体試料の前処理 (高分子化合物)

# 生体試料の前処理（高分子化合物）

## タンパク質分析の前処理のあれこれ

- タンパク質精製・抽出
  - タグ精製
  - ゲル電気泳動
  - 免疫沈降
  - 膜タンパク質抽出
- 還元・アルキル化～タンパク質消化
- 特異的なペプチドの精製
- 界面活性剤の除去
- 脱塩

# 生体試料の前処理（高分子化合物）

## タンパク質精製・抽出

タンパク質の精製・抽出では様々な手法が用いられている。

- タグ精製
- ゲル電気泳動
- 免疫沈降
- 膜タンパク質抽出 etc.

抽出・精製などでも新規手法の開発や製品の応用により再現性の向上や効率化が期待できる。

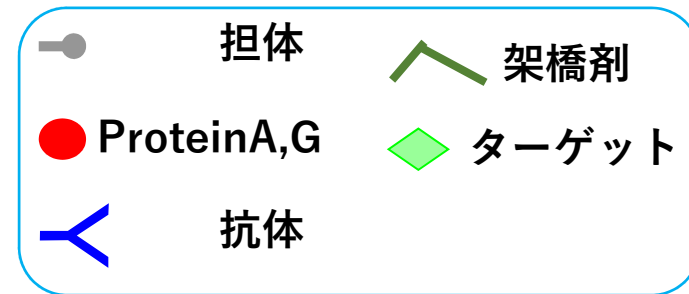
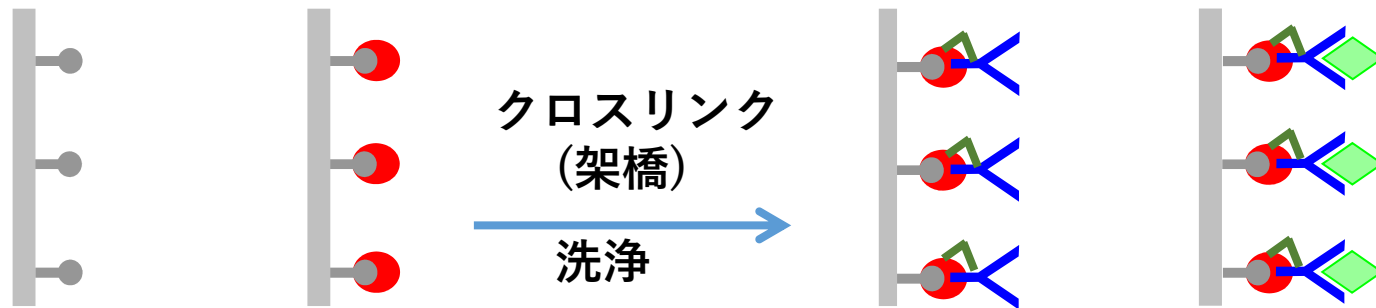
# 生体試料の前処理（高分子化合物）

MonoSpin ProA、ProGを用いた分子の精製

免疫沈降により、抗体特異的な分子を精製する手法

MonoSpin ProA、ProGを用いることで、抗体カラムが効率的に作成可能

## MonoSpin ProA,ProG を用いた方法

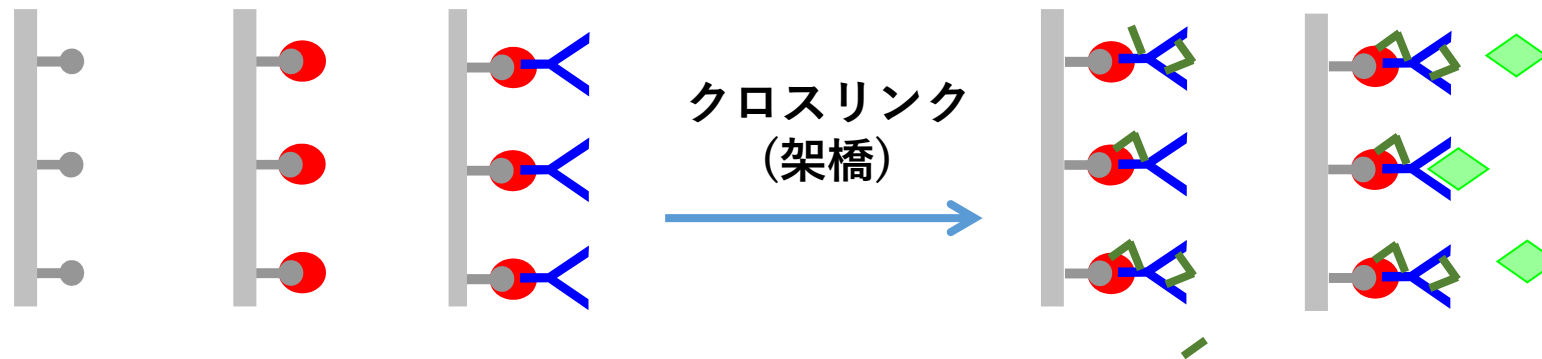
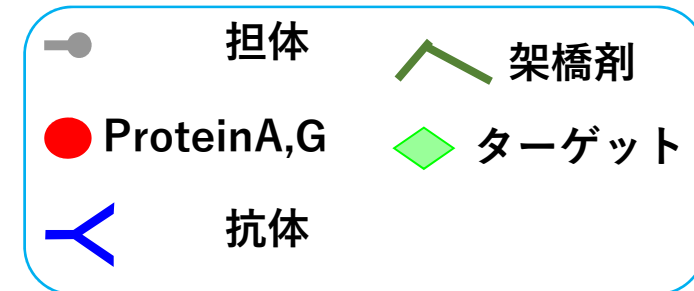


MonoSpinでは、proteinAを架橋剤で活性化し、余分な架橋剤を洗浄後、抗体を結合するため、抗体の活性部位は失活しません

# 生体試料の前処理（高分子化合物）

MonoSpin ProA、ProGを用いた分子の精製

従来法：アガロースビーズに抗体を固定化

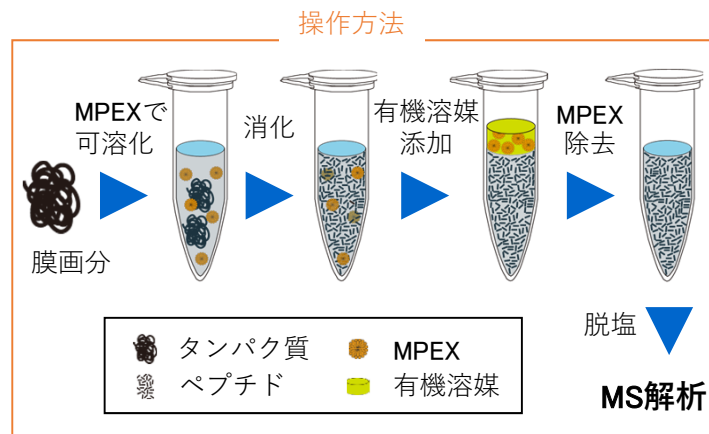


従来法での抗体の共有結合固定では、proteinAに抗体を結合後、クロスリンクを行う為架橋剤が抗体の活性部位も架橋し、アフィニティの失活が起こる場合があります

# 生体試料の前処理（高分子化合物）

## 膜タンパク質の抽出

膜貫通型タンパク質は機能性を持っている分子が多く解析ターゲットになるが、抽出が難しい  
プロテオミクスにおいては、デオキシコール酸を用いて膜タンパク質を抽出し、液液抽出の原理で界面活性剤を除去する方法



- 膜タンパク質を効率的に可溶化
- 簡便に界面活性剤除去
- トリプシンの消化活性向上
- 試薬のみで特別なキットは不要

# タンパク質消化

## タンパク質消化プロセス

プロテオミクスにおいてはタンパク質をペプチドに消化して、LC/MS/MSで測定をおこなう。

### 1. 変性条件

タンパク質(例 BSA) 1mg

-8M Urea-50mM Tris-HCl (pH7.5) , 1mM DTT 250  $\mu$ L

-40度で60分 インキュベーション

-500mM IAA 3  $\mu$ L

-室温で60分 インキュベーション

-50mM 重炭酸アンモニウム 747  $\mu$ L添加

還元アルキル化 タンパク質試料 (終濃度 1 mg/mL)

### 2. 消化

Trypsin溶液を還元アルキル化した試料に添加  
37°Cで18時間酵素処理

# タンパク質消化

## タンパク質消化プロセス

プロテオミクスにおいてはタンパク質をペプチドに消化して、LC/MS/MSで測定をおこなう。

MonoSpin Trypsinを用いることで効率的な消化が可能



### 1. 変性条件

タンパク質(例 BSA) 1mg

-8M Urea-50mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM DTT 250  $\mu$ L

-40度で60分 インキュベーション

-500mM IAA 3  $\mu$ L

-室温で60分 インキュベーション

-50mM 重炭酸アンモニウム 747  $\mu$ L添加

還元アルキル化 タンパク質試料 (終濃度 1 mg/mL)

### 2. 消化

MonoSpin Trypsin

-50mM 重炭酸アンモニウム 500  $\mu$ L

-2300  $xg$  30sec

サンプルアプライ 300 $\mu$ L (最大500  $\mu$ L)

-200  $xg$  5min x 2回

(\*スピンカラム下部から溶出された溶液を再びカラムにアプライし、合計2回通液する)

ハンドリングの時間を入れても15分程度で消化終了



# 特異的なペプチドの回収

## リン酸化ペプチド

タンパク質のリン酸化はシグナル伝達、アポトーシスの誘導などタンパク質が機能を発揮するためには大切なプロセス。

リン酸化部位の特定やリン酸化の定量など研究ターゲットとしても重要



リン酸化タンパク質由来のリン酸化ペプチドを選択的に抽出する必要あり

➤ IMAC法 (PhosSelectなど)

固定化した金属元素との相互作用により、選択的にリン酸化ペプチドを捕捉

➤ チタニア法

二酸化チタンの分子による結合速度の違いにより、リン酸化化合物を選択的に吸着

# 特異的なペプチドの回収

## TitanSphere PhosTiO Kit (チタニア法)

チタニアへの結合スピード  
リン酸化化合物 > ヒドロキシ酸 > カルボン酸

### コンディショニング

溶液Aを20uL加え、遠心 (2,000 xg, 2min, RT)する  
溶液Bを20uL加え、遠心 (2,000 xg, 2min, RT)する

### 試料吸着

試料15~50uLと溶液B100uLをチップカラムに加える  
試料とBuffer Bを混合するために、チップカラム内で3回程度ピペッティングする  
遠心 (1,000 xg, 10min, RT)  
チップカラムを通過した試料を再度チップカラムに加え、遠心 (1,000 xg, 10min, RT)する

### 洗浄

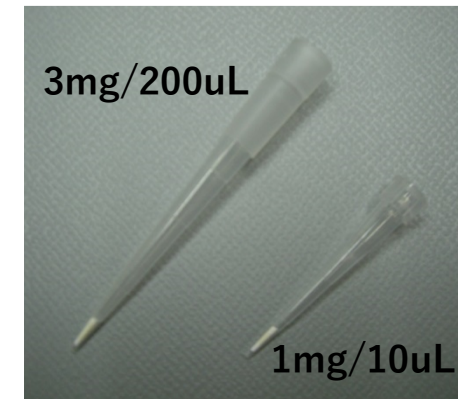
溶液Bを20uL加え、遠心 (2,000 xg, 2min, RT)する  
溶液Aを20uL加え、遠心 (2,000 xg, 2min, RT)する (2回繰り返す)

### 溶出

5% NH<sub>4</sub>OHを50uL加え、遠心 (1,000 xg, 5min, RT)する。(2回繰り返す)  
5%ピロリジン水溶液を50uL加え、遠心 (1,000 xg, 5min, RT)する。(2回繰り返す)

### 脱塩

5% NH<sub>4</sub>OHを100uLに対して、20%TFA又は20%リン酸水溶液を100uL添加し攪拌する  
本試料を逆相脱塩カラムで、脱塩処理



# 特異的なペプチドの回収

## 糖鎖タンパク質

糖鎖は抗体の分子認識などタンパク質の機能性を付与する上で重要  
糖タンパク質を消化した糖ペプチドを選択的に抽出するメソッド検討



アフィニティによる精製も可能

- ▶ レクチンフィッシング  
レクチンカラムを用いて、目的糖鎖が付与されている糖ペプチドや糖タンパク質を捕捉する。
- ▶ グラファイトカーボンカラム  
層状の結晶形を持っているグラファイトカーボンを用いることで糖鎖構造が保持でき、糖ペプチドの抽出が行える。

# 脱塩処理

## 脱塩処理

プロテオミクス試料において消化までの工程で様々な塩が混入  
測定試料に塩が混入することで、感度低下や質量分析計の汚染が発生



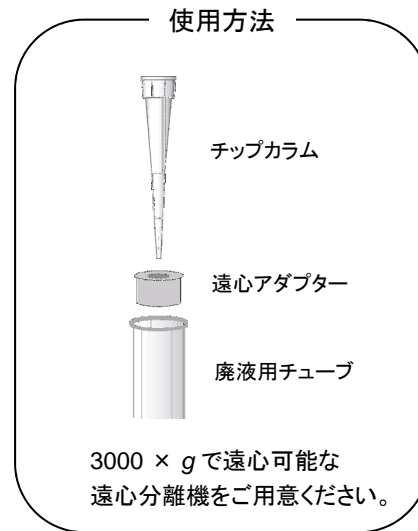
試料サイズに合わせた脱塩カラム（逆相カラム）を選定

- ▶ 試料量が数100 $\mu$ Lの場合  
MonoSpin C18を用いて、固相抽出を実施。  
試料量100~200 $\mu$ Lに調整でき、脱塩も行える。
- ▶ 試料量が $\leq$ 100 $\mu$ Lの場合  
市販の遠心脱塩チップが利用可能  
C-Tip  
GL-Tip SDB、GL-Tip GC

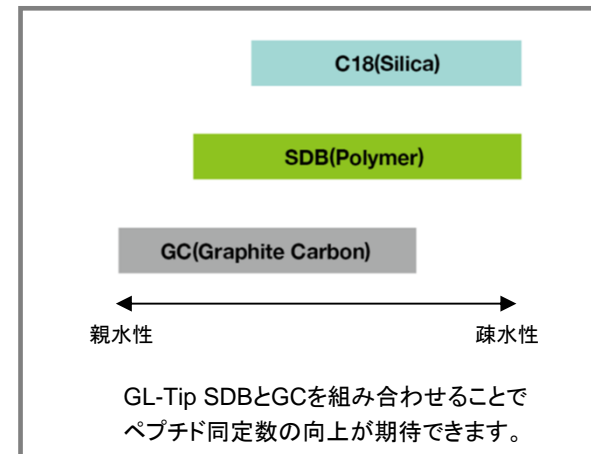
# 脱塩処理

## GL-Tip SDB、GL-Tip GC

ピペットチップの先端にSDB充填剤 (Empore) やグラファイトカーボンを充填したカラム



GL-Tip SDBとGC の適用範囲イメージ図

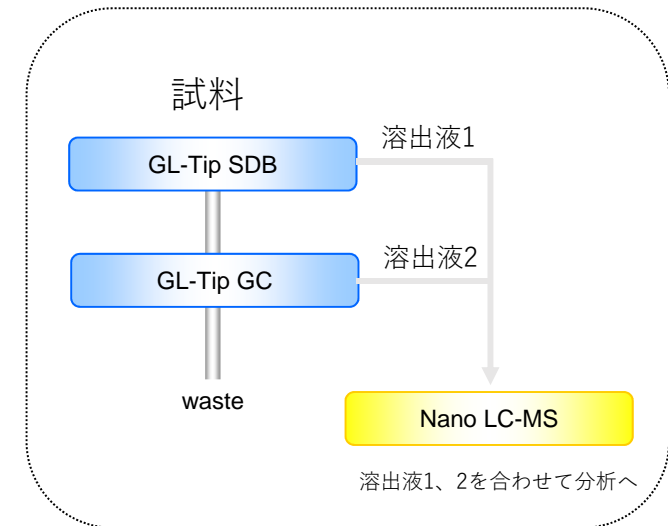
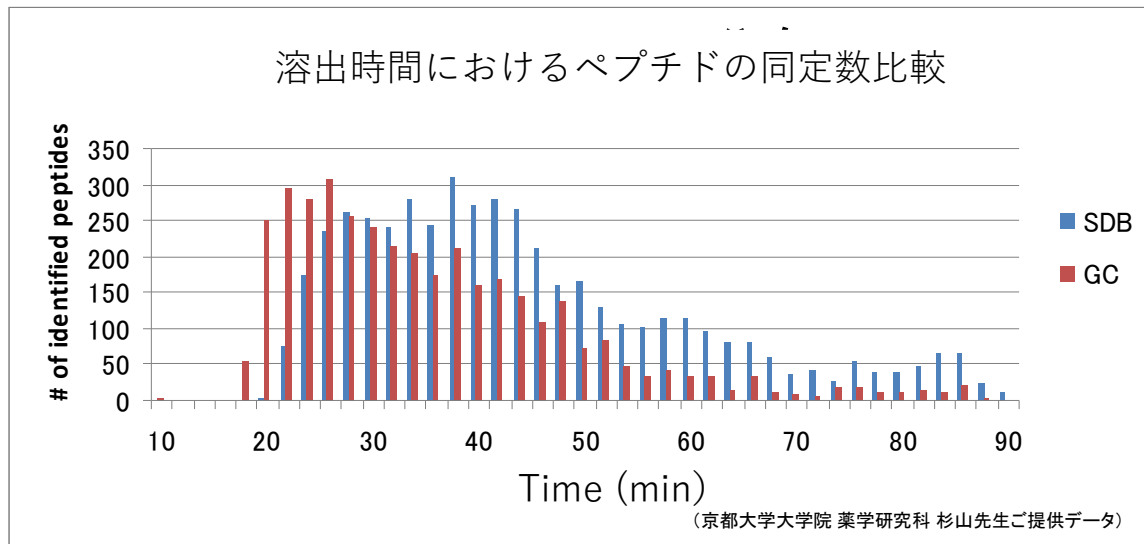


溶液A : 0.1%TFA含有5%アセトニトリル  
溶液B : 0.1%TFA含有80%アセトニトリル

1. コンディショニング : 20 $\mu$ L溶液B (3000 x g 2min)
2. 平衡化 : 20 $\mu$ L溶液A (3000 x g 2min)
3. 試料負荷 (3000 x g 5min)
4. 洗浄 : 20 $\mu$ L溶液A (3000 x g 2min)
5. 回収 : 50 $\mu$ L溶液B (3000 x g 3min)  
(回収時は回収用チューブに付替)

# 脱塩処理

## GL-Tip SDBとGL-Tip GCの比較



GL-Tip SDBの通過液（保持できなかった成分が混入している液）をGL-Tip GCにアプライし、それぞれ脱塩を行った回収液を混合し、測定試料へ供することでより多くのペプチドを同定することが可能

# 食品分析の前処理

# 食品分析の前処理

## 食品分析の前処理のあれこれ

- 機器分析のターゲットマトリクスで最も複雑
- 抽出工程においても工夫が必要
- 様々な前処理法が提案されている
  - 固相抽出
  - 固相抽出（クリーンナップ）
  - QuEChERS法
  - QuEChERS法後のクリーンナップ
- 試料とターゲットにより抽出法が異なる
- 公定法と自主検査手法
- 農薬や動物用医薬品分析
- 機能性成分分析
- 栄養成分分析



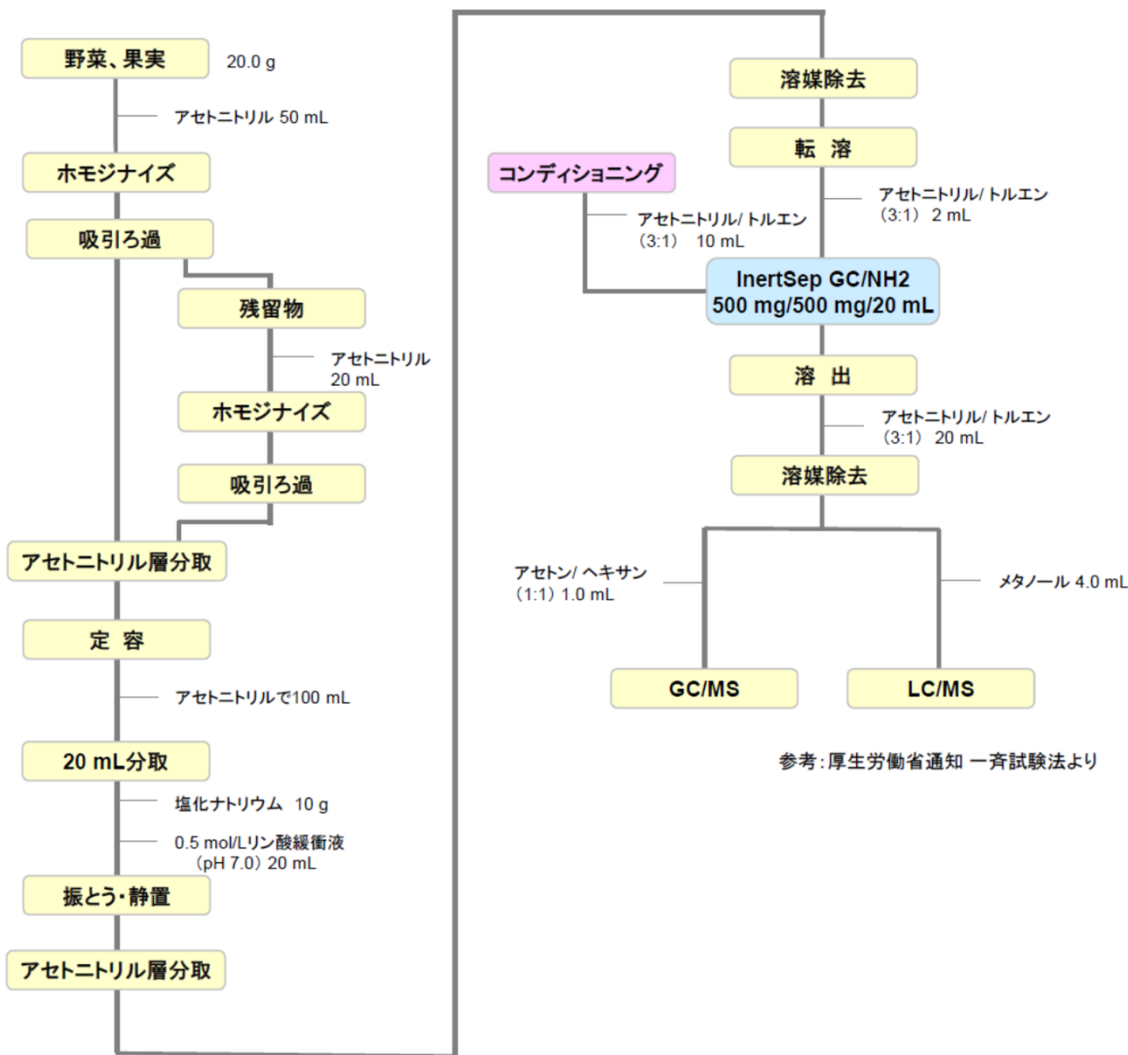
# 食品分析の前処理

- 食品は脂質、糖、色素が多く含まれており、これらを除去する方法が重要かつ困難
- 一般的には脂質はC18カラムで脱脂、色素はグラファイトカーボンや陰イオン交換樹脂にて除去、糖はターゲットによっては、この先の精製工程で除去される。
- 工程が複雑なため、ターゲットのロスにならないようにメソッド開発時に検証が必要
- 農薬などには、ポジティブリスト制により、測定法も決まっており、固相抽出法が主に採用されている
- 食品会社などの自主検査においては、より簡便なQuEChERS法も使用されている

# 食品分析の前処理

ポジティブリスト制による前処理の一例（農作物：野菜、果実）

## 1. 固相前処理のフロー図



GC/MSによる農薬等の一斉分析  
LC/MSによる農薬等の一斉分析  
の Protokol

参考：厚生労働省通知 一斉試験法より

# まとめ

- 前処理は機器分析に供するために、測定に影響を及ぼす夾雑物の除去、測定することができる十分な濃度にする、測定する機器で測定できる状態にすることが主な目的である。
- 機器分析における前処理では、目的成分をロスすることが無いようステップは極力少なくする。また、前処理工程の変動により測定結果に影響を及ぼさないように条件を合わせる必要がある。
- 試料によっては、吸着により失われるリスクがあることに注意し、吸着のない部材を選定することも重要。特に低濃度の試料を扱う場合は注意する。
- 測定の目的に合わせた前処理を選定する必要があり、前処理の特性を十分理解し実施する。
- 前処理には各メーカーから効果的な前処理ツールが出されているので、必要により試用し、効果的であれば採用することで、測定の精度、再現性の向上、検出下限の向上、時短などの利点を得ることができる。