



インラインサンプル前処理のメソッド開発

インラインサンプル前処理(ILSP)は、自動サンプルクリーンアップを可能にし、QuEChERS またはSPEなどの時間がかかる手動プロセスにとってかわることができます。Restek Revive ILSPカートリッジは2次元LCアプリケーション用に構成されたシステムに取り付けます。ILSPカートリッジは共抽出されたマトリックス成分を保持しますが、その後カートリッジを洗浄溶媒でバックフラッシュすることで除去されます。分析中にバックフラッシュをおこなうため、ILSPカートリッジは次の注入までに新しいサンプルをクリーンアップする準備が整い、サンプルスループットを大きく増大することが可能な極めて効率の良いワークフローを作り出します。Revive ILSPクリーンアップはきわめて効果的であり、時間と費用を節約するために簡単な固液抽出と組み合わせることができます。ここでは、この効果的な手法の利点をご理解いただけるように、インラインサンプル前処理のメソッド開発をおこなう際の簡単な手順について詳しく説明します。

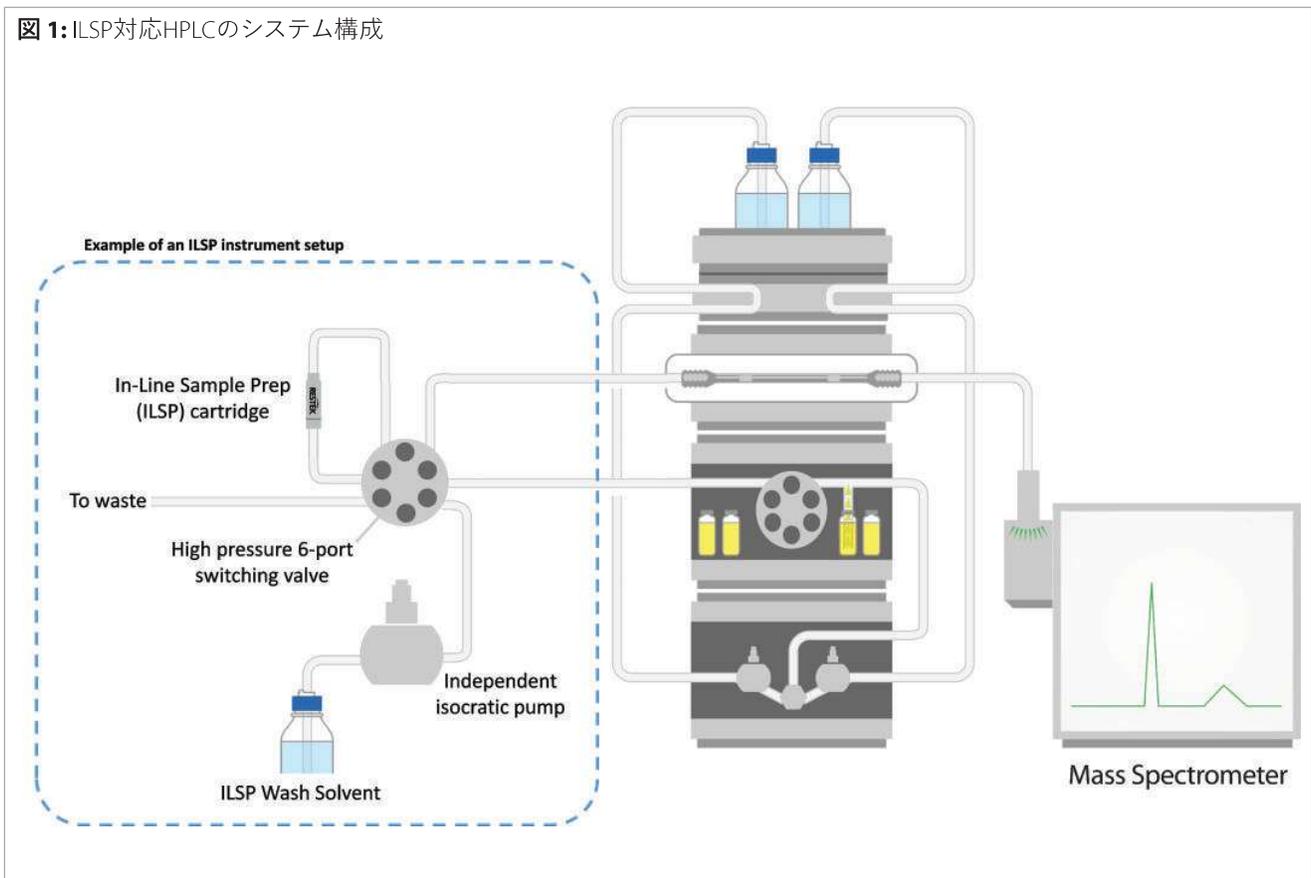
システムの構成要件

ILSPアプローチを使用するには、バイナリポンプまたはクォータナリポンプ、ニードル内洗浄が可能なオートサンプラー、カラムコンパートメント、および検出器を備えたHPLCが必要です。図.1に示すように、ILSPのセットアップに対応できるシステムには次のものが求められます。

- ・ 洗浄溶媒をILSPカートリッジに送ることができる独立したインクラティックポンプ。
- ・ 洗浄ステップ中にILSPカートリッジへの溶媒の流れをコントロールするための6ポート、高圧スイッチングバルブ。

機器のセットアップについてサポートが必要な場合は、機器メーカーにご相談ください。

図 1: ILSP対応HPLCのシステム構成



メソッド開発

その他のサンプル前処理手法と同様に、サンプルマトリックスや分析種が変わる毎にILSP条件を評価する必要があります。以下の「分析種パススルー」アプローチを使用して、インラインサンプル前処理メソッド開発をおこない、個々のアッセイに最適なILSPメソッド条件を決定します。

分析種パススルーアプローチでは、Revive ILSPカートリッジを使用して、妨害マトリックス成分を保持しながら分析種を溶出させます。全ての分析種がILSPカートリッジを通過して分析カラムへ入ると、6ポート、高圧バルブのポジションが切り替わります。そしてILSPに保持されていたマトリックス成分は、独立したポンプを使って送液される洗浄溶媒で廃液ラインへと排出されます。次の手順で特定のメソッドに適切なバルブ切換えのタイミングと洗浄溶媒条件を決めます。

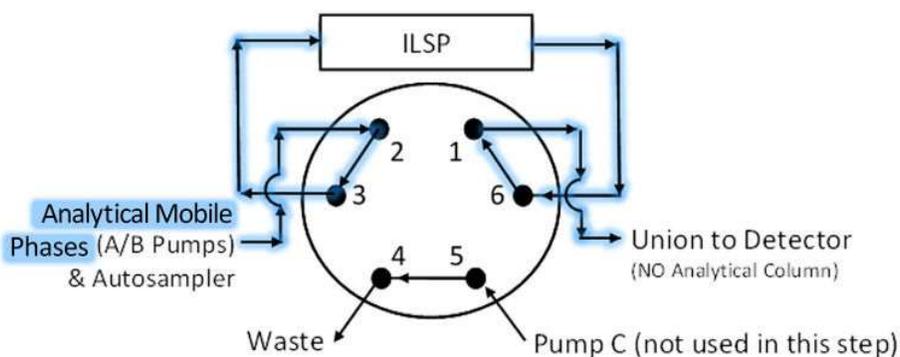
注記：以下では、マトリックスおよび分析種のための適切なクロマトグラフィーメソッドがすでに決まっていることを前提としています。分析メソッドが存在しない場合は、分離を確立してから進める必要があります。

ステップ1: カラムロード - ILSPカートリッジから分析種が溶出しきる時間の確立

このステップは、全ての分析種がRevive ILSPカートリッジから溶出するのにかかる時間を確認するためのものです。サンプルがILSPカートリッジから分析カラムへ移動する時間、つまり最初のバルブスイッチングイベントまでの時間が決まります。

- 図2に示すように、分析カラムの代わりにユニオンを使用して6ポート切り替えバルブをセットアップします。
- 分離クロマトグラフィー条件の既存移動相とグラジエント条件を用いて、ILSPカートリッジに分析種の標準溶液(マトリックスなし)を注入します。必要に応じてMRMウィンドウを調整してください。
- 得られたクロマトグラムで最後に溶出する分析種を見つめます。この分析種が完全に溶出しきる時間が、分析カラムへのロードポジションからILSPの洗浄ポジション(ステップ2の図3参照)へ切り替えることができる最短の時間になります。ロット間によるカラム保持のわずかな変動を考慮し、最後に溶出する分析種が完全に溶出しきる時間に10~20秒加えます。

図 2: ステップ1のバルブポジションとシステム構成



ステップ 2: ILSPの洗浄 – 洗浄溶媒組成と条件の確立

インラインサンプル前処理メソッド開発の2番目のステップは、適切な洗浄溶媒組成と最適な流量条件およびバルブスイッチングのタイミングを決定することです。これは1回の注入で保持されたマトリクス成分が、次の注入の前にRevive ILSPカートリッジから確実に洗い流されるようにするためのものです。

- 最初の洗浄溶媒として、2mMギ酸アンモニウムと0.1%ギ酸を含むメタノール溶媒を作成します。これは多くのアプリケーションに適していますが、以下に説明するように、最初の結果に基づいて他の洗浄溶媒の検討が必要となる場合もあります。
- 簡単にするために、移動相Bを調製した洗浄溶媒に置き換えます(図3)。
- 流量を1mL/minにし、ILSPカートリッジにマトリクスブランクを注入します。
- フルスキャンモード、または特定のマトリクスイオンが既知の場合は、選択イオンモニタリング(SIM)モードでマトリクスをモニターします。
- トータルイオンクロマトグラム(TIC)がベースラインに戻るのに必要な時間に注意してください。これは、モニターしているマトリクスが完全にILSPカートリッジから洗い流されたことを示します。
- これはマトリクス成分をトラップしたILSPカートリッジを完全に洗い流すために必要な時間であり、トータル分析サイクルタイムと比較する必要があります。
 - 分析時間の終了前にマトリクスがILSPカートリッジから完全に洗い流されている場合(図4)、洗浄メソッドのさらなる最適化は必要ないと考えられます。つまり、実際の分析中にILSPカートリッジを通る洗浄溶媒(ポンプC)の流量を制御する2番目の独立したポンプを使って、全体的なメソッドにプログラムすることができます。
 - ILSPカートリッジからマトリクスを完全に洗い流すのに要する時間が必要以上に長い場合は、効率を向上させるために、洗浄溶媒の組成や流量を最適化する必要があります。
 - 最高のパフォーマンスを得るには、バッファー濃度を2~10mM、酸濃度を0.1~0.5%に保つことをお勧めします。ILSPカートリッジを移動相で初期条件に戻す際には、バッファーの沈殿を防ぐように注意する必要があります。
- 注記: 洗浄溶媒は緩衝作用がpH2~8の範囲内になるようにしてください。

図 3: ステップ2のバルブポジションとシステム構成

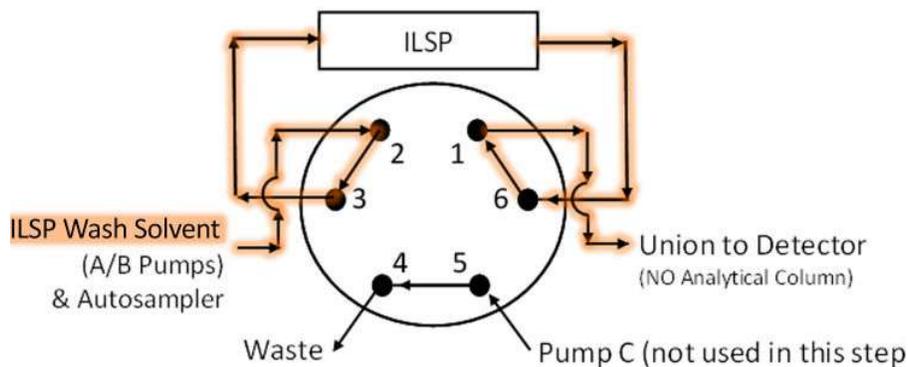
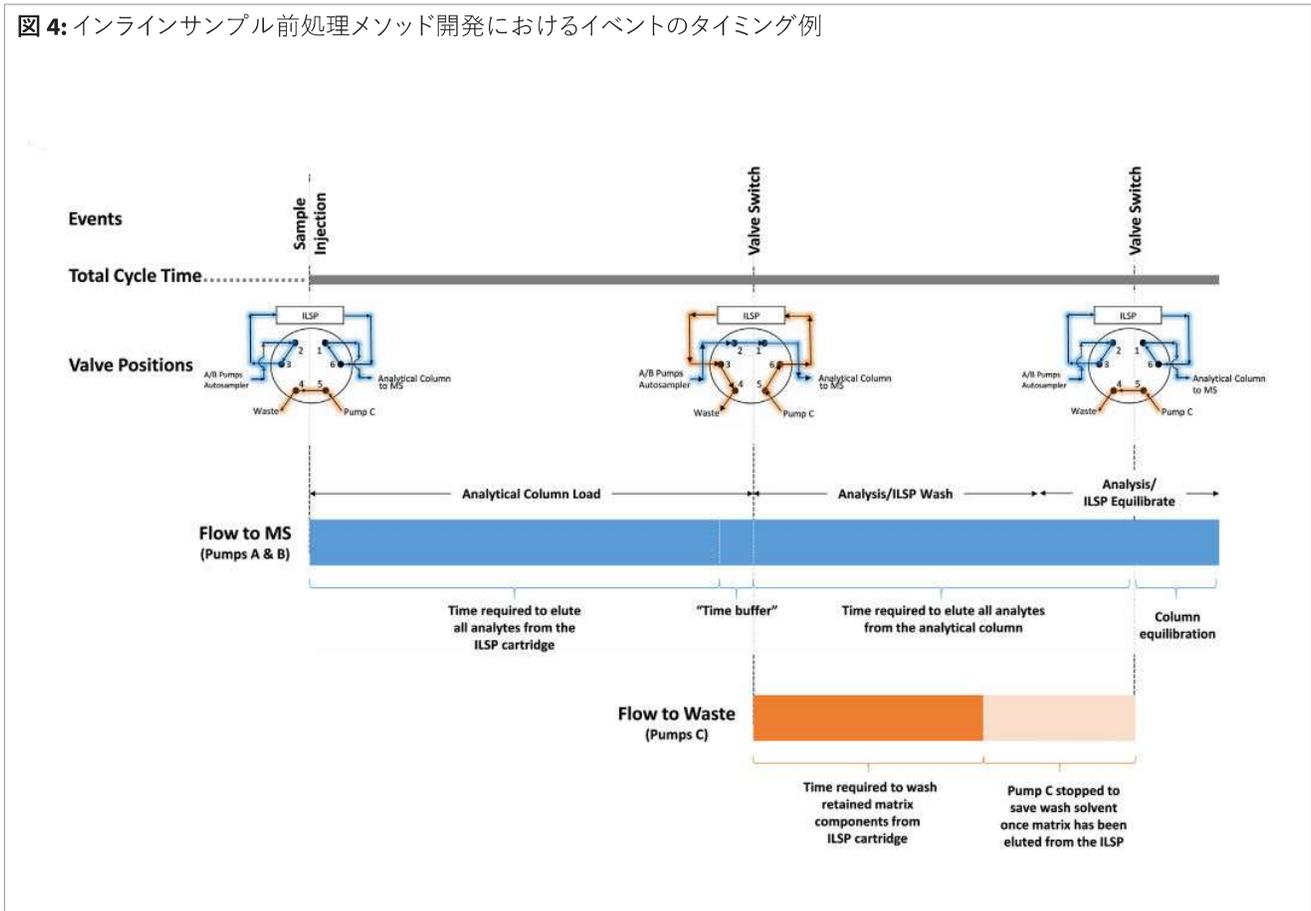


図 4: インラインサンプル前処理メソッド開発におけるイベントのタイミング例



ステップ 3: メソッドの更新 - 既存分析メソッドへILSPメソッドイベントを追加

この最終ステップでは、ステップ1および2で得られた情報を利用して、適切なタイムイベントを既存の分析メソッドに組み込みます。図4は、新しいイベントが一般的なHPLCグラジエントメソッドに挿入される位置の例を示します。食品中農薬の既存分析法における、インラインサンプル前処理メソッド開発プロセスの例を表に示します。

表 I: 食品中農薬におけるReviveインラインサンプル前処理メソッド開発プロセスの例

元のクロマトグラフィーイベントテーブル:		
Time (min)	%B Mobile Phase Composition	
0	5	
2	60	
4	75	
6	100	
7	100	
7.01	5	
9	Stop	
ILSPメソッド開発で決定された値:		
ステップ 1:		
ILSPから最後の分析種が溶出する時間 = 4.6 分		
最後に溶出した化合物が完全に移動するのを確実にするための追加時間 = 0.3 分		
バルブをILSP洗浄ポジションに切り替える時間(上記の合計) = 4.9 分		
ステップ 2:		
洗浄溶媒組成 = 2mMギ酸アンモニウムと0.1%ギ酸を含むメタノール溶媒		
洗浄溶媒の流量 = 1 mL/min		
モニター可能なマトリックス成分がILSPから溶出しきる時間 = 0.6 分		
トラップされたマトリックス成分が多い場合の変動を考慮するための追加時間 = 0.4 分		
ILSPカートリッジの合計洗浄時間 = 1.0 分		
注記: 洗浄溶媒の組成や流量の変更は不要		
更新後のクロマトグラフィーイベントテーブル:		
Time (min)	%B Mobile Phase Composition	イベント
0	5	
2	60	
4	75	
4.9	-	バルブを切り替えてILSP洗浄ポジションへ(図4参照)
4.92	-	ILSP洗浄溶媒流量を1 mL/minで送液 (ポンプC)
5.92	-	ILSP洗浄溶媒のポンプをオフにして、溶媒を節約(ポンプC)
6	100	
7	100	この時点で、すべての化合物は分析カラムから溶出
7.01	5	カラムを平衡化するために、初期移動相条件に戻す
7.05	-	ILSPカートリッジを平衡化させるため、バルブを切り替えて「分析カラムへのロード」ポジションへ*
9	Stop	
*バルブ切り替えによって分析中に生じる可能性のあるベースラインの乱れを回避するため、バルブ切り替えはこの時点まで待つことをお勧めします。		

メンテナンスとトラブルシューティング

インラインサンプル前処理で生じるほとんどの問題は、マトリックスとメソッドに関する基本的な知識があれば回避または修正することができます。まず最初のステップとして、抽出マトリックスブランクと抽出溶媒ブランクのプリカーサーキャンデータを比較して、マトリックス固有のイオンを特定する必要があります。マトリックス固有のイオンが決定できれば、それらを分析メソッドに設定してSIMモードでモニターすることができます。このようにすると、パフォーマンスの問題をトラブルシュートする際に、残留性のマトリックス汚染物質の存在が問題なのかどうかを判断するのに使用できる診断材料となりえます。一般的なトラブルシューティングシナリオの解決策を表IIに示します。

このアプローチをインラインサンプル前処理メソッド開発に採用し、発生する可能性のある問題にどのように対処するかを認識することにより、既存のメソッドにILSPを追加しやすくなり、サンプルスループットを大幅に向上させることができます。

表 II: ILSPトラブルシューティングソリューション

症状	考えられる原因	対処方法
溶出の遅いピークがない	カラムロードのイベント時間が正しくない	カラムロードの時間を長くします
ピークがない	MRMウィンドウの設定が正しくない	ILSPカートリッジを追加すると、保持時間がわずかに変化し、MRMウィンドウの更新が必要になる場合があります
溶出が早い分析種のピークがブロード/歪んでいる	ニードル洗浄溶媒ミスマッチ	ニードル内洗浄に強溶媒を使用する場合は、バンドの広がりを防ぐために、必ず弱溶媒(初期移動相組成)で洗浄してください
	サンプル溶媒ミスマッチ	バンドの広がりを防ぐために、主にアセトニトリルまたはメタノール溶媒に溶かしたサンプルは注入量を減らします
ピークの歪み/ベースラインの乱れ	ニードル内洗浄は、ピーク形状に影響を与える可能性のあるベースラインの乱れを引き起こすことがあります。	全ての分析種が分析カラムから溶出してから、ニードル内洗浄を開始します
分析種の回収率が低い	オートサンプラーでのマトリックスキャリーオーバー	マトリックスを可溶化する溶媒でニードル内洗浄を最適化します
	ILSPカートリッジの洗浄不足	主要なマトリックス成分を完全に除去するために、洗浄溶媒を最適化します
溶媒ブランク注入のマトリックスピーク(モニター時)	オートサンプラーでのマトリックスキャリーオーバー	マトリックスを可溶化する溶媒でニードル内洗浄を最適化します
	ILSPカートリッジの洗浄不足	主要なマトリックス成分を完全に除去するために、洗浄溶媒を最適化します

Reviveインラインサンプル前処理(ILSP)

- ・自動化されたサンプル抽出物のインラインクリーンアップは、前処理にかかる時間を大幅に短縮します。
- ・分析とILSPカートリッジ洗浄を同時におこなうことで、サンプル間のダウンタイムをなくします。
- ・食品中の多成分残留農薬分析における、QuEChERSまたはSPEの迅速でシンプルな代替法となります。
- ・使い捨てサンプル前処理および関連廃棄物に費やすコストを最小限に抑えます。
- ・手動のクリーンアップにまつわるエラーや変動の原因を低減します。

インラインサンプル前処理(ILSP)は、LC-MS/MSの能力を使用して、サンプル抽出物クリーンアップを効率化し、自動化します。RestekのRevive ILSP農薬カートリッジは、性能を犠牲にすることなく、多成分残留農薬のサンプルに費やす時間と費用を削減したい食品安全ラボにとって理想的なサンプル前処理の代替法です。Revive ILSP農薬カートリッジは、従来のQuEChERSおよびSPEメソッドのように、干渉する可能性のあるマトリックス成分から分析種を分離します。そしてこの手法では、システム上でサンプル分析と同時におこなわれる迅速な自動化されたクリーンアッププロセスが、時間のかかる手動手順に取って代わります。

Revive ILSP 農薬カートリッジ、6ポートバルブ、および独立したイソクラティックポンプを使用すると、サンプルのクリーンアップと分離検出を一つの効率的な方法に組み合わせ、機器を分析の主力へと変えることができます。Revive ILSPを食品中の多成分農薬分析における現在のメソッドに統合することにより、サンプル前処理時間を大幅に短縮し、使い捨てサンプル前処理製品に伴うコストを削減し、手動手順に関連したエラーを低減できます。



27882

詳細	入数	cat. #
Revive ILSP ホルダー、5 mmカートリッジ用	1個	27880
Revive ILSP 農薬カートリッジ (5 x 2.1 mm)	1個	27881
Revive ILSP ホルダーとRevive ILSP 農薬カートリッジ (5 x 2.1 mm)	キット	27882
Revive ILSP 農薬カートリッジ (5 x 2.1 mm)	3個	27883