

イオン交換ポリマー固相を用いたタンパク質、ペプチド試料からの界面活性剤の除去法の開発2

○由井 夕湖、三浦 早紀、太田 茂徳、高柳 学、佐藤 勉
(ジーエルサイエンス株式会社)



はじめに

生体試料の前処理において、試料を効果的に溶解、抽出する目的で様々な界面活性剤が使用されている。

LC/MS等の機器分析においては、これら界面活性剤は生体試料中の目的成分と一緒に分析機器 (LC/MS) に注入されると、目的成分のイオン化を抑制するイオンサプレッション等を引き起こし、分析に影響を与える場合がある。そのためLC/MS等の測定の前に、試料から界面活性剤のみを除去することが望まれている。

本研究では各種イオン交換ポリマー固相抽出カラムを用いて、タンパク質又はペプチドを含む試料から効果的に界面活性剤を除去する方法の開発を行った。昨年の検討結果を踏まえ、初めに固相の充填量に対する試料負荷量の上限の確認を行った。また、微量の生体試料の分析にも適用できるよう、固相抽出カラムの種類の検討とスケールダウンの検討を行った。

方法

イオン交換性と疎水性を有するミックスモードポリマー固相から成る固相抽出カラムを用い、界面活性剤としてNP-40、目的成分としてインシュリン (タンパク質) を含む試料中から、界面活性剤のみを除去する方法について検討を行った。



InertSep MCX

平均粒子径: **30 μ m**
表面積: 520m²/g
細孔容積: 1.1mL/g
細孔径: 9nm
pH使用範囲: 1~14
イオン交換容量: 1.2meq/g

InertSep MCX-FF

平均粒子径: **70 μ m**
表面積: 480m²/g
細孔容積: 1.1mL/g
細孔径: 9nm
pH使用範囲: 1~14
イオン交換容量: 1.2meq/g

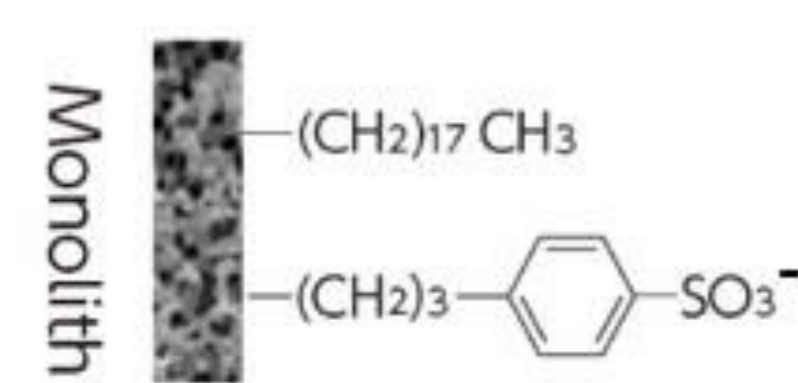
ポリマー型イオン交換固相として疎水性とイオン交換基を兼ね備えた、InertSep MCXを用いて検討を行った。

イオン交換ポリマー固相の特長

- シリカ固相における、母体由来のシラノールの影響を受けない
- pH 使用範囲として 0-14 まで対応
- 母体由来の疎水性相互作用をコントロールすることによって、選択性の調整が可能

シリカモノリスカラムの応用範囲

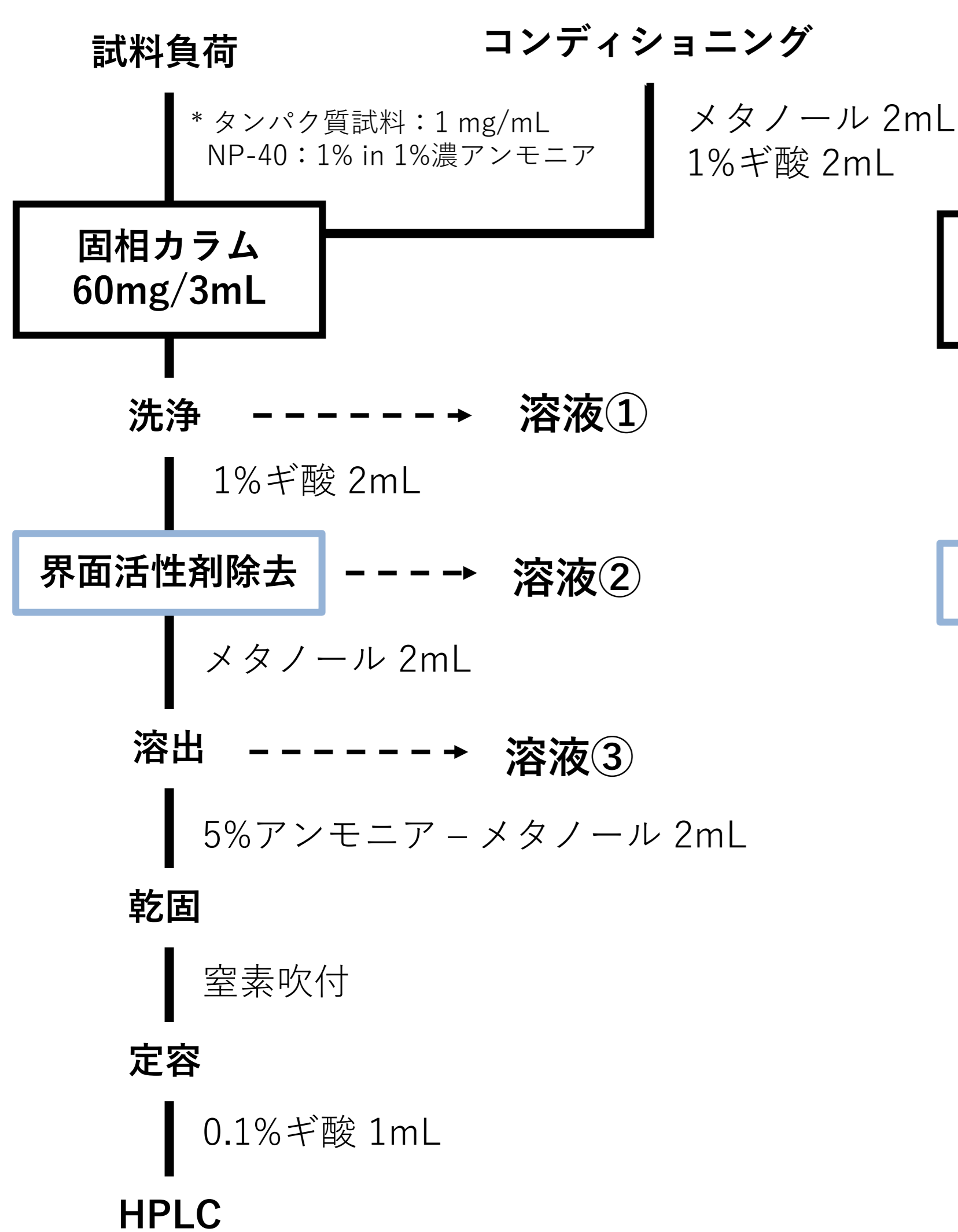
MonoSpin C18-CX



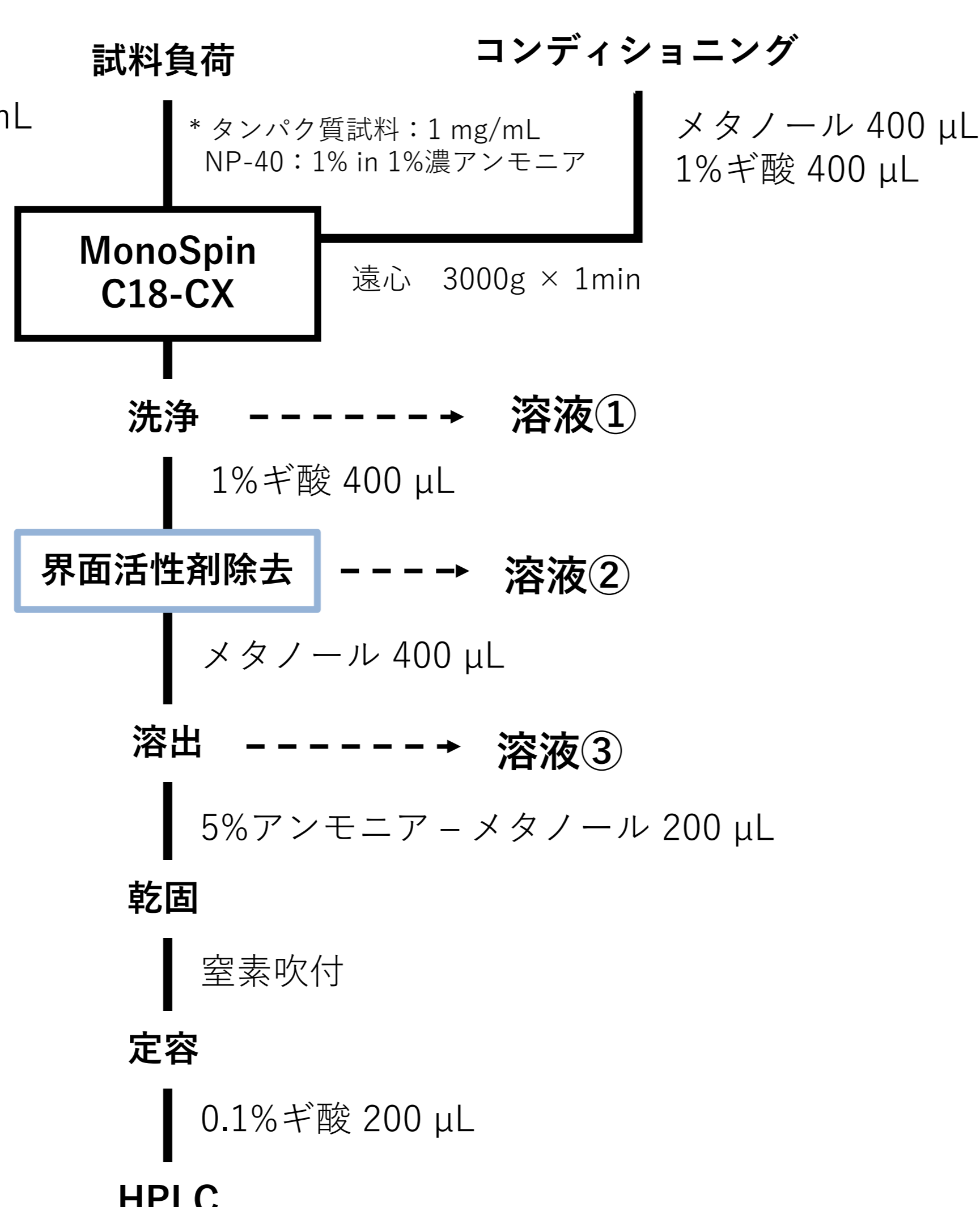
オクタデシル基とベンゼンスルホン酸基を結合したカラムです。疎水性相互作用とイオン交換作用が働きます。血清・尿中の解離している塩基性薬物の精製に適しています。MonoSpin C18やSCX担体と比べ、高いクリーンアップ効果があります。

タンパク質サンプルの前処理例

固相フロー



MonoSpinフロー



スピнкаラムによる処理



HPLC条件

Column : InertSustain C18 (3 μ m, 2.1 mm I.D. x 150 mm)
Eluents : A) 0.1% TFA in H₂O, B) 0.1% TFA in Acetonitrile
Flow Rate : 0.2 mL/min
Col. Temp. : 40 $^{\circ}$ C
Detection : UV 210 nm
Injection Vol. : 2 μ L

Time (min)	A (vol%)	B (vol%)
0.0	90	10
20.0	0	100
25.0	90	10
45.0	90	10

結果

InertSep MCXとMCX-FFの試料負荷量の検討

InertSep MCX

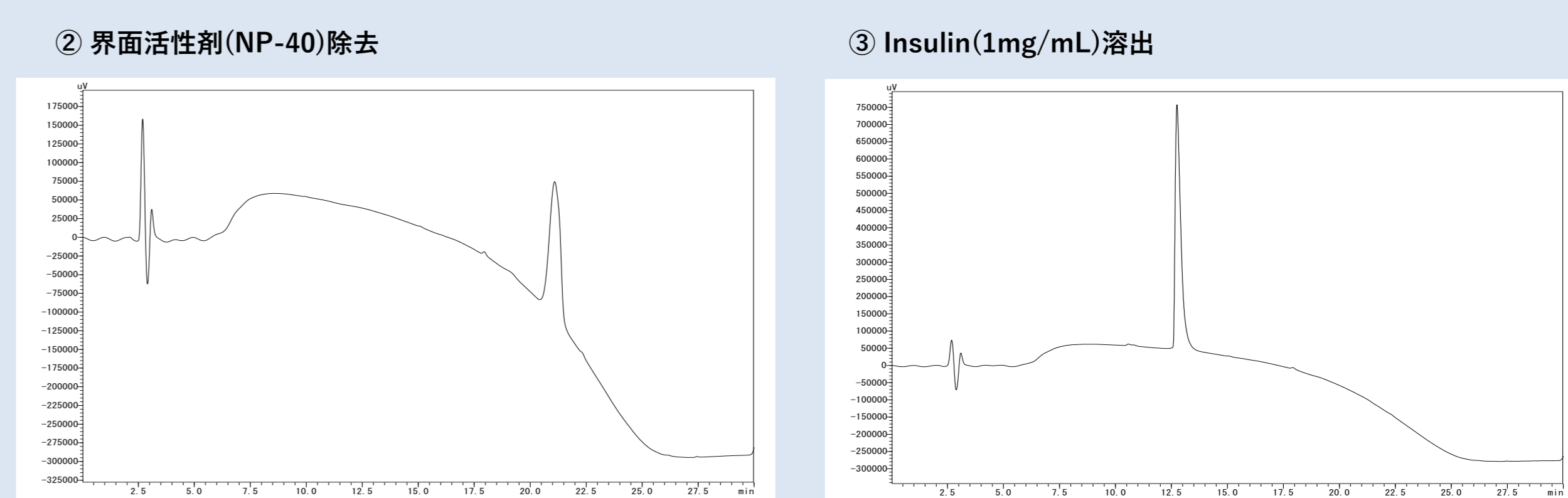
	100 μ L添加		200 μ L添加		400 μ L添加	
	insulin	NP-40	insulin	NP-40	insulin	NP-40
①	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
②	0.0	100.7	0.0	84.1	0.0	82.4
③-1	81.2	0.0	82.6	0.0	93.6	0.0
③-2	6.1	0.0	8.7	0.0	2.1	0.0

InertSep MCX-FF

	100 μ L添加		200 μ L添加		400 μ L添加	
	insulin	NP-40	insulin	NP-40	insulin	NP-40
①	0.0	0.0	0.0	0.0	9.4	12.2
②	0.0	92.2	0.0	74.8	1.4	58.8
③-1	88.6	0.0	85.3	0.0	73.0	0.0
③-2	5.6	0.0	3.5	0.0	2.6	0.0

MCX-FFの場合、400 μ Lを添加した場合、Insulin・NP-40の破過が確認された。MCXの場合、破過は確認されなかった。粒子径の大きさは試料添加量に影響を及ぼすことが示唆された。

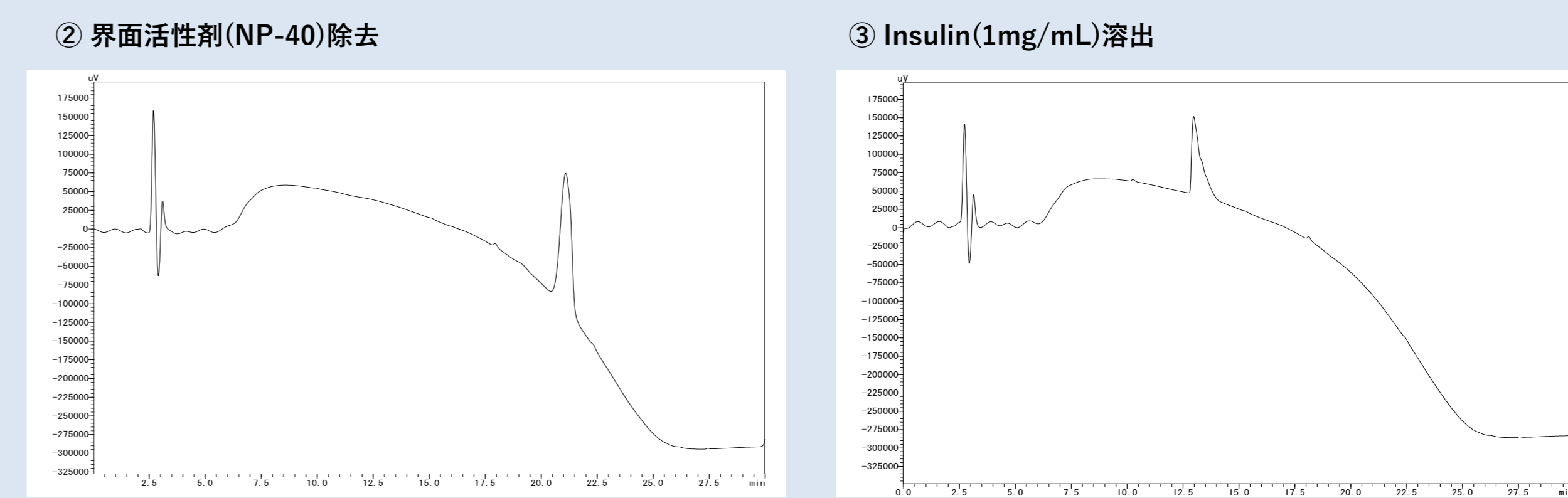
InertSep MCXの上限負荷量の確認



	600 μ L添加		800 μ L添加		1000 μ L添加	
	insulin	NP-40	insulin	NP-40	insulin	NP-40
①	0.0	0.0	0.0	0.0	10.2	0.0
②	0.0	97.7	0.0	89.5	62.9	51.8
③	97.6	0.0	89.3	0.0	0.0	0.0

1000 μ Lを添加した場合、Insulin・NP-40の破過が確認された。よって、InertSep MCX (6mg/3mL)の上限負荷量は、800 μ L程度であることが確認された。また、サンプルが破過した場合、充填剤に界面活性剤が残ってしまうことによりInsulinの溶出に影響が出る可能性が考えられた。

MonoSpin C18-CXの上限負荷量の確認



	40 μ L添加		100 μ L添加		150 μ L添加		200 μ L添加	
	Insulin	NP-40	Insulin	NP-40	Insulin	NP-40	Insulin	NP-40
①	0.0	0.0	7.4	0.0	8.1	2.4	12.3	4.7
②	0.0	94.2	0.0	97.8	0.0	80.4	0.0	82.7
③	79.6	0.0	85.9	0.0	91.6	0.4	72.3	0.1

溶出溶液量の1/5量(40 μ L)を添加した場合、サンプルに破過は確認されなかった。1/2量(100 μ L)の場合、Insulinのみ破過が確認された。3/4量(150 μ L)の場合、Insulin・NP-40の破過が確認された。よって、界面活性剤除去の上限負荷量は、150 μ L程度であることが確認された。

まとめ

試料を固相抽出カラムに負荷した後、洗浄後、メタノールを用いて固相を洗浄することで界面活性剤のみを固相から効果的に除去できた。その後、メタノール等の有機溶媒を含むアルカリ性溶液で目的成分の回収を行うことができた。

本検討では固相の充填量に対する試料負荷量の上限の確認ができたため、具体的なスケールダウン等、試料の量に応じた固相抽出カラムの適用性を広げることが可能となった。

COI開示

発表内容に関連し、過去3年間、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。
筆頭責任者: 太田茂徳、責任発表者 佐藤勉