[TECHNOLOGY BRIEF]

Xevo TQ-S micro を用いた臨床研究のための血漿中アルドステロンの分析

Dominic Foley

目的

臨床研究のための血漿中低濃度アルドステロンの定量を目的として、非常に選択性の高いサンプル前処理技術との組み合わせによる Waters® Xevo® TQ-S micro 質量分析計の性能について、ご紹介します。

背景

アルドステロンは、鉱質コルチコイドステロイドホルモンで、臨床研究におけるアルドステロン合成酵素阻害剤（ASIs）[1] の薬理機構の解明を助けるための指標とされています。血液中のアルドステロン循環濃度は、一般に低濃度（< 100 pmol/L）であり、そのことが分析上の課題となっています。このような低濃度の定量を可能にするためには、通常、高選択性のサンプル前処理技術だけでなく、高感度な質量分析計との組み合わせが必要とされます。

Xevo TQ-S micro に搭載されている革新的な StepWave™ イオン源技術は、メソッドの堅牢性を改善し、バックグランドノイズの低減にも役立ちます。それによりアルドステロンのような低濃度試料の精度と正確性の高い定量が可能となります。

ソリューション

血漿中アルドステロンの分析を成功させるための手法として、選択性の高い固相抽出による自動サンプル前処理の後に、LC-MS/MS 分析を行う方法を採用しました。サンプル前処理は、96 ウェル Oasis® MAX µElution プレートを Tecan Freedom EVO100/4 で自動処理し、続いて MassLynx® ソフトウェア（v4.1）制御の ACQUITY UPLC® I-Class / Xevo TQ-S micro システムによって測定しました。

サンプル前処理の自動化と XevoTQ-S micro により、低濃度アルドステロンの定量が可能に

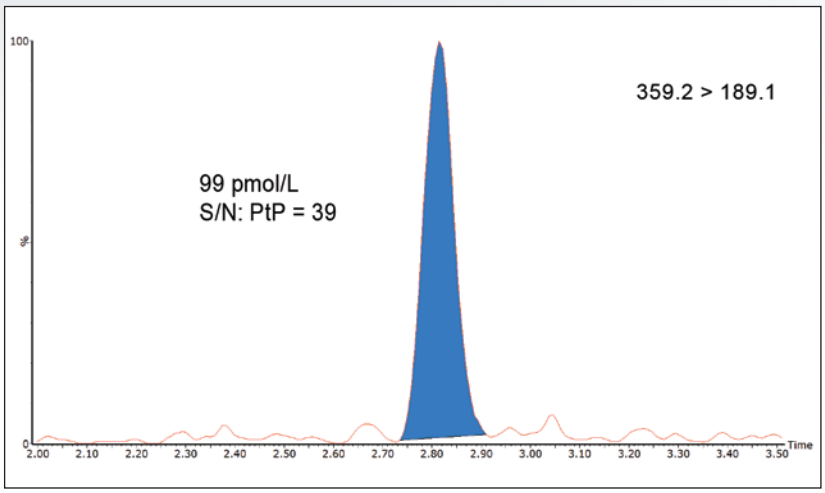

図 1. Xevo TQ-S micro における血漿中 99 pmol/L アルドステロンの SPE 前処理サンプル。S/N は、Peak to Peak 法の± 1 SD を用いて生データより算出。

サンプル前処理とLC-MS/MS分析

Tecan Freedom EVO100/4 を使用して、血漿試料を内部標準、硫酸亜鉛、メタノール、リン酸で希釈しました。続いてコンディショニングと平衡化を行った 96 ウェル Oasis MAX µElution プレート（P/N:186001829）に、遠心分離した上清をロードしました。その後、リン酸、10% メタノール含有アンモニア水、水の順で洗浄し、70% メタノール水溶液に続いて水でサンプルを溶出しました。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

抽出した試料の 30 µL を ACQUITY UPLC BEH Phenyl カラム (P/N: 186002884) と水 / メタノールのグラジエントを使用して、ACQUITY UPLC I-Class / Xevo TQ-S micro システムに注入しました。この分析に使用した MRM パラメーターを、表 1 に示します。

対象成分	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
Aldosterone (Quan)	359.2	189.1	38	14
Aldosterone (Qual)	359.2	297.2	38	10
Aldosterone-d4 (IS)	363.2	190.0	38	14

表 1. アルドステロン定量用 (Quan)、定性用 (Qual) および内部標準 (IS) アルドステロン -d4 の MRM パラメーター

結果

表 2 に示すように、SPE 前処理を行った血漿試料を使用し Xevo TQ-S micro で測定して得られた LLOQ でのピーク面積は数字としては大きいとは言えません。しかしながら、シグナル : ノイズ (S/N) は、＞20：1 となっており、SPE によるサンプル精製と MRM による選択性によって、バックグラウンドノイズが削減できることがわかります。さらに 28-2776 pmol/L の直線性範囲において、優れた相関係数が得られました。

MSシステム	検量線	LLOQ (28pmol/L)	
	相関係数 (r^2)	ピーク面積	S/N
Xevo TQ-S micro	0.9995	58	23

表 2. Xevo TQ-S micro の性能特性：検量線と LLOQ。S/N は、Peak to Peak 法の± 1 SD を用いて生データより算出。

アルドステロンの ESI MS 分析では、Oasis MAX µElution プレートによる選択性の向上によって、精製効果の高いサンプル抽出物が得られます。これは Xevo TQ-S micro を用いた血漿中アルドステロン 99 pmol/L の抽出物とその定量において確認されています (図 1)。

低濃度 (99)、中濃度 (500)、高濃度 (2000 pmol/L) の血漿試料を抽出し定量を 6 回繰り返し行うことで、メソッドの再現性を評価しました。表 3 に示す通り、全て≦ 5.5%RSD という結果でした。

	Xevo TQ-S micro 再現性 (RSD%)		
Compound	Low	Mid	High
Aldosterone	5.5%	4.0%	4.7%

表 3. Xevo TQ-S micro における血漿中アルドステロン分析の再現性評価

まとめ

臨床研究における血漿アルドステロン分析のための LC-MS/MS メソッドを開発しました。このメソッドは、96 ウェル Oasis MAX µElution プレートと Tecan Freedom EVO100/4 を用いた非常に効率的な自動サンプル前処理です。自動サンプル前処理により、分析感度を最適化し、試料の取り扱い工程を削減し、オペレーターによるミスの可能性を低減することでラボの効率が上がります。

ACQUITY UPLC I-Class システムに堅牢性と分析感度の高い Xevo TQ-S micro とを組み合わせた時、測定された全てのアルドステロン濃度において良好な再現性 (n=6) と直線性が得られることが示されました。さらにこの臨床研究メソッドの結果から、生理学的濃度でのアルドステロン測定においても適用可能と考えられます。

参考文献

1. Schumacher CD, Steele RE, Brunner HR. Aldosterone synthase inhibition for the treatment of hypertension and the derived mechanistic requirements for a new therapeutic strategy. *J Hypertens*. Oct 2013; 31(10): 2085–2093.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、Xevo、ACQUITY UPLC、MassLynx、Oasis および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
StepWave は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Printed in Japan. 2015年 1月 720005207JA PDF