[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

新規固相 Oasis PRiME HLB を用いた血漿中17- ヒドロキシプロゲステロン、アンドロステンジオンおよびコルチゾールのUPLC-MS/MS分析

Jonathan P. Danaceau and Erin E. Chambers
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- より迅速で単純化されたサンプル前処理のワークフロー
- タンパク質沈殿法と比較して少なくとも97% 以上のリン脂質除去
- エバポレーションや再溶解は不要
- 全ての分析種において、良好な直線性かつ正確、精密な分析結果

ウォーターズのソリューション

Oasis® PRiME HLB µElution プレート
(製品番号 186008052)

ACQUITY® 96 ウェルサンプルコレクションプレート 700 µL 円型 (製品番号 186005837)

ACQUITY UPLC® HSS T3 カラム 100Å、1.8 µm、2.1 × 50 mm (製品番号 186003538)

ACQUITY UPLC I-Class システム

Xevo® TQ-S 質量分析計

キーワード

アンドロステンジオン、コルチゾール、17α-ヒドロキシプロゲステロン、µElution、前処理、SPE、ステロイド類、マトリックス効果、リン脂質除去、LC-MS

はじめに

サンプル前処理は臨床研究の LC-MS/MS 法を用いた生体分析において重要です。ウォーターズは従来の SPE 充填剤に比べて大きなメリットを持つように設計された、Oasis PRiME HLB という新規のサンプル前処理用充填剤を開発しました。コンディショニングと平衡化の工程を除くことができ、従来の固相抽出充填剤と比べてより迅速なワークフローを可能にし、95% 以上のリン脂質除去能力を持ち、結果としてよりきれいな抽出液が得られ、短いカラム寿命や MSイオン源の汚染といったリスクを減らします。

本アプリケーションノートは Oasis PRiME HLB を用いて抽出した 17α-ヒドロキシプロゲステロン (17-OHP)、アンドロステンジオン (Adione)、コルチゾールを UPLC-MS/MS で分析した詳細について述べています。イムノアッセイ法による測定では、これらの混合物は類似化合物に対する抗体と交差反応しやすい可能性があります。イムノアッセイ法は各成分に対して個別試験法が求められ、サンプルと分析種がそれぞれの化合物に分離されることが必須です。LC-MS/MS は素晴らしい識別能力と選択性によって、複雑な混合物を同時に同定する複合メソッドを提供します。Oasis PRiME HLB の使用は、最小のマトリックス効果で全ての化合物において一貫して再現性の高い回収率が得られるという結果となりました。リン脂質については、タンパク質沈殿法と比較してほぼ完全に除去されました。さらに、ウォーターズの特許技術である µElution フォーマットを使うことによって、SPE カラム内でサンプルの濃縮を可能にし、エバポレート作業や、サンプル再溶解が必要なくなりました。全ての分析種に対して、良好な直線性かつ正確で精密な手法であり、アンドロステンジオンと 17-OHP において定量限界 50 pg/mL という結果となりました。

実験方法

UPLC® 条件

システム： ACQUITY UPLC I-Class

カラム： ACQUITY UPLC HSS T3 カラム、100Å、1.8 µm、2.1×50 mm

カラム温度： 40℃

サンプル温度： 10℃

移動相 A（MPA）：0.1% ギ酸水溶液

移動相 B（MPB）：0.1% ギ酸アセトニトリル

パージ溶媒： 25:25:50　アセトニトリル：メタノール：水

洗浄溶媒： 10% アセトニトリル

グラジエント条件は表 1 に示しました。

時間 (min.)	流速 (mL/min.)	%A	%B
0	0.6	70	30
1.0	0.6	50	50
2.0	0.6	45	55
2.5	0.6	5	95
3.5	0.6	5	95
3.6	0.6	70	30
4.5	0.6	70	30

表 1　移動相グラジエント。MPA と MPB の組成は方法の章に記載しました。

UPLC 使用時の MS 分析条件

MS システム： Xevo TQ-S 質量分析計

イオン化モード：ESI ポジティブ

キャピラリー電圧：1.0 kV

コーン電圧： 化合物毎に最適化

脱溶媒ガス： 1000 L/hr

コーンガス： 150 L/hr

脱溶媒温度： 500℃

イオン源温度： 150℃

全てのデータは Waters MassLynx® ソフトウェア（V4.1; SCN876）を使用して読み取りと分析を行いました。TargetLynx™ ソフトウェアを使用して定量しました。

方法

全ての標準物質と安定同位体標識された内部標準は Cerilliant 社（Round Rock、TX）から購入しました。混合標準物質ストック（20 µg/mL コルチゾール；1 µg/mL のアンドロステンジオンと 17-OHP）は 25 % メタノールを用いて調製しました。ストック溶液は、10 µg/mL コルチゾール -d4 と 0.5 µg/mL のアンドロステンジオン -^{13}C3 および 17-OHP-d8 をメタノールで調製しました。750 ng/mL のコルチゾール -d4 と 37.5 ng/mL のアンドロステンジオン -^{13}C3 および 17-OHP-d8 を 25 % のメタノールで調製し、作業用内部標準溶液としました。個別の内部標準と品質管理標準は 25 % メタノールを用いて用事調製しました。25 µL の作業用内部標準溶液または品質管理標準を 475 µL の木炭処理を 2 度行ったヒト血漿サンプル（Golden West Biological 社、TemecuLa、CA）に加えたものを検量線と QC 試料としました。

サンプル前処理

サンプルは以下の手順に従って準備しました。

20 µL の作業用内部標準溶液をそれぞれ 150 µL の検量線標準溶液または QC 試料に添加しました。全てのサンプルは 300 µL の 4:1　メタノール :89 g/L 硫酸亜鉛溶液を用いてタンパク質を沈殿させました。サンプルは完全に沈殿を形成させるために何回か吸引してよく混和し、その後 3220 rcf で 10 分間遠心分離を行いました。得られた上清 300 µL に、900 µL の 4 % リン酸を添加し、サンプルが完全に混和するように吸引を行いました。このように調製されたサンプルを直接 Oasis PRiME HLB µElution プレートに 2 回に分けてロードしました。全ての SPE プレートのウェルは 200 µL の 25% メタノールで 2 回洗浄しました。その後、25 µL の 90:10 アセトニトリル : メタノール溶液を用いて 2 回溶出を行いました。得られた溶液を 25 µL の水で希釈しました。そのうちの 7.5 µL を UPLC-MS/MS に注入しました。サンプル抽出の手順を図 1 に示します。

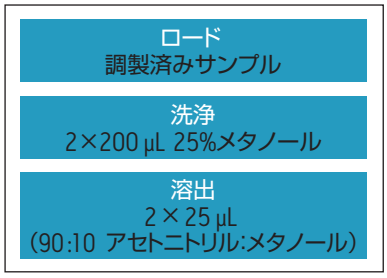

図 1. 血漿中コルチコステロイドに対する Oasis PRiME HLB サンプル前処理メソッド。コンディショニングと平衡化の工程を無くし、3 ステップと簡単にしました。

結果および考察

クロマトグラフィー

図 2 には 3 種類のステロイドを添加した血漿を Oasis PRiME HLB で抽出したサンプルのクロマトグラムを示しました。全てのステロイドは 2 分以内に溶出しました。HSS T3 カラムは他の C_{18} カラムと異なるクロマトグラフィー上の利点を提供します。これらは非極性物質ですが、HSS T3 カラムの高い保持力によって、サンプルを有機溶媒混合費比が高い状態で注入したときに他のカラムよりも溶媒効果が減少しました。

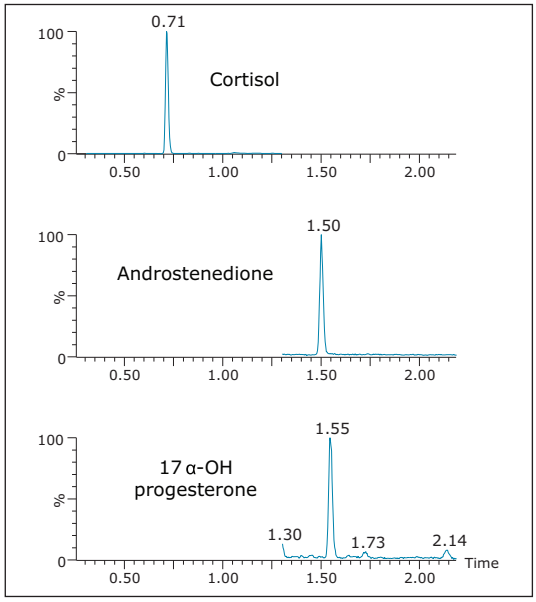

図 2. 血漿中から抽出したコルチゾール、アンドロステジオン、17-OHP の ACQUITY UPLC HSS T3 カラム、100Å、1.8 µm、2.1 × 50 mm によるクロマトグラム。コルチゾールの濃度は 20 ng/mL。その他の成分の濃度は 1 ng/mL。

表 2 には個々のステロイドとそれらの安定同位体標識した内部標準に対する保持時間と MS パラメーター、MRM トランジション、コーン電圧、コリジョンエネルギーを含めて記載しました。

2 種類の MRM トランジションはそれぞれの化合物に対して、定量用（リストの最初）と確認用（リストの 2 番目）として使用しました。

回収率とマトリックス効果

抽出物中の化合物の回収率は非常に一貫性のあるものでした。図 3 に示したところによると、全ての化合物の回収率は 72 ～ 73% で %RSD は 5% 以下であり、Oasis PRiME HLB の再現性を証明しました。

化合物	RT (min)	MRMトランジション (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
Cotisol	0.72	363.17>121.06	42	22
		363.17>91.03	42	52
d4 Cortisol (IS)	0.71	367.17>121.12	42	22
Androstenedione	1.50	287.17>97.08	58	20
		287.17>109.04	58	26
^{13}C3 A-dione (IS)	1.50	290.17>100.07	58	20
17-OHP	1.55	331.17>97.08	58	26
		331.17>295.20	58	16
d8-17-OHP (IS)	1.53	339.23>100.07	58	26

表 2. 全ての化合物と内部標準物質の質量分析パラメーター。

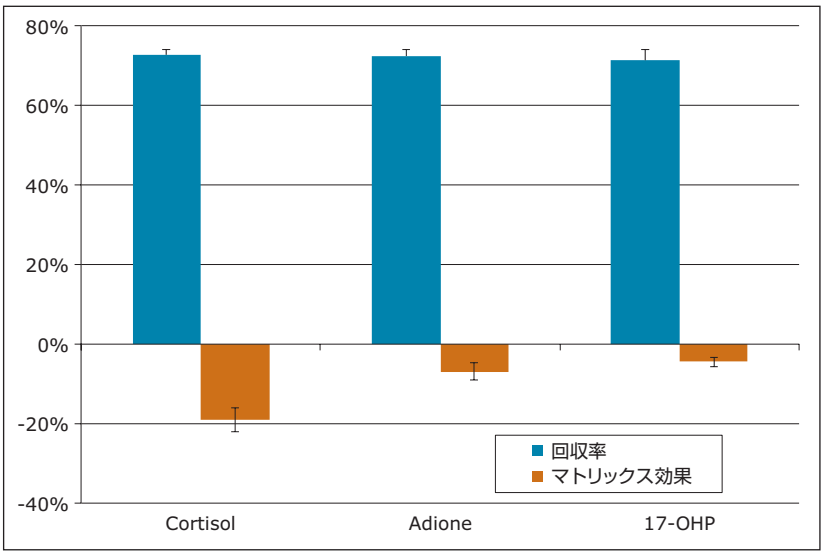

図 3. コルチゾール、アンドロステンジオン、17-OHP の Oasis PRiME HLB µElution プレートによる抽出物の回収率とマトリックス効果。全ての化合物で抽出液における回収率の %RSD は 5% 以下でした。マトリックス効果はコルチゾールで -19%、他の 2 種のステロイドでは -10% 以下でした。

マトリックス効果は全ての化合物で低い値を示しました。コルチゾールのマトリックス効果は -19% と軽微なイオンサプレッション効果が見られていますが、他の化合物に対しては最低限だったことを示します。全ての化合物におけるマトリックス効果の平均値は -10.1% でした。改めて、低い標準偏差（3.1% 以下）は抽出とクリーンアップに Oasis PRiME HLB を用いることで得られる高い一貫性を実証します。全ての回収率とマトリックス効果のデータは表 3 に記載しました。

定量結果

校正および品質管理サンプルの範囲は前述した方法の章の通りに調製されました。キャリブレーション範囲は、血漿中におけるこれらの化合物の予想される濃度を反映して、コルチゾールでは 1～500 ng/mL、残りの化合物では 0.05～25 ng/mL としました。品質管理サンプルは、適切な校正範囲のために、低、中、高濃度で調製しました。

全ての化合物は全体の校正範囲において直線的に応答し、R^2 値は 0.99 または 1/x の重み付け値以上を示しました。表 4 に検量線データの概略を述べてあります。定量下限値（LLOQ）はコルチゾールが 1.0 ng/mL、アンドロステンジオンと 17-OHP が 0.05 ng/mL でした。この条件でそれぞれの化合物は、真度、精度、分析感度において FDA の推薦するバリデーション法と適合しました [1]。

品質管理サンプルは全ての結果において、期待値は 10% 以内、%CV 値は 7% 以下（N=6）と正確かつ精密でした。このデータは表 5 から参照することができます。優れた正確性と精密性はこの充填剤の一貫性と堅牢性を示しています。

	回収率			マトリックス効果	
	Mean	S.D.	%RSD	Mean	S.D.
Cortisol	72.7%	3.1%	4.2%	-19.0%	3.1%
Adione	72.5%	1.9%	2.7%	-6.9%	2.2%
17-OHP	71.5%	1.9%	2.6%	-4.5%	1.3%
			Mean	**-10.1%**	

表 3. 回収率とマトリックス効果（全ての試験において N=4）

	R^2	平均偏差%
Cortisol	0.996	8.39
Adione	0.989	8.03
17-OHP	0.993	9.72

表 4. 検量線の概要。全ての化合物で 1/x の重み付けの線形適合を行っています。

	精度					
	Androstenedione			17α-OH progesterone		
QC Level (ng/mL)	Mean	S.D.	%CV	Mean	S.D.	%CV
0.15	94.3%	5.4%	5.7%	93.7%	6.1%	6.5%
1.5	95.0%	3.4%	3.6%	92.3%	4.7%	5.6%
15	95.4%	5.3%	**5.5%**	**93.7%**	6.1%	6.5%
Mean	**94.9%**			**92.6%**		

	精度		
	Cortisol		
QC Level (ng/mL)	Mean	S.D.	%CV
3	92.3%	4.9%	5.4%
30	94.8%	2.9%	3.0%
300	94.9%	5.7%	6.0%
Mean	94.0%		

表 5. 抽出血漿サンプルにおける品質管理結果（全ての化合物を 3 点において N=6 で測定）。

リン脂質除去

他の逆相 SPE 充填剤や液 - 液抽出法に対して Oasis PRiME HLB の重要な特長の 1 つは、その高いリン脂質除去能にあります。リン脂質はマトリックス効果の主要な原因となり[2,3]、分析カラムに蓄積し、MS イオン源の汚染を引き起こし、頻繁なクリーニングが必要となります。リン脂質除去について査定するにあたり、いくつかのもっとも一般的なリン脂質を用いて抽出を行い、タンパク質沈殿のみのサンプルと比較しました。図 4 には同一の血漿サンプルを用いて、前述の手法で Oasis PRiME HLB を用いて抽出したものと、タンパク質沈殿のみを行ったサンプルのクロマトグラムの比較を示します。Oasis PRiME HLB を用いて抽出したサンプルにおけるリン脂質の総ピーク面積は、タンパク質沈殿のみのサンプルにおける総ピーク面積の 3% でした。タンパク質沈殿のみのサンプルではサンプルが濃縮されていないことから、真のリン脂質除去率は 97% よりもさらに大きい可能性があります。濃縮という要素を考慮に入れると（約 6 倍）、リン脂質除去率は 99% 以上の結果であろうといえます。

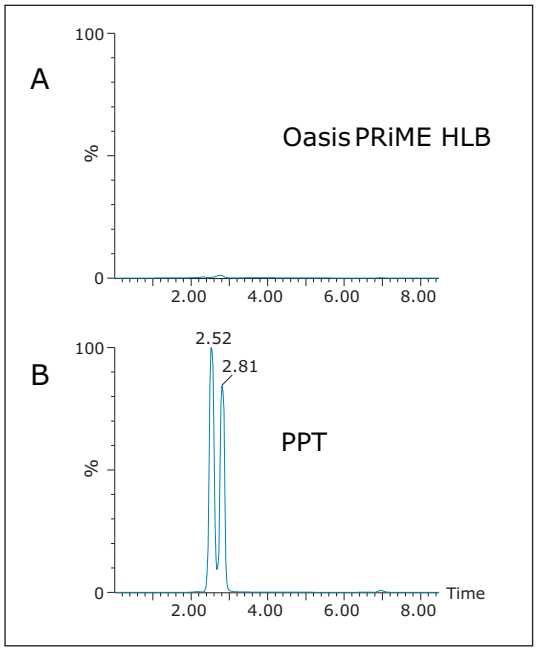

図 4. リン脂質除去とタンパク質沈殿法との比較。A. には血漿中サンプルから Oasis PRiME HLB を用いて抽出したもののリン脂質の合計クロマトグラム。B は A と同一の血漿サンプルからタンパク質沈殿法によって得られたサンプルによるリン脂質の合計クロマトグラム。両クロマトグラムのスケールは統一してあります。

結論

本アプリケーションノートは新規 SPE 充填剤である Oasis PRiME HLB を臨床試験に適した µElution というフォーマットで使用した、血漿中のコルチゾール、アンドロステンジオン、17-OHP の抽出について述べています。この充填剤の独特な性質は、コンディショニングと平衡化工程の排除を可能にし、抽出手順を簡素化し、試料前処理ワークフローの高速化を可能としました。これに加えて、残存するリン脂質は、タンパク質沈殿法と比較してほとんど除去されました。µElution フォーマットを使用することでエバポレート作業や再溶解を行わずに直接抽出液の注入が可能になりました。

回収率はすべての化合物において非常に一貫しており、マトリックス効果はコルチゾールで -20% 以下、他の化合物では -10% 以下でした。良好な直線性、真度、精度、分析感度は、全ての化合物において優れていました。全ての分析精度において、標的濃度の 8% 以内であり、全ての %CV が QC サンプルの 7% 未満という結果は、この充填剤の高い再現性を実証しています。

本製品は研究用であり、診断への直接的な使用はできません。

参考文献

1. Bansal, S., DeStefano A: Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *The AAPS Journal* 9(1), E109-E114 (2007).

2. Chambers, E., Wagrowski-Diehl D.M., Lu, Z, Mazzeo, J.R.: Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B* 852(1–2), 22–34 (2007).

3. Xia, Y.-Q., Jemal, M: Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23(14), 2125–2138 (2009).

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、UPLC、Oasis、MassLynx、Xevo および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
TargetLynx 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. Produced in Japan. 2015年9月 720005416JA PDF