新規固相抽出充填剤Oasis PRiME HLBによる回収率、再現性、マトリックス効果の改善

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

○松本真理子[1], Kim Haynes[2], Xin Zhang[2], Jonathan P. Danaceau[2], Erin E. Chambers[2]
[1]日本ウォーターズ株式会社、[2]Waters Corporation

はじめに

新規の逆相固相抽出（SPE）充填剤であるOasis PRiME HLBは、他のサンプル前処理法よりも簡単で速いSPEプロトコールを可能にすると同時により綺麗なサンプルを得るために開発された。本研究では、 Oasis PRiME HLBを用いて、コンディショニングと平衡化を省略した3ステッププロトコール～サンプルロード-洗浄-溶離～により、全血サンプル中の22種類の合成カンナビノイドおよび代謝物の抽出に成功した。低い相対標準偏差（%RSD）で優れた分析種の回収率、最小のマトリックス効果（ME）が対象とした分析種全般に渡って得られた。同時に、他の逆相（RP）SPEデバイスでそれぞれのデバイスに推奨されている5ステッププロトコールを使用して検討を行った。他のRP SPEによる結果は、より大きな%RSDとマトリックス効果で回収率も低かった。さらに、 Oasis PRiME HLBは他のRP SPEデバイスと比較して90%以上多くのリン脂質を除去し、その結果特定の分析種に対してマトリックス効果がほぼ除外された。

方法

個々のストック標準溶液（1 mg/mL）はメタノール、DMSO、50:50 DMSO:メタノールで調製した。
全分析種の混合ストック標準溶液（10 µg/mL）はメタノールで調製した。
作業用標準溶液は、用時40%メタノール水溶液で調製した。
回収率を求めるためのサンプルは、全血に作業用標準溶液を直接スパイクして調製した。分析中に一般的なリン脂質をモニタリングした。

SPE 前処理

Oasis PRiME HLB 10mgプレートによりサンプルを抽出した。0.1 mLの0.1 M硫酸亜鉛/酢酸アンモニウム水溶液を0.1 mLの全血サンプルに加え、5秒間、細胞を溶解させるためにボルテックスした。全てのサンプルは400 µLのアセトニトリルを加えてタンパク沈殿処理を行った。サンプルを10秒間ボルテックスした後、5分間7000 rcfで遠心分離を行った。上清を1.2 mLの水で希釈した後、全てのSPEデバイスにロードした。

Oasis PRiME HLBではコンディショニングと平衡化を省略したシンプルな3ステッププロトコールを用いたが、比較検討をした他のSPEデバイスは3ステッププロトコールでは機能しないため、 バイアスの無い性能評価をするために5ステッププロトコールを用いた。溶離液は窒素気流で乾固させ、100 µLの30%アセトニトリル水溶液に再溶解し、5 µLをUPLC-MS/MSシステムに注入した。比較した他のSPEデバイスフォーマットも96ウェルプレートに10 mgの充填剤が充填されたものを使用した。

UPLCおよびMS 条件

UPLC システム: ACQUITY UPLC I-Class
カラム: ACQUITY UPLC CORTECS UPLC C_{18}、1.6 µm 2.1 x 100 mm
移動相A: 0.1% ギ酸水溶液
移動相 B: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル
カラム温度: 30 °C
サンプル温度: 10 °C
グラジエント: 表1参照

表 1. UPLC グラジエント条件

時間 (min)	流速 (mL/min)	% A	% B
0	0.6	70	30
2.0	0.6	50	50
3.0	0.6	50	50
7.0	0.6	10	90
7.2	1.6	70	30
8.5	0.6	70	30

Waters Xevo TQ-S 条件、ESI+

キャピラリー電圧: 1 kV
脱溶媒温度: 550 ° C
脱溶媒ガス流速: 900 L/Hr
イオン源温度: 150 ° C
MRM トランジッション, ESI+: 表2参照

表 2. MS/MS 条件

No.	分析種	コーン電圧(V)	1 °MRM トランジッション	コリジョンエネルギー(eV)
1	AM2233	40	459.2→98.05	34
2	RCS-4, M10	40	324.2→121.0	22
3	RCS-4, M11	36	322.2→121.0	22
4	AM 1248	56	391.4→135.1	28
5	JWH-073 4-COOH	50	358.2→155.1	26
6	JWH-073 4-OH met.	50	344.2→155.1	22
7	JWH-018 5-COOH	46	372.2→155.1	24
8	JWH-073 3-OH met.	44	344.2→155.1	26
9	JWH-018 5-OH met.	40	358.2→155.1	24
10	JWH-018 4-OH met.	40	358.2→155.1	24
11	JWH-015	42	328.2→155.1	24
12	RCS-4	44	322.2→135.1	26
14	JWH-022	50	340.2→155.1	26
13	JWH-073	48	328.2→155.1	26
15	XLR-11	48	330.3→125.1	26
16	JWH-203	46	340.2→125.0	26
17	JWH-018	44	342.2→155.1	26
18	RCS-8	42	376.3→121.1	26
19	UR-144	46	312.3→125.1	24
20	JWH-210	48	370.2→183.1	26
21	AB 001	52	350.3→135.1	30
22	AKB 48	38	366.3→135.1	22

結果および考察

クロマトグラム （図 1）

WatersのCORTECS UPLC C_{18} カラム（2.1 x 100 mm; 1.6 µm）を用いることにより、 全分析種が7.5分以内に溶出し、8.5分のサイクルで分析可能だった。全分析種のピーク形状は優れており、テーリングや非対称性はなく、ベースラインから5%の高さにおけるピーク幅は3秒以下だった。

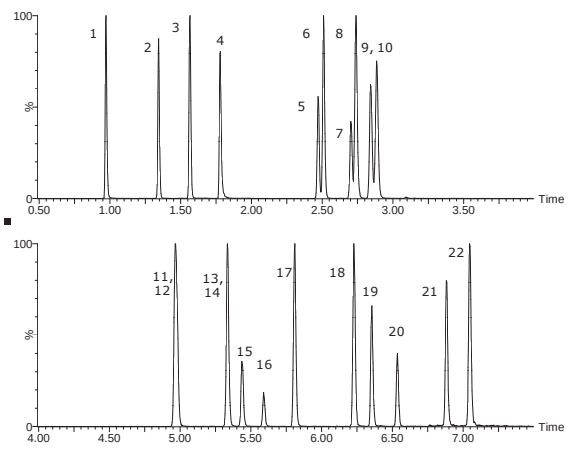

図 1. 合成カンナビノイドおよび代謝物22種のUPLC-MS/MSクロマトグラム

回収率（図 2 および 表 3）

Oasis PRiME HLBでは、22分析種中21成分の回収率が90～110%の間にあり（AM 2233は回収率71%）、%RSDは3～7%の範囲だった。比較検討した他のRP SPEデバイスでは、より低い回収率と高い変動のある結果だった。

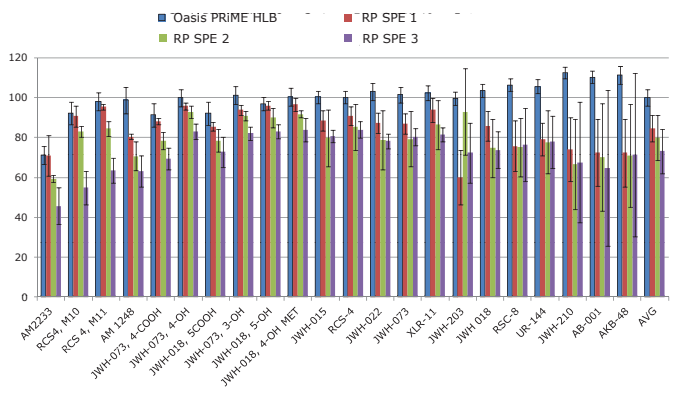

図2. 新規RP SPE デバイス（Oasis PRiME HLB）と比較検討したSPE デバイス の回収率および標準偏差（n=5）

表 3. 回収率および相対標準偏差の範囲

N=5	% 回収率 範囲	平均 % 回収率	% RSD 範囲	平均 % RSD
Oasis PRiME HLB	**90-110%**	**100**	**3-7**	**4**
RP SPE 1	60-97%	85	1-17	7
RP SPE 2	59-92%	80	2-27	11
RP SPE 3	46-84%	73	3-41	11

マトリックス効果（ME）

マトリックス効果は一斉分析において、3種の分析種が25%以上であった事を除けば、Oasis PRiME HLBは優れた結果を示し、マトリックス効果は平均11%であった。比較検討したSPEデバイスでは、遅く溶出する分析種ほど、高い変動を示した。

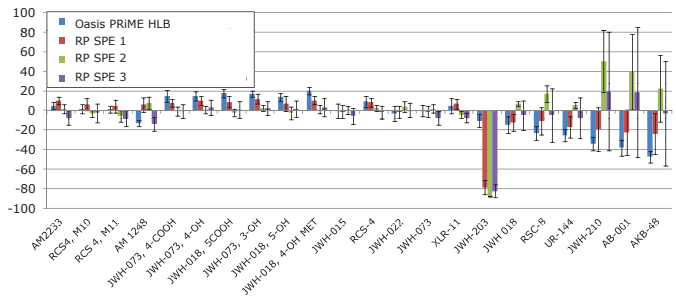

図 3. Oasis PRiME HLBおよび他のSPEデバイスのマトリックス効果（ME）および標準偏差。棒グラフとエラーバーは各分析種の平均と標準偏差を示す（N=5）。

リン脂質のモニターより、JWH-203が残存リン脂質であるlysophosphatidylcholine 18:0（*m/z* 524.4）と共溶出し、比較検討したSPEデバイスでは顕著なマトリックス効果を引き起こしていた。Oasis PRiME HLBは、90%以上のリン脂質を除去し、マトリックス効果および変動を抑制した（図4および図5）。

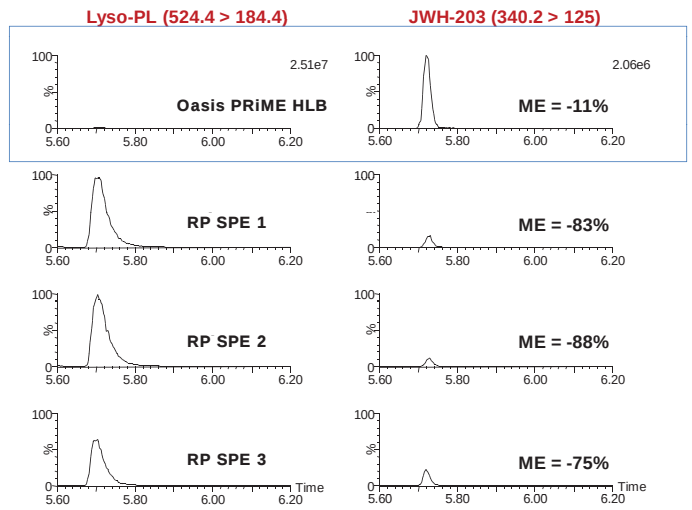

図 4. リン脂質524のクロマトグラム（左）およびJWH-203であらかじめスパイクされた全血サンプルのクロマトグラム（右）。右図内のマトリックス効果の数値は、各SPEデバイス毎に計算したイオンサプレッションの強度を示す。

リン脂質とマトリックス効果の関係

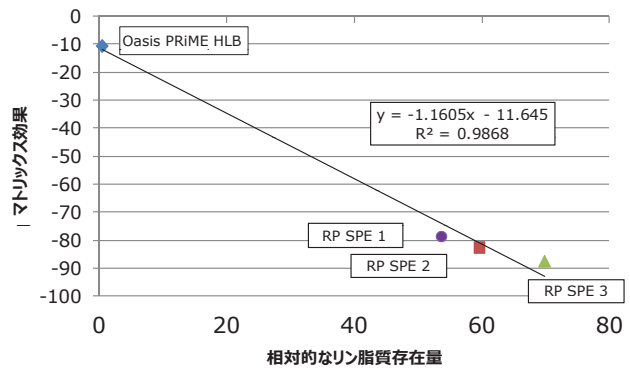

図 5. リン脂質524とJWH-203のイオンサプレッションの関係。結果として、共溶出したリン脂質とJWH-203のイオンサプレッションに直線的な相関関係がある事を示す。

結論

- 新規逆相SPE充填剤Oasis PRiME HLBによる簡単なSPEプロトコールは、コンディショニングおよび平衡化を必要としなかった。
- 簡略化されたプロトコールにも関わらず、Oasis PRiME HLBは妨害成分を除去し、結果として一貫性のあるより高い回収率が得られた。
- Oasis PRiME HLBは90%以上のリン脂質を除去する事により、分析種との共溶出を防ぎ、マトリックス効果を最小にした。
- Oasis PRiME HLBによるリン脂質などのマトリックス成分の除去は、カラム寿命を延ばし、質量分析計のイオン源メンテナンス頻度を削減すると示唆される。

TO DOWNLOAD A COPY OF THIS POSTER, VISIT WWW.WATERS.COM/POSTERS

©2015 Waters Corporation MKT16212