

LC-MS/MS分析サンプル前処理 ISOLUTE® SLE+ を使用した 加圧法と遠心法によるアプリケーション比較

データ提供：株式会社 住化分析センター

はじめに

ISOLUTE® SLE+プレートおよびカラムは、従来の液液抽出法(LLE)に代わる効率的なサンプル前処理製品です。エマルジョン形成を回避し、処理時間を大幅に短縮します。ターゲット回収率が高く、サンプル-to-サンプル(検体間)のデータ再現性に優れており、且つ、操作方法が極めてシンプルで容易に前処理を行うことができます。本製品の通液には一般的に加圧法または吸引法が用いられますが、遠心通液法を適用した場合の回収率と夾雑物混入の程度について今回検討を行いました。

試験内容

化合物の混合標準溶液が添加されたヒト血漿を下記条件にて前処理を行い、添加回収率について加圧法と遠心法との違いを確認しました。回収率はRecovery QC、Control QC及びBlankの注入試料をそれぞれ、液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置を用いて分析を行うことで算出しています。

- 分析化合物：・Diclofenac, Omeprazole, Amlodipine, Nicardipine, p-Nitrophenol(1濃度)の5種類
- サンプル種類：・Recovery QC：混合標準溶液添加ヒト血漿
・Control QC：前処理後に混合標準溶液を添加したヒト血漿
・Blank：前処理後に混合標準溶液を添加しないヒト血漿
- サンプル希釈pH：・pH 4およびpH 9
- 通液処理：・200 rpm(約6.5xg)、5 min
・350 rpm(約19.9xg)、5 min
・500 rpm(約40.6xg)、5 min
・750 rpm(約91.4xg)、5 min
・750 rpm(約91.4xg)、10 min



ISOLUTE® SLE+

実験項

1. 前処理操作方法

ヒト血漿(抗凝固剤:ヘパリンNa) 100 μ L

← 混合標準溶液 10 μ L (Recovery QC試料)

または、アセトニトリル 10 μ L (Control QC試料またはBlank試料)

← ほう酸塩pH標準液(pH 9.18) or フタル酸塩pH標準液(pH 4.01) 90 μ L

撪拌10秒間

ISOLUTE® SLE+ 各ウェルに全量負荷

加圧または遠心分離(4 °C, 750 rpm[約91.4 \times g], 5分間)

5分間静置

← ジエチルエーテル 1 mL

5分間静置

加圧または遠心分離(5種類の条件で検討)

← アセトニトリル 10 μ L (Recovery QC試料)

または、混合標準溶液 10 μ L (Control QC試料またはBlank試料)

撪拌10秒間

蒸発乾固(窒素気流下, 40 °C)

← アセトニトリル/メタノール(50:50, v/v) 200 μ L

撪拌10秒間

96ウェルプレートに100 μ L分取

← 水 100 μ L

撪拌10秒間

注入試料

2. 装置及び測定条件

2.1. 高速液体クロマトグラム

HPLCシステム: Ultra Performance LC system(Waters Corp.)

分析カラム: Shim-pack XR-ODS
3×50 mm, 3 μm (株式会社島津ジーエルシー)

カラム温度: 40 °C

移動相: A: 0.1%ギ酸水溶液
B: アセトニトリル

洗浄液: 水/アセトニトリル(1:1, v/v)

グラジエントプログラム:

時間(分)	0	0.5	4	5.50	5.51	7.5
B(%)	30	30	90	90	30	30

流量: 0.5 mL/min

オートサンプラー温度: 10 °C

2.2. 質量分析計(positive ion mode)

タンデム質量分析計: API4000 (AB Sciex Pte. Ltd.)

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

スプレー電圧: 4500 V

ヒーターガス温度: 設定値500 °C

コリジョンガス: 設定値5, 窒素

カーテンガス流量: 設定値20, 窒素

ネブライザーガス流量(GS1): 設定値40, 空気

ターボイオンスプレー流量(GS2): 設定値60, 空気

スキャンモード: Multiple reaction monitoring(MRM)mode

モニターイオン: Diclofenac m/z 296.1 → m/z 250.1

Omeprazole m/z 346.2 → m/z 198.1

Amlodipine m/z 409.0 → m/z 238.1

Nicardipine m/z 480.1 → m/z 315.0

2.3. 質量分析計(Negative ion mode)

タンデム質量分析計: API4000(AB Sciex Pte. Ltd.)

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

スプレー電圧: -4500 V

ヒーターガス温度: 設定値500 °C

コリジョンガス: 設定値5, 窒素

カーテンガス流量: 設定値20, 窒素

ネブライザーガス流量(GS1): 設定値40, 空気

ターボイオンスプレー流量(GS2): 設定値60, 空気

スキャンモード: Multiple reaction monitoring(MRM)mode

モニターイオン: p-Nitrophenol m/z 138.2 → m/z 107.9

Nicardipine m/z 480.1 → m/z 315.0

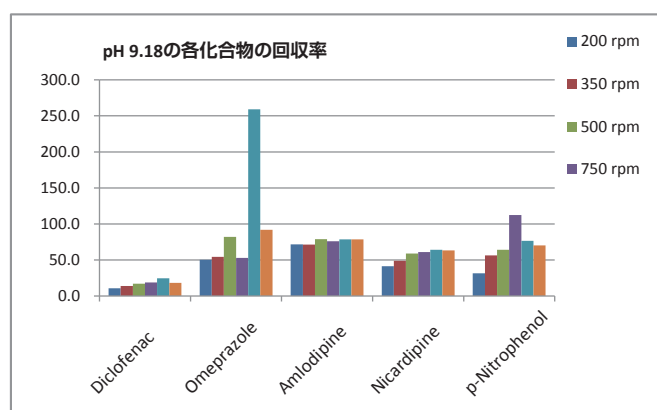
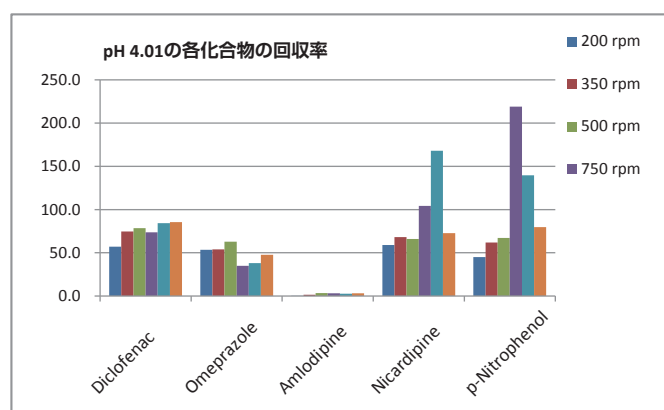
3. 回収率

・pH 4.01

	Diclofenac	Omeprazole	Amlodipine	Nicardipine	p-Nitrophenol
200 rpm	57.0	53.4	0.3	59.1	45.0
350 rpm	74.6	54.1	1.5	68.2	62.0
500 rpm	78.6	62.9	3.3	66.0	67.1
750 rpm	73.7	35.0	3.1	104.2	219.0
750 rpm_10 min	84.3	38.1	2.8	168.0	139.6
加圧	85.4	47.7	3.2	72.8	79.7

・pH 9.18

	Diclofenac	Omeprazole	Amlodipine	Nicardipine	p-Nitrophenol
200 rpm	10.9	50.3	71.6	41.3	31.4
350 rpm	13.8	54.4	71.3	48.8	56.3
500 rpm	16.9	82.1	78.9	59.0	64.2
750 rpm	18.8	52.9	76.1	61.1	112.4
750 rpm_10 min	24.5	259.1	78.5	64.0	76.7
加圧	18.2	91.8	78.7	63.3	70.2



4. 結果

血漿サンプル負荷時750 rpm、溶出時500 rpmの条件にて、全ての化合物で加圧法と同様の回収率を得ることができた。化合物によっては、350 rpm以下の回転数では加圧法より回収率が低下し、750 rpm以上の回転数では大きなバラつきが確認された。

まとめ

従来、加圧もしくは吸引によって処理されていたISOLUTE® SLE+プレートは、汎用の遠心法においても良好な回収率が得られることが確認できました。スルーブット性を考慮した場合には加圧操作が優れているものの、遠心機さえあれば場所を問わず作業可能であることから遠心法での対応も十分考えられます。

また、500 rpmでは加圧法とほぼ同等の結果でしたが、溶出後のプレートを更に強い遠心加速度で遠心したところ、10~20 μ L程度の溶媒が確認されました。遠心で落ちきれなかった残溶媒、または血漿の夾雑成分の可能性が考えられるため、500~750 rpmの間でさらに遠心条件の最適化が必要と考えられます。