

LC-MS/MS分析サンプル前処理

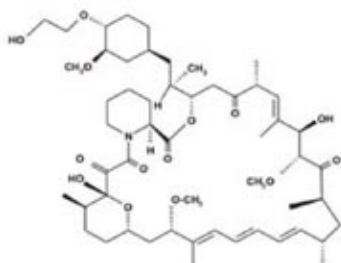
ISOLUTE® SLE+ を使用した 全血中免疫抑制剤分析のためのサンプル前処理

はじめに

このアプリケーションノートは、ISOLUTE SLE+96ウェルプレートを使用した、全血サンプルからのシロリムス、タクロリムス、エベロリムス、およびシクロスポリンAの抽出法を詳しく説明しています。

免疫抑制剤は、移植臓器に対する拒絶反応防止や自己免疫疾患の治療のために用いられますが、免疫不全のリスクがあるため、使用時には信頼性の高い測定手法による治療薬物モニタリング (TDM) が推奨されます。現在のところ、免疫抑制剤の血中濃度は主に免疫測定法 (イムノアッセイ) により測定されていますが、時間がかかる上、交叉反応性の影響を受けます。このアプリケーションノートでは、交叉反応の問題がなく、信頼性が高いLC-MS/MS分析法を提案します。分析薬物の回収率は60-97% (RSD<10%未満) です。

■ 図1 エベロリムスの構造



生体サンプル前処理用珪藻土 ISOLUTE SLE+

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。

分析薬物

シロリムス、タクロリムス、エベロリムス、シクロスポリンA

■ ISOLUTE SLE+による抽出メソッド

使用製品:	ISOLUTE® SLE+ 400μLサンプル用96ウェルプレート (Part# 820-0400-P01)
サンプルの希釈:	2mLマイクロチューブを使用し、全血50μLに水 (HPLCグレード) 250μLを加えて30秒間混和した後、遠心分離する (12,000rpm, 10分間)。
サンプルロード:	遠心分離後の上澄み液275μLをウェルにロードし、10秒間程度、軽くバキューム (または加圧) して導入する。5分間静置し、サンプルを珪藻土に完全に吸収させる。
溶出:	酢酸エチル600μLをウェルに加え、5分間静置した後、さらに酢酸エチル600μLを加える。軽くバキューム (または加圧) して溶出を完了する。
エバポレーション・再溶解:	30°Cで溶媒を留去し、水/アセトニトリル (25:75, v/v) 100μLで再溶解する。

HPLC条件

機器： Waters Acquity UPLC
 カラム： Waters UPLC BEH C18 (50mm x 1.7 μ m x 2.1mm id)
 サンプル温度： 10 °C
 カラム温度： 60 °C
 注入量： 10 μ L (partial loop)
 ニードル洗浄 (WNW)： 水/アセトニトリル (90 : 10, v/v)
 ニードル洗浄 (SNW)： 水/アセトニトリル (10 : 90, v/v)
 移動相： 溶媒A : 0.1% ギ酸-2mMギ酸アンモニウム水溶液
 溶媒B : 0.1% ギ酸-2mMギ酸アンモニウム-メタノール溶液

グラジエント：

Time	%A	%B	Curve
0	25	75	-
0.2	0	100	11
0.8	25	75	11
2.8	25	75	-

MS条件

機器： エレクトロスプレー・インターフェイス装備Premier XEトリプル四重極型質量分析装置
 (Waters Assoc., Manchester, UK)
 脱溶媒和温度： 450 °C
 イオン源温度： 150 °C

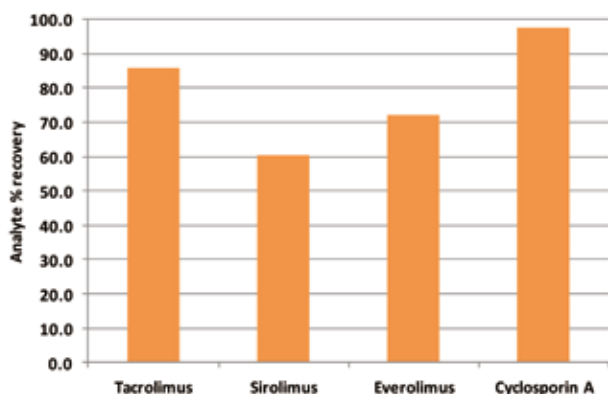
表1 MRMトランジション(ポジティブモード)

Analyte	Transition	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
Tacrolimus (Quant)	826.5 - 616.4	65	35
Tacrolimus (Qual)	826.5 - 505.4	65	39
Sirolimus (Quant)	936.5 - 409.4	65	50
Sirolimus (Qual)	936.5 - 209.2	65	60
Everolimus (Quant)	980.6 - 389.4	65	58
Everolimus (Qual)	980.6 - 453.4	65	51
Cyclosporin A (Quant)	1202.9 - 425.5	65	50
Cyclosporin A (Qual)	1202.9 - 298.4	65	57

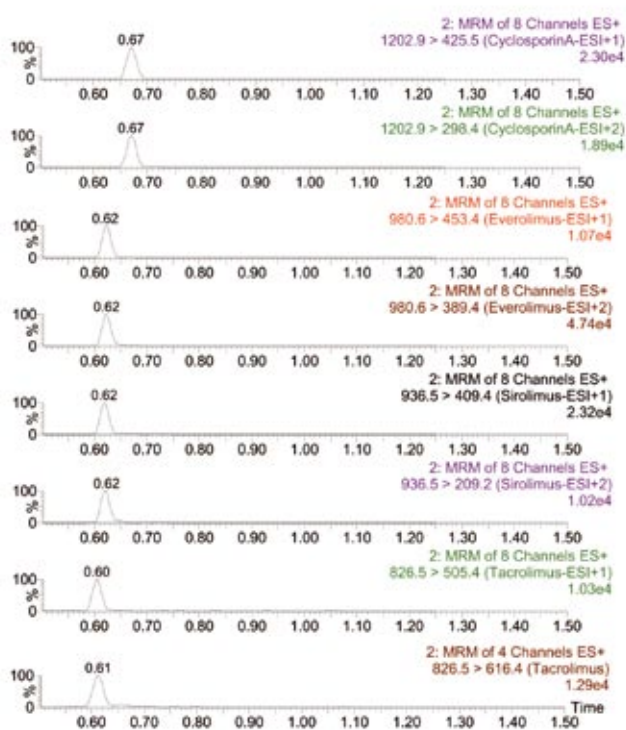
結果

図2に示す通り、分析薬物の回収率は60-97%だった (RSDはいずれも10%未満、n=7)。図3に、各分析薬物のイオンクロマトグラムを示す。

■ 図2 ISOLUTE SLE +プロトコールを使用した、抽出した免疫抑制剤の典型的な回収率



■ 図3 分析薬物 (80ng/mL) の典型的なイオンクロマトグラム



使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
820-0400-P01	ISOLUTE SLE+ 400 Supported Liquid Extraction Plate	1
PPM-96	PRESSURE+96 Positive Pressure Manifold 96 Well	1
121-9600	VacMaster 96 Sample Processing Manifold	1
SD-9600-DHS-UK	SPE Dry 96 240 V	1

バイオタージ・ジャパン株式会社

本社：〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121
 大阪：〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29, 6F TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312
 URL: <http://www.biotage.co.jp> E-mail: Japan_info@biotage.com