

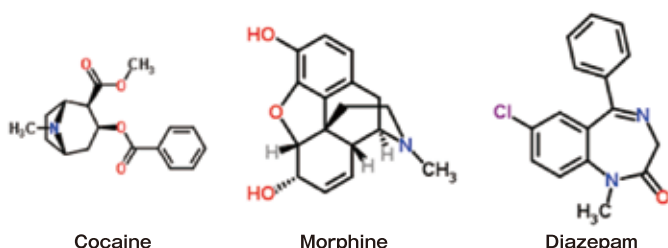
LC-MS/MS分析サンプル前処理

# ISOLUTE® SLE+ を使用した 尿中医療用麻薬（鎮痛薬）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+固定ウェルプレートを使用した、尿中から医療用麻薬（鎮痛薬）22種類の抽出法について説明します。がん治療等において、疼痛緩和ケアに用いられる薬剤の投与量モニタリングや投薬コントロールにお役立てください。

### ■ 図1 コカイン、モルヒネ及びジアゼパムの構造



患者の尿中の薬物スクリーニングは、遊離薬物をβ-グルクロニド型に変換する代謝プロセスがあるために複雑です。しかし、酵素による加水分解処理を行い、生体サンプル前処理用珪藻土ISOLUTE SLE+を使用して抽出することにより、効率的な分析前処理を行うことができます。

## 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、サンプル調製時間を短縮します。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という利点により、米国では疼痛治療モニタリングに活用されています。

## 分析薬物

コカイン、ヘロイン、モルヒネ、コデイン、オキシモルホン、ヒドロモルホン、オキシコドン、ヒドロコドン、メタドン、クロナゼパム、ジアゼパム、フルニトラゼパム、オキサゼパム、テマゼパム、ニトラゼパム、アルプラゾラム、メタンフェタミン、フェンタニル、ブプレノルフィン、メペリジン、ナロキソン、ナルトレキソン

### ■ ISOLUTE SLE+による抽出メソッド

使用製品:	ISOLUTE® SLE+ 400μL用96ウェルプレート (Part# 820-0400-P01)
尿の加水分解	尿にβ-グルクロニダーゼ (5000 units/mL) と内部標準物質を添加し、酢酸アンモニウム溶液 (pH5.0) で希釈する (1:1 v/v)。β-グルクロニダーゼ試薬の使用法に従ってインキュベートする。
サンプルの希釈	加水分解した尿200μLに2%水酸化アンモニウム200μLを加え、静かに混和する。
サンプルロード	加水分解、希釈を行ったサンプル全量400μLをウェルに添加し、軽くバキューム (または加圧) した後、5分間静置。
溶出	酢酸エチル600μLをウェルに加え、5分間静置した後、軽くバキューム (または加圧) する2回繰り返し、溶出液を回収する。
エバポレーション・再溶解	溶媒を除去し、HPLC移動相500μLで再溶解する。
備考	エバポレーション前に50mM HCl-メタノール溶液50μLを添加することにより、メタンフェタミンの分解をある程度防止することができる。

**HPLC条件**

機器: Agilent 1200 Liquid Handling System (Agilent Technologies, Berkshire, UK)  
 カラム: Biotage Resolux 200 C4, 4.5 $\mu$ m 分析用カラム, 150 x 2.1 mm  
 (Part# R2-1521-2045, Biotage, Uppsala, Sweden)  
 移動相: 溶媒A: 0.1%水酸化アンモニウム / 0.01%ギ酸 水溶液  
 溶媒B: 0.01%ギ酸-アセトニトリル溶液

グラジエント:

Step	Time	Flow Rate	%A	%B
1	0.0	500	80	20
2	0.50	500	80	20
3	4.0	500	0	100
4	6.0	500	0	100
5	7.0	500	80	20
6	10.0	500	80	20

注入量: 5  $\mu$ L  
 温度: 60  $^{\circ}$ C

**MS条件**

機器: Turbo Ionspray<sup>®</sup>インターフェース装備Applied Biosystems/MDS Sciex 4000  
 Q-Trap トリプル四重極型質量分析装置Applied Biosystems, Foster City, CA.  
 イオン源温度: 400  $^{\circ}$ C

**表1. MRMトランジション (ポジティブモード/大気圧イオン化法)**

Scan Function	Analyte	MRM Transition	Declustering Potential (DP)	Collision Energy (CE)	Cell Exit Potential(CXP)
1	コカイン	304>182	30	30	16
2	ヘロイン	370>165	30	30	16
3	モルヒネ	286>165	45	40	16
4	コデイン	300>199	30	40	16
5	オキシモルホン	302>227	30	30	16
6	ヒドロモルホン	286>185	30	35	16
7	オキシコドン	316>241	45	40	16
8	ヒドロコドン	300>199	25	25	16
9	メタドン	310>265	30	30	16
10	メタンフェタミン	150>91	30	40	16
11	アルプロゾラム	308.8>280.5	30	35	16
12	クロナゼパム	315.8>269.8	30	30	16
13	ジアゼパム	284.9>154	30	30	16
14	フルニトラゼパム	313.9>267.9	30	30	16
15	オキサゼパム	288>242	30	40	16
16	テマゼパム	300.9>255	30	30	16
17	ニトラゼパム	282>180	40	40	16
18	フェンタニル	337>188	30	30	16
19	ブプレノルフィン	468>396	30	60	16
20	メペリジン	248>220	30	30	16
21	ナロキソン	328>310	35	30	16
22	ナルトレキソン	342>323.8	30	40	16

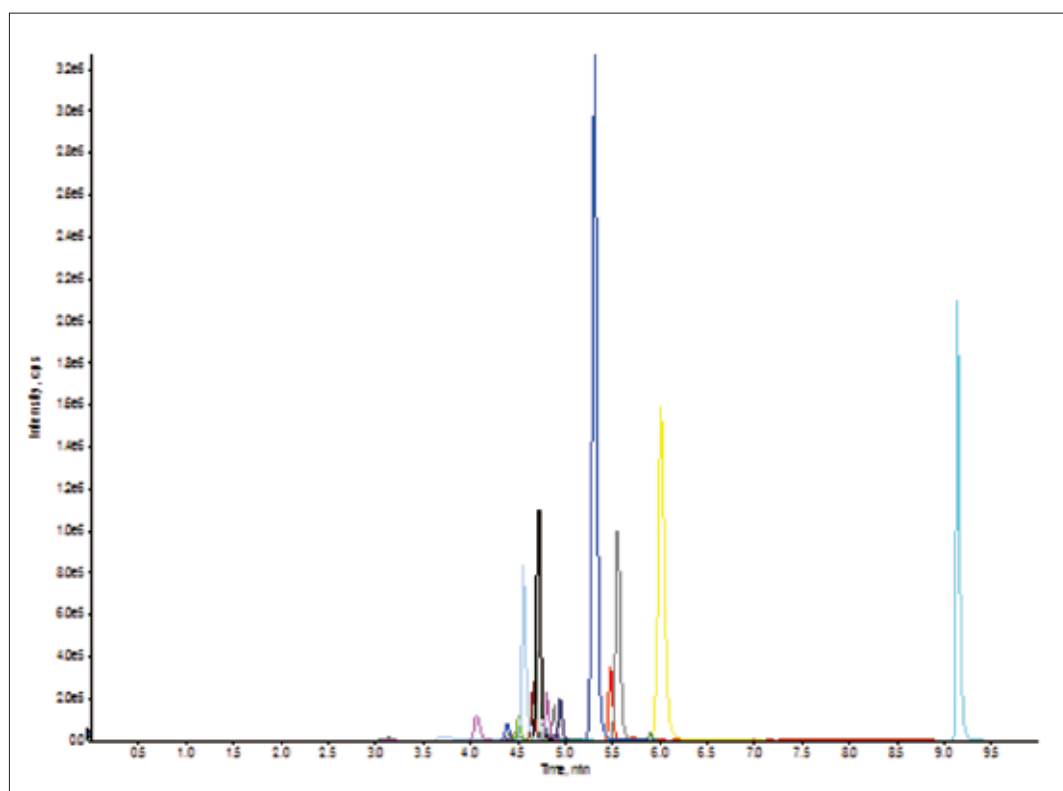
## 実験と結果

ブランク尿をβ-グルクロニダーゼで加水分解し、22種類の薬物混合物をスパイクした。添加した薬物の濃度はそれぞれ100ng/mL(フェンタニルのみ10ng/mL)。スパイク後の最終濃度は5ng/mL未満(フェンタニルのみ0.5ng/mL未満)。平均回収率(inter-run)は80%以上、平均RSD(inter-run)は10%未満だった。分析薬物の保持時間を表2に示した。

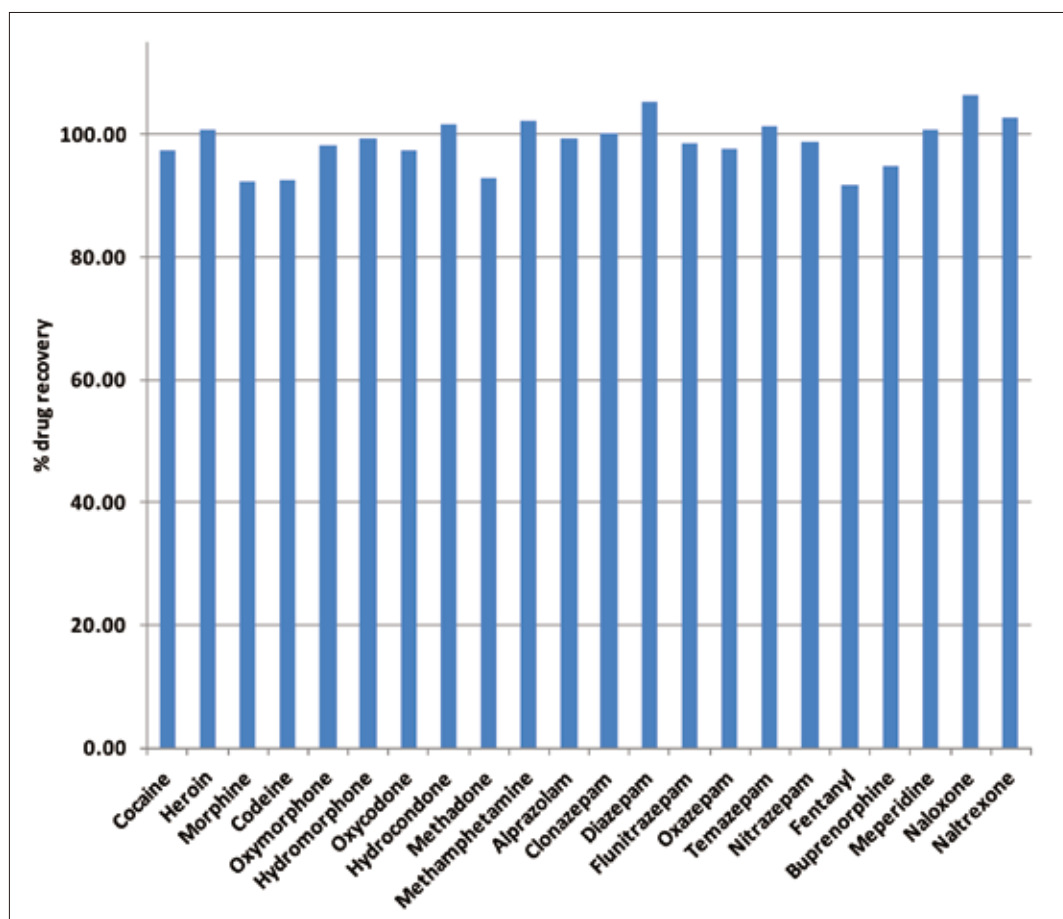
表2. 分析薬物の保持時間 (Biotage Resolux C4 HPLC分析用カラム使用)

Analyte	RT (mins)	Analyte	RT (mins)
コカイン	5.35	クロナゼパム	4.57
ヘロイン	5.75	ジアゼパム	4.99
モルヒネ	3.27	フルニトラゼパム	4.72
コデイン	4.92	オキサゼパム	4.52
オキシモルホン	3.81	テマゼパム	4.77
ヒドロモルホン	4.15	ニトラゼパム	4.46
オキシコドン	3.81	フェンタニル	5.51
ヒドロコドン	4.92	ブプレノルフィン	5.93
メタドン	9.14	メペリジン	5.59
アルプラゾラム	4.75	ナロキソン	4.62
メタンフェタミン	6.04	ナルトレキソン	4.86

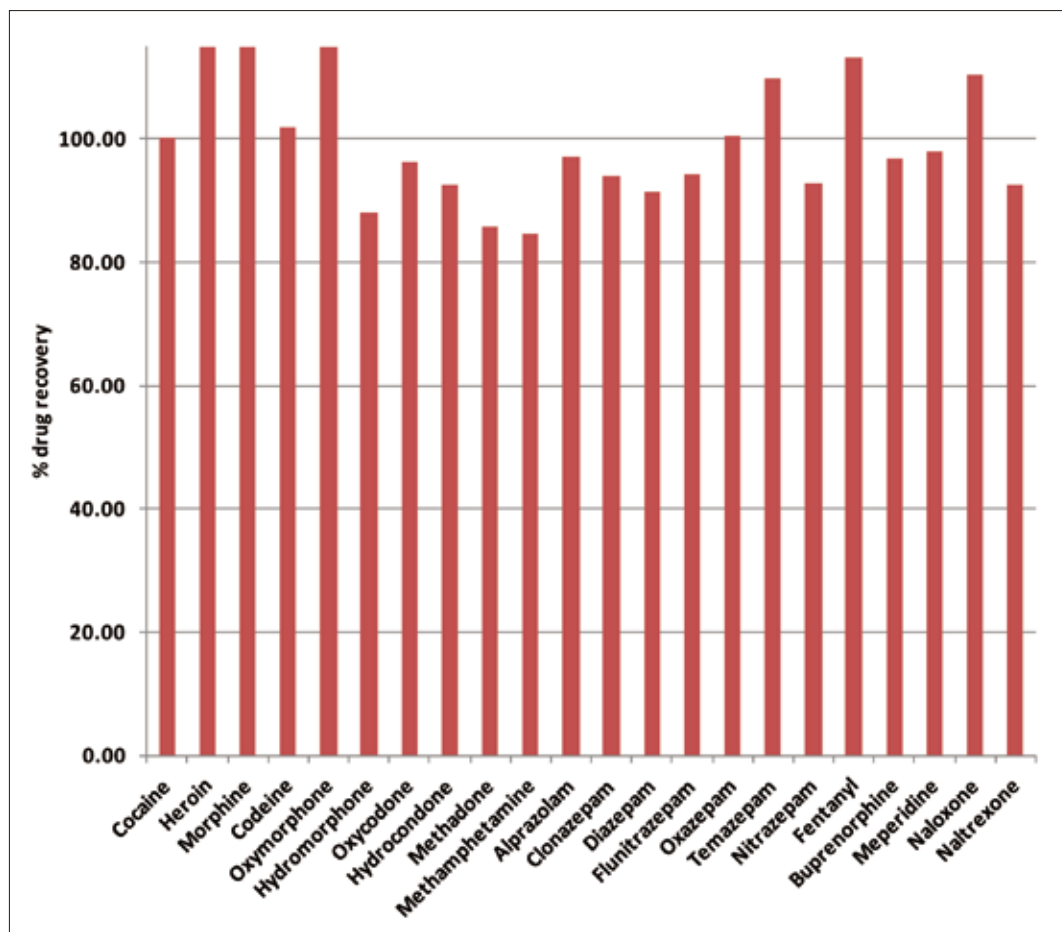
■ 図2 薬物濃度10ng/mL混合液の典型的なイオンクロマトグラム



■ 図3 非加水分解ヒト尿 (ISOLUTE SLE+プレートで抽出) に薬物5ng/mL (フェンタニルは0.5ng/mL) を添加したサンプルの平均回収率(%)



■  $\beta$ -グルクロニダーゼ加水分解ヒト尿 (ISOLUTE SLE+プレートで抽出) に薬物2.5ng/mL (フェンタニルは0.25 ng/mL) を添加したサンプルの平均回収率 (%)



#### ■ 使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
820-0400-P01	ISOLUTE SLE+ 400 Supported Liquid Extraction Plate	1
PPM-96	Biotage PRESSURE+ 96 Positive Pressure Manifold 96 Well	1
C103200	TurboVap LV, ASE, 40/60 mL vial, 110V	1
R2-1521-2045	Resolux 200 HPLC Column C4	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](mailto:Japan_info@biotage.com)

© 2012.無断複写・複製・転載を禁じます。記載のブランド名および製品名はすべて各社の商標または登録商標です。本書に含まれる情報は予告なしに変更することがあります。