

LC/MS/MS によるヒト血清中の 内因性ステロイド群の定量

Agilent Chem Elut S 保持型液液抽出 (SLE) プレート

著者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Chem Elut S 保持型液液抽出には、従来のケイソウ土よりも一貫性と保水力に優れた合成充填剤が採用されています。今回の研究では、Chem Elut S 2 mL 96 ウェルプレートを使用し、ヒト血清中の内因性ステロイド 15 種を LC/MS/MS で定量しました。血清サンプルを保持型液液抽出 (SLE) 法で前処理することにより、ターゲット成分が抽出され、塩、タンパク質、リン脂質部分などのマトリックス干渉物質が除去されました。サンプル前処理は、すべて 96 ウェルプレート内でバッチ処理として実施し、最初に水溶性サンプルを SLE 充填剤にロードしてから、非水溶性溶媒を使用して自然落下溶出しました。このプレート内 Chem Elut S ワークフローでは、従来の液液抽出 (LLE) よりも時間および労力が大幅に軽減されます。今回開発した SLE メソッドでは、きわめて優れた成分真度 (80 ~ 120 %) と再現性 (RSD < 15 %) が得られました。また、血清中のターゲットステロイドに対し、エストラジオールおよびテストステロン (10 ~ 10,000 pg/mL)、ヒドロコルチゾン、17-ヒドロキシプレグネロン、およびプロゲステロン (20 ~ 10,000 pg/mL) を除き、5 ~ 10,000 pg/mL という広いキャリブレーション範囲を達成できることが確認されました。メソッドの選択性とキャリーオーバーも評価したところ、これらの 5 種類の成分の定量下限 (LOQ) が高かったのは、血清マトリックスにおける選択性が原因でした。また、合成 SLE 充填剤は、評価したすべてのサンプル抽出溶媒について、ケイソウ土ベースの SLE および従来の LLE よりも、生体サンプルマトリックスからのリン脂質除去能力に優れていることがわかりました。

はじめに

誘導体化を行うかどうかを問わず、ステロイド分析のために血清や血漿などの生体サンプルマトリックスから内因性ステロイドを抽出するための手段として、従来型の LLE が広く使用されてきました^{1~3}。このプロトコルの一般的な手順では、まず、血清や血漿などの生体サンプルを、抽出溶媒を入れた個々の小型遠心管に分注します。サンプルを混合して遠心分離した後、有機上澄み層を別の一連のチューブまたは 96 ウェルプレートに移して、以降のサンプル処理を行います。ただし、実際の手順には、ラベル付け、サンプル混合、相分離、有機層の移動など、手間と時間のかかるステップが含まれ、これがハイスループットのサンプル前処理においてボトルネックとなっていました。

こういった LLE の欠点を解決する代替アプローチが SLE です。SLE カートリッジの充填剤は化学的に不活性な表面を持ち、この表面上に水溶性サンプルの被膜が形成されます。平衡化後、ターゲット成分は、非水溶性溶媒により重力下、弱い真空または圧力下で溶出され、水性相はカートリッジにそのまま残されます。SLE 充填剤は、保水表面積が大きく、有機溶媒の通液時にターゲット成分が効率的に有機溶媒に抽出されます。図 1 に、この抽出プロセスを示します。SLE では混合ステップが不要なため、エマルジョンの形成を効果的に防止することができます。水性相と有機相が密接することで効率的な分離が可能になり、高い成分回収率も得られます。また、ロードと溶出で構成されるシンプルな SLE ワークフローにより、必要な労力と時間が大幅に軽

減されます。さらに、96 ウェルプレートの SLE フォーマットは自動化に特に適しているため、サンプル前処理スループットを高めることができます。

従来、SLE の充填剤には、高純度のケイソウ土が使用されてきました。ただし、ケイソウ土は、不規則な化石微生物からなる天然材料であるため、バッチ間で充填剤粒子の一貫性をコントロールするのが困難です。この充填剤の不均一性が製品の製造と品質管理をさらに複雑にし、製品性能のばらつきにもつながります。また、合成充填剤と比較すると、ケイソウ土は保水力が低く、またその保水力も一様ではありません。

これに対し、Chem Elut S の合成充填剤は、保水力、バッチ間の一貫性、および性能の一貫性が大幅に向上しています。このアプリケーションノートでは、Chem Elut S 96 ウェルプレートを使用し、ヒト血清中の内因性ステロイド 15 種 (表 1) を定量した結果を紹介します。

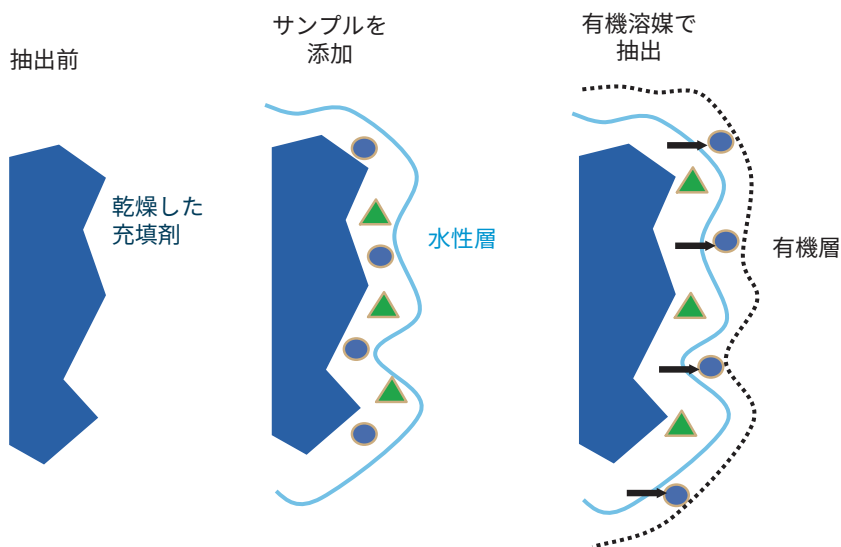


図 1. SLE の抽出プロセスと成分抽出の仕組み

表 1. ターゲットステロイド 15 種の分子式と分子構造

名前	Log P	分子式	構造
2-メトキシエストラジオール (2-MeE2)	4	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	
エストリオール (E2)	2.5	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	
2-メトキシエストロン (2-MeE1)	3.1	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	
プロゲステロン (PGT)	3.9	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
17-ヒドロキシプロゲステロン (17-OH PGT)	3.2	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
11-デオキシコルチゾール (11-DCTS)	2.5	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	
エストラジオール (E2)	4	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	
テストステロン (TTS)	3.4	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	

名前	Log P	分子式	構造
ヒドロコルチゾン (HCTS)	1.6	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	
アンドロステンジオン (ASD)	2.7	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	
17-α-ヒドロキシプレグネロン (17-OH PGN)	3.1	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	
11-デオキシコルチコステロン (11-DCCS)	2.9	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
アルドステロン	1.1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	
エストロン (E1)	3.1	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	
コルチゾン (CTS)	1.5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	

実験方法

試薬

試薬と溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。メタノール (MeOH) は Honeywell 社 (米国ミシガン州マスキーゴン) から、メチル t-ブチルエーテル (MTBE) は VWR-BDH Chemicals 社 (米国ペンシルベニア州ラドナー) から、酢酸エチル (EtOAc) は J.T. Baker 社 (米国ペンシルバニア州セ

ンターバレー) から入手しました。フッ化アンモニウム、すべてのステロイド標準試料、および内部標準原液 (1 mg/mL または 100 μg/mL の MeOH 溶液) は Sigma-Aldrich 社 (米国ミズーリ州セントルイス) から入手しました。また、ヒト血清 (DC Mass Spect Gold、MSG4000) は Golden West Biologicals 社 (米国カリフォルニア州テメキュラ) から購入しました。血清は、使用するまで -70 °C で保管しました。

標準および溶液の調製

標準スパイク溶液は、500 ng/mL の 1:1 MeOH/水溶液、また IS スパイク溶液は 50 ng/mL の 1:1 MeOH/水溶液として調製しました。ステロイド化合物は、特に低濃度ではガラス表面に対して不安定なため、すべてのスパイク溶液の調製および保管にプラスチック製バイアルを使用することが重要です。すべてのスパイク溶液は、使用するまで -20 °C で保管しました。

37.04 mg の NH₄F を 1 L の Milli-Q 水と MeOH に溶解し、1 mM フッ化アンモニウム (NH₄F) の MeOH/水溶液を調製しました。0.2 mM NH₄F の水溶液 (移動相 A) と 0.2 mM NH₄F の MeOH 溶液 (移動相 B) は、この 1 mM 溶液をそれぞれ Milli-Q 水と MeOH で希釈して調製しました。

抽出溶媒 1:1 MTBE/EtOAc は、100 mL の MTBE と EtOAc を混合して毎日新しく調製しました。SLE 後の乾燥サンプルの再溶解には、1:1 MeOH/水溶液を使用しました。

試薬およびサンプル

サンプル前処理に用いた実験器具:

- Centra CL3R 遠心管 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- マルチチューブ vortexer (VWR、ペンシルベニア州、米国)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- SPE Dry 96 エバポレータ
- Agilent 加圧式マニホールド 96 ウェルプレート用 (PPM-96、部品番号 5191-4116)
- ViaFlo 96 リキッドハンドラ (Integra 社、米国ニューハンプシャー州ハドソン)
- Agilent Chem Elut S 2 mL 96 ウェルプレート、200 µL (部品番号 5610-2003)
- Agilent スクウェア 96 ウェル 2 mL コレクションプレート (部品番号 5133009)
- Agilent スクウェア 96 ウェルシーリング キャップ (部品番号 5133005)

分析条件

サンプルの分析には、Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A)、Agilent 1290 Infinity サーマスタットカラムコンパートメント (G131C) で構成される Agilent 1290 Infinity LC を使用しました。この UHPLC システムを、Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオンソースを

搭載した Agilent G6490 トリプル四重極 LC/MS に連結しました。データの取得と分析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

表 2 に、成分のパラメータを示します。また、図 2 に、1 ng/mL の血清中ステロイドの LC/MS/MS クロマトグラムを示します。

HPLC 条件			
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、100 × 2.1 mm、1.8 µm (p/n 959758-902) Agilent ZORBAX RRHD C18 ガード、5 × 2.1 mm、1.8 µm (p/n 821725-901)		
流量	0.4 mL/分		
カラム温度	40 °C		
注入量	20 µL		
移動相	A) 0.2 mM フッ化アンモニウムの水溶液 B) 0.2 mM フッ化アンモニウムの MeOH 溶液		
ニードル洗浄	1:1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O と 0.2% FA		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0	50	0.4
	3.0	60	0.4
	8.0	90	0.4
8.5	100	0.4	
ストップタイム	8.5 minutes		
ポストタイム	2.5 minutes		
MS 条件			
ガス温度	180 °C		
ガス流量	11 L/min		
ネブライザ	20 psi		
シースガスヒーター	400 °C		
シースガス流量	10 L/min		
キャピラリー	3,500 V (ポジティブ)、3,000 V (ネガティブ)		
iFunnel パラメータ	高圧 RF: 150 V (ポジティブおよびネガティブ) 低圧 RF: 100 V (ポジティブおよびネガティブ)		
データ取り込み	dMRM		

表 2. ステロイド成分、使用 IS、リテンションタイム、および MRM 条件

成分	使用内部標準	リテンションタイム (分)	極性	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)			
					定量イオン	CE (V)	定性イオン	CE (V)
エストリオール	IS 1	2.04	負	287.2	171.0	45	143.1	73
アルドステロン-D ₄ (IS1)		2.31	正	365.2	347.1	17	319.2	21
アルドステロン	IS 1	2.32	正	361.2	343.2	17	91.1	80
コルチゾン-D ₈ (IS2)		2.71	正	369.2	169.2	21	125.1	49
コルチゾン	IS 2	2.75	正	361.2	163.2	25	91.0	73
ヒドロコルチゾン	IS 2	3.24	正	363.2	121.1	25	91.1	73
17-ヒドロキシプレグネロン	IS 2	3.24	負	331.2	313.2	21	--	
11-デオキシコルチゾール-D ₅ (IS3)		4.53	正	352.3	100.0	37	113.0	45
11-デオキシコルチゾール	IS 3	4.58	正	347.2	109.0	41	97.0	41
アンドロステンジオン	IS 3	5.31	正	287.2	97.0	25	109.0	29
エストラジオール-D ₅ (IS4)		5.39	負	276.2	147.0	45	187.0	49
エストロン- ¹³ C ₃ (IS5)		5.43	負	272.3	148.0	41	146.0	61
エストロン	IS 5	5.42	負	269.1	145.0	49	143.1	73
エストラジオール	IS 4	5.45	負	271.2	145.1	49	183.0	49
11-デオキシコルチコステロン	IS 3	5.72	正	331.0	97.1	25	109.1	33
2-メトキシエストロン	IS 5	5.85	負	299.2	284.1	25	--	--
テストステロン	IS 6	5.86	正	289.3	97.1	23	109.1	25
2-メトキシエストラジオール	IS 4	6.01	負	301.2	286.2	25	--	--
17-ヒドロキシプロゲステロン-D ₈ (IS6)		6.21	正	339.3	100.1	45	113.2	37
17-ヒドロキシプロゲステロン	IS 6	6.26	正	331.2	109.1	33	97.1	29
プロゲステロン-D ₉ (IS4)		7.39	正	324.3	100.1	29	113.0	25
プロゲステロン	IS 7	7.44	正	315.2	97.1	25	108.9	37

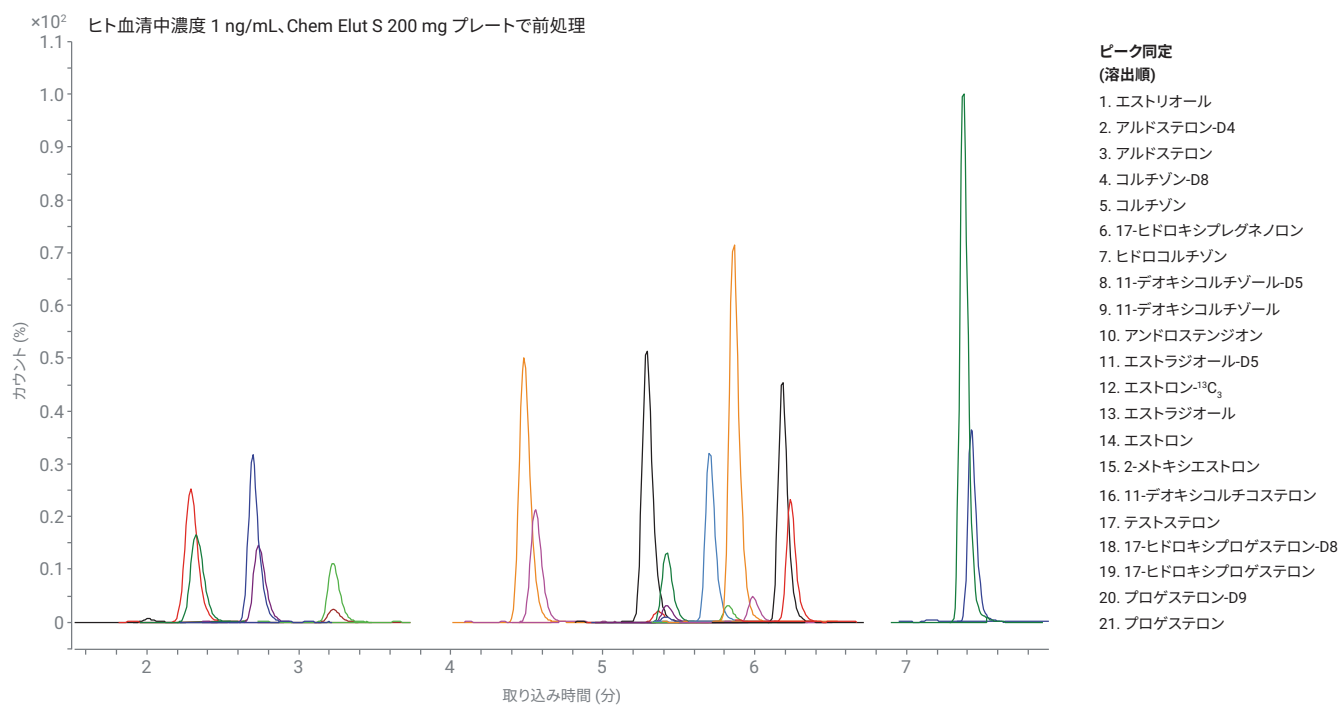


図 2. Agilent Chem Elut S 保持型液液抽出メソッドで前処理した 1 ng/mL の血清中ステロイドの LC/MS/MS クロマトグラム

標準溶液と QC サンプルの調製

500 ng/mL 標準スパイク溶液 (1:1 MeOH/水溶液) を使用して、血清中濃度 50 ng/mL の中間標準スパイク溶液を調製しました。この中間標準スパイク溶液の適量を血清ブランクにスパイクし、血清中濃度 5、10、20、50、100、500、1000、5000、および 10,000 pg/mL の標準溶液を調製しました。また、メソッドの真度および精度を確認するために、定量下限 (LLOQ) の 5 (10/20) pg/mL、中濃度 QC の 100 pg/mL、高濃度 QC の 1,000 pg/mL、および定量上限 (HLOQ) の 10,000 pg/mL の 4 濃度の品質管理 (QC) サンプルを分析しました。これらの QC サンプルも、適量の中間血清サンプルをスパイクして調製しました。すべての標準溶液と QC サンプルは、2 mL スナップキャップチューブまたは 5 mL プラスチックチューブ内で調製した後、96 ウェルプレートに分注し、抽出を行いました。

サンプル抽出

成分の回収率やマトリックスのクリーンアップ度にもとづいて溶媒、溶出液量、溶出回数などを選択し、SLE 抽出を最適化しました。図 3 に、最適化後のサンプル前処理手順を詳しく示します。プロトコル全体は、大まかには、プレートへのサンプルの分注、IS との混合と SLE プレートへの移動、SLE プレートでのサンプル抽出、およびコレクションプレートでのサンプル後処理の 4 つの部分に分かれています。まず、血清サンプルを、IS スパイク溶液を入れた 1 mL コレクションプレートに分注しま

した。ボルテックスミキサーでの攪拌後、すべてのサンプル混合液を、2 mL スクウェアコレクションプレートに載せた Chem Elut S 2 mL プレートに移しました。クロスコンタミネーションを避けるため、溶媒が飛散しないように注意しながら、抽出溶媒を SLE プレートに加えました。自然落下溶出した後、最後の溶媒乾燥ステップとして、圧力または真空の適用を

ゆっくり開始しました。抽出に使用した MTBE および EtOAc は揮発性溶媒であるため、抽出ステップはドラフト内で実施しました。

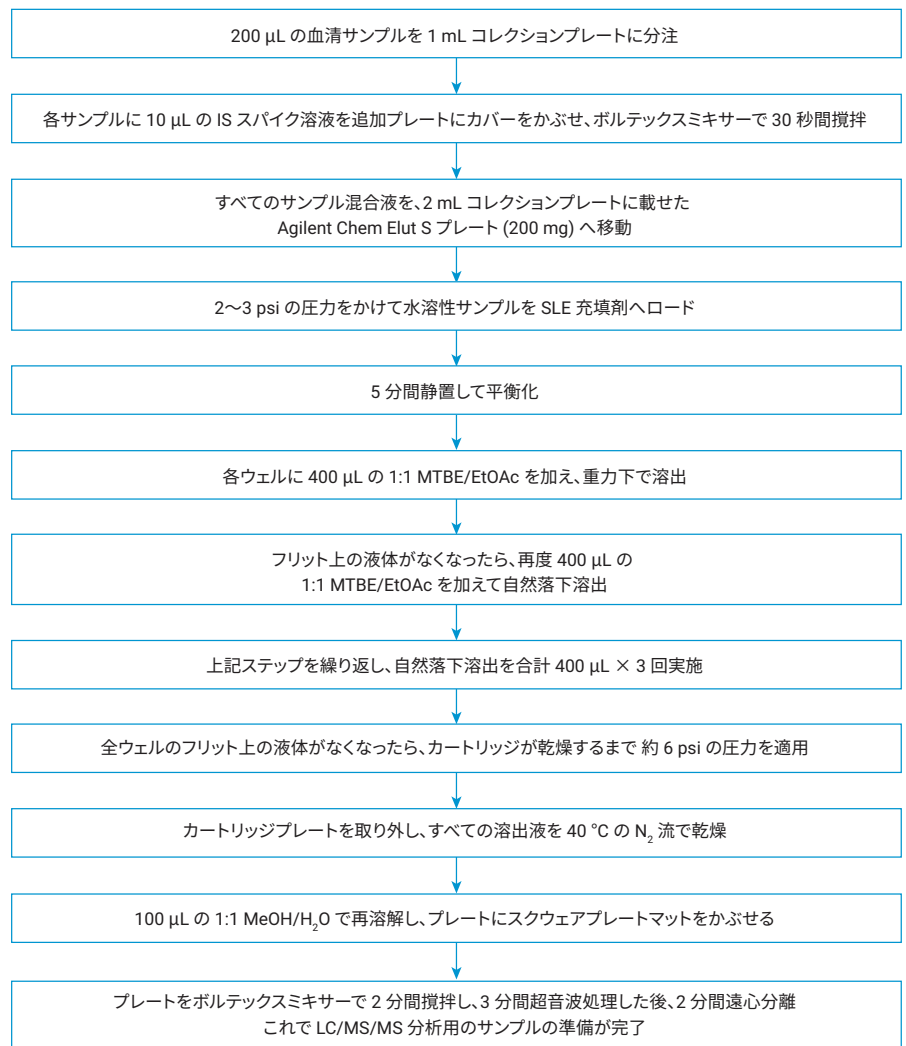


図 3. 血清中ステロイド分析のための Agilent Chem Elut S 2 mL プレート、200 μL によるサンプル前処理ワークフロー図

メソッド検証

メソッド検証では、3 日間にわたって真度および精度 (A および P) 分析を行いました。各日の A および P の分析にはそれぞれ異なるバッチの SLE プレートを使用したため、3 日間のメソッド検証で得られた A および P データをもとに、SLE プレートのバッチ間再現性も評価しました。標準溶液および QC は、適切にプレスパイクしました。コレクションプレートには、ダブルマトリックスブランク、マトリックスブランク (IS をスパイク)、1 セット目の標準溶液、マトリックスブランク 2 ~ 3 個、LLOQ (n = 6)、中濃度 QC (n = 6)、高濃度 QC (n = 6)、HLOQ (n = 6)、キャリアオーバーマトリックスブランク 2 ~ 3 個、ダブルマトリックスブランク、マトリックスブランク、2 セット目の標準溶液、マトリックスブランク 2 ~ 3 個の順にサンプルを分注しました。

メソッドおよび製品の比較

検証した SLE メソッドと LLE およびケイソウ土ベースの SLE による成分の回収率、再現性 (RSD)、マトリックス効果、および検量線の直線性の比較も行いました。

成分の絶対回収率は、血清に 1 ng/mL でプレスパイクした QC サンプルとポストスパイクした QC サンプルの各成分の機器レスポンス (ピーク面積) を比較することにより評価しました。プレスパイク QC サンプルは、血清に適宜直接スパイクして調製した後、開発したメソッドに従って前処理しました。ポストスパイク QC サンプルは、抽出後のマトリックスブランクにスパイクして調製しました。具体的には、ポストスパイクは、サンプルの再溶解ステップで、乾燥したマトリックスブランクを適切な濃度の標準品溶液に再溶解することにより行いました。マトリックス効果は、ポストスパイク QC サンプルとそれに相当する標準ブランク溶液 (試薬ブランク溶媒で調製) との間で各成分の機器レスポンス (ピーク面積) を比較することにより評価しました。

リン脂質マトリックスの除去

マトリックスのクリーンアップ度を調査するために、リン脂質プロファイルをモニタリングしました。Chem Elut S プレートによる血清サンプルの抽出では、リン脂質部分が除去されることがわかりました。マトリックスブランクのリン脂質プロファイルは、血清からの除去の他、その他の種類の血漿についても比較しました。さらに、Chem Elut S プレートとそれに相当する他社製のケイソウ土ベースの SLE プレートを使用して、複数の抽出溶媒によるリン脂質の除去能力の比較も行いました。

結果と考察

今回の研究では、臨床研究アプリケーションにおける血清中ステロイドの定量に Chem Elut S プレートを使用することの有効性を実証することに重点を置きました。

メソッドの開発と最適化

機器メソッドと特殊な注意点: エストリオール、エストロゲン、エストラジオール、2-メトキシエストロゲン、および 2-メトキシエストラジオールの 5 種類のステロイド成分は、ESI または APCI イオン源でのイオン化が非常に困難です。通常の条件下では、これらの化合物の信号は、高濃度であってもほとんど現れません。その改善策として誘導体化が考えられますが、そのためには、サンプル前処理に追加のステップが必要になります。また、ステロイドに対して誘導体化を行わないサンプル前処理法と誘導体化を行わないサンプル前処理法を組み合わせて実施するのも容易ではありません。フッ化アンモニウム緩衝液を使用すると、ネガティブイオンモードでのイオン化が促進され⁴、ステロイドの分析感度が劇的に向上する⁵ことが報告されています。これらの報告内容をもとに、イオン化しにくいステロイド化合物の移動相として 1 mM フッ化アンモニウム緩衝液を使用したところ、機器の分析感度が大幅に改善されました。また、緩衝液濃度の調査により、より低濃度のフッ化アンモニウム (0.2 mM) を使用することで、分析感度が高まることがわかりました。さらに、移動相 A と移動相 B を同じ塩濃度にする、結果の一貫性が向上しました。以上の結果から、最適化された条件として、0.2 mM フッ化アンモニウムの水/MeOH 溶液を移動相 A および B として使用することにしました。

以前のアプリケーションノートで述べられているとおり⁵、フッ化アンモニウム緩衝液を使用すると、イオン化しにくいステロイド化合物のネガティブモードでのイオン化だけでなく、ポジティブモードでの其他化合物のイオン化も促進されます。機器メソッドは、15種類のステロイド成分すべてに対し、この条件に基づいて確立しました。図4に、定量下限(LOQ)の血清中濃度 5 pg/mL のエストロン

(E1) およびエストラジオール (E2) のクロマトグラムを示します。メソッドの分析感度が明らかに向上しています。

ここで、ステロイド化合物が、特に低濃度ではガラス表面に対して非常に不安定であることに注意する必要があります。ガラス製バイアルを使用すると、特にサンプル溶液の含水量が高い場合は、大きなばらつきが生じ、ステロイド化合物が失われる可能性があります。その

ため、標準溶液の調製やサンプル前処理、およびこれらの溶液の取り扱い時には、ガラス製のバイアルやチューブの使用を避ける必要があります。

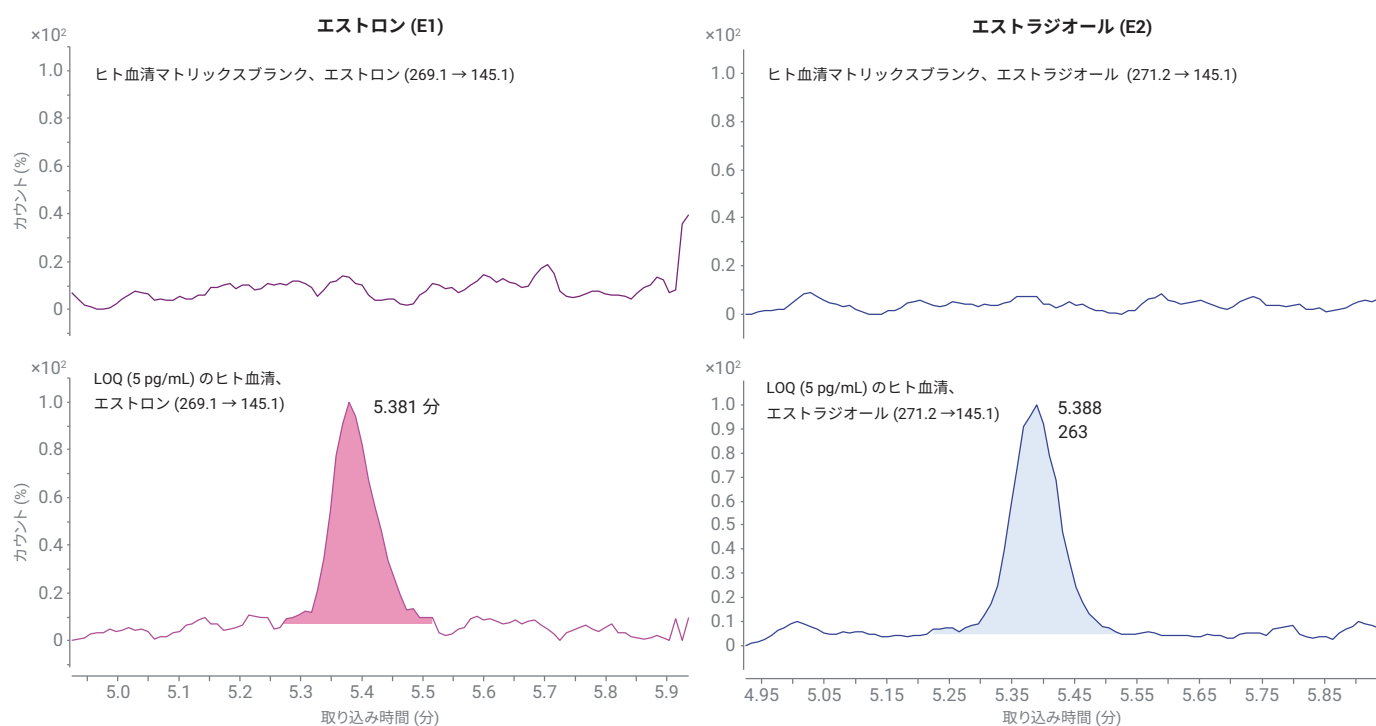


図4. 血清ブランクおよび LOQ (血清中濃度 5 pg/mL) におけるエストロゲン (E1) およびエストラジオール (E2) のクロマトグラム

SLE メソッドの最適化: SLE メソッドは、既存の LLE メソッドをもとに開発することも、SLE カートリッジまたはプレートで直接開発することもできます。今回の研究では、公開されている LLE メソッドを参照しながら、SLE メソッドを SLE プレートで直接最適化しました。SLE メソッドの最適化では、溶媒、溶媒混合液、およびサンプル溶出の最適化を行いました。その際、成分の平均回収率、RSD、およびマトリックス効果の総合的な評価にもとづきました。これを図 5 に示します。

最初に、抽出溶媒を調査するために、一般的な 4 種類の LLE 溶媒/溶媒混合液 (MTBE、ジエチルエーテル (DEE)、EtOAc、および DCM/MTBE (1:4)) を評価しました。溶媒の選択を目的とした比較では、図 5 の最初のグループ (左) に示すように、MTBE による抽出において最高の平均マトリックス効果、すなわち最もクリーンなマトリックスが得られました

が、平均回収率は比較的低い結果となりました。EtOAc による抽出では、抽出効率は最高でしたが、マトリックスによるイオン抑制が高くなりました。DEE および DCM/MTBE 混合液による抽出では、成分の回収率が比較的低く、DCM/MTBE については再現性も低くなりました。これらの結果を踏まえ、MTBE/EtOAc 混合液について、成分の回収率とマトリックス効果が最適なバランスで得られる比率をさらに調査しました。

溶媒混合液の最適化を目的とした比較では、図 5 の 2 番目のグループ (中央) に示すように、MTBE と EtOAc を 1:1、2:1、および 1:2 で混合してサンプルの抽出に使用しました。図 5 から、1:1 MTBE/EtOAc 抽出混合液において、成分の回収率とマトリックス効果が最高のバランスで得られていることがわかります。そのため、この溶媒混合液を最適な抽出溶媒として選択しました。これらの評価には、

500 μL の溶媒による二重抽出を使用しましたが、最適な溶媒 400 μL による三重抽出を使用したサンプル抽出についても調査しました。その比較結果を図 5 の 3 番目のグループ (右) に示します。400 μL の溶出液による三重抽出では、マトリックス効果を損なうことなく、成分の平均回収率がさらに高まりました。この結果から、SLE メソッドを、400 μL の 1:1 MTBE/EtOAc で三重抽出するように最適化しました。

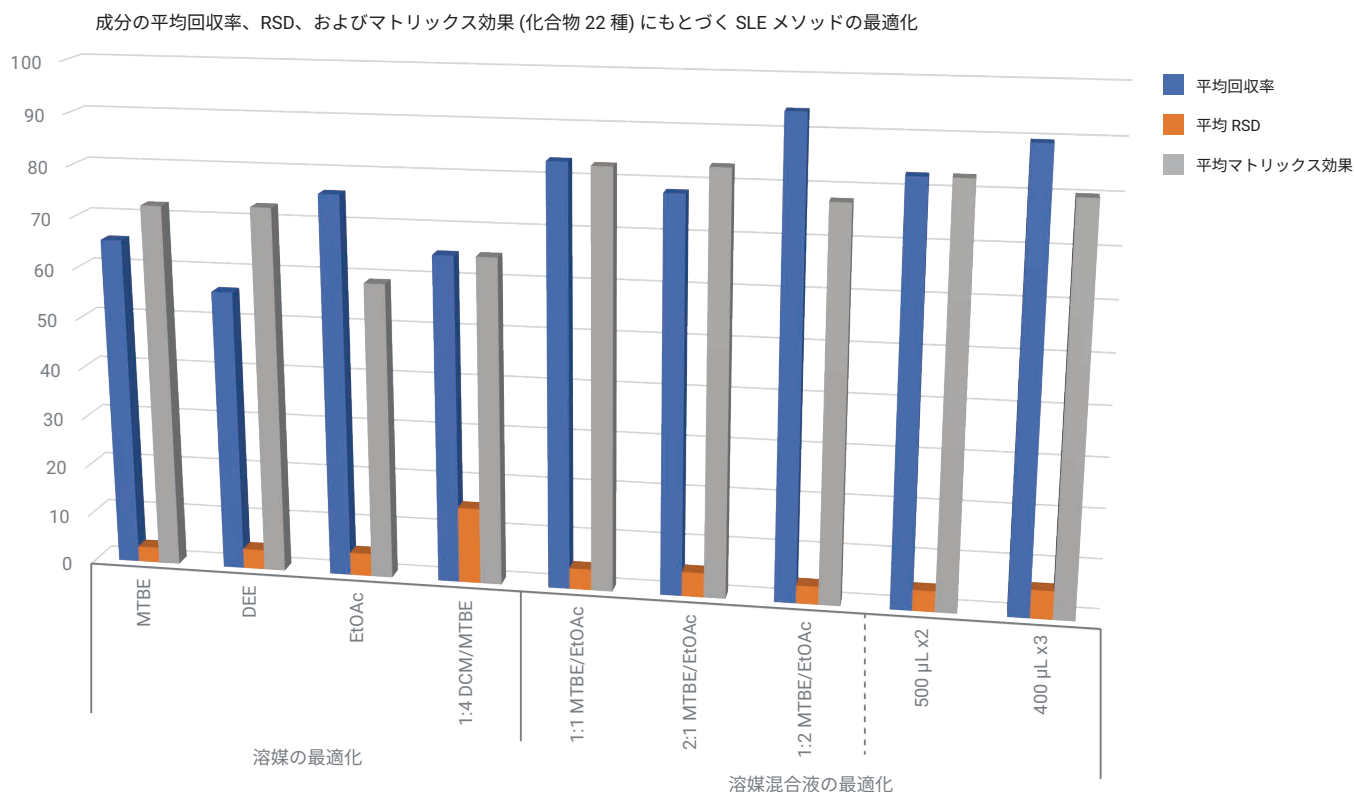


図 5. SLE メソッドの使用溶媒およびサンプル溶出の最適化。最適化は、成分の平均回収率、RSD、およびマトリックス効果の総合的な評価にもとづいて行いました。

メソッド検証

最適化されたメソッドを検証するために、3日間にわたって真度および精度分析を行い、完全な定量結果を収集しました。表3の結果には、検量線データと3日間バッチの真度および精度データが示されています。検量線は、すべての成分について、 $1/x^2$ の重み付き直線回帰を使用して作成しました。結果的な検量線の R^2 は0.99を上回りました。ほとんどの

成分のLOQは、血清中濃度5 pg/mLでした。ただし、エストラジオールおよびテストステロンについては10 pg/mL、プロゲステロン、17-ヒドロキシプレゲノロン、およびヒドロコルチゾンについては20 pg/mLでした。これは、マトリックスブランク中でのマトリックス干渉またはマトリックス成分が原因です。3日間にわたる真度および精度分析では、メソッドの定量信頼性の検証に加え、3つの製造ロット

のSLEプレートを使用してChem Elut Sプレートのバッチ間再現性も評価しました。図6に、成分の真度および精度にもとづくSLEプレートのバッチ間再現性の結果をまとめます。

表3. ヒト血清中のステロイド化合物15種の定量によるメソッドの検証結果

成分	LOQ (pg/mL)	キャリブレーション範囲 (pg/mL)	QCスパイク濃度 (pg/mL)	真度および精度						
				1日目 (SLE バッチ 1)		2日目 (SLE バッチ 2)		3日目 (SLE バッチ 3)		日内/バッチ RSD% (n = 18)
				真度% (n = 6)	RSD% (n = 6)	真度% (n = 6)	RSD% (n = 6)	真度% (n = 6)	RSD% (n = 6)	
エストリオール	5	5 ~ 10,000	5	95	18.0	97	6.9	103	11.6	12.8
			100	102	6.5	97	8.3	107	5.2	6.4
			1,000	98	2.8	92	1.2	92	4.6	3.1
			10,000	107	5.9	92	5.6	101	4.2	5.0
アルドステロン	5	5 ~ 10,000	5	106	4.7	103	12.4	100	9.4	9.2
			100	96	9.3	101	12.8	97	3.0	8.1
			1,000	111	2.5	103	4.2	98	1.9	3.3
			10,000	113	2.4	95	7.5	107	4.2	4.2
コルチゾン	5	5 ~ 10,000	5	104	9.8	92	10.1	99	7.6	9.5
			100	93	7.0	93	9.2	97	7.6	7.6
			1,000	104	3.5	94	3.7	100	2.4	3.3
			10,000	106	5.6	95	7.8	106	5.5	6.2
ヒドロコルチゾン	20	20 ~ 10,000	20	89	6.5	97	13.6	86	12.6	11.1
			100	96	18.2	90	6.7	96	9.5	11.3
			1,000	96	4.4	93	2.4	93	4.1	3.8
			10,000	95	6.3	92	4.1	97	6.8	5.6
17-ヒドロキシプレゲノロン	20	20 ~ 10,000	20	109	1.8	99	18.9	91	8.1	9.8
			100	94	19.2	91	8.2	103	15.4	14.0
			1,000	94	6.0	91	2.1	100	5.2	4.6
			10,000	93	3.6	97	3.8	106	9.3	5.3
11-デオキシコルチゾール	5	5 ~ 10,000	5	99	8.3	95	10.7	95	16.2	11.9
			100	94	6.5	89	10.4	97	9.1	8.5
			1,000	105	1.5	87	3.8	99	1.7	2.5
			10,000	110	2.7	92	7.2	104	4.5	4.6
アンドロステンジオン	5	5 ~ 10,000	5	99	11.4	102	9.5	110	11.2	10.9
			100	88	8.2	89	8.8	106	10.7	9.0
			1,000	104	2.1	90	3.7	91	1.6	2.7
			10,000	109	5.5	101	5.7	108	7.6	6.0
エストロン	5	5 ~ 10,000	5	95	8.7	92	11.3	102	8.9	9.8
			100	98	10.1	95	7.5	99	4.3	7.1
			1,000	104	2.8	95	2.8	96	3.0	3.1
			10,000	105	6.2	94	3.3	98	4.3	4.4

成分	LOQ (pg/mL)	キャリブレーション 範囲 (pg/mL)	QC スパイク 濃度 (pg/mL)	真度および精度						
				1 日目 (SLE バッチ 1)		2 日目 (SLE バッチ 2)		3 日目 (SLE バッチ 3)		日内/バッチ RSD% (n = 18)
				真度 % (n = 6)	RSD% (n = 6)	真度 % (n = 6)	RSD% (n = 6)	真度 % (n = 6)	RSD% (n = 6)	
エストラジオール	10	10 ~ 10,000	10	105	10.2	101	19.3	100	9.7	13.2
			100	97	11.4	96	10.2	102	10.2	10.4
			1,000	99	3.0	102	5.1	95	2.4	3.7
			10,000	101	2.9	102	2.1	100	4.3	2.9
11-デオキシコルチコステロン	5	5 ~ 10,000	5	108	12.3	101	13.5	113	6.5	11.0
			100	94	7.6	94	9.8	104	13.3	10.4
			1,000	108	4.8	105	5.2	103	4.7	4.7
			10,000	109	5.8	108	5.7	115	5.3	5.4
2-メトキシエストロン	5	5 ~ 10,000	5	109	9.0	111	4.8	100	7.8	7.4
			100	93	3.7	94	7.7	95	7.2	6.0
			1,000	106	2.9	93	4.1	91	4.7	4.1
			10,000	111	3.2	101	7.2	104	2.6	4.3
テストステロン	10	10 ~ 10,000	10	100	9.0	95	8.9	94	10.9	8.2
			100	94	3.7	91	6.6	100	8.5	8.2
			1,000	102	2.9	89	4.7	97	6.2	5.6
			10,000	104	3.2	106	6.3	102	5.0	5.7
2-メトキシエストラジオール	5	5 ~ 10,000	5	92	9.1	109	7.4	94	10.1	9.1
			100	96	6.2	103	7.9	98	7.2	6.9
			1,000	99	1.9	94	1.9	93	4.5	2.9
			10,000	106	3.1	99	2.5	105	2.9	2.6
17-ヒドロキシプロゲステロン	5	5 ~ 10,000	5	98	14.9	103	9.1	95	10.8	11.8
			100	89	5.2	93	9.2	98	7.2	7.0
			1,000	105	4.8	89	4.2	100	3.3	4.3
			10,000	106	4.5	103	4.9	100	2.2	3.7
プロゲステロン	20	20 ~ 10,000	20	108	4.8	97	11.0	89	4.0	6.8
			100	97	6.7	91	12.1	101	5.2	7.8
			1,000	119	6.7	91	3.3	95	2.5	4.3
			10,000	112	6.8	99	7.3	104	4.2	5.9

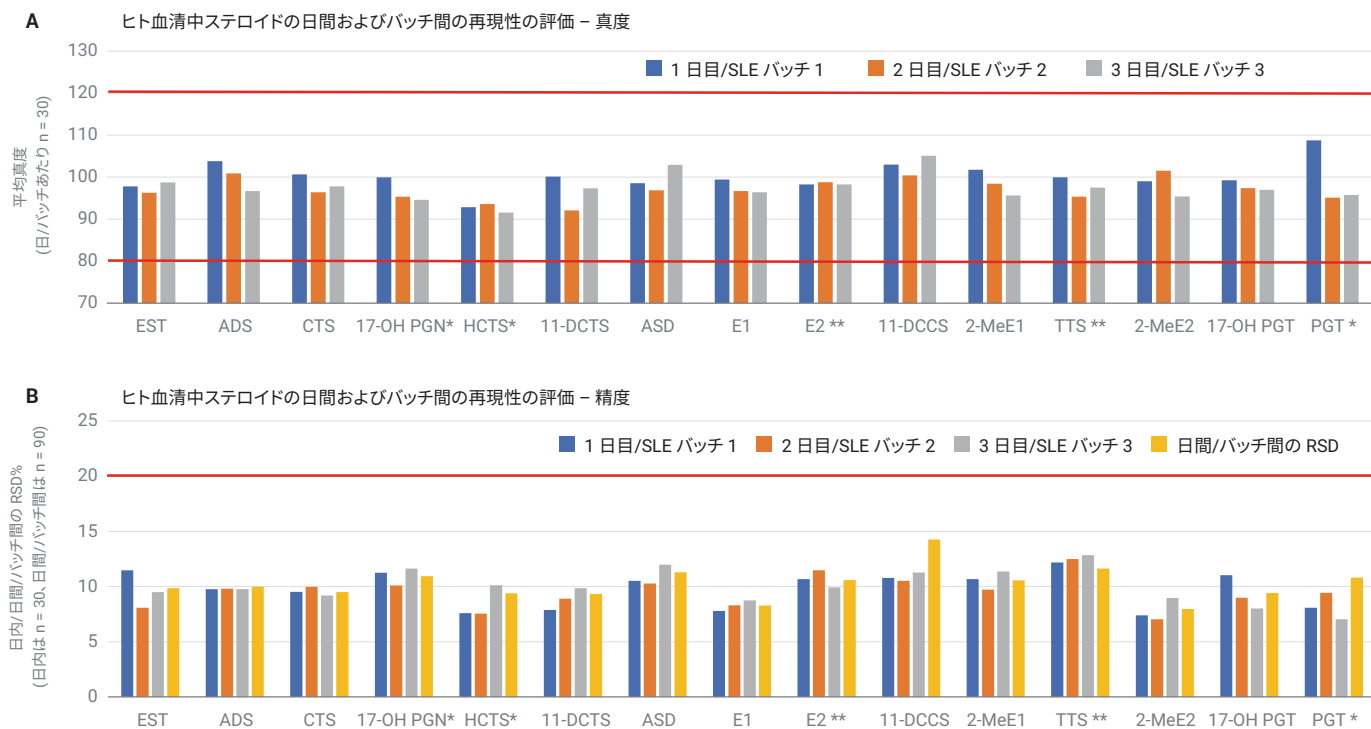


図 6. 真度および精度にもとづく Agilent Chem Elut S メソッドの日間評価およびプレートのバッチ間性能再現性のまとめ

メソッドおよび製品の比較

成分の回収率、再現性、マトリックス効果、および検量線の直線性にもとづいて、今回開発した Chem Elut S メソッドと従来の LLE および他社製のケイソウ土ベースの SLE のメソッド性能を比較しました。

LLE と比べ、SLE には、明らかに労力と時間の節約効果があります。SLE ワークフローでは、サンプル混合、相分離、有機上澄み液の移動など、重要なステップにかかる労力と時間が軽減され、サンプル前処理の効率が大幅に高まります。これらのステップが不要になることで、サンプル数によっては所要時間を容易に 50 % 以上短縮できます。SLE 手順では、時間と労力が軽減されるだけでなく、エマルジョンが形成されないため、メソッドの信頼性も向上します。

図 7 に、成分の回収率 (7A) および再現性 (7B) にもとづくメソッド性能の比較を示します。SLE プロトコルでは、水性相と有機相が密接することで効率的な分離が可能になり、成分の回収率が高まります。実際、SLE メソッドを使用することにより、全体的な成分の回収率が LLE メソッドよりも 10 ~ 20 % 増加しました。成分の回収率が高いほど、成分のレスポンスが高まり、結果的にメソッドの分析感度も向上します。

ケイソウ土ベースの SLE でも、同程度またはわずかに高い回収率が得られましたが、ウェル間で大きなばらつきが見られ、その傾向は極性の高い成分において顕著に現れました。これは、ケイソウ土充填剤とその保水力が均一でないことが原因と考えられます。Chem Elut S プレートでは、より優れたウェル間再現

性とメソッド分析感度により、検量線の直線性も向上しました。Chem Elut S が備えるこれらすべての利点により、さらに信頼性と一貫性の高い定量メソッドが実現します。

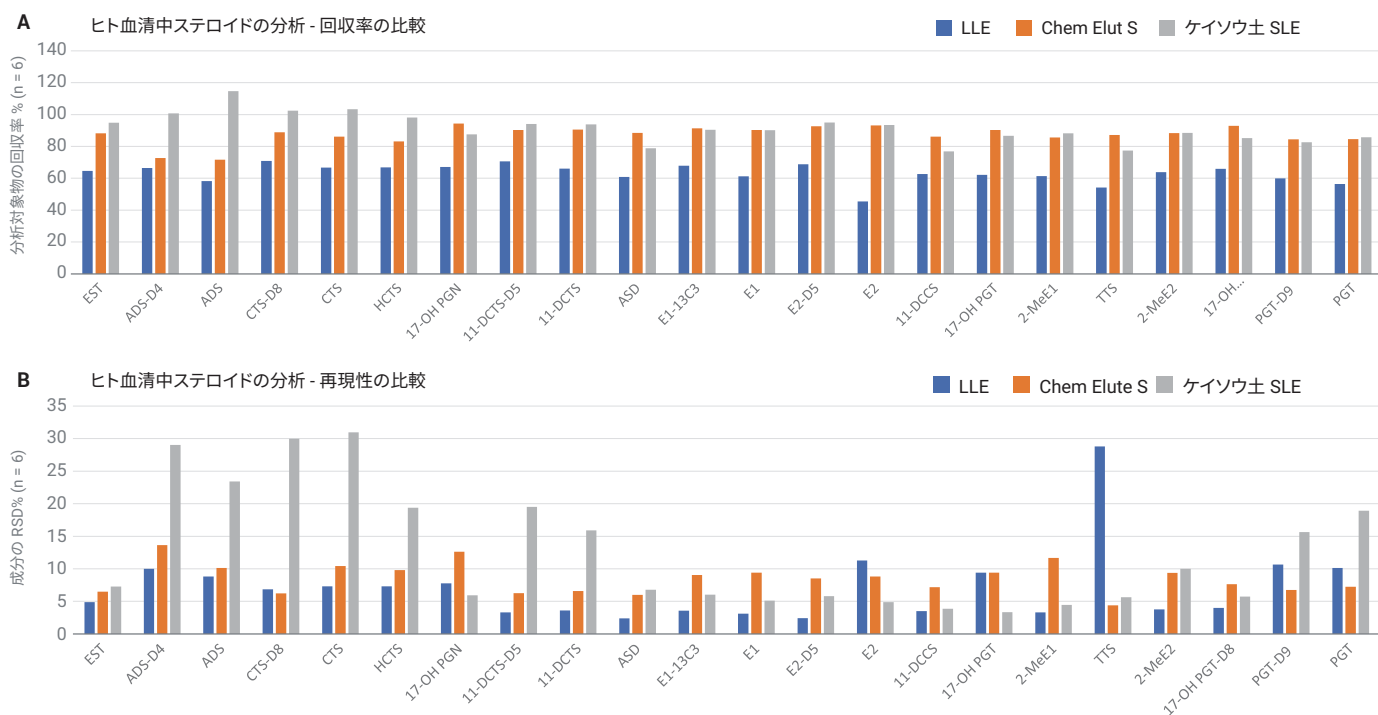


図 7. LLE, Agilent Chem Elute S, およびケイソウ土 SLE のメソッド性能と製品性能の比較

リン脂質マトリックスの除去

生体サンプルの前処理に Chem Elut S プレートを使用すると、リン脂質部分も除去されます。

今回の調査では、ホルモンを除去した血清を使用することにより、良好なマトリックス選択性が得られ、ターゲットステロイドに対してきわめて低い定量下限を達成することができました。また、除去後の血清からは、アプリケーションテストによっては不要となるリン脂質も除去されていました。リン脂質の除去について調査するために、除去前の血漿を標準的な LLE、Chem Elut S、および他社製のケイソウ土 SLE メソッドで前処理し、マトリックス中のリン脂質のプロファイリングを行いました。図 8A に示すプロファイルの比較から、MTBE 溶媒を使用した Chem Elut S メソッドにより、リン脂質の除去率が他社製のケイソウ土 SLE より 99 %、MTBE ベースの LLE より 30 % 高まることがわかりました。

また、数種類の血漿に対して複数の抽出溶媒を使用した Chem Elut S とケイソウ土 SLE の比較も行いました。その結果を図 8B に示します。図中のリン脂質の総レスポンスは、アバundanceにもとづいて正規化されています。この評価から、以下のことがわかりました。

- リン脂質のアバundanceは血漿の種類によって異なる可能性があります。脂肪血症の血漿ではリン脂質のアバundanceが最も高くなりました。
- リン脂質の抽出レベルは溶媒によって異なります。EtOAc および DCM では MTBE や DEE よりも多くのリン脂質が抽出されました。
- Chem Elut S では、他社製のケイソウ土 SLE よりも効率的にリン脂質を除去することができます。

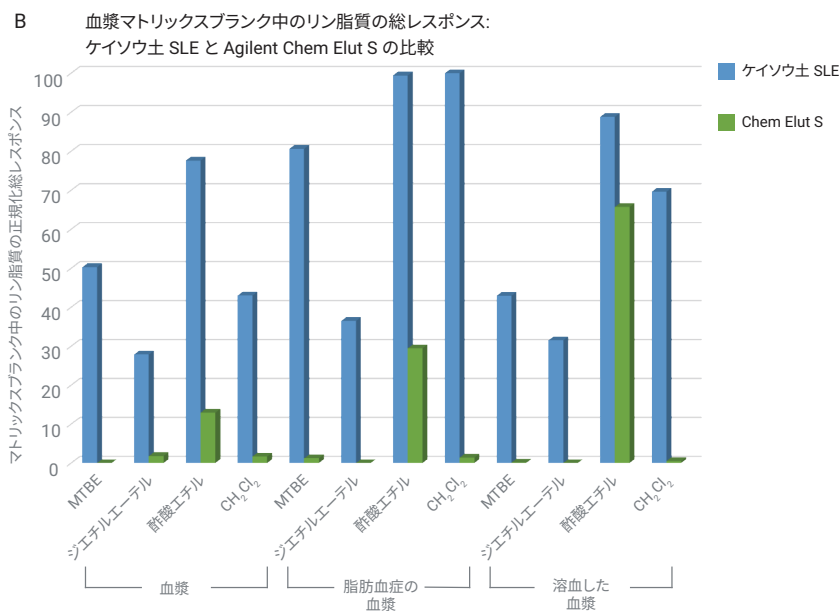
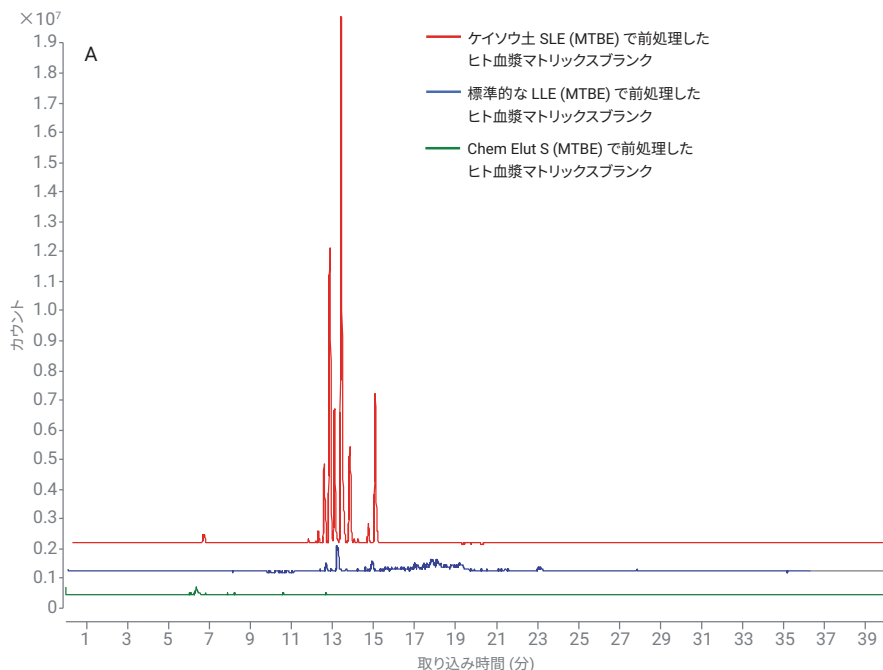


図 8. 複数の溶媒を使用した Agilent Chem Elut S、ケイソウ土 SLE、および LLE による血漿中リン脂質除去能力の比較

結論

Agilent Chem Elut S 2 mL プレートを使用したサンプル前処理メソッドを開発し、ヒト血清中ステロイド化合物 15 種の定量に対する性能を評価しました。この SLE メソッドの使用溶媒およびサンプル溶出を、成分の回収率、メソッドの再現性、およびマトリックス効果にもとづいて最適化しました。また、3 日間にわたる真度および精度分析の結果から、このメソッドにより、許容可能な検量線の直線性、卓越した日内および日間の真度と精度、優れた成分回収率とメソッド再現性が得られることが確認されました。標準的な LLE およびケイソウ土 SLE との比較では、Chem Elut S メソッドが、標準的な LLE よりも成分回収率が全体的に高く、ケイソウ土 SLE よりも充填剤の一貫性とウェルカートリッジ間の再現性に優れていることがわかりました。さらに、血漿や血清などの生体サンプルマトリックスからリン脂質が効率的に除去されました。96 ウェルプレートフォーマットで開発したプロトコルは、サンプル前処理の高速化と自動化を必要とするハイスループットラボに最適です。ロードと溶出からなる簡便な手順により、シンプルな液抽出ワークフローが実現し、労力と時間の大幅な節約につながります。Chem Elut S は、ケイソウ土充填剤よりも高いサンプル保持力を備え、サンプルを効率的に吸着するため、サンプル破過の可能性も低減します。新しいプレート設計には以下のような特長があります。

- サンプルおよび溶出液用の大きなヘッドスペース
- 圧力または真空が適用されるまでサンプルを留めておくことのできる上部スクウェアフリット
- ハードウェアにセットするためのフルスカート
- 迅速で一貫した溶出

参考文献

1. Anari, M. R.; *et al.* Derivatization of Ethinylestradiol with Dansyl Chloride to Enhance Electrospray Ionization: Application in Trace Analysis of Ethinylestradiol in Rhesus Monkey Plasma. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4136-4144.
2. Lee, J. S.; *et al.* Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2006**, *91*, 3791-3797.
3. Kushnir, M. M.; *et al.* High-Sensitivity Tandem Mass Spectrometry Assay for Serum Estrone and Estradiol. *Clinical Chemistry* **2008**, *129*, 530-539.
4. Wang, W.; Cole, R. B.; Enhanced Collision-Induced Decomposition Efficiency and Unraveling of Fragmentation Pathways for Anionic Adducts of Brevetoxins in Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 8826-8838.
5. Hindle, R. Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS, *Agilent Technologies Application Note*, 資料番号 5991-2473EN, **2013**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, May 15, 2019
5994-0949JAJP

