

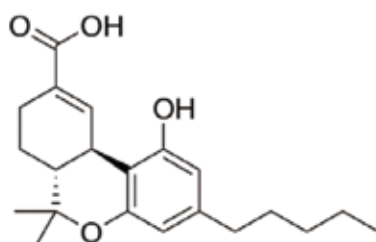
LC-MS/MS分析サンプル前処理

ISOLUTE® SLE+ を使用した 尿中11-ノル-9-カルボキシ- Δ^9 - テトラヒドロカンナビノール分析のためのサンプル前処理

はじめに

大麻は世界的に最も広く乱用されている違法薬物の1つです。大麻の種に含まれる天然のカンナビノイドは、脳内の受容体に結合してリラックスした、落ち着いた感覚を引き起こします。大麻の使用を取り締まる法律が広く施行されており、カンナビノイドとその代謝物を迅速に分析、

■ 図1 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (THC-COOH) の構造



定量する信頼性の高い手法が求められています。大麻乱用者から採取した生体サンプルにおける主要なマーカーは11-ノル-9-カルボキシ- Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC :THC-COOH)です。このアプリケーションノートはISOLUTE SLE+ 96ウェルプレート、またはISOLUTE SLE+カラムを用いた、ヒト尿からのTHC-COOH抽出法を詳しく説明しています。

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、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

11-ノル-9-カルボキシ- Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(THC-COOH)

■ ISOLUTE SLE+による抽出メソッド

尿の加水分解：尿1mLに酢酸アンモニウムバッファー(100mM) 500 μ Lと β -グルクロニダーゼ(4500U/mL) 50 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間、加水分解する。なお、加水分解後の尿サンプルをpH 5以下でISOLUTE SLE+にロードできる場合には、他の加水分解法でも良い。

使用製品:	ISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラム (Part #820-0140-C)
サンプルロード	加水分解した尿サンプル750 μ Lをカラムにロードし、軽くバキューム(または加圧)して導入する。5分間静置し、尿サンプルを珪藻土に完全に吸収させる。
溶出	ジクロロメタン2mLをカラムに加え、5分間静置する。続いて、MTBE 2mLを加えて5分間静置し、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	室温で溶媒を留去し、酸性化アセトニトリル:酸性化水(v/v, 70:30) ^{※1※2} 500 μ Lで再溶解する。

※1 酸性化アセトニトリルの調製方法:濃硝酸100 μ Lをアセトニトリル100mLに加え、混和する。

※2 酸性化水の調製方法:濃硝酸100 μ Lを水100mLに加え、混和する。

96ウェルプレートを使用する場合には、下表に示すサンプルロード量及び溶媒使用量で処理する。

ISOLUTE SLE+ Procedure	Solution	ISOLUTE SLE+ 200 μ L 96-well-plate part # 820-0200-P01	ISOLUTE SLE+ 400 μ L 96-well-plate part # 820-0400-P01	ISOLUTE SLE+ 1 mL column part # 820-0140-C
サンプルロード	加水分解尿	150 μ L	300 μ L	750 μ L
軽くバキューム(または加圧)して導入後5分間静置				
溶出1	ジクロロメタン	500 μ L	900 μ L	2mL
5分間静置				
溶出2	MTBE	500 μ L	900 μ L	2mL
5分間静置後に軽くバキューム(または加圧)して溶出を完了				
エバポレーション・再溶解	酸性化アセトニトリル: 酸性化水 (v/v, 70 : 30)	100 μ L	100 μ L	500 μ L

■ HPLC条件

機器: Waters Acquity UPLC (Waters Assoc., Milford, MA, USA).
 カラム: Acquity UPLC BEH C18カラム (1.7 μ , 100 x 2.1mm id) (Waters Assoc., Milford, MA, USA)
 流速: 0.3mL/min
 移動相: 溶媒A : 0.1% ギ酸水溶液
 溶媒B : 0.1% ギ酸-メタノール溶液

グラジエント:

Time	%A	%B
0	95	5
4	5	95
5.4	5	95
5.41	95	5
6.9	95	5

注入量: 10 μ L
 カラム温度: 30 $^{\circ}$ C

■ MS条件

機器: エレクトロスプレー・インターフェイス装備Quattro 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 $^{\circ}$ C
 イオン源温度: 150 $^{\circ}$ C
 衝突ガス圧: 3.46 x 10⁻³ mbar

■ 表1 MRMトランジション (ポジティブモード)

Scan Function	MRM Transition	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
1	343.2 -> 299.1	40	21

結果

表2にISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラムを使用した場合のTHC-COOH平均回収率とRSDを示す(n=7)。図2には、尿から抽出したTHC-COOH(20ng/mL)の典型的なマスクロマトグラムを示す。

表2 ISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラムを使用した場合の平均回収率とRSD(n=7)

Analyte	Mean % recovery	% RSD
11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (THC-COOH)	85.1	2.08

図2 尿から抽出したTHC-COOH(20ng/mL)の典型的なマスクロマトグラム



References参考文献

Williams, L., et al, 2010, 'Extraction of THC and metabolites from Urine and Plasma using Supported Liquid Extraction (SLE) prior to UPLC-MS/MS Analysis', SOFT 2010, Richmond, VA.

使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
820-0200-P01	ISOLUTE SLE+ 200 96-well-plate	1
820-0400-P01	ISOLUTE SLE+ 400 96-well-plate	1
820-0140-C	ISOLUTE SLE+ 1mL column	30

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