

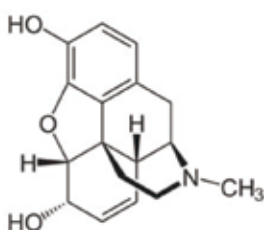
LC-MS/MS分析サンプル前処理

ISOLUTE® SLE+ を使用した ヒト尿中オピオイド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ウェルプレートまたはISOLUTE SLE+カラムを用いた、ヒト尿からのオピオイド類抽出法を詳しく説明しています。メソッドは最適化されており、分析薬物の回収率は70-102%です。

■ 図1 モルヒネの構造



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

モルヒネ、コデイン、オキシコドン、6-アセチルモルフィン、ジヒドロコデイン、ヒドロモルホン、ヒドロコドン、オキシモルホン、メタドン及びその代謝物EDDP

■ ISOLUTE SLE+による抽出メソッド

尿の加水分解：尿1mLにβ-グルクロニダーゼ(5000U/mL) 50μLと、酢酸アンモニウム水溶液(100mM、pH5.0)^{※1} 950μLを加え、60°C(ウォーターバス)で2時間、加水分解する。冷却した後、水酸化アンモニウム水溶液(25%, v/v)^{※2} 10μLを加えて混和する。

※1 酢酸アンモニウム溶液(100mM、pH5.0)の調製方法:水950mLに酢酸アンモニウム7.708 gを溶解し、ギ酸(濃度98%-100%)でpH5に調整する。

※2 水酸化アンモニウム水溶液(25%, v/v)の調製方法:アンモニウム(濃度28~30%, Sigma Aldrich) 3.33 mLを水90 mLに添加し、さらに水を加えて全量を100 mLとする。この溶液25mLと水75mLを混和する。

サンプル量200μLの場合

使用製品:	ISOLUTE SLE+ 200μLサンプル用96ウェルプレート (Part #820-0200-P01)
サンプルロード	加水分解した尿サンプル200μLをウェルにロードし、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:イソプロパノール(95:5, v/v) 1mL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)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、0.1%ギ酸水溶液 ^{※3} 100μLで再溶解する。

サンプル量1mLの場合

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1mL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:イソプロパノール (95:5, v/v) 2.5mLをカラムに加え、5分間静置する。 さらにジクロロメタン:イソプロパノール (95:5, v/v) 2.5mLを加え、 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、0.1%ギ酸水溶液 ^{※3} 500 μ Lで再溶解する。

※3 0.1%ギ酸水溶液の調製方法: ギ酸(濃度98~100%, Sigma Aldrich) 1mLを水900mLに添加し、さらに水を加えて全量を1Lとする。

UPLC条件

機器:	Waters Acquity UPLC
カラム:	Acquity BEH C18 100 x 2.1mm x 1.7 μ .
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
流速:	0.40mL/min.
注入量:	15 μ L (partial loop, needle overfill)
サンプル温度:	20 °C.
カラム温度:	40 °C.
グラジエント:	

Time (min)	%A	%B	Control
Initial	80	20	Initial
1.20	30	70	Switch
2.30	80	20	Switch
4.0	80	20	Hold

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
イオン源温度:	150 °C.
脱溶媒和温度:	450 °C.

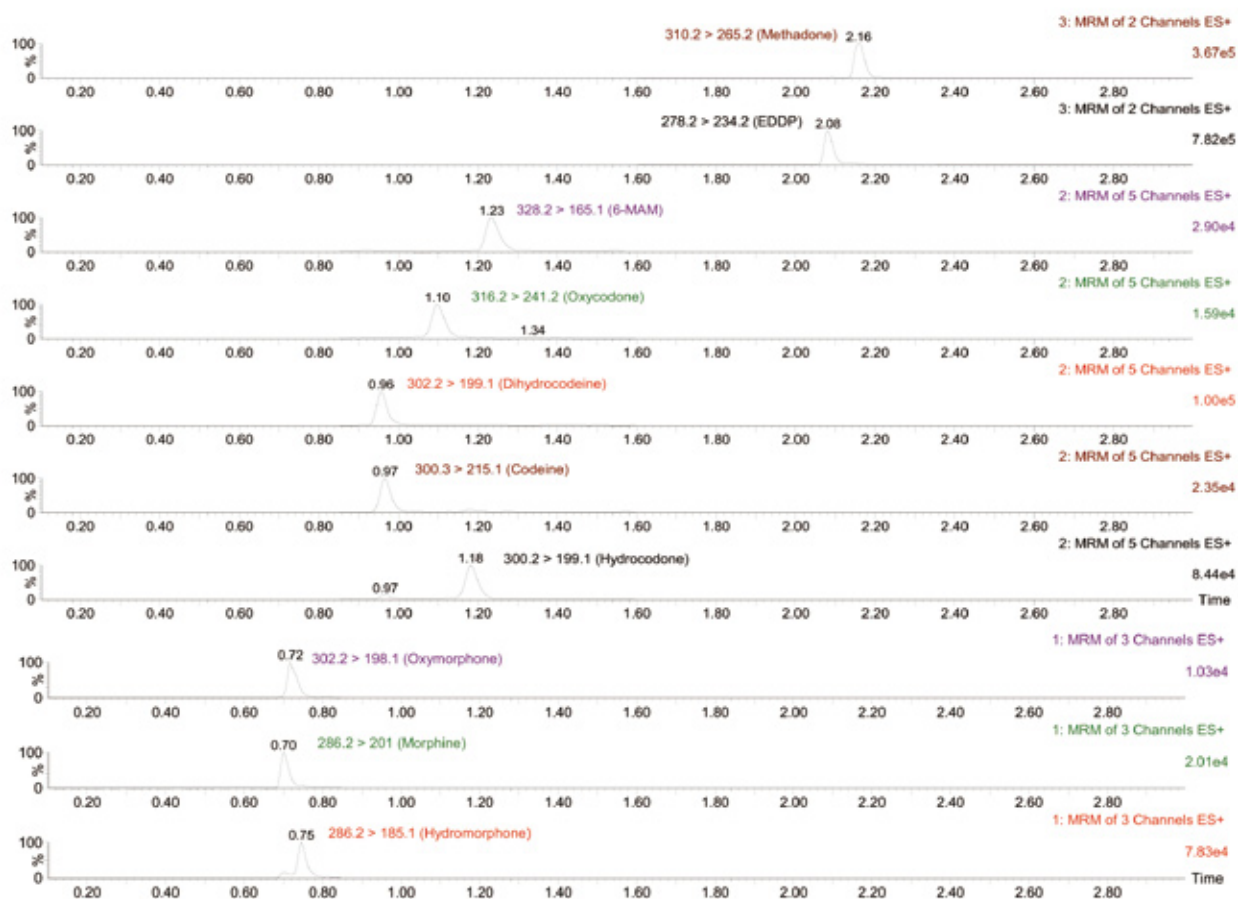
表1 MRMトランジション(ポジティブモード)

Scan Function	Compound	MRM transition	Cone voltage	Collision Energy (ev)
1	モルヒネ	286.2 > 201.0	42	25
2	オキシモルホン	302.2 > 198.1	34	37
3	ヒドロモルホン	286.2 > 185.1	44	29
4	ジヒドロコデイン	302.2 > 199.1	42	33
5	コデイン	300.3 > 215.1	42	25
6	オキシコドン	316.2 > 241.2	34	27
7	ヒドロコドン	300.2 > 199.1	46	33
8	6-アセチルモルフィン	328.1 > 165.1	44	33
9	EDDP	278.2 > 234.2	26	30
10	メタドン	310.2 > 265.2	26	15

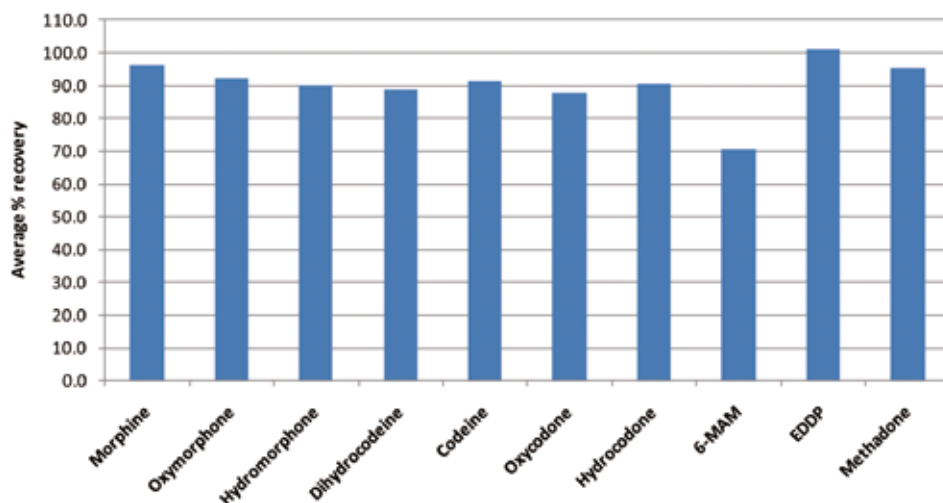
結果

図2に各分析薬物4ng/mLのマスキロマトグラムを示す。図3にISOLUTE SLE+96ウェルプレートを使用した場合の平均回収率、図4にはISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラムを使用した場合の平均回収率を示す。なお、RSDは200 μ Lサンプル用96ウェルプレート、1mLサンプル用カラムともに10%未満だった。200 μ Lサンプル用96ウェルプレートでの定量下限値(LOQ)は4 ng/mL、検出下限値(LOD)は1 ng/mL、ISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラムでの定量下限値(LOQ)は1ng/mL、検出下限値(LOD)は500pg/mLだった。

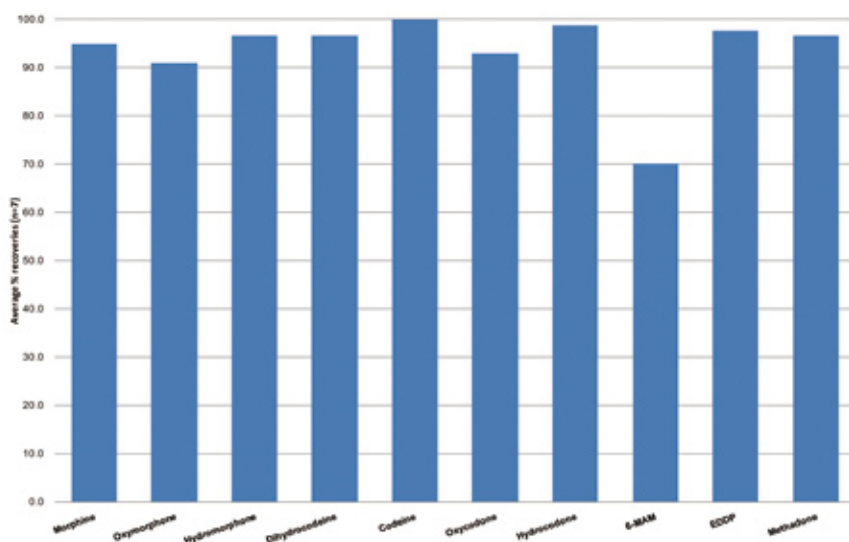
■ 図2 各分析薬物(4ng/mL)の典型的なマスキロマトグラム



■ 図3 ISOLUTE SLE+96ウェルプレートを使用した場合の平均回収率(分析薬物濃度4ng/mL, n=7)



■ 図4 ISOLUTE SLE+ 1mLサンプル用カラムを使用した場合の平均回収率(分析薬物濃度2ng/mL、n=7)



■ 使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
820-0200-P01	ISOLUTE SLE+ 200 μ L supported liquid extraction plate	1
820-0140-C	ISOLUTE SLE + 1mL sample volume column	30
121-5203	Deep well collection plate 2mL	50
121-9600	VacMaster-96 Sample processing manifold complete (without vacuum control)	1
SD2-9600-DHS-UK	SPE Dry 96 Dual, 240 V UK	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