

LC-MS/MS分析サンプル前処理

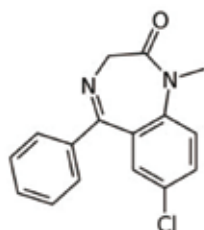
ISOLUTE® SLE+ を使用した ヒト尿中ベンゾジアゼピン分析のためのサンプル前処理

はじめに

ベンゾジアゼピン類は、不安、不眠、てんかん発作、アルコール離脱せん妄などの症状を抑えるために用いられる向精神薬です。長期使用により身体依存および投薬中止後の離脱症状を引き起こすため、投薬中のモニタリングと評価が必要です。

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、ヒト尿からのベンゾジアゼピン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、すべての分析薬物について回収率85%以上を達成しています。

■ 図1 ジアゼパムの構造



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

ミダゾラム、フルラゼパム、ブロマゼパム、 α -セドロキサールプラゾラム、ノルジアゼパム、ニトラゼパム、オキサゼパム、エスタゾラム、アルプラゾラム、ロラゼパム、トリアゾラム、ジアゼパム、テマゼパム、フルニトラゼパム

■ 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(～4500U/mL) 50 μ Lと、酢酸アンモニウム溶液(100mM、pH5.0)* 950 μ Lを加え、60°C(ウォーターバス)で2時間、加水分解する(尿1mL当たり酵素50 μ Lが必要)。

* 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。

サンプル量200 μ Lの場合

使用製品:	ISOLUTE SLE+ 200 μ L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200 μ L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、HPLCグレードの水/アセトニトリル(70/30, v/v) 200 μ Lで再溶解する。シーリングマットでウェルを密閉し、静かに60秒間混和する。

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、HPLCグレードの水/アセトニトリル(70/30, v/v) 1mLで再溶解した後、静かに60秒間混和する。

HPLC条件

機器:	Waters Alliance 2795.
カラム:	Phenomenex Kinetex C18 100 Åカラム (2.6μ, 50 x 2.1mm id)
移動相:	0.1%ギ酸/アセトニトリル(70/30, v/v) :アインクラティック
流速:	0.30mL/min.
注入量:	25 μL (partial loop)
サンプル温度:	20 °C.
カラム温度:	ambient

MS条件

機器:	エレクトロスプレー・インターフェイス装備Waters Ultima Ptトリプル四重極型質量分析装置
イオン源温度:	100 °C.
脱溶媒和温度:	350 °C.

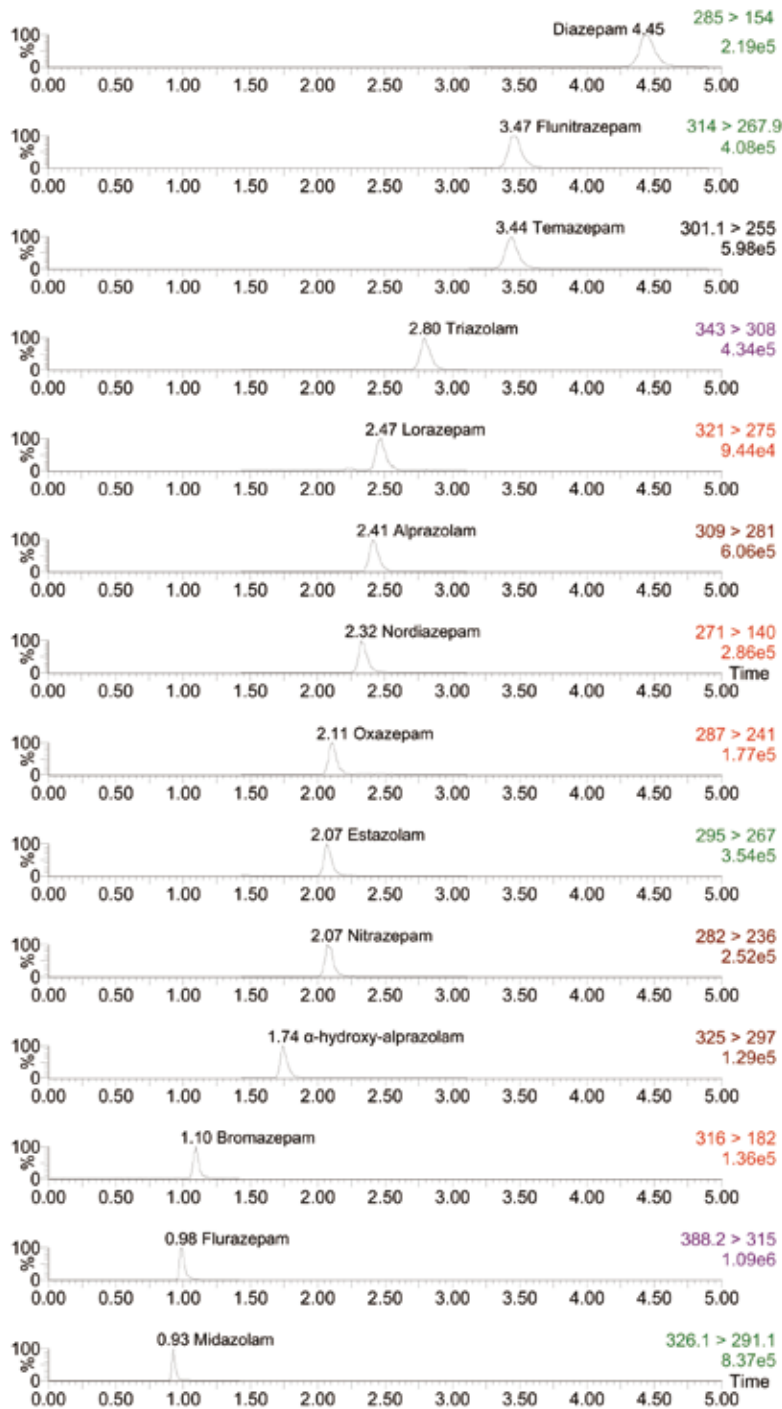
表1 MRMトランジション(ポジティブモード)

Scan Function	Compound	MRM transition	Cone voltage	Collision Energy (ev)
1	ブロマゼパム	316.0 > 182.0	35	25
2	ミダゾラム	326.1 > 291.1	35	25
3	フルラゼパム	388.2 > 315.0	35	21
4	ノルジアゼパム	271.0 > 140.0	35	25
5	ニトラゼパム	282.0 > 236.0	35	22
6	オキサゼパム	287.0 > 241.0	35	20
7	エスタゾラム	295.0 > 267.0	35	23
8	アルプラゾラム	309.0 > 281.0	35	24
9	ロラゼパム	321.0 > 275.0	35	20
10	α-ヒドロキシアルプラゾラム	325.0 > 297.0	35	25
11	トリアゾラム	343.0 > 308.0	35	25
12	ジアゼパム	285.0 > 154.0	35	25
13	テマゼパム	301.1 > 255.0	35	20

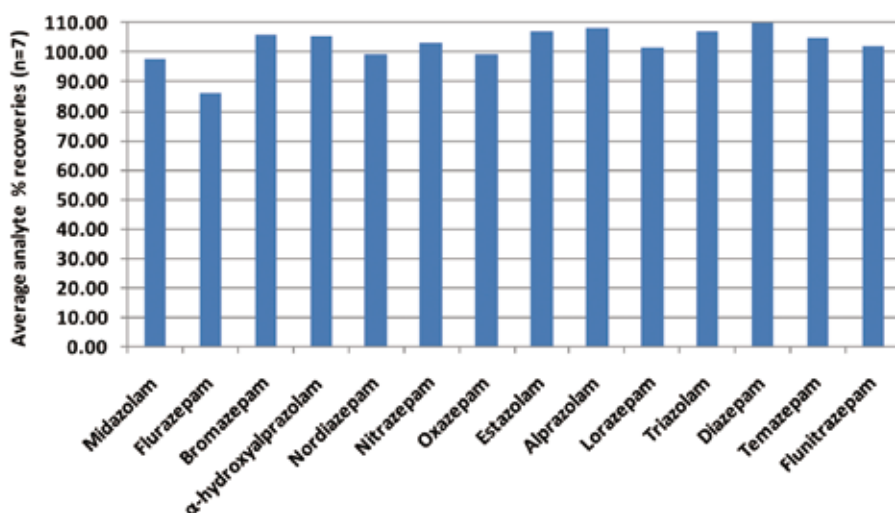
結果

図2に各分析薬物10ng/mLのマスク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(分析薬物濃度10ng/mL、RSD5%未満)、表2には各分析薬物の定量下限値(LOQ)を示す。

■ 図2 各分析薬物(10ng/mL)の典型的なマスクロマトグラム



■ 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10ng/mL、RSD5%未満)



■ 表2 ISOLUTE SLE+96ウェルプレートを使用した場合の定量下限値 (LOQ)

分析薬物	定量下限値 (LOQ)
ブロマゼパム	10ng/mL
ミダゾラム	100pg/mL
フルラゼパム	200pg/mL
ノルジアゼパム	500pg/mL
ニトラゼパム	500pg/mL
オキサゼパム	1ng/mL
エスタゾラム	200pg/mL
アルプラゾラム	200pg/mL
ロラゼパム	500pg/mL
α-ヒドロキシアルプラゾラム	500pg/mL
トリアゾラム	100pg/mL
ジアゼパム	100pg/mL
テマゼパム	200pg/mL
フルニトラゼパム	100pg/mL

■ 使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
820-0200-P01	ISOLUTE SLE+ 200μL 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