

LC/MS/MS と Agilent Bond Elut Plexa SPE による血漿中のホルモンの分析

アプリケーションノート

バイオ分析、医薬品、臨床研究

著者

Megan Juck and William Long
Agilent Technologies, Inc.

概要

血漿中の 13 種類のホルモンとそれぞれの内部標準の測定メソッドを開発しました。Agilent Bond Elut Plexa 固相抽出 (SPE) (30 mg、1 mL) カートリッジを用いて、ホルモンを血漿から抽出しました。抽出したホルモンは、Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8 カラム (2.1 × 50 mm、2.7 μm) で分離し、液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析システム (LC/MS/MS) で分析しました。各ホルモンの分析では 1 mM フッ化アンモニウムの移動相を用いてポジティブとネガティブの両方のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) モードを使用し、両方のモードでホルモンのレスポンスを向上させました。全体の回収率の範囲は 80 ~ 105 % で相対標準偏差 (RSD) 値は 2.8 ~ 5.8 % でした。このアプリケーションノートでは、血漿中のホルモンの測定における Bond Elut Plexa SPE カートリッジの使いやすさと有効性を解説します。

はじめに

血漿中のステロイドホルモンを測定するために、ポリマー系固相抽出 (SPE) を用いたメソッドを開発しました。表 1 は、分析した 13 種類のホルモンの構造式と化学式を示しています。Agilent Bond Elut Plexa は、ヒドロキシル化されかつ非保持性でアミドフリーな表面を持つユニークなポリマー構造です。タンパク質および脂質はポリマー表面での結合が最小であるため、サンプルはクリーンになり、マトリックス干渉物が低減します。非極性の PS-DVB コアは、ホルモンなどの低分子の保持に最適です。このアプリケーションノートでは、Bond Elut Plexa SPE カートリッジの使いやすさと有効性を解説します。



Agilent Technologies

表 1.13 種類の分析対象ホルモンの分子式と構造式。異性体ペアの情報も含まれています。

ホルモン	分子式	構造式	ホルモン	分子式	構造式
アルドステロン	$C_{21}H_{28}O_5$		11-デオキシコルチコステロン	$C_{21}H_{30}O_3$	
コルチゾール	$C_{21}H_{30}O_5$		アンドロステンジオン	$C_{19}H_{26}O_2$	
コルチゾン	$C_{21}H_{28}O_5$		エストロン	$C_{18}H_{22}O_2$	
コルチコステロン	$C_{21}H_{30}O_4$		17αOH プロゲステロン	$C_{21}H_{30}O_3$	
11-デオキシコルチゾール	$C_{21}H_{30}O_4$		ジヒドロテストステロン (DHT)	$C_{19}H_{30}O_2$	
β-エストラジオール	$C_{18}H_{24}O_2$		プロゲステロン	$C_{21}H_{30}O_2$	
テストステロン	$C_{19}H_{28}O_2$		異性体ペア アルドステロンとコルチゾン 11-デオキシコルチコステロンと 17αOH プロゲステロン 11-デオキシコルチゾールとコルチコステロン		

分析方法

試薬および薬品

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。メタノールは Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から入手しました。水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用して純水化しました。試薬グレードのギ酸 (FA、p/n G2453-85060) は Agilent Technologies から入手しました。フッ化アンモニウムは Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。11-デオキシコルチコステロン d7 は Toronto Research Chemicals (トロント、オンタリオ州、カナダ) から購入しました。その他のすべてのホルモンおよび内部標準は Sigma-Aldrich から購入しました。血漿 (DC Mass Spect Gold、MSG4000) は Golden West Biologicals, Inc. (テメキュラ、カリフォルニア州、米国) から購入しました。血漿は使用日まで -70°C で保管しました。

装置と材料

- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- 濃縮蒸発システム
- Vortexer およびマルチチューブ Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- Agilent Vac Elut SPS マニホールド 24、 13×100 mm 試験管用コレクションラック付き (p/n 12234022)
- Agilent Bond Elut Plexa、30 mg、1 mL ストレートパレルカートリッジ (p/n 12109301)
- Agilent MS 分析用の茶色のスクリュートップガラスバイアル、ラベル付き (p/n 5182-0716)
- Agilent 圧着スクリュューキャップ、PTFE/赤シリコンセブタム (p/n 5190-7024)
- Agilent バイアルインサート、250 μL 、不活性ガラス、樹脂足付 (p/n 5181-8872)

装置構成

分析には、以下のものから構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 FC/ALS サーモスタット (G1330B) を搭載した Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)

LC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン化技術を備えた Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS/MS システムに連結しました。すべてのデータ取り込みと分析に、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理

ホルモン標準ミックスとホルモン内部標準はそれぞれメタノールで調製しました。表 2 に、各分析対象物とそれぞれの内部標準の濃度を示します。各内部標準は各分析対象物と同じ濃度としました。例えば、ホルモン標準ミックス中にアルドステロンは 50 ng/mL の濃度、ホルモン内部標準ミックス中にアルドステロン-d4 は 50 ng/mL としました。

表 2. ホルモンおよび内部標準の濃度を示します。内部標準を親分析対象物と同じ濃度でスパイクしました。

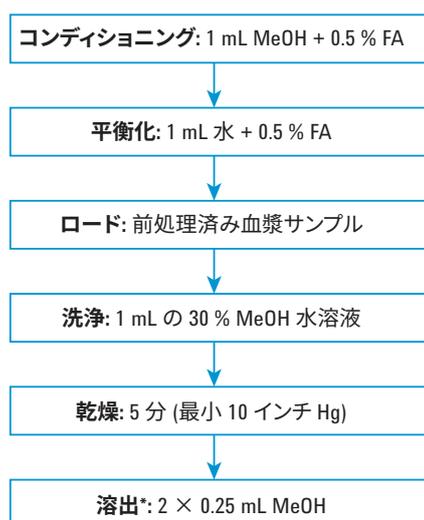
分析対象物/内部標準	それぞれの標準の濃度 (ng/mL)
アルドステロン/アルドステロン d4	50
コルチゾール/コルチゾール d4	50
コルチゾン/コルチゾン d8	50
コルチコステロン/コルチコステロン d4	50
11-デオキシコルチゾール/11-デオキシコルチゾール d5	50
β -エストラジオール/ β -エストラジオール d5	500
テストステロン/テストステロン d3	50
11-デオキシコルチコステロン/11-デオキシコルチコステロン d7	50
アンドロステンジオン/アンドロステンジオン $^{13}\text{C}3$	50
エストロン/エストロン d3	500
17 α OH プロゲステロン/17 α OH プロゲステロン d8	50
DHT/DHT d3	500
プロゲステロン/プロゲステロン d9	50

サンプル前処理

SPE 処理に先立って、400 μ L の 0.5 % ギ酸 (FA) 水溶液を 100 μ L の血漿に追加しました。サンプルに 20 μ L のホルモン標準ミックスと 20 μ L のホルモン内部標準ミックスをスパイクしました。 β -エストラジオール、 β -エストラジオール d5、エストロン、エストロン d3、DHT、DHT d3 の最終濃度は 100 ng/mL でした。その他のすべてのホルモンおよび内部標準の血漿中の最終濃度は 10 ng/mL でした。サンプルをボルテックスし遠心分離してすべての血漿微粒子を取り除きました。

SPE の後、採取した溶離液を 40 °C の窒素で蒸発乾固した後、100 μ L の 50/50 MeOH/水で再溶解しました。サンプルをボルテックスした後、LC/MS/MS 分析のためにガラスインサート付きのバイアルに移しました。

SPE プロトコル



* 自然落下溶出を実行しました。溶出が停止した後、低真空 (<5 インチ Hg、3 ~ 5 秒) にしてすべての溶離液を十分に収集しました。

図 1. Agilent Bond Elut Plexa 30 mg、1 mL カートリッジを用いたホルモン測定 SPE プロトコル

分析条件

パラメータ	設定値
HPLC	
カラム:	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8、 2.1 mm × 50 mm、2.7 μ m (p/n 699775-706)
ガード:	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8、 UHPLC ガードカラム、2.1 mm × 5 mm、2.7 μ m (p/n 821725-922)
移動相:	A) 1 mM フッ化アンモニウム水溶液 B) アセトニトリル (ACN)
流量:	0.4 mL/min
カラム温度:	40 °C
オートサンブラ温度:	4 °C
注入量:	10 μ L
ニードル洗浄:	1:1:1 ACN/MeOH/イソプロパノール/水と 0.2 % FA
グラジエント:	時間 (分) % B
	0 20
	8 50
	9 95
ストップタイム:	10 分
ポストタイム:	1 分
MS	
エレクトロスプレーイオン化 (ESI)	
ガス温度:	250 °C
ガス流量:	11 L/min
ネブライザ:	35 psi
シースガスヒーター:	350 °C
シースガス流量:	11 L/min
キャピラリ:	ポジティブ 3,000 V、ネガティブ 3,500 V
ノズル電圧:	ポジティブ 0 V、ネガティブ 1,800 V
デルタ EMV (+):	300 V
デルタ EMV (-):	0 V

表 3. ターゲット化合物の LC/MS/MS dMRM パラメータおよびリテンションタイム

分析対象物	RT (分)	プリカーサ イオン (m/z)	フラグメンター (V)	プロダクトイオン				イオン化モード
				定量イオン (m/z)	CE (V)	定性イオン (m/z)	CE (V)	
アルドステロン	1.55	361.2	100	343.2	15	315.2	16	ポジティブ
コルチゾール	1.98	363.2	105	121.1	24	91.1	72	ポジティブ
コルチゾン	2.05	361.2	133	163.1	24	121	32	ポジティブ
コルチコステロン	3.01	347.2	110	329.2	12	121	24	ポジティブ
11-デオキシコルチゾール	3.22	347.2	133	109.1	28	97.1	24	ポジティブ
β-エストラジオール	4.02	271.17	158	145.1	44	143	64	ネガティブ
テストステロン	4.17	289.2	104	109.1	24	97.1	24	ポジティブ
11-デオキシコルチコステロン	4.51	331.2	133	109.1	28	97.1	24	ポジティブ
アンドロステンジオン	4.70	287.2	84	109.1	24	97.1	20	ポジティブ
エストロン	4.77	269.15	158	145.1	44	143	64	ネガティブ
17αOH プロゲステロン	5.01	331.2	133	109.1	28	97.1	24	ポジティブ
DHT	5.34	291.2	158	255.1	8	77.1	80	ポジティブ
プロゲステロン	6.82	315.2	104	109.1	24	97.1	24	ポジティブ

表 4. 内部標準の LC/MS/MS dMRM パラメータおよびリテンションタイム

分析対象物	RT (分)	プリカー サイオン (m/z)	フラグメンター (V)	プロダクトイオン		イオン化モード
				定量イオン (m/z)	CE (V)	
アルドステロン d4	1.54	365.4	100	347.2	15	ポジティブ
コルチゾール d4	1.97	367.24	104	121	24	ポジティブ
コルチゾン d8	2.02	369.25	143	169.1	24	ポジティブ
コルチコステロン d4	3.01	363.2	105	121	24	ポジティブ
11-デオキシコルチゾール d5	3.20	352.26	133	100.0	24	ポジティブ
β-エストラジオール d5	4.02	276.2	150	147.1	35	ネガティブ
テストステロン d3	4.13	292.2	104	97.1	24	ポジティブ
11-デオキシコルチコステロン d7	4.51	338.27	84	100.1	20	ポジティブ
アンドロステンジオン ¹³ C3	4.70	290.4	104	100.1	20	ポジティブ
エストロン d3	4.77	272.19	158	148.1	40	ネガティブ
17αOH プロゲステロン d8	4.96	339.28	138	100.1	28	ポジティブ
DHT d3	5.31	294.25	120	258.2	12	ポジティブ
プロゲステロン d9	6.75	324.29	104	100.1	24	ポジティブ

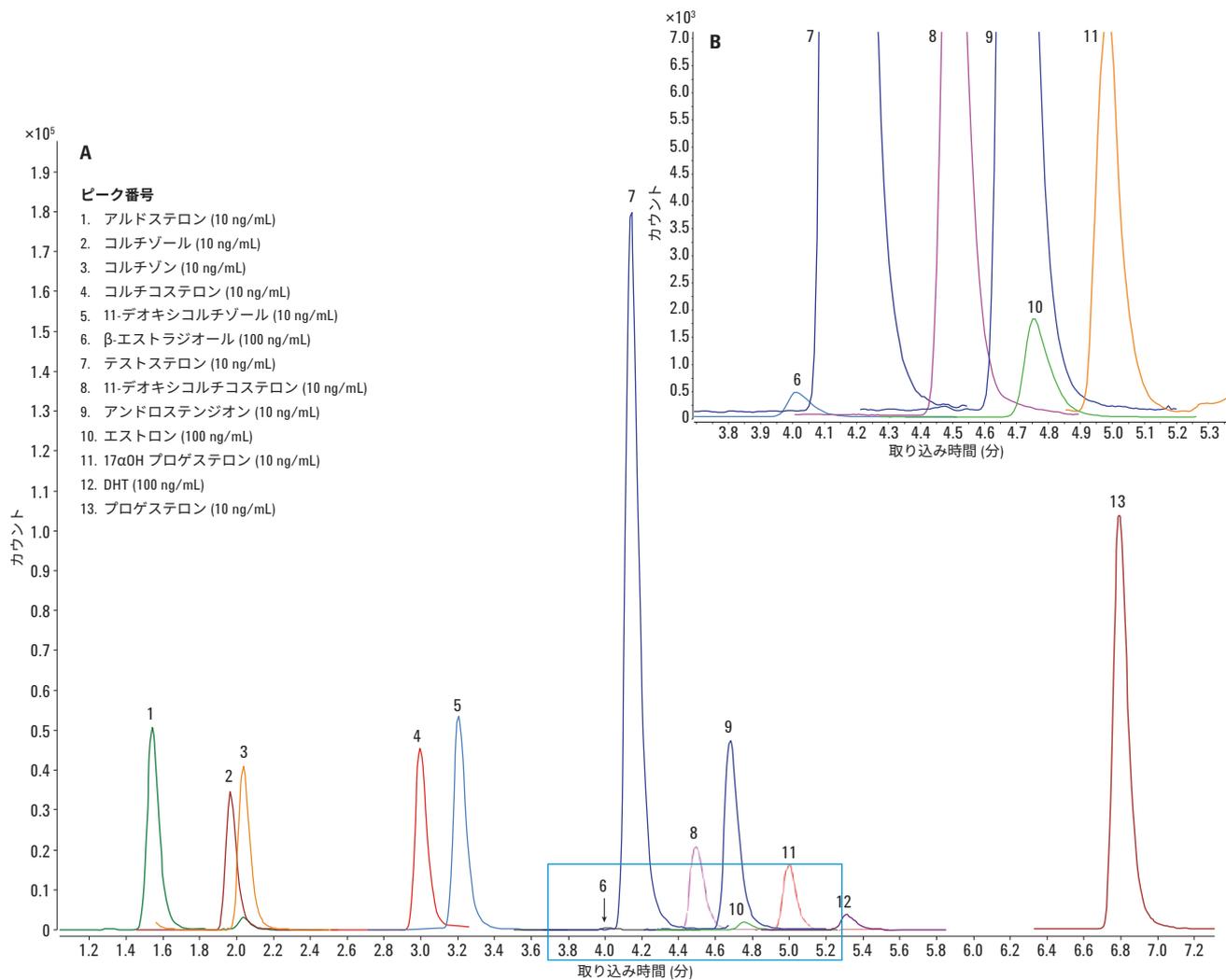


図2. 血漿中の13種類の分析対象ホルモンの最終のdMRMクロマトグラム(A)と、 β -エストラジオールとエストロンのクロマトグラムの拡大図(B)。濃度は凡例に記載されています。

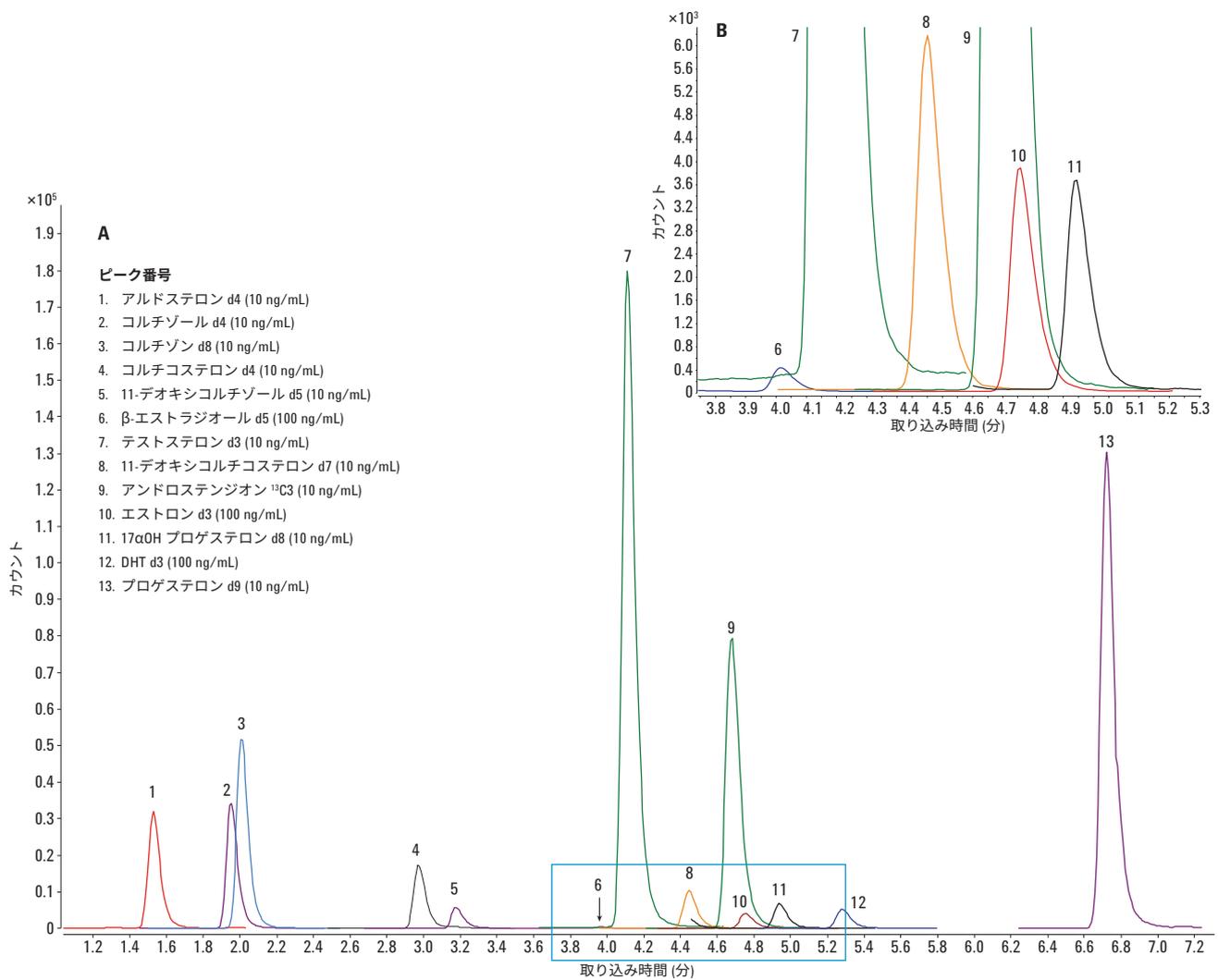


図 3. 血漿中の 13 種類の分析対象ホルモン内部標準の最終 dMRM クロマトグラム (A) と、 β -エストラジオール d5 とエストロン d3 のクロマトグラム (B)。濃度は凡例に記載されています。

結果と考察

SPE の最適化

SPE メソッドを開発する際は、目的の分析対象物を確実にカートリッジに保持しながら、マトリックス干渉を除去するのに十分強力な洗浄溶媒を使用することが重要です。洗浄溶媒の各候補 (100 % 水、10 % MeOH 水溶液、20 % MeOH 水溶液など) について洗浄溶出液を収集して分析することによって、ホルモン損失を測定できます。評価後、このプロトコルに最適な洗浄液として、30 % MeOH 水溶液を選定しました。

洗浄ステップと同様に、溶出溶媒も最適化することが可能です。溶出ステップの目標は、SPE 手順中に固相に保持されてしまったマトリックス干渉物を溶出することなく、すべての目的分析対象物を溶出するのに十分に強力な溶媒を選定することです。このアプリケーションノートでは、80 % MeOH 水溶液、90 % MeOH 水溶液、100 % MeOH、50/50 MeOH/ACN 溶出溶媒を評価しました。100 % MeOH 溶出溶媒が最も高いホルモン回収率を示したため、このアプリケーション用に選定しました。

条件

移動相 A: 水 + 0.1 % ギ酸
 移動相 B: メタノール + 0.1 % ギ酸
 グラジエントプログラム: 0 ~ 8 分: 40 % 移動相 B から 55 % 移動相 B
 8.1 分: 95 % 移動相 B、保持

合計分析時間: 10 分 + 1 分のポストタイム

流量: 0.4 mL/min

注入量: 10 μ L

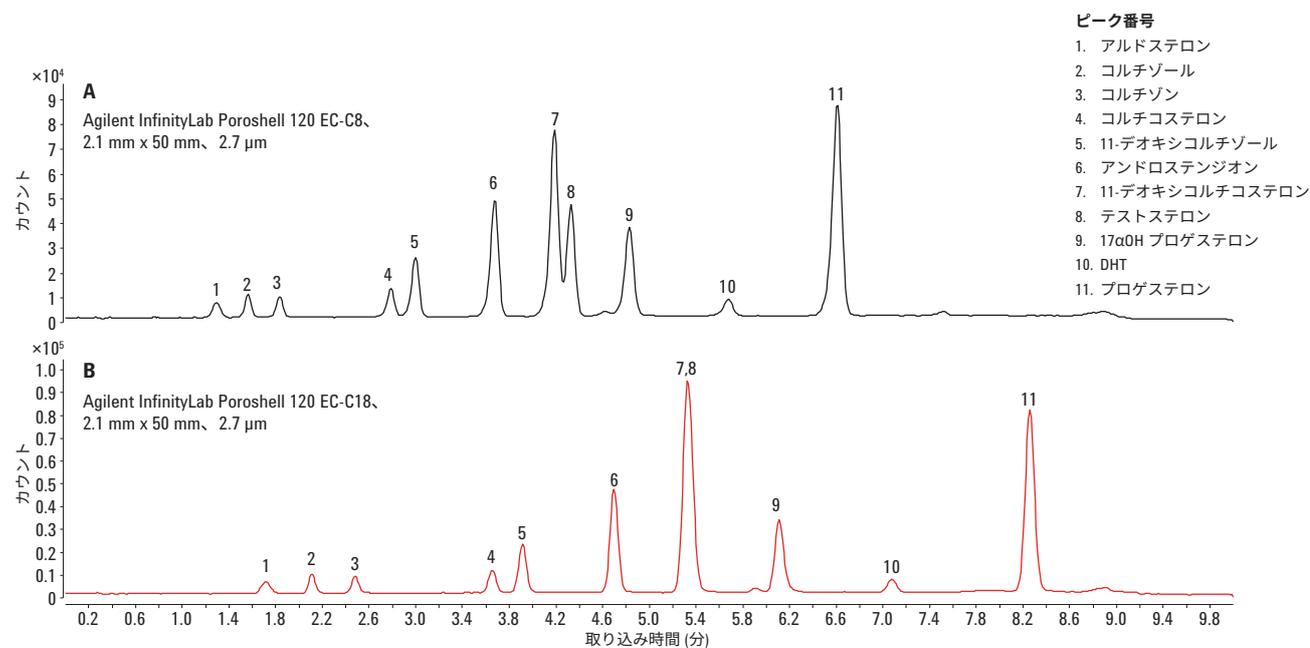


図 4. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラムおよび EC-C18 カラムを用いた場合の 11 種類のホルモン (100 ng/mL) の分離能とリテンションの比較。
 β -エストラジオールとエストロンは、クロマトグラムを生成した後に最終メソッドに追加したためこのクロマトグラムには含まれていません。

ギ酸 (0.1 %)、水酸化アンモニウム (0.02 %、pH 10.5)、フッ化アンモニウム (pH 6.2) 移動相も評価しました (図 5 ~ 7)。水酸化アンモニウム (0.02%) による高 pH 移動相では、ネガティブモードで分析したホルモンのイオン化の向上が示されました [1]。フッ化アンモニウムでは、ポジティブおよびネガティブの両方のモードでレスポンスの向上が示されました [2, 3]。

8 または 9 以上の高 pH の移動相にはほとんどのシリカベースの LC カラムの使用を推奨できないため、評価には Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8 カラムを使用しました。このカラムは pH 11 まで安定しており、InfinityLab Poroshell 120 EC-C8 カラムと極めて類似した選択性を備えています。このため、InfinityLab Poroshell HPH-C8 カラムを使用して、水酸化アンモニウムとフッ化アンモニウムの両方の移動相でメソッドを最適化し、最終的な分析メソッドとして選定しました。フッ化アンモニウム (1 mM) 移動相は、最高の分析対象物のレスポンスを生成したため、最終的なクロマトグラフィーメソッドで使用しました。

条件

移動相 A: 0.1 % ギ酸水溶液または 0.02 % 水酸化アンモニウム水溶液
 移動相 B: メタノール
 グラジエントプログラム: 0 ~ 9 分: 40 % 移動相 B から 60 % 移動相 B
 9 ~ 11 分: 60 % 移動相 B から 95 % 移動相 B
 合計分析時間: 12 分 + 1 分のポストタイム
 流量: 0.4 mL/min
 注入量: 10 μ L

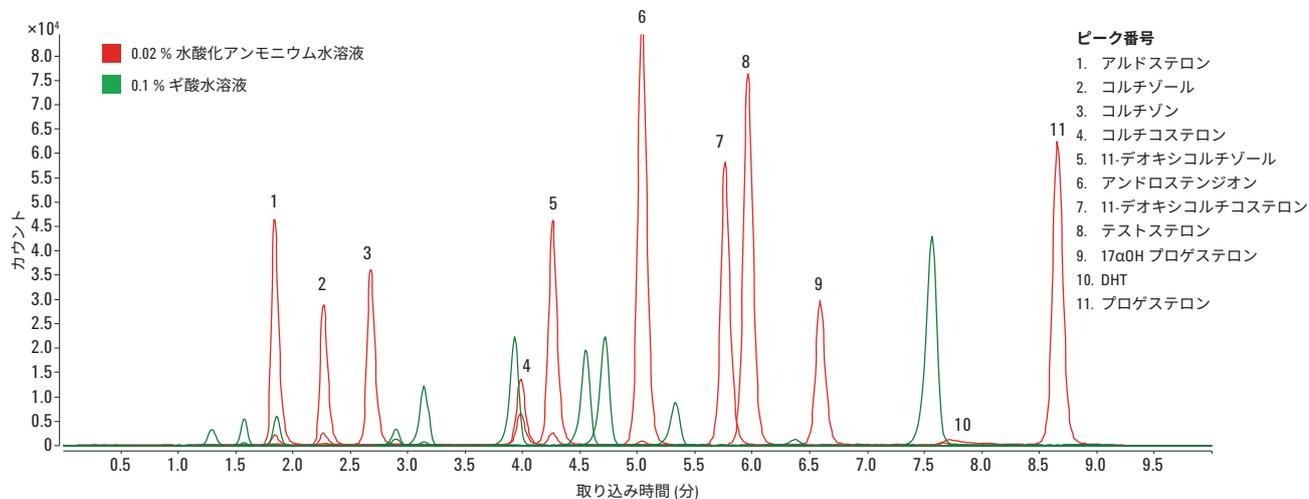


図 5. Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8、2.1 mm \times 50 mm、2.7 μ m カラムを用いて分析した 0.1 % ギ酸水溶液 (緑色のトレース) および 0.02 % 水酸化アンモニウム水溶液 (赤色のトレース) での 100 ng/mL ホルモンサンプルのクロマトグラム。比較のために LC/MS/MS のグラジエントは同一に保ちました。 β -エストラジオールとエストロンは、これらのクロマトグラムを生成した後メソッドに追加したため含まれていません。

条件

移動相 A: 1 mM のフッ化アンモニウム水溶液または 0.02 % の水酸化アンモニウム水溶液
移動相 B: メタノール
グラジエントプログラム: 0 ~ 9 分: 40 % 移動相 B から 60 % 移動相 B 9 ~ 11 分: 60 % 移動相 B から 95 % 移動相 B
合計分析時間: 12 分 + 1 分のポストタイム
流量: 0.4 mL/min
注入量: 10 μ L

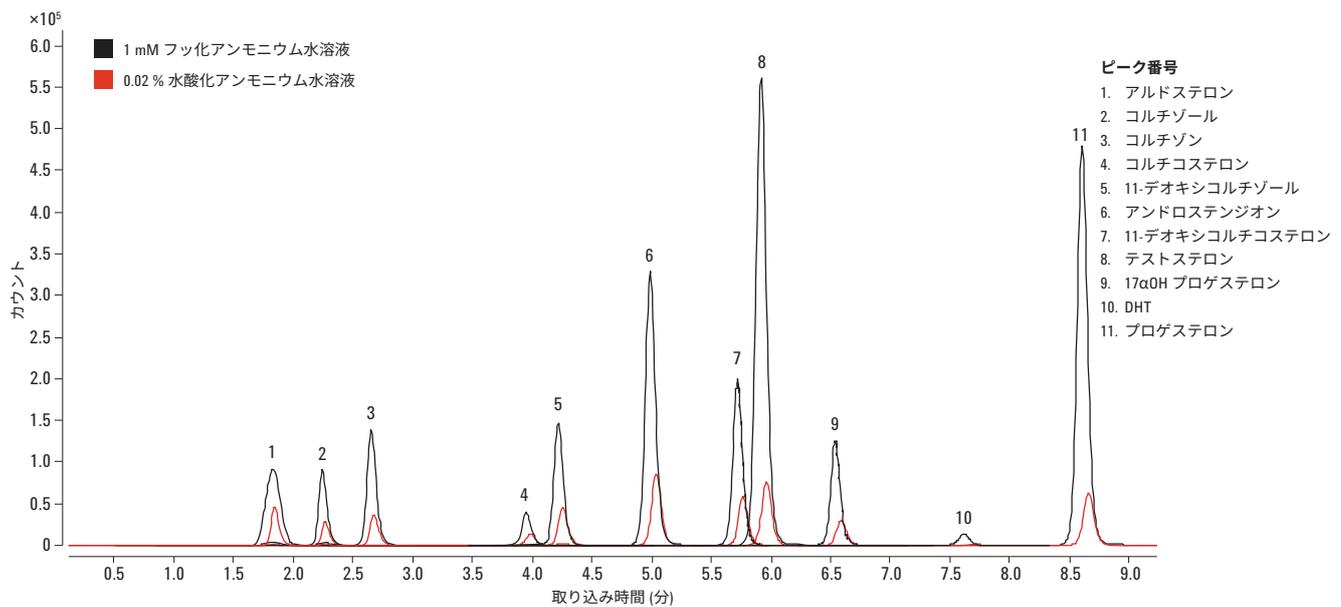


図 6. 100 ng/mL のホルモンサンプルの、1 mM フッ化アンモニウム水溶液 (黒色のトレース) および 0.02 % 水酸化アンモニウム水溶液 (赤色のトレース) によるトータルイオンクロマトグラム。Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8, 2.1 mm \times 50 mm, 2.7 μ m を用いました。比較のために LC/MS/MS のグラジエントは同一に保ちました。 β -エストラジオールとエストロンは、これらのクロマトグラムを生成した後にメソッドに追加したため含まれていません。

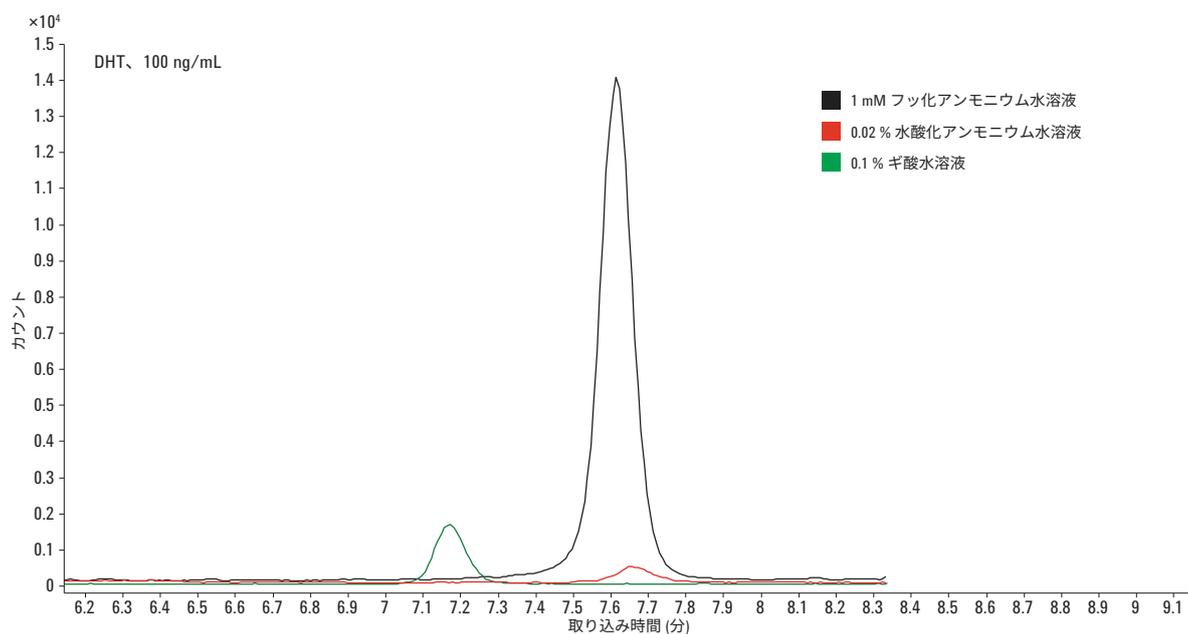


図 7. 次の 3 種類の移動相での DHT (100 ng/mL、ネガティブモード) の MRM クロマトグラムの重ね表示: 1 mM のフッ化アンモニウム水溶液 (黒)、0.02% 水酸化アンモニウム水溶液 (赤)、0.1% ギ酸水溶液 (緑)。Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8、2.1 mm × 50 mm、2.7 μm を用いました。グラジエント条件は、図 5 と図 6 の説明箇所を示しています。

回収率と再現性

回収率と再現性は、前述の SPE プロトコルを使用してプレススパイクされた血漿サンプルとブランク血漿サンプルを抽出することによって評価しました。血漿サンプルには 100 ng/mL の濃度の β-エストラジオール、エストロン、DHT をプレススパイクしました。残りの 10 種類のホルモンは 10 ng/mL の濃度でプレススパイクしました。ブランク血漿サンプルとスパイクされた血漿サンプルは、SPE プロトコルで抽出しました。ブランクサンプルは最終のドライダウンの後に、前述のとおり、10 および 100 ng/mL の濃度でポストスパイクしました。回収率 (%) と RSD の値を、プレススパイクおよびポストスパイクしたサンプルの平均ピーク面積 (n = 5) を比較して求めました。

表 5. 回収率 (%) と RSD の値 (括弧内に記載) (n = 5)

分析対象物	添加した濃度 (ng/mL)	% 回収率 (RSD)
アルドステロン	10	94 (5.8)
コルチゾール	10	102 (5.4)
コルチゾン	10	99 (5.7)
コルチコステロン	10	97 (5.1)
11-デオキシコルチゾール	10	97 (3.9)
β-エストラジオール	100	81 (5.3)
テストステロン	10	86 (3.3)
11-デオキシコルチコステロン	10	91 (4.6)
アンドロステンジオン	10	92 (4.7)
エストロン	100	80 (3.9)
17αOH プロゲステロン	10	105 (4.2)
DHT	100	88 (2.8)
プロゲステロン	10	90 (4.0)

結論

Agilent Bond Elut Plexa SPE カートリッジを用いて血漿中の 13 種類のホルモンと各内部標準を測定するためのメソッドを開発しました。Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS/MS をポジティブおよびネガティブモードで動作した場合の分析対象物のレスポンスは、1 mM のフッ化アンモニウムを加えることによって大幅に強まりました。Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C8 (2.1 mm × 50 mm、2.7 μm) カラムにより、短い分析時間と 3 つの異性体ペアのベースライン分離が実現し、より再現性の高い積分と定量が可能になりました。広い使用可能 pH レンジは、メソッド開発にとって最適なカラムの選択肢となります。このメソッドで、高い回収率 (80 ~ 105 %) と低い RSD 値 (2.8 ~ 5.8 %) を達成できました。Agilent Bond Elut Plexa SPE 製品は、メソッド開発がほとんど不要で使いやすいため、生体試料分析に最適な選択肢です。

参考文献

1. Fu, R.; Zhai, A. *Determination of Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS Using an Agilent InfinityLab Poroshell HPH Column (EPA 539)*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6995EN, **2016**.
2. Hindle, R. *Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-2473EN, **2013**.
3. Fiers, T.; Casetta, B.; Bernaert, B.; Vandersypt, E.; Debock, M.; Kaufman, J. Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *Journal of Chromatography B*. **2012**, 893-894, 57-62.

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。
アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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いません。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. 2017

Printed in Japan, May 2, 2017

5991-8042JAJP



Agilent Technologies