

トリプル四重極質量分析計LCMS-8060NXを用いたヒト血清中コルチゾールの高感度分析

加藤 紀子

ユーザーベネフィット

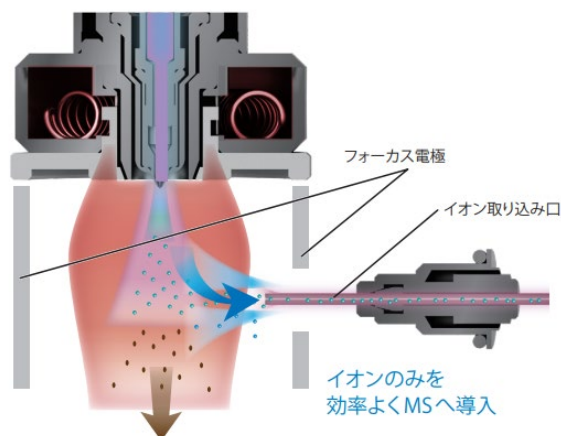
- ◆ 特異性が高く高感度に血清コルチゾールを測定できます。
- ◆ 広いダイナミックレンジでの定量分析が可能であり、定量値の正確さや信頼性に優れた分析法です。
- ◆ IonFocus™ユニットが効率的にイオンをMSへ導入するため、高い装置頑健性を実現します。

■はじめに

コルチゾールは副腎皮質から分泌され、タンパク質や炭水化物、脂質など様々な栄養素の代謝促進、抗炎症作用や免疫抑制作用を有する生命維持に必要なホルモンです。コルチゾールの測定は、下垂体機能および副腎皮質機能の診断指標として重要で、電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) や化学発光免疫測定法 (CLIA) などの免疫アッセイ法が用いられています。しかし、他のステロイドやステロイド系薬剤との交差反応性が危惧されていることから、本稿では感度と選択性の高いLC/MS/MSを用いた定量分析法をご紹介します。

今回は血清中コルチゾールの低下モニターへの応用性を確認するために、市販の脱ステロイド処理されたヒト血清を用い、正常値よりも低濃度域からのコルチゾールの測定性を確認しました。

また、LC/MS/MSでは生体試料のようなサンプルを測定する場合、MS内部が汚染される問題がありますが、LCMS-8060NXのIonFocusユニットはイオンのみを効率的にMSに導入するため、MS内部の汚染を軽減しつつ高感度分析を可能にします。(図1)



汚染やマトリクス効果の原因となる中性粒子 (マトリクス) は除去

図1 IonFocusユニットのコンセプト

■試料調製

コルチゾールの標準品を50%メタノール水溶液で段階希釈し、2.5~100000 pg/mLに調製した標準試料にて検量線を作成しました。

脱ステロイド血清添加試料はEVOLUTE EXPRESS ABN 30 mg plateを用いて前処理しました。図2にサンプル前処理の流れを示しました。

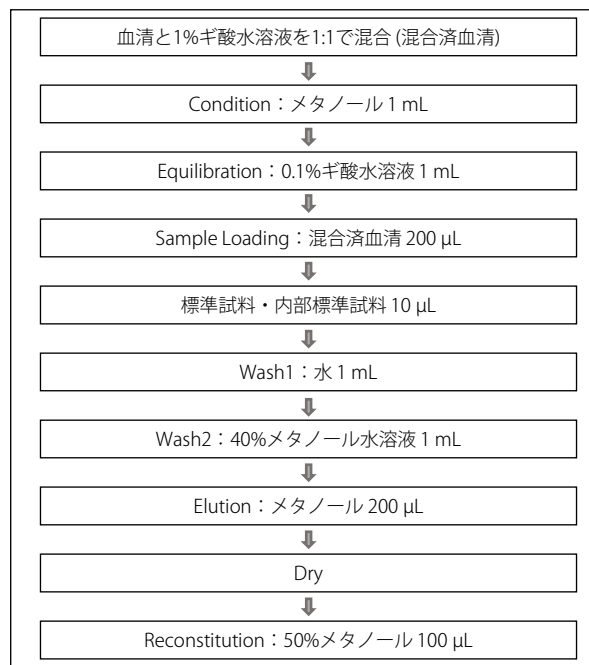


図2 前処理ワークフロー

■分析条件

LC条件を表1に示しました。またMS条件とMRMトランジションを表2、3に示しました。

表1 LC条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)	
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120, 50 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm *1
Mobile phases	: A) 0.2 mM NH ₄ F in water B) methanol
Gradient Program	: B 50% (0 min) → 95% (4 - 6 min) → 50% (6.1 - 8 min)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Injection volume	: 2 μL

表2 MS条件

[MS conditions] (LCMS-8060NX)	
Ionization	: ESI (Positive mode)
Mode	: MRM
Interface voltage	: 0.5 kV
IonFocus voltage	: 3.0 kV
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 15.0 L/min
DL temp.	: 150°C
Block heater temp.	: 500°C
Interface temp.	: 400°C
Probe position	: +1.5 mm

表3 MRMトランジション

Compound	Precursor m/z	Product m/z
Cortisol	363.0	121.1
Cortisol-D ₄	367.1	121.1

■ 標準試料の分析結果

内部標準溶液1 ng/mL (50%メタノール) を添加した検量線用標準試料を3回繰り返し測定し、直線性を確認しました。内部標準法により作成した検量線を図3に示しました。2.5~100000 pg/mLで寄与率 R²=0.999となり、良好な直線性が得られました。各検量点の正確さは80~110%以内となりました。

また標準溶液2.5 pg/mLのMRMクロマトグラムを図4に示しました。

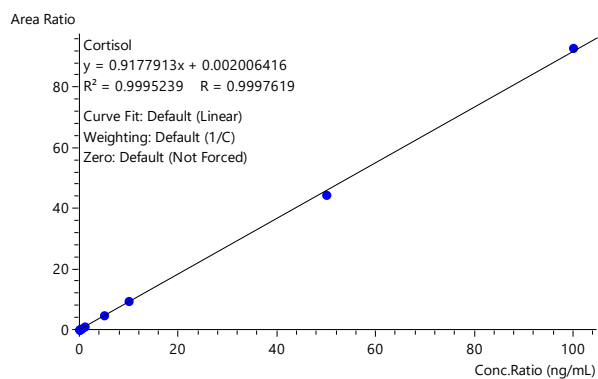


図3 検量線

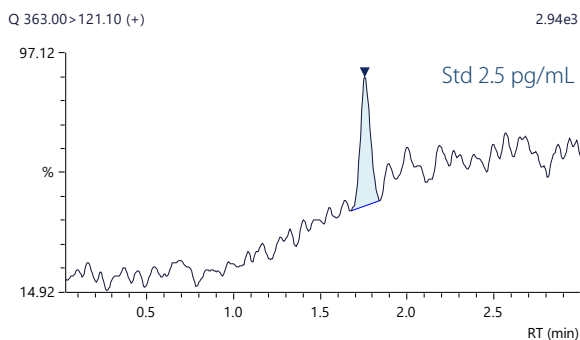


図4 MRMクロマトグラム (neat STD: 2.5 pg/mL)

■ ヒト血清添加試料の分析結果

前処理を行った試料を測定したところ、市販の脱ステロイド処理ヒト血清からコルチゾールが検出されました。血清中の添加濃度100 pg/mLに対して、脱ステロイド処理ヒト血清から検出された値を減算した値は92 pg/mLとなり、良好な結果が得られました。図5にヒト血清添加試料のMRMクロマトグラムを示しました。

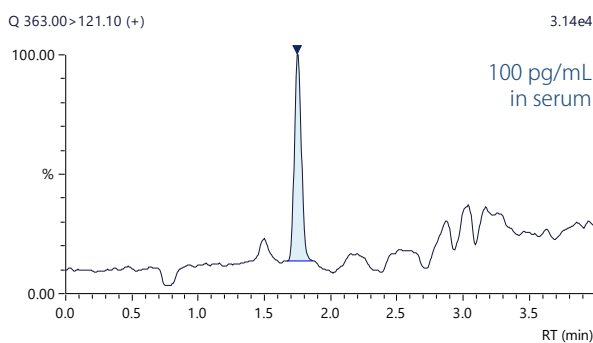
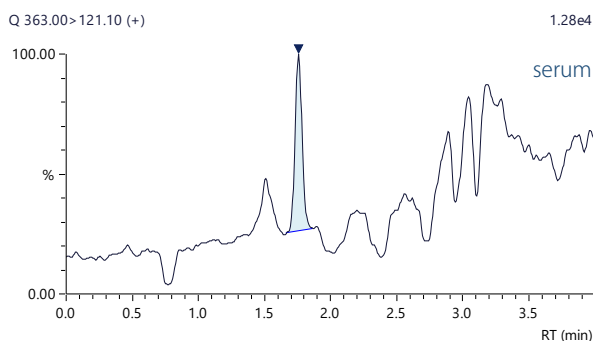


図5 MRMクロマトグラム
(上段: 処理ヒト血清、下段: ヒト血清添加試料)

■ まとめ

LCMS-8060NXを用いてコルチゾールの定量分析を行いました。その結果、2.5~100000 pg/mLの高感度、かつ幅広い濃度レンジでの定量分析が可能であり、ヒト血清への添加試料においても良好な結果が得られることが確認されました。脱ステロイド処理ヒト血清でもコルチゾールの検出は認められましたが、血清中で2.5 pg/mLの検出の可能性が示されました。

LCMS、IonFocus、NexeraおよびShim-packは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00214-JP 初版発行: 2021年8月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録いただけます。毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。