

LC/MS/MSを用いたラット血漿中のオキシトシンの定量分析

オキシトシンは脳下垂体後葉から分泌される9個のアミノ酸と1個のS-S結合からなるペプチドホルモンです。このオキシトシンは子宮筋の収縮促進作用から陣痛誘発剤として使用されることもあります。また、ストレス緩和などの効果があるとされることから、別名「幸せホルモン」や「愛情ホルモン」とも呼ばれており、母と子や、家族、恋人などの対人関係に大きく関わっているとされ、近年注目されているホルモンです。

本報告ではラット血漿中のオキシトシンをトリプル四重極型質量分析計 LCMSTTM-8050 により分析した事例をご紹介します。

T. Takahashi Y. Inohana

■ サンプルおよび前処理

ヘパリンを用いて凝固を阻止した血液（ラット SLC Wistar由来）について遠心後、血漿を採取しました。この血漿（100 μ L）に10倍容（1 mL）のアセトニトリルを添加して除タンパク処理をしました。さらに遠心後、上清（1 mL）を別チューブに移し、減圧下で遠心濃縮しました。

図1 にラット血漿試料の前処理ワークフローを示します。

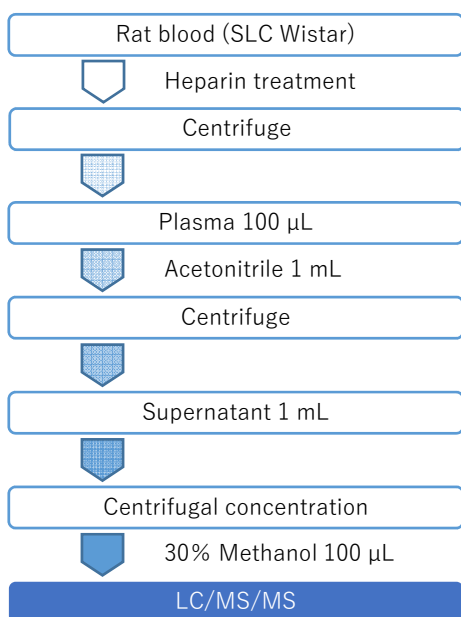


図1 ラット血漿試料の前処理ワークフロー

■ 標準品の分析

オキシトシンの標準品は30%メタノール溶液を用いて適宜溶解・希釈を行い、表1の分析条件の通り、LC/MS/MSにて測定を行いました。図2 にオキシトシンの代表的なMRMクロマトグラム（10 ng/mL）を示します。

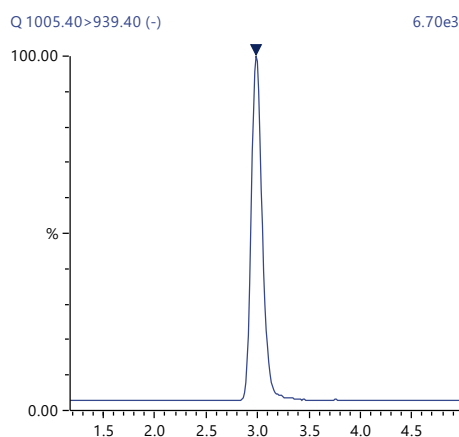


図2 オキシトシンの代表的なMRMクロマトグラム（10 ng/mL）

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera TM X2)	
Column	: Shim-pack TM GISS-HP (2.1 x 50 mm, 3 μ m)
Mobile phases	: A) Water B) Methanol
Time programs	: B conc. 30% (0 min) \rightarrow 50% (5 min) \rightarrow 30% (7.01-10 min)
Column temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Flow rate	: 0.3 mL/min
Injection volume	: 2 μ L
[MS conditions] (LCMS-8050)	
Ionization	: ESI (Negative mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 15.0 L/min
Heating gas flow	: 5.0 L/min
DL temp.	: 150 $^{\circ}$ C
Block heater temp.	: 500 $^{\circ}$ C
Interface temp.	: 350 $^{\circ}$ C
MRM Transition	: 1005.4 > 939.4 (CE: +56 V)

■ 検量線の直線性

図3 にオキシトシンの検量線を示します。0.1~500 ng/mLの濃度範囲で検量線を作成したところ、寄与率 $r^2 = 0.999$ 以上の良好な直線性が得られました。表2 にオキシトシンの標準品測定結果を示します。

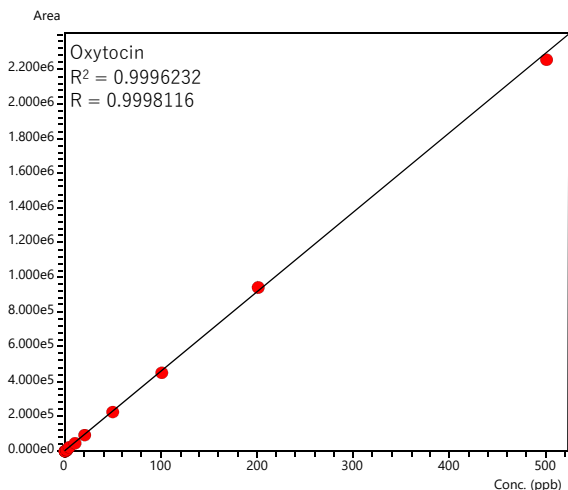


図3 オキシトシンの検量線 (0.1~500 ng/mL)

表2 オキシトシンの標準品測定結果

Compound	Cal. Range (ng/mL)	Contribution rate r^2	%RSD (0.1 ng/mL, n=3)
Oxytocin	0.1-500	0.999	8.27

■ 血漿検体の測定

ラット血漿前処理サンプルについて測定を行い、標準品の測定から得られた検量線を用いて定量を行いました。未添加のラット血漿ブランクサンプルからもオキシトシンが検出されました。図4 にラット血漿ブランクサンプルのMRMクロマトグラムを、表3 に定量結果を示します。

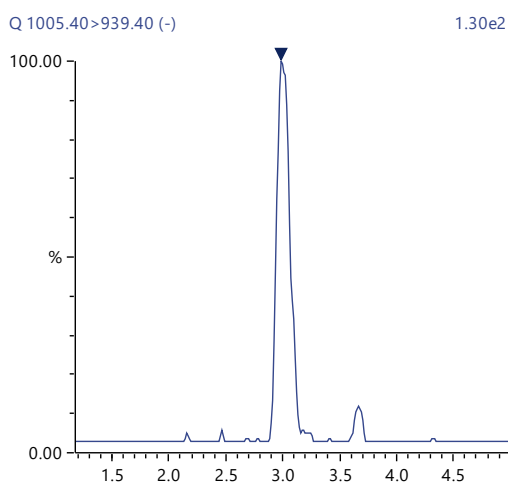


図4 ラット血漿サンプルのMRMクロマトグラム

表3 ラット血漿サンプルの定量結果

Sample Name	Conc. (ng/mL)
Rat Plasma Sample	0.23

<謝辞>

本稿でご紹介した分析試料は、神戸薬科大学 製剤学研究室の坂根稔康先生、田中晶子先生よりご提供いただきました。ご協力に深く謝意を表します。

掲載された製品は研究用です。医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。

治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

LCMS、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。

■ 血漿検体への添加回収試験

ラット血漿サンプルに標準品を 2 ng/mLの濃度となるように添加し、添加回収率試験を行いました。その結果、良好な回収率が得られました。図5 にオキシトシン標準品のMRMクロマトグラム (2 ng/mL) を、図6 にラット血漿サンプルのMRMクロマトグラム (2 ng/mL 添加)、表4 にラット血漿サンプルの添加回収試験結果を示します。

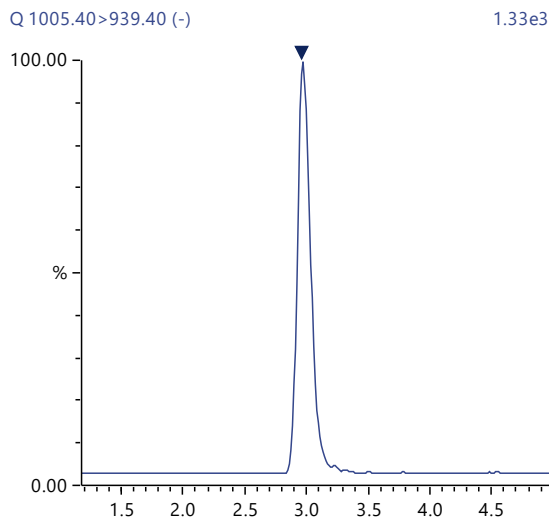


図5 オキシトシン標準品のMRMクロマトグラム (2 ng/mL)

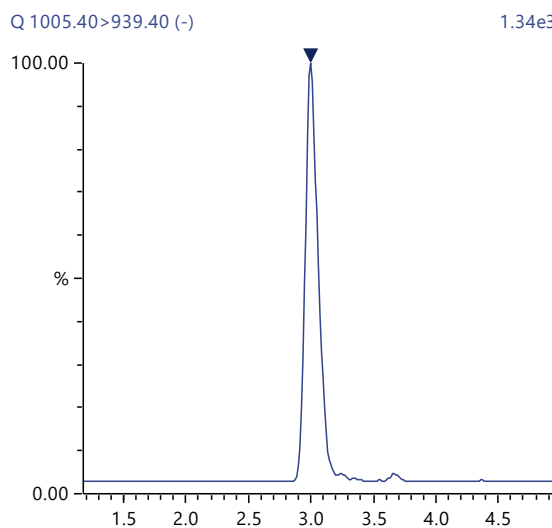


図6 ラット血漿サンプルのMRMクロマトグラム (2 ng/mL 添加)

表4 ラット血漿サンプルの添加回収試験結果

オキシトシン	2 ng/mL 添加
回収率	91.08%