SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No.C114

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた血漿中カテコールアミンの定量分析

High-Sensitivity Determination of Catecholamines in Plasma Using the LCMS-8060 Triple Quadrupole LC/MS/MS

カテコールアミンは主に脳，副腎髄質および交感神経に存在する生体アミンの総称です。臨床的には，ノルアドレナリン，アドレナリンおよびドーパミンの血漿中濃度が，心疾患や神経芽細胞腫などさまざまな疾患において変動することが知られており，迅速かつ高感度に測定できる方法が求められています。

ここでは，血漿中のカテコールアミン測定を効率化するための提案として，Biotage 社の EVOLUTE WCX を用いた多検体同時前処理と，感度と高速性に優れたトリプル四重極型質量分析計 LCMS-8060 による測定を組み合わせた，カテコールアミン 3 分画の一斉分析例をご紹介します。

A. Toyama

■標準溶液の MRM 測定およびマトリクス検量線の作成

MRM Analysis of Standards and Matrix Spiked Calibration Curves

高極性および高塩基性のカテコールアミンを保持分離するため，金属を含有させた逆相カラム Shimpack MAqC-ODS I を用いて MRM 測定を行った結果を Fig. 1 に示します。金属イオンを介した陽イオン交換モードにより，保持の弱いノルアドレナリンについても良好なピーク形状となりました。

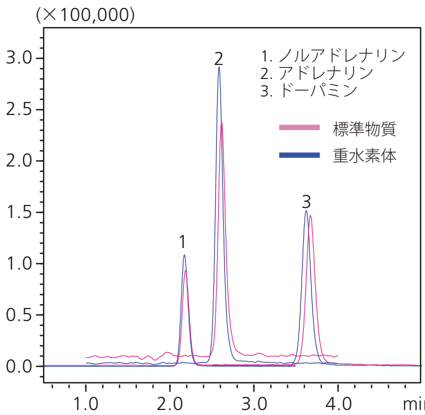

Fig. 1　カテコールアミン 3 分画のピーク検出例
Representative MRM chromatograms of 3 catecholamines

実際の定量分析では，重水素体を内部標準として 500 pg/mL の濃度で血漿に添加し，固相抽出操作を行い，分析に供します。

血漿マトリクスには内在性のカテコールアミンが含まれているため，実試料における定量下限の評価が難しくなっています。そこで，本来内部標準として一定量添加するノルアドレナリン，アドレナリンおよびドーパミンの重水素標識化合物（重水素体）を，あえて段階希釈し，マトリクス検量線を作成しました。

標識化合物を HPLC 移動相で段階希釈した標準サンプルと，市販ヒト血漿を固相抽出処理してから標識化合物を添加したサンプルとを，それぞれ MRM 測定に供した結果を Table 1 に示します。LCMS-8060 を用いた分析により，超低濃度のカテコールアミンであってもマトリクスの影響を受けずにピーク検出可能であることが示唆されました。

Table 1　標準溶液およびマトリクス添加試料の検量範囲
Quantitative range of neat and matrix-spiked calibration curves

化合物名	標準検量線		マトリクス検量線	
	検量範囲 (pg/mL)	寄与率 (r^2)	検量範囲 (pg/mL)	寄与率 (r^2)
ノルアドレナリン-d6 158.1 > 111.1	2.5 – 2000	0.9999	2.5 – 2000	0.9997
アドレナリン-d6 190.1 > 172.1	10 – 2000	0.9999	10 – 2000	0.9994
ドーパミン-d4 158.1 > 95.1	5 – 2000	0.9999	10 – 2000	0.9995

血漿試料における MRM クロマトグラムを Fig. 2 に示しました。

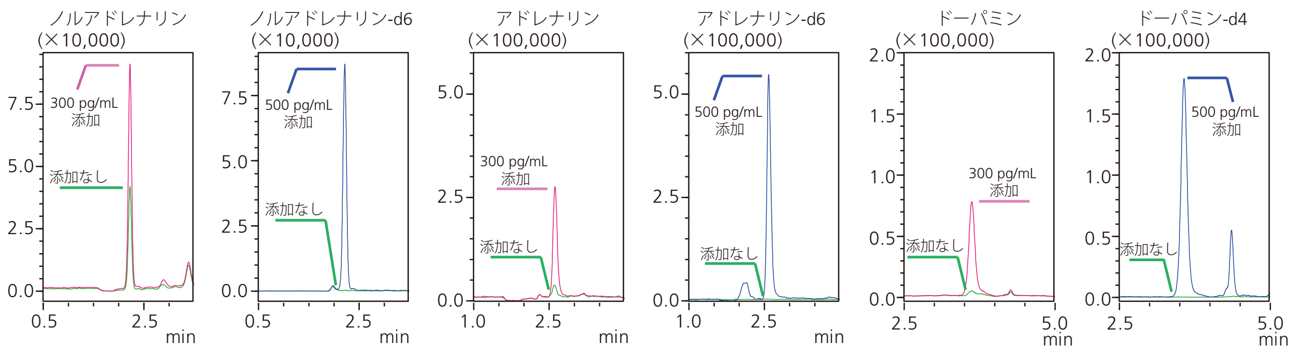

Fig. 2　血漿試料にスパイクしたカテコールアミン 3 分画および重水素体（内部標準）のピーク検出例
Detection of NE, EP and DA and their deuterated internal standards in plasma.

■ QC サンプルの分析

Analytical Performance of QC Samples

分析系の妥当性評価として，市販のヒト標準血漿に対して段階希釈したカテコールアミンおよび一定量の重水素標識化合物を添加し，前処理の後，LCMS-8060 による測定を行いました。

ブランクを差し引いた測定値をプロットしたマトリクス検量線からブランク試料中のカテコールアミン濃度を推定し，定量の再現性を評価した結果を Table 2 に示します。

Table 2　QC サンプルにおけるカテコールアミン 3 分画の定量正確さ
Catecholamine determination in QC samples

化合物名	添加濃度 (pg/mL)	測定値 (面積値比)	直線性 (r^2)	推定濃度 (pg/mL)	測定濃度 (pg/mL)	真度	測定間%RSD (n = 2)
ノルアドレナリン (152.1 > 107.1)	0	0.4969	0.9994	292.2	-	-	0.6 %
	18.1	0.4862		310.3	282.0	92.3 %	4.5 %
	72.5	0.6023		364.7	346.6	95.8 %	3.4 %
	300	1.0176		592.2	577.3	97.2 %	0.5 %
	600	1.5652		892.2	881.5	97.9 %	1.4 %
	1200	2.6390		1492.2	1478.1	97.6 %	0.1 %
アドレナリン (184.1 > 166.1)	0	0.1590	0.9986	52.2	-	-	1.2 %
	18.1	0.2056		70.3	66.3	94.4 %	2.4 %
	72.5	0.3947		124.7	123.7	99.2 %	3.7 %
	300	1.1140		352.2	341.8	97.0 %	0.7 %
	600	2.0267		652.2	618.5	94.8 %	3.9 %
	1200	4.2128		1252.2	1281.3	102.3 %	2.7 %
ドーパミン (154.1 > 91.1)	0	0.0223	0.9999	13.5	-	-	6.0 %
	18.1	0.0511		31.6	34.6	109.4 %	4.3 %
	72.5	0.1260		86.0	89.4	104.0 %	4.7 %
	300	0.4281		313.5	310.5	99.0 %	1.7 %
	600	0.8436		613.5	614.5	100.2 %	0.2 %
	1200	1.6754		1213.5	1223.2	100.8 %	0.1 %

■EVOLUTE WCX を用いた血漿試料の多検体同時前処理

High-Throughput Plasma Sample Preparation by EVOLUTE WCX

血漿中のカテコールアミンを測定するにあたり，妨害成分の影響をおさえて定量的に MS 検出するため，また，MS 装置の汚染を最小限にするために，除タンパク等の前処理を行う必要があります。このため，日々ルーチンで行うカテコールアミンの測定を効率化するためには，96 穴プレートのフォーマットで多検体を同時に前処理可能なシステムが必須といえます。

Biotage 社の EVOLUTE WCX は，陽イオン交換機能を主としたミックスモードによる固相抽出プレートで，撹拌や遠心分離等のオフライン作業が不要なため，短時間で簡便な前処理が可能になっています。これを用いた前処理プロトコルを Fig. 3 に示しました。

HPLC 条件

分析カラム	: Shimpack MAqC-ODS Ⅰ (150 mm × 2.0 mm, 5 μm)
移動相 A	: 0.1 % Formic acid in water
移動相 B	: 0.05 % Formic acid in methanol
タイムプログラム	: 1 %B. (0-0.5 min) → 50 %B. (3 min) → 99 %B. (3.1-7 min) → 1 %B. (7.1-12 min)
流速	: 0.2 mL/min.
注入量	: 5 μL
ポストカラム溶媒添加	: Mobile phase B at 0.2 mL/min

MS 条件（LCMS-8060）

インターフェイス電圧	: +0.6 kV
ネブライザガス流量	: 1.8 L/min
ドライングガス流量	: 3 L/min
ヒーティングガス流量	: 17 L/min
DL 温度	: 250 ℃
インターフェイス温度	: 250 ℃
ヒートブロック温度	: 400 ℃

Fig. 3　Biotage EVOLUTE WCX

Table 3　前処理プロトコル
Sample preparation protocol

血漿試料	市販ヒト標準血漿に対して，内部標準化合物の高濃度混合液を添加。さらに，血漿 300 μL を 50 mM 酢酸アンモニウム溶液（pH 7.0）300 μLと混合。
手順1	EVOLUTE WCX のウェルにメタノール 900 μLを添加。加圧により通液し，ウェルを洗浄する。
手順2	50 mM 酢酸アンモニウム溶液（pH 7.0）900 μL を添加。加圧により通液し，平衡化させる。
手順3	希釈済みの血漿試料 600 μL をウェルに添加。加圧により通液する。
手順4	10 %メタノール溶液 300 μL をウェルに添加。加圧により通液し，夾雑成分を洗い流す。
手順5	イソプロパノール 300 μL をウェルに添加。加圧により通液し，さらに夾雑成分を洗い流す。
手順6	5 %ギ酸・95 %メタノール溶液 1000 μL をウェルに添加。加圧により通液し，目的成分を溶出させる。
手順7	溶出液を窒素パージにより急速乾固させる。
手順8	0.1 %ギ酸溶液 150 μL により再溶解し，LCMS 分析に供する。

※本アプリケーションは研究用であり、本シート記載のデータも研究用に測定されたものです。

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
初版発行：2015年6月
島津コールセンター　0120-131691
(075)813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

3100-05502-480IK
2015.6