

Application News

No. C107

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた ビタミン D 代謝物の定量分析

Quantitative Analysis of Vitamin D Metabolite Using Triple Quadrupole LC/MS/MS

ビタミン D は脂溶性ビタミンの 1 種であり、体内でカルシウム代謝の調節を行うホルモンとして機能しています。加えて、筋力の維持、免疫機能の調節、血圧の調節といった多くの生理的な役割をもつことが報告されています。さらに、ビタミン D は細胞分化（細胞が特別な機能に分化する生物学的なプロセス）の調節を補う機能も果たしています。これらの生理学的な機能に起因して、ビタミン D は筋肉痛や筋力の低下、自己免疫疾患、高血圧、さらにはがん形成に対して関連があるとされています。

今回、ヒト血清中の 25-OH ビタミン D₂/D₃ を対象に、ISOLUTE® SLE+ で前処理し、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8050 を用いた分析を実施しました。

T. Minohata

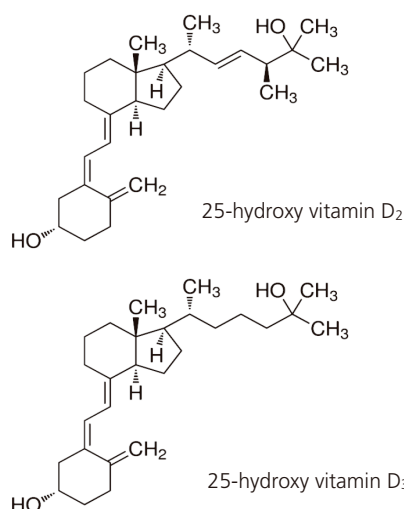


Fig. 1 ビタミン D 代謝物の構造
Structure of Vitamin D Metabolites

[サンプル処理メソッド]

1. サンプル前処理:

血清 100 μ L に内部標準溶液を含む精製水: イソプロパノール (1:1, v/v) 300 μ L を加え、10 秒間混合した。

2. サンプルロード:

固相プレートに前処理を行ったサンプル 400 μ L をロードし、加圧 (2~3 秒) することで導入した。5 分間静置し、珪藻土に吸収させた。

3. アナライトの溶出:

ヘプタン 700 μ L を加え静置した後、さらにヘプタン 700 μ L を加え、自然落下させた。5 分後、加圧することで完全に溶出した。

4. 抽出後の処理:

ガラスバイアルに溶出液を移し、40 $^{\circ}$ C で蒸発乾固した。100 μ L の溶媒 (33 % 移動相 A, 67 % 移動相 B, v/v) で再溶解後、遠心を行い、上清を新しいウエルプレートに移した。

Table 1 測定条件
Analytical Conditions

[LC] NexeraX2 System	
Column	: YMC Triart C18 (50 mm L. \times 2 mm I.D., 1.9 μ m)
Column Temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Mobile Phase A	: Water : Methanol : Formic Acid = 50 : 50 : 0.025
Mobile Phase B	: Methanol
Time Program	: 67 %B (0-1 min) - 67 %B-95%B (1-3 min) - 95 %B (3-4 min) - 67 %B (4-6 min)
Flow Rate	: 0.5 mL/min
Injection Volume	: 10 μ L
[MS] LCMS-8050	
Ionization	: ESI Positive
DL Temp.	: 150 $^{\circ}$ C
Block Heater Temp.	: 400 $^{\circ}$ C
Interface Temp.	: 180 $^{\circ}$ C
Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min
Drying Gas Flow	: 10 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min

血清中の 25-OH ビタミン D₂/D₃ についての検量線を Fig. 2 に示します。検量線の範囲は 2.4 ~ 150 ng/mL で 7 ポイント作成し、 $r^2 > 0.998$ で良好な直線性が得られました。さらに低濃度においても直線性が得られている事を確認しています。

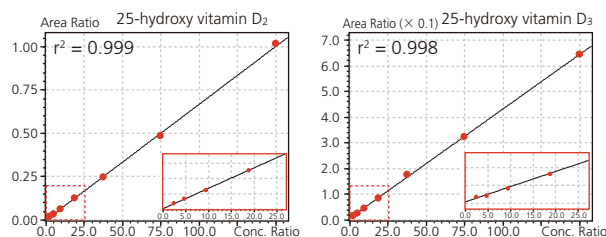


Fig. 2 25-OH ビタミン D₂/D₃ の検量線
Typical Calibration Curves for 25-OH Vitamin D₂/D₃

Table 2 ISOLUTE® SLE+ 処理とタンパク沈殿との比較
Comparison of ISOLUTE® SLE+ Treatment with Protein Precipitation

25-hydroxy vitamin D ₂					ISOLUTE® SLE+ treatment				Matrix Effect	Recovery
Level (ng/mL)	STD		Protein precipitation		Pre- spiked		Post- spiked			
	area	%RSD	area	%RSD	area	%RSD	Area	%RSD		
2.4	27,168	5.49	1,619	24.34	4,846	9.29	9,612	3.16	35 %	50 %
4.7	52,991	2.32	2,585	17.35	9,837	7.77	10,786	4.09	20 %	91 %
9.4	100,374	3.52	6,997	4.68	24,595	4.85	24,699	3.45	25 %	100 %
18.8	198,154	0.59	12,484	4.05	45,006	9.11	50,536	1.06	26 %	89 %
37.5	368,606	1.91	28,593	8.64	89,217	2.47	107,515	2.40	29 %	83 %
75	831,880	2.15	65,483	2.12	168,910	4.74	209,480	2.52	25 %	81 %
150	1,694,370	1.47	127,188	2.50	338,857	7.88	441,717	4.31	26 %	77 %
Average									27 %	82 %

25-hydroxy vitamin D ₃					ISOLUTE® SLE+ treatment				Matrix Effect	Recovery
Level (ng/mL)	STD		Protein precipitation		Pre- spiked		Post- spiked			
	area	%RSD	area	%RSD	area	%RSD	area	%RSD		
2.4	29,924	6.26	8,398	2.63	17,122	3.80	28,245	1.33	94 %	61 %
4.7	53,757	2.43	7,263	9.05	25,982	1.31	45,086	3.44	84 %	58 %
9.4	111,778	5.32	15,255	3.53	76,775	0.48	85,577	1.10	77 %	90 %
18.8	217,082	3.13	15,189	7.29	159,245	1.52	172,609	1.35	80 %	92 %
37.5	409,324	2.02	31,658	6.81	340,455	1.23	349,433	1.64	85 %	97 %
75	930,622	2.53	66,674	7.15	619,011	0.15	679,384	3.06	73 %	91 %
150	1,906,127	2.31	114,775	5.84	1,197,905	0.85	1,356,054	0.50	71 %	88 %
Average									81 %	82 %

Table 2 に 25-OH ビタミン D₂/D₃ についての ISOLUTE® SLE+ 処理とタンパク沈殿との比較結果について示します。ISOLUTE® SLE+ 処理した時の回収率は [pre-spiked] と [post-spiked] を比較することで決定しました。その回収率は 80 % 以上、RSD は 10 % 未満 (N=3) でした。

Fig. 3 にタンパク沈殿処理を行ったサンプル (A and B) と ISOLUTE® SLE+ を用いて処理を行ったサンプル (C and D) について、25-ヒドロキシビタミン D₂/D₃ (各 4.7 ng/mL) の MRM クロマトグラムを示しました。

ISOLUTE® SLE+ で処理することにより、タンパク沈殿と比較して効率的に抽出され、マトリックス効果を最低限に抑えることができ、より信頼性の高い定量を行うことが可能です。

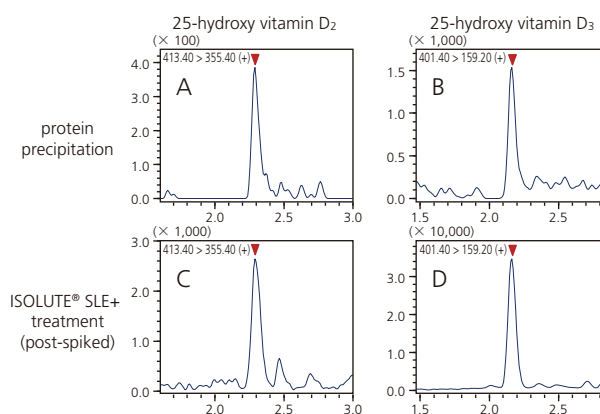


Fig. 3 ISOLUTE® SLE+ 処理とタンパク沈殿における 25-OH ビタミン D₂/D₃ の MRM クロマトグラムの比較
MRM Chromatograms of 25-OH Vitamin D₂/D₃ (Each 4.7 ng/mL)
Comparing ISOLUTE® SLE+ Treatment with Protein Precipitation

<謝辞>

本アプリケーションニュースは、バイオタージ・ジャパン株式会社のご協力により作成いたしました。深く感謝申し上げます。

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4月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691