



Supel™ Swift HLB固相カラムを用いた 血清試料のLC-MS分析

背景:

生体試料の調製は再現性と確度に大きな影響を及ぼすことがあります¹。固相抽出 (SPE) はイオンサプレッションなどのマトリックス効果を減少し、一貫した結果の信頼性確保に役立ちます。親水性疎水性バランス (HLB) SPEカラムは、親水性化合物に良好な水和性を与える吸着剤と、逆相保持における疎水性相互作用を提供する保持能を含んでいます²。これらの特性により、HLBカラムは様々な特性を持つ化合物を効率的に扱うことができます。本研究では、様々なlog P値(−0.89~4.65)を持つ牛血清からの化合物20種混合物をSupel Swift HLB固相カラムを用いて分析しました。

実験方法

表1と2に挙げた20種類の被分析物質と16種類の内部標準を牛血清に添加し、1時間エージングさせました。この牛血清試料を0.4%ギ酸水溶液で1:1に希釈した後、Supel Swift HLB固相カラム (1 mL/30 mg) または従来品のHLBカラム (1 mL/30 mg) へ試料をロードしました。

表1. 20種成分のLC-MS/MS分析結果とMS条件

	Analyte	Usage	Log P	Quantitative Transition	Qualitative Transition	Retention Time (min)	Collision Energy (V)	
1	Nizatidine	antacid	0.77	332.1/155.1	332.1/131.1	1.36	23.4	25.7
2	Amiloride	diuretic	-0.89	230.0/171.0	230.0/115.9	2.80	21	43
3	Benzoylcegonine	cocaine metabolite	-0.59	290.1/168.0	290.1/105.0	3.28	26.2	42
4	Imidacloprid	insecticide	0.87	256.0/208.9	256.0/175.0	4.16	22.3	22.4
5	Mirtazapine	antidepressant	3.21	266.2/195.1	266.2/166.9	4.60	33.9	60
6	Nevirapine	HIV antiviral	2.49	267.1/226.1	267.1/107.1	4.98	35.9	39.1
7	Methapyrilene	antihistamine	3.11	262.2/217.0	262.2/107.1	4.99	17	36
8	Imiquimod	anti-tumor	2.65	241.1/185.1	241.1/167.9	5.16	33.3	43.7
9	Buspirone	anxiolytic	1.78	386.2/122.0	386.2/95.1	5.36	39	65
10	Hydroquinidine	antiarrhythmic	2.82	327.3/172.2	327.3/160.2	5.40	52	42
11	Mesoridazine	neuroleptic drug	3.57	387.1/98.2	387.1/126.2	5.72	52	34
12	Mianserin	antihistamine	3.83	265.2/208.2	265.2/193.1	6.23	28.1	49.7
13	Haloperidol	antipsychotic	3.66	367.1/123.2	367.1/165.2	6.80	58.6	31.7
14	Imipramine	antidepressant	4.28	281.1/86.0	281.1/165.1	6.93	22	83
15	Atrazine	herbicide	2.2	216.1/174.0	216.1/68.0	7.13	22.4	50.4
16	Amitriptyline	antidepressant	4.81	278.1/191.0	278.1/233.2	7.17	31.8	22.5
17	Clarithromycin	antibiotic	3.24	748.5/590.1	748.5/158.0	7.50	24	32
18	Losartan	antihypertensive	4.06	423.2/207.2	423.2/235.2	7.50	33	22.7
19	Nefazodone	antidepressant	4.65	470.2/274.2	470.2/246.2	7.91	39.8	47.8
20	Loratadine	antihistamine	4.55	383.3/337.2	383.1/267.2	10.51	30	41.6

表2. 内部標準16種成分のLC-MS/MS分析結果とMS条件

	Internal Standard Analyte	Corresponding Analyte	Monitored Transition	Retention Time (min)	Collision Energy (V)
1	Not Applicable	Nizatidine	-	-	-
2	5-(N,N-dimethyl) amiloride	Amiloride	258.0/199.0	5.24	23
3	Benzoylecgonine-D3	Benzoylecgonine	293.1/171.0	3.28	26.2
4	Imiacloprid-D4	Imidacloprid	260.0/213.0	4.16	22.3
5	N-desmethylnortazapine	Mirtazapine	252.1/195.1	4.6	29
6	Abacavir	Nevirapine	287.2/191.1	3.56	26
7	Methapyrilene-dimethyl-D6	Methapyrilene	268.2/217.0	4.99	17
8	Not Applicable	Imiquimod	-	-	-
9	Buspirone-D8	Buspirone	384.2/122.0	5.36	39
10	Quinine	Hydroquinidine	325.2/172	5.12	52
11	Chlorpromazine	Mesoridazine	319.1/246.0	7.6	37
12	Mianserin-D3	Mianserin	268.2/208.2	6.23	28.1
13	Haloperidol-D4	Haloperidol	380.1/127.2	6.9	31.7
14	Imipramine-D3	Imipramine	284.1/89.0	6.93	22
15	Atrazine-D5	Atrazine	221.1/179.0	7.14	22.4
16	Amitriptyline-D3	Amitriptyline	281.1/191.0	7.17	31.8
17	Not Applicable	Clarithromycin	-	-	-
18	Not Applicable	Losartan	-	-	-
19	1-(3-Chlorophenyl)piperazine-D8 MCPD-D8	Nefazodone	205.2/157.8	4.21	37
20	Loratadine-D5	Loratadine	388.1/337.2	10.51	30

回収率およびイオンサプレッション／エンハンスメント

MRM法を用いて、被分析物質を定量および定性しました。試料は、マトリックスに適合させた校正曲線で分析しました。外部校正には、6種類の濃度（20～150 ng/mL）の被分析物質と、該当する場合は50 ng/mL濃度の内部標準液を用いました。牛血清に100 ng/mLの被分析物質と50 ng/mLの内部標準液を添加したものを3個

作製し、**図1**に示すような3ステップ法または5ステップ法で処理しました。試料を乾燥して開始移動相に再懸濁し、Sciex 3200 Q trap LC-MS/MSに接続したAgilent 1290 Infinity LCで2回分析しました。**表3**に、開始移動相を含むLC条件を列挙します。

図1. Supel Swift HLB (30 mg/1 mL) を用いた、5ステップ法と3ステップ法の手順

5ステップ法

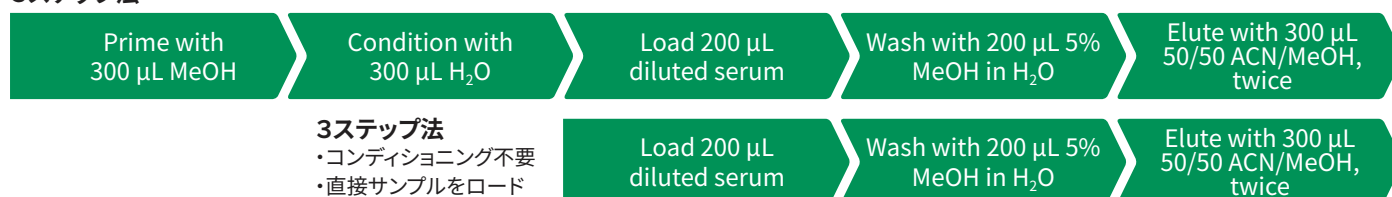


表3. LC-MS/MS測定条件

HPLCカラム:	Ascentis® Express Phase RP-Amide 2.7 µm particle size 10 cm x 2.1 cm
移動相溶媒	[A] 5 mM ammonium acetate, 0.1% acetic acid in water [B] 5 mM ammonium acetate, 0.1% acetic acid in 95% acetonitrile and 5% water
グラジエント条件:	95% A, 5% B held for 1 min; to 43% B in 6 min; held at 43% B for 1 min; to 61.5% B in 2 min, to 95% A and 5% B in 1 min, held for 3 mins.
流速:	0.4 mL/min
カラム温度:	40 °C
MS検出条件:	MS, ESI(+) Scheduled MRM (See Table 1 and 2)
注入量:	2 µL

リン脂質の除去

0.4%ギ酸水溶液で希釈した3つの牛血清を5ステップ法で処理しました。試料を乾燥した後、2つを開始移動相に再懸濁して分析に供しました。

SPEクリーンアップをしない場合と比較するため、希釈していない牛血清を3倍量のアセトニトリルと混合して20分静置した後、沈殿したタンパク質とリン脂質を遠心分離機で除去しました。

3つ作製した試料を乾燥後、乾燥前体積に対して2倍量の開始移動相に再懸濁させ、希釈牛血清と同じ濃度にして2つを分析に供しました。

表4には14種類のリン脂質とMS条件、表5には液体クロマトグラフィー条件を列挙します。図2に、被分析物質と内部標準のクロマトグラムを示します。

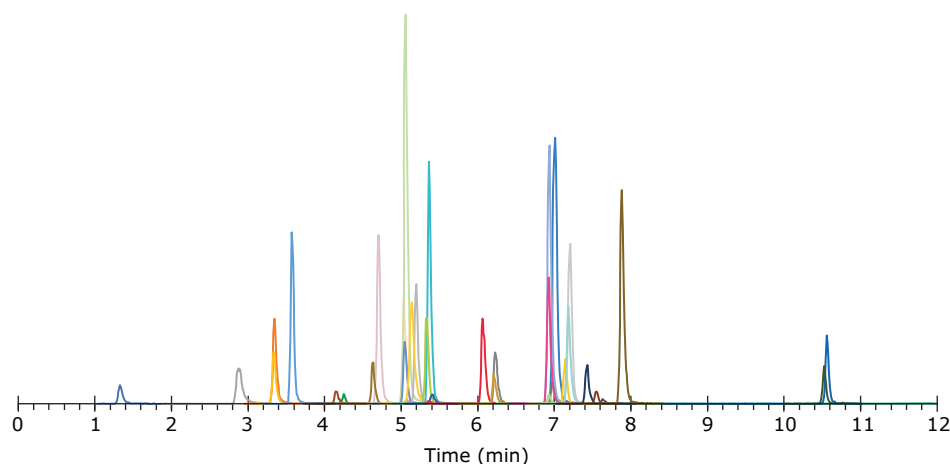
表4. 各リン脂質におけるMS条件

Phospholipid	Precursor	Product	Dwell Time (msec)	Collision Energy (V)
1	184	104	65	80
2	496	184	65	80
3	524	184	65	80
4	704	184	65	80
5	758	184	65	80
6	786	184	65	80
7	806	184	65	80
8	520.4	184	65	80
9	522.4	184	65	80
10	782.6	184	65	80
11	810.7	184	65	80
12	760.4	184	65	80
13	784.4	184	65	80
14	808.4	184	65	80

表5. LC-MS/MS測定条件

HPLCカラム:	Ascentis® Express C18 2.7 µm particle size, 5 cm x 2.1 mm
移動相溶媒	[A] 5 mM ammonium formate in 90:10 (v/v) methanol/water
分析時間:	アイソクラテックで 30分
流速:	0.5 mL/min
カラム温度:	40 °C
検出器:	MS, ESI(+) Scheduled MRM (See Table 3)
注入量:	2 µL

図2. 5ステップ法にて処理した分析サンプルと内部標準物質測定結果



結果と考察

表6と図3に、Supel Swift HLBの3ステップ法と5ステップ法の両方で処理したときの回収率を示します。回収率は3ステップ (85.1 ± 4.2%) より5ステップ (100.7 ± 6.8%) の方がわずかに高くなりましたが、その理由の1つは2種類の成分 (アミロライドとニザチジン、い

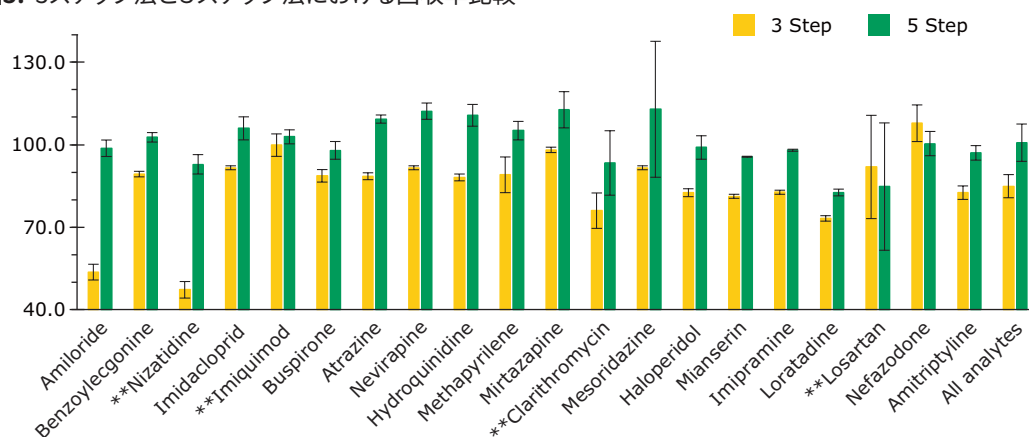
れも3ステップ法では回収率が70%未満) が早期に溶出したためです。5ステップ法では、20種類の被分析物質すべての回収率が80%と120%の間でした。3ステップ法を用いた被分析物質の80% (20種類中16種類) が80%~120%の回収率を達成しました。

表6. 3ステップ法と5ステップ法における回収率比較

	5 Step		3 Step	
	AVE	RSD	AVE	RSD
Amiloride	98.7	3.0	53.6	2.9
Benzoylcegonine	102.7	1.7	89.3	1.0
* Nizatidine	92.9	3.5	47.2	3.0
Imidacloprid	105.9	4.2	91.6	0.7
* Imiquimod	102.9	2.5	96.9	4.1
Buspirone	97.9	3.2	88.7	2.3
Atrazine	109.3	1.5	88.5	1.3
Nevirapine	112.2	3.0	98	3.4
Hydroquinidine	110.7	4.0	88.1	1.2
Methapyrilene	105.1	3.4	89	6.5
Mirtazapine	112.7	6.6	98.1	1.0
*Clarithromycin	93.4	11.7	76	6.4
Mesoridazine	112.9	24.7	91.6	0.7
Haloperidol	99	4.3	82.5	1.4
Mianserin	95.6	0.2	81.2	0.7
Imipramine	98	0.4	82.7	0.7
Loratadine	82.6	1.2	73.2	1.0
*Losartan	84.8	23.2	91.9	18.8
Nefazodone	100.4	4.4	107.8	6.7
Amitriptyline	97	2.6	82.5	2.5
All analytes	100.7	6.8	85.1	4.2

*No internal standards used, represent absolute recoveries.

図3. 3ステップ法と5ステップ法における回収率比較



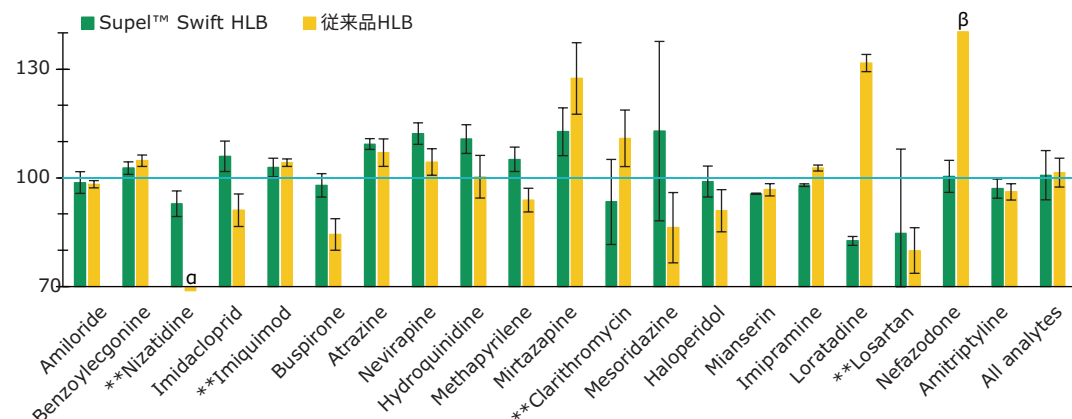
** Analytes did not have an internal standard.

Supel Swift HLB固相カラムの性能評価に加えて、従来品HLB固相カラムとの性能比較を実施しました。いずれのカラムにも30mgのポリマー充填剤が入っており、最大サンプル体積は1 mLです。これらカートリッジの効率を比較するために、同じ被分析サンプルと分析条件の組み合わせに基づいた5ステップ法を採用しました。

図4と表7に、2種類のHLB固相カラムを使用したときの回収率を示します。前述のように、Supel Swift HLBを使用したときは、すべての被分析物質の回収率が80～120%の範囲にありました。対照的に、従来品HLBカラムで80～120%の回収率を示したものは80% (20種類の被分析物質中16種類) でした。

図4. 5ステップ法における従来品HLBとの回収率比較結果

※分析サンプルは右へ行くほどLog Pが大きくなっていきます



** Analytes did not have an internal standard.

α/β Commercially Available HLB (not shown, off scale): Nizatidine: 18.7 ± 1.3% and Nefazodone: 199.4 ± 16.8%

表7. 5ステップ法における従来品HLBとの回収率比較結果

※分析サンプルは下へ行くほどLog Pが大きくなっていきます

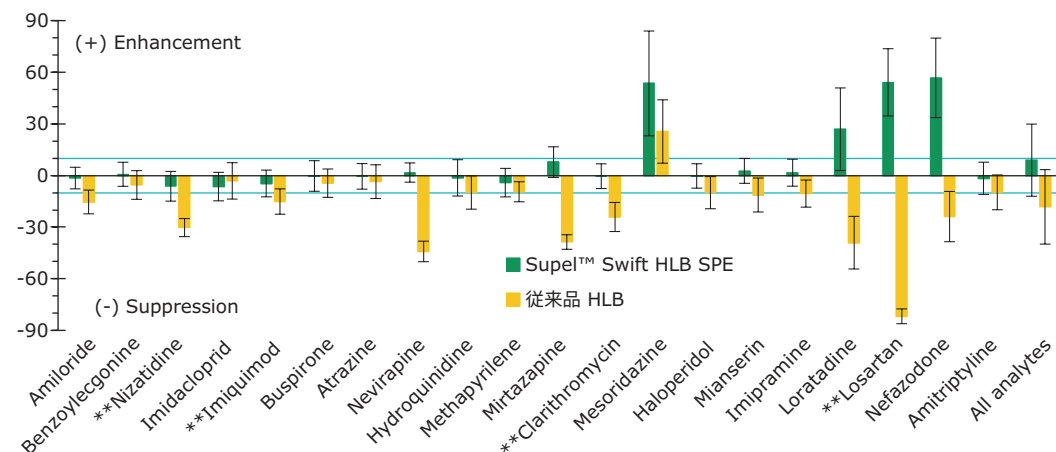
	Supel Swift HLB SPE cartridges		Commercially Available HLB product	
	AVE	RSD	AVE	RSD
Amiloride	98.7	3	98.2	1.0
Benzoylcegonine	102.7	1.7	104.7	1.6
*Nizatidine	92.9	3.5	18.7	1.3
Imidacloprid	105.9	4.2	91.1	4.5
*Imiquimod	102.9	2.5	104.2	1.0
Buspirone	97.9	3.2	84.4	4.4
Atrazine	109.3	1.5	107.0	3.8
Nevirapine	112.2	3	104.4	3.7
Hydroquinidine	110.7	4	100.3	5.9
Methapyrilene	105.1	3.4	93.9	3.3
Mirtazapine	112.7	6.6	127.4	9.9
*Clarithromycin	93.4	11.7	110.9	7.8
Mesoridazine	112.9	24.7	86.2	9.7
Haloperidol	99	4.3	90.9	5.8
Mianserin	95.6	0.2	96.7	1.7
Imipramine	98	0.4	102.7	0.8
Loratadine	82.6	1.2	131.7	2.4
*Losartan	84.8	23.2	80.0	6.3
Nefazodone	100.4	4.4	199.4	16.8
Amitriptyline	97	2.6	96.1	2.3
All analytes	100.7	6.8	101.4	4.0

*No internal standards used, represent absolute recoveries.

SPEを実施する上で考慮すべき重要な因子は、イオンサプレッションおよび／イオンエンハンスメントの影響です。これらマトリックス効果は、固相カラムがマトリックス成分（この場合は牛血漿からのもの）をいかにうまく除去できたかを示す指標です。図5に示すように、Supel Swift HLBで処理した被分析物質の80%（20種類中16種類）で、被分析物質のイオン化に対する影響が最小限（+/-10%）に抑えられました。被分析物質の残り20%（20種類中4種類）では

イオンエンハンスメントのみ観察され、イオンサプレッションは観察されませんでした。これは、被分析物質の70%（20種類中14種類）で10%を超えるイオンサプレッション（14種類中13種類）またはイオンエンハンスメント（14種類中1種類）が見られた、従来品HLBカラムとは対照的でした。Supel Swift HLBは、従来品HLB固相カラムと比べてマトリックス効果が少ないことが示されました。

図5. 5ステップ法における、従来品HLBとのマトリックス効果



** Analytes did not have an internal standard.

2種類のHLBカラムで行った本試験では、SPE前処理手順で除去されたリン脂質の量を、アセトニトリルを用いたタンパク質沈殿と比較しました。表8、図6に示すように、Supel Swift HLB固相カラム

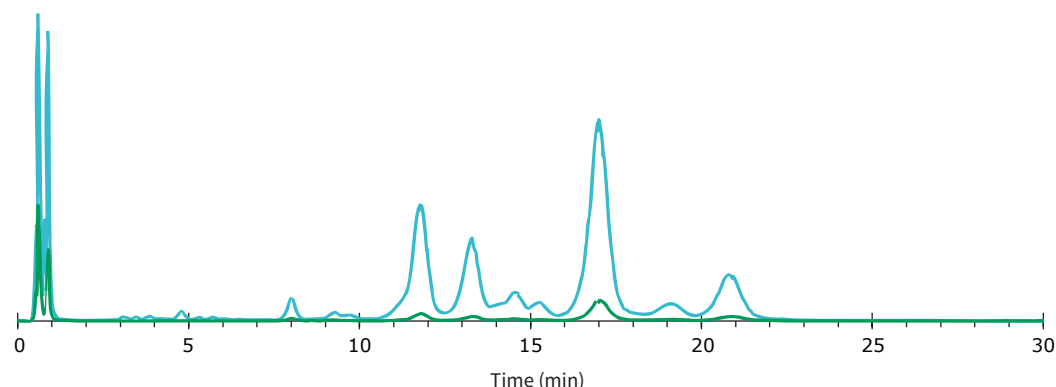
は、従来品（89.5%）と同様の91.8%というリン脂質除去率を示しました。

表8. 5ステップ法における、従来品HLBとのリン脂質除去率比較

	Supel Swift HLB	従来品HLB
% Phospholipid Removal	91.8%	89.5

図6. リン脂質除去効率を示すクロマトグラム

※ Supel Swift HLB(緑)、タンパク沈殿(青)



結論

Supel Swift HLB固相カラムは様々なlog P値を持つ20種類の被分析物質において優れた回収率(すべての被分析物質で80~120%の範囲)と、被分析物質の80%で最小のイオンエンハンスメント効

果を示しました。さらに、同じ一連の条件で従来品HLBと比較したときのSupel Swift HLBのメリットも示されました。

Materials

カタログ番号	Description
C-112-1mL	1-(3-Chlorophenyl)piperazine-D8 hydrochloride solution
Z336777	3000 count 1.5 mL microcentrifuge tubes
27001-U	4 mL amber vial
A4562	5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride
PHR1256	Abacavir sulfate
45754	Acetic Acid for HPLC
34851	Acetonitrile LC-MS
A-7410	Amiloride
A-8404	Amitriptyline hydrochloride
A-121-1ML	Amitriptyline-D3 hydrochloride solution
73594	Ammonium Acetate for mass spectrometry
70221	Ammonium Formate eluent additive for LC-MS
53913-U	Ascentis Express Phase RP-Amide 2.7 μ m particle size 10 cm x 2.1 cm
53822-U	Ascentis® Express C18, 2.7 μ m HPLC Column
90935	Atrazine
34053-R	Atrazine-D5
B-044-1ML	Benzoyllecgonine solution 1 mg/mL
B-008-1ML	Benzoyllecgonine-D3
B-055-1ML	Buspirone-D8 hydrochloride solution 100 ug/mL
PHR1038-500MR	Clarithromycin
57493-U	Supel™ Swift HLB SPE, weight 30 mg (bed), volume 1 mL, pk of 108 ea

カタログ番号	Description
57059	Disposable Liners for Visiprep DL Manifolds, pk of 100
H1512	Haloperidol
H-002	Haloperidol-D4 solution
358343-5G	Hydroquinidine
34170	Imidacloprid-d4
I7379	Imipramine hydrochloride 5g
I-903-1ML	Imipramine-D3 maleate solution
PHR1376	Loratadine
646377	Methanol HPLC Plus
442641	Methapyrilene hydrochloride 1000 mg
M2525	Mianserin Hydrochloride
M-901-1ML	Mianserin-D3 solution 100 ug/mL
M-128	Mirtazapine solution 1 mL of 1 mg/mL
23187-U	MRQ30 Clear CD Vial™, Blue cap, Pre-slit TEF/Silicone septa, volume 1.2 mL, clear glass vial, thread 9 mm pkg of 100 ea
D-086-1ML	N-DesmethyImirtazapine solution 1 mg/mL
N5536-10MG	Nefazodone Hydrochloride
57146-U	Visiprep Smanifold Replacement Flow Control Valve Stem
57030-U	Visiprep SPE Vacuum Manifold, standard 12-port model

References

- Andrade-Eirola, A. et al (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). Trends in Analytical Chemistry, 641-654. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.track.2015.08.015
- Michopoulos, F. L. et al (2009). UPLC-MS-Based Analysis of Human Plasma for Metabonomics Using Solvent Precipitation or Solid Phase Extraction. Journal of Proteome Research, 2114-2121. doi:https://doi.org/10.1021/pr801045q

Supel Swift HLB SPE製品ページはこちら bit.ly/supelswifthlb



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格(税別)です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年12月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Supelco are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit No. MK_AN6308EN.

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報ははこちら www.sigmaaldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: sialjpcs@merckgroup.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

AAM081-2012-pdf-E