

血清中 zolmitriptan の LC-MS/MS による分析

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

キーワード

zolmitriptan (ゾルミトリプタン)、diphenhydramine (ジフェンヒドラミン)、SOLA、SOLA SCX、Hypersil GOLD

概要

このアプリケーションノートでは、血清中 zolmitriptan の抽出および LC-MS/MS による測定方法をご紹介します。定量下限値は 1 ng/mL が得られ、Thermo Scientific™ SOLA™ SCX 固相抽出カートリッジを用いた場合は、平均回収率 88.2% が得られました。この固相抽出製品は、試料を効率的かつ再現性良く処理できる特長があります。この測定では Thermo Scientific Hypersil GOLD™ 1.9 μm UHPLC カラムを使用したため、分析時間はわずか 2 分でした。測定した濃度範囲は 1 ~ 100 ng/mL で、直線性は $r^2 = 0.996$ 、真度は $\pm 15\%$ でした。

はじめに

zolmitriptan は偏頭痛の治療に使用されている薬です。トリプタン系の偏頭痛薬の一つで、選択的な受容体刺激薬です。

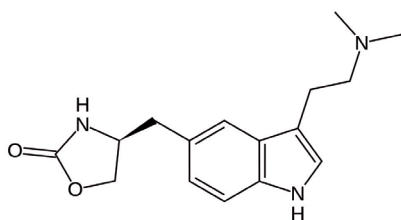
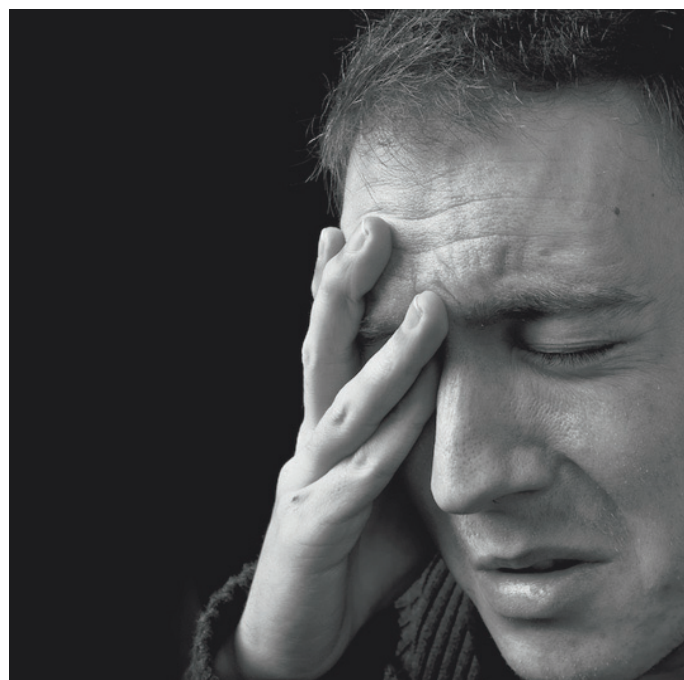


図1: zolmitriptan の構造

SOLA 固相抽出製品は次世代の固相です。先進的な技術で製造されており、従来の固相、リン脂質や除タンパクプレートと比較して、非常にクリーンな抽出を実現します。

この製品の特長

- ・高い再現性
- ・抽出物が非常にクリーン
- ・抽出時に使用する有機溶媒を削減
- ・高感度



臨床研究分野では、ミスをできるだけ少なくし、抽出時の有機溶媒を削減し、少ないサンプルをハイスループット分析することが求められています。このような分析に適している SOLA でサンプルの前処理を行うことで、分析データに自信を持っていただけます。また使いやすく、複雑なメソッド開発を必要としないため、コストの削減が期待できます。

Hypersil GOLD 1.9 μm UHPLCカラムは、高純度シリカを基材としたカラムです。良好なピーク形状を示すため、従来のシリカ基材のカラムで対称的なピーク形状が得られない場合などに特に適しています。またHypersil GOLDカラムでは、C18カラムと同様の選択性が得られます。Hypersil GOLD 1.9 μm UHPLCカラムで良好なピーク形状が得られるため、高分離、高い選択性、良好な真度、ピークキャパシティの増加が期待できます。1.9 μm の粒子径のカラムは、3 μm や5 μm のものと比較して、最適な線速度の範囲が広がっています。このため、速い流速でも分離を犠牲にすることなく測定できます。またHypersil GOLDカラムは、対称的なピークと真度が得られるように結合相が最適化されています。

SOLA SCXカートリッジとHypersil GOLD UHPLCカラムを用いて、血清中zolmitriptanの高速分析を行いました。分析に要した時間は、2分でした。

実験

消耗品	製品番号
Fisher Scientific™ LC/MS グレード メタノール	M/4062/17
Fisher Scientific LC/MS グレード水	W/0112/17
Fisher Scientific LC/MS グレード アセトニトリル	A/0638/17
Fisher Scientific Analytical Reagent grade formic acid 98/100%	F/1900/PB08
Fisher Scientific HPLC grade ammonia solution	A/3295/PB05
zolmitriptan, LGC standards	
diphenhydramine, Sigma-Aldrich®	
Serum	
SOLA SCX 10 mg/1 mL	60109-002
Hypersil GOLD 1.9 μm , 50 x 2.1 mm	25002-052130
Thermo Scientific Convenience kit, 8-425 standard opening clear screw vial, black cap, white Silicone/ red PTFE seal	60180-600

リキッドハンドリング	製品番号
Thermo Scientific FinnPipette™ (100~1000 μL)	4642090
Thermo Scientific FinnPipette (10~100 μL)	4642070
Thermo Scientific FinnPipette (1~10 μL)	4642040

試料溶液調製手順	製品番号
化合物名:	zolmitriptan, diphenhydramine (IS)
マトリックス:	血清
標準試料原液:	zolmitriptan 1 mgにメタノール1 mLを添加して溶解 diphenhydramine 1 mgにメタノール1 mLを添加して溶解

サンプル前処理手順

血清180 μL に標準試料溶液10 μL と内標準試料溶液10 μL を添加。これに、0.1%ギ酸水溶液200 μL を添加して、ボルテックス。14,000 rpmで10分間遠心。

固相抽出手順	製品番号
固相:	SOLA SCX 10 mg/1 mL 60109-002
コンディショニング:	メタノール500 μL を固相に添加
平衡化:	2.5%ギ酸水溶液500 μL を固相に添加
サンプルロード:	試料溶液を固相に添加
洗浄1:	2.5%ギ酸水溶液500 μL を固相に添加
洗浄2:	0.1%ギ酸含有メタノール溶液を添加
溶出:	5%アンモニア含有メタノール250 μL を2回添加
濃縮:	窒素雰囲気下で濃縮乾固。水200 μL を添加して軽くボルテックスした後、5分間超音波を照射して溶解

分析条件		製品番号
LCシステム：	Thermo Scientific Dionex™ UltiMate™ 3000 システム	
カラム：	Hypersil GOLD 1.9 μm、50 x 2.1 mm	25002-052130
移動相A：	0.1%ギ酸水溶液	
移動相B：	0.1%ギ酸含有アセトニトリル	
流速：	1 mL/min	
グラジエント：	時間	%A %B
	0	95 5
	1	5 95
	1.5	5 95
	1.6	95 5
	2	95 5
カラム温度：	60 ℃	
注入量：	10 μL	
洗浄液：	アセトニトリル／水 (50：50, v/v)	

MS測定条件

装置:	Thermo Scientific TSQ Vantage™ MS
MS/MSランタイム:	2.5 min
イオン化条件:	APCI Positive
放電電流:	4 µA
ベーパーライザー温度:	350 °C
シースガス圧:	60 arb
イオンスイープガス圧:	0 arb
補助ガス圧:	40 arb
キャピラリー温度:	270 °C
モニターイオン:	表1

表1: プリカーサーイオンおよびプロダクトイオン

化合物	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	コリジョン電圧 (eV)	RF-レンズ (V)
zolmitriptan	288.2	182.2	22	74
diphenhydramine (IS)	256.2	167.2	11	49

スキャン時間:	0.02 s
Q1 ピーク幅:	0.70 FWHM
Q3 ピーク幅:	0.70 FWHM
Q2 ガス圧:	1.5 mTorr
Chrom Filter:	5 s

データ解析

ソフトウェア:	Thermo Scientific LCquan™ ソフトウェア, version 2.6
---------	---

結果

Hypersil GOLD 1.9 μ m UHPLCカラムを使用して、良好なピーク形状が得られました。図2はMQC (15 ng/mL)のクロマトグラムです。

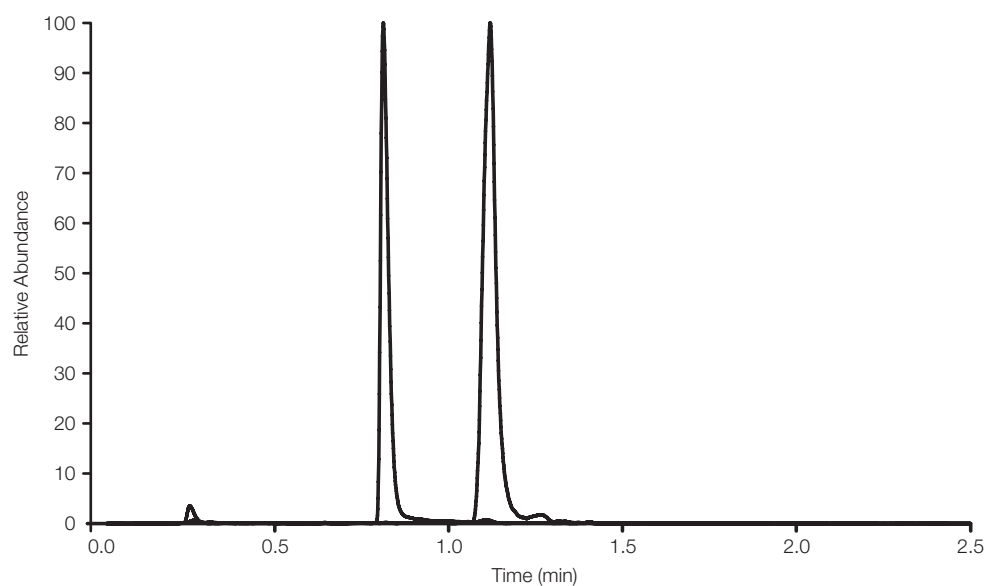


図2: zolmitriptanと diphenhydramineの15 ng/mLにおけるクロマトグラム

直線性

図3および表2で示すように、血清から抽出した zolmitriptanから良好な直線性が得られました。濃度 1 ～ 100 ng/mLの範囲で、 $r^2=0.9955$ が得られました。

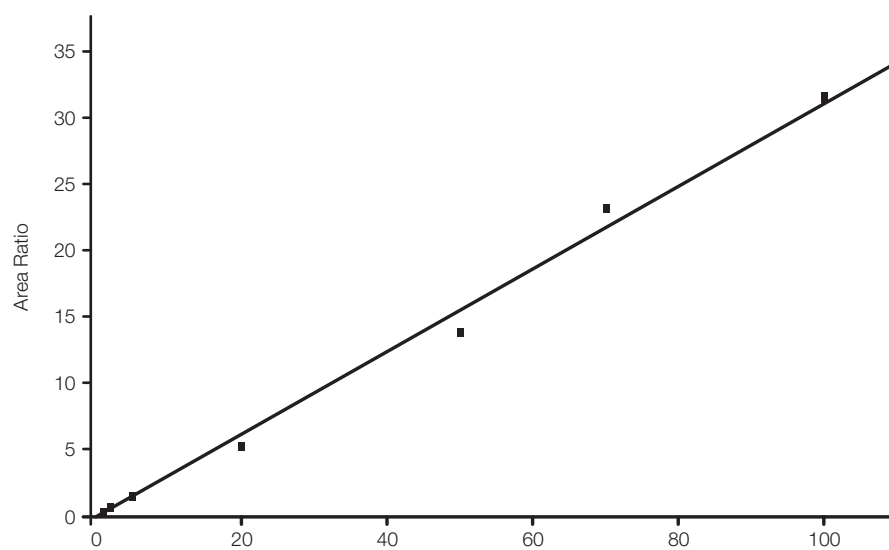


図3: zolmitriptanの濃度1 ～ 100 ng/mLにおける検量線

表2: zolmitriptan濃度1 ～ 100 ng/mLにおける真度

検量線用標準試料溶液	濃度 (ng/mL)	濃度 (計算値、ng/mL)	%Diff
S1 (注入2回の平均値)	1	1.03	4
S2	2	2.25	13
S3	5	4.75	-5
S4	20	17.1	-14
S5	50	44.6	-11
S6	70	74.8	7
S7 (注入2回の平均値)	100	101	1

真度および精度

表2で示すように、1 ～ 100 ng/mLの範囲で、±15 %以内の真度が得られました。

表3で示すように、3.5、15、60 ng/mLのQCサンプルを6回注入した結果、精度は<7.5 %が得られました。

表3: 6回注入における平均精度

試料	濃度 (ng/mL)	濃度 (計算値、6回注入の平均値)	%CV
LQC	3.5	3.90	3.4
MQC	15	16.7	3.5
HQC	60	66	7.4

回収率

表4で示すように、3.5、15、60 ng/mLのQCサンプルを注入した結果、回収率の平均は88.2 %となりました。

表4: zolmitriptanと diphenhydramineの回収率

化合物	QCサンプル	面積値	%回収率	%回収率 (平均)
zolmitriptan	LQC A	18880.2	91.7	88.2
	LQC B	20588.8		
	MQC A	86579.5	91.4	
	MQC B	94769.2		
	HQC A	342945.6	81.5	
	HQC B	420674.4		
diphenhydramine	IS A	16923.7	79.1	
	IS B	21382.9		

A: マトリックスに標準試料溶液を添加して処理

B: マトリックスを処理した後に標準試料溶液を添加

%回収率 = $A/B \times 100$

まとめ

- ・SOLA SCX SPEおよびHypersil GOLD 1.9 μ m UHPLCカラムを用いて、血清中のzolmitriptanの定量を行いました。
- ・SOLA SCX SPEを用いて、再現性良く抽出を行うことができました。
- ・1 ng/mLの血清中zolmitriptanを測定できました。
- ・回収率の平均は>88%でした。
- ・6回注入における精度は<7.5%でした。

©2013 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転載を禁じます。

ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標、登録商標です。

ここに記載されている内容は、予告なく変更することがあります。詳細については、販売代理店にお問い合わせください。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
分析機器・消耗品に関するお問い合わせはこちら

 TEL 0120-753-670 FAX 0120-753-671

〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町3-9

E-mail: Analyze.jp@thermofisher.com

www.thermoscientific.jp

販売店

E1501

Thermo
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand