

乾燥血漿スポットティングを使用した アミトリプチリン、フルオキセチン、 セルトラリンの分析

アプリケーションノート

医薬品

著者

William Hudson

Ben Yong

Paul Boguszewski

はじめに

近年、乾燥血液スポットティング (DBS) が医薬品ラボで広く使用されるようになっていきます。最近の薬品業界では、新規化学成分の前臨床および臨床試験が注目を集めており、その結果、医薬品企業は、新しい対象化合物のサンプル保管や血液サンプル分析に DBS を使用するようになりました。従来の生体分析は常に血漿で行われてきましたが、患者に関する薬物分析で血液か血漿かどちらが最適な選択であるかについては議論の分かれるところでもあります。

乾燥血液スポットティングカードは一般に血液に使用されていますが、その他の生体液も非セルロースカードにスポットし、LC-MS/MS で分析することができます。乾燥血漿スポットは、保管に広いスペースが必要な冷蔵血漿よりも保管に便利で、サンプルの安定性も冷蔵保存よりも優れています。15 μ L の血漿を紙の上にスポットし、2 時間以上乾燥させます。

スポットから 2~4 mm のコアをくり抜き、次に溶媒を使用して対象化合物を脱着させ、LC-MS/MS で分析します。



Agilent Technologies

実験方法

クエチアピン、アミトリプチリン、セルトラリン、フルオキセチンの4つの対象化合物を選択しました。フルオキセチン-D6は内部標準として容易に使用できるため、すべての化合物に対して使用しました。回収率の精度と確度を、キャリブレーション標準の線形回帰に基づいて計算しました。中レベル (5.0 ng/mL) と高レベル (500 ng/mL) のサンプルで行いました。

3 mm のディスクをくり抜き、96 ウェルコレクションプレートに入れました。

80 % メタノールに溶解した 300 μ L の 0.1 % ギ酸 (0.66 ng/mL の重水素化内部標準混合液を含む) を各ウェルに加え、撹拌しました。

サンプルを蒸発乾固させ、100 μ L の移動相に再溶解しました。

LC/MS の条件

カラム	Agilent Poroshell 120 EC C18、 3.0 mm x 50 mm、2.7 μ m
移動相	A : 0.1% ギ酸水溶液 B : アセトニトリル
ポンププログラム	流量 200 μ L/min
t_0	A : 50 %、B : 50 %
$t_{1.5-2.0}$	A : 10 %、B : 90 %
$t_{2.01-3.00}$	A : 50 %、B : 50 %
分析時間	3:00 分間
ガス温度	350 $^{\circ}$ C
ガス流量	10 L/min
ネブライジング	20 psi

化合物	Q1 イオン	プロダクトイオン	CE
クエチアピン	384.0	253.1	18 V
アミトリプチリン	278.2	105.1	22 V
セルトラリン	306.1	159.01	26 V
フルオキセチン	310.1	163.0	26 V
フルオキセチン-D6	316.1	154.1	2 V

結果と考察

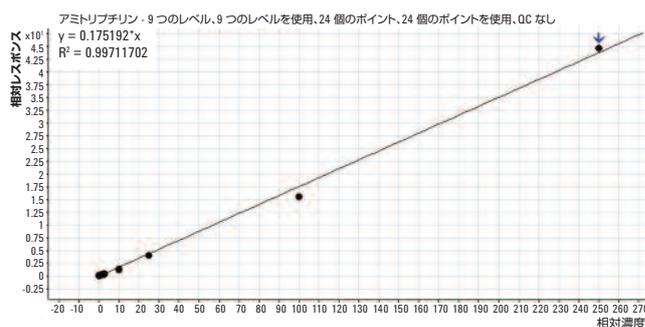
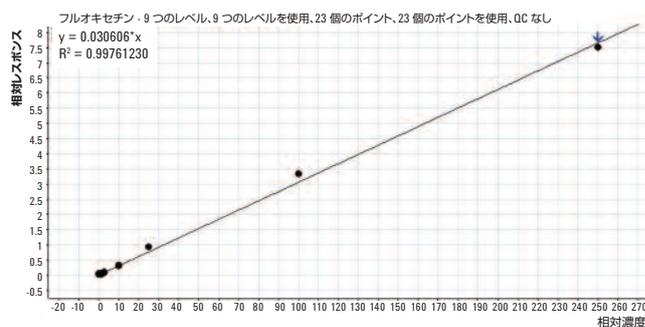
スポット面積

スポット面積は、乾燥血液スポットで懸念される点です。セルロース系カードでは、20~80 のヘマトクリットレベルによりスポットサイズが最大で 40 % 変動することがあります。本研究での血漿スポット面積は、ヘマトクリット 45 の血液スポットよりも 11 % 小さく、HCT 80 の血液スポットよりも 19 % だけ小さくなりました。

検量線

1 mL のヒト血液に、それぞれ 10 μ L の標準溶液をスパイクし、0.5、1.0、2.0、5.0、20、50、200、および 500 ng/mL の検量線を作成しました。これらの各標準の 15 μ L を DMS カードにスポットしました。

一次回帰を使用したところ、相関係数は 0.995 を超え、良好な直線性を示しました。



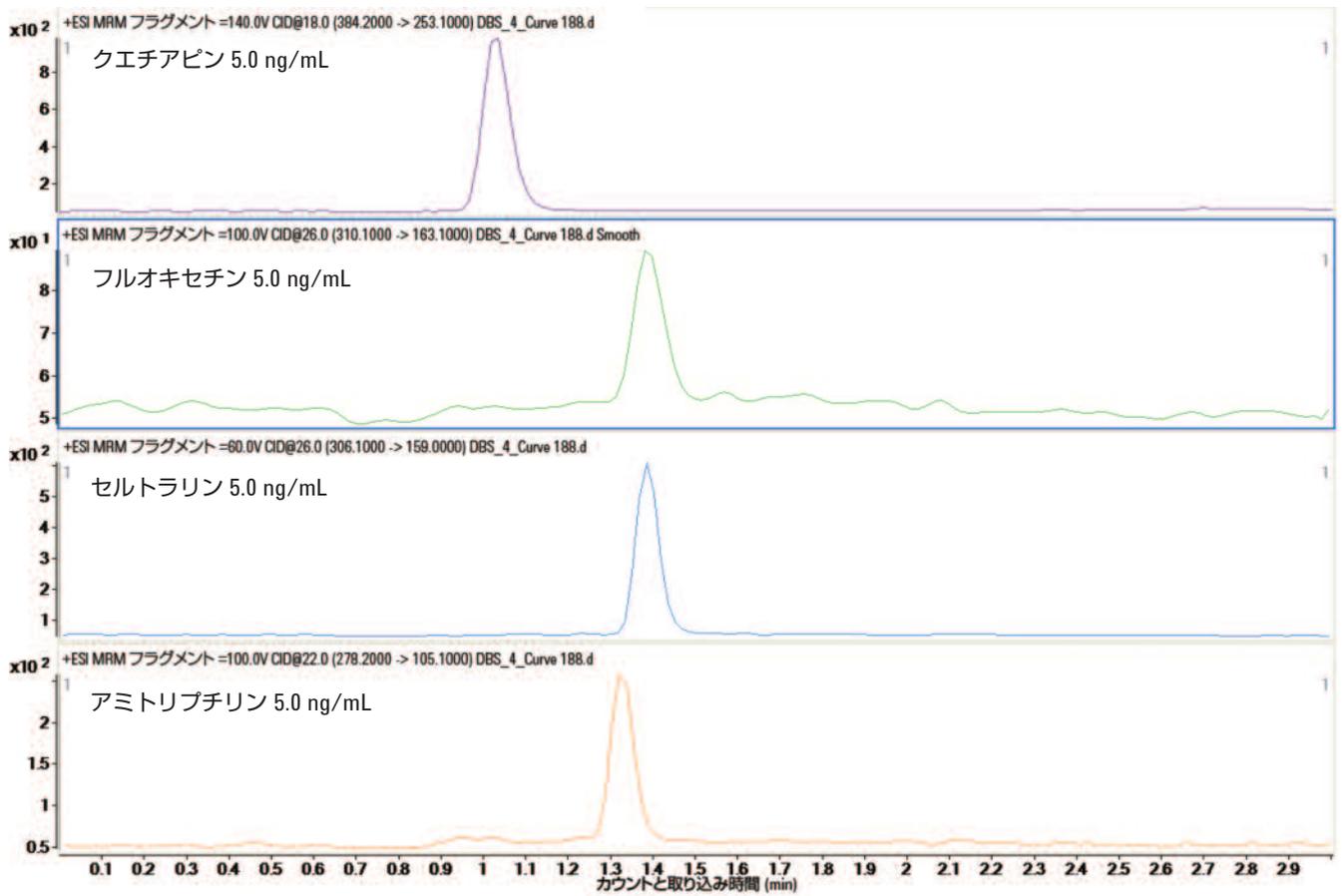
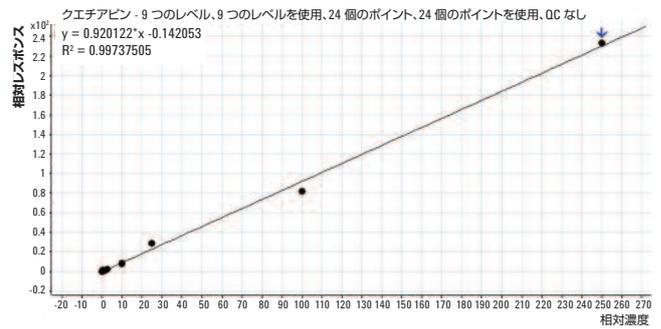
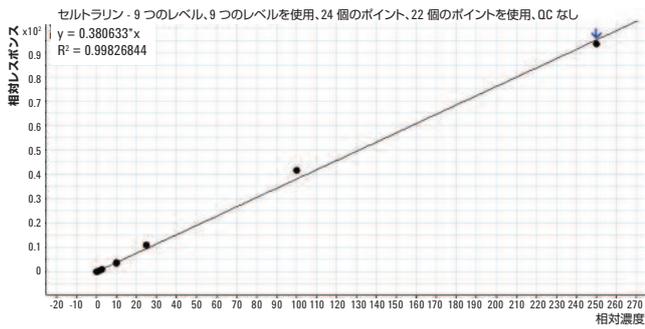


図 1. 中レベル抽出血液サンプルのクロマトグラム

対象化合物の回収率を一次回帰検量線に基づいて計算しました。
RSD は 8 回の繰り返しに基づく値です。

対象化合物の回収率 (n=6)

化合物	5.0 ng/mL		500 ng/mL	
	回収率	RSD	回収率	RSD
クエチアピン	98 %	7 %	94 %	4 %
アミトリプチリン	103 %	8 %	94 %	7 %
フルオキセチン	97 %	7 %	99 %	2 %
セルトラリン	106 %	5 %	98 %	2 %

結論

血漿中の 4 つの化合物の脱着と LC-MS/MS による分析に成功しました。Agilent 1290 LC システムと Agilent 6460 トリプル四重極質量分析装置を使用したところ、良好な検出レベルを達成しました。直線性は一次回帰を使用して示し、相関係数は 0.995 を超えました。相対的な回収率は真値の 10 % 以内、RSD は 10 % 未満でした。DBS が、血漿サンプルを保管し、不要なすべてのタンパク質を除去するための有効な方法であり、LC-MS/MS 分析前のサンプル前処理を簡単にできるアプローチであることが証明されました。

詳細情報

Bond Elut DMS カードは、DMPK/ADME の研究アプリケーション用です。診断手順で使用しないでください。

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Printed in Japan
May 27, 2011
5990-8169JAJP



Agilent Technologies