

乾燥血液スポットティングにおける ヘマトクリット値変化の影響調査

アプリケーションノート

製薬

著者

William Hudson、Ben Yong、Ritu
Arora、Paul Boguszewski
Agilent Technologies, Inc.
25200 Commercentre Drive
Lake Forest, CA 92630
USA

はじめに

乾燥血液スポットティング (乾燥マトリックススポットティング) は、ここ数年で広く利用されるようになってきました。サンプル処理が容易で、サンプル使用量が少ないという点は、製薬業界にとってきわめて魅力的です。乾燥血液スポットティングの大きな問題は、分析結果におけるヘマトクリット (HCT) 値の影響です。ヒト HCT 値は、成人女性で 36~48、成人男性で 40~52 の間で変化します。ヘマトクリット値が高くなると、血液粘度が上昇し、血液の拡散特性が変化するため、スポット面積の変動につながります。粘度の高い血液は、セルロースペーパー上ではあまり拡散しませんが、先ごろ、新たな非セルロース材質が発表されました。この新しい材質では、セルロースに比べて、拡散特性の変動が小さくなります。さまざまな HCT 値 (20、30、45、65、80) の血液を調査しました。



Agilent Technologies

実験手法

全血に血漿を添加および除去し、HCT 値を調節しました。オリジナルの血液サンプルの HCT 値は 45 です。サンプルを希釈または濃縮し、HCT 値を 20、30、45、65、80 としました。パロキセチンとノルトリプチリンの 2 つを分析対象化合物として選択しました。それぞれに対応する重水素化合物を、各化合物の内部標準として使用しました。

結果と考察

前述の薬剤標準物質を 20 ng/mL 含む血液サンプル 15 μ L を、Agilent Bond Elut DMS カード (部品番号 A400150) に滴下しました。

乾燥した各スポットから、3 mm の円盤を切りとり、96 ウェルプレートに入れました。

0.1 % ギ酸を含む 80 % メタノール 300 μ L (0.066 ng/mL の重水素化内部標準混合物を含む) を各ウェルに添加し、ボルテックスミキサーで混合しました。サンプルを 2 時間浸漬させたのち、円錐形オートサンプリャバイアルに移しました。

サンプルを蒸発乾固して、移動相 100 μ L に溶解しました。

非セルロース膜を用いた場合の HCT 20~HCT 80 におけるスポット面積の変動は、11 % 未満でした。セルロース膜の同じ HCT 範囲における変動は、平均 31 % でした (表 1 参照)。

カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、50 mm x 4.6 mm 2.7 μ m (部品番号 699975-902)	
移動相	A : 0.1 % ギ酸水溶液	B : MeOH
ポンププログラム	流速 400 μ L/min	
t ₀	A : 40 %、B : 60 %	
t ₂ -2.1	A : 20 %、B : 80 %	
t ₂ .01-3	A : 40 %、B : 60 %	
ランタイム =	3:00 分	
ガス温度	350 °C	
ガス流速	10 L/min	
ネブライザ	20 psi	
極性	ポジティブ	

化合物	Q1 イオン	プロダクトイオン	CE (V)
パロキセチン	330.2	192.1	19
パロキセチン-D6	336.2	198.1	19
ノルトリプチリン	264.2	233.1	11
ノルトリプチリン-D3	267.2	233.1	11

表 1. 各 HCT 値におけるセルロースおよび非セルロース材質のスポット面積

非セルロースペーパー			セルロースペーパー		
HCT 20	HCT 45	HCT 80	HCT 20	HCT 45	HCT 80
0.0369 in ²	0.0378 in ²	0.0409 in ²	0.0750 in ²	0.0653 in ²	0.0550 in ²
CV = -3 %		CV = 8 %	CV = 15 %		CV = -16 %

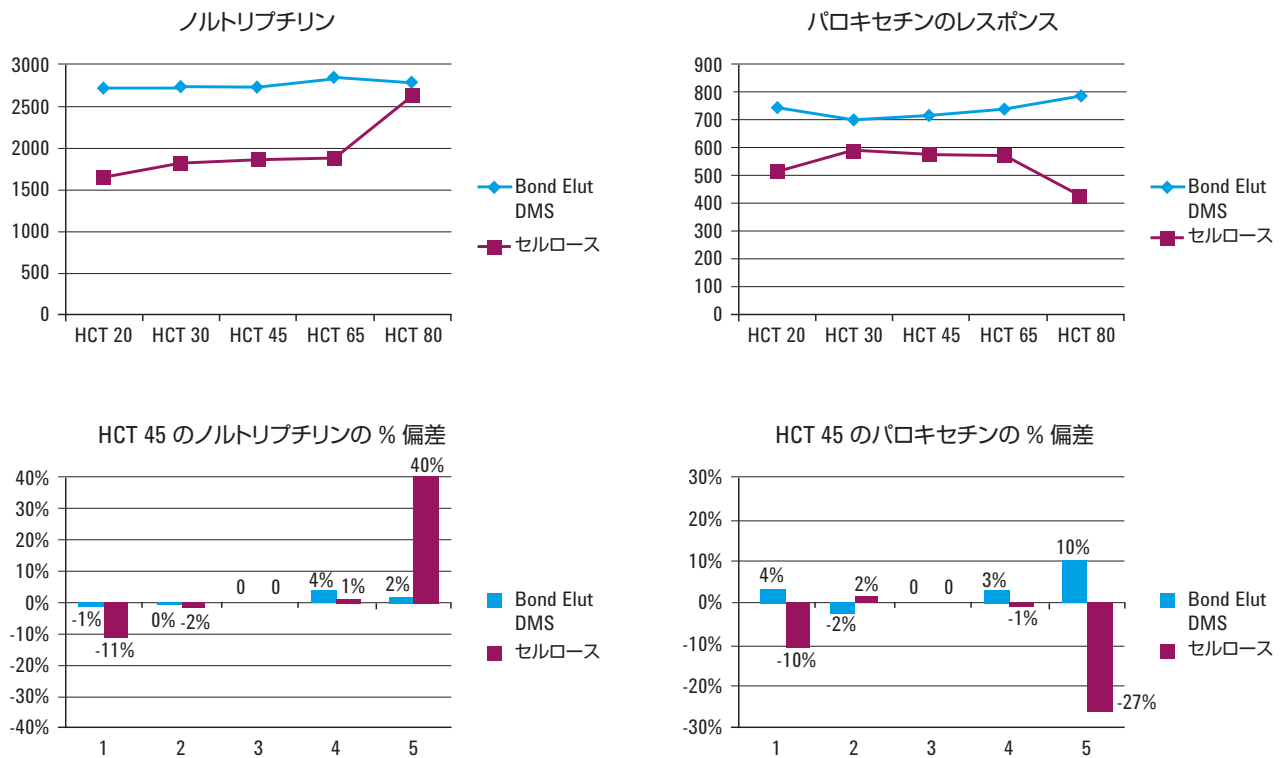


図 1. 各 HCT 値における非セルロースペーパーとセルロースペーパーでの分析対象化合物レスポンスと % 偏差の比較。全血中に 20 ng/mL で含まれる分析対象化合物のレスポンス。内部標準との面積比は使用していない。非セルロースペーパーでは、ノルトリプチリンとパロキセチンのいずれについても、セルロースペーパーに比べてレスポンスが向上し、一貫性も高くなっている。

結論

乾燥血液スポット用の非セルロース材質は、セルロース材質に比べて大きな利点があります。スポット面積の変動が小さくなるので、それに対応する分析結果の変動も小さくなります。HCT 20~80 におけるスポット面積の変動はわずか 11 % で、スポット面積が大きく変動するセルロースとは対照的です。スポット面積の変動は、分析結果の変動にもつながります。非セルロース材質の回収率は、HCT 20~80 で一定に保たれます。サンプルレスポンスの %CV は、全範囲で 10 % 未満でした。セルロース材質では変動はずっと大きく、HCT 20~80 におけるノルトリプチリンの変動は最大 50 % でした。スポットの大きさが小さくなったのとは反対に、パロキセチンではレスポンスが低下しました。セルロースペーパーにおける変動の原因としては、分析対象化合物の拡散スピードが血液の拡散スピードとは異なるためにペーパー上で、クロマトグラフィーが生じていることが考

えられます。この研究では、乾燥血液スポットにおける化合物レスポンスにヘマトクリット値変化が与える影響は、使用する材質によって左右されることが示されました。メソッドバリデーションにおいて、材質が大きな影響を与えているといえます。非セルロース材質を用いた Agilent Bond Elut DMS カードは、サンプル変化の影響を排除し、メソッドバリデーションや分析全体を容易にします。

Bond Elut DMS カードは、DMPK/ADME 生物分析アプリケーションのみに使用できます。臨床診断目的では使用できません。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト 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

June 13, 2011

5990-8306JAJP



Agilent Technologies