

製薬バイオ分析における 乾燥血液スポッティング技術を用いた 定量に関するヘマトクリット値の影響

アプリケーションノート

生物医薬品

著者

Ritu Arora, William Hudson, Paul
Boguszewski
Agilent Technologies, Inc.
Lake Forest, CA

概要

ヒト血液のヘマトクリット値は、個人や疾患の状態によって変化することが知られていることから、乾燥血液スポッティング (DBS) サンプルのスポットの大きさや、そうしたサンプルに含まれる分析対象物の定量精度におけるヘマトクリット値の影響が調査されています。全体的な性能にもっとも大きな影響を与えるパラメータ、すなわちスポット面積、イオン抑制、分析対象物の回収率を調査し、アッセイバイアスにおけるヘマトクリット値の影響を検証しました。非セルロース材質の Agilent Bond Elut DMS カードでは、3つの調査のすべてにおいて、アッセイバイアスを狭めるのに有望なデータが示されました。

はじめに

乾燥血液スポッティング (DBS) 技術は、従来の血漿サンプリングに比べて多くの利点を得られることから、製薬業界のバイオ分析を支える技術として関心が高まっています。DBS の利点としては、必要な血液サンプル量が少ないこと、コスト面や倫理面でのさまざまな利点があること、サンプル採取が容易なこと、サンプル運搬コストの削減、保管条件の汎用性などが挙げられます [1]。これらの利点から、前臨床および臨床分野での薬物動態/トキシコキネティクス (PK/TK) 研究のマイクロサンプリングアプローチとして、DBS 技術の導入に対する関心が高まっています [2]。治療薬剤モニタリング [3] や新規化学物質 (NCE) の臨床試験における血中薬剤濃度の測定 [2, 4] などの分野において、この技術のアプリケーションが数多く開発されるようになってきました。もっとも使用されるマトリックスは全血ですが、血漿、血清、脳脊髄液 (CSF)、胆汁、涙などの他のマトリックスも使用されています。したがって、この技術は乾燥マトリックススポッティング (DMS) 技術と呼ぶほうが適切でしょう。



Agilent Technologies

ヘマトクリット (Ht または HCT) または血中血球体積 (PCV) は、血液中に占める赤血球の体積の割合です。通常、男性ではおよそ 45 %、女性ではおよそ 40 % です。この値は、年齢、性別、一般的な健康状態によって変化します (表 1) [5, 6, 7, 8]。また、測定値は使用する装置によって異なることがあります [5, 6, 7]。しかし、通常の分析試験ラボが扱う子どもおよび成人の血液サンプルの大多数では、ヘマトクリットは 28~67 % の範囲に収まっています。ただし、赤血球増加症や貧血など、特定の極端な症状を伴う被験者のサンプルは例外です。血中ヘマトクリットの変化は、血液粘性の変化につながります。ヘマトクリットが高くなるほど、粘性は高くなります。粘性が変化すると、DBS サンプル採取に用いられる各種の基材における血液の流動性や拡散性が変化します。それにより、生成される血液スポットの大きさに直接的な影響が出て、最終的には DBS サンプル中の分析対象物の正確な測定を妨げることがあります [9]。この研究では、Agilent Bond Elut DMS カードを用いて、アッセイバイアスにおけるヘマトクリットの影響を調査しました。具体的には、DBS サンプルの物理的特性 (スポット面積)、サンプル中の分析対象物の定量精度 (回収率)、関連するイオン抑制/マトリックス干渉について検証しました。

表 1. 一般的なヒトヘマトクリット値

年齢	ヘマトクリット値 (%)
生後間もなく	42~64
1 か月未満	31~67
1 か月~2 歳	28~55
2~12 歳	34~45
12~18 歳、女性	36~46
12~18 歳、男性	37~49
成人女性	36~44
成人男性	41~50

実験手法

表 2 と表 3 に、DMS カードでスクリーニングをおこなった 6 種類の医薬品の構造、log P、pKa、治療用途を示しています。

表 2. ポジティブモードで分析した化合物：構造と一般的データ

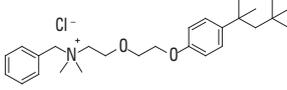
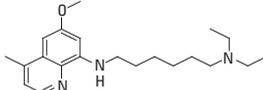
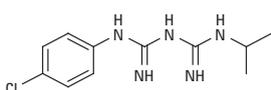
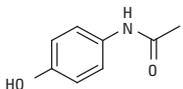
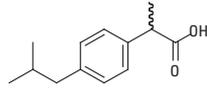
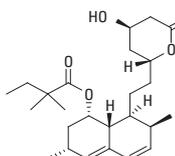
化合物	構造	Log P	pKa	治療用途
塩化ベンゼトニウム		4.00	N/A	消毒薬
シタマキン		5.59	2.7 (NH)、10.3 (NR ₃)	抗リーシュマニア薬
プログアニル		2.53	N/A	抗マラリア薬
アセトアミノフェン/ パラセタモール		0.46	9.38	鎮痛薬/解熱薬

表 3. ネガティブモードで分析した化合物：構造と一般的データ

化合物	構造	Log P	pKa	治療用途
イブプロフェン		3.97	4.91	非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID)/ 鎮痛薬
シンバスタチン		4.68	N/A	脂質低下薬

DMS 手順

オリジナルの新鮮なヒト血液に血漿を追加または除去し、さまざまなヘマトクリット値をもつ全血を作成しました。オリジナルの血球体積の測定値は 45 でした。サンプルを希釈または濃縮し、HCT 値を 30 から 70 としました。ボルテックス後、各 HCT の試料 15 μL を Agilent Bond Elut DMS カード (p/n A400150) にスポットティングしました。比較のために、Whatman FTA DMPK-C カードにも、HCT 30、45、70 の血液をスポットティングしました。Agilent Bond Elut DMS カードは非セルロース基材です。それに対して、他社の DMPK-C カードでは、セルロースベースの未処理材質が用いられています。スポットティング後のカードを一晩放置し、乾燥させました。直径 3 mm の円盤状サンプルをパンチングし、2 mL バイアルに入れました。パンチングした各スポットを脱着溶媒 (0.1 % ギ酸を含む 80 % メタノール) 300 μL に溶解し、ボルテックスしました。脱着溶媒中で、スポットを 15,000 rpm で 30 分間遠心分離しました。サンプルを取り出し、円錐形バイアルに入れたのち、蒸発して乾燥させました (空気中で 20 分、55 $^{\circ}\text{C}$)。その後、移動相 (95 % H_2O + 0.1 % ギ酸 : 5 % CH_3CN) 100 μL に再溶解し、ボルテックスしたのち、LC/MS/MS に注入して分析しました。

スポット面積

6 つの HCT 値 (HCT 30~70) の各サンプルを Agilent Bond Elut DMS カードと対応する Whatman カードに 4 回繰り返しスポットティングし、Panasonic Optical Comparator を用いてスポットの半径を測定しました。各 HCT 値の平均スポット面積を計算し、HCT に対してプロットしたのち、傾向を検証しました。

イオン抑制調査

ポストカラム注入 (PCI) 調査用に、全範囲の HCT から 6 つの分析対象物を選択しました。マトリックス干渉のスクリーニングには、低から高レベルのヘマトクリット値にあたる HCT 30、45、70 を選択しました。ポジティブモードでは、塩化ベンゼトニウム、シタマキン、プログアニル、アセトアミノフェンという 4 つの分析対象物を分析しました。ネガティブモードでは、シンバスタチンとイブプロフェンの 2 つを分析しました。

ポジティブモードの PCI 調査では、4 つの化合物を含む薬剤混合物をシリンジポンプにより連続的に注入しました。流速は 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、濃度は 50:50 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 中で 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ です。キャリーオーバーの問題を防ぐために、サンプルの前後にブランク (DBS カードを用いて処理した非添加 HCT サンプル) と、適切な移動相ブランクおよび CH_3CN ブランクを注入しました。ネガティブモードでは、2 つの薬剤の混合物を、シリンジポンプにより同じ流速 (20 $\mu\text{L}/\text{min}$) で注入しました。ただし、低濃度ではイブプロフェンの十分な感度が得られなかったため、濃度は 50:50 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 中で 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ としました。比較のために、Whatman FTA DMPK-C カードで処理したスポットについても PCI 調査を行ないました。ポジティブモードでは、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で注入した薬剤を 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準と比較しました。ネガティブモードでは、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準を用いて同様に比較しました。

回収率

ヘマトクリット値が 30、40、45、50、60、70 ($n=4$) の血液を用いて、分析対象物の定量実験をおこないました。HCT 45 を希釈または濃縮して、各 HCT 値の血液を作成したのち、各値のサンプル (990 μL) に、100 倍に濃縮した 4 つの分析対象物の標準混合物 10 μL を添加し、血液中の分析対象物濃度を 100ng/mL としました。比較のために、Whatman FTA DMPK-C カードにも各 HCT 値をスポットティングしました。添加血液の適量を DMS カードにスポットティングし、上述のように処理しました。各種 HCT 値の添加血液の回収率を、100 ng/mL の標準溶液と比較しました。標準溶液は、100 ng/mL 標準 4 μL に脱着剤 300 μL (内部標準のクロザピン 1 ng/mL を含む 0.1 % ギ酸と 80 % メタノール) を添加して作成し、血液スポットと同様に処理しました ($n=4$)。スポット面積に対するパンチ面積の比率を測定すれば、3-mm パンチから採取される体積を測定できます。採取した実際の血液量は 4 μL で、これはカードにスポットティングした量にかかわらず一定です [10]。

ポジティブモード LC/MS 条件

カラム	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18 2.1 x 50 mm、1.8 μm (p/n 822700-902)
移動相	A : H ₂ O + 0.1 % HCOOH、B : CH ₃ CN
流速	400 μL/min
グラジエント	t ₀ A: 95 %、 B: 5 % t _{1.0} A: 95 %、 B: 5 % t _{1.5} A: 65 %、 B: 35 % t _{3.0} A: 55 %、 B: 45 % t _{3.2} A: 0 %、 B: 100 % t _{4.5} A: 0 %、 B: 100 % t _{4.6} A: 95 %、 B: 5 % t _{6.0} A: 95 %、 B: 5 %
カラム温度	30 °C
ランタイム	6:00 分
機器	Agilent 1290 Infinity LC システム/ Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム
ガス温度	300 °C
ガス流速	5 L/min
ネブライザ	45 psi
シースガス温度	250 °C
シースガス流速	11 L/min
極性	ポジティブ

表 4. ポジティブモードでスクリーニングした分析対象物の MS/MS トランジションの詳細

化合物	親イオン	プロダクトイオン	衝突エネルギー (V)
塩化ベンゼトニウム	413.3	321.3	27
シタマキン	344.3	271.2	19
プログアニル	254.1	170	15
アセトアミノフェン	152.1	110.1	15

データは Agilent MassHunter ソフトウェアにより生成

ネガティブモード LC/MS 条件

カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.1 x 50 mm、2.7 μm (p/n 699775-902)
移動相	A : 5 mM ギ酸アンモニウム、B : CH ₃ CN
流速	400 μL/min
グラジエント	t ₀ A: 85 %、 B: 15 % t _{3.0} A: 35 %、 B: 65 % t _{3.1} A: 85 %、 B: 15 % t _{5.0} A: 85 %、 B: 15 %
カラム温度	30 °C
ランタイム	5:00 分
機器	Agilent 1290 Infinity LC システム/ Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム
ガス温度	300 °C
ガス流速	10 L/min
ネブライザ	15 psi
シースガス温度	250 °C
シースガス流速	11 L/min
極性	ネガティブ

表 5. ネガティブモードでスクリーニングした分析対象物の MS/MS トランジションの詳細

化合物	親イオン	プロダクトイオン	衝突エネルギー (V)
イブプロフェン	205.1	161.1	0
シンバスタチン	435.3	319.2	11

データは Agilent MassHunter ソフトウェアにより生成

結果と考察

Agilent Bond Elut DMS は、新しい非セルロース材質の乾燥血液スポットティング基材で、アッセイバイアスに関連する一部の要素に対するヘマトクリット値の影響を排除するために開発および使用されています。ヘマトクリット値の影響を受けるパラメータは、DBS サンプルの物理的特性 (スポット面積)、分析対象物の定量精度 (回収率)、関連するイオン抑制/マトリックス干渉の 3 つです。

スポット面積におけるヘマトクリット値の影響

ヘマトクリット値が30から70に上昇すると、血液スポットの色は明るい赤から深い赤に変化します。血液のヘマトクリット値が変化すると、血液粘性が変化します。ヘマトクリット値が高いほど、血球の数が増えるため、粘性は高くなります。粘性が変化すると、DBS サンプル採取に用いられる各種の基材における血液の流動性や拡散性が変化します。それにより、生成される血液スポットの大きさに直接的な影響が出る場合があります。表6に示すように、血液スポットの面積は、非セルロース材質の Agilent DMS カードではヘマトクリット値が高くなるほど大きくなっていますが、セルロース材質の Whatman カードでは小さくなっています。非セルロース基材では、血液が拡散すると繊維密度が高くなります。基材裏側の密度の高い繊維が縦方向の血液の拡散を防ぐため、粘性の高い血液はより放射状に広がります。セルロース材質では、これとは逆の傾向が見られます。セルロース材質のカードでは、ヘマトクリット値の高い、粘性の高い血液はあまり拡散せず、ヘマトクリット値と血液スポット面積は反比例の関係になります。非セルロース材質の Bond Elut DMS カードでは、HCT 30 から 70 のあいだにスポット面積が 19% 増加していますが、セルロース材質では 36% 減少しています。血液ヘマトクリット値の変化と、それに対応するスポット面積および分析対象物の反応の変化を調べた過去の研究でも、同様の傾向が見られています [11, 12]。どちらのカードでも、調査範囲の両極 (HCT 30 および 70) で HCT 45 との差が大きくなり、通常レベルの HCT 45 に近いヘマトクリッ

ト値ではその差はずっと小さくなっています。非セルロース材質のカードでは、両極におけるその差は HCT 45 の 10% 以下ですが、セルロース材質のカードでは HCT 45 の 25% になっています。この結果から、ヘマトクリット値の変化により生じるバイオ分析バイアスは、アジレントの非セルロース材質のほうがセルロース材質のカードよりも大幅に小さくなると推定することができます。図1は、両材質のスポット面積におけるヘマトクリット値の影響を示しています。どちらのカードでもグラフは直線的ですが、傾きが逆になっていることがわかります。

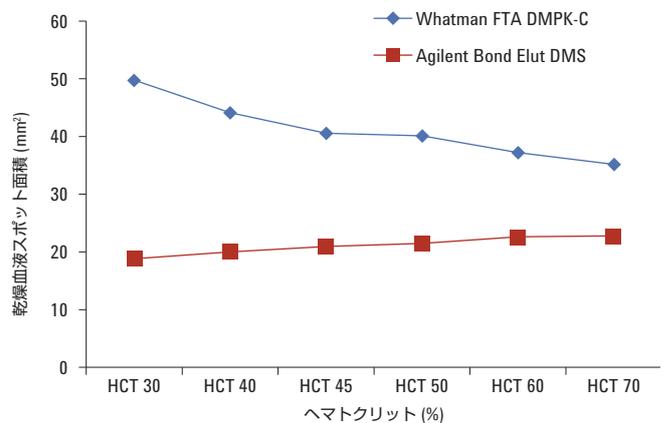


図1. Agilent Bond Elut DMS カードと Whatman FTA DMPK-C カードの乾燥血液スポット面積におけるヒト血液ヘマトクリット値の影響

表6. 各種ヘマトクリット値における非セルロース材質とセルロース材質のスポット面積

a) 非セルロースカード (Agilent Bond Elut DMS カード)

ヘマトクリット値	平均半径 (n = 4)	スポット面積 (in ²)	スポット面積 (mm ²)	HCT 45 との差 (%)
30	0.0979	0.0301	18.8310	-10
40	0.1010	0.0320	20.0190	-4
45	0.1033	0.0335	20.9448	0
50	0.1046	0.0343	21.4652	2
60	0.1073	0.0362	22.6092	8
70	0.1077	0.0364	22.7640	9

b) セルロースカード (Whatman カード)

ヘマトクリット値	平均半径 (n = 4)	スポット面積 (in ²)	スポット面積 (mm ²)	HCT 45 との差 (%)
30	0.1592	0.0796	49.7549	23
40	0.1499	0.0706	44.1108	9
45	0.1437	0.0649	40.5508	0
50	0.1429	0.0642	40.1146	-1
60	0.1377	0.0596	37.2352	-8
70	0.1338	0.0562	35.1559	-13

イオン抑制およびマトリックス干渉におけるヘマトクリット値の影響

薬剤混合物の分析と 30、45、70 のヘマトクリット値のブランクの分析を、ポジティブモードとネガティブモードで個別に実行しました。この研究では、酸、塩基、中性化合物を代表する 6 つの薬剤を使用しました。LC/MS/MS により、2 種類のモードで化合物セットを個別に分析しました。全多孔性サブ 2 μm カラムまたは表面多孔性サブ 3 μm カラムのいずれかを使用しました。

図 2 では、Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT 2.1 x 50 mm、1.8 μm カラムを用いて濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で分析したポジティブモード標準の例を示しています。4 つの化合物すべてが、4.5 分以内でベースラインで分離されています。ZORBAX RRHT (Rapid Resolution High Throughput) カラムは、高速および超高速分離に最適なカラムで、優れた分離能を備えています。このカラムは、全多孔性充てん剤を用いたサブ 2 μm カラムです。小さい粒子により分離能が向上し、短いカラム (15~50mm) により高速分析が実現します。

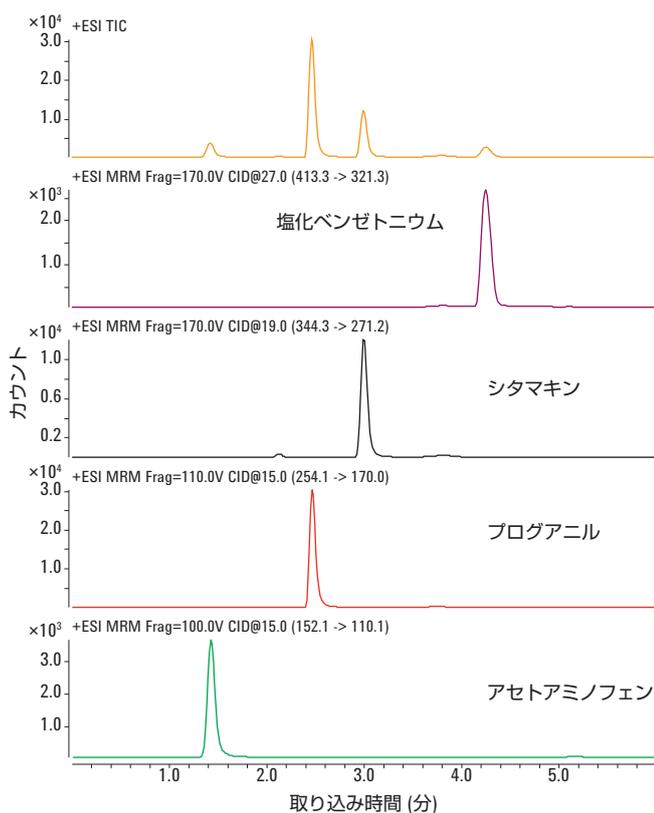


図 2. Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT 1.8 μm カラムを用いてポジティブモードで分析した濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の化合物の LC/MS/MS クロマトグラム

図 3 は、Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.1 x 50 mm、2.7 μm カラムを用いたネガティブモード分析の代表的な LC/MS/MS クロマトグラムを示しています。Poroshell は、表面多孔性微粒子充てん剤を用いたカラムで、背圧をサブ 3 μm 粒子と同等に抑えながら、サブ 2 μm の性能上のすべての利点を得ることができます。標準 2 μm フリットにより、未ろ過血漿などのクルードなサンプルによるつまりを防ぎます。この例では、どちらの化合物も 3 分以内で溶出し、優れたピーク形状が得られています。このカラムでは、高い背圧を発生させずに、1.8 μm 粒子充てんカラムと同様の分離能とスピードが得られます。

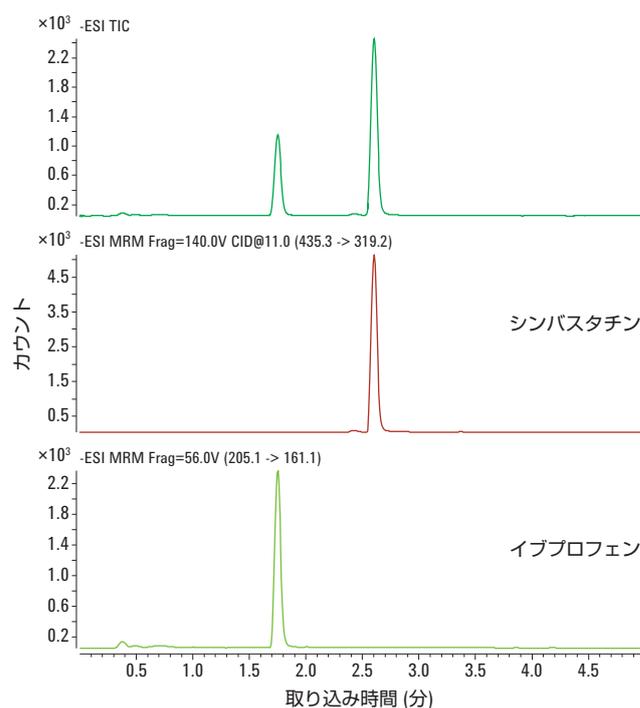


図 2. Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT 1.8 μm カラムを用いてポジティブモードで分析した濃度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の化合物の LC/MS/MS クロマトグラム

イオン抑制は、バイオ分析でしばしば生じる、悪影響のある現象です。タンパク質、脂質 (リン脂質およびリゾリン脂質)、塩などの疎水性種から生じる内因性のマトリックス干渉は、イオン抑制を引き起こし、データ品質に影響を与えることがあります。イオンシグナルの低下は、分析対象物の定量を阻害し、感度や精度、正確性の低下につながります。図 4 と 5 は、Agilent カードと Whatman カードを用いて、HCT 30、45、70 でポジティブおよびネガティブモードで生じたイオン抑制データを示しています。各 HCT サンプルを移動相ブランクと比較しています。使用したグラジエントに起因する移動相ドリフトを明らかにするために、移動相ブランクはサンプルの直前に分析しました。ポストカラム注入 (PCI) を、移動相ブランクおよび注入薬剤と同じ濃度の標準混合物と比較しました。どちらのカードでも、ヘマトクリット値の変化に伴うイオン抑制の変化は、ネガティブモードでの分析時 (図 5) よりも、ポジティブモードで分析した場合 (図 4) のほうが明白かつ大きくなっています。イオン抑制プロフィールは、クロマトグラフィーや分析対象物によって左右されます。ポジティブモードでは、塩化ベンゼトニウムはきわめて極性が低く、高い有機溶媒濃度 (100 %) で溶出します。また、塩化ベンゼトニウムには、脂質などの疎水性種の溶出を促進する働きもあります。この化合物は、脂質によるイオン抑制の影響を強く受けます。シタマキンは、タンパク質によるイオン抑制の影響をある程度受けます。ネガティブモードで使用した最大有機溶媒濃度は 65 % です。これは脂質が溶出するほどの濃度ではないと考えられます。

ポジティブモードのイオン抑制プロフィールを見ると、HCT 30 のグラジエント後部において、Agilent Bond Elut DMS カードに比べて Whatman カードのほうがリゾリン脂質によるイオン抑制が大きくなっていることがわかります。また、HCT 30 では、Whatman カードのピーク 2 とピーク 3 のあいだで、顕著なタンパク質ディップが見られます。脂質プロフィールの特徴は、3 つすべての HCT 値において、両方のカードで異なっています。Whatman カードでは、約 3.9 分でリゾリン脂質による明らかな脂質ディップが見られます。これは、Agilent カードではわずかしか見られません。表 6 と図 1 に示すように、Agilent カードのスポット面積は、HCT が高くなるほど大きくなりますが、Whatman では面積は小さくなります。このことは、イオン抑制となんらかの相関関係があるものと見られます。

Whatman カードでは、スポット面積が最大になる HCT 30 でイオン抑制がもっとも大きくなり、HCT 45 ではそれよりも小さくなり、HCT 70 でもっとも小さくなります。スポット面積が大きいと、より大きな干渉が引き出され、イオン抑制の増加につながるものと考えられます。

HCT 値の高いサンプルでは内因性干渉源をもっとも多く含む血漿が少ないため、ヘマトクリット値が高くなると、イオン抑制が小さくなることが予想されます。Whatman カードでは、ヘマトクリット値の上昇とともにイオン抑制が減少する傾向が明らかに見てとれますが、Agilent カードではそうした傾向は見られません。Agilent カードでは、HCT 30 でスポット面積が最小となりますが、イオン抑制はこのレベルでもっとも小さくなっています。全体として、Agilent DMS カードでは、Whatman カードに比べてイオン抑制が明らかに減少しています。顕著な傾向が見られない原因としては、クリーンさが不十分で、その影響が各抑制種の影響を上回っていることが考えられます。カードで処理したサンプルがクリーンではないことがあり、分析対象物とともに抽出される相当量の内因性干渉の影響が生じるという点は、この技術の制約要因です。

ネガティブモードで生成した PCI データ (図 5) では、どちらのカードでもヘマトクリット値はイオン抑制に大きな影響を与えていません。これは、分析対象化合物と、その溶出に用いたクロマトグラフィー条件によるものと考えられます。シンパスタチンは有機溶媒濃度 65 % で溶出しますが、これはカラムから脂質が溶出し MS に達するのに十分な濃度ではないと考えられます。

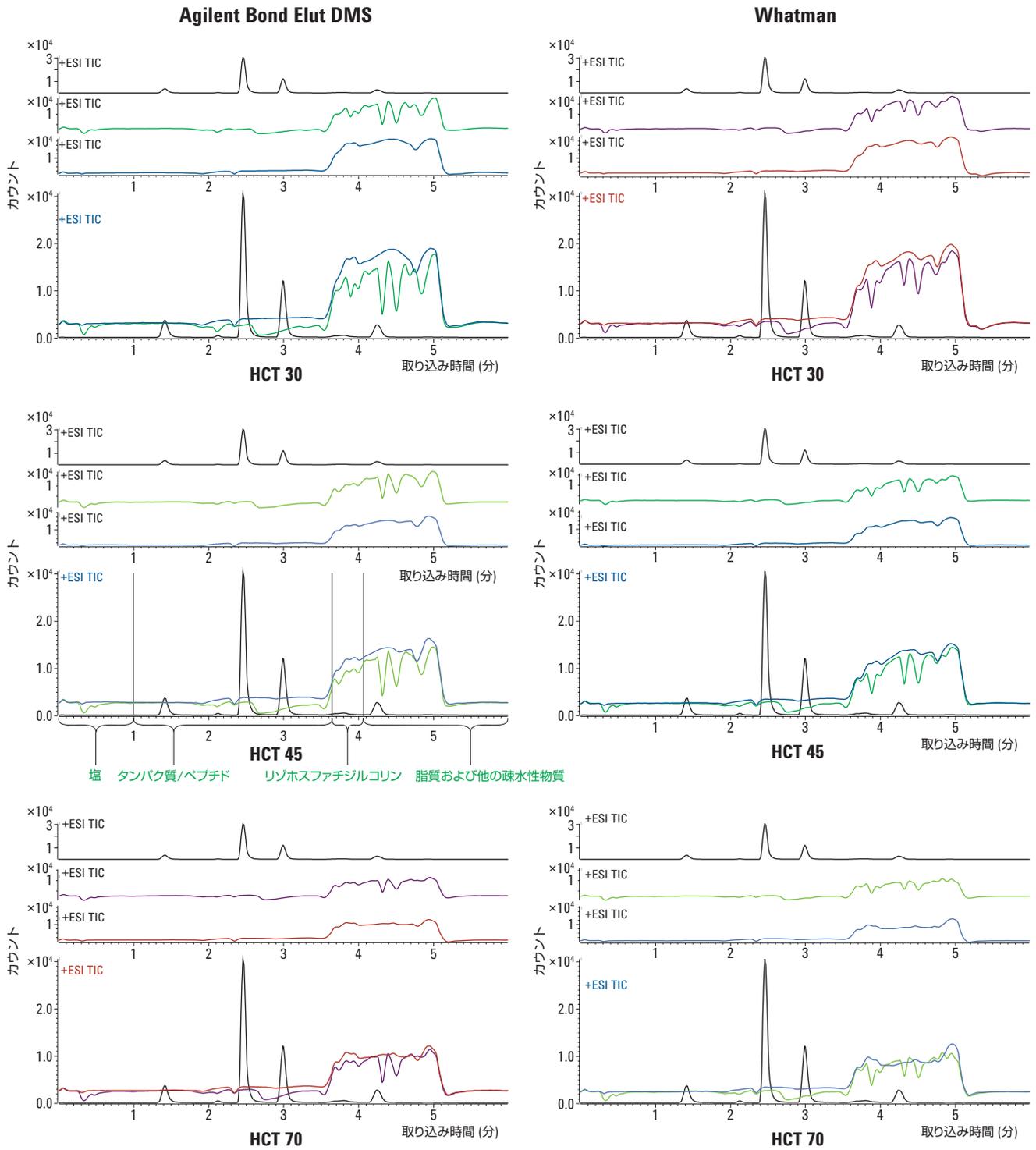


図 4. Agilent カードおよび Whatman カードにおけるヘマトクリット値 30、45、70 のポジティブモードでのイオン抑制データ

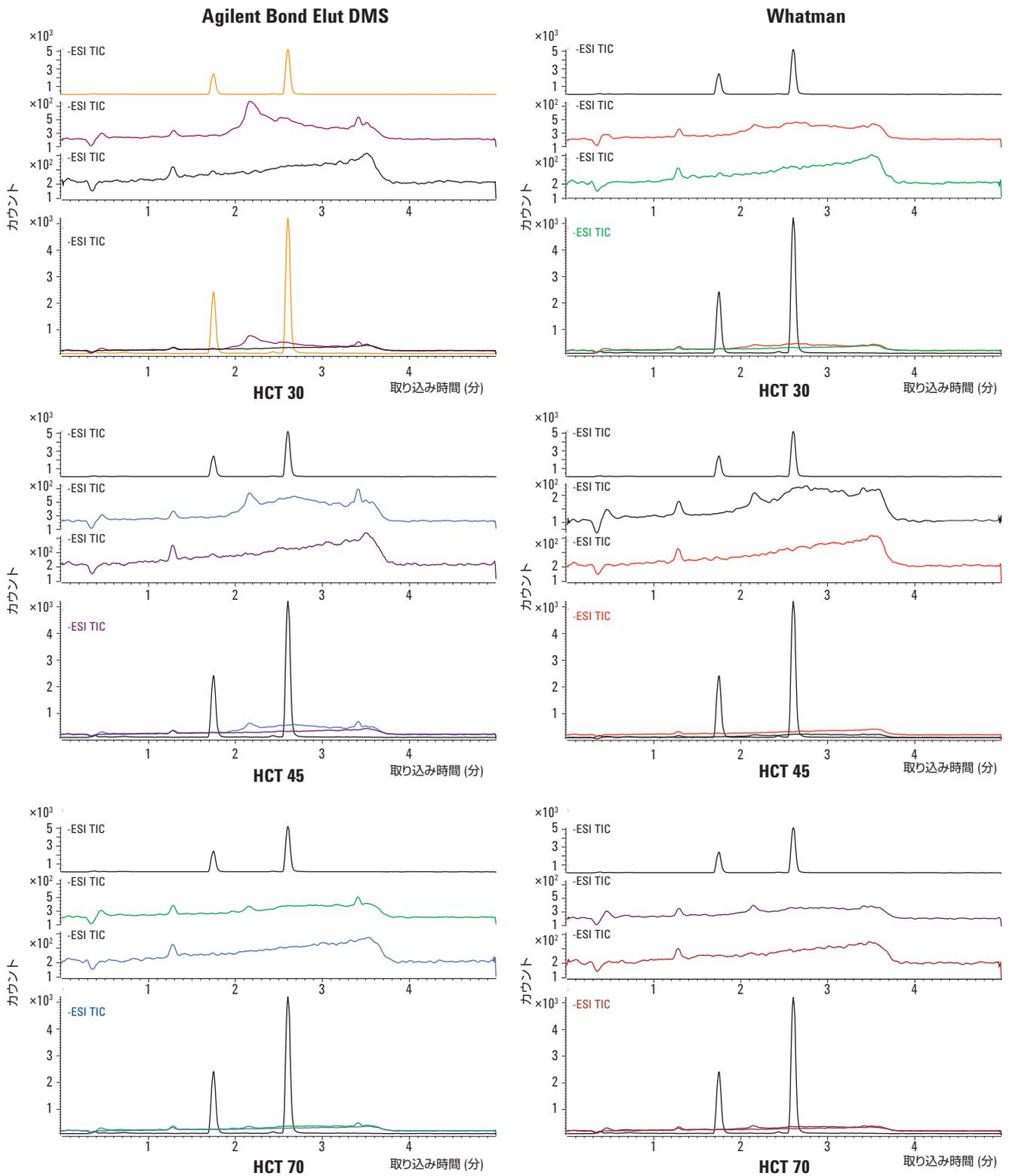


図 5. Agilent カードおよび Whatman カードにおけるヘマトクリット値 30、45、70 のネガティブモードでのイオン抑制データ

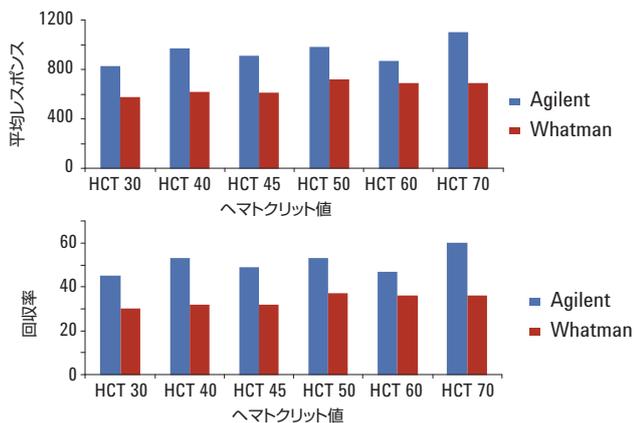
回収率におけるヘマトクリット値の影響

各 HCT 値を両カードで比べた場合 (表 6)、スポット面積が小さくなるほど、Agilent Bond Elut DMS カードのサンプル体積は Whatman カードよりも大きくなります。このことから、Agilent カードでは分析対象物の抽出量が多くなり、感度やレスポンスが向上するほか、干渉除去効率が高くなると考えられます。3 mm パンチから得られる実際の血液量は 4 μ L で、これはカードにスポッティングした体積にかかわらず一定です [10]。3 mm パンチから得られるこの体積は、スポット面積に対するパンチ面積の比率により決定されます。

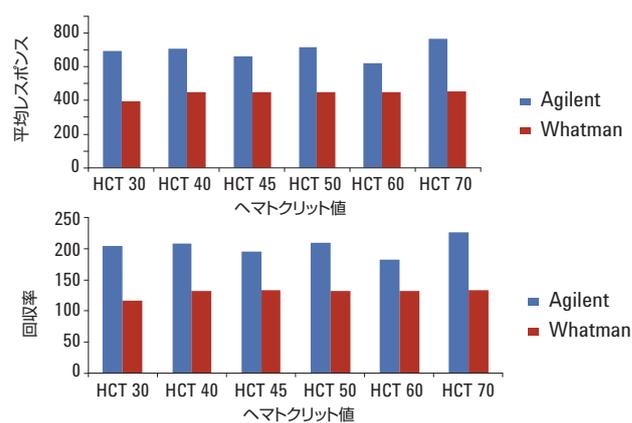
ポジティブモードでは、いずれのヘマトクリット値においても、4 つすべての化合物について得られた絶対回収率と平均レスポンス (4 μ L 標準溶液と比較) が、Whatman カードよりも Agilent

Bond Elut DMS カードで高くなっています (図 6)。プログアニルについては、6 つの HCT 値のうち 5 つで最高の回収率 (97~111 %) が得られています。HCT 60 サンプルに関する数字は、疑問のあるものです。Agilent HCT 60 サンプルでは、混合物中の 4 つの化合物のうち 3 つでレスポンスと回収率が低下していることから、処理または機器上のなんらかのエラーがあったものと考えられます。シタマキンと塩化ベンゼトニウムについては、すべての HCT 値でイオン化促進が見られています。Agilent カードで塩化ベンゼトニウムとシタマキンの回収率が 100 % を超えていることは、内因性化合物による若干のイオン化促進があったことを示唆しています。Whatman カードのシタマキンの回収率はほぼ 100 % ですが、これはサンプル体積が少なく、イオン化促進による影響が平準化されたためと考えられます。

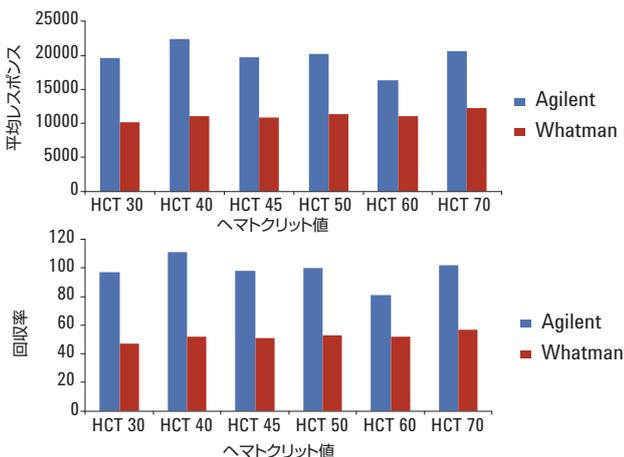
アセトアミノフェン



シタマキン



プログアニル



塩化ベンゼトニウム

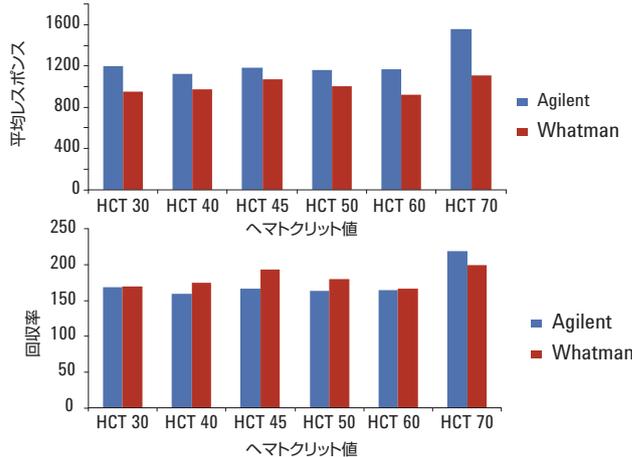


図 6. Agilent カードおよび Whatman カードにおけるヘマトクリット値による 4 つの化合物の平均レスポンスおよび回収率への影響

表 7 に、各 HCT に対応する平均レスポンスと回収率の % RSD を示しています。レスポンスの RSD のほとんどは 10 % 以下で、この範囲を外れているのはわずかであることが見てとれます。DMS がサンプル精製テクニックではなく、どちらかといえばサンプル保存テクニックであることを考えれば、こうした数字も意外ではありません。Agilent DMS カードでは、サンプル体積が大きいと、より多くの干渉が分析対象物とともに抽出されることから、回収率の RSD が同程度かわずかに大きくなっています。

シタマキンについては、DMS 処理後に、なんらかの異性化または構造変化が生じていると考えられます。図 7 は、処理をおこなった各種 HCT サンプルと標準溶液におけるシタマキンの MRM (344.3 > 271.2) を示しています。2.8 分のメインの親ピークは、時間の経過とともに (シーケンス分析において、標準溶液 1 を標準溶液 8 の前に分析)、より早い 2.1 分のピークに変化しています。シタマキンの分解が観察されているのは処理済みサンプルのみで、処理なしで注入した標準品では観察されていません (図 2)。シタマキンは熱の影響を受けやすく、高温でサンプルを蒸発させる際 (55 °C で 20 分) に異性化が生じた可能性があります。この変化がどの段階で生じたかを確認するための、各処理段階における処理済み HCT サンプルの分析は実施していません。

表 7. 非セルロース (Agilent Bond Elut DMS) およびセルロース材質 (Whatman) のカード

a) 平均レスポンスの % RSD における HCT の影響

化合物	HCT 30	HCT 40	ヘマトクリット			
			HCT 45	HCT 50	HCT 60	HCT 70
アセトアミノフェン、Agilent	4 %	22 %	10 %	9 %	3 %	3 %
アセトアミノフェン、Whatman	9 %	5 %	9 %	2 %	3 %	3 %
シタマキン、Agilent	3 %	16 %	11 %	9 %	4 %	8 %
シタマキン、Whatman	13 %	5 %	11 %	7 %	13 %	5 %
プログアニル、Agilent	7 %	23 %	9 %	6 %	5 %	2 %
プログアニル、Whatman	9 %	3 %	5 %	7 %	5 %	3 %
塩化ベンゼトニウム、Agilent	8 %	9 %	10 %	8 %	12 %	15 %
塩化ベンゼトニウム、Whatman	22 %	6 %	15 %	11 %	6 %	6 %

b) 回収率の % RSD における HCT 30~70 の影響

化合物	% RSD
アセトアミノフェン、Agilent	11 %
アセトアミノフェン、Whatman	8 %
シタマキン、Agilent	7 %
シタマキン、Whatman	5 %
プログアニル、Agilent	10 %
プログアニル、Whatman	6 %
塩化ベンゼトニウム、Agilent	13 %
塩化ベンゼトニウム、Whatman	7 %

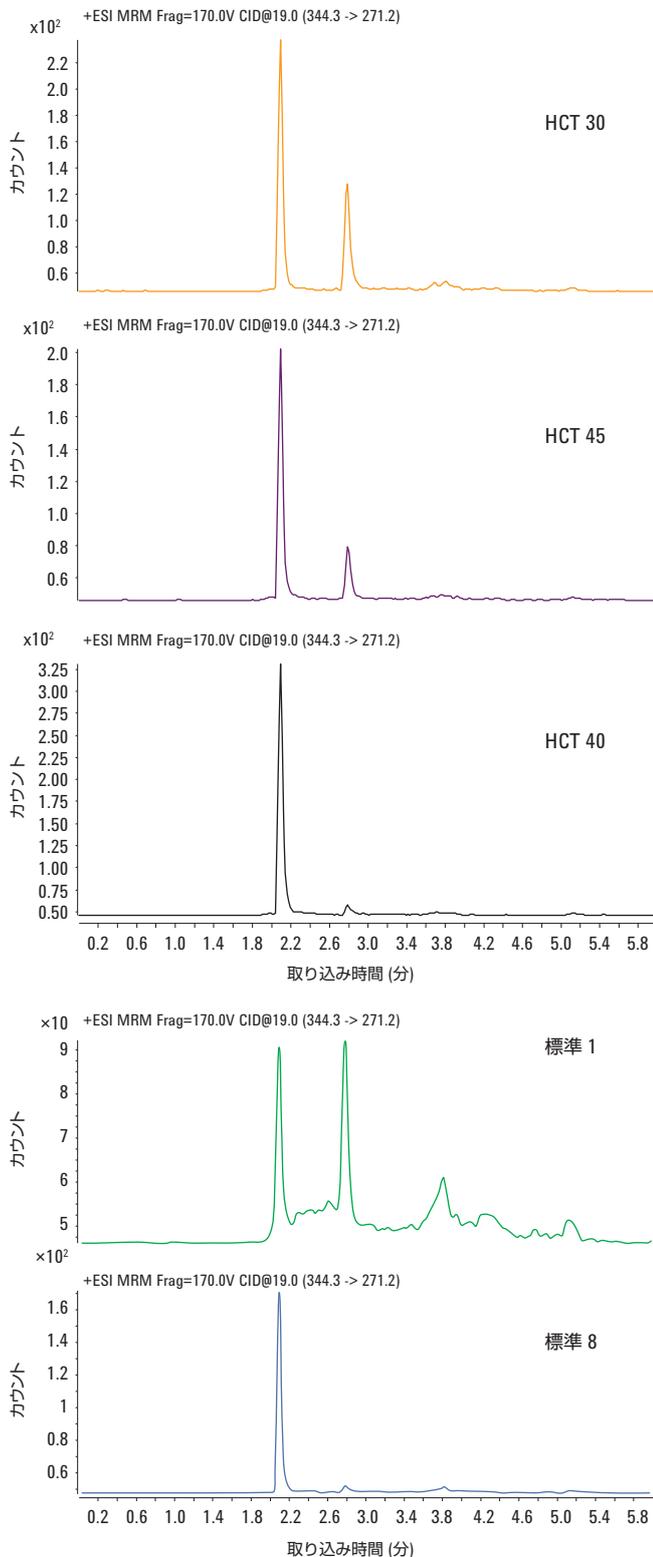


図 7. 処理をおこなった各種 HCT サンプルおよび標準溶液におけるシタマキンの MRM

結論

セルロースおよび非セルロース材質のカードを用いて、ヒト血液のヘマトクリット値と、アッセイバイアスに与えるその影響を調査しました。スポット面積、イオン抑制、分析対象物の回収率は、乾燥血液スポット分析に影響を与えるもっとも重要な要素です。非セルロース材質の Agilent Bond Elut DMS カードでは、3つの調査のすべてにおいて、アッセイバイアスを狭めるのに有望なデータが示されました。この2つの材質では、生成される乾燥血液スポットの大きさに対して、HCT が逆の影響を及ぼしました。非セルロース材質の DMS カードでは、HCT 30 から 70 にかけてスポット面積が 19% 増加しましたが、セルロース材質では 36% 減少しました。イオン化抑制とその他のマトリックス効果は、ヘマトクリット値が高くなるほど小さくなる予想されます。これは、HCT の高いサンプルでは、内因性干渉のほとんどが含まれる血漿が少なくなるためです。セルロース材質の Whatman カードでは、ヘマトクリット値が高くなるとイオン化抑制が小さくなるという明らかな傾向が見られましたが、非セルロース材質の Agilent カードでは、この傾向は見られませんでした。全体として、Agilent DMS カードでは、Whatman カードに比べて、リゾリン脂質によるイオン化抑制が明らかに減少しています。シタマキンと塩化ベンゼトニウムではイオン化促進が観察されましたが、Agilent カードにおける回収率は、すべての HCT で多かれ少なかれ許容可能な値でした。したがって、ヘマトクリット値の変化に起因するバイオ分析のバイアスは、非セルロース材質のほうがセルロース材質よりもずっと小さくなると考えられます。

参考文献

1. M. Barfield, N. Spooner, R. Lad, S. Parry, S. Fowles, "Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies", *J. Chromatogr. B* 2008, 870, 32-37.
2. N. Spooner, R. Lad, M. Barfield, "Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method", *Anal. Chem.* 2009, 81, 1557-1563.
3. P.M. Edelbroek, J. van der Heijden, L.M.L. Stolk, "Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays and pitfalls", *Ther. Drug Monit.* 2009, 31, 327-336.
4. W. Li, F.L.S. Tse, "Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules", *Biomed. Chromatogr.* 2010, 24, 49-65.
5. J.J Irwin, J.T. Kirchner, "Anemia in children", *Am. Fam. Physician* 2001, 64, 1379-1386.
6. J. Jopling, E. Henry, S.E. Wiedmeier, R.D. Christensen, "Reference ranges for hematocrit and blood hemoglobin concentration during the neonatal period: data from a multihospital health care system", *Pediatrics* 2009, 123, E333-E337.
7. A. Pappas, V. Delaney-Black, "Differential diagnosis and management of polycythemia", *Pediatr. Clin. North Am.* 2004, 51, 1063-1086.
8. MedFriendly www.medfriendly.com/hematocrit.html
9. P. Denniff, N. Spooner, "The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs", *Bioanalysis* 2010, 2(8), 1385-1395.
10. W.C. Hudson, B. Yong, P. Boguszewski, D. Tran, Y.L.Chen, "Dried Blood Spotting Sample Volume Variability", ASMS 2011 poster, ThP 114.
11. R.Arora., W.C. Hudson, B. Yong, P. Boguszewski, "Dried Blood Spot Analysis - Consistent Spot Homogeneity with Variable Spot Punch Locations", ASMS 2011 poster, ThP 116.
12. W.C. Hudson, B. Yong, R. Arora., P.Boguszewski, 「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」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-8306JAJP、2011

詳細情報

本書には典型的なデータを記載しています。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., 2012

Printed in Japan

February 6, 2012

5990-9630JAJP



Agilent Technologies