

ヘマトクリットが 乾燥血液スポット技術を使用した 定量バイオ分析に与える影響

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Ritu Arora, William Hudson,
and Paul Boguszewski
Agilent Technologies, Inc.

概要

ヒト血液のヘマトクリットレベルは個人間で、また疾病の状態で異なることが知られているため、乾燥血液スポットサンプル (DBS) のスポットサイズと、これらのサンプルに含まれる対象化合物の正確な定量にヘマトクリットレベルが与える影響を調査しました。アッセイバイアスに対する効果を、性能全体に影響を与える最も重要な一部のパラメータ、特にスポット面積と対象化合物の回収率を確認することで調べました。非セルロース系の Agilent Bond Elut DMS カードでは、3つのすべての実験で確実に小さいアッセイバイアスを提供するデータが得られました。

はじめに

医薬品バイオ分析をサポートするための乾燥血液スポット (DBS) 技術は、従来の血漿サンプリングに比べて多くの利点があるため、急速に注目を集めています。その利点として、必要な血液サンプルの量が少ないこと、関連するさまざまなコストや倫理上のメリットがあること、収集が容易なこと、サンプル輸送コストが削減されること、多様な保管条件に対応することなどがあります [1]。このような利点により、薬物動態/毒性解析 (PK/TK) の前臨床および臨床研究のマイクロサンプリングアプローチにこの技術を採用する動きがますます広がっています [2]。治療薬物モニタリング [3] や、臨床試験における新規化学成分 (NCE) の循環薬物濃度の測定 [2, 4] 用にこの技術を使用した数多くのアプリケーションが開発されています。最も頻繁に使用されるマトリックスは全血ですが、これまで使用されてきたその他のマトリックスとして血漿、血清、脳脊髄液 (CSF)、胆汁、涙などがあります。したがって、この技術は乾燥マトリックススポット (DMS) 技術と呼ぶ方が適切です。



Agilent Technologies

ヘマトクリット (Ht または HCT) またはヘマトクリット値 (PCV) は、血液体積に占める赤血球の割合です。これは、通常は男性で約 45 %、女性で約 40 % です。血液ヘマトクリットが変化すると血液の粘度が変化します。ヘマトクリットレベルが高いと、粘度が非常に高くなります。粘度の違いが、DBS サンプル収集に使用するさまざまな基材内での血液の流動および拡散特性の違いにつながります。したがって、これは形成される血液スポットのサイズに直接影響を与え、最終的には、DBS サンプル内の対象化合物の正確な測定に影響を与えることがあります [5]。アッセイバイアスに影響を与える一部のパラメータ、つまり、DBS サンプルの物理的特性 (スポット面積) と、これらのサンプル内の対象化合物の正確な定量 (回収率) に対するヘマトクリットの影響を、Agilent Bond Elut DMS カードを使用して調べました。

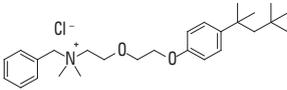
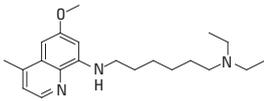
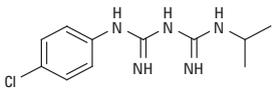
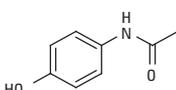
実験方法

DMS カードでスクリーニングした 4 種類の医薬品の構造、log P、pKa、および治療用途を表 1 に示します。

DMS の手順

元の HCT レベルが 45 の新しいヒト血液に血漿を加えて、または取り除いて、30 から 70 の様々な HCT レベルのヒト全血を作成しました。攪拌後、15 μ L の各 HCT を Agilent Bond Elut DMS カード (p/n A400150) にスポッティングしました。比較のために、Whatman FTA DMPK-C カードにも HCT 30、45、および 70 の血液をスポッティングしました。Agilent Bond Elut DMS カードは非セルロース系ですが、これに対し競合する DMPK-C カードは、セルロース系の未処理の基材です。スポッティングしたカードを一晩乾燥させました。直径 3 mm のディスクをくり抜き、2 mL のバイアル内に入れました。各スポットを 300 μ L の溶出溶媒 (80 % メタノール + 0.1 % ギ酸) に溶解し、攪拌しました。スポットを 15,000 rpm で 30 分間溶出溶媒中で遠心分離しました。サンプルを取り出して円錐型バイアルに入れ、蒸発乾燥させました (55 °C の空気中で 20 分間)。これを 100 μ L の移動相に再溶解し (95 % H₂O + 0.1 % ギ酸 : 5 % CH₃CN)、攪拌して、LC/MS/MS に注入して分析しました。

表 1. 調査対象の化合物の構造と一般情報

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	防腐剤
シタマキン		5.59	2.7 (NH)、10.3 (NR ₃)	抗リーシュマニア剤
プログアニル		2.53	N/A	抗マラリア剤
アセトアミノフェン/ パラセタモール		0.46	9.38	鎮痛剤/解熱剤

スポット面積

Agilent Bond Elut DMS カードと対応する Whatman カードの両方にスポットングした 6 つの各 HCT レベル (HCT 30~70) について、4 回の繰り返しにより得られたそれぞれのスポットの半径を Panasonic Optical Comparator を使用して測定しました。各 HCT レベルの平均スポット面積を計算し、HCT に対してプロットし、傾向を観察しました。

回収率

ヘマトクリットレベルが 30、40、45、50、60、70 (n = 4) の血液で対象化合物の定量分析を行いました。HCT 45 からの希釈または濃縮によって HCT レベルの異なる血液を作成した後、これらの各レベルの血液 (990 μ L) に、4 種類の対象化合物の 100 倍濃縮標準混合液 10 μ L をスパイクすることで、血中濃度を 100 ng/mL にしました。比較のために Whatman FTA DMPK-C カードにも各 HCT レベルの血液をスポットングしました。スパイクした血液の一部を DMS カードに取り、前述のように処理しました。スパイクしたさまざまな HCT レベルを持つ血液の回収率を、100 ng/mL の水溶液標準と比較しました。300 μ L の溶出溶媒 (80 % メタノール + 内部標準として 1 ng/mL のクロザピンを含む 0.1 % ギ酸) に 4 μ L の 100 ng/mL 標準溶液を加えて水溶液標準を調製し、血液スポットと同様に処理しました (n = 4)。くり抜いた部分の面積とスポット面積の比を確認することで、3 mm のくり抜きから得られた体積を測定しました。実際にサンプリングした血液体積は 4 μ L であり、これは、カードにスポットングした量にかかわらず一定でした [6]。

結果と考察

Agilent Bond Elut DMS は革新的な非セルロース系の乾燥血液スポットング基材で、アクセイバイアスに影響を与えるいくつかの要因に対するヘマトクリットレベルの効果を調査するために使用しました。DBS サンプルの物理的特性 (スポット面積)、対象化合物の正確な定量 (回収率)、関連するイオン抑制/マトリックス干渉の 3 つのパラメータはヘマトクリットの影響を受けることがあります。

LC/MS の条件

カラム:	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m (p/n 822700-902)
移動相:	A: H ₂ O + 0.1 % HCOOH, B: CH ₃ CN
流量:	400 μ L/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
分析時間:	6 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
ガス流量:	5 L/min
ネブライザ:	45 psi
シースガス温度:	250 °C
シースガス流量:	11 L/min
極性:	正

表 2. スクリーニングした対象化合物の 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	コリジョンエネルギー (V)	デュエルタイム (ミリ秒)	フラグメント (V)
塩化ベンゼトニウム	413.3	321.3	27	200	170
シタマキン	344.3	271.2	19	200	170
プログアニル	254.1	170	15	200	110
アセトアミノフェン	152.1	110.1	15	200	100

Agilent MassHunter ソフトウェアにより生成されたデータ

スポット面積に対するヘマトクリットの影響

血液プロットの色は、ヘマトクリットレベルを 30 から 70 に上げると、色が濃くなり、鮮やかな赤から暗い赤になります。血液ヘマトクリットレベルが変化すると血液の粘度も変わります。ヘマトクリットレベルが高いと、血液細胞の数が増加するため、粘度が非常に高くなります。粘度の違いが、さまざまな基材内での血液の流動および拡散特性の違いにつながり、これが形成される血液スポットのサイズに直接影響を与えることがあります。表 3 に示すように、アジレントの非セルロース系 DMS カードでは、ヘマトクリットレベルが上がるとスポッティングした血液の面積が大きくなりますが、Whatman セルロース系カードでは小さくなります。非セルロース系の基材では、血液が分散するにつれて繊維の密度が大きくなります。粘度の高い血液はより放射状に広がります。これは、基材の反対側のより密な繊維が垂直方向への血液の広がりを妨げるからです。セルロース系基材では逆の傾向が見られます。セルロース系のカードでは、ヘマトクリットレベルが高い、より粘度の高い血液の広がりは遅く、ヘマトクリットと血液のスポット面積との関係は逆になります。非セルロース系 Bond Elut DMS カードでは、HCT 30 と 70 の間でスポット面積が 19 % 増加しますが、セルロース系カードでは 36 % 減少します。さまざまな化合物セットを使用して血液ヘマトクリットレベルを変えて、それぞれのスポット面積と対象化合物の応答の変化を調べた以前の実験でも、同様の傾向が得られました [7, 8]。いずれのカードでも、調べた範囲の両端 (HCT 30 および 70) で HCT 45 との差が大きくなり、正

常レベルである HCT 45 に近づくほど差が小さくなることが明らかになりました。非セルロース系カードでは、両端とも差は HCT 45 の 10 % 以下に、セルロース系カードでは HCT 45 の 25 % になりました。これは、ヘマトクリットの変動の結果生じるバイオ分析のバイアスが、セルロース系基材よりもアジレントの非セルロース系基材の方が大幅に小さくなることを示しています。図 1 は、ヘマトクリットが両方の基材のスポット面積に与える影響がいずれのカードでも直線的であることを示しています (傾向は逆)。

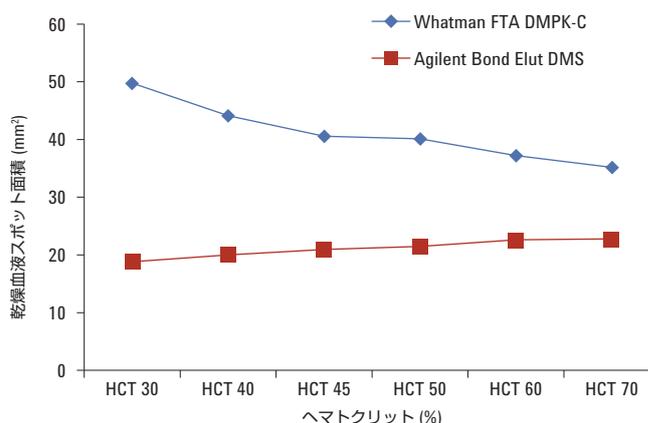


図 1. ヒト血液ヘマトクリットが Agilent Bond Elut DMS および Whatman FTA DMPK-C カードの乾燥血液スポット面積に与える影響

表 3. さまざまなヘマトクリットでの非セルロース系およびセルロース系カードのスポット面積

a) 非セルロース系カード (Agilent Bond Elut DMS カード)				
ヘマトクリットレベル	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) セルロース系カード (Whatman カード)				
ヘマトクリットレベル	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

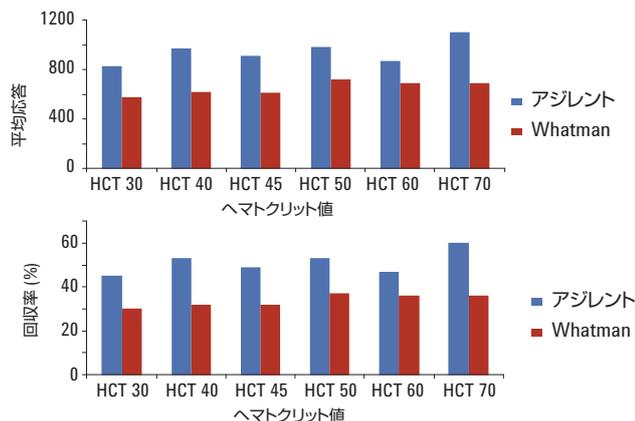
回収率に対するヘマトクリットの影響

サンプル量は、Agilent Bond Elut DMS カードの方が Whatman カードよりも多くなります。これは、両方のカードで各 HCT レベルを比較すると、このカードの方がスポット面積が小さいからです (表 3)。これは、より多くの対象化合物が抽出される結果、感度または応答が高くなり、多くの干渉が除去されることを示しています。3 mm のディスクから実際にサンプリングした血液体積は 4 μL であり、これは、カードにスポッティングした量にかかわらず一定です [6]。3 mm のくり抜きから得られたこの体積を、くり抜いた部分の面積とスポット面積の比を確認することで測定しました。

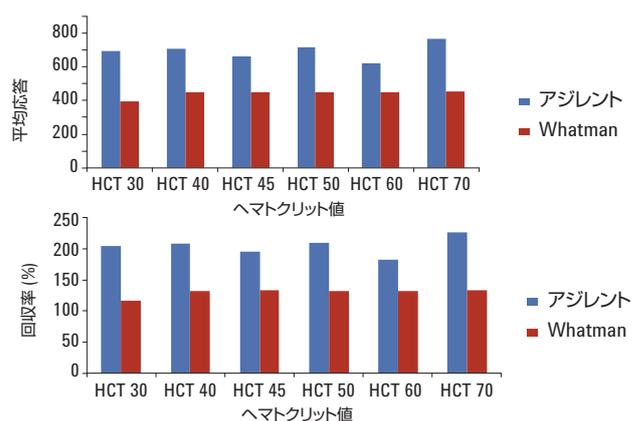
4 種類のすべての化合物について得られた絶対回収率および平均応答 (4 μL の水溶液標準と比較) は、すべてのヘマトクリットレベルで Agilent Bond Elut DMS カードの方が Whatman カードよりも高くなります (図 2)。

プログアニルでは、6 つの HCT レベルのうち 5 つで最高の回収率 (97~111 %) が得られました。HCT 60 のサンプルの数値については疑問があります。これは、Agilent の HCT 60 サンプルで、混合物の中の 4 つの化合物のうちの 3 つで応答と回収率に低下が見られるため、何らかの処理または機器エラーがあるように思われるからです。シタマキンおよび塩化ベンゼトニウムは、いずれもすべての HCT レベルでイオン強化が見られます。塩化ベンゼトニウムとシタマキンは Agilent カードで 100 % を超える回収率が得られ、内因性化合物からのイオン強化を示唆しています。Whatman でのシタマキンの回収率は 100 % に近付いていますが、これは、サンプル量が少ないためにイオン強化効果が平準化されていることが原因と考えられます。

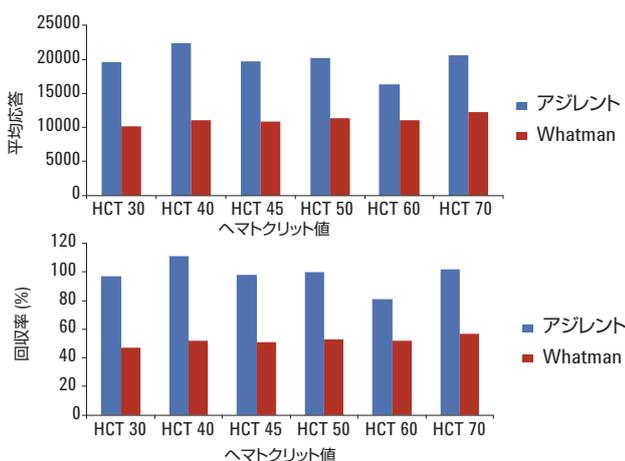
アセトアミノフェン



シタマキン



プログアニル



塩化ベンゼトニウム

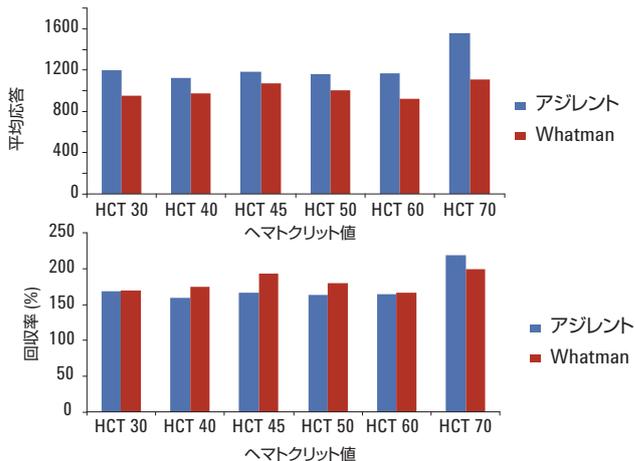


図 2. Agilent および Whatman 基材での 4 つの化合物の平均応答および回収率 (%) に与えるヘマトクリットの影響

表 4 に、HCT の関数として得られた平均応答と回収率の % RSD を示します。応答の RSD の大部分が 10 % 以下で、いくつかはこの範囲を外れていることがわかります。これらの数値は、DMS がサンプル精製技術でなく、むしろサンプル保存技術であることを考えると驚くべきことではありません。Agilent DMS カードが示す回収率の RSD は、同等かわずかに高くなります。これは、サンプル量が多いために、対象化合物と共抽出される干渉が多くなるからです。

結論

ヒト血液ヘマトクリットと、これがアッセイバイアスに与える影響を、セルロース系および非セルロース系基材で調べました。スポット面積、イオン抑制、および対象化合物の回収率は、乾燥血液スポット分析の性能に影響を与える最も重要な要因です。非セルロース系の Agilent Bond Elut DMS カードでは、小さいアッセイバイアスを確実に提供するデータが得られました。HCT は、両方の基材上に形成される乾燥血液スポットのサイズに反対の影響を与えます。つまり、非セルロース系 DMS カードでは、HCT 30~70 でスポット面積が 19 % 増加するのに対し、セルロース系基材では 36 % 低下します。シタマキンと塩化ベン

ゾトニウムで観察されたイオン強化に関わらず、アジレントのカードでは、すべての HCT で回収率にある程度良好な再現性がありました。したがって、ヘマトクリットの変動の結果生じるバイオ分析のバイアスは、セルロース系基材よりもアジレントの非セルロース系基材の方が大幅に小さくなります。

酸性対象化合物に関するイオン抑制/ポストカラムインフュージョンの実験とデータを示す詳細なアプリケーションノートについては、資料 5990-9630EN をご覧ください。

表 4. 非セルロース系 (Agilent Bond Elut DMS) およびセルロース系 (Whatman) 基材

a) HCT が平均応答の % RSD に与える影響

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 (アジレント)	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 (アジレント)	3 %	16 %	11 %	9 %	4 %	8 %
シタマキン (Whatman)	13 %	5 %	11 %	7 %	13 %	5 %
プログアニル (アジレント)	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 (アジレント)	8 %	9 %	10 %	8 %	12 %	15 %
塩化ベンゼトニウム (Whatman)	22 %	6 %	15 %	11 %	6 %	6 %

b) HCT 30~70 が回収率の % RSD に与える影響

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

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. 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.
6. W.C. Hudson, B. Yong, P. Boguszewski, D. Tran, Y.L. Chen, *Dried Blood Spotting Sample Volume Variability*. ASMS 2011 poster, ThP 114.
7. 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.
8. 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」、アプリケーションノート、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-8306JAJP (2011)

詳細情報

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., 2012

Printed in Japan

April 11, 2012

5991-0099JAJP



Agilent Technologies