

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いたヒト血清中薬物の LC/MS/MS 定量分析

アプリケーションノート

臨床研究

著者

Limian Zhao and Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-Lipid (Captiva EMR-Lipid) は利便性の高い SPE カートリッジまたは 96 ウェルプレートフォーマットに実装されたパススルー式のクリーンアップ製品です。この研究では、ヒト血清中の代表的な薬剤化合物 9 種の LC/MS/MS を用いた定量における Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートのアプリケーションを紹介します。サンプルはタンパク質除去のため *in situ* 除タンパク処理 (PPT) し、その後、Captiva EMR-Lipid クリーンアップで脂質を取り除きました。研究全体をバッチプロセスとして 96 ウェルプレート内で実施しました。薬剤化合物 9 種を定量化するため、同位体またはアナログ内部標準を用いて、血清中の 0.5 ~ 200 ng/mL のキャリブレーションダイナミックレンジに対して定量メソッドを定めました。メソッド検証は 3 日間の真度および精度分析によって実証しました。結果として、直線性 $R^2 > 0.99$ の優れた検量線が示され、5 つの QC レベルすべてにおいて、きわめて高い真度 (定量下限で <20 %、その他のレベルで <15 %) と精度 (RSD <15 %) が得られました。メソッド選択性およびキャリーオーバーも同様に評価しました。その結果、*in situ* PPT に続いて Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いる確立されたプロトコルによって、生物マトリックスにおける薬剤化合物の信頼性ある定量が大幅に改善されることが実証されました。



Agilent Technologies

はじめに

生物マトリックスにおけるターゲット薬物および代謝物化合物定量のためのバイオ分析では、96 ウェルプレートによるハイスループットのサンプル前処理法を用いるのが一般的です。サンプルは96 ウェルプレート内に直接投入し、目的成分の抽出やマトリックス除去等のすべてのサンプル前処理を96 ウェルフォーマット内で実施します。このプロセスは高い生産性と効率をもたらすため、生体試料を分析する分野で広く適用されています。生体試料の分析定量のメソッドバリデーションは、2点測定での検量線直線性、標準溶液の真度、添加されたQC サンプルのダイナミックレンジ全体の真度および精度、メソッド選択性、キャリアオーバー、サンプル処理中の成分安定性試験など、厳格で徹底した要件が求められるのが一般的です。厳格な許容基準には、定量下限 (LLOQ) 真度 $100 \pm 20\%$ 、その他のレベルの真度 $100 \pm 15\%$ 、および $LLOQ \leq 20\% RSD$ 、および他のレベルの $RSD \leq 15\%$ が含まれます¹。

96 ウェルプレートによるサンプル前処理法は一般に、固相抽出 (SPE)、液液抽出 (LLE)、固体サポート液液抽出 (SLE)、および除タンパク処理 (PPT) を含みます²。SPE は生体サンプルにおける低分子 LC/MS/MS 定量において幅広い用途を持ち、効率的なマトリックススクリーンアップが可能です。しかし、SPE はターゲット化合物の捕捉とその後の溶出のため、さらなるメソッド開発研究と複数のステップが必要となります³。LLE や SLE は SPE よりも効率的にリン脂質を除去することがありますが、高極性対象化合物の回収率が懸念されるのが一般的です⁴。PPT は最もシンプルで安価な生体サンプル前処理法であるため、幅広く採用されています。アセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒を用いてタンパク質を変性、沈殿させて除去します。この手法ではリン脂質が除去されず、これが定量メソッドと機器メンテナンスにも多くの問題を引き起こす可能性があります⁵。

Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal—Lipid (Captiva EMR-Lipid) は、最新の充填剤を用いた製品シリーズであり、分析対象物を損失することなく主な脂質をサンプルマトリックスから選択的に除去します。脂質除去のメカニズムは、サイズの排除と、脂質物質の長い脂肪族鎖と EMR-Lipid 充填剤間の疎水性相互作用の組み合わせです。選択的な相互作用メカニズムにより、リン脂質やその他の脂質を PPT 後の生体サンプルから効率的に除去することができます。Captiva EMR-Lipid SPE カートリッジ/96 ウェルプレートによって、*in situ* PPT とその後のパスルークリーンアップが可能になります。生体サンプル中のリン脂質の除去効率は、別のアプリケーションノートで詳細に評価および比較されており⁶、Captiva EMR-Lipid は PPT 後の優れたリン脂質除去を実証しました。この研究では、生体サンプル中の低分子定量に Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートプロトコルを用いて優れた結果が達成されることを実証するため、代表的な低分子医薬品を選択しました。幅広い極性 (親水性または疎水性) と酸、塩基性を持つ物質を選択しました。ターゲット化合物の化学的特性と化学構造を図 1 に示しました。メソッドは標準的な生体試料分析メソッドバリデーションガイドランスに従って検証しました。さらに、Captiva EMR-Lipid 充填剤のバッチ間再現性を、個別の材料ロット 3 個分のリン脂質除去と分析対象物の回収率に基づいて評価しました。

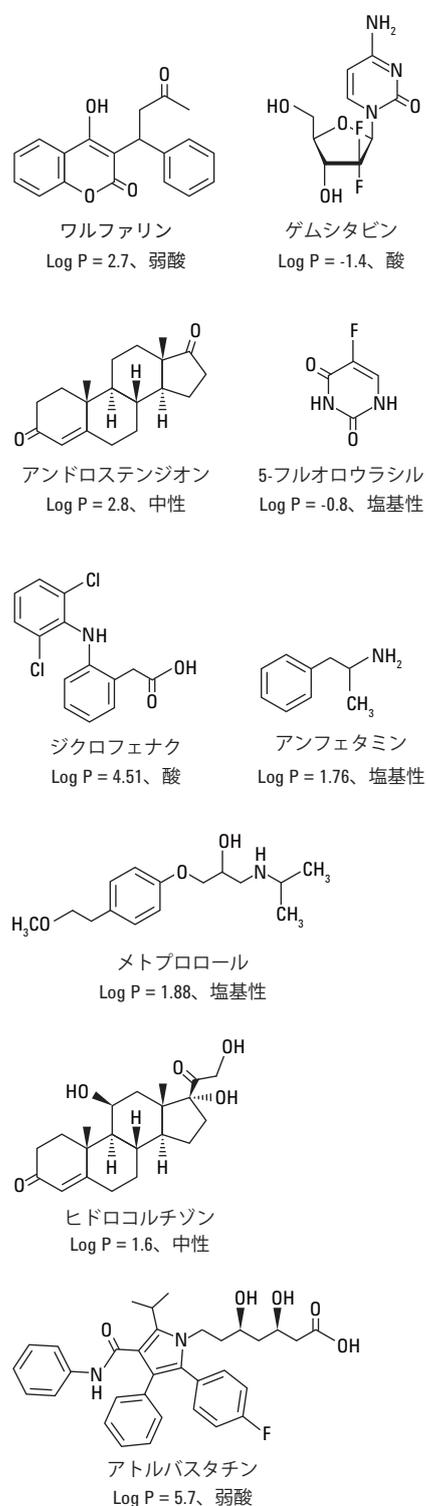


図 1. 代表的な薬剤化合物の化学構造と特性

実験方法

材料および試薬

試薬および溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリル (ACN) は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から入手しました。試薬グレードのギ酸 (FA) は Agilent から入手しました (部品番号 G2453-85060)。化学薬品標準溶液およびその他の化学薬品は、純粉末または標準原液として Sigma (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。ヒト血清は Biological Specialty Corporation (コルマール、ペンシルベニア州、米国) から調達しました。

標準および溶液

標準試料原液および内部標準 (IS) 原液は、それぞれ 2.0 mg/mL の、メタノールまたは DMSO のどちらかで作成しました。混合標準スパイク溶液は、1:1 の ACN/水 25 µg/mL でそれぞれ調製しました。各サンプルに加える IS 作業溶液は、2:8 の ACN/水に 2 µg/mL の濃度で作成しました。

アセトニトリル 20 mL にギ酸 200 µL を加えて、ギ酸 1 % が含まれる ACN 溶液を調製しました。この溶液は除タンパク処理に使用しました。

酢酸アンモニウム 385.3 mg を Milli-Q 水 1 L 中に溶解し、その後ギ酸 1 mL を加えて、ギ酸 0.1 % を含む 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (移動相 A) を調製しました。ギ酸 ACN 溶液 0.1 % (移動相 B) は、ACN 1 L にギ酸 1 mL を加えて作成しました。

5 mM の酢酸アンモニウム水溶液は、Milli-Q 水 200 mL 中に酢酸アンモニウム 77.06 mg を溶解して作成しました。再溶解溶液は、前述の緩衝液と ACN を 9:1 の割合で混合し作成しました。80:20 のアセトニトリル/水混合液は、ACN 80 mL と水 20 mL を混合し作成しました。

HPLC 条件

パラメータ	設定															
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 LC カラム、EC-C18、150 × 2.1 mm、2.7 µm (p/n 699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 ガードカラム、EC-C18、5 × 2.1 mm、2.7 µm (p/n 821725-911)															
流量	0.3 mL/min															
カラム温度	30 °C															
オートサンプリング温度	4 °C															
注入量	8 µL															
移動相	A) 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液と 0.1 % ギ酸を含む水 B) 0.1 % ギ酸アセトニトリル															
ニードル洗浄	1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O と 0.2 % FA、フラッシュ時間: 7.5 秒															
グラジエント	<table><thead><tr><th>時間 (分)</th><th>%B</th><th>流量 (mL/min)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>6</td><td>0.3</td></tr><tr><td>2.5</td><td>40</td><td>0.3</td></tr><tr><td>7.0</td><td>90</td><td>0.3</td></tr><tr><td>7.01</td><td>100</td><td>0.3</td></tr></tbody></table>	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)	0	6	0.3	2.5	40	0.3	7.0	90	0.3	7.01	100	0.3
時間 (分)	%B	流量 (mL/min)														
0	6	0.3														
2.5	40	0.3														
7.0	90	0.3														
7.01	100	0.3														
ストップタイム	8 分															
ポストタイム	3 分															

MS 条件

パラメータ	設定
ガス温度	120 °C
ガス流量	14 L/min
ネブライザ	40 psi
シースガスヒーター	400 °C
シースガス流速	12 L/min
キャピラリー	3,000 V
iFunnel パラメータ	高圧 RF: 150 V (POS)、90 V (NEG) 低圧 RF: 60 V (POS)、60 V (NEG)
データ取り込み	dMRM

装置と材料

サンプル前処理に用いた装置

- Centra CL3R 遠心管 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- ViaFlo 96 リキッドハンドラー (Integra、ハドソン、ニューハンブシャー州、米国)
- Captiva バキュームカラー (部品番号 A796)
- 真空ポンプ (Gast、ベントンハーバー、ミシガン州、米国)
- CentriVap コンセントレータ、コールドトラップ、および真空ゲージ (ラブコンコ、カンザスシティ、ミズーリ州、米国)
- Agilent Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレート (部品番号 5190-1001)
- Agilent Captiva 96 ウェル 1 mL コレクションプレート (部品番号 A696001000)
- Agilent Captiva 96 ウェルプレートカバー、10 パック (部品番号 A8961007)

機器条件

サンプルの分析には、次の機器で構成される Agilent 1290 Infinity UHPLC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)

UHPLC システムを、Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオンソース付きの Agilent G6490 トリプル四重極質量分析装置に接続します。データの取得と分析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

成分ダイナミック MRM パラメータは表 1 を、サンプルクロマトグラムおよびピーク同定は図 2 を参照してください。

表 1. ターゲット化合物の LC トリプル四重極 dMRM パラメータおよびリテンションタイム

分析対象物	RT (分)	デルタ RT (分)	極性	プロダクトイオン				
				プリカーサーイオン (m/z)	定量イオン	CE (v)	定性イオン	CE (v)
5-フルオロウラシル	1.5	2	ネガティブ	129	59.1	29	42.1	17
ゲムシタピン	1.7	2	ポジティブ	264.1	112.2	17	95.1	49
アンフェタミン	3.7	2	ポジティブ	136.1	119.1	5	91	21
D5-アンフェタミン (IS)	3.7	2	ポジティブ	141.1	124.1	5	93	13
メトプロロール	4.1	2	ポジティブ	268.2	77	69	56.1	41
ヒドロコルチゾン	4.7	2	ポジティブ	363.2	121.1	25	91	73
アンドロステンジオン	6.1	2	ポジティブ	287.2	109.1	29	97.1	25
ワルファリン	6.1	2	ポジティブ	309.1	251	15	163	8
アトルバスタチン	6.3	2	ポジティブ	559.3	440.2	25	250.1	49
ジクロフェナク	6.7	2	ネガティブ	294	249.9	9	35.1	45
D9-プロゲステロン (IS)	7.4	2	ポジティブ	324.3	113.2	29	100	29

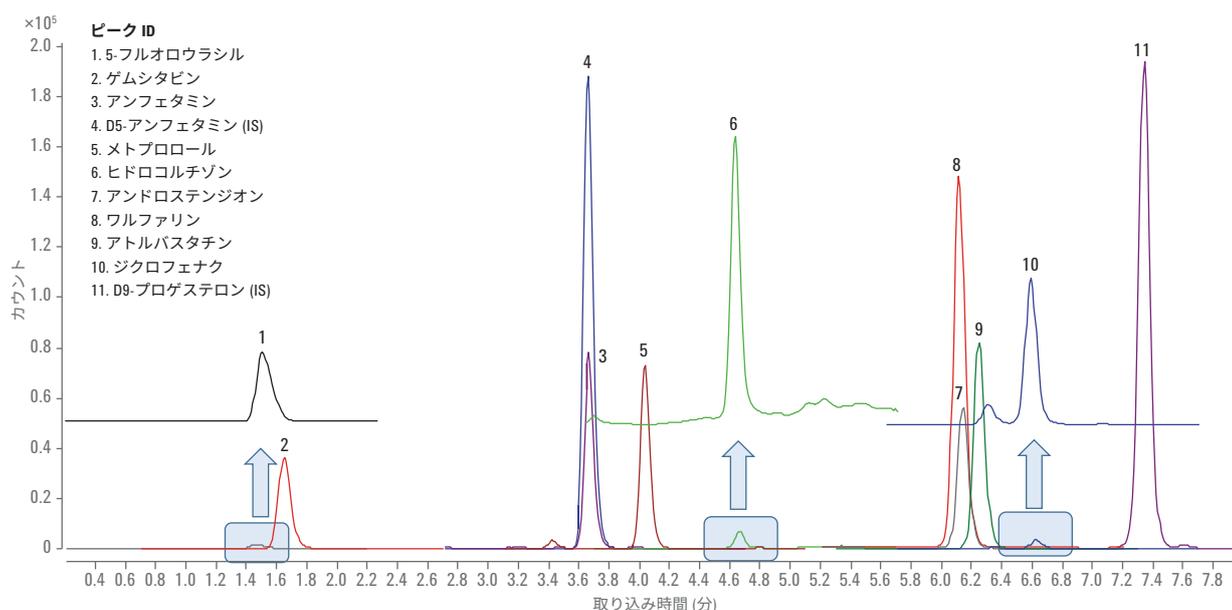


図 2. 50 ng/mL 薬物標準および 200 ng/mL IS 標準が添加されたヒト血清サンプルの LC/MS/MS クロマトグラム (DMRM)。除タンパク処理とその後の Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップによりサンプルを抽出した。詳細はサンプル前処理セクションを参照。

標準溶液および QC サンプル前処理法

検量線標準は、標準作業液 25 µg/mL in 1:1 ACN/水を血清中に添加して調製しました。マトリックスへの溶媒スパイクの影響を低減させるため、中間的希釈サンプルとして 250 ng/mL の濃度で血清に添加したものを各濃度の添加サンプルを作るたびに新しく作成しました。検量線のダイナミックレンジは 0.5 ~ 200 ng/mL で、0.5、1、5、10、50、100、150、200 ng/mL を含みます。これらの標準は、先の中間的希釈サンプル相当量を血清ブランクにスパイクし、その後ボルテックスで十分混合することによって調製しました。真度および精度メソッド検証試験のために、QC サンプルの 5 つのレベルを分析しました。これには 0.5 ng/mL (LLOQ)、2 ng/mL (低 QC)、50 ng/mL (中 QC)、150 ng/mL (高 QC)、200 ng/mL (定量上限 (HLOQ)) を含みます。これらの QC サンプルも、相当量の中間的希釈サンプルをスパイクすることによって調製しました。標準溶液および QC は、すべて 2-mL スナップキャップチューブ内で調製しました。その後、抽出のため 96 ウェルプレートに分配しました。

サンプル抽出

表 2 にサンプル前処理手順を詳しく記載しました。Captive EMR-Lipid プレート中で変性させる溶媒に血清サンプルを加える前に、コレクションプレートに血清サンプルを分配し、その後 IS 溶液を加えることが重要です。第一に、これにより、EMR-Lipid プレートへの複数サンプルの同時移動が促され、ウェル内での同時 PPT が可能になり、サンプルの再現性が向上します。第二に、生体マトリックスへの IS 溶液の添加とその後の混合は、IS 溶液を適切に均一化し、抽出前にタンパク質へ結合させ、内部標準とターゲット化合物を同一の挙動にする上で重要です⁴。

表 2. タンパク処理の後に Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いたヒト血清のサンプル前処理手順

手順	操作パラメータ
各サンプルを 1 mL 96 ウェルプレートに分配する。	100 µL
コントロールブランクを除く各サンプルに IS 作業液を加える、または 50:50 の ACN/水をコントロールブランクに加える。	10 µL
プレートカバーで覆い、2,500 rpm でボルテックスする。	1 分
別の 1-mL コレクションプレート上の Agilent Captiva EMR-Lipid プレートに、1% ギ酸を含む ACN を加える。	300 µL
96 リキッドハンドラーを用いて、サンプル混合物全体を EMR-Lipid プレートに移す。	110 µL
ピペットにより、EMR-Lipid プレート内のサンプル混合物を混合する。	3 ~ 5 回
EMR-Lipid プレートとコレクションプレートの間に Captiva カラーを挿入する。	
メイクアップ溶液 (80:20 の ACN/水) を各サンプルに加える。	300 µL
段階的かつ一定した溶出に適切な真空を行う。	2 ~ 4 inch Hg
最後に、強度を上げた真空でカートリッジベッドをドレインする。	8 ~ 10 inch Hg
コレクションプレートを取り外し、CentriVap で蒸発および乾燥させる。	40 °C
10:90 の ACN/5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液で再溶解する。	100 µL
2,500 rpm でボルテックスし、超音波洗浄器にかけ、プレートマットでふたをする。	2 分 + 5 分

メソッド検証

メソッド検証は 3 日間の真度および精度分析を通じて実施しました。検証ランシーケンスには次のものが含まれます。

- ダブルマトリックスブランク
- マトリックスブランク (IS でスパイク)
- 最初の標準溶液セット
- 2 ~ 3 マトリックスブランク
- LLOQ (n = 6)
- 低 QC (n = 6)
- 中 QC (n = 6)
- 高 QC (n = 6)
- HLOQ (n = 6)
- 2 ~ 3 キャリーオーバーマトリックスブランク
- ダブルマトリックスブランク
- マトリックスブランク
- 2 番目の標準溶液セット
- 2 ~ 3 マトリックスブランク

合計で 56 ~ 58 サンプルが各検証分析に含まれました。

マトリックスイオン抑制の研究

ターゲット化合物に対するマトリックスイオン抑制の影響は、標準ポストカラムインフュージョンメソッドを用いて評価しました。10:90のACN/5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液中で20 ng/mLで調製された純粋な標準溶液は、シリンジポンプとTコネクタを用いてポストカラム法で導入し、LCカラムから質量選択検出器へのフローを組み合わせました。標準のポストカラムインフュージョンの設定図は、図3のとおりです。各種クリーンアッププロトコル下で調製されたマトリックスブランクは、前述の分析メソッドを用いてLCシステムに注入されました。分析対象物のMRMチャンネルを8分間のクロマトグラフィーウィンドウでスキャンし、成分反応へのマトリックスの効果モニタリングしました。

結果と考察

この研究では、Captiva EMR-Lipidを用いて生物マトリックス中の低分子を定量しました。

メソッド検証

3日間の真度および精度分析の定量結果は、LLOQおよびその他のレベルにおける真度および精度の許容基準に基づいて分析しました。その他のレベルとは、真度 $\geq 80\%$ 、LLOQレベル $\leq 20\%$ RSD、および真度 $\geq 85\%$ およびLLOQレベル $\leq 15\%$ RSDなどです。キャリブレーションポイントは合計16個です。真度許容レベルを超過したポイントはいずれもキャリブレーション計算に用いることができませんでした。未使用キャリブレーションポイントの合計は、キャリブレーションポイント全体の20%を超えてはならず、超えた場合は分析失敗としました。使用したキャリブレーションポイントはキャリブレーション合計16個に対し ≥ 13 である必要があります。

日内の検量線標準の結果は表3のとおりです。すべての化合物が、許容可能な検量線の直線性および真度結果となりました。クリーンアップされたマトリックスによって一貫した成分反応が得られ、2点測定検量線がタイトで直線性のあるものになりました。これとは逆に、PPTのみのサンプルは多量リン脂質を含み⁶、成分反応が分析を通じて一貫せず、一致しない非線形の2点検量線となっています(図4)。このような不一致線と30%超の未使用キャリブレーションポイントは、分析失敗となります。日内のQC真度および精度結果を表4に、日間の結果を図5に示します。日内および日間の真度および精度はともに、許容基準を満たす結果となりました。

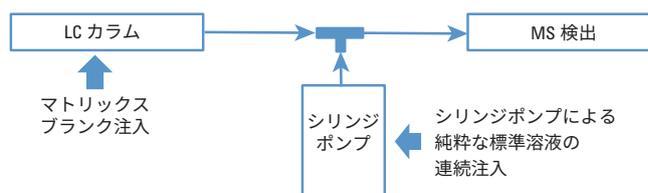


図3. マトリックスイオン抑制の評価および比較研究における標準ポストカラムインフュージョンの設定図

表3. 3日間の真度および精度分析の検量線標準結果のまとめ

分析対象物	5-フルオロウラシル	ゲムシタピン	アンフェタミン	メトプロロール	ヒドロコルチゾン	ワルファリン	アンドロステンジオン	アトルバスタチン	ジクロフェナク	
検量線	回帰	直線	直線	直線	直線	直線	直線	直線	直線	
重量	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x^2$	$1/x$	$1/x^2$	$1/x$	
定量に使用されたIS	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Pro-D9	Pro-D9	Pro-D9	
1日目	使用したポイント (合計ポイント)	14 (16)	15 (16)	16 (16)	16 (16)	15 (16)	15 (16)	16 (16)	15 (16)	16 (16)
	R ²	0.9929	0.9912	0.9958	0.9907	0.9966	0.9914	0.9989	0.9965	0.9988
	平均真度	97.6	98.7	100.0	100.0	101.5	98.5	100.0	100.2	100.0
	RSD (n = 16)	8.5	7.3	3.8	5.2	5.8	8.2	2.5	3.9	3.9
2日目	使用したポイント (合計ポイント)	14 (16)	15 (16)	15 (16)	14 (16)	15 (16)	15 (16)	16 (16)	15 (16)	15 (16)
	R ²	0.9918	0.9964	0.9975	0.9961	0.9948	0.9912	0.9985	0.9958	0.9981
	平均真度	101.6	99.7	99.9	99.0	99.1	99.6	100.0	98.8	101.7
	RSD (n = 16)	5.8	2.7	2.3	6.3	6.1	6.8	3.7	6.0	8.1
3日目	使用したポイント (合計ポイント)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	16 (16)	15 (16)
	R ²	0.9926	0.9936	0.9953	0.9928	0.9910	0.9929	0.9993	0.9933	0.9971
	平均真度	100.5	99.2	99.7	99.5	99.4	98.9	100.0	100.0	100.6
	RSD (n = 16)	5.0	5.1	4.9	6.7	4.8	2.6	2.2	6.1	2.8

Am = アンフェタミン、Pro = プロゲステロン

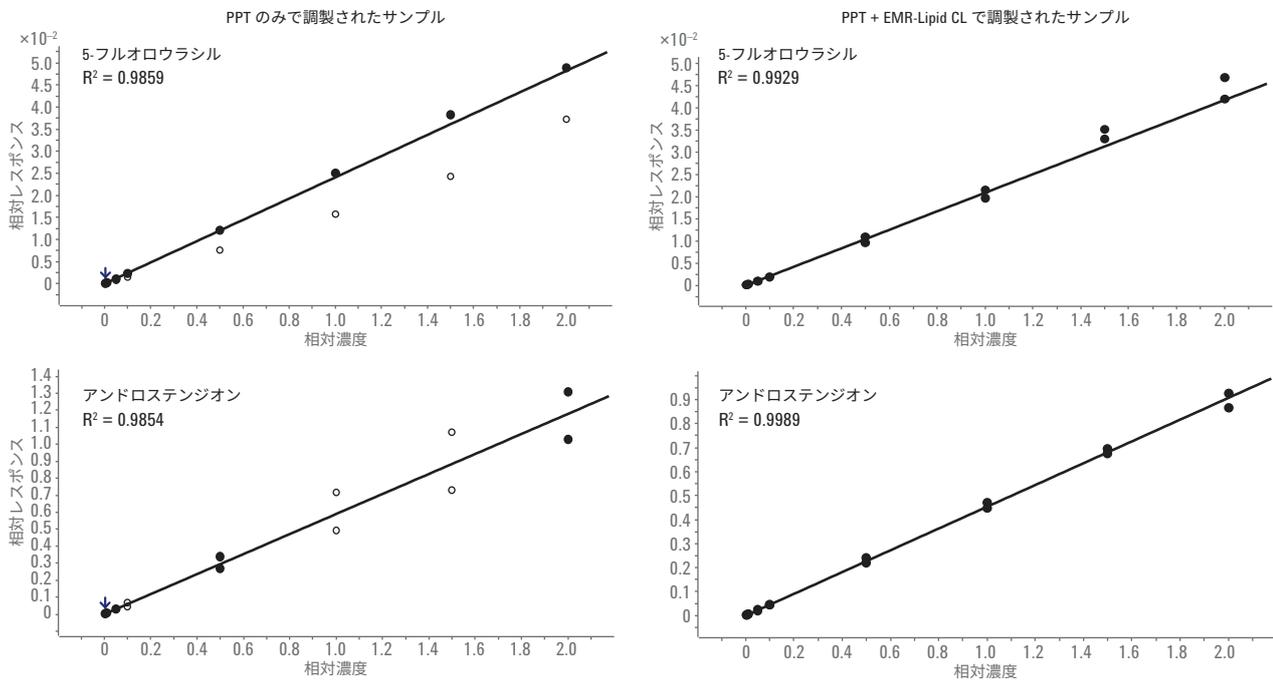


図 4. PPT のみを用いたサンプルと PPT 後に Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いたサンプルの 2 点測定検量線直線性の比較

表 4. QC サンプルの 3 日間の真度 (%Ac) および精度 (%RSD) 分析の日内結果のまとめ (各レベルで n = 6)

分析対象物		5-フルオロウラシル		ゲムシタビン		アンフェタミン		メトプロロール		ヒドロコルチゾン		フルフェリン		アンドロステンジオン		アトルバスタチン		ジクロフェナク	
		%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD
LLOQ (0.5 ng/mL)	1 日目	103.0	8.0	97.2	5.4	94.4	5.0	105.1	12.2	100.4	2.8	105.9	8.6	99.7	6.9	98.8	8.7	99.9	6.0
	2 日目	97.4	5.9	87.2	5.6	93.2	9.5	93.8	9.7	87.5	10.4	87.5	5.1	86.0	10.5	103.5	6.5	90.3	11.3
	3 日目	98.4	5.6	88.6	4.2	98.2	2.6	96.7	7.1	87.7	7.3	90.3	4.5	90.3	7.5	92.3	14.1	94.2	14.1
低 QC (2 ng/mL)	1 日目	103.7	10.0	90.5	5.5	96.1	4.2	99.7	6.4	103.3	5.2	88.7	6.0	95.8	4.7	94.5	7.3	89.9	14.2
	2 日目	97.4	6.5	87.2	7.5	93.2	3.6	93.8	3.6	87.5	4.1	87.5	8.6	86.0	7.0	103.5	6.1	90.3	15.0
	3 日目	85.8	6.1	95.2	4.6	100.3	3.8	101.9	10.8	97.9	3.7	99.3	6.2	99.3	6.2	93.8	6.8	91.2	8.1
中 QC (50 ng/mL)	1 日目	107.0	6.3	94.7	3.3	97.9	5.0	107.5	6.9	103.1	4.7	92.2	3.8	104.3	3.8	86.6	12.2	97.3	6.7
	2 日目	101.5	7.1	94.3	7.0	100.5	5.0	102.5	9.5	92.5	14.6	97.7	10.4	97.7	3.4	95.9	13.0	93.3	6.5
	3 日目	85.8	7.6	95.2	4.2	100.3	6.1	101.9	5.6	97.9	6.5	99.3	5.2	99.3	5.2	93.8	7.1	91.2	8.6
高 QC (150 ng/mL)	1 日目	109.2	11.9	102.8	3.8	98.9	4.1	95.6	4.9	108.7	7.6	101.5	8.0	94.2	3.7	92.5	7.8	96.4	10.5
	2 日目	104.4	5.6	99.4	9.3	100.0	5.1	92.3	5.1	101.7	7.8	105.1	6.6	93.4	6.5	93.4	5.1	94.8	6.1
	3 日目	110.1	3.1	99.5	6.4	99.7	4.1	92.7	4.4	103.3	6.9	103.6	8.9	105.8	8.0	98.2	7.4	102.7	9.0
HLOQ (200 ng/mL)	1 日目	108.7	4.3	106.9	4.3	101.1	5.6	101.3	8.4	112.5	2.6	107.0	8.4	97.6	3.6	85.4	14.2	93.1	4.5
	2 日目	104.5	6.6	101.7	7.4	102.7	4.6	94.1	8.7	109.0	4.9	108.5	7.2	101.5	5.0	95.5	8.9	100.9	4.5
	3 日目	100.5	6.4	100.7	3.9	99.5	4.6	90.0	1.8	107.3	6.0	110.6	6.7	110.6	6.7	105.8	5.9	110.0	3.4



図5. メソッド検証の日間真度および精度結果のまとめ

最低標準溶液の前のマトリックスブランク分析は、メソッド選択に用いました。マトリックス共溶出干渉反応は、LLOQ レベルでターゲット化合物反応の 20 % 以下である必要があります。干渉はアンフェタミンピークに存在し、0.5 ng/mL でアンフェタミンピーク反応 >20 % の一因になる可能性があります。ヒドロコルチゾンは血清ブランクにトレースレベルで存在しましたが、そのレスポンスは 0.5 ng/mL レベルでの分析対象薬剤のレスポンスの 20 % 以下でした。キャリアオーバーは、最高標準溶液の後にマトリックスブランクを用いて評価されました。アンドロステンジオン、アトルバスタチンおよびジクロフェナクは同じトレースキャリアオーバーを示しました。トレースキャリアオーバーは、ニードルポートの洗浄時間とポスト LC グラジエントカラムのフラッシュ時間を延ばすことで対処しました。

3 日間の真度および精度分析に基づき、複数の薬物化合物を単独で判定できるメソッドを検証しました。この検証済みメソッドでは、IS (内部標準) を用いました。一般的に、バイオ分析では安定同位体標識 IS が強く推奨されます。安定同位体標識 IS を利用できない場合は、構造的に類似したアナログ IS を使用する必要があります⁴。このメソッドでは、2 つの IS

化合物を 9 種の薬剤化合物に用い、アンフェタミンのみに安定同位体標識 IS、D5-アンフェタミンがありました。D5-アンフェタミンと D9-プロゲステロンを、残りの化合物の IS として用いました。しかし、この確立されたメソッドは、多くの化合物について構造的相関性のない IS によってバリデーションすることができませんでした。その要因は、よりクリーンなサンプルマトリックスと、イオン抑制効果の低減です。この利点によりメソッド開発とバリデーションが簡素化され、費用対効果が上がります。

マトリックスイオン抑制

マトリックス効果は、標準ポストカラムインフュージョン研究によって評価されました。処理済み血清ブランクを LC カラムへ注入後、成分の連続ポストカラムインフュージョンによって、可能なマトリックス効果が評価されました。成分のリテンションタイムまたはその付近での信号強度のあらゆる変化は、分析とのマトリックス干渉から生じる物質の存在を示しています。

ポストカラムインフュージョン研究は、PPT のみによって、PPT とその後の Captiva EMR-Lipid クリーンアップによって、および PPT とその後の

他社の脂質除去製品クリーンアップによって調製された血清マトリックスブランク注入で実施しました。図 6 のとおり、プロファイルはターゲット化合物のサンプルクロマトグラムとオーバーラップおよび比較し、ターゲット化合物の各種イオン抑制を示します。可能なイオン抑制には主要ゾーンが 3 つあります。RT 1 ~ 2 分 (ゾーン 1)、RT 3.5 ~ 6 分 (ゾーン 2)、および RT 6.2 ~ 8 分 (ゾーン 3) です。ゾーン 1 では、すべてのプロファイルで抑制が見られます。その原因としては、マトリックスから生じる塩が考えられます。ゾーン 2 は主としてマトリックスから生じるリゾリン脂質が原因で、ゾーン 3 は主としてマトリックスから生じるグリセロリン脂質が原因です。PPT と Captiva EMR-Lipid の両方を行なったクリーンアップのサンプルに対するプロファイルは、ゾーン 2 およびゾーン 3 に大幅な低下のないスムーズな成分トレースを示し、リン脂質が効率的に除去されていることを表しています。しかし、PPT のみに対するプロファイル、および PPT と他の脂質除去製品クリーンアップのサンプルに対するプロファイルは、ゾーン 2 およびゾーン 3 に大幅な低下があり、リン脂質によるイオン抑制を表しています。これらのゾーンにおけるターゲット化合物のイオン抑制、特に低下部分にある成分のイオン抑制は、これらの成分の定量メソッドの信頼性に影響を与えます。



図 6. 標準ポストカラムインフュージョンのプロファイルの比較とターゲット化合物に対するマトリックスイオン抑制効果の実証

Agilent Captiva EMR-Lipid 充填剤の バッチ間再現性

Captiva EMR-Lipid 充填剤のバッチ間再現性を、1 ng/mL レベルでのリン脂質除去および分析対象物の回収率について、3 種類の製造ロットが充填された 1-mL カートリッジを用いて評

価しました。3 種類すべての充填剤ロットで、リン脂質が 99 % 以上除去されました。Captiva EMR-Lipid 充填剤の一貫性およびバッチ間再現性も同様に、図 7 のとおり、一貫した分析対象物の回収率結果によって実証されました。

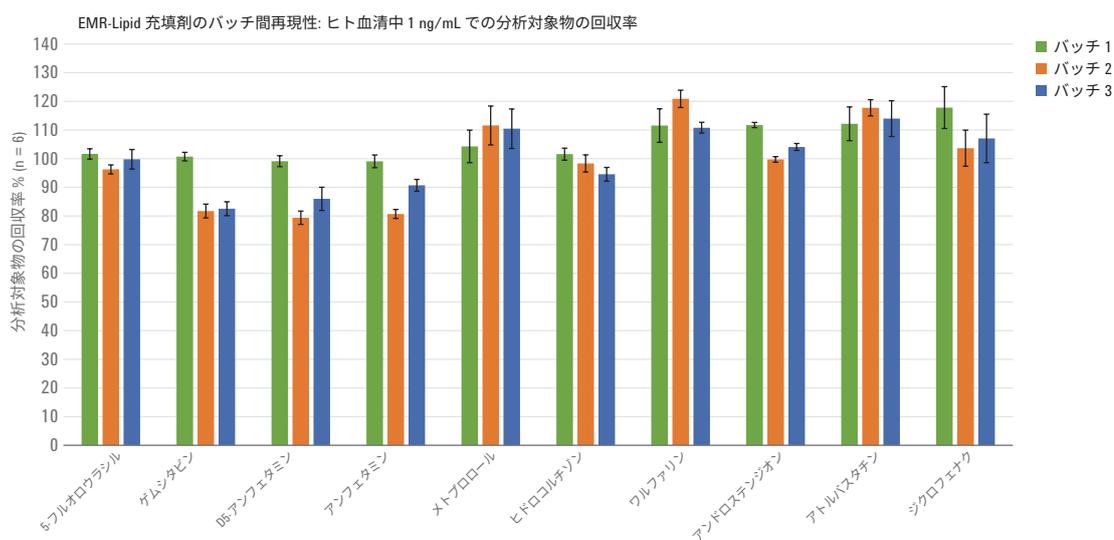


図 7. Agilent Captiva EMR-Lipid 充填剤のバッチ間再現性が、ヒト血清中の 1 ng/mL での分析対象物の回収率として実証された。

結論

PPTの後に Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-Lipid クリーンアップを用いるサンプル前処理メソッドを、ヒト血清中の代表的な薬剤化合物9種の定量について検証しました。3日間の真度および精度分析から、このメソッドは2点測定検量線のダイナミックレンジが広く再現性の高い直線性を得られ、日内および日間の真度と精度がきわめて優れていることが確認されました。標準ポストカラムインフュージョン研究では、PPTのみおよびPPT後に他社の脂質除去製品クリーンアップを組み合わせた場合と比較して、マトリックスイオン抑制が大幅に低減することを示しました。優れた定量結果が示すとおり、クリーンなマトリックスによって、確立されたメソッドの信頼性がさらに向上します。クリーンなマトリックスであれば、アナログISや構造的相関性のないISでさえも、高価な安定同位体標識ISの代わりに使用できる可能性があり、メソッドバリデーションが容易になるとともに、サンプル分析の費用対効果が向上します。

参考文献

1. US Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* **2001**.
2. Bylda, C.; Thiele, R. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst* **2014**, *139*, 2265–2276.
3. León, Z.; *et al.* Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 831–843.
4. Mulvana, D.E. Critical topics in ensuring data quality in bioanalytical LC-MS method development. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1051–1072.
5. Michopoulos, F.; *et al.* Extraction methods for the removal of phospholipids and other endogenous material from a biological fluid. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2747–2755.
6. Zhao, L.; Lucas, D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal using Captiva EMR—Lipid Cleanup. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8006EN, **2017**.
7. Bonfiglio, R.; *et al.* The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1175–1185.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, April 27, 2017

5991-8007JAJP



Agilent Technologies