

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いた LC/MS/MS による ヒト全血中の依存性薬物の定量

著者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Captiva EMR-Lipid は第 2 世代の Agilent EMR-Lipid 製品として位置づけられ、使い勝手の良い SPE カートリッジまたは 96 ウェルプレートで使用することができます。本研究では、ヒト全血中の代表的な依存性薬物 24 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、ウェル内タンパク処理 (PPT) を行った後、Captiva EMR-Lipid クリーンアップで脂質を取り除きました。プロトコルは全血サンプルを最初に添加し、次に変性溶媒で完全なウェル内 PPT を促進するよう修正されました。サンプル処理全体は 96 ウェルプレート内でのバッチで実行し、サンプル溶出は遠心分離か陽圧マニホールドのいずれかにより行いました。プロセス全体は単純かつ迅速で、2 時間以内に 96 サンプルの前処理が行えます。マトリックスクリーンアップはきわめて効率的なため、99 % を超えるリン脂質が除去され、マトリックスによるイオン抑制作用やシステムの汚染を軽減します。定量法は 3 日間の真度および精度分析によって検証され、全スパイクレベルにおいて優れた真度 ($100 \pm 20 \%$) および精度 ($RSD < 15 \%$) を示し、全血の定量下限 (LOQ) は $0.1 \sim 0.5 \text{ ng/mL}$ の範囲であり、検量線の直線性は $R^2 > 0.995$ を示しました。その結果、ウェル内 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、ヒト全血中の依存性薬物の定量の信頼度が大幅に向上することが実証されています。

はじめに

法中毒学では、生体サンプル中の依存性薬物 (DoA) の高速かつ高信頼性のスクリーニングおよび定量に対する需要が着実に高まっています^{1~3}。これは主に、依存性薬物の数が、分析用に提出されるサンプル数と同様に増加しているためです。従来、尿はスクリーニングや同定のために最適なサンプルでした。しかし、依存性薬物の代謝物を同定しなければならなかったため、定量試験の複雑さと不確実性が増大しました。そのため、血液サンプル、例えば全血、血漿、血清などの分析の重要度が増してきました。初期においては血漿が定量のための最適な主要サンプルマトリックスでしたが、サンプル前処理と機器による検出手法が改善されたことから、全血が同定と定量のための有用なマトリックスになりました。尿と比較して、血液を検体として分析に用いることには利点があります。

- 第 1 に、薬剤が身体で代謝およびろ過されないうちに、摂取直後に検出することができます。
- 第 2 に、血液は生理学的パラメータの変動が狭い範囲内になるため比較的均質です。
- 第 3 に、血液サンプルは欧州の国々や米国の一部で実施される薬物影響下での運転 (DUID) テストの場合に必須です⁴。

したがって、血液マトリックス中の DoA の信頼性の高い定量、特に全血の定量は公的な毒物分析において重要です。

DoA の毒物試験での機器は、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) および液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いました。しかし、GC/MS メソッドは通常、時間がかかり、分析前に分析

対象物の化学的誘導体化が必要な場合があります⁵。LC/MS/MS 分析技法を用いる利点は、試験を高速に実施でき、高感度、高選択性、および高安定性を得られることです⁶。毒物分析における系統的なサンプル前処理メソッドには、液液抽出 (LLE)、固相抽出 (SPE)、保持型液液抽出 (SLE) などがあります。しかし、こうしたメソッドは時間と手間がかかり、大量の有毒溶媒を使用する可能性があります。

Agilent EMR-Lipid 充填剤は最新の充填剤で、分析対象物の損失なしにサンプルマトリックスから主な脂質を選択的に除去することができます。Agilent EMR-Lipid 充填剤が提供する脂質除去メカニズムは、脂質化合物と独自の充填剤との間のサイズ排除および疎水の相互作用の組み合わせに基づきます。この相互作用のメカニズムにより、PPT 後の生体サンプルからリン脂質やその他の脂質をきわめて選択的かつ効率的に除去することができます。SPE カートリッジ/プレートフォーマットに充填された第 2 世代の EMR-Lipid 充填剤を使えば、充填剤にサンプルを通すだけでクリーンアップすることができます。生体サンプル中のリン脂質除去の有効性およびヒト血清中の代表的な医薬品の定量は、Agilent Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートを用いたウェル内 PPT および後続のフロースルークリーンアップにより実証されました^{7,8}。Agilent Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートを法医学検査に用いることの実現可能性を実証するために、本研究では一般的な DoA 化合物を 24 種選択しました。表 1 に、選択された化合物の化学的特性および構造を示します。メソッドはマトリックスクリーンアップ評価と同様に 3 日間の真度および精度試験を用いて検証しました。

実験方法

材料および試薬

試薬と溶媒はすべて 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)。酢酸アンモニウムと水酸化アンモニウムは Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。混合 DoA 標準原液 (MeOH 中に 1 µg/mL) は Agilent (部品番号 5190-0470-1) のものを使用しました。ヒト全血は Biological Specialty Corp. (コルマール、ペンシルベニア州、米国) から調達しました。内部標準 (IS) 原液 (MeOH または ACN 中に 1 mg/mL) は、Cerilliant (ラウンドロック、テキサス州、米国) から購入しました。

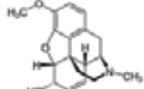
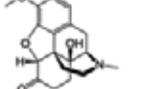
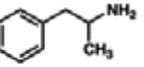
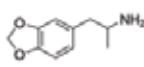
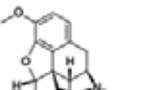
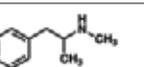
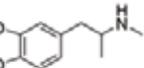
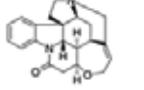
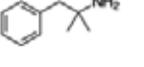
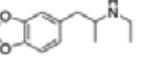
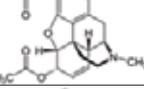
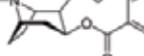
標準および溶液

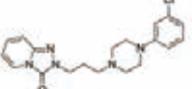
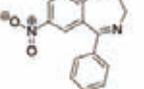
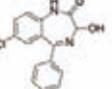
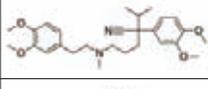
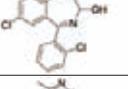
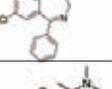
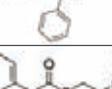
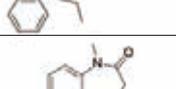
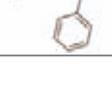
DoA 標準原液および個別 IS 原液の組み合わせは、標準および IS のスパイク溶液を作成するために用いました。標準スパイク溶液は 200 ng/mL の濃度で MeOH/水 20:80 の溶液で作成し、定量用標準溶液および QC サンプルに添加するために用いました。IS スパイク溶液は個別 IS 原液を 20:80 の MeOH/水で 2 µg/mL に希釈して作成し、サンプルに直接添加するために用いました。

移動相 A、0.1 % ギ酸 (FA) 含有 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液は、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 1 mL の FA を添加して作成しました。移動相 B、0.1 % FA 含有 ACN は、1 mL の FA を ACN 1 L に添加して作成しました。

1 % 水酸化アンモニウム (NH₄OH) 含有 95:5 ACN/MeOH 溶液は、事前混合した 95:5 の ACN/MeOH 40 mL に 400 µL の NH₄OH を添加することで用時調製しました。この溶液は使用するまで -20 °C に維持しました。

表 1. DoA 化合物、分類、logP、pKa および構造の一覧

DoA 化合物	分類	pKa	LogP	構造
コデイン	オピオイド	8.21	1.19	
オキシコドン	オピオイド	8.28	0.3	
アンフェタミン	アンフェタミン	10.2	1.76	
MDA	アンフェタミン	9.67	1.64	
ヒドロコドン	オピオイド	8.23	1.2	
メタンフェタミン	アンフェタミン	9.87	2.07	
MDMA	アンフェタミン	9.9	2.28	
ストリキニーネ	アルカロイド	8.26	1.93	
フェンテルミン	アンフェタミン	10.14	1.9	
MDEA	アンフェタミン	8.52	2.14	
ヘロイン	オピオイド	7.95	1.98	
コカイン	アルカロイド	8.61	2.3	

DoA 化合物	分類	pKa	LogP	構造
メペリジン	オピオイド	8.59	2.72	
トラゾドン	トリアゾロピリジン	6.14	2.9	
PCP	アリルシクロヘキシルアミン	8.29	4.69	
ニトラゼパム	ベンゾジアゼピン	3.2, 10.8	2.25	
オキサゼパム	ベンゾジアゼピン	1.55, 10.9	2.24	
ベラパミル	フェニルエチルアミン	8.92	3.79	
ロラゼパム	ベンゾジアゼピン	13	2.39	
アルプラゾラム	ベンゾジアゼピン	11.6	2.12	
メサドン	オピオイド	8.93	3.93	
テマゼパム	ベンゾジアゼピン	10.86	2.19	
プロアジフェン	-	6.8	5.1	
ジアゼパム	ベンゾジアゼピン	3.4	2.82	

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。この再溶解溶液は前述の緩衝液と ACN を 8:2 の割合で混合し作成しました。80:20 の ACN/水混合液は、ACN 80 mL と水 20 mL を混合し作成しました。

装置と材料

サンプル前処理に用いた機器は以下のとおりです。

- Centra CL3R 遠心機 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- マルチチューブ Vortexer (VWR、ペンシルベニア州、米国)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- SPE Dry 96 エバポレータ
- Agilent 加圧式マニホールド PPM-96 (部品番号 5191-4116)
- Agilent Captiva EMR 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)

分析条件

このサンプルの分析には、Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)、Agilent 1290 Infinity サーモスタットカラムコンパートメント (G1316C) を搭載する Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。LC 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 LC/MS 装置 (G6490A) に連結しました。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。機器メソッドの詳細を表 2 に示します。

表 2. 機器のメソッド条件

LC 条件			
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120, EC-C8, 100 × 2.1 mm, 2.7 μm (部品番号 695775-906 (T)) Agilent InfinityLab Poroshell 120 ガード, EC-C18, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm (部品番号 821725-911)		
流量	0.5 mL/min		
カラム温度	60 °C		
注入量	5 μL		
移動相	A) 0.1 % 酢酸含有 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 B) 0.1 % 酢酸含有アセトニトリル		
ニードル洗浄	1:1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O と 0.2 % FA		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0	10	0.5
	0.5	10	0.5
	3.0	50	0.5
	4.0	95	0.5
6.0	100	0.5	
ストップタイム	6 分		
ポストタイム	2 分		
MS			
ガス温度	120 °C		
ガス流量	14 L/min		
ネブライザ	40 psi		
ソースガスヒーター	400 °C		
ソースガス流量	12 L/min		
キャピラリー	3,000 V		
iFunnel パラメータ	高圧 RF: 90 V (POS), 90 V (NEG) 低圧 RF: 70 V (POS), 60 V (NEG)		
データ取り込み	dMRM		
取り込み極性	ポジティブ		

分析対象物のパラメータについては表 3 を、ヒト全血中の DoA の LOQ での LC/MS/MS クロマトグラムについては図 1 を参照してください。

標準溶液および QC サンプル前処理法

検量線標準は、標準スパイク溶液 (MeOH/水 20:80 に 200 ng/mL の濃度) 全血に添加して作成しました。検量線のダイナミックレンジは 0.1/0.5 ~ 20 ng/mL で、0.1、0.5、1、5、10、15、20 ng/mL を含みます。これらの標準液は全血ブランクに標準スパイク溶液を適量スパイクした後、十分ボルテックスすることにより作成しました。3 レベルの QC サンプルの真度および精度のメソッド検証試験で分析したところ、定量下限 (LLOQ) 0.1 ng/mL または 0.5 ng/mL、中位 QC 1 ng/mL または 5 ng/mL、定量上限 (HLOQ) 20 ng/mL で行ないました。これらの QC サンプルは、サンプル全血ブランクに標準スパイク溶液を適量スパイクすることで作成しました。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前処理しました。

表 3. DoA 分析対象物および IS リテンションタイムおよび MRM 条件の一覧

分析対象物	用いる内部標準	リテンションタイム (分)	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)			
				定量イオン	CE (V)	定性イオン	CE (V)
コデイン	IS 1	1.19	300.2	128.1	60	165.1	40
オキシコドン	IS 1	1.60	316.2	241.1	28	256.1	24
アンフェタミン-D ₅ (IS 1)		1.68	141.1	93.0	13	124.1	5
アンフェタミン	IS 1	1.70	136.1	91.1	20	65.0	40
MDA	IS 1	1.78	180.1	163.1	4	105.1	24
ヒドロコドン	IS 1	1.89	300.2	128.1	60	171.1	40
メタンフェタミン	IS 1	2.04	150.1	91.1	20	119.1	8
MDMA	IS 1	2.08	194.1	163.1	8	105.1	24
ストリキニーネ	IS 1	2.28	335.2	184.1	40	156.1	40
フェンテルミン	IS 2	2.32	150.1	91.0	20	65.1	48
MDEA	IS 2	2.42	208.1	163.1	8	105.1	24
ヘロイン	IS 2	2.93	370.2	328.2	20	165.1	40
コカイン	IS 2	3.04	304.2	182.1	16	82.0	48
コカイン-D ₃ (IS 2)		3.04	307.2	185.1	30	82.0	48
メペリジン	IS 2	3.10	248.2	220.1	20	174.1	16
トラゾドン	IS 2	3.31	372.2	176.1	24	148.1	36
PCP	IS 2	3.43	244.2	86.2	8	91.1	36
ニトラゼパム	IS 2	3.97	282.1	180.1	40	236.1	24
オキサゼパム	IS 2	4.00	287.1	241.1	20	104.1	40
ベラパミル	IS 2	4.01	455.3	165.1	28	150.1	48
ロラゼパム	IS 2	4.08	321.0	229.1	32	275.0	20
アルプラゾラム	IS 2	4.11	309.1	205.1	48	281.1	40
メサドン	IS 2	4.11	310.2	265.2	12	105.0	28
テマゼパム	IS 2	4.31	301.1	177.0	44	255.1	16
プロアジフェン	IS 2	4.48	354.2	167.1	40	91.1	40
ジアゼパム	IS 3	4.55	285.1	193.1	32	154.1	24
ジアゼパム-D ₅ (IS 3)		4.54	290.1	198.1	32	154.1	24

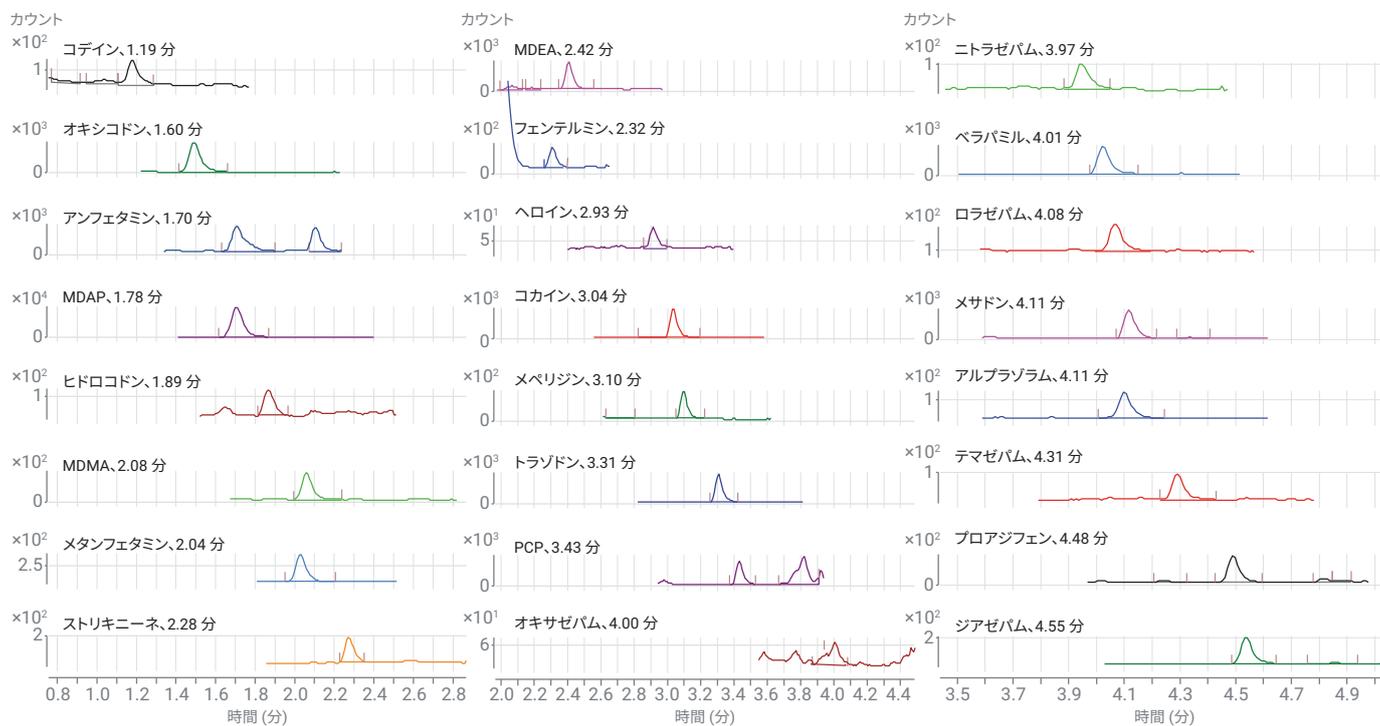


図 1. ヒト全血中の DoA の LOQ レベルで添加したヒト全血サンプルの LC/MS/MS クロマトグラム (dMRM) (アンフェタミン、ヘロインおよびロラゼパムが 0.5 ng/mL であった以外は 0.1 ng/mL)。ウェル内タンパク処理とその後の Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップによりサンプルを抽出しました。

メソッド検証

メソッド検証は 3 日間の真度および精度 (A&P) 分析を通じて実施しました。標準溶液と QC は適切にプレススパイクしました。サンプルは以下の順番で EMR-Lipid プレートに分配しました。

1. ダブルマトリックスブランク
2. マトリックスブランク (IS でスパイク)
3. 最初の標準溶液セット
4. 2 ~ 3 マトリックスブランク
5. LOQ (n = 6)
6. 中 QC (n = 6)
7. HLOQ (n = 6)
8. 2 ~ 3 キャリーオーバーマトリックスブランク
9. ダブルマトリックスブランク
10. マトリックスブランク
11. 2 番目の標準溶液セット
12. 2 ~ 3 マトリックスブランク

分析対象物の絶対回収率およびマトリックス効果

分析対象物の絶対回収率は、プレススパイクした QC サンプルとポストスパイクした QC サンプルとの間の分析対象物の機器応答 (ピーク面積) を、低濃度 (全血中に 1 ng/mL) および高濃度 (全血中に 10 ng/mL) で確認しました。プレススパイクした QC は適切に全血に直接スパイクし、サンプルは開発したメソッドで前処理しました。ポストスパイクした QC は、サンプル再溶解ステップ時に純粋な標準溶液を適切に用いてスパイクしました。マトリックス効果は、ポストスパイクした QC と試薬ブランクに作成された対応する純粋な標準液との間の分析対象物の機器応答 (ピーク面積) を比較することで確認しました。マトリックスクリーンアップはリン脂質プロファイルのモニタリングで調査しました。

サンプル抽出

図 2 に、サンプル前処理手順を示します。サンプル前処理の前に、96 ウェルコレクションプレート Captiva EMR-Lipid プレートの下に配置しました。溶出液の回収まで、沈殿物の蓄積は工程を通して進行しました。まず血液サンプルを添加し、次に変性溶媒を入れて、全血をウェル内でタンパク変性処理しました。この添加順序を用いることで、サンプルをより均質に混合することができ、完全なタンパク処理が確実にになりました。Captiva EMR-Lipid プレートの多層ろ過デザインにより、詰まることなくより円滑にサンプルを溶出できました。本研究では、PPM と遠心分離をそれぞれ用いて、サンプル溶出メソッド 2 種を試験および検証しました。

結果と考察

メソッド開発

全血ウェル内 PPT: ヒトの全血は粘性が高い体液と考えられるため、全血のサンプルハンドリングおよび前処理には通常、困難を伴います。血漿や血清とは異なり、全血には血球や多くのタンパク質が含まれており、PPT 中に多くの沈殿物が生成されます。96 ウェル EMR-Lipid プレートでのウェル内 PPT の場合、最初に全血を添加してから、変性溶媒を添加することを推奨します。この添加順序は PPT 効率を向上させ、ワークフローを単純化し、サンプルの損失や交差汚染のリスクを軽減するために不可欠です⁹。

変性溶媒: 低温の MeOH/ACN 溶媒を用いることは、赤血球を破裂させ、内容物 (細胞質) を周囲の血漿に放出し、粉末状の沈殿物を生成させるための便利な方法であることが報告されています¹⁰。過去の試験にならって、15:85 の MeOH/ACN を最初に用いましたが、一部の分析対象物でわずかに低い回収率が認められました。変性溶媒を 5:95 の

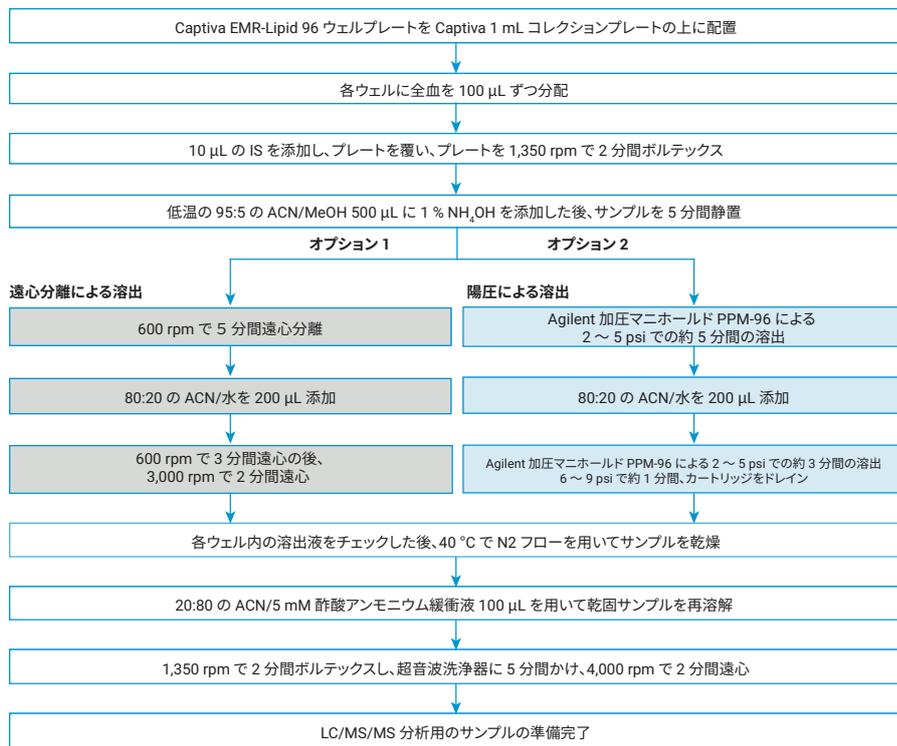


図 2. ウェル内タンパク処理後に Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いたヒト全血のサンプル前処理手順。サンプルは 96 ウェルプレートフォーマットのバッチで前処理しました。

MeOH/ACN に変更しました。

全血 PPT には酸性の変性溶媒の使用を避けることが推奨されるため⁹、本研究では中性および塩基性の変性溶媒の両方を用いて試験しました。中性の変性溶媒を用いる PPT の上澄みは、わずかに濁っており、PPT の効率が良くないことが示されました。変性溶媒に NH_4OH (1%) を添加することで、低 RSD でのメソッドの再現性が高まり、一部の分析対象物の回収率がわずかに向上しました (図 3)。その結果、1% NH_4OH を添加した 5:95 の MeOH/ACN を、全血ウェル内 PPT の変性溶媒として用い

ました。

Agilent EMR-Lipid プレートでのサンプル溶出: Agilent Captiva EMR-Lipid プレートフォーマットを用いることで、PPT 後に生体サンプル抽出液のために便利な通過型クリーンアップを行うことができ、99% を超えるリン脂質除去が可能になります⁷。十分な脂質除去効率の達成には、サンプル溶出時の適切な流量が重要です。これはサンプルと Agilent EMR-Lipid 充填剤との間の相互作用が促進されるためです。高く推奨される溶出流量は 3 ~ 5 秒あたり 1 滴です。96 ウェルプレートを用いたサンプル溶出については、溶出コントロール方法が 3 種あります。

- プレート底部からの減圧
- プレート上部からの加圧
- 遠心分離

プレート底部からの減圧は以前のアプリケーションノート^{7, 8}で実証されており、サンプル溶出には通常、2 ~ 4 inHg の真空が用いられました。

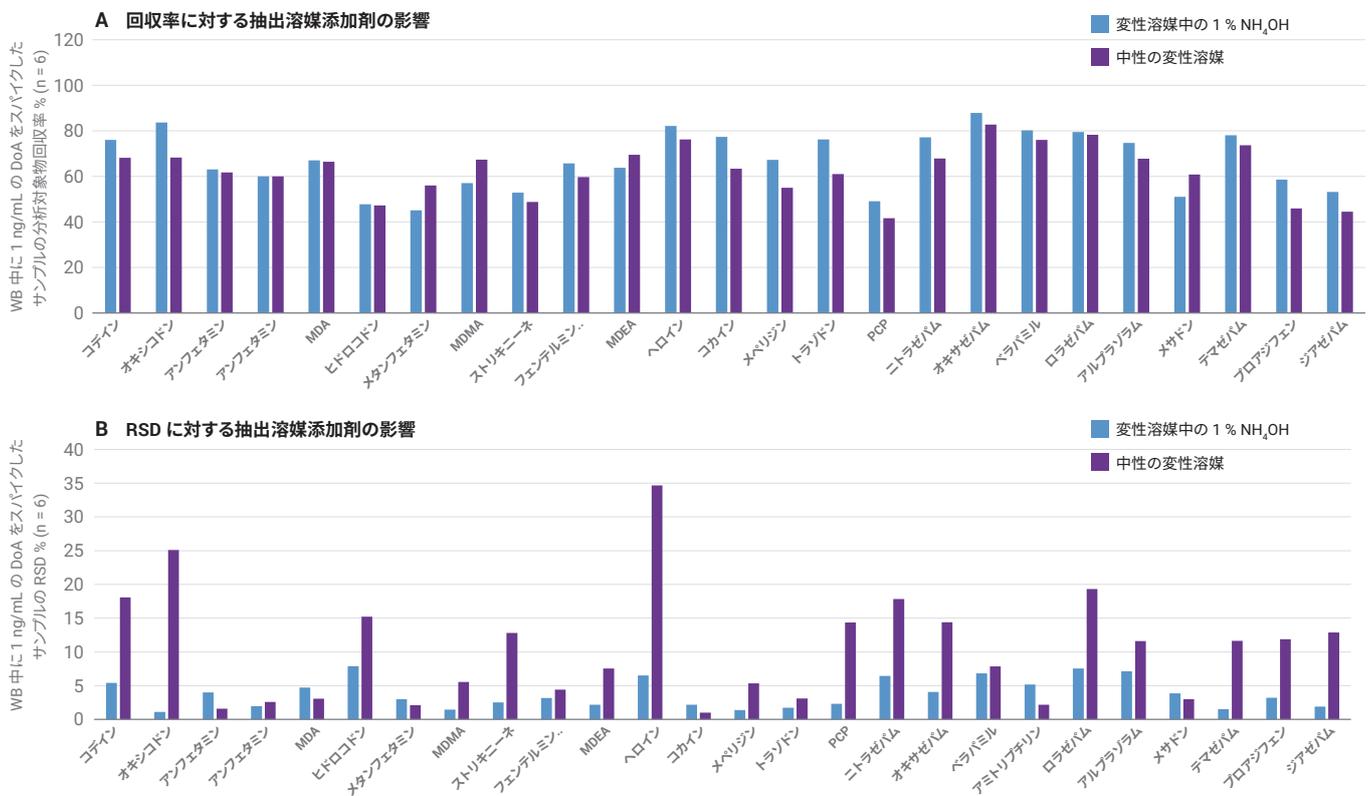


図 3. 変性溶媒への添加物 (1% NH₄OH) の添加による分析対象物の回収率およびメソッド再現性への影響比較

この試験では、陽圧および遠心分離の両方による溶出を試験および検証しました (図 2)。PPM による溶出の場合、溶出後に Agilent EMR-Lipid プレートとコレクションプレート短時間、遠心分離 (3,000 rpm で 30 秒 ~ 1 分間) することで、プレートのウェルの壁面に付着した溶離液残留物すべてを回収できる可能性があります。両メソッドで、低速かつ一貫したサンプル溶出が得られました。図 4 に、両溶出法によって得られた同等の定量結果を示します。二次的溶出は一次のサンプル溶出後、Agilent EMR-Lipid に 80:20 の ACN/水 200 μ L を添加して行われ、分析対象物の回収率が全体として 10 ~ 20 % 改善しました。

メソッド検証

最適化されたメソッドはその後、3 日間の A&P 試験によって検証され、完全な定量結果が収集されました。表 4 に検量線データ、定量下限 (LOQ)、平均回収率およびマトリックス効果、日内および日間の分析の真度と精度データを示します。3 日間の A&P 試験の定量結果により、優れたメソッド真度および精度が実証され、日内および日間の結果はすべて、許容基準の定義、すなわち 100 \pm 20 % の真度および RSD \leq 20 % の精度に適合しました。全血中の LOQ は大半の分析対象物で 0.1 ng/mL となりましたが、アンフェタミン、ヘロインおよびロラゼパムでは 0.5 ng/mL でした。これは化合物が低感度であるかまたは

マトリックス干渉のいずれかによるものでした。直線回帰と 1/x の重み付けを、相関係数 R² > 0.99 の分析対象物の検量線すべてに対して使用しました。DoA 分析対象物の大半の絶対回収率は 70 % を超えていましたが、60 % 台の例外も若干ありました。このメソッドにより、キャリブレーション範囲全体におけるさまざまなスパイク濃度で全分析対象物に対して卓越した精度が得られ、目的の LOQ に適合する十分な感度も得られました。開発したメソッドは遠心分離溶出法を用いて 3 日間の試験で検証した後、陽圧溶出を用いて 1 日間の試験で交差検証しました。

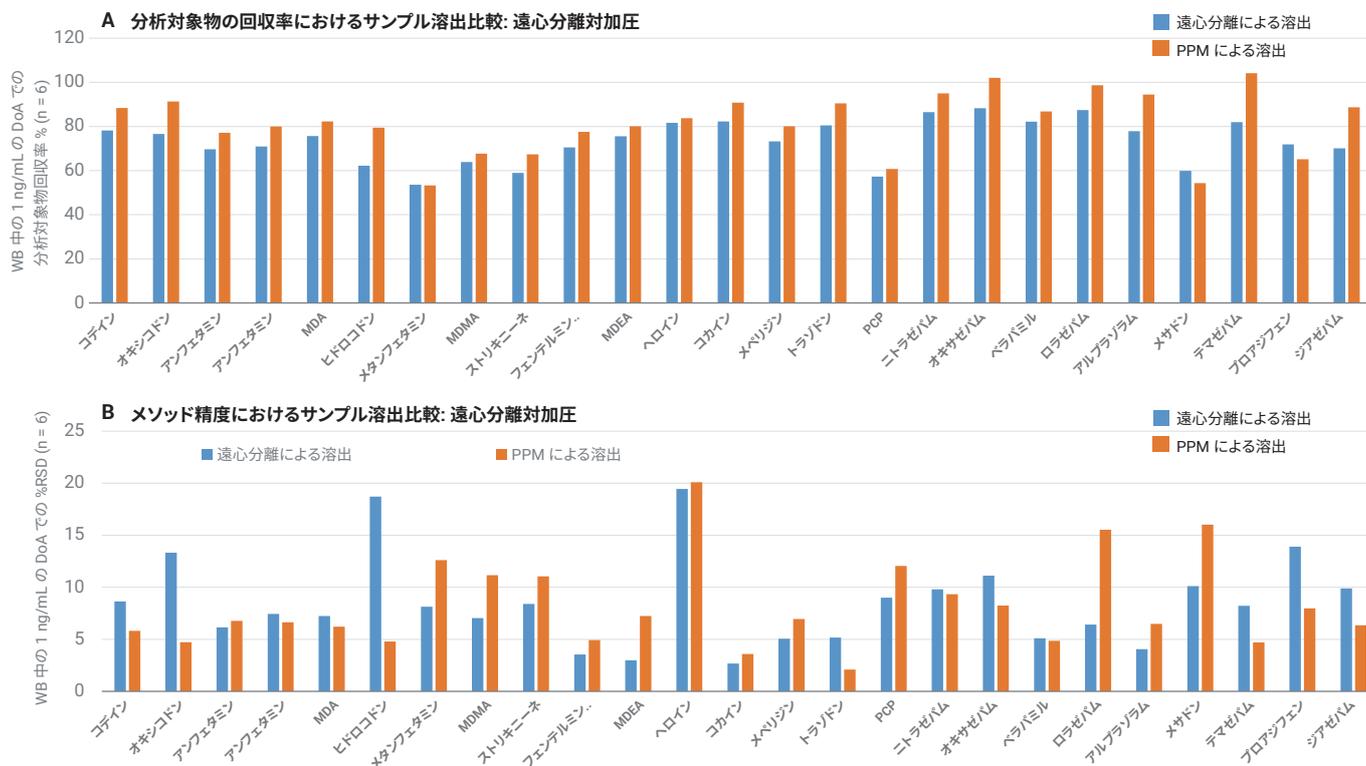


図 4. 遠心分離と加圧による 2 つの異なる溶出メソッドの比較: 分析対象物の回収率 (A) およびメソッド精度 (B)

マトリックスクリーンアップおよび機器上の検出システムへの影響

マトリックスクリーンアップは、184 のプロダクトイオンに対してプリカーサイオンスキャンを用いて、リン脂質プロファイルをモニタリングすることにより評価しました。PPT のみによるサンプルと比較した場合、99 % を超えるリン脂質が Agilent EMR-Lipid クリーンアップによって除去されました (図 5)。この結果は過去の結果と良好に一致します⁷。リン脂質の除去はメソッドの信頼性と定量結果の一貫性を向上させるだけでなく、システムの汚染とキャリーオーバーを大きく軽減しました。

PPT は単独で LC/MS/MS 分析用の生体サンプルの前処理に広く用いられてきました。マトリックス夾雑物はメソッドの信頼性とデータ品質に影響を及ぼすだけでなく、注入口、LC カラム、MS ソースなどの検出流路に蓄積する可能性もあります。最終的に、サンプル分析は失敗し、機器のダウンタイムが長期化するおそれがあります。従来、マトリックス夾雑物の検出流路上の汚染および蓄積を軽減するためには、LC グラジエントを長くし、ニードル洗浄を頻繁に行い、もしくはサンプル後のブランクサンプル注入量を増加するか、100 % ACN などの高有機移

動相を用いて定期的にシステムフラッシングを行ってきました。こうした対策はマトリックスによる汚染/蓄積の機器システムへの影響を軽減する可能性があります、時間が浪費され、試験のスループットが制限されます。

過去の試験⁹により、Agilent EMR-Lipid クリーンアップを用いて生体サンプルを分析することで、検出システムの汚染や機器のダウンタイムを低減することができるだけでなく、短い LC グラジエントと短時間の洗浄時間によってサンプル試験サイクルタイムを短縮することもできることが示されました。これらの利点により、サンプル試験スループットとラボ全体の生産性が大幅に向上します。

表 4. ヒト全血中の DoA 化合物 24 種の定量のメソッド検証結果

分析対象物	LOQ (ng/mL)	キャリブレーション範囲 (ng/mL)	相関係数 R ²	平均回収率 % (n = 12)	平均 ME% (n = 12)	スパイク濃度 (ng/mL)	遠心分離溶出の結果			加圧溶出の結果	
							真度 % (n = 18)	日内 RSD% (n = 6)	日間 RSD% (n = 18)	真度 % (n = 6)	RSD% (n = 6)
コデイン	0.1	0.1 ~ 20	0.9909	87	13	0.1	97	9.3	6.8	97	11.0
						1	103	5.9	5.7	100	7.2
						20	112	3.0	3.0	100	4.9
オキシコドン	0.1	0.1 ~ 20	0.9952	81	25	0.1	102	6.0	5.8	95	5.2
						1	99	4.4	9.2	98	7.6
						20	108	2.4	2.9	105	3.8
アンフェタミン	0.5	0.5 ~ 20	0.9947	79	-9	0.5	108	7.8	5.5	97	5.2
						1	101	2.5	8.1	97	3.4
						20	108	5.7	2.3	99	2.9
MDA	0.1	0.1 ~ 20	0.9973	84	4	0.1	102	6.9	6.4	100	7.0
						1	104	4.2	3.0	97	5.4
						20	108	5.8	4.3	99	4.7
ヒドロコドン	0.1	0.1 ~ 20	0.9920	71	-7	0.1	102	7.8	8.4	101	8.8
						1	104	9.2	9.7	96	9.1
						20	109	8.3	5.8	107	5.6
メタンフェタミン	0.1	0.1 ~ 20	0.9938	60	2	0.1	100	5.2	7.1	96	4.0
						1	103	10.4	9.5	96	3.7
						20	109	7.4	4.4	102	5.0
MDMA	0.1	0.1 ~ 20	0.9962	70	6	0.1	103	3.0	3.6	96	2.8
						1	103	5.8	6.5	97	2.9
						20	110	7.3	3.8	100	5.0
ストリキニーネ	0.1	0.1 ~ 20	0.9912	66	5	0.1	103	4.7	5.6	92	6.6
						1	104	4.6	5.2	96	4.8
						20	111	6.7	4.8	105	6.6
フェンテルミン	0.1	0.1 ~ 20	0.9928	80	0	0.1	105	6.9	5.6	94	6.1
						1	106	6.9	4.9	95	3.2
						20	104	5.4	5.5	99	2.9
MDEA	0.1	0.1 ~ 20	0.9971	79	7	0.1	102	4.0	4.2	101	5.6
						1	106	5.2	4.2	93	4.5
						20	109	5.7	3.9	98	4.0
ヘロイン	0.5	0.5 ~ 20	0.9943	80	25	0.1	97	13.4	16.6	92	11.5
						1	100	6.8	7.0	102	10.7
						20	107	6.6	8.5	94	8.2
コカイン	0.1	0.1 ~ 20	0.9987	88	-19	0.1	106	4.0	5.8	105	12.5
						1	104	4.7	4.2	96	4.3
						20	109	2.2	3.4	103	3.1
メペリジン	0.1	0.1 ~ 20	0.9948	79	-14	0.1	109	3.9	4.7	100	2.9
						1	107	4.7	2.7	94	1.9
						20	109	4.8	3.0	105	5.9
トラゾドン	0.1	0.1 ~ 20	0.9957	87	-7	0.1	110	5.6	3.7	104	4.5
						1	105	3.8	3.6	96	4.4
						20	111	4.8	3.6	107	4.5
PCP	0.1	0.1 ~ 20	0.9916	68	-26	0.1	104	6.9	7.2	102	2.9
						1	104	9.8	9.2	99	2.0
						20	106	9.9	7.8	102	4.0
ニトラゼパム	0.1	0.1 ~ 20	0.9941	91	7	0.1	100	11.2	9.3	116	12.5
						1	106	6.7	7.6	105	6.2
						20	109	5.5	5.8	100	6.3

表 4. ヒト全血中の DoA 化合物 24 種の定量のメソッド検証結果 (続き)

分析対象物	LOQ (ng/mL)	キャリブレーション範囲 (ng/mL)	相関係数 R ²	平均回収率 % (n = 12)	平均 ME% (n = 12)	スパイク濃度 (ng/mL)	遠心分離溶出の結果			加圧溶出の結果	
							真度 % (n = 18)	日内 RSD% (n = 6)	日間 RSD% (n = 18)	真度 % (n = 6)	RSD% (n = 6)
オキサゼパム	0.1	0.1 ~ 20	0.9953	88	32	0.1	102	7.4	13.7	93	12.7
						1	103	7.0	9.0	101	11.9
						20	114	5.5	5.9	108	6.3
ペラバミル	0.1	0.1 ~ 20	0.9959	79	31	0.1	111	2.7	3.1	100	1.6
						1	100	5.6	4.6	92	5.7
						20	112	3.1	7.0	103	7.9
ロラゼパム	0.5	0.5 ~ 20	0.9947	88	20	0.1	99	11.3	13.6	102	10.9
						1	100	6.3	10.1	103	9.8
						20	109	1.9	3.7	105	4.9
アルプラゾラム	0.1	0.1 ~ 20	0.9949	86	19	0.1	100	5.5	7.6	101	6.8
						1	107	4.7	4.2	97	7.2
						20	104	3.8	3.8	102	5.3
メサドン	0.1	0.1 ~ 20	0.9950	62	5	0.1	102	4.4	8.6	99	4.8
						1	101	7.7	8.2	93	3.0
						20	110	6.5	4.8	103	6.1
テマゼパム	0.1	0.1 ~ 20	0.9947	85	17	0.1	105	12.1	12.2	106	16.7
						1	107	6.0	5.5	94	13.6
						20	111	1.3	4.0	104	3.2
プロアジフェン	0.1	0.1 ~ 20	0.9945	70	5	0.1	109	3.0	4.0	102	7.0
						1	96	3.6	3.0	92	8.9
						20	112	3.5	5.6	110	5.7
ジアゼパム	0.1	0.1 ~ 20	0.9977	72	2	0.1	108	3.8	6.8	88	9.0
						1	106	5.5	4.1	94	3.9
						20	110	2.6	3.5	101	7.7

結論

タンパク処理後に Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いるサンプル前処理メソッドを、ヒト全血中の代表的な DoA 化合物 24 種の定量で検証しました。3 日間の真度および精度の分析により、このメソッドが良好かつ厳密な検量線直線性、優れた日内および日間の真度と精度、および許容可能な分析対象物の回収率とマトリックス効果削減をもたらすことが検証されました。Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップによって、全血マトリックスからの優れたリン脂質除去が行われました。ウェル内 PPT は、まず全血サンプルを添加し、次に変性溶媒を添加する方法で実施し、サンプル混合の均質性を改善し、タンパク質の完全な沈澱を促進できました。96 ウェルプレートフォーマットで開発したプロトコルは、ハイスループトラポにおける高速かつ自動のサンプル前処理に対するニーズに応え、ウェル内 PPT 後の

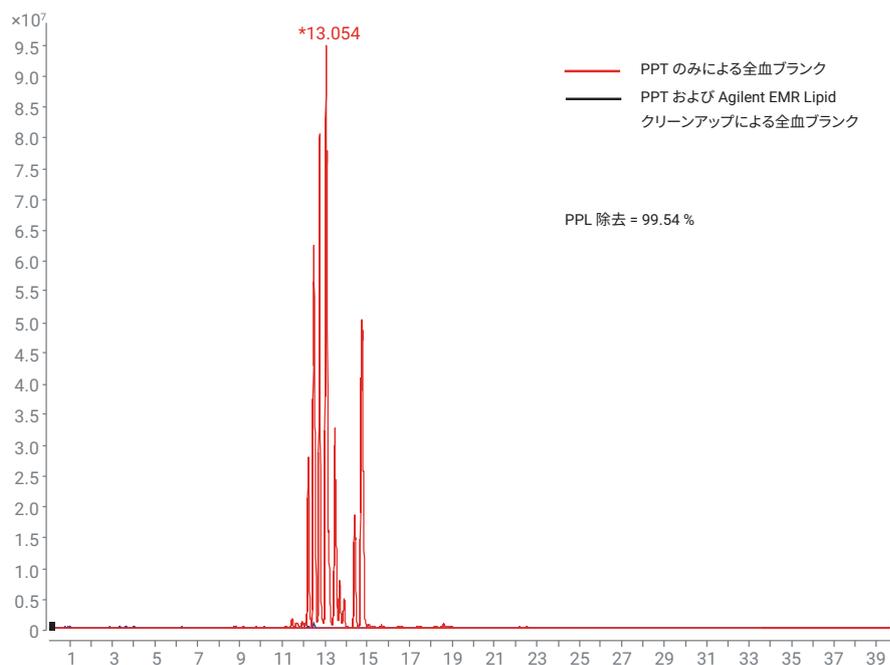


図 5. Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップがある場合とない場合の PPT によって前処理された全血サンプル間の、184 m/z のプリカーサイオンスキャンのモニタリングによるリン脂質プロファイルのクロマトグラムを重ね合わせたもの

Agilent EMR-Lipid クリーンアップはワークフローを単純化した上で、効率的なサンプル抽出およびマトリックスクリーンアップを実現します。分析サンプルがよりクリーンになることで、機器上の検出システムの清浄の所要時間が短縮され、サンプル試験のスループットおよびデータ品質が改善されます。

参考文献

1. Mali, N.; Karpe, M.; Kadam, V. A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse, *J. Applied Pharmaceutical Science* **2011**, 06, 58–65.
2. Saito, K.; et al. Analysis of Drugs of Abuse in Biological Specimens, *J. Health Science* **2011**, 57(6), 472–487.
3. Moeller, M. R.; Steinmeyer, S.; Kraemer, T. Determination of drugs of abuse in blood, *J. Chromatog. B* **1998**, 713, 91–109.
4. Moeller, M. R.; Kraemer, T. Drugs of Abuse Monitoring in Blood for Control of Driving Under the Influence of Drugs, *Therapeutic Drug Monitoring* **2002**, 24, 210–221.
5. Cheong, J. C.; et al. Gas chromatography-mass spectrometric method for the screening and quantification of illicit drugs and their metabolites in human urine using solid-phase extraction and trimethylsilyl derivatization, *J. Sep. Sci.* **2010**, 33, 1767–1778.
6. Øiestad, E. L.; et al. Drug Screening of Whole Blood by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Analytical Toxicology* **2011**, 35, 280–293.
7. Zhao, L.; Lucas, D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal Using Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8006EN, **2017**.
8. Zhao, L.; Lucas, D. Quantitative LC/MS/MS Analysis of Drugs in Human Serum with Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8007EN, **2017**.
9. Protein Precipitation for Biological Fluid Samples Using Agilent Captiva EMR-Lipid 96-well Plates, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-9222EN, **2018**.
10. Stevens, J.; Zhao, L. Efficient Quantitative Analysis of THC and its Metabolites in Whole Blood Using Agilent Captiva EMR—Lipid and LC/MS/MS, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8635EN, **2017**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

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. 2018
Printed in Japan, April 19, 2018
5991-9251JAJP