

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップと LC/MS/MS を用いた ヒト血漿および血清中の依存性薬物の定量

著者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

EMR 製品の第 2 世代である Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) は、利便性の高い SPE カートリッジまたは 96 ウェルプレートを使用します。この研究では、96 ウェルプレートフォーマットを用いて、ヒト血漿および血清中の代表的な 24 種類の依存性薬物について LC/MS/MS を用いて定量します。サンプルはタンパク質除去のためウェル内で除タンパク処理 (PPT) し、その後 Captiva EMR-Lipid クリーンアップで脂質を除去しました。サンプル前処理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。サンプル溶出は遠心分離か加圧式マニホールドで検証しました。バッチプロセス全体は使いやすく、プレートの 96 サンプルについて 2 時間未満で前処理ができます。効率的なマトリックスクリーンアップで、リン脂質が 99 % 超除去され、これにより、マトリックスによるイオン抑制効果とシステムの汚染を低減することができます。定量メソッドは、真度および精度分析により検証し、3 段階すべての QC レベルできわめて高い真度 ($100 \pm 20 \%$) と精度 ($RSD < 20 \%$) が得られました。定量下限 (LOQ) は、血漿または血清において 0.1 から 0.5 ng/mL であり、検量線の直線性は $R^2 > 0.99$ でした。血清や異なる抗凝固剤入りの血漿を含む一般的なヒト血液マトリックスを用いてメソッドをクロス検証しました。

はじめに

法中毒学において、生体検体中の依存性薬物 (DoA) を短時間で確実にスクリーニングおよび定量するという需要が、着実に増大しています^{1,2}。これは主に、DoA だけでなく、分析サンプル数も増えているためです。血液マトリックスを用いるといくつかの利点があります。第 1 に、薬物は取り込み直後、すなわち代謝またはろ過される前に検出することができます。第 2 に、血液は比較的均一のため、生理学的パラメータは狭い範囲でしか変化しません。第 3 に、多くの欧州諸国や米国の一部の州では、薬物服用時の運転 (DUID) 検査で、血液サンプルが必須です。そのため、毒物のルーチン分析において血液マトリックス中の DoA の信頼性の高い定量が重要になります。

毒物分析における体系的なサンプル前処理メソッドとして、液液抽出 (LLE)、固相抽出 (SPE)、および保持型液液抽出 (SLE) などがあります。しかし、これらのメソッドは時間と手間がかかり、大量の有害溶媒を使用します。Agilent Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) は、最新の充填剤で、分析対象物を損失することなく主な脂質類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、脂質と EMR 充填剤間の疎水性相互作用の組み合わせに基づいています。第 2 世代の Captiva EMR-Lipid 充填剤は、SPE カートリッジ/プレートフォーマットに充填されています。パススルー形式で溶出させてクリーンアップするため、分析対象物は溶液中に残されたままになります。以前の研究では、生体サンプル中のリン脂質の除去効率、およびヒト血清中の代表的な医薬品の定量について、Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートを用いてウェル内で除タンパク処理 (PPT) 後にパススルークリーンアップする方法を説明しています^{4,5}。

別の研究では、ウェル内 PPT 後の Captiva EMR-Lipid プレートクリーンアップが、ヒト全血中でよく使われる DOA 分析法として確立され、検証されています⁶。今回の研究では、同様のメソッドを血清および血漿を含む異なる血液マトリックスに適用しました。ターゲットとなる分析対象化合物の化学的特性と化学構造は以前のアプリケーションノート⁶ に掲載されています。1 日間の真度および精度分析を用いてそれぞれの血液マトリックス間でメソッドをクロス検証し、また分析対象物の回収率およびマトリックス効果の評価も実施しました。

実験方法

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は Agilent から入手しました (部品番号 G2453-85060)。酢酸アンモニウムおよび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) から入手しました。混合した DoA 標準原液の 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ メタノール (MeOH) 溶液は Agilent から入手しました (部品番号 5190-0470-1)。ヒト血清、ヘパリンリチウム入りヒト血漿、クエン酸ナトリウム入りヒト血漿、および K_2EDTA 入りヒト血漿は Biological Specialty Corp. (コルマール、ペンシルベニア州、米国) から入手しました。内部標準 (IS) 原液の 1 mg/mL MeOH または ACN 溶液は Cerilliant (ラウンドロック、テキサス州、米国) から入手しました。

標準および溶液の調製

混合した DoA 標準原液と各 IS 原液を用いて標準スパイク溶液と IS スパイク溶液を調製しました。標準スパイク溶液は、20:80 の MeOH/水で 200 ng/mL に調製し、標準溶液と QC サンプルにスパイクするのに用いました。IS スパイク溶液は各 IS 原液を 20:80 の MeOH/水で 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈することにより調製しました。この IS スパイク溶液をサンプルに直接スパイクしました。

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。ACN 1 L にギ酸 1 mL を加えて、ギ酸 0.1 % を含む ACN 溶液 (移動相 B) を調製しました。

1 % 水酸化アンモニウムを含む 95:5 ACN/MeOH 溶液は、 NH_4OH 400 μL をあらかじめ混合した 95:5 ACN/MeOH 40 mL に加えて、毎回新たに調製しました。溶媒は使用するまで -20°C で保管しました。80:20 の ACN/水混合液は、ACN 80 mL と水 20 mL を混合して作製しました。5 mM 酢酸アンモニウム溶液は、Milli-Q 水 200 mL 中に酢酸アンモニウム 77.06 mg を溶解して作製しました。再溶解溶液は、前述の緩衝液と ACN を 8:2 の割合で混合して調製しました。

実験器具と材料

サンプル前処理に用いた実験器具:

- Centra CL3R 遠心管 (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 SPE カートリッジ 96 本用 (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)

分析機器

サンプルは、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 カラムコンパートメント (G1316C) で構成される Agilent 1290 Infinity LC システムで分析しました。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 6490 トリプル四重極質量分析装置 (G6490A) に連結しました。データの取り込みと解析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

標準溶液および QC サンプル前処理法

検量線用標準は、200 ng/mL の標準スパイク溶液 (20:80 MeOH/水混合液) を用いて対応する血液マトリックスに添加して調製しました。検量線のダイナミックレンジは全血中 0.1 ~ 20 ng/mL で、0.1、0.5、1、5、10、15、20 ng/mL を含みます。これらの標準溶液は、標準スパイク溶液相当量をマトリックス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。真度および精度のメソッド検証試験のために、品質保証 (QC) サンプルを 3 つのレベルで分析しました。3 つのレベルは、定量下限 (LLOQ) が、0.1 または 0.5 ng/mL、中

LC 条件			
カラム	InfinityLab Poroshell 120、EC-C8、100 × 2.1 mm、2.7 μm (p/n 695775-906(T)) InfinityLab Poroshell 120 ガード、EC-C18、2.1 × 5 mm、2.7 μm (p/n 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 % 酢酸アセトニトリル溶液		
ニードル洗浄	1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O と 0.2 % 酢酸		
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 条件			
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、ポジティブモード 分析対象物の MRM パラメータは参考文献 ⁶ 、クエン酸ナトリウム入りのヒト血漿中の DoA の LLOQ レベルの LC/MS/MS クロマトグラムは図 1 をご参照ください。		

QC が 1 または 5 ng/mL、定量上限 (HLOQ) が 20 ng/mL でした。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。次に、抽出するために、Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートに分注しました。

サンプル抽出

サンプル前処理手順は、以前のアプリケーションノート⁶ に掲載しています。サンプル前処理の前に、96 ウェルコレクションプレートを Captiva EMR-Lipid プレートの下に置きます。プレートスタックは溶出液を回収するまで、手順を繰り返します。Captiva EMR-Lipid プレートのウェルに分注された血液サンプルに変性溶媒を添加することにより、血液サンプルの in situ PPT を実施しました。この添加順序により混合の均一性が大幅に改善され、タンパク質を完全に沈殿させることが可能になりました。

た。Captiva EMR-Lipid プレートの多層フィルタ構造により、サンプルは詰まることなく溶出することができます。全血を用いた初期の研究でのテストおよび検証は、加圧式マニホールドと遠心分離の 2 つのサンプル溶出メソッドで実施されました。本研究では加圧式マニホールドによる溶出のみ用いました。

メソッド検証

通常、3 日間の真度および精度分析で 1 つのマトリックスについて完全に検証するメソッドでは、異なるマトリックスにメソッドを適用する場合のみクロス検証が必要になります。そのため、全血についての完全な検証があるとして、本研究で追加した血液マトリックスそれぞれについて、メソッドのクロス検証を 1 日間の真度および精度分析で実施しました。

標準溶液および QC は、適切にプレスパイクしました。次の順序で Captiva EMR-Lipid プレートにサンプルを分注しました。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 のマトリックスブランク、LLOQ (n = 6)、中 QC (n = 6)、HLOQ (n = 6)、2～3 の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 のマトリックスブランク。

分析対象物の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、プレスパイク QC サンプルとポストスパイク QC サンプルにおける分析対象物の反応 (ピーク面積) を比較することにより検討しました。サンプルの濃度は低レベル (血清または血漿中に 1 ng/mL) および高レベル (血清または血漿中に 10 ng/mL) を用いました。プレスパイク QC サンプルはマトリックスブランクに直接、適切にスパイクした後、改良したメソッドで調製しました。ポストスパイク QC サンプルは、抽出後にマトリックスブランクにスパイクしま

した。乾燥させたマトリックスブランクを再溶解するために、適切な標準原液を用いて、サンプルの再溶解中にポストスパイクしました。マトリックス効果は、ポストスパイク QC サンプルと、対応する標準原液 (試薬ブランクで作製) における分析対象物の反応 (ピーク面積) を比較することにより検討しました。

結果と考察

本研究は、毒物学アプリケーションにおける生体マトリックス中の依存性薬物の定量に Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いる利点の実証に重点を置いています。

メソッドプロトコル: サンプル優先除タンパク処理

粘度の高い全血サンプルに変性溶媒を添加するという添加順序により、効率的にタンパク質を沈殿させるための均一性に優れた混合が可能なのが既の実証されています^{6,7}。血清や血漿などの粘度の低い生体サンプルでは、生体サンプルを混合するときの抵抗は、全血などの粘度の高いマトリックスほど深刻な問題

にはなりません。しかし、生体サンプルにおけるサンプル優先 PPT は、溶媒優先 PPT よりも混合の均一性が向上しました。サンプルをまず添加することにより、Captiva EMR-Lipid プレートを用いて IS に直接 in situ スパイクした後に変性溶媒の添加が可能になります。先にサンプルを添加するという順序は、サンプルの移動作業が不要になるため、ワークフローの簡素化につながります。均一性に優れた混合ができるため、以前は推奨されていた^{4,5}、タンパク質を完全に沈殿させるためのピペットによる混合は必要ありません。さらに、ハイスルーブット法、特に、自動サンプル前処理操作で重要となる、96 ウェルプレート上のサンプルのクロスコンタミネーションリスクが、この添加順序の変更により低減します。移動ステップを省略することにより、コレクションプレートやピペットチップなど使用する消耗品の数を減らすこともできます。上記の留意点に基づき、新しいサンプル優先 PPT を、血清および血漿サンプルの分析に用いました。

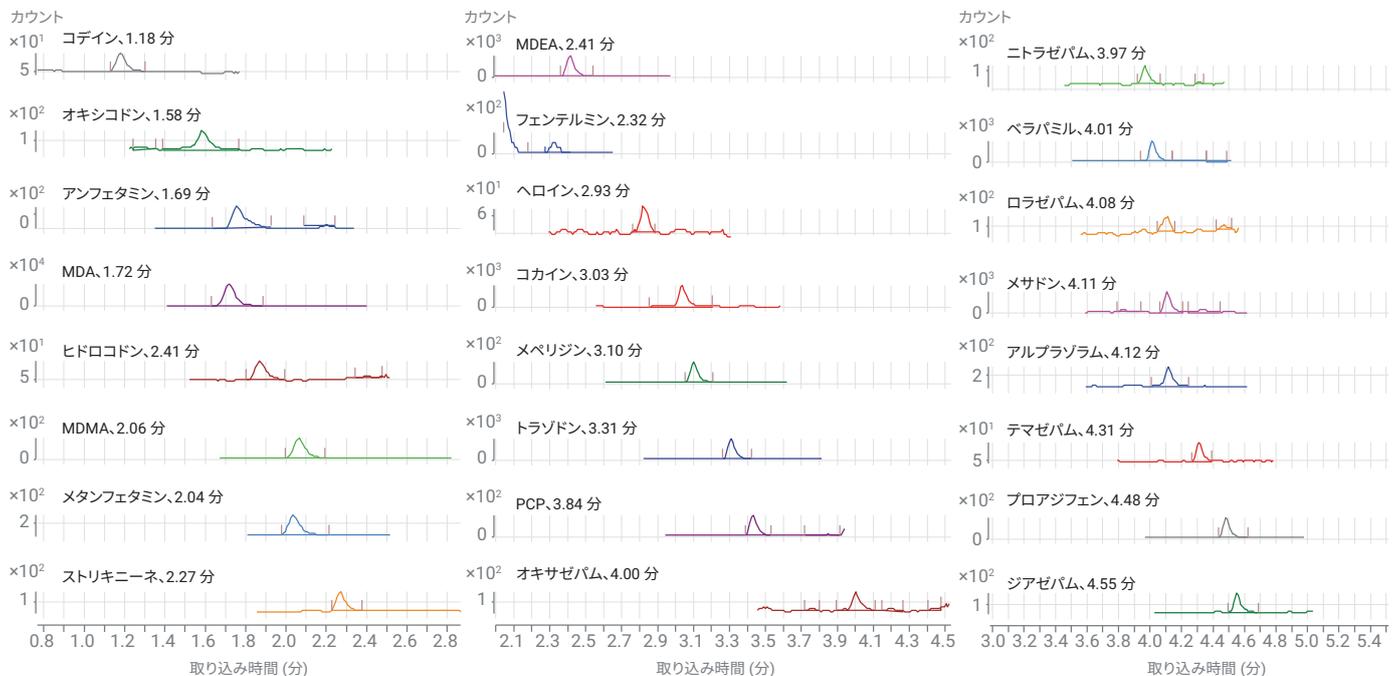


図 1. クエン酸ナトリウム入りのヒト血漿に DoA を LOQ レベル (0.1 ng/mL、アンフェタミンおよびヘロインは 0.5 ng/mL) で添加した場合の LC/MS/MS クロマトグラム (DMRM)

遠心分離および加圧式による溶出は、全血の DoA 分析においてテストされ、検証されています⁷。その結果、どちらの溶出方法でも同等の溶出となることが示されました。本研究では、加圧式の溶出のみを用いてメソッドのクロス検証を実施しました。図 2 に、Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートでのサンプルバッチプロセスの写真を示します。図 2A およ

び 2B は、Captiva EMR-Lipid プレートにおけるウェル内 PPT サンプルの均一性と一貫性を示しています。図 2C および 2D は、溶出後の Captiva EMR-Lipid プレート中の乾燥させた沈殿物、およびコレクションプレートに回収した均一なサンプル溶出液を示しています。

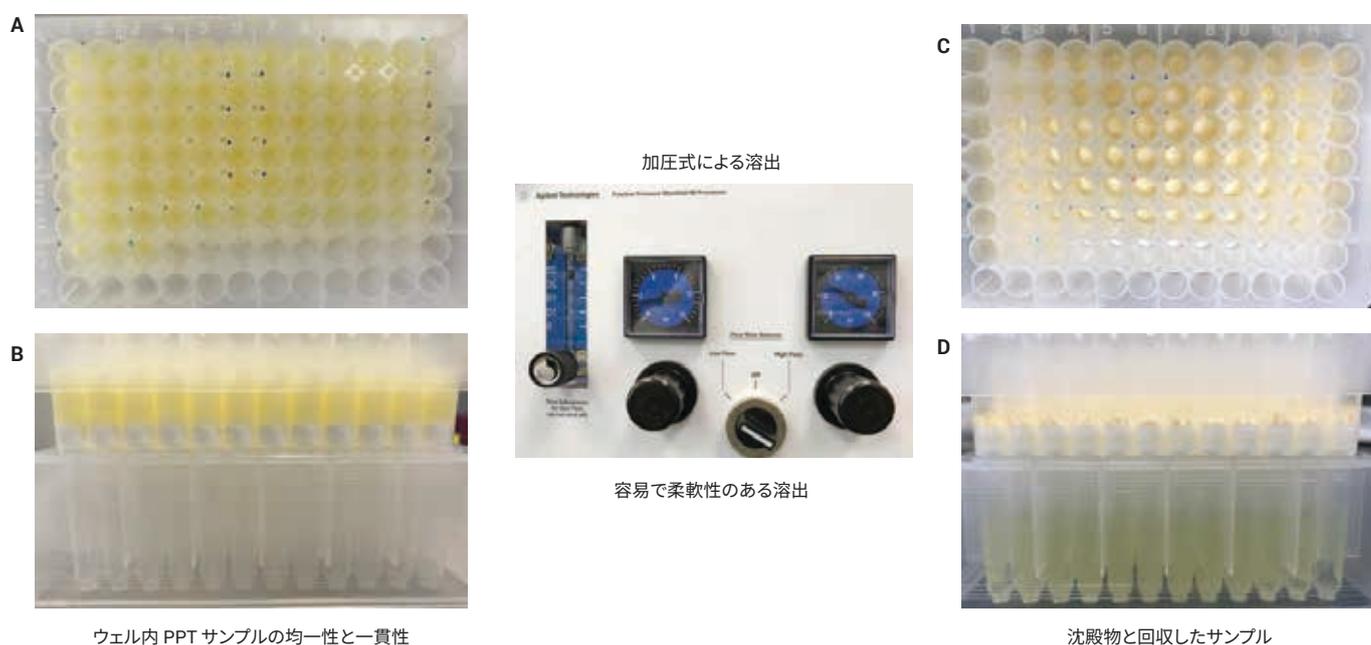


図 2. ウェル内 PPT 後のパススルー EMR-Lipid クリーンアップによる 96 ウェル Captiva EMR-Lipid プレートのバッチプロセス。

A) ウェル内 PPT を Captiva EMR-Lipid プレートの上から見た図、B) ウェル内 PPT を Captiva EMR-Lipid プレートの横から見た図、

C) ウェル内の乾燥させた沈殿物 (溶出後) を Captiva EMR-Lipid プレートの上から見た図、D) コレクションプレートに回収した均一で一貫性のあるサンプル溶出液

分析対象物の回収率およびマトリックス効果

複数の血液マトリックス中の DoA における分析対象物の回収率およびマトリックス効果を、マトリックスにスパイクレベル 1 および 10 ng/mL で、それぞれ 6 回繰り返し分析した平均値を図 3 に示します。異なるタイプの血液マトリックスでも、分析対象物の回収率およびマトリックス効果は一貫性がありますが、異なるサンプルタイプでマトリックス効果がみられる分析対象物もありました。回収率

の低い分析対象物もいくつかありましたが、メソッドの精度および感度はいずれも許容範囲でした。

メソッド検証

本研究では、4 つの一般的な血液マトリックス、すなわちヒト血清、ヘパリンリチウム入りヒト血漿、クエン酸ナトリウム入りヒト血漿、K₂EDTA 入りヒト血漿を用いました。血清および血漿は血液細胞から分離させた血液の重要な成分です。血漿と血清の主な違いは、凝固

因子にあります。血漿は目詰まりを引き起こすフィブリノーゲンを含んでいますが、血清は含みません。そのため、凝固を防ぐため血漿には抗凝固剤を添加します。一方、血清には抗凝固剤の添加は不要です。血清および血漿を DoA のスクリーニングおよび確認分析を実施するサンプルマトリックスとしました。

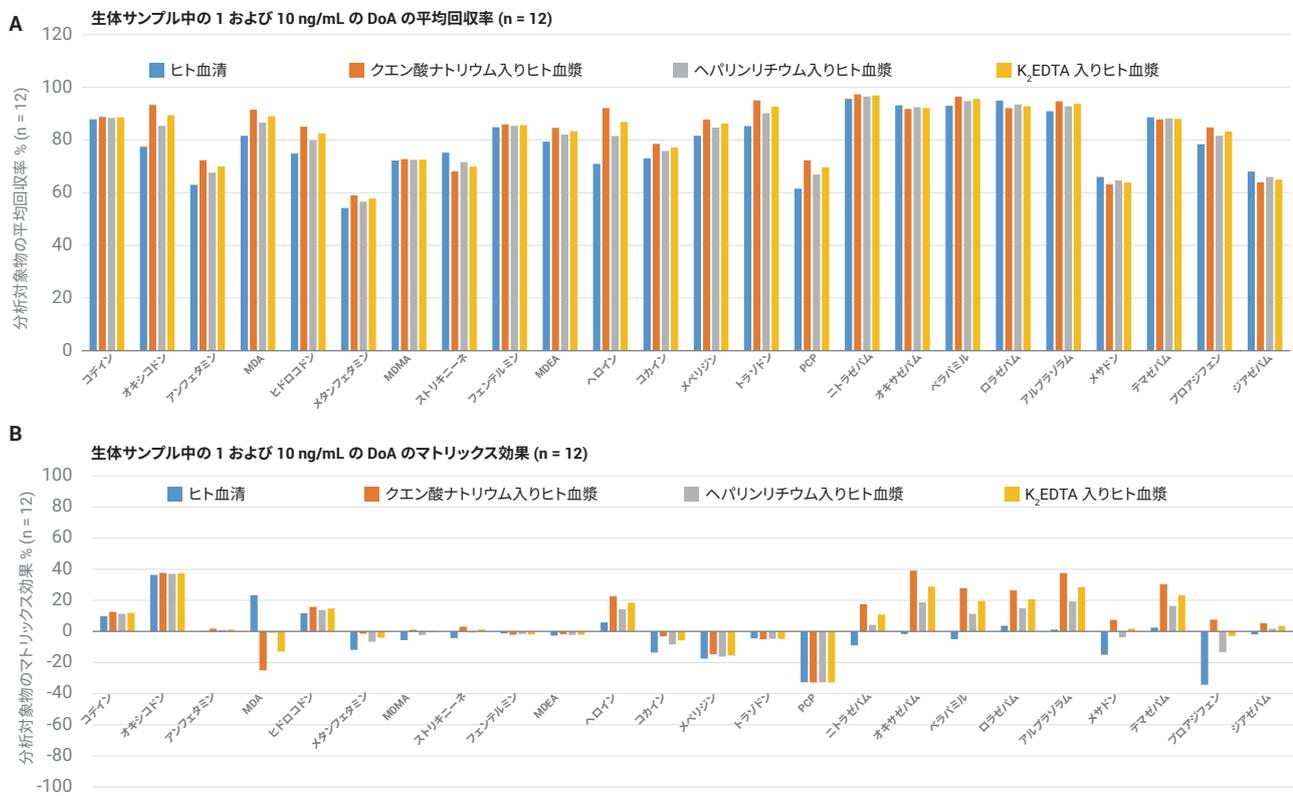


図 3. ウエル内 PPT 後の Captiva EMR-Lipid クリーンアップによる生体サンプル中の 1 ng/mL (n = 6) および 10 ng/mL (n = 6) の DoA の平均回収率 (A) およびマトリックス効果 (B)

表 1に、それぞれのマトリックスにおけるメソッドのクロス検証の検量線データ、LOQ、真度および精度データの結果を示します。血液マトリックスの検量線範囲は、0.1 (0.5) から 20 ng/mL でした。検量線の回帰では、直線

回帰の適合は $1/x^2$ 重み付けを用いました。ほとんどの分析対象物は、血液中の LOQ が 0.1 ng/mL でした。ただし、感度が低いためにすべてのマトリックスにおけるヘロインと、マトリックス干渉のために特定のマトリックスにお

けるアンフェタミンおよびロラゼパムは除きます。すべての定量結果は、異なる血液マトリックスにメソッド移管できることが示されました。

表 1. クロス検証データ

DoA 分析対象物	ヘパリンリチウム入りヒト血漿					クエン酸ナトリウム入りヒト血漿					K ₂ EDTA 入りヒト血漿					ヒト血清				
	LOQ*	R ²	濃度*	真度%**	RSD%**	LOQ*	R ²	濃度*	真度%**	RSD%**	LOQ*	R ²	濃度*	真度%**	RSD%**	LOQ*	R ²	濃度*	真度%**	RSD%**
コデイン	0.1	0.9967	0.1	92	6.5	0.1	0.9968	0.1	103	6.0	0.1	0.9985	0.1	98	2.5	0.1	0.9917	0.1	88	4.4
			1	98	5.7			1	96	4.1			1	103	4.2			1	91	7.4
			20	100	3.3			20	102	3.5			20	102	3.4			20	99	9.1
オキシコドン	0.1	0.9949	0.1	99	6.3	0.1	0.9939	0.1	100	9.0	0.1	0.9936	0.1	93	5.6	0.1	0.9797	0.1	84	3.2
			1	104	4.7			1	95	4.1			1	96	1.9			1	101	11.4
			20	110	3.7			20	105	3.1			20	107	2.8			20	115	3.5
アンフェタミン	0.1	0.9971	0.1	98	6.5	0.5	0.9972	0.1	100	4.4	0.1	0.9980	0.1	92	5.3	0.1	0.9963	0.1	97	4.7
			1	96	1.4			1	100	4.4			1	99	2.6			1	100	5.3
			20	100	4.9			20	100	3.8			20	102	2.5			20	100	3.8
MDA	0.1	0.9978	0.1	88	6.2	0.1	0.9991	0.1	105	6.3	0.1	0.9968	0.1	104	3.6	0.1	0.9863	0.1	88	8.1
			1	101	3.3			1	97	6.9			1	101	2.8			1	105	6.4
			20	107	3.2			20	100	2.1			20	105	2.0			20	111	5.7
ヒドロコドン	0.1	0.9951	0.1	98	9.2	0.1	0.9947	0.1	103	13.0	0.1	0.9913	0.1	87	9.3	0.1	0.9855	0.1	102	12.9
			1	99	4.4			1	91	6.0			1	102	7.4			1	106	7.5
			20	108	5.1			20	103	3.3			20	106	3.2			20	116	6.1
メタンフェタミン	0.1	0.9988	0.1	93	5.4	0.1	0.9982	0.1	105	5.1	0.1	0.9977	0.1	91	7.6	0.1	0.9928	0.1	104	5.6
			1	93	2.2			1	94	6.8			1	97	5.4			1	100	5.7
			20	97	4.5			20	100	5.7			20	101	2.7			20	94	6.9
MDMA	0.1	0.9989	0.1	94	5.0	0.1	0.9955	0.1	100	4.7	0.1	0.9979	0.1	102	3.3	0.1	0.9957	0.1	85	3.6
			1	96	3.1			1	94	3.5			1	100	5.1			1	91	7.9
			20	101	3.7			20	101	5.3			20	103	4.1			20	99	7.1
ストリキニーネ	0.1	0.9984	0.1	100	8.3	0.1	0.9930	0.1	109	7.8	0.1	0.9967	0.1	101	6.6	0.1	0.9929	0.1	96	9.7
			1	101	5.0			1	93	6.9			1	100	5.7			1	96	3.6
			20	108	3.6			20	102	4.3			20	108	3.1			20	101	6.7
フェンテルミン	0.1	0.9948	0.1	97	7.9	0.1	0.9952	0.1	97	6.0	0.1	0.9941	0.1	102	7.5	0.1	0.9968	0.1	98	5.7
			1	109	4.0			1	104	4.9			1	97	3.8			1	106	5.3
			20	100	4.6			20	91	2.9			20	97	3.9			20	102	11.1
MDEA	0.1	0.9993	0.1	99	4.5	0.1	0.9985	0.1	99	5.6	0.1	0.9984	0.1	99	6.6	0.1	0.9983	0.1	98	3.8
			1	98	3.5			1	94	6.7			1	101	3.6			1	106	4.2
			20	100	3.7			20	94	3.0			20	99	3.7			20	100	4.1
ヘロイン	0.5	0.9848	0.5	99	10.3	0.5	0.9932	0.5	101	10.3	0.5	0.9908	0.5	107	7.7	0.5	0.9802	0.5	93	11.2
			5	103	6.6			5	113	6.7			5	108	9.8			5	112	11.2
			20	101	10.4			20	102	10.1			20	106	3.8			20	111	4.3
コカイン	0.1	0.9981	0.1	93	11.7	0.1	0.9948	0.1	96	11.8	0.1	0.9979	0.1	100	6.9	0.1	0.9959	0.1	88	16.7
			1	98	2.0			1	100	4.6			1	98	3.9			1	95	5.7
			20	100	2.1			20	95	2.4			20	100	2.5			20	102	5.9
メペリジン	0.1	0.9988	0.1	100	6.3	0.1	0.9983	0.1	101	4.0	0.1	0.9991	0.1	100	2.3	0.1	0.9924	0.1	111	5.7
			1	99	4.2			1	94	5.2			1	103	4.1			1	113	5.3
			20	102	5.3			20	96	2.4			20	104	2.9			20	98	8.4

* 濃度単位: ヒト血漿またはヒト血清中に ng/mL

** 6 回の繰り返し分析による値

表 1. クロス検証データ (続き)

DoA 分析対象物	ヘパリンリチウム入りヒト血漿					クエン酸ナトリウム入りヒト血漿					K ₂ EDTA 入りヒト血漿					ヒト血清				
	LOQ*	R ²	濃度*	真度 %**	RSD% **	LOQ*	R ²	濃度*	真度 %**	RSD% **	LOQ*	R ²	濃度*	真度 %**	RSD% **	LOQ*	R ²	濃度*	真度 %**	RSD% **
トラゾドン	0.1	0.9955	0.1	101	3.1	0.1	0.9976	0.1	95	4.0	0.1	0.9962	0.1	84	6.2	0.1	0.9920	0.1	101	5.6
			1	94	4.4			1	95	3.3			1	97	3.5			1	101	2.8
			20	101	3.5			20	97	4.4			20	104	2.7			20	102	3.0
PCP	0.1	0.9987	0.1	100	3.4	0.1	0.9983	0.1	102	1.6	0.1	0.9985	0.1	99	2.5	0.1	0.9857	0.1	107	8.0
			1	96	5.5			1	97	4.8			1	100	2.9			1	112	10.2
			20	98	4.8			20	95	1.4			20	99	3.2			20	92	11.9
ニトラゼパム	0.1	0.9858	0.1	94	9.3	0.1	0.9870	0.1	115	2.7	0.1	0.9938	0.1	100	13.6	0.1	0.9913	0.1	96	14.5
			1	107	3.9			1	109	4.6			1	105	8.2			1	112	5.6
			20	97	3.4			20	86	2.8			20	100	7.2			20	100	8.4
オキサゼパム	0.1	0.9870	0.1	100	3.6	0.1	0.9783	0.1	99	10.0	0.1	0.9842	0.1	99	10.6	0.1	0.9936	0.1	98	11.2
			1	108	7.1			1	96	7.3			1	89	6.1			1	103	4.0
			20	111	9.0			20	107	10.0			20	88	5.5			20	105	7.3
ベラパミル	0.1	0.9944	0.1	103	6.3	0.1	0.9934	0.1	103	2.7	0.1	0.9950	0.1	98	4.7	0.1	0.9973	0.1	111	5.1
			1	91	8.0			1	93	8.2			1	91	7.3			1	103	10.3
			20	105	3.3			20	104	4.0			20	105	3.6			20	99	6.5
ロラゼパム	0.5	0.9935	0.5	95	12.7	0.1	0.9882	0.5	101	12.3	0.5	0.9778	0.5	103	9.9	0.5	0.9936	0.5	98	12.7
			5	112	4.9			5	107	6.3			5	111	4.8			5	105	3.6
			20	105	4.1			20	111	8.0			20	102	7.0			20	107	6.4
アルプラゾラム	0.1	0.9943	0.1	103	10.0	0.1	0.9936	0.1	99	4.2	0.1	0.9921	0.1	85	10.9	0.1	0.9951	0.1	92	12.5
			1	106	5.7			1	100	6.4			1	98	5.2			1	103	7.2
			20	105	6.3			20	98	4.3			20	99	5.0			20	100	4.9
メサドン	0.1	0.9963	0.1	94	5.3	0.1	0.9966	0.1	102	5.3	0.1	0.9963	0.1	104	4.2	0.1	0.9919	0.1	109	5.5
			1	89	6.3			1	87	9.3			1	99	5.3			1	102	9.8
			20	5.3	7.5			20	95	6.7			20	100	2.7			20	93	5.4
テマゼパム	0.1	0.9862	0.1	105	11.0	0.1	0.9930	0.1	117	6.7	0.1	0.9821	0.1	91	14.4	0.1	0.9941	0.1	101	9.8
			1	98	6.8			1	102	6.3			1	90	8.1			1	98	4.2
			20	105	6.1			20	98	2.1			20	97	3.4			20	97	10.8
プロアジフェン	0.1	0.9888	0.1	111	5.1	0.1	0.9887	0.1	111	3.9	0.1	0.9933	0.1	101	4.8	0.1	0.9835	0.1	119	10.1
			1	84	4.3			1	85	6.8			1	92	3.4			1	104	11.3
			20	111	6.3			20	100	8.1			20	102	3.6			20	92	8.4
ジアゼパム	0.1	0.9959	0.1	94	8.5	0.1	0.9967	0.1	109	8.3	0.1	0.9974	0.1	97	8.5	0.1	0.9977	0.1	113	6.2
			1	95	3.3			1	99	3.9			1	102	3.2			1	102	6.9
			20	100	4.7			20	100	5.7			20	102	2.1			20	102	5.9

* 濃度単位: ヒト血漿またはヒト血清中に ng/mL

** 6 回の繰り返し分析による値

マトリックスクリーンアップおよび機器検出システムに与える影響

以前の研究⁴で、異なる血液マトリックスのマトリックスクリーンアップは、Captiva EMR-Lipid クリーンアップによりリン脂質が 99 % 超除去されることが示されました。リン脂質の除去により、メソッドの信頼性と定量の一貫性が向上します。また、システムの汚染お

よびキャリアオーバーを著しく低減させます。LC/MS/MS 検出システムにクリーンなサンプルを注入すると、システムの汚染が低減し、その結果、サイクル時間が短くなり、サンプルスルー時間が向上します⁷。これらの効果は血清および血漿サンプルでみられ、分析スルー時間の向上の可能性がります。

結論

ウェル内 PPT 後の Captiva EMR-Lipid クリーンアップによるサンプル前処理メソッドについて、複数のヒト血液マトリックス中の 24 種類の代表的な DoA 化合物を定量することでクロス検証しました。それぞれの血液マトリックスにおける 1 日間の真度および精度の評価により、他のマトリックスへメソッド移管ができることを確認しました。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、ハイスループットラボの高速で自動化できるサンプル前処理のニーズを満たしています。さらに、利便性の高いウェル内 PPT 後の Captiva EMR-Lipid クリーンアップにより、作業を簡略化し、サンプル抽出と脂質クリーンアップを効率的に行います。分析においてクリーンなサンプルは、検出システムのクリーニング時間を短縮し、サンプルのスループットの向上につながります。まず血漿または血清サンプルを添加し、その後変性溶媒を添加するというタンパク処理により、サンプルの混合の均一性、そしてタンパク質の除去が改善し、サンプルの移動ステップが減少しました。

参考文献

1. Saito, K.; et al. Analysis of Drugs of Abuse in Biological Specimens, *J. Health Science*, **2011**, 57(6), 472–487.
2. Moeller, M. R.; Steinmeyer, S.; Kraemer, T. Determination of drugs of abuse in blood, *J. Chromatog. B* **1998**, 713, 91–109.
3. 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.
4. 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**.
5. 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**.
6. Zhao, L.; Juck, M. Quantitative Determination of Drugs of Abuse in Human Whole Blood by LC/MS/MS Using Agilent Captiva EMR-Lipid Cleanup, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-9251EN, **2018**.
7. Zhao, L.; Juck, M. Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートを用いた生体サンプルのタンパク処理、アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、publication number 5991-9222JAJP, **2018**.

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, May 8, 2018
5991-9312JAJP