

Agilent Captiva EMR-Lipid を用いた LC-QQQ によるヒト血清およびヒト血漿中の ヒドロキシクロロキンと代謝物の分析

著者

Anne-Laure Larroque
Center for Translational
Biology (CTB) Drug Discovery
Platform, Research Institute
of the McGill University
Health Center

Amichai Grunbaum,
McGill University
Health Center

Limian Zhao and
Christophe Deckers
Agilent Technologies, Inc.

概要

ヒト血清およびヒト血漿中のヒドロキシクロロキン (HCQ) とその 3 種類の代謝物を定量分析するための、堅牢性の高い固有の高感度メソッドを開発および検証しました。ヒト血清またはヒト血漿のサンプル (100 μ L) をタンパク変性沈殿処理によって前処理し、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを実行してから LC/MS/MS で分析しました。このアッセイでは、4 種類の分析対象物すべてについて、検量線のダイナミックレンジが 0.4 ~ 100 ng/mL となり、相関係数 R^2 は 0.99 を超えました。1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL の 3 つのスパイクレベルでメソッド定量を検証した結果、ヒト血清とヒト血漿でいずれも真度が 100 \pm 15 % 以内、精度 CV < 15 % となりました。このメソッドは、ヒト血液マトリックス中の HCQ および代謝物の新しい定量アプリケーション向けの信頼性の高いソリューションとなります。

はじめに

ヒドロキシクロロキン (HCQ) は、抗マラリア薬クロロキンの水酸化型です。この薬はクロロキンと同程度の有効性がありますが、毒性が低いことがわかっており¹、マラリアやその他の疾病の予防と治療に最も広く使用される処方薬の 1 つです。HCQ は一般的に経口で投与され、肝臓で代謝されて 3 つの活性代謝物 (デスエチルクロロキン (DCQ)、デスエチルヒドロキシクロロキン (DHCQ)、ビスデスエチルクロロキン (BDCQ)) になります。

HCQ と代謝物のほとんどのアッセイは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と蛍光 (FL) 検出の組み合わせに基づきます。ただし通常、これらのアッセイは非選択的であり、大量のサンプルを必要とします。LC/MS/MS は従来の HPLC-FL 検出より感度と選択性が優れているため、バイオ分析でよく使用されている検出ツールです。²⁻⁴ これらのアッセイで使用される一般的なサンプル前処理法としては、シンプルなタンパク変性沈殿処理 (PPT) や液液抽出 (LLE) などがあります。ただし、これらのサンプル前処理法は時間と手間がかかり、LC/MS/MS でイオン抑制の原因となる複雑なマトリックス干渉を招く可能性があります。

Agilent Captiva EMR-Lipid のカートリッジとプレートでは新しい EMR-Lipid 充填剤が使用されており、生体サンプルマトリックスから主要な脂質を選択的に除去できます。このメカニズムは脂質化合物と EMR-Lipid 充填剤の間のサイズ排除と疎水性相互作用の組み合わせに基づいているため、不要な成分損失は発生しません。一般的なタンパク変性沈殿処理プロセスの後に Captiva EMR-Lipid クリーンアップを実行することで、タンパク質とリン脂質の血液マトリックスクリーンアップの効率と選択性が向上します。以前の調査では、生体血液マトリックスから 99 % 超のリン脂質を除去できました。⁵ Captiva EMR-Lipid の 96 ウェルプレートフォーマットでは、シンプルなウェル内 PPT による効率的でハイスループットなサンプル前処理の後に、通過型クリーンアップを実行できます。このため複数サンプル

の移送にかかる時間と手間を節約し、操作エラーや成分損失が発生する可能性を低減することができます。この方法は複数の臨床研究アプリケーションで生体血液サンプルの分析に使用されました^{6,7}。例えばヒト全血に含まれる HCQ と代謝物の定量などです。⁸ 今回の調査ではメソッドアプリケーションをヒト血漿とヒト血清に拡張し、さまざまなヒト血液マトリックス中の HCQ と代謝物の定量分析を実施しました。表 1 に、4 種類のターゲット (HCQ、DCQ、DHCQ、BDCQ) と内部標準 HCQ-d₄ の成分情報を示します。

表 1. 対象分子

分子	構造	化学式	[M+H] ⁺ (m/z)	pKa
ヒドロキシクロロキン (HCQ)		C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O	336.1837	8.3 および 9.7 [9a]
ヒドロキシクロロキン-d ₄ (HCQ-d ₄)		C ₁₈ H ₂₂ D ₄ ClN ₃ O	340.2088	—
デスエチルヒドロキシクロロキン (DHCQ)		C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	308.1524	10 および 15.6 [9b]
デスエチルクロロキン (DCQ)		C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃	292.1575	8.4 および 10.9 [9a]
ビスデスエチルクロロキン (BDCQ)		C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃	264.1262	10.2 [9b]

実験方法

試薬および調製

試薬と溶媒はすべて LC/MS グレードのものを使用しました。OmniSolv アセトニトリル (ACN)、メタノール (MeOH)、LiChropur ギ酸 (FA) は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。試薬グレードの水酸化アンモニウム (NH₄OH) は Ward's Science (ロチェスター、ニューヨーク州、米国) から購入しました。成分標準と内部標準 (IS) は Toronto Research Chemical (ノースヨーク、オンタリオ州、カナダ) から購入しました。ヒト血清とヒト血漿 K₂EDTA は BioIVT (ウェストベリー、ニューヨーク州、米国) から購入しました。

標準および溶液の調製

1 mg/mL の HCQ と内部標準 (HCQ-d₄) の原液は、それぞれ水で調製しました。1 mg/mL の BDCQ、DHCQ、DCQ の原液は、それぞれメタノール (MeOH) で調製しました。すべての原液と作業用溶液は -20 °C で保管しました。中間希釈液は MeOH:水 (1:1、v:v) で調製しました。

4 つの分析対象物の標準スパイク溶液の混合物は、水で 10 µg/mL に調製しました。IS スパイク溶液は水で 1 µg/mL に調製し、サンプルに直接スパイクするのに使用しました。

Milli-Q 水 1 L に FA 1 mL を加えて、移動相 A (FA 0.1 % を含む水) を調製しました。ACN 1 L に FA 1 mL を加えて、移動相 B (FA 0.1 % を含む ACN) を調製しました。変性溶媒 (95/5 ACN/MeOH) は ACN 190 mL と MeOH 10 mL を混合して調製しました。これを -20 °C で保管しました。ACN 160 mL と Milli-Q 水 40 mL を混合してから濃縮 NH₄OH (29 % のアンモニア溶液) 50 mL を混合して、追加の溶出溶媒 (80/20 ACN/水、NH₄OH 5.8 % を含む) を調製しました。ACN 95 mL、水 5 mL、FA 100 µL を混合して、再溶解溶液 (95/5 ACN/水、FA 0.1 % を含む) を調製しました。すべての試薬は室温で保管および使用しました。

サンプル前処理機器と消耗品

- Agilent Captiva EMR-Lipid、96 ウェルプレート、40 mg (部品番号 5190-1000)
- Agilent 加圧式マニホールド SPE カートリッジ 96 本用 (PPM-96) (部品番号 5191-4116)
- Agilent スクウェア 96 ウェル 2 mL コレクションプレート (部品番号 5133009)
- Agilent スクウェア 96 ウェルシーリング キャップ (部品番号 5133005)
- ボルテックスミキサー、VWR
- 振とう機、ThermoScientific
- エバポレータ、CentriVap Complete、Labconco
- 遠心分離機 5424 R、Eppendorf
- ピペット

機器メソッド

サンプルは次の条件で LC-QQQ システムで分析しました。

HPLC 条件			
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8、2.1 × 50 mm、3.5 µm (p/n 971700-906)		
流量	0.3 mL/min		
カラム温度	40 °C		
注入量	10 µL		
移動相	A) 0.1 % ギ酸水溶液 B) 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0	5	0.3
	1.0	5	0.3
	2.0	8	0.3
	5.0	10	0.3
	5.1	70	0.3
	7.0	70	0.3
ポストタイム	3.0 min		
QQQ 条件			
ガス温度	350 °C		
ガス流量	7 L/min		
ネブライザ	35 psi		
ソースガスヒーター	350 °C		
ソースガス流量	11 L/min		
キャピラリー	3,500 V (POS)		
データ取り込み	MRM は表 2 のとおり		

表 2. ターゲット化合物の MRM 条件

分析対象物	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE (V)	RT (分)
HCQ	336.2	247.0	19	3.17
		158.2	19	
HCQ-d ₄ (IS)	340.2	251.0	19	3.16
		162.2	19	
BDCQ	264.1	179.0	20	2.55
		247.0	15	
DHCQ	308.1	179.0	20	2.70
		130.2	17	
DCQ	292.2	179.0	18	3.10
		114.3	16	

キャリブレーション標準と品質管理 (QC) サンプル前処理

検量線のダイナミックレンジは 0.4 ~ 100 ng/mL で、0.4、1、5、10、50、80、100 ng/mL の濃度のマトリックス標準液を使用しました。これらの標準液は、血漿ブランクまたは血清ブランクに標準スパイク溶液を適量スパイクした後にボルテックスして調製しました。メソッド検証試験では 3 つの濃度（低 QC 1 ng/mL、中 QC 10 ng/mL、高 QC 100 ng/mL）の QC サンプルを分析しました。これらの QC サンプルは、マトリックスブランクにスパイク溶液を適量スパイクして調製しました。次に適量の IS スパイク溶液を標準液と QC サンプルにスパイクし、マトリックスでの最終 IS 濃度を 50 ng/mL にしました。すべてのサンプルを静かにボルテックスし、サンプル前処理プロセスを完了しました。マトリックス適合 QC は、乾燥したマトリックスブランク残留物と対応する純粋な標準溶液を 10 ng/mL と 100 ng/mL で再溶解させて調製しました。純粋な標準溶液は、標準スパイク溶液を再溶解溶液で 10 ng/mL と 100 ng/mL まで適切に希釈して調製しました。

サンプル前処理

図 1 にサンプル前処理の手順を示します。このメソッドは、ヒト全血用のサンプル前処理メソッドと同じステップに従います。⁸ ただし血清と血漿のどちらでも、サンプルに IS をスパイクした後に水で希釈する必要がないという点が異なります。全血サンプルの場合は水を加えて浸透破壊によって赤血球を溶解させ、あらゆる成分を赤血球に吸収させます。ただし、このステップは血清や血漿の前処理には不要です。

メソッド検証

開発したメソッドを真度および精度 (A&P) 分析で検証しました。標準液×2セット、3つの濃度の QC サンプルとマトリックスブランク×6組を適切に調製しました。2セットの標準液をシーケンスの最初と最後に分析し、3つの濃度の QC サンプルを濃度が低い順から分析しました。マトリックスブランクサンプルを分析して、メソッドの選択性とキャリーオーバーを評価しました。

分析対象物の絶対回収率およびマトリックス効果

中濃度 (10 ng/mL) および高濃度 (100 ng/mL) のスパイク済み QC とマトリックス適合 QC の間で分析対象物のピーク面積を比較し、それに基づいて分析対象物の絶対回収率を評価しました。同じ濃度 (10 ng/mL と 100 ng/mL) のマトリックス適合 QC と純粋な標準液の間で分析対象物のピーク面積を比較し、それに基づいてマトリックスを評価しました。

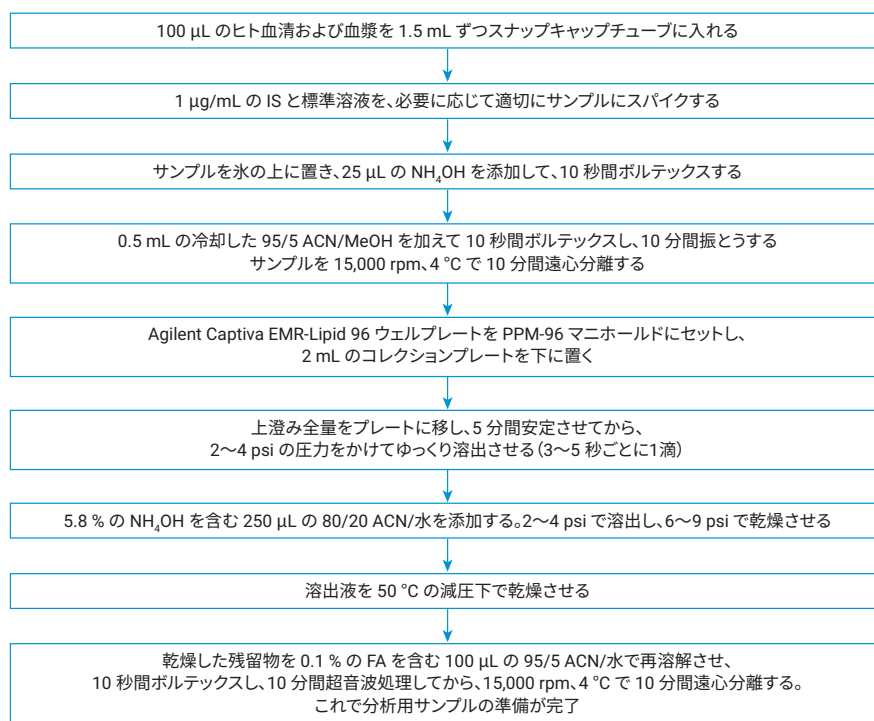


図 1. サンプル前処理手順スキーム

結果と考察

サンプル前処理メソッド

(ACN や MeOH などの) 有機変性溶媒を用いたタンパク変性沈殿処理メソッドを、生体血液マトリックス中の HCQ と代謝物の抽出に使用しました。¹⁰ また塩基性薬品に水酸化アンモニウム (NH₄OH) 1% を含む塩基性変性溶媒も使用しました。¹¹ HCQ と代謝物は塩基性化合物であるため、水酸化アンモニウムでマトリックス pH を上げると抽出率が上がります (表 1)。血液マトリックス中の生理学的 pH では、HCQ とその代謝物の主な型はジカチオン型です。5.8% の NH₄OH (v:v) を含む変性溶媒によって、マトリックス中のターゲット化合物が完全に中和され、抽出率が上がったことがわかりました。¹² 3 種類の血液マトリックス中の各種変性溶媒/溶媒混合液の試験後に、95/5 ACN/MeOH と 5.8% の NH₄OH の混合物を、タンパク変性沈殿処理の抽出用の変性溶媒として最適化しました。また、溶出後に 5.8% の NH₄OH を含む 80/20 ACN/水を用いた洗浄ステップを実行することで、回収率が向上しました。

分析対象物の回収率およびマトリックス効果

分析対象物の回収率の評価結果を図 2 に示します。ヒト血漿とヒト血清のどちらのマトリックスでも、すべてのターゲットの絶対回収率が 60 ~ 120%、RSD が 15% 未満でした。低濃度および高濃度での分析対象物の回収率は相互に整合性があり、異なる濃度でもサンプル前処理メソッドによる抽出効率に一貫性があることがわかりました。

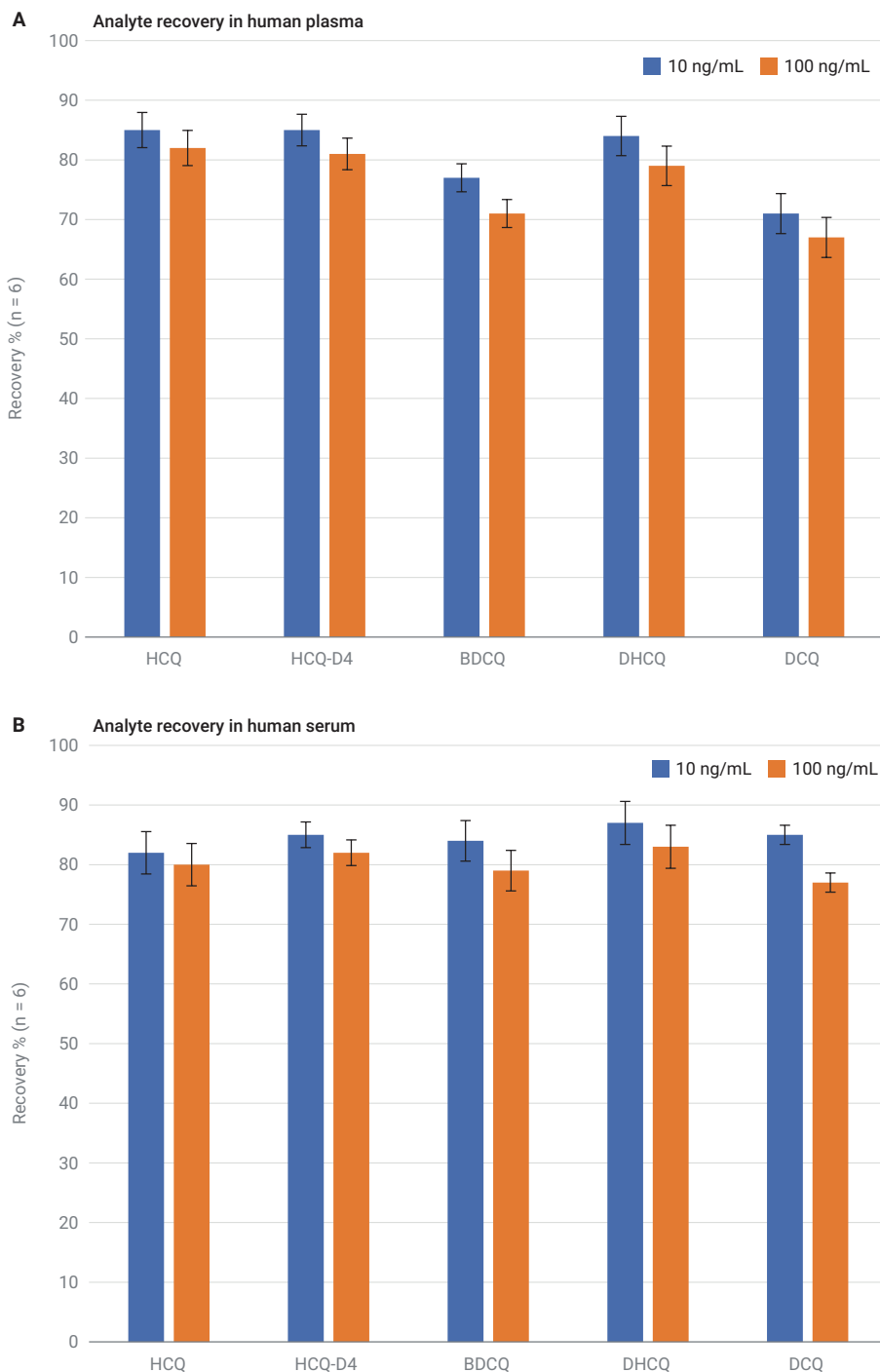


図 2. ヒト血漿 (A) とヒト血清 (B) に含まれる分析対象物の回収率。10 ng/mL と 100 ng/mL で比較

分析対象物のマトリックス効果の評価結果を図3に示します。ヒト血漿とヒト血清のどちらのマトリックスでも、すべてのターゲットで50%超のマトリックス効果（低濃度DCQを除く）が見られました。一般的に、血漿でも血清でも、低濃度サンプルのマトリックス効果値は低くなりました。これはサンプル濃度が低いとマトリックスの影響が大きくなることを示しています。マトリックス効果は分析メソッド評価に適したパラメータですが、定量メソッドが信頼できるものである限り、特定の許容基準はありません。

メソッドの感度と選択性

メソッド検証の一部として、LOQレベルでのS/N比に基づいてメソッド感度を評価しました。またLOQレベルでマトリックスブランクの寄与と対応する分析対象物のピーク面積を比較し、それに基づいてメソッド選択性を評価しました。図4と5はそれぞれ、ヒト血清およびヒト血漿中の各分析対象物のマトリックスブランクと定量下限（LOQ）のクロマトグラムを示しています。所定のLOQ（0.4 ng/mL）における分析対象物のS/Nは ≥ 10 でした。マトリックスブランクの寄与は、LOQレベルで成分のレスポンスの20%未満でした。この結果はメソッドの感度と選択性を明確に示しており、定量メソッドの信頼性を確認できるものです。

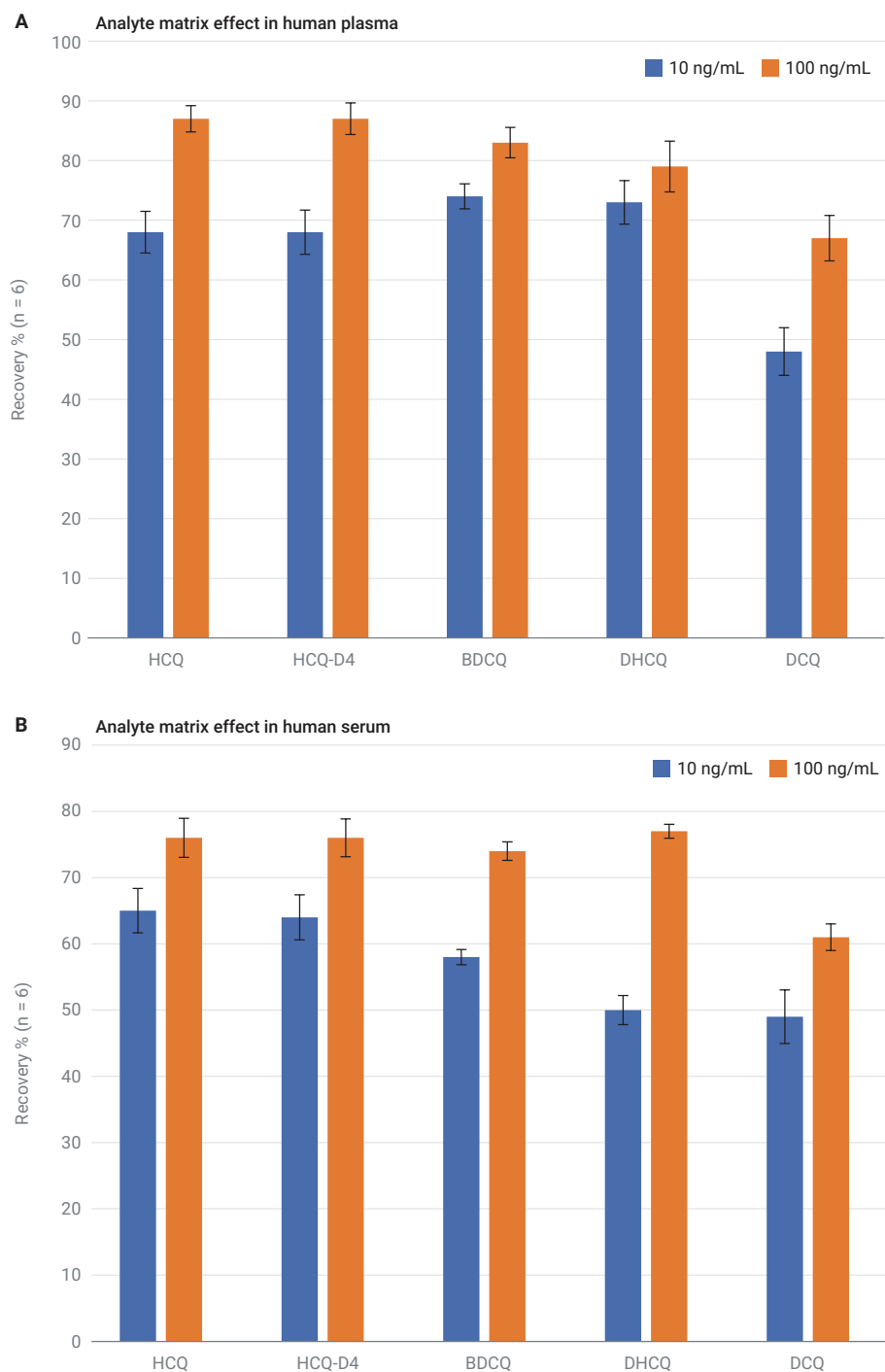


図3. ヒト血漿(A)とヒト血清(B)に含まれる分析対象物のマトリックス効果。10 ng/mLと100 ng/mLで比較

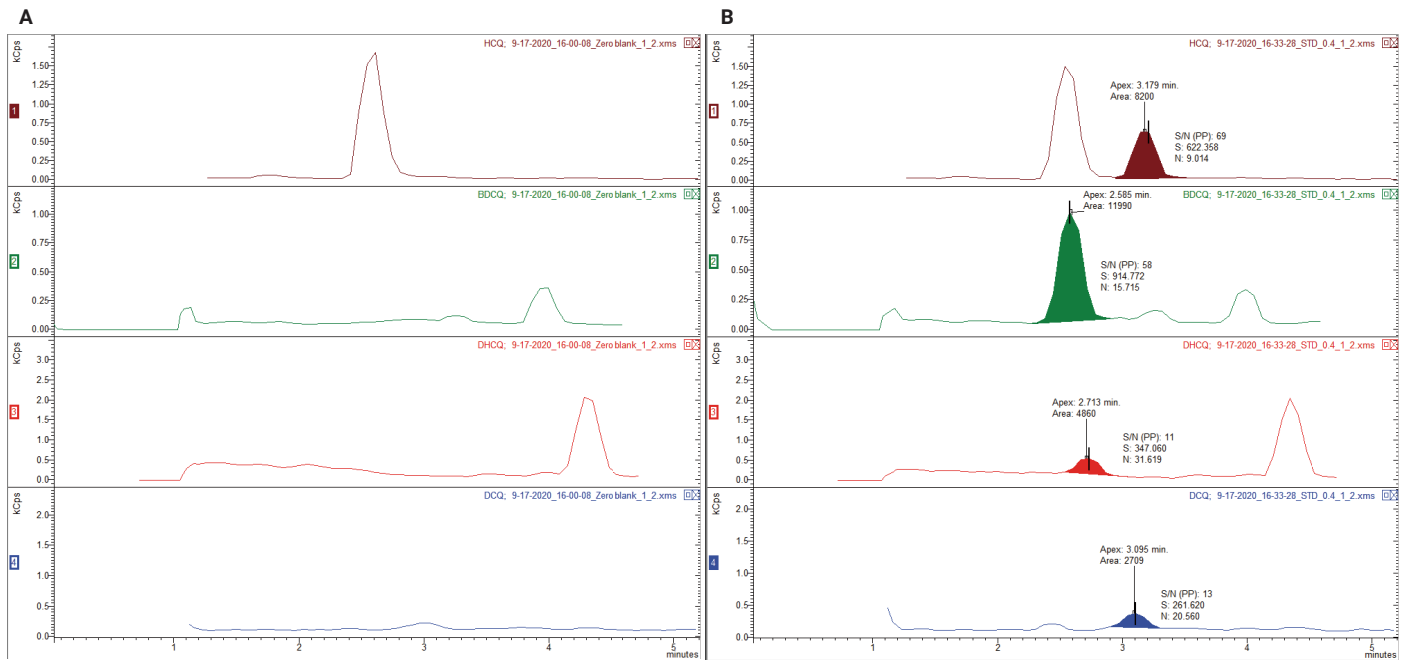


図 4. ヒト血清マトリックスブランク (A) と LOQ (B) の 4 種類のターゲット化合物の LC/MS/MS MRM クロマトグラム

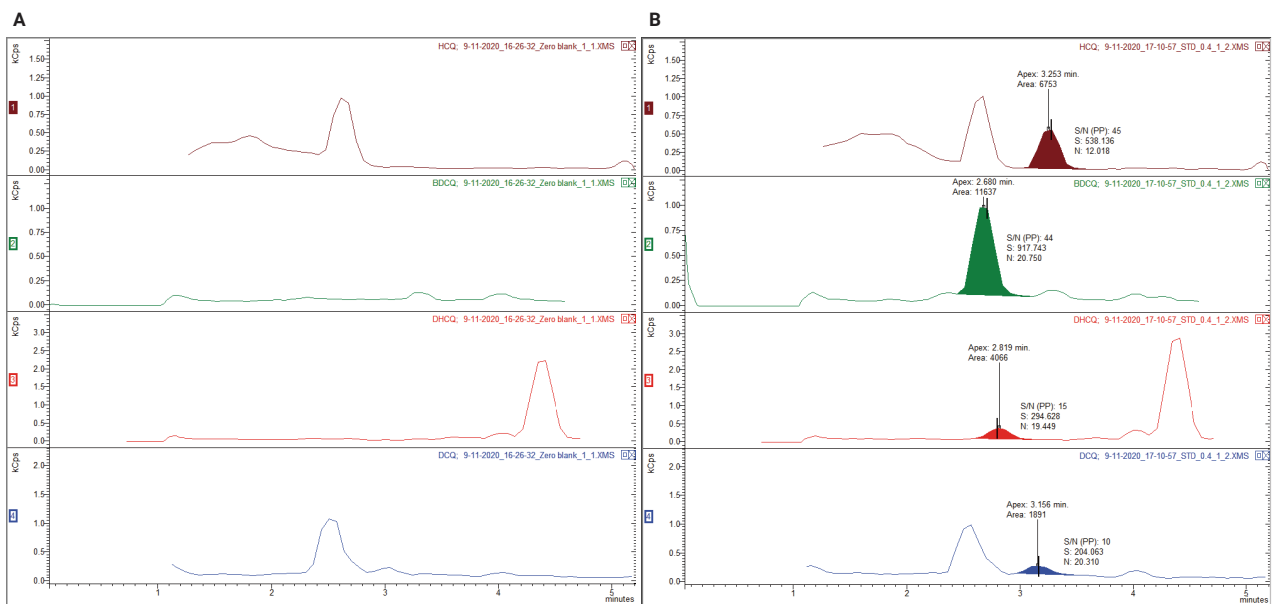


図 5. ヒト血漿マトリックスブランク (A) と LOQ (B) の 4 種類のターゲット化合物の LC/MS/MS MRM クロマトグラム

検量線の直線性

マトリックスでは 0.4 ~ 100 ng/mL のダイナミックレンジで検量線の直線性が示されました。検量線は、直線回帰の適合と $1/x$ の重み付けを用いて回帰分析しました。ヒト血清中の各分析対象物の検量線を図 6 に、対応する

血漿の検量線を図 7 に示します。すべての検量線がキャリブレーション範囲を超える優れた直線性を示し、 R^2 は 0.99 を上回りました。

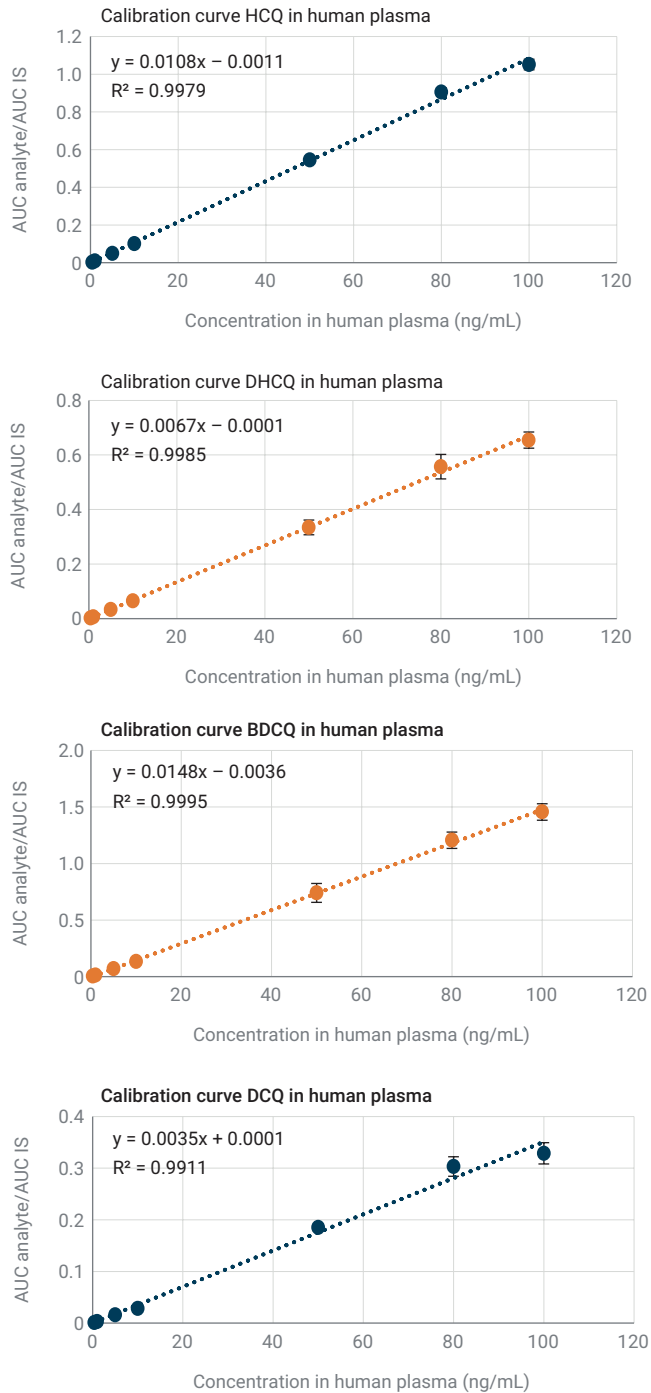


図 6. 0.4~100 ng/mL の範囲のヒト血清に含まれるターゲット化合物の検量線

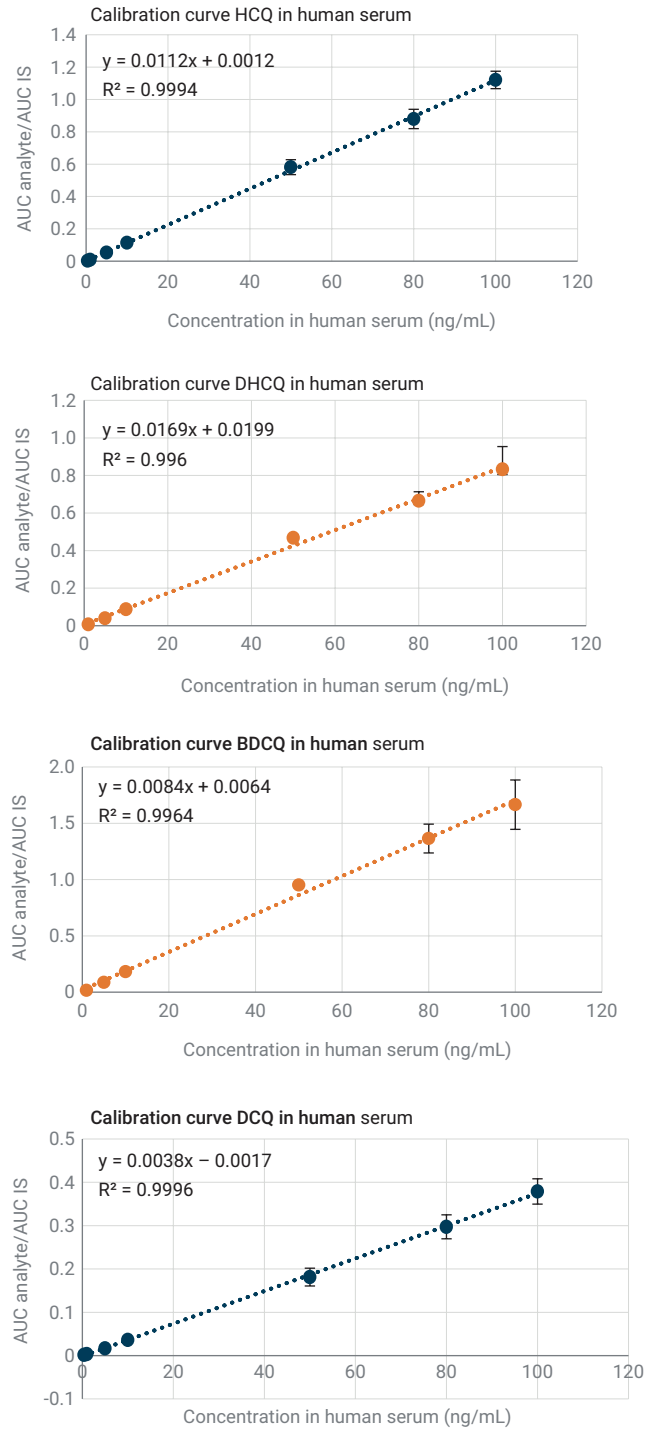


図 7. 0.4~100 ng/mL の範囲のヒト血漿に含まれるターゲット化合物の検量線

定量の真度と精度

開発したメソッドを真度および精度（A&P）分析によって検証し、定量結果全体を収集しました。表3の結果には、2種類のマトリックスの3つの濃度におけるすべての分析対象物の真度とCVが含まれています。A&P分析の定量結果から、メソッドの真度と精度が非常に優れており、臨床研究試験の一般的な許容基準（真度が100 ±15%、CVが ≤15%）を満たしていることがわかります。

結論

タンパク変性沈殿処理とその後の Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いた堅牢なメソッドが確立され、LC-QQQ によってヒト血清およびヒト血漿中のヒドロキシクロロキンと代謝物を迅速かつ確実に分析できるようになりました。このメソッドによって優れた定量結果を取得し、分析対象物の真度と精度、検量線の直線性、感度、選択性、効率的な回収率、マトリックス除去、およびシンプルなワークフローを実現できました。

表 3. ヒト血清とヒト血漿の HCQ および 3 種類の代謝物のメソッドの真度および精度の結果

サンプルマトリックス	添加濃度	HCQ	DHCQ	DCQ	BDCQ	
ヒト血漿	1 ng/mL (n = 6)	計算された濃度 (ng/mL)	1.06	1.09	1.09	1.09
		精度 %	106	109	109	109
		CV %	1.9	4.1	2.5	7.3
	10 ng/mL (n = 6)	計算された濃度 (ng/mL)	10.27	10.48	10.90	10.50
		精度 %	103	105	109	105
		CV %	3.6	2.3	6.5	5.0
	100 ng/mL (n = 6)	計算された濃度 (ng/mL)	105.64	104.70	111.93	109.95
		精度 %	106	105	112	110
		CV %	2.1	5.6	5.0	6.3
ヒト血清	1 ng/mL (n = 6)	計算された濃度 (ng/mL)	1.04	1.15	1.00	1.15
		精度 %	104	115	100	115
		CV %	3.5	5.5	12.6	3.1
	10 ng/mL (n = 6)	計算された濃度 (ng/mL)	10.39	11.51	11.28	11.52
		精度 %	104	115	113	115
		CV %	4.2	2.5	5.4	3.5
	100 ng/mL (n = 6)	計算された濃度 (ng/mL)	102.56	103.31	114.82	98.47
		精度 %	103	103	115	98
		CV %	1.7	4.2	2.7	5.4

参考文献

1. Lim, H. S. *et al.* Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine and its Clinical Implications in Chemoprophylaxis Against Malaria Caused by *Plasmodium Vivax*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1468–1475.
2. Wang, L-Z.; Ong, R. Y-L.; Chin, T-M.; Thuya, W-L.; Goh, B-C. Method Development and Validation for Rapid Quantification of Hydroxychloroquine in Human Blood Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, *61*, 86–92.
3. Füzéry, A. K.; Breaud, A. R.; Emezienna, N.; Schools, S.; Clarke, W. A. A Rapid and Reliable Method for the Quantitation of Hydroxychloroquine in Serum Using Turbulent Flow Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clinica Chim. Acta* **2013**, *421*, 79–84.
4. Soichot, M.; Mégarbane, B.; Houzé, P.; Chevillard, L.; Bourgogne, E. Development, Validation and Clinical Application of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of Hydroxychloroquine and Its Active Metabolites in Human Whole Blood. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *100*, 131–137.
5. Zhao, L.; Juck, M. Protein Precipitation for Biological Fluid Samples Using Agilent Captiva EMR—Lipid 96-Well Plates, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-9222EN, **2018**.
6. 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**.
7. Lucas, D.; Zhao, L. Vitamin D Metabolite Analysis in Biological Samples Using Agilent Captiva EMR—Lipid, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-7956EN, **2017**.
8. Larroque, A-L.; Grunbaum, A.; Zhao, L.; Deckers, C. Analysis of Hydroxychloroquine and Metabolites in Human Whole Blood Using the Agilent Captiva EMR—Lipid by LC/TQ, *Agilent Technologies application brief*, publication number 5994-2420EN, **2020**.
9. A) Warhurst, D. C.; Steele, J. C. P.; Adagu, I. S.; Craig, J. C.; Cullander, C. Hydroxychloroquine is Much Less Active Than Chloroquine Against Chloroquine-Resistant *Plasmodium Falciparum*, in Agreement with its Physicochemical Properties, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, *52*(2), 188–193.
B) Predicted values for DHCQ and BDCQ, <https://go.drugbank.com/metabolites/DBMET02740>, <https://go.drugbank.com/metabolites/DBMET02741>.
10. Chhonker, Y. S.; Sleightholm, R. L.; Li, J.; Oupický, Murry, D. J. Simultaneous Quantitation of Hydroxychloroquine and its Metabolites in Mouse Blood and Tissues Using LC–ESI–MS/MS: an Application for Pharmacokinetic Studies, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1072*, 320–327.
11. Zhao, L. 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**.
12. Charlier, B.; Pingeon, M.; Piaz, F. D.; Conti, V.; Valentini, G.; Filippelli, A.; Izzo, V. Development of a Novel Ion-Pairing HPLC-FL Method for the Separation and Quantification of Hydroxychloroquine and its Metabolites in Whole Blood, *Biomed. Chromatogr.* **2018** Aug, *32*(8), e4258.

謝辞

この共同調査の開始にあたっての Nathalie Bourgeois 氏のご協力、ならびに Jean-Claude 博士、Das 博士、Kremer 博士のご支援に心より感謝申し上げます。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタム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. 2021

Printed in Japan, January 26, 2021

5994-2949JAJP

RA 44200.5218865741