Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPLCおよびタンデム四重極型質量分析計による DBS（乾燥ろ紙血液）を用いた医薬品の高速分析

利点

ACQUITY UPLC を タンデム四重極型質量分析計Xevo TQと組み合わせることで高感度分析が可能となり、乾燥ろ紙血液を用いたDMPK試験サンプル分析のための理想的なソリューションとなります。

- 試験に用いる動物数を低減し、コストを削減
- 投与量の少ない化合物の分析に必要な感度を達成
- 医薬品代謝物検出および同定のためのフルスキャンMSおよびMRMデータの同時取り込みによる効率的なメソッド開発

ソリューション

ACQUITY UPLC®

Xevo® TQ

キーワード

Dried blood spots（DBS,乾燥ろ紙血液）、生体試料分析、UPLC®/MS/MS、メソッド開発、感度

はじめに

小型のげっ歯類を用いる安全性試験や治験のための血液採取の際、図1のようなガスリー法で用いられるカード型のろ紙を用いることで、コストおよび動物の使用を削減できると考えられます。Spooner[1-4] らは、その可能性について他の手法[5-7]と比較しながら評価を行いました(「血液スポットカード」を参照)。通常15 µLの血液をカードにスポットし、直径3～6 mm（3～6 µLに相当）をパンチアウトしてサンプリングします。このアプリケーションノートでは、Xevo TQとACQUITY UPLCを組み合わせて、乾燥ろ紙血液サンプル中の医薬品および代謝物検出のためのメソッドを開発し、高感度定量を行う方法について、ご紹介します。

図1. カード上の乾燥血液スポット

結果

カードからのバックグラウンド

血液スポットカードは処理及び非処理の2種類を用意しました。処理を行ったカードは、血液サンプルにウイルスの影響が及ばないように化学処理を行ったもので、化学処理に用いた化合物が抽出時に溶出して、目的物質のシグナルに影響を与えます。従ってメソッド開発の際に、カードに由来するバックグラウンドをモニターし、目的の成分と分離するクロマトグラフィー条件となるよう調整することが重要です。

分析条件

サンプル前処理

サンプル、検量線およびQC用のサンプルは、新鮮なラット血液にスタンダードを添加して作成しました。15 µLのサンプルをWhatman DMPK cards type A, B, およびCにスポットしました。カードを直径3 mmでパンチアウトしてサンプリングを行い、100 µLのメタノールで1時間振とう抽出した後、1分間遠心分離しました。上清を採取し、蒸留水を1:1の割合で添加したものをLC/MSに注入しました。

LC条件

LCシステム:	ACQUITY UPLC System
カラム:	ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 1.7 µm, 2.1 x 50 mm
グラジエント:	2分間の逆相グラジエント

MS条件

MSシステム:	Xevo TQ
イオン化:	ESIポジティブ
	フルスキャン/MRM同時取り込み (RADARモード)
	コリジョンエネルギー、キャピラリー電圧及びコーン電圧は、化合物ごとに最適化した値

Xevo TQは、RADAR™モードを用いたフルスキャン/MRMの同時取り込みを可能にする、実績のあるコリジョンセルデザインが特長となっています(「T-Wave™ コリジョンセル」を参照)。図2には、溶媒およびメタノール抽出サンプルにアルプラゾラム(1 ng/mL)を添加した3種類のカードを用いて測定した、フルスキャンおよびMRMデータを示しました。

このデータから、未処理のカード(DMPK C)は、処理を行ったものと比べて圧倒的にバックグラウンドが低いことがわかります。各カードのフルスキャンデータから、処理を行ったカードでは、LCのグラジエントに応じてシグナルが上昇することが確認できます。すなわち、未処理のカードと比較して処理を行ったカードでは、目的物質のシグナルが低下する可能性があります。

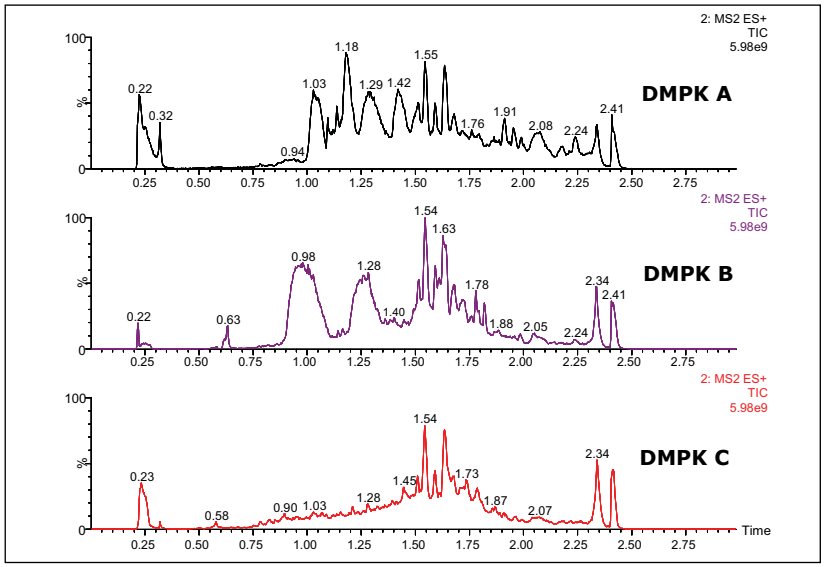

図2A. 3種類のDMPKカードのフルスキャンデータ。AおよびBは化学処理済み、Cは未処理。

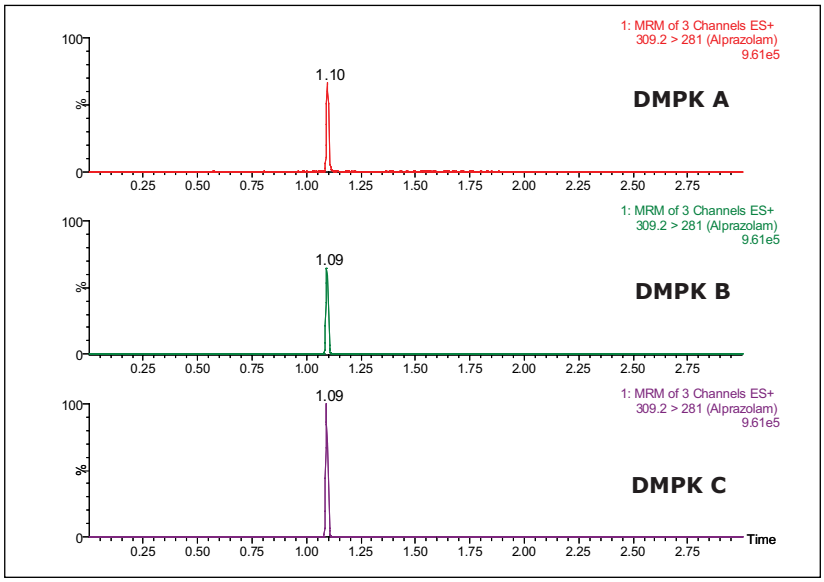

図2B. 3種類のDMPKカードのMRMデータ

感度

少量の血液スポットおよびサンプリング量のため、実際に分析に用いられる血液がわずか3～6 µLとなります。一般的な安全性試験では、一日に一度または二度の静脈内投与または3～200 mg/Kgのレベルで経口投与されます。臓器や脂質へ分布しない、あるいは速やかに排泄されない化合物の場合、経時時間が長いポイント(24時間後)では、5 ng/mLよりも高濃度の医薬品および（または）代謝物が循環することになります。MRMモードを用いる場合、最近のLC/MS/MS分析システムの検出範囲では、これらは十分検出可能です。しかしながら、低用量、迅速な排出および吸入投与などの場合、血中濃度が大幅に低下するため、1～10 pg/mL程度の濃度検出が必要となります。従って、乾燥血液スポットのようなサンプルを用いて正確な定量を行うには、より高感度な分析システムが必要とされます。

UPLCテクノロジーは、2 µm以下の粒子径を用いたクロマトグラフィーで、従来のHPLC[8-10]と比べて3～5倍の感度が得られることが、多くの利用者によって実証されています(詳細はUPLCのウェブサイトwww.waters.com/uplcを参照)。Xevo TQ MSと組み合わせることで、感度面でも最大限のパフォーマンスを発揮できるため、ろ紙血液を用いて迅速にDMPK試験を行うことができる理想的な分析システムです。

図3Aは、アルプラゾラムをスパイクした血液を、カードにスポット(15 µL)した時のLLOQおよびブランクのデータを示しています。図3Bに示した検量線では100 pg/mL～500 ng/mLの範囲で直線性が得られています。この試験では、低濃度の感度を得ることは必須ではありませんでしたが、注入量を増加することで10 pg/mL以下のLLOQも得ることができます。この試験での感度は、低暴露量化合物の薬物動態を確認するのにも十分です。

血液スポットカード

従来のDMPK試験を踏襲して、げっ歯類を用いた安全性試験を行う場合、各サンプルあたり約1 mLの血漿を用います。血漿サンプルは、1.5～2 mLの血液から得られるため、各時間ごとに1個体の動物が犠牲になります。したがって薬物動態曲線は、時間ごとに2～3個体の動物を用いた合成データから得られます。血液スポットカードを用いる場合には、各時間ごとに15～20 µLの血液ですみます。これには複数の利点があります。:

- サンプリングのたびに動物を犠牲にする必要がない
- 薬物動態曲線が複数の動物のデータの合成ではなく、1個体の動物で作成可能
- 使用する動物の数を削減
- 必要とする化合物量を低減
- サンプルの保管や送付の際に凍結する必要がない

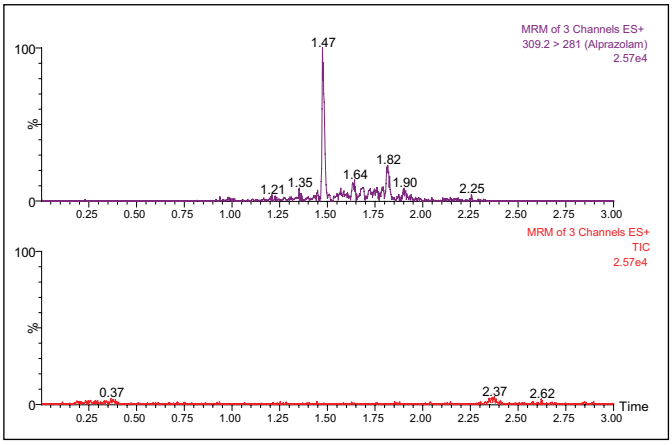

図3A. 上段: LLOQ 100 pg/mLのクロマトグラム
下段: ブランク血液スポットのクロマトグラム

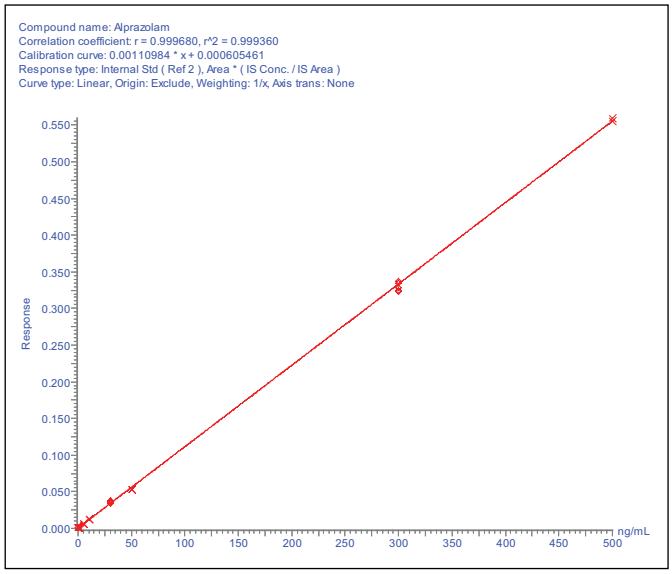

図3B. 100 pg/mL～500 ng/mLの検量線

T-Waveコリジョンセル

- T-Waveコリジョンセルは、イオン輸送時間を最小限にし、高速分析でのパフォーマンスを最大化しています。
- シャープなピークあるいは複数のMRMトランジッション測定のためには、短いサイクル時間が必要になりますが(同時取り込みのため)、T-Waveコリジョンセルでは非常に短いDwell時間を用いる場合にも、シグナル強度を維持したまま、チャンネル間のクロストークを最小限に押さえます。
- T-Waveコリジョンセルでは、プレカーサイオンまたはニュートラルロス分析を用いて、特異的なモニタリングが行えるよう感度および分解能が向上しており、より高速なスキャンを行う場合にも一般的なポール電極タイプのコリジョンセルより優れています。

ScanWave技術

- Xevo TQ は、感度を向上するために、ScanWave™ コリジョンセル技術を用いています。この技術は、コリジョンセルにイオンを蓄積し、質量と電荷の比 (*m/z*) によって分離するものです。コリジョンセルから後段の四重極へのイオン放出は、四重極のスキャンに同期しており、プロダクトイオンスペクトルの感度が大きく向上します。従って、目的の化合物の同定および構造の確認を容易に行うことができます。

RADAR

- RADARモードでは、MRMおよびフルスキャンスペクトルの同時取り込みが可能です。さらに、ポジティブおよびネガティブ両モードのフルスキャンMSによって、検出可能な全てのイオンを取り込むことができるため、従来の定量分析では困難であったサンプルの詳細を把握することができます。RADARは、XevoTQの高速MSおよびMS/MS切り替えによって、他の取り込みモードを犠牲にすることなく、容易に行えるようになりました。

メソッド開発

一般的なDMPK試験のためのメソッド開発では、目的の物質とマトリックスに含まれる内因性の物質との共溶出を最小限にするクロマトグラフィー条件に調整することが重要です。DBSのためのメソッド開発では、カードに由来するマトリックスのバックグラウンドによってより複雑になっているため、バックグラウンドと分析成分とを分離しなくてはなりません。Xevo TQのRADARモードでは、MRMおよびフルスキャンデータの同時取り込みが可能であるため、目的物質と同時にバックグラウンドシグナルをモニターできます。すなわちイオン化抑制を起こす可能性のあるサンプルのバックグラウンドシグナルをモニターすることが可能となり、目的のピークがクロマトグラム上で影響を受ける可能性を最小限に押さえることができます。

図4には、2種類のLC条件で分析を行った目的成分とバックグラウンドのMRM およびフルスキャンデータを示しました。左のクロマトグラムと比べて右のクロマトグラムの方が、バックグラウンドピークの同時溶出が少ないことがわかります。

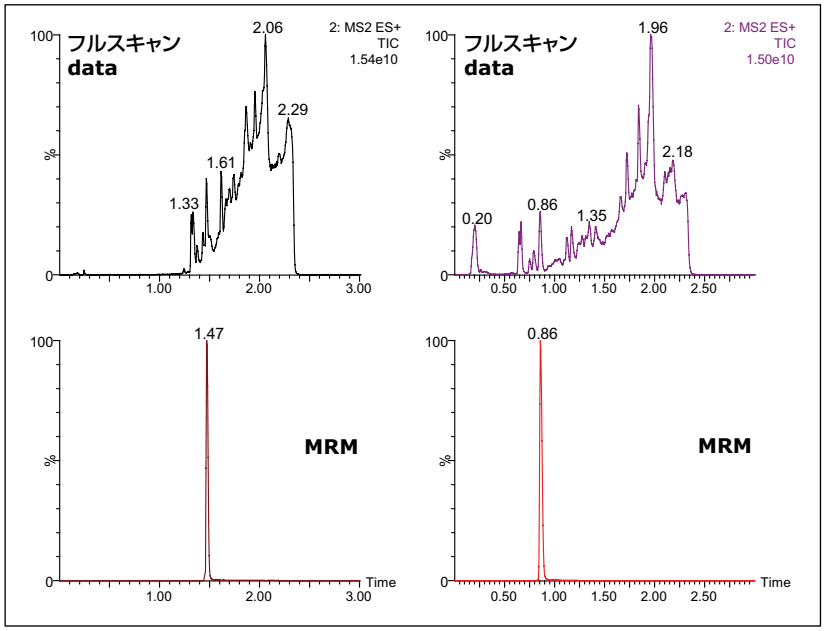

図4. 左のクロマトグラム: 初期グラジエント条件でのMRMおよびバックグラウンドデータ
右のクロマトグラム: グラジエント時間を短縮したMRMおよびバックグラウンドデータ

再現性

生体試料分析を行う際の要求事項として、信頼性と再現性が挙げられます。血液スポットの試験の再現性を示すために、カードにスポットした血液を抽出、UPLC/MS/MSを用いて検量線及びQCサンプルの分析を行いました。表1にQCデータによる再現性を示しました。QCサンプルのRSDは2.09〜4.97%であり、血液スポットおよびUPLC/MS/MSを用いる高感度試験の再現性が非常に良好であることが確認されました。

	濃度 (ng/mL)	平均	% RSD
QC1	0.25	0.22	2.09
QC2	0.40	0.38	4.84
QC3	3	3.25	2.56
QC4	30	31.86	4.97
QC5	300	300.27	3.81

表1.各濃度6回ずつ行ったQCの再現性データ

代謝物

アルプラゾラム代謝物のMRM検出および定量は、近年の生体試料分析では不可欠です。MSおよびMRMのデータを1インジェクションで取り込むことのできるXevo TQは、生体試料分析における医薬品の代謝物の検出および同定に活用されています。DBSサンプルから、アルプラゾラムの代謝物である4-水酸化体を検出したデータを図5に示しました。MS/MSスペクトルは、代謝物に関連するMRMのシグナルをトリガーにして得られた代謝物ピークから抽出しました。スペクトル取り込みには、ScanWave™モードを用い、ピークトップが溶出してから取得されています(「ScanWaveテクノロジー」を参照)。ScanWaveのMS/MSデータ取り込みの感度向上により、生体試料定量分析を行いながら、代謝物ピークを同定できる可能性が示されました。

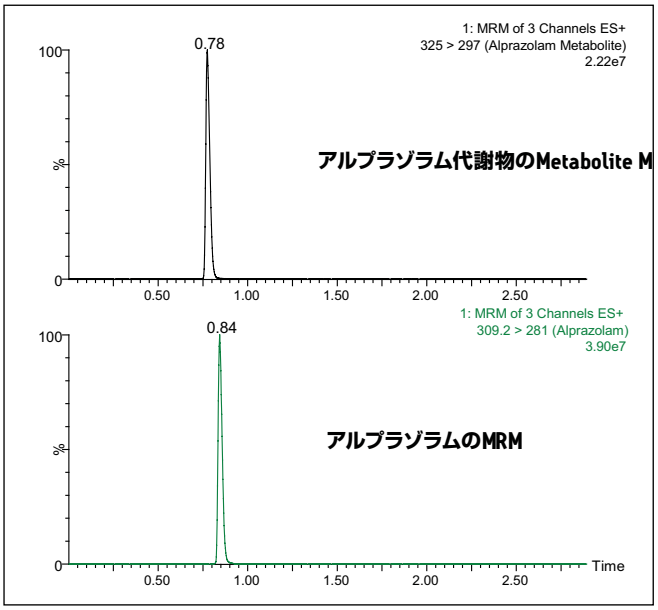

図5A.アルプラゾラムおよび代謝物である4-水酸化体の検出

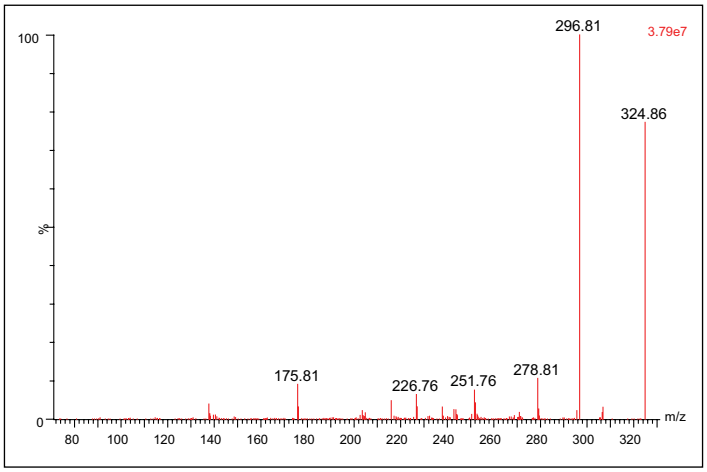

図5B. 代謝物ピークから得られたMS/MSスペクトル

結論

DBSの形態でDMPK試験のサンプルを採取することにより、コストだけでなく動物の使用量も削減することのできる可能性が示されました。サンプルの絶対量が少ないDBSでは、特に化合物の投与量や暴露量が少ない場合に、高感度な試験系が必要とされます。ACQUITY UPLC/Xevo TQシステムの組み合わせにより、試験系の感度の問題を解決することができます。このシステムのRADARモードを用いるスキャン/MRMの同時取り込みでは、目的の成分と代謝物の分離を確認しながら、血液中の内因性化合物あるいは血液スポットカード上の化学物質を、目的成分と分離できるメソッドの開発を容易に行うことができます。

参考文献

1. Direct quantitative bioanalysis of drugs in dried blood spot samples using a thin-layer chromatography mass spectrometer interface. Abu-Rabie P, Spooner N. Anal Chem. 2009 15;81(24):10275-84
2. 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. Spooner N, Lad R, Barfield M. Anal Chem. 2009 15;81(4):1557-63
3. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies. Barfield M, Spooner N, Lad R, Parry S, Fowles S. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2008 1;870(1):32-7
4. Evaluation of ultra-performance liquid chromatography in the bioanalysis of small molecule drug candidates in plasma.vGoodwin L, White SA, Spooner N. J Chromatogr Sci. 2007 45(6):298-304
5. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. Li W, Tse FL. Biomed Chromatogr. 2010 24(1):49-65
6. Blood spots as an alternative to whole blood collection and the effect of a small monetary incentive to increase participation in genetic association studies. vBhatti P, Kampa D, Alexander BH, McClure C, Ringer D, Doody MM, Sigurdson AJ. BMC Med Res Methodol. 2009 13;9:76
7. Analysis of mycophenolic acid in dried blood spots using reversed phase high performance liquid chromatography. Wilhelm AJ, den Burger JC, Chahbouni A, Vos RM, Sinjewel A. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009 Nov 15;877(30):3916-9
8. Ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for direct quantification of salbutamol in urine samples in doping control. Ventura R, Ramírez R, Monfort N, Segura J. J Pharm Biomed Anal. 2009 5;50(5):886-90.
9. Pulse gradient, large-volume injection, high-throughput ultra-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometry bioanalysis for measurement of plasma amrubicin and its metabolite amrubicinol. Li Y, Sun Y, Du F, Yuan K, Li C. J Chromatogr A. 2008 6;1193(1-2):109-16.
10. Development of a highly sensitive and selective UPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of testosterone and 5alpha-dihydrotestosterone in human serum to support testosterone replacement therapy for hypogonadism. Licea-Perez H, Wang S, Szapacs ME, Yang E. Steroids. 2008 Jul;73(6):601-10

適用規格：JISQ9001：2008（ISO9001：2008）
登録番号：JMAQA-331 登録日：1999年05月31日
審査登録範囲：理科学機器（液体クロマトグラフ・質量分析装置・データ管理システム等）の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

Waters および ACQUITY UPLC は Waters Corporation の登録商標です。Xevo、ScanWave、RADAR、T-Wave および The Science of What's Possible は Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

©2010 Waters Corporation. Produced in Japan. March 2011 720003408JA PDF