[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Ostro 96-wellサンプル前処理プレートワンステップメソッドによるDBS抽出液精製度の改善

利点

- シンプルでよりきれいなウェル内迅速ワンステップDBS抽出法
- リン脂質を99.9%除去
- リン脂質のLCカラムへの蓄積を排除し頑健性を改善

ソリューション

- Xevo® TQ-S MSシステム
- ACQUITY UPLC® カラム
- Ostro™ 96-well サンプル前処理プレート

キーワード

Dried blood spots (DBS, 乾燥血液スポット)

Ostro

はじめに

製薬業界においてDBS(乾燥血液スポット)バイオアナリシスの勢いが急速に加速しています。ラボにおける実験動物使用についての経済的および倫理的問題と生体試料の運送と保管に係るコストの削減がDBSバイオアナリシスを魅力的にしています。

DBSは分析種に高い回収率を与えますが、本手法ではわずかな内因性妨害成分の除去しか行われません。妨害成分、例えば特定のリン脂質はバイオアナリシスにおいて主要な関心事となっています。リン脂質はLC/MS/MSに堆積しマトリックス効果の主要な原因のひとつとなります。マトリックス効果は質量分析計のレスポンスを不規則に変化させメソッドの頑健性を低下させます。Ostro 96-wellサンプル前処理プレートはリン脂質を99%以上除去します。更に、Ostro 96-wellサンプル前処理プレートはDBSカードから多成分を同時抽出する工程も簡略化します。DBSカードからパンチされたディスクはOstroのwell内で抽出、希釈および精製工程が実施され、得られたサンプル溶液は直接LC/MS/MSへインジェクションすることができます。この新しい手法はサンプルの移し変えや乾燥再溶解などの工程を省くことにより、サンプル前処理時間を顕著に削減し、抽出工程におけるサンプルロスの可能性を排除します。本アプリケーションノートではリスペリドンとその代謝物である9-OHリスペリドンおよび内標準としてクロザピン（以上図1）を含有する全血をDBS抽出従来法とOstro 96-wellプレートwell内抽出法で処理した比較を紹介します。

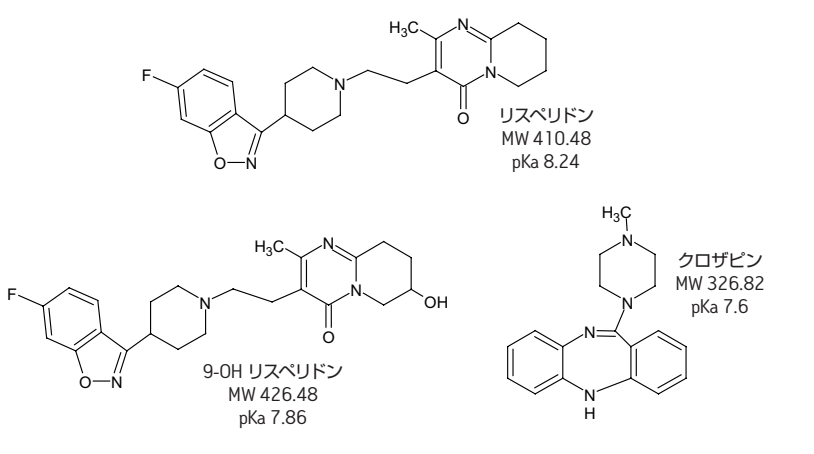

図1. リスペリドン、9-OH リスペリドンおよびクロザピンの構造、分子量とPka

実験

ACQUITY UPLC条件

カラム: ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm

移動相A: 28%濃アンモニア水/精製水 0.1 : 99.9

移動相B: 50%アセトニトリル水溶液

流速: 0.6 mL/min

グラジエント:

時間 (min)	%A	%B	Curve
0.0	75	25	6
2.0	0.5	99.5	6
3.0	0.5	99.5	6
3.1	75	25	6
3.5	75	25	6

注入量: 40 µL

インジェクションモード: パーシャルループ

カラム温度: 35 ℃

サンプル温度: 15 ℃

強ニードル洗浄液: 2%ギ酸in アセトニトリル/IPA 60:40混合液

弱ニードル洗浄液: 5%メタノール水

Waters Xevo TQ-S条件、ESI^+

キャピラリ電圧: 3.0 V

脱溶媒温度: 550 ° C

コーンガス流量: 1000 L/Hr

コリジョンセル圧: 2.6 x 10^{-3} mbar

MRMトランジション、ESI^+: Table 1参照

Table 1. MRMトランジション、コリジョンエネルギー、コーン電圧

化合物名	プリカーサイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	コリジョンエネルギー(eV)	コーン電圧(V)
リスペリドン	411.1	190.9	28	46
9-OH リスペリドン	427.1	109.8	38	42
クロザピン	327.0	269.7	22	42

サンプル前処理

全血20 µLをWhatman DMPK-C未処理カードにスポット後室温で2時間乾燥。Harris 3 mmマイクロパンチにより3 mmのディスクをくり抜き、下記の方法で抽出しました。

DBS抽出従来法：3 mmディスクを1.5 mmエッペンドルフチューブに入れ、250 µLの95%メタノール水を加えて1分間攪拌後3000 gで1分間遠心し、上清を96-wellコレクションプレートへ移しました。

Ostro 96-wellプレートwell内抽出法(図2):3 mmディスクをOstroの各wellに入れ250 µLの95%メタノール水を加え1分間攪拌後5分間吸引により96-wellコレクションへ抽出液をとりました。

それぞれの手法による抽出液は250 µLの精製水で希釈しLC/MS/MSへ直接インジェクションしました。

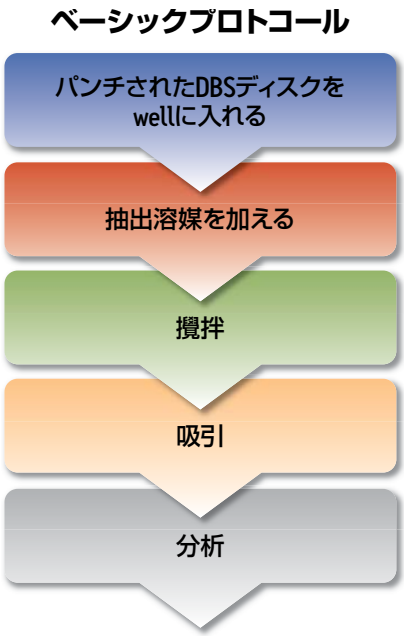

図2. Ostro 96-wellプレートによるDBS well内抽出法

結果と考察

ESIポジティブモードで分析。通常DBS抽出液は非常に希釈されていますがXevo TQ-Sではその高感度により問題の多いエバポレートと再溶解を行わずに直接分析が可能でした。

二つの手法により調製した抽出液中のリン脂質残存量を比較しました（図3）。5種のリン脂質のピークエリア積算値は従来法における残存を100%とするとOstro well内抽出法では99.9%除去されています。5種のリン脂質のTICクロマトグラムによる比較は図4に示されています。

Ostroプレートによりリン脂質が除去され、カラムやMSへの堆積の問題は排除されます。

従来法による抽出では顕著なリン脂質残存が確認され、繰り返し分析の結果からはリン脂質の堆積を防ぐために有機溶媒混合比が高い移動相で1分間ホールドしても堆積していることが示唆されました（図5）。

Ostro 96-wellプレートwell内抽出法によるサンプルのセミバリデーション結果は規制当局が要求する15%以内の変動に収まり、9-OHリスペリドン（図6）および未変化体について0.05ng/mLの定量下限値(LLOQ' s)が達成されました。検量線は全血中0.05 ng/mLから50 ng/mLまで3桁にわたり直線性が得られました（図7）。

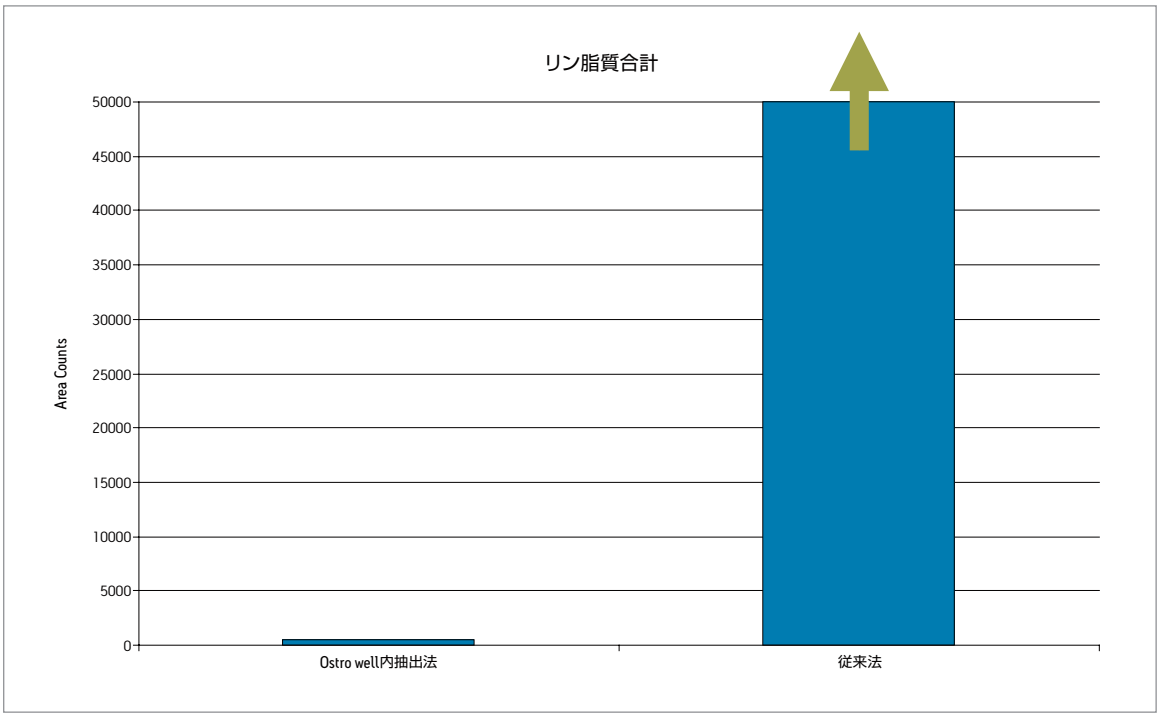

図3. 従来法とOstro well内抽出法によるDBS抽出液のリン脂質残存量比較（n=4）。抽出溶媒メタノール/水 95:5。5種のリン脂質（プリカーサイオン496,533,704,758,806）の合計値

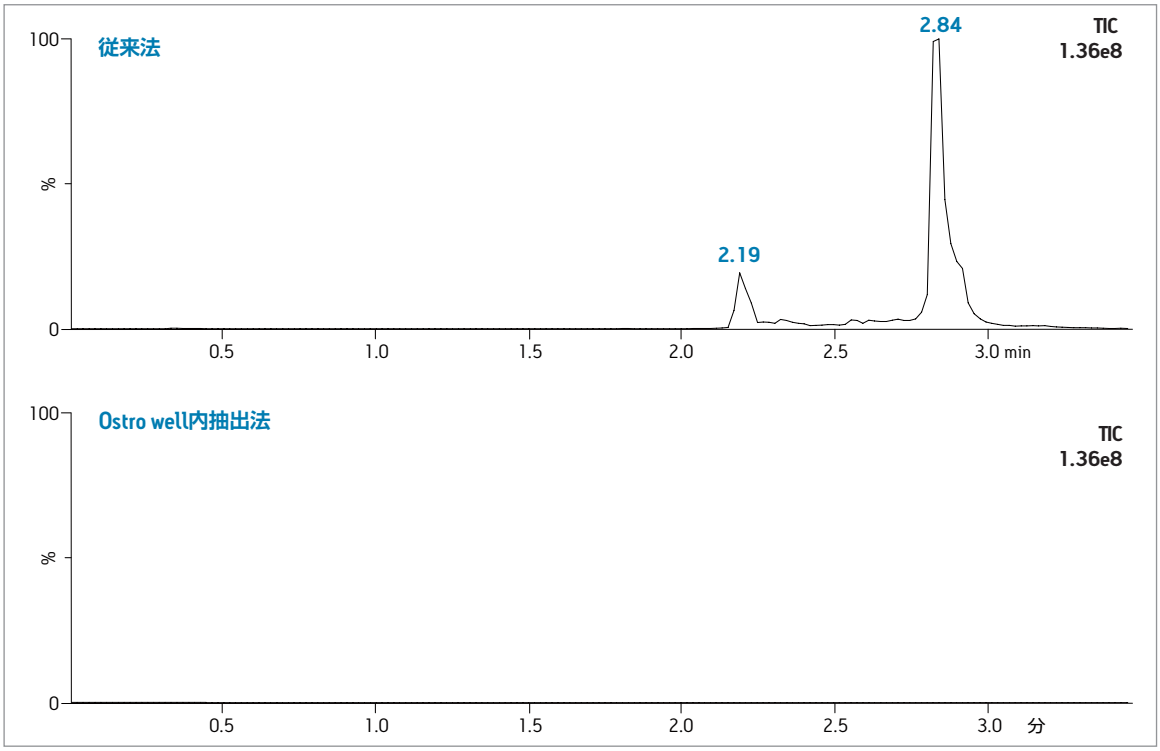

図4. 従来法とOstro well内抽出法によるDBS抽出液に残存する5種のリン脂質のTICクロマトグラム例

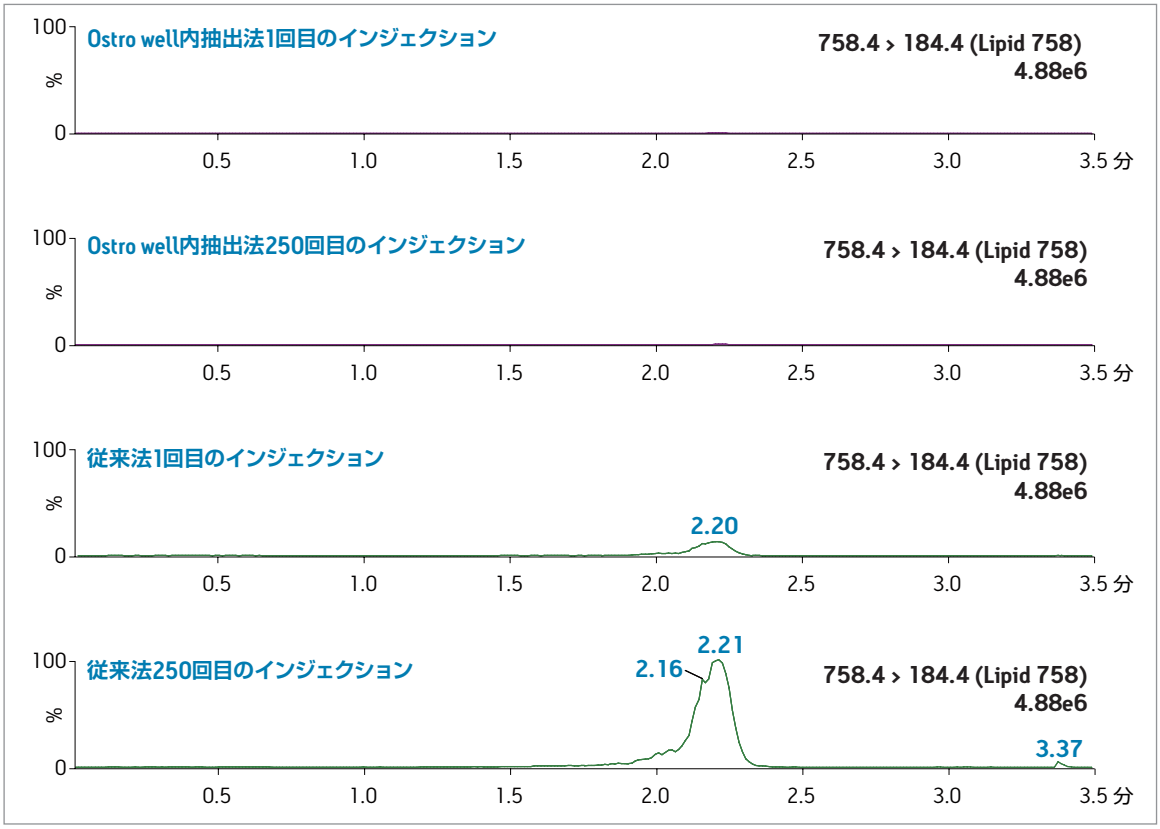

図5. MRMトランジション 758>184のリン脂質、繰り返し分析における堆積の従来法とOstro well内抽出法比較。
25-99.5%B、2分間グラジエント後99.5%Bで1分間ホールド

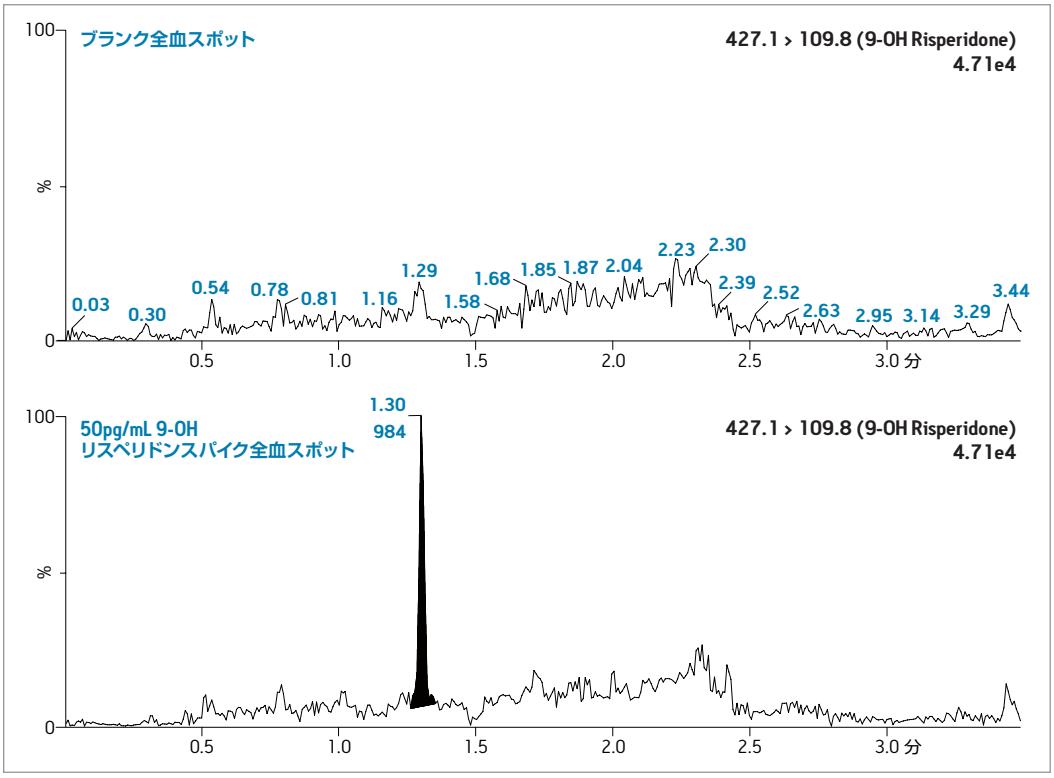

図6. Ostro well内抽出法によるブランクDBS抽出液と0.05 ng/mL 9-OHリスペリドン添加DBS抽出液のクロマトグラム例

Name	Type	Std. Conc.	RT	Area	IS Area	Response	Conc.	% Dev.
0_05_direct_inject_042011_001	Standard	0.05	1.53	945	37691	0.025	0.05	4.0
0_1_direct_inject_042011_001	Standard	0.10	1.52	1146	37531	0.031	0.10	-4.5
0_25_direct_inject_042011_001	Standard	0.25	1.53	1682	35798	0.047	0.23	-9.3
0_5_direct_inject_042011_001	Standard	0.50	1.53	3392	40329	0.084	0.52	4.5
1_direct_inject_042011_001	Standard	1.00	1.53	5114	39457	0.130	0.88	-11.5
5_direct_inject_042011_001	Standard	5.00	1.52	28760	38637	0.744	5.78	15.7
10_direct_inject_042011_001	Standard	10.00	1.52	57317	42923	1.335	10.49	4.9
25_direct_inject_042011_001	Standard	25.00	1.52	156098	51934	3.006	23.80	-4.8
50_direct_inject_042011_001	Standard	50.00	1.52	289427	45519	6.358	50.51	1.0
0_075_QC_direct_inject_042011_001	QC	0.075	1.52	1467	51641	0.028	0.08	4.8
0_75_QC_direct_inject_042011_001	QC	0.75	1.52	4473	44994	0.099	0.64	-14.1
7_5_QC_direct_inject_042011_001	QC	7.50	1.52	48110	49944	0.963	7.53	0.4
15_QC_direct_inject_042011_001	QC	15.00	1.52	96139	42200	2.278	18.00	20.0

図7. 全血中9-OHリスペリドンの検量線とQCサンプル定量値例、R^2=0.991 (1/x2 重み付け)

結論

- DBSサンプルのシンプルワンステップ前処理メソッド
- 従来法によるDBS抽出サンプルで残存するリン脂質を99.9%除去
- Xevo TQ-Sを使用することにより最も高い感度を発揮
- リン脂質のLCカラムへの堆積を排除

世界のウォーターズ

Austria and European Export (Central South Eastern Europe, CIS and Middle East) 43 1 877 18 07

Australia 61 2 9933 1777

Belgium 32 2 726 1000

Brazil 55 11 4134 3788

Canada 1 800 252 4752

China 86 10 5293 6688

Czech Republic 420 2 617 11384

Denmark 45 46 59 8080

Finland 358 9 5659 6288

France 33 1 30 48 72 00

Germany 49 6196 400 600

Hong Kong 852 2964 1800

Hungary 36 1 350 5086

India 91 80 2837 1900

Ireland 353 1 448 1500

Italy 39 02 265 0983

Japan 81 3 3471 7191

Korea 82 2 6300 4800

Mexico 52 55 52 00 1860

The Netherlands 31 76 508 7200

Norway 47 6 384 6050

Poland 48 22 833 4400

Puerto Rico 1 787 747 8445

Russia/CIS 7 495 727 4490/ 290 9737

Singapore 65 6593 7100

Spain 34 93 600 9300

Sweden 46 8 555 115 00

Switzerland 41 56 676 7000

Taiwan 886 2 2501 9928

United Kingdom 44 208 238 6100

All other countries:
Waters Corporation U.S.A.
1 508 478 2000
1 800 252 4752

www.waters.com

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、ACQUITY UPLC および Xevo は Waters Corporationの登録商標です。Ostro 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

©2011 Waters Corporation. Produced in Japan. 2011年8月 720004047JA PDF