



Agilent Captiva EMR-Lipid を用いた 生体サンプル中のビタミン D 代謝物の分析

アプリケーションノート

臨床研究

著者

Derick Lucas and Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

生体サンプル中に脂質が存在する場合、25-ヒドロキシビタミン D2 および D3 代謝物の分析に悪影響を与えます。除タンパク処理のような従来のサンプル前処理法では脂質干渉は除去されず、固相抽出では複数の手順とメソッド開発が必要になります。信頼性の高いサンプル前処理法では、96 ウェルプレートベースの *in-situ* 除タンパク処理と通過型の脂質クリーンアップに Agilent Captiva EMR-Lipid が用いられています。最新の充填剤化学においては、ターゲット化合物を保持し、脂質を選択的に除去できます。すべての QC レベルにおいて、日内および日間真度は 90 ~ 110 %、精度は < 10 %RSD でした。タンパク処理に関する分析感度と堅牢性が大幅に向上したのは高い脂質除去に起因するものであり、それを示すためにポストカラムインフュージョン、マトリックス効果、およびリン脂質分析実験を用いました。



Agilent Technologies

はじめに

通常ビタミン D を分析するには、血漿や血清などの生体サンプル中の 25-ヒドロキシビタミン D2 および D3 (25-OH D2 および D3) 代謝物をモニタリングします。LC/MS/MS は、ビタミン D 代謝物の分離と正確な定量において幅広く支持されている手法です。ターゲット化合物の質量分析では高い分析感度と選択性が実現されていますが、生体サンプルにはリン脂質という干渉物が含まれており、これを除去しないと分析性能が向上しません。このことは、除タンパク処理 (PPT) などの標準的なサンプル前処理プロトコルに関連する一般的な問題点です。固相抽出を用いることによりマトリックス干渉は効率的に除去できますが、複数の手順とメソッド開発が必要になります。

Agilent Captiva EMR-Lipid は、血漿、血清、血液などの汚れた生体サンプルの PPT および脂質クリーンアップを実施するのに有用です。96 ウェルプレートおよび 1 mL カートリッジの両方を用いましたが、これらには溶媒リテンションフリットが含まれており、*in-situ* PPT が実施可能です。試料液が Agilent EMR-Lipid 充填剤を通過してクリーンアップされ、沈殿したタンパク質がフィルタリングされます。Agilent Captiva EMR-Lipid は市販の脂質除去製品とは異なり、詰まりに対して優れた耐性とまったく新しい選択的充填剤化学特性を備えています¹。脂質は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせさせたメカニズムによって除去され、分析に対して精製された試料液を提供します。

このアプリケーションノートでは、血清中の 25-OH D2 および D3 を LC/MS/MS によって検証する方法について説明します²。メソッド性能の堅牢性を確認するために、真度と精度を日内および日間で評価しました。Agilent Captiva EMR-Lipid により、効率的な *in-situ* タンパク処理とクリーンな抽出が実現されました。このことを示すために、マトリックス効果、ポストカラムインフュージョン、およびリン脂質分析実験を用い、最終的にメソッドの信頼性と堅牢性が向上しました。

LC の構成とパラメータ

構成	
Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)	
Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)	
Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)	
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 50 mm、2.7 μm、LC カラム (699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 5 mm、2.7 μm、ガードカラム (821725-911)
カラム温度	30 °C
注入量	20 μL
移動相 A	H ₂ O + 0.1 % 酢酸
移動相 B	メタノール + 0.1 % 酢酸
流量	0.5 mL/分
グラジエント	75 % B で 0.5 分間保持、 98 % B まで 4 分間で上昇、 98 % B で 5 分間保持
ポストタイム	2 分

MS/MS の構成とパラメータ

構成	
Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS (AJS 搭載)	
MS/MS モード	ダイナミック MRM
イオンモード	ポジティブ
乾燥ガス温度	250 °C
乾燥ガス流量	5 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
シースガス温度	325 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	5,000 V
EMV	200 V
ノズル電圧	1,500 V

化合物	プリカーサイオン	定量イオン	定性イオン	コリジョンエネルギー (V)	フラグメンター (V)
25-OH D2	413.3	395.3	355.3	4	115
25-OH D2-d ₃	416.3	398.3	—	4	115
25-OH D3	401.3	365.3	383.3	4	115
25-OH D3-d ₃	404.3	386.3	—	4	115

実験方法

サンプル前処理

- Agilent Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレート (5190-1000)、(5190-1001 [5 個])
- Captiva 96 ウェルコレクションプレート、1 mL (A696001000)
- Agilent CaptiVac バキュームカラー (A796) およびガスケットキット (A796G)
- Agilent Captiva 96 ウェルプレートカバー、10 個 (A8961007)
- DuoSeal 96 ウェルプレートシール、10 個 (A8961008)

真度および精度に関する検証実験

材料および試薬

ヒト血漿、ビタミン D 除去血漿、およびヒト血清は Golden West Biological Inc. から入手しました。ヒト血清はメソッド定量研究に使用し、ヒト血漿はマトリックス除去評価に使用しました。標準および内部標準は、100 µg/mL 溶液として Sigma-Aldrich から購入しました。サンプル前処理溶媒と LC 溶媒は Honeywell から購入しました。

検証研究

ビタミン D 代謝物用の Agilent Captiva EMR-Lipid プロトコルは、3 日間にわたって別のバッチで試験しました。バッチはそれぞれのレベルにおいて、2 つのダブルブランク、8 つのブランク、7 つのキャリブレータ、および 6 つの QC で構成しました (表 1)。QC は 2 セットの検量線間でブラケットティングし、25-OH D3 に対しては 10、20、50、100、250、500、および 750 ng/mL のレベル、25-OH D2 に対しては 20、30、50、100、250、500、および 750 ng/mL のレベルで作成しました。同位体標識された内部標準 25-OH D3-d₃ および 25-OH D2-d₃ は 250 ng/mL で添加しました。

サンプル前処理

キャリブレータおよび QC の前処理

キャリブレータおよび QC は適切なレベルでプレスパイクし、完全に混合しました。次に、100 µL の血清サンプルを 96 ウェルサンプルプレートに移し、10 µL の内部標準を添加しました。サンプルプレートはマットで覆い、ボルテックスしました。以降の移動と吸引混合用として、96 ウェルプレートピペットを使用しました。

Agilent Captiva EMR-Lipid での手順

- 400 µL のアセトニトリルに 1 % のギ酸を加え、Agilent Captiva EMR-Lipid プレートウェルに移します。
- サンプルプレートから 100 µL の血清を EMR-Lipid プレートウェルに移して PPT を実施します。
- 溶媒/血清混合物をピペットで 5 回吸引して混合します。
- 完全に沈殿するまで 1 分間待ちます。
- EMR-Lipid プレートとコレクションプレート間に CaptiVac バキュームカラーを挿入し、1 ~ 2 inHg 真空状態で流し始めます。96 ウェルコレクションプレートにろ液を集めます。
- 必要に応じて、1 滴/5 秒を維持しながら真空状態を高めます。
- 10 inHg の真空状態を印加し、完全に溶出するまで 1 分間待ちます。
- コレクションプレートをプレートマットで覆い、サンプルを分析準備完了状態にします。

表 1. サンプル同定と QC 濃度

サンプル ID	定義	25-OH D2	25-OH D3
		濃度 (ng/mL)	濃度 (ng/mL)
LLOQ	定量下限	10	20
LQ	低 QC	20	30
MQ	中 QC	250	250
HQ	高 QC	500	500
ULOO	定量上限	750	750

結果と考察

直線性

データは MassHunter 定量ソフトウェアで処理しました。25-OH D2 および D3 に対して 10 ~ 750 ng/mL の範囲で、直線回帰と $1/x^2$ 重み付けを適合させた場合の検量線 R^2 値は 0.992 ~ 0.997 でした (図 S1)。すべてのキャリブレーションの真度が、予想された値の $\pm 10\%$ 以内に収まっていました。

真度と精度の結果

この研究では優れた結果が得られました。日間の結果をまとめたものを表 2 に、日間の結果をまとめたものを表 3 に示します。すべての QC で真度は 90 ~ 110%、%RSD < 10 でした。Agilent Captiva EMR-Lipid が 25-OH ビタミン D を保持し続けていないことを示すために、内部標準補正を実施していないポストスパイク検量線とプレススパイク血清サンプルを用いて QC の絶対回収率を判定しました。絶対回収率はすべてのレベルにおいて 89 ~ 106% の間で、%RSD < 15 でした (表 S1)。すべてのブランクおよびダブルブランクサンプルにおいて、キャリーオーバーは検出されませんでした。

マトリックス除去

生物マトリックスにおいては、血漿、タンパク質、リン脂質など大きな悪影響を与える干渉物が存在することがあります。上で説明したように、サンプル/アセトニトリルの割合を 1:4 にして 1% のギ酸を加えた *in-situ* PPT を実施することにより、タンパク質を効率的に除去しました。また、多数の手法により、リン脂質除去とイオン抑制について評価しました。

表 2. ヒト血清中の 25-OH D2 および D3 のメソッド検証による日内真度と精度 (QC レベルごとに n = 6)

	25-OH D2		25-OH D3	
	精度 (%)	%RSD	精度 (%)	%RSD
1 日目				
LLOQ	97.2	4.7	106.8	9.9
LQ	97.8	5.8	104.1	5.9
MQ	96.0	5.3	93.4	2.8
HQ	107.3	4.9	105.1	2.7
ULOQ	101.9	2.7	101.5	3.1
2 日目				
LLOQ	108.4	5.8	108.3	6.6
LQ	101.2	4.8	99.3	7.4
MQ	108.7	5.6	108.1	4.7
HQ	105.4	3.6	108.7	2.7
ULOQ	104.3	2.9	109.1	1.5
3 日目				
LLOQ	99.1	5.6	109.4	8.1
LQ	92.9	4.8	99.2	5.4
MQ	105.0	4.6	104.0	4.0
HQ	106.0	3.1	105.8	3.0
ULOQ	105.6	2.7	109.1	3.7

表 3. 日間 QC サンプルの真度と精度の結果 (n = 18)

	25-OH D2		25-OH D3	
	精度 (%)	%RSD	精度 (%)	%RSD
LLOQ	101.6	5.4	108.2	8.2
LQ	97.3	5.1	100.9	6.2
MQ	103.2	5.2	101.9	3.8
HQ	106.2	3.9	106.5	2.8
ULOQ	103.9	2.8	106.6	2.8

LC/MS/MS を用いたリン脂質除去の モニタリング

リン脂質除去分析では、 $m/z = 184$ に対して MS/MS プリカーサイオンスキャンを使用しました。結果を図 1 に示しています。高アバンドランスを示す青のトレースは、PPT のみでは除去されていない血漿リン脂質です。小さい赤、緑、黒のトレースは、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ 3 回実施後の 3 つの血漿サンプルを示しています。Agilent Captiva EMR-Lipid によるマトリックス除去を方程式 1 により計算すると、99.53 % になりました。

$$\text{PLR \%} = \frac{(\text{ピーク面積}_{\text{クリーンアップなしのブランク}} - \text{ピーク面積}_{\text{Captiva クリーンアップしたブランク}})}{(\text{ピーク面積}_{\text{クリーンアップなしのブランク}} - \text{ピーク面積}_{\text{試験ブランク}})} \times 100$$

方程式 1 総ピーク面積を用いたパーセントリン脂質除去 (% PLR) の計算

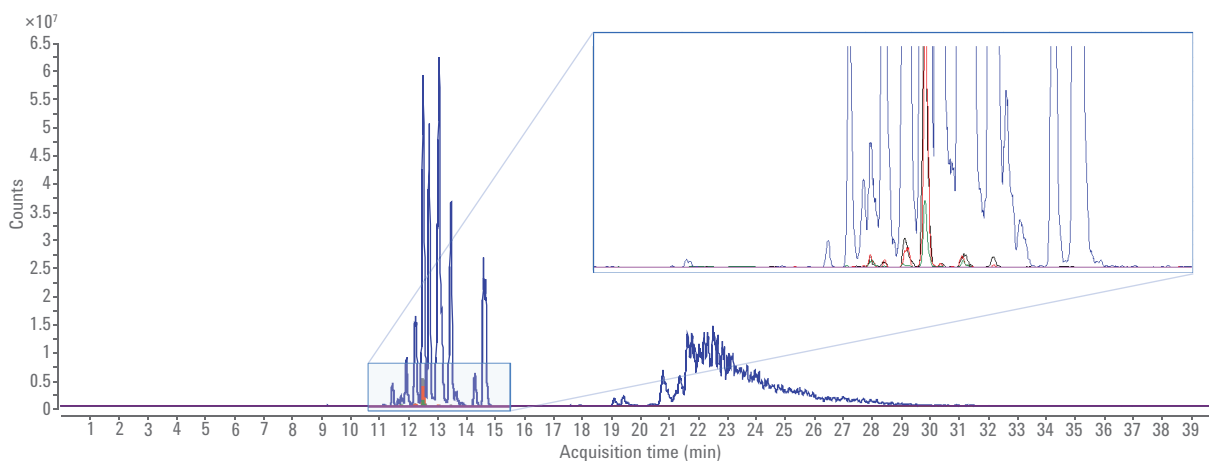


図 1. $m/z = 184$ のリン脂質分析プロダクトイオンスキャンの重ね書き、青のトレース = PPT、緑、赤、黒のトレース = Agilent Captiva EMR-Lipid (n = 3)

マトリックス効果

血漿サンプルを 50 ng/mL において 25-OH D2 および D3 でポストスパイクしました。次に Agilent Captiva EMR-Lipid ワークフロー (A) と PPT (B) を実施し、レスポンスの再現性と相対ピーク面積を比較しました。図 2 は、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップにより %RSD < 3 で高い一貫したピーク面積を実現していることを示しています。PPT サンプルでは、Agilent Captiva EMR-Lipid 処理サンプルと比較して分析対象物のレスポンスが最大 80 % も低くなっており、ピーク面積は %RSD > 25 を示しています。

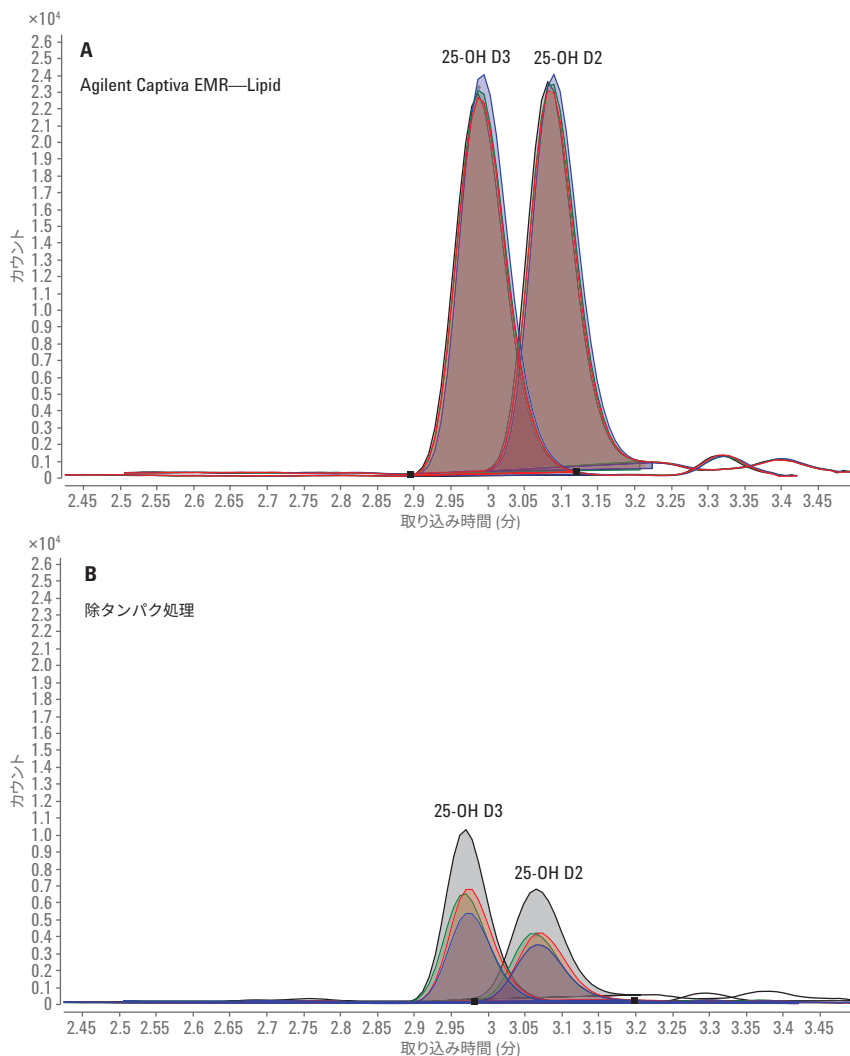


図 2. MRM の重ね書き (n = 4)、1) 25-OH D2 (m/z 313.3 > 295.3)、2) 25-OH D3 (m/z 303.3 > 265.3)、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ (A) および PPT (B) 実施後のヒト血漿 50 ng/mL での様子

ポストカラムインフュージョン

ターゲットの 25-OH ビタミン D 化合物に対するマトリックス効果を評価するための定性メソッドとして、ポストカラムインフュージョンを行いました。LC メソッドを実施しながら、25-OH D2 および D3 の 50 ng/mL 溶液を T 字管を通して LC カラムの後に 90 μ L/h の流速でシリンジポンプで注入しました。次に、ブランク血漿サンプルを注入し、マトリックス/脂質が溶出してイオン抑制が生じる範囲を確認しました。25-OH D2 および D3 がイオン抑制が生じている範囲と共溶出している様子を図 3B のクロマトグラムの重ね書きで示しています。図 3A の重ね書きは、Agilent Captiva EMR-Lipid によりイオン抑制が除去され、分析対象物のレスポンスが大幅に向上している様子を示しています。

Agilent Captiva EMR-Lipid を用いた サンプル前処理

EMR-Lipid プレートは使いやすく、効率的なクリーニングが実施でき、ビタミン D 代謝物に対して高い分析対象物の回収率と精度を実現しました。完全な混合、均一な移動、および完全な PPT を実現するため、血漿 QC とキャリブレーションは別のサンプルプレートで前処理しました。溶媒リテンションフリットを使用することにより変性溶媒の常圧での通過防止および真空状態での容易な流動が可能になりました。タンパク質は詰まることなく効率的にフィルタリングされ、注入に適した透明な試料液が定期的に提供されました。メソッド開発では、溶媒の蒸発と再溶解による濃縮で分析感度が向上したことが示されました。しかし、濃縮を行わず、短時間でできるダイレクト注入でも適切な感度になったことは予想外でした。流量は慎重に制御しました。初期時は 1 inHg で真空状態を 3 inHg まで上昇させ、1 滴/5 秒を維持しました。幅広い種類のサンプルに対して、主要なすべての脂質マトリックス除去は一貫して高い状態であり、そのうちの一部はこの研究の範囲を超えていました^{1,3}。

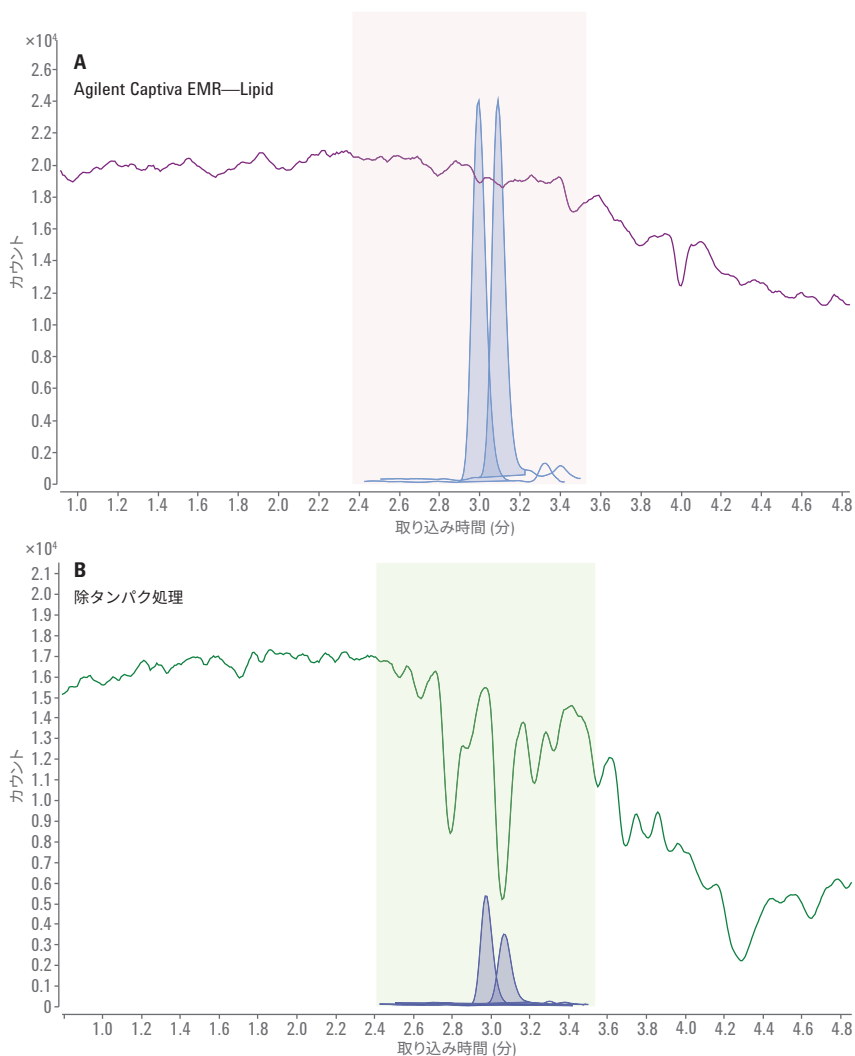


図 3. 50 ng/mL のポストカラムインフュージョンのクロマトグラムの重ね書き、PPT のみ (B)、Agilent Captiva EMR-Lipid (A)

結論

ビタミン D 代謝物の日間変動検証において Agilent Captiva EMR-Lipid 96 ウェルプレートを用いることにより、優れた真度 (90 ~ 110 %)、精度 (< 10 %RSD)、およびクリーンアップ結果 (> 99 % リン脂質除去) が達成されました。in situ タンパク処理により、タンパク質は詰まらずに血漿および血清サンプルから効率的にフィルタリングされると同時に、新たに開発された Agilent EMR-Lipid 充填剤により、脂質を除去することができました。このメソッドは実施するのが簡単かつ高速で優れたマトリックス除去を実現しているため、分析感度を最大限に高め、キャリアオーバーを大幅に減らし、高い再現性が得られます。また、脂質に対する充填剤の選択性が幅広いため、複数の種類の医薬品分析が実施可能になります³。将来の研究では、高度な複数の種類の多成分残留分析が要求される食品などの複雑なサンプルに対しても、このアプリケーションが拡張されることが予想されます。

参考文献

1. L. Zhao, D. Lucas, *Agilent Technologies*, publication number 5991-8006EN.
2. U.S. Department of Health and Human Services (HHS), Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, **2001**.
3. L. Zhao, D. Lucas, *Agilent Technologies*, publication number 5991-8007EN.

表 S1. 25-OH D2 および D3 の絶対回収率と %RSD 値 (n = 6)

	25-OH D2		25-OH D3	
	絶対回収率 (%)	%RSD	絶対回収率 (%)	%RSD
10 ng/mL	106.4	4.8	106.3	10.2
20 ng/mL	88.8	9.5	94.2	9.2
30 ng/mL	90.8	5.0	94.7	6.3
250 ng/mL	96.9	14.6	96.6	4.2
500 ng/mL	97.1	11.5	100.1	9.5
750 ng/mL	96.9	6.4	100.3	5.0

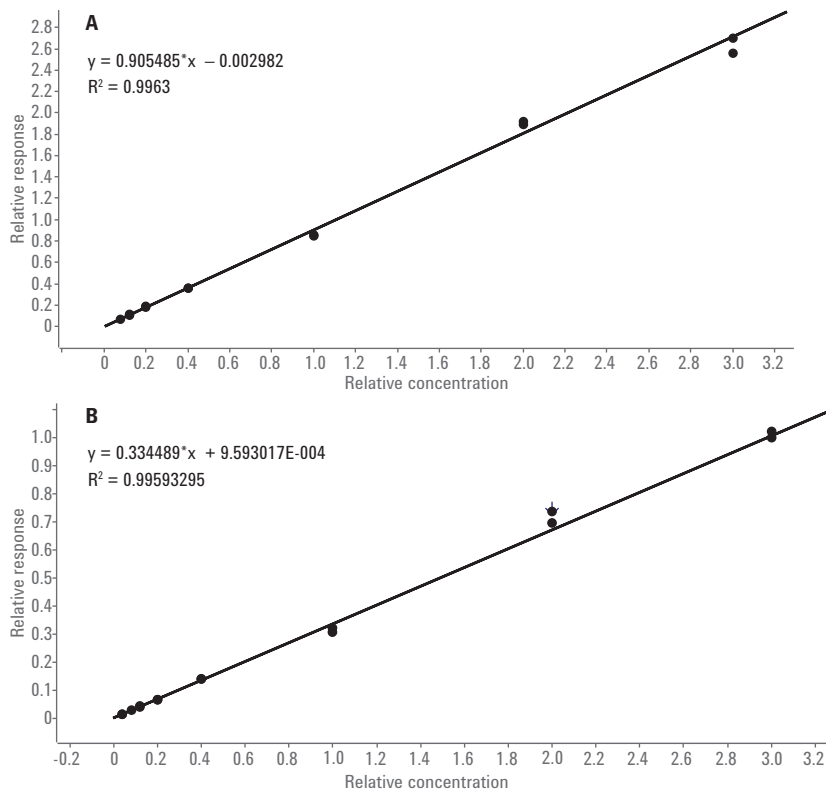


図 S1. 選択した検量線、25-OH D2 の 20~750 ng/mL の範囲 (A) および 25-OH D3 の 10~750 ng/mL の範囲 (B)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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. 2017

Printed in Japan, July 11, 2017

5991-7956JAJP



Agilent Technologies