
Approach to DBS Method Using Improved SCAP System

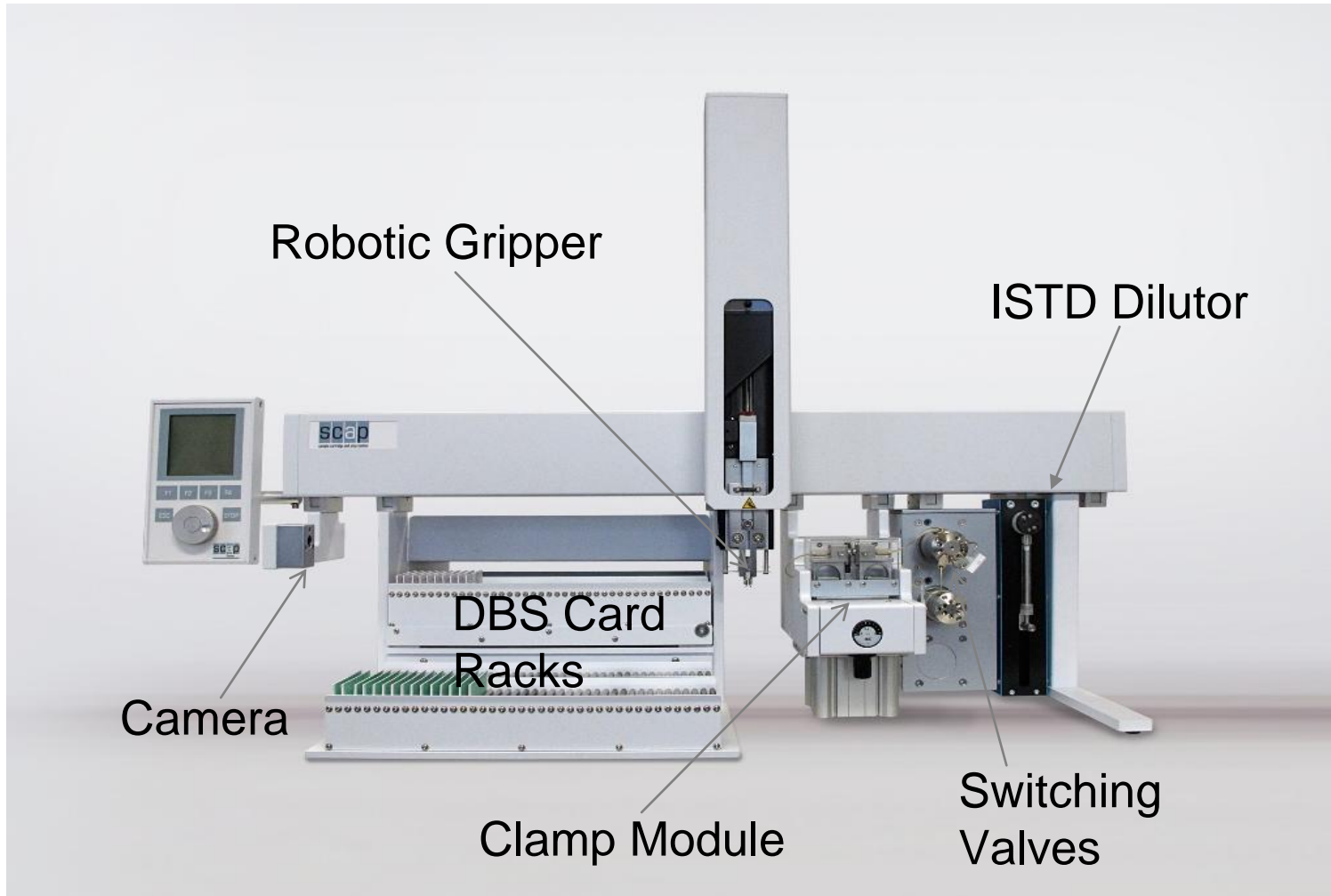
S. Kanda, A. Sakurai
*Pharmacokinetics Research Laboratories
Toray Research Center, Inc.*

H. Hike
AMR, Inc.



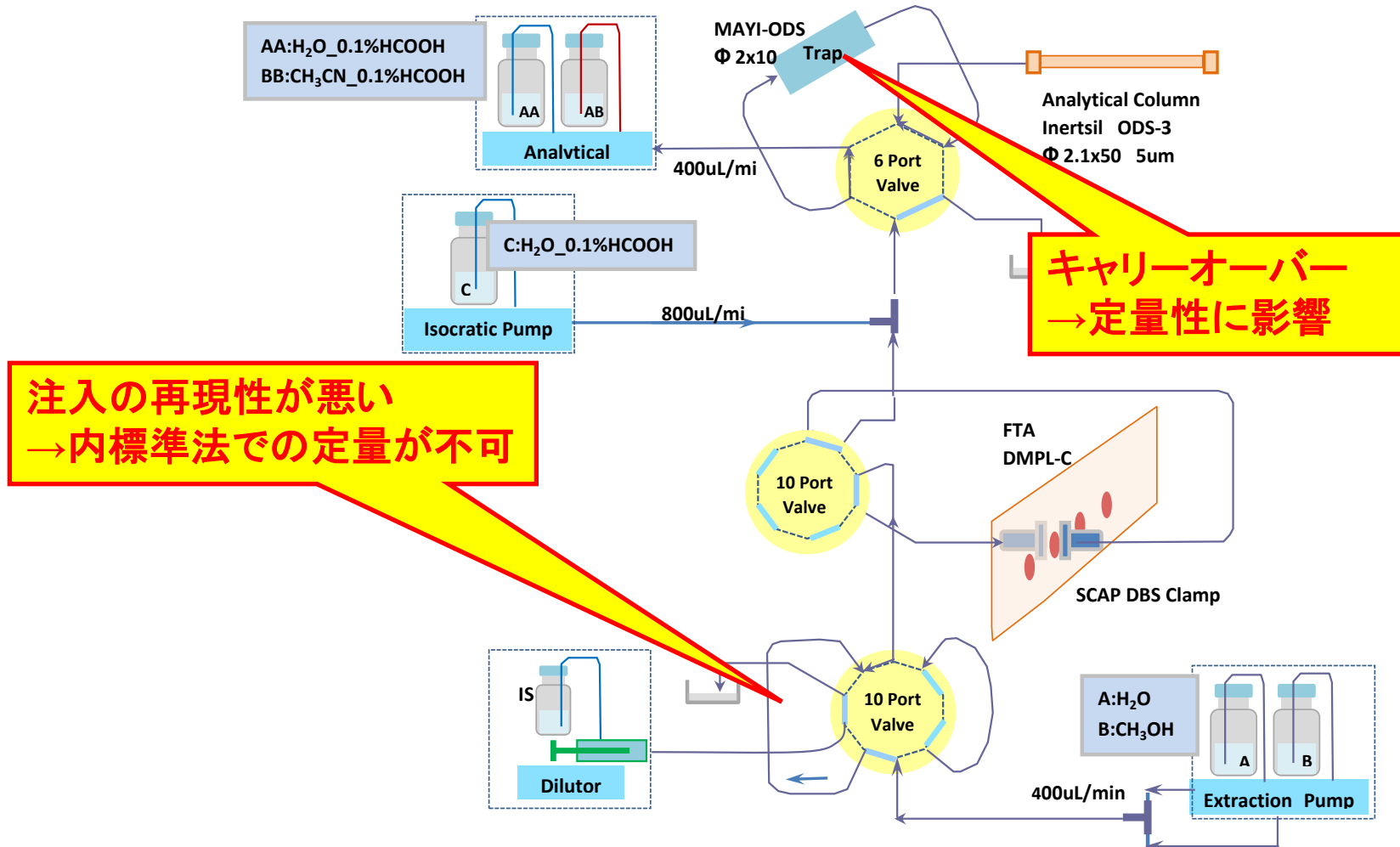
改良型SCAP システム

SCAP (Sample Cartridge and Prep System)



流路図(旧タイプ)

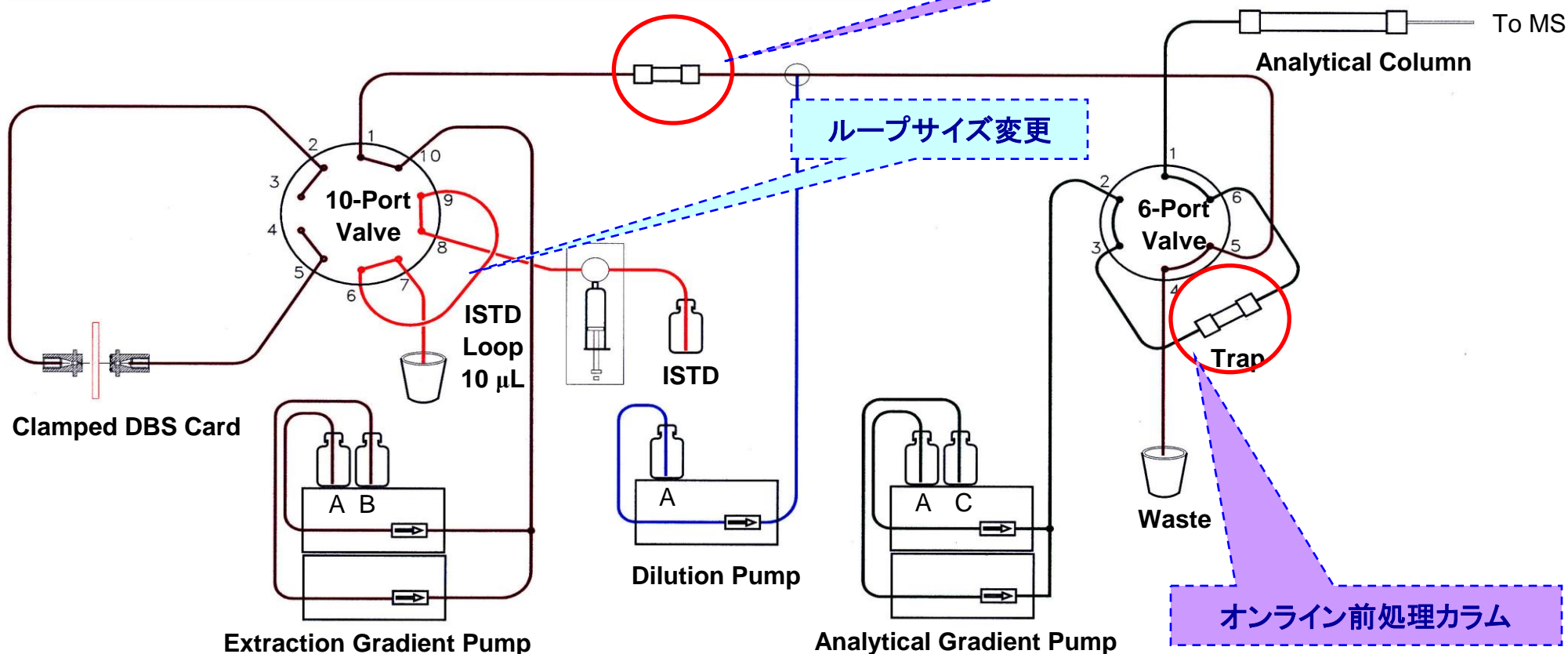
旧タイプでの問題点



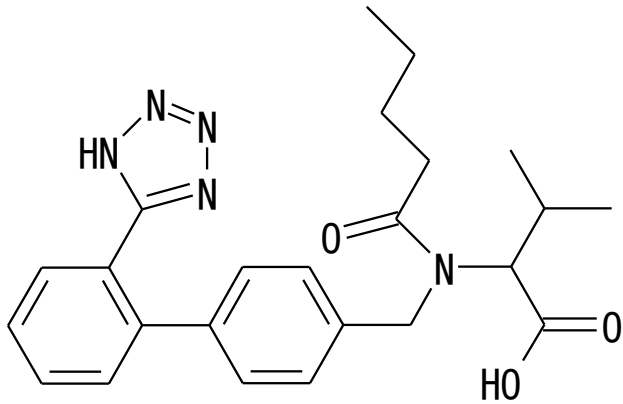
流路図(改良後)

主な改良点

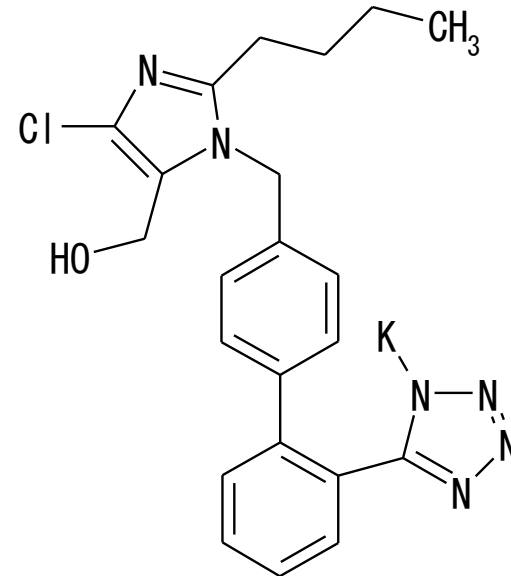
- ループサイズを容量の大きいものに変更 ($3\ \mu\text{L} \rightarrow 10\ \mu\text{L}$)
- オンライン前処理カラムを2つ利用



測定対象物と内標準物質



Valsartan



Losartan

ラット全血中Valsartanの定量分析

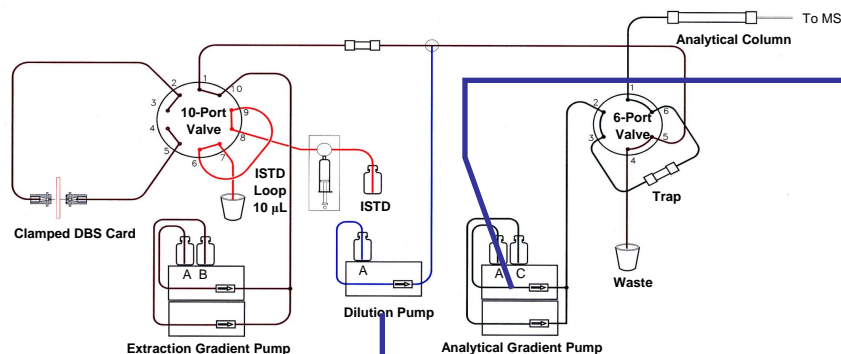
分析条件

- ✚マトリックス：全血
(ヘパリンNa処理)
- ✚動物種：ラット
- ✚カード上のスポット量：15 μ L
- ✚FTA DMPK-Aカード
(GE Healthcare)
- ✚分析カラム：
Inertsil ODS-3 (2.1 mm I.D. \times 50 mm, 5 μ m)

評価項目

- ✚検量線：10~10000 ng/mL
- ✚日内再現性：4濃度, n=5
- ✚カード上安定性(2週間)
- ✚IS注入の再現性
- ✚高感度化
- ✚スポット内/スポット間の抽出再現性

各ポンプのタイムプログラム



Extraction Gradient Pump

A: H₂O/HCOOH (1000:1, v/v)

B: IPA/CH₃OH/CH₃CN/HCOOH (200:400:400:1, v/v/v/v)

Time	A(%)	B(%)	Flow (µL/min)
0.00	60	40	400
1.00	60	40	400
1.10	50	50	400
2.00	50	50	400
3.50	20	80	400
3.60	5	95	400
6.00	5	95	400
6.10	60	40	400
6.50	60	40	400

Extraction Gradient Pump

A: H₂O/HCOOH (1000:1, v/v)

B: IPA/CH₃OH/HCOOH (200:800:1, v/v/v)

Time	A(%)	B(%)	Flow (µL/min)
0.00	80	20	500
2.00	80	20	500
2.01	45	55	800
3.50	45	55	800
3.51	0	100	800
7.00	0	100	800
7.01	90	10	800
7.50	90	10	800
7.51	90	10	500
8.00	90	10	500

2.01分～3.50分の間で測定対象とイオン化抑制化学種との分離を行う。

逆相オンライン前処理カラムへの保持を高めるために、水系溶媒を流入。

Dilution Pump

H₂O/HCOOH (1000:1, v/v)

Time	Flow (µL/min)
0.00	100
1.90	100
1.95	1500
3.60	1500
3.61	100
9.00	100

検量線

◆内標準法による8点検量線を作成

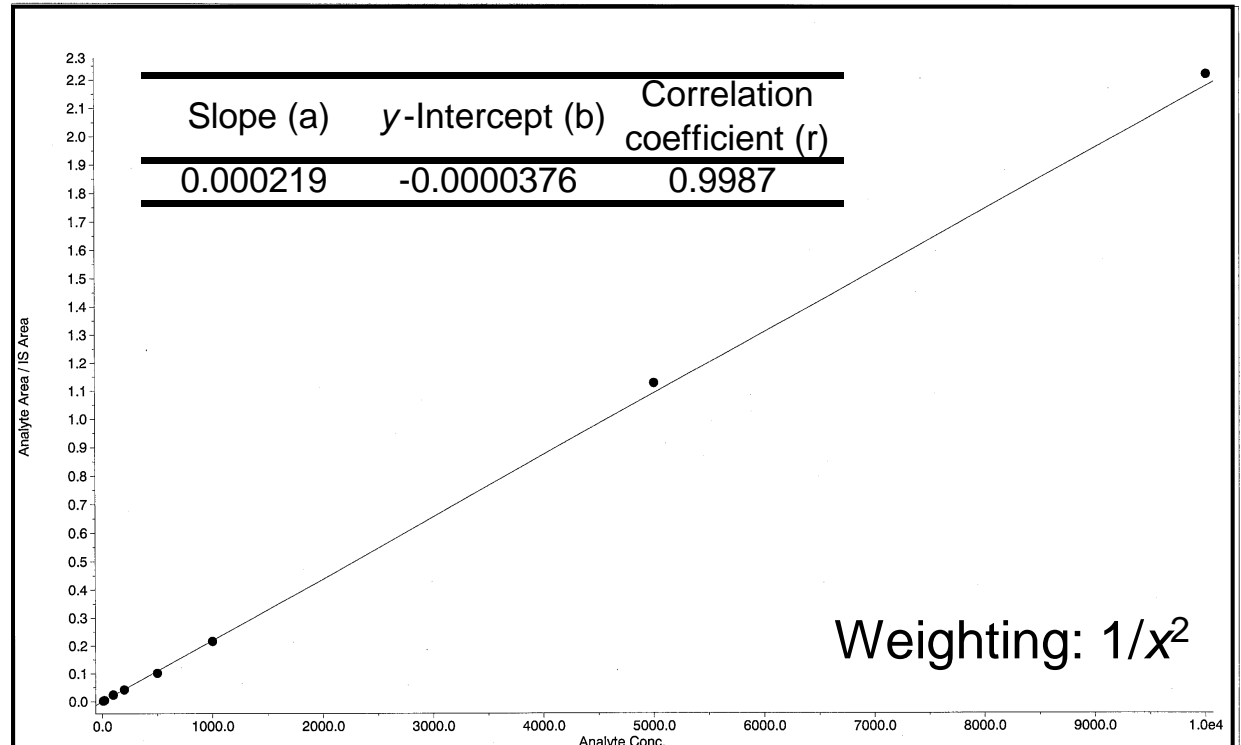
	Valsartan concentration (ng/mL)							
Nominal concentration	10.0	20.0	100	200	500	1000	5000	10000
Found concentraion	9.84	20.5	107	191	464	986	5160	10200
Accuracy (%)	98.4	102.5	107.0	95.5	92.8	98.6	103.2	102.0

結果

検量線の各点における
逆回帰濃度が全て
±15%以内



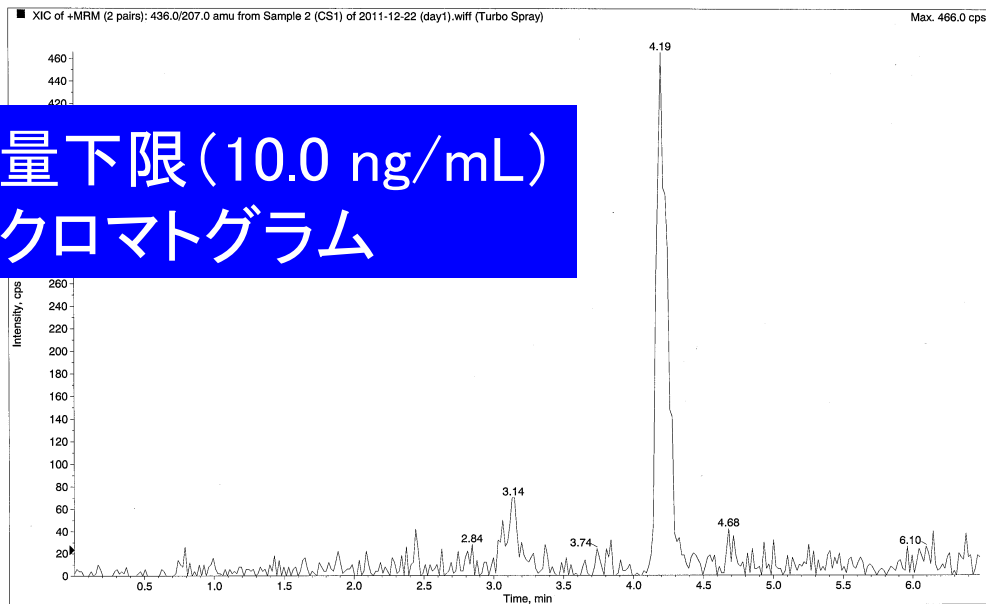
良好な直線性



日内再現性

	Valsartan concentration (ng/mL)			
	LLQC	LQC	MQC	HQC
	10.0	20.0	400	8000
Found concentration	13.1	18.5	358	8020
	12.1	18.7	374	8180
	11.0	19.4	370	8870
	11.0	18.7	371	8750
	9.32	18.0	360	7840
Mean	11.3	18.7	367	8332
SD	1.4	0.5	7	455
Accuracy (%)	93.4	99.8	98.0	101.9
CV (%)	12.5	2.7	1.9	5.5

定量下限 (10.0 ng/mL)
のクロマトグラム



再現性 (n=5)

4濃度水準のQCサンプルをカード上にスポットし、SCAPによって自動分析

結果

LLOQの感度

S/N比: >5

全QCサンプルについて

Accuracy (%) : ±15%以内

CV (%) : 15%以内

良好な定量性

カード上安定性 2週間

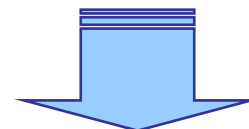
DMPK-Aカードに全血QCサンプルを15 μ Lスポットし, 室温下にて乾燥材とともに14日間保存後, SCAPにて自動分析を実施.

Period	Valsartan concentration (ng/mL)	
	LQC	HQC
	20.0	8000
Initial	18.7	8460
	19.3	8580
	18.2	8670
Mean	18.7	8570
Accuracy (%)	93.7	107.1
2 weeks (14 days)	19.6	7360
	20.5	8040
	17.9	8030
Mean	19.3	7810
Accuracy (%)	96.7	97.6

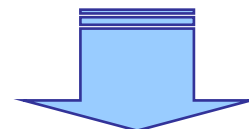
結果

14日間保存後の各QC
サンプルにおいて

Accuracy(%): $\pm 15\%$ 以内



カード上で安定



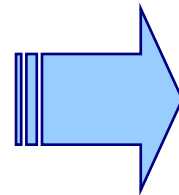
TK・PK測定に適応可

IS注入量の再現性

同一バッチ内で、検量線、日内再現性及びカード上安定性を評価した時のISの面積値(n=35)について、変動係数(CV%)を算出.

Serial No.	Peak area	Serial No.	Peak area	Serial No.	Peak area	Serial No.	Peak area
1	1142052	11	982402	21	1159667	31	1260808
2	1165502	12	975750	22	1237872	32	1238394
3	1138190	13	980799	23	1194847	33	1220463
4	1031788	14	1004226	24	1194472	34	1215152
5	1066347	15	1176772	25	1221695	35	1262293
6	1124830	16	1154706	26	1202233	Average	1149402
7	1095065	17	1199979	27	1224610	SD	82116
8	1083143	18	1177297	28	1168473	CV(%)	7.14
9	1153235	19	1193490	29	1190221		
10	1032731	20	1158667	30	1200894		

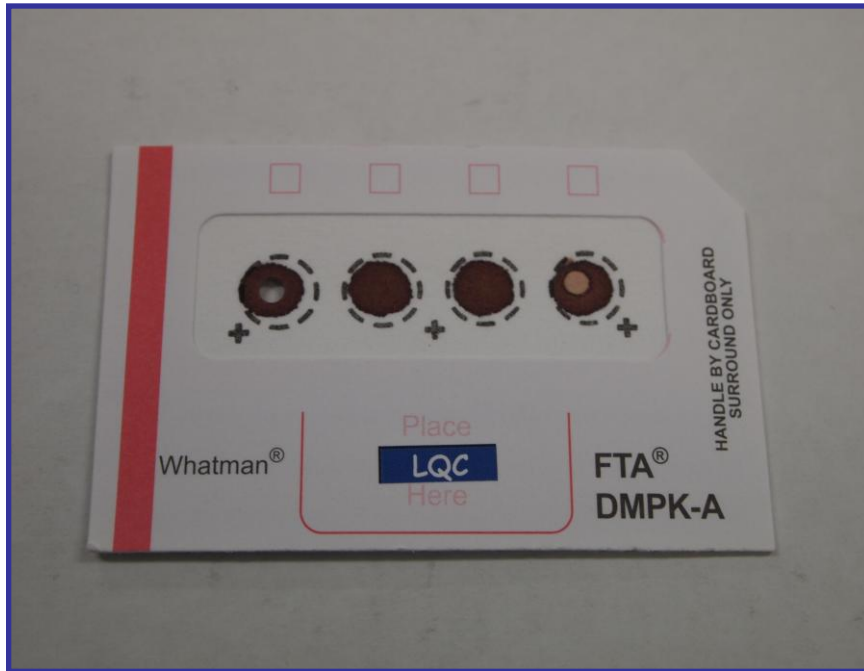
- ループサイズの変更
- IS溶液ボトルの設置場所の工夫



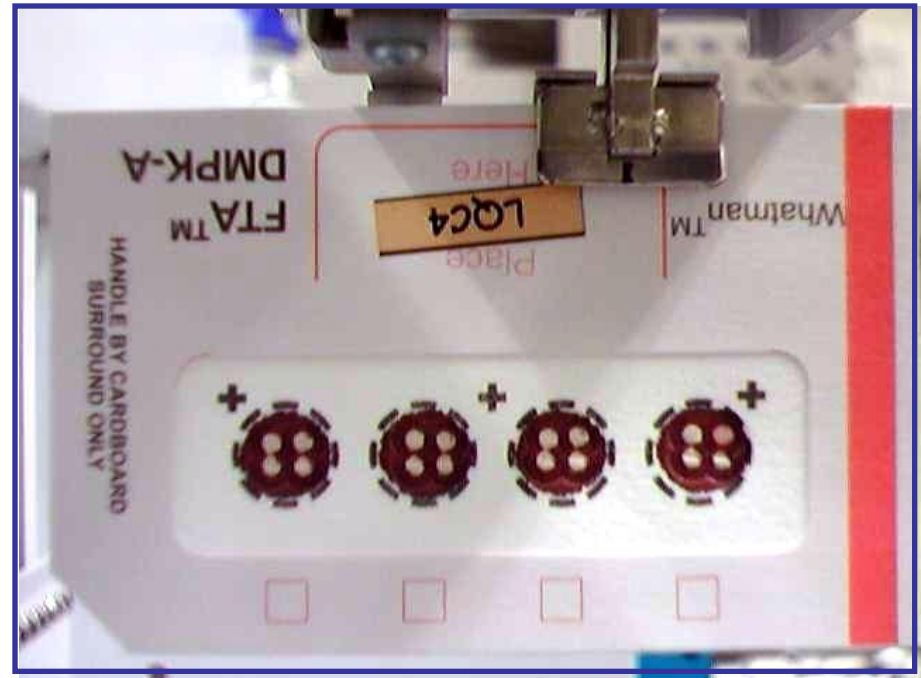
バラつきが小さく、
良好な再現性が得られた

高感度化

SCAP system 改良前



SCAP system 改良後

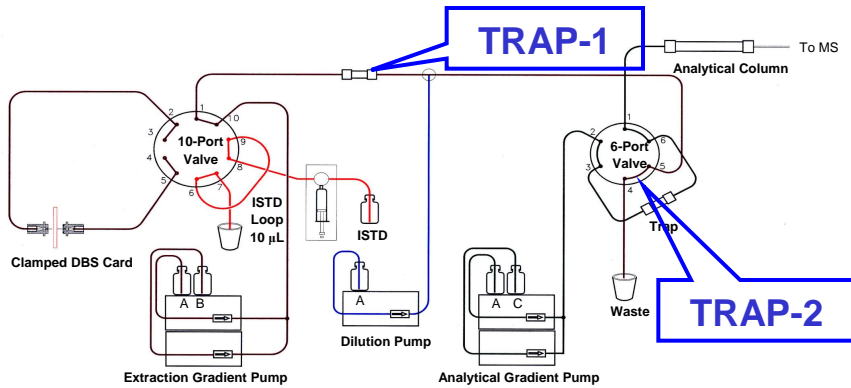


クランプサイズ: 直径3 mm

クランプサイズ: 直径1.5 mm

理論上, 感度は1/4となるはず...

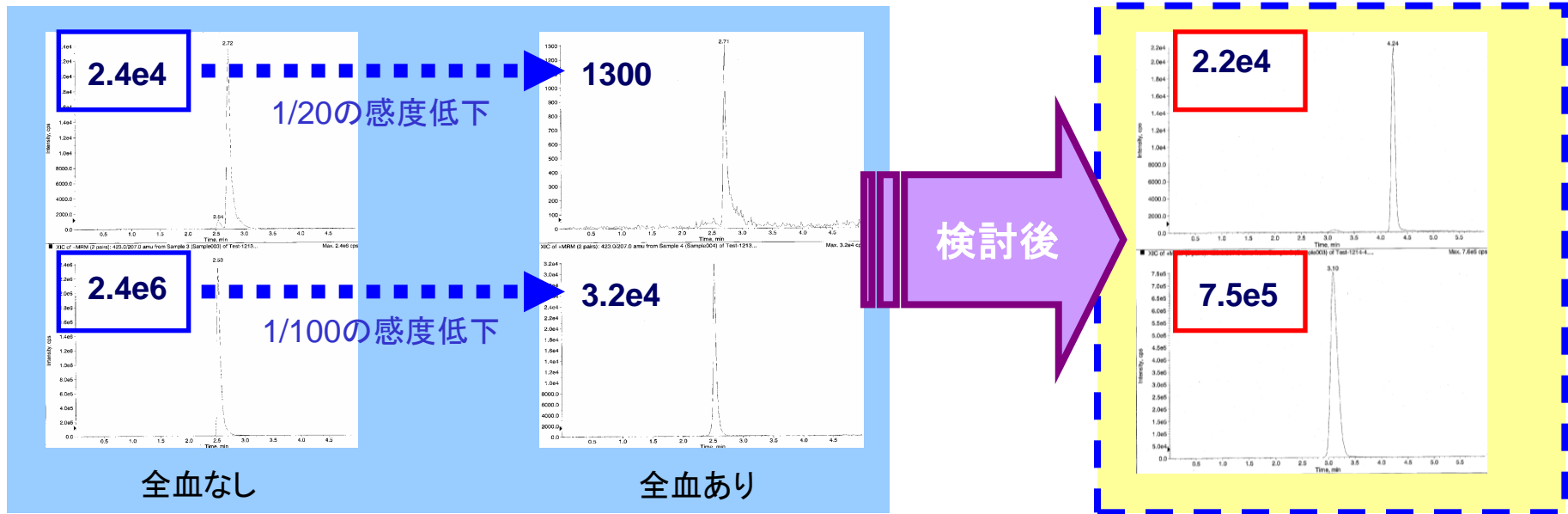
高感度化



TRAP-1: C6, TRAP-2: C4

TRAPカラムの役割

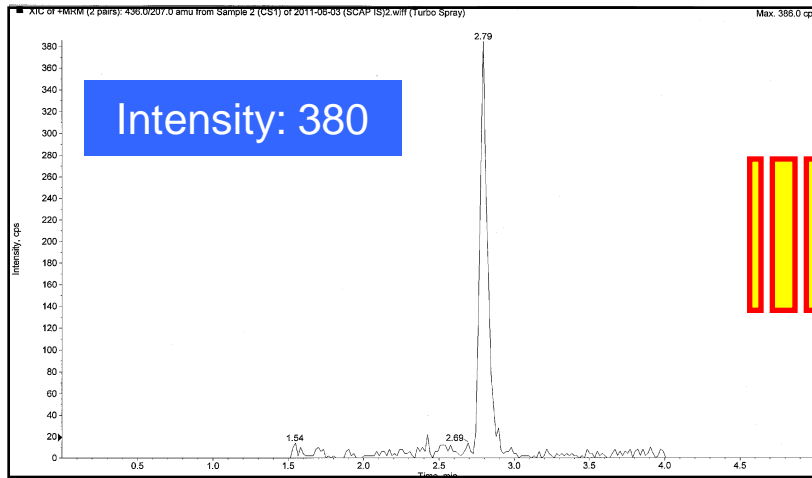
- TRAP-1** 全血からのイオン化抑制成分 (リン脂質など) を測定対象と分離
- TRAP-2** 親水性と疎水性の成分を分離 及び濃縮



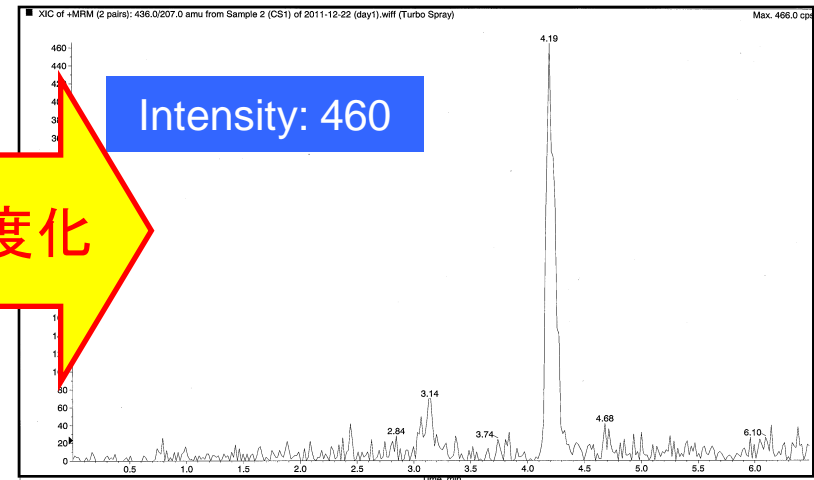
高感度化

◆全血サンプル(定量下限: 10 ng/mL)の測定結果

SCAP system 改良前



SCAP system 改良後



高感度化

クランプサイズが1/2
(抽出量としては1/4)

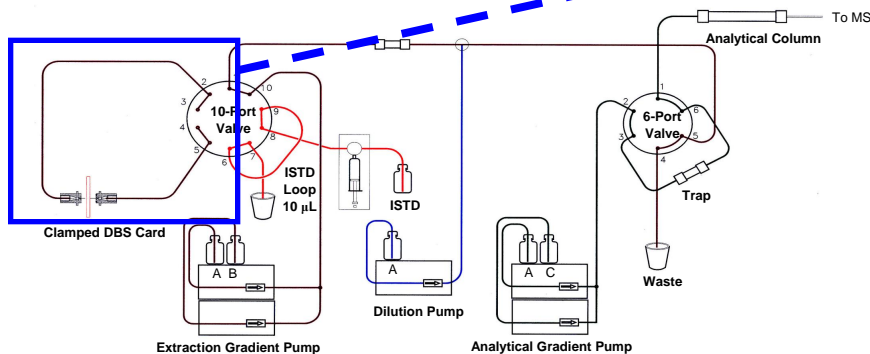
TRAPカラムによる
全血由来のイオン化
抑制化学種(リン脂質等)
との分離

1.2倍の高感度化

キャリアオーバー対策

定量上限サンプル測定後にブランクサンプルを測定し、検出した面積値からキャリアオーバーを算出.

Sample Name	Basic Type		Improved Type	
	Peak Area	of ULOQ (%)	Peak Area	of ULOQ (%)
ULOQ	1578365	—	1237778	—
Blank sample-1	11614	0.736	26976	2.1794
Blank sample-2	2227	0.141	980	0.0792
Blank sample-3	1162	0.074	340	0.0275
Blank sample-4	811	0.051	282	0.0228



2つのオンライン前処理カラムに対して
効果的な洗浄とバルブの切替により...

TRAP-1: 測定対象を分離後, 3.5分間の洗浄
TRAP-2: TRAP-1から選択的にサンプルを保持

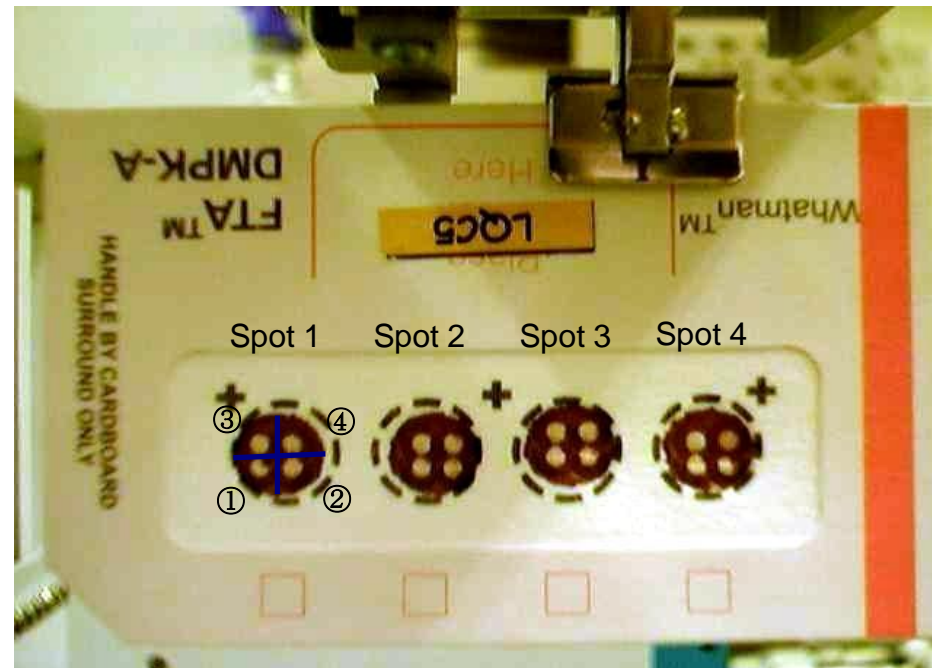
流路の切り離しによって洗浄が不十分
となり, さらなる改良が加えられる予定

洗浄能力が高い



スポット内/スポット間の抽出再現性

Spot No.	Point No.	Peak area		Area Ratio
		Valsartan	Losartan	
1	1	3425	1018281	0.00336
	2	3501	999762	0.00350
	3	3531	995566	0.00355
	4	3376	966263	0.00349
		Mean		0.00348
		CV(%)		2.3
2	5	3079	1036773	0.00297
	6	3605	1007048	0.00358
	7	3156	1033959	0.00305
	8	3390	1058613	0.00320
		Mean		0.00320
		CV(%)		8.4
3	9	3536	1032495	0.00342
	10	3390	1062231	0.00319
	11	3726	1044620	0.00357
	12	3251	1089760	0.00298
		Mean		0.00329
		CV(%)		7.8
4	13	3447	1086969	0.00317
	14	2924	1062266	0.00275
	15	2995	1067742	0.00280
	16	2295	1041023	0.00220
		Mean		0.00273
		CV(%)		14.6
		Overall Mean		0.00318
		Overall CV		10.0

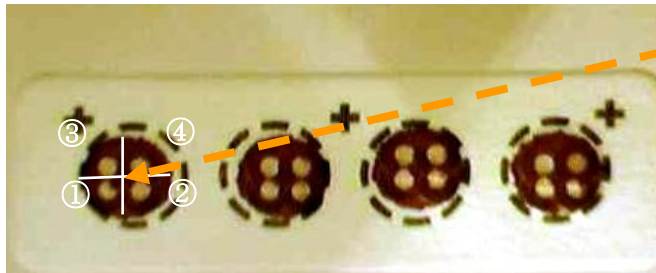


各Spot 内で4点を抽出して測定した結果: V(%) < 15.0%
Spot 間のバラつきを算出した結果: CV(%) < 15.0%

スポット内及びスポット間で抽出に差がない

その他の機能

- 画像処理カメラの設置によって、抽出位置の自動補正が可能
→同一ポイントからの抽出を回避



スポットの中心

サークル内のスポット位置がずれていても、スポットの中心を自動で認識することができる。

- クランプ内流路の内径は数種のタイプが用意される予定であり、化合物の感度によって選択が可能。
- オンライン前処理カラムの選択によって、各種測定対象物質の物性に応じたイオン化抑制化学種との分離が可能となり、汎用性が高い。
- オーバーラップインジェクション機能によって、短時間での多検体処理が可能。

まとめ

- ✦内標準法による定量が可能となったことから、定量性が向上し、安定性評価の実施が可能となった。

【ラット全血中Valsartanの定量法の検討結果】

検量線:	10~10000 ng/mLで良好な直線性を確認
日内再現性:	真度(Accuracy%) 91.7%~104.3% 精度(CV%) 1.9%~5.5%
安定性:	DMPK-Aカード上で室温下14日間安定

- ✦異なる2種のオンライン前処理カラム(逆相)を配置することで、イオン化抑制化学種の成分と測定対象物を分離することができ、感度の向上が認められた。
- ✦洗浄機構の改良によってキャリーオーバーが低減した。

小動物からの経時採血や臨床試験への適用を可能とする
有用性の高いシステムである。

