

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5449202号
(P5449202)

(45) 発行日 平成26年3月19日 (2014. 3. 19)

(24) 登録日 平成26年1月10日 (2014. 1. 10)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 27/62 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 V

GO 1 N 33/82 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 X

GO 1 N 33/48 (2006. 01)

GO 1 N 33/82

GO 1 N 1/10 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 C

GO 1 N 30/88 (2006. 01)

GO 1 N 1/10 C

請求項の数 20 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-547764 (P2010-547764)
 (86) (22) 出願日 平成21年2月20日 (2009. 2. 20)
 (65) 公表番号 特表2011-513710 (P2011-513710A)
 (43) 公表日 平成23年4月28日 (2011. 4. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/034606
 (87) 国際公開番号 W02009/108571
 (87) 国際公開日 平成21年9月3日 (2009. 9. 3)
 審査請求日 平成24年2月15日 (2012. 2. 15)
 (31) 優先権主張番号 61/031, 033
 (32) 優先日 平成20年2月25日 (2008. 2. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509131764
 ウォーターズ・テクノロジーズ・コーポレ
 イション
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
 757、ミルフオード、メープル・ストリ
 ート・34
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 カルトン、リサ・ジエーン
 イギリス国、ストックポート・エス・ケイ
 ・7・4・ジエイ・エイ、ヘイゼル・グロ
 ーブ、キングス・ロード・30・エイ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプル中のビタミンD類似体の存在および量の決定のための方法およびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中のビタミンD類似体の存在または不存在を検出する方法であって、
 前記サンプルに有効量の多電荷カチオン剤を加えてカチオン処理されたサンプルを形成す
 るステップであって、前記有効量の多電荷カチオン剤は質量分析法によるさらなる分析の
 ときにビタミンD類似体からのシグナルを強めるステップ、
 前記カチオン処理されたサンプルを、遠心分離して上澄み液を形成させるステップ、
 前記上澄み液を、前記ビタミンD類似体を他のビタミンD以外の組成物から分離するた
 めの分離手段上に装填して被分析物質溶液を形成させるステップであって、前記分離手段は
 タンパク質沈殿を含むステップ、
 前記被分析物質溶液を、分析用カラム上に置いて互いにおよびビタミンD以外の化合物か
 ら分離された前記ビタミンD類似体を有する溶離液を形成させるステップ、
 前記溶離液を、質量分析計中に置き、質量スペクトルによってサンプル中のビタミンD類
 似体の存在または不存在を検出するステップ
 を含む、方法。

【請求項 2】

前記タンパク質沈殿が、沈殿剤を前記上澄み液と一緒にして混合することおよび前記タ
 ンパク質沈殿物を水溶液から分離して被分析物質溶液を形成させることによって行なわれ
 る、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記タンパク質沈殿物が、遠心分離によって分離される、請求項 2 の方法。

【請求項 4】

前記サンプルが血清である、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

前記多電荷カチオン剤が、金属硫酸塩を含む群から選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 6】

前記金属硫酸塩が、硫酸亜鉛である、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

前記サンプルが、既知量の標識されたビタミン D 類似体を加えられる、請求項 1 の方法

。

【請求項 8】

前記標識されたビタミン D 類似体が、重水素化された 25 (OH) ビタミン D₃ および重水素化された 25 (OH) ビタミン D₂ を含む群から選択される、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

前記被分析物質溶液が、乾燥され、メタノールおよび水中において再構成されて再構成されたサンプルを形成する、請求項 1 の方法。

【請求項 10】

前記再構成されたサンプルが、分析用カラム上のクロマトグラフィーによって分離されて前記溶離液を形成し、この溶離液は質量分析計に向けられる、請求項 9 の方法。

【請求項 11】

サンプル中のビタミン D 類似体の存在または不存在を検出するためのキットであって、有効量の多電荷カチオン剤、
タンパク質沈殿剤、および

有効量の多電荷カチオン剤が前記サンプルに加えられてカチオン処理されたサンプルを形成し、ここで前記有効量の多電荷カチオン剤は質量分析法によるさらなる分析のときにビタミン D 類似体からのシグナルを強め、前記処理されたサンプルは遠心分離されて上澄み液を形成し、前記上澄み液中のタンパク質は前記タンパク質沈殿剤によるタンパク質沈殿により前記ビタミン D 類似体から分離されて被分析物質溶液を形成し、および前記被分析物質溶液は分析カラム上に置かれて互いにおよびビタミン D 以外の化合物から分離された前記ビタミン D 類似体を有する溶離液を形成し、前記溶離液を質量分析計に入れて質量スペクトルによってサンプル中のビタミン D 類似体の存在または不存在を検出する方法におけるその使用のための取扱説明書
を含む、キット。

【請求項 12】

前記タンパク質沈殿が、沈殿剤を前記上澄み液と一緒にして混合することおよび前記タンパク質沈殿物を水溶液から分離して被分析物質溶液を形成させることによって行なわれる、請求項 11 のキット。

【請求項 13】

前記タンパク質沈殿物が、遠心分離によって分離される、請求項 12 のキット。

【請求項 14】

前記サンプルが、血清である、請求項 11 のキット。

【請求項 15】

前記多電荷カチオン剤が、金属硫酸塩を含む群から選択される、請求項 11 のキット。

【請求項 16】

前記金属硫酸塩が、硫酸亜鉛である、請求項 15 のキット。

【請求項 17】

前記キットが、質量分析法による定量化を容易にするような標識されたビタミン D 類似体の既知量を含む、請求項 11 のキット。

【請求項 18】

前記標識されたビタミン D 類似体が、重水素化された 25 (OH) ビタミン D₃ および

10

20

30

40

50

重水素化された 25 (OH) ビタミン D₂ を含む群から選択される、請求項 17 のキット。

【請求項 19】

分析用カラムをさらに含む、請求項 11 のキット。

【請求項 20】

前記分析用カラムが、架橋されたエチルハイブリッド材料を含むクロマトグラフィー媒体を有する、請求項 19 のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

(関連出願への相互参照)

本出願は、2008年2月25日に出願した米国特許仮出願第61/031,033号の優先権を主張するものである。これらの出願の全内容は参照により本明細書に組み込まれている。

【0002】

(連邦政府財政援助に関する声明)

本明細書において提示される発明は、連邦政府の補助金または資金によって支援されたものではない。

【0003】

(発明の分野)

20

本発明は、サンプル中のビタミンDおよびビタミンD類似体の存在および量を検出またはモニターすることが望ましい診断の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

ビタミンDの欠乏は、高齢者にとっておよび重大な肝臓疾患または腎臓疾患を有する個人において問題である。欠乏は日光への露光が少ないまたは栄養不足の個人においても留意されることがある。

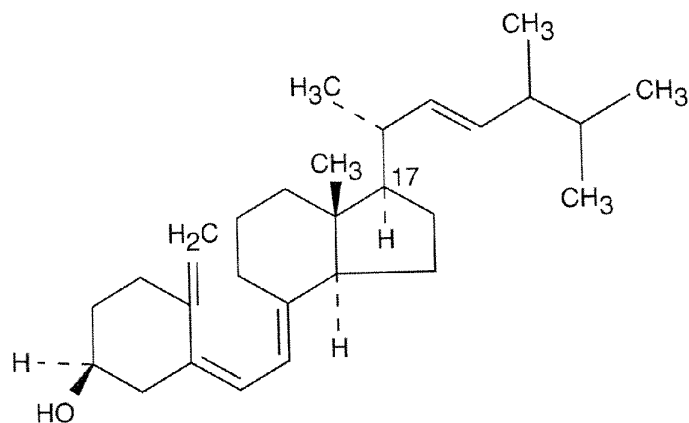
【0005】

ビタミンDとは密接に関連する化合物群のことであり、そのうちの2つはヒトにおいて最も重要なビタミンD₂およびビタミンD₃である。ビタミンD₂、エルゴカルシフェロールは下の化学式1に示す。

30

【0006】

【化1】



40

式 1

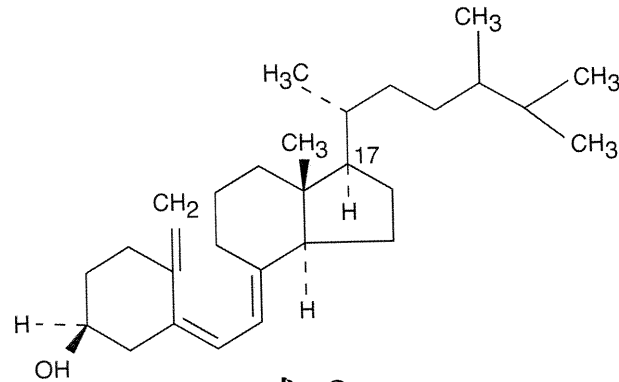
【0007】

ビタミンD₃、コレカルシフェロールは下の化学式2に示す。

【0008】

50

【化 2】



式 2

10

ビタミンD₃は、皮膚内の光媒介反応において合成され、ヒトにおいて最も活性な形態である。肝臓内で、ビタミンD₂およびビタミンD₃は25-ヒドロキシビタミンD₂および25-ヒドロキシビタミンD₃に転化される。腎臓内で、25-ヒドロキシビタミンD₂および25-ヒドロキシビタミンD₃は、1, 25-ジヒドロキシビタミンD₂および1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃に転化される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0009】

ビタミンD欠乏症は通常、ビタミンD₂を用いて治療される。ビタミン欠乏症および治療を評価するために、生体サンプル中のビタミンDレベルおよびビタミンD₂のレベルを検出しモニターするための正確で再現性のある方法を有することが望ましい。本文書は、すべての密接に関連するビタミンD化合物ならびにこれらの前駆体および代謝産物をビタミンD類似体と呼ぶ。また、より詳細な化学的特定が必要な場合は、これらの化学種はビタミンD₂またはビタミンD₃という用語によって識別される。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

30

本発明の実施形態は、サンプル中のビタミンD類似体の存在または不存在、および存在する場合の量を決定するための方法およびキットを対象とする。サンプル中のビタミンD類似体の存在または不存在を検出するための本発明の方法の一実施形態は、有効量の多電荷カチオン剤をサンプルに加えてカチオン処理されたサンプルを形成するステップを含む。有効量の多電荷カチオン剤は、さらに質量分析法による分析のときにビタミンD類似体のシグナルを強める。次に、カチオン処理されたサンプルは遠心分離されて上澄み液を形成する。この上澄み液は、ビタミンD類似体を他のビタミンD以外の組成物のそれぞれから分離するための分離手段に装填されて、被分析物質溶液を形成する。被分析物質溶液は、分析用クロマトグラフィー媒体上に置かれてビタミンD類似体が互いからおよびビタミンD以外の化合物から分離された溶離液を形成する。サンプル中にビタミンD類似体が存在する場合は、溶離液はビタミンD類似体を有し、質量分析法によって検出される。本明細書において使用される「サンプル」という用語は、評価することが望ましい任意の材料のことを言うものである。これらの材料は通常、組織または流体の形態の生物起源のものである。ビタミンD類似体の血液、血漿、または血清濃度を測定することが特に望ましい。本明細書において使用される「装填される」という用語は、種々の化合物を分離することができる態様で置かれることを意味する。「溶離される」という用語は、取り去ることまたは取り除くことを意味するために使用される。クロマトグラフィー媒体から取り去られたものは「溶離液」として知られている。

40

【0011】

本明細書において使用される「分離手段」という用語は、液／液抽出、固相抽出および

50

タンパク質沈殿を含む群のことを言うものである。固相抽出において、上澄み液は分取クロマトグラフィー媒体上に装填される。ビタミンD類似体は、分取クロマトグラフィー媒体から溶離されて被分析物質溶液を形成する。サンプル中にビタミンD類似体が存在する場合、ビタミンD類似体を有する被分析物質溶液は、分析用クロマトグラフィー媒体を有する分析用カラム上に置くことによって、さらに処理される。

【0012】

本明細書において使用される「液／液抽出」という用語は、上澄み液を含む水溶液に脂肪族溶媒を加えることによる抽出の方法のことを言うものである。脂肪族溶媒および上澄み液は混合され、分離されて被分析物質溶液を形成する。本明細書において使用される脂肪族溶媒は、1個－12個の炭素を有する有機分子から成る。

10

【0013】

本明細書において使用される「タンパク質沈殿」という用語は、沈殿剤を上澄み液と一緒にし、タンパク質沈殿物を水溶液から分離して、沈降させたときに、またはより一般的には、さらに遠心分離したときに、被分析物質溶液を形成させる方法のことを言うものである。沈殿剤は高濃縮された塩溶液およびメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコールを含む。

【0014】

本発明の一実施形態は、金属硫酸塩を含む群から選択される多電価カチオン剤を特徴とする。1つの好ましい金属硫酸塩は、硫酸亜鉛である。

【0015】

20

好ましい分取クロマトグラフィー媒体は親水性成分および疎水性成分を有するポリマー媒体である。このクロマトグラフィー媒体は、好ましくはカラム、カートリッジまたはマルチウエル抽出デバイスなどの適当な容器中に保持される。96ウエルプレートなどのマルチウエル抽出デバイスは、オフラインの分取処理のために好ましく、カラムまたはカートリッジはオンラインの分取処理のために好ましい。

【0016】

好ましくは、サンプルには既知量の標識されたビタミンD類似体に加えらる。標識されたビタミンD類似体は、所望の被分析物質の質量分析ピークの同定を容易にする。また、標識されたビタミンD類似体は、既知量の標識されたビタミンD類似体ピーク面積と未知のビタミンD類似体のピーク面積の間で比較することを可能にすることによって、定量化を容易にする。好ましい標識されたビタミンD類似体は、重水素化ビタミンD類似体を含む群から選択される。例えば、ビタミンD₂類似体またはビタミンD₃類似体を同定し定量化することが望まれる場合は、重水素化25(OH)ビタミンD₃および重水素化25(OH)ビタミンD₂の組成物が好ましい。

30

【0017】

好ましくは、本方法は、分析溶液を乾燥し、かかる固体をメタノールおよび水中において再構成して再構成されたサンプルを形成させるステップをさらに含む。好ましくは、この再構成されたサンプルは、分析用クロマトグラフィー媒体を用いてクロマトグラフ的に分離されて溶離液を形成する。この溶離液は質量分析計へ向けられる。

【0018】

40

好ましい分析用クロマトグラフィー媒体は、架橋されたエチルハイブリッド組成物である。この分析用クロマトグラフィー媒体は、好ましくは分析カラム中に保持される。分析用カラムは、1,500psi－15,000psiの間の圧力で操作される高性能カラムである。好ましい高性能カラムは6,000－15,000psiの圧力で操作される。

【0019】

本発明のさらなる実施形態は、サンプル中におけるビタミンD類似体の存在または不存在を検出するためのキットを特徴とする。キットという用語は、方法を行なうための部品、要素および試薬の集合体を意味するために使用される。このキットは通常、集合体および取扱説明書を保持するためのパッケージングを含む。キットを対象とする本発明の実施

50

形態は、有効量の多電荷カチオン剤、およびビタミンD類似体の存在もしくは不存在または量を決定するための方法におけるその使用のための取扱説明書を含む。この方法において、有効量の多電荷カチオン剤がサンプルに加えられて、カチオン処理されたサンプルを形成する。有効量の多電荷カチオン剤は、遠心分離後に、質量分析計のシグナルを強める。処理されたサンプルは遠心分離されて上澄み液を形成する。この上澄み液は、前記ビタミンD類似体を他のビタミンD以外の組成物のそれぞれから分離して被分析物質溶液を形成するための分離手段に装填される。この被分析物質溶液は、互いにおよびビタミンD以外の化合物から分離されたビタミンD類似体を有する溶離液を形成させるための分析用クロマトグラフィー媒体上に置かれる。この溶離液は、質量分析計中に入れられて、サンプル中のビタミンD類似体の存在もしくは不存在または量が質量分析法によって検出される。

10

【0020】

サンプルが血清である場合、キットは好ましくは流体を取り扱うためのピペットを含む。固体組織サンプルの分析に向けられるキットは、好ましくは組織を可溶化するための溶液を含む。

【0021】

1つの好ましい多電荷カチオン剤は、硫酸亜鉛などの金属硫酸塩を含む群から選択される。

【0022】

1つの好ましいキットは、分離手段を含む。この分離手段は、液／液抽出、固相抽出およびタンパク質沈殿を含む群から選択された少なくとも1つを含み、かかるキットはかかる分離手段を含む。

20

【0023】

例えば、固相抽出が、上澄み液を分取クロマトグラフィー媒体上に装填することおよびビタミンD類似体を分取クロマトグラフィー媒体から溶離して被分析物質溶液を形成させることによって行なわれる場合は、キットは分取クロマトグラフィー媒体を収容している。分取クロマトグラフィー媒体は、好ましくはオフライン抽出用の単一ウエルまたはマルチウエルデバイス、およびオンライン作業用のカラムおよびカートリッジなどの固相抽出デバイス内部に収容されている。マルチウエルデバイスは一般的に、96の倍数のウェル数で販売されている。上澄み液を受け入れるための好ましい分取クロマトグラフィー媒体は、親水性成分および疎水性成分を有するポリマー媒体である。オフライン抽出用の好ましい固相抽出デバイスは、ウエルデバイスまたはマルチウエルデバイスである。

30

【0024】

液／液抽出が、脂肪族溶媒を加えること、混合することおよび脂肪族溶媒を水溶液から分離して被分析物質溶液を形成することによって行なわれる場合は、キットはかかる脂肪族溶媒を含む。

【0025】

タンパク質沈殿が、沈殿剤を入れて上澄み液と一緒に混合することおよび前記タンパク質沈殿物を水溶液から分離して被分析物質溶液を形成させることによって行なわれる場合は、キットはかかる沈殿剤を含む。

40

【0026】

好ましくは、キットは、質量分析法による定量化を容易にするために既知量の標識されたビタミンD類似体を含む。好ましい標識されたビタミンD類似体は、重水素化されたビタミンD類似体を含む群から選択される。例えば、被分析物質が25(OH)ビタミンD₃および25(OH)ビタミンD₂である場合は、好ましい標識されたビタミンD類似体は重水素化された25(OH)ビタミンD₃および重水素化された25(OH)ビタミンD₂を含む。

【0027】

好ましくは、キットは、分析用クロマトグラフィー媒体をさらに含む。分析用クロマトグラフィー媒体は、好ましくは分析用カラム中に収容され、分析溶液は乾燥され、再構成

50

されて再構成されたサンプルを形成する。この再構成されたサンプルは、分析用クロマトグラフィー媒体へ向けられて溶離液を形成する。この溶離液は質量分析計によって質量分析される。好ましい第2のクロマトグラフィー媒体は、架橋されたエチルハイブリッド材料である。

【0028】

本発明のさらなる特徴および利点は、図面を見て、下記の詳細な説明を読むと当業者には認められる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】本発明の特徴を具体化しているキットを示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0030】

(発明の詳細な記述)

本発明の実施形態は、サンプル中におけるビタミンD類似体の存在または不存在および存在する場合の量を決定するための方法およびキットに関して詳細に記載される。「サンプル」という用語は広い意味で使用されるが、本論は組織または流体の形態の生物起源の材料を想定している。また、特に、本論および実施例は、ある種のステップおよび材料は変更または改変され得るという理解の下で、血清および好ましいステップを対象としている。本発明の実施形態は、ビタミンサプリメントの欠乏または過剰投与を診断する目的のための、ビタミンD類似体の臨床的血中濃度を決定するために使用されることができる。

20

【0031】

まず方法については、本方法は有効量の多電荷カチオン剤をサンプル、血清、に加えてカチオン処理されたサンプルを形成させるステップを含む。サンプルが全血として提供される場合、当業者は血液細胞をスピアウトして血漿を形成させ、次いで血液タンパク質を沈殿させて血清を形成させることによって全血サンプルを処理して血清を得ることを知っている。血清サンプルは任意の容積であってよいが、約200 μ Lの小容積が普通である。有効量の多電荷カチオン剤は、遠心分離したときにサンプルからのビタミンD以外の組成物の除去を排除するまたは容易にする。

【0032】

好ましい多電荷カチオン剤は、硫酸亜鉛などの金属硫酸塩を含む群から選択される。硫酸亜鉛は、いくつかの販売者から入手可能である。多電荷カチオン剤は、0.01–1 Mの間の、より好ましくは0.05–0.5 Mの最終濃度となるようにサンプルに加えられる。

30

【0033】

好ましくは、サンプルは既知量の標識されたビタミンD類似体を受け入れる。標識されたビタミンD類似体は、好ましくはサンプルに加えられるが、既知量の標識されたビタミンD類似体を有する校正溶液の別個の操作によって質量分析計を校正することが可能である。標識されたビタミンD類似体は、所望の被分析物質についての質量スペクトルのピークの同定を容易にする。また、標識されたビタミンD類似体は、既知量の標識されたビタミンD類似体と未知のビタミンD類似体とのピーク面積の間で比較することを可能にする。ことによって、定量化を容易にする。好ましい標識されたビタミンD類似体は、重水素化されたビタミンD類似体を含む群から選択される。例えば、ビタミンD₂類似体またはビタミンD₃類似体を同定および定量化することが望まれる場合は、重水素化された25(OH)ビタミンD₃および重水素化された25(OH)ビタミンD₂組成物が好ましい。

40

【0034】

血清中ビタミンD類似体および校正用標識ビタミンD類似体のための好ましい溶媒はメタノールである。したがって、血清、水性混合物は、10 ng/mLのd₆-25(OH)ビタミンD₃を含有しているメタノールの2倍容積と合わせられる。

【0035】

多電荷カチオン剤は、適当な時間、通常は5–180秒間、ボルテックスすることによ

50

って完全に混合され、さらに5秒間－10分間静置されてカチオン処理されたサンプルを形成する。

【0036】

次に、カチオン処理されたサンプルは、遠心分離されて上澄み液を形成する。本発明者らは如何なる特定の理論にも束縛されたくはないが、多電荷カチオン剤は血清中に残っているビタミンD以外の化合物と錯体を形成すると考えられている。これらの錯体はより低い溶解度を有し、遠心分離の間に沈降して、ビタミンD化合物の検出を妨害する可能性がある組成物が除去された上澄み液を形成する。代わりにまたは加えて、多電荷カチオン剤は、ビタミンD類似体が結合されているタンパク質を、それに結合されているビタミンD類似体がタンパク質から外されるように変更する場合がある。上澄み液は、600－26,000rpmにおいて2－30分間、より好ましくは6000－20,000rpmにおいて5－10分間遠心分離されると生じる。

10

【0037】

この上澄み液は分離手段に投入される。例えば、固相抽出を行なうことが望まれる場合は、上澄み液はビタミンD類似体を他のビタミンD以外の組成物のそれぞれから分離するための分取クロマトグラフィー媒体上に装填される。好ましい分取クロマトグラフィー媒体は、親水性成分および疎水性成分を有するポリマー媒体である。1つの好ましいポリマー媒体は、OASIS（登録商標）HLB（Waters Corporation（Milford, MA）の商標で販売されている。

20

【0038】

この分取クロマトグラフィー媒体は、好ましくはカラム、カートリッジまたはマルチウエル抽出デバイスなどの適当な容器中に保持されている。96ウエルプレートなどのマルチウエル抽出デバイスはオフラインの分取処理のために好ましく、カラムまたはカートリッジはオンラインの分取処理のために好ましい。96ウエルプレートは30mgの収着剤と一緒にOASIS（登録商標）HLBの商標で販売されている。

【0039】

収着剤は通常、上澄み液を装填する前に、当技術分野において知られている仕方で調整される。調整は、部分的には、収着剤の性質、被分析物質が溶離される仕方およびその中に被分析物質が溶解される溶媒によって決定される。本明細書において記載されている96マルチウエルデバイス中のポリマー収着剤は、装填の前に、酢酸エチル1mL、メタノール1mLで調整され、水1mLと平衡状態にされる。

30

【0040】

収着剤が調整され、上澄み液が装填された後、収着剤は妨げになる可能性のある化合物を除去するために洗浄される。それ故に、収着剤は2回、まず、5%メタノール／水溶液1mLを用いて、次に80%メタノール／水溶液1mLを用いて洗浄される。

【0041】

ビタミンD類似体は、分取クロマトグラフィー媒体から溶離されて被分析物質溶液を形成する。サンプル中にビタミンD類似体が存在する場合は、被分析物質溶液はビタミンD類似体を有する。標識されたビタミンD類似体がサンプルに加えられた場合は、標識されたビタミンD類似体も存在する。標識されたビタミンD類似体および標識されていないビタミンD類似体の双方が酢酸エチル500μLの2倍容積で溶離される。

40

【0042】

好ましくは、被分析物質は乾燥され、再構成されて再構成されたサンプルを形成する。例えば、被分析物質溶液は窒素または何らかの他の不活性ガスの下の高められた温度、例えば50℃において乾燥される。好ましくは、かかる再構成されたサンプルは、メタノールおよび水の中で形成される。好ましい溶液は、70／30のメタノール／水である。通常の容積は200μLである。

【0043】

再構成されたサンプルは、分析用クロマトグラフィー媒体を用いてクロマトグラフィーで分離され、溶離液を形成する。この溶離液は、質量分析計に向けられる。

50

【0044】

好ましい分析用クロマトグラフィー媒体は、架橋されたエチルハイブリッド組成物である。この第2のクロマトグラフィー媒体は、好ましくは分析用カラム中に保持されている。分析用カラムは、1, 000–15, 000 psi の圧力で操作される高性能カラムである。好ましい高性能カラムは、6, 000–15, 000 psi の圧力で操作される。好ましいカラムは、ACQUITY (登録商標) BEH 2. 1×50 mm、C8、1. 7 μ 粒子 (Waters Corporation、Milford、MA) の商標で販売されている。かかるカラムを受け入れるための好ましい計器は、ACQUITY (登録商標) UPLC (登録商標) クロマトグラフィーシステム (Waters Corporation、Milford、MA) である。

10

【0045】

ビタミンD類似体および標識されたビタミンD類似体は、2つの溶液から成るグラジエントを用いて溶離される。第1の溶液は2 mMの酢酸アンモニウムを有し、0. 1 %のギ酸を有する水であり、本明細書において「移動相A」と呼ばれることがある。第2の溶液は2 mMの酢酸アンモニウムを有し、0. 1 %のギ酸を有するメタノールであり、本明細書において「移動相B」と呼ばれることがある。この系に対して、第1の溶液は弱い洗浄溶媒として使用され、第2の溶液は強い洗浄溶媒として使用される。

【0046】

グラジエントはある時間を掛けて達成される。1つの好ましいグラジエントは約25 %の移動相Aおよび75 %の移動相Bで開始して75 %の移動相Aおよび25 %の移動相Bまで6分間かけて、流量0. 35 mL/分、および注入容積20 μ L (PLNO、ループ50 μ L、サンプルシリンジ250 μ L。25 (ヒドロキシ) ビタミンD₂の保持時間は3. 48分であり、25 (ヒドロキシル) ビタミンD₃は3. 3分であり、d₆25 (ヒドロキシル) ビタミンD₃は3. 3分である。

20

【0047】

ビタミンD類似体は、質量分析法によって検出される。質量分析計は、いくつかの販賣者から種々の商標で入手可能である。好ましい質量分析計は、WATERS (登録商標) TQD、MASSLYNX (登録商標) 4. 1ソフトウェアを有するタンデム四重極型検出器質量分析計として販売されている。

【0048】

少しだけ分離手段に戻って、分離手段は、直ぐ前に記載された固相抽出法または液/液抽出またはタンパク質沈殿から選択されるとよい。液/液抽出法が好ましい場合は、分離手段は、上澄み液を含む水溶液に脂肪族溶媒を加えることを含む。脂肪族溶媒および上澄み液は、混合され、分離されて被分析物質溶液を形成する。

30

【0049】

本明細書において使用される脂肪族溶媒は、1–12個の炭素を有する有機分子から成る。好ましい脂肪族溶媒はヘキサンである。混合は一般的に、ボルテックスすることによって行なわれ、分離はさらなる遠心分離によって支援されてもよくまたは単に水性媒体および脂肪族媒体を時間を掛けて分液および沈降させるだけでもよい。水性成分は脂肪族成分から分離されて被分析物質溶液を形成する。

40

【0050】

分離手段がタンパク質沈殿である場合、分離手段は沈殿剤を上澄み液に加えることを含む。沈殿剤は、濃縮された塩溶液および/またはメタノール、エタノール、プロパノールおよびブタノールなどのアルコールを含む。沈殿剤は、タンパク質が、沈降またはさらなる遠心分離によって上澄み液を去る原因となって、被分析物質溶液を形成する。

【0051】

ここで図1を見ると、本発明のさらなる実施形態は、一般的に数字11によって示されているキットを特徴とする。このキットは、血清を含むサンプル中のビタミンD類似体の存在または不存在を検出するためのものである。キット11は、より詳細に後述される集合体を含む様々な部品を保持するためのパッケージング15を有する。パッケージング1

50

5 は、袋、プラスチック包み、プラスチック型枠または描かれているような箱などの如何なる形態をも含み得る。

【0052】

有効量の多電荷カチオン剤は、バイアル17中に保持される。バイアル17は、多電荷カチオン剤を溶液または再構成のための乾燥状態で収容し得る。1つの好ましい多電荷カチオン剤は、硫酸亜鉛などの金属硫酸塩を含む群から選択される。

【0053】

キットは、その使用のためのビタミンD類似体の存在もしくは不存在または量を決定するための方法を記載している取扱説明書19をさらに含む。この方法において、有効量の多電荷カチオン剤がサンプルに加えられてカチオン処理されたサンプルを形成する。取扱説明書19は、好ましくは多電荷カチオン剤を形成させるための仕方を記載している。

10

【0054】

サンプルが血清である場合、キットは好ましくは流体を取り扱うためのピペット〔示されていない〕を含む。固体組織サンプルの分析に向けられるキットは、好ましくは組織を可溶化するための溶液または溶液を作成するための手段を含む。例えば、カオトロピックとして知られているある種の塩は、細胞膜を溶解させる。かかる塩は、溶液中に入れられるために、バイアル〔示されていない〕中に、多電荷カチオン剤の仕方で、収容されている。

【0055】

1つの好ましいキット11は、分取クロマトグラフィー媒体の形態の分離手段、沈殿剤および／または液／液抽出材料および試薬を含む。例えば、抽出デバイス中にマルチウエルプレートまたは分取カラム21の形態で保持されている分取クロマトグラフィー媒体は、パッケージング15中に保持されている。分取カラム21が示されているが、一部の用途のためには96ウエルプレート〔示されていない〕が好ましいことがある。沈殿剤ならびに／または液／液抽出材料および試薬は、通常バイアルまたはボトル〔示されていない〕中に収容されている。

20

【0056】

好ましくは、キットは、質量分析法による定量化を容易にするための既知量の標識されたビタミンD類似体を含む。好ましい標識されたビタミンD類似体は、重水素化されたビタミンD類似体を含む群から選択される。例えば、被分析物質が25(OH)ビタミンD₃および25(OH)ビタミンD₂である場合は、好ましい標識されたビタミンD類似体は、重水素化された25(OH)ビタミンD₃および重水素化された25(OH)ビタミンD₂を含む。適当な溶媒中に溶解させるためのかかる標識されたビタミンD類似体は、バイアル23中に収容されているものとして示されている。取扱説明書19は、その再構成の仕方を記載している。

30

【0057】

このキットは、分析用カラム25の形態の分析用クロマトグラフィー媒体をさらに含む。

【0058】

本発明の実施形態は、25(OH)ビタミンD₂およびD₃の検出および濃度の決定を強調している次の実施例において、さらに例示される。

40

【0059】

(実施例)

実施例1および2は、下記の計器、材料、設定および手順を使用する。

計測器

質量分析計：WATERS（登録商標）TQD S/N QBA068

クロマトグラフィーシステム：ACQUITY（登録商標）UPLC（登録商標）クロマトグラフィーシステムSM：S/N K06UPS15M（FW 1.23.172）、BSM：S/N B07UPB805M（FW 1.23.121）

ソフトウェア：MassLynx 4.1

50

材料および方法

標準

25 (OH) ビタミン D3 (1 mg) は、F l u k a (17938) から購入し、エタノール (1 mL) 中に溶解させた。25 (OH) ビタミン D2 (1 mg) は、F l u k a (17937) から購入し、エタノール (1 mL) 中に溶解させた。d6-25 (OH) V i t D3 は、内部標準として使用する。1 mg を E t O H (1 mL) 中に溶解させて 1 mg/mL 標準を得た。

1 mg/mL 標準は、必要となるまで -20 において貯蔵した。この標準は必要に応じて適切な溶媒中に希釈した。

【実施例 1】

【0060】

クロマトグラフィー

移動相 A : 2 mM 酢酸アンモニウム + 0.1 % 酢酸を有する水

移動相 B : 2 mM 酢酸アンモニウム + 0.1 % 酢酸を有する MeOH

弱い洗浄溶媒 : 移動相 A

強い洗浄溶媒 : 移動相 B

カラム : A c q u i t y B E H 2.1 × 50 mm C8 1.7 μm

カラム温度 : 45 °C

注入容積 : 20 μL (P L N O、ループ容積 50 μL、適合サンプルシリンジ 250 μL)

流量 : 0.35 mL/min

グラジエント :

【0061】

【表 1】

時間	%A	%B	カーブ
0	27	73	1
2	27	73	6
3.5	2	98	6
4.0	2	98	6
4.1	27	73	6

ランタイム : 6.0 分

【0062】

質量分析計 (MS/MS)

この計器は、MS1 に関する単位分解能 (0.7 Da HH) および MS2 に関する分解能 (0.9 Da HH) について調整した。

極性 E S +

キャピラリー (kV) 2.00

コーン (V) 22.00

エクストラクター 3.00

R F (V) 0.1

ソース温度 (°C) 120

脱溶媒和温度 (°C) 350

コーンガス流量 (L/hr) 50

脱溶媒和ガス流量 (L/hr) 900

衝突ガス流量 (mL/min) 0.15

LM1 分解能 14.9
 HM1 分解能 14.9
 イオンエネルギー1 0.1
 MSモード注入口 50.00
 MSモード衝突エネルギー 2.00
 MSモード出口 50.00
 MSMSモード注入口 0.00
 MSMSモード衝突エネルギー 12.00
 MSMSモード出口 0.50
 LM2 分解能 13.5
 HM2 分解能 13.5
 イオンエネルギー2 1.0
 ゲイン 1.0
 マルチプライヤー -652.10
 MRM遷移
 【0063】
 【表2】

10

化合物	MRM	データ 取り込み時間 (sec)	コーン電圧 (V)	衝突エネルギー (eV)
25-OH D3	401.2> 159.1	0.05	22	28
D6-25-OH D3	407.2> 159.1	0.05	22	28
25-OH D2	413.15 >83.15	0.05	30	22

20

表2 25 (OH) ビタミンD2およびD3およびd6 ビタミンD3 ISの分析に関する
MRM遷移

スキャン間スキャン遅延 (sec) : 0.02
 スキャン間チャンネル遅延 (sec) : 0.01
 【0064】

30

サンプル抽出
 タンパク質沈殿
 血清 150 μL
 MeOH / IPA 中 250 ng / mL の d6-25 (OH) ビタミンD3 IS 10 μL を
 加える
 5 秒間ボルテックスする
 0.2 M ZnSO4 150 μL を加える
 5 秒間ボルテックスする
 MeOH 600 μL を加える
 30 秒間ボルテックスする
 13,000 rpm で 5 分間遠心分離する
 上澄み液 20 μL を注入する

40

液-液抽出
 血清 150 μL、
 MeOH / IPA 中 250 ng / mL d6-25 (OH) ビタミンD3 IS 10 μL を
 加える
 0.2 M ZnSO4 150 μL を加える
 5 秒間ボルテックスする

50

MeOH 300 μ Lを加える
5秒間ボルテックスする
ヘキサン750 μ Lを加える
30秒間ボルテックスする
13,000 rpmで5分間遠心分離する
上の有機層（ヘキサン）を取り除く
窒素下、50℃で乾燥する
70/30のMeOH/水75 μ L中で再構成する
20 μ Lを注入する。

10

固相抽出

Oasis HLB 30mg 96ウェルプレート
サンプルの前処理：血清200 μ L + IS (80/20 MeOH/IPA中X ng/mL
d6-25 (OH) ビタミンD3) 10 μ Lを5秒間ボルテックスする+0.2M Zn
SO4 200 μ Lを5秒間ボルテックスする。MeOH800 μ Lを加え30秒間ボル
テックスする。13,000 rpmで5分間遠心分離する。

条件1：酢酸エチル1 mL

条件2：MeOH 1 mL

平衡：水1 mL

装填：上澄み液

20

洗浄1：5% MeOH 1 mL

洗浄2：80% MeOH 1 mL

溶離液：酢酸エチル2 $\times$ 500 μ L

窒素下、50℃で乾燥し、70/30のMeOH/水100 μ L中で再構成する。

20 μ Lをカラムに注入する

【実施例2】

【0065】

25 (OH) ビタミンD₂ およびD₃ の分析

SPE/UPLC/MS/MS条件

クロマトグラフィー

30

移動相A：酢酸アンモニウム2 mMを有する水+0.1%ギ酸

移動相B：酢酸アンモニウム2 mMを有するMeOH+0.1%ギ酸

弱い洗浄溶媒：移動相A、600 μ L

強い洗浄溶媒：移動相B、200 μ L

シール洗浄：20% MeOH水溶液

カラム：ACQUITY BEH 2.1 $\times$ 50mm Phenyl 1.7 μ m (製品
番号 186002884) プレカラムフィルター付き

カラム温度：60℃

注入容積：20 μ L (PLNO、ループ50 μ L、取付けサンプルシリンジ250 μ L)

オーバーフィル3 μ L (SCN 627)、前装填

40

流量：0.4 mL/min

グラジエント：

【0066】

【表 3】

時間	%A	%B	カーブ
0	35	65	1
2. 5	15	85	6
2. 6	2	98	6
3. 1	35	65	11

10

ランタイム：4. 0分

【0067】

質量分析

計器は、MS1に関する単位分解能（0. 7 Da FWHM）およびMS2に関する分解能（0. 8－0. 9 Da FWHM）について調整した。

MS条件

極性	ES+
キャピラリー（kV）	2. 5
コーン（V）	24. 00
エクストラクター（V）	3. 00
RF（V）	0. 1
ソース温度（℃）	120
脱溶媒和温度（℃）	350
コーンガス流量（L/Hr）	50
脱溶媒和ガス流量（L/Hr）	900
衝突ガス流量（mL/min）	0. 15
LM1分解能	14. 9
HM1分解能	14. 9
イオンエネルギー1	0. 1
MSMSモード注入口	0. 00
MSMSモード衝突エネルギー	12. 00
MSMSモード出口	0. 50
LM2分解能	13. 5
HM2分解能	13. 5
イオンエネルギー2	1. 0

20

MRM遷移

【0068】

30

【表 4】

化合物	MRM	データ 取り込み時間 (sec)	コロン電圧 (V)	衝突エネルギー (eV)
25 (OH) D ₃	401. 35> 159. 1	0. 02	24	28
25 (OH) D ₃	401. 35> 365. 35	0. 02	24	12
d ₆ -25 (OH)) D ₃	407. 35> 159. 1	0. 02	24	28
25 (OH) D ₂	413. 35> 83. 1	0. 02	24	24
25 (OH) D ₂	413. 35> 355. 35	0. 02	24	10

25 (OH) ビタミンD₂およびD₃およびd₆ビタミンD₃ I Sの分析に関するMRM遷移、赤の遷移は場合によるクオリファイアイオンである。

スキャン間スキャン遅延 (sec) : 0. 02

スキャン間チャンネル遅延 (sec) : 0. 01

【0069】

Oasis (登録商標) HLB μ Elution SPE抽出

このSPE抽出ステップは、OASIS (登録商標) (Waters Corporation、Milford、Massachusetts USA) の商標で販売されている親水性-親油性バランスを有する有機ポリマー収着剤を有する96ウェルデバイスを特徴とする。

サンプル調製:

血清150 μ Lを2mLディープウェルの96ウェルプレートに加える

IS20 μ Lを加える: 250 ng/mLのd₆-25 (OH) ビタミンD₃ (60% MeOH/40% IPA)

10秒間ボルテックスする

0. 2M ZnSO₄水溶液 150 μ Lを加える

10秒間ボルテックスする

MeOH600 μ Lを加える

30秒間ボルテックスする

プレートを13, 000 rpmで5分間遠心分離する

上澄み液600 μ Lを取り出して装填ステップのために使用する。

SPE Oasis (登録商標) HLB μ Elution (製品番号 186001828BA) プロトコール:

調整: メタノール200 μ L

平衡: 60%メタノール(水溶液) 200 μ L

サンプル装填: 上記サンプル調製からの上澄み液600 μ L

洗浄1: 5%メタノール(水溶液) 200 μ L

洗浄2: 60%メタノール(水溶液) 200 μ L

溶離1: 60/40 メタノール/IPA 80 μ L

溶離2: Water (登録商標) 40 μ L

(Waters (登録商標) 1ml 96ウェルプレート中に溶離する)

プレートウェルを混合する(180秒間ボルテックスする)

20 μ Lをカラムに注入する。

【0070】

こうして、本発明の実施形態が、本明細書の教示から逸脱することなく本発明が変更および改変され得るとの理解の下に記載されてきた。したがって、本発明は正確な詳細に限定されてはならず、むしろ続く特許請求の範囲の主題およびその同等物を包含するべきである。

【図1】

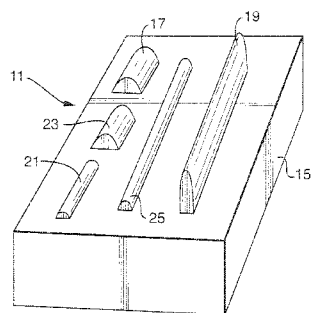


FIG. 1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 30/72 (2006.01)		G 0 1 N 1/10	D
G 0 1 N 30/06 (2006.01)		G 0 1 N 1/10	F
		G 0 1 N 1/10	H
		G 0 1 N 1/10	V
		G 0 1 N 30/88	1 0 1 P
		G 0 1 N 30/72	C
		G 0 1 N 30/88	E
		G 0 1 N 30/06	Z

(72)発明者 グラハム, ケンドン・スチュアート
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01748-1653、ホプキントン、ウェイブリッジ・レ
 イン・16

審査官 大竹 秀紀

(56)参考文献 特開2007-132741 (JP, A)
 特表2005-521041 (JP, A)
 国際公開第2007/140962 (WO, A2)
 国際公開第2006/078859 (WO, A2)
 国際公開第2004/002996 (WO, A1)
 特開平04-233460 (JP, A)
 Feliciano Priego Capote (外3名), Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007年 6月15日, vol. 21, No. 11, p. 1745-1754

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 27/62
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)