

## 高速高分離分析の応用 (その43)

## “Nexera” によるヒト血漿中グリベンクラミドのキャリーオーバー評価

## High Speed with High Resolution Analysis (Part 43)

## Carry Over Evaluation of Glibenclamide in Human Plasma by “Nexera”

近年、LC/MS/MSによる血漿中の薬物分析の分野においても、2 μm前後の微粒子充填カラムを用いた高速高分離分析技術が使用されるようになってきました。微粒子充填カラムのカラム内拡散は、汎用カラム (5 μm) より小さいため、ピーク高さが高く、さらなる高感度な定量が可能となります。こうした高感度分析が行なわれる一方、オートサンプリングのキャリーオーバーが、LC/MS/MSの高感度分析に影響を与えることが問題となってきました。

アプリケーションニュースNo. L425では、ヒト血漿中レセ

ルピンによるNexeraオートサンプリング“SIL-30AC”のキャリーオーバー評価を行い、低キャリーオーバー性能であったことを報告しました。これは、“SIL-30AC”の持つポテンシャルの高さに加え、リンス機構による洗浄が有効であったと考えられます。

ここでは、血中薬物の測定において、幅広い薬物に適用できるリンス洗浄として、No. L425で報告したリンス洗浄方法の妥当性についてご紹介します。

T. Yoshida

## ■ヒト血漿中のグリベンクラミド試料調製

## Preparation of Glibenclamide in Human Plasma

今回、“SIL-30AC”のキャリーオーバー評価用薬物として、グリベンクラミドを用いました。グリベンクラミドは1969年に当時のBoehringer Mannheim社とFarbwerke Hoechst社により開発された第2世代の経口血糖降下薬で、膵臓のβ細胞の刺激によってインスリンを放出させ、血糖値を下げます。通常、インスリン非依存型糖尿病の治療、特に二型糖尿病の患者の治療に用いられています。

グリベンクラミドはFig. 1に示しますように、パラフェニル基、スルホニル基、ウレア結合からなるスルホニルウレア構造 (S-フェニルスルホニルウレア構造) を持つ化合物であり、キャリーオーバーしやすい化合物であると予想されます。評価には高感度タイプのMS/MS装置を使用し、ヒト血漿中グリベンクラミドのLC/MS/MS測定を行いました。

Fig. 2に、グリベンクラミド添加ヒト血漿の前処理工程を示します。ヒト血漿は市販品を使用しました。調製されたグリベンクラミド添加試料3 μLを“SIL-30AC”によりNexera-MS/MSシステムに導入しました。

グリベンクラミドのプロトン付加分子イオン ( $[M+H]^+$ :  $m/z=494$ ) をプレカーサイオン、 $m/z=369$  をプロダクトイオンとして、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 定量しました。

次ページTable 1の分析条件により、ヒト血漿中グリベンクラミドを定量しました。本法では分析時間は4分と高速分析が可能であり、ヒト血漿中濃度0.005 ng/mLでもS/N比=2と高感度分析が可能でした。

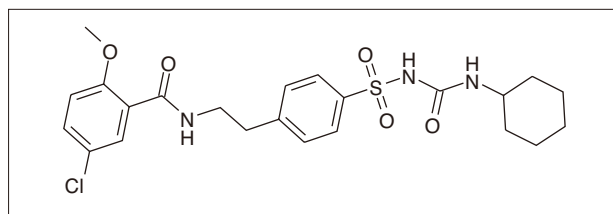


Fig. 1 グリベンクラミドの構造式  
Structure of Glibenclamide

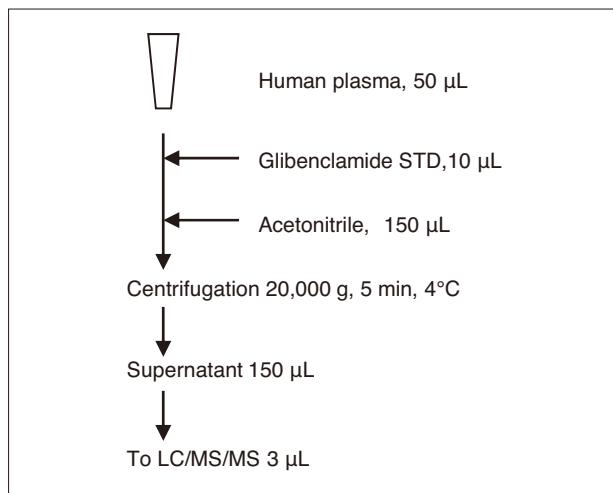


Fig. 2 前処理工程  
Pretreatment Protocol

## ■ヒト血漿中グリベンクラミドのキャリーオーバー評価結果

### Carry Over Evaluation of Glibenclamide in Human Plasma

Table 1に、分析条件を示します。オートサンプラ“SIL-30AC”は、4種類の洗浄液を用いてサンプル針内外面の洗浄を行うことができます。洗浄液および洗浄方法については、Table 1をご覧ください。

血漿中薬物のキャリーオーバー発生原因のひとつに血漿に存在するりん脂質がサンプリングデバイスに付着し、その上に薬物が吸着することも考えられています。そのため、針内洗浄には、りん脂質を溶解しやすい2-プロパノールをベースに、2-プロパノール濃度の高い「R1」、2-プロパノールと他の溶媒と組み合わせた「R2」を考案し、300 µLで交互2回洗浄しました。また、針外面は、「R3」（「R1」と同一溶液）で洗浄ポンプを用いて1秒間洗浄を行いました。

Fig. 3に、ヒト血漿中グリベンクラミドのキャリーオーバー

評価の結果を示します。まず、ヒトブランク血漿 (Fig. 2の工程でグリベンクラミドの代わりにメタノールに変更した試料) を分析しました。そのMRMクロマトグラムが「Pre Blank」です。次に、ヒト血漿中グリベンクラミド濃度1000 ng/mLの試料を3 µL注入 (Fig. 3中「1000 ng/mL」) 後、再度ヒトブランク血漿「Post Blank」を分析し、グリベンクラミド溶出位置 (1.7分付近) のキャリーオーバーを評価しました。その10倍拡大図をFig. 3-1に示しますが、グリベンクラミドは検出されませんでした。この結果より、キャリーオーバーは0.005 ng/mL以下 (0.0005 %以下) でした。このようにヒト血漿試料を用いるLC/MS/MSの薬物分析において、ここで示しましたリンス洗浄方法は、Nexeraオートサンプラ“SIL-30AC”の低キャリーオーバー性能を十分発揮することができるものでした。

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

<b>&lt;HPLC conditions&gt;</b>		<b>[Auto Sampler Option]</b>	
Column	: ODS column (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.3 µm)	Wash Solution	R0 : Mobile phase A
Mobile Phase	: A: 0.1 % Formic acid in Water B: 0.1 % Formic acid in Acetonitrile Isocratic elution, A/B = 7/3		R1 : 50 % 2-Propanol
Flow Rate	: 0.5 mL/min		R2 : Acetonitrile / 2-Propanol / Water / Formic acid (700 / 200 / 100 / 2)
Column Temperature	: 40 °C		R3 : 50 % 2-Propanol Internal Rinse
Injection Volume	: 3 µL		R1 → R2 → R1 → R2 → R0 Wash volume 300 µL each
<b>&lt;MS conditions&gt;</b>		External Rinse	R3 1 s
Ionization Mode	: ESI positive Glibenclamide (494 > 369)	Rinse Mode	: Before and after aspiration
		Rinse Method	: Rinse pump then port

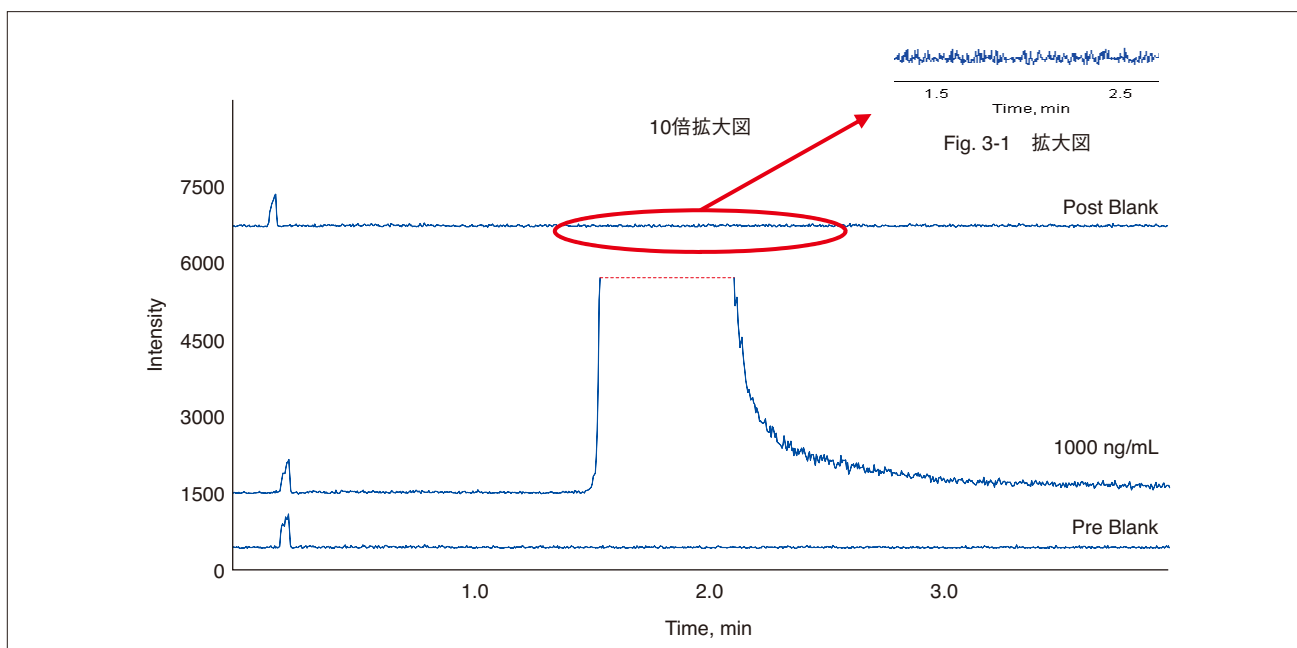


Fig. 3 ヒト血漿中グリベンクラミドのキャリーオーバー評価  
Carry Over Evaluation of Glibenclamide in Human Plasma

※ 掲載データは薬事承認された装置で採取したものではありません。

初版発行：2011年10月

**島津製作所** 分析計測事業部  
応用技術部

島津コールセンター

☎0120-131691  
TEL:075-813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>  
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。