

# Application News

## No. C143

LC/MS

### LC/MS/MS によるヒト血漿中チロシンキナーゼ阻害薬の一斉分析

近年のがん治療では、分子標的薬といわれる、腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移に関わる分子を標的として、腫瘍細胞の増殖を抑制することを目的に開発された薬剤が用いられています。

肺がん治療では、上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) および未分化リンパ腫キナーゼ (Anaplastic Lymphoma Kinase: ALK) などを標的としたチ

ロシンキナーゼ阻害薬 (Tyrosine Kinase Inhibitors: TKIs) が用いられており、第2世代、第3世代と呼ばれる分子標的薬の新薬開発が続々と行われています。

ここでは薬物動態の研究を目的とした、トリプル四重極型高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8050 を用いたヒト血漿中の EGFR-TKIs、ALK-TKIs および代謝物の一斉分析例を紹介します。

T. Tsukamoto

#### EGFR-TKIs 4 剤および ALK-TKIs 3 剤の一斉分析

コントロールヒト血漿に表 1 に示した EGFR-TKIs および ALK-TKIs 標準品を添加した試料を図 1 の手順で除タンパクし、上清を分析に供しました。LC/MS/MS による MRM 測定

では、対象薬物分子の質量と構造によって選択的に対象薬物を検出することができます (図 2 および図 3)。

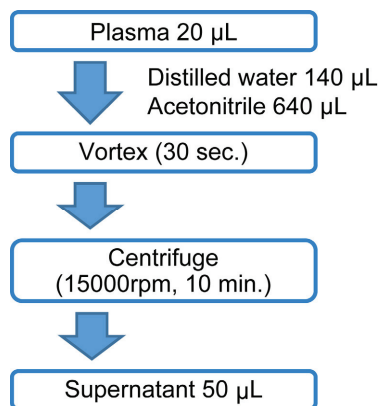


図 1 血漿試料の前処理ワークフロー

表 1 EGFR-TKIs、ALK-TKIs および代謝物

	Compound	Molecular formula	Monoisotopic mass [u]	MRM transition m/z
EGFR-TKIs	Afatinib	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> ClFN <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	485.163	486.2 > 371.1
	Erlotinib	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	393.169	394.2 > 278.1
	OSI-420 <sup>*1</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	379.153	380.2 > 278.1
	Gefitinib	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	446.152	447.2 > 128.1
	Osimertinib	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	499.270	500.3 > 72.1
	AZ5104 <sup>*2</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	485.254	486.3 > 72.2
ALK-TKIs	Alectinib	C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	482.268	483.3 > 396.3
	Crizotinib	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O	449.119	450.1 > 260.2
	Ceritinib	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	557.223	558.2 > 433.1

\*1 Erlotinib metabolite, \*2 Osimertinib metabolite

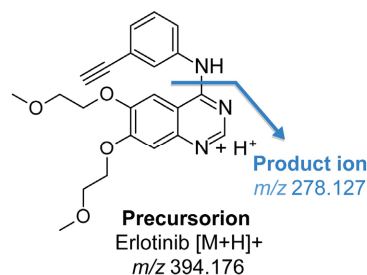


図 2 エルロチニブのプリカーサーイオンおよびプロダクトイオン

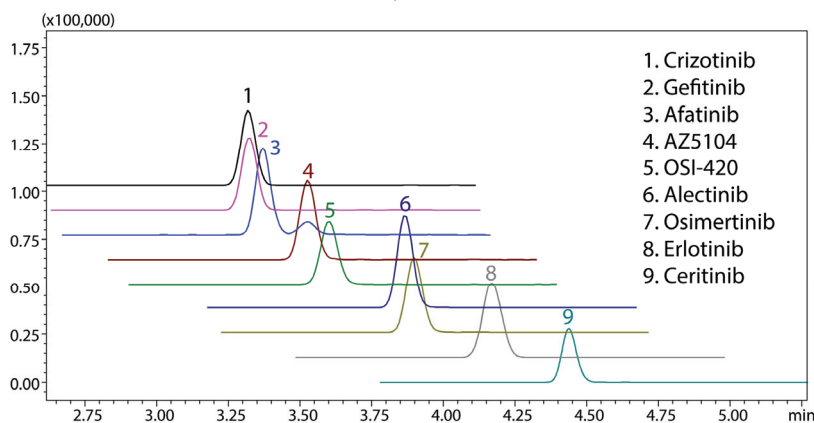


図 3 標準品添加ヒト血漿試料のマスクロマトグラム

標準品を添加したコントロール血漿より検量線を作成し、真度（正確さ）と精度（再現性）の妥当性を評価しました。いずれの TKIs についても設定した濃度範囲にて良好な直線性を得ることができ、定量下限を含む全範囲において正確さ

は 100±15%以内となりました。また、精度についても同様に %RSD 15%以内となり、良好な再現性が得られました（表 2）。

表 2 EGFR-TKIs、ALK-TKIs および代謝物一斉分析の妥当性評価結果

Compounds	Range (ng/mL)	Accuracy (%)				Precision (%RSD, n=5)			
		LLOQ*1	Low*2	Medium*3	High*4	LLOQ*1	Low*2	Medium*3	High*4
Afatinib	5-2000	98.5	103.2	106.3	95.7	12.4	13.9	7.6	7.4
Erlotinib	5-2000	95.1	103.2	102.7	92.3	4.7	5.4	0.8	2.0
OSI-420	5-2000	95.1	104.3	103.4	91.9	9.0	2.7	2.7	3.2
Gefitinib	5-2000	93.0	110.2	103.9	93.5	12.1	6.4	3.4	1.3
Osimertinib	5-2000	94.5	107.0	103.5	93.1	4.6	3.7	2.4	1.9
AZ5104	5-2000	94.7	106.5	102.7	92.5	9.8	6.0	2.7	3.1
Alectinib	5-2000	96.9	101.4	104.0	93.1	13.4	6.3	1.8	1.9
Crizotinib	5-2000	95.4	106.1	106.6	95.3	10.9	11.1	4.1	2.5
Ceritinib	10-2000	94.4	105.2	103.6	91.6	8.0	6.7	1.7	2.8

\*1: 5 ng/mL (10 ng/mL for Ceritinib), \*2: 10 ng/mL (25 ng/mL for Ceritinib), \*3: 100 ng/mL, \*4: 1000 ng/mL

## ■ 血漿検体の分析

血漿検体の分析例を図 4 および図 5 に示しました。検体 A ではエルロチニブに加えて、その代謝物である OSI-420 が、検体 B ではアレクチニブが検出されました。いずれの検体においても検量線に用いたコントロール血漿と同様に血漿中の夾雑物による顕著な妨害は確認されませんでした。

LC/MS/MS を用いた本分析手法は血漿検体中の TKIs 分析手法として活用が期待されます。

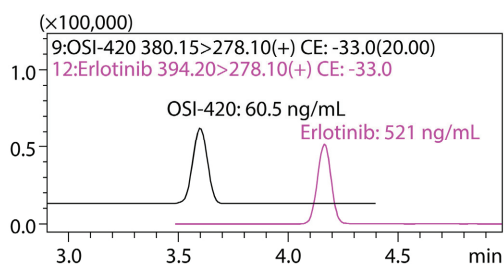


図 4 血漿検体 A の分析結果

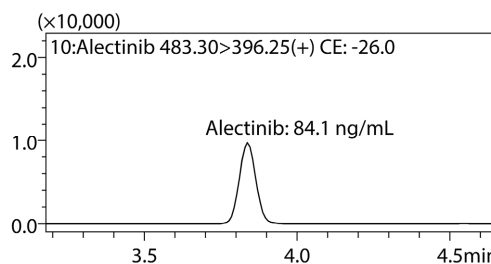


図 5 血漿検体 B の分析結果

表 3 分析条件

Column	: Shimadzu GLC Mastro C18 (100 mm L. x 2.1 mm I.D., 3 μm)		
Mobile Phase	: A 10 mmol/L Ammonium formate buffer - water, B Acetonitrile		
Flow Rate	: 0.3 mL/min		
Time program	: B Conc. 10 % (0 min) - 100 % (5 - 7 min) - 10 % (7.01 - 10 min)		
Column Temp.	50°C	Injection Volume	: 3 μL
Probe Voltage	: 1.0 kV (ESI-positive mode)		
Interface Temp.	: 300°C	DL Temp.	: 250°C
Block Heater Temp.	: 400°C	Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min	Drying Gas Flow	: 10 L/min

## 【謝辞】

本資料における検討には国立研究開発法人 国立がん研究センター病院 薬剤部 牧原玲子先生より多大なご協力をいただきました

- 参考文献
- ・ Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation (2001, US FDA)
  - ・ 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン (2013, 厚生労働省)

- 注)
- ・ 本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。
  - ・ 治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。
  - ・ 本文書に記載の検体は、いずれも国立がん研究センター病院にて採取、測定されたものです。測定データの掲載について正規の手続きに基づき許諾を得ています。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2017年1月

島津コールセンター ☎0120-131691  
(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。