

Application News

No. C197

LC/MS

全自動前処理LC-MS/MSシステムを用いた全血中の免疫抑制剤4成分の一斉分析 (1)

本報では、安定同位体標識された内部標準物質と、全自動LCMS™前処理装置 CLAM™-2030 および高速液体クロマトグラフ質量分析計からなる全自動前処理 LC-MS/MS システムを用いて、全血中の免疫抑制剤4成分（タクロリムス、シロリムス、エベロリムスおよびシクロスポリン A）の定量分析について検討した研究成果をご紹介します。

T. Tsukamoto, D. Kawakami, T. Minohata

■ LC-MS/MS 用免疫抑制剤分析キット DOSIMMUNE™

測定にあたっては、LC-MS/MS 用免疫抑制剤分析キット DOSIMMUNE（島津グループ Alsachim、フランス）を使用しました。

タクロリムス、シロリムス、エベロリムスおよびシクロスポリン A は赤血球への移行率が高く、血中濃度の測定では全血を検体試料とします。DOSIMMUNE キットでは全血試料に安定同位体標識された内部標準物質を添加し、試料中の夾雑物によるマトリクス効果を補正します。さらに抽出液により溶血および除タンパクした溶液を LC-MS/MS での分析試料とします（図 1）。この一連のプロトコールは全自動 LCMS 前処理装置 CLAM-2030 により全自動化が可能です。

LC-MS/MS 分析では、トラップカラムによる精製（図 2）の後、MRM 測定を行います。

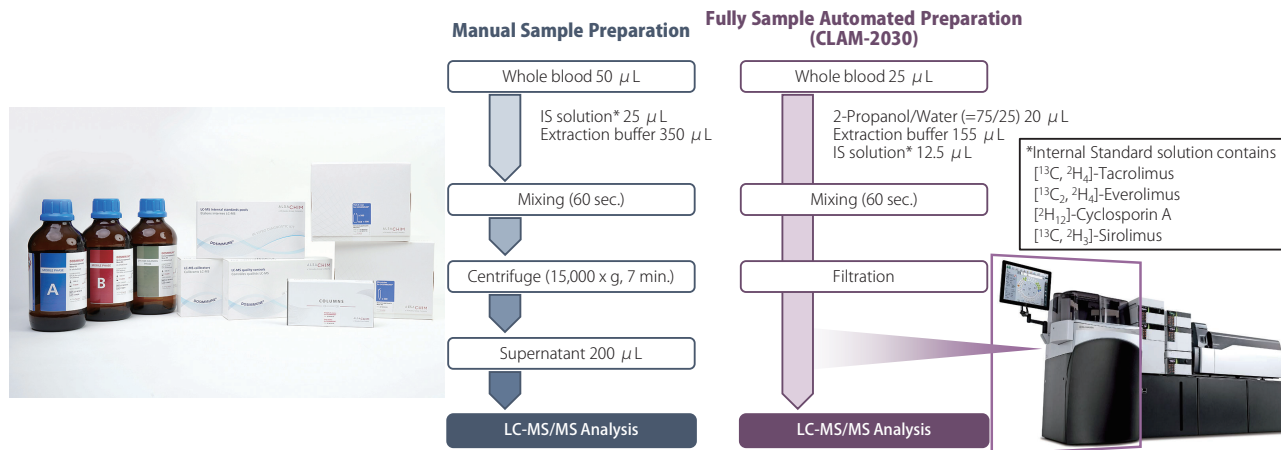


図 1 LC-MS/MS 用免疫抑制剤分析キット DOSIMMUNE™ の前処理プロトコール（左：手技による前処理、右：CLAM™-2030 による全自動前処理）

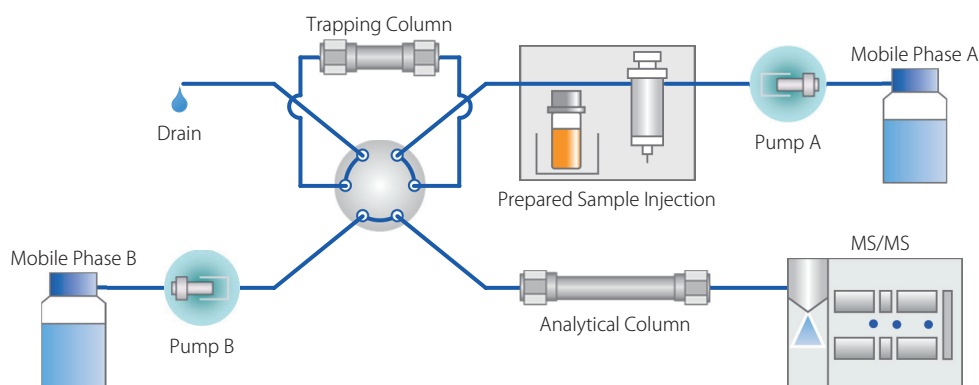


図 2 分析システムの流路図（トラップ&溶出システム）

■免疫抑制剤 4 成分の分析

LC-MS/MS は優れた特異性を有し、対象薬物と代謝物などの類縁物質との識別が求められるバイオアナリシスでは極めて有用な分析手法です。しかし、一般に生体試料の LC-MS/MS 分析では除タンパクなどの前処理が必要になります。特に多数の検体を測定するケースでは、検体数の増加に応じて作業者の負担も増加してしまいます。また、過度な負担は、手技に由来するばらつきや検体の取り違いなどの事故を誘発する要因となる可能性があります。

全自動 LCMS 前処理装置 CLAM-2030 は、セットされた採血管等の検体容器から検体試料を分注し、任意のプログラムに則って除タンパクや内部標準物質の添加などの前処理を全自動で実行可能です。前処理された分析試料は LC-MS/MS システムに自動的に搬送され、検体 ID 情報と紐付けられて分析に供されるため、一連の操作に作業者の手技による介入は発生しません。

本報では免疫抑制剤 4 成分を既定の濃度で添加した全血試料を分析し、全自動前処理 LC-MS/MS システムによる測定系の評価を行いました。

正確さの確認には 6 濃度の検量線用サンプルを用いました。タクロリムス、シロリムスおよびエベロリムスについて 1.5~40 ng/mL の範囲で、シクロスポリン A について 25~1500 ng/mL の範囲で、各検量点での正確性は 90~110% と良好な結果が得られました。

全自動前処理装置 CLAM-2030 と LCMS-8050 を用いた全自動分析では、作業者の負担を低減し、より信頼性の高い検体分析を実施することが可能です。

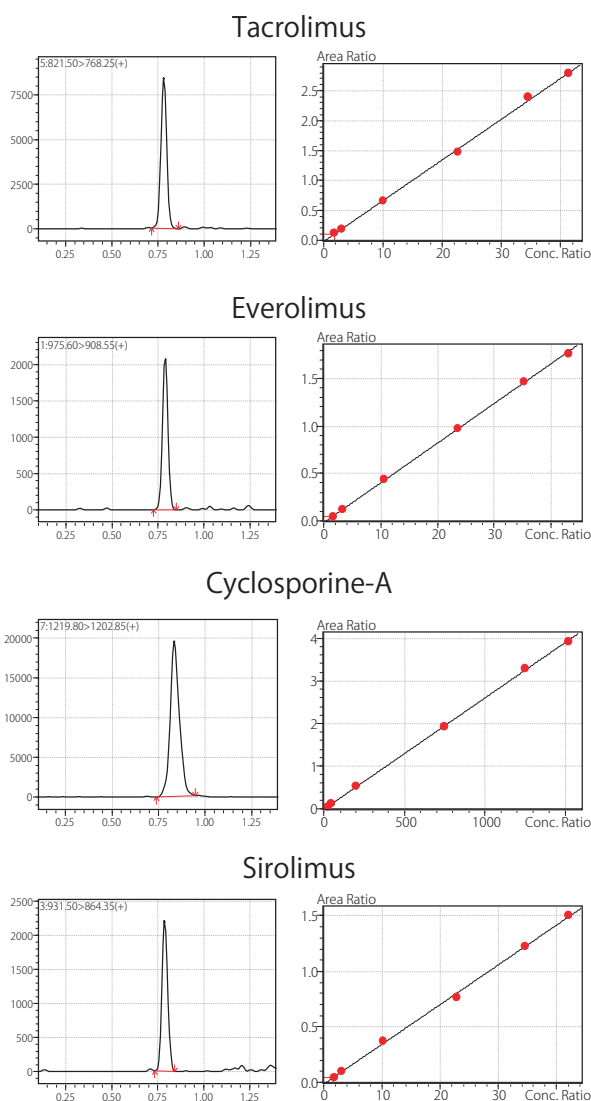


図3 免疫抑制剤 4 成分の MRM クロマトグラム (L1) と検量線

表1 分析条件

System	: CLAM-2030 + Nexera™ X2 + LCMS-8050	
Protocol	: 2-Propanol/Water disp. 20 μ L - Sample disp. 25 μ L - Extraction buffer disp. 155 μ L - IS solution disp. 12.5 μ L - Mixing 1900 rpm, 60 sec - Filtration 90 sec	
Column	: DOSIMMUNE kit trapping column, analytical column	
Mobile Phase	: DOSIMMUNE kit mobile phase A, B	
Time program	: A Flow : 2 mL/min (0 - 0.26 min) - 0.02 mL/min (0.27 - 1.21 min) - 2 mL (1.22 - 1.5 min) B Flow : 1 mL/min (0 - 1.5 min) Valve position : loading (0 min) - analysis (0.28 min) - loading (1.2 min)	
Column Temp.	: 65 $^{\circ}$ C	Injection Volume : 10 μ L
Probe Voltage	: 2.5 kV (ESI-positive mode)	
Interface Temp.	: 200 $^{\circ}$ C	DL Temp. : 250 $^{\circ}$ C
Block Heater Temp.	: 200 $^{\circ}$ C	Nebulizing Gas Flow : 3 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min	Drying Gas Flow : 10 L/min

掲載された製品は研究用です。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。

LCMS、CLAM、DOSIMMUNE、および Nexera は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

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：2019年7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。