

マイクロフローLC/MS/MS を用いた 超微量血漿試料中の薬物の高感度分析

一般に薬物などの生体外由来物質は、生体内で代謝を受けることで体外への排泄や解毒が促進されることが知られています。このため、医薬品開発では前臨床試験および臨床試験で体内薬物動態に関する評価が行われます。¹⁾

前臨床における薬物動態試験では動物実験により得られた生体試料中の薬物および代謝物濃度を LC/MS/MS 等を用いて分析します。

この際、安全に採取可能な試料量は動物種により制限を受けるため、動物種によっては多くの実験動物と評価薬物を必要とするケースもあり、倫理および経済性の観点から課題となっています。

この課題解決のアプローチとして、試料の微量採取（マイクロサンプリング）技術の発達とともに、微量試料からの検出を可能とするため、LC/MS/MS 分析の高感度化についても検討されています。

ここでは、微量血漿試料中の薬物分析を想定し、マイクロフローLC/MS/MS 法による高感度化の検討例をご紹介します。

D. Vecchietti, K. Matsumoto

■マイクロ流量対応 液体クロマトグラフ 質量分析計システム Nexera Mikros™

本検討には 1~500 $\mu\text{L}/\text{min}$ とマイクロ~セミマイクロの幅広い流量領域で移動相の送液が可能な Nexera Mikros を用いました (図 1)。



図 1 ミクロ LC-MS システム「Nexera Mikros™」

Nexera Mikros は、一般的に使用されている 100~500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度の流量範囲で測定するセミマイクロ LC/MS システムよりも目的成分を高感度に検出でき、かつ数百 nL/min ~1 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量範囲で測定するナノ LC/MS システムと比べて分析の短時間化と堅牢性に優れています。

また、図 2 にトラップ時およびエリユート（溶出）時の流路図を示します。試料溶媒が除タンパク時に使用するアセトニトリル等であるため、直接注入ではアセトニトリルの溶出力によって、ピーク形状が広がることがあるため、使用可能な注入量に限りがあります。試料溶媒によるピークのブロード化を抑制するため、注入はトラップ&エリユート方式で行いました。トラップカラムに目的化合物を保持させた後に（トラップ）、バルブを切り換えて分析用の移動相にてバックフラッシュし、分析カラムに目的化合物を送り込み（エリユート）、分離・検出を行いました。

■試料の調製

図 3 に示す Verapamil と Nor verapamil 添加血漿試料 (2 μL) に除タンパク用溶媒 58 μL (0.1% ぎ酸/アセトニトリル、内部標準物質 Verapamil-d6 を含む) を添加しました。室温で 20 分間静置後、遠心分離し、上清をバイアルに移し、5 μL 注入して分析を実施しました。

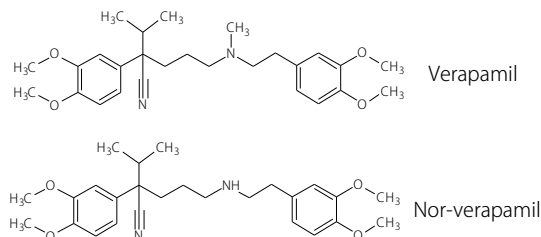
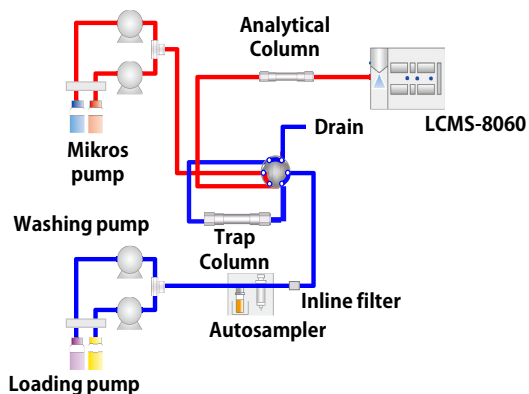


図 3 Verapamil およびその代謝物 Nor-verapamil の化学構造式

A) トラップ時



B) 溶出時

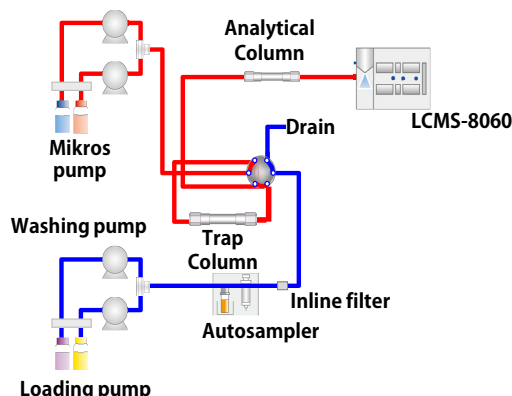


図 2 トラップ時および溶出時の流路図

■ 分析条件

Nexera Mikros の HPLC および MS の条件を表 1 および 2 に示します。トラップカラムへの試料ローディングは 0.1 % ige酸を含む水/アセトニトリル=98/2 を用い、分析は 0.1 % ige酸を含む水とアセトニトリルのグラジエント溶離により行いました。Washing ポンプを用いて、分析中にアセトニトリル 100 % をトラップカラムに送液し洗浄を行いました。また、同じ装置構成を用いて、マイクロ流量とセミマイクロ流量の比較を行いました。

表 1 LC 条件 (マイクロ流量)

Analytical Column	: Shim-pack™ PLONAS Biphenyl (2.7 μm, 100 mm×0.2 mm I.D.)
Trap Column	: Shim-pack™ MCT LC8 (5 μm, 5 mm×0.3 mm I.D.)
Temperature	: 40 °C
Mobile Phase A	: Water + Formic Acid 0.1 %
Mobile Phase B	: Acetonitrile + Formic Acid 0.1 %
Flow Rate	: 250 μL/min (Load), 4 μL/min (Elution)
Gradient	: B Conc. 26 % (0-1 min)-95 % (4-5 min)
Injection Volume	: 5 μL

表 2 MS 条件

Ionization	: Micro ESIMicro-ESI 8060
Probe Voltage	: +2.6 kV (positive ionization)
Temperature	: Interface: no heating Desolvation Line: 250 °C Heater Block: 400 °C
Gas Flow	: Nebulizing Gas: 1 L/min Heating Gas: -- Drying Gas: --
MRM	: (Quant / Qual) Verapamil (455.0 > 150.25 / 455.0 > 303.3 (165.2)) Nor verapamil (440.95 > 165 / 440.95 > 150) Verapamil D6 (461.3 > 309.3 / 461.3 > 165.25 (150.25))

■ ミクロ流量分析によるシグナル強度の評価

Verapamil と Nor verapamil を添加した血漿 (検量点最小濃度、0.5 μg/L) を使って、マイクロ流量分析が目的化合物のシグナル強度に及ぼす効果を評価しました。試料注入量およびカラム内線速度を揃え、マイクロ流量およびセミマイクロ流量でのシグナル強度を比較しました。マイクロ流量条件ではイオン化ユニットにマイクロ流量用イオン化ユニット Micro-ESI 8060 を、セミマイクロ流量では標準の ESI イオン化ユニットを使用しました。各分析条件を表 3 に示します。

表 3 ミクロ流量とセミマイクロ流量の分析条件

Parameter	Micro LC/MS/MS method	Semi-Micro LC/MS/MS method
Injection mode	Trap & Elute	Direct
Injection volume (μL)	5	5
Flow rate (μL/min)	4	441
Analytical column	0.2×100 mm, 2.7 μm	2.1×100 mm, 2.7 μm
Linear velocity (cm/sec)	4.145	4.145
Sample concentration (μg/L)	0.5	0.5

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。

Nexera Mikros および Shim-pack 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：2020年6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。

マイクロ流量時のシグナル強度は、セミマイクロ流量時に比べて Verapamil は 4.5 倍以上、Nor verapamil は 3.5 倍以上増加しました (図 4)。マイクロ流量を使うことにより、同じサンプル量で感度を向上できることが確認できました。

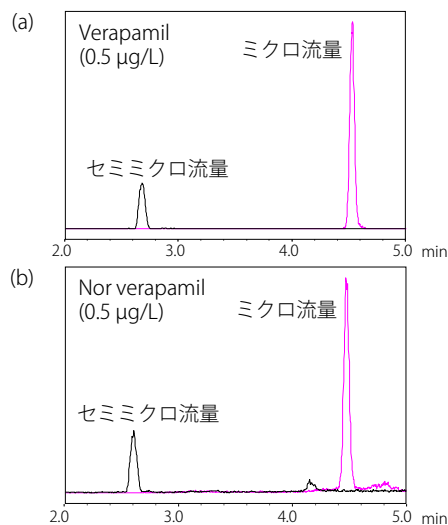


図 4 ミクロ流量とセミマイクロ流量の (a) Verapamil、(b) Nor verapamil のシグナル強度の比較 (spiked plasma sample at 0.5 μg/L)

■ 検量線の直線性

内部標準法により作成した検量線 (1/X の重み付けの線形回帰モデル) を図 5 に示します。Verapamil と Nor verapamil 共に、直線性は $R^2=0.998$ 以上かつ正確さも良好な検量線が得られました (図 5、表 4)。

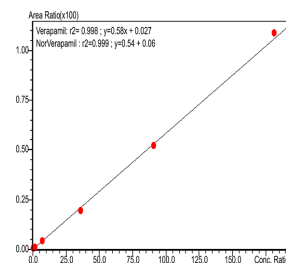


図 5 Verapamil の検量線

表 4 ミクロ流量とセミマイクロ流量の検量点誤差率

Conc. (μg/L)	Accuracy % (Verapamil)	Accuracy % (Nor verapamil)
0.5	101.4	94.2
0.9	110.7	108.4
1.8	93.9	91.2
7.3	100.5	108.5
36.3	93.5	98.1
90.8	97.3	98.9
181.6	102.6	100.7

■ 結論

マイクロ流量対応 液体クロマトグラフ質量分析計システム Nexera Mikros を用い、サンプル溶媒によるピークのブロード化を抑制するため、トラップ&エリユート方式により Verapamil と Nor verapamil の定量を行いました。

生体試料中の薬物の定量においてマイクロ流量条件では一般的なセミマイクロ流量条件より高感度な検出が可能でした。このことから、マイクロフロー LC/MS/MS を用いることで、薬物動態試験において必要な試料採取量を低減できる可能性が示唆されました。

<参考資料>

1) Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014, 28, 1293-1302.