

Application News

全自動LCMS前処理装置 CLAM™-2030

高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-8045/8050/8060/8060NX

全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステムによる ヒト血漿中Dexamethasoneおよび抗生物質の同時測定

D. Toinon、井本 英志

ユーザーベネフィット

- ◆ ステロイド系抗炎症薬と抗生物質の高感度一斉分析が可能です。
- ◆ 自動で生体試料の前処理からLC/MS/MS測定までを行います。
- ◆ 測定時間 5 分の高速スクリーニングと安定した併行精度と日差再現性を実現しました。



■はじめに

ステロイド系抗炎症薬の一つであるDexamethasoneは炎症反応や免疫反応を抑制する効果を有しており、腫瘍の対症療法や目の炎症治療に広く使用される薬剤です。これらの症状に対する効果だけでなく、アレルギー症状の改善やがん治療にも有効であると報告されています¹⁾。最近の研究ではCOVID-19の治療薬として注目を集め、2020年7月には本邦において、2例目の治療薬として厚生労働省から使用が認められた薬剤です¹⁾。一般的に副腎皮質ステロイドを用いて治療を行う場合、細菌の異常増殖を防ぐために抗生物質も併せて投与されます²⁾。抗生物質であるTazobactamとPiperacillinを併用した場合、腎機能障害や急性腎不全を引き起こす可能性があるとして報告されています³⁾。

ここでは、ヒト血漿中のDexamethasoneと複数の抗生物質を測定対象とし、全自動で血液の前処理を可能とするCLAM-2030を用いたLC/MS/MSによる高感度一斉分析手法を紹介します。CLAM-2030は採血管をセットするだけで前処理からLC/MS/MS測定までをシームレスに行うことが可能であり、検体の取り違い、手技によるバラツキを低減する事ができます。

分析時間 5 分と短時間で多検体のスクリーニングを行えるだけでなく、LC/MS/MSの測定と並行して、次に測定する検体の前処理を行うことで、前処理から測定までを効率よく実施する事ができます。これら薬剤の定量にはLCMS-8060を使用し、血漿添加検量点サンプルと3濃度のQCサンプルにより、真度（正確さ）および併行精度、日差再現性の確認を行いました。

■分析手法

Dexamethasone、抗生物質であるTazobactam、Meropenem、Piperacillinの構造式を図1に示します。各薬剤の標準物質と重水素でラベル化した $[^2H_4]$ -Dexamethasoneは島津製作所グループ会社Alsachim製を使用しました。前処理に使用した有機溶媒および酸は富士フィルム 和光純薬株式会社から購入し、フッ化アンモニウムはMerckから購入しました。装置は超高速液体クロマトグラフ Nexera™ X2（島津製作所）、全自動LCMS前処理装置 CLAM-2030（島津製作所）、高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8060（島津製作所）を用いました。装置の外観を図2に示します。全ての薬剤のMRMトランジションはフローインジェクションで最適化しました。最適化したLCおよびMSの分析条件を表1に示します。

[²H₄]-Dexamethasoneは10 ng/mLに調製し、内部標準物質として用いました。CLAM-2030に設定した血漿サンプルの前処理工程を図3に示します。75%IPA 10 μL、アセトニトリル 50 μL、血漿 25 μL、ISTD 10 μLを前処理容器に添加、攪拌、PTFEメンブレンフィルターによるろ過を行った後、0.2%ギ酸水を240 μL添加し、LC/MS/MS分析を行いました。

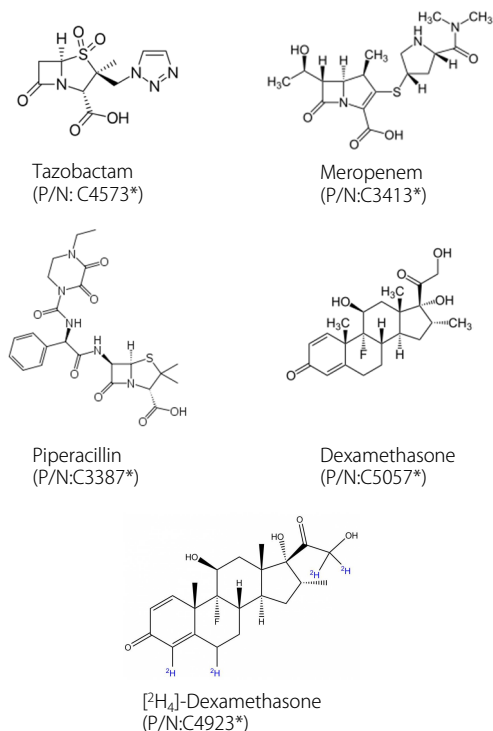


図1 各薬剤および安定同位体の構造式

*Alsachim製品番号



図2 全自動前処理装置付きLC/MS/MSシステム

表1 LC条件

Liquid chromatograph	
System	: Nexera X2
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9μm, P/N: 227-31012-03*)
Temperature	: 30 °C
Injection volume	: 25 μL
Mobile phases	: 0.1 mM ammonium fluoride-Water 0.1 mM ammonium fluoride-Methanol
Flow rate	: 600 μL/min
Analytical time	: 5 min

表2 MS条件

Mass spectrometer	
System	: LCMS-8060
Nebulizing gas	: 3 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp	: 150 °C
Heat block temp	: 500 °C
Interface temp	: 400 °C
CID	: 270 kPa

*島津ジーエルシー製品番号

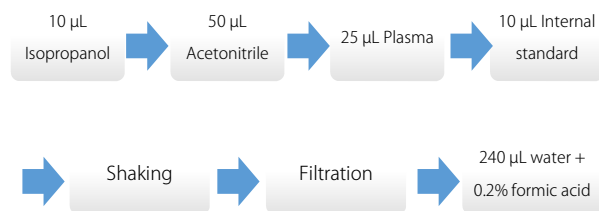


図3 血漿サンプル前処理

■ 結果

検量線の作成および定量下限

血漿に各薬剤を0.4、1、2、5、10、25、50、100 ng/mLとなるように添加し、検量点サンプルを作成しました。検量線の決定係数 (R²) は全ての薬剤で0.995以上を示しました。また、定量範囲 1-100 ng/mLにおいて、正確さ85-115%を満たしました。各薬剤の検量線と定量下限 (1 ng/mL) におけるMRMクロマトグラムを図4に示します。

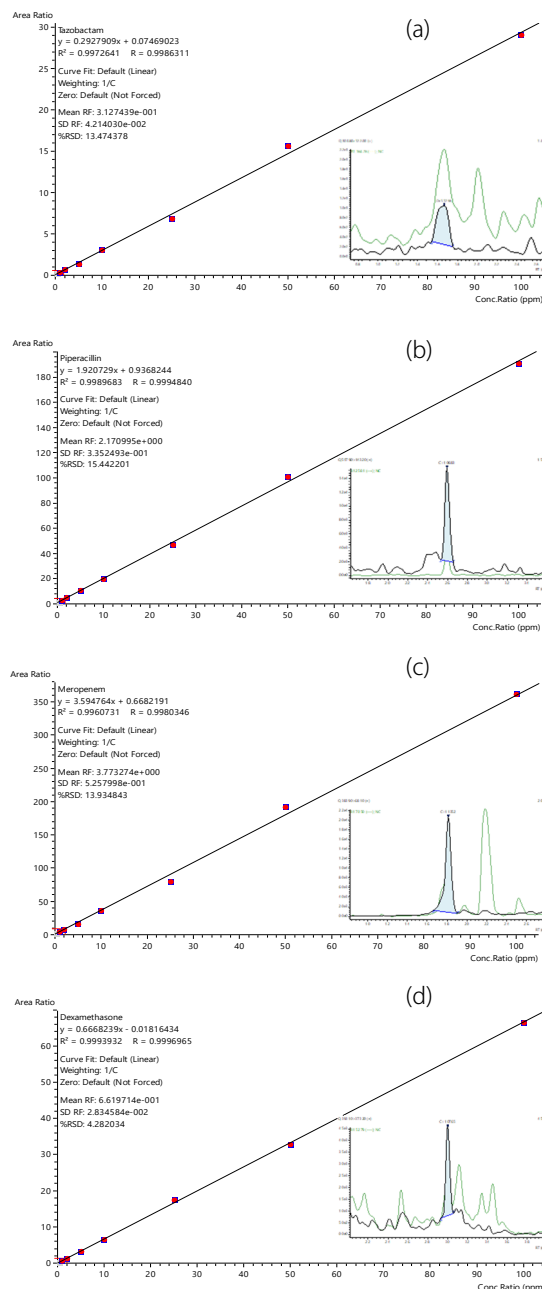


図4 (a) Tazobactam、(b) Piperacillin、(c) Meropenem および(d) Dexamethasoneの検量線と定量下限 (1 ng/mL) におけるMRMクロマトグラム

表3 3濃度のQCサンプルを用いた血漿中薬剤の併行精度と日差再現性

Compounds	QC Sample	Spiked Conc. (ng/mL)	Day 1st (n=6)			Day 2nd (n=3)			Day 3rd (n=3)		
			Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Tazobactam	Low	2	2.22	11.8	111	2.14	7.44	107	1.74	12.5	87
	Medium	20	22.6	6.12	113	18.9	9.60	94	18.5	3.04	92
	High	80	86.4	7.56	108	73.4	8.28	92	71.3	3.82	89
Piperacillin	Low	2	2.05	7.53	103	2.13	14.2	107	1.81	6.38	91
	Medium	20	20.9	11.9	104	20.1	14.5	101	21.5	5.41	107
	High	80	76.8	10.8	96	77.4	5.86	97	81.4	3.82	102
Meropenem	Low	2	2.00	5.86	100	2.12	12.0	106	1.788	2.59	89
	Medium	20	22.1	8.29	111	18.6	11.4	93	18.4	3.44	92
	High	80	80.2	9.01	100	73.3	2.61	92	72.6	3.45	91
Dexamethasone	Low	2	1.98	11.5	99	1.98	14.9	99	1.82	8.01	91
	Medium	20	20.8	9.57	104	22.6	14.1	113	20.4	6.88	102
	High	80	82.6	12.0	103	79.6	7.86	99	83.7	4.90	105

正確さと再現性

3濃度のQCサンプル（LQC: 2 ng/mL、MQC: 20 ng/mL、HQC: 80 ng/mL）を調製し、真度（正確さ）および精度（再現性）と3日間の日差再現性を確認しました。QCサンプルの前処理は、血漿に各薬剤を添加してから1時間静置し、図3と同様に行いました。表3に1日目（n=6）、2日目（n=3）、3日目（n=3）に取得したそれぞれのQCサンプルの測定結果を示します。Tazobactamの正確さは87% – 113%、精度は%RSD 12.5%以下、Piperacillinの正確さは91% – 107%、精度は%RSD 14.5%以下、Meropenemの正確さは89% – 111%、精度は%RSD 12.0%以下、Dexamethasoneの正確さは91% – 113%、精度は%RSD 14.9%以下でした。全ての薬剤において、正確さは85-115%以内、精度は15%以下と良好な結果を得ました。

■ まとめ

ステロイド系抗炎症剤 Dexamethasoneおよび抗生物質3種（Tazobactam、Meropenem、Piperacillin）の薬剤を対象とし、CLAM-2030による自動前処理、ならびにLCMS-8060による高感度一斉分析系を構築しました。本分析法は全自動で検体の前処理を行い、分析時間5分の高速分析を実現しました。LCMS-8060の高感度分析により血漿中1~100 ng/mLの範囲で正確さ85-115%を満たし、3濃度のQCサンプルにおいても、全ての薬剤で正確さ85-115%以内、並行および室内精度 %RSD 15%以下と良好な結果を得ました。

■ Reference

- 1) https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/covid-19tiryoyaku_vaccine.html
- 2) <https://www.antibioticresearch.org.uk/dexamethasone-evidence-based-treatment-for-hospitalised-covid-19-patients/>
- 3) TDM研究, 日本TDM学会誌, 2014, Vol31, No.4.

LCMS、CLAM、NexeraおよびShim-pack Scepter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

01-00112-JP 初版発行：2021年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。
改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、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/>

© Shimadzu Corporation, 2021

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ LCMS-8050
トリプル四重極質量分析計



＞ CLAM-2030
全自動LCMS前処理装置



＞ LCMS-8060NX
トリプル四重極質量分析計



＞ LCMS-TQ RX シリーズ
トリプル四重極質量分析計

関連分野

＞ ライフサイエンス

＞ 臨床研究・法科学

＞ 臨床研究

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ