

Application  
News

No. C153

LC/MS

全自動前処理 LC/MS/MS システムによる  
ヒト血漿中の抗不整脈薬の一斉分析

治療有効域が狭い薬物や中毒域と有効域が近接し投与管理が難しい薬物による薬物療法の実施に際しては、患者の薬物血中濃度を測定し、個々の患者について薬物動態学的・薬力学的な解析をもとに最適な薬用量や投与方法が設定されています。アプリケーションニュース C123 では全自動 LCMS 前処理装置 SCLAM-2000 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、前処理を含めた分析ワークフローの効率化についての検討をご紹介します。

本報ではこの全自動前処理 LC/MS/MS システムを用いて、抗不整脈薬 6 剤について迅速な一斉分析ワークフローを実現した研究成果をご紹介します。

T. Tsukamoto, D. Kawakami

■ 血漿中抗不整脈薬の全自動前処理分析

一般的に血漿試料の前処理としては有機溶媒の添加により除タンパクを行った後、固体成分を遠心分離して上清を分取するプロセスが必要となります。全自動前処理 LC/MS/MS システムでは血漿を分離後、採血管などをセットするだけでこれらの前処理を全自動で行い、連続して LC/MS/MS による分析を行います（図 1）。LC/MS/MS による分析と次の試料の前処理は並行して実行されますので、1 試料あたりの所要時間を大幅に短縮することが可能となります。

この分析例では血漿の前処理から LC/MS/MS による抗不整脈薬 6 剤および代謝物の一斉分析（表 1 および図 2）まで 1 試料あたり 7 分のサイクルタイムを実現しました。

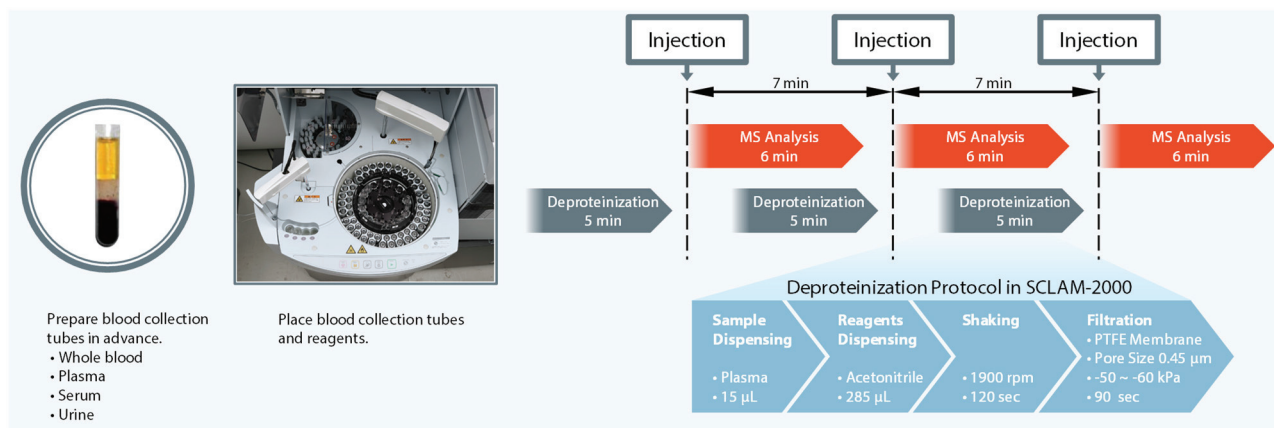


図 1 血漿試料の前処理ワークフロー

表 1 抗不整脈薬および代謝物

Compound	Molecular Formula	MRM Transition m/z
Amiodarone	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	646.0 > 58.1
Desethylamiodarone*	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	618.0 > 72.1
Bepidil	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O	367.1 > 84.1
Flecainide	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	415.0 > 301.0
Pilsicainide	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	272.9 > 110.1
Cibenzoline	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	262.9 > 115.0
Mexiletine	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO	180.1 > 58.0

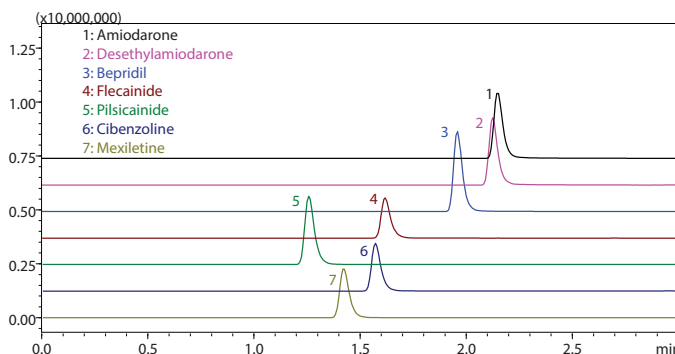


図 2 標準品添加ヒト血漿のマスククロマトグラム

## ■ 全自動前処理分析法の妥当性評価

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、QC 試料 (各濃度 n=5) の分析結果より真度 (正確さ) と精度 (再現性) の妥当性を評価しました (表 2)。いずれの抗不整脈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ました。定量下限を含む全範囲において QC 試料の正確さは 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。

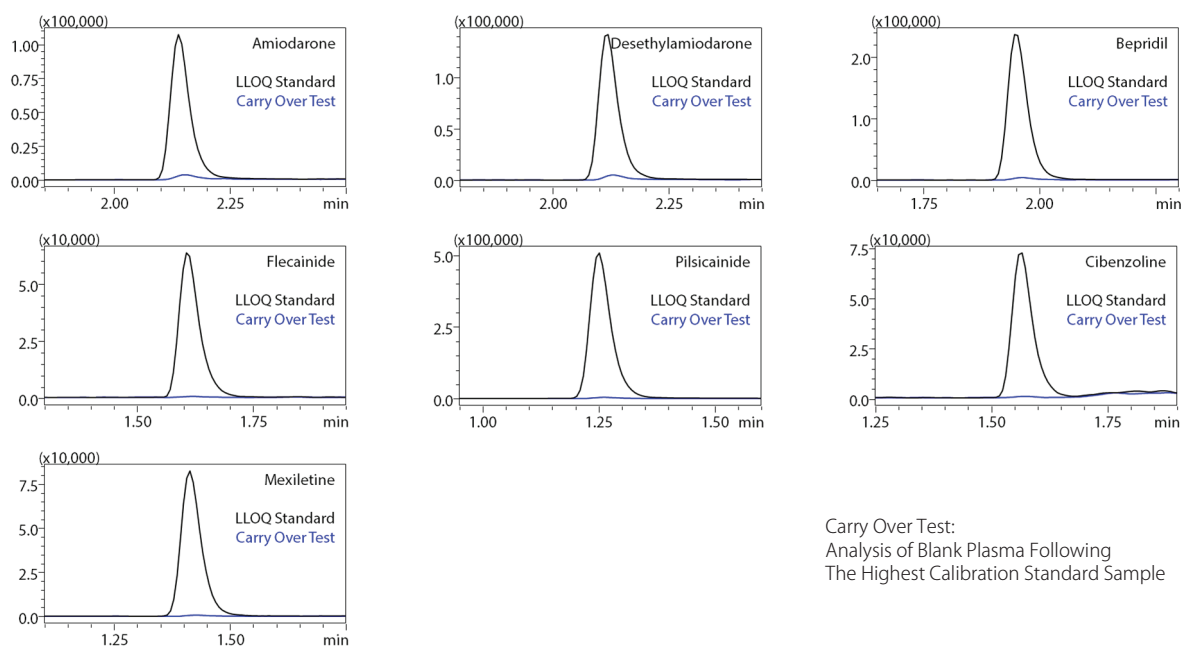
検量線の最高濃度試料の分析直後にブランク血漿を測定し、全自動前処理 LC/MS/MS システムにおけるキャリアオーバーについて確認しました。いずれの薬物についても、検量線の最低濃度試料におけるピーク強度と比較して、有意なキャリアオーバーは確認されませんでした (図 3)。

以上の結果から本報の全自動前処理 LC/MS/MS システムでは広範な濃度領域の試料の連続分析に際して、十分な信頼性をもった定量分析が可能であることが確認されました。

表 2 抗不整脈薬および代謝物一斉分析の妥当性評価結果

Compounds	Cal. Range [ng/mL]	Correlation Coefficient R	Accuracy %				Precision %RSD, n=5			
			LLOQ	Low	Medium	High	LLOQ	Low	Medium	High
Amiodarone*1	100-3000	0.9983	98.3	100.6	99.4	103.9	4.1	2.9	3.0	2.7
Desethylamiodarone*1	100-3000	0.9987	99.2	98.9	101.1	100.3	5.3	4.2	3.6	4.2
Bepidil*2	50-1500	0.9992	100.9	100.5	96.6	103.4	4.1	3.7	2.3	1.8
Flecainide*2	50-1500	0.9987	98.1	98.7	96.7	101.4	4.7	3.3	2.4	2.4
Pilsicainide*1	100-3000	0.9987	100.4	99.6	97.3	104.8	4.0	3.0	1.8	2.0
Cibenzoline*2	50-1500	0.9987	102.4	101.4	99.1	102.9	4.2	3.4	3.0	2.4
Mexiletine*1	100-3000	0.9984	104.5	107.4	106.3	107.8	3.8	3.9	2.6	2.6

\*1: 100 ng/mL for LLOQ, 250 ng/mL for Low, 1000 ng/mL for Medium, 3000 ng/mL for High  
\*2: 50 ng/mL for LLOQ, 125 ng/mL for Low, 500 ng/mL for Medium, 1500 ng/mL for High



Carry Over Test:  
Analysis of Blank Plasma Following  
The Highest Calibration Standard Sample

図 3 キャリーオーバー確認試験結果

表 3 分析条件 (妥当性評価)

System	: SCLAM-2000 + Nexera + LCMS-8060		
Protocol	: Plasma disp. 15 μL - Acetonitrile disp. 285 μL - Shaking 1900 rpm, 120 sec - Filtration 90 sec		
Column	: Shimadzu GLC Mastro C18 (50 mmL.×2.1 mmL.D., 3 μm)		
Mobile Phase	: A 0.1% Formic acid - Water, B 0.1% Formic acid - Methanol		
Flow Rate	: 0.4 mL/min		
Time program	: B Conc. 10% (0 min) - 100% (2 - 3.5 min) - 10% (3.51 - 6 min)		
Column Temp.	: 50°C	Injection Volume	: 0.2 μL
Probe Voltage	: 2.0 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

## ■ 用手前処理法との比較試験

アミオダロン血中濃度測定用ヒト血漿を用いて、用手前処理法と全自動前処理 LC/MS/MS システムによる全自動前処理分析法との比較試験を行いました。

用手前処理法では、手作業にて血漿を分取し、アセトニトリルを添加、混合して除タンパクを行いました。この試料を遠心分離の後、上清をバイアルに移し変えて LC/MS/MS 分析を行いました。一方、全自動前処理分析法では、血漿の分取から LC/MS/MS 分析までの全工程を本報のシステムを用いて全自動で行いました (図 4)。

アミオダロンおよびその代謝物であるデスエチルアミオダロンについて、手法間の定量値の比較を行いました (図 5、図 6、表 4 および表 5)。各試料より検出された幅広い濃度範囲において、用手前処理法と全自動前処理分析法の定量結果に良好な一致が確認されました。また、これらの結果から算出した両手法の寄与率 R2 は 0.95 以上となりました (図 7 および 8)。

本システムを用いた全自動前処理分析法は、従来の用手前処理法と同様の定量結果を得ることができる迅速かつ低負荷な分析手法として今後活用が期待されます。

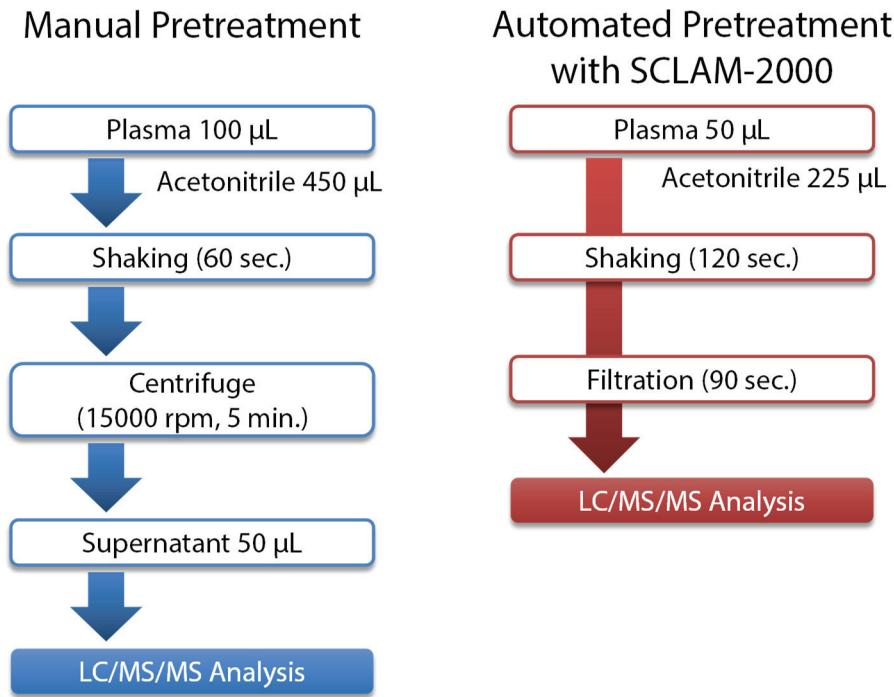


図 4 用手前処理法および全自動前処理分析法の前処理ワークフロー

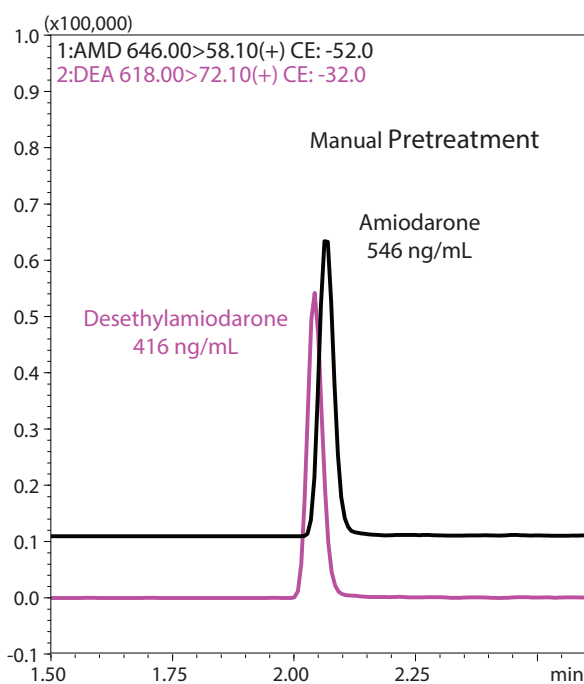


図 5 用手前処理法によるヒト血漿 (Sample 3) 分析結果

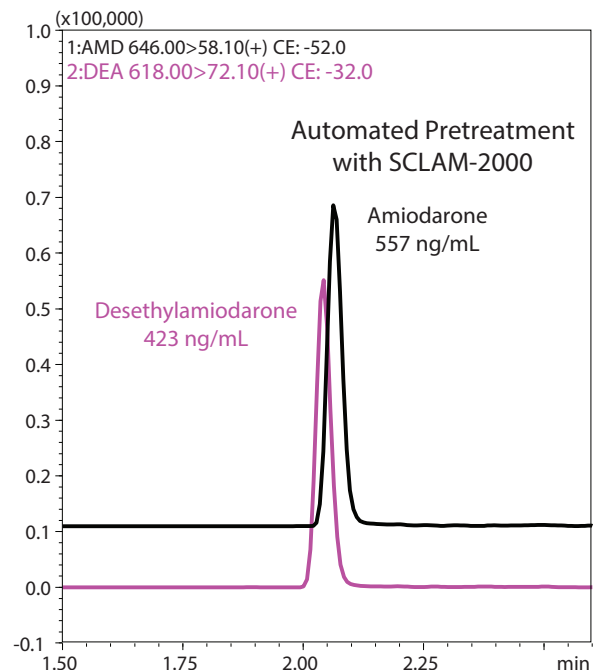


図 6 全自動前処理分析法によるヒト血漿 (Sample 3) 分析結果

表4 用手前処理法および全自動前処理分析法の定量結果 (アミオダロン)

	Amiodarone		
	Manual [ng/mL]	Automated [ng/mL]	Ratio %*
Sample 1	373	411	110.2
Sample 2	399	404	101.3
Sample 3	546	557	102.0
Sample 4	205	211	102.9
Sample 5	963	895	92.9
Sample 6	1,318	1,213	92.0
Sample 7	1,271	1,229	96.7
Sample 8	1,233	1,282	104.0
Sample 9	2,259	2,208	97.7
<b>Average</b>			<b>100.0</b>
<b>RSD %</b>			<b>5.8</b>

\* Automated Pretreatment / Manual Pretreatment

表5 用手前処理法および全自動前処理分析法の定量結果 (デスエチルアミオダロン)

	Desethylamiodarone		
	Manual [ng/mL]	Automated [ng/mL]	Ratio %*
Sample 1	304	271	89.1
Sample 2	412	366	88.8
Sample 3	416	423	101.7
Sample 4	271	240	88.6
Sample 5	717	654	91.2
Sample 6	151	150	99.3
Sample 7	431	408	94.7
Sample 8	664	628	94.6
Sample 9	940	1,080	114.9
<b>Average</b>			<b>95.9</b>
<b>RSD %</b>			<b>8.9</b>

\* Automated Pretreatment / Manual Pretreatment

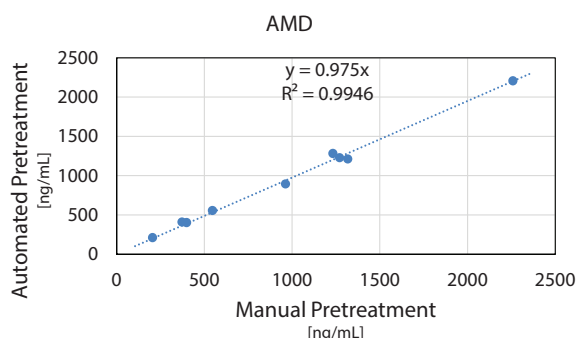


図7 アミオダロンの定量結果比較

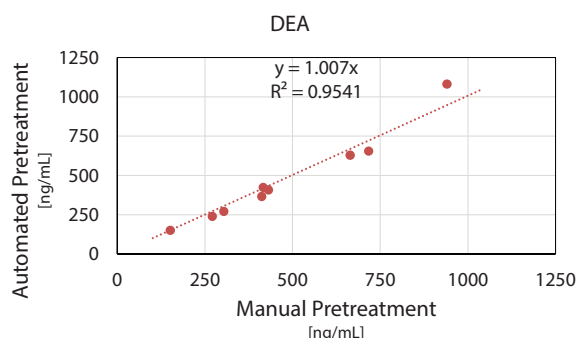


図8 デスエチルアミオダロンの定量結果比較

表6 分析条件 (前処理法比較試験)

System	: SCLAM-2000 + Nexera + LCMS-8040		
Protocol	Plasma disp. 50 $\mu$ L - Acetonitrile disp. 225 $\mu$ L - Mixing 1900 rpm, 120 sec - Filtration 90 sec		
Column	: Shimadzu GLC Mastro C18 (50 mmL $\times$ 2.1 mmI.D., 3 $\mu$ m)		
Mobile Phase	: A 0.1% Formic acid - Water, B 0.1% Formic acid - Methanol		
Flow Rate	: 0.4 mL/min		
Time program	: B Conc. 10% (0 min) - 100% (2 - 3.5 min) - 10% (3.51 - 6 min)		
Column Temp.	50 $^{\circ}$ C	Injection Volume	: 0.1 $\mu$ L
Probe Voltage	: 4.5 kV (ESI-positive mode)		
DL Temp.	: 250 $^{\circ}$ C	Block Heater Temp.	: 400 $^{\circ}$ C
Neb. Gas Flow	: 3 L/min	Drying Gas Flow	: 15 L/min

【謝辞】

本資料における検討には国立研究開発法人 国立循環器病研究センター病院 薬剤部 島本裕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。
  - ・ 本文書に記載の試料は、いずれも国立循環器病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許諾を得ていません。