

Application News

No. C196

LC/MS

LC/MS/MS によるヒト血漿中免疫抑制薬および抗真菌薬の同時分析

免疫抑制薬のプロドラッグであるミコフェノール酸モフェチルは、臓器移植後の拒絶反応を抑制する目的で使用されます。また、移植後には感染症を予防するため抗真菌薬としてポリコナゾールやイトラコナゾールが併用されます。

本報では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免疫抑制薬（ミコフェノール酸）、抗真菌薬（ポリコナゾールおよびイトラコナゾール）および代謝物の一斉分析例を紹介します。

T. Tsukamoto

■ ミコフェノール酸、ポリコナゾールおよびイトラコナゾールの一斉分析

コントロールヒト血漿に表 1 に示した免疫抑制薬（ミコフェノール酸）、抗真菌薬（ポリコナゾール、イトラコナゾール）および代謝物の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）。

表 1 免疫抑制薬、抗真菌薬および代謝物

Group	Compound	MRM transition <i>m/z</i>
Immunosuppressive drug	Mycophenolic acid (MPA)	321.1 > 207.1
Antifungal drug and metabolite	Voriconazole (VRC)	350.1 > 281.1
	Itraconazole (ITC)	705.2 > 392.2
	Hydroxyitraconazole (OH-ITC)	721.2 > 408.2
Internal Standard	MPA-d ₃	324.1 > 210.1
	VRC-d ₃	353.1 > 284.1
	ITC-d ₄	709.2 > 396.2
	OH-ITC-d ₄	725.2 > 396.2

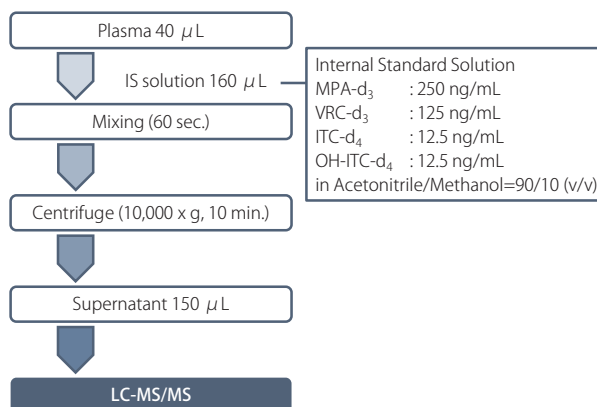


図 1 血漿試料の前処理ワークフロー

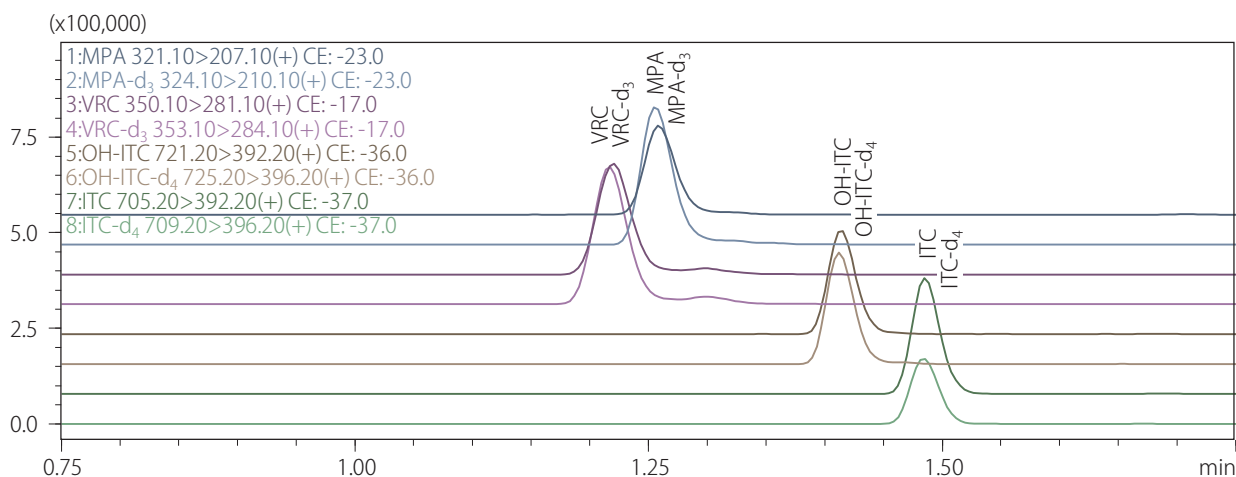


図 2 対象化合物および内部標準物質の代表的なクロマトグラム

■ 分析妥当性評価

標準品を添加したプールコントロール血漿より検量線を作成し、QC 試料 (各濃度 n=6) の分析結果より真度 (Accuracy) と精度 (Precision) の妥当性を評価しました (表 2)。いずれの化合物についても設定した濃度範囲にて良好な直線性を示し、定量下限を含む全範囲において QC 試料の真度は 100 ± 15 %以内となりました。また、精度は %RSD 15%以内となり、良好な再現性が得られました^{1),2)}。

独立コントロール血漿 6 種に標準品を添加し、分析結果よりマトリクス効果の影響を評価しました。いずれの化合物についても真度 100 ± 15 %以内および精度 %RSD 15 %以内であり、由来差による定量結果への顕著な影響は確認されませんでした。

表 2 免疫抑制薬、抗真菌薬および代謝物一斉分析の分析妥当性評価結果

Compound	Cal. Range [ng/mL]	Correlation Coefficient R	Accuracy %				Precision %RSD, n=6				Matrix Effect at Low conc. n=6	
			LLOQ	Low	Med	High	LLOQ	Low	Med	High	Accuracy %	Precision %RSD
MPA ^{*1}	100-20,000	0.9983	94.5	97.8	100.2	101.7	4.0	3.7	1.7	0.3	95.5	1.6
VRC ^{*2}	50-10,000	0.9987	102.3	103.1	102.2	102.9	3.5	1.2	1.0	0.7	106.1	1.0
ITC ^{*3}	5-1000	0.9992	92.8	98.0	102.9	92.4	5.3	2.3	2.1	2.6	99.2	2.4
OH-ITC ^{*3}	5-1000	0.9987	101.6	102.5	103.9	100.7	8.9	6.4	1.6	1.7	107.9	2.8

*1: 100 ng/mL for LLOQ, 200 ng/mL for Low, 1000 ng/mL for Med, 15000 ng/mL for High

*2: 50 ng/mL for LLOQ, 100 ng/mL for Low, 500 ng/mL for Med, 7500 ng/mL for High

*3: 5 ng/mL for LLOQ, 10 ng/mL for Low, 50 ng/mL for Med, 750 ng/mL for High

■ 血漿検体の測定

ミコフェノール酸モフェチル及びビトラコナゾール服用患者の血漿検体の分析例を図 3 に示しました。実際の血漿検体試料においてもコントロール血漿への添加試料と同様に、血漿中の夾雑物による顕著な妨害は確認されず、ミコフェノール酸、イトラコナゾールおよび代謝物の選択的な検出が可能でした。

LC/MS/MS を用いた本分析手法は血漿検体中の免疫抑制薬および抗真菌薬の同時分析手法として活用が期待されます。

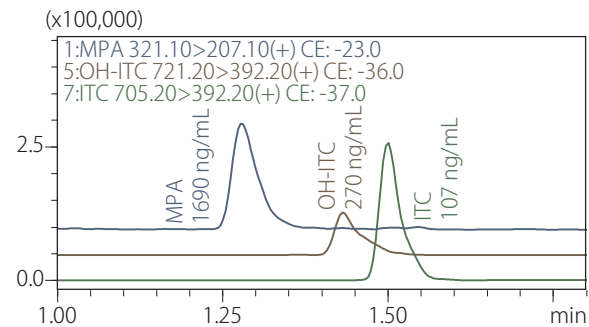


図 3 ミコフェノール酸モフェチル及びビトラコナゾール服用患者の血漿検体の測定結果

表 3 分析条件 (分析妥当性評価)

System	: Nexera™ + LCMS-8050		
Column	: Shimadzu Shim-pack Scepter™ C18 Metal Free (50 mmL×2.1 mmI.D., 3 μm)		
Mobile Phase	: A: 10 mmol/L Formic acid + 10 mmol/L Ammonium formate - Water B: 10 mmol/L Formic acid + 10 mmol/L Ammonium formate - Methanol		
Flow Rate	: 0.45 mL/min		
Time program	: B Conc. 55 % (0 - 0.55 min) - 100 % (0.9 - 2.1 min) - 55 % (2.11 - 3 min)		
Column Temp.	: 40 °C	Injection Volume	: 5 μL
Probe Voltage	: 4.0 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	: 15 L/min	Drying Gas Flow	: 5 L/min

<謝辞>

本資料における検討には東北大学病院薬剤部様より多大なご協力をいただきました

<参考文献>

- 1) Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry (2018, US FDA)
- 2) 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のパリデーションに関するガイドライン (2013、厚生労働省)

<免責事項>

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、いずれも東北大学病院にて採取、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す。

LCMS、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

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。