

DPiMS-8060 による血漿中薬物の分析 (1) -エベロリムスの定量分析-

齋木秀和、脇華菜

ユーザーベネフィット

- ◆ 血漿中に含まれる薬剤の濃度依存性のある分析が簡単にできます。
- ◆ カラムの劣化やコンディションに左右されない分析結果が得られます。

■はじめに

血液や血漿中に含まれる薬剤の濃度測定は、研究や臨床サンプル分析の場面で頻繁に行われる分析の一つです。そのため、簡単かつ迅速に結果を得られる手法が求められています。現在、サンプル中の薬剤の濃度を測定する場合はLC/MSがよく用いられています。しかし、LC/MSはカラムを使用しているため、血液や血漿中に含まれるタンパク質など、代謝産物に由来するマトリックス成分を慎重に除く必要があります。前処理を怠るとカラムの劣化やコンディションの変化が起こり、分析結果に影響を及ぼす可能性があります。それ以外にも、不十分な前処理は装置の汚染の原因となりメンテナンス頻度の増加にもつながります。

本稿では、LCMS™-8045へ装着した探針エレクトロスプレーイオン化 (Probe electrospray ionization; PESI) ユニットDPiMS-8060による分析方法を提案します。蛋白質除去のみの簡単な前処理のみで、市販血漿成分中に含まれるエベロリムスの濃度を計測した事例を紹介いたします。

■PESI法の原理と分析可能サンプル

LC/MSにより血漿中の薬物を分析する場合、流路やカラムの劣化を避けるために除蛋白のプロセスを慎重に行う必要があります。そのため、移動相やメソッドにも左右されますが、前処理から分析まで1サンプル当たり約30分程度の時間がかかります。

今回使用したPESI法は直接イオン化技術の一つであり、カラムを使用しません。そのため、カラムの劣化に由来する分析結果への影響は起こりません。さらに、一度にイオン化する液滴量が数十pLと微量であるため、イオン化を阻害するマトリックス効果の影響や装置の汚染が少ない分析方法です。このような特長をもつPESI法は、サンプル中の薬剤濃度などを簡単に測定したい場合に有用です。

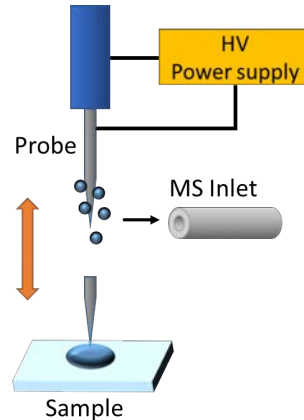
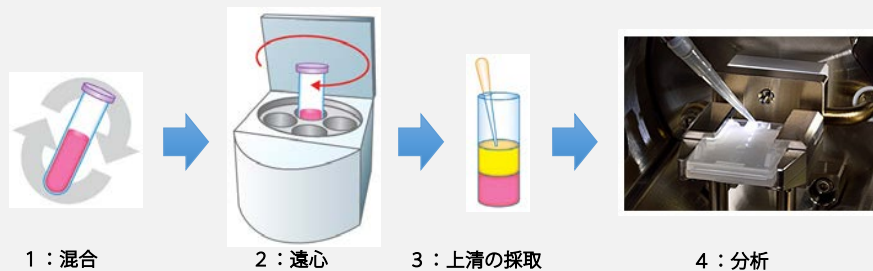


図1 DPiMS™-8060の外観とPESI法の原理



1 サンプル当たり約10分間で分析が完了

手順1: 血漿100 μLにLCMSグレードのエタノール100 μLを加え、ボルテックスで10秒混合

手順2: 混合液を10000 gで5分間遠心し、タンパク質を除去する

手順3: 上清を採取する

手順4: 専用のサンプルプレートに上清を10 μL添加し、分析を行う

図2 サンプル調整のワークフロー

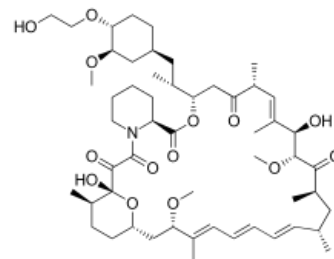


図3 エベロリムスの構造

■ エベロリムス標準品の測定

今回は、分子標的治療薬のひとつであるエベロリムス（図3）を用いて実験を行いました。血漿にはイオン化を阻害するマトリックス成分が多く存在しています。このような状況下で、PESI法による血漿中濃度の定量が可能かを確かめました。

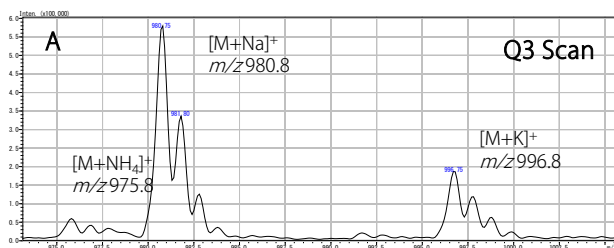
50 %エタノール/水 (v/v) に溶解したエベロリムス標準試料を用い、表1 と2 の装置条件を設定してQ3 スキャンモードで分析をおこないました。その結果、エベロリムスは主に3 種類の付加物イオンとして検出されました（図4 A）。次に、プロダクトイオンスキャンをおこないました。プリカーサーイオンはQ3 で検出された3 種類のイオンの中で最も強度が高かったNa付加イオン (m/z 980.8) としました。分析の結果、CE値を-51.0 に設定した場合に特徴的なフラグメントイオンが生成されることがわかりました（図4 B）。その中で最もシグナル強度が高かった m/z 389.3 を血漿中のエベロリムスの測定に用いました。

■ 血漿中のエベロリムスの測定

サンプル調整は図2 のワークフローに従っておこないました。まず、エベロリムスの最終濃度を様々に変えた血漿を調製しました。次に等量のエタノールを加えてボルテックスで混合したのちに遠心分離を行い、その上清を分析サンプルとしました。分析条件は表1 と表2 に示す値に設定しました。サンプルをMRMモードで分析し、得られた結果を元に作成した検量線が図5 です。

表1 PESI駆動条件

イオン化位置	: -37 mm
イオン化停止時間	: 200 msec
サンプル採取位置	: -45.0 mm
サンプル採取停止時間	: 50 msec
探針速度	: 250 mm/s
探針加速度	: 0.63 G



血漿中に添加したエベロリムスは3 ~50 ng/mLの濃度範囲で直線性が得られ、検量線の決定係数は $R^2=0.9972$ と良好でした。さらに、直線性が得られた範囲における各測定値のばらつきは%RSDで約20 %以内に収まっており、半定量的に分析可能であると考えられます (n=3)。また、前処理を含めた分析時間も1 サンプル当たり10 分程度でした。これらの結果から、簡便で迅速に薬物測定のモニタリングをおこなえると考えられます。

■ まとめ

DPiMS-8060 を用いて血漿中に添加したエベロリムスの濃度依存的な測定が可能でした。%RSDが約20 %以内に収まっていたことから、定量的な分析も可能と考えられます（図5）。また、分析にかかる時間は前処理も含めて1 サンプルあたり約10 分と、測定にかかる時間を大幅に短縮することが可能です。また、液体クロマトグラフィーを使用しない分析方法であるため、カラムや流路の汚染などに左右されない分析結果を得られます。

本稿で紹介した手法は、DPiMSシステムが様々なマトリックス成分を含む溶媒中の標的物質の測定に使用できる可能性を示したものであり、将来的に臨床サンプル分析などでの活用が期待されます。

■ 謝辞

本報告は京都大学の井上武弘様のご協力のもと実施されました。この場を借りて感謝いたします。

表2 質量分析計 分析条件

DL温度	: 250 °C
ヒートブロック温度	: 50 °C
インターフェイス電圧	: +2.45 kV(ESI – Positive mode)
サンプル採取停止時間	: 50 msec
スキャンレンジ	: m/z 10-1200 (Q3、プロダクトイオンスキャン時) m/z 10-500 (MRM分析時)
スキャンスピード	: 5,000 u/sec

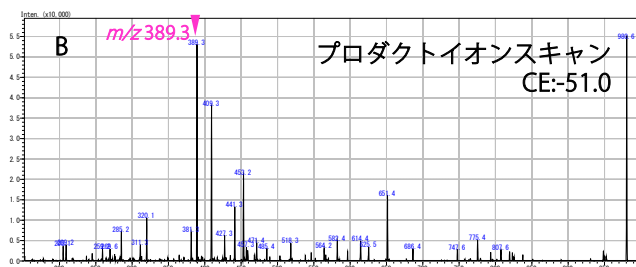
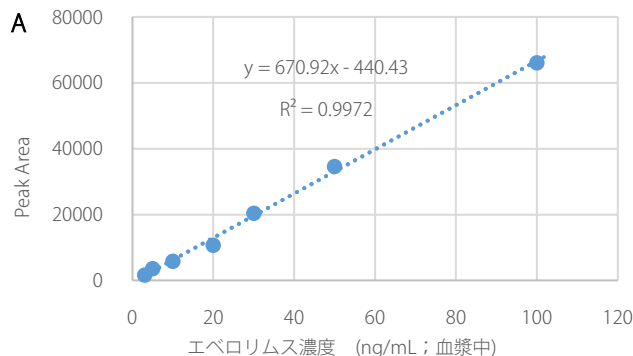


図4 エベロリムス標準品の測定結果 (5 ppm)



エベロリムス濃度 (ng/mL)	ピーク面積の平均値	SD	%RSD
3	1712	162.3	9.5
5	3635	467.2	12.8
10	5857	943.2	16.1
20	10756	1158.6	10.8
30	20487	2898.4	14.1
50	34640	4256.4	12.3
100	66089	13650.1	20.6

図5 血漿中のエベロリムス測定結果
A: 血中エベロリムス濃度の検量線 (n=3)、B: 各濃度の面積値の平均と標準偏差 (SD) から算出した%RSD

DPiMSおよびLCMS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

01-00339 初版発行：2022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。
最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022