

## シングル四重極質量分析計を用いた 血漿中のミコフェノール酸および代謝物の分析

吉川 航平、箕畑 俊和

### ユーザーベネフィット

- ◆ シングル四重極LC-MSを用いることで、ミコフェノール酸およびその代謝物を1検体当たり2分で分析可能です。
- ◆ 装置がコンパクトであるため、HPLCと同等の設置スペースで使用可能です。

### はじめに

生体試料中の薬物分析では、免疫測定法や液体クロマトグラフィー (LC) がよく用いられます。臨床現場では主に免疫測定法が用いられてきましたが、非特異反応や抗体試薬のロット間差が指摘されています。LCではダイオードアレイ検出器や蛍光検出器が主流ですが、夾雑成分に由来するピークとの分離のため、長い分析時間を要することがあります。また感度が十分でない場合もあります。

質量分析計 (MS) は  $m/z$  による質量分離が可能であるため、選択性が高く、スループットや感度の観点で優れています。そのため、LC/MSによる分析が現在主流となりつつあります。

本報では、血漿中のミコフェノール酸 (MPA) およびグルクロン酸抱合体 (MPA-G) について、シングル四重極質量分析計を用いて分析した例をご紹介します。シングル四重極質量分析計はトリプル四重極質量分析計と比べ安価であり、条件設定もシンプルなため、質量分析が初めての方でも簡単に分析を始めることが可能です。

### ■ サンプル調製

本報では、MPAおよびMPA-Gの標準試料が血漿に添加されている試薬キット (DOSIMYCO™) を用いました。ここでは、DOSIMYCOの検量線用試料、コントロール試料を用いました。また、それぞれの同位体標識化合物 [ $^{13}\text{C},^2\text{H}_3$ ]-MPA、 [ $^{13}\text{C},^2\text{H}_3$ ]-MPA-Gを内部標準試料として用いました。

MPA及びMPA-Gを添加した血漿サンプルの前処理方法を図1に示します。ここでは血漿サンプル50  $\mu\text{L}$  に対して、内部標準試料を25  $\mu\text{L}$ 、DOSIMYCO抽出液350  $\mu\text{L}$  を添加し、攪拌した後、遠心分離を行い、上清をバイアルに分注してLC/MS分析に供しました。

1. 検量線用試料/コントロール試料 50  $\mu\text{L}$
2. 内部標準試料を25  $\mu\text{L}$  添加  
( [ $^{13}\text{C},^2\text{H}_3$ ]-MPA, [ $^{13}\text{C},^2\text{H}_3$ ]-MPA-G )
3. 抽出液を350  $\mu\text{L}$  添加
4. 攪拌 (60 秒)
5. 遠心分離 (15,000  $\times g$ , 7 分)
6. 上清 200  $\mu\text{L}$  をバイアルへ分注

図1 前処理プロトコル

### ■ 分析条件

超高速液体クロマトグラフ Nexera™ X3とシングル四重極質量分析計 LCMS-2050を用いました (図2)。

LCMS-2050は、コンパクトでありながら、使いやすさや性能面にも秀でたシングル四重極質量分析計です。ESI法とAPCI法、両方の特長を有するイオン化である加熱型DUIS™を搭載し、質量範囲は  $m/z$  2-2000まで対応しています。



図2 Nexera™およびLCMS™ -2050

表1にHPLC及びMS、表2にSIMの分析条件を示します。

表1 分析条件

HPLC conditions	
System	: Nexera X3
Column	: DOSIMYCO trapping column DOSIMYCO analytical column
Mobile phases	: DOSIMYCO mobile phase A, B
Flow rate	: A/B 0.8 mL/min (for analysis) C 2 mL/min (for trap)
Column temp.	: 65°C
Injection volume	: 10 $\mu\text{L}$
MS conditions	
Instrument	: LCMS-2050
Ionization	: ESI
Mode	: SIM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 7.0 L/min
Desolvation Line temp.	: 355°C
DL temp.	: 100°C

表2 SIM条件

Compound	Polarity	$m/z$
MPA	+	338.0
[ $^{13}\text{C},^2\text{H}_3$ ]-MPA	+	342.0
MPA-G	+	514.0
[ $^{13}\text{C},^2\text{H}_3$ ]-MPA-G	+	518.0

また図3に流路構成を示します。注入された試料はトラップカラムによりトラップされた後、分析カラムにより分離され、質量分析計へ導入されます。

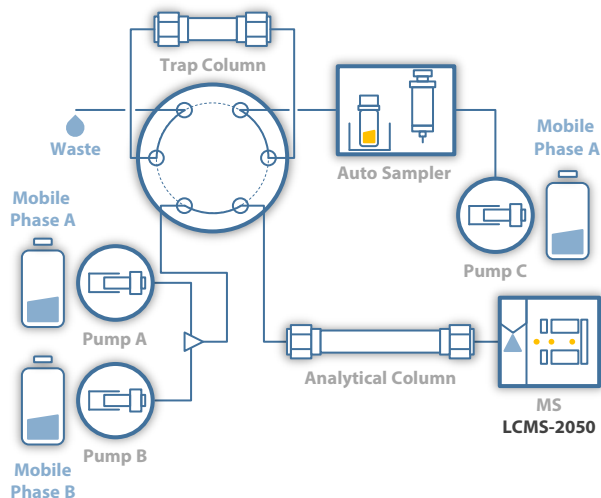


図3 前処理及びLC-MS システムの流路構成

### ■ 検量線用試料の分析結果

検量線用試料 6 点を各点 3 回繰り返し分析し、得られた検量線と検量線最下点のクロマトグラムを図4に示します。各化合物について検量線用試料の濃度範囲 (MPA: 0.1-50 mg/L、MPA-G: 1-250 mg/L) においてR<sup>2</sup>値が0.999以上の良好な直線性を得ました。また、各点の正確さについても各化合物で100±10%以内と良好な結果となりました。

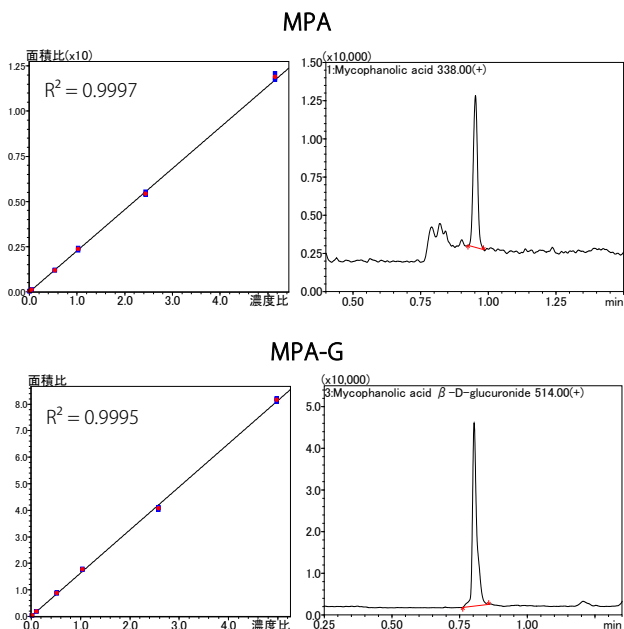


図4 検量線及び検量線最下点のクロマトグラム

### ■ コントロール用試料の分析結果

コントロール用試料3点を各点3回繰り返し分析し、得られた結果を表3に示します。いずれの化合物についても正確さは100±10%以内、濃度%RSDは5%以内と良好な結果が得られました。

表3 コントロールの分析結果

MPA			
試料	設定濃度 (mg/L)	正確さ% (average, n=3)	濃度%RSD (n=3)
Control 1	1.02	90.4	1.03
Control 2	8.13	92.3	0.19
Control 3	31.6	104.8	1.54

MPA-G			
試料	設定濃度 (mg/L)	正確さ% (average, n=3)	濃度%RSD (n=3)
Control 1	10.1	98.6	0.64
Control 2	43.1	97.8	0.33
Control 3	168.3	103.6	4.03

### ■ まとめ

血漿中のミコフェノール酸 (MPA) およびグルクロン酸抱合体 (MPA-G) について、シングル四重極質量分析計を用いて分析しました。2分という短い分析時間で、いずれの成分においても設定した濃度域で良好な直線性、正確さが得られました。シングル四重極質量分析計を用いることで高感度かつハイスループットで生体試料中の薬物を分析できることが示されました。

シングル四重極質量分析計は比較的低コストで質量分析計の経験が無い方でも扱いやすい装置です。幅広い薬剤への応用により、本分野における質量分析法の発展が期待されます。

LCMS、Nexera、およびDOSIMYCOは、株式会社島津製作所またはその関係会社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

01-00433-JP 初版発行：2022年 9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本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 に登録いただきますと、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