

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を用いた 血漿中のセフェム系抗生物質の一斉分析

吉川 航平、箕畑 俊和

ユーザーベネフィット

- ◆ 12種類のセフェム系抗生物質の一斉分析が可能です。
- ◆ 生体試料の前処理からLC-MS/MS測定までを自動で行うことが可能です。
- ◆ 測定時間7分のサイクルで再現性良く分析可能です。

■はじめに

セフェム系抗生物質は、ペニシリンやカルバペネム系抗生物質と同様にβ-ラクタム系抗生物質の一種であり、経口剤や注射液に使用されています。一般的に、セフェム系抗生物質は副作用の頻度や程度も小さく、安全性が高いので、適応できる症例が多いと言われています。

本報では、血漿中のセフェム系抗生物質を測定対象とし、全自動で生体試料の前処理を可能とするCLAM-2030を用いたLC-MS/MSによる一斉分析法を紹介します。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い、検体の取り違えや手技によるばらつきを低減することが可能です。

セフェム系抗生物質は主に50種類存在しますが、今回はそのうち12成分（セファドロキシル、セファピリン、セファクロル、セファレキシン、セフロキシム、セフォタキシム、セフォキシチン、セファゾリン、セファラジン、セフォペラゾン、セファマンドール、セファロチン）を対象とした分析系を構築しました。



図1 全自動前処理装置付きLC-MS/MSシステム

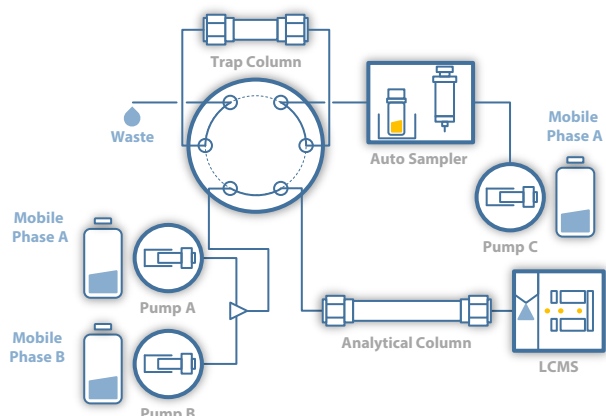


図2 流路図 (Trap & Elute system)

■分析条件

装置は全自動LCMS前処理装置CLAM-2030、超高速液体クロマトグラフ Nexera™ X2とトリプル四重極質量分析計 LCMS-8060を用いました (図1)。

表1にHPLC及びMSの分析条件を示します。今回は免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNE™に含まれるトラップカラム、分析カラム、移動相を用いました。LC-MS/MSへ注入した分析試料はトラップカラムにより濃縮・精製後、分析カラムにて分離します (Trap & Elute; 図2)。また、内部標準物質 (IS) として用いた安定同位体標識化合物3成分はAlsachim製を用いました。

表1 分析条件

HPLC conditions			
HPLC conditions	Nexera X2		
Column	: DOSIMMUNE trapping column DOSIMMUNE analytical column		
Mobile phases	: DOSIMMUNE mobile phase A, B		
Flow rate	: A/B 0.5 mL/min (for analysis) C 1.2 mL/min (for trap)		
Time program	: 1%B(0-0.5 min) - 30%B(3 min) - 98%B(4-5 min) - 1%B(5.01-7 min)		
Column temp.	: 40°C		
Injection volume	: 1 µL		
MS conditions			
MS conditions	LCMS-8060		
Ionization	: ESI-positive		
Nebulizing gas flow	: 3 L/min		
Drying gas flow	: 10 L/min		
Heating gas flow	: 10 L/min		
Interface temp.	: 300°C		
DL temp.	: 200°C		
Heat block temp.	: 400°C		
Mode	: MRM		
Analyte	MRM	R.T (min)	
Cefadroxil	364.00>114.05	1.221	
Cefapirin	424.00>292.05	1.812	
Cefaclor	368.00>174.10	1.957	
Cefalexin	348.00>158.10	2.047	
Cefuroxime	442.00*2>364.05	2.176	
Cefotaxime	456.00>125.05	2.284	
Cefoxitin	445.00*2>215.10	2.297	
Cefazolin	455.00>323.10	2.315	
Cephadrine	350.00>176.15	2.320	
Cefoperazone	646.00>143.15	2.939	
Cefamandole	463.00>158.05	3.110	
Cephalothin	414.00*2>152.00	3.520	
[2H5]-Cefaclor (C7546)*1	373.00>179.15	1.941	
[2H5]-Cefalexin (C6695)*1	353.00>158.05	2.032	
[13C,2H3]-Cefotaxime (C6106)*1	460.00>125.05	2.269	

*1 Alsachim製品番号

*2 [M+NH4]+

■セフェム系抗生物質標準品の分析

セフェム系抗生物質12成分を0.01、0.05、0.1、0.5、1、5 µg/mLになるよう検量点サンプル6点を作成しました。キャリブレーター6点を各点6回繰返し分析し、得られた検量線を図3、検量点最下限のクロマトグラムを図4に示します。

各化合物について、キャリブレーターの濃度範囲でR²値0.998以上の良好な直線性を得ました。また、各検量点の正確さについても各化合物で100±10%以内、面積値再現性(%RSD)も15%以下と良好な結果となりました。

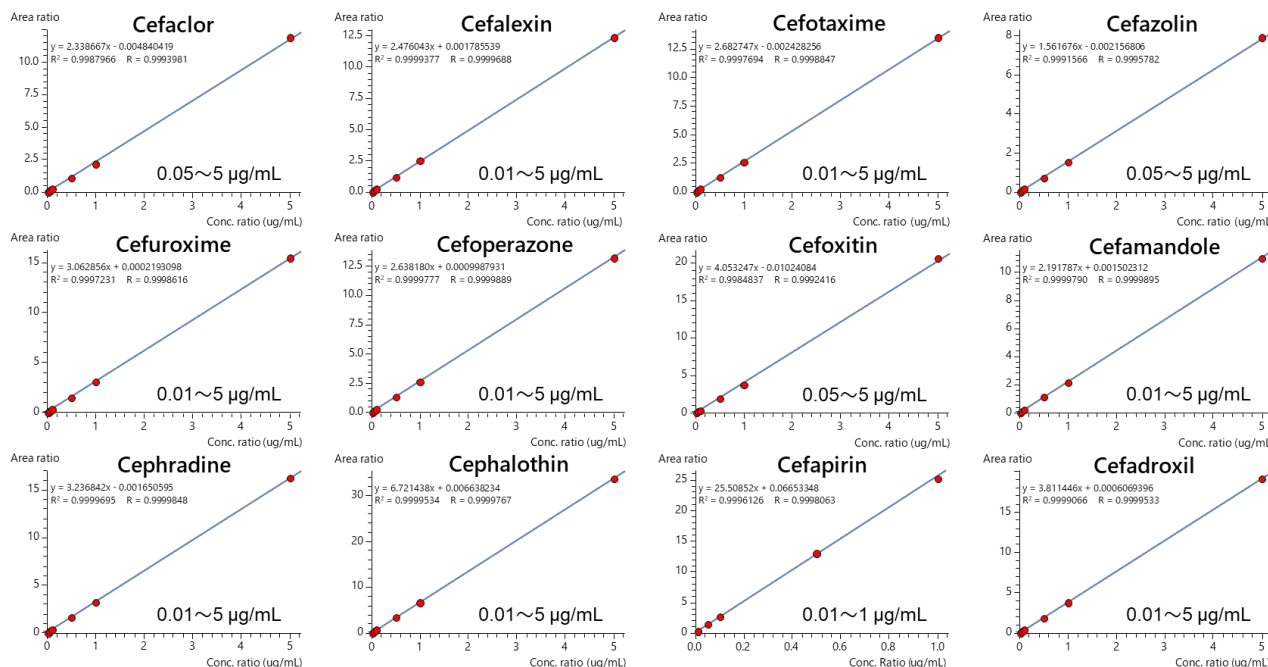


図3 セフェム系抗生物質12成分の検量線

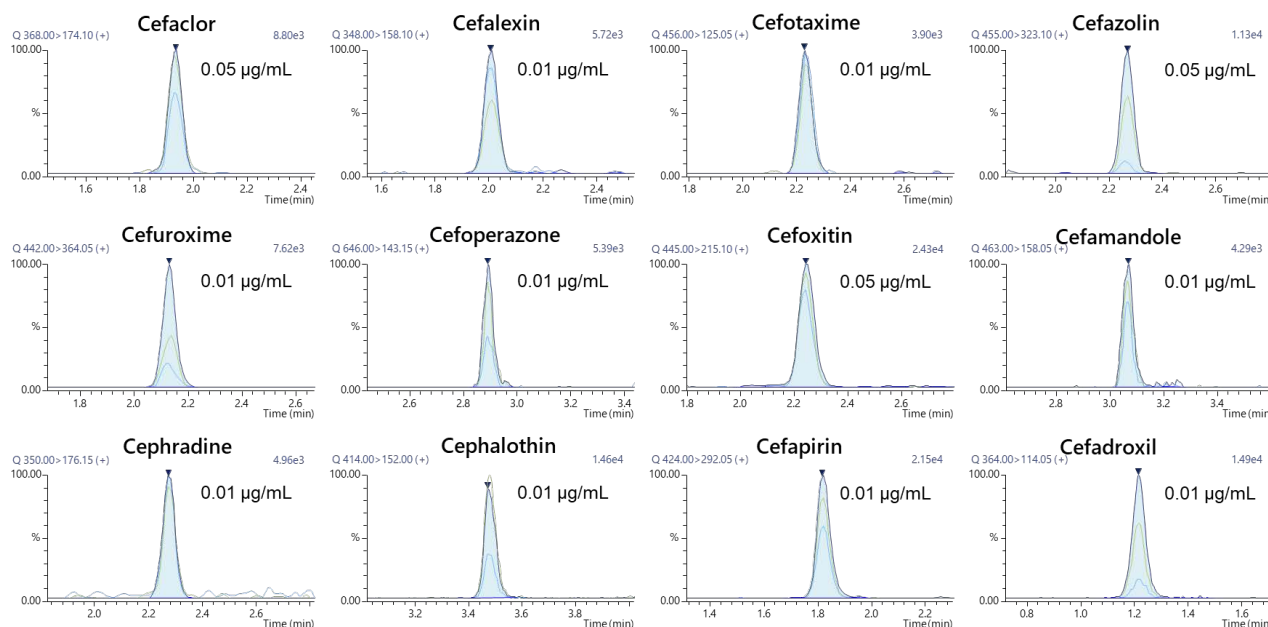


図4 セフェム系抗生物質12成分の検量線最下限におけるMRMクロマトグラム

■ CLAM-2030を用いた血漿中セフェム系抗生物質の分析

セフェム系抗生物質12成分を0.3、3 µg/mLになるよう血漿に添加したサンプルを作製しました。ISは各5 µg/mLとなるよう調製しました。

CLAM-2030での血漿サンプルの前処理工程を図5に示します。まず75%イソプロパノールを20 µL添加し、血漿サンプル20 µL、ISを10 µL、メタノールを100 µL添加し攪拌した後、吸引ろ過を行い、LC-MS/MS分析を行いました。

2濃度の血漿サンプルによる測定結果を表2に示します。前処理により血漿サンプル中のセフェム系抗生物質は20/150に希釈されるため、測定サンプルの終濃度はそれぞれ0.04、0.4 µg/mLになります。

正確さは各化合物で100±15%以内、濃度値再現性(%RSD)も15%以下と良好な結果となりました。

■ まとめ

セフェム系抗生物質12成分について、CLAM-2030による自動前処理からLC-MS/MSによる一斉分析系を構築しました。いずれの成分においても設定した濃度域において良好な直線性、正確さが得られました。また、血漿に添加したサンプルにおいても正確さは各化合物で100±15%以内、濃度値再現性(%RSD)も15%以下と良好な結果が得られました。

CLAM-2030による検体の自動前処理が約3分、LCMS-8060による分析時間が7分で、トータル10分で測定結果を得ることができます。

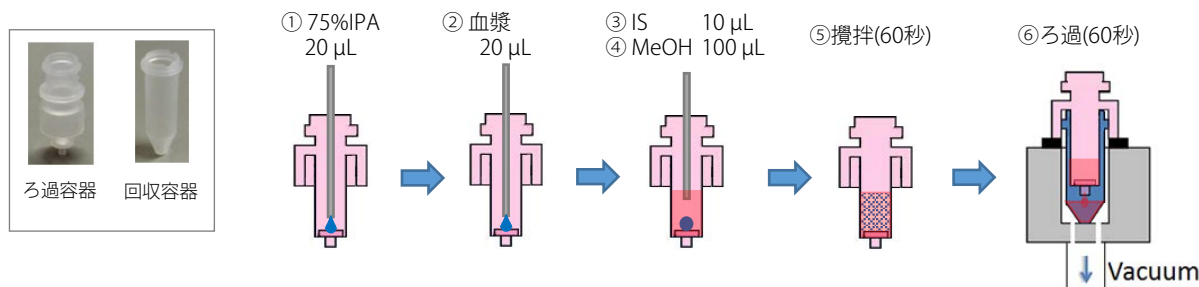


図5 CLAM-2030による前処理工程

表2 血漿サンプル中のセフェム系抗生物質の測定結果

設定濃度 (µg/mL)	0.3 (終濃度0.04)			3 (終濃度0.4)			
	化合物	測定値 (µg/mL)	正確さ%	濃度 %RSD	測定値 (µg/mL)	正確さ%	濃度 %RSD
Cefaclor		0.28	92.4	12.1	2.89	96.3	1.8
Cefalexin		0.30	100.4	5.0	3.14	104.5	5.3
Cefotaxime		0.27	89.8	2.5	2.87	95.5	3.5
Cefazolin		0.28	94.7	5.1	2.97	99.1	2.2
Cefuroxime		0.29	96.4	5.9	2.85	95.1	3.5
Cefoperazone		0.29	98.1	1.9	2.97	99.0	4.3
Cefoxitin		0.29	96.7	5.5	2.99	99.6	5.4
Cefamandole		0.29	97.2	2.6	3.02	100.6	6.4
Cephadrine		0.29	96.2	2.3	2.96	98.8	3.0
Cephalothin		0.28	93.6	2.3	2.95	98.4	4.7
Cefapirin		0.32	107.7	6.3	3.28	109.3	2.9
Cefadroxil		0.33	110.9	5.7	3.42	113.9	2.0

LCMS、Nexera、CLAM、およびDOSIMMUNE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

01-00444-JP 初版発行：2023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。
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。