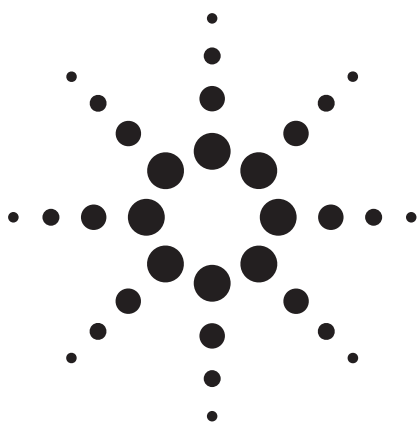


# LC/トリプル四重極質量分析計を用いた 血液中の免疫抑制剤の迅速な定量



## アプリケーション

### 臨床毒物

## 著者

Michael Zumwalt  
Agilent Technologies, Inc.  
Englewood, CO  
USA

Linda Côté  
Agilent Technologies, Inc.  
Montreal, Quebec  
CA

Jeffrey Keever  
Agilent Technologies, Inc.  
Cary, NC  
USA

Uwe Christians and Jamie Bendrick-Peart  
Clinical Research & Development  
Department of Anesthesiology  
University of Colorado Health Sciences Center  
Denver, CO  
USA

## 要約

Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計 (QQQ) を用いて、ヒト血液中の免疫抑制剤の迅速かつ高感度測定を行いました。QQQ は、簡単なタンパク質沈殿処理以上のサンプルクリーンアップを必要とせずに、良好な定量能力を示します。移動相流量 450  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、粒径 3.5  $\mu\text{m}$  の Agilent Cyano カラムを使用し、全 3 種類の化合物 (タクロリムス、

シクロスポリン A、シロリムス) は 3 分以内で分析できました。それぞれ 0.1% の酢酸を含む水とアセトニトリルを使用することで、シロリムス、タクロリムス、エベロリムス [内部標準] のナトリウム付加イオン  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  と、シクロスポリン A の脱プロトン化イオン  $[\text{M} - \text{H}]^-$  の分析で、最高の感度を実現します。800 fg というわずかな注入量で、検出下限  $[\text{S}/\text{N} = 3:1]$  を実現しました。

## 緒言

シロリムス、カルシニューリン阻害剤シクロスポリン、タクロリムスのような免疫抑制剤は、臓器移植患者の治療に一般的に使用される医薬品です。これらの医薬品は、患者の免疫系を抑制し、それにより臓器移植の拒絶反応のリスクを減らすために使用されます。治療濃度範囲が狭いこと、そして中毒の可能性があるため、血液濃縮物中でこれらの化合物を正確にモニタリングする必要があります。

高スループット分析を用いて必要な定量下限 (タクロリムスとシロリムスは 1 ng/mL 以下) を達成するために、一般的な分析方法としては、LC ポンプによる固定相抽出カートリッジへの大容量 ( $> 0.1 \text{ mL}$ ) 注入 (オンライン注入)、クリーンアップ、トラッピングに続き、2 台目のポンプにより、クロマトグラフ分離のために、トラップした化合物をカラムに溶出させます [1]。上記の方法では、分析所要時間は 2.5 分ほどの短さです [2, 3]。しかし、異なるシステム構成の性能、特に感度に関して、比較する際、実際のオンカラム注入量は重要な検討事項で



す。このような検討は、分析する必要のある血液サンプル量や、サンプル抽出処理をどの程度行う必要があるかを判断する手助けになります。

著者 (Christians) は、免疫抑制剤化合物を 1 ng/mL 含む、全血からの簡単なタンパク質沈殿処理の後に得られる、100  $\mu$ L の上澄みを注しました。この量は、20 pg のオンカラム注入量に相当します。本研究では、SPE が装備されていない LC システムに、上澄み 40  $\mu$ L を注しました。結果として、ここで調べられているサンプル量は一般的な分析法でのそれよりも少なくなり、SPE を使用した追加のサンプルクリーンアップ処理を行わずに済みます。

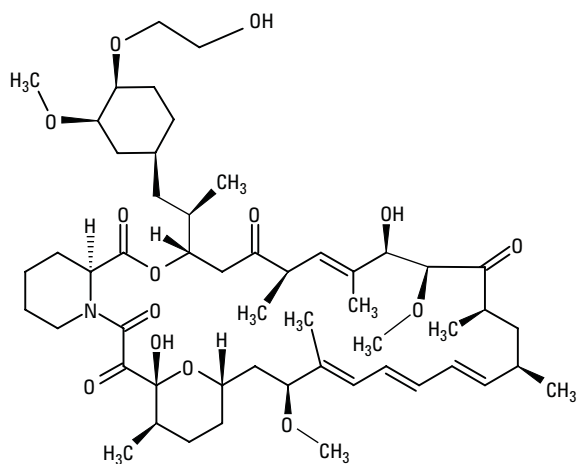
## 実験

### サンプル前処理

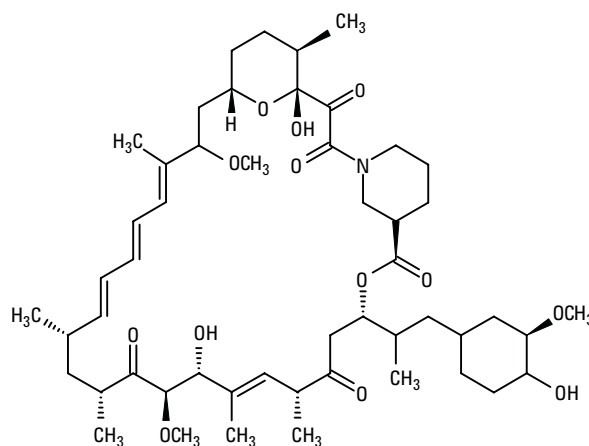
本研究で分析した化合物は、タクロリムス、シロリムス、シクロスポリン A です。下に構造式を示します。

免疫抑制剤はそれぞれ 200  $\mu$ L のヒト全血にスパイクされます。抽出には、まず 800  $\mu$ L の 0.2 M ZnSO<sub>4</sub>/MeOH (30:70 v/v) を加えます。遠心分離後、約 800  $\mu$ L の上澄みをサンプルバイアルに移し、LC/MS/MS システムに注します。内部標準であるエベロリムスの濃度は 100 ng/mL です。

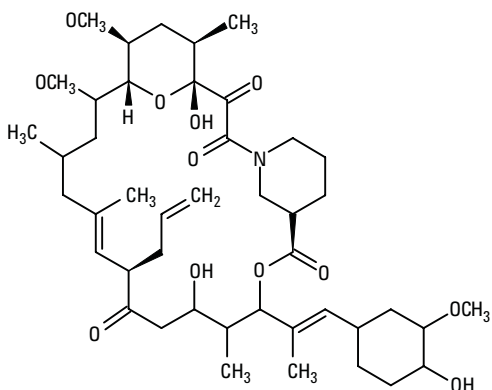
### Compounds Analyzed



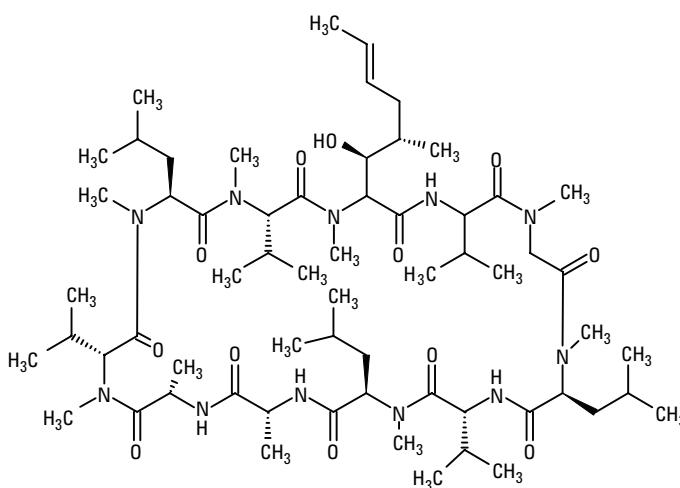
**Internal standard:**  
Everolimus, C<sub>53</sub>H<sub>83</sub>NO<sub>14</sub>  
[M + Na]<sup>+</sup> = 980.6



Sirolimus, C<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>  
[M + Na]<sup>+</sup> = 936.5



Tacrolimus, C<sub>44</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>12</sub>  
[M + Na]<sup>+</sup> = 826.5



Cyclosporin A, C<sub>62</sub>H<sub>111</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>  
[M - H]<sup>-</sup> = 1200.8

## LC/MS/MS 機器構成

本研究で使用した LC/MS/MS システムは、Agilent 1200 シリーズデガッサ、バイナリポンプ、ウェルプレートオートサンブラ、カラム恒温槽、Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計、エレクトロスプレーイオン源 (ESI) から構成されます。Agilent MassHunter QQQ コントロールコンソールと定性および定量データ解析ソフトウェアプログラムにより、システムコントロールとデータ解析を行いました。LC と MS 条件は、「LC/MS メソッド詳細」に示します。

メソッド開発の目的は、血液中の免疫抑制剤を定量するために、短時間で高感度な分析を得ることです。良好なクロマトグラフ分解能とピークの対称性を維持しながら、様々な溶媒、流量、カラムパラメータを最適化して高速化を検討しました。粒径 3.5  $\mu\text{m}$  の CN カラム、450  $\mu\text{L}/\text{min}$  のアイソクラティック流量、水、アセトニトリル、酢酸を使用したシンプルな溶媒システムにより、LC/MS で利用可能な技術と短い分析時間で化合物を溶出できることがわかりました。クロマトグラフ条件は、P.Hatsis と D.A.Volmer の以前の研究に基づき、測定対象成分間のイオン抑制の可能性を低減しました。[4]

また、異なる LC 溶媒を必要とするメソッド開発中に、プロトン付加  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、脱プロトン付加  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 、ナトリウム付加  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  された分子イオンのマルチプルリアクションモニタリング (MRM) シグナル強度を比較しました。ナトリウム付加イオンはシロリムス、タクロリムス、エベロリムスの最高レスポンスから作成されたため、すべて 2.3 分以内の化合物の溶出中に正イオンが分析されました。シクロスポリン A は、脱プロトン化イオン  $[\text{M} - \text{H}]^-$  が最もシグナル強度があったため、シクロスポリン A の溶出後半の間に、イオン化の極性が負モードに切り換えられました。

## LC/MS メソッド詳細

### LC 条件

Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ SL、ウェルプレートサンブラ、カラム恒温槽、ニードルシートキャピラリとインジェクタバルブの間のインラインフィルタ

カラム:	Agilent ZORBAX XDB-CN, 2.1 x 150 mm, 3.5 $\mu\text{m}$ (P/N 960967-905)
ガードカラム:	Agilent ZORBAX XDB-CN, 2.1 x 12.5 mm, 5 $\mu\text{m}$ (P/N 821125-935)
カラム温度:	50 $^{\circ}\text{C}$
移動相:	A = 0.1% 酢酸水溶液 B = 0.1% 酢酸アセトニトリル (ACN) 溶液

両移動相中に存在するナトリウムの量はラボごとに異なる可能性があります。測定対象成分のナトリウム付加体形成の可能性を高めるには、50  $\mu\text{M}$  の酢酸ナトリウムを加えます。

流量:	0.45 mL/min
アイソクラティック:	0 ~ 3 分は 52% B 3.1 ~ 4.0 分は 100%
終了時間:	3.0 分
ポストランタイム:	1.0 分
注入量:	40 $\mu\text{L}$

100% B でのカラム洗浄には、1 分のポストランタイムが使用されることに注意する必要があります。参考文献 [4] で Hatsis と Volmer が述べたように、カラム洗浄は注入 50 回ごとに行う必要があります。

### MS 条件

モード:	Agilent G1948 A イオン源を使用した ポジティブ ESI
ネブライザ:	40 psig
乾燥ガス流量:	10 L/min
乾燥ガス温度:	350 $^{\circ}\text{C}$
$V_{\text{cap}}$ :	4,000 V
Q1 分解能:	2.5 amu
Q2 分解能:	0.7 amu
MRM:	表 1 のような、タクロリムス、シロリムス、シクロスポリン A の推移。フラグメンター (Frag)、衝突エネルギー (CE)、デュエルタイムが含まれます。

表 1. MRM 推移のデータ取込パラメータ

化合物	プリカーサイオン	生成物 イオン ( $m/z$ )	Frag (V)	CE (V)	デュエル (msec)
<b>セグメント 1</b> (0–2.25 分)					
タクロリムス	826.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	616.2	200	40	150
シロリムス	936.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	409.2	360	60	150
エベロリムス (IS)	980.7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	389.4	360	60	150
<b>セグメント 2</b> (2.25–3 分)					
シクロスポリン A	1200.7 $[\text{M} - \text{H}]^-$	1088.6	260	30	250

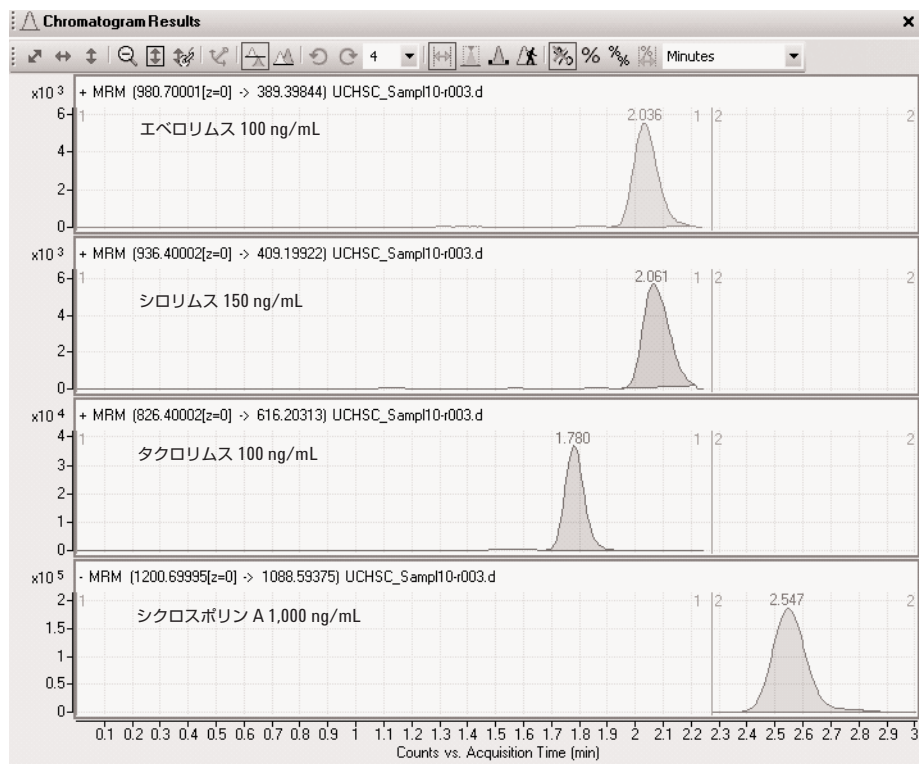


図 1. 全 4 種類の免疫抑制剤化合物を含む最高濃度のクロマトグラフ溶出形状。正極性 (0 ~ 2.25 分) と負極性 (2.25 ~ 3.0 分) 間のセグメント分離に注意してください。

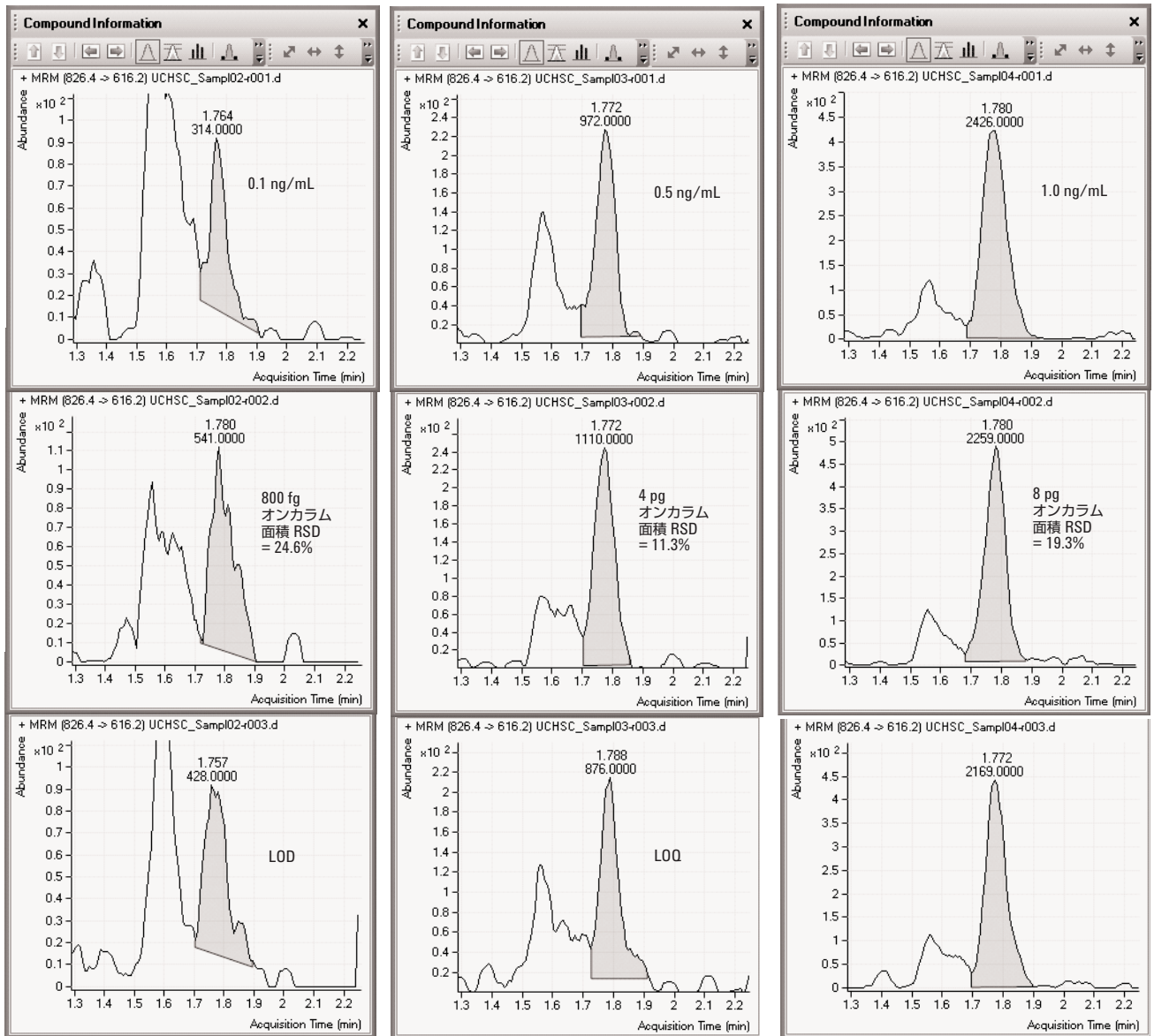


図 2. タクロリムス (注入 3 回) の最も低濃度の 3 つの積分済みピーク

## 結果と考察

本研究では、免疫抑制剤の治療域用量測定は、タクロリムスとシロリムスでは 1 ~ 50 ng/mL、シクロスポリン A では 1,000 ng/mL であると考えられます。全 4 種類の化合物を含む最高濃度のクロマトグラムは図 1 のとおりです。定量下限 (LOQ) は、3 回以上の注入でのピーク面積カウント再現性が 20% 以下のパーセント相対標準偏差 (% RSD) を示す濃度になるように規定されます。タクロリムスの結果は図 2 のとおりです。3 種類の最低濃度で 3 回注入した結果が記載されています。LOQ は 0.5 ng/mL に規定され、図 2 でのピークの明らかな存在と、積分した面積と図 3 の直線性の一致に基づく LOD は、0.1 ng/mL に規定されます。タクロリムスの 3 桁を超える直線性は図 3 のように、係数  $R^2 > 0.997$  です。タクロリムスのリテンションタイムはわずか 1.8 分であることに注意してください。

図 4 ~ 7 では、シロリムスとシクロスポリン A に対する繰り返し分析の結果を示しています。3 桁を超える優れた直線性は注目に値します。さらに、タクロリムスの場合のように、直線、原点の無視、重み付けなしなどの曲線近似設定値はシロリムスに対しても良く機能するため、係数  $R^2 > 0.999$  になります。シクロスポリン A の直線性に関しては、原点が含まれるように強制することで、係数は  $R^2 > 0.997$  になりました。

シロリムスとシクロスポリン A のリテンションタイムは、それぞれわずか 2.0 分と 2.5 分です。シロリムスの検出下限は 0.1 ng/mL で、定量下限は 0.5 ng/mL です。さらに、最低濃度のピークは微量であることが明らかですが、これらのピークはまだ上手く積分できます。

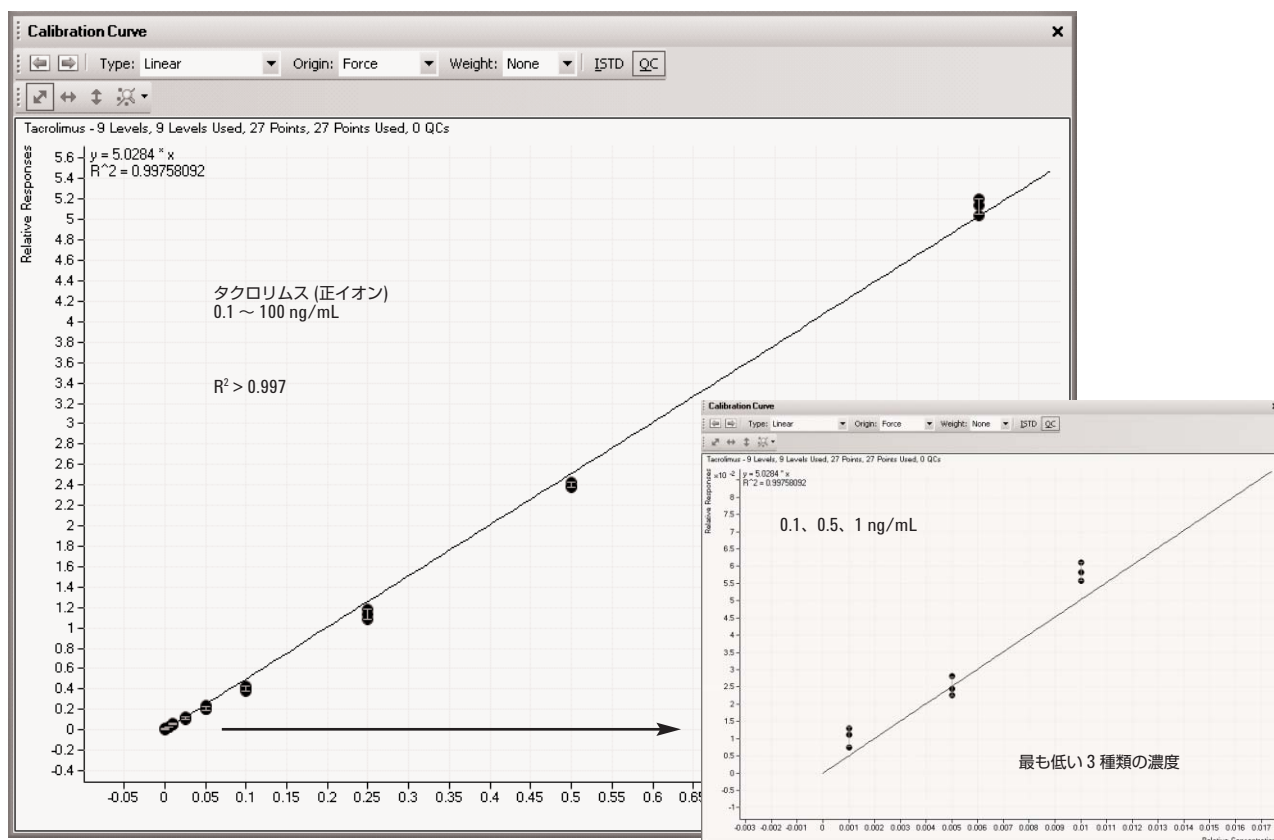


図 3. 3 桁を超えるタクロリムスの直線性。最も低い 3 つの濃度の範囲が大きくなっています。

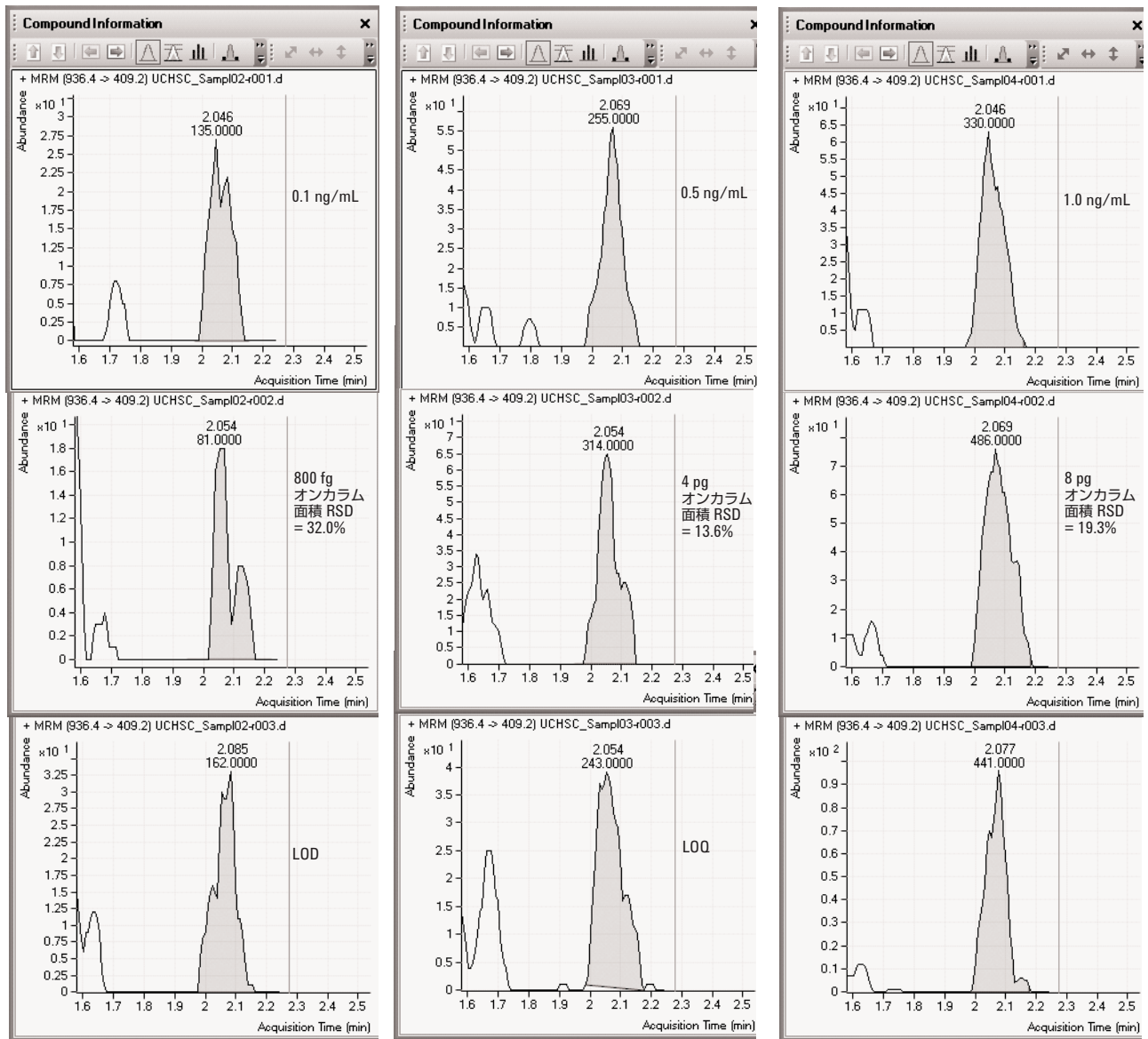


図 4. シロリムス (注入 3 回) の最も低い 3 つの濃度の積分済みピーク

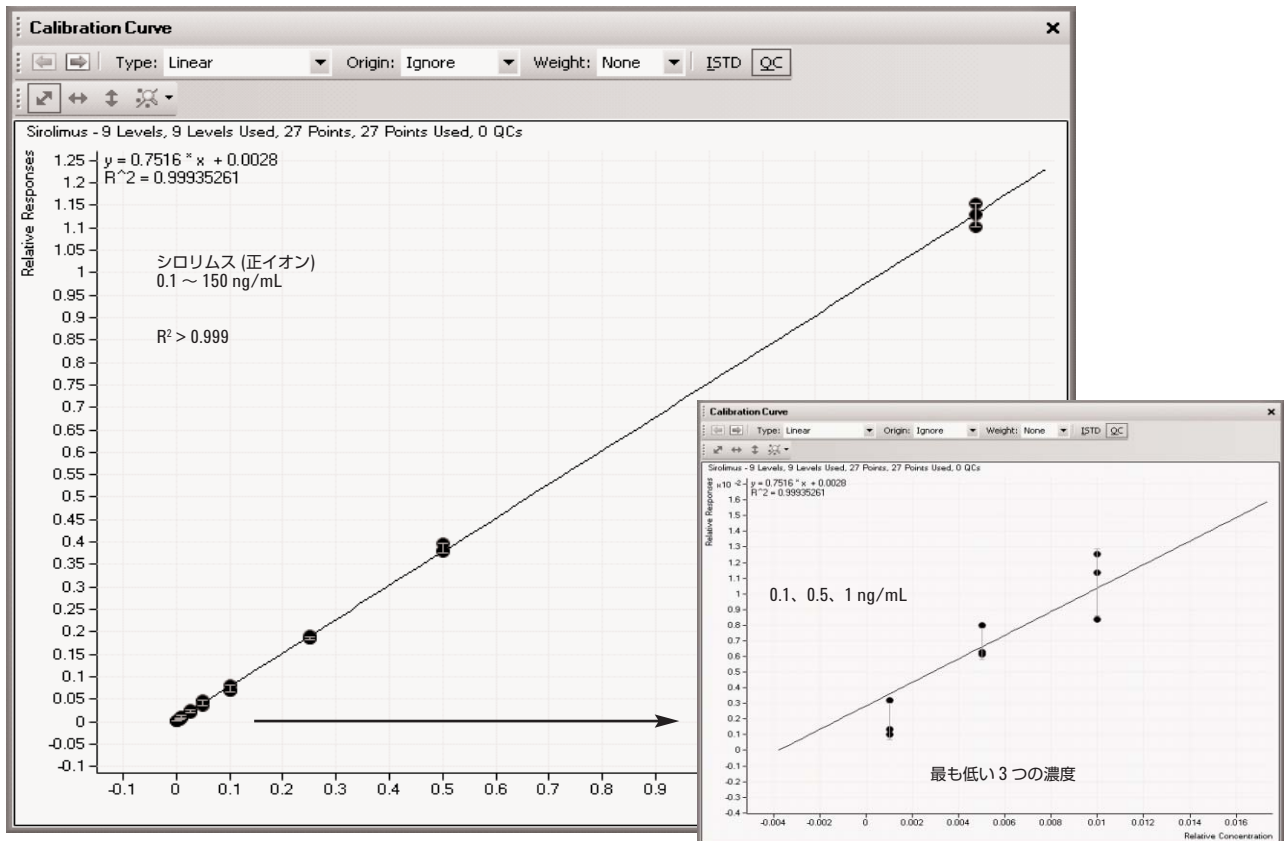


図 5. 3桁を超えるシロリムスの直線性。最も低い3つの濃度の範囲が大きくなっています。



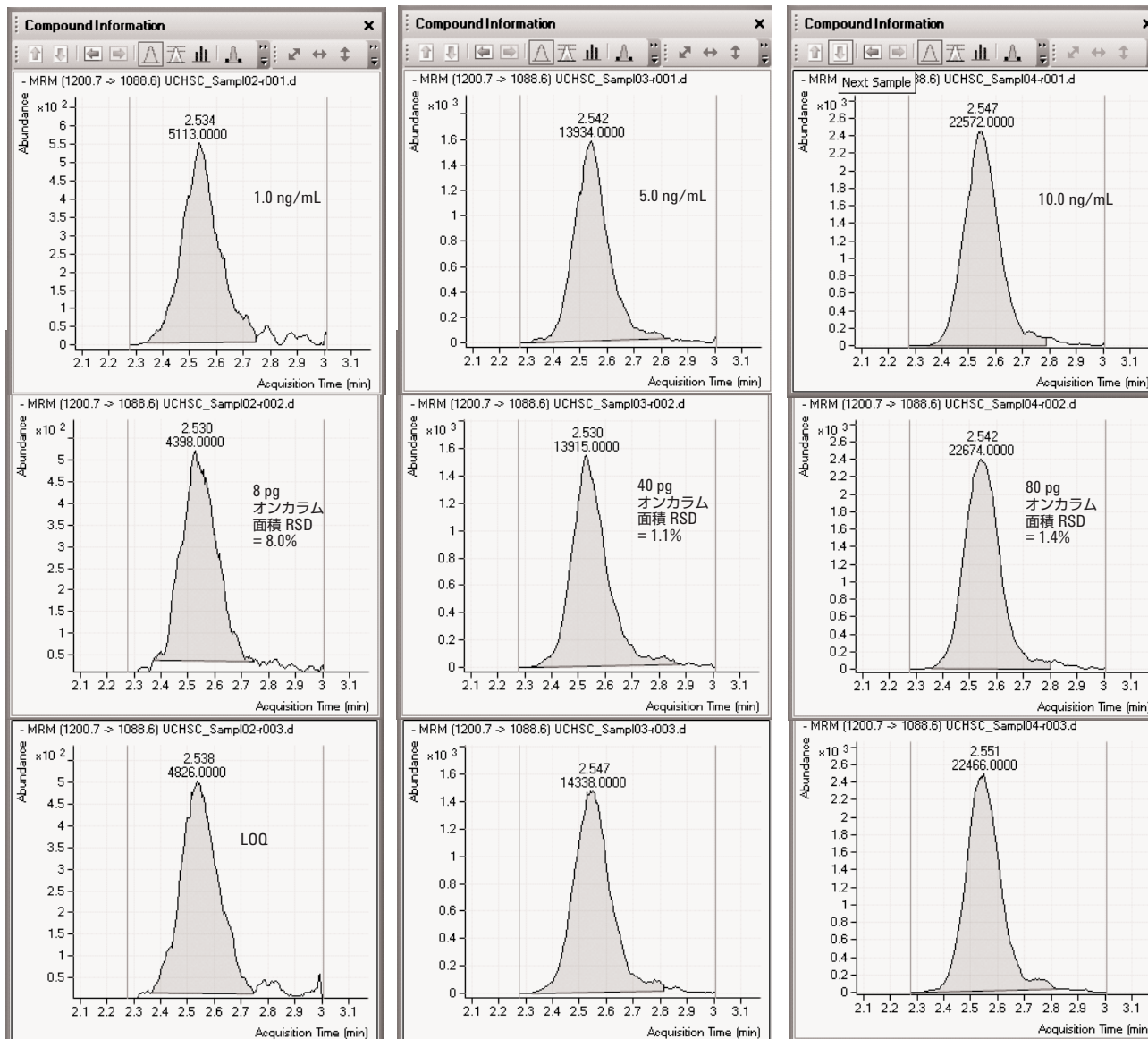


図 6. シクロスポリン A (注入 3 回) の最も低い 3 つの濃度の積分済みピーク

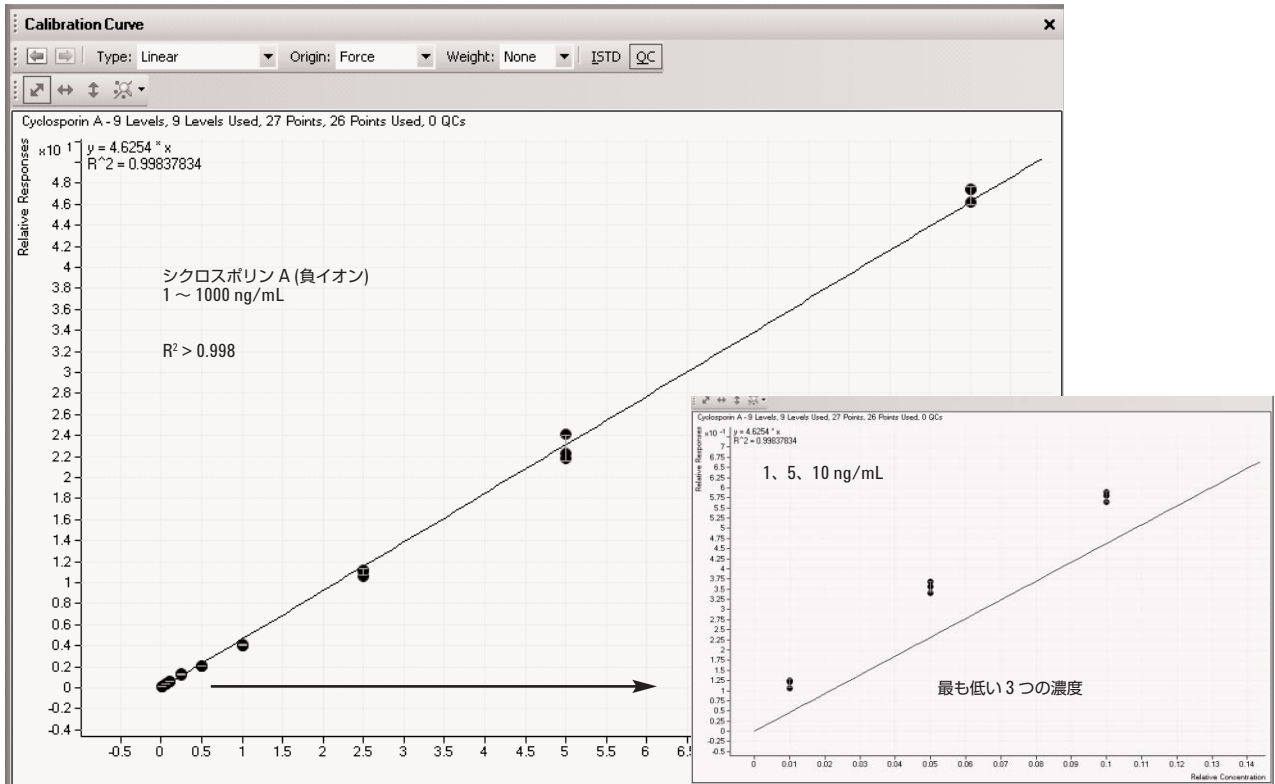


図7. 3桁を超えるシクロスポリン A の直線性。最も低い3つの濃度の範囲が大きくなっています。

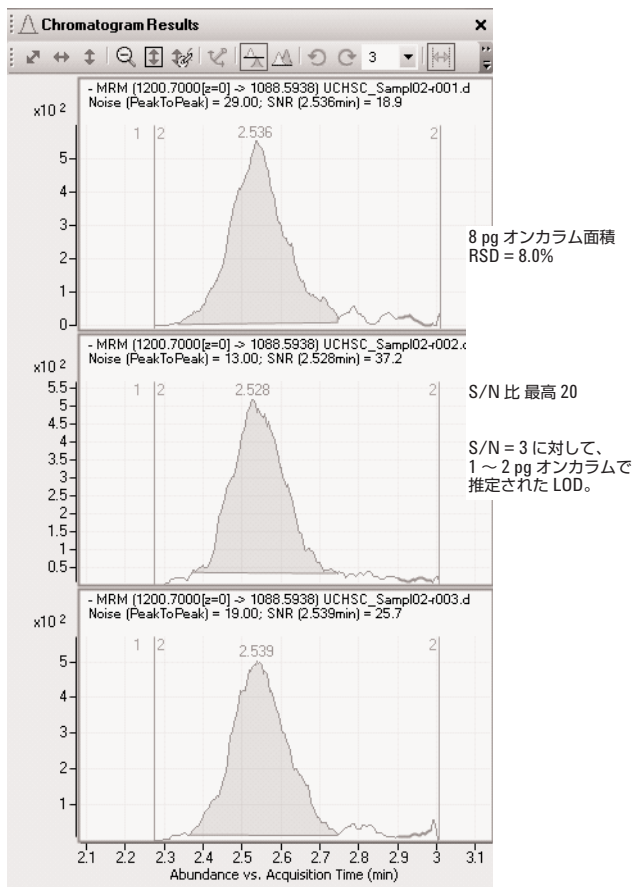


図8. シクロスポリン A のLOD (S/N=3)

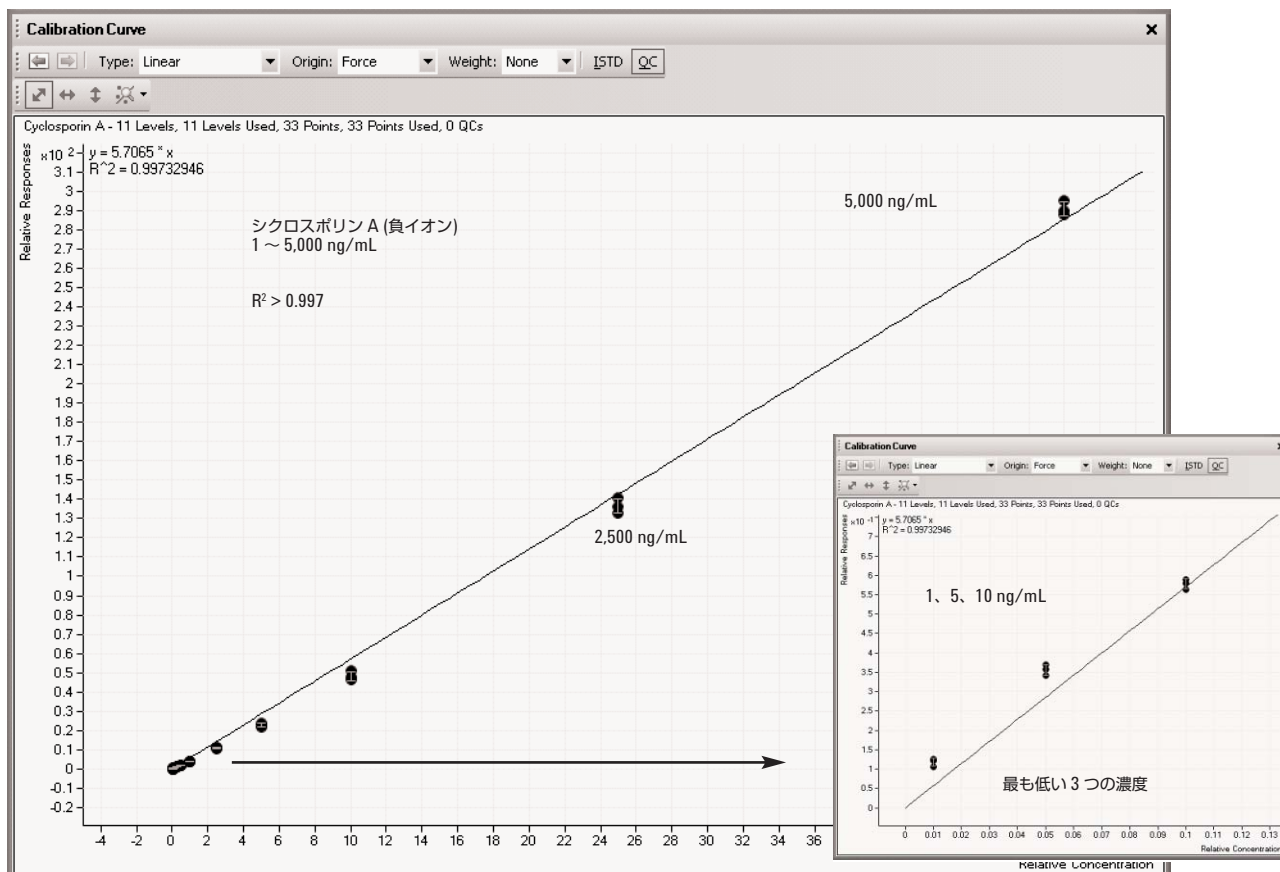


図 9. シクロスポリン A を含む 2 種類の追加濃度が分析され、ほぼ 4 桁を超える優れた直線性を示します。最も低い 3 つの濃度の真度は、非常に良好です。

## 結論

図 6 のように、シクロスポリン A の LOQ 要件は、濃度 1.0 ng/mL で簡単に満たすことができます。しかし、シクロスポリン A の LOD はさらに詳しく観察する必要があります。シクロスポリン A の最低濃度、1 ng/mL の 3 回注入の S/N 比計算に関しては、図 8 を参照してください。平均 S/N は約 20:1 です。これは、検出下限がカラム上で約 1 ~ 2 pgであることを意味します。

シクロスポリン A の濃度はさらに高くなる可能性があるため、トリプル四重極質量分析計が、2,500 ~ 5,000 ng/mL のような高濃度に対して、直線性を維持することができるかを知ることが重要です。図 9 では、直線性が係数  $R^2 > 0.997$  で維持されることだけでなく、最も低い 3 種類の濃度でも精度が維持されることが分かります。

ここで述べた LC/MS/MS メソッドは、最も一般的に分析される免疫抑制剤、シロリムス、タクロリムス、シクロスポリン A のオンカラム感度の基準を示します。タクロリムスとシロリムスのナトリウム付加イオンとシクロスポリン A の脱プロトン化イオンの分析が、最高感度を示しています。サンプル前処理は、簡単なタンパク質沈殿処理だけです。0.997 以上の直線性係数と 800 fg の低い検出下限が得られます。すべての化合物が 3 分以内に溶出するため、このメソッドは血中免疫抑制剤のハイスループット分析に対する優れた分析方法になります。シアノカラムは 450  $\mu$ L/min の流量で優れた分離能を示します。

## 参考文献

1. G. I. Kirchner, C. Vidal, W. Jacobsen, A. Franzke, K. Hallensleben, U. Christians, and K. F. Sewing. "Simultaneous on-line extraction and analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry." *J. Chromatogr. B* 721 (1999) 285.
2. U. Christians, W. Jacobsen, N. Serkova, L. Z. Benet, C. Vidal, K. F. Sewing, M. P. Manns, and G. I. Kirchner. "Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction:immunosuppressants." *J Chromatogr.B* 748 (2000) 41.
3. T. Koal, M. Deters, B. Casetta, and V. Kaever. "Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 215.
4. P. Hatsis and D. A. Volmer, "Evaluation of a cyano stationary phase for the determination of tacrolimus, sirolimus and cyclosporin A in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 287-294.

## 詳細情報

弊社の製品およびサービスに関する詳細情報は、ホームページ [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録は行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料の複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan  
March 19, 2007  
5989-5815JAJP