

TSQ Altisトリプル四重極質量分析計を用いた 血漿中一般医薬品の高感度かつ堅牢な定量分析

Keeley Murphy, Simon Szwandt, and
Claudia Martins

Thermo Fisher Scientific,
San Jose, CA

キーワード

抗うつ剤、LC-MS/MS、TSQ Altis MS、
医薬品、低分子、バイオアナリシス、生
物学的同等性

目的

ヒト血漿および前臨床用の動物試料の血漿に含まれる、一般医薬品の定量のための高感度で堅牢かつ再現性の高いLC-MS/MSアッセイの開発

はじめに

低分子医薬品は、ジェネリック医薬品の規制当局への申請に関連する広範な作業だけでなく、新規化学物質を探索する創薬および医薬品開発において大きな割合を占めています。ターゲット定量アッセイは、低分子医薬品開発の成功に欠かせない最適なワークフローに必須の要素です。このターゲット定量分析は生体マトリックス中で行わなければなりません。多くの場合、分析上の問題をもたらします。本研究では、ラット血漿に含まれる複数の一般医薬品を対象とする高感度で堅牢かつ信頼性と再現性の高いLC-MS/MSアッセイの開発を報告します。

実験

サンプル調製

血漿は、3倍量のアセトニトリル (ACN) を用いて除タンパク処理後、10,000 rpmで10分間遠心分離しました。上清を採取して、同量の水を添加し、除タンパク処理した血漿原液を調製しました。1 mg/mLの各化合物の原液は、上記のプール血漿原液中で1 pg/mLから25,000 pg/mLおよび10 pg/mLから100,000 pg/mLの濃度範囲になるように希釈しました。同位体標識した内標準物質は、最終濃度が0.5 ng/mLになるように各検量線サンプルに添加しました。すべての試薬は、Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas) から1 mg/mLメタノール溶液の形で入手しました。

液体クロマトグラフィー

クロマトグラフィー分離は、Thermo Scientific™ Vanquish™ Horizon HPLCシステムを用いて実施しました。カラムはThermo Scientific Hypersil GOLD™ aQ C18 LCカラム (100 × 2.1 mm、粒子径1.9 μm) を使用しました。移動相Aおよび移動相Bはそれぞれ、Fisher Chemical™ Optima™グレードの水で調製した10 mMギ酸アンモニウムおよびFisher Chemical™ Optima™グレードのアセトニトリルで調製した0.1%ギ酸含有アセトニトリルを使用しました。カラム温度は50°Cに設定し、分析時間は3.5分になりました (表1)。

表1: グラジエントテーブル

時間 (分)	流量 (mL/min)	%A	%B
0	0.6	95	5
0.4	0.6	95	5
0.5	0.6	65	35
1.5	0.6	64	36
1.6	0.6	55	45
2.2	0.6	53	47
2.3	0.6	5	95
2.95	0.6	5	95
2.995	0.6	95	5
3.5	0.6	95	5

質量分析計

質量分析は、Thermo Scientific OptaMax™ NGイオン源ハウジングを備えたThermo Scientific TSQ Altis™トリプル四重極質量分析計で実施しました。表2および表3は、分析の設定で用いた質量分析計のイオン源とSRMのパラメーターです。

表2: 質量分析計の設定

パラメーター	設定値
分析時間	3.5 min
イオン源	HESI
スプレー電圧	3500 V
シースガス	40 Arb
補助ガス	15 Arb
スイープガス	0 Arb
イオントランスファーチューブ温度	350 °C
ベポライザー温度	325 °C
スキャンタイプ	SRM
サイクル時間	0.3 s
クロマトグラフィーピーク幅	6 s
衝突ガス圧力	1.5 mTorr
Q1 分解能	0.7 FWHM
Q3 分解能	0.7 FWHM

データ解析

データ取得およびデータ解析には、Thermo Scientific TraceFinder™ソフトウェアを使用しました。

表3: SRMの分析条件

Compound Name	Start Time (min)	End Time (min)	Polarity	Precursor m/z	Product m/z	Collision Energy (V)	RF Lens
Desomorphine	0.760	1.060	Positive	272.062	215.054	26	69
Desmethyldoxepin	1.230	1.530	Positive	266.062	107.000	23	56
Flecainide	1.310	1.610	Positive	415.050	398.054	24	84
Midazolam	1.410	1.710	Positive	326.012	291.054	28	87
Imipramine	1.660	1.960	Positive	281.462	86.054	17	48
Amitriptyline	1.800	2.100	Positive	278.075	233.111	18	53
Fluoxetine	1.890	2.190	Positive	310.362	43.889	11	39
Diazepam	2.230	2.530	Positive	285.012	193.071	33	78

結果および考察

表4は、TSQ Altis MSで各医薬品に関して得られた定量下限 (LLOQ) を示しており、これらの値は前世代MSシステムで得られた値よりも有意に低くなっています。さらに、ISの%CV値が有意に低下していることもTSQ Altis MSの堅牢性および再現性が向上していることを意味しています。300 pg/mLにおけるQC 2の代表的なクロマトグラムを図1に示します。QCの直線性および再現性に関する詳細情報は表5に記載しています。

表4: 血漿中医薬品の定量下限および内標準の%CV (n=3)

Compound	LLOQ (pg/mL)	IS %CV
Desomorphine	5	3.5
Desmethyldoxepin	2.5	3.5
Flecainide	1	3.5
Midazolam	2.5	4.4
Imipramine	2.5	4.4
Amitriptyline	2.5	4.4
Fluoxetine	5	5.1
Diazepam	2.5	3.4

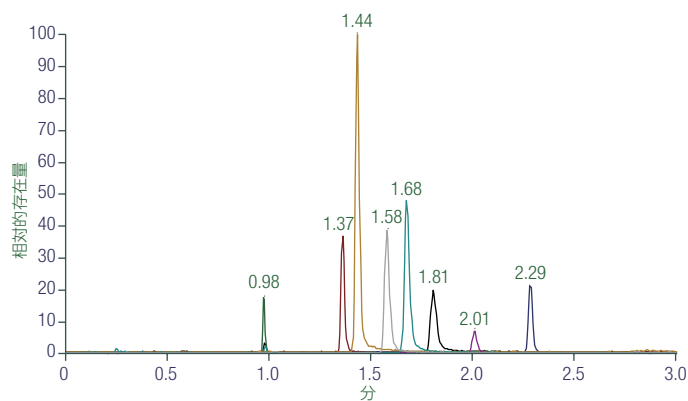


図1: QC 2 (300 pg/mL) の代表的クロマトグラム

表5: 4濃度のQCサンプルの再現性 (%CV) と検量線の直線性

Compound	QC 1 %CV 30 pg/mL	QC 2 %CV 300 pg/mL	QC 3 %CV 3000 pg/mL	QC 4 %CV 15,000 pg/mL	R ² Linear Fit
Desomorphine	7.93	4.72	3.47	1.15	0.9945
Desmethyldoxepin	5.28	1.55	0.67	1.01	0.9904
Flecainide	4.20	4.88	2.46	2.97	0.9924
Midazolam	2.96	1.52	1.71	2.77	0.9917
Imipramine	2.50	1.26	0.38	1.24	0.9913
Amitriptyline	7.04	3.16	0.68	0.83	0.9908
Fluoxetine	3.15	2.80	2.03	2.87	0.9901
Diazepam	5.77	3.15	0.53	2.69	0.9927

結論

本アプリケーションノートで参照したメソッドでは、アッセイのダイナミックレンジ全体にわたり優れた直線性と再現性が確認されました。このメソッドは、TSQ Altis MSにより医薬品の分析に必要な感度と再現性が得られることを証明しています。

Find out more at thermofisher.com/Altis-Quantis

© 2017 Thermo Fisher Scientific K.K. 無断複写・転写を禁じます。 LCMS113_A17070B
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。
ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC