

# LC-MS/MSによるヒト血漿中のMontelukastの定量

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

## キーワード

喘息薬、Accucore C8、montelukast (モンテルカスト、商品名 シングレア)、Montelo-10、SPE、SOLA SAX

## 概要

ヒト血漿中montelukastをThermo Scientific™ SOLA™ SAX SPE 96ウェルプレートで抽出し、Thermo Scientific Accucore™ C8 HPLCカラムで分析を行いました。この抽出方法は再現性や精度が良好で、しかも分析時間は1.5分です。分析の結果、1-1000 ng/mLの範囲で直線性 $R^2=0.9901$ が得られました。

## はじめに

1970年代から、喘息患者が増加しています。2010年には、世界中で30億人の喘息患者がいると言われています。2009年には、世界中で25万人もの人が喘息で亡くなっています。喘息の原因はまだはっきりと分かっていませんが、遺伝と環境の両方であるとされています。喘息の治療には、一般的にbeta-2 agonistが使用されています。また、アレルゲンや刺激物を摂取しないようにし、corticosteroidsもしくはleukotriene拮抗薬を吸引して喘息の症状が出ないようにすることが可能です。製薬会社では高いレベルの研究が継続されており、信頼性のある分析方法が望まれています。

montelukast (図1、商品名 Singulair® もしくは Montelo-10) はleukotrieneの阻害物質で、喘息の継続的な抑制や、季節性のアレルギーの抑制に使用されています。leukotrienesは花粉のようなアレルゲンを吸い込んだ時に放出され、肺が腫れたり気道の筋肉の硬直を引き起こしたりします。montelukastは、一般的に1日あたり1錠4-10 mgを1回摂取します。子供に5 mgを経口投与した場合、 $C_{max}$  の値は667 ng/mLと報告されています。このアプリケーションでは、ヒト血漿中のmontelukastの抽出および定量を行いました<sup>[1-3]</sup>。

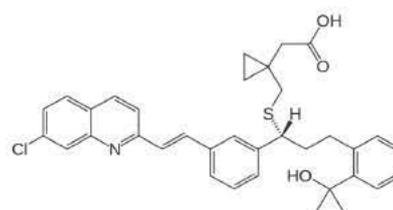
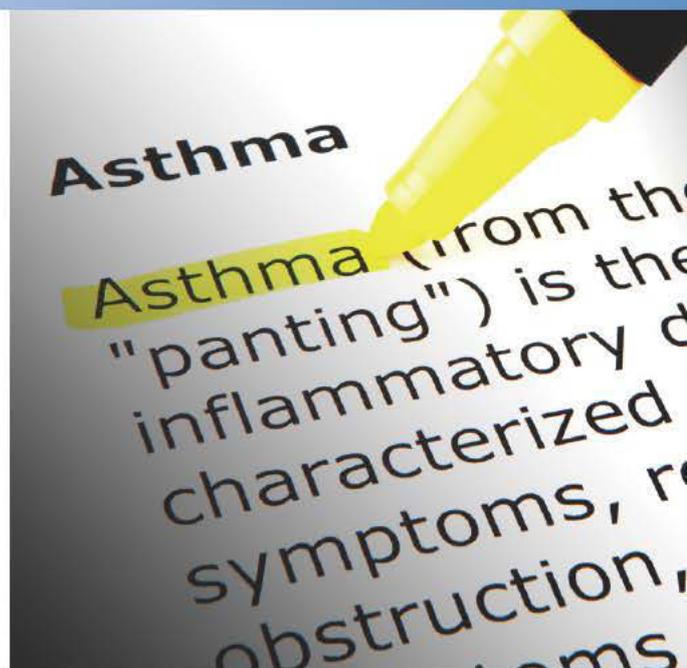


図1: Montelukast [3]

SOLA固相抽出製品は次世代の固相です。先進的な技術で製造されており、従来の固相、リン脂質や除タンパクプレートと比較して、非常にクリーンな抽出を実現します。

#### この製品の特徴

- ・高い再現性
- ・抽出物が非常にクリーン
- ・抽出時に使用する有機溶媒を削減
- ・高感度

臨床研究分野では、ミスをできるだけ少なくし、抽出時の有機溶媒を削減し、少ないサンプルをハイスループット分析することが求められています。SOLAはこのような分析に適しています。SOLAでサンプルの前処理を行うと、分析データに自信を持っていただけます。また使いやすく、複雑なメソッド開発を必要としないので、コストの削減が可能です。

Accucore HPLCカラムはコアテクノロジーによるカラムで、迅速かつ高効率を実現するカラムです。2.6  $\mu\text{m}$ の充填剤は完全な多孔質ではなく、ソリッドコア（無孔性）の周囲を多孔性の外層で覆っています。最適化されたアルキル鎖は高い被覆率と強固な固定相を生み出しました。アルキル鎖の高い被覆率は二次的相互作用を抑制し、高いピーク効率とテーリングを抑制します。Accucore C8 HPLCカラムは、C18と比較して短いアルキル鎖を結合しており、低い疎水性相互作用を持つカラムです。Accucore HPLCカラムは厳しく粒度分布が管理されているため、通常のサブ-2  $\mu\text{m}$ のカラムと比較して明らかに低いバックプレッシャーです。

## 実験

消耗品	製品番号
Fisher Scientific™ LC/MS グレード 水	W/0112/17
Fisher Scientific LC/MS グレード メタノール	M/4062/17
Fisher Scientific LC/MS グレード アセトニトリル	A/0638/17
Fisher Scientific Analytical グレード 酢酸	F/1900/PB08
Fisher Scientific アンモニウム水溶液	A/3295/PB05
Thermo Scientific National™ Mass Spec Certified 2 mL clear vial with blue bonded PTFE silicone cap	MSCERT4000-34W

サンプル前処理器具	製品番号
Thermo Scientific 96 well plate バキュームマニホールド	60103-351
Thermo Scientific Ultra vap	CLS-229070

#### 試料溶液調製手順

標準試料物質:	montelukast, montelukast d6 (IS)
マトリックス:	ヒト血漿
検量線用標準試料溶液:	montelukast をメタノールで溶解し、1.0 mg/mL の標準試料原液を調製。標準試料原液を希釈し、20、200、1000、2000、4000、16,000、20,000 ng/mL の検量線用標準試料溶液をそれぞれ調製。ヒト血漿 (180 $\mu\text{L}$ ) に内部標準試料溶液 10 $\mu\text{L}$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と、検量線用標準試料溶液 10 $\mu\text{L}$ を添加。
QC 用標準試料溶液:	180 $\mu\text{L}$ のヒト血漿に、10 $\mu\text{L}$ の内部標準試料溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と QC 用標準試料溶液 10 $\mu\text{L}$ を添加し、30、300、600 ng/mL になるようにそれぞれ調製。
ブランク:	ブランクとして、ヒト血漿 180 $\mu\text{L}$ にメタノール 20 $\mu\text{L}$ を添加。

#### サンプル前処理手順

タンパクに montelukast が結合しないように、それぞれのサンプルにメタノールを 800  $\mu\text{L}$  添加し、30 秒間ボルテックスを行い、14,000 rpm で 5 分間遠心。上清を固相に添加。

固相抽出手順	製品番号
固相:	10 mg SOLA SAX 96 well plates 60309-003
コンディショニング:	0.5 mLメタノール、2%アンモニア含有水を0.5 mL添加
サンプルロード:	試料溶液を固相に添加し、自然落下
洗浄 1:	2%アンモニア含有水を0.5 mL添加
洗浄 2:	2%アンモニア含有メタノールを0.5 mL添加
溶出:	5%オルトリン酸含有メタノール150 $\mu$ Lを2回添加
備考:	溶出は、自然落下させた。極性を調整するために 100 $\mu$ L の脱イオン水を各サンプルに加えて、10 分間超音波を照射してから測定した。

分析条件	製品番号
装置:	Thermo Scientific Dionex™ UltiMate™ 3000 Binary RSLC HPLC system
カラム:	Accucore C8, 2.6 $\mu$ m, 50 $\times$ 2.1 mm 17226-052130
ガードカラム:	Accucore C8, 2.6 $\mu$ m, 10 $\times$ 2.1 mm 17226-012105
移動相 A:	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B:	0.1% ギ酸含有アセトニトリル
グラジエント:	時間 (分)      % A      % B
	0                    30            70
	0.5                0              100
	1                    0              100
	1.01              30            70
	1.5                30            70
流速:	1.0 mL/min
カラム温度:	60 $^{\circ}$ C
注入量:	10 $\mu$ L
洗浄溶媒 1:	水 / アセトニトリル (80:20, v/v)
洗浄溶媒 2:	2-プロパノール / アセトニトリル / アセトン (45:45:10, v/v/v)

#### MS 測定条件

装置:	Thermo Scientific TSQ Vantage™ MS
Ionization conditions:	HESI
Polarity:	Positive
Spray voltage (V) :	3500
Vaporizer temp ( $^{\circ}$ C) :	300
Sheath gas pressure (Arb) :	50
Aux gas pressure (Arb) :	30
Capillary temp ( $^{\circ}$ C) :	270
Collision pressure (mTorr) :	1.5
Scan time (s) :	0.02
Q1 (FWHM) :	0.7
Q3 (FWHM) :	0.7

表1: プレカーサーイオンおよびプロダクトイオン

Compound	Montelukast	Montelukast d6 (IS)
Precursor (m/z)	586.2	592.2
Products (m/z)	422.2	427.3
Collision energy (eV)	23	22
S-lens (V)	137	138

## データ解析

ソフトウェア: Thermo Scientific LCQuan™ software, version 2.6

## 結果

表2で示すように、ヒト血漿中の montelukast の分析において濃度1 – 1000 ng/mLの範囲で検量線を確認し、直線性 ( $R^2$ ) は0.9901となりました。QC試料を30、300、600 ng/mLの濃度で調製し、6回注入を行い、再現性や回収率を確認しました。HQC、MQC、LQCの精度はそれぞれ2.5%、5.7%、10.6%となりました。HQCの回収率は89%、MQCの回収率は84%、LQCの回収率は93%となりました。表3より、回収率の平均は89%となり、SOLA SAXの高い性能を発揮させることができました。

図2および3に、montelukastと montelukast d6 (内部標準物質) のクロマトグラムを示します。

表2: 検量線1 - 1000 ng/mLにおける真度

検量線用標準試料溶液	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	計算値 (ng/mL)	% Difference
S1	1	0.990	-0.91
S2	10	10.6	6.42
S3	50	57.5	14.9
S4	100	106	5.87
S5	200	172	-14.08
S6	800	746	-6.7
S7	1000	945	-5.49

表3: QC試料の複数回注入による結果

QC 試料	QC 試料溶液濃度 (ng/mL)	計算値 (n=6 平均) (ng/mL)	真度	RSD (n=6)	回収率
HQC (600 ng/mL)	600	573	95.5%	2.5%	89%
MQC (300 ng/mL)	300	216	98.5%	5.7%	84%
LQC (30 ng/mL)	30	32.3	107.6%	10.6%	93%

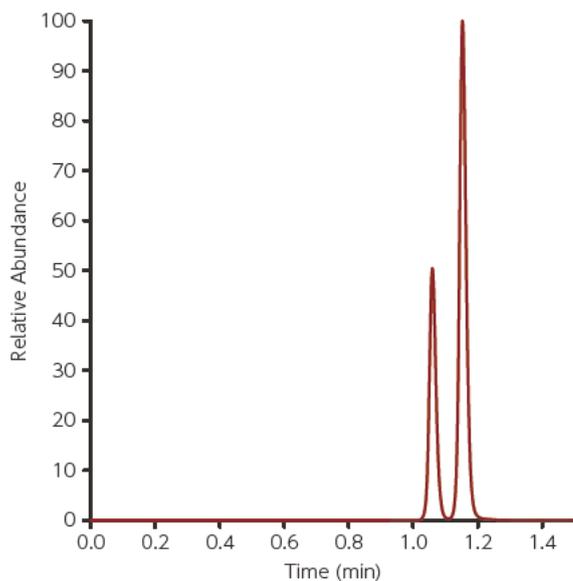


図2: ヒト血漿中montelukastのクロマトグラム。1.04分のピークはmontelukastの異性体で、Accucore C8 HPLCカラムで分離することができました

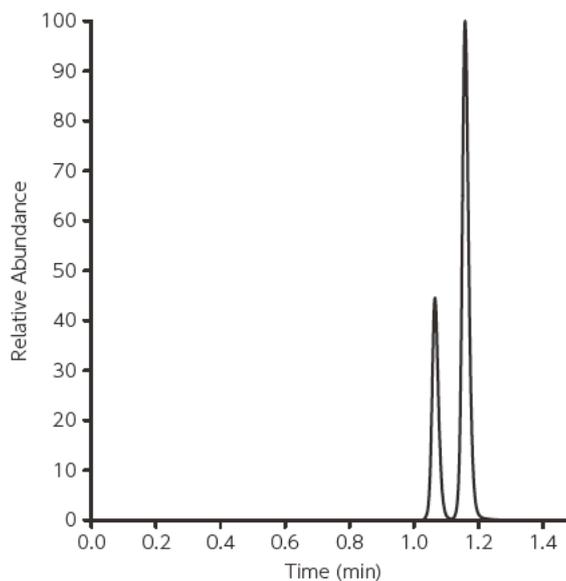


図3: ヒト血漿中montelukast d6 (内部標準物質) のクロマトグラム。1.04分のピークはmontelukast d6の異性体で、Accucore C8 HPLCカラムで分離することができました

## まとめ

SOLA SAX SPEとAccucore C8 HPLCカラムを使用して、ヒト血漿中montelukastの定量を行いました。このアプリケーションでは、以下の結果が得られました。

- ・Accucore C8カラムを使用して、ヒト血漿中のmontelukastの分析および定量を1.5分で行いました。
- ・montelukastの *cis* および *trans* 異性体を分離しました。
- ・良好な精度および真度が得られました。
- ・SOLA SAXでmontelukastの高い回収率が得られました。
- ・少ない溶出溶媒量で高い回収率が得られました。
- ・ヒト血漿中montelukastのLOQは 1 ng/mLでした。
- ・シンプルで高い再現性の抽出および分析方法が得られました。

## 参考文献

- [1] Merck Pharmaceuticals, [http://www.merck.ca/assets/en/pdf/products/SINGULAIR-PM\\_E.pdf](http://www.merck.ca/assets/en/pdf/products/SINGULAIR-PM_E.pdf)
- [2] Drug Information, <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfocfm?archiveid=15499>
- [3] Wikipedia, [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Montelukast\\_skeletal.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Montelukast_skeletal.svg)
- [4] Drug Bank, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00471>, Dated 02/10/2012

©2014 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転載を禁じます。

ここに掲載されている会社名、製品名は各社の商標、登録商標です。掲載されている価格は消費税を含んでおりません。  
ここに掲載されている内容は、予告なく変更することがあります。詳細については、販売代理店にお問い合わせください。

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・消耗品に関するお問い合わせはこちら

 TEL 0120-753-670 FAX 0120-753-671  
〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町3-9

E-mail: [Analyze.jp@thermofisher.com](mailto:Analyze.jp@thermofisher.com)  
[www.thermoscientific.jp](http://www.thermoscientific.jp)

販売店

E1403

**Thermo**  
SCIENTIFIC  
Part of Thermo Fisher Scientific