

Application News

No. C123

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

使用全自动预处理 LC/MS/MS 系统 提高治疗药物监测的效率

High-Throughput Optimization of Therapeutic Drug Monitoring Using Fully Automated Sample Preparation LC/MS/MS System (SCLAM-2000 + LCMS-8040)

对患者进行药物治疗时，通常对于给药管理困难的药物（如治疗效果范围窄或者中毒浓度范围与有效浓度范围相近）需要进行治疗药物监测（TDM: Therapeutic Drug Monitoring），即定量分析患者的血药浓度，根据药代动力学及药效学解析，对每位患者设计最佳的用药剂量及给药方法。传统的 TDM 分析方法主要使用高效液相色谱（HPLC）。近年来，为了提高分析准确度和精密度，开始使用具有出众选择性的液相色谱-质谱联用仪（LC/MS/MS）。

在分析血清、血浆等样品时，通常需要进行除蛋白、稀释等预处理操作。在此过程中，由于操作人员技术水平的参差不齐而容易产生偏差或发生错误。并且，随着样品数量的增加，操作人员的作业负荷也随之增加。因此，在对大量样品进行测定的分析流程中，预处理操作显得十分重要。

本应用报告向您介绍使用全自动 LCMS 预处理仪器 SCLAM-2000 和高效液相色谱-质谱联用仪 LCMS-8040 组合的全自动预处理 LC/MS/MS 系统，在解决上述 TDM 中存在的问题的基础上，更快速且高精度地进行 TDM 分析流程的示例。



全自动预处理 LC/MS/MS 系统
Fully Automated Sample Preparation LC/MS/MS System

■ 提高抗癫痫药分析流程的效率

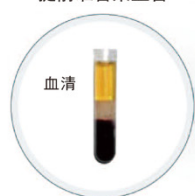
High-Throughput Analytical Workflow for Antiepileptic Drug Analysis

以下介绍使用全自动预处理 LC/MS/MS 系统同时分析血清中的抗癫痫药及其活性代谢物共 7 种成分的示例。

对血清样品进行预处理时，通常需要添加有机溶剂以除蛋白，然后对固体成分进行离心分离，分取上清液。如果使用全自动预处理 LC/MS/MS 系统，只需放置采血管等物，即可全自动进行上述预处理，然后使用 LC/MS/MS 进行分析（图 1）。

因为 LC/MS/MS 分析和下一样品的预处理同时进行，所以可以大幅度地缩短每个样品所需要的测定时间，在本示例中，包括分析在内，每个样品只需 9 分钟的循环时间。

提前准备采血管



放置采血管及试剂

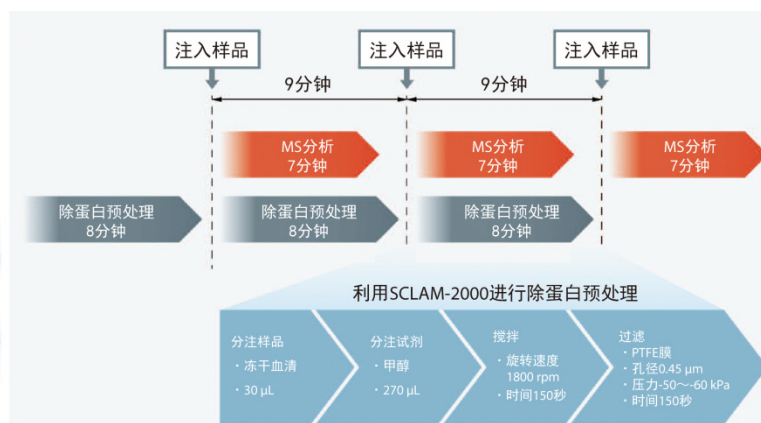
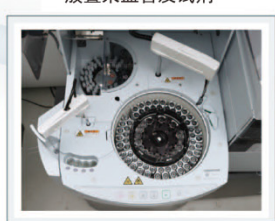


图 1 使用全自动预处理 LC/MS/MS 系统同时分析血清中的抗癫痫药的工作流程

Workflow for Simultaneous Analysis of Antiepileptic Drugs in Blood Serum Using Fully Automated Sample Preparation LC/MS/MS System

图 2 为人血清中添加抗癫痫药和代谢物共计 7 种成分的控制样品的质谱图。因为 LC/MS/MS 可以根据目标药物的质量和结构，

选择性地检测目标药物，所以由图可知，未发现来自血清的杂质成分造成的明显干扰。

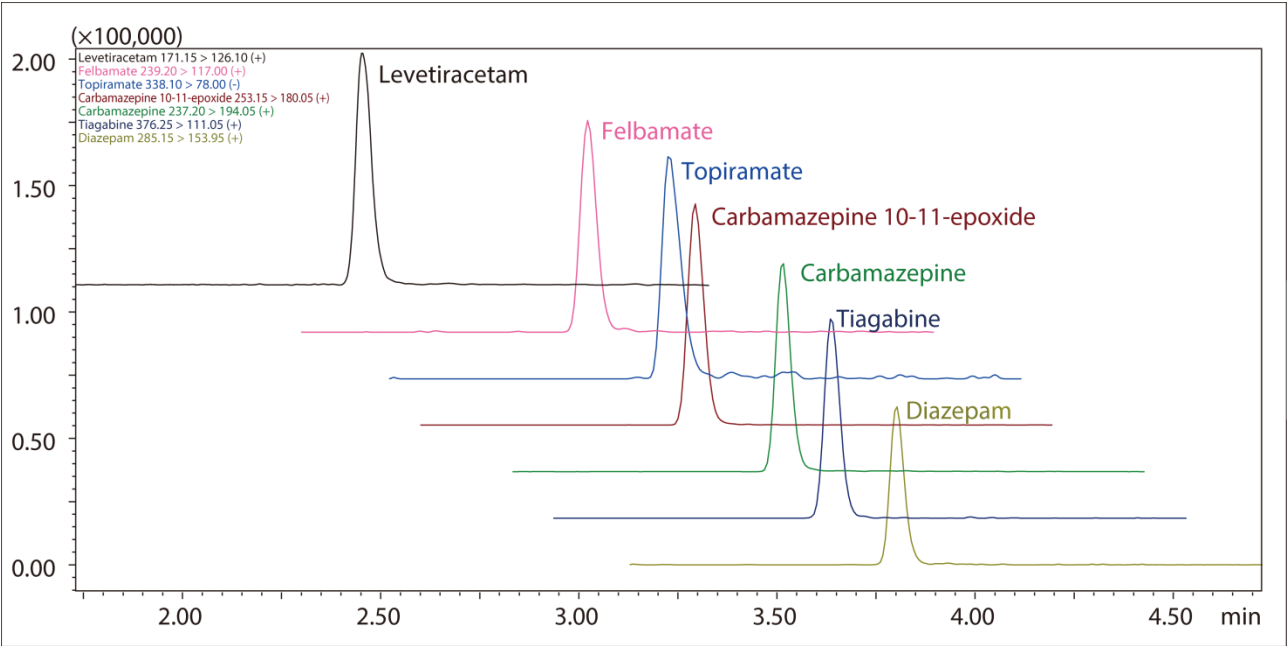


图 2 血清控制样品中的抗癫痫药及代谢物共计 7 种成分的质量色谱图
Mass Chromatogram of Seven Antiepileptic Drugs and Drug Metabolites in a Control Serum Sample

在全自动预处理分析条件下进行连续分析并绘制标准曲线，以判断分析结果的准确度和精密度（重复性）。由图 3 可知，在所设的标准曲线范围内，所有抗癫痫药的线性良好；由表 1 可知，

在包括定量下限的所有范围内，准确度均在 $100 \pm 15\%$ 以内，相对标准偏差% RSD 均在 15 % 以内，表示重复性良好。

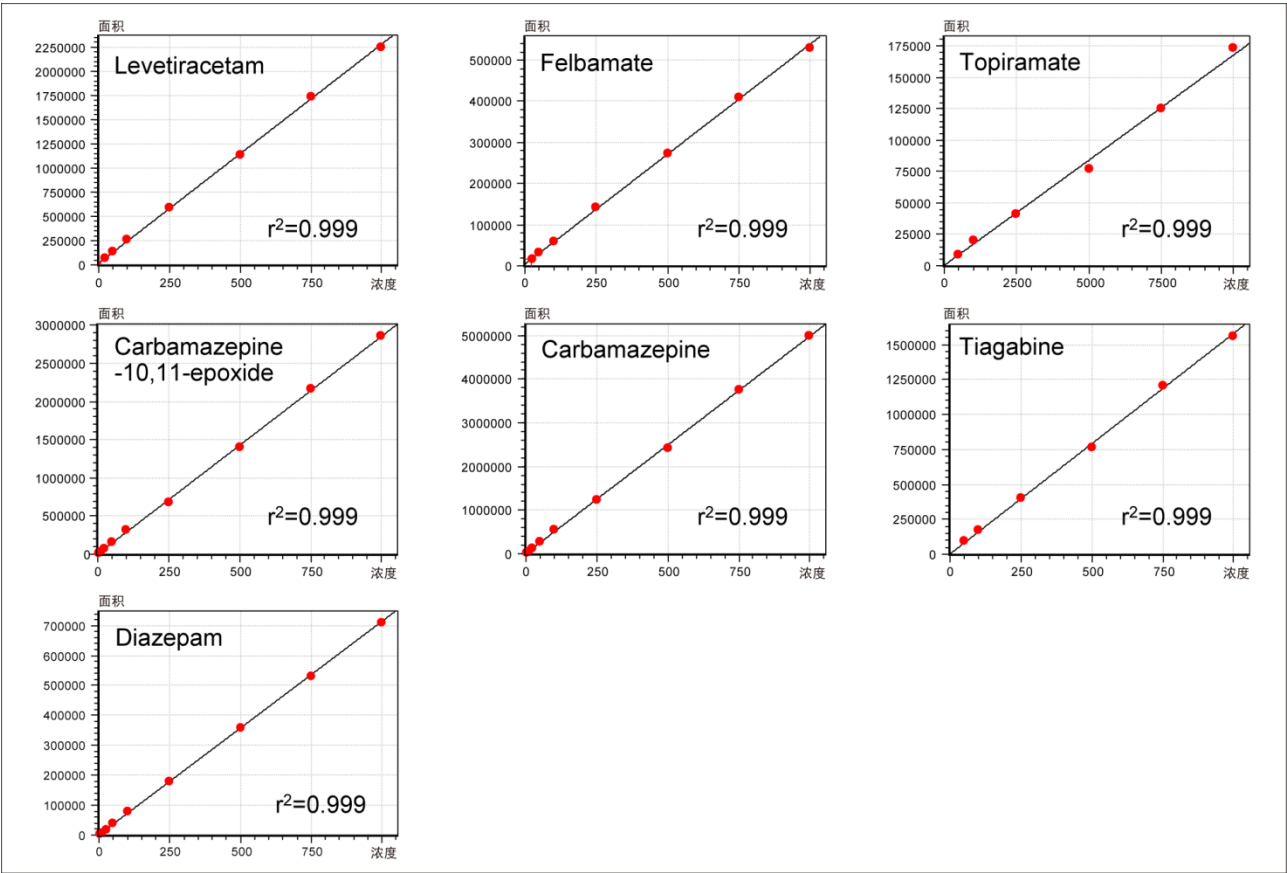


图 3 抗癫痫药及代谢物共计 7 种成分的标准曲线
Calibration Curves of Seven Antiepileptic Drugs and Drug Metabolites

表 1 抗癫痫药同时分析的认证分析结果
Results of Validation Test for Simultaneous Analysis of Antiepileptic Drugs

Compounds	Range (ng/mL)	QC samples concentration (ng/mL)			Accuracy(%)			%RSD (n=6)		
		LLOQ	Medium	ULOQ	LLOQ	Medium	ULOQ	LLOQ	Medium	ULOQ
Levetiracetam	10 - 750	10	100	750	94.6	106.1	99.2	3.42	1.23	1.98
Felbamate	25 - 1000	25	250	1000	98.6	101.8	99.6	6.28	1.88	1.50
Topiramate	500 - 10000	500	2500	10000	102.3	97.1	100.6	6.71	3.58	2.96
Carbamazepine-10,11-epoxide	5 - 1000	5	100	1000	92.9	107.8	99.3	7.48	3.32	1.41
Carbamazepine	10 - 1000	10	100	1000	90.6	110.3	99.1	3.79	3.42	1.19
Tiagabine	50 - 1000	50	250	1000	98.5	101.9	99.6	1.95	2.00	1.26
Diazepam	5 - 1000	5	250	1000	98.1	102.4	99.5	4.61	1.50	1.53

表 2 抗癫痫药的分析条件
Analytical Conditions for Antiepileptic Drugs

色谱柱	: Inertsil ODS-4 (50 mm L. x 2.1 mm I.D., 2 µm)
流动相	: A 10 mmol/L 醋酸铵 - 水 : B 甲醇
流速	: 0.4 mL/min
时间程序	: B Conc. 3 % (0 - 0.5 min) – 90 % (3.0 - 5.0 min) – 3 % (5.01 - 7.0 min)
柱温	: 40 °C
进样体积	: 1 µL
离子源电压	: 4.5 kV / -3.5 kV (ESI-正离子模式 / 负离子模式)
DL 温度	: 150 °C
加热模块温度	: 400 °C
雾化气流速	: 3 L/min
干燥气流速	: 10 L/min
MRM 离子对	: Levetiracetam (+) m/z 171.15 > 126.10, Felbamate (+) m/z 239.20 > 117.00, Carbamazepine-10,11-epoxide (+) m/z 253.15 > 180.05, Carbamazepine (+) m/z 237.20 > 194.05, Tiagabine (+) m/z 376.25 > 111.05, Diazepam (+) m/z 285.15 > 153.95, Topiramate (-) m/z 338.10 > 78.00

■ 使用抗心律失常药进行分析系统的认证
System Validation for Antiarrhythmic Drugs Analysis

TDM 所涉及的目标药物种类繁多，并且物理化学性质也各不相同。因此，分析流程中的操作及包括器具、器械在内的一系列标准作业是否正确，对由此分析流程所得分析结果的有效性而言十分重要。

下文是对物理化学性质差异较大（尤其是亲水性差异较大）的抗心律失常药进行预处理和分析的认证^{1),2)}示例。

采用全自动预处理 LC/MS/MS 系统对高亲水性药物索他洛尔（分配系数 log P = 2.6342）和高疏水性药物胺碘酮（log P = 6.9326）及其活性代谢物 N-去乙基胺碘酮进行了同时分析（图 4）。

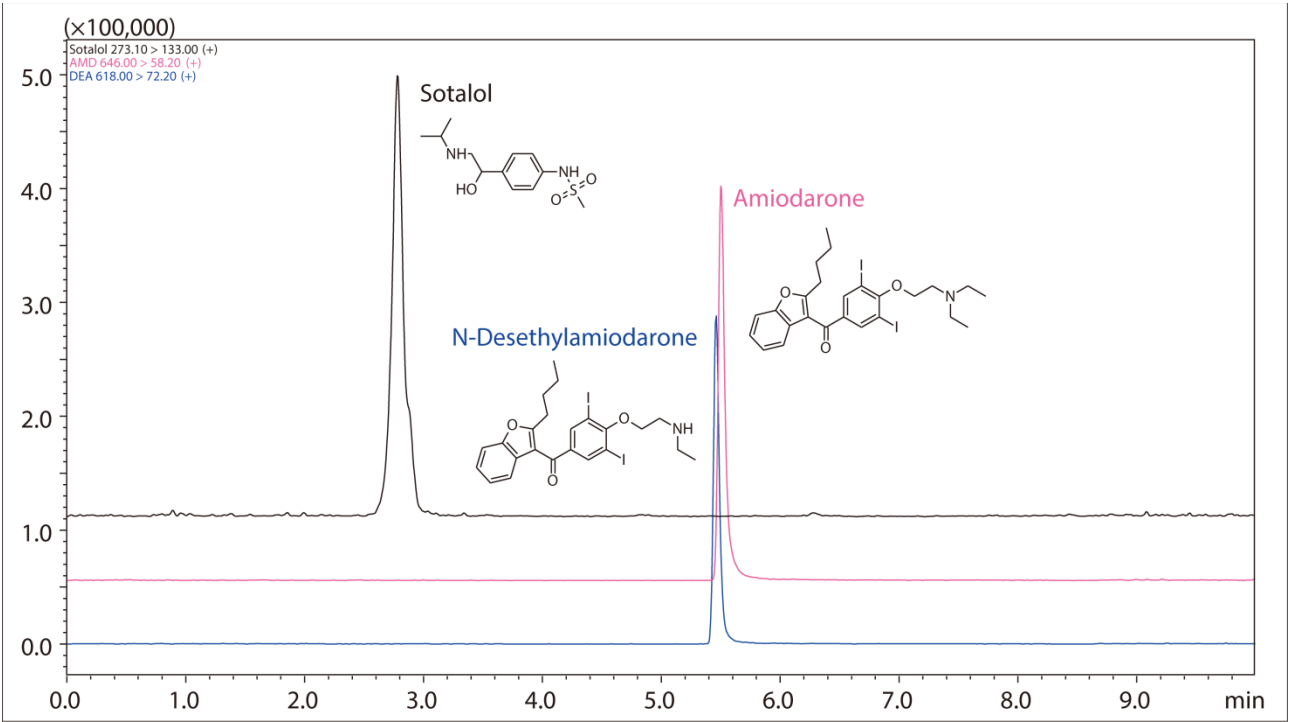


图 4 血清控制样品中的抗心律失常药及代谢物共计 3 种成分的质量色谱图
Mass Chromatogram of Three Antiarrhythmic Drugs and Drug Metabolite in a Control Serum Sample

通过连续分析并绘制标准曲线，对准确度和精密度（重复性）进行认证。由表 3 可知，在所设的标准曲线范围内，高亲水性药物索他洛尔以及高疏水性药物胺碘酮及其代谢物 N-去乙基胺碘酮均得到良好的线性，在包括定量下限的所有范围内，准确度均

在 100 ± 15 % 以内。此外，相对标准偏差 % RSD 在 15 % 以内，表示重复性良好。
上述结果表明，全自动预处理 LC/MS/MS 系统的预处理及分析可以适用于众多亲水性和疏水性药物。

表 3 抗心律失常药同时分析的认证测试结果
Results of Validation Test for Simultaneous Analysis of Antiarrhythmic Drugs

Compounds	Range (ng/mL)	QC samples concentration (ng/mL)			Accuracy(%)			%RSD (n=6)		
		LLOQ	Medium	High	LLOQ	Medium	High	LLOQ	Medium	High
Sotalol	100 - 5000	100	1000	2000	107.0	101.2	101.1	3.20	1.83	1.80
Amiodarone	100 - 5000	100	1000	2000	99.2	102.6	100.6	3.78	1.66	1.99
N-Desethylamiodarone	100 - 5000	100	1000	2000	101.2	103.3	100.1	4.22	1.48	3.01

表 4 抗心律失常药的预处理条件
Preparation Conditions for Antiarrhythmic Drugs

样品体积	: 50 µL
试剂	: 乙腈 200 µL
振荡	: 90 sec, 1900 rpm
过滤	: 150 sec

表 5 抗心律失常药的分析条件
Analytical Conditions for Antiarrhythmic Drugs

色谱柱	: Mastro C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 µm)
流动相	: A 0.1 % 甲酸 - 水 : B 0.1 % 甲酸 - 甲醇
流速	: 0.4 mL/min
时间程序	: B Conc. 5 % (0 - 1.5 min) - 100 % (5.5 - 7.5 min) - 5 % (7.51 - 10 min)
柱温	: 40 °C
进样体积	: 0.3 µL
离子源电压	: 4.5 kV (ESI-正离子模式)
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 400 °C
雾化气流速	: 3 L/min
干燥气流速	: 15 L/min
MRM 离子对	: Sotalol (+) m/z 273.1 > 133.0, Amiodarone (+) m/z 646.0 > 58.2, N-Desethylamiodarone (+) m/z 618.0 > 72.2

■ 总结
Conclusion

综上所述，全自动预处理 LC/MS/MS 系统可以解决 TDM 中存在的因预处理技术水平参差不齐而产生偏差和错误的问题，并且

能够对众多物理化学性质不同的药物快速且高精度地进行分析。今后有望在 TDM 分析领域提高测定数据的可靠性和工作效率。

鸣谢
在本报告的撰写过程中得到了国立研究开发法人 国立循环器官疾病研究中心 药剂部 栗原健先生的大力协助，在此深表感谢。

参考文献：
1) Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation (2001, US FDA)
2) 医药品开发中生物样品中药物浓度分析法的验证相关指导原则 (2013, 厚生劳动省)

注) · 本应用报告中记载的产品并非为经国内相关法律批准和认证的医疗器械。
· 请勿将本应用报告中记载的分析方法用于诊断目的。

