

## [原著論文]

液体クロマトグラフィー質量分析法による  
がん患者の血清中フェンタニル濃度の測定井之上浩一<sup>\*1</sup> 松下 祥子<sup>\*1</sup> 野村 基雄<sup>\*2</sup> 立松三千子<sup>\*3</sup>  
水谷 和子<sup>\*4</sup> 日野 知証<sup>\*1, \*5</sup> 岡 尚男<sup>\*1, \*5</sup><sup>\*1</sup> 金城学院大学薬学部<sup>\*2</sup> 愛知県がんセンター中央病院薬物療法部<sup>\*3</sup> 愛知県がんセンター中央病院薬剤部<sup>\*4</sup> 愛知県がんセンター中央病院臨床検査部<sup>\*5</sup> 金城学院大学大学院人間生活学研究科

(2011年10月12日受理)

【要旨】本研究では、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) を用いて、ヒト血清中フェンタニルの分析法開発を試みた。LC/MS 測定法については、エレクトロスプレーイオン化法を使用し、安定同位体 (フェンタニル- $d_5$ ) を血清中に添加して内標準法により測定した。前処理は、オンライン固相抽出法 (Waters 社製 OASIS-HLB) を用いて LC/MS に直接導入した。モニタリングイオンとしては、フェンタニル ( $m/z$  337.1  $\rightarrow$  187.9) およびフェンタニル- $d_5$  ( $m/z$  342.2  $\rightarrow$  187.9) を設定して、定量限界 0.05 ng/ml (血清) となった。添加回収実験において、99 ~ 111% となり、再現性については日内変動 RSD: 1.0 ~ 10.1% および日差変動 RSD: 1.7 ~ 6.9% となった。本手法をがん患者の血清へ応用した。その際、フェンタニルの血清中濃度は、持続静注症例において  $0.20 \pm 0.01 \sim 1.69 \pm 0.04$  ng/ml および経皮吸収剤使用症例において  $0.16 \pm 0.01 \sim 1.09 \pm 0.03$  ng/ml と良好に測定することが可能であった。本分析技術は、ヒト血清中フェンタニル濃度測定することができ、疼痛コントロールなどの臨床へ応用できるものと思われる。

キーワード：フェンタニル、血中モニタリング、液体クロマトグラフィー質量分析法、オピオイド・ローテーション

## 緒 言

がん性疼痛に対する治療は WHO 方式を原則に行われる。良好な疼痛コントロールを保つことは患者の QOL (生活の質) を保つために非常に重要であるが、病状の悪化、活性代謝産物の蓄積による副作用のコントロール困難、長期継続使用による鎮痛耐性の形成や経口投与困難によりオピオイド・ローテーション (OR) や剤型の変更が行われる。

オピオイド鎮痛剤であるフェンタニルは、モルヒネやオキシコドンと比べて、便秘、嘔気、嘔吐や眠気、せん妄などのオピオイド関連有害事象が少ないという報告もあり、活性代謝産物をほとんど生成しないことから腎機能悪化症例でも使用できるため、臨床では広く使われている<sup>1-3)</sup>。特に、フェンタニル経皮吸収剤は、経口投与困難ながん疼痛治療においても用いることが可能である。しかしながら、フェンタニル経皮吸収剤は、吸収速度が経口オピオイド製剤に比べて非常に緩徐で効果発現まで時間がかかり、

血中濃度上昇に個人差があるために、モルヒネ製剤などの併用投与を用いても変更中の疼痛増強や有害事象が認められることがある<sup>4-6)</sup>。そこで、われわれは、治療薬物モニタリング (TDM) を実施することで、より安全にフェンタニル製剤の OR を実施することができると考え、新たなオンライン固相抽出-液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を用いて、簡便かつ精度の高い血清中フェンタニルの測定法を検討し、臨床への応用を試みた。

フェンタニルの TDM を目的としたヒト血清濃度分析に関して、現在までいくつか報告がある。1980 年代の測定法では、ガスクロマトグラフィー (GC)<sup>7)</sup> が利用されていたが、2000 年以降では LC/MS が汎用されるようになってきた。LC/MS は、GC とは違って、極性物質の分析に有効であり、誘導体化の必要性もなく、生体試料からの高感度な定量に適している。特に有効な手段として、96 ウェル固相抽出法<sup>8)</sup> や液/液分配<sup>9)</sup> の前処理を併用した LC/MS による血中フェンタニルの分析が報告されている。しかし、少量の血清により、簡便な前処理による迅速なスクリーニング測定は報告されていない。そこで、本研究の目的は、臨床現場での簡便なヒト血清処理を想定したオンライン固相抽出-LC/MS 法を開発することとした。さらに、

本手法を用いて、フェンタニル持続静注および経皮吸収剤を使用中のがん患者における TDM を実践する。

## 実験方法

### 1. 試薬および試料

フェンタニルおよびフェンタニル- $d_5$  標準品 (1.0 mg/ml メタノール溶液) に関しては、Sigma-Aldrich, Co. から入手した。LC/MS 分析には、和光純薬社製メタノール (HPLC 用)、ギ酸 (HPLC 用) を用いた。標準血清に関しては、日本製薬株式会社製 CONSERA を使用した。

フェンタニル標準溶液に関しては、標準原液を精製水で希釈して、各濃度に調製している。

### 2. オンライン固相抽出-LC/MS 法

LC/MS 装置は、Waters 社製 Alliance 2695/ Micro-mass Quattro Premier triple quadrupole mass spectrometer を用いた。分離カラムには、東ソー社製 TSK-GEL ODS-100V (2.1 × 50 mm, 3 μm) を恒温槽 40°C で使用した。流速は 0.2 ml/min とし、注入量を 30 μl とした。移動相には、0.1% ギ酸水 (移動相 A) および 0.1% ギ酸メタノール (移動相 B) を用いた。移動相はグラジエントで送液し、移動相 A/B (45/55, v/v) を 5 分間保持した後、10 分間で A/B (20/80, v/v) とした。オンライン固相抽出カラムには、Waters 社製 OASIS-HLB (4.6 × 20 mm, 2.5 μm) を用いて、コンディショニング溶液 (1.0% ギ酸水) を 1.0 ml/min で送液した。カラムスイッチングバルブは、分析開始 5 分で切り替えた。タンデム質量分析 (MS/MS) には、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) で測定した。分析モードは、多重反応モニタリング (MRM) として、質量電荷比  $m/z$  337.1 → 187.9 (フェンタニル) および  $m/z$  342.2 → 187.9 (フェンタニル- $d_5$ ) をモニタリングした。イオン化ソースの条件は、キャピラリー電圧 3.0 kV、エクストラクター電圧 3 V、交流 (RF) 電圧 0 V、ソース温度 120°C、ディソルベーション温度 400°C とした。また、コーンおよびディソルベーションガス流量は、53 および 900 l/h に設定した。コリジョンガスにはアルゴン (ガス流量 0.35 ml/min) を用い、マルチプルレイヤーを 650 V に設定した。

### 3. ヒト血清処理法

ヒト血清に関しては、使用まで -30°C で保存した。使用時は、自然溶解させた後、100 μl をとり、フェンタニル- $d_5$  溶液 (0.5 μg/ml) 1 μl を添加した。その後、ギ酸メタノール溶液 (50/50, v/v) を 1 μl 加え、遠心分離 (13,000 rpm, 5 分間) を行い、上清をオンライン固相抽出-LC/MS 法により分析した。

検量線には、標準血清を用いて、フェンタニル標準液を濃度範囲 (0.05 ~ 10 ng/ml) となるように 1 μl 添加した。その後、上記と同様の操作により分析を実施し、内標準法

による定量を実施した。

### 4. バリデーション

FDA ガイドラインに準じて、分析バリデーションを実施した<sup>10)</sup>。日内変動 (Intra-day assay) では、4 濃度 (0.05, 0.5, 1.0, 10 ng/ml) を 5 回繰り返して、相対標準偏差 (RSD) を算出した。日差変動 (Inter-day assay) においては、1 日 2 回を 3 日間実施し、RSD を算出した。安定性試験に関しては、2 濃度 (0.5, 1.0 ng/ml) で行った。オートサンプラー安定性試験 (Process/wet) では、オートサンプラー (4°C) で 12 時間放置後、分析を行った。室温安定性試験 (Bench-top) では、6 時間室温で放置し、血清処理の後、分析を行った。凍結/解凍安定性試験 (Freeze/thaw) では、血清試料を -30°C 保存後、自然解凍させる操作を 3 回繰り返して、血清処理した後に分析を実施した。長期安定性試験 (Long-term) では、-30°C に血清試料を 1 カ月間保存した試料を分析した。

### 5. がん患者のフェンタニル投与に関する情報

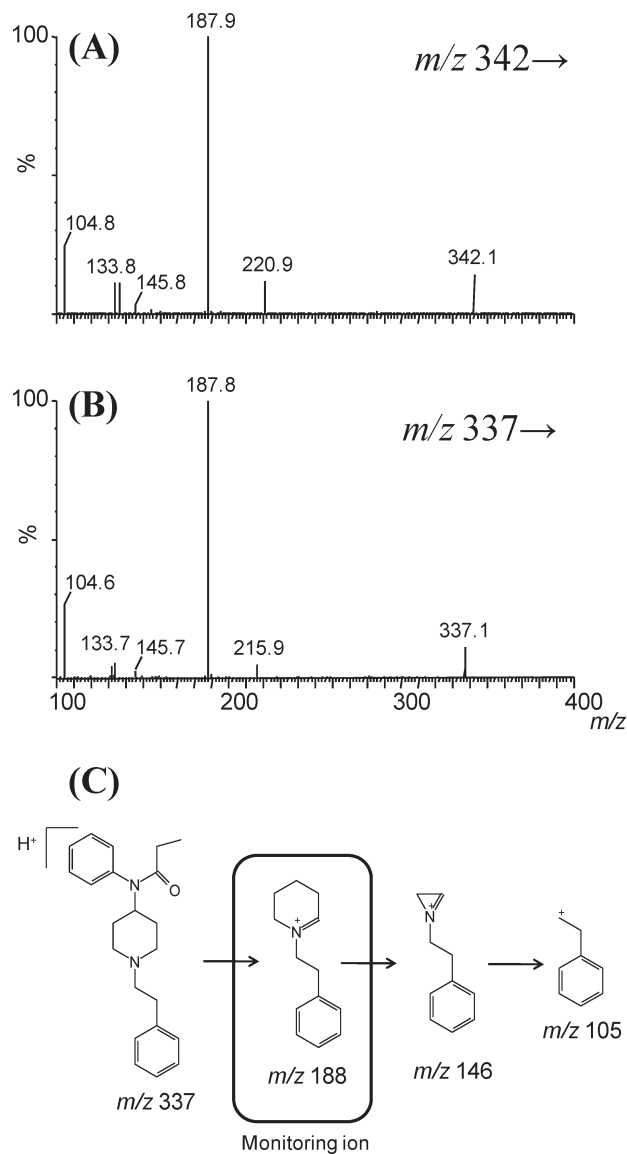
対象症例は平成 22 年 2 月から 12 月までに登録された。適格規準は、がん性疼痛に対しフェンタニル持続静注で用量調整後に同一用量で 5 日間以上経過している患者、20 歳以上、5 日間以上継続して Numeric Rating Scale (NRS) 5 以下と安定したがん性疼痛であることとした。除外基準は、頻回の突出痛を有する患者、鎮痛不良、意識障害、肝機能障害 (ALT または AST ≥ 正常上限の 2 倍、総ビリルビン ≥ 2.0 mg/dl) または腎機能障害 (血清クレアチニン ≥ 2.0 mg/dl) とした。また、採血前の 8 時間以内にレスキューを使用している症例および、投与量の変更や貼付から静注投与へ変更した症例などは除外している。経皮吸収剤は、デュロテップ<sup>®</sup> MT パッチを用いた。

対象症例の検体は、愛知県がんセンター中央病院倫理委員会および金城学院大学倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを行い、本研究目的のみのため提供された。採血はフェンタニル持続静注から経皮吸収剤へ変更する前後に行った。採血時刻は午前 9 時とした。採血直後に経皮吸収剤を貼り付け、3 時間後である午前 12 時にフェンタニル持続静注の投与速度を半分にし、さらに 3 時間後の午後 3 時には持続静注の投与を終了した。貼付 24 時間後である午前 9 時に再度採血を行った。採血量は、患者の負担を考え、1 回に 3 ~ 5 ml とした。検体は 3 本の試験管 (それぞれを測定し、結果として標準偏差 SD と示す) に分けて、愛知県がんセンター中央病院臨床検査室において血清を分離し、凍結保存 (-30°C) した。検体には登録番号のみ記載し、1 カ月以内に金城学院大学薬学部へ凍結したまま搬送し、測定を実施した。

## 結 果

## 1. オンライン固相抽出-LC/MS法の基礎的検討

フェンタニルのイオン化に関して、既報<sup>9)</sup>を参考として、ESIによるポジティブモードを採用した。その結果、プロトン付加  $[M+H]^+$  イオンを検出し、フラグメントイオンとして  $m/z$  187.9 を得ることができた (Fig. 1 (A), (B))。また、フラグメントパターンに関しては、Fig. 1 (C) に示す<sup>11)</sup>。したがって、MRMモードによるモニタリングイオンを、 $m/z$  337.1  $\rightarrow$  187.9 (フェンタニル) および  $m/z$  342.1  $\rightarrow$  187.9 (フェンタニル- $d_5$ ) を用いて、定量することとした。標準血清に各濃度になるように調製し、



**Fig. 1** MS/MS spectra of fentanyl. ESI-Positive mode (daughter scan:  $m/z$  100-400). (A) Precursor ion:  $m/z$  342 for fentanyl- $d_5$ . (B) Precursor ion:  $m/z$  337 for fentanyl. (C) Fragmentation pathway of fentanyl in ESI-MS/MS<sup>11)</sup>.

オンライン固相抽出-LC/MS分析を行った結果、検出限界 0.01 ng/ml ( $S/N = 3$ ) および定量限界 0.05 ng/ml ( $S/N = 10$ ) となった。内標準法による定量範囲 (0.05 ~ 10 ng/ml) の検量線では、相関係数 0.99 以上となり、良好な直線性を得た。

## 2. バリデーション

FDAガイドラインに準じて、実験操作の再現性および試料安定性試験を実施した<sup>10)</sup>。その結果、Table 1のようになった。いずれも、FDAガイドラインの許容範囲内であり、臨床応用として十分に適用できるものであった。

## 3. 臨床検体への応用

実検体における代表的なMRMクロマトグラムをFig. 2に示す。いずれも、夾雑物質の影響を受けず良好に定量が可能であった。疼痛コントロールされたがん患者の血中濃度の結果をTable 2に示す。フェンタニルの血清中濃度は、持続静注症例において  $0.20 \pm 0.01 \sim 1.69 \pm 0.04$  ng/ml、および経皮吸収剤症例において  $0.16 \pm 0.01 \sim 1.09 \pm 0.03$  ng/ml であった。

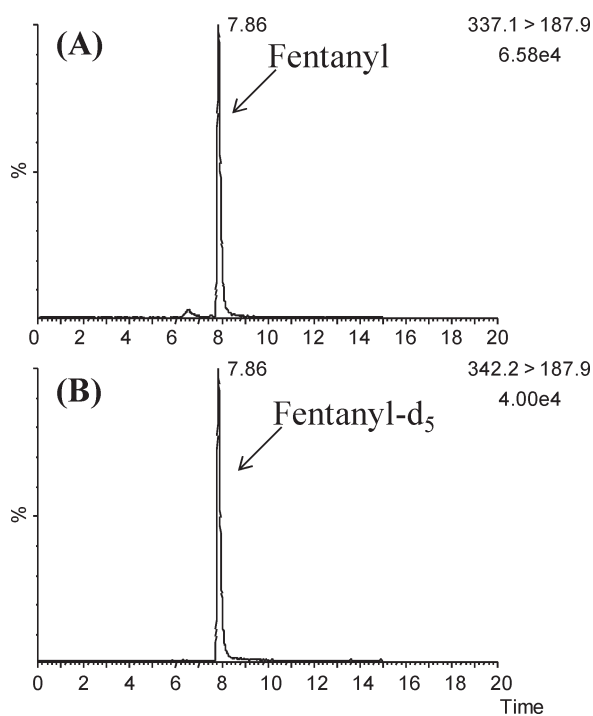
## 考 察

フェンタニルは、同じ強オピオイドのモルヒネと比較し、便秘、嘔気、嘔吐や眠気、せん妄、ミオクローヌスなどのオピオイド関連有害事象が少ないという報告がある<sup>12, 13)</sup>。また、中等度から高度の強さの痛みを用いるオピオイドとして、がん疼痛治療に広く用いられている。しかしながら、フェンタニルの治療域は患者ごとに非常に広く分布しており、経皮吸収剤においては、皮膚透過性、皮膚温度、血流なども影響している<sup>1, 12, 13)</sup>。そのため、フェンタニルの疼痛コントロールにおける適正使用は、臨床現場における薬剤師の積極的な介入が必要である<sup>14, 15)</sup>。一方で、TDMの情報は乏しく、それに伴う分析技術の提供や血中濃度の測定値は重要な知見となる。本研究では、臨床現場と基礎研究の共同による血清中フェンタニル濃度の測定を検討した。分析技術では、高感度なLC/MS法を採用し、安定同位体 (フェンタニル- $d_5$ ) を用いた内標準法により定量を行った。さらに、患者の負担 (採血量の低減化) や臨床現場での血清処理を想定したうえで、安価で多検体処理の可能なオンライン固相抽出法を用いた。その結果、FDAガイドラインに準じたバリデーションを達成し、定量範囲 (0.05 ~ 10 ng/ml) も予想される治療濃度域での測定が可能となった。また、安定性試験により、採血から血清処理した後、1カ月以内の凍結保存検体において、安定に測定できることも判明した。6時間室温で放置後、血清処理の検体を測定してもほとんどフェンタニルの分解などはないことも実証した。さらに、凍結/解凍安定性試験の結果より、運搬中などで凍結血清が解凍しても3回程度まで安定に測定できることも判明した。以上の結果よ

**Table 1** Analytical validation of fentanyl in human serum samples for recovery and stable tests

| Stability                        | n | Spiked levels (ng/ml) | Detection levels (ng/ml) | Recovery [RSD] (%) |
|----------------------------------|---|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| Intra-day assay                  | 5 | 0.05                  | 0.054                    | 108 [10.1]         |
|                                  | 5 | 0.5                   | 0.51                     | 102 [1.4]          |
|                                  | 5 | 1.0                   | 1.01                     | 101 [2.4]          |
|                                  | 5 | 10.0                  | 10.23                    | 102 [1.0]          |
| Inter-day assay                  | 6 | 0.05                  | 0.055                    | 111 [6.9]          |
|                                  | 6 | 0.5                   | 0.50                     | 102 [2.6]          |
|                                  | 6 | 1.0                   | 0.99                     | 99 [1.7]           |
|                                  | 6 | 10.0                  | 10.24                    | 102 [2.4]          |
| Process/wet extract <sup>a</sup> | 5 | 0.5                   | 0.49                     | 98 [3.8]           |
|                                  | 5 | 1.0                   | 0.99                     | 99 [1.9]           |
| Bench-top <sup>b</sup>           | 5 | 0.5                   | 0.49                     | 97 [2.3]           |
|                                  | 5 | 1.0                   | 0.98                     | 98 [1.1]           |
| Freeze and thaw <sup>c</sup>     | 5 | 0.5                   | 0.48                     | 96 [4.5]           |
|                                  | 5 | 1.0                   | 0.99                     | 99 [2.6]           |
| Long-term <sup>d</sup>           | 5 | 0.5                   | 0.48                     | 96 [2.7]           |
|                                  | 5 | 1.0                   | 0.98                     | 98 [1.8]           |
|                                  | 5 | 5.0                   | 4.91                     | 98 [1.5]           |

<sup>a</sup> After 12 h in autosampler at 5°C. <sup>b</sup> After 6 h at room temperature (27°C). <sup>c</sup> After three freeze and thaw cycles at -30°C. <sup>d</sup> At -30°C for 30 days.



**Fig. 2** MRM chromatograms of fentanyl in human serum from patient with cancer. (A) Monitoring ion:  $m/z$  337  $\rightarrow$  188, fentanyl concentration: 0.80 ng/ml. (B) Monitoring ion:  $m/z$  342  $\rightarrow$  188 for internal standard of fentanyl- $d_5$ .

り、高精度な血清中フェンタニルの測定法を構築できたものと思われる。また、本測定法は、オンライン固相抽出法を採用しているため、そのほとんどが自動化されており、連続的に200検体以上を一括で測定することも可能である。そのうえ、1検体において、最短で10分の分析時間となり、その迅速スクリーニングは、臨床測定では画期的なものと考えられる。そのため、現在まで報告されている測定技術よりも、格段に簡便、迅速かつ安価な臨床分析の方法と位置づけられる。

本法を用いて、疼痛コントロールされているがん患者のフェンタニル血清濃度を測定した結果、0.16 ~ 1.69 ng/mlと広い濃度範囲となった (Table 2)。さらに、8例中7例で、持続静注投与時よりも経皮吸収剤使用時の濃度がやや低く、いずれも投与方法による血中濃度の違いも観察された。その原因として、経皮吸収剤の最高血中濃度到達まで24 ~ 28時間<sup>16, 17)</sup>を要するとの報告があり、経皮吸収剤に対する採血時刻 (貼付後24時間) では最高血中濃度まで到達していなかった可能性が考えられる。また、経皮吸収剤においては、悪液質や血中アルブミン濃度といった患者の全身状態による影響<sup>18, 19)</sup>も考えられる。以上より、具体的な血中濃度変化を把握することは、今後の安全かつ安定した疼痛コントロールを実施するための課題と考えられる。今後、緩和医療におけるフェンタニルの血中濃度を測定することの意義について、患者の安全な薬物利用だけではなく、有効なORの改善や耐性患者の判断などへ展開できるものと思われる。

**Table 2** Fentanyl concentration levels in human serum samples from patients with cancer

| No. | Information of patients with cancer |     |     |             | Administration               |                           | Concentration<br>(average $\pm$ SD ng/ml) |
|-----|-------------------------------------|-----|-----|-------------|------------------------------|---------------------------|---|
|     | Sex                                 | BMI | Age | Alb (mg/dl) | Methods                      | Concentration (mg/3 days) |   |
| 1   | Female                              | 18  | 48  | 2.9         | Intravenous (12.5 $\mu$ g/h) |                           | 0.27 $\pm$ 0.03                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 2.1                       | 0.16 $\pm$ 0.01                           |
| 2   | Male                                | 17  | 39  | 1.9         | Intravenous (12.5 $\mu$ g/h) |                           | 0.30 $\pm$ 0.02                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 2.1                       | 0.20 $\pm$ 0.01                           |
| 3   | Female                              | 15  | 57  | 3.6         | Intravenous (12.5 $\mu$ g/h) |                           | 0.46 $\pm$ 0.05                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 2.1                       | 0.38 $\pm$ 0.01                           |
| 4   | Male                                | 20  | 68  | 3.7         | Intravenous (25 $\mu$ g/h)   |                           | 0.65 $\pm$ 0.02                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 4.2                       | 0.73 $\pm$ 0.04                           |
| 5   | Male                                | 21  | 70  | 2.0         | Intravenous (25 $\mu$ g/h)   |                           | 0.84 $\pm$ 0.06                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 4.2                       | 0.56 $\pm$ 0.07                           |
| 6   | Female                              | 23  | 51  | 3.4         | Intravenous (25 $\mu$ g/h)   |                           | 0.45 $\pm$ 0.13                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 4.2                       | 0.40 $\pm$ 0.02                           |
| 7   | Male                                | 20  | 60  | 4.0         | Intravenous (75 $\mu$ g/h)   |                           | 1.22 $\pm$ 0.04                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 12.6                      | 1.09 $\pm$ 0.03                           |
| 8   | Male                                | 17  | 49  | 3.4         | Intravenous (75 $\mu$ g/h)   |                           | 1.69 $\pm$ 0.04                           |
|     |                                     |     |     |             | Transdermal                  | 12.6                      | 0.84 $\pm$ 0.04                           |

## 文 献

- Mercadante S. Opioid rotation for cancer pain: Rationale and clinical aspects. *Cancer* 1999; 86: 1856-1866.
- Radbruch L, Sabatowski R, Loick G, et al. Constipation and the use of laxatives: A comparison between transdermal fentanyl and oral morphine. *Palliat. Med.* 2000; 14: 111-119.
- Morita T, Takigawa C, Onishi H, et al. Opioid rotation from morphine to fentanyl in delirious cancer patients: An open-label trial. *J. Pain Symptom Manag.* 2005; 30: 96-103.
- Cachia E and Ahmedzai SH. Transdermal opioids for cancer pain. *Curr. Opin. Support Palliat. Care* 2011; 5: 15-19.
- Hostynek JJ and Maibach HI. Fentanyl transdermal patches: Overview of cutaneous adverse effects in humans. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2010; 29: 241-246.
- 小川淳司, 中村克徳, 飯塚恵子, 他. オピオイド製剤からフェンタニル貼付剤へのオピオイドローテーションの適応とがん疼痛治療における換算比の検討. *薬誌* 2009; 129: 335-340.
- Phipps JA, Sabourin MA, Buckingham W, et al. Measurement of plasma fentanyl concentration: Comparison of three methods. *Can. Anaesth. Soc. J.* 1983; 30: 162-165.
- Shou WZ, Jiang X, Beato BD, et al. A highly automated 96-well solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of fentanyl in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15: 466-476.
- Lu C, Jia JY, Gui YZ, et al. Development of a liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry method for quantification of fentanyl in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* 2010; 24: 711-716.
- FDA Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation*. US Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM, 2001; www.fda.gov/cder/guidance/indeex.html.
- Wichinithad W, McManus TJ, and Callery PS. Identification of isobaric product ions in electrospray ionization mass spectra of fentanyl using multistage mass spectrometry and deuterium labeling. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010; 24: 2547-2553.
- Trescott AM. Review of the role of opioids in cancer pain. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2010; 8: 1087-1094.
- Tassinari D, Drudi F, Rosati M, et al. Transdermal opioids as front line treatment of moderate to severe cancer pain: A systemic review. *Palliat. Med.* 2011; 25: 478-487.
- 渡辺法男, 安村幹央, 吉田直優, 他. がん治療期から終末期におけるフェンタニルパッチの有効性および安全性の検討. *Palliative Care Research* 2008; 3: 201-208.
- 北澤文章, 安部敏生, 上田久美, 他. フェンタニルパッチ使用の適正化を目指して一本剤に対する鎮痛耐性が疑われた症例とオピオイド使用量調査. *日緩和医療誌* 2010; 3: 93-96.
- Hoy SM and Keating GM. Fentanyl transdermal matrix patch (Durotep MT patch; Durogesic DTrans; Durogesic SMAT): In adults with cancer-related pain. *Drugs* 2008; 68: 1711-1721.
- Hair PI, Keating GM and McKeage K. Transdermal matrix fentanyl membrane patch (matrifen): In severe cancer-related chronic pain. *Drugs* 2008; 68: 2001-2009.
- Heiskanen T, Mätzke S, Haakana S, et al. Transdermal fentanyl in cachectic cancer patients. *Pain* 2009; 144: 218-222.
- 岡澤美貴子, 折井孝男. フェンタニルパッチ投与における血清アルブミン値モニタリングの有用性. *日緩和医療誌* 2008; 1: 53-58.

## Determination of Fentanyl Drug in Cancer Patient Serum by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry

Koichi INOUE<sup>\*1</sup>, Shoko MATSUSHITA<sup>\*1</sup>, Motoo NOMURA<sup>\*2</sup>,  
Michiko TATEMATHU<sup>\*3</sup>, Kazuko MIZUNO<sup>\*4</sup>, Tomoaki HINO<sup>\*1, \*5</sup>,  
and Hisao OKA<sup>\*1, \*5</sup>

<sup>\*1</sup> School of Pharmacy, Kinjo Gakuin University,  
Nagoya, Japan

<sup>\*2</sup> Department of Clinical Oncology, Aichi Cancer Center Hospital,  
Nagoya, Japan

<sup>\*3</sup> Department of Pharmacy, Aichi Cancer Center Hospital,  
Nagoya, Japan

<sup>\*4</sup> Department of Clinical Examination, Aichi Cancer Center Hospital,  
Nagoya, Japan

<sup>\*5</sup> Graduate School of Human Ecology, Kinjo Gakuin University,  
Nagoya, Japan

**Abstract:** We developed a liquid chromatography-mass spectrometric (LC/MS) method for the analysis of fentanyl in human serum. Quantification of fentanyl was performed by on-line solid phase extraction (SPE) using OA-SIS-HLB, reversed-phase LC separation, and finally stable isotope dilution electrospray ionization-tandem MS in multiple reaction-monitoring (MRM) mode. The MRM monitoring ions were  $m/z$  337.1  $\rightarrow$  187.9 for fentanyl and  $m/z$  342.1  $\rightarrow$  187.9 for fentanyl- $d_5$  (internal standard), respectively. The lower limit of quantitation (LLOQ) of fentanyl was 0.05 ng/ml in human serum. Recovery values ranged from 99 to 111% for inter- (RSD: 1.7–6.9%) and intra- (RSD: 1.0–10.1%) day assays. This method was applied to measuring fentanyl levels in serum from patients with cancer. Fentanyl levels in serum samples were  $0.20 \pm 0.01$  to  $1.69 \pm 0.04$  ng/ml for continuous intravenous administration and  $0.16 \pm 0.01$  to  $1.09 \pm 0.03$  ng/ml for transdermal fentanyl. This analytical technique proved useful to measure fentanyl levels in human serum samples during a clinical study for pain control.

**Key words:** fentanyl, human serum, liquid chromatography mass spectrometry