

# Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 LC カラムを使用した LC/MS システムによる 血漿中のオキシコドンとその代謝物 (ノルオキシコドン、オキシモルホン、 ノルオキシモルホン) の分析

## アプリケーションノート

製薬

### 著者

Linda L. Risler,  
Fred Hutchinson Cancer Research Center,  
1100 Fairview Ave. N., PO Box 19024,  
Seattle, WA 98109

Anne E. Brooks  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808  
USA

### 概要

高速液体クロマトグラフ/質量分析 (HPLC/MS) 法と Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT) StableBond SB-C18 カラムによるクロマトグラフ分離を組み合わせることによってオキシコドンとその酸化代謝物 (ノルオキシコドン、オキシモルホン、ノルオキシモルホン) を分析します。このメソッドでは、酢酸アンモニウム/アセトニトリルのグラジエントを利用し、質量分析計による検出をエレクトロスプレーポジティブイオンモードで行います。スパイク添加したヒト血漿サンプルは、LC/MS 分析の前に固相抽出を行います。このメソッドは、高速かつ効率的な分析および最小限の溶媒使用量によって生産性を高めると同時に、すべての化合物について良好な直線性 ( $R^2 > 0.9900$ ) と再現性 (反復分析間の差異は 10% 未満) を実現します。



Agilent Technologies

## はじめに

オキシコドン、それ以前に使用されていた中毒性の高い鎮痛薬、ヘロインに代わるオピオイド鎮痛薬として 1916 年に開発されました。現在、オキシコドンは、米国の規制物質法でスケジュール II に分類されている薬物です。つまり、治療薬としての使用実績はあっても肉体的/精神的な依存をまねく可能性のある常習性の高い薬物とみなされているものです。図 1 は、オキシコドンから (二次代謝産物として) ノルオキシコドン、オキシモルホン、およびノルオキシモルホンが生成される代謝経路を示したものです [1]。痛みは主観的なものである上に代謝速度には個人差があるため、オキシコドンの適切な用量を決定することは困難です。鎮痛効果と各種副作用 (便秘、眩暈、眠気、頭痛、吐き気、不眠、嘔吐、脱力感など) とのバランスを取る必要があります [2]。このバランスを見極める上で重要な

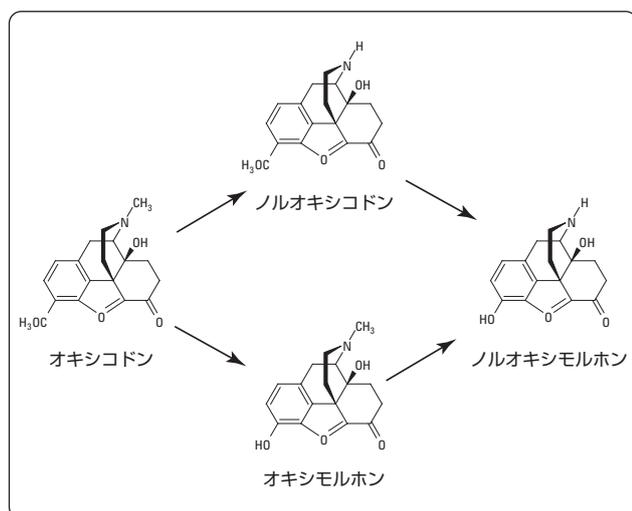


図 1. オキシコドンからノルオキシコドン、オキシモルホン、およびノルオキシモルホンへの代謝経路

ことは、オキシコドンから各代謝産物への代謝速度をモニターすることです。代謝の活発な人の場合、血漿中のオキシコドン濃度を上げなければ薬理効果が現れませんが、代謝の悪い人の場合は薬物の除去される速度が遅いため、血漿中の濃度を上げ過ぎると中毒状態に陥る恐れがあります。この薬物の性質上当然のことながら、オキシコドンやその代謝産物は多様なマトリックスの中から定性分析/定量分析をしなければなりません。

液体クロマトグラフィーと質量分析法との組み合わせ (LC/MS) は、オキシコドンとその代謝産物の検出に理想的な組み合わせです。エレクトロスプレー方式の質量分析法を使用すれば、こうしたアルカロイド系化合物を誘導体化せずに分析できます [3]。さらに、質量分析法では、複雑なマトリックス、特に、尿、血液、毛髪をはじめとして薬物の残留が疑われるあらゆる物質について高い分析感度が得られます。

## 実験

この実験には、Agilent 1100 シリーズ HPLC/MS システムを以下のような構成と分析条件で使用しました。

- G1312A バイナリポンプ。移動相 A: 20 mM 酢酸アンモニウム、pH 4.0。移動相 B: アセトニトリル。流量は 0.300 mL/min。B の濃度 5% を 2.33 分間保持したのち、B の濃度を 2.33 分の時点から 4.33 分までの間に 5% から 20% に上昇。ストップタイムは 6 分、ポストタイムは 4 分間。
- G1367A ウェルプレート・オートサンブラ (ALS)。注入量は 5.0  $\mu$ L。フラッシュポートのニードル洗浄を水/アセトニトリル混合液 (混合比 50:50) で 5 秒間。
- G1316A カラム恒温槽 (TCC)。温度は 30  $^{\circ}$ C。
- 質量分析計による検出は、大気圧イオン化エレクトロスプレーポジティブイオンモードで行いました。ノルオキシモルホンについては  $m/z=288$  のイオンをモニターし、オキシモルホンおよびノルオキシコドンについては  $m/z=302$ 、オキシコドンについては  $m/z=316$ 、d6-オキシコドン (内部標準) については  $m/z=322$  のイオンをモニター。スプレーチャンバの  $N_2$  ガスの流量と温度は 12 L/min で 350  $^{\circ}$ C。
- ChemStation バージョン B.01.01 (HPLC/MS の制御およびデータの処理に使用)。

このクロマトグラフ分離には、Agilent ZORBAX ナローボア RRHT (Rapid Resolution High Throughput) StableBond SB-C18、2.1 mm  $\times$  50 mm、1.8- $\mu$ m カラム (部品番号 827700-902) を使用しました。

アセトニトリル、酢酸アンモニウム、メタノール、塩化メチレン、イソプロパノール、および水酸化アンモニウムは Fisher 社から、また、ホウ酸は Baker 社から購入しました。オキシコドン、ノルオキシコドン、オキシモルホン、ノルオキシモルホンの各標準メタノール溶液は Cerilliant 社から購入したもので、オキシコドン、ノルオキシコドン、オキシモルホンの濃度はそれぞれ 1 mg/mL、ノルオキシモルホンの濃度は 0.1 mg/mL でした。ここから、オキシコドン、ノルオキシコドン、ノルオキシモルホンをそれぞれ 25  $\mu$ L、オキシモルホンを 2.5  $\mu$ L、メタノールを 25 mL 混ぜ合わせて混合サンプルを調製しました。

マトリックスサンプルは、さまざまな濃度の複合サンプルに血漿を 1 mL 添加するという方法で調製しました。代謝産物は、固相抽出 (SPE) 法で血漿から抽出しました。SPE 結合相は、エンドキャップ処理の施されていないオクチル (C8) とベンゼンスルホン酸 (SCX) との混合型吸着剤です。カートリッジは、2 mL のメタノールのあと 2 mL の脱イオン水でコンディショニングしました。スパイク添加した各血漿サンプルは、1.5 mL のホウ酸緩衝液 (pH 8.9) で希釈してから SPE カートリッジにロードし、その後、2 mL の脱イオン水、1 mL の 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 4)、および 2 mL のメタノールで洗浄し、最終的には、3 mL の塩化メチレン/イソプロパノール/水酸化アンモニウムの混合液 (混合比 80:20:2) で溶出しました。各サンプルは、60 °C で空気乾燥させ、その後、60  $\mu$ L の 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 4)/アセトニトリル混合液 (混合比 95:5) で再溶解しました。

## 結果と考察

pH 4 では、StableBond SB-C18 固定相 (エンドキャップなしの B シリカ) が優れた選択性を示しました。エンドキャップなしの結合相では露出したシラノール基との反応も発生するため、オ

キシコドンやその代謝産物 (塩基) のような極性化合物に対する選択性がエンドキャップのある結合相よりも選択性が向上します。こうしたシラノール基との反応は、移動相の条件を変えることによって制御/最適化できます。粒径 3.5  $\mu$ m や 5  $\mu$ m のカラムよりも、1.8- $\mu$ m という微粒子のカラムを使用の方が分離能と効率は良くなります。このカラムには、短くて (カラム長 50 mm)、内径が小さい (2.1 mm) という利点もあります。カラム長を短くすれば分析時間の短縮によって生産性を高めることができ、カラム内径を小さくすれば溶媒の使用量を節約できます。

図 2 は、ヒト血漿サンプルの抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示したものです。分析に使用したサンプルは、オキシコドンやその代謝産物が一切含まれないことが判明しているヒト血漿に対して 50 ng/mL のオキシコドン、50 ng/mL のノルオキシコドン、5 ng/mL のオキシモルホン、5 ng/mL のノルオキシモルホン、および 40 ng/mL の d6-オキシコドン (内部標準) を添加したのち、SPE によって抽出したヒト血漿サンプルです。複雑なサンプルマトリックス (血漿) にもかかわらず、5 つのどの化合物についてもクロマトグラムがきれいに分離されています。

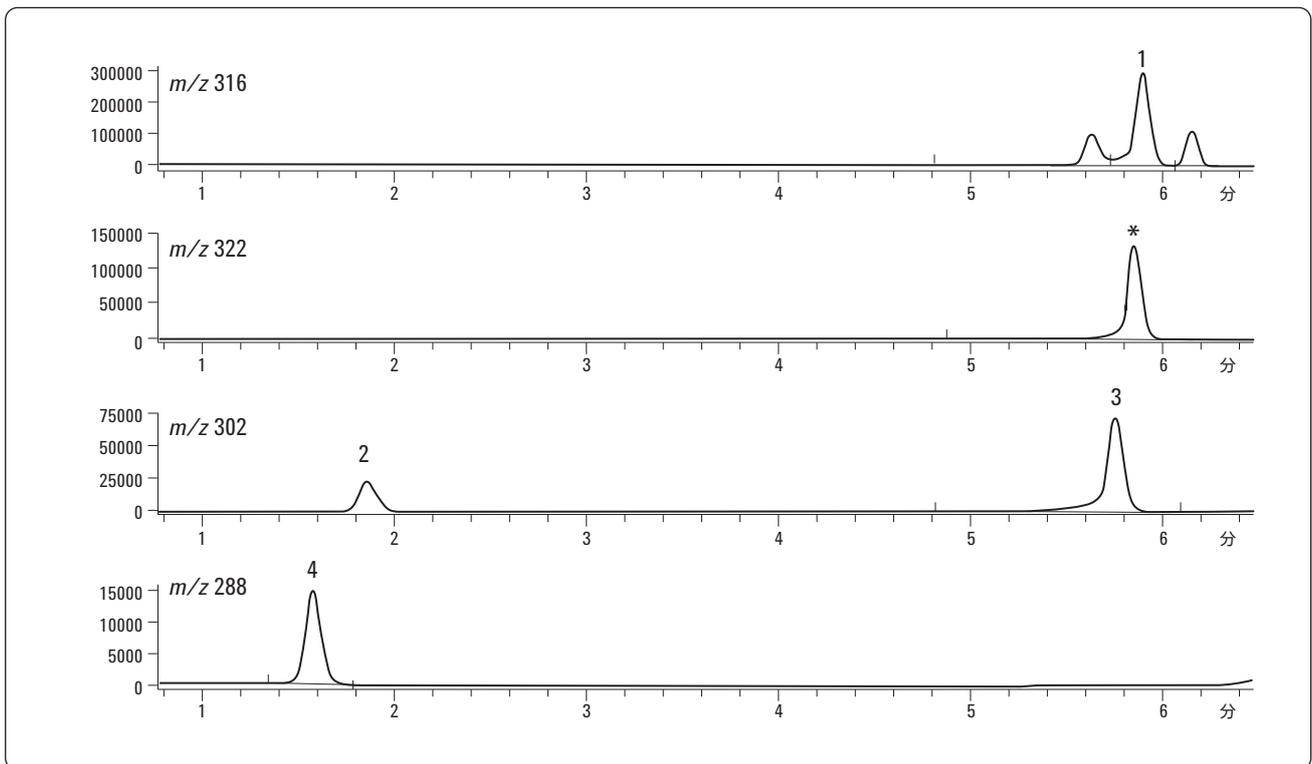


図 2. 50 ng/mL のオキシモルホン (1) とノルオキシコドン (3)、5 ng/mL のオキシモルホン (2) とノルオキシモルホン (4)、および 40 ng/mL の内部標準、d6-オキシコドン (\*) をスパイクしたヒト血漿サンプル。サンプルは SPE によって抽出したのち、Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 カラムを使用して LC/MS システムで分析。図は抽出イオンクロマトグラム。

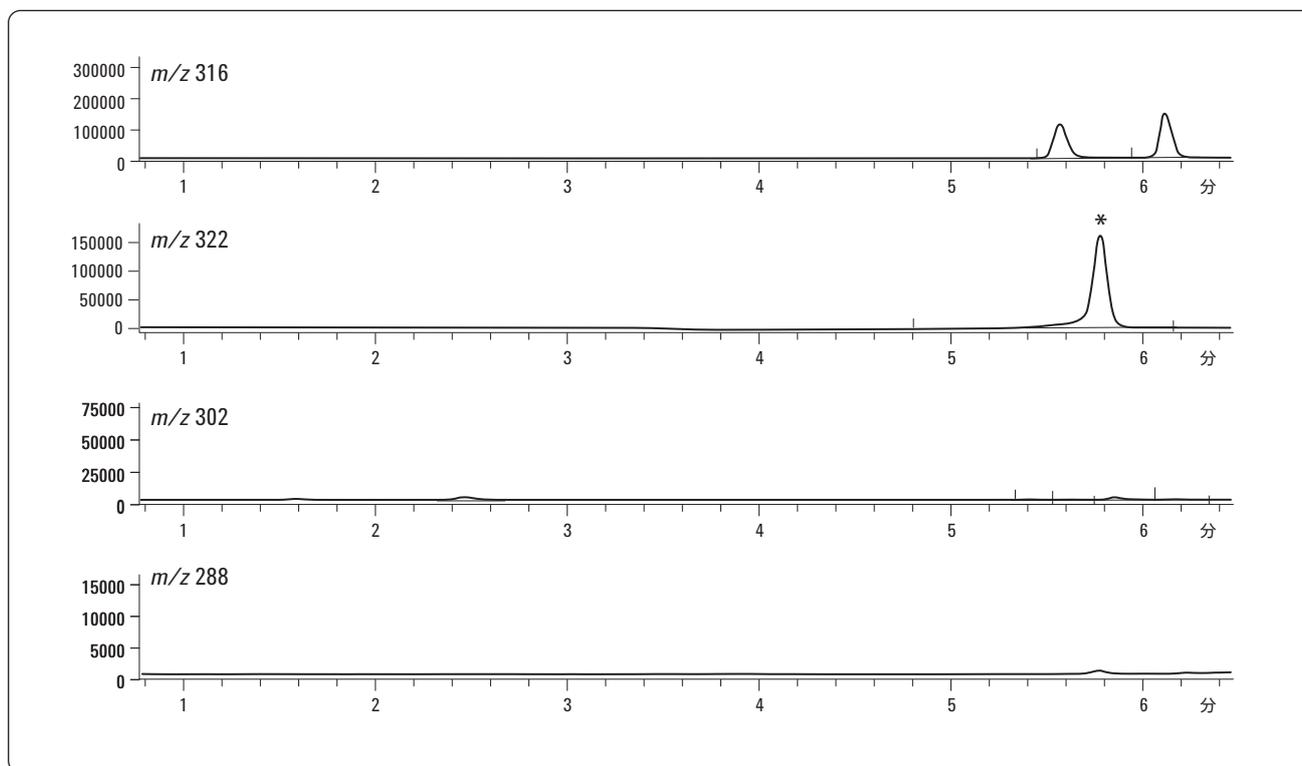


図 3. オキシコドンやその代謝産物が一切含まれないヒト血漿に 40 ng/mL の内部標準、d6-オキシコドン (\*) を添加したサンプル。サンプルを SPE によって抽出したのち、Agilent ZORBAX StableBond SB-C18 カラムを使用した LC/MS システムで分析。図は抽出イオンクロマトグラム。

$m/z=316$  の抽出イオンクロマトグラムにはオキシコドン以外の溶出ピークが 2 本検出されています。図 3 (ブランクの血漿サンプルに関するイオン抽出クロマトグラム) から判断すると、この 2 つのピークは血漿マトリックス由来のピークです。

2 ~ 50 ng/mL のオキシコドン/ノルオキシコドン濃度範囲、および 0.2 ~ 5 ng/mL のオキシモルホン/ノルオキシモルホン濃度範囲において、すべての化合物について、 $R^2$  の値が 0.9900 を超

えるという優れた直線性が見られます。Agilent 1100 シリーズ LC/MS システムによる検出/定量の限界濃度は、オキシコドンについては 0.5 ng/mL、ノルオキシコドンについては 1 ng/mL、オキシモルホンとノルオキシモルホンについては 0.2 ng/mL になります。再現性は、上記の濃度範囲における各複製サンプルセット間の差異が 10% 未満に収まるという良好なレベルです。

## 結論

オキシコドンおよびその代謝産物は、医療分野で扱われる一定の濃度範囲にわたって、Agilent ZORBAX RRHT StableBond SB-C18 カラムを用いた LC/MS システムによって分析可能です。このカラムを選択することにより、分析を効率化/高速化して生産性を高めながら溶媒の使用量を最小限に抑えることができます。どの化合物についても検量線に優れた直線性が見られ、血漿などの複雑なマトリックス中でも高い分析感度と再現性が得られます。

## 参考文献

1. B. Lalovic, et al., "Quantitative Contribution of CYP2D6 and CY3PA to Oxycodone Metabolism in Human Liver and Intestinal Microsomes," *Drug Metabolism and Disposition*. 32, (2004): 447–454.
2. A. Furlan, et al., "Opioids for Chronic Noncancer Pain: A Meta-analysis of Effectiveness and Side Effects," *Canadian Medical Association Journal*. 174(11). (2006): 1589–1594.
3. S. Schlueter, et al., "Determination of Opiates and Metabolites in Blood Using Electrospray LC/MS," *Agilent Technologies Publication 5988-4805*. (2005).

## 詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書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、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、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、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc., 2009  
Published in Japan  
April 2, 2009  
5990-3815JAJP



**Agilent Technologies**