

# 超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) と トリプル四重極 LC/MS システムによる カセット分析と極性切り替え方式を 併用した代謝安定性評価

## アプリケーションノート

### 著者

Anabel S. Fandiño, Edgar Naegele  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA USA

### 概要

本アプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS を用いて、カセット分析と高速極性切り替え方式を併用して代謝安定性を評価した場合の分析性能を示します。

本アプリケーションノートで紹介するメソッドは、次の特徴を備えた UHPLC/MS/MS メソッドです。

- ・ハイスループット分析 (移動相の流速 1.5 mL/分、バイナリポンプ圧 1,100 bar で 0.8 分未満のリテンションタイム)
- ・高速な MS/MS 分析 - わずか 114 ms のサイクルタイムで 6 つの MRM トランジションのモニターと極性の切り替えが可能 (極性の切り替え時間は 30 ms)
- ・優れた精度 - 10% 未満のピーク面積 RSD [%] および相対ピーク面積 RSD [%] 値で、クロマトグラフのピーク (わずか 0.37 sec の半値幅) から十分な数のデータ点 (最低 9 点) を取り込むことが可能
- ・優れた確度 (90.7 ~ 107.1% の範囲内) - 外部または内部標準キャリブレーションを使用することによって全予想濃度範囲において高い直線性を確保
- ・結果の比較が可能 - 極性切り替え方式を使用した分析結果と切り替えなしの分析結果 (親薬物の残存率) を比較することが可能
- ・優れたクロマトグラフ分離能 - 代謝産物がインソースの衝突誘起解離 (CID) によって親薬物へ変化することがなくなるため、親薬物の量を過剰評価する恐れがない



**Agilent Technologies**

## はじめに

代謝安定性検査のような *in vitro* アッセイを実施すれば、生体内での薬物動態特性を大まかに把握できるようになり、その後の開発段階で成功の見込みのない非薬物様化合物を予め除外できるようになります。新薬開発の初期段階では、特性を解析しなければならぬ未知化合物が数多く発見されるため、大量の未知化合物をスクリーニングできる高速なスクリーニングメソッドが必要とされます。代謝安定性評価には、通常、カセット分析と高速な LC/MS/MS メソッドが使用されます。

カセット分析では、分析するサンプルの数を減らすために、ポジティブとネガティブの両方のモードでイオン化する薬物の混合液を培養後に調製します。高い移動相流量と 2  $\mu\text{m}$  未満の充填孔径のショートカラムを使用する高速 LC メソッドでは分析時間が短縮化されるため、サンプルのスループットが高まります [1, 2]。検出は、通常、トリプル四重極質量分析計を使用して MRM (複数反応モニタリング) スキャンモードで行われます。

カセットは、一般的に、ポジティブとネガティブの両方のモードでイオン化する薬物をプールしてから LC/MS/MS 分析器へ送給するような仕組みになっています。こうした設計が採用されているのは、MS/MS 分析では定量データの品質を維持しにくい状況が発生するためです。つまり、高速クロマトグラフィーによって極端に幅の狭いピークが生成された場合、質量分析計へ所定の数 (最低 9 ~ 10 個) のデータ点を取り込む前にピーク溶出が終了してしまう可能性があるためです。しかし、ポジティブとネガティブの両方のモードでイオン化する基質をプールしておけば、こうした状況に柔軟に対応できるようになります。

本アプリケーションノートでは、カセット分析と高速 LC システムを組み合わせるだけでなく、高速極性切り替えの MS/MS 分析も併用したメソッドを紹介します。このメソッドにより、高い精度と確度を維持しながらハイスループットで柔軟な代謝安定性検査が行えるようになります。また、Agilent 1290 Infinity LC システムでは、高速な分析条件下 (圧力 = 1,200 bar, 流量 = 最大 2 mL/min) でも、隣接したピークをきれいに分離することができました。

## 実験

### 試薬および消耗品

塩酸ブスピロンと塩酸ベラパミルは Sigma-Aldrich 社 (米国ミズーリー州セントルイス) から購入しました。デキストロメトルファン、ジクロフェナク、デキストロルファン-d3 (内部標準) は Cerilliant 社 (米国テキサス州ラウンドロック) から購入しました。ジクロフェナク-d4 (フェニル-d4) は CDN Isotopes 社 (カナダ、ケベック州) から購入しました。NADPH 再生系、溶液 A ( $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸塩 (NADP) + グルコース -6-リン酸 + 塩化マグネシウム + 水) と溶液 B (グルコース -6-リン酸脱水素酵素 + 5 mM クエン酸ナトリウム)、および 0.5 M のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) は BD Biosciences 社 (米国マサチューセッツ州ウオーバーン) から購入したものです。Sprague Dawley 雄ラットの S9 肝細胞粉砕液は In vitro Technologies 社 (メリーランド州ボルティモア) から購入しました。使用した試薬および有機溶媒は、すべて HPLC グレードまたは分析グレードの製品で、VWR 社 (ドイツ、ダルムシュタット) から購入したものです。

### ラット肝細胞 S9 フラクションによる基質の培養

一次代謝用の培養混合液は、タンパク質 0.3 mg 相当量の S9 調製液、1  $\mu\text{M}$  の薬物 (水 70% / アセトニトリル 30% のアセトニトリル水溶液を溶媒として 100  $\mu\text{M}$  の原液から調製したブスピロン、ベラパミル、デキストロメトルファン、またはジクロフェナク)、1.3 mM の NADP、3.3 mM のグルコース -6-リン酸、3.3 mM の塩化マグネシウム、0.4 U/mL のグルコース -6-リン酸脱水素酵素、および 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.4) から構成されるもので、合計 300  $\mu\text{L}$  の体積になります。培養は 37°C で行いました。

分析時間を短縮するために、培養後に 4 つの薬物の混合液を調製しました。

0、5、10、15、25、および 35 分の時点で 25  $\mu\text{L}$  のフラクションを各培養液から取り分けて、内部標準 (デキストロルファン-d3 およびジクロフェナク-d4) を含んだアセトニトリル 300  $\mu\text{L}$  を加えることによって反応を止め、14,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離しました。この上澄み液を緩やかな窒素ガス流で乾固させ、0.1% のギ酸を含んだアセトニトリル水溶液 (水とアセトニトリルの体積比は 8 対 2) で再溶解して UHPLC/MS/MS 分析にかけました。

### 機器

- Agilent 1290 Infinity LC システム 1290 Infinity バイナリポンプ (デガッサ装備) + 1290 高性能オートサンブラ (サーモスタット装備) + 1290 Infinity カラム恒温槽)
- Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS システム + Agilent Jet Stream テクノロジー
- Agilent MassHunter Workstation ソフトウェア (機器制御、データ取り込み、およびデータ処理に使用)
- Agilent MassHunter Optimizer ソフトウェア
- Agilent Rapid Resolution High Definition (RRHD) ZORBAX SB-C18.2.1 x 50 mm.1.8  $\mu\text{m}$  カラム

## Agilent 1290 Infinity メソッド

移動相:

A:0.1% のギ酸水溶液

B:0.1% のギ酸アセトニトリル溶液

注入量:1 µL

ニードル洗浄:(0.1% のギ酸を含む) メタノール水溶液 (メタノール/水の体積比 1 対 1) を使用してフラッシュポートで 20 秒間洗浄

### UHPLC メソッド 1:

カラム温度:25°C または 40°C

流量:1.0 mL/min

グラジエント:25% B (0.2 分間)、80% B (1 分の時点)、80% B (1.25 分の時点)、25% B (1.26 分の時点)、停止 (1.8 分の時点)。

### UHPLC メソッド 2:

カラム温度:60 °C

流量:1.5 mL/min

グラジエント:25% B (0.2 分間)、80% B (0.73 分の時点)、80% B (1.00 分の時点)、25% B (1.01 分の時点)、停止 (1.5 分の時点)。

## Agilent 6460A トリプル四重極質量分析計の条件

スキャンモード:MRM (選択した化合物に最適なフラグメンター電圧、MRM トランジション、およびコリジョンエネルギーが MassHunter Optimizer ソフトウェアによって自動的に決定されます。最適化されたパラメータは表 1、2、3 の通りです)

イオン極性:ポジティブ/ネガティブ、ポジティブのみ、またはネガティブのみ

パラメータ:乾燥ガス温度:350°C、乾燥ガス流量:10 L/min、シースガス温度:400°C、シースガス流量:12 L/min、ネブライザ圧:35 psig、ノズル電圧:0 V (+) 1000 V (-)、キャピラリー電圧:4,000 V (+/-)、極性の切り替え時間:30 ms

化合物名	内部標準	プリカーサイオン	Q1 の選択性	プロダクトイオン	Q2 の選択性	ドウェルタイム [ms]	フラグメンターV [V]	CE [V]	極性
ベラパミル		455.3	Unit	165.1	Unit	5	185	26	ポジティブ
ブスピロン		386	Unit	122.1	Unit	5	185	28	ポジティブ
ジクロフェナク-d4	X	298	Unit	254	Unit	5	80	4	ネガティブ
ジクロフェナク		294	Unit	250	Unit	5	95	5	ネガティブ
デキストロメトルファン		272.2	Unit	215.2	Unit	5	190	22	ポジティブ
デキストロメトルファン-d3	X	261.2	Unit	157.1	Unit	5	125	40	ポジティブ

表 1:ポジティブ/ネガティブ切り替えによる MRM 取り込み

化合物名	内部標準	プリカーサイオン	Q1 の選択性	プロダクトイオン	Q2 の選択性	ドウェルタイム [ms]	フラグメンターV [V]	CE [V]	極性
ベラパミル		455.3	Unit	165.1	Unit	22	185	26	ポジティブ
ブスピロン		386	Unit	122.1	Unit	22	185	28	ポジティブ
ジクロフェナク		296	Unit	250	Unit	22	80	8	ポジティブ
デキストロメトルファン		272.2	Unit	215.2	Unit	22	190	22	ポジティブ
デキストロメトルファン-d3	X	261.2	Unit	157.1	Unit	22	125	40	ポジティブ

表 2:ポジティブ極性による MRM 取り込み

化合物名	内部標準	プリカーサイオン	Q1 の選択性	プロダクトイオン	Q2 の選択性	ドウェルタイム [ms]	フラグメンターV [V]	CE [V]	極性
MRM トランジション 1		455.3	Unit	165.1	Unit	22	185	26	ネガティブ
MRM トランジション 2		386	Unit	122.1	Unit	22	185	28	ネガティブ
ジクロフェナク		294	Unit	250	Unit	22	95	5	ネガティブ
MRM トランジション 3		272.2	Unit	215.2	Unit	22	190	22	ネガティブ
ジクロフェナク-d4	X	298	Unit	254	Unit	22	80	4	ネガティブ

表 3:ネガティブ極性による MRM 取り込み\*

\* ポジティブ/ネガティブ切り替え方式と Dwell time を揃えるためにモニターしています。

## 結果と考察

### 高速極性切り替え方式を使用した場合の分析速度とデータ品質

最大 1,100 bar の圧力、高流量 (1.0 mL/min または 1.5 mL/min) で UHPLC システム を稼働させると、わずか 1.5 分で分析を完了させることができ、半値幅 1 秒未満 (通常は、0.4 ~ 1.0 秒) のピークが得られました。質量分析のサイクルタイムが短いため、ピーク全体にわたって十分な数 (9 点を超える数) のデータ点を確保

することができます。精度の高い定量が行えます (面積 RSD [%] および相対面積 RSD [%] = 目的化合物の面積 / 内部標準の面積 < 10)。図 1 は、1.5 mL/min と 1.0 mL/min の流量を使用したときの MRM クロマトグラム、データ品質、および分析時間を比較したものです。

精度の高い定量を行うには、全てのピークに対して 9 ~ 10 個のデータ点を取り込む必要があります。ピークの幅が狭くなるにつれ、質量分析計の取り込み速度を高速化しなければなりません。

質量分析のサイクルタイムが短くなります。サイクルごとに MS システムは 6 つの MRM トランジションをモニターして極性を切り替えなければなりません。こうしたことが可能になるのは、ジクロフェナクについて図 2 に示した通り、極性が 30 ms で切り替えられ、合計サイクルタイムが僅か 114 ms に抑えられているからです。図 2 は、半値幅 0.37 のピークについても合計 9 個のデータ点を質量分析計でモニターすることができ、それぞれ 4.8 と 7.9% という優れた面積 RSD と相対面積 RSD 値が得られたことを示しています。

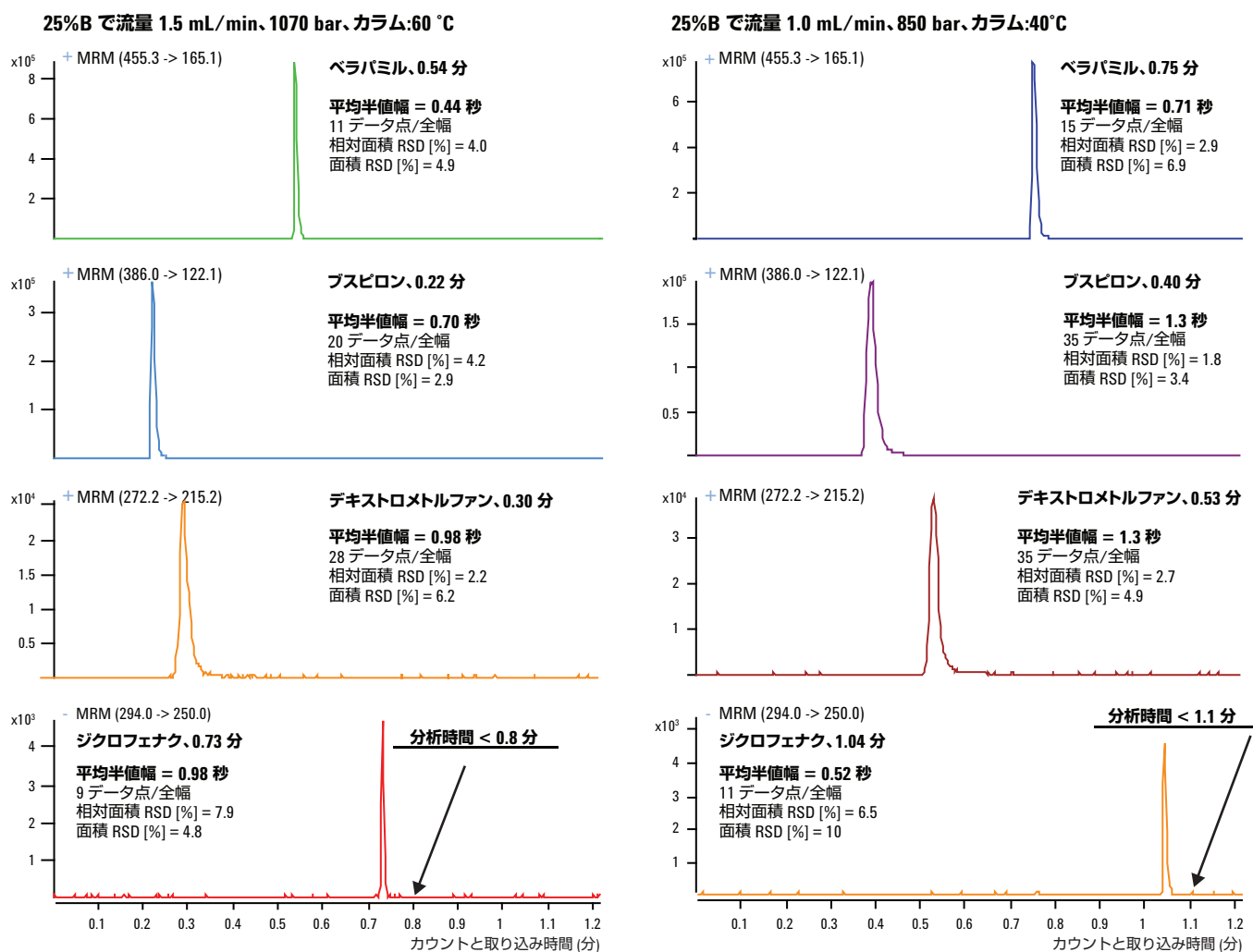


図 1: 1.5 mL/min と 1.0 mL/min の流量を使用して得られた MRM クロマトグラム、データ品質、および分析時間

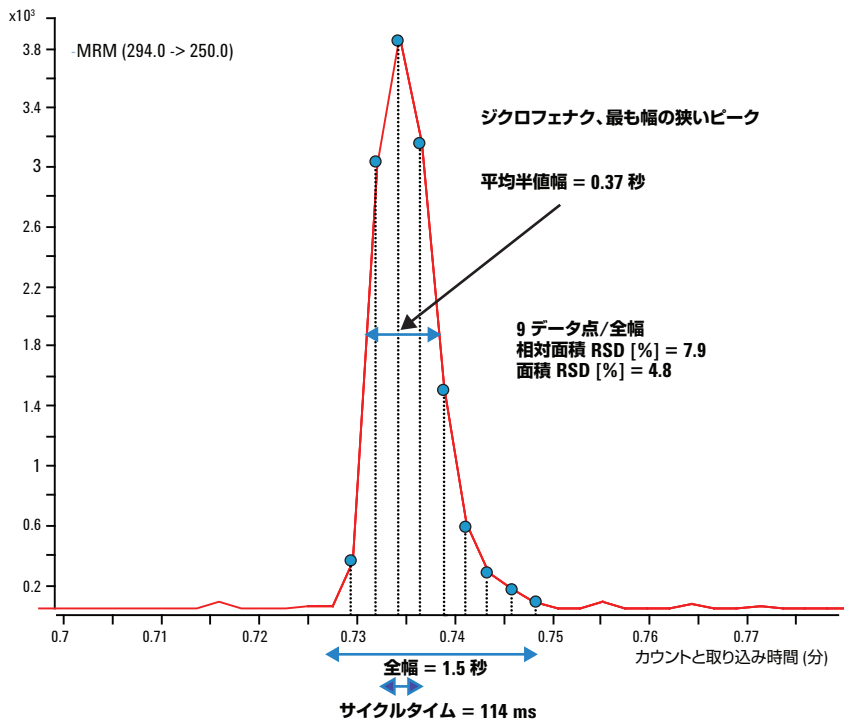


図 2: 1.5 mL/min の流量を使用して得られたジクロフェナクの MRM クロマトグラム。この図は、ピークの半値幅 (0.37 秒) とピーク全幅で取り込まれたデータ点の数 (9 データ点) を示したものです。

### 高速極性切り替え方式を使用した場合の直線性/精度/確度の評価

直線性/精度/確度は、UHPLC メソッド 1 (流量 = 1.0 mL/min、カラム温度 = 25°C) で標準溶液を分析して評価しました。予想される範囲の全域で親化合物の残存率を算出しました。外部および内部キャリブレーションを使用した直線性テストの結果から分かる通り、カセット分析と極性切り替え方式を併用した場合、予想範囲の全域で直線的な分析結果が得られます。さらに、表 4 に示すように、すべてのレベルで優れた精度/確度値が得られました。内部標準キャリブレーションを使用したときには、35Cl2-ジクロフェナク-d4 (m/z 298) と 37Cl2-ジクロフェナク (m/z 298) との間に食い違いが見られました。37Cl2-ジクロフェナクに由来する 298 から 254 への MRM トランジションのレスポンスは、内部標準 35Cl2-ジクロフェナク-d4 のレスポンスに寄与します。このため、内部標準の人為的な増加による二次曲線化が起こります。この問題は、外部キャリブレーションを使用するか、または 298 → 217 (CE = 17) のような独特なジクロフェナク-d4 トランジションを使用することによって解決できます。

	ブスピロン		ベラパミル		デキストロメトर्फアン		ジクロフェナク	
	外部 キャリブレーション	同位体 希釈	外部 キャリブレーション	同位体 希釈	外部 キャリブレーション	同位体 希釈	外部 キャリブレーション	同位体 希釈
タイプ	直線	直線	直線	直線	直線	直線	直線	二次曲線
r <sup>2</sup>	0.9989	0.9994	0.9965	0.9989	0.9978	0.9980	0.9990	0.9991
確度レンジ [%]	97.4 – 102.0	94.4 – 107.1	90.7 – 105.1	96.2 – 103.2	97.6 – 102.4	95.5 – 106.1	96.2 – 103.1	99.9 – 100.4
面積 RSD [%]	2.4 – 6.1		2.3 – 6.9		3.7 – 5.1		1.7 – 8.0	
RSD 範囲 [%]	n.a	1.7 – 4.9	n.a	1.4 – 6.0	n.a	2.6 – 5.9	n.a	0.9 – 4.1

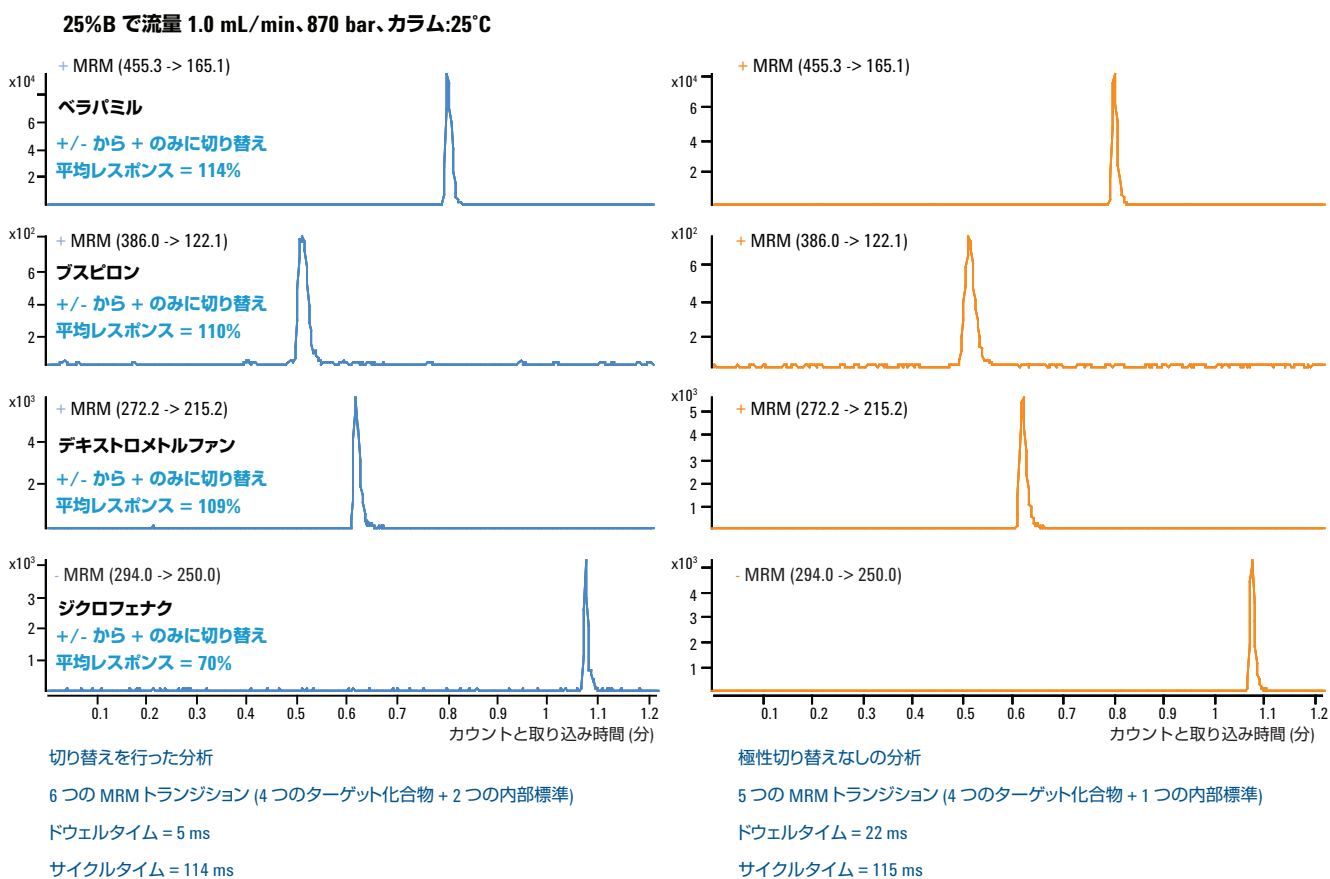
表 4: カセット分析と高速極性切り替え方式を併用した場合の検量線タイプ、相関係数 (r<sup>2</sup>)、確度レンジ [%]、面積 RSD [%]、および相対面積 RSD レンジ [%]。注: 「n.a」と記されている箇所は、該当する数値のない欄です。

### 極性切り替えを行った分析と切り替えなしの分析 – プールした培養液の面積レスポンスと精度

切り替えを行った分析 (高速極性切り替え方式の分析) でも、切り替えなしの分析 (ポジティブモードのみ、またはネガティブモード

のみの分析) でも、平均面積レスポンスに大きな差はありませんでした。面積 RSD および相対面積 RSD の値は、極性切り替えを行った分析では 10.4% 未満になり、切り替えなしの分析では 8.6% 未満になりました。

図 3 は、プールされた培養液を 1.0 mL/min の流量、25°C のカラム温度 (UHPLC メソッド 1) で分析したときの MRM クロマトグラム、平均面積レスポンス、および相対面積 RSD [%] を比較したものです。



時間 [分]	プスピロン		ベラパミル		デキストロメトルファン		ジクロフェナク		面積 RSD [%]	
	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]	相対面積 RSD [%]
0	2.7	0.5	8.7	1.0	3.0	2.7	3.2	1.5	5.3	3.6
5	5.2	3.3	8.1	2.8	5.7	2.9	6.4	1.4	3.9	7.0
10	7.2	4.9	6.5	5.5	5.0	3.7	8.1	2.5	2.4	4.1
15	4.0	3.9	4.8	2.0	4.1	2.4	8.9	3.0	10.2	5.2
25	3.2	4.3	5.6	1.7	10.4	1.7	6.8	2.4	4.3	4.8
35	9.2	3.8	5.4	5.8	8.9	8.6	6.3	2.9	6.9	8.6

図 3: 高速極性切り替えを使用した分析 (左側) と切り替えなしの分析 (右側) の平均面積レスポンスを示す MRM クロマトグラム。一番下の表は、高速極性切り替えを使用した分析の精度と切り替えなしの分析の精度を培養時間別に比較したものです。



## 切り替えを行った分析と切り替えなしの分析 – 代謝安定性 (親薬物の残存率)

親薬物の残存率は、培養時間 5 分、10 分、15 分、25 分、および 35 分のサンプルで測定した親化合物と培養時間 0 分の各サンプルで測定した親化合物の平均相対面積を比較する

ことによって決定し、次のような計算式に基づいて算出しました。

親化合物の残存率 = (培養時間 x における平均相対面積 / 培養時間 0 における平均相対面積) x 100

図 4 は、ベラパミルについて高速極性切り替えを使用した分析結果と切り替えを使用しなかった分析結果の相関関係を示したものです。極性切り替えを使用した分析結果と切り替えなしの分析結果は、どの薬物についてもほぼ同じで、 $r^2$  の値は 0.9848 未満になりました。

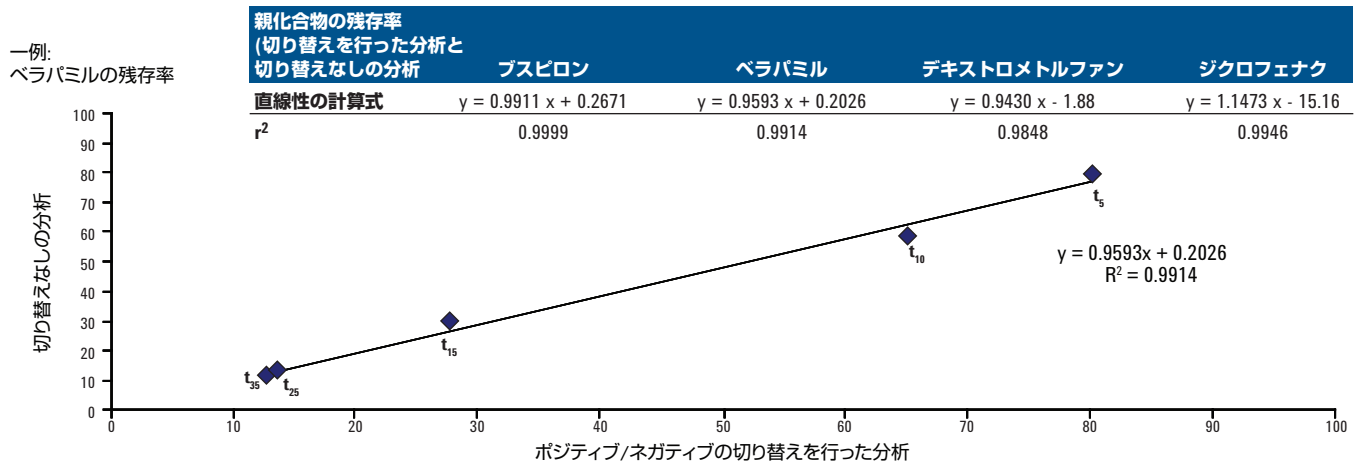


図 4:UHPLC メソッド 1 (流量 = 1.0 mL/min、カラム温度 = 25°C) で高速極性切り替えを行った分析と切り替えなしの分析による親薬物の残存率の比較

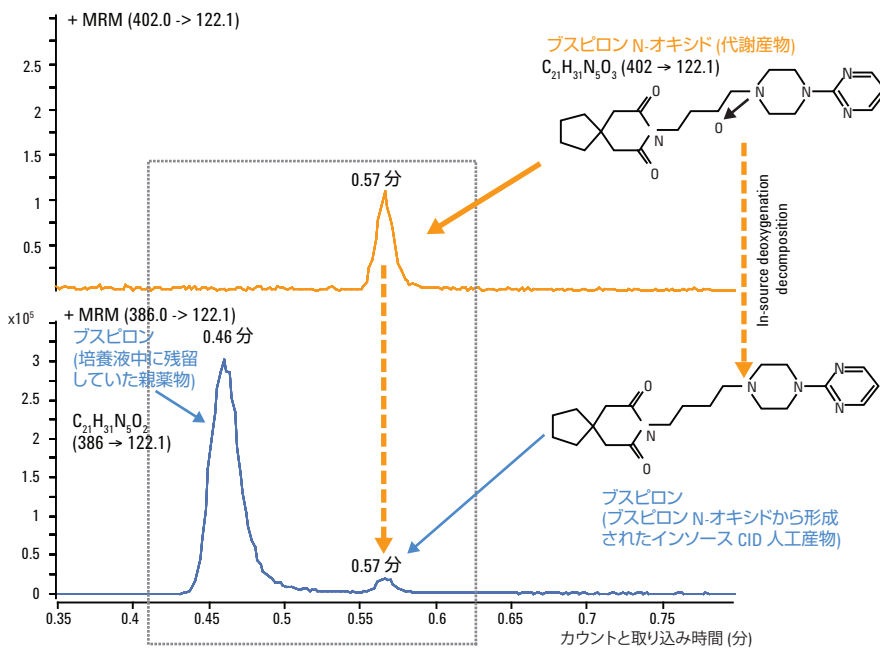


図 5:もともと培養液中にあった親薬物ブスピロンと、その代謝産物の 1 つであり、インソース脱酸素化反応によってブスピロンに変化する化合物 (ブスピロン N-オキシド) に関する優れたクロマト分離能。

## クロマトグラフの分離能 – カセット分析の利点

隣接したピークをきれいに分離できることが実証されました。代謝安定性の検査で重視されるのは、S9 肝細胞フラクションによって生成された代謝産物を親化合物からきれいに分離できる高いクロマト分離能があるかどうかという点です。代謝産物が熱に不安定な物質で、インソース CID によって親化合物に変化する可能性がある場合、そうした代謝産物の共溶出によって親化合物の量が過剰に評価される恐れがあります。図 5 は、脱酸素化によってブスピロン N-オキシドがブスピロン (親薬物) に変化する例を示したものです。ブスピロンとブスピロン N-オキシドをクロマト分離する能力があれば、親薬物であるブスピロン (もともと培養サンプル中に存在していた化合物、リテンションタイム = 0.46 分) と人為的に形成されたブスピロン (ブスピロン N-オキシドからインソース CID によって形成された化合物、リテンションタイム = 0.57 分) を区別できるようになります。

## 結論

Agilent UHPLC/MS/MS システムでカセット分析と高速極性切り替えを併用した場合、次のような利点が得られます。

- カセットデザインの柔軟性: ポジティブとネガティブの両方のモードでイオン化する化合物を一箇所にプールしておくことが可能
- ハイスループット分析 (移動相の流速 1.5 mL/分バイナリポンプ圧 1,100 bar で 0.8 分未満のリテンションタイム)
- 高速な MS/MS 分析 - わずか 114 ms のサイクルタイムで 6 つのトランジションのモニターと極性の切り替えが可能 (極性の切り替え時間は 30 ms)
- 優れた精度 - 10% 未満のピーク面積 RSD [%] および相対ピーク面積 RSD [%] 値で、クロマトグラフのピーク (わずか 0.37 sec の半値幅) から十分な数のデータ点 (最低 9 点) を取り込むことが可能
- 優れた確度 (90.7 ~ 107.1% の範囲内) - 外部または内部標準キャリブレーションを使用することによって全予想濃度範囲において高い直線性を確保
- 結果の比較が可能 - 極性切り替え方式を使用した分析結果と切り替えなしの分析結果 (親薬物の残存率) の比較が可能
- 優れたクロマト分離能 - 代謝産物がイオンソースの衝突誘起解離 (CID) によって親薬物へ変化することで起こる、親薬物の量を過剰評価してしまう恐れがない

## 参考文献

1. Timothy J. Carlson and Michael B. Fisher, "Recent Advances in High Throughput Screening for ADME Properties," *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, Vol 11, No 3, March 2008, 258-264.
2. Walter A. Korfmacher, "Principles and applications of LC-MS in drug discovery", *Drug Discovery Today*, Vol 10, No 20, October 2005, 1357-1367.

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

本製品は薬事法に基づく医療機器の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。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。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc., 2009

Published in Japan, September 15, 2009.  
5990-4469JAJP



**Agilent Technologies**