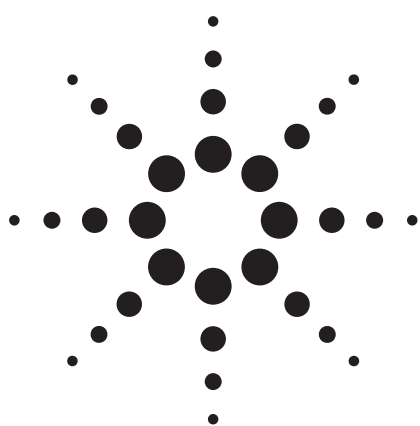


2 μm 未満の粒子のカラムと 液体クロマトグラフによる、 生体サンプルからの代謝物単離の向上



アプリケーション

医薬品

著者

Amanda G. Culp
5 Moore Drive
P.O. Box 13398
GlaxoSmithKline
Research Triangle Park
USA

要旨

開発中の医薬品を早期に商業ベースに乗せるという要求は、近年ますます高まっています。[1] そのため、分析の品質を維持したまま、より迅速に分析を行う必要があります。粒径 2 ミクロン未満の充てん剤を充てんしたカラムにより、高速、高分離の液体クロマトグラフィが可能になりました。血漿や尿などの複雑なマトリックスから代謝物を単離する場合、サンプル単離の効率を高め、代謝物の純度や回収率を低下させないことが重要です。低濃度の代謝物を単離するアプリケーションでは、微小粒子カラムの利点が発揮されます。

緒言

薬物代謝と薬物動態 (DMPK) では、*in vitro* および *in vivo* の両方において、医薬品関連成分を同定することが必要となります。[2,3] ある代謝物に対して、LC/MS から得られる構造情報のみでは不十分で、核磁気共鳴分析法 (NMR) によりさらにキャラクタライゼーションを行う場合、LC による分離は重要なステップになります。血漿、尿、排泄物、肝臓、胆汁など、さまざまな複雑な生体マトリックスから代謝物を単離する必要があります。2 ミクロン未満の粒子のカラムを用いると、迅速かつ優れた分離が可能になるため、代謝物単離の時間短縮方法として従来の HPLC メソッドを再評価しました。[4, 5]

実験

ラピッドレゾリューション LC

ラピッドレゾリューション LC (RRLC) システムと 1.8 μm カラムを使用して、分離の向上について検討しました。使用した RRLC システムの構成は図 1 のとおりです。

- 1200 シリーズ SL バイナリポンプ、マイクロダガッサ付き
- 1200 シリーズ 高性能オートサンブラ
- 1200 シリーズ カラムコンパートメント
- 1200 シリーズ 高速可変波長型検出器
- 1100 シリーズ フラクションコレクタ



Agilent Technologies

長さや充填剤の粒子径の異なる ZORBAX SB-C18 カラムを使用しました。保持容量と流量を一定に維持するため、内径 4.6 mm のカラムを用いました。必要量のフラクションを得るためには、約 1 mL/min の流量が理想的です。使用カラムは、下記のとおりです。

- 4.6 x 250 mm、5 μm、PN 880975-906
- ラピッドレゾリューション 4.6 x 150 mm、3.5 μm、PN 863953-902
- ラピッドレゾリューション HT 4.6 x 150 mm、1.8 μm、PN 829975-902
- ラピッドレゾリューション HT 4.6 x 100 mm、1.8 μm、PN 828975-902

移動相には、移動相 A: 10 mM 酢酸アンモニウム pH 5.0 と移動相 B: 75:25 ACN: MeOH、を用いました。標準フローセル (部品番号 G1314-60086) を搭載した可変波長型検出器 (VWD) により 235 nm をモニタリングし、ピーク幅を 0.005 分以上またはレスポンスタイムを 0.12 秒に設定しました。

オリジナルメソッド (4.6 x 250 mm カラム) のグラジエントテーブルは、以下のとおりです。

時間	%B
0	20
35	35
50	55
55	100
55.1 ~ 60	20

ラピッドレゾリューション (RR) とラピッドレゾリューションハイスループット (RRHT) カラムでは、長さ按比例してグラジエントテーブルを短縮しました。

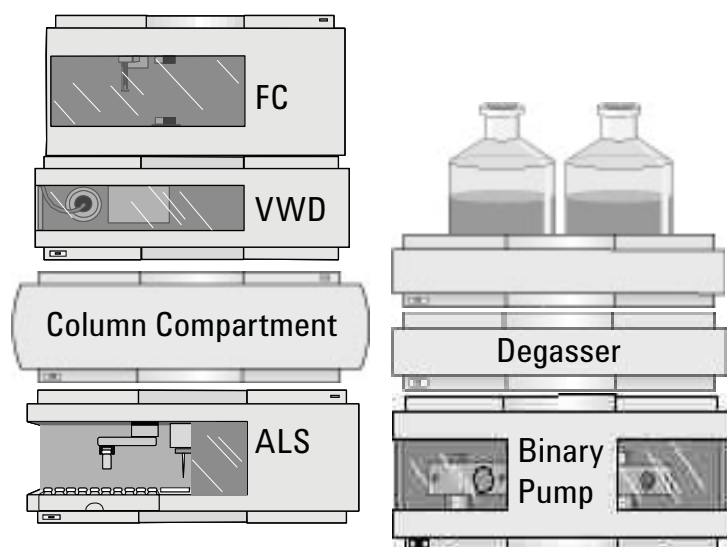


図 1. 医薬品代謝物の迅速な同時検出/単離のための RRLC システム

サンプル

尿分析の結果を図 2 と 3 に示します。尿のサンプル前処理は、遠心濃縮機により 10 倍に濃縮し、初期移動相で再溶解しました。さらに、微粒子を除去するため、注入前に再度遠心分離しました。

この手法は、血漿、肝臓のホモジネート、排泄物のホモジネートに用いることができます。サンプルは、抽出 (サンプル: アセトニトリル = 1:3)、ボルテックスによる混合、遠心分離の前処理を行います。抽出物を初期移動相で再溶解し、遠心分離して注入します。胆汁の場合、通常前処理なしで注入します。

尿分析の結果は図 2 と 3 のとおりです。医薬品代謝物はクロマトグラムにより、M5、M13、M15、M17 として同定されました。

結果および考察

我々の研究室では、分析サンプルの複雑さによって、4.6 mm x 250 mm、5 μm カラムを用いた場合の分析時間は 60 分から最高 3 時間に及ぶことがあります。今回の目的は、分離を維持しながら既存のメソッドを利用し、分析時間を短縮することです。

サンプル負荷量を考慮してカラムの内径を決定します。一般的に、マトリックスの 1 mL 中に、関連代謝物はナノグラムまたはマイクログラム単位で存在し、サンプルの大部分は内因性物質です。代謝物をより多く得るために、カラムが過負荷になることがよくあります。カラムに大量にサンプルが注入された場合、過負荷とクロマトグラフィ結果の低下の原因につながります。そのため、関連代謝物と内因性物質の共溶出を防ぐために、適切な

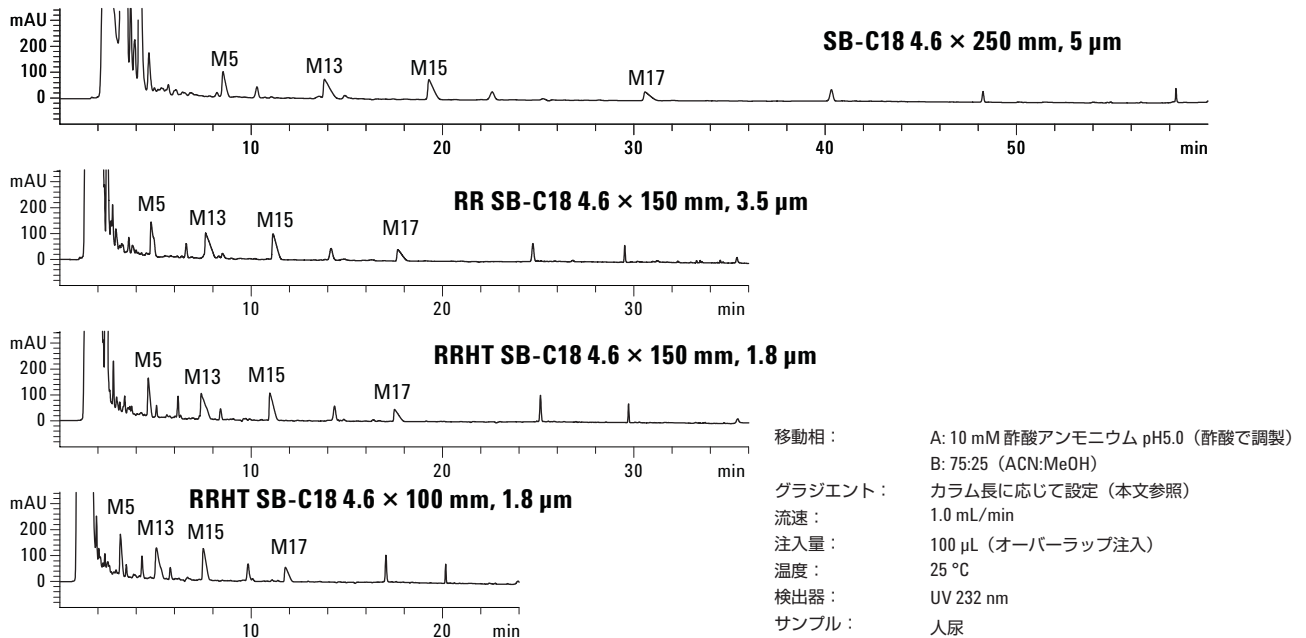
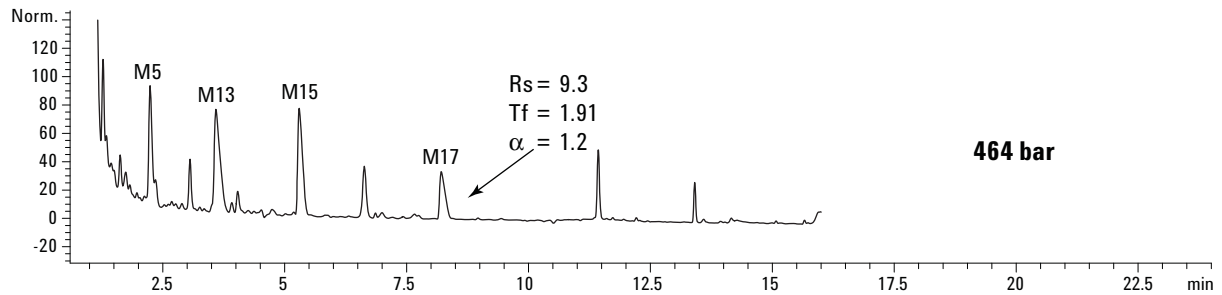
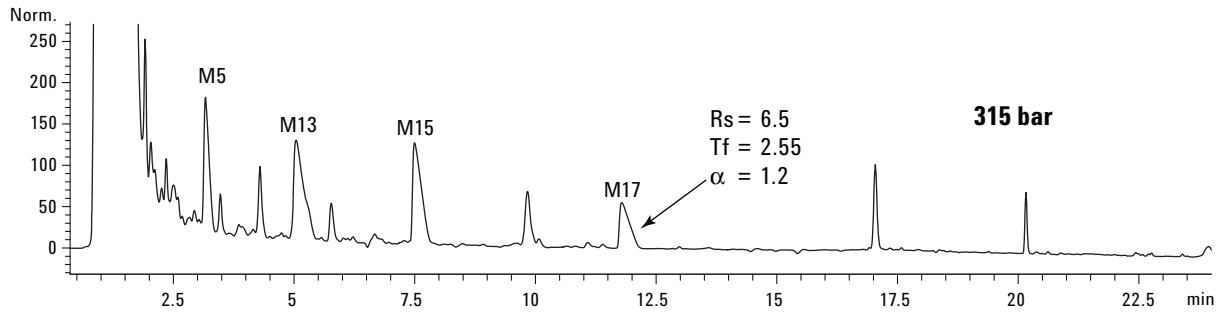


図 2. SB-C18 カラムの拡張性による、DMPK 代謝物単離メソッドのスループットの増加



R_s = 分離度	移動相 :	A: 10 mM 酢酸アンモニウム pH5.0 (酢酸で調製)
T_f = テーリングファクタ (USP 5%)		B: 75:25 (ACN:MeOH)
α = 選択性	グラジエント :	本文参照
	流速 :	1.0 mL/min (上), 1.5 mL/min (下)
	注入量 :	100 μ L (オーバーラップ注入, 上)
		50 μ L (オーバーラップなし, 下)
	温度 :	25 $^{\circ}$ C
	検出器 :	UV 232nm
	サンプル :	人尿

図 3. 流量増加と注入量減少の RRHT 分析への影響

量のサンプルを注入し、繰り返し分析する必要があります。非常に少量の物質を単離する場合、この方法はかなりの時間を必要とします。

ハイスループットは我々のラボの最終目的ではありませんが、スループットの向上は重要なファクタとなります。Agilent 1200 シリーズ RRLC とラピッドレゾリューションカラムを用いて得られた結果を示します。内因性化合物のバックグラウンドの存在下で医薬品関連物質を同定する効果的な方法として、 ^{14}C 放射性同位体が代謝研究ではしばしば用いられます。2 ミクロン未満の粒子径のカラムと同位体元素を組み合わせた研究は、今後の論文

の題材になると考えられます。ここでは、 ^{14}C 放射性同位体を医薬品に組み込んでいません。単離目的のために、UV レスポンスのみをモニタリングしました。

図 2 に、尿サンプルの分離の比較を示しました。ZORBAX SB-C18 4.6 mm x 250 mm, 5 μ m カラムを用いたオリジナルの方法では、分析に 60 分を要しました。比較のために、同サンプルを、4.6 mm x 100 mm, 1.8 μ m カラムと 4.6 mm x 150 mm, 1.8 μ m および 3.5 μ m カラムで分離しました。グラジエントはカラム長に比例して変更しました。

予想どおり、粒子径とカラム長を短くすると、分離と UV レスポンスの両方が増加しました。各代謝物の UV レスポンスとピーク幅の一覧を、表 1 に示します。各代謝物に対して、ピーク形状が著しく向上し、理論段数が増加しました。内径 2.1 μm カラムを用いると、カラム性能はさらに向上すると予想されます。

図 2 では、SB-C18 カラムメソッドの堅牢性と拡張性も実証されています。カラムの粒径や長さを変えても、選択性への影響を最小限に抑えることができました。これは、それぞれの分析において、同じ溶出パターンが確認されたことからわかります。精製される代謝物をできるだけ多く得る目的で意図的にカラムを過負荷にしたため、目的のピークはテーリングしています。

表 1. さまざまなカラムを用いた際のピーク高さ

	M5	M13	M15	M17
4.6 x 250 mm, 5 μm 60 分	105 mAU 30 秒	75 mAU 48 秒	75 mAU 48 秒	25 mAU 60 秒
4.6 x 150 mm, 3.5 μm 36 分	145 mAU 22 秒	100 mAU 34 秒	100 mAU 33 秒	40 mAU 48 秒
4.6 x 150 mm, 1.8 μm 36 分	165 mAU 18 秒	105 mAU 34 秒	105 mAU 30 秒	45 mAU 36 秒
4.6 x 100 mm, 1.8 μm 24 分	180 mAU 17 秒	135 mAU 33 秒	130 mAU 24 秒	55 mAU 30 秒

従来の 4.6 x 250 mm, 5 μm カラムを RRHT 4.6 x 100 mm に置き換えた場合、同じサンプル注入量で、ピーク高さは平均 46% 高くなり、ピーク幅は平均 44% 狭くなりました。これにより、分離する際のピークの重なりを最小限にすることができ、フラクションを組み合わせる必要性がなくなります。さらに、分析時間が半分以下に短縮されました。これにより、ラボの生産性向上を図ることができます。

流量を 1 mL/min から 1.5 mL/min に上げ、注入量を 100 μL から 50 μL に減らすことで、結果を簡単に向上させることができました。図 3 には、図 2 のクロマトグラムの一部の拡大と、最適化した場合のクロマトグラムとその条件を示しました。分析速度が約 3.8 倍速くなり、ピーク形状も向上しました。システム背圧 (最大) は、1.5 mL/min の分析で 464 bar、1 mL/min 分析で 315 bar で、両方とも Agilent 1200 RRHC システムの使用範囲 (600 bar) 内でした。ZORBAX 1.8 μm の充てん剤のカラムは、他の 2 ミクロン未満の充てん剤のカラムより低い圧力となるように特別に設計された粒度分布を有しています。

結論

RRHT 技術により、ラボの効率向上が可能です。従来のカラムを RRHT カラムに置き換えることで、分離を低下させることなく、スループットを高めることができます。粒子径の小さい (1.8 または 3.5 μm) カラムを使用することにより、高分離やピーク形状の改善が可能です。さらに、分析時間もカラム長に比例して短縮されます。これらの利点により、ラボの生産性が向上します。このメソッドは、さまざまな粒子径の SB-C18 カラム間で簡単に拡張可能で、尿や血漿などの複雑なマトリックスを含むサンプルを、最小限のサンプル前処理で分析することができます。

参考文献

1. M. Rouhi, *Chemical and Engineering News*, June 19 (2006) pp. 26-28.
2. D. Dalvie, *Current Pharmaceutical Design*, 6 (2000) pp. 1009-1028.
3. J. G. Dain, J. M. Collins, and W. T. Robinson, *Pharmaceutical Research*, Vol. 11 No. 6 (1994) pp. 925-928.
4. A. D. Broske, R. D. Ricker, et. al. The Influence of Sub-Two-Micron Particles on HPLC Performance, Agilent Technologies publication, 5988-9251EN.
5. W. E. Barber, M. Joseph, and A. D. Broske, Increasing Sample Throughput Using ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT Columns, Agilent Technologies publication, 5988-9997EN.

謝辞

本論文に協力いただいた、GlaxoSmithKline 社の Stephen Castellino 氏に謝意を表します。

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 をご覧ください。

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。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
July 8, 2008
5989-6668JAJP