

Plexa PAX を用いた ヒト血漿からの酸性化合物の抽出

アプリケーションノート

創薬

著者

William Hudson
Agilent Technologies, Inc.
25200 Commercentre Drive
Lake Forest, CA 92630
USA

はじめに

製薬業界で用いられる生体試料中の分析対象化合物は、多くが塩基性であり、疎水性またはカチオン交換充填剤により簡単に抽出できます。しかし、脂質低下薬のスタチンや抗炎症薬は、本質的に酸性となる傾向があります。こうした化合物は、従来の疎水性相互作用の充填剤を用いた抽出では、問題が生じることがあります。こうした化合物に適した、ポリマ系強アニオン交換充填剤が、新たに登場しました。

Plexa PAX を用いて、酸性化合物に適した簡単な汎用メソッドを開発しました。充填剤ベッドからの分析対象化合物の回収率、抽出サンプルのレスポンスの直線性、添加血漿サンプル分析の精度と正確性を調査することにより、メソッドの性能を評価しました。

メソッドバリデーションプロセスは時間がかかり、かつ高品質のデータが求められるため、高い再現性で良好な回収率が短時間で得られる固相抽出 (SPE) メソッドの使用が推奨されます。データの完全性を損なわない範囲内で SPE プロセスを能率化すれば、メソッドバリデーションを単純化および短縮することができます。Bond Elut Plexa ファミリーを使えば、標準メソッドがあるのでメソッド開発を簡略化でき、分析の感度と再現性を高めることが可能です。



Agilent Technologies

材料と方法

SPE 用試薬と溶媒

2 % NH ₄ OH	アンモニア水 (28~30 %) 20 µL を蒸留水 1 mL に添加
5 % ギ酸 MeOH	ギ酸 0.050 mL をメタノール 1 mL に添加
Plexa PAX 30 mg 96 ウェルプレート (部品番号 A4967030)	

SPE メソッド

	Plexa PAX (30 mg)
サンプル	ヒト血漿 100 µL
前処理	2 % NH ₄ OH で 1:3 に希釈
コンディショニング	1. MeOH 500 µL 2. H ₂ O 500 µL
洗浄	1. H ₂ O 500 µL 2. MeOH 500 µL
溶出	5 % ギ酸 MeOH 500 µL

すべてのサンプルを乾固させ、5 mM ギ酸アンモニウム水溶液/CH₃OH (80:20) 100 µL に再溶解しました。

LC/MS 分析には Agilent 325 LC-MS/MS – vESI を使用しました。

LC 条件

移動相	A : 5 mM ギ酸アンモニウム B : メタノール
グラジエント	t = 0 – 50 % A : 50 % B t = 2:0 - 2:59 分 20 % A : 90 % B t = 3:0 - 4:00 分 50 % A : 50 % B
カラム	Pursuit XRs Diphenyl 2.0 x 50 mm, 3 µm

MS 条件

化合物	LogP	PKa
アトルバスタチン	5.7	4.5
ジクロフェナク	4.2	4.2
フロセミド	1.5	4.7
ケトプロフェン	3.2	5.2
プラバスタチン	2.6	4.6

化合物	Q1	Q3	CE
アセチルサリチル酸	136.0	136.0	5.0 V
アトルバスタチン	557.4	397.0	30.0 V
ジクロフェナク	293.7	249.6	10.5 V
フロセミド	328.8	284.7	13.0 V
ケトプロフェン	252.7	208.7	7.0 V
プラバスタチン	423.3	320.1	13.0 V

キャピラリ	41 V
ドライガス温度	285 °C、30 psi
ボルテックスガス	300 °C、20 psi
ネブライジングガス	50 psi
CID	アルゴン
極性	ネガティブ

結果と考察

分析対象化合物の回収率

分析対象化合物のレスポンスを移動相添加標準物質と比較し、回収率を測定しました。不完全な抽出、イオン抑制、不溶出に起因する分析対象化合物のロス、回収率として測定されます。一部の物質の回収率は 50~60 % の範囲内でしたが、検量線で示される MS のレスポンスは、直線性が高く、高精度でした。回収率 50 % 以上での再現性も良好で、RSD は 7 % 未満でした (表 1)。

0.5 ng/mL~200 ng/mL の範囲で優れた直線性が得られました (図 2)。50 ng/mL の中点濃度から、検量線の正確な精度を測定しました (表 2)。

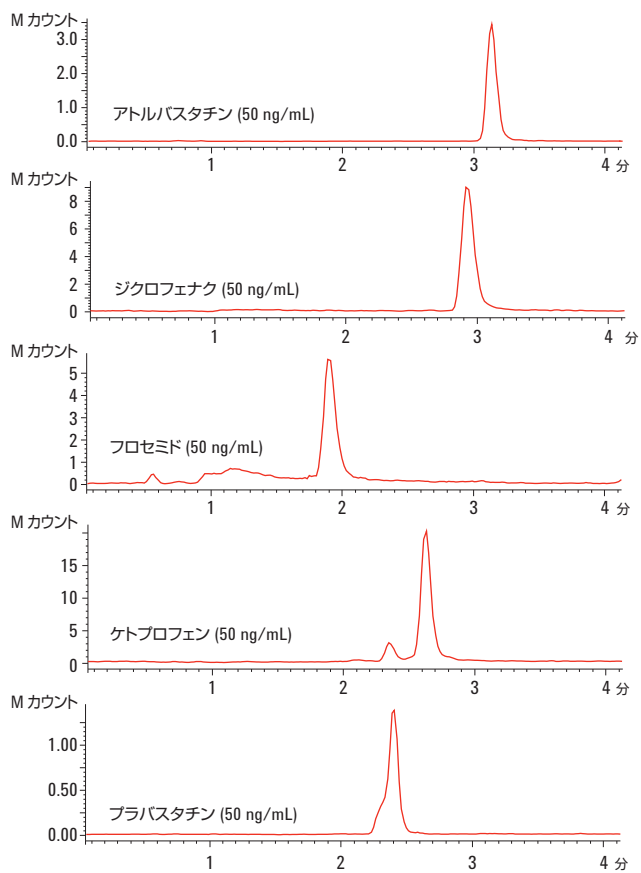


図 1. ヒト血漿の 50 ng/mL 抽出サンプルから得られたクロマトグラム

表 1. 分析対象化合物の回収率

	PAX % 回収率	RSD (n=6)
アトルバスタチン	62 %	4.4 %
ジクロフェナク	52 %	3.7 %
フロセמיד	96 %	6.1 %
ケトプロフェン	67 %	2.3 %
プラバスタチン	95 %	3.4 %

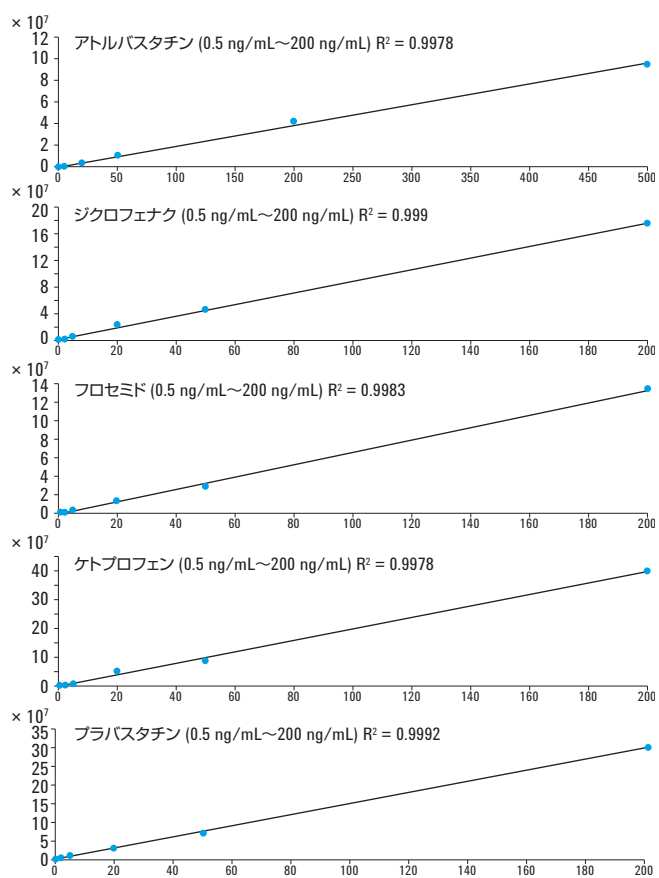


図 2. 検量線

表 2. 精度

	0.5 ng/mL 精度	RSD (n=8)	50 ng/mL 精度	RSD (n=8)
アトルバスタチン	90 %	11 %	106 %	11 %
ジクロフェナク	116 %	14 %	109 %	6 %
フロセמיד	99 %	14 %	95 %	9 %
ケトプロフェン	104 %	13 %	108 %	4 %
プラバスタチン	108 %	9 %	96 %	8 %

結論

Plexa PAX を用いて、酸性化合物を抽出するための簡単でシンプルなメソッドを開発しました。すべての化合物で良好な回収率が得られ、ヒト血漿添加濃度 0.5~200 ng/mL の範囲で直線的な結果が得られました。検量線の直線性も良好で、1 次回帰の相関係数は 0.995 を上回りました。精度と再現性も十分なもので、ほとんどの分析結果は真値の 10 % 以内で、RSD はすべての化合物で 15 % を下回りました。

詳細情報

本書に記載のデータは、代表的な結果です。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。

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。

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., 2011

Printed in Japan

September 23, 2011

5990-9027JAJP



Agilent Technologies