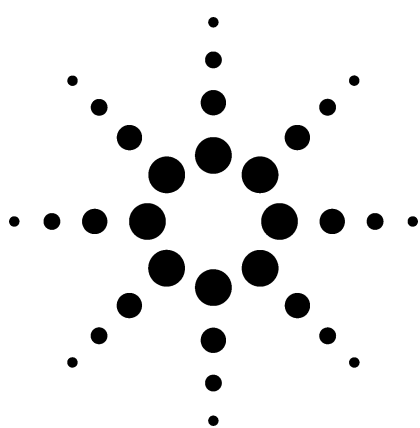




親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC) 分離による塩基性薬物のMS/MS 検出 アプリケーション

薬物分析

著者

Tatsunari Yoshida, Kazuo Yamanaka, and Hiroki Kumagai
Yokogawa Analytical Systems, Inc.
9-1 Takakura-Cho, Hachioji-Shi, Tokyo 192-0033
Japan

Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要旨

塩基性薬物であるラニチジンとパロキセチンを、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を使用して分離しました。溶出の順序は、逆相クロマトグラフィー(RPLC)とは逆の結果となりました。0.5 ~ 100 ppb において高い直線性を示しました。スパイクした血清はタンパク沈殿によりクリーンアップし、上澄をHILIC/ESI-MS システムに直接注入しました。100 ppb の濃度で、ラニチジンの回収率は98%、パロキセチンの回収率は79% でした。

はじめに

RPLC は、その汎用性からHPLC 分析で最も広く使用されている分離方式です。RPLC は、一般的な化合物の有機部分と無極性固定相との疎水性相互作用により、分子を分離します。しかし、測定対象が極性化合物である場合にはしばしば、それらの化合物を保持するために、水

の比率が高い移動相を必要とします。水の比率が高いシステムでは、固定相の崩壊(寝込み、**dewetting**)などの問題[1]、移動相脱溶媒の不足とイオンサプレッションによるマスペクトル検出感度の低下、および非常に極性の高い化合物を保持できなくなる場合があります。極性を埋め込んだ固定相、親水性エンドキャップ型の逆相結合シリカ、広孔で低密度結合のシリカ、および短鎖相などの特殊な設計をした高親水性システムを使用するための専用充填剤がいくつか開発されています[2]。

RPLC による諸問題を回避して高極性の化合物を分離するための代替的な方法としては、**HILIC** があります。**HILIC** では、高い割合の非極性移動相と極性の固定相が必要で、これは順相クロマトグラフ(NPC)における必要条件に類似しています。しかし、ヘキサンやジクロロメタンなどの非極性溶媒を使用して移動相から水を排除しようとするNPC とは違い、**HILIC** では移動相内に一部の水を保持してその表面上に濃縮水層を形成し、化合物を選択的に分配できるようにする必要があります。また、NPC では水非混和性の溶媒を使用しますが、**HILIC** では水混和性の有機溶媒を使用します。**HILIC** では、ベアシリカ、結合ジオール、ポリハイドロキシアスパルトアミド(polyhydroxyethylaspartamide)などの吸着剤が使用されます。これで、極性化合物はよく保持され、溶出順序はRPLC とは逆に、親水性の低いものから先に溶出します。**HILIC** 条件下では、RPLC と比較して非常に多様な極性化合物の選択性を示す場合があります。最近の研究では、**HILIC** のメカニズムは、親水性相互作用、イオン交換、およびシリカ表面上のシロキサンによる逆



Agilent Technologies

相的保持などのさまざまな組み合わせであることが報告されています[3]。

アミン官能基を有する塩基性薬物はしばしばRPLCによって分離され、プロトン付加した酸性条件下では保持力の低下を示すことがあります。本研究では、血清に含まれる塩基性薬物を、C18 カラムを用いたRPLC と、ベアシリカゲルを用いたHILIC により分離を検討し、エレクトロスプレーイオン化(ESI) およびMS/MS により検出しました。

研究に用いた塩基性薬物

今回の検討対象とする塩基性薬物の構造式を図1 に示しました。パロキセチン(図1a) は経口投与の向精神薬です。パロキセチンの水溶解度は5.4 mg/mL で、遊離塩基形の分子量(MW) は329.36 です。ラニチジン(図1b) は抗潰瘍薬で、胃が産生する酸の量を減少させる作用があります。ラニチジンは水およびメタノールには溶けやすいですが、エタノールにはやや溶けにくいです。ラニチジンの分子量は、遊離塩基形で314.41 です。

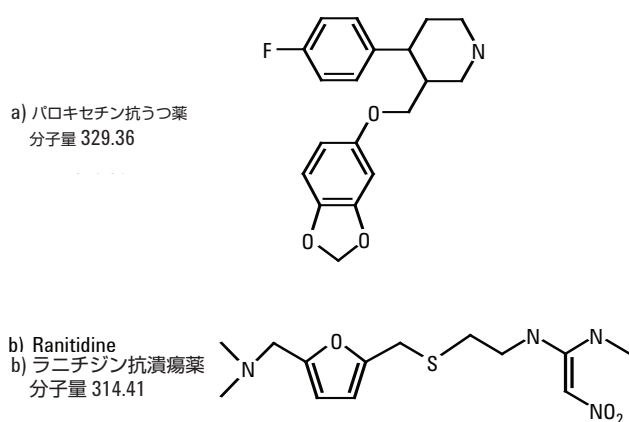


図1 研究に用いた薬物化合物の構造式

クロマトグラフシステム

ESI を用いるマスマススペクトロメトリー(MS) を検出に使用するため、通常の流量で使用する内径2.1 mm のカラムを採用しました。

RPLC	
装置：	Agilent シリーズ1100LC
カラム：	ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm×150 mm、5 μm)
移動相：	A：8 mM HCOONH ₄ 水溶液 B：8 mM HCOONH ₄ (95% アセトニトリル/5%) 水溶液
グラジエント：	10 分間でB 5% からB 90%
カラム温度：	40℃
注入量：	5 μL
流量：	0.3 mL/分
HILIC	
カラムとグラジエントの条件以外は、RPLC の場合とすべて同じ	
カラム：	ZORBAX RX-SIL, 2.1 mm×150 mm、5 μm
グラジエント：	10 分間で100% Bから50% B
マスマススペクトロメトリー	
装置：	シリーズ1100 LC/MSD トラップ
イオン化：	ポジティブESI
スキャン範囲：	100～500 <i>m/z</i>
SIM イオン：	<i>m/z</i> = 315、330
乾燥ガス：	350 °C で10 L/分
ネブライザガス：	45 psi
フラグメンタ電圧：	0.25 V

結果と考察

オンラインモニタリングに使用する最適なSIM イオンを選択するため、薬物標準品のMS スペクトルを測定しました。図2 では、 M^{+1} イオンも観測されていますが、それより強いシグナルの m/z 192.0 をパロキシセチンに m/z 175.9 をラニチジンにそれぞれ使用することになりました。これらのイオンを使って、以後の分析をモニタリングします。

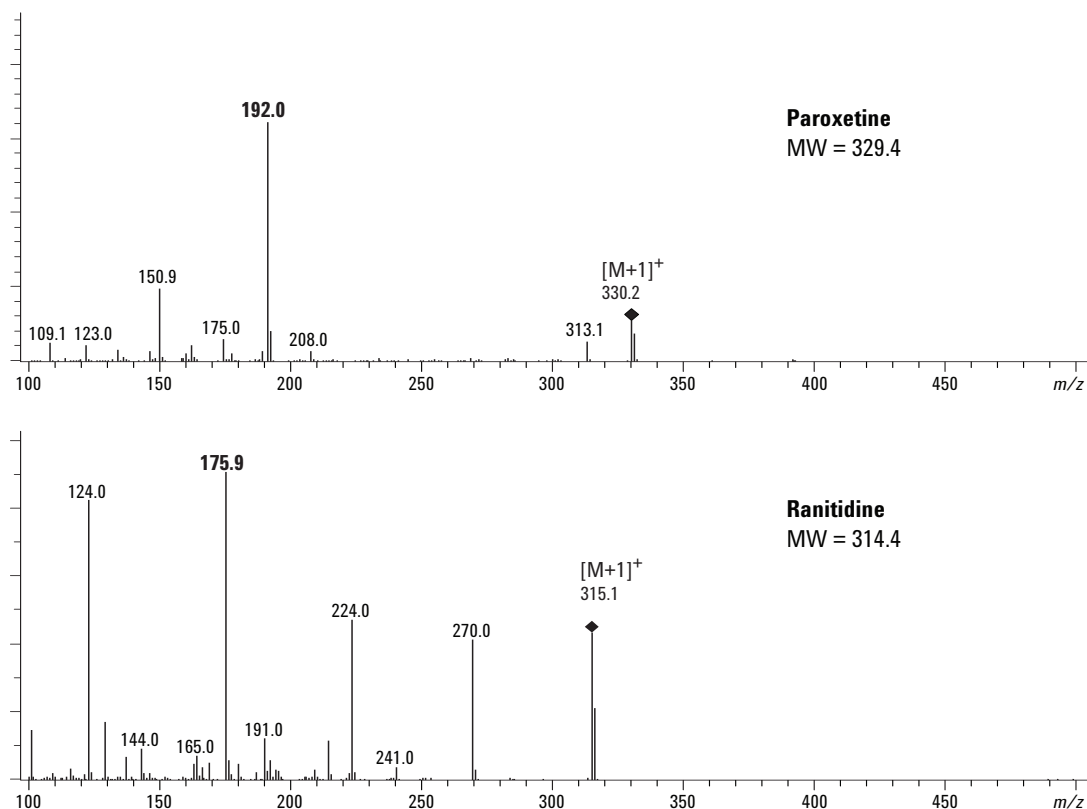


図2 薬物標準品のMS/MS スペクトル。以後の分析で使用するフラグメントイオンを選択した。

図3 に示す標準品のRPLC グラジエント溶離による全イオンクロマトグラムでは、この2 種類の薬物の分離が良好でかつ比較的短時間であることが示されます。しかし、ラニチジンでは、100 ppb (parts per billion) レベルにおいて若干のテーリングが認められました。我々は血清に含まれる微量薬物の測定に関心を持っていたため、このテーリングは受け入れ難いものと見なしました。そのため、我々は関心の対象をHILIC 条件に切り替えることにしました。

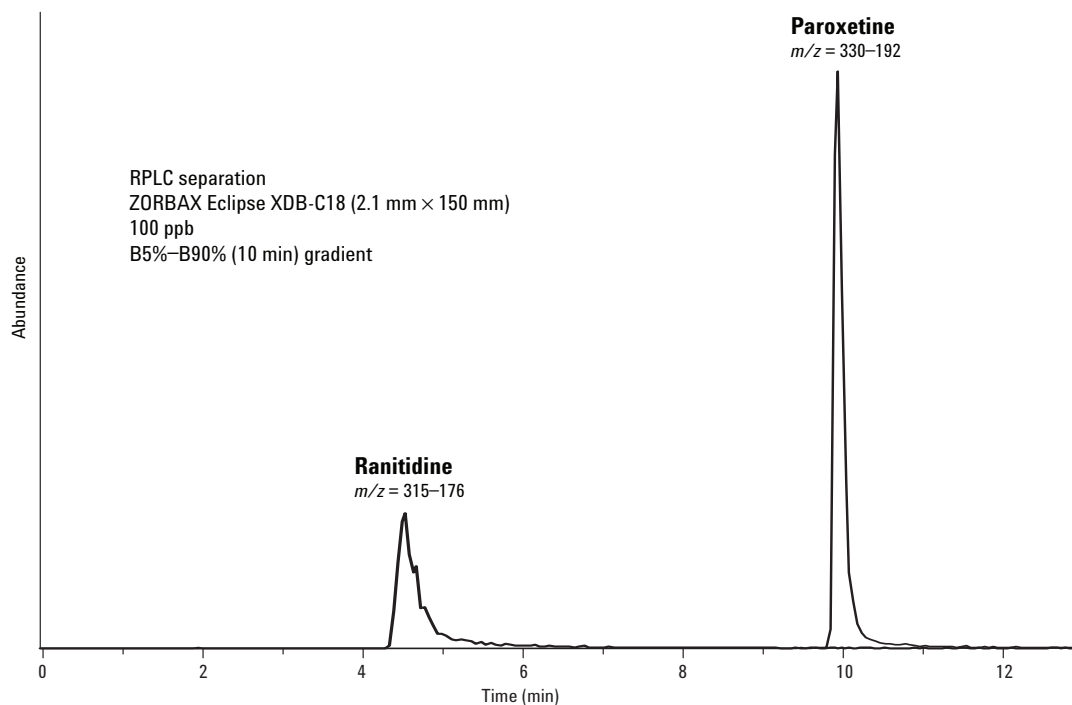


図3 ZORBAX Eclipse XDB-C18 カラム(RPLC モード) での分離によるパロキセチンおよびラニチジンのLC/MS/MS 分析。

図4 は、対象とする2 種類の薬物標準品を、シリカゲル上でのHILIC によって分離した結果について示しています。溶出順序は予想とは逆になりましたが、ラニチジンのピーク形状はRPLC による分離よりも改善されたことは注目すべき結果でした。選択性についてはRPLC ほどは良くありませんでしたが、それでもベースライン上での分離が達成されていますさらに、今回採用した条件の方がRPLC の場合よりも短時間で分離できています。

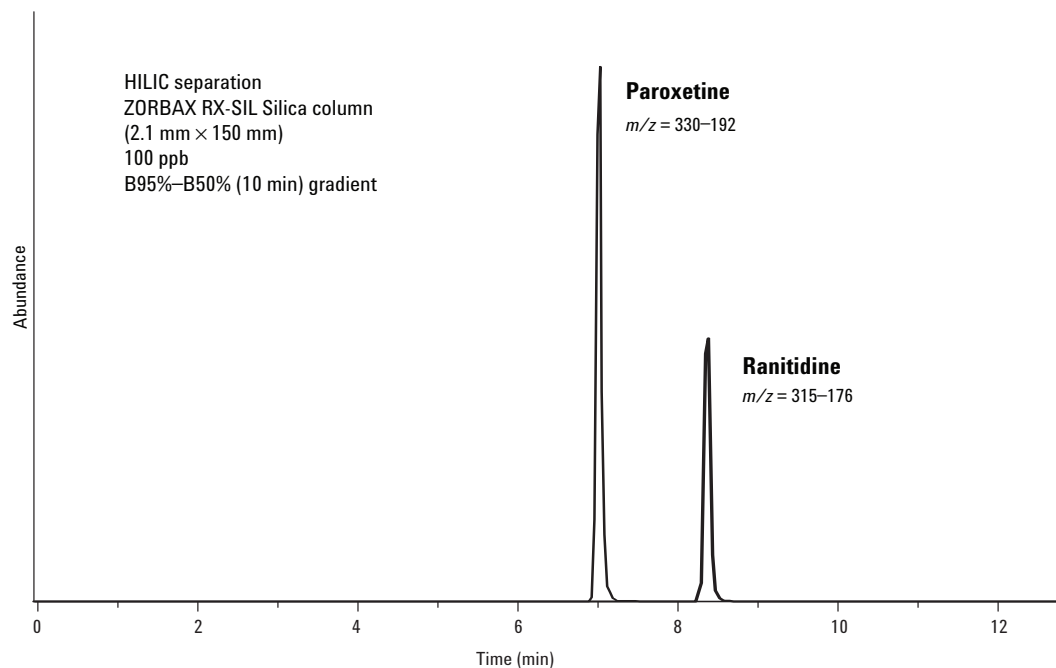


図4 ZORBAX RX-SIL カラム(HILIC モード) での分離によるパロキセチンおよびラニチジンのLC/MS/MS 分析(100 ppb レベル)。

図5 は、同じ分離方法を0.5 ppb において行った結果を示します。両薬物とも良好な感度が認められました。

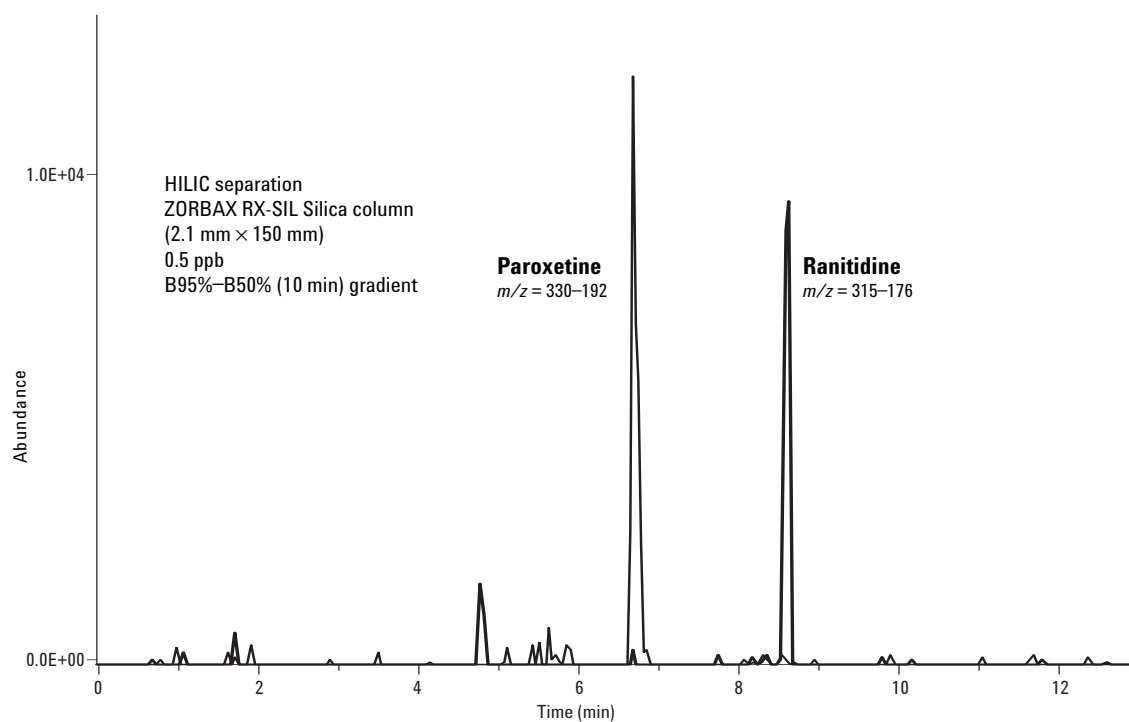


図5 ZORBAX RX-SIL カラム(HILIC モード) での分離によるパロキセチンおよびラニチジンのLC/MS/MS 分析(0.5 ppb レベル)。

図6 に示すように検量線を作成したところ、予測した濃度範囲において両化合物とも高い直線性を示し、許容できる相関係数を示しました。

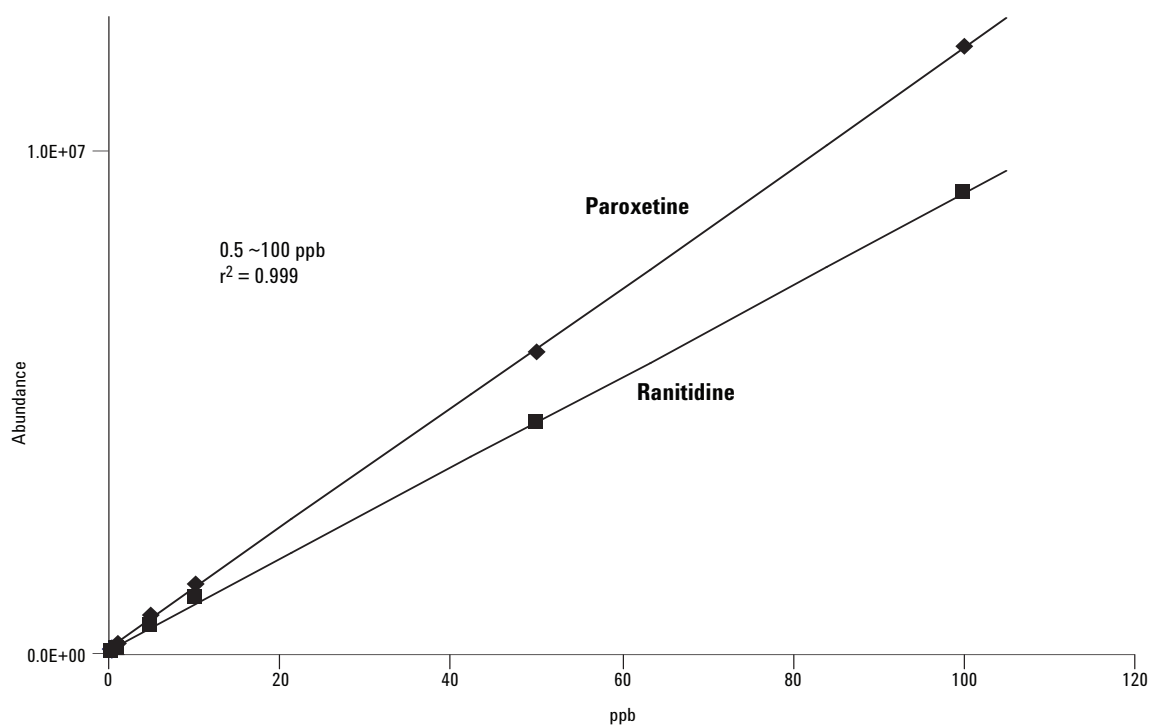


図6 ZORBAX RX-SIL カラム(HILIC モード) 分離でのパロキセチンおよびラニチジンの直線性。

次に、ヒト血清サンプルを、各薬物化合物の5 μL 標準液 (20 ppm) でスパイクしました。同サンプルの調製は、図7で概説するサンプル調製プロトコールに従って行いました。

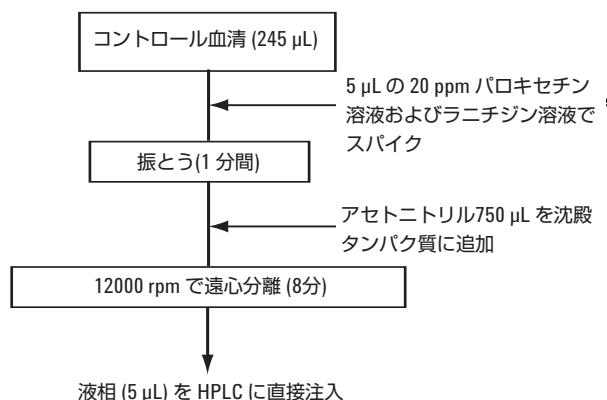


図7. スパイクした血清のサンプル調製手順

クリーンアップされた対象薬物含有の血清サンプルの5 μL を、HILIC カラムに注入しました。図8に示すイオンクロマトグラムの結果(上段のクロマトグラムはLC/MS、下段のクロマトグラムはLC/MS-MS)による。2種類の化合物とも100 ppb レベルの血清で測定できています。パロキセチンの回収率は79%、ラニチジンの回収率は98%で、ともに100 ppb レベルで許容できる結果となりました。

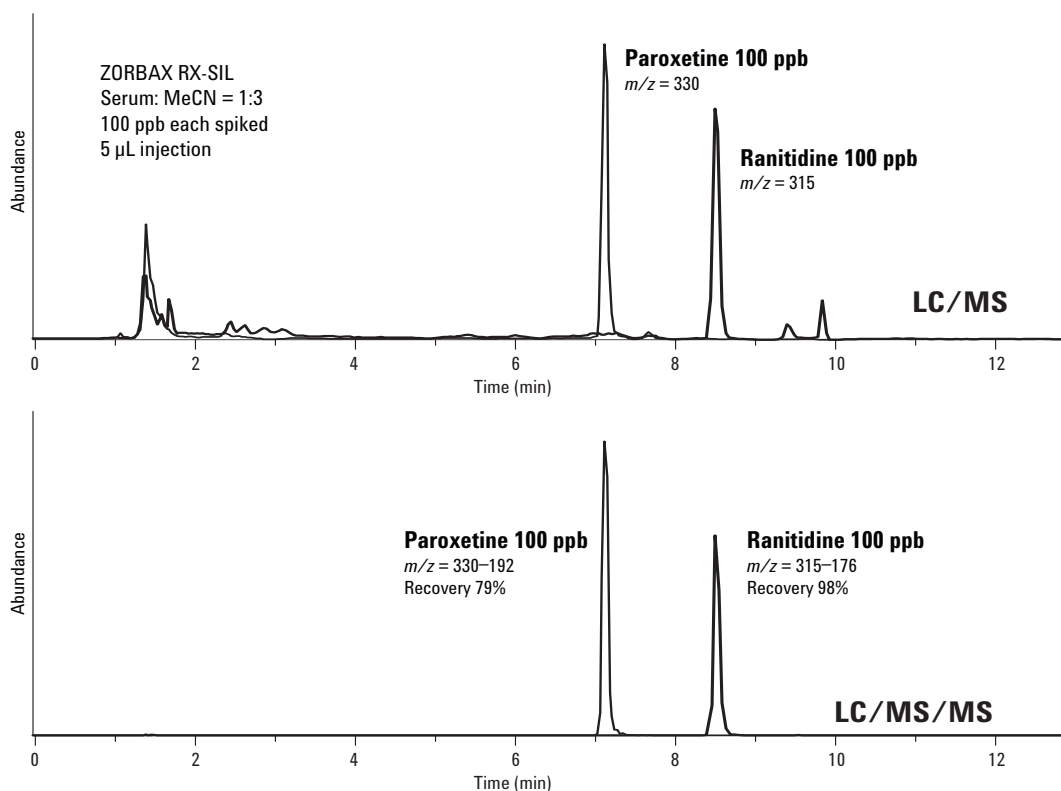


図8 ZORBAX RX-SIL カラム分離によるヒト血清にスパイクしたパロキセチンとラニチジンのLC/MS 分析およびLC/MS/MS 分析。

結論

ラニチジンおよびパロキセチンは、HILIC モードを使用してうまく分離できました。溶出順序は、RPLC モードとは逆になりました。0.5 ～ 100 ppb において高い直線性が得られました。スパイク添加した血清のクリーンアップはタンパク沈殿により行い、上澄をHILIC/ESI-MS システムに直接注入しました。100 ppb における回収率は、ラニチジンでは98%、パロキセチンでは79% でした。

参考文献

1. M. Przybyciel and R. E. Majors, (2002), *LCGC No. America*, **20** (6), 516–523.
2. R. E. Majors and M. Przybyciel, (2002), *LCGC No. America*, **20** (7), 584–593.
3. W. Naidong, (2003), *J. Chromatogr. B*, **796**, 209–224.

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

お問い合わせは：0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in Japan
September 8, 2005
5989-3761JAJP



Agilent Technologies