

ACQUITY Premier およびハイブリッド有機表面テクノロジーによる体液中薬物の代謝物構造推定の改善：感度および再現性の向上

Lauren Mullin, Adam King, Lee A. Gethings, Robert S. Plumb

Waters Corporation

要約

エレクトロスプレータンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィーは、*in vivo* および *in vitro* の両方の薬物代謝物構造推定に用いられる主要なプラットフォームです。代謝物構造推定の成功の鍵は、薬物関連分析種の相互間およびマトリックス内に存在する内因性成分からのクロマトグラフィー分離です。クロマトグラフィーシステムおよびカラムに存在する遷移金属がルイス酸として作用し、リン酸基、非荷電アミン、水酸基、脱プロトン化カルボン酸を含む分析種と相互作用して、クロマトグラフィーピーク形状が悪くなったり、重大な分析種のロスにすら至ることがあります。ACQUITY Premier クロマトグラフィーシステムおよびカラムは、ハイブリッド有機表面テクノロジーを採用しており、この種類の非特異的吸着を排除できます。ACQUITY Premier クロマトグラフィーシステムおよびカラムを使用したゲフィチニブの *in vivo* 代謝物の分析において、ピーク形状が改善し、シグナルレスポンスが向上して、よりきれいな MS/MS レスポンスが得られることがわかりました。

アプリケーションのメリット

- 薬物代謝物のクロマトグラフィー分離の向上

- ピークレスポンスの向上
- 再現性の改善

はじめに

代謝物構造推定は、創薬および開発のプロセスで非常に重要な役割を果たし、動物モデルおよびヒトにおける *in vitro* および *in vivo* での、代謝の「ソフトスポット」の特定、反応性代謝物の検出、および候補薬物の結果の確認を可能にします。LC-MS/MS は、特にこのテクノロジーがもたらす特異性、感度、および構造情報による、正確な質量分析（MS）によって、代謝物構造推定の最適なテクノロジーになっています。精密質量およびイオンモビリティなどの質量分析の進歩により、DMPK の研究者の、MS シグナルを「クリーンアップ」してフィルター処理する能力が向上し、取り込んだデータの品質が向上しています¹。

薬物分子は、広範な代謝を受けて複数の代謝物が生成することや、低レベルで投与されて極めて低い循環濃度の薬物関連分子になることがあります。薬物の代謝経路を包括的に理解するには、サンプル中に存在するすべての薬物代謝物を検出して分離し、きれいな MS および MS/MS スペクトルを得て解釈できるようにする必要があります。クロマトグラフィーシステムおよびカラムで使用される遷移金属がルイス酸として作用し、リン酸基、非荷電アミン、水酸基、脱プロトン化カルボン酸を含む分析種と相互作用して、クロマトグラフィーピーク形状が悪くなったり、重大な分析種のロスにすら至ることがあります²。ACQUITY Premier クロマトグラフィーシステムおよびカラムでは、ハイブリッド有機ポリマー表面テクノロジーが採用されて、これらの相互作用が軽減・解消されています。MaxPeak High Performance Surfaces（HPS）LC テクノロジーは、非常に効果的な表面バリアを提供することによってこれらの好ましくない相互作用を軽減し、これに対処するために特別に開発されました。MaxPeak HPS LC 表面は、架橋エチルハイブリッド（BEH）シリカと化学的に類似している高度に架橋された層で構成されています。この層は、分析種と金属表面の間に弾力性のあるバリアを提供しますが、分離には関わりません。

ゲフィチニブは、特定の乳がん、肺がん、およびその他のがんの治療に使用される EGFR 阻害剤です³。ゲフィチニブの実験式は $C_{22}H_{24}ClFN_4O$ で、分子量は $446.91 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ であり、肝臓で CYP 3A4 によって代謝されて 8 種類の主要代謝物が生成します。その中で O-デスメチルが最も重要です（図 1）。排出の主要ルートは顔で、小量が尿中に排出されます。以前のゲフィチニブの薬物動態研究により、許容できる分析時間で、ピークテーリングを防ぎ、対象ピークを他のピークから完全に分離するには、酢酸アンモニウムなどのバッファーが含まれている移動相を使用する必要があります³⁻⁵。酢酸アンモニウムなどのバッファーが存在することにより、特にネガティブイオンモードでイオン化効率が低下することがあり、分析種のレスポンスが低下して、低濃度の代謝物が検出されない可能性が大きくなります。このアプリケーションノートでは、ACQUITY Premier クロマトグラフィーシステムをマウス尿中のゲフィチニブの代謝物分析に使用するメリットを実証します。

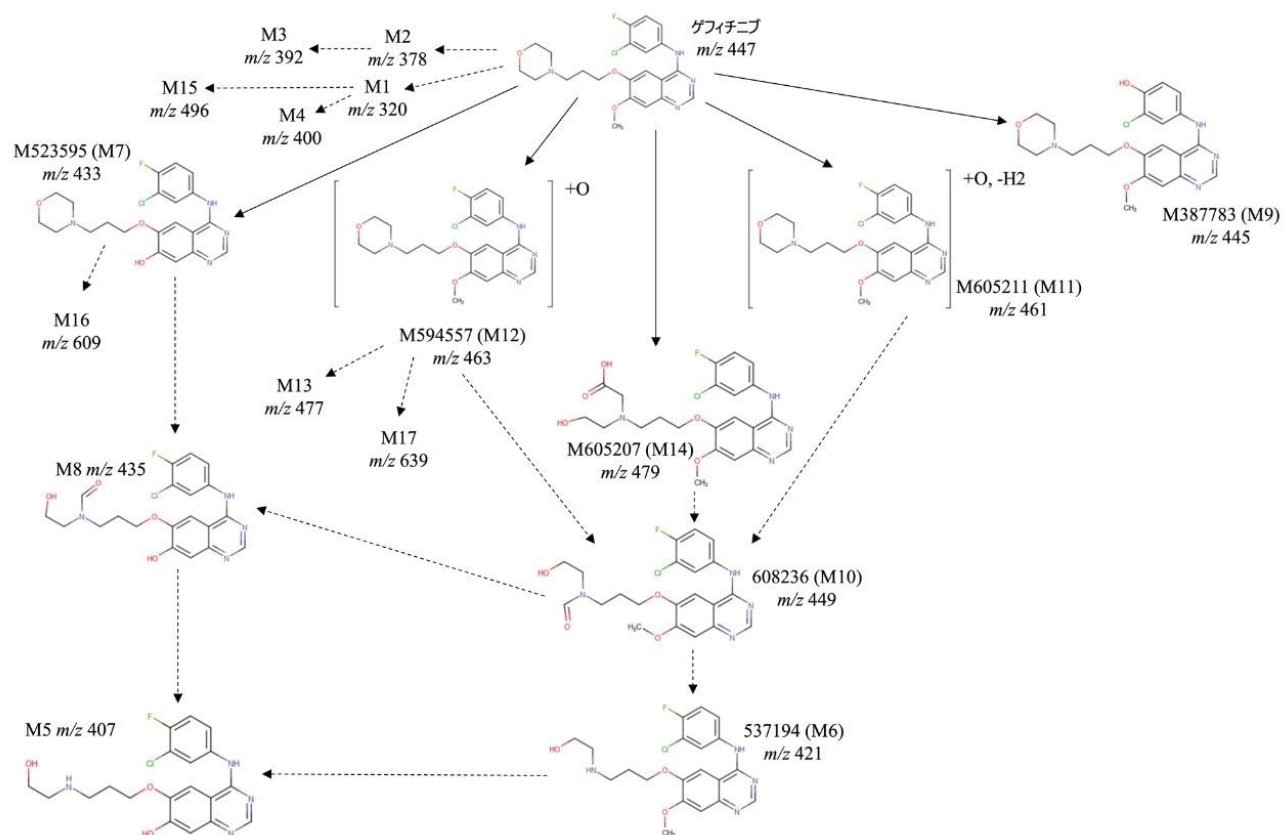


図 1. ゲフィチニブとその関連代謝物の概略図²

実験方法

ゲフィチニブおよび賦形剤のみのそれぞれ 10 mg/Kg および 50 mg/Kg を、マウスにそれぞれ静脈内投与（IV）および経口投与（PO）しました。尿サンプルを、投与前、および投与後 0～3 時間、3～8 時間、8～24 時間に収集し、氷上で保管しました。マウスの尿サンプルは、0.1%（v/v）ギ酸水溶液で 1:5 に希釈しました。サンプル溶液をボルテックス混合し、25,000g で 5 分間遠心分離しました。得られた上清を取り、分析のためにガラス製 Max Recovery バイアル（600000670CV <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/vials-containers--collection-plates/600000670cv-lcms-certified-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-max-recovery-vi.html>>）に移しました。尿サンプルは LC-MS^E によって 3 回の繰り返しで分析しました。

LC 条件

LC 条件

LC システム:	ACQUITY Premier または ACQUITY UPLC I-Class PLUS
バイアル:	ウォーターズマキシマムリカバリー
カラム:	ACQUITY Premier HSS T3、2.1 × 100、1.8 μm または ACQUITY UPLC HSS T3、2.1 × 100、1.8 μm
カラム温度:	40 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	3 μL
流速:	600 μL/分
移動相 A:	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B:	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント:	以下を参照

グラジエント

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	カーブ
0	0.6	99	1	リニア
1	0.6	99	1	リニア
3	0.6	85	15	リニア
6	0.6	50	50	リニア
9	0.6	5	95	リニア
10	0.6	5	95	リニア
10.1	0.6	99	1	リニア

MS 条件

MS システム:	SYNAPT XS
イオン化モード:	エレクトロスプレー (ESI) ポジティブイオン
取り込み範囲:	m/z 50 ~ 1000
キャピラリー電圧:	2.8 kV
コリジョンエネルギー:	リニア CE ランプ (19 ~ 45 eV)
コーン電圧:	30V

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	MassLynx v4.2
------------------	---------------

MS ソフトウェア:

MassLynx v4.2

インフォマティクス:

Progenesis QI、Skyline

結果および考察

体液は本質的に、極性の高い低分子の酸および塩基、アミノ酸、そして親油性のペプチドおよび脂質に至るまでの幅広い極性範囲の分析種が含まれている、複雑な混合液です。また、これらの分析種は、微量のホルモン性ステロイドやエイコサノイドから、mMol 濃度で存在する馬尿酸やタウリンまで、幅広い濃度のダイナミックレンジにわたって存在します。薬物関連の代謝物を正確に同定および定量するには、クロマトグラフィーシステムに可能な限り最高の分離能力があり、薬物代謝物を相互に分離でき、そしてサンプル内の内因性成分から分離できることが極めて重要です。

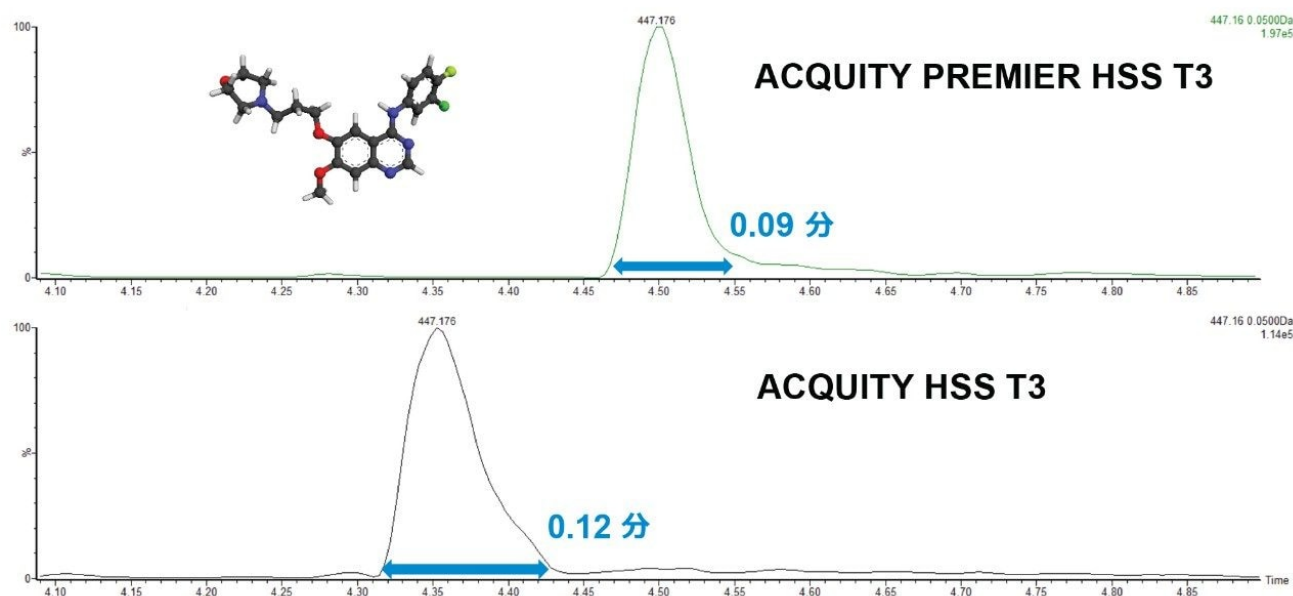


図 2. ACQUITY Premier HSS T3 と ACQUITY HSS T3 カラムを用いたゲフィチニブのクロマトグラフィー分析の比較。ACQUITY Premier HSS T3 では、基部でのピーク幅 (Wb) の改善が認められています。

図 2 に示すデータでは、投与したゲフィチニブについて、ACQUITY Premier HSS T3 C₁₈ カラムのクロマトグラフィー性能を、標準 ACQUITY カラムと比較しています。基部でのピーク幅の測定値は、従来の ACQUITY HSS T3 C₁₈ カラム

では 0.12 分 (n = 3)、ACQUITY Premier HSS T3 C₁₈ カラムでは 0.09 分 (n = 3) でした。得られたクロマトグラフィーピークキャパシティは、ACQUITY Premier および従来の ACQUITY カラムについて、それぞれ 111 および 83 と測定されました

ACQUITY Premier カラムによって得られた性能の向上の結果、ピーク強度が 1.14×10^5 (従来のカラム) から 1.97×10^5 (ACQUITY Premier カラム) へと 72% 増加していました。改善は代謝物 M523595 (図 3) でも認められました。この場合、観察されたピーク強度は 30×10^3 (従来カラム) から 60×10^3 (ACQUITY Premier カラム) まで 2 倍増加していました。ピークレスポンスの増加は、ACQUITY Premier カラムを使用して得られた狭いピーク幅の結果か、あるいはクロマトグラフィーシステムの露出した金属表面への分析種の吸着の減少の結果である可能性があります。この代謝物レスポンスの改善は、低濃度代謝物の検出 (特に低投与量群) では極めて重要です。

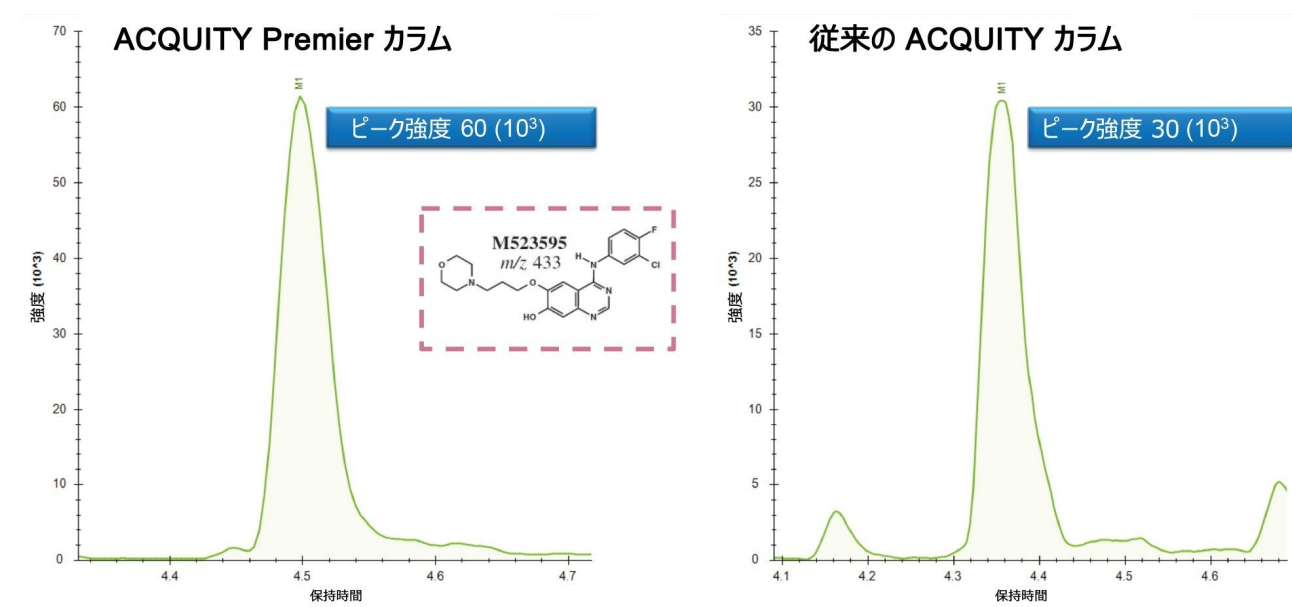


図 3. ゲフィチニブの代謝物 M1 (M523595) についての、ACQUITY Premier HSS T3 カラムおよび ACQUITY HSS T3 カラムでのピーク強度の比較

代謝物に対する曝露レベルの認識は、その構造の決定と同程度に重要であるはずですが。このため、標準物質や放射性同位体標識を使用するか、親化合物のレスポンスと、レスポンスを比較することによって、特に濃度が最も低くなる薬物動態プロファイルの末期において、薬物代謝物の濃度を高い信頼度で測定できることが重要です。観察されたピークレスポンスおよびピーク形状の向上により、優れたピーク強度だけでなく優れた再現性が得られます。このことは図 4 に示す結果からわかります。データは、ゲフィチニブのピークに対して標準化した代謝物のピークレスポンスを示しています。これらの結果から、ACQUITY Premier カラムによって各代謝物のピークレスポンスが向上すると同時に、

ACQUITY Premier カラムを使用すると、低濃度の代謝物の繰り返し注入でのピークレスポンスのばらつきが低減することがわかります。このことは低濃度の代謝物 M2 (M605211) によって示され、この場合、ACQUITY Premier カラムのピークレスポンス範囲は、従来のカラムの $12 \sim 14 \text{ e}^3$ と比べて、 $17 \sim 19 \text{ e}^3$ に増加しています。

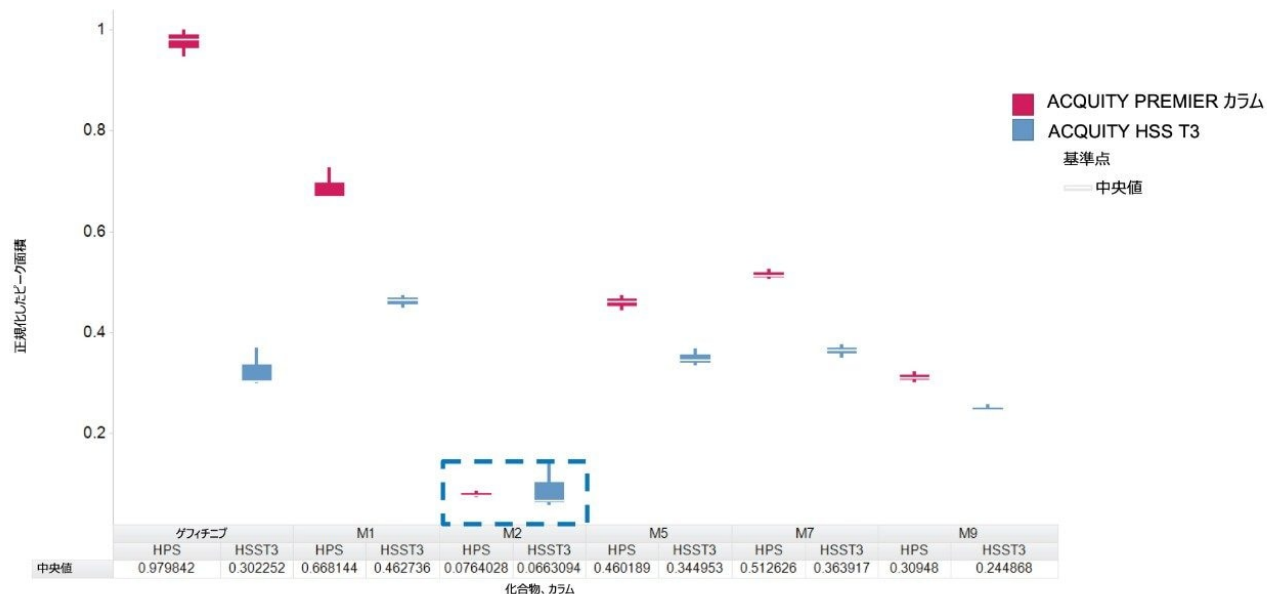
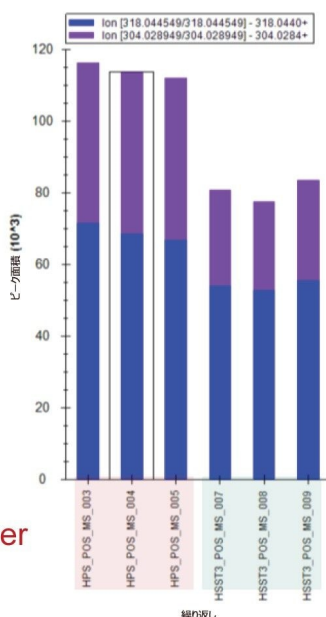
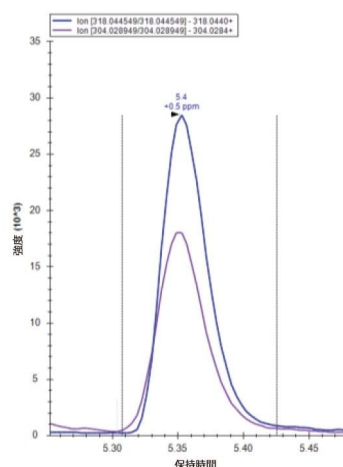


図 4. ゲフィチニブおよび関連代謝物の繰り返し注入 ($n = 3$) にわたるピーク面積レスポンス。ACQUITY Premier HSS T3 (赤色) および ACQUITY HSS T3 (青色) に対応するデータを示します。

高品質 MS および MS/MS スペクトルの取り込みは、迅速で信頼できる代謝物構造推定および構造解析において特に重要です。代謝物の検出および構造推定の基礎は、サンプル内の他の薬物関連成分や相互作用・共溶出する内因性成分からの、分析種のクロマトグラフィー分離です。ACQUITY Premier システムによって得られる追加のクロマトグラフィー性能である、狭いピーク、ピークテーリングの低減により、分離の向上とピーク強度の増加が得られ、代謝物の特性解析が簡単になります。このことは代謝物 M7 (ゲフィチニブの水酸化) の分析を示す図 5 のデータに示されており、ACQUITY Premier システムではピーク強度が大幅に向上していることがわかります。

ACQUITY Premier



Premier

HSS T3

ACQUITY HSS T3

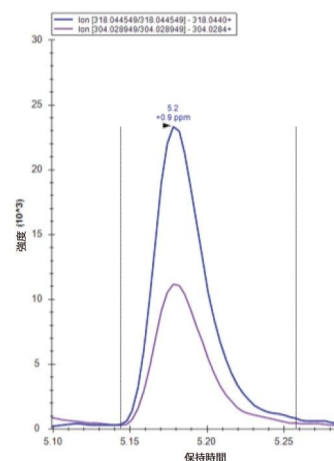


図 5. ゲフィチニブの代謝物 M7 (MQZP、m/z 378.1021) で示されたフラグメントイオン強度の向上。トランジション m/z 318.0440 および 304.0284 に関連するイオン強度が増加していることが、ACQUITY Premier HSS T3 カラムについて示されています。

結論

ハイブリッド有機ポリマー表面テクノロジーを使用した ACQUITY Premier システムでは、クロマトグラフィーシステムの金属表面に存在する遷移金属イオンとの、リン酸塩、非荷電アミン、水酸基、脱プロトン化カルボン酸などの多くの分析種分子の結合が大幅に低減・減弱します。その結果、ピーク形状の改善、感度の増加、再現性の向上により、ACQUITY Premier カラムでは、ゲフィチニブとその代謝物などの分析種について、標準の HSS T3 ステンレススチール製カラムと比較してピーク強度が平均 50% 増加します。このことは、組織濃度が低い薬物代謝物の分析（例えば、候補薬物が低レベルで投与された場合や薬物動態の末期や排出期において）の場合、特に重要です。極端に低いレベルの代謝物を検出するこの性能は、初期の FTHM 臨床研究、マイクロドージング、マイクロサンプリングに対応する上で極めて重要であり、このような研究での動物の使用を低減、代替、洗練するための 3R イニシアチブへの対応が可能になります。

参考文献

1. <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/ion-mobility-for-metabolite-characterization-improving-spectral-clarity-of-data-independent-acquisitions.html>
2. Wakamatsu, A.; Morimoto, K.; Shimizu, M.; Kudoh, S. “A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction with Stainless Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry” , *J. Sep. Sci.* 28, 2005, 1823–1830.
3. McKillop D. *et al.* (2005) Metabolic Disposition of Gefitinib, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Rat, Dog and Man. *Xenobiotica* 4(4), 914–934.
4. Liu X. *et al.* (2015) Metabolomics Reveals the Formation of Aldehydes and Iminium in Gefitinib Metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 97(1), 111–121.
5. Zhang Q. *et al.* (2017) Effect of Weekly or Daily Dosing Regimen of Gefitinib in Mouse Models of Lung Cancer. *Oncotarget*.8(42), 72447–72456.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

720007048JA、2020 年 11 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)