

非誘導体化ゲンタマイシン成分の分析用超高速液体クロマトグラフィー質量分析法

Adam Bengtson, Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

Waters Corporation

要約

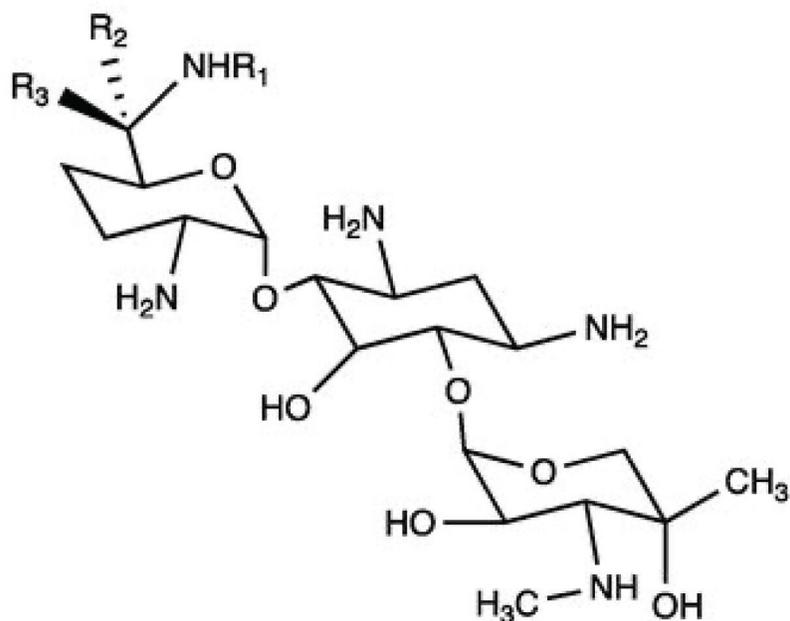
発色団のないアミノグリコシドであるゲンタマイシンは、グラム陰性細菌感染および一部のグラム陽性細菌感染に対する広範囲の抗生物質として一般に使用されています。ゲンタマイシンは、メチル化の程度および毒性の程度が異なるさまざまな関連成分で構成されています。そのため、各成分を分析および定量することは、患者の安全性および規制機関への準拠のために、特に重要です。この試験では、Atlantis™ Premier BEH™ Z-HILIC カラムを使用する、ACQUITY QDa™ 質量検出器を備えた、ACQUITY™ Ultra Performance Liquid Chromatography™ H-Class システム用に、ゲンタマイシン C1、C1a、C2、C2a を迅速に分離する、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）ベースの分析法を開発しました。この分析法を、眼科用ゲンタマイシン製剤について試験し、Z-HILIC ケミストリーについて充填剤の差異を調査しました。この分析法には、文献で見られる多くの現行分析法とは異なり、誘導体化やフッ素化イオン対試薬は不要です。分離には、10 分間のアイソクラティック溶出が使用されます。これにより、サンプル間の再平衡化時間が短縮され、ゲンタマイシン成分が迅速で正確に、再現性よく分離されます。

アプリケーションのメリット

- 使いやすいコンパクトな ACQUITY QDa 検出器を活用
 - 誘導体化やフッ素化イオン対試薬は不要
 - アイソクラティック分離により、平衡化時間が短縮され、サンプルの分析を加速
 - 同じ装置および同様の分析法を使用して、多くのアミノグリコシド（AMG）を分離可能
-

はじめに

ゲンタマイシンは、広範なアミノグリコシド系抗生物質であり、4種類の主要成分ゲンタマイシン C1、C1a、C2、C2a と1種類のマイナー成分 C2b の混合物で、図 1 にその構造が示されています。ゲンタマイシンは、*Micromonospora purpurea* による発酵によって生成されます。この発酵により、その生合成のために選択された菌株に基づいて、製造者ごとにこれらの化合物の組成が異なる可能性があるという状況を引き起こします。ゲンタマイシンのさまざまな「C」化合物は、メチル化の差異はわずかですが、毒性レベル（特に、聴神経障害および腎臓毒性）はさまざまです。これにより、この薬剤の狭い治療指数を考慮すると、構成成分の化合物を分離できることが重要です¹。1998年にゲンタマイシン投与による死亡が数例あったことを考慮すると、この重要性はより明らかです。完全には証明されていませんが、仮説では、死亡は関連化合物シソマイシンとそのプリカーサーであるヒスタミンによって引き起こされたと言われてています²。



	ゲンタマイシン C1	C1a	C2	C2a	C2b
R1	CH ₃	H	H	H	CH ₃
R2	H	H	H	CH ₃	H
R3	CH ₃	H	CH ₃	H	H

図 1. ゲンタマイシン化合物の構造

この分析は、双性イオン（スルホベタイン）固定相を充填し、MaxPeak™ HPS テクノロジーを採用した Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを使用し、HILIC モードで実行しました。この双性イオン固定相により、高極性の化学物質が良好に保持され、ゲンタマイシン混合物中に含まれている類似化合物が良好に分離されます³。化合物の分離を促進するためにフッ素化イオン対試薬または誘導体化を使用する、C₁₈ カラムや HILIC カラムを使用する、いくつかの分析法が開発されています⁴⁻⁶。これらの分析法では長時間かかる傾向があり、高いイオン強度が必要です⁶。華東理工大学の他の研究者たちは、双性イオンリック TE-Cys カラムなどのさまざまなケミストリーで成功を収めています。彼らの分析法には長時間が必要であり、高イオン強度移動相とエバポレイト光散乱検出器が必要です。これは、イオン性化合物の蓄積の問題になる可能性があります⁶。

このアプリケーションノートで概説する分析法は、フッ素化イオン対試薬および誘導体化を回避して、ゲンタマイシンが 4 つの主要成分に分離されるように設計されています。このことは、フッ素化イオン対試薬を質量分析法で使用する

と、イオン化抑制や装置の汚染を引き起こす可能性があるため、有用です³。誘導体化を回避することも、サンプル前処理の時間が短縮され、分析法全体が簡素化されることから、有用です。本書で開発されたこの分析法のもう1つの利点は、ウォーターズによって類似の分析法が既に開発されていたことです。ウォーターズの分析法では、同じ装置構成を使用し、ギ酸アンモニウム濃度と分析法パラメーターのみが異なる、AMGのパネルを分離および定量できます⁷。以下の分析法では、Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを ACQUITY QDa 質量検出器と組み合わせて使用し、ゲンタマイシン成分を分離および定量します。

実験方法

再現性のあるカラム

異なるバッチ（バッチ番号 101、102、104）が充填された Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1.7 μm 2.1 \times 100 mm カラム 3 本を入手し、4 本目のカラムに、ステンレススチール製 2.1 \times 100 mm カラムハードウェアを使用してバッチ 101 を社内で充填しました。

サンプルの説明

ゲンタマイシン硫酸塩の2つのサンプルは、Sigma Aldrich (G1914、PHR0177) から入手しました。ストック溶液は、LCMS グレードの水 (Burdick & Jackson) でポリプロピレン (PP) 内で調製され、PP 容器に入れて冷凍庫で保管しました。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシン硫酸塩のサンプルを作成し、10 $^{\circ}\text{C}$ で保管しました。

ゲンタマイシン製剤サンプル

サンプルは、マサチューセッツ州 Avon にある Asaman から入手し、Bausch and Lomb および Greenstone/Pacific Pharma 製の 0.3% ゲンタマイシン点眼液 5 mL を使用しました。サンプルは、MS グレードの水で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈しました。

分析条件

分析法では、標準の 100 μL ミキサーから 250 μL ミキサーに変更して使用しました（製品番号：205000719 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/205000719-mixer-assembly-250-l-zirconia.html>>）。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY Ultra Performance LC H-Class Plus (250 μ L ミキサー)
検出:	ACQUITY QDa 質量分析計 (パフォーマンス)
バイアル:	ポリプロピレン 2 mL
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 μ m 2.1 mm \times 100 mm カラム
カラム温度:	55 $^{\circ}$ C
サンプル温度:	5 $^{\circ}$ C
注入量:	3 μ L
流速:	0.8 mL/分
移動相 A:	80 mmol ギ酸アンモニウム含有 MS グレード水 (Burdick & Jackson、pH 未調整: 約 6.3)
移動相 B:	0.1% (v/v) ギ酸含有 MS グレード ACN (Burdick & Jackson)
移動相の比率:	A: 48% B: 52%

MS 条件

MS システム:	ACQUITY QDa
イオン化モード:	ポジティブ
取り込み範囲:	300 ~ 630 Da
キャピラリー電圧:	0.8 kV

プローブ温度: 600 °C

コーン電圧: 12 V

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア: Empower™ 3

結果および考察

アミノグリコシドのパネルを用いる別のプロジェクトで、ゲンタマイシンの分離が注目されました⁷。ゲンタマイシンのピークはそれ以前に2つの明瞭なピークに分離されていました。2つのピークは完全には分離されませんでした。これらの分離の条件は、一時一事法の分析法開発アプローチの出発点として、使用しました。

まず、移動相組成の影響を調べました。最初に、50% 未満水系で始まって 85% 水系で終わる、グラジエントメソッドを調査しました。グラジエントメソッドでは非常に緩やかなグラジエントで最良の分離が得られたため、アイソクラティック溶出を調査しました。85% 水系から 40% 水系まで下がるアイソクラティック溶出を確認しました。水系の比率が 48% のときに、形状が良好で非常によく保持されたピークが得られました。より低い水系比率も試験しましたが、ピークのシャープさが低下し、波形解析がさらに困難になりました。ピークが強く保持されるため、カラム温度を 50 °C から 55 °C に上げて、ピーク形状を維持しながら保持時間を短縮しました。次に評価した変数はバッファー濃度でした。8、25、40、80 mM のギ酸アンモニウムを試験しました。結果から、ギ酸アンモニウム濃度が分離に大きな影響を与えることが示されています。表 1 に示されているように、濃度が高くなると、ピーク幅が狭くなり、シャープさが増加しました。図 2 に示されているように、より高濃度のギ酸アンモニウムにより、分離が維持または改善され、分析時間が短縮されました。文献で示唆されているように、濃度が高いほど良好です。ただし、濃度が高いと、ベースラインノイズの増加やその他の感度の問題が発生することにより、QDa の性能に悪影響を与える可能性があります。一般に、QDa で使用する場合、ギ酸アンモニウム濃度を約 10 mmol に維持しますが、この分析法では 80 mmol で一貫して機能しています⁸。80 mmol との一貫性は、ミキサーのサイズを標準の 100 μL から 250 μL のミキサーに増加したことに起因する可能性があります。4 周辺の低 pH が最適であると述べている文献もありますが²⁻⁴、この分析法では、未調整の pH (約 6.3) を用いることで、よりシャープなピークで、レスポンスが大きい、より一貫した結果が得られることがわかりました。MS プローブの温度を 600 °C まで上げると、感度が向上することがわかりました。

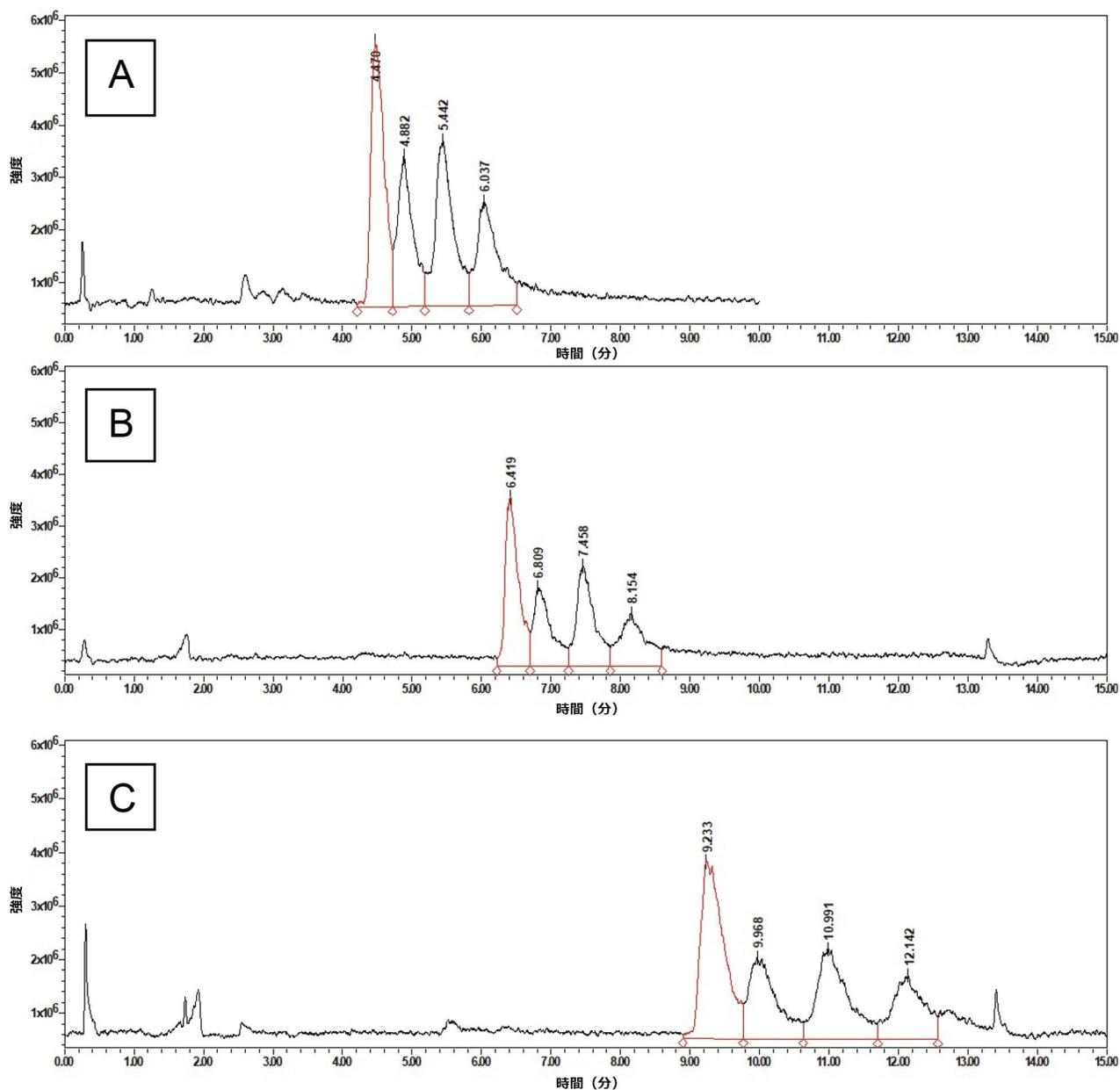


図 2. ギ酸アンモニウム濃度の相違による分析法への影響この比率の水系移動相では、低濃度では所要時間内に溶出しませんでした。A: 80 mmol、B: 40 mmol、C: 25 mmol。クロマトグラムはすべて、平均してレベル9でスムージングしました。

50%での幅	C1 (分)	C2 (分)	C2a (分)	C1a (分)
25 mmol	0.369	0.411	0.437	0.521
40 mmol	0.209	0.270	0.255	0.363
80 mmol	0.166	0.202	0.215	0.298

表 1. さまざまなギ酸アンモニウム濃度でのピークの半値幅

開発した分析法で、ゲンタマイシン混合物の4つの主要成分 C1、C1a、C2、C2a を、正常に分離できました。各ピークの間隔は、すべての注入で 1.390 を超え、図 3 に示されているように、一部のピークは最大 1.873 の分離度でした。

解析メソッド（より具体的には波形解析パラメーター）が偏差を生じる最大のポイントであるように思われます（特に C1a ピークの終端の決定）。表 4 に、6 回の注入にわたる平均保持時間と標準偏差が示されています。相対標準偏差が 1% 未満であるため、この分析法は再現性があると結論できます。最後のピークの波形解析が困難であることを考慮すると、この分析法では波形解析した面積の相対標準偏差は 5% 未満に維持されています。これらの正確な値は、表 2 および表 3 に示されています。

面積 %	C1	C2	C2a	C1a
平均 %	32.066	20.143	27.677	20.113
STD	0.310	0.500	0.686	0.654
RSTD	0.97%	2.48%	2.48%	3.25%

表 2. ゲンタマイシンの4つのピークのパーセント面積。C1a ピークの RSTD が最も低いのは、ピーク形状が一貫していないためではなく、ピークの波形解析が一貫していないためであることに注意してください。

面積	C1	C2	C2a	C1a
平均	64091068	40258217	55331353	40213206
STD	1514286	1125810	2177412	1871773
RSTD	2.36%	2.80%	3.94%	4.65%

表 3. ゲンタマイシンの 4 つのピークを波形解析したピーク面積

RT	C1	C2	C2a	C1a
平均	4.472	4.922	5.541	6.217
STD	0.0198	0.0210	0.0233	0.0326
RSTD	0.44%	0.43%	0.42%	0.52%

表 4. ゲンタマイシンの 4 つのピークの保持時間

異なる移動相組成からのカラムの平衡化には最大 30 分かかることがあることに注意してください。そうしないと、保持時間に一貫性がなくなる可能性があります。化合物の分析に SIR を検討しましたが、高イオン強度によって多くのギ酸アンモニウム付加イオンが形成され、さまざまな質量が生じて SIR レスポンスが低下しました。SIR で見られる低レスポンスを避けるため、TIC を使用しました。化合物が非常に類似しているため、クロストークも検討する必要がある問題であり、シングル四重極質量分析計メソッドがこれらの化合物の分離に必要になりました。

カラムケミストリーのバッチ間再現性

充填剤のさまざまなバッチにわたってこの分析法が適合することを確認するため、カラム間再現性を調査しました。本書で開発した分析法と、アミノグリコシドについて行った以前の試験について、再現性を試験しました。MaxPeak HPS テクノロジーの効果も、ベアメタルステンレススチール製カラムと比較して確認したところ、ピーク面積に大きな差異は示されませんでした。HPS により、アミノグリコシドパネルについて保持時間が長くなりました。表 5 に示されているように、ゲンタマイシンサンプルの相対標準偏差は HPS によってわずかに減少しました。再現性は、どちらの分析法でも許容できることがわかりました。保持時間およびピーク形状は、充填剤のバッチの違いにより、少し変わるようです。それぞれのカラムの 6 回の別々の注入にわたるピーク面積の標準偏差は 10% 未満でした。それぞれのカラムの保持時間は、すべてのカラムにわたって 1% RSTD 未満で、すべてのカラムおよびすべての注入にわたる保持時間は 5% RSTD 未満でした。このように、この分析法では、カラムケミストリーの通常の差異に対して、再現性があります。

成分	C2		C2a		C1a	
カラム	平均	RSTD	平均	RSTD	平均	RSTD
バッチ番号 101	1.092	0.1%	1.222	0.2%	1.366	0.1%
バッチ番号 102	1.092	0.2%	1.221	0.1%	1.358	0.2%
バッチ番号 104	1.096	0.1%	1.227	0.1%	1.368	0.2%
ステンレススチール #101	1.090	0.4%	1.220	0.4%	1.362	0.3%
すべてのカラム	1.093	0.3%	1.223	0.3%	1.364	0.4%

表 5. 4 本のカラムにわたるゲンタマイシンのピークの相対保持時間および相対標準偏差パーセント

ゲンタマイシン点眼液の処方は、Greenstone/Pacific Pharma および Bausch & Lomb から入手しました。この点眼液は濃度 3 mg/mL で、検出器を過負荷にしないために、希釈する必要がありました。サンプルを MS グレードの水で希釈して、最終濃度を 100 µg/mL にしました。Bausch & Lomb の点眼液には防腐剤の塩化ベンザルコニウム 0.01% が含まれ、Greenstone の点眼液にもこれが含まれていますがその濃度は不明でした。製造者によって不活性成分の異なる混合物が使用されていましたが、いずれにも生理食塩水リン酸バッファー溶液 (pH 6.5 ~ 7.5 に調整済み) が含まれていました。Greenstone 製には、エドト酸二ナトリウムとポリビニルアルコールで構成される添加剤が追加されていました。

点眼液の成分は異なりますが、この分析法によりゲンタマイシンを構成成分の化合物に分離できました。ベンザルコニウムは、カラムに保持されず、Greenstone 製点眼液および Bausch & Lomb 製点眼液はそれぞれ 0.245 分および 0.244 分に溶出して、ボイドボリューム時間近くでした。分離されたパターンによりベンザルコニウムのピークの同定が確認されます。Greenstone は塩化ベンザルコニウムの濃度を報告していませんが、ピーク面積は Bausch & Lomb 製の 2 倍以上であり、濃度に差があることが示唆されています。図 4 と図 5 に示されているように、ゲンタマイシンの 4 本のピークすべてが分離されました。

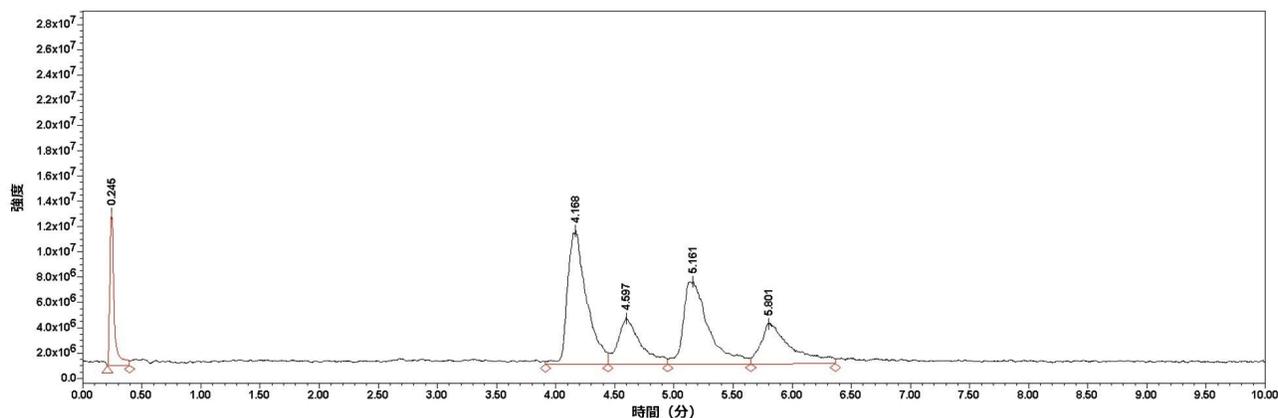


図 4. 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した *Greenstone* 製ゲンタマイシン点眼液。グラフの y 軸のスケールがベンザルコニウムのピークによって増加しているため、ピークはシャープに表示されません。

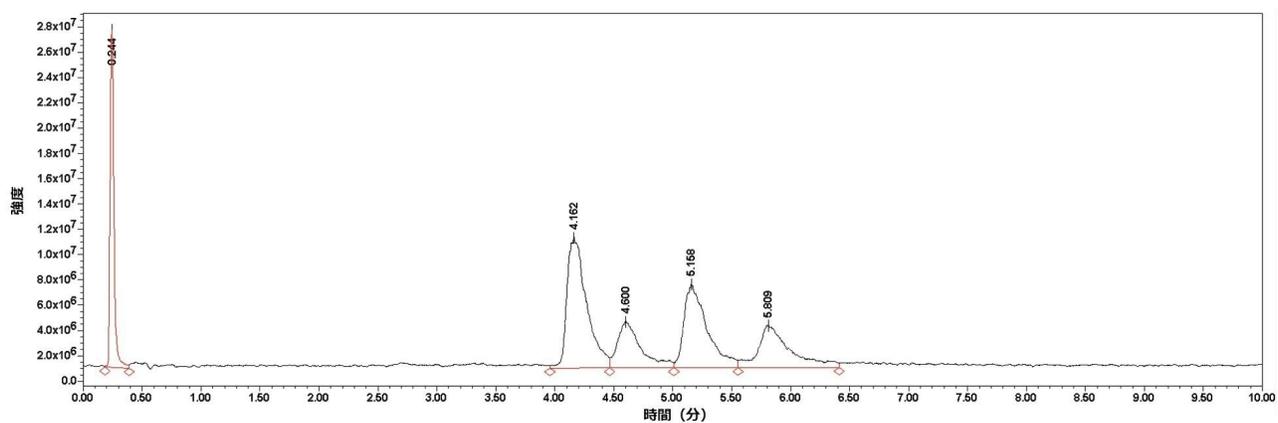


図 5. 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した *Bausch & Lomb* 製ゲンタマイシン点眼液

結論

新しい Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを ACQUITY QDa 検出器を搭載した Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS システムと組み合わせて使用して、ゲンタマイシンを分離するための高速アイソクラティック分析法が作成されました。これにより、充填剤の複数のバッチにわたって一貫した再現性のある結果が得られました。この簡潔な分析法では、ゲンタマイシンの 4 つの主要成分 (C1、C1a、C2、C2a) を迅速に分離できる一方で、フッ素化イオン対試薬、

複雑な分析前誘導体化、長い分析時間などの他のゲンタマイシン分離の欠点を回避できます。

参考文献

1. Masamichi Kobayashi, Michihiko Sone, Masayuki Umemura, Toshitaka Nabeshima, Tsutomu Nakashima & Sten Hellström (2008). Comparisons of Cochleotoxicity Among Three Gentamicin Compounds Following Intratympanic Application, *Acta Oto-Laryngologica*, 128:3, 245–249, DOI: 10.1080/00016480701558948.
2. Wohlfart J, Holzgrabe U. Analysis of Histamine and Sisomicin in Gentamicin: Search for the Causative Agents of Adverse Effects. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2021 Dec;354(12):e2100260. doi: 10.1002/ardp.202100260. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34427364.
3. Kumar P, Rubies A, Companyó R, Centrich F. Hydrophilic Interaction Chromatography for the Analysis of Aminoglycosides. *J Sep Sci*. 2012 Feb;35(4):498–504. doi: 10.1002/jssc.201100860. PMID: 22282410.
4. Stypulkowska, K., Blazewicz, A., Fijalek, Z. *et al.* Determination of Gentamicin Sulphate Composition and Related Substances in Pharmaceutical Preparations by LC With Charged Aerosol Detection. *Chroma* 72, 1225–1229 (2010). <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1763-y> <<https://doi.org/10.1365/s10337-010-1763-y>> .
5. White LO, Lovering A, Reeves DS. Variations in Gentamicin c1, c1a, c2, and c2a Content of Some Preparations of Gentamicin Sulphate Used Clinically as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit*. 1983;5(1):123–6. doi: 10.1097/00007691-198303000-00014. PMID: 6845395.
6. Wei J, Shen A, Wan H, Yan J, Yang B, Guo Z, Zhang F, Liang X. Highly Selective Separation of Aminoglycoside Antibiotics on a Zwitterionic Click Te-Cys Column. *J Sep Sci*. 2014 Jul;37(14):1781–7. doi: 10.1002/jssc.201400080. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24798626.
7. Fadi L. Alkhateeb, Adam Bengtson, Paul D. Rainville, Simultaneous Separation and Quantification of Aminoglycosides Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry, 2022. Waters Application Note, [720007558](https://www.waters.com/waters/720007558).
8. McMaster, John Wiley, M. C. Appendix B Solvents and Volatile Buffers for LC/MS. In *LC/MS: A practical user's guide* (pp.139–140). essay, 2005.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY QDa 質量検出器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720007609JA、2022 年 4 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](#)