[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters ACQUITY UPLC I-Class/ Xevo TQ-S microシステムを用いた主要なミクロソーム基質と代謝物の迅速検出および定量

Kerri M. Smith and Paul D. Rainville
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- Xevo® TQ-S micro は、UPLC® モードの分析において、多数のトランジッションに対応可能な高速 MRM および極性スイッチングが可能、また優れた感度と広範な直線性を提供します。
- 個別の試験法を 1 つの分析法に統合し、さらにサイクル時間を削減、ハイスループット分析を可能にします。
- 対象成分において 0.2 nM 付近での低い定量下限値（LOQ）が得られました。

ソリューション

ACQUITY UPLC® I-Class システム

Xevo TQ-S micro 質量分析計

ACQUITY UPLC 1.7 µm BEH Technology™ C_{18} カラム

MassLynx® ソフトウェアおよび TargetLynx™ アプリケーションマネージャ

キーワード

Xevo TQ-S micro、質量分析計、
トリプル四重極、UPLC、
バイオアナリシス、ミクロソーム

はじめに

医薬品候補の特性を見るための吸収（absorption）、分布（distribution）、代謝（metabolism）、排泄（excretion）の ADME ハイスループットスクリーニングは、現代の医薬品開発において欠かせないものとなっています。このようなスクリーニングによって、より有用な情報につながる基本情報が得られ、結果として創薬および医薬品開発過程において、より適切な意思決定を可能にします[1]。このような研究の 1 つである、チトクローム CYP450 を含む肝ミクロソームと候補化合物を混合してインキュベートする試験が、化合物の代謝、安定性、薬物相互作用（drug-drug interactions（DDI））の可能性を確認する目的で広く用いられています。

薬物相互作用（DDI）の確認では、阻害および誘導の試験を通して CYP450 が使用されます。医薬品の副作用が起こる可能性は、処方される薬の種類が増えるほど高くなるため、CYP450 を用いた DDI が特に重要になります。ある患者が 10 種類以上の医薬品を投与されている場合、DDI の可能性は最大 40% にもなると言われています[2]。標準的な CYP450 阻害および誘導試験では、複数のテスト化合物が既知の CYP450 特異的基質の代謝物に対し、変化または影響を与える可能性を判断するために用いられます。

ここでは、複数の主要な CYP450 基質と代謝物の検出と定量を同時にするための迅速で高感度な LC-MS の分析法開発とバリデーションについてご紹介します。

図 1. Waters ACQUITY I-Class UPLC と Xevo TQ-S micro

実験方法

測定条件

LC条件

LCシステム： ACQUITY UPLC I-Class

バイアル： Waters マキシマムリカバリー

カラム： ACQUITY UPLC BEH C_{18}、3.0 × 50 mm、1.7 µm

カラム温度： 35℃

サンプル温度： 室温

注入量： 5 µL

流速： 0.6 mL/min

移動相 A： 2 mM 酢酸アンモニウム - 0.1% アンモニウム水

移動相 B： 2 mM 酢酸アンモニウム - 0.1% アンモニウム含有メタノール

グラジエント： 1%-90%B（2 min）; カーブ 4

MS条件

MS システム： Xevo TQ-S micro

イオン化モード： ESI+

キャピラリー電圧：1 kV

測定モード： MRM

データ管理

MassLynx ソフトウェア

化合物	トランジッション	Dwell時間 (ms)	コーン電圧	コリジョンエネルギー
Acetaminophen	152>110	5	20	13
Acetaminophen-d4	156>114			
Hydroxymephenytoin	235>150	5	25	14
Hydroxymephenytoin-d3	238>150			
Hydroxybupropion	256>131	5	30	26
Hydroxybupropion-d6	262>131			
Dextorphan	258>199	5	20	29
Dextorphan-d3	261>199			
Hydroxytestosterone	305>269	5	20	11
Hydroxytestosterone-d3	308>272			
Hydroxydiclofenac	312>231	5	20	17
Hydroxydiclofenac-13C6	318>237			
Hydroxymidazolam	342>203	5	30	23
Hydroxymidazolam-d4	346>203			
6a-Hydroxypaclitaxel	870>286	5	30	4
6a-Hydroxypaclitaxel-d5	875>291			

結果および考察

製薬でパイプラインとなる新薬候補の数と多様性は増加しており、より質の高い候補を開発に進めるための情報を獲得するために、迅速な ADME 試験方法が必要とされています。DDI の可能性をいち早く明確にすることは、特に重要です。もし開発過程の後期もしくは、その薬が市場に出た後に DDI の問題が発見された場合、製薬企業は数百万ドルの利益を失うことになります。図 2 は、CYP450 阻害および誘導試験を通して、DDI の可能性を調査するために日常的にモニターされている 2 種の基質と 6 種類の代謝物の分離を示しています。クロマトグラムのピーク幅はおよそ 3 秒とシャープで、良好な分離であることが分かります。これらの結果は、一般的な条件下で得られており、そのメソッド開発の容易さと短時間分析であることがわかります。

図 3 は、CYP450 イソ型 1A2 基質であるアセトアミノフェンの検量線です。3 桁以上の直線性があり、R^2 は 0.998935 となりました（表 1 には、この試験で使用された他の成分の R^2 も示しています。）。また図 3 では、定量下限値（LLOQ）0.2 nM のクロマトグラムのベースラインから求めたシグナルとノイズの比が 14 以上であることが分かります。

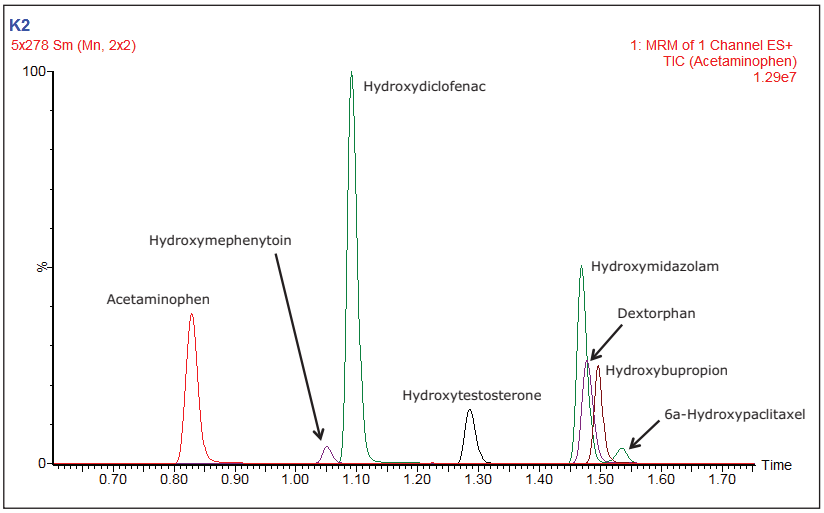

図 2. Waters ACQUITY UPLC I-Class/ Waters Xevo TQ-S micro を用いた CYP450 基質と代謝物の高速分離

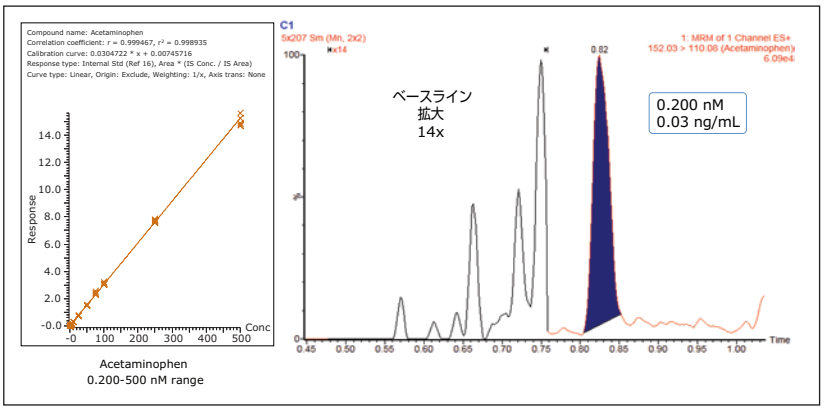

図 3. アセトアミノフェンの検量線と LLOQ

化合物	検量線 R^2 値
Hydroxymephenytoin	0.996465
Hydroxybupropion	0.993304
Dextorphan	0.998533
Hydroxytestosterone	0.995952
Hydroxydiclofenac	0.996227
Hydroxymidazolam	0.997798
6a-Hydroxypaclitaxel	0.997247

表 1. 試験で使用された CYP450 基質と代謝物の検量線 R^2 値

米国 FDA ガイダンスにあるバイオアナリシスの分析法バリデーションの規定に基づいて、開発した分析法の精度と正確性のテストを LC-MS で行いました。0.5-500 nM の範囲で 10 ポイント以上の濃度を調製し、N=5 で測定しました。表 2 のデータから、全対象成分の精度と正確性が 15%CV (3) 以内に含まれているのが分かります。

	Acetaminophen			Hydroxymephenytoin			Dextorphan			6α-Hydroxypaclitaxel		
[Nominal]nM	[Mean]	Accuracy %	%CV	[Mean]	Accuracy %	%CV	[Mean]	Accuracy %	%CV	[Mean]	Accuracy %	%CV
0.5	0.456	-11	10				0.446	-11	9	0.534	7.6	8
1	1.05	5.1	5	1.05	4.6	8	0.944	-5.7	5	1.06	5.5	7
2	1.98	-1.1	4	1.93	-3.4	13	1.97	-1.3	5	1.96	-2.2	6
5	4.89	-2.2	2	4.68	-6.4	12	5.17	3.3	3	4.82	-3.7	12
10	10.2	1.6	4	10.3	2.7	11	10.5	5	5	9.61	-3.9	10
25	24.9	-0.55	2	24.9	-0.38	6	25.5	2	3	24.5	-1.9	9
50	50.4	0.73	2	51.3	2.5	4	50.8	1.6	4	48.8	-2.5	8
75	80	6.7	4	73.7	-1.8	3	76.5	2	5	75.8	1.1	7
100	101	1.5	2	102	1.7	4	103	2.6	4	103	3	10
250	252	0.94	1	253	1.3	4	254	1.6	4	251	0.23	4
500	491	-1.8	3	495	-0.93	7	490	-2	2	498	-0.43	4

	Hydroxymidazolam			Hydroxytestosterone			Hydroxydiclofenac			Hydroxybupropion		
[Nominal]nM	[Mean]	Accuracy %	%CV	[Mean]	Accuracy %	%CV	[Mean]	Accuracy %	%CV	[Mean]	Accuracy %	%CV
0.5	0.484	-0.1	12	4.85	-3	12	0.454	13.4	9	0.872	-13	6
1	0.93	-7	7	10.4	3.7	10	0.8	0.04	9	1.95	-2.4	11
2	2.17	8.3	5	20.1	0.45	7	1.93	-3.5	8	4.94	-1.2	4
5	5.12	2.3	11	50.1	0.13	6	4.01	0.2	11	9.96	-0.38	1
10	10.4	4.3	9	102	2.3	8	7.85	-1.9	10	27.7	11	4
25	24.7	-1.1	12	252	0.69	9	19.4	-2.8	9	51.5	3	2
50	48.9	-2.2	8	508	1.5	6	39.6	-1	8	79.2	5.6	3
75	73.4	-2.2	7	813	8.5	8	97.7	-2.3	9	96.8	-3.2	8
100	98.4	-1.6	5	1045	4.5	7	195	-2.4	10	258	3.1	2
250	240	-3.8	5	2528	1.1	4	302	0.57	8	487	-2.5	3

表 2. CYP450 基質と代謝物の精度と正確性

バイオアナリシスの LC-MS 試験の感度は、マトリックス効果、クロマトグラムのピーク形状、関心のあるクロマトグラムピーク（または複数ピーク）を取り込む際に掛かる質量分析計のデータ取り込み時間によって影響を受けます。この試験では、インキュベーション条件もまた感度に影響する要因となり得ます。長時間のインキュベーションもしくは高濃度の酵素によって、検出あるいは代謝される基質の量が増える可能性があります。2 µm 以下の充填剤による LC 分離によってもたらされるシャープなピーク幅で適切な定量を行うには、クロマトグラムピーク上に充分なポイント数が必要です。図 4 では、Xevo TQ-S micro が、複数の MRM トランジッションをモニターしながらもシャープなピーク幅に対して 20 以上のポイントを取得することが充分可能であることを示しています。

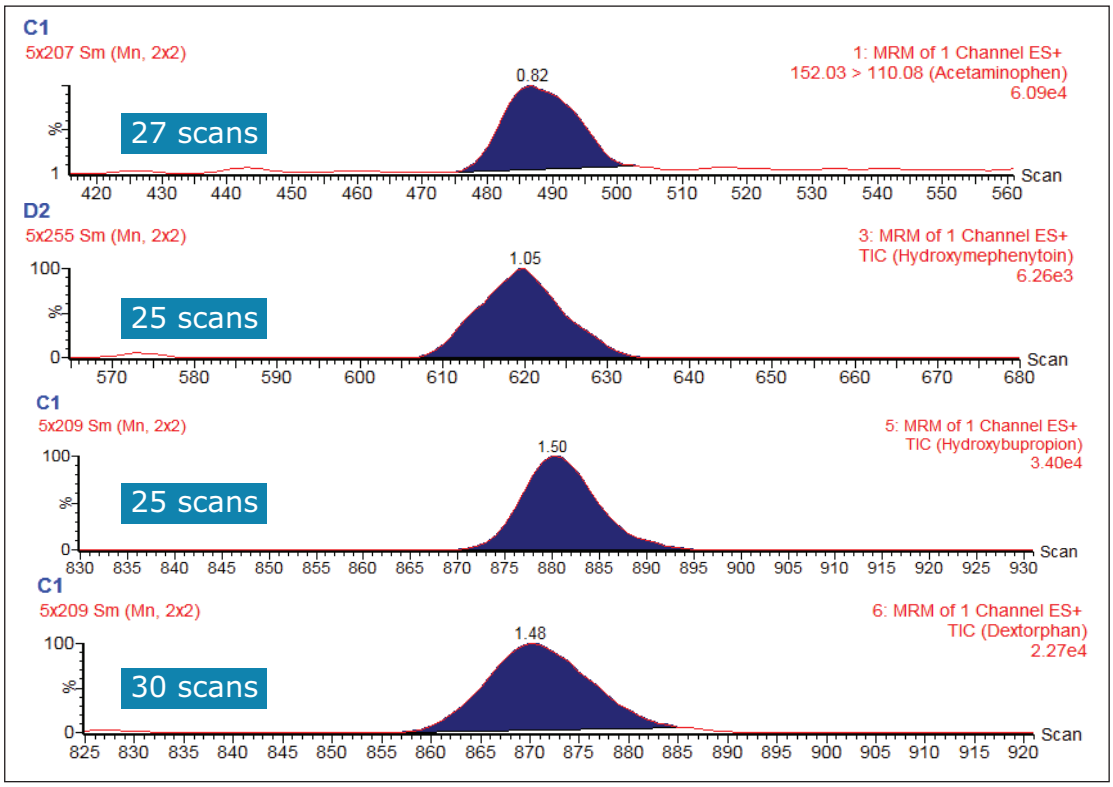

図 4. アセトアミノフェンの繰り返し注入：UPLC によってもたらされるシャープなピーク幅に対しても、Xevo TQ-S micro によって高速取り込みが可能なことを示しています。

Xevo TQ-S micro は、RADAR™ 取り込みモードによる測定も可能です。これはフルスキャンと MRM データを一度の測定で同時に取得できるモードです。この測定でモニターした MRM チャンネルデータと *m/z* 50-600 のフルスキャンデータを、図 5 に示しました。RADAR では、ターゲット成分とマトリックス成分との共溶出も確認することができます。MRM チャンネルとフルスキャンデータのモニターは、共溶出やマトリックス効果の可能性を最小限にする堅牢な分析法を迅速に開発するのに役立ちます。フルスキャンと MRM チャンネルデータをモニターする機能は、薬物の安定性や代謝物同定の研究においても活用することが可能です。特定の MRM チャンネルとは異なる成分が存在したとしても、フルスキャン測定により検出することができるからです。このようにして得られたデータは、さらに確信の持てる同定を行う際の証明にもなります。

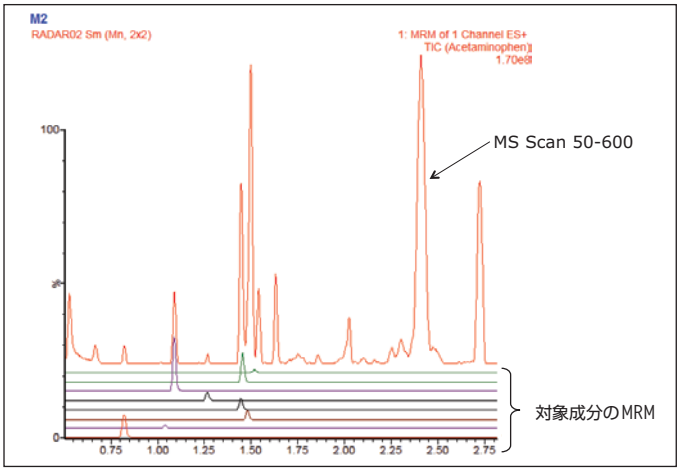

図 5. Xevo TQ-S micro の RADAR 機能を示すクロマトグラム。フルスキャンと複数の MRM チャンネルを同時にモニターすることが可能。

結論

DDI 試験においてよく使用されているいくつかの主要な CYP450 基質と代謝物の分離と検出において、Xevo TQ-S micro と ACQUITY UPLC I-Class の組み合わせにより、高速・高感度で堅牢な分析法を作成しました。この分析法から得られたデータの精度と正確性は、米国 FDA ガイダンスにあるバイオアナリシスの分析法バリデーションに規定されている許容範囲に収まりました。検量線のレスポンスは直線性が得られており、対象成分の LLOQ は 0.2 nM 付近であることが確認されました。さらにフルスキャンと MRM データが一回の測定で得られる Xevo TQ-S micro の RADAR 測定モードは、メソッド開発や他のアプリケーションにも生かすことができます。

参考文献

1. Plumb R, Potts W, Rainville P, Alden P, Shave D, Baynham G, Mazzeo, J. Addressing the analytical throughput challenges in ADME screening using rapid ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry methodologies. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008 Jul;22(14): 2139–52.
2. Adlen P, Plumb R, Jones M, Rainville P, Shave D. A rapid ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric methodology for the in vitro analysis of pooled and cocktail cytochrome P450 assays. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010 Jan;24(1):147–54.
3. Guidence for the Industry Bioanalytical Validation, May 2001, available at http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル 11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、UPLC、ACQUITY UPLC、Xevo、MassLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
RADAR、BEH Technology および TargetLynx は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年1月 720005241JA PDF