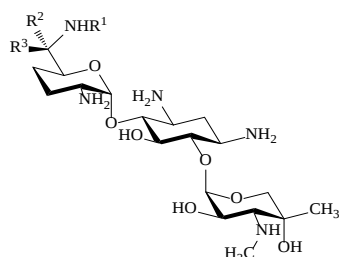


ゲンタマイシン硫酸塩(分取) Gentamicin sulfate (Preparative)

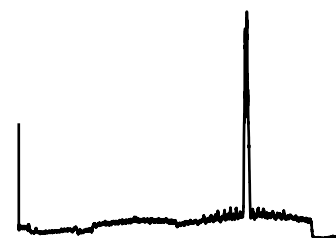
ゲンタマイシン硫酸塩は広範囲の抗菌スペクトルを有するアミノグリコシド系抗生物質で、ヒトや動物に対する感染症治療に用いられています。ゲンタマイシンは、放線菌による発酵で生成されることから様々な類縁体及びその他の夾雑物からなる混合物であり、有効成分については不明な点が多く、これを分取することは非常に有意義です。

しかし、ゲンタマイシンはイオン性が強いので、イオン対試薬(ペルフルオロ脂肪酸)と逆相カラムが使用されますが、LCシステムへのイオン対試薬の残留が問題となるほか、類縁物質に対する選択性が低いのが現状です。今回はイオン対試薬を用いずに分取LC条件を作成しました。

Key words : ゲンタマイシン硫酸塩 アンモニア溶液 分取 分取 精製
Column : USP category: L1



Gentamicin	-R ¹	-R ²	-R ³
C ₁	-CH ₃	-H	-CH ₃
C _{1a}	-H	-H	-H
C ₂	-H	-H	-CH ₃
C _{2a}	-H	-CH ₃	-H
C _{2b}	-CH ₃	-H	-H



イオン対試薬添加による分析

A: CH₃CN
B: 5 mmol/L Heptafluorobutyric acid
A/B, 15/85-30/70 (0-40 min)

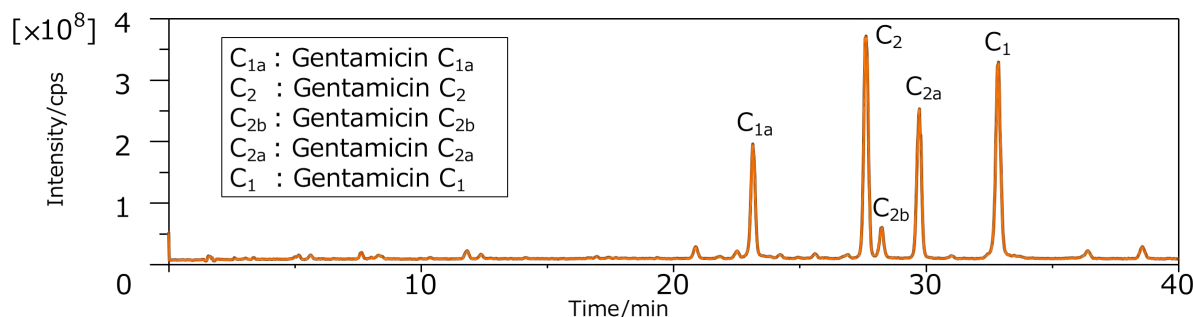
◆LC/MSによる分取LC条件の検討※

ゲンタマイシン硫酸塩はUV吸収がほとんどないため、LC/MSにより分取LC条件の検討を行いました。また、ゲンタマイシンのイオン性が強く、pKaは10付近であることから、pH が11程度になるようにアンモニア濃度を調整しました。

※日本薬学会第143回にて発表

[Analytical conditions]

Column : L-column3 C18 (C18, 5 μm, 12 nm); 2.0 mm I.D. × 150 mm L. Metal-free column; Cat. No. 862020
Eluent : A: CH₃CN, B: 超純水/28%アンモニア水/酢酸溶液 (200/20/0.5 v/v/v, 1.3 mol/Lアンモニア溶液相当, pH 11.2)
A/B, 1/99-15/85 (0-40 min)
Flow rate : 0.2 mL/min
Temperature : 40°C
Detection : ESI (+) (scan range *m/z* 320-510)
Injection volume : 10 μL
System : HPLC: UltiMate™ 3000 BioRS LC (Thermo Fisher Scientific), MS: 3200QTRAP (SCIEX)
Sample : Gentamicin硫酸塩標準溶液 100 mg/L in H₂O



アンモニア溶液を溶離液に使用することで各ゲンタマイシンをそれぞれ分離することができました。
この結果をもとに分取スケールをアップしました。

2024.06 OGT

◆ゲンタマイシン硫酸塩の分取

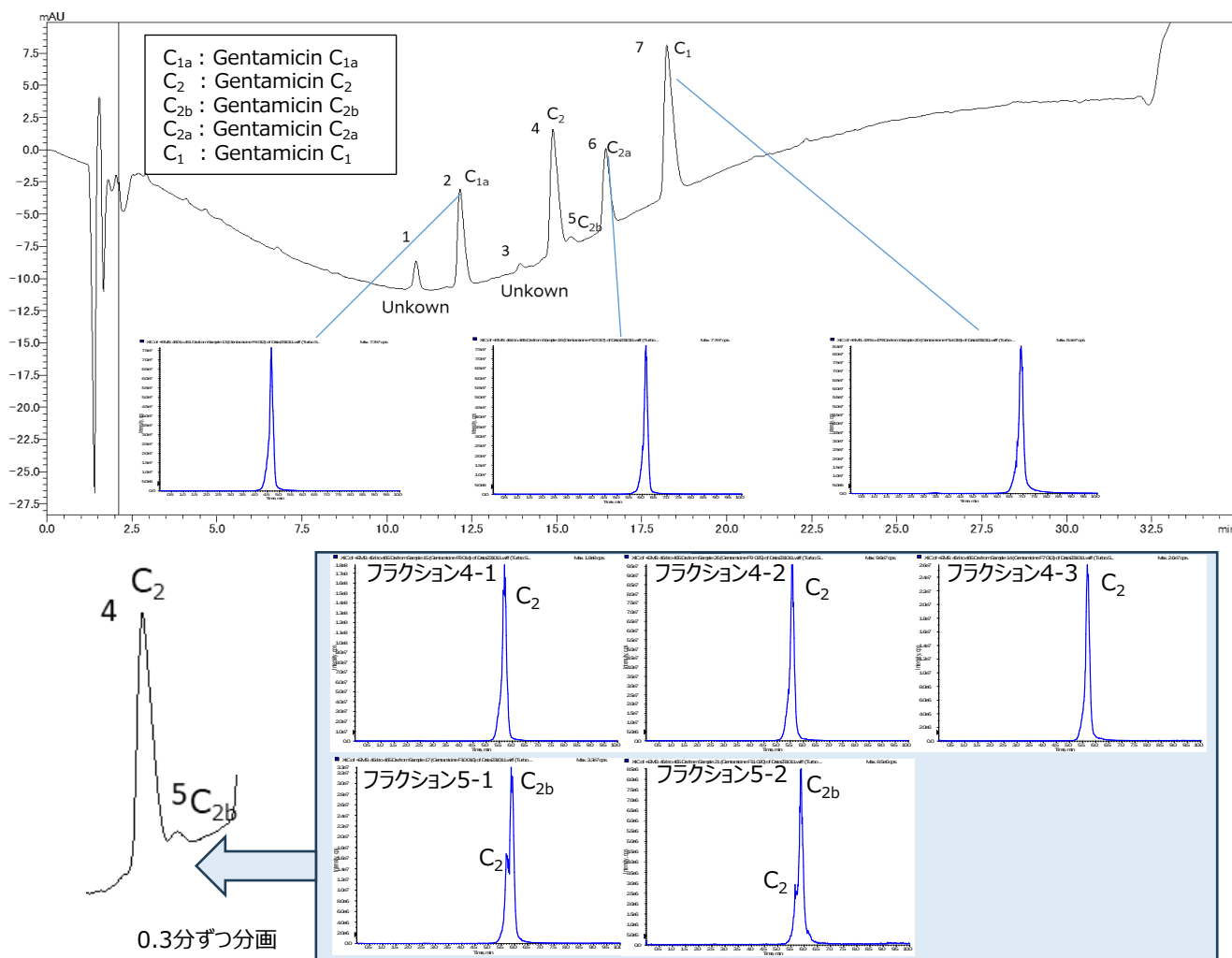
以下の条件で分取を行いました。分取LCでは試料が高濃度であるため、システムのメタルフリー化の効果は少なく、通常のステンレスカラムを使用します。また、アンモニア試薬の消費が大きくなるため、測定時間を40分のグラジエント溶離から30分へ変更しました。測定の結果、感度は低いもののゲンタマイシン主要成分5成分、不明成分(ピークNo.1, 3)を分取しました。また各フラクションはLC/MSにより確認しました。

[Analytical conditions]

Column : L-column3 C18 (C18, 5 μ m, 12 nm); 20 mm I.D. $\times$ 150 mm L.; Cat. No. 842520
 Eluent : A: CH₃CN, B: 超純水/28%アンモニア水/酢酸溶液 (1000/50/1 v/v/v, 0.70 mol/Lアンモニア溶液相当, pH 11.4)
 A/B, 5/95-20/80 (0-30 min)
 Flow rate : 20 mL/min
 Temperature : Room temperature
 Detection : UV 210 nm
 Injection volume : 1000 μ L
 System : Shimadzu Nexera Prep
 Sample : Gentamicin硫酸塩標準溶液 100 g/L in H₂O

[MS]

Column : L-column3 C18 (C18, 3 μ m, 12 nm); 2.0 mm I.D. $\times$ 50 mm L. Metal-free column; Cat. No. 861140
 Eluent : A/B, 5/95-20/80 (0-10 min)
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature : 40°C
 Detection : ESI (+) (scan range m/z 320-510)
 Injection volume : 10 μ L



ゲンタマイシン硫酸塩には単体の標準品がC₁及びC_{1a}のみが存在しません。各フラクションをLC/MSで測定した結果、本分取法ではC₂及びC_{2a}との単離が可能であることを確認しました。C_{2b}とC₂は完全に分離できないため、0.3分刻み(6 mL)で分画した結果、2フラクション分を回収することができ、各フラクションのC_{2b}の割合は71%と87%でした。本手法ではこれまで分離が困難であった成分も分取することができ、標準品の作成や、機能性の解明に役立てることが可能です。

2024.06 OGT