

液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置を利用した 生薬を例とする低分子化合物分析

小木曾 英夫, 薬事研究会分析部会

Component analysis of herbal medicines using liquid chromatography/ time-of-flight mass spectrometry

Ogiso H, The Chemical Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

医薬品開発において必要となる成分分析や不純物分析において、質量分析法は特異性が高く、かつ高感度測定が可能であるとともに、分子構造に由来する情報が得られることから、極めて有益な分析手段である。

当センターに導入された液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) は、精密質量測定により化合物の構造推定が可能なることから、医薬品開発においてしばしば直面する含有未知成分の構造推定や成分含有量の変動解析などに威力を発揮する。

本研究では、LC-TOF/MS を用いた低分子医薬品の分析手法の習得を目的に、様々な成分が含まれる生薬を解析対象とし、未知化合物を含む成分の構造推定や成分含量比較を効率的に行える網羅的かつ包括的分析方法の条件検討を行い、一連の分析手法を確立した。

Summary

Mass spectrometry is a very useful tool in the component analysis, required for a drug development, because it enables the specific and sensitive measurement, and provides some information on the molecular structure.

The liquid chromatograph time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS), settled in our institute, enables to effectively estimate the molecular structure by measuring the exact mass of molecule. Accordingly, it is a very potent tool for the structural estimation and the comparative analysis of component amounts, including unknown components, which often encountered in drug development.

This study was aimed at developing a comprehensive analytical method, which can efficiently carry out a series of analyses for low-molecular-weight drugs, using LC-TOF/MS. Practically, we comparatively analyzed their component amounts between different herbal medicines, and tried to estimate their chemical structures of herbal component.

緒 言

医薬品開発においては、主成分のみならず、分解物、不純物、代謝物などの成分分析が必要になる。こうした分析において、質量分析法は特異性が高く、かつ高感度であり、分子構造に由来する情報が得られることから、極めて有益な分析手段である。県内製薬企業における医薬品分析の支援を目的に、創薬研究開発センターに導入された液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) は、精密質量測定により化合物の構造推定が可能なることから、未知成分の構造推定や成分含有量の変動解析などに威力を発揮する。

本研究は、LC-TOF/MS を用いた低分子医薬品分析をテーマに、様々な成分を含む生薬を解析対象として、未知化合物を含めた成分について、化合物の構造推定や成分含量比較を効率的に行える網羅的かつ包括的分析方法の条件検討を行い、一連の分析手法を確立した。

方法及び結果

1. シャクヤク末からの成分抽出法の検討

生薬含有成分の網羅的分析を目的とするためには、水溶性から脂溶性化合物までの異なる物性を持つ含有化合物群を分析対象にする必要がある。通常行われるエタノー

ル抽出などの方法では、脂溶性化合物まで十分に抽出できない懸念があったことから、本研究ではシャクヤク末を抽出する際に、ブタノール抽出法を用い、脂溶性化合物を含むブタノール層画分と水溶性化合物を含む水層画分の2つの画分に分けて取得することとした(図1)。

2. 液体クロマトグラフ(LC)による成分分離条件の検討

脂質等の脂溶性成分の分離に適したLC条件(LC-A法)と核酸塩基等の水溶性成分の分離に適したLC条件(LC-B法)を設定した(図1)。



図1 LC-TOF/MSによる成分分析手法

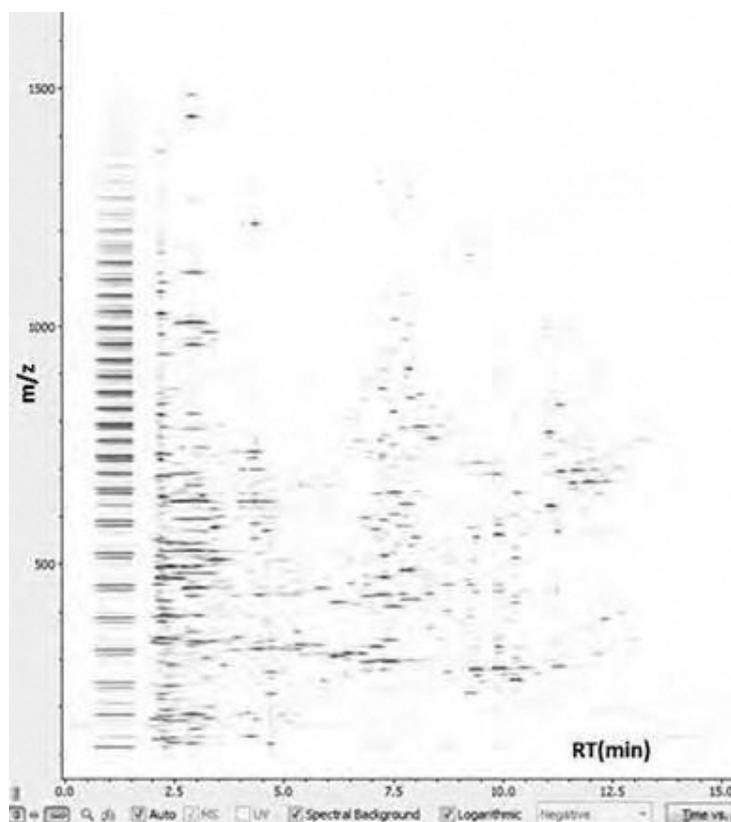


図2 LC-TOF/MSで検出された芍薬成分マップの例(LC-A法/MS-A法での測定)

横軸にLC保持時間、縦軸にm/zをプロットした2次元マップ。各スポットが1つの検出イオン(成分)に相当する。このマップからm/z 300~1000の範囲に主要な化合物が分布していることがわかる。

3. 質量分析条件の検討

一般的なイオン化法としての①エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) と②ステロイド化合物等の検出に適した大気圧化学イオン化法 (APCI) の2種類を用いることとし、それぞれについて、①ポジティブイオンモードと

②ネガティブイオンモードによる合計4種類の異なる検出条件を設定した (図1)。

4. 化合物の構造推定方法の検討

化合物の構造推定に当たり、オープンソースの巨大デー

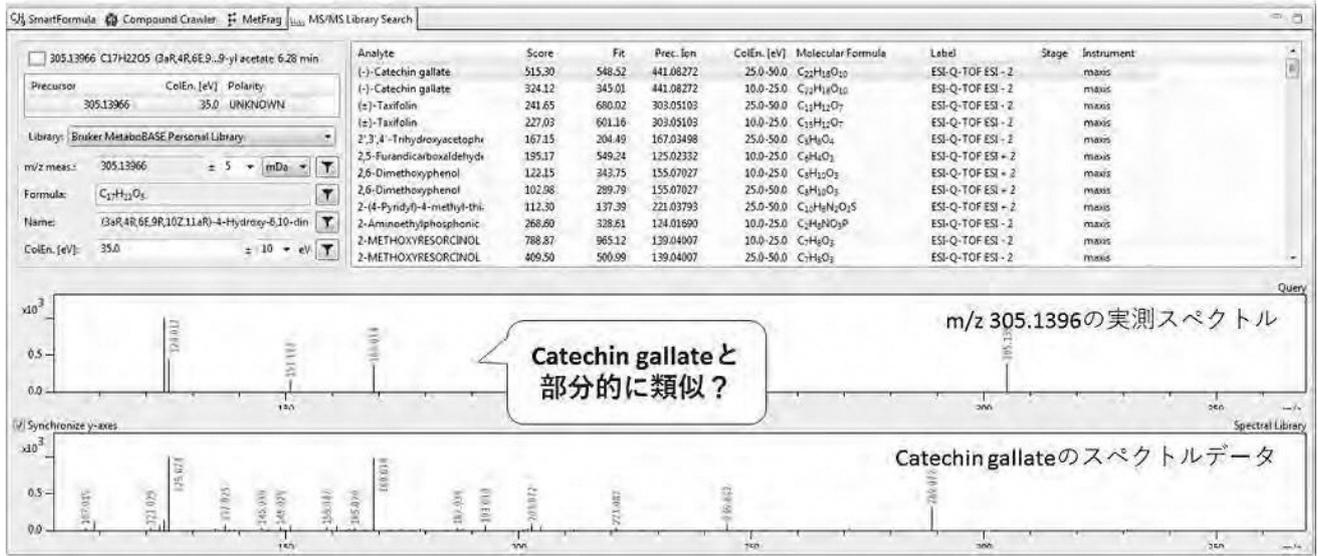


図3 MS/MS スペクトルサーチによる化合物の推定の例

MetaboScape® ソフトウェアによる化合物検索の1つであるスペクトルサーチから、m/z 305.1396の成分はgallate構造を有すると推定された。

ロット1に多い成分

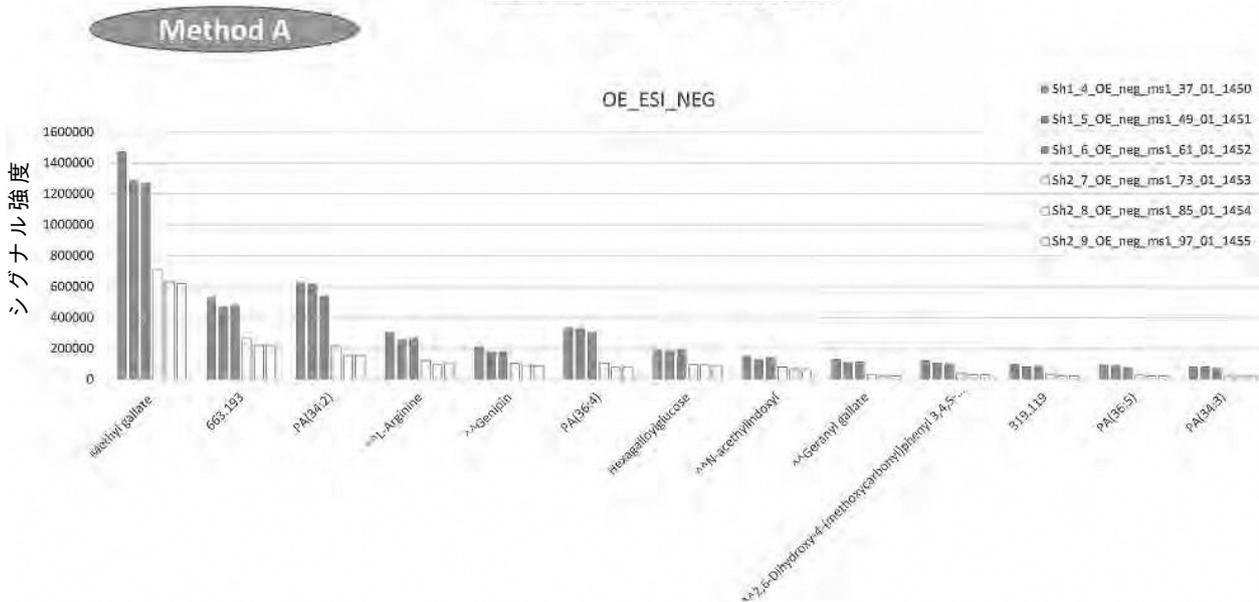


図4 局方シャクヤク末2ロット間の成分比較の例 (LC-A法/MS-A法での測定)

ロットNo. 1に多い成分 (イオン) について、化合物を推定した。概ね同定されたイオンについてはその名称を記した。候補化合物として上位に推定されたものの、MetFragのスコアが高くない成分については化合物名の前に^^を付記した。推定できなかったイオンについてはm/z値を記した。

データベース (PubMed や ChemSpider) に対する検索を行う前に、あらかじめ含有成分として推定される化合物群をリスト化したプライベートデータベースを構築し、この限定的なデータベースに対して検索を行うことにより、効率的な推定が可能となった。

すなわち、シャクヤク成分の分析を目的とする場合、既報にあるシャクヤク成分情報を収集し、それらを統合した「①シャクヤク成分データベース」を構築した。また、質量分析では一般的に、プロトンの脱着によるイオン化以外にも、ギ酸付加やアンモニア付加などによる種々の付加イオンの生成並びに、分子が2量体化もしくは3量体化などのクラスターイオンの生成がしばしば観察されることから、こうした二次的な生成イオンを特定するために、それらの情報をまとめた「②シャクヤク成分クラスターイオンデータベース」を構築した。その他に、アミノ酸、有機酸、核酸、糖類、脂質など生物(植物)が共通して含有する代謝物を収集した「③植物代謝物データベース」を構築した。これらプライベートデータベースに対して検索を行い、ヒットしたイオンを初めにアサインした。その後、アサインされなかったイオンについて、ChemSpider や PubChem などの巨大データベースに対して検索を行った。

化合物の絞り込みに際しては、MS/MS 測定で取得したフラグメントイオン情報を基に、MS/MS スペクトルデータベースや MetFrag ソフトウェアを使うことで化合物を検索し、リストアップされた候補化合物について、推定の確からしさを評価した。

5. 成分比較方法の検討

日本薬局方シャクヤク末の異なる2ロットについて、上述の方法に基づいて成分比較を行い、測定方法とデータ解析方法について検証した。1つの試料につき各3回別々に抽出操作を行い、それぞれの抽出液について合計6種類の異なる測定を行った。各測定で検出された成分について、MetaboScape® ソフトウェアを用いて網羅的な成分比較を行った。ロット間において含有量が2倍以上異なるものをリストアップし、これら成分の化合物推定を行った。

まとめと考察

LC-TOF/MS を用いて、低分子化合物分析を目的とした一連の標準手法を確立できた。本研究を通して、試料前処理及び測定パラメーターがどの程度質量分析結果に影響を及ぼすかを調べることにより、LC-TOF/MS 装置の性能とその限界について把握することができた。

本研究で確立した一連の方法は、生薬分析のみならず、

医薬品に含まれる未知不純物の構造推定にも応用可能である。