

# 液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析装置および 液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置を活用した薬物分析

小木曾英夫, 薬事研究会分析部会

## Drug chemical analysis using the tandem quadrupole and time-of-flight mass spectrometry coupled with liquid chromatography

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

### 要 約

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装置であることから、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。一方、液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析装置 (LC-MS/MS) は、MS/MS測定により特定化合物の微量定量が可能な装置であることから、医薬品開発において薬物動態測定や微量不純物の定量などに威力を発揮する。

本研究は、LC-TOF/MSおよびLC-MS/MSを用いた低分子医薬品分析をテーマとして実施した。LC-TOF/MSを用いて構造推定を行う課題として、プレドニゾン吉草酸エステル・酢酸エステル (PVA) の強制劣化物の測定を実施した。LC-MS/MSを用いて微量定量を行う課題として、パクリタキセルの細胞内取り込み量の測定を実施した。これら分析手法を確立することを通して、医薬品の品質管理における質量分析装置の有用性を確認した。

### Summary

A mass spectrometer is a very useful tool in the component analysis, because it enables structural elucidation or identification of unknown molecules, which is required for drug development process. The liquid chromatograph time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS) enables to effectively estimate the molecular structure by measuring the exact mass of molecule. On the other hand, liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) enables to quantitatively determine trace amounts of specific compounds by their MS/MS measurements.

The major theme in this study is quality assessment of the low-molecular-weight drugs, using LC-TOF/MS and LC-MS/MS. First, we performed the forced degradation study of prednisolone valerate acetate (PVA) for the purpose of structural estimation. Second, the intracellular uptake of paclitaxel was monitored for the purpose of micro-quantitative analysis. It was thus demonstrated that the mass spectrometry analysis was useful for quality control of pharmaceutical products, through the development of these analytical methods.

### 緒 元

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。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装置であることから、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。一方、液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析装置 (LC-MS/MS) は、MS/MS

測定により特定化合物の微量定量が可能な装置であることから、医薬品開発において薬物動態測定や微量不純物の定量などに威力を発揮する。

本研究は、LC-TOF/MSおよびLC-MS/MSを用いた低分子医薬品分析をテーマとして実施した。具体的には、構造推定を目的としてプレドニゾン吉草酸エステル・酢酸エステル (PVA) の強制劣化物の測定および、微量定量を目的としてパクリタキセルの細胞内取り込み量の測定等の検討を通して、医薬品の品質管理における質量分析装置の有用性を評価したので報告する。

## 方法及び結果

### 1. プレドニゾン吉草酸エステル・酢酸エステル (PVA) の強制劣化物のLC-TOF/MSによる分析

PVAをエタノール・緩衝液 (1:1) 中に溶解し、60℃または4℃で10日間保存することにより強制劣化物を得た。緩衝液の種類は、酸性 (pH2.7~3.1) および中性 (pH6.0~7.0) とし、20 mMリン酸緩衝液 (pH2.7とpH7.0) と20 mMクエン酸緩衝液 (pH3.1とpH6.0) の4種類を用いた。合計13種類の試料液を測定したところ、中性、60℃において8種類の分解物の

生成が、クロマトグラム上のピークとして確認された (図1)。このうち1種類はクエン酸緩衝液使用時のみ生成するピークであり、他の7種類は、緩衝液の種類によらず中性pHにおいて生成する分解物ピークであった。

次に13種類の試料液の測定結果について、ブルカー製Metaboscape® ソフトウェアを用いて成分ごとの比較を行うことによって、強制劣化処理後に生成した成分を明らかにした。Metaboscape® によると上記8成分に加えて、新たに1成分の強制劣化物が検出された。この1成分はクロマトグラム上では、未分解物で

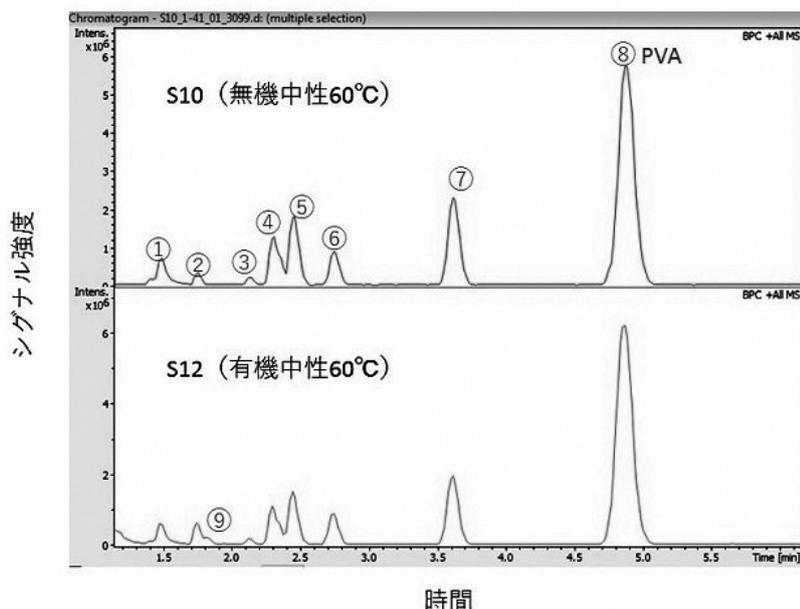


図1. PVA強制劣化物のLC-TOF/MS測定によるベースピーククロマトグラム (BPC)

PVAのピークは⑧, その他強制劣化により①~⑨のピークが検出された。その他の強制劣化条件では、これら以外のピークは観察されなかった。

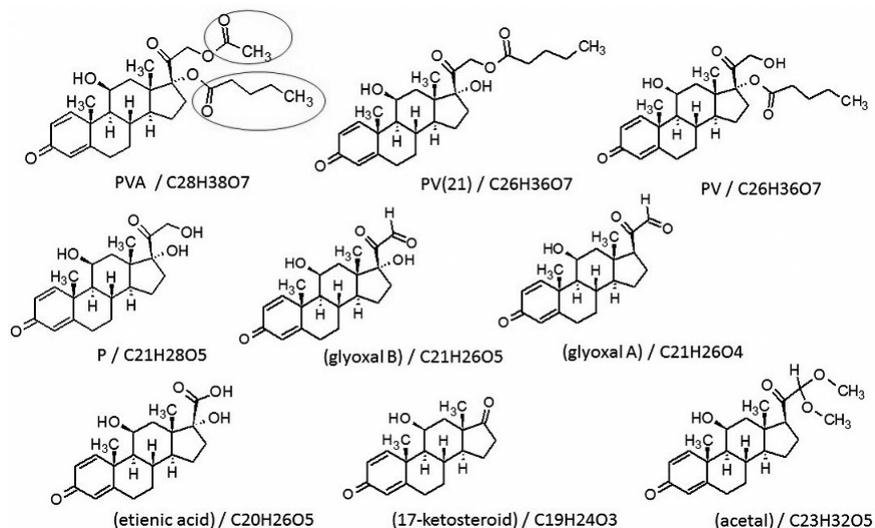


図2. これまでに報告されているPVAの強制劣化処理による分解物の構造

(医薬品研究11(2), 216-227(1980)より引用)

あるPVAのピークと重なっていたことから認識できていなかった。こうして捉えた合計9成分の分解物と未分解物PVAについて、精密質量から求めた化学組成式を表1に示した。PVAの分解物について、これまで8種類が明らかにされており(図2)、これら化合物の組成式と一致した7種類を、既知分解物として同定した(表1)。一方、他の3種類については、組成式とMS/MSスペクトルから構造推定を試みた。MS/MSスペクトルはいずれもプレドニゾロンのスペクトルと一致しており、プレドニゾン骨格は維持されているものと仮定し、側鎖の構造変化に絞って化学

構造を推定した(図3)。

なお、これら強制劣化物の同一試料液について、タンデム四重極型質量分析装置をシングル四重極質量分析計として用いることにより、分解物の推定がどの程度可能か検証した。その結果、①~⑧の成分については、 $m/z$ の値から分解物を推定することが可能であった。しかしながら⑨と⑩について、分解物として検出することができなかったか、もしくは、検出はできても正確に $m/z$ を求めることはできなかった。このことから、微量成分を含めた正確な質量測定には、分解能の高いTOF/MSが有効であることが確認された。

表1. LC-TOF/MS測定により推定されたPVA分解物

ピーク	Rt (min)	化合物名	組成式	[M]	PDAでのピーク面積比 (%)	
					S10 (無機中性)	S12 (有機中性)
①	1.41	P	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	360.194	3.94	3.45
②	1.66	未知化合物 (etienic acidのデオキシ体?)	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	330.183	1.15	2.62
③	2.02	(glyoxal A)	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	342.183	3.40	2.69
④	2.21	(acetal)/(hemiacetal)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	388.225	14.02	11.58
⑤	2.32	(acetal)/(hemiacetal)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	388.225	9.55	7.10
⑥	2.59	PV	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	444.251	3.84	4.22
⑦	3.38	PV(21)	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	444.251	15.17	12.67
⑧	4.57	PVA	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	486.261	48.11	53.67
⑨	1.74	未知化合物 (有機酸との反応生成物?)	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	400.225		1.43
⑩	⑧PVAと ほぼ同じ	未知化合物	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	416.256		

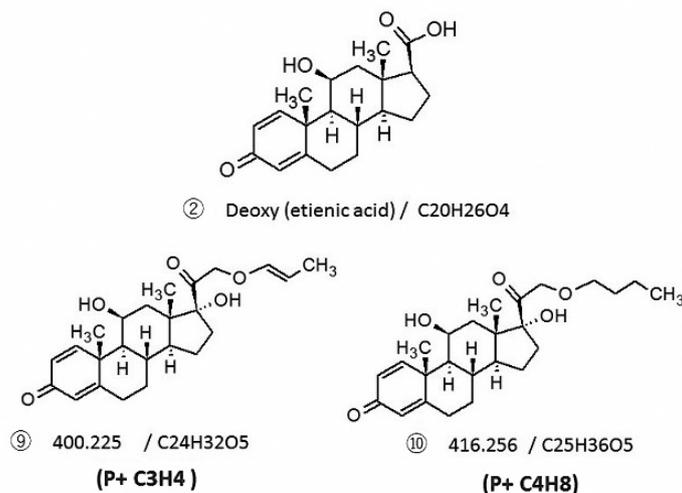


図3. 新たに検出されたPVA分解物の推定構造

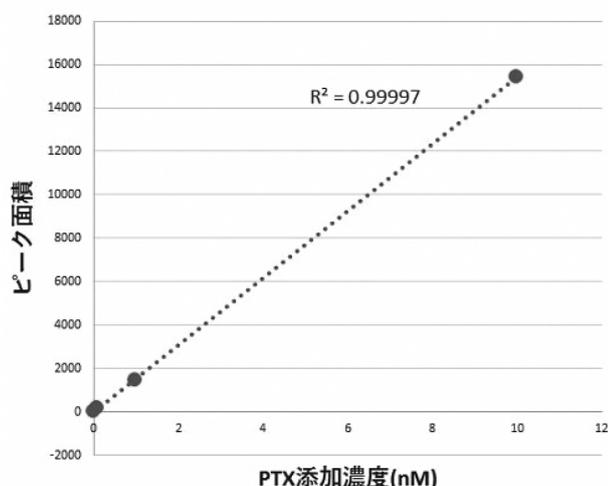
## 2. パクリタキセルの細胞内取り込み量の測定

タンデム四重極型のLC-MS/MSは、特定化合物をターゲットとする場合、複雑なマトリクス中の微量定量に適した測定装置である。この有用性を明らかにすることを目的として、抗がん剤パクリタキセルが、がん細胞内に取り込まれる経時変化をモニターすることを試みた。

はじめに、パクリタキセルの測定条件を設定するため、標準溶液を用いて測定パラメータの最適化を行った。次に、実際の試料測定に適用できるか確認する

ために、細胞懸濁液に種々の濃度のパクリタキセルを添加した添加検量線を測定した。その結果、検出下限は約0.1 nMであり、0.1 nMから10 nMの間で良好な直線性が得られた。このとき、10 nMでのパクリタキセルの回収率は99%であった。以上のことから実試料の測定に適用できる方法であることを確認した(図4)。こうして確立したパクリタキセルの微量定量法を用いて、培養がん細胞の培養液に30 nM相当のパクリタキセルを添加したときの、細胞内取り込み量を測定した。添加直後から60分までの経時変化を図5に示

### ●細胞懸濁液にパクリタキセル標準液を添加して作成した検量線 (濃度ポイント4点：0, 0.1, 1, 10 nM)



### ●添加回収率

細胞懸濁液に10 nMパクリタキセル標準液を添加したときの回収率(n=3)は99%であった

### ●検出下限

0.1 nMがほぼ検出下限であった

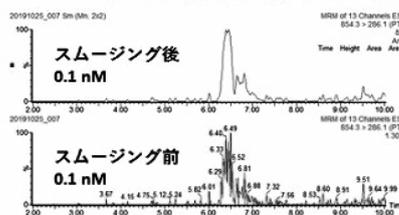


図4. 四重極型LC-MS/MSによるパクリタキセル添加検量線の測定

6 wellプレート上にサブコンフルエントに培養した細胞 (B16F10) を、メタノール1 mLでかきとり細胞懸濁液とした。このうち0.45 mLをとり、パクリタキセル標準液0.05 mLを混合して添加試料とした。14,000 gで遠心後取得した上清をメタノールで10倍希釈して測定に供した。

- ↓A549細胞 (3 cm dish x6, 2 mL/dish)
- 接着細胞40~50%コンフルエント
- ↓30 nM PTX添加
- ↓0~60分間, 37°C
- ↓細胞をPBSで洗浄(3回)
- ↓細胞を1 mL MeOHでかきとる
- ↓遠心後上清を回収
- ↓上清をMeOHで10倍希釈
- ↓遠心後上清の2 µLをLC-MS/MSに注入

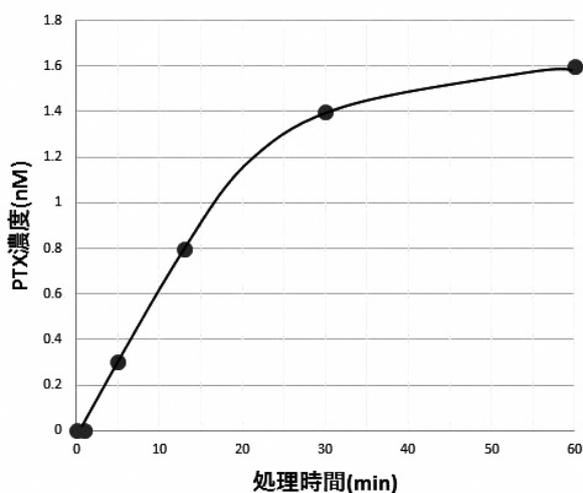


図5. 培地に添加したパクリタキセルの細胞内取り込み量の経時変化

取り込み量は、細胞から抽出した液の濃度として表した。

した。この結果から、パクリタキセルは添加20分後まで、細胞内取り込み量は直線的に増加し、その後は頭打ちになることが明らかとなった。

### 3. LC-TOF/MSを利用したその他の検討事項

#### 3-1. トラメチニブの微量不純物の構造推定

試薬として購入したトラメチニブに含まれる不純物の構造推定を試みた。検出された不純物は1種類であったが、構成元素をC/H/Oに限定したとき組成式はC<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>と推定された。しかしながら、データベース (PubChem) 上でヒットする候補化合物が多すぎて、構造の絞り込みには至らなかった。

#### 3-2. ジクロフェナク・メントール混合液の強制劣化処理により生じた分解物の構造推定

ジクロフェナクとメントールの混合液について、強制劣化処理の結果生成した分解物の構造推定を試みた。Metaboscape<sup>®</sup> ソフトウェアの成分比較から、5種類の分解物が検出されたが、そのうち既知分解物2種類を同定した。その他3種類のうち2種類は組成式を推定できたものの化合物の推定には至らなかった。残り1種類は組成式を推定することはできなかった。

#### 3-3. インドメタシン・メントール混合液の強制劣化処理により生じた分解物の構造推定

インドメタシンとメントールの混合液について、強制劣化処理の結果生成した分解物の構造推定を試みた。Metaboscape<sup>®</sup> ソフトウェアの成分比較から、6種類の分解物が検出されたが、そのうち既知分解物1

種類を同定した。その他5種類のうち2種類は、組成式からインドメタシン+Oとインドメタシン-CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>であることが推定できたが、構造の特定には至らなかった。残り3種類は組成式を推定できたものの化合物の推定には至らなかった。

### 4. 四重極型質量分析計を利用したその他の検討事項

#### ・ホスファチジルチオエタノールのSH基の反応性の検討

ホスファチジルチオエタノール (PtdSH) のSH基と、グルタチオン (GSH) のSH基とを酸化的にSS架橋することのできる反応条件を見つけることを目的として、四重極型質量分析計を用いた。液体クロマトグラフ装置を使わず、シリンジポンプにて反応液を直接質量分析計に導入し、生成物の量をモニターすることにより (図6), 反応条件を最適化することができた。

### まとめと考察

#### 1. LC-TOF/MSを用いて、医薬品に含まれる分解物や不純物の構造を推定する

あらかじめ分解物や不純物の候補がわかっている場合、その化合物が混入しているか否かを特定することは容易であった。また、化合物の構成元素や安定性等の情報がある場合、推定された組成式から、O元素が1つ付加した酸化物であるとか、O元素が1つ脱離したデオキシ体であるとか、または脱炭酸化合物で

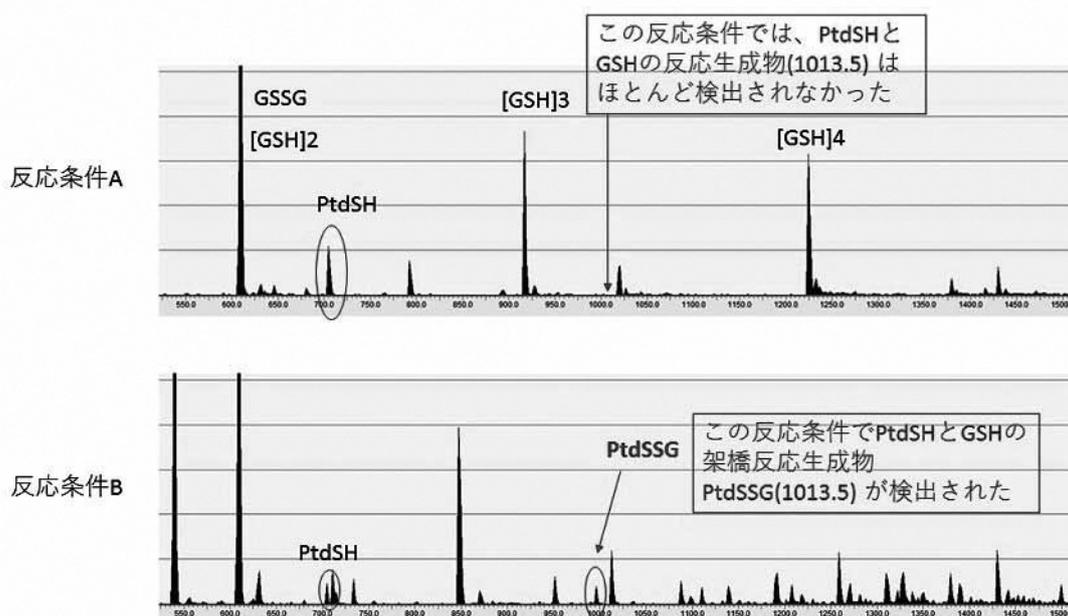


図6. シングル四重極質量分析による溶液中に含まれる化合物群の検出

条件Aの反応液と条件Bの反応液に含まれる成分を比較した。目的とするPtdSSGは条件Bで生成した。  
[GSH] n : GSHのクラスターイオン, PtdSSG : PtdSHとGSHとのSS架橋生成物

ある等を推定することは可能であった。一方で、何の情報もない不純物の場合、CHON以外の元素（S, P, I, F, Si, Cl等）を含むのか含まないのか不明なため、精密質量情報のみから組成式を推定することは不可能であった。すなわち、LC-TOF/MS測定から構造を推定できるのは、構成元素が明らかであること、原薬由来の分解物情報など、何らかの情報がある場合に限られることがわかった。

## **2. 四重極型LC-MS/MSを用いて、原薬や不純物等の特定化合物の微量定量を行う**

特定化合物の標準品を用いて、あらかじめMS/MS測定パラメータを最適化し、測定方法を確立する。次に、実試料を想定し添加検量線を作成し定量範囲を決める。その後、実試料に含まれる特定化合物の定量を行う。この一連のステップを踏むことにより、複雑なマトリクス中に含まれるターゲット化合物の微量定量を行うことができた。

## **3. 質量分析計を用いて、合成化合物や誘導体化等の反応条件を決める**

薄層クロマトグラフィの代わりに、シングル四重極質量分析計を用いて、反応生成物をモニターすることにより、反応条件を最適化することができた。