

LC/ESI-MS/MS を用いる低分子化合物の分析における
インソース CID による定量範囲の調節
(要約)

東北大学大学院薬学研究科
生命薬科学専攻

石 井 英 昭

LC/ESI-MS/MS を用いる低分子化合物の分析における インソース CID による定量範囲の調節

病態分子薬学分野 石井 英昭

質量分析 (MS) 法は、医薬品や生理活性低分子をはじめ、様々な分子の分析に用いられる。MS は、荷電粒子の運動特性を利用して質量分離を行うため、分析対象物をイオン化する必要がある。これまでに様々なイオン化法が開発されている。このうち、大気圧化学イオン化 (APCI) 法やエレクトロスプレーイオン (ESI) 化法を用いる液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析 (LC/MS/MS) 法は、低分子化合物の定量分析に汎用される。APCI 法では、加熱霧化した LC 溶離液中の溶媒分子が、高電圧を印加した針電極の放電によってイオン化し、イオン-分子反応によって試料分子がイオン化する。したがって、分析対象物のイオン化は共溶出物質の影響を受けにくいものの、抱合代謝物のような不安定な分子は、イオン化過程で分解することもある。一方、ESI 法は、電荷の偏りによって生じる帯電液滴の微細化に伴って試料分子への電荷移動が起こるため、熱分解の起こりにくいソフトなイオン化法であるが、共溶出物質の影響を受けやすい。こうしたイオン化法を装着した LC/MS/MS による定量分析では、しばしば直線性の飽和が生じることがある。原因としてイオン化の飽和、MS 内部の反応過程の飽和、イオン透過性の飽和や検出器におけるエレクトロンマルチプライヤの飽和が考えられる。これらのうち、イオン化の飽和を除く質量分析計内部における飽和現象を回避するには、それぞれの部位に到達するイオン量を低減することが重要となる。そこで本研究では、インソース衝突誘起解離 (CID) により質量分離部に導入するイオン量を調節し、検出器の有するダイナミックレンジを最大限に活用して、低分子化合物の定量範囲を調節する方法を考案することとした。

まず、検出感度の大きく異なるウラシル (U)、デオキシウリジン (dUrd) 及びウリジン (Urd) を用いて、直線範囲のコントロールに有効な手段を調べることにした。LC/ESI-MS/MS を用いて、各化合物の脱プロトン分子をプリカーサーイオンとするプロダクトイオンスキャンを行った。その結果、U では m/z 42 に単一のプロダクトイオンが得られ、他の 2 化合物については相対強度の異なる複数のプロダクトイオンが生成した。ベースピークを用いる選択反応モニタリング (SRM) では、U、dUrd 及び Urd の直線範囲は、それぞれ 0.3–300 ng/mL、1–100 ng/mL 及び 10–1000 ng/mL であった。これに対

し、相対強度の異なるプロダクトイオンをモニターする secondary product ion SRM (*s*-SRM)では、dUrd の定量上限 (ULOQ) が 3 倍高濃度側にシフトしたものの、Urd では変化がなかった (Fig. 1)。一方、Q1 で同位体を選択する isotopologue SRM (*i*-SRM)では、U、dUrd 及び Urd のイオン量をそれぞれ 1.2%、7.2%及び 11.4%に制限したにもかかわらず、直線範囲に変化は見られなかった。次に、declustering potential (DP)を変化させることによりインソース CID を調節して、質量分析計内に導入するイオン量をコントロールしたところ、U、dUrd 及び Urd の定量範囲は 10–1000 ng/mL、30–3000 ng/mL 及び 100–10000 ng/mL となり (Fig. 2)、最大で 30 倍高濃度側にシフトした。

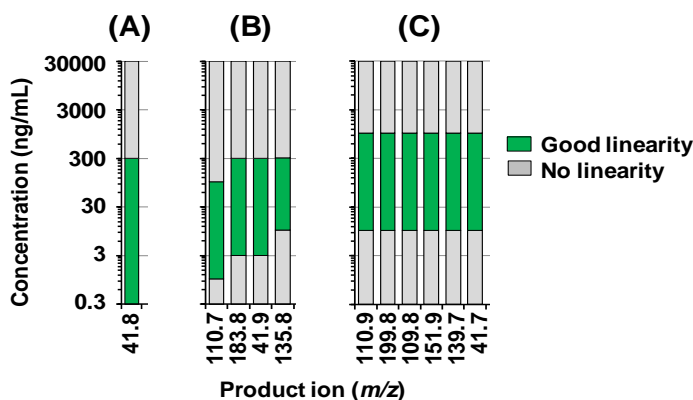


Fig. 1 Effect of *s*-SRM on linear ranges for U (A), dUrd (B), and Urd (C).

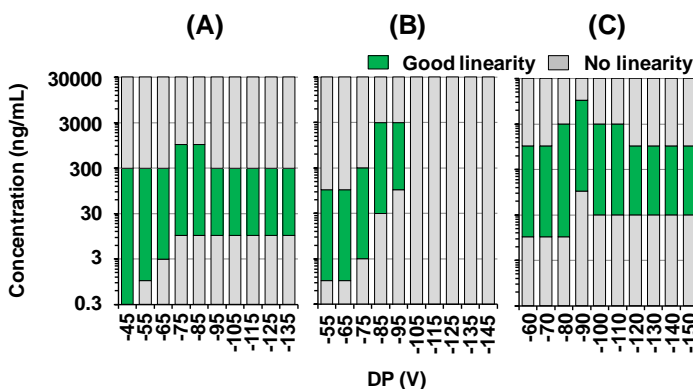


Fig. 2 Effect of in-source CID on linear ranges for U (A), dUrd (B), and Urd (C).

次に、物性の大きく異なるレセルピン、フロセミド、インドメタシン及びジクロフェナクを用いて、検出極性 (正・負) やイオン化法 (ESI・APCI) が異なる場合でも、先の現象が再現することを検証した。まず、ESI 及び APCI による検出イオンを確認したところ、レセルピンはプロトン付加分子を、フロセミドは脱プロトン分子を与え、インドメタシン及びジクロフェナクは正負両イオンを生成した。次いで、先と同様に *s*-SRM 分析並びにインソース CID を用いる SRM 分析を行った。APCI と ESI を比較すると、絶対感度は ESI の方が優れるが、APCI の方が高濃度領域の飽和が起こりにくく、直線範囲が広いことが判った (Fig. 3)。ESI では高濃度試料の場合に帯電液滴中の試料分子同士あるいは共存物質によるイオン化の競合が起こることによって、イオン化の飽和が生じやすいものと考えられる。一方、APCI では、イオン源雰囲気中において溶媒イオンが大過剰であるためにイオン化の飽和が生じにくいものの、

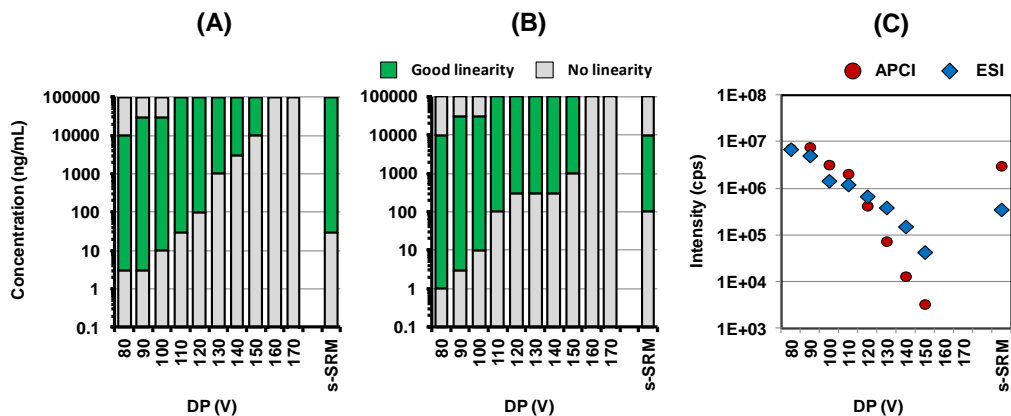


Fig. 3 Effect of in-source CID on linear ranges for indomethacin in positive ion mode using APCI (A) and ESI (B). Graph (C) represents intensity on MS at ULOQ by APCI (red) and ESI (blue).

逆に低濃度試料では溶媒イオンと試料分子の会合確率が低く、このために、絶対感度に劣るものと考えられる。APCI 及び ESI を用いて、インドメタシンの正負両イオンのシグナル強度を比較すると、いずれの場合も直線の飽和が見られるときのシグナル強度は類似しており、エレクトロンマルチプライヤにおける検出の飽和には差がないことが判った。

以上の検討より、APCI、ESI いずれのイオン化法においても、また正負どちらのイオンを検出する場合でも、DP の調節によるインソース CID を活用することにより、直線の範囲をコントロールできることが明らかとなった。

続いて、ヒト血中の 5-FU 及びその代謝物の測定系を構築し、複雑なマトリクス成分共存下においても、インソース CID による定量範囲の調節が可能であることを検証した。5-FU の適正使用には、代謝物である FUH₂、5-FdUrd、5-FUrd 及び FBAL の血中濃度測定が必要となる (Fig. 4)。特に極めて極性の高い FBAL の、他の化合物との同時測定がこれまで

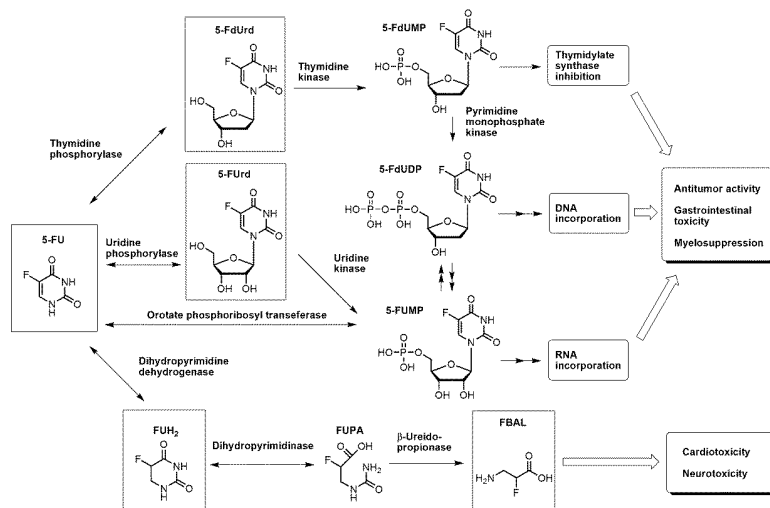


Fig. 4 Pathways for metabolism of 5-FU and proposed mechanism of action.

困難であったが、今回、アセトニトリルを用いる除タンパクによる前処理を検討したところ、いずれの化合物も良好に回収できることが判った。次に、ホスホコリン基結合型シリカゲルを充填した HILIC カラムを用いて分離条件を検討したところ、10 mmol/L 酢酸アンモニウムとアセトニトリルの混液を用いるグラジエント分析により、すべての化合物の相互分離に成功した。次いで、SRM 分析条件を設定して各化合物の定量可能な範囲を調べたところ、FUH₂ と FBAL において目標とする定量下限の測定が困難であった。そこで次に、グリセリンをイオン化促進剤としてポストカラム添加したところ、両化合物は定量下限も測定可能となったものの、逆に 5-FU、5-FdUrd 及び 5-FUrd の高濃度域の直線性を確保できないことが判明した。そこで、DP の調節によるインソース CID を活用することで、それら 3 化合物の直線範囲を調節することにした。その結果、複雑なマトリクス共存下においても、定量範囲のシフトが認められ (Fig. 5)、すべての分析対象物につき、目的とする範囲で定量可能であることが判った。

次に分析法バリデーションを実施した。血球中の酵素によって 5-FU が代謝されるため、各化合物の全血中での安定性を調べた。その結果、FBAL を除く化合物はいずれも他の物質に変換されたことから、試料採取後に冷却しながら速やかに血漿を分離することが重要であった。日内、日間再現性をはじめ、他のバリデーション項目でも十分に満足できる結果が得られ、本測定法が 5-FU 投与患者の血中濃度測定に適用可能であることが判明した。

以上の結果から、インソース CID による定量範囲の調節は、検出感度の異なる複数成分の同時測定に極めて有用であり、今後、本研究の成果が様々な分野における低分子化合物の定量分析に広く活用されることが期待される。

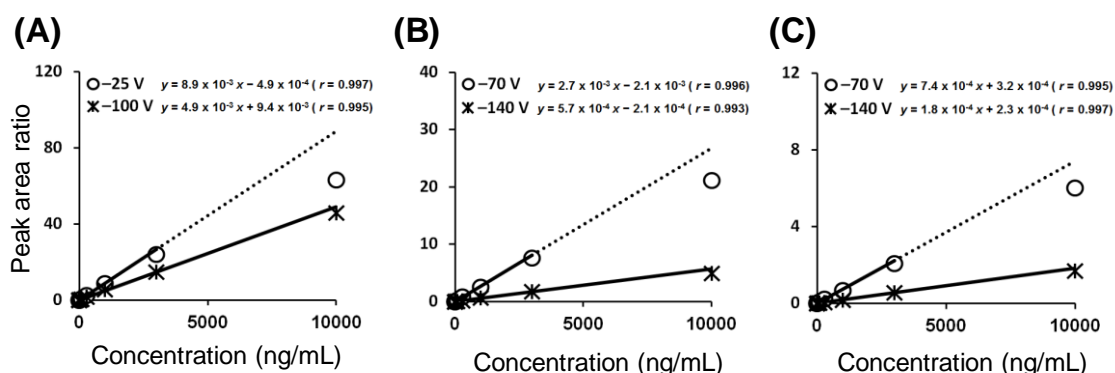


Fig. 5 Comparison of linear regression lines for 5-FU (A), 5-FdUrd (B) and 5-FUrd (C) using DP at the initial value and 70 V more negative. Solid lines were plotted using at least four successive points in triplicates. Dotted lines represent extrapolations from solid lines beyond the linear range.