

# LC/MSを駆使した医薬品研究

山梨大学クリーンエネルギー研究センター

橋本 豊

# 医薬品開発研究でのMSの 登場場面

- 候補薬物の構造決定
- 合成研究
- 規格試験法
- 薬物動態
- 毒性研究
- 臨床研究

# LC/MSに必要な知識

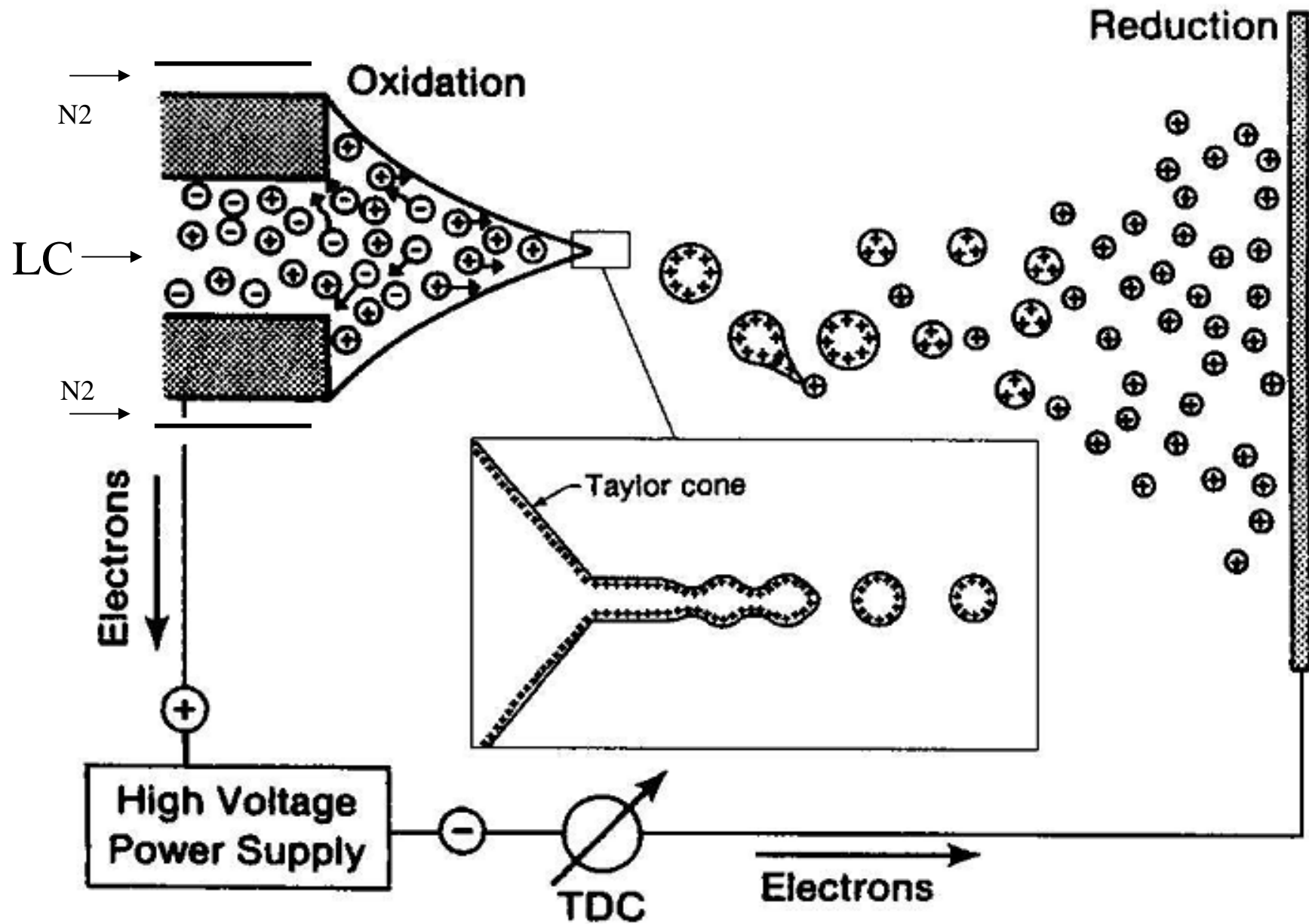
- LCの基礎知識
- MSの基礎知識
- LC/MSとしてのメリットと制限の知識

# LC/MSに適したイオン化法

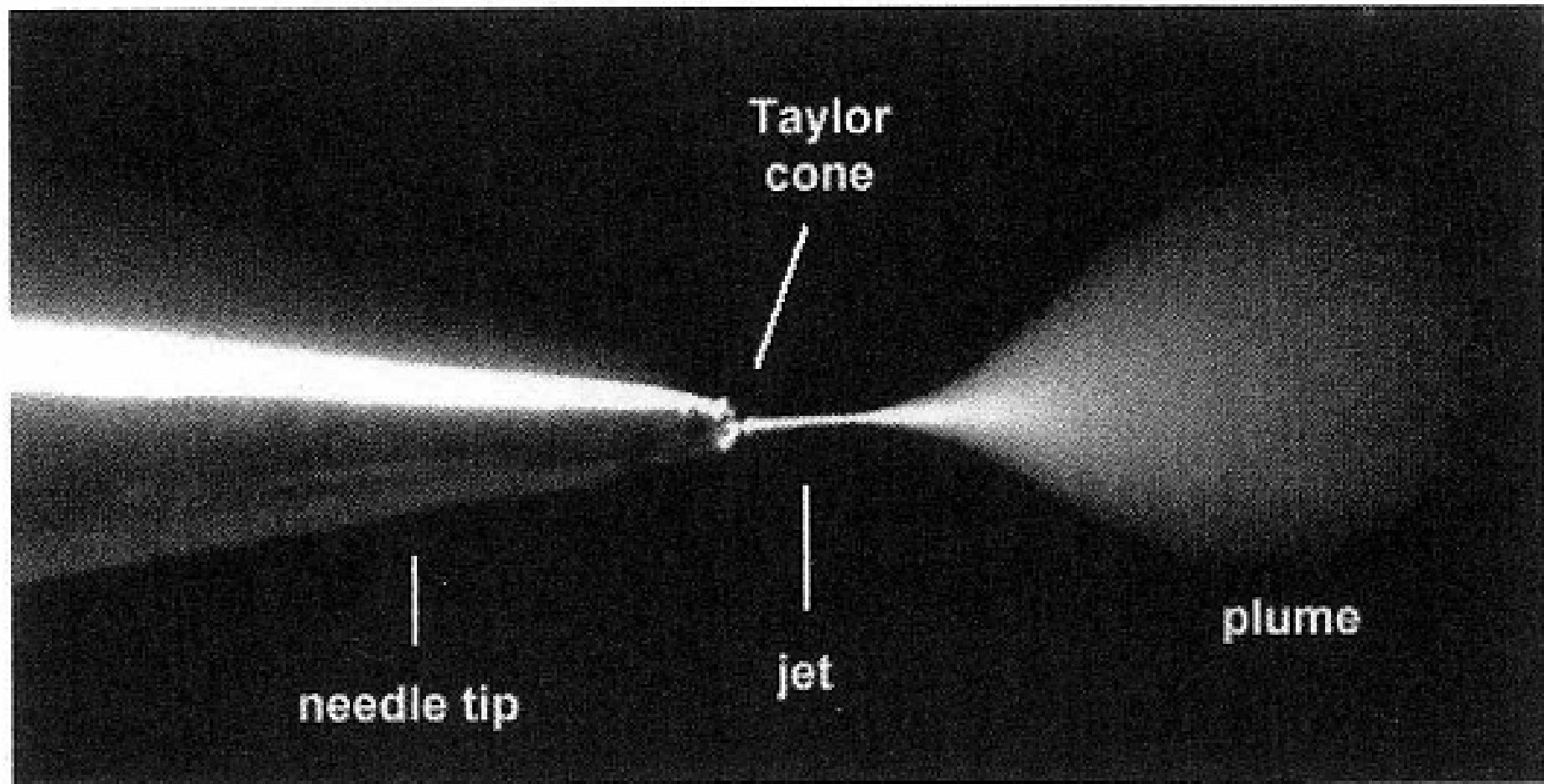
- スプレーイオン化法

ESI (Electrospray Ionization)

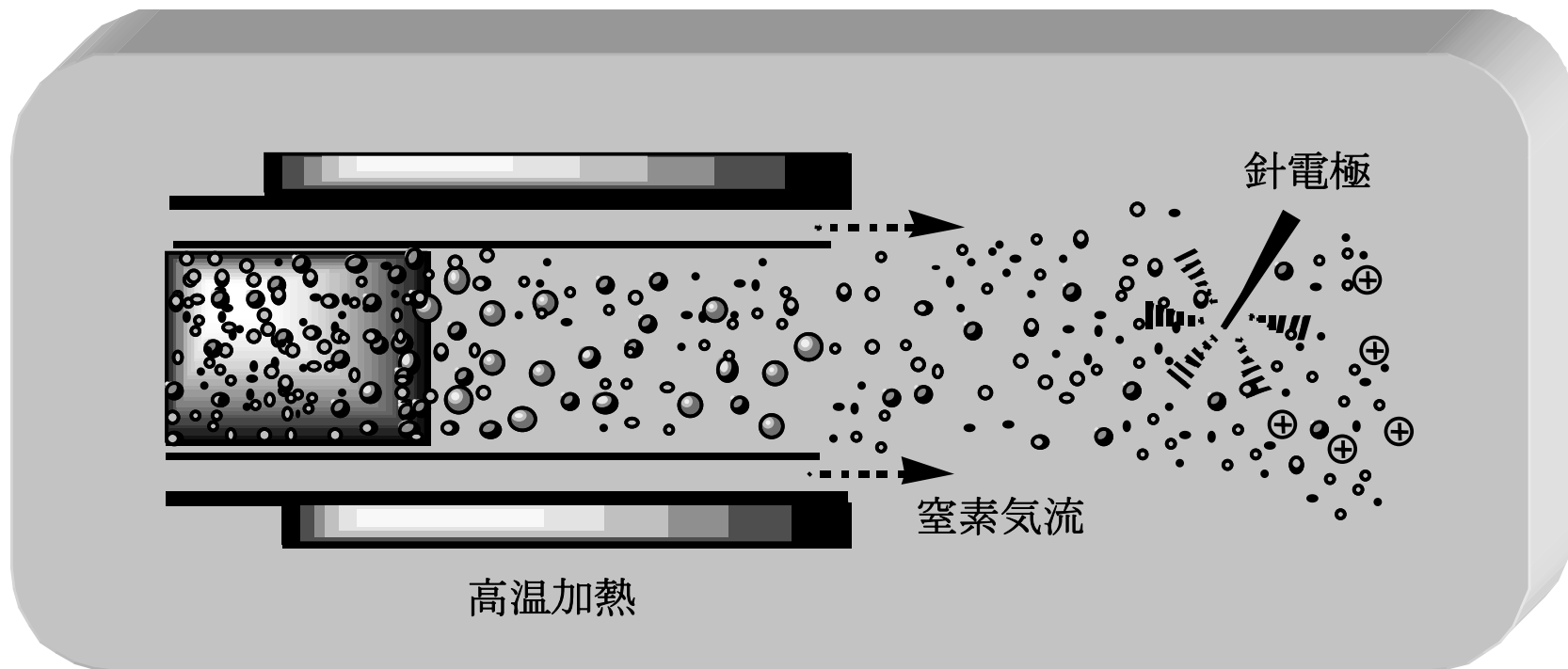
APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)



Taylor cone formation and the electrochemical processes of ESI



Electrospray from a nanoESI capillary. The jet emitted from the Taylor cone is clearly visible and separate from the region of rapid expansion into a plume of microdroplets. By courtesy of New Objective, Woburn, MA.



APCIイオン源

# LC/MSに適したMS

- 四重極型 (Quadrupole) MS
- 飛行時間型 (Time of Flight) TOFMS
- イオントラップ型 (Ion Trap) MS

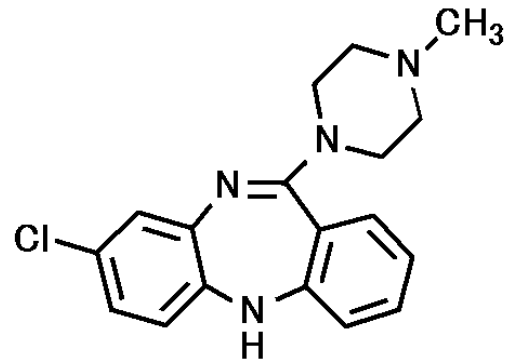
# LC/MSに適したHPLCモード

- 逆相HPLC  
ESI
- 順相HPLC  
APCI

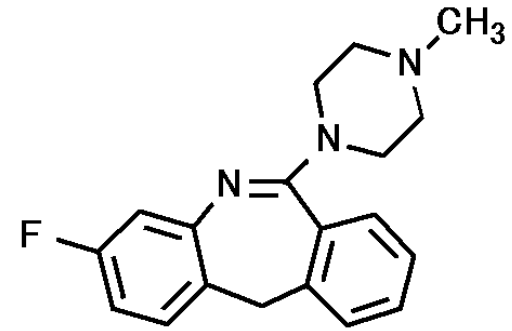
# 代謝研究からDrug Designへ

# 代謝研究の必要性

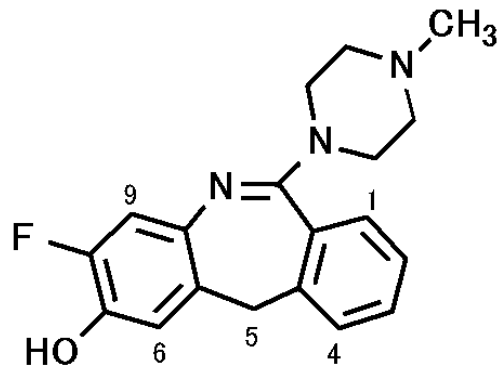
- 薬効の本体は何か
- 代謝物に薬理活性はあるか、毒性はないか
- 代謝酵素の特定→相互作用の予測
- 活性代謝物→毒性発現の予測
- 新たなドラッグデザインのヒント



(A)

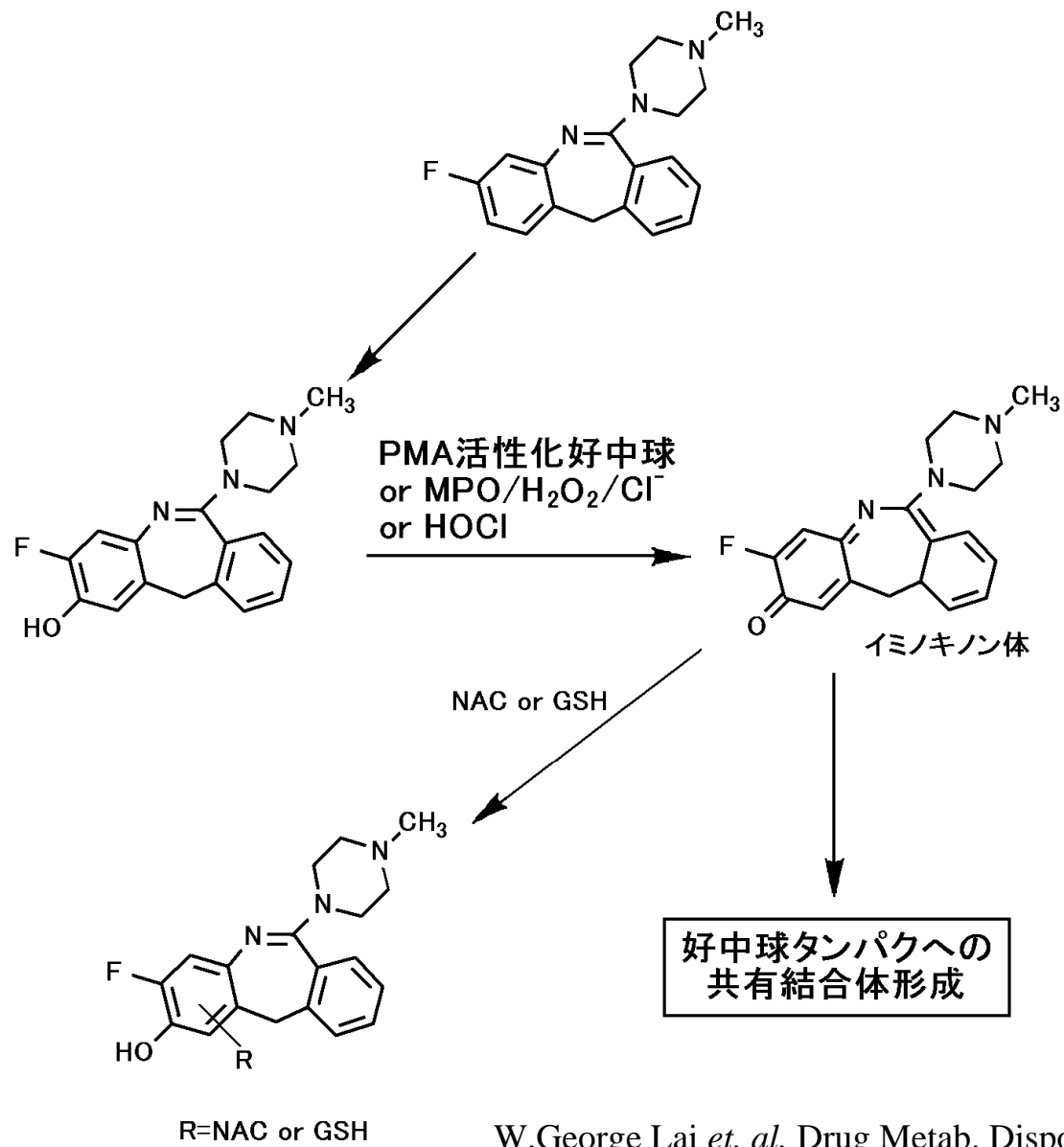


(B)

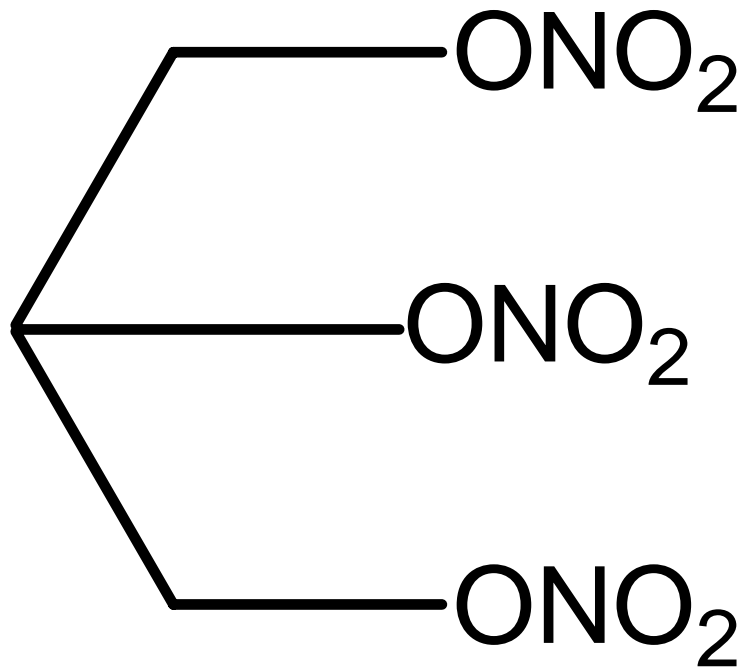


(C)

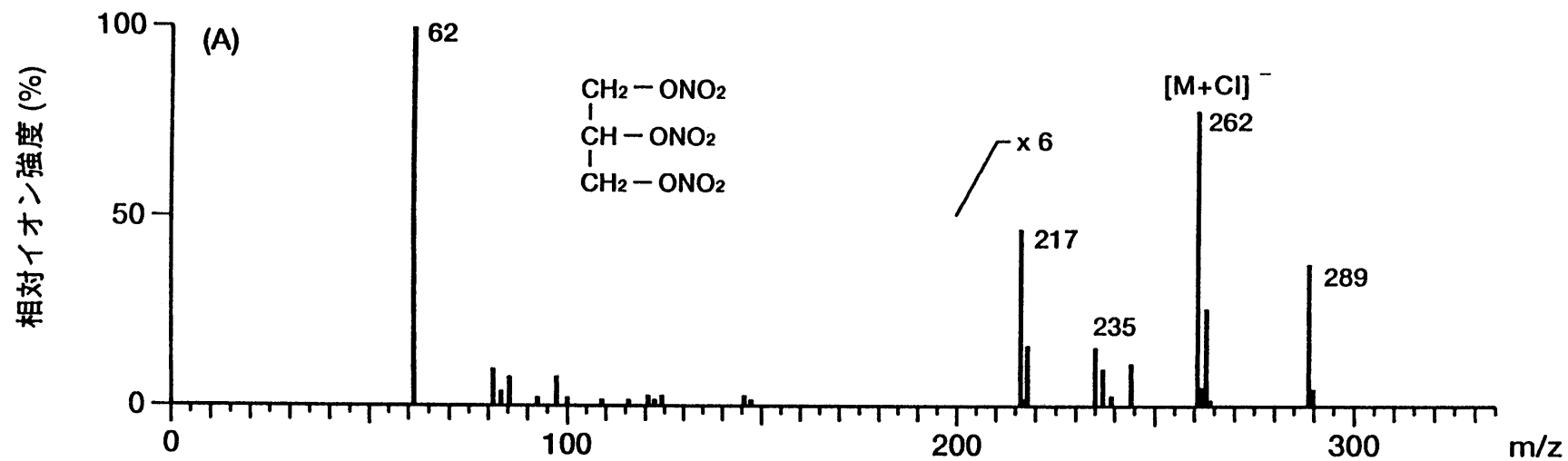
**A: Clozapine, B: Fluperapine, C: 7-hydroxy-Fluperapine**



W.George Lai *et. al.* Drug Metab. Dispos. 28 255-263 (2000)

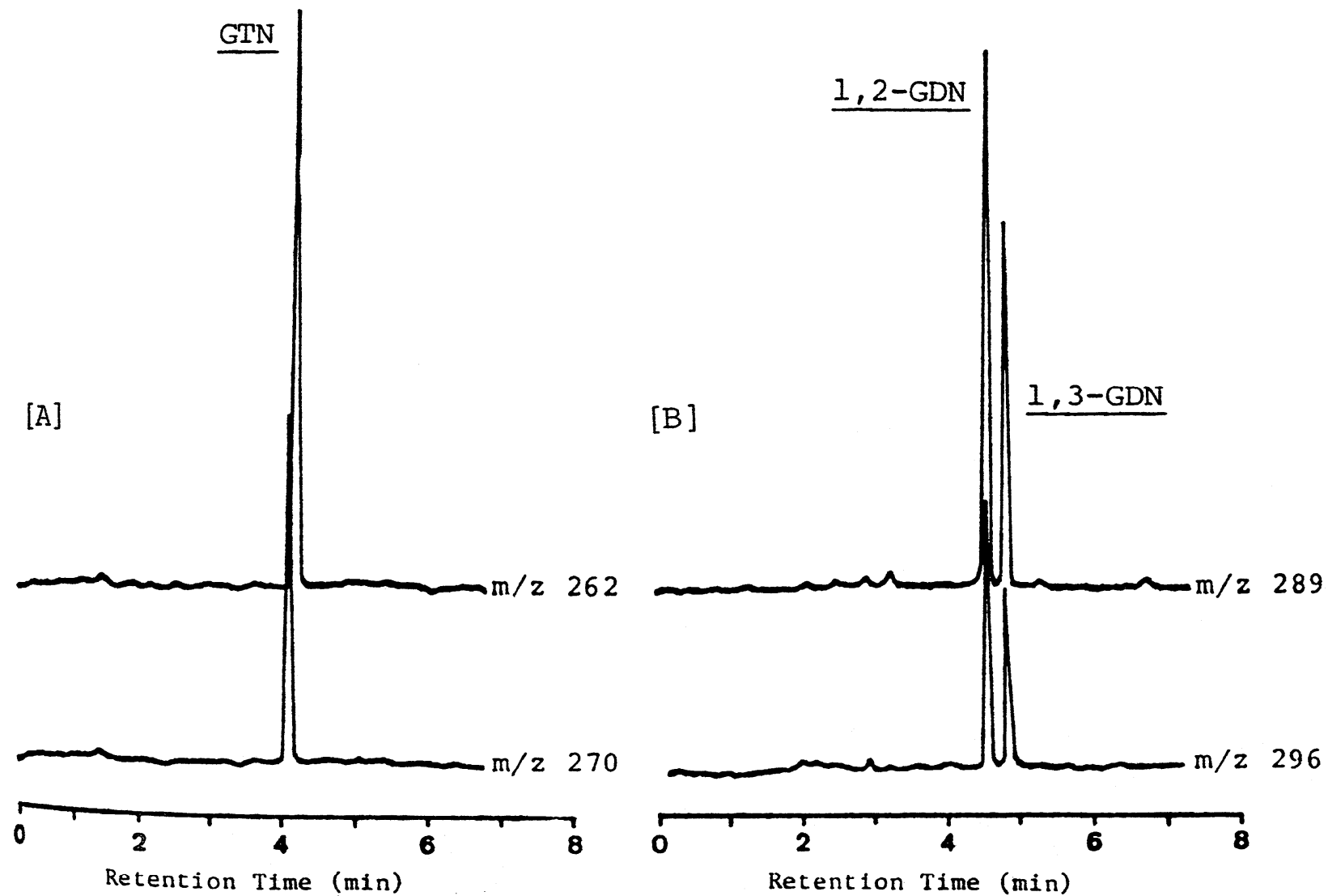


**Nitroglycerin**

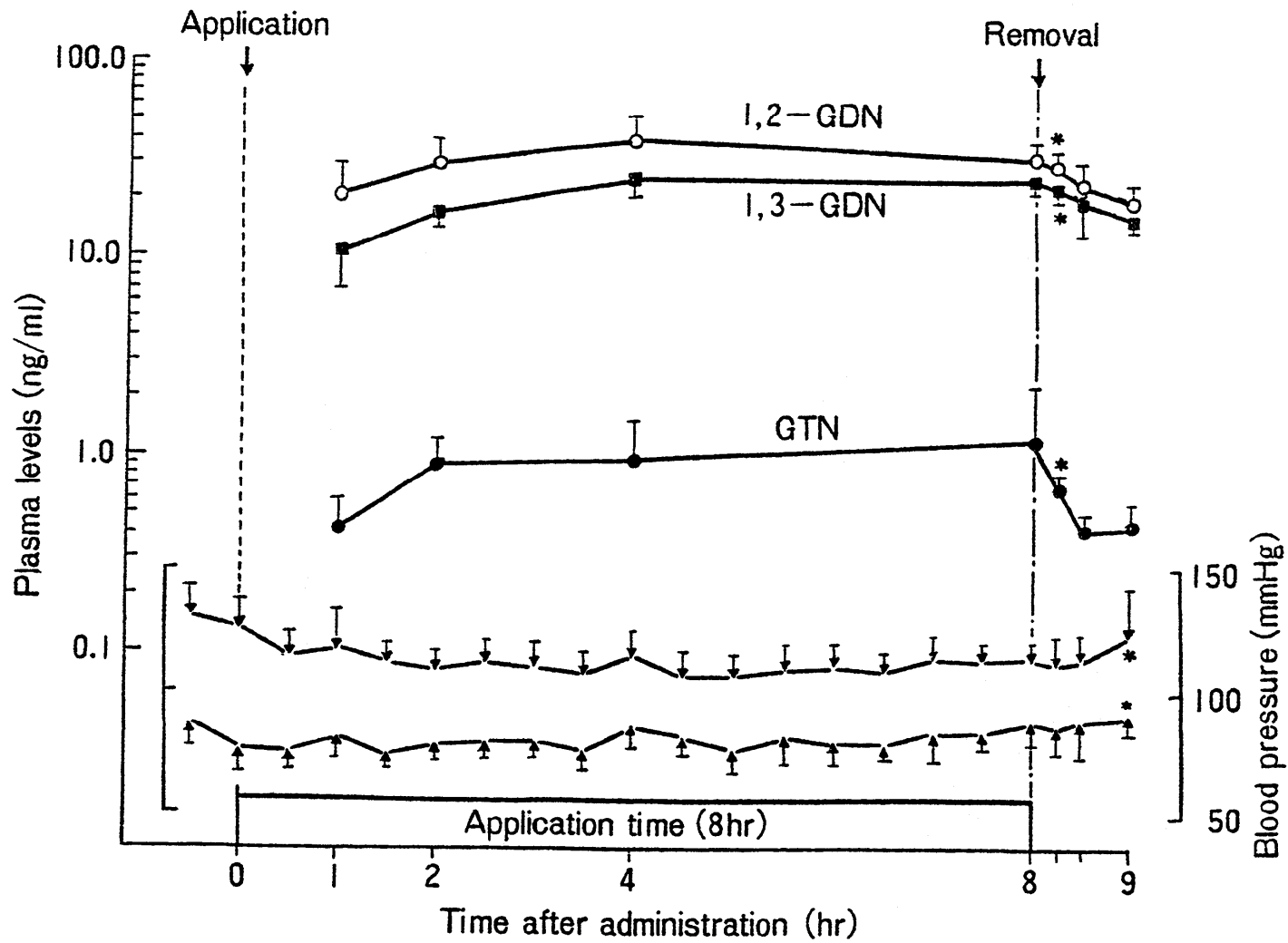


## ニトログリセリンのClマススペクトル

(反応ガス; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>またはCHCl<sub>3</sub>)



Selected ion recordings of (A) GTN and (B) GDNs in extract obtained from beagle dog plasma.



Plasma levels of GTN and GDNs after application of NT-1 tape on breast and abdomen of female dog (n=5, \*:n=4).

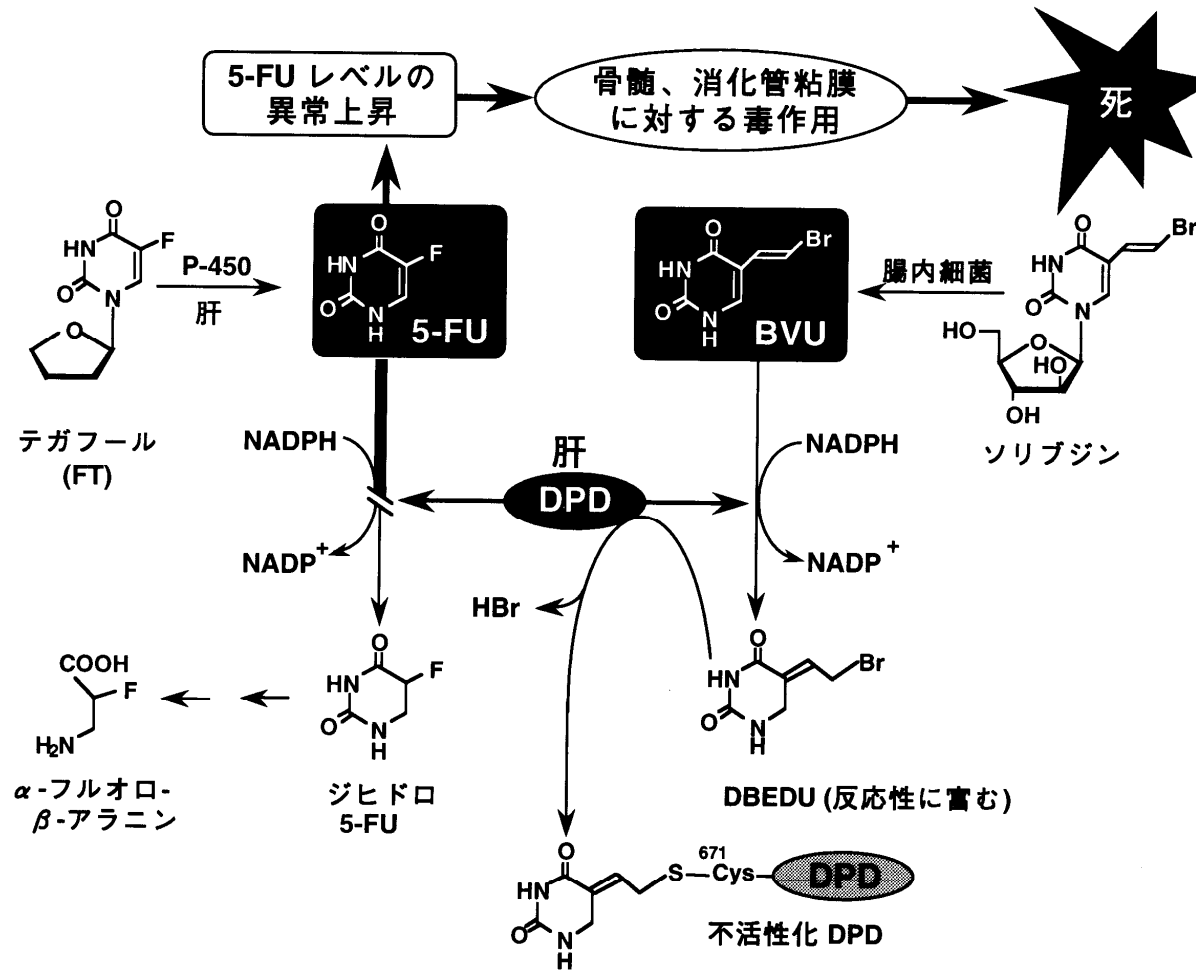
# 毒性研究について

# 毒性発現機構の解明

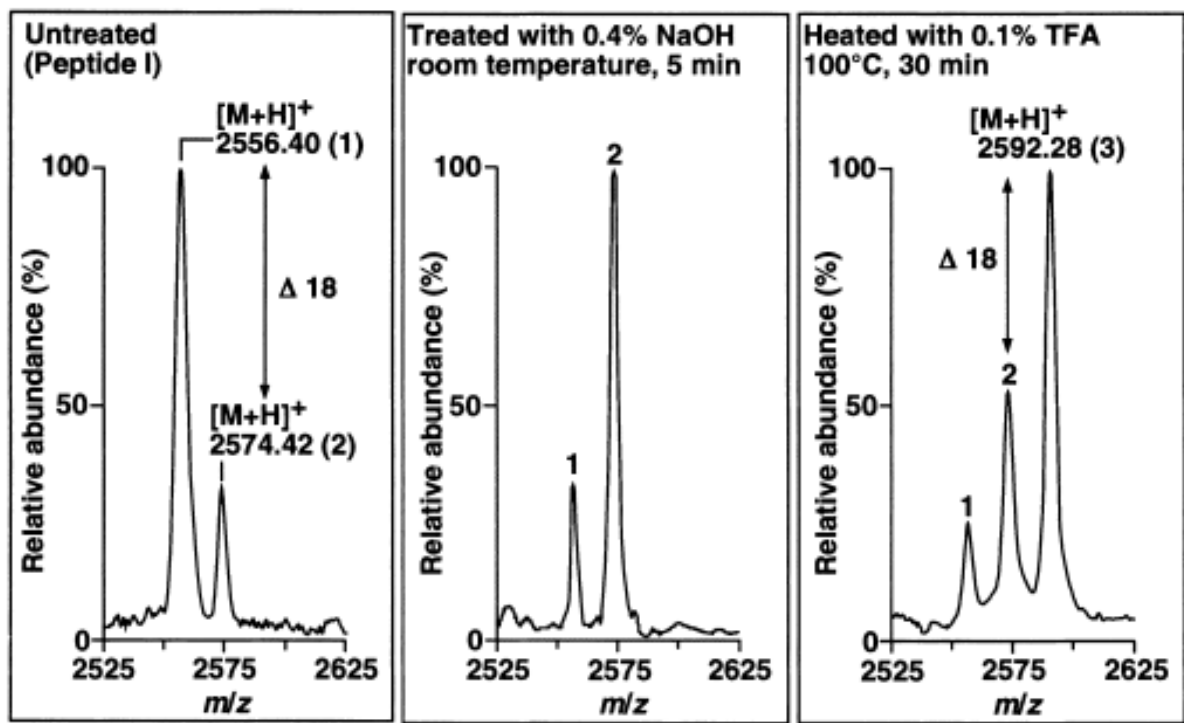
- Drug-Drug Interaction

ソリブジンと 5-FU の例

→ 代謝研究の必然性

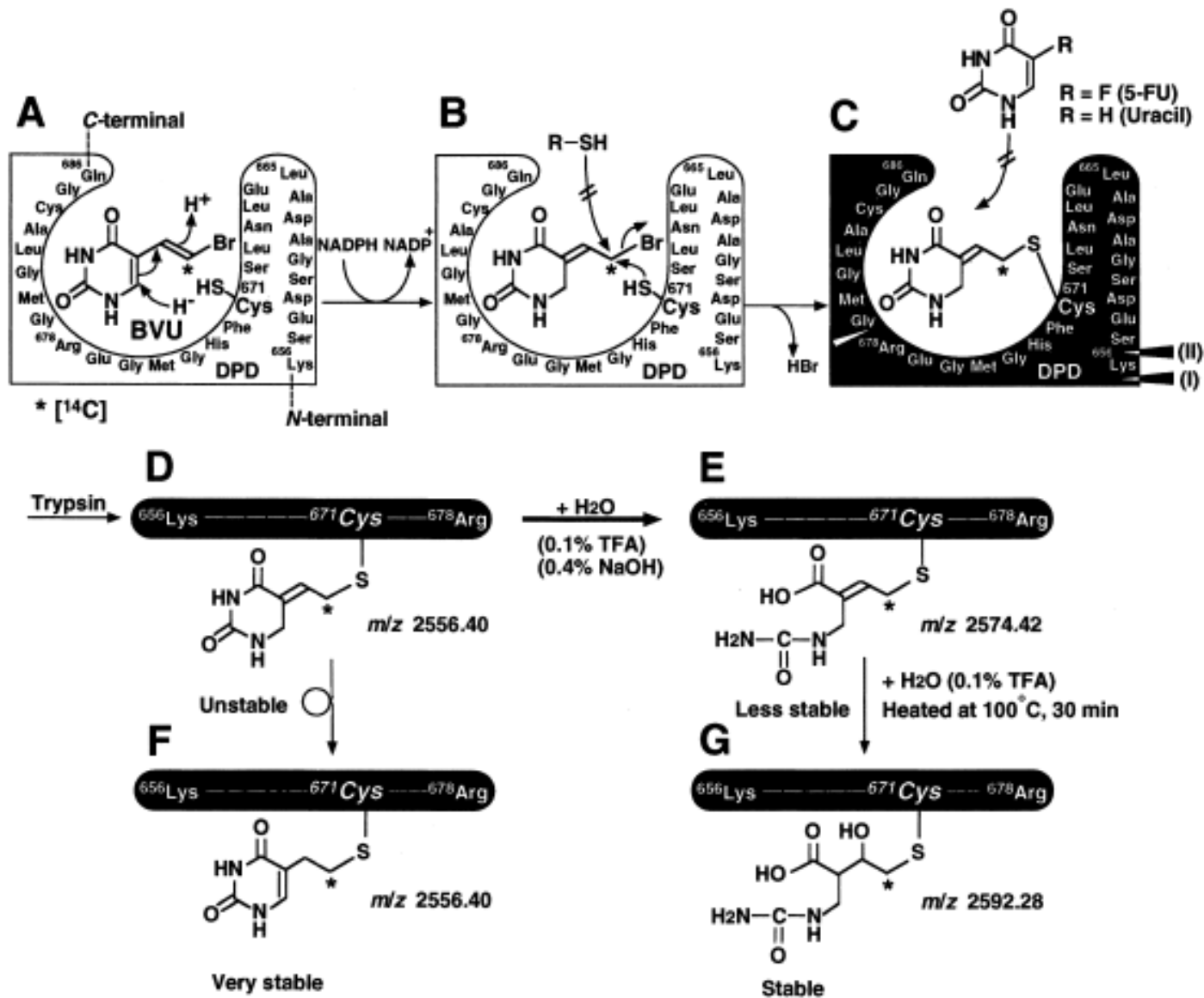


抗帯状疱疹薬ソリブジンと抗癌薬テガフル(FT)の併用服用による致死的相互作用発現(ソリブジン薬害)のメカニズム(1-7).  
 DPD: ジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼ(5-FUの代謝律速酵素). DPDは5-FUのみならずBVU(ブロモビニルウラシル)も基質とし、NADPHによってこれらを還元する。ソリブジンはDPDの基質とはならない。BVUより生成するアリルブロミド型代謝物DBEDU(ジヒドロブロモエチリデンルウラシル)は反応性に富み、DPDを不活性化する(図7参照)。このため、5-FUの組織レベルの異常上昇が起こり、ヒトおよびラットを死に至らしめる(図1参照)。



MALDI-TOF MS of radioactive peptide I from hDPD inactivated by [ $^{14}\text{C}$ ]BVU in the presence of NADPH. The peptide (A) was treated with NaOH (B) and TFA (C) under the conditions as shown in the figure.

(T.Watabe and K.Ogura; J.Mass Spectrom. Soc. Jpn. 50 155 (2002))



(T.Watabe and K.Ogura; J.Mass Spectrom. Soc. Jpn. 50 155 (2002))

# 蓄積機構の解明

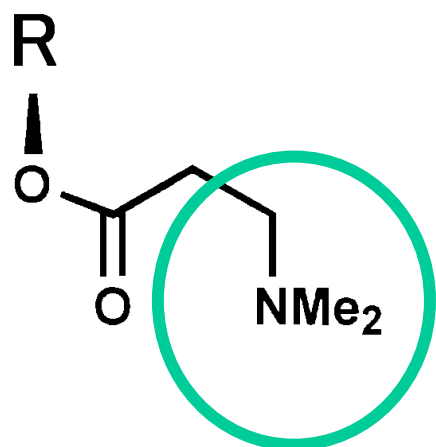
- 毒性回避のための薬物動態研究

化合物Aの例

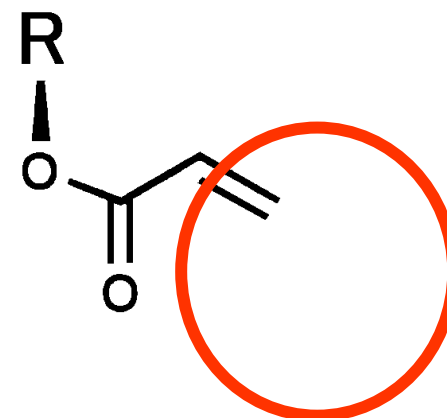
→連投後、わずかであるが赤血球中のヘモグロビンに蓄積される。

→蓄積の本体は化合物Aではない。

→ヘモグロビンとは共有結合を形成しているらしい。



化合物 A

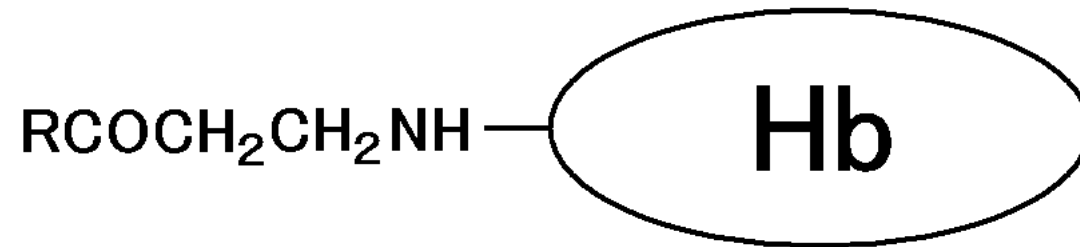
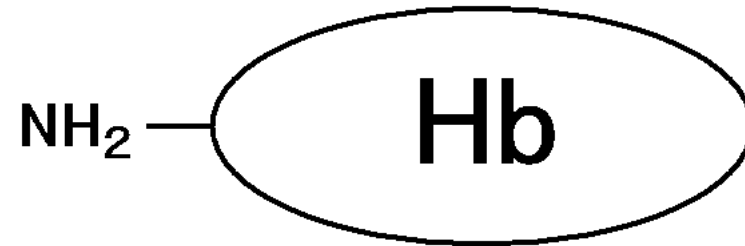


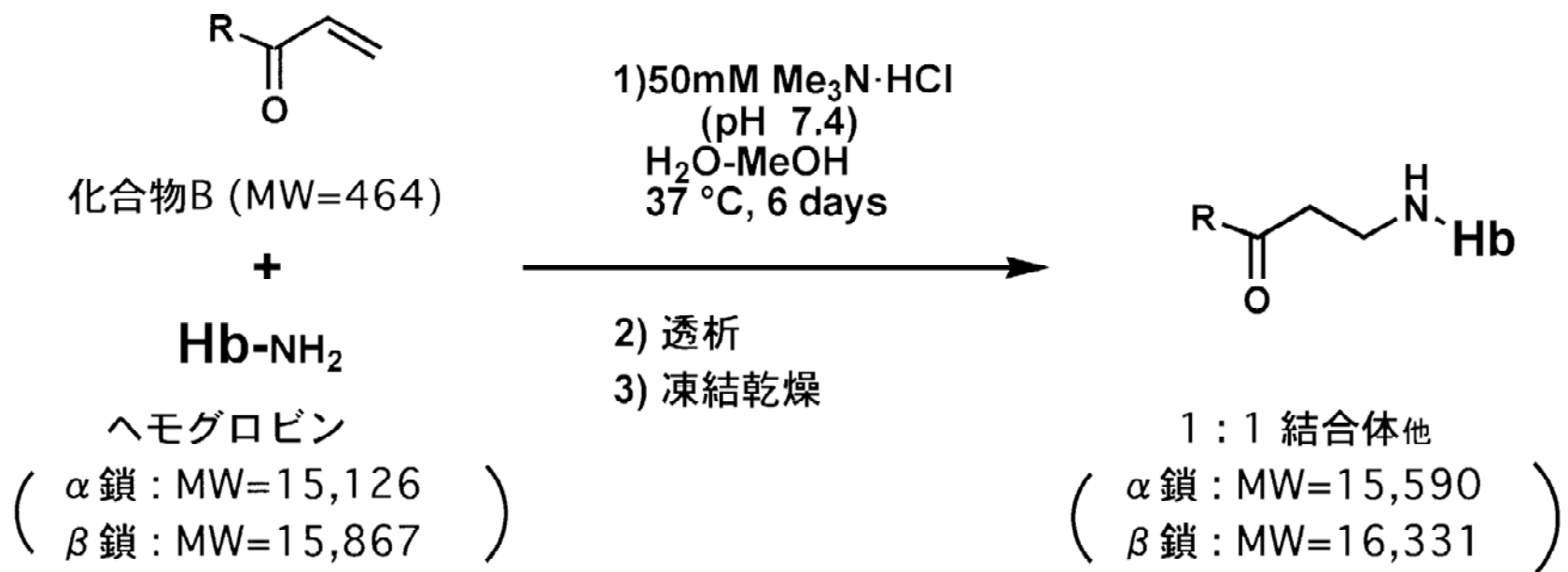
分解物 B

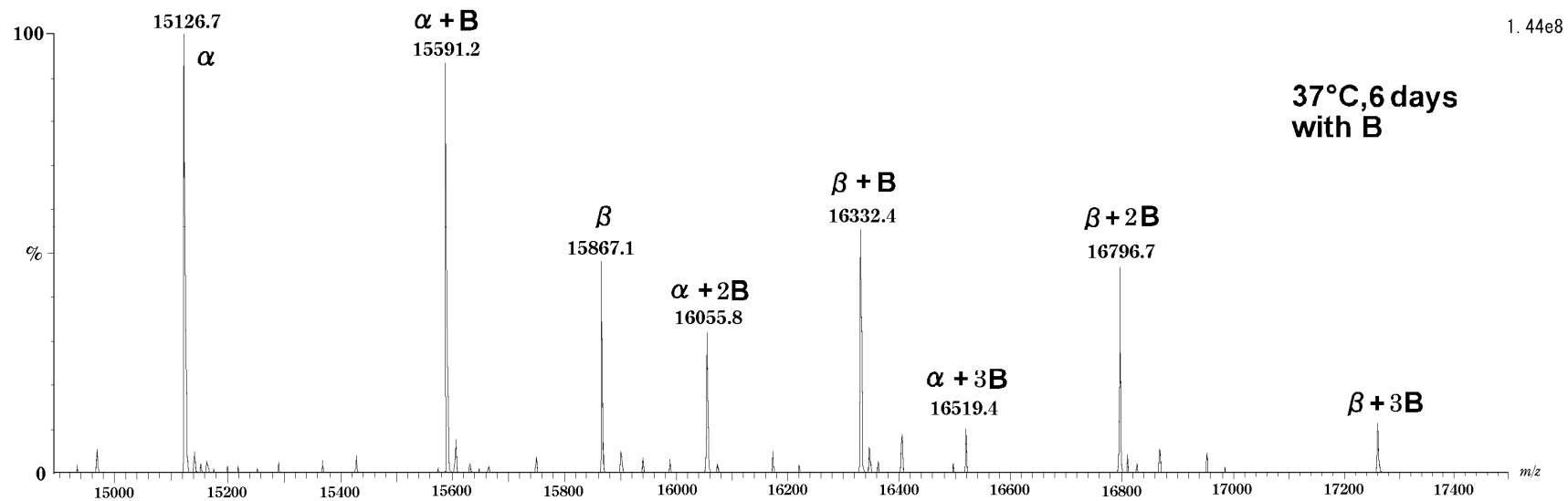
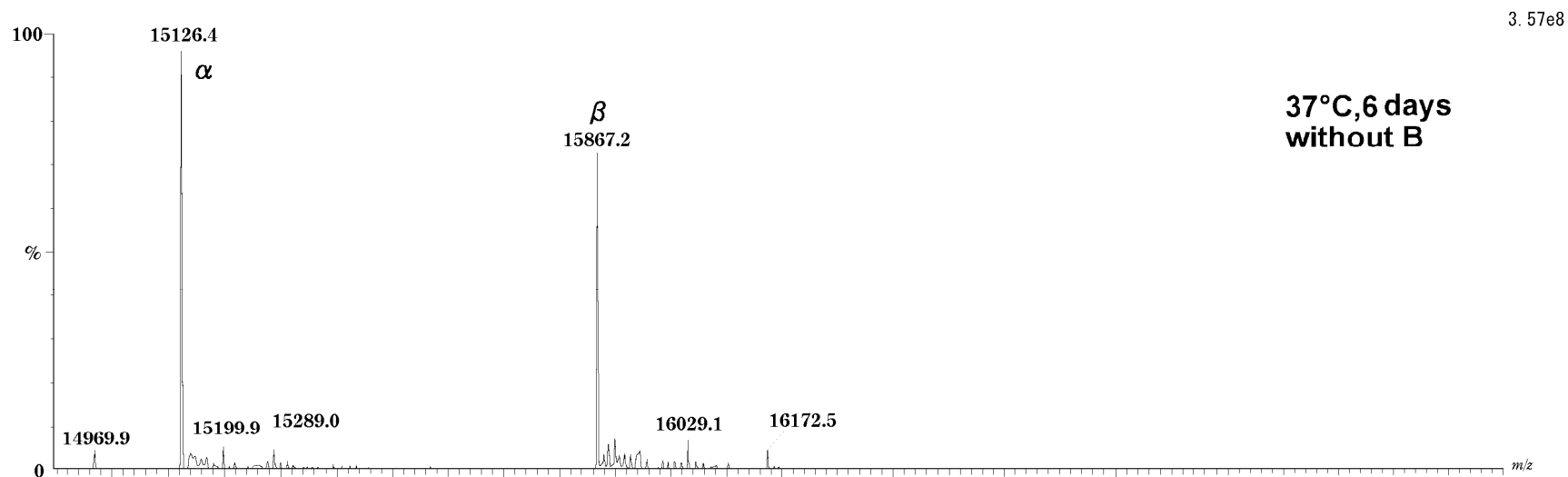
## 化合物Aの分解

化合物B (RCOCH=CH<sub>2</sub>) MW=464

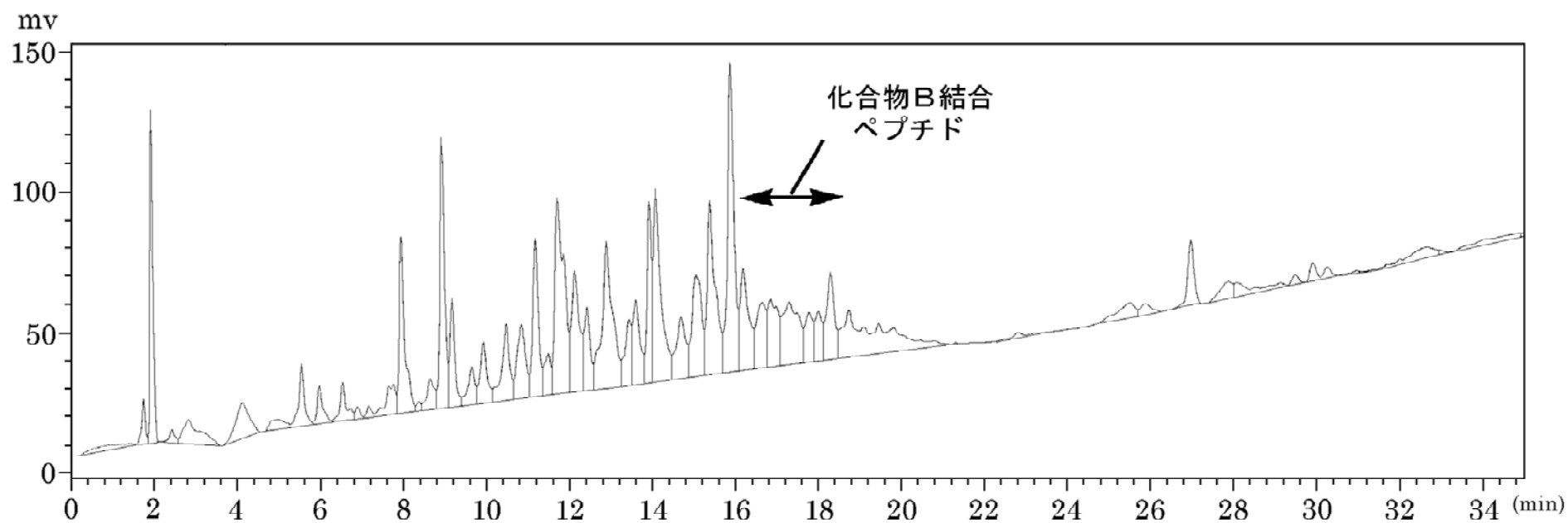
+



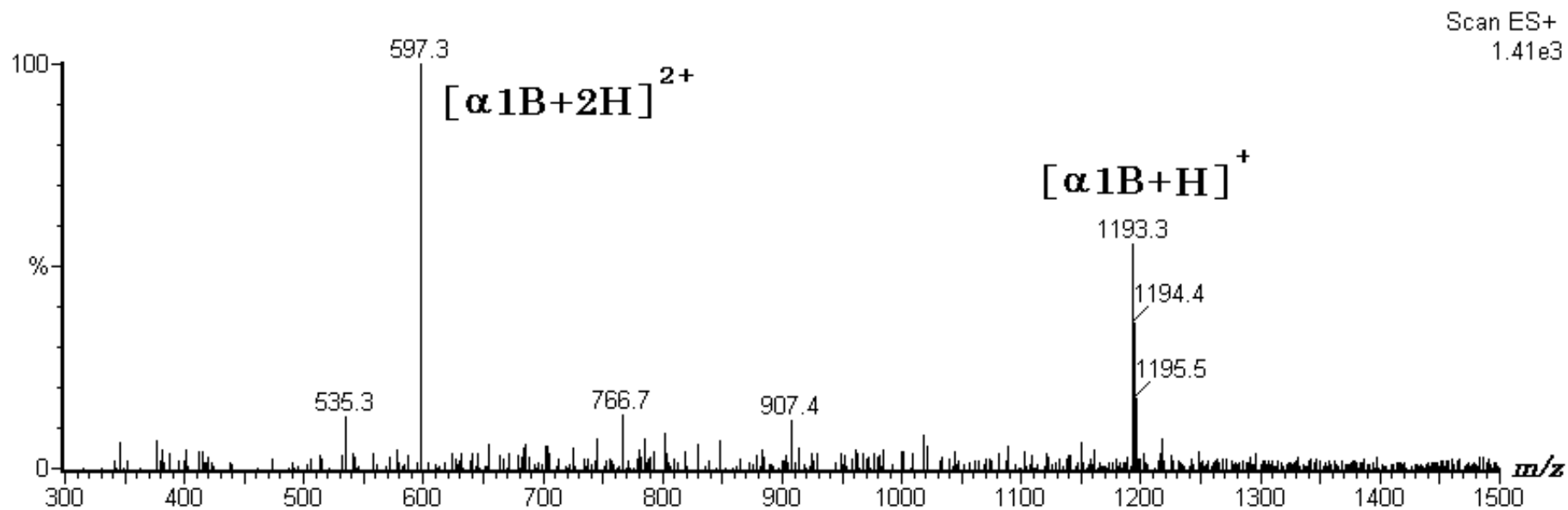




## MALDI Mass Spectra of Hb-compound B Complex



HPLC Chromatogram of Tryptic Peptides of Hb-compound B



ESI Mass Spectrum of a HPLC fraction at 17.6-18.1 min.

1	7	1	7
$\alpha 1-B$ :	<u>B-Val</u> -Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys	or	Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp- <u>Lys-B</u>

$\alpha 2-B$  : Thr-Asn-Val-Lys-Ala-Ala-Trp-Gly-<sup>G</sup>Lys-B 16  
 or Thr-Asn-Val-Lys(-B)-Ala-Ala-Trp-Gly-Lys

$\alpha 3-B$  : Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Lys-B 56

$\alpha 4-B$  : Ala-Val-Ala-His(-B)-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu 80

$\alpha 5-B$  : Lue-Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-Ala-Ala-His-Leu-122  
 Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-B

$\alpha 6-B$  : Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-B 127

1	8	1	8
$\beta 1-B$ :	<u>B-Val</u> -His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys	or	Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu- <u>Lys-B</u>

$\beta 2-B$  : Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-B 104

$\beta 3-B$  : Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-Ala-His-Lys-B 144

$\beta 4-B$  : Tyr-His-B 145 146

(1) ESI/MS

m/z 1193.5 ( $[M+H]^+$ )

m/z 597.5 ( $[M+2H]^{2+}$ )

のシグナルより

MW=1192.5

(2) アミノ酸シーケンサー

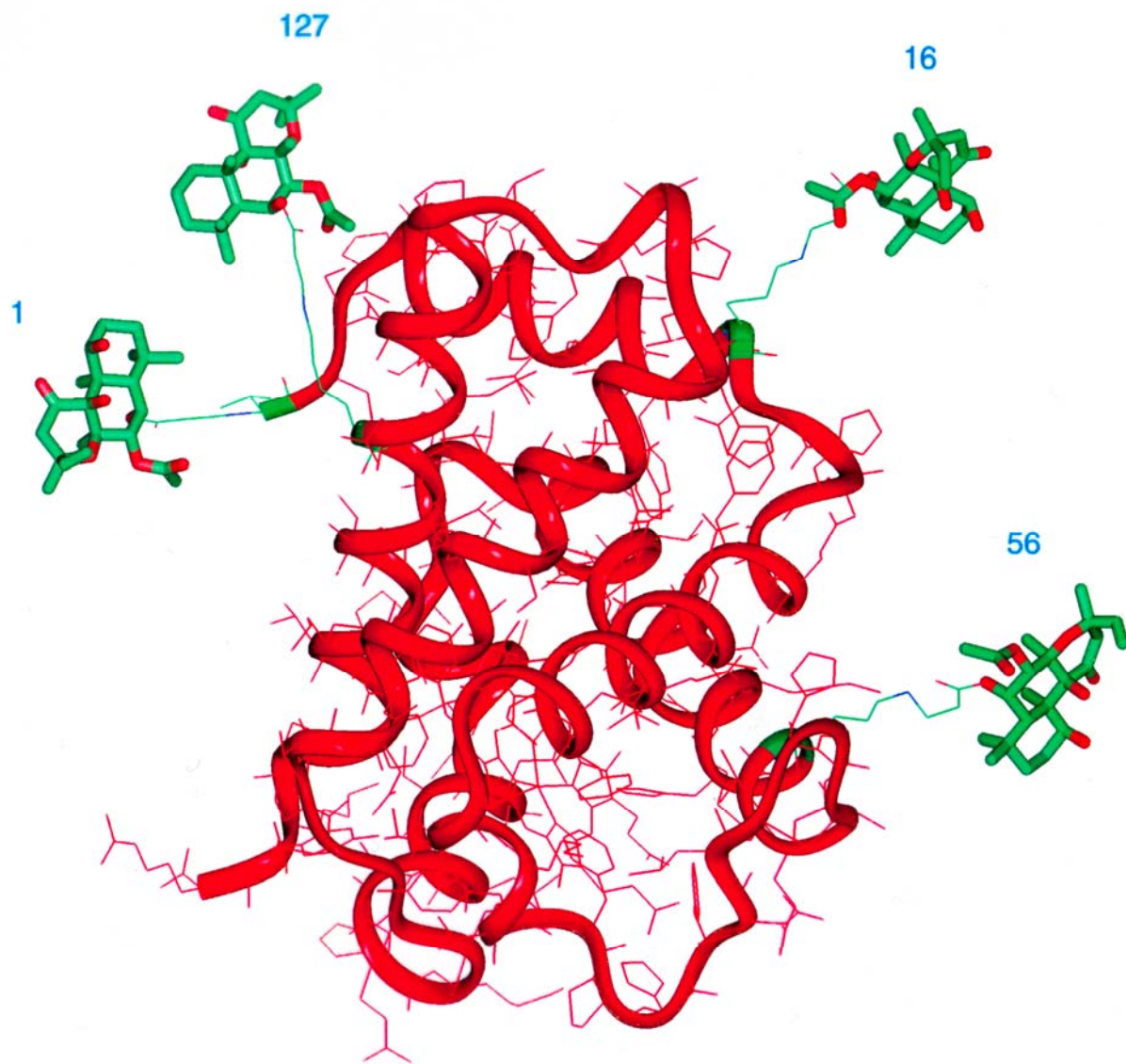
?-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys

1 残基目は不明

C末端LysはFree

以上より、化合物B結合ペプチド $\alpha$ 1-Bは化合物Bが $\alpha$ 鎖のN末に付加した構造、すなわち以下の構造であることが確認された

$\alpha$ 1-B : B-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys



MSで定量する

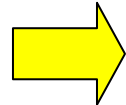
# 本日の予定

- 前処理について
- 内部標準物質の調製法
- 標準品(分析目的物)の調製法
- 定量法を作る

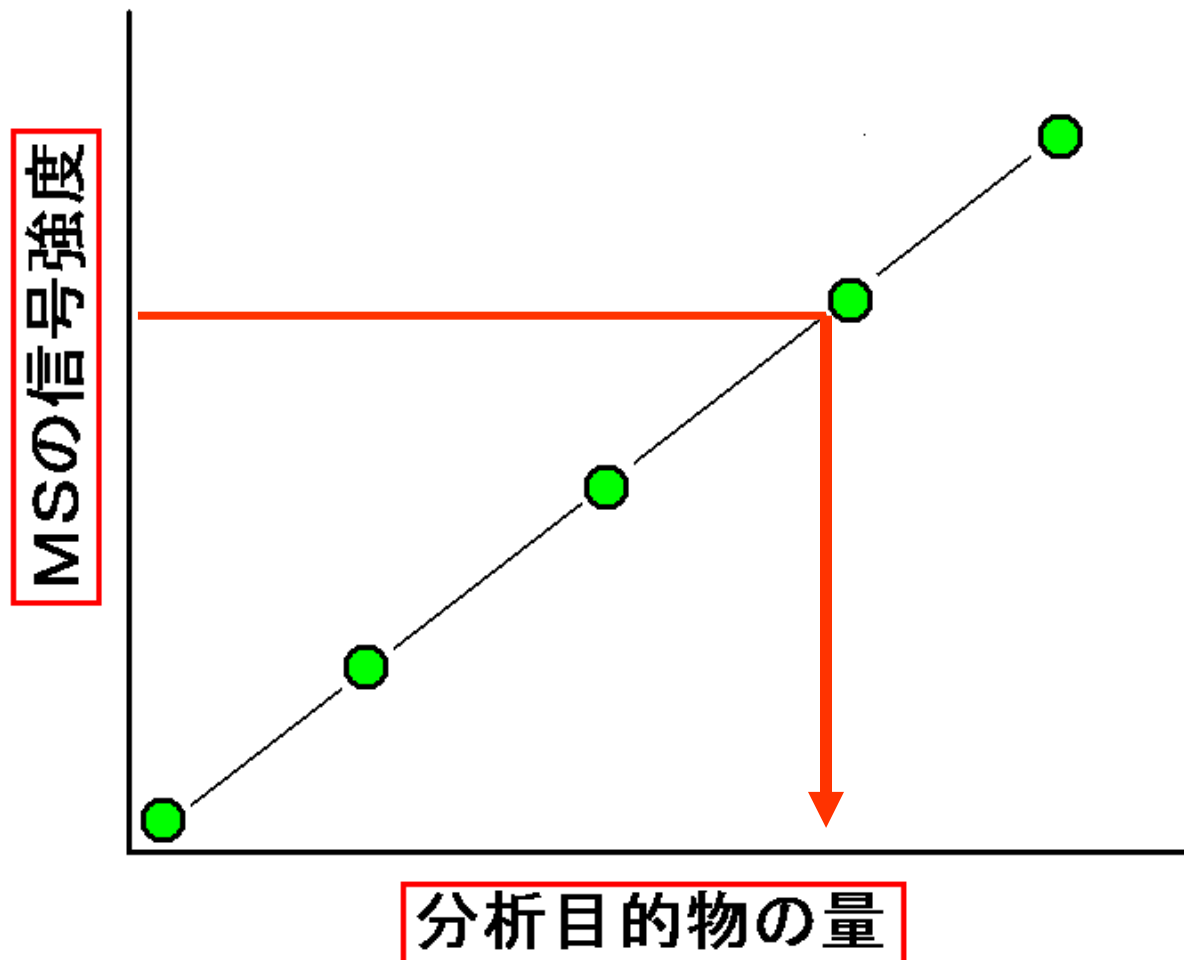
# MSで定量するってどうするの？

分析目的物の量  $\propto$  MSの信号強度

 定量は可能

MSで定量する  この関係を確認し、信号強度を測ること。

# MSで定量するということ



# 検量線の種類

- 絶対検量線
- 相対検量線（内部標準添加法、標準試料添加法）
- 直線、曲線、Sigmoid Curve  
MS較正も一種の検量線

# 定量に適したMS装置の要件

- 定量範囲 (dynamic range) が広いこと
- 高感度であること

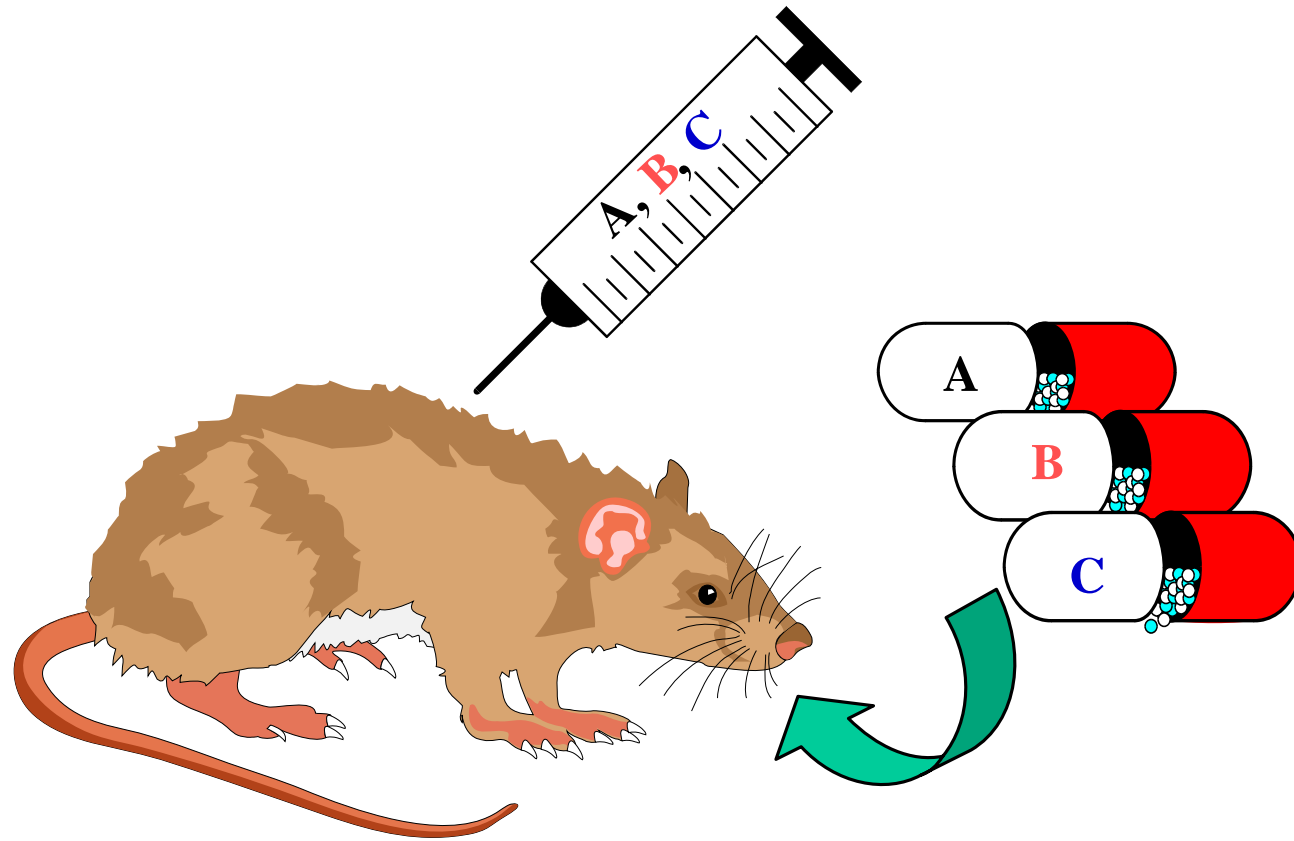
四重極型

磁場型

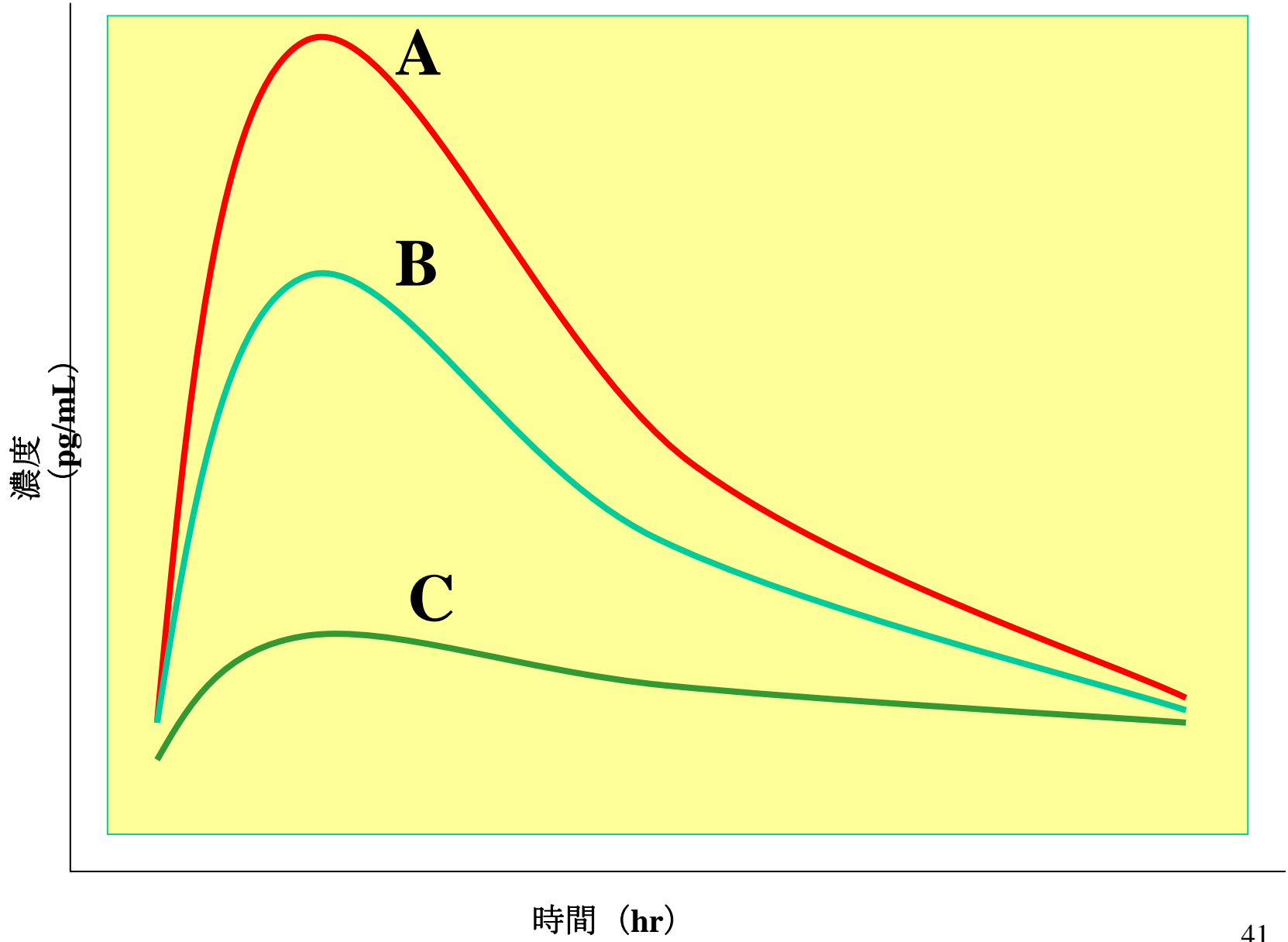
(TOF型)

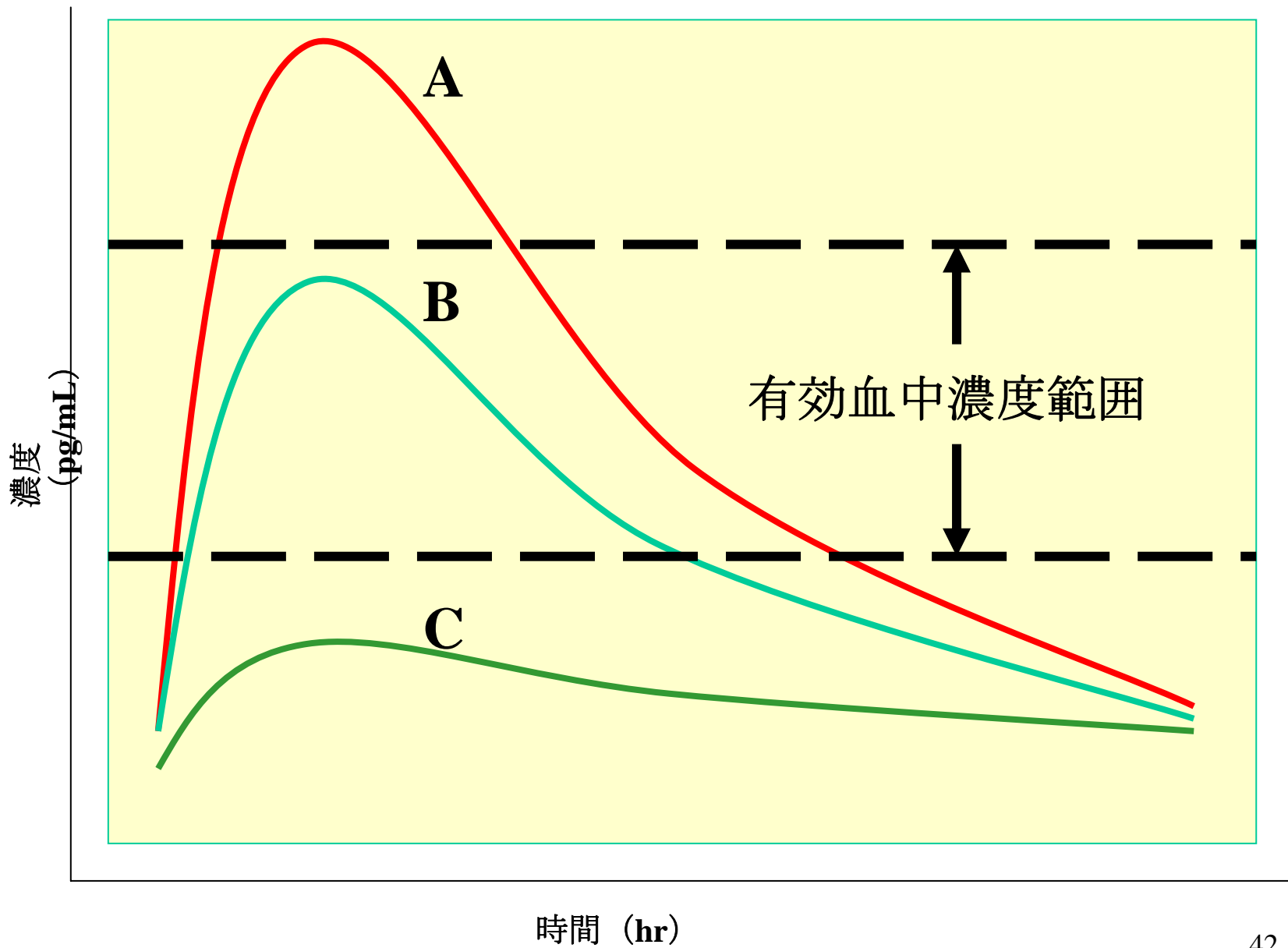
# 定量分析法には2種類ある(?)

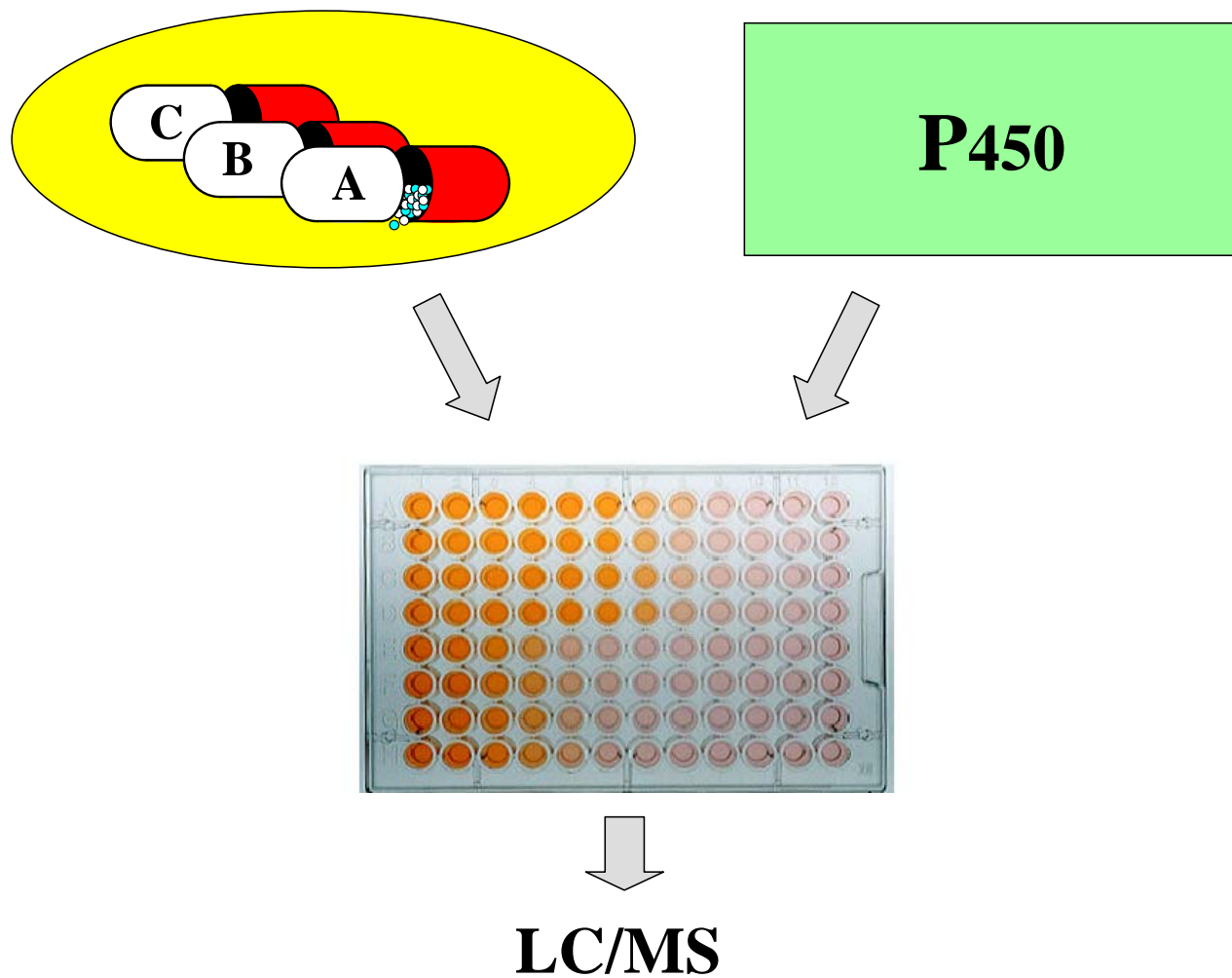
1. ハイスループットを重視  
測定結果は相対値でよい  
スクリーニングなどで多用される
2. スループットはそれほど重視しない  
厳密な測定値(絶対値)を要求する



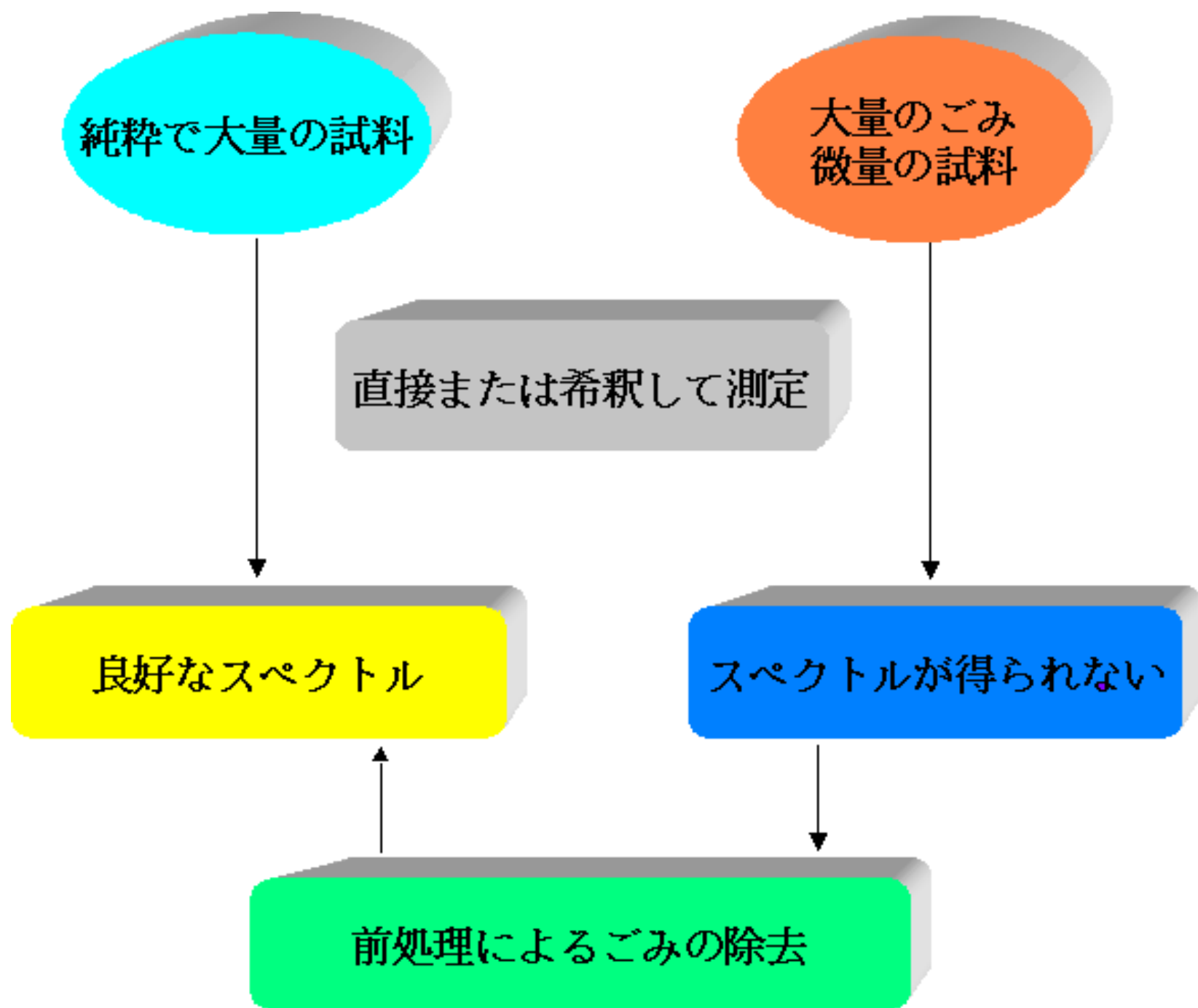
## Cassette Dosing



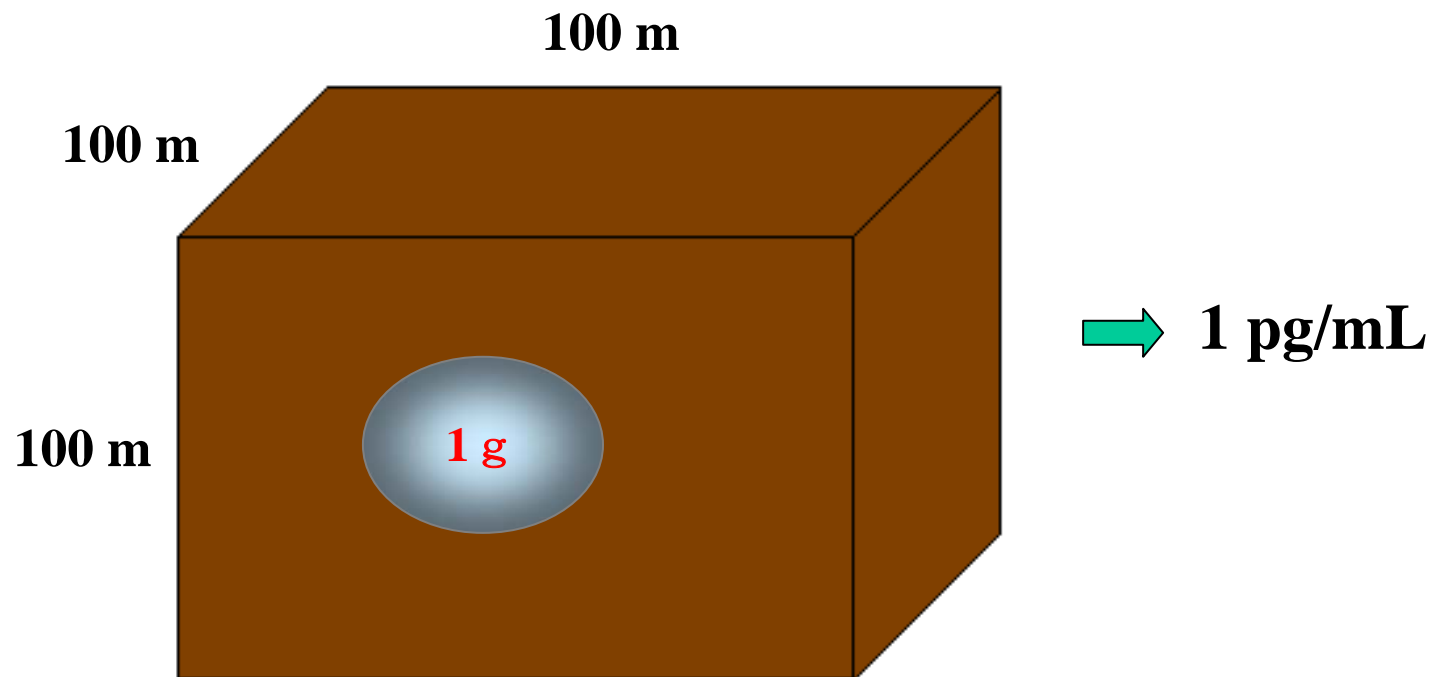
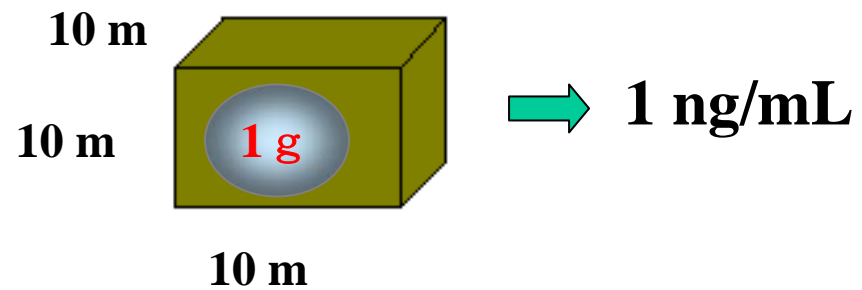




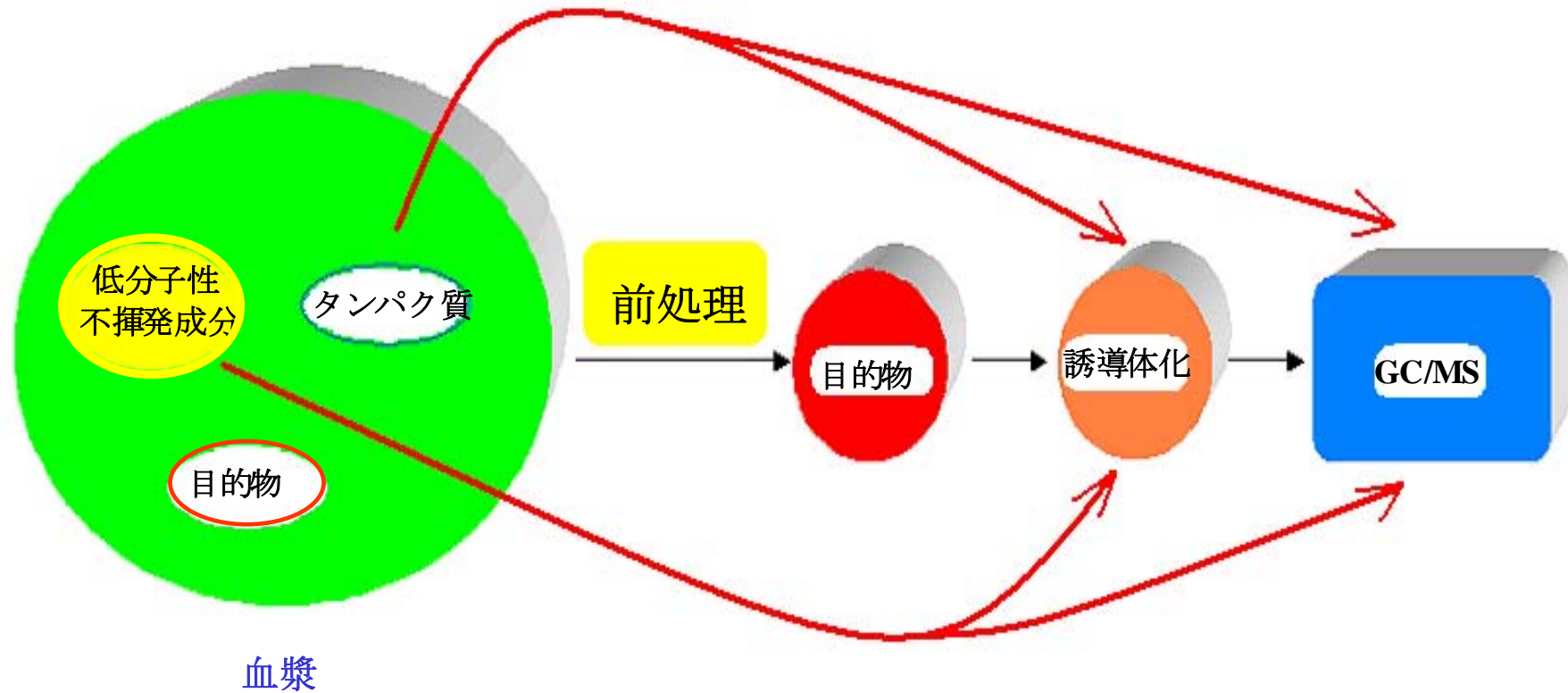
## Cassette Analysis

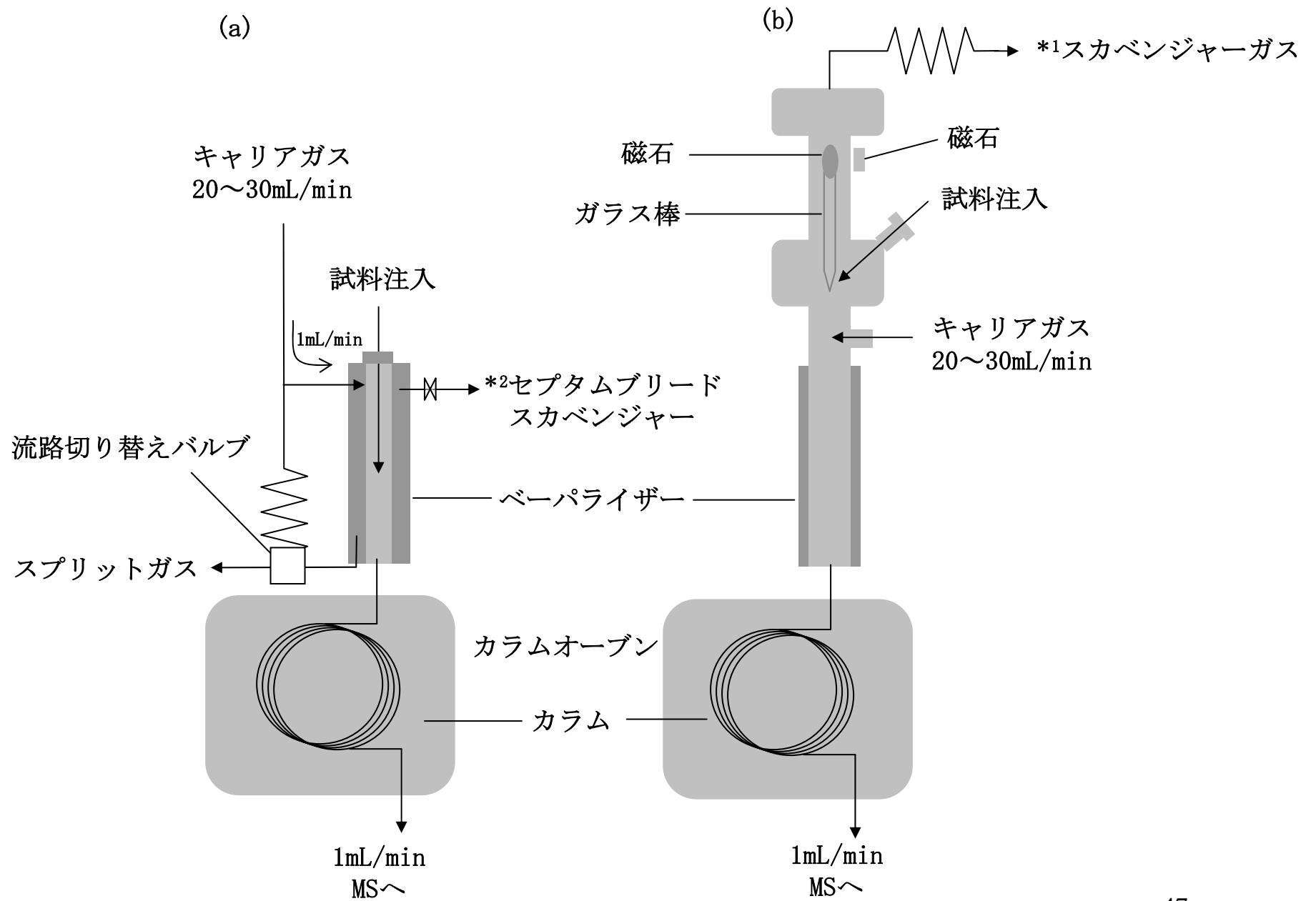


## 微量の概念図

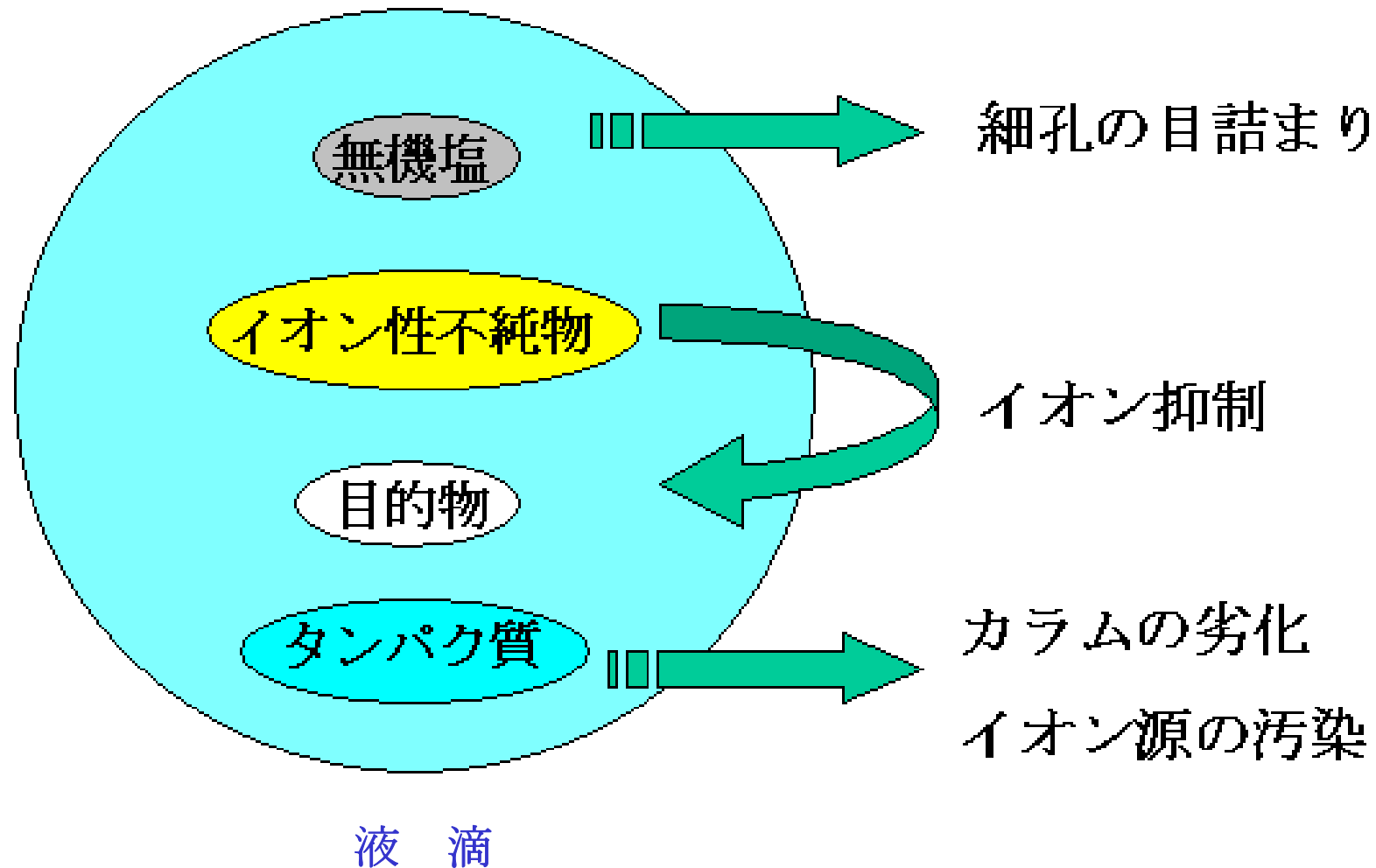


# GC/MSで前処理が必要なわけ





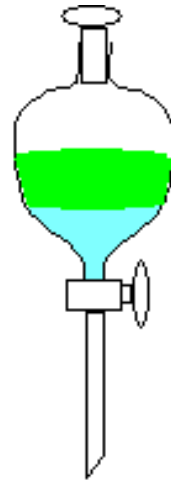
# LC/MSで前処理が必要なわけ



# 前処理法のいろいろ



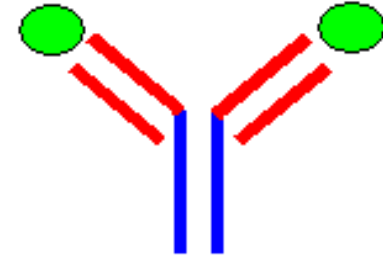
有機溶媒抽出法



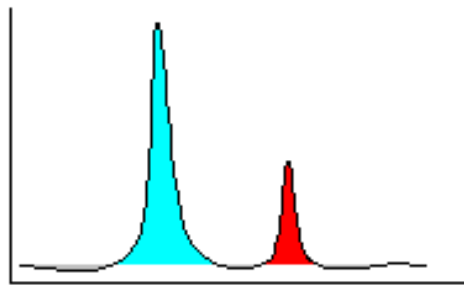
液-液抽出法



固相抽出法



抗体法



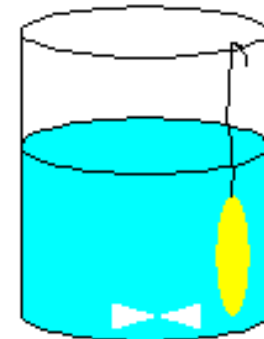
HPLC



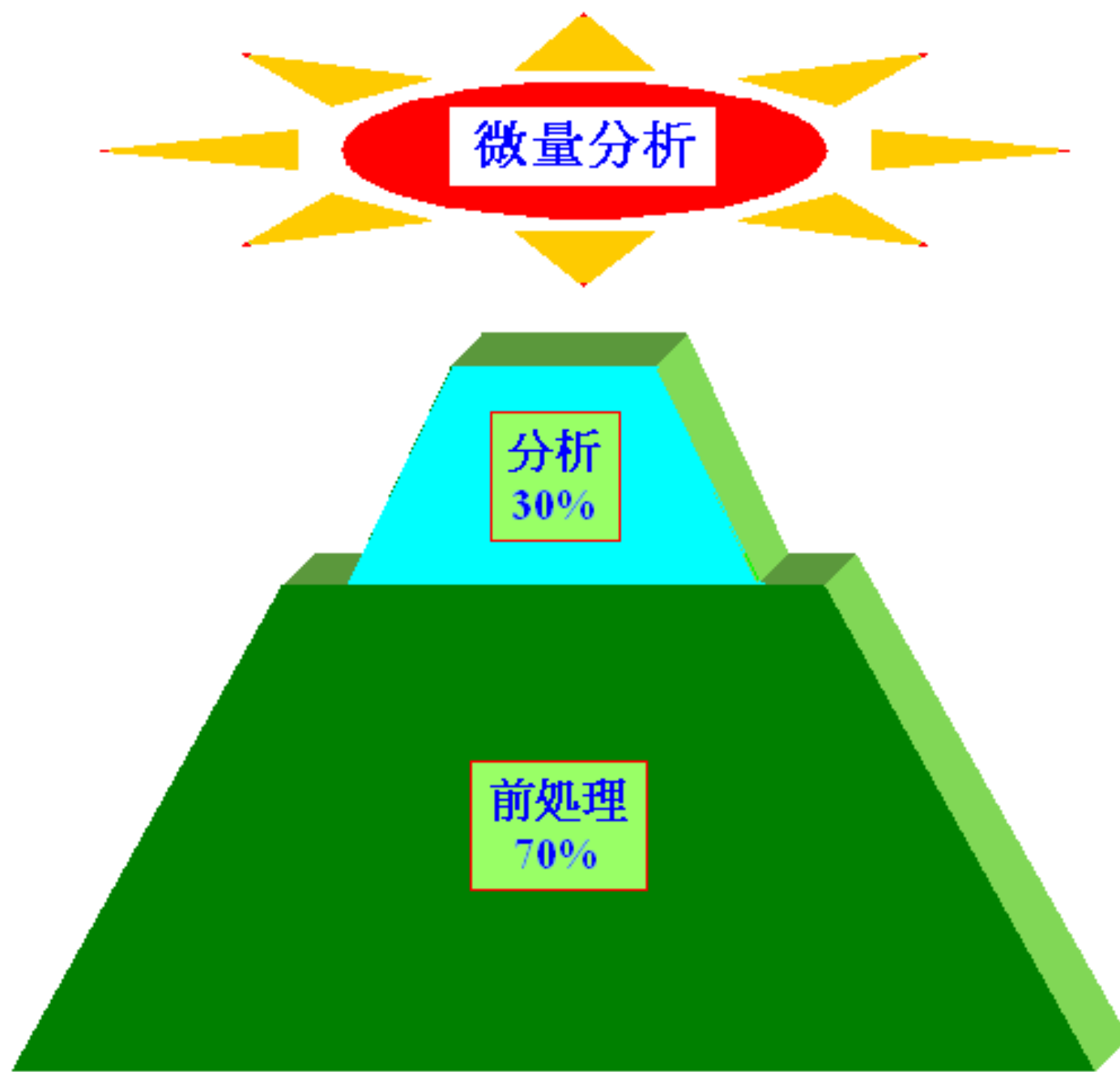
クロマトグラフィー



電気泳動法



透析



# MCとSIMの選択基準

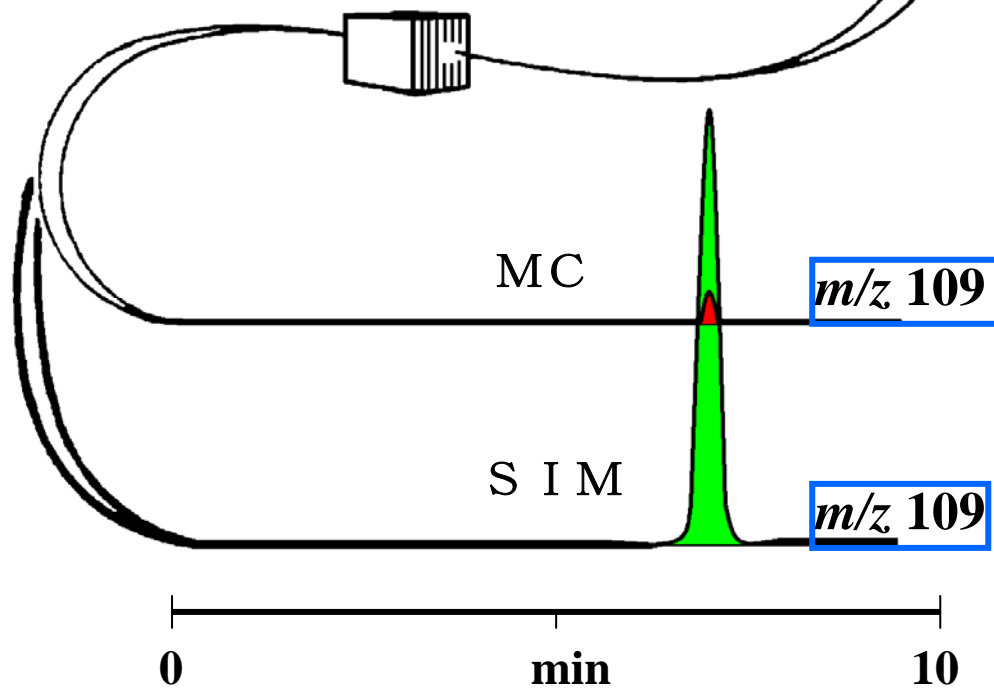
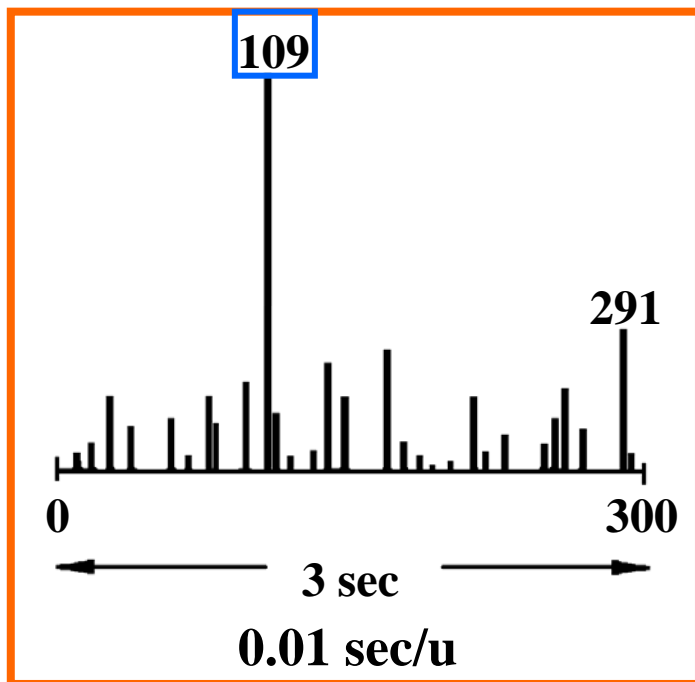
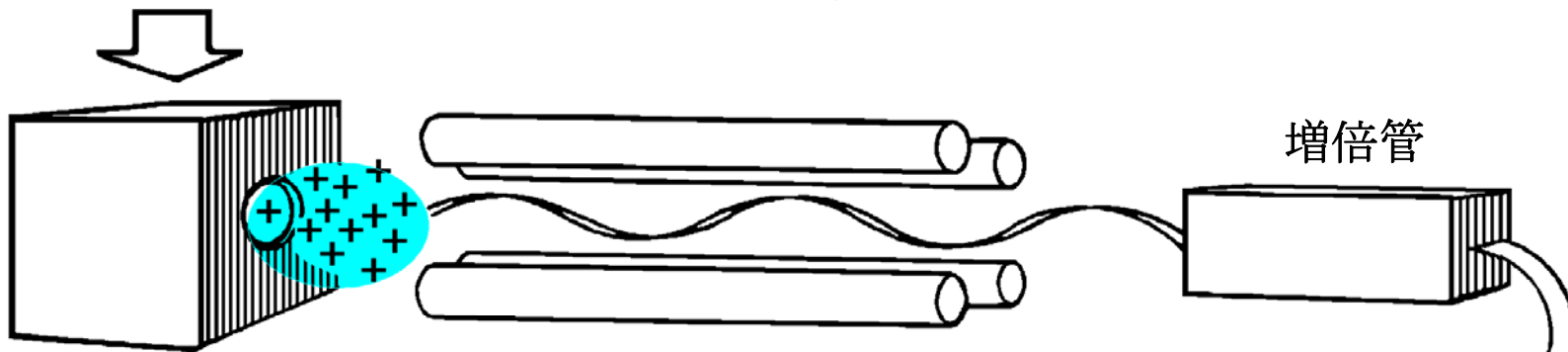
- MC: スペクトル採取レベル  
→ 100ng以上
- SIM, SRM: 微量分析  
→ 100ng 以下

MC: mass chromatography, SIM: selected ion monitoring,  
SRM: selected reaction monitoring

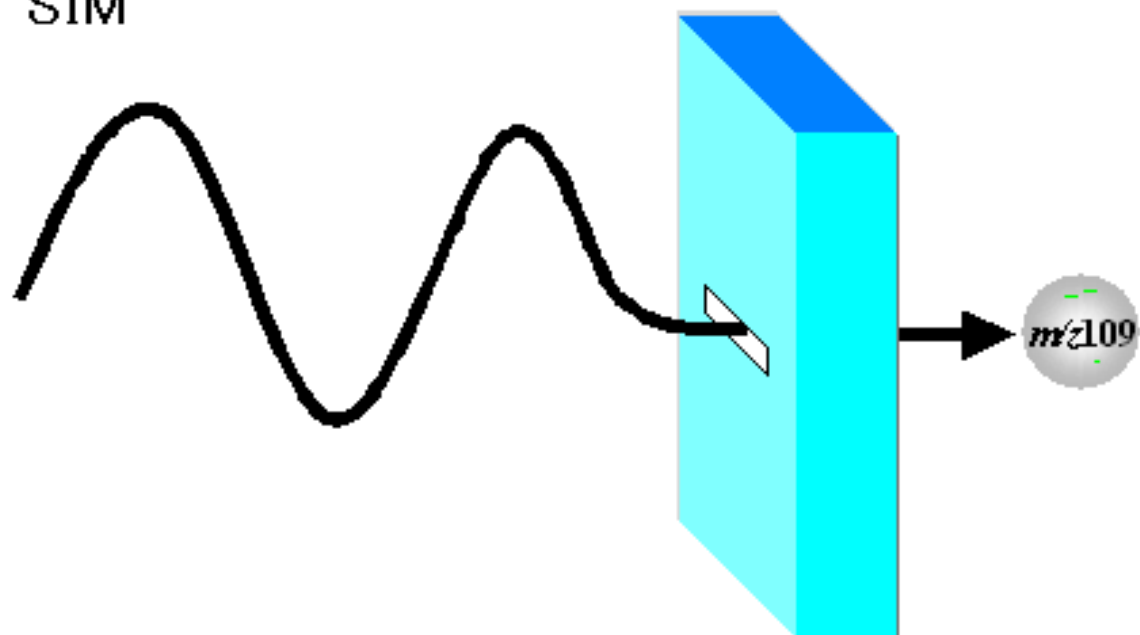
# MCとSIMの違い

クロマトからの

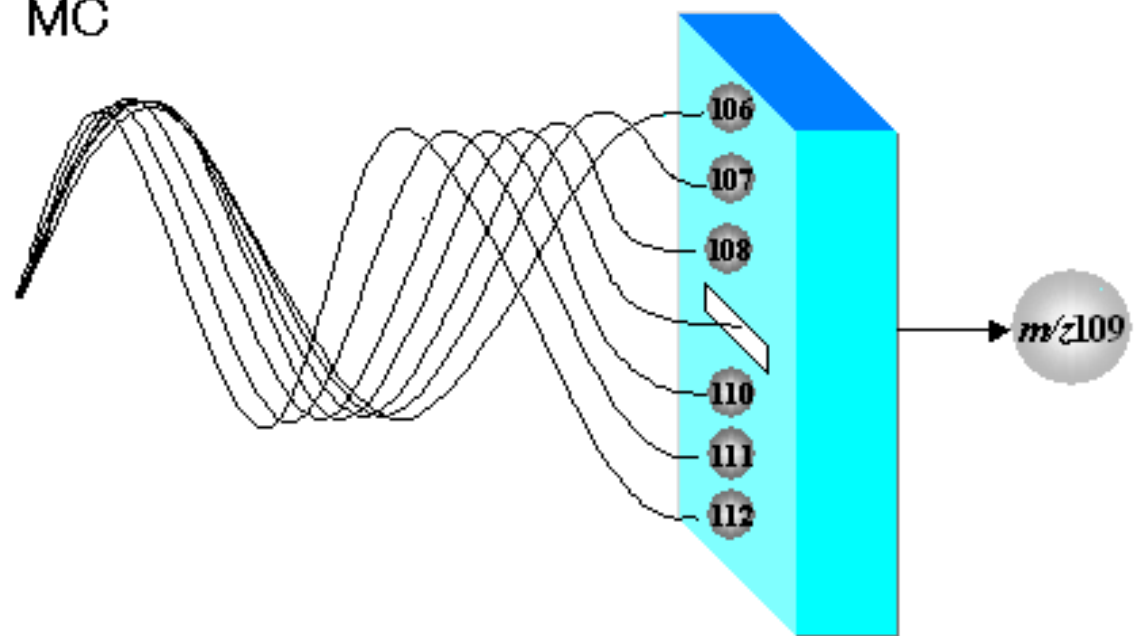
溶出物



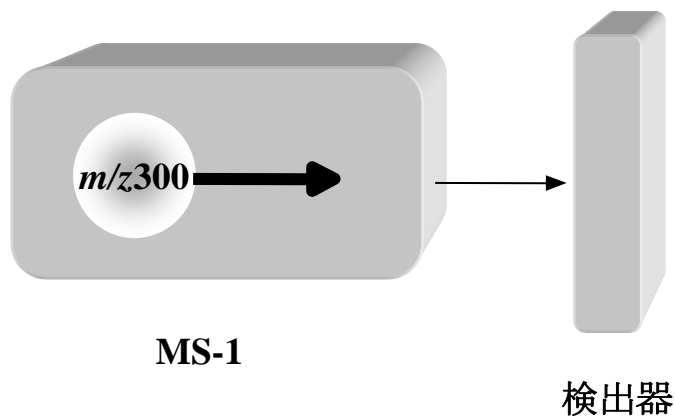
(a) SIM



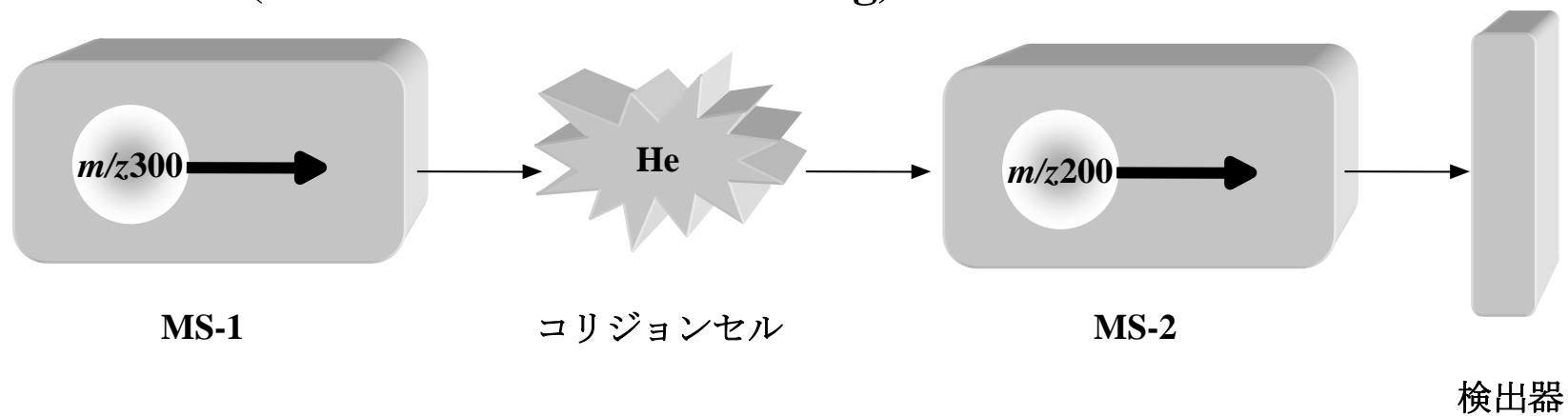
(b) MC



(a) **SIM (selected ion monitoring)**



(b) **SRM (selected reaction monitoring)**



# 定量法作成の手順

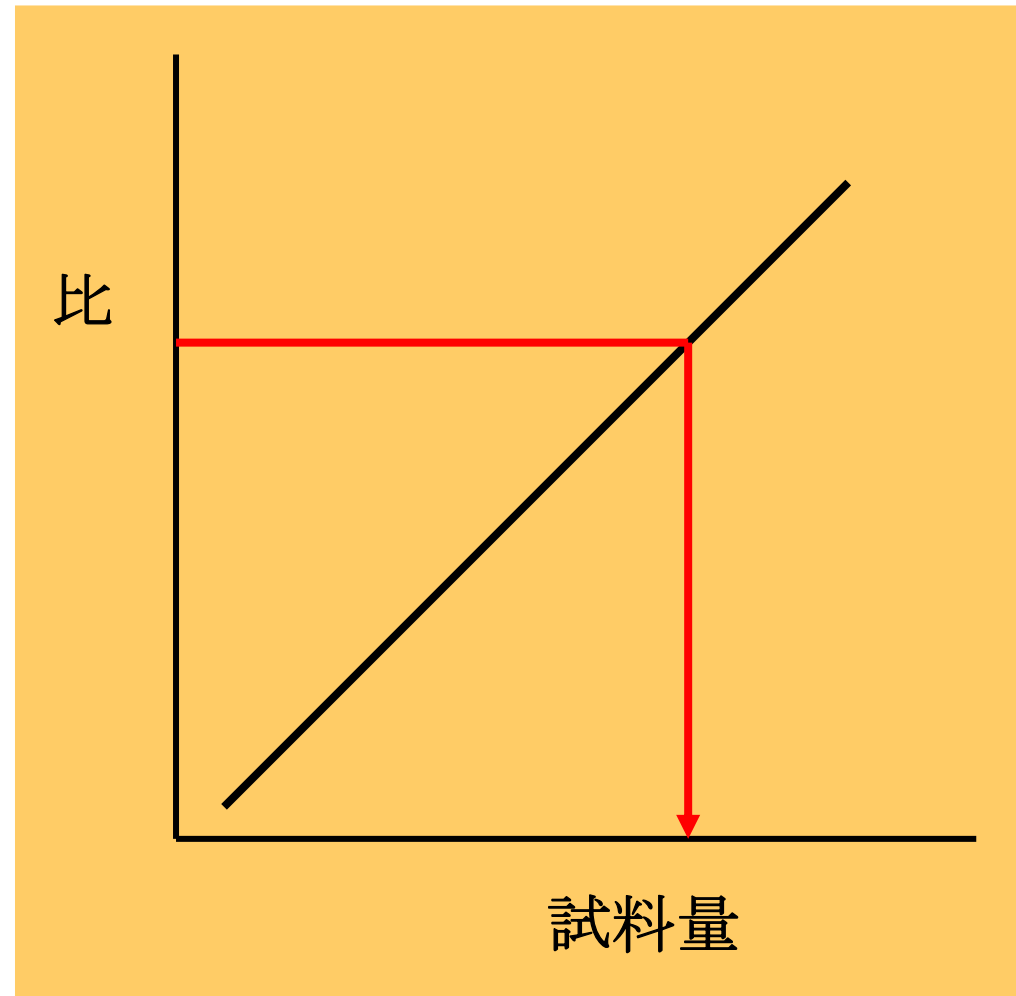
1. 分析目的物の標準品を用意する
2. 内部標準物質を用意する
3. クロマトグラフィー条件を決める
4. 抽出精製法を確立する
5. 検量線を引く

# 定量分析のための三種の神器

1. 標準品(分析目的物、内部標準物質)
2. クリーンナップ法
3. 検量線

# 内部標準物質を使うと定量分析が楽になる

試料 + I S  
↓  
抽出・精製  
↓  
誘導体化  
↓  
GC/MS、  
LC/MS分析



# 内部標準物質

- 安定同位体標識体を使う
- 同族体も選択肢の一つ

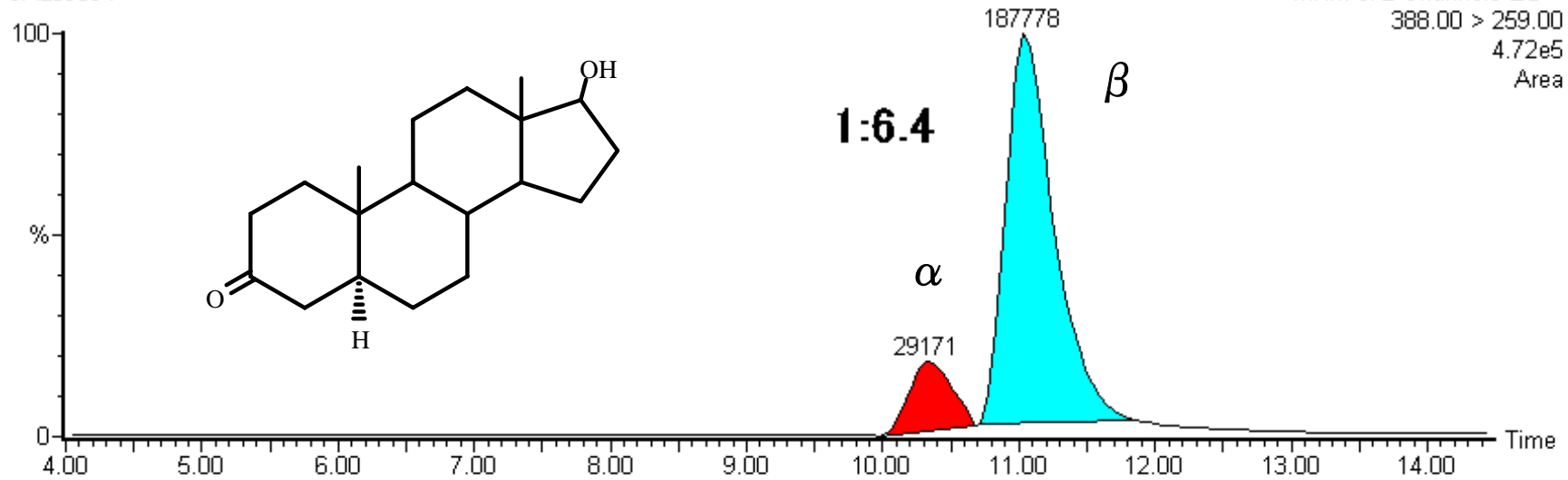
# MSで使える内部標準物質

## 安定同位体標識体

- 化学的挙動は非標識体(分析目的物)と同一
- 質量のみが違う理想的IS
- Carrier 効果も期待できる

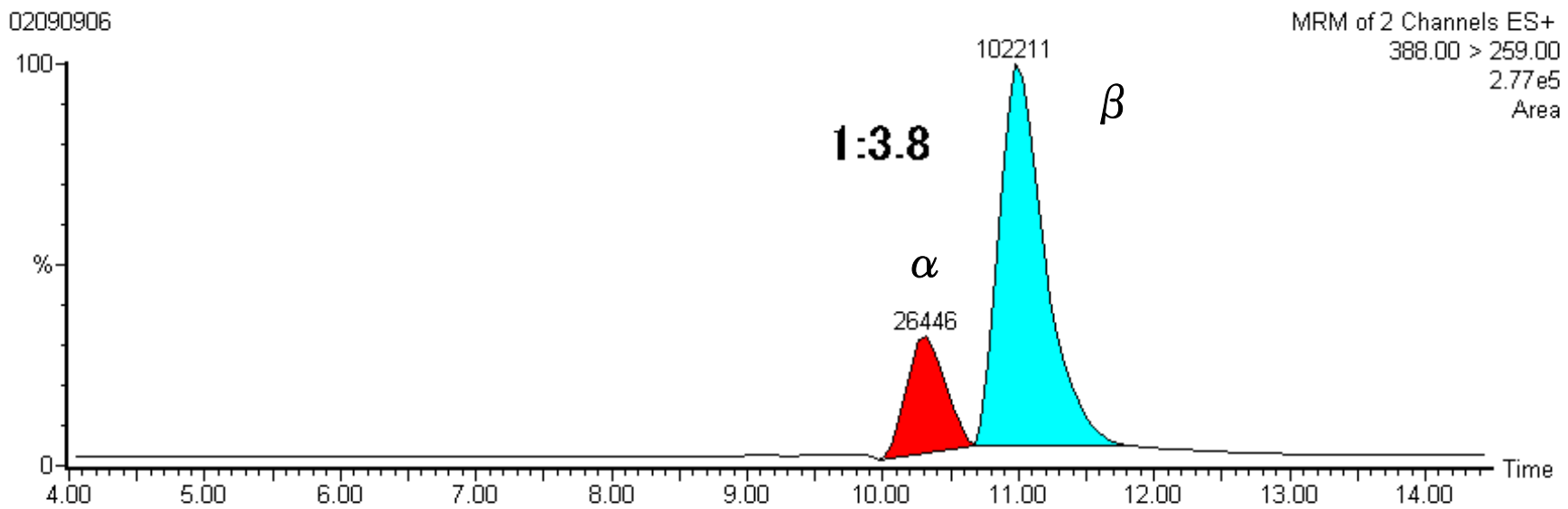
### DHT Standard 50pg

CAL09094



### 7/3 Plasma K M

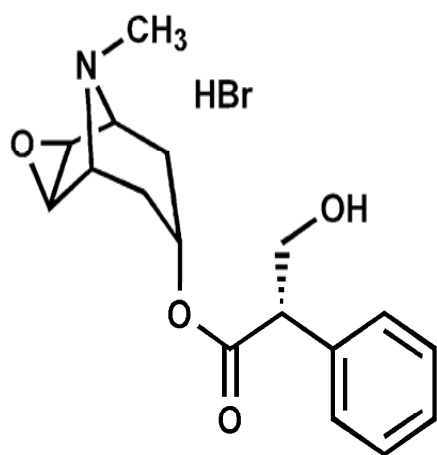
02090906



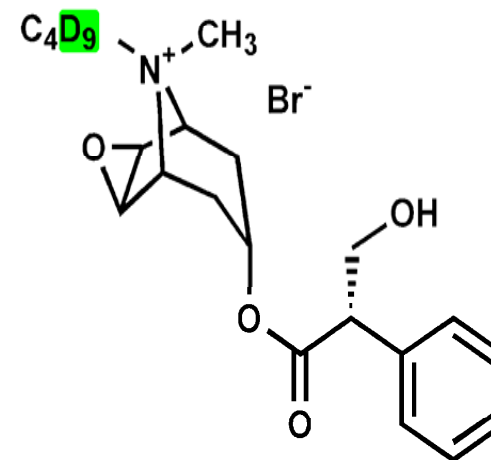
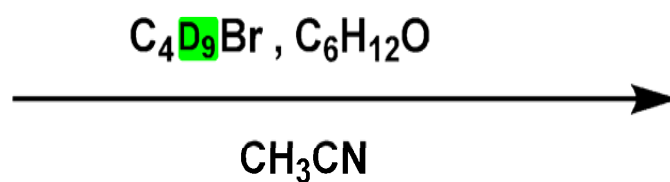
# 安定同位体標識体の調製

1. 合成的方法
2. P450化学モデルによる合成
3. 交換反応の利用
4. 生合成
5. 動物に投与

# 内部標準物質の合成

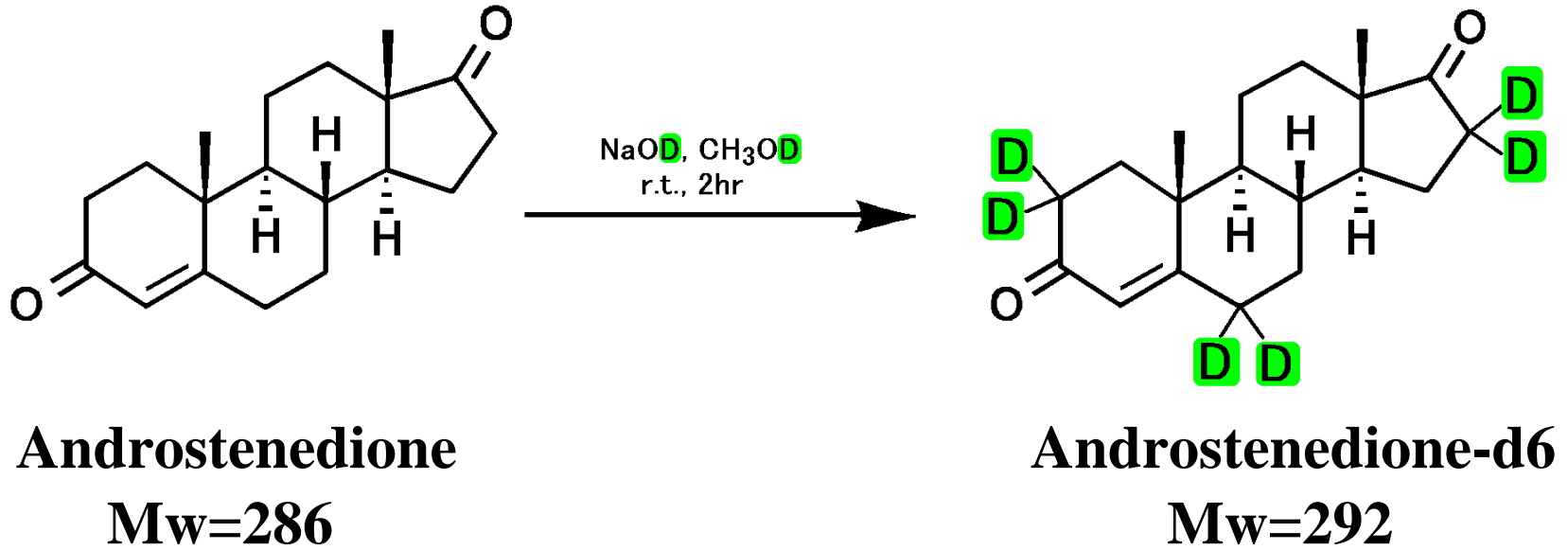


Scopolamine



Scopolamine Butylbromide-d9

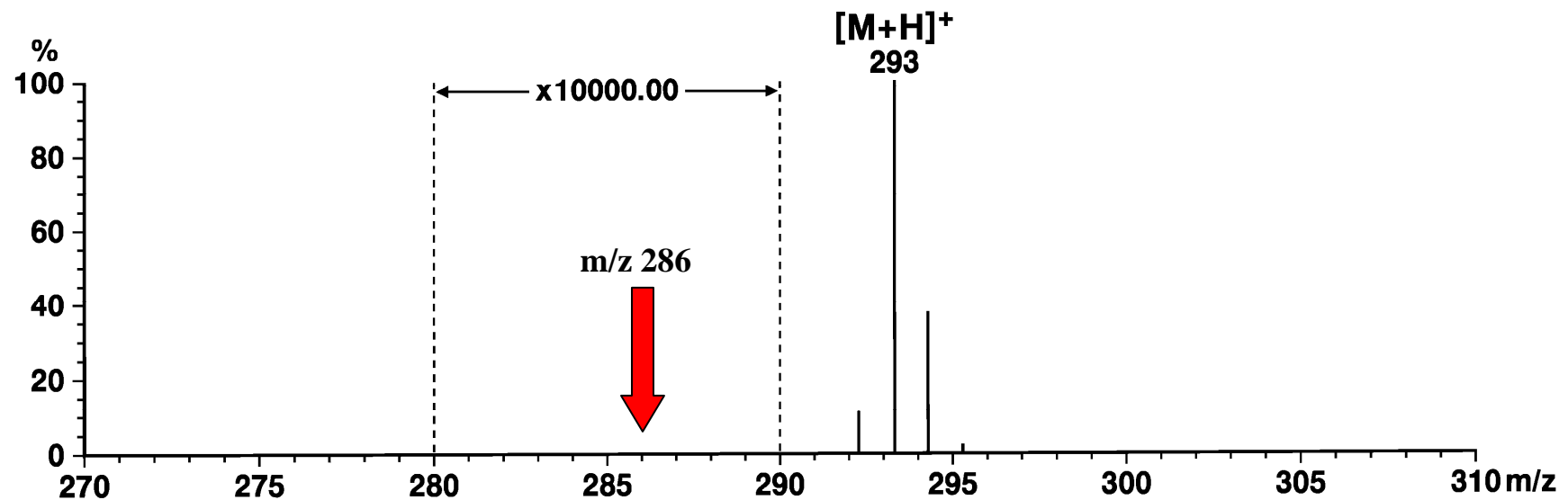
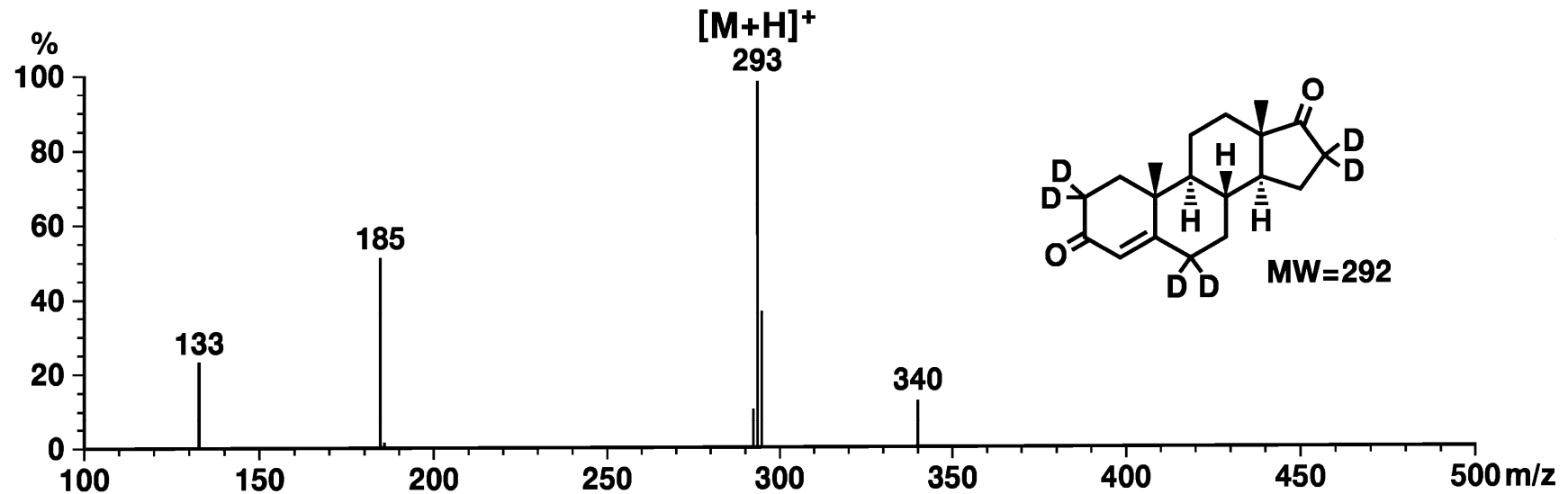
# HD交換反応によるIS調製



# 内部標準物質の評価

- 非標識体含量
- 標識位置の安定性

# 内部標準物質の評価(非標識体含量)



## Human plasma

← Androstenedione-d<sub>6</sub>/H<sub>2</sub>O (0.1%CH<sub>3</sub>CN)  
← H<sub>2</sub>O

## Bond Elut C18

washed with H<sub>2</sub>O  
eluted with AcOEt

dried up

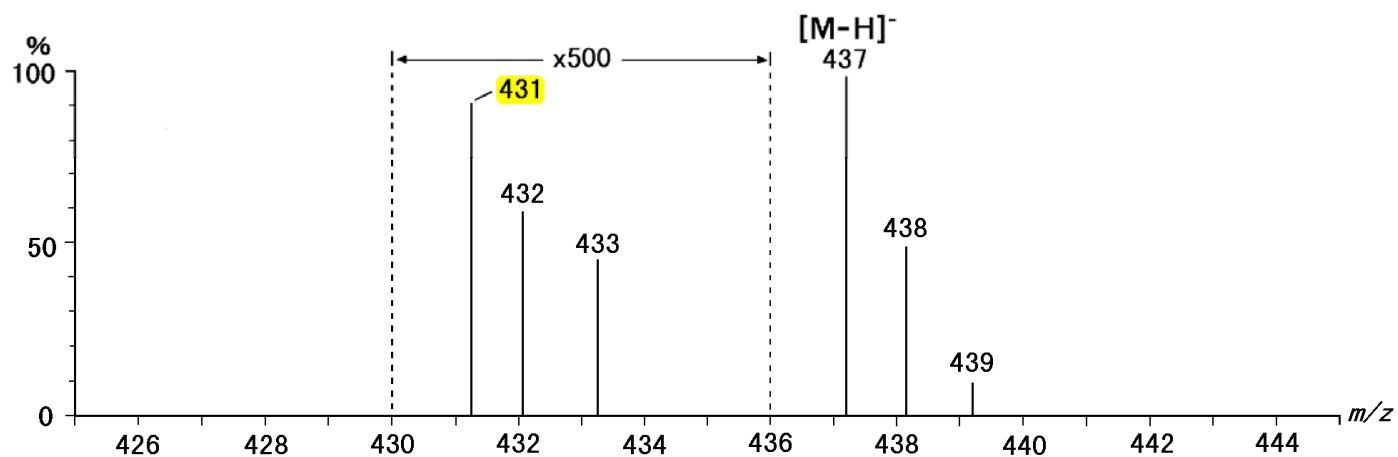
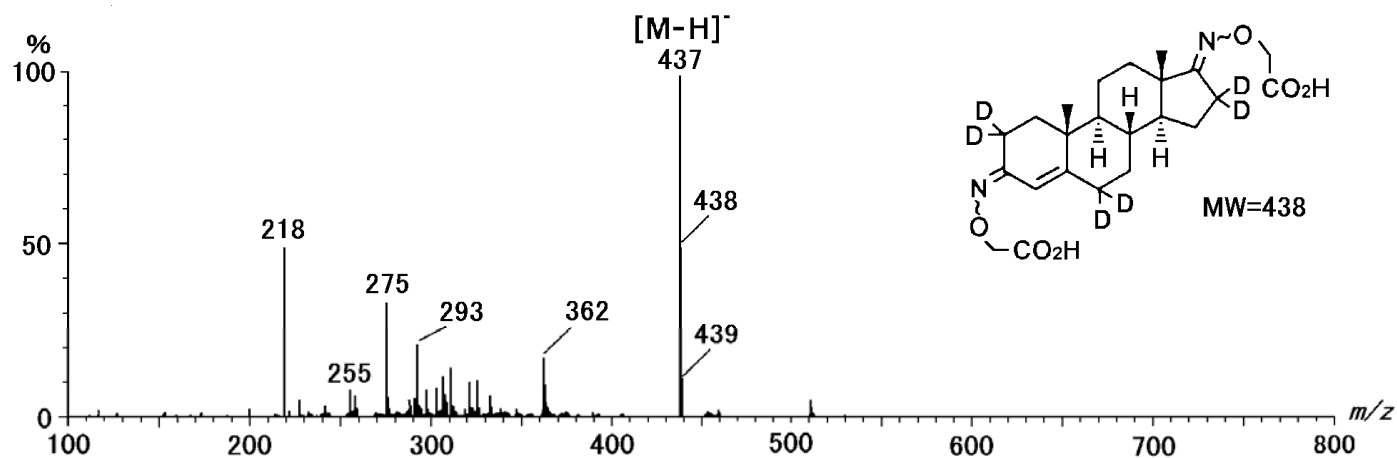
← pyridine  
← carboxymethoxylamine  
60°C, 4h

dried up  
dissolved in AcOEt  
washed with 10mM HCl  
dried up

↓  
Androstenedioxime  
LC/ESI(negative)-MS

↓  
Androstenedione  
LC/ESI(positive)-MS  
(control)

# 内部標準物質の評価(安定性)



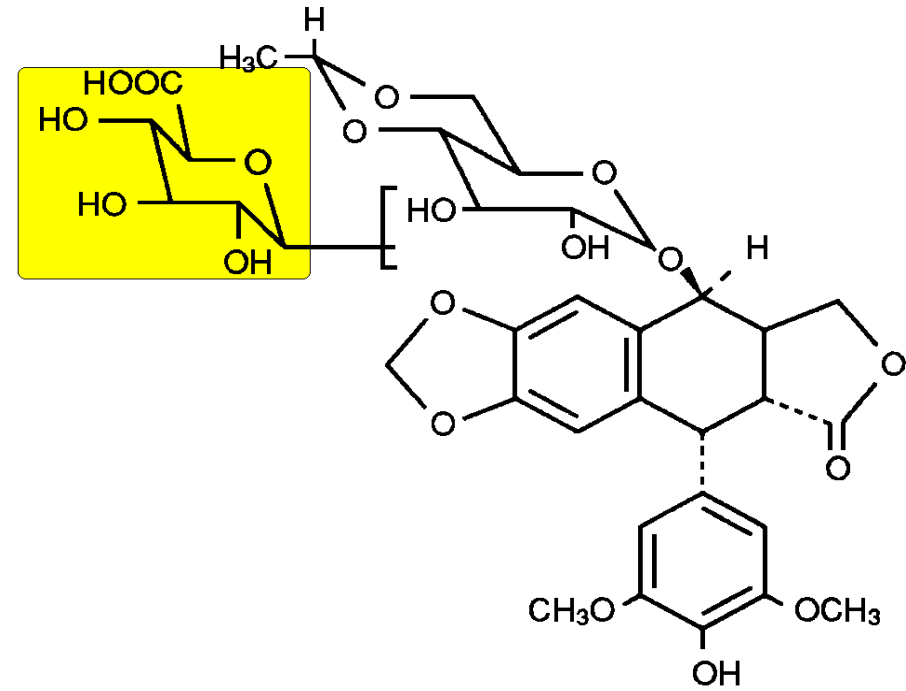
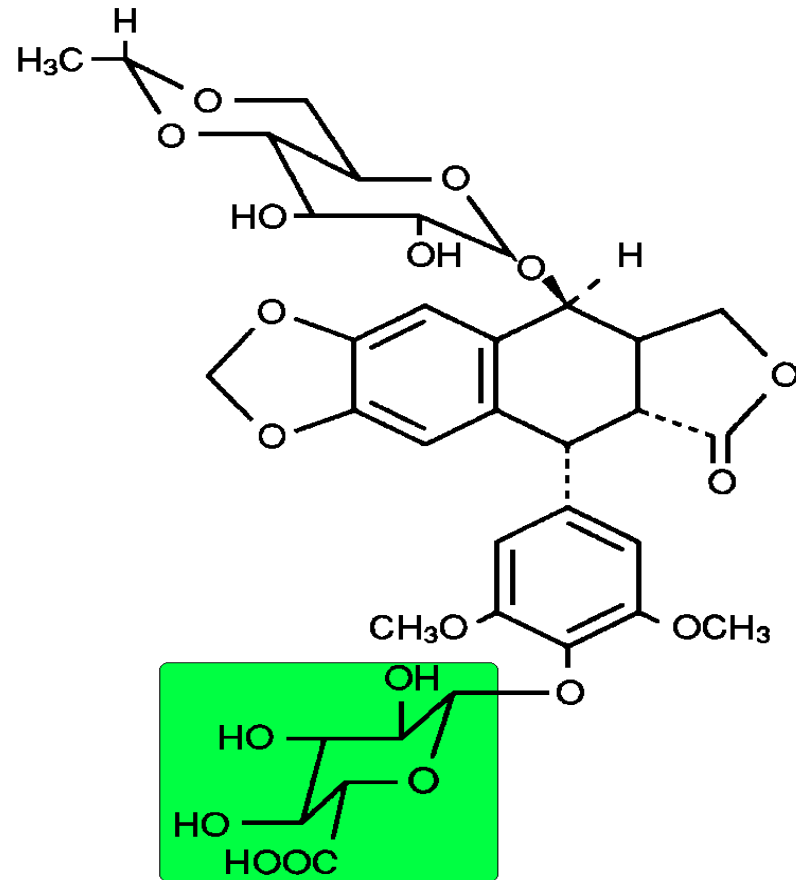
# 標準品の調製法

- 酵素による生合成
- 動物に投与
- P450モデル化合物の利用

# 酵素を利用したグルクロン酸抱合体の調製法

1. ラビットやラットの新鮮な肝臓
2. マイクロソーム画分を取り出す
3. コール酸を添加してグルクロニルトランスフェラーゼを可溶化
4. Sepharoseに固定化
5. 基質(薬物)に固定化酵素を加えてインキュベーション

# Etoposide の代謝物



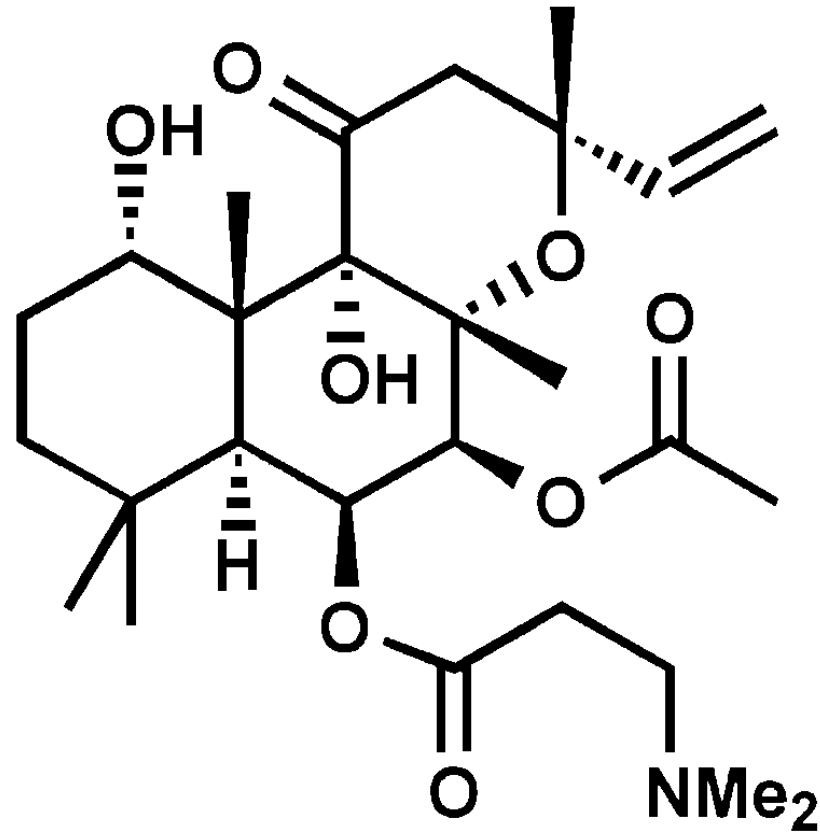
# HPLC条件

- 出来る限り逆相系カラムを選択する
- 溶媒はMeOH/H<sub>2</sub>Oのような、単純系に
- 塩は添加しない
- 酸や塩基は揮発性の高いものを使う
- カラムはセミマイクロ～マイクロを使う
- 溶出条件はアイソクラティックで
- イオンペアー試薬は避けたい

# GC条件を決める

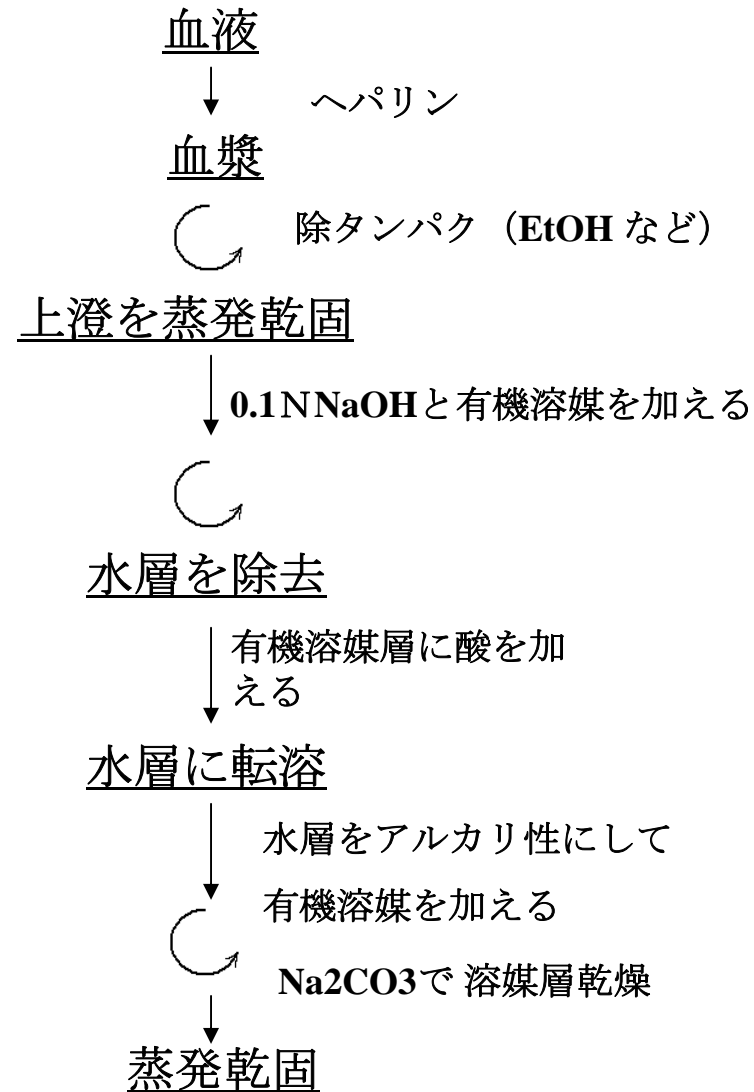
- カラム  
無極性、中極性、高極性
- カラム温度  
等温、昇温

# クリーンナップ法を作る(1)

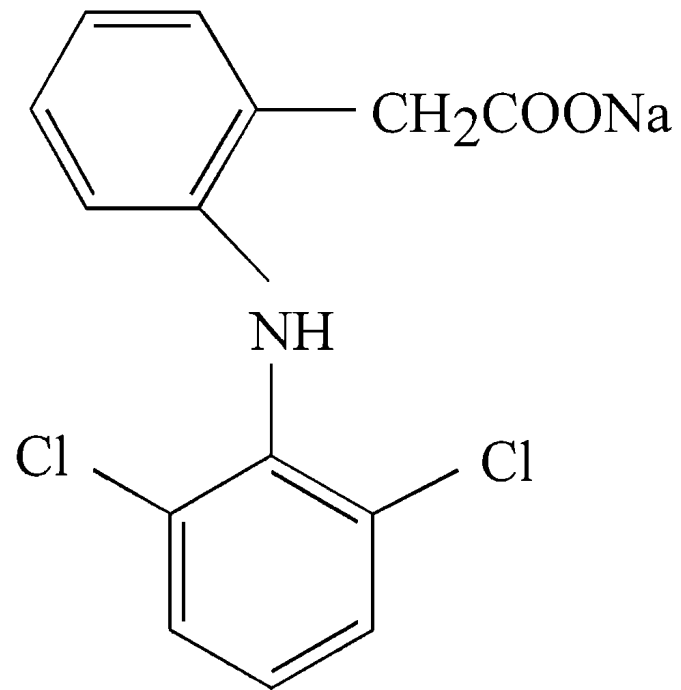


NKH477

# 塩基性化合物のクリーンアップ法

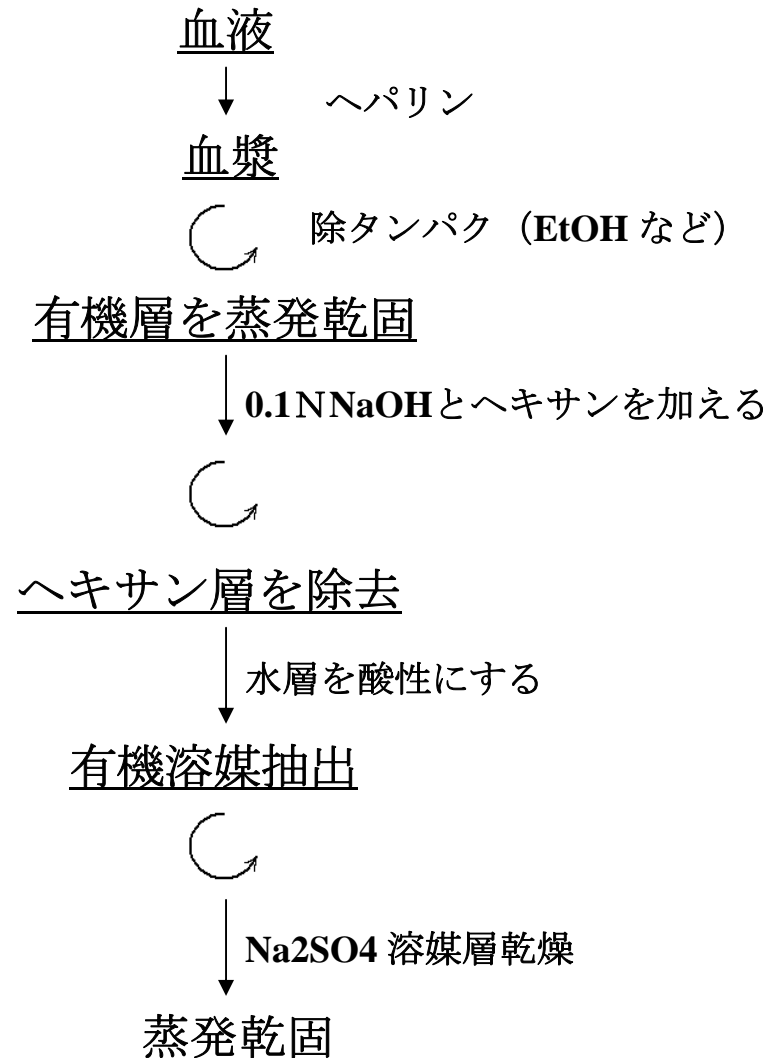


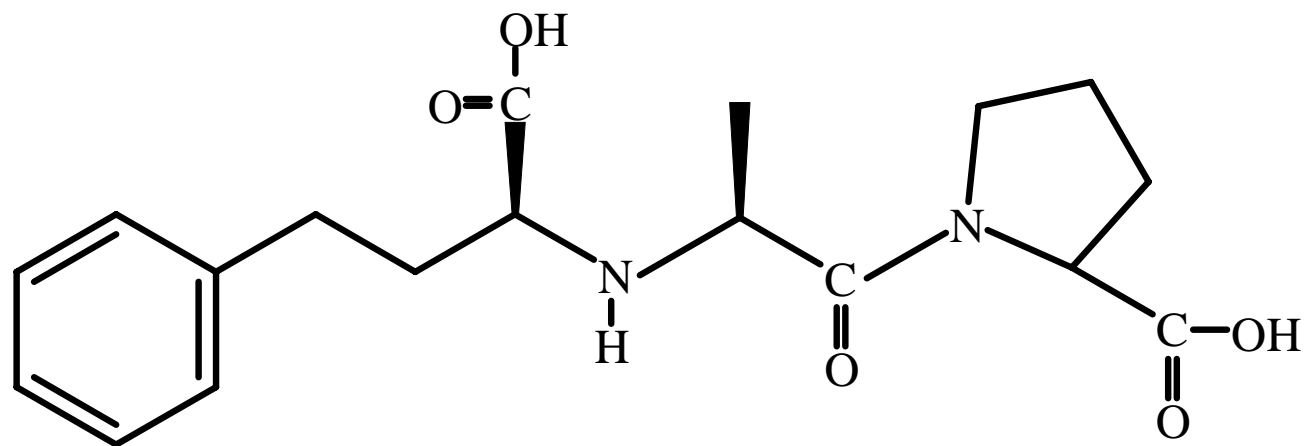
# クリーンナップ法を作る(2)



**Diclofenac sodium**

# 酸性化合物のクリーンアップ法





**Enalaprilate**

Plasma, 1mL

IS(9.2 ng/50 uL,  $^{18}\text{O}_4$ -labeled)  
0.1 M HCl, 2mL

Bond Elut C18(200 mg)

0.1 M HCl 3x3 mL  
n-hexane(2x3 mL)  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc(9:1), 2 mL  
eluted with 2 mL of EtOAc/MeOH(7:3)  
evaporated under N<sub>2</sub> at 50 C

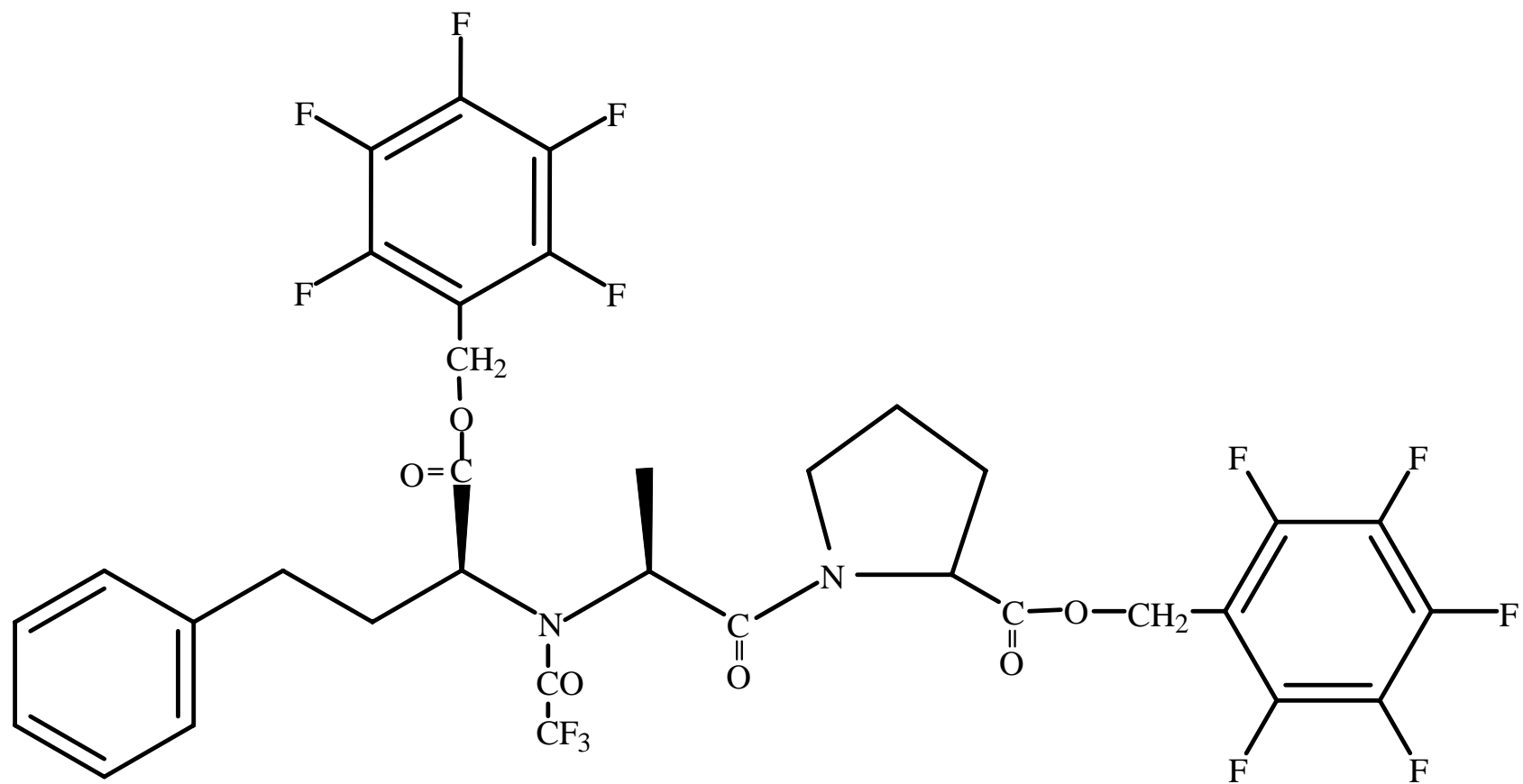
Derivatization

PFB-Br in acetone, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1hr, 75 C  
2 mL EtOAc, 100 mg Kiessel-gel G60

supernatant was dried  
100 uL EtOAc, 50uL TFAA  
evaporate  
100 uL EtOAc

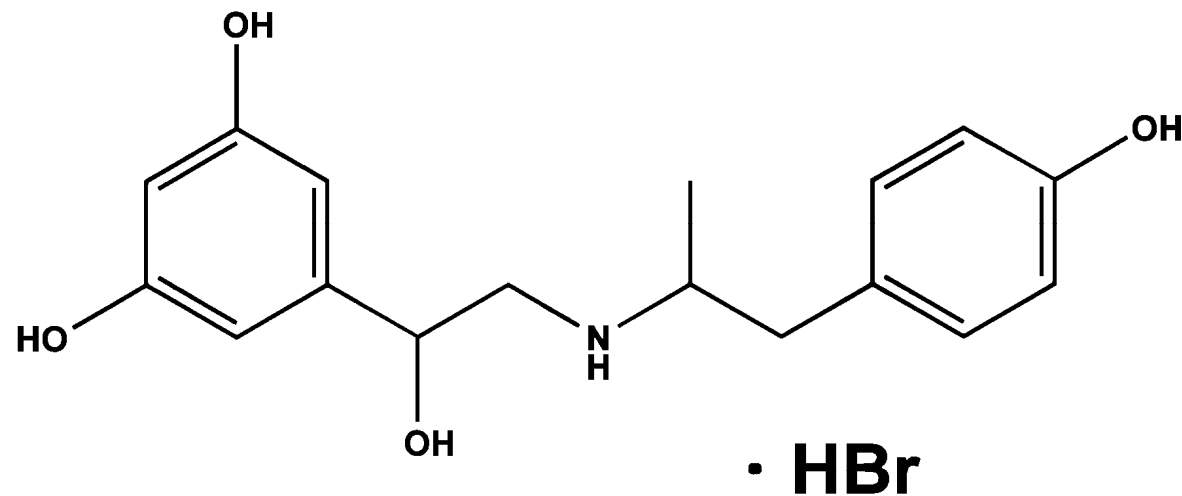
GC-NICI-MS

(by H.J.Leis et.al.:J.Mass.Spectrom. 30 1447(1995))



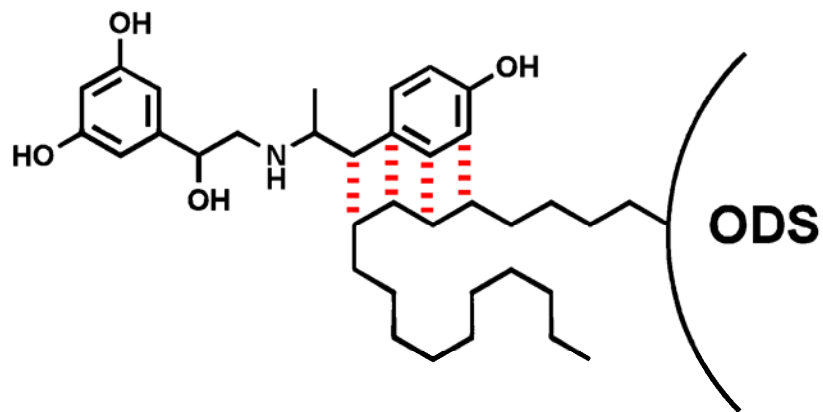
**PFB, TFA derivative of Enalaprilate**

# クリーンナップ法を作る(3)

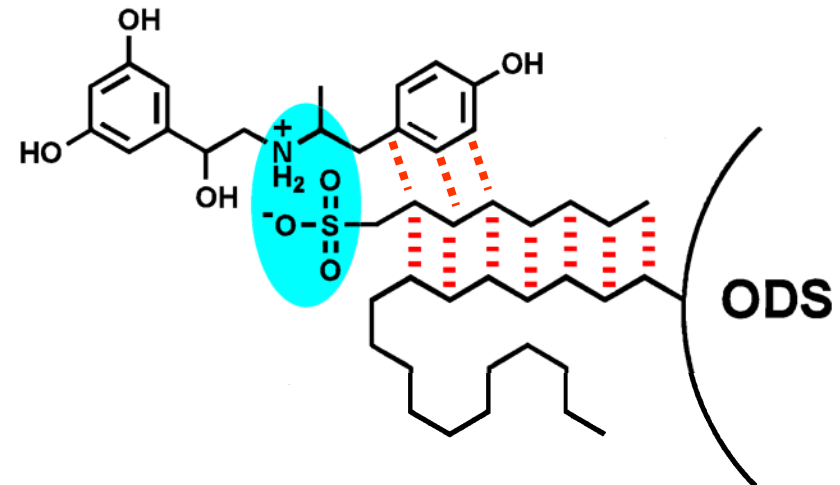


臭化水素酸フェノテロールの構造

# ペアードイオン形成による固相抽出

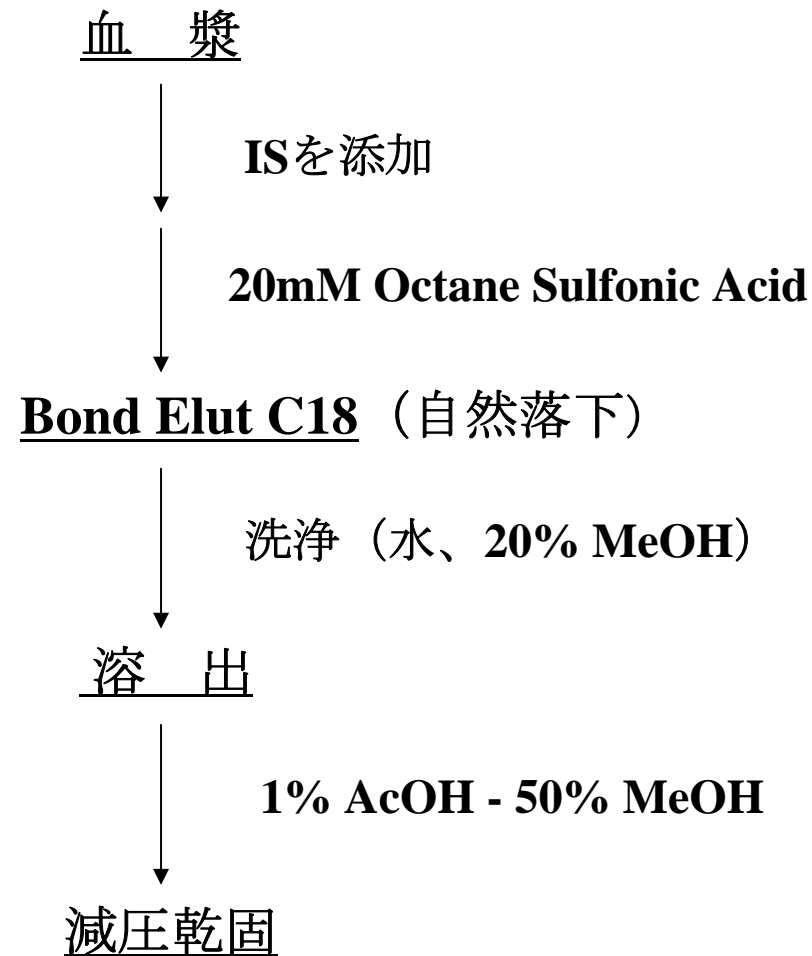


ペアードイオン試薬の無い場合  
保持:弱い



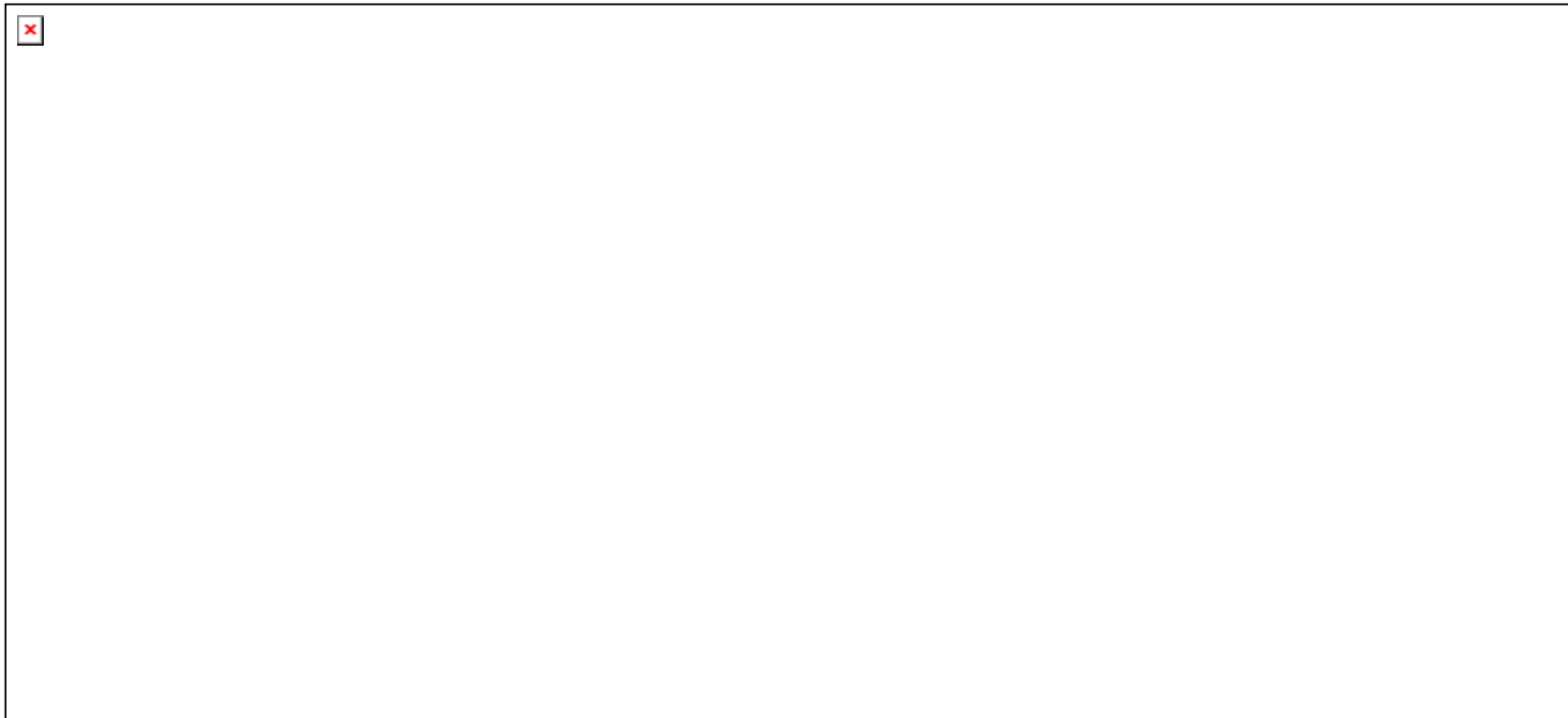
ペアードイオン試薬を使った場合  
保持:強い

# 両性化合物のクリーンアップ法

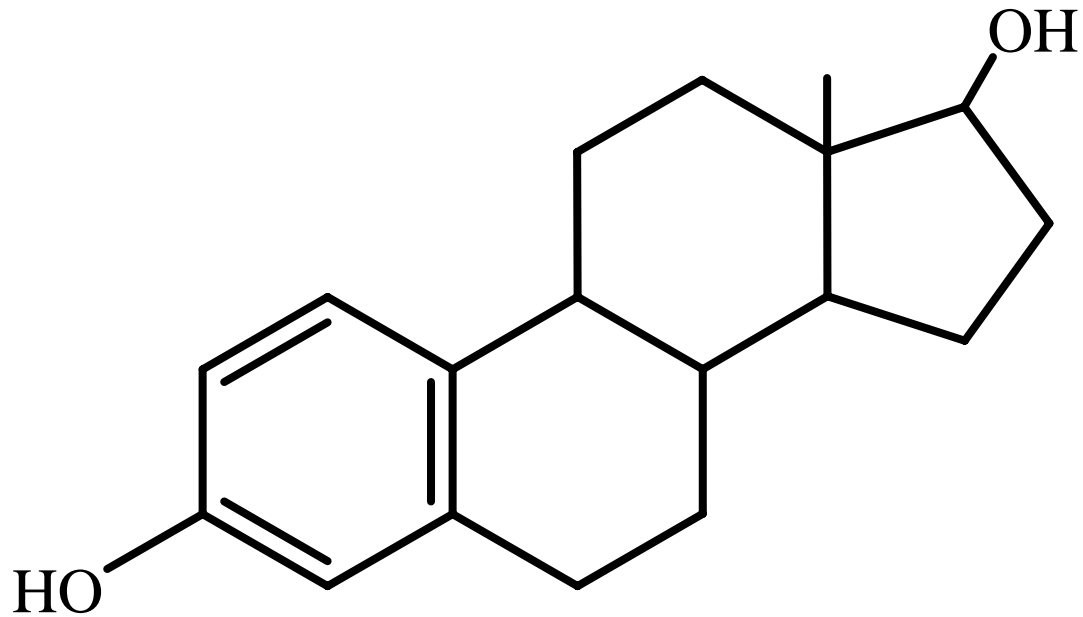


# クリーンアップ法を作る(4)

固相抽出法を使う



# クリーンナップ法を作る(5)



**Estradiol**

## Plasma 2mL

IS (d<sub>3</sub>-estradiol, 500 pg)  
2 hr, 20 C  
**anti-estradiol-17 β serum**  
**(microcellulose coupled)**  
↓ incubation 4 C, 30 min



## Pellet

↓ extracted with MeOH  
evaporation  
↓

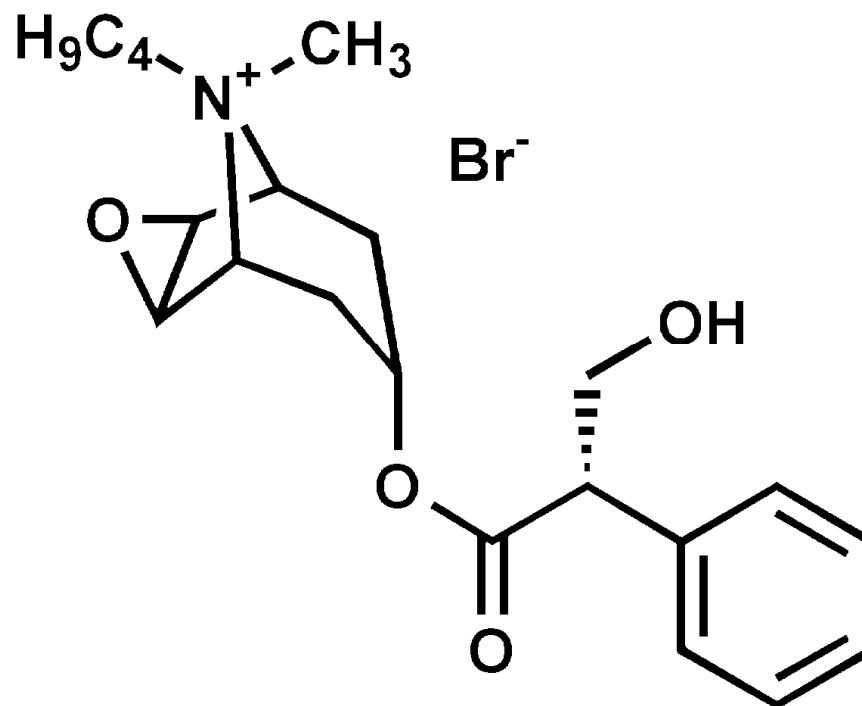
## Derivatization

↓ TBDMS, 12 hr, 20 C  
Sephadex LH-20  
↓

## GC-MS

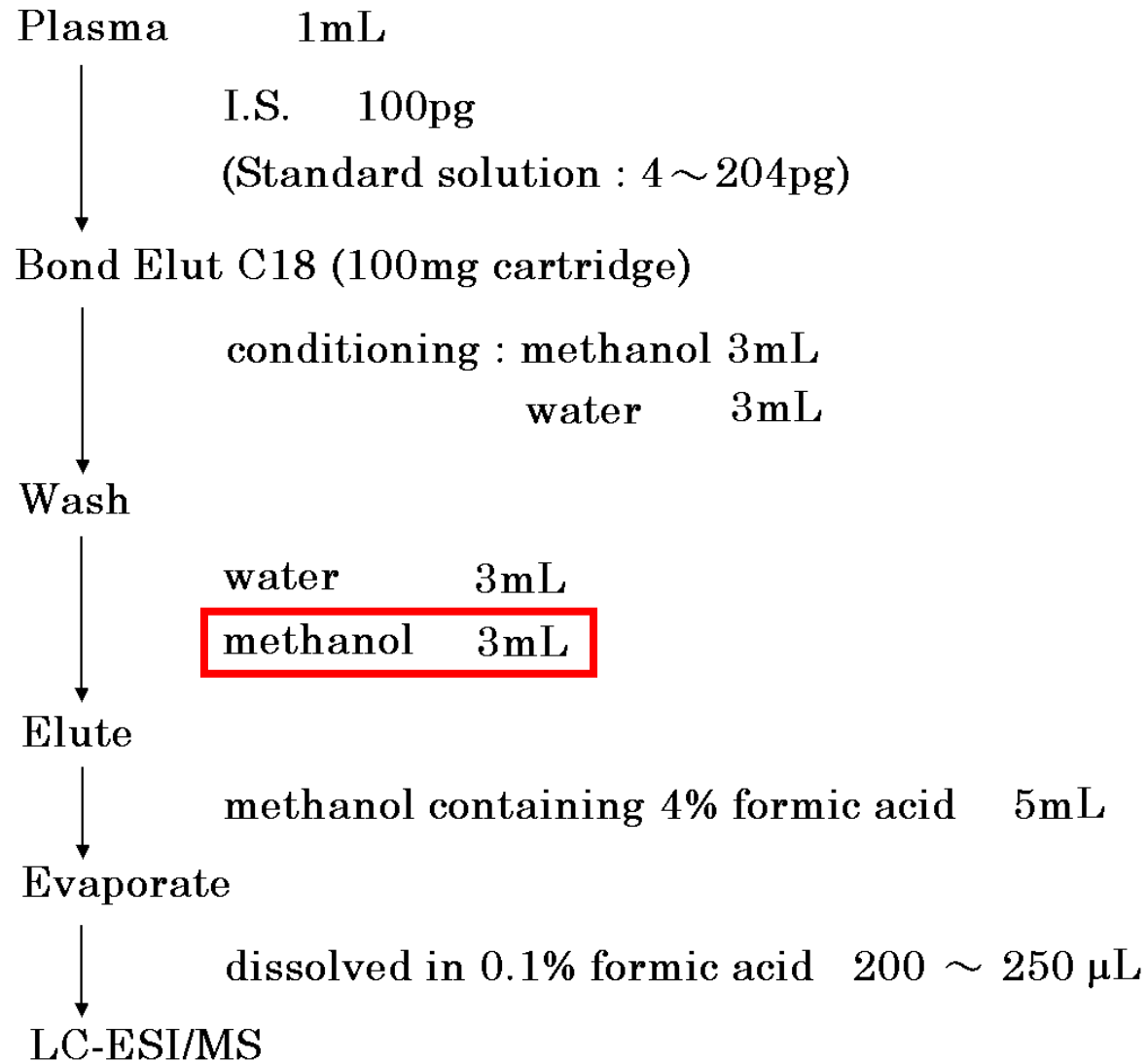
(by G.C.Thorne and S.J.Gaskell:Bio.Med.Mass spectrom.12 19 (1985) )

# クリーンナップ法を作る(6)

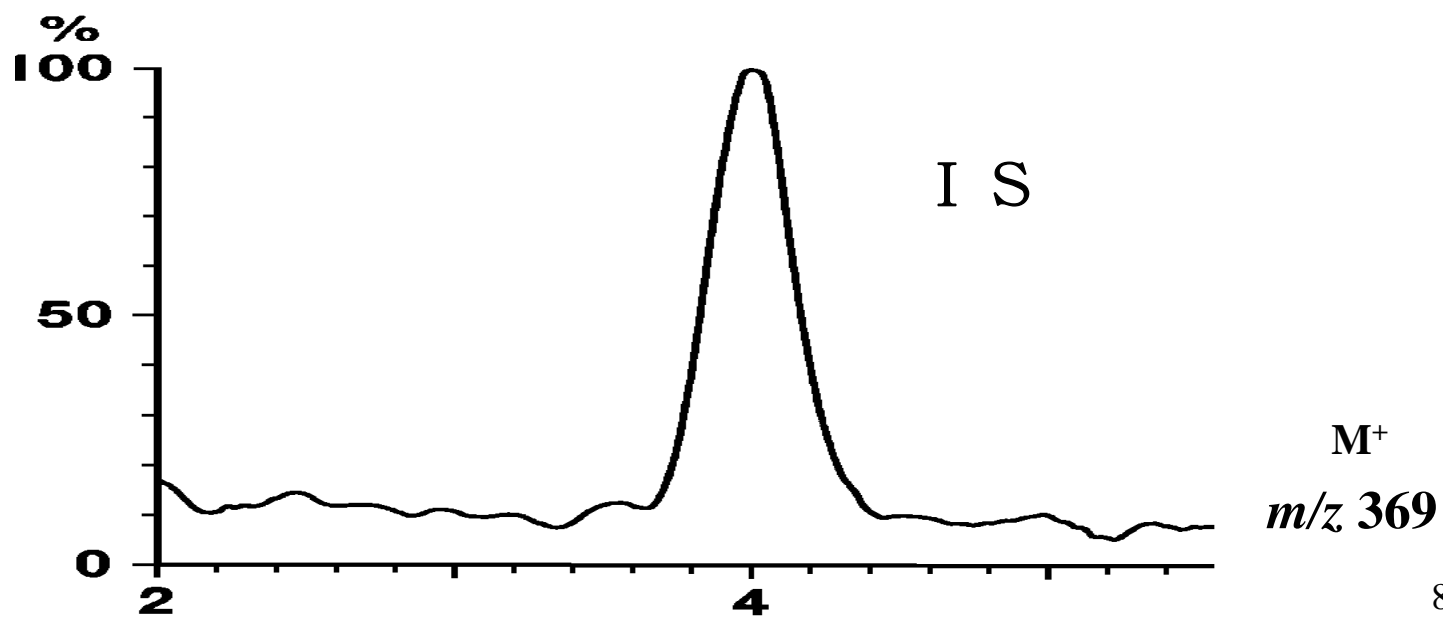
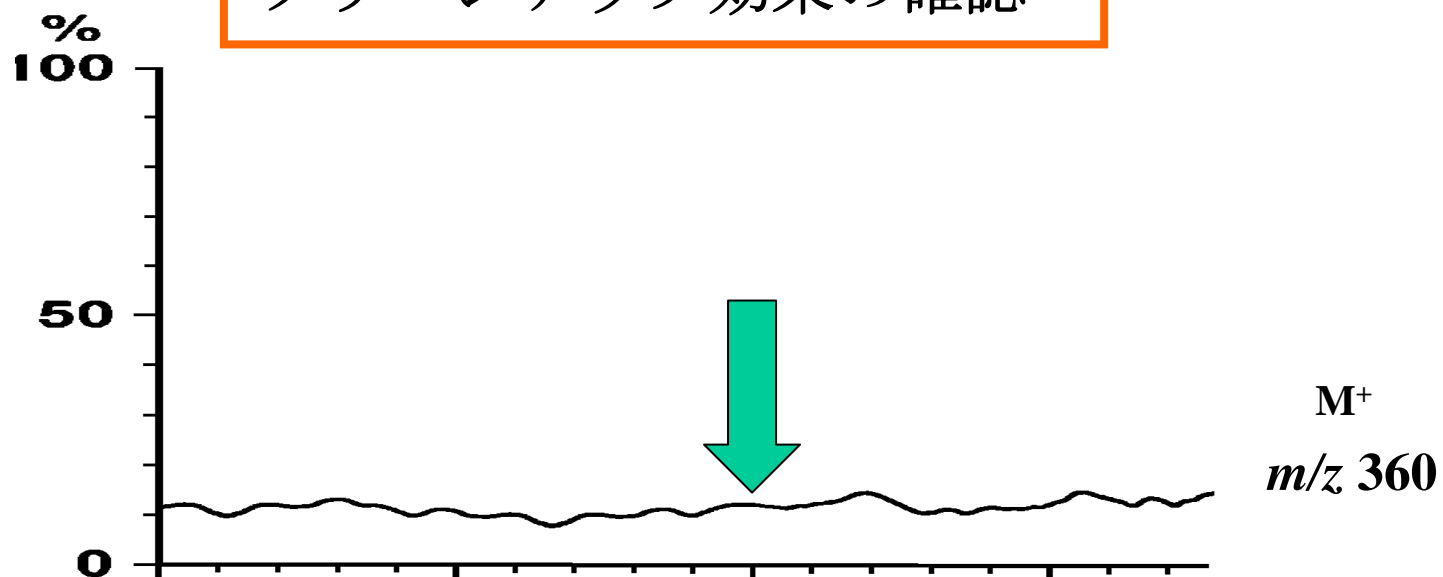


**Scopolamine butylbromide**

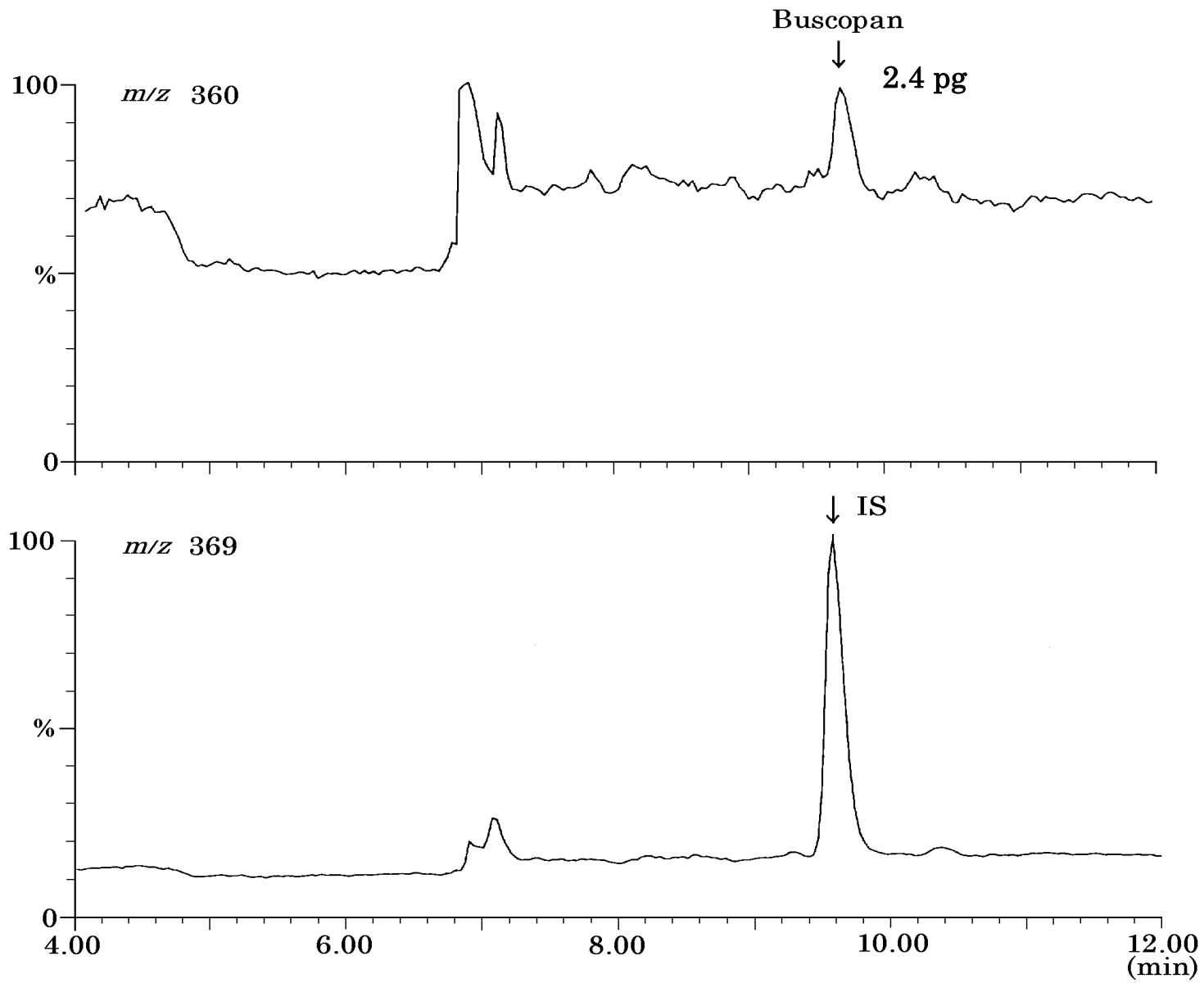
# 固相抽出法を使う



クリーンナップ効果の確認



# 定量時のSIM



# 定量分析のための検量線作成法

血液 1mL x 6本

分析目的物の標準品を各々に  
10,20,50,100,200,500 pg 添加する

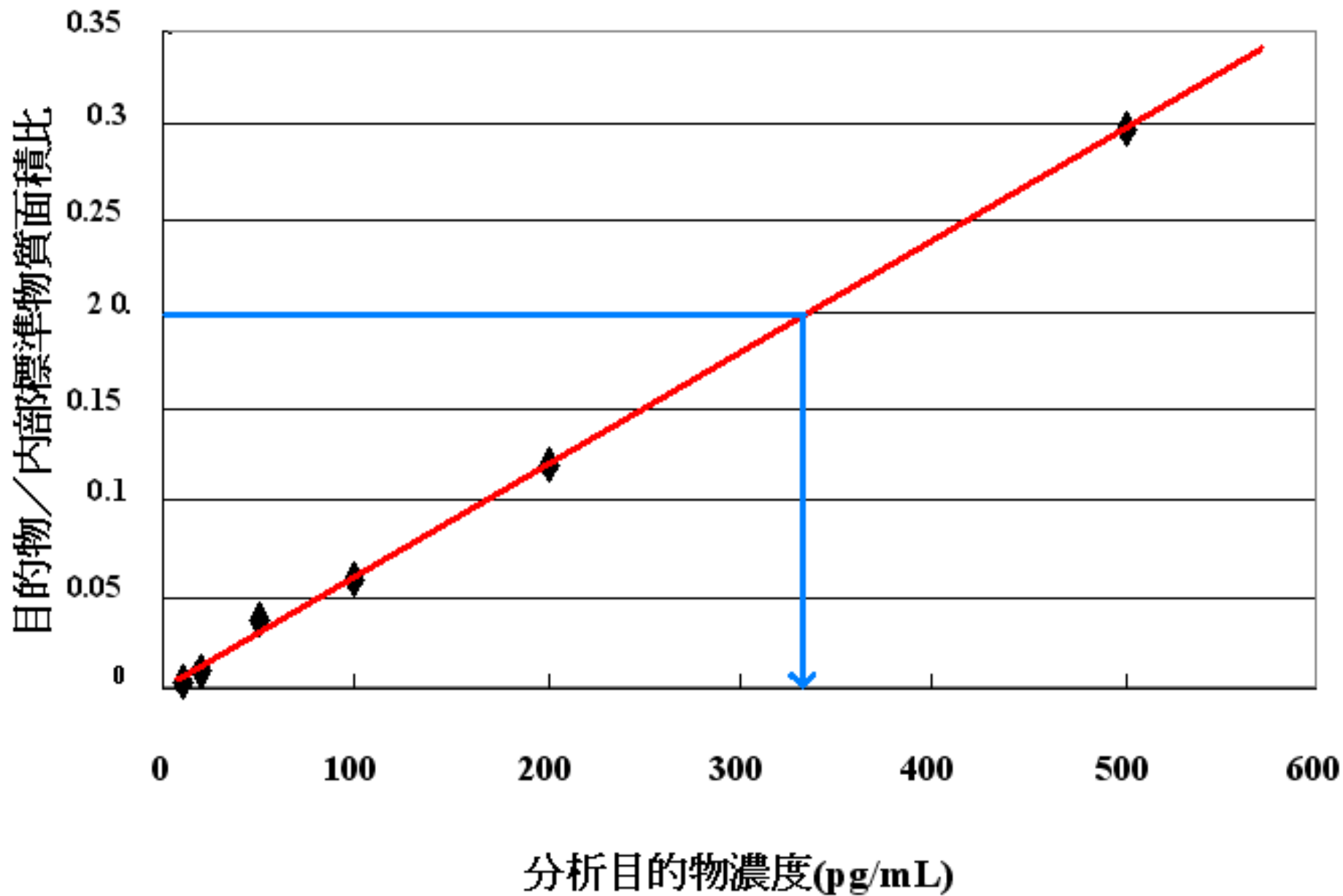
内部標準物質を各々に250 pg 添加する

前処理

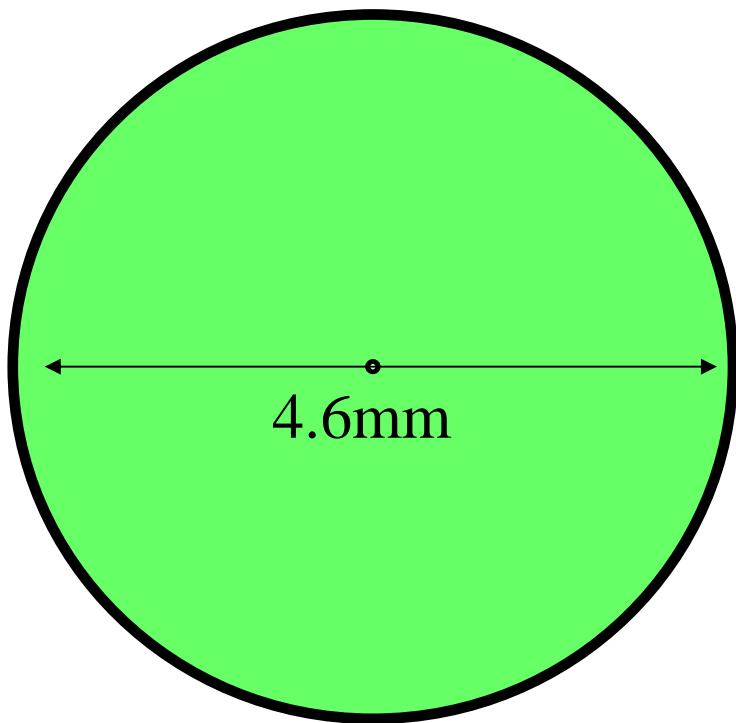
MSによる測定

検量線の直線性と傾きを確認

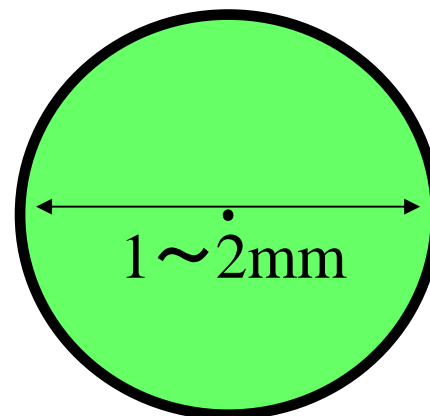
定量法の完成



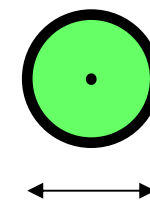
コンベンショナル  
カラム



セミマイクロ  
カラム



マイクロ  
カラム



0.3~0.5  
mm

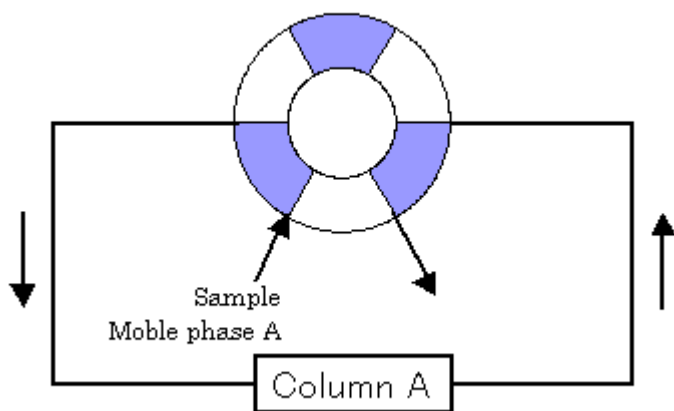
感度: 1

21

85~235

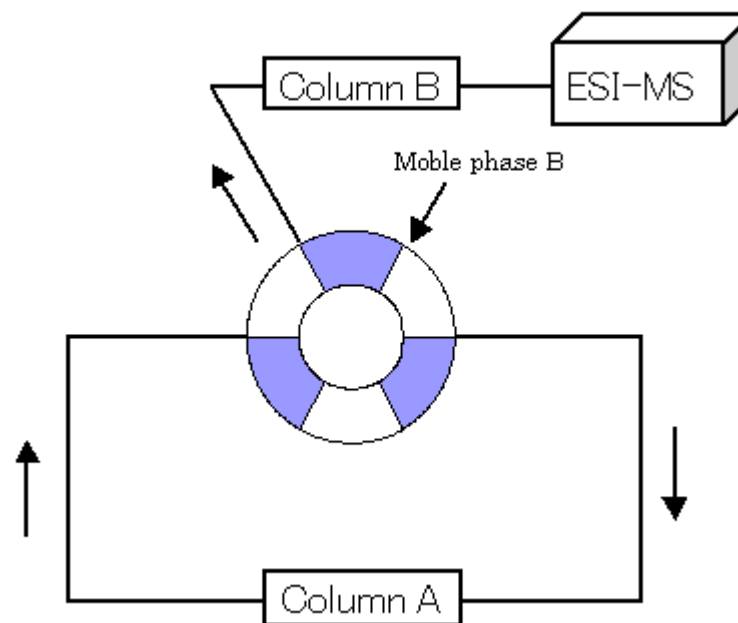
# カラムスイッチ法による濃縮

## Concentration



500uL/min

## Analysis



100uL/min

# HPLC conditions

## *Concentration Column:*

Capcell Pak C<sub>18</sub> MG 5  $\mu$  m (2x20 mm)

Mobile Phase: AcCN/H<sub>2</sub>O

(15/85, containing 0.05% formic acid)

Flow Rate: 500  $\mu$  L/min

## *Analytical Column:*

Senshu Pak Docosil 3  $\mu$  m (2x100 mm)

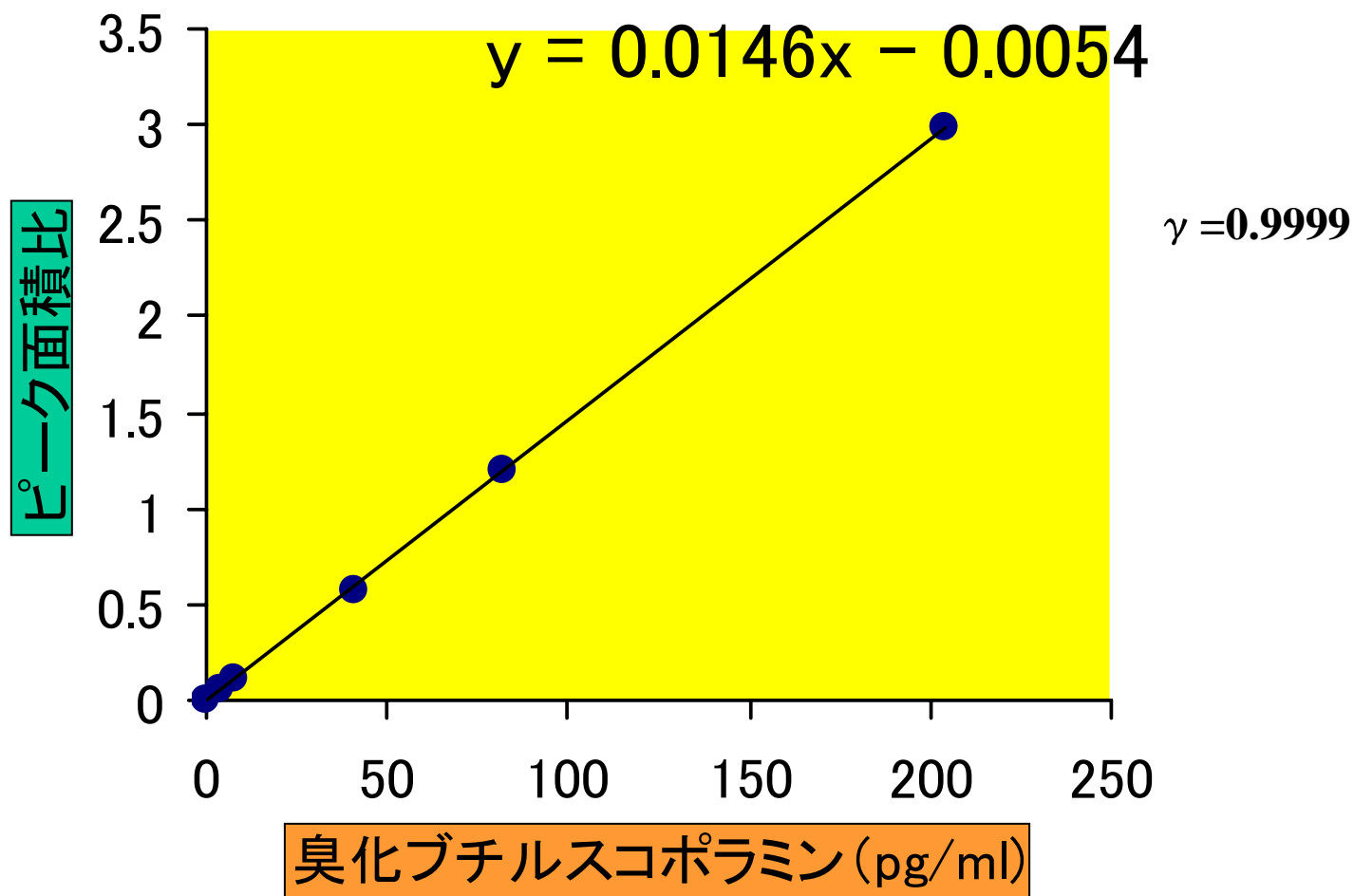
Mobile Phase: AcCN/H<sub>2</sub>O

(43/57, containing 0.05% formic acid)

Flow Rate : 100  $\mu$  L/min

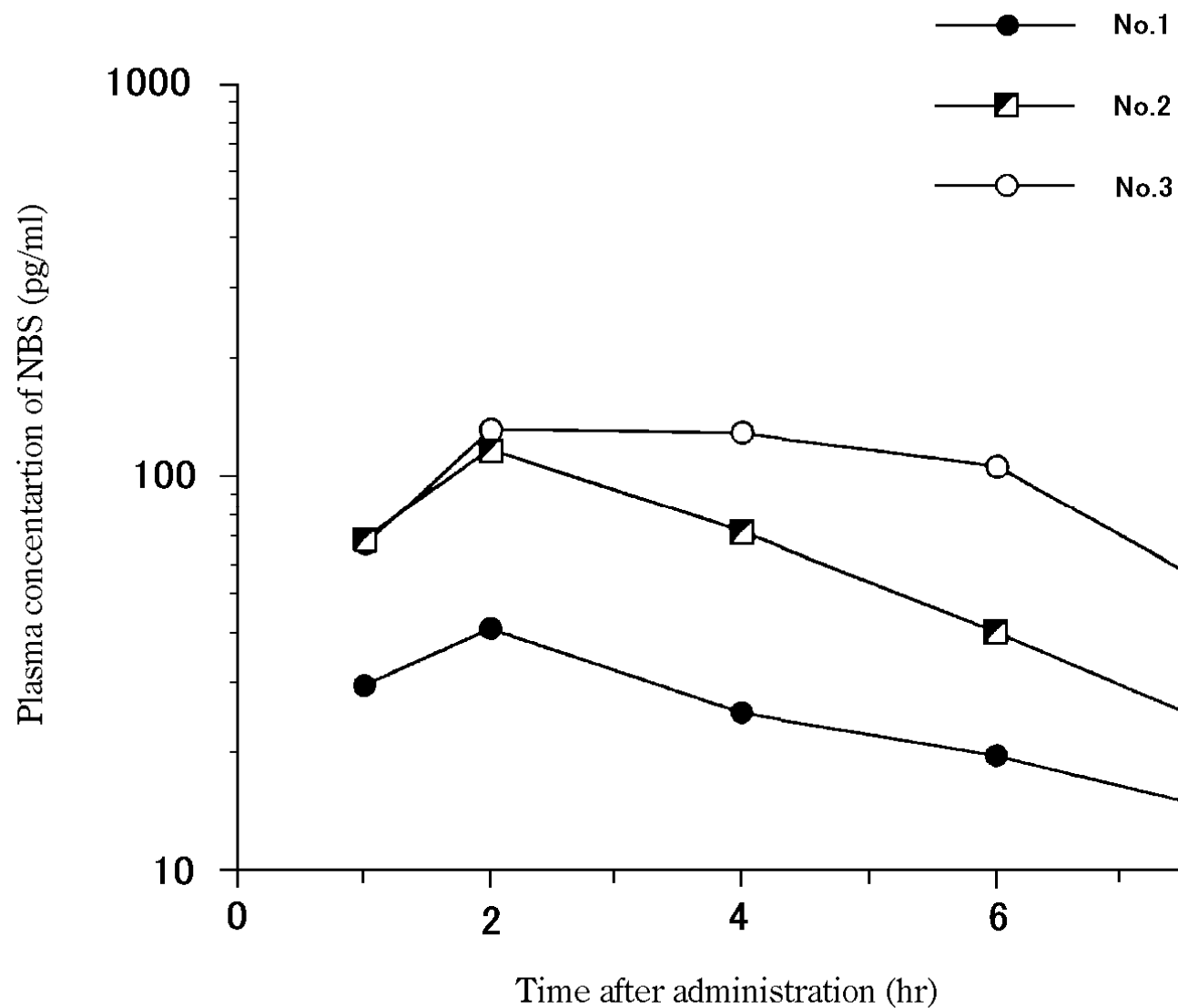
Injection : 500  $\mu$  L

# ブスコパンの検量線

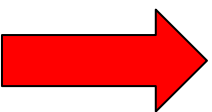


検量線

# 測定例：ブスコパンの血中濃度



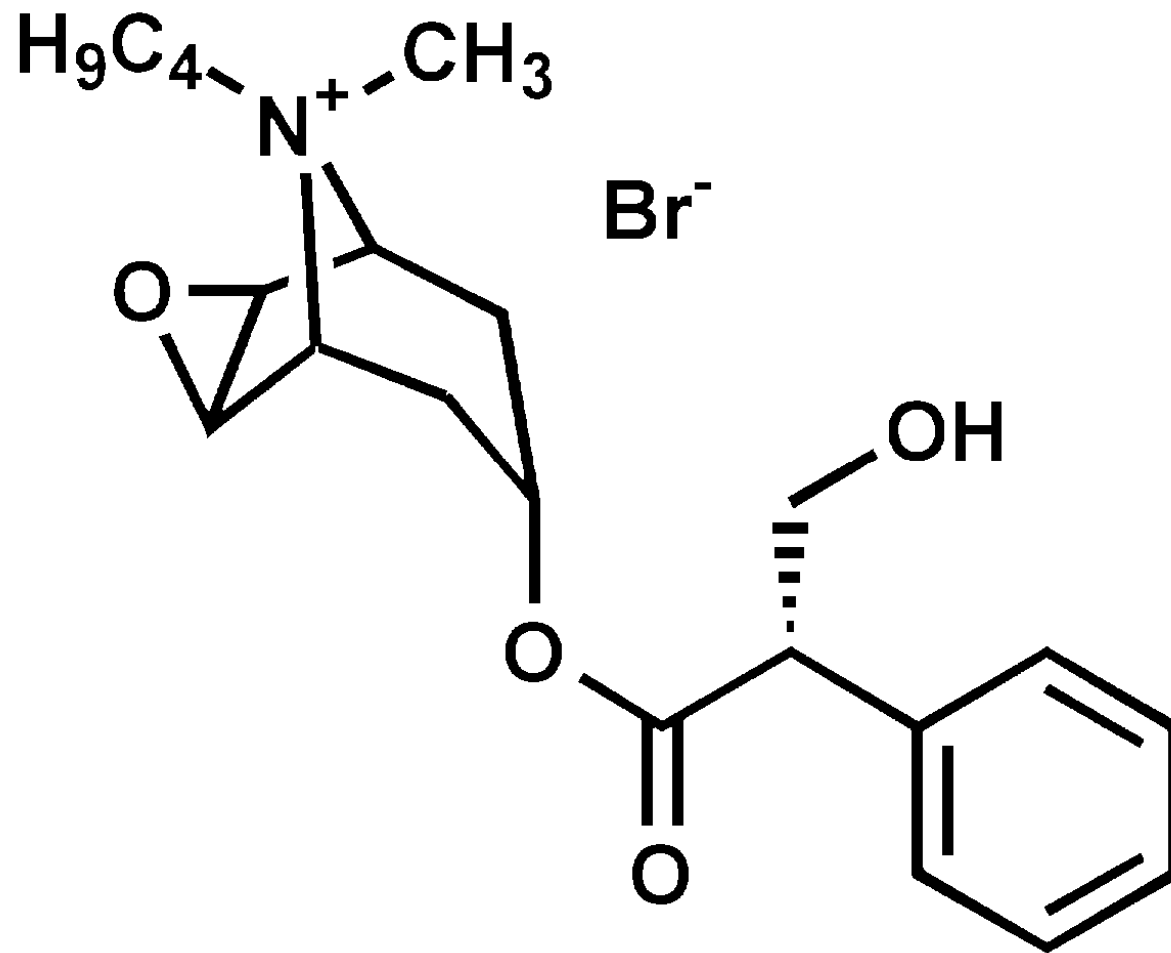
# まとめ

- MSで定量する  総合力が必要  
前処理はサボれない

# ESI高感度化のための 極性誘導体化

# キーワード

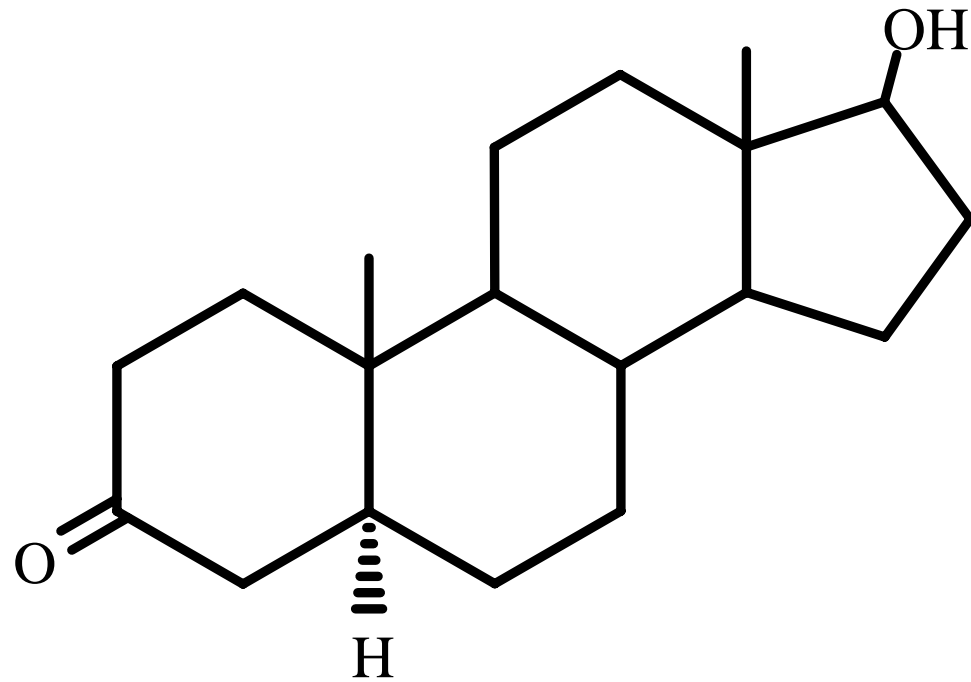
- ステロイド
- 糖
- 四級アンモニウム塩
- ESI sensitive



**N-Butylscoporamine**

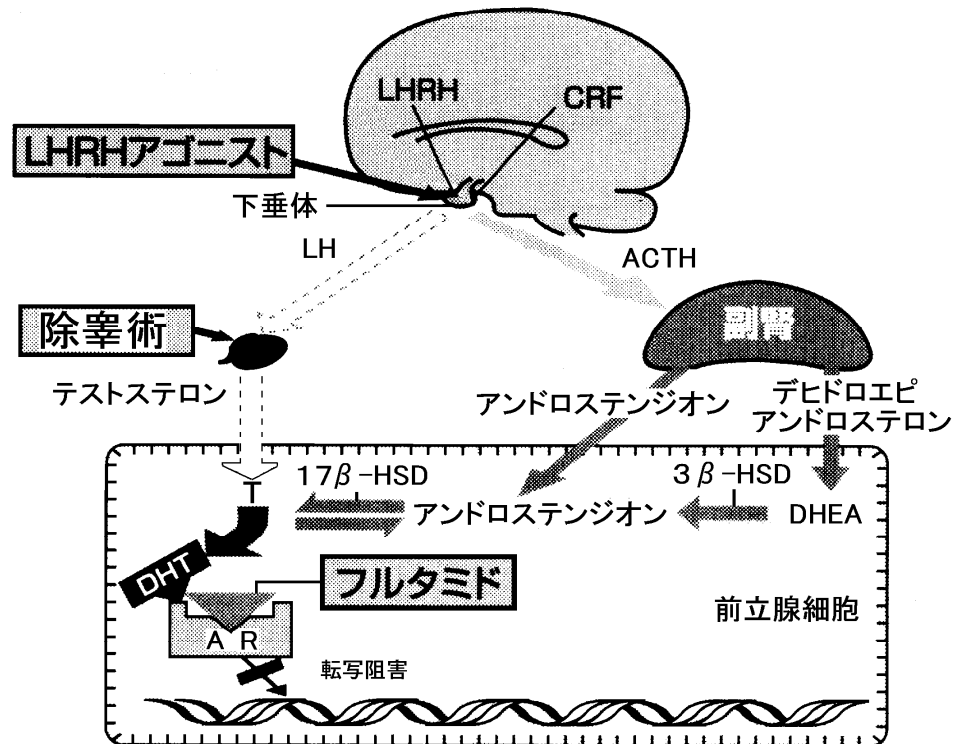
## Butylscoporamineで得られた知見

- 四級アンモニウム塩誘導体にすればESI高感度化が可能になるだろう。



**5  $\alpha$  -Dihydrotestosterone(DHT)**

# MAB療法によるアンドロゲンの阻害



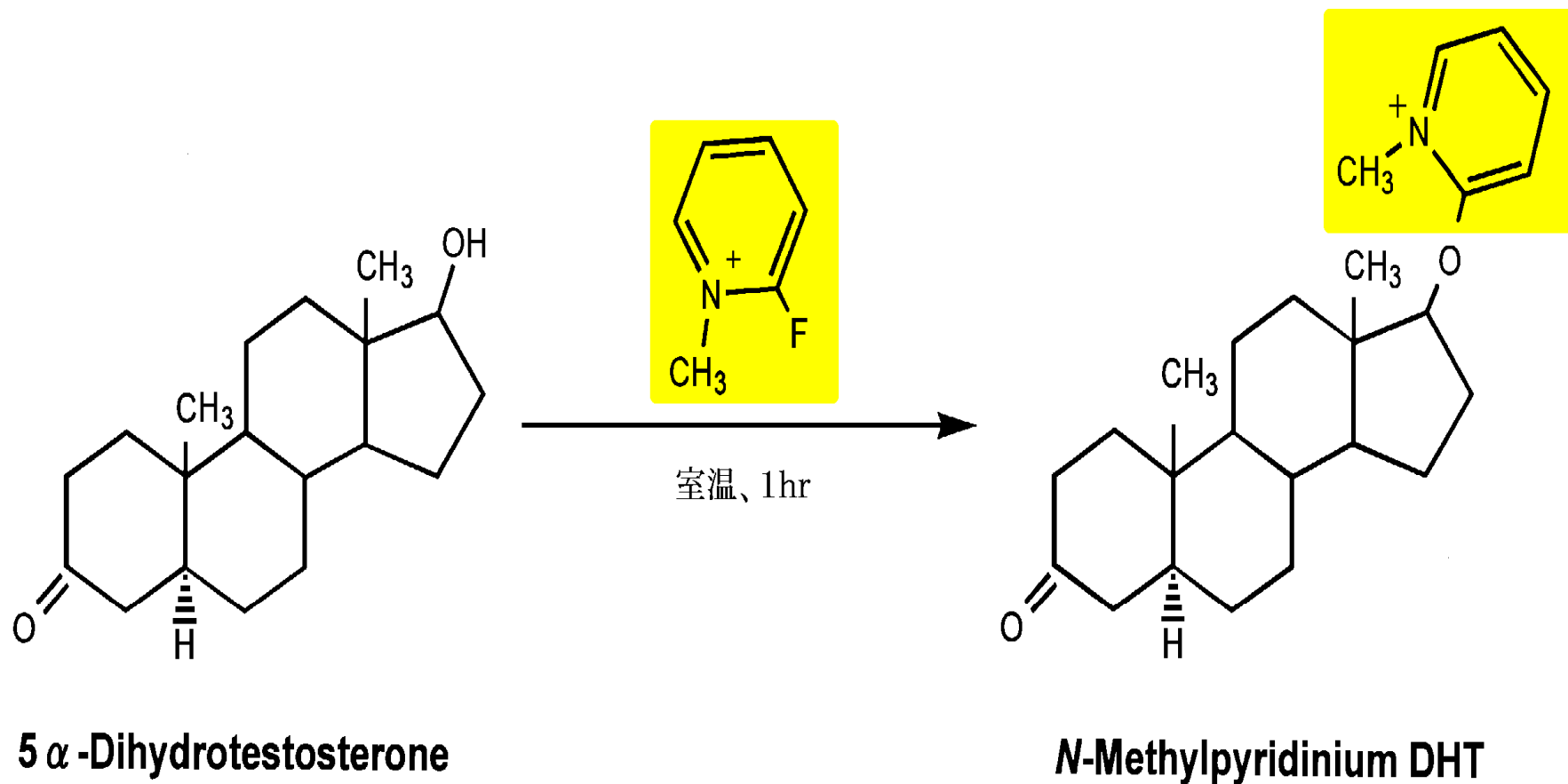
# DHT濃度

- 前立腺

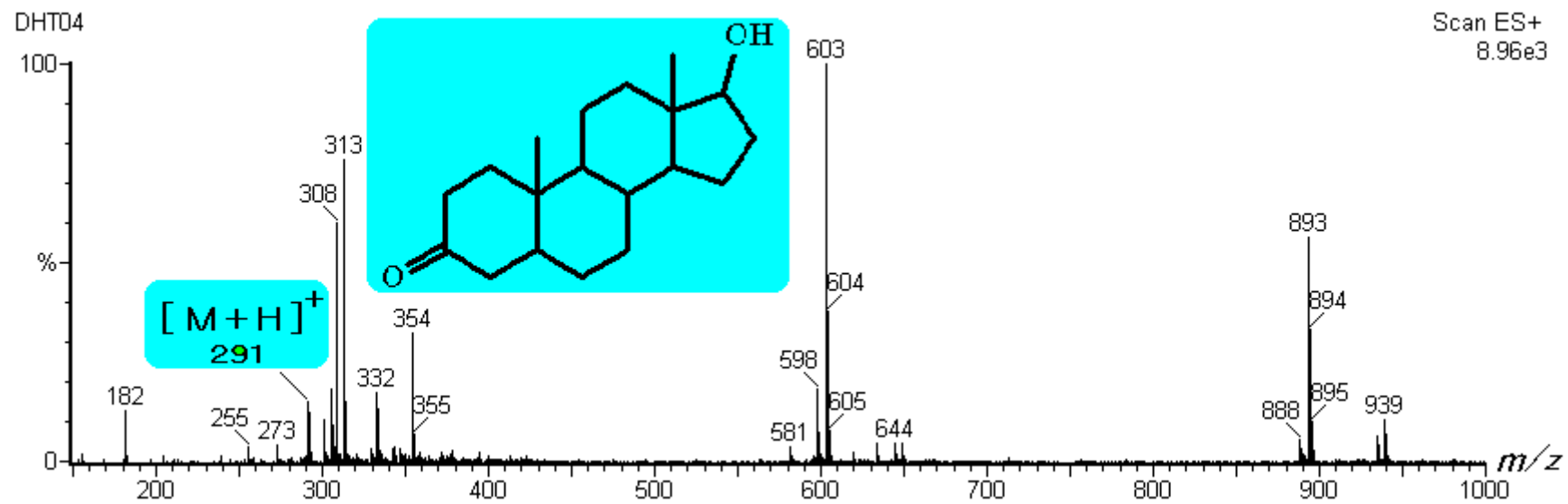
100~ 500pg/g tissue → 1~ 5pg/10 mg tissue

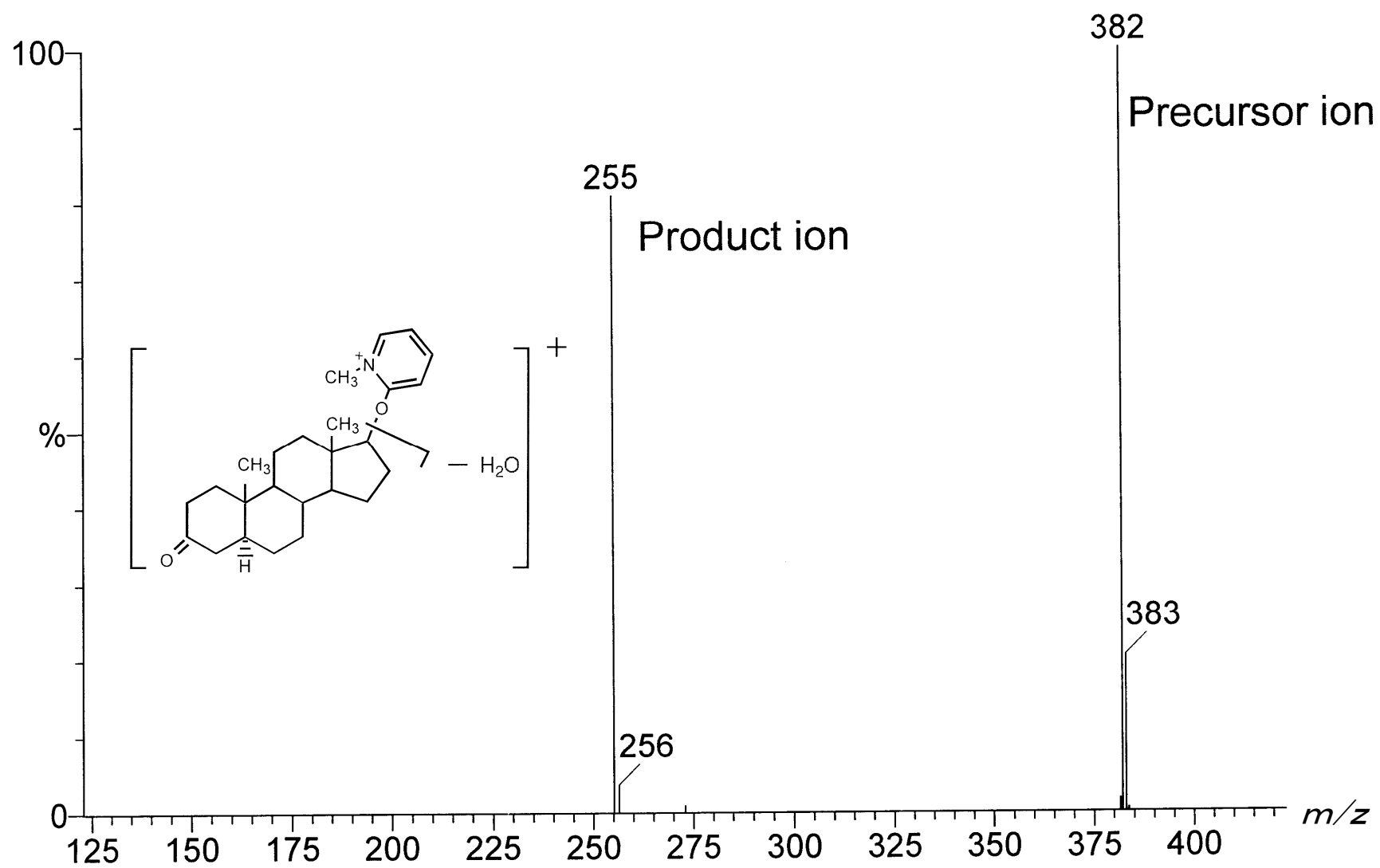
- 血液

50~ 250pg/mL plasma → 5~ 25pg/0.1mL plasma



## Polar Derivatization of DHT





ESI-MS/MS spectrum of N-methylpyridinium DHT.

# Polar Derivatization and Clean-up Procedure for DHT

Prostate or plasma

↓ extract with ethyl acetate

2-fluoro-1-methylpyridinium p-toluenesulfonate

triethylamine

↓ stand for 1hr at room temperature

Evaporate



Bond Elut C18



Wash 0.3 % ammonia solution  
water



methanol  
0.1% formic acid in 50% methanol

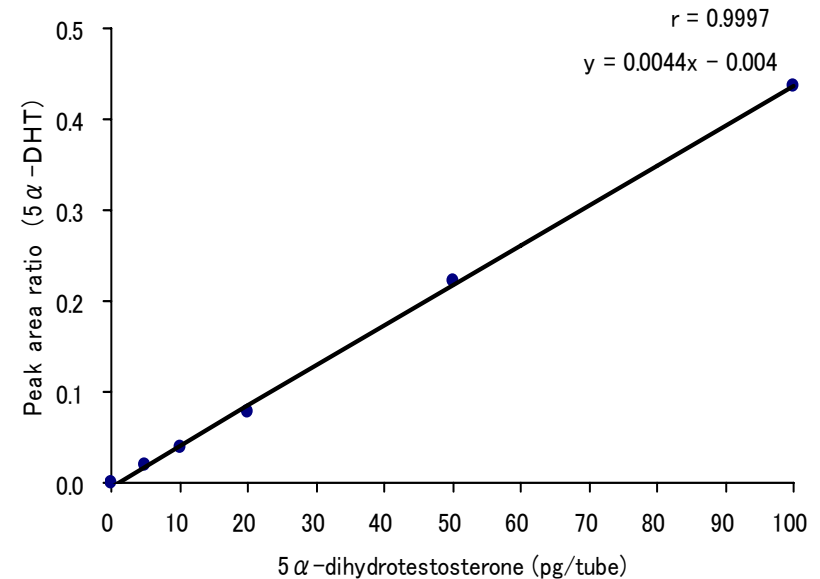
Elute

↓ 10% formic acid in methanol

Evaporate

↓ dissolve in 15% acetonitrile containing 0.05%  
formic acid

LC-MS/MS



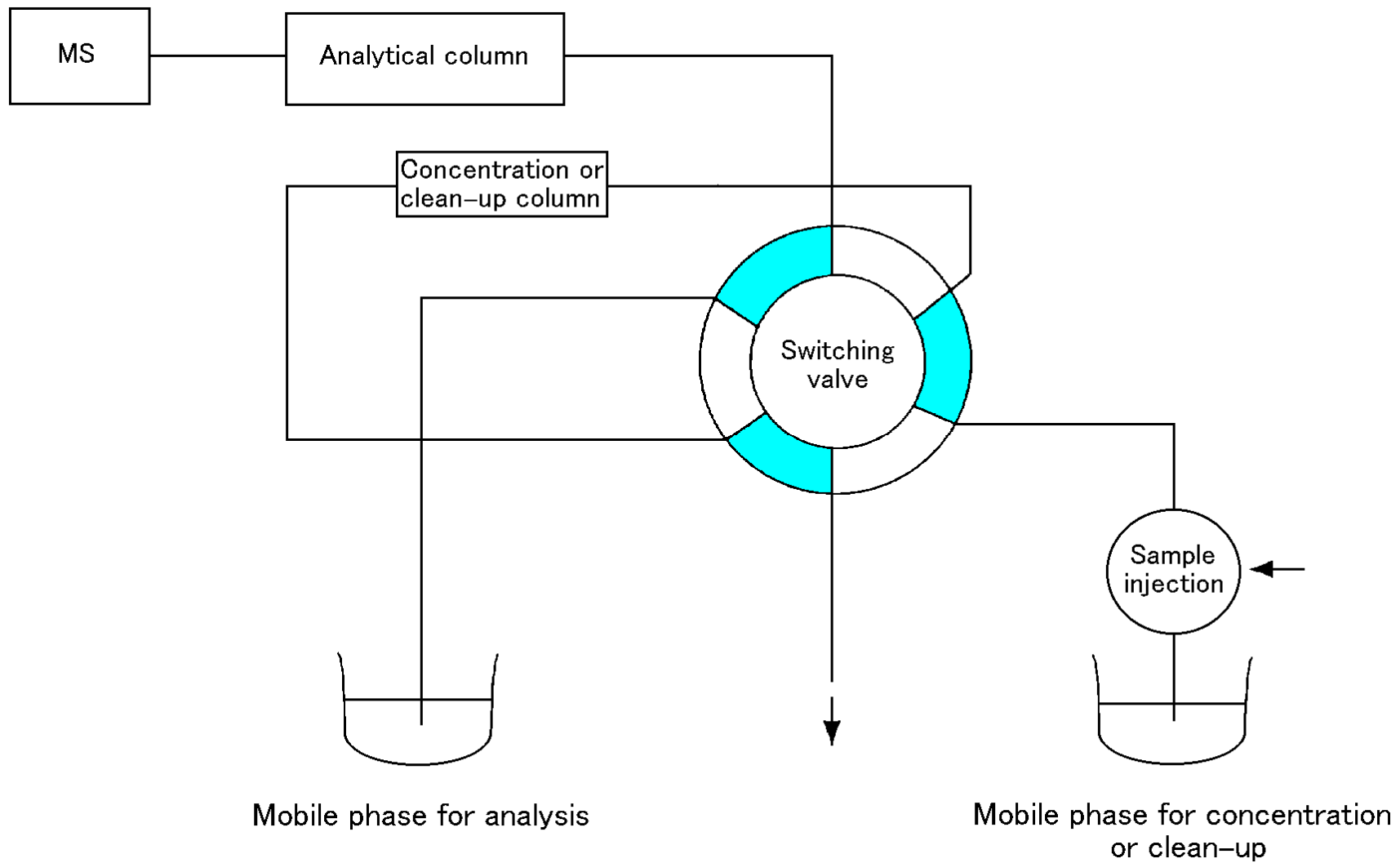
Calibration curve: 5~100 pg/tube

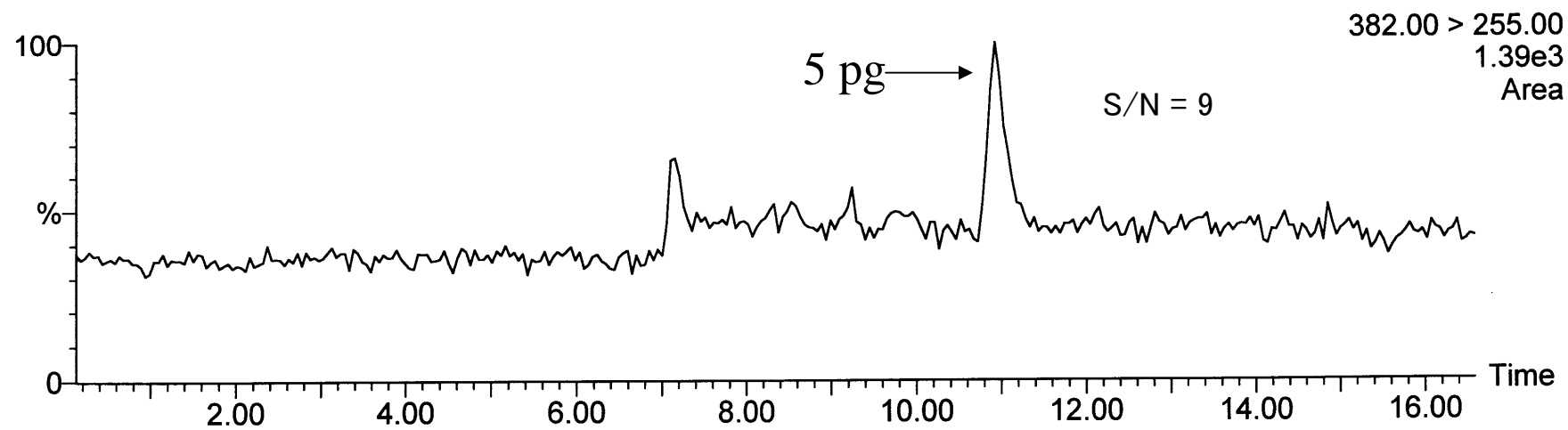
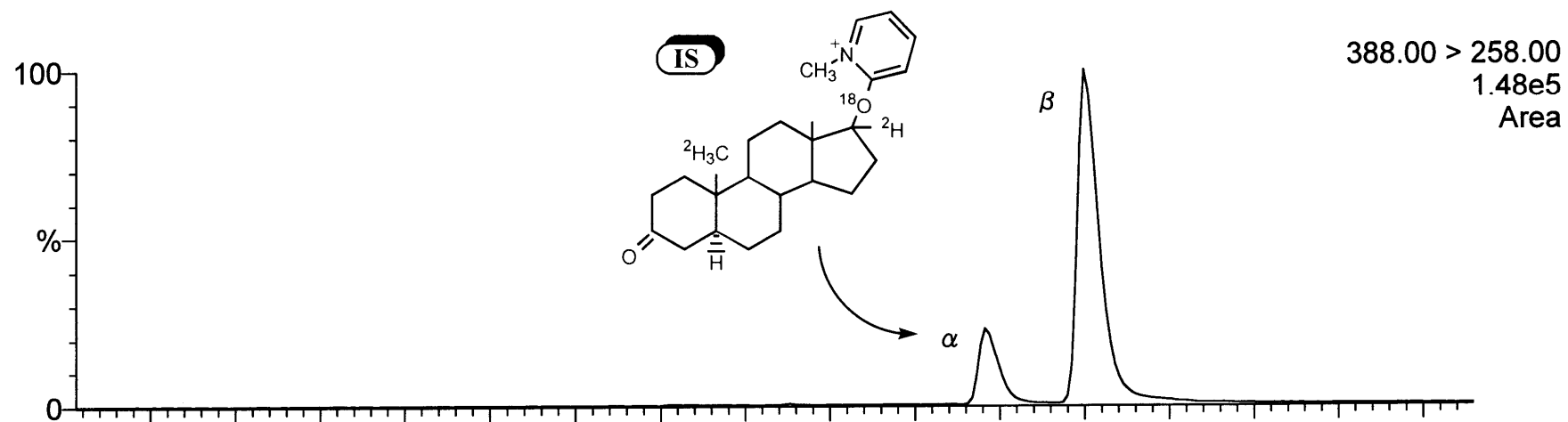
# LC/MS Conditions

- LC: Gulliver (JASCO)
- MS: Quattro II (Micromass)
- Ion Source: ESI
- Column

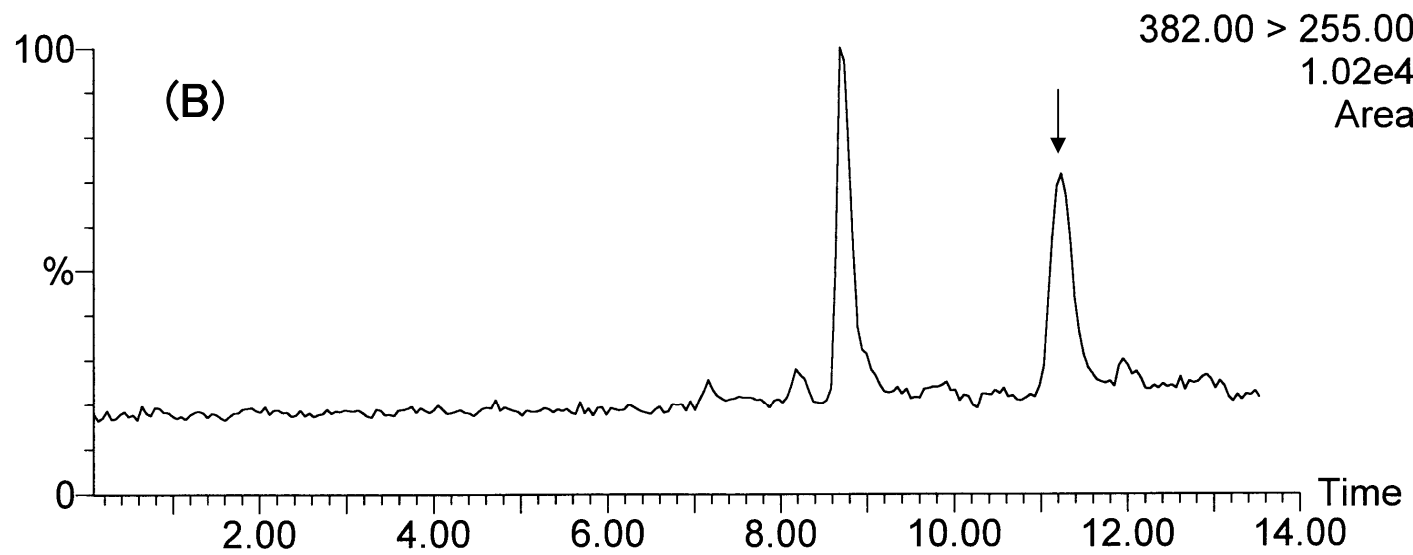
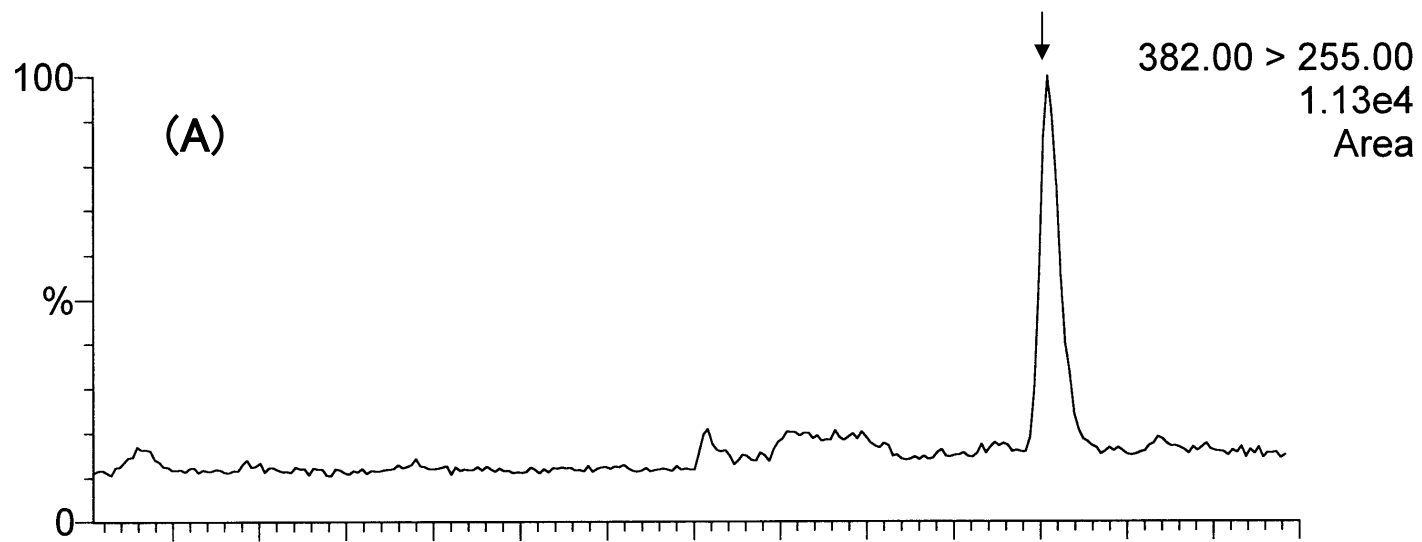
Concentration: Capcell Pak C18 (1.5 x 35 mm)

Analytical: Docosil (2 x 100 mm)



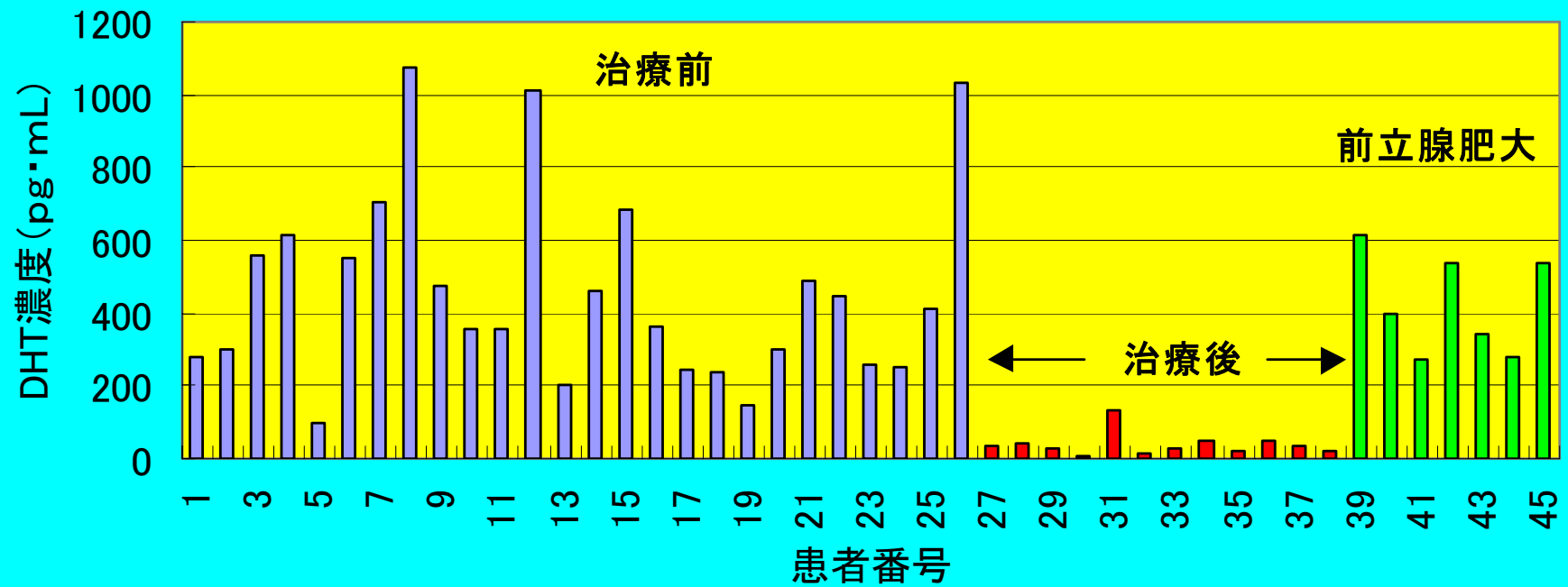


Selected reaction chromatograms of N-methylpyridinium DHT.



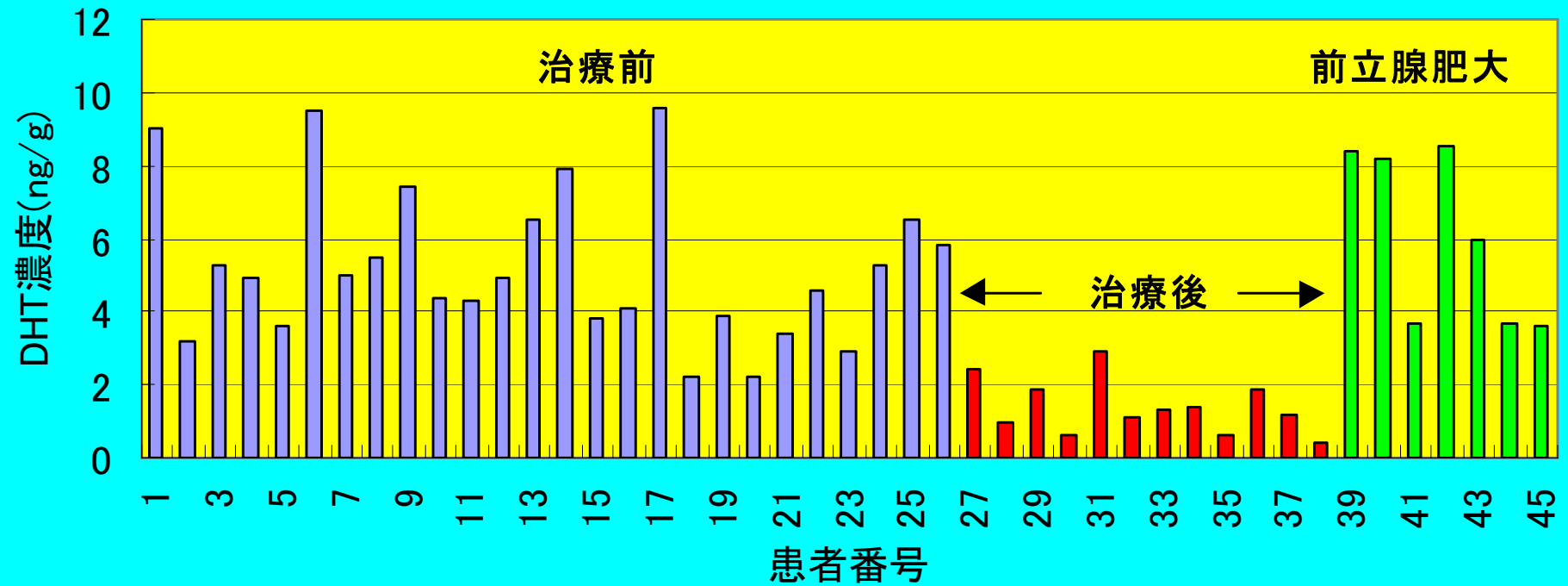
Selected reaction chromatograms of N-methylpyridinium DHT in rat prostate (A) and human plasma (B).

## ヒト血漿中DHT濃度



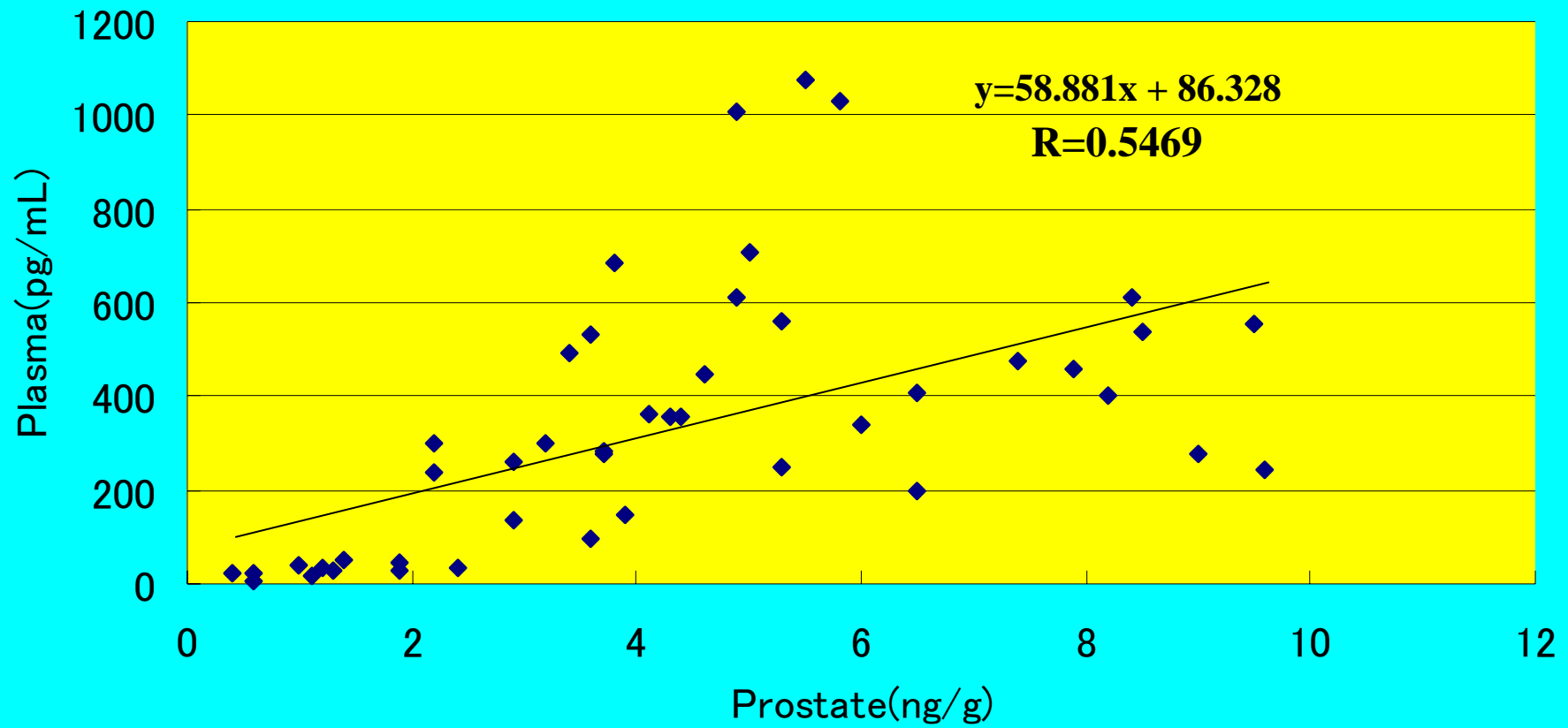
By T.Nishiyama, Y.Hashimoto, and K.Takahashi: Clin.Cancer Res. 10, 7121-7126 (2004)

## ヒト前立腺中DHT濃度

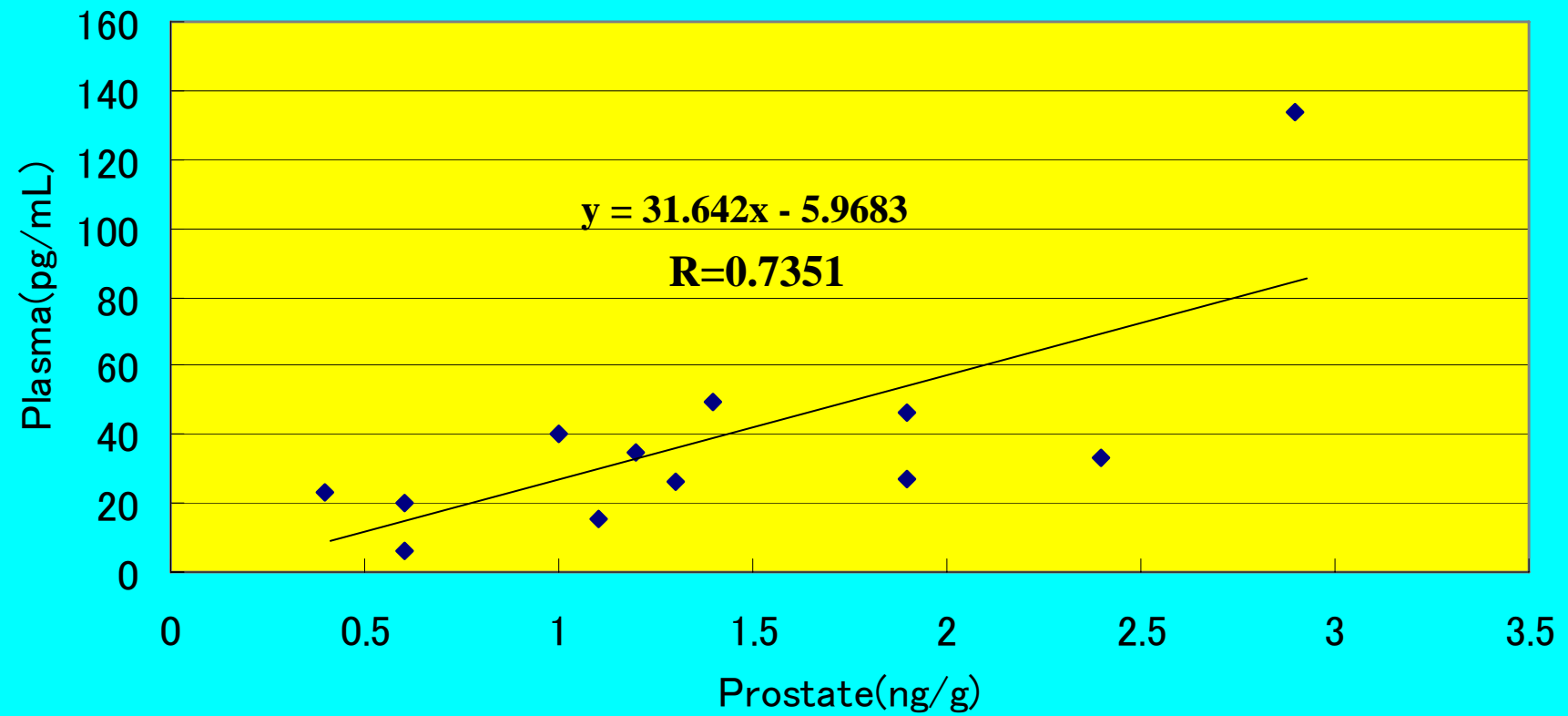


By T.Nishiyama, Y.Hashimoto, and K.Takahashi :Clin.Cancer Res.10 7121-7126 (2004)

### 血漿—前立腺中DHT濃度相關



## 治療後の血漿—前立腺中DHT濃度相関関係



## DHTのまとめ

- Pyridinium基を導入する極性誘導体化により、pgオーダーの定量が可能となった。これはImmunoassayに匹敵する感度であった。
- ヒト前立腺および血中DHT濃度は、治療により明らかに低下していた。
- 両者の相関は $R=0.7351$ とかなり高い関係を示していた。

# Mass Spectrometry 入門書

- Mass Spectrometry—Principles and Applications—  
by Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant , Wiley (1999)
- Mass Spectrometry— A Textbook—  
by Jurgen H. Gross, Springer(2004)
- これならわかるマススペクトロメトリー  
志田保夫、黒野 定、高橋利枝、笠間剛嗣、高山光男 著  
化学同人(2001年)