

親水性薬物の微量分析に対する大気圧光イオン化質量分析法の応用範囲の検討

丹羽 誠,* 河城 孝史

Applicability of Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry to Trace Analysis of Hydrophilic Drugs

Makoto NIWA,* and Takashi KAWASHIRO

Pharmaceutical Research Laboratories, Research and Development Group, Nippon Kayaku Co., Ltd., 3-31-12, Shimo, Kita-ku, Tokyo 115-8588, Japan

(Received January 27, 2009; Accepted April 28, 2009; Published online April 30, 2009)

Applicability of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry (APPI-MS) to the analysis of hydrophilic drugs was investigated. Model compounds with moderate to high hydrophilicity was tested, and most compounds showed good signal response with APPI-MS, but some compounds with high molecular polarity like folic acid derivatives, glycoside and some nucleic acid derivatives showed very weak signal responses. By observing relationship between the compounds' physicochemical properties and APPI response, compounds with higher lipophilicity and less polar surface area were considered to be advantageous for APPI-MS. To provide information for applying APPI-MS to the analysis of hydrophilic drugs, approximate lower limit of calculated octanol-water partition coefficient and the higher limit of the number of oxygen and nitrogen atoms were determined to be -0.95 and 6 , respectively. These APPI-applicable model compounds could be analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography-APPI-tandem mass spectrometry.

Key words—atmospheric pressure photoionization; mass spectrometry; lipophilicity; polar surface area

緒 言

現在、液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography/mass spectrometry; LC/MS) は血漿や血清といった生体試料中の薬物を定量する手段として重要な位置を占めている。LC/MS に用いるイオン化法としては、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) 法及び大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization; APCI) 法が用いられてきている。¹⁾ その一方、比較的最近になり大気圧光イオン化 (atmospheric pressure photoionization; APPI) 法が開発された。²⁾ APPI 法には光照射により試料を直接イオン化する direct APPI モードと、イオン化を促進するドーパントを移動相に添加する dopant-assisted APPI モードとがあり、より高感度が得られる³⁾ 後者が微量定量に用いられる。

APPI 法の特徴には、酸性物質・塩基性物質のみ

でなく、中性物質 (anthracene 等) の分析が可能である点、²⁾ 化合物に依存するが APCI 法に比較して高感度な傾向を示す点、^{2,4)} APCI 法に比較し in-source fragmentation が顕著でない点、³⁾ 移動相中の揮発性塩による ion suppression がみられない点³⁾ などが挙げられる。さらに、APPI 法におけるマトリックス効果の程度については、Marchi らによる Vitamin D₃ の測定結果⁵⁾ のように全くマトリックス効果がみられないものから、Hsieh らによる clozapine, lonafamib の測定結果³⁾ のように逆相 HPLC のポイド容量付近にある程度 ion suppression がみられるものまで程度の差があるが、この結果を含め総括的には ESI 法や APCI 法に比較してマトリックス効果は小さいとされている。^{3,6,7)}

これらの特徴から、APPI 法は生体試料中の医薬品を微量定量するための有力な技術と成り得ると思われる。現在までに APPI 法が薬物分析に有用であることの検証はなされているが、^{3,4)} 従来の報告は APCI 法の代替を企図したもの、³⁾ また APCI 法によっても分析困難な極めて低極性の化合物の分析を

指向したもの⁸⁾が多く、中-高極性薬物についての検討ははまだ少なく情報量が十分ではない。

以上のことから、マトリックス効果を受けにくい^{3,6,7)}ことをはじめとする APPI 法の様々な特徴に着眼し、親水性薬物への適用可能性を確認し、積極的な応用の一助とすることには意義があると考えられる。そこで本研究では、核酸誘導体や葉酸誘導体等の親水性薬物を含めた化合物群に対する APPI 法の分析可能性を検討し、適用範囲の特定を行うことを試みた。さらに、LC/MS として組み合わせ可能な LC 条件の探索・評価を行い、今回取り上げた化合物群に対する LC/MS 分析系としての実用性を検証した。

材料及び方法

1. APPI 法による分析が可能な化合物の実験的スクリーニング

1-1. モデル化合物及び試薬 モデル化合物として levofolinate, aminopterin, fluorouracil, flutamide, bicalutamide, acyclovir, estrone-3-sulfate (Sigma-Aldrich), gemcitabine, doxifluridine, capecitabine

(Toronto Research Chemicals), phenacetin, 3-hydroxy-2-naphtoic acid, epirubicin, uracil [和光純薬工業㈱], testosterone [東京化成工業㈱], etoposide, cevimeline [日本化薬㈱]を使用した (Fig. 1).

メタノールは HPLC 用、その他の試薬は特級品を使用した。モデル化合物の極性の範囲は $c\text{LogP}$ 値で $-2.87 \sim 3.36$ であった。

1-2. 装置 LC/MS 装置は SIL-HTc オートサンプラーを備えた LC-20A Prominence HPLC システム (島津製作所) と API-4000 型タンデム四重極質量分析計 (Applied Biosystems) を用いた。ESI/APCI イオン源は Turvo V™ イオン源を、APPI イオン源は Photospray™ イオン源を用い、ion transfer voltage は 800 V に設定した。APPI におけるドーパントは、クリプトンランプ (光子エネルギー 10.0 及び 10.6 eV) による光イオン化に適し、分析対象へのプロトン供与に適したプロトン親和性を有するものとしてトルエン (イオン化エネルギー 8.83 eV, プロトン親和性 784 kJ/mol)⁷⁾ を選択し、HPLC ポンプにより流速 0.03 ml/min で送液した。

1-3. MS/MS 分析 溶媒としてメタノール/

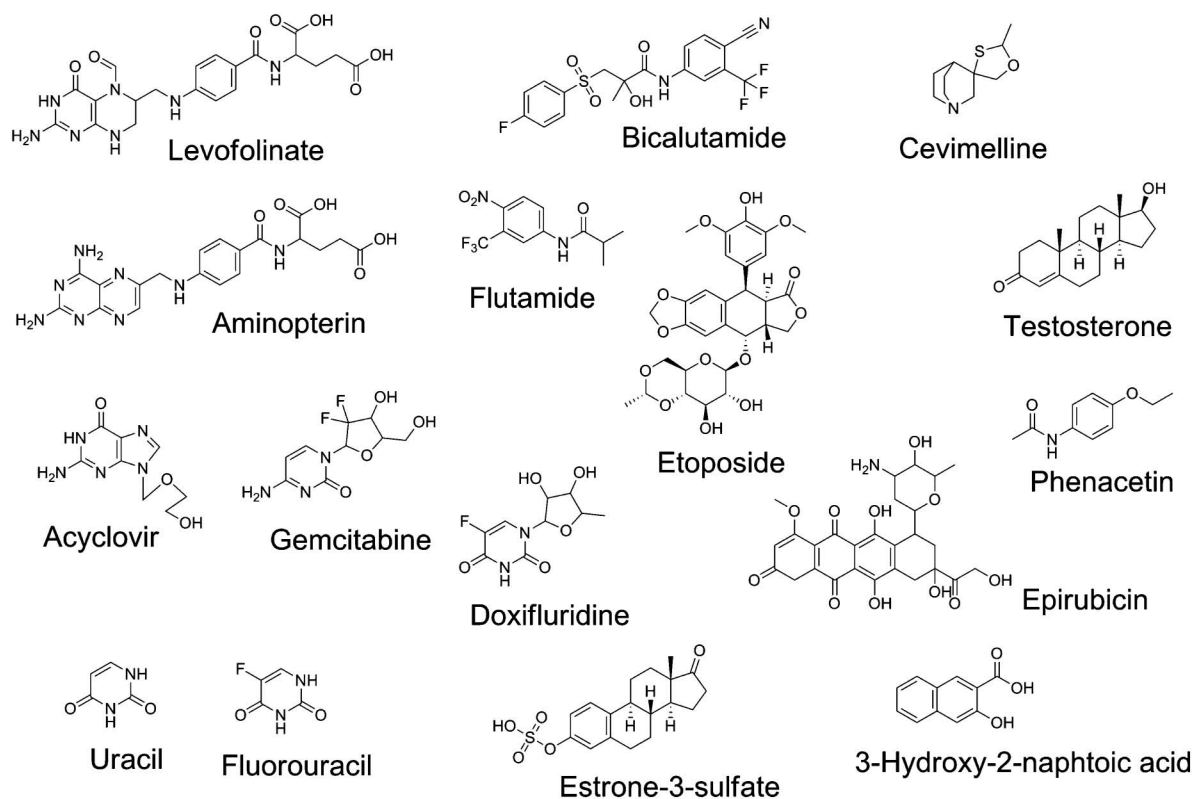


Fig. 1. Chemical Structures of the Model Compounds

水/ギ酸 (500 : 500 : 1, v/v/v) を用いるフローインジェクション分析法 [flow injection analysis (FIA), 流速 0.25 ml/min] で試料を注入, ESI/APCI/APPI 各イオン化法でスペクトル測定を行った. さらに制御ソフトウェア Analyst 1.4.1 の quantitative optimization 機能により selected ion monitoring (SIM) 及び selected reaction monitoring (SRM) 条件の最適化 (モニターイオン又はトランジションの選択, イオン源温度及びネブライザーガス流量の設定, declustering potential, collision energy 及び collision cell exit potential の設定) を行った. 最適化後の FIA における ESI, APCI 及び APPI 法の感度データ (ピーク高さ, counts per second, cps) を以後の解析に用いた.

2. 化学構造と APPI 法の適用性の関係

化学構造に由来する物理化学的性質のうち簡便に計算により求められるものを用いて MS レスポンスを予測することを目的とし, 物理化学的性質 (計算値) と MS レスポンスの関係を検討した. 脂溶性指標のオクタノール/水分配係数 (cLogP), 極性表面積 (Polar Surface Area, PSA), 分子量 (MW) 及び気液平衡指標の Henry's Law Constant を ChemBioOffice Ultra 11.0 (CambridgeSoft) で計算し, 沸点は MolWorks 2.0 (Beyond Computing Co., Inc.) で Joback 法により推定した. また, 各分子の極性領域の大きさの指標として窒素原子数及び酸素原子数を求めた. これらの物理化学的パラメータとイオン化特性の関係を検討した.

まず, 各物理化学的パラメータと絶対感度の関係について, 散布図を作成し目視的に相関性を検討した. その後, 化合物を APPI 法適用可能群と不可能群に分割し, 両群の物理化学的性質に差異があるかどうかを統計的に検討した. 統計解析ソフトには JMP 7.0.2 (SAS Institute) を用い, Wilcoxon 検定により 2 群間の差を検討した. さらに, 物理化学的性質を指標とした APPI 適用性の予測を目的とし, 受信者操作特性 (Receiver Operating Characteristic; ROC) 分析を実施して APPI 適用性の目安となる物理化学的性質の値を特定した.

3. モデル化合物の LC 挙動の確認

モデル化合物の LC 挙動を確認するとともに, LC/MS/MS 分析の実用性を確認するため, 逆相 (reversed phase; RP) HPLC を用いた LC/MS/MS

分析を実施した. MS/MS 分析条件は 1-3 項と同様とした. カラムには親水性物質の分析実績がある^{9,10} Atlantis dC18 (2 mm×100 mm length, 粒子径 3 µm) を用い, 移動相 A に 0.1% (v/v) 酢酸, 移動相 B にメタノールを用いた. 移動相の流速は 0.25 ml/min とし, B 濃度 0% で 2 分間保持した後 20%/分の割合で B 濃度を 100% まで上昇させ, 100% で 3 分間保持した.

結果及び考察

1. 実験データに基づく ESI/APCI/APPI イオン化特性の比較

1-1. 生成イオン APPI 法を使用したとき, uracil, phenacetin, testosterone, cevimeline について分子量関連イオンとして $[M+H]^+$ が, uracil, fluorouracil, flutamide, bicalutamide, 3-hydroxy-2-naphthoic acid では $[M-H]^-$ が生成した. 以上の化合物については, ESI 及び APCI 法でも同様のイオンが生成した.

APPI 法では陽イオン検出モードで $[M]^+$ が検出される可能性があると考えられるが, 今回のモデル化合物においては $[M]^+$ の生成はみられなかった. $[M]^+$ の生成は, 文献上では naphthalene, diphenyl sulfide,² triphenylene, naproxene, fenoprofen⁴) などでみられており, 構造上プロトンの付加を生じにくい化合物及びラジカルが安定化されるビフェニルまたはナフタレン構造を有する化合物に特徴的である. 今回, 陽イオン検出に適したモデル化合物には該当する構造はみられなかったため, $[M+H]^+$ が優先的に生成したものと考えられる.

1-2. APPI 法の中-高極性化合物微量分析への適用性 Levofolate, aminopterin, etoposide, estrone 3-sulfate といった葉酸誘導体, 配糖体, 抱合体では APPI 法で注入量 100 pg に対し, 明瞭な FIA ピーク (ピーク高さ 10^3 cps 以上) を得ることができなかった. 一方, ESI 法では明瞭な FIA ピークが得られた. 核酸誘導体の acyclovir についても ESI 法の感度が APPI 法の 100 倍を超えて高く, 微量分析の実用にあたり APPI 法を積極的に選択すべき感度は得られていないと考えられた. その他の化合物では APPI 法で明瞭な FIA ピークが得られた. このように葉酸誘導体, 配糖体, 抱合体, 核酸誘導体が APPI 法で不検出または低感度

となる傾向は APPI 法と APCI 法とで同様であった (Fig. 2). なお, 参考としてヌクレオチドである adenosine-5'-triphosphate も分析に供したが, ESI 法による検出は塩基性条件 [10 mmol/l アンモニア水溶液/メタノール (1:1, v/v) を溶媒に使用] のみで可能, APPI 及び APCI 法ではイオンが検出できないという結果であった.

APPI 法及び APCI 法ではイオン化に先立って試料を揮発させ気相に導く必要があることから, 葉酸誘導体, 配糖体や核酸誘導体といった揮発性の低い試料では感度を得にくいと考えられる. 一方, ESI 法では液相からのイオン蒸発を利用しイオン化を行うため, 分子状態での揮発性は分析に直接影響しない. すなわち, 中-高極性薬物については, 分子としての揮発性を物理化学的性質から推定することにより, APPI 法の積極的な使用を考慮すべきなのか ESI 法を中心に検討すべきなのかを判断できると考えられる. この考察を踏まえ, 化合物の物理化学的性質との関係について, 次節で定量的に整理を試みた.

絶対感度については多くの化合物について ESI > APPI > APCI となり, 一部の化合物 (Gemcitabine

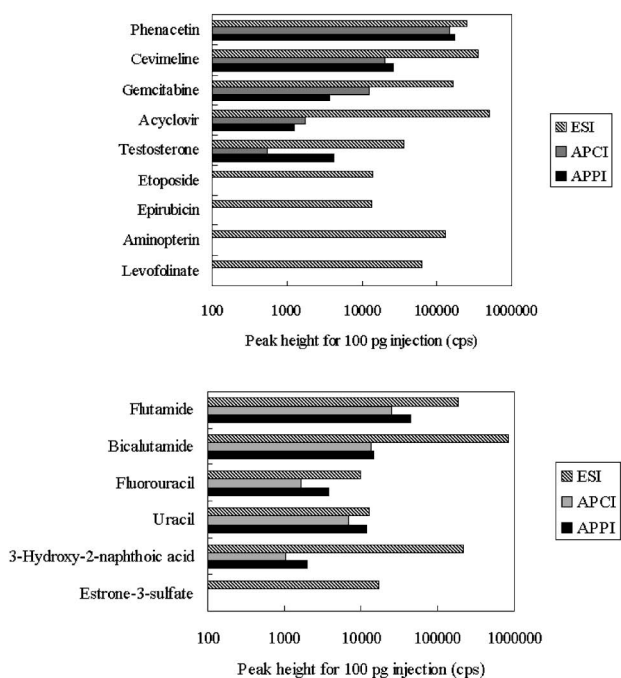


Fig. 2. Absolute Sensitivity in the Mass Spectrometric Analysis with ESI, APCI and APPI and Positive (upper) or Negative (lower) Ion Detection

Data represent the peak height (cps) in the flow injection analysis of 100 pg analyte.

及び Acyclovir) でのみ ESI > APCI > APPI となった. 今回実験に供し, APPI 法及び APCI 法でイオンが検出された化合物群に対して, 感度面では APPI 法が APCI 法に対し若干優位な傾向²⁾であった (Fig. 2).

2. 化学構造とイオン化特性との関係検討

2-1. 化学構造と各イオン化法における絶対感度

まず, 化学構造と各イオン化法における絶対感度の関係を把握することとし, 分析対象物質 100 pg 注入時における SRM 分析の絶対感度 (ピーク高さ, cps) と物理化学的性質の関係の散布図を作成した. 感度と特徴的な関係を示した N+O 原子数と cLogP の散布図を Fig. 3 に示す. これらの因子に対し, ESI 法の感度はほとんど影響されないが, APCI 法及び APPI 法の感度は N+O 原子数の増加につれて低下する傾向, cLogP 値の上昇につれて上昇する傾向を示した.

すなわち, APCI 及び APPI においては分析対象物質を気相に導く必要があることから, 今回検討したモデル化合物 (中-高極性) の範囲においては,

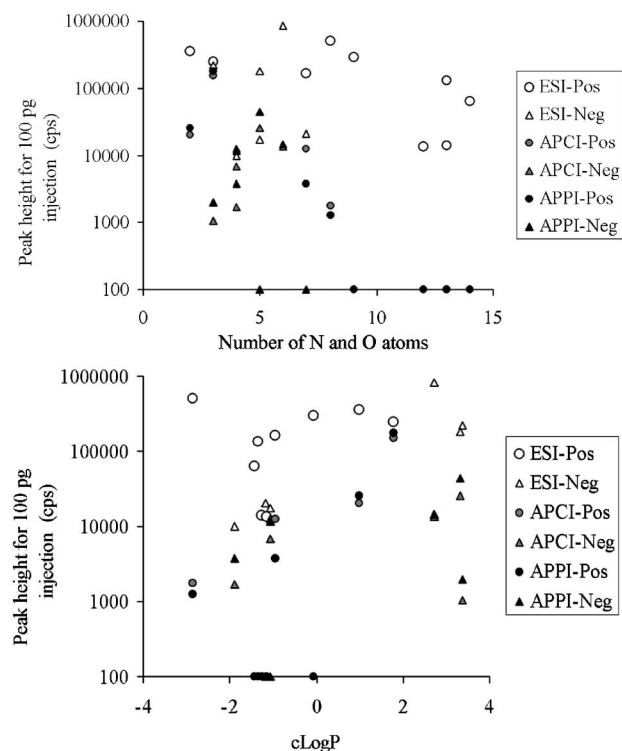


Fig. 3. Correlation of Physicochemical Properties (number of N and O atoms and cLogP) of Analyte and Absolute Sensitivity in the Mass Spectrometric Analysis

Sensitivity data represent the peak height (cps) in the flow injection analysis of 100 pg analyte.

脱溶媒の効率が感度に影響している可能性があり、極性溶媒が溶媒とする表面積としての N+O 原子数、溶媒和のされにくさを示す cLogP と特徴的な関係を示した可能性が考えられる。

2-2. 化学構造と APPI 法の適用性：実験データに基づく解析 ESI 法のみで明瞭な FIA ピークが得られた化合物群（葉酸誘導体、配糖体及び核酸誘導体の一部）とその他の化合物の相違を検討した。

すべての化合物について ESI 法におけるレスポンスは 100 pg の注入に対し 1×10^4 cps 以上であり、ESI 法で実用的な感度が得られていた。この結果を考慮し、APPI 法の利点を考慮しても、ESI 法に対する相対感度が 1/100 を下回る場合には感度面から実用上 APPI 法を積極的に適用しないものと考え、APPI 法の適用性の指標を感度比 (APPI 法/ESI 法) 1/100 以上に設定して、各化合物の構造上の特徴と APPI 法の適用性の関係を検討した。

化合物群を APPI 法の適用が可能なもの (uracil, fluorouracil, flutamide, bicalutamide, phenacetin, 3-hydroxy-2-naphtoic acid, testosterone, cevimeline, gemcitabine) と実用上困難であるもの (levofolinate, aminopterin, acyclovir, epirubicin, doxifluridine,

capecitabine, etoposide, estrone 3-sulfate) に分割し、物理化学的性質と APPI 法適用性の関係を導き出した。

まず、沸点が実分析温度より明らかに低い化合物では揮発性には問題がないと考えられるため、沸点が 300°C 以下と推算された化合物については APPI 法が適用可能であると判断するのが妥当と思われた (uracil と fluorouracil が該当した)。次いで、沸点が 300°C を超える化合物について物理化学的性質と APPI 法適用性の関係を検討した。Wilcoxon 検定により APPI 法適用可能群と不可能群の間の差異を検討したところ、N+O 原子数 ($p=0.002$)、cLogP ($p=0.001$)、logP ($p=0.010$)、PSA ($p=0.004$)、MW ($p=0.045$)、沸点 ($p=0.008$) において差異が認められた (Fig. 4)。なお、N+O 原子数と PSA は高い相関を示した ($r=0.966$) ため、分子の極性部位の大きさの指標としてはいずれかを採用することでよいと考えられ、以後の解析では、統計的に鋭敏な指標と判断された N+O 原子数を使用した。

特に両群で明瞭な差がみられた N+O 原子数または cLogP と APPI 法適用性の関係を検討し、

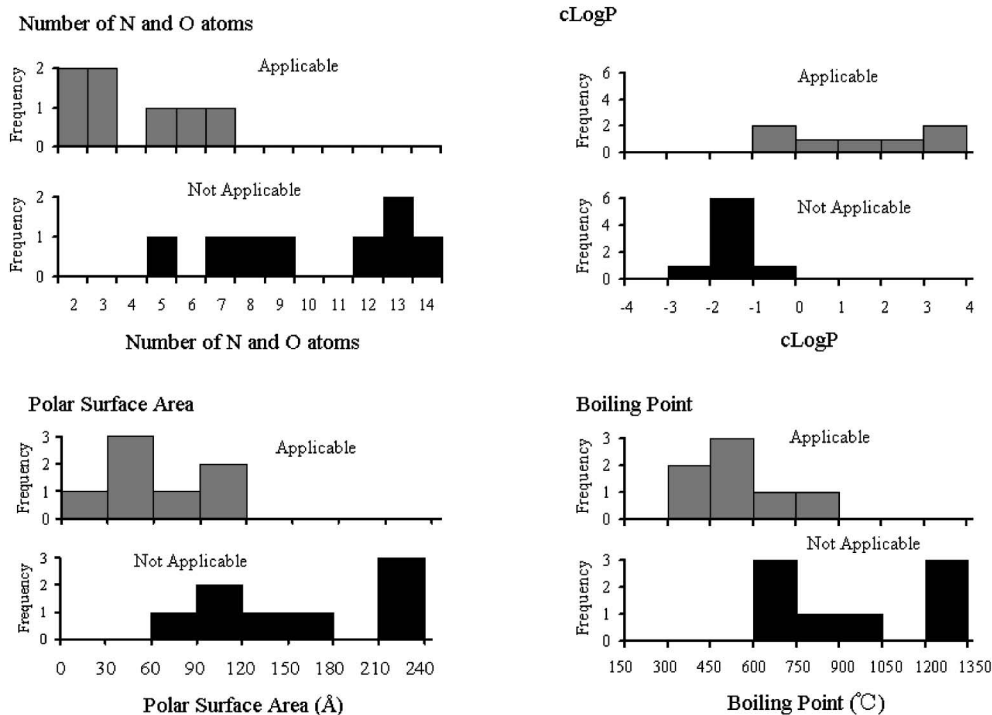


Fig. 4. Histogram of the Number of APPI-Applicable or not Applicable Compounds, Classified by the Number of N and O Atoms, cLogP, Polar Surface Area and Estimated Boiling Point

ROC 分析により APPI 適用性予測のための最適なカットオフポイントを検索したところ、N+O 原子数 ≤ 6 、 $c\text{LogP} \geq -0.95$ が APPI 適用性の目安と考えられた。なお、この目安値を用いたときにモデル化合物中で誤判定となるのは N+O 原子数について gemcitabine (N+O=7, APPI 適用可能)、estrone-3-sulfate (N+O=5, APPI 適用困難) の 2 化合物、 $c\text{LogP}$ について capecitabine ($c\text{LogP} = -0.08$, APPI 適用困難) の 1 化合物であり、N+O 原子数について 5~7、 $c\text{logP}$ について -1~0 は境界領域にあたり、APPI 法が適する化合物と適さない化合物双方が存在するものと推察される。

2-3. 化学構造と APPI 法の適用性：文献データに基づく検証 文献^{8,11-14)}的に APPI 法による微量定量のアプリケーションが存在する 9 化合物 (idoxifene, dexchlorpheniramine, omeprazole, anastrozole, omeprazole-sulfone, 5-hydroxyomeprazole, isosorbide-5-mononitrate, betamethasone, chloramphenicol) を利用し、前項の検討内容の検証を行った。

これらの化合物のうち、沸点 (300°C 以下) に基

づき APPI 法の適用が可能と推定されるグループには isosorbide-5-mononitrate が分類された。これを除いたグループについては、N+O 原子数は 2~7、 $c\text{LogP}$ は -0.90~8.76 であった。N+O 原子数については、目安値に基づき APPI 法適用可能と予測されるグループ (N+O ≤ 6) には idoxifene, dexchlorpheniramine, omeprazole, anastrozole の 4 化合物が含まれた。残る 5 化合物の N+O 原子数は 7 であり、前項で境界領域と考えた範囲に含まれた。一方、 $c\text{LogP}$ についてはすべての化合物が目安値に基づき APPI 法適用可能と予測されるグループ ($c\text{LogP} \geq -0.95$) に含まれた。

この結果から、少ないデータではあるが、目安値の設定と境界領域の存在に関する前項の考察内容は妥当であるものと判断した。

3. モデル化合物の LC 挙動の確認

実用的な LC/MS/MS 法構築の一助とする目的でモデル化合物の RP-HPLC における溶離位置を確認した。Fig. 5 にモデル化合物の RP-HPLC における溶離位置を示す。APPI 法の利用可能な化合物と困難な化合物との間で、溶離位置に差異がある傾向

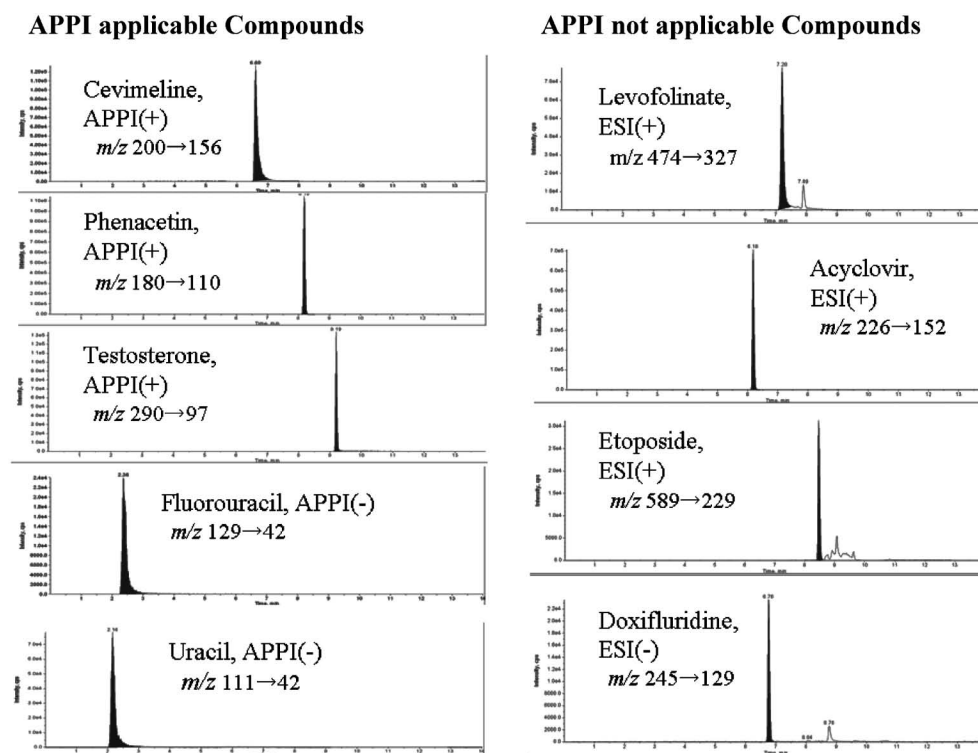


Fig. 5. Representative Chromatograms of APPI-applicable (left column, LC-APPI/MS/MS) or Not Applicable (right column, LC-ESI/MS/MS) Compounds in LC-MS/MS Analysis

The horizontal axis represents time after injection and scaled to 14 min. Injected amount for each analyte was 100 pg.

はなかった。また、すべての化合物が RP-HPLC に保持を示した。比較的保持が小さい uracil (保持時間 2.16 分, Fig. 5) 及び fluorouracil (保持時間 2.36 分) についても、同様の条件による微量分析例,^{9,10)} が報告されていることから、RP-HPLC 分析系としては妥当なものと考えられる。

以上のことから、今回のモデル化合物群について親水性物質分析用 C18 カラムを用いた逆相 LC/MS/MS 法の適用性が確認された。

結 論

APPI 法にあたっては分析対象物質を気相に導く必要があるが、水和水の除去がその障害となると推察される。水と可能な表面積の指標として窒素及び酸素原子数、水和水のされにくさの指標として cLogP を取り上げることにより、APPI 法適用性の鍵となる性質を客観的に把握することができ、APPI 法適用性の予見がある程度可能であることが明らかとなった。この情報はマトリクス効果を受けにくく、中性物質にも有用とされる APPI 法を積極的に活用し、生体試料中医薬品成分の分析を効率化していくために有益と考えられる。

REFERENCES

- 1) Masuda Y., Kanayama N., Manita S., Ohmori S., Ooie T., *J. Chromatogr. B*, **853**, 70–79 (2007).
- 2) Robb D. B., Covey T. R., Bruins A. P., *Anal. Chem.*, **79**, 3653–3659 (2000).
- 3) Hsieh Y., Merkle K., Wang G., Brisson J. M., Korfmacher W. A., *Anal. Chem.*, **75**, 3122–3127 (2003).
- 4) Cai Y., Kingery D., McConnell O., Bach A. C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1717–1724 (2005).
- 5) Marchi I., Rudaz S., Selman M., Veuthey J.-L., *J. Chromatogr. B*, **845**, 244–252 (2007).
- 6) Mei H., Hsieh Y., Nardo C., Xu X., Wang S., Ng K., Korfmacher W. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 97–103 (2003).
- 7) Robb D. B., Blades M. W., *Anal. Chim. Acta*, **627**, 34–49 (2008).
- 8) Yang C., Henion J., *J. Chromatogr. A*, **970**, 155–165 (2002).
- 9) Sparidans R. W., Bosch T. M., Jörger M., Schellens J. H., Beijnen J.H., *J. Chromatogr. B*, **839**, 45–53 (2006).
- 10) Salvador A., Millerioux L., Renou, A., *Chromatographia*, **63**, 609–615 (2006).
- 11) Mendes G. D., Hamamoto D., Ilha J., Pereira A. S., Nucci G. D., *J. Chromatogr. B*, **850**, 553–559 (2007).
- 12) Martens-Lobenhoffer J., Reiche I., Tröger U., Mönkemüller K., Malfertheiner P., Bode-Böger S. M., *J. Chromatogr. B*, **857**, 301–307 (2007).
- 13) Silva L. C., Oliveira L. S. O. B., Mendes G. D., Garcia G., Pereira A. S. P., Nucci G. D., *J. Chromatogr. B*, **832**, 302–306 (2006).
- 14) Pereira A. S., Oliveira L. S. O. B., Mendes G. D., Gabbai J. J., Nucci G. D., *J. Chromatogr. B*, **828**, 27–32 (2005).