

# ヘテロ原子を元素標識として使用した HPLC-ICP-QQQ による医薬品有効成分の 定量分析

## アプリケーションノート

医薬品

### 著者

杉山尚樹<sup>1</sup>、阿南弥寿美<sup>2</sup>、小椋康光<sup>2</sup>

1. アジレント・テクノロジー株式会社

2. 昭和薬科大学



### はじめに

医薬品開発では、新成分の発見や医薬品の特性解析から、製薬、最終医薬品の品質管理にいたるあらゆる場面で LC-MS/MS が広く利用されています。LC-MS/MS は複雑な分子に対する選択性に優れていることから、ターゲットのない定性分析および特定の化合物をターゲットとした定量分析のどちらにも有効なツールです。ただし、LC-MS/MS の感度は各化合物の分子構造に大きく左右され、サンプルに含まれる他の共存物質の影響を受けることもあります。この制限から、多くの場合、化合物固有のキャリブレーション標準を使用しないかぎり LC-MS/MS で正確な定量分析は行えません。一方、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) は、微量濃度および超微量濃度の元素を正確かつ迅速に定量できる多元素分析テクニックです。すでに無機「金属」ラボには広く導入されていますが、製薬分野においても、ヘテロ原子含有の医薬品を対象とした分析に利用されています [1, 2]。ICP-MS は、サンプルを原子レベルに分解する高温のプラズマイオン源を採用しています。この高温のプラズマにより、LC-MS/MS に比べ、マトリックスに起因するシグナル抑制がはるかに少なく、基本的に元素レスポンスが化合物の構造に左右されることもありません。また、プラズマでサンプル化合物が分解されることで、分子構造に関する情報は得られないものの、分析対象化合物中のヘテロ原子の元素レスポンスにもとづく正確な定量が可能になります。以上の利点から、ICP-MS は生物学研究現場にも定量分析手段として広く普及しつつあります [3~6]。



Agilent Technologies

ICP-MS では、ターゲット分子/タンパク質中のヘテロ原子を分析対象物の「標識」として使用することで、分子/タンパク質を間接的に検出できます。ヘテロ原子は自然にも存在し、例えば翻訳時にタンパク質に組み込まれるシステインやメチオニンといったアミノ酸は硫黄を含有しています。また、化学反応 [7] または免疫反応 [8] によってターゲット分子に金属「標識」を付加することもできます。このような標識には、一般に希土類元素 (REE) が使用されます。この REE のシグナルを測定することで、既知の元素/分子間の化学量論 (REE と分子の比) をもとにターゲット分子またはタンパク質の濃度を測定できます。元素標識の付加により得られる利点は 2 つあります。1 つは、最小の検出限界が得られる標識元素、すなわちイオン化が容易で、スペクトル干渉を受けない元素を選択できることです。生物マトリックスにはほとんど存在しない金 (Au) や REE を使用するのが一般的です。もう 1 つの利点は、金属標識を付加するために使用する反応プロセス自体によって、ICP-MS の測定では本来得られない優れた化合物選択性をもたらされることです。例えば、免疫反応を使用する場合、分析対象分子 (低分子またはタンパク質) のみに選択的に標識を付加し、ターゲットタンパク質のみを検出することが可能です。このように元素標識の付加と ICP-MS による分析を組み合わせることで、有機化合物を優れた感度と選択性で検出および定量するテクニックとして役立てることができます。

ターゲット分子にもともとヘテロ原子が含まれている場合は、その原子を用いて、ICP-MS で分子の濃度を間接的に定量できます。例えば、多くの医薬品有効成分 (API) には、硫黄 (S)、リン (P)、またはハロゲンが含まれています。この場合は元素標識による誘導体化が不要なため、絶対定量が可能です。誘導体化後の回収率を気にする必要もありません。ただし、残念ながら S、P、およびハロゲンの第一イオン化ポテンシャルは高いため、ICP-MS のプラズマでの低いイオン化率が低感度につながります。また、S、P、および塩素 (Cl) はスペクトル干渉を強く受けるため、従来の四重極 ICP-MS (ICP-QMS) では測定が困難です。これらの制限から、ICP-QMS を用いて医薬品分子に関連する分析範囲で S、P、およびハロゲンを正確に分析するのはほぼ不可能です。このスペクトル干渉の問題は、最近発表されたトリプル四重極 ICP-MS (ICP-QQQ) テクニックを MS/MS リアクションセルモードで動作させることにより解決できます。スペクトル干渉を排除することで、従来の ICP-QMS より格段に低濃度 (生物体に存在する濃度) の S、P、および Cl を定量することができます。

今回紹介する研究では、ヘテロ原子 S、P、または Cl を含む分子/タンパク質の測定について調査し、ICP-QQQ によって分析結果が大幅に改善されることを確認しました。実験では、5 種類の API とモノクローナル抗体 (mAb) を ICP-QQQ で分析しました。ターゲット化合物には、低分子 ( $m = 250 \sim 320$  Da) および高分子 ( $m = 146$  kDa の mAb) を使用しました。

## 実験方法

### 使用機器

クォータナリポンプ (G5611A) およびオートサンプラ (G5667A) を搭載した Agilent 1260 Infinity バイオイナート HPLC システムを Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS (G3663A, #100) に接続しました。実験中は、常に HPLC の流量を 0.4 mL/min、注入量を 20  $\mu$ L としました。カラムとして、低分子の分析には Agilent ZORBAX plus C18, 2.1 x 100 mm, 3.5  $\mu$ m (アジレント部品番号 959793-902)、mAb の分析には Agilent Bio SEC-3 300 Å, 4.6 x 150 mm, 3  $\mu$ m (アジレント部品番号 5190-2514) を使用しました。各ターゲット分子の同定は、それぞれのリテンションタイムにもとづいて行いました。各メソッドに用いた HPLC 移動相の組成と分離条件については、「結果と考察」の該当セクションに示します。

HPLC カラムの出口を、オンライン内標準 (ISTD) 添加用の混合 T 字コネクタのポートの 1 つに接続しました。ISTD 溶液は、ICP-QQQ に搭載されているペリスタルティックポンプで移送し、T 字コネクタでカラムからの溶出液と混合しました。チューニング用の ISTD として 50  $\mu$ g/L の Co および Y を導入しました。ISTD は、機器のドリフトをモニタリングする目的でも使用しました。ただし、実験を通してシグナルが常に安定していたため、ドリフト補正は必要ありませんでした。Cl 含有医薬品の分析時には、より確実にウォッシュアウトを行うために、ISTD ラインで 20 % NH<sub>3</sub> 水を導入しました。

すべての測定は、X レンズ、標準のペルチエ冷却式ダブルパス スコット型スプレーチャンバ、ガラス同軸ネブライザ、および白金製インタフェースコーンを搭載した Agilent 8800 ICP-QQQ で実行しました。mAb の分析には、標準の内径 (ID) 2.5 mm インジェクタ付き一体型石英製トーチを使用し、LC 分離に有機移動相を必要とする低分子の分析には、1.5 mm インジェクタ付きトーチを使用しました。また、有機溶媒移動相の導入によるインタフェースコーンへの炭素の蓄積を防ぐために、アルゴンに 20 % の酸素を混合したガスをオプションのガスラインで導入しました。

## 最適化

ICP-QQQ でのマスシフトメソッドによる S および P の測定 (S 含有 API、P 含有 API、および mAb の分析) には、セルガスとして O<sub>2</sub> を使用しました。また、このメソッドによる Cl の測定 (Cl 含有 API の分析) には、セルガスとして H<sub>2</sub> を使用しました。機器の最適化は、それぞれの移動相を導入しながら ISTD 元素のシグナルにもとづいて行いました。最適化後のチューニングパラメータを表 1 にまとめます。

表 1: Agilent 8800 ICP-QQQ のチューニングパラメータ

パラメータ	単位	mAb	スルホン アミド	ゾレドロン酸	クロニジン
RF 出力	W	1600			
サンプリング 深さ	mm	8.0			
キャリアガス 流量	L/min	0.9	0.6		
メイクアップ ガス流量	L/min	0.25	0.0		
オプションガス 流量 (20 % O <sub>2</sub> )	L/min	0.0	0.2		
オクタポール バイアス	V	-4.0			
KED	V	-8.0			
セルガス流量	mL/min	O <sub>2</sub> = 0.3			H <sub>2</sub> = 3.0
ヘテロ原子		硫黄	リン	塩素	
質量ペア (Q1, Q2)		(32, 48)	(31, 47)	(35, 37)	

## 試薬

HPLC グレードのメタノールは、関東化学株式会社 (東京、日本) から購入しました。アセトニトリル、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、ギ酸、テトラブチルアンモニウムブロミド、および酢酸は、和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入しました。スルファメチゾール、スルファメタジン、スルファメトキサゾール、ゾレドロン酸水和物、および塩酸クロニジンは、Sigma Aldrich 社 (ミズーリ州セントルイス、米国) から購入しました。半導体グレードの NH<sub>3</sub> 水は、多摩化学工業株式会社 (神奈川、日本) から購入しました。モノクローナル抗体 (IgG2a) は、アジレント・テクノロジー株式会社 (アジレント部品番号 200473) から入手しました。

## 結果と考察

### MS/MS リアクションモードでの S、P、Cl の分析

Agilent 8800 ICP-QQQ の MS/MS モードで S、P、または Cl を含む API を測定しました。前述のとおり、これらの元素は容易にはイオン化されず、除去困難な多原子の干渉を強く受けるため、低濃度で存在する場合は ICP-QMS で分析することはほぼ不可能です。MS/MS 機能を備えた Agilent 8800 ICP-QQQ は、マスシフト [9] によって分析対象イオンの質量を選択的に変化させ、各元素に対する強いスペクトル干渉を排除します。マスシフトモードでは、分析対象イオンは、オクタポールリアクションシステム (ORS<sup>3</sup>) セルでのセルガスとのイオン分子反応によりプロダクトイオンになります。プロダクトイオンは、反応前の分析対象イオンとは異なる質量を持つため (例えば、0 原子付加反応の場合は 16 amu だけ質量が増加)、元のイオンに対する干渉を受けずに検出できます。MS/MS モードでは、新たなプロダクトイオンと同じ質量を持つ他の既存イオンやセルでの生成イオンが分析対象物にオーバーラップする可能性を排除することもできます。最初の四重極マスフィルタ (Q1) で分析対象物のプリカーサイオンのみが厳選されるためです。その他のイオンはすべて除去され、ORS に進入することはありません。これにより、多様なサンプルマトリックスと高い反応性を持つセルガスを使用しても、結果の一貫性が保たれます。これは、ICP-QMS のリアクションモードでは得られない 8800 ICP-QQQ の大きな利点です。

図 1 に、MS/MS マスシフトモードで O<sub>2</sub> セルガスを使用して S を測定する仕組みを示します。マスシフトモードで使用するリアクションガスには、分析対象物と選択的に反応し、干渉イオンとは反応しないものを選択します (オンマスモードでの測定では、分析対象物とは反応せず、干渉イオンとのみ反応するリアクションガスを選択します)。O<sub>2</sub> セルガスを使用した S の測定では、最初の四重極マスフィルタ (Q1) を分析対象物のプリカーサイオンの質量 (この場合は、S<sup>+</sup> の質量である m/z 32) に設定します。MS/MS モードでは、Q1 は本来のマスフィルタ (質量分離能は 1 amu) として機能し、分析対象物と、分析対象物と同じ質量を持つ干渉多原子イオンのみを ORS<sup>3</sup> セルに進入させて O<sub>2</sub> セルガスと反応させることができます。2 番目の四重極マスフィルタ Q2 は、分析対象元素/同位体のプロダクト (酸化物) イオンの質量 (この場合は、<sup>32</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup> の質量である m/z 48) に設定します。セルガスと反応せず質量が m/z 32 のまま変化しない干渉イオン (<sup>16</sup>O<sub>2</sub><sup>+</sup> や <sup>14</sup>N<sup>16</sup>O<sub>2</sub><sup>+</sup> など) は、ここですべて除去されます。P についても、同様に O<sub>2</sub> セルガスを用いてマスシフトモードで (m/z 47 の <sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sup>+</sup> として) 測定します。Cl については、マスシフトモードで H<sub>2</sub> セルガスを使用して分析します。この場合、Cl<sup>+</sup> (m/z 35) は H<sub>2</sub> セルガスと反応して ClH<sub>2</sub><sup>+</sup> (m/z 37) になります。

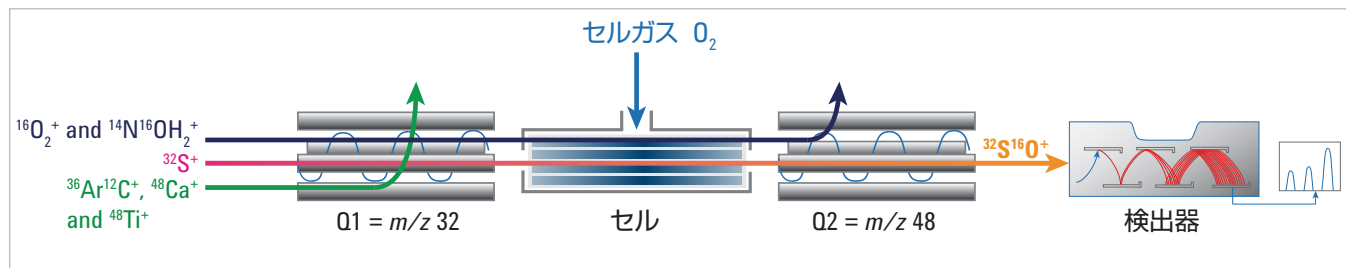


図 1. ICP-QQQ の MS/MS マスシフトモードで O<sub>2</sub> セルガスを使用した <sup>32</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup> としての S の測定

## 硫黄含有 API

スルホンアミドは、細菌の DNA 合成に必要な葉酸塩の合成を阻害することから、細菌感染症の治療で抗菌薬として広く使用されています。スルファメチゾール、スルファメタジン、およびスルファメトキサゾールの 3 種類のスルホンアミド API をメタノールまたはメタノール水溶液に別々に溶解しました。各サンプルをろ過し、0.1 % ギ酸を添加した 13 % アセトニトリルの LC 移動相で希釈しました。その後、HPLC に注入し、イソクラティック分離法により分析しました。各 API サンプルのクロマトグラムの重ね表示を図 2 に示します。計算により求めたスルファメチゾールのメソッド検出限界 (MDL) は 23 nM (化合物換算で 6.3 ppb、S 換算で 1.5 ppb) でした。

モノクローナル抗体 (mAb) を用いた生物学的療法は、癌および関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療に主に使用されている免疫療法の一つで、新たな治療法として非常に大きな効果が期待されています [10]。これは、mAb を利用して特定の抗原 (異常細胞) や細胞分裂などの細胞プロセスを攻撃するターゲット療法です。

抗体は約 1 % の硫黄を含む糖タンパク質であるため、ICP-QQQ での硫黄測定による定量ターゲットとして非常に適しています。アジレントから入手した mAb (IgG2a) は、超純水 (UPW) で希釈し、HPLC に注入しました。イソクラティック移動相には、pH 7.0 に調整した 50 mM リン酸緩衝液を使用しました。図 3 は、2 種類の濃度の IgG2a で得られたクロマトグラムの重ね表示です。計算により求めた MDL は、化合物換算で 14 nM (40 ng) でした。

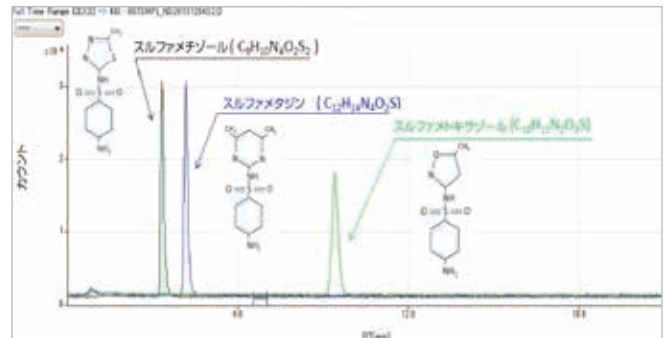


図 2. 3 種類の硫黄含有 API のクロマトグラムの重ね表示。S の注入濃度はすべて 100 ppb です。

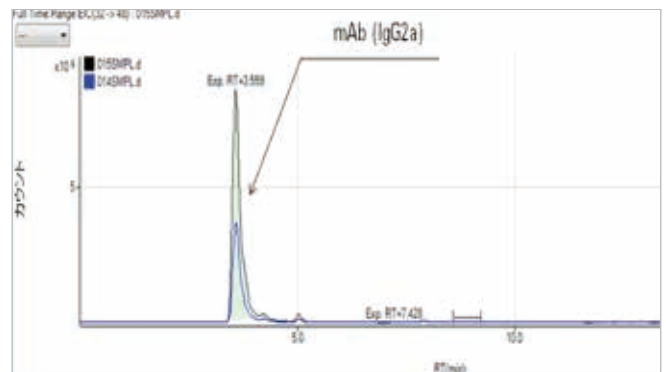


図 3. HPLC-ICP-QQQ で得られた 0.5 mg/mL および 1.0 mg/mL mAb (IgG2a) のクロマトグラムの重ね表示



## リン含有 API

ゾメタ<sup>®</sup>は、高カルシウム血症（血中カルシウムが高濃度）の治療に使用される市販薬です。破骨細胞骨吸収の阻害剤および破骨細胞アポトーシスの誘発剤として作用するゾレドロン酸一水和物 ( $C_5H_{10}N_2O_7P_2 \cdot H_2O$ ) を含有しています。市販の 5 mL バイアル入りゾメタ<sup>®</sup> (4.264 mg の API を含有) を LC 移動相で 2000 倍に希釈して、API の最終濃度が 426.4  $\mu\text{g/L}$  になるように調整しました。イソクラティック移動相には、A (6 mM テトラブチルアンモニウムブロミドおよび 5 mM 酢酸を  $\text{NH}_3$  水で pH 6.5 に調整) と B (95 %  $\text{MeOH}$ ) の 70:30 混合物を使用しました。ゾレドロン酸一水和物標準を用いて検量線を作成し、この検量線に P のレスポンスを照合することでサンプル中の API を定量しました。m/z 47 の  $\text{PO}^+$  として測定した P の検量線と、ゾメタ<sup>®</sup> サンプルで測定したゾレドロン酸一水和物のサンプルクロマトグラムを図 4 に示します。

これらの分析の結果、サンプル中の API の濃度は 433 ng/mL でした。回収率は 102 % です。また、計算により求めた医薬品化合物の MDL は 25 nM (144 pg、化合物換算で 7.2 ppb、P 換算で 1.5 ppb) でした。

## 塩素含有 API

カタプレス<sup>®</sup>は、高血圧症の治療に使用される市販薬です。脳内でノルアドレナリンを抑制し、血圧を下げる作用のある塩酸クロニジン ( $C_9H_9Cl_2N_3 \cdot \text{HCl}$ ) を含有しています。カタプレス<sup>®</sup>錠 (75  $\mu\text{g}$  の API を含有) を 50 mL の水に溶解し、60 分間超音波洗浄器にかけました。その後、この水溶液をろ過し、HPLC-ICP-QQQ で分析しました。塩酸クロニジン標準を分析して検量線を作成し、サンプル中の API を検量線法で定量しました。0.1 % ギ酸を添加した 20 % アセトニトリルを  $\text{NH}_3$  水で pH 7.0 に調整した移動相を使用し、イソクラティック HPLC メソッドにて測定しました。m/z 37 の  $^{35}\text{ClH}_2^+$  として測定した Cl の検量線と、カタプレス<sup>®</sup> サンプルで測定した塩酸クロニジンのサンプルクロマトグラムを図 5 に示します。これらの分析の結果、サンプル中の API の濃度は 1444 ppb でした。回収率は 96 % です。また、この化合物の MDL は 146 nM (780 pg、化合物換算で 39 ppb、Cl 換算で 15 ppb) でした。

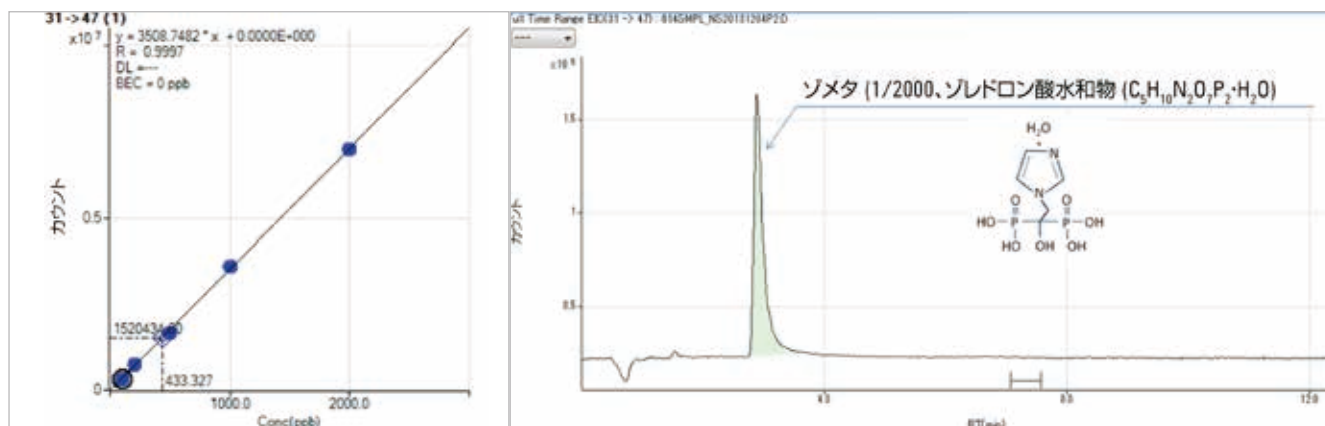


図 4. (左) P ( $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^-$ ) の検量線。(右) ゾメタ<sup>®</sup> サンプル中のゾレドロン酸一水和物 ( $C_5H_{10}N_2O_7P_2 \cdot H_2O$ ) のクロマトグラム。

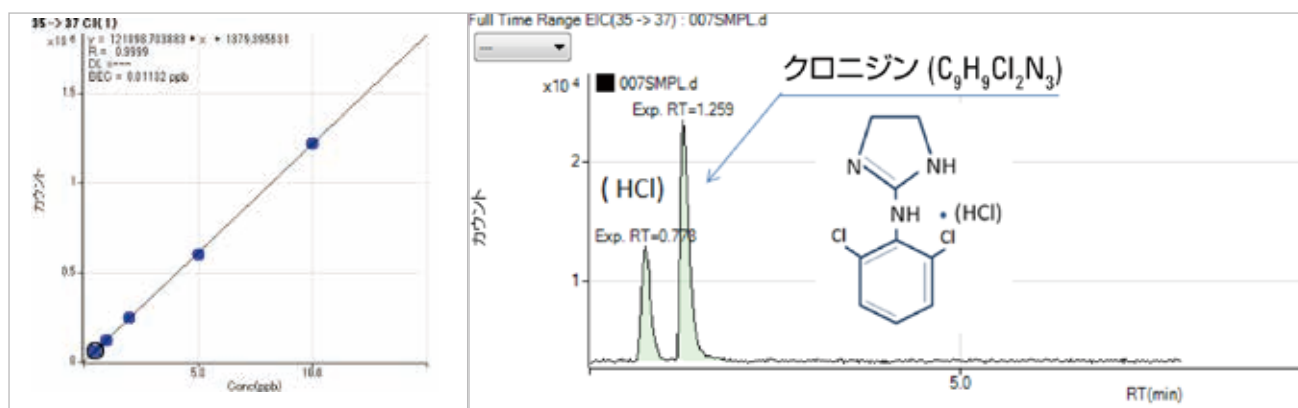


図 5. (左)  $\text{Cl} (^{35}\text{ClH}_2^+)$  の検量線。(右) カタプレス®中の塩酸クロニジン ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ ) のクロマトグラム。

## 結論

MS/MS モードで動作する Agilent 8800 ICP-QQQ の高度な機能を利用することで、ヘテロ原子 S、P、および Cl の測定をもとに API および mAb を分析することができました。これは、通常であれば分子 MS テクニックを用いて実行する分析です。今回紹介した予備研究は、医薬品開発および製薬後の QA/QC 管理における HPLC-ICP-QQQ 活用の可能性を示すことを目的としています。

ICP-QQQ の優れた検出下限性能をさらに探求する調査は現在も進行中です。ヘテロ原子を使用することで、ICP-QQQ は、従来の金属分析だけでなく、金属標識生体分子の測定などバイオ分析および医薬品業界においても有効な分析ツールとして必ず役立ちます。

## 参考文献

1. D. Esteban-Fernandez et al., J. Anal. At. Spectrom., 2007, 22, 1113.
2. A. K. Bytze et al., Metallomics, 2011, 3, 1049
3. D. Esteban-Fernandez, C. Scheler and M W. Linscheid, Anal. Bioanal Chem, 2011, 401, p657–666
4. A. Prange and D. Pröfrock, J. Anal. At. Spectrom., 2008, 23, p432–459
5. A. Sanz-Medel, Anal. Bioanal Chem., 2008, 391, p885–894
6. Q. He, Z. Zhu, L. Jin, L. Peng, W. Guo and S. Hu, J. Anal. At. Spectrom., 2014, recent articles as of July 1, 2014
7. D. Iwahata, K. Nakamura, R. Yamada, H. Miyano and N. Yamada, Journal of Anal. Science, Methods and Instrumentation, 2013, 3, p80–89
8. V. I. Baranov, Z. Quinn, D. R. Bandura and S. D. Tanner., Anal. Chem, 2002, 74, p1629–2636
9. 杉山尚樹、中野かずみ、「Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS による  $\text{O}_2$ 、 $\text{NH}_3$ 、 $\text{H}_2$  ガスを用いた 70 元素の反応データ」、アジレントテクニカルノート、2014 年、5991-4585JAJP
10. Wending D et al, The Journal of Rheumatology, 1993, 20(2), p259–262

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的  
または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2015

Published February 1, 2015  
5991-5445JAJP