

オフライン高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 による難揮発性化合物の分析*

岩渕 晴男, 長 島 潜, 中村 皖一®*

(1987 年 9 月 25 日受理)

極性に富み, かつ難揮発性の薬物 (シスプラチン, PGE_2) 及び代謝物 (ビタミン K_3 由来) を分析対象に選び, オフライン LC/MS 測定を試みた. 逆相 HPLC で分離し, 低容量の高圧切り換えバルブを介してあらかじめ水で置換しておいた逆相ミニカラムへ目的ピークのみを分取した. カラム内溶媒を真空下で除去した後, 少量のアセトニトリルで溶出させ, 改造したサンプルホルダーにより SIMS 測定を行った. 又, 逆相マイクロ LC からの溶出ピーク (PGE_2) についてはマイクロシリンジ内に分取し, 電界脱離 MS 測定を試み, いずれにおいても満足できるスペクトルが得られた. 本法は大掛かりな装置を必要とせず, オンライン LC/MS 測定で問題にされている妨害物質も除去できる 効率の良い分析法であることを認めた.

1 緒 言

SIMS は難揮発性化合物のソフトイオン化法として, 高速原子衝撃法 (FAB) と並び MS において繁用されている. 著者らは TLC のプレートからの直接 SIMS 測定を行う TLC/SIMS 法^{1)~4)} を試み, 薬物代謝研究において有用な分析法であることを認めた. しかし, シリカゲル担体への吸着が強く, マトリックス (通常グリセリン) への溶解性も低い極性化合物については感度不足である欠点は避けられなかった. 一方, 逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC, LC) はこれらの化合物の分離においては不可欠な分離手段となっており, サーマスプレー法や大気圧イオン化 (API) 法を用いるオンライン LC/MS や LC/FAB-MS⁵⁾ としても既に実用段階にある.

しかし, これらの装置は高価であると共に, 逆相 HPLC で多用されているイオン対試薬やリン酸系緩衝液を溶離液に用いた連続測定に伴う保守上の問題があ

り, 又イオン化への妨害を完全に克服することは難しい⁶⁾. 従って, 単離精製が困難な微量成分や極めて不安定な成分以外は, HPLC 周辺技術の進歩並びに MS における種々のイオン化法の開発も相まって, オフライン LC/MS 測定でも十分に対応できるものと思われた. そこで, そのための工夫を幾つか試み, その結果, 効率の良いオフライン LC/SIMS 法とマイクロ LC にも適用可能なオフラインの LC/MS {電子衝撃イオン化 (EI), 電界脱離 (FD)} 法を確立できたので, 以下に報告する.

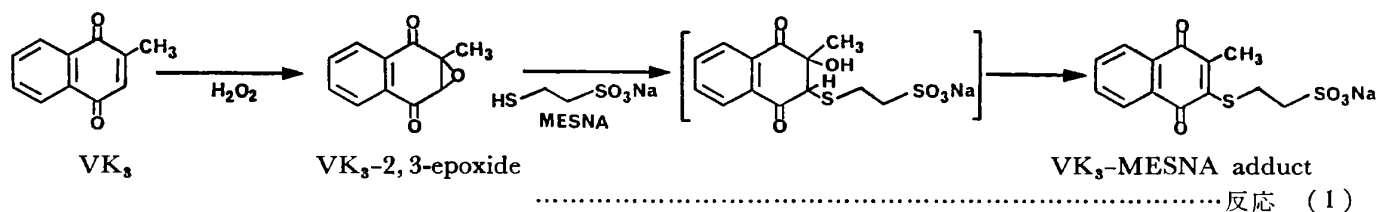
2 実 験

2.1 試薬及び検体の調製

試薬はいずれも市販の特級を用いた.

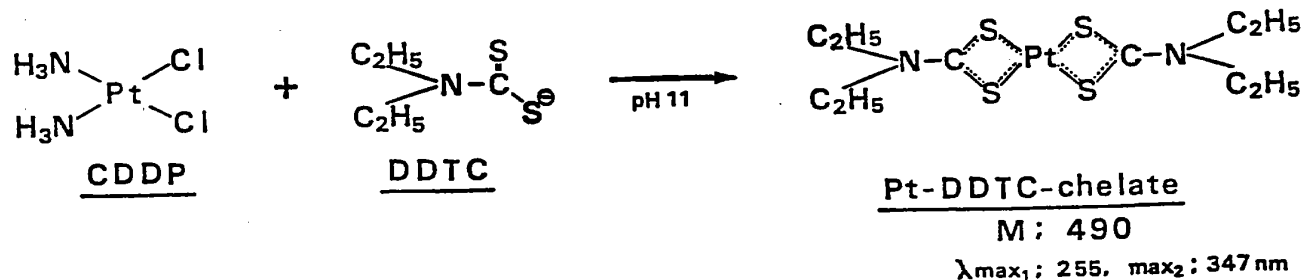
LC/SIMS 測定用検体は次のように調製した.

(1) ビタミン K_3 -MESNA 付加体: ビタミン K_3 (VK_3 , 半井化学薬品製) を用いて, 既報に従い⁷⁾ 過酸化水素水により, 2,3-エポキシドを得た. 次に, 過剰の 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム塩 (MESNA, 半井化学薬品製) と反応させ (pH 7.4, リン酸緩衝液



* SIMS による薬物代謝研究 (第 II 報). 前報は, H. Iwabuchi, A. Nakagawa, K. Nakamura: *J. Chromatogr.*, **414**, 139 (1987)

** 三共(株)分析代謝研究所: 140 東京都品川区広町 1-2-58



.....反応 (2)

中, 37 °C, 5 分間), 2-メチル-3-(2-スルホエチル)チオ-1,4-ナフトキノ (VK₃-MESNA 付加体) を調製した (白色結晶, d. p. 250 °C 以上, 収率 90%).

(2) Pt(II)-ジエチルジチオカルバメート錯体: シスプラチン (CDDP, Aldrich Chem. 製) を加えたラットの血しょう (10 µg/ml) 1 ml にジエチルジチオカルバメート Na 塩 (DDTC, 和光純薬工業製) のアセトニトリル溶液 (1 mg/ml) を 1 ml 加えた後, 60 °C で 1 時間反応させ Pt-DDTC キレートを生成させた⁸⁾.

マイクロ LC/MS 測定用検体: *p*-ヒドロキシ安息香酸メチル, エチル, プロピルエステル (東京化成工業製) 及びプロスタグランジン E₂ (PGE₂, Sigma Chem. 製) を用いた.

HPLC 用溶離液: アセトニトリルは LC 用 (和光純薬工業製), イオン対試薬として PIC A® (Millipore 製) を用いた.

SIMS 用マトリックス: グリセロール (東京化成工業製) と *m*-ニトロベンジルアルコール (*m*-NBA, 同) を用いた.

2.2 装 置

HPLC 装置: LC 用高圧ポンプ M45 (Millipore 製) に UV 検出器 UVILOG-5IV (応用分光製) を接続させた. 又, 高圧四方切り換えバルブ E1E009 (低容量, 5 µl, センシュア科学製) を検出器の出口に直結させ, 分取に用いた.

マイクロ LC 装置: LC 用高圧ポンプ CCPD (東洋曹達製) にマイクロ LC 用 UV 検出器 875 型 (日本分光製) と前述のバルブ及びマイクロシリッジ MS-10 (テルモ製, プランジャー挿入口を内径 1/16 インチ, 深さ 5 mm に拡大) を Fig. 1 に示すように接続させた.

分離用カラム: YMC Pack A312, ODS (6 mm i.d., 15 cm, 山村化学製), マイクロ LC 用には YMC Gel-ODS (5 µm, 内径 1 mm, 長さ 25 cm, 同) を用いた.

ミニカラム: Bond Elute C8, 1 ml (Analytichem International 製) をメタノールと水で洗浄したものをを用いた.

質量分析計: 高分解能二重収束型質量分析計 M80A 及びデータ処理システム M003 (日立製作所製) を用い, SIMS, EI, FD 測定を行った.

サンプルホルダー: 日立製作所製の SIMS 用ホルダー (A) を Fig. 2 に示すようなステンレス鋼の網 (0.2 mm × 50 メッシュ) を二重折りにして作製したメッシュ型 (B), ステンレス鋼板 (厚さ 0.2 mm) を用いたポート

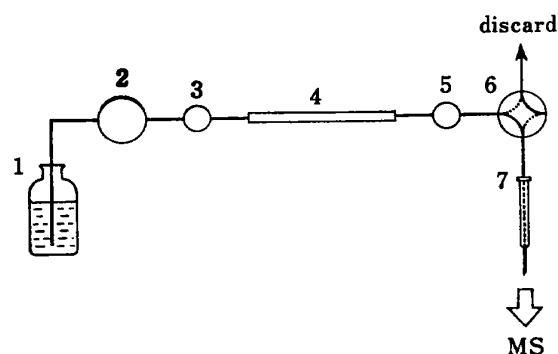


Fig. 1 Flow diagram of off-line micro-LC/MS

1: reservoir; 2: pump; 3: loop injector; 4: column; 5: UV detector; 6: switching valve; 7: microsyringe

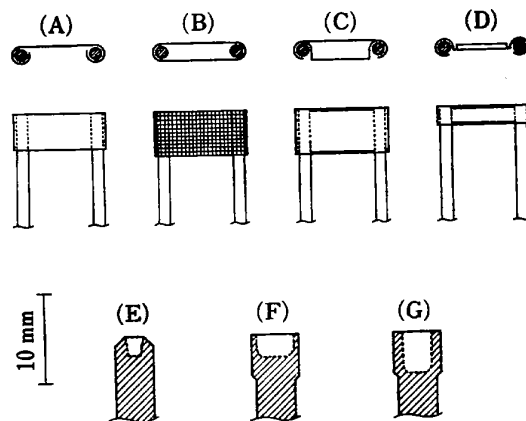


Fig. 2 Cross section of sample holders for SIMS (A~D) and electro-impact (EI) (E~G)

(A) and (E): commercially available; (B): meshed; (C): boat shaped; (D): ribbon shaped; (F): modified (10 µl); (G): modified (25 µl) glass tip

型 (C) とリボン型 (D, マイクロ LC 用) のそれぞれに改造した. 又, 市販の EI 用ホルダー (E) の内径を大きくし, 内容量として 10 µl (F) 及び 25 µl (G) にしたものをマイクロ LC 用に試作した.

2.3.1 LC/SIMS 測定

VK₃-MESNA 付加体：移動相として、50% (v/v) アセトニトリルに PIC A® を 0.5% となるように加え、流量は 1 ml/min に、UV 測定波長は 254 nm とした。VK₃-MESNA 付加体の 50% アセトニトリル溶液 (100 µg/ml) を HPLC 装置に 20 µl を注入した。保持時間 (R_t) 3.9 分に出現したピークをあらかじめ 500~750 µl の水を加えておいた逆相ミニカラム中へ高圧バルブを切り換えて分取した。緩やかにミニカラムから内溶液を溶出させ、更に真空下 (5 mmHg) で残存する溶媒を除いた。次に、200 µl のアセトニトリルを加え、SIMS 用ホルダー (Fig. 2) へ窒素を吹き付けながら溶出させた。

Pt-DDTC キレート：反応後のラットの血しょうを遠心分離し、その上澄み 20 µl を HPLC 装置に注入した。移動相には 80% (v/v) アセトニトリルを流量 1 ml/min で用い、測定波長は 347 nm とした。 R_t : 7.8 min のピークを前述の操作に従い分取し、SIMS 測定を行った。

SIMS 測定：常法どおり、グリセロールあるいは *m*-NBA マトリックスを約 10 µl 添加し均一化した後、キセノンを用い、一次加速電圧：8 kV (正) 又は 9 kV (負イオン)、二次加速電圧：3 kV、質量走査領域： m/z 50~700 で測定した。

2.3.2 ミクロ LC/MS 測定

EIMS 測定：*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル、エチル、プロピルの各エステル 500 ng/µl 溶液を 0.5 µl ミクロ LC 装置に注入した。移動相には 80% (v/v) メタノールを用い、流量を 30 µl/min とした。ピークの立ち上がりを検出 (UV: 254 nm) した 10 秒後にバルブをマイクロシリンジ側へ切り換えて、30 秒間にわたりシリンジ内を流した。次に、バルブを元に戻した後、シリンジを系から外し、改良した EI 用サンプルホルダー内へ溶出液を移した。同様の操作を 3 成分について行い、各 EI 測定を行った (イオン化電圧：20 eV、電子電流：100 µA、質量走査領域： m/z 30~300)。

FDMS 測定：PGE₂ の 500 ng/µl 溶液 0.5 µl をミクロ LC 装置に注入した。移動相のアセトニトリル-10 mM オルトリン酸 (1:1) (v/v) を流量 30 µl/min で流し、測定波長は 220 nm に設定した。前述の方法によりマイクロシリンジ内に R_t : 10.3 min のピークを分取し、FD エミッター (シリコン) 上に塗布し、FDMS を測定した (対向電極：-5 kV、加速電圧：+3 kV、質量走査範囲： m/z 1~500)。

3 結果及び考察

3.1 分取の効率

HPLC からの分取の効率を求めるために、反応 (1) にその構造を示した VK₃ (P-3)、その 2,3-エポキシド (P-2) 及び VK₃-MESNA 付加体 (P-1) のそれぞれ濃度 200 µg/ml の溶液を 25 µl 注入し、HPLC を行い、Fig. 3 に示すようなクロマトグラムを得た。

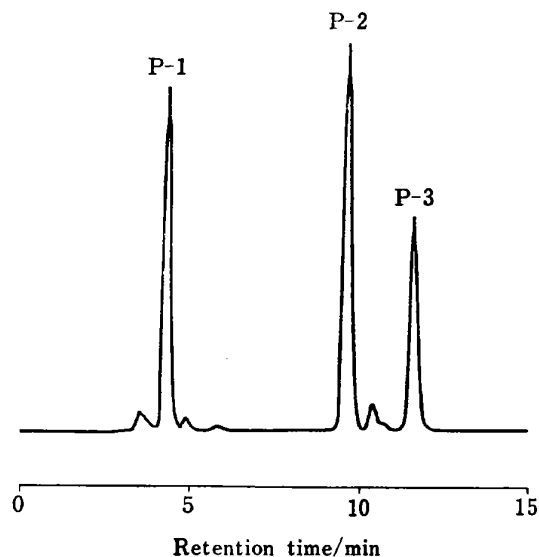


Fig. 3 Chromatogram of vitamin K₃ related compounds

P-1: VK₃-MESNA adduct; P-2: VK₃-2,3-epoxide; P-3: VK₃

バルブを作動させ各ピークを分取し、5 ml 容に正確に希釈したものとはじめの試料液 25 µl をそのまま 5 ml 容に正確に希釈したものを比較し、各 HPLC のピーク面積比から HPLC 分離における回収率を求めた ($n=4$)。次に、所定の状態にしておいたミニカラムに各成分の 10 µg/200 µl を別々に注入し、溶出後に分取のときと全く同じ操作に従い、メタノール溶液約 200 µl を得、この濃度を HPLC により求め、初めの濃度と比較してミニカラム処理段階における添加回収率を求めた ($n=4$)。P-1、P-2、P-3 についてこれらの回収率を掛け合わせて、全操作の回収率を算出した。その結果は Table 1 に示すように、HPLC からの回収率は各成分の極性の強さに比例し、P-1 > P-2 > P-3 の傾向を示したが、C8 のミニカラムからの回収率はいずれも約 70% であった。そして全操作を通しての回収率は 60% 前後となった。溶出するピークの極性や pK_a に応じて、C1~C18 やイオン交換などの特性を有したミニカラムを選択

Table 1 Recovery data

	HPLC	SPE	Total
P-1	94.1±2.8	68.4±16.6	54
P-2	86.5±5.9	76.6± 9.8	66
P-3	83.6±1.1	68.7±14.1	57

Recoveries of VK₃-MESNA adduct (P-1), VK₃-2,3-epoxide(P-2) and VK₃ (P-3) from HPLC and solid phase extraction (SPE), and recovery of each component calculated from the combined two steps. Data are expressed as %± standard deviation from quadruplicate runs.

することにより更に回収率を向上させることは可能と思われる。

なお、流量を 1 ml/min に設定したときには流路系の全容量を考慮すると、実際の溶出はピークの検出よりわずかに 2 秒の遅れがあることが分かった。ミニカラムの保持能力を考慮すると、約 15 秒間にわたり溶出液 (250 μ l) を分取できることになる。複数個のミニカラムを用意しておくことにより、連続したピークを分取することも可能であるが、ループ内の追い出しも含めると切り換えに約 4 秒を要するので、極めて接近したピークの場合には 1 回の注入からそれぞれを分取することはできない。ミニカラムを用いたことによる LC 溶出液からの無機塩やイオン対試薬などの除去効率は、実際の測定において妨害が全くみられなかったことから、かなり高いものと思われる。本法は MS 測定のみならず、NMR や FT-IR などの分析機器とのオフライン測定にも有用であろう。

マイクロ LC からの回収率は算出していないが、EIMS スペクトルの強度から見て、少なくとも約 50% には達していると思われる。更に、この回収率と接近するピークからの分取効率を改善するためには内容積を更に小さくした切り替えバルブの開発が望まれる。

3.2 SIMS 用ホルダーの性能

市販のホルダーは銀板製 (5×10 mm) であるが、これを Fig. 2 に示したようなメッシュ型に改良することによりミニカラムから溶出するメタノールの気化を容易にするばかりでなく、一定の感度で長時間にわたり測定することが可能となった。負イオン SIMS 測定で得られるマトリックスのグリセロールの m/z 91 のピーク強度変化を比較して示す (Fig. 4)。市販のホルダーでは質量走査 (17 秒) の都度感度は急激に減少した。これは滑面であるためにマトリックスが下部へ移動したことによると思われる。これに対して、メッシュ型ではややス

パッタリング効果が低いため感度は市販のホルダーの約 70% に低下したが、そのまま持続し、より安定なスペクトルを得ることができた。この特性は粘性の低いマトリックス (例えば、チオグリセロール) においては更に顕著に見られた。又、ボート型ホルダーは約 50 μ l の内容量を有するので、本法のみならず LC から直接、ホルダーへ分取する際にも利用できる。しかし、一次イオンビームの照射される位置を微少調整したが、感度は同様に通常の約 70% に低下した。これはマトリックスが広がったためと、スリットとスパッタリング面の距離が通常の測定時に比べ、約 2 mm 離れたことによるものと思われる。リボン型ホルダーはマイクロ LC から直接分取し、SIMS 測定するために考案したものである。マトリックスの添加量は 1~3 μ l と少なく、試料はより濃縮された状態にあるので、PGE₂ を用いた感度比較 (0.8 μ g/ホルダー) では通常のホルダーにおけるより少なくとも 20% 以上は高かった。

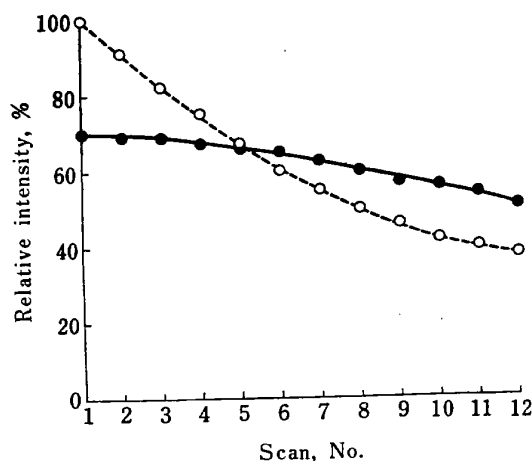


Fig. 4 Comparison of negative-SI (m/z : 91) from glycerol matrix

○ : by SIMS holder-(A); ● : by holder-(B)

メッシュ型のホルダーで酸化反応性を有する m -NBA をマトリックスにしたときの VK₃-MESNA 付加体の負イオン SIMS スペクトルを Fig. 5 に示す。[M-Na]⁻ に相当する m/z 311 が顕著に検出され、このほかに [M-H]⁻ として m/z 333, [M-CH₂CH₂SO₃Na]⁻ に相当する m/z 203 の各イオンが検出された。なお、 m/z 153, 305 は m -NBA 由来であるが、以上の結果より VK₃-MESNA 付加体の構造を解析できた。MESNA 試薬は不安定な陽イオンの捕集剤として用いられているが⁹⁾、このような VK₃ 代謝の中間体である 2,3-エポキシドの同定に用いることができたことから、薬物代謝の

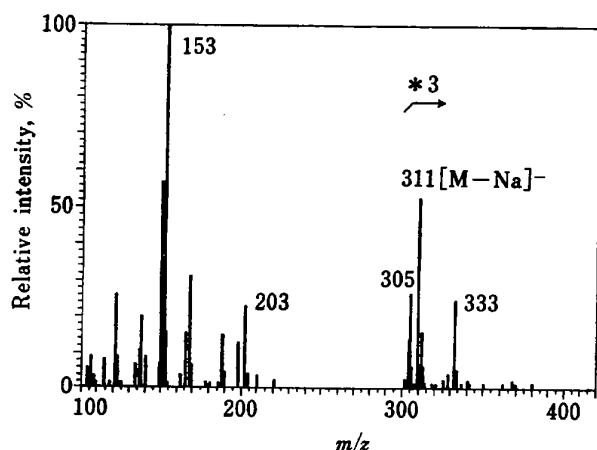


Fig. 5 Negative SI mass spectrum of VK₃-MESNA adduct

過程で生成するこうした活性なエポキシドの同定にも普遍化できるものと思われる。

次に、血しょう中の CDDP より得られた Pt-DDTC キレート の HPLC クロマトグラムを Fig. 6 に示す。この R_t : 7.8 min の溶出ピークを分取したものの SI-MS スペクトルは Fig. 7 に示すように、 m/z 491 の $[M+H]^+$ イオンと、それから DDTC が一つ脱離したフラグメントイオン m/z 343 より、目的とする Pt-DDTC キレートであると同定することができた。このキレートの生成 {反応(2)} は Pt(II) に基づくものであるので、シスプラチン以外の白金系制がん剤の生体試料

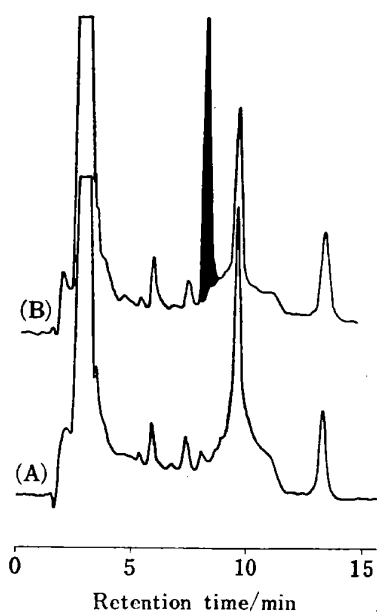


Fig. 6 Chromatograms of rat plasma after treated with diethyldithiocarbamate (DDTC)
(A): blank plasma; (B): CDDP spiked plasma (10 μ g/ml)

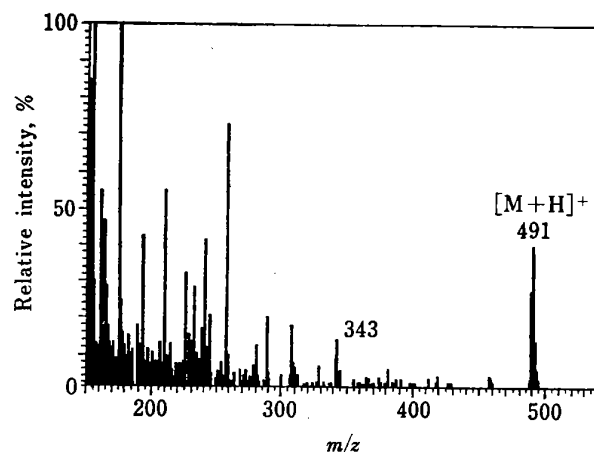


Fig. 7 SI mass spectrum of Pt(II)-DDTC chelate

中における HPLC 定量にも有効である。本 SIMS 測定を組み合わせることにより、これら制がん剤の薬効や毒性とのかかわりの深い組織への移行性や残留性、生体高分子との反応性に関しても更に信頼性のある知見が得られると期待できる。

3.3 ミクロ LC/MS の有用性

ミクロ LC 用に Fig. 2 に示した内容量の大きな EI 用ホルダーを 2 種試作したが、いずれも熱伝導性がやや劣るので市販のものに比べると感度は低下した。しかし、一例として挙げた、*p*-ヒドロキシ安息香酸エステルのミクロ LC クロマトグラムとそれぞれの EIMS スペクトル {Fig. 8, (G) のホルダーを使用} から判断すると、先に述べたバルブの改良点以外には操作性も含め、実用面での測定における問題は特にないと思われる。すなわち、それぞれの親イオンとして m/z 152, 166, 180 が得られ、更にフラグメントイオンとして共通な m/z 121 ($O=C-\text{C}_6\text{H}_4=O+H^+ \longleftrightarrow \text{etc.}$) も得られた。次に、Fig. 9 に PGE₂ の R_t 値に相当するミクロ LC からの溶出ピークの FDMS スペクトルを示す。LC での絶対注入量が 250 ng と低いにもかかわらず、 $[M+Na]^+$ として m/z 375 に顕著に出現し、脱水ピークに相当するイオンも m/z 357 に見られた。最近、操作上においてより簡便な FAB や SIMS の普及により FD イオン化法はあまり使われなくなった。しかし、FAB や SIMS は決して万能ではなく、リン酸イオンや PIC 試薬が存在すると、複雑な付加イオンが数多く生成し、解析を困難にしたり、試料のイオン化を抑制する場合が多い。一方、FDMS においてはたとえリン酸が過剰に存在しても、特別な前処理をせずに QM^+ として検出できる利点がある。従って、リン酸系緩衝液をどうして

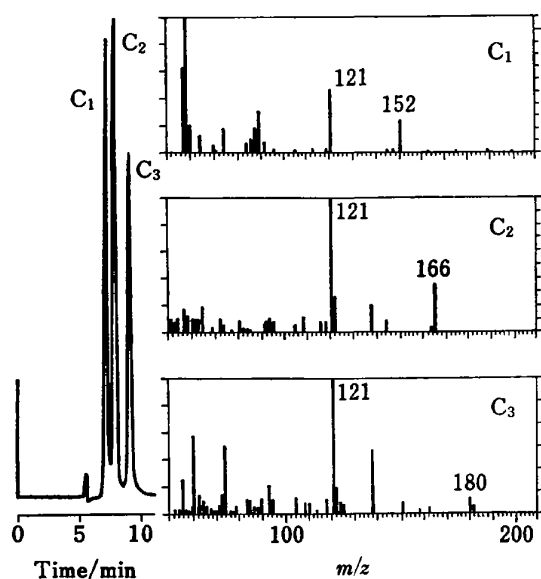


Fig. 8 Micro-LC chromatogram and EI spectra of C₁: methyl-, C₂: ethyl- and C₃: *n*-propyl-ester of *p*-hydroxybenzoic acid

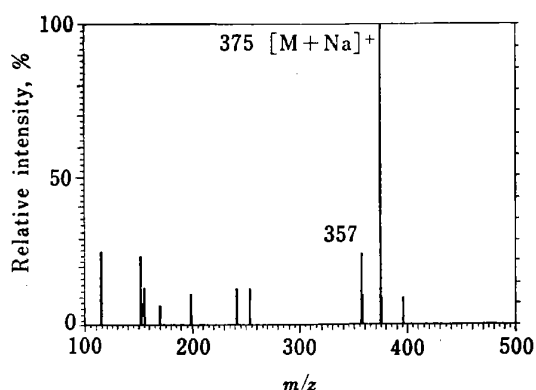


Fig. 9 Field desorption mass spectrum of PGE₂

も分離に用いる必要のある極性化合物にとっては、オフラインでのマイクロ LC/FDMS 測定は極めて有用な手段であると言える。

終わりに、本研究の遂行に当たり終始、助言並びに激励を頂いた当研究所 進藤英世所長、高萩英邦博士、木下 武博士及び MS 用ホルダーの改造に協力を頂いた高橋達彦氏と大地信也氏に深謝致します。

文 献

- 1) Y. Kushi, S. Handa : *J. Biochem.*, **98**, 265 (1985).
- 2) 岩谷宏治, 中川有造 : 質量分析, **34**, 189 (1986).
- 3) H. Iwabuchi, A. Nakagawa, K. Nakamura :

J. Chromatogr., **414**, 139 (1987).

- 4) H. Iwabuchi, H. Nagashima, K. Nakamura : Abstracts of 23rd International Symposium on Advances in Chromatography, p. 135 (1986).
- 5) Y. Ito, T. Takeuchi, D. Ishii : *J. Chromatogr.*, **346**, 161 (1985).
- 6) 柘植 新, 松本幸三 : 蛋白質, 核酸, 酵素, **30**, 1138 (1985).
- 7) L. F. Fieser : *J. Biol. Chem.*, **133**, 391 (1940).
- 8) S. J. Bannister, L. A. Sternson, A. J. Repta : *J. Chromatogr.*, **173**, 333 (1979).
- 9) I. Many, I. Dietrich, M. Przybylski, U. Niemeyer, J. Pohl, P. Hilgard, N. Brock : *Bio-med. Mass Spectrom.*, **12**, 545 (1985).



Analysis of non-volatile compounds by off-line LC/MS. Haruo IWABUCHI, Hisomu NAGASHIMA and Kanichi NAKAMURA (Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., 1-2-58, Hiro-machi, Shinagawa-ku, Tokyo 140)

Polar and non-volatile pharmaceutical substances were analyzed by off-line LC/MS. Cisplatin in rat plasma was derivatized to a Pt(II)-DDTC chelate by reaction with sodium diethyldithiocarbamate(DDTC). VK₃-2,3-epoxide, active metabolite of VK₃, was reacted with 2-mercaptoethane sulfonic acid sodium salt(MESNA) and a VK₃-MESNA adduct was obtained quantitatively. These samples were separated by reversed phase paired ion HPLC using phosphate buffer and acetonitrile. The objective peaks were collected into a reversed phase mini-column(C8) cartridge containing 500 to 750 μ l of water by means of a pressured tight valve with low dead volume (5 μ l). After discarding most of the inner solvent by connecting to a vacuum line, 200 μ l of acetonitrile was added to achieve the elution. The eluent was dropped onto a modified sample holder, and acetonitrile was evaporated under nitrogen flow. After addition of matrix(glycerol or *m*-nitrobenzylalcohol) to the holder, molecular SIMS was conducted to each measurement. The total recoveries were achieved to 60%. On the otherhand, PGE₂ was able to be determined by field desorption MS without any special pretreatment *i.e.* PGE₂ was separated by reversed phase micro-LC using phosphoric acid solution as a mobile phase, and the corresponding peak was trapped in a microsyringe (10 μ l). The trapped sample was transferred to the silicone emitter. The present method makes it possible to remove interfering substances which cause trouble in on-line LC/MS, and are recognized to be not only simple but also efficient methods without employing any expensive apparatus.

(Received September 25, 1987)

Keyword phrases

off-line LC/MS; analysis of non-volatiles by SIMS, field desorption MS, MS.