

## 技術論文

## 液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法による ヒト血清中 26,26,26,27,27,27-ヘキサフルオロ-1 $\alpha$ ,25- ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> の定量分析

松崎 和恵<sup>®\*</sup>, 溝奥 康夫\*, 鈴木 隆\*, 木村 寛三\*\*

Quantitative determination of 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>  
in human serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Kazue MATSUZAKI, Yasuo MIZOOKU, Takashi SUZUKI\* and Kanzo KIMURA\*\*

\* Sumika Chemical Analysis Service, Ltd., 3-1-135, Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka 554

\*\* Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd., 2-2-8, Doshohmachi, Chuo-ku, Osaka 541

(Received 11 January 1996, Accepted 8 March 1996)

A highly sensitive and specific liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method was developed for the determination of 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>, a new fluoro analogue of 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>. It was found that this compound gave an acetic acid-adducted ion with high intensity when the mobile phase contained acetic acid. By optimizing the mobile phase composition in the liquid chromatography system in obtaining the highest response of the adduct ion, this compound in serum was determined down to as low concentration as 0.1 pg/ml, following only deproteinization by acetonitrile and purification on solid phase cartridge. It was recognized that the present assay method has sufficient precision, rapidity and simplicity in execution, and enables us to carry out the determination of very low concentration of this compound in clinical studies for humans.

**Keywords** : quantitative determination; vitamin D<sub>3</sub> derivative; human serum; LC/MS/MS.

### 1 緒 言

26,26,26,27,27,27-ヘキサフルオロ-1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> {F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub>, Fig. 1} は、活性型ビタミン D<sub>3</sub> (1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub>)<sup>1)2)</sup> のフッ素化誘導体<sup>3)</sup>である。げっ歯動物においてカルシウムの小腸からの吸収と骨への沈着を促進させる作用を有し、その活性は活性型ビタミン D<sub>3</sub> のおよそ 5~10 倍

である。現在、副甲状腺機能亢進、慢性じん疾患、骨粗しょう症及び骨軟化症に関する臨床試験が行われている。F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> は、高力価のため臨床試験において投薬量は  $\mu\text{g}$ /人オーダーと極めて少なく、ヒト血清中濃度は極めて低いレベルにあると予想される。

このような体液中で低濃度レベルの薬物についての生物学的利用性、同等性及び薬物動態を研究するためには、高感度で迅速性に優れ精度の高い定量法の確立が必須である。F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> のヒト血清中定量法として、先に高分解能-選択イオン検出法 (HR-

\* (株)住化分析センター: 554 大阪市此花区春日出中 3-1-135

\*\* 住友製薬株式会社: 541 大阪市中央区道修町 2-2-8

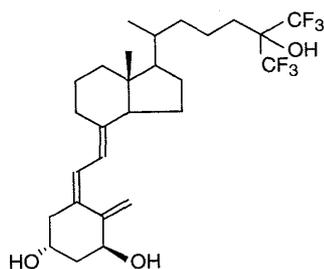


Fig. 1 Chemical structure of F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>

SIM) を用いたガスクロマトグラフ/質量分析計で測定する方法<sup>4)</sup>が確立されている。この GC/MS 法は、前処理として長くて煩雑な精製工程と二つの水酸基部分の誘導体化が必要であった。又、定量下限は 2 pg/ml であるため、比較的高い投与量 (2 μg/人) での単回投与にしか適用できなかった。更にこれより約 6 分の 1 の投与量にて臨床試験を行うことから、薬物動態プロファイルを把握するには、定量下限を従来の 2 pg/ml よりも更に下げる必要があり、より高感度な定量法が必須となった。

近年、タンデム型質量分析計 (MS/MS) は、液体クロマトグラフィー (LC) における高選択性検出器としても使用され、生体試料中の薬物や生理活性物質の定量分析に用いられるようになってきた<sup>5)~10)</sup>。今回、低濃度領域の血清中 F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> を迅速かつ選択的に定量するため、LC/MS/MS を用いた検討を行ったので、その結果を臨床試験への応用例とともに報告する。

## 2 実 験

### 2.1 実験材料及び試薬

F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> (化学純度 99.1%), 6, 19,19-d<sub>3</sub>-F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> (内標準物質; 化学純度 96.3%) は、住友製薬にて合成されたものを用いた。エタノール (ホルモン測定用), アセトニトリル, ヘキサン, イソプロパノール, メタノール, ジクロロメタン (以上液体クロマトグラフ用) は、ナカライテスク製を用い、ヒトコントロール血清は、オーソ・ダイアグノスティック・システムズ及び日水製薬より購入した。その他の試薬については特級試薬を使用した。

Bond Elut C18/OH カートリッジ (500 mg/2.8 ml) はバリアン製を使用した。

### 2.2 装置及び測定条件

LC 装置はポンプ 600-MS とオートサンプラー 717 (いずれもウォーターズ) を、分析カラムは YMC Pack MB ODS AM (150×2.1 mm i.d., 平均粒子径 5 μm, ワイエムシィ) を使用した。移動相は、イソプロパノール-アセトニトリル-水-酢酸の混合溶媒を用い、クロマトグラフィーは、室温条件下、毎分 0.2 ml の流量にて行った。質量分析計は、トリプルステージ四重極型質量分析計 (TSQ700, フィニガンマツト) を用い、イオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を、検出には陰イオン検出モードで選択反応検出 (selected reaction monitoring, SRM) を用いた。

### 2.3 前処理法

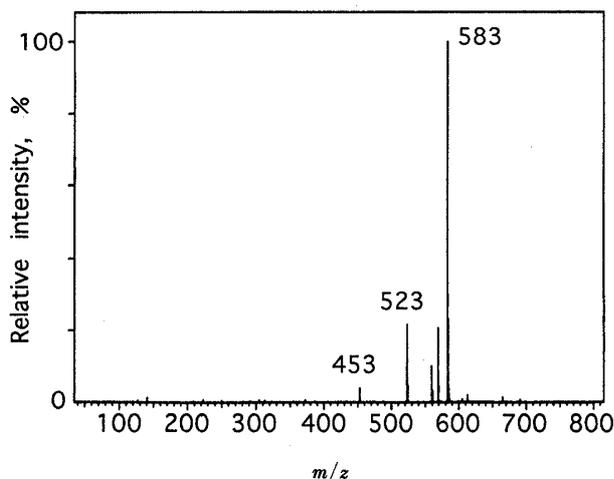
血清 2.0 ml をサンプリングし、内標準物質 (0.2 ng/ml エタノール) 20 μl, エタノール 20 μl 及びアセトニトリル 2 ml を加え 5 分間振り混ぜた後、5 分間約 1500 g で遠心分離した。この上澄みを分取し、0.4 M リン酸水素二カリウム 2 ml を加えてかき混ぜ、この溶液をあらかじめヘキサン, イソプロパノール及びメタノール各 2 ml で洗浄し、水 2 ml でコンディショニングした Bond Elut C18/OH カートリッジに負荷した。続いてカートリッジを水, 水-メタノール (40:60, v/v), ジクロロメタン-ヘキサン (10:90, v/v) 及びイソプロパノール-ヘキサン (0.5:99.5, v/v) 各 5 ml で洗浄し、最後にイソプロパノール-ヘキサン (5:95, v/v) 5 ml で F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> 及び内標準物質を溶出させた。この溶出液を窒素気流下、水浴中 (約 25°C) で蒸発乾固して、その残留物を移動相 90 μl に溶解し、その 3 分の 1 量を LC/MS/MS に注入した。

### 2.4 検量線の作成

F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> のエタノール溶液 20 μl をヒトコントロール血清に添加して、0.1~20 pg/ml 血清相当の血清試料を調製した。この血清試料 2 ml と内標準物質溶液 20 μl を混和し、前処理法に従って処理した試料を LC/MS/MS に注入し、内標準物質に対するピーク面積比と添加濃度をプロットして最小二乗法で検量線を作成した。

### 2.5 臨床試験

6 人の健康な日本人成人 (男子) のボランティアに F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> を 0.3 μg 経口投与した。採血は、投与前と投与後 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 及び 96 時間に行い、血清を分離した後、測定まで



**Fig. 2** Negative ion mass spectrum of  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$

Eighty ng of the chemical was injected into a LC/MS/MS system in the flow-injection mode, using the mobile phase of acetonitrile-water (1:1, v/v) containing 0.1% acetic acid, and the spectrum was obtained in the negative-ion detection mode.

-20°C で凍結保管した。

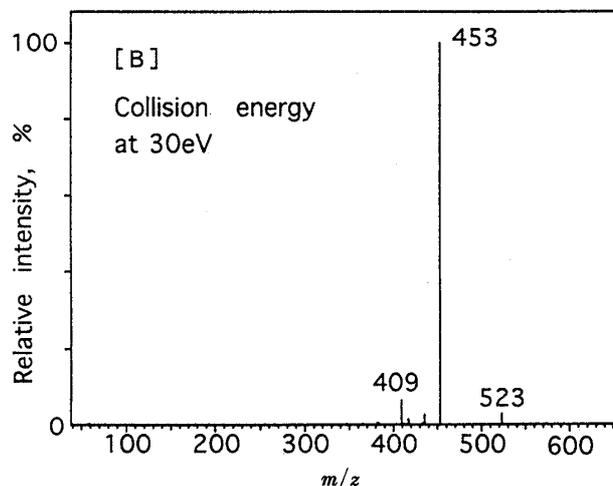
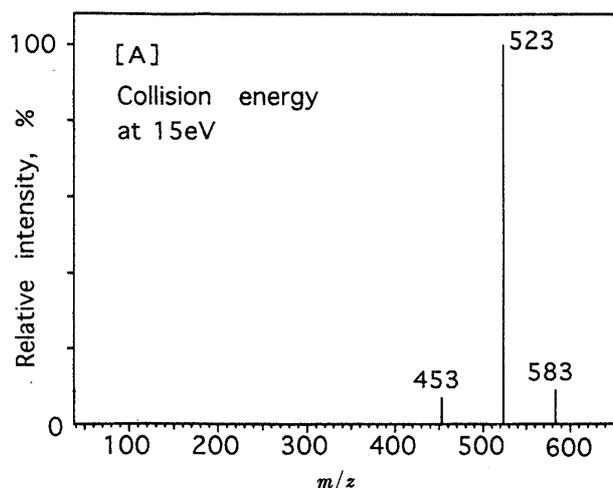
### 3 結 果

#### 3.1 前駆イオンの選択

分析カラムを用いずに,  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  をフローインジェクションで 0.1% (v/v) 酢酸含有のアセトニトリル-水 (1:1, v/v) の移動相に導入して, その質量スペクトルを測定した。陽イオン検出モードでは, 顕著なイオンは観測されなかったのに対し, 陰イオン検出モードでは, 水素原子が離脱した  $[M-H]^-$  ( $m/z$  523) とそれ以上のイオン強度を示す酢酸付加イオン  $[M+CH_3COOH-H]^-$  ( $m/z$  583) が認められた (Fig. 2)。同様に内標準物質においても酢酸付加イオン ( $m/z$  586) が確認された。この酢酸付加イオンの生成と高いイオン強度は再現性があり, これを前駆イオンに選定した。又, この前駆イオン生成に関与するパラメーターとしてキャピラリー温度, シースガス圧及び補助ガス流量を, それぞれ 200°C, 4.23 kg/cm<sup>2</sup>, 2978 ml/min に設定した。

#### 3.2 生成イオンの選択

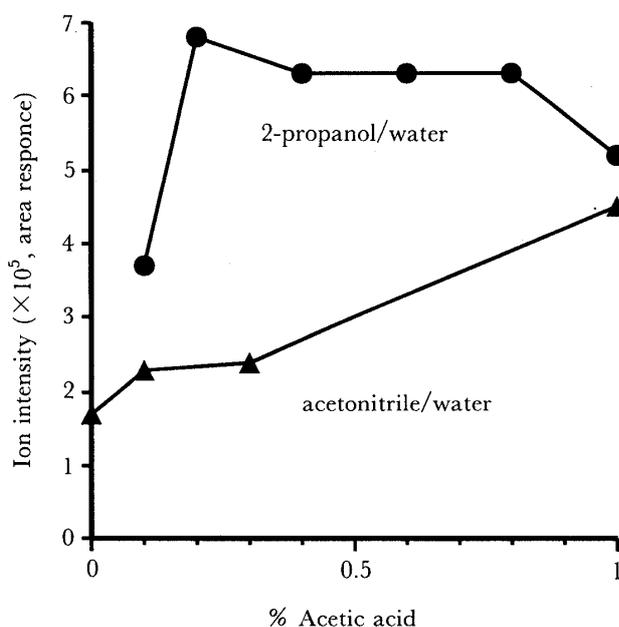
MS/MS モードにおけるイオン解離は, コリジョンガス圧及びコリジョンエネルギーに依存する。そこでコリジョンガスにアルゴンを用い, そのガス圧を 1.5 m



**Fig. 3** Product ion mass spectra of the acetic acid-adducted  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$  ion

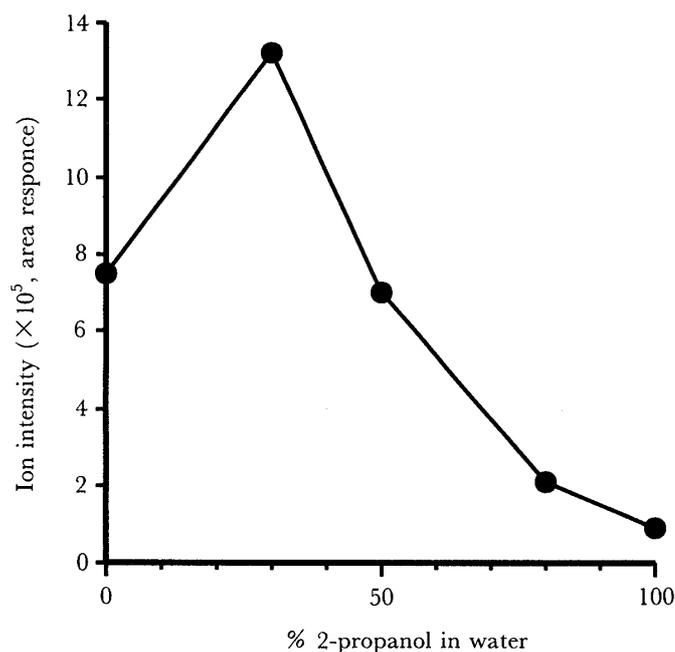
Eighty ng of the chemical was injected into a LC/MS/MS system in the flow-injection mode, using the mobile phase of acetonitrile-water (1:1, v/v) containing 0.1% acetic acid. The precursor ion ( $m/z$  583) formed was then collided against Ar gas at the energy of 15 eV [A] and 30 eV [B] to observe the product ions.

Torr に固定し, コリジョンエネルギーを変動させて, 前駆イオンである酢酸付加イオンを衝突解離させ, 生成イオンを観測した。コリジョンエネルギー 15 eV で前駆イオンである酢酸付加イオンのほとんどが解離し, そのときの生成イオンは, 前駆イオンから酢酸が離脱した  $[M-H]^-$  ( $m/z$  523) が最大強度を示した。更にコリジョンエネルギーを 30 eV としたとき, 前駆イオンから酢酸及びトリフルオロメタン基が離脱したと考えられるイオン  $[M-CF_3-H]^-$  ( $m/z$  453) がベースイオンとして認められた (Fig. 3)。強度的にはどちらのイオンも



**Fig. 4** Effect of the concentration of acetic acid in the mobile phase on formation of acetic acid-adducted  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$  ion

Eighty ng of the chemical was injected into a LC/MS/MS system in the flow-injection mode, using two kinds of mobile phase, 2-propanol/water (1/1, v/v) (●) and acetonitrile/water (1/1, v/v) (▲), with the concentration gradient of acetic acid increasing 1% (v/v), and the ion intensity of  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$  was observed.



**Fig. 5** Effect of 2-propanol in the mobile phase on formation of acetic acid-adducted  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$  ion

Eighty ng of the chemical was injected into a LC/MS/MS system, and the ion intensity of  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$  was observed with the volume ratio of 2-propanol and water being changed from 0 to 100%, and a constant concentration of acetic acid at 0.2%

大差がなかったが、血清を処理したときにノイズレベルが低い  $[M-CF_3-H]^-$  ( $m/z$  453) を SRM における生成イオンに選定した。

以上の結果から、SRM モードでの  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  の検出には前駆イオン  $m/z$  583, 生成イオン  $m/z$  453, 内標準物質については前駆イオン  $m/z$  586, 生成イオン  $m/z$  456 のイオンをモニターすることとした。

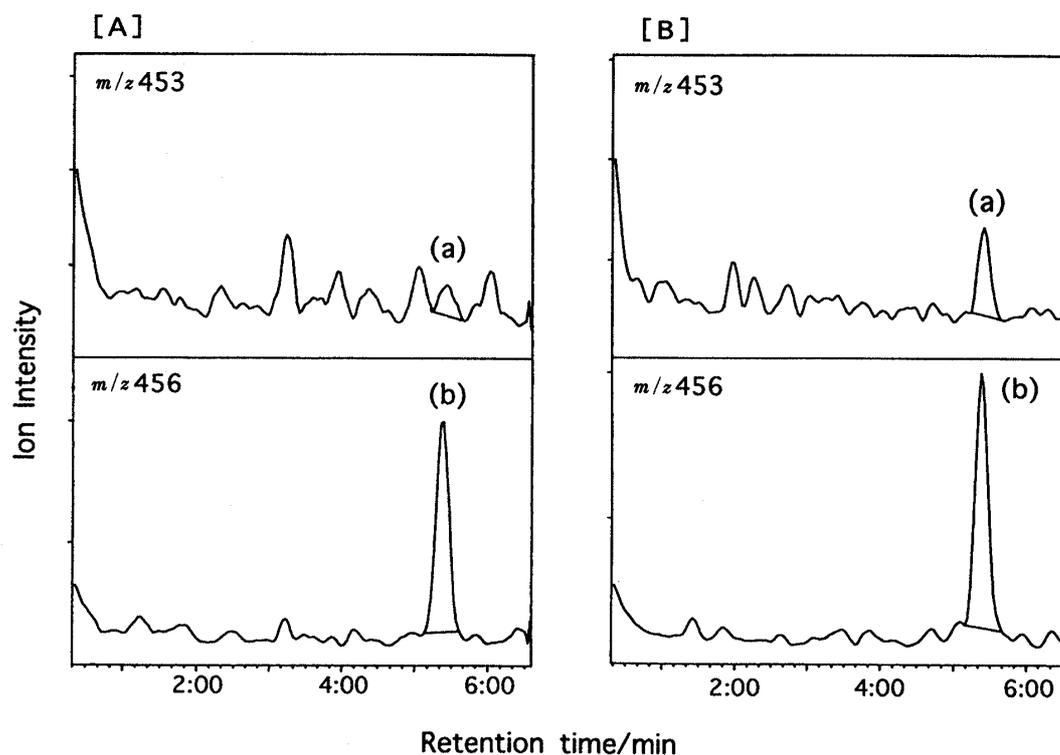
### 3.3 LC 条件の検討

陰イオンモードに用いる移動相として、アセトニトリルとイソプロパノールの比較と酢酸付加イオン生成に最適な酢酸の添加量の検討を行った。アセトニトリル-水 (1:1, v/v) とイソプロパノール-水 (1:1, v/v) を用意し、添加する酢酸の含量を変化させて  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  の酢酸付加イオンの強度を観察した (Fig. 4)。その結果、イソプロパノール系で酢酸を 0.2% 含有させたときにイオン強度が最も高かった。次に酢酸含量

を 0.2% に固定し、イソプロパノール-水の組成を変化させて  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  の酢酸付加イオンの強度を観察した。その結果、イソプロパノール-水 (30:70, v/v) のときに、最大強度を示した (Fig. 5)。この溶媒系は水を多く含むため分析カラムには逆相カラムを使用することとしたが、更に溶出力を高めるためアセトニトリルを混合することとした。最終的には 0.2% 酢酸含有イソプロパノール-アセトニトリル-水 (30:50:20, v/v/v) の移動相を選択した。極性を異にする 6 種のカラムについて検討を行い、適当な保持力と良好なピーク形状を与える YMC Pack MB ODS AM を選択した。

### 3.4 前処理法の検討

従来の GC/MS 法<sup>4)</sup>では、血清をアセトニトリル及びリン酸緩衝液で除タンパクした後、Bond Elut C18/OH で固相抽出し、更に順相 LC による分離精製を行い、トリメチルシリル誘導体化していた。しかし、LC/MS/



**Fig. 6** LC/MS/MS chromatograms of  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$  and the internal standard in human serum

Peaks: (a),  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$ ; (b), the internal standard

Human serum was spiked either with the internal standard (2 pg/ml) only [A], or with both of  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$  (0.1 pg/ml) and the internal standard (2 pg/ml) [B], pre-treated and injected into a LC/MS/MS system. The chromatograms were obtained in SRM mode: for  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$ ; the precursor ion of  $m/z$  583 and product ion of  $m/z$  453, and for the internal standard; the precursor ion of  $m/z$  586 and product ion of  $m/z$  456. To clearly visualize the signals from  $F_6-1,25(OH)_2$ -vitamin  $D_3$ , they were recorded with 2-fold sensitivity.

MS の測定条件においては, アセトニトリルのみで除タンパク後, Bond Elut C18/OH で固相抽出するだけで妨害ピークの影響なく測定することができ, 更にその絶対回収率は, 従来法と同等以上であった (従来法 62%, 本法 78%)。

### 3・5 定量法の検証

LC/MS/MS に内標準物質 1.25 pg を注入すると, 内標準物質のピーク面積に対し, 5.1% のピーク面積を示す  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  のピークが現れた。これは内標準物質に含まれる未標識の  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  であると考えられる。内標準物質の添加量を 2 pg/ml 血清としたが, このときの  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  は, 計算上約 0.102 pg/ml 含まれていることになる。従って 0.1 pg/ml 血清の  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン

$D_3$  と, 2 pg/ml 血清の内標準物質を添加したときの機器の応答は, 内標準物質のみを添加したときの約 2 倍となるはずであるが, 実際に測定したとき有意な差が認められた (Fig. 6)。6 種のヒトコントロール血清すべてについて, 測定成分の位置に妨害成分は認められなかった。

内標準物質のピーク面積に対する  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  のピーク面積の比と,  $F_6-1,25(OH)_2$ -ビタミン  $D_3$  の添加濃度をプロットした検量線は, 0~20 pg/ml の範囲で相関係数 0.997 以上の良好な直線性を示した。又, 各濃度レベル (0.5, 3, 20 pg/ml) における定量値の再現性を確認したところ, 日内変動の相対標準偏差は 12.8% 以下であり, 日間変動の相対標準偏差は 17.5% 以下であった。定量下限濃度 (0.1 pg/ml) についても日内変動の相対標準偏差が 16.7% であった (Table 1)。

Table 1 Intra-day and inter-day precision for the determination of  $F_{6-1,25}(\text{OH})_2$  vitamin  $D_3$  in serum

Theoretical concentration/ $\text{pg ml}^{-1}$ serum	No. of replicate	Mean concentration observed/ $\text{pg ml}^{-1}$ serum	Relative standard deviation, %
Intra-day assay			
0.10	5	0.12	16.7
0.50	5	0.47	12.8
3.00	5	2.85	5.6
20.00	5	18.47	6.8
Inter-day assay			
0.50	$5 \times 3^\dagger$	0.52	17.5
3.00	$5 \times 3$	3.16	8.1
20.00	$5 \times 3$	18.95	5.4

$\dagger$  3 replicated trials with 5 samples each

これらの結果から、この分析法は体内動態試験用に十分耐え得る<sup>11)</sup>と考えられた。

### 3・6 臨床試験結果

0.3  $\mu\text{g}$  の  $F_{6-1,25}(\text{OH})_2$ -ビタミン  $D_3$  を経口投与した6人のボランティアの血清を分析した結果を Fig. 7 に示す。薬物は投与後 96 時間でも検出できており、本定量法がヒトにおける薬物動態プロファイルを確認するために十分な感度を与えることを意味している。血清中薬物濃度は投与後 2 時間に最大 ( $4.07 \pm 0.41 \text{ pg/ml}$ ) となり、以後低下して投与後 96 時間には  $1.00 \pm 0.21 \text{ pg/ml}$  となった。

## 4 考 察

従来、血清中  $F_{6-1,25}(\text{OH})_2$ -ビタミン  $D_3$  の定量法として、GC/MS 法による定量下限 2  $\text{pg/ml}$  の方法が適用されていた<sup>4)</sup>。この GC/MS 法と本定量法を比較するため、同一検体について GC/MS 法と本定量法で測定を行ったところ、高い相関性が認められた (Fig. 8)。しかし、この GC/MS 法は、前処理として LC 分取を含む長く煩雑な精製工程と、水酸基部分の誘導体化が必要であった。これに対して本定量法では誘導体化の必要がなく、煩雑な前処理工程も不要である。本定量法は、この前処理操作の迅速性、簡便性だけでよく、0.1  $\text{pg/ml}$  血清という、より低濃度まで定量できる点で GC/MS 法より優れていると考えられる。

他の種類の LC 検出器と同様に LC/MS/MS についても、使用する溶媒系の選択が検出感度に対して重要な

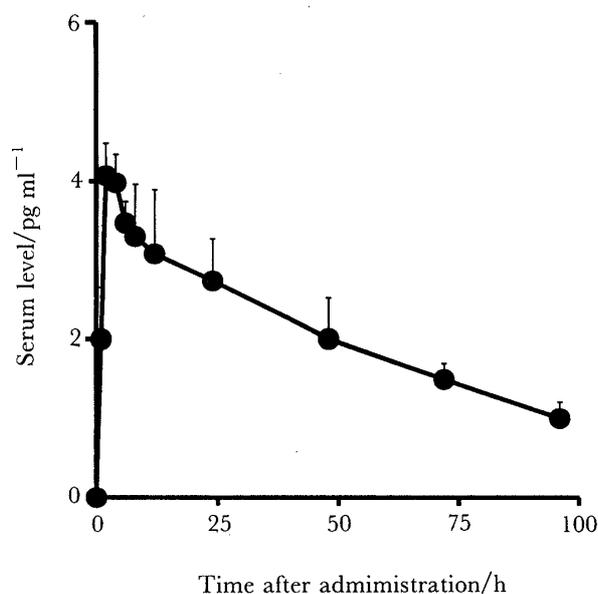


Fig. 7 Serum level of  $F_{6-1,25}(\text{OH})_2$ -vitamin  $D_3$  after a single oral administration of  $F_{6-1,25}(\text{OH})_2$ -vitamin  $D_3$  at a dose of 0.3  $\mu\text{g}$  to 6 volunteers. Each point with a vertical line represents the mean  $\pm$  s.d. of 6 data.

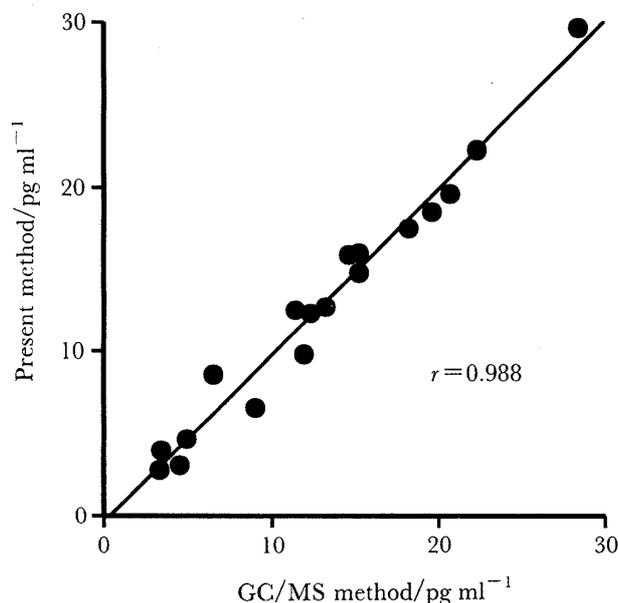


Fig. 8 Correlation of the concentration of  $F_{6-1,25}(\text{OH})_2$ -vitamin  $D_3$  in serum obtained by the present method with that by GC/MS method

The same serum samples from healthy volunteers given  $F_{6-1,25}(\text{OH})_2$ -vitamin  $D_3$  orally were analyzed by GC/MS method<sup>4)</sup> and the present method. The serum samples of higher concentrations were appropriately diluted with the control serum and subjected to LC/MS/MS analysis.

要素となることが明らかになった。今後更に溶媒系についての有用な知見が得られれば, より高感度の分析が可能となるであろう。又, 内標準物質として使用する安定同位体の標識化率を更に向上させることができれば, わずかに含まれる F<sub>6</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub>-ビタミン D<sub>3</sub> 量の影響が減少することから, 定量精度の向上が期待できると考えられる。

LC/MS/MS を検出器とする, 生体試料中の薬物等の微量定量分析について記述している論文が最近発表され始めている<sup>5)~10)</sup>。今回の検討結果が示すように, 検出器における分離・精製効果のため, MS/MS は MS 以上の選択性を有していること, 及び特に LC と接続した場合は, GC のように極性化合物を誘導体化する必要がなく, 直接分析することが可能であることが注目されたからであろう。このような MS/MS の特徴を生かした生体試料中の薬物等の定量分析への応用が, 今後ますます活発に展開されると考えられる。

## 文 献

- 1) D. R. Fraser, E. Kodicek: *Nature* (London), **228**, 764 (1970).
- 2) R. Gray, I. Boyle, H. F. Deluca: *Science*

- (Washington, D. C.), **172**, 1232 (1971).
- 3) Y. Tanaka, H. F. Deluca, Y. Kobayashi, N. Ikekawa: *Arch. Biochem. Biophys.*, **229**, 348 (1984).
- 4) S. Komuro, I. Nakatsuka, A. Yoshitake, K. Iba: *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 33 (1994).
- 5) I. G. Beattie, T. J. A. Blake: *J. Chromatogr.*, **474**, 123 (1989).
- 6) S. Naylor, M. Kajbaf, J. H. Lamb, M. Jahanshahi, J. W. Gorrod: *Biol. Mass Spectrom.*, **21**, 165 (1992).
- 7) A. T. Murphy, P. L. Bonate, S. C. Kasper, T. A. Gillespie, A. F. DeLong: *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 621 (1994).
- 8) A. T. Murphy, S. C. Kasper, T. A. Gillespie, A. F. DeLong: *J. Chromatogr. B*, **668**, 273 (1995).
- 9) J. D. Gilbert, T. F. Greber, J. D. Ellis, A. Barrish, T. V. Olah, C. Fernández-Metzler, A. S. Yuan, C. J. Burke: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**, 937 (1995).
- 10) A. Kussak, C. A. Nilsson, B. Andersson, J. Langridge: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1234 (1995).
- 11) V. P. Shah, K. K. Midha, S. Dighe, I. J. McGilveray, J. P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C. T. Viswanathan, C. E. Cook, R. D. McDowall, K. A. Pittman, S. Spector: *J. Pharm. Sci.*, **81**, 309 (1992).

## 要 旨

活性型ビタミン D<sub>3</sub> のフッ素化誘導体である 26,26,26,27,27,27-ヘキサフルオロ-1 $\alpha$ , 25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> の液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法 (LC/MS/MS) を用いるヒト血清中濃度測定法を開発した。本物質が酢酸と結合して高いイオン強度を与えることを見だし, 更に LC の移動相条件を検討することにより, 前処理として除タンパク後, 固相抽出するだけで 0.1 pg/ml 血清以上の濃度の定量が可能となった。この方法は精度, 迅速性及び簡便性に優れていることが認められた。この定量法の確立によって低用量での臨床試験における血中濃度測定が可能となった。