

氏名	ほりもと しんご 堀 本 眞 吾
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 葉 博 第 685 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	各 種 イ オン 化 法 を 応 用 し た 質 量 分 析 計 に よ る 薬 物 な ら び に そ の 代 謝 物 の 分 析 に 関 す る 研 究
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 川 照 眞      教 授 半 田 哲 郎      教 授 佐 治 英 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、従来の質量分析法では困難あるいは不可能であった薬物ならびにその代謝物の分析法の開発とその応用に関する研究であり、(1)新規イオン化法を適用した HPLC-APCI-MS による  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の特異的な分子量決定法の開発、(2) ACE 阻害剤イミダプリルとその代謝物の GC-MS 法および DCI-MS-MS 法による高感度かつ高選択的なヒト生体試料中薬物濃度測定法の開発、(3)脊髄小脳変性症の新規経口治療薬であるタルチレリンの HPLC-MS-MS 法による高感度かつ高選択的なヒト生体試料中薬物濃度測定法の開発を中心にまとめたものである。

まず、最初に、特異的な分子量決定法について検討した。新規ペネム系抗生物質 FC/TA-891 は、HPLC-APCI-MS 分析において APCI インターフェイス中での分解のため分子量確認が困難であった。そこで、付加イオンを生成させることにより化合物自身の熱分解が防げると考え、クロロホルムを移動相に添加する手法を適用した。その結果、FC/TA-891 およびその活性体 FCE22101 両者の塩素付加イオンを得ることができたが、塩素の安定同位体比を明確に検出することはできず、単独では塩素付加イオンとして認識できなかった。そこで、安定同位体比が 1 : 1 であり、かつ塩素より電気陰性度が高い臭素を用いることを考案し、移動相にプロモホルムを加えた、その結果、FC/TA-891 および FCE22101 の臭素付加イオンを強く検出することができ、そのイオン強度比は安定同位体比を示すことが分かった。臭素同位体イオンは他の夾雑イオンと視覚的に容易に判別でき、塩素付加イオンよりも確実に分子量を決定できることが分かった。

更に、この方法を HPLC-APCI-MS 法での分子量決定が困難であった  $\beta$ -ラクタム系抗生物質に適用した。塩素付加イオンと比較した結果、検討したペニシリン系 8 化合物のうちスルベニシリンを除くすべての化合物について塩素付加または臭素付加イオンを得ることができたが、臭素付加イオンの  $[M-H]^-$  に対する相対感度が塩素付加イオンより高いことが分かった。また、セフェム系の 13 化合物のうち 4 化合物しか塩素付加イオンは検出されなかったが、臭素付加イオンは 9 化合物について検出することができた。検出できなかった薬物の分子量は大きく、硫酸基やカルボン酸基を有しているものが多いことを見出した。このように臭素付加イオンが塩素付加イオンより生成しやすく、本法がよりソフトなイオン化法であることを見出し、分子量決定に適していることを明らかにした。

次に、質量分析計を用いたイミダプリルの分析法について検討した。イミダプリルの代謝物の定量については、M2、M3 および M4 が低分子量であることから、GC-MS 法の適用が有利であると考え、GC-MS 分析のための誘導体化法について研究した。その結果、Pentafluorobenzyl (PFB) エステル誘導体化法によりイオン強度の強いフラグメントイオンが得られることを見出し、M3 および M4 の高感度定量が可能となった。M2 の PFB 誘導体は M3 および M4 の PFB 誘導体と比べ分子量が小さく、ヒト尿中の夾雑物の影響で測定できなかったため、PFB 誘導体化後、更に Heptafluorobutyl (HFB) 誘導体化を実施することで、M2 が高感度に定量できることを見出した。一方、イミダプリルおよびその活性体である M1 の定量については、既存法として HPLC 法が用いられているが、1 検体の HPLC 測定時間が 1 時間以上で前処理に 2 段階の固相抽出 (C18 および Si) を用いるため、煩雑かつ簡便性に欠けている。そこで、迅速定量が可能な desorption chemical ionization (DCI) 法を選択した。DCI 法は一般的に誘導体化を用いない分析法であるが、イミダプリルおよび M1 に

ークテーリングが認められたため、従来 DCI-MS-MS には応用されていなかった PFB 誘導体化法を用い、負イオンモードで高選択的な定量を行う手法を考案した。その結果、ピーク形状が向上し、高感度かつ高選択的な測定が可能となり、検体の DCI-MS-MS 測定時間を 5 分以内に短縮することができた。前処理においては、除タンパク操作を用いることにより 2 段階であった固相抽出法を 1 段階にすることが可能となり、前処理時間を短縮することができた。

最後に、質量分析法を用いたタルチレリンの分析法について検討した。タルチレリンの定量には従来 RIA 法や EIA 法が用いられていたが、測定に必要な抗体の調製が煩雑で測定に長時間を要し、数 mL もの患者のブランク血漿を必要とするため、より有用な理化学的測定法の開発が必要となった。そこで、ポリマー系固相抽出法および新規な Turbo-ionspray を用いた HPLC-MS-MS 法の適用を検討した。タルチレリンより 1 マスユニット大きい代謝物アシド体の測定への影響を防ぐため保持の強いカラム (DAISO PAC) を用い 6 分以内に完全分離し、前処理にはアルカリ領域でも使用可能なポリマー系固相抽出法を応用した。タルチレリンの回収率はほぼ定量的であることが分かった。本法での定量限界は 20 pg/mL であり、従来の RIA 法より測定感度が高く、本法は極めて高感度かつ簡便な測定法を開発することができた。

以上、本研究は、新しいイオン化法を開発し質量分析法を医薬品の定性分析および定量分析に応用することにより、医薬品の効率的な開発研究に貢献するものである。

### 論文審査の結果の要旨

医薬品分析には、原末、製剤中の主薬、不純物、分解物の構造決定や主薬等の定量などの品質保証を目的とした分析と生体試料中薬物濃度測定などの薬物動態評価を目的とした分析がある。両者とも医薬品の有効性ならびに安全性を確保する上で極めて重要である。特に後者では生体マトリックスの影響を受け易いため、適切な前処理、高選択的分析、高感度分析が必要不可欠である。その分析手法の一つに質量分析法 (MS) がある。本研究は、従来の質量分析法では困難あるいは不可能であった薬物ならびにその代謝物の分析法の開発とその応用に関する研究である。

まず、最初に、特異的な分子量決定法について検討した。新規ペネム系抗生物質 FC/TA-891 は、HPLC-APCI-MS 分析において APCI インターフェイス中での分解のため分子量確認が困難であった。そこで、クロロホルムを移動相に添加する手法を適用した。その結果、FC/TA-891 およびその活性体 FCE22101 両者の塩素付加イオンを得ることができたが、塩素の安定同位体比を明確に検出することはできず、単独では塩素付加イオンとして認識できなかった。そこで、安定同位体比が 1 : 1 であり、かつ塩素より電気陰性度が高い臭素を用いることを考案し、移動相にプロモホルムを加えた。その結果、FC/TA-891 および FCE22101 の臭素付加イオンを強く検出することができ、そのイオン強度比は安定同位体比を示すことを見出した。この方法を HPLC-APCI-MS 法での分子量決定が困難であった  $\beta$ -ラクタム系抗生物質に適用した。塩素付加イオンと比較した結果、検討したペニシリン系 8 化合物のうちスルベニシリンを除くすべての化合物について塩素付加または臭素付加イオンを得ることができたが、臭素付加イオンの  $[M-H]^-$  に対する相対感度が塩素付加イオンより高いことを見出した。また、セフェム系の 13 化合物のうち 4 化合物しか塩素付加イオンは検出されなかったが、臭素付加イオンは 9 化合物について検出することができた。検出できなかった薬物の分子量は大きく、硫酸基やカルボン酸基を有しているものが多いことを見出した。このように臭素付加イオンが塩素付加イオンより生成しやすく、本法がよりソフトなイオン化法であることを見出し、分子量決定に適していることを明らかにした。

次に、イミダプリルの代謝物の定量については、M2, M3, M4 が低分子量であることから、GC-MS 分析のための誘導体化法について研究した。その結果、Pentafluorobenzyl (PFB) エステル誘導体化法によりイオン強度の強いフラグメントイオンが得られることを見出し、M3 および M4 の高感度定量が可能となった。M2 は PFB 誘導体化後、更に Heptafluorobutyl (HFB) 誘導体化を実施することで、M2 が高感度に定量できることを見出した。一方、イミダプリルおよびその活性体である M1 の定量については、既存法である HPLC 法の HPLC 測定時間が 1 時間以上であり、前処理に 2 段階の固相抽出を用いるため、煩雑かつ簡便性に欠けていた。そこで、迅速定量が可能な desorption chemical ionization (DCI) 法を選択した。DCI 法は一般的に誘導体化を用いない分析法であるが、イミダプリルおよび M1 にピークテーリングが認められたため、従来 DCI-MS-MS には応用されていなかった PFB 誘導体化法を用い、負イオンモードで高選択的な定量を行う手法を考案した。その結果、ピーク形状が向上し、高感度かつ高選択的な測定が可能となり、1 検体の DCI-MS-MS 測

定時間を5分以内に短縮することができた。前処理においては、除タンパク操作を用いることにより2段階であった固相抽出法を1段階にすることが可能となり、前処理時間を短縮することが可能となった。

最後に、質量分析法を用いたタルチレリンの分析法について検討した。タルチレリンの定量には従来RIA法やEIA法が用いられていたが、抗体の調製が煩雑で、測定に長時間を要し、数mLもの患者のブランク血漿を必要とするため、より有用な理化学的測定法の開発が必要となった。そこで、新規なTurbo-ionsprayを用いたHPLC-MS-MS法の適用を検討した。タルチレリンより1マスユニット大きい代謝物アシド体の測定への影響を防ぐため、保持の強いカラムを用い6分以内に完全分離し、前処理にはアルカリ領域でも使用可能なポリマー系固相抽出法を応用した。本法での定量限界は20pg/mLであり、従来のRIA法より測定感度が高く、本法は極めて高感度かつ簡便な測定法を開発することができた。

以上、基礎的および応用的研究は、新しいイオン化法を開発し質量分析法を医薬品の定性分析および定量分析に応用することにより、医薬品の効率的な開発研究に貢献できるものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値のあるものと認める。

さらに、平成15年1月28日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果優秀と認定した。