

Technical Review

サイズ排除と逆相のミックスモードカラムを用いたイソクラティック溶出によるアルブミン含有薬物試料の直接LC-MS分析

*新保邦明、岡田由治、近藤英幸

Mixed-mode Column with Size Exclusion and Reversed Phase for Direct LC-MS Analysis of Drug Samples Containing Albumin

Kuniaki Shimbo*, Yoshiji Okada and Hideyuki Kondo

Separation & Refining Materials Group, Showa Denko K.K., 5-1 Ogimachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa, 210-0867

Abstract

We developed a simple and rapid method for the direct LC-MS analysis of polar-drugs containing polymer matrix (e.g. proteins) using a mixed-mode column serving both as a pretreatment and an analytical column. The mixed-mode column with size exclusion and reversed phase (Shodex MSPak GV-50 2 B) provided successful separation of bovine serum albumin and three kinds of barbitals, which avoided ion-suppression to keep the sufficient sensitivity of each drug in the ESI-negative mode. Isocratic elution with (10 mM ammonium acetate)/acetonitrile = 70/30 at 0.20 ml/min for 5 min was a simple and rapid procedure compared with the column-switching technique using two columns and a gradient-elution system.

Keywords : direct LC-MS analysis, mixed-mode column, size exclusion, reversed phase, isocratic, protein, ion-suppression

【緒言】

体液中の低分子薬物およびその代謝物をLC-MS分析する場合、許容量以上の高分子マトリックス（タンパク質など）が重なって溶出すると、イオン化が抑制されMSの感度が著しく低下する。この問題を解決するには、有機溶媒を添加して高分子を沈殿除去するだけでは不充分であるため、通常はカラムスイッチングLC法が併用される。しかしこの方法は、分析カラムのほかに前処理カラム、特殊な流路切り替えバルブ、3台のLCポンプ（1対のグラジエントシステムを含む）と3種類の移動相を必要とするので、簡便とはいえない。また、分析のたびに前処理カラムと分析カラムの両方を初期状態に戻さなければならないので、迅速さにも限界がある。

簡便さと迅速さを高めるには、前処理（高分子マトリックスの除去）と分析（低分子の分離）を一度に達成できるカラムがあればよい。さらに、イソクラティック溶出または変化

幅の小さなグラジエント溶出で、極性薬物も感度よく分析できることが望まれる。しかし、既存の内面逆相型（ISRP）や浸透制限型（RAM）と呼ばれるカラムの中には、前処理カラムとして優れたものはあるが、前処理兼分析カラムとしてLC-MSに適用された例は少ない〔1〕。マトリックスの高除去率を維持したまま極性薬物の保持容量を稼ぐのが難しいためであろう。

そこで我々は、新しく開発したサイズ排除と逆相のミックスモードカラムShodex MSPak GV-50 2 B（試作品）を前処理兼分析カラムとして用い、イソクラティック溶出によるアルブミン含有薬物試料の直接LC-MS分析を試みた。このカラムに充填されているのは、中極性の多孔質架橋ポリマー粒子（排除限界分子量：プルランで約20,000）で、粒子表面のみならず細孔内面にも点在する水酸基により極性薬物との水素結合が促進されるように設計されている。

【実験】

比較的極性の高い低分子薬物として3種のバルビタール類 (Fig.1) 高分子マトリックスとして牛血清アルブミン (BSA、分子量：約67,000) を選んだ。LC-MSシステムとしては、Agilent 1100シリーズHPLCシステム (アジレントテクノロジー製) にLCQ Advantage (サーモエレクトロン製) を連結し、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で使用した。前処理兼分析用カラムとしてShodex MSPak GV-50

2 B (50×2.0 mm i.d., 昭和電工試作品) を用い、カラム温度30℃、(10 mM 酢酸アンモニウム) アセトニトリル = 70/30 を移動相とする5分間のイソクラティック溶出 (0.20 ml/min、スプリットなし) で分析を行なった。

まず、薬物 (各5 µg/ml) のみをイオン交換水に溶かした試料10 µlを注入し、UV検出 (220 nm) およびESI-負イオンモードによる選択イオンモニタリング (SIM) にて測定した (イオン化電圧：5 kV)。次に、薬物 (各5 µg/ml) とBSA

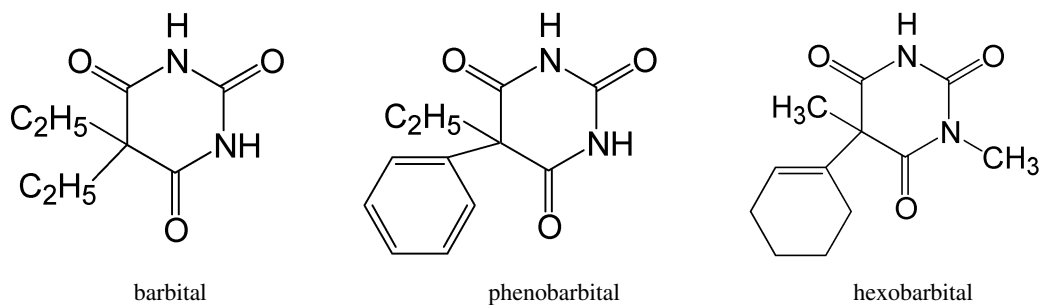


Fig.1. Structures of barbital.

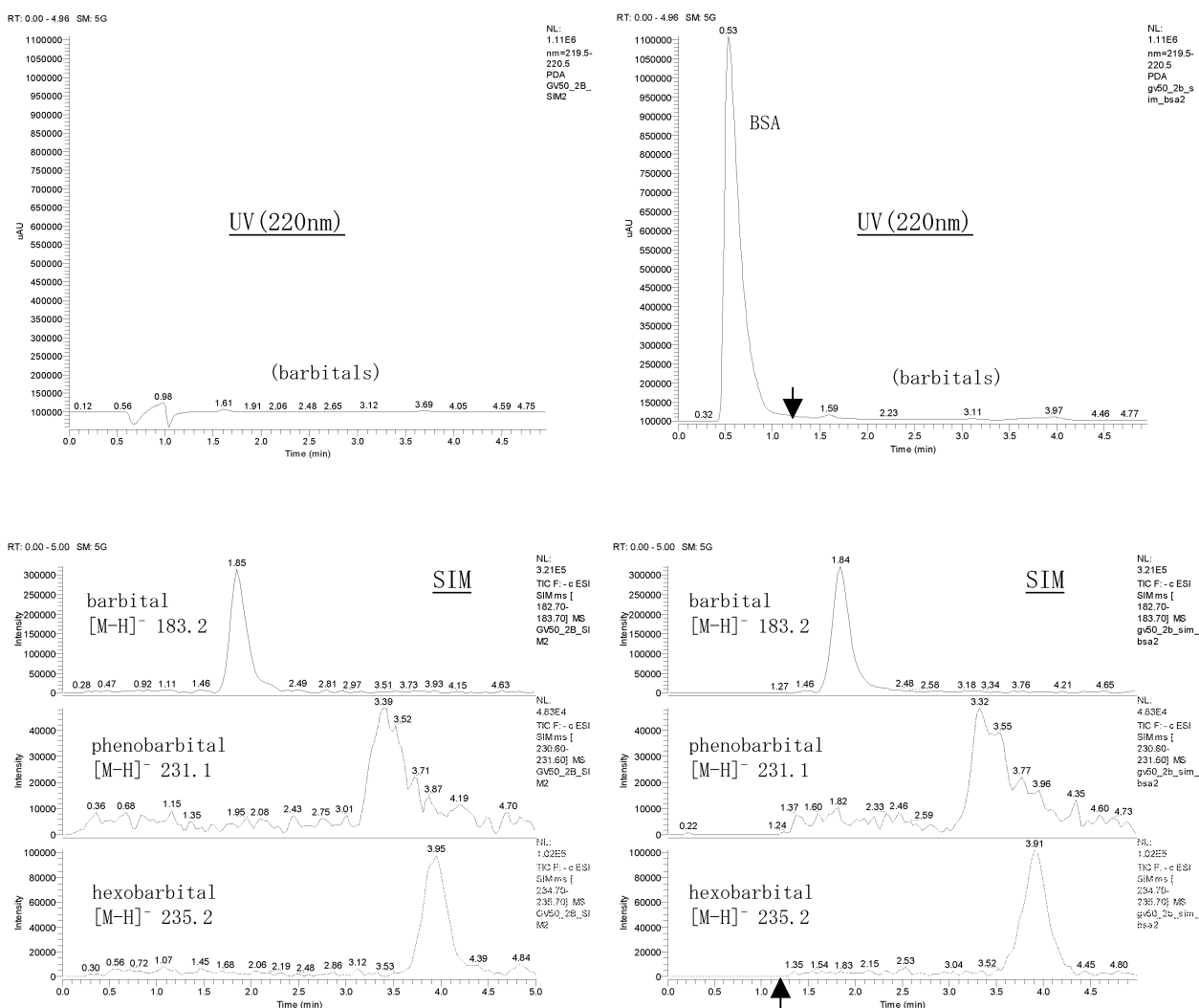


Fig.2. UV chromatograms (upper) and SIM chromatograms (lower) of barbital without BSA (left) and with BSA (right).

(0.7 mg/ml) をイオン交換水に溶かした試料10 μ l を注入し、同様に測定した。ただし後者では、BSAが高濃度で溶出している部分(1.2 minまで)の溶出液はMSへ導入しなかった。

【結果と考察】

薬物試料の分析結果をFig. 2の左側に、BSA含有薬物試料の分析結果をFig. 2の右側に示す。UV検出クロマトグラムの縦軸最大値は、BSAのピークトップに合わせてある。また、SIMクロマトグラムの縦軸最大値は、同じm/zにおける測定では合わせてある。

初めに行なった薬物試料の分析結果から、各薬物は脱プロトン化した負の分子イオン[M-H]⁻として感度よく検出され、バルビタール(m/z 183.2)、フェノバルビタール(m/z 231.1)、ヘキソバルビタール(m/z 235.2)が保持時間1.3~4.5 minの間によく分離して溶出することが分かった。

次に行なったBSA含有薬物試料の分析では、BSAが保持時間0.4~0.9 minに集中して溶出したので、バルビタール溶出の直前で流路を切り替える瞬間(1.2 min)まで十分な余裕があった。得られた各薬物のSIMクロマトグラムは、ピークの形状・高さともに、BSAを含まない場合の結果と非常によ

く一致した。フェノバルビタールの感度は他の2種に比べて低かったが、BSAの有無による差は認められなかった。

充填剤の排除限界より大きいBSAの場合は、サイズ排除モードが働くため逆相的な相互作用は無視できるほど小さくなり、その結果、先端にまとまって溶出されたと考えられる。それに対し、低分子のバルビタール類は細孔内に入って逆相モードで分離されるが、細孔内面に点在する水酸基との水素結合により保持が若干増加するので、BSAとの分離がさらに促進されたと推定される。

本報告で用いたShodex MSPak GV-50 2B(50×2.0 mm i.d.)は、昭和電工株式会社の試作カラムであるが、他のカラムサイズも含めて近々上市される予定である。

【結論】

サイズ排除と逆相のミックスモードカラムを前処理兼分析用カラムとしたイソクラティックLC-ESI-MS法で、アルブミンを含む極性薬物試料の簡便・迅速分析が可能になった。

【文献】

- [1] Papp, R.; Mullett, W. M.; Kwong, E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 36, 457-464.