

コンパクトな質量検出器で創薬研究に貢献

—質量検出器 Chromaster 5610—

渡邊 正樹 Watanabe Masaki 源 法雅 Minamoto Norimasa 吉江 正樹 Yoshie Masaki

豊崎 耕作 Toyosaki Kosaku 吉岡 信二 Yoshioka Shinji

質量分析計は、有機合成や生化学分野をはじめとした科学分野全般で広く用いられている。株式会社日立ハイテクサイエンスは、大型の質量分析計とは異なる、新たなコンセプトに基づいた、より多くのユーザーが簡便に使用で

きる質量検出器Chromaster 5610を製品化した。本稿では、この分析装置を用いた創薬研究分野での応用事例を紹介する。

1. はじめに

質量分析法とは、高電圧下で試料成分をイオン化し、成分分子の質量数を測定する技術である。質量情報を利用して、成分の同定、構造解析、定量が可能であり、有機合成や生化学分野をはじめとした科学分野全般で広く用いられている。

特に製薬業界では、創薬研究から臨床試験、生産管理とあらゆる段階で質量分析技術が活用されている。高分解能MS (Mass Spectrometer：質量分析計) を用いた構造解析や、高感度MSを用いた定量分析がその中心であるが、高コストと取り扱いの難易度からオペレータが専門化され、すべてのニーズを満たしているとは言えない。逆に合成研究の分野などを中心に、初心者でも手軽に扱える簡便なMSへのニーズが高まっている。

2. コンパクトな質量検出器の開発

科学分野の強力な分析ツールである質量分析計であるが、その普及率は決して高くない。高速液体クロマトグラフ (HPLC：High Performance Liquid Chromatography) 市場においては、近年、日本薬局方の試験法に質量分析法が新規収載され、主に製薬市場においては一般のHPLCユーザーの間でも質量分析のニーズが高まっている。しかし、HPLC市場はワールドワイドにおいて20万台を超えるLC (Liquid Chromatography：液体クロマトグラフィー) システムが導入されているが、質量分析計との接続率は20%以下であり、HPLCユーザーにとって、質量分析計は導入

障壁が高い。HPLC用光検出器と比較した場合、導入率はまだまだ低いのが現状である。

導入率の低い大きな要因として、質量分析計の設置環境、装置価格、メンテナンス性、操作性などが挙げられる。高速液体クロマトグラフ用質量検出器Chromaster 5610は、HPLCユーザーにとって導入障壁となる上述の課題を



図1 | Chromaster LC/MSシステム

Chromaster LC/MS (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry：液体クロマトグラフ—質量分析) システムは、Chromaster HPLC (High Performance Liquid Chromatography：高速液体クロマトグラフ) システム (左) にChromaster 5610質量検出器 (右) を組み合わせることで、より信頼性の高い分析が可能となる。

改善し、新しいユーザーに向けて簡便に使える質量検出器を低コストで提供することを目的として開発された(図1参照)。

(1) コンパクト設計

小型で高精度なイオン光学系の開発、小型真空ポンプの採用によって省スペース化を実現し、Chromaster HPLCシステムと同様の接地面積となっている。

(2) 設置条件の緩和

本製品ではLC/MSシステムとして使用する際、質量検出器前段で導入する溶媒(移動相)を $\frac{1}{100} \sim \frac{1}{250}$ の比で分割(スプリット)し、流量を数マイクロリットル毎分に低減して導入する。そのため、環境中に排出される溶媒量を大幅に低減している。また、イオン化時に必要となる窒素ガスの使用量も、一般的な質量分析装置と比べて大幅に削減されている。このため、窒素ガス供給設備もより簡便なもので使用可能となっている。また、一般的な質量分析装置で必要な200V電源ではなく、100Vで稼働することができる。

(3) メンテナンス性の向上

質量分析装置のメンテナンスには真空停止が必要となるのが一般的であるが、本製品ではイオン導入部に大気圧イオンフィルタ(AIF: Atmospheric-pressure Ion Filter)というイオン光学系フィルタを導入した。日常的なメンテナンスは、真空停止せずにこれを取り外して、洗浄して元に戻すだけである(図2参照)。AIFは内部でイオン経路が直角に曲がり、イオン導入部から取り込まれた中性分子や夾(きょう)雑イオンを低減させる効果がある。さらにその後段の真空内部への導入部に軸ずらし室があり、残った夾雑イオンをさらに低減させて真空奥部の電極汚れを防止している。

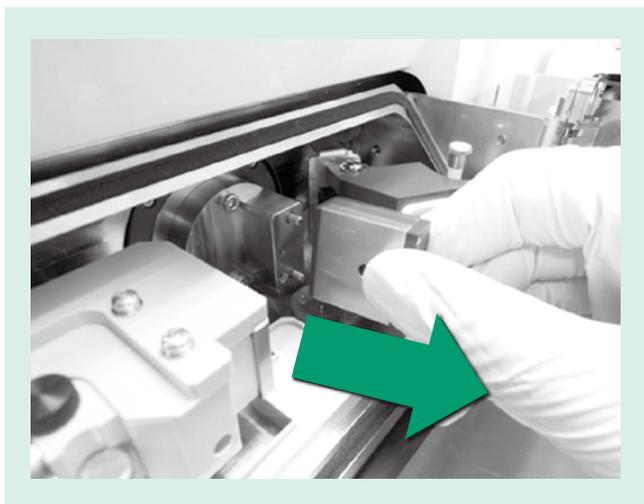


図2 | イオン導入部からAIFを取り外すところ

日常的なメンテナンスは写真中央のAIF(Atmospheric-pressure Ion Filter: 大気圧イオンフィルタ)を取り外して洗浄し、再度取り付けるだけで完了する。

小型化と設置条件の緩和により、これまで条件的に設置に制約があったHPLCの実験室への導入がしやすくなり、また、メンテナンス性を向上させてユーザーの負担を軽減することで、大型の質量分析計とは異なる新たな市場の獲得をめざしている。

3. 創薬研究分野における応用事例

ここでは、Chromaster 5610質量検出器の3つの使用形態である、質量分析法として一般的な質量検出器単独(ダイレクトインフュージョン法)、LC/MS、近年開発された手法であるTLC(Thin Layer Chromatography: 薄層クロマトグラフィー)-MS、およびそれらの創薬研究分野への応用事例を紹介する。

3.1 天然物合成中間体の質量情報の確認¹⁾

創薬ターゲットとなる天然化合物の全合成では、反応の各過程で目的化合物の生成を確認する必要がある。特に複雑な構造を持つ天然化合物の場合、その合成過程も複雑となるため、途中段階での反応生成物の分析が重要となる。ここでは、抗がん活性を有する天然物であるPhaeosphaeride Aの全合成において、その途中段階で生成される中間体化合物4種についてChromaster 5610質量検出器を用いて質量分析を行った事例を紹介する(図3参照)。

分析条件を表1に示す。図3中の化合物AからDをそれぞれメタノールで10 ppmに希釈し、ダイレクトインフュージョン法でChromaster 5610質量検出器に直接導入して測定した。その結果、いずれの化合物についてもそれぞれのナトリウム付加型分子イオン($[M+Na]^+$)が観測された。ダイレクトインフュージョン法はシリンジに充填したサンプルを直接導入するだけの非常に簡便な測定法で、短時間で化合物の質量情報を得ることができる。

3.2 LC/MSによる微生物培養液の分析

液体クロマトグラフィー(HPLC)は、試料中の各成分の固定相と移動相に対する親和性(保持力)の差によって成分を分離し、成分の性質に合わせた検出器で検出する。一般にUV(Ultraviolet)検出器が広く用いられるが、この場合、物質の定性分析は主に保持時間で、定量分析はピーク強度・面積で行われる。ダイオードアレイ検出器(DAD: Diode Array Detector)はUV検出器と同じ原理を用いるが、時間軸とピーク強度に加え、スペクトル情報が得られるため、三次元のクロマトグラムデータを得ることができる。

質量検出器は、HPLCと組み合わせることにより、時間軸×ピーク強度×質量情報(マスペクトル)の三次元クロ

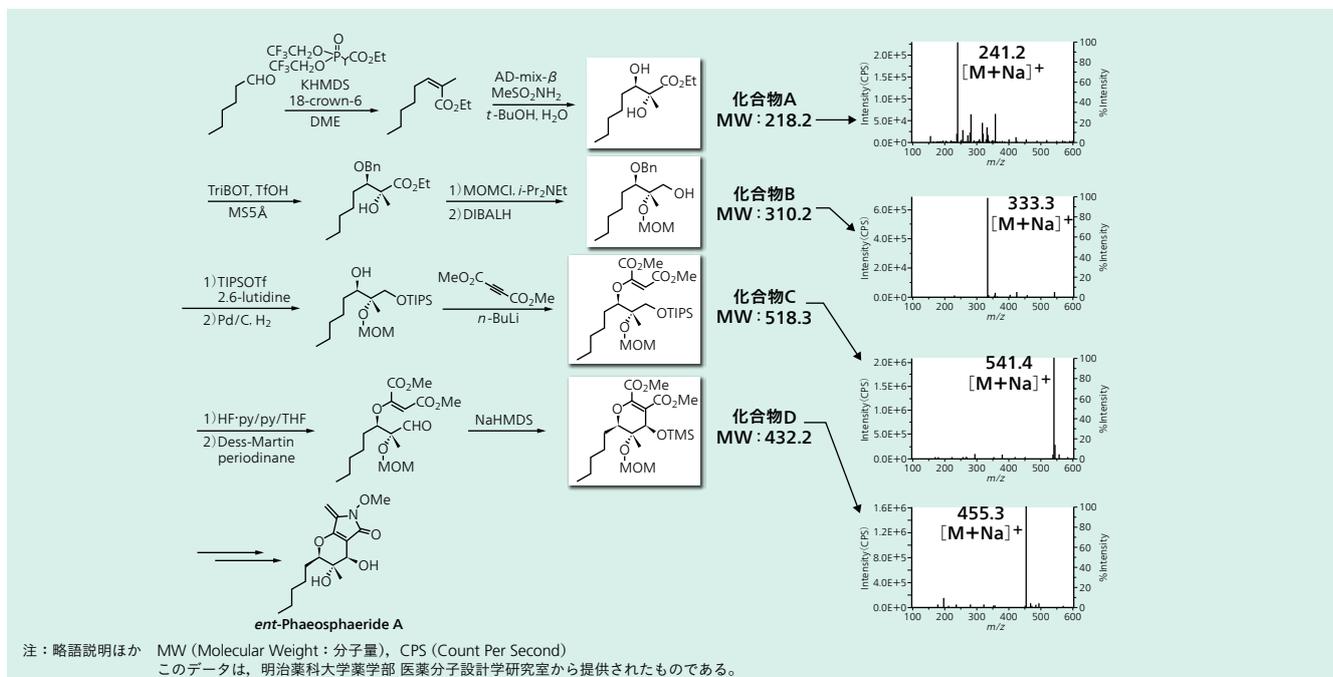


図3 ent-Phaeosphaeride Aの全合成スキーム (左) と合成中間体化合物AからDのマススペクトル (右)

天然物の合成には多くの反応工程を必要とする。質量検出器を用いて途中段階の生成化合物の成分を分析することで、各工程で合成反応が正しく進行していることを確認することができる。

表1 ent-Phaeosphaeride A中間体化合物分析 (ダイレクトインフュージョン法) の分析条件

ent-Phaeosphaeride A中間体化合物分析 (ダイレクトインフュージョン法) の分析条件を示す。

イオン化法	ESI
極性	Positive
イオン化電圧	2,200 V
測定モード	Scan
ガス流量	0.5 L/min
IS/AIF温度	70°C/120°C
シリジポンプ流速	2 μL/min

注：略語説明 ESI (Electrospray Ionization: エレクトロスプレーイオン化法), IS (Ion Source: イオン源)

マトグラムデータを取得することができる (図4参照)。DADのみの場合、同時に複数成分が溶出されるような多量の成分を含む試料の分析では、UV吸収を持たない化合物の分析は不可能である。また、同時溶出する成分の濃度

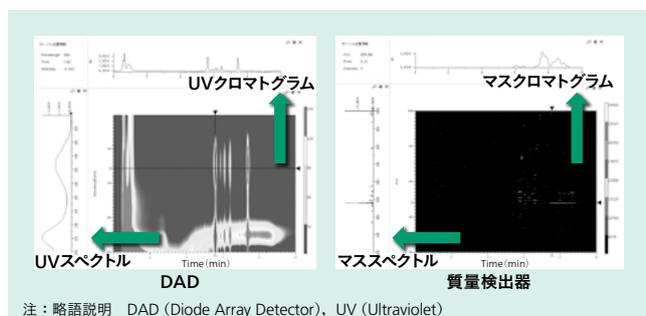


図4 微生物培養液を分析した際のDADおよび質量分析データの等高線図

等高線表示により、データを時間軸×ピーク強度×質量情報で三次元的に表示し、全体像の把握や包括的な評価が可能となる。Chromaster 5610は、DADデータで一般的なこの機能を質量分析データにも適用している。

差や移動相の影響を受けやすいため、同定が難しくなることがある。一方で質量検出器にも、イオン化しにくい成分の検出がしづらい、質量が同じ化合物の同定が難しいなどのケースがある。この解決方法として、2つの特性の異なる検出器を組み合わせた分析事例を紹介する。

微生物や植物などの天然資源からの生物活性化合物のスクリーニングは、創薬ターゲットとなるリード化合物を発見する古典的な手法である。しかし、大量かつ多様な新規化合物を人工的に合成して活性成分を単離するハイスループットスクリーニングが主流になりつつある現在でも、その重要性が再認識されている²⁾。ここで紹介する事例は、Chromaster 5610質量検出器とDADを組み合わせたLC/MSシステムによる、微生物培養液からの有効成分のスク

表2 微生物培養液分析 (LC/MS分析) の質量検出器設定条件

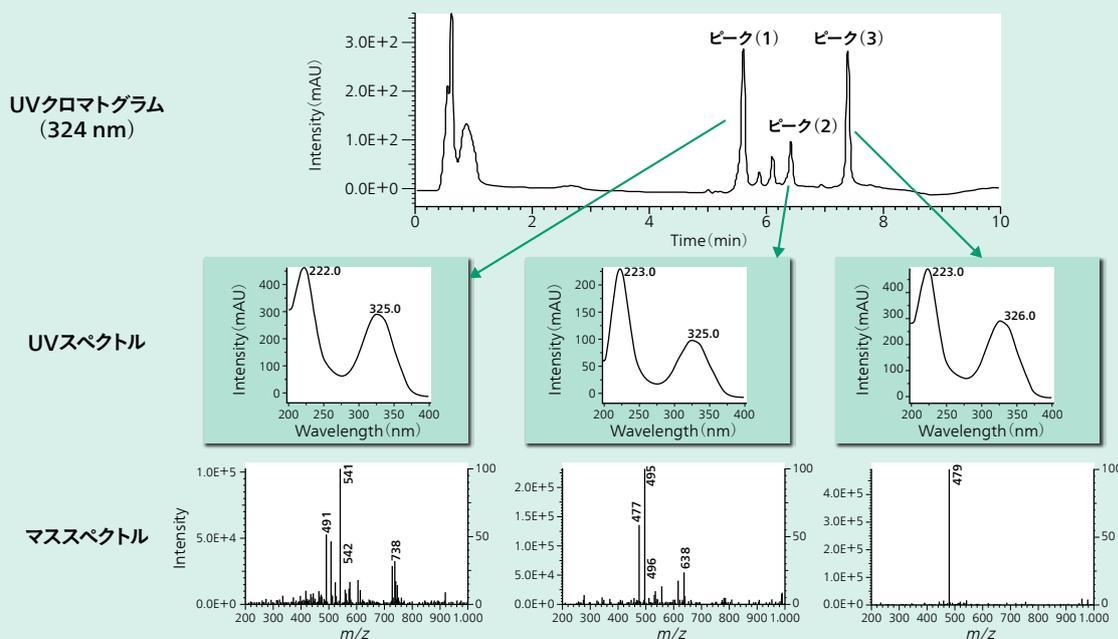
微生物培養液分析 (LC/MS分析) の質量検出器設定条件を示す。

イオン化法	ESI
極性	Positive
イオン化電圧	2,700 V
測定モード	Scan : (m/z 200-400)

表3 微生物培養液分析 (LC/MS分析) の液体クロマトグラフ設定条件

微生物培養液分析 (LC/MS分析) の液体クロマトグラフ設定条件を示す。

カラム	LaChromUltra (1.9 μm) 2.0 mm I.D. × 50 mm
移動相	A : 0.1% HCOOH in H ₂ O (v/v) B : 0.1% HCOOH in CH ₃ CN (v/v) % B = 20 (0-0.5 min) -100 (3-5 min) -20 (5.1-10 min)
流速	0.2 mL/min (スプリット比 = 1 : 50)
注入量	20 μL



注：このデータは、北里大学薬学部微生物薬品製造学教室の協力を得て測定したものである。

図5 | 微生物培養液から分離したピークの成分同定

UVスペクトルは移動相や同時溶出する成分の影響を受けやすく、ここで示した例のように区別が付きにくい場合がある。このようなときにマススペクトルを併用することで成分の違いが明確になり、成分同定の信頼性が向上する。

リーニングである。分析条件を表2, 表3に示す。

図4に示したように、Chromaster 5610の質量分析データは、DADの測定データと同様の等高線表示に対応している。微生物培養液のように多様な成分を含むサンプルの場合、そのデータは非常に複雑になるが、三次元情報を視覚化することで測定ごとの変化を捉えやすくしている。

図5では、UV波長324 nmで検出されたピーク(1)から(3)について、それぞれに対応するUVスペクトルとマススペクトルを示している。この場合、UVスペクトルは3点とも類似のパターンを示したが、マススペクトルが全く異なっており、3つのピークに含まれる成分がそれぞれ別の物質であることが示された。この事例は質量分析に適した成分であるが、イオン化しにくい化合物は逆にUV分析が適しており、このようにUVスペクトルとマススペクトルのデータを相補的に用いることにより、多様な成分を含む試料の分析が可能となる。

3.3 TLC-MSインタフェースを使用した質量分析

薄層クロマトグラフィーは、ガラスなどの板の上にシリカゲル、アルミナなどの吸着剤を薄膜状に固定した薄層プレートに混合物をスポットし、溶媒を用いて展開して分離を行うクロマトグラフィーの一種である。安価で簡単に混合物の成分を分離分析する手法として、合成研究分野などで広く用いられている。

TLCで展開した試料を質量分析によって同定する場合、

(1) 分離されたスポットの掻き取り, (2) 抽出, (3) 質量分析計での分析という手間のかかる作業が必要であった。しかし近年、図6に示すような、スポットからの直接抽出～質量分析計へのオンライン導入を可能とする技術が製品化され、同定分析が大幅に簡便化された。ここではCAMAG社製TLC-MSインタフェース2(英弘精機株式会社)とChromaster 5610質量検出器を組み合わせた、オンラインTLC-MS分析の事例を紹介する。表4, 表5に分析条件を示す。

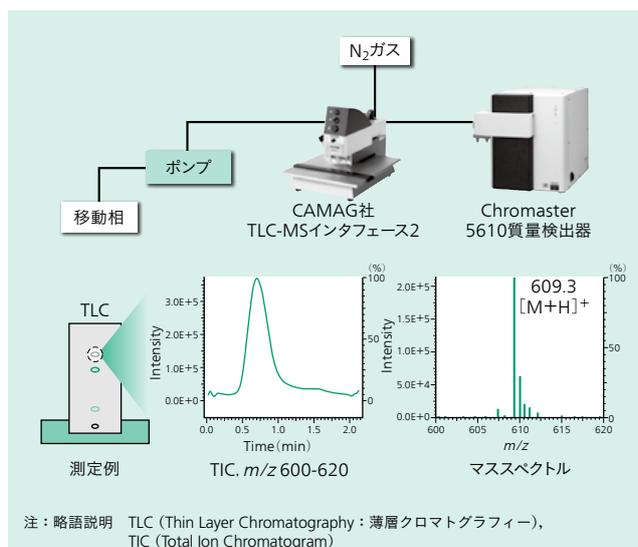


図6 | オンラインTLC-MSシステム構成例と分析例(レセルピン)

TLCプレート上のスポットから直接成分を抽出してオンラインで質量検出器へ導入し、1~2分で質量情報を得ることができる。

表4 | TLC-MS分析での質量検出器設定条件

TLC-MS分析での質量検出器設定条件を示す。

イオン化法	ESI
極性	Positive
イオン化電圧	2,600 V
測定モード	Scan

表5 | TLC-MS分析でのポンプ設定条件

TLC-MS分析でのポンプ設定条件を示す。

移動相	メタノール
流速	0.1 mL/min (スプリット比 = 1 : 50)

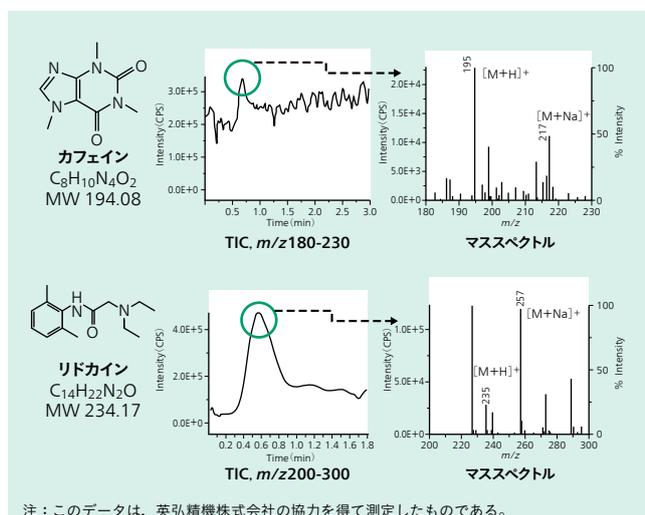


図7 | TLC-MSシステムによるカフェイン(上)、リドカイン(下)の分析例

TLCプレート上のスポットから成分を直接抽出し、200 ng相当のカフェイン、リドカインをそれぞれ検出した。

TLCで展開したカフェインとリドカインの質量分析データを図7に示す。メタノールに溶解したカフェインとリドカイン各2 μ L (200 ng相当) をTLCプレート上に展開し、スポットに抽出用ピストンを密着させ、ポンプで送液した溶媒(メタノール)を用いて成分を抽出した。抽出液は速やかにChromaster 5610質量検出器に送液され、1~2分で同図のような質量情報を得ることができた。このようにして短時間でTLC上に展開した成分の同定が可能である。

4. おわりに

ここではコンパクトな質量検出器Chromaster 5610を用いた3つの応用例、ダイレクトインフュージョン法による合成中間体の分析、LC/MSを用いた微生物培養液のスクリーニング分析、TLC-MSを用いた化合物分析を紹介

した。

こうした実験室レベルでの簡易的な質量検出器を活用した分析のニーズはまだ開拓の余地があり、今後も顧客ニーズに即したソリューションを提供していく。

謝辞

本稿作成にあたり、明治薬科大学薬学部 医薬分子設計学研究室、北里大学薬学部 微生物薬品製造学教室から研究データを提供していただいた。深く感謝の意を表する次第である。

参考文献

- 小林：Chromaster 5610による天然物合成中間体の質量情報の確認，HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS (2016.3)
- 菅，外：今こそ，天然物の全合成！——優れた生体機能分子の創製を目指した新しい取り組み，化学，Vol.59, No.11 (2004)

執筆者紹介



渡邊 正樹

株式会社日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 光学設計部 所属
現在、質量検出器のシステム開発に従事
博士(工学)



源 法雅

株式会社日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 光学設計部 所属
現在、質量検出器のシステム開発に従事



吉江 正樹

株式会社日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 光学設計部 所属
現在、質量検出器のアプリケーション開発に従事



豊崎 耕作

株式会社日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 光学設計部 所属
現在、質量検出器のシステム開発に従事



吉岡 信二

株式会社日立ハイテクノロジーズ
科学・医用システム事業統括本部 バイオ分析システム製品本部
バイオシステム設計部 所属
現在、質量検出器の設計開発に従事