

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	蛍光およびMS 検出を指向したLC 用新規誘導体化試薬の開発と その医薬品ならびに食品分析への応用研究
作成者（著者）	植草, 秀介
公開者	東邦大学
発行日	2021.03.17
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 7.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 吉尾 隆 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲1008号
学位記番号	甲第130号
学位授与年月日	2021.03.17
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28181795">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28181795</a>

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

# 蛍光およびMS検出を指向したLC用新規誘導体化試薬の開発と その医薬品ならびに食品分析への応用研究

分子病態解析学講座 植草 秀介 印

## 【背景・目的】

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、汎用性の高い分離・定量ツールとして、様々な研究分野で使用されている。医療現場においても、HPLC は主に Therapeutic drug monitoring (TDM) で活用される。しかしながら、光学活性を持ち、片方の光学異性体のみが活性を有する薬物の場合、光学異性体の分離が必要とされる。また、特に小児においては採血時の血液量が少ないことが望ましく、定量法より高感度化が不可欠である。このような HPLC の分離性能や検出感度の向上には、プレカラム誘導体化法が有効である。

一方、質量分析計 (MS) を HPLC の検出器として使用することで分析対象物質の情報を得やすくなったが、プレカラム誘導体化により更なる高選択、高感度化が可能である。

以上の背景から、本研究では蛍光およびMS検出を指向した HPLC 用の新規プレカラム誘導体化試薬の開発を行った。次いで、医薬品として抗てんかん薬ビガバトリン (VB)、食品としてアサリをはじめとする貝類のアミノ酸分析への応用を検討した。

## 【実験・結果・考察】

### I. 医薬品 (ビガバトリン) 分析に用いる新規誘導体化試薬の開発とその適用

VB (図 1) は不斉炭素をもつ抗てんかん薬で、ラセミ体で投与されるが、S体が薬理活性を有する。VBは、国内では小児の点頭てんかんに用いられ、安全性を担保する観点から血中濃度測定に有益性が報告されている。しかし、VBは芳香環を持たないため、蛍光検出するには誘導体化が必要である。そこで、本研究ではVBのアミノ基を誘導体化することで、光学分離、蛍光検出を可能とする新規誘導体化試薬を開発することとした。

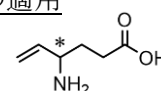


図1 ビガバトリン (VB) の化学構造式

新規誘導体化試薬をデザインするにあたり、蛍光団として4-ヒドロキシキノリン-2-カルボン酸 (キヌレン酸、以下 KYNA) の化学構造を基に、6位に様々な置換基を持つ KYNA-6 位置換体を合成した。蛍光特性を調べたところ、KYNA-(3-oxomorpholino) 置換体で最も高い蛍光強度が得られ、この置換体は有機溶媒よりも水含有量が高い条件下で強い蛍光を発する性質があった。そのため、逆相分配 HPLC で水の割合が高い移動相を使用する場合に蛍光強度が強くなり、高感度定量に適することが示唆された。次に、光学異性体を分離できるようにするため、環構造を有する光学活性なプロリン、また、アミノ基等と反応させるために活性エステル、更に KYNA5 位のフェノール性ヒドロキシ基の保護基として 2-Nitrobenzensulfonyl (ノシル) 基を導入し、2,5-dioxypyrrolidin-1-yl (4-(((2-nitrophenyl)sulfonyl)oxy)-6-(3-oxomorpholino)quinoline-2-carbonyl) prolinat (以下 Ns-

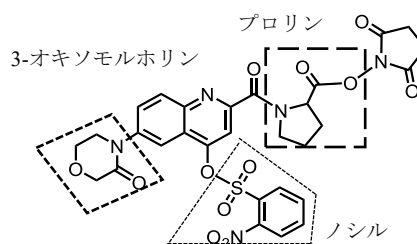


図2 Ns-MOK-Pro-OSu

MOK-(R)- or (S)-Pro-OSu (図2) を7工程を経て合成した。

Ns-MOK-(R)-Pro-OSu により VB 誘導体化反応を行い、蛍光定量法の開発を検討した。塩基性条件下、60°C、60 分の誘導体化反応によって、クロマトグラムにはノシル基が脱離した化合物 (MOK-(R)-Pro-VB) のピークが検出されたが (LC-飛行時間型 MS で確認)、MOK と Ns-MOK の蛍光強度を比較したところ、MOK の蛍光強度が強かったため、蛍光検出する場合は Ns 脱離体が適すと考えられた。MOK-(R)-Pro-VB は、固相抽出に陰イオン交換樹脂、カラムにオクタデシルシリル(ODS) カラムを用いることにより、分析時間 40 分で完全に光学分割 ( $R_s = 13.0$ ) され、検出限界は(R)-VB が 0.80 pmol、(S)-VB が 0.37 pmol と高感度であり、VB の TDM に用いるには十分であることが示された。次に、分析時間の短縮を図るため、ODS カラムに代わり、ODS の炭素鎖と強イオン交換基で修飾した粒子を充填したミックスマード型カラムを使用し、その移動相条件を種々検討した結果、12 分以内で VB の両光学異性体の分離分析を達成した (図3)。

本 HPLC 法により Sprague-Dawley 系雄性ラット (9 週齢) における VB (50 mg/kg) 経口投与後の血漿中 VB 光学異性体濃度を定量することができ、また、その濃度は LC-MS/MS 法を使用して定量した値と高い相関を示した (図4)。この結果より、Ns-MOK-Pro-OSu を用いた VB の蛍光定量法は、LC-MS を有しない医療施設においても、LC-MS に代わる TDM の分析ツールとして活用できる可能性が示唆された。

本 HPLC 法により Sprague-Dawley 系雄性ラット (9 週齢) における VB (50 mg/kg) 経口投与後の血漿中 VB 光学異性体濃度を定量することができ、また、その濃度は LC-MS/MS 法を使用して定量した値と高い相関を示した (図4)。この結果より、Ns-MOK-Pro-OSu を用いた VB の蛍光定量法は、LC-MS を有しない医療施設においても、LC-MS に代わる TDM の分析ツールとして活用できる可能性が示唆された。

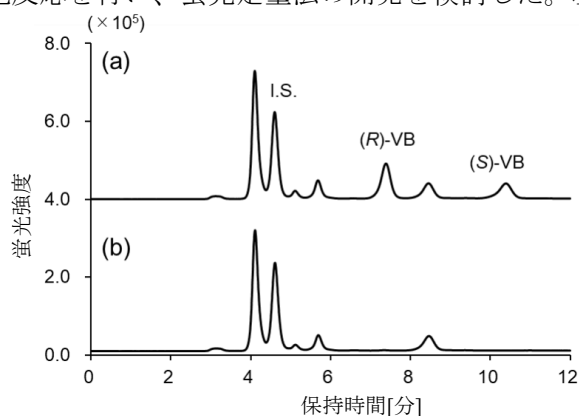


図3 (a) VB (50 mg/kg) 経口投与後 (1 h) ラット血漿 (b) 投与前ラット血漿 [+ 内標準物質 (I.S.) ]

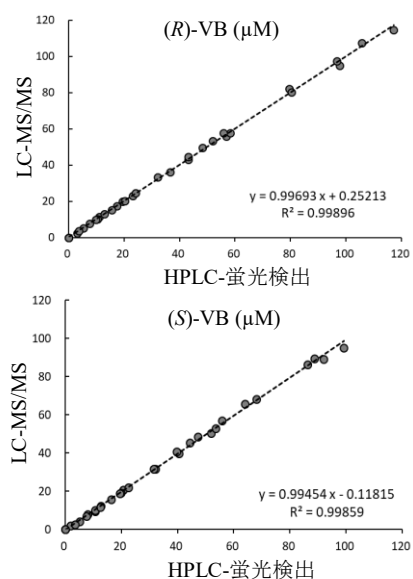


図4 HPLC-蛍光検出法 (横軸) ならびに LC-MS/MS 法 (縦軸) で得られた定量値の相関プロット図

## II. 食品中アミノ酸分析のターゲット探索のためのノンターゲットメタボロミクス

誘導体化試薬について、他のターゲット分子の分離・定量研究への適用性を探るため、その前段階として精神病前駆期に該当する精神病罹病危険状態 (以下 ARMS) に着目し、低分子代謝物を網羅的に解析するノンターゲットメタボロミクスを検討した。文書による同意を得た ARMS 患者 ( $n = 24$ ) ならびに健常人 ( $n = 23$ ) の血清試料 (本学医学部倫理委員会承認番号 A17039-26012、薬学部生命倫理委員会承認番号 2016-006) 30  $\mu\text{L}$  に含まれる低分子について、超高速液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析計 (UHPLC-HRMS)

による分析、部分最小2乗モデルを使った判別分析である Orthogonal partial least squares-

discriminant analysis (OPLS-

DA)、変数の重要度を示す

Variable importance for projection

(VIP) 等により、統計解析を

行った。得られた血清中生体分

子データにより ARMS と健常人

の群が分離され、イノシン

(Ino)、乳酸 (Lac)、タウリン

(Tau) およびグルタミン酸

(Glu) 等の血清中濃度が、ARMS と健常人の分離に寄与していた。Lac、Glu 濃度の変動

は報告されていたが、新たに Ino、Tau 濃度が変動していることが分かった (表 1)。

表 1 ARMS と健常人で大きな差があった代表的生体分子

Positive ion-mode	Formula	Measured accurate mass ( $m/z$ )	$-\log_{10} q$ value	$\log_2 FC$	VIP
Glutamate	C5 H9 N O4	147.0533	2.13	1.25	2.61
Taurine	C2 H7 N O3 S	125.0148	2.08	-0.78	2.38
Inosine	C10 H12 N4 O6	268.0810	2.08	1.18	2.07
Ornithine	C5 H12 N2 O3	132.0900	1.56	-0.37	1.93
Negative ion-mode	Formula	Measured accurate mass ( $m/z$ )	$-\log_{10} q$ value	$\log_2 FC$	VIP
Lactate	C3 H6 O3	90.0318	1.60	-0.61	2.45
2,3-Dihydroxy propanoate	C3 H6 O4	106.0267	1.60	-0.54	2.12
Inosine	C10 H12 N4 O6	268.0810	1.73	1.14	2.04
citramalate	C5 H8 O5	148.0373	1.62	-1.13	2.03

### III. Tau を含むアミノ酸分析に用いる新規誘導体化試薬の開発とその適用

前項IIIの結果から、ARMS 患者血清において一部のアミノ酸濃度の変動が認められた。中でも Tau は大きな VIP を示したことから、食品として Tau を比較的多く含む貝類を対象として、食品中アミノ酸含有量を調べることにした。ここで、Tau のアミノ基と反応し、ODS カラムを用いたときに、高速な分析ができるように Ns-MOK-Pro-OSu よりも保持時間の短い試薬として、光学活性な  $\beta$ -プロリンを用いた、2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (4-(((2-nitrophenyl) sulfonyl)oxy)-6-(3-oxomorpholino)quinoline-2-carbonyl)pyrrolidine-3-carboxylate

(以下 Ns-MOK-(R)- or (S)- $\beta$ -Pro-OSu) (図 5) を 7 工程を

経て合成した。Ns-MOK-(S)- $\beta$ -Pro-OSu を用いて Tau 等の

アミノ酸を誘導体化し、UHPLC-HRMS により分析した。

塩基触媒存在下、室温で誘導体化反応を行うことによっ

て、ノシル基が脱離していない誘導体 (Ns-MOK-(R)- $\beta$ -

Pro-) のみが認められ、ESI (-)-mode ではノシル基が結合

したフェノール性ヒドロキシ基部分が規則的に脱離する

特徴的開裂 ( $m/z = 201.98$ ) (図 6 a, b)、ESI (+)-mode では、試薬の共通構造部分である Ns-

MOK-部分での規則的な特徴的開裂 ( $\Delta m/z = 457.05$ ) が認められ (図 6 c, d)、誘導体化分子

を特定できた。また、Tau では、低電圧で  $SO_3$  基部分の開裂 ( $m/z = 79.96$ ) が認められ、

$SO_3$  基の有無を判別できる可能性が示唆された (図 6 a)。Ns-MOK-(S)- $\beta$ -Pro-OSu を使用し

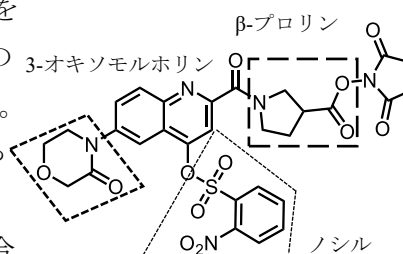


図 5 Ns-MOK- $\beta$ -Pro-OSu

て、アサリ可食部のホモジネートに含有される Tau を定量でき (図 7)、Tau 誘導体の定量

下限は 0.167 pmol であり、測定した濃度範囲 (10-100  $\mu M$ ) で検量線の直線性が確認できた。また、内標準物質として安定同位体標識アミノ酸を用いたところ、上述の特異的な開裂により試薬誘導体であるかの判別が可能であり、多くのアミノ酸誘導体が 10 分以内に

検出され、他のアミノ酸も迅速な定量が可能であることが示唆された (図 8)。

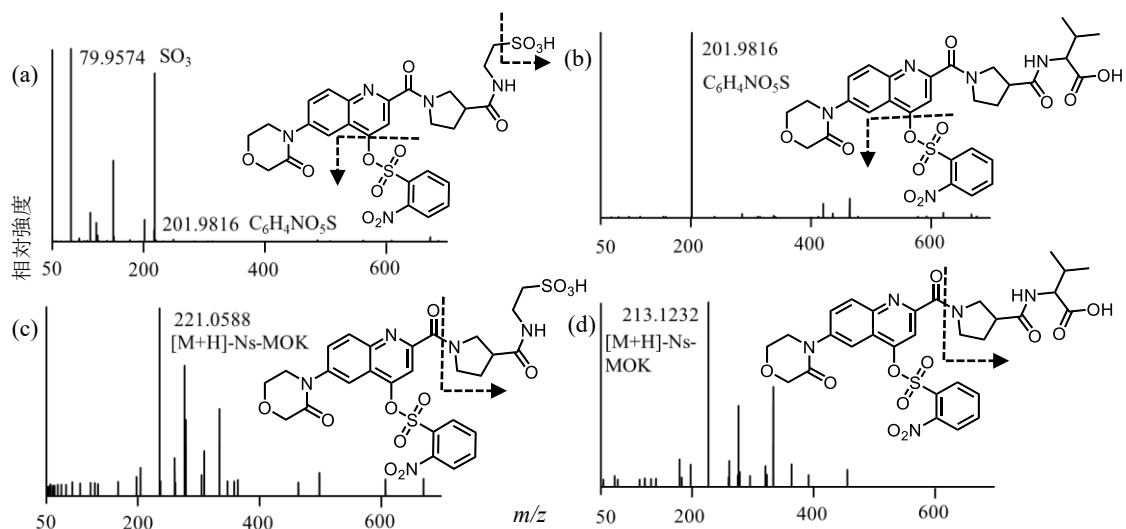


図6 Ns-MOK-(S)-β-Pro-OSuで誘導体化した Tau および Val 誘導体の MS (プロダクトイオン) スペクトル (a) Ns-MOK-β-Pro-Tau (ESI -), (b) Ns-MOK-β-Pro-Val (ESI -), (c) Ns-MOK-β-Pro-Tau (ESI +), (d) Ns-MOK-β-Pro-Val (ESI +)

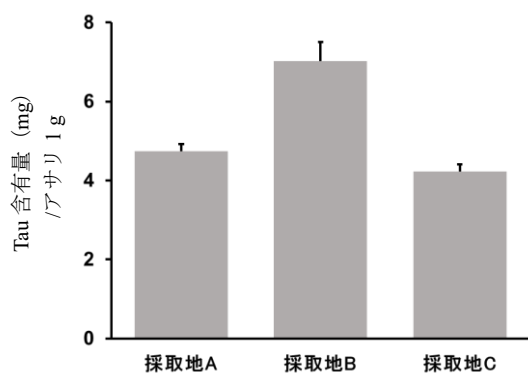


図7 採取地別のアサリに含有される Tau 量

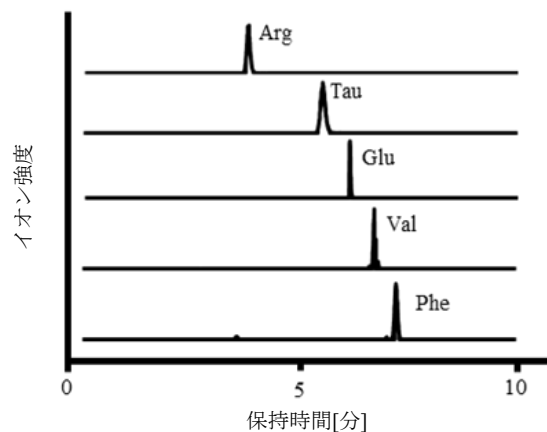


図8 代表的アミノ酸誘導体の SIM クロマトグラム

【総括】本研究では、蛍光検出および LC-MS/MS を指向した新規誘導体化試薬 Ns-MOK-(R)- or -(S)-Pro-OSu および Ns-MOK-(R)- or -(S)-β-Pro-OSu を開発した。Ns-MOK-Pro-OSu を用いて、抗てんかん薬 VB の完全な光学異性体分離ならびに高感度検出が可能な HPLC-蛍光定量法を確立した。また、UHPLC-HRMS によるメタボロミクスにより判明した ARMS 血清中で減少しているアミノ酸に対して、Ns-MOK-(S)-β-Pro-OSu を用いる誘導体化ならびに UHPLC-HRMS による分析により、アミノ酸の誘導体に特異的なプロダクトイオンを見出し、貝類中アミノ酸の迅速な分析が可能であった。

以上の成果より、本研究で開発された誘導体化試薬を活用したプレカラム誘導体化法が、医薬品分析およびアミノ酸等の生体分子研究に役立つことが期待される。

【対象論文】 [Uekusa S, Onozato M, Sakamoto T, Umino M, Ichiba H, Fukushima T.](#) Fluorometric determination of the enantiomers of vigabatrin, an anti-epileptic drug, by reversed-phase HPLC with a novel diastereomer derivatisation reagent. *Biomed. Chromatogr* in press. doi: 10.1002/bmc.5060.

# 学位論文審査報告書

報告書記載: 2021 年 2月 9日

学位申請者名	植草 秀介
論文題目	蛍光およびMS検出を指向したLC用新規誘導体化試薬の開発とその医薬品ならびに食品分析への応用研究
審査委員名	主査 吉尾 隆 副査 加藤 恵介 副査 桧貝 孝慈
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>薬学研究科分子病態解析学分野の植草秀介氏による博士論文“蛍光およびMS検出を指向したLC用新規誘導体化試薬の開発とその医薬品ならびに食品分析への応用研究”の査読結果について述べる。</p> <p>本研究では蛍光検出器を用いる蛍光定量に着目し、抗てんかん薬ビガバトリン（VB）分析に用いる新規誘導体化試薬の開発とその適用を検討し、蛍光検出およびLC-MS/MSを指向した新規誘導体化試薬Ns-MOK-(R)-or-(S)-Pro-OSuを開発した。この試薬は、水含有比率が高い移動相条件下で蛍光強度が高くなる性質を持つため、逆相HPLC条件で水溶性化合物の高感度定量に適することが示唆され、VBの高感度検出を達成するHPLC-蛍光定量法を確立することができた。また、Ns-MOK-(S)-Pro-OSuを用いた、VB誘導体の光学異性体分離を行う定量法の検討を行い、カラムの選定等により更なる高速分析を達成し、医療現場における定量を指向した手法を開発した。HPLC-蛍光検出を用いたVB定量結果は、LC-MS/MS法を用いた定量結果と強い相関関係があり、LC-MS/MSを有しない施設において、LC-MS/MSに代わるTDMのツールとして活用可能である。後半では、抗精神病薬による治療歴のない精神病罹病危険状態（ARMS）患者の血清を用いたノンターゲットメタボロミクスを行い、UHPLC-HRMSによる測定と、そのデータを用いたOPLS-DAによる解析から、ARMSにおいてプリン代謝経路、糖代謝経路、アミノ酸代謝経路に異常を認める可能性を示し、inosineやGluがバイオマーカーとして有効である可能性を見出している。Tauを含むアミノ酸分析に用いる新規誘導体化試薬の開発とその適用の検討では、生体内の代表的内因性抗酸化物質であるTauを多く含む食事療法を検討する前調査として、貝類アミノ酸のUHPLC-HRMSによる定量を行い、Ns-MOK-<math>\beta</math>-Pro-OSuを用いた定量法により、試薬特異的なプロダクトイオンを見出し、Tauを含む貝類中アミノ酸の短時間分析を可能とした。本研究の最終的な目的はARMS患者と統合失調症患者におけるバイオマーカーの確定による疾患の原因究明と診断方法であると考ええる。</p> <p>植草氏の研究は、薬品分析の技術を用いて、臨床現場におけるより簡便な薬物治療モニタリングを可能とし、今後、統合失調症の診断や病状把握に用いるバイオマーカーの探索に応用できる可能性がある。論文審査の場面においては、主査及び副査の指摘や意見を真摯に受け止め、多くの質問に適切に応えていた。植草氏の研究は、今後、新たな試薬の合成や検査方法の確立に留まらず、精神科領域での診断や薬物治療に応用することが可能である。よって、本論文は博士（薬学）を授与するに質、量共に相応しいものであると考える。</p>	