

Application News

GC-MS GCMS-QP™シリーズ

NCI-GC/MS法を用いた血しょう中ニトログリセリン代謝物の分析

坂本 雄紀¹、木村 夏花²、相澤健一²

1 株式会社島津製作所、2 自治医科大学

ユーザーベネフィット

- ◆ NCI-GC/MS法は、ニトログリセリン代謝物および硝酸代謝物を高感度に検出することができます。
- ◆ ニトログリセリン代謝物と硝酸代謝物を同一のシステム構成で測定が行えます。
- ◆ 代謝物を定量することにより、ニトログリセリンの最適投与量を予測できる可能性があります。

■はじめに

ニトログリセリン(GTN)は、ダイナマイトの原料などに用いられる爆発性化合物ですが、医療分野では、血管拡張を促す抗狭心症薬として利用されています。

ニトログリセリンを投与すると、肝臓や血液中でグリセリルジニトレート(GDN)やグリセリルモノニトレート(GMN)に代謝され、細胞内で二酸化窒素(NO₂)由来の一酸化窒素(NO)が遊離されます。一酸化窒素がグアニル酸シクラーゼを活性化することによりサイクリックGMPの産生を増大させ、その後、細胞内Ca²⁺濃度を減少させて、心筋を弛緩させます。

狭心症などの持病を持つ方や急性心不全を起こした方の治療には有効な医薬品ですが、その一方で血圧低下によるめまいや立ち眩みなどの貧血症状の副作用があることから適量での処方が必要になります。

負化学イオン化法(NCI)は、化学イオン化法の一つであり、電子親和性を持つ化合物の特異的に検出できるイオン化法です。電子イオン化法(EI)では感度が低い化合物でも、ペンタフルオロベンジル(PFB)誘導体化など電子親和性をもつフッ素誘導体を付与することにより、高感度で検出することが可能になります。

本アプリケーションでは、硝酸薬としてニトログリセリンの最適投与量を予測する目的で、ニトログリセリン代謝物および硝酸代謝物測定の分析系についてNCI-GC/MS法を用いて検討した結果を紹介します。

1. ニトログリセリンおよび代謝物の分析

■実験

ニトログリセリン(GTN)および代謝物として、1,2-グリセリルジニトレート(1,2-GDN)、1,3-グリセリルジニトレート(1,3-GDN)、1-グリセリルモノニトレート(1-GMN)を対象化合物としました。内部標準として、*o*-ヨードベンジルアルコールを用い、添加用内部標準溶液として2.5 μMの濃度になるように超純水を用いて調製しました。

既定の濃度で調製した混合標準水溶液200 μLを10 mLポリプロピレン製チューブに取り、内部標準溶液を10 μL添加しました(水溶液中濃度が250 nM)。トルエン4 mLを添加して、20分間攪拌しました。その後、10℃、3,000 rpmで5分間遠心分離を行い、有機相を分取しました。有機相は窒素気流下で乾固し、2%トリエチルアミン含有ヘキサンを200 μL添加して攪拌後、溶液をバイアルインサート入りの2 mL GCバイアルに移しました。

ニトログリセリンはガラス器具に非常に吸着しやすいことから、誘導体化しないで測定することは困難でしたが、マスキング剤としてトリエチルアミンを添加することによって吸着を防止することができました。

血しょう試料の前処理は200 μLを10 mLポリプロピレン製チューブに採取して同様の手順で前処理を行いました。分析条件を表1に示します。イオン化法はEIおよびNCI(試薬ガス:メタン)を用いました。

ニトログリセリンは熱分解しやすい化合物として知られており、PTVなどの注入口が必要だと言われていますが、気化室の温度を150℃と低めに設定することにより、検出することが可能でした。

表1 装置構成および分析条件

GC-MS	: GCMS-QP2020 NX
オートインジェクタ	: AOC-30i / 20s U
カラム	: InertCap 17ms (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm)
[GC]	
気化室温度	: 150℃
カラムオープン温度	: 50℃ (1 min) → (10℃/min) → 200℃ (2 min)
注入モード	: スプリットレス
キャリアガス	: He
キャリアガス制御	: 40.7 cm/sec
注入量	: 2 μL
[MS]	
イオン化法	: NCI
試薬ガスおよび圧力	: メタン (300 kPa)
イオン源温度	: 200℃
インターフェイス温度	: 200℃
データ採取モード	: Scan/SIM
スキャン範囲	: <i>m/z</i> 40 - 300
モニタリング <i>m/z</i>	: 1-GMN 91.0 1,2-GDN 62.0, 46.0 1,3-GDN 62.0, 46.0 GTN 62.0 <i>o</i> -ヨードベンジルアルコール 127.0

■分析結果

図1に超純水に各対象化合物を添加して前処理を行った試料をNCIモードで測定したトータルイオンカレントクロマトグラム(TICC)、図2に5 nMの標準試料を測定したSIMクロマトグラム、図3に5~2,000または5,000 nMの範囲で測定した検量線を示します。ニトログリセリンおよび代謝物のグリセリルニトレート類のいずれにおいても5 nMの濃度で検出することが可能でした。また、トリエチルアミンを添加していない場合は、これらの濃度では検出することができず、

GCバイアルやバイアルインサートに吸着することが原因であることが証明できました。

検量線の直線性は $R^2=0.997$ 以上であり、幅広い範囲で良好な直線性を得ることができました。図4にニトログリセリンを投与して一定時間経過した人の血しょう試料を測定した結果を示します。代謝物であるグリセリルモノニトレート(GMN)およびグリセリルジニトレート(GDN)が高濃度で検出され、時間経過による代謝の挙動を把握することが可能でした。

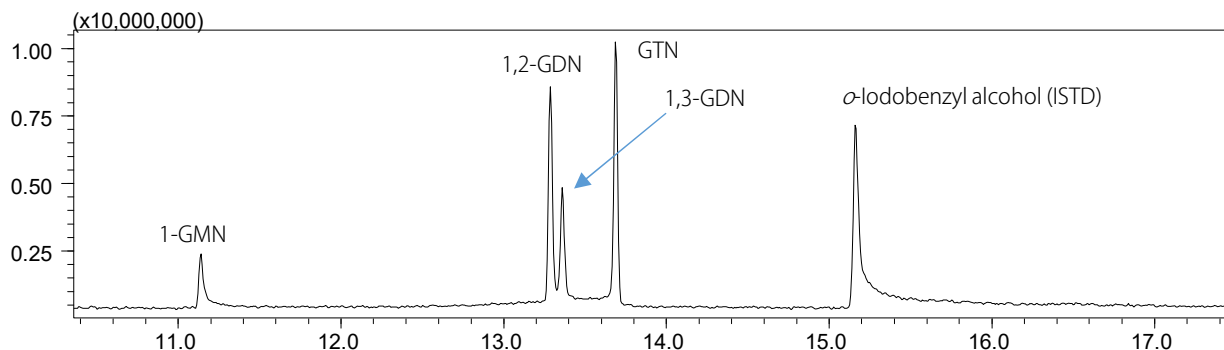


図1 ニトログリセリンおよびグリセリルニトレート類のトータルイオンカレントクロマトグラム (TICC)

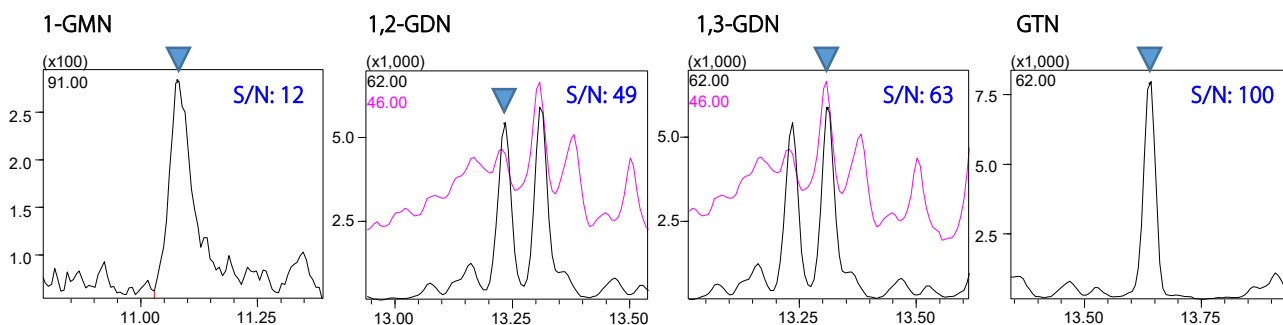


図2 標準試料を測定したニトログリセリンおよびグリセリルニトレート類のSIMクロマトグラム (濃度: 5 nM)

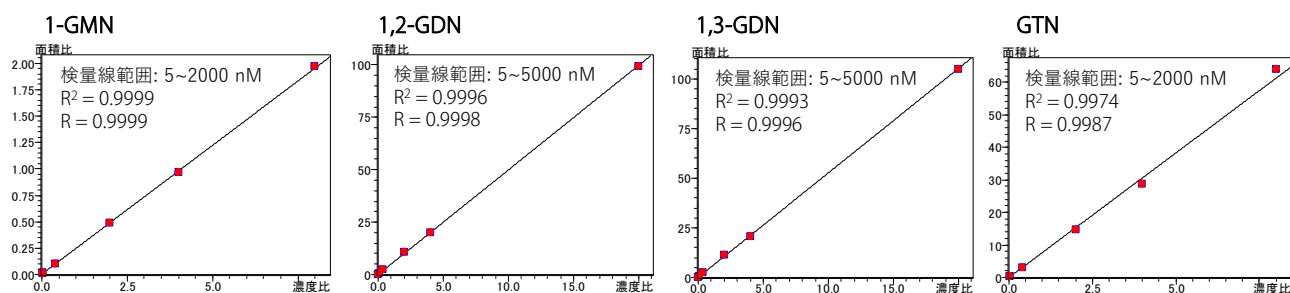


図3 ニトログリセリンおよびグリセリルニトレート類の検量線

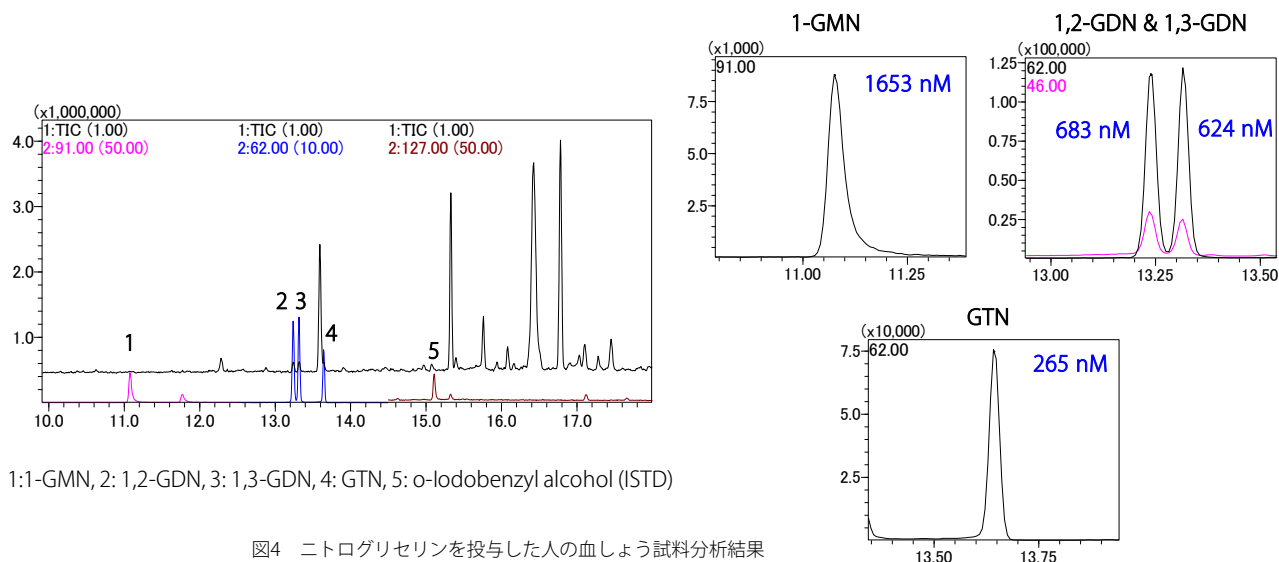


図4 ニトログリセリンを投与した人の血しょう試料分析結果

2. 硝酸代謝物の分析

■ 実験

硝酸代謝物としての硝酸塩および亜硝酸塩の検量線は超純水を用いて調製しました。また、内部標準として ^{15}N にラベル化された硝酸塩および亜硝酸塩を用いました。内部標準溶液は $^{15}\text{N-NO}_2$ が100 μM 、 $^{15}\text{N-NO}_3$ が1000 μM になるように超純水を用いて調製しました。

既定の濃度で調製した硝酸塩および亜硝酸塩水溶液100 μL をマイクロチューブに取り、内部標準溶液を10 μL 添加しました(水溶液中の $^{15}\text{N-NO}_2$ 濃度が10 μM 、 $^{15}\text{N-NO}_3$ 濃度が100 μM)。アセトン400 μL 、ペンタフルオロベンジルブロミド(PFBBR)を10 μL 添加し、50℃で60分加熱してPFB誘導体化しました。室温で静置して冷却後、アセトンを窒素気流下で気化させて除去しました。その後、トルエンを1000 μL 添加し、ボルテックスミキサーで1分間攪拌後、3,500 rpmで5分間遠心分離して、有機相をGC用バイアルに採取しました。血しょう試料においても100 μL をマイクロバイアルに採取して同様の手順で前処理を行いました。

表1に最終的な装置構成及び分析条件を示します。装置構成、イオン化法、分析カラムは、ニトログリセリンの代謝物であるグリセリルニトレートの測定と同じシステムが利用可能な形で最適化しました。

硝酸塩および亜硝酸塩誘導体化物の感度はNCIの方がEIよりも100倍以上高いことがわかりました。図5にNCIで採取した内部標準として用いた ^{15}N ラベル化された硝酸塩および亜硝酸塩のマススペクトルを示します。誘導体化物としての分子イオンは検出されず、また m/z 100以上のイオンはPFB由来のフラグメントイオンでした。そのためモニタリングイオンはイオン化により、PFBが外れたイオンを選定しました。

表2 装置構成および分析条件

GC-MS	: GCMS-QP2020 NX	
オートインジェクタ	: AOC-30i / 20s U	
カラム	: InertCap 17ms (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm)	
[GC]		
気化室温度	: 250℃	
カラムオープン温度	: 70℃ (1 min) $\rightarrow$ (20℃/min) $\rightarrow$ 300℃ (3 min)	
注入モード	: スプリットレス	
キャリアガス	: He	
キャリアガス制御	: 40.2 cm/sec	
注入量	: 1 μL	
[MS]		
イオン化法	: NCI	
試薬ガスおよび圧力	: メタン (300 kPa)	
イオン源温度	: 200℃	
インターフェイス温度	: 250℃	
データ採取モード	: Scan/SIM	
スキャン範囲	: m/z 40 - 300	
SIMモニタリング m/z	: $^{15}\text{N-NO}_3\text{-PFB (ISTD)}$ 63.0 $^{14}\text{N-NO}_3\text{-PFB}$ 62.0 $^{15}\text{N-NO}_2\text{-PFB (ISTD)}$ 47.0 $^{14}\text{N-NO}_2\text{-PFB}$ 46.0	

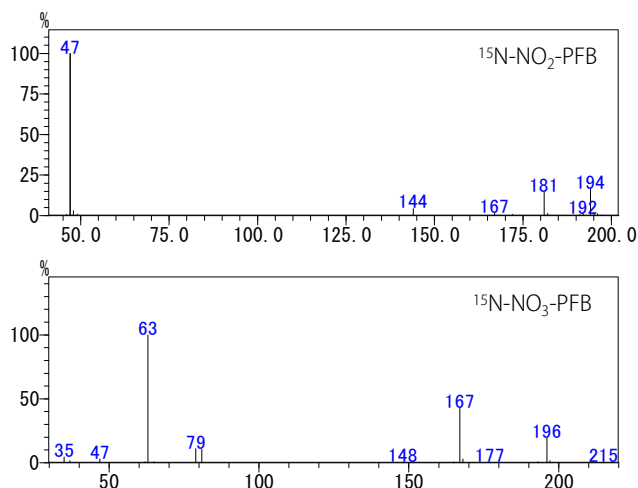


図5 ^{15}N ラベル化された硝酸塩および亜硝酸塩誘導体化物のNCIマススペクトル

■ 分析結果

図6に検量線の最小検量点濃度(NO_2 : 0.75 μM , NO_3 : 7.5 μM)で測定したSIMマスキログラム、図7に検量線の結果を示します。感度は濃縮をしなくても数 μM の濃度で十分検出可能であり、検量線は NO_2 が0.75~100 μM の濃度範囲で $R^2=0.9998$ 、 NO_3 が7.5~1000 μM の濃度範囲で $R^2=0.9979$ と良好な直線性が得られました。

図8にニトログリセリンを投与した人の血しょう試料を測定した結果を示します。

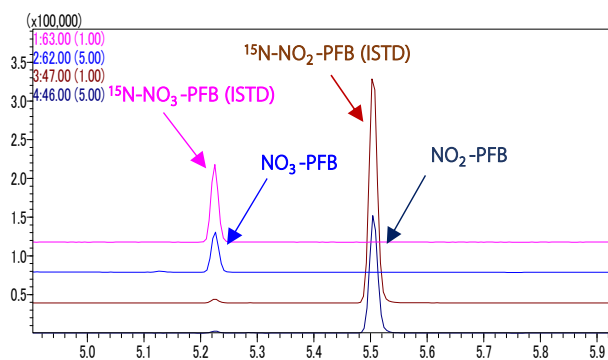


図6 硝酸塩および亜硝酸塩誘導体化物のSIMマスキログラム (NO_2 : 0.75 μM , NO_3 : 7.5 μM)

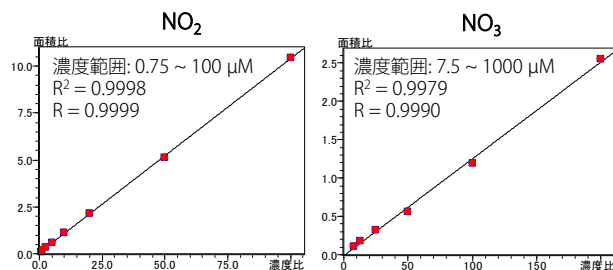


図7 硝酸塩および亜硝酸塩誘導体化物の検量線

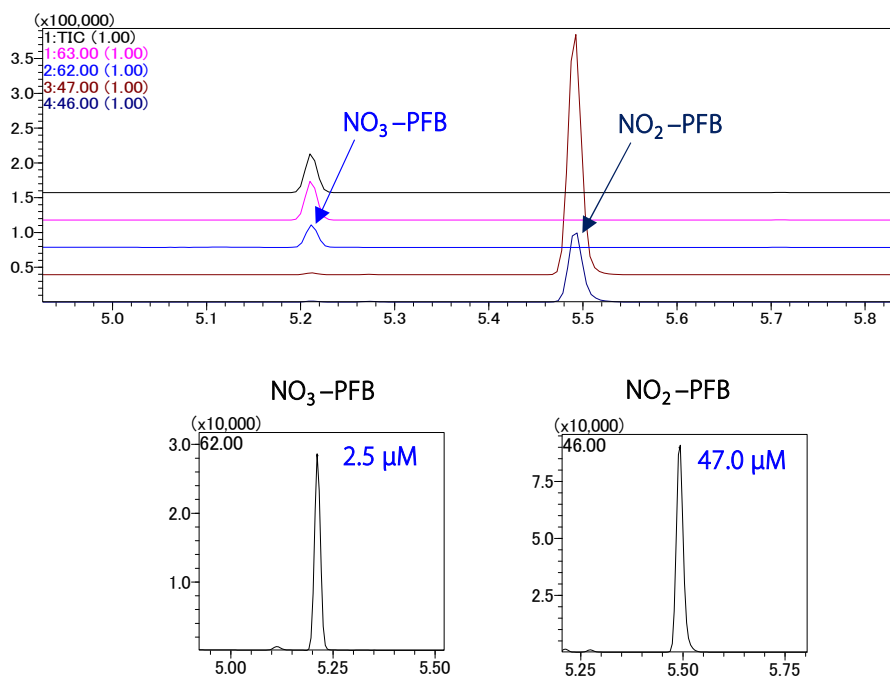


図8 ニトログリセリンを投与した人の血しょう試料の測定結果

■まとめ

NCI-GC/MS法を用いたニトログリセリンおよび代謝物と硝酸代謝物の分析系を構築しました。NCIで高感度に検出可能な誘導体化法およびマスキング剤を利用した吸着対策により、血しょう中濃度でニトログリセリンおよびその代謝物は数nM、硝酸代謝物は数μMで定量することが可能でした。

抗狭心症薬としてのニトログリセリンの代謝物を定量することによって、副作用を低減できる最適な投与量を予測することができる可能性があります。

また、今回投与後の時間経過による代謝物濃度の挙動については評価しておりませんが、時間経過による代謝物の濃度挙動によって、最適量の投与コントロールができる可能性があります。

<参考文献>

- Dimitrios Tsikas, Anal. Chem, 2000, 72, 4064-4072
- Peter Akrill, John Cocker, Journal of Chromatography B, 778 (2002) 193-198
- Martin Jorgensen, Michael P. Andersen, Journal of Chromatography, 517 (1992) 167-170

GCMS-TQは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

01-00408-JP 初版発行：2022年 6月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ GCMS-QP™2020
NX
ガスクロマトグラフ質量分析計



＞ AOC-30シリーズ
オートインジェクタ/オートサンプラ

関連分野

＞ ライフサイエンス

＞ バイオ医薬品

＞ 臨床研究・法科学

＞ 臨床研究

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ