

# Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-9050

## LCMS-9050を用いた薬剤代謝物の定性解析

馬越 泰

### ユーザーベネフィット

- ◆ 四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9050とLabSolutions Insight Explore™により薬剤代謝物の定性解析が可能です。
- ◆ LabSolutions Insight Explore のアナライズとスクリーニング機能により、候補代謝物のピーク抽出が可能です。

### ■はじめに

薬剤は生体内に取り込まれた後、酸化、還元、加水分解、抱合など、様々な反応により代謝されます。生成される代謝物は薬効や毒性が元の薬剤と異なることがあるため、出発化合物から予測される代謝物の定性は重要です。

本アプリケーションニュースでは四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9050を用いた薬剤代謝物の定性解析例を紹介します。ラットに抗がん剤として知られるレンバチニブを経口投与し、肝臓中の代謝物を測定しました。薬剤代謝物のピークはLabSolutions Insight Exploreのアナライズ機能を使用して抽出しました。スクリーニング機能で薬剤代謝物のリストを読み込み、候補ピークを絞り込んだ後、MSスペクトルやMS/MSスペクトルを詳細に解析しました。

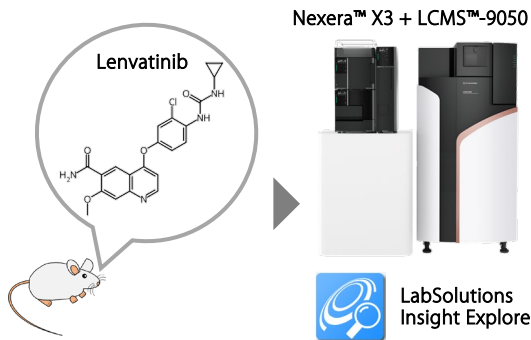


図1 概要

### ■前処理および分析条件

10週齢の雄SDラットに、レンバチニブを5日間連続で経口投与（4 mg/kg/day）して、その後肝臓を摘出しました。以下の通り、前処理を行いました。

- ① ラット肝臓を約60 mg秤量して、50 mg/mLとなるようにメタノールを添加しました。
- ② ジルコニアビーズ3 mmを3個添加し、Bead Smash 12（冷却、30 sec、4,000 rpm）で破碎しました。
- ③ 遠心分離後（4℃、5 min、13,000 rpm）、上清500 μLを回収しました。
- ④ 遠心濃縮後、50 μLのメタノールに再溶解しました。

表1に分析条件を示します。測定には四重極飛行時間型質量分析計であるLCMS-9050を用い、Data Dependent Acquisition (DDA)モードでデータを取得しました。DDAモードではMS測定で強度の高かったイオンのMS/MSスペクトルが自動で取得されます。本モードでは、分子の組成解析に有用なMSスペクトルと、構造解析に有用なMS/MSスペクトルが同時に取得できます。

表1 分析条件

#### [HPLC] Nexera X3

Column: Shim-pack Scepter™ C18-120 (100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm) \*1  
 Column Temp.: 40° C  
 Solvent A: Water + 0.1% Formic acid  
 Solvent B: Acetonitrile + 0.1% Formic acid  
 Rinse: Acetonitrile + 0.1% Formic acid  
 Gradient: B conc. 5% (0 min) → 40% (9.0 min) → 98% (10.0-12.0 min) → 5% (12.1-15.0 min)  
 Flow Rate: 0.25 mL/min  
 Injection Volume: 5 μL

#### [MS] LCMS-9050

Ionization: ESI positive  
 Nebulizing Gas: 3.0 L/min  
 Drying Gas: 10.0 L/min  
 Heating Gas: 10.0 L/min  
 DL Temp.: 250° C  
 Heat Block Temp.: 400° C  
 Interface Temp.: 300° C  
 CID Gas Pressure: 230 kPa  
 Mode: DDA  
 MS Scan Range: m/z 50-1,000 (0.100 sec)  
 MS/MS Scan Range: m/z 50-1,000 (0.100 sec×10)  
 CE: 35 ± 17 kV  
 DDA Threshold: 3,000

\*1 P/N : 227-31014-05

### ■データ解析

図2に代謝物定性のためのワークフローを示します。まずレンバチニブにより生成する可能性のある代謝物の分子式をリストにまとめました。分子式のリストは先行文献および代謝反応予測ソフトウェアを使用して作成しました。次にLabSolutions Insight Exploreのアナライズ機能を使用してピーク抽出をしました。その後スクリーニング機能で用意したリストを読み込み、ピークの絞り込みを行いました。

Name	Formula
Lenvatinib	C21H19ClN4O4
Demethylation	C20H17ClN4O4
Demethylation, Oxidation	C20H17ClN4O5
Hydrolysis	C17H14ClN3O3
Oxidation	C21H19ClN4O5
.	.
.	.
.	.

#	保持時間	m/z	レスポンス	ターゲット名	ターゲット組成式	ターゲットm/z	質量誤差 (mDa)
675	8.113	443.11239	1865758	Oxidation	C21H19ClN4O5	443.11167	0.72
417	6.309	443.11238	432537	Oxidation	C21H19ClN4O5	443.11167	0.71
122	3.855	219.07671	188754	O-dearylation2	C11H10N2O3	219.07642	0.29
303	5.350	403.08966	791441	O-dearylation1 OH-gly	C16H19ClN2O8	403.09027	0.69
594	7.497	227.05943	2397710	O-dearylation1	C10H11ClN2O2	227.05918	0.25
551	7.269	427.11738	9222287	Lenvatinib	C21H19ClN4O4	427.11676	0.62
435	6.439	344.08019	3490408	Hydrolysis	C17H14ClN3O3	344.07965	0.54
581	7.364	413.10186	108585	Demethylation	C20H17ClN4O4	413.10111	0.75
295	5.359	399.12836	138870	.....	.....	.....	.....
294	5.364	397.18996	149472	.....	.....	.....	.....
293	5.359	396.17704	591441	.....	.....	.....	.....
292	5.364	379.15186	147977	.....	.....	.....	.....
291	5.359	378.14937	1134566	.....	.....	.....	.....
290	5.359	377.14632	5864459	.....	.....	.....	.....
289	5.338	368.15571	253334	.....	.....	.....	.....
288	5.319	415.13070	594592	.....	.....	.....	.....
287	5.315	402.23407	514994	.....	.....	.....	.....
297	5.372	418.19552	120751	.....	.....	.....	.....

図2 代謝物定性のワークフロー

## ■ 検出された化合物

前述のワークフローにより、レンバチニブに由来すると考えられる代謝物が複数検出されました。検出された化合物のクロマトグラムを図3に示します。レンバチニブ①のほかに、脱メチル②、加水分解③、芳香環の脱離④⑤⑥、酸化⑦の反応に由来すると考えられる化合物が検出されました。

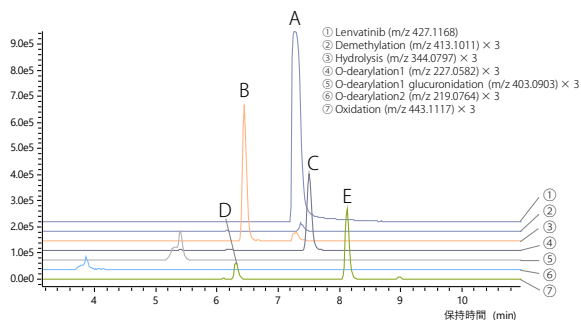


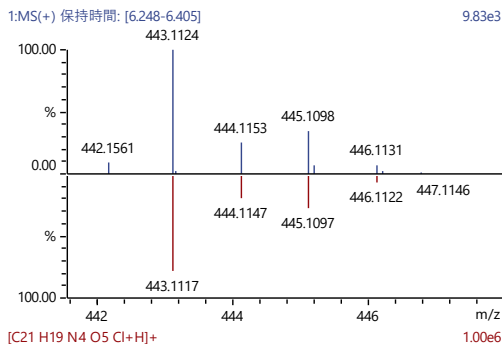
図3 クロマトグラム  
(レンバチニブ以外は3倍に拡大して表示)

以下ではレンバチニブのピークAと強度の高かった代謝物のピークB~Eをより詳細に解析しました。

## ■ MSスペクトルと理論スペクトルの比較

図4に実測のMSスペクトルと理論MSスペクトルを表示しました。<sup>35</sup>Clと<sup>37</sup>Clの同位体比は約3:1であり、ピークA~Eすべてで、塩素の天然同位体比を反映したMSスペクトルであることが確認できました。またモノアイソトピック質量の実測と理論値との差はすべて1 mDa以内であることも確認できました。

D: Oxidation (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) Mass Error: 0.72 mDa



E: Oxidation (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) Mass Error: 0.72 mDa

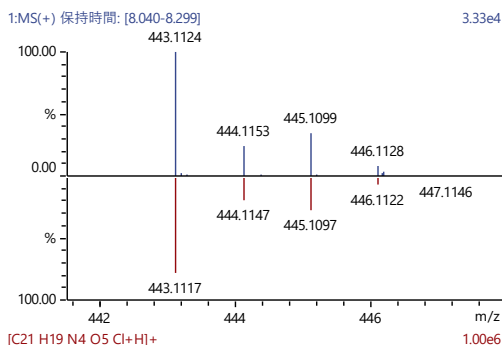
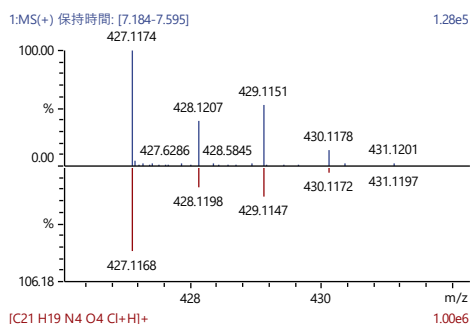
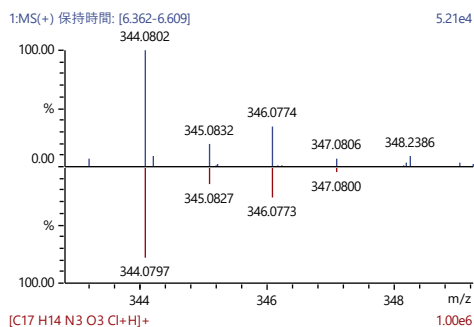


図4 MSスペクトル  
(上段: 実測のMSスペクトル, 下段: 理論MSスペクトル)

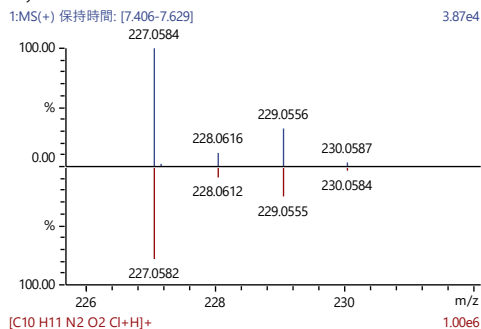
A: レンバチニブ (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>) Mass Error: 0.63 mDa



B: Hydrolysis (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) Mass Error: 0.54 mDa



C: O-dearylation1 (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Mass Error: 0.24 mDa



## ■ MS/MSスペクトル

図5にDDAモードにより取得したMS/MSスペクトルを示します。LabSolutions Insight Exploreのアサイン機能を用いて予測した開裂位置も示します。アサイン機能の詳細については、以前のアプリケーションニュース<sup>12</sup>をご参照ください。

A: レンバチニブ (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>)

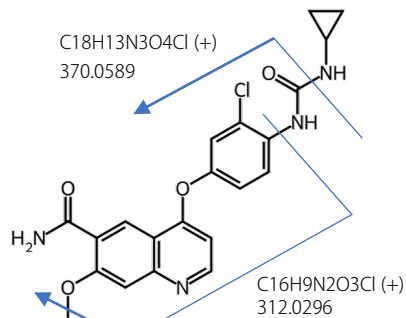
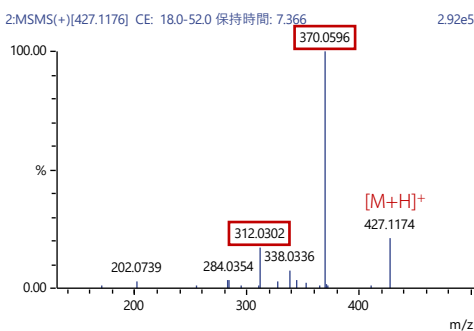
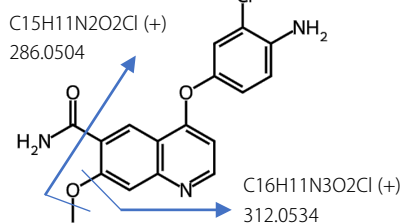
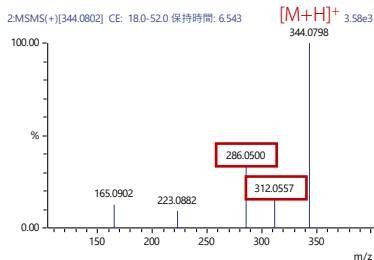
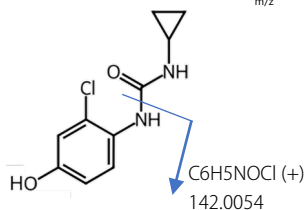
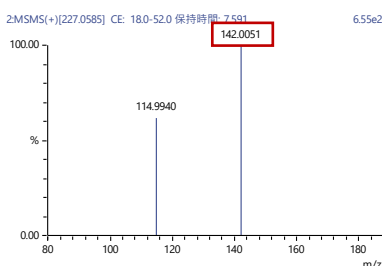


図5 MS/MSスペクトルと推定開裂位置

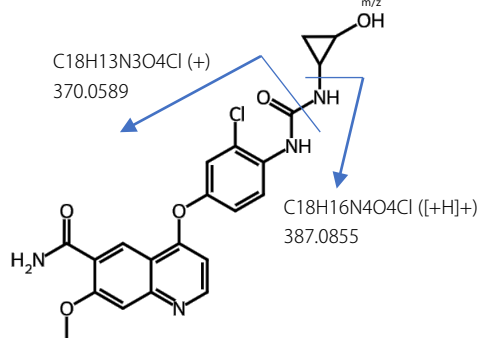
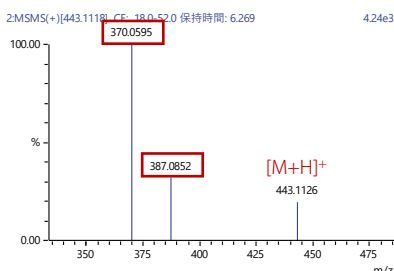
B: Hydrolysis (C17H14ClN3O3)



C: O-dearylation1 (C10H11ClN2O2)



D: Oxidation (C21H19ClN4O5)



E: Oxidation (C21H19ClN4O5)

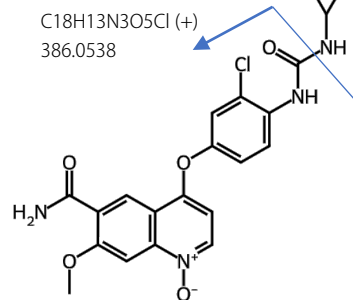
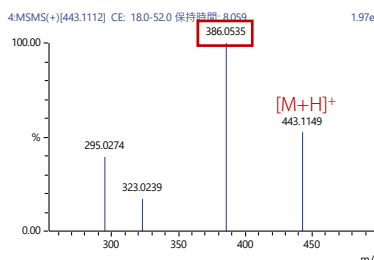


図5 MS/MSスペクトルと推定開裂位置 (続き)  
ピークD, Eの詳細な酸化位置はMS/MSスペクトルからは判定できなかったため、推定構造を示しています。

酸化により生成した代謝物として、ピークD、Eの二種類が検出されました。ピークDの一番強度の高いプロダクトイオンはC18H13N3O4Cl (+)であり、レンパチニブと一致していました。一方でピークEの一番強度の高いプロダクトイオンはC18H13N3O5Cl (+)であり、レンパチニブとは異なっていたため、ピークD、Eは酸化位置が異なることが推定されました。

■まとめ

四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9050とLabSolutions Insight Exploreによりレンパチニブに由来する代謝物が複数検出されました。薬剤代謝物のリストを準備することで簡単に候補化合物のピーク抽出が可能です。本ワークフローはレンパチニブ以外の薬剤の代謝物解析にも適用可能です。

<謝辞>

本アプリケーションの作成にあたり、奈良県立医科大学・山内 哲司先生から試料をご提供いただきました。心より感謝申し上げます。

<関連アプリケーションニュース>

1. 四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030を用いた医薬品中不純物の構造解析 [01-00017-JP](#)
2. 赤ワイン中代謝物のスクリーニング解析 [01-00329-JP](#)

LCMS、LabSolutions Insight Explore、NexeraおよびShim-pack Scepterは、株式会社島津製作所またはその関係会社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** 分析計測事業部  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00757-JP 初版発行：2024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、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

＞ 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。



＞ LCMS-9050

四重極飛行時間型質量分析計

## 関連分野

＞ 医薬・バイオ医薬品

＞ 低分子医薬品

＞ ライフサイエンス

＞ メタボロミクス

＞ 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