

CE-MS[®] による薬物の分析 アプリケーション

法医学/毒物学

著者

Doug Knisley, Mark Hetherington, Gordon McKay, and
Murray Malcom
Pharmalytics, Inc.
Saskatoon
Saskatchewan
Canada.

要旨

CE-MS[®] を、検出された薬物の同定に使用して、キャピラリー電気泳動およびキャピラリー電気泳動エレクトロスプレーイオン化法マスマスペクトロメトリーの応用可能性を検証しました。このアプリケーションは、毒物学での薬物スクリーニングに役立てることもできます。

はじめに

紫外ダイオードアレイ検出器 (UV-DAD) と組み合わせたキャピラリー電気泳動 (CE) は、薬物の定性および定量分析に有効なツールであると報告されています¹。また、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) とマスマスペクトロメトリーを組み合わせた CE (CE-ESI-MS) による乱用薬物の分析も報告されています²。イオントラップ型の質量選択検出器 (MSD) を使用すると、MSⁿ データを得ることができ、CE による薬物および薬物混合物分析の能力を高めることが期待されています。

CE-MS をこのような用途に使用できるかどうかを検討する第一段階として、この手法の分離能の確認、この装置で薬物に関して有意な MS データを生成できるかどうかの試験、および、取得したスペクトルを標準データとしてライブラリに構築できることを実証する必要がありました。

本アプリケーションノートでは、Hudson et al¹ によって提唱された CE 手法を推進し、1 回の分析で UV データおよび MSⁿ データの両方を採取できることを示します。本アプリケーションノートで報告する分析には、純粋な試薬の溶液を使用しました。本アプリケーションノートの続報では、全血から抽出された薬物分析について報告する予定です。

実験方法

すべての薬物分析は、Agilent G1600A 3D CE を Agilent LC/MSD Trap XCT と組み合わせて使用しました。インターフェースには G1603A CE-MS アダプタキットおよび G1607A CE-MS スプレイヤーを使用しています。

CE の条件

キャピラリー:	Bare fused silica (内径50 μm)
キャピラリーの長さ:	DAD: 21.5 cm、 LC/MSD Trap: 84.0 cm
カセットの温度:	25 °C
泳動緩衝液:	pH 2.38の100 mmol/L リン酸塩
注入:	電氣的注入 (12.0 kV、16.0 s)
印加電圧:	0.15 s で 0 から 20kV ヘブプログラム、 分析中はこの値を維持
分析時間:	25 min
ダイオードアレイ:	波長:200 nm、バンド幅: 4 nm
リファレンス波長:	375 nm、バンド幅: 75 nm



Agilent Technologies

LC/MSD Trap条件

マスレンジモード:	ウルトラスキャン
イオン極性:	Positive
イオン源タイプ:	ESI
乾燥ガス温度:	130 °C
乾燥ガス流量:	7.00 L/min
ネブライザ:	8~12 psi
トラップドライブ:	27.0
スキマー1:	40.0 V
スキマー2:	-5.0 V
オクタポールRF振幅:	131.2 V
キャピラリー出口:	97.0 V
スキャンレンジ:	通常50~500
平均:	8スペクトル
最大積算時間:	100000 ms
ICCターゲット:	100000
チャージコントロール:	オン
シース液:	0.5 %蟻酸 (50/50:メタノール/水)
シース液流量:	7.5 µL/min (0.75 mL/min split 100:1)

Auto MS パラメータ

Auto MS ³ :	オン
スレッシュホールド値:	2500
プリカーサの数:	1
フラグメンテーション振幅:	1.0 V
アイソレーション幅:	4.0 m/z

毒物学的に関心が高く、広範な移動度を示す 550 種類の薬物¹の中から、代表的な移動度を持つ 17 の薬物と 1 つの内部標準 (ISTD) を選びました。これらの薬物の濃度を 1 mg/mL

とし、単品および混合物として分析しました。MS、MS²、および MS³ データに加え、各薬物の UV スペクトルも採取しました。UV および MS データは、分析に使用した装置の設定条件と共に、後で使用できるようにライブラリに編集しました。作成したライブラリは、次に説明する Auto MSⁿ 分析で使用しました。

Auto MSⁿ 機能を使用すれば、あらかじめ設定されたスレッシュホールド値よりも高い強度を示すピークの MS、MS²、および MS³ スペクトル (必要に応じて、さらなるフラグメンテーションも可能) を自動的に採取し、ライブラリでこれらのスペクトルを検索できます。今回は、純粋な標準試薬溶液の分析における同定能力を検討しました。

予備実験により、薬物の移動時間はネブライジングガスの圧力によって大きく影響を受けることが観察されました。数種類の異なるネブライザ圧力で薬物の混合物を分析することにより、さらに検証しました。移動速度の増加は観察されましたが、この変化は電気泳動移動度には影響しないことが判明したため、それ以上検討しませんでした。

結果と考察

図 1 は、分析した 17 の薬物混合物 (各濃度は 1 mg/mL) および ISTD のトータルイオンエレクトロフェログラム (TIE) です。

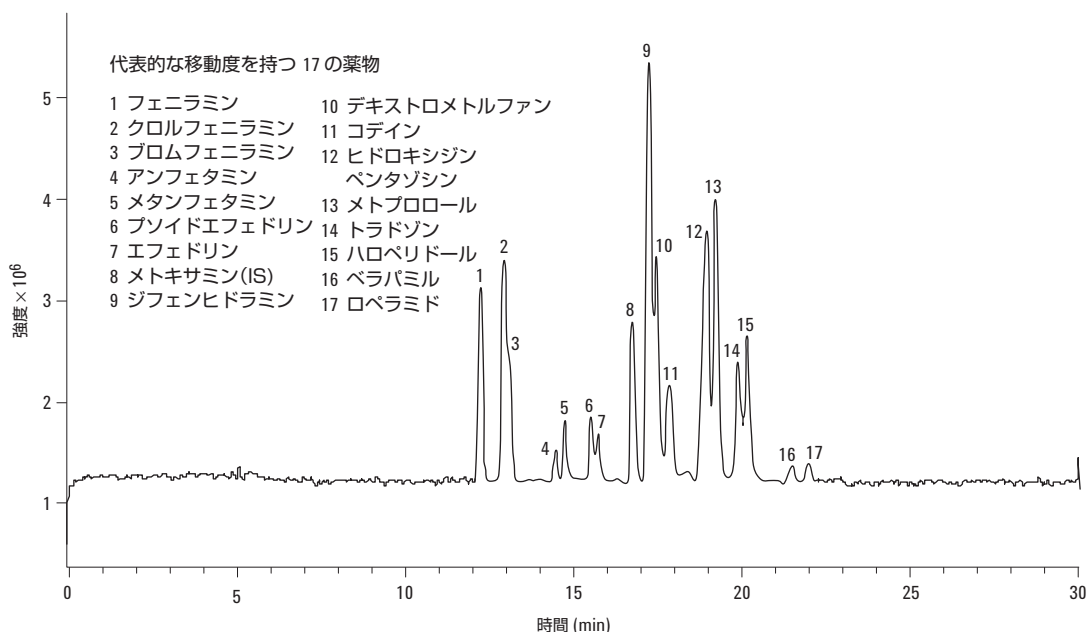


図 1. 薬物混合物の TIE。

本研究では、ヒドロキシジンとペンタゾシンの共溶出が観察されたことを除いては、移動の順序および分離度は、Hudson¹ によって報告された内容とほぼ同じです。ヒドロキシジンとペンタジシンの移動時間は同じでしたが、2つの化合物の存在がそれぞれの質量データにより即座に判別できたのは注目すべき点です。

100 mmol/L のリン酸泳動緩衝液は、有機分子のイオン化抑制のために、MS 検出では良い感度が得られないおそれがあります。しかし、シース液に0.5% の蟻酸を含むメタノール/水を使用することによって、CE キャピラリー出口から MS への輸送メカニズムの中で液滴がイオン化します。この泳動緩衝液を用いる場合、キャピラリーを使用後に水と空気で洗浄し、スタンバイ乾燥ガス温度を 130 °C に維持することが重要です。こうすることで、保管中に CE キャピラリーが詰まるのを防ぐことができます。

表 1 では、本実験条件で測定された電気泳動移動度と、Hudson et al¹ に報告されている移動度を比較しています。本研究では、Hudson et al¹ に報告されているキャピラリーと同じ材質および径のものを使用しましたが、関連する長さは大幅に異なりました。Hudson et al では、検出器までの長さが 60 cm のキャピラリーを使用していますが、本研究で使用したキャピラリーは、UV 検出器までの長さが 21.5 cm、LC/MSD トラップまでの長さが 84 cm でした。このような長さの違いは、移動時間の差として顕著に現れました。図 2 の 2 つのエレクトロフェログラムは、この差を表しています。しかし、表 1 が示すように、電気泳動移動度はほぼ一致しています。

表 1: 電気泳動移動度の比較

薬物名	移動度* (×10000) - Hudson (1)	移動度* (×10000) - 本研究
フェニラミン	3.287	3.235
クロルフェニラミン	3.081	3.022
ブロムフェニラミン	3.034	2.999
アンフェタミン	2.597	2.585
メタンフェタミン	2.515	2.501
プソイドエフェドリン	2.330	2.327
エフェドリン	2.292	2.295
メトキサミン (ISTD)	2.072	2.072
ジフェンヒドラミン	1.985	1.990
デキストロメトルファン	1.941	1.927
コデイン	1.871	1.862
ヒドロキシジン	1.792	1.777
ペンタゾシン	1.703	1.677
メトプロロール	1.666	1.668
トラドゾン	1.566	1.558
ハロペリドール	1.536	1.528
ベラパミル	1.391	1.381
ロベラミド	1.319	1.310

*電気浸透流 (EOF) の移動度に補正された分析対象成分の見かけ上の移動度。見かけ上の移動度は、 IL/tV で求められます。このとき、I は検出器までのキャピラリーの長さ (cm)、L はキャピラリーの全長 (cm)、t は移動時間 (s)、V は電圧 (V) です。pH 2.38 において EOF は非常に遅いため、移動度は Williams and Vigh² に従い、リファレンス化合物に関連して決定しました。

混合物に含まれる薬物分析の例としてアンフェタミンを用いました。図2に個々の薬物のTIE、UVエレクトロフェログラムおよびMS、MS²、MS³スペクトルを示しています。

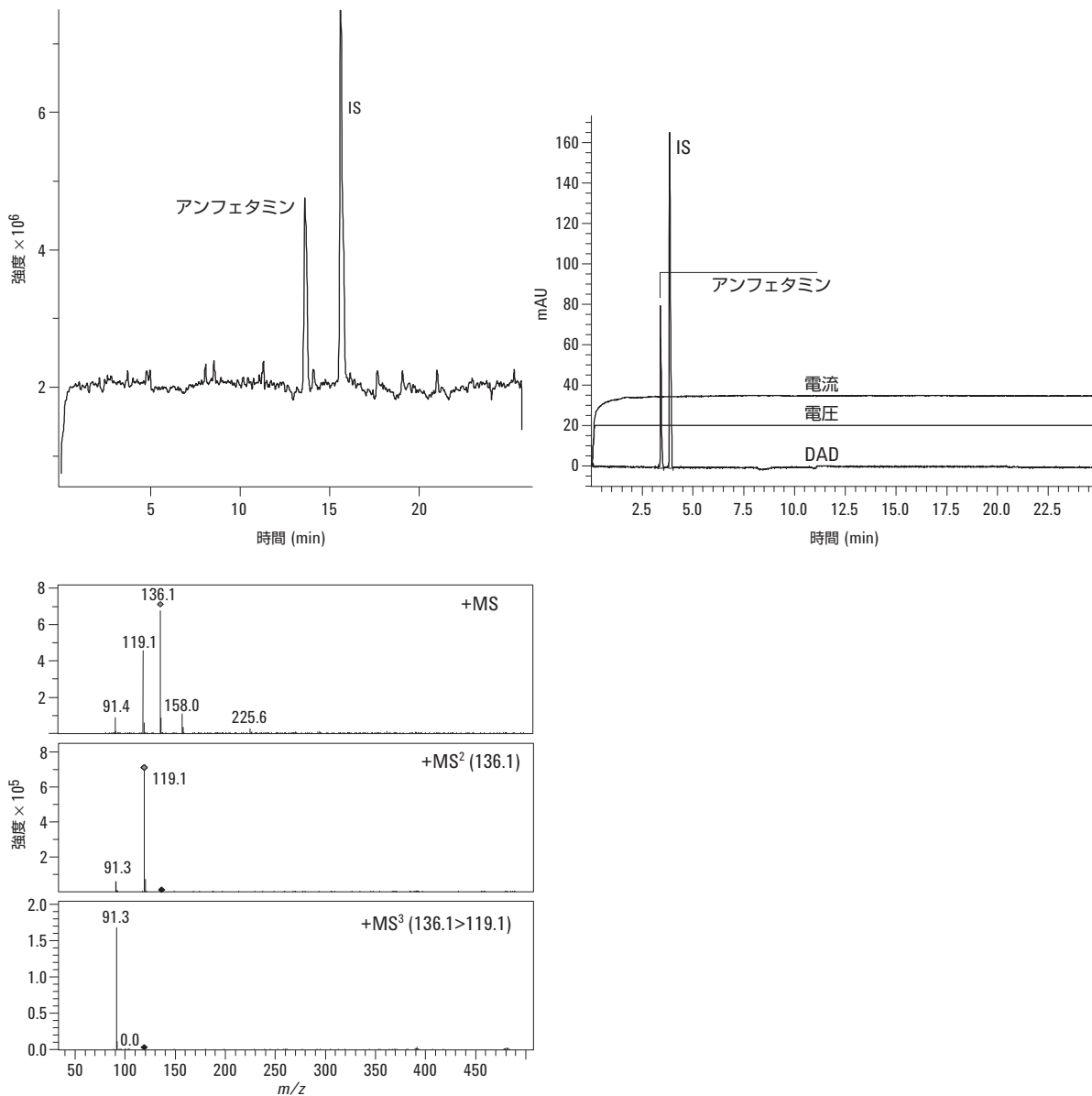


図2. アンフェタミンのTIE、UVエレクトロフェログラム、およびMSデータ。

図 3 は、コデインを例として、Auto MS³ による分析結果を示しています。あらかじめコデインを分析して、ライブラリエントリを作成しておきます。Auto MS³ を実行すると、コデインは良好に検出され、下記に示す MS-MS²-MS³ のフラグメンテーションパターンによって同定されました。フラグメンテーション振幅をコデインに最適化して、MS² スペクトルでより大きなフラグメンテーションを得ることもできます。しかし、本研究では、フラグメンテーション振幅に 1 V を使用しています。この値は、さまざまな薬物に対して適用できます。

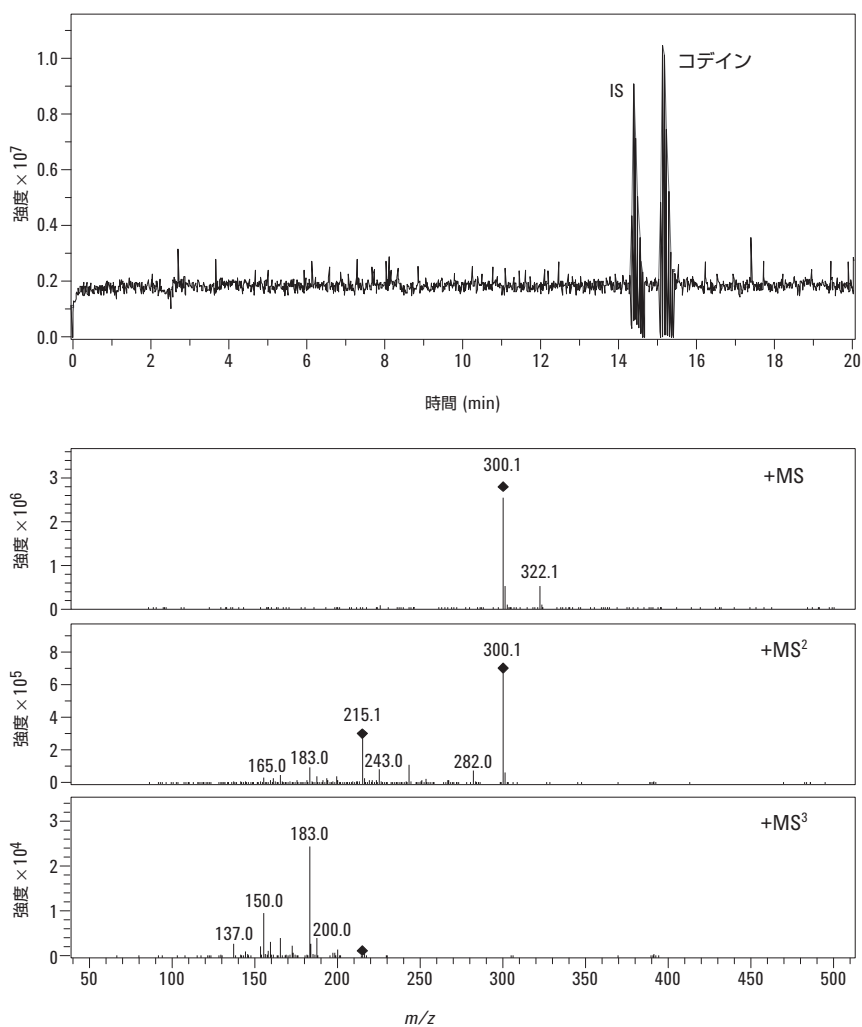


図3. コデインの Auto MS データ。

結論

CE の薬物分析への応用は、Hudson et al¹ によって報告されています。また、Phan and Harrsch² は、CE-ESI-MS を使用した乱用薬物分析の実施可能性を検討しました。本研究では、CE-MSⁿ をこれらの薬物分析に使用して、検出された薬物の同定能力を強化し、より強力な分析能力を持つ可能性を検証しました。このアプリケーションは、毒物学での薬物スクリーニングに役立てることもできます。

謝辞

薬物の標準溶液については、カナダ連邦警察 (RCMP) の Forensic Laboratory Services (Regina, Saskatchewan, Canada) の J. Hudson 氏にご協力いただきました。ここに感謝いたします。

参考文献

1. J. C. Hudson, M. Golin, M. Malcolm, and C. F. Whiting, (1998), Can. Soc. Forens. Sci. J. 31: 1–29.
2. D. T. Phan and P. B. Harrsch, Agilent Technologies, publication 5968-9221E, www.agilent.com/chem.
3. B. A. Williams and G. Vigh, Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. (1996) Anal. Chem. 68: 1174–1180.

さらに詳しくは...

当社の製品およびサービスの詳細についてはウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in the USA
April 27, 2005
5989-2910JAJP