

LC/MSD TOF精密質量分析を用いた 尿中麻酔薬成分の定量分析 アプリケーション

法科学

著者

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要旨

液体クロマトグラフィ/飛行時間型質量分析計を用いて、濃度6 ng/mLレベルの尿サンプルの定量分析を行ないました。選択性を高める精密質量分析の利点を紹介します。検出限界はカラムへの注入量で2 pg、S/N比は5:1です。

はじめに

飛行時間型（TOF）質量分析計を用いた定量分析は、これまでのところ幅広く実用されるには至っていません。本アプリケーションノートでは、Agilentの液体クロマトグラフィ/飛行時間型質量分析計（LC/MSD TOF）を用いて、法科学者の間で関心の高いマトリックス中の低濃度化合物が

ルーチンで定量分析できることを実証します。尿の直接注入および固相抽出（SPE）により、LC/MSD TOFの堅牢性、感度、選択性を示します。

実験

サンプル調整

直接注入用サンプルについては設定した各濃度で定量成分を添加し、それ以上の処理は行ないませんでした。固相抽出にあたっては、抽出手順に従い、麻酔薬成分の抽出にAccuBOND II Evidex SPEカートリッジ（部品番号188-2946）を使用しました（カートリッジ付属の手順書を参照）。ブランクおよび尿添加溶液5mLを濃塩酸0.5 mLおよび10 N水酸化ナトリウム0.75 mLで処理し、0.5 Mリン酸2.5 mLによりpH 6.5-7.5に調整しました。グルクロニドの酸加水分解は予想されないため、加熱処理は省きました。調整後、溶液をカートリッジにロードし、洗浄し、所定の塩化メチレン/イソプロパノール/水酸化アンモニウム溶液で溶出させました。溶出液は（加熱せずに）窒素で乾固させたのち、水：アセトニトリルが40:60の溶液0.5 mLに溶解しました。



Agilent Technologies

装置

Agilent 1100バイナリポンプとウェルプレートオートサンプラーを含むAgilent 1100シリーズLC/MSD TOF

表1 分析条件

LC条件

カラム ZORBAX XDB-C18、2.1 mm × 50 mm、3.5 μm
P/N 971700-902

移動相 A: アセトニトリル (ギ酸0.1%)
B: 水 (ギ酸0.1%)

グラジエント A 35%(0分)⇒A 95%(5分)⇒A 100%(6分)

流速 0.35 mL/min

MS条件

標準的なオートチューニング条件後に、デュアルESIを用いて測定中も連続して自動キャリブレーション（キャリブレントデリバリシステムにより、約2μMのプリンとHP-921を安定した低流速で導入）を行ないました。

結果

図1の上図は、添加濃度300 ng/mLの尿の直接注入により得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示しています。下図は、モルヒネ、コデイン、アセチルモルヒネの各抽出イオンクロマトグラム (EIC) を重ね描きした図です。EICの質量幅は 20 ppm ($\sim \pm 0.002 \mu$) です。図2は、各麻酔薬成分の精密な質量スペクトルを示しています。表2は、直接注入により得られた定量結果を示しています。表3は、固相抽出 (SPE) による定量結果を示しています。

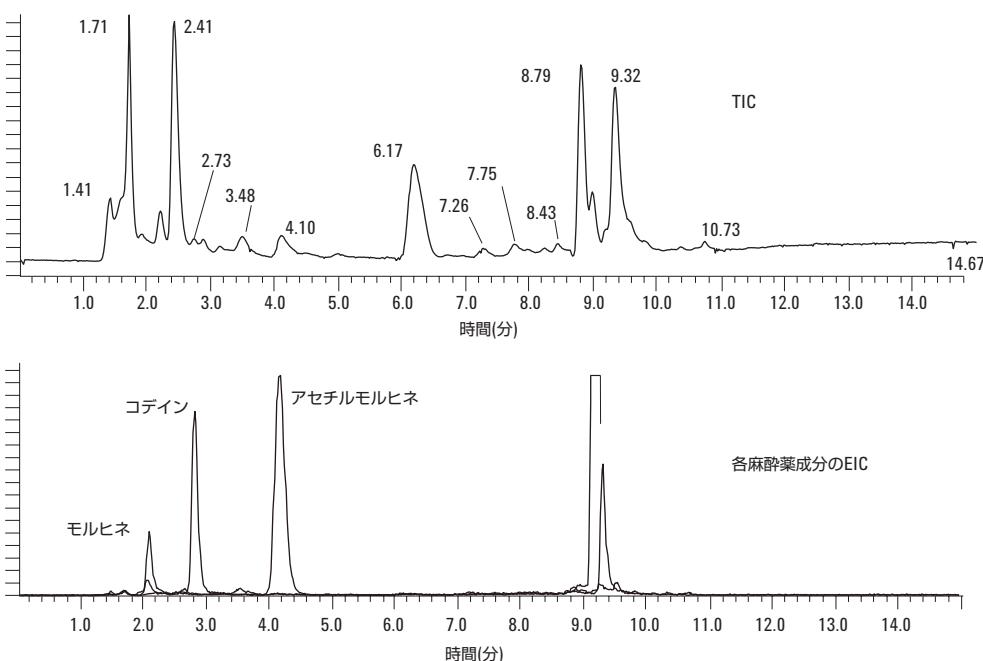


図1. 上図は、各麻酔薬成分300 ng/mLを添加した尿の直接注入により得られたTICを示しています。
下図は、各化合物のEICを示しています。

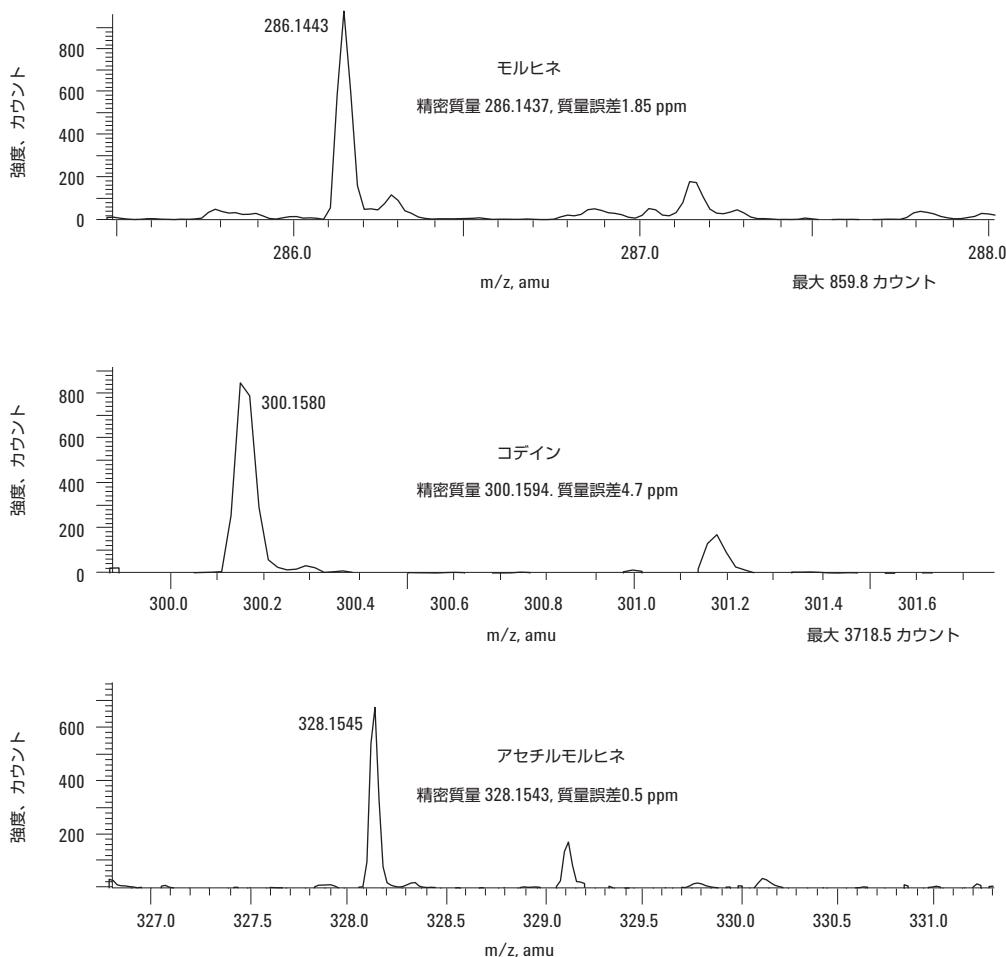


図2. 各麻酔薬成分のM+H⁺イオンの質量スペクトル。カラムで分離した2pgでの高分解能および質量測定精度が示されています。

表2. 尿の直接注入によるLC/MSD TOFで得られた添加溶液 (1000 ng/mLおよび300 ng/mL) の定量結果 (単位 : ng/mL)

尿直接注入 (1000 ng/mL添加)			尿直接注入 (300 ng/mL添加)		
モルヒネ	コデイン	アセチルモルヒネ	モルヒネ	コデイン	アセチルモルヒネ
241	446	715	66.7	93.8	176
222	402	653	78.5	94.8	203
238	426	683	73.7	93	199
195	338	687	73.7	96.5	201
200	351	588	76.6	94.3	185
平均	219.2	392.6	665.2	94.5	192.8
SD	21.2	46.8	48.4	4.5	11.8
RSD (%)	9.7	11.9	7.3	6.1	6.1

これらの数値は実際に人体から検出される平均的な値で、300 ng/mLは免疫学的測定で検出される最低レベルです。添加濃度と測定値との差は、イオン源でのイオンサプレッションによると推定されます。

表3. AccuBOND Evidex SPEでサンプルを前処理したLC/MSD TOFにより得られた添加溶液（6 ng/mLおよび60 ng/mL）の定量結果

AccuBOND Evidex 尿5 mL (6 ng/mL添加) 予想濃度 60 pg/µL			AccuBOND Evidex 尿5 mL (60 ng/mL添加) 予想濃度 600 pg/µL		
モルヒネ	コデイン	アセチルモルヒネ	モルヒネ	コデイン	アセチルモルヒネ
6.97	8.62	3.74	508	499	182
8.56	9.57	4.21	567	543	193
10	8.41	4.03	525	504	183
9.24	8.5	3.81	521	502	191
7.07	8.15	3.48	595	532	193
9.46	8.99	3.5	591	532	192
7.66	8.91	3.79	582	540	196
平均	8.4	8.7	平均	555.6	190.0
SD	1.2	0.5	SD	36.6	5.4
RSD (%)	14.4	5.3	RSD (%)	6.6	2.8

添加濃度と測定濃度の差は、SPE法の回収率およびイオンサプレッション（の可能性）の両方の影響を受けていると推定されます。

まとめ

本研究のデータにより、LC/MSD TOFを用いた分析では、精密質量測定による確認と、選択的な狭い質量幅による定量が可能なことが示されています。

- 尿の直接注入による結果は、LC/MSD TOFの頑強性を示しています。
- 一般的なクリーンアップ手法（SPE法）による定量では、極めて優れた感度が示されています。
- 各スペクトルの高分解能と精密質量から、定量分析と化合物の確認において、夾雑物由来ノイズを減らすことでの高い選択性が得られます。

詳細情報

Agilentの製品およびサービスの詳細については、当社のWeb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、本文書に含まれる誤り、および本文書中製品の据付、作動、または使用に関連して付随的または間接的に引き起こされる損害については、一切の責任を負いません。

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. 2004

Printed in the USA
January 17, 2005
5989-2206AJP

