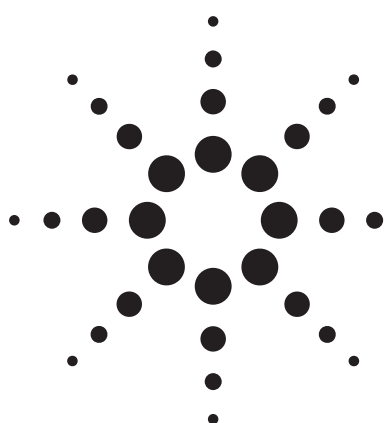


RRHT LC/MS/MS を用いた 尿中のアヘン類の定量分析



アプリケーション

法医学

著者

Sheher Mohsin
Agilent Technologies, Inc.
10 N. Martingale Rd., Suite 550
Schaumburg, IL 60173
USA

Yanan Yang
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112
USA

概要

Agilent 6410 トリプル四重極質量分析計 (QQQ) で、尿中のアヘン誘導体を分析しました。ZORBAX C18、2.1 x 50 mm、粒径 1.8 μm カラムを搭載したラピッドレゾリューションハイスループット液体クロマトグラフを用いて、アイソクラティック分析で 3.5 分以内に、全 7 種類の分析対象成分と、それぞれの内部標準を検出することができました。各分析対象化合物のクオリファイア/クオンティファイアイオンをモニターし、その比を $\pm 20\%$ 以内に設定してサンプル中の各成分の存在を確認しました。6-アセチルモルヒネ (6-MAM) を除き、すべてのキャリブレーション標準は

マトリックスから抽出し、尿中濃度は 1 ~ 150 $\text{pg}/\mu\text{L}$ でした。6-MAM の濃度範囲は 0.067 ~ 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ です。抽出後、つまり濃度因子が 6.78 減少したとき、注入濃度は 0.147 ~ 22.12 $\text{pg}/\mu\text{L}$ (147 ppt ~ 22.12 ppb) でした。6-MAM では、9.8 ppt ~ 1.5 ppb に相当します。すべての化合物は、非常に良好な直線性 ($R^2 > 0.99$) を示します。

緒言

アヘン誘導体は鎮静や鎮痛としてよく使われる薬物で、処方薬として合法的に、ときには違法に入手されます。アヘンには中毒性があります。アヘン誘導体の分析は、治療薬モニタリング、薬物服用時の運転、職場での薬物テストなどのため、尿中でよく分析されます。サンプルが入手しやすく、量も確保できるからです。法医学の分野では、定量値が定義したカットオフ値を超える化合物があることを確認するためにさらなるテストが必要な場合がよくあります。

トリプル四重極質量分析計 (QQQ) では、対象化合物のプリカーサイオンのフラグメントからプロダクトイオン (クオンティファイア) の最も高いレスポンスシグナルを取り込むことで、最高感度の定量が可能になります。これを、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) といいます。さらに、次の高いプロダクトイオン (クオリファイア) のシグナルの比率が、キャリブレーション標準と未知サンプルの比率と一致している場合、存在確認として利用できます。QQQ でクオンティファイアとクオリファイアイオンのシグナル両方を MRM で取り込むと、定量と確認を同時に行うことができます。



Agilent Technologies

Agilent MassHunter ソフトウェアには、図 1 に示すように、定量分析でユーザーがイオン比を定義できる機能があります。確認のために使われるイオン比の許容差は、 $\pm 20\%$ がデフォルトですが、これをカスタマイズすることもできます。さらに、最高 4 つの異なる生成物イオンをクォリファイアとして使用できます。この研究では、クォリファイアイオンひとつ、デフォルト値の $\pm 20\%$ を使用しました。

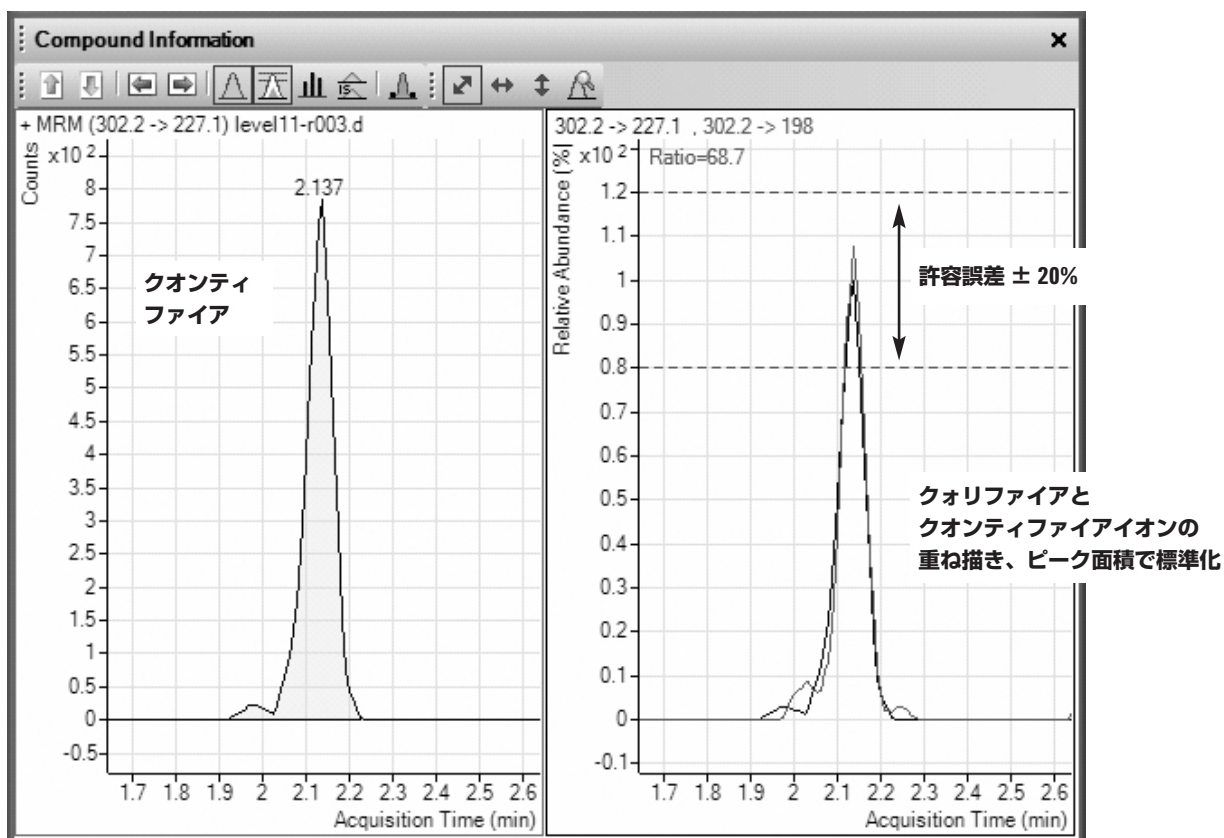


図 1. オキシモルホン確認のためのクォリファイア/クオンティファイアイオン比

この研究では、モルヒネ、オキシモルホン、ヒドロモルホン、コデイン、オキシコドン、コドロコドン、6-アセチルモルヒネ (6-MAM)、ヘロイン代謝物などの尿中アヘン類を分析しました。各々の構造式を図 2 に示します。抽出効率とマトリクス干渉を考慮して、各化合物の重水素化類似物も混合しました。各内部標準のクォリファイアイオンは必要ないので、分析は行いませんでした。

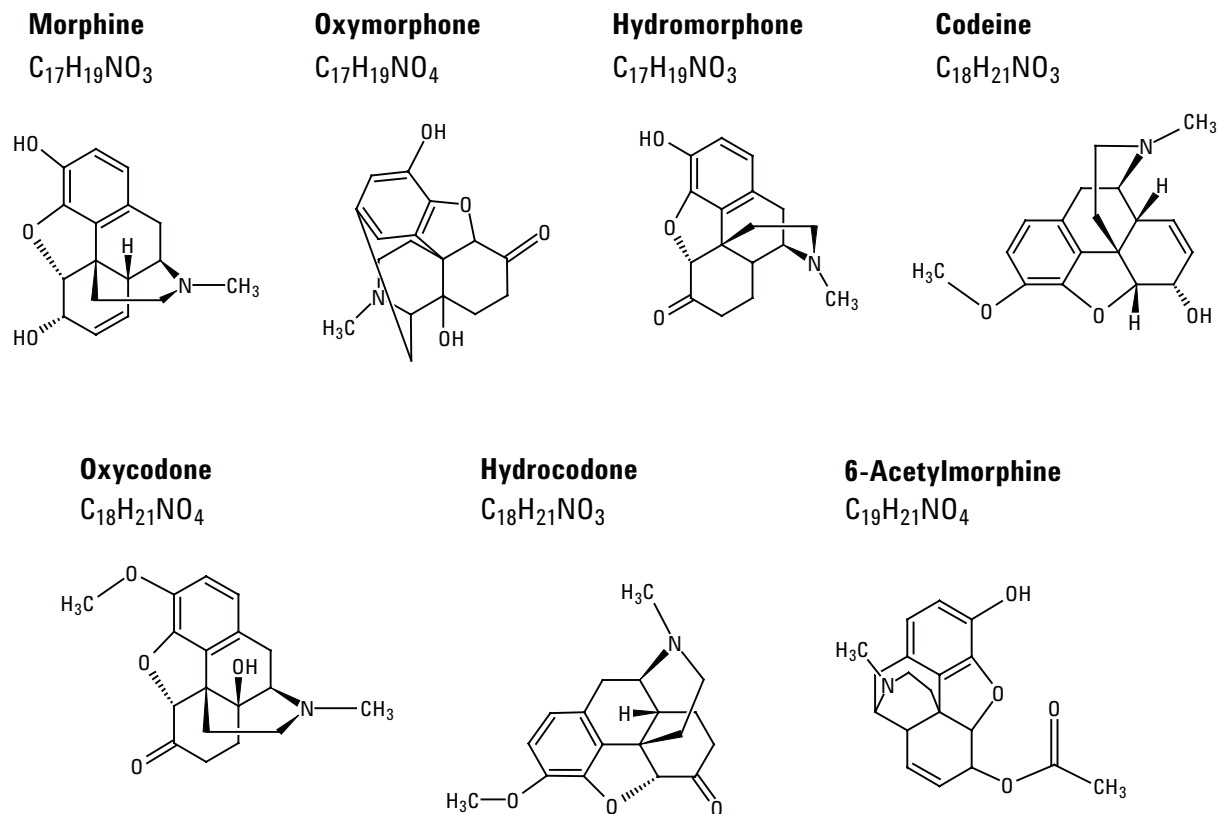


図 2. 分析したアヘン類の構造式

水とアセトニトリル（改質剤なし）によるグラジエント LC 分析を行いました。粒径 1.8 μm のラピッドレゾリューションハイスルーブット（RRHT）LC カラムで、すべての測定対象化合物と対応する内部標準が 3.5 分以内に溶出しました。サイクルタイムは、約 8 分です。化合物は、エレクトロスプレーイオン源を用いてポジティブイオンモードで分析しました。ドライガスのような、このイオン源に関連するパラメータは、LC の流量 0.4 mL/min の標準設定とし、流量を変えずに質量分析計に導入されました。

イオン源と QQQ のアナライザコンポーネント間の最大イオン移送の電圧は、オートチューン機能で設定されます。これにより、シグナル強度、分解能、質量範囲が最

適化されます。最適化に必要なパラメータのひとつに、イオン源とアナライザの間のイオン移送光学機器内にあるフラグメンタ電圧があります。最適化をすると、QQQ の最初の四重極で、プリカーサイオンのレスポンスが最大になります。すべての測定対象化合物に最適なフラグメンタ電圧は 110 V でした。

次に、コリジョンエネルギーを最適化してプリカーサを解裂させ、生成物イオンの最高レスポンスを得ます。これでクオンティファイアイオンに関する質量分析計のメソッド最適化は完了です。2 番目に感度の高い生成物イオンのコリジョンエネルギーの繰り返し最適化と、両方の MRM が 1 つの化合物から得られます。最適化のステップは、フローインジェクション分析で行います。

実験

サンプル前処理

アヘン類化合物をスパイクした尿サンプルの濃度は、各々 1、5、10、50、100、150 pg/ μ L です。ただし、6-MAM の濃度は 15 分の 1 です。その後、以下の手順を用いて、これらのサンプルを処理しました。

1. サンプル 250 μ L から開始
2. 酢酸ナトリウム緩衝液 500 μ L を加える
3. グルクロニダーゼ 20 μ L を加える
4. 500 ng/mL の内部標準混合液 75 μ L を加える (脱イオン水中)
5. ボルテックス
6. 60 °C で 20 分間、培養
7. 脱イオン水 850 μ L を加える
8. ボルテックスし、沈降
9. サンプルバイアルに上澄み 200 μ L を入れる

調製されたサンプルは、すべての顧客から提供されました。

尿中で濃度 1 pg/ μ L、実質 147 fg/ μ L になるように、サンプルを 6.78 倍に希釈しました。内部標準の添加と抽出に伴って、尿中の注入濃度は 0.147、0.737、1.47、7.37、14.7、22.12 pg/ μ L に相当します。注入量 5 μ L だと (LC 条件参照)、オンカラムで 0.737、3.685、7.35、36.85、73.5、110.6 pg に相当します。なお、6-MAM の濃度は、すべてこれらの 15 分の 1 です。

表 1. アヘン剤の MRM パラメータ

セグメント	化合物	移送	衝突エネルギー (V)	リテンション時間 (分)
1 (0分)	D3-モルヒネ	289.2 > 152.1	75	1.851
	モルヒネ	286.2 > 152.1 (128.0)	75 (73)	1.862
	D3-オキシモルホン	305.2 > 230.1	33	2.138
	オキシモルホン	302.2 > 227.1 (198.0)	33 (55)	2.146
	D3-ヒドロモルホン	289.2 > 157.1	50	2.379
	ヒドロモルホン	286.2 > 185.0 (157.0)	33 (50)	2.385
2 (2.65分)	D3-コデイン	303.2 > 152.0	75	2.908
	コデイン	300.2 > 152.0 (115.0)	75 (85)	2.912
	D3-オキシコドン	319.2 > 244.1	30	3.109
	オキシコドン	316.2 > 241.0 (256.0)	30 (27)	3.120
	D6-6-MAM	334.2 > 165.1	40	3.161
	6-MAM	328.2 > 165.0 (211.0)	40 (27)	3.168
	D3-ヒドロコドン	303.2 > 199.1	28	3.245
	ヒドロコドン	300.2 > 199.0 (128.0)	28 (73)	3.249

LC/MS メソッド詳細

LC 条件

Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ、デガッサ、ウェルプレートサンブラ、カラム恒温槽

カラム: Agilent ZORBAX SB-C18、
2.1 \times 50 mm、粒径 1.8- μ m
(PN: 822700-902)

カラム温度: 50 °C

移動相: A = 水

B = アセトニトリル

流量: 0.4 mL/min

注入量: 5 μ L

グラジエント:

時間 (分)	%B	
0	2	
4	40	ストップタイム:6.1分
4.1	90	ポストタイム:2.0分
6	90	
6.1	2	

ニードル洗浄 (25:75 水/メタノール) - ポート洗浄 10 秒

MS 条件

モード: Agilent G1948B イオン源を用いた
ポジティブ ESI

ネブライザ: 60 psig

ドライガス流量: 11 L/min

ドライガス温度: 350 °C

V_{cap}: 2,000 V

分解能 (FWHM): Q1 = 0.7; Q2 = 0.7

MRM のデュエルタイム = 50 msec

フラグメンタ電圧 = 110 V

各化合物の MRM を、表 1 にリテンションタイム順に記載します。カッコ内はクオリファイアとして使用した生成物イオンです。リテンションタイムも記載されていません。6-モノアセチルモルヒネは、6-MAM と略記してあります。

結果と考察

全 7 種類の化合物の検量線を図 3A ~ 3G に示します。最も低い 3 つの濃度レベルは拡大図で確認できます。すべての検量線は、原点を含まず、重み付け 1/x とし、直線近似で作成しました。相関係数はいずれも最低で 0.99 で、最低濃度でも良好な再現性と精度を示しました。

例外は 6-MAM で、最低濃度 (49 fg オンカラム) では 3 回の注入のうち、2 回に対してのみシグナルが得られました。しかし、尿中に換算した濃度は 0.067 pg/ μ L (0.067 ng/mL) で、これは 米国 SAMSHA (乱用薬物精神衛生局) から提案された職場テストの確認カットオフ濃度の 10 ng/mL よりもはるかに低い濃度です。

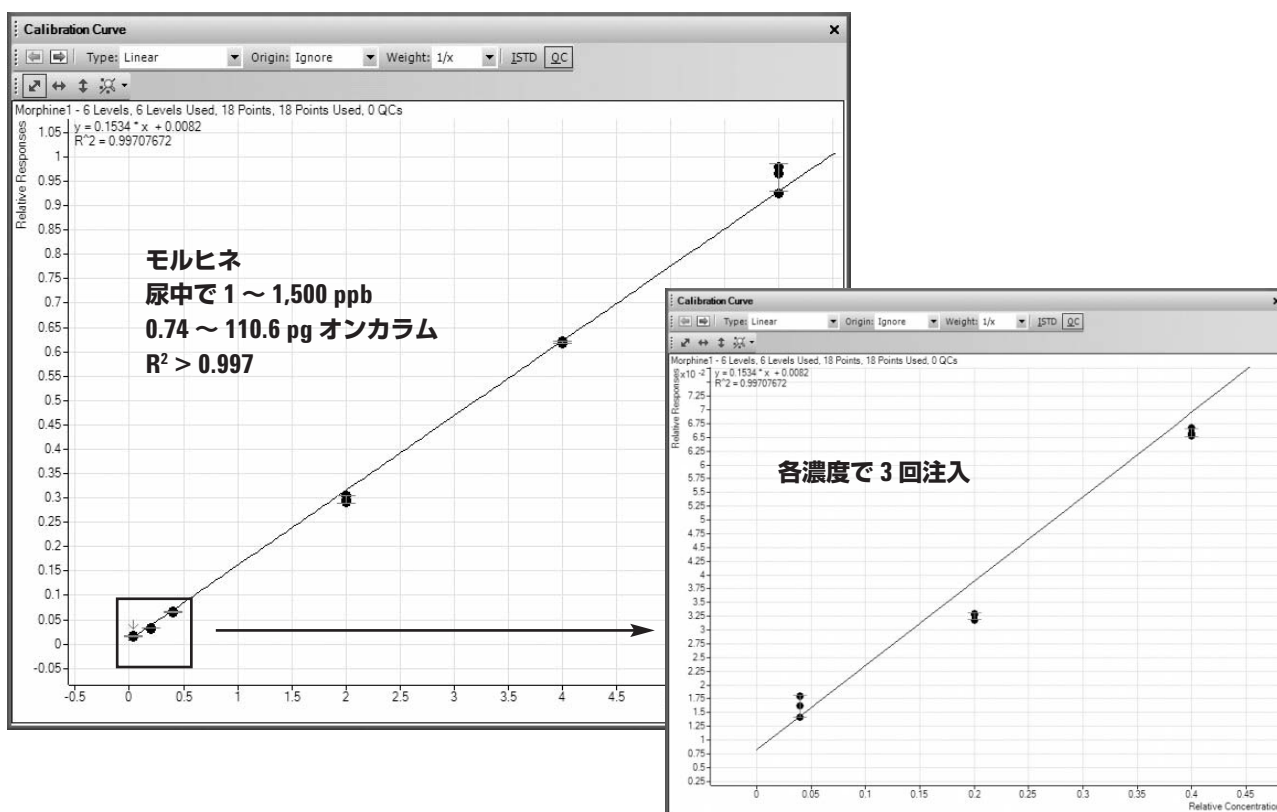


図 3A. 尿中のモルヒネの直線性。注入濃度範囲 = 147 ppt ~ 22 ppb

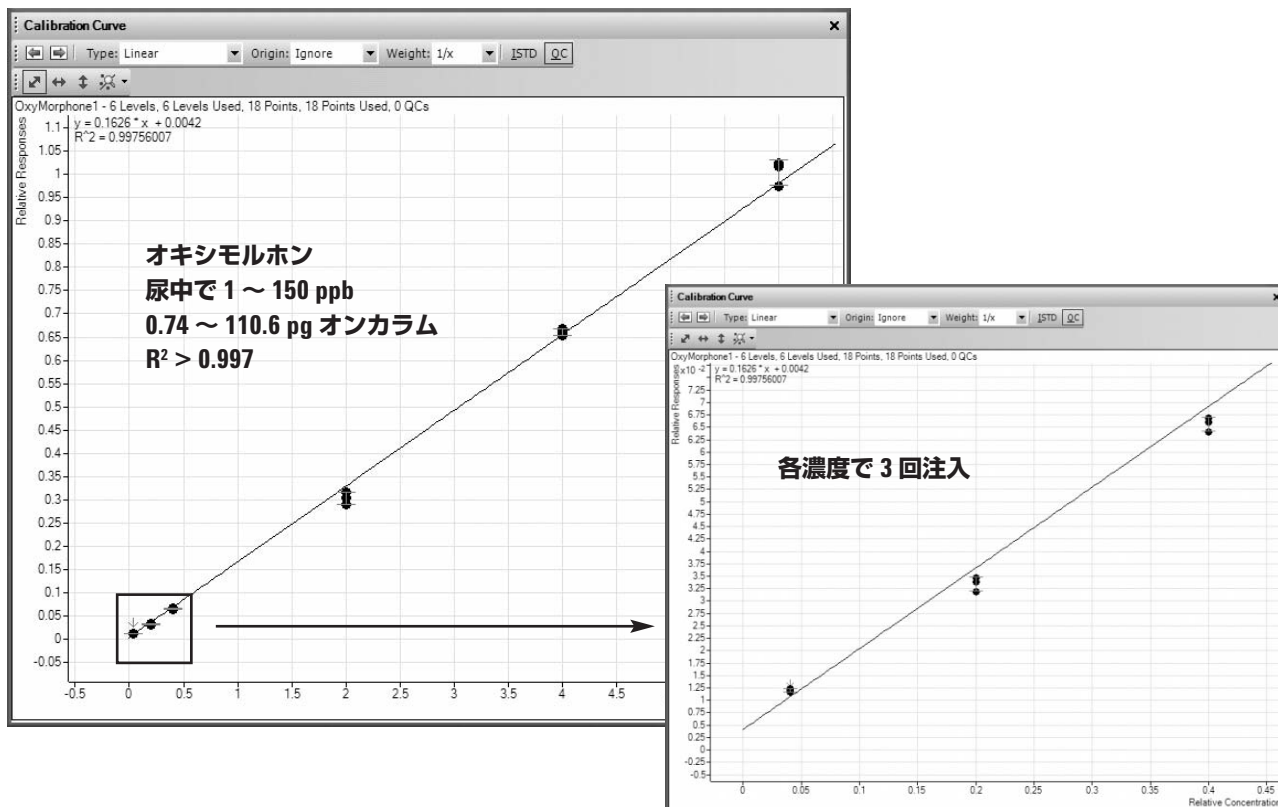


図 3B. 尿中のオキシモルホンの直線性。注入濃度範囲 = 147 ppt ~ 22 ppb

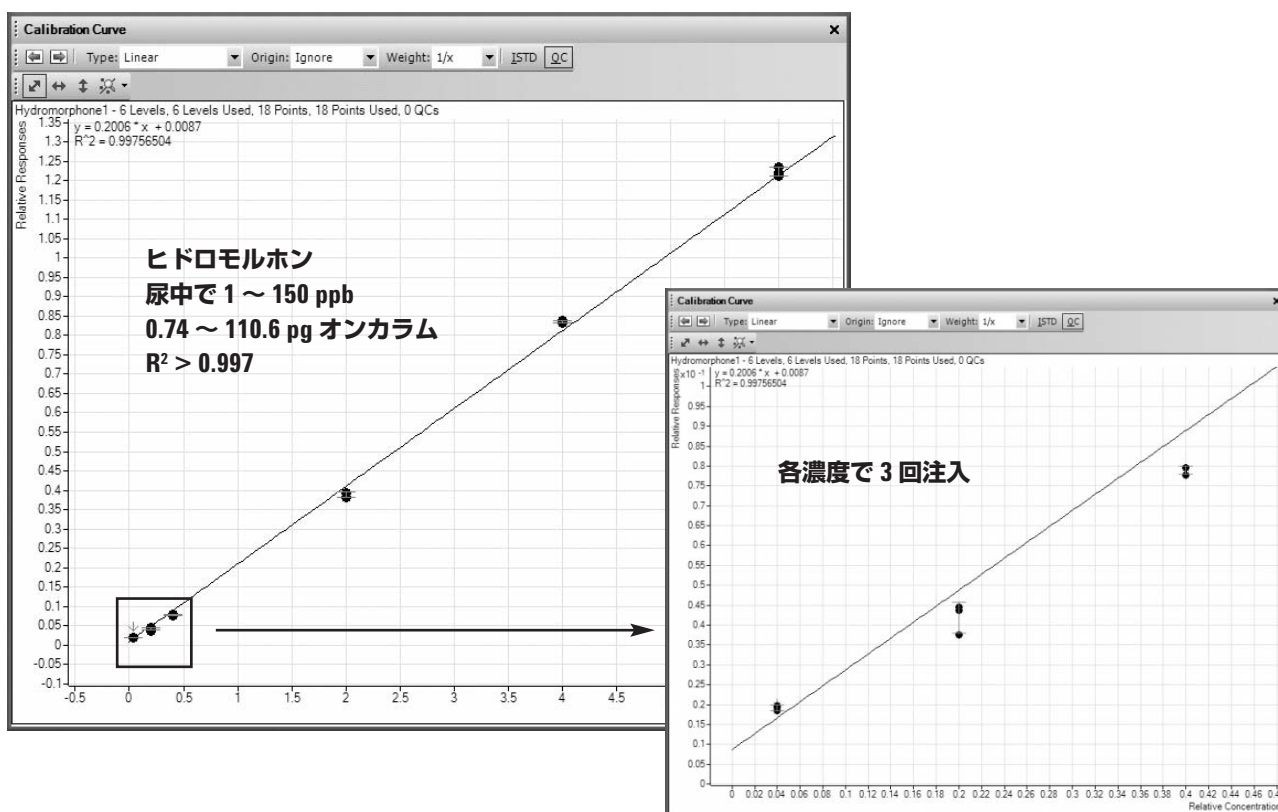


図 3C. 尿中のヒドモルホンの直線性。注入濃度範囲 = 147 ppt ~ 22 ppb

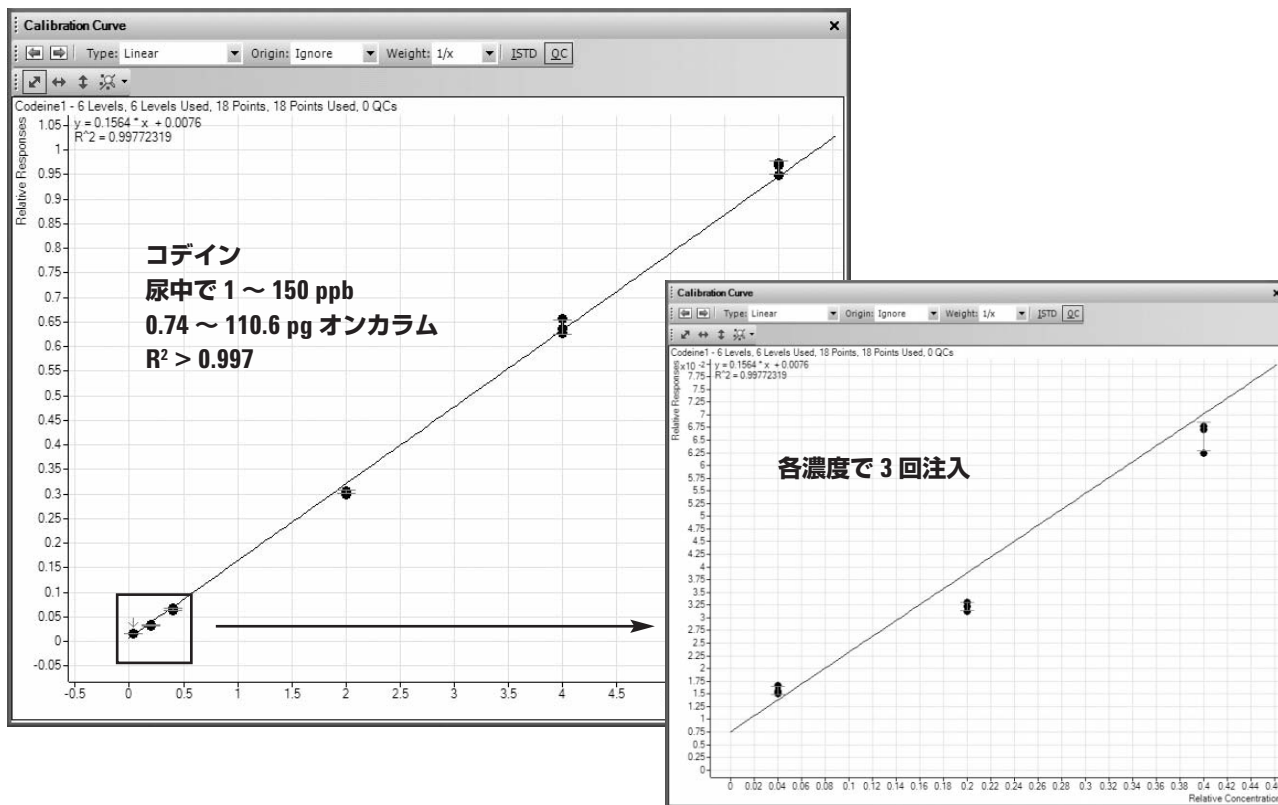


図 3D. 尿中のコデインの直線性。注入濃度範囲 = 147 ppt ~ 22 ppb

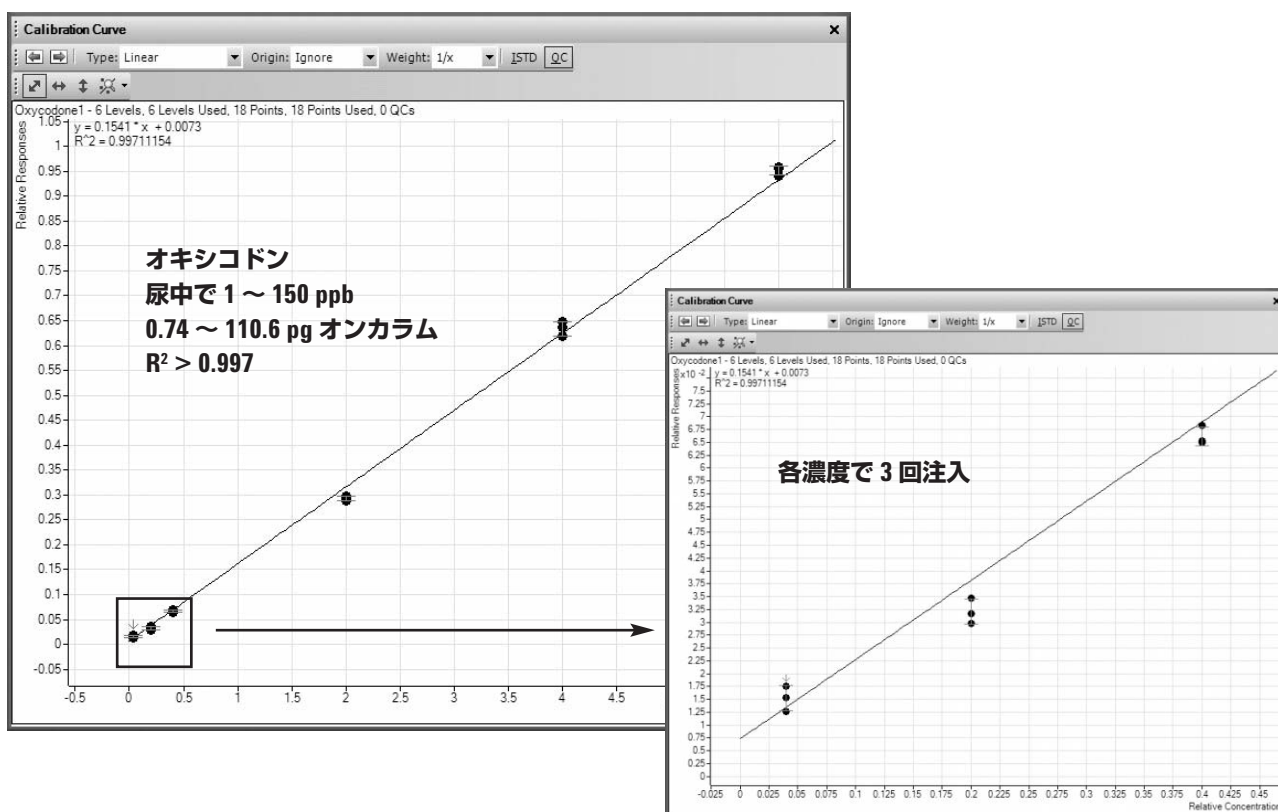


図 3E. 尿中のオキシコドンの直線性。注入濃度範囲 = 147 ppt ~ 22 ppb

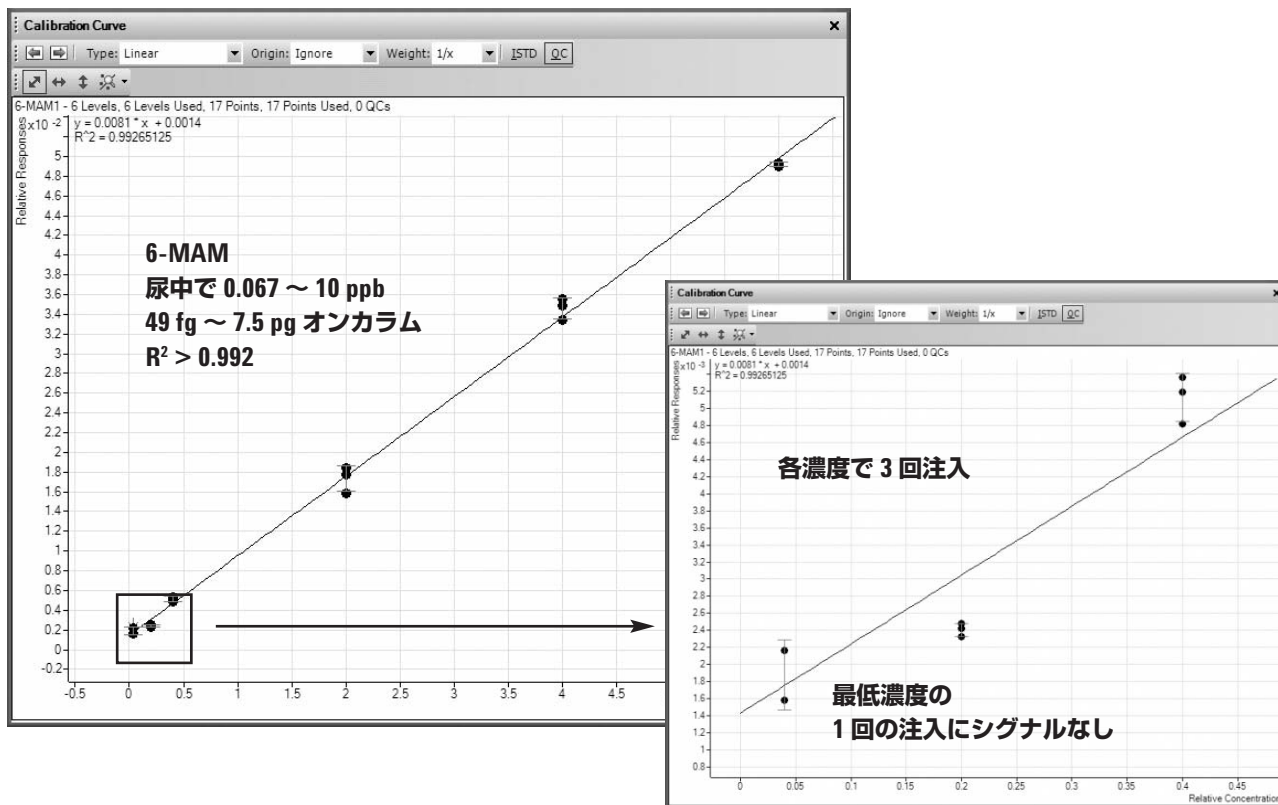


図 3F. 尿中の 6-MAM の直線性。注入濃度範囲 = 9.8 ppt ~ 1.5 ppb

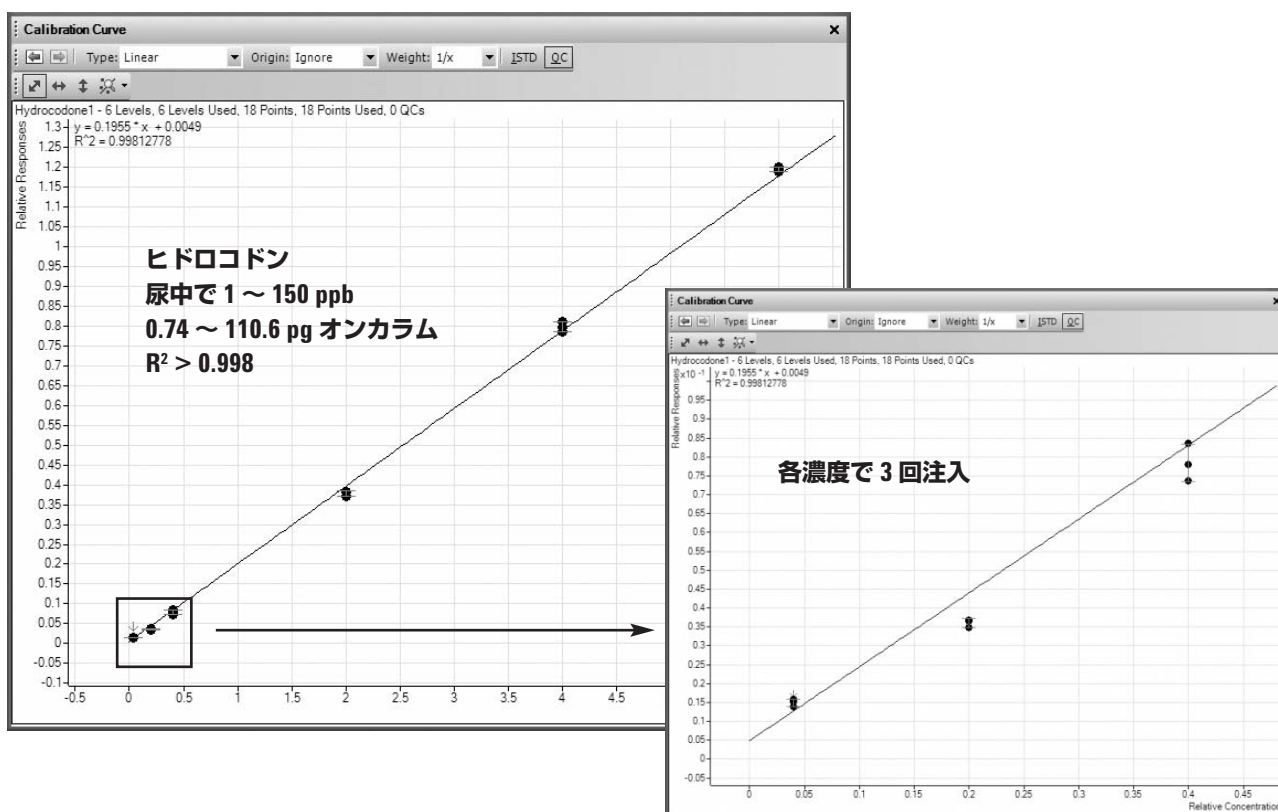


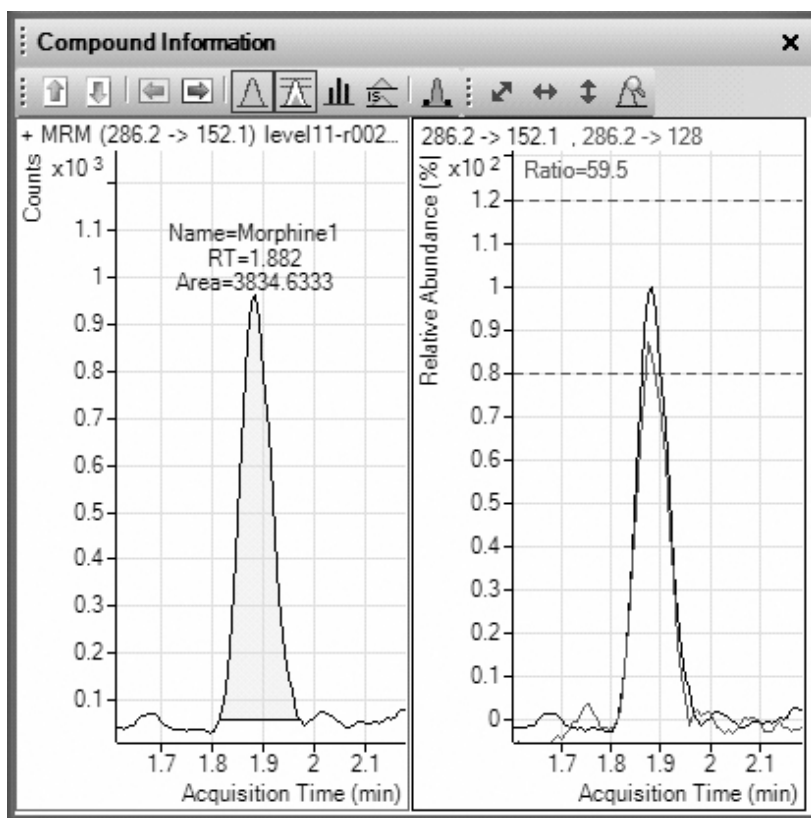
図 3G. 尿中のヒドロコドンの直線性。注入濃度範囲 = 147 ppt ~ 22 ppb

化合物の存在確認は、クオリファイア/クオンティファイアイオン比を求め、それが各測定対象化合物の測定値の± 20% に収まっているかで判断しました。たとえば、モルヒネの両生成物イオンの MRM を最適化した後は、クオリファイアピークのクオンティファイアのピークに対する比率が 0.7、あるいは 70% である必要があります。これは、MassHunter の定量機能で自動的に測定されます。この比率に± 20% の許容差を適用するという事は、つまりモルヒネの存在を確認するためには、このバッチで分析されたすべてのキャリブレーション標準とサンプルが 0.56 ~ 0.84 の比率内に収まっていなければならないということです。各測定対象化合物の確認要件を満たしている最低キャリブレーション濃度を図 4A ~ 4G に示します。

オキシコドンと 6-MAM を除いて、すべての測定対象化合物の確認イオン比は、相当する尿中の最低キャリブレーション濃度 1 pg/μL を満足しました。オキシコドンと 6-MAM の最低濃度は、それぞれ 5 と 0.3 pg/μL でした。

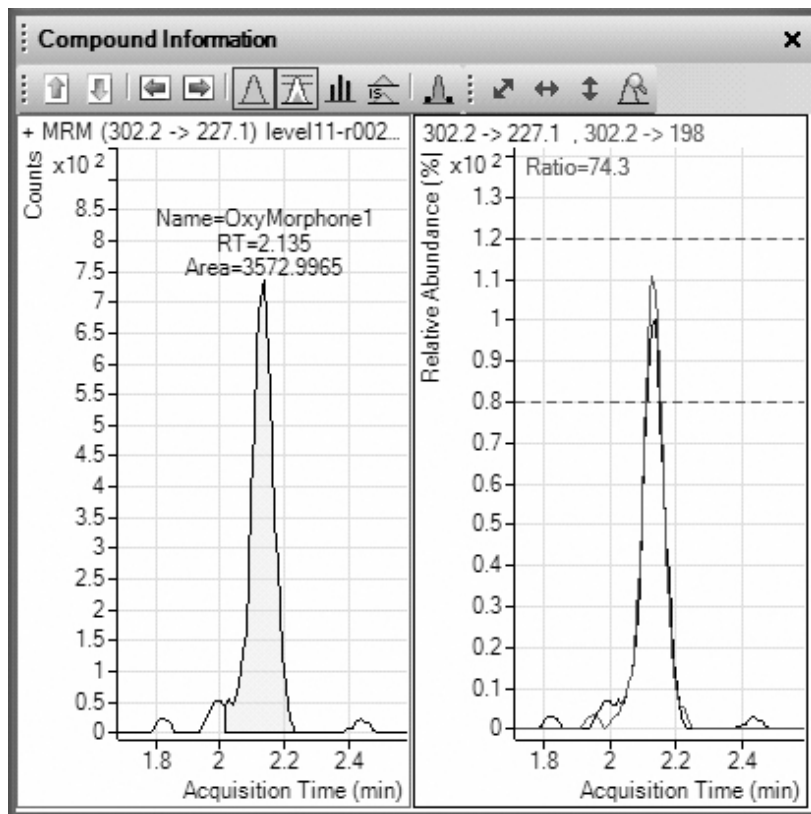
検出限界 (図 5A ~ 5G) は、S/N 比が 3、ピーク面積 %RSD (相対標準偏差パーセント) が 30 以下とし、各測定対象化合物のクオンティファイアイオンを用いて求めました。オキシコドンと 6-MAM を除いたすべての測定対象化合物は、それぞれオンカラムで 147 fg、注入量 1 μL で 8 回分析した値から算出されました。これらは、尿中濃度 1 pg/μL に相当します。オキシコドンの検出下限は、濃度 1 pg/μL に相当する量を 5 μL 3 回注入した結果から求めました (図 5E 参照)。オキシコドンと同様に、6-MAM の LOD は 5 μL 注入しましたが、相当する濃度は 0.067 pf/μL です。しかし、3 回の注入のうち、シグナルを示したのは 2 回だけであったため、ピーク面積 %RSD は算出されませんでした。詳細は、表 2 に記載されています。

検出限界 (図 5A ~ 5G) は、S/N 比が 3、ピーク面積 %RSD (相対標準偏差パーセント) が 30 以下とし、各測定対象化合物のクオンティファイアイオンを用いて求めました。オキシコドンと 6-MAM を除いたすべての測定対象化合物は、それぞれオンカラムで 147 fg、注入量 1 μL で 8 回分析した値から算出されました。これらは、尿中濃度 1 pg/μL に相当します。オキシコドンの検出下限は、濃度 1 pg/μL に相当する量を 5 μL 3 回注入した結果から求めました (図 5E 参照)。オキシコドンと同様に、6-MAM の LOD は 5 μL 注入しましたが、相当する濃度は 0.067 pf/μL です。しかし、3 回の注入のうち、シグナルを示したのは 2 回だけであったため、ピーク面積 %RSD は算出されませんでした。詳細は、表 2 に記載されています。



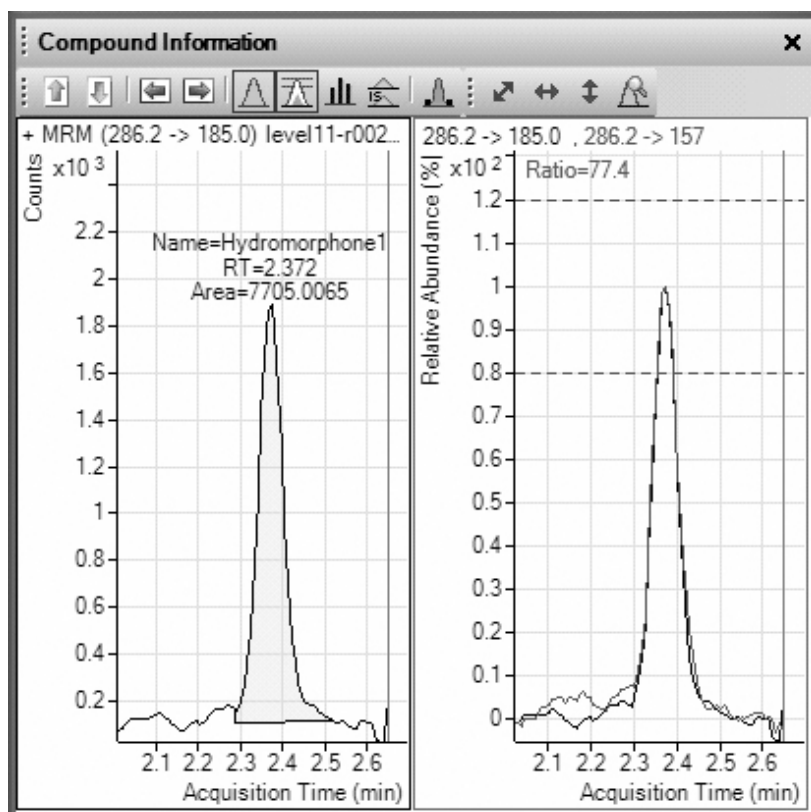
0.74 fg オンカラム

図 4A. 1 pg/μL (147 fg/μL) のモルヒネの確認



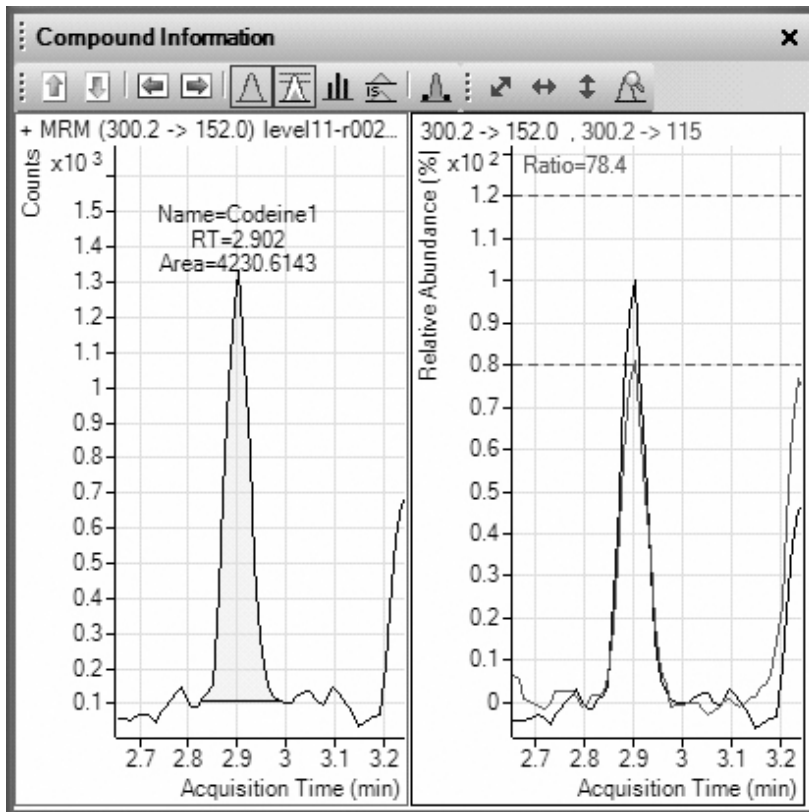
0.74 fg オンカラム

図 4B. 1 pg/μL (147 fg/μL) のオキシモルホンの確認



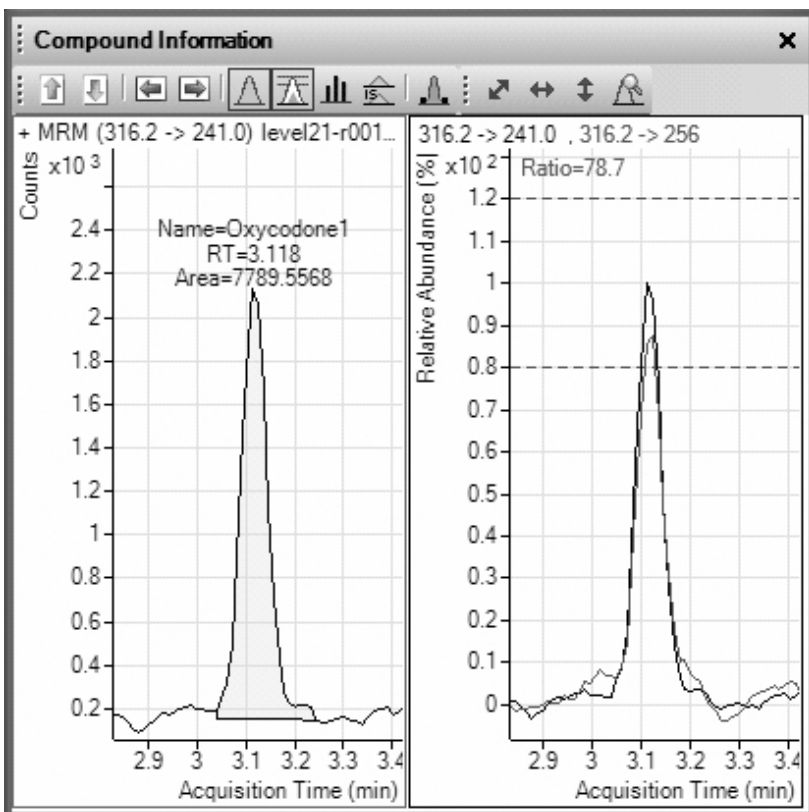
0.74 fg オンカラム

図 4C. 1 pg/μL (147 fg/μL) のヒドロモルホンの確認



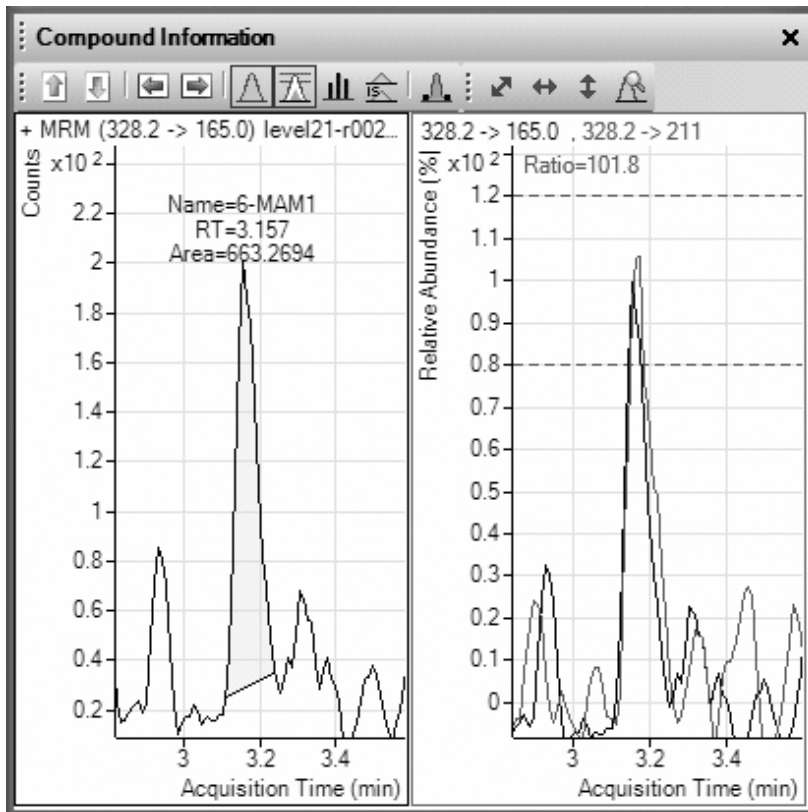
0.74 fg オンカラム

図 4D. 1 pg/ μ L (147 fg/ μ L) のコデインの確認



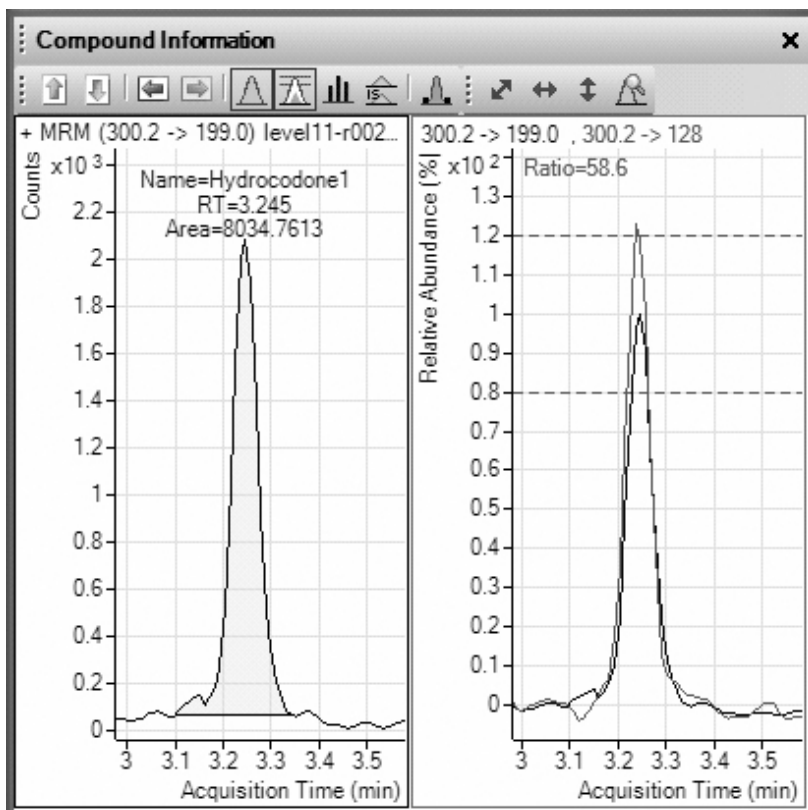
3.7 pg オンカラム

図 4E. 5 pg/ μ L (737 fg/ μ L) のオキシコドンの確認



245 fg オンカラム

図 4F. 0.3 pg/μL (49 fg/μL) の 6-MAM の確認



0.74 pg オンカラム

図 4G. 1 pg/μL (147 fg/μL) のヒドロコドンの確認

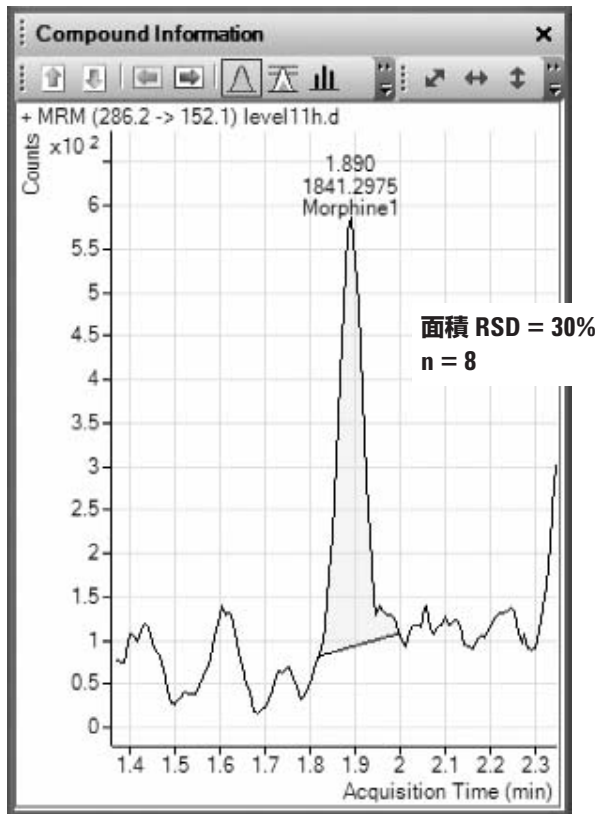


図 5A. 147 fg オンカラムのモルヒネの LOD

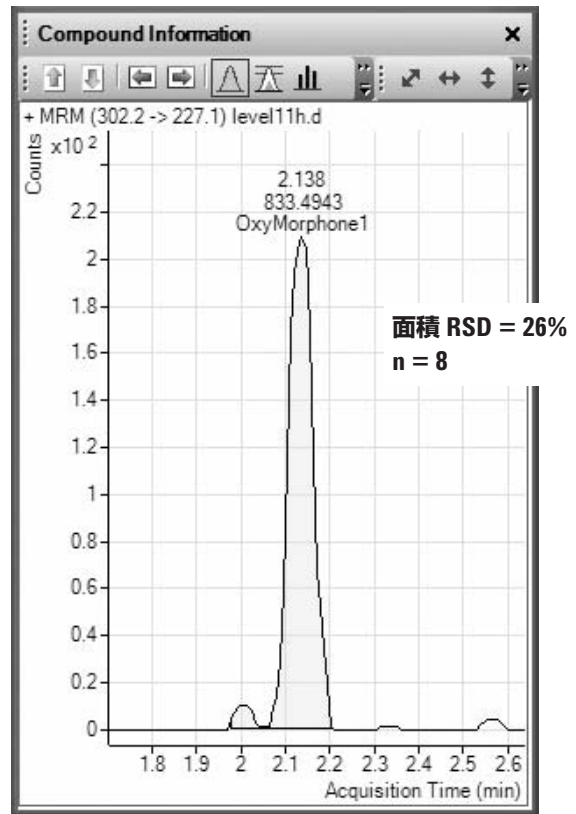


図 5B. 147 fg オンカラムのオキシモルホンの LOD

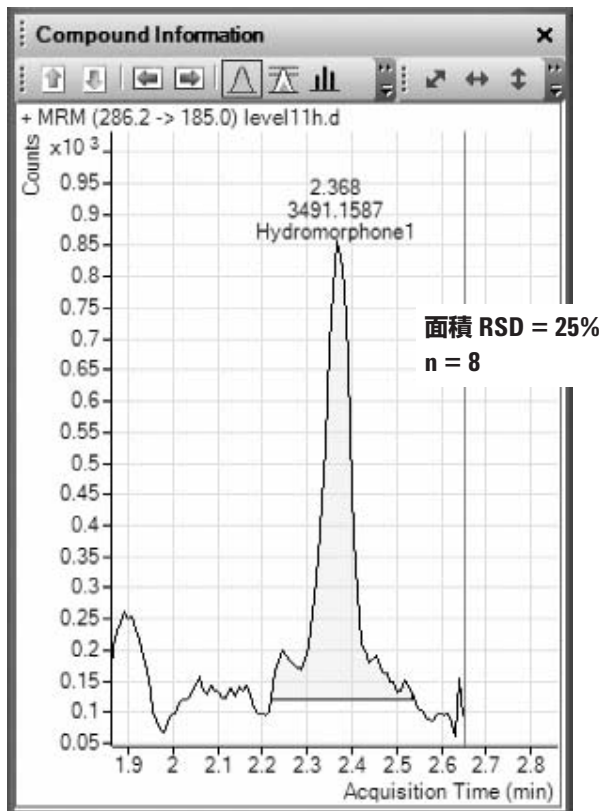


図 5C. 147 fg オンカラムのヒドモルホンの LOD

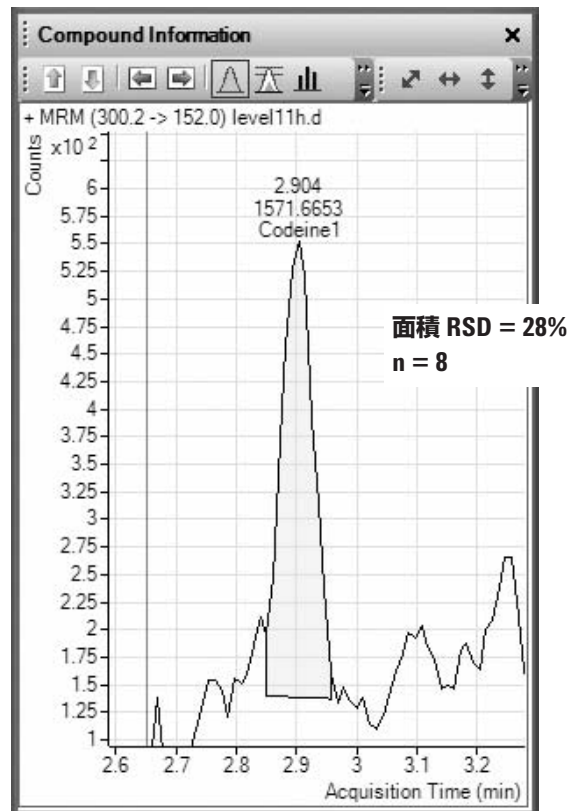


図 5D. 147 fg オンカラムのコデインの LOD

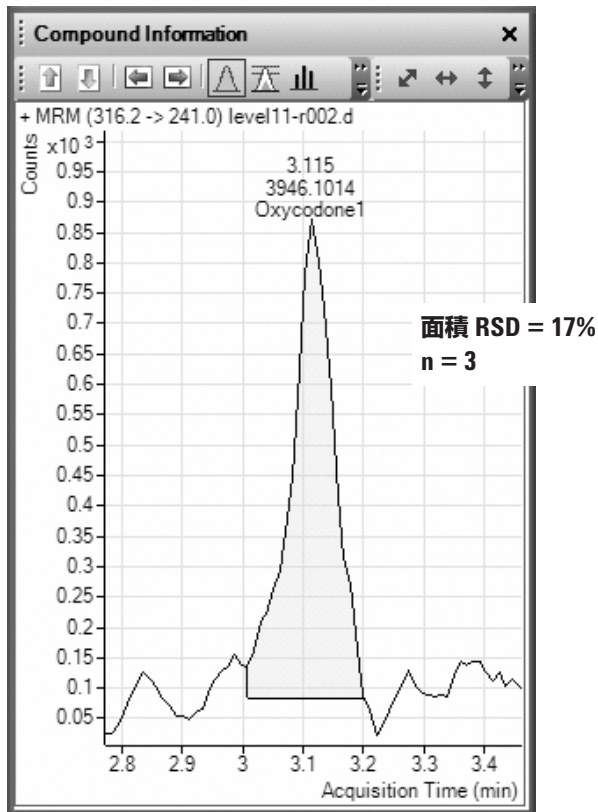


図 5E. 737 fg オンカラムのオキシコドンの LOD

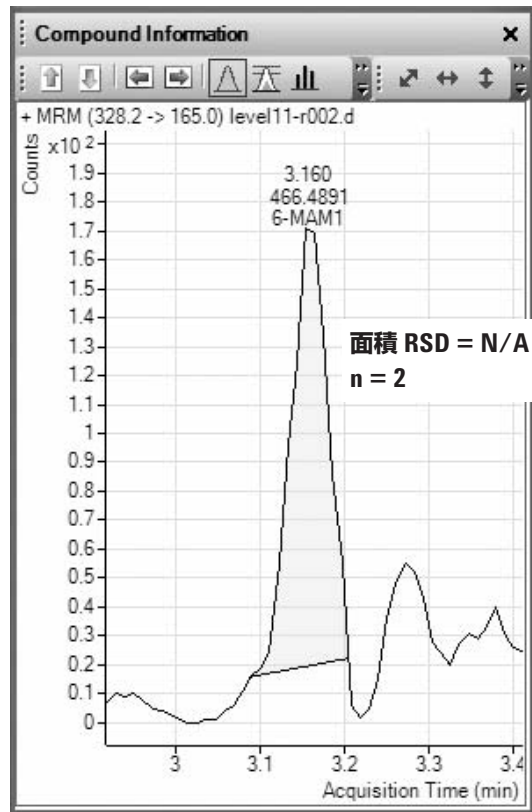


図 5F. 49 fg オンカラムでの 6-MAM の LOD。
3 回注入のうち、シグナルを含むのは 2 回だけであったため、
ピーク面積 %RSD は適用外。

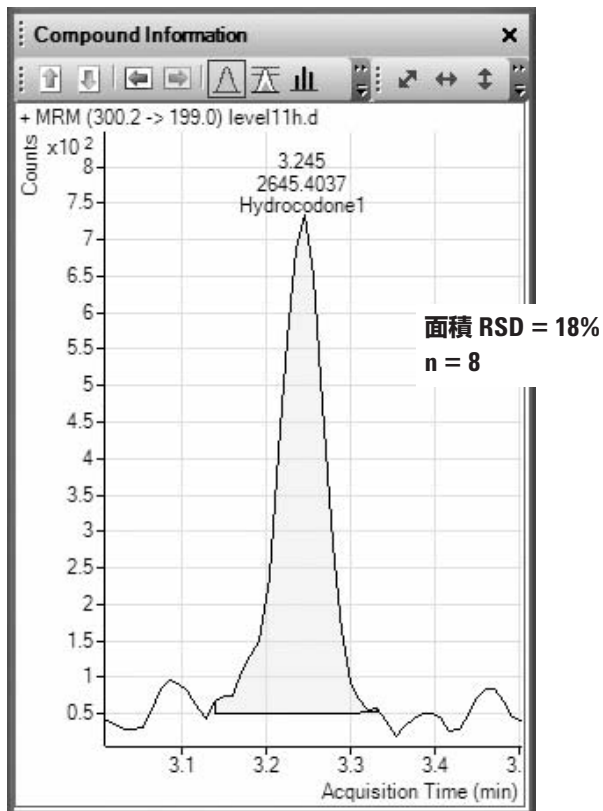


図 5G. 147 fg オンカラムのヒドロコドンの LOD

表 2. 各測定対象化合物の尿中の検出限界 (LOD)

測定対象化合物	LOD (fg オンカラム)
モルヒネ	147
オキシモルホン	147
ヒドロモルホン	147
コデイン	147
オキシコドン	737
6-MAM	49
ヒドロコドン	147

結論

尿中のアヘン類を良好に分析することができました。6-MAMを除いたすべての測定対象化合物では1～150 ppb、6-MAMは0.067～10 ppbの濃度範囲で優れた直線性 ($R^2 > 0.99$) が得られました。サンプルを処理し、5 μ L 注入した場合、この範囲はオンカラムで0.74～110.6 pgに相当します (6-MAMでは49 fg～7.5 pg)。検量線は、原点を含まず、直線近似で、 $1/x$ の重み付けで近似しました。最低濃度でも非常に良好な再現性と精度が実証されました。すべての測定対象化合物で、検出限界はオンカラムで1 pg未満でした。Agilent 6410 QQQは、比較的汚れたマトリクスでも高感度定量が可能な優れた機器です。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
September 26, 2008
5989-7213JAJP