

Q-RAI 法を用いた Agilent 6546 LC/Q-TOF による薬物スクリーニング法



Authors

滝埜昌彦
澤田浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、Q-RAI (Quadrupole Resolved All Ions)法を用いた四重極飛行時間型 LC/MS (LC/QTOF)による薬物分析について紹介します。Q-RAI 法とは従来のデータ依存型 MS/MS 法と異なりデータ非依存型 MS/MS 法です。この手法の特徴は検出されたイオンの網羅的な MS/MS 測定が可能な事です。しかし、従来のデータ非依存型 MS/MS 法である All Ions 法は四重極でイオンを選択しない事から、測定される MS/MS スペクトルの特異性が低い問題点がありました。一方、Q-RAI 法は四重極でイオンを任意の質量範囲で絞りこみながら測定が可能な事から測定される MS/MS スペクトルの特異性を高くする事が可能です。そこで生体試料中薬物分析に Q-RAI 法を用いた Agilent 6546 LC/QTOF によるスクリーニング法を検討しました。

Key words : Q-RAI, LC/QTOF, 薬物分析, データ非依存型 MS/MS 法

分析条件

システム

1290 Infinity II High speed pump (G7120A)
 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
 1290 Infinity II Multicolumn thermostat (G7116B)
 6546 LC/Q-TOF (G6546A)
 MassHunter Data Acquisition B.10.1
 MassHunter Quantitative analysis B.10.1

LC/MS条件

今回の分析は高分解能LC/Q-TOF法を使用しました。条件は表1及び2に示した通りです。

表 1. 分析条件

LC		Agilent 1290 Infinity II Prime LC System	
移動相	A:5 mM酢酸アンモニウム水溶液 B:メタノール		
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) (P/N:959758-902)		
流速	0.2 mL/min	Time(min)	%B
カラム温度	40 °C	0	10
注入力	2 μL	30	100
グラジエント	右図		
MS		Agilent 6546 LC/Q-TOF System	
イオン源	Agilent Jet Stream(AJS) ESI		
測定モード	Q-RAI(Quadrupole resolved All Ions)		
乾燥ガス	300 °C 10L/min		
シースガス	300 °C 12L/min		
ネブライズ圧	50 psi		
キャピラリ電圧	4000 V		
ノズル電圧	0 V		

表2 Q-RAIの測定条件

開始(m/z)	終了(m/z)	幅(m/z)	CE(eV)
130	200	70	30
200	250	50	30
250	300	50	30
300	350	50	30
350	400	50	30
400	500	100	30
500	660	160	30

CE:コリジョンエネルギー

試料調製

薬物混合標準液は各薬物の保存標準液(10 ppm)を混合後、適宜アセトニトリルで希釈調製しました。Q-RAI法検証用の検体は既知薬物を添加した尿試料を使用し、β-グルクロニダーゼ処理とアセトニトリル除タンパク処理した尿試料は東京慈恵会医科大学法医学教室前橋先生から提供を受けました。

薬物スクリーニング法

スクリーニングに使用したPCDL(Personal Compound Database Library)は表3に示した通り化合物名、組成式、モノアイトピック質量、保持時間及びプロダクトイオンスペクトルを含みます。薬物スクリーニング条件は表4に示しました。

表3. 薬物のPCDL

薬物	組成式	モノアイトピック質量	保持時間	薬物	組成式	モノアイトピック質量	保持時間	薬物	組成式	モノアイトピック質量	保持時間	薬物	組成式	モノアイトピック質量	保持時間
Acetabulol	C18H28N2O4	336.20491	15.20	Delorazepam	C15H10Cl2N2O	304.01702	23.96	Maprotiline	C20H23N	277.18305	22.62	Piroxicam	C15H13N3O4S	331.06268	16.97
Acemetacin	C21H18ClNO6	415.08227	24.45	Desipramine	C18H22N2	266.17830	22.67	Mazindol	C16H13ClN2O	284.07164	19.88	Pramipexole	C10H17NS	211.11432	7.18
acetaminophen	C8H9NO2	151.06333	7.35	Diazepam	C16H13ClN2O	284.07164	25.03	Medazepam	C16H15ClN2O	270.09238	28.63	Prazepam	C12H17ClN2O2	324.10294	27.43
Acetazolamid	C4H6N4O5S2	221.98813	7.23	Dibucaine	C20H29N3O2	343.22598	25.98	Mefenamic acid	C15H15NO2	241.11028	24.00	Primidon	C12H14N2O2	218.10553	14.81
acetylpheneturide	C13H16N2O3	248.11609	22.49	Diclofenac	C14H11Cl2NO2	295.01668	22.88	Meloxicam	C14H13N3O4S2	351.03475	18.74	Procaine	C12H18N2O2	236.15248	10.82
Alimemazine	C17H21N3	298.15037	26.12	Dihydrocodeine	C18H23NO3	301.16779	11.69	Mepivacaine	C15H22N2O	246.17321	17.58	Prochlorperazine	C20H24ClN3S	373.13795	30.07
alprazolam	C17H13ClN4	308.08287	22.86	Diltiazem	C22H26N2O4S	414.16133	26.01	Mequitazine	C22H22N2S	322.15037	23.69	Promethazine	C17H20N2S	284.13472	26.02
Alprenolol	C15H23NO2	249.17288	20.06	Dimethothiazine	C19H25N3O2S2	391.13882	25.95	Methamphetamine	C10H15N	149.12045	11.26	Proprietaryzine	C21H23N3OS	365.15618	24.20
Amantadine	C10H17N	151.13610	13.83	Diphenhydramine	C17H21NO	255.16231	21.45	Methocarbamol	C11H15NO5	241.09502	15.38	Quazepam	C21H22ClF4N2S	386.02676	27.05
Amiodaron	C25H29N2O3	645.02368	34.02	Diphenylpyraline	C19H23NO	281.17796	23.27	Methylphenidate	C14H19NO2	233.14158	16.82	quetiapine	C21H25N3O2S	383.16675	26.27
amitriptyline	C20H23N	277.18305	26.00	Disopyramine	C21H29N3O	339.23106	15.42	Mexitene	C20H23NS	309.15512	25.77	Ramelteon	C16H21NO2	259.15723	23.21
Amlopidine	C20H25ClN2O5	408.14520	23.35	Donepezil	C24H29NO3	379.21474	23.23	Mianserin	C18H20N2	264.16265	28.24	Rantidine	C13H22N4O3S	314.14126	10.50
amoxapine	C17H16ClNO3	313.09819	24.08	Dosulepine	C17H21NS	295.13947	24.56	Milanserin	C18H20N2	264.16265	28.24	Reserpine	C33H40Cl2O9	608.27338	28.84
Atomolol	C15H21NO3S2	371.07959	16.26	Droperidol	C22H22F3NO2	379.16961	25.75	Midazolam	C18H13ClF3N3	325.07820	24.91	Risperidone	C21H20Cl2N6O3	474.07979	22.17
Atenolol	C14H22NO3	266.16304	8.52	Duloxetine	C18H19NO5	297.11873	22.88	Milnacipran	C15H22FN2O	246.17321	18.14	Risperidone	C23H27F3N4O2	410.21180	23.15
Atropine	C17H23NO3	289.16779	13.11	Eplazocine	C15H21NO	221.16231	13.04	Morphine	C17H19NO3	285.13649	9.36	Rocuronium	C32H52N4O4	528.39271	21.34
Azithromycin	C33H49NO6	582.24783	31.31	esazolam	C16H11ClNO4	294.05722	22.14	Mossapramine	C28H35ClNO4O	478.24994	30.51	Ropivacaine	C17H26NO2	274.20451	23.73
Biperiden	C21H29NO	311.22491	25.77	ethenzamide	C9H11NO2	165.07988	16.60	Naloxone	C15H21NO4	327.14706	19.13	Salsylamide	C7H7NO2	137.04768	12.02
Biperiden	C14H18ClNO3	315.00072	20.52	Ethoin	C11H12NO2	204.08988	16.29	Naloxon	C19H21NO4	327.14706	18.83	Sertaline	C17H17Cl2N	305.07380	25.69
Bromazepam	C23H40BrN5O5	652.22128	30.81	Ethyl loflazepate	C18H14ClFN2O3	360.06770	25.51	Naproxen	C14H14O3	220.09429	18.83	Setipiline	C19H19N	261.15175	25.80
Bromovalerylurea	C6H11BrN2O2	222.00039	16.95	Etizolam	C17H15ClN5	342.07059	23.60	Nemonepride	C21H26ClNO2	387.17135	27.18	Spiperone	C23H26FN3O2	395.20091	23.12
Bromperidol	C21H28BrFN2O	419.08962	23.81	Etodolac	C17H21NO3	287.15214	23.83	nicotine	C10H14N2	162.11570	9.76	Sulindac	C22H26F3O3S	356.08244	19.67
Brotizolam	C15H10Cl2N4S	391.94981	23.29	Fludiazepam	C16H12Cl2FNO	302.06222	24.13	Nimetazepam	C16H13N3O3	295.09569	22.02	sulpiride	C15H23N3O4S	341.14093	9.17
Buprenorphine	C28H41ClNO4	467.30356	32.87	Flufenamic acid	C14H10FN3O2	281.06656	24.28	Nitrazepam	C15H11N3O3	281.08004	21.39	Sultopride	C17H26N2O4S	354.16133	12.08
Bupivacaine	C18H28N2O	288.22016	25.94	Flumazepam	C15H14FN3O3	303.10192	18.66	Nortriptyline	C15H11ClN2O	270.05999	24.43	Talipexole	C10H15NS	209.09867	10.78
carbamazepine	C15H12N2O	236.09496	21.18	Flunitrazepam	C16H12FN3O3	313.08627	21.49	Nortriptyline	C19H21N	263.16740	23.37	Tandospirone	C21H29NO2	383.23213	24.06
caripramine	C28H38NO4	446.30456	29.02	Flurazepam	C22H26FN3O3	437.17487	29.39	Olanzapin	C17H20N4S	312.14087	23.38	Temazepam	C16H13ClN2O2	300.06656	23.44
Carvedilol	C24H26NO4	406.18924	22.92	Flurazepam	C21H23ClFN3O	387.15137	25.45	Olmesartan	C24H26N6O3	446.20664	16.65	Tenoxicam	C13H11N3O2	307.09110	15.81
chlordiazepoxide	C16H14Cl2NO3	299.08254	24.12	Flutazolam	C19H18ClFN2O3	376.09900	24.66	Oxapropzin	C18H15NO3	293.10519	23.15	Tetraacine	C15H24NO2	264.18378	23.47
Chlormezanone	C11H12Cl2NO3S	273.02264	17.24	Flutoprazepam	C21H23ClFN2O	342.09352	27.00	Oxazepam	C15H11ClN2O2	286.05091	22.80	Thioridazine	C21H26N2S2	378.15374	27.96
Chlorphenesin-1	C10H12Cl2NO4	245.04549	19.33	Fluvaxamine	C15H21F3N2O2	318.15551	23.56	oxazolam	C16H17ClN2O2	328.09786	27.27	Tiaprofenic acid	C14H13O3S	260.05071	18.24
Chlorphenesin-2	C10H12Cl2NO4	245.04549	20.56	Galopentine	C9H17NO2	171.12593	7.75	Oxybutrocaine	C17H28NO3	308.20999	22.73	Timiperone	C22H42FN3OS	397.16241	25.59
chlorpheniramine	C16H19ClNO2	274.12368	19.94	Glutethimide	C13H15NO2	217.11028	20.65	Oxycodone	C18H21NO4	315.14706	12.74	Tizanidine	C9H8ClNS	253.01899	10.84
chlorpromazine	C17H19ClN2S	318.09575	27.61	Haloperidol	C21H23ClFNO2	375.14013	23.22	Oxycodone	C23H29NO4	379.22598	25.68	Tofisopim	C22H26N2O4	382.18853	23.71
Clemastine	C21H26ClNO	343.17029	27.11	Halozolam	C17H14BrFN2O2	376.02227	25.32	Papaverine	C20H21NO4	339.14706	22.63	Tolfenamic acid	C14H12ClNO2	261.05566	14.64
clobazam	C16H13Cl2NO2	300.06656	22.31	Homochlorcyclizine	C19H23ClN2O	314.15498	25.12	Paroxetine	C19H20F3NO2	329.14272	22.16	Tramadol	C16H15NO2	263.18853	25.90
clocapramine	C28H37ClNO4O	480.26559	30.81	Hydroxyzine	C21H27ClN2O2	374.17611	27.86	Pemoline	C9H8N2O2	176.05858	11.04	Trazodone	C19H22ClNO	317.15219	25.95
Clofedanol	C17H20ClNO	289.12334	21.27	Imipramine	C19H24N2	280.19395	24.65	Pentazocin	C19H27NO2	285.20926	18.05	Triazolam	C17H12Cl2N4	342.04390	22.78
clomipramine	C19H23ClNO	314.15498	27.64	Indomethacin	C19H16ClNO4	357.07679	23.97	Pergolide	C19H26N2S	314.18167	25.00	Trifluoperazine	C21H24F3N3	407.16430	30.50
clonazepam	C15H10Cl2NO3	315.04107	21.45	Isopropylantipyrine	C14H18N2O	230.14191	21.09	Perospirone	C23H30NO4S	426.20895	28.04	Trixephenidyl	C20H31NO	301.24056	26.37
clotiazepam	C16H15Cl2NO2	318.05936	26.22	Ketamine	C13H16ClNO	237.09204	21.05	Perphenazine	C22H26ClN3OS	403.14851	28.86	Trimipramine	C20H26N2	294.20060	27.32
cloxazolam	C16H14Cl2NO2	348.04323	26.22	Ketoprofen	C19H23ClNO2	254.09429	19.18	Pethidine	C15H21ClNO	247.15723	18.63	Triprolidine	C19H22N2	278.17830	21.46
Clozapine	C18H19ClN4	326.12982	26.70	Labetalol	C19H24N2O3	328.17869	18.68	Phenacetin	C10H13NO2	179.09463	16.88	Tubocurarine	C37H46ClNO6	608.28864	16.06
Cocaine	C17H21NO4	303.14706	17.99	Levomemoprazine	C19H24N2OS	328.16933	26.42	Pimozide	C15H12NO2	252.08988	20.30	Verapamil	C21H28ClN2O	468.23924	25.12
Codeine	C18H21NO3	299.15214	14.18	Lidocaine	C14H22NO2	234.17321	23.54	Pimozide	C28H29FN2NO	461.22787	29.73	zolpidem	C19H21NO3	307.16846	23.09
Cyproheptadine	C21H21N	287.16740	26.69	Lorazepam	C15H10Cl2NO2	320.01193	22.82	Pipamperone	C15H10Cl2NO2	375.23221	21.16	Zonisamide	C8H8ClNO3S	212.02556	12.21
Dantrolene	C14H10NO5	314.06512	20.40	Lormetazepam	C16H12Cl2N2O2	334.02758	23.79	Proheptine	C22H29N	303.19870	25.83	Zopiclone	C17H17ClNO3	388.10507	30.40

表4. 薬物スクリーニング条件及び基準値

条件	設定値
抽出質量幅	±30 ppm
抽出時間	±2 分
抽出イオン数	5
基準項目	基準値
ターゲットイオン	
相対質量誤差	±3 ppm以下
同位体スコア	90以上
プロダクトイオン	
相対質量誤差	±3 ppm以下
共溶出スコア	90以上
S/N	5以上
保持時間	±5 %以下
全基準値を満たすプロダクトイオン数	2以上

結果

標準液

Q-RAI法は表2に示した通り、四重極の質量範囲を任意に指定する事で選択性の高いMS/MSスペクトルの測定が可能です。一方、Q-RAI法では多チャンネルで測定するため、クロマトグラムのピークあたりのデータ数を下げない様にTOFMSの測定速度を高くする必要があります。薬物標準液(25 ppb)をQ-RAIモードで測定し、表4のスクリーニング条件で解析した結果を図1に示します。ターゲットイオン及びプロダクトイオンが基準値を満たす薬物数は157✔️、ターゲットイオン又はプロダクトイオンが基準値を満たす薬物数は21⚠️、ターゲットイオン及びプロダクトイオンが共に基準値を満たさない薬物数は10❌ (図1上部青枠参照)でした。また、スクリーニング結果には化合物名、組成式、保持時間、同位体スコア、相対質量誤差など及び各薬物のプロダクトイオンスペクトル、分子関連イオンの同位体イオン、PCDLから指定したイオンのプロダクトイオンスペクトルの表示が可能で、図1はクエチアピンの結果を示しています。定量結果の詳細は図2の通り、クロマトグラムや検量線を確認することが可能です。



図1 薬物標準液(25 ppb)のスクリーニング結果

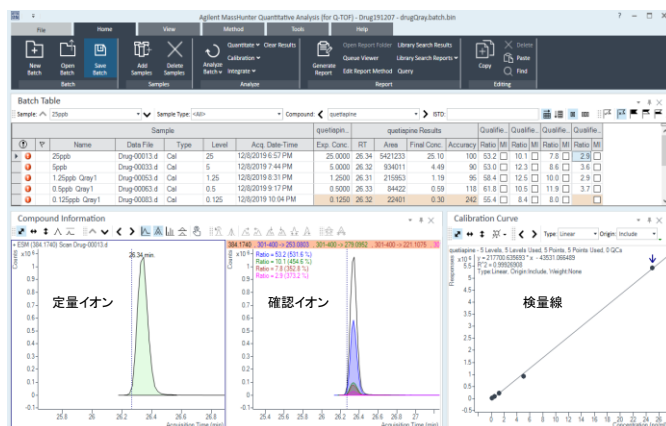


図2 クエチアピンの定量結果

尿試料

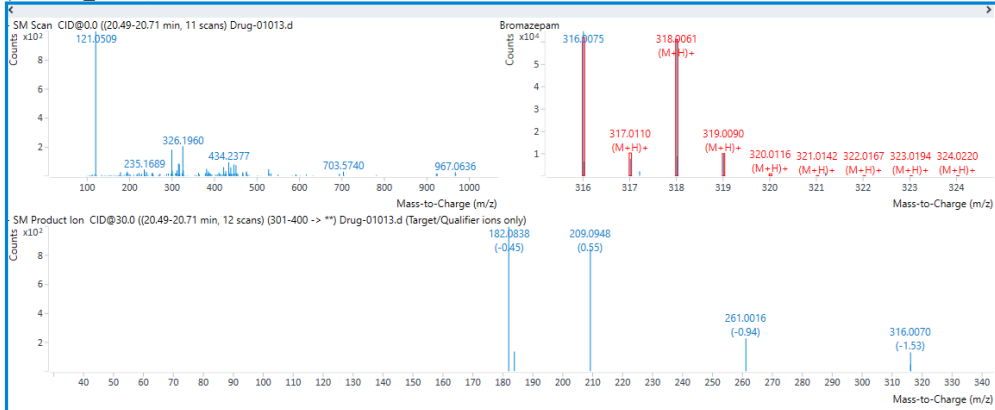
既知薬物を添加した尿試料の結果を図3に示しました。全ての基準を満たした薬物はプロマゼパム、ロラゼエパム及びレボメプロマジンでした。これら薬物濃度は2.2, 36.8及び20.7 ppbでした。

まとめ

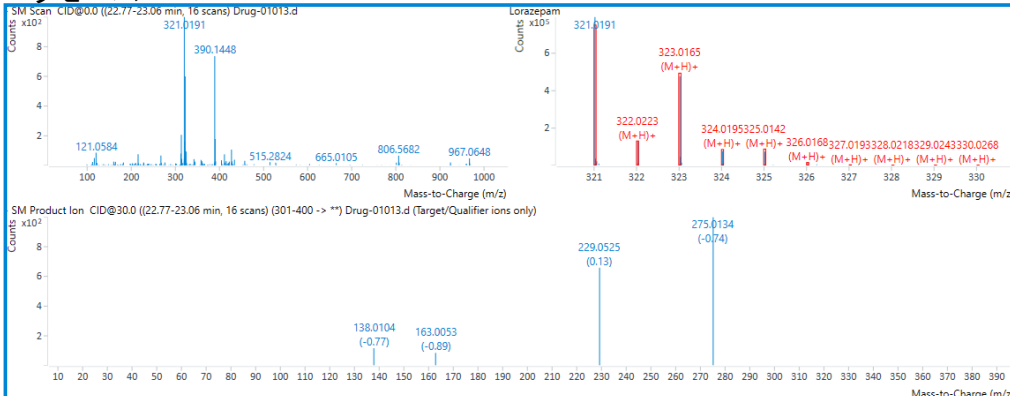
Agilent 6546 LC/Q-TOFシステムのQ-RAI法を用いた薬物スクリーニング法を検証しました。薬物標準液(25 ppb)を用いて測定及び解析した結果、83%の薬物が全ての基準を満たしました。5%の薬物は確認イオンの相対強度が低いなどの原因で2個以上の基準を満たしませんでした。また、既知の薬物を添加した尿試料で全ての薬物の検出が可能でした。1薬物(ゾルピデム)が尿中で4基準を満たした偽陽性として検出されました。Q-RAI法は高分解能Q-TOFと併用する事で偽陽性の少ない信頼性の高いスクリーニング法と考えられます。

Status	Compound Name	CAS#	Formula	R.T.	R.T. Diff.	Final Conc.	Mass Match Score	Target Ion	Mass Accuracy	# of Verified Ions
✓	Bromazepam	C14H10BrN3O		20.580	0.057	2.2640	96.4	316.0080	-1.5309	3
✓	Lorazepam	C15H10Cl2N2O2		22.874	0.068	96.8437	98.5	321.0192	-0.3733	5
✓	Levomepromazine (methotrimeprazine)	C19H24N2OS		26.493	0.072	20.6691	94.5	329.1682	0.1252	4
⚠	Zopiclone	C17H17ClN6O3		30.450	0.046	9.8407	61.3	389.1123	-2.7189	2

ブロマゼパム



ロラゼパム



レボプロマジン

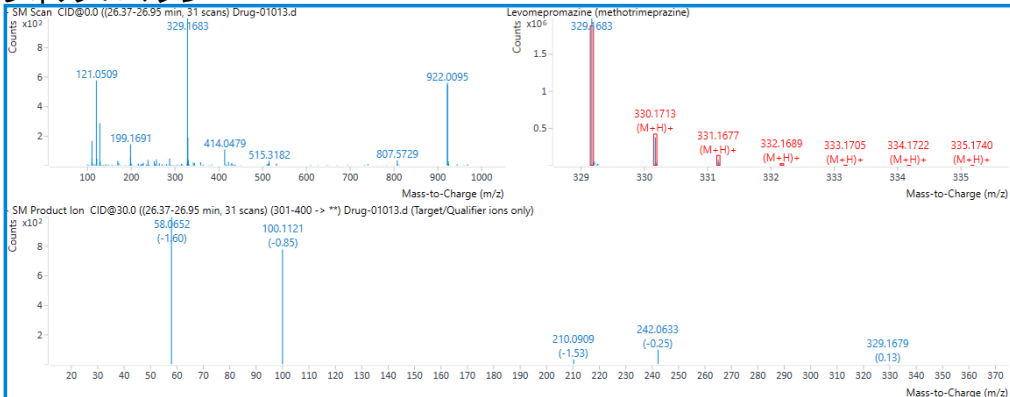


図3 尿中薬物のスクリーニング結果

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。
本文書に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, June 15, 2020

LC-MS-202006TK-001

DE44259.9144560185 (RA approved)

