

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(1.8µm, 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 |
| 注入量 | 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 | | |
| ネブライザ圧 | 50 psi | | |
| キャピラリ電圧 | 4000 V | | |
| ノズル電圧 | 0 V | | |

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 | C15H10C2N2O | 304.01702 | 23.96 | Maprotiline | C20H23N | 277.18305 | 22.62 | Piroxicam | C15H13N3O4S | 331.02668 | 16.97 |
| Acemetacin | C21H18CIN6 | 415.08227 | 24.45 | Desipramine | C18H22N2 | 266.17830 | 22.67 | Mazindol | C16H13CIN2O | 284.07164 | 19.88 | Primapexole | C10H17N3S | 211.11432 | 7.18 |
| acetaminophen | C8H9NO2 | 151.06333 | 7.35 | Diazepam | C16H13CIN2O | 284.07164 | 25.03 | Medazepam | C16H13CIN2O | 270.09238 | 28.63 | Prazepam | C12H17CIN2O | 324.10294 | 27.43 |
| Acetazolamide | C4H6N4O3S2 | 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 | C14H11C2N2O2 | 295.01668 | 22.88 | Meloxicam | C14H13N3O4S2 | 351.03475 | 18.74 | Procaine | C13H20N2O2 | 236.15248 | 10.82 |
| Alimemazine | C17H12N2S | 298.15037 | 26.12 | Dihydrocodeine | C18H23NO3 | 301.16779 | 11.69 | Mepivacaine | C15H22N2O | 246.17321 | 17.58 | Prochloroperazine | C20H24CIN3S | 373.13795 | 30.07 |
| alprazolam | C17H13CIN4 | 308.08287 | 22.86 | Diltiazem | C22H26N2O4S | 414.16133 | 26.01 | Mequitazine | C15H22N2S | 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 | C17H11CIN4N2S | 386.02676 | 27.05 |
| Amiodaron | C25H29N2O3 | 645.02368 | 34.93 | 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 | C20H25CIN2O5 | 408.14520 | 23.35 | Donepezil | C24H29NO3 | 379.21474 | 23.23 | Mianserin | C18H22ON2 | 264.16265 | 28.24 | Rantidine | C13H22N4O3S | 314.14126 | 10.50 |
| amoxapine | C17H16CIN3O | 313.09819 | 24.08 | Dosulepine | C17H21NS | 295.13947 | 24.56 | Milazepam | C18H13CIN3 | 325.07820 | 24.91 | Reserpine | C33H40CIN2O9 | 608.27338 | 28.84 |
| Atenolol | C15H21N3O2S3 | 371.07959 | 16.26 | Droperidol | C22H22FN3O2 | 379.16961 | 25.75 | Midazolam | C18H13CIN3 | 325.07820 | 24.91 | Risperidone | C21H20CIN2N6O3 | 474.07939 | 22.17 |
| Atenolol | C14H22N2O3 | 266.16304 | 8.52 | Duloxetine | C18H19NO3 | 297.11873 | 22.88 | Milnacipran | C15H22N2O | 246.17321 | 18.14 | Risperidone | C23H27FN4O2 | 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 | C33H39N5O6 | 582.24783 | 31.31 | estazolam | C16H11CIN4 | 294.05722 | 22.14 | Mossapramine | C28H35CIN4O | 478.24994 | 30.51 | Ropivacaine | C17H26NO2 | 274.20451 | 23.73 |
| Biperiden | C21H29NO | 311.22491 | 25.77 | ethenzamide | C9H11NO2 | 165.07898 | 16.60 | Nabumetone | C15H16O2 | 228.11503 | 25.19 | Salsylamide | C7H9NO2 | 137.04768 | 12.02 |
| Biperiden | C14H18N4O | 315.00072 | 20.52 | Ethotoin | C11H12N2O2 | 204.08988 | 16.29 | Naloxon | C19H21NO4 | 327.14706 | 19.13 | Sertaline | C17H17CIN2N | 305.07380 | 25.69 |
| Bromazepam | C23H40BrN5O5 | 652.22128 | 30.81 | Ethyl loflazepate | C18H14CIN2O3 | 360.06770 | 25.51 | Naproxen | C14H14O3 | 220.09429 | 18.83 | Setipitine | C19H19N | 261.15175 | 25.80 |
| Bromovaleyfurea | C6H11BrN2O2 | 222.00039 | 16.95 | etizolam | C17H15CIN4S | 342.07059 | 23.60 | Nemonapride | C21H26CIN3O2 | 387.17135 | 27.18 | Spiperone | C23H26FN3O2 | 395.20091 | 23.12 |
| Bromperidol | C21H23BrFN2O2 | 419.08962 | 23.81 | Etodolac | C17H21NO3 | 287.15214 | 23.83 | nicotine | C10H14N2 | 162.11570 | 9.76 | Sulindac | C23H26FN3O2 | 395.20091 | 23.12 |
| Brotizolam | C15H10CIN4S | 391.94981 | 23.29 | Fludiazepam | C16H12CIN2O | 302.06222 | 24.13 | nicotine | C10H14N2 | 162.11570 | 9.76 | Sulindac | C15H23NO4S | 341.14093 | 9.17 |
| Buprenorphine | C28H41N2O4 | 467.30356 | 32.87 | Flufenamic acid | C14H10FN2O2 | 281.06656 | 24.28 | Nitrazepam | C15H11N3O3 | 281.08004 | 21.39 | Sultopride | C17H26N2O4S | 354.16133 | 12.08 |
| Bupivacaine | C18H28N2O | 288.22016 | 25.94 | Flumazenil | C15H14FN3O3 | 303.10192 | 18.46 | Nordiazepam | C15H11CIN2O | 270.05599 | 24.43 | Talipexole | C10H15N3S | 209.09867 | 10.78 |
| carbamazepine | C15H11N2O | 236.09496 | 21.18 | Flunitrazepam | C16H12FN3O3 | 313.08627 | 21.69 | Nortriptyline | C19H21N | 263.16740 | 23.37 | Tandospirone | C21H29NO2S | 383.23213 | 24.06 |
| caripramine | C28H38NO4 | 446.30456 | 29.02 | Flurazepam | C22H26FN3O3 | 437.17487 | 29.39 | Olanzapin | C17H20N4S | 312.14087 | 23.38 | Temazepam | C16H13CIN2O2 | 300.06656 | 23.44 |
| Carvedilol | C24H26CIN2O4 | 406.18924 | 22.92 | Flurazepam | C21H23CIN3O | 387.15137 | 25.45 | Olmesartan | C24H26N6O3 | 446.20664 | 16.65 | Tenoxicam | C13H11N3O2S | 307.01910 | 15.81 |
| chlordiazepoxide | C16H14CIN3O | 299.08254 | 24.12 | Flutazolam | C19H18CIN2O3 | 376.09900 | 24.66 | Oxaprozin | C18H15NO3 | 293.10519 | 23.15 | Tetraacine | C15H24N2O2 | 264.18378 | 23.47 |
| Chlormezanone | C11H12CIN3O3S | 273.02264 | 17.24 | Flutoprazepam | C21H23CIN3O | 342.09352 | 27.00 | oxazepam | C15H11CIN2O2 | 286.05091 | 22.80 | Thioridazine | C19H24N2S2 | 378.15374 | 27.96 |
| Chlorphenesin-1 | C10H12CIN4O | 245.04549 | 19.33 | Fluvaxamine | C15H21F3N2O2 | 318.15551 | 23.56 | oxazolam | C17H17CIN2O2 | 328.09786 | 27.27 | Tiaprofenic acid | C14H12O3S | 260.05071 | 18.24 |
| Chlorphenesin-2 | C10H12CIN4O | 245.04549 | 20.56 | Galapentine | C9H17NO2 | 171.12593 | 7.75 | Oxybutrocaine | C17H28N2O3 | 308.20999 | 22.73 | Timiperone | C22H42FN3O3S | 397.16241 | 25.59 |
| chlorpheniramine | C16H19CIN2 | 274.12368 | 19.94 | Glutethimide | C13H15NO2 | 217.11028 | 20.65 | Oxycodone | C18H21NO4 | 315.14706 | 12.74 | Tizanidine | C9H8CIN3S | 253.01899 | 10.84 |
| chlorpromazine | C17H19CIN2S | 318.09575 | 27.61 | haloperidol | C21H23CIN2O | 375.14013 | 23.22 | Oxypertine | C23H29NO2 | 379.22598 | 25.68 | Tofisopam | C22H26N2O4 | 382.18852 | 23.71 |
| Clemastine | C21H26CIN2O | 343.17029 | 27.11 | Halozolam | C17H14BrFN2O2 | 376.02227 | 25.32 | Papaverine | C20H21NO4 | 339.14706 | 22.63 | Tolfenamic acid | C14H12CIN2O2 | 261.05566 | 14.60 |
| clobazam | C16H13CIN2O2 | 300.06656 | 22.31 | Homochlorcyclizine | C19H23CIN2 | 314.15498 | 25.12 | Paroxetine | C19H20F3NO2 | 329.14272 | 22.16 | Tramadol | C16H15NO2 | 263.18853 | 25.94 |
| clodramine | C28H37CIN4O | 480.26559 | 30.81 | Hydroxyzine | C21H27CIN2O2 | 374.17611 | 27.86 | Pemoline | C9H8N2O2 | 176.05858 | 11.04 | Trazodone | C19H22CIN5O | 371.15129 | 25.95 |
| Clofazamine | C17H20CIN2O | 289.12334 | 21.27 | imipramine | C19H24N2 | 280.19395 | 24.65 | Pentazocin | C19H27NO | 285.20926 | 18.05 | Triazolam | C17H12CIN4 | 342.04390 | 22.78 |
| clomipramine | C19H23CIN2 | 314.15498 | 27.64 | Indomethacin | C19H16CIN4O | 357.07679 | 23.97 | Pergolide | C19H26N2S | 314.18167 | 25.00 | Trifluoperazine | C21H24F3N3 | 407.16430 | 30.50 |
| clonazepam | C15H10CIN3O3 | 315.04107 | 21.45 | Isopropylantipyrine | C14H18N2O | 230.14191 | 21.09 | Perospirone | C23H30N4O2S | 426.20895 | 28.04 | Trihexyphenidyl | C20H31NO | 301.24056 | 26.37 |
| clotiazepam | C16H15CIN2O2 | 318.05936 | 26.22 | Ketamine | C13H16CIN2O | 237.09204 | 21.05 | Perphenazine | C22H26CIN3O3S | 403.14851 | 28.86 | Trimipramine | C20H26N2 | 294.20960 | 27.32 |
| cloxazolam | C17H14CIN2O2 | 348.04323 | 26.22 | Ketoprofen | C19H14CIN2O2 | 328.17869 | 18.68 | Pethidine | C15H21NO2 | 247.15723 | 18.63 | Triprolidine | C19H22N2 | 278.17830 | 21.46 |
| Clozapine | C18H19CIN4 | 326.12982 | 26.70 | Labetalol | C19H24N2O3 | 328.17869 | 18.68 | Phenacetin | C10H13NO2 | 179.09463 | 16.88 | Tubocurarine | C37H40N2O6 | 608.28864 | 16.06 |
| Cocaine | C17H21NO4 | 303.14706 | 17.99 | Levomemoprazine | C19H24N2O3 | 328.16935 | 26.42 | Phenazone | C15H12N2O2 | 252.08988 | 20.30 | Verapamil | C21H28N2O4 | 408.23926 | 25.12 |
| Codine | C18H21NO3 | 299.15214 | 14.18 | Lidocaine | C14H22N2O | 234.17321 | 23.54 | Pimozide | C28H29F2N3O | 461.22787 | 29.73 | zolidem | C19H21N3O | 307.16846 | 23.09 |
| Cyproheptadine | C21H21N | 287.16740 | 26.69 | Lorazepam | C15H10CIN2O2 | 320.01193 | 22.82 | Pipamperone | C15H13CIN3O2 | 375.23221 | 21.16 | Zonisamide | C8H8N2O3S | 212.02556 | 12.21 |
| Dantrolene | C14H10NO5 | 314.06512 | 20.40 | Lormetazepam | C16H12CIN2O2 | 334.02758 | 23.79 | Proheptine | C22H25N | 303.19870 | 25.83 | Zopiclone | C17H17CIN3O3 | 388.10507 | 30.40 |

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。

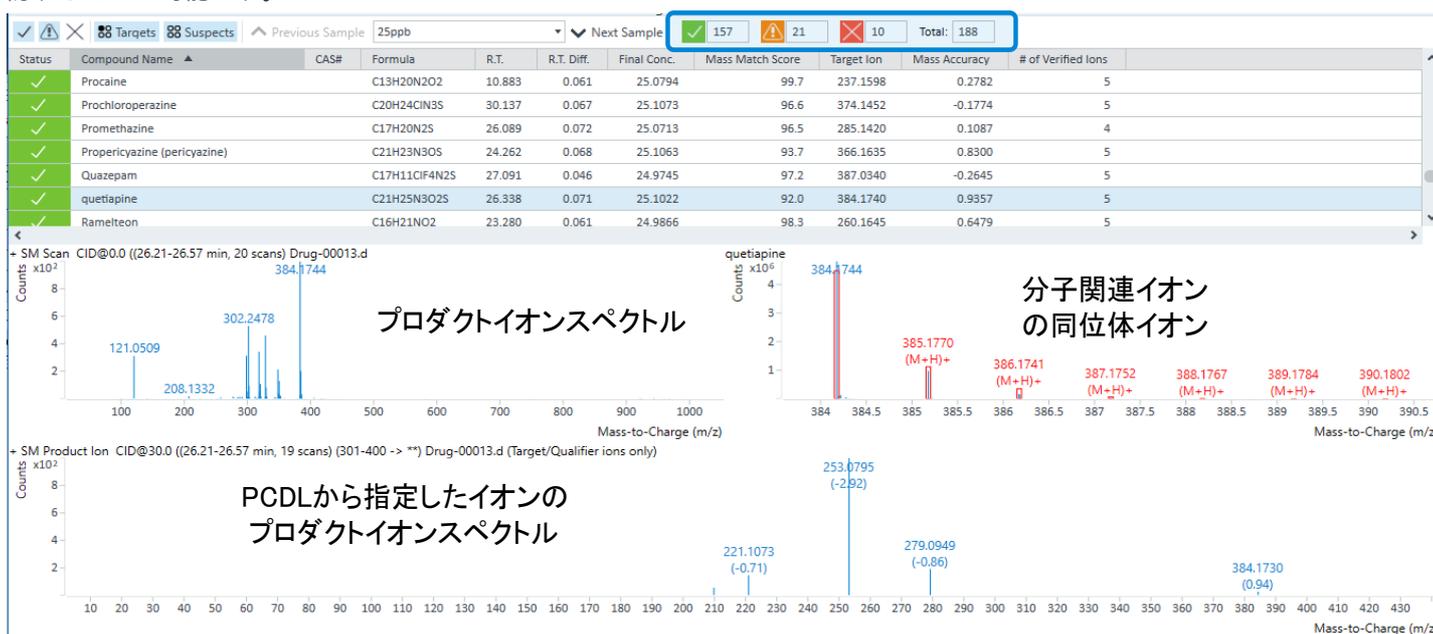


図1 薬物標準液(25 ppb)のスクリーニング結果

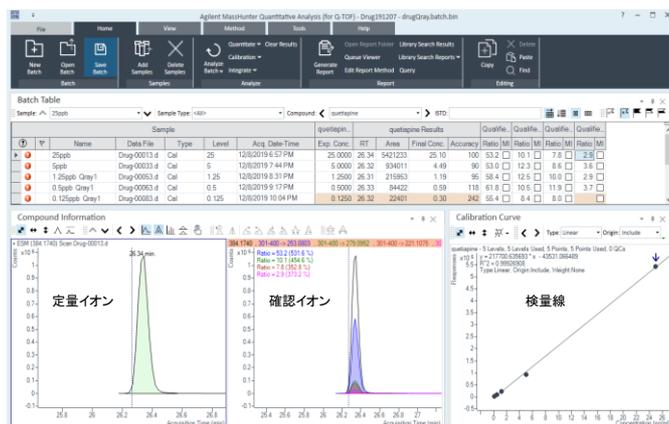


図2 クエチアピンの定量結果

尿試料

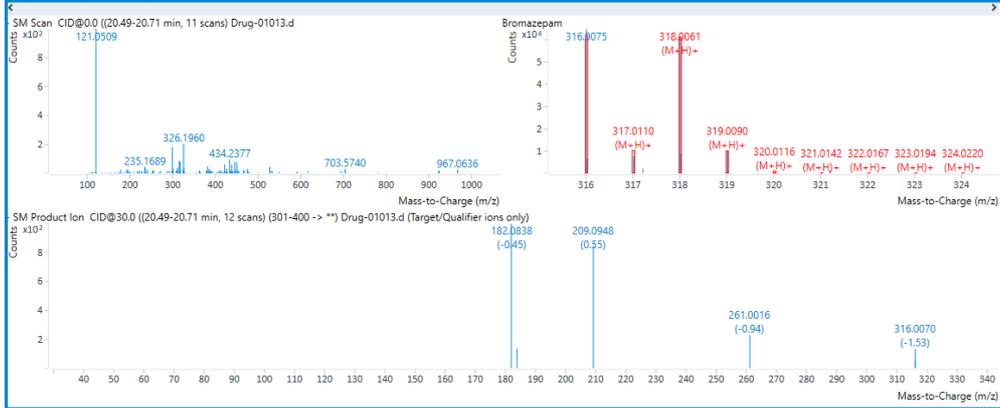
既知薬物を添加した尿試料の結果を図3に示しました。全ての基準を満たした薬物はプロマゼパム、ロラゼエパム及びレボメプロマジンでした。これら薬物濃度は2.2, 36.8及び20.7 ppbでした。

まとめ

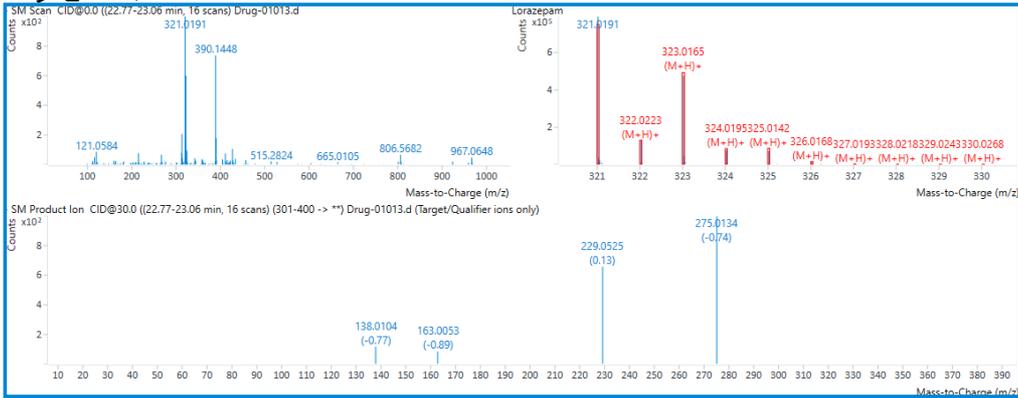
Agilent 6546 LC/Q-TOFシステムのQ-RAI法を用いた薬物スクリーニング法を検証しました。薬物標準液(25 ppb)を用いて測定及び解析した結果、83%の薬物が全ての基準を満たしました。5%の薬物は確認イオンの相対強度が低いなどの原因で2個以上の基準を満たしませんでした。また、既知の薬物を添加した尿試料で全ての薬物の検出が可能でした。1薬物(ゾルピデム)が尿中で4基準を満たした偽陽性として検出されました。Q-RAI法は高分解能Q-TOFと併用する事で偽陽性の少ない信頼性の高いスクリーニング法と考えられます。

| 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 | C17H17ClN2 | | 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

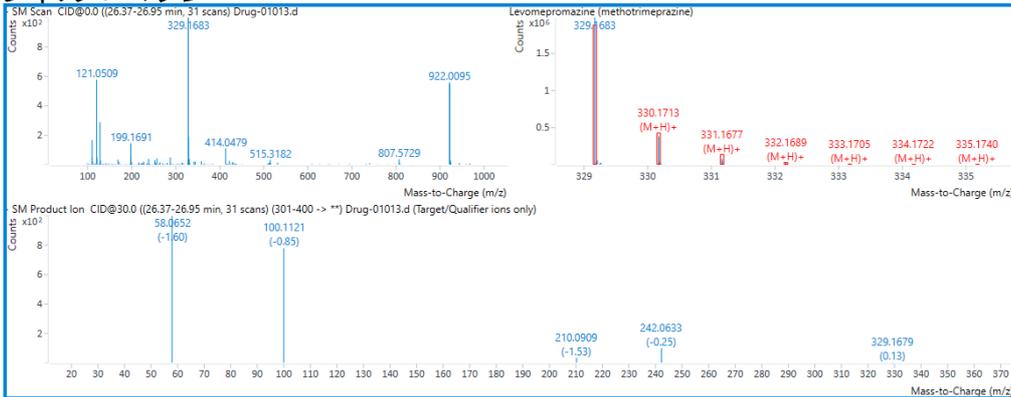


図3 尿中薬物のスクリーニング結果

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)

