

EPA メソッド 1694 : Agilent 6410A トリプル四重極質量分析計を用いた 水、土壌、堆積物、バイオソリッド中の 医薬品およびパーソナルケア用品の HPLC/MS/MS 分析

アプリケーション

環境

著者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
Center for Environmental Mass
Spectrometry
University of Colorado
Civil, Environmental, and Architectural
Engineering
ECOT 441, 428 UCB
Boulder, CO 80309
USA

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

概要

Agilent G6410A トリプル四重極質量分析計 (QQQ) を用いて、水サンプルに含まれる 65 種類の医薬品をスクリーニングおよび確認するための分析手法を開発しました。このメソッドは、EPA メソッド1694 のガイドラインに従って開発しました。各種医薬品の極性と系統に応じて、4 つの異なるクロマトグラフィグラジエントおよび LC 条件を使用しました。2 つのマルチリアクションモニタリング (MRM) トランジション (各化合物の定量および定性イオン) による正および負のイオンエレクトロスプレー分析も実施しました。この分析は、EPA メソッドにはない確認手法です。分析したすべての医薬品について、3 桁の応答直線性が得られました ($r^2 > 0.99$)。コロラド州ボルダークリークで採取した廃水サンプルについて、メソッドの分析性能を評価しました。本実験で開発したメソッドを用いた分析では、このサンプルからカルバマゼピンとジフェンヒドラミンが検出されました。



Agilent Technologies

はじめに

環境における新たな汚染物質の測定は、過去 20 年にわたって科学者が取り組んでいる主要な研究テーマです。医薬品およびパーソナルケア用品 (PPCPs) は、特にここ 10 年で主要な研究対象になっている汚染物質グループです。PPCP については、最近公布された (2007 年 12 月) EPA メソッド 1694 をはじめ [1]、汚染源となる物質を分析するための複数のメソッドが存在しています。EPA メソッド 1694 プロトコルでは、水サンプルの前処理に固相抽出 (SPE) が用いられます [1]。その後、各化合物につき 1 つのランジションを用いて、タンデム質量分析計により抽出物を直接分析します。本アプリケーションノートでは、Agilent 6410A

LC/MS QQQ を用いた、このメソッドを実施するためのアジレントのソリューションを紹介します。アジレントの EPA メソッド 1694 ソリューションでは、まず (全 75 種類のうち) 65 種類の分析対象物と (全 20 種類のうち) 17 種類の標識内部標準で構成される PPCP 混合液を、それぞれ 1 つの MRM ランジションにより分析します (この時点では、他の化合物と内部標準は分析できない点に注意してください)。このメソッドでは、すべての分析対象物で Agilent C-18 および Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) カラムも使用します。さらなる確認のために、第2の MRM ランジションにより、全 65 種類のうち 60 種類の分析対象物を分析します。これにより、EPA に記載された手法よりも確実性の高い同定が可能になります。表 1 に分析した医薬品を記載しています。

表 1. 本実験で分析した化合物

グループ 1 化合物のリスト : EPA 1694 : 46 種類

アセトアミノフェン	コデイン	フルメキン	ペニシリン V	スルファニルアミド
アンピシリン	コチニン	フルオキセチン	ロキシスロマイシン	チアベンダゾール
アジスロマイシン	デヒドロニフェジピン	リンコマイシン	サラフロキサシン	トリメトプリム
カフェイン	ジゴキシゲニン	ロメフロキサシン	スルファクロロピリダジン	チロシン
カルバドックス	ジルチアゼム	ミコナゾール	スルファジアジン	バージニアマイシン
カルバマゼピン	1,7-ジメチルキサンチン	ノルフロキサシン	スルファジメトキシ	ジゴキシ [*]
セフォタキシム	ジフェンヒドラミン	オフロキサシン	スルファメラジン	
シプロフロキサシン	エンフロキサシン	オキサリリン	スルファメサジン	
クラリスロマイシン	エリスロマイシン	オキシソリン酸	スルファメチゾール	
クロキサリリン	エリスロマイシンアンハイドレート		ペニシリン G	スルファメトキサゾール

^{*}現在の条件において測定できない Na 付加物で形成される化合物

グループ 2、3、4 化合物のリスト : EPA 1694 : 19 種類

アンヒドロテトラサイクリン (2)	ドキシサイクリン (2)	ミノサイクリン (2)	トリクロカルバン (3)
		トリクロサン (3)	
		ワルファリン (3)	
クロルテトラサイクリン (2)	4-エピアンヒドロテトラサイクリン (2)	テトラサイクリン (2)	アルブテロール (4)
	メクロサイクリン (2)	シメチジン (4)	
		メトホルミン (4)	
デメクロサイクリン (2)	4-エピテトラサイクリン (2)	ラニチジン (4)	
	ゲムフィブロジル (3)		
	イブプロフェン (3)		
	ナプロキセン (3)		

標識内部標準物質リスト

¹³ C ₂ - ¹⁵ N-アセトアミノフェン	¹³ C ₂ -エリスロマイシン	¹³ C ₆ -スルファメサジン	¹³ C ₃ -トリメトプリム
¹³ C ₃ -アトラジン	フルオキセチン-d ₆	¹³ C ₆ -スルファメトキサゾール	ワルファリン-d ₅
¹³ C ₃ -カフェイン	ゲムフィブロジル-d ₆	¹³ C ₆ -2,4,5-トリクロロ-フェノキシ酢酸	カルバマゼピン-d ₁₀
¹³ C ₃ - ¹⁵ N-シプロフロキサシン	¹³ C ₃ -イブプロフェン	¹³ C ₆ -トリクロカルバン	(追加の化合物、EPA リスト外)
コチニン-d ₃	¹³ C-ナプロキセン-d ₃	¹³ C ₁₂ -トリクロサン	

実験手法

サンプル前処理

医薬品分析標準物質を Sigma(ミズーリ州セントルイス)から購入しました。内部標準として利用した安定同位体標識化合物は、すべて Cambridge Isotope Laboratories (マサチューセッツ州アンドーバー) から入手しました。それぞれの化合物の溶解性に応じて、各医薬品原液 (約 1,000 µg/mL) を純アセトニトリルまたはメタノールで調製し、-18°C で保管しました。この溶液をアセトニトリルと水で希釈し、分析用の標準溶液を作成しました。

ボルダークリーク河口 (コロラド州ボルダー) にある廃水処理施設から水サンプルを採取し、EPA メソッドに従って抽出しました。アジレントは、親水性/親油性特性を持つポリマー SPE 吸着剤を導入しています。この吸着剤も、本アプリケーションに適している可能性があります。バリデーションの目的で、「ブランク」廃水抽出液を使用してマトリックスマッチング標準溶液を作成しました。廃水抽出液に各種濃度 (0.1~500 ng/mL または ppb) の医薬品混合物を添加したのち、LC/MS/MS で分析しました。

LC/MS/MS 機器設定

分析物を複数のグループに分類しました (EPA サンプル抽出プロトコルに従っています)。各グループのクロマトグラフィ分離に用いた LC 条件は以下のとおりです。

グループ 1 の LC 条件 - 酸性抽出、

正エレクトロスプレーイオン化 (ESI+) 機器条件

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1×100 mm、3.5 µ (p/n 959793-902)
カラム温度	25 °C
移動相	10% ACN および 90% H ₂ O、0.1% HCOOH
流量	0.2-0.3 mL/min
グラジエント	t ₀ = 10% ACN、0.2 mL/min t ₅ = 10% ACN、0.2 mL/min t ₆ = 10% ACN、0.3 mL/min t ₂₄ = 60% ACN、0.3 mL/min t ₃₀ = 100% ACN
注入量	15 µL

グループ 2 の LC 条件 - 酸性抽出、

正エレクトロスプレーイオン化 (ESI+) 機器条件

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1×100 mm、3.5 µ (p/n 959793-902)
カラム温度	25 °C
移動相	10% ACN および 90% H ₂ O、0.1% HCOOH
流量	0.2 mL/min
グラジエント	t ₀ = 10% ACN t ₁₀ = 10% ACN t ₃₀ = 100% ACN
注入量	15 µL

グループ 3 の LC 条件 - 酸性抽出、

負エレクトロスプレーイオン化 (ESI-) 機器条件

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1×100 mm、3.5 µ (p/n 959793-902)
カラム温度	25 °C
移動相	40% MeOH および 60% H ₂ O、 5 mM 酢酸アンモニウム、pH 5.5
流量	0.2 mL/min
グラジエント	t _{0.5} = 40% MeOH t ₇ = 100% MeOH
注入量	15 µL

グループ 4 の LC 条件 - 酸性抽出、

正エレクトロスプレーイオン化機器条件

カラム	Agilent ZORBAX HILIC Plus 2.1×100 mm、3.5 µm (p/n 959793-901 2008 年 11 月 1 日まではカスタムオーダー)
カラム温度	25 °C
移動相	98% ACN および 2% H ₂ O、 10 mM 酢酸アンモニウム、pH 6.7
流量	0.25 mL/min
グラジエント	t ₀ = 98% ACN t ₅ = 70% ACN t ₁₂ = 70% ACN
注入量	15 µL

質量分析計条件については、すべてのグループに以下の条件を適用しました。

MS 条件

モード	Agilent G6410A トリプル四重極質量分析計を用いた正および負 (グループにより異なる) ESI
ネブライザ	40 psig
乾燥ガス流量	9 L/min
キャピラリー電圧	4000 V
乾燥ガス温度	300 °C
フラグメンター電圧	70-130 V
衝突エネルギー	5-35 V
MRM	各化合物につき 2 トランジション (表 1 参照)
ドウェルタイム	10 msec

結果と考察

LC/MS/MS 条件の最適化

最初の実験は、2 つのパートから構成されます。まず、プリカーサイオンに対して最大のシグナルを生成できるように、分析する各医薬品のフラグメンター電圧を最適化します。通常、プリカーサイオンにはプロトン化した分子を使用します。自動手順 (MassHunter Optimizer ソフトウェア、Agilent Technologies) を用いて各化合物を個別に分析し、各電圧におけるフラグメンターを確認しました。最適なフラグメンターシグナルが得られるデータを選択したのち、各化合物をふたたび最適化し、定量イオンおよび定性イオンの衝突エネルギーを自動決定しました。最適な衝突エネルギーは、5~35 V の範囲で変化しました。本実験で用いた MRM トランジションと最適化したエネルギーを表 2A~2D に示しています。

表 2A. グループ 1 の医薬品化合物分析に使用した MRM トランジションと MS 動作パラメータ (太字は標識標準物質)

化合物	フラグメンター電圧	MRM トランジション (m/z)	衝突エネルギー (eV)
アセトアミノフェン	90	152 → 110 152 → 65	15 35
¹³ C ₂ - ¹⁵ N-アセトアミノフェン	90	155 → 111 155 → 93	15 25
アンピシリン	70	350 → 160 350 → 106	10 15
¹³ C ₃ -アトラジン	120	219 → 177 219 → 98	15 25
アジスロマイシン	130	749.5 → 591.4 749.5 → 158	30 35
カフェイン	110	195 → 138 195 → 110	15 25
¹³ C ₃ -カフェイン	110	198 → 140 198 → 112	15 25
カルバドックス	80	263 → 231 263 → 130	5 35
カルバマゼピン	110	237 → 194 237 → 179	15 35
カルバマゼピン-d ₁₀	110	247 → 204 247 → 202	15 35
セフォタキシム	90	456 → 396 456 → 324	5 5
シプロフロキサシン	110	332 → 314 332 → 231	20 35
¹³ C ₃ - ¹⁵ N-シプロフロキサシン	110	336 → 318 336 → 235	15 35

表 2A. グループ 1 の医薬品化合物分析に使用した MRM トランジションと MS 動作パラメータ (太字は標識標準物質) (続き)

化合物	フラグメンター 電圧	MRM トランジション (m/z)	衝突エネルギー (eV)
クラリスロマイシン	110	748.5 → 158 748.5 → 590	25 15
クロキサシリン	90	436 → 160 436 → 277	15 15
コデイン	130	300 → 215 300 → 165	25 35
コチニン	90	177 → 98 177 → 80	25 25
コチニン-d₃	90	180 → 80 180 → 101	25 25
デヒドロニフェジピン	130	345 → 284 345 → 268	25 25
ジゴキシゲニン	90	391 → 355 391 → 337	15 15
ジゴキシ	応答なし、Na 付加物		
ジルチアゼム	130	415 → 178 415 → 150	25 25
1,7-ジメチルキサンチン	90	181 → 124 181 → 99	15 15
ジフェンヒドラミン	70	256 → 167 256 → 152	15 35
エンロフロキサシン	130	360 → 316 360 → 342	15 15
エリスロマイシン	90	734.5 → 158 734.5 → 576	35 15
¹³C₂-エリスロマイシン	90	736.5 → 160 736.5 → 578	25 15
エリスロマイシンアンハイドレート	90	716.5 → 158 716.5 → 116	25 25
フルメキン	90	262 → 174 262 → 244	35 15
フルオキセチン	90	310 → 148	5
フルオキセチン-d₆	90	316 → 154	5
リンコマイシン	110	407 → 126 407 → 359	25 15
ロメフロキサシン	130	352 → 308 352 → 265	15 25
ミコナゾール	90	415 → 159 415 → 69	35 25
ノルフロキサシン	70	320 → 302 320 → 276	15 15
オフロキサシン	110	362 → 318 362 → 261	15 25

表 2A. グループ 1 の医薬品化合物分析に使用した MRM トランジションと MS 動作パラメータ (太字は標識標準物質) (続き)

化合物	フラグメンター 電圧	MRM トランジション (m/z)	衝突エネルギー (eV)
オキサシリン	70	402 → 160 402 → 243	15 5
オキシリン酸	90	262 → 244 262 → 216	15 25
ペニシリン G	90	335 → 160 335 → 176	5 5
ペニシリン V	70	351 → 160 351 → 114	5 25
ロキシスロマイシン	130	837.5 → 679 837.5 → 158	15 35
サラフロキサシン	130	386 → 299 386 → 368	25 25
スルファクロロピリダジン	90	285 → 156 285 → 92	10 25
スルファジアジン	110	251 → 156 251 → 92	15 25
スルファジメトキシシ	80	311 → 156 311 → 92	20 35
スルファメラジン	110	265 → 156 265 → 92	15 25
スルファメタジン	90	279 → 156 279 → 186	15 15
¹³C₆-スルファメタジン	90	285 → 186 285 → 162	25 25
スルファメチゾール	80	271 → 156 271 → 92	10 25
スルファメトキサゾール	110	254 → 156 254 → 92	15 25
¹³C₆-スルファメトキサゾール	110	260 → 162 260 → 98	15 25
スルファニルアミド	70	173 → 156 173 → 92	5 15
チアベンダゾール	130	202 → 175 202 → 131	25 35
¹³C₆-2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸	110	259 → 201 259 → 165	5 25
トリメトプリム	110	291 → 230 291 → 261	25 25
¹³C₃-トリメトプリム	110	294 → 233 294 → 264	25 25
チロシン	110	916.5 → 174 916.5 → 772	35 35
バージニアマイシン	110	526 → 508 526 → 355	5 15

表 2B. グループ 2 の医薬品化合物分析に使用した MRM トランジションと MS 動作パラメータ

化合物	フラグメンター 電圧	MRM トランジション (m/z)	衝突エネルギー (eV)
アンヒドロテトラサイクリン	90	427 → 410 427 → 154	15 25
クロルテトラサイクリン	110	479 → 462 479 → 197	15 35
デメクロサイクリン	130	465 → 430 465 → 448	25 15
ドキシサイクリン	110	445 → 428 445 → 154	15 25
4-エピアンヒドロテトラサイクリン (EATC) 90		427 → 410 427 → 105	15 35
4-エピテトラサイクリン (ETC)	110	445 → 410 445 → 427	15 5
ミノサイクリン	90	458 → 441	15
テトラサイクリン (TC)	110	445 → 410 445 → 427	15 5

表 2C. グループ 3 の医薬品化合物分析に使用した MRM トランジションと MS 動作パラメータ

化合物	フラグメンター 電圧	MRM トランジション (m/z)	衝突エネルギー (eV)
ゲムフィブロジル	100	249 → 121	5
ゲムフィブロジル-d₆	100	255 → 121	5
イブプロフェン	75	205 → 161	5
¹³C₃-イブプロフェン	75	208 → 163	5
ナプロキセン	75	229 → 169 229 → 170	25 5
¹³C-ナプロキセン-d₃	75	233 → 169 233 → 170	25 5
トリクロカルバン	100	313 → 160 313 → 126	10 25
¹³C₆-トリクロカルバン	90	319 → 160 319 → 132	5 25
トリクロサン	75	287 → 35	5
¹³C₁₂-トリクロサン	75	299 → 35	5
ワルファリン	125	307 → 117 307 → 161	35 15
ワルファリン-d₅	90	312 → 161 312 → 255	15 25

表 2D. グループ 4 の医薬品化合物分析に使用した MRM トランジションと MS 動作パラメータ

化合物	フラグメンター 電圧	MRM トランジション (m/z)	衝突エネルギー (eV)
アルブテロール (サルブタモール)	90	240 → 148	15
		240 → 166	5
シメチジン	100	253 → 159	10
		253 → 95	25
メトホルミン	80	130 → 60	10
		130 → 71	25
ラニチジン	110	315 → 176	15
		315 → 130	25

グループごとに個別にクロマトグラフィ分離を実施し、すべての MRM トランジションでドウェルタイムを10 msec としました。図 1A~1D に、カラムに全医薬品の100 ppb標準溶液を負荷して分析して得られたクロマトグラムを示しています。各分析対象化合物におけるそれぞれのプロトン化分子およびMRM トランジションに合致したプロダクトイオン、の抽出イオンクロマトグラムを重ねて表示しています。

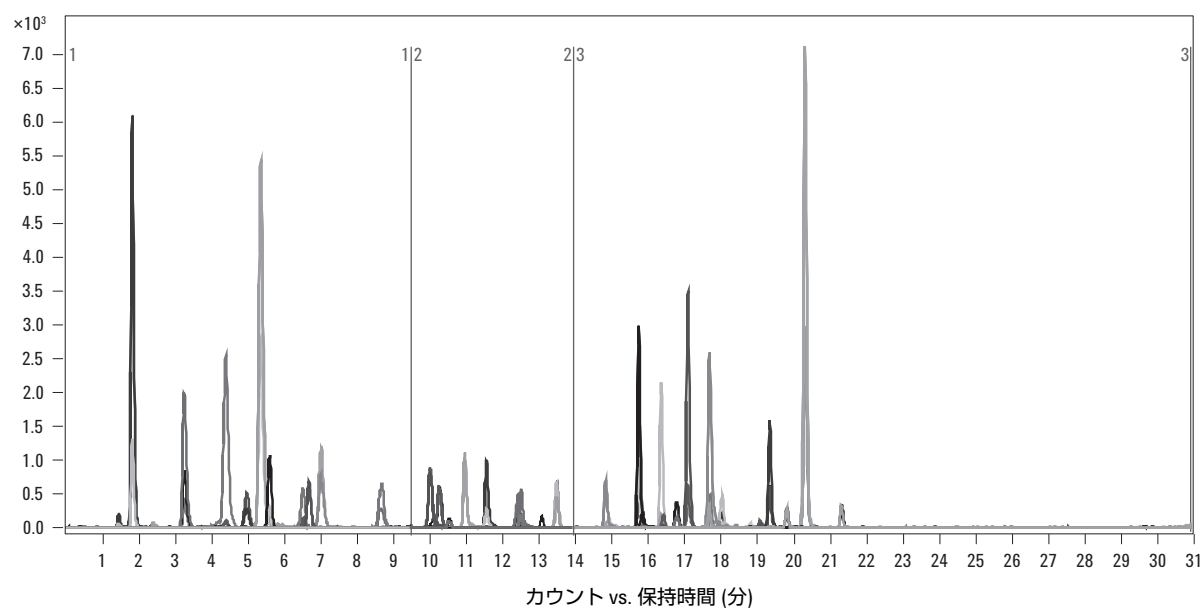


図 1A. グループ 1 の医薬品の MRM 抽出クロマトグラム。このクロマトグラフィ分離では、3 つのタイムプログラムを使用しました。

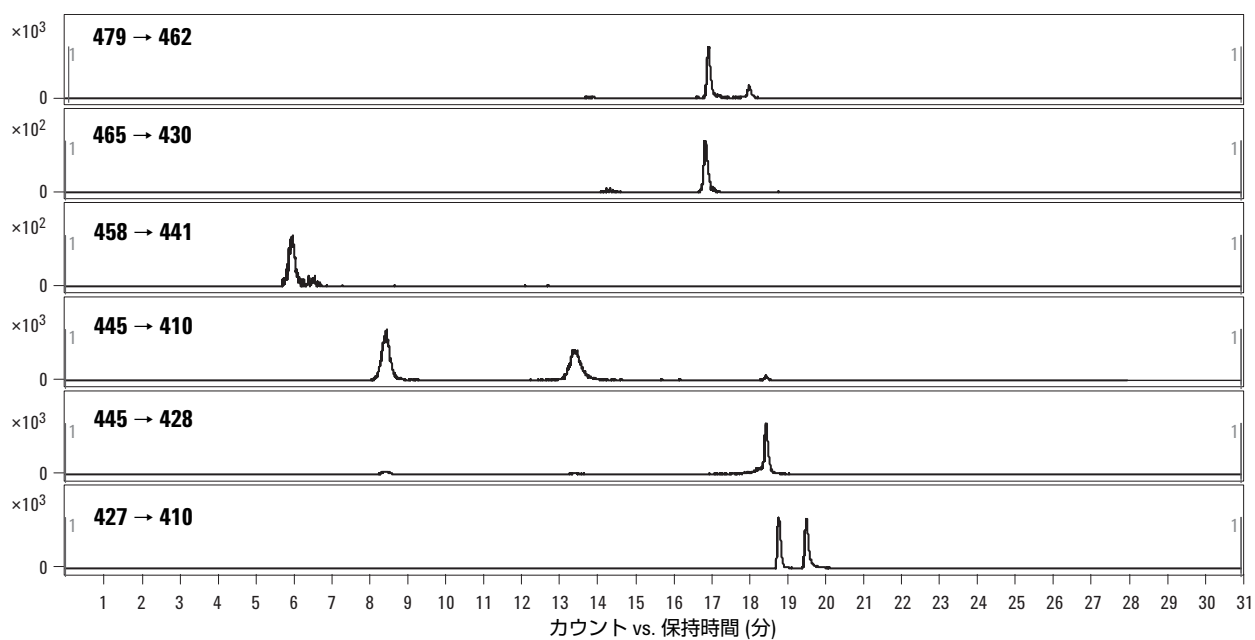


図 1B. グループ 2 の医薬品の MRM 抽出クロマトグラム。1 つのトランジションのみを示しています。化合物同定については表 2B を参照してください。

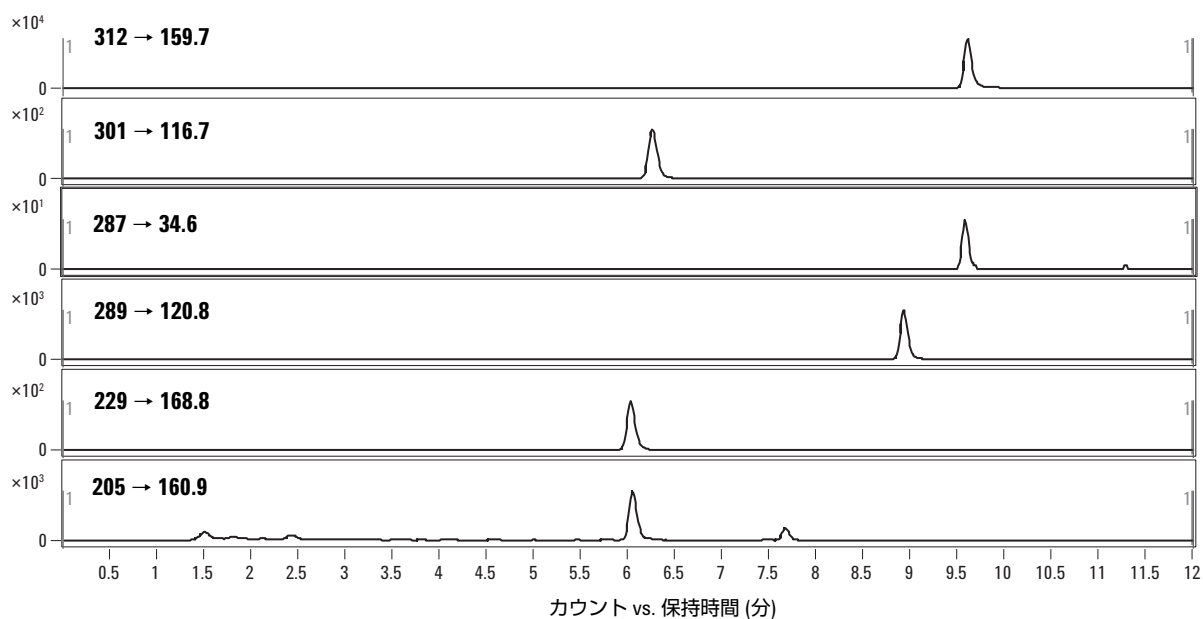


図 1C. グループ 3 の医薬品の MRM 抽出クロマトグラム。1 つのトランジションのみを示しています。化合物同定については表 2C を参照してください。

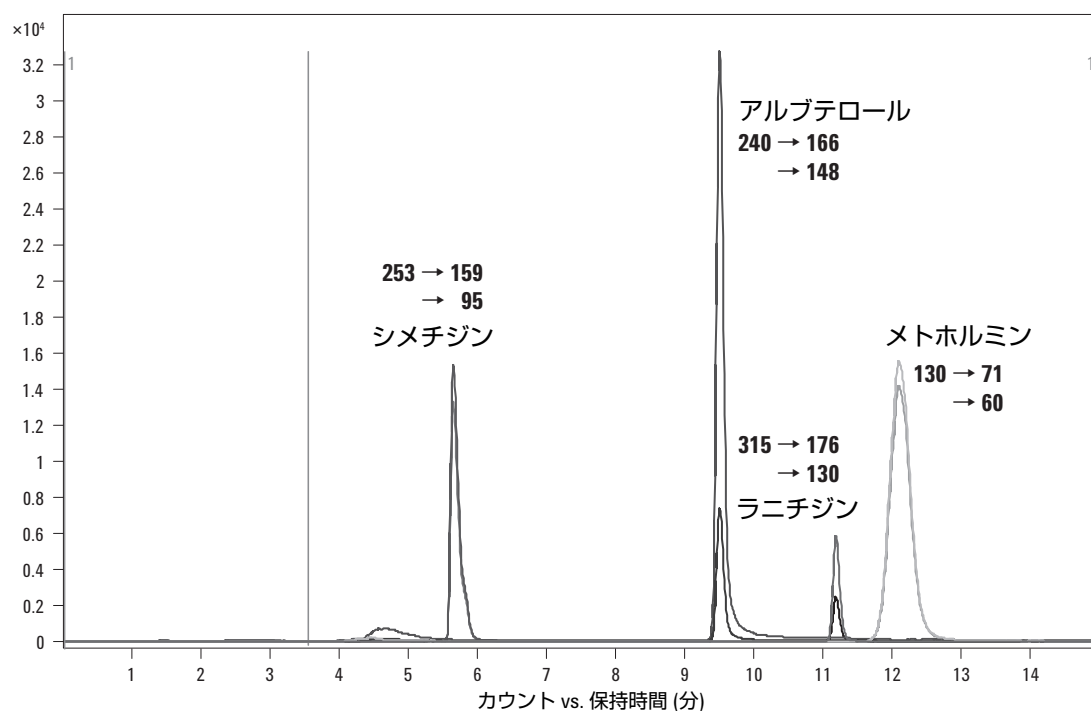


図 1D. グループ 4 の医薬品の MRM 抽出クロマトグラム

廃水サンプルへの応用

実際のサンプル分析におけるメソッドの適用性を確認するために、廃水現場から採取した廃水マトリックスを用いて、8 種類の濃度 (0.1、0.5、1、5、10、50、100、500 ng/mL または ppb) でマトリックスマッチング標準物質を分析しました。図 2 に、廃水マトリックス中アセトアミノフェンの検量線例を示しています。全般に、すべての化合物で 3 桁にわたる優れた感度と良好な直線性が得られ、 r^2 は 0.99 以上でした。

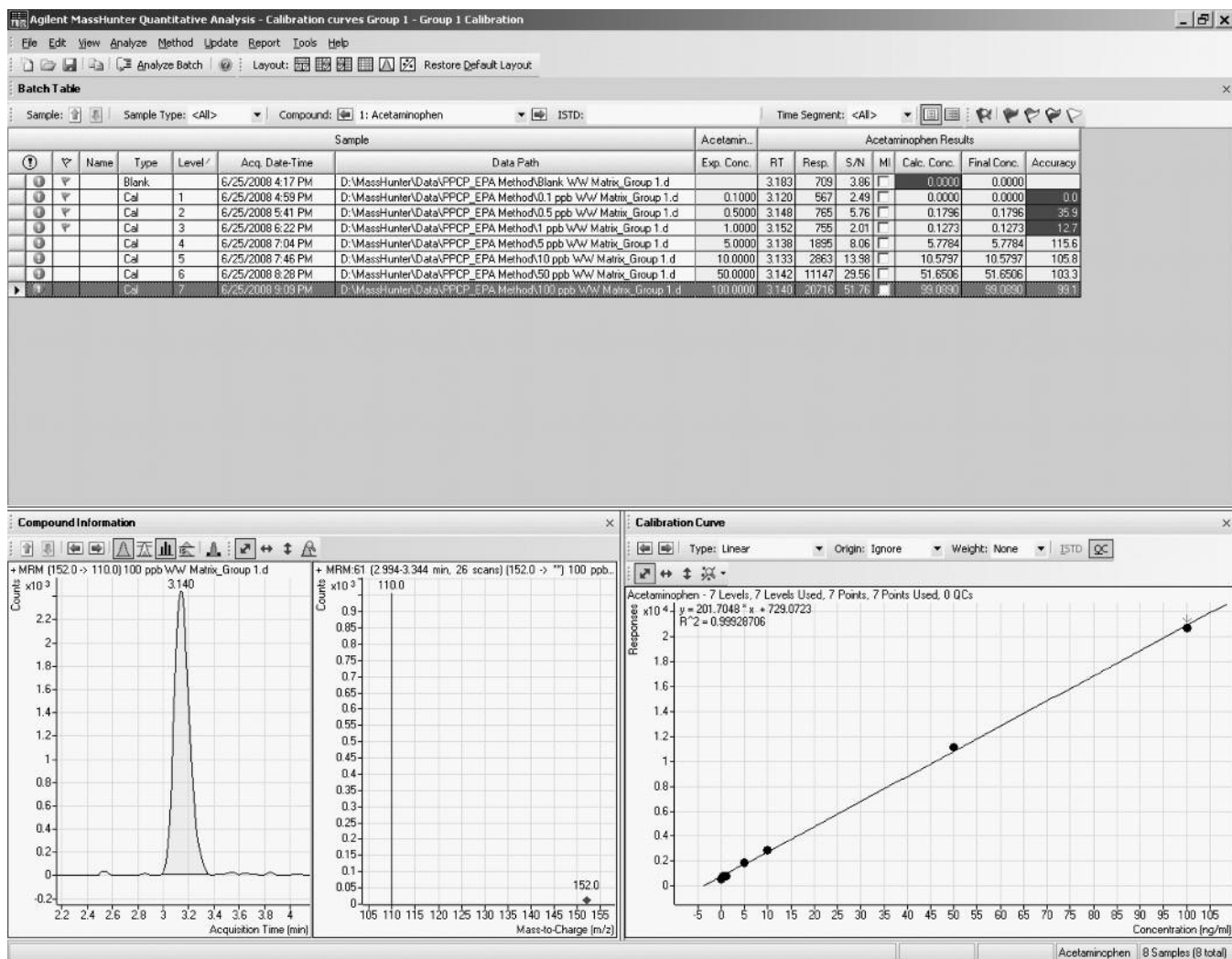


図2. 0.1~100 ng/mL (ppb) の7ポイントプロットにより得られた廃水マトリックス中アセトアミノフェンの検量線
(検量線は原点を通さず、直線を選択)

最後に、「ブランク」の廃水サンプルを分析しました。2つのMRM トランジションにより、2つの医薬品 (カルバマゼピンとジフェンヒドラミン) の存在を確認できました。図3には、廃水抽出液中の2つの医薬品を表すイオン比を示しています。図3に示す2つのイオンプロフィールでは、MRM トランジションの選択性と機器の高い感度により、複雑なマトリックスに含まれる2つの医薬品が容易に同定されています。

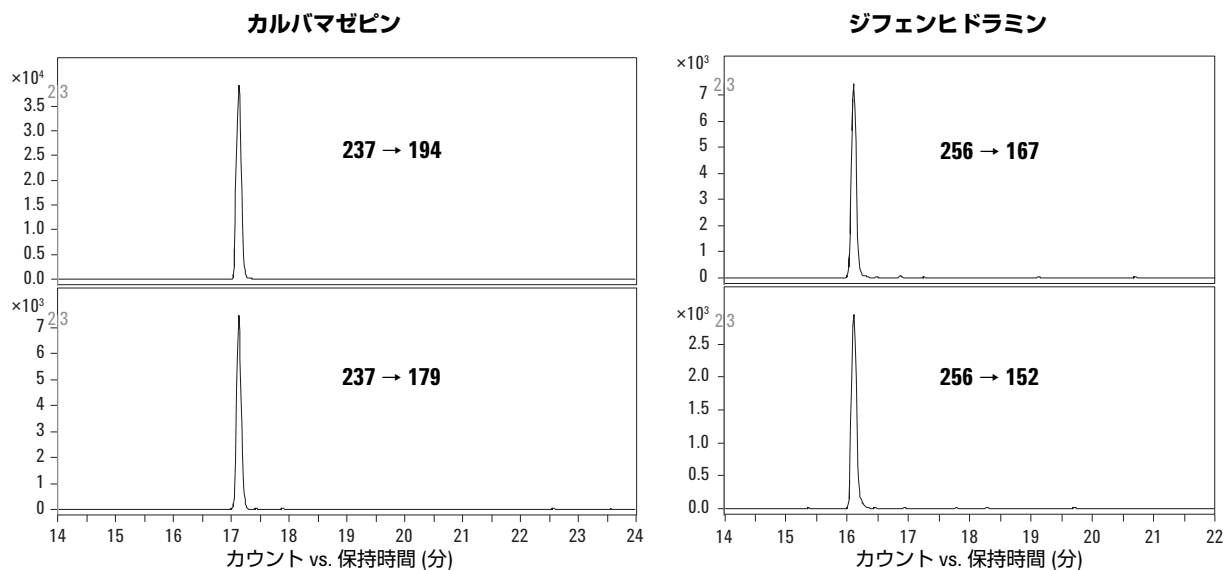


図3. 2つのトランジションを用いて得られた、廃水サンプル中カルバマゼピンおよびジフェンヒドラミンのMRMクロマトグラム

結論

本実験の結果は、ハイスループットメソッドを用いた水サンプル中医薬品の分析において、Agilent 6410A トリプル四重極質量分析装置が堅牢で高感度、かつ信頼性の高い機器となることを示しています。Agilent 6410A を使えば、EPA メソッド 1694 を良好に実施できることが明らかになりました。

参考文献

1. EPA Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS, December 2007, EPA-821-R-08-002.

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書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。

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。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、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008
Printed in Japan
September 19, 2008
5989-9665JAJP



Agilent Technologies