

高分解能質量分析計 (LC/Q-TOF/MS) による環境水中の医薬品類 (PPCPs) の検出

アプリケーションノート

環境

著者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
Center for Environmental Mass
Spectrometry
Department of Environmental
Engineering
University of Colorado
Boulder, CO
USA

概要

Agilent LC/Q-TOF 質量分析計と各種ソフトウェアツールを活用することにより、水源等の環境水に ppt レベルの低濃度で含まれる 100 種類以上の医薬品類やその代謝物の同定と分析が可能です。同定が困難な同重体化合物や異性化合物にも対応することができます。

はじめに

環境における医薬品類の存在が最初に報告されてから、20 年以上が経過しています。患者に投与された医薬品類は、排泄されて下水処理場に達しますが、下水処理過程では完全には除去されず、最終的には環境中に排出されます。そうした医薬品類は、廃水や地表水、地下水など、あらゆる場所に存在します。環境中の濃度は増加傾向にあり、特に抗鬱剤や β -遮断薬の濃度が高くなっています [1]。

環境中医薬品類に対する関心は世界中で高まっており、各国の規制当局が水中の濃度をモニタリングし、そうした医薬品類に伴う健康上のリスクを調査しています。しかし、環境中医薬品類の濃度はきわめて低いレベル (ng/L) が多いため、選択性と感度の高い検出手法が求められます。分解生成物や代謝物を含めたすべての医薬品由来の汚染物質を確実に検出するためには、ノンターゲット分析のアプローチが必要です [2]。



Agilent Technologies

液体クロマトグラフィー/四重極飛行時間型質量分析 (LC/Q-TOF/MS) を用いた手法なら、必要とされる感度と選択性を得られると同時に、水に含まれる医薬品類のノンターゲットスクリーニングが可能です。このアプリケーションノートでは、Agilent 6540 Q-TOF LC/MS システムと、Molecular Feature Extractor や Molecular Formula Generator といった関連ソフトウェアツール、精密質量データベースを用いて、環境水試料に含まれる低濃度の医薬品類の検出、同定、定量手法を紹介します。

実験

試薬と標準試料

標準溶液 (100 µg/mL) は、Cerrilant (オースチン、テキサス州) から購入しました。重水素化標準は Cambridge Isotopes (ケンブリッジ、マサチューセッツ州) から入手しました。HPLC グレードのアセトニトリルとメタノールは Burdick and Jackson (マスキゴン、ミシガン州) から購入しました。ギ酸は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から入手しました。100 µg/mL 標準溶液を純メタノールで希釈して、各原液 (1 µg/mL) を作成し、-18 °C で保存しました。アセトニトリル 10 %、水 90 % になるように、この原液をアセトニトリルと水で希釈し、作業用標準溶液を作成して LC/MS で分析に供しました。

装置

この研究では、Agilent 1200 Infinity LC システムと 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF/LC/MS システムを使用しました。機器の設定条件を表 1 に示します。

サンプル前処理

自動 Gilson SPE システムとジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体を充填した固相カートリッジを用いて水試料 (100 mL) を抽出し、メタノール 6 mL で溶出しました [2]。水槽で窒素パージを行い、メタノールを蒸発させ、最終容量を 0.5 mL としました。

データ解析

医薬品化合物の同定には、Molecular Feature Extractor、Molecular Formula Generator、Molecular Structure Correlator などの複数のアジレント製ソフトウェアツールと精密質量データベースを使用しました。塩素フィルタなどの、著者の作成したソフトウェアアダプテーションも使用しました [3]。

表 1. LC および Q-TOF/MS 条件

LC 分析条件

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse XDB C8、 4.6 × 150 mm、3.5 µm 粒子 (p/n 963967-906)
カラム温度	25 °C
注入量	20 µL
移動相	A = 0.1 % ギ酸水 v/v B = アセトニトリル
直線グラジエント	10 % B で 5 分、 その後 25 分間で 10 % B から 100 % B へ
流速	0.6 mL/min

Q-TOF MS 条件

イオンモード	ESI、ポジティブとネガティブ
ネブライザガス	45 psi
キャピラリの電圧	3,500 V
検出器レート	2 GHz
分解能	25,000、 <i>m/z</i> 922
精度	< 2 ppm

結果と考察

環境水試料中に含まれる医薬品類の調査

Molecular Feature Extractor (MFE) を使えば、イオンを複数の化合物 (構造特性) グループに分類し、抽出イオンクロマトグラムを作成することができます。強度の高い上位 100 化合物が抽出されます。必要に応じて、上位 1,000 化合物以上を抽出することも可能です。抽出数が多くなるほど、検索に要する時間も長くなります。リテンションタイム枠も調節可能です。図 1 に、河川水試料のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示します。この環境水試料では、1,498 個の構造特性が抽出されています。

精密質量データベースを使えば、精密質量とリテンションタイムを用いて、水試料から抽出された構造をから化合物を同定することができます。この例では、MFE 実行後にアジレントの法医学データベース (PDCL) を使用し、ガバペンチン (Gabapentin, GABA 誘導体の抗てんかん薬) を検出しました。ここに示すスペクトルは、MS/MS を用いずに検出されたものです (図 1)。咳止め薬のデキストロメトルファンヒト代謝物であるデキストロメトルファンも、脱メチル基の精密質量をもとに、水試料中で同定されました。これらのツールを用いて、地表水試料で 100 を超える医薬品類化合物を同定しました [2]。

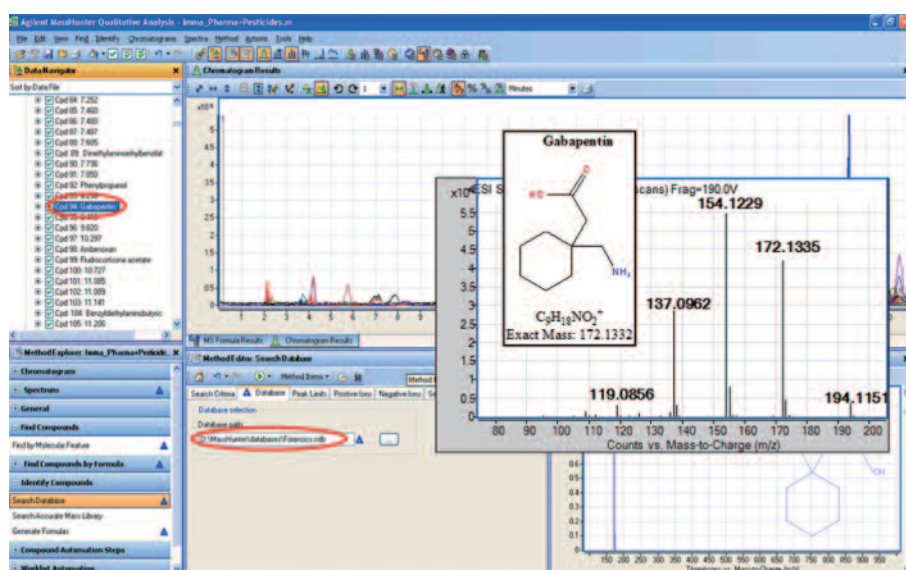


図 1. 河川水試料の分子構造抽出。1,498 個の構造が抽出されました。そのうちの 1 つのガバペンチンは、法医学データベースを用いて同定しました

水試料中医薬品類の分析

医薬品類やその代謝物の同定には、多くのソフトウェアツールが使用できます。たとえば、河川水試料中の抗鬱薬ラモトリギンの検出では、MFE と Molecular Formula Generator (MFG) を応用した塩素質量フィルタソフトウェアツールを使用しました

[3]。MFE を最初に実行した後、少なくとも 1 つの塩素原子が含まれるように MFG を設定しました。この例では、最大 2 つ、最低 1 つの塩素を用いました。設定後、ソフトウェアにより、塩素を含むすべての化合物が MFE から選別され、ラモトリギンが同定されました (図 2)。

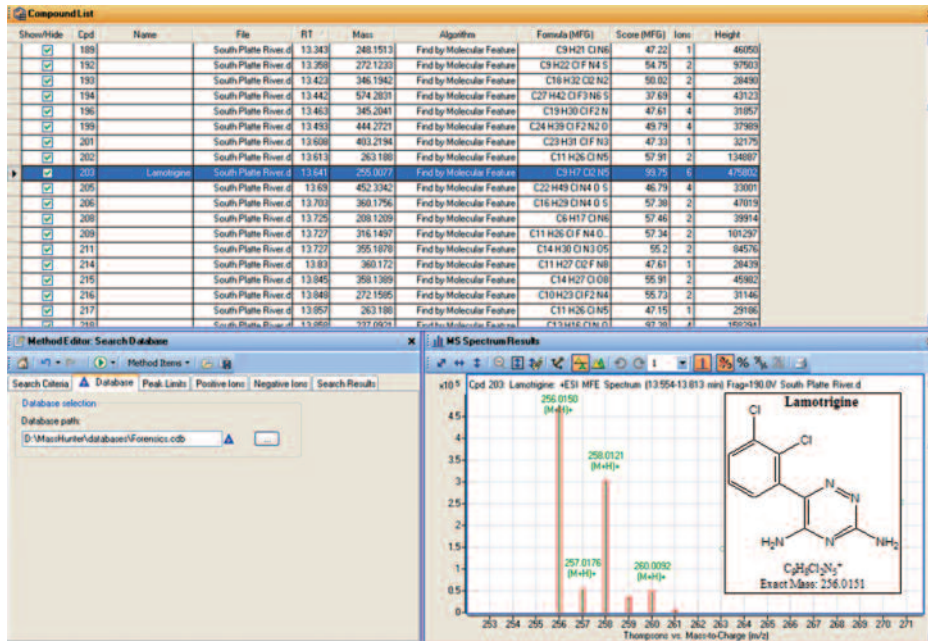


図 2. 塩素質量フィルタソフトウェアツールを用いたラモトリギンの同定

水試料中のラモトリギンの代謝物も、診断イオンツールと MS/MS により同定されました。m/z 256 イオンを抽出すると、この質量数では、イオンクロマトグラムには複数のピークが表れます。およそ 9 分のピークは、ラモトリギンと精密質量が同じです。このことは、この物質が異性体か関連代謝物であることを示唆しています。フルスペクトルでは、整数質量 m/z 432 が示されました。この差は、グルクロニド、すなわち 176 質量単位の差です (図 3)。哺乳類の代謝では、しばしば医薬品のグルクロニドが生成されます。2 つの MS/MS 実験により、これ

がラモトリギンの代謝物であることを確認しました。まず、m/z 432 イオンを MS/MS で分析し、m/z 256 がこのイオンに由来していることを確かめました (図 3)。次に、フラグメント電圧を上昇させ、m/z 256 の MS/MS 分析をおこなうことで、擬似 MS³ 実験を実施しました。これにより、親化合物のラモトリギンと同じスペクトルが得られました (図 3)。さらに、2-N-グルクロニドラモトリギンの純標準物質を分析し、この結果を確認しました。

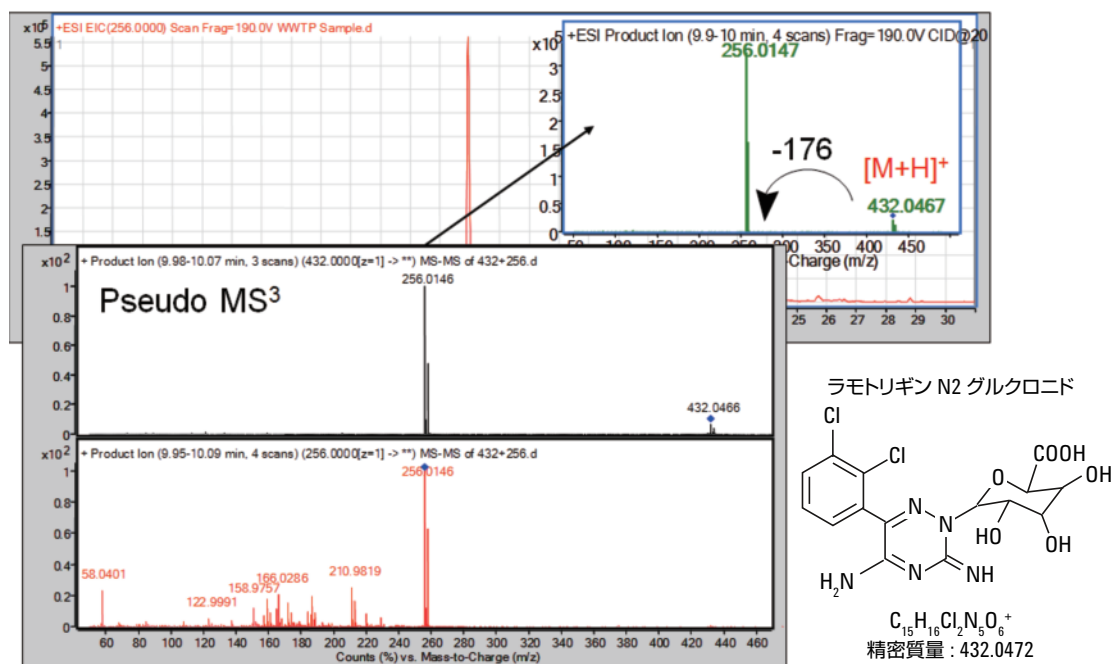


図 3. 診断イオンツールと MS/MS 分析による、ラモトリギンのグルクロニド代謝物同定の確認

異性体と同重体の識別

水試料中の医薬品類分析で、同重体化合物と異性体化合物を識別および同定するためには、Q-TOFの使用が欠かせません。同重体は同じ質量数を持つ化合物です。異性体は、同じ分子式を持ち、同じ精密質量を持つ化合物です。同重体は精密質量で区別できるケースもありますが、異性体を区別するためには、多くの場合、MS/MSとクロマトグラフィー分離の両方が必要になります。その後、リテンションタイムの違い、精密質量、MS/MSによる断片化、同位体特性、同位体質量欠損のすべて解析技術を用いて、異性体であることの同定ができます [2,4]。

医薬品の同重体対であるラモトリギンとヒドロキシプロピオンは、どちらも廃水試料中に存在します。2つの化合物のリテンションタイムは、わずか0.2分の差しかありません。しかし、精密質量には0.0948質量単位の違いがあります。分解能25,000のLC/Q-TOF/MSを使えば、 m/z 256.0149および256.1096という2つの質量をベースラインで分離することが可能です。2つのイオンが分離されるだけでなく、スペクトル内で同位体特性がベースラインで分離されます(図4)。ラモトリギンには2つの塩素同位体パターンがあるのに対し、ヒドロキシプロピオンの塩素同位体パターンが1つであることに注目してください。1つの塩素原子はA+2で同位体パターンのおよそ30%、2つの塩素原子はA+2で同位体シグナルのおよそ60%を占めています [3]。質量スペクトルの重ね表示により、この質量分析計の高い分解能がわかります。

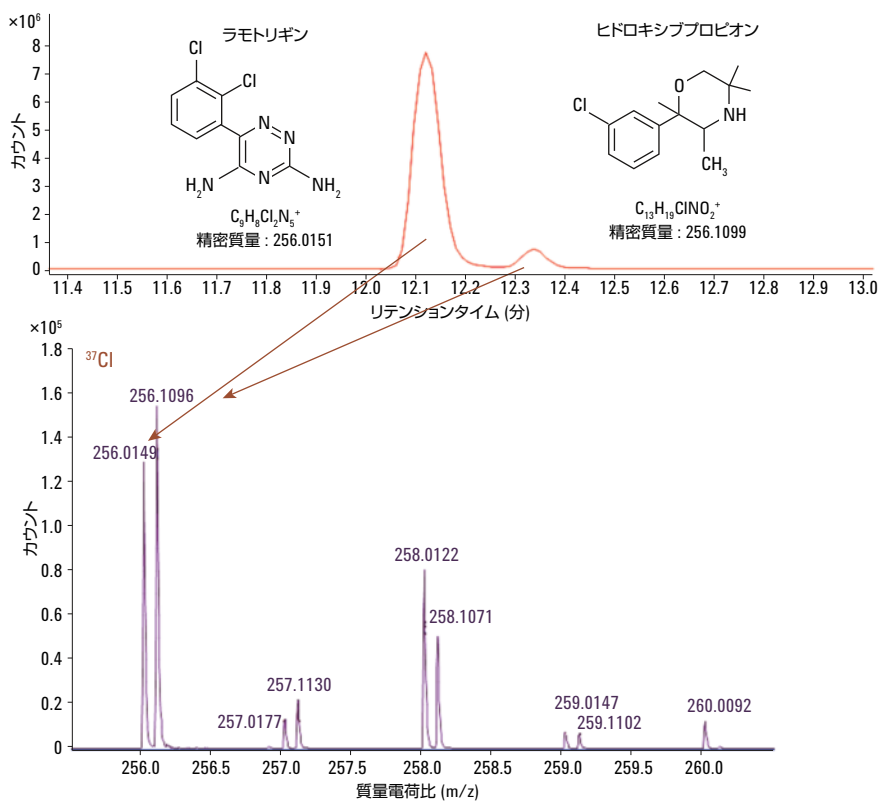
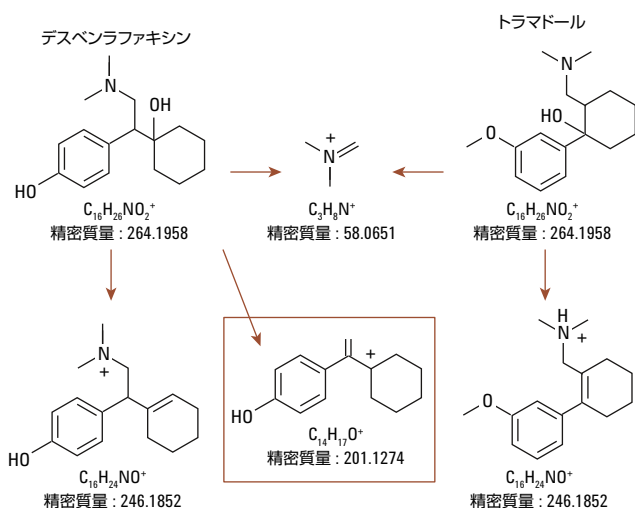


図4. 精密質量による同重体対の識別。ラモトリギンとヒドロキシプロピオンは、質量単位の差が0.0948質量単位、リテンションタイムの差が0.2分です。2つの同位体特性がベースラインで分離されている点に注目してください

デスベンラファキシンとトラマドールは医薬品の異性体化合物で、同じ分子式を持ち、したがって精密質量も m/z 264.19587 で同じです。リテンションタイムは若干違いますが、どちらも同じ精密質量の2つのフラグメントイオンを持ちます。しかし、MS/MS のパワーを使えば、デスベンラファキシンにのみ存在する m/z 201.1274 のフラグメントイオンを同定することが可能です (図 5)。



水源水中の医薬品類のモニタリング

6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムの精密質量分析機能と各種ソフトウェアツールを活用すれば、さまざまな水源に含まれる 100 種類以上の医薬品類のモニタリングが可能です。こうした化合物や代謝物のうち、14 種類は米国各地の地表水で一般的に検出されます (表 2、黄色で表示)。その多くは抗鬱薬とその代謝物、および抗生物質です [2]。たとえば、ラモトリギンは広く検出されており (分析した地表水の 97 %)、平均検出濃度は 400 ng/L を超えています。今回の研究では、流出廃水中の濃度と下流部位の濃度、および地下水における化合物の有無に関連性があることが示されています [1]。

表 2. 米国各地の地表水で検出された 36 種類の医薬品類。それぞれの平均濃度と、検出された水試料の検出割合 (%) も示しています。黄色で表示しているものは、もっとも頻りに検出された化合物です。

化合物	水試料中で 検出された割合 (%)	平均濃度 (ng/L)
1,7-ジメチルキサンチン (パラキサンチン)	10	110
10,11-ジヒドロキシ-カルバマゼピン	45	80
10-ヒドロキシ-カルバマゼピン	85	255
アテノール	74	166
プロピオン	68	140
カフェイン	70	220
カルバマゼピン	95	350
セチリジン	82	70
シタロプラム	79	85
クラリスロマイシン	75	46
コチニン	22	40
ジメチルデキストロファン	65	10
デスベンラファキシン	78	84
デキストロファン	75	50
ジルチアゼム	69	47
ジフェンヒドラミン	80	57
エリトロヒドロプロピオン	78	180
エリスロマイシン	55	137
エリスロマイシアンハイドレート (無水エリスロマイシン)	35	62
フルオキセチン	25	65
ガバペンチン	44	54
ゲムフィプロジル	74	95
ヒドロキシプロピオン	75	150
イブプロフェン	20	21
ラモトリギン	97	455
メトプロロール	91	237
メトプロロール酸	85	74
2N-グルクロニドラモトリギン	68	95
ナプロキセン	64	22
ノルシタロプラム	66	74
プロプラノロール	88	53
スルファメトキサゾール	95	320
チアベンダゾール	75	188
トリクロカルバン	64	96
トリメトプリム	76	264
ベンラファキシン	78	310

結論

Agilent LC/Q-TOF システムと各種ソフトウェアは、水試料に含まれる多数の医薬品類の同定および分析に対応する、強力なツールとなります。高速 LC 分析により、100 種類を超える既知医薬品類を、ppb および ppt という低濃度でモニタリングすることが可能です。Molecular Feature Extractor、Molecular Formula Generator、Molecular Structure Correlator、Fragmentation Pathways、塩素質量フィルタなどのツールを使えば、各化合物やその代謝物を分析することができます。Q-TOF 分析は、今まで分析困難とされていた同重体化合物や異性体化合物の分離および同定において、特に威力を発揮します。

参考文献

1. J.H.Writer, I. Ferrer, L.B.Barber, and E.M.Thurman
“Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals in and metabolites in 24 Minnesota Rivers and wastewaters”
Science of the Total Environment 461-462, 519-527 (2013).
2. I. Ferrer, and E.M.Thurman “Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry”
J. Chromatography A **1259**, 148-157 (2012).
3. I. Ferrer, and E.M.Thurman “Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry”
*Anal.Chem.***82**, 8161-8168 (2010).
4. E.M.Thurman, and I. Ferrer “The isotopic mass defect:A tool for limiting molecular formula by accurate mass.”
*Anal.Bioanal.Chem.***397**, 2807-2816 (2010).

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

October 31, 2013

5991-3261JAJP



Agilent Technologies