

LC/MS 分析における Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V カラムを用いたメタンフェタミンとアンフェタミンのキラル分離

著者

Carl Griffin and William Long
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

概要

Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V 2.1 × 150 mm、2.7 μm カラム (p/n 683775-604) を用いて、メタンフェタミンとアンフェタミンを LC/MS 分析しました。移動相には 0.1 % 酢酸と 0.02 % 水酸化アンモニウムを含むメタノールを使用しました。ラセミ体のアンフェタミンとメタンフェタミンの分離は $R_s = 1.9$ 以上で、分析にかかった時間は 5 分間でした。

はじめに

液体クロマトグラフィーには、表面多孔質粒子のカラムが広く使用されています。表面多孔質粒子カラムは、全多孔質粒子カラムの同等製品と比べて低圧で高効率を実現できます¹。これは主に、カラム内での物質移動距離が短く、粒子径の実質的な分布幅が狭いためです²。現在、表面多孔質粒子は、効率をさらに高めるため小粒子化が進んでいます。カラムの効率が高いほど、分析を高速化できるだけでなく、分解能と感度が向上し、より信頼性の高い結果が得られます。

選択性、感度、またスピードの観点から、治療薬や代謝物の分析に LC/MS が広く利用されています。アンフェタミンの分析の場合、LC/MS では誘導体化の必要がなく、直接分析で 100 % 検出されます。しかし、質量分析は単に質量で化合物を特徴付けるため、質量分析のみでは立体異性体の識別はできません。そのため、質量分析システムを使用する前に分離が必要です。

メタンフェタミンとアンフェタミンはキラール分子です (図 1)。いずれも、D-エナンチオマーの生物活性が L-エナンチオマーより高い化合物です。メタンフェタミンのそれぞれのエナンチオマーとラセミ化合物はどちらも規制物質です (欧州では Class A、米国では Schedule II)。レボメタンフェタミンは抗パーキンソン病薬セレギリンの原料です³。セレギリンはレボメタンフェタミンとレボアンフェタミンに代謝されます^{4, 5}。そのため、セレギリンの使用者にアンフェタミンの陽性反応が出る原因となってきました^{6, 7}。従来使用されてきた免疫測定法ではエナンチオマーの識別ができず、不完全で不確定な結果となります。

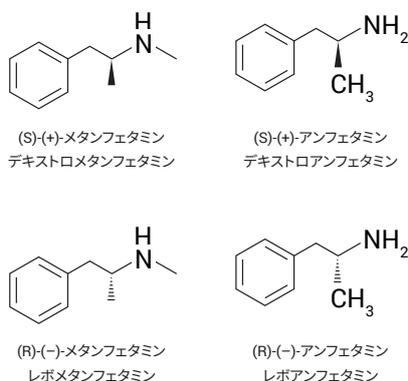


図 1. アンフェタミンおよびメタンフェタミンのエナンチオマーの化学構造

この研究では、LC/MS を用いて 2.7 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V カラムの UHPLC 性能について、2 種のラセミ体対のベースライン分離能も含めて紹介します。

実験方法

この実験では、Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS を使用しました。システムボリュームと分散を抑えるため、標準構成のシステムに変更を加えました。表 1 は、機器構成の詳細を示しています。本研究で用いた Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V 2.1 \times 150 mm、2.7 μm カラムは表 1 に記載しました。表 2 は LC と MS のパラメータを示しています。

メタンフェタミンとアンフェタミンサンプルは、1 mg/mL メタノール溶液のラセミ混合物として Cerrilant (ラウンドロック、テキサス州、米国) から購入しました。サンプルは注入前に移動相で希釈しました。酢酸は Sigma-Aldrich から購入しました。水酸化アンモニウムは、Veritas double-distilled グレードを GFS Chemicals (コロラド州、オハイオ州、米国) から購入しました。メタノールは Honeywell (Burdick and Jackson) から購入しました。水は、Milli-Q システム (Millipore 社) で生成された、0.2 μm フィルタでろ過した 18 MW のものを使用しました。

表 1. 機器構成の詳細

パラメータ	設定値
LC	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V 2.1 \times 150 mm、2.7 μm (p/n 683775-604)
移動相	メタノール: 酢酸: 水酸化アンモニウム、100:1:0.2 (アイソクラティック)
流量	0.25 mL/min
カラム温度	20 $^{\circ}\text{C}$
注入量	0.2 μL
MS	
イオン化モード	ESI ポジティブ (Agilent Jet Stream)
ガス温度	300 $^{\circ}\text{C}$
ガス流量	5.0 L/min
シーガス温度	250 $^{\circ}\text{C}$
キャピラリー電圧	3,500 V
ノズル電圧	500 V

表 2. 標準物質と MRM 条件

分析対象物	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメント電圧	衝突エネルギー	セル加速電圧	ドウェルタイム
メタンフェタミン	150.1	91.1	75	20	4	200
メタンフェタミン	150.1	65.1	75	44	4	200
アンフェタミン	136.1	119	90	4	3	200
アンフェタミン	136.1	91	90	16	3	200

結果と考察

図 2 は、InfinityLab Poroshell 120 キラル-V 2.1 × 150 mm、2.7 μm カラムを用いて分析した、(R)-(-) と (S)-(+)-メタンフェタミン、(R)-(-) と (S)-(+)-アンフェタミンの分離を示しています。LC/MS 検出の場合、すべての化合物一括でのベースラインクロマトグラフィー分離能は不要です。検出器にて各化合物固有

の質量フラグメント毎に、成分が分離されるためです。ただしエナンチオマー化合物が存在する場合は、ベースラインクロマトグラフィー分離能が必要です。今回の場合、メタンフェタミンとアンフェタミンエナンチオマーのクロマトグラフィー分離能は、20 °C で 2 以上となりました。よって、この 2 つの異性体について、良好な積分が得られ、正確な定量ができたことが示されました。図 3 は、3 種類の温度で

の分離能とリテンションタイムを示し、表 3 にその値をまとめています。温度が上がるにつれ、リテンションタイムは短くなり、選択性が高まっています。一方、カラム圧力が低くなると移動相の粘度が下がります。

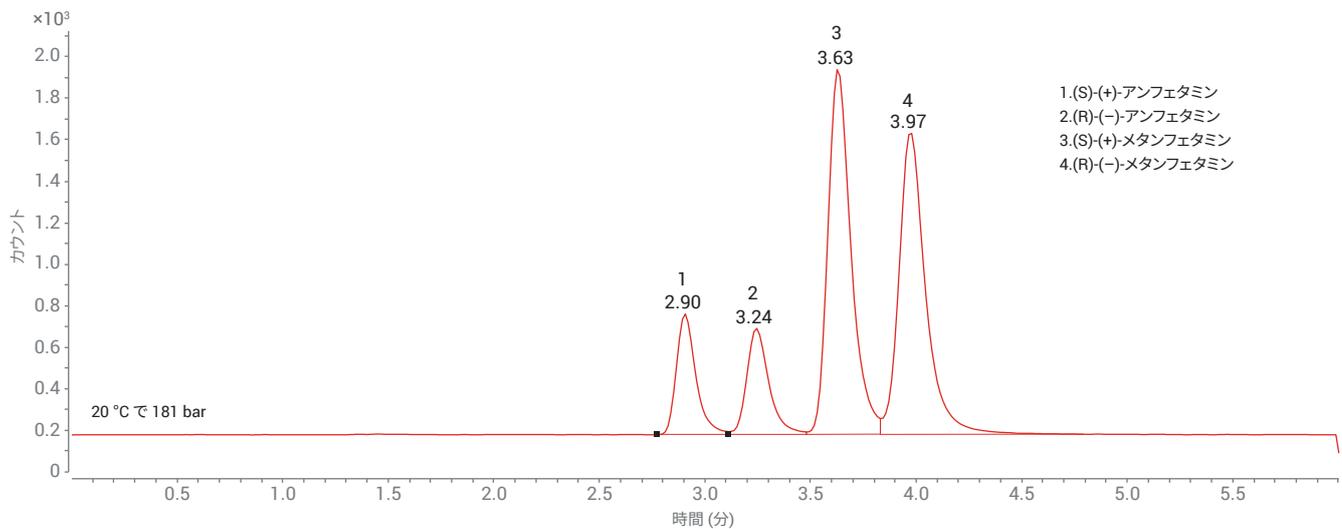


図 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V 2.1 × 150 mm、2.7 μm カラムを用いたメタンフェタミンとアンフェタミンの分析。5 μg/mL のメタンフェタミンとアンフェタミンの注入量はそれぞれ 0.2 μL。バンドの広がりを抑えるために、長さ 320 mm、内径 0.075 mm チューブを用いて MS にカラムを接続しました。

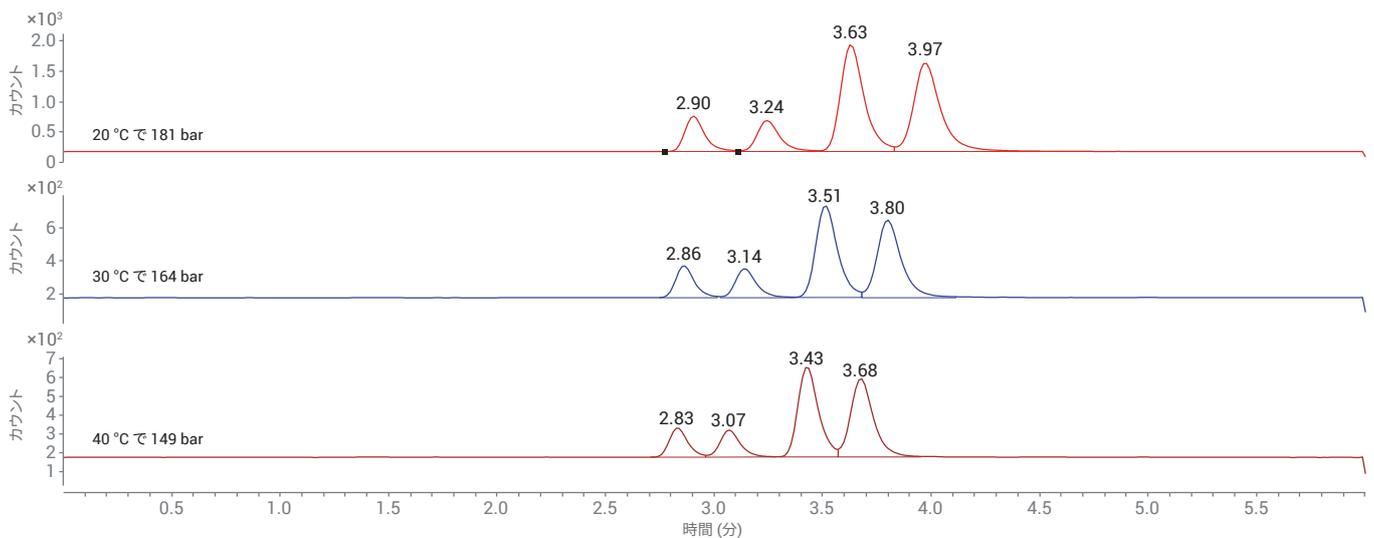


図 3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V 2.1 × 150 mm、2.7 μm カラムを異なる温度で用いたメタンフェタミンとアンフェタミンの分析。流量 0.25 mL/min、移動相、1 L MeOH、1 mL ACN、200 μL NH₄OH

結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120 キラル-V 2.7 μm カラムを用いて、LC/MS でメタンフェタミンとアンフェタミンのキラル化合物を分離できました。この小さい表面多孔質粒子を充填したカラムは効率が高いため、ラセミ体対をベースライン分離する分解能が実現しました。

参考文献

1. Gratzfeld-Huesgen, A.; Naegele, E. Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 Columns, Agilent Technologies Application Note, publication number 5990-5602EN, **2016**.
2. Meyer, V. R. Practical High Performance Liquid Chromatography, Fourth Edition, Wiley, **2004**, p. 34.
3. Method for the production of selegiline hydrochloride, European Patent, retrieved 2015-10-04.
4. Kalász, H.; et al. Metabolism of selegiline [(–)-deprenyl], Current Medicinal Chemistry **2014**, 21(13), 1522–1530.

表 3. 異なる温度でのリテンションタイムと分離能

温度 (°C)	リテンションタイム (分)				分離能		
	ピーク 1	ピーク 2	ピーク 3	ピーク 4	ピーク 1-2	ピーク 2-3	ピーク 3-4
20	2.39	3.24	3.63	3.94	2.1	2.1	1.8
30	2.86	3.14	3.51	3.80	1.8	2.2	1.6
40	2.83	3.07	3.43	3.68	1.5	2.2	1.4

ピーク 1: (S)-(+)-アンフェタミン

ピーク 2: (R)-(-)-アンフェタミン

ピーク 3: (S)-(+)-メタンフェタミン

ピーク 4: (R)-(-)-メタンフェタミン

サンプル: 移動相で希釈した 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の (±) メタンフェタミンと (±) アンフェタミン

流量: 0.25 mL/min、移動相、1 L MeOH、1 mL ACN、200 μL NH_4OH

5. Magyar, Kálmán, M. The pharmacology of selegiline, International Review of Neurobiology **2011**, 100, 65–84.
6. Cody, J. D. Metabolic Precursors to Amphetamine and Methamphetamine, Forensic Science Review **1993**, 5(2), 109–127.
7. Cody, J. T. Precursor medications as a source of methamphetamine and/or amphetamine positive drug testing results, Journal of Occupational and Environmental Medicine/American College of Occupational and Environmental Medicine **2002**, 44(5), 435–450.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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おりません。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. 2018

Printed in Japan, January 24, 2018

5991-8968JAJP