[TECHNOLOGY BRIEF]

高効率の CORTECS Phenyl カラムを用いた薬毒物での一斉分析

Jonathan P. Danaceau and Erin E. Chambers
Waters Corporation, Milford, MA, USA

目的

1.6 µm CORTECS® Phenyl カラムの性能を法医中毒学アプリケーションで実証すること

背景

イムノアッセイによるスクリーニング法、GC-MS 法、従来からの LC-MS 法のアップデート、多分析を一斉分析に変更する目的で、幅広い毒物学の化合物を LC-MS/MS にて分析することが広がっています [1]。

多くの逆相カラムがこのようなアプリケーションには用いられてきましたが、ウォーターズはソリッドコア粒子にフェニル官能基を結合させたカラムを開発しました。このカラムにより、法的に規制された幅広い薬物を独自の選択性で高効率に分析可能になりました。

法医学でのスクリーニングおよび定量技術において LC-MS/MS 分析法はますます増加しているため、最新のラボの要求に対応した適切な選択性を持つ高効率なカラムが必要とされています。

LCシステム	ACQUITY UPLC® I-Class システム、FL with Column Manager（CMA）
検出器	Xevo® TQD 検出器
移動相 A	0.1% ギ酸水溶液
移動相 B	0.1% ギ酸を含むアセトニトリル；メタノール
カラム	CORTECS UPLC Phenylカラム、1.6 µm、2.1 × 100 mm（製品番号 186008381）
カラム温度	40 ℃

表 1. 本研究で用いたカラム、装置、移動相溶液の一覧

ソリューション

天然・合成オピオイドおよびその代謝物、ベンゾジアゼピン、アミン覚醒剤、PCP、ベンゾイルエクゴニンを含む法規制薬物を UPLC-MS/MS で分析する方法を開発しました。カラムの選択性を変えるために、クロマトグラフィーによる分離では、もっとも汎用的な溶媒であるアセトニトリル（ACN）とメタノール（MeOH）の両方を用いました。メタノールはフェニル固定相と芳香環を持つ目的化合物との π-π 結合相互作用を最大化し、アセトニトリルとは異なる選択性を示します。分析法の概要は表 1 に、各移動相の組み合わせの詳細は表 2A と 2B に示しました。どちらの分析法も全化合物が 4.5 分以内に迅速に溶出しました。また分離に関しても優れ、アセトニトリルとメタノールの平均ピーク幅はそれぞれ 2.41 秒と 3.00 秒でした。どちらの場合も、メタンフェタミンとフェンテルミンのような同質量を持つ構造異性体やモルヒネとヒドロモルフォン

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

時間（分）	流速（mL/min）	移動相A%	移動相B%
0.0	0.5	98	2
4.0	0.5	40	60
4.1	0.5	98	2
5.0	0.5	98	2

表 2A. 移動相 B にアセトニトリルを用いた場合のグラジエント条件

時間（分）	流速（mL/min）	移動相A%	移動相B%
0.0	0.5	95	5
4.5	0.5	10	90
5.0	0.5	10	90
5.1	0.5	95	95
7.0	0.5	95	5

表 2B. 移動相 B にメタノールを用いた場合のグラジエント条件

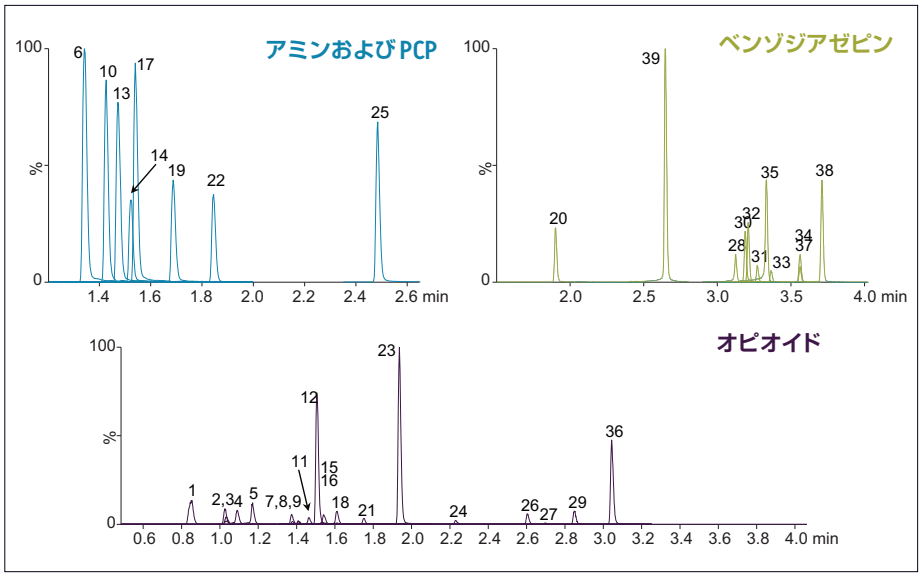

図 1A. 移動相 B にアセトニトリルを用いた場合の全化合物のクロマトグラム

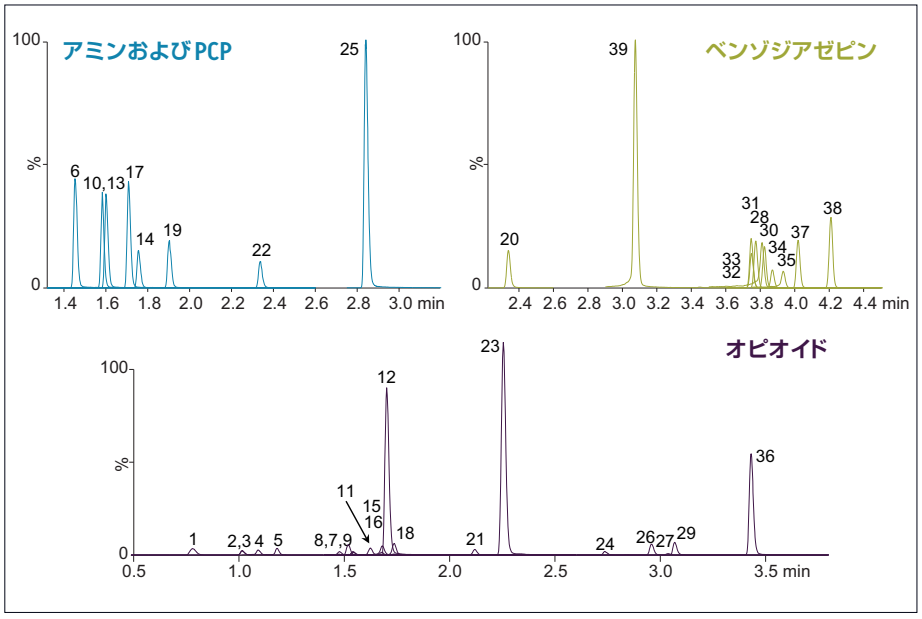

図 1B. 移動相 B にメタノールを用いた場合の全化合物のクロマトグラム

などを含む全ての同重体の化合物に関してベースライン分離を達成しました。幾つかの化合物で異なる選択性がみられました。例として、ベンゾイルエクゴニン（化合物 22）はアセトニトリルを用いた場合と比較して、メタノールを用いた場合、他の化合物よりも保持が強くなりました（図 1A および 1B 参照）。また、同じ質量数で同じ MRM トランジションを用いたメタンフェタミンとフェンテルミンに関しても選択性の違いがみられました。アセトニトリルを用いるとベースライン分離を達成しますが（1.47 分と 1.52 分）、メタノールを用いるとピークの間隔が 3.0 秒から 9.6 秒に、結果として分離度が 1.88 から 4.85 に増加し、共溶出する可能性のある化合物に対してむしろ大きな改善がみられました。ベンゾジアゼピンも二種類の移動相で異なる選択性を示しました。フルニトラゼパムとテマゼパムはアセトニトリルを用いた場合は共溶出したものの、メタノールを用いるとベースライン分離しました。同様な傾向がオキサゼパムとニトラゼパムでもみられ、保持時間の違いが 0.02 分から 0.08 分に改善されました。

	化合物	RT-ACN	RT-MeOH	分子量	M+H⁺	プロダクトイオン
1	3-beta-morphine glucuronide	0.85	0.78	461.2	462.2	286.1
2	6-beta-morphine glucuronide	1.03	1.01	461.2	462.2	286.1
3	Morphine	1.03	1.01	285.2	286.2	201.1
4	Oxymorphone	1.09	1.09	301.2	302.2	284.2
5	Hydromorphone	1.17	1.18	285.1	286.1	185.0
6	Amphetamine	1.34	1.45	135.1	136.1	119.0
7	Dihydrocodeine	1.37	1.52	301.2	302.2	199.1
8	Naloxone	1.38	1.48	327.2	328.2	253.2
9	Codeine	1.41	1.54	299.2	300.2	165.1
10	MDA	1.43	1.58	179.1	180.1	163.0
11	Noroxycodone	1.46	1.62	301.1	302.1	187.1
12	O-desmethyl tramadol	1.50	1.70	249.2	250.2	58.2
13	Methamphetamine	1.47	1.60	149.1	150.0	119.1
14	Phentermine	1.52	1.76	149.1	150.0	133.1
15	6-acetyl morphine	1.53	1.68	327.2	328.2	165.0
16	Oxycodone	1.54	1.68	315.2	316.2	298.2
17	MDMA	1.54	1.71	193.1	194.1	163.0
18	Hydrocodone	1.61	1.74	299.2	300.2	199.1
19	MDEA	1.69	1.90	207.1	208.1	105.0
20	7-aminoclonazepam	1.90	2.34	285.1	286.1	121.0
21	Norfentanyl	1.75	2.12	232.2	233.2	177.2
22	Benzoylecgonine	1.84	2.34	289.2	290.1	168.1
23	Tramadol	1.94	2.25	263.2	264.2	58.2
24	Norbuprenorphine	2.23	2.74	413.3	414.3	101.1
25	PCP	2.48	2.84	243.1	244.2	86.0
26	Fentanyl	2.60	2.96	336.3	337.3	105.1
27	Buprenorphine	2.69	3.04	467.4	468.4	101.1
28	Alpha-hydroxyalprazolam	3.12	3.81	324.1	325.1	297.1
29	EDDP	2.85	3.07	278.2	278.2	234.2
30	Oxazepam	3.21	3.83	286.1	287.1	104.0
31	Lorazepam	3.27	3.77	320.1	321.1	229.0
32	Nitrazepam	3.19	3.75	281.2	282.1	207.2
33	Clonazepam	3.37	3.74	315.1	316.1	214.0
34	Flunitrazepam	3.56	3.87	313.1	314.1	239.2
35	Alprazolam	3.33	3.93	308.1	309.1	205.0
36	Methadone	3.04	3.43	309.3	310.3	105.0
37	Temazepam	3.56	4.02	300.1	301.1	177.0
38	Diazepam	3.71	4.21	284.1	285.1	154.0
39	Flurazepam	2.65	3.07	387.2	388.2	315.1

表 3. 本アプリケーションで分析した全ての化合物一覧。アセトニトリルおよびメタノール移動相での保持時間、分子量、M+H⁺イオン、定量 MRM トランジションのデータ。同一分子量イオンを持つ化合物は、同一色でハイライト。

まとめ

新製品であるCORTECS UPLC Phenylカラム、1.6 µm、2.1×100 mm（製品番号 186008381）を用いてUPLC-MS/MS法により法規制薬物の一斉分析法を開発しました。分離は非常に効率が高く、全ての化合物をベースライン分離する事ができました。異なる有機溶媒の移動相を用いることによる有意な選択性の違いが明らかとなり、これは必要に応じて分離の難しい分析種ペアの分離最適化に利用出来ます。本カラムの登場は、CORTECSソリッドコアシリーズの拡張を意味します。

参考文献

1. Webster, L. The Role of Urine Drug Testing in Chronic Pain Management: 2013 Update. *Pain Medicine News*, 45-50 (2013).

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、CORTECS、Xevo および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年2月 720005569JA PDF