

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590870

研究課題名(和文)モノリスカラムを用いたハイスループットLC/MSによる緊急薬物同定システムの開発

研究課題名(英文)An automated on-line method for simultaneous analysis of drugs by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with backflush column switching

研究代表者

有信 哲哉(Arinobu, Tetsuya)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30329776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、前処理の大幅な簡略化とスイッチングバルブを3台とバイナリーポンプ一台によるバックフラッシュカラムスイッチングシステムを構築し、HPLC/MS/MSを用いた薬物の迅速分析法の開発を行った。構築したバックフラッシュスイッチングシステムでは、タンパク質等の生体高分子は、約0.1分以内に溶出することを確認した。また、移動相として0.1%ギ酸水溶液及び0.1%ギ酸含有アセトニトリルを用いたグラジエント法により、テスト化合物として用いたハロペリドール及びその代謝物は3.5分以内に溶出し、さらに相互分離させることも可能となった。

研究成果の概要(英文)：Existing methods for the detection of the drugs in biological samples usually involve time-consuming multi-step pretreatment. To avoid such sample pretreatments, special HPLC columns, which enabled direct injection of crude biological samples, were developed; we applied them to compounds of forensic toxicological interest. In this study, we have established an automated on-line method for ultra-fast determination of haloperidol and its metabolites, which is widely used as an antipsychotic drug and frequently encountered in the fields of forensic and clinical toxicology, in biological samples, by HPLC-MS/MS with backflush column-switching using one of special HPLC columns and a monolithic separation column.

研究分野：法中毒学

キーワード：法中毒学 分析化学

1. 研究開始当初の背景

血中薬物の同定において、もっとも主流な分析法はガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) である。しかし、この GC/MS 法では、生体高分子の除去 (前処理) が必要不可欠であるため、測定結果を得るのに数時間、場合によっては数日を要することもある。そのため、前処理を大幅に簡略化した新しい迅速分析法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

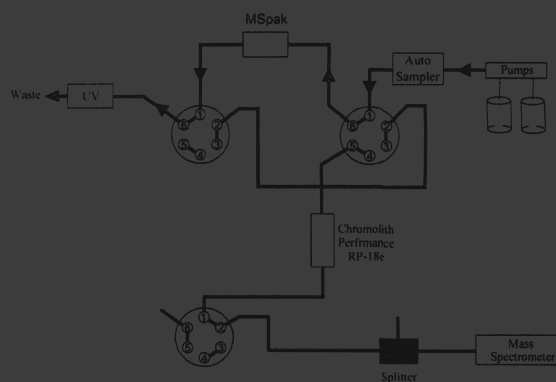
本研究は、中毒原因薬物の同定・定量を、血液の前処理を数分以内に実行可能な超迅速・簡易分析法の確立を目的とする。そのため、特に前処理を大幅に簡略化した手法を開発し、分析測定時間も数分以内とした。

3. 研究の方法

分析装置は、薬物の誘導体化を特に必要としない高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (HPLC/MS/MS) を使い、Fig.1 に示すようなバイナリーポンプ1台のみ用いたバックフラッシュカラムスイッチングシステムを構築した。今回テスト化合物として対象とし、ハロペリドールとその代謝物である還元型ハロペリドールおよび 4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxypiperidene (CPHP) を用いた (Fig. 2)。内部標準 IS としてクロロハロペリドールを用いた。生体試料 25 μ L に既知濃度の標準物質を添加し、水 1600 μ L を加え、HPLC-MS/MS の分析に供した。MS は AB SCIEX API3000 LC/MSMS system を用いた。生体高分子の排除と

薬物の保持は Shodex MSpak PK series のカートリッジカラムを用い、分離分析用のカラムは Merck 社製 Chromolith Performance RP-18 を使用した。移動相は A: 0.1%ギ酸水溶液, B: 0.1%ギ酸アセトニトリルを用い、0-0.3min まで A100%, 0.31min において A: 88%, B:12%とし、0.31-6.5 min (42%, B: 58%)までグラジエント溶出を行った。各薬物のイオン化は ESI 法を用いた。

Step
Elimination of large molecules and trapping of the compounds



Step
Backflush elution, chromatographic separation and mass spectrometric detection of the compounds

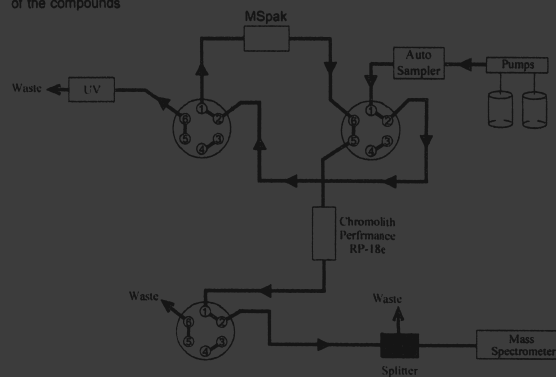
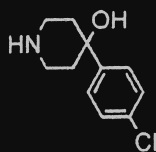


Fig. 1 Schematic diagrams of a backflush column-switching system constructed in this study

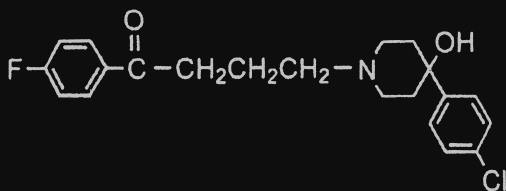
4. 研究成果

ハロペリドールのMS/MS分析における最適条件を調査した (Table 1~4)。この結果に基づき、パラメーターの最適化を行った。Fig. 3には、各薬物のプロダクトイオンのマススペクトルを示す。

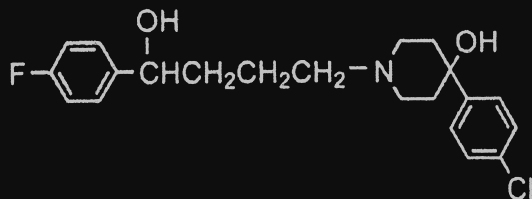
(a) CPHP



(b) Reduced Haloperidol



(c) Haloperidol



(d) IS

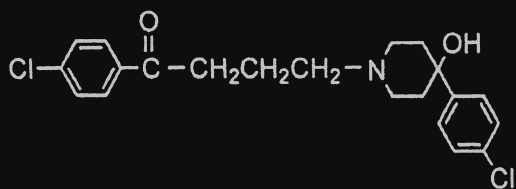


Fig. 2. Molecular structures of the investigated compounds.

Fig. 3に示すように、生体高分子 (タンパク質) の排除を0.2分以内に、ハロペリドールとその代謝物である還元型ハロペリドールおよびCPHP及びクロロハロペリドール (IS) は3.6分以内に溶出し、相互分離させることも可能となった (Fig. 4)。

Table 1. Quantitative optimization for Nebulizer gas (NFB) of haloperidol by flow injection analysis (FIA).

Step value	Max intensity (cps)			
	Monitor ion (m/z ~m/z)			
	376.00~165.00	376.10~123.00	376.10~95.00	376.10~74.90
4.0	1st	54660	42747	20620
	2nd	74380	56800	28487
6.0	1st	88813	68540	34173
	2nd	86593	66360	32447
8.0	1st	84893	64620	31793
	2nd	89327	69187	34473
10.0	1st	90073	69987	33780
	2nd	93980	72293	34700
11.0	1st	90440	70640	33947
	2nd	90367	68967	33947
12.0	1st	98960	76453	37480
	2nd	93307	69613	35553
13.0	1st	92173	71540	34847
	2nd	92993	70360	35447
14.0	1st	85667	65760	33267
	2nd	89133	69133	34327
Optimal value	12.0	12.0	12.0	12.0

Table 2. Quantitative optimization for curtain gas (CUR) of haloperidol by flow injection analysis (FIA).

Step value	Max intensity (cps)			
	Monitor ion (m/z ~m/z)			
	376.00~165.00	376.10~123.00	376.10~95.00	376.10~74.90
6.0	1st	91533	68980	34727
	2nd	90000	68693	34467
8.0	1st	89843	68540	34073
	2nd	86153	66920	32947
10.0	1st	76927	59680	28987
	2nd	88893	67507	33507
12.0	1st	93640	72340	35133
	2nd	93513	71773	35920
13.0	1st	91127	68787	34813
	2nd	89527	66280	32927
14.0	1st	63060	48627	24873
	2nd	56527	44160	20420
15.0	1st	59893	46053	23273
	2nd	58480	40260	20380
Optimal value	12.0	12.0	12.0	12.0

Table 3. Quantitative optimization for ion source voltage (IS) of haloperidol by flow injection analysis (FIA).

Step value (V)	Max intensity (cps)			
	Monitor ion (m/z ~m/z)			
	376.00~165.00	376.10~123.00	376.10~95.00	376.10~74.90
4000	1st	87527	63153	29393
	2nd	94793	71147	36060
4500	1st	85500	68173	32587
	2nd	85727	66553	33347
5000	1st	70453	55000	27240
	2nd	98120	73360	36980
Optimal value	4000.0	4500.0	4500.0	4000.0

Table 4. Quantitative optimization for temperature (TEM) of haloperidol by flow injection analysis (FIA).

Step value (°C)	Max intensity (cps)			
	Monitor ion (m/z ~m/z)			
	376.00~165.00	376.10~123.00	376.10~95.00	376.10~74.90
400	1st	188153	156113	70820
	2nd	243593	192687	91353
430	1st	276127	202153	103113
	2nd	288460	221927	110847
450	1st	307973	226720	110587
	2nd	297533	231860	111087
Optimal value	450.0	450.0	450.0	450.0

Table 5. Quantitative optimization for (CAD) of haloperidol by flow injection analysis (FIA).

Step value	Max intensity (cps)				
	S/Monitor ion (m/z→m/z)				
	376.00→165.00	376.10→123.00	376.10→95.00	376.10→74.90	
2.0	1st	243207	185427	88853	37633
	2nd	241340	181193	91047	39560
3.0	1st	286260	216207	106033	47653
	2nd	288207	222407	110773	48760
4.0	1st	349533	259933	134673	60073
	2nd	341513	264760	122247	57987
5.0	1st	414387	317953	156267	78680
	2nd	374160	295533	145527	71813
6.0	1st	463593	362913	167247	93113
	2nd	465600	367780	167907	91400
7.0	1st	452960	373120	168300	95107
	2nd	448767	366347	171080	96240
8.0	1st	470600	385380	184560	97180
	2nd	472027	379240	169253	96227
9.0	1st	499927	421573	175713	110080
	2nd	466560	386200	171100	100607
Optimal value	9.0	9.0	8.0	9.0	

MRMにより定量を行ったところ、検量線はハロペリドールでは8.1–4167 ng/mL、還元型ハロペリドールは8.1–4167 ng/mL、CPHPは16.3–8333 ng/mlの範囲で直線性を示した (Table 6)。ハロペリドールの中毒濃度は血中で50 ng/mL以上との報告があり、本法では中毒域での定量が可能である。

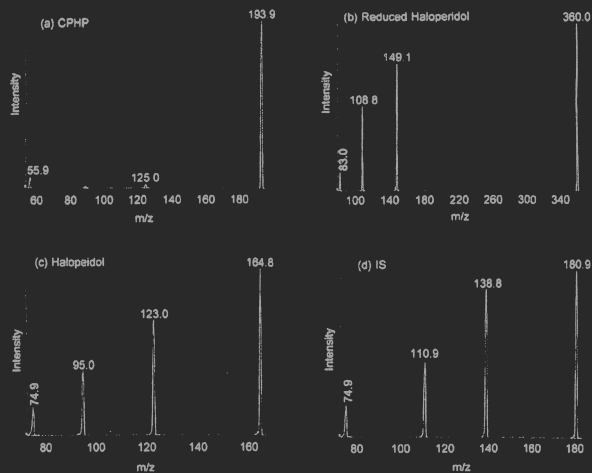


Fig. 3. Product ion mass spectra for (a) CPHP, (b) Reduced Haloperidol, (c) Haloperidol, and (d) IS in the positive ionization mode.

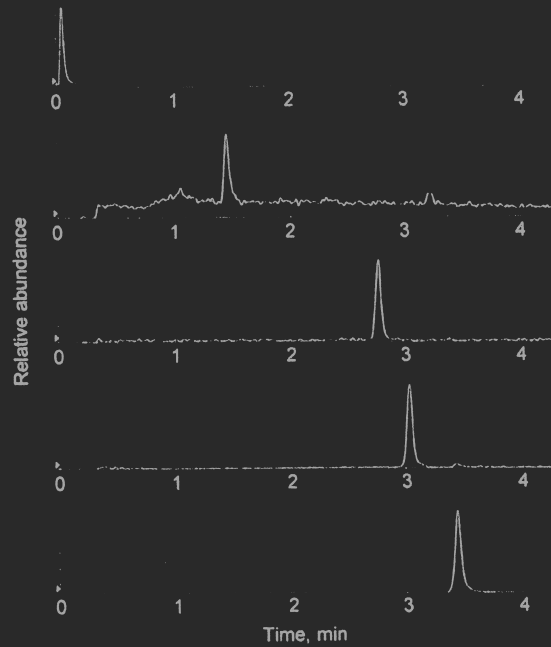


Fig. 4 LC-UV chromatogram at 280 nm for monitoring mainly proteins (upper panel), and MRM chromatogram for CPHP (2nd panel), reduced haloperidol (3rd panel), haloperidol (4th panel), and IS (5th panel).

Table 6

Calibration equations and quantitation ranges of haloperidol and its metabolites^a (n=5)

	Calibration equation		Quantitation range (ng/ml)	Correlation coefficient (r ²)
	$y = ax + b$			
	a	b		
Haloperidol	5.85×10^{-4}	-2.13×10^{-1}	8.1-4167	0.9944
Reduced haloperidol	2.48×10^{-4}	5.88×10^{-4}	8.1-4167	0.9987
CPHP	2.75×10^{-4}	1.47×10^{-2}	16.3-8333	0.9976

^ay is the ratio of peak area of haloperidol or its metabolites to that of I.S., and x is the concentration (ng/ml) of haloperidol or its metabolites.

今回設定した方法は、煩雑な前処理を必要とせず、生体試料を水で希釈するのみでカラムに導入でき、迅速かつ簡便にハロペリドール及びその代謝物を分離・検出することができた。本法は法中毒学の分野において極めて有効な手法になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

- ① X.-P. Lee, T. Kumazawa, C. Hasegawa, T. Arinobu, H. Seno, O. Suzuki, and K. Sato, “High-throughput determination of barbiturates in human plasma using on-line column-switching ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Forensic Toxicol.*, 査読あり, vol. 31, no. 1, pp. 9–20, 2013.
DOI : 10.1007/s11419-012-0155-4

[学会発表]

- ① 小川匡之, 岩井雅枝, 服部秀樹, 伊藤健次郎, 有信哲哉, 石井 晃, 鈴木 修, 妹尾 洋,
「UPLC-MS/MS を用いたヒト血漿中メラトニン受容体作動薬の迅速・一斉分析」第 37 回日本医用マススペクトル学会（愛知）平成 24 年 10 月 25 日－26 日

- ② X.-P. Lee, T. Kumazawa, C. Hasegawa, T. Arinobu, H. Seno, A. Marumo, and K. Sato, “High-throughput determination of barbiturates in human plasma using on-line column-switching ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists-To protect society from drug abuse and chemical terrorism, June 3-8, 2012, Hamamatsu, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有信 哲哉 (ARINOBU, Tetsuya)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 30329776