

Development and clinical application of
high-resolution and high-precision UPLC/Q
TOF-MS analysis system

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中内, 暁博, 藤城, 雅也, 長谷川, 智華, 熊澤, 武志, 松山, 高明, FUJISHIRO, Masaya, HASEGAWA, Chika, KUMAZAWA, Takeshi, MATSUYAMA, Takaaki メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.50818/00000110

【総説】

高感度・高精度UPLC/Q ToF-MS分析システムの構築および臨床応用

Development and clinical application of high-resolution and high-precision UPLC/Q TOF-MS analysis system

中内 暁博^{1), 2)} 藤城 雅也²⁾ 長谷川 智華^{2), 3)}
熊澤 武志^{2), 4)} 松山 高明²⁾

Akihiro NAKAUCHI Masaya FUJISHIRO Chika HASEGAWA

Takeshi KUMAZAWA Takaaki MATSUYAMA

要 旨

新開発したモノリス型固相抽出スピントップ (Monolithic Solid Phase Extraction SpinTip) による簡便・迅速な抽出と超高速液体クロマトグラフィー/ハイブリッド四重極飛行時間型質量分析法 (Ultra-performance Liquid Chromatography/Quadrupole Time of Flight-Mass Spectrometry; UPLC/Q ToF-MS) による高精度・高感度分析は、人体試料中微量薬毒物の新しい分析システムとして、救急救命における薬毒物検査ならびに臨床治療薬物血中濃度モニタリング (Therapeutic drug monitoring; TDM) 実務への応用が期待される。

キーワード：薬毒物, TDM, 人体試料, UPLC/Q ToF-MS, 高精度・高感度

I. はじめに

今日、幼児および高齢者における誤飲・誤食・誤薬など不慮の事故が多発し、医薬品の個人輸入による重篤な健康被害も急増している。また、覚せい剤・麻薬・向精神薬などの乱用や自殺目的でのこれらの薬物の過剰摂取に伴う中毒事故は、依然として大きな社会問題となっている。臨床における救急救命ならびに法医学における司法解剖何れの実務において、中毒死或いは中毒の原因物質を簡便・迅速かつ確実に同定することが強く求められている。しかし、薬毒物同定分析に必要な不可欠である試料前処理法はいまだ複雑な従来法に依存し、環境性を含めて効率性および再現性などの欠点が多く存在し、高感度分析の同定において正確性・信頼性を低下させているのが現状で、改善が急務である。2010年には日本臨床救急医学会より救急認定薬剤師制度がスタートしたが、実施可能な分析はスクリーニングのトライエージ

(Triage) DOA[®]または簡易分析のクロマトグラフィー (HPLC) が一般的で、一部では先進的なガスクロマトグラフィー (Gas chromatography; GC) /質量分析 (Mass spectrometry; MS), HPLC/タンデム質量分析 (Tandem mass spectrometer; MS/MS) も用いられている。しかし、トライエージDOA[®]は感度が低いだけでなく、偽陰性・偽陽性が常に存在し、確実な薬毒物同定は不可能である。また、従来のGC-MS, HPLC/MS/MS分析には同定用標準物質が必須条件で、同定用標準物質が入手できない薬毒物については確実な同定が困難である大きな欠点として指摘されている。さらには、危険ドラッグのような違法薬物は法の規制を逃れるため、新規構造類似化合物が次々と流通・乱用され、標準物質の入手はほぼ不可能なのが実情である。

そこで、上記のような欠点を改善すべく開発された「新しいSPE技術であるモノリス型スピントップ固相抽出」および「高精度・高感度な検出・同定UPLC/Q ToF-MS法」について概括するとともに、人体試料を用いた薬毒物分析への臨床応用を我々の経験を交えながら紹介する^{1, 2)}。

¹⁾ 東都大学 沼津ヒューマンケア学部 看護学科

²⁾ 昭和大学 医学部 法医学講座

³⁾ 東邦大学 医学部 法医学講座

⁴⁾ 聖隷クリストファー大学 看護学部

E-mail: akihiro.nakauchi@tohto.ac.jp

II. 新開発法 1. モノリス型固相抽出スピントップ 試料前処理法

試料前処理に用いられているSPEカートリッジは、従来からのシリカ系固相粒子充填型とポリマー系固相粒子充填型が主流となっている。しかし、カートリッジの活性化、平衡化および溶出の各ステップに多量有機溶媒の使用、煩雑な操作、更には目詰まりも問題点として指摘されている³⁻⁵⁾。2004年にシリカモノリスゲルと呼ばれる全く新しい固相を充填したSPE装置が登場した⁶⁾。モノリス (monolith) とは、単一 (mono) の石 (lith) という意味で、シリカモノリスゲルは三次元網目構造の骨組み部分とそれ以外の空隙が一体型となったシリカゲルの共連続構造物で、粗い目のスポンジのようなスカスカな構造に似ている (図1)。共連続構造物の空隙部分はスルーポア (あるいはマクロポア) と呼ばれ、液体の流路のようにになっている。シリカモノリスは、ケイ酸エチルから合成された均一な連続孔を有する一体型のシリカゲルで、粒子とは異なり分離剤がディスク状に成型されている。シリカモノリスは貫通孔となるスルーポアと骨格表面にある微細な孔のメソポアを持つため、高い通液性と大

きな表面積を有する。さらに、分離剤のボリュームも小さくすることが可能なため、溶液通過時にカラム内に液残りが生じにくく、試料液回収時に微量溶出も可能である。この様に、高い通液性を有しているにもかかわらず、高い捕集率と優れた吸脱着特性を有した分離媒体として注目されている。

シリカモノリスゲルはSPE法への応用として、ジーエルサイエンス社 (東京) からチップ型およびスピントップ型が発売されている (図2)。ピペットチップあるいはスピントップの先端部分には数ミリグラムの小さなシリカモノリスゲルが固定されており、この部分で抽出が行われる。化学結合基としては逆相系、順相系、イオン交換系等がある。固相粒子を充填したスピントップは、ハーバード/アミカ (Harvard Amika) 社 (米国) やビバサイエンス (Vivascience) 社 (ドイツ) 等から発売されている。しかし、シリカモノリス固相を充填したスピントップは、ジーエルサイエンス社のMonoSpinのみである (図2)。我々は従来から少量、または微量の生体試料からでも薬毒物の同定解析が可能な分析システムを開発してきた⁷⁻¹¹⁾。そこで、従来あるプロテオーム解析の用途に限定されていたがピペットチップ型SPE装置にもオクタデシル

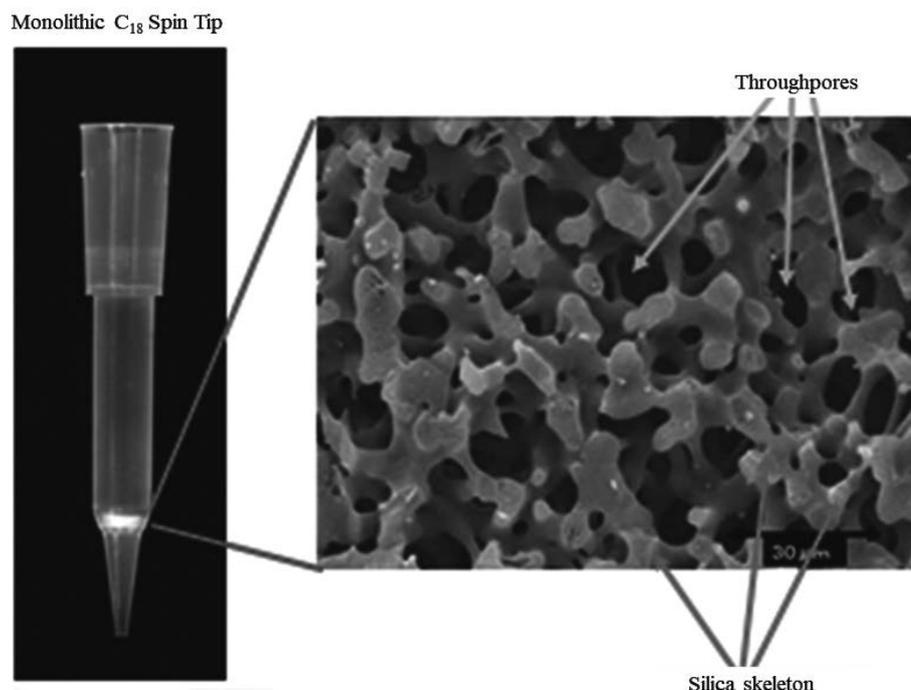


図1 モノリス型固相抽出スピントップとシリカモノリスゲルの走査型電子顕微鏡写真 (灰白色に見えるネットワーク状の構造がシリカ骨格で、散在する黒色の空洞部分がスルーポアである)

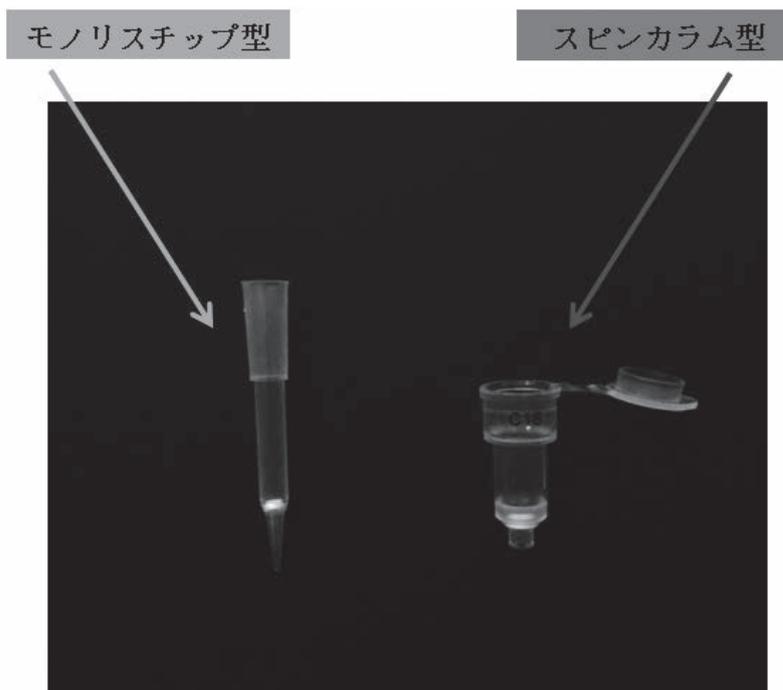


図2 市販シリカモノリスゲルはSPE装置 (ジーエルサイエンス社)

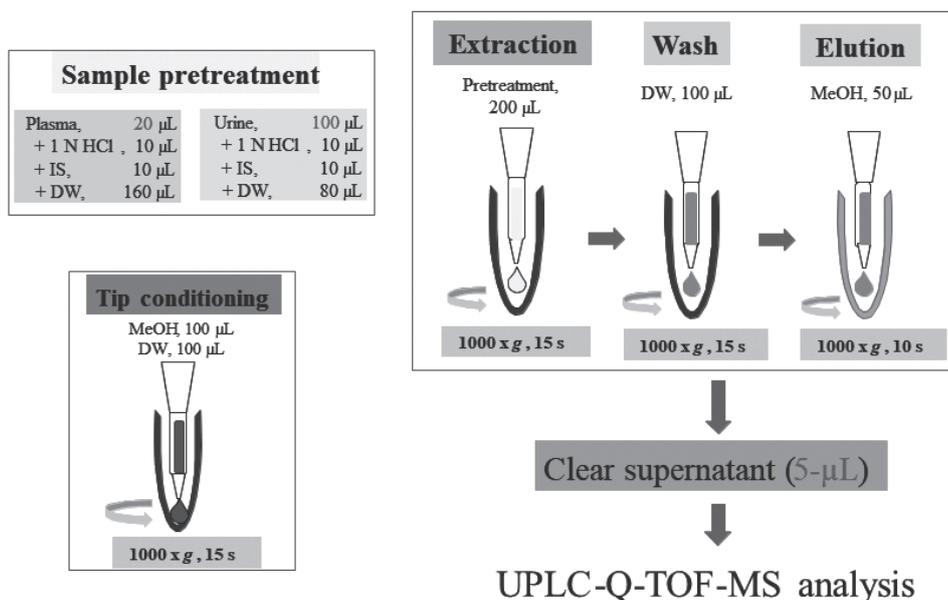


図3 モノリス型SPEスピンチップによるヒト血漿および尿中フルニトラゼパムと代謝物の抽出操作法

基やイオン交換基等でシラノール基を化学修飾したモノリス固相を充填していることに着目し、モノリス型SPEスピンチップを利用した人体試料からの薬毒物の抽出法を考案した^{1, 2)}。現在は、モノリス型SPEスピンチップとして製品化予定されている(ジーエルサイエンス社)。

モノリス型SPEスピンチップによる抽出操作法は、従来のカートリッジSPE法と同じく、コンディショニング、試料負荷、洗浄、溶出の順序で行われる(図3)。しかし、試料液や溶媒の固相への通液は、全て遠心下において行われるところがカートリッジSPE法と唯一異なる点である。試料液や溶媒の固相への通液

は遠心力を利用して行われる(図3)。スピнкаラムを遠心機のローターにセットした後コンディショニング、試料負荷、洗浄および溶出の全ての操作を遠心下で行え、目詰まりの発生がほとんどなく、人的要因の影響は少なく、サンプル間のバラッキも少ない。簡便・迅速な実用性のある試料前処理法と言える。しかも、通常の遠心機ローターでも多検体(6~12)同時にセットしたままでコンディショニングから溶出までの一連の操作が行うことができる。

モノリス型SPEスピッチップ法を効率良く行うには、固相官能基にマッチした試料の調整(特にpH調整)が必要である。同時に、試料負荷時の遠心・通液もスムーズに行われなければならない。一般に血液中の薬毒物分析では全血、血漿、血清および尿等が用いられるが、そのままの状態では抽出を行うと血球成分や固形成分によってシリカモノリスゲルの目詰まり(clogging)を起こしてしまう。同様の現象はカートリッジSPE法でも生じるが、その解決方法として試料液の遠心分離やフィルター処理等が行われる。また、試料液の粘性が高く通液抵抗が高い場合は、蒸留水や緩衝液による希釈が有効である。モノリス型SPEスピッチップの場合は、シリカモノリスゲルのスルーポア径とメソポア径の大きさを調節することによって、目詰まりや通液抵抗の問題点を解決することができる。例えば、通常のピペットチップ型SPE(200 µL容量)ではスルーポア径は10~20 µmに、メソポア径は20 nmに設定されている。しかし、我々はスルーポア径を15~25 µmに広げて通液抵抗を下げ、逆にメソポアの孔径を15 nmに狭めて低分子対象物の選択的捕捉を高めた改良型ピペットチップ型SPEをジーエルサイエンス社と共同で開発した。これによって全血、血漿、血清を用いた試料の通液が適度な速度でスムーズに行うことができるようになった。

モノリス型SPEスピッチップの薬毒物分析への応用例としては、ヒト血漿および尿中のバルビツール酸系薬物およびその代謝物¹⁾、ヒト血漿および尿中のフルニトラゼパムおよびその代謝物²⁾。

図3ヒト血漿および尿中フルニトラゼパムと代謝物のモノリス型SPEスピッチップ法による抽出操作法を示す²⁾。昭和大学医学部人を対象とする研究等に関する倫理委員会の承認(No.861)を受けた後、ボランティアによる治療用量(1 mg)のフルニトラゼパム(の投与試験を行った。全血および尿サンプルの採取

は0, 0.5, 1, 2, 8, 10, 12, 24, 48と60時間計10ポイントのTDMを行った。採取した全血は直ちに4℃で遠心分離を行い、得られた血漿が分析試料とした。また、同時に採取した尿試料はそのまま用いた。試料の調製としては、ヒト血漿20 µLまたは尿100 µLに2種類の薬物および高精度・高感度定量分析に必要な内部標準物質を添加した後、1M塩酸10 µLを混和し、超純水で全量を200 µLとした。モノリス型SPEスピッチップには、メタノール、蒸留水(スピッチップの前処理)、体液試料(試料負荷)、蒸留水(チップの洗浄)の順序で各溶液をロードし、各ステップは1000 gで15秒の遠心操作を行った。最後にメタノール50 µLによる遠心溶出を行い、その溶出液5-µLをUPLC/Q ToF-MS装置に直接注入して分析を行った。モノリス型SPEスピッチップによって3分以内に固相抽出操作が完了し、血漿および尿中からはそれぞれ4分以内に感度良く検出された。血漿または尿において、内部標準法を用いて作成した検量線は0.4~500 ng/mLの範囲でそれぞれ良好な直線性を示し、回収率は94~104%であった。フルニトラゼパム1mgを服用したボランティアの血漿および尿中から、未変化体フルニトラゼパムおよび代謝物である7-アミノフルニトラゼパムがそれぞれ感度良く同定・定量された。さらに、尿中からは3-ヒドロキシフルニトラゼパム、7-アセトアミドフルニトラゼパムおよび7-アセトアミド-3-ヒドロキシフルニトラゼパムも検出され、それぞれ精密質量同位体マススペクトルによる元素組成解析が可能であった(図4, 5)。また、TDM分析では、未変化体のフルニトラゼパムは血漿中において12時間まで、尿中には2時間と迅速の代謝を示した。一方、主代謝物である7-アミノフルニトラゼパムは血漿中で12時間、尿中には60時間までの長い代謝・排泄のTDMが可能であった(図6)。本法の臨床における薬物TDMの実用性、また、フルニトラゼパム混入による性犯罪捜査にも寄与できることを示唆した。

モノリス型SPEスピッチップ法の利点として以下の点が挙げられる。

①**操作が簡便・迅速である。**本法は従来のカートリッジSPE法と比較して概ね1/3以下の時間で抽出が完了する。これは遠心機にSEPスピッチップをセットしたままで、コンディショニングから溶出までの抽出操作を連続的に実施できることが最大の理由である。

②**使用するサンプル量と溶媒量が少ない。**スピッチップ内に充填されているシリカモノリスゲル

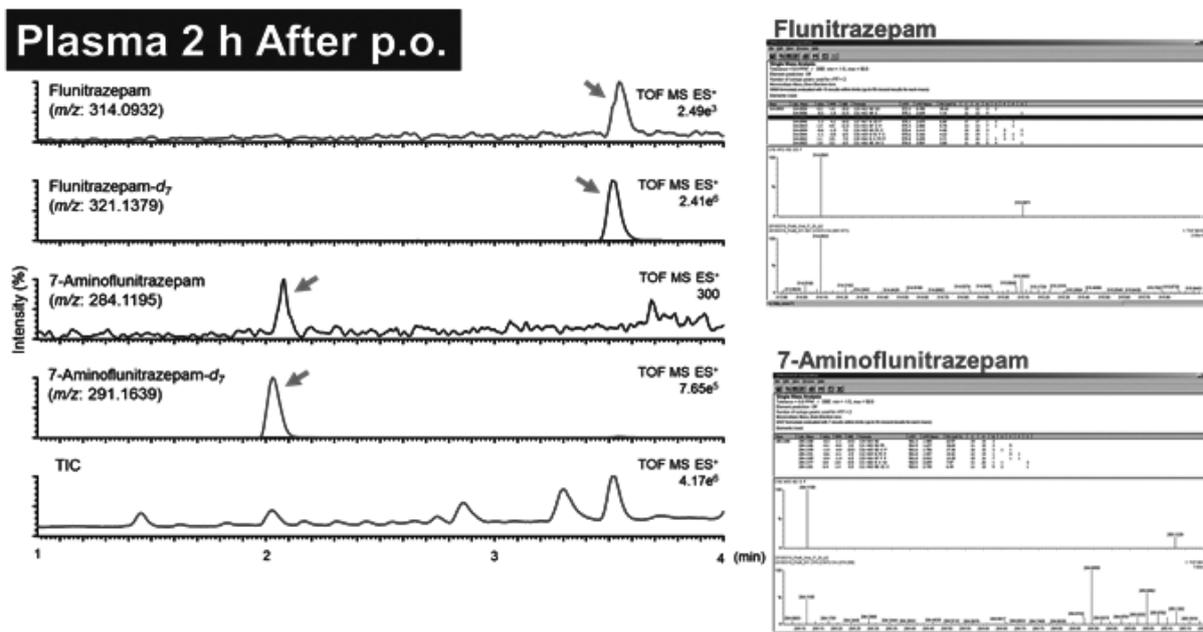


図4 モノリス型SPEスピッチップを用いて抽出したフルニトラゼパム (1mg) の経口投与2時間後の血漿中フルニトラゼパムと代謝物のUPLC/Q ToF-MSクロマトグラムおよび元素組成のスペクトル「20 μ Lの血漿に対して、2種類のISを各々1ngずつ添加して抽出を行った (文献2より一部改め引用)」

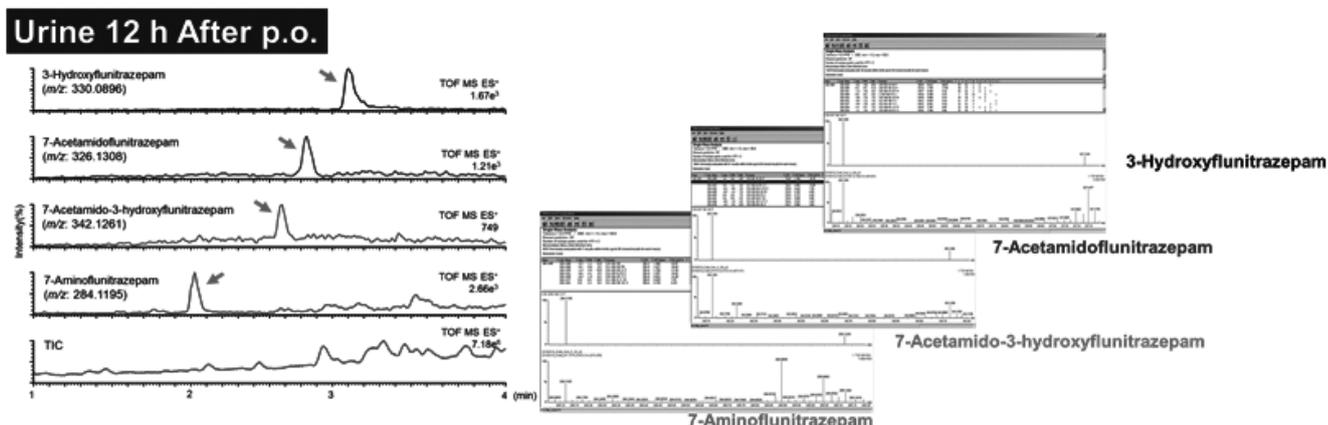


図5 モノリス型SPEスピッチップを用いて抽出したフルニトラゼパム (1mg) の経口投与12時間後の尿中フルニトラゼパムと代謝物のUPLC/Q ToF-MSクロマトグラムおよび元素組成のスペクトル「100 μ Lの尿に対して、2種類のISを各々1ngずつ添加して抽出を行った (文献2より一部改め引用)」

は数ミリグラムで、使用する試料と溶媒の少量化が可能である。図3で示した。

ヒト血漿および尿の抽出では、血液試料が20 μ L、尿試料が100 μ L、蒸留水とHCl溶液が合計で200 μ L、メタノールは150 μ Lを使用するだけである。臨床応用の際には新たな採血必要性も無く、一般臨床検査として行われる採血の残りでも本法による薬物の抽出が可能で、患者の負担軽減にも貢献ができる。

③溶出液がきれい。一般にシリカゲル粒子はアルカリ耐性が低く、カートリッジSPE法の場合には壊れたシリカゲル微粒子がカートリッジから露出して溶出液に混入することがある。その結果、HPLC/MSでは分析カラムの目詰まりやインターフェースの汚染につながってしまう。一方、スピンSPEチップに充填されているシリカモノリスゲルは極微量で、しかも構造的にシリカゲル粒子より強固で壊れにくく、分析機器の

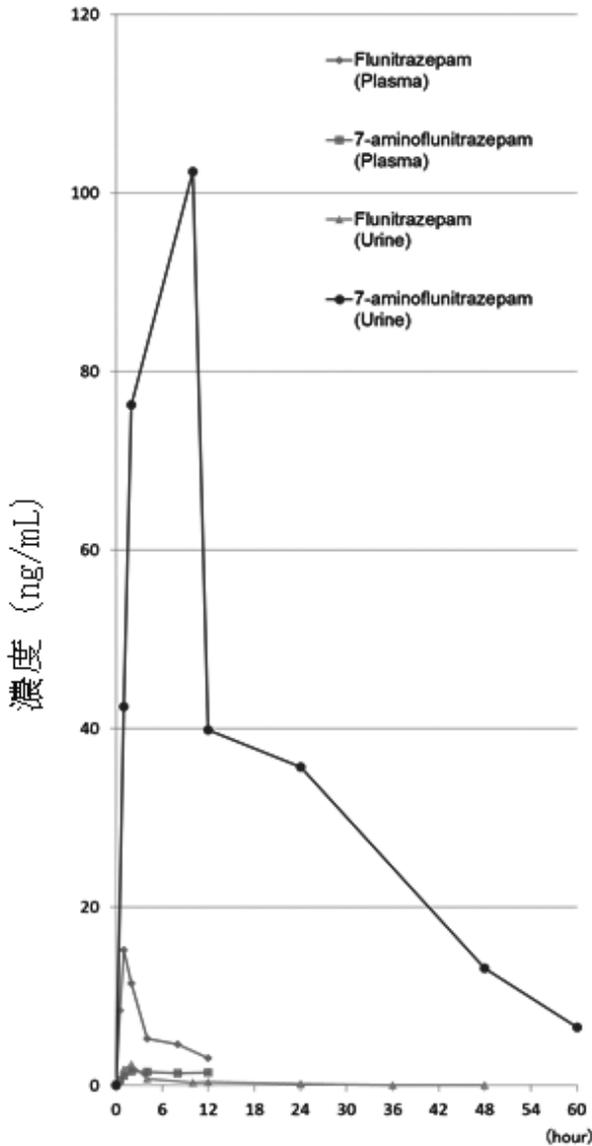


図6 フルニトラゼパム (1mg) の経口投与ボランティアの血液および尿におけるTDM [20 μ Lの血漿および100 μ L尿に対して、2種類のISを各々1ngずつ添加して抽出を行った (文献2より一部改め引用)]

汚染が非常に少ない。

④多検体処理ができる。スピンSPEチップは、一般実験室ある遠心機ローターを利用するので、最低でも6～12検体の同時抽出ができる。

Ⅲ. 新開発法2. UPLC/Q ToF-MSによる高精度・高感度分析法

人体試料からの薬毒物分析には、従来、スクリーニングのSIGNIFY™ ERまたは簡易分析のロマトグラフィー (HPLC) が主に用いられてきたが、近年、GC-MS/選択イオンモニタリング (Selective Ion Monitoring ; SIM), あるいはHPLC-MS/MSによる選択反応モニタリング (selected reaction monitoring ; SRM) 測定を用いた手法が報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾。これらの手法は、クロマトグラフィーにおける分離が不十分であっても互いに影響を受けることなく高選択的に測定ができるといった利点があるが、一方で、①全ての測定対象化合物に対して個別にSIMあるいはSRM条件を設定する必要がありメソッド開発が難しい。②事前に標準物質を用いてSIMあるいはSRM条件を設定していない化合物の測定ができないと大きな欠点もあった¹²⁻¹⁵⁾。しかし、近年、LCに接続される質量分析計としては、タンデム四重極型質量分析計のほかに、Q TOF-MSも開発された。Q TOF-MSは、四重極型質量分析計とTOF-MSが組み合わさったハイブリッド質量分析計であり (図7)、プロダクトイオン等の精密質量を測定できるため、分子の組成や構造推定等の定性分析に主に用いられ、タンデム四重極型質

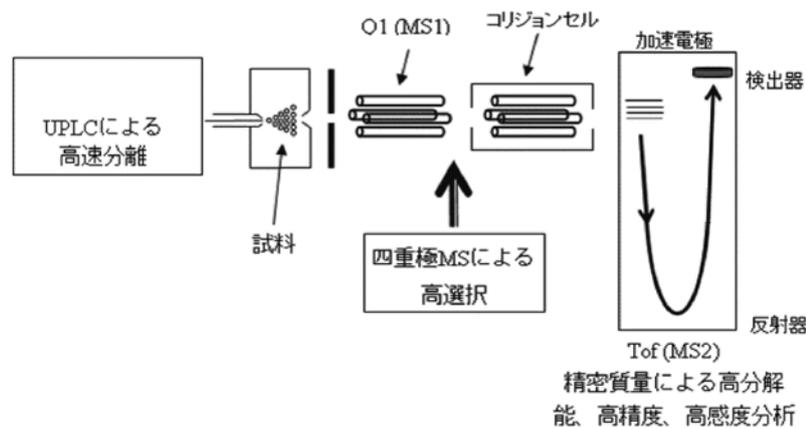


図7 UPLC/Q ToF-MS分析の概念図

量分析計と比較して定量性やダイナミックレンジ等が劣るとの理由から、従来、定量分析にはあまり利用されてこなかった。しかしながら、近年の装置性能の向上に加えて、Q TOF-MSによる全イオンモニタリング (The total ion monitoring; TIM) 測定には、①化合物毎の測定条件の設定が不要である、②標準物質を必要とせず網羅的な分析 (ノンターゲット分析) も可能である、取得した精密質量データについて統計学的解析を行うことより薬毒物の未変化体や代謝物の情報を割り出し、確実な高精度同定が可能であるという利点がある。さらに、定量分析にも利用されるようになってきているため、薬毒物など低分子分析への応用も報告されている^{1, 2, 16-18)}。

IV. まとめ

新しいモノリス型SPEスピントップによる簡便・迅速な前処理と標準物質を必要とせず精密質量データを取得可能なUPLC/Q ToF-MS分析法との組み合わせは、これまで指摘されている欠点を改善し、人体試料中薬毒物について簡便・迅速、高精度かつ高感度な分析ができると分析システムである。本稿で紹介した最新のモノリス型SPEスピントップ法は、次世代のSPE技術として、ハイスループット分析の一翼を担って行くものと考えられる。救命救急実務への応用のみならず、法医学領域、食品衛生、環境などの分析への波及効果も期待できる。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究の一部はGLサイエンス株式会社技術開発部宮崎将太氏と共同で実施したものであり、また本稿執筆にあたり同氏よりシリカモノリスゲルの走査型電子顕微鏡写真の提供を頂きました。ここに深謝いたします。

利益相反

本研究において、申告すべき利益相反はない。

文献

- 1) Shouji Y, Hasegawa C, Lee XP: High resolution and high precision analysis of barbiturates and metabolite in human body fluids using a Monolithic Spin Tip and UPLC-Q-ToF-MS. *J Showa Univ J Med Sci.* 30 (2) : 175-187, 2018
- 2) Fujishiro M, Noguchi A, Lee XP: A new method for high resolution and high precision analysis of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in human body fluids using a Monolithic SPE SpinTip and UPLC-Q-ToF-MS. *Forensic Toxicol.* 37 (2) : 387-397, 2019
- 3) Hackett J, Elian AA: Extraction and analysis of flunitrazepam/7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC-PDA and GC-MS using butyl SPE columns. *Forensic Sci Int.* 157: 156-162, 2006
- 4) Nguyen H, Nau D: Rapid method for the solid-phase extraction and GC-MS analysis of flunitrazepam and its major metabolites in urine. *J Anal Toxicol.* 24: 37-45, 2000
- 5) Marchi I, Schappler J, Veuthey JL: Development and validation of a liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam, and their main metabolites in haemolysed blood. *J Chromatogr B.* 877: 2275-2283, 2009
- 6) Miyazaki S, Morisato K, Ishizuka N: Development of a monolithic silica extraction tip for the analysis of proteins. *J Chromatogr A.* 1043: 19-25, 2004
- 7) Tsukada M, Ikemoto H, Lee XP: Kamikihito, a traditional Japanese Kampo medicine, increases the secretion of oxytocin in rats with acute stress. *J Ethnopharmacol.* 276: 114218, 2021
- 8) Minohara S, Fujishiro M, Lee XP: High-throughput identification and determination of aminoglycoside antibiotics in human plasma using UPLC-Q-ToF-MS. *Eur J Mass Spectrom.* 27 (1) : 63-70, 2021
- 9) Yamada M, Lee XP, Fujishiro M: Highly sensitive determination of alendronate in human plasma and dialysate using metal-free HPLC-MS/MS. *Legal Med.* 30 (1) : 14-20, 2018
- 10) Lee XP, Shouji Y, Kumazawa T: Rapid and highly sensitive analysis of benzodiazepines and tandospirone in human plasma by automated on-line column-switching UPLC-MS/MS. *Legal Med.* 24 (1) : 36-55, 2017
- 11) Nemoto T, Lee XP, Kumazawa T: High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 88: 71-80, 2014
- 12) Mokh S, Hawari KE, Nassar R: Optimization of a solid-phase extraction method for the determination of 12 aminoglycosides in water samples using LC-ESI-MS/MS. *Chromatographia.* 78: 631-640, 2015

- 13) de Bairros AV, de Almeida RM, Pantaleão L: Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Chromatogr B*. 975: 24-33, 2015
- 14) Kwon W, Kim JY, Suh S: Simultaneous determination of creatinine and uric acid in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with polarity switching electrospray ionization. *Forensic Sci Int*. 221 (1-3) : 57-64, 2012
- 15) Abuin S, Codony R, Granados M: Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1114: 73-81, 2006
- 16) Skillman B, Kerrigan S: Drug-mediated ion suppression and mitigation of interferences using liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry (LC-Q/TOF-MS) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Chromatogr B*. 1152: 122265, 2020
- 17) Yisimayili Z, Guo X, Liu H: Metabolic profiling analysis of corilagin in vivo and in vitro using high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 165: 251-260, 2019
- 18) Broecker S, Herre S, Pragst F: General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Sci Int*. 218: 68-81, 2012

受付日：2022年2月14日 受諾日：2022年2月25日

[Review]

Development and clinical application of high-resolution and high-precision UPLC/Q TOF-MS analysis system

Akihiro NAKAUCHI^{1,2)} Masaya FUJISHIRO²⁾ Chika HASEGAWA^{2,3)}
Takeshi KUMAZAWA^{2,4)} Takaaki MATSUYAMA²⁾

Abstract

The extractive pretreatments are critical for making successful mass spectrometric analysis of target compounds in human specimens. A solid-phase extraction (SPE) technique based on porous silica monoliths is a new approach for the extractive pretreatments of drugs and toxic compounds. In this review, the clinical therapeutic drug monitoring (TDM) with use a high-resolution and high-precision method by a new monolithic C18 gel-packed spin tip and ultra-performance liquid chromatography (UPLC)-quadrupole-time of flight (Q-ToF) mass spectrometry (MS) is introduced. This new method could be applied widely in the clinical and forensic fields for the quantitative determination of drugs and metabolites.

Key words : Drugs and poisons, Therapeutic drug monitoring (TDM), Human samples, UPLC/Q Tof-MS, High-resolution and high-precision

¹⁾ Faculty of Human care at Numazu, Tohto University

²⁾ Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine

³⁾ Department of Legal Medicine, Toho University School of Medicine

⁴⁾ Seirei Christopher University School of Nursing

E-mail: akihiro.nakauchi@tohto.ac.jp