

LC-TOF MS を用いた医薬品成分のスクリーニング

佐賀県衛生薬業センター 中園陽子 原口那津美 八ヶ代一郎 轟田清典

キーワード：化粧品 ステロイド スクリーニング LC-TOF MS

【はじめに】

近年、医薬品成分が含有された健康食品・化粧品等による健康被害の事例が問題となっている。LC-TOF MS の ESI によって生じる付加イオンの精密質量は機種に依存しないため、過去に医薬品 990 成分の精密質量をデータベース化し、本データベースが原因物質推定に有効であることを本協議会において報告した¹⁾。現在、ステロイド剤を始めとした医薬品成分のカラム保持時間情報を追加しているところである。今回、本データベースの有用性と課題について事例と合わせて報告する。

【方法】

1. データベース作成

(1) 精密質量 日本医薬品集 医療薬 2007 年版 (株式会社じほう) に記載されている医薬品 990 成分を対象とし、モノアイソトピック質量を使用し化学構造式を基に算出した。

(2) 保持時間 購入試薬について標準溶液 (10ppm) を調製し以下の条件で測定し、そこで得た保持時間情報をデータベースに追加した。ステロイド剤の例を図 1 に示す。なお、ステロイド剤 27 種の混合標準溶液の TIC クロマトグラムを図 2 に示す。

(3) LC-TOF MS 装置及び分析条件

[LC条件] 装置：HPLC (Agilent 1200series), カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD 2.1×100mm, 1.8μm 移動相：A; 0.1% HCOOH+2.5mM CH₃COONH₄/15% CH₃CN, B; 0.1% HCOOH+2.5mM CH₃COONH₄/85% CH₃CN, グラジエント条件：A:B (time)=100:0 (0min)→0:100 (30min)

カラム温度：40℃付近の一定温度, 流速：0.3 mL/min, 注入量：3μL

[TOF MS条件] 装置：Q-TOF MS (Agilent 6540), イオン化法：Dual ESI, Positive/negative mode, 乾燥ガス：N₂, 350℃, 10 L/min, ネブライザー：N₂ 50 psig, キャピラリー電圧：4000V, フラグメンター電圧：120V, コリジョンガス：N₂, コリジョンエネルギー：10~40V, スキャン範囲：100~1300 (m/z), リファレンスマス：121.0508739及び922.009798(pos.), 112.985587, 119.03632及び1033.988109(neg.)

| # Compound database Cpdl | # Formula | RT | Mass |
|-------------------------------|-------------|--------|-----------|
| amcinonide | C28H35FO7 | 20.967 | 502.23668 |
| betamethasone | C22H29FO5 | 12.271 | 392.19990 |
| clobetason 17-propionate | C25H32ClFO5 | 21.163 | 466.19223 |
| clobetason 17-butyrate | C26H32ClFO5 | 23.908 | 478.19223 |
| cortisone 21-acetate | C23H30O6 | 14.958 | 402.20424 |
| dexamethasone | C22H29FO5 | 12.324 | 392.19990 |
| dexamethasone 21-acetate | C24H31FO6 | 16.250 | 434.21047 |
| diflorason diacetate | C26H32F2O6 | 18.609 | 494.21161 |
| fludrocortisone 21-acetate | C23H31FO6 | 14.289 | 422.21047 |
| flumethasone | C22H29FO5 | 12.351 | 410.19048 |
| flumethasone 21-pivalate | C27H36F2O6 | 21.868 | 494.24800 |
| flucinolone acetonide | C24H30F2O6 | 13.743 | 452.20105 |
| flucinolone | C26H32F2O7 | 18.566 | 494.21161 |
| flurmethalone | C22H29FO5 | 14.184 | 376.20499 |
| fluticasone propionate | C25H31F3O5 | 21.634 | 500.18443 |
| halcinonide | C24H32ClFO5 | 20.455 | 454.19223 |
| hydrocortisone | C21H30O5 | 10.395 | 362.20933 |
| hydrocortisone 17-butyrate | C25H36O6 | 16.412 | 432.25119 |
| hydrocortisone 21-acetate | C23H32O6 | 14.177 | 404.21989 |
| methylprednisolone | C24H32O5 | 11.895 | 374.20833 |
| methylprednisolone 21-acetate | C24H32O6 | 15.627 | 416.21989 |
| mometason furoate | C27H30Cl2O6 | 21.779 | 520.41495 |
| paramethasone 21-acetate | C24H31FO6 | 16.122 | 434.21047 |
| prednisolone | C21H28O5 | 10.196 | 360.19368 |
| prednisolone 21-acetate | C23H30O6 | 13.879 | 402.20424 |
| triamcinolone | C21H27FO6 | 7.977 | 394.17817 |
| triamcinolone acetonide | C24H31FO6 | 13.256 | 434.21047 |

図 1 医薬品精密質量データベース (ステロイド抜粋)

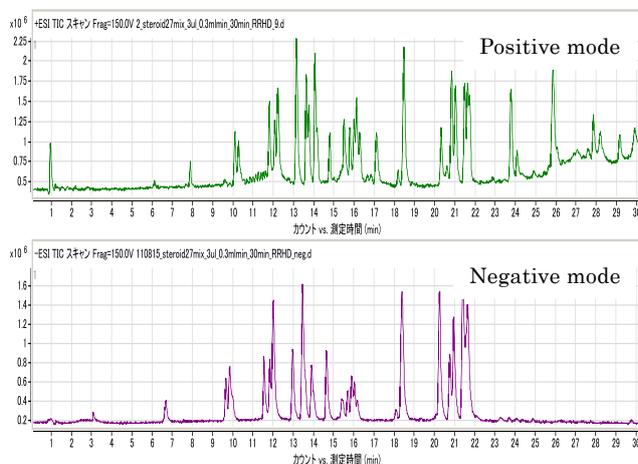


図 2 ステロイド 27 種混合標準溶液の TIC クロマトグラム)

2. スクリーニング事例

(1) 模擬試料の調製 県内産化粧品クリーム 0.2g (ステロイド非含有確認済) に対して、同組成式を有するステロイド2種 (プレドニゾロン酢酸エステル($C_{23}H_{32}O_6$, $M=402.20424$, 図3)及びコルチゾン酢酸エステル($C_{23}H_{32}O_6$, $M=402.20424$, 図4)) を各成分が1.25%含有するように調製した。

(2) 分析方法 メタノールで超音波抽出し、遠心分離後得られた上澄みを合わせ25mLとし、メンブランフィルター(0.45 μ m, PTFE)でろ過後、20倍希釈したものを試料溶液とした。試料溶液3 μ Lについて、1.(3)の条件下でLC-TOF MSを用いて測定しTICクロマトグラム(図5)を得た。これ

について、Agilent社製Mass hunterのMFE(molecular feature extractor)によるピーク抽出※¹を行い、抽出ピークについてデータベース検索※²を行った。結果、RT13.7分付近に酢酸プレドニゾロン及びRT14.7分付近に酢酸コルチゾンを検出した。

※¹ 抽出条件 RT: 0~30min, Mass: 100-1000, イオン強度: 10000以上

※² 検索条件 イオン: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$, $[M-H]^-$, $[M+COOH]^-$, $[M+COONH_4]^-$, Mass error: ± 5 ppm, RT: ± 0.5 min

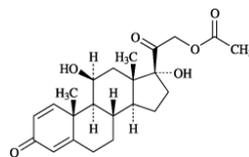


図3 プレドニゾロン酢酸エステル
($C_{23}H_{32}O_6$, $M=402.20424$)

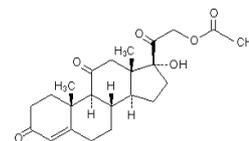


図4 コルチゾン酢酸エステル
($C_{23}H_{32}O_6$, $M=402.20424$)

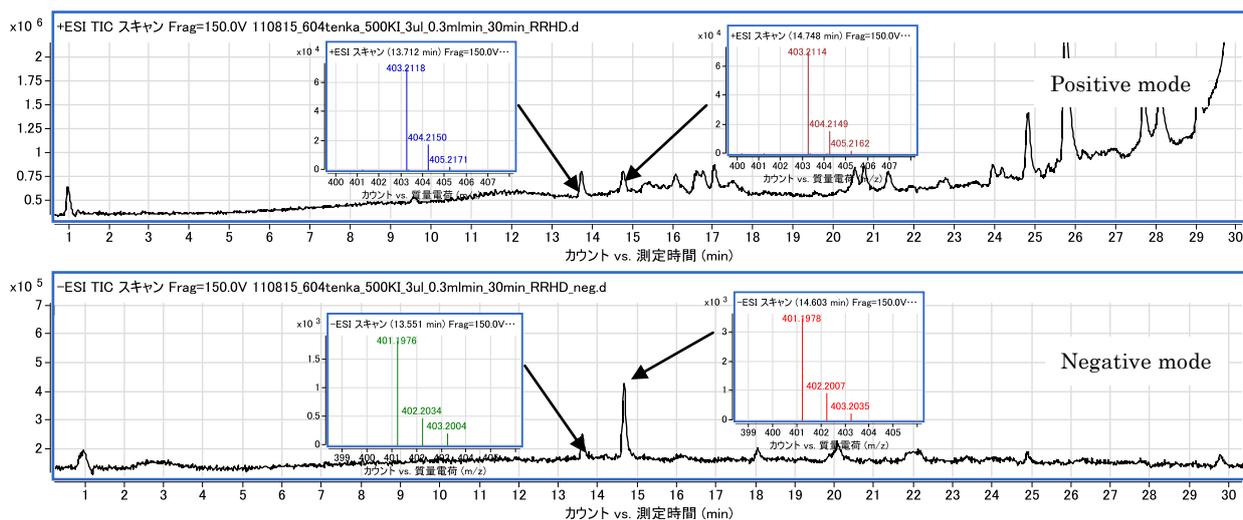


図5 模擬試料のTICクロマトグラム

【結果と考察】

医薬品精密質量データベース990成分のうち、ステロイド27成分について保持時間情報を追加した。TOF MSはミリマス単位での質量分離が可能であるが、データベースの中には全く同じ構造をもつもの、質量が極めて近似(± 0.01 Da)しているもの等、精密質量情報だけでは十分な検索結果が得られない場合も想定され、保持時間情報は検索精度を向上させる上で貴重な情報である。本法は、健康食品・化粧品等に含有される医薬品成分の迅速かつ高感度なスクリーニング方法として有用であると考え、現在、ステロイド剤に続き抗ヒスタミン剤、利尿剤等順次保持時間情報を追加しデータベースの整備を進めている。本法は、データベースに収載されていない化学物質に対しては効果を発揮できないため、昨年の本協議会で報告した化学物質の基本骨格に着目したスクリーニング法等といかに組み合わせるかが今後の検討課題であると考え。

【参考】 1) 第46回全国衛生化学技術者協議会年会 講演集 2009, p302-302, TOF-MSの精密質量データベースを利用した医薬品成分のスクリーニング 2) 第47回全国衛生化学技術者協議会年会 講演集 2010, p306-307, 未知医薬品成分のスクリーニング法の開発