

D/L-Amphetamine 키랄 분리를 위한 분석법 개발

SFC/MS에 의한 표준 전혈 시료의 정량 분석

응용 자료

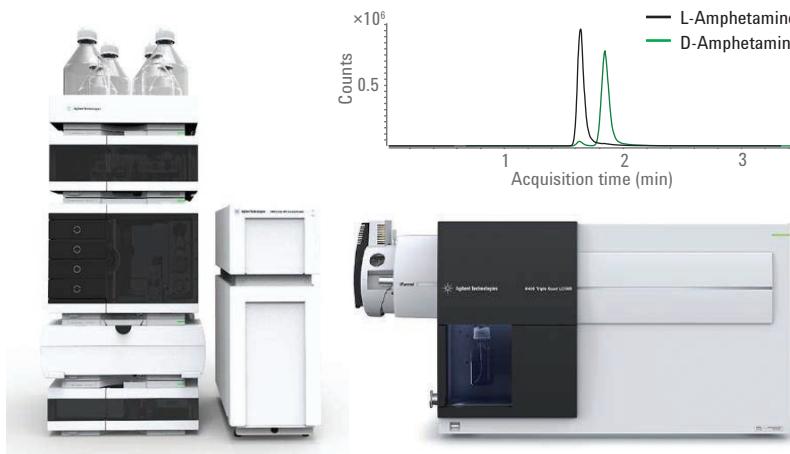
법의학 및 독성학, 증거 분석학

저자

Melanie Muelek, Herbert Godel,
Edgar Naegele
Agilent Technologies Inc.

개요

이 응용 자료에서는 Agilent 1260 Infinity II SFC 시스템을 사용하여 D/L-amphetamine의 키랄 분리를 위한 분석법 개발을 소개합니다. Agilent 6495 QQQ MS를 통해 이 두 개의 키랄 거울상 이성질체에 대한 정량을 보여줍니다. 분석법 개발 과정을 설명하고, QQQ MS에 의한 최종 분석법을 사용하여 검량선 및 정량 한계를 결정하였습니다. 처리한 표준(authentic) 전혈 시료 분석이 나타나 있습니다.



Agilent Technologies

서론

D/L-amphetamine 화합물은 2가지 키랄 거울상 이성질체 형태로 존재합니다(그림 1). D-amphetamine 이성질체가 보다 활성이 있기 때문에 약학적으로 순수한 거울상 이성질체 형태¹로 생산합니다.

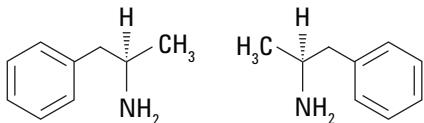


그림 1. D- 및 L-amphetamine의 분자 구조식

법독성학에서는 GC 및 HPLC와 같은 크로마토그래피 분석법을 질량분석법과 연결하여 체액 내의 amphetamine을 정성 및 정량적으로 확인할 수 있습니다².

본 응용 자료에서는 D- 및 L-amphetamine의 분리를 위한 고속 SFC/MS 분석법 개발 및 QQQ 질량 분석기를 사용하는 정량 분석을 소개합니다. 이 분석법을 사용하여 의료용 D-amphetamine의 정량 값과 불법적인 출처의 D/L-amphetamine 양을 구별할 수 있습니다. 끝으로 이 분석법은 표준 추출 전혈 시료 분석을 통해 법독성학에서의 사용을 검증하였습니다.

실험

기기

Agilent 1260 Infinity II SFC/MS 시스템 구성은 다음과 같습니다:

- Agilent 1260 Infinity II SFC 제어 모듈(G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Binary 펌프(G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler(G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(DAD) 및 고압 SFC 플로우 셀(G7115A)
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(MCT) (G7116B) 및 4컬럼 선택 밸브
- Agilent 1260 Infinity II Isocratic 펌프(G7110B) 및 SFC/MS Splitter 키트(G4309-68715)
- Agilent Jet Stream 및 iFunnel 기술을 탑재한 Agilent 6495 QQQ MSD

기기 설정

Agilent 1260 Infinity II SFC 시스템과 Agilent LC/MS 시스템 연결 시 권장 구성은 이전의 문헌에 설명되어 있습니다³.

소프트웨어

- LC 및 LC/MS 시스템용 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, Rev. C.01.07 SR3
- Agilent MassHunter Triple Quadrupole Acquisition 소프트웨어, 버전 B.08.02
- Agilent MassHunter Optimizer 소프트웨어, 버전 B.08.02
- Agilent MassHunter Source 및 iFunnel Optimizer 소프트웨어, 버전 B.08.02
- Agilent MassHunter Quantitative 소프트웨어, 버전 B.08.00
- Agilent MassHunter Qualitative 소프트웨어, 버전 B.07.00 SP1

컬럼

- Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H 150 × 4.6mm, 5µm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H 250 × 4.6mm, 5µm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK IA 250 × 4.6mm, 5µm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK IC 250 × 4.6mm, 5µm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK ID 250 × 4.6mm, 5µm

화학품

모든 용매는 Merck(독일)에서 구입하였습니다.

시료

D-amphetamine, L-amphetamine 및 D/L-amphetamine 용액은 검량선에 표시된 관련 농도에 따라 개별 원액으로부터 메탄올에 용해하여 제조하였습니다(원액: 메탄올에서 1ppm).

처리한 표준 전혈 시료를 제공받았습니다(감사의 글 참조).

시료 전처리

표준 전혈 시료는 acetonitrile로 단백질 침전한 다음, 분석 전에 이동상 B (ethanol + 0.1% aq. NH₃)에서 1:1,000/1:100/1:10으로 희석 하였습니다.

최종 SFC 분석법

파라미터	값
SFC 유속	4mL/분
변형제	Ethanol + 0.1% NH ₃ (aq)
등용매	10% 변형제
컬럼 온도	20°C
역압 조절기(BPR) 온도	60°C
BPR 압력	200bar
총 분석 시간	3분
주입	5μL
피드 스피드	400μL/분
오버피드 부피	4μL
니들 세척	Methanol로 3초

MS QQQ 분석법

파라미터	값
보충 용매 조성	Methanol/water(95/5) + 0.2% formic acid
보충 용매 유속	0.4mL/분
전자분무 이온화(Agilent Jet Stream 이온화원 사용)	
건조 가스	170°C, 16L/분
Sheath 가스	300°C, 9L/분
분무기	60psi
캐필러리	2,500V
노즐	500V
iFunnel	고압 RF: 80, 저압 RF: 60
MS 파라미터	
ESI 극성	양이온
스캔 유형	MRM
전이	2
주기 시간	502ms
ΔEMV	+200V

화합물명	전구 이온 (m/z)	생성 이온 (m/z)	Dwell (ms)	Fragmentor 전압(V)	충돌 에너지(V)	셀 가속기 전압(V)
D/L-Amphetamine	136.1	119.1	250	380	7	1
D/L-Amphetamine	136.1	91.1	250	380	17	1

결과 및 토의

라셈(Racemic) amphetamine 표준 용액(100ppb)을 4 종류의 서로 다른 키랄 고정상 컬럼 및 2가지 유기 변형제(organic modifier)에 대해 스크리닝하였습니다(실험 섹션 내 컬럼 2~5 참조). Amphetamine이 염기성 화합물이기 때문에 염기성 첨가제인 0.1% aqueous ammonia를 methanol 및 ethanol에 추가하여 CO₂ 변형제로 사용하였습니다. 초기 분석법 개발 단계에서는 모든 컬럼에 대해 다양한 등용매 분리를 수행하였습니다. 실험 결과, 컬럼 2에서 최초 분리가 이루어졌습니다(그림 2). 변형제의 양을 줄일 때, 두 가지 거울상 이성질체 모두 분리가 더 잘 되는 경향이 나타났습니다. Methanol 변형제를 사용한 실험 조건에서는 베이스라인 분리를 할 수 없었습니다.

이 두 amphetamine의 분리를 개선하기 위해 용리 세기가 더 약한 용매인 ethanol을 사용하여 컬럼 2에서 시험하였습니다(그림 3). 그 결과, 변형제 농도 10%B 이하에서 2 개의 거울상 이성질체의 명확한 분리를 얻었습니다. 두 거울상 이성질체는 변형제 농도가 10%B일 때 3.5~4.5분 사이에 용리되었고, 6%B의 경우 7~9분 사이에 용리 되었습니다.

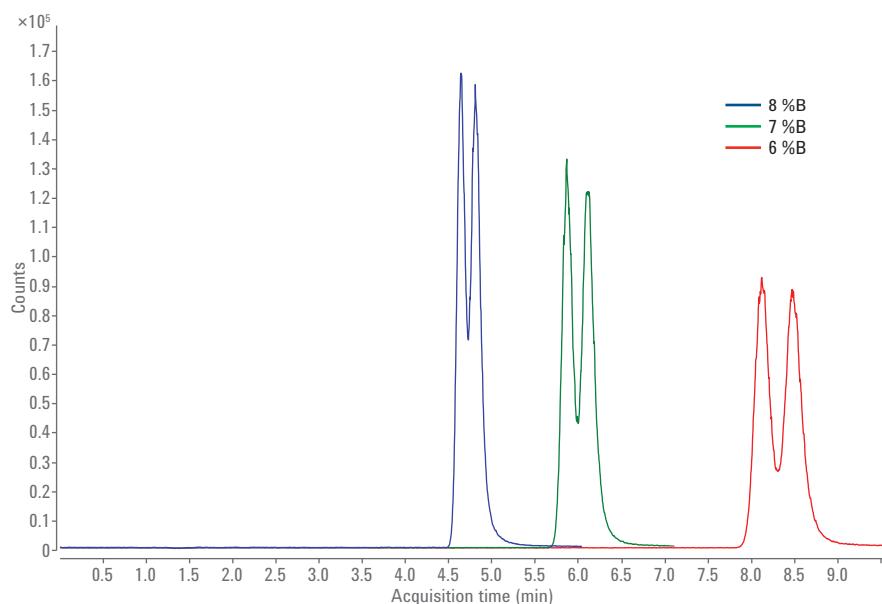


그림 2. 다양한 변형제 조성에 따른 D/L-amphetamine 거울상 이성질체(100ppb)의 키랄 분리(변형제 B: MeOH+ 0.1% NH₃(aq), 유속: 3mL/분, 컬럼 온도: 20°C, 컬럼: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250mm, 5μm).

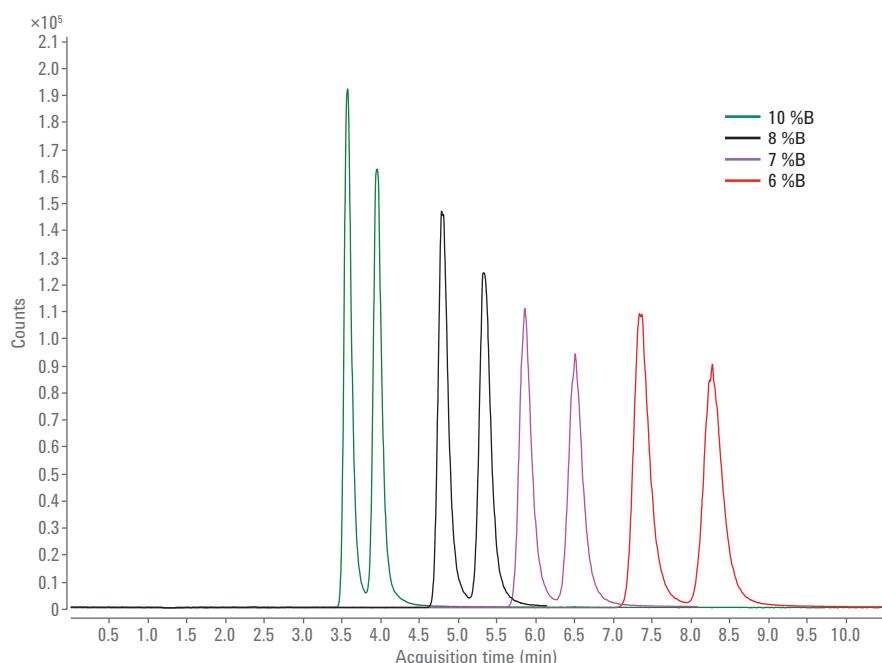


그림 3. 다양한 변형제 조성에 따른 D/L-amphetamine 거울상 이성질체(100ppb)의 키랄 분리(용매 B: EtOH+ 0.1% NH₃(aq), 유속: 3mL/분, 컬럼 온도: 20°C, 컬럼: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250mm, 5μm).

마지막 단계에서는 유속을 3에서 4mL/분으로 높여 분석법의 분석 시간을 최적화하였습니다. 유속을 높인 결과, 2.5~3.2분 사이에서 두 거울상 이성질체가 용리 되었습니다(그림 4). 분석 시간을 더욱 줄이기 위해 동일한 고정상, 내경 및 입자 크기로 구성된 더 짧은 컬럼(컬럼 1)을 사용하였습니다(그림 5). 250mm 컬럼을 더 짧은 150mm 컬럼으로 변경 시, 2 개 거울상 이성질체의 용리가 1.5~2.1분 사이에서 더욱 빨리 이루어졌습니다. 뿐만 아니라, 다양한 온도(40, 30 및 20°C)를 시험하였으며, 컬럼 온도가 20°C일 때 분리능이 가장 높았습니다(데이터 미제공).

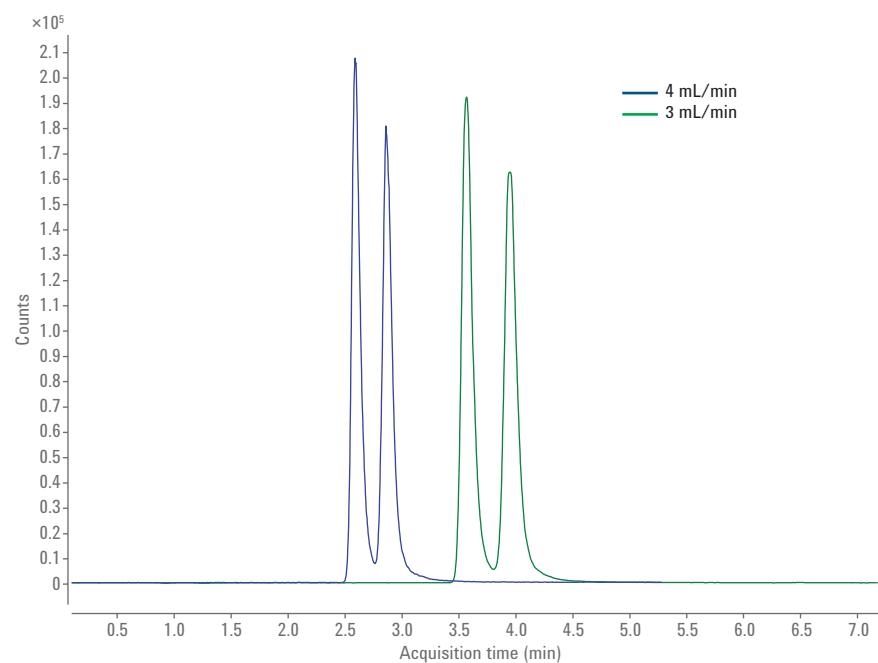


그림 4. 유속 변화에 따른 D/L-amphetamine 거울상 이성질체(100ppb)의 키랄 분리(용매 B: 10% EtOH+ 0.1% NH₃(aq), 유속: 3 및 4mL/분, 컬럼 온도: 20°C, 컬럼: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250mm, 5μm).

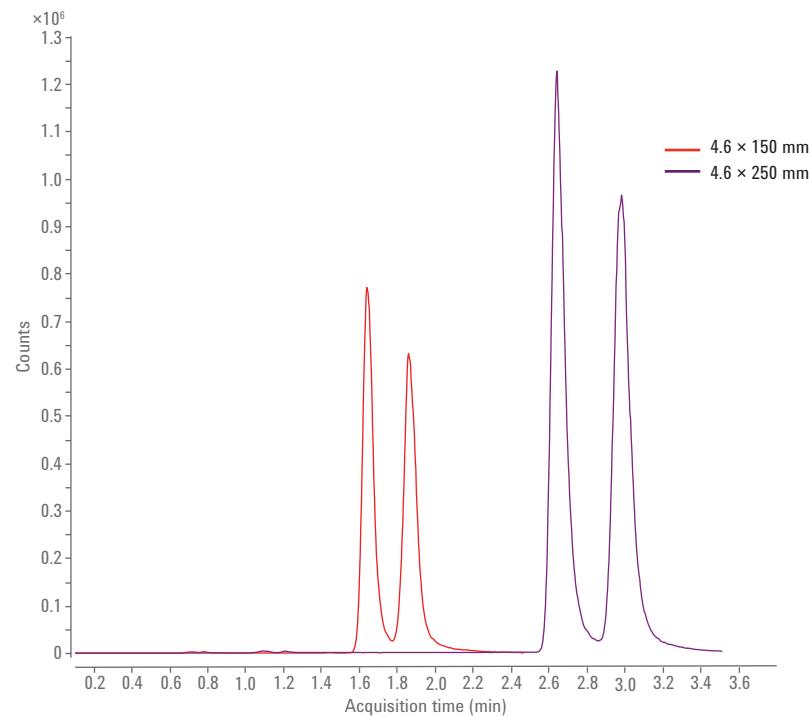


그림 5. 서로 다른 크기의 컬럼을 사용한 D/L-amphetamine 거울상 이성질체(100ppb)의 키랄 분리(용매 B: 10% EtOH+ 0.1% NH₃(aq), 유속: 4mL/분, 컬럼 온도: 20°C, 컬럼: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250mm 및 4.6 × 150mm, 5μm).

마지막으로, 질량 분석기
이온화원으로의 전달에는 적절한
이온화를 위해 보충 용매를 추가하고
최대 감도를 얻는 방향으로 최적화
하였습니다. 분배기(splitter) 설정으로
역압이 이온화원으로 전달되는 컬럼
용출액의 양을 조절하기 때문에(그림 6)
이를 위해 다양한 역압 설정을
시험하였습니다. 최종 분석법에서는
200bar의 역압을 적용하였습니다.
추가한 보충 용매(methanol/water
(95/5) + 0.2% formic acid)의 유속이
미치는 영향도 조사했으나, 실질적으로
감도에 영향을 미치지 않았기 때문에
0.4mL/분으로 유지하였습니다. 감도를
최대한 높이기 위해 MS의 모든 이온화원
파라미터를 완전히 최적화하였습니다
(실험 참조).

SFC/MS 분석법을 최종 확정하기 위해,
순수 거울상 이성질체 형태로 시판중인
개별 D- 및 L-amphetamine 표준
물질을 분석하였습니다. 각 거울상
이성질체에 대한 단일 피크가 결과로
나타났습니다. L-amphetamine은
1.632분에서, D-amphetamine은
1.860분에서 용리되었습니다(그림 7).

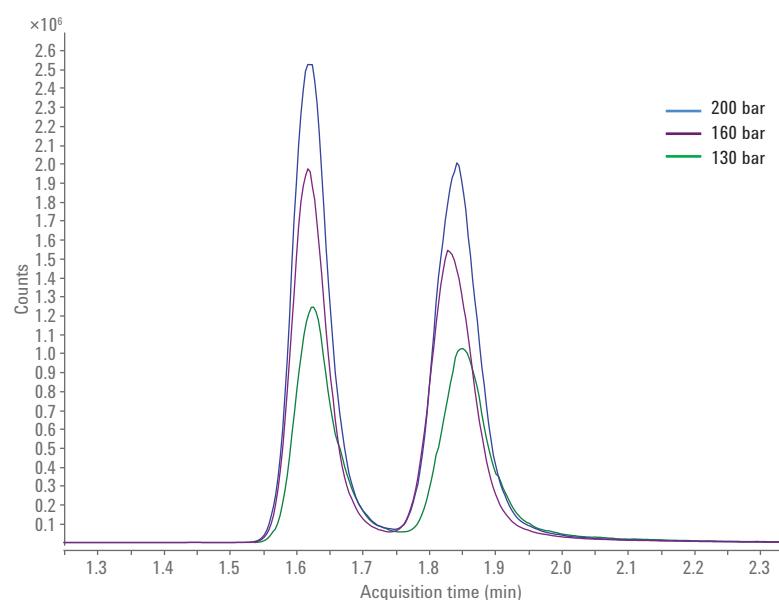


그림 6. MS 감도 극대화를 위한 SFC 역압 설정의 최적화

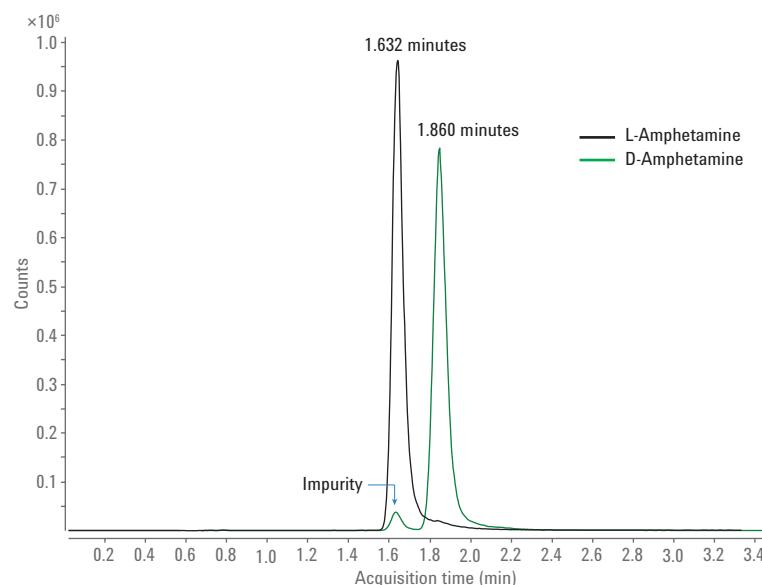


그림 7. 개발한 키랄 분석법을 사용하여 시중에서 유통되는 개별 순수 거울상 이성질체
D-amphetamine 및 L-amphetamine 표준물질(100ppb)의 키랄 분리. 화살표는 D-amphetamine
의 표준물질에 존재하는 L-거울상 이성질체의 불순물을 나타냄

D- 및 L-amphetamine의 정량 분석의 경우 개별 검량선을 100ppt~100ppb 범위에서 생성하였으며, 탁월한 직선성을 보여주었습니다(그림 8). 정량 한계(LOQ)는 신호대 잡음비(S/N)가 10인 지점에서 100ppt로, 검출한계(LOD)는 40ppt(S/N = 3)로 확인되었습니다. L- 및 D-amphetamine의 선형 계수는 각 0.9998 및 0.9996이었습니다.

개발한 SFC/MS 분석법의 능력을 입증하기 위해 실제 전혈 시료를 실험 섹션에서 설명한 방법으로 전처리하고, 개발한 분석법을 사용해 측정하였습니다. 전혈 시료는 용매 B를 사용해 1/10, 1/100 및 1/1,000으로 희석하였습니다(그림 9 및 표 1). 표 1은 시료에서 D- 및 L-amphetamine에

대해 측정한 면적값과 피크 높이를 자세히 보여주며, 이것이 본래 비의약품성 약물로부터 유래한 라셈(racemic) 형태로 생체 내에 존재함을 설명합니다. 그림 9는 1:1,000 및 1:10 희석에 해당하는 크로마토그램을 보여줍니다.

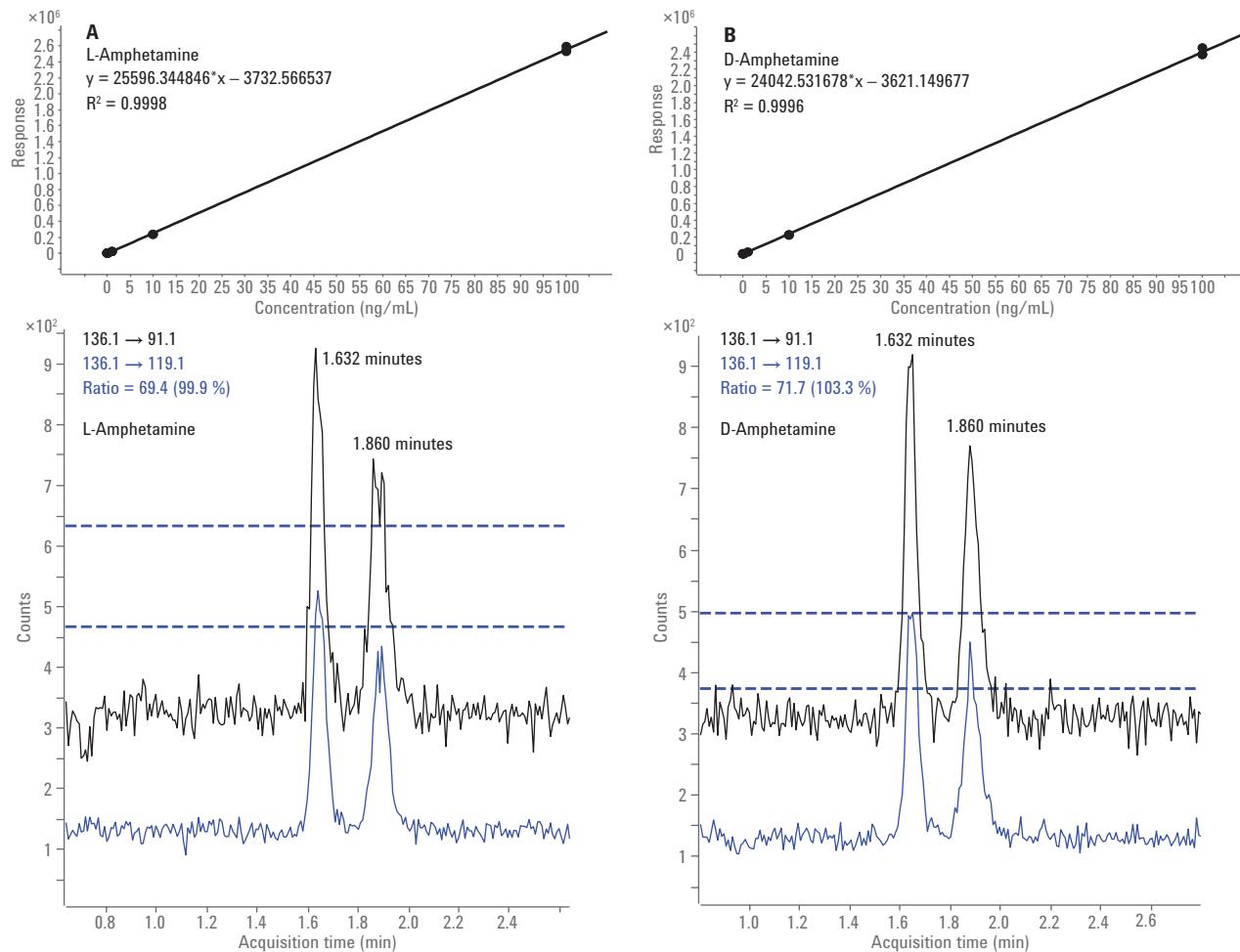


그림 8. 100ppt에서의 검량선 및 검증/정량이온 신호. L-amphetamine의 머무름 시간 1.632분(A), D-amphetamine의 머무름 시간 1.860분(B). D- 및 L-amphetamine 사이의 분리능 >1, 전체 분석 시간 3분

결론

이 응용 자료에서는 Agilent 1260 Infinity II SFC를 사용한 D/L-amphetamine 거울상 이성질체의 고속 분리 및 Agilent 6495 QQQ 질량 분석기를 사용한 고감도 정량 분석을 위한 분석법 개발을 소개하였습니다. SFC 분리는 총 분석 시간 3분 이내에 가능하여 빠른 분석 시간을 나타냈습니다. 또한, 100ppt 이하의 LOQ를 제공하는 정량 분석을 수행하였습니다. 마지막으로 전처리한 전혈 시료에서 신뢰할 수 있는 amphetamine 측정 결과가 성공적으로 나타났습니다.

감사의 글

처리된 표준 전혈 시료를 제공해 주신 National Board of Forensic Medicine(Linkoping, Sweden)의 Martin Josefsson 및 Markus Roman 님께 감사를 드립니다.

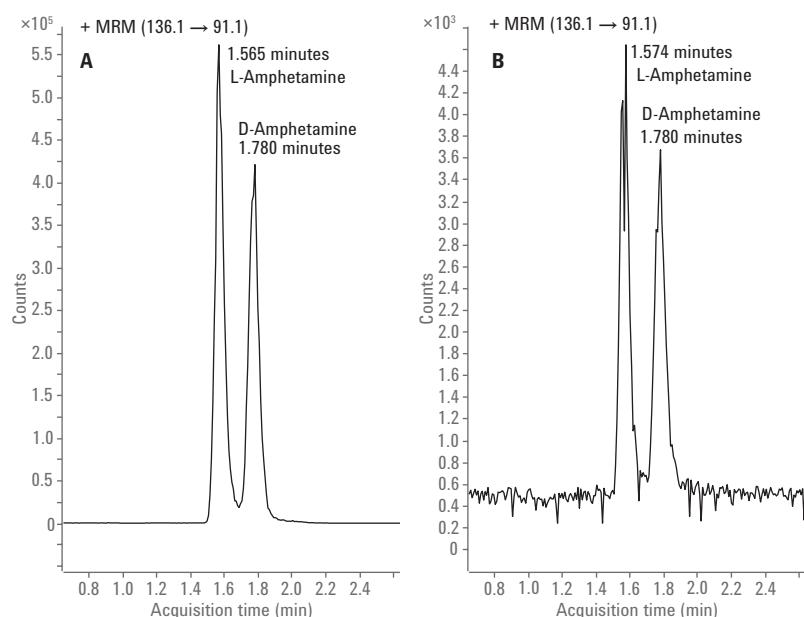


그림 9. 희석 배율별 실제 전혈(처리) 중 D/L-Amphetamine: 변형제를 사용하여 1:10(A) 및 1:1,000(B)으로 희석

표 1. 변형제를 사용하여 1:10, 1:100 및 1:1,000으로 희석한 실제 전혈 시료(처리)의 D-및 L-amphetamine 상세 측정 결과

명칭	L-Amphetamine 결과			D-Amphetamine 결과		
	RT	면적	높이	RT	면적	높이
Case 2 Dil 1_1000	1.574	14,605.41	4,129.08	1.780	14,342.73	3,159.12
Case 2 Dil 1_100	1.574	178,409.64	48,475.84	1.780	165,744.26	34,952.28
Case 2 Dil 1_100	1.574	165,569.54	45,037.95	1.780	154,606.59	35,124.32
Case 2 Dil 1_100	1.565	156,671.29	44,736.99	1.780	139,086.04	32,365.24
Case 2 Dil 1_10	1.565	2,073,946.07	561,571.92	1.780	1,780,961.78	417,402.00

참고 문헌

1. Heal, D. J; et al. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *Journal of Psychopharmacology* **2013**, *27* (6), 479–496.
2. Kde Mariotti, C.; et al. Simultaneous analysis of amphetamine-type stimulants in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicology* **2014**, *38*(7), 432–437.
3. Use of the SFC-MS Splitter Kit G4309-68715. *Agilent Technologies Technical Note*, publication number G4309-90130, **2015**.

www.agilent.com/chem

법의학 용도.

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하실
수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
2017년 10월 15일, 한국에서 인쇄
5991-8262KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies