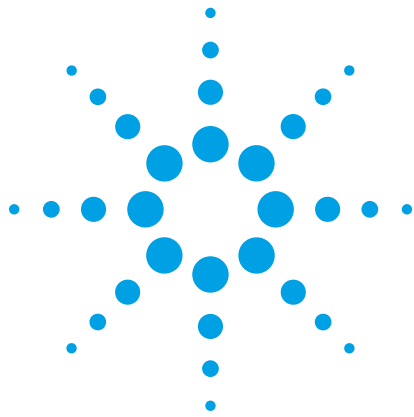




Agilent イナートフローパスによる 乱用薬物分析結果の向上

アプリケーションノート

法医学・薬物分析

著者

Ken Lynam
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Ultimate Union で Siltite フェラルと Agilent UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルの両方を使用し、結果を比較したところ、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルを使用する方が、FID 分析におけるベンゾジアゼピンのピーク形状およびレスポンスが向上することがわかりました。Agilent 7890/5975C GC/MS イナートフローパスとスプリット/スプリットレス注入口を用いた場合には、スキャンモードと SIM モードのいずれについても、標準的なスプリット/スプリットレス注入口と比べて、ベンゾジアゼピン薬物種のピーク形状とレスポンスが向上しました。法医学/毒物学確認用ミックスのクロマトグラム例と重ね書きの図を紹介します。

はじめに

乱用薬物は化学的な活性の高い物質で、最先端 GC/MS システムのフローパスに存在するあらゆる活性部位に容易に反応し、吸着します。ガスクロマトグラフ分析では、注入から検出器までの経路を分析対象化合物が途中で反応や吸着を起こすことなく無事に通過しなければなりません。それが難しくなるのが、活性の高い化合物や微量化合物を分析するケースや、フローパスの表面の活性が高いケースです。GC/MS の技術開発が進み、検出下限が以前より引き下げられるのに伴い、分析対象化合物が通過するフローパスを構成する一連のコンポーネントについても、高い不活性化の必要性が、これまでになく高まっています。フローパスに活性があると、ピーク形状や定量性能の悪化、分析対象化合物のロスにつながります。

これまで、フローパス活性の除去にあたっては、カラムとライナを不活性化する戦略が重視されてきました [1, 2]。そうした戦略はある程度成功を収めていますが、さらにフローパスの他のコンポーネントに重点を置くことが、完全な不活性フローパスの実現に向けた次なる戦略ステップとなります。注入口ウェルドメント、ゴールドシール、フェラルは、いずれも分析対象化合物と接触するフローパスコンポーネントです [3]。



Agilent Technologies

Agilent J&W ウルトライナートカラム、ライナ、不活性 MS イオン源コンポーネントの設計に関する表面不活性化戦略の開発から得られた教訓は、不活性を次なるレベルに到達させるためのたしかな基盤となっています。こうした戦略を活用して不活性フローパスを拡張し、スプリット/スプリットレストップおよびシェルウェルドメント、ウルトライナートゴールドシール、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルを開発しました。このアプリケーションノートでは、乱用薬物分析用 Agilent イナートフローパスソリューションの予備評価について紹介します。

スプリット/スプリットレス注入口に設置したイナートフローパスと標準フローパスに乱用薬物を注入して得られたクロマトグラム例を見ると、この分析対象化合物におけるイナートフローパスの影響が明らかにわかります。比較のために、どちらの注入口でも同じ Agilent J&W HP-5ms UI GC カラムを用いてデータを採取し、イナート注入口と標準注入口を構成するコンポーネントを直接評価しました。

実験手法

使用した GC/FID システムは、Agilent 7890 GC および Agilent 7693 オートサンブラで構成されます。このシステムを用いて、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルを用いたフローパスが乱用薬物分析に与える影響を評価しました。キャピラリーフローテクノロジー (CFT) ユニオンをポストカラムで使用し、Siltite フェラルまたは UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルを設置しました。他の条件はすべて同じです。GC/FID システムのクロマトグラフィ条件を表 1 に記載しています。

表 1. フェラルの評価に用いた Agilent 7890 FID システムのクロマトグラフィ条件

カラム:	Agilent J&W HP-5ms UI, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm (p/n 19091S-433UI)
リストリクタ:	1.0 m x 0.25 mm id 不活性チューブ
オープン:	95 °C、0.5 分維持、10 °/min で 95~280 °C、6 °/min で 280~300 °C (3.67 分維持)
ガスフィルタ:	ガスクリーン GC/MS、1/8 in キット (p/n CP17974)
キャリア:	水素、74.9 cm/s (3 mL/min)、95 °C に設定、EPC コンスタントフロー
注入口:	スプリット/スプリットレス、標準ウェルドメントコンポーネント
注入:	スプリットレス、1 µL、280 °C、0.35 分で 50 mL/min パージ
注入口ライナ:	ウルトライナートライナ、ウール入り (p/n 5190-2293)
ゴールドシール:	標準ゴールドシール (p/n 5190-2209、10 個)
シリンジ:	ブルーライン、5 µL (p/n G4513-80206)
CFT:	Ultimate Union (p/n G3182-6580)
フェラル:	標準 Siltite (p/n 5188-5361)、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル (p/n G3188-27501)
検出器:	FID、320 °C、H ₂ 40 mL/min、空気 400 mL/min、メイクアップ 30 mL/min

GC/MS システムは、7890 GC とトリプルアクシスディテクタ搭載 Agilent 5975C MSD で構成されます。1 台の 7693 オートサンブラを用いて、フロントおよびバックのスプリット/スプリットレス注入口を切り替えました。フロント注入口はイナート注入口、バック注入口は標準注入口として設定しました。スキャンモードと SIM モードの分析条件は、できるかぎり同じになるようにしました。どちらの注入口でも同じカラムを使用し、トリミングをおこなわずに、2 つの注入口を慎重に切り替えました。表 2 に、イナートフローパス GC/MS 注入口のクロマトグラフィ条件を示しています。表 3 に標準スプリット/スプリットレス GC/MS 注入口のクロマトグラフィ条件を、表 4 に SIM イオンの詳細を示しています。

表 2. Agilent 7890/5975C イナートフローパス注入口のクロマトグラフィ条件

カラム:	Agilent J&W HP-5ms UI, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm (p/n 19091S-433UI)
オープン:	100 °C、4 分維持、10 °/min で 100~280 °C、6 °/min で 280~300 °C (4.67 分維持)
ガスフィルタ:	ガスクリーン GC/MS、1/8 in キット (p/n CP17974)
キャリア:	ヘリウム、52.7 cm/s (2 mL/min)、100 °C に設定、EPC コンスタントフロー
注入口:	スプリット/スプリットレス、イナートシェルおよびトップウェルドメント
注入:	スプリットレス、1 µL、パルス、35 psi パルスで 0.73 分まで、0.75 分パージ 50 mL/min、2 分でガスセーバー 20 mL/min
注入口ライナ:	ウルトライナートライナ、ウール入り (p/n 5190-2293)
ゴールドシール:	ウルトライナートゴールドシール (p/n 5190-6144 UI)
シリンジ:	ブルーライン、5 µL (p/n G4513-80206)
フェラル:	UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル、注入口 (p/n G3188-27501)、MS (p/n 5188-5361)
検出器:	MSD スキャンモード、40~450 amu、イオン源温度 300 °C、四重極温度 150 °C、トランスファーライン温度 310 °C MSD SIM モード、イオン源温度 300 °C、四重極温度 150 °C、トランスファーライン温度 310 °C

表 3. Agilent 7890/5975C 標準フローパス注入口のクロマトグラフィ条件

カラム:	Agilent J&W HP-5ms UI, 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm (p/n 19091S-433UI)
オープン:	100 °C、4 分維持、10 °/min で 100~280 °C、6 °/min で 280~300 °C (4.67 分維持)
ガスフィルタ:	ガスクリーン GC/MS、1/8 in キット (p/n CP17974)
キャリア:	ヘリウム、52.7 cm/s (2 mL/min)、100 °C に設定、EPC コンスタントフロー
注入口:	スプリット/スプリットレス、標準シェルおよびトップウェルドメント
注入:	スプリットレス、パルス、35 psi パルスで 0.73 分まで、0.75 分パージ 50 mL/min、2 分でガスセーバー 20 mL/min
注入口ライナ:	標準シングルテーパライナ、ウール入り (p/n 5190-3165)
ゴールドシール:	標準ゴールドシール、ワッシャつき (p/n 5190-2209、10/pk)
シリンジ:	ブルーライン、5 µL (p/n G4513-80206)
フェラル:	UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル、注入口 (p/n G3188-27501)、MS (p/n 5188-5361)
検出器:	MSD スキャンモード、40~450 amu、イオン源温度 300 °C、四重極温度 150 °C、トランスファーライン温度 310 °C MSD SIM モード、イオン源温度 300 °C、四重極温度 150 °C、トランスファーライン温度 310 °C

表 4. SIM イオンの詳細

分析対象化合物 (ピーク溶出順)	SIM T	Q1	RT (分)	採取 幅 (分)
アンフェタミン (1)	44、	91	4.05	
フェンテルミン (2)	58、	134	4.72	
メタンフェタミン (3)	58、	91	5.12	
ニコチン (4)	84、	133	7.92	3.2~8.30
メチレンジオキシ アンフェタミン (MDA) (5)	44、	135	9.88	
メチレンジオキシ メタンフェタミン (MDMA) (6)	58、	135	10.61	
メチレンジオキシエチル アンフェタミン (MDEA) (7)	72、	135	11.23	8.3~12.0
メペリジン (8)	71、	247	13.38	
フェンサイクリジン (9)	200、	242	14.94	
メタドン (10)	72、	57	17.44	
コカイン (11)	182、	82	17.99	12.0~18.3
プロアジフェン (SKF-525a) (12)	86、	99	18.99	
オキサゼパム (13)	239、	267	19.13	
リン酸トリフェニル (14) ISTD	326、	325	19.31	
コデイン (15)	299、	162	19.57	
ロラゼパム (16)	239、	274	19.82	
ジアゼパム (17)	256、	283	20.05	
ヒドロコドン (18)	299、	242	20.13	
テトラヒドロカンナビノール (19)	231、	314	20.27	18.3~20.5
オキシコドン (20)	315、	230	20.76	
デマゼパム (21)	271、	273	21.28	
フルニトラゼパム (22)	312、	286	21.44	
ジアセチルモルヒネ (ヘロイン) (23)	327、	369	21.61	
ニトラゼパム (24)	253、	206	22.6	
クロナゼパム (25)	314、	286	23.24	
アルプラゾラム (26)	279、	308	24.04	20.5~25.0
ストリキニーネ (27)	334、	335	25.77	
ベラパミル (28)	303、	304	25.82	
トラゾドン (29)	205、	70	27.51	25.0~最後

表 5 に、GC/FID システムおよび GC/MS システムで用いたフロー
バス部品を記載しています。

表 5. その他の消耗品

バイアル:	茶色、シラン処理済、スクリュートップ (p/n 5183-2072)
バイアルキャップ:	ブルー、スクリュキャップ (p/n 5185-5820)
バイアルインサート:	ガラス/ポリマーフィート、250 μ L (p/n 5181-8872)
セプタム:	アドバンストグリーン (p/n 5183-4759)
ガスフィルタ:	ガスクリーン GC/MS 1/8 in キット (p/n CP17974) FID 代替ガスクリーン、4 ポジション、1/8 in キット (p/n CP736530)
注入口ライナ:	ウルトライナーシングシングルトーパーライナ、ウール入り (p/n 5190-3163、5 個) Agilent オリジナルシングルトーパーライナ、ウール入り (p/n 5062-3587)
ゴールドシール:	金メッキ注入口シール、 ワッシャつき (p/n 5190-2209、10 個)
標準フェラル:	0.4 mm id ショート、85/15 ベスベル/グラファイト (p/n 5181-3323、10 個)
PCT フィッティング:	内部 (p/n G2855-20530)
イナータフェラル:	UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル (p/n 5188-5361、10 個)
拡大鏡:	20 倍拡大鏡 (p/n 430-1020)
シリンジ:	交換可能ニードル、PTFE ブラシ、 1 mL (p/n 5190-1539)、 0.5 mL (p/n 5190-1525); 5 μ L (p/n 5181-1273)

前処理

Agilent Technologies, Inc. (サンタクララ、カリフォルニア州) の公
称濃度 5 ng/ μ L の 28 成分の GC/MS 法医学/毒物学分析用確認
ミックスを使用しました (p/n 5190-0471)。容積式シリンジを用い
て、このミックスをクラス A の容積測定ガラス容器に移し、順次
希釈しました。トルエン:メタノール:アセトニトリル (90:5:5) の混
合液を作成し、希釈液およびシリンジ洗浄溶液として使用しま
した。Ultra Resi 分析グレードトルエンおよびメタノール (J. T.
Baker) と高純度アセトニトリル (Burdick and Jackson) を VWR
International から購入しました。内部標準として使用するリン酸
トリフェニルを作成し、最終濃度 0.25 ng/ μ L で添加しました。

結果と考察

FID 搭載 7890 GC を用いて、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルの性能を評価しました。同じ注入口を用いてフェラルを切り替え、ポストカラムの Ultimate Union をフレキシブルメタルフェラルと Siltite フェラルに接続しました。可能な限り公正に比較するために、それ以外の条件は一定に保ちました。

図 1 は、1 成分あたりのオンカラム濃度が 1 ng における法医学/毒物学確認用ミックスのクロマトグラムを示しています。この注入の設定には、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルにより接続されたポストカラムユニオンが含まれています。このミックスにアンフェタミン、オピオイド、活性の高いベンゾジアゼピンが含まれていることを考えれば、得られたピーク形状とレスポンスは良好なものといえます。ニトラゼパムとクロナゼパムについては、若干のピークテーリングが見られています。

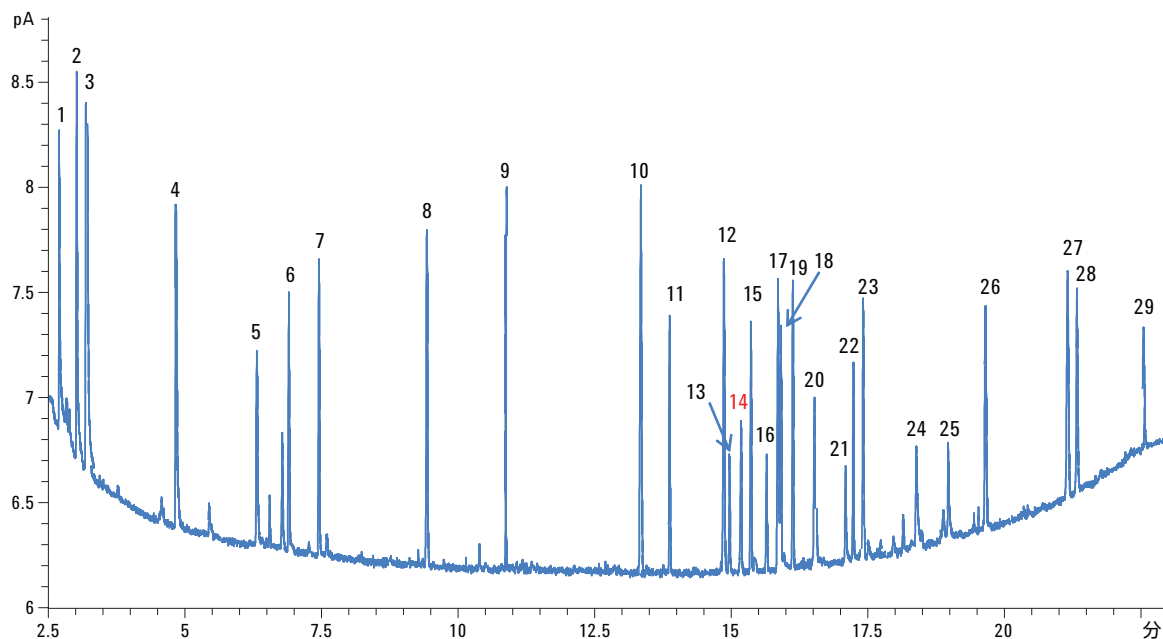


図 1. Agilent J&W HP-5ms UI GC カラムを用いた法医学/毒物学確認用標準 (1 成分あたり 1 ng) の FID 分析クロマトグラム例 (内部標準のリン酸トリフェニルを個別に添加) (GC 条件については表 1、ピーク番号については表 4 を参照)

図 2 では、ユニオンに UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル (青) を設置した場合と Siltite フェラル (赤) を設置した場合の FID シグナルを重ねて表示しています。ユニオンのフェラルを除いて、いずれの注入でも設定は同じです。ニトラゼパムとクロナゼパムのピークテーリングは、Siltite フェラルを設置した場合のほうが大きくなっています。また、Siltite フェラルでは、アルプラゾラムのシグナルが小さくなり、テマゼパムのシグナルが大幅に減少しています。この分析結果は、乱用薬物分析において活性の高いベンゾジアゼピンを分析する場合、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルのほうが適切な選択肢であることを示唆しています。

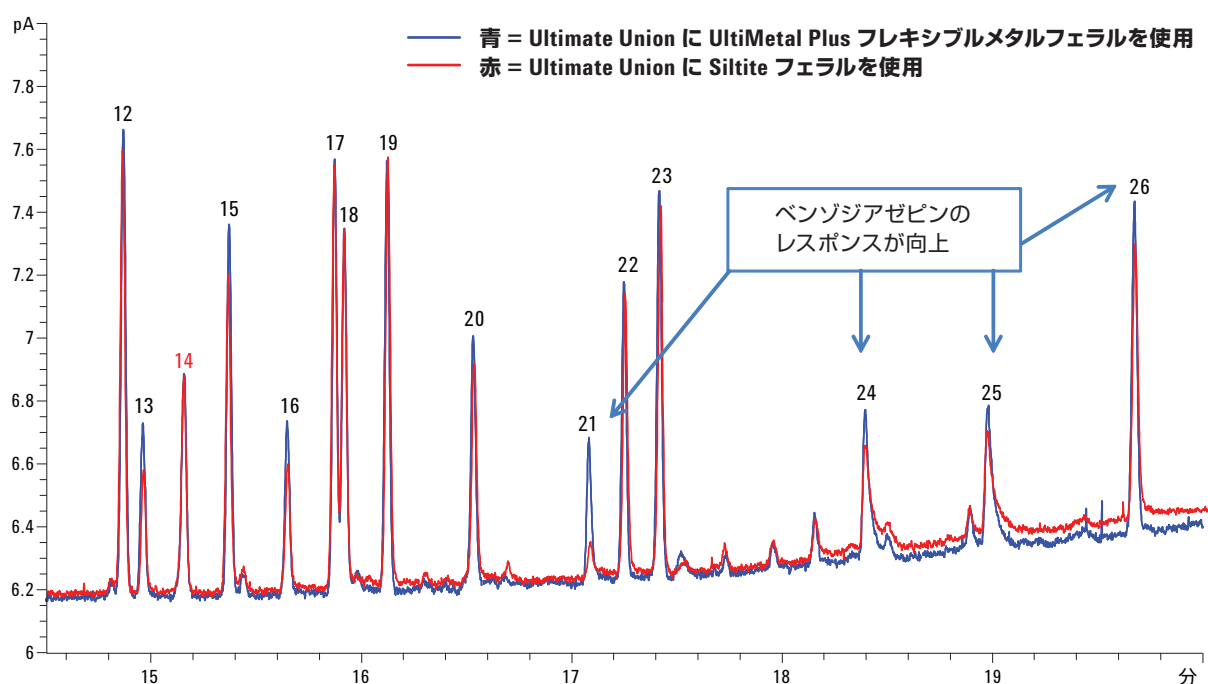


図 2. ポストカラムの Ultimate Union に Agilent UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルと Siltite フェラルを設置したフローパスにおける法医学/毒物学ミックス (1 成分あたり 1 ng) の FID クロマトグラムの重ね表示 (GC/FID 条件については表 1、ピーク番号については表 4 を参照)

図 3 は、イナートフローパス搭載 7890/5975C GC/MS を用いて得られた、1 成分あたりのオンカラム濃度が 1 ng の法医学/毒物学確認用ミックスのトータルイオンクロマトグラムを示しています。ミックス中のすべての成分について、良好なピーク形状が得られています。標準フローパスとイナートフローパスの切り替えの際には、システムをベントし、注入口のカラムナットを慎重に取り外し、取り外したナットを他方の注入口に直接移しました。この措置は、カラム、注入口コネクタ、MSD システムを制御変数として用いて、できるかぎり公正に比較するためのものです。

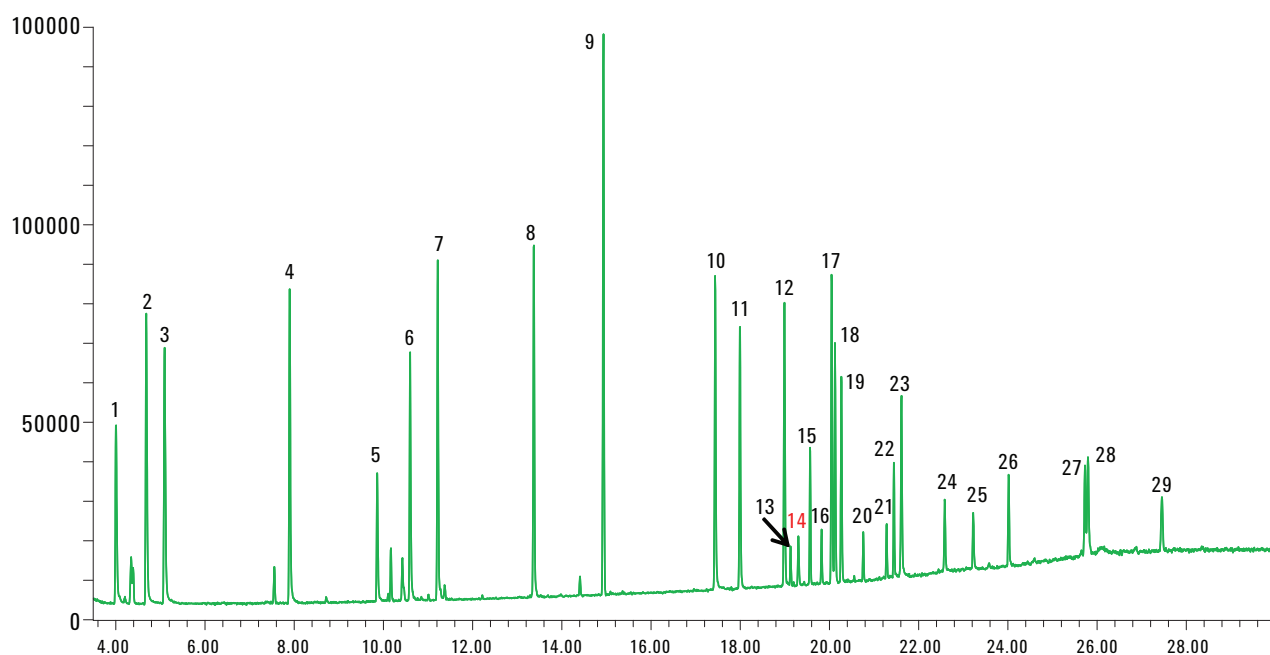


図 3. Agilent J&W HP-5ms UI GC カラムを用いた法医学/毒物学確認用標準 (1 成分あたり 1 ng) の TIC 例 (内部標準のリン酸トリフェニルを個別に添加) (GC/MS スキャン条件については表 2 を参照)

図 4 は、トータルイオンクロマトグラムのベンゾジアゼピン溶出領域におけるイナート注入口と標準注入口の性能の違いを示しています。スキャンモードで 1 成分あたりのロード量が 0.5 ng の場合、標準フローパスシステムでは、テマゼパムのピークが消え、ニトラゼパムとクロナゼパムのレスポンスもきわめて小さくなっています。イナートフローパスでは、これらの化合物で違いが見られます。イナートフローパスを用いた場合、テマゼパムのピーク形状は良好で、各ベンゾジアゼピンのピークがシャープになり、レスポンスも大きくなっています。ジアセチ

ルモルヒネ (ヘロイン) ピークもシャープになり、レスポンスが大きくなっています。

図 5 は、SIM モードを用いた場合のベンゾジアゼピン分析におけるイナート注入口と標準注入口の性能の違いを示しています。1 成分あたりの濃度が 0.25 ng で標準フローパスを用いた場合、テマゼパムのピークが完全に消えています。ニトラゼパムとクロナゼパムのピークも幅がきわめて広く、ノイズにまぎれています。

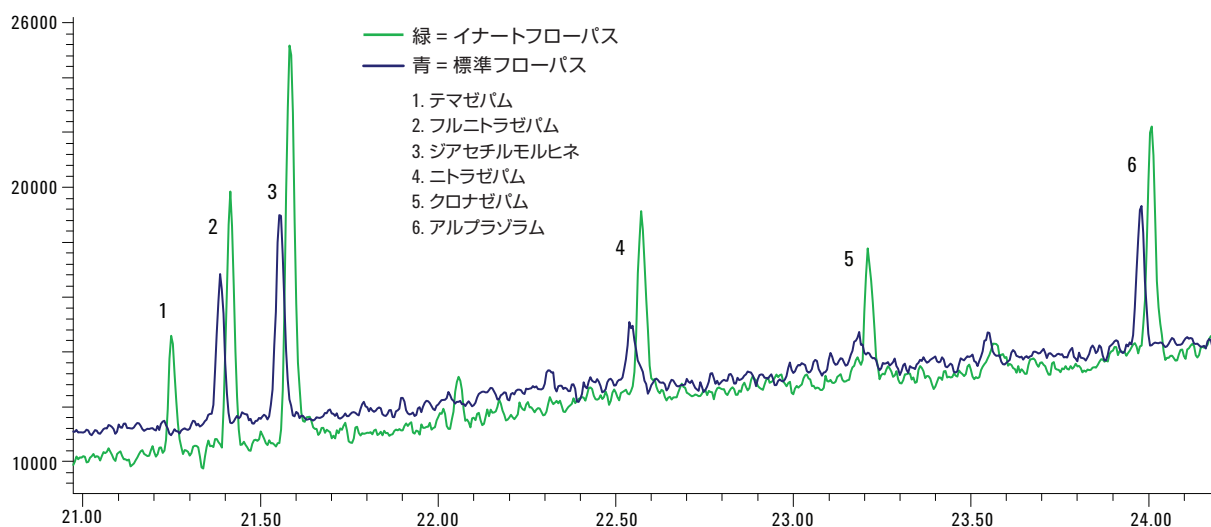


図 4. Agilent J&W HP-5ms UI GC カラムを用いた法医学/毒物学確認用標準 (1 成分あたりオンカラム 0.5 ng) 分析結果の重ね表示、スキャンモードにおけるイナートフローパス注入口と標準注入口の違いを示す (イナートおよび標準フローパス条件については表 2 および 3 を参照)

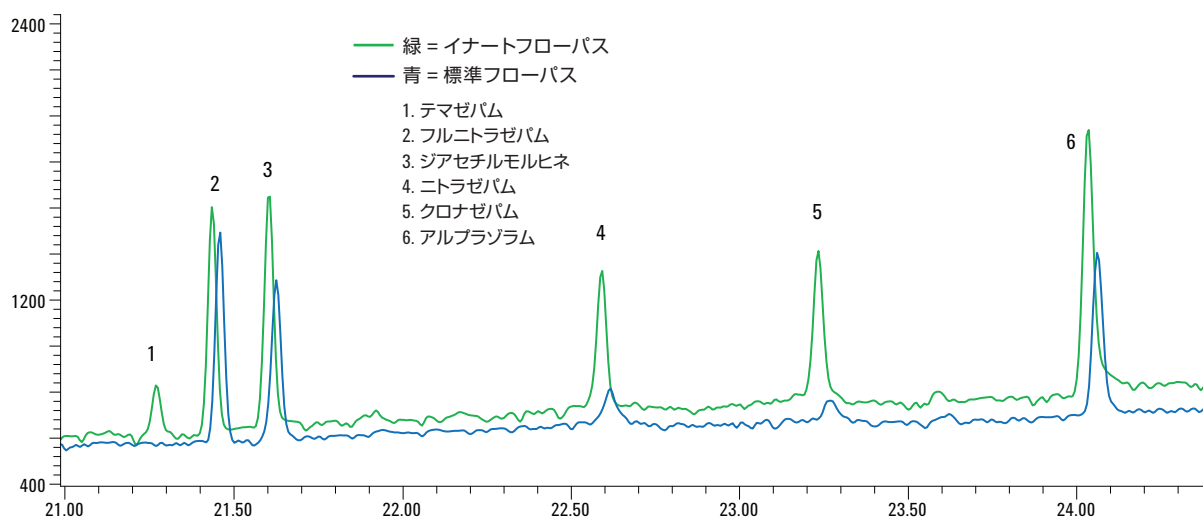


図 5. Agilent J&W HP-5ms UI GC カラムを用いた法医学/毒物学確認用標準 (1 成分あたりオンカラム 0.25 ng) 分析結果の重ね表示、SIM モードにおけるイナートフローパス注入口と標準注入口の違いを示す (イナートおよび標準フローパス条件については表 2 および 3 を参照)

結論

Agilent UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルでは、法医学/毒物学確認用ミックスに含まれる化合物の分析において、Siltite フェラルに比べて良好なピーク形状とレスポンスが得られました。違いはおもに、ベンゾジアゼピン薬物種で見られました。ポストカラムの Ultimate Union に Siltite フェラルを設置した場合、オンカラム濃度 1 ng において、FID 分析の際のテマゼパムピークがほぼノイズに埋もれてしまったのに対し、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルを用いた同じ設定では、シャープではっきりとしたピークが得られました。Ultimate Union に設置したフェラルにおいて、分析対象化合物と接触する表面は限られた範囲であることを考えると、この結果は予想外ながら、期待のもてるものといえます。ベンゾジアゼピンを分析する場合は、Siltite フェラルよりも Agilent UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラルのほうが適しています。

Agilent 7890/5975C GC/MS のイナートフローパス注入口についても、ベンゾジアゼピン薬物種の分析において、標準コンポーネント注入口よりも優れた性能が得られることが実証されました。イナートフローパス注入口と標準注入口の違いがもっとも顕著に表れた化合物はテマゼパムでした。これはスキャンモードでも SIM モードでも同様です。標準フローパス注入口を用いた場合、テマゼパム、ニトラゼパム、クロナゼパムはいずれも、イナートフローパス注入口を用いた場合よりも早くベースラインに埋もれてしまいました。この結果は、イナートフローパス注入口を使えば、ベンゾジアゼピンの検出および定量が向上することを示しています。

参考文献

1. K. Lynam. 「不活性度性能テスト済み Agilent J&W DB-ms ウルトライナートカラムを使用した半揮発性物質分析」、アプリケーションノート、アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-8616JAJP (2008).
2. L. Zhao, A. Broske, D. Mao, A. Vickers. *Evaluation of the Ultra Inert Liner Deactivation for Active Compounds by GC*. Technical Overview, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-7380EN (2011)
3. Anon. *Optimize your GC flow path for inertness*. Poster, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-8902EN (2013).

詳細

本書に記載されたデータは代表的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

February 21, 2013

5991-1859JAJP



Agilent Technologies