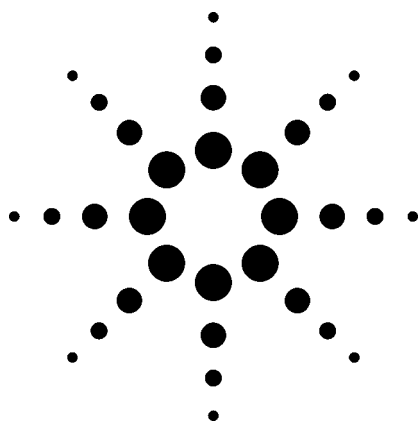


不活性化 (inert) イオン源 GC/MS を用いた 口腔液中鎮痛剤の分析 アプリケーション



法医学

著者

Christine Moore, Sumandeep Rana, and Cynthia Coulter
Immunoanalysis Corporation
829 Towne Center Drive
Pomona, CA 91767
USA

要約

口腔液は、医療専門家による誤処方や乱用される恐れのある処方薬を検出するために、多くの法医学や臨床分野において尿の代替分析手段として認められつつあります。今では「Med-Pro」テストパネルは広く行き渡っており、侵襲性の低い口腔液中のこれらの医薬品の分析は、日常的なモニタリングに優れた代替手段です。一般的に、口腔液中の薬物濃度は尿中濃度よりも低く、感度の高い抽出と分析手法が必要です。これらの薬物の口腔液分析に推奨できる特定の「cut-off：限界」濃度はなく、そのため、この手法は定量限界を向上するために開発されました。不活性化 (inert) イオン源を装着した Agilent 5975 GC/MSD は、口腔液中のメペリジン、トラマドール、プロポキシフェン、オキシコドンを検出するために必要な感度を得ることができました。これらの薬物は口腔液以外のマトリックス中で検出されてきましたが、増加傾向にある薬物分析への唾液の利用による研究室での分析手順の開発および迅速な分析が必要になります。

緒言

最近、さまざまな研究室では「医療専門家」に薬物テストパネルが提供されています。これは名前が示すように、処方薬の検出の他、より一般的な依存性薬物の検出にも適応したものです。標準の処方薬テストパネルには、メペリジン (ペチジン、デメロール)、トラマドール (ウルトラム)、プロポキシフェン (コープロクサモル)、オキシコドン (パーコセット、オキシコンチン) が含まれます。

血液や尿はこれらのテストプロフィールにより一般的に使用されていますが、口腔液は捕集のしやすさ、マトリックスが混合物であることの難しさ、分析技術の感度向上のために代替マトリックスとして一般的になりつつあります。口腔液中の薬物定量に関する主要な問題の 1 つは捕集を行う際の試料量における難しさです。現在利用可能な捕集装置の多くは捕集される口腔液量が明記されません。従って定量結果を求めることは、研究室でさらに分析する必要があるのであれば、意味がなくなってしまいます。さらに、唾液捕集のためのパッドまたは器具を組み込んだ装置は、分析前にパッドから回収される量を必ずしも指示しているとは限りません。この場合も同様に定量結果は正確性を欠くこととなります。定量される薬物濃度は使用される捕集手順に依存します。

本検討では、一定量の口腔液を捕集するのに優れた Immunoanalysis Corporation の QUANTISAL 口腔液捕集装置を採用しました。定量値の信頼性を高めるために、捕集パッドから運搬緩衝液への薬物の回収効率を測定しました。標準のシングル四重極 Agilent 6890-5975 GC/MSD 装置を使用して抽出物を分析しました。



Agilent Technologies

実験

口腔液捕集装置

口腔液試料の捕集用 QUANTISAL 装置は Immunalysis Corporation (カルフォルニア州ポモナ) から入手しました。この装置には、口腔液が 1 mL (±10%) 捕集されると青色に変色する適正容量インジケータ付きの捕集パッドが含まれます。次に、パッドを運搬緩衝液 (3 mL) の中に入れ、全試料量が 4 mL (緩衝液 3 mL + 口腔液 1 mL) になるようにし、次の分析に供しました。これは、試料が 1 つ以上の薬物で陽性になった場合でも、そして分析に利用できる試料量に問題がある場合にも特に有利となります。Quantisal 捕集装置を使用した場合、口腔液濃度は 1:3 に希釈されるので、測定された薬物濃度はそれに応じて換算しました。

標準試料と試薬

- 重水素化内部標準のシス - トラマドール -d4、メペリジン -d4、オキシコドン -d6、プロポキシフェン -d5、および標識されていない薬物標準試料のメペリジン、トラマドール、オキシコドン、プロポキシフェンは Cerillant (テキサス州ラウンドロック) から購入しました。
- Clin II 固定相抽出カラム (部品番号 #691-0353T) は SPE-Ware (カルフォルニア州サンペドロ) から購入しました。
- 誘導体化試薬の N,O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド + 1% トリメチルクロロシラン (BSTFA + 1% TMCS)、および N-メチル -N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド + 1% トリメチルクロロシラン (MSTFA + 1% TMCS) は Pierce (イリノイ州ロックフォード) から購入しました。

内部標準の濃度

メペリジン、プロポキシフェン、トラマドール 250 ng/mL、オキシコドン 200 ng/mL

クロマトグラフ分析のためのサンプル前処理

- Quantisal 試料 1 mL (口腔液 0.25 mL に相当)
- 内部標準の添加
- メペリジン、トラマドール、オキシコドンにはリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0、1 mL) 0.1 M の添加
- プロポキシフェンには、炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 8.0、1 mL) 0.05 M の添加
- 空焼き SPE カラム: メタノール (2 mL)、リン酸塩緩衝液 (pH 6.0、2 mL) 0.1 M
- サンプルの添加

- カラムを以下の溶液で洗浄:
 - 脱イオン水 (1 mL)
 - 酢酸塩緩衝液 (pH 4、1 mL) 0.1 M
 - メタノール (1 mL)
 - 酢酸エチル (1 mL)
- 窒素気流下でのカラムの乾燥 (30 psi、2 分)
- 溶出: 新たに調製した酢酸エチル/水酸化アンモニウム (98:2 v/v、2 mL)
- 窒素気流下での蒸発乾燥

誘導体化なし

プロポキシフェン: 酢酸エチル (50 µL) で再溶解、オートサンプリバイアルに移送

メペリジン: メペリジンは、誘導体化反応に利用できる活性水素位置がないため誘導体化できないため、抽出物は酢酸エチル (20 µL) で再溶解します。BSTFA + 1% TMCS (20 µL) を加え、キャップを付け、加熱します (50 °C/20 分)。シラン誘導体化試薬を抽出物に加えることで、抽出物の安定性が向上し、メペリジンのクロマトグラフが著しく改善されます。

誘導体化

トラマドール: 酢酸エチル (25 µL) に再溶解し、BSTFA + 1% TMCS (25 µL) を加え、オートサンプリバイアルに移し、キャップを付け、誘導体化します (70 °C/20 分)。

オキシコドン: 1% 塩酸ヒドロキシルアミンのピリジン溶液 (50 µL) に再溶解し、放置し (45 °C/30 分)、その後、MSFTA + 1% TMCS (50 µL) を加え、キャップをし、誘導体化します (65 °C/20 分)。

GC/MS 条件

装置:	Agilent 6890 GC 5975 MSD、不活性化イオン源、220/240V オープン
検出モード:	電子衝撃イオン化
カラム:	DB-5 MS、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 µm、長さ 15 m
インジェクタ温度:	250 °C
ページ流量:	50 mL/min、1 分間
キャリアガス:	ヘリウム
注入モード:	スプリットレス
注入量:	2 µL
測定モード:	1.5 mL/min コンスタントフローモード
トランスファライン温度:	280 °C
四重極温度:	150 °C
イオン源温度:	230 °C
デュエルタイム:	50 ms

オープンプログラム

プロポキシフェン: 60 °C (1 分) → 30 °C/min → 200 °C (0.2 分) → 80 °C/min → 250 °C

メペリジン: 50 °C → 30 °C/min → 280 °C

トラマドール: 65 °C (1 分) → 40 °C/min → 200 °C → 15 °C/min → 230 °C → 100 °C/min → 290 °C

オキシコドン: 100 °C (0.5 分) → 10 °C/min → 270 °C

モニタリングイオン

薬物	モニタリングイオン
プロポキシフェン	重水素化物 (d5) 213.2 , 198.1; 208.2 , 193.1, 179.1
メペリジン	重水素化物 (d4) 251.2 , 222.2; 247.2 , 218.2, 172.2
トラマドール	重水素化物 (d4) 339.3 , 324.2; 335.3 , 245.2, 320.2
オキシコドン	重水素化物 (d6) 480.3 , 391.3; 474.3 , 385.3, 459.3

定量イオンは太字で表示

リテンションタイム

	分
プロポキシフェン:	5.5
メペリジン:	5.1
トラマドール:	5.4
オキシコドン:	16.0

結果と考察

口腔液分析に関連する問題の 1 つとして、装置が使用できるとしても、捕集パッドからの薬物回収率を考慮する必要があります。これらの薬物に対する捕集システムの抽出回収率を測定しました。トラマドールとメペリジンには 25 ng/mL、オキシコドンには 20 ng/mL、プロポキシフェンには 10 ng/mL の濃度の 3 種類の薬物を添加し口腔液を作成しました。

適正容量インジケータが青色に変色し、口腔液が 1 mL (± 10%) 吸収されたことを示すまで、捕集パッドを液体の中に入れました。パッドを Quantisal 緩衝液 (3 mL)の中に入れ、キャップをし、室温で一晩放置することで、

研究室への輸送をシミュレートできるようにしました。翌日、パッドを取り除き、試料の一定分量 (1 mL) を上記で説明した手法 (n = 6) に従って分析しました。

	メペリジン	オキシコドン	トラマドール	プロポキシフェン
薬物の平均	86.7	96.6	87.7	92.0
回収率 (%)				

GC/MS メソッドバリデーション

標準プロトコルに従って、定量限界、直線性範囲、相関係数、日内と日間の精度を 5 日間にわたり複数の複製した試料を通して測定することにより、分析メソッドをバリデーションしました。検量線の Y 軸切片は原点を強制的に通るように設定しました。

分析対象化合物	定量限界 (ng/mL)	方程式 (平均値、SD)	相関係数 (r^2)	直線性範囲 (ng/mL)
メペリジン	10	$y = 0.0196x$	0.999	10-100
プロポキシフェン	5	$y = 0.0392x$	0.999	5-300
オキシコドン	10	$y = 0.0132x$	0.997	10-80
トラマドール	10	$y = 0.0190x$	0.999	10-100

日間精度 (n = 10)

薬物	理論濃度 (ng/mL)	測定濃度 (平均 ± SD) (ng/mL)	精度 (%)
メペリジン	25	25.32 ± 0.628	2.48
プロポキシフェン	10	10.12 ± 0.36	3.59
オキシコドン	20	20.74 ± 1.202	5.80
トラマドール	25	25.65 ± 0.627	2.44

日間精度 (n = 5)

薬物	理論濃度 (ng/mL)	測定濃度 (平均 ± SD) (ng/mL)	精度 (%)
メペリジン	25	25.72 ± 0.60	2.33
プロポキシフェン	10	9.8 ± 0.23	2.39
オキシコドン	20	23.08 ± 1.75	7.61
トラマドール	25	25.88 ± 0.25	1.00

一般的に存在の確認ができた薬物は高濃度で抽出、分析され、分析の妨害をしないことが分かりました。図 1 に実試料の口腔液中のトラマドール (1175 ng/mL) のクロマトグラムを示します。

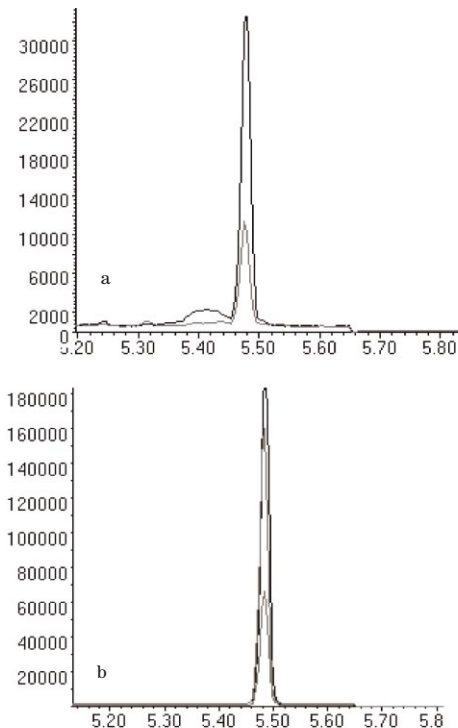


図 1. Quantisal 装置を用いて捕集され、説明した手順を用いて分析された口腔液試料

a) D4-トラマドール:イオン 339.3、324.3

b) トラマドール 335.3、320.3、245.2

結論

本検討で説明した分析方法は、不活性化 (inert) イオン源付きの Agilent Technologies 製シングル四重極 GC/MSD システムを用いた口腔液中の鎮痛剤の分析に適しています。このメソッドは口腔液中の薬物濃度をルーチンにおける検出および確認に適しています。

参考文献

S. Rana, C. Moore, A. Agrawal, C. Coulter, M. Vincent, and J. Soares. Determination of propoxyphene in oral fluid. *J Anal Toxicol* 2006; 30(8): 516-518.

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社 Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても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することがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
December 5, 2006
5989-5859JAJP

